

石榴酒酵母的筛选

李 兰,许桂芳,张连苹

(河南科技学院生命科技学院,河南 新乡 453003)

摘要:以石榴为原料进行石榴酒发酵研究,对6种酒用酵母进行多级筛选,得到3株优良酵母,对这3株酵母进行耐酒精度、耐SO₂、耐糖度实验分析。结果表明A号菌株耐酒精度为18%vol,耐糖度为24°Brix,耐SO₂浓度为430 mg/L。以初始糖度为20°Brix的石榴汁在28℃条件下发酵7 d,可以酿制出酒体纯正,色泽光亮透明,酸甜爽口的石榴酒,发酵醪液酒精度为9.6%vol。

关键词:微生物;石榴酒;酵母菌;筛选

中图分类号:Q93-3;TS262.7;TS261.4;TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)11-0044-04

Screening of Yeast for the Production of Pomegranate Fruit Wine

LI Lan, XU Gui-fang and ZHANG Lian-ping

(School of Life Science and Technology, He'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang, He'nan 453003, China)

Abstract: The production of pomegranate fruit wine was studied. Three quality yeast strains were screened through three-stage screening of 6 kinds of yeast. Then alcohol tolerance capacity, sugar tolerance capacity and SO₂ tolerance capacity of the three strains were analyzed. The results showed that No.4 strain was the best one (alcohol tolerance was 18%vol, sugar tolerance was 24°Brix, and the SO₂ tolerance was 430 mg/L). As the initial sugar concentration was 20°Brix, after 7 d fermentation of pomegranate juice at 28℃, pomegranate fruit wine with pure and enjoyable taste and transparent and clear wine body could be produced. The alcoholicity of the fermenting mash could reach up to 9.6%vol.

Key words: microbe; pomegranate fruit wine; yeast; screening

石榴是一种营养丰富且具有广泛药用价值的水果,果实含有丰富的高抗氧化剂和大量的维生素、氨基酸、矿物质和微量元素,常食之可有软化血管、降低血糖、血脂及延缓衰老之功效。以石榴鲜果为原料酿制的石榴酒,不仅保留了石榴鲜果的营养成分,而且某些成分如氨基酸、维生素、矿物质等含量还得到了提高^[1],因此,石榴酒作为一种具有特殊营养价值的保健酒而倍受消费者的青睐。单纯将石榴作为水果销售已不能满足商家和消费者的需要,开发研制石榴果酒,不仅可以为消费者市场提供一个新的果酒品种,满足消费者追求营养、保健的需求,符合当代“限制高酒精度酒发展,鼓励低酒精度果酒发展”的产业政策,而且对提高石榴的经济价值和附加值、发展循环经济、建设节约型社会均有重要意义。因此,开发研制具有保健功能的石榴酒具有广阔的发展前景。

发酵度系数是指麦汁中浸出物被酵母消耗部分与原麦汁浸出物总量之比,用百分数表示,百分数越大,发酵度越高。高发酵度果酒含极少的残糖,它符合现代人对酒的新潮追求,低热低糖,喝后不易使人发胖,适合现代人的营养观念,又有较好的口感,老少皆宜,因此风行于全世界,广受青睐。提高发酵过程的发酵度主要有两条途

径:一是选用高发酵度酵母;二是提高可发酵糖的含量,而选用高发酵度酵母是提高酒发酵度的根本,最有效途径。在果酒酿造中,以葡萄酒历史最为悠久,对石榴酒也有若干报道^[2-8]。本文对筛选优良的石榴酒酵母及其酿造工艺进行了探讨。石榴酒以石榴为原料,发酵而成,其风味物质主要来源于石榴本身和酵母发酵代谢产生的物质^[9],因而选育优良的石榴酒酵母尤为重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1~6号酵母依次为:葡萄酒用高活性干酵母,安琪啤酒用高活性干酵母,丹宝利酿酒高活性干酵母,酒用活性干酵母(珠海紫英生物有限公司),石榴汁分离酵母2株。

1.2 培养基及试剂

1.2.1 培养基

分离培养基:PDA培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂15~20 g,水1000 mL,pH自然)。

筛选培养基:TTC培养基:TTC上层培养基(葡萄糖10 g,蛋白胨2 g,酵母膏1.5 g,KH₂PO₄1 g,MgSO₄·7H₂O

收稿日期:2010-07-30

作者简介:李兰(1972-),女,大学本科,高级实验师,主要从事发酵食品,天然活性物质的研究。

0.4 g,琼脂 20 g,水 1000 mL,pH5.5~5.7);TTC 下层培养基(TTC 0.5 g,葡萄糖 5 g,琼脂 15 g,水 1000 mL,pH 自然)。

麦芽汁培养基,石榴汁。

1.2.2 试剂

无水乙醇、亚硫酸、TTC、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖、酵母膏、蛋白胨、琼脂,以上均为分析纯。

1.3 仪器与设备

超净工作台, YXQ602 型电热式蒸汽灭菌器, HH. B11 生化培养箱, HH-S24 数显恒温水浴锅, Olympus 显微镜, YPW-I 型恒温调速摇床。

1.4 方法

1.4.1 酵母的分离

平板梯度稀释涂布, 28 °C 培养 1~3 d, 待长出菌落后, 选择具有典型菌落特征的单菌落, 转至斜面培养基保存备用。

1.4.2 酵母的筛选

1.4.2.1 一级筛选

1.4.2.1.1 TTC 显色法^[10]

将分离到的酵母于 TTC 下层培养基上划线, 28 °C 培养 2~3 d, 等长出菌落后覆盖 TTC 上层培养基, 阴暗处保温 2~3 h 进行显色。产酒精能力强的菌落一般为深红色, 次之为粉红色, 再者为微红色。通过颜色深浅比较各菌株的产酒精能力, 初步筛选出产酒精能力强的菌株, 平行重复 3 次。

1.4.2.1.2 杜氏管法

将各菌株接入带有杜氏小管的麦芽汁培养基中, 于 28 °C 培养, 分别观察各管的产气情况, 并记录起酵时间。根据气泡多少, 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, 平行重复 3 次。

1.4.2.2 二级筛选

麦芽汁发酵法: 将一级筛选出的菌株活化后接到麦芽汁培养基上培养, 菌浓达到 10^8 个/mL 以上, 然后取 4.5 mL 接入装有 100 mL 麦芽汁(初始糖度为 12 °Brix)的三角瓶中, 28 °C 培养 72 h 后, 测定醪液的酒精体积分数, 选择成熟醪酒精体积分数较高的菌株进行三级筛选, 平行重复 3 次^[11]。

活化条件: 28 °C 于 20 mL PDA 液体培养基中振荡培养 10 h。

1.4.2.3 三级筛选

石榴汁发酵法: 二级筛选出的菌株活化后接入装有 100 mL 石榴汁(初始糖度为 20 °Brix)的三角瓶中, 28 °C 发酵 7 d 后测定酒精体积分数, 进一步比较各菌株的发酵能力, 平行重复 3 次。

活化条件: 28 °C 于 20 mL PDA 液体培养基中振荡

培养 10 h。

接种量: 石榴汁体积的 1 %。

1.4.2.4 耐性实验

1.4.2.4.1 耐酒精度实验

在杜氏管中装入麦芽汁, 加 95 % vol 的乙醇和无菌水, 使各管的乙醇浓度依次分别为 8 % vol、10 % vol、12 % vol、14 % vol、16 % vol、18 % vol, 控制各管的糖度一致, 接种量相同, 于 28 °C 下培养, 观察气泡的产生情况, 比较各菌株对乙醇的耐受能力, 进而确定适合石榴酒酿造的菌株, 平行重复 3 次。

1.4.2.4.2 耐 SO_2 实验

将酵母接入含有不同 SO_2 浓度(分别为 80 mg/L、100 mg/L、120 mg/L、140 mg/L、160 mg/L、180 mg/L、230 mg/L、280 mg/L、330 mg/L、380 mg/L 和 430 mg/L)的麦芽汁培养基中, 相同条件下进行培养, 观察气泡的产生情况, 比较 SO_2 浓度对各菌株的影响, 平行重复 3 次。

1.4.2.4.3 耐糖度实验

杜氏管中装入麦芽汁, 添加蔗糖, 调整各管的糖度分别为 12 °Brix、14 °Brix、16 °Brix、18 °Brix、20 °Brix、22 °Brix、24 °Brix 和 26 °Brix。然后接种, 置于 28 °C 培养 60 h, 观察气泡产生情况。平行重复 3 次。

1.4.3 形态特征观察^[12-13]

1.4.3.1 个体形态观察

用美蓝染色法取对数期菌制片, 在放大 400 倍及 1000 倍显微镜下观察酵母形态。

1.4.3.2 液体培养特征观察

用三角瓶装入 PD 液 300 mL, 灭菌后, 接种酵母, 于 28 °C 培养并观察其特征。

1.4.3.3 菌落形态观察

将分离的酵母接种在 PDA 平板上, 28 °C 保温培养 48 h 后观察菌落形态。

1.4.4 检测方法

酒精度测定: 取 100 mL 发酵醪液放入蒸馏烧瓶中, 加 100 mL 蒸馏水, 置 1000 W 电炉上蒸馏出 100 mL 液体, 摇匀后用酒精计和温度计分别测定其酒精度和温度, 然后查表校正为 20 °C 酒精浓度^[14]。

酵母菌细胞数目测定: 采用 Neubauer 血球计数板法计数^[15]。

2 结果分析

2.1 酵母的一级筛选

通过 TTC 显色, 1 号、3 号、4 号较深, 2 号次之, 5 号、6 号微红。可见, 1~4 号酵母产酒精能力较强, 5 号、6 号产酒精能力较弱。

在杜氏管中发酵 10 h 后, 观察到 1 号、3 号、4 号管开始产气, 15 h 后 4 号管产气为满管, 3 号管 13 mL, 1 号

表1 杜氏管发酵法产气量 (mL)

管号	发酵时间(h)				
	10	15	23	26	35
1号	开始产气	9.6	已满	-	-
2号	-	开始产气	9.8	已满	-
3号	开始产气	13	开始产气	13	-
4号	开始产气	已满	-	-	-
5号	-	-	开始产气	5.6	已满
6号	-	-	开始产气	1.2	不足1/3

管9.6 mL,此时2号管刚开始产气,26 h后观察到2号管也为满管。23 h后5号、6号管开始产气,35 h后5号为满管,而6号管内气体还不到1/3。产气较快的1~5号管内都有酒香生成,因此,需做进一步筛选。

2.2 酵母的二级筛选

接种到麦芽汁培养基中的菌于28℃静止发酵72 h后,测醪液中酒精体积分数,结果见表2。

表2 麦芽汁发酵结果

项目	管号				
	1	2	3	4	5
发酵后醪液的酒精度(%vol)	5.0	4.2	3.2	4.6	2.5

表2结果表明,1号、2号、4号管的酵母产酒精量相对较多,对其作进一步筛选。

2.3 酵母的三级筛选

经过两级筛选后,1号、2号、4号菌株产酒精量相对较多,对其进行石榴汁发酵后,进行酒精体积分数测定,结果见表3。

表3 石榴汁发酵结果

项目	管号		
	1	2	4
发酵后的酒精度(%vol)	10.3	7.5	9.6

表3结果表明,3株酵母对石榴汁的发酵程度虽有所差异,但其发酵后测得醪液的酒精度均在7%以上,因此,对其进行耐性试验以筛选优良的石榴酒酵母。

2.4 酵母四级筛选

2.4.1 耐酒精度实验

发酵条件为初始糖度12°Brix,pH5.4,发酵温度为28℃,时间为72 h,结果见表4~表6。

由表4~表6的耐酒精度试验结果可以看出,1号菌株的耐酒精性能较2号、4号好为18%vol,而2号、4号为16%vol,原乙醇浓度在8%vol~10%vol范围内,3株酵母发酵后产酒精量均在2%vol左右,原乙醇浓度为12%vol时,产酒精量接近1%,原乙醇浓度为14%vol时,几乎不产酒精,可见,3株酵母的产酒精性能在原乙醇浓度8%vol~10%vol范围内影响较小,大于10%vol时,抑制程度明显增强直至不再产酒精。

2.4.2 耐SO₂实验

表4 1号酵母菌株耐酒精度结果

原乙醇浓度(%vol)	醪液的酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
8	10.4	8.0
10	11.6	9.4
12	12.7	10.6
14	14.8	0.5
16	16.2	11.5
18	18.0	12.0

表5 2号酵母菌株耐酒精度结果

原乙醇浓度(%vol)	醪液的酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
8	10.2	8.2
10	11.8	9.3
12	12.9	10.6
14	14.6	10.8
16	16.0	12.0
18	18.0	12.0

表6 4号酵母菌株耐酒精度结果

原乙醇浓度(%vol)	醪液的酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
8	9.6	9.5
10	11.9	9.0
12	13.0	10.4
14	14.5	10.9
16	16.0	12.0
18	18.0	12.0

发酵条件为初始糖度12°Brix,pH5.4,发酵温度为28℃,时间72 h,结果见表7~表9。

表7 1号酵母菌株耐SO₂结果

SO ₂ 浓度(mg/L)	发酵后醪液酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
60	3.7	6.2
80	3.4	6.6
100	3.3	6.8
120	3.0	7.2
140	2.9	7.2
160	2.9	7.3
180	3.5	6.6
230	2.8	7.5
280	2.3	8.2
330	1.7	9.0
380	0.8	10.5
430	-	12.0

由表7~表9的耐SO₂试验结果可以看出:1号、2号、4号酵母的耐SO₂浓度均为430 mg/L,在SO₂浓度在60~230 mg/L范围内,3株酵母的产酒精能力受影响较小,SO₂超过230 mg/L酵母的产酒精能力明显受到抑制,而且随着浓度的增加,抑制程度有所增强直至不再产酒精。

2.4.3 耐糖度实验

发酵条件为发酵温度为28℃,pH5.4,时间72 h,结果见表10~表12。

表 8 2号酵母菌株耐SO₂结果

SO ₂ 浓度(mg/L)	发酵后醪液酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
60	3.2	6.8
80	2.9	7.5
100	2.5	7.8
120	2.4	8.0
140	2.7	7.8
160	2.3	8.2
180	2.8	7.6
230	2.0	8.8
280	1.7	9.3
330	1.4	9.5
380	0.6	10.8
430	-	12.0

表 9 4号酵母菌株耐SO₂结果

SO ₂ 浓度(mg/L)	发酵后醪液酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
60	3.4	6.5
80	3.3	6.7
100	3.0	7.4
120	2.7	7.6
140	2.8	7.5
160	2.7	7.8
180	3.1	7.0
230	2.9	7.3
280	2.5	7.8
330	1.8	9.0
380	1.0	10.2
430	-	12.0

表 10 1号酵母菌株耐糖度结果

原糖度(°Brix)	发酵后醪液酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
12	4.2	5.5
14	5.0	6.2
16	4.2	9.5
18	4.7	10.5
20	4.0	13.5
22	3.2	16.8
24	1.2	21.9
26	-	26

表 11 2号酵母菌株耐糖度结果

原糖度(°Brix)	发酵后醪液酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
12	3.0	7.2
14	2.3	10.3
16	2.5	12.0
18	2.6	13.8
20	2.2	16.6
22	1.3	18.2
24	-	24
26	-	26

表 10~表 12 结果表明:1 号菌株的耐糖度较高为 26°Brix,而 2 号、4 号均为 24°Brix。在糖度耐受范围之内,1 号、4 号的产酒精性能明显高于 2 号,4 号的产酒精量高于 1 号,最高时超过 8%vol(此时糖度为 16°Brix),在 14°Brix~20°Brix 范围内 1 号、4 号的产酒精能力受糖度

表 12 4号酵母菌株耐糖度结果

原糖度(°Brix)	发酵后醪液酒精度(%vol)	糖度(°Brix)
12	4.2	5.5
14	4.8	6.5
16	5.0	8.0
18	4.4	10.8
20	4.0	13.5
22	1.6	19.2
24	-	24
26	-	26

影响不大。而 2 号菌株的产酒精性能的抑制程度明显随着糖度的增加而有所增强。

综合耐性试验结果表明:3 株酵母的耐酒精度差异不大;在耐 SO₂ 方面,1 号、4 号菌株的耐受程度较好,且在一定范围内酵母的产酒精能力受影响较小;就糖度的耐受程度来讲,糖度对 2 号、4 号的发酵产酒性能影响相对来说较小。综合各个因素考虑,4 号菌株更适合石榴酒发酵。

2.5 酵母形态特征观察

2.5.1 个体形态观察

4 号酵母的营养细胞为圆形,生长方式为芽殖,无假菌丝。

2.5.2 液体培养特征

4 号菌株接种后 10 h 开始产气泡,20~60 h 气泡最多,72 h 后气泡开始减少并消失,发酵液表面有菌膜,发酵后的培养液澄清,发酵 5 d 后,容器底部有大量乳白色沉淀。

2.5.3 菌落特征

4 号菌株的菌落为圆形,边缘整齐,有明显的突起,菌落为乳白色,透明度较差,质地光滑湿润,较厚,香气较浓。

3 结论

筛选的优良酵母(珠海紫英酒用活性干酵母)具有较好的产香性能,能耐受较高浓度的乙醇(18%vol)、SO₂ 浓度(430 mg/L)和糖度(24°Brix),起酵时间快,很适合石榴酒的酿制所用。

参考文献:

- [1] 濮智颖,翟文俊,杨春霞.全发酵石榴酒的营养价值和保健作用[J].食品科技,2007,63(8):278-281.
- [2] 吴连军,于玲,杜金华. SO₂ 对石榴酒发酵的影响研究[J].酿酒,2007,34(2):72-73.
- [3] 杜琨,刘钊.低度石榴果酒的生产工艺[J].酿酒科技,2006,31(11):81-82.
- [4] 刘月永,高红心.干性石榴酒的研制[J].食品工业,2000,23(4):23-27.

(下转第 52 页)

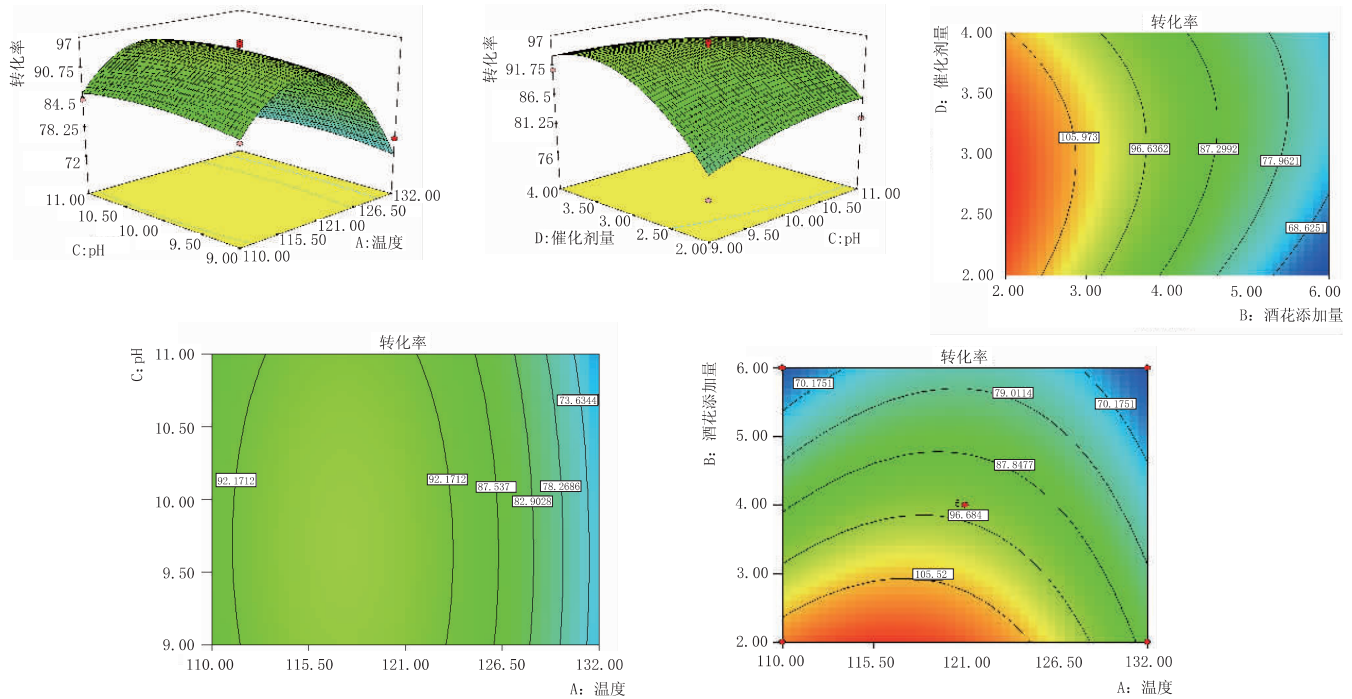


图6 AB, AC, BD, CD 曲面图及等高线图

参考文献:

- [1] De Keukeleire, D., and Verzele, M. The absolute configuration of the isohumulones and the humulinic acids[J]. Tetrahedron, 1971,27:4939-4945.
- [2] Howard, G. A., and Slater, C. A. Utilization of humulone and cohumulone in brewing[J]. J. Inst. Brew, 1957, 63:478-482.
- [3] A skew, H. O. Changes in hop alpha acids concentrations on heating in aqueous solutions and unhopped worts[J]. J. Inst. Brew,1964, 70:503-514.
- [4] Laws, D. R. J., McGuinness, J. D., and Rennie, H. The losses of bitter substances during fermentation[J]. J. Inst. Brew, 1972, 78: 314-321.
- [5] Ono, M., Kakudo, Y., Yamamoto, Y., Nagami, K., and Kumada, J. Quantitative analysis of hop bittering components and its application to hop evaluation[J]. J. Am. Soc. Brew.Chem, 1984, 42:167-172.
- [6] Irwin, A. J., Murray, C. R., and Thompson, D. J. An investigation of the relationship between hopping rate, time of boil and individual α -acid utilization[J]. J. Am. Soc. Brew.Chem., 1985, 43:145-152.
- [7] McMurrough, I., Cleary, K., and Murray, F. Applications of high-performance liquid chromatography in the control of beer bitterness[J]. J. Am.Soc. Brew. Chem,1986, 44:101-108.
- [8] Malowicki, M. G., and Shellhammer, T. H. Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling system[J]. J. Agric. Food Chem, 2005, 53: 4434-4439.

(上接第47页)

- [5] 唐虎利, 谢亚玲. 浸渍发酵法酿制干红石榴酒[J]. 酿酒科技, 2004, 24(6):74-76.
- [6] 翟文俊. 石榴营养酒的酿造工艺研究[J]. 食品科技, 2006, 47(11):205-208.
- [7] 刘玉琼, 霍向东, 史应武. 新疆石榴酒专用酵母的选育及应用研究[J]. 食品科学, 2009, 35(11):211-215.
- [8] 张家训. 石榴的栽培及石榴酒酿造[J]. 酿酒, 1997, 15(5): 63-64.
- [9] 陈兰兰, 童军茂, 单春会. 高产酒精酵母的筛选[J]. 酿酒科技, 2008, 34(7):36-38.
- [10] 董亮, 赵长新, 奚少华. 高发醇度酵母的筛选及鉴定[J]. 工业微生物, 2007, 37(2):53-56.
- [11] 张怀东, 刘作易, 周礼红. 高耐热性高产酒精酵母的分离和筛选[J]. 酿酒科技, 2009, 162(3):40-42.
- [12] 苏艳秋, 朱卫华, 吴鹏. 耐高温、耐酸产酒精酵母的筛选与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2009, 27(2):43-47.
- [13] Barnett JA. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.164-168.
- [14] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.57-61.
- [15] 程丽娟. 微生物学实验技术[M]. 西安: 天则出版社, 1993. 142-145.