

文章编号: 1673-1689(2007)01-0095-05

桑椹果酒酵母筛选及发酵性能

赵祥杰^{1,2}, 肖更生¹, 杨荣玲^{1,2}, 刘学铭¹, 吴继军¹, 涂国全²

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

摘要: 从桑椹成熟果实、桑叶以及桑果园的土壤采样, 进行桑椹果酒专用酵母的筛选, 得到一株在性能上优于对照菌葡萄酒干酵母的酵母菌 Y11。该菌起酵快, 从第2天开始糖度大幅度下降, 酒精度快速上升, 发酵第4天酒精体积分数即可达到10%以上。发酵过程 pH 值变化趋势比较平缓, 发酵结束后高级醇量符合要求。综合发酵性能及感官评定, 表明该菌能代替葡萄酒干酵母用于桑椹果酒的生产。

关键词: 桑椹果酒 酵母菌 选育

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

Study on the Breeding of Mulberry Wine Yeast Strain

ZHAO Xiang-jie^{1,2}, Xiao Geng-sheng¹, YANG Rong-ling^{1,2},

LIU Xue-ming¹, WU Ji-jun¹, TU Guo-quan²

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

Abstract: A yeast strain Y11 was screened from ripe mulberry fruits, leaves and orchard soil. It was superior to commercial dry yeast for grape wine in the initialization of fermentation and alcohol yield by sugar. The yeast could start alcohol fermentation quickly in the fermentation system, and the sugar content decreased greatly while alcohol content increased rapidly in the second day. The pH value fluctuated between 3.6 and 4.0 during the fermentation. The higher alcohol content in the wine was up higher than that of the mentioned standard. The results of fermentation performance and wine sensory evaluation showed that Y11 could replace the contrast strain for mulberry wine production.

Key words: mulberry wine yeast strain breeding

收稿日期: 2006-05-18.

基金项目: 粤港农产品深加工关键领域重点突破招标项目(200549832).

作者简介: 赵祥杰(1982-), 男, 山东潍坊人, 微生物专业硕士研究生. Email: zhaoxiangjie_2004@163.com

通讯作者: 刘学铭(1967-), 男, 江西兴国人, 工学博士, 研究员, 主要从事微生物方面的研究. Email: xuemingliu@21cn.com

涂国全(1947-), 男, 江西永丰人, 农学硕士, 教授, 主要从事微生物方面的研究. Email: tuguquan@263.com

万方数据

桑椹为桑科落叶乔木桑树(*Morus albal*)的成熟果实。自古以来,桑椹就作为中药材应用。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。桑椹营养丰富,已被我国卫生部列入“既是食品又是药品”的名单^[1]。

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。桑椹果酒是果桑资源综合利用深加工产品之一,根据其生产工艺的不同,桑椹果酒大体上可以分为配制酒和发酵酒两种。目前,我国研究和生产应用中发展较快的是发酵酒^[2]。

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,这样酿造的果酒口味欠佳。作者从成熟桑椹果实、桑叶及桑果园土壤中采集样品,进行菌种筛选并得到一株酵母菌 Y11,与工业上使用的葡萄酒干酵母相比,该菌起酵速度快,酒精度高,风味独特,无异味,适用于桑椹果酒的酿造。

1 材料与方法

1.1 实验材料

对照菌株及活化方法:安琪葡萄酒活性干酵母,活化时将 2 g/dL 的蔗糖水加热到 37~40℃,加入 5%~10% 的干酵母,静置 20 min 左右,至有气泡产生为止,加入到发酵液中的酵母量为 0.2 g/L。桑椹果汁:鲜桑椹果实榨汁,作者所在研究所桑果汁厂生产。TTC:分析纯,上海灵锦精细化工有限公司生产。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基 (组分 g/dL):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, 120℃ 高压灭菌 15 min。

1.2.2 分离培养基 麦芽汁液体培养基。

1.2.3 斜面培养基 麦芽汁琼脂培养基。

1.2.4 液体发酵培养基 进行成分调整的桑椹果汁。

1.3 分析方法

1.3.1 酒精度、总酸等指标 按葡萄酒、果酒通用试验方法(GB/15038—1994)进行测定。其中酒精度采用酒精计法,表观糖度以糖度计法,总酸(以柠檬酸计)以 NaOH 滴定法, pH 值以 pH 计法。

1.3.2 高级醇 采用比色法^[3]。

2 酵母的选育过程

2.1 样品的采集

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,采集的其它样品置于灭菌的桑椹果汁中发酵。

2.2 培养分离

当样品在发酵瓶中有大量气泡产生时,取发酵醪 10 mL 接入 90 mL 酵母富集培养基中, 28℃ 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, 28℃ 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℃ 培养 12 h, 4℃ 冰箱中保藏,备用。

2.3 酵母的初筛

按王梅等^[4]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。

2.4 复筛选菌

大试管中加入 20 mL 桑椹汁,调整糖度,加入杜氏小管,于蒸汽灭菌锅中灭菌,冷却后将分离的试管斜面菌种接入其中, 25℃ 恒温培养箱中培养,每隔 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入选菌。

2.5 放大实验

将复筛入选菌种在 10°Bx 麦芽汁培养基中扩大培养 24 h,按体积分数 5% 的接种量接种于桑椹果汁中, 25℃ 生化培养箱中发酵 7 d,进行感官评定和理化指标测定。选取的桑椹果汁澄清透明、且有浓郁桑椹香气、口味纯正、风格独特、酒精度在 10% 以上,即为入选的酵母菌种。

2.6 性能测定

调整桑椹原汁,使其外观糖度为 20°Bx,酸度为 10 g/L(以柠檬酸计), SO_2 质量浓度为 120 mg/L,将放大实验入选菌接入容量为 250 mL 的三角瓶(装液量为 150 mL),以葡萄酒酵母作对照菌株, 25℃ 发酵 11 d,每天取样测定糖度、酸度、酒精度和 pH 值。

3 结果与分析

3.1 不同来源样品酵母数的比较

在 4 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,见图 1。可以看出,从桑叶上筛选的菌占到 42.7%,而从果实上分离到的只占到 27.2%。由于本批试验样品是在 11 月中下旬采集的,气温可能是造成筛选的菌种偏少的原因。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酒精度高的酵母菌株。

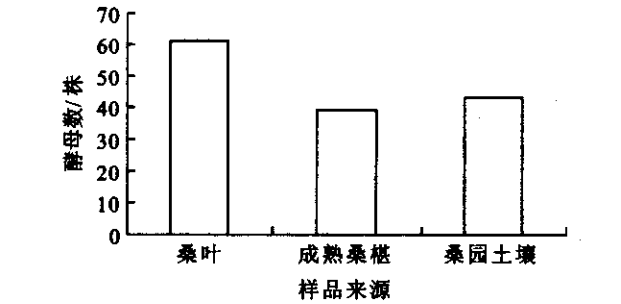


图 1 不同来源样品中筛选到的酵母菌株数量比较
Fig.1 Compare of yeast strain population from different origin

3.2 初筛酵母菌的特征

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,划线接种于麦芽汁培养基斜面上。根据各酵母菌的镜检形态、平板生长的菌落特征、菌落颜色以及气味可分为 4 大类,其特征见表 1。

3.3 酵母菌的复筛试验

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 12 h 内有大量气泡产生的菌株有 5 株,24 h 发酵有大量气泡产生的菌株有 19 株,这些菌种的发酵性能见表 2。

3.4 放大试验结果

将复筛试验得到的 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 3。

表 1 酵母菌种的分离结果
Tab.1 Isolation results of yeast strains

镜检细胞形状	平板上菌落特征	菌落颜色	气味	菌株数
卵圆型	生长速度快、圆形、光滑、湿润、边缘整齐、易挑起	暗乳白色	酒香味明显	13
长圆型	生长速度较慢、边缘不整齐、不湿润	奶褐色	略有酒香,有异味	21
椭圆型	生长速度较慢、菌落较小	白色	酒香味较明显	18
球形	生长速度较快、菌落大、湿润	乳白色	酒香味较淡	26

表 2 复筛入选酵母的发酵实验
Tab.2 Fermentation results of selected yeast strains

菌株编号	残糖度/°Bx	酒精体积分数/%	起酵时间/h	菌落特征
T2	13.0	5.9	>24	白色,粘稠,光滑
T3	12.5	7.0	>24	灰白,粘稠,光滑
Y106	13.3	4.8	>24	白色,粘稠,光滑
Y21	15.3	4.3	>24	灰色,粘稠
T5	14.3	5.0	<24	灰色,粘稠
Y111	16.2	3.1	<24	灰色,粘稠
Y101	7.2	10.6	12	灰色,粘稠
Y27	12.2	6.6	<18	灰白,光滑,粘稠
Y14	18.4	0.4	>24	灰色,粘稠
Y22	15.3	3.6	<24	灰色,粗糙
T4	14.8	4.0	<18	灰色,粘稠
Y11	8.0	10.2	<12	灰色,粘稠
Y42	7.4	10.6	<12	灰色,粘稠
Y41	7.5	11.0	<12	灰色,粘稠
T1	16.2	2.8	>24	白色,粗糙
Y77	17.5	2.3	<18	灰白,干燥
Y20	20.4	0.1	>24	白色,光滑
Y2	12.8	6.1	<18	灰色,粘稠

续表 2

菌株编号	残糖度/°Bx	酒精体积分数/%	起酵时间/h	菌落特征
T8	15.0	4.4	<24	灰白 枯燥
Y15	16.4	3.2	<18	灰白 粘稠 有粗糙纹
Y12	7.4	10.6	<12	灰白
T92	13.1	5.9	<24	灰白粗糙 比 T3 更粗糙
T91	14.9	4.8	<18	灰白粗糙 比 T3 更粗糙
Y78	10.8	7.9	<18	奶褐 粗糙
CK	7.3	10.2	<12	灰色 粘稠

表 3 大瓶发酵实验结果

Tab.3 Results of big bottle fermentation

菌株号	可溶性固形物质量浓度/(g/dL)	酒精体积分数/%	pH 值	气味
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
Y11	7.1	11.7	3.78	酒香浓郁
Y12	7.1	10.4	3.78	有酒香
Y101	7.1	11.4	3.80	有香气
CK	7.1	10.7	3.80	酒香较浓

以上实验表明 :菌株 Y11 经 7 d 的主发酵后 , 酒液的酒精度最高为 11.7% , 而且有浓郁的果香气 , 口味纯正、风格典型 , 可溶性固形物质量浓度为 7.1 g/dL。与目前工业上应用的葡萄酒酵母相比 , 产酒精度高 , 故 Y11 入选优良酵母菌种。

3.5 选育酵母的性能测定

3.5.1 发酵过程中的糖度、酒精度的变化 对入选的 Y11 酵母和对照酵母菌种进行发酵试验 , 从图 2 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 , 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。通过与对照菌株的比较可以发现 , Y11 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。

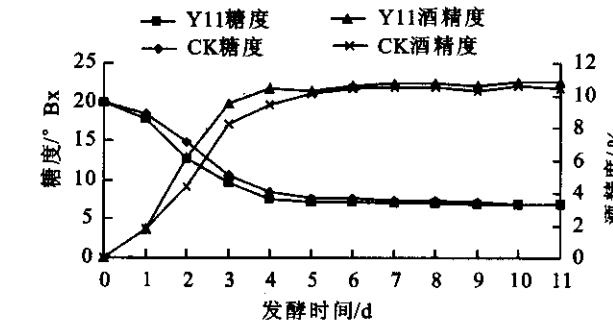


图 2 发酵过程中的糖度、酒精度变化曲线

Fig. 2 The curve of sugar and alcohol concentration in fermentation

3.5.2 发酵过程中的酸度和 pH 值的变化 发酵液中的 pH 值对酵母生长繁殖及代谢有重要的影响。pH 值偏高则易染杂菌 , pH 值偏低虽能抑制杂菌生长 , 但也会抑制细胞中的乙醇脱氢酶活力 , 使产酒量减少。因此发酵过程中 pH 值应控制在适宜的范围内。酵母菌最适 pH 值为 4.5 ~ 5.0 , 但为了防止杂菌污染 , 多控制在 3.5 ~ 4.5。此外一定的酸度不仅可以抑制杂菌 , 还能赋予果酒以良好的口味^[5]。

从图 3 可以看出 , 发酵过程中 Y11 和对照菌株的 pH 值变化十分接近 , 起酵阶段略有波动 , 第 6 天以后 pH 值趋向平稳 , 整个发酵过程中的 pH 值始终保持在 3.6 ~ 4.0。发酵过程中 Y11 的酸度值虽有一定的波动 , 但仍维持在 8.0 g/L 的范围内 , 而对照菌株却有很大的波动 , 最大的酸度值达到 9.2 g/L。

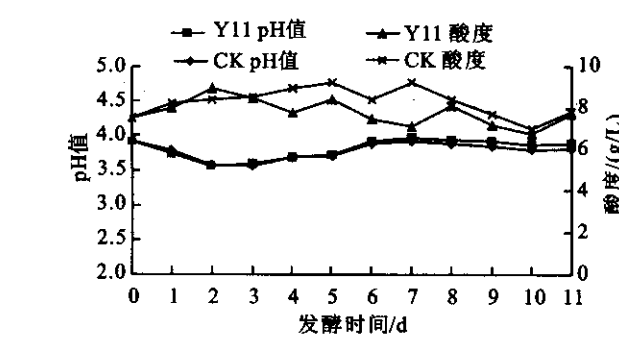


图 3 发酵过程中 pH 值、酸度的变化曲线

Fig. 3 The curve of pH value and acidity in fermentation

3.5.3 发酵过程中高级醇的变化 高级醇是酵母代谢过程的产物 , 是果酒中的主要香味物质 , 适量的高级醇能赋予果酒以醇厚感 , 浓度太低会造成不醇厚、单薄和单调的感觉 , 但因为高级醇特有的尖刺气息和辣味 , 其含量过高会带来不愉快的口感^[6] , 因此在果酒生产中要控制其生成量。一般认为 , 高级醇质量浓度不应超过 0.4 g/L^[7]。从图 4 可以看出 , 发酵过程中高级醇的量逐渐增大 , 在第 5 天时达到最高值 , 此后逐渐降低 , 在发酵进行到第 11 天时 , Y11 和对照菌株的高级醇质量浓度分别为

0.29 g/L 和 0.21 g/L。从两条曲线的对比可以看出,选育酵母 Y11 发酵过程中的高级醇曲线在发酵起始和后发酵阶段虽有一定的波动,但发酵结束后,高级醇量在果酒良好口感允许的范围内。

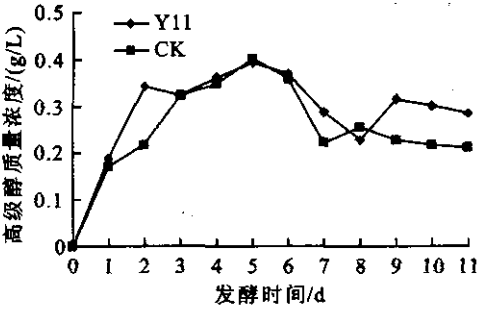


图 4 发酵过程中高级醇浓度的变化曲线

Fig.4 The curve of higher alcohol in fermentation

4 结 论

本实验表明,从成熟桑果表皮、果园土壤以及桑叶上都能筛选到酵母菌。而且通过以上的筛选、分离、纯化以及发酵实验,选出了细胞活力高、起酵快、产酒率高、风味佳的桑椹果酒专用优良酵母菌种。

该菌在发酵性能上完全可以取代葡萄酒干酵母用于桑椹果酒的发酵,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,该菌种在应用于大规模生产之前,还需要进一步对其进行驯化培养以及进行菌种鉴定工作。

参考文献(References):

[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.
LIU Xue-ming ,XIAO Geng-sheng ,CHEN Wei-dong. Advances in research and development of mulberry[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs ,2001 ,32(6) :569 – 571.(in Chinese)

[2] 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.
LIANG Yan-ying ,REN Yu-qiao ,WANG Hua. Advances of studies on the mulberry wine and drink[J]. **Liquor Making** ,2005 ,32(6) :48 – 50.(in Chinese)

[3] 秦含章. 葡萄酒分析化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1991:579 – 580.

[4] 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.
WANG Mei ,ZHANG Peng-pai ,SHUAI Gui-lan ,et al. Application of TTC in the yeast selection of yellow rice wine[J]. **Liquor Making** 2001,28(5) :62 – 64.(in Chinese)

[5] 陈卫平,熊建华,侯英梅,等. 菠萝干酒生产工艺的研究[J]. 酿酒科技,2001(5) :88 – 90.
CHEN Wei-ping ,XIONG Jian-hua ,HOU Ying-mei ,et al. Investigation on Production Techniques of Pineapple Wine[J]. **Liquor-making Science and Technology** ,2001 (5) :88 – 90.(in Chinese)

[6] 饭野修一,渡边正平,著. 黄平译. 葡萄酒中的高级醇苦味[J]. 酿酒科技,1995(3) :55 – 57.

[7] 王方,王树生. 葡萄酒中的香味物质的来源[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2005(5) :50 – 51.
WANG Fang ,WANG Shu-sheng. Source of aromatic materials in wine[J]. **Sino-Overseas Grapevine & Wine** ,2005 (5) :50 – 51.(in Chinese)

(责任编辑:李春丽)