

哈密瓜酒产香酵母的筛选及特性研究

申 彤,陈红征,杨 洁

新疆大学生命科学与技术学院,新疆 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 从哈密瓜自然发酵汁中分离到产香较好的酵母6a-4,该菌株最适生长温度为34℃,最适生长pH4.2。经多次驯化分离,菌株产酒精能力逐步增强,在适宜条件下,最终酒精浓度可达10%~11%(v/v),残糖为0.19%~0.46%,可作独立发酵的菌株使用。 陶然)

关键词: 哈密瓜酒; 产香酵母; 筛选; 驯化; 特性

中图分类号: Q93-33; TS261.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286 (2004)03-0036-03

Selection of Aroma-producing Yeast for Hami Melon Wine and Its Properties

SHEN Tong, CHEN Hong-zheng and YANG Jie

Life Science & Technology College of Xinjiang University, Urumchi, Xinjiang 830046, China)

Abstract: The aroma-producing yeast 6a-4 was separated from the natural fermentative juice of Hami melon. The optimal growth temperature and pH value for the strain was 34℃ and 4.2 respectively. Through domestication and separation several times, the alcohol-producing capability of the strain enhanced gradually. Under proper conditions, the ultimate alcohol concentration could achieve 10%~11% (v/v) and the residual sugar content could achieve 0.19%~0.46%. And the strain could be used for fermentation independently. (Tran. by YUE Yang)

Key words: Hami melon wine; aroma-producing yeast; selection; domestication; property

哈密瓜 (*Cucumis melo* var. *saccharus* L.) 是新疆特色的甜瓜品种,属葫芦科、甜瓜属、甜瓜种、厚皮甜瓜亚种,为一年生藤本植物,是我国瓜果中的珍品,其味美香甜,多汁爽口,营养丰富,具有清热解毒、止渴利尿、消除疲劳等保健功效^[1]。

利用哈密瓜生产果酒,符合国家提倡的粮食酒向果酒转变,低档酒向高档酒转变的发展目标,也满足了人们对营养和健康的需求。为了获得适合哈密瓜酒的发酵菌株,使酵母在发酵过程中形成的香味物质能弥补果香的散失或形成有特点的与哈密瓜酒相协调的风味物质,并使其充分适应哈密瓜汁的原料特点和新疆当地的自然条件。我们从哈密瓜的果实、自然发酵汁和哈密瓜生长的环境中采样,筛选适宜的菌株,获得一株产香酵母6a-4,并对其进行了简单分类和特性考察,现分述如下。

1 材料和方法

1.1 材料和设备

1.1.1 原料

哈密瓜:购于乌鲁木齐市北园春市场,品种有伽师、早金、87-1。

对照菌株CR:为西班牙酿酒酵母。

蔗糖:食用级,市售。

柠檬酸:食用级,市售。

酒精:化学纯。

1.1.2 培养基

增殖培养基:将成熟哈密瓜切丝榨汁,以一层纱布过滤,装入无菌三角瓶中,添加100 mg/L亚硫酸,4%(v/v)乙醇,用柠檬酸调

pH4.5。

平板分离培养基:哈密瓜汁调pH4.5,加入2%琼脂粉,装入三角瓶,115℃灭菌20 min,备用。

选择性平板分离培养基:在平板分离培养基中加入15%~25%的蔗糖或7%~14%的酒精。

发酵培养基:哈密瓜汁(可溶性固形物TSS一般为7%~9%),加入蔗糖调TSS为20%左右,加入柠檬酸调pH为4.5左右,SO₂ 50 mg/L放置过夜,备用。

一级种子、二级种子培养基:哈密瓜汁,加入柠檬酸,调pH值为4.5,115℃灭菌15 min。

生孢子培养基:详见参考文献[2]。

酵母菌生理生化实验培养基:详见参考文献[3]。

1.1.3 主要仪器和设备

SYQ.DMSX-280:手提式压力蒸汽消毒器;LRH-150S:恒温恒湿培养箱;ZQ-X100:振荡培养箱;752:紫外可见分光光度计;PHS-25:数显酸度计;KF2CPCX:体视显微镜;BH-2:显微摄像系统。

1.2 方法

1.2.1 酵母的增殖培养

取闻之有果香和酒味的腐烂伽师瓜肉及瓜汁→无菌纱布过滤→取过滤瓜汁50 ml加入150 ml增殖培养基中→28℃恒温培养2~3 d

1.2.2 酵母的分离

将增殖液适当稀释后,以麦芽汁培养基作倾注平板分离。28

收稿日期:2003-07-21

℃培养3 d,待平板上长出单个菌落,挑取形态各异、大小不一的典型菌落,记录菌落特征、命名,共计16株酵母,分别接入麦芽汁试管斜面培养基上28℃培养2~3 d,保存待用。

1.2.3 试管发酵初筛

将发酵培养基分装无菌大试管10 ml/支,放置过夜。接入分离得到的菌株一环,于28℃培养箱中发酵。每天观察发酵状况,培养5 d后,测残余TSS值,品评风味。根据实验结果,初步筛选能产酒精或产香较好的酵母菌5株。

1.2.4 三角瓶复筛

将发酵培养基分装入250 ml三角瓶中,每瓶200 ml。将初筛得到的菌株从保存斜面上取一环接入10 ml一级种子瓜汁试管中活化,每株两管,28℃培养20 h左右,使菌数达到 10^7 个/ml,接入三角瓶发酵培养基中,每株两瓶。于室温发酵,每天测TSS值,待此值不再变化时停止发酵。测酒精含量并进行风味的品评。综合对照后,选定一株酒精产量较高、产香较好的酵母6a-4。

1.2.5 驯化实验及纯化

将得到酵母菌接入三角瓶发酵培养基中经多次驯化培养,平板分离,使筛选菌株纯化,6a-4为产膜酵母,发酵后酒液有浓郁瓜果香气,但酒精产率低,而且发酵液浮膜较厚,不利于酒液的澄清。经发酵实验后,从凝聚在瓶底的酵母泥中取样,以无菌水稀释后用高糖(5%~25%)平板和高酒精(1%~14%)平板分离,取得单菌落后再做发酵实验,如此反复5次后,6a-4的产酒率逐步提高且浮膜明显变薄,酵母凝集性增强,酒液可澄清,但香味也略淡薄。

1.2.6 选育酵母的分类鉴定

见参考文献[3]。

1.2.7 选育酵母生物学测定^[4]

选育酵母最适生长温度的测定 将酵母种子接入麦芽汁中,分别在22~36℃的不同温度下恒温培养10 h,于660 nm测定培养液的OD值大小,确定其最适生长温度。

选育酵母对高温、低温的耐性测定 将酵母种子液接入麦芽汁中,分别于低温和高温培养7 d,观察有无菌体生长。

选育酵母最适生长pH值的测定 将酵母种子液接入不同pH值的麦芽汁中于最适生长温度恒温培养10 h,在660 nm下测定OD值,依据OD值大小确定其最适pH。

选育酵母耐酸、碱能力的测定 试管内装10 ml灭菌的麦芽汁,按设定pH分别加入乳酸或0.1 N 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。

选育酵母耐酒精能力的测定:试管内装入10 ml灭菌的麦芽汁,冷却后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,观察菌体生长和产气情况。

选育酵母发酵速率的测定^[5] 采用体积法测发酵速率制作发酵速率曲线。1 L三角瓶中装入哈密瓜汁800 ml,调整TSS为20%,pH4.0,SO₂ 50 mg/L放置过夜,按5%接入酵母种子液,室温发酵,定时测定每分钟放出的CO₂的体积。

选育酵母生长曲线的测定^[4] 将酵母种子液5%接入麦芽汁中,调整选育酵母的最适pH,以最适生长温度,115 r/min在摇床上振荡培养,每隔2 h用血球计数板测定麦芽汁中的菌体数。

2 结果

2.1 形态特征

6a-4麦芽汁培养液经美兰染色,菌体为椭圆形,假菌丝微弱,细胞大小6.5~11.5 mm×3.6~7.8 mm。在产孢子培养基上形成卵形孢

子,见图1~图2。麦芽汁平板上的菌落特征:乳白色、干燥,表面有凹凸感,扁平,边缘皱褶,直径为2~7 mm。

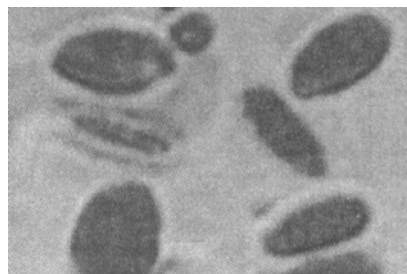


图1 6a-4酵母细胞形态

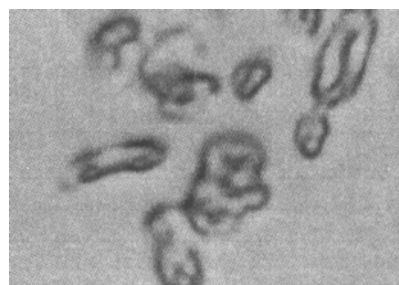


图2 6a-4酵母孢子形态

2.2 生理生化特性 见表1~表3)

表1 选育酵母对不同碳源的发酵情况

碳源	发酵情况	碳源	发酵情况
葡萄糖	+	棉子糖	-
半乳糖	-	纤维二糖	-
麦芽糖	-	山梨糖	-
蔗糖	+	海藻糖	-
乳糖	-	可溶性淀粉	-

注:“+”表示发酵,“-”表示不发酵。

表2 选育酵母对碳源的利用

碳源	发酵情况	碳源	发酵情况
半乳糖	-	山梨糖	-
乳糖	-	酒精	+
麦芽糖	-	富马酸	-
木糖	-	水杨素	-
鼠李糖	+	甘露醇	-
棉子糖	-		

注:“+”表示利用,“-”表示不利用。

表3 选育酵母其他部分生理实验结果

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

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

根据表1,表2,表3实验结果,对照《真菌鉴定手册》,初步判断菌株6a-4为汉逊酵母属(*Hansenula* H.et P.Sydow)中的异常汉逊酵母(*Hansenula anomala* (Hans.)sydow)。

2.3 选育酵母生物学测定

2.3.1 选育酵母最适生长温度的测定 6a-4在麦芽汁中的生长温度曲线见图3。

由图3可知,6a-4的最适生长温度为34℃。

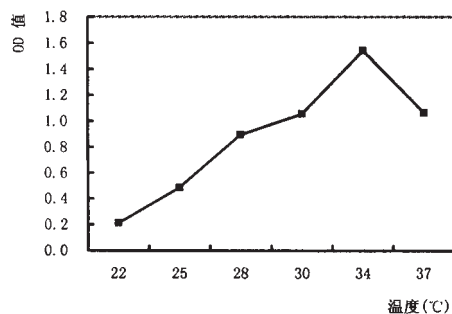


图3 选育酵母的生长温度曲线

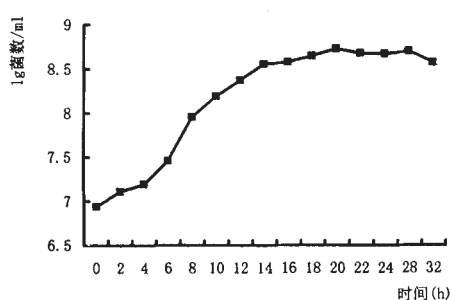


图5 选育酵母的生长曲线

2.3.2 选用酵母对高温、低温的耐性测定

选育酵母对高温、低温的耐性实验结果见表4。由表4可知,6a-4的最低生长温度为8℃,最高生长温度为40℃,适应生长的温度范围较宽,有利于生产上的应用,当进行非控温发酵时,能适应新疆温差大的特点。

表4 选育酵母对高温、低温的耐性测定结果

温度(℃)									
4	6	7	8	9	36	37	38	39	40
-	-	-	±	+	+++	+++	+	+	±

注:“+++”表示生长好,“++”表示生长良好,“+”表示生长较差,“±”表示生长很少,“-”表示不生长。

2.3.3 选育酵母最适生长pH测定

选育酵母在不同pH值的麦芽汁中30℃培养,其生长pH曲线如图4,6a-4的最适生长pH为3.9~4.2。

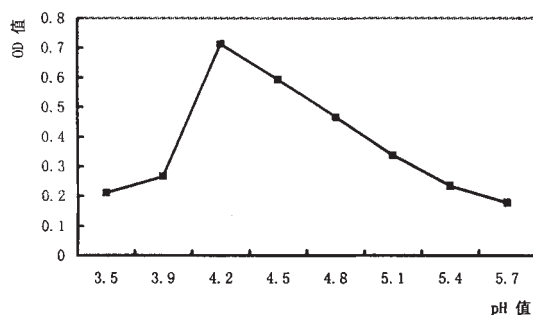


图4 选育酵母的生长pH曲线

2.3.4 选育酵母耐酸碱能力的测定

选育酵母在1.4~2.0的低pH和8.5~10.0的高pH麦芽汁中的生长特性如表5。由表5可知,6a-4的最低生长pH为1.8,最高生长pH为9.5,生长pH范围较广。

表5 选育酵母耐酸、碱能力的测定结果

pH值							
1.4	1.6	1.8	2.0	8.5	9.0	9.5	10.0
-	-	±	+	++	+	±	-

注:同表4注。

2.3.5 选育酵母耐酒精能力的测定

表6 选育酵母耐酒精能力的测定结果

酒精(%)						
12	14	15	16	18	20	22
+	-	-	-	-	-	-

从表6可知,6a-4耐酒精能力较弱。当酒精浓度达到12%时,

此酵母仍能生长但不发酵产气。

2.3.6 选育酵母生长曲线的测定

由图5可以看出,菌株6a-4生长速度较慢,在4h后进入对数生长期,22h后菌量达到稳定,菌数约为 6.8×10^8 ,若用麦芽汁制备种子液,摇瓶培养,需培养至22h,方可收获或接种。

2.3.7 选育酵母发酵速率的测定

2003年3月25日,室温17~21℃,将选育酵母和对照酵母CR接入800ml哈密瓜汁发酵培养基中,接种量3%,各菌株的发酵速率曲线见图6。由图6可见,对照CR在接种后7h左右起发,6a-4起发较慢,接种后12h才有极少量气泡缓缓产生,在整个发酵过程中,产气速率较平缓。

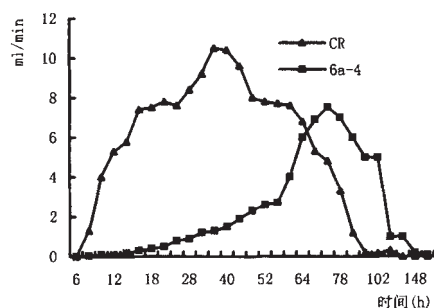


图6 选育酵母和对照CR的发酵速率曲线

3 结论与讨论

从哈密瓜自然发酵汁中分离得到的酵母6a-4为产膜酵母,在哈密瓜汁中发酵能产生浓郁的香甜气息,应属于非酿酒酵母属的产香酵母,而产香酵母一般酒精生成能力较弱,不单独作为果酒的发酵菌种^[6]。所选菌株经多次驯化分离,其产酒精能力逐步增强,在适宜条件下最终酒精浓度可达到10%~11.6%,残糖为0.19%~0.46%,完全可作为独立的发酵菌株使用,达到果酒中干酒的酒度和残糖要求。此株酵母繁殖速度较慢,在哈密瓜汁中发酵速率较低,产气较为平缓,有利于果香的保存,但起酵慢、周期长也易于染杂菌和导致风味的散失。因此所筛选的酵母是否能用于工业生产以及如何扬长避短仍需作进一步的研究。

参考文献:

- [1] 新疆甜瓜西瓜志[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1985.
- [2] 诸葛健,等.工业微生物实验手册[M].北京:轻工业出版社,1994.
- [3] 杜连祥,等.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.
- [4] 李剑芳,等.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,(4):19-22.
- [5] 冯作山.葡萄酒优良酵母的选育[R].新疆农业大学硕士论文[Q].1999.
- [6] Rainier,S; Pretorius,I.S., Selection and imprint of wine yeasts [J]. An. Microbiol, 2000, 50 (1):15-31.