

无花果果酒酵母的筛选及发酵性能研究

左勇, 刘利平, 鞠帅, 谢晖, 祁峰

(四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000)

摘要: 本文主要筛选适合无花果果酒发酵的酵母。从无花果果皮和无花果果酒酒渣中初步分离得到 41 株酵母菌, 经过一级筛选得到 12 株产酒产香较好的菌株, 经过杜氏管法筛选得到 6 株起酵快的优势菌株, 再经过无花果浆汁发酵法筛选得到 1 株起酵快、产酒产香较好的酵母。再对这株菌进行耐受性测试, 结果表明, 酵母菌 Z20 对糖度、酸度、SO₂ 以及乙醇的耐受性较好, 可作为无花果果酒发酵的专用酵母。

关键词: 无花果; 酵母菌; 筛选; 发酵性能

文章编号: 1673-9078(2013)6-1293-1296

Screening and Fermentation of Yeast for Fig Fruit Wine Production

ZUO Yong, LIU Li-ping, JU Shuai, XIE Hui, QI Feng

(Department of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: From 41 yeast strains preliminarily isolated from fig skin and fig wine lees, 12 strains were screened due to their capability of producing better wine fragrances. Then 6 strains showing fast fermentation speed were selected by duclenne tube method. Comparison of the fig sauce fermentation by the strains showed that yeast Z20 gave fast fermentation speed and produced better wine fragrance. The tolerability of the strain was measured and the result showed that the Z20 yeast can tolerate high sugar content, acidity, SO₂ and ethanol, which could be used for fig fruit wine fermentation.

Key words: fig; yeast; screening; fermentation capability

无花果属桑科 (Moiaceae) 无花果属 (*Ficus carical*), 以大乔木, 小乔木为主, 原产于热带和亚热带地区^[1]。无花果又名奶浆果、隐花果, 其果实皮薄而无核, 软甜可口, 风味郁香, 口感甘甜, 营养丰富^[2]。成熟无花果可食部分达 90%。其含糖量在 15~28% 之间, 富含人体必需的氨基酸、矿物质和维生素, 还含有大量的膳食纤维、果胶、蛋白质分解酶、脂肪酶等多种具有药理价值的成分^[3]。研究表明, 无花果含有抑制白血病的天门冬氨酸、治疗冠心病的丝氨酸、抗癌的活性元素、抗衰老的超氧化物歧化酶等^[4-7]。虽然无花果的营养价值和药用医疗价值都很高, 但由于其保鲜期短, 常温条件下 1~2 d 即软化、褐变、风味下降以及腐烂, 极大地影响了无花果的食用价值与经济价值, 使无花果不能得到充分的利用。以无花果为原料生产果酒, 不但可以提高无花果附加值, 而且还可以解决卖果难的问题, 促进果农的增收。利用发酵法将无花果制成果酒, 既能保留无花果果酒的营养和药用价值, 又能延长其保存时间, 是目前开发利用无花果的有效途径之一。

由于无花果果酒质量、风味参差不齐, 制约了市场的占有率, 不利于无花果果酒的发展。因此, 提高无花果果酒的品质, 满足消费者对无花果果酒需求, 是目前亟待解决的问题。在无花果果酒发酵阶段是形成其风味和口感的关键环节, 直接影响无花果果酒的质量, 其关键因素是需要优良的菌种, 但目前尚无专门发酵无花果果酒的酵母菌, 多采用葡糖酒酿酒酵母。本研究拟从无花果果皮和无花果果酒酒渣中筛选出酵母菌种, 并研究其耐受性, 筛选出最佳发酵菌种, 对无花果果酒品质具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成熟的无花果: 市售。

无花果果酒酒渣: 四川威远国友果业有限公司提供。

1.2 培养基

富集培养基: 葡萄糖 5%、KH₂PO₄ 0.25%、尿素 0.1%、酵母膏 0.05%、MgSO₄ 0.1%、Fe₂(SO₄)₃ 0.01%、孟加拉红 (1% 的水溶液) 0.023%, 121 °C 灭菌 15 min。

麦芽汁培养基: 麦芽汁 1000 mL, 加入琼脂 20 g, 溶化分装后, 121 °C 灭菌 20 min。

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 四川省教育厅成果转化项目 (11ZZ016)

作者简介: 左勇 (1972-), 男, 教授, 主要从事发酵工程方面的研究

YEPD 培养基: 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.0, 115 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基: 新鲜无花果浆汁, 用蔗糖调整糖度为 18 °Be, 自然 pH, 115 °C 灭菌 15 min。

1.3 主要仪器

GZ-250-HSH 恒温恒湿培养箱, 韶关市广智科技设备有限公司; BD-30 生物显微镜, 深圳市博视达光学仪器有限公司; WZ-103 手持糖度计, 四川省成都市光学厂; UV2400 紫外可见分光光度计, 上海分析仪器总厂; LDZX-50FBS 历史压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; PX-A80T 酒度计, 广州市普析通仪器有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 酵母菌的富集

无菌条件下, 准确称量无花果果皮和酒渣各 1 g, 分别接种到酵母富集培养基中, 于 28 °C 振荡培养 24 h。

1.4.2 酵母菌的分离

在无菌条件下, 将不同富集液进行不同梯度稀释, 记录并编号。选取适宜的稀释度, 涂布于平板, 28 °C 倒置培养 48 h, 根据菌落特征及镜检, 初步确认为酵母菌。挑取单菌落, 在麦芽汁培养基平板上划线直到单菌落, 纯菌株培养后于 4 °C 条件下保藏, 备用。

1.4.3 酿酒酵母的筛选

一级筛选: 将分离的菌株活化扩大培养后^[8], 分别接种到含糖 18% YEPD 液体培养基中, 于 28 °C 振荡培养 7 d, 筛选酒香浓郁且伴有果香的菌株; 二级筛选—杜氏管法: 将活化的菌种, 分别接种 YEPD 培养液中, 附有杜氏管。在相同条件下, 筛选出产气快且多的菌株, 重复三次; 三级筛选: 将活化的菌种, 分别接种发酵培养基中, 于 28 °C 培养 7 d, 测其酒精度和酸度, 并结合感官评定, 选出产酒精度较高, 酸度和口感适宜的菌株。感官评定标准见文献^[9], 评定项目包括色泽、香味和滋味。

1.5 酵母菌的发酵性能测定^[10]

1.5.1 菌株对酸度的耐受性试验

将相同量菌种接种到不同 pH 值的无花果浆汁中, 28 °C 摇床培养 3 d, 每隔 12 h 取样测定波长 600 nm 处吸光度值, 观察生长曲线的变化情况。

1.5.2 菌株对初始糖度的耐受性实验

将相同量菌种接种到不同糖度的无花果浆汁中, 28 °C 培养 3 d, 每隔 12 h 取样测定波长 600 nm 处吸光度值, 观察生长曲线的变化情况。

1.5.3 菌株对 SO₂ 的耐受性实验

将相同量菌种接种到不同浓度 SO₂ (添加不同量亚硫酸钠) 的无花果浆汁中, 28 °C 条件下培养 3 d, 每隔 12 h 取样测定波长 600 nm 处吸光度值, 观察生长曲线的变化情况。重复三次。

1.5.4 菌株对酒精的耐受性实验

将菌种接种到不同酒精浓度的无花果浆汁中, 28 °C 摇床培养 3 d, 每隔 12 h 取样测定波长 600 nm 处吸光度值, 观察生长曲线的变化情况。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离结果

根据酵母菌的菌落特征和镜检结果^[11-12], 初步分离得到 41 株酵母菌。得到的菌落颜色为灰白色或乳白色, 表面光滑、湿润, 质地均匀, 呈奶油状的圆形或者椭圆形。在显微镜下观察细胞形态, 有圆形和卵圆形两种, 繁殖方式有产孢子和芽殖两种。保留一端或两端出芽生殖的菌株 25 株。

2.2 酵母菌的筛选

2.2.1 一级筛选

将分离得到的 41 株酵母菌分别接种到 YEPD 培养基培养 7 d 后, 从感官评定, G3、G7、G8、G15、Z1、Z5、Z9、Z10、Z12、Z17、Z20、Z21 等 12 株菌株的发酵液酒香味浓郁, 且具有无花果的特殊香味, 其他菌株发酵液有酸味、臭味、馊味等不愉快气味。

2.2.2 二级筛选

将一级筛选得到的 12 株菌株作为杜氏管法筛选的出发菌株, 接种到 YEPD 培养液的试管中, 然后放入杜氏管, 28 °C 培养 48 h, 杜氏管发酵试验的结果见表 1。

表 1 杜氏管中发酵情况

Table 1 The fermentation by different strains in Durham tube

发酵时间/h	G3	G7	G8	G15	Z1	Z5	Z9	Z10	Z12	Z17	Z20	Z21
10	-	+++	+	+	+++	++	+	-	+	-	++	++
16	-	+++	++	+	+++	++	++	+	++	-	++	+++
24	-	+++	++	++	+++	++	++	++	+++	-	+++	+++
48	-	+++	++	++	+++	++	++	+++	+++	-	+++	+++

注: 其中“G”表示从果皮筛选的菌株, “Z”表示酒渣筛选的菌株; “-”表示杜氏管中没有气体“-”表示杜氏管中没有气体; “+”表示产气量约等于杜氏小管体积的 1/3; “++”表示产气量约等于杜氏小管体积的 2/3; “+++”表示产气量约等于杜氏小管体积。

由表 1 可以看出, 酵母菌在 28 °C 培养 48 h 能产气达到或超过满体积的酵母菌有 6 株。这些菌株生长旺盛, 起酵能力较强, 可能有较高的发酵效率。其中,

G7和Z1在发酵10h时产气就已经充满杜氏管,起酵最快;Z21在发酵16h时产气充满杜氏管,起酵较快;Z12和Z20在发酵24h产气达到杜氏管满体积,起酵稍慢;Z10起酵较慢,发酵48h才充满杜氏管。其余菌株发酵两天仍未充满杜氏管。故将在48h内产气达到或超过杜氏管满体积的6株菌株(G7、Z1、Z10、Z12、Z20、Z21)作为下一级筛选的出发菌株。

2.2.3 三级筛选的结果

将二级筛选得到的6株菌株以5%的接种量接种入糖度为18°Be的无花果浆汁中,28℃发酵7d,每株菌做三个平行。发酵后感官评定各发酵液,并测定其酒精度和酸度,结果见表2。

表2 不同菌株发酵果酒的评定指标

Table 2 Indicators of fruit wine fermented by different strains

菌株号	酒精度/ %vol	酸度/ (10 ⁻² g/mL)	感官评定
G7	11.6	2.53	浅褐色,酒香浓郁,果香较淡,酸度较淡
Z1	11.8	2.98	浅褐色,酒香浓郁,果香较淡,酸度较淡
Z10	10.5	1.85	浅褐色,酒香较淡,有异味,酸涩
Z12	10.9	2.33	浅褐色,酒香浓郁,果香较淡,酸涩
Z20	12.1	3.04	浅褐色,酒香浓郁,果香浓郁,酸度适中
Z21	10.7	2.41	浅褐色,酒香较淡,无果香,酸涩

由表2可知,菌株Z20发酵的无花果酒香气浓郁,酒精产率较高,果香宜人。根据综合评定,Z20菌株较其他菌株更适合做无花果酒的发酵菌株。其他菌株的发酵液酒香果香较淡,口感酸涩,还伴有异味,因此不适合做无花果酒的发酵菌株。

2.3 目标菌株的性能测试

2.3.1 目标菌株耐酸性试验

将Z20菌株接种于pH分别为3.0~5.0的无花果浆汁中,28℃培养3d,每12h取样1mL,稀释至5mL,测定吸光度,结果见图1。

由图1可知,酵母菌Z20在pH为3时生长较缓慢,因为在pH较低时,细胞会产生应急反应,致使细胞丧失生理活性,对细胞造成损伤^[13]。当pH在3.5~5.0之间,菌体的生长随pH的增加而加快,但整体较稳定,因此酵母Z20在一定范围内具有耐酸性。

2.3.2 目标菌株糖度耐受性试验

将Z20菌株接种到糖度分别为15~27°Be的无花果浆汁中,接种量为5%,28℃培养3d,每12h取样1mL,稀释至5mL,测定吸光度,测定结果见图2。

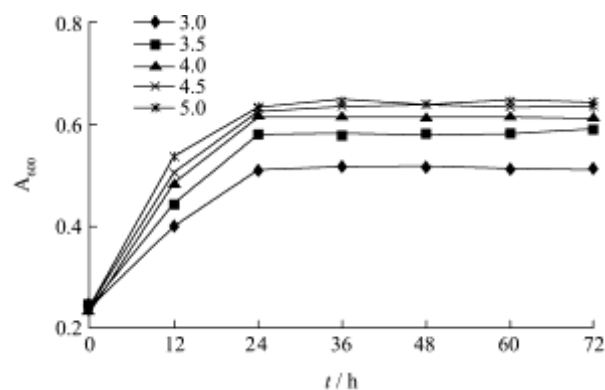


图1 不同pH下酵母Z20生长情况图

Fig.1 Growth curve of Z20 at different pH

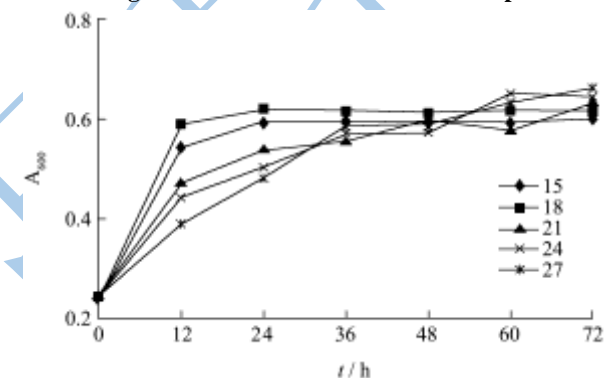


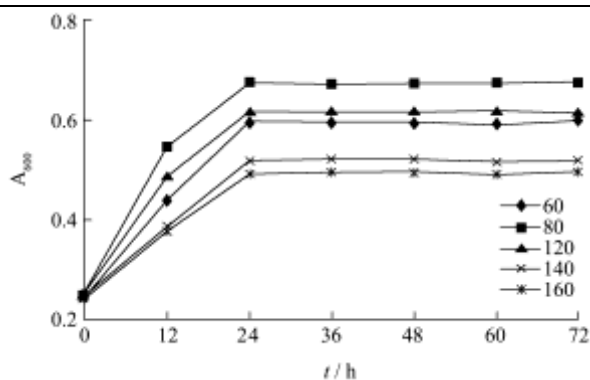
图2 不同糖度下酵母Z20生长情况

Fig.2 Growth curve of Z20 at different sugar degree

由图2可知,当初始糖度小于18°Be时,随糖度是我增加菌体的生长加快;当初始糖度大于18°Be时,随着糖度的增加,糖度对菌体的抑制作用越明显,这可能是由于糖含量增加,环境的渗透压增大,对酵母菌细胞内部主要代谢途径中的酶的活性产生一定的影响^[10]。但随着时间的增加,糖度对菌体的抑制作用减弱,当菌体生长到48h时,抑制作用基本消失。由此可知,酵母菌Z20的耐糖性较高。

2.3.3 目标菌株SO₂耐受性试验

由图3可知,当SO₂的浓度小于120mg/L的时候,酵母菌的生长基本不受影响,即SO₂浓度在60~120mg/L的时候对酵母菌基本没有抑制作用;当SO₂的浓度超过120mg/L,酵母菌的生长随SO₂浓度的增加而减少,SO₂在抑制杂菌生长的同时也抑制酵母菌的生长即SO₂的抑制作用较强。则酵母菌Z20在一定范围内具有SO₂耐受性。

图3 不同SO₂浓度下酵母Z20生长情况Fig.3 Growth curve of Z20 with different SO₂ concentration

2.3.4 目标菌株酒精耐受性试验

乙醇对酵母细胞本身来说,既是抑制剂又是毒素^[14]。果酒的酒精度一般在7~13% (V/V)之间^[15],优良果酒酿造酵母须具备一定的耐乙醇能力。将Z20菌种以5%的接种量接种入乙醇浓度为6~14% (V/V)糖度为20°Be的无花果浆汁中,28℃培养3d,每12h取样1mL,稀释至5mL,测定吸光度,结果见图4。

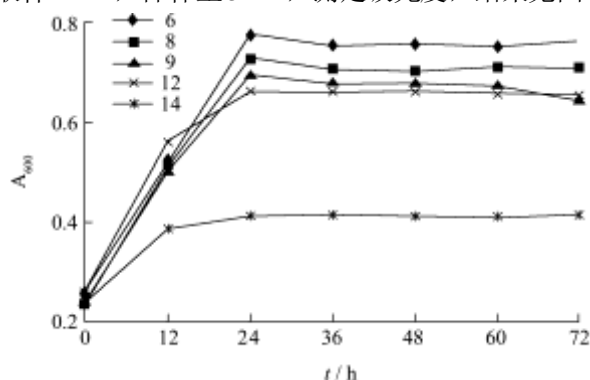


图4 不同酒精浓度下酵母Z20生长情况

Fig.4 Growth curve of Z20 with different alcohol concentration

由图4知,对于酵母菌Z20,当酒精浓度小于12% vol时菌体生长随酒精浓度的增加而变缓慢,但整体较稳定,菌体受到的抑制作用较小。但当酒精浓度超过14% vol则菌体受到的抑制作用较严重,菌体生长缓慢。

3 结论

通过富集、分离纯化和筛选,得到一株酵母菌Z20,其产酒和产香能力较好,且起酵快、发酵能力较好、产酒精率高且产香较好的无花果就专用酵母菌。通过耐受性试验可知,该酵母菌具有一定的耐酸性、

糖度耐受性、SO₂耐受性以及一定的酒精耐受性。且该菌可以提高无花果酒的品质,可以取代葡糖酒酵母进行无花果酒发酵。

参考文献

- [1] 邵晓祥.无花果酒生产技术[J].江苏食品与发酵,2001,6: 34-35
- [2] 朱定和,钟瑞敏,刘健南.无花果酒酿造工艺的研究[J].食品科技,2003,7:88-90
- [3] 马云杰.系列无花果保健酒的研制与开发[J].食品科学,1999,3:36-38
- [4] 生吉萍,孙志健,申琳,等.无花果的营养和药用价值及其加工利用[J].农牧产品开发,1999,3:10-11
- [5] 莫少红.无花果研究进展[J].基层中草药杂志,1998,12: 54-56
- [6] 尹卫平,陈宏明,王天欣,等.无花果抽提物抗肿瘤成分的分析[J].新乡医学院学报,1995,12(4):316
- [7] 茹克娅·沙德克·维吾尔医常用药材学(上册)[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993
- [8] 李锐,冯奎,吴婧,等.不同来源酿酒酵母对柑橘果酒香气成分的影响[J].食品科学,2010,38(17):206-213
- [9] 李华.葡萄酒品尝学[M].北京:中国青年出版社,1992
- [10] 徐清萍,朱广存.野生猕猴桃果酒酵母的筛选鉴定及耐受性的研究[J].中国酿造,2011,7:120-123
- [11] N J W Kreger-van Rij. The yeasts a taxonomic study [M]. The Netherlands: Elsevier Science publisher B V, 1984
- [12] J A BARNETT, R W DAYNE, D YARROW. YEASTS characteristics and identification [M]. New York: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1983
- [13] Squier T. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging [J]. Experimental Gerontology, 2001, 36(9): 1539-1550
- [14] Alexandre H, V Ansanay-Galeote, S Dequin, et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEBS Letters, 2001, 498: 98-100
- [15] Rosa M F. In vivo Activation by ethanol of plasma Membrane AT-Pase of *Sac. ce* [J]. Applied and environmental Microbiology, 1991,57: 830-835