

黑莓果酒发酵菌株的筛选和性能初探

方 亮,吴文龙,赵慧芳,胡淑英,李维林

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏 南京 210014)

摘 要: 从黑莓自然发酵物中经过三级分离筛选得到 1 株适宜黑莓果酒发酵的酵母菌,命名为 CNBG001。该菌株在麦芽汁中的生长特性为:最适生长温度 26℃,最适生长 pH 范围 3.0~5.0,酒精耐受能力可达 16%vol,耐 SO₂ 能力可达 200 mg/L,是 1 株优良的黑莓果酒酿造酵母。

关键词: 微生物; 黑莓果酒; 酵母; 筛选

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)08-0028-03

Screening of Yeast Strains for the Production of Blackberry Fruit Wine and Study of Its Properties

FANG Liang, WU Wenlong, ZHAO Huifang, HU Shuying and LI Weilin

(Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Science, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

Abstract: A yeast strain CNBG001 suitable for blackberry fruit wine production was screened out from naturally fermented blackberry fruits through three-level separation. The growth properties of such strain in wort were summed up as follows: the optimum growth temperature was at 26℃ and the pH value was 3.0~5.0. The strain displayed good resistance to high concentration alcohol (as high as 16%vol) and SO₂ (200 mg/L). It is a fine yeast strain for the production of blackberry fruit wine.

Key words: microbe; Blackberry fruit wine, yeast, screening

果酒^[1]是以果品为原料经发酵酿制而成的低度饮料酒,酒度一般在 12%vol 左右,由于果酒是由各种新鲜的水果经发酵直接酿制而成,故能较好地保留原果中的有机酸、果胶质、含氮物、各种维生素、微量元素、钙、镁等天然成分,营养价值较高,可促进血液循环和机体的新陈代谢,控制体内胆固醇水平,改善心脑血管功能,同时具有利尿、激发肝功能和抗衰老的功效^[2]。果酒含有大量的多酚,能起到抑制脂肪在人体中堆积的作用。随着人们生活水平的提高以及对生活质量的更高要求,果酒的诸多优点和独特功效受到越来越多的重视。作为果品生产大国,我国的果酒开发研究也已取得较大进展。但目前我国的果酒产业中,葡萄酒占了大部分的市场份额,其他果酒开发力度还相对较小。

黑莓作为重要的小浆果类果树,在欧洲许多国家有悠久而广泛的栽培历史。黑莓果实柔软多汁,风味独特,富含人体所需的多种维生素,特别是 V_E 和人体中必需的 8 种氨基酸及多种矿物质元素,其中硒的含量达 1.7~4.9 μg/g^[3]。黑莓果实具有独特的香味,其中可检测出 51 种挥发油成分^[4]。将其制成黑莓果酒,色泽鲜艳,风味独特,同时,其果实中所含的多种维生素特别是其中的

维生素 E,可以基本得到保存^[5]。因此,开发研制具有保健功能的黑莓果酒具有广阔的发展前景。

现在市场上的黑莓酒大多不是全汁酒,而是用酒精浸提法而非发酵法生产的黑莓酒,这样大大降低了黑莓的营养价值和商品价值。黑莓发酵酒的加工最近几年才开始,技术路线还不够成熟,一般多采用传统老工艺自然发酵或制成黑莓配制酒,或者使用商业用酿酒酵母发酵产酒^[6-7],产品果香味不足,V_C 等维生素损失大,酒的稳定性不高,很易出现褪色、褐变、浑浊或沉淀等。无数酿酒实践证明,菌种是酿酒的必要条件^[8]。

为了获得适合酿造黑莓果酒的酵母菌,使其充分适应黑莓的原料特点,本课题组从黑莓自然发酵物中筛选适宜的菌株,获得 1 株适宜黑莓果酒发酵的酵母菌,并对其生长特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

黑莓果实采自江苏南京地区黑莓生产原料基地,为美国引进的赫尔(Hull)^[9]品种的果实。选择新鲜良好、完

基金项目 江苏省基础研究计划(自然科学基金)-重点项目(BK2010069) 江苏省科技基础设施建设计划项目(BM2009041 BM2010458)。

收稿日期:2011-05-09

作者简介 方亮(1980-),女,安徽安庆人,博士,助理研究员,主要从事经济林果的研究利用。

优先数字出版时间 2011-07-08,地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110708.1026.002.html?uid=>。

全成熟、色泽乌黑有光泽、无霉烂和病虫害的果实,轻微破碎后置于 25 ℃ 培养 7 d,收集发酵物。

1.1.2 培养基^[10-11]

富集培养基:麦芽汁培养基(麦芽汁,自然 pH),于 115 ℃ 灭菌 15 min 备用。

分离平板培养基:黑莓汁琼脂培养基(琼脂 2%,黑莓汁调至 10°Brix,自然 pH),于 115 ℃ 灭菌 15 min 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母菌的分离^[12]

1.2.1.1 酵母分离源的采集

采用随机取样原则收集赫尔(Hull)品种的自然发酵物,采集时间为 2010 年 7 月份,共采集样品 22 份,分别装入无菌纸袋中,并贮存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.1.2 菌种分离方法

采用富集培养法,以灭菌麦芽汁为富集培养液,于 25 ℃ 培养 1 d 后,采用稀释平板法进行分离。在黑莓汁琼脂培养基中于 25 ℃ 培养,待长出菌落后,选择具有典型酵母菌菌落特征的单菌落进一步划线分离 3 次,经镜检为纯种后,分别移植单个菌落于麦芽汁斜面上保存待用。

1.2.2 酵母菌的筛选^[12-13]

1.2.2.1 酵母菌一级筛选

采用杜氏管发酵法,25 ℃ 下在 10°Brix 麦芽汁培养基中发酵 24 h,根据规定时间内产生气泡的速度和大小进行筛选。以上实验平行重复 3 次。

1.2.2.2 酵母菌二级筛选

采用黑莓汁发酵法,25 ℃ 下在 10°Brix 黑莓汁培养基中发酵 5 d,根据发酵物酒精度的高低和风味进行筛选。以上实验平行重复 3 次。

1.2.2.3 酵母菌三级筛选

采用杜氏管发酵法,调整黑莓汁培养基酒精度 10 %vol~18 %vol、SO₂ 浓度 50~200 mg/L,25 ℃ 下发酵 2 d,观察杜氏管中起泡情况。以上实验平行重复 3 次。

1.2.3 酵母菌发酵性能研究

1.2.3.1 最适生长温度测定^[14]

将酵母菌接入 10°Brix 麦芽汁中,分别在 18~32 ℃ 不同温度下恒温培养 12 h,于 660 nm 测定培养液 OD 值,依据 OD 值大小确定其最适生长温度。

1.2.3.2 最适生长 pH 值测定

将酵母菌接入不同 pH 值 10°Brix 麦芽汁中,于最适生长温度下恒温培养 12 h,再于 660 nm 测定培养液 OD 值,依据 OD 值大小确定其最适生长 pH 值。

1.2.3.3 生长曲线测定^[15]

将酵母种子液以 2 % 添加量接入麦芽汁中,调整到最适 pH 值,在最适生长温度下以 115 r/min 于摇床上振荡培养,每隔 2 h 测定培养液于 660 nm 处 OD 值,制作生长曲线。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的筛选

2.1.1 杜氏管一级筛选

通过 1.2.1.1 所述方法,从黑莓汁培养平板上分离出 48 株菌株作为酵母菌筛选试验的出发菌株。首先采用杜氏管发酵法进行一级筛选。

上述 48 株酵母菌在含有杜氏小管的麦芽汁培养基中 25 ℃ 培养 12 h,杜氏管中充满气泡的菌株数为 26 株,摇动试管可以闻到淡淡的酒味。其余 22 株酵母菌在杜氏小管中的产气情况为:无起泡、气泡量很少或者直到 24 h 才开始产生气泡。这表明,前 26 株菌株起酵能力比较强,能在厌氧环境下较快的发酵,可能有较高的发酵度和发酵效率。根据经验^[16],在 1 d 内产气量未达到杜氏管满体积的酵母菌,其发酵度一般不能满足果酒的酿造要求,筛选过程中应将其舍弃。因此,保留这 26 株酵母菌作为出发菌株进行下一级筛选。

2.1.2 黑莓汁二级筛选

将上述 26 株酵母菌在 25 ℃ 下在 10°Brix 黑莓汁培养基中发酵 5 d 后,测定其酒精度并对其风味进行评价。其中,发酵物酒精度在 5.0 %vol 以上的酵母菌株为 3 株,最高酒精度为 5.34 %vol,酒精度在 4.0 %vol~5.0 %vol 之间的有 6 株,其余酒精度均在 4.0 %vol 以下。同时,根据感官评价结果,风味优良的菌株有 12 株,其中包括发酵物酒精度在 5.0 %vol 的有 2 株,酒精度在 4.0 %vol~5.0 %vol 之间的有 6 株,另外 4 株的酒精度较低(低于 4.0 %vol)。综合发酵能力和发酵物风味,选择发酵物酒精度在 4.0 %vol 以上、同时风味优良的 8 株酵母菌株,进行下一级筛选。

2.1.3 酵母菌三级筛选

果酒中酒精含量通常为 8 %vol~17 %vol^[1],发酵过程中随着酒精含量的增加,酵母菌的发酵能力受到酒精的抑制和糖分的减少的影响会逐渐减弱。同时,果酒酿造中 SO₂ 的添加量通常为 50~100 mg/L,因此,选择酵母菌的标准之一是能在较高 SO₂ 含量的果汁中进行酒精发酵。8 株酵母菌的耐酒精、耐 SO₂ 能力测定结果见表 1。

表 1 酵母菌耐酒精耐 SO₂ 能力测定

菌株 编号	酒精度 (%vol)					SO ₂ 浓度 (mg/L)				
	10	12	14	16	18	50	100	150	200	250
1	+++	++	+	-	-	++	+	+	+	-
2	+++	++	+	-	-	+++	++	+	-	-
3	+++	++	+	-	-	+++	++	+	+	-
4	+++	++	+	-	-	+++	++	+	-	-
5	+++	++	+	-	-	+++	+	+	-	-
6	+++	+++	++	+	-	+++	++	++	+	-
7	+++	++	++	+	-	++	+	-	-	-
8	+++	+++	++	+	-	+++	+	-	-	-

注: +表示产气量大小,其中+、++、+++分别表示产气达到杜氏小管体积的 1/3、2/3、全部。

由表1可以看出,综合考虑酒精耐受度和 SO_2 耐受度,选择编号为6的菌株作为黑莓果酒发酵菌株。该菌株酒精耐受度可达16%vol, SO_2 耐受度可达200 mg/L。

2.2 酵母菌生长特性

经由上述筛选过程后,得到最适黑莓果酒发酵酵母菌株1株,命名为CNBG001,该菌株已于2010年10月20日在中国典型培养物保藏中心(中国武汉)保藏,保藏编号为CCTCC NO:M 2010265。

2.2.1 最适生长温度

将酵母菌CNBG001接入自然pH的麦芽汁培养基中,在不同温度下培养,测定其生长温度曲线,结果见图1。由图1可以看出,CNBG001的最适生长温度范围为24~28℃,最适生长温度为26℃。

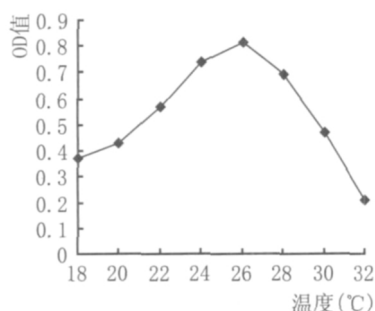


图1 CNBG001的生长温度曲线

2.2.2 最适生长 pH

将酵母菌CNBG001接入不同pH值的麦芽汁培养基中培养,测定其生长曲线,结果见图2。由图2可以看出,CNBG001的最适生长pH值范围为3.0~5.0。说明其是可耐受黑莓汁天然pH值,是1株适宜的黑莓果酒发酵菌株。

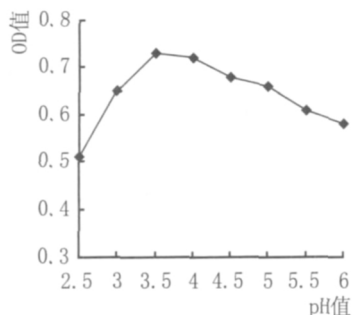


图2 CNBG001的生长pH值曲线

2.2.3 菌株生长曲线

按1.2.3.3生长曲线测定方法对菌株进行培养,制作该菌株的生长曲线,结果见图3。

由图3可以看出,CNBG001在4h后进入对数生长期,菌量增加迅速,12h后菌体数量基本稳定。因此,在发酵生产中制备种子液时,应该选择培养12h后的发酵液接入发酵培养基。

由以上研究得到的CNBG001生长特性可知,由麦芽汁制备种子发酵液,控制培养基pH值为4.0左右,发酵温度26℃,摇瓶培养12~16h后即可。

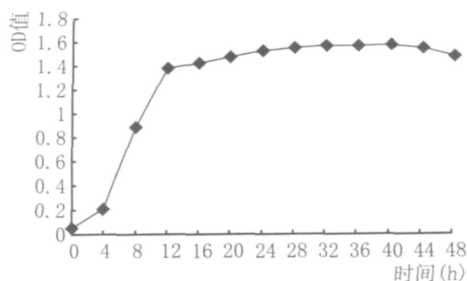


图3 CNBG001的生长曲线

3 结论

从黑莓自然发酵物中分离得到1株酵母,命名为CNBG001,于2010年10月20日在中国典型培养物保藏中心(中国武汉)保藏,保藏编号为CCTCC NO:M 2010265。该酵母菌株在黑莓汁发酵中起酵较快、发酵能力强、产生酒度较高、产香较好,可以作为独立的发酵菌株使用。该酵母的最适生长温度为26℃,最适pH生长范围为3.0~5.0。该菌耐酒精能力较高,可达到16%vol,耐 SO_2 能力可达200 mg/L,是1株优良的黑莓果酒酿造酵母。

参考文献:

- [1] 奚惠萍.中国果酒[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [2] 赵霖.果酒与健康[J].中国酿造,1995(6):36-37.
- [3] 吴文龙,李维林,阎连飞,等.不同品种黑莓鲜果营养成分的比较[J].植物资源与环境学报,2007,16(1):58-61.
- [4] 李维林,贺善安,顾烟,等.黑莓果实挥发油化学成分的研究[J].中国药理学杂志,1998,33(6):335-336.
- [5] 李维林,孙醉君,郑海燕.黑莓鲜果及其加工品的营养成分[J].天然产物研究与开发,1997,10(1):55-59.
- [6] 马维成,高学玲,葛自兵.黑莓果酒酿造工艺研究[J].安徽农业大学学报,2010,37(3):483-487.
- [7] 杜云建,朱孔岳,付瑾.黑莓山楂复合发酵果酒的研究[J].中国酿造,2009,213(12):149-152.
- [8] 王琳,岳田利.桑椹酒酵母筛选及酿造工艺优化[J].酿酒科技,2005(5):66-68.
- [9] 吴文龙,孙醉君,蔡剑华.黑莓的优良品种“赫尔”与“切斯特”及其栽培[J].中国果树,1995(4):16-18.
- [10] 陈茂彬,何平,曾莹.柑橘酒酿造酵母的筛选及特性研究[J].酿酒科技,2007(1):20-22.
- [11] 石勇,何平,陈茂彬.梨酒酿造酵母的筛选[J].农产品加工·学刊,2006,85(12):19-21.
- [12] 权英.酿造红枣果酒的酵母菌选种研究[D].保定:河北农业大学,2002.
- [13] 李兰,许桂芳,张连萃.石榴酒酵母的筛选[J].酿酒科技,2010(11):44-47.
- [14] 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,2001,22(9):19-22.
- [15] 申彤,杨洁,陈红征.哈密瓜酿酒酵母的筛选及特性研究[J].酿酒,2003,31(3):48-50.
- [16] 杨晓英,丁立孝,梁美霞,戴洪义.苹果酒优良酵母菌株的筛选[J].青岛农业大学学报:自然科学版,2008,25(1):28-33.