

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

葡萄酒生產菌之篩選鑑定及發酵試驗

計畫類別：V 個別型計畫

☐ 整合型計畫

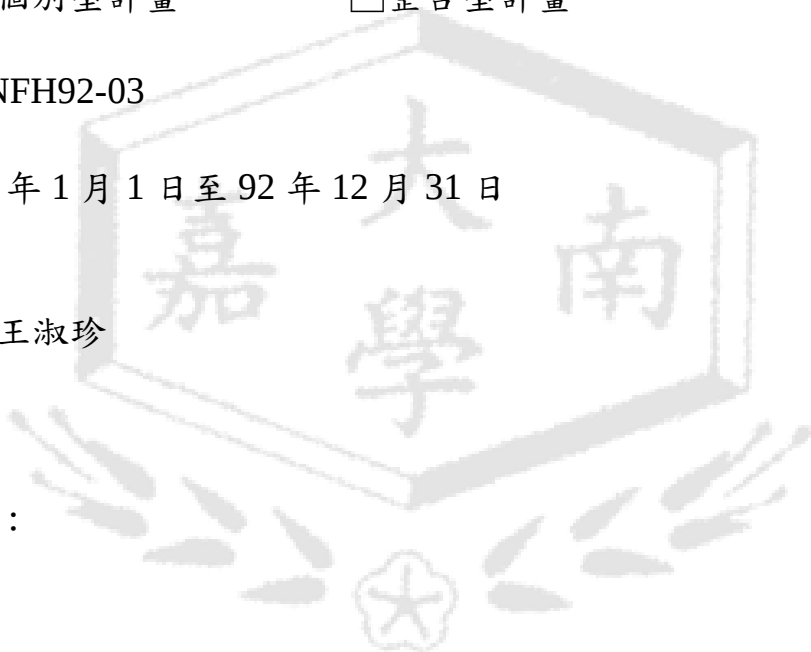
計畫編號：CNFH92-03

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：王淑珍

共同主持人：

計畫參與人員：



執行單位：食品科技系

中華民國 93 年 2 月 1 日

葡萄酒生產菌之篩選鑑定及發酵試驗

嘉南藥理科技大學 食品科技系

一、前言

葡萄酒含有豐富健康療效，適當飲用有極佳的健康療效。台灣進入 WTO 後，國內農產品面臨進口激烈競爭，因此如何有效利用農產品，提昇農業產品附加價值乃是值得國人大力研究的方向。水果酒以往是水果的附屬品，農民利用生產過剩的水果，釀成水果酒，讓水果得以進一步利用。葡萄酒具有清除血管壁上膽固醇的功效，並且含有單寧及含酚化合物，具有抗氧化的功效，可以防止冠狀動脈血管狹小。葡萄酒是優良鐵質的來源，可以防止鐵質不足所造成的貧血。葡萄酒中的維他命 B 群，可以治腳氣病，調整血糖含量，對皮膚、神經系統、眼睛也有良好的幫助，同時可以幫助消化，緩解壓力，促進新陳代謝，其中 B₁，thiamine，在紅葡萄酒中含量最多，可營養神經組織，B₆，Pyridoxie 有抗貧血功能。

葡萄酒之發酵，可以直接利用葡萄外皮之酵母，因葡萄果皮部分有酵母存在，在壓榨時，混入榨汁中，自然能生發酵，此種混入之酵母稱之為葡萄酒酵母（Wine yeast），其中酵母非常混雜；主要為 *Saccharomyces elliposideus* 及 *Saccharomyces apiculatus*，此種微生物來自土壤，蜜蜂蝴蝶有傳播之功，葡萄果汁含有葡萄糖及果糖，且含定量之酒石酸及他種酸，可防止大多數細菌之繁殖。酒精發酵菌主要屬於 *Saccharomyces* 屬之酵母，此屬菌種很多，性質各異：利用於葡萄釀造者，應選良種酵母；可耐高溫，耐亞硫酸強盛，發酵力旺盛，安全度高者，純粹培養之酵母概用 *S. elliposideus hauson* 是一種液面酵母，從葡萄果皮分離而得，但在皮膜中，成長的孢子呈球狀，其發育溫度自 0~41℃（最適發酵溫度為 22~30℃），發酵時溫度控制非常重要，據美國加州大學之 Hahl 氏之研究，以 75°F 時酵母產生酒精之作用最強。100°F 時則作用停止。一般水果酒酵母在 56°F 以下的溫度發酵作用極慢。近來由於優良酵母的純菌培養，利用亞硫酸控制野生酵母之介入，而使發酵作用精純，而使酒質安定。

目前台灣從事酒類發酵微生物的分離及研究並不多，我們希望針對葡萄酒生產菌之

優良菌種篩選、純菌培養鑑定及發酵試驗等做為我們研究之主題、希望獲得有高存活率、雜菌污染程度低及良好儲藏安定性之葡萄酒生產菌。本實驗研究的目的為篩選出葡萄酒發酵良好的菌株，包括酒精發效力、糖的利用率，作為評估的標準。將篩選出的菌株進行發酵試驗，測驗其菌株的發酵能力及品評其香氣、酒氣，並進行顯微鏡鏡檢，型態、大小、出芽方式，再進行 API ID32C 生理生化試驗以鑑定菌株。

二、實驗方法

1. 葡萄酒生產菌之分離

市售新鮮葡萄除梗、選別、洗淨、陰乾，用沾有無菌水的棉花棒擦拭葡萄果皮表面，將之劃在 PDA 培養基上（Potato Dextrose Agar），放入培養箱 30℃ 培養 24 ~ 48 小時。觀察長出似酵母菌之單一菌落再轉接培養到新鮮的 PDA 培養基。

將挑出之單一菌落進行初步之顯微鏡鏡檢鑑定工作（顯微鏡型號 OLYMPUS），觀察菌種大小、顏色、型態及出芽方式，將似酵母菌的菌株進行編號（PY1~PY93）

2. 葡萄酒生產菌初步發酵試驗

將 PDA 平板上單菌轉接種到新鮮 PDA 上進行菌種活化，培養 24~48 小時，視生長情形良好後，再轉接種至含有 20ml PDB 的振盪瓶中於 30℃ 進行過夜培養，做為葡萄酒發酵之菌液。

將葡萄原料前處理，包括除梗、選別、洗淨、風乾、壓破。葡萄酒初步發酵試驗；葡萄裝罐約 200g、加糖 1%、菌液 3ml，於室溫開始發酵培養，發酵期間，觀察紀錄發酵變化和香氣、菌體成長之情形，從葡萄酒初步發酵試驗中，選出 40 株品評較佳的葡萄酒酵母菌，評定發酵力、風味、香味、顏色，總評較好的菌株，進行第一次發酵試驗，並做一組不接菌的空白對照組。

從第一次發酵試驗 40 株菌中，經蒸餾後，品評香氣、酒氣，挑選出 9 株酒精發酵力強，香氣、風味優良的葡萄酒酵母菌，進行第二次發酵，並做一組不加葡萄只加糖液的實驗，測驗菌株對糖液的發酵能力。葡萄原料前處理，裝罐做第二次發酵，並做不接

菌的空白對照組與一組不加葡萄只加糖液的對照實驗，測驗菌株對糖液的發酵能力；最後自葡萄酒第二次發酵實驗的 9 株菌中，經蒸餾後，品評香氣、酒氣，挑選出 6 株酒精發酵力強，香氣、風味優良的葡萄酒酵母菌，進行第三次發酵，並做一組不加葡萄只加糖液的對照實驗及一組不開封的葡萄酒（使用封口膠阻絕空氣進入），測試實驗菌株對糖液的發酵代謝能力，以及開罐氣體是否會影響葡萄酒的酒精及糖度。

3.葡萄酒酵母菌型態觀察、鑑定

(1) 酵母菌型態觀察

將第二次發酵之類葡萄酒酵母菌以光學顯微鏡觀察型態。

(2) API 鑑定試驗：

活化酵母菌（表四）利用 biomerieux API ID32C 鑑定套組進行生理生化試驗。

1. 將 ID32C strip 上的鋁箔撕開放入盒中。
2. 將菌由 Medium 中挑入 2ml 無菌水中，混合均勻，調整濃度至 2 Mcfarland。
3. 打開 C Medium，由上述菌液中取 250 μ l 至 C Medium 中，混合均勻。
4. 以定量吸管再各試驗中加入 135 μ l 菌液。
5. 蓋上盒蓋，放入 30 $^{\circ}$ C 培養箱。培養 24 小時，即可進行判讀。

4.葡萄酒蒸餾

葡萄酒發酵 46 天後，以簡易型蒸餾器蒸餾保存，並測其糖度（Brix）、酒精濃度（%），以及品評香氣、酒氣。

5.嗜好性品評

品評樣品：發酵中的葡萄酒品評香氣、酒氣，觀察發酵情形。

品評室溫：約 25 $^{\circ}$ C。

評分標準：香氣酒氣以九分法為評分標準，開罐後聞其散發出來的香氣（葡萄果香）有刺激感者，則其具有揮發性成分（酒香）。發酵情形以四分法為評分標準視葡萄汁之冒泡情形、混濁度判斷。

品評人數：50 人

四、結果

（一）本實驗自 PDA 上分離出適合的似酵母菌株，以 400 倍光學顯微鏡鏡檢觀察酵母菌的形狀、大小及出芽方式，本實驗篩選似酵母菌菌株共 93 株。培養 84 株似酵母菌的菌

株，於室溫（約 20 $^{\circ}$ C）做初步發酵 35 天，進行香氣品評及觀察培養。從初步發酵 84 株菌中挑選出 40 株發酵力佳，香氣、酒氣、色澤佳的葡萄酒生產菌株（表一），進行第一次發酵試驗並做對照組，培養 46 天後，觀察品評發酵後蒸餾的結果，結果（表五）。最後挑選九株葡萄酒生產菌進行第二次發酵，比較第二次發酵蒸餾品評的結果如表二，得知加葡萄的實驗組糖度平均為 5.3 度，酒精濃度平均為 12.8%，而未加葡萄的糖度平均為 2.0 度，酒精濃度為 1%，因此葡萄酒酵母菌明顯利用葡萄做為發酵所需的營養，而且葡萄酒酵母菌無法僅靠糖液作為發酵的營養來源。

（二）自葡萄酒第二次發酵中選出六株葡萄酒生產菌做第三次發酵品評及蒸餾的結果，由數據判斷開罐的葡萄酒糖度平均為 5.9 度，酒精濃度平均為 11.3%，而未開罐的葡萄酒糖度平均為 5.4 度，酒精濃度平均為 10.5%，因此實驗得知空氣對葡萄酒酵母菌發酵糖度及酒精濃度的影響在本實驗並不顯著，見表三。

（三）似酵母菌株 PY3、PY10、PY13、PY19、PY22、PY39、PY81、PY88 及對照組

（*Saccharomces cerevisiae*），使用光學顯微鏡一千倍油鏡觀察其型態、大小及出芽並照相存檔（表六）。

（四）API ID32C 快速鑑定套組電腦資料庫判讀結果：

八株似酵母菌使用 API ID32C 快速鑑定套組進行生理生化試驗，經與酵母菌資料庫比對鑑定，其中 PY3、PY10、PY13、PY19 初步判斷與 *Trichosporon mucoides* 的相似度達 56.9%，另外 PY22 與 *Candida guilliermondii* 的相似度達 92.9%，而 PY24、PY39 與 *Cryptococcus humicolus* 之相似度達 99.2%，PY88 判定結果與其相似度太低，無法鑑定（表四）。

（五）葡萄酒發酵的總平均結果

本實驗進行三次發酵，篩選出六株酵母菌 PY10、PY19、PY22、PY39、PY81、PY88，比較三次蒸餾的酒精度，由平均數據得知 PY10 與 PY88 的酒精度達 12.5%，PY19 與 PY81 的酒精度達 12.3%，PY39 為 13.1%，最高者為 PY22 酒精度達 13.0%，蒸餾結果

酒精濃度不低於對照組酵母菌
(*Saccharomyces cerevisiae*) (表五)。

五、討論

本實驗分離葡萄果皮上的酵母菌，希望得到生產酒精發酵力高、沒有雜菌污染以及

品質良好的葡萄酒生產菌，分離出的其中兩株菌，分別是 PY22 與 PY39，在後續發酵中，以及蒸餾後的酒精濃度都高達 13.0% 以上，品評香氣與發酵能力結果也都較其他菌株為高。經 API ID32C 快速鑑定，得到 PY22 與 *Candida guilliermondii*，PY39 與 *Cryptococcus humicicola* 的相似度分別為 92.2% 與 99.2 %。

表一 所分離出 40 株品評較佳的似酵母菌

PY3	PY10	PY13	PY18	PY19	PY21	PY22	PY23
PY24	PY29	PY30	PY32	PY34	PY36	PY37	PY38
PY39	PY40	PY41	PY42	PY43	PY45	PY49	PY53
PY55	PY56	PY58	PY61	PY63	PY64	PY65	PY66
PY67	PY73	PY75	PY77	PY80	PY81	PY88	PY89

表二 經第二次發酵，添加葡萄與無添加葡萄之發酵結果

葡萄	糖 (Birx)	酒精 (%)	無葡萄	糖 (Birx)	酒精 (%)
PY3	2.4	12.0	PY3	0	1.0
PY10	3.0	12.5	PY10	0	2.0
PY19	2.6	13.0	PY19	0	2.0
PY22	2.4	14.0	PY22	0	0
PY24	2.6	11.5	PY24	0	0
PY39	2.2	13.5	PY39	0	1.0
PY77	2.6	12.0	PY77	0	0
PY81	2.8	13.0	PY81	0	0.5
PY88	2.0	11.5	PY88	0	2.0
(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	2.4	9.0	(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	0	1.0
對照(不加菌)	1.6	10.0	對照(不加菌)	0	0

表三 經第三次發酵，添加葡萄與添加葡萄封口膠封住瓶口之發酵結果

葡萄	糖 (Birx)	酒精度 (%)	未開封	糖 (Birx)	酒精度 (%)
PY10	3.8	13.0	PY10	3.0	9.0
PY19	3.4	12.0	PY19	2.8	9.0
PY22	3.4	11.0	PY22	2.8	9.0
PY39	2.2	(7.0)	PY39	3.6	14.5
PY81	3.2	11.0	PY81	3.2	10.0
PY88	4.0	14.0	PY88	3.2	12.0
(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	2.4	8.5	(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	3.8	12.0

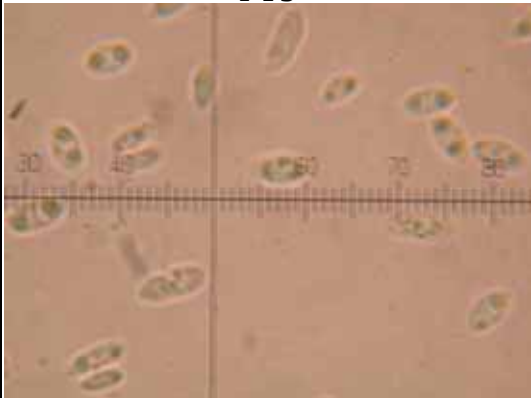
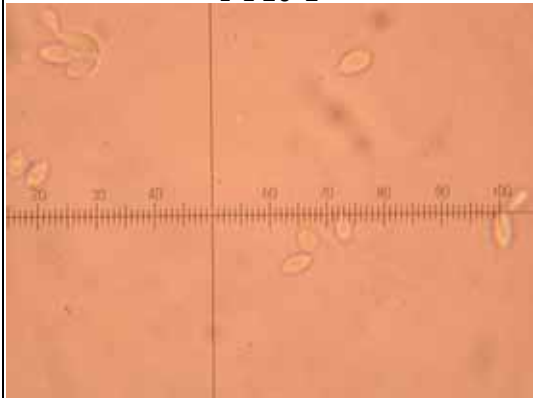
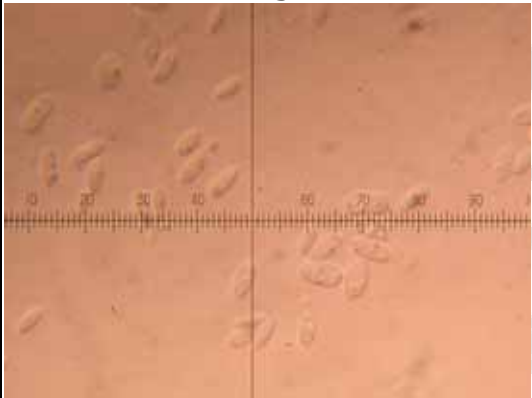
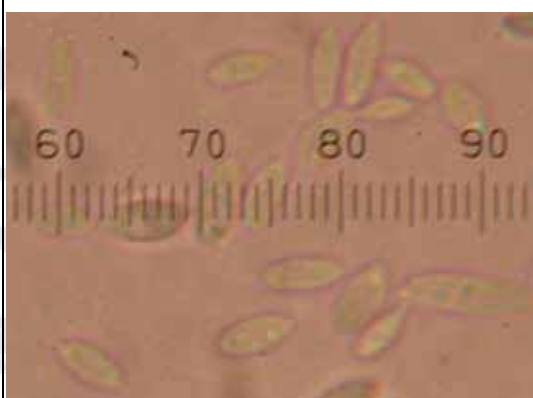
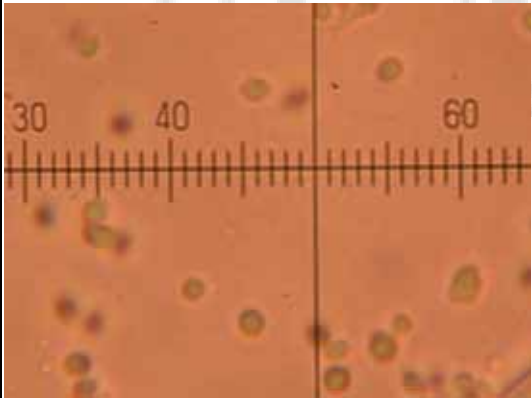
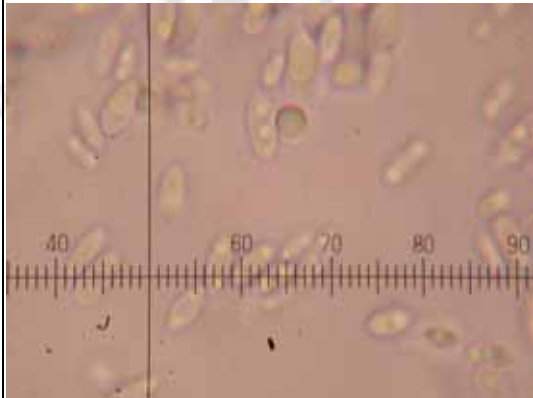
表四 API ID32C 菌種鑑定結果

菌名	判定結果（48 小時）	相似度
PY3	<i>Trichosporon mucooides</i>	56.9%
PY10	<i>Trichosporon mucooides</i>	56.9%
PY13	<i>Trichosporon mucooides</i>	56.9%
PY19	<i>Trichosporon mucooides</i>	56.9%
PY22	<i>Candida guilliermondii</i>	92.2%
PY24	<i>Cryptococcus humicolus</i>	99.9%
PY39	<i>Cryptococcus humicolus</i>	99.2%
PY88	（不能接受的結果）	

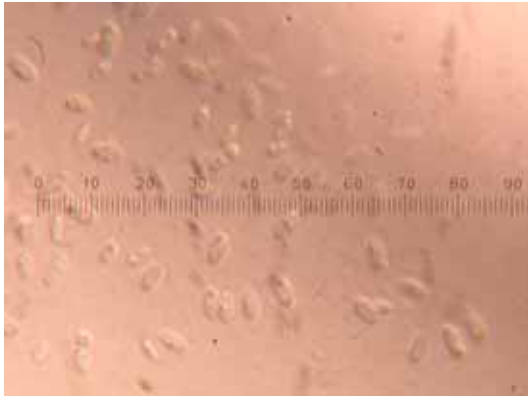
表五 六株分離出之似酵母菌之發酵結果

菌種	第一次發酵 酒精度（%）	第二次發酵 酒精度（%）	第三次發酵 酒精度（%）	平均酒精度 （%）
PY10	12	12.5	13	12.5
PY19	12	13	12	12.3
PY22	14	14	11	13
PY39	12	13.5	14.5	13.1
PY81	13	13	11	12.3
PY88	12	11.5	14	12.5
（ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ）	8.75	9	8.5	8.8
對照(不加菌)	8.3	10.25	11	9.9

表六 光學顯微鏡鏡檢結果

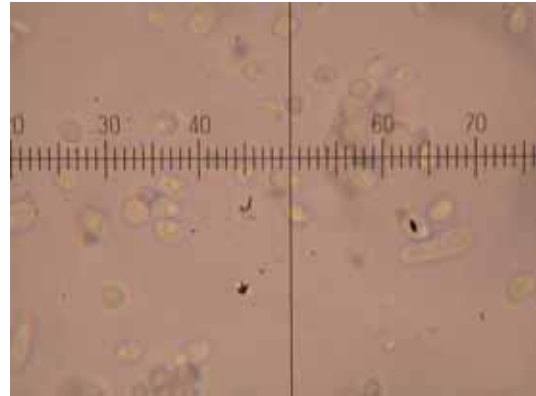
PY3  1000X	PY10-1  1000X
PY13-1  1000X	PY19-1  1000x
PY22-1  1000x	PY24-1  1000x

PY39-1



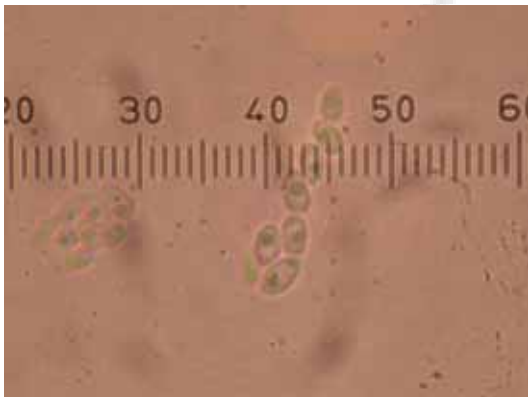
1000x

PY81-1



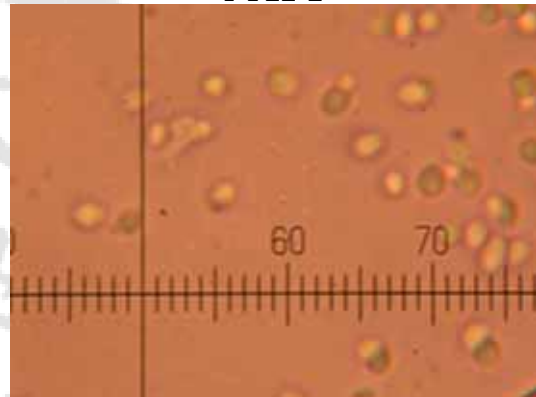
1000x

PY88-1



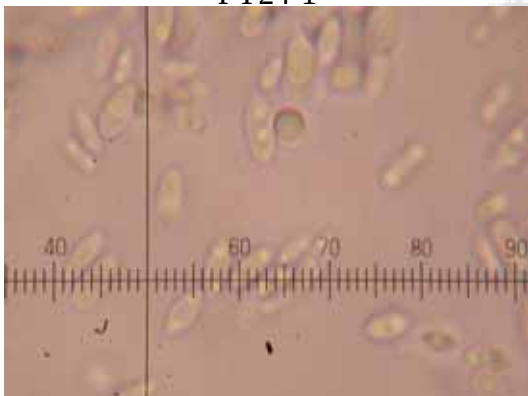
1000x

PY22-2



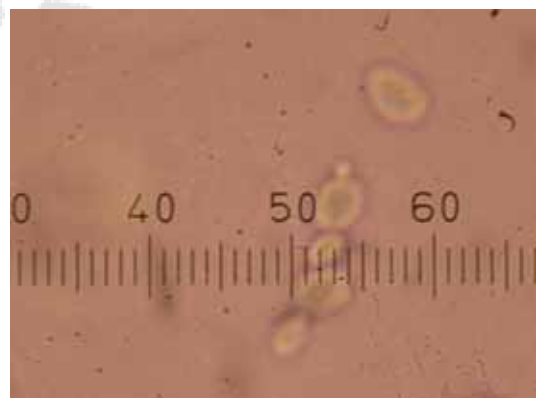
1000x

PY24-1



1000x

Saccharomyces cerevisiae



1000x