

文章编号 :1009-038X(2000)04-0345-04

# 猕猴桃汁中产香酵母的分离、鉴定及生长特性

李剑芳, 张灏, 厉凡

(无锡轻工大学食品学院, 江苏无锡 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-36, 经鉴定为膜醭假丝酵母 *Candida pelliculosa*。研究了该菌在麦芽汁中的生长特性, 发现其最适生长温度为 32 ℃, 最低和最高生长温度分别为 9 ℃ 和 41.5 ℃, 最适生长 pH 为 5.4, 最低和最高生长 pH 分别为 2.0 和 12.0。

**关键词:**膜醭假丝酵母; 猕猴桃汁; 分离; 鉴定; 生长特性

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

## Isolation, Identification and Growth Characteristics of the Aroma-producing Yeast in Kiwifruit Juice

LI Jian-fang, ZHANG Hao, LI Fan

(School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

**Abstract:** A strain of E-36 was isolated from the natural fermented kiwifruit juice. It was further identified as *Candida pelliculosa*. The growth characteristics of *C. pelliculosa* E-36 in malt extract were studied. The optimum growth temperature was 32 ℃, while the minimum and maximum growth temperatures were 9 ℃ and 41.5 ℃ respectively. The optimum growth pH value was 5.4, while the minimum and maximum growth pH values were 2.0 and 12.0 respectively.

**Key words:** *C. pelliculosa*; kiwifruit juice; isolation; identification; growth characteristics

近年来,随着人们营养保健意识的增强,猕猴桃这种极富营养,且具有一定的防癌和医疗保健效果的新型水果倍受消费者青睐。除鲜食外,国内外市场相继推出一系列加工产品,如果片罐头、果酱、果酒、果汁、果脯蜜饯、果冻、冰淇淋、果茶以及速溶茶粉<sup>[1]</sup>等。目前市场上猕猴桃的加工产品以果汁为主,有澄清汁、浓缩汁、果汁饮料及果肉饮料等品种。与苹果汁、柑桔汁、菠萝汁等相比,猕猴桃汁酸度大、风味平淡,有时甚至有“卡喉”感及“干草”味<sup>[2]</sup>。为此,本课题组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-36,并对

其进行了菌种鉴定和主要生长特性的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

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) 麦芽汁培养基(10 °Bx) : 参见文献[3]。

2) 生孢子培养基 : 参见文献[3,4]。包括麦氏培养基,石膏块,酵母膏麦芽汁琼脂,玉米粉琼脂,麦芽汁琼脂和醋酸钠琼脂。

收稿日期: 1999-11-23; 修订日期: 2000-04-07。

作者简介: 李剑芳(1965-),女,江苏无锡人,工学硕士,讲师。

万方数据

3)其他菌种鉴定培养基:见文献[3,5].

## 1.2 实验方法

1.2.1 猕猴桃汁的制备 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质量分数为9%→分装.整个过程均在半无菌条件下进行.

1.2.2 酵母菌的分离筛选 将上述制得的猕猴桃汁分装于250 mL的无菌四旋瓶中,分别于15~20℃进行15 d和30 d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2~3 d.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<sup>[8]</sup>和猕猴桃汁中,28℃培养3 d.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 将酵母菌由斜面接入液体麦芽汁试管活化,将活化菌以2%接种量接入装有30 mL麦芽汁的三角瓶中,置于回转式摇瓶柜中,以115 r/min于30℃振荡培养20 h.

1.2.4 酵母菌的鉴定 按照文献[3,5]所介绍的鉴定程序和鉴定方法,对试验菌株在个体形态、培养特征和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 将酵母菌种子液接入10°Bx麦芽汁中,分别于22~36℃恒温培养10 h,于660 nm测定培养液光密度值(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 将酵母菌种子液接入10°Bx麦芽汁中,分别于低温和高温培养7 d,观察有无菌落生长.

1.2.7 最适生长pH值测定 将酵母菌种子液接入不同pH值麦芽汁中,于最适生长温度恒温培养10 h,在660 nm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 将酵母菌种子液分别接入低pH和高pH麦芽汁中,于最适生长温度培养7 d,观察有无菌落生长.

1.2.9 生长曲线测定 将酵母菌种子液以2%接入pH为5.4的麦芽汁中,在最适生长温度下,以115 r/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,分离到20株酵母菌株.将各菌接入产酯

培养基和猕猴桃汁中,经28℃培养3 d,选出一株在产酯培养基中产生浓郁的水果甜香味、在猕猴桃汁发酵过程中产生淡的甜味、微弱的醇味和柔和的花香果香味的优良菌株,编号为E-36.

### 2.2 E-36菌种的鉴定

2.2.1 细胞形态 E-36麦汁培养液经涂片、染色、镜检,其菌体为卵圆形和腊肠形,大小为(3.4~5.16)×(6.0~12.6)μm,多边出芽,有时繁殖的细胞相连形成小的菌株群,见图1.

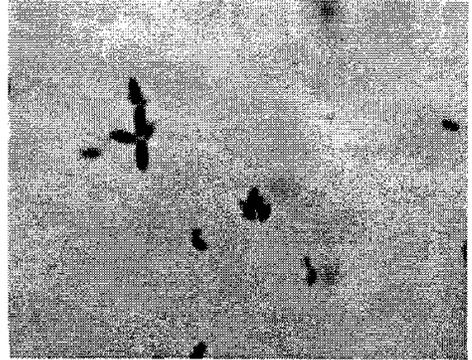


图1 菌株E-36的菌体形态(400×)

Fig.1 Cell morphology of E-36(400×)

2.2.2 培养特征 E-36在麦芽汁琼脂培养基上,菌落大小为6~7 mm,正面不规则,侧面为折皱凸面,边缘丝状,白色,干燥,无光泽,不透明,有弱的香味产生,其菌落形态见图2.在马铃薯琼脂培养基上,有发达的假菌丝形成,其形态见图3.在麦芽汁液体培养基中静止培养时,有厚且呈皱褶状的菌膜,有沉淀,菌液混浊,产气明显.在多种生孢子培养基上,均无子囊孢子产生.

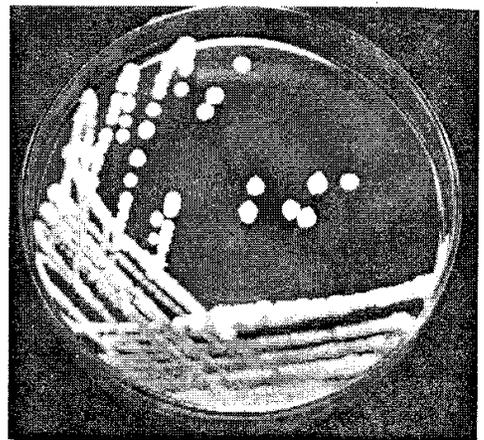


图2 菌株E-36在麦芽汁琼脂上的菌落形态

Fig.2 Colonial morphology of E-36 on malt agar

2.2.3 生理生化特征 菌株E-36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.

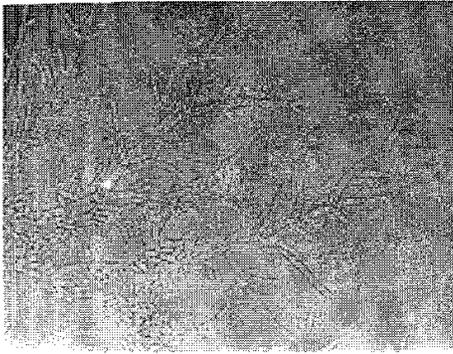


图 3 菌株 E-36 在马铃薯琼脂上的假菌丝形态(40×)

Fig.3 Pseudohyphae of E-36 on potato agar(40×)

表 1 菌株 E-36 的糖类发酵结果

Tab.1 Sugar fermentation test by E-36

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-36 对碳源的同化

Tab.2 Assimilation of carbon compounds by E-36

碳源	结果	碳源	结果	碳源	结果
葡萄糖	+	可溶性淀粉	w	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	+
蜜二糖	-	阿东醇	-	α-甲基-D-葡萄糖苷	w
棉子糖	+	卫矛醇	-	松三糖	w
菊糖	-	D-甘露醇	+	半乳糖	-
核糖醇	-	乙醇	w	2-酮葡萄糖酸	-

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“w”表示微弱。

表 3 菌株 E-36 部分生理试验结果

Tab.3 Other physiological characters of E-36

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

注：“+”表示发酵；“-”表示不发酵。

根据以上各项实验结果,对照 Kreger-van Rij 资料<sup>[3]</sup>及《真菌鉴定手册》,菌株 E-36 鉴定为膜醭假丝酵母 *Candida pelliculosa*, 是汉逊酵母属异常

汉逊酵母 *Hansenula anomala* 的无性世代。

据文献[3,6,7],*H. anomala*(同 *C. pelliculosa*) 在葡萄和果汁中多见,与柠檬形克勒克氏酵母 *Kloeckera apiculata* 一起在果汁发酵早期大量生长,对酒尤其是葡萄酒有明显的增香作用。此外,该菌亦存在于大曲、酱菜、酱油等发酵品中,常用于白酒、酱油、食醋、酱菜等的风味改善,至今尚未见到对人体有任何危害作用的报道。

### 2.3 *C. pelliculosa* E-36 的生长特性

为了比较全面地了解 *C. pelliculosa* E-36 的生长特性,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 *C. pelliculosa* E-36 在麦芽汁中的生长温度曲线见图 4。可以看出,该菌的最适生长温度为 32℃,比一般酵母最适生长温度(25~28℃)高 5~7℃。在 30℃和 34℃培养时,其光密度值分别为 32℃光密度值的 89%和 85%。随着温度进一步变化,OD 值明显减小。由此可见,该菌株的最适生长温度范围为 30~34℃。

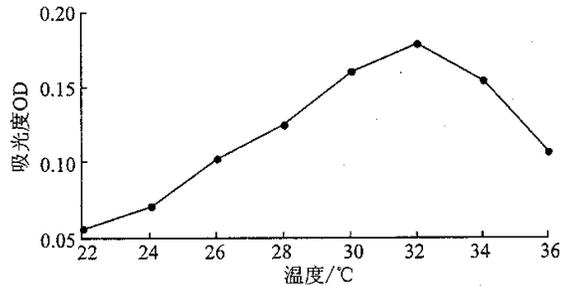


图 4 *C. pelliculosa* E-36 的生长温度曲线

Fig.4 The growth temperature curve of *C. pelliculosa* E-36

2.3.2 最低和最高生长温度 *C. pelliculosa* E-36 在麦芽汁液体培养基中于 6~10℃低温和 40~43℃的高温培养 7 d,结果见表 4。可见,*C. pelliculosa* E-36 的最低生长温度为 9℃,最高生长温度为 41.5℃。该菌生长温度范围宽,有利于生产应用。

表 4 *C. pelliculosa* E-36 的最低、最高生长温度

Tab.4 The minimum and maximum growth temperatures of *C. pelliculosa* E-36

温度/℃	生长状态	温度/℃	生长状态
6	-	40	++
7	-	41	+
8	-	41.5	±
9	+	42	-
10	+	43	-

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

2.3.3 最适生长 pH 值 *C. pelliculosa* E-36 于不

同 pH 值麦芽汁中 32 ℃ 培养,其生长曲线见图 5. 可见其生长最适 pH 在 4~6 之间.

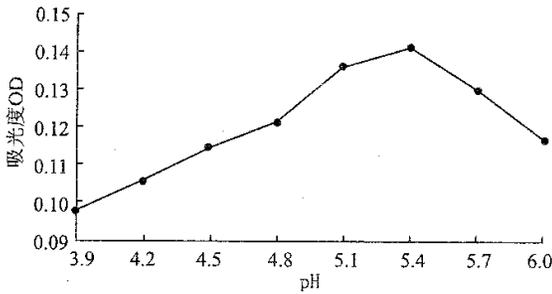


图 5 *C. pelliculosa* E-36 的生长 pH 曲线

Fig. 5 The growth pH curve of *C. pelliculosa* E-36

2.3.4 最低和最高生长 pH 值 *C. pelliculosa* E-36 在 pH 为 1.8~2.5 的麦芽汁和 pH 为 11.5~13.0 的麦芽汁中的生长特性见表 5.

表 5 *C. pelliculosa* E-36 的最低、最高生长 pH

Tab. 5 The minimum and maximum growth pH values of *C. Pelliculosa* E-36

温度	生长状态	温度	生长状态
1.8	-	11.5	++
2.0	±	12.0	±
2.2	+	12.5	-
2.5	+++	13.0	-

注:“+++”表示生长很好;“++”表示生长良好;“+”表示生长较差;“±”表示生长很少;“-”表示无生长.

*C. pelliculosa* E-36 在麦芽汁中的最低生长 pH 值为 2.0,最高生长 pH 值为 12.0. 其生长 pH 范围相当宽,而且对高酸性环境有很强的忍耐力,因而适用于果汁,尤其是高酸性果汁如猕猴桃汁和山楂汁的发酵生产.

2.3.5 *C. pelliculosa* E-36 的生长曲线 *C. pelliculosa* E-36 在麦芽汁中于 32 ℃ 纯培养时的生长规律见图 6.

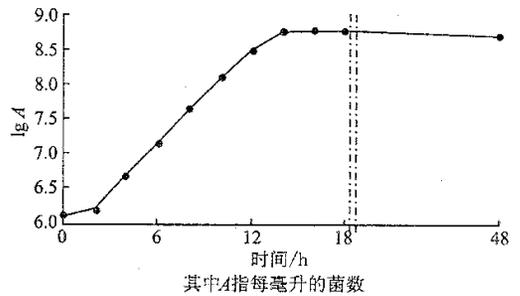


图 6 *C. pelliculosa* E-36 在麦芽汁中的生长曲线

Fig. 6 The growth curve of *C. pelliculosa* E-36 in malt extract

由曲线可以看出,*C. pelliculosa* E-36 在 2 h 后菌量以指数级增加,生长速率常数为 0.70,到 14 h 时菌量达到稳定期(约为  $5.8 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ),并在较长时间内(约 34 h)菌量基本维持稳定.

由 *C. pelliculosa* E-36 生长特性可知,由麦芽汁制备种子发酵液时,控制培养基 pH 为 5.4 左右,发酵温度为 30~32 ℃,摇瓶培养 14~16 h 便可达最大生物量.

### 3 结 语

膜醭假丝酵母 *C. pelliculosa* (同 *H. anomala*) 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,能产生多种芳香物质.目前多用于固态白酒、串香白酒、固态酱油和酱菜等的风味改善,但在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.本研究分离到的产香酵母 *C. pelliculosa* E-36 具有很强的耐酸能力,可用于猕猴桃汁的品质改善,为酸性果汁风味的改善提供了一条新的途径.

### 参考文献

- [1] GRUBNER K. Instant powder for making Kiwi tea [P]. 欧洲专利:EP 0151662A1, 1985-08-21.
- [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 [J]. *J Sci Food Agric*, 1992, 58(4): 519~522.
- [3] KREGGER-VAN RIJ N J W. The yeasts: a taxonomic study [M]. The Netherlands: Elsevier Science Publish, 1984.
- [4] 王金盛, 高东. 酿酒酵母子囊孢子形成条件的探讨 [J]. *中国调味品*, 1990(7): 57~60.
- [5] 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 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [6] HEARD G M, FLEET G H. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice [J]. *J Appl Bacteriol*, 1988, 65: 23~28.
- [7] 施安辉. 产酯酵母 8 号菌株的分离、鉴定、代谢产物分析及应用 [J]. *中国酿造*, 1988(1): 25~31.