

靖州杨梅果酒发酵菌种筛选、鉴定及发酵性能研究

Screening and fermentation characteristics of yeast strains for bayberry wine from Jinzhou of Hunan

阳秀莲^{1,2} 刘伟^{2,3} 林树花^{2,3} 陈万能⁴ 张菊华^{1,2,3}

YANG Xiu-lian^{1,2} LIU Wei^{2,3} LIN Shu-hua^{2,3} CHEN Wan-neng⁴ ZHANG Ju-hua^{1,2,3}

(1. 湖南大学研究生院隆平分院, 湖南 长沙 410125; 2. 湖南省农业科学院农产品加工研究所, 湖南 长沙 410125; 3. 果蔬贮藏加工与质量安全湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410125; 4. 湖南省靖州县湘百仕酒业有限责任公司, 湖南 怀化 418400)

(1. Longping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha, Hunan 410125, China; 2. Hunan Agricultural Products Processing Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China; 3. Hunan Key Lab of Fruits & Vegetables Storage, Processing, Quality and Safety, Changsha, Hunan 410125, China; 4. Hunan Jingzhou Xiang Baishi Wine Co., Ltd., Huaihua, Hunan 418400, China)

摘要:以不同杨梅园杨梅鲜果、杨梅叶和果园土壤为原料,共分离得到172株酵母菌。采用显色法、杜氏管法、糖发酵法和杨梅酒发酵法进行四级筛选,获得3株综合性能优良的菌株;经形态学、分子生物学鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) RY1、仙人掌有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora opuntiae*) DY5与有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora pseudoquilliermondii*) JW14。通过发酵性能研究发现,3株酵母均能耐受可溶性固形物含量(SSC)为32%、SO₂添加量为200 mg/L、酒精含量为16% Vol、pH为2.0的环境;RY1酵母具有较强的发酵性能及耐受能力,适宜发酵杨梅果酒,DY5和JW14酵母具有较好的产香能力,适宜辅助发酵为杨梅酒增香。

关键词:杨梅果酒;发酵;菌种筛选;鉴定;耐受性

Abstract: In order to select excellent strains for the fermentation of Chinese bayberry wine in Hunan province, 172 strains of yeast were isolated from fruits, leaves and soil of bayberry in different arbutus orchard. The three strains with excellent comprehensive performance were screened at four levels by chromogenic

method, duchenne tube method, sugar fermentation method and bayberry wine fermentation method. It was identified as *Saccharomyces cerevisiae* RY1, *Hanseniaspora opuntiae* DY5 and *Hanseniaspora pseudoquilliermondii* JW14 by morphology and molecular biology. Through fermentation performance studies, it was found that all 3 yeasts were able to withstand an environment with a soluble solid content (SSC) of 32%, an SO₂ addition of 200 mg/L, an alcohol content of 16% Vol, and a pH of 2.0. RY1 yeast has strong fermentation performance and tolerance. It is suitable for fermenting bayberry wine. DY5 and JW14 yeast have good aroma-producing ability, and it is suitable for auxiliary fermentation to enhance the aroma of bayberry wine.

Keywords: Chinese bayberry wine; fermentation; strain screening; identification; tolerance

基金项目:湖南省重点研发计划(编号:2016NK2182);湖南省农业科学院科技创新项目(编号:2016QN05);长沙市重点科技项目(编号:kq1801031)

作者简介:阳秀莲,女,湖南大学在读硕士研究生。

通信作者:刘伟(1983—),男,湖南省农业科学院助理研究员,博士。E-mail:175244822@qq.com

张菊华(1971—),女,湖南省农业科学院研究员,硕士。E-mail:498282528@qq.com

收稿日期:2018-11-06

杨梅(*Myrica rubra* Sieb. & Zucc.)为杨梅属杨梅科乔木或灌木常绿植物。中国杨梅产量占世界总产量的98%以上^[1],浙江、湖南等省份均有分布。目前湖南杨梅栽培面积约 1.0×10^4 hm²,其中,靖州县栽培面积达到6 667 hm²,年产杨梅 6.0×10^4 t,已成为中西部地区最大的产区。杨梅酸甜可口营养丰富,不仅能生津止渴、消食解暑^[2],还具有抗氧化^[3]、降血糖^[4]、抑癌^[5]等功效。由于果实裸露,易受到机械损伤和微生物侵染,不耐贮运且上市集中,极大地制约了杨梅产业发展。杨梅酒加工有助于减少采后损失、改善杨梅营养价值及延长货架期,提高水果产业附加值^[6]。

发酵型杨梅酒是以杨梅汁为原料,加入优质的酿酒酵母发酵而成,口感柔和,营养丰富,具有杨梅果的典型性。发酵型果酒品质取决于所选择的酵母性能,酵母菌株的起酵、产酒、产香、耐性等特性不同,其作用也相差甚远。选育发酵性能优良、适合特定水果发酵的专用酵母已成为果酒酿造的研究热点^[7]。酿酒酵母分离筛选主要是在酵母菌活跃存在的地方,如成熟水果、鲜榨果汁、果园土壤、空气和发酵醪^[8]。目前,已从草莓^[9]、人参果^[10]、猕猴桃^[11]等水果中筛选出发酵专用酵母,并开展了发酵性能和工艺优化等的研究。但目前市场上几乎没有杨梅果酒专用酵母,分离筛选适宜酿造杨梅酒菌种的研究也鲜有报道。仅杜晶等^[12]从杨梅果园周边环境及自然发酵醪中筛选鉴定 4 株酵母(1 株酿酒酵母和 3 株非酿酒酵母属酵母),其发酵性能还有待研究。

本研究为挖掘靖州杨梅主产区的酵母资源,拟从土壤及果品表面开展酵母菌株的筛选,筛选出起酵速率快、酒精转化率高、酒精耐受力高、抗 SO₂ 能力强和风味独特的优质杨梅酿酒酵母,并进行菌株鉴定,确定菌株的最佳生长条件,以期工业化生产提供优良发酵剂。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集

从靖州县多个杨梅园采集鲜果、杨梅叶和土壤。

1.1.2 培养基

麦芽汁培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基(YPD 培养基)、酵母浸出粉胨葡萄糖液体培养基(YPD 液体培养基):自然 pH 值,115 °C 高压灭菌 15 min,广东环凯微生物科技有限公司;

2,3,4-氯化三苯基四氮唑(TTC)上层培养基:添加 0.05% TTC 试剂至灭菌冷却约 50 °C 的 YPD 培养基中混合均匀;

TTC 下层培养基:YPD 培养基。

1.1.3 主要试剂与仪器

蔗糖:食品级,大润发超市;

TTC:分析纯,上海灵锦精细化工有限公司;

其他试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

智能恒温恒湿培养箱:HWS 型,宁波江南仪器厂;

全自动色度分析仪:Color Quest XE 型,美国 HunterLab 公司;

紫外可见分光光度计:UV-1800 型,岛津仪器(苏州)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株分离

(1) 样品处理:分别称取土壤、杨梅果、树叶各 10 g 于 90 mL YPD 液体培养基中,振荡培养 24 h,取上清液梯

度稀释,涂布于 YPD 培养基上,倒置培养 2~3 d^[13]。杨梅果实破碎去核榨汁,装入无菌三角瓶中发酵,不定期振荡,发酵第 1,3,5,7 天取样,梯度稀释涂布于 YPD 培养基上,培养 2~3 d。培养温度均为 28 °C。

(2) 分离纯化:挑选具有典型酵母特征的菌落进行平板划线,纯化后接种至 YPD 斜面培养 12~24 h,置于 4 °C 冰箱保存^[14]。

1.2.2 酵母筛选

(1) 一级筛选(TTC 显色法):参考文献^[15]。

(2) 二级筛选(杜氏管法):参考文献^[12]修改如下,菌种添加量为 5%(菌液浓度为 10⁷ CFU/mL),杨梅汁的 SSC 为 7%,pH 为 3.0,85 °C 水浴加热 15 min 后迅速冷却。

(3) 三级筛选(糖发酵试验):参考文献^[16]修改如下,5 mL 的豆芽汁中分别加入葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖,不加糖的豆芽汁为对照组。

(4) 四级筛选(杨梅酒发酵法):活化酵母菌液,接种量为 5%,SO₂ 添加量为 50 mg/L、加糖量为 170 g/L,杨梅汁 pH 为 2.7,主发酵温度 24 °C,主发酵停止后测定总糖、总酸、总花色苷、色差值并进行感官评价。

1.2.3 形态学观察 将斜面保藏的酵母在 YPD 平板上划线,28 °C 培养 3~4 d 后观察菌落形态,并制成菌悬液,在 10×100 倍显微镜下观察菌株的形态及出芽方式等。

1.2.4 分子生物学鉴定 采用上海生工 Ezup 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株 DNA,对 26S rDNA 中的 D1/D2 区域基因进行序列扩增,PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳进行检测,经纯化后送至生工生物工程(上海)公司测序,在美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 BLAST 程序中比对,用 MEGA 4.0 绘制系统发育树,确定菌株的种属。

1.2.5 酵母发酵性能

(1) 生长曲线的测定:参考文献^[17]修改如下,将菌液以 1% 的接种量分别接种至 18 瓶麦芽汁培养基中,设置 1 瓶未接种的发芽汁为空白对照,28 °C 振荡培养,前期每 2 h 取样,后期每 4 h 或 6 h 间隔取样,根据实际情况稀释,测定麦芽汁培养基的 OD 值(600 nm),重复 3 次,绘制生长曲线。

(2) 酵母耐糖、SO₂、pH、酒精性能研究:将菌株活化后接种至 YPD 液体培养基中,28 °C 培养 12 h,接种量为 3%,分别添加菌液至含 SSC(16%,20%,24%,28%,32%)的 YPD 液体培养基、含 SO₂(40,80,120,160,200 mg/L)的 YPD 液体培养基、含酒精(8%,10%,12%,14%,16% Vol)的 YPD 液体培养基和不同 pH 值(2.0,2.5,3.0,3.5,4.0)的 YPD 液体培养基中。28 °C 振荡培养 48 h,取样稀释 10 倍,测量其 OD 值(600 nm),重复 3 次。

1.2.6 检测方法

- (1) 总糖:采用直接滴定法^{[18]5}。
- (2) 总酸:采用电位滴定法^{[18]7}。
- (3) 酒精度:采用酒精计法^{[18]4}。
- (4) 色差值:采用色差仪测定。
- (5) TSS:采用手持糖度仪测定。
- (6) pH 值:采用 pH 计测定。
- (7) 总花色苷:采用 pH 示差法^[19]。

2 结果与分析

2.1 酵母的分离

从靖州县不同杨梅园中采集样本共 67 份,经梯度稀释涂布、分离纯化和菌落形态观察后共得到 172 株菌,其中土壤 43 株,杨梅叶 32 株,鲜果 59 株,发酵汁 38 株。

2.2 酵母的筛选

2.2.1 一级筛选 利用 TTC 显色原理对酵母菌株的活性和产酒精能力进行筛选。菌落颜色越深,表明其活性越高,产酒精能力越强;呈浅红色或无色,表明其活性较低,产酒精能力较弱或不产酒精^[20]。TTC 显色反应后的菌株呈色情况如图 1 所示,共有 65 株呈深红色,49 株呈玫红色,37 株呈淡粉色,21 株基本无颜色变化。TTC 显色法中选取菌落颜色呈深红色的 65 株菌株进行下一步筛选。

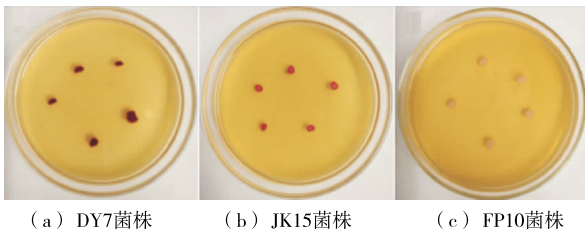


图 1 TTC 平板显色筛选

Figure 1 The screening of yeasts by TTC color

2.2.2 二级筛选 酵母发酵过程中产生 CO₂ 气体,杜氏管中气泡的体积和数量可直接反映菌株发酵的起酵速度和发酵能力^[21]。通过杜氏管筛选试验,筛选出能在低 pH 的杨梅汁中发酵产气,且在 48 h 内充满杜氏管的菌株^[22]。如表 1 所示,19 株在 48 h 内充满杜氏管,36 株规定时间内未充满杜氏管或没有明显产气现象。选取充满杜氏管的 19 株进行下一步筛选。

表 1 杜氏管产气情况[†]

Table 1 Gas production in duchenne tube

时间/h	产气情况	菌株/Strains
24	+	4
36	+	7
48	+	8
>48	-	36

[†] “+”表示杜氏管已充满;“-”表示杜氏管未充满。

2.2.3 三级筛选 碳源的利用能力是考察菌株性能的一个重要指标,在糖发酵试验中,菌株对各类糖的利用程度不一^[23]。如表 2 所示,72 h 内充满杜氏管的菌株,蔗糖组有 9 株,葡萄糖组有 9 株,果糖组有 11 株,麦芽糖组和对照组无充满现象。结果表明,果糖最易被菌株利用,起酵速度快且产气速率高,蔗糖和葡萄糖次之。但考虑工厂实际成本,添加蔗糖(白砂糖)作为菌株能量来源最为经济,故选取能有效利用蔗糖的 9 株菌株进行下一步试验。

表 2 不同糖发酵 72 h 杜氏管产气结果[†]

Table 2 The gas production in duchenne tube after 72 h of different sugar fermentation

菌株	蔗糖	葡萄糖	果糖	麦芽糖	无糖(对照)
BY9	√	√	√	+	+
CY2	+	-	-	-	-
CY10	√	√	√	+	+
CY16	√	√	+	+	+
DY1	+	+	+	+	-
DY5	√	√	√	+	+
DY7	√	+	+	+	+
GS4	+	√	√	+	+
J3	+	√	√	+	+
J11	+	+	+	-	-
JY12	√	√	√	+	+
JK6	-	+	+	-	+
JW14	√	√	√	+	+
JW20	-	+	+	+	-
RY1	√	√	√	+	+
RY15	+	+	√	-	-
RW8	√	+	√	+	+
TM9	-	+	+	-	-
TM17	+	+	√	-	-

[†] “-”表示杜氏管中没有气泡产生;“+”表示杜氏管中有气泡产生但未被充满;“√”表示杜氏管已被充满。

2.2.4 四级筛选 通过比较 9 株菌发酵果酒的各项指标,筛选出发酵能力强、香气浓郁、色泽鲜亮的菌株。

由图 2 可知, DY5 与 JW14 发酵果酒在色泽和香气特征方面最为突出,综合感官评分高,具有浓郁和谐的果

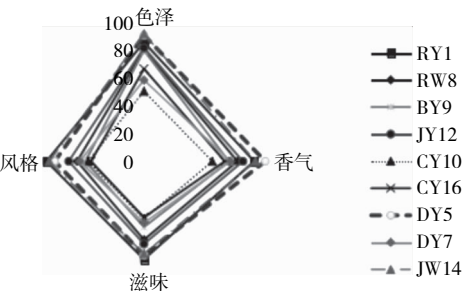


图 2 果酒感官评分雷达图

Figure 2 Radar chart for sensory evaluation of fruit wine

香和酵母香,但酒味不突出;RY1 具有较好的酒香味,其果香不明显,滋味和风格最好,综合评分较高;其他 6 株发酵果酒整体评分偏低,风格和滋味特征不显著。结果表明,JW14 与 DY5 色泽显著;DY5 香气显著;RY1 在风格与滋味上显著,此 3 株菌株的综合感官评分高于其他菌株。

通过色差 L^* 、 a^* 、 b^* 值(图 3)结合总花色苷(表 3)

含量可知,杨梅汁的颜色最深, L^* 值最小,总花色苷含量最高,为 187.491 mg/L。在发酵过程中,发酵温度、 SO_2 添加量、pH、酵母菌株等因素会引起果酒色泽和花色苷含量的变化^[24]。在 9 株酵母发酵果酒中,颜色最深的为 DY5 和 JW14,其色差值相差较小,但 DY5 总花色苷含量最高;RY1 颜色稍浅,可能是该菌株活性高对花色苷的降解作用大而导致;其他果酒花色苷含量低,色泽较差。

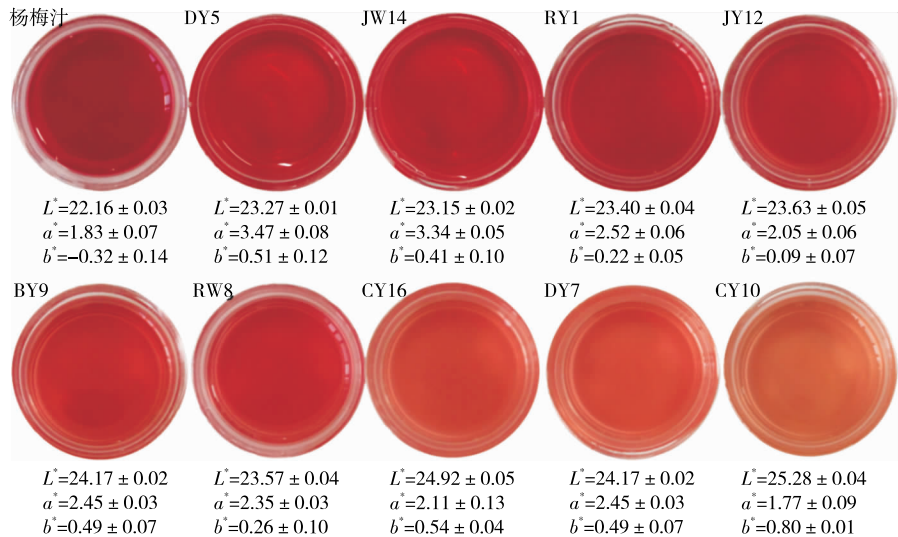


图 3 发酵杨梅酒的色差值比较

Figure 3 Comparison of color difference between different strains of fermented Chinese bayberry wine

表 3 菌株发酵杨梅酒的理化指标[†]

Table 3 Physicochemical properties of Chinese bayberry wine fermented by different strains

菌株名称	酒精度/ (% Vol)	总糖/ (g · L ⁻¹)	总酸/ (g · L ⁻¹)	总花色苷/ (mg · L ⁻¹)
CY10	5.4	42.94	11.100	3.125
CY16	4.8	41.12	11.925	4.101
DY5	7.0	34.23	12.045	16.405
DY7	5.6	40.26	11.813	4.687
JW14	6.5	33.64	12.099	15.429
RY1	9.0	15.01	12.675	3.906
JY12	5.5	49.35	12.232	2.930
BY9	5.8	50.92	11.025	2.927
RW8	5.0	45.63	12.698	3.711
杨梅汁	—	78.80	10.737	187.491

[†] “—”表示该指标未检测。

杨梅酒理化指标如表 3 所示,RY1 酒精度最高,DY5 和 JW14 次之,其他杨梅酒的酒精度皆低于 6% Vol;总糖含量 RY1 最低,DY5 和 JW14 较低,其他杨梅酒的总糖含量比 RY1 高 2.7~3.4 倍。在初始糖含量相等的情况下,

总糖含量越低,酒精度越高,则菌株的发酵能力越强。由于杨梅汁的总酸含量较高,采用小容器发酵且未进行降酸处理,导致 9 株菌发酵的杨梅酒口感偏酸^[25]。

综上,RY1 菌株的产酒精能力强,感官评分高,酵母活性好,适合普通的杨梅果酒酿造。DY5 菌株和 JW14 菌株产酒精能力较强,果酒中果香浓郁,总花色苷含量高,酒体颜色艳丽,感官评分高,适合酿造低度数果酒饮料或协助增香。此 3 株酵母具有较好的应用前景,故选取 RY1、DY5、JW14 3 株菌株进行形态学、分子生物学鉴定。

2.3 形态学鉴定

DY5、RY1、JW14 3 株菌株的形态见图 4。

(1) DY5 菌株:菌落呈圆形,菌株平整,乳白色,中心处颜色较深,边缘整齐,菌落光滑湿润易挑起,有浓郁的酵母香;细胞形态为纺锤状,出芽生殖。

(2) RY1 菌株:菌落呈圆形,中心点凸起,色泽呈乳白色,颜色均匀,边缘整齐,菌落光滑湿润易挑起,有轻微的酒香;细胞形态为球形,出芽生殖。

(3) JW14 菌株:菌落呈圆形,中心点微凸起,乳白色,边缘处颜色微浅,颜色似同心圆状,表面光滑不黏稠,不易挑起,有较浓郁的酵母香;细胞形态为纺锤状,出芽生殖。

2.4 分子生物学鉴定

以 NL1 和 NL4 为引物,对筛选得到的酵母菌进行了

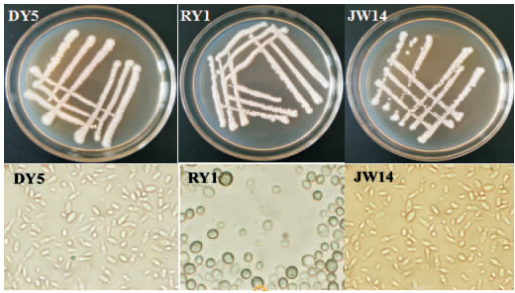


图 4 酵母菌形态特征图

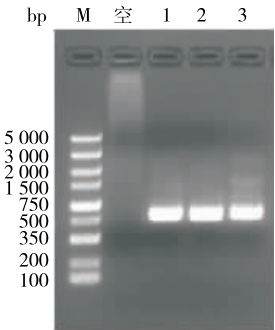
Figure 4 The morphological characteristics of yeast

26S rDNA D1/D2 区域序列扩增,得到的电泳图如图 5 所示。

将所得碱基序列在 NCBI 上比对,RY1 的序列长度为 588 bp,确定该酵母为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);DY5 的序列长度为 586 bp,确定该酵母为仙人掌有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora opuntiae*);JW14 的序列长度为 585 bp,确定该酵母为有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora pseudoquilliermondii*),各株菌系统发育树如图 6~8 所示。

2.5 酵母发酵性能

2.5.1 生长曲线测定 如图 9 所示,菌株 RY1 与菌株 DY5 活性较高,前 2 h 为延滞期,之后迅速进入对数期,RY1 对数期时长为 16 h,在 18 h 后进入稳定期,其进入对数期早,时间长;DY5 菌株对数期时长为 14 h;JW14 菌



1. JW14 菌株 2. DY5 菌株 3. RY1 菌株 M. Mark

图 5 PCR 扩增电泳图

Figure 5 PCR amplification electropherogram

株的延滞期稍长,呈指数增长速度较慢,在 16 h 以后趋于平稳。3 株菌株在 48 h 内没有明显的衰亡期,与前人^[26-27]研究结果一致。

2.5.2 高糖耐受性 在杨梅果酒发酵过程中需添加蔗糖,为酵母的生长代谢提供充足的能量。糖原添加量过高会降低酵母活性,抑制其生长。耐受较高浓度糖溶液的菌株,其产酒精能力强,可降低发酵产物对菌株本身的毒害和抑制作用^[28]。由图 10 可知,3 株酵母菌在 SSC 为 16%时,OD 值最大,表明该糖浓度下菌株生长旺盛;随着 SSC 增加,OD 值均有所减小;在 SSC 为 32%时,RY1 菌株与 DY5 菌株的 OD 值略有下降,JW14 菌株的曲线变化较大,OD 值最小。结果表明,含糖量越高,酵母在高渗

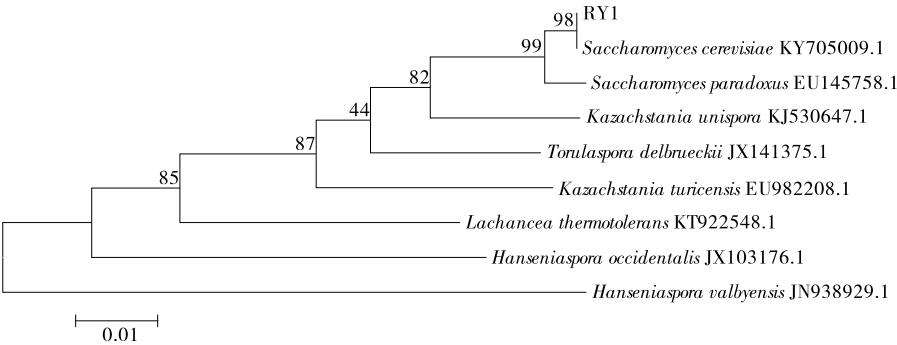


图 6 菌株 RY1 系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of strain RY1

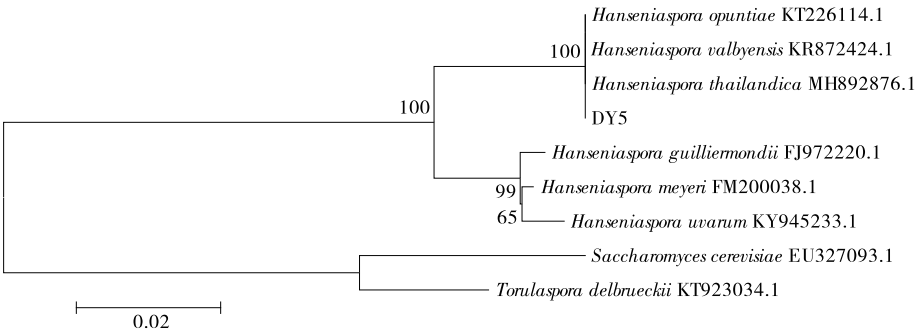


图 7 菌株 DY5 系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of strain DY5

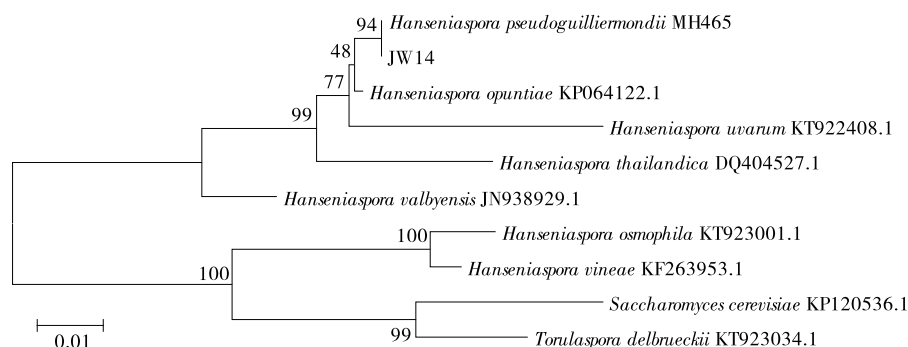


图 8 菌株 JW14 系统发育树

Figure 8 Phylogenetic tree of strain JW14

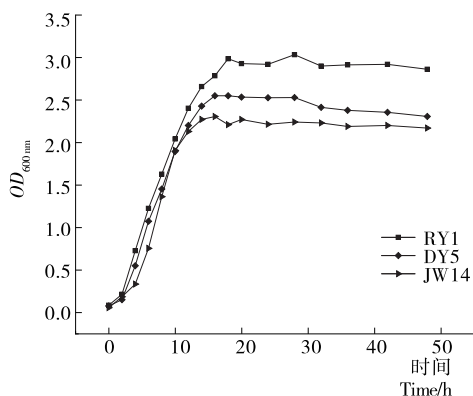


图 9 菌株生长曲线的测定

Figure 9 Determination of yeast growth curve

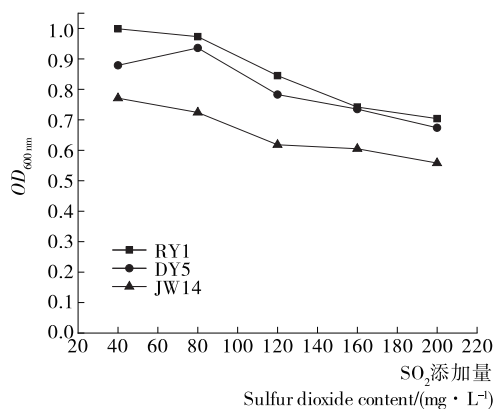
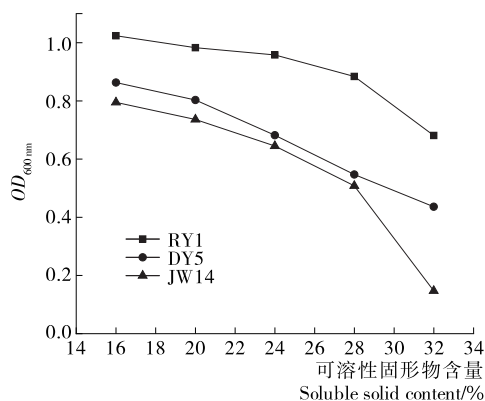
图 11 菌株 SO₂ 耐受性Figure 11 SO₂ tolerance of strains

图 10 菌株高糖耐受性

Figure 10 High glucose tolerance of strains

透压的环境下其生长活性受到了一定的抑制,其中 RY1 具有在高糖溶液下发酵的潜力,DY5 菌株和 JW14 菌株适合在正常糖含量的环境下发酵。

2.5.3 SO₂ 耐受性 在果酒发酵过程中,SO₂ 添加量过低,发酵液易受到杂菌的污染;SO₂ 添加量过高,酵母的生长繁殖受到抑制,发酵进程缓慢^[29]。由图 11 可知,3 株菌株的 OD 值随 SO₂ 添加量增加而有所减小,在 SO₂ 添加量为 200 mg/L 时,仍保持较高的活性,OD 值相差较小。加入高浓度的 SO₂,菌株前期受到抑制,在震荡培养

过程中 SO₂ 加速挥发,其抑制能力减弱,菌株正常生长,在 48 h 后测其 OD 值,数值变化不大。结果表明 3 株酵母均能耐受 200 mg/L 的 SO₂ 添加量。

2.5.4 低 pH 耐受性 耐酸性是考察酵母性能的一个重要指标,杨梅果汁中的 pH 值普遍较低,为 3.0 左右,菌株的低 pH 耐受性强,可降低发酵液被污染的风险。由图 12 可知,RY1 菌株最适生长 pH 值为 3.0,DY5 菌株和 JW14 菌株的最适生长 pH 为 3.5。3 株菌株都能耐受 pH 2.0 的环境,在 pH 2.5 及以上能较好地生长,在

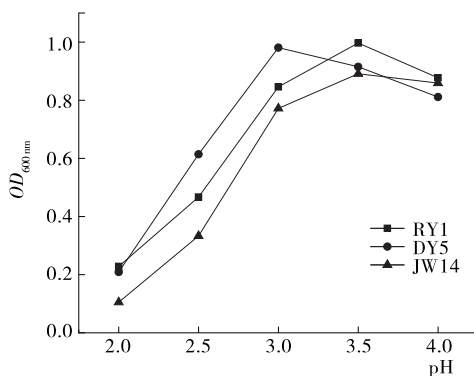


图 12 菌株 pH 耐受性

Figure 12 pH tolerance of strains

pH 3.0 左右生长旺盛,此 pH 与杨梅汁相近,因此均适合杨梅酒发酵。

2.5.5 酒精耐受性 酵母菌在产酒精的同时,自身会受到胁迫作用,酵母细胞的生长会因酒精的毒害作用而受到抑制,从而影响发酵液中酒精的形成^[30]。菌株对酒精的耐受性分为 3 个等级:只能耐受酒精含量为 6% Vol 以下的菌株,乙醇耐受性差;能耐受 6%~10% Vol,菌株耐受性一般;能耐受 11% Vol 及以上的对酒精具有高耐受性^[31]。由图 13 可知,菌株 RY1、DY5 与 JW14 随着酒精体积分数增大,OD 值稍有下降,在酒精含量为 16% Vol 时,OD 值下降不明显,菌株仍保持较好的活性,说明 3 株菌株均能耐受高酒精含量的溶液,能满足杨梅酒的酿造需求^[32]。

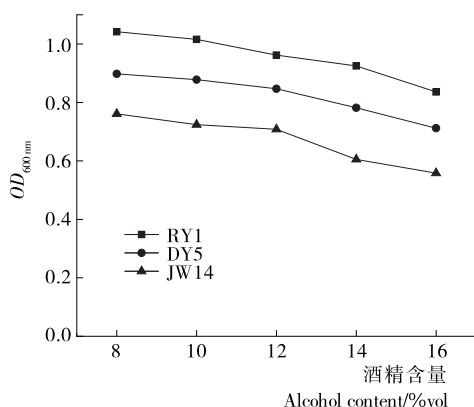


图 13 菌株酒精耐受性

Figure 13 Alcohol tolerance of strains

综上所述,通过测定 RY1、DY5、JW14 菌株在高糖、低 pH、高 SO₂ 添加量及高酒精体积分数环境下的耐受性,发现酿酒酵母 RY1 的活力最高,耐受性最强,能在 SSC 36%、pH 2.0、SO₂ 添加量 200 mg/L、酒精含量 16% Vol 的环境下保持较好的生长活性;JW14 酵母活性较低,其耐受性相对较差,勉强能耐受 32% 的高糖溶液和 pH 2.0 的低酸溶液;DY5 酵母活性及耐受性介于菌株 RY1 和 JW14 之间,3 株酵母的性能符合果酒酿造要求,适用于发酵杨梅酒。

3 结论

本研究筛选出 3 株综合性能优良的菌株,经分子生物学鉴定:菌株 RY1 为酿酒酵母属 (*Saccharomyces cerevisiae*),菌株 DY5 为仙人掌有孢汉逊酵母属 (*Hanseniaspora opuntiae*),菌株 JW14 为有孢汉逊酵母属 (*Hanseniaspora pseudoquilliermondii*)。通过耐受性试验,发现 RY1 酵母活性高,产酒精能力及耐受性强,香气协调,适合发酵杨梅果酒;DY5 和 JW14 酵母酒精发酵能力一般,具有较好的产香能力,适宜发酵低度数杨梅饮料和辅助发酵增香。

但有关湖南地区酵母菌的生理生化、发酵特性及其进一步利用仍需继续研究。

参考文献

- [1] 陈方永. 我国杨梅研究现状与发展趋势[J]. 中国南方果树, 2012, 41(5): 31-36.
- [2] 张伟清, 林媚, 冯先桔, 等. 杨梅的营养保健价值及其加工技术进展[J]. 浙江柑橘, 2012(4): 26-30.
- [3] ZHOU Shao-huan, FANG Zhong-xiang, LV Yuan, et al. Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pomace[J]. Food Chemistry, 2009, 112(2): 394-399.
- [4] ZHENG Yi-xiong, CHEN Qing-jun, SUN Chong-de, et al. Effects of flavonoids-rich Chinese bayberry (*Myrica rubra*, Sieb. et Zucc.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 144-153.
- [5] SUN Chong-de, ZHENG Yi-xiong, CHEN Qing-jun, et al. Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit[J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1 287-1 294.
- [6] JAGTAP U B, BAPAT V A. Wines from fruits other than grapes: Current status and future prospectus[J]. Food Bioscience, 2015, 9: 80-96.
- [7] 刘永衡, 华惠敏, 吴桂君, 等. 果酒酵母选育及酵母对香气成分影响的研究进展[J]. 中国酿造, 2013, 32(10): 5-8.
- [8] 赵祥杰, 陈卫东, 刘学铭, 等. 果酒酵母选育研究进展[J]. 酿酒, 2006, 33(1): 61-64.
- [9] 李豪, 章霞, 张静, 等. 草莓果酒酵母菌的筛选、鉴定及耐受性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 85-88.
- [10] 苏凤贤, 张井, 郑晓杰. 人参果自然发酵醪中酵母菌种筛选及其发酵性能[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 100-106.
- [11] 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.
- [12] 杜品, 余培斌, 苏琪, 等. 杨梅果酒酿造酵母的筛选、鉴定及耐受性研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(9): 34-39.
- [13] 剧柠, 赵梅梅, 柯媛, 等. 枸杞果酒用非酿酒酵母的分离筛选及香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2017(11): 125-131.
- [14] 李锐, 冯奎, 吴婧, 等. 不同来源酿酒酵母对柑橘果酒香气成分的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 206-213.
- [15] 胡晓冰, 王振伟. TTC 法在筛选西瓜果酒酵母中的应用[J]. 酿酒科技, 2011(2): 69-70.
- [16] 甘广东, 陆其刚, 冯海燕, 等. 酒醪中优势酵母菌的筛选及生理生化特性分析[J]. 酿酒, 2016, 43(1): 31-35.
- [17] 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.

(下转第 62 页)

- 的现状分析[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(11): 76-80.
- [4] 赵超群. 液相色谱—串联质谱联用技术在测定食品中非法添加物的应用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015: 1-2.
- [5] PATEL Misari, CHARMY Kothari. Critical review of statins: A bio-analytical perspective for therapeutic drug monitoring[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2017, 86: 206-221.
- [6] LIU Ai-mei, WU Qing-hua, GUO Jing-chao, et al. Statins: Adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions[J]. Pharmacology and Therapeutics, 2018, DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.004.
- [7] 国家食品药品监督管理总局.《总局办公厅关于印发国家食品安全监督抽检实施细则(2018 年版)的通知: 食药监办食监三[2018]14 号[EB/OL]. (2018-01-18) [2019-01-24]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1605/223270.html>.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 辅助降血脂类保健食品违法添加药物的检测方法: 国食药监办许[2010]114 号[EB/OL]. (2010-04-27) [2019-01-24]. <http://www.instrument.com.cn/download/shhtml/809955.shtml>.
- [9] 国家市场监督管理总局. 全国食品保健食品欺诈和虚假宣传整治工作领导小组办公室发布《食品保健食品欺诈和虚假宣传整治问答》[EB/OL]. (2018-10-19) [2019-01-24]. http://samr.saic.gov.cn/xw/yw/xwfb/201810/t20181009_276222.html.
- [10] 王铁松, 全禹, 郑洁, 等. 薄层色谱法快速筛查降脂、降压、止咳平喘类中药制剂中的 29 种添加化学药物[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(11): 857-861.
- [11] 孙亮, 张蓉, 邬国庆, 等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中 9 种非法添加降脂类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3 098-3 102.
- [12] HELI Sirén, LAURA Kaijane, SINI Kaartinen, et al. Determination of statins by gas chromatography-EI/MS/MS-Tandem mass spectrometry: Fermentation of pine samples with *Pleurotus ostreatus*[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 94: 196-202.
- [13] GUO Meng-ran, ZHAO Long-shan, LI Mo, et al. Simultaneous determination of lovastatin and its metabolite lovastatin acid in rat plasma using UPLC-MS/MS with positive/negative ion-switching electrospray ionization: Application to a pharmacokinetic study of lovastatin nanosuspension[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1 023: 55-61.
- [14] SRINIVASA Rao Polagani, NAGESWARA Rao Pilli, RAMAKRISHNA Gajula, et al. Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 3 (1): 9-19.
- [15] ASMA El-Zailik, LILY K Cheung, WANG Yang, et al. Simultaneous LC-MS/MS analysis of simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin and their active metabolites for plasma samples of obese patients underwent gastric bypass surgery[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 164: 258-267.
- [16] 于泓, 胡青, 张甦, 等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法检测中药及保健食品中 21 种非法添加的降脂类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2 704-2 709.
- [17] 钮正睿, 王聪, 丁宏, 等. 超高效液相色谱-四极杆/飞行时间高分辨质谱测定保健食品及其原料中洛伐他汀及类似物的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2 563-2 570.
- (上接第 47 页)
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 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, 2006.
- [19] 孙婧超, 刘玉田, 赵玉平, 等. pH 示差法测定蓝莓酒中花色苷条件的优化[J]. 中国酿造, 2011, 30(11): 171-174.
- [20] 徐俊, 雍晓雨, 费文斌, 等. 基于 TTC 染色法的高活力酵母细胞定量筛选[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 1-5.
- [21] 徐本刚, 母应春, 陈虹文, 等. 贵州黑糯米酒曲优良酵母菌分离筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 62-67.
- [22] 张陈云, 刘金福, 王娜, 等. 冬枣果酒酿造酵母的分离筛选研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(8): 43-47.
- [23] 杨鲁君, 蒋予箭, 李余动. 黄酒酵母优良抗逆菌株的筛选、鉴定及发酵特性研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(9): 71-77.
- [24] 侍崇娟, 吕钰凤, 杜晶, 等. 杨梅酒发酵工艺及其风味变化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 166-170.
- [25] 沈颖, 刘晓艳, 白卫东, 等. 果酒中有机酸及其对果酒作用的研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(2): 29-32.
- [26] 马勇, 图雅, 陈秀莉, 等. 分光光度法测定高浓度培养液下的产油酵母菌生长曲线[J]. 北方园艺, 2013(8): 116-118.
- [27] 何贝, 王学东, 叶鹏, 等. 几种品牌酵母耐性生长曲线对比研究[J]. 中国酿造, 2014(12): 63-67.
- [28] 阎贺静, 时月, 刘畅, 等. 玫瑰香干红葡萄酒自然发酵过程中优势酵母分离鉴定及其应用潜力分析[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 117-124.
- [29] 朱宝生, 刘功良, 白卫东, 等. 耐高糖酵母筛选及其高糖胁迫机制的研究进展[J]. 中国酿造, 2016, 35(6): 11-14.
- [30] 王孝荣, 罗佳丽, 潘年龙, 等. 草莓果酒酿造工艺的优化及其香气成分分析[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 196-201.
- [31] 尤亮, 丁东栋, 崔志峰. 乙醇耐受性酿酒酵母菌株选育的研究进展[J]. 工业微生物, 2016, 46(3): 51-55.
- [32] 张强, 郭元, 韩德明. 酿酒酵母乙醇耐受性的研究进展[J]. 化工进展, 2014, 33(1): 187-192.