

潘训海,刘新露,罗惠波,等. 桑葚果酒酵母的分离及筛选[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):249-251.

桑葚果酒酵母的分离及筛选

潘训海¹, 刘新露², 罗惠波¹, 卫春会¹

(1. 四川理工学院生物工程学院/酿酒生物技术及应用四川省重点实验室,四川自贡 643000;

2. 四川理工学院化学与制药工程学院,四川自贡 643000)

摘要:以桑葚果汁自然发酵液和桑果园土壤为分离源,从中分离筛选桑葚果酒酵母,将筛选得到的酵母与对照酵母进行发酵对比研究,进一步确定桑葚果酒酿酒优良菌种,并将筛选得到的酵母进行生产中试。结果表明:从分离源中分离得到 12 株酵母菌,经过初筛、复筛,获得 1 株比较适宜酿造桑葚果酒的酵母菌(SY-2),该菌种具有起酵快、发酵过程缓和、产香好等优异特征,通过生产中试,制得紫红色、澄清透明、香气协调、柔和爽口的优质桑葚果酒,从而确定该菌株可作为桑葚果酒生产用酵母。

关键词:桑葚果酒;酵母;筛选

中图分类号:TS261.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)05-0249-03

桑葚又叫桑果,为桑科落叶乔木桑树的果实,成熟的桑葚甘甜多汁、酸甜适口、风味独特^[1]。桑葚富含多种营养成分及黄酮类化合物,具有滋阴补血、保肝护肾、润肠通便、增强免疫力及促进新陈代谢等功效^[2-4],已被我国卫生部列入“既是食品又是药品”的名单中^[5]。

桑葚酒历史悠久,根据生产工艺不同可以分为发酵酒和配制酒 2 种^[6]。桑葚发酵酒是以成熟的桑果为原料,经榨汁、调整成分后加入活性酵母精心酿制而成的果酒。桑葚酒营养价值高,具有很高的开发利用价值。我国是丝绸之国,种桑养蚕历史悠久,桑树种类及桑葚产量均位居世界首位,全国各地均有栽培,资源十分丰富。开发桑葚果酒是果桑资源综合利用的一个重要领域,可以增加桑农收入,具有良好的社会效益和经济效益。果酒生产中菌种是影响果酒品质的关键因素之一^[7],目前多数果酒生产菌种采用葡萄酒酿酒酵母,尚缺乏桑葚酿酒专用酵母。本试验从自然环境中分离、筛选桑葚酿酒酵母,并在四川省阆州圣果酒业有限公司进行生产中试,期望得到适合桑葚果酒生产用的优良酵母。

收稿日期:2012-12-28

基金项目:四川省重点技术创新项目(企业技术创新专项)(编号:2011NCLZ433)。

作者简介:潘训海(1980—),男,重庆忠县人,讲师,硕士,主要从事发酵工程方面的研究。E-mail:panxh2000@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜桑葚:购于农贸市场(四川自贡产);干桑葚:四川省阆州圣果酒业有限公司提供;对照菌种:高活性葡萄酒酵母(实验室保存)。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 柠檬酸(上海试剂一厂产品,分析纯);偏重亚硫酸钾(上海试剂四厂产品,分析纯);其他试剂均为分析纯。

1.2.2 培养基 麦芽汁琼脂培养基^[8]

1.2.3 仪器 手持糖量计:成都格纳丝商贸有限公司生产;蒸汽灭菌锅:上海三申医疗器械有限公司生产;AR1140 电子分析天平:奥克斯国际贸易有限公司生产;酸度计:热电(上海)仪器有限公司生产;722S 型分光光度计:上海精密科学仪器有限公司生产;榨汁机:广州旭众有限公司生产;HH-6 电热数显恒温水浴锅:江苏金坛市医疗器械厂生产;OLYMPUS CX21 生物显微镜:南京麦迪森仪器有限公司生产;LRH-250 生化培养箱:上海齐欣科学仪器有限公司生产;生产中试设备:四川省阆州圣果酒业有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 桑葚果汁的制备 选取新鲜成熟桑葚,榨取果汁,在桑葚汁中加蔗糖调糖度至 15%,用柠檬酸调节 pH 值至 4.0,然后添加 $K_2S_2O_5$ 使有效 SO_2 含量达到 70 mg/L。

[7] Chan L W, Cheah E L C, Saw C L L, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Cortex Magnoliae Officinalis* and some other medicinal plants commonly used in South-East Asia[J]. Chinese Medicine, 2008, 3: 15.

[8] 黄树苹, 谈大明, 徐长城, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定丝瓜中多酚含量的研究[J]. 中国蔬菜, 2010(4): 47-52.

[9] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(6/7): 669-675.

[10] Deepika G, Rajinder G. Bioprotective properties of Dragon's blood

resin; *in vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011, 11: 13.

[11] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9/10): 1231-1237.

[12] 杨盈, 刘扬, 聂舟, 等. Trolox 及其酯化物与 DPPH 自由基的反应机理[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2009, 30(3): 280-283.

[13] 章佳妮, 侯建平, 翁新楚. 合成抗氧化剂及其氧化产物的抗氧化活性[J]. 粮油加工, 2009(1): 59-63.

1.3.2 酿酒酵母的分离 (1)桑葚汁中酵母的增殖培养及分离:将成熟桑葚榨汁,取 300 mL 桑葚汁装入 500 mL 无菌三角瓶中,加入几颗桑葚,再加入 95% 乙醇使桑葚汁中的乙醇度为 5%,用柠檬酸调节 pH 值为 4.0,然后敞口放置在 25 ℃ 下让其自然发酵,直至产生气泡、有酒味时停止发酵。取 5 mL 增殖培养液作适当梯度稀释后,在麦芽汁琼脂平板培养基上进行梯度稀释划线分离。25 ℃ 培养,待平板长出单菌落后进行镜检,根据镜检结果初步分离出酵母,并观察记录菌落特征,编号命名。(2)土壤中野生酵母菌的分离:将成熟桑葚浅埋于某桑园的土壤里,15 d 后取出所埋桑葚和周围的土壤作为分离源。取分离源土壤约 1 g,加入 10 mL 5% 蔗糖水溶液中,并用玻棒搅匀,然后静置,待泥土沉淀后取上层溶液接入 100 mL 桑葚果汁中,25 ℃ 恒温敞口培养 1 d。取 5 mL 该果汁作适当梯度稀释后,在麦芽汁琼脂平板培养基上进行梯度稀释划线分离,25 ℃ 培养,待平板长出单菌落后镜检,然后根据镜检结果初步分离出酵母,并观察记录菌落特征,编号命名。

1.3.3 酿酒酵母的筛选 (1)试管发酵初筛:将制备好的桑葚果汁分装于无菌大试管中,每支装量 20 mL,然后分别接入分离得到的酵母菌,于 25 ℃ 培养箱中先敞口培养 3 h,然后加棉塞进行发酵。注意观察起始发酵时间,然后定期观察发酵情况,7 d 后品评原酒风味。根据试验结果,初步筛选出起酵快、发酵过程缓和及产香较好的酵母菌。(2)三角瓶复筛:将制备好的桑葚果汁分别装入 1 000 mL 三角瓶中,每瓶为 700 mL,用蔗糖将糖度调整为 20%。将初筛到的菌株及活化后的高活性葡萄酒干酵母(对照菌株)分别接入三角瓶中,于 25 ℃ 发酵,注意观察发酵情况,定期测定发酵液的残糖、乙醇度,待发酵停止后进行风味品评,综合对照酵母的发酵情况,选出发酵性能好、产香好的酵母菌。

1.3.4 桑葚果酒中试生产 (1)菌种扩培:称取适量干桑葚加入提取罐中,按 1:3(体积比)加入饮用水,70 ℃ 提取 1 h,过滤,制得桑葚果汁,添加 K₂S₂O₅ 使有效 SO₂ 含量达到 70 mg/L;取无菌三角瓶装入制备好的桑葚果汁,然后接入经活化的菌种,加上棉塞,于 25 ℃ 培养 12 h,再按 10% 的接种量转接入种子罐中,25 ℃ 控温培养,当外观耗糖率达到 30% 时,菌种扩培完毕。(2)主发酵:筛选、称取所需干桑葚清洗后倒入发酵罐,按 1:3(体积比)加入饮用水,根据干桑葚含糖量计算糖度,并添加白砂糖,使浸出的桑葚汁含糖量达到 23%,添加 K₂S₂O₅ 使有效 SO₂ 含量达到 80 mg/L,按 10% 的接种量接入制备好的种子液,25 ℃ 控温发酵,其间定期检测糖度、乙醇度等指标,当残糖降至 5 g/L 时主发酵结束。(3)后处理:主发酵结束,将自流原酒泵入后发酵罐,控制温度在 25 ℃ 以下进行后发酵,待后发酵结束后将原酒进行均衡调配,然后进行澄清过滤及脱色除菌。

1.3.5 分析方法 外观糖度:手持糖量计测定;乙醇度:乙醇计测定^[9];残糖:斐林滴定法测定^[9];pH 值:pH 计测定;综合评分:根据葡萄酒感官评定要求,结合桑葚果酒实际,制定桑葚果酒感官评定标准(表 1)。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母的分离

从 2 种分离源中各采集样品 3 份进行分离,从中共分离

表 1 桑葚果酒感官评定标准

项目	标准	分值
色泽 (10 分)	紫红色、深红色、宝石红、澄清、透明、光泽感强	8~10 分
	浅红色、澄清、透明、有一定光泽	6~8 分
	褐色、基本澄清、基本无光泽	4~6 分
	褐色、较浑浊、无光泽	2~4 分
	黄褐色、浑浊、无光泽	0~2 分
香味 (30 分)	果香浓郁、酒香较馥郁、香气协调	25~30 分
	果香适中、酒香醇和	20~25 分
	果香和酒香较淡、无不良气味	15~20 分
	香气不悦人、或有不良气味	10~15 分
	香气不足、有明显的不良气味	0~10 分
滋味 (40 分)	酒体丰满、柔和爽口、酸甜适口、回味绵长	35~40 分
	酒体较丰满、较柔和、酸甜适当、回味悠长	25~35 分
	酒体轻弱、无异味、回味单一	20~25 分
	酒体瘦弱、味道平淡、缺少柔和性、有异味、回味很淡	0~20 分
典型性 (20 分)	桑葚果酒特有风味明显、典型完美、独具一格、优雅	15~20 分
	有桑葚果酒特有风味、典型明确、风格和谐良好	10~15 分
	略带桑葚果酒特有风味、缺乏和谐性或典型性	5~10 分
	无典型性	0~5 分

得到酵母菌 12 株,其中来自桑葚果汁自然发酵液的酵母 7 株(分别编号为 SY-1、SY-2、SY-3、SY-4、SY-5、SY-6、SY-7),来自分离源土壤中的酵母 5 株(分别编号为 TY-1、TY-2、TY-3、TY-4、TY-5)。其基本特征见表 2。

表 2 分离酵母基本特征

来源	颜色	细胞形态	生殖特征	菌株数
桑葚果汁自然发酵液	乳白色	椭圆形	单端、多端出芽	3
	白色	柠檬形	两端出芽	1
	淡黄色	椭圆形	两端出芽	1
	白色	椭圆形	两端出芽	2
分离源土壤	淡黄色	卵圆形	多端出芽	1
	黄色	椭圆形	两端出芽	1
	白色	椭圆形	两端出芽	2
	乳白色	圆形	两端出芽	1

从分离结果可看出,桑葚果汁在自然发酵过程中可富集周围环境中的酵母菌,其种类和数量较多,说明果汁自然发酵醪为分离果酒酵母的良好材料。将桑葚果实埋在土壤中 15 d 后再从土壤中分离酵母,由于土壤中菌种种类较多,情况较复杂,含有多种微生物,分离较困难,同时分离得到的酵母菌数量相对较少。

2.2 酿酒酵母的筛选

2.2.1 试管发酵初筛 根据表 3 和表 4 的结果,结合起酵时间、发酵速度以及发酵结束后果酒的色泽、澄清度、乙醇度、产香情况,初步筛选出产乙醇能力较强、产香较好、发酵完毕果酒澄清好、色泽较好的酵母菌种 SY-2、SY-7 和 TY-2。

2.2.2 三角瓶复筛 将试管初筛得到的 3 株酵母菌及对照菌株高活性葡萄酒酵母一起接入三角瓶进行复筛。从表 5 可以看出 SY-2 发酵完毕所得到的果酒感官评价较好,特别是产香特点较突出,其综合评分为 92 分,与其他选育菌株(SY-7、TY-2)及对照菌株高活性葡萄酒酵母相比,SY-2

表3 桑葚果汁中酵母初筛结果

菌株	发酵时间(h)										
	3	6	9	12	18	24	36	48	72	96	120
SY-1	-	-	-	+	++	++	+++	+++	++	-	-
SY-2	-	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	++	++	-
SY-3	+	+	++	++++	++++	++	-	-	-	-	-
SY-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SY-5	+	+	+++	++++	+	-	-	-	-	-	-
SY-6	-	-	+	+++	+++	++	-	-	-	-	-
SY-7	-	+	+	+++	+++	++++	+++	++	++	+	-

注:“-”表示发酵液静止不动,没有发酵现象;“+”表示有气泡,发酵正在进行,“+”越多,表示发酵越剧烈。

表4 分离源土壤中酵母初筛结果

菌株	发酵时间(h)										
	3	6	9	12	18	24	36	48	72	96	120
TY-1	-	-	-	+	+	+++	++	++	+	-	-
TY-2	-	+	++	+++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
TY-3	-	-	-	+	++	++	+++	++	-	-	-
TY-4	-	+	++	+++	++	+	-	-	-	-	-
TY-5	-	-	+	++	++	+++	+++	++	+	-	-

注:“-”表示发酵液静止不动,没有发酵现象;“+”表示有气泡,发酵正在进行,“+”越多,表示发酵越剧烈。

表5 不同菌种发酵果酒感官评定

项目	SY-2	SY-7	TY-2	葡萄酒酵母
色泽	紫红色,清亮透明	深红色,略显浑浊	深红色,清亮透明	深红色,清亮透明
香味	果香浓郁,酒香较馥郁	果香味较淡,酒香馥郁	果香味较淡,酒香味较淡	果香浓郁,酒香馥郁
滋味	酒体丰满,柔和爽口,酸甜适口,回味绵长	酒体较丰满,较柔和,酸甜适口	酒体较单薄,回味单一	酒体不够丰满,柔和爽口,酸甜适口,回味绵长
典型性	风味明显、典型完美,最具桑葚果酒之特点	完美性欠佳,具桑葚果酒之特点	完美性欠佳,具桑葚果酒之特点	较完美、具桑葚果酒典型性
综合评分	92	78	72	87

注:1号酒酵母为SY-2;2号酒酵母为SY-7;3号酒酵母为TY-2;4号酒酵母为高活性葡萄酒酵母。

更适合作为桑葚酿酒菌种。因此选择SY-2作为桑葚酒生产中试发酵菌株。

2.2.3 桑葚果酒中试生产 用筛选得到的酵母进行1 t规模桑葚果酒中试生产,制得紫红色、澄清透明、香气协调、柔和爽口的优质桑葚果酒,其理化指标为:乙醇度 11.4%,残糖 4.0 g/L,pH值 3.4,挥发酸 1.01 g/L。

3 结论

从桑葚果汁自然发酵液及土壤中共分离得到12株酵母菌,经过试管发酵初筛、三角瓶复筛及1 t规模中试生产得到1株在桑葚果酒发酵中起酵快、发酵能力强、残糖较低、产香较好的酵母菌SY-2,其可以作为独立的发酵菌株供桑葚果酒生产使用。

参考文献:

[1]张艳丽,邵则夏,陆 斌,等. 桑葚酒食用药用价值与加工技术

[J]. 中国林副特产,2005(4):30-31.
[2]梁贵秋,吴婧婧,祁广军,等. 桑葚酒的营养价值及保健作用[J]. 现代食品科技,2011,27(4):457-460.
[3]宋于洋,汪宗玉,杨新民. 葡萄酒中的白藜芦醇[J]. 酿酒,2003,30(6):44-45.
[4]史清龙,樊明涛,马兆瑞. 营养型桑葚酒加工工艺的研究[J]. 酿酒,2005,32(6):78-79.
[5]林 巧,张 艳,孙小波,等. 保健型桑葚酒的研制[J]. 农产品加工·学刊,2008(4):60-63.
[6]梁艳英,任玉巧,王 华. 桑葚果酒及饮品的研究进展[J]. 酿酒,2005,32(6):48-50.
[7]陆寿鹏. 果酒工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
[8]赵祥杰,杨荣玲,肖更生,等. 桑葚果酒专用酵母的筛选及鉴定[J]. 中国食品学报,2008,8(8):60-65.
[9]GB/T 15038—2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].