

李子酒製作用酵母菌之篩選及研究

林世斌¹ 陳莉臻² 黃中宜³ 丁翠傑⁴

1、國立宜蘭技術學院食品科學系助理教授

2、國立宜蘭技術學院食品科學系講師

3、國立宜蘭技術學院食品科學系副教授

4、國立宜蘭技術學院食品科學系學生

摘要

本實驗利用數株不同來源之酵母菌，嘗試李子酒的製作。酵母菌的來源除自市售酒麴中篩選出之酵母菌株外，其他的菌株則分別來自市售麵包酵母菌及編號為 CCRC21812 的酵母菌株。此外，本實驗也利用野生種酵母的自然發酵做為實驗的對照組。本實驗室所篩得之兩株酵母菌 Y01 及 B02，在菌落的形態、顏色、菌體的大小、形狀等具有極大的差異。而利用 Y01，B02 及 CCRC21812 菌株所釀造出來的李子酒的酒精度，明顯高於市售麵包酵母菌及自然發酵的酒精度；然而，在可滴定酸量、糖度變化及 pH 變化上，所有菌種並沒有明顯的差別。官能品評的結果發現、用 Y01 所釀造酒的李子酒則有明顯優於其他菌種的風味。因而在李子酒製作上，Y01 菌株頗具潛力。

關鍵字： 酵母菌、李子酒、菌種篩選

Isolation of Yeasts Used for Plum Wine Fermentation

Shih-Bin Lin¹ Li-Chen Chen² Chung-I Huang³ Tzuey-Jieh
Ding⁴

Department of Food Science, National Ilan Institute of
Technology

1. Assistant Professor, Department of Food Science, National Ilan Institute of
Technology

2. Lecturer, Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology

3. Associate Professor, Department of Food Science, National Ilan Institute of
Technology

4. College Student Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology

ABSTRACT

In this study, plum wine made by brewing with several different strains of yeast was attempted. In addition to two yeast strains isolated out from commercial koji, a commercial baker's yeast and the yeast strain labeled CCRC21812 were also tried in brewing plum wine. Besides, plum wine brewed with wild yeast was done and served as a control group. Two yeast strains, Y01 and B02, obtained in this study were remarkably different in their colony type, color, individual size and shape. The alcohol production rate of Y01, B02, and CCRC21812 were apparently higher than the others. However, all strains made no difference in their wine products for titerable acid amount, sugar residual and pH change. Taste panel of plum wine made remarkably demonstrated Y01 had the best quality over the others. Therefore, Y01 had better potential in making plum wine.

Keywords: yeast, plum wine, isolation, *Saccharomyces cerevisiae*

李子酒製作用酵母菌之篩選及研究

林世斌¹ 陳莉臻² 黃中宜³ 丁翠傑⁴

1、國立宜蘭技術學院食品科學系助理教授

2、國立宜蘭技術學院食品科學系講師

3、國立宜蘭技術學院食品科學系副教授

4、國立宜蘭技術學院食品科學系學生

摘要

本實驗利用數株不同來源之酵母菌，嘗試李子酒的製作。酵母菌的來源除自市售酒麴中篩選出之酵母菌株外，其他的菌株則分別來自市售麵包酵母菌及編號為 CCRC21812 的酵母菌株。此外，本實驗也利用野生種酵母的自然發酵做為實驗的對照組。本實驗室所篩得之兩株酵母菌 Y01 及 B02，在菌落的形態、顏色、菌體的大小、形狀等具有極大的差異。而利用 Y01，B02 及 CCRC21812 菌株所釀造出來的李子酒的酒精度，明顯高於市售麵包酵母菌及自然發酵的酒精度；然而，在可滴定酸量、糖度變化及 pH 變化上，所有菌種並沒有明顯的差別。官能品評的結果發現，用 Y01 所釀造酒的李子酒則有明顯優於其他菌種的風味。因而在李子酒製作上，Y01 菌株頗具潛力。

關鍵字： 酵母菌、李子酒、菌種篩選

1
2
3 **Isolation of Yeasts Used for Plum Wine Fermentation**

4
5 **Shih-Bin Lin¹ Li-Chen Chen² Chung-I Huang³ Tzuey-Jieh Ding⁴**

6
7 Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology

8 1. Assistant Professor, Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology

9 2. Lecturer, Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology

10 3. Associate Professor, Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology

11 4. College Student Department of Food Science, National Ilan Institute of Technology

12
13
14 **ABSTRACT**

15
16 In this study, plum wine made by brewing with several different strains of yeast was
17 attempt. In addition to two yeast strains isolated out from commercial koji, a
18 commercial baker's yeast and the yeast strain labeled CCRC21812 were also tried in
19 brewing plum wine. Besides, plum wine brewed with wild yeast was done and served as
20 a control group. Two yeast strains, Y01 and B02, obtained in this study were remarkably
21 different in their colony type, color, individual size and shape. The alcohol
22 production rate of Y01, B02, and CCRC21812 were apparently higher than the others.
23 However, all strains made no difference in their wine products for titerable acid
24 amount, sugar residual and pH change. Taste panel of plum wine made remarkably
25 demonstrated Y01 had the best quality over the others. Therefore, Y01 had better
26 potential in making plum wine.

27
28 Keywords: yeast, plum wine, isolation, *Saccharomyces cerevisiae*

一、 前言

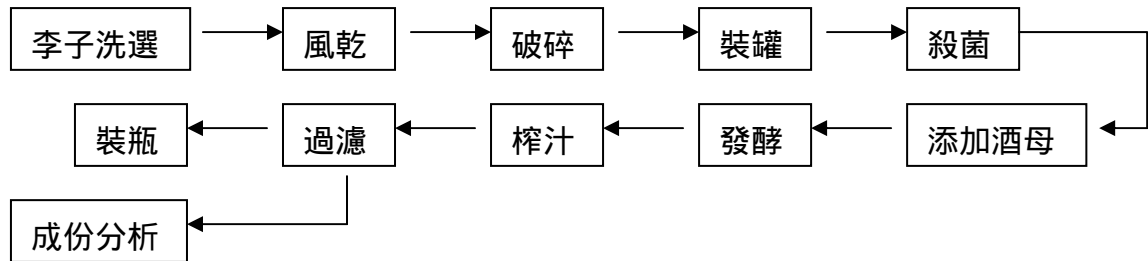
酒為我國傳統的主要飲料之一，其成品可分成果汁酒(wines)、麥酒(beer)、含酒精飲料(liquor)等。我國酒類產品一直是由菸酒公賣局釀製與專賣，民間業者一直無法私自釀製販賣。然而由於台灣即將加入 W.T.O.，未來酒類的製造與販賣將可望開放民間製造與販售，因此如何配合地方特色釀製品質優良的酒就成該產業成功與否的一項重要關鍵。台灣地處亞熱帶，水果種類繁多且產量豐，極適合發展水果酒。其不但可提高水果的附加價值，也可提供市場的供需平衡的管道。李子，其果肉多汁、味道甜美、色澤鮮紅晶瑩、且價格低廉，且民間咸信李子酒有行血活血、消除疲勞、增強體力的功效。此外，李子酒色澤，不易因放置時間過久而變色，有酒中的紅寶石之稱。加上其酒精度不高，很適宜用來調酒⁽¹⁾。南投縣仁愛鄉農會產銷班，以李子酒為其重點輔導項目之一。李子，尤其是紅肉李，也是宜蘭本地的特產。因此，李子酒應可發展為本縣特色農產品之一。

影響酒的嗜好性及接受度的重要關鍵包括酒精含量、香氣、酸度等。決定這些品質的因子除了水果本身的品種、季節性及成熟度之外，最重要的就是取決於酵母菌的品種。水果酒的發酵可利用散佈水果表皮的野生酵母(wild yeast)進行自然發酵或利用經常年篩選的酵母種菌(yeast starter)。前者的優點在於不須另行培養及添加酵母菌，然而其品質則會隨著不同的批次(batch)而有所不同或有發酵失敗導致酸敗的可能性；而後者則能產生品質穩定的產品。此外，為了縮短發酵的時間，酵母菌常預先以純種培養方式製成大量且高濃度的酵母菌培養液作為釀造用的酒母，該程序顯著改善了酒品的品質且大幅度縮短了發酵所需的時間。因此，酒母已成為製酒工業不可或缺的關鍵步驟。除了純種培養所製造的酒母外，也有利用前一批次所留下來的發酵液，作為進行下一批次發酵所用之酒母，以維持一定的品質⁽²⁾。

關於水果酒的研究，多以葡萄酒、蘋果酒、梅子酒等為主。李子酒釀造的相關研究，極少見於專刊及文獻。因此，本實驗擬配合酵母菌種的篩選，嘗試李子酒的製作，初步評估開發李子酒的潛力。

二、 材料與方法

(一) 李子酒製造流程



圖一、李子酒製造流程

(二) 酵母菌菌種

本實驗室所使用之酵母菌種來源有以下幾種：(1). 市售麵包酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*, HASMAYA Co., USA); (2). 購自新竹食品工業研究所的酵母菌株(CCRC 21812); (3). 篩選自市售酒麴。

(三) 市售酒麴中酵母菌的篩選

將市售之酒麴以無菌操作法取出 25g，加入 225ml 的 yeast malt extract broth(YMB)培養液之中，利用 500ml 的錐形瓶在 28℃ 下震盪培養。兩天後取出培養液，利用連續稀釋(10^{-1} 、 10^{-2} 及 10^{-3})塗抹在 yeast malt extract agar (YMA)的平板上，置於 28℃ 培養之。24 小時後以白金耳分別勾取生長快速且菌落型態外觀不同之純種酵母菌於 10ml 的 YMB 試管之中，在 28℃ 下震盪培養。所有使用於本實驗之酵母菌皆以 YMA 斜面做菌種之繼代及以 YMB 作酒母 (starter culture)之製作。酵母菌細胞的觀察及其大小的測定則利用位相差光學顯微鏡 (Labophot-2, Nikon) 進行之。

(四) 酒母製作

用作李子酒製作之酒母的製法如下：將純酵母菌菌種由 YMA 斜面接種於 10 ml YMB 試管中，經 28℃、24 小時震盪培養後，再將菌液以 1:100 的比例於相同條件下作放大培養 (即取 24 小時培養液 1ml 加入 100 ml 新鮮 YMB 培養液)。所得菌液可直接用作李子酒釀造用之酒母。

1 (五) 李子酒發酵

2 李子(紅肉李)乃購自宜蘭縣冬山鄉農戶。李子經去除泥土,雜質,枝葉
3 及外皮清洗後,秤取 600g 並經適當壓碎後,置入有蓋的玻璃罐之中(容積約
4 1 L),再加入 90g 的白砂糖,充分混合均勻之後測量其 pH 及糖度。將不同來
5 源之酒母,以 10 ml 菌液量分別加入發酵,其最終菌液之菌數濃度約為每 ml
6 含 10^6 個酵母菌。為使罐蓋與罐身密封,利用玻璃紙平鋪於罐口上再將罐蓋蓋
7 上,使其密合。

8 除了酒母發酵外,另作野生酵母自然發酵作為對照組之用。該組不加酒母,
9 且李子的外皮僅略加清洗,以避免野生酵母菌的流失。其餘步驟皆與酵母發酵
10 同。

11 各組實驗皆靜置於 28 培養箱中約 40 天,並於發酵期間測定糖度變化。
12 發酵完畢後,利用約 1 cm 厚之矽藻土(置於直徑 11 cm 之布氏漏斗)經抽氣
13 過濾法,將李子酒渣及懸浮物質移除,取得濾液即為澄清李子酒。

15 (六) 李子酒成品之分析

16 1. 酒精度測定

17 取 100ml 澄清李子酒利用蒸餾法蒸餾出 70ml 的蒸餾液,置於 100ml 之
18 量筒之中,加入蒸餾水至 100ml,利用酒精計測量酒精含量,並用溫度計
19 作校正。

20 2. 總酸的測定

21 將澄清李子酒以蒸餾水稀釋 200 倍後,取 100ml 加入酚 指示劑數滴,
22 以 0.01 N NaOH 滴定至當量點後,計算每 ml 李子酒須多少體積的 0.01N
23 NaOH,以該體積作為總酸的測量單位。李子酒之 pH 則由 pH 計 (Corning 240,
24 Corning)測定之。

25 3. 糖度

26 取適量澄清李子酒以 ATAGO 手持式折射計測定糖度值。

27 4. 李子酒的官能品評

28 酒類品評的設計乃參考謝建中的方法⁽³⁾,對李子酒就外觀(色澤、清
29 濁度)、香氣、滋味、特色作總分 100 分之感官喜好性品評試驗。其中的滋
30 味代表味覺的綜合表現,而特色則為直觀上感覺與一般產品的不同程度。
31 總分即代表對產品的接受度。本實驗請 10 位已經官能品評課程訓練之國立
32 宜蘭技術學院食品工業科同學及老師,針對利用各種菌株發酵 40 天的李子
33 酒作官能品評。品評的做法如下:品評員先以蒸餾水漱口,清除口中異味。
34 用一匙約 10ml 的湯匙取酒樣本,留置入口中約 10-15 秒後吐掉。期間利用

1 舌頭攪動及嗅覺分別就評定之項目作評分。每個測試的樣本間以蒸餾水漱
2 口，使評定不受樣本間的干擾。

3 三、 結果與討論

4 (一) 酵母菌篩選

5 本實驗除比較市售烘培用酵母菌、購自新竹食品工業研究所的酵母菌株
6 外，另從市售酒麴中篩選酵母菌進行「李子酒試作實驗」。酵母菌的篩選是通
7 過酵母菌特性實驗，諸如生長速度、發酵度、死亡率、凝聚性、發酵速度測定、
8 死亡溫度及小規模發酵實驗之官能品評等⁽³⁾。此外，根據劉英俊等⁽⁴⁾的建議，
9 酵母菌的篩選以菌落邊緣完整且規則為佳。隨著微生物改良技術的進步，微生
10 物的死亡率及死亡溫度，在適當的範圍內，都可藉由酵母菌的馴育來達到須
11 求。因此，本實驗之酵母菌的篩選乃以菌落外觀、生長速度、發酵度、發酵速
12 度、小規模發酵實驗之官能品評為篩選指標。符合需求者，將進一部作酵母菌
13 的馴化以改良菌種。本實驗從市售酒麴中篩得兩株菌落較大、生長明顯快速、
14 且外觀及顏色截然不同的酵母菌菌株，分別標記為 Y01 及 B02。前者菌落呈淡
15 黃色，且邊緣平滑(圖二 A)；後者菌落呈乳白色，起邊緣有小波浪狀(圖二 B)。
16 經鏡檢發現酵母菌 Y01 的直徑約為 10 μ m(圖三 A)；而酵母菌 B02 則明顯較小，
17 約為 7 μ m(圖三 B)。

18 (二) 李子酒物化特性測試

19 李子酒物化的特性，包括 pH 值、糖度、酸度及酒精度等，直接決定了酒
20 的嗜好性。酒精的生成乃來自於葡萄糖的發酵。在發酵的過程中，當糖度不再
21 減低時，即可視為發酵終止。因此，糖度的減少可間接視為酒精發酵的程度。
22 為了解各菌株完成李子酒發酵所需之時間，乃監控發酵期間發酵液糖度的變
23 化。一般而言，李子果肉的全糖量約介於 6-14%之間⁽⁵⁾，經加入砂糖後，測
24 得李子酒發酵的起始糖度約為 21.2°Brix。由圖四發現 B02 約在第 10 天即已
25 接近發酵完成，而 Y01 則須延至約 14 天。但兩者之最終的酒精度(10.7%)及糖
26 度(分別為 5.0 及 5.5°Brix)則沒有太大差別(表一)。自然發酵及市售烘培用
27 酵母菌則明顯有較低之酒精度。若依酒精生成速率或發酵速度來看，B02 似乎
28 是最理想的，然而發酵速度的快慢除了與酵母菌的種類有關外，添加的酒母起
29 始菌量亦有極大的影響。此外，本實驗之李子酒之酒精濃度與一般之市售葡萄
30 酒(約介於 7-16%)⁽⁶⁾比較起來有偏低的現象，若調整溫度、糖度、添加營養
31 成份等發酵條件，李子酒的酒精度應有再提升的空間。

32 李子的有機酸以蘋果酸為主，約含 1-2%⁽⁷⁾。本實驗之李子酒發酵之起始

1 pH 為 3.4, 各組酵母菌所造成的 pH 變化約在 3.63-3.64 之間, 並無明顯不同。
2 但若依可滴定酸觀之, 則 Y01 及 B02 有較其他組別略高的情形(表一中的總酸
3 即代表李子酒中的可滴定酸量), 而在官能品評中, Y01 及 B02 也被認為明顯
4 較其他組別酸(數據未列)。該現象也說明了 pH 不能完全代表酒類酸味的程
5 度, 而應以可滴定酸量的高低做為酸味的參考依據。以葡萄酒為例, 中國國家
6 葡萄酒標準規定總酸濃度為 0.5-0.8%⁽⁶⁾, 若超過則太酸, 若太低則平淡無味。
7 然而水果酒中的可滴定酸常包含酒石酸、蘋果酸、檸檬酸、乳酸、醋酸等有機
8 酸, 也因此無法確切計算出李子酒中各種有機酸的重量百分濃度, 而僅能粗略
9 地以 NaOH 的滴定量表示之。若以蘋果酸為總酸代表計算之, 則 Y01 與 B02 之
10 蘋果酸含量分別為 0.69 及 0.71%; 若以醋酸表之, 則分別為 0.62 及 0.64%。
11 至於李子酒過酸與否, 只能以官能品評的方式鑑識之。

12

13 (三) 李子酒的品評

14 酒品質的優劣主要並非決定於酒精成份的高低, 而多決定於酒的香氣成
15 份、色澤、清濁度、滋味等。因此, 李子酒的優劣乃利用官能品評來決定。用
16 作品評的李子酒乃取自進行 40 天發酵的樣本。經矽藻土過濾之李子酒之混濁
17 度皆明顯降低, 且呈現清亮的色澤, 其澀味也明顯改善, 這可能是由於懸浮的
18 粒子、疏水性的色素或具味覺收斂性的物質被矽藻土移除之故。由表二發現,
19 無論是在視覺上(色澤、清濁)、味覺上(香氣、滋味)、或是特色上, Y01 都
20 有最好之表現。因此, Y01 具有最高之接受度, 其他的組別則無明顯差異。B02
21 在酒精度及發酵的速度上雖有較佳的表現, 但是整體而言, 其接受度並不理
22 想。因此, 在本實驗所使用的酵母菌菌種中, Y01 似乎較有潛力作為李子酒發
23 酵菌種。而自然發酵的酒精生成速度及酒的品質是本實驗中最差的, 但這並不
24 表示自然發酵的製造方式是最差的, 因為其品質與依附在所使用的李子表面之
25 酵母菌菌種之種類與數目有關。

26 酒的品質可藉由熟化(aging)的過程進一步來提升, 雖然從品評的結果發
27 現 Y01 優於其他菌種, 但總分差距僅在 10% 左右。如果再加上熟化的過程, 將
28 可加大其彼此間的優劣的距離。未來將針對此點, 作進一步的研究。

29 本次的實驗乃著眼於對李子酒製作初步的了解, 未來將再就菌種的改良、
30 發酵基質的改善、香氣的分析等方向作更深入的瞭解。

31

四、參考文獻

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

1. Prescott and Dunn, C.G. (1959), *Industrial Microbiology*, McGraw-Hill, New York, USA.
2. 王莉民 (2001), *喝自己釀的酒*, 第 47-56 頁, 成陽出版社, 台北。
3. 謝建中 (2000), *啤酒酵母分離純化選育*, *釀酒科技*, 第二期, 第 28-29 頁。
4. 劉英俊、汪金追、劉俊國 (2000) *最新圖解微生物科技基礎實驗法*, 第三章, 中央圖書出版社, 台北。
5. 鄭清和 (1988), *食品原料 (上)*, 第 253-254 頁, 復文書局, 台北。
6. 孫雪梅 (1999), *葡萄酒的品嚐與欣賞*, *釀酒科技*, 第四期, 第 94-99 頁。
7. 賴滋漢、賴業超 (1988), *食品科技辭典*, 第 1124 頁, 富林出版社, 台北。

1

2 表一、 利用不同酵母菌釀造之李子酒之物理及化學特性分析

3 Table 1. The physical and chemical characteristics of plum wine brewed
4 with various yeast strains.

酵母菌	酒精度 (%)	總酸,ml (0.01N NaOH/ml)	PH 值	糖度 (°Brix)
Y01	10.7 ^a	10.50 ^a	3.64 ^a	5.5 ^{ab}
B02	10.7 ^a	10.64 ^a	3.63 ^a	5.0 ^a
CCRC21812	10.2 ^a	9.80 ^b	3.63 ^a	5.9 ^{bc}
市售烘培用酵母 Baker's yeast	9.0 ^b	9.52 ^b	3.63 ^a	6.1 ^c
野生酵母菌 Wild yeast	9.8 ^{ab}	9.94 ^b	3.64 ^a	6.8 ^d

5

6 a,b,c,d: 同一欄平均值之上標相同者表無顯著差異(p < 0.05)。

7 Means within the same column bearing the same superscripts differ
8 insignificantly (p < 0.05).

1

2 表二、 利用不同酵母菌釀造之李子酒之官能品評結果

3 Table 1. The taste panel results of plum wine brewed with various yeast
4 strains.

酵母菌	色澤 (10%)	清澈度 (10%)	香氣 (30%)	滋味 (40%)	特色 (10%)	總分 (100%)
B01	8 ^a	7.8 ^a	24.1 ^a	29.1 ^a	5.6 ^a	74.6 ^a
Y02	8.6 ^a	8.3 ^a	26.1 ^b	33.8 ^b	6.4 ^b	83.2 ^b
CCRC21812	8.3 ^a	8.0 ^a	23.5 ^a	28.7 ^a	5.9 ^a	74.4 ^a
市售烘培酵母 Baker's yeast	8.5 ^a	7.9 ^a	23.4 ^a	28.6 ^a	5.8 ^a	74.2 ^a
野生酵母菌 Wild yeast	8.5 ^a	8.0 ^a	24.7 ^a	26.8 ^a	5.8 ^a	73.8 ^a

5

6 a,b: 同一欄平均值之上標相同者表無顯著差異(p < 0.05)。

7 Means within the same column bearing the same superscripts differ

8 insignificantly (p < 0.05).

1 (A)

2

3

4

5 (B)

6

7

8

9

10 圖二、從酒麴中篩選酵母菌。兩株菌落邊緣有顯著不同者被篩選出：(A) .

11 B01：邊緣呈波浪狀，(B) . Y02：邊緣呈平滑狀。

12 Figure 1. Two yeasts with different colony margin were isolated from

13 commercial koji. (A). B01: Wave-margined colony, (B) Y02:

14 Smooth-margined colony.

1

2 (A)

(B)

3

4

5

6

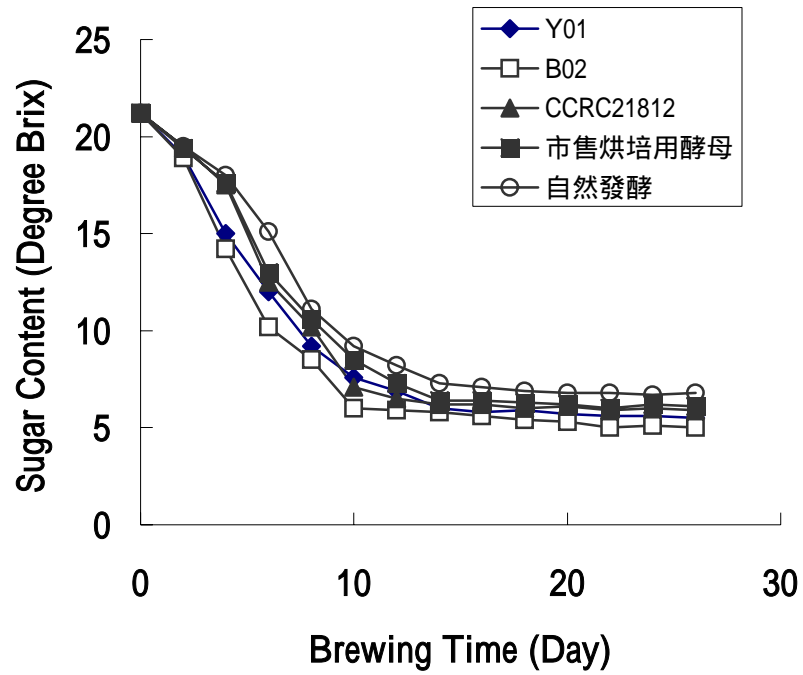
7 圖三 利用相位差光學顯微鏡觀察從酒麴中篩選出之酵母菌。酵母菌分別為：

8 (A). B01 (大小約為 7 μm), (B). Y02 (大小約為 10 μm)。

9 Figure 3. The observation of koji-isolated yeast strains with
10 phase-contrast light microscope. (A). B01, with size of about
11 7 μm , (B). Y02, with size of about 10 μm .

1

2



3

4 圖四、 利用不同酵母菌菌種發酵製造李子酒過程中，糖度變化的情形。

5 Figure 4. The change of sugar content during the plum wine brewing
6 process with different yeast strains.

7