

# 新疆石榴酒专用酵母的选育及应用研究

刘玉琼<sup>1,2</sup>, 霍向东<sup>2</sup>, 史应武<sup>2</sup>, 娄恺<sup>2,\*</sup>

(1.石河子大学食品工程学院, 新疆 石河子 832003; 2.新疆农科院微生物所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

**摘 要:** 以石榴树叶、石榴皮及石榴园土壤为分离源, 共分离到 71 株酵母菌, 经过三级筛选, 获得两株适宜酿造石榴果酒的酵母菌, 编号分别为 SL18 和 SL20。发酵性能测试结果表明, SL20 菌株在 25℃ 时的发酵周期比对照菌株和 SL18 少 1d, 酒精度达到 9.7%(V/V), 并且所酿造的石榴酒香味浓郁纯正, 而 SL18 在 25℃ 时虽然发酵周期与对照菌株相同但所酿造的石榴酒香味比对照菌株要浓郁纯正。30℃ 时, 3 株菌起酵速度都比较快, SL20 和 SL18 的发酵周期比对照菌株少 1d, SL20 菌株的酒精度高于 SL18 和对照菌株, 为 10.1%(V/V), 但 3 株菌发酵的石榴酒香味没有 20℃ 和 25℃ 浓郁, 说明自选菌株 SL20 和 SL18 适于 25℃ 发酵并且所酿制的石榴酒明显优于常用的酿酒活性干酵母, 并且两株菌能耐受 12%(V/V) 的酒精度, 经鉴定均为酵母属(*Saccharomyces*) 的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

**关键词:** 石榴果酒; 酵母菌; 筛选; 鉴定

## Screening, Identification and Fermentation Performance of Yeast Used for Production of Pomegranate Wine

LIU Yu-qiong<sup>1,2</sup>, HUO Xiang-dong<sup>2</sup>, SHI Ying-wu<sup>2</sup>, LOU Kai<sup>2,\*</sup>

(1. College of Food Science, Shihezi University, Xinjiang 832003, China; 2. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

**Abstract:** A total of 71 strains of yeast were isolated from pomegranate leaves and rind as well as pomegranate garden soil. After 3 screening cycles, 2 strains, numbered as SL18 and SL20, were obtained, which were the most suitable for production of pomegranate wine. According to morphological observation and physiological and biochemical tests, the 2 strains were identified as *Saccharomyces cerevisiae*. In addition, the fermentation performances of this 2 strains and active dry yeast (Anqi brand) were compared. Results showed that when the fermentation temperature was 25 °C, the fermentation cycle of strain SL20 was 1 day shorter than that of strain SL18 and active dry yeast, the alcohol degree was up to 9.7% (V/V) at the end of fermentation, and the wine product obtained was full-bodied and sterling. Although the fermentation cycle of strain SL18 was the same as that of active dry yeast, the wine produced by the former was more full-bodied and sterling than that produced by the latter. When the fermentation temperature was 30 °C, all the three starters led to rapid fermentation at the early stage, the fermentation cycle of both strain SL18 and SL20 was 1 day shorter than that of active dry yeast, and the alcohol degree produced by strain SL20 was higher than that produced by strain SL18 and active dry yeast, reaching 10.1% (V/V), but for these three starters, the flavors of pomegranate wines produced by them was not more full-bodied than those produced by them when the fermentation temperatures were 20 and 25 °C, indicating that strain SL18 and SL18 are more adapted to 25 °C fermentation and can endure alcohol degree of 12% (V/V), and the quality of the wine products produced by them is superior to that produced by active dry yeast.

**Key words:** pomegranates wine; yeast; screening; identification

中图分类号: Q935

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0211-05

近年来, 随着市场化的不断深入, 我国石榴果酒的生产已形成一定规模, 石榴加工企业已约有 20 多家, 其中, 在新疆规模较大的石榴加工企业就有十几家, 产品有石榴汁、浓缩石榴汁、石榴酒等<sup>[1]</sup>。在果酒酿造

中, 以葡萄酒历史最为悠久, 对石榴果酒的研究也有若干报道<sup>[2-6]</sup>, 但多为有关酿造工艺的探讨, 而关于分离筛选适宜酿造石榴果酒的菌种的研究尚未见报道。本研究分离筛选出两株适宜酿造石榴果酒的酵母菌株, 并

收稿日期: 2008-07-22

作者简介: 刘玉琼(1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物技术与酶工程研究。E-mail: liuyuqiong1234@126.com

\* 通讯作者: 娄恺(1968-), 男, 研究员, 博士后, 主要从事生物技术与酶工程研究。E-mail: loukai02@mail.com

对其进行了菌种鉴定和实验室发酵特性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、培养基及试剂

菌株分离源为新疆喀什市周边城市石榴园的土壤、石榴树叶、新鲜及烂的成熟石榴皮;对照菌株为安琪活性干酵母。发酵原料为新疆喀什市周边城市石榴园石榴榨取的果汁。

酵母菌分离培养基: PDA(马铃薯 200g、葡萄糖 20g、水 1000ml、琼脂 15~20g); YPD(葡萄糖 20g、蛋白胨 10g、酵母浸膏 10g、水 1000ml); 酵母菌筛选培养基: PDA 液体培养基(马铃薯 200g、葡萄糖 20g、水 1000ml)、石榴汁; 酵母菌鉴定培养基: PDA 液体培养基、玉米粉琼脂培养基、麦氏培养基(培养基配方见参考文献[7]~[9])。

无水乙醇(分析纯) 天津市富宇精细化工有限公司; 偏重亚硫酸钾(分析纯) 上海试四赫维化工有限公司; 葡萄糖(分析纯) 天津市天达净化材料精细化工厂; 酵母浸膏、琼脂粉、蛋白胨(BR 生化试剂) 北京奥博星生物技术有限责任公司; 果胶酶 上海蓝季科技发展有限公司; 链霉素 上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 仪器与设备

VITEK 全自动微生物检测仪 法国梅里埃股份有限公司; PHILIPScomfort HR1727 榨汁机 珠海经济特区飞利浦家庭电器有限公司; 5417R 离心机 Eppendorf Centrifuge 公司; SPX 智能型生化培养箱 宁波东南仪器有限公司; Olympus 显微镜; THZ-C-1 台式冷冻恒温振荡器 国华企业 CHA-S; 立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; GC2000 型气相色谱仪 美国 Finnigan 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 酵母菌的分离

##### 1.3.1.1 酵母分离源的采集

采用随机取样原则采集新疆喀什市周边城市石榴园的新鲜石榴、烂石榴、石榴树叶及其土壤,共采集石榴样品 24 份,石榴树叶样品 12 份,石榴园土壤样品 8 份,分别装入无菌纸袋中,并贮存于 4℃ 冰箱中备用。

##### 1.3.1.2 菌种分离方法

采用不同的培养基种类、酒精浓度、培养温度、pH 值对酵母进行分离,以尽量扩大样本量。富集、分离条件如下:

(1)取适量的样品分别加入到已灭菌的分别含 3%、6%、9%、12% 乙醇的 PDA、YPD 培养基中,自然 pH 值,于生化培养箱中 30℃ 培养 1~2d。

(2)取适量的样品分别加入到已灭菌的 pH 值分别为

3.0、5.0、7.0 的 PDA、YPD 培养基中,于生化培养箱中 30℃ 培养 1~2d。

(3)取适量的样品分别加入到已灭菌的 PDA、YPD 培养基中,自然 pH 值,分别于 30℃、37℃ 条件下生化培养箱中培养 1~2d。

然后取 100μl 的菌液转接到 PDA 固体培养基上进行稀释涂布,30℃ 培养 2~3d,待长出菌落后选择具有典型酵母菌菌落特征的单菌落进一步划线分离 2~3 次,经镜检为纯种后分别转入 PDA 固体斜面,低温保存,菌种以阿拉伯数字 1、2、3、……依次编号。

#### 1.3.2 酵母菌的筛选

##### 1.3.2.1 酵母菌的一级筛选

采用杜氏管发酵法,在相同的培养条件下,测定酵母菌株产气泡的快慢及在规定时间内产气泡的多少,初步比较各株酵母菌的起酵能力和发酵能力,初筛出发酵性能优良的酵母菌株。实验平行重复 3 次。

菌株活化条件: 28℃ 于 20ml PDA 中振荡培养 10h; 发酵条件: 28℃ 于 5ml PDA 中静止发酵 48h; 接种量: 5ml PDA 接入 1%。

##### 1.3.2.2 酵母菌的二级筛选

采用石榴汁取代 PDA 发酵,在果胶酶的作用下,石榴打浆取汁,放入三角瓶内,菌种活化后接入三角瓶中进行发酵,7d 后采用气相色谱法比较各菌株产酒精能力的大小,进一步确定实验菌株的发酵能力。实验平行重复 3 次。

菌株活化条件: 28℃ 于 20ml PDA 中振荡培养 10h。发酵条件: 28℃ 于 50ml 石榴汁中静止发酵 7d。接种量: 石榴汁的 1%。

##### 1.3.2.3 酵母菌的三级筛选

采用杜氏管发酵法,将酵母菌分别接入含不同乙醇浓度(8%、10%、12%、14%、16%、18%)和不同 SO<sub>2</sub> 浓度(60、80、100、120、140、160、180mg/L)的 PDA 中,在相同的条件下进行培养,观察杜氏管的气泡产生情况,比较各酵母菌株对乙醇和 SO<sub>2</sub> 的耐受程度,进一步确定适合石榴酒酿造的菌株。实验平行重复 3 次。

菌株活化条件: 28℃ 于 20ml PDA 中振荡培养 10h。发酵条件: 28℃ 于 5ml PDA 中静止发酵 96h。接种量: 5ml PDA 的 1%。

#### 1.3.3 酵母菌的鉴定

##### 1.3.3.1 酵母菌的形态学鉴定

(1)形态和培养特征: 将菌种接种到 PDA 液体培养基中,28℃ 培养 3~7d,观察是否发酵、培养液是否混浊,是否形成环或岛,沉淀量多少及松紧状况,并简单染色于显微镜下观察,记录酵母的无性繁殖方式与细胞的形状,测其营养细胞大小,将酵母在 PDA 固体

培养基上划线, 30℃培养 2~3d, 观察其菌落形态。

(2)酵母假菌丝的观察: 菌株于 30℃活化后, 在玉米粉琼脂培养基平板上划线接种, 在菌线上盖上无菌盖玻片, 30℃培养 5~10d

(3)酵母子囊孢子的观察: 菌株在 PDA 固体培养基上 30℃重新培养 1~2d, 进行活化。将活化好的酵母在产子囊孢子培养基上划线, 30℃培养 1~2 周, 镜检是否有子囊孢子, 每个子囊孢子的数目, 孢子的颜色。

### 1.3.3.2 生理生化鉴定

利用 API 鉴定系统(进行发酵糖类实验、同化碳源实验、同化氮源(硝酸钾、乙胺、尸胺)实验、生成类淀粉化合物实验、无维生素生长测试、50%(W/W)葡萄糖-酵母膏中生长测试和 1000mg/L 放线菌酮抗性实验等 7 项生理生化检测。

### 1.3.4 自选酵母发酵性能测试

将筛选出的酵母菌株分别在 20、25 和 30℃三个温度下进行石榴酒发酵, 同时以安琪活性干酵母为对照菌株, 各重复 3 次。

菌株活化: 酵母先在 50ml PDA 液体培养基中振荡培养 10h, 然后转入 50ml 含有 10° Brix 石榴汁的三角瓶中继续扩大培养 10h。安琪活性干酵母按要求于 2% 糖水中在 35℃条件下复水活化, 然后转入 50ml 含有 10° Brix 石榴汁的三角瓶中继续扩大培养 10h。接种量为石榴汁的 1%。

石榴汁的处理: 对石榴汁进行 SO<sub>2</sub> 杀菌, 同时加入果胶酶, 加入量为石榴汁的 0.1%。

酒精度、总糖、还原糖、总酸等指标按 GB/15038—1994 葡萄酒、果酒通用实验方法进行测定。气相色谱条件如下: 色谱仪: GC-2000 型气相色谱仪; 色谱柱: FFAP(30m × 0.32mm, 0.25 μm); 检测器: FID; 进样口温度: 250℃; 检测器温度: 200℃; 柱温: 采用程序升温至 60℃, 保持 2min, 然后以 10℃/min 的速度升至 100℃, 保持 2 min; 载气: N<sub>2</sub> 流量 5ml/min; 分流比: 10:1; 进样量: 1 μl。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母的分离

从 44 份新鲜石榴皮、烂石榴皮、石榴树叶和石榴园土壤样品中共分离得到酵母菌 71 株, 分别编号。

### 2.2 酵母的一级筛选

在试管中发酵 24h, 产气为杜氏管满管的菌株有 2 株; 经 36h 发酵, 产气为杜氏管满管的菌株有 23 株, 经 48h 发酵, 产气为杜氏管满管的菌株有 16 株, 共 41 株酵母菌株, 这 41 株菌株所在的试管中都有酒香生成。保留这 41 株进行下一步筛选。

### 2.3 酵母的二级筛选

初筛的 41 株菌经小瓶石榴汁(100ml)培养 6d 后, 取发酵液 1ml, 用气相色谱进行酒精度的测定, 酒精度在

5%~6%(V/V)的有 1 株菌、在 6%~7%(V/V)的有 3 株菌、在 7%(V/V)以上的有 7 株菌。酒精度在 6%(V/V)以上的共 10 株, 保留进入下一步筛选。

### 2.4 酵母菌的三级筛选

10 株酵母菌分别在含不同乙醇浓度(8%、10%、12%、14%、16%、18%)和不同 SO<sub>2</sub> 浓度(60、80、100、120、140、160、180mg/L)的 PDA 中进行培养, 比较 10 株菌对乙醇和 SO<sub>2</sub> 的耐受程度, 最终 18 号、20 号菌株, 在乙醇浓度分别为 8%、10%、12%(V/V)时, 在两天内均产气; SO<sub>2</sub> 浓度在 60~180 mg/L 时, 在两天内均产气, 并且发酵液香气浓郁, 因而将菌株 SL18 和 SL20 保留, 进行下一步的鉴定。

### 2.5 酵母鉴定结果

#### 2.5.1 形态与培养特征

SL18 菌株在 PDA 液体培养基中培养 3~7d 后, 细胞呈椭圆形, 三角瓶壁无膜或蹼, 细胞大小为(3.26~6.28 × 2.84~3.32) μm, 无性繁殖方式是一端出芽, 见图 1a。在 PDA 固体培养基上生长的菌落为灰白色, 奶油状, 表面平滑, 边缘整齐。在加盖片的玉米粉琼脂培养基上培养, 形成假菌丝, 见图 1b。在生孢培养基上 30℃培养 2 周后, 有子囊孢子形成, 每个子囊有 1~4 个子囊孢子, 孢子呈圆形, 见图 2。

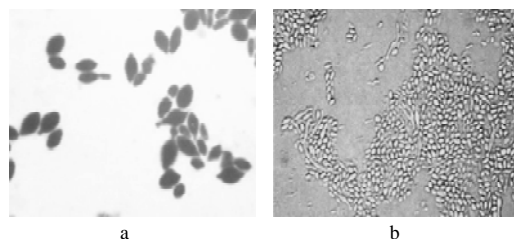


图1 SL18 的细胞形态和出芽方式(a)和假菌丝(b)

Fig.1 Electron microscopic images showing cell morphology and germination (a) and pseudohypha (b) of strain SL18

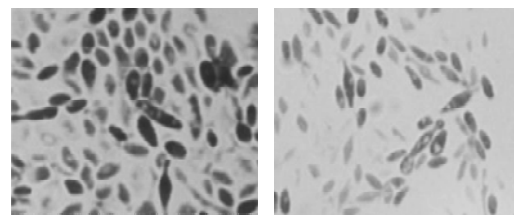


图2 SL18 的子囊和子囊孢子形态

Fig.2 Electron microscopic images showing ascus and ascospore morphology of SL18

SL20 菌株在 PDA 液体培养基中培养 3~7d 后, 细胞呈椭圆形, 三角瓶壁无膜或蹼, 细胞大小为(3.02~7.05 × 1.66~3.17) μm, 无性繁殖方式是一端出芽, 见图 3a。在 PDA 固体培养基上生长的菌落为乳白色, 奶油状, 表面平滑, 边缘整齐。在加盖片的玉米粉琼脂培养基上培养, 形成假菌丝, 见图 3b。在生孢培养基上 30℃

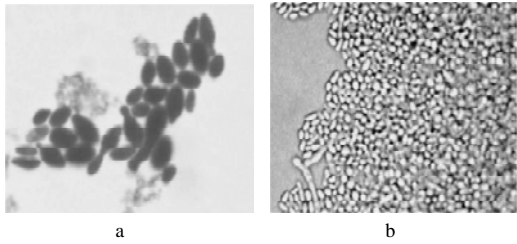


图3 SL20的细胞形态和出芽方式(a)和假菌丝(b)

Fig.3 Electron microscopic images showing cell morphology and germination (a) and pseudohypha (b) of strain SL20

培养2周后,有子囊孢子形成,每个子囊有1~2个子囊孢子,孢子呈圆形,见图4。

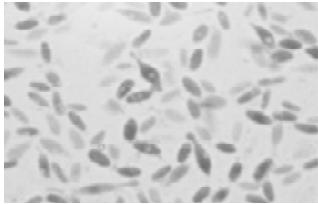


图4 SL20的子囊和子囊孢子形态

Fig.4 Electron microscopic images showing ascus and ascospore morphology of SL20

2.5.2 生理生化鉴定结果

表1 API生化鉴定反应

Table 1 Results of physiological and biochemical tests for strain SL18 and SL20

测试项目	SL18	SL20
半乳糖(GAL)	+	+
乳糖(LAC)	-	-
蔗糖(SUC)	+	+
麦芽糖(MLT)	-	-
纤维二糖(CEL)	-	-
甲基葡萄糖甙(AMG)	+	+
木糖(XYL)	-	-
阿拉伯糖(ARA)	-	-
海藻糖(TRE)	-	-
松三糖(MLZ)	-	-
棉子糖(RAF)	+	+
N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)	-	-
木糖醇(XLT)	-	-
卫矛醇(DUL)	-	-
侧金盏花醇(ADO)	-	-
古老糖(PAL)	-	-
丙三醇(GLY)	-	-
山梨醇(SOR)	-	-
赤鲜醇(ERY)	-	-
蜜二糖(MEL)	-	-
环乙糖胺(CYC)	-	-
葡萄糖(GLU)	+	+
肌醇(INO)	-	-
硝酸盐(NIT)	-	-
酮基葡萄糖(2KD)	-	-
尿素(URE)	-	-

注: +. 阳性; -. 阴性。

由表1鉴定结果可知,菌株SL18和SL20均为酵母属的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

2.6 自选酵母发酵性能测试结果

观测不同温度下3株酵母的起酵时间、发酵周期及酵母的凝集情况,并在发酵结束后对石榴酒主要成分含量进行测定,结果见表2。

表2 温度影响酵母发酵性能实验的观测结果

Table 2 Comparison of fermentation performances among strain SL18 and SL20 and active dry yeast

酵母	温度(℃)	起酵时间(h)	发酵周期(d)	总糖(g/L)	挥发酸(%)	酒精度(%)	酵母凝集
SL18	20	5	12	3.56	0.23	9.1	沉淀结实呈泥状
	25	3.5	8	4.03	0.22	8.8	
	30	3	7	3.40	0.35	9.6	
SL20	20	5	12	3.40	0.25	10.0	沉淀结实呈泥状
	25	3	7	4.18	0.23	9.7	
	30	2	7	3.33	0.19	10.1	
安琪酵母	20	6	12	3.40	0.20	10.4	沉淀呈泥状
	25	3	8	4.10	0.16	9.9	
	30	2	8	3.02	0.13	9.0	

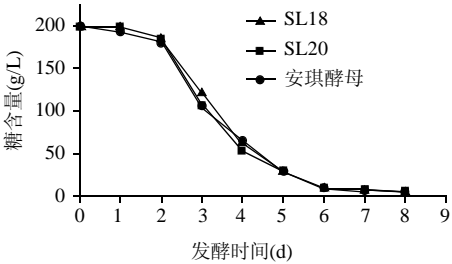


图5 发酵过程中残糖的变化曲线

Fig.5 Time course curves of sugar consumption by strain SL18 and SL20 and active dry yeast

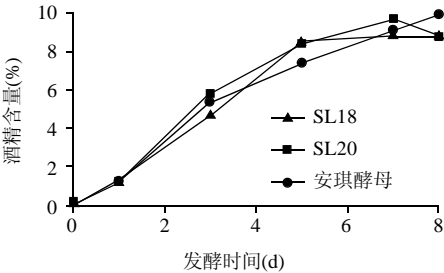


图6 发酵过程中酒精的变化曲线

Fig.6 Time course curves of alcohol production by strain SL18 and SL20 and active dry yeast

由表2可知,温度对酵母发酵性能影响较大,随发酵温度由20℃升至30℃,3株酵母的起酵时间和发酵周期依次缩短。SL20菌株在25℃时的发酵周期比对照菌株和SL18少1d,酒精度达到9.7%(V/V),并且所酿造的石榴酒香味浓郁纯正,而SL18在25℃时虽然发酵周期与对照菌株相同,但所酿造的石榴酒香味比对照菌株要浓郁纯正,30℃时,3株菌起酵速度都比较快,SL20

和 SL18 的发酵周期比对照菌株少一天, SL20 菌株的酒精度高于 SL18 和对照菌株, 为 10.1% (V/V), 但 3 株菌发酵的石榴酒香味没有 20℃ 和 25℃ 浓郁, 说明自选菌株 SL20 和 SL18 的低温发酵性能优于干酵母。

由于 25℃ 时两株自选菌株所酿石榴酒香味浓郁程度比其他温度均高, 因此在石榴酒酿制的小试实验中采用了 25℃ 的发酵温度。25℃ 时酵母降糖量及产酒精量, 如图 5、6 所示。随着发酵时间的延长, 石榴汁中残糖浓度降低、酒精含量逐渐增加。第 1 天酵母降糖缓慢, 酒精度增长较慢, 说明此时酵母正处于大量增殖阶段, 菌体产生量大。从第 2 天开始糖度迅速下降, 酒精度也较快增长, 进入发酵阶段。主发酵进行到第 6 天后表观糖度和酒精度趋缓, 进入后发酵阶段。通过与对照菌株的对比可以发现, SL20 酵母比安琪酵母起酵快, 发酵度平稳, 能更好地防止杂菌污染, 是优良的酵母菌种。

### 3 讨 论

实验中所筛选出的两株酵母经鉴定属于同一属内的两株不同的酵母菌, 与对照安琪干酵母相比, 其突出

优点是所酿石榴酒的风味、质地和典型性较好。另外, 两株菌虽然在酿酒特性上存在许多共同之处, 但所酿石榴酒的风味也有不同, 其中 SL18 菌株所酿石榴酒, 石榴香突出, 酒体丰满, 颜色纯正; 而 SL20 菌株所酿石榴酒除具上述特点之外, 还具有浓郁和谐的果香和酒香。因此, 两株自选菌株是酿造石榴果酒的优良菌种, 目前尚需对其稳定性和产香性能做进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 王爱伟, 孟繁锡, 刘春鸽, 等. 我国石榴产业现状、发展对策及前景分析[J]. 中国果业信息, 2006, 23(6): 7.
- [2] 吴连军, 于玲, 杜金华. SO<sub>2</sub>对石榴酒发酵的影响研究[J]. 酿酒, 2007, 34(2): 72-73.
- [3] 杜琨, 刘钊. 低度石榴果酒的生产工艺[J]. 酿酒科技, 2006(11): 81-82.
- [4] 刘月永, 高红心. 干性石榴酒的研制[J]. 食品工业, 2000(4): 23-27.
- [5] 唐虎利, 谢亚玲. 浸渍发酵法酿制干红石榴酒[J]. 酿酒科技, 2004(6): 74-76.
- [6] 翟文俊. 石榴营养酒的酿造工艺研究[J]. 食品科技, 2006(11): 205-208.
- [7] 权英. 酿造红枣果酒的酵母菌选育研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2002.
- [8] 崔铁忠. 柿子果酒酵母菌的分离筛选及应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [9] 袁丽. 鸭梨酒酵母菌的选种研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2004.