

植酸对刺梨果酒发酵作用及酵母菌生长影响研究

丁筑红, 谭书明, 伍佳琪, 王准生, 母先海
(贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 本文利用植酸作为发酵促进剂, 应用于刺梨果酒发酵中, 研究其对酵母菌的生长繁殖及刺梨酒发酵作用的影响, 结果如下: (1) 添加植酸能缩短发酵周期、降低刺梨果酒的残糖量, 提高发酵的酒精度; (2) 添加植酸能促进酵母菌的增殖, 促进酵母细胞出芽, 使其提前进入对数生长期; (3) 植酸使酵母的耐酒精能力提高; (4) 试验条件下植酸最佳添加量 0.08%。

关键词: 植酸; 刺梨果酒; 酵母; 发酵作用

Study on Effects of Phytic Acid on Yeast Growth and Fermentation of *Rosa roxburghii* Tratt Wine

DING Zhu-hong, TAN Shu-ming, WU Jia-qi, WANG Zhun-sheng, MU Xian-hai
(College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Phytic acid (PA) was applied in *Rosa roxburghii* Tratt wine for studying the effects on yeast growth and propagation and fermentation of the wine. The results were as follows: (1) PA shortened the fermentation time, reduced the sugar residue and increased the alcohol content; (2) PA accelerated the yeast growth and proliferation, advanced the logarithmic growth phase and promoted the yeast germination; (3) PA improved the alcohol tolerance of yeast; (4) The optimum PA concentration was 0.08% in the test.

Key words phytic acid (PA); *Rosa roxburghii* Tratt wine; yeast; fermentation

中图分类号: TS201.57; TS261.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)04-0129-05

植酸(PA), 即肌醇六磷酸酯, 是大多数谷物及豆科植物成熟种子和花粉中磷的基本贮存形式, 主要以其钙、镁、钾复盐的形式广泛存在于植物种子中, 植酸成分中占其重量的 1%~5%^[1]。植酸是一种天然营养成分, 性质独特, 可作为生物体有机磷的来源, 其使用安全性较食盐高^[2], 植酸作为防腐剂、抗氧化剂、护色剂、除重金属剂、稳定剂, 广泛应用于食品行业以及医药、化工行业中, 在食品工业中常用于油脂食品、

酒类、饮料罐头、水产品、新鲜果蔬中^[3]。在发酵工业, 植酸作为发酵促进剂, 用于提高菌体如某些霉菌酵母繁殖速度, 增加产物的量及提高原料的利用率^[4~7], 近年来引起了越来越多专家学者的注意与研究。

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt), 属蔷薇科蔷薇属的一种野生灌木果树, 果实肉质肥厚可食, 含有丰富的营养物质, 如蛋白质、脂肪、碳水化合物、多种维生素, 以及人体所需的矿物质等, 其中 V C 含量高达

收稿日期: 2005-06-17

基金项目: 贵州省科技计划课题(黔科合 2004NGY003)

作者简介: 丁筑红(1966-), 女, 副教授, 主要从事农产品加工与综合利用研究。

学研究, 2001, 3(1): 5-7.

③ 王肇慈. 粮油食品品质分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.

④ Bau H M, Villaume C, Nicolas J P, et al. Effects of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional fac-

tors of soya bean (*Glycine max*) seeds[J]. J Sci Food Agric, 1997, 73: 1-9.

⑤ 籍保平, 梁建芬. 玉米胚芽面包面团的发酵性能[J]. 中国农业大学学报, 1999, 4(6): 98-100.

2500mg/100g, 因此被誉为“VC之王”^[8]。用刺梨酿制果酒, 果香浓郁, 营养丰富, 含18种人体所需要氨基酸及8种矿物质, 对人体具有增强免疫功能、延缓衰老、抗肿瘤、消除疲劳、改善睡眠、健胃作用等等多种效果^[9, 10]。但由于原料果汁中酚类物质、总酸含量高, 使其发酵周期的缩短, 产品酒度的提高, 残糖的降低成为发酵过程的重点和难点问题^[10, 11], 在一定程度上影响了刺梨酒产品质量和档次的进一步提升。因此, 本文在果酒及刺梨酒现有发酵技术的基础上, 以植酸作为促酵剂, 研究其对果酒酵母的生长繁殖及刺梨酒发酵作用的影响, 探讨添加植酸作为一种刺梨果酒发酵的促酵方法的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

刺梨 本地充分成熟冻藏鲜果, 密封包装, 无霉变腐烂; 酵母 安琪葡萄酒用活性干酵母, 湖北安琪酵母股份有限公司; 蔗糖 市售一级白砂糖; YPG 固体培养基 酵母膏、蛋白胨、葡萄糖、琼脂; 植酸(浓度50%) 天津市博迪化工有限公司; 无水乙醇(浓度 $\geq 99.7\%$, 分析纯)。

1.2 仪 器 设 备

LDZX-40 立式灭菌消毒器; HH·B11·420-S 型电热恒温培养箱; SW-CJ-2FD 净化工作台; XH-B 型旋涡混合器; HH·SY21-Ni8 型电热恒温水浴锅; XB-K-25 型血球计数器; YP200K 电子天平; 小型榨汁机; 测微尺; XS-18 生物显微镜; 冰箱等。

1.3 方 法

1.3.1 刺梨发酵基质的准备

刺梨冻果自然解冻, 压榨取汁, 粗滤, 加入 SO_2 为 60mg/L 的 $NaHSO_3$, 得刺梨原汁。调整原汁糖度 23% 、 $pH4.0$ ^[10], 加热灭菌, 即为刺梨发酵基质。

1.3.2 果酒活性干酵母的复水活化^[12]

称取适量的果酒活性干酵母(为发酵果汁量的 0.02%), 加入10倍含 4% 葡萄糖的无菌水溶液中, 轻轻摇晃使菌体分散开, 于 35°C 保温 $20\sim 30\text{min}$, 每 10min 手摇震荡一次, 至有大量气泡产生时即活化完毕。

1.3.3 活性干酵母的扩大培养^[13]

一级培养: 将适量刺梨发酵基质与无菌水以 $1:3$ 的比例进行稀释, 接入复水活化后的酵母, 于 26°C 恒温培养 24h 。

二级培养: 将适量刺梨发酵基质与无菌水以 $1:1$ 的比例进行稀释, 接入一级培养液, 于 26°C 恒温培养 24h 。

三级培养: 取适量刺梨发酵基质, 接入二级培养

液, 于 26°C 恒温培养 24h 。

1.3.4 刺梨果酒的发酵

刺梨发酵基质中, 接入 4% 的酵母三级培养菌种子液, 于 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 下恒温培养^[12]。测定酒精度及外观糖度。

1.4 分析与测定方法

1.4.1 刺梨酒发酵过程中酵母菌增殖与出芽率的检测

刺梨发酵基质中接入 4% 酵母菌种子液, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温培养, 定时取发酵液计算总菌数, 定期观测出芽数, 计算出芽率。

1.4.2 刺梨酒发酵过程中酵母菌生长及形态观察

刺梨发酵基质接入 4% 酵母菌种子液, 在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 下恒温培养 24h 后, 稀释倾注平板, 倒置于 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下恒温培养 2d , 观察酵母在培养皿中的生长情况, 计活菌数, 同时镜检, 观察细胞形态。

1.4.3 酵母菌耐酒精能力的检测

取刺梨发酵基质, 添加一定量无水乙醇, 调配成不同酒精浓度的发酵液。然后均接入 4% 酵母菌种子液, 于 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 下恒温培养, 定期测定 CO_2 。以 CO_2 失重量为纵坐标, 发酵时间为横坐标, 绘制发酵速率曲线^[14]。

刺梨发酵基质, 接入 4% 酵母菌种子液, 在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 下恒温培养 24h 后, 充分混匀后取发酵液稀释, 涂布于不同酒精浓度的YPG培养基中, 于 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 2d , 观察菌落形态, 并镜检观察发酵液中酵母细胞形态。

1.4.4 指标的测定

酒精度 蒸馏比重法^[15];

总糖 滴定法^[15];

酵母细胞数目与出芽率的测定 血球计数法^[16];

酵母细胞大小的测定 测微尺测定^[17];

活菌计数 平板倾注法^[18]。

2 结果与分析

2.1 植酸对刺梨酒发酵过程中产酒及残糖的影响

由图1、2可知, 添加一定浓度PA能提高发酵过程可发酵性糖的利用率, 使残糖量下降, 发酵酒精度数提高, 产酒能力增强。整个发酵进程中, PA 0.08% 组对降糖及产酒速度, 均快于对照及其它试验组, 主发酵后残糖低、酒度高。

随着植酸浓度增加, 植酸增酵作用开始下降, 高浓度的植酸 0.18% 组表现出对发酵的抑制作用, 其降糖、产酒速度、残糖量及产酒能力均较对照为低。可能因为高浓度的植酸使发酵液pH过低, 对酵母生长及代谢产生不利影响。

表1 植酸对酵母菌菌落特征及细胞形态比较
Table 1 Comparison of plate clony character and cell shape of yeast

样品	菌落形态	细胞形态	细胞大小(μm)	活菌数(CFU/ml)
PA 0.08%	圆形, 乳白色, 直径3.5mm, 表面光滑湿润, 有光泽, 中央隆起, 边缘整齐, 不透明, 易挑起	椭圆形, 卵形, 大小均一, 一端出芽, 芽殖明显	(9.24~14.52) × (6.6~10.56)	5.9 × 10 ⁷
C K	圆形, 乳白色, 直径2.7mm, 表面光滑湿润, 有光泽, 中央隆起, 边缘整齐, 不透明, 易挑起	椭圆形, 卵形, 偶有不规则形态, 一端出芽, 芽殖明显	(7.92~11.88) × (5.28~10.56)	5.15 × 10 ⁷

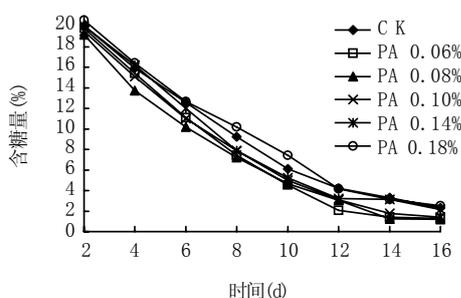


图1 不同植酸添加量对残糖量的影响
Fig.1 Effect of PA on sugar degree

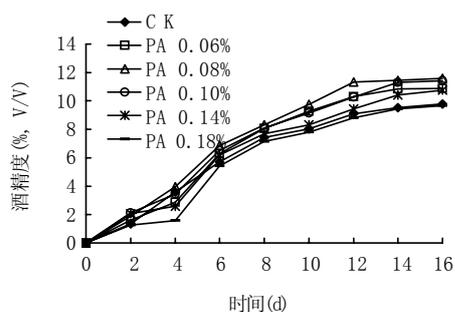


图2 不同植酸添加量对发酵酒精度的影响
Fig.2 Effect of PA on alcohol

由试验结果得出, PA 0.08% 为实验条件下的最优组。

2.2 植酸对果酒酵母菌增殖与出芽率的影响

以2.1中植酸最优组(PA 0.08%)与对照的试验比较, 由图3显示: 酵母菌培养过程中, 植酸组酵母菌的细胞增殖速度快于对照组, 细胞数量始终高于对照, 植酸组较对照更早进入对数生长期繁殖, 在6h后进入对数

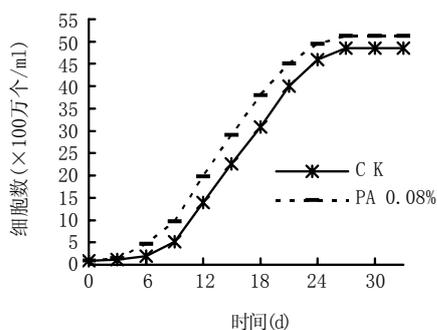


图3 酵母菌生长数量变化
Fig.3 Effect of PA on amount of yeast

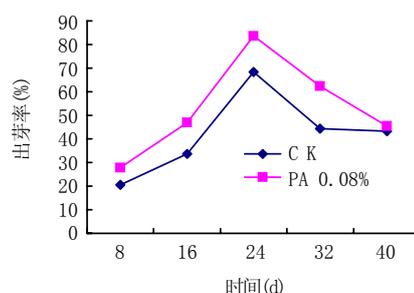


图4 植酸对酵母出芽情况的影响
Fig.4 Effect of PA on budding of yeast

生长期, 比对照组提前了3h。图4中, 酵母出芽率在发酵过程中均高于对照组, 且在培养24h时出芽率达到最大值, 较对照高出15.3%。说明加入植酸后, 酵母菌生长旺盛, 细胞数增殖快, 出芽率较高, 延滞期缩短, 起酵快, 有利于抑制杂菌污染, 加快发酵速度, 保证生产与产品质量。

2.3 植酸对酵母菌菌落及细胞形态的影响

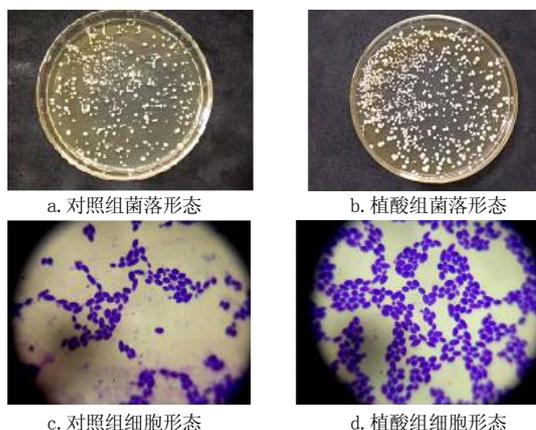


图5 酵母菌平板菌落和细胞形态
Fig.5 Plate clony and cell shape of yeast

选2.1中最佳植酸组(PA 0.08%), 比较植酸组与对照组酵母菌菌落及细胞形态差异。从表1可见, 植酸组酵母菌菌落及细胞大小均大于对照组, 活菌数也高于对照。图5显示, 植酸组酵母菌细胞饱满, 大小均一, 酵母生长繁殖旺盛、个体发育健壮, 说明植酸能促进酵母菌体的生长繁殖。

2.4 植酸对酵母菌耐酒精能力的影响

表2 酵母菌菌落特征及细胞形态比较
Table 2 Comparison of plate clony character and cell shape of yeast

酒精度(%)	样品	菌落形态	镜检形态	细胞大小(μm)
9	PA 0.08%	圆形, 乳白色, 直径3.1mm, 光泽一般	椭圆形、卵形, 一端出芽, 无变形。	4.85×3.28
	C K	圆形, 乳白色, 直径2.7mm, 光泽好。	椭圆形、卵形, 一端出芽, 无变形。	4.20×2.80
11	PA 0.08%	圆形, 乳白色, 直径2.9mm, 光泽一般	大多数呈椭圆形、卵形, 偶有腊肠形, 大小较均一。	5.18×2.95
	C K	圆形, 乳白色, 直径2.5mm, 光泽好。	椭圆形、卵形居多, 腊肠形也较多, 大小不太均一。	4.27×2.72
13	PA 0.08%	圆形, 乳白色, 直径2.5mm 光泽一般	卵形多, 腊肠形少见, 大小较均一。	4.23×2.85
	C K	圆形, 乳白色, 直径2.4mm, 光泽好。	腊肠形多见, 有些细胞大。	4.28×2.71
15	PA 0.08%	圆形, 乳白色, 直径2.2mm, 光泽一般	腊肠形不多, 椭圆形细胞大。	4.05×2.91
	C K	圆形, 乳白色, 直径2.1mm, 光泽好。	腊肠形多, 有些细胞增大。	3.98×2.88

2.4.1 植酸对刺梨发酵基质中酵母菌发酵耐酒精能力的影响

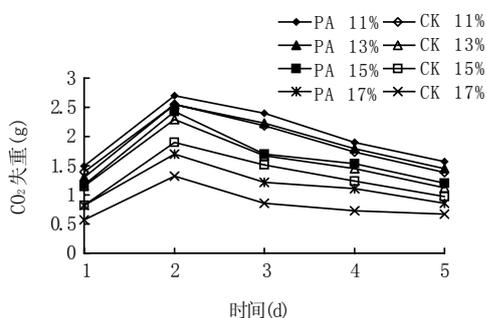


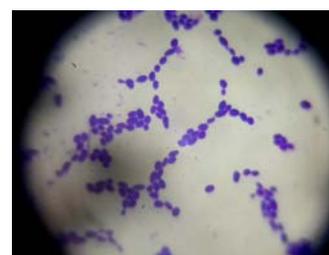
图7 植酸对酵母菌产CO₂影响
Fig.7 Effect of PA on carbon dioxide yeast produced

以2.1中最优组(PA 0.08%)为样品与对照比较, 由图7可以看出, 植酸组和对照组发酵基质中酒精浓度的增加与酵母菌产CO₂量均呈现负相关。同浓度酒精条件下, 植酸组较对照CO₂失重多且随着酒精浓度增加, 与对照组的差异出现明显变化, 当酒精浓度为11%时, 植酸组的酵母产CO₂比对照多1.25g; 酒精浓度为13%时, 加入植酸的酵母产CO₂比对照多1.72g; 当酒精浓度为15%、17%时, 此差值增大到2.21、2.54g。由此可见, 添加植酸后, 酵母菌的耐酒精能力明显提高; 随着酒精浓度增加, 植酸组与对照组耐酒精能力差异加大。实验还发现, 植酸组酵母菌产CO₂起步早, 产量多, 说明植酸能增强酵母菌生长繁殖及代谢速度, 提高细胞生长及发酵能力。

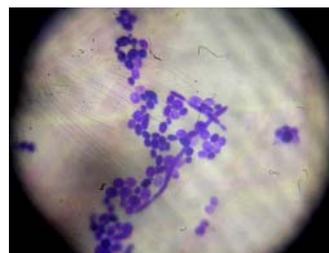
2.4.2 酵母菌在不同浓度酒精固体培养基中的生长情况

由表2、图6可知, 在YPG培养基中生长的所有酵母菌落都为圆形, 乳白色, 但空白组的菌落色泽较植酸组菌落外观光泽度稍好。各组表现出来的菌落大小有所不同。还可发现, 无论是植酸组还是对照组, 随着酒精浓度的增加, 菌落直径均趋向减小, 同一酒精浓度条件下, 植酸组酵母菌落直径较对照大。

随着酒精浓度的增加, 细胞形态逐渐出现变形, 由椭圆形、卵形逐渐变为腊肠形, 甚至有些细胞变得巨大, 特别是空白组的变形严重, 有些变得细长, 像



a. 不加酒精



b. 加酒精对照组



c. 加酒精植酸组

图6 酵母菌细胞形态

Fig.6 The cell shape of yeast

假菌丝(如图6-b)。其中, 同一酒精浓度条件下, 植酸组的酵母菌细胞变形较空白的小, 其细胞形态腊肠形较少, 有的细胞呈现出圆且大的形态(如图6-c)。

以上结果说明基质中酒精浓度提高直接影响了酵母菌细胞个体正常生长活动, 添加植酸组细胞形态异常变化较对照组小, 大大减轻了高浓度酒精对酵母生长及发酵的抑制作用, 从而提高了酵母的活力及发酵力。

植酸作为一种非离子型表面活性剂, 在发酵基质中能积累在酵母菌细胞膜表面, 改善氧的通透性及物质传递性, 从而加快菌体繁殖速度, 进而加快可发酵性糖

的代谢消耗及其产物的生成和分泌^[19]。在发酵时,植酸在酵母菌分泌的肌醇六磷酸-3-磷酸水解酶的作用下,被分解为肌醇和磷酸^[20,21],因而植酸分子在发酵液中残留很少。肌醇是一种生物激素,在微生物发酵中能激活微生物体系内的酶类,增加产物的生产量^[22]。同时肌醇磷酸酯可能对质膜蛋白质特别是ATP酶和质膜完整性起保护作用,以免受高浓度酒精的有害影响^[23],在一定程度上对酵母菌的耐酒精能力有所提高。而磷既是机体重要的结构成分,是磷脂和核酸的成分,组成多磷化合物及许多酶的活性基,又广泛地参与许多重要的生理、生化过程,发挥不可替代的代谢功能。微生物对磷的需要量很高,磷进入细胞后即迅速同化为有机磷化物,同时形成ATP、ADP等,用于调节微生物细胞生长及发酵过程的能量代谢^[7]。

因而在刺梨酒发酵中,加入一定量植酸,利于促进酵母的生长繁殖,缩短发酵周期,提高原料利用率,而且减少杂菌污染生长机会,同时植酸对酵母菌的耐酒精性能也有所提高。

3 结 论

刺梨营养丰富,其加工品符合现代食品营养、保健、绿色的需要,同时刺梨栽培与加工业的发展对生态环境的保护及农业农民的增产增收都具有重要意义。植酸是以玉米、米糠或小麦为原料制备的,具有独特的生理、药理及化学性质^[3],植酸的毒性极低,安全性高,小鼠口服半致死量(LD₅₀)为4192mg/kg,比食盐(LD₅₀为4000mg/kg)更安全^[2],因而美国等发达国家已将其列为新型添加剂广泛用于食品工业。作为发酵促进剂,经实验证明可应用于果酒酿造,提高菌体繁殖及发酵速度,提高酒度降低残糖,增加产物量及提高原料的利用率,是一种良好的果酒促发酵剂。

参考文献:

[1] 李好管. 植酸的生产及应用开发[J]. 上海化工, 2001, 26(20): 33-36.

- [2] 吴谋成, 袁俊华. 植酸的毒理学评价和食用安全性[J]. 食品科学, 1997, 18(2): 46-49.
- [3] 钟正升, 王运吉, 张苓. 天然食品添加剂—植酸的多功能性介绍[J]. 中国食品添加剂, 2003, (2): 74-77.
- [4] Selma H A Elyas, Abdullahi H E I Tinay, Nabila E, et al. Effect of natural fermentation on nutritive value and in vitro protein digestibility of pearl millet[J]. Food Chemistry, 2002, 78: 75-79.
- [5] 谢广发. 植酸提高米曲霉产糖化酶能力初探[J]. 酿酒科技, 1998, (1): 59.
- [6] 池振明, 高峻. 酵母耐酒精机制的研究进展[J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 373-376.
- [7] 夏艳秋, 等. 植酸对黄酒酵母607生长和发酵性能影响的研究[J]. 酿酒科技, 2004, (1): 28-30.
- [8] 方修贵, 李嗣彪, 郑益清. 刺梨的营养价值及其开发利用[J]. 食品科技, 2004, (1): 37-38.
- [9] 况光仪. 加强型刺梨酒的生产[J]. 酿酒科技, 2004, (3): 71-72.
- [10] 蔡金腾, 郭文升. 活性干酵母在不同刺梨原汁发酵液中的产酒度[J]. 贵州大学学报(农业与生物科学版), 2002, 21(1): 39-43.
- [11] 武世新. 刺梨酒生产工艺的探讨[J]. 食品工业, 1993, (4): 32-33.
- [12] 陈敏, 梁新乐, 励建荣. 葡萄酒活性干酵母复水活化条件的研究[J]. 江苏食品与发酵, 2001, (2): 6-9.
- [13] 陈陶声, 桂祖发. 葡萄酒、果酒与配制酒生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991, (1): 138.
- [14] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 81-82.
- [15] GB/T 15038-1994, 中华人民共和国国家标准: 葡萄酒、果酒通用试验方法[S].
- [16] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, (6): 221.
- [17] 吴金鹏. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992. 329.
- [18] GB/T 4789.15-2003, 中华人民共和国国家标准: 食品卫生微生物学检验霉菌与酵母计数[S].
- [19] Reddy N R, Sathe S K, Salunkhe D K. Phytase in legumes and cereals [J]. Advanced Food Research, 1982, 82: 91-95.
- [20] A L El-Batal, H Abdel Karem. Phytases production and phytic acid reduction in rapeseed meal by aspergillus niger during solid state fermentation[J]. Food Research International, 2001, 34: 715-720.
- [21] Larsson M, Sandberg A S. Phytate reduction in oats during malting[J]. Journal of Food Science, 1992, 57: 994-997.
- [22] 龚士选. 生物激素在凤型酒生产中的试验研究[J]. 酿酒, 1995, (1): 57-58.
- [23] 池振明, 高峻. 酵母菌耐酒精机制的研究进展[J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 373-37.

