(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 112126595 B
(45)授权公告日 2022.04.08

(21)申请号 202010453987.8

(22)申请日 2020.05.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112126595 A

(43)申请公布日 2020.12.25

(83)生物保藏信息
GDMCC No:60997 2020.04.17

(73)专利权人 中国食品发酵工业研究院有限公司
地址 100015 北京市朝阳区酒仙桥中路24号院6号楼
专利权人 银川产业技术研究院

(72)发明人 于佳俊 张晓蒙 薛洁 张凤杰 金玮鋆 王旭亮 张彦青

(51)Int.Cl.
C12N 1/18(2006.01)
C12N 1/02(2006.01)
C12Q 1/04(2006.01)
C12G 1/022(2006.01)
C12G 1/14(2019.01)
C12R 1/865(2006.01)

(56)对比文件
CN 110951629 A,2020.04.03
CN 101497866 A,2009.08.05
CN 102093960 A,2011.06.15
US 2016348192 A1,2016.12.01
US 2011293778 A1,2011.12.01
WO 2017214673 A1,2017.12.21
CN 103013845 A,2013.04.03

审查员 李娟娟

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一株低产酒精的产香酵母及其在低醇葡萄酒中的应用

(57)摘要

本发明公开了一株低产酒精的产香酵母及其在低醇葡萄酒中的应用,属于微生物和发酵酿造工程领域。该产香酵母是从宁夏贺兰山东麓产区酿酒葡萄原料中分离得到,其筛选方法是获取酿酒葡萄原料,使用培养基方法对酵母进行分离和纯化,然后经过初筛、复筛、产酒精能力试验和发酵实验,发酵液及成品采用GC以及SPME-GC-MS检测微生物代谢风味成分,生产中采用该菌株能有效提高低醇葡萄酒的香气特性。

CN 112126595 B

1.一株低产酒精的产香酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),保藏号为GDMCC NO.60997,主要用于发酵低醇葡萄汁并增加低醇葡萄酒的香气。

2.权利要求1所述的低产酒精产香酿酒酵母作为发酵菌株在低醇葡萄酒生产中应用。

一株低产酒精的产香酵母及其在低醇葡萄酒中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株低产酒精的产香酵母及其筛选方法，该产香酿酒酵母已经保存到广东省微生物菌种保藏中心，保藏号为GDMCC NO.60997，属于微生物技术领域。还涉及该产香酵母在葡萄酒中的应用，属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 葡萄酒贸易在国际经济中占有十分重要的地位：全世界葡萄栽培面积为10多万平方公里，近年来葡萄酒平均年产量在3000万吨左右，葡萄酒生产和与之配套的其他行业活动，为世界3700多万人提供了就业条件。葡萄酒含有丰富的营养物质，如氨基酸、有机酸、微量元素和糖醇类等，经过研究表明，葡萄酒中富含白藜芦醇和多酚物质，可降低血液中的低密度胆固醇，其中的红色素物质具有软化血管、保护心脏和防癌作用，能够补血养颜，保护心脑血管，使人面色红润，有益于人体健康，如今已经成了家家户户不可或缺的健康饮品。但是近年来，葡萄酒的消费人群，尤其在传统饮用葡萄酒的国家已经降低了对葡萄酒的消费，其重要原因是人们已经认识到酒精对人体的危害，因而激发了生产者及研究者对低醇葡萄酒的兴趣。

[0003] 低醇葡萄酒是指采用鲜葡萄或葡萄汁经全部或部分发酵，采用特种工艺加工而成的、酒精度为1.0%～7.0%(体积分数)的葡萄酒。这类产品在满足人们对葡萄酒饮用习惯的同时，又可以消除酒精的某些危害，不但有解酒的功能，还具有葡萄酒丰富的营养价值。2016年无醇(或低醇)葡萄酒的收益达160亿元，随着越来越多人崇尚个性化的生活方式，特别是女性饮酒的人数不断增加，低醇葡萄酒毕竟会越来越受到消费者的青睐。

[0004] 低醇葡萄酒的生产方法目前主要是利用膜过滤或蒸馏对葡萄酒进行脱醇处理，这些技术不仅成本较高，而且会影响终产品的风味品质。在特定条件下，利用特殊酵母，控制氧气，使其部分的将糖代谢为二氧化碳和水，不产生乙醇，形成典型的发酵香气，释放出果香，当达到所需的乙醇浓度后，断绝空气，通过微孔过滤的方式从发酵液中除去酵母菌。该方法不需要添加任何营养物质和其他物质，对葡萄汁的感官及主要质量的不利影响较小。

[0005] 本发明的目的是要筛选出优良的本土葡萄酒酿酒酵母，用于低醇葡萄酒的酿造，使其不但在工艺上容易控制，增加产品稳定性，同时也具有地域性的香气和风味特点，并能安全饮用。

发明内容

[0006] 1.本发明的目的，旨在为开发一款高档优质且香气成分复杂的低醇葡萄酒，提供一株产香酵母及其在葡萄酒中的应用，该酵母具有易于培养和生产，在葡萄汁发酵中低产酒精，且显著提高了低醇葡萄酒的香气特性。

[0007] 2.本发明所提供的低产酒精的产香酵母，其分类命名是：经过48h固体YEPD培养基上生长的菌落为圆形、乳白色，有光泽，边缘整齐，菌体粘稠，易挑起。此菌株生命力强，能够在较恶劣的环境下生长，提供基本的氮源和碳源，即可生长，易于工业生产。

[0008] 3.本发明从宁夏贺兰山东麓产区酿酒葡萄原料中分离筛选得到的产香酵母，主要筛选步骤包括：

[0009] ① 在葡萄园中选取成熟的酿酒葡萄原料，以无菌操作的方式在不同位置处摘取整串葡萄，从每串葡萄的上部、下部、内部、外部摘取葡萄50粒，放入100mL生理盐水中，以120r/min在25℃下震荡24h，然后梯度稀释涂布于PDA分离培养基中，于25℃培养箱中静置培养3d，随机选取具有典型酵母菌菌落特征的单菌落，划线分离纯化2-3次，YPD培养基斜面保存备用；

[0010] ② 将分离的酵母菌株进行初筛、复筛、产酒精能力试验和发酵试验，获得高产香气的一株酵母。

[0011] 4.本发明所述的分离培养基为YEPD培养基，所含组分为：

[0012] 酵母浸粉1%，蛋白胨2%，葡萄糖2%，琼脂2%，氯霉素0.1g/L。

[0013] 5.本发明所使用的斜面保存培养基为YPD培养基，所含组分为：

[0014] 酵母浸粉1%，蛋白胨2%，葡萄糖2%，琼脂2%。

[0015] 6.本发明所述筛选方法(2)中的初筛是酵母菌的产气性能测试，具体过程为：采用杜氏管发酵法，将10ml的10°Brix麦芽汁加入试管中，灭菌冷却后加入酵母菌，在25℃下发酵48小时，选择产气量等于杜氏小管体积的菌株。

[0016] 7.本发明所述的初筛是酵母菌的产气性能测试，具体过程为：采用杜氏管发酵法，将10ml的10°Brix麦芽汁加入试管中，灭菌冷却后加入酵母菌，在25℃下发酵48小时，选择产气量等于杜氏小管体积的菌株。

[0017] 8.本发明所述的复筛是酵母菌的产乙酸乙酯试验，具体过程为：采用液体法，在含有2%的碳源的培养基中，接入菌种，25~28℃下培养，发酵48~72小时，GC检测风味物质，选择香气浓郁且乙酸乙酯含量1000mg/L以上的菌株。

[0018] 9.本发明所述的酵母菌的产酒精能力试验，具体过程为：采用宁夏贺兰山地区赤霞珠葡萄汁为原料，葡萄汁总糖含量为210g/L。在25℃条件下培养6天后，选择酒精度低于4%(V/V)、香气浓郁的菌株。

[0019] 10.本发明所述的发酵试验，具体过程如下：

[0020] 将葡萄汁糖含量调到210g/L，将耐受性试验中筛选得到的酵母菌株活化后接到装有200mL葡萄汁的三角瓶中，使终浓度达到1×10^{8}cfu/mL，在25℃下发酵7天，每天称重绘制生长曲线，发酵结束灭菌调配，取发酵液样品以及调配成品进行GC和SPME-GS-MS分析风味和香气物质，并进行感官品评。

[0021] 11.利用本发明的产香酵母生产的低醇葡萄酒优点在于：该菌株在工业葡萄汁发酵生产中，能够有选择性的利用葡萄汁的内容物，其发酵得到的葡萄发酵液中乙酸乙酯含量为3000~4000mg/L，具有菌种生长与产香效率高，且低产酒精的优良酿造特性，保持发酵香气与葡萄品种香气协调叠加，香气持久。本发明应用价值高，具有极高的社会和经济效益。

具体实施方式

[0022] 下述实施例中的方法，如无特别说明，均为常规方法。

[0023] 下述实施例中的YEPD培养基配方如下：

[0024] 酵母浸粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%,琼脂2%,氯霉素0.1g/L。

[0025] 下述实施例中的YPD培养基配方如下:

[0026] 酵母浸粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%,琼脂2%

[0027] 下述实施例中的葡萄汁为:宁夏贺兰山东麓霞多丽葡萄汁,调节糖含量到210g/L。

[0028] 实施例1:产香酵母的分离、纯化及鉴定

[0029] 对宁夏贺兰山东麓酿酒葡萄中所分离的多株野生酵母菌株进行鉴定和筛选。其分离方法采用平板稀释涂布法挑取单菌落并进行连续两次纯化,并进行初筛、复筛、产乙酸乙酯试验和产酒精能力试验,鉴定方法采用传统形态学并结合26SrDNA D1/D2区域序列分析。

[0030] 具体筛选过程如下:

[0031] 1.酵母菌的产气性能测试,具体过程为:采用杜氏管发酵法,将10ml的10°Brix麦芽汁加入试管中,灭菌冷却后加入酵母菌,在25℃下发酵48小时,选择产气量等于杜氏小管体积的菌株。

[0032] 2.酵母菌的产乙酸乙酯试验,具体过程为:采用液体法,在含有2%的碳源的培养基中,接入菌种,26℃下培养,发酵48小时,GC检测风味物质,选择乙酸乙酯含量1000mg/L以上的菌株。

[0033] 3.酵母菌的产酒精能力试验,具体过程为:采用宁夏贺兰山地区赤霞珠葡萄汁为原料,葡萄汁总糖含量为210g/L。在25℃条件下培养6天后,选择酒精度低于4%(V/V)、香气浓郁的菌株。

[0034] 4.酵母菌的发酵试验:供试酵母活化扩培后接到含有500ml葡萄汁的三角瓶中,使接种量达到4.0×10^6个/mL,在25℃下发酵48小时,发酵结束灭菌调配,取发酵液样品以及调配成品进行GC和SPEM-GS-MS分析风味物质,并进行感官品评。

[0035] 具体鉴定过程如下:

[0036] 该菌株经形态学并结合26SrDNA D1/D2区域序列分析,鉴定为酿酒酵母的新株,具体过程及结果如下:

[0037] 1、形态学观察方法和结果:该菌种经过48小时固体YEPD培养基上生长的菌落为圆形、乳白色,有光泽,边缘整齐,菌体粘稠,易挑起。

[0038] 1. 26SrDNA D1/D2区域序列分析方法和结果:

[0039] (1) 酵母菌基因组DNA的提取采用玻璃珠法,具体方法如下所述:

[0040] ①取液体YPD培养基活化好的酵母菌悬液于1.5mL离心管中,10000rpm离心1min收集细胞,湿细胞体积达200μL即可,用去离子水洗涤一次;

[0041] ②细胞用200μL破菌缓冲液重悬,加0.3g玻璃珠(约200μL体积)及200μL酚:氯仿:异戊醇,漩涡混合器上振荡5min;

[0042] ③加200μL TE缓冲液,振荡1min,高速离心5min,将水相转移到干净离心管中,加1mL冰乙醇,颠倒混匀;

[0043] ④ 高速(13000rpm)离心10min,去上清液,干燥沉淀,用40μL TE缓冲液重悬沉淀;

[0044] ⑤加30μL的1mg/mLRNA酶A,用微量取样器混匀,37℃温育30min;

[0045] ⑥加10μL4mol/L乙酸铵及1mL冰乙醇,颠倒混匀;

[0046] ⑦高速离心3min,弃上清液,干燥沉淀,DNA用40μL TE缓冲液重悬。

[0047] (2) 酵母26SrDNA D1/D2区域特异性片段的扩增采用通用引物NL1/NL4由上海生物

工程技术服务有限公司合成;PCR扩增条件为94℃×1min,52℃×2min,72℃×2min,35个循环;72℃×10min;PCR扩增体系(50uL)的组成为:模板DNA2μL,10×PCR反应缓冲液5.0μL,25mmoL/L $MgCl_2$4 μL,25mmoL/L dNTPS0.4μL,5U/μLTaq DNA聚合酶0.5μL,双蒸水补充体系至50μL,混匀。随后对PCR扩增产物进行检测:取5μLPCR扩增产物点样于1.4%琼脂糖凝胶上。电泳缓冲液为1×TAE,100V电压下,电泳40min,溴化乙锭(EB)染色后,由凝胶成像系统对电泳图谱拍照并进行分析,采用100-bp DNA Marker判断PCR扩增产物的大小,结果显示酵母的特异性片段长度约为600bp。

[0048] ③酵母26SrDNA D1/D2序列分析:26SrDNA PCR扩增产物由上海生物工程技术服务有限公司进行测序,根据测序结果,利用BLAST软件从Genbank核酸序列数据库中进行同源序列搜索,比较试验菌株与已知酵母菌株相应序列的相似程度。

[0049] 根据目前酵母菌分子系统学研究领域的观点:即具有相同或相似ITS序列(序列同源性≥99%)的菌株属于同一物种,根据序列分析结果确定与基因库参考菌株的序列同源性≥99%的菌株为酿酒酵母。

[0050] 实施例2:产香酵母在低醇葡萄酒中的应用

[0051] 1. 产香酵母活化扩培:产香酵母接种于PDA(酵母浸粉1%、蛋白胨2%、碳源2%,pH值6.0,121℃灭菌20min)液体培养基,26℃,扩培时间24小时,然后转接于葡萄汁中,26℃,摇床120r/min,扩培时间24小时,得到扩培液。

[0052] 2. 在2个2.5L广口瓶里分别装2L赤霞珠葡萄汁,理化指标为:还原糖213.1g/L,总酸5.25g/L,pH 4.80,添加总SO_2约60mg/L。

[0053] 3.将上述酵母扩培液和工业化普遍应用的商业酿酒酵母71B,使终浓度达到1×10^8cfu/mL,按照白葡萄酒的标准工艺进行生产,发酵结束后取澄清的白葡萄酒。

[0054] 4. 采用SPEM-GC-MS(固相微萃取-气相-质谱联用法)对发酵结束后葡萄酒的香气物质组分及其含量进行检测,并组织具有国家级品酒师资质的感官人员对其进行感官品评,具体信息见表1、表2和表3。

[0055] 表1 两种酵母菌株生产葡萄酒的理化指标

[0056]

酒样编号	残糖(g/L)	酒精度(%,20℃)	总酸(g/L)	挥发酸(g/L)	总硫(mg/L)
产香酵母	40.6	4.54	7.65	0.38	75.42
商业酵母	2.1	14.79	5.81	0.41	78.52

[0057] 表2 两种酵母菌株生产葡萄酒中各种风味成分的检测结果(单位:ug/L)

风味物质	产香酵母	商业酵母 7IB
乙酸乙酯	390844.67	154337.11
甲基丁酸乙酯	103.82	64.57
乙酸丁酯	233.57	158.51
异丁醇	42251.27	39387.53
乙酸异戊酯	1105.99	511.51
己酸乙酯	542.3	442.72
乙酸己酯	1.23	3.84
辛酸乙酯	325.77	317.52
乳酸乙酯	620.81	363.38
己醇	2201.98	3110.36
4-甲基-4-硫基-2-戊酮	72.49	69.91
辛酸乙酯	247.69	173.25
糠醛	540.23	437.13
丁酸乙酯	219.55	235.76
里那醇	0.91	6.61
癸酸乙酯	28.45	26.9
壬醇	28.45	26.9
丁二酸二乙酯	27628.53	15847.29
十一烷酸乙酯	0.02	0.4
香茅醇	2.93	8.36
乙酸苯乙酯	66.51	43.65
香叶醇	8.56	15.74
愈创木酚	0.04	1.13
苯甲醇	2401.75	870.8
苯乙醇	53424.81	50361.1
橙花叔醇 1	0.99	19.49
橙花叔醇 2	1.79	23.05
辛酸	2271.82	1909.49
丁香酚	23.23	31.36
癸酸	2890.7	2707.07
苯甲酯	15.6	7.71
丁酸里那酯	3.92	4.1

[0058]

[0059] 表3 两种酵母菌株生产低醇葡萄酒的感官品评

[0060]

感官品评	产香酵母	商业酵母
外观	深宝石红色,澄清透明	深宝石红色,澄清透明
香气	具有浓度的果香,协调,持久	果香较浓,协调,优雅
口感	入口舒顺,稍甜,酒体轻盈,简单易饮	酒体醇厚,结构感强