

釀酒用酵母菌的篩選 與基本釀酒特性分析

一、前言

酒類釀製是微生物複雜的作用過程，其中酵母菌扮演極重要的角色，傳統葡萄酒製作為藉由葡萄表皮上附著的酵母菌進行發酵，將葡萄酒醪中的糖類轉化成酒精，通常葡萄酒醪於發酵後 3-4 天，隨 *S. cerevisiae* 本菌種進行發酵使酒精產生增加可抑制其他野生菌種，此類酵母菌因酒精耐性較高，為酒醪發酵後期主要的菌類。不同種的釀酒用酵母菌由於生理生化特性不同，以相同原料進行釀製後之葡萄酒產品風味亦會產生差異，因此由自然界廣泛篩選天然酵母菌以生產具有獨特風味特性的葡萄酒或發酵製品已成為食品界生產差異化產品的手段之一。台灣的酒類產品過去為專賣制度，葡萄酒僅由菸酒公賣局製造或引進販售，同時葡萄此作物亦為引進栽培，因此不論在釀酒葡萄品種、釀酒用酵母菌種類與釀製技術等各方面，台灣農民自產葡萄酒都難以與世界各重要葡萄酒生產區產品相比較。要產出具有台

灣特色的葡萄酒須由上述育種、菌種或技術上改進，因此本場由葡萄酒醪中篩選純化釀酒菌種，以作為酒類釀造可供之選擇。

要分離釀酒菌種首先需進行釀酒酵母菌之純化與鑑定，傳統上酵母菌鑑定是依據型態及生理特性，不同的培養條件易導致不確定性的結果，通常需有 50-100 次的測試鑑定，才可達到種的鑑定層次。目前分子生物技術則成為重要的鑑定工具，其中 PCR 增幅微生物的特定序列為一普遍的技術，具有容易操作及高生產性，而在可供鑑定分析的基因



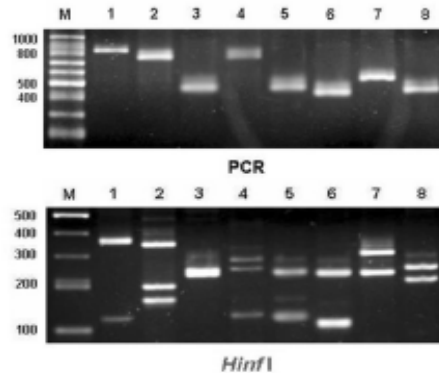
▲ 本場栽培之貝利 A 葡萄，其表皮上附有完整果粉以及天然酵母菌。

序列中，核糖體基因內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 區域為常用的區域，其在研究基因的多樣性及種類鑑定上具有重要的價值。利用 PCR 方法增幅酵母菌 ITS 區域，可鑑識出屬間有差異性，種間及菌系間則具有相同或相似分子大小，若以限制酵素如 *HinfI*、*CfoI*、*HaeIII* 進行分析，可進一步獲得種間專一性限制圖譜，同時酵母菌有性世代和無性世代具有相同的限制圖譜，可有效鑑別出不同的酵母菌種類。

本研究室以栽培於本場之貝利 A 葡萄發醇酒膠為來源進行酵母菌之分離與純化，在發醇後期由於酒精濃度提高，殘存於酒膠中之酵母菌推測應屬生產酒精之菌種 *Saccharomyces cerevisiae*，在



▲ 於發醇初期的酒膠中可以篩選出不同種的酵母菌。



▲ 不同的酵母菌種外觀接近，但是經由 DNA 分析之後可區分出八種酵母菌。

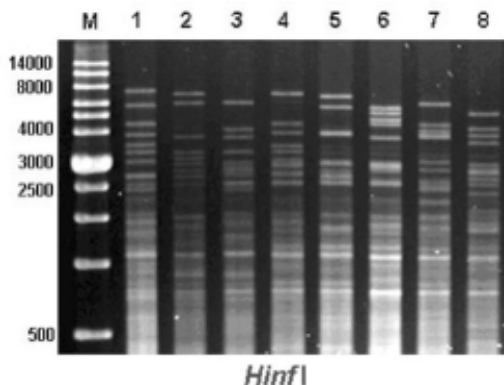
分離純化後並再培養用於葡萄酒之誘導發醇以了解其釀造之基本特性，作為進一步利用之參考，誘導發醇試驗之對照菌種使用 Lalvin 2226 (*Lalvin L2226*, Lallemand inc., Montreal, Canada)。

二、葡萄酒自然發醇與菌株分離

上述採收於本場之貝利 A 葡萄以破碎去梗機進行破碎除梗後，添加液態果膠分解酵素 0.07 g/kg (*RapidaseTM Vino Super*, RVS, 泛球)，調整汁液糖度至 25° Brix，總酸為 0.8 % 以下，另添加偏亞硫酸鉀 (*Potassium Metabisulfite*, KMS) 使酒膠中保持 50 ppm 二氧化硫開始發醇。葡萄酒自然發醇之處理於七天後進行殘存菌種之分離純化，取酒膠 1 ml 以無菌水序列稀釋後，再由稀釋液取



100 μ l 塗抹於 LB 平板培養基上，待菌落長出後再次純化並選殖其核糖體基因



▲ 同為釀酒用酵母菌仍有不同菌系的區別，可以由粒線體基因的差異區別。

內轉錄間隔區 (ITS)。

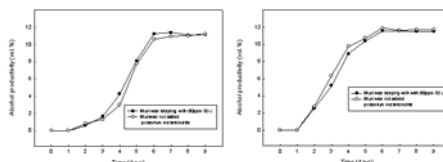
葡萄酒誘導發酵處理為將貝利 A 葡萄破碎去梗後分為 16 公升，四重複，酒膠置於 20°C 含皮發酵，添加先前試驗所純化之菌種或商業酵母菌 (Lalvin L2226) 以供對照。於第七天進行壓榨去皮，分裝於玻璃桶中，玻璃桶瓶口並裝設發酵栓。不同發酵試驗處理之酒膠於不同時間取酒液離心，測定還原糖濃度及酒精度。

菌株分離方法為將取樣之發酵酒膠以無菌水序列稀釋後，各取 100 μ l 塗抹於含有 100 ppm 鏈黴素 (streptomycin sulfate, sigma) 之 YMA (0.3 % yeast

extract, 0.3 % malt extract, 0.5 % peptone, 2 % agar, sigma) 平板上，3 日後計數菌落數，每一處理分離 50 個菌落培養於 YEPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose, 2 % agar, sigma) 培養基，使用合成引子進行酵母菌 ITS PCR 增幅反應。進行 ITS 限制酵素片段多形性分析時取 7 μ l 的 PCR 產物，加入 1 μ l 緩衝液及 5 單位限制酵素和 1 μ l 二次蒸餾水，在 37°C 下反應 3 小時，反應產品以 3 % 瓊脂膠電泳分離。確認為釀酒用酵母菌後即進行純化培養，如此可獲得需要的菌種。

三、篩選純化釀酒菌種之特性

本場利用前述技術所分離純化的酵母菌在發酵初期初步鑑定有八株，但其中僅一菌系屬於釀酒用的酵母菌，但在發酵末期僅有該釀酒用的酵母菌可以殘存。此菌株已被純化以作進一步鑑定及



▲ 貝利 A 葡萄於發酵過程中酒精度生成之變化：(左)自然發酵(右)誘導發酵。

釀酒特性的鑑定。

由於葡萄表面具有各種不同的微生物，以自然發酵常導致每一批葡萄酒品質不穩定，因此商業釀酒一般均會接種大量優勢酵母菌以確保不同批次的產品均可達到品質一致。因此我們也比較了本純化菌種與商業菌種在發酵釀酒特性的差異，以了解本菌種作為商業釀造菌種的潛力。

試驗結果顯示不論是添加商業酵母菌或是本菌種誘導發酵之處理，其酒醪於第六日完成酒精發酵作用，還原糖量降至 5-6.35 g/L，酒精度達 11.55-11.9 vol. %。相對的，不添加商業酵母菌以自然發酵處理之酒醪於第八日完成酒精發酵作用，還原糖量降至 3.4-5.5 g/L，酒精度達 11-11.1 vol. %。由還原糖量降低及酒精生成結果顯示誘導發酵之酒醪可提前二日完成發酵作用，商業酵母菌添加處理可縮短酒精發酵時間，酒醪中添加偏亞硫酸鉀之處理於還原糖降低及酒精生成上無顯著的差異。在製酒風味的比較上，我們發現用本菌種可有產生較濃郁的果香，但商業菌種 L2226 則香氣明顯較淡

四、結語

酵母菌(*S. cerevisiae*) 於葡萄酒釀造中扮演重要角色，傳統酒莊通常使用篩選過之固定菌種來維持其產品獨特且穩定之風味，隨發酵技術的進步，目前普遍採用添加活性乾酵母菌進行酒類誘導發酵，以大量接種優勢酵母菌種 *Saccharomyces cerevisiae*，確保發酵過程可降低其他微生物污染，避免每批不同葡萄上微生物相之差異影響釀造的結果，有效控管發酵過程以獲得穩定且均一的品質。目前國內酒莊製酒多使用國外進口的活性乾酵母菌種如 Pasteur champagne 即為分離自法國知名葡萄酒產區之菌系，國內如要發展具本土特色之葡萄酒應廣泛比較不同菌種對釀酒品質之影響。本場於葡萄表面所分離純化之酵母菌經過初步基本釀酒特性之測定後發現，不但釀酒特性與一般商業菌種無顯著差異，並且在成品的風味上優於商業菌種，將來可為農村酒莊使用，開創其專屬風味的葡萄酒。

誌謝

本研究承農委會科技計畫經費補助，賴月櫻、黃展瑩、曹淑娟小姐協助