(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109456904 B
(45)授权公告日 2022.01.25

(21)申请号 201811445978.3
(22)申请日 2018.11.29
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109456904 A
(43)申请公布日 2019.03.12
(83)生物保藏信息
CGMCC NO.16522 2018.09.21
(73)专利权人 安徽金种子酒业股份有限公司
地址 236000 安徽省阜阳市河滨路302号
(72)发明人 张杰 程伟 李娜 潘天全 彭兵
(74)专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司 31220
代理人 郑立
(51)Int.Cl.
C12N 1/16(2006.01)
C12P 7/62(2022.01)
C12G 3/021(2019.01)
C12H 6/02(2019.01)
C12R 1/645(2006.01)

(56)对比文件
CN 108018218 A,2018.05.11
CN 103184167 A,2013.07.03
CN 108330075 A,2018.07.27
CN 105349444 A,2016.02.24
黄光建等.豉香型白酒酒饼中高产乙酸乙酯酵母菌的分离鉴定及发酵性能研究.《食品工业科技》.2015,第36卷(第11期),第153-158页.
侯建光等.陶香型窖池中1株高产乙酸乙酯酵母的筛选与鉴定.《酿酒科技》.2016,(第11期),第56-59页.
王鹏昊等.小曲中优质产酯酵母分离鉴定及其产酯条件优化.《食品与发酵工业》.2018,第44卷(第2期),第62-67页.

审查员 胡百灵

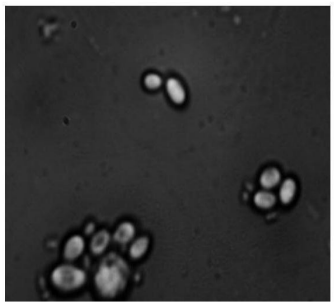
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种产乙酸乙酯的酵母及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种产乙酸乙酯酵母菌及其应用,涉及生物技术领域,所述产乙酸乙酯酵母菌为异常威克汉姆酵母(wickerhamomyces anomalus),所述产乙酸乙酯酵母菌已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC NO.16522。本发明提供的酵母菌株不仅为高产乙酸乙酯菌株,同时该菌株具有良好的酒精度及温度耐受性,该菌株在酒精度为6.0%vol、温度为28℃的条件下具备较好的产乙酸乙酯的特性,适应于清香型白酒固态发酵过程中酒醅的酒精度及温度的变化要求,在实际生产应用中可以提高清香型白酒固态发酵过程中乙酸乙酯的产量。



CN 109456904 B

1.一种产乙酸乙酯酵母菌，其特征在于，所述产乙酸乙酯酵母菌为异常威克汉姆酵母(wickerhamomyces anomalus)，所述产乙酸乙酯酵母菌于2018年09月21日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC NO.16522。

2.一种使用如权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌生产乙酸乙酯的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

1.1将权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌进行液体培养；

1.2将步骤1.1所得的培养物接种于含有乙酸、乙醇的体系中进行发酵培养；

1.3收集发酵产物，得到乙酸乙酯；所述发酵培养的时间为48小时；所述发酵培养的温度为30℃；所述含有乙酸、乙醇的体系中乙酸体积百分含量为1％，乙醇体积百分含量为20％；所述液体培养的时间为48小时。

3.一种使用如权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌进行麸曲培养的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

2.1将权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌接种于液体培养基进行液体培养；

2.2将步骤2.1所得的培养物接种于麸皮培养基，混合均匀静止培养；

2.3检测步骤2.2所得成品麸曲的酯化力、糖化力、发酵力。

4.如权利要求3所述的方法，其特征在于，所述步骤2.2中每隔4小时进行翻曲。

5.一种使用权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌进行固态发酵的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

3.1将权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌接种于液体培养基进行液体培养；

3.2将步骤3.1中所得的培养物接种于固态发酵培养基，模拟小曲清香型白酒固态发酵，蒸馏取酒；

3.3将步骤3.2中所得的酒样进行乙醇蒸馏，取馏分；

3.4气相色谱对步骤3.3所得馏分中乙酸乙酯含量进行检测。

6.一种酿酒方法，其特征在于，所述方法使用如权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母或包含其的组合物。

一种产乙酸乙酯的酵母及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一种产乙酸乙酯的酵母及其应用。

背景技术

[0002] 酵母菌能分泌淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、酯化酶等多种酶系，既有分解作用的酶，又有合成作用的酶。产酯酵母又称生香酵母，它不属于传统酵母分类学意义上的名词，而是一类可生成较多量酯类物质的酵母的通称，它们分别属于汉逊酵母属、产朊酵母属、假丝酵母属等，是白酒和黄酒发酵产香的重要菌种，在酿造过程中有增酯、提香等作用。产酯酵母主要产乙酸酯类，特别是乙酸乙酯，常见的产酯酵母有清香型酒中的汉逊酵母及酱香型酒中的球拟酵母。

[0003] 酯类物质一般具有芳香性气味，多呈果香，是白酒中重要的芳香物质，可以在不同程度上增加白酒的香气，并决定香气的品质，尤其对白酒香型的归属起到重要作用。清香型白酒的历史源远流长，以乙酸乙酯为主体香，其特点是“清香纯正、自然协调、醇甜柔和、后味爽净”等。现有技术中，普通小曲清香型白酒是以纯种培养的酿酒酵母、根霉等为主体进行发酵，其特点是原料出酒率高，但是成品酒中酯类物质含量较低，清香度不足，影响成品酒品质。研究表明，清香型白酒中的乙酸乙酯，主要是由小曲中的生香酵母在发酵过程中利用葡萄糖代谢产生乙醇、乙酸等，并在酵母酯化酶的作用下生成，目前，选育出高产酯生香的酿酒酵母工业菌种，是解决白酒中酯类物质含量问题从而提高成品酒品的的重要途径。

[0004] 因此，本领域的技术人员致力于开发一种产乙酸乙酯的酵母菌，并提供相应的筛选方法和应用，本发明提供的酵母菌株为高产乙酸乙酯菌株，在实际生产应用中可以提高清香型白酒固态发酵过程中乙酸乙酯的产量，对于清香型白酒的典型风格特点的形成具有重要意义。

发明内容

[0005] 有鉴于现有技术的上述缺陷，本发明所要解决的技术问题是普通小曲清香型白酒成品酒中酯类物质含量较低，清香度不足，成品酒品质不够好的问题。

[0006] 为实现上述目的，本发明提供了一种产乙酸乙酯酵母菌，所述产乙酸乙酯酵母菌为异常威克汉姆酵母(wickerhamomyces anomalus)，所述产乙酸乙酯酵母菌已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会，保藏编号为CGMCC NO.16522。

[0007] 进一步地，本发明还提供了一种使用上述产乙酸乙酯酵母菌生产乙酸乙酯的方法，包括以下步骤：

[0008] 1.1将上述产乙酸乙酯酵母菌进行液体培养；

[0009] 1.2将步骤1.1所得的培养物接种于含有乙酸、乙醇的体系中进行发酵培养；

[0010] 1.3收集发酵产物，得到乙酸乙酯。

[0011] 进一步地，所述发酵培养的温度为26℃-32℃。

[0012] 进一步地，所述发酵培养的温度为30℃。

[0013] 进一步地，所述含有乙酸、乙醇的体系中乙酸体积百分含量为1%-5%，乙醇体积百分含量为20%-60%。

[0014] 进一步地，所述液体培养的时间为48小时，所述发酵培养的时间为48小时。

[0015] 进一步地，本发明还提供了一种使用上述产乙酸乙酯酵母菌进行麸曲培养的方法，包括以下步骤：

[0016] 2.1将权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌接种于液体培养基进行液体培养；

[0017] 2.2将步骤2.1所得的培养物接种于麸皮培养基，混合均匀静止培养；

[0018] 2.3检测步骤2.2所得成品麸曲的酯化力、糖化力、发酵力。

[0019] 进一步地，上述步骤2.2中每隔4小时进行翻曲。

[0020] 进一步地，本发明还提供了.一种使用上述产乙酸乙酯酵母菌进行固态发酵的方法，包括以下步骤：

[0021] 3.1将权利要求1所述的产乙酸乙酯酵母菌接种于液体培养基进行液体培养；

[0022] 3.2将步骤3.1中所得的培养物接种于固态发酵培养基，模拟小曲清香型白酒固态发酵，蒸馏取酒；

[0023] 3.3将步骤3.2中所得的酒样进行乙醇蒸馏，取馏分；

[0024] 3.4气相色谱对步骤3.3所得馏分中乙酸乙酯含量进行检测。

[0025] 进一步地，本发明还提供了一种酿酒方法，所述方法使用上述的产乙酸乙酯酵母或包含其的组合物或其发酵产物。

[0026] 进一步地，本发明还提供了一种制备包含乙酸乙酯的产品的方法，所述方法使用上述的产乙酸乙酯酵母或包含其的组合物或其发酵产物。

[0027] 进一步地，本发明还提供了一种制备酿酒的产品的方法，所述方法使用上述的产乙酸乙酯酵母或包含其的组合物或其发酵产物。

[0028] 本发明提供的酵母菌株为高产乙酸乙酯菌株，该菌株模拟小曲清香型白酒固态发酵所产乙酸乙酯的含量可达11.44g/L，同时该菌株具有良好的酒精度及温度耐受性，在酒精度为6.0%vol、温度为28℃的条件下仍具备较高的产乙酸乙酯的特性，尤其适应于清香型白酒固态发酵过程中酒醅的酒精度及温度的变化要求。在实际生产应用中可以提高清香型白酒固态发酵过程中乙酸乙酯的产量，成为清香型白酒酿造过程不可缺少的特征性功能菌，其代谢特性对于清香型白酒的典型风格特点的形成具有重要意义。

[0029] 以下将结合附图对本发明的构思、具体结构及产生的技术效果作进一步说明，以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

[0030] 图1是本发明的一个较佳实施例的初筛培养基平板酵母菌落生长状态图；

[0031] 图2是本发明的一个较佳实施例的初筛培养典型酵母单菌落特征图；

[0032] 图3是本发明所获得的目标菌株Jmx-01的平板划线菌落生长状态图；

[0033] 图4是本发明所获得的目标菌株Jmx-01的40倍镜下菌体特征图；

[0034] 图5是本发明所获得的目标菌株Jmx-01麸曲培养前期状态图；

[0035] 图6是本发明所获得的目标菌株Jmx-01麸曲培养后期状态图。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例对本发明的技术内容做进一步的说明:下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0037] 本发明中出现的字符简写释义如下:min:分钟;h:小时;d:天;rpm:转/分钟。

[0038] 本发明使用的溶液配方如下:

[0039] 富集培养基:高粱粉碎后,按照比例高粱:水=1:8混匀,90℃水浴下糊化90min,冷却到60℃,加糖化酶,糖化3h,煮沸5min,双层纱布过滤,115℃灭菌20min;

[0040] 初筛培养基:酵母膏10g,溴甲酚紫0.4mg,乙酸乙酯1.0mL和乳酸乙酯1.0mL,琼脂20g,加水至1000mL,115℃灭菌20min;

[0041] 复筛培养基:麦芽汁液体培养基;

[0042] YEPD液体培养基:葡萄糖2%,蛋白胨2%,酵母粉1%,115℃灭菌20min;

[0043] 麸皮培养基:麸皮、丢糟(干燥)按4:1比例,水分50%,121℃灭菌30min;

[0044] 固态发酵培养基:粉碎后的高粱,润料24h后装瓶,121℃灭菌30min,冷却后备用;

[0045] 蛋白提取液:0.5mol/L Tris-HCLpH 7.0,0.1%tritonX-100;

[0046] 酶活检测反应液:0.5mol/L Tris-HCLpH 7.0,11.6mmol/L氯化镁,0.3mmol/L乙酰辅酶A(acetyl-COA),10mmol/L丁醇;

[0047] 破菌缓冲液:2%Triton X-100,1%SDS,100mM氯化钠,10mM Tris-HCl(pH 8.0)。

[0048] 实施例1

[0049] 菌株的筛选

[0050] 1.菌株初筛

[0051] 将固态发酵清香型白酒酒醅粉碎,各取10g加入三角瓶中,加入100mL富集培养液,摇床震荡摇匀1h,将富集培养液用无菌水分别稀释至10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}倍,分别涂布初筛平板,并放入恒温培养箱中,28℃培养72h,每隔6h定期观察培养结果。观察具有变色圈的菌株,根据菌落形态,并结合镜检结果,区分出不同的菌株,用平板划线的方法进行纯化,挑选有黄色变色圈的菌株30株,原始编号分别为Jm-01,Jm-02,直至Jm30。观察发现,如图1及图2所示,酵母菌生长在初筛固体培养基表面,用接种针容易挑起,菌落质地均匀,正、反面及中央与边缘的颜色一致。酵母菌的菌落特征与细菌相似,但比细菌菌落大而厚,菌落表面光滑、湿润、粘稠,易挑起,菌落质地均匀,正反面、边缘和中央等部位的颜色较均一,菌落多呈乳白色,少数为红色,个别为黑色。研究表明,不产生假菌丝的酵母菌菌落更隆起,边缘十分圆整;形成大量假菌丝的酵母,菌落较平坦,表面和边缘粗糙。酵母菌菌落特征是分类鉴定的重要依据。

[0052] 2.菌株复筛。

[0053] (1)产乙酸乙酯能力检测。

[0054] a.乙酸乙酯含量检测:将初筛所得的酵母菌株作为实验组,配置1%乙酸的20%乙醇水溶液,取2ml,并向其中加入培养2d的酵母上清液8ml(对照组加入8ml的YEPD液体培养基),混匀后,置于30℃,200rpm摇床,培养48h;气相色谱法测定反应体系中的乙酸乙酯含量(中华人民共和国国家质量监督检验检疫局.GB/T10345-2007,白酒分析方法[S].北京:中

国标准出版社,2007)。

[0055] b.醇酰基转移酶酶活检测:第一步制备粗酶液,取实验组培养液(即初筛所得酵母菌株培养液),5000g离心20min,用0.5mol/L的Tris-HCL缓冲液洗涤2次,取沉淀,液氮研磨菌体至粉末状,加入蛋白提取液,15000g离心20min,取上清液即为粗酶提取液;第二步进行酶活检测,取0.15ml粗酶液,加入0.85ml的酶活检测反应液,所得混合液在35℃条件下水浴15min,气相色谱法检测乙酸丁酯的含量。

[0056] 产乙酸乙酯能力检测结果如表1所示,在Jm-04,Jm-05,Jm-06这3个菌株的1%乙酸的20%乙醇水溶液反应体系中,两次实验结果的平均乙酸乙酯含量分别为0.20695mg/ml,0.2489mg/ml,0.191955mg/ml,醇酰基转移酶酶活检测结果分别为3.237847u/ml,4.694444u/ml,2.717188u/ml,因此,选择Jm-04,Jm-05,Jm-06这3个菌株作为复筛得到的高产乙酸乙酯菌株保藏,并按照其产乙酸乙酯水平重新编号为jmx-01(原始编号Jm-05),jmx-02(原始编号Jm-04),jmx-03(原始编号Jm-06)。

[0057] 表1初筛分离菌株产乙酸乙酯能力的测定结果

[0058]

编号	第一次 (mg/ml)	第二次 (mg/ml)	平均 (mg/ml)	酶活 (u/ml)
Jm-04	0.2064	0.2075	0.20695	3.237847
Jm-05	0.29351	0.20429	0.2489	4.694444
Jm-06	0.19856	0.18535	0.191955	2.717188
对照	0.09444	0.13296	0.1137	

[0059]

[0060] (2)发酵力检测

[0061] 用CO2失重法对初筛得到的30株酵母菌进行发酵力检测,把培养24h的新鲜酵母菌接种到新的YEPD培养基上,15ml的摇管中装入5ml的YEPD培养基,菌种接种量200μl,220rpm,30℃培养。注入培养基前称15ml摇管的重量,接种后称量总重量。设置空白对照组实验,即15ml摇管中装入5ml YEPD培养基,不接种酵母,220r/min,30℃培养。培养72h,每隔24小时测定发酵体系重量。测定重量时,在无菌条件下打开管塞,并摇晃摇管,使CO2充分逸散。

[0062] 结果如表2所示,除Jm-05(即jmx-01)之外,Jm-23,Jm-26,Jm-28这3个菌株的发酵力试验表明,其15ml摇管72小时失重率分别为1.101%,2.230%,1.374%,处于初筛得到的30株酵母菌的较高水平,因此选择Jm-23,Jm-26,Jm-28这3个菌株作为复筛得到的高发酵力菌株保藏,并按照其发酵力水平重新编号为jmf-01(原始编号Jm-26),jmf-02(原始编号Jm-28),jmf-03(原始编号Jm-23)。

[0063] 表2初筛分离菌株发酵力的测定结果

[0064]

编号	24 小时失重率	48 小时失重率	72 小时失重率
Jm-05	0.835%	0.903%	0.968%
Jm-23	0.719%	0.921%	1.101%
Jm-26	1.886%	1.955%	2.230%
Jm-28	0.866%	1.082%	1.374%
对照	0.041%	0.078%	0.171%

[0065] (3)酵母麸曲的培养及检测

[0066] a.液体培养:YEPD液体培养基装液量为300mL/500mL的三角瓶,取1环活化后的高产乙酸乙酯能力和高发酵力的复筛酵母菌分别接种于YEPD液体培养基中,置于30℃摇床培养48h,转速为90rpm。在液态培养过程中,Jmf-01菌株与Jmx-01菌株的最适温度均为30℃,三角瓶液态培养24小时后,Jmf-01菌株的菌液表面产生气泡较多,迅速晃摇三角瓶,有大量小气泡上溢,表面有大量泡沫产生,可将培养瓶的棉球顶起;48小时后,泡沫减少,瓶底有一层较厚的乳白色沉淀物。Jmx-01菌株的菌液表面有小气泡上溢,其培养液有一定的酯香,瓶底有一层较厚的乳白色沉淀物。

[0067] b.麸曲培养:麸皮培养基装量为30g/500mL的三角瓶,接种量为10%左右的液体种子,接入麸皮培养基中并混合均匀,置于30℃培养箱中静止培养48h,取出放入40℃烘干箱中烘干备用,并采用酿酒大曲通用分析方法QB/T4257-2011,检测成品麸曲的酯化力、糖化力、发酵力等指标,结果如表3所示。麸曲培养时,麸曲温度为30℃,15h后麸曲散发出酵母菌自身特有的气味,Jmf-01酵母麸曲产生一定的酒香,麸皮表面颜色逐渐变白;Jmx-01酵母麸曲产生较为清新的水果酯香,麸皮表面颜色逐渐变白,有假丝产生。培养20h后,曲温升至最高,每4h翻曲一次,有利于排湿降温,翻曲时麸曲温热、疏松柔软有弹性。酵母菌属好氧菌,翻曲控温的同时可使原料充分与空气接触,有利于酵母的生长繁殖;鲜曲入房培养培养48小时左右成熟出房,干燥粉碎后的成品曲呈亮黄色,具有酵母麸曲特殊的香味。Jmx-01酵母麸曲培养前期及后期状态特征如图5及图6所示。

[0068] 表3酵母麸曲糖化力、酯化力、发酵力等指标的检测结果

[0069]

编号	糖化力（u）	酯化力（u）	发酵力（72 小时 CO2 失重率）
菌种 Jmx-01 麸曲	174	23	4.92%

[0070] 最后筛选出菌株Jmx-01为高产乙酸乙酯的目标菌株。

[0071] 实施例2

[0072] 目标菌株的鉴定

[0073] 1.形态鉴定

[0074] 经对目标菌株Jmx-01的菌落特征及40倍镜下镜检观察,如图3及图4所示,Jmx-01的形态如图菌体呈椭圆形,可见出芽繁殖形成的芽体,其单菌落呈圆形、有隆起、呈乳白色、边缘较整齐、易挑取、粘稠,具有酵母菌菌落的典型形态特征。

[0075] 2.分子生物学鉴定

[0076] 采用18S rDNA方法对Jmx-01菌株进行生物多样性测序

[0077] a.挑取酵母单菌落接种于5mL的YEPD培养基中,220rpm,30℃摇床培养12-16h;

[0078] b.5000g离心5min,1mL无菌水洗涤一次,加200ul的玻璃珠,加入200ul的破菌缓冲液再加200uL的酚氯仿,涡旋1min,放在冰上1min,重复4次;

[0079] c.加入500ul的超纯水,涡旋,离心,抽上清和等体积的酚氯仿混合;

[0080] d.涡旋,离心,抽上清和等体积的酚氯仿混合,重复本步骤直到离心后两层之间没有蛋白出现;

[0081] e.抽上清加1ml的无水乙醇,-20℃放置30min。12000g离心10min,抽上清,70%乙醇洗一次,真空干燥,超纯水溶解获得酵母基因组DNA,用作PCR扩增的模板。

[0082] f.采用18S rDNA通用引物(由Invitrogen合成):NS1:GTAGTCATATGCTTGTCTC,NS8:TCCGCAGGTTCACCTACGGA进行PCR扩增,20uL反应体系如下,其中10×Ex Taq buffer、2.5mM dNTP Mix、5u Ex Taq均购自Takara:

[0083]

10×Ex Taq buffer	2.0μl
2.5mM dNTP Mix	1.6μl
5pmol/uL NS1	0.8μl
5pmol/uL NS8	0.8μl
模板	0.5μl
5u Ex Taq	0.2μl
超纯水	14.1μl

[0084]

[0085] PCR反应条件为:95℃5min预变性,95℃变性30S,55℃退火30s,72℃延长40s,35个循环,之后72℃延长10min.

[0086] g.PCR扩增产物凝胶电泳后胶回收(使用Takara胶回收试剂盒),送上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

[0087] 测序结果显示,PCR扩增所得DNA序列如SEQ ID NO:1所示,测定结果表明该片段与NCBI公布的wickerhamomyces anomalus菌株的18S rDNA序列在相同区域的相似度均为100%。

[0088] 3.菌株的保藏

[0089] 一株产乙酸乙酯酵母菌(wickerhamomyces anomalus)菌株Jmx-01

[0090] 保藏单位:该菌株由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC);

[0091] 保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101);

[0092] 保藏日期:2018年09月21日

[0093] 保藏编号:CGMCC NO.16522;

[0094] 分类命名:异常威克汉姆酵母(wickerhamomyces anomalus)

[0095] 实施例3

[0096] 酵母菌Jmx-01在生产乙酸乙酯的应用

[0097] a.配置含有乙酸、乙醇的培养体系,其中,乙酸的体积百分比含量为1%-5%,乙醇的体积百分含量为20%-60%,优选地条件为,乙酸的体积百分比含量为1%,乙醇的体积百分含量为20%,

[0098] b.菌株Jmx-01接种于YEPD液体培养基,28℃,220rpm震荡培养,按照4:1的比例向步骤a配置的乙酸、乙醇的培养体系中加入培养2d的酵母上清液,混匀后,置于26-32℃,优选的温度设为30℃,200rpm摇床,发酵48h;

[0099] c.气相色谱法测定反应体系中的乙酸乙酯含量(中华人民共和国国家质量监督检验检疫局.GB/T10345-2007,白酒分析方法[S].北京:中国标准出版社,2007)。

[0100] 实施例4

[0101] 酵母菌Jmx-01在固态发酵中的应用

[0102] 菌株Jmx-01的发酵培养及乙酸乙酯检测

[0103] a.将菌株Jmx-01接种于YEPD液体培养基,28℃,220rpm震荡,培养36h,取10ml培养液接种于100g高粱固态发酵培养基中,并加入2万u的糖化酶,模拟小曲清香型白酒固态发酵,33℃发酵15天,蒸馏取酒。

[0104] b.将步骤a获得的酒样取100mL固态蒸馏,加入500mL的圆底烧瓶中,加入100mL60%乙醇,蒸馏收集100mL馏分,备测。

[0105] c.将步骤b中制备好的馏分转入旋转蒸发仪中,60℃水浴旋蒸乙醚萃取,通过气相色谱对乙醚萃取液中的乙酸乙酯含量进行检测。色谱条件为:色谱柱:安捷伦DB-5MS石英毛细管柱,30m×0.25mm(i.d.),膜厚0.25μm;进样口温度:200℃;色谱-质谱接口温度:280℃;载气:氦气,纯度≥99.999%,流速:1mL/min;进样方式:不分流;进样体积:1μL;电离方式:EI;溶剂延迟:4min。程序升温:50℃保持2min,之后以5℃/min的速度升温至190℃,再以10℃/min的速度升温至240℃,保持15min.

[0106] 测定结果见表4,从表中可以看出,乙酸乙酯的含量最高为11.44g/L,这表明菌株Jmx-01为稳定的高产乙酸乙酯菌株,在生产乙酸乙酯,制备包含乙酸乙酯的产品,酿酒以及制备酿酒的产品等生产领域具有良好的应用前景。

[0107] 表4酵母菌Jmx-01气相色谱检测结果

[0108]

己酸乙酯（g/L）	乳酸乙酯（g/L）	丁酸乙酯（g/L）	乙酸乙酯（g/L）	正丙醇（g/L）
0.02	0.01	0.07	11.44	0.05

[0109] 实施例5

[0110] 酵母菌Jmx-01对酒精的耐受性

[0111] 在YEPD液体培养基中加入不同浓度的乙醇,1:75接入酵母菌Jmx-01种子,置于30℃,200rpm摇床,培养48h,检测不同乙醇浓度下乙酸乙酯产量,结果如表5所示,乙醇体积浓度为6%时酵母菌Jmx-01的乙酸乙酯产量最高。

[0112] 表5不同浓度酒精下酵母菌Jmx-01产乙酸乙酯的能力比较

[0113]

酒精度（%vol）	0	2	4	6	8	10
乙酸乙酯（g/L）	0	0.7362	0.6211	1.2599	0.1213	0.0741

[0114] 实施例6

[0115] 酵母菌Jmx-01对温度的耐受性

[0116] 在YEPD液体培养基中1:75接入酵母菌Jmx-01种子,置于不同温度下,200rpm摇床,培养48h,检测不同温度条件下乙酸乙酯产量,结果如表6所示,温度为28℃时酵母菌Jmx-01的乙酸乙酯产量最高。

[0117] 表6不同温度下酵母菌Jmx-01产乙酸乙酯的能力比较

[0118]

温度（℃）	28	30	32	34
乙酸乙酯（g/L）	0.12	0.07	0.01	未检出

[0119] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解，本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此，凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案，皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 安徽金种子酒业股份有限公司

[0003] <120> 一种产乙酸乙酯的酵母及其应用

[0004] <130> 01554-18049PIZ

[0005] <160> 1

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0007] <210> 1

[0008] <211> 1550

[0009] <212> DNA

[0010] <213> 异常威克汉姆酵母(wickerhamomyces anomalus)

[0011] <400> 1

[0012] tactacttgg tataaccgtg gtaattctag agctaataca tgctaaaaac cccgactgtt 60

[0013] tggaaggggt gtatttatta gataaaaaat caatgctctt ctgagctctt tgatgattca 120

[0014] taataacttt tcgaatcgca tgacttcgtg tcggcgatgg ttcattcaaa tttctgccct 180

[0015] atcaactttc gatggtagga tagtggccta ccatggtttc aacgggtaac ggggaataag 240

[0016] ggttcgattc cggagaggga gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc 300

[0017] gcgcaaatta cccaatccta attcagggag gtagtgacaa taaataacga tacagggccc 360

[0018] atttgggtct tgtaattgga atgagtacaa tgtaaatacc ttaacgagga acaattggag 420

[0019] ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt 480

[0020] tgcagttaaa aagctcgtag ttgaactttg ggcttggtca gccggtccgc ttttttgcgt 540

[0021] gtactggtcc tgaccgagcc tttccttctg gctaacctgt ctctcggggc aggcgaacca 600

[0022] ggacttttac tttgaaaaaa ttagagtgtt caaagcaggc ctttgctcga atatattagc 660

[0023] atggaataat agaataggac gtttggttct attttgttgg tttctaggac catcgtaatg 720

[0024] attaataggg acggtcgggg gcatcagtat tcaattgtca gaggtgaaat tcttggattt 780

[0025] attgaagact aactactgcg aaagcatttg ccaaggacgt tttcattaat caagaacgaa 840

[0026] agttagggga tcgaagatga tcagataccg tcgtagtctt aaccataaac tatgccgact 900

[0027] agggatcggg tggtgttttt tatataccca ctcggcacct tacgagaaat caaagtcttt 960

[0028] gggttctggg gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaaa ggaattgacg gaagggcacc 1020

[0029] accaggagtg gagcctgcgg cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga 1080

[0030] cacaataagg attgacagat tgagagctct ttcttgattt tgtgggtggt ggtgcatggc 1140

[0031] cgttcttagt tggtggagtg atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc 1200

[0032] tactaaatag tgcgattagc ttttgctgat tttgacactt cttagaggga ctatcgattt 1260

[0033] caagtcgatg gaagtttgag gcaataacag gtctgtgatg cccttagacg ttctgggccg 1320

[0034] cacgcgcgct acactgacgg agccagcgag taataacctt ggccgagagg tctgggtaat 1380

[0035] cttgtgaaac tccgtcgtgc tggggataga gcattgcaat tattgctctt caacgaggaa 1440

[0036] ttcctagtaa gcgcaagtca tcagcttgcg ttgattacgt ccctgccctt tgtacacacc 1500

[0037] gcccgtcgct actaccgatt gaatggctta gtgaggcttc cggatcagct 1550

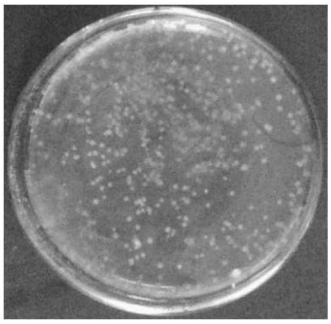


图1

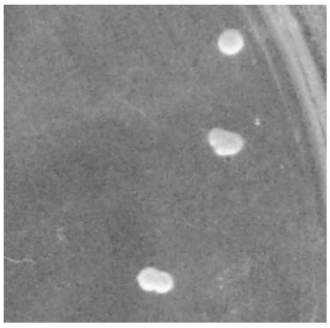


图2

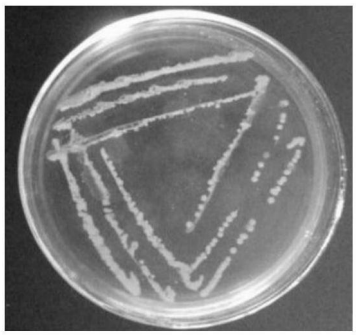


图3

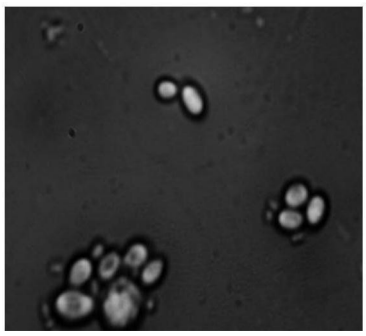


图4

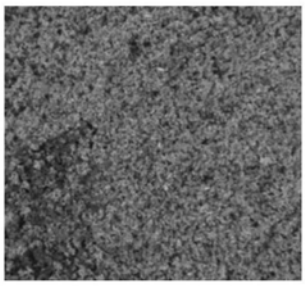


图5

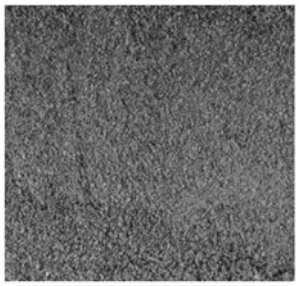


图6