

一株桑椹果酒酵母的分离筛选及耐性测定

赵样杰^{1,2}, 涂国全¹, 肖更生², 杨荣玲^{1,2}, 刘学铭², 陈卫东²

(1.江西农业大学生物工程系, 江西 南昌 330045; 2.广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工公共实验室, 广东 广州 510610)

摘要: 对来源于成熟桑椹果实、桑叶以及桑果园的土壤的酵母进行筛选, 以 TTC 显色法及产气初筛、大瓶复筛以及放大试验对菌株进行优选, 得到一株优良的酵母菌株, 发酵结果表明, 该酵母菌起酵快, 7 d 发酵即可产酒 11.7 %Vol。对其进行各种耐性测定, 证明其能耐受高糖、高酒精度、高二氧化硫浓度, 适合在桑椹果汁 pH 中进行正常产酒发酵, 综合各种性能表明, 该菌能取代葡萄酒酵母进行桑椹果酒的酿造。

关键词: 微生物; 桑椹果酒; 酵母; 分离; 耐性测定

中图分类号: Q93- 3 ; TS261.1 ; TS262.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001- 9286 (2007) 01- 0028- 04

Isolation of a Yeast Strain for Mulberry Fruit Wine and Determination of Its Tolerance

ZHAO Xiang-jie^{1,2}, TU Guo-quan¹, XIAO Geng-sheng², Yang Rong-ling^{1,2}, LIU Xue-ming² and CHEN Wei-dong²

(1.Department of Bioengineering of Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045; 2.The Sericulture & Farm Product Processing Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Open Access Laboratory of Agricultural Product Processing, Guangzhou, Guangdong 510610, China)

Abstract: The yeast strains from ripe mulberry fruits, leaves and orchard soil were screened preliminarily and then a quality strain with rapid fermentation performance (7 d fermentation could reach 11.7 %Vol liquor yield) was screen through secondary screening by the methods of TTC color reaction, gas producing primary screening, and big bottle fermentation secondary screening and amplification test. The determination of the strain tolerance proved that it could tolerate the high content of sugar, alcohol and SO₂, it could carry out normal fermentation under mulberry juice pH value, and it could take the place of grape wine yeast for mulberry wine production because of its favorable properties.

Key words: microbe; mulberry fruit wine; yeast; isolation; tolerance determination

桑椹为桑科落叶乔木桑树 *Morus alba* 的成熟果实。桑椹果肉多汁、滋味甘美、营养丰富, 功能成分突出, 具有诸多保健功能, 是药食两用之佳品, 自古以来, 桑椹就被作为中药材应用。中医认为: 桑椹味甘性寒, 归心、肝、肾经, 具有滋阴补血、生津止渴、润肠通便等功效, 现已被我国卫生部列入‘既是食品又是药品’的名单^[1,2]。

桑椹酿酒有着悠久的历史, 我国中医名著《本草纲目》就有桑椹‘捣汁饮, 解酒中毒; 酿酒服, 利水气, 消肿’的记载^[3]。大力发展桑椹果酒加工产业, 既可以解决桑椹果实季节性强、极不耐储运的问题, 又能满足人们对高

品质生活资料的需求, 又符合国家在酿酒行业的‘四个转变’政策, 促进果桑资源综合利用及深加工的发展, 还能增加果农收入, 提高经济效益。

工业上尚无酿造桑椹果酒的专用酵母, 用于工业化生产的多为葡萄酒酵母, 而葡萄汁与桑椹果汁之间成分差别很大, 所以用葡萄酒酵母酿造桑椹果酒就会产生所酿果酒口味欠佳的问题, 不能突出桑椹果汁的特有香气, 因此选育优良的人工酵母势在必行^[4]。本实验通过采集来源于成熟桑椹果实、桑叶及桑果园的土壤中的微生物并进行有效的分离筛选, 得到一株适合于酿造桑椹果

基金项目: 粤港农产品深加工关键领域重点突破招标项目 (No. 200549832)。

收稿日期: 2006- 09- 14

作者简介: 赵样杰(1982-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物次级代谢产物。

通讯作者: 涂国全, 教授, E- mail: tuguoquan@263.net; 肖更生, 研究员, E- mail: gshxiao@yahoo.com.cn; 刘学铭, 研究员, E- mail: xueningliu@21cn.com;

酒的酵母菌 E44, 与工业上使用的葡萄酒干酵母相比, E44 起酵速度快, 产酒度高, 风味独特, 适于高品质桑椹果酒的酿造。结合各种耐性测定证实该菌可以取代葡萄酒酵母进行桑椹果酒的酿造。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料及试剂

对照菌株(CK): 安琪葡萄酒活性干酵母, 安琪酵母股份有限公司。

桑椹果汁: 鲜桑椹果实榨汁, 本所桑果汁厂。

TTC: A.R, 上海灵锦精细化工有限公司。

其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 培养基

斜面及平板培养基: 麦芽汁琼脂培养基, 广州环凯试剂公司。

种子培养基: 麦芽汁培养基, 广州环凯试剂公司。

富集培养基: 葡萄糖 5 %, KH_2PO_4 0.25 %, 尿素 0.1 %, 酵母膏 0.05 %, MgSO_4 0.1 %, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.01 %, 孟加拉红 (1 %的水溶液) 0.023 %, 于 120 °C 高压灭菌 15 min。

发酵培养基: 经成分调整的桑椹原汁, 广东省农科院蚕业所花都基地。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集与菌种的培养分离

从位于广州市花都区赤坭镇的宝桑园新生态农业示范基地的桑果园中随机摘取成熟桑椹, 并采集部分桑叶及桑果园浅层地表土壤样品。鲜桑椹榨汁后自然发酵, 采集的其他样品置于灭菌的桑椹果汁中发酵。

当样品在发酵瓶中有大量气泡产生时, 取发酵液 10 mL 接入 90 mL 酵母富集培养基中, 28 °C 培养 18~24 h, 然后取发酵液梯度稀释和平板涂布, 每一梯度做 3 个平行, 于 28 °C 培养箱中培养 48 h, 将具有典型酵母菌落形态的菌落用竹签在麦芽汁培养基平板上划线分离, 直至有单菌落出现, 镜检观察, 选出纯单菌落, 接在麦芽汁试管斜面上, 28 °C 培养 12 h, 4 °C 冰箱中保藏, 备用。

1.2.2 酵母菌种的三级筛选

初筛按王梅等^[5]的方法进行菌种筛选, 由菌落的颜色来判定酵母产酒精能力的大小, 挑选红色的菌落作为入选菌; 复筛是在加有杜氏小管的大试管液体培养基中进行, 接入分离的斜面菌种, 25 °C 恒温培养箱中培养, 隔 6 h 记录菌体生长及发酵情况。将有典型酒香生成, 气泡生成较多的酵母菌作为复筛菌株; 放大实验是将复筛入选菌种经活化后, 按 5 % 的接种量接种于发酵培养基, 于 25 °C 生化培养箱中发酵 7 d, 进行感官评定和理

化指标测定。选取发酵后酒体桑椹香气浓郁, 口味纯正, 风格独特, 酒精含量在 10 % Vol 以上的菌种为入选菌种。

1.2.3 性能测定

将筛选酵母用葡萄酒酵母作对照菌株在发酵培养基中进行常规发酵试验, 在其发酵周期中定时取样测定果酒中的糖酸度、酒度和 pH 值。

1.2.4 菌种的耐性测定

分别以不同乙醇浓度、糖度、二氧化硫浓度以及 pH 值作为其生长及发酵的影响因素, 测定菌种在这些影响因素中的耐性。

1.2.5 酵母细胞数与死亡率的测定

采用 Neubauer 血球计数板法计数。25×16 型血球计数板的计算公式如下:

$$\text{菌细胞数(mL)} = \frac{\text{菌细胞数}}{80 \text{ 小格内细}} \times 400 \times 10000 \times \text{稀释倍数}$$

存活率采用先次甲级蓝染色, 再利用血球计数板镜检计数的方法。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{经次甲基蓝染色显蓝色的酵母数}}{\text{全部酵母数}} \times 100 \%$$

2 结果与分析

2.1 酵母菌株的分离筛选

2.1.1 不同来源样品酵母的分离

在多次采样基础上, 经过富集培养和划线分离, 共分离出酵母菌 143 株。按其来源进行分类, 结果表明从桑叶上筛选到 61 株菌, 占筛选到总菌数的 42.7 %, 而从果实上分离到 39 株, 只占到 27.2 %。由于本批试验样品是在 11 月中下旬采集的, 天气温度可能是造成从桑椹果实筛选到的菌种偏少的原因。但由于此时降雨水量较少, 光照充足, 桑椹果实含糖量较高, 易于筛选到耐高糖及产酒率高的酵母菌株。

2.1.2 桑椹果酒酵母的筛选

从采集的样品中共分离得到 143 株酵母菌。根据 TTC 颜色变化, 挑出具有典型酵母菌菌落特征的菌株 78 株, 初筛入选菌经杜氏小管产气实验得到 24 株都有酒香生成、部分酒香浓郁的菌株, 其中在 12 h 内有大量气泡产生的菌株有 5 株。将这 5 株发酵性能较好的酵母菌株和对照葡萄酒酵母经大瓶发酵后, 综合理化指标与感官评定结果见表 1。

表 1 表明, 菌株 E44 经 7 d 的主发酵后, 酒液的酒度最高为 11.7 % Vol, 而且有浓郁的果香气, 口味纯正, 风格典型, 残糖含量为 7.1 %, 与目前工业上应用的葡萄酒酵母相比, 产酒高, 故 E44 为入选优良酵母菌种。

表 1 大瓶发酵试验结果

菌株	可溶性固形物 (%)	酒度 (20℃, %Vol)	pH 值	香气
Y42	6.9	10.4	3.80	有不愉快气味
Y41	7.0	10.9	3.81	有不愉快气味
E44	7.1	11.7	3.78	香气浓郁
Y12	7.1	10.4	3.78	香气淡
Y101	7.1	11.4	3.80	香气不明显
CK	7.1	10.7	3.80	香气较浓

2.2 选育酵母的性能测定

2.2.1 发酵过程中的糖度、酒精度的变化(图 1)

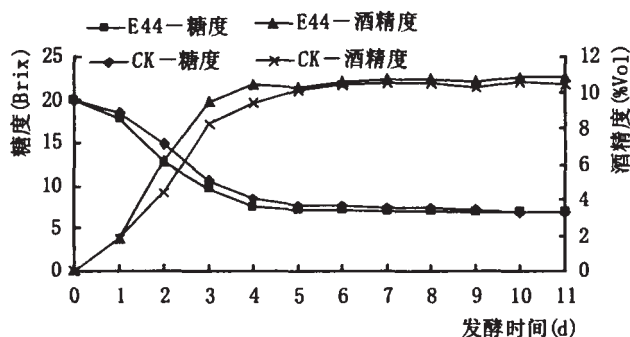


图 1 发酵过程中的糖度、酒精度变化

对入选的 E44 酵母和对照酵母菌种进行发酵试验,从图 1 中可以看出,第 1 天酵母降糖缓慢,酒精度增长较慢,说明此时酵母正处于大量增殖阶段,菌体产生量大。从第 2 天开始糖度迅速下降,酒精度也较快增长,进入发酵阶段,主发酵进行到第 5 天后表观糖度和酒精度趋缓,进入后发酵阶段。通过与对照菌株的对比可以发现,E44 酵母比葡萄酒酵母起酵快,发酵度平稳,能更好地防止杂菌污染,是优良的酵母菌种。

2.2.2 耐酒精能力的比较

将麦芽汁加入带有杜氏小管的试管中,高压灭菌,冷却后按比例加入无水乙醇,制成含不同乙醇浓度梯度的培养基(见表 2)。将活化后的 E44 酵母和对照葡萄酒活性干酵母按 5 %的接种量(菌数为 1.5×10^7 个/mL)于生化培养箱中 32℃培养 10 h 后测定细胞的死亡率,并于 660 nm 处测定 OD 值,根据 OD 值确定菌体的生长情况,结果见图 2 和图 3。

表 2 不同酒精度麦芽汁的配置

项目	麦芽汁中酒精量(%Vol)						
	3	6	9	12	15	18	20
麦芽汁(mL)	10	10	10	10	10	10	10
无水乙醇(mL)	0.31	0.64	0.99	1.36	1.76	2.2	2.5

从图 2 和图 3 可看出,这两种酵母对酒精的耐受性是不同的,从整个变化趋势来看,相同乙醇浓度下筛选酵母比对照酵母菌株的死亡率低,即耐乙醇性能好。在乙醇浓度低于 6 %时两菌的死亡率较低,在乙醇浓度大

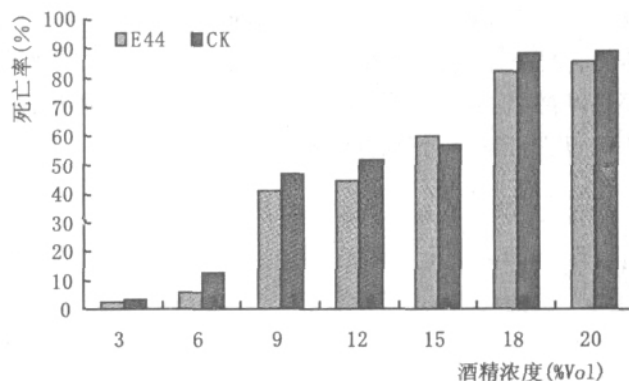


图 2 不同乙醇浓度下酵母死亡率

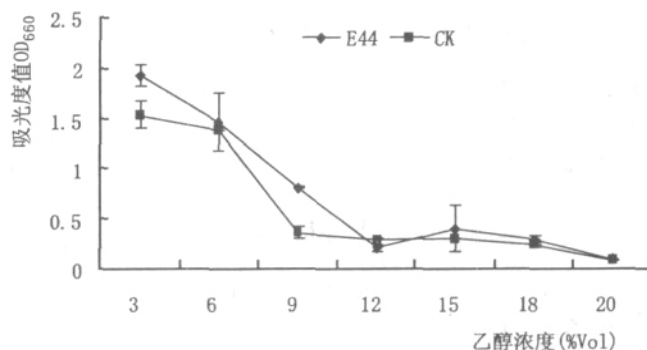


图 3 不同乙醇浓度下酵母的耐受性

于 9 %时两菌的死亡率较高。在乙醇浓度为 9 %时,E44 与 CK 的死亡率分别为 41.09 %和 47.06 %,此后随着乙醇浓度的不断增大,酵母菌种的死亡率也不断增大,在酒精度为 18 %时,E44 的死亡率为 82.2 %,而 CK 已达到 88.2 %。结合图 3 可以看出,当乙醇浓度低于 6 %时,受乙醇影响两菌的存活率逐渐下降,但由于酵母菌自身具有一定的抗性,其下降曲线较为平缓。从图中的近似直线的变化过程可以看出,在乙醇浓度大于 9 %时,酵母细胞的存活率急速下降。在达到 12 %时酵母细胞受到很大抑制,继续增大乙醇浓度,酵母细胞的死亡率接近 100 %。一般来说,酵母细胞的发酵能力与菌株对酒精的耐性成正相关^[6,7]。相对于一般果酒发酵中产酒度来看,本筛选酵母对酒精的耐性完全可满足其发酵生产的要求。

2.2.3 耐高糖度能力比较

将酵母种子液接种于调整可溶性固形物含量分别为 5 %,10 %,20 %,30 %,40 %,50 %和 60 %(w/v) 的麦芽汁液体培养基中,于最适生长温度下培养箱中恒温培养 10 h,于 660 nm 处测定 OD 值,根据 OD 值确定不同糖浓度下菌体的生长情况。结果见图 4。

从图 4 可以看出,两株菌都随着糖浓度的增加而呈现出良好的生长状态,在含糖量为 20 %时都达到最大吸光度值。当糖浓度大于 20 %后,两者的生长都开始受到抑制,且随着糖浓度的增加而抑制作用显著加强。在

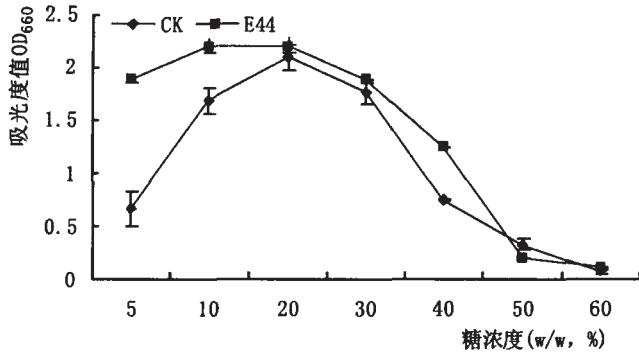


图4 不同糖度下酵母的耐受性

含糖量为 60 % 时, 两种酵母已经停止了生长。

由于桑椹果汁含糖量较少, 在桑椹果酒生产中为了使产品达到一定的酒精度, 常进行糖度的调整。由于桑椹果酒发酵过程中糖酒转化比率比葡萄酒发酵的转化比率低约 10 %^[8], 因此在桑椹果酒发酵之前必然要对果汁成分进行调整, 糖分调整的方法不外乎两种: 一次添加法和多次添加法。两种方法进行的糖分调整都不会使发酵液的糖度高于 30 %, 而 E44 酵母在含糖量为 30 % 以下的发酵环境中的耐糖力强于对照酵母菌株, 因此使用试验选育的酵母菌能很好地适应高糖环境, 有利于发酵过程的顺利进行。

从整体上看, E44 的吸光度值在每一点均比对照酵母菌株要高, 这说明 E44 对高糖的耐受能力要好于对照菌, 因此适于桑椹果酒的酿造。

2.2.4 耐酸度能力的比较

分别将活化后的筛选酵母 E44 和 CK 菌株接种于不同 pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 和 9.0 的培养基中, 接种量为 5 % (1.5×10^7 个 / mL), 于最适生长温度下恒温培养 10 h, 于 660 nm 处测定 OD 值, 根据 OD 值确定不同 pH 条件下菌体的生长情况, 结果见图 5。

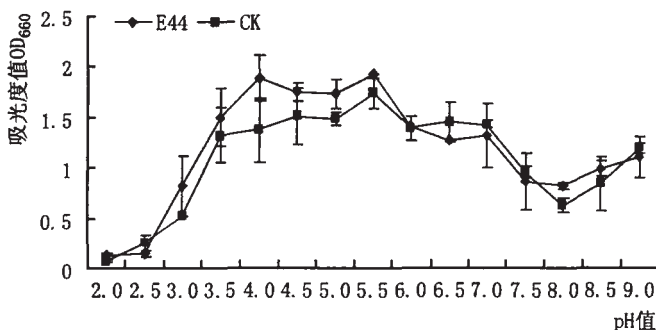


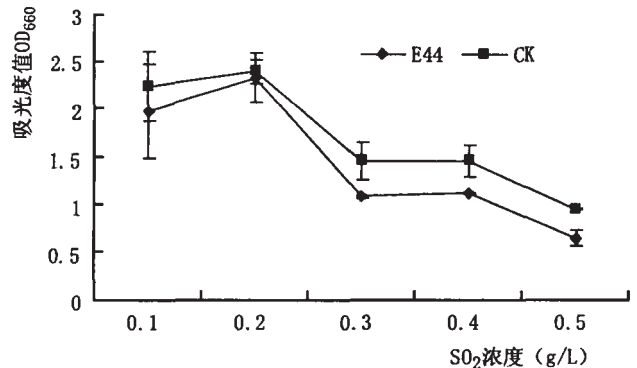
图5 不同 pH 下酵母的耐受性

从图 5 可以看出, 在 pH 2.0~2.5 以及 pH 6.0~9.0 之间两种酵母的生长较差且大体相当, 由于在此范围内并不是进行桑椹果酒酿造的最适 pH, 所以不会对正常发酵产生任何不良影响。在 pH 2.5~6.0 之间, 两菌 OD

值的波动非常明显, 而且 E44 的 OD 值一直位于 CK 之上, 这说明在此 pH 值范围内 E44 明显要比 CK 生长活跃, 也就是对这一范围内酸性环境的适应能力明显强于对照菌株, 而由于桑椹果汁的 pH 值在 4 左右, 所以说 E44 更适合于在这一 pH 范围内增殖及发酵, 所以该选育酵母更适合桑椹果汁发酵环境, 产酒稳定, 是酿造高品质桑椹果酒的优良酵母。

2.2.5 对 SO₂ 的耐性试验

分别将活化后的酵母 E44 和 CK 菌株接种于不同 SO₂ 添加量 (0.1 g/L, 0.2 g/L, 0.3 g/L, 0.4 g/L 和 0.5 g/L) 的发酵培养基中, 接种量为 5 % (1.5×10^7 个 / mL), 于最适生长温度下恒温培养 10 h, 于 660 nm 处测定 OD 值, 根据 OD 值确定不同 SO₂ 添加量下菌体的生长情况。结果见图 6。

图6 不同 SO₂ 浓度下酵母的耐受性

在果酒酿造过程中, 通常在发酵液中添加一定浓度的 SO₂, 起杀菌、增酸、澄清果汁、促进果皮中某些成分的溶解以及防止酒体的氧化作用^[9]。加入合适剂量的 SO₂ 能有效杀灭桑椹果汁中的杂菌, 促使发酵正常开始。因此要确保选育酵母能够耐受一定浓度 SO₂ 的能力。发酵过程中 SO₂ 的添加量通常为 200 mg/L 左右, 对于有轻度变质的果汁可适当增大剂量。

图 6 结果表明, 当 SO₂ 添加量低于 200 mg/L 时, 对酵母的生长及发酵无明显的影响, 筛选酵母 E44 和 CK 酵母均能够正常发酵。在 SO₂ 浓度达到 400 mg/L 时, 自选酵母虽然发酵速度减慢, 但仍能够起始发酵, 而葡萄酒酵母发酵速度缓慢, 几乎不能发酵。由于 CK 菌株是工业化比较成熟的菌株, 具有很强的耐 SO₂ 的能力, 而上述试验结果也表明, 筛选酵母也具有较强的耐 SO₂ 能力。

虽然 SO₂ 在桑椹果酒酿造过程中是不可取代的, 但过量的 SO₂ 对人体健康也是有危害的, 为了减少化学药品对人类的危害, 应尽量减少 SO₂ 的用量。在发酵酒卫生标准 (GB 2758-2005) 中明确规定果酒中总 SO₂ 含量

(下转第 35 页)

的措施研究。

3.2 通过添加磷酸氢二铵和硫酸铵营养素,可增加 α 值,其中,磷酸氢二铵在添加 200 mg/L 时,游离 SO₂ 为 21.5 mg/L, α 值达到最大值 17.5 %; 硫酸铵添加量为 800 mg/L 时,游离 SO₂ 为 24.4 mg/L, α 值达到最大值 17.4 %。

3.3 在比较低的 pH 值下亚硫酸的抑菌等效果好。因此在不影响起酵前提下,适当增加总酸的含量,调低 pH 值,达到减少亚硫酸添加的目的。

3.4 实验中,添加营养素的样品比未添加营养素的样品发酵快,缩短了发酵周期。通过添加 N 源,减少酵母利用荔枝汁中蛋氨酸,有利于减少不利于荔枝酒风味的硫化物生成。但由于过量的含氮化合物也会影响到酒的风味和微生物的稳定性,而且还会形成致癌物质氨基-甲酸乙酯的前体物质^[7],各国对氮源添加量都有严格规定;另外过快的发酵,会使荔枝酒中杂醇油增加,因此添加量尽量不能过多。

参考文献:

- [1] 方强,籍保平,李博,张泓.营养素对苹果酒中结合 SO₂ 影响的研究[J].食品科学,2005,26(2):146-151.
- [2] Basil Jarvis,Andrew G.H.Lea.Sulphite Binding in Ciders[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2000,35:113-127.
- [3] 肖德润.关于葡萄酒的 SO₂ 与其结合成分[J].食品与发酵工业,1979,(6):65-81.
- [4] 蔡定域.酿酒工业分析手册(第一版)[M].北京:轻工业出版社,1988.
- [5] A. Yasuhara and T. Shibamoto. Analysis of Aldehydes and Ketones in the Headspace of Heated Pork Fat[J]. Journal of Food Science,1989,54(6):1471-1472.
- [6] Andrew G.H.Lea et al.Analytical Techniques for the Estimation of Sulphite Binding Components in Cider and Wine[J]. International Journal of Food Science and Technology,2000,35: 105-112.
- [7] 曾新安,于淑娟.酿造过程中葡萄酒氨基酸变化[J].酿酒科技,2006,(4):50-51.

(上接第 31 页)

不得高于 250 mg/L。因此筛选酵母完全可以在此浓度下进行桑椹果酒的发酵生产。

3 讨论

实验表明从成熟桑果表皮、果园土壤以及桑叶上都能筛选到酵母菌。而且通过筛选、分离纯化以及发酵实验,选出了细胞活力强、起酵快、产酒率高、风味佳的桑椹果酒专用优良酵母菌种。通过其对酒精浓度、糖度、pH 值以及二氧化硫浓度的耐性试验,发现该酵母对酒精、糖分、二氧化硫都有一定的耐性,且优于对照菌种,并且在桑椹果汁 pH 范围内有优良的发酵性能。综合以上试验结果表明,该菌在发酵性能上完全可以取代葡萄酒干酵母进行桑椹果酒的发酵,并有利于提高果酒的品质。同时该菌还具有进一步诱变和推广使用的价值。此外,在进行工业化应用之前还需要对其进行更细致的发酵试验及菌种的驯化培养和鉴定工作。

参考文献:

- [1] 刘学铭,肖更生,陈卫东.桑椹的研究与开发进展[J].中草药,

2001,32(6):569-571.

- [2] 肖更生,徐玉娟,刘学铭,等.桑椹的营养、保健功能及其加工利用.中药材,2001,24(1):70-72.
- [3] 梁艳英,仁玉巧,王华.桑椹果酒及饮品的研究进展[J].酿酒,2005,32(6):48-50.
- [4] 王俊汭,杨丽娟,冯作山.优良香梨酵母的选育[J].酿酒,2003,30(6):26-29.
- [5] 王梅,张澎湃,帅桂兰,等.TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J].酿酒,2001,28(5):62-64.
- [6] Thornton R.J.New yeast strains from old-the application of genetics to wine yeast[J].Food Technol.Australia,1983,35:46-50.
- [7] Romano P.,Soli M.G.,Grazia L,et al.Improvement of a wine Saccharomyces cerevisiae strain by a breeding program[J].Appl.Environ.Microbiol.,1985,50:1064-1067.
- [8] 梁建芬,韩北忠,欧南骏.桑椹酒发酵工艺的研究[J].中国酿造,2003,(4):29-30.
- [9] 朱宝镛.葡萄酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1995.

“超级酿酒酵母及其应用技术”获湖北省科技进步一等奖

本刊讯 据悉,“超级酿酒酵母的研制及其在酒精浓醪发酵中的应用”获 2006 年湖北省科技进步奖一等奖。

超级酿酒酵母的酒精浓醪发酵工艺先进合理,所选择的同步糖化发酵技术,能够降低染菌的机会,减少渗透压对酵母生长、发酵的影响,使酒精浓醪发酵的大规模工业化生产成为现实。该产品使用简便适用范围广,具有发酵活性强、产酒精浓度高、发酵周期短、生产稳定等特点,能够显著提高设备利用率,降低能耗和酒精生产成本,减少废物排放,具有显著的经济效益和社会效益。

目前,超级酿酒酵母已在我国所有燃料乙醇公司以及全国 100 多家大中型酒精、化工企业应用,出口到巴西、英国、德国、泰国等 20 多个国家和地区。(陶然)