

酸枣酿酒酵母菌的选种研究

丁兆龙 郑是琳 王立新 姜广正

(山东农业大学植保系,泰安)

摘要 从野生酸枣等果实表皮上分离获得 128 株酵母菌,通过发酵筛选试验,从中选出 4 株发酵酸枣优良菌株(0016.2, 0013.2, 0023.1, 0015.2),产酒精度(10 天)达 10% (V/V) 以上,抗 100 ppm SO_2 ,能耐 20% (V/V) 酒精度和 21 Brix 糖度。4 株优良菌株经鉴定均属于啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

关键词 酸枣;酵母菌;选种;酿酒

酸枣 (*Ziziphus jujuba*) 是一种野生植物,原产于我国。酸枣果实是一种营养丰富的果品,除含多种氨基酸外,还含有极为丰富的维生素 C,而且具有重要的药用价值^[1]。目前国内外对酿造酸枣酒的菌种选育研究甚少,从野生酸枣上分离酵母菌进行发酵酸枣的系统研究未见报道。为了开发野生酵母菌资源,故对酸枣酿酒酵母菌的选种进行了研究。

材料和方法

(一) 材料

1. 样品的采集: 1987 年 7 月—1988 年 10 月在山东省野生酸枣主要产区: 淄川、博山、济南、历城、长清、烟台福山、莱西、临沂、泰安等八个地、市、县采集酸枣果实。此外还采集部分葡萄果实。

2. 实验酵母菌株来源: 从酸枣果实上分离获得的酵母菌 110 个,葡萄上获得 17 个。对照菌株 0088.1 菌株为淄川口头副食品一厂提供的生产菌株。

3. 培养基: 麦芽汁培养基 (ME); 麦芽汁琼脂培养基 (MEA); 葡萄糖酵母浸膏蛋白胨培养基 (YEPD)^[2]。

(二) 方法

1. 菌种的分离培养、纯化和保存: 称取样品 20—30 g, 压碎后放入盛有 40 ml 无菌水的 250 ml 三角瓶, 25℃ 振荡 (120 r/min) 培养

48—72 小时。取富集培养液 1 ml, 分别按平板稀释法用 MEA 培养基进行分离。每皿加链霉素达 300 ppm, 25℃ 培养, 重复三次。

酵母菌的纯化和保存: 用单细胞分离显微操作仪获得单个细胞, 在 MEA 斜面上培养, 0—4℃ 下保存。

2. 初筛

(1) 发酵培养基配制: 称取优质酸枣; 加 2 倍水 (W/W), 煮沸 1 小时, 双层纱布过滤, 用葡萄糖调枣汁为 12 Brix 糖度, 0.55 kg 15 分钟间歇灭菌二次。

(2) 菌株培养: 供试菌株在 5 ml ME 液体培养基中 28℃ 培养 24 小时。

(3) 三角瓶发酵试验: 吸取上述菌液 1 ml 加到盛有 150 ml 枣汁的发酵瓶中, 称量发酵瓶, 28℃ 静置发酵。每隔 24 小时称量一次, 并取发酵液测定各种成分 (以 72 小时的测定为标准), 重复三次, 另以不加菌的培养液为对照。

(4) 发酵液成分测定^[3]: 乙醇、乙醛、乙酸乙酯和甲醇测定采用 GC-9A 型气相色谱仪。残糖测定采用改良斐林氏快速热滴定法。总酸测定采用电位滴定和中和滴定。pH 值测定采用 PHS-3A 型酸度计。

(三) 发酵过程中酵母细胞数检测

取发酵液用血球计数板计数酵母细胞。在荧光显微镜下用吖啶橙活体染色检测活细胞数^[4]。

(四) 复筛

1. 耐 SO_2 试验: 在盛有 12 Brix 糖度, 酸 (以柠檬酸计) 为 0.6 g/ml, pH 4.1 枣汁的发酵瓶内, 加入 SO_2 达 100 ppm 进行发酵试验, 筛选耐 SO_2 菌株。

2. 耐高浓度糖和 SO_2 试验: 用葡萄糖调枣汁糖度为 21 Brix, 其余同耐 SO_2 试验, 选取耐高浓度糖和 100 ppm SO_2 菌株。

3. 耐酒精试验: 参照文献[5]的方法。

(五) 扩大发酵试验

1. 菌株培养: 参照文献[6]的方法。

2. 培养基配制: 同初筛培养液配制法。改用蔗糖调糖度至 20% (以折光计), pH 3.2。

3. 发酵试验: 将菌液 (酵母细胞 10^8 个/ml) 和培养基按 1:30 (V/V) 比例混匀倒入硫磺消毒的大缸内, 每缸约 30 kg 左右, 加 SO_2 达 100 ppm, 25℃ 密闭发酵, 不同时间观察发酵状况并测定各种成份含量。

(六) 酵母菌鉴定

鉴定方法和培养基参照文献[7]。

结果和讨论

(一) 初筛

1. CO_2 失重比较: 72 小时 CO_2 失重量各菌株间差异明显。 CO_2 失重量最高达 7.9 克, 最低的为 0 克。 CO_2 失重量在 6.0—7.0 克范围内菌株 21 个, 皆是从酸枣上分离获得。从葡萄上获得的 17 个菌株 CO_2 失重量较低。同时又对 21 个菌株不同发酵时间 CO_2 失重量进行比较, 其结果证明从 12—168 小时内各菌株随发酵时间延长, CO_2 失重量逐渐增加。12—72 小时这段时间内 CO_2 失重量增加幅度最大。96 小时以后 CO_2 失重量增加甚微。

2. 产乙醇、乙醛、乙酸乙酯、甲醇的比较: 21 个菌株 72 小时测定结果, 16 个菌株产乙醇较高达 4% (V/V) 以上, 另 5 株菌产乙醇低。此外 21 个菌株均不产甲醇; 0023.1, 0063.2, 0020.1 产少量乙醛, 只 0016.2 菌株产少量乙酸乙酯。发酵期间 pH 值由 4.0 降为 3.4—3.9 左右。72 小时各菌株在发酵液内细胞数目在 0.5

— 1.5×10^8 个/ml 范围内, 残糖范围为 2—6 g/100 ml。

根据菌株在 72 小时 CO_2 失重大和产乙醇高等指标初步筛出 0015.2, 0018.2, 0017.2, 0016.2, 0014.2, 0013.2, 0023.1 和 0088.1 等 8 个菌株供复筛试验。

(二) 复筛

1. 耐 SO_2 试验: 供试 8 个菌株中 0013.2, 0016.2, 0023.1, 0015.2, 0088.1 5 个菌株 CO_2 失重均较大, 能耐 100 ppm SO_2 液, 其余 3 个菌株不耐 100 ppm SO_2 液。

2. 耐高浓度糖和 SO_2 试验: 对上述 5 个耐 SO_2 菌株进行该项试验, 各菌株在 12—96 小时时间范围内 CO_2 失重量不一致, CO_2 失重量最大的是 0013.2 菌株, 5 个菌株中产酒精量最高的为 0013.2 菌株。在 72 小时各菌株均有一个产酒精高峰。此外由表 1 中可知: 72 小时各菌株均不产甲醇, 但产少量乙醛。仅 0016.2 菌株产少量乙酸乙酯。证明 5 个菌株均耐 21 Brix 糖度和 100 ppm SO_2 液。

3. 耐酒精试验: 0016.2, 0015.2, 0023.1, 0013.2, 0088.1 各菌株在含 12—20% (V/V) 的酒精培养基中发酵, 均能产气, 由此证明它们均能耐 12—20% (V/V) 的酒精浓度。

(三) 扩大发酵试验

上述 5 个菌株扩大发酵试验结果见表 2。各菌株在发酵 3 天时, 0013.2 菌株产乙醇量最高, 0088.1 (对照) 产乙醇量最低。各菌株发酵 3 天产少量乙醛, 均不产甲醇, 只有 0016.2 产少量乙酸乙酯。证明 0013.2, 0016.2, 0015.2, 0023.1 四个性状优良菌株, 可用来小试或中试生产酸枣酒。

(四) 鉴定结果

经鉴定 0013.2, 0016.2, 0015.2, 0023.1 和 0088.1 (对照) 5 个菌株均属于啤酒酵母 (*Saccharomyces cereviceae*)。4 个酸枣酵母菌具有产酒力较强特点, 均产少量乙醛, 但都不产生甲醇等有毒物质, 菌株 0016.2 能产少量酯类, 使发酵液具有芳香味。该 4 株菌均来自酸枣果实表面。

表 1 供试菌株耐高浓度糖和 SO₂ 试验 72 小时测定结果

菌株号	CO ₂ 失重 (g)	乙醇含量 % (V/V)	残糖 g/100ml	甲醇含量 % (V/V)	乙酸乙酯含量 % (V/V)	乙醛含量 % (V/V)	总酸 g/100ml
0013.2	14.35	8.58	3.8	0	0	0.0012	0.71
0016.2	11.50	7.81	3.9	0	0.011	0.0196	0.72
0023.1	11.20	6.72	3.9	0	0	0.0136	0.74
0015.2	9.25	6.48	4.0	0	0	0.0108	0.75
0088.1	8.10	4.89	5.1	0	0	0.0184	0.78

表 2 供试菌种扩大发酵试验比较*

菌株号		0023.1	0015.2	0016.2	0013.2	0088.1
发酵时间(天)						
3	乙醇含量(%)	5.96	6.08	5.67	6.33	5.58
	甲醇含量(%)	0	0	0	0	0
	乙醛含量(%)	0.006	0.006	0.014	0.005	0.003
	乙酸乙酯含量(%)	0	0	0.001	0	0
	残糖 (g/100ml)	4.0	3.7	3.6	3.5	4.0
	总酸 (g/100ml)	1.05	1.08	1.05	1.02	1.1
5	乙醇含量(%)	7.74	7.8	8.02	8.55	7.0
10	乙醇含量(%)	9.23	9.9	10.1	11.2	8.5

* 试验地点: 济南酒厂透明山分厂; 山东农业大学真菌实验室。

4 个菌株发酵液经有关专家品尝, 认为口感良好, 果酒香味浓, 无邪杂味道。4 个菌株与目前生产用发酵葡萄酒菌株 0088.1 相比较, 其性状好于 0088.1。此外目前国内市场上的酸枣酒主要是浸酒, 缺乏具有酸枣风味的发酵酒。因此本研究选出的 4 个菌株如在中试生产酸枣酒试验中性状优良, 对于酸枣酒的生产将产生一定的推动作用。此外, 在生产中最好采用半发酵-半浸制工艺酿造酸枣酒。这样生产出的酸枣酒, 既能保持酸枣的色泽和风味, 又使酒体醇和, 果香味浓郁, 而且减少了糖的用量, 降低了成本, 这方面的研究我们正在继续进行。

参 考 文 献

1. 中国科学院植物研究所: 中国高等植物图鉴, 科学出版社, 北京, 1985 年。
2. 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组: 常见与常用真菌, 科学出版社, 北京, 1978 年。
3. 天津轻工学院等: 工业发酵分析, 轻工业出版社, 北京, 1979 年。
4. 徐浩等: 微生物学报 5 (3): 271—277, 1957。
5. 方心芳: 应用微生物学实验法, 三联书店出版社, 1951 年。
6. 赵光鳌等: 果酒酿制, 中国食品出版社, 北京, 1987 年。
7. Kreger-Van Rij: The Yeasts—a Taxonomic Study, 3th ed., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1984。