

发酵猕猴桃汁中产香酵母的分离、鉴定及生长特性的研究

李剑芳 张灏 江南大学食品学院 无锡 214036

摘 要 从优质自然发酵猕猴桃汁中分离筛选到一株产香酵母 E-45, 经鉴定为柠檬形克勒克氏酵母 *Kloeckera apiculata*。研究了该菌在麦芽汁中的生长特性。其最适生长温度为 30℃, 最低和最高生长温度分别为 7℃ 和 36.5℃, 最适生长 pH 为 5.4, 最低和最高生长 pH 分别为 1.6 和 9.5, 耐 11% 的酒精度。其生长曲线显示, 于最适生长温度和 pH 下, 摇瓶发酵 12~24h 便可获得满意的种子。

关键词 猕猴桃汁 柠檬形克勒克氏酵母 分离 鉴定 生长特性

Abstract A strain of E-45 was isolated from the natural fermented kiwifruit juice. It was further identified as *Kloeckera apiculata*. The growth characteristics of *K. apiculata* E-45 in malt extract were studied. The optimum growth temperature was 30℃, while the minimum and maximum growth temperatures were 7℃ and 36.5℃, respectively. The optimum growth pH value was 5.4, while the minimum and maximum growth pH values were 1.6 and 9.5, respectively. The maximum concentration of ethanol permitting growth was 11% v/v. Based on the studied results of the growth curve, the seed culture could be obtained by shaking flask culture for 12~14h at the optimum growth temperature and pH.

Key words *K. apiculata* Kiwifruit juice Isolation Identification Growth characteristics

近年来,猕猴桃这种极富营养、风味独特、具有一定的防癌和医疗保健效果的新型水果愈来愈受到消费者亲睐。除鲜食外,大量用于加工。果汁是目前市场上猕猴桃的主要加工产品之一,但存在酸度大、风味平淡、“卡喉”感或“干草”味^[1,2]等缺陷。为此,我们从自然发酵猕猴桃汁中筛选出一株能明显改善果汁风味的产香酵母 E-45,并对其进行了菌种鉴定和主要生长特性的研究,为该菌的进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 原料:中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch) 购于江苏镇江。

1.1.2 培养基

(1)10°Brix 麦芽汁培养基 (2)生孢子培养基^[3,4,5]

A、麦氏培养基 B、石膏块 C、酵母膏麦芽汁琼脂 D、玉米粉琼脂 E、麦芽汁琼脂 F、醋酸钠琼脂

(3)其他菌种鉴定培养基见文献[3]、[6]

1.2 实验方法

1.2.1 猕猴桃汁的制备

经后熟的猕猴桃→清洗→破碎→加少量蒸馏水→打浆→加水调整可溶性固形物含量为 9%→分装。

注:为避免引入杂菌,制汁过程中所接触物品均用开水烫过(或煮过)。

1.2.2 酵母菌的分离筛选

将上述方法制得的猕猴桃汁装于 250ml 无菌四旋瓶中,分别于 15、20℃ 不同温度进行 30d、15d 的自然发酵。选取风味柔和、有水果香及淡醇香的自然发酵汁,经适当稀释后在猕猴桃汁平板和麦芽汁平板上作涂布或划线,28℃ 培养 2~3d。选择具有典型酵母菌菌落特征的单菌落进一步划线分纯。

把分纯后的菌株,分别接入产酯培养基^[6]和猕猴桃汁中,28℃ 培养 3d,根据酯香大小进一步筛选菌株。

1.2.3 酵母菌种子液的制备^[7]

1.2.4 酵母菌的鉴定

按照文献[3]、[6]、[8]所介绍的鉴定程序和鉴定方法,对试验菌株在个体形态、培养特征、生理生化特性等方面逐一进行试验和观察。

1.2.5 最适生长温度测定

将酵母种子接入麦芽汁中,分别在 22~36℃ 不同温度下恒温培养 10h,于 660nm 测定培养液 OD 值,依据 OD 值大小确定其最适生长温度。

1.2.6 最低和最高生长温度的测定

将酵母种子液接入麦芽汁中,分别于低温和高温培养 7d,观察有无菌生长。

1.2.7 最适生长 pH 值测定

将酵母种子液接入不同 pH 值麦芽汁中,于最适生长温度恒温培养 10h,在 660nm 下测培养液 OD 值,依据 OD 值大小确定其最适生长 pH。

1.2.8 最低和最高生长 pH 值的测定

将酵母种子液分别接入低 pH 和高 pH 麦芽汁中,于最适生长温度培养 7d,观察有无生长。

1.2.9 耐酒精度测定

将酵母种子液分别接入不同乙醇含量的麦芽汁中,于最适生长温度培养 7d,观察有无生长。

1.2.10 生长曲线测定

将酵母种子液以 2% 接入 pH 为 5.4 的麦芽汁中,在最适生长温度以 115r/min 于摇瓶柜振荡培养,每隔一定时间用血球计数板计数法测定麦芽汁中的活菌数。

2 结果与讨论

2.1 产香酵母菌株的分离

从风味柔和、有水果香和淡醇香的自然发酵猕猴桃汁中,共分离到 20 株具有代表性的典型酵母菌株。将各菌接入产酯培养基和猕猴桃汁中,经 28℃、3d 培养,筛选到一株在产酯培养基中有淡的香味产生、在猕猴桃汁发酵过程中产生淡甜味、微弱的醇味及水果清香味的优良菌株,编号为 E-45。

2.2 E-45 菌种的鉴定

2.2.1 细胞形态

E-45 麦汁培养液经涂片、染色、镜检,菌体为卵圆形、柠檬形,大小为 $2.6 \sim 3.3 \times 6.8 \sim 11.9 \mu\text{m}$,两极出芽,如图 1。



图 1 菌株 E-45 的菌体形态(400×)

2.2.2 培养特征

E-45 在麦芽汁琼脂培养基上,菌落大小为 5~6mm,正面圆形,侧面为低凸面,边缘整齐,白色,湿润,

光滑,不透明,有弱的香味产生,其菌落形态如图 2。在马铃薯琼脂培养基上,无假菌丝形成。在麦芽汁液体培养基中静止培养时,有菌环,沉淀,菌液混浊,产气明显。有多种生孢子培养基上,均无子囊孢子产生。



图 2 菌株 E-45 在麦芽汁琼脂上的菌落形态

2.2.3 生理生化特征

菌株 E-45 对糖的发酵试验及对各种碳源的同化结果如表 1、2 所示,其他生理试验结果见表 3。

表 1 菌株 E-45 的糖类发酵结果

糖类	结果	糖类	结果
葡萄糖	+	纤维二糖	-
麦芽糖	-	蜜二糖	-
半乳糖	-	海藻糖	-
乳糖	-	松三糖	-
蔗糖	-	α -甲基-D-葡萄糖苷	-
棉子糖	-	可溶性淀粉	-
菊糖	-		

注:“+”表示发酵,“-”表示不发酵

表 2 菌株 E-45 对碳源的同化

碳源	结果	碳源	结果	碳源	结果
葡萄糖	+	可溶性淀粉	-	D-山梨醇	-
L-山梨糖	-	D-木糖	-	水杨素	-
蔗糖	-	L-阿拉伯糖	-	琥珀酸	-
麦芽糖	-	D-阿拉伯糖	-	柠檬酸	-
纤维二糖	+	D-核糖	-	肌醇	-
海藻糖	+	L-鼠李糖	-	甘油	-
乳糖	-	赤鲜糖醇	-	DL-乳酸	-
		阿东醇	-	α -甲基-D-葡	-
蜜二糖	-	卫矛醇	-	葡糖苷	-
棉子糖	-	D-甘露醇	-	松三糖	-
菊糖	-	乙醇	-	半乳糖	-
核糖醇	-			2-酮葡萄糖酸	+

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

根据以上各项实验结果,对照 Kreger-van Rij (1984) 资料^[3]及《真菌鉴定手册》^[8],菌株 E-45 鉴定为柠檬形克勒克氏酵母 *Kloeckera apiculata*,是有孢汉逊酵母属 *Hanseniaspora* 的无性世代。

表 3 菌株 E-45 部分生理试验结果

项目	硝酸钾同化	产生类淀粉	产酸	产酯	37℃ 生长	对氧的利用状态
特征	-	-	+	+	-	兼性厌氧

注:说明同表 2。

据资料^[3,9,10], *K. apiculata* 在葡萄和果汁中多见, 在果汁发酵早期常大量生长, 与酒精酵母相比, 产生更多的醋酸、*n*-丙醇、异丁醇、异戊醇等醇类和多种酯类、乙偶姻等风味物质, 产酒精能力弱, 对酒类尤其是葡萄酒等果酒的风味和感官品质有明显的改善作用。至今尚未见到对人体有任何危害作用的报道。

2.3 *K. apiculata* E-45 的生长特性

为了比较全面地了解 *K. apiculata* E-45 的生长特性, 为科学地利用提供理论依据, 我们又进行了该菌株在麦芽汁培养基中一系列生长特性的测定。

2.3.1 最适生长温度

菌株 *K. apiculata* E-45 在麦芽汁中的生长温度曲线见图 3。由图可以看出, 该菌的最适生长温度为 30℃, 最适生长温度范围为 28~32℃。

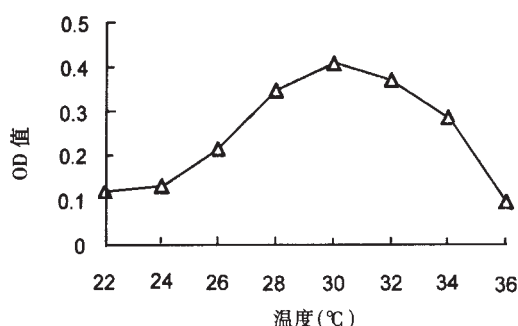


图3 *K. apiculata* E-45 的生长温度曲线

2.3.2 最低和最高生长温度

K. apiculata E-45 在麦芽汁液体培养基中, 于 4~9℃ 低温和 35~37.5℃ 的高温培养 7d, 其结果如表 4。由表可见, *K. apiculata* E-45 的最低生长温度为 7℃, 最高生长温度为 36.5℃。该菌生长温度范围宽广, 有利于生产应用。

2.3.3 最适生长 pH 值

K. apiculata E-45 于不同 pH 值麦芽汁 30℃ 培养, 其生长 pH 曲线如图 4。由图可见, 该菌在整个试验 pH 范围, OD 值变化不大, 因而其生长最适 pH 范围在 4~6 之间, 其最适生长 pH 值为 5.4。这与麦芽汁的自然 pH 十分接近。

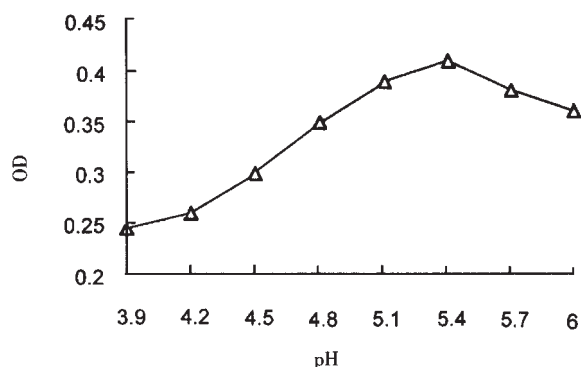


图4 *K. apiculata* E-45 的生长 pH 曲线

2.3.4 最低和最高生长 pH 值

K. apiculata E-45 在 1.4~2.0 的低 pH 和 8.5~10.0 的高 pH 麦芽汁中的生长特性如表 5。由表可见 *K. apiculata* E-45 在麦芽汁中的最低生长 pH 值为 1.6, 最高生长 pH 值为 9.5。其生长 pH 范围宽阔, 并对高酸性环境有很强的忍耐力, 因而应用于果汁尤其是高酸性果汁如猕猴桃汁、山楂汁等发酵有很大的前景。

2.3.5 耐酒精度试验

K. apiculata E-45 在含 3%~12% 乙醇的麦芽汁中的生长特性如表 6。由表可见, *K. apiculata* E-45 耐乙醇能力较弱, 这与文献^[11]报道的类似, 故其更适合于低醇果汁饮料和低度酒精饮料增香。

2.3.6 *K. apiculata* E-45 的生长曲线

K. apiculata E-45 在麦芽汁中 30℃ 纯培养时间的生长规律如图 5。

表4 *K. apiculata* E-45 的最低、最高生长温度

温度(℃)	4	6	7	8	9	35	36	36.5	37	37.5
生长状态	-	-	±	+	++	++	+	±	-	-

注: “++”表示生长良好, “+”表示生长较差, “±”表示生长很少, “-”表示无生长。

表5 *K. apiculata* E-45 的最低、最高生长 pH

pH	1.4	1.6	1.8	2.0	8.5	9.0	9.5	10.0
生长状态	-	±	++	++	++	++	++	-

注: 说明同表 4。

表6 *K. apiculata* 对酒精的耐受性

酒精含量(% v/v)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
生长状态	++	++	++	+	+	+	+	+	±	-

注: 说明同表 4。

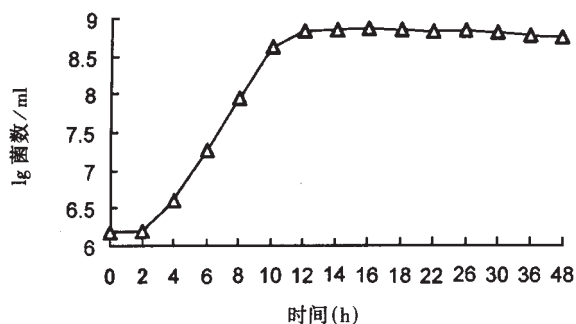


图5 K. apiculata E-45 在麦芽汁中的生长曲线

由曲线可以看出, K. apiculata E-45 在 2h 后菌量以指数级增加, 生长速率常数为 0.87, 到 12h 菌量达到稳定 (约为 6.9×10^8 个/ml), 并在较长时间内 (约 36h) 菌量基本维持恒定。

由 K. apiculata E-45 生长特性可知, 由麦芽汁制备种子发酵液, 控制培养基 pH 为 5.4 左右, 发酵温度为 28~30℃, 摇瓶培养 12~14h 即可收获。

3 结语

柠檬形克勒克氏酵母 *Kloeckera apiculata* 为低发酵力的产香酵母, 与酒精酵母相比, 该菌产乙醇能力微弱, 能产生酸类、醇类、酯类、乙偶姻等多种芳香物质。目前多用于葡萄酒等酒类的增香和品质改良, 在发酵果汁应用方面很少见报道。

由于猕猴桃酸度大 (pH 为 3.0~3.2), 细菌难以生长繁殖, 故其发酵品以酵母菌发酵的果酒为主。本试验分离到的产香酵母 K. apiculata E-45 具有很强的耐酸能力, 既可以用于猕猴桃汁的品质改善, 又不

增加其酒精含量, 从而为酸性果汁风味的改善提供了一条新的途径。

参考文献

- 1 潘林娜. 猕猴桃的加工和综合利用. 食品工业科技. 1993, (1) 24~29.
- 2 YOUNG H, PERERA C O, PATERSON V J. Identification of E-hex-3-enal as an important contributor to the off-flavour aroma in kiwifruit juice. jSciFoodAgric. 1992, 58(4): 519~522.
- 3 N. J. W. KREGER-VAN RIJ. The yeasts: a taxonomic study. third revised and enlarged edition. The Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V. 1984.
- 4 王金盛, 高东. 酿酒酵母子囊孢子形成条件的探讨. 中国调味品. 1990, (7) 5~7.
- 5 诸葛键, 王正祥编著. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- 6 中科院微生物研究所常见与常用真菌编写组. 常见与常用真菌. 北京: 科学出版社, 1978.
- 7 李剑芳, 张灏. 发酵猕猴桃汁的研究 (I) 发酵条件的确定. 1999, 25(5) 28~31.
- 8 魏景超著. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- 9 ROMANO P, et al. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. J. Appl. Bacteriol. 1992, 73: 126~130.
- 10 ROMANO P, et al. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *kloeckera apiculata*. Applied and Environmental Microbiology. 1993, 59(6): 1838~1841.
- 11 GAO C X, et al. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. J. Appl. Bacteriol. 1988, 65: 405~409.

灵芝——松茸混菌共酵对胞外活性多糖积累的影响因素研究

白晨 复旦大学 生命科学学院 上海 200433
王淑珍 上海师范大学 生命与环境科学学院 200234

摘要 通过液体摇瓶正交试验研究了灵芝——松茸混菌共酵对胞外活性多糖积累的影响因素及其相关性, 优选出最佳培养基配方、接种量、共酵温度、pH、通气量、共酵时间等参数, 为研制功能饮料中以胞外活性多糖积累为目的物的工业化生产最佳共酵工艺条件的制定奠定了基础。

关键词 灵芝 松茸 混菌共酵 活性多糖 功能饮料

Abstract Study the factors affecting their inter relation of *Ganoderma lucidum* *Thicholoma matsutake* (S Ito et Imai)