



(21) 申请号 202110120767.8

(22) 申请日 2021.01.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112662575 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO:M2021104 2021.01.19

(73) 专利权人 武汉轻工大学
地址 430023 湖北省武汉市常青花园学府
南路68号

(72) 发明人 缪礼鸿 张宸瑞

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222
专利代理师 张火春

(51) Int.Cl.

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

C12G 3/02 (2019.01)

C12G 3/022 (2019.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111876295 A, 2020.11.03

CN 107034149 A, 2017.08.11

审查员 唐善波

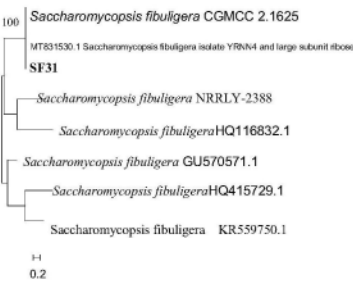
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

高蛋白酶活性及高出酒率的扣囊复膜酵母
菌、其组合物及应用

(57) 摘要

本发明公开了一株新的扣囊复膜酵母菌,含
该菌的酿酒菌剂及其在米酒和白酒酿造中的应
用。本发明公开的扣囊复膜酵母菌具有耐高温、
耐酸和耐酒精能力强、蛋白酶活性和酒精产率
高,产乙酸等有机酸和乙酸苯乙酯等白酒风味成
分的能力强的特点,发酵生产的米酒具有总酸和
氨基酸态氮含量高、香味浓郁等优点,酿酒菌剂
组合物及酿酒强化曲应用于米酒及白酒发酵可
提高米酒和白酒产品质量和产量。



1. 一株扣囊复膜酵母,能用于米酒和白酒酿造,其特征在于,该菌株耐高温和耐酸生长能力强、蛋白酶活性和酒精产率高,发酵产品中总酸和氨基酸态氮含量高,该菌株为扣囊复膜酵母SF31,*Saccharomycopsis fibuligera* SF31,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M2021104。

2. 一种含权利要求1中所述的扣囊复膜酵母SF31株的酿酒菌剂,其特征在于其活性成分为保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母SF31及其代谢产物。

3. 一种含权利要求1中所述保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母组合物。

4. 根据权利要求3中所述的保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母组合物,其特征在于它含有下列组份,按接种量计:

扣囊复膜酵母 20×10^8 cfu/g ,

马克斯克鲁维酵母 10×10^8 cfu/g ,

其中扣囊复膜酵母为CCTCC NO:M2021104,马克斯克鲁维酵母为CCTCC NO: M2013258。

5. 一种含权利要求1中所述保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母的酿酒强化曲。

6. 根据权利要求5中保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母的酿酒强化曲,其特征在于它含有下列组份:

传统酒曲 90%,

酿酒菌剂组合物 10%,

其中传统酒曲为用传统方法制备的用于白酒酿造的大曲或小曲,酿酒菌剂组合物为权利要求4所述的扣囊复膜酵母组合物。

7. 根据权利要求6中所述的保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母的酿酒强化曲的菌剂组合物,其特征在于所述的酿酒菌剂组合物为固态菌剂。

8. 制备权利要求5中所述的扣囊复膜酵母的酿酒强化曲的方法,包括如下步骤:

(1) 菌种活化:分别接种保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母和马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258于灭菌的糖度为12巴林的麦芽汁三角瓶培养基中,28℃摇床培养24小时;

(2) 固体培养:固体培养的配料是:麸皮68%、玉米粉30%,蔗糖2%,用水润料,蒸煮冷散后,将上述步骤(1)活化培养的2种酵母菌液分别按4-8%比例接种后装盒,保持25-35℃发酵温度,培养2天发酵完毕;

(3) 真空冷冻干燥及粉碎:对发酵后的固体样品在-45℃进行真空冷冻干燥处理,样品含水率低于10%后用万能粉碎机将干燥的培养物粉碎、制备成固体粉末状菌剂并装入密封的塑料袋中,放置冰箱保鲜层中保藏,取样采用稀释平板测数法检测各样品中扣囊复膜酵母SF31株和马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258酵母的活菌数均达30亿cfu/克;

(4) 混合与包装:将含SF31株的固体菌剂装塑料袋后封口后制成含单一菌种的酿酒菌剂;将马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258与SF31按活菌数比=1:2比例混合后塑料袋后封口制成酿酒菌剂组合物。

9. 权利要求1中所述的保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母在米酒和白酒酿造中的应用。

10. 权利要求3中所述的保藏编号为CCTCC NO:M2021104的扣囊复膜酵母组合物在米酒

和白酒酿造中的应用。

11. 权利要求5中所述的酿酒强化曲在米酒和白酒酿造中的应用。

高蛋白酶活性及高出酒率的扣囊复膜酵母菌、其组合物及应用

[0001] 发明所属领域：

[0002] 本发明属于酿酒领域，具体地说，本发明涉及扣囊复膜酵母菌、含该菌的固态菌剂、及该酵母菌和其组合物在米酒和白酒酿造中的应用。

背景技术：

[0003] 扣囊复膜酵母(*Saccharomycopsis fibuligera*) 又称拟内孢霉，是多种酒曲和酒醅中的主要酵母菌之一(范光森，等.中国食品学报,2018;罗小叶，等.食品与发酵工业,2016;郝文军，等.酿酒科技,2019;李静心，等.食品与发酵工业,2018;唐洁，等.中国酿造,2020)。有研究表明，扣囊复膜酵母在6个品牌黄酒酒药内的分布占有绝对优势，对绍兴黄酒酒药的生产性具有重要作用(臧威，等.菌物学报,2015)。

[0004] 扣囊复膜酵母具有分泌淀粉酶、蛋白酶、 β -葡萄糖苷酶等水解酶的能力，可为酿酒酵母等其他白酒发酵微生物的生长提供营养。扣囊复膜酵母与其他微生物的协同作用，对酒精的生成和白酒风味的形成都具有重要贡献(王居伟，等.白酒发酵过程中常见酵母菌扣囊复膜酵母的研究进展，广西科学,2020年;苏畅，等.食品研究与开发,2018)。孙思佳等(食品与发酵工业,2019)对一株高产淀粉酶扣囊复膜酵母的产酶条件优化及酶学性质研究，经72h固态发酵，淀粉酶活力达到12297u/g，所产淀粉酶能够适应大曲发酵的酸性高温环境，具有应用于高温大曲生产的潜力。周阳子等(食品与发酵工业,2020)从高温大曲中分离得到1株产淀粉酶的扣囊复膜酵母菌株，在液体培养中产酶最高为1452u/mL。该菌产淀粉酶及产酒、产香能力都比较强，在白酒酿造中有很好的应用潜质。

[0005] 氨基酸是白酒中高级醇的主要来源，而高级醇及其派生物是白酒中重要的呈香物质(周恒刚.酿酒科技,1998)。黄酒的质量等级与黄酒中的氨基酸态氮含量成正相关，等级越高的黄酒氨基酸态氮含量越高(黄酒国家标准GB/T13662-2018)。在酿酒业中应用酒用酸性蛋白酶具有溶解发酵原料、促进微生物繁殖、分解蛋白质生成香味物质等多种功能，提高酒的产量和质量(唐胜球，等.酿酒科技,2005)。通过添加一定量的蛋白酶可以改善葡萄酒的稳定性，增加葡萄酒的风味物质，提高葡萄酒的感官特性及营养价值(Ubeda J, et al.FEMS Yeast Research,2014;徐亚男，等.现代食品科技,2015)。

[0006] 有机酸是白酒和米酒的重要香味成分，也是生成酯类的前驱物质。乙酸能使白酒有爽快感(白酒生产技术全书,p769,沈怡方主编,中国轻工业出版社2013)。王春晓等(食品科学,2020)报道了小曲白酒成品曲糖化样品中主要的酸类物质为乳酸和乙酸，其中乙酸的生成与样品中的扣囊复膜酵母有关。吴健等(食品与发酵工业,2020)比较了扣囊复膜酵母、毕赤酵母、酿酒酵母等4种酵母菌在米曲汁培养基中发酵产酸能力，结果表明，扣囊复膜酵母产总酸能力最强，达3.57g/L。

[0007] 扣囊复膜酵母在高粱等基质中发酵可产生多种酯类、内酯类、醇类、有机酸类和醛酮类化合物，对白酒风味的形成具有重要作用(郝文军，等.酿酒科技,2019;黄昊，等.食品与发酵工业,2020)。孙思佳等(酿酒科技,2018)采用微生物强化技术，将扣囊复膜酵母

CICC 33077应用于芝麻香型白酒高温大曲的生产,与对照大曲相比,强化大曲曲块表面“穿衣”较好,曲皮较薄,糖化力和液化力显著增加,强化大曲发酵得到的酒醇甜爽净,优于对照大曲发酵酒样。杨子琳等(广西科技大学学报,2016)将扣囊复膜酵母与酿酒酵母进行混合发酵,与酿酒酵母单菌种发酵相比,糯米酒中总酸和氨基酸态氮含量分别提高了17.3%和19.8%;甲醇、异丁醇、异戊醇的含量显著下降。Chang Su等(Food Research International,2020)采用扣囊复膜酵母和酿酒酵母混合酵母作为川法小曲酒的微生物强化接种剂,结果表明,与传统小曲相比,接种强化菌剂制备的强化曲的糖化酶和酸性蛋白酶活力明显提高,酿造的白酒乙醇和总酯含量分别提高了42.5%and 11.8%,而醛酮和杂环化合物分别下降了73.7%和77.1%。吴健等(中国酿造,2020.)用异常维克汉逊酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)、扣囊复膜酵母(*S.fibuligera*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kudriazevii*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)制备复配酵母,与纯种米根霉菌共培养制备风味米曲,并以市售小曲为对照,对风味米曲进行了质量指标检测与半固态发酵制备米香型白酒验证。结果表明,产香酵母的添加,使得风味米曲的产酯能力与产酸能力明显提升,极大的改善了米香型白酒香气。

[0008] 马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)广泛存在于酸奶、水果、酸乳酒等环境中,是食品安全级酵母(莫文娟等.中国科学:生命科学,2016)。Sha Shankar Prasad等(Frontiers in microbiology,2018)报道了印度的一种传统的酿酒接种剂中同时存在酿酒酵母、扣囊复膜酵母和马克斯克鲁维酵母等多种酵母菌种。马克斯克鲁维酵母具有产乙酸乙酯等多种风味物质的能力(LÖSER C,et al.Applied Microbiology and Biotechnology,2014)。López-alvarez等(Journal of Bioscience and Bioengineering,2012)将马克斯克鲁维酵母应用于龙舌兰酒发酵中,制备出了具有较高乙醇浓度和芳香化合物的龙舌兰酒。刘梦等(食品与发酵工业,2020)报道了马克斯克鲁维酵母与酿酒酵母液态法混合发酵黄酒的风味与特性,混合发酵黄酒样的乙酸乙酯和乙酸含量分别比单一酿酒酵母提高了2.46倍和1.31倍;高级醇(正丙醇、异丁醇、异戊醇和 β -苯乙醇)总量比单一酿酒酵母发酵酒样降低了18.1%。

[0009] 中国专利(CN201810274972.8)报道了一株扣囊复膜孢酵母及其应用,该菌株产 α -淀粉酶活是目前已知最高酶活(7425.4U/g)的2.56倍,同时还具有产生糖化酶、酸性蛋白酶、脂肪酶等7种酶的能力,应用于速腐菌剂可直接快速彻底腐熟酒糟。中国专利(CN201910264999.3)报道了一株产酯酵母ZB406及其应用,筛选分离的扣囊复膜酵母与酿酒酵母的共酵实现酒精发酵与香气物质合成的同步进行,实现液态发酵米醋香气风味的明显提升。中国专利(CN201710539656.4)报道了一种扣囊复膜孢酵母及其在中高温大曲生产中的应用,所述的菌株淀粉酶活力能够达到7425.7U/g。将该菌株制备加工成菌剂,应用于芝麻香型中高温大曲的生产中,强化后的中高温大曲的糖化力和液化力显著高于对照大曲,提高了大曲制备过程中原料的利用率。中国专利(201510636469.9)报道了一种扣囊复膜孢酵母及其用途,该菌株能在酱香型白酒中产异戊醇。中国专利(申请号201910622949.8)报道了一种提高液化法黄酒质量的酿造方法,采用从绍兴黄酒小曲中筛选的扣囊复膜孢酵母与黄酒酵母菌混合培养制备高温糖化酒母,来达到改善黄酒的香气和口感的目的。中国专利(201811299636.5)报道了一种小曲强化剂及其制备和应用。该小曲强化剂是由扣囊复膜孢酵母菌株发酵制备得到的。中国专利(201310250102.4)报道了一株

新的马克斯克鲁维酵母菌,含该菌的酿酒菌剂组合物以及马克斯克鲁维酵母菌和其酿酒菌剂组合物在酒精发酵和白酒酿造中的应用,该菌株具有耐受性好,产酯率高的特点。

[0010] 现有专利的不足之处是报道的扣囊复膜酵母一般出酒率不高,对菌株的产淀粉酶能力报道的较多,而对菌株的产酸、产蛋白酶能力报道较少。杨子琳等(中国酿造,2016)报道了一株扣囊复膜酵母单一菌株3-1Y发酵糯米酒的酒精度为2.6%vol,产总酸含量为 5.04 ± 0.3 (g/L)。王晓丹等(食品科学,2017)从茅台大曲中分离出一株编号为FBKL2.0071扣囊复膜酵母,固态发酵物具有浓郁的果香味,其中以乙酸乙酯、乙酸异戊酯、苯乙醇、乙酸苯乙酯、棕榈酸乙酯含量较高,但该菌株的产酒能力不高,在含小麦和高粱的固态培养基中发酵酒精度小于3.5%。周阳子等(食品与发酵工业,2020)报道的菌株在含小麦、大米和麸皮的液态培养基中发酵产酒精达9.3%,且能产生苯乙醇、乙酸乙酯、辛酸乙酯等37种呈香呈味物质,但未报道关于该菌株产酸及产蛋白酶活性的能力。关于高产酸和高蛋白酶活性的扣囊复膜酵母菌株未见报道,也未见扣囊复膜酵母与马克斯克鲁维酵母混合发酵白酒的报道。米酒和白酒是由酿酒酵母和非酿酒酵母组成的多菌种混合发酵的产物根据。根据已有的研究及专利检索,目前在米酒和白酒酿造行业中尚没有同时兼具高产酒精,高蛋白酶活性、总酸含量及乙酸苯乙酯等风味物质含量均高,并具有耐高温等特性的扣囊复膜酵母及其与马克斯克鲁维酵母菌株复合而成的组合菌剂的应用报道。

[0011] 发明技术内容:

[0012] 本发明的一个目的是提供一种新的扣囊复膜酵母菌株,该菌株发酵产乙醇能力强,蛋白酶活性高,发酵风味独特且适合中高温环境下发酵,在发酵中可提高总酸和氨基酸态氮含量。

[0013] 本发明的另一个目的是提供扣囊复膜酵母的液态发酵特征。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种含扣囊复膜酵母的固态酿酒菌剂。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种含扣囊复膜酵母的固态酿酒菌剂制备方法。

[0016] 本发明的另一个目的是提供扣囊复膜酵母的固态酿酒菌剂在米酒和白酒发酵中的应用。

[0017] 本发明公开了一株新的扣囊复膜酵母菌,其特征在于,扣囊复膜酵母SF31, (*Saccharomycopsis fibuligera* SF31),保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M2021104,保藏日期是2021年1月19日。

[0018] 本发明公开的扣囊复膜酵母SF31株从湖北省某酒厂酒醅中分离经筛选获得。该菌株有如下特征:

[0019] 扣囊复膜酵母SF31在YPD平板上培养2d的菌落形态特征是:呈圆形,白色,表面粗糙且干燥,外边缘整齐。在YPD液体培养基摇床培养30h的显微形态特征是:细胞呈圆形或椭圆形,出芽增殖。

[0020] 扣囊复膜酵母SF31利用碳源的生化特征是:能利用蔗糖、麦芽糖、棉子糖、甘油和纤维二糖等糖类,但不能利用乳糖、木糖和海藻糖。

[0021] 扣囊复膜酵母SF31耐酸能力特征是:扣囊复膜酵母SF31在pH为3.0的YPD培养基中仍生长良好,而标准菌株CGMCC 2.1625生长较差,明显受到抑制。

[0022] 扣囊复膜酵母SF31耐高温生长能力特征是:该菌株在45℃下仍生长良好,SF31菌株在45℃培养的OD600nm值是其标准菌株2.1625的4.17倍。与25℃培养的生长量相比,其相

对生长量达75.6%。

[0023] 对扣囊复膜酵母SF31菌株进行26S rDNA的PCR扩增与测序实验,分析显示:菌株SF31与*Saccharomycopsis fibuligera*CGMCC2.1625的26S rDNA的同源性达到了100%,确定菌株SF31为一种扣囊复膜酵母,,如图1所示。

[0024] 本发明的还公开了扣囊复膜酵母SF31及其微生物菌剂在发酵米酒和白酒中的应用。

[0025] 本发明的还公开了扣囊复膜酵母SF31菌剂组合物在发酵米酒和白酒中的应用。

[0026] 在本发明中采用的参比菌株扣囊复膜酵母CGMCC 2.1625登载于中国普通微生物菌种保藏管理中心目录中,处于公开状态,科学工作者可向该菌种保藏中心索取。马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258为一株专利保藏菌种,在中国专利201310250102.4中已经公开,任何符合条件的研究者可从中国典型培养物保藏中心索取。

[0027] 本发明公开的菌剂为固态或液态。优先的,本发明公开的SF31酵母菌剂为固态。

[0028] 本发明还公开了制备固态菌剂的方法,包括如下步骤:

[0029] (1) 菌种活化:分别接种扣囊复膜酵母SF31株和马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258于灭菌的糖度为12巴林的麦芽汁三角瓶培养基中,28℃摇床培养24小时。

[0030] (2) 固体培养:固体培养的配料是:麸皮68%、玉米粉30%,蔗糖2%,用水润料,蒸煮冷散后,将(1)活化培养的2种酵母菌液分别4-8%比例分别接种后装盒,保持25-35℃发酵温度,培养2天发酵完毕。

[0031] (3) 真空冷冻干燥及粉碎:对发酵后的固体样品在-45℃进行真空冷冻干燥处理,样品含水率低于10%后用万能粉碎机将干燥的培养物粉碎、制备成固体粉末状菌剂并装入密封的塑料袋中,放置冰箱保鲜层中保藏。取样采用稀释平板测数法检测各样品中扣囊复膜酵母SF31株和马克斯克鲁维酵母CCTCCM2013258酵母的活菌数均达30亿cfu/克。

[0032] (4) 混合与包装:将含SF31株的固体菌剂装塑料袋后封口后制成含单一菌种的酿酒菌剂;将马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258与SF31按活菌数比=1:2比例混合后塑料袋后封口制成酿酒菌剂组合物。

[0033] 本发明的优点:

[0034] 本发明提供的扣囊复膜酵母SF31株是一株新的菌株,优点如下:

[0035] 1、该菌株具有很强的耐高温、耐酒精和耐酸生长能力。该菌株在45℃下仍能生长良好,是扣囊复膜酵母标准菌株CGMCC 2.1625相对生物量的4.17倍,与25℃培养温度相比,其相对生长量达到75.6%。SF31菌株可耐受pH为3.0的酸性生长环境,较标准菌株耐酸能力强。

[0036] 2、扣囊复膜酵母SF31株蛋白酶活性高,其蛋白酶活高达565U/mL,是标准菌株CGMCC 2.1625酶活的138.8%;SF31株发酵米酒的氨基酸态氮含量高,比标准菌株高52.1%。

[0037] 3、扣囊复膜酵母SF31株产酒精率高。菌株SF31发酵糯米糖化液的出酒率达9.68%(v/v),比标准菌株CGMCC2.1625高68.1%。固态发酵条件下,SF31组合物出酒率比标准菌株CGMCC 2.1625组合物高19.3%。

[0038] 4、扣囊复膜酵母SF31株产酸、产乙酸苯乙酯风味物质能力强。SF31株液态发酵米酒样的乙酸、总酸分别比标准菌株2.1625提高44.2%和46.3%。SF31产乙酸苯乙酯的含量

达35.23ug/L,比标准菌株2.1625高75.3%。

[0039] 5、组合物发酵的优点:与马克斯克鲁维酵母的组合发酵,组合物液态法发酵米酒的乙醛和总高级醇含量分别比对照低。添加扣囊复膜酵母SF31复合酿酒菌剂的酒样出酒率和乙酸乙酯含量高,总高级醇含量适中,发酵米酒和白酒风味感官好,香味浓。

[0040] 即扣囊复膜酵母SF31株与标准菌株CGMCC2.1625相比具有较高的耐高温和耐酸生长能力、蛋白酶活性高、出酒率高、产酒的风味成分乙酸苯乙酯的能力强,香味突出,并具有乙醛和高级醇含量低的特性,发酵米酒和白酒口感好的特点。

附图说明

[0041] 图1.扣囊复膜酵母SF31株26S rDNA D1/D2区序列系统发育树

具体实施方式

[0042] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应当理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不能限制本发明的保护范围。

[0043] 实施例

[0044] 实施例1扣囊复膜酵母SF31菌株的分离与鉴定

[0045] 1.1扣囊复膜酵母SF31株的分离:从湖北省某酒厂采集发酵基质样品,称取样品10g,加入到90mL已经灭菌的液态酸性YPD培养基中(pH3.0),40℃、180rpm摇床富集培养90h。取出1mL菌悬液进行系列稀释,取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 三个稀释梯度涂布到马丁-孟加拉红培养基上,每个稀释梯度做3个重复,置40℃恒温培养箱中培养40h,观察平板上长出的菌落形态,选取菌落表面粗糙的单菌落,经镜检为酵母菌细胞形态并进一步划线分离纯化保存用于酸性蛋白酶活性测定。将分离自发酵基质样品的21株酵母菌及1株参比酵母菌株经YPD平板活化后,分别接种至100mL、糖度为20%的糯米糖化液三角瓶培养基中,置摇床180rpm/min,30℃培养24h后各取10mL发酵液离心收集各菌株发酵上清液,采用福林试剂方法测定各发酵液的蛋白酶活性,从中筛选出5株蛋白酶活性 ≥ 500 U/mL的酵母菌株(表1)。然后从5株产蛋白酶活性较高的酵母菌中,通过在YPD液体培养基中酒精发酵能力和产风味的比较,最后筛选获得1株出酒率高、具有独特果香风味的酵母菌,菌株编号为SF31株,其在YPD液体培养基中出酒率达7.16%,果香味浓郁(表2)。

[0046] 表1扣囊复膜酵母不同菌株的蛋白酶活检测结果

[0047]	菌株编号	蛋白酶活 (U/mL)	菌株编号	蛋白酶活 (U/mL)
	SF07	554	AF11	514
	SF08	450	AF12	531
	SF09	488	AF13	469

	SF10	359	AF14	420
	SF12	396	AF15	479
	SF13	490	AF16	398
[0048]	SF14	480	AF17	380
	SF25	476	AF18	528
	SF29	408	AF19	430
	SF31	565	AF20	410
	CGMCC 2.1625	407	AF21	395

[0049] 表2扣囊复膜酵母不同菌株发酵糯米糖化液的出酒率和产香能力的比较结果

	菌株编号	出酒率% (v/v)	香气	香气得分
	SF31	7.16	果香味浓郁	9
	SF07	6.82	果香味浓郁	8
[0050]	AF12	6.53	果香味较浓	8
	AF18	5.85	果香味较浓	7
	AF11	5.69	果香味较淡	6
	CGMCC2.1625	5.34	果香味较淡	5

[0051] 本发明人将分离的一株新的扣囊复膜酵母SF31株 (*Saccharomycopsis fibuligera*SF31) 保藏于国家知识产权局指定的保藏机构-中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC NO:M2021104, 保藏日期是2021年1月19日。中国典型培养物保藏中心简称CCTCC, 位于湖北省武汉市武汉大学校内, 邮编430072, 电话:027-68752319, Email:cctcc@whu.edu.cn。

[0052] 1.2扣囊复膜酵母SF31株的鉴定

[0053] 通过形态特征观察、生理生化测定及26S rDNA D1/D2区域基因序列分析结果对SF31进行鉴定。在鉴定中, 选择扣囊复膜酵母标准菌株2.1625作为对照菌株。扣囊复膜酵母标准菌株2.1625为常用普通微生物菌种, 来自中国科学院北京菌种保藏中心, 科学工作者可索取。

[0054] 1.2.1扣囊复膜酵母SF31株形态特征观察

[0055] 扣囊复膜酵母SF31在YPD平板上培养2d的菌落形态特征是: 呈圆形, 白色, 表面粗糙且干燥, 外边缘整齐。在YPD液体培养基摇床培养30h的显微形态特征是: 细胞呈圆形或椭圆形。

[0056] 1.2.2通过26S rDNA D1/D2区域序列分析进行系统发育地位鉴定

[0057] 以酵母菌株的基因组DNA为模板做PCR扩增反应, 扩增酵母菌株26S rDNA D1/D2区域, 扩增酵母26S rDNA正向引物NL1 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG-3'); 反向引物NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC GG-3')。

[0058] 采用50μL反应体系 (25μL Taq DNA聚合酶、22μL三蒸水、1μL正向引物、1μL反向引物、1μL抽提的DNA模板) PCR扩增。PCR循环程序为: 94℃预变性5min; 94℃30s, 55℃30s, 72℃60s, 循环33次; 72℃延伸10min; 16℃保温10min。PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送往武汉吉美生物科技有限公司测序。

[0059] 测序长度500bp左右,测序结果采DNA Star软件进行人工校对。校正以后的序列在NCBI的核酸序列数据库中进行同源序列搜索,比较测试菌株和已知酵母菌株之间的亲缘关系及其系统地位。根据同源序列搜索结果,取与实验菌株亲缘关系最近的模式菌株的D1/D2区序列,用Clustal X校准排齐序列,MEGA5.2软件邻接法,1000次Bootstrap检验构建系统发育树。

[0060] 通过分子测序和同源序列比较后,发现菌株SF31与*Saccharomycopsis fibuligera*的26S rDNA的同源性达到了100%,确定菌株SF31为一种扣囊复膜酵母。图1是根据26S rDNA D1/D2区域序列所做的系统发育树。

[0061] 1.2.3扣囊复膜酵母SF31株对碳源的利用能力测定

[0062] SF31菌株对不同碳源的利用结果见表3。

[0063] 表3扣囊复膜酵母SF31不同碳源的利用结果

[0064]	检测项目	结果	检测项目	结果
	葡萄糖	+	木糖	-
	蔗糖	+	乳糖	-
	麦芽糖	+	纤维二糖	+
	甘油	+	棉子糖	+
	山梨醇	+	海藻糖	-

[0065] 注:“-”为不能利用,“+”为可利用。

[0066] 实施例2扣囊复膜酵母SF31的耐受性比较

[0067] 2.1扣囊复膜酵母SF31与标准菌株及酿酒酵母的耐酸性比较

[0068] 接种经活化的酵母菌斜面菌种于YPD液体培养基,30℃,180rpm,摇床培养24h制备种子液。取培养好的种子液按 1×10^6 个/mL接种到不同pH值(3.0-6.5,采用乳酸调pH)的YPD液体培养基中,30℃,180rpm,摇床培养24h,将菌液稀释一定倍数后紫外分光光度计测菌液OD_{600 nm}吸光度值。结果表明(表4),SF31菌株可耐受的pH为3.0的酸性生长环境,而标准菌株CGMCC 2.1625耐酸能力较差,在pH3.0时生长明显受到抑制。

[0069] 表4两株扣囊复膜酵母和酿酒酵母的耐酸性结果与分析(OD_{600nm}值)

[0070]	pH 值	SF31	CGMCC2.1625
	3.0	0.95	0.71
	3.5	1.10	0.98
	4.0	1.27	1.18
	4.5	1.29	1.20
	5.0	1.48	1.43
	5.5	1.53	1.55
	6.0	1.65	1.32
	6.5	1.43	1.30

[0071] 2.2扣囊复膜酵母SF31耐高温生长能力比较

[0072] 将经活化的三种酵母菌种子液按相同比例接种至YPD液体培养基中,分别在25-45℃不同温度下180rpm摇床培养24h,测定OD₆₀₀值。检测结果见表5,结果表明SF31菌株在45℃

下仍生长良好,具有很强的耐高温性,与25℃培养的生长量相比,45℃下的相对生长量达75.6%。SF31菌株在45℃培养的OD_{600nm}值是标准菌株2.1625的4.17倍。

[0073] 表5二株扣囊复膜酵母不同生长温度下的OD_{600nm}值测定结果

[0074]	不同温度 (℃)	SF31	CGMCC2. 1625
	25	1. 27	1. 18
	30	1. 57	1. 33
	35	1. 36	1. 13
	40	1. 18	0. 68
	45	0. 96	0. 23

[0075] 2.3SF31菌株与标准菌株CGMCC2.1625耐酒精能力比较

[0076] 将菌株SF31和标准菌株CGMCC2.1625的种子液接入含有乙醇浓度(v/v)分别为2%-10%的YPD液体培养基中,置于30℃、170rpm摇瓶培养24h后,测OD₆₀₀值。如表6所示,在添加了6%(v/v)乙醇的培养基中,SF31和CGMCC2.1625均能生长,但SF31的耐受能力强于CGMCC2.1625,SF31的OD₆₀₀值是CGMCC2.1625的159.2%;在添加了8%乙醇的培养基中,SF31的耐受能力仍强于CGMCC2.1625,SF31的OD₆₀₀是CGMCC2.1625的239.3%。

[0077] 表6扣囊复膜酵母SF31株与标准菌株CGMCC2.1625耐酒精生长能力比较(OD₆₀₀)

[0078]	乙醇浓度% (v/v)	SF31	CGMCC2. 1625
	0	1. 62	1. 50
	2	1. 28	1. 32
	4	1. 27	1. 23
	6	1. 21	0. 76
	8	0. 67	0. 28
	10	0. 12	0. 032

[0079] 实施例3扣囊复膜酵母SF31株发酵米酒产酒精、产酸及产乙酸苯乙酯能力比较

[0080] 扣囊复膜酵母SF31株有较高的产乙醇能力。糯米糖化液米酒发酵结果如表7所示,扣囊复膜酵母SF31株发酵乙醇产量高。28℃条件下发酵7天,SF31株发酵糯米糖化液的出酒率达9.68%(v/v),是标准菌株2.1625的1.68倍。发酵米酒的风味组分气相色谱检测结果表明,SF31株产乙酸苯乙酯的含量达35.23ug/L,是标准菌株2.1625的1.75倍,发酵米酒香味突出。SF31株液态发酵米酒样的乙酸、总酸和氨基酸态氮含量分别为569.57mg/L、3.98g/L和0.73g/L,分别为标准菌株2.1625的144.2%、146.3%和152.1%。表明扣囊复膜酵母SF31在米酒发酵应用中更具有优势。

[0081] 表7不同酵母菌株液态发酵米酒的气相色谱及米酒样品理化指标分析结果

组分	SF31	CGMCC2.1625	比标准菌株提高%
乙醇 (% vol)	9.68	5.76	68.1
正丙醇 (mg/L)	19.15	22.59	-15.2
异丁醇 (mg/L)	14.12	17.51	-19.4
异戊醇 (mg/L)	22.78	28.35	-19.6
[0082] 乙酸乙酯 (mg/L)	16.81	13.74	22.3
乙酸苯乙酯 (ug/L)	35.23	20.10	75.3
乙酸 (mg/L)	569.57	394.98	44.2
总酸 (g/L)	3.98	2.72	46.3
氨基酸态氮 (g/L)	0.73	0.48	52.1

[0083] 实施例4扣囊复膜酵母SF31酿酒菌剂及其组合物的制备方法

[0084] 按照如下步骤进行：

[0085] 4.1菌种活化：分别接种扣囊复膜酵母SF31株和马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258于灭菌的糖度为12巴林的麦芽汁三角瓶培养基中，28℃摇床培养24小时。

[0086] 4.2固体培养：固体培养的配料是：麸皮68%、玉米粉30%，蔗糖2%，用水润料，蒸煮冷散后，将(1)活化培养的2种酵母菌液分别4-8%比例分别接种后装盒，保持25-35℃发酵温度，培养2天发酵完毕。

[0087] 4.3真空冷冻干燥及粉碎：对发酵后的固体样品在-45℃进行真空冷冻干燥处理，样品含水率低于10%后用万能粉碎机将干燥的培养物粉碎、制备成固体粉末状菌剂并装入密封的塑料袋中，放置冰箱保鲜层中保藏。取样采用稀释平板测数法检测各样品中扣囊复膜酵母SF31株和马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258酵母的活菌数均达30亿cfu/克。

[0088] 4.4混合与包装：将含SF31株的固体菌剂装塑料袋后封口后制成含单一菌种的酿酒菌剂；将马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258与SF31按活菌数比=1:2比例混合后塑料袋后封口制成酿酒菌剂组合物。

[0089] 实施例5扣囊复膜酵母SF31酿酒菌剂在液态法米酒中的应用

[0090] 将马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258与扣囊复膜酵母SF31酿酒菌剂分别按1:0、2:1、1:1、1:2和0:1的菌数比混合接种糯米糖化液进行液态法米酒发酵。发酵结束后对发酵酒样进行气相色谱分析，结果见表8。从表中可以看出，当马克斯克鲁维酵母CCTCC M2013258与扣囊复膜酵母SF31菌数按1:2混合发酵时，发酵酒样中乙醇、乙酸乙酯、乙酸苯乙酯、乙酸等含量较高，风味物质含量比例协调，感官评分最高。表明在马克斯克鲁维酵母中添加一定比例的扣囊复膜酵母SF31酿酒菌剂后，其产生的蛋白酶能将蛋白质水解成氨基酸，能促进酵母发酵，对于提高米酒出酒率及风味物质含量具有明显的促进作用，酒样的总高级醇含量适中，口感好。

[0091] 表8 M2013258与SF31按不同比例混合发酵米酒的风味物质及理化指标分析与感官评价结果

[0092]	M2013258:SF31					
	1:0	2:1	1:1	1:2	0:1	
	酒精度（% vol）	8.15	8.22	8.45	8.97	9.68
	正丙醇(mg/L)	14.23	15.56	16.49	17.10	19.15
	异丁醇(mg/L)	35.17	28.33	26.25	20.93	14.12
	异戊醇(mg/L)	58.98	50.29	45.38	35.26	22.78
	乙酸乙酯(mg/L)	298.68	207.39	164.34	135.62	16.81
	乙酸苯乙酯（ug/L）	20.30	25.32	28.79	32.50	35.23
	乙酸(mg/L)	278.68	382.78	473.16	505.59	569.57
	总酸（g/L）	3.39	3.55	3.64	3.80	3.98
氨基酸态氮（%）	0.28	0.46	0.53	0.61	0.73	
感官评分	8.0	9.0	9.5	10.0	9.0	

[0093] 实施例6SF31酿酒组合菌剂在提高白酒出酒率和酒品质量中的应用6.1试验方法

[0094] 将某白酒企业酿酒车间蒸馏后的酒醅摊凉后按照250kg/组分堆,对照组接种传统酒曲比例为投料量的6%,两个实验组接种传统酒曲比例均为投料量的3%(减少酒曲用量50%),同时分别加入实施例6制备的SF31酿酒菌剂组合物(SF31组)和用扣囊复膜酵母标准菌株替代SF31的CGMCC2.1625酿酒菌剂组合物(CG MCC2.1625组),接种比例均为投料量的0.3%(体积百分比),替代50%的传统酒曲。接种后入池发酵30d,取样蒸馏。每个处理三个平行样。对蒸馏的样品中的醇类、酸类、酯类等成分含量进行气相色谱分析。主要仪器:气相色谱分析仪。

[0095] 6.2酒质色谱分析及感官品评

[0096] 由表9可以看出:含SF31酿酒菌剂组组合物的实验组酒醅中酒精度可达6.8%,比CGMCC2.1625组提高了19.3%。SF31组中正丙醇、异丁醇、异戊醇含量分别较CGMCC2.1625组降低了10.9%、8.7%和18.5%。乙酸乙酯和乙酸苯乙酯含量分别提高了7.6%和47.2%,总酸和总酯分别提高了17.5%和8.4%,对降低原酒中高级醇含量、提高原酒的风味和改善口感作用明显。表明酒醅中添加含SF31酿酒菌剂组合物对于提高原酒出酒率和酒品质量有明显的促进作用,并可减少酒曲用量50%。

[0097] 表9发酵酒醅蒸馏酒样中各成分气相色谱分析结果

	传统曲对照组	CGMCC2.1625 组	SF31 组	比 CGMCC2.1625 组提高%	
[0098]	乙醇 (%)	5.6	5.7	6.8	19.3
	正丙醇(mg/L)	16.8	16.3	14.7	-10.9
	异丁醇(mg/L)	37.1	33.9	31.2	-8.7
	异戊醇(mg/L)	62.4	60.1	50.7	-18.5
	乙酸乙酯(mg/L)	805.2	1120.7	1205.6	7.6
	乙酸苯乙酯 (ug/L)	12.5	19.3	28.4	47.2
	总酸 (g/L)	2.06	2.40	2.82	17.5
	总酯 (g/L)	1.67	2.26	2.45	8.4

[0099] 感官品评对比为:对照组酒样分数在85-90,评语是绵甜较醇厚、香味较淡、入口刺

激味较重;CGMCC2.234组酒样分数在90-95,评语为绵甜较醇厚、香味较浓、酒体较醇厚;SF31组酒样分数在95-100,评语为绵甜醇厚、香味浓郁谐调、酒体丰满。表明传统酒曲中配合使用扣囊复膜酵母SF31菌剂可以明显改善酒质,总酸、总酯和乙酸苯乙酯等白酒的主要香味成分含量有明显增加,使酒中的香气更加协调,口感更佳。

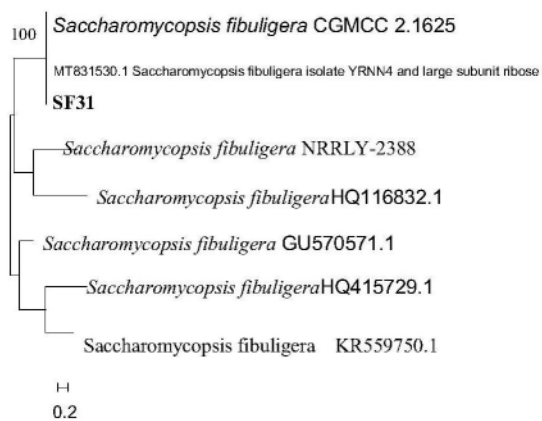


图1