

一株酿造枣酒优良发酵酵母菌的筛选

张忠勇,陈 双,毛文超,李 兰

(河南科技学院生命科技学院,河南 新乡 453003)

摘 要: 以河南内黄枣园生产的优质大枣、烂枣以及枣园土壤为分离源,通过富集培养和划线分离,获得 67 株酵母菌,通过比较酵母菌的产气能力、小瓶发酵枣酒的感官评价及理化检测结果、耐酒精能力、耐 SO₂ 能力以及酵母菌凝集能力等指标筛选,最终筛选获得 1 株适宜酿造枣酒的酵母菌 ZJ16。研究 ZJ16 的菌落形态特征,并用枣浸提液为发酵原料对其发酵能力进行测定,发酵枣酒酒精度为 9.8 %vol,发酵酒呈琥珀色,清澈透亮,枣香浓郁,酒体丰满,酸甜适口。

关键词: 微生物; 酵母菌; 筛选; 枣酒

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)03-0033-04

Screening of A Fine Yeast Strain for Jujube Fruit Wine Production

ZHANG Zhong-yong, CHEN Shuang, MAO Wen-chao and LI Lan

(He'nan College of Science & Technology, Xinxiang, He'nan 453003, China)

Abstract: Quality jujube, rotten jujube and soil collected from Neihuang Jujube Garden were used as isolation source. And 67 yeast strains were isolated from them through accumulating culture and marking-on separation. Through the comparison of their gas-producing capacity, physio-chemical indexes, ethanol tolerance, SO₂ tolerance, flocculating capability, and sensory evaluation of jujube fruit wine by bottle fermentation, a fine yeast strain--ZJ16 was finally obtained which was suitable for jujube fruit wine production. The morphological features of ZJ16 were observed and its fermenting capacity was tested with jujube extracting liquid as fermenting raw materials. The alcohol content of produced jujube fruit wine was 9.8 %vol and the wine was transparent and amber in color with harmonious jujube aroma and enjoyable taste.

Key words: microbe; yeast strains; screening; jujube fruit wine

枣的栽培起源于我国,有 3000 多年的历史,我国自古就有“每日三颗枣,永远不会老”的谚语^[1]。《齐民要术》所论的 42 种果品中,枣居首位,与桃、李、杏、栗并称“中国五果”,红枣不仅具有很高的营养价值,内含蛋白质、脂肪、糖、钙、铁、维生素等多种人体所需要的微量元素,有“百果之王”和“活维生素之丸”之誉,而且有很高的药用价值,味甘性温,主要功能为补中益气,养血安神,枣作为一种高级滋补果品不仅被古代医学所推崇,也被现代医学所证明。目前,大枣成品多处于传统的初级加工阶段,主要以干枣的形式面世,辅以少量的大枣汁饮料,深加工甚少,产品较单一简单^[2]。酒类消费近年来倡导以低度酒取代高度酒,果酒取代粮食酒,在果酒酿造中,酵母菌是发酵的原动力,要提高生产效率并且使果酒的酿造便于控制,保证安全高效生产,就要筛选出优良的生产菌株进行纯种发酵^[3]。因此,本研究旨在筛选出 1 株优良的枣酒生产用酵母菌,为枣汁发酵生产枣酒蒸馏酒奠定基础。

基金项目: 河南科技学院生科院科技创新项目。

收稿日期: 2010-12-02

通讯作者: 李兰(1972-)女,河南人,高级实验师,主要从事发酵食品,天然活性物质的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

大枣:河南内黄大枣。

菌株分离源:河南内黄枣园生产优质大枣,烂枣以及枣园土壤,对照菌株为安琪葡萄酒活性干酵母。

发酵原料:河南内黄枣园生产新鲜大枣或干枣的浸提液。

酵母菌分离培养基:虎红琼脂培养基;PDA 培养基^[4]。

酵母菌筛选培养基:PDA 液体培养基。

酵母菌鉴定培养基:麦芽汁培养基;PDA 液体培养基。

1.2 试剂

无水乙醇、亚硫酸、果胶酶、柠檬酸、蔗糖均为市售分析纯。

1.3 仪器与设备

高压蒸汽灭菌锅:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;无菌操作台:苏州净化设备有限公司;分析天平:上海精天电子仪器有限公司;手持糖度计:成都泰华光学有限公司;榨汁机:九阳料理机;恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂;显微镜、血球计数板、移液枪、酒精计、酒精蒸馏装置等实验室常用仪器。

1.4 方法

1.4.1 酵母菌的分离

1.4.1.1 酵母菌分离源的采集

采用随机取样原则采集河南内黄枣园生产的优质大枣、烂枣以及枣园土壤,共采集优质大枣10份,烂枣8份,土壤6份,分别装入无菌袋,并贮存于4℃冰箱备用。

1.4.1.2 菌种分离方法

取等量优质大枣、烂枣以及枣园土壤,分别加入适量灭过菌的枣浸提液,以淹没样品为宜,室温培养一段时间,取上部澄清液进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 等3个梯度稀释,并于虎红琼脂培养基上进行涂布分离,每个梯度做2个平行,于28℃培养箱中培养3d,据TTC颜色变化挑选出具有典型酵母菌菌落形态的菌落转入PDA斜面培养基,28℃培养3d,检查菌苔是否单纯,菌苔单纯的菌株置冰箱低温保存,并依据菌种的筛选来源顺序以ZJ1、ZJ2、ZJ3等依次编号。

安琪牌酿酒高活性干酵母的活化条件:将安琪葡萄酒酵母放入2%的蔗糖水溶液中搅拌均匀,于30℃活化40min后,冷却至25℃后使用,挑取2株菌以安琪1、安琪2编号^[5]。

试验中菌种均为5%液体种子的接种量。

1.4.2 大枣浸提液的制备

由于枣自身出汁率非常低,所以需加入一定比例的软化水,让其充分浸提。浸提方法有2种,一种是常温浸提,直接加入软化水浸提,时间为24h;另一种是热浸提。本实验采用第二种方法:通过水浴加热的方法使软化水的水温达到45~50℃,然后加入已破碎去籽的大枣,加入发酵液0.5%~0.6%的果胶酶^[6],保持6h后,取出并迅速冷却至18~20℃。浸提法的优点是不仅能降低酒中挥发酸的含量,而且有利于大枣果皮上色素的浸提,能防止杂菌感染,并提高酒的质量^[7]。

1.4.3 酵母菌的筛选

1.4.3.1 一级筛选

采用杜氏管发酵法,将初筛获得的菌株分别接入到28mL 20°Brix的麦芽汁中,在相同的培养条件下,观察酵母菌株产气泡的快慢及在规定时间内产气泡的多少,比较各株酵母的发酵能力,初步筛选出发酵性能优良的菌株,试验平行重复3次^[8]。记录产气时间和产气量。

1.4.3.2 二级筛选

采用枣汁发酵法,将枣浸提液糖度调整到20°Brix,用柠檬酸调pH为3.5,向发酵液中加入40mg/L的SO₂,分装于250mL的三角瓶中,20℃条件下,培养7d后,通过蒸馏法用酒精计测定酒精度^[9],并进行感官评定,由40人组成的品评小组进行参评对枣酒的色泽、香味、口感等感官指标进行筛选,并通过测定发酵结束时的残糖、酒精度、pH等^[10],进一步确定试验菌株的发酵能力,试验平行重复3次。

1.4.3.3 三级筛选

采用杜氏管发酵法,将酵母菌株分别接入含不同浓度乙醇(8%vol、10%vol、12%vol、14%vol、16%vol、18%vol)和不同浓度SO₂(40mg/L、50mg/L、60mg/L、70mg/L、80mg/L、90mg/L)的糖度为20°Brix麦芽汁培养基中,在相同条件下培养,观察杜氏管中气泡的产生情况,比较分析所筛选的酵母菌对不同浓度的乙醇、不同浓度SO₂的耐性,进一步确定适合枣酒酿造的菌株,试验平行重复3次。

1.4.3.4 酵母菌凝集能力

将经三级筛选获得的酵母菌接种于麦芽汁液体培养基中,25℃培养6d,利用显微镜观察酵母菌的凝集性,比较不同菌株发酵过程中产生泡沫的情况^[11]。

1.4.4 选育酵母菌种的菌落形态特征

将酵母菌接种到麦芽汁液体培养基中,28℃培养24~48h,观察酵母菌生长情况,并用血球计数板计数,并将酵母菌接种到PDA培养基上,28℃培养,观察菌落特征、细胞形态及繁殖方式。

1.4.5 选育酵母菌发酵性能的测定

将枣浸提液糖度调整到20°Brix,用柠檬酸调pH为3.5,加入0.5%~0.6%果胶酶,向发酵液中加入40mg/L的SO₂,取30个250mL的三角瓶,每瓶接入调整好的浸提液200mL,接入选育菌种。20℃条件下^[12],培养10d左右,每天取样观察,测定残糖含量、酒精度、pH值。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离

在多次采样的基础上,经过富集培养和划线分离,共获得菌种67株。按其来源分类,来自优质大枣的共22株,烂枣的28株,来自土壤的共17株。大枣和烂枣中酵母菌种类和数量较多,从中分离出大量的酵母菌,果园土壤中的菌种比较复杂,且容易染菌,所以从中分离到的酵母菌数量相对较少。

2.2 酵母菌的筛选

2.2.1 酵母菌的一级筛选

对分离得到的酵母菌进行初筛,酵母菌在杜氏管中 28 ℃ 培养 24 h,产气为杜氏管满管的菌株有 3 株,培养 36 h 产气为杜氏管满管的菌株有 14 株,培养 48 h 产气为杜氏管满管的菌株有 11 株,共筛选得 28 株,包括 2 株安琪酵母,说明这些酵母菌起酵能力较强,可能有较高的发酵效率。筛选过程杜氏管发酵产气结果见表 1。

表 1 杜氏管产气情况

发酵时间(h)	产气菌
24	ZJ16、安琪 1、安琪 2
36	ZJ5、ZJ7、ZJ12、ZJ13、ZJ17、ZJ20、ZJ22、ZJ28、ZJ37、ZJ43、ZJ47、ZJ52、ZJ55、ZJ63
48	ZJ3、ZJ4、ZJ8、ZJ16、ZJ19、ZJ24、ZJ25、ZJ29、ZJ32、ZJ36、ZJ44

由表 1 可知,ZJ16、安琪 1、安琪 2 产气能力较强,24 h 产气就能满管,将 ZJ5、ZJ7、ZJ12、ZJ13、ZJ16、ZJ17、ZJ20、ZJ22、ZJ28、ZJ37、ZJ43、ZJ47、ZJ52、ZJ55、ZJ63 等 15 株酵母菌进入下一级筛选,同时保留安琪 1 在下面的实验中作对照。

2.2.2 酵母菌的二级筛选

将初筛获得的 16 株酵母菌经小瓶发酵 7 d 后,对主发酵后的枣酒进行感官和理化测定,其中酒精度在 9.0 %vol~10.0 %vol 的有 7 株,酒精度在 8.0 %vol~9.0 %vol 的有 5 株,其他 4 株菌种的酒精度小于 8.0 %vol,其中酵母菌 ZJ16 发酵酒精度达到 9.7 %vol;酒精度大于 9.5 %vol 的枣酒的感官评价较理想,酒精度小于 9.0 %vol 的枣酒的感官评价较差;ZJ16、ZJ28、安琪 1 等起酵时间小于 24 h,ZJ5、ZJ20、ZJ37、ZJ52 起酵时间小于 36 h,其他菌株的起酵时间均大于 36 h。酵母菌的二级筛选试验结果见表 2。

由表 2 可知,由安琪 1、ZJ16、ZJ28、ZJ37 等菌株发酵获得的枣酒酒体丰满,枣香明显,较好地保持了大枣的果香,且对糖有较高的利用率,较高的产酒率,保留这 4 株菌株进入下一级筛选。

2.2.3 酵母菌的三级筛选

发酵过程中,酵母菌在糖液中发酵到一定程度后即停止,最大原因是由于酒精浓度增大所致,所以要选择对酒精有一定耐受力的酵母菌^[13];SO₂ 的添加量对酒精度

影响不大,但对发酵时间和酒的风味影响较大,酵母菌在 SO₂ 浓度为 40~80 mg/L 时,原酒的各项指标较好且风味较理想^[14],因此,要选择在这个范围内生长良好的酵母菌,实验结果见表 3。

表 3 酵母菌三级筛选结果

菌株	酒精度 (%vol)						SO ₂ 浓度 (mg/L)					
	8	10	12	14	16	18	40	50	60	70	80	90
ZJ16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ZJ28	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
ZJ37	1	2	2	2	2	3	1	1	1	1	1	2
安琪 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

由表 3 可知,ZJ16、安琪 1 在酒精度为 18 %vol 时,仍能在第一天起酵,ZJ28 起酵稍晚,ZJ16、ZJ28、安琪 1 等 3 株菌株在试验中 SO₂ 浓度范围内均生长良好,ZJ37 在 SO₂ 浓度为 90 mg/L 时起酵稍晚。经三级筛选保留 ZJ16、ZJ28、安琪 1 3 株菌株。

2.2.4 酵母菌凝集能力比较

对不同酵母菌株发酵过程中的凝集能力进行比较,结果见表 4。

表 4 不同酵母菌株发酵过程中凝集能力比较

酵母菌	发酵泡沫	凝集性
安琪 1	泡沫较明显	较好
ZJ16	泡沫明显	好
ZJ28	泡沫明显	一般

从表 4 可以看出,ZJ16 菌株在发酵过程中表现出较强的活力,发酵结束后的凝集性能在所有菌株中表现最好,最终确定 ZJ16 为选育菌株。

2.3 选育菌株 ZJ16 的菌落形态特征

选育酵母菌株 ZJ16 生长速度较快,菌落圆形较大,有凸起,表面湿润有光泽,边缘整齐或呈浸润状,乳白色;细胞圆形,大小形态较一致;一端出芽;培养 2 d 后酵母菌数量可达 2.63×10⁷ 个/mL;发酵力强,有菌体沉淀。

2.4 选育菌株 ZJ16 发酵性能的测定

对 ZJ16 酵母菌株进行枣酒发酵,并对其发酵过程中的糖度、酒精度及酸度进行测定,结果见图 1~图 3。

由图 1~图 3 可以看出,菌株 ZJ16 第 1 天降糖比较缓慢,酒精度增长较少,pH 下降较快,说明此时酵母菌正

表 2 酵母菌的二级筛选试验结果

菌株	终产物分析			感官评定结果		
	糖度(brix)	pH 值	酒精度(%vol)	香气	色泽	口味
安琪 1	3	3.4	9.6	枣香浓郁	琥珀色,清澈	酒体丰满,酸甜适口
ZJ16	2.9	3.5	9.7	枣香浓郁	琥珀色,清澈透亮	酒体丰满,酸甜适口
ZJ28	3	3.3	9.5	枣香浓郁	琥珀色,清澈	酒体丰满,酸甜,口味稍差
ZJ5	3.2	3.2	9.2	枣香较淡	琥珀色,有杂质	酒质较丰满,偏酸
ZJ20	3.1	3.3	9.0	枣香不明显	浅琥珀色,清澈	酒体较丰满,酸甜,口味差
ZJ37	3	3.4	9.5	枣香明显	琥珀色,清澈	酒体丰满,酸甜,口味稍差
ZJ52	3.2	3.2	9.1	枣香不明显	浅琥珀色,有杂质	酒体较丰满,偏甜

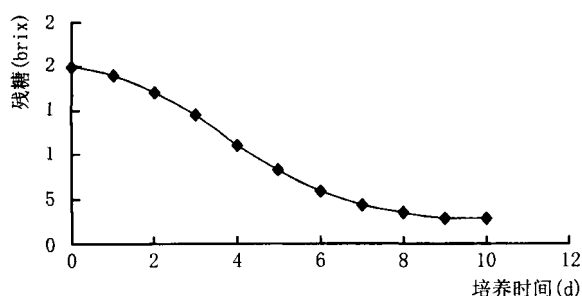


图1 发酵过程中糖度随时间的变化

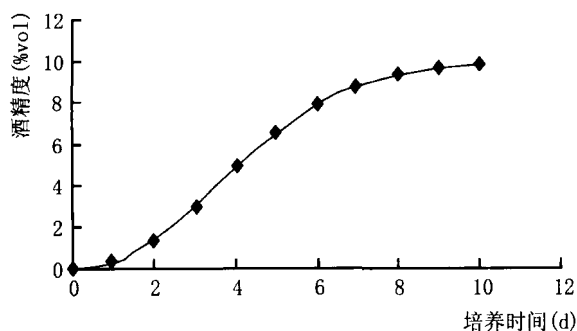


图2 发酵过程中酒精度随时间的变化

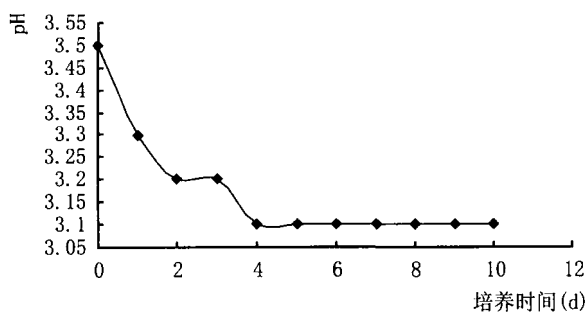


图3 发酵过程中pH随时间的变化

处于大量增殖阶段,从第2天开始糖度迅速下降,酒精度增长也较快,pH值变化幅度不大,主发酵进行到第8天后残糖、酒精度和pH值趋于稳定,进入后发酵阶段;对主发酵得到的枣酒进行感官评价,所得枣酒呈琥珀色,清澈透亮,枣香浓郁,酒体丰满,酸甜适口。

3 结论

对分离的野生酵母菌进行一系列分离纯化,发酵筛选以及耐性研究,发酵产品品评及各项性能测试,凝集能

力比较等,从67株酵母菌中选育出1株较优良的适合枣酒生产的菌株ZJ16,该菌株在20℃条件下采用5%的接种量、添加二氧化硫浓度40 mg/L、pH值为3.5时,在枣浸提液中生长繁殖快,起酵快,产酒率高,能耐高温和高酒精度。主发酵所得枣酒呈琥珀色,清澈透明,具有典型的枣香和酒香,酒体丰满,酸甜适口,产品理化指标符合各项标准^[15]。

参考文献:

- [1] 刘孟军,代丽.二十一世纪中国枣业面临的机遇、挑战与对策·干枣研究进展(2)[M].北京:中国林业出版社,11-15.
- [2] 杨清香,葛亮,潘锋,孙来华.哈密大枣发酵特性研究[J].酿酒科技,2010,191(5):23-26.
- [3] 洗嘉雯,吴晖,刘冬梅.菠萝果酒酿造酵母菌的筛选研究[J].中国酿造,2009,202(1):51-54.
- [4] 刘玉琼,霍向东,史应武,姜恺.新疆石榴酒专用酵母菌的选育及应用研究[J].食品科学,2009,30(11):211-215.
- [5] 颜璐洁,郭红,朱岳麟,杨金恒,梁建芬.红心火龙果酒酿酒酵母的筛选[J].食品科技,2008,(5):4-7.
- [6] 吴忠会.大枣发酵醋酸饮料的研制[J].饮料工业,2006,(10):13-15.
- [7] 杨启贤.干型冬枣发酵酒的研制[J].酿酒科技,2007,158(8):136-143.
- [8] 牛广财,朱丹,王军,范兆军,李志江.沙棘果酒优良酵母菌的筛选及分子生物学鉴定[J].中国食品学报,2009,(6):60-65.
- [9] 林森,蒋予箭,国建娜,等.醋酸发酵工艺条件优化的研究[J].中国酿造,2008,178(1):39-40.
- [10] 徐桂华,关海宁,王娟.野生酸枣果酒的研制[J].中国酿造,2007,(4):73-74.
- [11] 游见明.桔子果酒酵母的分离筛选[J].中国酿造,2009,205(4):55-57.
- [12] 贺晓光,李冰峰,郭春香,王松磊.鲜红枣发酵酒生产工艺的研究[J].安徽农业科技,2008,36(36):16138-16139.
- [13] 王俊沪,杨丽娟,冯作山.优良香梨酒酵母的选育[J].酿酒,2003,30(6):26-29.
- [14] 任琪,寻华风,程江华,于之恩.枣酒发酵工艺条件的研究[J].中国酿造,2009,206(5):167-170.
- [15] 杨惠芳.食品卫生理化检验标准手册[M].北京:中国标准出版,1997.577-617.

~~~~~  
(上接第32页)

酒的口感和风味。在低度浓香型白酒中适量提高其金属离子含量,金属离子与酒中的香味物质形成聚集体,能有效地减少浓香型白酒贮存过程中香味物质的损失,从而提高低度浓香型白酒货架期的稳定性。

### 参考文献:

- [1] 吴士业.浓香型白酒微观形态的研究[J].四川食品与发酵,2007,(5):9-10.
- [2] 吴士业,冯治平.几种白酒的微观形态讨论[J].中国酿造,2008,(3):64-65.
- [3] 李大和.白酒勾兑技术问答[M].北京:中国轻工业出版社,2006.
- [4] 李家民.浓香型白酒贮存过程中质量变化规律的研究及应用[J].四川酿酒,2009,(4):21-29.
- [5] 邓少平.中国白酒微观非均相分布现象[J].酿酒,1999,(2):18-21.