

蓝靛果酵母发酵特性的研究

孙广仁^{1,2}, 张启昌¹, 董凤英¹, 赵洪南¹, 杜凤国^{1,*}

(1.北华大学林学院, 吉林 吉林 132013; 2.东北师范大学生命科学院, 吉林 长春 130024)

摘要: 以蓝靛果果实为原料, 经酵母菌富集培养后, 分离纯化得到优势酵母菌, 并对其进行耐酸、耐酒精、耐亚硫酸及降酸实验, 在此基础上利用活化的蓝靛果酵母菌进行蓝靛果酒的发酵。结果表明: 蓝靛果酵母菌能够较好地利用柠檬酸与苹果酸, 而利用酒石酸的能力较差, 并且有一定的耐酒精和耐亚硫酸能力。蓝靛果酵母菌发酵使得果酒的酸度降低了13.2%, 对高酸果酒的发酵具有较好的应用前景。

关键词: 蓝靛果; 酵母; 发酵特性; 生物降酸; 果酒

Fermentation Characteristics of Yeast from *Lonicera edulis* Fruits

SUN Guang-ren^{1,2}, ZHANG Qi-chang¹, DONG Feng-ying¹, ZHAO Hong-nan¹, DU Feng-guo^{1,*}

(1. Forestry College of Beihua University, Jilin 132013, China;

2. School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: The predominant yeast strain isolated from *Lonicera edulis* fruits after enrichment culture was tested for its acid-resistant, alcohol-resistant, sulfurous acid-resistant and acid degrading properties. This was followed by fermentation of *Lonicera edulis* fruit wine with this strain after activation. It was found that this yeast strain could utilize citric acid and malic acid well and its ability to utilize tartaric acid was bad. Meanwhile, this yeast strain exhibited the resistance to sulfurous acid and alcohol. Moreover, fermentation with it resulted in a 13.2% decrease of acidity in *Lonicera edulis* fruit wine. Therefore, this strain will have promising application prospect in the fermentation of high-acidity fruit wine.

Key words: *Lonicera edulis*; yeast; fermentation characteristics; bio-deacidification; fruit wine

中图分类号: TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0305-05

蓝靛果 (*Lonicera edulis* Turcz) 又名蓝靛果忍冬、羊奶子、黑瞎子果、山茄子果、蓝果, 属忍冬科忍冬属多年生落叶小灌木; 喜冷凉湿润气候, 抗寒能力强, 是一种新兴的野生浆果资源。主要分布在东北、华北和西北的一些地区, 东北的长白山地区和大、小兴安岭野生资源贮量最大^[1-4]。果实为浆果, 果汁为鲜艳的深玫瑰色, 果味酸甜, 含有氨基酸、多种糖类、有机酸、矿物质、维生素和微量元素等^[5]。长白山区的蓝靛果总酸含量可达2.8%以上^[6], 是一种高酸浆果, 可用于生产饮料、加工果脯与果酱、发酵果酒、开发色素等^[7-14]。由于蓝靛果提取物具有降压、抗疲劳、抗氧化及抗癌的作用而受到广泛关注^[15-18]。近年来, 虽然对蓝靛果的加工及其功能进行了大量的研究, 但对蓝靛果酵母菌特性的研究却较少, 尤其是对蓝靛果酵母菌的降酸作用研究极少。不同的酵母菌株对果酒的香气程度具有明显影响^[19], 采用纯种酵母菌与混合酵母菌发酵的果

酒的香气成分与风味有明显差别, 同一菌株对不同含糖量的果汁发酵其挥发性成分也有所不同^[20], 对发酵酒酵母菌的研究已逐步引起酿造行业的重视^[21-25]。本实验对长白山区野生蓝靛果酵母特性进行发酵特性研究, 为优化蓝靛果酒的发酵工艺提供实验指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝靛果鲜果采自长白山区吉林省抚松县松江河镇; 一级白砂糖 黑龙江依安瑞雪糖业有限公司。

柠檬酸、苹果酸、酒石酸 阳江市港阳香化企业优先有限公司; 亚硫酸 天津市致远化学试剂有限公司; 葡萄酒高活性干酵母 安琪酵母股份有限公司。

1.2 培养基

富集培养基: 蛋白胨 10g、蔗糖 10g、KH₂PO₄ 3g、MgSO₄·7H₂O 5g、氯霉素 0.01g, 加水至 1000mL, pH

收稿日期: 2010-09-28

基金项目: 国家林业局“948”支撑项目(2008-4-15)

作者简介: 孙广仁(1964—), 男, 教授, 博士研究生, 主要从事微生物利用研究。E-mail: sungr8189@163.com

* 通信作者: 杜凤国(1960—), 男, 教授, 博士, 主要从事植物资源开发与利用研究。E-mail: dfg4656@hotmail.com

值自然, 121℃灭菌 20min。孟加拉红琼脂培养基: 配方见 GB 4789—2010《食品霉菌与酵母菌计数》。

1.2 仪器与设备

722N 型分光光度计 上海佑科仪器仪表有限公司; SPX-250BS-II 生化培养箱 上海线描新苗医疗器械制造有限公司; BSD-250 程控全温振荡培养箱 常州诺基仪器有限公司; 一等标准酒精计(已校正) 上海医疗控温仪器厂; 手持糖度计 北京德明达光学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 蓝靛果酵母菌活化液的制备

1.3.1.1 发酵醪的制备

将新鲜的蓝靛果果浆(按浆果 2~3 倍量加水, 控制总酸含量 10g/L 以下)按 60mg/L 二氧化硫质量浓度添加亚硫酸, 置于经灭菌的三角瓶中, 棉塞封口, 每隔 12h 振荡 1 次, 室温下当自然发酵有大量气泡产生并且有明显酒味后, 用灭菌脱脂纱布过滤制成蓝靛果发酵醪, 4℃保存。

1.3.1.2 优势酵母菌的分离与纯化

吸取新制备的蓝靛果发酵醪 1mL, 加入到 50mL 灭菌的富集培养基中, 28℃摇床(160r/min)培养 48h, 在孟加拉红琼脂培养基平板上对其不同稀释度的发酵醪进行划线, 28℃培养 3~5d, 对优势酵母菌的菌落进行划线培养 3 次, 得到的纯菌株于 4℃以斜面试管(孟加拉红琼脂培养基)保存。

1.3.1.3 酵母菌活化液的制备

菌种使用前于室温放置 1h, 于超净工作台上挑取试管保存的酵母菌落于装有 50mL 富集培养基的三角瓶中, 28℃摇床(160r/min)培养 48h, 再将此酵母液扩大培养到 1L, 得蓝靛果酵母菌活化液。于 4℃保存。

1.3.2 蓝靛果酵母菌发酵特性实验

1.3.2.1 耐糖能力实验

称取 50.0g 蔗糖用新配制的富集培养基溶解并定容至 100mL, 配制成质量浓度为 50g/100mL 的蔗糖母液, 于 121℃灭菌 20min。取 10mL 试管, 分别加入蔗糖母液 2、3、4、5、6、8mL, 用灭菌后的富集培养基补足 9.0mL, 再加入 1.0mL 蓝靛果酵母活化液, 得到蔗糖质量浓度分别为 10、15、20、25、30、40g/100mL 的发酵液, 28℃摇床(160r/min)培养 24h。分别以不加酵母液的含相应质量浓度蔗糖的液体培养基为对照, 于波长 560nm 处测吸光度。

1.3.2.2 耐二氧化硫能力实验

取灭菌后的 10mL 试管, 分别加入质量浓度为 0.6mg/mL 的亚硫酸稀释液 0.5、1、1.5、2、3、4mL, 用新配制的富集培养基补足 9.0mL, 再加入 1.0mL 蓝靛果酵母

活化液, 得到质量浓度分别为 30、60、90、120、180、240mg/L 的二氧化硫发酵液, 28℃摇床(160r/min)培养 24h。分别以不加酵母液的含相应质量浓度亚硫酸的液体培养基为对照, 于波长 560nm 处测吸光度。

1.3.2.3 耐酒精能力实验

取灭菌后的 10mL 试管, 分别加入 0.8、1.2、1.6、2、3、4mL 无水酒精用新配制的富集培养基补足 9.0mL, 再加入 1.0mL 蓝靛果酵母活化液, 得到体积分数为 8%、12%、16%、20%、30%、40% 的发酵液, 28℃摇床(160r/min)培养 24h。分别以不加酵母液的含相应体积分数酒精的液体培养基为对照, 于波长 560nm 处测吸光度。

1.3.2.4 耐酸能力实验

用新配制的富集培养基分别配制成质量浓度为 10g/100mL 柠檬酸、苹果酸、酒石酸和混合酸(柠檬酸:苹果酸:酒石酸质量比为 1:1:1)的酸母液, 121℃灭菌 20min 制得酸液。

取 10mL 试管, 按 5、10、15、20、30、40g/L 的质量浓度加入酸液, 用新配制的富集培养基补足 9.0mL, 再加入 1.0mL 蓝靛果酵母活化液, 摇床(160r/min)培养 24h。分别以不加酵母液的含相应质量浓度酸的富集培养基为对照, 于波长 560nm 处测吸光度。

1.3.3 蓝靛果果酒的发酵

蓝靛果果浆制备: 将 2.5t(保藏时添加质量浓度 6g/L 的亚硫酸 4L)经过挤压破碎后再补加亚硫酸 3L、水 1t、白砂糖 0.5t, 蔗糖质量浓度达到 18g/100mL, 总二氧化硫含量 84mg/L。

蓝靛果发酵母液的制备: 取 500mL 酵母菌活化液(按 1.3.1.3 节方法制备)加入到 65℃灭菌 30min 的 5L 蓝靛果果浆中, 28℃摇床培养 24h 的蓝靛果果浆, 再于 38~40℃恒温条件下加入 250g 白沙糖、500g 酿酒酵母, 活化 40min, 冷却, 加入 10L 蓝靛果果浆并对其充分混匀, 室温放置 2h, 得到蓝靛果发酵母液。

果酒发酵: 将上述蓝靛果发酵母液加入到蓝靛果果浆中, 搅拌。发酵 24h 后观察, 如果有大量气泡产生, 则表明发酵正常。发酵 3d, 酒精体积分数达到 5%~6% 时, 补白沙糖至质量分数为 18%, 继续发酵, 每天搅拌, 发酵 12~15d 主发酵结束后过滤, 于冬季冷冻 5d 后过滤、陈酿。

1.3.4 降酸实验

取 1g 酿酒酵母加质量浓度为 2g/100mL 蔗糖水溶液 100mL 按使用说明进行活化, 得人工酵母液。取 1L 三角瓶 12 支, 分别加入蓝靛果果浆 1000mL, 121℃灭菌 20min。其中 3 支三角瓶分别加入 10mL 人工酵母液; 3 支三角瓶分别加入 10mL 蓝靛果酵母活化液(按 1.3.1 节方法制得); 3 支三角瓶分别加入 5mL 人工酵母液和 5mL 蓝

靛果酵母活化液；混匀后于 25℃ 培养箱中培养 6 个月。未接种酵母菌的空白以灭菌蒸馏水代替。发酵结束后测定酸度。降酸率按下式计算。

$$\text{降酸率} / \% = \frac{\text{发酵酒酸度} - \text{空白果汁酸度}}{\text{空白果汁酸度}}$$

1.3.5 指标测定方法

游离二氧化硫、总酸、酒精体积分数、总糖、还原糖、干浸出物的测定按 GB/T 15038—2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》所规定的方法进行。

2 结果与分析

2.1 蓝靛果酵母菌耐蔗糖实验结果

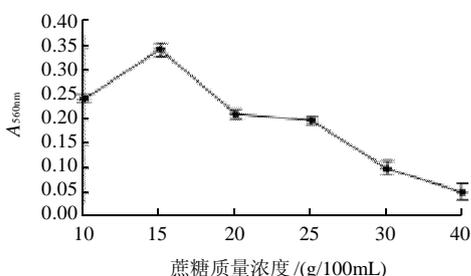


图 1 蔗糖质量浓度对酵母活性的影响

Fig.1 Effect of sucrose concentration on yeast activity

由图 1 可知，蔗糖质量浓度在 10~25g/100mL 范围内蓝靛果酵母生长良好，同时在 10~15g/100mL 之间蓝靛果酵母活性出现一个峰值，说明在一定温度下蓝靛果酵母的生长存在适宜的糖度。当蔗糖质量浓度大于 25g/100mL 时蔗糖对蓝靛果酵母菌生长产生抑制作用。

2.2 蓝靛果酵母菌耐二氧化硫实验结果

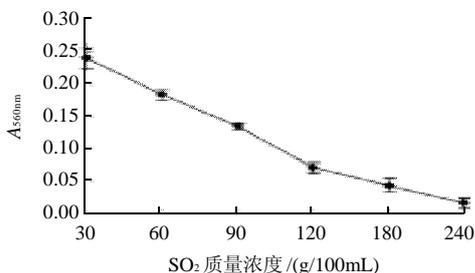


图 2 SO₂ 质量浓度对酵母活性的影响

Fig.2 Effect of SO₂ concentration on yeast activity

从图 2 可以看出，随着二氧化硫质量浓度的增加，蓝靛果酵母菌生长受到抑制，当二氧化硫质量浓度达到 90mg/L 时，A_{560nm} 值较初始(30mg/L)时值下降了一半，由此可见，在发酵过程中，视原料受微生物污染的情况

应尽可能减少二氧化硫的使用量。

2.3 蓝靛果酵母耐酒精实验结果

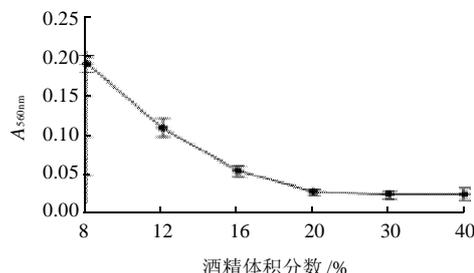


图 3 酒精体积分数对酵母活性的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on yeast activity

从图 3 可以看出，随着酒精体积分数的增大，蓝靛果酵母菌生长明显受到抑制，当酒精体积分数达到 20% 时，A_{560nm} 值已经下降到很低的水平，可见，蓝靛果酵母菌很难发酵 20% 以上酒精体积分数的果酒，在发酵酒精体积分数 12%~16% 果酒时蓝靛果酵母菌活性较高。而一般果酒发酵的酒精体积分数都在 10%~17% 之间，因此，蓝靛果酵母菌适合于果酒的发酵。

2.4 蓝靛果酵母耐酸实验结果

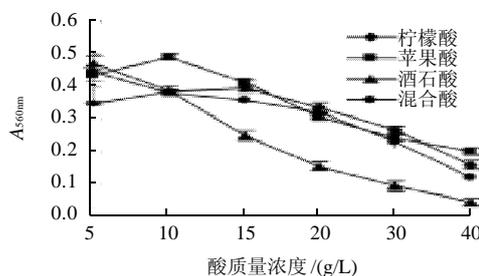


图 4 酸质量浓度对酵母活性的影响

Fig.4 Effect of organic acid type and concentration on yeast activity

从图 4 可以看出，对柠檬酸与苹果酸而言，在一定范围内 A_{560nm} 值出现一个峰值，这说明蓝靛果酵母菌发酵存在适宜的柠檬酸质量浓度和苹果酸质量浓度，这与蔗糖相似，由此推断，蓝靛果酵母菌能够利用柠檬酸与苹果酸。而酒石酸与混合酸呈现 A_{560nm} 值随酸质量浓度的增大而减小的趋势，酒石酸减少的幅度大于混合酸，可见酒石酸对蓝靛果酵母菌生长有明显的抑制作用，同时从下降幅度看，混合酸虽然也呈现抑制趋势，但较酒石酸幅度低。对蓝靛果酵母菌的抑制作用由强到弱依次为酒石酸>混合酸>柠檬酸>苹果酸。

2.5 蓝靛果酒发酵实验结果

2.5.1 降酸实验结果分析

表1 降酸实验结果

Table 1 Results of experiments on acid degrading ability

指标	人工酵母菌	蓝靛果酵母菌	混合酵母菌	空白
总酸(以苹果酸计)含量/(g/L)	17.9	16.9	16.2	18.6
降酸率/%	3.76	9.14	12.90	
酒精体积分数/%	8.3	9.1	10.1	0
残糖(以葡萄糖计)含量/(g/L)	34	22	8.5	18.5

将进行降酸实验的三角瓶取出后补水至1000mL,分别测定总酸、总糖与酒精体积分数。从表1可以看出,3种发酵方式的酵母菌都具有一定的降酸能力,其中混合酵母菌降酸能力最强;从残糖质量浓度看,天然蓝靛果酵母菌优于人工酵母菌,混合酵母菌的残糖质量浓度最低,酒精体积分数也比较高。

2.5.2 原酒分析

对发酵前的蓝靛果果浆与发酵后得到的原酒进行了分析,测定了总二氧化硫、干浸出物、酒精体积分数、总糖、还原糖与总酸含量,结果见表2。

表2 蓝靛果发酵前后原汁与原酒的分析结果

Table 2 Analytical results of chemical indexes of the fruit juice of *Lonicera enulis* before and after fermentation

指标	发酵前	发酵后
总二氧化硫含量/(mg/L)	—	48
干浸出物含量/(g/L)	—	20.1
酒精体积分数/%	—	12.3
总糖(以葡萄糖计)含量/(g/L)	47.2	5.6
还原糖(以葡萄糖计)含量/(g/L)	37.6	—
总酸(以苹果酸计)/(g/L)	18.2	15.8

注:—,未测定。

从表2可以看出,发酵得到的蓝靛果原酒的干浸出物、酒精体积分数符合GB 15037—2006《葡萄酒》要求,而残糖质量浓度为5.6g/L略高(<4g/L),可以用于干酒调配。总酸质量浓度由原来的18.2g/L降低到15.8g/L,降酸率为13.19%,表现出蓝靛果酵母菌具有一定的降酸能力。

3 讨论

3.1 蔗糖质量浓度在10~25g/100mL范围内,蓝靛果酵母菌活性出现一个峰值,表明蔗糖在适宜的质量浓度范围内对其生长有利,可见酵母在发酵果酒过程中,如果要加快发酵速度,应保持适宜的糖质量浓度使其保持最大的发酵速度,这也为分次加糖提供了指导。

3.2 酒精与二氧化硫对蓝靛果酵母菌的生长均有抑制作用,蓝靛果酵母菌对发酵低度酒(酒精体积分数<8%)有利,而随着酒精体积分数的增大,蓝靛果酵母菌活性

显著下降,当酒精体积分数为13%时, A_{560nm} 值下降到低度酒(<8%)时的一半,当酒精体积分数达到20%时, A_{560nm} 值则下降80%,说明酒精对蓝靛果酵母具有较强的抑制作用,蓝靛果酵母适用于发酵酒精体积分数为8%~13%的果酒,能够满足目前对一般果酒发酵的需求。通过耐二氧化硫实验表明,蓝靛果酵母对二氧化硫虽然较为敏感,但二氧化硫质量浓度在90mg/L的条件下, A_{560nm} 值下降到二氧化硫质量浓度在30mg/L的一半。所以,二氧化硫的使用质量浓度在90mg/L以下,蓝靛果酵母能够生长,超过180mg/L时酵母生长受到严重抑制,这对指导实际生产具有一定的实践意义。

3.3 对比人工酵母与蓝靛果酵母菌以及混合酵母菌的发酵实验可以看出,无论是人工酵母还是蓝靛果酵母都具有一定的降酸能力,而蓝靛果酵母菌(9.14%)比人工酵母(3.76%)降酸能力强,但都比混合酵母降酸能力(12.90%)低,这可能是由于不同酵母的代谢之间存在交互作用或相互影响,通过深入研究不同酵母菌对有机酸利用以及糖代谢的相互作用可知,其对开发复合酵母发酵剂有一定的实际指导意义。与人工酵母菌比较,虽然蓝靛果酵母菌在发酵蓝靛果酒方面表现出一定的降酸能力,但这一特性是否对其他果汁的发酵有普遍意义还有待进一步研究。

3.4 从蓝靛果酵母菌耐酸实验的结果来看,柠檬酸的质量浓度5~15g/L、苹果酸质量浓度5~10g/L范围内对蓝靛果酵母菌的生长有促进作用,说明蓝靛果酵母菌能够利用柠檬酸与苹果酸,而高质量浓度酸则对其表现为抑制作用。由此可见,在发酵果酒过程中,除了要调整适当的酸度外,还要了解果汁中酸的组成,为探寻最佳的发酵工艺提供依据。由于酵母菌利用不同酸的程度不同,从而改变了发酵酒的有机酸组成,进而影响发酵酒的口味,探讨酵母菌对不同有机酸的利用程度对进一步研究酿酒工艺是非常有意义的。

参考文献:

- [1] 王振宇,杨玲.蓝靛果的研究利用现状及其发展前景[J].安徽科技学院学报,2009,23(3):18-20.
- [2] 霍俊伟,睢薇,于泽源,等.野生蓝靛果忍冬人工驯化栽培[J].北方园艺,2004(4):31.
- [3] 霍俊伟,睢薇,阮瑞雪.黑龙江省野生蓝靛果忍冬染色体的观察[J].中国林副特产,2004,8(4):15-16.
- [4] 李恒,刑桂菊,廉美丹,等.药用植物:蓝靛果[J].中国林副特产,2002(1):10.
- [5] 李淑芹,李延冰,姜福臣,等.野生植物:蓝靛果营养成分研究[J].东北农业大学学报,1994,25(4):401-404.
- [6] 孙广仁,杜凤国,金春红.接骨木复合饮料的研究(I):蓝靛果忍冬果实的食用价值研究[J].吉林林学院学报,1996,12(2):96-98.
- [7] 岳晓霞,张根生,孙胜敏,等.蓝靛果、胡萝卜复合固体饮料的研制[J].食品科学,2009,30(18):420-423.

- [8] 黄祥童, 刘明才, 孟庆江, 等. 蓝靛果低糖果脯及低糖果酱的研制[J]. 食品科技, 2006 (7): 110-114.
- [9] 岳晓霞, 张根生, 李大龙, 等. 复合型蓝靛果果酱的研制[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 723-725.
- [10] 黄祥童, 朴龙国, 孟庆江, 等. 蓝靛果发酵制酒工艺研究[J]. 酿酒科技, 2003(2): 82-84.
- [11] 包怡红, 王恩福, 应华章. 蓝靛果果酒调配工艺的研究[J]. 酿酒, 2007, 34(1): 92-94.
- [12] 张雁南. 蓝靛果饮料的研制[J]. 农产品加工: 学刊, 2008(10): 82-83.
- [13] 赵桂红, 王世平. 蓝靛果天然红色素纯化工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(2): 48-50.
- [14] 焦岩, 王振宇. 蓝靛果花色苷对高脂膳食诱导肥胖大鼠脂代谢和抗氧化能力的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 230-234.
- [15] 王宏涛, 叶云, 肖顺林, 等. 蓝靛果乙酸乙酯提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜血管活性物质的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(3): 360-361.
- [16] 杨玲, 王振宇. 蓝靛果乙醇提取物体外抗氧化作用的研究[J]. 食品工业科技, 2009(12): 162-164.
- [17] 杨玲, 王振宇. 响应面法优化蓝靛果抗氧化成分提取的工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(1): 67-72.
- [18] JIN Xuehai, OHGAMI K, SHIRATORI K, et al. Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Experimental Eye Research*, 2006, 82: 860-867.
- [19] VALLES B S, BEDRIÑANA R P, TASCÓN N F, et al. Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice[J]. *Lebenswissenschaften*, 2005, 38: 455-461.
- [20] CLEMENTE-JIMRENEZ J M, MINGORANCE-CAZORLA L, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ S, et al. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 98: 301-308.
- [21] MATEO J J, JIMÉNEZ M, PASTOR A, et al. Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles[J]. *Food Research International*, 2001, 34: 307-314.
- [22] AYOGU T E. Evaluation of the performance of a yeast isolate from *Nigerian palm* wine in wine production from pineapple fruits[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 69: 189-190.
- [23] LI Shuangshi, CHENG Chao, LI Zheng, et al. Yeast species associated with wine grapes in China[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 138: 85-90.
- [24] COMUZZO P, TAT L, TONIZZO A, et al. Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility[J]. *Food Chemistry*, 2006, 99: 217-230.
- [25] KOGAN G, KOCHER A. Role of yeast cell wall polysaccharides nutrition and health protection[J]. *Livestock Science*, 2007, 109: 161-165.