一株刺梨非酿酒酵母的分离鉴定、生理特性及混菌发酵研究

赵湖冰，黎　华，田　野，于志海，刘晓辉，黄名正，刘晓柱*
（贵州理工学院，贵州贵阳 550000）

摘　要：为获得适合刺梨果酒酿造的非酿酒酵母菌株，从刺梨自然发酵液中分离优质非酿酒酵母，通过形态学与 26S rDNA 序列分析来鉴定菌株；从葡萄糖耐受性、柠檬酸耐受性、酒精耐受性、二氧化硫耐受性、单宁耐受性、β-糖苷酶产生能力、硫化氢产生能力等方面分析菌株的生理特征；与酿酒酵母混合发酵刺梨果汁，从发酵刺梨果酒常规理化指标、感官品评以及香气物质方面探讨非酿酒酵母对刺梨果酒品质的影响。结果表明，利用赖氨酸筛选培养基从刺梨果实上筛选出 80 株非酿酒酵母，嗅闻法筛选出一株产香浓郁的菌株 F13。形态学与分子生物学鉴定结果表明，F13 为一株刺梨来源的葡萄汁有孢汉逊酵母；该菌株可耐受浓度为 300 g/L 葡萄糖、3% 乙醇、3% 柠檬酸、300 mg/L SO_2 以及 25 g/L 单宁处理。但酒精耐受性和 β-糖苷酶产生能力不及酿酒酵母 X16。此外，F13 菌株不产硫化氢。F13 与酿酒酵母混合发酵可降低刺梨果酒的酒精度和挥发酸，增加残糖量，分别为 11.1% ±0.39%、(0.67 ±0.03) g/L、(20.41 ±1.44) g/L。F13 不影响刺梨果酒的感官品评，但可有效增加刺梨果酒中醇类物质的种类和含量，降低酯类物质种类和含量。本研究从刺梨自然发酵液中得到一株非酿酒酵母 F13，对酿酒环境具有较优的耐受性（耐糖、酸、酒精度、二氧化硫），具有一定的工业化应用潜能。

关键词：刺梨，非酿酒酵母，分离鉴定，生理特性，混菌发酵，品质分析

Isolation, Identification, Physiological Characteristics and Mixed Fermentation of a Non-*Saccharomyces cerevisiae* from *Rosa roxburghii*

ZHAO HU-bing, LI Hua, TIAN Ye, YU Zhi-hai, LIU Xiao-hui, HUANG Ming-zheng, LIU Xiao-zhu*
(Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550000, China)

Abstract: To obtain the non-*Saccharomyces cerevisiae* suitable for the *Rosa roxburghii* wine fermentation, *non-Saccharomyces cerevisiae* isolated from spontaneous fermented *Rosa roxburghii* wine were identified by the analysis of morphology and 26S rDNA sequence. Physiological characteristics were detected via analyzing of glucose tolerance, citric acid tolerance, alcohol tolerance, sulfur dioxide tolerance, tannic tolerance, β-glycosidase producing ability and sulfuretted hydrogen producing ability. To explore the effects of non-*Saccharomyces cerevisiae* on the quality of *Rosa roxburghii* wine, the conventional physicochemical indexes, sensory evaluation and aroma profiles of *Rosa roxburghii* wine fermented with non-*Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* were performed. A total of 80 strains of non-*Saccharomyces cerevisiae* were isolated and identified from *Rosa roxburghii* using lysine identification medium. One aroma-producing strain named F13 was chosen for the further study via sniffing method. Morphological and molecular biology results indicated that F13 was *Hanseniaspora uvarum* from *Rosa roxburghii*. The F13 strain was able to tolerate 300 g/L glucose, 3% ethanol, 3% citric acid, 300 mg/L SO_2 and 25 g/L tannin. However, the alcohol tolerance and β-glycosidase producing ability were lower than *Saccharomyces cerevisiae* X16. In addition, F13 did not produce sulfuretted hydrogen. Moreover, the mixed fermentation of F13 with *Saccharomyces cerevisiae* could reduce the alcohol content and volatile acid of *Rosa roxburghii* wine, and the concentration were 11.1% ±0.39%, (0.67 ±0.03) g/L and (20.41 ±1.44 g/L), respectively. Besides, the mixed fermentation of F13 with *Saccharomyces cerevisiae* could not affect the sensory evaluation of *Rosa roxburghii* wine. But it could effectively increase the variety and contents of alcohols, and reduce the variety and contents of esters of *Rosa roxburghii* wine. In this study, one *non-Saccharomyces cerevisiae* strain F13 was obtained from spontaneous fermented *Rosa roxburghii* wine, which possessed excellent tolerance to brewing environment, including sugar, acid, alcohol and sulfur dioxide, therefore had some industrialized application potential.

收稿日期：2019-08-13
作者简介：赵湖冰（1998-），男，本科，研究方向：功能性优质酿酒微生物资源开发，E-mail：463235625@qq.com。
* **通讯作者：**刘晓柱（1984-），男，博士，副教授，研究方向：功能性优质酿酒微生物资源开发，E-mail：liuxiaozhu_840914@163.com。
基金项目：贵州省科技计划项目（黔科合平台人才［2017］5789）；贵州省果酒酿造工程技术科技创新人才团队（黔科合平台人才［2018］5603）；贵州省教育厅创新群体重大研究项目（黔教合 KY 字［2017］046）；2017 年大学生创新创业训练计划项目（201714440060）。

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Key words: *Rosa roxburghii*; non-*Saccharomyces cerevisiae*; isolation and identification; physiological characteristics; mixed fermentation; quality analysis

中图分类号: TS261　　**文献标识码:** A　　**文 章 编 号:** 1002-0306(2020)16-0114-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.16.019

引文格式: 赵湖冰,黎华,田野,等.一株刺梨非酿酒酵母的分离鉴定、生理特性及混菌发酵研究[J].食品工业科技,2020,41(16):114-120.

果酒是指鲜果经破碎、发酵而成的一种低酒精度饮品。除原料、工艺、设备等因素外,微生物在果酒酿造中扮演着至关重要的角色。果酒发酵中起主要作用的是酿酒酵母,其发酵活性强,酒精代谢旺盛。但非酿酒酵母菌作为果酒发酵过程中非接种发酵菌群,却对果酒风味及成分有着显著影响,其代谢及发酵作用在很大程度上影响果酒的复杂性[1-2]。在模拟葡萄汁中接种3株非酿酒酵母中,共检测出74种与酵母代谢相关的挥发性化合物,其中葡萄汁有孢汉逊酵母产生香气物质较为丰富,典型发酵香气包括乙酸乙酯、乙酸-3-甲基丁酯、辛酸乙酯、辛酸-3-甲基丁酯、乙酸-2-苯乙酯、辛酸和香茅醇,赋予了葡萄酒复杂的果香和花香[3]。目前对非酿酒酵母的认识主要停留在葡萄酒等传统酿造领域,在其它果酒酿造中的了解还十分有限。

刺梨(*Rosa roxburghii*)蔷薇科、蔷薇属,多年生落叶丛生灌木植物,其果实中 V_C 含量高达2200~2500 mg/100 g,是猕猴桃的10倍,故有"V_C 之王"美称。此外,刺梨果实中还富含多种维生素、多糖、胡萝卜素、黄酮类、三萜及苷类、过氧化物歧化酶等具有生物活性物质,是一种较好的果酒酿造源水果[4-5]。刺梨作为贵州省重点发展的特色产业之一,2018年全省种植面积达219.65万亩,生产总值达31.61亿元[6]。尽管刺梨具有丰富的营养价值和药用价值,但刺梨果实中含有较多的单宁,鲜果生食口感较差[7],因此,对刺梨进行深加工是刺梨产业发展的必然选择。利用刺梨鲜果发酵生产刺梨果酒是一种比较可行的刺梨加工方式。但目前,还缺乏刺梨果酒专用酵母。利用非酿酒酵母与酿酒酵母混合发酵果汁,包括共接种和顺序接种两种方式,可有效提高增加发酵果酒中香气物质成份或含量。但目前还未见有刺梨非酿酒酵母的报道。因此,本研究采用传统的微生物分离技术,从贵州刺梨鲜果上选育出一株产香浓郁的非酿酒酵母,分析了其生理特性,并与商业酵母进行混菌发酵,探讨其对刺梨果酒风味的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

刺梨为贵农5号　采自贵州龙里地区;商业化酿酒酵母 ZYMAFLORE X16(简称X16)　法国LAFFORT公司;赖氨酸固体培养基　海博生物技术有限公司;对硝基苯基-β-D吡喃葡萄糖苷(p-nitrophenyl-β-D glucopyranoside,p-NPG)　上海源叶生物科技有限公司;蔗糖　本地超市;其余试剂均为国产分析纯　购自贵州博奥瑞杰生物科技有限公司。

雷磁 PHSJ-3F pH仪　上海仪电科学仪器股份有限公司;UH5300紫外分光光度计　日本日立公司;CKX41-倒置显微镜　日本OLYMPUS公司;SZM体视显微镜　中国宁波舜禹仪器有限公司;电子舌味觉系统　日本Insent公司;Bio-rad T100TM PCR仪、GelDocXR凝胶成像系统　美国伯乐公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制　YPD培养基:称取酵母浸粉10 g,蛋白胨20 g,葡萄糖20 g,加热煮沸溶解于蒸馏水中,定容至1000 mL,pH自然。固体培养基另加入20 g琼脂,灭菌备用。使用时加入氯霉素100 mg/L。

WL培养基:称取酵母浸粉4 g、蛋白胨5 g、葡萄糖50 g、琼脂20 g,量取储存液A 40 mL(磷酸二氢钾13.75 g/L,氯化钾10.625 g/L,氯化钙3.125 g/L,七水合硫酸镁3.125 g/L),储存液B 1 mL(氯化铁2.5 g/L,硫酸锰2.5 g/L),储存液C 1 mL(0.44 g溴甲酚绿溶于10 mL无菌蒸馏水和10 mL 95%乙醇中),加热煮沸溶解于蒸馏水中,定容至1000 mL,pH自然。

赖氨酸培养基:称取赖氨酸培养基粉末66.3 g,量取8.4 mL 60%乳酸钾溶液,加热煮沸溶解于蒸馏水中,定容至1000 mL,冷却至50 ℃左右时,用16%乳酸溶液调整pH至4.8±0.2,混匀,倾入无菌平板中,备用。

亚硫酸铋琼脂培养基[8]:称取柠檬酸铋铵5 g、亚硫酸钠3 g、甘氨酸10 g、葡萄糖10 g、酵母浸粉1 g、琼脂15 g、加热溶解于1000 mL蒸馏水中,煮沸1 min,调节pH至6.8±0.2。

1.2.2 菌株分离与鉴定　参考徐亚男[9]、蒋文鸿[10]方法,称取100 g新鲜成熟刺梨在无菌研钵中轻轻捣碎,放入无菌250 mL锥形瓶中,密封置于28 ℃进行自然发酵,分别于发酵第1、3、5 d取样。采用梯度稀释法并涂布于YPD固体平板上,28 ℃培养48 h。然后挑取单克隆,继续划线于YPD固体平板上,直至为纯的单克隆为止。

YPD固体平板上纯的单克隆菌株划线于赖氨酸培养基上,28 ℃培养3 d,观察其生长情况,在赖氨酸培养基上可以生长的为非酿酒酵母。选YPD固体平板上纯的单克隆菌株划线于WL固体培养基上28 ℃,培养5 d,观察菌落颜色和形态,以鉴定非酿酒酵母的类别。挑取YPD固体平板上纯的单克隆菌株,置于显微镜观察细胞形态和生殖方式。

PCR扩增菌体26S rDNA D1/D2区域,进行分子鉴定。PCR反应体系包括Taq PCR Master Mix(2×)25 μL,引物NL1和NL4(10 μmol/L)各2 μL,菌液2 μL,反应体积为50 μL。反应结束后取5 μL PCR

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

扩增产物产进行琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 同源序列搜索比对,采用 MEGA X 构建系统进化树。

1.2.3 生长曲线测定 菌株以 10^6 CFU/mL 接种于 YPD 液体培养基,28 ℃、180 r/min 条件下培养,每隔 4 h取样,以 YPD 液体培养基作为空白对照,在 600 nm波长处测定菌悬液 OD 值,平行重复 3 次,共取样40 h。根据时间和 OD_{600}值绘制生长曲线。

1.2.4 菌株生理特性分析 以 X16 作为对照,培养菌株 F16、X16 并调整浓度至 10^6 CFU/mL。分别将 F13、X16 接种至不同处理组的 YPD 液体培养基中,糖处理组葡萄糖质量浓度为 100、150、200、250、300 g/L,乙醇处理组乙醇体积分数为 3%、6%、9%、12%、15%,酸处理组柠檬酸酸度为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%,SO_2 处理组 SO_2 质量浓度分别为 50、100、150、200、300 mg/L,单宁处理组为单宁浓度 0、5、10、15、20、25 g/L,各处理组分别于 28 ℃、180 r/min条件下培养 34 h,在 600 nm 波长处测定菌悬液 OD 值,平行重复 3 次,以测定菌体对葡糖糖、乙醇、柠檬酸、SO_2 以及单宁的耐受性[11-12]。

1.2.5 硫化氢产生能力分析 参考王优蓓等[13]研究方法,用镊子夹取灭菌滤纸片贴于事先准备好的亚硫酸铋培养基表面,吸取 10 μL 浓度为 10^6 CFU/mL 的菌液滴加在滤纸片上,待液体完全吸入培养基后,28 ℃倒置培养 5 d,观察培养基变色情况。产 H_2S 能力由高到低显色情况分别为显棕黑色、棕色、墨绿色、淡墨绿色及不显色。

1.2.6 产 β-葡萄糖苷酶能力分析 采用对硝基苯基-β-D 吡喃葡萄糖苷(p-NPG)法分析菌株产 β-葡萄糖苷酶能力。参照侯晓瑞等[14]文献方法制作标准曲线。绘制的标准曲线方程式为 $y = 0.1302x + 0.0226$,$R^2 = 0.9995$。

菌株以 10^6 CFU/mL 接种于 YPD 培养基中,28 ℃、200 r/min 培养 72 h,取 1 mL 发酵液于离心管中,4 ℃、8000 r/min,离心 10 min,取上清液作为粗酶液。取 0.1 mL 粗酶液与 0.2 mL 35 mmol/L p-NPG 混匀,40 ℃保温 30 min,加入 2 mL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,于 400 nm 波长处测定吸光度。酶活力单位(U)定义为 pH5.0、50 ℃条件下,1 min 水解p-NPG 产生 1 μmol p-NP 所需酶量。

1.2.7 菌株混合发酵 将新鲜刺梨榨汁,调整其 pH 为 3.5,糖度为 24 °Bx。将非酿酒酵母 F13 和酿酒酵母 X16 种子液以 1∶1比例混合接种于刺梨汁中,使其菌株终浓度为 10^8 CFU/mL。25 ℃恒温静置发酵,以糖度不再降低,酒精度不再增加判定发酵终点。以 X16 单独发酵作为对照,每个样本 3 个平行重复。发酵结束后,取刺梨果酒 4 ℃、3000 r/min 离心 5 min 去残渣,上清液用于后续分析[15-16]。

1.2.7.1 乙醇体积分数、总酸、挥发酸、pH 测定 参照 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》[17],进行刺梨果酒乙醇体积分数,总酸和挥发酸的测定。刺梨果酒 pH 测定采用 pH 仪进行。

1.2.7.2 总糖测定 采用李晓旭等[18]优化蒽酮法测定刺梨果酒总糖。采用乙酸乙酯配制 15 mg/mL 蒽酮溶液,0.2 mg/mL 葡萄糖标准液。分别取葡萄糖标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于试管中,稀释至 2 mL,蒽酮试剂 0.5 mL,冷水浴中加入浓硫酸 5 mL,摇匀。迅速放入水浴锅中,80 ℃下水浴 15 min,取出后流动水冷却至室温,在 620 nm 处测定其吸光度。以糖含量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,绘制的标准曲线方程式为 $y = 13.90x + 0.038$,$R^2 = 0.999$。

采用 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》酸水解刺梨果酒,测定的值带入标准曲线换算为样品中葡萄糖值。

1.2.7.3 电子舌分析刺梨果酒感官特性 取刺梨酒样上清液 80 mL 倒入电子舌专用烧杯中进行检测,试验采用清洗溶液和刺梨果酒样本交替检测序列进行检测,清洗溶液为专用电极清洗液。采样时间 120 s,采样速度为 1 次/s,每个样品平行测定 3 次,每个平行重复采集 4 次[19]。

1.2.7.4 HS-SPME-GC-MS 分析刺梨果酒挥发性香气物质 借鉴李雪等[20]研究方法,取 8 mL 刺梨果酒,加入 2.0 g NaCl,40 ℃水浴萃取刺梨果酒中挥发性香气物质。萃取头插入进样口中,180 ℃进行解吸附 2 min。GC-MS 分析条件为:PEG.20 m 弹性石英毛细管柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm),1 mL/min 流量的氦气为载气。进样口温度 50 ℃,出样口温度 235 ℃。离子源温度为 230 ℃;四极杆温度为 150 ℃,调谐 EMV 947 V,质量扫描范围为 30.00~500.00 amu。NIST 14.L 标准谱库检索并匹配 GC-MS 采集得到的数据,进行定性分析。采用峰面积归一化法进行物质的定量分析。

1.3 数据分析

数据结果以平均值 ± 标准差表示,Excel 2007 进行作图。SPSS 17 进行数据差异分析。两组均数间比较用成组 t 检验,多组均数间比较用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 非酿酒酵母的筛选与鉴定

赖氨酸培养基鉴定结果表明,刺梨自然发酵液中共分离得到 80 株非酿酒酵母。形态分析结果与测序分析结果发现,分离到的刺梨非酿酒酵母包括葡萄汁汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、伯顿丝孢毕赤酵母(*Hyphopichia burtonii*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、*Pichia sporocuriosa*、异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)五类。通过嗅闻法初筛后获得 7 株非酿酒酵母菌,进一步接入刺梨汁发酵后筛选出 1 株果香和酒香味较浓的酵母菌株,编号为 F13,对该菌株进行了深入分析。

F13 菌株显微形态为柠檬状,出芽繁殖(图 1A);YPD 培养基上菌落黄白色、有光泽、边缘整齐、凸起、表面湿润(图 1B)。F13 在赖氨酸培养基上生长良好,说明 F13 是一株非酿酒酵母(图 1C)。F13 在

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

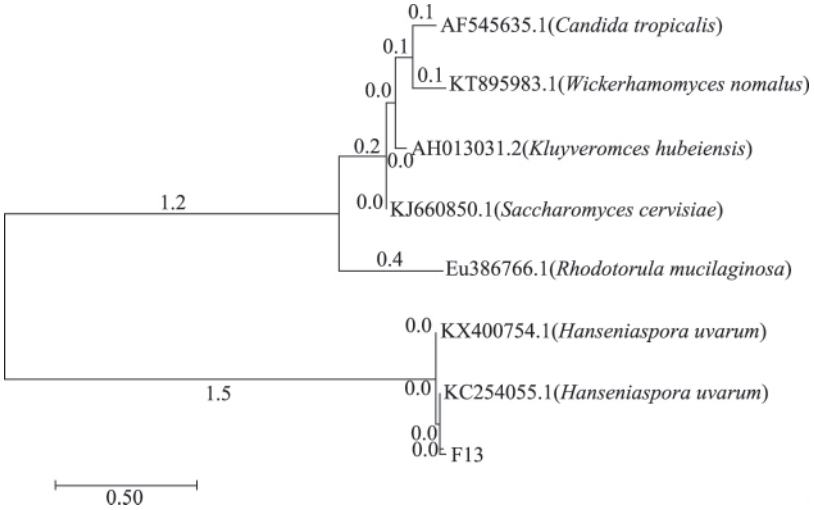

图 2　基于 26S rDNA D1/D2 区域序列构建的酵母菌菌株系统进化树

Fig.2　Phylogenetic tree of yeast strains based on 26S rDNA D1/D2 domain sequence

WL 培养基上，菌落深绿色、边缘平整、光滑湿润（图 1D）。因此，根据 F13 显微形态与菌落形态，初步认为 F13 为一株汉逊酵母（*Hanseniaspora* sp.）。

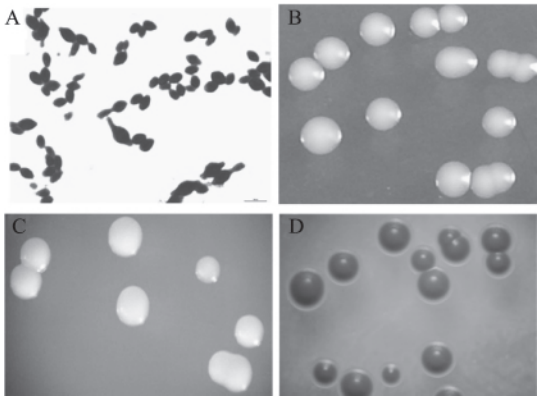

图 1　菌株 F13 细胞与菌落形态

Fig.1　Cellular and colonial morphologies of the F13 strain

注：A：菌株 F13 细胞显微镜形态（×400，bar = 100 μm）；
B：菌株 F13 在 YPD 培养基菌落形态；
C：菌株 F13 在赖氨酸培养基菌落形态；
D：菌株 F13 在 WL 培养基菌落形态。

采用 PCR 方法扩增 F13 菌株 26S rDNA D1/D2 区域，PCR 扩增产物 BLAST 结果表明，菌株 F13 与 *Hanseniaspora uvarum* 菌株同源性较高，达 97% 相似性。因此，认为 F13 为 1 株来源于刺梨的葡萄汁有孢汉逊酵母，其进化树结果见图 2。

2.2　非酿酒酵母 F13 生长曲线

非酿酒酵母菌株 F13 生长曲线如图 3 所示，前 4 h为延滞期，4~16 h 为对数生长期，16 h 后达到稳定期。在对数生长期 F13 生长速率小于商业化的酿酒酵母 X16，且对数生长期时间比 X16 长；稳定期阶段 F13 与 X16 生长特性较为一致。

2.3　非酿酒酵母 F13 生理特性分析

葡萄糖耐受性结果如图 4A 所示，菌株 F13 与商业化酿酒酵母 X16 在 100~300 g/L 葡萄糖浓度范围内，均可生长。但各浓度葡萄糖处理下，F13 菌体浓

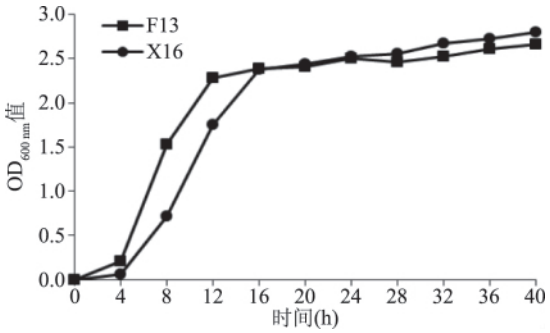

图 3　非酿酒酵母 F13 生长曲线

Fig.3　Growth curve of non-*Saccharomyces cerevisiae* F13 strain

度均显著低于 X16。

酸耐受性结果如图 4B 所示，菌株 F13 在酸度 1.0%~3.0% 范围不受影响，均可生长，其生长量与商业化酿酒酵母 X16 相比无显著差异，表明非酿酒酵母 F13 菌株具有较强的酸耐受性。

乙醇耐受性如图 4C 所示，F13 酒精耐受性随着乙醇体积分数的增大而逐渐降低，在乙醇体积分数 6% 时生长受到明显抑制。与商业化酿酒酵母 X16 相比，F13 乙醇耐受性显著降低。

SO_2 耐受性结果如图 4D 所示，F13 菌株生长量在 SO_2 质量浓度 50~300 mg/L 范围内均可生长，波动较小，表明 F13 可耐受 300 mg/L SO_2。此外，F13 在 SO_2 不同浓度下，其生长量与酿酒酵母 X16 之间无显著区别。

单宁为多酚类高度聚合化合物，可与蛋白质和消化酶形成难溶于水复合物，具有抗菌抑菌作用。刺梨中含有大量单宁，含量一般在 0.6% ~2.2% 之间[21]。F13 单宁耐受性如图 4E 所示，F13 菌株生长量在单宁浓度 0~25 g/L 范围内均可生长，波动不大，表明，F13 可耐受 25 g/L 的单宁。此外，F13 在单宁不同浓度下，其生长量与酿酒酵母 X16 之间无显著区别。

2.4　硫化氢产生能力

在酒类酿造中，酵母菌通过自溶，蛋白质分解可

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

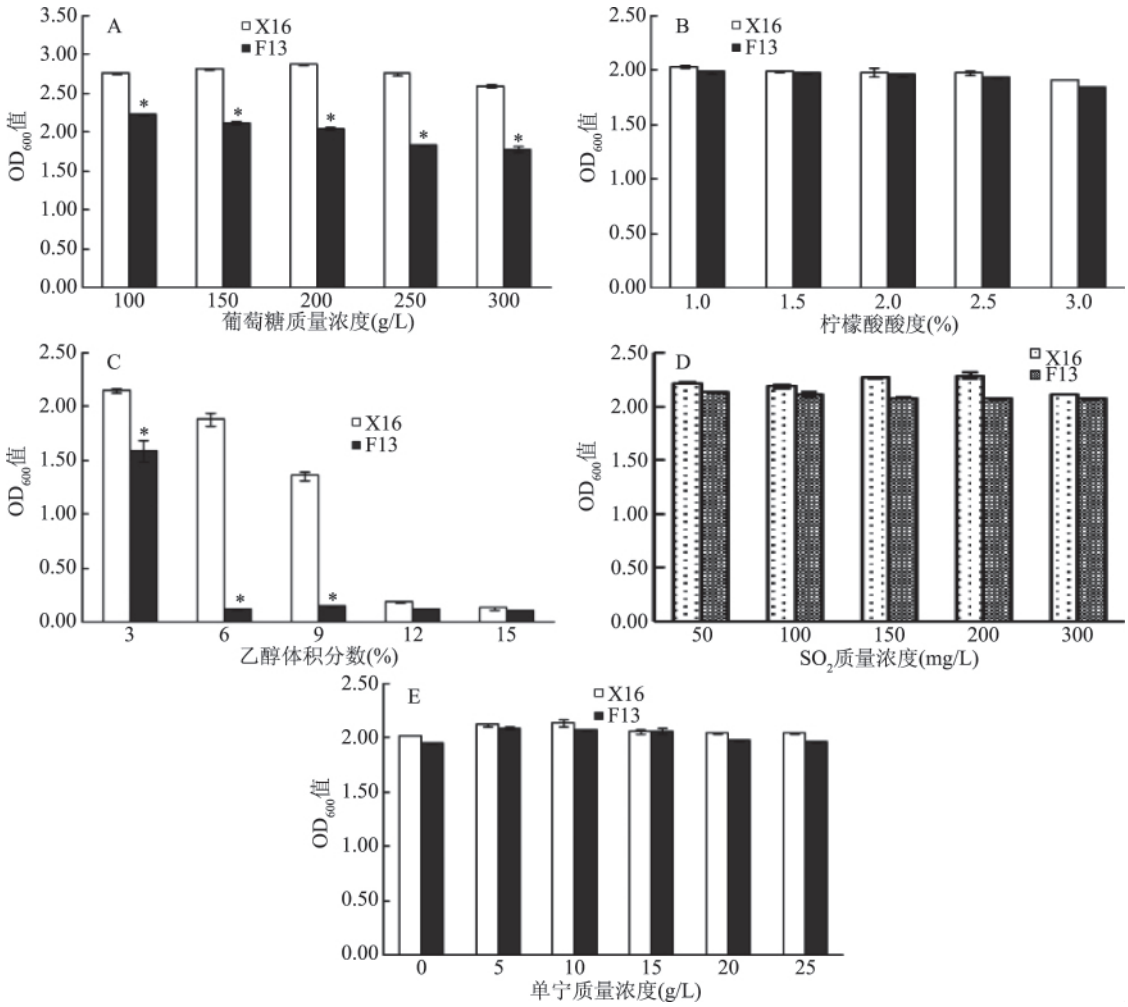

图4　非酿酒酵母 F13 耐受性分析

Fig.4　Tolerance of non-*Saccharomyces cerevisiae* F13 strain

注: A: 葡萄糖耐受性; B: 柠檬酸耐受性; C: 乙醇耐受性; D: 二氧化硫耐受性; E: 单宁耐受性; 与 X16 组相比,* 代表差异显著,$P<0.05$。

产生 H_2S。H_2S 具有大蒜味或臭鸡蛋味,少量存在即可对酒体风味带来不良影响。此外,H_2S 还能与醇类物质反应生成有害健康的低级硫醇。如图 5 所示,F13 在亚硫酸铋琼脂平板上滤纸片为无色,即不产生硫化氢。商业化酿酒酵母 X16 平板上滤纸片为棕色,说明具有较强的 H_2S 产生能力。因此,非酿酒酵母 F13 产 H_2S 产生能力小于 X16。王汝瑱[12] 对从宁夏贺兰山东麓三个酒庄分离得到的菌株产 H_2S 产生能力进行了分析,发现酿酒酵母都具有较强的 H_2S 产生能力,而分离得到的非酿酒酵母葡萄汁有孢汉逊酵母不产 H_2S,与本研究结果一致。

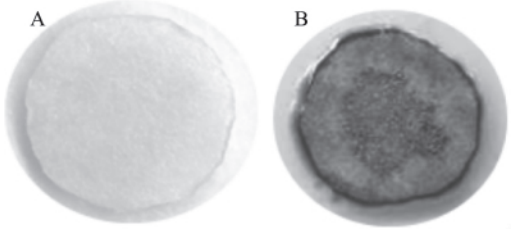

图5　亚硫酸铋琼脂平板法分析非酿酒酵母 F13 硫化氢产生能力

Fig.5　Analysis of hydrogen sulfide production ability of non-*Saccharomyces cerevisiae* F13 strain by barium sulfite agar plate method

注: A: F13; B: X16。

2.5　β-葡萄糖苷酶产生能力

以对硝基苯酚浓度为横坐标,400 nm 波长下的吸光值为纵坐标,绘制的标准曲线如图 6 所示。标准曲线回归方程为: $y = 0.1302x + 0.0226$, $R^2 = 0.9995$,吸光值与对硝基苯酚浓度之间为线性关系。菌株 F13 产 β-葡萄糖苷酶结果如表 1 所示,β-葡萄糖苷酶产生能力较低。商业酿酒酵母 X16 产 β-葡萄糖苷酶量约为 F13 产酶量的 2 倍。

表1　p-NPG 显色法产 β-葡萄糖苷酶能力测定

Table 1　Determination of β-glucosidase production by p-NPG chromogenic method

菌种编号	产酶量(U/mL)
F13	0.0136 ± 0.0013
X16	0.0254 ± 0.0006

2.6　非酿酒酵母 F13 对刺梨果酒品质的影响

2.6.1　非酿酒酵母 F13 对刺梨果酒常规理化指标的

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表2 刺梨果酒的理化指标

Table 2 Physical and chemical indicators of *Rosa roxburghii* wine

菌种编号	乙醇体积分数(%)	pH	总酸(g/L)	总糖(g/L)	挥发酸(g/L)
X16+F13	11.1±0.39*	3.42±0.01	4.00±0.06	20.41±1.44*	0.67±0.03*
X16	11.7±0.49	3.42±0.01	4.22±0.06	11.79±0.39	0.71±0.01

注:与X16组相比,* 代表差异显著,$P<0.05$。

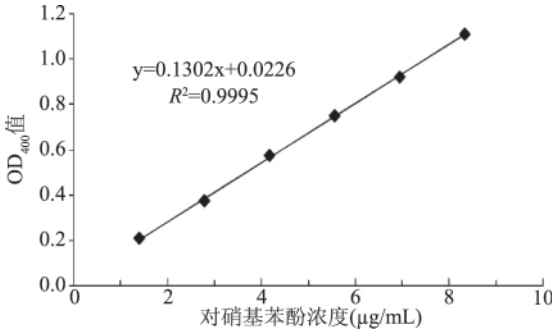

图6 对硝基苯酚溶液标准曲线

Fig.6 Standard curve of p-nitrophenol solution

影响 利用非酿酒酵母F13与商业化酿酒酵母X16混合发酵刺梨,以X16纯种发酵为对照,分析F13对刺梨果酒品质的影响。刺梨果酒基本理化指标如表2所示,F13混合发酵刺梨果酒的pH、总酸与X16纯种发酵刺梨果酒相比,无显著区别;F13混合发酵刺梨果酒的总糖高于X16纯种发酵刺梨果酒,酒精度、挥发酸则低于X16纯种发酵刺梨果酒。表明,F13混合发酵显著影响刺梨果酒的残糖量、酒精度和挥发酸含量。

由表2可知,F13与X16混酿刺梨果酒降酸能力大于纯种X16,因此刺梨果酒酿造中加入非酿酒酵母F13具有一定降酸效果。Bely等[23]采用德尔布有孢酵母与酿酒酵母混酿时,葡萄酒中挥发酸含量减少53%;Kapsopoulou等[24]采用耐热克鲁维酵母和酿酒酵母混酿是也可实现生物降酸作用,与本研究结果一致。

2.6.2 非酿酒酵母F13对刺梨果酒感官品评的影响 采用电子舌分析了非酿酒酵母F13对刺梨果酒感官品评的影响,结果如图7所示,采用非酿酒酵母F13与酿酒酵母X16混合发酵刺梨果酒与酿酒酵母X16纯种发酵刺梨果酒,在咸味、酸味、苦味、涩味、鲜味、丰富度、后味A、后味B响应值上均无显著差异,表明非酿酒酵母F13与酿酒酵母X16混酿与纯种酿酒酵母X16酿造刺梨果酒相比,在感官品评方面无显著影响。

2.6.3 非酿酒酵母F13对刺梨果酒香气物质的影响 利用HS-SPME-GC-MS技术测定非酿酒酵母F13与酿酒酵母X16混合发酵刺梨果酒(F13+X16)挥发性香气物质成分。如图8所示,F13混合发酵刺梨果酒中共检出41种香气物质,包括醇类12种、酯类15种、醛酮类3种、其他类11种;酿酒酵母X16纯种发酵刺梨果酒检中检测出41种香气成分,其中醇类11种、酯类17种、醛酮类3种、其他类10种。F13+X16混合发酵比X16纯种发酵减少了酯类物质的种类,增加了醇类和其它类物质的种类。F13+X16

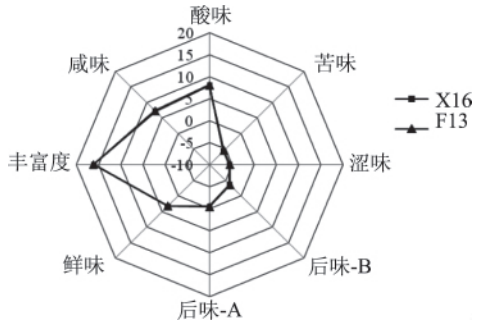

图7 刺梨果酒滋味属性雷达图

Fig.7 Taste attribute radar chart of *Rosa roxburghii* wine

混合发酵酯类物质总量较X16组相比也发生显著性降低,但醇类物质总量显著性增加,醛酮类类物质和其它种类物质总量变化不显著。

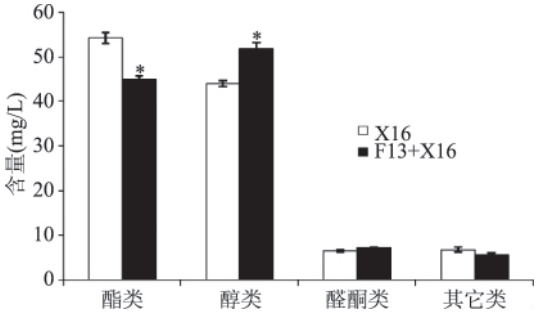

图8 刺梨果酒香气物质种类及含量

Fig.8 The aroma substances and their contents in *Rosa roxburghii* fruit wine

注:与X16组相比,* 代表差异显著,$P<0.05$。

2种刺梨发酵果酒中主要的酯类物质均为辛酸乙酯、己酸乙酯、乙酸异戊酯、癸酸乙酯和2-糠酸乙酯,其在F13+X16发酵刺梨果酒酯类物质比例分别为45.3%、19.7%、13.7%、6.6%和3.8%。庚酸甲酯为F13+X16发酵刺梨果酒中所特有香气物质,异丁酸乙酯、己酸甲酯、十一酸甲酯为X16纯种发酵刺梨果酒中所特有物质;2种刺梨发酵果酒中主要的醇类物质均为苯乙醇、正己醇和正辛醇,其在F13+X16发酵刺梨果酒醇类物质中比例分别为73.2%、5.1%、4.4%。

3 讨论与结论

本研究对刺梨自然发酵果汁中的非酿酒酵母进行了分离和鉴定,赖氨酸培养基共鉴定出80株非酿酒酵母,鉴定出包括*Hanseniaspora uvarum*、*Hyphopichia burtonii*、*Pichia kluyveri*、*Pichia sporocuriosa*、*Wickerhamomyces anomalus*五大类。通过嗅闻法从中筛选出一株产香较为浓郁的F13菌株做深入分析,形态学与分子生物学结果表明该菌株属于*Hanseniaspora uvarum*。生理特性进一步研究表

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

明，该菌株具有高耐糖、高耐酸、高耐 SO_2、高耐单宁、不产 H_2S 等优点，具有一定的商业开发潜力。但与商业化的酿酒酵母相比，其酒精耐受性，产 β-葡萄糖苷酶量等方面还稍逊一筹；同时在菌体生长的稳定期前，其生长速率还低于商业化酿酒酵母。所以，还需要采用传统育种技术或现代化的基因工程育种方式，对该菌株进行改造，使其具有更好、更优的生理特性。

共接种 F13 菌株与酿酒酵母 X16 菌株进行混合发酵刺梨果酒，果酒中的乙醇体积分数、总酸和挥发酸等指标均低于酿酒酵母纯种发酵刺梨果酒；而残糖量高于酿酒酵母 X16 纯种发酵刺梨果酒。尽管 F13 菌株混合发酵对刺梨果酒的感官评价未产生影响，但增加了刺梨果酒醇类物质的种类和含量，如具有玫瑰香特性的苯乙醇在 F13 混合发酵果酒中含量高于 X16 单一菌种发酵果酒。此外，非酿酒酵母通过可分泌多种胞外酶，分解果汁中香气前体物质，有助于丰富果酒中香气物质的种类和含量，本研究仅测定了该菌株 β-葡萄糖苷酶的产生能力，测定酶的种类有限，其蛋白酶、葡聚糖酶、木聚糖酶、淀粉酶、脂肪酶等其它酶类还需要做进一步的研究，以进一步分析该菌株的产酶特性。

综上，本研究首次报道了从贵农 5 号刺梨果实中分离与鉴定非酿酒酵母，并进行了混合发酵刺梨果酒研究，该研究为进一步提升刺梨果酒品质奠定了基础，在后期的研究中，将扩大菌株的研究种类，为刺梨酿造筛选更多优质本土酵母，同时也将进一步进行放大生产，进行中试化试验。

参考文献

[1] Domizio P，Liu Y，Bisson L F，et al. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine [J]. Food Microbiol，2014：215-237.

[2] Prior K J，Bauer F，Divol B. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine [J]. Food Microbiology，2019，79：75-84.

[3] 原苗苗，赵新节，姜凯凯，等. 3 株非酿酒酵母在模拟葡萄汁中的生长特性与发酵香气 [J]. 食品工业科技，2018，39(9)：111-118，123.

[4] Wang L，Zhang B，Xiao J，et al. Physicochemical，functional，and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit [J]. Food Chemistry，2018，249：127-135.

[5] 姚敏. 刺梨果酒技术研究-发酵过程成分变化及与刺梨浸泡酒的营养、风味、滋味比较 [D]. 贵阳：贵州大学，2015.

[6] 李玉素. 贵州探讨打通刺梨产品绿色通道 拟推动绿色产品走出国门 [N]. 中国新闻网，2019-03-06.

[7] 张季，苟惠荣，蔡卫东，等. 贵州刺梨栽培技术 [J]. 植物医生，2018，31(12)：46-47.

[8] 李新菊. 非酿酒酵母的筛选及多样性研究 [D]. 石河子：石河子大学，2015.

[9] 徐亚男. 非酿酒酵母菌的筛选及产酶研究 [D]. 石河子：石河子大学，2016.

[10] 蒋文鸿. 昌黎与济源产区高产 β-葡萄糖苷酶野生非酿酒酵母的筛选及鉴定 [D]. 杨凌：西北农林科技大学，2014.

[11] 刘灿珍，董书甲，姜凯凯，等. 5 株非酿酒酵母的耐受性及发酵特性研究 [J]. 中国酿造，2017，36(10)：42-46.

[12] 蒲鹏飞. 非酿酒酵母与酿酒酵母的相互作用及其对海红果酒品质的影响 [D]. 西安：陕西科技大学，2018.

[13] 王优蓓，肖凤，季雪傲，等. 10 种非酿酒酵母硫化氢产生能力及动态分析 [J]. 中国酿造，2017，36(6)：23-27.

[14] 侯晓瑞，王婧，杨学山，等. 甘肃河西走廊葡萄酒产区高产 β-葡萄糖苷酶酵母菌株筛选 [J]. 食品科学，2014，35(23)：139-143.

[15] 贺红早，张玉武，刘盈盈，等. 三种酵母对无籽刺梨果酒品质的影响 [J]. 酿酒科技，2015(10)：10-13.

[16] 余欢，管敬喜，杨莹，等. 7 株野生葡萄酒酵母对 '桂葡 3 号' 干白葡萄酒香气成分的影响 [J]. 食品科学，2019，40(4)：251-258.

[17] 全国食品工业标准化技术委员会酿酒分技术委员会. GB/T 15038-2006 葡萄酒、果酒通用分析方法 [S]. 北京：中国标准出版社，2007.

[18] 李晓旭，李家政. 优化蒽酮比色法测定甜玉米中可溶性糖的含量 [J]. 保鲜与加工，2013，13(4)：24-27.

[19] 贾言言. 2 株非酵母属酵母对酿造菠萝酒和番木瓜酒风味的影响 [D]. 海南：海南大学，2015.

[20] 李雪，杨艳，王瑜，等. 不同酒曲发酵刺梨鲜果香气成分分析 [J]. 食品工业科技，2017，38(22)：268-272，285.

[21] 罗小杰. 刺梨果汁澄清技术研究 [J]. 广西轻工业，2011，27(4)：6-7.

[22] 王汝瑱. 陕西泾阳酿酒酵母与非酿酒酵母酿酒特性的比较研究 [D]. 杨凌：西北农林科技大学，2011.

[23] Bely M，Stoeckle P，Masneuf Pomar，et al. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* culture on high sugar fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology，2008，122(3)：312-320.

[24] Kapsopoulou K，Mourtzini A，Anthoulas M，et al. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. World Journal of Microbiology and Blotechnology，2007，23(5)：735-739.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net