

醋酸铅试纸法在低产 H₂S 酿酒酵母筛选中的应用

韩 娜,刘延琳,刘爱国,王泽举
(西北农林科技大学 葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨醋酸铅试纸法筛选低产硫化氢(H₂S)酿酒酵母的可行性。【方法】在模拟汁培养基发酵条件下,以采自新疆鄯善地区酿酒葡萄自然发酵液中的 10 株野生型酿酒酵母(M1,M2,⋯,M10)为对象,采用醋酸铅试纸法对其中的低产 H₂S 酵母进行了初筛和复筛。【结果】经醋酸铅试纸初筛后,菌株 M2、M3、M6 属于低产 H₂S 的菌株,而 M1、M8、M10 属于高产 H₂S 的菌株。复筛结果显示,菌株 M2、M3、M6 的硫化氢生成量较低,均为 12 μg/L;菌株 M10 的 H₂S 生成量最高,为 1 920 μg/L。模拟发酵试验表明,有 8 株野生型酿酒酵母(M7 和 M9 除外)发酵正常,具备良好的发酵能力,酒精度都在 10%(体积分数)以上。【结论】醋酸铅试纸法可用于低产 H₂S 酿酒酵母的筛选,该法具有结果稳定,方法简便,成本低廉,操作简单等优点,有一定的推广价值。菌株 M2、M3 和 M6 皆为低产 H₂S 酿酒酵母,且其发酵能力适合工业发酵要求。

【关键词】 醋酸铅试纸法;酿酒酵母;低产硫化氢
【中图分类号】 TS261.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)01-0225-04

Application of lead acetate test paper in the screen of
low-H₂S-producing yeast strains

HAN Na,LIU Yan-lin,LIU Ai-guo,WANG Ze-ju
(College of Enology,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The feasibility of the lead acetate test paper in screening of low-yield H₂S yeast strains was studied. 【Method】 With 10 wild *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains,separated from Shanshan,Xinjiang province,as subject,low-yield H₂S yeast strains were screened twice in the fermented simulated juice with the method of lead acetate test paper. 【Result】 The results showed that M2,M3,M6 were low-yield H₂S strains,M1,M8,M10 high-yield H₂S strains. Among them,M2,M3,M6 produced H₂S 12 μg/L;M10 could produce the highest content of H₂S by 1920 μg/L. With higher ethanol-production ability (all above 10%) 8 wild yeast strains (except M7 and M9) showed superior characters in the fermentation experiment. 【Conclusion】 The method of lead acetate test paper is convenient,low-cost,stable,and has high value for expansion and application in the screen of low-yield H₂S yeast strains. With the method,the three yeast strains suitable for industrial fermentation of M2,M3,M6 were screened as low-yield H₂S strains.

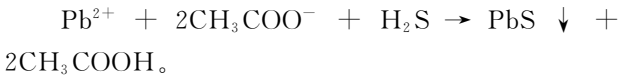
Key words: Lead acetate test paper;*Saccharomyces cerevisiae*;low-producing H₂S

葡萄酒发酵过程中会产生痕量的挥发性含硫化氢(H₂S)。当葡萄酒中的 H₂S 含量达 0.12~0.37 mg/L 时,在品尝时就能感觉到其不良的气味^[1],当 H₂S 含量高于 0.7 mg/L(以 H₂SO₄ 计)时,则往往具有明显的还原味。H₂S 与醇类物质结合可形成硫

* 【收稿日期】 2008-03-03
【基金项目】 国家“863”计划项目(2007AA10Z314);西北农林科技大学人才支持计划项目(01140301)
【作者简介】 韩 娜(1982—),女,北京人,在读硕士,主要从事酿酒微生物研究。
【通信作者】 刘延琳(1966—),女,陕西富县人,教授,博士生导师,主要从事葡萄酒与酿酒微生物研究。
E-mail:lylsun@yahoo.com.cn

醇,低级硫醇有毒,有害健康,破坏酒的风味,给人以不愉快的感觉。在啤酒的生产过程中也存在同样的问题^[2],当啤酒中 H₂S 的含量超过 10 μg/L 时,就能感到明显的“酵母臭味”^[3-4]。H₂S 不仅本身对酒的风味产生影响,而且还是其他挥发性含硫化合物形成的关键物质^[5]。

有研究显示,应用低产硫化氢的酿酒酵母可以减少酒中 H₂S 的含量^[6-8]。目前在筛选低产 H₂S 酵母菌株时,一般采用蛋氨酸平板法和醋酸铅平板法。尹吉泰等^[9-10]分别利用醋酸铅平板法和蛋氨酸抗性平板法对低产 H₂S 菌株进行筛选,最终各得 1 株低产 H₂S 的突变菌株。陈叶福等^[4]采用醋酸铅平板法和发酵试验相结合的方法,筛选出 1 株低产 H₂S 的啤酒酵母突变菌株。但这 2 种方法均有一定的缺陷,蛋氨酸平板法在筛选过程中需要多步筛选,所用试剂昂贵;醋酸铅平板法在筛选过程中显色不明显,不利于对结果的判断。而且,这 2 种方法都只能进行定性检测,若需检测 H₂S 生成量则要结合亚甲基兰分光光度法,过程复杂,操作繁琐。目前,在检测天然气^[11]、污水^[12]和环境空气^[13]中的 H₂S 时常采用醋酸铅试纸法,该方法可将定性和定量检测一次完成。硫化氢醋酸铅试纸检测法的化学反应原理是,硫化氢与试纸上的醋酸铅发生变色反应,硫化氢的生成量越多,变色越深,其化学反应式为:



目前,尚未见将醋酸铅试纸检测法用于葡萄酒发酵中 H₂S 检测的报道。为此,本试验利用醋酸铅试纸法对低产 H₂S 酿酒酵母进行了筛选,以期为低产 H₂S 酿酒酵母的选择提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株 自新疆鄯善地区酿酒葡萄自然发酵液中采集酿酒酵母 200 株,用醋酸铅试纸法初步筛选后,挑出 10 株具有代表性的酿酒酵母冷冻备用。此 10 株酿酒酵母的编号分别为:A711、N518、N525、N507、P515、N520、P523、A729、G832、E1217。为方便叙述,文中用 M1~M10 依次重新编

号。

1.1.2 培养基 (1)模拟汁培养基。参考文献[14]的方法配制。(2)YPD 液体培养基。葡萄糖 20 g/L+蛋白胨 20 g/L+酵母浸粉 10 g/L,121 ℃灭菌 20 min。

1.1.3 检测用醋酸铅试纸的制备 (1)检测试纸(初筛用)。将滤纸裁成 1.3 cm×8 cm 的纸条,折成 3 折,在中心滴上 2~3 滴质量分数为 0.3%的醋酸铅溶液,自然温度下干燥,备用。(2)检测试纸管(复筛用)。将滤纸裁成 1.5 cm×10 cm 的纸条,用 200 μL 质量分数为 0.3%的醋酸铅溶液将其浸湿,在室温下干燥后卷成纸卷插入塑料管中,备用。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母菌的活化 将冻存的菌液接种到 YPD 液体培养基中,于 28 ℃活化培养 24 h。

1.2.2 低产 H₂S 酿酒酵母的初筛 将模拟汁培养基过滤除菌后分装至试管,每管 5 mL。取活化好的菌液 50 μL 接种到盛有模拟汁培养基的试管中,将干燥的醋酸铅试纸插在试管口,28 ℃、120 r/m 摇床培养 4 d 后,观察试纸显色情况并进行分类、记录。每菌株做 2 个重复。

1.2.3 低产 H₂S 酿酒酵母的复筛 将模拟汁培养基过滤除菌后分装于 100 mL 三角瓶中,每瓶 90 mL。取活化好的初步筛选的 10 菌株菌液 150 μL 接种到模拟汁培养基中,加盖装有干燥醋酸铅试纸管的瓶塞密封,28 ℃、120 r/m 摇床培养。每 12 h 取三角瓶称质量 1 次,记录发酵过程中损失 CO₂ 的质量,并测量醋酸铅试纸管的显色长度,计算 H₂S 生成量。本试验中醋酸铅试纸管每显色 1 mm 表示 H₂S 的生成量为 12 μg/L。每菌株做 3 个重复。

1.2.4 模拟酒理化指标的检测 将复筛发酵模拟酒的 3 个重复混合后,检测其酒度及残糖和挥发酸含量,检测方法参照 GB/T15038 进行。

2 结果与分析

2.1 低产 H₂S 酿酒酵母的初步筛选

低产 H₂S 酿酒酵母醋酸铅试纸法初步筛选结果见表 1。

表 1 低产 H₂S 酿酒酵母醋酸铅试纸法初步筛选结果
Table 1 Color change of lead acetate test paper in pre-selection

项目 Item	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
重复 1 Repeat 1	棕黑色 Black	近无色 White	近无色 White	棕黄色 Tan	棕黄色 Tan	近无色 White	微黄色 Yellowish	棕黑色 Black	微黄色 Yellowish	棕黑色 Black
重复 2 Repeat 2	棕黑色 Black	近无色 White	近无色 White	棕黄色 Tan	棕黄色 Tan	微黄色 Yellowish	微黄色 Yellowish	棕黑色 Black	微黄色 Yellowish	棕黑色 Black

由表 1 可知,菌株 M1、M8、M10 的醋酸铅试纸显棕黑色,颜色最深;其次为 M4、M5;再次为 M7、M9; M2、M3、M6 的颜色最浅,试纸几乎不显色。说明 M2、M3、M6 菌株产 H₂S 量最低,属于低产 H₂S 的菌株,而 M1、M8、M10 的 H₂S 生成量最高,属高产 H₂S 菌株。

2.2 低产 H₂S 酿酒酵母的复筛

从图 1 可以看出,菌株 M2、M3、M6 的 H₂S 生成量均为 12 μg/L,生成量最低;M10 的 H₂S 生成量最高,为 1 920 μg/L;M1 和 M8 的 H₂S 生成量分别为 1 520 和 1 120 μg/L。

从图 2 可以看出,10 株酵母菌发酵正常,具有良好的发酵性能。酵母菌从接种后的第 24 h 开始,进入发酵旺盛期,CO₂ 平均日失重可达 20~35

g/L,从第 96 h 开始进入发酵迟缓期,至第 156 h 后 CO₂ 平均日失重已降至 5 g/L 以下。当日 CO₂ 失重减小到 0.2 g/L 以下时,判定发酵结束。

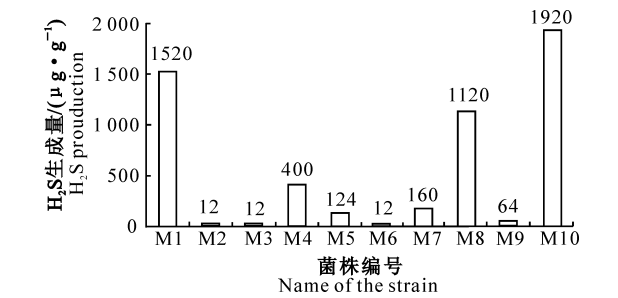


图 1 低产 H₂S 酿酒酵母醋酸铅试纸法复筛结果
Fig. 1 Hydrogen Sulfide Production

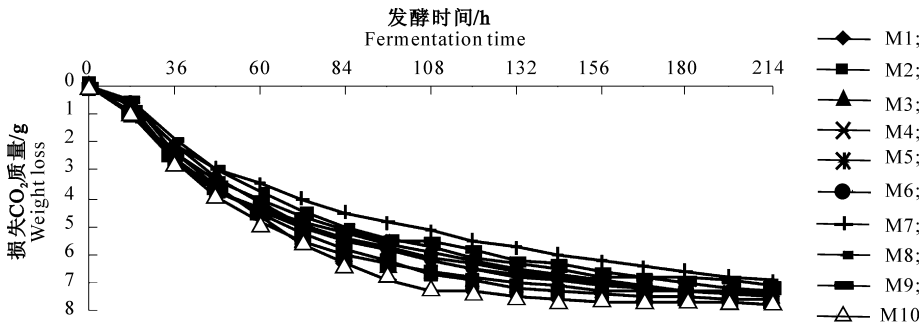


图 2 酵母发酵过程中 CO₂ 的失重图
Fig. 2 Weight loss of CO₂ in fermentation

从图 3 可以看出,M1 接种 24 h 后,可以明显看到试纸管的显色反应,36 h 时就可以清楚的测量试纸管的显色长度,从而计算 H₂S 的生成量;H₂S 最大 12 h 生成量出现在 36~48 h;而 96 h 后只有很少量的 H₂S 生成。从图 4 中可以看出,M8 接种 24 h 后也可以明显看到试纸管的显色反应;在 24~36 h 内出现 H₂S 最大 12 h 生成量,之后 H₂S 的生成量

逐渐减小,96 h 后只有少量 H₂S 生成。由图 2~4 可知,酵母菌株的发酵能力从第 24 h 后开始进入旺盛期,一般在 36 h 时 CO₂ 损失质量最大;96 h 后进入迟缓期,发酵速率明显降低。这说明同一菌株在不同发酵过程中若发酵速度缓慢,则 H₂S 的生成量较少;相反,若发酵速度快,则 H₂S 生成量增加。表明 H₂S 的生成量与发酵速率的快慢呈正相关。

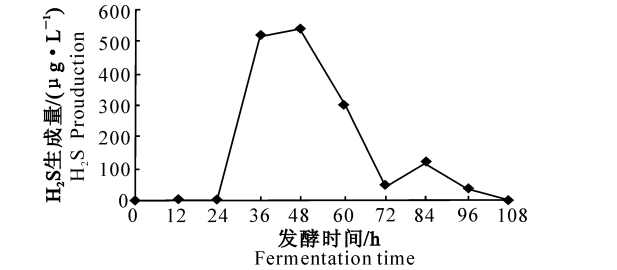


图 3 M1 菌株发酵过程中 H₂S 生成量的变化
Fig. 3 M1 Hydrogen Sulfide Production

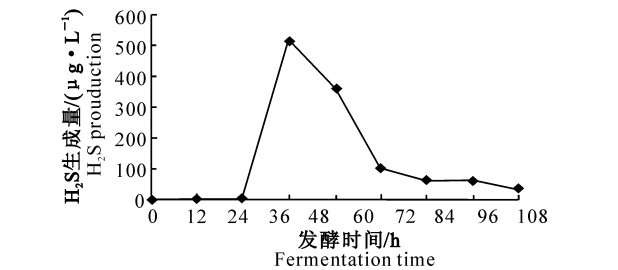


图 4 M8 菌株发酵过程中 H₂S 生成量的变化
Fig. 4 M8 Hydrogen Sulfide Production

2.3 模拟酒理化指标的检测

从表 2 可以看出,除菌株 M7 和 M9 外,其他所有菌株均可以充分发酵模拟汁中的糖,使之转化为

酒精,酒精度均在 10%(体积分数)以上,残糖含量均小于 4 g/L,挥发酸含量均小于 0.6 g/L(以乙酸计),符合工业发酵的要求。

表 2 模拟酒理化指标检测结果

Table 2 Physical and chemical parameters of simulation wines

菌株编号 Name of the strain	酒精度/% Ethanol	残糖/(g·L ⁻¹) Residual sugar	挥发酸/(g·L ⁻¹) (以乙酸计) Volatile acidity	菌株编号 Name of the strain	酒精度/% Ethanol	残糖/(g·L ⁻¹) Residual sugar	挥发酸/(g·L ⁻¹) (以乙酸计) Volatile acidity
M1	10.8	1.47	0.426	M6	10.1	2.15	0.364
M2	10.9	1.27	0.273	M7	8.4	11.57	0.264
M3	10.3	1.35	0.264	M8	10.8	3.65	0.425
M4	10.9	2.11	0.348	M9	9.8	7.7	0.576
M5	10.8	1.60	0.255	M10	11.0	1.92	0.366

3 讨 论

醋酸铅试纸法与目前常用的蛋氨酸平板法和醋酸铅平板法相比,具有省工、试验周期短、对试验条件要求低等优点。从本试验研究结果可以看出,醋酸铅试纸法可以用于低产 H₂S 酿酒酵母的筛选。酵母经过此法筛选后,以复筛模拟酒的理化指标为依据,判断酵母菌株的发酵性能,简化了酵母筛选的步骤。此外,通过改变醋酸铅溶液浓度和检测纸长度,可以改变醋酸铅法的最小检出值和检测范围,更便于测量和计算 H₂S 的生成量。

在 H₂S 生成量的检测过程中,一定浓度的 SO₂ 对醋酸铅试纸能产生正干扰^[15],增加醋酸铅试纸管的显色长度,产生误差。而在葡萄酒发酵过程中添加一定量的 SO₂ 是不可避免的,因此在实际发酵过程中,运用醋酸铅试纸法检测 H₂S 生成量会有一定误差。但单独的 SO₂ 气体与试纸并不发生显色反应。本试验中采用模拟汁发酵,未添加 SO₂,因此不存在误差干扰的问题。

[参考文献]

[1] 吴 军,刘振来,刘 涛.红葡萄酒硫化氢味的产生和防治[J].中外葡萄与葡萄酒,2003,45(3):45-46.
Wu J, Liu Z L, Liu T. Causes and prevention measures of Hydrogen Sulfide odour in red wine [J]. Sino-overseas Grapevine and Wine, 2003, 45(3): 45-46. (in Chinese)

[2] Seung K, Ji Y K. New development for measuring Hydrogen Sulfide during brewing-preliminary data [J]. MBAA TQ, 2004, 41(3): 310-360.

[3] 丁书美,陈叶福,肖冬光,等.啤酒酵母硫化氢生成量测定方法的研究 [J]. 酿酒, 2007, 34(2): 90-92.
Ding S M, Chen Y F, Xiao D G, et al. on the determination of H₂S produced by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Liquor Making, 2007, 34(2): 90-92. (in Chinese)

[4] 陈叶福,王 艳,丁书美,等.低产硫化氢啤酒酵母菌株的选育

[J]. 酿酒科技, 2007, 157(7): 23-25.
Chen Y F, Wang Y, Ding S M, et al. Breeding of beer yeast strain of low H₂S yield [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2007, 157(7): 23-25. (in Chinese)

[5] Thomas D, Yolande S K. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology and Molecular Biologu Revies, 1997, 61(4): 506-515.

[6] Acree T E, Sonoff E P, Splittstoesser D F. Efect of yeast strain and type of sulfur compound on Hydrogen Sulfide production [J]. Am J Enol Vitic, 1972, 23: 6-9.

[7] Thomas C S, Gubler W D, Silacci M W, et al. Changes in elemental sulfur residues on Pinot noir and Cabernet Sauvignon berries during the growing season [J]. Am J Enol Vitic, 1993, 44: 205-210.

[8] Rankie B C. Hydrogen Sulphide production by yeasts [J]. Sci Food Agric, 1964, 15: 872-877.

[9] 尹吉泰,张 军,吴 军,等.产硫化氢低的葡萄酒酵母的选育 [J]. 酿酒科技, 2006, 144(6): 52-54.
Yin J T, Zhang J, Wu J, et al. Breeding of wine yeast which produced low H₂S [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2006, 144(6): 52-54. (in Chinese)

[10] 尹吉泰,张 军,吴 军,等.低产硫化氢葡萄酿酒酵母的选育 [J]. 酿酒, 2006, 33(4): 46-47.
Yin J T, Zhang J, Wu J, et al. Mutation of wine yeast which produced low H₂S [J]. Liquor Making, 2006, 33(4): 46-47. (in Chinese)

[11] 唐 蒙,涂振权,吴敏初.醋酸铅反应速率法检测天然气中的硫化氢 [J]. 石油与天然化工, 2001, 38(1): 41-44.
Tang M, Tu Z Q, Wu M C. Analysis of Hydrogen Sulfide in natural gas by lead acetate reaction rate method [J]. Chemical Engineering of Oil and Gas, 2001, 38(1): 41-44. (in Chinese)

[12] 王凌星.污水中硫化氢的简易测定法 [J]. 环境与健康杂志, 2000, 17(15): 300-301.
Wang L X. Easy method for determination of Hydrogen Sulfide in sewage [J]. Journal of Environment and Health, 2000, 17(15): 300-301. (in Chinese)