

# 低高级醇石榴酒的酵母筛选及发酵工艺优化

朱玉章, 王俊人, 李西子, 张翠英

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 为了探究酵母种类和发酵条件对石榴酒高级醇含量的影响, 本实验以石榴汁为原料, 通过全汁发酵的方法, 采用两种不同的工艺对酿酒酵母进行筛选以及对酿造条件进行优化, 生产高级醇含量低的石榴酒。通过对石榴酒理化性质的测定以高级醇含量作为主要指标筛选出最佳酵母和最优条件, 结果显示: 筛选的酵母中, WY-T21 酵母生成的高级醇含量最低, 总高级醇产量为 272.26 mg/L, 较 WY-1 酵母下降了 21.71%。同时, 以高级醇含量为主要指标结合其他理化性质分析可得, 温度对发酵速度影响最大, 而浸渍时间对乙醇产量的影响最大, 低产高级醇石榴酒的最佳发酵条件为浸渍时间 6 d、二氧化硫添加量 80 mg/L、发酵温度 20 ℃, 其发酵工艺优化后生成总高级醇含量为 245.35 mg/L, 较优化发酵条件前高级醇含量下降了 9.88%。通过研发低高级醇石榴酒可以为开发更高质量果酒提供新的研究思路。

**关键词:** 石榴酒; 酿酒酵母; 高级醇; 发酵条件优化

文章编号: 1673-9078(2021)04-64-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0921

## Optimization of Yeast and Fermentation Process for Pomegranate Wine with Low Higher Alcohol

ZHU Yu-zhang, WANG Jun-ren, LI Xi-zi, ZHANG Cui-ying

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In order to investigate the effects of yeast species and fermentation conditions on the higher alcohol content of pomegranate wine, pomegranate juice was used as raw material, and two different fermentation processes was adopted to screen *Saccharomyces cerevisiae*. The brewing conditions were optimized to produce pomegranate wine with low yield of higher alcohol. Through the determination of physical and chemical properties of pomegranate wine, the higher alcohol content was considered as the main index to screen out the best yeast and optimal conditions. Results show that WY-T21 yeast could produce the lowest content of higher alcohol, and the total yield of higher alcohol was 272.26 mg/L, which was 27.74% lower than that of WY-1 yeast. The higher alcohol content was used as the main index and other physical and chemical properties analysis was also considered. It can be concluded that temperature had the greatest influence on the fermentation speed, while the dipping time had the greatest influence on the ethanol content. The optimum fermentation conditions for low yield of higher alcohol pomegranate wine were as follow: immersion time of 6 days, addition of sulfur dioxide of 80 mg/L, and fermentation temperature of 20 ℃. Under this optimal fermentation process, the total content of advanced alcohol was 245.35 mg/L, which was 9.88% lower than that of the control. In conclusion, the research and development of low content of higher alcohol pomegranate wine could provide new research ideas for the development of higher quality wine.

**Key words:** pomegranate wine; *Saccharomyces cerevisiae*; higher alcohols; optimization of fermentation conditions

引文格式:

朱玉章, 王俊人, 李西子, 等. 低高级醇石榴酒的酵母筛选及发酵工艺优化[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 64-71

ZHU Yu-zhang, WANG Jun-ren, LI Xi-zi, et al. Optimization of yeast and fermentation process for pomegranate wine with low higher alcohol [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 64-71

石榴, 分布在全球温带和热带地区, 具有独特的食品文化特征, 在中西方都有广泛的受众人群<sup>[1,2]</sup>。我

收稿日期: 2020-10-09

基金项目: 国家级大学生创新训练项目 (201910057264)

作者简介: 朱玉章 (1999-), 女, 本科生, 研究方向: 酿酒

通讯作者: 张翠英 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 现代酿造技术

国对石榴的栽培已经有上千年的历史, 拥有多个产区<sup>[3]</sup>。石榴具有很高的营养价值、药用价值与食用价值, 石榴含多种有机酸、果糖、优质蛋白、酚类化合物等, 是公认的养生食品, 且石榴对慢性疾病的发病率有降低作用<sup>[4,5]</sup>, 石榴的提取物可用于治疗寄生虫感染、溃疡、腹泻、肥胖等疾病; 石榴籽中含有丰富的共轭亚

麻酸,可以预防肥胖症,抑制胰岛素抵抗;石榴叶的提取物也能有效减轻体重,降低血清中的总胆固醇<sup>[6]</sup>;石榴中的石榴子素和鞣花酸、没食子酸、熊果酸和阿拉伯酸等都具有抗糖尿病的作用,可以通过减少氧化应激和脂质过氧化对2型糖尿病进行抑制进而有效控制病情<sup>[7]</sup>。

虽然石榴的受众群体广泛,但是由于石榴不易运输存储的特点导致非产区的石榴的价格较高,因此开展石榴相关产品的研究具有现实意义。石榴酒是利用酵母菌将石榴本身的糖分发酵成为酒精的一种具有保健作用的酒饮料,在发酵阶段生成褪黑素,可作为一种良好的褪黑素食品补充剂<sup>[8]</sup>。且石榴酒的饮用品鉴价值很高,其具有红果、甜菜、黑莓、樱桃、绿藤等风味,层次多样,风味复杂<sup>[9]</sup>。近几年关于石榴酒酿造工艺有多方面研究,如张宝善等<sup>[10]</sup>在石榴酒发酵工艺的研究中,发现用含有三分之一果皮的甜石榴在低温下发酵出的石榴酒品质较好;Akalin等<sup>[11]</sup>通过对比不同浸渍法生产的石榴酒抗氧化酚类化合物含量,发现种子浸渍发酵更有利于石榴酒酚类物质含量的增加;María等<sup>[12]</sup>筛选得到*Viniferm PDM*酵母在较低温度条件下发酵可以有效降低石榴酒中花青素的降解,提高成品酒的品质。但是,少有对石榴酒高级醇方面的研,酵母在发酵过程中会产生各类风味物质,其中生成的高级醇主要作用于红酒香气,红酒香气是由复杂的混合香气相互作用而产生,可以通过不同种类和不同浓度的高级醇组合对红酒香气进行改变。高级醇是指碳原子大于等于三个的一级醇类,又称杂油醇。目前,酵母中高级醇的代谢途径包括两种,分别是Ehrlich途径和Harris途径。酵母通过氨基酸转化或者 $\alpha$ -酮酸脱氢还原生成异戊醇、戊醇、异丁醇等高级醇<sup>[13,14]</sup>。其中异丁醇和异戊醇对红酒香气影响较大,会对果香和木本气味有所影响,但是对皮革类气味以及动物气味影响不大<sup>[15-17]</sup>。但是,高级醇的含量过高往往会引起饮用者头痛、恶心、呕吐等中毒症状。因此,控制适宜的高级醇含量,对丰富红酒香气、提高红酒品质,以及增强红酒的养生效果有着重要的意义。通过对石榴红酒酵母进行筛选并优化其发酵条件进行针对性的探究,以期生产健康的低产高级醇石榴酒。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

老树晚熟甜石榴,山东省枣庄市峄城区万亩榴园;WY-T21、WY-T22、WY-1,天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏;RC212 酵母, LALEMAND

公司;实验所采用的其他试剂,天津光复精细化工研究所。

### 1.2 仪器与设备

数字式 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;糖度仪,可睦电子(上海)商贸有限公司;7890A 气相色谱仪,美国 Agilent 公司;Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 原料处理

首先对原料进行预处理,精选成熟度高、无霉变、单果大、籽粒颜色深的品种(选用山东枣庄产地的石榴,主要为大青皮、大马牙和泰山甜红等当地传统特色果种石榴<sup>[3]</sup>。山东产区石榴总体甜度和酸度相较云南产区更高;单宁较山西产区含量更丰富;且山东产区石榴种植面积全国最大,价格低廉,是作为酿酒原料的首选)。人工去皮,去除白色囊衣,清水漂洗,经榨汁机把石榴籽粒破碎,此过程避免破坏石榴籽。视实际情况补加酒石酸和蔗糖,使可溶性固形物含量达到 20%。

#### 1.3.2 酿酒酵母的筛选

用单因素法对不同酵母酿造石榴红酒的进行比较,筛选出 WY-T21、WY-T22、WY1、RC212 中最佳的酿酒酵母。

筛选酿酒酵母的石榴酒红酒发酵工艺为:在发酵温度 25℃、二氧化硫添加量为 60 mg/L、单宁浸渍时间为 4 d 的条件下对石榴酒进行 100 mL 的小瓶发酵。将活化后的酿酒酵母加入发酵瓶中,搅拌均匀,启动发酵。在发酵开始时加入石榴籽和果胶酶,使它有效分解浸渍过程中石榴籽上附着的果肉,总发酵时间为 7 d。对主发酵过程中各种理化物质进行分析,通过对比发酵效力、残糖含量、发酵过程中风味物质含量等理化性质筛选出酿酒最优酵母。

#### 1.3.3 酿造条件的单因素优化

将 1.3.1 筛选出的最优酿酒酵母作为发酵菌株,对发酵温度、二氧化硫的添加量、石榴籽浸渍时间进行优化。

优化酿造条件的石榴酒红酒发酵工艺为:对原料进行预处理后,将活化后的酿酒酵母加入到发酵罐中,搅拌均匀启动全汁发酵。在全汁发酵进行一天后把果汁连同籽粒一起发酵,让酿制的酒保持一定的单宁含量。浸渍发酵一段时间后进行汁渣分离,再进行全汁发酵。待果汁中的糖分全部发酵完毕,不再产生气泡,即发酵完毕。

以发酵效力、高级醇产量、风味物质含量等指标作为评定标准。每组三次取样,记录数据。具体实验设计参考表1。

表1 单因素实验设计与因素表

Table 1 Single factor experimental design and factor table

实验变量	实验水平 1	实验水平 2	实验水平 3
二氧化硫添加量/(mg/L)	60	80	100
浸渍时间/d	2	4	6
温度/°C	16	20	25

石榴籽浸渍时间筛选:石榴籽浸渍出的单宁是去皮酿造石榴酒中单宁的主要来源,对单宁的处理主要集中在主发酵阶段。单宁具有抗氧化能力,同时也可以给果酒带来一定的风味。因此,在发酵温度 25 °C、二氧化硫添加量 80 mg/L 的条件下,探究石榴籽浸渍时间为 2、4、6 d 时石榴酒发酵的理化指标,选择最优浸渍时间。

对二氧化硫添加量的筛选:在原料预处理阶段,添加二氧化硫,具有杀菌护色的作用。在发酵温度 25 °C,石榴籽浸渍时间为最佳浸渍时间的条件下,探究二氧化硫添加量在 60 mg/L、80 mg/L、100 mg/L 条件下石榴酒发酵的理化指标。

对发酵温度的筛选:发酵温度是影响发酵速度的主要因素。控制二氧化硫的添加量和石榴籽浸渍时间均为最佳发酵条件,探究在 16 °C、20 °C、25 °C 下石榴酒发酵的风味物质变化和高级醇含量,筛选出最优发酵温度。

### 1.3.4 基本理化指标的测定

还原糖、pH 值、二氧化碳释放量的测定:参照 GBT 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》。

### 1.3.5 风味物质的测定

使用气相色谱法和液相色谱法对风味物质进行检测。

#### 1.3.5.1 测定发酵结束后发酵液中级醇含量。

采用气相色谱法<sup>[18]</sup>测定,气相色谱仪 Agilent 7890A,自动进样器 Agilent G4512A,色谱柱 Agilent 1909N-213,30 m×0.32 mm×0.5 μm 毛细管柱,检测器 FID。进样口温度 200 °C,检测器温度恒定 200 °C,升温条件:起始柱温度 50 °C 保持 8 min,以 5 °C/min 升至 120 °C 保温 5 min,使温度稳定。测试条件:进样量 1 μL,分流比 10:1,流速 2.0 mL/min,载气载体高纯氮气。

#### 1.3.5.2 其他风味物质的测定

采用高效液相色谱法<sup>[19]</sup>测定,色谱柱 HypersilC18 (5 μm, 250 mm×4.6 mm i.d.);流动相 A:甲醇, B:

0.5%磷酸水溶液;梯度洗脱程序:甲醇-0.1%乙酸水,40%甲醇,0~20 min;60%甲醇,20~30 min;80%甲醇,6~12min;80%甲醇,12~18 min。流速 1.0 mL/min,柱温 25 °C,进样量 20 μL,检测波长 λ=210 nm。

标准溶液的配制:准确称取标准品苹果酸、甘油、乙酸、乙偶姻、乙醇、柠檬酸、酒石酸和丙酮酸各 10.0 mg,用甲醇溶解并分别定容在 10 mL 容量瓶中,配制成 1 mg/mL 的标准贮备液。标准贮备液置于 4 °C 冰箱中保存,使用时用流动相稀释成所需浓度。

样品的制备:吸取混合均匀的石榴酒样 20.0 mL,用 0.45 μm 滤膜进行减压过滤。在 10 min 内通过 C18 固相萃取小柱(分别用 6 mL 甲醇、6 mL 乙腈和 10 mL 水预先活化)。待样品全部吸附完,分别以纯水、10%的甲醇水溶液冲洗固相萃取柱后,连续抽真空 5 min,最后用 5 mL 甲醇洗脱,洗脱液在氮吹仪上于 40 °C 下蒸发至近干,用 40%甲醇准确定容到 1.0 mL,待 HPLC 分析。

### 1.3.6 数据分析

各项理化指标进行两次平行取样,三次平行测定,全部实验数据以均值±标准差表示。对实验数据进行统计分析并进行图形绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 石榴酒酿酒酵母筛选

石榴酒的香气特征和各种风味物质的变化主要依赖于酵母,酵母对于酒的香气风味、口感、颜色和复杂性有着重要的意义<sup>[13]</sup>。石榴红酒的色泽和风味以及石榴酒香气的产生与变化主要集中在发酵的初期阶段,即主发酵阶段。石榴红酒的香气主要由多种多样的醇类物质和酯类物质组成,根据 HS-SPME/GC-MS 测定石榴酒中香气组分为 57 种,其风味成分主要由酯类和醇类组成<sup>[20-22]</sup>。因此酵母筛选实验对生产出低级醇石榴红酒具有重要意义。

#### 2.1.1 石榴酒中风味物质生成量的分析

发酵初期是石榴酒主要风味形成的阶段,高级醇的含量如表 2 所示,WY1 酵母、WY-T21 酵母、WY-T22 酵母、RC212 酵母所产生的总高级醇含量分别为 347.78 mg/L、272.26 mg/L、282.00 mg/L、216.62 mg/L。其中,RC212 酵母总高级醇生成量最少,但是 RC212 发酵产生的乙酸乙酯远远高于其他三种菌株,乙酸乙酯具有低毒性,有甜味,浓度较高时有刺激性气味,易挥发的特点<sup>[23]</sup>,其含量过高会对发酵的其他过程产生影响,所以弃用此菌种。酵母筛选实验石榴酒其他风味物质含量见表 3,根据表 3 可知在这个阶段进行苹

果酸、乳酸发酵, 苹果酸含量下降, 乳酸含量上升, 一个菌种各类风味物质含量的变化趋势基本相同。因

此, 对比 WY-T21 菌株和 WY1、WY-T22 两菌株, 它有效减少高级醇的生成, 且风味物质的生成更为稳定。

表 2 酵母筛选实验石榴酒醇酯类物质含量 (mg/L)

Table 2 Content of endol esters in yeast screening experiment

菌种	乙酸乙酯	乙酸异戊酯	乳酸乙酯	甲醇	正丙醇	异丁醇	异戊醇	苯乙醇
WY1	18.09±0.32	4.29±0.17	5.03±0.11	25.71±1.11	19.01±0.23	39.49±0.66	242.74±1.01	20.83±0.23
WY-T21	16.68±0.77	3.86±0.13	4.97±0.88	26.36±0.98	19.43±0.88	33.1±0.32	174.3±1.20	19.07±0.44
WY-T22	17.55±0.96	4.05±0.33	-	24.33±0.17	18.66±0.79	34.46±0.33	185.91±0.97	19.47±0.11
RC212	152.52±2.11	19.99±0.87	4.96±0.45	21.96±0.23	18.95±0.63	32.32±0.32	121.87±0.99	21.52±0.12

表 3 酵母筛选实验石榴酒其他风味物质含量 (g/L)

Table 3 Content of other flavor substances in yeast screening experiment

菌种	苯乙醇	苹果酸	乙酸	乙偶姻	乙醇	柠檬酸	酒石酸	乳酸
WY1	20.83±0.12	0.97±0.04	0.11±0.03	0.19±0.01	79.37±0.53	1.89±0.07	2.05±0.03	0.11±0.05
WY-T21	19.07±0.07	0.96±0.11	0.15±0.02	0.09±0.02	78.95±0.71	1.93±0.11	2.07±0.04	0.10±0.01
WY-T22	19.47±0.13	0.97±0.05	0.15±0.03	0.07±0.01	77.79±0.42	1.95±0.09	1.50±0.14	0.36±0.01
RC212	21.52±0.17	0.85±0.06	0.11±0.07	0.07±0.04	77.50±0.31	1.81±0.05	1.70±0.13	0.11±0.01

2.1.2 发酵力的比较

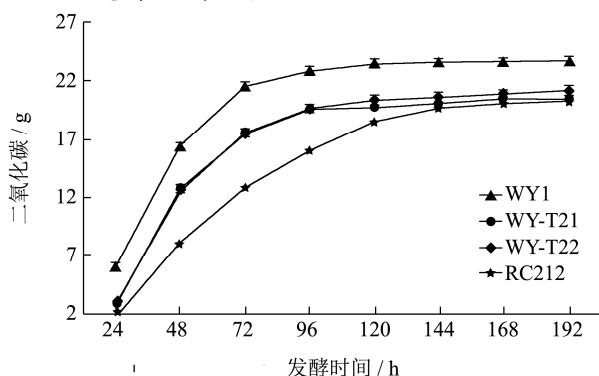


图 1 酵母筛选实验 CO<sub>2</sub> 释放量

Fig.1 Extracts from yeast CO<sub>2</sub> screening experiments

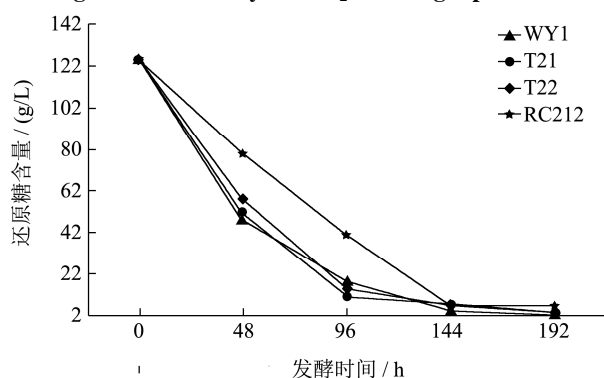


图 2 酵母筛选实验还原糖含量变化

Fig.2 Changes of reducing sugar content in yeast screening experiment

在酵母筛选实验中石榴红酒在发酵第 7 d 左右完成主发酵, 主发酵的发酵初期失重和耗糖速度快、发酵效力高, 后期发酵趋于平缓稳定。根据图 1 所示的 CO<sub>2</sub> 释放量可知, WY-T21 的发酵稳定性和发酵速度优于 WY1 和 WY-T22。根据图 2 所示还原糖含量变化

可知, 4 种菌株的还原糖消耗曲线趋势相似, 证明其发酵速度和发酵程度基本相同。其中, WY1、WY-T21 和 WY-T22 酵母的发酵启动快、发酵能力与速度略优于 RC212。

2.1.3 发酵过程中 pH 的变化

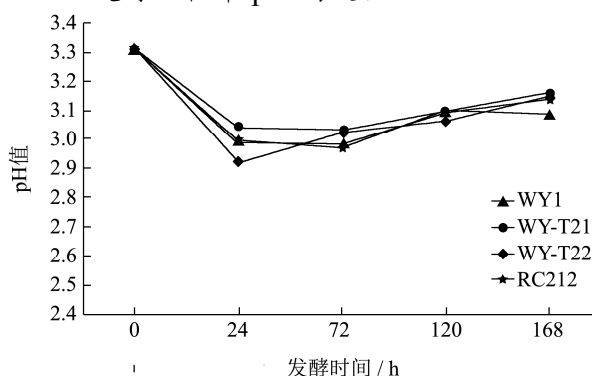


图 3 酵母筛选实验发酵过程中 pH 变化

Fig.3 Changes in fermentation pH yeast screening experiment

在发酵过程中 pH 对红酒色泽起到一定的影响作用, 红酒颜色的保持与 pH 的稳定有着密切联系, pH 变化如图 3 所示 pH 呈现出先降低再升高后稳定的趋势, 且 4 种菌株的 pH 变化趋势相同, 因此判断上述菌株对发酵全程 pH 波动影响很小, 从而保证酒质稳定。主发酵初期, 酵母启动, 石榴汁的花色苷、没食子酸、鞣花酸等其他多酚类物质和抗氧化物质含量的大幅度变化导致 pH 发生变化<sup>[21]</sup>。在主发酵后期, pH 也逐渐上升并趋于稳定, 但是总体仍然是一个下降的趋势, 与李楠<sup>[24]</sup>的山楂果酒发酵过程中 pH 的变化一致, 这是由于发酵过程中糖类物质不断减少, pH 下降, 产酸代谢被抑制最终 pH 趋向稳定, pH 的稳定有利于红酒颜色的保持。综合发酵效力和不同酵母菌株所产

生的风味物质种类及含量,尤其是考虑到总高级醇含量的高低,对菌种进行筛选,选择 WY-T21 为最适宜的酿酒酵母。

## 2.2 石榴红酒发酵条件的优化

### 2.2.1 浸渍时间的优化

石榴籽含有大量的单宁类物质,其中总酚含量高达 41.791 mg GAE/g,对 DPPH 自由基、羟基自由基有较强的清除作用,能够作为天然的抗氧化剂<sup>[25]</sup>。为了增强石榴酒的抗氧化能力同时增加酒的风味,故在酿造过程中采取浸渍发酵的方法,但是浸渍发酵会引起红酒颜色的损失,因为复合物解离会导致光吸收减弱<sup>[26]</sup>。根据表 4 所示的浸渍优化发酵过程中石榴红酒的醇酯类物质含量,表明浸渍发酵的时间越长,酵母产生的乙醇含量越低,此结果与张宝善<sup>[10]</sup>的研究结果相同,其研究发现带籽浸渍发酵可以提高单宁含量和增加色度,使酒体更加明显,而乙醇含量的降低可能是发酵过程中产生的二氧化碳将石榴籽和其他固态不溶物顶到醪液表面产生大量泡沫,使得酵母发酵不完

全,因此浸渍发酵时间越长,越可以抑制酵母发酵产生高级醇。根据浸渍优化发酵实验 CO<sub>2</sub> 释放量如图 4 信息所示,浸渍时间长短对发酵程度和发酵速度影响很小,其主发酵周期均为 6 d。浸渍时间为 2 d 时,高级醇含量 434.76 mg/L;浸渍时间为 4 d 时,高级醇含量 414.96 mg/L;浸渍时间为 6 d 时,高级醇含量 396.38 mg/L,综合考虑,最佳浸渍时间为 6 d。

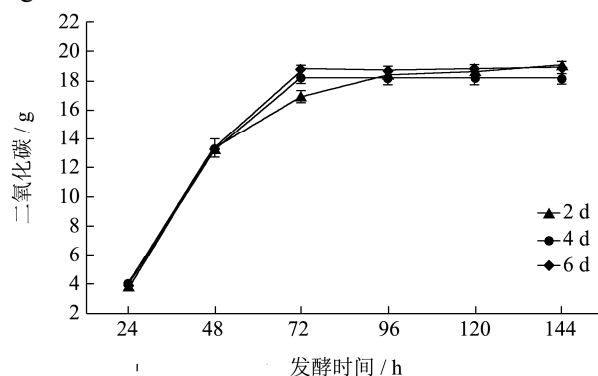


图 4 浸渍优化发酵实验 CO<sub>2</sub> 释放量

Fig.4 Extracts from optimized fermentation experiments CO<sub>2</sub> impregnation

表 4 浸渍优化发酵石榴红酒的醇酯类物质含量 (mg/L)

Table 4 Optimization of alcoholic ester content of garnet wine by impregnation

浸渍时间/d	乙酸乙酯	乙酸异戊酯	甲醇	正丙醇	异丁醇	异戊醇	苯乙醇
2	35.65±0.17	5.12±0.13	81.64±0.77	28.48±0.13	45.73±0.88	260.32±0.98	18.59±0.55
4	31.52±0.88	4.91±0.21	79.04±0.22	25.27±0.25	41.93±0.45	250.83±1.77	17.89±0.34
6	27.79±0.73	4.473±0.55	77.85±1.01	25.06±0.33	40.68±0.71	235.77±1.23	17.02±0.27

表 5 浸渍优化发酵石榴红酒其他风味物质含量 (g/L)

Table 5 Content of other flavor substances in fermented pomegranate red wine

浸渍时间/d	苹果酸	甘油	乙酸	乙偶姻	乙醇	柠檬酸	酒石酸	丙酮酸	还原糖
2	1.55±0.12	6.23±0.11	0.12±0.08	0.2±0.01	102.62±1.32	4.02±0.91	2.57±0.17	4.43±0.23	4.70±0.11
4	1.52±0.22	5.75±0.53	0.11±0.03	0.2±0.03	92.9±1.44	3.52±0.22	2.83±0.09	4.08±0.56	5.00±0.11
6	1.35±0.13	4.92±0.23	0.11±0.02	0.21±0.02	78.82±0.98	2.93±0.37	2.44±0.07	3.49±0.27	3.90±0.08

表 6 SO<sub>2</sub> 优化发酵石榴红酒的醇酯类物质含量 (mg/L)

Table 6 SO<sub>2</sub> Optimization of alcoholic ester content of garnet wine

二氧化硫添加量/(mg/L)	乙酸乙酯	乙酸异戊酯	乳酸乙酯	甲醇	正丙醇	异丁醇	异戊醇
60	29.31±0.17	3.83±0.03	4.86±0.02	140.66±0.22	26.42±0.09	39.73±0.01	188.62±0.99
80	31.07±0.22	3.74±0.02	5.43±0.06	129.32±0.17	22.34±0.07	37.09±0.01	175.69±0.79
100	31.15±0.09	3.71±0.04	5.17±0.04	123.42±0.16	21.55±0.07	35.35±0.01	164.69±0.82

表 7 SO<sub>2</sub> 优化发酵石榴红酒其他风味物质含量 (g/L)

Table 7 SO<sub>2</sub> Optimization of other flavor substances in fermented pomegranate red wine

二氧化硫添加量/(mg/L)	苹果酸	甘油	乙酸	乙偶姻	乙醇	柠檬酸	酒石酸	丙酮酸	还原糖
60	1.42±0.05	4.47±0.11	0.12±0.01	0.17±0.03	73.71±0.98	1.18±0.02	0.72±0.03	6.03±0.55	2.8±0.09
80	1.43±0.07	4.55±0.09	0.12±0.01	0.35±0.02	73.43±1.11	1.19±0.04	0.73±0.03	6.13±0.56	4.3±0.03
100	1.34±0.04	4.30±0.07	0.11±0.03	0.09±0.01	69.46±1.17	1.11±0.04	0.66±0.01	5.76±0.11	2.84±0.02

表8 温度优化发酵石榴红酒的醇酯类物质含量 (mg/L)

Table 8 Content of alcoholic est in garnet wine by temperature optimization

发酵温度/℃	乙酸乙酯	乙酸异戊酯	甲醇	正丙醇	异丁醇	异戊醇	苯乙醇
16	16.37±0.08	3.65±0.02	22.64±0.03	23.23±0.02	23.18±0.04	118.46±0.22	14.59±0.04
20	17.68±0.07	3.81±0.01	22.74±0.04	21.63±0.07	28.24±0.08	155.89±0.18	16.35±0.06
25	17.19±0.04	3.64±0.05	22.81±0.05	22.33±0.08	28.98±0.01	155.29±0.11	17.51±0.08

表9 温度优化发酵石榴红酒其他风味物质含量 (g/L)

Table 9 Content of other flavor substances in fermented pomegranate red wine

发酵温度/℃	苹果酸	甘油	乙酸	乙偶姻	乙醇	柠檬酸	酒石酸	丙酮酸	还原糖
16	2.28±0.12	3.78±0.09	0.12±0.01	0.14±0.02	76.83±1.11	2.61±0.15	4.05±0.06	3.06±0.06	5.83±0.08
20	1.24±0.07	4.36±0.07	0.12±0.01	0.11±0.01	78.00±1.65	1.97±0.04	3.82±0.04	3.47±0.11	5.80±0.05
25	1.08±0.07	5.16±0.11	0.19±0.01	0.14±0.01	78.23±0.96	2.35±0.01	1.76±0.02	4.27±0.08	4.80±0.04

### 2.2.2 SO<sub>2</sub>添加量的优化

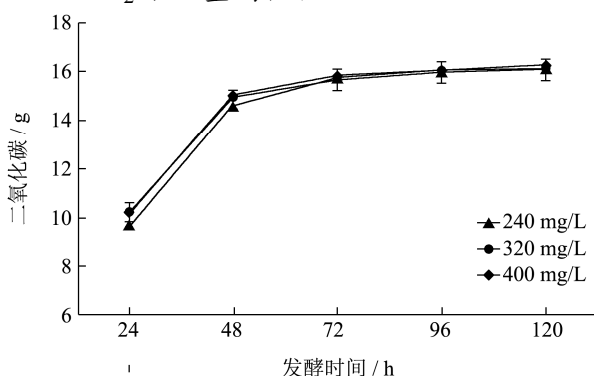


图5 SO<sub>2</sub>优化发酵实验 CO<sub>2</sub>释放量

Fig.5 SO<sub>2</sub> Ejection CO<sub>2</sub> optimized fermentation experiments

在果酒发酵过程中通过添加二氧化硫对杂菌进行抑制,同时促进甘油形成、对石榴红酒起防腐作用,且二氧化硫的添加也可以起到护色作用,石榴红酒的颜色主要源于花色苷,而在果酒中,二氧化硫在酸性条件下产生亚硫酸离子,与部分花色苷2位碳结合生成无色的花色苷亚硫酸盐复合物,保持整体酒液稳定<sup>[27]</sup>。但二氧化硫添加过量会使得红酒硝石味过重导致红酒整体口感有所下降,且使发酵起步缓慢,降低发酵效力<sup>[12,28]</sup>。表6和表7中各类风味物质含量表明,添加过量的SO<sub>2</sub>会抑制酵母的酒精转化率,二氧化硫添加量为100 mg/L时,其乙醇产量较二氧化硫添加量为60、80 mg/L下降4 g/L左右,二氧化硫添加量过低时,会导致杂油醇含量上升,不利于人体健康。此结果与李安<sup>[28]</sup>等研究SO<sub>2</sub>添加量对蓝莓酒的影响结果一致,由于过量添加二氧化硫会导致酒液酸度增加,不利于酵母生长繁殖及代谢。根据图5,CO<sub>2</sub>释放量可知,不同的二氧化硫添加量对发酵程度和发酵速度没有显著影响。二氧化硫添加量为60、80、100 mg/L时,总高级醇含量分别为414.18、381.41、361.92 mg/L,因此,综合考虑二氧化硫添加量为80 mg/L时为最适宜的二氧化硫添加量。

### 2.2.3 发酵温度的优化

根据发酵过程中生成的风味物质含量,如表8和表9所示可知随着发酵温度的增加,石榴发酵酒中的高级醇含量有所增加,在25℃条件下,石榴酒中的甲醇、异丁醇、异戊醇和苯乙醇的含量都高于20℃和16℃,且在发酵温度为16、20、25℃时,总高级醇含量分别为202.10 mg/L、245.35 mg/L、246.92 mg/L,在16℃时还原糖的消耗程度较低。根据Berenguer M<sup>[12]</sup>等研究也表明在低温发酵条件下,石榴酒的风味可以更好的保留。但是,在16℃发酵时,石榴红酒的乙醇产量仅为76.83 g/L,而在20℃和25℃条件下,石榴酒的乙醇产量均达到78 g/L左右,证明发酵温度过低,不仅使发酵启动缓慢同时乙醇产量低,酵母没有完全将糖类转化成酒精,主发酵过程不彻底。且根据图6,CO<sub>2</sub>释放量与时间关系可知,影响发酵效力的主要因素是发酵温度,发酵温度越高,酵母的发酵效力越强,发酵速度越快。石榴酒的发酵温度为25℃时,主发酵期为6 d,而发酵温度为16℃时,主发酵期延长至8 d,因此,综合考虑风味指标和发酵效力,确定20℃为石榴酒主发酵的适宜温度。

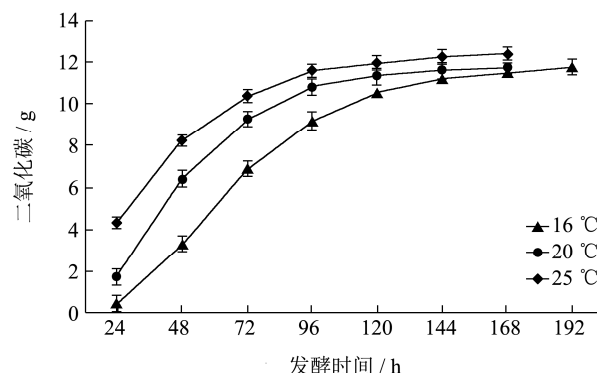


图6 温度优化发酵实验 CO<sub>2</sub>释放量

Fig.6 Temperature optimized fermentation experiment CO<sub>2</sub> yield

### 3 结论

本研究以石榴汁为原料,通过全汁发酵的方法,采用两种不同的工艺对酿酒酵母进行筛选,获得最佳酿酒酵母菌株 WY-T21,其发酵速度快、发酵稳定且生成的杂油醇类物质含量较低,高级醇产量仅为 272.26 mg/L;并且对酿造条件进行了优化,获得最佳发酵条件为浸渍时间 6 d、二氧化硫添加量 80 mg/L、发酵温度 20 ℃,其发酵工艺优化后生成总高级醇含量为 245.35 mg/L,较未优化前下降了 9.88%。利用本研究技术可以生产出低高级醇的健康石榴红酒,为生产更高品质的果酒提供了一种新思路。

### 参考文献

- [1] Gumienna M, Szwengiel A, Górna, Barbara. Bioactive components of pomegranate fruit and their transformation by fermentation processes [J]. *European Food Research & Technology*, 2016, 242(5): 631-640
- [2] Mena P, Girones-Vilaplana A, Martí N, et al. Pomegranate varietal wines: phytochemical composition and quality parameters [J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(1): 108-115
- [3] 温素卿.我国石榴的研究进展[J].*贵州农业科学*,2009,37(7): 155-158  
WEN Su-qing. Advances in pomegranate research in China [J]. *Guizhou Agricultural Science*, 2009, 37(7): 155-158
- [4] Silva J A T D, Rana T S, Narzary D, et al. Pomegranate biology and biotechnology: a review [J]. *Entia Horticulturae*, 2013, 160: 85-107
- [5] Singh B, Singh J P, Kaur A, et al. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: a review [J]. *Food Chemistry*, 2018, 261: 75-86
- [6] Al-Muammar M N, Khan F. Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*) [J]. *Nutrition*, 2012, 28(6): 595-604
- [7] Banihani S, Swedan S, Alguraan Z. Pomegranate and type 2 diabetes [J]. *Nutrition Research*, 2013, 33(5): 341-348
- [8] Mena P, ángel Gil-Izquierdo, Moreno D A, et al. Assessment of the melatonin production in pomegranate wines [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2012, 47(1): 13-18
- [9] Andreu-Sevilla A J, Mena P, Martí, Nuria, et al. Volatile composition and descriptive sensory analysis of pomegranate juice and wine [J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 246-254
- [10] 张宝善,田晓菊,陈锦屏,等.石榴发酵酒加工工艺研究[J].*西北农林科技大学学报(自然科学版)*,2008,36(12):172-180  
ZhANG Bao-shan, TIAN Xiao-ju, CHEN Jin-ping, et al. Study on the processing technology of pomegranate fermented wine [J]. *Journal of Northwest Agricultural and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2008, 36 (12): 172-180
- [11] Akalin A C, Bayram M, Anli R E. Antioxidant phenolic compounds of pomegranate wines produced by different maceration methods [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2018, 124(1): 38-44
- [12] Berenguer M, Vegara S, Barrajón E, et al. Physicochemical characterization of pomegranate wines fermented with three different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains [J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 848-855
- [13] 刘灿珍,秦伟帅,孙玉霞,等.酿酒酵母高级醇合成路径及关键基因[J].*中国酿造*,2018,8:9-13  
LIU Can-zhen, QIN Wei-shuai, SUN Yu-xia, et al. On the synthesis pathway and key genes of *Saccharomyces cerevisiae* advanced alcohols [J]. *Chinese Brewing*, 2018, 8: 9-13
- [14] Pires E J, Teixeira José A, Brányik Tomás, et al. Yeast: the soul of beer's aroma-a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5): 1937-1949
- [15] De-La-Fuente-Blanco A, Saenz-Navajas M P, Ferreira V. Levels of higher alcohols inducing aroma changes and modulating experts' preferences in wine model solutions [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2017, 23(2): 162-169
- [16] De-La-Fuente-Blanco A, Saenz-Navajas M P, Ferreira V. On the effects of higher alcohols on red wine aroma [J]. *Food Chemistry*, 2016, 210(nov.1): 107-114
- [17] 曾朝珍,张永茂,康三江,等.发酵酒中高级醇的研究进展[J].*中国酿造*,2015,34(5):11-15  
ZENG Chao-zhen, ZHANG Yong-mao, KANG San-jiang, et al. Advances in research on advanced alcohols in fermented wine [J]. *Chinese Brewing*, 2015, 34(5): 11-15
- [18] 于洪梅.气相色谱法分析啤酒中 5 种高级醇的方法研究[J].*食品研究与开发*,2018,18:151-154  
YU Hong-mei. Analysis of 5 advanced alcohols in beer by gas chromatography [J]. *Method Food Research and Development*, 2018, 18: 151-154
- [19] 杨东伟,李晓静,王芬,等.高效液相色谱法测定葡萄酒中 11 种有机酸含量[J].*安徽农业科学*,2013, 3: 1286-1287, 1290  
YANG Dong-wei, LI Xiao-jing, WANG Fen, et al. Determination of 11 organic acids in wine by HPLC [J].

- Anhui Agricultural Science, 2013, 3: 1286-1287, 1290
- [20] Lan Y, Wu J, Wang X, et al. Evaluation of antioxidant capacity and flavor profile change of pomegranate wine during fermentation and aging process [J]. Food Chemistry, 2017, 232: 777-787
- [21] 方强,籍保平,乔勇进,等.果酒中二氧化硫及其控制技术的研究进展[J].农业工程技术:农产品加工业,2008,2:12-17  
FANG Qiang, JIAN Bao-ping, QIAO Yong-jin, et al. Advances in Research on Sulfur Dioxide and Its Control Technology in Fruit Wine [J]. Agricultural Engineering Technology: Agro-processing Industry, 2008, 2: 12-17
- [22] 唐柯,王茜,周霞,等.石榴酒发酵过程中香气动态变化规律[J].食品与发酵工业,2019,45(6):197-202  
TANG Ke, WANG Xi, ZHOU Xia, et al. Changes of aroma dynamics during fermentation of pomegranate wine [J]. Food and Fermentation Industry, 2019, 45(6): 197-202
- [23] 王延云,胡强,李超豪,等.气相色谱测定白酒中乙酸乙酯含量的方法[J].食品研究与开发,2013,16:91-93  
WANG Yan-yun, HU Qiang, LI Chao-hao, et al. Determination of ethyl acetate in liquor by gas chromatography [J]. Food Research and Development, 2013, 16: 91-93
- [24] 李楠.山楂果酒发酵过程中品质特性的变化规律[J].食品工业,2019,40(3):60-63  
LI Nan. Changes of quality characteristics of hawthorn fruit wine during fermentation [J]. Food Industry, 2019, 40(3): 60-63
- [25] Shi Y, Yuan L U, Liu B, et al. Antioxidant activity of ethanol extract of pomegranate seed [J]. Agricultural Science & Technology, 2014, 2: 138-140
- [26] 李美萍,苗潇潇,张生万.HS-SPME-GC-MS 分析石榴酒中易挥发性成分[J].食品科学,2014,35(8):263-268  
LI Mei-ping, MIAO Xiao-xiao, ZHANG Sheng-wan. HS-SPME-GC-MS analysis of volatile components in pomegranate wine [J]. Food Science, 2014, 35(8): 263-268
- [27] 庄惠婷,杜金华,郭春宝,等.发酵石榴酒的色泽变化[J].食品与发酵工业,2011,37(3):113-117  
ZHUANG Hui-ting, DU Jin-hua, GUO Chun-bao, et al. Color change of fermented pomegranate wine [J]. Food and Fermentation Industry, 2011, 37(3): 113-117
- [28] 李安,刘小雨,张惟广.发酵及贮藏条件对蓝莓果酒花色苷稳定性的影响及其抗氧化性研究[J].中国酿造,2020,39(2):146-151  
LI An, LIU Xiao-yu, ZHANG Wei-guang. Effects of fermentation and storage conditions on stability of anthocyanin and its antioxidant properties in blueberry wine [J]. Chinese Brewery, 2020, 39(2): 146-151

---

(上接第 43 页)

- [32] Feng X J, Yu W, Li X D, et al. Apigenin, a modulator of PPAR $\gamma$ , attenuates HFD-induced NAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism and oxidative stress via Nrf2 activation [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 136: 136-149
- [33] Hsiao W Y, Jung S M, Tang Y F, et al. The lipid handling capacity of subcutaneous fat is programmed by mTORC2 during development [J]. Cell Rep, 2020, 331(1): 1-24
- [34] Zhu X P, Bian H, Wang L, et al. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 141: 192-204
- [35] 徐拥建,杨钦河,韩莉,等.疏肝健脾方药对 NAFLD 大鼠肝细胞 SREBP-1c、SCD-1 mRNA 及蛋白表达的影响[J].中药材,2014,37(1):80-86  
XU Yong-jian, YANG Qin-he, HAN Li, et al. Effects of soothing liver and invigorating spleen recipes on SREBP-1c, SCD-1 mRNA and proteins expression in hepatocytes of NAFLD rats [J]. Zhong Yao Cai, 2014, 37(1): 80-86

---

(上接第 78 页)

- [13] Roth Stephanie, Kumme Jacqueline, Schüller Hans-Joachim. Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Current Genetics, 2004, 45(3): 121-128