

猕猴桃果酒专用酵母的筛选与鉴定

Screening and identification of special yeast for kiwi wine

蒋 成 魏妙宏 刘 路 赵雅芹

JIANG Cheng WEI Miao-hong LIU Lu ZHAO Ya-qin

赵江林 侯晓燕 陈安均

ZHAO Jiang-lin HOU Xiao-yan CHEN An-jun

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

摘要:旨在筛选酿制猕猴桃果酒专用酵母,为猕猴桃酒在生产过程中品质改善提供专用菌种资源。通过菌落形态和 18S rDNA 进行测序鉴定菌株,确定从猕猴桃表面筛选出的 3 株酵母菌的种属关系,并比较分析三者的发酵力、酒精和二氧化硫的耐受情况,采用 3 株酵母酿制猕猴桃酒,经陈酿后测定酒的理化指标、甲醇含量及挥发性风味物质,筛选最理想的菌株。通过分子生物学鉴定,3 株菌株被鉴定为季也蒙毕赤酵母,其中菌株 Q3 的发酵力最强,能够耐受酒精体积分数为 16%,可耐受 SO₂ 的质量浓度为 300 mg/kg,酿制的猕猴桃酒酒精度可达 11.54% Vol, V_C 含量 390.82 mg/L,残糖 5.35 g/L,甲醇含量 87.7 mg/L,检测出挥发性风味物质 25 种。菌株 Q3 在发酵力、酒精和二氧化硫耐受方面都优于菌株 Q1、Q2,能满足工业需求,且菌株 Q3 酿制的猕猴桃酒品质优良,甲醇含量低,在猕猴桃酒工业中具有良好的运用前景。

关键词:猕猴桃酒;筛选;鉴定;季也蒙毕赤酵母

Abstract: In order to screen raw and low-yield methanol kiwifruit yeast and provide special strains resources to the kiwifruit wine production. Strains were identified by colony morphology and 18S rDNA sequencing to determine the species relationship of the three strains of yeast. The fermentation capacity, alcohol and sulfur dioxide tolerance were evaluated. Additionally, the three strains were used for kiwifruit wine fermentation, and the physicochemical properties, methanol content and volatile flavor compounds of the product were determined. The three strains were identified as *Pichia guilliermondii* by molecular biology. Among them, Q3 had the strongest fer-

mentation capacity, it could tolerate 16% of alcohol and 300 mg/kg of SO₂. The alcoholicity of brewed kiwifruit wine by Q3 was 11.54% Vol, the vitamin C 390.82 mg/L, the residual sugar 5.35 g/L, and the methanol 87.7 mg/L. In addition, there were 25 kinds of volatile flavor compounds were detected. The strain Q3 screened from the surface of kiwifruit is superior to the strains Q1 and Q2 in the aspects of fermentation ability, alcohol and sulfur dioxide tolerance. And kiwifruit produced by Q3 has good quality and low methanol content, and has bright application prospect in the kiwifruit industry.

Keywords: kiwi wine; selection; identification; *pichia guilliermondii*

猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch) 原产地为中国,被称为“水果之王”,属于猕猴桃科 (*Actin-idiaceae*) 猕猴桃属 (*Actinidia*) 的植物果实^[1]。近年,猕猴桃栽培面积飞速增长,猕猴桃精深加工越发重要。采用葡萄酒商业酵母酿造猕猴桃果酒典型性不强、果香不突出、风味偏单薄,其原因是多方面的,其中缺乏猕猴桃酒专用酿酒酵母是其主要因素之一^{[10]7-8[11]}。有研究者希望通过筛选酿制猕猴桃酒专用酵母来提高猕猴桃酒的品质,如周一琴等^[12]从猕猴桃表面筛选出 1 株酿制猕猴桃酒的产香菌株,但该菌株耐受二氧化硫能力不强;罗安伟^{[10]107-108}构建出 1 株嗜杀生香的猕猴桃酒酿酒酵母,但并没对菌株发酵猕猴桃酒中甲醇含量进行报道;左勇等^[13]筛选出 1 株酿制野生猕猴桃果酒的酵母菌,但没有对菌株的酒精和 SO₂ 耐受情况进行报道。

本试验拟从猕猴桃果实表面获得 3 株菌株,通过试验希望筛选出 1 株发酵性能够满足猕猴桃酒工业生产的要求,同时 V_C 保留率高、低产甲醇生香的猕猴桃酒专用优良酵母。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料与试剂

秦美猕猴桃:雅安农贸市场;

基金项目:四川省重大科技成果转化示范项目(编号:2017CC0067)

作者简介:蒋成,男,四川农业大学在读硕士研究生。

通信作者:陈安均(1970—),男,四川农业大学副教授,博士。

E-mail:anjunc003@163.com

收稿日期:2018-01-06

乙醇:色谱纯,成都市科隆化学品有限公司;
甲醇:色谱纯,东莞康润实验科技有限公司;
4-甲基-2 戊醇标准品:色谱纯,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;
蛋白胨、酵母粉、琼脂:国产生化试剂;
PCR 扩增试剂盒:生工生物工程上海股份有限公司;
引物 ITS1/ITS4:北京擎科新业生物技术有限公司;
其它试剂均为国产分析纯;
菌种 Q1、Q2、Q3:由四川农业大学食品学院从猕猴桃果实表皮筛选获得。

1.1.2 培养基

YEPD 培养基:酵母粉 10 g、蛋白胨 20 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL、pH 6.0、115 ℃灭菌 20 min;
猕猴桃清汁培养基:猕猴桃破碎后榨汁,加入 60 mg/L 果胶酶,0.7 g/L 硅藻土 40 ℃恒温保护 4.5 h,虹吸上清液得清汁,加入 SO₂ 并调整其浓度为 80 mg/L,然后加入蔗糖,调整猕猴桃清汁糖度为 20 Brix,置于 4 ℃冰箱备用^{[10]21-22}。

1.1.3 主要仪器设备

气浴恒温振荡器:ZD-85 型,金坛市科析仪器有限公司;
生物安全柜:HR40-IIA2 型,南京温诺仪器设备有限公司;
生化培养箱:SPX-250 型,上海申贤恒温设备厂;
气相色谱仪:7890B 型,美国 Agilent Technologies 公司;
分析天平:京制 00000249 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;
电热恒温水浴锅:DZKW-D-4 型,北京市永光明医疗仪器厂;
双目光源生物显微镜:CX21 型,奥林巴斯有限公司;
手动进样手柄:SPME 型,上海安普科学仪器有限公司;
固相微萃取头:PDMS/DVB/CAR 50/30 μm,北京康林科技有限责任公司;
1 μL 微量进样器:W-3 型,上海安亭微量进样器厂;
气相色谱/质谱联用仪:7890A/59750 型,美国 Agilent Technologies 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 在生物安全柜中分别取一环保藏在试管斜面上的菌株 Q1、Q2、Q3,于 YEPD 固体培养基上活化 2 次。对活化好的菌株进行菌落形态的观察和镜检。同时取 2 环活化好的菌株分别于装有 10 mL 猕猴桃汁的试管中,在 25 ℃、150 r/min 恒温振荡培养 36 h。将 2 支试管的菌液接入装有 250 mL 猕猴桃汁的三角瓶中,在 25 ℃、150 r/min 恒温振荡培养 30 h,用无菌生理盐水将三角瓶中扩大培养液的菌数调至 1×10⁷ CFU/mL 备用^[14]。

1.2.2 3 株菌株的分子生物学鉴定 3 株菌的总 DNA 提取参考文献^[15~16]。将提取的总 DNA 送往成都擎科梓熙生物技术有限公司进行基因扩增、克隆测序。对测得的结果除杂处理后进行拼接,将拼接后的序列导入 NCBI 进行 Blast 比对,筛选相似度较高的 18S rDNA 序列,使用 Clustal X 软件进行序列比对,采用 MEGA5.1 绘制发育树^[15-16]。

1.2.3 3 株菌发酵力的测定 取猕猴桃汁 150 g 于三角瓶中,将菌株 Q1、Q2、Q3 的扩大培养液按 5% 的接种量接入三角瓶中,在 28 ℃条件下恒温培养,每天对其进行称重,计算 CO₂ 的生成量,比较 3 株菌株的发酵力和起酵速度^{[10]20-21}。

1.2.4 3 株菌耐受试验

(1) 酒精耐受试验:配制酒精体积分数为 8%,10%,12%,14%,16% 的 YEPD 液体培养基,取不同酒精体积分数的 YEPD 液体培养基 10 mL 分装于试管中(内置杜氏小管),取各菌株活化好的菌液 2 mL 接种于不同酒精梯度的试管中,在 28 ℃生化培养箱中恒温培养,每隔 24 h 观察产气情况,比较 3 株菌的酒精耐受情况^[17-18]。

(2) 二氧化硫耐受试验:配制 SO₂ 质量浓度为 100,150,200,250,300 mg/L 的 YEPD 液体培养基(以游离的 SO₂ 计),取不同 SO₂ 质量浓度的 YEPD 液体培养基 10 mL 分装于试管中(内置杜氏小管),取各菌株活化好的菌液 2 mL 接种于不同 SO₂ 质量浓度的试管中,在 28 ℃生化培养箱中恒温培养,观察产气情况,比较 3 株菌的 SO₂ 耐受情况^[17-18]。

1.2.5 猕猴桃酒的酿制 分别取猕猴桃汁 800 mL 于 12 个磨砂广口瓶中,将 3 株菌的扩大培养液按 5% 的接种量分别接入广口瓶中,每株菌接 4 个瓶,于 23 ℃恒温生化培养箱中发酵 8 d,然后进行倒罐,倒罐后在 23 ℃条件下继续发酵 10 d,分离酒脚得到各菌株发酵的原酒,将原酒转入玻璃罐密封,在 20 ℃条件下陈酿 30 d,得到猕猴桃酒^{[10]38-39}。

1.2.6 猕猴桃酒理化指标测定 分别测定 3 株菌株发酵猕猴桃酒的酒精度、总酸、总糖、V_C、干浸出物,测定方法按 GB/T 15038—2006 执行。

1.2.7 甲醇的测定

(1) 样品的预处理和溶液的配制:按 GB/T 15038—2006 执行。

(2) 气相色谱条件:按 GB/T 15038—2006 执行。

(3) 回收率的测定:根据文献^[19~20],修改如下,向 6 个 10 mL 容量瓶中分别加处理好的样品至刻度线并加入内标物,分别向 3 个容量瓶中加入 0.3 mL 体积分数为 2% 的甲醇溶液,将 6 个样品处理后进行分析,按式(1)计算加标回收率。

$$c = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100\%,$$

(1)

式中:

c ——回收率,%;

m_1 ——加标样品中甲醇测定值,g;

m_2 ——样品中甲醇测定值,g;

m_3 ——加标甲醇的含量,g。

1.2.8 猕猴桃酒风味物质的测定

(1) 猕猴桃酒香气物质的萃取:取酿制的猕猴桃酒 4 mL 于样品瓶,向瓶中加入 1 g NaCl,于 40 ℃恒温水浴平衡 5 min 后,将老化的萃取头插入样品瓶的上部,40 ℃条件下萃取 40 min 后,将萃取头拔出,GC 解析 5 min,进行猕猴桃酒香气物质分析^[21-22]。

(2) GC 条件:HP-5MS 色谱柱(30 m×0.250 mm);升温

程序初始温度 40 ℃ 保持 8 min,以 5 ℃/min 升至 75 ℃,再以 3.5 ℃/min 升至 125 ℃,再以 5 ℃/min 升至 185 ℃ 保持 1 min,再以 10 ℃/min 升至 230 ℃ 保持 20 min;载气为氦气,流速为 1.2 mL/min,不分流;进样口温度为 260 ℃。

(3) MS 条件:电离方式 EI,电离电压 70 eV,灯丝流量 0.25 mA,连接杆温度 280 ℃,电子倍增器电压 1 500 V,扫描范围 30~350 AMU,离子源温度 250 ℃。对检测到的香气物质在普库 NIST11.L 进行检索,选取匹配度在 80% 以上的物质确认为香气成分。并以归一化法计算各物质峰面积,作为各物质的相对含量。比较各菌株产生的酯类化合物,分析各菌株发酵的猕猴桃酒的生香性能。

1.2.9 数理统计分析 采用 IBM SPSS Statistics 20 软件对数据进行统计分析;采用 OriginLab OriginPro 8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 菌落形态的观察 菌株 Q1、Q2、Q3 的菌落形态和细胞形态见图 1。

由图 1(a)可知,菌株 Q1、Q2、Q3 具有典型的酵母菌菌落特征:菌落大而厚且为乳白色,单菌落为椭圆形、菌落表面光滑、黏稠、中央和边缘颜色均一。

由图 1(b)可知,3 株菌为典型的圆形酵母属,出芽生殖。

2.1.2 分子生物学鉴定 利用引物 ITS1/ITS4 对菌株 Q1、Q2、Q3 进行 PCR 扩增然后测序,Q1、Q2、Q3 3 株菌株 18S rDNA 测序结果拼接后的有效序列长度分别为 614,615,612 bp 左右,将序列输入到 NCBI 进行同源比较,选取与菌株 Q1、Q2、Q3 序列相似的菌株序列,运用 Clustalx 软件进行比对,利用 MAGE 5.1 软件构建系统发育树,最后将序列在 Gen bank 上注册登录,获得登录号分别为 SUB3257838、SUB3297127、SUB3297298,结果见图 2。

由图 2 可知,菌株 Q1、Q2、Q3 的分支置信度为 68%,同时 3 株菌株与菌株 *Meyerozyma guilliermondii* CBS 2030、*Meyerozyma guilliermondii* CBS 2030、*Pichia guilliermondii*

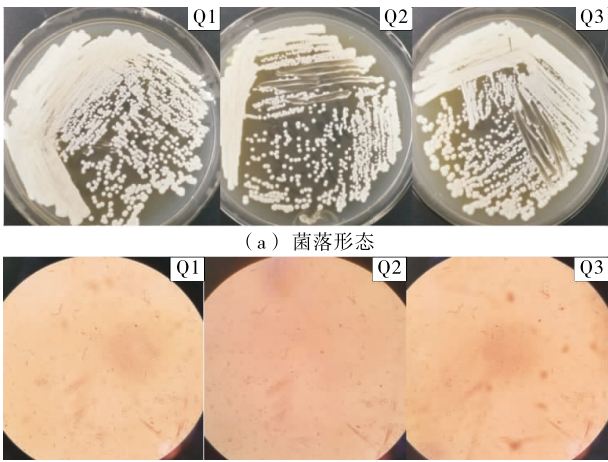


图 1 菌株 Q1、Q2、Q3 的形态特征

Figure 1 Morphology characteristics of strain Q1,Q2,Q3

ATCC6 260 的 18S rDNA 同源性为 99%,分支置信度为 88%,因此可以判定 3 株菌都属于季也蒙毕赤酵母。

2.2 发酵力的测定

对菌株 Q1、Q2、Q3 进行发酵力测定,结果见图 3。

由图 3 可知,3 株菌在接种后能够迅速起酵,其中菌株 Q2 发酵速度最快在第 2 天到达发酵高峰期,在第 4 天完成主发酵,菌株 Q3 相对 Q1 发酵速度较缓在第 4 天达到发酵高峰期,在 6~7 d 完成主发酵,菌株 Q1 主发酵速度平缓,在 6~7 d 完成主发酵。通过 8 d 发酵菌株 Q1、Q2、Q3 发酵液总失重量分别为 16.42,16.85,20.66 g。3 株菌发酵力大小比较为:Q3>Q2>Q1。通过对 3 株菌的发酵力比较可以得出:3 株酵母菌就发酵力和起酵速度方面能够用于猕猴桃汁的发酵。

2.3 耐受试验

2.3.1 酒精耐受试验 对菌株 Q1、Q2、Q3 进行酒精耐受试验,结果见表 1。

由表 1 可知,在酒精体积分数 8% 和 10% 的条件下 3 株菌在 48 h 都能起酵。在酒精体积分数为 14% 条件下菌株

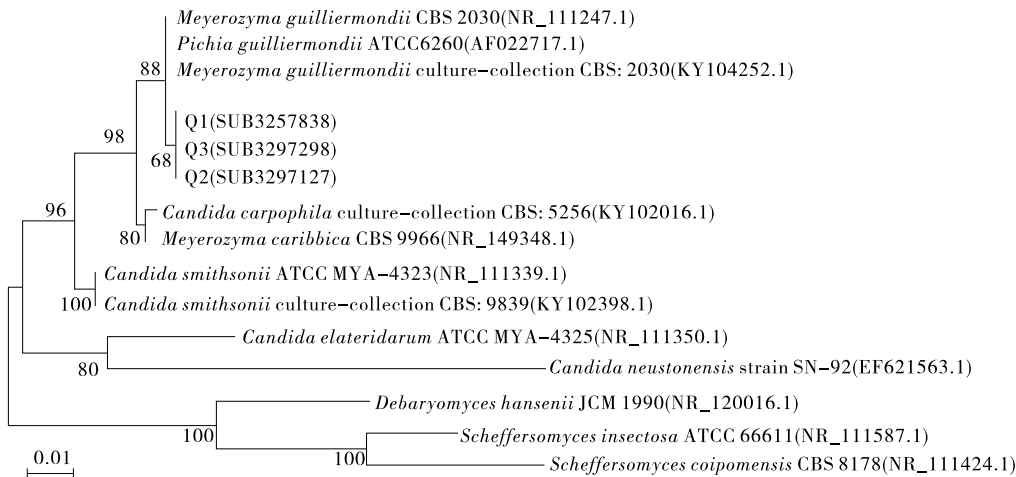


图 2 菌株 Q1、Q2、Q3 系统发育

Figure 2 Phylogenetic tree of Q1,Q2,Q3

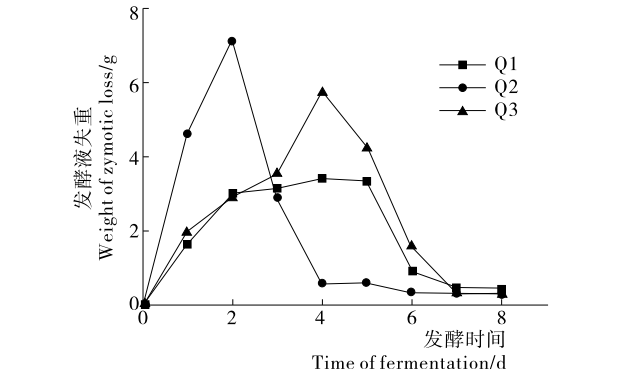


图 3 各菌株发酵力曲线

Figure 3 Curves of each strain's fermentation force

表 1 酒精耐受试验 [†]						
Table 1 Alcohol tolerance test						
菌株	时间/ h	酒精体积分数/%				
		8	10	12	14	16
Q1	24	—	—	—	—	—
	48	++++	++	+	—	—
	72	++++	+++	++	+	—
	96	++++	++++	++++	++	—
Q2	24	—	—	—	—	—
	48	++	+	—	—	—
	72	++++	++++	+	—	—
	96	++++	++++	++	+	—
Q3	24	—	—	—	—	—
	48	++++	++++	++	+	—
	72	++++	++++	++++	+++	—
	96	++++	++++	++++	++++	+

[†] +表示气体量占杜氏小管的 1/4;++++表示气体充满整个杜氏小管;—表示不产气。

Q1 在 72 h 时起酵,菌株 Q2 在 96 h 起酵,Q3 在 48 h 起酵。在酒精体积分数为 16% 条件下 Q1、Q2 不起酵,Q3 在 96 h 起酵。说明菌株 Q1、Q2 能够在酒精体积分数为 14% 的条件下耐受,菌株 Q3 能够在酒精体积分数为 16% 的条件下耐受。通过对 3 株菌耐受的酒精体积分数和在相同酒精体积分数下起酵时间的对比可以得出:酒精耐受能力大小为 Q3>Q1>Q2,3 株菌对酒精的耐受方面能够满足猕猴桃酒的生产要求。

2.3.2 二氧化硫耐受试验 对菌株 Q1、Q2、Q3 进行二氧化硫耐受试验,结果见表 2。

由表 2 可知,在二氧化硫质量浓度为 100 mg/kg 的条件下,菌株 Q1、Q2、Q3 在 18 h 时均能起酵。在二氧化硫质量浓度为 200 mg/kg 的条件下,菌株 Q2 在 24 h 时产气量不能充满整个杜氏小管。在二氧化硫质量浓度为 300 mg/kg 的条件下菌株 Q2 不起酵,菌株 Q1 和 Q3 在 48 h 时产气量充满整个杜氏小管,但菌株 Q3 能在 24 h 起酵。通过对菌株 Q1、Q2、Q3 二氧化硫耐受试验的比较可以得出:二氧化硫耐受能力大小为 Q3>Q1>Q2,3 株菌对 SO₂ 的耐受能够满足猕猴桃酒工业的生产要求。

表 2 二氧化硫耐受试验 [†]						
Table 2 SO ₂ resistance tests of screened strains						
菌株	时间/ h	SO ₂ 质量浓度/(mg·kg ⁻¹)				
		100	150	200	250	300
Q1	18	+	—	—	—	—
	24	++++	++++	++++	+	—
	48	++++	++++	++++	++++	++++
Q2	18	+	+	—	—	—
	24	++++	++	+	—	—
	48	++++	++++	++++	++++	—
Q3	18	++	+	—	—	—
	24	++++	++++	++++	++	++
	48	++++	++++	++++	++++	++++

[†] +表示气体量占杜氏小管的 1/4;++++表示气体充满整个杜氏小管;—表示不产气。

2.4 猕猴桃酒理化指标的测定

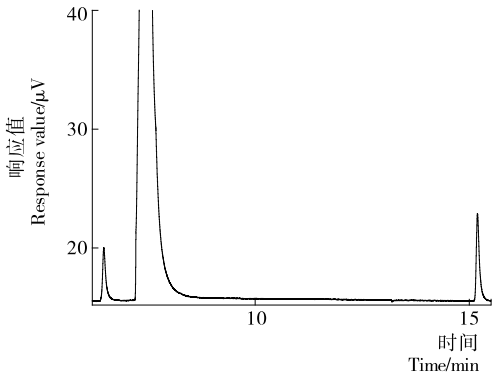
对菌株 Q1、Q2、Q3 发酵陈酿好的猕猴桃酒进行理化指标测定,结果见表 3。

表 3 猕猴桃酒理化指标测定				
Table 3 Physicochemical properties of kiwi wine				
菌株	酒精度(20℃)/ %Vol	Vc 含量/ (mg·L ⁻¹)	总酸/ (g·L ⁻¹)	残糖/ (g·L ⁻¹)
Q1	11.56	233.01	11.15	3.96
Q2	11.19	234.46	10.89	6.27
Q3	11.54	390.82	10.95	5.35

由表 3 可知,菌株 Q1、Q2、Q3 酿制猕猴桃酒的酒精度分别为 11.56%, 11.19%, 11.54% Vol, 总酸分别为 11.15, 10.89, 10.95 g/L。残糖分别为 3.96, 6.27, 5.35 g/L。其中菌株 Q3 发酵的猕猴桃酒 Vc 含量 390.82 mg/L 远远高于菌株 Q1、Q2,是一株比较理想的菌株。

2.5 猕猴桃酒甲醇含量的测定

2.5.1 校正因子的测定 对甲醇、4-甲基-2-戊醇标准品的分离见图 4,6 次测定的相对校正因子见表 4。



1. 甲醇 2. 乙醇 3. 4-甲基-2-戊醇

图 4 甲醇、4-甲基-2-戊醇标准品的分离色谱图

Figure 4 Chromatogram of isolation of methanol, 4-methyl-2-pentanol standards

表 4 甲醇的相对校正因子

Table 4 The relative correction factor of Methanol

测定次数						平均值	RSD/%
1	2	3	4	5	6		
2.003	2.089	2.066	2.134	2.050	2.062	2.067	2.1

由图 4 可知,甲醇和内标物质能够很好地分离,在本试验条件下甲醇出峰的时间在 6.466 min 附近,4-甲基-2-戊醇的出峰时间在 15.173 min 附近。由表 4 可知,平行测定 6 次时相对校正因子的相对标准偏差(RSD)为 2.1%,根据以上试验数据求得校正因子为: $f=2.067$ 。

2.5.2 回收率试验和样品甲醇含量测定 加标回收率测定结果见表 5,对菌株 Q1、Q2、Q3 发酵陈酿好的猕猴桃酒进行甲醇含量测定结果见表 6。

表 5 甲醇加标回收率

Table 5 The recovery rate of Methanol spiking dosages

样品	甲醇含量/(mg·L ⁻¹)						RSD/%	平均回收率/ %
	1	2	3	4	5	6		
加标后菌株 Q3	528.2	542.2	560.9	543.3	558.0	567.1	2.6	97.5
菌株 Q3 样品	92.8	88.3	86.4	83.0	87.4	88.1	3.6	

表 6 猕猴桃酒甲醇含量测定结果[†]

Table 6 The measurement results of Methanol content in Kiwi wine ($n=6$)

样品	甲醇含量/(mg·L ⁻¹)						平均值/ (mg·L ⁻¹)
	1	2	3	4	5	6	
Q1	133.5	130.2	131.2	134.3	132.3	132.7	132.4±1.50 ^b
Q2	218.6	206.4	234.5	221.7	233.9	223.6	223.1±2.68 ^a
Q3	92.8	88.3	86.4	83.0	87.4	88.1	87.7±3.17 ^c

† 不同字母表示不同处理之间差异显著,P<0.05。

2.6 猕猴桃酒香气成分的测定

将 3 株菌检测出的挥发性物质在普库 NIST11.L 进行检索,得到香气物质和相对含量分别见表 7。

由表 7 可知,在本试验条件下对 3 株菌株发酵的猕猴桃酒香气物质的分析,菌株 Q1 发酵的猕猴桃酒鉴定出 20 种香气物质,Q2 鉴定出 29 种,Q3 鉴定出 25 种。其中菌株 Q1 发酵猕猴桃酒的香气成分酯类物质有 11 种,相对含量为总香气物质的 76.39%,己酸乙酯占 15.47%、苯甲酸乙酯 13.33%、9-癸烯酸乙酯 12.32%、癸酸乙酯 24.60%,醇类 3 种相对含量为总香气物质的 13.53%,苯乙醇 11.72%、4-萜烯醇 1.28%、(R)-(+) - β -香茅醇 0.53%。菌株 Q2 发酵猕猴桃酒的香气成分酯类物质有 18 种,相对含量为总香气物质的 82.3%,己酸乙酯 7.69%、苯甲酸乙酯 8.65%、9-癸烯酸乙酯 16.6%、癸酸乙酯 28.97%,醇类 3 种,苯乙醇 5.82%、4-萜烯醇 0.60%、反式-橙花叔醇 0.13%。菌株 Q3 发酵猕猴桃酒的香气成分酯类物质有 12 种,相对含量为总香气物质的 70.27%,己酸乙酯 14.30%、苯甲酸乙酯 19.39%、9-癸烯酸乙酯 7.67%、癸酸乙酯 15.78%,醇类 4 种,芳樟醇 3.38%、苯乙醇 13.70%、4-萜烯醇 1.41%。酯类化合物是果酒中重要的

206

由表 5 可知,向 Q3 样品中加入 474 mg 甲醇后测得甲醇回收率为 97.5%,RSD 小于 5%,说明在本试验条件下该方法能够用于猕猴桃酒中甲醇的测定。由表 6 可知,3 株菌株发酵的猕猴桃酒中甲醇含量 $Q3<Q1<Q2$ 。菌株 Q3 发酵的酒中甲醇含量仅为 87.7 mg/L,显著低于菌株 Q1、Q2 发酵的($P<0.05$);菌株 Q2 发酵的猕猴桃酒中甲醇含量与菌株 Q1、Q3 具有显著差异($P<0.05$),含量为 223.1 mg/L;菌株 Q1 发酵的猕猴桃酒中甲醇含量为 132.4 mg/L。甲醇是果酒中的有害物质,其本身具有一定的毒性,饮用甲醇超标的果酒,会损害人的中枢神经系和视网膜,严重者可能会导致失明,甚至死亡^[23-25]。因此,果酒中甲醇含量必须严格控制。目前,对于猕猴桃酒中甲醇含量没有相关规定,参考 GB 15307—2006 规定,每升葡萄酒中的甲醇含量必须在 400 mg 以下。单从甲醇含量这一指标可以得出菌株 Q1、Q3 更适合猕猴桃酒的酿造。

风味物质,其中乙酯类化合物,主要呈现水果香和花果香^[26],是香气的骨架成分^[27],如乙酯类化合物在中国浓香型白酒中含量很高^[26]。本研究筛选的株菌 Q3 发酵猕猴桃果酒的风味物质中乙酯类化合物相对含量很高,使得猕猴桃酒果香浓郁,赋予猕猴桃酒怡人的香气,如检测出的己酸乙酯似菠萝香蕉水果香、癸酸乙酯似葡萄香等。

3 结论

本研究从猕猴桃表面分离、纯化获得 3 株能够发酵猕猴桃果酒的菌株,对菌株发酵力测定发现 3 株菌株发酵力强,发酵 8 d 后发酵液总失重均在 16.00 g 以上,其中菌株 Q3 的发酵液失重为 20.66 g 高于菌株 Q1、Q2;各株菌在酒精体积分数 14%、二氧化硫质量分数 250 mg/L 的发酵培养基中能够起酵,在酒精体积分数 16%的培养基中只有 Q3 能够起酵;菌株 Q1、Q2、Q3 发酵的猕猴桃果酒甲醇含量均低于 224 mg/L,菌株 Q3 发酵的果酒甲醇含量显著($P<0.05$)低于其它菌株为 87.7 mg/L;经过综合比较菌株 Q3 在发酵猕猴桃果酒方面优于其它 2 株,经过进一步驯化可考虑用于猕猴桃果酒的生产。对这 3 株菌株进行形态和分子生物学鉴

表 7 菌株 Q1、Q2、Q3 发酵猕猴桃酒的香气分析[†]

Table 7 Aroma analysis results of the strain Q1、Q2、Q3 fermented Kiwi Wine

保留时间/ min	中文名称	相对含量/%			保留时间/ min	中文名称	相对含量/%		
		Q1	Q2	Q3			Q1	Q2	Q3
5.725	丁酸乙酯	0.49	0.17	nd	25.540	乙酸苯乙酯	1.28	4.98	1.50
9.701	乙酸异戊酯	0.00	1.13	2.61	26.959	甲基壬基甲酮	0.00	0.00	0.41
10.073	苯乙烯	nd	nd	0.77	27.262	香芹酚	0.00	0.00	0.77
15.269	己酸	2.36	0.00	1.58	27.268	百里香酚	0.92	0.32	nd
15.406	正己酸乙酯	15.47	7.69	14.30	27.663	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	nd	0.25	0.30
15.973	乙酸己酯	nd	0.36	nd	28.132	癸酸甲酯	nd	0.21	nd
16.385	右旋萜二烯	nd	0.36	nd	29.883	癸酸	2.86	4.60	1.22
17.546	2-糠酸乙酯	0.62	0.36	0.75	28.984	正辛酸异丁酯	nd	0.17	nd
18.902	2,4-二甲基苯乙烯	0.79	0.36	0.79	30.261	大马士酮	0.36	0.32	0.36
19.120	苯甲酸甲酯	5.39	3.64	6.73	30.427	9-癸烯酸乙酯	12.32	16.60	7.67
19.389	芳樟醇	nd	nd	3.38	30.707	癸酸乙酯	24.60	28.97	15.78
19.423	3-甲硫基丙酸乙酯	nd	2.92	nd	34.220	2,4-二叔丁基苯酚	2.79	1.68	3.89
19.847	苯乙醇	11.72	5.82	13.70	35.599	橙花叔醇	nd	nd	0.34
20.430	辛酸甲酯	0.56	0.36	0.38	35.611	反式-橙花叔醇	nd	0.13	nd
22.170	苯甲酸乙酯	13.33	8.65	19.39	36.406	月桂酸乙酯	1.90	5.30	0.45
22.393	4-萜烯醇	1.28	0.60	1.41	37.642	癸酸 3-甲基丁酯	nd	0.15	nd
22.965	辛酸	nd	3.28	nd	41.041	十四酸乙酯	nd	0.15	nd
24.470	香茅醇	nd	nd	0.81	44.989	棕榈酸乙酯	0.43	0.49	0.45
24.481	(R)-(+) - β -香茅醇	0.53	nd	nd					

[†] “nd”表示酒样中未检测到该香气成分。

定,3株菌均为季也蒙毕赤酵母,为今后猕猴桃果酒专用酵母的筛选提供理论支持。

参考文献

[1] 袁琳,宋育阳,鲁燕汶,等.两种酵母菌对猕猴桃原酒品质的影响[J].山西农业大学学报:自然科学版,2017,37(2):130-133.

[2] HAFEZI F, RAD H E, NAGHIBZADEH B, et al. Actinidia deliciosa (kiwifruit), a new drug for enzymatic debridement of acute burn wounds[J]. Burns, 2010, 36(3): 352-355.

[3] 楼丽君,吕定量,胡增仁,等.猕猴桃根抗肝癌的实验研究[J].中华中医药学刊,2009,27(7):1509-1511.

[4] 罗安伟.猕猴桃酒生香嗜杀酵母的选育[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.

[5] 周一琴.原生质体电融合法构建嗜杀猕猴桃酒酵母[D].杨凌:西北农林科技大学,2008:2-3.

[6] 周一琴,罗安伟,刘兴华,等.猕猴桃酒天然优良酵母的筛选[J].中国酿造,2008(1):63-65.

[7] 左勇,杨小龙,傅彬,等.野生猕猴桃果酒酵母菌的筛选及鉴定[J].酿酒科技,2015(11):37-40.

[8] 朱宝镛.葡萄酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1995:89-90.

[9] CHUMILLAS M R, CORTINES M E, GOMEZ A L, et al. E-valuation of a ra-pid DNA extraction method todetect yeast cells by PCR in orange juice[J]. Food Control, 2005(18): 33-39.

[10] VASDINYEI R, DEA' K T. Characterization of yeast isolate-soriginating from Hungarian dairy products using traditionaland molecular identification techniques[J]. International Journal of

Food Microbiology, 2003, 86: 123-130.

[11] 王庆科,孙中贯,陈青.枣酒酿造用酵母的筛选及发酵性能研究[J].中国酿造,2015,34(11):103-108.

[12] 郝瑶,王陶,李文,等.富硒猕猴桃果酒酵母的筛选及鉴定[J].食品科学,2014,35(21):175-179.

[13] 刘国平,黄诚,薛荣旋,等.顶空气相色谱内标法快速测定葡萄酒中甲醇[J].实用预防医学,2015,22(4):497-498.

[14] 张鹏,卢伟,管磊.内标法与外标法测定餐具洗涤剂中甲醇含量的分析比较[J].日用化学工业,2015,45(7):415-417.

[15] VELÁZQUEZ R, ZAMORA E, ÁLVAREZ M L, et al. Effects of new Torulaspora delbrueckii killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1222.

[16] GARCIA- CARPINTERO E G, SÁNCHEZ-PALOMO E, GONZÁLEZ-VINAS M A. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region[J]. Food Research International, 2011, 44(1): 61-70.

[17] 齐晓茹,师旭,王颀,等.赤霞珠干红葡萄酒中甲醇、乙酸乙酯、高级醇含量的测定[J].酿酒科技,2018(3):1-5.

[18] 赵丹平.白酒中超标甲醇的危害及控制[J].大家健康:中旬版,2015,9(19):26.

[19] 贾偶然.酒精中甲醇含量检测方法[J].现代食品,2016(23):65-67.

[20] 范文来,徐岩.酒类风味化学[M].北京:中国轻工业出版社,2014:117-124.

[21] 高传强.芝麻香型白酒风味物质及其生物活性研究[D].武汉:湖北工业大学,2017:4-6.