柑橘酒酿造酵母的筛选及特性研究

陈茂彬,何 平,曾 莹
(湖北工业大学工业微生物省级重点实验室,湖北 武汉 430068)

摘 要: 从柑橘自然发酵液中分离得到的酵母为出发菌,通过初筛及发酵瓶复筛,筛选得酵母菌株 GJ-17,该酵母的最适生长温度为 28 ℃,最适 pH 生长范围为 3.2～4.2,耐酒精能力较高,可达到 16 %Vol。在柑橘汁发酵中发酵能力强,产生酒度较高,残糖较低,产香较好,完全可以作为独立的发酵菌株使用。

关键词: 微生物; 酵母; 柑橘酒; 筛选; 特性
中图分类号: Q93-33;TS261.1;TS262.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2007)01-0020-03

Screening of Yeast for Orange Fruit Wine Production and Its Properties

CHEN Mao-bin, HE Ping and ZENG Ying
(Bioengineering Institute of Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China)

Abstract: The yeast starting strains were separated from naturally-fermented orange juice and then the yeast strain GJ-17 was screened through primary screening and secondary screening by fermenting flask. The optimal growth temperature and pH value for the strain were at 28 ℃ and between 3.2～4.2 respectively. The strain displayed good resistance to high concentration alcohol (as high as 16 %Vol). Besides, the strain had powerful fermentation capability and high alcohol-producing capability with low residual sugar content and satisfactory aroma-producing performance in orange juice fermentation. Accordingly, it could be used as an independent fermentation strain.

Key words: microbe; yeast; orange wine; screening; property

柑橘酸甜可口,营养丰富,有很高的食用和药用价值。它不仅味道鲜美,而且具有很高的营养价值。据测定,柑橘果肉含蛋白质、脂肪、糖、钙、磷、铁以及苹果酸、柠檬酸等有机酸类营养成分,而且富含维生素,它含有的维生素 C 是苹果的 7 倍,梨的 10 倍。

我国柑橘年产量达到 1000 万吨, 为世界柑橘总产量的 11.79 %,仅次于美国和巴西,居世界第三。但在柑橘加工方面水平不高,远远低于 33 %的世界总体水平。柑橘易腐烂,无有效的保鲜措施,利用其作原料酿造柑橘酒是一种有效方法。为了获得合适酿造柑橘酒的酵母,使其充分适应柑橘汁的原料特点,我们从柑橘汁自然发酵液中筛选适宜的菌株,获得一株适宜柑橘酒发酵的酵母 GJ-17,并对其进行了简单的特性研究。

1 方法与材料

1.1 材料和设备

1.1.1 原料

柑橘:购于武汉市农贸市场。

菌株分离源:武汉市武南郊区草莓园土壤。

对照菌株 DV10:上海杰兔工贸有限公司。

蔗糖:食用级,市售。

柠檬酸:分析纯,上海试剂一厂。

1.1.2 培养基

活化培养基:完全培养基(琼脂 2 %,蔗糖 2 %,酵母膏 1 %,蛋白胨 1 %,自然 pH)。

增殖培养基:将成熟柑橘去皮除核榨汁,装入无菌三角瓶中,按 30 μg/mL 和 100 u/mL 添加链霉素、青霉素,加入 4 %Vol 乙醇,用柠檬酸调节 pH 值为 3.2～3.8。

分离平板培养基:完全培养基(琼脂 2 %,蔗糖 2 %,酵母膏 1 %,蛋白胨 1 %,自然 pH)。

种子培养基:柑橘汁(可溶固性物含量 Tss 为 8 %～10 %),加蔗糖调 Tss 为 15 %,调 pH 值为 3.2～3.8,于

基金项目:湖北省科技攻关计划(2005AA201C19);武汉市科技攻关计划(20056002045)。
收稿日期:2006-09-14
作者简介:陈茂彬(1965-),男,武汉人,博士,教授,研究方向为生物工程。
联系人:何平,E-mail:heping89@126.com,地址:湖北省武汉市南湖湖北工业大学生物工程学院 #928 信箱(430068)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

115 ℃灭菌 15 min 备用。

发酵培养基：柑橘汁可溶固性物含量 Tss 为 8 %～10 %，加蔗糖调 Tss 为 15 %，调 pH 值为 3.2～3.8，添加有效量为 50 %的 $Na_2S_2O_5$ 使 SO_2 含量为 100 mg/L，于 115 ℃灭菌 15 min 备用。

酵母菌性能测定培养基：完全液体培养基。

1.1.3　主要仪器及设备

YX280A 手提蒸汽灭菌锅：上海三申医疗器械有限公司；AR1140 电子分析天平：奥克斯国际贸易有限公司；HR7641 飞利浦食品加工机：飞利浦电器有限公司；Delta320 数字酸度计：Metter-Toledo 工贸有限公司；手持糖量计：永州光学仪器厂；722S 型分光光度计：上海精密科学仪器有限公司。

1.2　方法

1.2.1　柑橘汁中酵母的增殖培养及分离

将成熟柑橘去皮除核榨汁，装入 2 个无菌三角瓶，其中一瓶加入少量柑橘皮，按 30 μg/mL 和 100 u/mL 添加链霉素、青霉素，加入 95 %乙醇使柑橘汁中的酒度达到 4 %Vol，用柠檬酸调节 pH 值到 3.2～3.8，28 ℃让其自然发酵直至终了。

将增殖发酵液适当稀释后，在完全平板培养基上进行梯度稀释分离。28 ℃培养 3 d，待平板长出单菌落后，挑选形态各异、大小不一的单菌落进行镜检，确定是否为酵母，观察菌落特征，编号命名，共计 10 株酵母。

1.2.2　土壤中野生酵母菌的分离

取分离源土壤 1 g，加入到增殖培养基中，28 ℃恒温培养 3 d，在完全平板培养基上进行梯度稀释分离，分离平板 28 ℃培养 3 d，待平板长出单菌落，挑选形态各异、大小不一的单菌落进行镜检，确定是否为酵母，观察菌落特征，编号命名，共计 7 株酵母。

1.2.3　试管发酵初筛

将柑橘汁调糖使 Tss 为 15 %，调酸使 pH 值为 3.2～3.8 后分装于无菌大试管 20 mL/支，接入分离得到的酵母菌 2 满环，于 28 ℃培养箱中发酵。观察起始发酵时间，每隔 12 h 观察发酵情况，培养 5 d 后，品评风味。根据试验结果，初步筛选出产酒精能力较强和产香较好的酵母菌 5 株。

1.2.4　三角瓶复筛

将发酵培养基分别装入 250 mL 三角瓶中，每瓶为 200 mL。于 100 ℃灭菌 10 min。将初筛到的菌株及对照菌株 DV10 从保存斜面上接入种子培养基中，于 28 ℃，115 r/min 培养 20 h，接入三角瓶发酵培养基中，于室温下发酵，每隔 48 h 测发酵液的残糖、酒精度和固形物含量，停止发酵后进行风味品评，综合对照酵母的发酵情况，选出发酵性能最好、产香较好的一株酵母菌。

1.2.5　选育酵母的性质研究

1.2.5.1　选育酵母最适生长温度的测定

将酵母 GJ-17 接入完全培养基中，在 24～40 ℃的不同温度下恒温培养 10 h。于 660 nm 处测定培养液的 OD 值，确定其最适生长温度。

1.2.5.2　选育酵母对高温、低温的耐性测定

将酵母 GJ-17 接入完全培养基中，分别于低温和高温培养 10 d，观察有无菌体生长。

1.2.5.3　选育酵母最适生长 pH 值的测定

将酵母 GJ-17 接入不同 pH 值的完全培养基中于最适生长温度恒温培养 10 h，在 660 nm 处测定 OD 值。依据 OD 值确定其最适 pH。

1.2.5.4　选育酵母耐酸、碱能力的测定

将完全培养基按设定 pH 分别加入柠檬酸或 0.1 N 的 NaOH 调匀后接种。在最适温度下培养 7 d，检查是否有菌体生长。

1.2.5.5　选育酵母耐酒精能力的测定

将完全培养基按设定的浓度分别加入 95 %酒精，摇匀后接种，28 ℃恒温培养一周，观察菌体生长情况和产气情况，并在 660 nm 处测定 OD 值。

1.2.5.6　选育酵母生长曲线的测定

将酵母 GJ-17 种子液接入完全培养基中，调整选育酵母的最适 pH，在最适生长温度下 150 r/min 的摇床上振荡培养，每隔 4 h 在 660 nm 处测定 OD 值。

2　结果与分析

2.1　酵母的分离筛选

2.1.1　酵母试管初筛（见表 1）

根据表 1 的结果，并结合起酵时间、发酵速度以及发酵结束后产香情况，初步筛选出产酒精能力较强和产香较好的编号为 GJ-11，GJ-13，GJ-15 和 GJ-17 的酵母菌 4 株。

2.1.2　三角瓶复筛（见图 1 和图 2）

将初筛的 4 株菌及对照菌株一起接入三角瓶复筛，但只有 GJ-15，GJ-17 和对照菌株 DV10 能进行发酵，而编号为 GJ-11，GJ-13 的菌株没有任何发酵迹象，推断是由于在发酵培养基中添加了 SO_2 抑制其生长发酵。

从图 1 和图 2 可以看出，GJ-17 起酵早、发酵能力强、产生酒度较高、残糖较低。感官评价：产香较好。因此选择 GJ-17 作为柑橘酒发酵菌株。

2.2　选育酵母的性质研究

2.2.1　选育酵母最适生长温度的测定

GJ-17 酵母在完全培养基中的生长温度曲线参见图 3。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 酵母初筛

菌株	发酵时间（h）									
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
GJ-1	+	+	+++	+++	++++	+++	-	-	-	-
GJ-2	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-
GJ-3	-	+	+	+++	+++	+++	+	-	-	-
GJ-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GJ-5	-	+	+	++	+++	++++	+++	+	-	-
GJ-6	-	-	+++	++++	++	+	-	-	-	-
GJ-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GJ-8	-	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-
GJ-9	-	+	+	++	++	+++	++++	++++	+	-
GJ-10	-	-	+	+++	++++	++	+	-	-	-
GJ-11	-	-	+	+++	++++	+++++	++++	++++	+++	++
GJ-12	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-
GJ-13	-	+++	++	+++	++++	++++	+++	++	-	-
GJ-14	-	+	++	++++	++++	+++	++	++	-	-
GJ-15	++++	++++	+++	+	+	-	-	-	-	-
GJ-16	++++	++++	+	-	-	-	-	-	-	-
GJ-17	++++	++++	++	+	+	-	-	-	-	-

注："-"表示发酵液静止不动，没有发酵现象；"+"表示有气泡，发酵正在进行，"+"越多，表示发酵越剧烈。

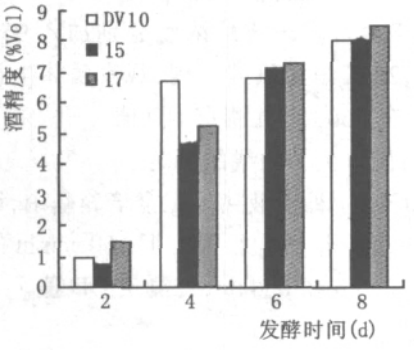

图 1 不同菌种发酵过程中酒精度的变化

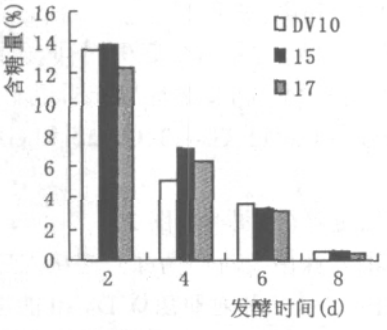

图 2 不同菌种发酵过程中糖度的变化

由图 3 可知，GJ-17 的最适生长温度为 28 ℃。

2.2.2 选育酵母对高温、低温的耐性测定(见表 2)

由表 2 可知，GJ-17 的最低生长温度为 8 ℃，最高生长温度为 40 ℃，能适应的生长温度范围宽。

2.2.3 选育酵母最适生长 pH 值测定

选育酵母 GJ-17 在不同 pH 值的完全培养基中于 28 ℃培养，其生长曲线见图 4。

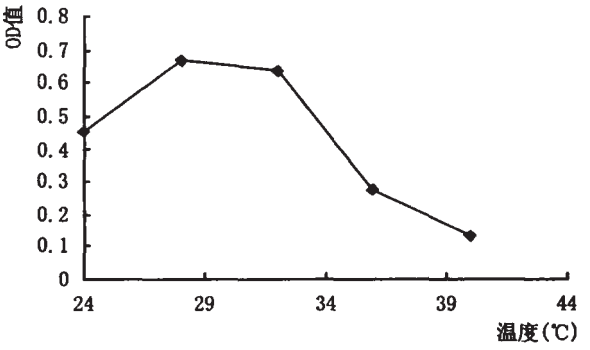

图 3 选育酵母的生长温度曲线

表 2 选育酵母对高温、低温的耐性测定结果

项 目	温度(℃)							
	4	6	7	8	9	37	40	45
生长情况	-	-	-	+	+	++	+	-

注："-"表示不生长；"+"表示能生长；"+"越多，表示生长越好。

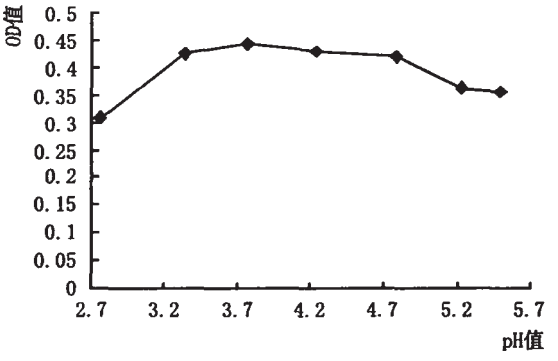

图 4 选育酵母的生长 pH 曲线

由图 4 可以看出，GJ-17 酵母的最适生长 pH 值范围为 3.2～4.2。

2.2.4 选育酵母耐酸碱能力的测定

选育酵母耐酸碱能力的测定试验结果见表 3。

表 3 选育酵母耐酸、碱能力的测定结果

项 目	pH							
	1.4	1.6	1.8	2.0	2.5	8.5.	9.0	10.0
生长情况	-	-	-	-	+	+	+	-

注："-"表示不生长；"+"表示能生长；"+"越多，表示生长越好。

由表 3 可知，GJ-17 的最低生长 pH 值为 2.5，最高生长 pH 值为 9.0，生长 pH 值范围较宽。

2.2.5 选育酵母耐酒精能力的测定(见表 4)

由表 4 可知，GJ-17 耐酒精能力较强，当酒精浓度达到 16 % Vol 时，还能生长，当培养基的酒精浓度达到 18 % Vol 时，停止生长。

2.2.6 选育酵母生长曲线的测定(见图 5)

从图 5 可看出，GJ-17 生长较慢，在 8 h 后进入对数生长期，20 h 后菌体达到稳定，因此在进行发酵瓶发酵

(下转第 27 页)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

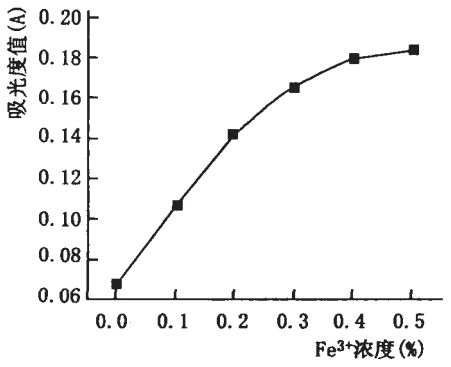

图 6　Fe^{3+} 浓度对葡萄皮色素稳定性的影响

3.2　本方法以乙醇水溶液为提取剂,成本低廉,而且提取过程中没有加入任何毒害物质,所以安全性较高。

3.3　本方法提取所得刺葡萄皮色素, 色价高、性质稳定、耐酸性、耐光性好,常温下不易变质;蔗糖及 Vc 对其稳定性影响较小, 故可用于食品及化妆品的添加剂,具有较好的开发前景,是一种非常重要的天然色素。

参考文献:

[1] 邱冬梅.葡萄酒酿酒副产物的开发应用[J].食品工业,2000,(3):34-35.

[2] 崔结.葡萄皮色素的提取及其性能测试[J].湖州师范学院学报,2000,22(3):46-47.

[3] 郭金耀,杨晓玲.葡萄皮色素的提取及其性能研究[J].山西农业大学学报,1994,14(4):415.

[4] Johanna Bakker and Colin F. Timberlake. The Distribution of Anthocyanins in Grape Skin Extracts of Port Wine Cultivar as Determined by High Performance Liquid Chromatography[J]. J. Sci. Food Agric, 1985, 36: 1315-1324.

[5] Koki Yokotsuka, Akitoshi Nagao. Changes in Anthocyanins in Berry Skins of Merlot and Cabernet Sauvignon Grapes Grown in Two Soils Modified with Limestone or Oyster Shell Versus A native Soil over Two Yeast [J]. Am. J. Enol. Vitic,1999,50 (1): 1-12.

[6] Emma Cantos, Juan Carlos Espin. Varietals Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC-DAD-MS-MS[J]. J. Agric. Food Chem., 2002, 50: 5691-5696.

[7] Mazza G, Fukumoto, et al. Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Comlumbia [J].J. Agric. Food Chem., 1999,47: 4009-4017.

[8] James A, Kennyedy, Andrew L. Waterhouse, et al. Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoils [J]. Am. J. Enol. Vitic, 2002, 53(4): 268-274.

[9] 吉宏武.葡萄酒厂下脚料的综合开发利用途径[J].食品研究与开发,2000,21(1):29-31.

[10] 吉欣,毛立群,李霞,等.葡萄色素的提取及稳定性研究[J].化学研究,2004,15(1):48-52.

[11] 王辉宪,姜晖霞,熊兴耀,等.葡萄籽油及原花青素研究与开发利用[J].果树学报,2005,22(5):542-547.

(上接第 22 页)

表 4　选育酵母耐酒精能力的测定结果

项目	酒精(%Vol)					
	12	14	16	18	20	22
OD 值	+	+	+	−	−	−

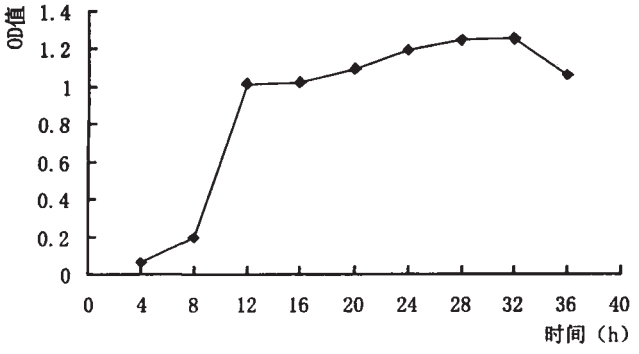

图 5　选育酵母的生长曲线

前制作种子液,需要培养 20 h 后才能接入发酵培养基。

3　结论

从柑橘自然发酵液中分离得到的酵母 GJ-17,在柑橘汁发酵中发酵能力强、产生酒度较高、残糖较低、产香较好,完全可以作为独立的发酵菌株使用。在柑橘汁中起酵较快,有利于避免染菌。该酵母的最适生长温度为 28 ℃,最适 pH 生长范围为 3.2～4.2。该菌耐酒精能力较高,可达到 16 %Vol。

参考文献:

[1] 傅力,章运,郑灿龙.哈密瓜酒酵母的筛选及哈密瓜酒酿造工艺初探[J].食品工业科技,2004,25(12):40-41.

[2] 李剑芳,张灏.发酵猕猴桃汁中产香酵母的分离、鉴定、及生长特性的研究[J].食品科学,2001,(9):19-22.

[3] 胡亚平,李宗军,王燕,欧亦群.枸杞酒酵母菌的筛选及特性研究[J].湖南农业大学学报,2000,26(4):310-313.

[4] 王强.沙棘酒优良酵母菌种的分离筛选及应用[J].莱阳农学院学报,1991,8(2):123-127.

[5] 覃宇阳,黄宏慧.野生山葡萄酒酵母筛选及应用[J].广州轻工业,1999,(1):45-47.

[6] 王丽威,岳田利,袁亚宏,彭帮柱,高振鹏.优良猕猴桃干酒酵母的筛选[J].食品与发酵工业,2004,30(4):86-87.

[7] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2001.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net