

文章编号:2095-7386(2016)03-0020-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.03.003

南瓜酒酵母菌的筛选及其发酵特性研究

程旺开¹, 杨柳²

(1. 芜湖职业技术学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 合肥工业大学 生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘 要:为筛选得到适合南瓜酒发酵的酵母菌株,对南瓜皮中天然存在的酵母菌进行平板分离,通过TTC显色法筛选出产酒精能力强的酵母菌株,并考察其在南瓜汁中的发酵特性,确定其生长受外界条件的影响情况。实验结果表明,在分离筛选得到的12株酵母菌株中,1号菌和12号菌产酸较低且具有较强的发酵产酒精能力,其最适生长条件为温度28℃、pH 6、糖浓度15%,分别能耐受酒精浓度20%和SO₂浓度200 mg/L,但1号菌产酸能力较12号菌低,且产乙醇能力及凝聚性能均优于12号菌。因此,1号菌可作为南瓜酒发酵专用菌种。

关键词:南瓜酒;酿酒酵母;筛选

中图分类号:TS 262.7;TS 261.4;TS 261.1

文献标识码:A

Screening of a yeast strain for pumpkin wine and study on its properties

CHENG Wang-kai¹, YANG Liu²

(1. Wuhu Institute of Technology, Wuhu 241000, China;

2. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In order to obtain yeast suitable for the fermentation of pumpkin wine, the yeast strains with strong ability of alcohol production were screened out from the Pumpkin Peel by the TTC method. The fermentation characteristics of the yeast in the pumpkin juice were investigated, and the influence of external conditions on the growth of the yeast was determined. The experimental results show that 12 strains of yeast strains were isolated and screened, the 1 bacteria and 12 bacteria produce acid is low and has a strong ability to produce alcohol. The optimum conditions for the growth of strain 1 and strain 12 were temperature 28℃, pH6 and sugar concentration 15%. The strain displayed good resistance to high concentration alcohol (as high as 20%) and SO₂ (200 mg/L). But the yield of 1 bacteria was superior to 12 bacteria in ethanol and aggregation, and the ability of produce acid was lower than 12. Therefore, the 1 bacteria could be used for pumpkin wine fermentation.

Key words: pumpkin wine; yeast; screening

收稿日期:2016-06-01.

作者简介:程旺开(1972-),男,副教授,E-mail:448408718@qq.com.

通信作者:杨柳(1975-),女,博士,副教授,E-mail:yangliu199@163.com.

基金项目:安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(KJ2015A432);安徽省高校领军人才引进与培育计划项目(gxfxZD2016361);安徽省高等学校省级质量工程项目(2015zy086).

1 引言

南瓜为葫芦科南瓜属的一年生蔓性草本植物,又名倭瓜、麦瓜、饭瓜等^[1],其富含淀粉、脂肪、还原糖、多种氨基酸、维生素及矿物质等营养物质,具有防癌、治病、驱虫、保护视力、消炎止痛等功效,对防治糖尿病、动脉硬化、胃溃疡、排除重金属和肾结石以及防治便秘等具有良好作用^[2-4],在国际上已被认为特效保健食品。近年来将南瓜加工成酒的研究不少,主要集中于发酵工艺、香气变化、抗氧化活性等方面^[5-7],尚未见有南瓜酿酒酵母筛选的报道。

酿酒酵母在果酒的生产中起着重要的作用,直接影响果酒的感官和理化品质^[8-10]。目前南瓜酒的酿造过程中,大多选用葡萄酒酵母或活性干酵母,在一定程度上造成南瓜果酒风味偏于平淡,无法突出南瓜特有的口感和香气^[11]。因此,本实验以期从南瓜皮中分离筛选适宜的南瓜酒酵母菌,并对其生长特性进行初步的研究,为南瓜的深加工开发利用提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料及试剂

南瓜采摘于芜湖市郊区菜园;蛋白胨、葡萄糖、琼脂粉、酵母膏、TTC(红四氮唑)、七水合硫酸镁、磷酸二氢钾、蔗糖、氢氧化钠、亚硫酸、乙醇均出自国药集团化学试剂有限公司。

2.2 培养基

A 分离培养基(PDA培养基,g/100 mL):马铃薯20(制成浸汁),葡萄糖2,琼脂1.5—2。

B 鉴别培养基(TTC培养基,g/100 mL):下层,葡萄糖1,蛋白胨0.2,酵母膏0.15,磷酸二氢钾0.1,七水合硫酸镁0.004,琼脂2。上层,葡萄糖1,TTC 0.05,琼脂2,自然pH,0.1MPa,121℃灭菌20 min。

C 种子培养基(南瓜汁培养基):南瓜汁,蔗糖调整糖度至5%。

D 发酵培养基(南瓜汁培养基):南瓜汁,蔗糖调整到所需糖度,HCL或NaOH溶液调节pH。

2.3 仪器与设备

721B型分光光度计:上海第三分析仪器厂;HH-4型电热恒温水浴锅:江苏常州市国华仪器厂;SKP-01B恒温培养箱:湖北省黄石市恒丰医疗器械有限公司;JA1003N电子天平:上海精密科学仪器有限公司;0-50酒精浓度计:国营武强县仪表厂;WYT-J

0-32%手持糖度计:四川成都光学厂。

2.4 实验方法

2.4.1 菌株的分离

将5 g南瓜皮加入50 mL无菌水中,混合梯度稀释后涂布于PDA固体培养基,在28℃培养24 h。采用划线法将疑似酵母菌落转接至新的PDA平板上,培养后得纯种菌落。

将TTC下层培养基倒平板后,在其上用点接法接种纯种菌落,在28℃培养24 h。倒入TTC上层培养基,避光反应2 h后观察菌落颜色变化。将PDA平板上与出现相应颜色反应的菌落位置对应的菌落接种到新的PDA平板上,培养得到纯种酵母菌株。

将所得酵母菌株接种于扩培培养基中,于28℃下振荡培养24 h,制得菌悬液加入发酵培养基中,在28℃下静置培养,酒度高、发酵液酸度低的菌株,即为较优菌株。同时以活性干酵母为发酵菌株作对照。

2.4.2 菌种发酵特性

南瓜取籽、去皮后切片,按1:1加热煮沸20 min,冷却后打浆并加入0.1%果胶酶和0.20%糖化酶,在40℃下酶解4 h,过滤,分别用蔗糖及酸碱调整南瓜汁糖度及pH,杀菌后接种,于一定的温度下培养24 h后,测量发酵液菌浓(OD₄₂₀值)、酒精度及酸度,确定所筛选酵母菌的生长特性、凝聚力及产酸能力。

2.4.3 指标测定

菌体浓度:以420 nm处的吸光度OD₄₂₀表示。

酸度、酒精度测定:参照GB/T15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》测定。

凝聚性能测定:在300 mL南瓜汁培养基中加入0.5 mL鲜酵母培养液并于28℃下培养,每隔24 h称重一次,直至两天的重量偏差小于0.2 g为止。充分振荡发酵液后测总悬浮酵母数(*T*),另取充分振荡的发酵液于28℃下静置6 h,测上清液中悬浮酵母数(*D*),按公式(1)计算酵母凝聚力。

$$\text{酵母凝聚力}(\%) = (T - D) / T \times 100. \quad (1)$$

3 结果与讨论

3.1 酿酒酵母的分离

通过分离,在PDA平板上得到乳白色、湿润、较光滑的菌落,将这些菌落点接至TTC平板上反应后,部分菌落变为红色,则证明有酒精产生,是酵母菌落,共得到12株酵母菌菌株。所得菌株经扩大培

养接种南瓜汁中发酵后,所得酒液中酒精度及酸度见表 1。

表 1 不同菌株发酵酒液中酒精及酸含量

编号	酒精度 /%	酸度 /(g/L)	编号	酒精度 /%	酸度 /(g/L)
活性干 酵母	5.5	0.935	7	5	1.084
1	6	0.680	8	5.5	0.956
2	4.6	0.914	9	5.5	0.893
3	5.5	1.275	10	5	1.041
4	5	0.850	11	6	1.339
5	5.5	1.105	12	6	0.744
6	5	0.999			

从表 1 中可以看出,1 号菌、11 号菌和 12 号菌发酵液酒精度最高,具有较强的发酵产酒精能力。在该三株菌中,由于菌种 11 号菌发酵后酸度大,故选择 1 号菌、12 号菌进行后续研究。

3.2 不同条件对酵母菌株生长的影响

3.2.1 温度对酵母菌生长的影响

在糖度 15%、pH7 的南瓜汁中接入 10% 的菌悬液,分别置于 22℃、24℃、26℃、28℃、30℃ 温度下进行发酵培养 24 h,发酵液中菌体浓度如图 1 所示。

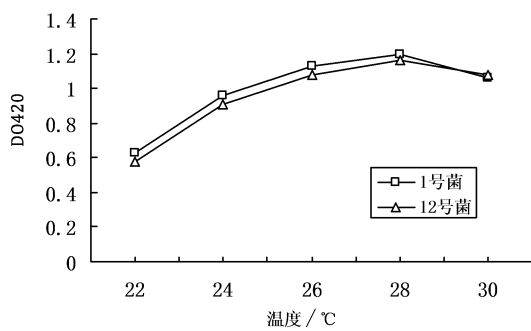


图 1 温度对 1 号和 12 号酿酒酵母生长的影响

从图 1 可以看出,两株菌生长受温度变化的影响情况基本相同,当温度低于 28℃ 时,菌浓随温度的升高逐渐增大;当温度高于 28℃ 时,菌体浓度降低,这表明 28℃ 的温度最适该酵母菌的生长。

3.2.2 糖度对酵母菌生长的影响

将南瓜汁的糖度分别调至 5%、10%、15%、20%、25%,pH 调至 7,接入 10% 的菌悬液于 28℃ 温度下培养 24 h,发酵液中菌体浓度如图 2 所示。

由图 2 中可以看出,两株菌菌浓随糖度变化的趋势一致,即两株菌生长受糖度变化的影响情况基本相同。在糖度低于 15% 时,菌浓随糖度升高逐渐

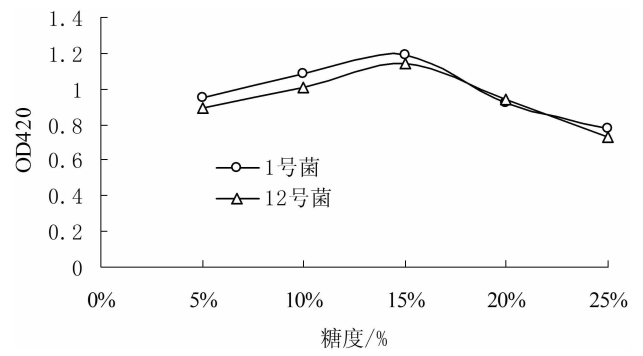


图 2 糖度对 1 号和 12 号酿酒酵母生长的影响

增大,在糖度为 15% 时达到最大值,当糖度大于 15% 时,由于过高浓度的糖使溶液渗透压增大,反而抑制酵母菌的生长,菌浓随糖度增大而降低。糖度为 15% 时,菌浓最大,最适宜酵母菌的生长。

3.2.3 pH 对酵母菌生长的影响

将南瓜汁的糖度调至 15%,pH 分别调至 2,4,6,8,10,接入 10% 的菌悬液于 28℃ 温度下培养 24 h,发酵液中菌体浓度如图 3 所示。

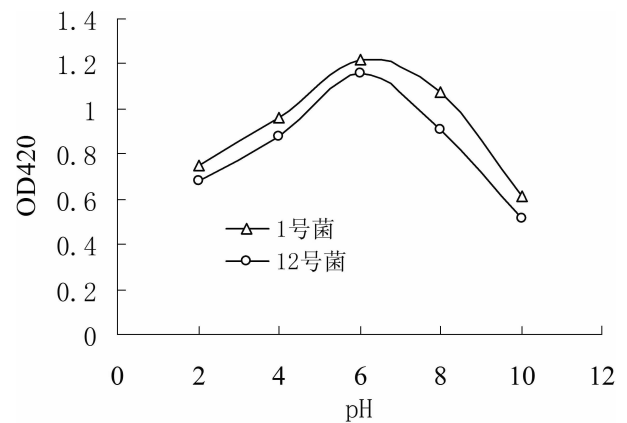


图 3 pH 值对 1 号和 12 号酿酒酵母生长的影响

由图 3 中可以看出,两株菌菌浓随酸度变化的趋势基本一致,在 pH 低于 6 时,菌浓随 pH 纸升高逐渐增大,在 pH 值为 6 时达到最大值,当 pH 大于 6 时,由于过高的 pH 抑制酵母菌的生长,菌浓随 pH 值增大而降低。因此最适宜酵母菌的生长的 pH 为 6。

3.2.4 酒精浓度对酵母菌生长的影响

在糖度 15%、pH7 的南瓜汁中加入酒精,调整酒精度至 5%、10%、15%、20%、25%,接入 10% 的菌悬液于 28℃ 温度下培养 24 h,发酵液中菌体浓度如图 4 所示。

酵母菌对酒精的耐受能力是影响果酒发酵的重要因素,如果酵母菌耐酒精能力差,发酵难以持续。由图 4 中可以看出,两株菌生长受酒精浓度变化的

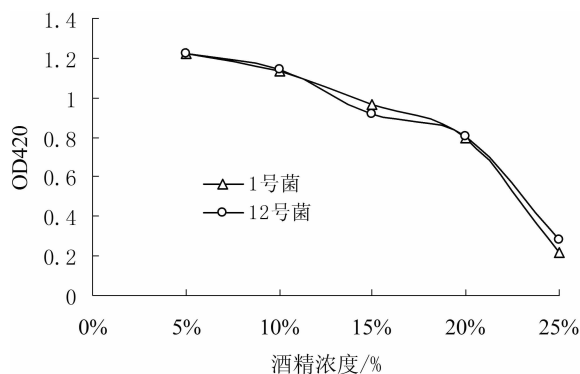


图4 酒精度对1号和12号酿酒酵母生长的影响
影响情况基本相同,随着酒精浓度的增大,菌浓值不断减小,当酒精浓度大于20%时,菌浓迅速减小,即酒精对酵母菌生长的抑制作用迅速增强。果酒酒精度一般低于10%,因此该两株酿酒酵母可用于果酒发酵中。

3.2.5 二氧化硫浓度对酵母菌生长的影响

在糖度15%、pH7的南瓜汁中添加亚硫酸,分别调整其二氧化硫浓度至50 mg/L,100 mg/L,200 mg/L,300 mg/L,400 mg/L,接入10%的菌悬液于28℃温度下培养24 h,发酵液中菌体浓度如图5所示。

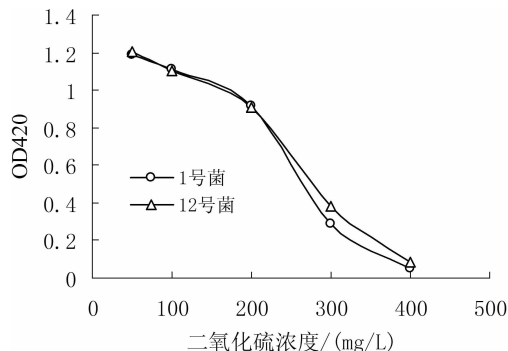


图5 二氧化硫浓度对1号和12号酿酒酵母生长的影响

果酒生产中常使用二氧化硫为抑菌剂,在抑制有害微生物的同时,可最大程度地保留原料原有成分,因此,酵母菌需对二氧化硫有一定的耐受能力。由图5可以看出,两株菌生长受二氧化硫浓度变化的影响情况基本相同。随着二氧化硫浓度的增大,菌浓值不断减小,当二氧化硫浓度大于200 mg/L时,菌浓迅速减小,即二氧化硫对酵母菌生长的抑制作用迅速增强,说明酵母菌可耐受的最高二氧化硫浓度为200 mg/L。二氧化硫浓度大于100 mg/L时可起到抑制杂菌生长的作用,因此,该两株菌对二氧化硫的耐受能力可满足发酵要求。

3.3 酵母菌凝聚性能

酵母的凝聚性是重要酿造特性。能影响到酵母回收再利用、酵母发酵速率和发酵度、果酒过滤速度以及过滤方法的选择以及成品果酒的稳定性及风味等。1号菌和12号菌的凝聚性能测定结果如图6所示。

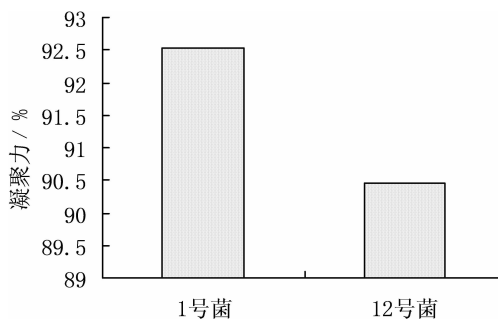


图6 凝聚性能测定结果

由图6中数据可知,两菌凝聚率均大于90%,凝聚性能良好,其中一号菌的凝聚率高于12号菌,更有利于南瓜酒的发酵。

3.4 酵母菌产酸能力

将南瓜汁糖度调至15%,pH调至7,接入10%的菌悬液于28℃温度下发酵8 d后测其酒精度及酸度,结果如图6所示。

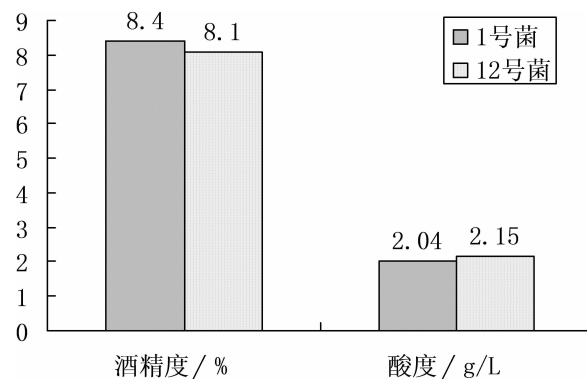


图7 1号和12号酵母菌产酸产乙醇的比较

从图7可以看出,在相同的发酵条件下,1号菌较之12号菌的发酵液中酒精度更高、酸含量更低,且1号酵母菌的凝聚性能更好。因此,1号酵母菌可作为南瓜酿酒酵母菌。

4 结论

从南瓜皮中分离得到两株发酵性能较为优良的1号和12号酿酒酵母菌株,其在南瓜汁具有相似的生长特性,合适的生长条件为温度28℃、pH6、糖浓15%,可耐受的20%酒精浓度和200 mg/L的SO₂浓度;1号菌的凝聚性能及产乙醇的能力均好于12号

酵母菌,且1号菌在发酵过程中产酸能力较低,酿造出的南瓜酒口感更佳,因此,1号菌株是一株优良的南瓜酒酿造酵母。下一步将以1号酵母作为南瓜酿酒酵母,并对其发酵工艺进行优化,为南瓜酒的酿造提供理论参考。

参考文献:

- [1] 卢丽芳,朱海生,温庆放,等. 南瓜种质资源遗传多样 SRAP 分析[J]. 热带作物学报. 2015, 36(12):2142-2148.
- [2] 刘宏伟,朱乾华,谢华林. 南瓜子中微量元素的组成研究[J]. 食品科技,2012,37(11):67-69.
- [3] Mi Y, Eun J, Young-Nam, et al. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts [J]. Nutrition Research and Practice, 2012,6(1):21-27.
- [4] 张高帆,苏东洋,张拥军,等. 南瓜多糖对不同糖尿病模型小鼠的降糖作用[J]. 中国食品学报,2014,14(2):24-26.
- [5] 黄儒强,郭倩玉,陈杰,等. 南瓜酒发酵工艺条件的研究[J]. 食品科学,2007,28(8):227-230.
- [6] 张靖媛,王成荣,杨绍兰,等. 响应面分析法优化南瓜酒发酵工艺条件[J]. 食品科学,2012(5):213-217.
- [7] 张靖媛,吴昊,王凤舞,等. 南瓜酒抗氧化活性及其 Vc、多酚和多糖含量的关系[J]. 食品科学,2013,34(1):78-85.
- [8] 郝瑶,王陶,李文,等. 富硒猕猴桃果酒酵母的筛选及鉴定[J]. 食品科学,2014,35(1):175-179.
- [9] LAMBRECHTS M G, PRETORIUS I S. Yeast and its importance to wine aroma: a review[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2000, 21(1): 97-129.
- [10] 赵祥杰,杨荣玲,肖更生,等. 桑椹果酒专用酵母的筛选及鉴定[J]. 中国食品学报,2008,8(1):60-66.
- [11] 安冬梅,孟长军,孙爱红. 南瓜酒加工工艺研究[J]. 北方园艺,2012(15):166-168.
- [3] Alvarez A P, Maya E R, Suarez L A . Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(14): 2843-2847.
- [4] 周宝磊,董新荣. 辣椒素类物质的研究进展[J]. 化工中间体,2010(9):16-21.
- [5] 中国国家质量监督检验检疫总局. 辣椒及辣椒制品中辣椒素类物质测定及辣度表示方法:GB/T 21266-2007. 北京:中国标准化出版社,2008. 3.
- [6] 中国国家质量监督检验检疫总局. 辣椒辣度的感官评价方法:GB/T 21265-2007. 北京:中国标准化出版社,2007. 12.
- [7] 陈旭华. 酱卤肉制品定量卤制工艺研究[D]. 北京:中国农业科学院,2014.
- [8] 黄婷. 辣椒加工制品溶出与肠道微生物体外发酵特性[D]. 华中农业大学,2013.
- [9] 朱书平,李添宝. 高效液相色谱法测定辣椒碱[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2005,28(4):63-66.
- [10] Smallwood I M. Handbook of organic solvent properties [M]. US: John Wiley & Sons Inc 1966.
- [11] 刘佳,李琼,黄惠芳,周汉林,周璐丽. 海南黄灯笼辣椒油树脂的超临界 CO₂ 提取工艺优化及 GC-MS 分析[J]. 广东农业科学,2015(6):80-87.
- [12] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:2570.
- [13] Hemwimon S., Pavasant P., Shotipruk A. Microwave-assisted extraction of antioxidative antraquinones from roots of *Miranda citrifolia* [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 54: 44-50.

(上接第 19 页)