

低甲醇甘蔗酒的酿造工艺研究

武晓娜, 康富帅, 阎锐鸣, 周世水

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 为了降低甘蔗酒中甲醇含量, 本文采用紫外诱变和化学诱变选育得到低产甲醇的酿酒酵母, 结合优化酿酒工艺: 接种量 2.0×10^7 cfu/mL、23 °C 发酵 6 d, 得到甘蔗酒的相对甲醇含量 172.9 mg/L, 比初始酵母酿造酒的 284 mg/L, 降低了 39%。

关键词: 酿酒酵母; 诱变; 甘蔗酒

文章编号: 1673-9078(2012)6-670-671

Study of Brewing Technique for Reducing Methanol Content of Sugar Cane liquor

WU Xiao-na, KANG Fu-shuai, YAN Rui-ming, ZHOU Shi-shui

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, which was obtained by UV and MES mutation, was used for fermentation of sugar cane liquor to decrease the methanol content. The brewing techniques was optimized as: inoculums size 4.0×10^7 cfu/mL, fermentation temperature 23 °C and fermentation time 6 days. Under the optimum fermentation conditions, the methanol content of sugar cane liquor was 172.9 mg/L, which was 39% lower than that of the liquor brewed by original strain (284 mg/L).

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; mutation; liquor of sugar cane

甘蔗是我国南方廉价高产的农作物, 亩产可达 10 吨, 其主要用途是榨糖和直接食用。为提高甘蔗的附加价值和拓展甘蔗的用途, 可将甘蔗发酵成燃料酒精、食用酒精和朗姆酒, 特别是甘蔗蒸馏酒。但是甘蔗酿造蒸馏酒中甲醇的含量较高, 这对饮酒者健康不利^[1,2], 因为甲醇是一种神经毒物, 对人体的神经系统特别是视神经的毒害作用十分严重。因此, 本文首先通过物理和化学诱变来选育低产甲醇的酿酒酵母, 再优化甘蔗汁酿酒工艺, 以酿造健康的低甲醇甘蔗蒸馏酒, 同时也为多途径利用我国年产上亿吨的甘蔗^[3]寻找新的出路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

菌种: 酿酒酵母 (华南理工大学微生物实验室), 原料: 甘蔗、麦芽汁。

1.2 仪器

Agilent 7890A 气相色谱仪; Agilent 7694E 顶空进样器; 酒精蒸馏装置等。

1.3 方法

收稿日期: 2012-02-29

基金项目: 广东省部产学研结合项目 (2011B090400496); 广东省学生科技创新研究项目 (S1010561107)

作者简介: 武晓娜 (1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事酿酒方面的研究

通讯作者: 周世水, 博士, 副教授, 硕士生导师

1.3.1 菌种的活化

斜面酵母菌种用加 50% 甘蔗汁的麦芽培养液, 进行 20 °C 三角瓶扩大培养 24 h。

1.3.2 紫外 (UV) 诱变

超净台紫外灯与培养皿中的液体酵母相距 30 cm, 照射 0.5 min 或 1.0 min 后涂布平板培养。

1.3.3 硫酸二乙酯 (DES) 诱变

采用 DES 浓度分别为 0.4%、0.8%、1.2% 的麦芽培养液, 诱变 30 min、60 min 后涂布平板培养。

1.3.4 菌种选育培养基

利用 2% 酵母浸膏、糖度 180 g/L 的发酵液, 进行诱变菌种培养选育。

1.3.5 甘蔗汁的发酵与蒸馏

将甘蔗汁调到 pH 4.0, 糖度 180 g/L, 接种酵母 2.0×10^7 cfu/mL 发酵。取上清蒸馏, 得到上清体积 30% 的甘蔗蒸馏酒。

1.3.6 甘蔗酒酿造的工艺流程

甘蔗 → 清洗压榨 → 甘蔗汁 → 调糖酸 → 发酵液 → 发酵 → 蒸馏 → 甘蔗酒 → HS-GC 法测定甲醇

↑ 接种

酵母 → 诱变 → 选育低产甲醇酵母 → 菌种扩培

1.3.7 酒精度的测定

按国家标准 GB/T10345-2007 方法。

1.3.8 甲醇的测定方法

采用顶空气相色谱法 (HS-GC)^[4], 以乙酸丁酯为内标物, 测得蒸馏酒中甲醇含量, 并按酒精度 60% (V61)

折算成相对甲醇含量。

2 结果与讨论

2.1 DES 诱变酵母菌种的选育

一个培养平板挑选 10 个 DES 诱变菌落为一组,进行多组发酵实验,蒸馏后测定甲醇含量并折算成相对甲醇含量,含最低产甲醇菌种一组的酿酒结果,如表 1。

从表 1 的实验结果可知,DES 诱变后能够选育得

表 1 DES 诱变酿酒酵母的酿酒结果

Table 1 Methonal content of brewing wine by *Saccharomyces cerevisiae* mutant with DES mutation

试验菌种编号	对照组	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
相对甲醇含量/(mg/L)	134.8	165.2	209.4	116.2	111.0	205.4	146.6	140.7	134.3	115.8	177.3

表 2 UV 诱变酿酒酵母的酿酒结果

Table 2 Methonal content of brewing wine by *Saccharomyces cerevisiae* mutant with UV mutation

试验菌种编号	对照组	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
相对甲醇含量/(mg/L)	111.0	176.0	109.4	99.0	116.6	176.2	105.7	117.9	118.4	97.3	106.7

从表 2 的实验结果可知,UV 诱变能够在 DES 诱变选育菌种基础上进一步降低甲醇生成量,其中 9 号菌种酿造酒的相对甲醇含量为 97.3 mg/L,比对照组菌种的相对甲醇含量 111 mg/L 降低了 12.3%,而 DES 诱变+UV 诱变的酵母菌种比原始菌种的相对甲醇含量 134.8 mg/L 降低了 27.8%。

2.3 酿酒酵母菌种的确定

根据已有的优化发酵条件^[5],本实验采用温度 20℃,发酵 7 d,糖度 180 g/L。

表 3 酿酒酵母菌种的筛选实验

Table 3 Fermentation properties of different strains of *Saccharomyces cerevisiae*

试验菌种编号	对照组	3#菌种	9#菌种
蒸馏酒精度/(%,vol)	28	29	27
甲醇相对含量/(mg/L)	284	206	211

从表 3 的实验结果可知,诱变选育菌种进行甘蔗汁发酵,酿造甘蔗酒中相对甲醇含量为 206 mg/L,比原始菌种酿造酒中相对甲醇含量 284 mg/L 降低了 27.5%,甲醇降低效果显著。

由于酿酒过程中甲醇生成途径主要有果胶降解、纤维素降解和甘氨酸代谢来生成甲醇,这些不仅与培养基有关,而且都与菌种本身代谢和发酵有关。因此,在甘蔗汁酿酒过程中,诱变选育到低产甲醇酿酒酵母中的 3#菌种,其酿造酒中相对甲醇含量最低,且发酵快、酒精度高,故确定 3 号酿酒酵母作为甘蔗汁酿酒工艺优化的菌种。

2.4 甘蔗蒸馏酒发酵工艺条件的优化

采用 3 因素 3 水平的正交实验,即温度采用 20℃、23℃、26℃,接种量 1.0×10⁷ cfu/mL、2.0×10⁷ cfu/mL、

到低产甲醇的酵母菌株,其中 4#菌种酿造酒中相对甲醇量为 111 mg/L,比原始菌种(对照组)的相对甲醇量 134.8 mg/L 降低了 17.7%。

2.2 UV 诱变酵母菌种的选育

将 DES 诱变得最低产甲醇的酵母菌 4#进行 UV 诱变,一个培养平板挑选 10 个诱变菌落为一组,进行多组发酵实验,蒸馏后测定甲醇含量并折算成相对甲醇含量,最低产甲醇组菌种的酿酒结果,如表 2。

4.0×10⁷ cfu/mL,发酵时间 6 d、7 d、8 d,正交试验如表 4。

表 4 正交实验结果

Table 4 Result of orthogonal experiment

试验号	A (温度/℃)	B [接种量/(cfu/mL)]	C (时间/d)	相对甲醇含量/(mg/L)
1	20	1.0×10 ⁷	6	194.1
2	20	2.0×10 ⁷	7	235.0
3	20	4.0×10 ⁷	8	193.4
4	23	1.0×10 ⁷	7	203.3
5	23	2.0×10 ⁷	8	236.4
6	23	4.0×10 ⁷	6	172.9
7	26	1.0×10 ⁷	8	292.0
8	26	2.0×10 ⁷	6	276.4
9	26	4.0×10 ⁷	7	276.4
K ₁	622.5	633.8	643.5	
K ₂	612.6	747.7	716.3	
K ₃	846.3	644.3	721.7	
R	233.7	113.9	78.2	

因素主次 A>B>C, 即温度>接种量>时间
优化方案 A₂B₂C₁, 即 23℃发酵 6d, 接种量 4.0×10⁷ cfu/mL

从表 4 的实验结果可知,低产甲醇酿酒酵母的酿酒工艺优化是:温度 23℃,发酵时间 6 d,接种量 4.0×10⁷ cfu/mL,酿造酒中相对甲醇含量 172.9 mg/L,比酿酒工艺优化前的 206 mg/L 降低 16%。

3 结论

本文采用紫外诱变和化学诱变选育出低甲醇酿酒酵母,结合甘蔗汁的发酵工艺优化,酿造出甲醇含

量低、成本低、甘蔗香突出、与酒香协调的新型甘蔗蒸馏酒，其相对甲醇含量 172.9 mg/L，比原始酵母酿造甘蔗酒中相对甲醇含量 284 mg/L，降低幅度达到 39%。甘蔗作为糖的最廉价来源，经发酵和蒸馏后得到蒸馏酒，能够大量消耗甘蔗和显著提高甘蔗的附加价值。本研究成果还可应用到其它原料酿造各种低甲醇酒，以提升我国酿造酒的健康品质。

参考文献

- [1] 李永生,齐娇娜,高秀峰.酒中甲醇测定方法的研究进展[J].酿酒科技,2006,139(1):84-89
- [2] 冀玉良.甲醇低含量酵母菌的筛选[J].商洛师范专科学校学报,2006,2:44-44
- [3] 徐雪.未来 5-10 年我国食糖产需形势与对策思路[J].农业展望,2008,1:17-19
- [4] 刘江勋,黎锡流.顶空气相色谱法测深色酒中微量甲醇[J].酿酒,2002,29(1):91-92
- [5] 熊建春,周世水.麦芽甘蔗酒的研制[J].现代食品科技,2008,24(11):1128-1129