

# 优良苹果酒酵母的选育\*

彭帮柱, 岳田利, 袁亚宏, 王丽威

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 以目前我国应用于葡萄酒及其他果酒的1<sup>#</sup>, 2<sup>#</sup>, 3<sup>#</sup>, 4<sup>#</sup>, 5<sup>#</sup>酿酒酵母为材料, 通过其对苹果汁的发酵能力、发酵特性及发酵所得苹果酒品质的系统试验, 筛选出5<sup>#</sup>为最佳苹果酒酿酒酵母, 其发酵的原酒的酒精度可达到113.2 mL/L。然后以5<sup>#</sup>酵母为出发菌株, 利用甲基磺酸乙酯(EMS)进行诱变, 获得了1株对苹果汁的发酵能力更强、发酵特性更佳和发酵所得苹果酒品质更优的苹果酒酵母E-3, 其发酵的原酒的酒精度可达到114.2 mL/L, 且酒体澄清透明, 色泽金黄, 具有苹果酒的典型风味。

[关键词] 苹果酒酵母; 苹果酒发酵; 苹果汁; 甲基磺酸乙酯

[中图分类号] TS261.1<sup>+</sup>1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)05-0081-04

苹果酒是用新鲜苹果汁或浓缩苹果汁进行酒精发酵, 然后通过一系列的工艺处理而得到的一种营养丰富、低酒精度的发酵制品<sup>[1]</sup>。苹果酒原料丰富, 成本低, 基本可以实现全年生产<sup>[2]</sup>。苹果酒的生产将会改变我国苹果深加工产业品种较少的局面, 实现产品开发生产的多元化格局, 创造可观的经济效益和社会效益, 并进一步降低苹果产业的市场风险。在全球范围内, 苹果酒是一种产量仅次于葡萄酒的果酒, 在英、法、德、美等国家, 苹果酒属于大众流通商品, 而我国还没有大规模的苹果酒生产厂家, 苹果酒生产尚处于发展阶段, 因此市场潜力巨大。目前, 国内外用于生产苹果酒的酵母多数为葡萄酒酵母或从自然界分离的酵母菌, 这2种酵母菌均不同程度地存在着酿酒风味较差、出酒率低、酒体及品质稳定性差等弊端<sup>[3]</sup>。因此, 选育优良的适合中国苹果原料的苹果酒专用酿造酵母是当务之急, 且对我国苹果酒产业的发展将产生深远影响。本研究利用甲基磺酸乙酯(EMS)对筛选出的苹果酒酵母进行诱变, 获得了1株较理想的突变菌株, 现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酵母 1<sup>#</sup>, 3<sup>#</sup>, 5<sup>#</sup>酿酒酵母由中国轻工部发酵研究所提供; 2<sup>#</sup>, 4<sup>#</sup>酿酒酵母由中科院微生物研究所提供。

浓缩苹果汁 由陕西恒兴果汁厂提供, 含总糖

702 g/L, 还原糖 605 g/L, 总酸 25 g/L。

### 1.2 培养基

产孢培养基(SPM)、完全培养基(CM)、产孢前培养基和基本培养基(MM)按文献[4]介绍的方法配制。苹果汁培养基的配制是将浓缩苹果汁稀释到含糖度152.2 g/L, 然后调节酸度为5.0 g/L(以苹果酸计), 并在115℃下灭菌20 min。

### 1.3 理化指标的测定

苹果酒中的总糖和还原糖用费林试剂法测定<sup>[5]</sup>; 总酸用酸碱滴定法测定<sup>[5]</sup>; 乙醇用气相色谱法测定<sup>[5]</sup>。

### 1.4 苹果酒生产工艺流程<sup>[6,7]</sup>

浓缩苹果汁 稀释 调整 接种酵母 前发酵 倒罐 去除酒脚 后发酵 陈酿 澄清处理 冷热处理 过滤 调配 除菌 苹果酒。

### 1.5 试验方法

1.5.1 出发菌株的筛选 (1)根据发酵苹果酒品质进行选择。取5个1000 mL三角瓶, 各加入800 mL苹果汁(含糖196 g/L), 按30 mL/L的接种量(在苹果汁培养基中培养, 酵母数达到 $10^7$  mL<sup>-1</sup>)分别接入1<sup>#</sup>, 2<sup>#</sup>, 3<sup>#</sup>, 4<sup>#</sup>, 5<sup>#</sup>酵母种子液, 在20℃下发酵。发酵至第8天进行倒罐, 去除酒脚, 陈酿10 d, 然后测定苹果酒的理化指标并进行感官分析。

(2)根据酵母发酵能力进行选择<sup>[8]</sup>。取5只100 mL三角瓶, 各加入80 mL苹果汁(总糖196 g/L), 按每升接种30 mL的比例分别接入1<sup>#</sup>, 2<sup>#</sup>, 3<sup>#</sup>, 4<sup>#</sup>

\* [收稿日期] 2003-09-22

[基金项目] 国家科技部“十五”重大专项(2001BA501A 21); 国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A 5-2 3); 霍英东基金(200281065); 国家西部专项(2001BA901A 19)

[作者简介] 彭帮柱(1978-), 男, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事食品生物技术与发酵工程研究。

[通讯作者] 岳田利(1966-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物技术和食品工程高新技术研究。

和 5<sup>#</sup> 酵母种子液, 在 20 ℃ 下发酵。发酵过程中每 24 h 测定 1 次 CO<sub>2</sub> 损失量, 每次测定时, 摇晃瓶子, 以排出 CO<sub>2</sub>。随着发酵时间的延续, 瓶重逐渐减轻, 直到减轻量不高于 0.2 g, 即表示发酵结束, 然后绘制 5 种酵母的发酵速率曲线, 并确定菌株发酵力的强弱。

1.5.2 优良苹果酒酵母的筛选 (1) 单倍体的制备<sup>[9]</sup>。以筛选出的酿酒酵母为出发菌株, 将其活化接至产孢前培养基, 28 ℃ 培养 2 d, 再转接于产孢培养基(SPM), 28 ℃ 培养 2 d, 然后涂片染色, 观察孢子形成与否。待大量孢子生成时, 用无菌生理盐水制成孢子悬液, 取无菌的 1.5 mL 离心管 1 只, 加入 1 mL 孢子悬液(约含有 10<sup>7</sup> 个细胞), 离心 5 min(转速 5 000 r/min) 收集菌体, 加入 2% 的蜗牛酶液, 33 ℃ 水浴酶解 4 h, 58 ℃ 水浴处理 8 min, 迅速冷却菌液, 倒入装有玻璃珠的无菌离心管中, 加适量无菌生理盐水和无菌液体石蜡, 振荡 20 min, 稀释 10<sup>5</sup> 倍, 取菌液涂在完全培养基平板上, 28 ℃ 培养至长出明显菌落。将平板上各个菌落按上述方法在产孢前培养基和产孢培养基中再培养, 涂片染色镜检, 凡不形成子囊孢子的为单倍体细胞。(2) 单倍体诱变<sup>[10]</sup>。将单倍体酵母接种到液体完全培养基中, 28 ℃ 培养 24 h, 培养物将含有细胞数(2 × 10<sup>7</sup>) mL<sup>-1</sup>, 转移 1 mL 到无菌离心管, 离心收集细胞, 用无菌水洗 2 次(离心 5 min, 使细胞沉淀)。悬浮细胞在 1 mL 无菌磷酸

钠缓冲溶液中, 加 30 mL EM S 到离心管中, 震荡分散细胞, 将离心管置于 28 ℃ 摇床培养 1 h, 离心分离得到富集菌体, 转入洁净离心管中, 用 50 g/L 硫代硫酸钠洗 2 次, 悬浮细胞于 1 mL 无菌水中, 稀释细胞, 涂布在完全培养基平板上, 通过诱变后菌落形态的异常变化, 筛选突变菌株。(3) 优良苹果酒酵母菌株的筛选方法。在形态突变菌株中随机挑取 20 株, 通过对其各自的发酵能力的测定, 初筛出 5 株发酵能力较强的菌株(E-1, E-2, E-3, E-4, E-5) 并进行酿酒试验, 通过对其发酵原酒的理化指标和感官评价的比较, 筛选出优良苹果酒酵母。

## 2 结果与分析

### 2.1 出发菌株筛选结果

用 5 种酵母发酵制取的苹果酒的品质对比结果见表 1 和表 2。由表 1、2 可以看出, 5<sup>#</sup> 酵母发酵的原酒, 耗糖较其他酵母彻底, 酒精度可达 113.2 mL/L, 且口感、风味较好; 4<sup>#</sup> 酵母发酵最不完全, 且发酵原酒品质最差, 酸度最高; 其余各酵母的酸度变化不大。对 5 种酵母发酵能力的测定结果见图 1。由图 1 可以看出, 3<sup>#</sup> 酵母发酵力最强, 5<sup>#</sup> 酵母发酵力次之, 4<sup>#</sup> 酵母发酵力最弱。5 种酵母在发酵 3 d 以后, 发酵力均达到峰值, 随后缓慢下降。由于 3<sup>#</sup> 酵母发酵制取的苹果酒感官品质较差, 综合考虑, 最后确定 5<sup>#</sup> 酵母为最佳诱变出发菌株。

表 1 不同酵母发酵苹果酒理化指标比较

Table 1 Comparison of different cider characteristics

酵母 Strain	酒精度/(mL · L <sup>-1</sup> ) Ethanol	还原糖/(g · L <sup>-1</sup> ) Glucose	总糖/(g · L <sup>-1</sup> ) Sugar	总酸(以苹果酸计)/ (g · L <sup>-1</sup> ) Acid (malic equivalent)
1 <sup>#</sup>	108.5	3.00	6.28	2.50
2 <sup>#</sup>	110.5	2.75	6.08	2.67
3 <sup>#</sup>	112.5	6.80	12.78	2.07
4 <sup>#</sup>	8.1	92.25	176.00	13.26
5 <sup>#</sup>	113.2	3.80	5.63	2.76

表 2 不同酵母发酵苹果酒的感官评价

Table 2 Sensory judgment of cider produced by different yeasts

酵母 Strain	色泽 Color	澄清度 Clarification	香气 Aroma	滋味 Flavor	典型性 Typicality
1 <sup>#</sup>	橙黄 Gamboge	澄清 Transparent	酵母味浓 Yeast odor	味苦, 发涩 Bitter, astringent	啤酒风格 Beer style
2 <sup>#</sup>	橙黄 Gamboge	澄清 Transparent	有酒香 Bouquet	不协调 Disharmony	果香不浓 Thin aroma
3 <sup>#</sup>	橙黄 Gamboge	澄清 Transparent	酵母味重 Yeast odor	细腻, 有涩味 Exquisite, astringent	无特殊风格 No style
4 <sup>#</sup>	黄色 Yellow	浑浊 Little oily	有腐败味 Putrefactive odor	有酸涩味 Cadaver	不适合苹果酒 Bad style
5 <sup>#</sup>	橙黄 Gamboge	澄清 Transparent	有果香和酒香 Aroma and bouquet	柔细清爽 Delicate	苹果酒型风格 Cider style

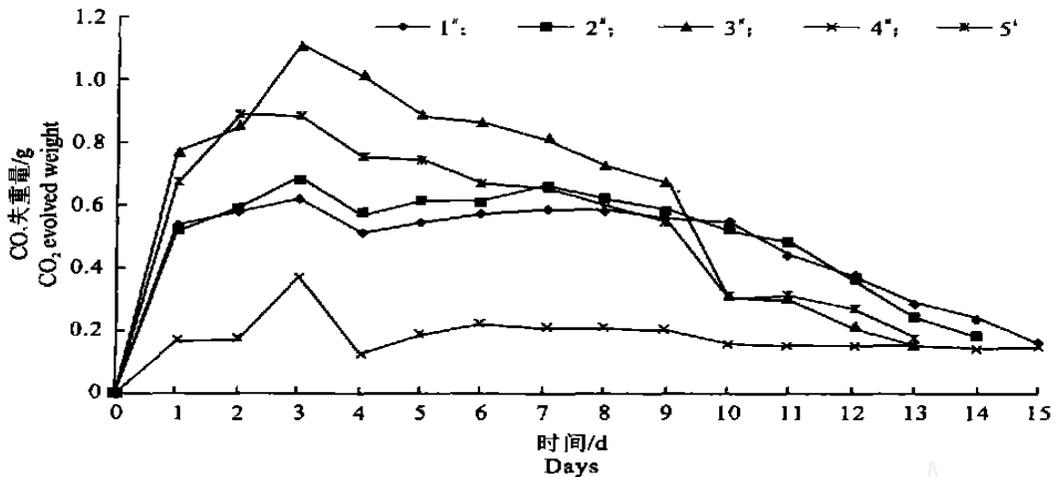


图 1 不同酵母发酵能力测定

Fig 1 The measurement of fermentation vigor of different yeasts

2.2 优良苹果酒菌株筛选结果

对诱变后发酵能力较强的 5 株 (E-1, E-2, E-3, E-4, E-5) 酵母进行酿酒试验, 并对发酵原酒的品质进行综合比较, 结果见表 3 和表 4。从表 3, 4 可以看出, E-3 酵母发酵的原酒, 耗糖较其他酵母彻底, 酒精

度可达 114.2 mL/L, 且口感、风味均优于 5# 酵母; E-2 发酵也较彻底, 但发酵苹果酒风味较差; E-5 色泽和澄清度优良, 但酒精度偏低, 酒香不足。综合考虑各因素后, 确定 E-3 为最优的苹果酒诱变菌株。

表 3 不同酵母发酵苹果酒的理化指标

Table 3 Analytical results of cider produced by different yeasts

酵母 Strain	酒精度/(mL · L <sup>-1</sup> ) Ethanol	还原糖/(g · L <sup>-1</sup> ) Glucose	总糖/(g · L <sup>-1</sup> ) Sugar	总酸(以苹果酸计)/(g · L <sup>-1</sup> ) Acid (malic equivalent)
E-1	98.1	17.45	26.05	3.02
E-2	101.0	10.82	16.10	2.75
E-3	114.2	3.10	5.80	2.51
E-4	80.0	35.23	60.11	8.23
E-5	85.2	32.56	54.12	7.32

表 4 不同酵母发酵苹果酒的感官评价

Table 4 Sensory judgment of cider produced by different yeasts

酵母 Strain	色泽 Color	澄清度 Clarification	香气 Aroma	滋味 Flavor	典型性 Typicality
E-1	黄色 Yellow	澄清 Transparent	酵母味浓 Yeast odor	清爽, 酒味淡 Delicate, light ethanol	有啤酒风味 Beer style
E-2	黄色 Yellow	澄清 Transparent	有酒香 Bouquet	发涩 Astringent	无苹果酒风格 No cider style
E-3	金黄 Golden	澄清透明 Transparent	有果香和酒香 Aroma and bouquet	酒体醇厚 Mellow	苹果酒典型风格 Cider style
E-4	橙黄 Gamboge	澄清 Transparent	有果香 Aroma	味较酸 High sour odor	无苹果酒风格 No cider style
E-5	橙黄 Gamboge	透明无悬浮物 Transparent	酒香不足 Thin bouquet	后味较淡 Light remaining taste	有苹果酒风格 Little cider style

3 结论与讨论

1) 出发菌株的筛选试验结果表明, 5# 酵母发酵所得原酒、酒度、口感及风味均优于其他酵母, 同时也表现出较强的发酵能力, 因此, 确定 5# 酵母为最佳诱变出发菌株。

2) 对诱变后筛选出的 5 株酵母菌株进行酿酒试验, 结果表明用 E-3 酵母发酵所得原酒的酒度、口感和风味均优于出发菌株 5# 酵母, 因此确定 E-3 为最佳的诱变菌株, 适合作为苹果酒酿造酵母。其发酵的原酒的酒精度可达 114.2 mL/L, 残糖可降至 5.8 g/L, 比宋安东<sup>[7]</sup>等从苹果渣中分离纯化得到的优

良苹果酒酵母  $Y_{02}$  发酵更加彻底, 且酒质较好, 因而更具有应用价值和广阔的市场前景。

3) 由于诱变株太多, 考虑到试验量太大的问题, 不能逐个进行发酵研究, 可能有更好的优良菌株未

被发现, 挑取的诱变株总数需要进一步扩大。

4) 诱变育种中, 随机性较大, 发生正向突变的几率较低, 欲得到理想的目标菌株, 可以结合原生质体融合技术、基因定位等其他方法进行。

### [参考文献]

- [1] Brian J, Wood B. 发酵食品微生物学[M]. 徐岩, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 2001. 164- 177.
- [2] 阮仕立, 王西锐. 苹果酒的开发研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, (27): 75- 77.
- [3] 宋安东, 吴云汉. 产苹果酒优良酵母菌的选育研究[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(6): 183- 186.
- [4] 陈思妘, 肖熙佩. 酵母生物化学[M]. 济南: 山东科学出版社, 1990.
- [5] GB/T15038-94. 葡萄酒、果酒通用实验方法[R]. 1994.
- [6] 冯卫华, 许克勇, 叶孟韬, 等. 浓缩苹果汁酿酒的研究[J]. 河南职业技术学院学报, 2000, 28(2): 34- 36.
- [7] 宋安东, 胡渝. 甜型苹果酒发酵条件的研究[J]. 河南农业科学, 2002, (8): 36- 38.
- [8] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [9] 陈海昌, 刘波, 张苓花, 等. 原生质体融合技术构建糖化型啤酒酵母的研究[J]. 微生物学通报, 1997, 24(3): 159- 160.
- [10] 亚当斯 A, 戈特施林 D E, 凯泽 C A. 遗传学实验方法指南[M]. 刘子铎, 译. 北京: 科学技术出版社, 2000.

## Breeding of excellent yeast of cider

PENG Bang-zhu, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, WANG Li-wei

(College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Five yeasts, which were presently used to ferment wine, were selected as experimental material in this paper. According to their characteristics of making cider and fermentation capability, 5<sup>#</sup> yeast was chosen as optimal cider yeast strain. Its cider has a good taste and ethanol content of 113.2 mL/L. Then 5<sup>#</sup> yeast was selected as original strain and treated by EMS, a better cider yeast strain E-3 was gotten, its ethanol content of cider can reach 114.2 mL/L, and the cider has an excellent cider style.

**Key words:** cider yeast; cider fermentation; apple juice; EMS