

市售釀造米酒用菌粉中酵母菌相之調查與發酵能力評估¹

洪爭坊²、洪梅珠²

摘 要

本研究為探討市售菌粉中酵母菌相對菌粉釀酒品質的影響，分離純化六種市售釀造米酒用菌粉包所含之微生物相，結果各菌粉中除麴菌外至少均可分離出兩種以上的微生物。將各菌粉中族群佔優勢的酵母菌株分離純化並進行ITS區間序列比對及RFLP分析後，各市售菌粉包中的酵母菌均鑑定為*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen。利用上述市售菌粉進行米酒發酵，結果以菌粉E釀造的發酵液pH值(3.42)及酒精度(11.19%)均最低，但殘糖度(6.33%)最高。另以小量發酵方式評估各菌粉中優勢酵母菌單獨生產酒精的能力，結果於第15天時，F1菌株產生酒精能力最強，而C1菌株產生酒精能力最差。

關鍵字：米酒、菌粉包、酵母菌。

前 言

米酒是我國的民生必需品之一，舉凡烹飪調味、產婦坐月子、冬令進補與浸泡藥酒等都不可或缺。伴隨臺灣加入世界貿易組織後，政府開放民間經營釀酒事業，許多農村酒莊紛紛成立，不但有效調節農產品的流量，更能促進農業精緻化，提昇我國農業競爭力。然而相較於國外釀造發酵產業走向大型化，並嚴格控管製造流程的競爭壓力下，若無法有效評估釀酒用菌粉原料的良窳，進而選用較佳的菌粉作為發酵材料，也將影響業者製酒的成本與品質。此外，一般民眾若想以菌粉包自行釀造米酒，也常會因菌粉包產品品質的參差不齊，而無法獲得品質穩定的米酒產品。

在米酒釀造的過程中，米粒的澱粉經由麴菌的澱粉酶分解為葡萄糖後，酵母菌再將葡萄糖轉化為酒精。因此，釀造用菌粉中的微生物相在釀酒過程中，不但會影響米酒產品的品質，亦是發酵成敗的重要關鍵之一。倪氏⁽³⁾曾指出，在製造白酒、燒酒、威士忌等蒸餾酒類的發酵工程中，佔主要角色的*Saccharomyces*屬酵母菌，是決定酒類品質與類型的重要因素⁽³⁾。據此，本研究初步調查六種市售釀造米酒用菌粉中主要的微生物相，除比對各菌粉中優勢酵母菌種的核糖體內轉錄間隔區(Internal transcribed spacer, ITS)序列，並配合限制酵素長度多型性分析(Restriction fragment length polymorphism; RFLP)技術進行酵母菌鑑定外，亦直接使用市

¹ 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0664 號。

² 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員、研究員兼秘書。

售菌粉進行米酒發酵，配合各菌粉中優勢菌種的小量發酵數據，作為評估菌粉品質優劣的參考依據之一。

材料與方法

一、市售菌粉包微生物相調查

取市售之釀造米酒用菌粉A、B、C、D、E及F各1 g，分別加入9 ml無菌水中，製成懸浮液後分別序列稀釋 10^6 與 10^7 倍，並各取100 μ l塗抹於YEPD平板培養基(yeast extract 5 g, peptone 10 g, glucose 20 g, agar 20 g, D. W. 1 L)上，於室溫中培養48 hr後，觀察記錄各菌粉包中分離獲得的微生物相，並挑取分離比率較高的微生物進行分生鑑定與小量發酵試驗。

二、利用分子生物學方法進行微生物鑑定

1.核糖體內轉錄區間(Internal transcribed spacer, ITS)之PCR增幅與定序：

將各菌粉包中分離比率較高的微生物純化後，以White氏等(1990)所發表的ITS1、ITS4作為引子⁽⁸⁾，進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，增幅其ITS區間。PCR反應條件如下：95°C 10 min；95°C 1 min，52°C 2 min，72°C 2min，上述三個步驟進行35個循環；72°C 10 min後，4°C ∞ 。PCR產物以1.4% agarose gel進行電泳分析後，利用Viogene DNA/RNA extraction Kit回收DNA後解序，並將定序結果上網至NCBI網站進行DNA序列比對。

2.ITS區間之限制酵素長度多型性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)：

取10 μ l不同酵母菌之ITS區間PCR增幅產物，加入7.3 μ l無菌去離子水，10 $\times$ Restriction buffer 2 μ l、acetylated BSA 0.2 μ l，最後分別加入Hae III與Hinf I限制酶(Promega, USA) 0.5 μ l，使各反應液的總體積為20 μ l後，於37°C水浴槽反應4小時，並以2% agarose gel進行電泳分析後，根據Esteve-Zarzoso氏等(1999)的試驗結果進行酵母菌鑑定⁽⁷⁾。

三、不同市售菌粉包之米酒釀造試驗

取1 kg白米加入1.35倍的一次蒸餾水蒸煮，待溫度降至約35°C後，分別加入10 g的A、B、C、D、E及F等六種市售菌粉，於室溫(23 $\pm$ 2°C)下進行發酵，並於發酵第3天加入2.5 l一次蒸餾水。發酵期間分別於第3、6、9、12及15天取樣一次，每次取樣50 ml發酵液，分別記錄其糖度、pH值與酒精度之變化。

四、不同微生物之小量發酵測試

分別取A1、B1、C1、D1、E1及F1菌株，調整各酵母菌濃度，使其接種於100 ml發酵營養液(0.3 % yeast extract, 15 % glucose, distilled water 1 L)後，濃度為 10^4 cells/ml。接種後每3天取樣一次，至第15天為止。各發酵樣品經0.22 μ m過濾膜過濾後，以高效液相色層分析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)進行酒精含量分析，樣品注射量為20 μ l，並以5 mM硫酸為移動相，流速0.6 ml/min通過Aminex HPX-87H分離管柱(Biorad, USA)，管柱溫度為室溫，再以Bischoff RI Detector進行偵測30分鐘。

結 果

一、不同的菌粉包中分離出的微生物

本研究調查市售釀造米酒用菌粉包中微生物濃度與微生物相。其中，各菌粉中除麴菌外，至少均含有兩種以上的微生物(表一)，唯各菌粉中微生物的濃度及其佔菌粉中的比例不同。在6種菌粉中，菌粉A、B及C分離獲得的*Sacharomyces*-like酵母菌均佔總微生物相的96%以上，而菌粉D、E及F中，*Sacharomyces*-like的酵母菌則少於60% (表一)。

表一、不同菌粉中微生物種類與酵母菌所佔比例

Table 1. The number of microbial species and percentage of *Saccharomyces*-like yeast isolated from different brewing powders

Brewing powder	No. of microbial species ¹	Population of microbes ² (*10 ⁷ cfu/ml)	Percentage of <i>Saccharomyces</i> -like yeast (%)
A	2	1087.3±69.3	99.9
B	2	227.0±15.7	96.0
C	3	325.3±152.1	99.3
D	5	16.0±0.0	58.3
E	4	25.3±3.2	38.2
F	2	6.0±3.5	50.0

¹ Microbial species isolated from different brewing powders after serial diluted to 10⁻⁷ except filamentous fungi.

² Total colonies of different microbes isolated from the brewing powders.

二、利用分子生物學方法進行微生物鑑定

1. 利用PCR增幅酵母菌ITS區間

各菌粉中分離比率與濃度較高之菌株，包括A1、B1、C1、D1、E1及F1等，均為*Sacharomyces*-like酵母菌。以ITS1與ITS4引子對增幅各酵母菌的ITS區間，並以1.4%膠體電泳分析後，A1、B1、C1、D1、E1及F1菌株ITS區間的PCR產物大小都約為850 bp(圖一)。

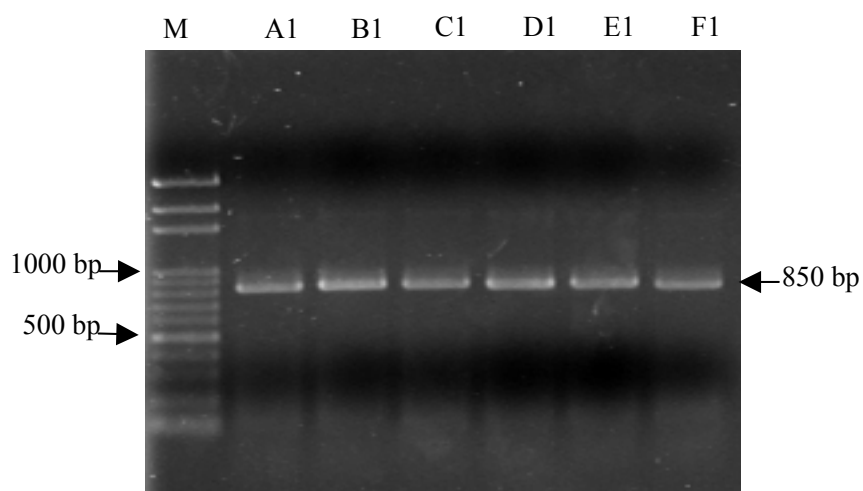
2. 各菌株之RFLP分析

取各菌株ITS區間之PCR增幅產物，分別以Hinf I及Hae III限制酵素進行RFLP分析，結果以Hinf I限制酶作用後，A1、B1、C1、D1、E1及F1菌株均可切出長度約365及155 bp的條帶；另以Hae III限制酶作用後，A1、B1、C1、D1、E1及F1菌株可獲得大小分別約為320、220、180及150 bp的條帶(圖二)。

3. 各菌株之部分DNA序列比對結果

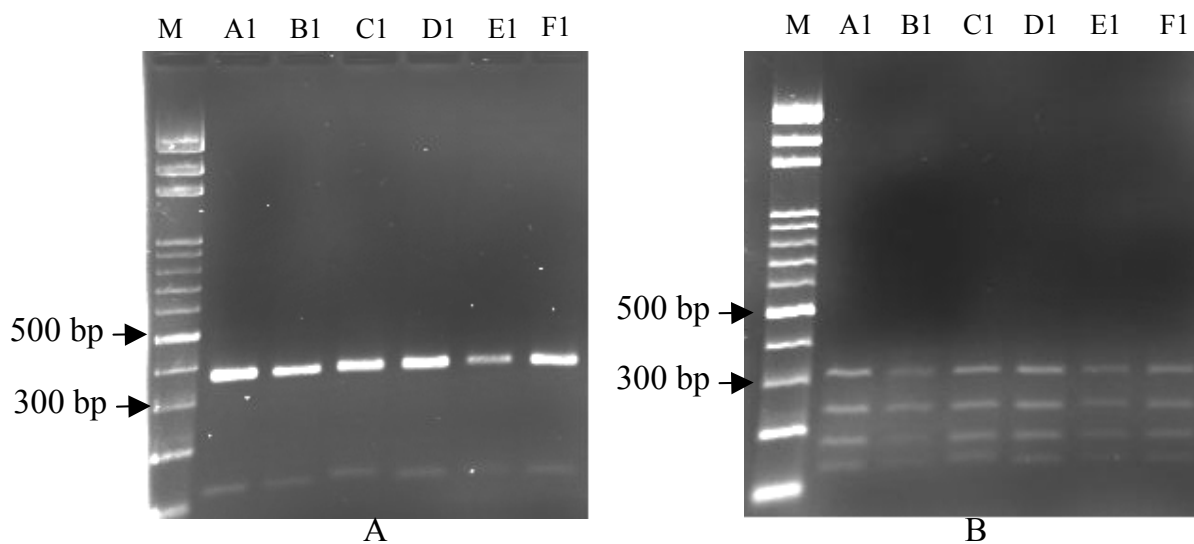
將各菌株的部份DNA序列解序後，上網與NCBI資料庫比對，結果A1菌株為*Saccharomyces cerevisiae* (Accession No. EF457565.1、EF457564.1、EF457563.1)；B1菌株為*S. cerevisiae* (Accession No. EF457565.1、EF457564.1、EF457563.1)；C1菌株為*S. cerevisiae* (Accession No. AB280541.1、AB279758.1、AB279756.1)；D1菌株為*S. cerevisiae* (Accession No. AY525600.1、Z73326.1、U53879.1)；E1菌株則為*S. cerevisiae* (Accession No.

D89886.1、AY939814.1、AY525600.1)；F1 菌株為 *S. cerevisiae* (Accession No. AB280538.1、AB279744.1、AB279743.1)。



圖一、由不同菌粉包中分離獲得之主要菌株的 ITS 區間 PCR 增幅結果。

Fig. 1. PCR amplification of ITS region of predominant microbes isolated from different commercial brewing powders.

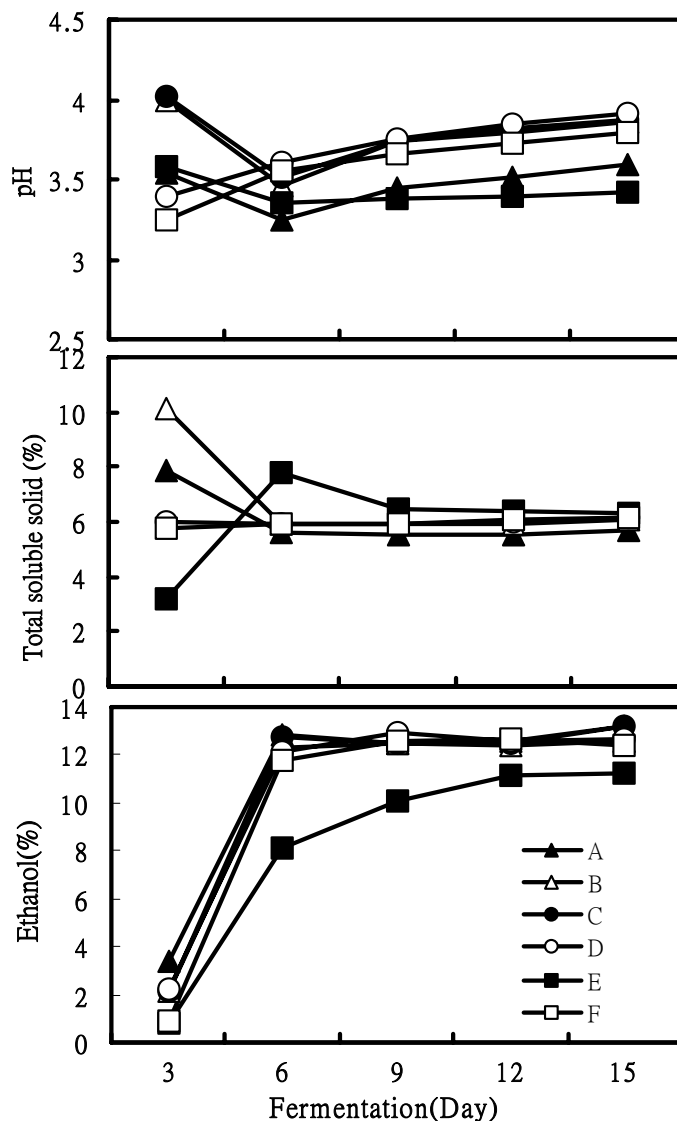


圖二、由不同菌粉包中分離獲得之主要菌株的 ITS 區間限制酵素長度多型性分析結果。(A) Hinf I; (B) Hae III。

Fig. 2. RFLP analyses of ITS region of predominant microbes isolated from different commercial brewing powders (A) Hinf I; (B) Hae III.

三、不同市售菌粉包釀製米酒結果

不同菌粉包釀造米酒時，酒醪pH值、糖度與酒精度變化如圖三。使用不同菌粉進行米酒釀造，於第15天時，各發酵液pH值均介於3-4之間。其中，菌粉E釀造獲得之米酒發酵液pH最低，僅3.42。此外，以菌粉A進行發酵的米酒發酵液殘糖為5.7%，而以菌粉E進行發酵的米酒發酵液殘糖則達6.33%。在酒精度方面，使用菌粉A釀造的發酵液酒精度可達13.22%，使用菌粉E釀造獲得的發酵液酒精度僅11.19%。其餘菌粉釀造獲得的發酵液酒精度均可達12%以上。

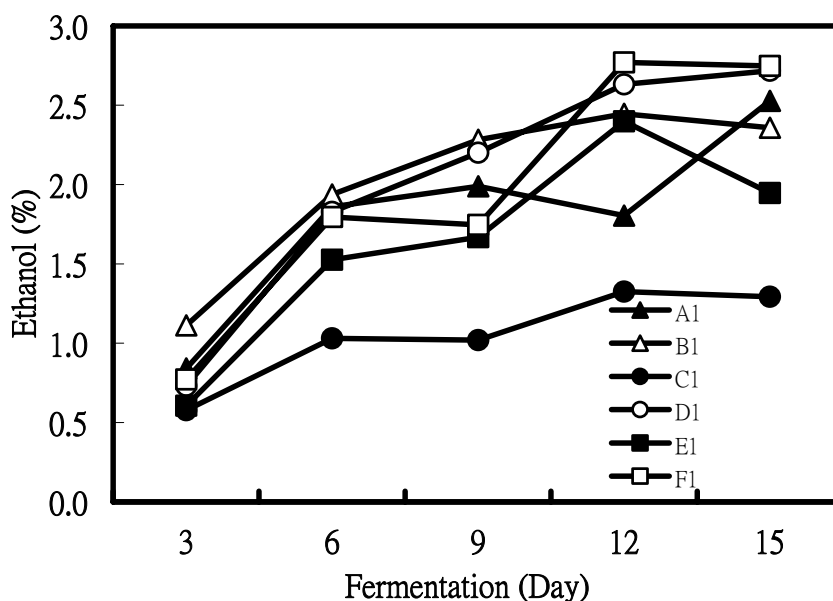


圖三、利用不同菌粉包進行米酒發酵時酒醪糖度、pH 與酒精含量變化。(A)菌粉 A；(B)菌粉 B；(C)菌粉 C；(D)菌粉 D；(E)菌粉 E；(F)菌粉 F。

Fig. 3. Effect of different brewing powders on the composition of total soluble solid, pH value and ethanol production during rice wine fermentation (A) brewing powder A, (B) brewing powder B, (C) brewing powder C, (D) brewing powder D, (E) brewing powder E, (F) brewing powder F.

四、小量發酵測試

將各酵母菌株接種於100 ml發酵營養液中，每3天取樣一次，至第15天為止，並將各發酵樣品以高效液相色層分析儀進行酒精含量分析。小量發酵結果顯示A1、B1、D1及F1菌株在第15天的酒精濃度均可超過2%。然C1及E1菌株在發酵第15天時，酒精度僅達1.29 %及1.95% (圖四)。



圖四、不同微生物進行小量發酵試驗之酒精度變化。

Fig. 4. Ethanol production capability of microbes isolated from different brewing powders.

討 論

本研究比較六種市售釀造米酒用菌粉中，除麴菌外的微生物相。各菌粉中分離純化獲得之優勢微生物，經比對其ITS區間的DNA序列，並配合RFLP方法鑑定，結果各菌株均鑑定為 *S. cerevisiae*。然而，各菌粉中除麴菌及佔優勢的酵母菌外，亦可分離出其他微生物。由於發酵過程中，*Saccharomyces*屬酵母菌為生產酒精的主要微生物之一，而市售菌粉D、E及F中，稀釋 10^7 後*Saccharomyces*屬酵母菌的比例均低於60%，菌粉E中的酵母菌雖為優勢菌種，但僅佔菌粉中具有活性之微生物總量的38.2%。薛氏(1992)曾指出，酒母中弱活性酵母易使酒精收得率低，殘澱粉高⁽⁵⁾。進一步利用前述六種不同菌粉進行米酒釀造試驗，結果顯示使用菌粉E釀製獲得的米酒發酵液在pH值與酒精度方面均為最低，而殘糖則為最高，此點與薛氏的結論相符。以純化後的酵母菌進行小量發酵結果，顯示F1菌株產生酒精能力最強，而C1菌株產生酒精能力最差。此外，於發酵過程中，筆者發現使用不同菌粉包進行發酵的發酵液除酒精產量的差異外，各米酒發酵液的香氣表現亦不相同(未發表資料)。其中，使用菌粉E進行米酒發

酵第6天以後，可聞到明顯酸敗味，且該菌粉釀造獲得的米酒發酵液酒精濃度較低。由此亦可證實菌粉中的活性酵母菌數量及菌種的差異，是主導米酒品質的關鍵之一。

此外，從不同菌粉製作米酒、各酵母菌之小量發酵試驗，以及各菌粉中酵母菌所佔比例的結果，我們可以看出利用不同菌粉發酵所獲得的發酵液中，酒精產量結果為菌粉A>菌粉C>菌粉D>菌粉B>菌粉F>菌粉E，而各菌粉中可分離獲得具活性酵母菌的比例為菌粉A>菌粉C>菌粉B>菌粉D>菌粉F>菌粉E，其中，僅菌粉B和D的排序不同。而在小量發酵的結果中，各酵母菌單獨產生酒精的能力為F1菌株>D1菌株>A1菌株>B1菌株>C1菌株>E1菌株。其中，菌粉E可分離獲得的活性酵母比例最低，且E1菌株在小量發酵時酒精產量亦最低，由此使用該菌粉進行米酒發酵時的表現也最差。此外，菌粉B雖然酵母菌比例高於菌粉D，但在小量發酵試驗中，D1菌株的酒精產量卻高於B1菌株，由此應可解釋為何使用菌粉D製作的米酒發酵液中酒精產量高於使用菌粉B的米酒發酵液。而A1菌株產生酒精能力雖亞於D1及F1菌株，但在菌粉A中，A1菌株的族群數量遠高於D1及F1菌株在菌粉D及菌粉F中的含量，可能也因此造成利用菌粉A釀製的米酒酒精度較高。然而本研究中，僅針對酵母菌族群及其活性對米酒成品的影響作初步的探討，唯其他微生物有無參與產生酒精或抑制酵母菌產生酒精，仍需進一步研究探討。

綜上所述，我們可初步歸納出市售釀造米酒用菌粉的品質，可依據其中活性酵母菌的濃度、酵母菌種的良窳、以及是否受其他微生物污染進行初步的判斷。此外，由於本試驗所購得的菌粉為目前市面上流通的產品，因此除了上述原因之外，亦可能因為不同菌粉的儲存方法不同，或因保存時間過長而導致雜菌數量上升，而造成發酵品質及產生酒精的能力不如預期。筆者在先前試驗中發現，同處製造購得的菌粉隨儲存時間的增長，菌粉中的*Saccharomyces*屬酵母菌數量隨之降低，且雜菌數亦隨之增加(未發表資料)。是故若能針對釀造用菌種進行篩選、菌粉製造流程與保存方法嚴加管控，將能有效降低雜菌污染，同時提高菌粉產品的釀酒品質與效率。

謝 辭

本研究承農委會96年科技計畫(96農科-1.1.1-中-D1)補助研究經費，與黃麗娟小姐協助試驗進行，特致謝忱。

參考文獻

1. 林讚峰 1994 酵母菌對酒類香氣生成之貢獻 製酒科技專論彙編 16:1-24。
2. 林讚峰 1994 米類釀造酒發酵工程管理技術的新發展 製酒科技專論彙編 16:181-208。
3. 倪德全 1992 酒類酵母的菌種改良 製酒科技專論彙編 14:209-216。
4. 楊美桂 2004 普通微生物學實驗 p.36-40 藝軒圖書出版社 臺北，臺灣。
5. 鄔美雲 2004 應用分子技術於葡萄酵母菌之鑑定與分型 國立中興大學碩士論文 臺中，臺灣 96 pp。

6. 薛添福 1992 從釀酒過程談米類釀造酒的熟成 製酒科技專論彙編 14:71-78。
7. Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu and A. Querol. 1999. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 49:329-337.
8. White, T. J., S. L. Bruns and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. In: N. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London.

Investigation on Yeast Population and Evaluation of Fermentation Capability of Six Commercial Rice Wine Brewing Powders ¹

Cheng-Fang Hong ² and Mei-Chu Hong ²

ABSTRACT

Population and species of microbes were investigated in six commercial rice wine brewing powders. Six dominant microbes, A1, B1, C1, D1, E1, and F1, were obtained from each brewing powder and identified. According to the DNA sequences of internal transcribed spacer and RFLP analyses, all the six microbes were identified as *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen. In order to assess the quality of brewing powders, pH value, total soluble solid, and ethanol production during rice wine fermentation were surveyed. After 15 days, the rice wine fermented with brewing powder E has the lowest pH value (3.42), ethanol production (11.19%), and the highest amount of total soluble solid (6.33%). In the micro-fermentation test of each *S. cerevisiae* strain obtained from different brewing powder, F1 strain has the highest ethanol production while C1 strain has the lowest ethanol production by the 15th day.

Key words: rice wine, brewing powder, yeast.

¹ Contribution No. 0664 from Taichung DARES, COA.

² Assistant Researcher, Researcher and Secretary of Taichung DARES, COA.