

菠萝果酒酵母的分离及筛选

胡月英 陈文学 仇厚援 李从发

(海南大学食品学院,海南 海口 570228)

摘要: 从成熟的菠萝表皮和果肉分离得到 101 株酵母菌,经过筛选,最终确定 A4C13 菌株为最优菌株。该菌株在 SO_2 浓度为 300 mg/L、pH1.5、乙醇浓度为 19 %vol 时,均能产气发酵。且对菠萝汁的发酵能力强,菠萝酒香气浓郁。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 分离; 筛选

中图分类号: TS262.7; TS261.1

文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2009)11-0021-03

Isolation and Screening of Wine Yeast Strains From Pineapple

HU Yue-ying, CHEN Wen-xue, QIU Hou-yuan and LI Cong-fa

(College of Food Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: 101 yeast strains were isolated from the pericarps and pulp of mature pineapple and a yeast strain numbered as A4C13 was screened for pineapple fruit wine fermentation. Yeast A4C13 could ferment at 300 mg/L SO_2 , pH 1.5 and 19 %vol alcohol content and produce pineapple fruit wine with strong fruit aroma.

Key words: microbe; *Saccharomyces cerevisiae*; isolation; screening

我国是世界上最大的水果生产国之一,而水果深加工工业又较薄弱,为发展果酒产业提供了契机。作为发酵酒,果酒富含多种氨基酸、维生素及矿物质等营养成分,还含有丰富的生理活性物质,适量饮用,可舒筋活络,调整新陈代谢,促进血液循环,同时具有控制体内胆固醇水平,利尿、激发肝功能和抗衰老等功效,具有较强的保健作用^[1]。

菠萝糖酸含量适中、香气浓郁、营养价值高,是酿酒的良好原料。因此,大力发展菠萝酒生产,不仅可减少生产酒类的粮食消耗,满足消费者需求,而且可以促进资源的开发利用,增加果农收入^[2]。酵母品种是酿造果酒的关键因素之一,酵母性状的好坏直接影响到所酿果酒的品质。本文针对果酒酿造中所需菌种的性状,通过测定其对菠萝汁的发酵能力、发酵特性等的系统实验,选出 A4C13 为最佳菠萝酒酿酒酵母。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 菌种来源

从菠萝的果皮、果肉中分离得到的酵母菌株。

1.1.2 主要试剂

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2007BAD76B04)。

收稿日期: 2009-08-31

作者简介: 胡月英(1971-),女,硕士研究生。

通讯作者: 李从发。

无水乙醇、浓硫酸、浓盐酸、重铬酸钾、亚硫酸氢钠,均为分析纯试剂。

1.2 主要仪器与设备

HWS 恒温恒湿培养箱, ZD-88-B 大容量冷冻恒温振荡器, UV-2450 型分光光度计等。

1.3 实验方法

1.3.1 酵母菌的初筛

分别从不同菠萝、不同部位的果皮、果肉中采集样品。取样品各 1 g,用无菌水稀释至 10^{-2} (250 mL 三角瓶中),再稀释至 10^{-4} ,振荡 30 min 后,分别吸取 0.1 mL 上清液转入豆芽汁琼脂固体培养基平皿上,于 28 °C 恒温培养 48 h,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 2~3 次,经镜检为纯种后分别移植单个典型菌落于豆芽汁琼脂斜面培养基上 4~8 °C 保存待用^[3]。

1.3.2 酵母菌的复筛

为得到符合菠萝果酒酿造要求的优良菌株,将所分离到的酵母菌进行复筛。

1.3.2.1 酵母菌的产气性能比较

采用杜氏管发酵法^[4],先将斜面菌种 2 环接种于液

体豆芽汁培养基中,于 28 °C 振荡培养 10 h,然后接入 10 mL、5°Bx 的内置杜氏小管的豆芽汁培养基中,接种量为 5%,28 °C 静止发酵 48 h。记录产气时间和产气量。试验重复 3 次。

1.3.2.2 酵母菌的产酒精能力比较

将上一级筛选得到的酵母菌经活化后按接种量 5% 在 120 mL、9°Bx 已灭菌的菠萝汁中 28 °C 发酵 5 d 后,采用蒸馏法测其酒精度并进行感官评定。试验重复 3 次。

1.3.2.3 酵母菌耐酒精性能、耐 SO₂ 性能、耐酸性能比较

采用杜氏管发酵法,将活化二代的酵母菌分别接入含不同乙醇浓度(10%、13%、16%、19%)、不同 SO₂ 浓度(80 mg/L、120 mg/L、160 mg/L、200 mg/L、300 mg/L)、不同 pH 值(1.01、1.5、2.03、2.99、3.96)10 mL 的带杜氏小管的菠萝汁培养基中,接种量为 5%,28 °C 培养 5 d。观察杜氏管中的气泡产生情况,比较各酵母菌株对乙醇、SO₂ 和 pH 的耐受程度^[5-6],以确定适合果酒酿造的菌株。

1.3.2.4 产香能力的比较

测定酵母菌的产香能力:将活化后的酵母菌接入到 22°Bx 的菠萝汁中,15 °C 发酵 30 d。打开瓶塞,轻轻摇动,选择特征性香气突出的菌株^[7]。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的初筛

从不同菠萝的不同部位共采集样品 76 份,根据《The yeasts:a taxonomic study》(第三版)^[8],初步判定分离得到酵母菌 101 株。

2.2 酵母菌的复筛

2.2.1 酵母菌的产气性能比较

将分离得到的 101 株酵母菌进行产气性能比较,结果见表 1。

表 1 杜氏小管产气情况

发酵时间(h)	产气情况	菌株数量
24	++	5
	+++	6
48	++	15
	+++	20

注:“+++”表示杜氏小管中充满气体;“++”表示杜氏小管中充满 2/3 气体;“+”表示杜氏小管中充满 1/3 气体;“-”表示杜氏小管中没有气体。以下相同。

由表 1 可以看出,在含有杜氏小管的发酵液中经过 48 h 培养,35 株酵母菌可产生较多的气体,打开棉塞摇动这些试管可以闻到淡淡的酒香。表明这些酵母菌在厌氧条件下能较快地发酵豆芽汁产生乙醇和二氧化碳,因此保留这 35 株酵母菌进行下一步筛选。

2.2.2 酵母菌的产酒精能力比较

35 株酵母菌发酵产酒精能力结果见表 2。

表 2 酵母菌产酒精能力

项目	酒精度(%vol)						
	≥10	9~10	8~9	7~8	6~7	5~6	4~5
酵母菌株数	4	3	4	10	10	3	1

由表 2 可知,酒精产率大于 7% 的酵母菌株有 21 株,对这 21 株酵母菌酿造的菠萝果酒进行感官评定,其中 16 株酵母菌所酿造的菠萝果酒口感协调,香气平衡,且有浓郁的菠萝香味,具有一定的典型性。将此 16 株作为下一步的筛选菌株。

2.2.3 酵母菌耐酒精性能、耐 SO₂ 性能、耐酸性能比较

2.2.3.1 酵母菌在不同乙醇浓度菠萝汁中的产气情况

酵母菌在不同乙醇浓度菠萝汁中的产气情况见图 1。

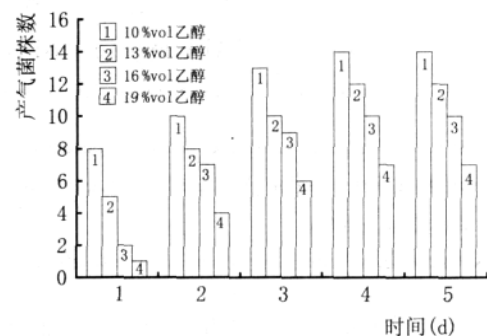


图 1 酵母菌在不同乙醇浓度中的产气情况

由图 1 可知:在 28 °C 培养 4 d 后,有 14 株酵母菌株能够耐受 10%vol 的酒精度,有 12 株酵母菌株能够耐受 13%vol 的酒精度,有 8 株酵母菌株能够耐受 16%vol 的酒精度,有 5 株酵母菌株能够耐受 19%vol 的酒精度。将能耐受 16%vol 的酒精度且香气较好的 7 株酵母菌株进行下一步的耐二氧化硫筛选。

2.2.3.2 酵母菌在不同浓度 SO₂ 菠萝汁中的产气情况

实验结果表明,筛选出的这 7 株酵母菌对 SO₂ 的耐性有较明显的差别,其中 A4C13、A2B22 的菌株能够耐受 SO₂ 浓度为 300 mg/L;B1C2、A2B2、A1B11 能耐受 SO₂ 浓度为 200 mg/L。符合酿造果酒中 SO₂ 的添加量为 50~150 mg/L 的标准^[9]。因此,将这 5 株菌株进行下一步筛选。

2.2.3.3 酵母菌在不同 pH 菠萝汁中的产气情况

产香酵母所用的培养液需要一定量的有机酸,以利于产香酵母的生长和酯类物质的生成^[10]。产香酵母发酵适宜的 pH 值在 3.5~5.5 范围内,故对以上 5 株酵母进行耐酸度筛选,结果见表 3。

由表 3 可知,除了编号为 A2B22、A2B2 的酵母菌株外,其他 3 株均能耐受 pH1.5 的酸度,耐酸性较强,故这 3 菌株作为下一步筛选的出发菌株。

表3 酵母菌在不同 pH 中的产气情况

菌株编号	酸度 (pH 值)				
	3.96	2.99	2.03	1.50	1.01
B1C2	+++	+++	+++	+++	-
A1B11	+++	+++	+++	+++	-
A4C13	+++	+++	+++	+++	-
A2B22	+++	+++	+++	-	-
A2B2	+++	+++	+++	+	-

2.2.4 酵母菌产香能力的比较

酿酒酵母应具有较强的产酯能力,所以选择果酒酵母的标准之一是在同等条件下有较强的产酯能力,产酯能力的强弱主要依靠嗅觉判断。本试验对上述3株酵母菌进行了产酯筛选^[11],选出了1株产酯能力较强的酵母菌 A4C13,菌株来自菠萝果肉。

将上述各项测试结果(产气性能、产酒精能力、耐酒精能力、耐 SO₂ 能力、耐酸性及产酯能力)综合分析,确定 A4C13 为最优菌株。

3 讨论

适合菠萝果酒酿造的优良酵母菌株不仅应具有较强的起酵能力、发酵能力和良好的耐乙醇、耐 SO₂、耐酸能力,更重要的是能酿制出品质好的菠萝果酒。因而,必须进行酿制菠萝果酒发酵试验,并对其酿造的菠萝果酒进行理化指标分析和感官评价。只有酿造出残糖低、酒精含量高、酒质好的优质菠萝果酒的菌株才有可能适合菠萝果酒酿造的优良酵母菌株。这与 Mangas^[12]认为优良的果酒酿造酵母所应具有的特性是吻合的^[12]。但本研究的所有试验都是在实验室条件下进行的,故此菌株在实际

(上接第20页)

- 进展, 2002, 21(1):37-39.
- [9] 陶玉贵, 汤斌, 黄伟, 等. 环境条件对压力脉动发酵生产苏云金芽孢杆菌的影响[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(5):466-468.
- [10] 李宏强, 陈洪章. 固态发酵的参数周期变化对微生物发酵的影响[J]. 生物工程学报, 2005, (5):440-445.
- [11] 付小果. 压力脉动周期刺激对固态发酵微生物信息传递的影响[D]. 北京: 北京化工大学, 2006.
- [12] 徐福建. 新型纤维素酶固态发酵[D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所, 2002.
- [13] 陶玉贵, 项骝文, 周大潮. 压力脉动发酵生产酸性蛋白酶饲料的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2003, (3):23-24.
- [14] 徐福建, 陈洪章, 邵曼君, 等. 纤维素酶固态发酵环境扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 2002, 21(1):25-29.
- [15] Xu Fujian, Chen Hongzhang, Li Zuohu. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulose production in solid-state fermentation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30: 45-48.
- [16] 徐福建, 陈洪章, 李佐虎. 纤维素酶气相双动态固态发酵[J].

生产中的作用效果, 还需进行进一步的中试实验验证。

参考文献:

- [1] 悉惠萍. 中国果酒[M]. 北京: 轻工业出版社, 1991.
- [2] 潘咏梅. 菠萝汁及加工、发酵过程中风味变化的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2007.
- [3] 徐飞, 钮福祥, 张爱军, 等. 速溶紫薯粉的加工工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2005, (1):102-104.
- [4] 张翠英. 优良果酒酵母的分离及发酵性能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2006.
- [5] 熊子书. 中国酿造酵母菌的研究—不同酒类酵母筛选与应用(上)[J]. 酿酒科技, 2002, (5):28-32.
- [6] 吴思方, 孙灿. 产酯酵母产酯条件的研究[J]. 武汉工业学院学报, 1996, (1):62-21.
- [7] 李剑芳, 张赅. 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.
- [8] Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell. The yeasts, A taxonomic study [M]. 4th ed. Florida: ELSEVIER, 2001. Third revised and enlarged edition The Netherlands: Elsevier Science Publisher B.V., 1984.
- [9] 沈昌. 优良果酒酵母菌筛选与紫甘薯酒发酵工艺研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [10] 熊子书. 中国酿造酵母菌的研究——不同酒类酵母筛选与应用(下)[J]. 酿酒科技, 2002, (5):19-21.
- [11] Rainier S, Pretorius I. S. Selection and improvement of wine yeasts[J]. An. Microbiol, 2000, 50(1):15-31.
- [12] J. J. Mangas, C. Cabranes, J. Moreno et al. Influence of cider-making technology on cider taste[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 1994, 27(6):583-586.
- [17] 陈洪章, 李佐虎. 秸秆生态工业建设的关键技术[J]. 农业工程学报, 2001, 17(3):1-4.
- [18] 陈洪章, 邱卫华. 秸秆发酵燃料乙醇关键问题及其进展[J]. 化学进展, 2007, 19(7/8):1116-1121.
- [19] 徐先炉. 白僵菌工业化生产工艺研究[J]. 浙江工业大学学报, 2003, 31(5):520-523.
- [20] 赵华, 张小勇, 李佐虎. 以麦秸为基质豌豆根瘤菌的压力脉动固态发酵[J]. 生物工程学报, 2001, 17(5):598-600.
- [21] 付小果, 陈洪章, 李宏强, 等. 压力脉动固态发酵微生物蛋白质及机理的研究[J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(3):42-46.
- [22] M. Tohyama, T. Patarinska, Ziwen Qiang etc. Modeling of the mixed culture and periodic control for PHB production[J]. Biochemical Engineering Journal, 2002, (10):157-173.
- [23] 宋俊萍, 陈洪章, 马润宇. 甜高粱秆固态发酵制取酒精的研究[J]. 酿酒, 2007, 34(1):81-83.
- [24] 康利平, 刘莉, 刘萍, 等. 甜高粱茎秆固态发酵生产燃料乙醇的研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(7):181-184.