

# 酵母对无花果酒有机酸的影响

## The effect of yeast on the organic acids of fig wine

蒋成 陈安均 付云云 陈劫 刘兴艳

JIANG Cheng CHEN An-jun FU Yun-yun CHEN Jie LIU Xing-yan

侯晓艳 申光辉 张志清

HOU Xiao-yan SHEN Guang-hui ZHANG Zhi-qing

(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:**为研究不同商业酵母发酵对无花果酒有机酸的影响,通过5株商业酵母发酵无花果酒,测定无花果酒及汁中有机酸含量,通过主成分分析研究不同酵母与有机酸之间的相关性。结果表明:5株酵母发酵无花果汁后有机酸总量升高,乙酸、丁二酸、柠檬酸、马来酸含量升高,其中菌株D254发酵的酒中乙酸、丁二酸的含量最高分别为3 805.99, 2 194.29 mg/L, KD发酵的无花果酒中柠檬酸含量最高为1 635.31 mg/L, 不同菌株发酵无花果汁后富马酸、草酸含量均下降,菌株KD对草酸含量的保留高于其它菌株,为104.99 mg/L;通过主成分分析发现与菌株KD密切相关的有机酸种类最多,分别为苹果酸、柠檬酸、酒石酸、草酸。

**关键词:**无花果酒;有机酸;主成分分析;酵母菌

**Abstract:** The effect of fermentation with different yeast on the organic acids of fig wine was investigated. Five different commercial yeast were used in this test, and the content of organic acids in fig wine and juice was determined. Moreover, the relationship between quality of fig wine fermented by different yeast and the organic acid was investigated through the PCA analysis. The results showed that, content of total organic acid, including acetic acid, succinic acid, citric acid, maleic acid in fig wine fermented by five different yeast raised. The contents of acetic acid and succinic acid in wine fermented by D254 were 3 805.99 mg/L and 2 194.29 mg/L, respectively. The content of citric acid in KD fermenting wine was 1 635.31 mg/L. Moreover, all of the contents of fumaric acid and oxalic acid in wine fermented by different yeast declined. And the content of oxalic acid in KD fermenting wine (104.99 mg/L) was higher than others. The

PCA analysis indicated that, organic acid such as malic acid, citric acid, tartaric acid and oxalic acid showed apparent reciprocity with KD. The results of this experiment can provide theoretical basis to fig wine production.

**Keywords:** fig wine; organic acids; principal component analysis; yeast

无花果又称蜜果、天仙果,属于桑科榕属的植物果实<sup>[1]</sup>,是药食两用水果。无花果营养丰富,富含有机酸、矿物质、氨基酸、膳食纤维等<sup>[2]</sup>,同时还含有黄酮、多糖等功能成分<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4-6]</sup>表明,无花果药用价值极高,具有促进人体消化、润肠、消肿功能,同时还具抗癌、镇痛、抑菌作用的成分。目前,无花果主要以鲜食和药用价值为主<sup>[2]</sup>,然而,无花果受季节影响强,极不耐贮藏,常温一般贮藏1~2 d<sup>[1]</sup>,极大制约了无花果产业的发展。有研究提出,将无花果酿制成酒,能够保留无花果的营养价值和药用价值,延长保存时间<sup>[7]</sup>,无花果酒具有改善血脂和控制体重等功效<sup>[8]</sup>。

有机酸是果酒中酸味的主要来源,与果酒的品质密切相关,不仅能够影响果酒的稳定性,还影响果酒的pH值<sup>[9-11]</sup>。有机酸不仅赋予食品的酸味,还产生其它风味,如苹果酸产生苦味和涩味<sup>[12-14]</sup>。果酒中有机酸主要来源于水果和微生物的代谢活动,如酒精发酵、乙醇氧化、苹果乳酸发酵<sup>[15]</sup>。目前,酵母对发酵无花果酒中有机酸的影响尚未见报道。

基于上述原因,研究5株商业酵母对无花果酒有机酸的影响,为无花果酒的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 材料与试剂

无花果(*Ficus carica* Linn):雅安农贸市场;  
乙醇:色谱纯,成都市科隆化学品有限公司;

**基金项目:**国家重点研发计划课题(编号:2017YFC0505106)

**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:**2018-03-15

甲醇:色谱纯,东莞康润实验科技有限公司;

草酸、乙酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、马来酸、富马酸、丁二酸:标准品,上海阿拉丁试剂公司;

偏重亚硫酸钠、磷酸二氢钠、蛋白胨、酵母粉、琼脂:分析纯,成都市科隆化学有限公司;

菌株 KD、D254、EC1118、X16、BO213:市售。

### 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 °C 灭菌 20 min;

无花果果汁培养基:无花果破碎后榨汁,加入 60 mg/L 的果胶酶,0.7 g/L 的硅藻土 40 °C 恒温保护 4.5 h,虹吸上清液得清汁,加入 SO<sub>2</sub> 并调整其浓度为 80 mg/L,加入蔗糖,调整无花果清汁糖度为 20 Brix,置于 4 °C 冰箱备用。

### 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,南京诺谱仪器设备有限公司;

生化培养箱:SPX-250 型,上海申贤恒温设备厂;

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;

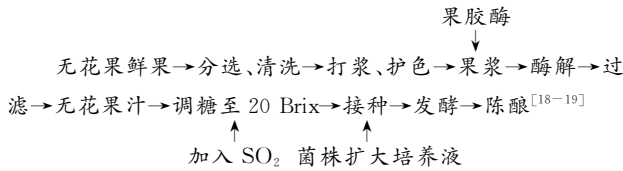
双目光源生物显微镜:CX21 型,奥林巴斯有限公司;

高效液相色谱:DEBAC05697 型,美国 Agilent Technologies 公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 5 株活性干酵母按 0.03% 的比例称取,加入 5% 的糖水中,在 30 °C 条件下活化 30 min。将活化的酵母全部转入无花果果汁培养基中,在 28 °C、150 r/min 气浴恒温振荡器中培养 48 h,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用无菌生理盐水洗涤 3 次,重新悬浮于细胞,用无菌生理盐水将悬浮液菌数调至 1×10<sup>7</sup> CFU/mL 备用<sup>[16-17]</sup>。

### 1.2.2 无花果酒的酿制工艺



1.2.3 有机酸的检测 标准液配制,样品处理参考吕国涛等<sup>[20]</sup>和肖作兵等<sup>[9]</sup>的方法。色谱柱:Agilent ZORBAX SB-Aq 250 mm×4.6 mm,5 μm;柱温 30 °C;检测波长 210 nm;流动相为 0.01 mol/L 磷酸氢二钾,磷酸调 pH=2.55,磷酸二氢钾溶液:甲醇(体积比)=95:5;流速为 1 mL/min;进样量 10 μL。根据标准品外标法进行定量分析,根据标准品的混标与单标对比确定不同有机酸的保留时间,进行定性分析。

1.2.4 试验数理统计分析 采用 IBM SPSS Statistics 20 软件,对本试验测得的定量数据进行统计分析;采用 OriginLab OriginPro 8.5 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 有机酸的分离

由图 1、2 可知,无花果酒及果汁中的有机酸能够得到较好的分离,各有机酸的色谱峰与标准品出峰时间一致,并且样品中各有机酸出峰未见干扰。

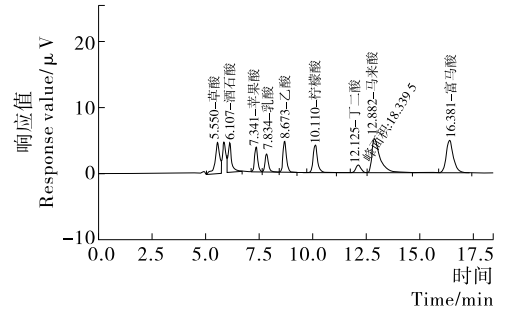


图 1 有机酸混合标品色谱图

Figure 1 The liquid chromatogram of calibration organic acid mixture

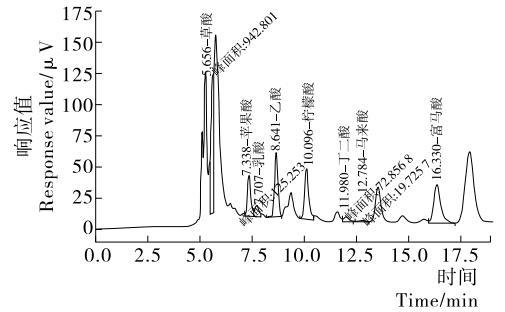


图 2 无花果汁中有机酸色谱图

Figure 2 The liquid chromatogram of fig juice organic acids

### 2.2 有机酸标品线性关系

由表 1 可知,不同浓度的有机酸标准品的质量浓度与峰面具有良好的线性关系。

### 2.3 无花果汁及酒中有机酸含量测定

对 5 株菌株发酵的无花果酒及无花果汁中有机酸含量进行测定,酸味特征参考文献<sup>[21]</sup>,结果见表 2。

由表 2 可知,5 株菌株发酵的无花果酒中检测到 9 种有机酸,分别为:草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、丁二酸、马来酸、富马酸,无花果汁发酵成无花果酒后有机酸总量升高。无花果汁中不含有酒石酸,在无花果汁发酵的过程中微生物代谢产生酒石酸。除富马酸外无花果汁与 5 种无花果酒中草酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、丁二酸、马来酸的含量均存在差异。乙酸在无花果汁及酒中含量最高,无花果汁经不同酵母发酵成酒,乙酸含量升高,菌株 D254 发酵的无花果酒乙酸含量高达 3 805.99 mg/L。其次,丁二酸、柠檬酸、马来酸在发酵成酒后含量也升高,D254 发酵的无花果酒丁二酸含量最高为 2 194.29 mg/L,KD 发酵的无花果酒柠檬酸含量最高为 1 635.31 mg/L。无花果汁中富马酸含量较低(11.2 mg/L),不同菌株发酵后无花果汁富马酸含量降低。

表 1 有机酸标准曲线  
Table 1 Standard curve of organic acids

有机酸种类	回归方程	相关系数 $R^2$	出峰时间/min	线性范围/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
草酸	$Y=14.567 6X+4.388 9$	0.999 4	5.550	4.1~20.6
酒石酸	$Y=2.386 5X+8.932 7$	0.992 7	6.107	15.7~78.5
苹果酸	$Y=1.073 1X-0.163 2$	0.999 9	7.341	35.6~178.2
乳酸	$Y=0.865 6X-0.043 4$	0.999 9	7.834	35.1~175.5
乙酸	$Y=0.602 9X-0.232 4$	1.000 0	8.673	90.6~453.1
柠檬酸	$Y=1.474 3X+0.897 3$	0.999 9	10.110	41.0~205.0
丁二酸	$Y=0.248 0X+0.164 8$	0.999 9	12.125	73.2~366.1
马来酸	$Y=79.748 9X-3.513 9$	0.999 9	12.882	1.8~8.9
富马酸	$Y=157.187 4X-0.242 1$	0.999 9	16.381	0.7~3.7

表 2 无花果酒及果汁中有各机酸含量  
Table 2 Organic acid content of fig and fig wine

有机酸种类	检出量/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )						酸味特征
	无花果汁	D254	EC1118	KD	X16	BO213	
草酸	156.58	101.27	96.36	104.99	96.96	98.68	有酸的口感、无香气
酒石酸	—	123.39	131.88	288.09	82.93	246.59	稍有涩感、酸味强烈
苹果酸	824.39	839.75	870.44	971.49	767.88	710.49	尖酸味、稍苦
乳酸	368.17	325.79	311.45	336.14	346.47	333.96	稍有涩感、稍苦
乙酸	2 391.86	3 805.99	3 342.15	3 766.65	3 555.80	3 486.27	带刺激性
柠檬酸	963.12	1 420.52	1 433.94	1 635.31	1 420.87	1 395.47	温和、爽快、有新鲜感
丁二酸	691.11	2 194.29	1 794.39	1 751.78	1 841.34	2 057.36	有鲜味
马来酸	0.71	5.13	6.63	5.04	8.41	4.81	—
富马酸	11.27	9.50	9.73	8.70	10.61	9.63	—
有机酸总量	5 407.23	8 825.63	7 996.97	8 868.19	8 131.27	8 343.22	—

5 株菌株发酵的无花果酒,草酸含量均下降,菌株 KD 对草酸的保留高于其它菌株,该菌发酵的酒中草酸含量为 104.99 mg/L。

#### 2.4 PCA 分析结果

对表 2 中 5 株菌发酵的无花果酒有机酸含量主成分进行分析,结果见表 3、4。主成分 1、主成分 2、主成分 3 特征值分别为 4.68,1.91,1.50,3 个主成分能够解释原始有机酸的方差分别为 52.01%,21.17%,16.72%。主成分 1 和主成分 2 可解释 73.18%的原始有机酸信息。因此,提取前 2 个主成分进行分析。其中,除乙酸、乳酸的共同度稍低外,其它的有机酸共同度 $\geq 0.622$ ;说明提取的前 2 个主成分能够很好地反映有机酸的信息<sup>[9,22-24]</sup>。

对有机酸的定量数据作图,主成分 1 和主成分 2 的累积贡献率为 73.18%,结果见图 3、4。

表 3 主成分特征值及解释的总方差

Table 3 Eigenvalue and total variance of principal components analysis

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差/%	累积/%	合计	方差/%	累积/%
1	4.68	52.01	52.01	4.68	52.01	52.01
2	1.91	21.17	73.18	1.91	21.17	73.18
3	1.50	16.72	89.90			

表 4 主成分分析有机酸的共同度

Table 4 Principal component analysis of common organic acids

有机酸	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸
初始	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
提取	0.928	0.622	0.796	0.002	0.523
有机酸	柠檬酸	丁二酸	马来酸	富马酸	
初始	1.000	1.000	1.000	1.000	
提取	0.982	0.954	0.864	0.914	

从图 3、4 可以看出,以横坐标为基准,菌株 KD 明显区别于其它菌株。菌株 KD 位于第 2 象限,与菌株 KD 密切相关的有机酸有苹果酸、柠檬酸、酒石酸、草酸,这些有机酸对应的酸味特征分别为:苹果酸尖酸味、稍苦;柠檬酸温和、爽快、有新鲜感;酒石酸稍有涩感、酸味强烈;草酸有酸的口感、无香气<sup>[15]</sup>,这些有机酸赋予了无花果酒特殊的风味。菌株 EC118 与菌株 X16 位于第 2 象限与这 2 株菌株密切相关的有机酸为马来酸。菌株 BO213 与菌株 D254 位于第 4 象限与它们密切相关的有机酸为丁二酸与乙酸,其中丁二酸具有鲜味,醋酸具有刺激味。

### 3 结论

采用 5 株优良的商业酵母发酵无花果酒,研究酵母对无

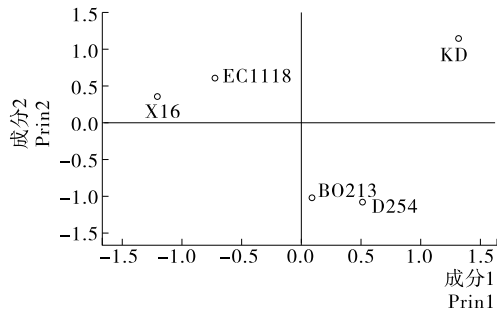


图3 5株酵母对前2个主成分的散点图

Figure 3 Scatterplots of five yeast on the first two principal components

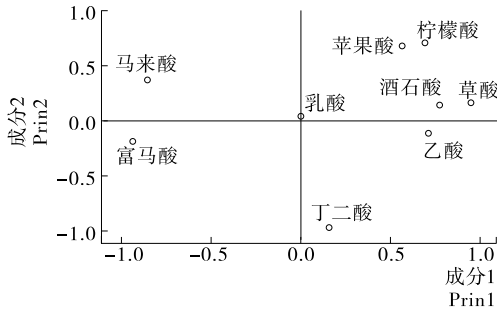


图4 9种有机酸对前2个主成分的散点

Figure 4 Scatterplots of nine organic acid on the first two principal components

花果酒有机酸及品质的影响,结果表明,5株酵母发酵的无花果酒中均能检测到9种有机酸,在发酵成酒后有机酸总量与发酵前相比均升高,乙酸、丁二酸、柠檬酸、马来酸含量升高。无花果汁中不含有酒石酸,在无花果汁发酵的过程中微生物代谢产生酒石酸。菌株D254发酵的酒中乙酸、丁二酸的含量最高分别为3805.99,2194.29 mg/L,KD发酵的无花果酒柠檬酸含量最高为1635.31 mg/L,5株菌株发酵的无花果酒,草酸含量均下降,菌株KD对草酸的保留高于其它菌株,该菌发酵的酒中草酸含量为104.99 mg/L;PCA结果表明,不同菌株与发酵的无花果酒有机酸存在一定的相关性,与菌株KD密切相关的有机酸种类最多,分别为苹果酸、柠檬酸、酒石酸、草酸。

参考文献

[1] 邓星星,江英,卢志强,等.无花果内源酵母的筛选及鉴定[J].中国酿造,2015,34(8):22-27.  
 [2] 董亚晨,戴忆宁,蔡瑾,等.无花果内源酵母的筛选,鉴定及发酵性能测试[J].中国食品学报,2014(8):240-247.  
 [3] BAROLO M I, MOSTACERO N R, LÓPEZ S N. *Ficus carica* L.(Moraceae): An ancient source of food and health[J]. Food Chemistry, 2014, 164: 119-127.  
 [4] 黄丹丹,张吟.无花果药用价值研究进展[J].海峡药学,2013,25(12):50-53.  
 [5] VEBERIC R, COLARIC M, STAMPAR F. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region[J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 153-157.  
 [6] 王志国,何德,金洪,等.无花果抗癌作用的研究进展[J].现代生物医学进展,2010,11(10):2183.

[7] 左勇,刘利平,鞠帅.无花果酒发酵条件的优化[J].食品科技,2014,39(1):95-98.  
 [8] JEONG M R, HAN J H, HWANG E H, et al. Fig wine, fig fruits and fig leaf improve lipid profile and suppress body weight gain in rats fed high-fat diet[J]. The FASEB Journal, 2007, 21(6): A1 086-A1 087.  
 [9] 肖作兵,周璇,牛云蔚.发酵温度对樱桃酒香气物质和有机酸的影响[J].中国食品学报,2016(7):259-267.  
 [10] ESTEVES V I, LIMA S S F, LIMA D L D, et al. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 513(1): 163-167.  
 [11] 严超,侯丽娟,齐晓茹,等.红枣白兰地发酵过程中酒酯氨基酸和有机酸的变化分析[J].食品工业科技,2017,38(14):121-125.  
 [12] 向进乐,杜琳,郭香凤,等.离子抑制反相高效液相色谱法测定菠萝果酒中10种有机酸[J].中国食品学报,2014(6):229-235.  
 [13] ZHANG Hong, ZHOU Feng, JI Bao-ping, et al. Determination of organic acids evolution during apple cider fermentation using an improved HPLC analysis method[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227(4): 1183-1190.  
 [14] KADER A A. Flavor quality of fruits and vegetables[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88(11): 1863-1868.  
 [15] 钱冲,廖永红,刘明艳,等.不同香型白酒的聚类分析和主成分分析[J].中国食品学报,2017,17(2):243-255.  
 [16] MINNAAR P P, JOLLY N P, PAULSEN V, et al. Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae yeasts in sequential fermentations: Effect on phenolic acids of fermented Kei-apple (*Dovyalis caffra* L.) juice [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 257: 232-237.  
 [17] 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,2012:20-22.  
 [18] 赵丛枝,寇天舒,张子德.发酵型无花果果酒加工工艺的研究[J].食品研究与开发,2014,35(13):79-82.  
 [19] 邓星星,江英,马越,等.无花果及其果酒挥发性成分的研究[J].中国酿造,2016,35(3):98-103.  
 [20] 吕国涛,牛宇,单璐,等.高效液相色谱法测定樱桃汁及不同酿酒酵母所酿樱桃酒的活性成分[J].食品与发酵工业,2016,42(8):171-177.  
 [21] 范文来,徐岩.酒类风味化学[M].北京:中国轻工业出版社,2014:85-109.  
 [22] BATISTA L, MONTEIRO S, LOUREIRO V B, et al. Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids[J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1067-1075.  
 [23] WELKE J E, MANFROI V, ZANUS M, et al. Differentiation of wines according to grape variety using multivariate analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection data [J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3897-3905.  
 [24] PERESTRELO R, BARROS A S, ROCHA S M, et al. Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties[J]. Talanta, 2011, 85(3): 1483-1493.