

# 葡萄酒發酵過程中酵母菌相變化之研究

陳裕星、林秀儒、洪梅珠、張致盛、洪爭坊

## 目 的

酒類釀製是微生物複雜的作用過程，酵母菌扮演極重要的角色，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，需有50~100次的測試鑑定，才可達到種的鑑定層次。本研究即藉由核糖體基因內轉錄間隔區之選殖及其限制酵素多形性分析，探討貝利A葡萄酒發酵過程中，自然與誘導發酵酒醪中酵母菌種出現之差異與添加偏亞硫酸鉀對酒醪發酵之影響，並以粒線體DNA分析鑑識主要生產酒精的酵母菌類。

## 材料與方法

92年第1季採收的本場貝利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 (Rapidase™ VINO Super, RVS，泛球)，調整汁液糖度至25 °Brix，總酸為0.8%以下。每處理為16公升酒醪，有四重複，另以添加偏亞硫酸鉀(Potassium Metabisulfite, KMS)使酒醪中保持50 ppm二氧化硫及添加活性乾酵母0.25 g/l (Lalvin L2226, Lallemand inc., Montréal-Canada)處理，比較葡萄酒自然發酵及誘導發酵。酒醪置於20°C含皮發酵，於第七天進行壓榨去皮，分裝於玻璃桶中，玻璃桶瓶口裝設發酵栓，發酵過程中定時取樣分離鑑定酵母菌種。

## 結果與討論

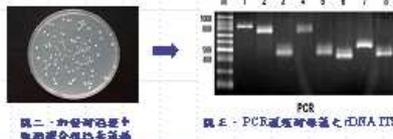
以貝利A葡萄進行紅葡萄酒釀製，利用ITS PCR-RFLP鑑識酒醪中的酵母菌類，共獲得八種不同的酵母菌電泳分析圖譜，初步鑑定為*Saccharomyces cerevisiae*、*Kloeckera apiculata*(*Hanseniaspora uvarum*)、*Hanseniaspora occidentalis*、*Candida stellata*、*Candida membranae*、*Issatchenkia terricola*、*Kluyveromyces phaffii*及*Candida magnoliae*。在酒醪發酵後期僅可分離到*S. cerevisiae*，利用限制酶HinfI分析酵母菌*S. cerevisiae*粒線體DNA，可鑑識出供測之8種商業酵母菌為不同的菌系，自誘導發酵酒醪中分離的*S. cerevisiae*與加入酒醪的商業酵母菌具有相同限制圖譜。添加商業酵母菌誘導發酵之酒醪於第六日還原糖量降至5~6.35 g/L，酒精度達11.55~11.9 vol.%，自然發酵處理酒醪於第八日還原糖量降至3.4~5.5 g/L，酒精度達11~11.1 vol.%，誘導發酵處理可提前二日完成酒精發酵。誘導發酵時，酒醪中酵母菌在發酵初期即佔有族群優勢，發酵第二天後，酒醪中僅可偵測到產酒精之酵母菌(*S. cerevisiae*)。反之，自然發酵處理之酒醪則在發酵七天後才具有完全優勢。酵母菌量變化與酒精含量變化呈正相關。

# 台中區農業改良場

## 葡萄酒發酵過程中酵母菌相變化之研究

陳裕星、林秀儒、洪梅珠、張政盛、洪爭坊

以月川A葡萄進行紅葡萄酒釀製(圖一)，利用ITS PCR-RFLP鑑定酒液中的酵母菌類，並獲得八種不同的酵母菌或混合菌種，鑑定為*Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces fragilis*、*Metschnikowia uvarum*、*Metschnikowia octocaryota*、*Candida sakei*、*Candida membranacea*、*Wickerhamomyces anomalus*、*Kluyveromyces fragilis*及*Candida magnoliae*(圖二、三、四、五表一)。在酒液發酵過程中分離到*S. cerevisiae*，利用限制酶*HinfI*分析酵母菌*S. cerevisiae*核糖DNA，可鑑定出核糖DNA中核糖體基因座5-13S rDNA，將其在*cll13511.9* w/LA，自然發酵酒液中加入自選庫標準株5.4-5.5 g/L，酒液在*cll111.1* w/LA，酒液在*cll111.1* w/LA，將發酵酒液可應用二日後繼續發酵(圖六、七、八)。將發酵酒液，酒液中酵母菌在發酵初期佔有數種酵母(表二)。發酵第二天後，酒液中僅可檢測到酒液中的酵母菌(*S. cerevisiae*)。反之，自然發酵酒液之酒液則在發酵七天後才具有完全優勢，酵母菌量變化與酒精含量變化互相關聯。



表一 葡萄酒液ITS PCR/RFLP分析

Lane	Yeast species	Concentration size of ITS	rDNA ITS	
			Size of restriction fragments	Size of restriction fragments
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	150,160	182.8, 138.8
2	<i>Metschnikowia octocaryota</i>	750	186,200,250	74
3	<i>Candida sakei</i>	470	235,250	47
4	<i>Metschnikowia octocaryota</i>	770	200,200,240,120	670,160
5	<i>Candida sakei</i>	480	260,130	480
6	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	450	240,160,160	200,120
7	<i>Metschnikowia octocaryota</i>	570	110,200	520
8	<i>Candida magnoliae</i>	400	330,280	330, 280

