

TTC 法在筛选西瓜果酒酵母中的应用

胡晓冰,王振伟

(黄河水利职业技术学院,河南 开封 475004)

摘要: 利用 TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑)作为显色剂对酵母的代谢产物发生呈色反应,可以判断酵母生长过程呼吸酶活力的大小,即酵母产酒精能力的高低,进行快速筛选西瓜酒酵母。筛选出的酵母 XH1# 在与酿酒酵母和安琪酵母的发酵对比中,其产品西瓜果酒在颜色、气味、口感等感官评定指标方面都比对照样好。

关键词: TTC; 酵母; 西瓜酒

中图分类号: TS261.1; TS262.7

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2011)02-0069-02

Application of TTC in Screening Yeast for Watermelon Fruit Wine Production

HU Xiao-bing and WANG Zhen-wei

(Yellow River Conservancy Technical Institute, Kaifeng, He'nan 475004, China)

Abstract: In this experiment, TTC was used as a chromogenic reagent for the reaction with yeast metabolites, through which the respiratory enzyme activity in yeast (namely, the producing ethanol capacity of yeast) could be judged. Such method was applied for rapid screening of yeast for watermelon fruit wine production. Compared with wine fermented by Angel yeast and *S.cerevisiae*, wine produced by the screened yeast XH1# had better performance in color, taste, aroma, and other sensory evaluation indexes.

Key words: triphenyltetrazolium chloride (TTC); yeast; watermelon fruit wine

西瓜也叫寒瓜、水瓜,英文名直译就是“多水分的甜瓜”,属葫芦科,是一年生草本蔓生植物。其汁多味甜,质地性凉,素有“水果之王”和“天然白虎汤”的美称。祖国医学认为它具有消暑、止渴、利尿、降压等功效,可治疗中暑烦渴、痰热喘咳、血压偏高、水肿和小便不利等症。

西瓜果酒是用新鲜西瓜汁或浓缩西瓜汁进行酒精发酵,然后通过一系列的工艺处理而得到的一种营养丰富、低酒精度的发酵制品。与其他果酒酿造一样,西瓜酒酿造所用酵母将直接影响到西瓜酒的品质。优良纯种的西瓜酒酵母可使发酵更具规律性,更完全彻底。但是一般筛选酵母的方法费时费力,效率很低,所以找出一种能够快速筛选高产西瓜酒菌株的方法意义重大。

TTC 是(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)一种显色剂,它可对酵母的代谢产物发生呈色反应^[1],通过它可以判断酵母中呼吸酶活力的大小,即酵母产酒精能力的高低。将在一定的培养基上培养的酵母菌落上覆盖一层 TTC 显色剂,TTC 会显不同的颜色,产酒精能力强的酵母会显现深红色,次之显粉红色,微红色的或不显色的为野生酵母。使用 TTC 平板法筛选西瓜酒酵母可以筛选出产酒精能力较强的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酿酒酵母,河南大学生物工程实验室保藏;安琪酵母,市售;从果实自然发酵得到的酵母。

1.1.2 培养基

TTC 下层培养基:葡萄糖 10.1 g,蛋白胨 2.0 g,酵母浸膏 1.5 g,酸性磷酸钾 1.0 g,硫酸镁 0.4 g,柠檬酸 0.27 g,琼脂 30.0 g,水 200 mL。

TTC 上层培养基:TTC 0.05 g,葡萄糖 0.5 g,琼脂 1.5 g,水 100 mL。

增殖培养基:麦芽培养基。

斜面培养基:YPD 培养基。

酵母培养基:将糖度调整为 250 g/L 的西瓜果汁^[2]。

1.2 设备

多功能榨汁机,蒸馏装置,滴定装置,杀菌设备,培养箱,天平等。

1.3 分析方法

总糖测定:斐林试剂法;残糖测定:斐林试剂法;酒精含量测定:蒸馏-比重法。

收稿日期:2010-09-27

作者简介:胡晓冰(1981-),男,河南开封人,助教,硕士研究生,主要从事发酵食品研究。

质量评定^[2]:理化指标分析,感官质量评价按果酒、葡萄酒的国标 GB/T15038—94 进行。

卫生指标:符合国标 GB2758—81 的规定。

1.4 实验步骤

1.4.1 野生菌增殖培养液的制备

将成熟西瓜取瓢去籽捣碎放于无菌的培养皿中,暴露于空气中于 28~30℃ 自然发酵,当有气泡产生并闻之有酒味时,用无菌纱布过滤,取过滤瓜汁 50 mL 加入到 150 mL 增殖培养基中,28℃ 恒温培养 1~2 d,得到增殖培养液^[4]。

1.4.2 TTC 下层平板的制备

取本品 200 mL,在沸水中加热溶解,灭菌后在每个培养皿中倒入 20 mL 制成无菌平板。空白培养 2~3 d。

1.4.3 TTC 上层平板的制备

取本品 100 mL,在沸水中溶解。

1.4.4 产酒精能力强的酵母菌筛选

将增殖培养液稀释到 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 4 个梯度,取 1 滴涂布到 TTC 下层平板上,30℃ 倒置培养 2~3 d 后,选择菌落数为 10~30 的平板倒入约 12 mL TTC 上层培养基覆盖原有菌落,之后在 30℃ 下避光保温 2~3 h,由菌落的呈色来判定酵母产酒精能力的大小,挑选红色的菌落。

1.4.5 对比试验

将筛选酵母与安琪酵母和酿酒酵母进行对比发酵实验。将 3 种酵母分别接入发酵培养基中进行培养,20℃ 条件下培养 7 d,测定其产酒精及残糖曲线。对 3 种酵母发酵的果酒于 18~20℃ 下后酵 15 d^[5],进行感官评定。

2 结果与讨论

2.1 出发菌株的筛选

筛选过程菌株在平板上的生长过程见图 1 和图 2。

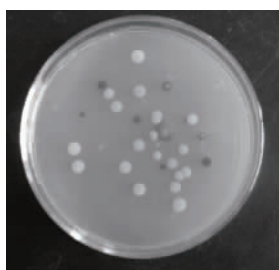


图1 原酵母显色平板

图 1 为原酵母菌的 TTC 显色平板图,从图 1 可看出,其菌落大小不均一,颜色深浅也不同,这说明酵母的繁殖能力和产酒精能力参差不齐,在发酵过程中会同步性较差。从中挑选出 5 株颜色较深的菌落再进行 TTC 显色,从颜色较深、菌落大小较均一的平板上挑出 1 株酵母 XH1# 作为后续实验的出发菌。

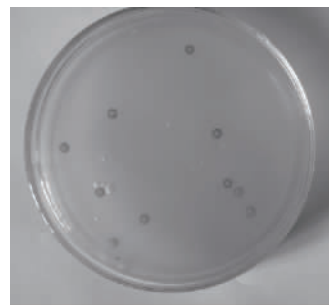


图2 XH1# 显色平板

图 2 为酵母 XH1# 的 TTC 显色平板图,与原始菌的 TTC 显色平板图相比可看出,其菌落大小较均一,颜色较深,且深浅一致,这说明经 TTC 筛选得到的酵母 XH1# 生长代谢状况较统一,并且其产酒精能力较强。

整个筛选过程用时 6 d,这要比传统筛菌(初筛,复筛)节省了很多时间;筛菌的结果也十分直观,易于观察。并且作为一种理性的筛选方法,TTC 筛选减少了筛选的盲目性,节省了大量的人力物力,大大地提高了效率。

2.2 对比发酵实验

对菌株进行发酵实验,结果见图 3、图 4。

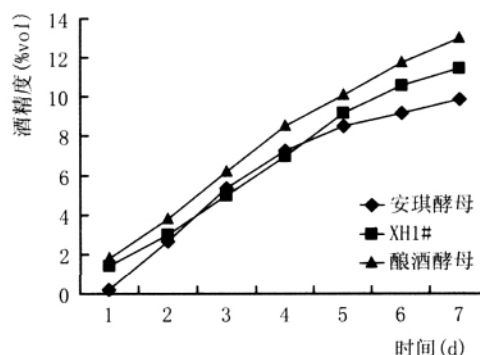


图3 发酵产酒精曲线

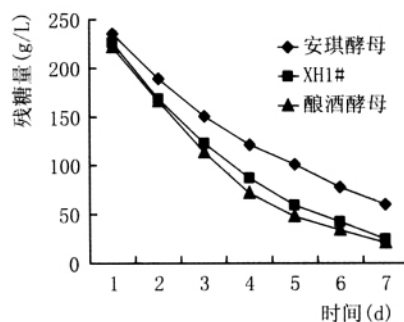


图4 糖降曲线

由图 3、图 4 可以看出,XH1# 产酒精的能力比安琪酵母要高,比酿酒酵母差,糖的利用方面 XH1# 和酿酒酵母几乎相同,残糖含量很低,而安琪酵母发酵后残糖较高。

2.3 后酵及感官评定

对 3 种果酒产品后酵 15 d 并进行感官评定,结果见(下转第 73 页)

孢杆菌。嫌气芽孢杆菌是好气芽孢杆菌的 3~6 倍。老窖泥是厌气芽孢杆菌的主要栖息地,从老窖泥中分离得到 35 株芽孢杆菌,这是老窖独有的微生物学特征。尤其是浓香型酒,制酒离不开老窖,这就是其主要原因。

6 改善凤型酒新老车间质量差异的措施

通过对新老车间所产酒的口感、理化指标比较,窖泥成分分析,乙酸乙酯、己酸乙酯形成机理的探讨,在改善新老车间产酒质量差异上采取了以下措施。

6.1 对新车间窖泥进行技术改造

西凤酒发酵窖池均为土坯筑起的土窖池,上盖窖板固态发酵,但不同于浓香型的百年老窖。泥土中有较多的梭状芽孢杆菌存在,因此,每年更换一次窖皮和窖底,去掉窖池四周和旧泥皮及窖底的泥土。另外,在更换新泥土和新底土时,可添加一定量的生香酵母(如汉逊酵母、假丝酵母等),以提高乙酸乙酯的含量,也可培养己酸菌加入窖泥中,以增加己酸乙酯的含量。

6.2 抓关键工序的控制

由于不同香型的白酒由其独特的生产工艺决定,生产过程抓住入池前水分、温度等条件的控制,适当延长发酵期,为有益微生物的生长繁殖提供有利的条件。生产工艺上坚持西凤酒的传统“热拥法”作窖,使窖池主发酵期提前,给产酒精和生香阶段留足时间。形成香味成分的前提条件是要有一定浓度的酒精,这也是合成乙酸乙酯、己酸乙酯等的先驱物质。

6.3 坚持缓慢装甑,缓火蒸馏,接较高酒度

试验证明,同样的酒醅缓火蒸馏 20 min 与大火蒸馏

10 min 相比,成品酒中乙酸乙酯提高 15 %左右,己酸乙酯提高 10 %,乳酸乙酯降低 30 %~40 %;由于乙酸乙酯、己酸乙酯难溶于水,易溶于乙醇,其随乙醇的馏出而馏出,其馏出量与酒精浓度成正比,所以采取接较高酒度措施。

6.4 做好平窖、踩窖、泥封窖及跟窖工作

生成己酸乙酯的主要微生物是己酸菌,其严格厌氧,所以入池后要要做到平窖、踩窖、泥封窖。封窖为了使酒醅与外界空气隔绝,形成厌氧条件,入池 7 d 左右进行跟窖 1 次,防止有害微生物入侵,保证酒醅发酵正常进行。

通过上述一系列的措施,使新车间所产酒质量上基本趋于老车间所产酒,其改造后产酒抽样感官品评与及色谱分析结果见表 5。

表 5 改造后产酒主要色谱指标结果

项目	新车间	老车间
乙酸乙酯	178.5	184.2
己酸乙酯	42.4	46.4
乙酸/己酸	1:0.23	1:0.25

老车间酒:具有乙酸乙酯、己酸乙酯为主体的复合香气,醇厚协调,味长有余香。

新车间酒:主体香突出,醇厚协调,余味长。

由表 5 可以看出,新老车间所产酒的微量成分及其量比关系几乎协调。经传统的“酒海”贮存 3 年,再用色谱分析其成分,最后进行科学勾兑,新老车间的酒质基于平衡。均具有西凤酒清亮透明,醇香秀雅,甘润爽口,诸味协调,尾净悠长的独特风格。●

(上接第 70 页)

表 1。

表 1 3 种果酒产品感官评定结果

项目	XH1#	酿酒酵母	安琪酵母
颜色	金黄色,清澈透亮	金黄色,清澈透亮	金黄色,清澈透亮
气味	有较强的西瓜果香味	有较大的异味	有淡淡的果香味
口感	清新爽口	发苦发酸,辛辣	稍有刺激,后味发甜

由表 1 可以看出,自筛酵母 XH1# 无论从色、香、味哪个方面均表现优良,金黄色的酒体清澈透亮,散发出西瓜果香味,入口后甘冽,清爽。而酿酒酵母发酵产品异味较大且发苦发酸,辛辣,猜想是由于发酵过程高级醇代谢较多的缘故^[6]。安琪酵母发酵产品入口后给人感觉较清淡,无特别感觉。

3 结论与展望

通过 TTC 平板法筛选酵母用时短,结果直观,易于观察,效率高。筛选出来的酵母 XH1# 所发酵的酒,其酒

精度较高,残糖低,并且口味优良,具有典型性。如果能将该方法应用于生产,就能有效提高原料利用率,减少成本。总之,TTC 平板法筛选效率高,时间短,尤其适合于大量产酒菌株的初筛。另外,该法对其他产酒菌株的筛选也有着较高的借鉴意义。

参考文献:

- [1] Ryssov N H[J]. Water Res. 1975, (9):1179-1185.
- [2] 胡晓冰,杨生玉,张彭湃,林标声.西瓜酒发酵工艺的研究[J].酿酒,2007,(3):83-85.
- [3] GB/T15038—94.57,葡萄酒、果酒通用试验方法[S].
- [4] 李兰,许桂芳.西瓜酒酵母的选育及特性研究[J].酿酒,2004,(5):72-74.
- [5] 姚荣清,梁世中,刘学铭,吴继军.干酵母活化温度与果酒品质的关系[J].酿酒科技,2004(3):63-64.
- [6] Carmen A, Belé n A, Juliá n G et al. [J].Food Chemistry, 1996,55(3):241-249.