

佛手果醋乙醇发酵优良酵母菌的选育及鉴定

朱佳琪¹, 郑飞云¹, 杨悦¹, 王金晶¹, 刘春风¹, 钮成拓¹,
王海鸣², 杨惠成², 李永仙^{*1}, 李崎¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡, 214122; 2. 广州广电计量检测股份有限公司, 广东 广州, 510656)

摘要: 佛手汁酿制果醋的过程需要优先利用酵母菌将糖发酵为酒精, 但佛手汁中的柠檬苦素会抑制酵母生长。为避免其对酵母酒精发酵能力的影响, 作者利用佛手为原料, 结合醋酸发酵的选育方式, 筛选适合佛手果醋乙醇发酵的酵母菌株。从自然发酵的佛手汁中, 分离得到 85 株酵母菌株。经过杜氏小管初筛, 以产乙醇能力、起酵速度、有机酸生产能力为指标进行复筛和醋酸发酵试验, 最终得到优良菌株 FS-ZJQ。经 18S rDNA 序列鉴定该酵母菌株为酿酒酵母。其在糖度 18 °Bx 的佛手汁中, 25 °C 发酵 7 d 可产乙醇 8.49%, 发酵液中萜烯类化合物、酯类化合物质量分数高, 分别占挥发性风味成分的 58.83%、16.44%; 经醋酸发酵后, 非挥发酸质量浓度可达 5.06 mg/mL。菌株 FS-ZJQ 对糖度、pH、乙醇的耐受性较好。

关键词: 佛手汁; 酵母; 筛选; 鉴定

中图分类号: TS 264 文章编号: 1673-1689(2020)05-0023-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.004

Isolation, Screening and Identification of Yeasts for Alcoholic Fermentation of Bergamot Vinegar

ZHU Jiaqi¹, ZHENG Feiyun¹, YANG Yue¹, WANG Jinjing¹, LIU Chunfeng¹, NIU Chengtuo¹,
WANG Haiming², YANG Huicheng², LI Yongxian^{*1}, LI Qi¹

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Guangzhou Grg Metrology & Test Co., Ltd., Guangzhou 510656, China)

Abstract: Yeasts with good characteristics are important for the alcohol fermentation in bergamot vinegar production while limonin in bergamot will inhibit the yeast growth. This study aimed to screen yeast strains with favorable characteristics in bergamot fermentation based on the unique properties of bergamot. Eighty five yeast strains were screened from natural fermented bergamot juice and the yeast strain named FS-ZJQ with good ethanol and organic acids production ability was selected through a three step screening method. Strain FS-ZJQ was identified as *Saccharomyces cerevisiae* in taxonomy through 18S rDNA sequencing and it showed strong ability to tolerate sugar, pH and alcohol. This strain could produce 8.49% alcohol in 18 °Bx bergamot juice when fermented

收稿日期: 2018-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571942, 31601558, 31771963); 江苏省现代工业发酵协同创新中心资助项目。

* 通信作者: 李永仙(1964—), 女, 硕士, 高级工程师, 硕士研究生导师, 主要从事酿酒工程与食品生物技术方面的研究。

E-mail: yxli@jiangnan.edu.cn

at 25 °C for 7 d. High contents of terpenoid and ester compounds were observed in bergamot wine, which accounted for 58.83% and 16.44% of the total volatile compounds. After acetic fermentation, the content of non-volatile acids reached 5.06 mg/mL.

Keywords: ergamot juice, yeast, screening, identification

佛手属芸香科柑橘属,其性状与柑橘、柚子等果木类似^[1]。佛手含有丰富的矿物质和多种生理活性物质,尤其是其含有的柠檬苦素类化合物具有抗癌、抗菌、抗疟药等药理作用^[2-3]。目前佛手主要被用作景观和药材,深加工产品种类较少^[4]。作者首次利用佛手汁为原料,经乙醇发酵和醋酸发酵得到果醋饮料。

目前水果醋的乙醇发酵阶段主要使用安琪葡萄酒酵母,工业上尚无用于佛手果醋乙醇发酵的专用酵母。在已有的果醋乙醇酵母的筛选中,大多只涉及乙醇发酵阶段^[5-6],在选育过程中与醋酸发酵结合的选育方式鲜有报道,两个发酵阶段的结合能否产生有益的效果更值得人们探索。乙醇发酵是生产果醋的第一步^[7],乙醇的积累、香气的形成以及有机酸含量的增减都对果醋成品的品质起着非常重要的作用。同时为避免柠檬苦素对酵母发酵能力的影响,筛选一株能适应佛手发酵环境、产乙醇能力强、起发速度快、风味优良、益于醋酸发酵的酵母菌对佛手果醋的工业化生产具有重要意义。作者利用市售佛手,从其自然发酵的汁液中分离筛选适合乙醇发酵的优良酵母,得到了一株发酵性能、香气均优良且能与醋酸菌较好结合的酵母菌,并对其进行了菌株鉴定、风味测定和耐受性验证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

佛手汁、白砂糖、安琪葡萄酒干酵母粉、食用乙醇:市售;琼脂粉、蛋白胨、酵母粉:Thermo Fisher Oxoid;葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钠:国药集团药品。酵母基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;巴氏醋酸菌:作者所在实验室保藏。

AMP溶液:1 g 氨基青霉素溶于10 mL蒸馏水中,并用滤膜过滤,-20 °C保存,以抑制细菌生长。

YPD富集培养基:葡萄糖2 g,蛋白胨2 g,酵母粉1 g,琼脂粉2 g,自然pH,蒸馏水定容至100 mL,115 °C灭菌15 min,灭菌后待培养基冷却后加入AMP

100 μL。

产酯初筛培养基:酵母粉1 g,琼脂2 g,蒸馏水定容至100 mL,pH 6.8~7,115 °C灭菌15 min,灭菌后待培养基冷却后加入溴甲酚紫0.04 mg,乙酸乙酯0.1 mL,乳酸乙酯0.1 mL。

YPD固体培养基:葡萄糖2 g,蛋白胨2 g,酵母粉1 g,琼脂粉2 g,自然pH,蒸馏水定容至100 mL,115 °C灭菌15 min。

醋酸菌种子培养基:葡萄糖1 g,酵母粉1 g,pH 5.5,115 °C灭菌15 min,灭菌后待培养基冷却后加入乙醇(食用级)5 mL。

1.2 仪器与设备

低温水浴槽、生化培养箱 BSP-250:上海博迅公司;阿贝折光仪:山东泰光电气有限公司;PL2002 电子天平、便携式 pH 计、AL204 分析天平:METTLER TOLEDO仪器有限公司;气相色谱串联质谱联用仪:美国瓦里安公司;高效液相色谱(Chromaster):日本HITACHI公司。

1.3 研究方法

1.3.1 菌种富集与分离 取250 mL新鲜佛手汁于500 mL无菌的三角瓶中,于28 °C恒温自然发酵。待三角瓶中出现大量气泡并伴有酒香时,取10 mL发酵液接入YPD富集培养基,28 °C静置培养2 d。将菌悬液稀释涂布于产酯初筛培养基,28 °C培养2 d。挑取单菌落至YPD斜面,培养后于4 °C保存。

1.3.2 酵母菌的初筛 利用杜氏小管法进行酵母菌初筛。试管中佛手汁体积10 mL,接入酵母培养液,接种浓度 2.5×10^7 CFU/mL,28 °C静置培养2 d。根据观察杜氏小管中气柱的高低以及对各菌株的香气感官品评,初步筛选出发酵能力强、发酵香气宜人的酵母菌株。

1.3.3 酵母菌的复筛 将初筛所得的菌株活化后接入含糖18 °Bx的250 mL佛手汁中,接种浓度 2.5×10^7 CFU/mL,25 °C发酵7 d,以安琪葡萄酒酵母为对照,比重瓶法测定发酵液的乙醇体积分数。香气感官评价^[8]:组织品评小组(由具有相关专业背景、受过

专业训练的教师6人和学生14人组成)对乙醇发酵液进行香气品评,品评结果取平均值。发酵气味好、佛手柑橘香与酒香协调、诸香和谐纯正,满分10分。在后续的研究过程中若无特别说明,酵母的接种浓度和发酵条件与本方法一致。

1.3.4 酵母菌三级筛选

1) 酵母菌起酵速度筛选 将复筛所得产乙醇能力强的酵母进行500 mL三角瓶发酵,以安琪葡萄酒酵母为对照。每日称质量,计算CO₂质量的减少。根据48 h CO₂质量减少的总量判断酵母菌的起酵速度。

2) 乙醇发酵液和醋酸发酵中的主要有机酸含量分析 将所得到的产乙醇能力强且起酵速度快的酵母菌株进行500 mL三角瓶发酵,发酵液于4 000 r/min,离心5 min,去除酵母,将发酵上清液置于新灭菌500 mL空瓶中,接入巴氏醋酸菌接种浓度为6×10⁶ CFU/mL,转速150 r/min,37 °C培养5 d。离心取上清液,经0.22 μm膜过滤后,利用液相高效色谱测定各类有机酸含量。色谱条件如下,色谱柱:XBridge C18 4.6×150 mm;柱温:30 °C;紫外检测器:220 nm;流动相:0.02 mol/L NaH₂PO₄ pH 2.7;进样量:10 μL;流速:0.5 mL/min。

1.3.5 菌株鉴定 取-80 °C甘油贮存液接种于100 mL YPD培养基中,接种浓度5×10⁶ CFU/mL,28 °C、150 r/min培养24 h。取适量培养液离心1 min(12 000 r/min),弃上清液,采用试剂盒法提取菌体DNA。用酵母ITS通用引物对正向引物ITS1、反向引物ITS4扩增基因组DNA。PCR产物用2 g/dL琼脂糖凝胶电泳检测,并进行测序。用BLAST方式将测定的18S rDNA序列与GenBank中酵母菌的序列进行比对,构建系统发育树。

1.3.6 酵母菌株发酵液中主要风味成分分析 将所得菌株与安琪葡萄酒酵母进行对比发酵,分析乙醇发酵液中的风味成分。发酵结束后采用气相色谱-质谱(GC-MS)分析佛手乙醇发酵液的香气成分。

样品前处理萃取条件如下:20 mL顶空瓶中加入5 mL佛手酒样品,1.0 g NaCl在45 °C条件下预热5 min,萃取60 min。萃取完成后,将萃取头插入进样口,解吸附5 min,进行GC-MS分析^[9]。分析条件同桑葚果酒GC-MS分析条件^[10]。

风味成分评价方法:采用气味活度值(Odor Activity Value, OAV)评价各化合物对样品总体风味

的贡献,即OAV值为物质浓度与感觉阈值的比值。只有OAV>1的挥发性化合物对总体风味有直接贡献,并且在一定范围内OAV值越大说明该物质对总体风味贡献越大^[11]。本研究仅分析OAV>1的挥发性物质。

1.3.7 菌株耐受性验证

1) 糖度耐受性 将菌株分别接种于12、15、18、21、24 °Bx佛手汁中,接种浓度2.5×10⁷ CFU/mL,28 °C培养3 d,每隔12小时取样,测定600 nm下菌液的吸光值。

2) pH耐受性 调整初始佛手汁pH为2.0、2.5、3.0、3.5、4.0,接种浓度2.5×10⁷ CFU/mL,28 °C培养3 d,每隔12小时取样,测定600 nm下菌液的吸光值。

3) 乙醇耐受性 分别调整佛手汁初始乙醇体积分数为5%、8%、11%、14%、17%,接种浓度2.5×10⁷ CFU/mL,28 °C培养3 d,每隔12小时取样,测定600 nm下菌液的吸光值。

1.3.8 实验数据处理与统计分析 各组实验均做3次重复,采用“均值±标准差”表示实验数据结果。使用SPSS20.0软件对数据进行统计和差异性分析,显著性界值为P<0.05。

2 结果与分析

2.1 菌株的富集与分离

佛手汁经自然发酵、富集与分离,菌落都具有酵母的典型性特征:表面光滑,黏稠,乳白色,有酒香味,显微镜下呈椭圆形^[12]。分离得到85株酵母菌株,经YPD斜面培养后于4 °C保存备用。

2.2 酵母菌的初筛

采用杜氏小管法进行酵母菌株初筛,结果见表1和图1。

表1 酵母初筛结果

Table 1 Results of yeast screening

产气量	产气情况/株	发酵气味/株
-	13	33
+	38	23
++	34	29

注:“-”表示产气很少,不足1/3试管或者发酵气味差、有异味;“+”表示气体达到1/2试管或者发酵无酸败味;“++”表示产气量充足超过2/3或者发酵液有明显佛手柑橘香和酒香。

结果表明:1)有34株酵母经过发酵后,杜氏小管内充满了气泡,说明其发酵能力强^[13];2)有29株酵母发酵气味优良,具备佛手酒发酵的柑橘清爽的香气。如图1所示,综合产气情况和发酵气味这两个指

标分析,初筛得到29株发酵能力强且发酵气味愉悦的酵母菌株。

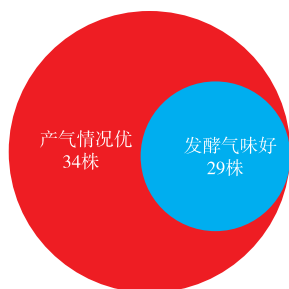


图1 酵母初筛结果维恩图

Fig. 1 Venn diagram of yeast screening

2.3 酵母菌的复筛

乙醇产生能力的强弱是评价果酒酵母优劣的重要指标^[14]。对初筛所得的29株酵母菌进行三角瓶发酵,发酵结束后测定其乙醇体积分数,并对发酵后酒样进行香气的感官品评,对照菌为安琪葡萄酒酵母,其发酵后乙醇体积分数为7.25%,香气感官评价得分为5.5。以这两个指标作为复筛的标准,筛选乙醇发酵度及感官评分均高于对照菌的酵母菌株,最终得到7株酵母,编号分别为1-3、2-13、2-29、2-36、6-7、7-7、10-1,其乙醇体积分数和香气感官评价得分见表2和图2。

表2 酵母菌乙醇体积分数与香气感官评价得分

Table 2 Alcohol production capacity and sensory evaluation of the yeasts

菌种编号	乙醇体积分数/%	香气感官评价得分
对照菌	7.25±0.04 ^d	5.5±0.5 ^d
1-3	8.39±0.06 ^b	6.5±0.6 ^c
2-13	8.51±0.10 ^b	6.9±0.3 ^{bc}
2-29	8.48±0.11 ^b	6.3±0.4 ^c
2-36	7.46±0.09 ^c	8.1±0.3 ^a
6-7	8.49±0.07 ^b	7.9±0.3 ^b
7-7	8.76±0.11 ^a	6.0±0.3 ^c
10-1	8.38±0.08 ^b	7.2±0.4 ^b

注:同一行中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

乙醇体积分数>7.25% 香气感官得分>5.5分

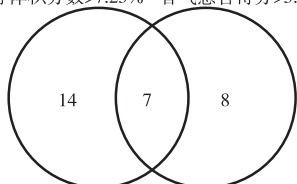


图2 酵母复筛结果维恩图

Fig. 2 Venn diagram of yeasts' alcohol production capacity and sensory evaluation

2.4 酵母菌三级筛选

2.4.1 酵母菌起酵速度筛选 酵母菌株具有较快的起酵速度,能缩短发酵周期,对工业生产成本的节约有重要意义。酵母菌在乙醇发酵过程中将糖转化为乙醇的同时会产生CO₂,因此发酵初期CO₂的释放量的多少可以表示起酵速度的快慢^[15]。对复筛所得的7株酵母进行三角瓶发酵,每日称质量并计算CO₂释放量,对照菌为安琪葡萄酒酵母。发酵24 h与48 h CO₂具体释放量情况见表3。由表3可知,对照菌在48 h内的质量损失为4.83 g,大于对照菌,即起酵速度快于对照菌的菌株共有3株,分别为6-7、2-36、10-1,选取这3株菌进行下一步研究。

表3 酵母菌乙醇发酵48 h内CO₂释放量

Table 3 CO₂ emission amount of the yeasts in 48 hours

菌种编号	24 h CO ₂ 释放量/g	48 h CO ₂ 释放量/g	48 h CO ₂ 释放总量/g
对照菌	1.24±0.05 ^{bc}	3.59±0.15 ^a	4.83±0.19 ^b
1-3	1.30±0.06 ^b	3.29±0.18 ^b	4.59±0.06 ^c
2-13	1.15±0.06 ^c	3.54±0.13 ^{ab}	4.69±0.04 ^b
2-29	1.04±0.21 ^d	3.05±0.15 ^c	4.09±0.36 ^d
2-36	1.90±0.13 ^a	3.46±0.06 ^b	5.36±0.20 ^a
6-7	1.40±0.03 ^b	4.04±0.13 ^a	5.44±0.10 ^a
7-7	1.15±0.09 ^c	2.87±0.18 ^d	4.02±0.27 ^d
10-1	1.58±0.09 ^{ab}	3.42±0.11 ^b	5.00±0.02 ^b

注:同一行中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.4.2 乙醇发酵液和醋酸发酵液中的主要有机酸质量浓度分析 果醋中有机酸种类和质量浓度是评价果醋优劣的重要指标之一。种类丰富的有机酸能使果醋酸感柔和,缓解刺激感^[16]。作者以安琪葡萄酒酵母为对照菌,利用2-36、6-7、10-1号菌在三角瓶中进行乙醇发酵,发酵结束后离心去除酵母菌体,接入巴氏醋酸菌继续发酵。醋酸发酵结束后,测定各类有机酸质量浓度,结果见表4。

表4表明,不同种类的有机酸经过醋酸发酵后质量浓度有所变化,其中乙酸质量浓度变化最大,增加量约32 mg/mL。非挥发性酸略有增减。乙醇发酵液中乳酸、琥珀酸、酒石酸、苹果酸等非挥发性有机酸质量浓度分别为4.29、4.24、4.64、4.57 mg/mL,其中菌株6-7和10-1产挥发酸性能较佳。非挥发性酸的增加能使醋酸发酵液酸味绵柔、减小刺激感。与6-7号菌对应的醋酸发酵液中,非挥发性有机酸质量浓度为5.06 mg/mL,相比于乙醇发酵液中的有机

酸提高了9.05%,比安琪葡萄酒酵母高12.7%,而10-1菌株在经过醋酸发酵后非挥发性酸质量浓度没有显著变化。

菌株6-7在乙醇发酵过程中能产生更多的有机

酸,且在经过醋酸发酵后,有机酸质量浓度进一步增加。因此,将6-7号菌定位为本研究的优选菌,命名为FS-ZJQ。

表 4 乙醇发酵液和醋酸发酵液中的有机酸质量浓度

Table 4 Contents organic acids in wine and vinegar

有机酸质量浓度	乙醇发酵液				醋酸发酵液			
	对照菌	2-36	6-7	10-1	对照菌	2-36	6-7	10-1
乙酸/(mg/mL)	2.21±0.10 ^b	1.70±0.06 ^b	1.93±0.08 ^b	1.65±0.07 ^b	34.88±1.89 ^a	34.13±1.39 ^a	34.45±1.97 ^a	34.09±2.23 ^a
酒石酸/(mg/mL)	1.14±0.05 ^c	1.15±0.04 ^c	1.25±0.06 ^b	1.20±0.06 ^{bc}	1.28±0.11 ^b	0.58±0.02 ^d	1.42±0.06 ^a	1.22±0.05 ^b
丙酮酸/(μg/mL)	49.28±2.33 ^d	50.33±1.24 ^c	52.37±3.85 ^b	51.49±2.10 ^b	49.56±3.19 ^{cd}	50.32±2.88 ^c	56.54±4.15 ^a	51.12±1.67 ^{bc}
α-酮戊二酸/(μg/mL)	6.66±0.53 ^b	7.41±0.48 ^a	5.23±0.21 ^c	7.35±0.48 ^a	5.27±0.35 ^c	6.20±0.40 ^b	5.54±0.45 ^c	6.28±0.41 ^b
苹果酸/(mg/mL)	0.50±0.02 ^d	0.51±0.03 ^d	0.69±0.05 ^b	0.68±0.05 ^b	0.63±0.02 ^c	0.64±0.04 ^c	0.73±0.04 ^a	0.65±0.02 ^c
乳酸/(mg/mL)	1.98±0.11 ^b	1.91±0.08 ^c	2.06±0.08 ^b	2.03±0.08 ^b	2.01±0.12 ^b	2.02±0.13 ^b	2.13±0.16 ^a	2.03±0.13 ^b
柠檬酸/(mg/mL)	0.33±0.02 ^a	0.30±0.01 ^a	0.29±0.01 ^b	0.30±0.01 ^a	0.23±0.01 ^c	0.21±0.01 ^c	0.25±0.02 ^b	0.20±0.01 ^c
琥珀酸/(mg/mL)	0.29±0.02 ^b	0.25±0.02 ^c	0.23±0.01 ^d	0.26±0.01 ^c	0.30±0.02 ^b	0.32±0.02 ^b	0.36±0.01 ^a	0.32±0.02 ^b
富马酸/(μg/mL)	0.86±0.05 ^b	1.40±0.11 ^a	0.91±0.04 ^b	0.72±0.03 ^c	0.66±0.03 ^c	0.85±0.03 ^b	0.74±0.04 ^b	0.66±0.03 ^c
非挥发性酸总量/(mg/mL)	4.29±0.04 ^c	4.24±0.18 ^c	4.64±0.15 ^b	4.57±0.03 ^b	4.49±0.11 ^{bc}	3.89±0.04 ^c	5.06±0.06 ^a	4.53±0.06 ^{bc}

注:同一行中不同字母表示显著差异($P<0.05$)。

2.5 菌种鉴定

如图3所示,菌株FS-ZJQ的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定结果良好。将测序结果与Genbank中酵母菌的18S rDNA序列比对,构建系统发育树。本研究选择了3种与FS-ZJQ碱基个数相似的、食品用酵母菌:*Saccharomyces cerevisiae* (KC183722.1、KX131151.1),*Rhodotorula mucilaginosa*(AF444541.1、

AF444608.1),*Pichia kudriavzevii* (KX131152.1),*Pichia membranifaciens* (AY251639.1)。如图4所示,FS-ZJQ与酿酒酵母(*S. cerevisiae*)同源率为100%,可确定菌株FS-ZJQ为酿酒酵母。

2.6 酵母菌株发酵液中主要风味成分分析

将酵母菌株FS-ZJQ与安琪葡萄酒酵母于三角瓶中进行发酵,采用气相色谱-质谱(GC-MS)分析佛手乙醇发酵液的香气成分。由表5可知,不同的菌株经过乙醇发酵后,发酵产物中挥发性成分都有不同程度的变化。经FS-ZJQ发酵后,与安琪葡萄酒酵母相比,发酵液中萜烯类化合物质量分数为7.60%,萜烯类化合物种类有:α-萜品烯(柑橘和柠檬香气)、α-水芹烯(薄荷香气)、β-水芹烯(青草香气)^[17]等9种。酯类化合物质量分数为6.04%,酯类化合物有:乙酸己酯(水果清甜气味)、辛酸乙酯(水果香气)、乙酸香叶酯(玫瑰薰衣草香气)、乙酸苯乙酯(玫瑰花香)^[17]等12种。酵母菌株决定了酯的形成量,同时不同酯的种类和数量决定了果醋的香气和风味^[18]。芳香族化合物基本得到保留,醇类与羰基化合物与对照菌质量分数相当。由此可见,FS-ZJQ挥发性香气成分种类丰富,能适应佛手环境,产香能力优于安琪葡萄酒酵母。

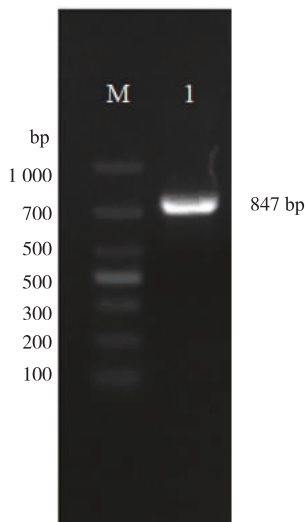


图 3 酵母PCR产物琼脂糖电泳图

Fig. 3 Agarose electrophoresis of PCR products of yeast

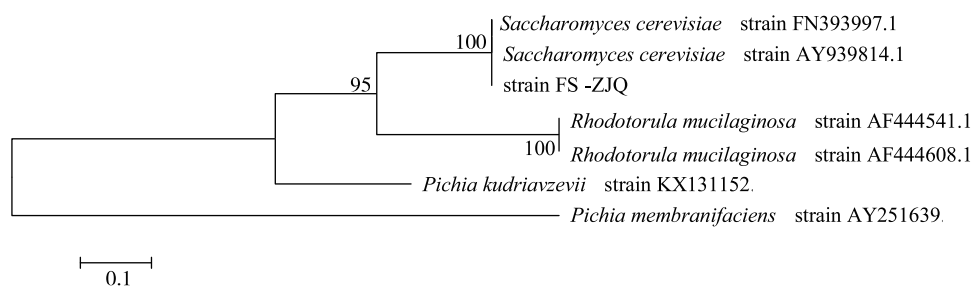


图 4 基于18S rDNA测序构建酵母菌株系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Saccharomyces cerevisiae* based on 18S rDNA sequencing

表 5 发酵液中主要挥发性风味成分分析

Table 5 Analysis of main volatile aroma components

挥发性风味成分	佛手汁	FS-ZJQ	对照菌
萜烯类化合物 质量分数/%	95.12±2.24 ^a	58.83±2.15 ^b	51.23±1.87 ^c
种类	17	9	5
酯类化合物 质量分数/%		16.44±1.89 [*]	10.40±0.24
种类		12	8
醇类化合物 质量分数/%	2.64±0.12 ^b	13.29±1.35 ^a	14.25±1.44 ^a
种类	4	4	4
芳香族化合物 质量分数/%	1.69±0.04 ^a	1.72±0.06 ^a	1.17±0.05 ^b
种类	6	4	3
酸类化合物 质量分数/%		8.59±0.98	21.23±1.75 [*]
种类		4	5
羰基化合物 质量分数/%	0.55±0.01 ^b	1.13±0.25 ^a	1.72±0.48 ^a
种类	3	2	4

注:同一行中不同字母表示显著差异($P < 0.05$), *表示在 $P < 0.05$ 水平上显著差异。

2.7 FS-ZJQ菌株耐受性验证

2.7.1 糖度耐受性 将FS-ZJQ接种于不同初始糖度的佛手汁中,培养过程中定期取样测定菌液在600 nm测定吸光值。由图5可知,0~24 h期间,当初始糖度低于21 °Bx时,酵母生长速率随着糖度的增加而加快,当糖度高于21 °Bx时,其生长速率随着糖度的增加而减缓,随后趋于稳定。由此可知,FS-ZJQ能耐12~21 °Bx的糖度,符合酵母菌乙醇发酵的12~20 °Bx的糖度范围^[19]。

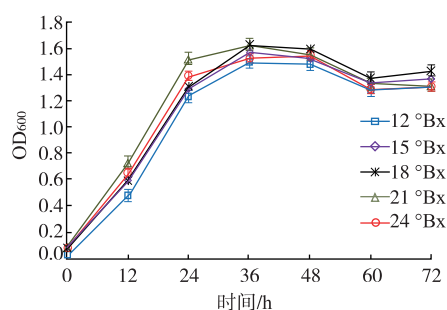


图 5 不同糖度下FS-ZJQ生长情况

Fig. 5 Growth curves of FS-ZJQ with different initial sugar contents

2.7.2 pH耐受性 佛手汁的pH为4.2左右,故考虑FS-ZJQ在pH<4的耐受性。将FS-ZJQ接种于不同初始pH的佛手汁中,培养过程中定期取样测定菌液在600 nm测定吸光值。由图6可知,当初始pH<3时,酵母细胞的生长受到抑制;当pH 2时,抑制作用明显。这是因为强酸条件会对细胞造成一定的损伤,导致生理活性的丧失。当初始pH在3~4时,酵母生长趋势整体相似,生长速度均由快速趋于缓慢。由此可知,FS-ZJQ在pH为3~4时具有耐酸能力,符合酸类果汁乙醇发酵对pH的要求^[20]。

2.7.3 乙醇耐受性 果酒乙醇体积分数一般为7%~13%^[21],将FS-ZJQ接种于不同初始乙醇体积分数的佛手汁中,培养过程中定期取样测定菌液在600 nm处吸光值,结果见图7。乙醇体积分数高于14%时,酵母生长受到抑制。当乙醇体积分数为5%、8%、11%时,酵母生长趋势较为相似。0~24 h酵母生长缓慢;24~48 h生长明显加快,随后趋于稳定。这是因为初始培养基中的乙醇对酵母的生长产生了胁迫作用^[22],酵母生长进入迟滞期。24 h后酵母进入对数生长期,细胞浓度增加。36 h后酵母生长缓慢,乙醇的积累抑制了酵母的生长,最后趋于平稳。由此可知,FS-ZJQ在

乙醇体积分数低于14%具有较强的耐受性。

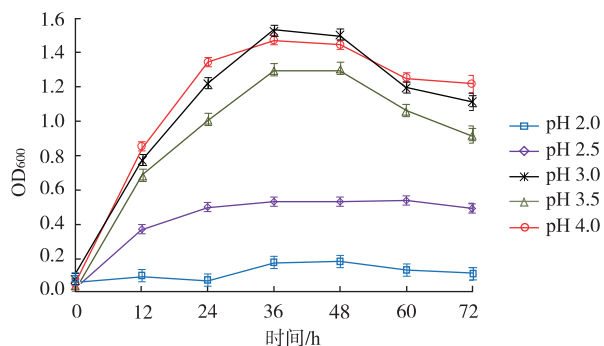


图 6 不同pH下FS-ZJQ生长情况

Fig. 6 Growth curves of FS-ZJQ with different pH values

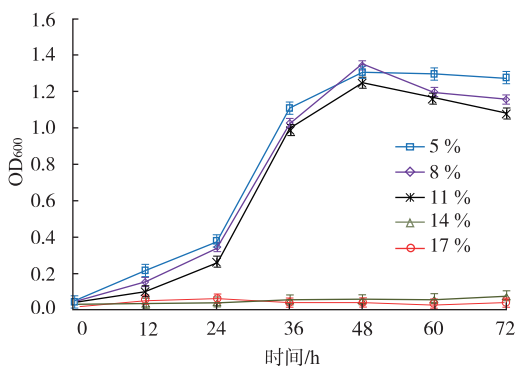


图 7 不同乙醇体积分数下FS-ZJQ生长情况

Fig. 7 Growth curves of FS-ZJQ with different alcohol concentrations

3 结语

果醋酿造行业中,大多使用安琪葡萄酒酵母作为乙醇发酵阶段菌株,但其特异性弱,并不能突出佛手原料特色。同时在筛选果醋乙醇酵母的过程中,与醋酸发酵结合的选育方式却鲜有报道。本研究通过菌种富集、分离、初筛及复筛,并结合醋酸发酵实验,最终得到一株酵母菌FS-ZJQ,其产乙醇能力强、起酵速度快、产香较好、非挥发性酸质量浓度相对较高,且经醋酸发酵后非挥发性酸质量浓度进一步提高。在糖度18°Bx的佛手汁中,25℃发酵7d可产乙醇8.49%,乙醇产量比安琪葡萄酒酵母高17.1%;经醋酸发酵后,非挥发性酸质量浓度可达5.06 mg/mL,比安琪葡萄酒酵母高12.7%。经菌种鉴定FS-ZJQ为酿酒酵母;通过GC-MS风味分析,测得萜烯类化合物、酯类化合物分别占总挥发性风味成分的58.83%、16.44%,分别比安琪葡萄酒酵母高7.60%、6.04%;通过耐受性试验可知,该酵母菌对糖度、pH、乙醇体积分数都具有一定的耐受性,能适应佛手汁环境,具有工业应用前景。

参考文献:

- [1] 许茹,钟凤林,王树彬. 中药佛手的本草考证[J]. 中药材, 2017, 40(8): 1975-1978.
- [2] 石慧,王喜军. 柠檬苦素类化合物的药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2014, 42(04): 128-129.
- [3] GUALDANI R, CAVALLUZZI M, LENTINI G, et al. The chemistry and pharmacology of *Citrus limonoids*[J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1530-1569.
- [4] 梅淑芳,赵华,刘向蕾,等. 佛手种质资源的开发及其产后高效利用[J]. 中国种业, 2006(10): 68-69.
- [5] 匡钰. 优良菠萝果酒酵母的选育及其在菠萝果醋发酵中的应用研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- [6] 隆文娟. 沙棘果醋酿造技术及其保健成分的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [7] HO C W, LAZIM A M, FAZRY S, et al. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: a review[J]. *Food Chemistry*, 2016, (221): 1621-1630.
- [8] 李宏,刘锐萍,张克义. 葡萄酒感官品评技术要求及品评方法研究[J]. 酿酒科技, 2013, (5): 122-127.
- [9] 沈海月,范文来,徐岩,等. 应用顶空固相微萃取分析四种红葡萄酒挥发性成分[J]. 酿酒, 2008, 35(2): 71-74.
- [10] 曹倩雯,郑飞云,赵佳迪,等. 桑葚果酒专用酵母的分离、筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(3): 94-98.
- [11] SONG C, ZUO L, SHI P, et al. Aroma characterization of Chinese hutai-8 wines: comparing with merlot and cabernet sauvignon wines[J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 14(194): 237-245.
- [12] MORENO-ARRIBAS M V, POLO M C. *Wine Chemistry and Biochemistry*[M]. New York: Springer, 2009: 55-71.
- [13] 张大为,张洁,高健,等. 柑橘酒酿造酵母的筛选及鉴定[J]. 酿酒科技, 2016, (7): 42-46.

- [14] LEE Y J, CHOI Y R, LEE S Y, et al. Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits[J]. *Mycobiology*, 2011, 39(1):33-39.
- [15] 陈清婵, 孙爱红, 简清梅, 等. 适用于橘子酒发酵的野生酵母初步筛选[J]. 中国酿造, 2017, 36(5):128-131.
- [16] 张丽娟, 许伟, 许泓瑜, 等. 恒顺香醋固态发酵过程中有机酸的变化分析[J]. 中国调味品, 2009, 34(2):106-109.
- [17] 孙宝国. 食用调香术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010:10-36.
- [18] 张强, 辛秀兰, 杨富民, 等. 主成分分析法评价红树莓果醋的相对气味活度值[J]. 现代食品科技, 2015, 31(11):332-338.
- [19] OSHO A. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4(7):660-662.
- [20] 熊海燕, 李莹. 不同果汁发酵液中酵母菌生长曲线的测定及 pH 值的变化[J]. 农产品加工学刊, 2009(4):26-27.
- [21] 左勇, 刘利平, 鞠帅, 等. 无花果果酒酵母的筛选及发酵性能研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6):1293-1296.
- [22] STANLEY D, BANDARA A, FRASER S, et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1):13-24.

会 议 消 息

会议名称: 第十届食品微生物检测与控制技术交流会

会议时间: 2020 年 8 月 4-7 日

会议地点: 上海

主 办 方: 中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心

中国微生物学会分析微生物专业委员会

食品伙伴网(烟台富美特信息科技股份有限公司)

会议报名: <http://www.foodmate.net/hyhy/794/fy.html>

会议内容: 如何有效控制微生物污染和提高实验室微生物检测能力, 已成为食品行业健康发展的重要问题, 也是政府监管部门及食品企业关注的焦点问题之一。为提升我国相关企业的微生物检测与控制能力, 保障食品质量安全, 由中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心、中国微生物学会分析微生物专业委员会、食品伙伴网联合主办的 2020 第十届食品微生物检测与控制技术交流会, 计划于 2020 年 8 月 4 日-7 日在上海举办。

联系人: 张女士

电话: 13370917540(微信同号)

QQ: 3103849236

邮箱: train03@foodmate.net