

桑椹酒发酵关键技术研究

范作卿, 王娜, 朱琳, 郭光, 邹德庆* (山东省蚕业研究所, 山东烟台 264002)

摘要 [目的]通过对桑椹酒发酵专用酵母的筛选和多酚氧化酶钝化2项关键技术进行研究,为桑椹酒稳定发酵工艺的建立提供技术支持。[方法]分别对桑椹及桑园土壤中的酵母进行富集、培养与筛选,考察了pH、温度对桑椹多酚氧化酶活性的影响。[结果]获得2株桑椹酒发酵专用菌株,一株来自桑椹发酵汁,一株来自桑园土壤;在pH 3.0~7.0时,多酚氧化酶活性随pH的增大而升高,在pH为7.0时相对活性达到最大,之后随pH的增大其活性又逐渐减小。在pH低于5.0的环境中,酶活性会低于40%;在温度为40℃时活性达到最大,80℃时活力丧失。[结论]在pH低于5.0的条件下,将桑椹汁在70℃加热20 min或在80℃加热5 min,即可达到使桑椹多酚氧化酶的活性钝化失活的目的。

关键词 桑椹酒;关键技术;酵母;多酚氧化酶

中图分类号 S789.5;TS262.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)12-0087-02

Research on the Key Technology of Mulberry Wine Fermentation

FAN Zuo-qing, WANG Na, ZHU Lin, ZOU De-qing* et al (Sericultural Research Institute of Shandong Province, Yantai, Shandong 264002)

Abstract [Objective] Two key techniques of mulberry wine fermentation that bacterial strain selected and polyphenol oxidase inactivated were studied, in order to provide technical support for the establishment of stable fermentation technology of mulberry wine. [Method] The yeast were enriched, cultured and selected from mulberry and mulberry field. The effects of pH and temperature on the activity of polyphenol oxidase were studied. [Result] 2 kinds of mulberry wine fermentation special yeast were obtained. The two yeast were isolated from mulberry juice and mulberry field. The polyphenol oxidase activity increased with the increase of pH from 3.0 to 7.0. And the relative activity reached the maximum at pH 7.0. The activity decreased gradually with the increase of the pH. When pH was less than 5.0, the enzyme activity was less than 40%. The activity reached the maximum at 40℃, and will be lost at 80℃. [Conclusion] Polyphenol oxidase could be inactivated under the condition of the mulberry juice heated at 70℃ for 20 min or 80℃ for 5 min in less than pH 5.0. So as to protect the stability of the anthocyanins and polyphenols in the brewing process.

Key words Mulberry wine; Key technology; Yeast; Polyphenol oxidase

桑椹为桑的成熟果穗,又名桑果、桑枣等,果肉多汁、滋味甘美,是水果中的珍品,甘甜可口、风格独特^[1],有“中华果王”之美誉^[2],是国家卫生部首批公布的药食同源的植物品种之一。桑椹含有丰富的有机酸、多种维生素、微量元素、总黄酮及花青素等,不仅具有极高的营养价值,而且具有良好的保健功能^[3]。桑椹果酒是以新鲜桑椹为主要原料,经生物发酵酿制而成的纯天然健康饮品,营养丰富、品味优良,较好地保留原桑椹中的有机酸、各种维生素、含氮物、微量元素、矿物质等天然成分^[4],酒度低、色泽艳美的同时又具有佳酿特有的风味,芳香诱人;还具有调整人体新陈代谢、促进血液循环、控制体内胆固醇水平、利尿、激发肝功能和抗衰老的功效,常饮有益健康,是一种可以和葡萄酒相媲美的保健果酒^[5]。目前关于桑椹酒的发酵技术已有相关报道^[3,6-7],但有关桑椹酒发酵专用酵母的筛选及多酚氧化酶对发酵工艺的影响等报道较少。

笔者对桑椹酒发酵专用酵母菌的培养与筛选、桑椹多酚氧化酶的钝化两大影响桑椹酒发酵的关键工艺技术进行了研究,为蚕桑业的综合利用以及桑椹的深度开发提供了一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料 原辅料:桑椹于2016年6月采于山东省蚕业研究所果桑资源圃;蔗糖为市售1级。主要试剂:麦芽汁(食品级)、焦性没食子酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等,均为分析纯。主要仪器:KQ3200DB超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌的培养与筛选。

1.2.1.1 从桑椹中分离培养。将成熟桑椹破碎,挤压出汁,分装于250 mL三角瓶中,塞好棉塞于25℃自然发酵6~8 d,选取风味柔和、有果香及淡醇香的自然发酵汁,经适当稀释后在麦芽汁平板上作涂布或划线,28℃培养2~3 d,选择具有典型酵母菌落特征的单菌落进一步划线分纯。

1.2.1.2 从土壤中富集培养。在无菌条件下挑取少量土壤样品接入已灭菌的含4%~7%(V/V)乙醇的麦芽汁液体培养基中,于25℃培养72 h增菌,然后进行梯度稀释,并涂布于麦芽汁固体培养基上,28℃培养2~3 d,选择具有典型酵母菌落特征的单菌落进一步划线分纯。

1.2.1.3 酵母菌的筛选。将富集培养得到的酵母菌株进行杜氏小管产气试验,将斜面活化二代的酵母菌接入8°Brix的麦芽汁中,25℃、180 r/min培养10 h后,接种于13°Brix的带有杜氏小管的麦芽汁培养基中25℃培养48 h,初筛出产气好的菌株,再接入糖度为20%的桑椹汁中发酵7 d,选择产酒精度高、风味好的菌株进行耐酒精性试验。

1.2.2 桑椹多酚氧化酶的钝化。

1.2.2.1 桑椹多酚氧化酶的提取纯化。称取50 g桑椹,加入

基金项目 山东省现代农业产业技术体系蚕桑创新团队首席兼加工与综合利用岗位专项(SDAIT-18-01);2016年度山东省农业重大应用技术创新项目。

作者简介 范作卿(1977—),男,山东烟台人,助理研究员,从事蚕桑资源综合利用研究。*通讯作者,研究员,从事蚕桑资源综合利用研究。

收稿日期 2017-01-15

预冷的含1%吐温80的0.1 mol/L磷酸缓冲液100 mL,打浆,在4℃条件下盐析,收集沉淀物,用超声波将其溶解于0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液,平衡过SephadexG-75凝胶柱,再用含有1.0 mol/L NaCl的平衡磷酸盐缓冲液进行洗脱收集。

1.2.2.2 pH对多酚氧化酶活性的影响。在3.9 mL pH分别为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0的缓冲溶液中,分别加入1.0 mL 0.02 mol/L焦性没食子酸溶液和0.1 mL酶液,测定不同pH对酶活性的影响。

1.2.2.3 温度对多酚氧化酶活性的影响。在3.9 mL pH 7.0磷酸盐缓冲液中,加入1.0 mL 0.02 mol/L焦性没食子酸溶液和0.1 mL酶液,分别在20、30、40、50、60、70℃下反应5 min,测定其酶活性。

1.2.2.4 多酚氧化酶对温度的稳定性。在3.9 mL pH 7.0磷酸盐缓冲液中加入1.0 mL 0.02 mol/L焦性没食子酸溶液和0.1 mL酶液,分别放在40~70℃的水浴中,放置10~60 min后,测定其酶活性。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离培养 经镜检选择从桑椹中分离培养的28株为纯种,从土壤中富集培养的39株为纯种后转入麦芽汁固体斜面。

2.1.1 杜氏小管产气筛选。初筛出产气好的菌株,结果见表1。可以看出,在25℃条件下发酵48 h,产气能达到杜氏小管体积一半以上的酵母菌有12株,说明这些菌株可能有较高的发酵度和发酵效率。

表1 杜氏小管产气情况

Table 1 The gas production of Duchenne tubule

发酵时间 Fermentation time//h	产气情况 Gas production	菌株数 Strains//株
12	+	4
	++	4
	+++	5
24	+	5
	++	6
	+++	7
>48	+	5
	++	6
	+++	6

注: +表示产气量约等于杜氏小管体积的1/3, ++表示产气量约等于杜氏小管体积的2/3, +++表示产气量约等于杜氏小管体积

Note: +, ++ indicates gas production was approximately equal to 1/3, 2/3 of the tubular volume, respectively, +++ indicates gas production was approximately equal to the tubular volume

2.1.2 产酒精能筛选。筛选出的产酒精度高、风味好的菌株,结果如下:酒精度>9%的菌株3株;7%~9%的菌株3株;5%~7%的菌株4株;<5%的菌株2株。由发酵桑椹汁产酒情况可见,12株酵母菌发酵桑椹汁后,酒精产率大于5%的有10株,将产率小于5%的2株淘汰。

2.1.3 耐酒精性能筛选。将上述得到的10株酵母菌进行耐酒精性试验,结果见表2。由表2可知,有7株酵母菌能耐受12%以上的酒精浓度,有4株能够耐受14%以上的酒精浓度,由于良好的酒精耐受性与较高的产酒精能力有密切关系,预示着这4株菌株可能有较高的发酵度。

表2 酵母耐酒精试验

Table 2 Yeast alcohol resistance test

酒精浓度 Alcohol concentration//%	产气时间 Gas production time//d	产气菌株数 Strains for gas production
10	1	2
	2	1
12	1	1
	2	2
14	1	1
	2	1
16	1	1
	2	1

2.1.4 酵母菌发酵性能测试。组织10名具有相关知识的人员组成评价组,对菌株编号8、12、28、32、35、51、70的发酵酒进行感官评价分析,记录结果见表3。由表3可以看出,28号菌株无论是产酒量还是感官评价总分都是最高的,其次是35号菌株。这2株菌株一株来自桑椹发酵汁,一株来自桑园土壤。

表3 发酵性能测试结果

Table 3 Fermentation performance test results

菌株编号 Strain No.	酒精度 Alcoholic strength//%	色泽 Color 分	香气 Aroma 分	滋味 Taste 分	综合得分 Comprehensive score//分
8	11.2	8.3	7.5	8.2	24.0
12	12.4	7.6	7.8	7.9	23.3
28	14.7	9.2	8.9	9.5	27.6
32	12.2	6.5	7.1	7.5	21.1
35	14.5	8.9	8.2	8.4	25.5
51	13.6	7.9	8.8	8.2	24.9
70	13.1	7.5	6.7	7.3	21.5

2.2 桑椹多酚氧化酶的钝化

2.2.1 pH对多酚氧化酶活性的影响。由图1可见,在pH 3.0~7.0时,活性随pH的增大而升高,在pH为7.0时相对活性达到最大,之后又随pH的增大其活性又逐渐减小。在pH低于5.0的环境中,酶活性便会低于40%,由于桑椹汁的pH大多在5.0以下,所以可以采取降低pH的方法来抑制多酚氧化酶活性。

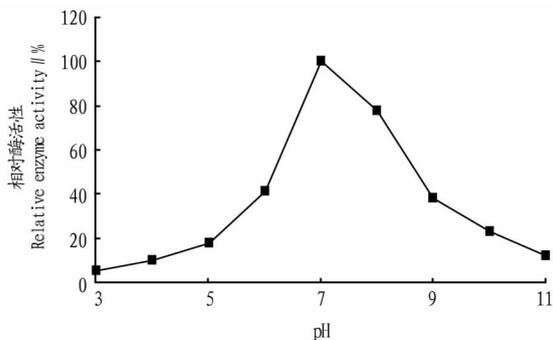


图1 pH对酶活性的影响

Fig. 1 Effects of pH on enzyme activity

2.2.2 温度对多酚氧化酶活性的影响。由图2可见,桑椹多酚氧化酶活性在低于40℃时下随温度的上升酶活性逐渐(下转第121页)

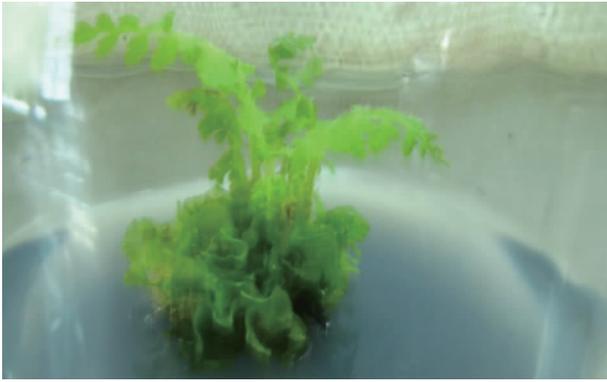


图5 MS + KT 0.2 mg/L 培养基上诱导出的幼孢子体

Fig.5 Induced young sporophytes on MS + KT 0.2 mg/L culture medium

(2) 蕨菜孢子萌发温度最好在 20 ~ 25 °C, 心形原叶体必须在光照条件下才能形成。

(上接第 88 页)

增大, 在温度为 40 °C 时活性达到最大, 当温度大于 40 °C 时, 随温度的上升酶活性又逐渐减弱, 80 °C 时活力丧失。

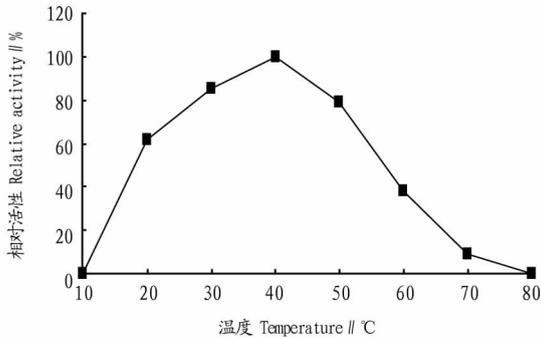


图2 温度对多酚氧化酶活性的影响

Fig.2 Effects of temperature on polyphenol oxidase activity

2.2.3 多酚氧化酶的热稳定性。由图3可以看出, 在 70 °C 条件下加热 20 min, 桑椹多酚氧化酶活力已经完全丧失, 在 60 °C 条件下加热 70 min, 其酶活力才完全丧失, 而在 40 °C 加热 70 min, 其酶活力还残存 40%。可见桑椹多酚氧化酶在较高的温度下容易失活。

3 结论

该试验对桑椹酒发酵专用酵母进行了富集、培养与筛选, 结果表明, 第 28 号菌株无论是产酒量还是感官评价总分都是最高的, 其次是第 35 号菌株。这 2 株菌株一株来自桑椹发酵汁, 一株来自桑园土壤。

该试验通过高温钝化多酚氧化酶的方式对桑椹汁中的多酚氧化酶进行钝化失活, 从而达到控制酒液中黑色素浑浊

(3) 蕨菜原叶体增殖最好的培养基是 MS, 此时增殖系数达 79.1; 蕨菜原叶体增殖最佳培养基为 MS + 1% 蔗糖, 此时增殖系数是 88.3。

(4) KT 有利于蕨菜幼孢子体形成, 最佳培养基添加浓度为 MS + KT 0.2 mg/L, 此时蕨菜叶片最多 (达 4.6 个), 长势最好, 幼孢子体出现时间最短 (35 d)。

参考文献

- [1] 王振业. 育苗基质和播种方法对蕨菜孢子繁殖的影响[J]. 草原与草坪, 2010, 30(5): 56 - 58.
- [2] 张有生. 蕨菜的人工繁殖方法[J]. 河北林业科技, 2002(4): 34 - 35.
- [3] 孙起梦, 刘兴剑. 几种蕨类植物的孢子繁殖试验研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(25): 13571 - 13572, 13576.
- [4] 吴春华, 石元亮, 王森. 蕨菜根状茎的组织培养技术研究[J]. 园艺与种苗, 2013(11): 41 - 44.
- [5] 藤瑶, 王晓花, 王德斌, 等. 蕨菜的栽培技术[J]. 延边大学农学报, 2002, 24(4): 279 - 284.
- [6] 王森, 孙丽娜, 吴春华, 等. 东北蕨菜的 GGB 组培移栽技术及驯化[J]. 园艺与种苗, 2016(1): 27 - 29.

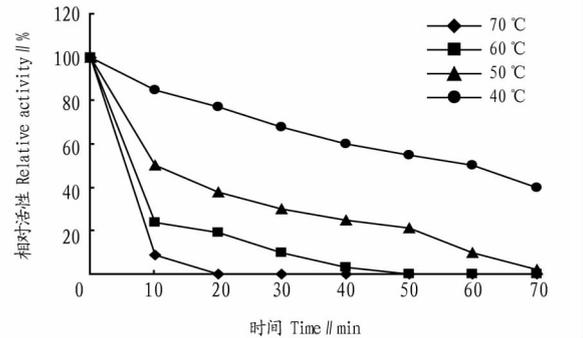


图3 多酚氧化酶对热的稳定性

Fig.3 Thermal stability of polyphenol oxidase

沉淀的目的, 以解决桑椹酒发酵过程的关键技术。结果表明, 在 pH 低于 5.0 的条件下, 将桑椹汁在 70 °C 加热 20 min 或在 80 °C 加热 5 min, 从而使桑叶多酚氧化酶的活性钝化, 以达到保护桑椹中总花色苷、多酚类物质在酿制过程中的稳定性的目的。

参考文献

- [1] 伍娟霞, 董文宾, 黄科, 等. 桑椹的营养成分及在食品加工中的应用[J]. 食品科技, 2013, 38(12): 68 - 71.
- [2] 王艳辉, 白兴荣, 卢焕仙, 等. 桑椹干红的营养成分分析[J]. 云南农业科技, 2006(2): 29 - 30.
- [3] 陈祖满. 桑椹果酒的酿造技术[J]. 中国酿造, 2005, 24(4): 62 - 64.
- [4] 张艳丽, 邵则夏, 陆斌, 等. 桑椹酒食用药用价值与加工技术[J]. 中国林副特产, 2005(4): 30 - 31.
- [5] 吴继军, 肖更生, 徐玉娟, 等. 桑果酒生产工艺的研究[J]. 广东蚕业, 1999, 33(4): 39 - 41.
- [6] 陈娟. 蜂蜜桑椹酒的工业化生产技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [7] 王琳. 桑椹酒酿造工艺的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003.