

# 蓝靛果果酒降酸酵母菌的筛选鉴定及其发酵特性

包怡红<sup>1,2\*</sup>, 梁爽<sup>1</sup>, 骆嘉原<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

(2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 该研究从蓝莓、西梅、葡萄及蓝靛果中分离具有降酸作用的酵母菌。以菌株耐酸、降酸性能进行初筛, 分析菌株发酵特性及耐受性, 利用主成分分析进行综合性评价, 得到性能最优酵母菌。接种于蓝靛果汁中发酵, 与市售安琪酿酒酵母 SY、RW、BV818 发酵蓝靛果果酒比较。结果表明, 共分离得到 32 株酵母菌, 筛选出耐酸菌株 17 株, 其中 5 株对柠檬酸、苹果酸、酒石酸均具有较高降解率, 16 株产乙醇, 9 株高产酯, 7 株高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶。主成分分析结果表明菌株 LD3 与 LD4 的综合性能最好, 经 26S rDNA 测定显示两株酵母菌均为季也蒙迈耶氏酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*)。该菌株对柠檬酸、苹果酸、酒石酸降酸率分别为 97.82%、78.26%、32.90%, 耐受葡萄糖、SO<sub>2</sub> 质量浓度分别为 300 g/L、700 mg/L, 耐受酒精体积分数为 8%。与三株市售酵母菌发酵蓝靛果果酒相比, 季也蒙迈耶氏酵母果酒的总酸含量 (21.46 g/L)、挥发酸含量 (0.15 g/L) 均为最低, 感官评分最高, 可用于蓝靛果果酒发酵。这为蓝靛果等含酸量高的浆果类产品的开发应用提供参考。

**关键词:** 蓝靛果; 酵母菌; 有机酸; 耐受性; 发酵特性

文章编号: 1673-9078(2024)09-74-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0993

## Screening and Identification of Acid-reducing Yeasts from *Lonicera edulis* Fruit Wine and Their Fermentation Properties

BAO Yihong<sup>1,2\*</sup>, LIANG Shuang<sup>1</sup>, LUO Jiayuan<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Acid reducing yeasts were isolated from blueberries, plums, grapes, and *Lonicera edulis*. The yeast strains were initially screened for acid tolerance and acid-reducing properties, and an analysis was conducted on their fermentation characteristics and tolerances. Finally, the best-performing yeasts were comprehensively evaluated using principal component analysis. These yeasts were inoculated into *L. edulis* fruit juice for fermentation and compared with the commercially available Angie's brewer's yeasts SY, RW, and BV818 in fermenting *L. edulis* fruit wine. A total of 32 yeast strains were isolated and 17 acid-resistant strains were screened, among which five strains had high degradation rates of citric, malic, and tartaric acids, 16 strains produced ethanol, 9 strains produced high levels of ester, and 7 strains produced high levels of  $\beta$ -glucosidase. The principal component analysis revealed that the LD3 and LD4 strains exhibited superior overall performance. Additionally, 26S rDNA analysis identified *Meyerozyma guilliermondii* as the species for both strains. This

引文格式:

包怡红, 梁爽, 骆嘉原. 蓝靛果果酒降酸酵母菌的筛选鉴定及其发酵特性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9): 74-86.

BAO Yihong, LIANG Shuang, LUO Jiayuan. Screening and identification of acid-reducing yeasts from *Lonicera edulis* fruit wine and their fermentation properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 74-86.

收稿日期: 2023-08-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1600500); 黑龙江省“双一流”学科协同创新项目 (LJGXCG2022-009)

作者简介: 包怡红 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 森林食品资源开发利用, E-mail: baoyihong@163.com

strain has acid reduction rates of 97.82%, 78.26%, and 32.90% for citric, malic, and tartaric acids, respectively. The tolerance of the *M. guilliermondii* strain to glucose was 300 g/L, and its SO<sub>2</sub> mass concentration was 700 mg/L, with an alcohol tolerance of 8% by volume. Compared to the three commercially available yeast strains from fermented *L. edulis* fruit wines, *M. guilliermondii* contained the lowest level of total acid (21.46 g/L) and volatile acid (0.15 g/L) content, and it obtained the highest organoleptic score. Therefore, it is recommended to use *L. edulis* fruit in wine fermentation. The results of this study serve as a valuable reference for the development and application of high-acid-content berry products.

**Key words:** *Lonicera edulis* fruit; yeasts; organic acid; tolerance; fermentation characteristics

蓝靛果 (*Lonicera caerulea* L. var. *edulis*) 是一种天然野生浆果, 富含花青素、酚酸、黄酮、维生素 C 等多种生物活性物质, 具有很好的抗炎、抗氧化、治疗糖尿病等作用, 被定义为“药食同源”水果<sup>[1]</sup>。蓝靛果果酒是以蓝靛果为原料的酒类制品, 可将 20 g/L 葡萄糖转化成 1 vol% 酒精<sup>[2]</sup>, 同时生物发酵可产生多种人体必需氨基酸以及大量生物活性物质, 具有改善视力、预防和治疗心血管疾病、抗癌、提高免疫力等多种功效<sup>[3]</sup>。但蓝靛果果酒中有机酸含量过高, 导致口感较差, 对其品质及市场发展产生不良影响。蓝靛果果酒中主要的有机酸为柠檬酸与苹果酸<sup>[4]</sup>, 其中高水平的柠檬酸则会导致细胞外酸中毒及抑制人牙龈成纤维细胞的蛋白质合成, 苹果酸则具有强烈辛酸味的双羧基酸, 过量会导致尖锐的酸涩感<sup>[5]</sup>。因此, 蓝靛果果酒降酸成为亟待解决的问题。

目前, 主要的降酸方法为化学降酸、物理降酸和生物降酸, 其中化学降酸应用较为广泛但易残留矿物质, 影响果酒感官特性; 物理降酸效果甚微, 且成本较高<sup>[6]</sup>。因此, 能够有效降酸并提高品质的生物降酸, 成为果汁、果酒降酸的首选方法。例如 Zhong 等<sup>[7]</sup>通过分离筛选得到一株毕赤酵母 JT-1-3, 可有效降解猕猴桃酒中柠檬酸。Jiang 等<sup>[8]</sup>从红树莓果中分离得到菌株 *Issatchenkia terricola* WJL-G4, 使红树莓汁中柠檬酸含量从 22.80 g/L 降低到 6.20 g/L。Peinado 等<sup>[9]</sup>证明菌株 *Schizosaccharomyces pombe* 可将葡萄酒中苹果酸转化为乙醇, 从而达到降酸的目的。Mónaco 等<sup>[10]</sup>分离得到菌株 *Pichiakudriavzevii* ÑNI15, 并证实该菌株有效降解葡萄酒中苹果酸, 同时还能够改善葡萄酒的感官属性, 增加其果香。

本研究拟从蓝莓、西梅、葡萄及蓝靛果中分离纯化酵母菌, 以耐酸性能、降酸性能、发酵特性及耐受性为筛选指标, 得到性状优良的耐酸、降酸酵母菌。分析该菌株发酵蓝靛果果酒的理化特性, 并探究对其感官品质的影响。以期改善蓝靛果果酒

口感、提升蓝靛果果酒品质、促进蓝靛果果酒产业发展提供菌种资源, 并为后续实际应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

#### 1.1.1 样品

蓝靛果样品来自黑河中俄林业科技合作园区, 蓝莓 (丹东 H5)、西梅 (欧洲李)、葡萄 (新疆和田红) 均购自东北林业大学水果超市。

#### 1.1.2 培养基

YPD 培养基 (*m/V*): 酵母浸粉 1%, 蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%; 固体培养基在此基础上添加琼脂 2%;

柠檬酸培养基 (*m/V*): 酵母浸粉 1%, 蛋白胨 2%, 柠檬酸 1%;

苹果酸培养基 (*m/V*): 酵母浸粉 1%, 蛋白胨 2%, 苹果酸 1%;

酒石酸培养基 (*m/V*): 酵母浸粉 1%, 蛋白胨 2%, 酒石酸 1%;

按照张二豪等<sup>[11]</sup>的方法配置 2,3,5- 氯化三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC) 上层培养基、TTC 下层培养基、产酯固体培养基和发酵培养基。

#### 1.1.3 主要试剂

酵母浸粉、蛋白胨、琼脂, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 酒石酸、苹果酸、柠檬酸 (分析纯), 天津市北联精细化学品开发有限公司; 常规药品均为分析纯。

#### 1.1.4 仪器与设备

PHS-3C 型精密 pH 计, 上海仪电科学仪器有限公司; DH6000A 恒温培养箱, 天津市泰斯特公司; JYL-C91T 型榨汁机, 九阳股份有限公司; TGL-16G 型高速离心机, 北京普析通用仪器有限公司; 721 型可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 酵母菌的初步分离与筛选

#### 1.2.1.1 酵母菌的分离

参考 Jiang 等<sup>[8]</sup>的方法进行菌株分离实验,称取 25 g 破碎打浆样品于盛有 90 mL 无菌水的锥形瓶中,28 °C 摇床振荡 20 min。梯度稀释后吸取 0.1 mL 于 YPD 固体培养基平板上均匀涂布,28 °C 下培养 72 h,挑选各典型菌落,反复进行平板划线分离,得到纯化的单菌落进行保存并命名。

#### 1.2.1.2 耐酸酵母菌的筛选

使用 5 mol/L 的 HCl 配置 pH 值为 2、3 和 4 的 YPD 液体培养基。各菌株以 3% (V/V) 的接种量接入到不同 pH 值培养基中。28 °C、150 r/min 摇床培养 24 h,后通过平板计数法计算存活率<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.1.3 酵母菌降酸能力测定

将 3 mL 活化菌液以 4 000 r/min 离心 5 min 获得沉淀,无菌盐水洗涤两次后置于生理盐水中 1 h 消耗残留的碳源。初始接种量为 10<sup>6</sup> CFU/mL<sup>[7]</sup>接种于柠檬酸、苹果酸、酒石酸液体培养基中,28 °C,150 r/min 条件下震荡培养 5 d。按照 GB/T 12456-2021 《食品安全国家标准食品中总酸的测定》采用酸碱滴定法,测定有机酸含量变化<sup>[13]</sup>。

$$A = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A——样品的降酸率, %;

A<sub>0</sub>——未加菌液的有机酸质量浓度, g/L;

A<sub>1</sub>——加入菌液以后的有机酸质量浓度, g/L。

### 1.2.2 酵母菌发酵特性测定

#### 1.2.2.1 发酵性能测定

将活化菌种按 1% (V/V) 的接种量接种于含有 20 mL YPD 液体培养基和杜氏小管的试管中,28 °C 培养 8 d。根据杜氏小管发酵法观察各菌株产气量与产气速率,每 12 h 记录一次二氧化碳的重量损失<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.2.2 产H<sub>2</sub>S能力测定

在含有铋作为指示剂的 Biggy 琼脂上测试选定菌株的 H<sub>2</sub>S 产量。将活化后的菌株接种于培养基上,26 °C 下孵育 3~5 d,通过评估菌落周围的区域颜色<sup>[15]</sup>,测定其 H<sub>2</sub>S 产量。

#### 1.2.2.3 产酯能力测定

将活化后的菌株接种到产酯培养基上,28 °C 培

养 48 h,菌落呈黄色越深,产酯能力越强。

#### 1.2.2.4 产乙醇能力测定

将活化后的菌株接种到 TTC 下层培养基。28 °C 培养 48 h 后倒入上层培养基,避光保持 2 h,比较菌株颜色<sup>[14]</sup>,颜色越红,产乙醇能力越强。

#### 1.2.2.5 产β-葡萄糖苷酶能力测定

根据 Son 等<sup>[12]</sup>的方法稍作修改,各菌株产 β-葡萄糖苷酶能力通过 p-NPG 法进行测定。菌株过夜培养后,于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液(粗酶液)。每 100 μL 上清液中加入 200 μL 的 35 mmol/L p-NPG 溶液混匀,37 °C 保温 30 min,加入 2 mL 浓度为 1 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止液,在 405 nm 波长处测定 OD 值。得到标准曲线为 y=9.635 6x,相关系数 R<sup>2</sup>=0.998 7。

### 1.2.3 酵母菌耐受性测定

#### 1.2.3.1 葡萄糖耐受性测定

将菌株以 3% (V/V) 的接种量接入到添加葡萄糖质量浓度为 50、100、150、200、250、300 g/L 的 YPD 液体培养基中,28 °C 恒温培养 48 h。测定其在 600 nm 波长处的吸光度以确定菌株的葡萄糖耐受性。

#### 1.2.3.2 酒精耐受性测定

将菌株以 3% (V/V) 的接种量接入到酒精体积分数分别为 0%、4%、8%、12%、16%、20% 的 YPD 液体培养基内,28 °C 恒温培养 48 h。测定其在 600 nm 波长处的吸光度以确定菌株的乙醇耐受性。

#### 1.2.3.3 SO<sub>2</sub>耐受性测定

将菌株以 3% (V/V) 的接种量接种到 SO<sub>2</sub> 质量浓度(以偏重亚硫酸钾计)为 100、200、300、400、500、600、700 mg/L 的 YPD 液体培养基中,28 °C 恒温培养 48 h。测定其在 600 nm 波长处的吸光度以确定菌株的 SO<sub>2</sub> 耐受性<sup>[7,16]</sup>。

### 1.2.4 主成分分析

筛选出具有耐酸特性的酵母菌,对菌株的耐酸性能、降酸性能、产 H<sub>2</sub>S、产酯、产乙醇、产 β-葡萄糖苷酶能力及葡萄糖、乙醇、SO<sub>2</sub> 的耐受性指标采用 SPSS 17.0 软件(美国 IBM 公司)进行主成分分析,筛选得到性能最优的耐酸、降酸菌株。

### 1.2.5 分子生物学鉴定

使用酵母 DNA 试剂盒(Sangon Biotech, Shanghai, China)提取菌株的 DNA。正向引物 ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')和反

向引物 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增 rDNA 基因的 ITS1 和 ITS2 区域。

PCR 扩增条件: 94 °C 初变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环, 最后于 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物通过 1% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳分离。150 V 条件下电泳 20 min, 凝胶在紫外线下可视化。使用搜索工具 (BLAST) 将最终 PCR 产物的序列与 GenBank 数据库中可用序列进行比较, 使用 MEGA 版本 7 软件构建系统发育树。

### 1.2.6 蓝靛果果酒发酵

处理 (自然解冻蓝靛果流水下清洗、挑选) → 打浆 → 酶解 (添加 400 mg/L 纤维素酶、400 mg/L 果胶酶, 50 °C, 180 min) → 调配 (焦亚硫酸钠 60 mg/L) → 巴氏杀菌 (85 °C, 20 min) → 接种 3% 菌液 (V/V) → 发酵 (27 °C、15 d) 市售安琪酿酒酵母 SY、RW、BV818 均为活性干粉, 以 200 mg/L 的接种量进行温水活化, 接种于 50 mL 蓝靛果汁中扩培 24 h, 最后进行接种试验。

### 1.2.7 蓝靛果果酒质量评价

#### 1.2.7.1 基本理化指标测定

根据 GB/T 15038-2006, 采用电位滴定法测定发酵蓝靛果汁总酸度, 并以柠檬酸表示, 乙醇含量采用密度瓶法测定, 挥发酸含量通过碱标准溶液滴定法测定。还原糖含量采用 NY2742-2015《水果及制品可溶性糖的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法》测定。可溶性固形物含量 (SSC) 通过便携式折光仪测量。颜色密度和色调采用光谱仪分别测定样品在 420、520 和 620 nm 处的吸光度<sup>[17]</sup>, 使用以下公式计算色彩密度 ( $C_1$ ) 与色调 ( $C_2$ )。

$$C_1 = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad (2)$$

$$C_2 = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (3)$$

式中:

$C_1$  样品的色彩密度;

$C_2$  样品的色调;

$A_{420}$  上清液在 420 nm 处的吸光度;

$A_{520}$  上清液在 520 nm 处的吸光度;

$A_{620}$  上清液在 620 nm 处的吸光度。

#### 1.2.7.2 有机酸的测定

采用高效液相色谱法测定样品中柠檬酸、苹

果酸、酒石酸含量<sup>[13]</sup>。测定条件: 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (250 mm×4.6 mm), 流动相: 0.1% 磷酸溶液 - 甲醇, 体积比为 97.5:2.5 的流动相等度洗脱 10 min, 较短时间梯度让甲醇相达到 100% 并平衡 5min, 后将流动相调整为 0.1% 磷酸溶液 - 甲醇体积比比例为 97.5:2.5, 平衡 5 min。流量为 0.5 mL/min, 进样量为 20 μL, 柱温为 40 °C, 检测波长为 210 nm。

#### 1.2.7.3 总黄酮和总酚含量的测定

采用硝酸铝显色法<sup>[18]</sup>评估总黄酮含量 (TFC)。TFC 的结果显示为芦丁标准曲线 ( $y=0.0005x-0.0002$ ,  $R^2=0.9935$ )。

采用 Folin-Ciocalteu 法<sup>[19]</sup>测定总酚含量 (TPC)。TPC 的结果显示为没食子酸标准曲线 ( $y=0.0019x+0.0018$ ,  $R^2=0.9951$ )。

#### 1.2.7.4 总花色苷含量的测定

采用 pH 示差法测定发酵蓝靛果果酒中总花色苷含量<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.7.5 感官评定

参考 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》, 培训小组由 20 人组成 (男女各 10 人), 均符合法定饮酒年龄 (>18 周岁)。从口感、香气、状态、色泽和典型性共 5 个指标进行感官评价, 满分 100 分, 感官评分标准见表 1。

表 1 蓝靛果果酒感官评分标准

Table 1 Sensory scoring criteria for *L. edulis* wines

指标	评价标准	分数/分
口感 (30分)	酸甜适度、醇厚柔和、酒体完整、无异味	20~30
	酸甜较适度、酒体完整、无异味	10~19
	酸甜不协调、有苦涩味	0~9
香气 (20分)	香气浓郁、酒香与果香协调	15~20
	香气一般、酒香与果香协调	8~14
	有刺激性气味、酒香与果香不协调	0~7
状态 (15分)	清亮透明、无悬浮物、摇动无气泡	10~15
	清亮、较透明、略带少量悬浮物	5~9
	不透明、含有大量悬浮物, 大量气泡	0~4
色泽 (15分)	呈亮红色、色泽较好、光泽度明显	10~15
	呈亮红色、色泽一般、光泽度一般	5~9
	颜色异常或褪色, 光泽度差	0~4
典型性 (20分)	具有蓝靛果特有的风味、饱满纯正、爽口	15~20
	带有蓝靛果特有的风味	8~14
	无蓝靛果特有的风味、有酸败味	0~7

## 1.2.8 数据分析

使用 Origin 软件制图、SPSS 17.0 软件（美国 IBM 公司）进行数据分析，采用 MEGA 软件构建系统发育树。每个实验重复 3 次，数据用“平均值 ± 标准差”表示，当  $P < 0.05$  时数值具有显著性差异。

表 2 酵母菌在酸性环境下的存活率 (%)

Table 2 Survival of yeast in acidic environment

菌株编号	菌株来源	pH 值 4	pH 值 3	pH 值 2
LD1	蓝靛果	39.81 ± 0.14 <sup>n</sup>	10.30 ± 0.07 <sup>f</sup>	—
LD2	蓝靛果	41.80 ± 0.57 <sup>n</sup>	20.30 ± 0.07 <sup>ef</sup>	11.40 ± 0.07 <sup>i</sup>
LD3	蓝靛果	102.97 ± 1.29 <sup>bc</sup>	100.44 ± 5.66 <sup>ab</sup>	86.97 ± 1.63 <sup>bcd</sup>
LD4	蓝靛果	97.01 ± 0.00 <sup>efg</sup>	92.93 ± 0.38 <sup>abc</sup>	80.17 ± 2.45 <sup>e</sup>
LD5	蓝靛果	99.08 ± 1.25 <sup>cd</sup>	89.18 ± 5.95 <sup>abc</sup>	69.17 ± 0.65 <sup>f</sup>
LD6	蓝靛果	111.83 ± 0.29 <sup>a</sup>	107.37 ± 4.24 <sup>ab</sup>	89.97 ± 6.13 <sup>bc</sup>
LD7	蓝靛果	58.03 ± 0.35 <sup>k</sup>	26.30 ± 0.64 <sup>def</sup>	—
LD8	蓝靛果	97.50 ± 2.11 <sup>efg</sup>	92.12 ± 1.37 <sup>abc</sup>	70.07 ± 0.15 <sup>f</sup>
LD9	蓝靛果	97.81 ± 2.61 <sup>defg</sup>	95.76 ± 0.87 <sup>abc</sup>	83.87 ± 7.54 <sup>cde</sup>
LD10	蓝靛果	104.96 ± 3.70 <sup>b</sup>	107.30 ± 1.74 <sup>ab</sup>	80.67 ± 1.35 <sup>de</sup>
LD11	蓝靛果	66.00 ± 0.28 <sup>j</sup>	26.30 ± 0.35 <sup>def</sup>	—
LD12	蓝靛果	94.96 ± 4.80 <sup>fg</sup>	89.21 ± 3.02 <sup>abc</sup>	85.67 ± 4.16 <sup>cde</sup>
LD13	蓝靛果	58.5 ± 0.49 <sup>k</sup>	23.3 ± 1.13 <sup>def</sup>	10.00 ± 0.21 <sup>i</sup>
LD14	蓝靛果	62.9 ± 0.92 <sup>j</sup>	18.3 ± 0.64 <sup>ef</sup>	11.20 ± 0.14 <sup>i</sup>
LD15	蓝靛果	100.81 ± 1.10 <sup>bcde</sup>	96.69 ± 4.91 <sup>abc</sup>	59.87 ± 1.19 <sup>g</sup>
LD16	蓝靛果	97.98 ± 0.64 <sup>defg</sup>	85.72 ± 2.81 <sup>bc</sup>	66.97 ± 0.32 <sup>f</sup>
LM1	蓝莓	48.60 ± 1.84 <sup>lm</sup>	23.36 ± 1.34 <sup>def</sup>	—
LM2	蓝莓	49.20 ± 1.70 <sup>lm</sup>	26.36 ± 0.57 <sup>def</sup>	11.26 ± 0.42 <sup>i</sup>
LM3	蓝莓	50.50 ± 1.48 <sup>lm</sup>	25.03 ± 2.83 <sup>def</sup>	11.80 ± 0.64 <sup>i</sup>
LM5	蓝莓	94.53 ± 0.04 <sup>sh</sup>	92.39 ± 1.29 <sup>abc</sup>	88.17 ± 2.00 <sup>bc</sup>
LM6	蓝莓	104.50 ± 1.84 <sup>b</sup>	102.21 ± 0.80 <sup>ab</sup>	85.07 ± 6.36 <sup>cde</sup>
LM7	蓝莓	93.91 ± 0.94 <sup>sh</sup>	83.42 ± 0.64 <sup>bc</sup>	50.17 ± 14.30 <sup>h</sup>
PT1	葡萄	70.52 ± 1.34 <sup>i</sup>	36.30 ± 0.21 <sup>de</sup>	—
PT2	葡萄	41.27 ± 0.71 <sup>n</sup>	47.30 ± 2.90 <sup>d</sup>	11.58 ± 0.21 <sup>i</sup>
PT3	葡萄	46.65 ± 1.41 <sup>m</sup>	22.35 ± 1.08 <sup>def</sup>	—
PT4	葡萄	102.13 ± 6.20 <sup>bcd</sup>	112.06 ± 5.61 <sup>a</sup>	108.7 ± 3.25 <sup>a</sup>
XM1	西梅	51.5 ± 0.64 <sup>l</sup>	21.38 ± 0.92 <sup>ef</sup>	9.52 ± 0.03 <sup>i</sup>
XM2	西梅	58.2 ± 0.71 <sup>k</sup>	25.33 ± 0.57 <sup>def</sup>	11.20 ± 0.07 <sup>i</sup>
XM3	西梅	93.99 ± 4.75 <sup>sh</sup>	93.99 ± 2.05 <sup>abc</sup>	72.07 ± 0.95 <sup>f</sup>
XM4	西梅	90.30 ± 1.87 <sup>h</sup>	105.20 ± 2.04 <sup>c</sup>	92.57 ± 1.75 <sup>b</sup>
XM5	西梅	27.40 ± 0.28 <sup>o</sup>	11.34 ± 1.70 <sup>de</sup>	—
XM6	西梅	98.03 ± 1.01 <sup>defg</sup>	96.09 ± 2.83 <sup>abc</sup>	84.97 ± 1.01 <sup>cde</sup>

注：结果以平均值 ± 标准差表示 ( $n=3$ )，字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )；—：表示未见菌株存活。

## 2 结果与分析

## 2.1 酵母菌的分离与筛选

## 2.1.1 耐酸酵母菌筛选

从蓝莓、西梅、葡萄及蓝靛果中分离得到了 32 株酵母菌，对其耐酸性进行研究。由表 2 可知，32 株酵母菌在 pH 值为 4 的条件下均可生长，其中菌株 LD6 存活率最高为 111.83%，菌株 XM5 存活率最低为 27.40%。pH 值为 3 条件下，差异显著 ( $P < 0.05$ )，菌株 PT4 存活率最高为 112.06%，菌株 LD1 存活率最低为 10.30%。pH 值为 2 条件下，17 株酵母菌存活率大于 50%，7 株酵母菌受到抑制无法生长。因此选取在 pH 值为 2 条件下存活率大于 50% 的 17 株耐酸酵母菌进行后续试验。多项研究表明，在浆果发酵过程中，低 pH 值环境会抑制微生物活性，导致发酵时间延长，果酒口感变差。具有良好的耐酸性能，对于酵母菌的应用具有重要意义<sup>[21]</sup>。

## 2.1.2 降酸酵母菌的筛选

17 株酵母菌对有机酸（柠檬酸、苹果酸、酒石酸）的降酸能力如图 1 所示。在柠檬酸液体培养基中具有降酸效果的菌株有 16 株，降酸率均可达 60%，菌株 XM4、XM3、LM5、LD3、XM6、LD5、LM6 降酸效果显著，降酸率可达 90%。在苹果酸液体培养基中具有降酸效果的菌株共 14 株，8 株降酸率达 50%，其中菌株 XM4、PT4、LM5 降酸效果显著，降酸率可达到 90%。对于酒石酸具有降酸效果的菌株 17 株，7 株降酸率可达 30%。对于三种有机酸降酸率均能达到 17 株酵母菌降酸均值以上的共 5 株，分别为 LD3、LD4、XM6、LM5、PT4。卢思言等<sup>[13]</sup>从长白山蓝靛果中筛得到降酸效果良好的二孢接合酵母，其柠檬酸、苹果酸、酒石酸的降解率分别为 42.60%、18.28%、13.09%，本研究筛选的菌株降酸率比之有明显提升。

## 2.2 发酵特性

## 2.2.1 发酵性能分析

酵母菌可利用葡萄糖进行发酵，将葡萄糖消耗、分解生成乙醇与二氧化碳，减少系统的质量，因此可以样品的失重量作为评价  $\text{CO}_2$  释放量的参数，用于评价菌株的发酵能力<sup>[22]</sup>。从表 3 可以看出，17 株酵母菌的失重量存在显著差异 ( $P < 0.05$ )，发酵能力也不同，菌株 LD8 失重量为 0.56 g，发酵能力最强。菌株 PT4 与 LD16 的失重量分别为 0.30 g 与 0.35 g，

产气量仅为杜氏小管的 1/4, 甚至不产生气体, 发酵能力最弱。48 h 内, 有 15 株菌株的杜氏小管中充满气体, 发酵能力较强。Yin 等<sup>[23]</sup>以菌株发酵能力和酒精耐受性为评价指标, 筛选得到一株适合酿造山楂酒的非酿酒酵母菌 *Meyerozyma guilliermondii*。由于酿酒酵母菌的发酵能力一般强于非酿酒酵母菌, 因此本实验所筛选的降酸酵母在发酵能力上, 产生了较大差异。

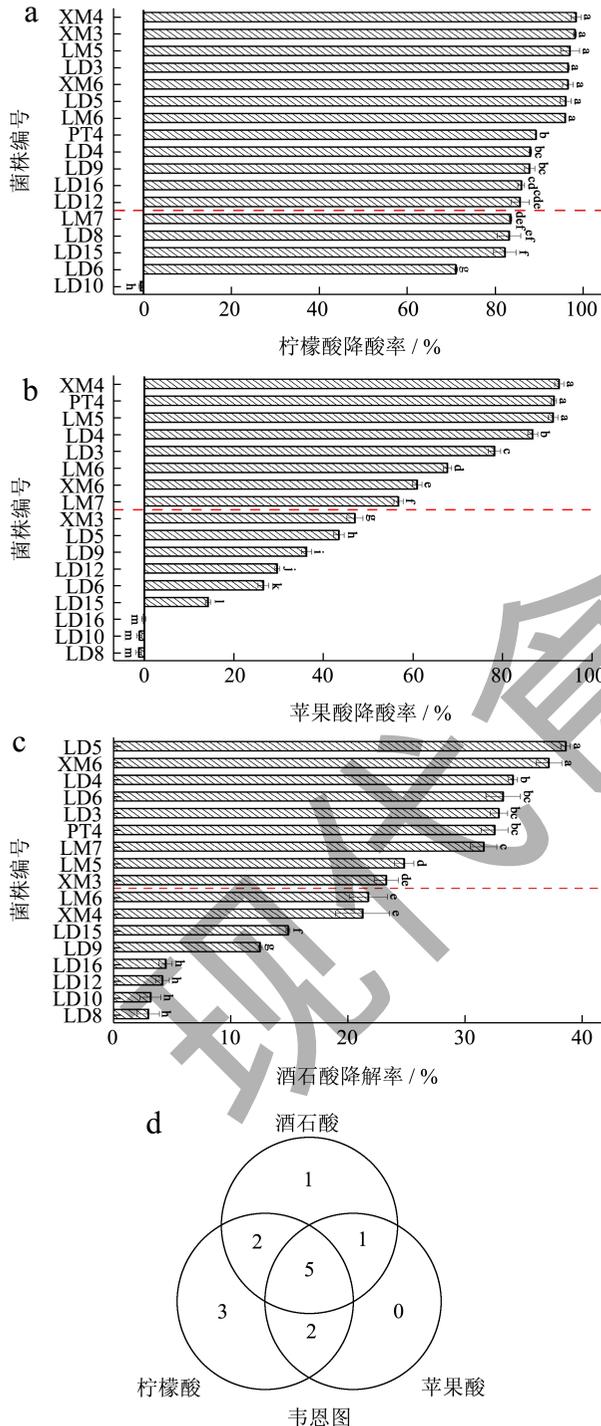


图 1 酵母对三种有机酸的降酸能力  
Fig.1 Acid-reducing ability of yeast for three organic acids

表 3 酵母菌的产气能力与失重量

Table 3 Gas production and weight loss in yeast

酵母菌	发酵时间/h				CO <sub>2</sub> 失重量/g
	12	2	36	48	
LD3	-	++	++++	++++	0.47 ± 0.08 <sup>bcd</sup>
LD4	-	+	+++	++++	0.49 ± 0.03 <sup>ab</sup>
LD5	-	+	++	++++	0.51 ± 0.08 <sup>ab</sup>
LD6	-	+	+++	++++	0.39 ± 0.03 <sup>cf</sup>
LD8	-	++++	++++	++++	0.56 ± 0.06 <sup>a</sup>
LD9	+	+++	++++	++++	0.51 ± 0.01 <sup>ab</sup>
LD10	-	+++	++++	++	0.40 ± 0.04 <sup>def</sup>
LD12	-	++++	++++	++++	0.52 ± 0.02 <sup>ab</sup>
LD15	-	++++	++++	++++	0.45 ± 0.04 <sup>cde</sup>
LD16	-	+	+	-	0.35 ± 0.01 <sup>fg</sup>
LM5	-	++	++++	++++	0.41 ± 0.01 <sup>cdef</sup>
LM6	-	+++	++++	++++	0.50 ± 0.02 <sup>ab</sup>
LM7	+	++	++++	++++	0.50 ± 0.04 <sup>ab</sup>
PT4	-	-	-	-	0.30 ± 0.05 <sup>g</sup>
XM3	-	-	++++	++++	0.49 ± 0.01 <sup>ab</sup>
XM4	-	-	++++	++++	0.48 ± 0.05 <sup>abc</sup>
XM6	+	+++	++++	++++	0.50 ± 0.04 <sup>ab</sup>

注: 结果以平均值 ± 标准差表示 (n=3), 字母不同表示差异显著 (P<0.05)。-: 表示不产气; +: 表示产气量占杜氏管的四分之一; ++、+++、++++: 表示按程度递增。

### 2.2.2 酵母菌产H<sub>2</sub>S能力分析

H<sub>2</sub>S 具有大蒜味或臭鸡蛋味的不良气味, 感官阈值低且难以去除, 对果汁、果酒感官产生负面影响的同时还对人体有害<sup>[24]</sup>。

LD9	●	++++	LM6	●	++++	LD6	●	++
PT4	●	++++	LM5	●	++++	LD10	●	-
LM7	●	++++	LD5	●	+++	LD8	●	-
XM4	●	++++	XM6	●	+++	LD12	●	-
LD15	●	++++	LD3	●	++	LD16	●	-
XM3	●	++++	LD4	●	++			

图 2 17 株酵母菌在 BIGGY 培养基上的显色

Fig.2 Color development of 17 strains of yeast on BIGGY medium

注: -: 表示不生产; +: 表示白色菌落; ++: 表示浅棕色; +++: 表示棕色; ++++: 表示深棕色/黑色。

各菌株产生 H<sub>2</sub>S 性能如图 2 所示, 菌株 LD9、PT4 在 BIGGY 培养基上颜色最深呈黑色, 菌株 LM7、XM4、LD15、XM3、LM6、LM5 呈深棕色,

菌株 LD5、XM6 呈棕色，以上均为高产 H<sub>2</sub>S 酵母菌。菌株 LD3、LD4、LD6 在培养基上呈浅棕色，为低产 H<sub>2</sub>S 酵母，菌株 LD10、LD8、LD12、LD16 在培养基上呈白色，为不产 H<sub>2</sub>S 酵母。Šuranská 等<sup>[15]</sup>、Mandy 等<sup>[25]</sup>在筛选适宜发酵葡萄酒菌株的研究中，均将 H<sub>2</sub>S 产量作为一项重要筛选标准，并验证了高产 H<sub>2</sub>S 菌种会导致异味生成。因此，应选择低产与不产 H<sub>2</sub>S 的酵母菌应用于后续果汁发酵中。

### 2.2.3 酵母菌产酯能力分析

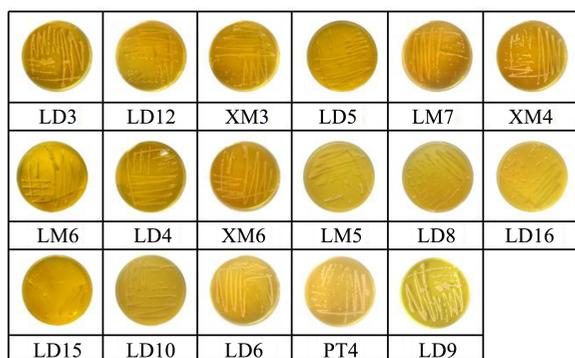


图 3 17 株酵母菌在产酯培养基上的显色

Fig.3 Color development of 17 yeast strains on ester-producing medium

产酯酵母具有降低乙醇产量和增强风味的作用，其中醇与羧酸反应形成的酯类化合物是影响果酒风味特征的重要挥发性香气化合物<sup>[26]</sup>。如图 3 所示，17 株酵母菌中 LD3、LD12、XM3、LD5、LM7、XM4、LM6、LD4、XM6 在产酯培养基上呈深黄色，其中菌株 LD3 颜色最深、产酯能力最强。LM5、LD8、LD16、LD15、LDF4 呈浅黄色，产酯能力较弱。LD6、PT4、LD9 呈白色，不属于产酯酵母。在果酒发酵过程中，产酯酵母释放蛋白酶、脂肪酶和糖苷酶等功能性酶，通过糖酵解、酯化等途径降解果汁中的糖、脂肪和蛋白质，从而产生芳香族酯、醇类和萜烯等具有芳香特性的代谢产物<sup>[27]</sup>。Qu 等<sup>[28]</sup>在 9 种广东酒曲中筛选得到产酯能力最强的酵母菌 CM15，其发酵米酒的酯含量高、高级醇含量低，其中乙酸乙酯和乳酸乙酯含量分别增加 25% 和 214%，证明产酯酵母可以作为一种功能微生物来提升酿造酒的感官品质。

### 2.2.4 酵母菌产乙醇能力分析

TTC 作为感光络合物，可以通过其与酵母代谢物发生反应呈现的颜色，来判断酵母菌的产乙醇能力<sup>[11]</sup>。如图 4 所示，在 TTC 培养基上，菌株 LD9 呈深红色，说明其产乙醇能力最高，但其产酯能力最低。菌株 XM6、LD16、LD8 与 LD10 在培养基

上呈微红色，产乙醇能力低，菌株 LDF12 在培养基上呈白色，不产乙醇。其他菌株在 TTC 培养基上呈粉红色，产乙醇能力较强。酯类物质作为果酒最丰富的香气化合物，包括乙酸酯和乙酯两类，其中乙酯的生物合成受乙醇含量的影响较大，因此产酯能力高的菌种产乙醇能力一般较低<sup>[29]</sup>。

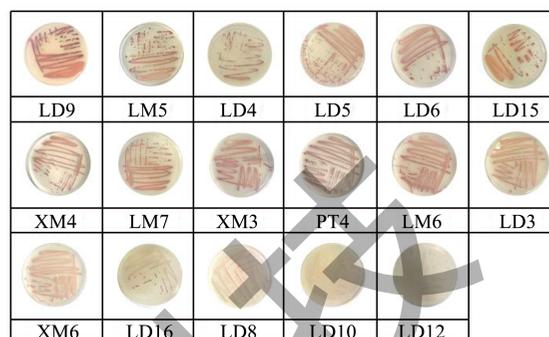


图 4 17 株酵母菌在 TTC 培养基上的产乙醇能力

Fig.4 Ethanol production ability of seventeen yeast strains on TTC medium

### 2.2.5 酵母菌产β-葡萄糖苷酶能力分析

β-葡萄糖苷酶在各种生物过程中发挥重要作用，可通过释放游离糖苷键，增强香气物质的产生<sup>[30]</sup>。如图 5 所示，所筛选的 17 株酵母菌均能生成 β-葡萄糖苷酶，且菌株之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )，有 14 株菌株产酶活大于 3.00 mU/mL，其中菌株 LM5 产酶活为 7.06 mU/mL，产酶能力最强。菌株 PT4 产酶活为 1.24 mU/mL，产酶能力最弱。Liu 等<sup>[31]</sup>分离筛选得到一株高产 β-葡萄糖苷酶的酵母菌 *Wickerhamomyces anomalus* C4，并通过顶空固相微萃取 (HS-SPME) 法进行挥发性成分分析。与低产 β-葡萄糖苷酶的市售酵母相比，C4 酵母菌可以显著增强果酒的挥发性香气丰富度和复杂性，表明具有产 β-葡萄糖苷酶特性的酵母菌在果酒酿造方面具有巨大应用潜力。

## 2.3 耐受性分析

### 2.3.1 葡萄糖耐受性

葡萄糖作为酵母菌发酵的基础原料，决定了酵母菌的生长繁殖和代谢能力，但高浓度糖溶液所形成的高渗透压环境会抑制酵母菌的生长繁殖<sup>[32]</sup>。如图 6 所示，随着葡萄糖质量浓度增加，酵母菌株生长量呈现先增长后下降的趋势，在葡萄糖质量浓度为 100 g/L 时，生长量达到最高。其中菌株 LD12 耐糖能力最强，在葡萄糖质量浓度为 250 g/L 时生长受到抑制作用，PT4 受耐糖能力最弱，在质量浓

度为 100 g/L 时生长受到抑制作用。17 株酵母菌在高渗条件下均表现出良好的耐受性，在 300 g/L 葡萄糖条件下依旧能够存活。徐易洁等<sup>[33]</sup>以葡萄糖耐受性为指标，复筛得到 *Wickerhamomyces anomalus* 酵母菌，耐糖能力较强，在葡萄糖质量浓度为 150 g/L 时生长能力最强，葡萄糖浓度为 300 g/L 时生长情况较差。本实验结果与之相似。蓝靛果中葡萄糖含量较低，一般为 30 g/L<sup>[34]</sup>，本实验筛选酵母菌可满足蓝靛果及其他浆果果酒发酵。

### 2.3.2 乙醇耐受性

乙醇是酵母菌发酵代谢的产物，但高浓度的乙

醇对细胞具有一定的毒害作用，甚至会杀死酵母菌<sup>[32]</sup>。因此具有较高的乙醇耐受性是酵母存活与发酵的一个重要特征。乙醇胁迫结果图 7 表明，随着乙醇体积分数的增加，菌株生长量受到抑制作用显著 ( $P < 0.05$ )，大多菌株可耐受乙醇体积分数为 8%，适合于低醇饮品的研制。其中菌株 LD15 乙醇耐受能力最强，乙醇体积分数为 20% 时依然能够存活。菌株 LD10、LD16 不耐受乙醇，当添加乙醇体积分数为 4% 时菌株不生长。王晖等<sup>[32]</sup>从青梅发酵液中分离得到 *Zygosaccharomyces parabailii* 酵母菌，发现其乙醇耐受性较弱，仅为 3%。

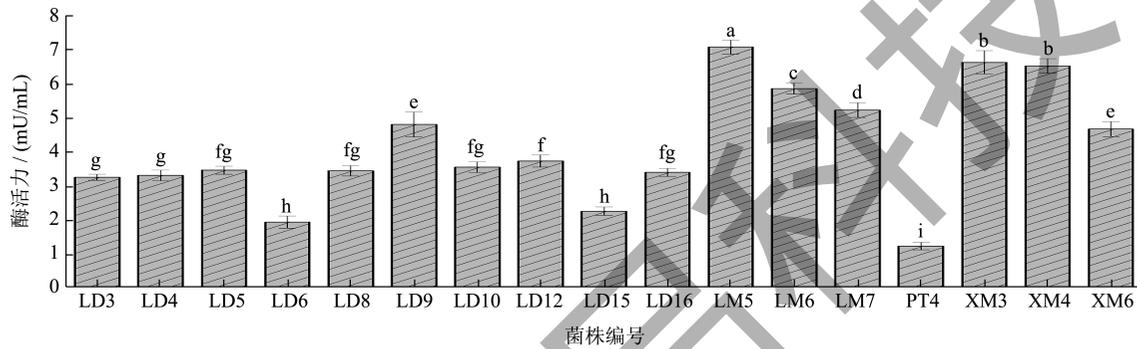


图 5 17 株酵母产  $\beta$ -葡萄糖苷酶能力

Fig.5  $\beta$ -glucosidase production capacity of seventeen yeast strains

注：结果以平均值  $\pm$  标准差表示 ( $n=3$ )，图中字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，图 6~8 同。

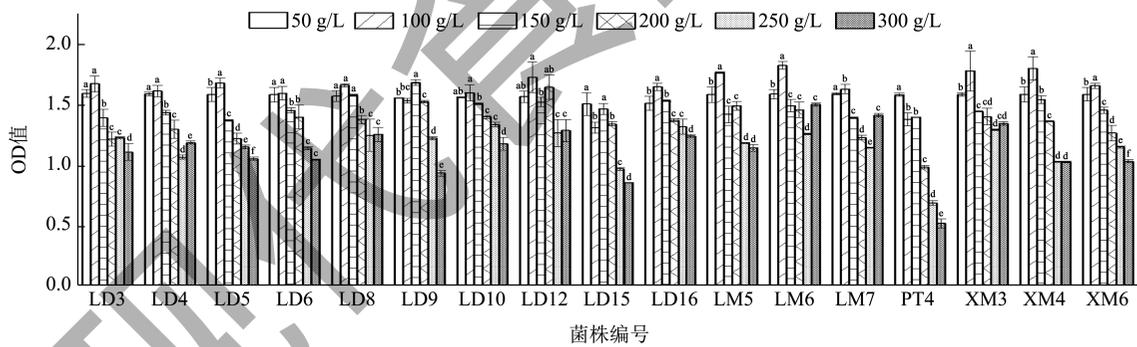


图 6 17 株酵母菌葡萄糖耐受性能

Fig.6 Glucose tolerance performance of 17 strains of yeasts

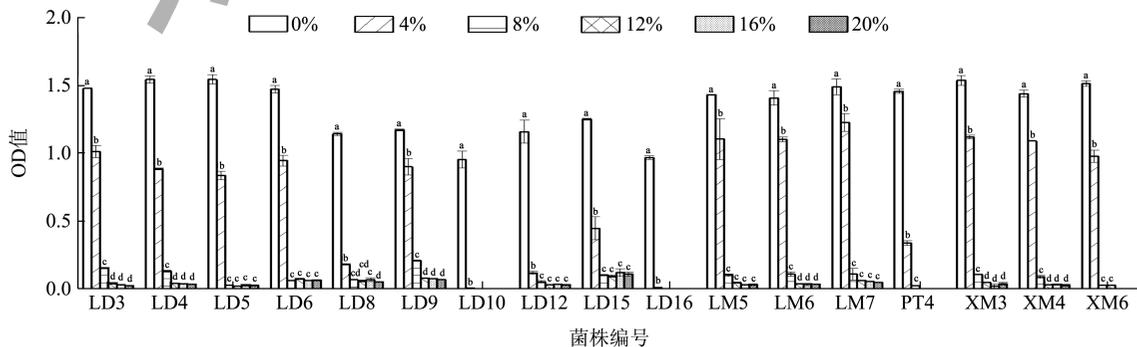


图 7 17 株酵母菌乙醇耐受性能

Fig.7 Ethanol tolerance performance of 17 strains of yeast

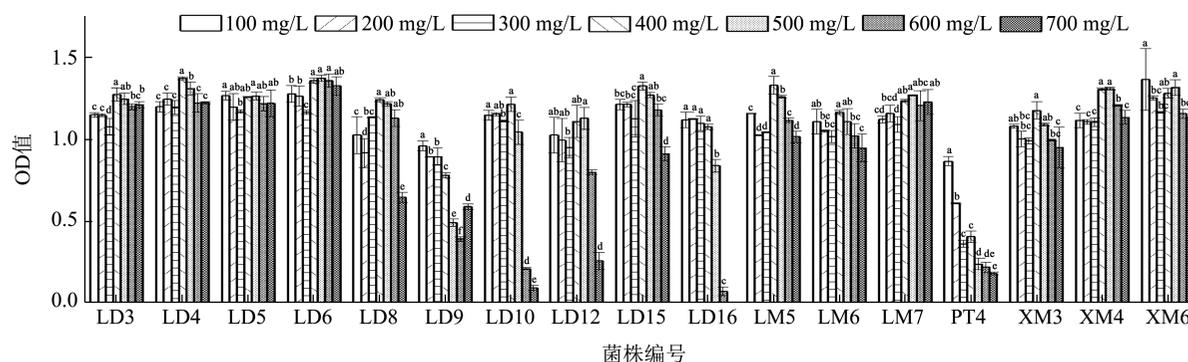


图 8 17 株酵母菌 SO<sub>2</sub> 耐受性能

Fig.8 SO<sub>2</sub> tolerance performance of 17 strains of yeast

### 2.3.3 SO<sub>2</sub>耐受性

果酒通过添加 SO<sub>2</sub> 起到抗氧化和抗菌的重要作用，但超过一定量则会引起酵母菌发酵停滞或停止。果酒中 SO<sub>2</sub> 添加量通常小于 0.25 g/L，最大不超过 0.4 g/L，为保证发酵的正常进行，确认酵母菌对 SO<sub>2</sub> 的高耐受性是十分必要的<sup>[35]</sup>。由图 8 可知，随着 SO<sub>2</sub> 浓度的增加，不同菌株对不同浓度 SO<sub>2</sub> 的抗性也表现出较大的差异。菌株 LD9、LD10、LD12、LD16 受抑制作用显著 ( $P < 0.05$ )，其中菌株 LD16 在 700 mg/L 的 SO<sub>2</sub> 浓度下无法生长。其余酵母菌株均表现出较强的 SO<sub>2</sub> 耐受性，未受到明显抑制作用。卢思言等<sup>[13]</sup>对筛选得到的降酸菌株二孢接合酵母进行 SO<sub>2</sub> 耐受性分析，发现该菌株在 500 mg/L 的 SO<sub>2</sub> 浓度下几乎不能存活，证明本实验分离菌株 SO<sub>2</sub> 耐受性较高。

### 2.4 主成分分析

将 17 株酵母菌的耐酸性能、降酸性能（柠檬酸、苹果酸、酒石酸）、发酵特性（产 H<sub>2</sub>S、产酯、产乙醇、产 β-葡萄糖苷酶）、耐受性（葡萄糖、乙醇、SO<sub>2</sub>）中共计 11 个特性指标进行整理和标准化处理，进行主成分分析，筛选出性能最优的耐酸降酸菌株。

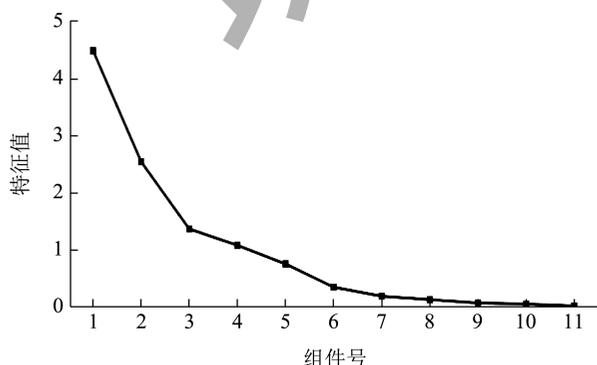


图 9 11 个特性指标的碎石图

Fig.9 Scree plot of 11 characteristic indicators

表 4 主成分特征值及贡献率

Table 4 Eigenvalues and contribution rates of principal components to total variance

成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	4.481	40.741	40.741
2	2.538	23.071	63.812
3	1.362	12.383	76.194
4	1.076	9.782	85.977

如图 9 所示，优良菌株的 11 个特征值中，共有 4 个的数值大于 1。因此，用于分析的特性指标可以简化为 4 个主成分。由表 4 可知，4 个主成分的方差贡献率分别为 40.741%、23.071%、12.383%、9.782%。其中主成分 1、2、3 的累计贡献率达到了 76.194%。可以将进行分析的 11 个特性简化为 3 个主成分，用于解释实验的大部分信息。

由表 5 可以看出每个主成分在所分析特性上的成分载荷。第 1 主成分主要对 7 个特性进行解释：其成分载荷分别为对乙醇的耐受性 0.929、SO<sub>2</sub> 的耐受性 0.840、苹果酸降解率 0.796、酒石酸降解率 0.761、产乙醇能力 0.730、柠檬酸降解率 0.711、低产 H<sub>2</sub>S 能力 0.515，低产 H<sub>2</sub>S 能力的表达为负向；第 2 主成分主要解释 4 个特性：对葡萄糖的耐受性 0.924、产酯能力 0.748、耐酸能力 0.677、产 β-葡萄糖苷酶能力 0.540，其中耐酸能力的表达为负向。第 3 主成分主要解释 1 个特性：低产 H<sub>2</sub>S 能力 0.762。

由表 6 可知，综合排名前 4 的菌株为 LM7、LD3、LD4、LM6，得分分别为 3.084、2.904、2.803、2.797，明显高于其他菌株。菌株 LM7 与 LM6 由于产 H<sub>2</sub>S 较多，不适于蓝靛果果酒降酸应用。菌株 LD3 与 LD4 可有效降解三种有机酸，同时具有良好的发酵性能与耐受性能，值得一提的是其低产 H<sub>2</sub>S，并且高产酯与 β-葡萄糖苷酶的特性为果酒发酵香气提供更多可能性，可作为潜在的耐酸降酸菌株进行后续研究。

表 5 主成分的成分荷载矩阵

Table 5 Component loading matrix for principal components

菌株特性	成分		
	1	2	3
对乙醇的耐受性	0.929	0.092	-0.043
对 SO <sub>2</sub> 的耐受性	0.840	0.203	0.238
苹果酸降解率	0.796	-0.320	0.294
酒石酸降解率	0.761	-0.277	0.367
产乙醇能力	0.730	-0.364	-0.391
柠檬酸降解率	0.711	0.037	-0.043
对葡萄糖的耐受性	0.004	0.924	0.043
产酯能力	0.380	0.748	0.375
耐酸性能	0.076	-0.677	0.361
产 β-葡萄糖苷酶	0.497	0.540	-0.273
低产 H <sub>2</sub> S 能力	-0.515	0.108	0.762

表 6 17株酵母菌的主成分得分结果

Table 6 Results of the principal component scores of 17 strains of yeasts

菌株编号	成分			
	第 1 主成分	第 2 主成分	第 3 主成分	总和
LD3	1.192	-0.157	1.869	2.904
LD4	1.247	-0.016	1.573	2.803
LD5	1.104	0.140	0.420	1.664
LD6	0.141	-1.557	1.065	-0.350
LD8	-2.554	1.153	0.244	-1.157
LD9	0.331	-1.577	-2.120	-3.366
LD10	-4.972	0.086	0.258	-4.629
LD12	-2.898	1.252	1.416	-0.23
LD15	-0.738	-0.361	-1.434	-2.533
LD16	-2.823	0.890	-1.623	-3.556
LM5	2.136	-0.078	-0.598	1.460
LM6	1.489	1.468	-0.160	2.797
LM7	1.866	2.029	-0.811	3.084
PT4	-0.393	-4.805	-0.132	-5.329
XM3	1.605	1.563	-0.937	2.230
XM4	2.3	-0.099	-0.143	2.058
XM6	0.968	0.069	1.113	2.151

### 2.5 26S rRNA序列分析和系统发育树分析

由图 10 可知,对纯化后的酵母菌株 LD3 与 LD4 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,进行琼脂糖凝胶电泳分析<sup>[13]</sup>。在紫外灯照射下的结果可知菌株 LD3 与 LD4 的电泳条带分别为 591 bp 与 589 bp。

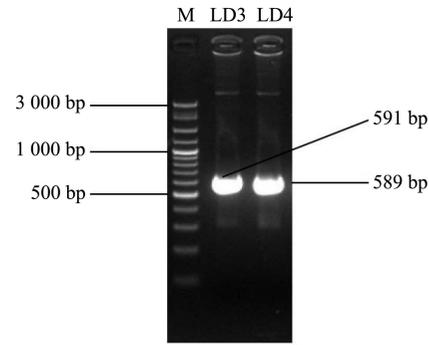


图 10 酵母菌 PCR 扩增结果分析

Fig.10 Result of PCR amplify of yeast strains

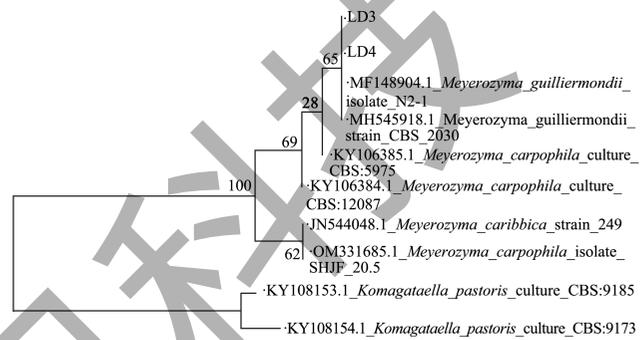


图 11 酵母菌株的系统进化发育树

Fig.11 Phylogenetic tree of yeast strains

将得到的基因序列与 Genebank 数据库中序列进行同源性比较,使用 MEGA V7.0.26 软件进行系统进化树分析<sup>[13]</sup>。结果如图 11 所示,可判定菌株 LD3 与 LD4 均为季也蒙迈耶氏酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*)。菌株 LD3 与 LD4 均来源于蓝靛果,两菌株的菌落形态、发酵性能和耐受性能都非常接近,故判断二者为同一种菌。季也蒙迈耶氏酵母作为非酿酒酵母菌,相比传统酿酒酵母能够生成高水平的香气化合物<sup>[23]</sup>,在实现有效降酸的同时为果酒提供更加理想的口味。Gao 等<sup>[36]</sup>通过实验证明 *Meyerozyma guilliermondii* NM218 在赤霞珠葡萄酒发酵中能够显著降低果酒总酸含量、增加香茅醇和反式橙花醇含量,增强葡萄酒的花香与果香。

## 2.6 蓝靛果果酒的理化特性

### 2.6.1 基本理化指标分析

将筛选出的季也蒙迈耶氏酵母与商业用安琪 SY 酵母、安琪 RW 酵母、安琪 BV818 酵母分别接种于蓝靛果汁中进行纯菌发酵,进一步验证其降解有机酸的能力。蓝靛果果酒的基本理化指标见表 7。季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒的可溶性固形物与总还原糖含量分别 9.95 °Brix 与 4.05 g/L,显著高于其

他3组酿酒酵母菌纯发酵,适用于酿制半干型果酒,这与非酿酒酵母菌的发酵能力和代谢途径差异相关。安琪SY酵母发酵蓝靛果果酒酒精度最高,在相同条件下,安琪SY酵母将底物转化为酒精的能力强于其他3种酵母菌,其中BV818酒精度含量最低,可能是蓝靛果果汁的低酸环境对其发酵能力有所影响。

季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒总酸含量为21.46 g/L,显著低于蓝靛果果汁与3种酿酒酵母发酵得到的果酒。柠檬酸是蓝靛果中主要有机酸,季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒柠檬酸含量显著降低,降酸率可达10.27%,3种酿酒酵母菌发酵果酒中的柠檬酸显著增加,其中BV818发酵果酒柠檬酸含量最多,为25.78 g/L。季也蒙迈耶氏酵母菌发酵果酒中L-苹果酸与酒石酸均显著降低,在酿酒酵母RW与SY发酵果酒苹果酸含量降低,酒石酸含量增加,酿酒酵母BV818发酵果酒中苹果酸与酒石酸含量均显著增加。证明季也蒙迈耶氏酵母具有明显降酸作用,且能较好的调节发酵蓝靛果汁的口感。挥发酸也是评价果酒品质的重要指标,挥发酸含量过高会导致果

酒发酵异常,在口感上带给人醋味和尖酸感。其中季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒挥发酸含量为0.15 g/L,为发酵果酒中最低,其他3种酿酒酵母发酵果酒的挥发酸含量高于0.31 g/L,但均符合果酒生产标准。刘小雨等<sup>[37]</sup>在发酵野木瓜果酒实验中发现,季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒的总酸、挥发酸均低于市售酿酒酵母菌发酵果酒,且感官评分最高。

由表7可知,4种蓝靛果果酒中黄酮含量相差不大,总酚含量差异显著,其中季也蒙迈耶氏酵母与RW酵母发酵蓝靛果果酒中多酚含量显著高于SY与BV818酵母发酵果酒。季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒中花色苷含量为88.49 mg/L,显著低于3种酿酒酵母发酵果酒。在臧伟等<sup>[38]</sup>的研究中,花色苷含量也呈下降趋势,这可能归因于季也蒙迈耶氏酵母的高 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力,通过催化花色苷 $\beta$ -糖苷键断裂,生成糖和花色素,花色素很不稳定可自发转换成无色衍生物<sup>[39]</sup>。同时季也蒙迈耶氏酵母发酵的蓝靛果果酒颜色密度和色调也最低,主要归因于花青素、单宁等酚类物质的含量变化<sup>[23]</sup>。

表7 蓝靛果果酒的理化指标

Table 7 Physical and chemical indicators of *L. edulis* wines

指标	蓝靛果果汁	季也蒙迈耶氏酵母	RW	SY	BV818
SSC/(°Brix)	15.5 ± 0.03 <sup>a</sup>	9.95 ± 0.07 <sup>b</sup>	8.03 ± 0.04 <sup>c</sup>	8.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	8.08 ± 0.04 <sup>c</sup>
总还原糖/(g/L)	27.67 ± 0.31 <sup>a</sup>	4.05 ± 0.34 <sup>b</sup>	2.07 ± 0.26 <sup>c</sup>	2.05 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.14 ± 0.27 <sup>c</sup>
酒精度/%vol	—	2.23 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.48 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.27 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.06 <sup>d</sup>
总酸/(g/L)	23.34 ± 0.37 <sup>d</sup>	21.46 ± 0.20 <sup>c</sup>	26.25 ± 0.36 <sup>b</sup>	25.90 ± 0.07 <sup>c</sup>	27.99 ± 0.60 <sup>a</sup>
柠檬酸/(g/L)	21.33 ± 0.46 <sup>d</sup>	19.14 ± 0.21 <sup>c</sup>	23.48 ± 0.17 <sup>b</sup>	22.46 ± 0.24 <sup>c</sup>	25.78 ± 1.18 <sup>a</sup>
L-苹果酸/(g/L)	1.28 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.78 ± 0.08 <sup>d</sup>	1.02 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.47 ± 0.07 <sup>a</sup>
酒石酸/(g/L)	1.53 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.26 ± 0.08 <sup>d</sup>	1.78 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.65 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.62 ± 0.03 <sup>bc</sup>
挥发酸/(g/L)	—	0.15 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>b</sup>
总黄酮/(mg/mL)	21.42 ± 0.03 <sup>d</sup>	22.25 ± 0.43 <sup>a</sup>	22.31 ± 0.31 <sup>a</sup>	21.89 ± 0.86 <sup>b</sup>	21.77 ± 0.94 <sup>c</sup>
总多酚/(mg/mL)	6.89 ± 0.13 <sup>b</sup>	7.43 ± 0.31 <sup>a</sup>	7.57 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.25 <sup>b</sup>	5.87 ± 0.18 <sup>c</sup>
花色苷/(mg/L)	141 ± 4.77 <sup>a</sup>	83.49 ± 7.58 <sup>c</sup>	110.04 ± 5.21 <sup>b</sup>	111.97 ± 2.95 <sup>b</sup>	106.37 ± 6.85 <sup>b</sup>
色彩密度	5.82 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.77 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.71 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.81 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.75 ± 0.31 <sup>a</sup>
色调	0.61 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.57 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.57 ± 0.04 <sup>b</sup>

注:结果以平均值±标准差表示(n=3),字母不同表示差异显著(P<0.05)。

### 2.6.2 感官评价

如图12可知,4种蓝靛果果酒的感官评价存在明显差异,其中季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒评分最高,RW酵母发酵果酒评分最低。在色泽与状态方面,季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒表现最优,呈亮红色,光泽度更佳,酿酒酵母发酵蓝靛果果酒则可能因为花色苷含量高,酚类物质氧化导致酒体颜色偏深,

酒体浑浊且光泽度较差。在口感方面,季也蒙迈耶氏酵母发酵果酒总糖含量、糖酸比均最高,总酸、挥发酸含量最低,总酚、黄酮含量较高,因此酒体丰满、醇厚协调、酸甜适中。3种酿酒酵母菌发酵果酒总酚、总酸含量高、糖酸比偏低,酒体酸涩感尖锐且无典型性。在香气方面,相比于3种酿酒酵母,非酿酒酵母菌季也蒙迈耶氏酵母在发酵过程中可产

生高浓度的乙酸乙酯等香气物质,使蓝靛果果酒具有纯正怡人的果香和酒香。同时, Yin 等<sup>[23]</sup>研究发现季也蒙迈耶氏酵母发酵山楂酒能产生较高的主要香气物质,提升山楂酒的感官特性,并证实该菌株具有提高山楂酒品质的潜力。总体而言,季也蒙迈耶氏酵母能够有效降低蓝靛果果酒中总酸含量,起到平衡酸感并丰富香气化合物的作用,使蓝靛果果酒感官品质得到提升。

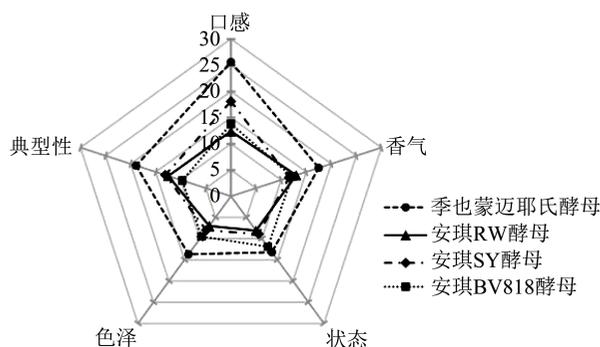


图 12 4 种蓝靛果果酒的感官评价雷达图

Fig.12 Sensory evaluation radar chart of four *L. edulis* wines

### 3 结论

近年来,蓝靛果作为高酸浆果,其产品加工与功能性已有大量研究,但高酸度作为其果酒加工中的难点,严重影响产品品质,如何有效降低果酒酸度是蓝靛果果酒加工亟待解决的关键问题。本研究通过多种指标方法,综合筛选出适宜发酵蓝靛果果酒的酵母菌。通过耐酸性能与降酸性能分离出 17 株优势酵母,对其进行了发酵能力与耐受性的评价,并利用主成分分析进行综合评估。最后通过比较 4 种蓝靛果果酒的理化指标与感官特性,证明筛选得到的季也蒙迈耶氏酵母可显著降低蓝靛果果酒中总酸含量,有效平衡蓝靛果果酒酸感,对感官特性产生积极影响。综上所述,非酿酒酵母菌季也蒙迈耶氏酵母具有优良的降酸、降酸性能与较高耐受性,并且低产硫化氢、高产酯类化合物与  $\beta$ -葡萄糖苷酶,对于提高蓝靛果果酒品质,丰富果酒香气成分具有巨大潜力。本研究并未探明该菌株降酸路径,后续需深入探究其降酸途径与机理,为生物降酸提供一定参考。

### 参考文献

[1] SIP S, SIP A, SZULC P, et al. Haskap berry leaves (*Lonicera caerulea* L.)-the favorable potential of medical use [J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 3898.  
[2] 韩春然,毕海鑫,王鑫.发酵蓝靛果果汁酵母菌的筛选及香

气成分分析[J]. *食品研究与开发*,2022,43(7):199-206.

- [3] 关莹,霍俊伟,丁健.蓝靛果忍冬酿酒工艺及稳定性研究[J]. *食品工业科技*,2014,35(2):206-209.  
[4] JURIKOVA T, ROP O, MLCEK J, et al. Phenolic profile of edible honeysuckle berries (Genus *Lonicera*) and their biological effects [J]. *Molecules*, 2011, 17(1): 61-79.  
[5] TANNER G A, VIJAYALAKSHMI K, TANNER J A. Effects of potassium citrate/citric acid intake in a mouse model of polycystic kidney disease [J]. *Nephron*, 2000, 84(3): 270-273.  
[6] 曹颖,耿瑶,韩乃瑄,等.果酒中的有机酸及降酸策略研究[J]. *食品工业科技*,2023,44(14):457-464.  
[7] ZHONG W, CHEN T, YANG H, et al. Isolation and selection of Non-*Saccharomyces* yeasts being capable of degrading citric acid and evaluation its effect on kiwifruit wine fermentation [J]. *Fermentation*, 2020, 6(1): 25.  
[8] JIANG Y, LUO T, TANG Y, et al. Isolation of a novel characterized *Issatchenkia terricola* from red raspberry fruits on the degradation of citric acid and enrichment of flavonoid and volatile profiles in fermented red raspberry juice [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(4): 1018-1027.  
[9] PEINADO R A, MORENO J J, MAESTRE O, et al. Gluconic acid consumption in wines by *Schizosaccharomyces pombe* and its effect on the concentrations of major volatile compounds and polyols [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(3): 493-497.  
[10] DEL MÓNACO S M, BARDA N B, RUBIO N C, et al. Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(2): 451-464.  
[11] 张二豪,何萍,刘盼盼,等.西藏沙棘酵母菌的分离鉴定及其产香特性分析[J]. *食品科学*,2022,43(20):207-215.  
[12] SON S H, JEON H L, YANG S J, et al. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on  $\beta$ -glucosidase activity [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(1): 123-129.  
[13] 卢思言,曾祥玉,王鑫源,等.蓝靛果中可降解有机酸的酵母菌株筛选及鉴定[J]. *食品工业科技*,2021,42(20):126-133.  
[14] XU C, XIA H, ZHANG S, et al. Isolation, screening, identification and tolerance of yeast in cherry wine lees [J]. *International Journal of Food Engineering*, 2020, 16(9): 20190385.  
[15] ŠURANSKÁ H, VRÁNOVÁ D, OMELKOVÁ J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(1): 181-190.  
[16] WANG X, WANG Z, FENG T. Screening of yeast in various vineyard soil and study on its flavor compounds

- from brewing grape wine [J]. *Molecules*, 2022, 27(2): 512.
- [17] CASTILLO-SÁNCHEZ J X, GARCÍA-FALCÓN M S, GARRIDO J, et al. Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(1): 18-26.
- [18] LUO T, CHEN S, ZHANG H, et al. Phytochemical composition and potential biological activities assessment of raspberry leaf extracts from nine different raspberry species and raspberry leaf tea [J]. *Journal of Berry Research*, 2020, 10(2): 295-309.
- [19] CHEN W, XIE C, HE Q, et al. Improvement in color expression and antioxidant activity of strawberry juice fermented with lactic acid bacteria: A phenolic-based research [J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 17: 100535.
- [20] 刘乾坤. 浸渍酶及多糖对蓝莓酒缩合单宁特性和感官品质的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [21] TIAN T, WU D, NG C T, et al. A multiple-step strategy for screening *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved acid tolerance and aroma profiles [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(7): 3097-3107.
- [22] ARRIZON J, FIORE C, ACOSTA G, et al. Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar Agave tequilana and grape must fermentations [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 89(1): 181-189.
- [23] YIN L, WANG C, ZHU X, et al. A multi-step screening approach of suitable non-*Saccharomyces* yeast for the fermentation of hawthorn wine [J]. *LWT*, 2020, 127: 109432.
- [24] WANG C, LIU M, LI Y, et al. Hydrogen sulfide synthesis in native *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentations [J]. *Food Microbiology*, 2018, 70: 206-213.
- [25] LIN M M-H, BOSS P K, WALKER M E, et al. Evaluation of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 312: 108373.
- [26] CAI W, LI B, CHEN Y, et al. Increase the content of ester compounds in blueberry wine fermentation with the ester-producing yeast: *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, and *Wickerhamomyces anomalus* [J]. *Foods*, 2022, 11(22): 3655.
- [27] CHEN L, LI K, CHEN H, et al. Reviewing the source, physiological characteristics, and aroma production mechanisms of aroma-producing yeasts [J]. *Foods*, 2023, 12(18): 3501.
- [28] QU C, PENG L, FEI Y, et al. Screening ester-producing yeasts to fortify the brewing of rice-flavor Baijiu for enhanced aromas [J]. *Bioengineered*, 2023, 14(1): 2255423.
- [29] 王飞, 王晓宇, 赵擎豪, 等. 果酒增香酿造技术研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(13): 244-252.
- [30] ORLIC S, VOJVODA T, BABIC K H, et al. Diversity and oenological characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* associated with Žilavka grapes [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(8): 1483-1489.
- [31] LIU X, LI Y, YU Z, et al. Screening and characterisation of  $\beta$ -glucosidase production strains from *Rosa roxburghii* Tratt [J]. *International Journal of Food Engineering*, 2021, 17(1): 1-9.
- [32] 王辉, 袁婷玉, 白卫东, 等. 青梅自然发酵液中酵母菌的分离鉴定及特性研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(8): 16-21.
- [33] 徐易洁, 张红玉, 解修超, 等. 甘蔗内生酵母菌的分离鉴定及发酵性能[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(1): 159-166.
- [34] 包洪涛, 梁敏, 赵云财, 等. 蓝锭果营养价值及其果酒关键工艺研究进展[J]. *酿酒*, 2020, 47(2): 25-30.
- [35] 张杰, 赵洋溢, 林静, 等. 蓝莓果酒主发酵工艺参数优化及其品质分析[J]. *江西农业大学学报*, 2022, 44(3): 690-705.
- [36] GAO P, PENG S, SAM F E, et al. Indigenous non-*Saccharomyces* yeasts with  $\beta$ -glucosidase activity in sequential fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: A strategy to improve the volatile composition and sensory characteristics of wines [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 845837.
- [37] 刘小雨, 李科, 张惟广. 纯种发酵和混菌发酵对野木瓜果酒品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 134-140.
- [38] 藏伟, 刘叶, 刘宇, 等. 本土季也蒙毕赤酵母在干红葡萄酒中试生产中的应用潜力[J]. *食品科学*, 2023, 44(18): 117-125.
- [39] 王英, 周剑忠, 胡彦新, 等. 低活性 $\beta$ -葡糖苷酶酵母菌株的筛选及其在黑莓果酒发酵中的应用[J]. *中国酿造*, 2016, 35(7): 102-107.