

文章编号:1000-8551(2020)07-1480-11

水蜜桃酒速酿酵母菌的筛选、鉴定及发酵条件优化

刘沁源 吴祖芳* 翁佩芳

(宁波大学食品与药学院,浙江 宁波 315800)

摘要:为获得快速酿造水蜜桃酒的专用酵母菌株,生产优质水蜜桃酒,以水蜜桃自然发酵醪为筛菌原料,通过 TTC 显色法与杜氏小管法初筛;再经耐酒精能力、发酵速度与产酒能力以及发酵液风味分析与感官评定三级复筛,获得了优质高效的酿酒酵母菌 PY01 (*Saccharomyces cerevisiae* PY01);并以初始 pH 值、主发酵温度、酵母接种量为自变量,以酒精度为响应值作酿酒工艺的响应面优化。结果表明,PY01 菌株发酵水蜜桃酒最适发酵参数为初始 pH 值 3.9,发酵温度 26℃,酵母接种量 6.2%。在此条件下发酵可得到酒精度为 12.78% vol,总糖含量为 6.71 g·L⁻¹,风味纯正,口感醇厚,典型性的半干型水蜜桃发酵酒。本研究结果为水蜜桃发酵酿酒产业菌种的选择与工艺优化提供了基础。

关键词:水蜜桃酒;酿酒酵母;筛选;风味分析;响应面

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.07.1480

水蜜桃(*Prunus persica*)肉质细软、汁多味甜、营养丰富,其中奉化水蜜桃品质最为优异,被誉为“琼浆玉露”、“瑶池珍品”^[1-2]。水蜜桃是呼吸跃变型水果,耐储性差,易腐烂,一般以鲜食为主,上市时间集中于5-9月,往往因不能及时销售和加工造成大量浪费,严重影响我国水蜜桃果业的发展^[3-4]。要解决这个问题,必须改变传统水果的消费观念,改变水蜜桃食用途径与模式^[5-6]。水蜜桃酒正是一种理想的消费转换方式^[7-8]。

果酒生产过程中酵母菌起关键性作用,其发酵力的好坏,影响酒的产量、副产物的量、发酵周期及产品风味,具有重要的研究应用价值^[9-11]。目前果酒生产中所用酵母菌大多为葡萄酒用酵母,这种酵母菌是针对葡萄酒生产工艺特点而开发的,应用于其他果酒的酿造难以形成良好风味,不能满足消费者需求^[12]。少数针对桃子酒酿造酵母的研究尚处初步阶段,李泽霞等^[9]从感官质量、发酵特性、产酒能力3个方面进行综合评价,选育了1株优良的蜜桃酒酿造菌种 HJ2-1;蒋锡龙等^[13]通过杜氏管发酵法、耐受性试验、发酵性能测定驯化选育了1株产酒能力达到酿酒要求的酵母 J11,但上述研究均缺少发酵风味方面的桃酒酵母菌筛

选工作,若将风味分析应用于菌种筛选,可为提高发酵液口感与品质提供一定的指导。同时,在果酒产业化酿造中,发酵性能好的菌种能缩短主发酵周期,节约能耗,提高设备利用率^[13]。因此,针对水蜜桃发酵酒的生产特点,开发出优质高效的发酵菌种非常必要^[14-16]。

本研究将基础菌种的筛选步骤与顶空固相微萃取-气相色谱-质谱(headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)分析技术相结合,从水蜜桃自然发酵醪中分离筛选能快速酿造水蜜桃酒的专用酵母菌,并对其发酵工艺进行响应面优化,使发酵菌种在最适发酵条件下酿造得到优质水蜜桃酒,旨在为水蜜桃酒的研究与开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原材料:玉露水蜜桃,采摘于浙江省宁波市奉化区种植基地。

商业化酿酒酵母:安琪牌葡萄酒活性干酵母

收稿日期:2019-02-25 接受日期:2019-05-04

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31471709),浙江省基础公益研究计划项目(LGN18C200018)

作者简介:刘沁源,女,主要从事食品生物技术研究。E-mail:2940684740@qq.com

* 通讯作者:吴祖芳,男,教授,主要从事食品生物技术研究。E-mail:wzfpf@163.com

(angel brand grape wine active dry yeast, NQ, 经鉴定为酵母属酿酒酵母菌), 安琪酵母股份有限公司提供。

试剂: 酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 培养基、煌绿乳糖胆盐肉汤、平板计数琼脂, 杭州微生物试剂有限公司; 果胶酶 (500 U·mg⁻¹), 源叶生物科技有限公司; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 显色剂, 北京索莱宝科技有限公司; Megazyme 乙醇检测试剂盒, 上海仁捷生物科技有限公司; 3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、苯酚、无水亚硫酸钠、葡萄糖、氢氧化钠、偏亚硫酸钾、氯化钠均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 无水柠檬酸 (食品级), 江苏科伦多食品配料有限公司; 白砂糖, 购于当地市场。

1.2 主要仪器与设备

7890B-7000C GC-MS 联用仪, 美国 Agilent 公司; SpectraMax190 酶标仪, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司; SW-CJ-2D 型单人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; UV-3300 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; WYT-IV 手持式折光仪, 广州沪瑞明仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种分离 将新鲜水蜜桃打浆, 置于 250 mL 三角瓶中, 覆上三层纱布, 于 28℃ 自然发酵 3~7 d, 当有大量气泡产生时, 取适量发酵醪稀释涂布于 YPD 固体培养基, 28℃ 放置 2~3 d, 从中分离不同形态的菌株。典型的酵母菌菌落表面光滑、湿润、黏稠, 易挑起, 多为乳白或奶油色, 有酒香味。将分离所得具有初步酵母形态的菌株划线分离纯化^[16-18]。

1.3.2 菌种初筛 TTC 显色法参照王梅等^[19]的方法, 产酒精度越高的菌株, 与 TTC 反应显色越深, 由菌落呈色深浅来判定菌株产酒精能力, 挑选菌落呈红色的菌株作为优选菌株。

杜氏小管法: 在同等条件下, 将 TTC 显色法优选的菌株分别接入水蜜桃果汁, 28℃ 培养 48 h, 每隔一段时间观察杜氏小管中产气情况。初步判断酿酒酵母的发酵能力和絮凝能力, 进一步筛选出性状良好的酵母菌株^[20]。

1.3.3 菌种一级复筛 (不同菌株耐酒精能力) 将活化后的初筛优选菌株接入酒精度分别为 6、8、10、12、14 和 16% vol 的 YPD 液体培养基中, 28℃ 条件下摇床培养 24 h, 在 600 nm 波长处测定吸光度值, 通过比较各菌悬液的吸光度值筛选出耐酒精性能较强的菌株^[21-22]。

1.3.4 菌种二级复筛 (不同菌株发酵速度与产酒能

力) 水蜜桃酒酿造工艺流程^[23-24]: 桃子清洗→去核打浆→80 mg·L⁻¹ 偏亚硫酸钾抑菌护色→果胶酶酶解→过滤→成分调整→巴氏灭菌→接种酵母菌→主发酵→后发酵→下胶处理→灭菌→陈酿→灌装→成品。

将上述一级复筛的优选菌株与 NQ (用无菌温水浸泡后接于 YPD 培养基中活化, 并于试管斜面保存) 均按 5% (种子液菌体浓度约为 5.0×10⁶ CFU·mL⁻¹) 的接种量分别接入桃汁, 28℃ 发酵 7 d, 测定发酵液各理化指标。

1.3.5 菌种三级复筛 (GC-MS 分析发酵液挥发性风味与感官评定) 取主发酵结束后的水蜜桃酒 5 mL 于顶空瓶中, 加 1.4 g 氯化钠, 将酒样置于 60℃ 条件下平衡 15 min。将老化后的固相微萃取头插入顶空瓶中, 60℃ 萃取 30 min, 插入 GC-MS 进样器, 210℃ 解吸 7 min。

色谱条件: 毛细管柱为 Vocol (60 m×0.32 mm×1.8 μm)。程序升温条件: 初始温度 35℃, 保持 3 min, 以 3℃·min⁻¹ 升至 40℃, 保持 1 min, 再以 5℃·min⁻¹ 升至 200℃, 保持 20 min。

质谱条件: 采用全扫描模式采集信号, 扫描质量范围 m/z 40~600, 扫描频率 3.6 scans·s⁻¹; 离子源 EI, 70 eV, 230℃; 四级杆温度 150℃; 接口温度 220℃。

定性分析: 将质谱图经 NIST 14 Library 谱库检索。选择较高匹配度的检索结果, 按面积归一化法进行定量分析, 求得不同酵母菌发酵果酒中挥发性风味成分相对百分含量。

感官评定: 参考 NY/T 1508-2017^[25], 由 8 位经验丰富的感官品评员 (男女各 4 名) 对水蜜桃酒进行评价, 品评员根据水蜜桃酒外观、香气、滋味、典型性进行打分, 具体评分标准见表 1。

1.3.6 菌种分子生物学鉴定 利用通用引物 NLI (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 与 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), 以酵母菌基因组为模板, 扩增 26S rDNA D1/D2 区序列, 将其克隆到载体中再转化到大肠杆菌感受态细胞, 筛选阳性克隆提交至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序^[8]。将测定的序列提交至 GenBank 数据库, 使用 BLAST 程序与已有菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列进行相似性比较, 确定该菌株的分类地位。

1.3.7 单因素工艺优化 调节水蜜桃果汁初始糖度为 22°Brix, 用食品级无水柠檬酸调节水蜜桃汁初始 pH 值分别为 3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0 (自然状态下完全成熟的水蜜桃 pH 值约为 5.0, 该 pH 下所酿水蜜桃酒口味平淡), 添加酵母量为 5%, 置于 28℃ 条件下发

表 1 水蜜桃酒感官评定标准
Table 1 Sensory evaluation criterion of peach wine

项目 Item	标准 Criterion	评分 Score
外观 Appearance	具有水蜜桃酒的色泽、澄清透明、有光泽	9~10
	具有水蜜桃酒的色泽、澄清透明、无明显悬浮物	8~9
	与水蜜桃酒的色泽略有不同、澄清、无夹杂物	7~8
	与水蜜桃酒的色泽不符、微浑、失去光泽	7 分以下
香气 Aroma	果香与酒香浓馥幽雅、协调悦人	27~30
	果香与酒香良好、尚愉悦	24~27
	果香与酒香较少、但无异香	21~24
	果香不足或不悦人	21 分以下
滋味 Taste	酒体丰满、有新鲜感、醇厚协调、舒服、爽口、回味绵延	37~40
	酒质柔顺、柔和爽口、甜酸适当	34~37
	酒体协调、纯正无杂	31~34
	酒体寡淡、不协调	31 分以下
典型性 Typical	风格独特、优雅无缺	17~20
	典型明确、风格良好	14~17
	有典型性、不够优雅	11~14
	有明显缺陷	11 分以下

酵 5 d, 测定发酵液酒精度, 进行感官评价; 以上述最优 pH 值为基础, 在水蜜桃果汁中添加接种量分别为 3%、5%、7%、9% 和 11% 的酵母菌, 置于 28℃ 条件下发酵 5 d, 测定发酵液酒精度, 进行感官评价; 在最优 pH 值, 最佳接种量的基础上, 将发酵液分别置于 24、26、28、30 和 32℃ 的培养箱中放置 5 d, 测定发酵液酒精度, 进行感官评价。

1.3.8 响应面工艺优化 水蜜桃酒响应面试验设计因素水平见表 2。

表 2 Box-Behnken 响应面试验设计因素水平

Table 2 Variables and levels in Box-Behnken experimental design

水平 Level	初始 pH 值 X_1 Initial pH value	主发酵温度 X_2 Main fermentation temperature/℃	酵母接种量 X_3 Yeast inoculation capacity/%
-1	3.5	24	5
0	4.0	26	7
1	4.5	28	9

1.3.9 理化指标测定 可溶性固形物: 手持式折光仪测定; 酒精度: Megazyme 乙醇检测试剂盒法测定; 总糖、还原糖: DNS 比色法测定^[26]; 总酸、干浸出物: 参考 GB/T 15038 - 2006 测定^[27]; 菌落总数: 参考 GB

4789.2-2016 检测^[28]; 大肠菌群数: 参考 GB 4789.3-2016 检测^[29];

1.4 数据处理

每组试验均进行 3 次生物学重复。采用 Origin 2017 软件作图, 采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 与邓肯法 (Duncan's) 差异分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 菌种分离

从有大量气泡的水蜜桃发酵醪中共分离出 38 株不同形态的菌株, 观察菌株菌落形态与显微形态, 纯化分离出 10 株具有初步酵母形态且菌落特征有差异的菌株, 依次编号为 PY01~PY10, 菌株基本特征如表 3 所示。

2.2 菌种初筛

2.2.1 TTC 显色法 将上述 10 株菌株进行 TTC 显色试验。由表 4 可知, PY03 与 PY07 菌落颜色不变, 表明其不产酒精; 其他 8 株菌落呈红色, 表明这 8 株菌株具备产酒精能力。根据呈色深浅, 说明 PY01、PY05、PY09 产酒精能力较强。

表 3 分离菌株菌落及细胞形态特征

Table 3 Colony and cell morphology of isolated strains

菌株编号 Strain number	菌落颜色 Colony color	菌落大小 Colony size	边缘情况 Edge situation	表面情况 Surface condition	是否易挑起 Susceptibility to provoke	细胞形态 Cell morphology	繁殖方式 Breeding method
PY01	乳白色	中等	整齐	光滑、较湿润	易挑起	椭圆形	单端出芽
PY02	乳白色	偏小	整齐	光滑、较湿润	易挑起	球形	单端出芽
PY03	奶油色	中等	整齐	光滑、较湿润	易挑起	柠檬形	单/多端出芽
PY04	乳白色	中等	整齐	光滑、较湿润	易挑起	椭圆形	单/多端出芽
PY05	奶油色	中等	整齐	光滑、较湿润	易挑起	球形	单端出芽
PY06	乳白色	中等	整齐	光滑、较湿润	易挑起	球形	单端出芽
PY07	乳白色	偏小	整齐	光滑、较湿润	易挑起	椭圆形	单端出芽
PY08	乳白色	偏小	整齐	光滑、较湿润	易挑起	椭圆形	单/多端出芽
PY09	乳白色	中等	整齐	光滑、较湿润	易挑起	椭圆形	单/多端出芽
PY10	橘红色	中等	整齐	光滑、较湿润	易挑起	椭圆形	单端出芽

表 4 不同菌株 TTC 显色效果

Table 4 TTC color rendering effect of different strains

菌株编号 Strain number	PY01	PY02	PY03	PY04	PY05	PY06	PY07	PY08	PY09	PY10
菌落颜色 Colony color	深红色	粉红色	不显色	粉红色	深红色	粉红色	不显色	粉红色	深红色	橘红色

2.2.2 杜氏小管法 将上述 8 株具备产酒精能力的菌株接入杜氏小管进行产气能力测试。由表 5 可知, PY01、PY05 发酵速度最快, 发酵 12 h 产气量可充满整个杜氏小管, 其中 PY01 起酵速度最快, 第 6 小时开始

发酵产气。28℃ 发酵 48 h 产气量能充满整个杜氏小管的菌株有 6 株, 分别为 PY01、PY02、PY04、PY05、PY06 和 PY09, 将这 6 株菌株作为复筛的出发菌株。

表 5 不同菌株杜氏小管产气效果

Table 5 Gas production effect of Durham tube of different strains

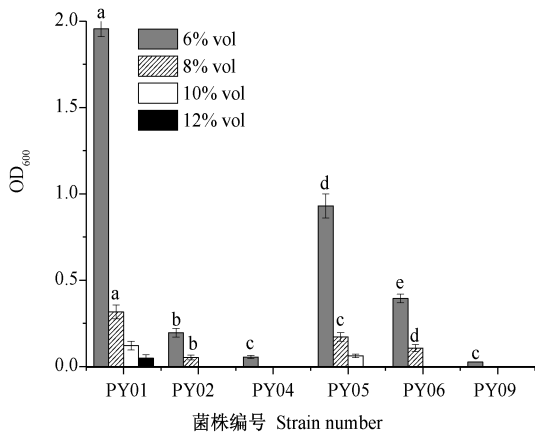
菌株 Strain	发酵时间 Fermentation time/h												
	4	6	8	10	12	14	16	18	24	30	36	42	48
PY01	-	+	++	+++	++++								
PY02	-	-	+	++	+++	++++							
PY04	-	-	-	-+	+	+++	++++						
PY05	-	-	-+	++	++++								
PY06	-	-	-+	+	++	++++							
PY08	-	-	-	-+	-+	-+	-+	+	++	++	++	++	+++
PY09	-	-	-	+	++	+++	++++						
PY10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示杜氏小管中未出现气体;“-+”表示产气量少于杜氏小管体积的 1/4;“+”表示产气量约等于杜氏小管体积的 1/4;“++”表示产气量约等于杜氏小管体积的 1/2;“+++”表示产气量约等于杜氏小管体积的 3/4;“++++”表示产气量几乎充满整个杜氏小管。

Note: - indicates that there was no gas in the Durham tube. ‘-+’ indicates that the gas production was less than 1/4 of the volume of Durham tube. ‘+’ indicates that the gas production was about 1/4 of the volume of Durham tube. ‘++’ indicates that the gas production was about 1/2 of the volume of Durham tube. ‘+++’ indicates the gas production was about 3/4 of the volume of Durham tube. ‘++++’ indicates that the gas production was almost filled with the entire Durham tube.

2.3 菌种一级复筛

将上述 6 株菌株接种到不同酒精度的 YPD 液体培养基中。由图 1 可知, PY01 对酒精的耐受能力最强, 最高可耐受 12% vol 的酒精度; 其次是 PY05, 最高可耐受 10% vol 的酒精度; PY02 与 PY06 对酒精的耐受力均为 8% vol; PY04 与 PY09 的酒精耐受力最差, 仅可以耐受 6% vol 的酒精度。一般果酒的酒精度可达到 10~12% vol, 因此选择 PY01 与 PY05 作为二级复筛的出发菌株。



注: 相同酒精度不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters of the same alcohol degree indicated significant difference at 0.05 level.

图 1 不同菌株对酒精的耐受能力

Fig.1 Alcohol tolerance of different strains

2.4 菌种二级复筛

调节水蜜桃汁初始糖度为 22° Brix, 总糖含量为 $190 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 总酸含量为 $6.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 3.5, 将 PY01、PY05 与 NQ 均按照 5% 接种量分别接入桃汁, 置于 28°C 恒温培养箱中发酵, 定期测定发酵液的酒精度及总糖含量。由图 2 可知, 3 种酵母菌在发酵过程中总糖、酒精度的动态变化在第 5 天后趋于稳定, 表明 3 种酵母菌均可在发酵第 5 天完成主发酵; PY01、PY05 与 NQ 主发酵结束后酒中残糖含量均低于 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酒精度分别为 11.67%、10.43% 和 10.67% vol, 可知筛选出的 PY01 和 PY05 菌株的发酵速度与产酒能力与 NQ 相当, 可在 5 d 内快速酿造水蜜桃酒。

2.5 菌种三级复筛

由表 6 可知, 3 种不同酵母菌发酵酒中共检出 45 种挥发性成分, 主要包括酯类 25 种、醇类 8 种、酮和醛类 3 种、酸类 5 种、其他类 4 种。其中含量较高的挥发性物质为辛酸乙酯、癸酸乙酯、月桂酸乙酯、乙酸乙酯、苯乙醇、桃醛。PY01、PY05 和 NQ 3 种酵母菌发酵酒中挥发性风味成分的种类与含量存在较大差异, 其中

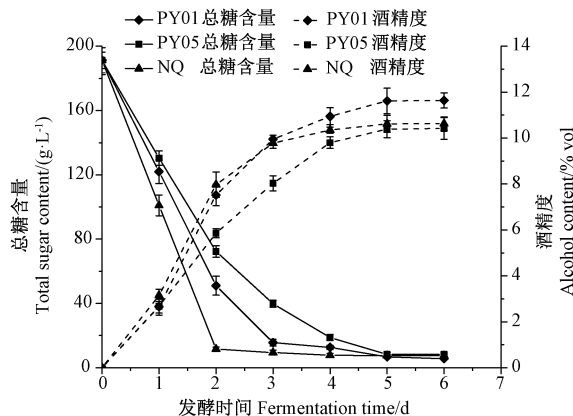


图 2 3 种酵母菌发酵过程中总糖、酒精度的变化

Fig.2 Changes in total sugar and alcohol content during fermentation of three species of yeast strains

酯类物质种类分别为 18、11、13 种, 相对含量分别为 83.593%、75.839%、69.990%。PY01 发酵酒的酯类种类最为丰富, 相对含量也最高, 主要归因于癸酸乙酯、月桂酸乙酯和辛酸乙酯的高产。癸酸乙酯赋予果酒蜜香, 月桂酸乙酯赋予果酒花香, 而辛酸乙酯赋予果酒酒香果香以及白兰地的香韵^[30]。因此, PY01 发酵酒比 PY05 和 NQ 发酵酒呈现出更丰富的风味层次。醇类物质种类及其相对含量也是影响果酒风味的主要原因^[31], PY01 和 NQ 发酵酒中醇类物质较丰富, 均为 7 种, PY05 发酵酒中醇类物质为 4 种。其中含量较多的醇类物质为二氢- β -紫罗兰醇和苯乙醇, 这 2 种物质均为国标允许使用的食用香料, 二氢- β -紫罗兰醇具有温柔的紫罗兰花香, 苯乙醇具有玫瑰花香^[32-33], 均赋予果酒浓郁的风味。由醇类物质分析结果可知, PY01 和 NQ 菌株发酵酒优于 PY05。在 3 种菌株发酵酒中醛酮类物质共有 3 种, 其中桃醛具有强烈的桃子香气, 在 3 种菌株果酒中含量均较高, 赋予水蜜桃酒香甜醇厚的典型性。甲酸、乙酸是 3 种菌株发酵酒中共有的酸味物质, 赋予果酒酸味, 但己酸、正癸酸会产生腐败酸臭味, 其中正癸酸为 NQ 酵母发酵酒所特有, 赋予水蜜桃酒不愉快的风味^[33]。

由表 7 可知, PY01 发酵的水蜜桃酒微黄透明、桃香浓郁、口感醇厚、酸甜适中、无苦涩味、具有桃酒应有的特征与风味, 综合评分为 88.6 分; PY05 发酵的水蜜桃酒酸味较大、有苦涩味, 在香气方面与感官评分上也远远低于 PY01; NQ 发酵的水蜜桃酒带有令人难以接受的苦涩味, 桃香清淡, 不具有水蜜桃酒应有的特征与风味, 感官评分最低。综合 3 株酵母菌 GC-MS 风味分析和感官品评结果, PY01 优于 PY05 和 NQ, 最终选择 PY01 菌株作为快速酿造水蜜桃酒的专用酵母菌。

表 6 3 种酵母菌发酵水蜜桃酒主要香气成分分析

Table 6 Analysis of main aroma components in peach wine fermented by three species of yeast strains

类别 Types	挥发性风味成分 Volatile flavor components	相对含量 Relative contents/%		
		PY01 发酵酒 PY01 fermentation wine	PY05 发酵酒 PY05 fermentation wine	NQ 发酵酒 NQ fermentation wine
酯类 Esters	乙酸乙酯	3.172	1.623	2.186
	丁酸乙酯	0.815	0.322	-
	乙酸异戊酯	0.574	-	-
	庚酸乙酯	-	0.020	-
	戊酸甲酯	0.032	-	-
	己酸乙酯	0.047	0.125	0.074
	丁酸甲酯	0.498	-	-
	辛酸甲酯	0.561	-	-
	辛酸乙酯	7.268	6.278	6.731
	苯甲酸乙酯	0.628	-	0.740
	乙酸异戊酯	-	0.330	0.541
	乙酸己酯	-	0.044	0.057
	壬酸乙酯	1.279	-	1.173
	乙酸苯乙酯	-	-	0.072
	2-苯基-1,3-丙二醇二氨基甲酸酯	-	0.862	-
	癸酸乙酯	44.571	43.930	42.648
	3-苯丙酸乙酯	0.564	-	0.733
	蓖麻油酸乙酯	-	-	0.069
	辛酸异戊酯	0.870	-	-
	辛酸 3-甲基丁酯	0.847	-	0.189
十一酸乙酯	-	1.593	-	
癸酸异丁酯	0.753	-	-	
月桂酸乙酯	19.831	17.712	14.777	
癸酸异戊酯	0.987	-	-	
癸酸 3-甲基丁酯	0.296	-	-	
总和 Total		83.593	75.839	69.990
醇类 Alcohols	异丁醇	0.023	0.529	0.339
	异戊醇	-	-	0.201
	2-甲基-1-丁醇	0.335	1.573	0.453
	苯丙二醇	0.048	-	0.089
	苯甲醇	0.057	-	0.042
	苯乙醇	4.782	4.139	4.219
	4-萜烯醇	0.235	0.723	-
	二氢- β -紫罗兰醇	3.204	-	2.512
总和 Total		8.684	6.964	7.855
醛酮类 Aldehydes and ketone	苯甲醛	0.024	0.068	0.074
	α -大马酮	0.476	0.239	-
	桃醛	2.412	4.014	5.692

表 6(续)

类别 Types	挥发性风味成分 Volatile flavor components	相对含量 Relative contents/%		
		PY01 发酵酒 PY01 fermentation wine	PY05 发酵酒 PY05 fermentation wine	NQ 发酵酒 NQ fermentation wine
总和 Total		2.912	4.321	5.766
酸类 Acids	甲酸	1.252	2.626	0.467
	乙酸	1.645	2.264	1.474
	DL-高丝氨酸	-	0.874	-
	己酸	0.119	0.227	0.244
	正癸酸	-	-	0.642
总和 Total		3.016	5.991	2.827
其它物质 Other substances	丁香酚	0.132	1.251	0.421
	2-甲氧基-6-[(E)-丙-1-烯基]苯酚	-	-	4.660
	环癸烷	-	2.578	3.892
	茶香螺旋烷	1.663	3.056	4.589
总和 Total		1.795	6.885	13.562

注：“-”表示未检出。

Note: ‘-’ means not detected.

表 7 3种酵母菌发酵水蜜桃酒感官品评结果

Table 7 Sensory evaluation results of 3 species of yeast strains fermented peach wine

菌株 Strain	外观 Appearance	香气 Aroma	滋味 Taste	典型性 Typical	总分 Total score
PY01	微黄透明 (9.1)	桃香浓郁 (25.3)	醇厚浓郁、酸甜适中、无苦涩味(36.8)	具有桃酒应有的特征与风味(17.4)	88.6
PY05	微黄较透明 (8.0)	桃香较浓郁 (23.6)	酸味较大、带较大的苦涩味(32.7)	初步具有桃酒应有的特征与风味(12.5)	76.8
NQ	微黄透明 (9.3)	桃香清淡 (22.5)	酸味不明显、欠爽、带很重的苦涩味(30.6)	不具有桃酒应有的特征与风味(10.4)	72.8

2.6 菌种分子生物学鉴定

PY01 菌株 26S rDNA D1/D2 区序列扩增电泳图,如图 3 所示,序列长度为 593 bp。将此序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对, PY01 菌株与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 一些种属的 26S rDNA 序列相似度达到 100%, 鉴定 PY01 为酵母属酿酒酵母菌。

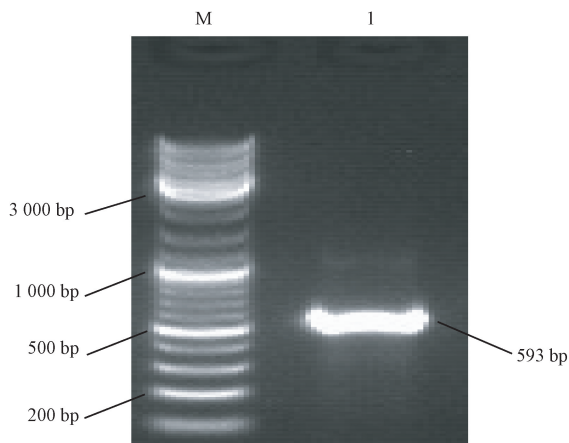
2.7 发酵工艺优化

2.7.1 单因素试验 果酒发酵过程中发酵条件的控制直接影响果酒的品质与风味^[34-36]。由图 4-A 可知,当初始 pH 值为 4.0 时,发酵 5 d 后水蜜桃酒酒精度最高,为 11.33% vol,感官评分也最高。pH 值过低或过高,会导致酵母蛋白变性、细胞死亡或分解,最终影响发酵速率^[3]。且初始 pH 值过低,水蜜桃酒颜色浑浊,口感偏酸;初始 pH 值过高,水蜜桃酒滋味平淡,均影响果酒的风味与品质。

由图 4-B 可知,当主发酵温度从 24℃ 升至 26℃,酒精度也逐渐增加,26℃ 达到最大值(11.42% vol),感官评分也最高。当主发酵温度继续升高时,酒精度逐渐降低,说明温度过高不利于酵母菌产酒精,且过快的发酵速度难以形成良好的果酒风味^[7]。

由图 4-C 可知,当 PY01 菌株的接种量为 7% 时,酒精度最高,达到 11.28% vol,感官评分也维持在较高水平。继续增加接种量,酒精度反而下降,说明过高的酵母量不利于酒精的发酵,这可能是由于当酵母量过高,用于酵母自身生长的糖类等营养物质增多,而用于酒精发酵的营养物质减少;若接种量过大,果酒浑浊、有酵母的味道,发苦,风味与品质会严重下降^[37-38]。

2.7.2 响应面优化结果分析 利用 Design Expert 8.0.6 软件对因素水平进行二次多元回归分析,各试验影响因子初始 pH 值(X_1)、主发酵温度(X_2)、酵母接种量(X_3)对酒精度(Y)的影响可用回归方程表示: Y



注: M 为 Marker, 1 为 PY01。

Note: M is Marker and 1 is PY01.

图 3 PY01 菌株 26S rDNA D1/D2 区序列扩增电泳图

Fig.3 Electrophoresis pattern of 26S rDNA D1/D2 sequence amplification of PY01 strain

$$= 12.38 - 0.44X_1 - 0.19X_2 - 0.72X_3 + 0.35X_1X_3 + 0.19X_2X_3 - 1.54X_1^2 - 1.49X_2^2 - 1.05X_3^2。$$

由表 7 可知,该模型的 F 值为 72.96, $P < 0.0001$, 说明该模型是极显著的,且失拟项 $P = 0.1068 > 0.05$, 不显著,表明该模型对因素水平进行了很好的拟合,试验误差小。一次项 X_1 与 X_3 对酒精度的影响极显著 ($P < 0.01$), X_2 对酒精度的影响显著 ($P < 0.05$), 根据 F 值可知各因素对酒精度的影响依次为: 酵母接种量 (X_3) > 初始 pH 值 (X_1) > 主发酵温度 (X_2)。二次项只有 X_1X_3 对酒精度的影响显著。

通过模型得到理论最优发酵条件为: 初始 pH 值 3.91, 主发酵温度 25.82℃, 酵母接种量 6.23%, 预测发酵后的酒精度为 12.57% vol。为验证该模型的准确性,按照修正后的操作条件: 初始 pH 值 3.9, 主发酵温度 26℃, 酵母接种量 6.2%, 平行进行 3 次验证试验, 得到水蜜桃酒酒精度为 12.51% vol, 与最优条件下预测值基本接近, 表明该模型模拟水蜜桃酒的发酵工艺准确可靠, 具有实用价值。

2.8 水蜜桃成品酒指标测定

酒精度、总糖、总酸、干浸出物、菌落总数、大肠菌

表 7 回归模型方差分析

Table 7 Regression model analysis of variance

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	平方差 Square difference	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	33.37	9	3.71	72.96	< 0.0001	**
X_1	1.56	1	1.56	30.65	0.0009	**
X_2	0.30	1	0.30	5.99	0.0443	*
X_3	4.16	1	4.16	81.90	< 0.0001	**
X_1X_2	0	1	0	0	1	
X_1X_3	0.50	1	0.50	9.78	0.0167	*
X_2X_3	0.15	1	0.15	2.99	0.1272	
X_1^2	10.01	1	10.01	197.09	< 0.0001	**
X_2^2	9.34	1	9.34	183.90	< 0.0001	**
X_3^2	4.62	1	4.62	90.88	< 0.0001	**
残差 Residual	0.36	7	0.051			
失拟项 Missing item	0.27	3	0.089	4	0.1068	
纯误差 Pure error	0.09	4	0.022			
总和 Sum	33.72	16				
		$R^2 = 0.9895$	$R^2_{Adj} = 0.9759$			

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: ** indicates extremely significant difference at 0.01 level. * indicates significant difference at 0.05 level.

群均属于 NY/T 1508-2017^[25] 中的检测指标项目。由表 8 可知,水蜜桃成品酒总糖含量为 6.71 g·L⁻¹, 根据标准规定^[25], 半干型果酒的总糖 (以葡萄糖计) 含量为 4.1 ~ 12.0 g·L⁻¹, 表明本研究酿造的水蜜桃酒为半干型果

酒。酒精度、总酸含量、干浸出物含量、菌落总数、大肠菌群数均符合 2017 版果酒行业标准^[25]。成品酒酒体颜色金黄, 澄清透明, 桃香浓郁, 酸甜适中, 口感醇厚, 具有桃酒应有的特征与风味, 感官评分为 95.0。

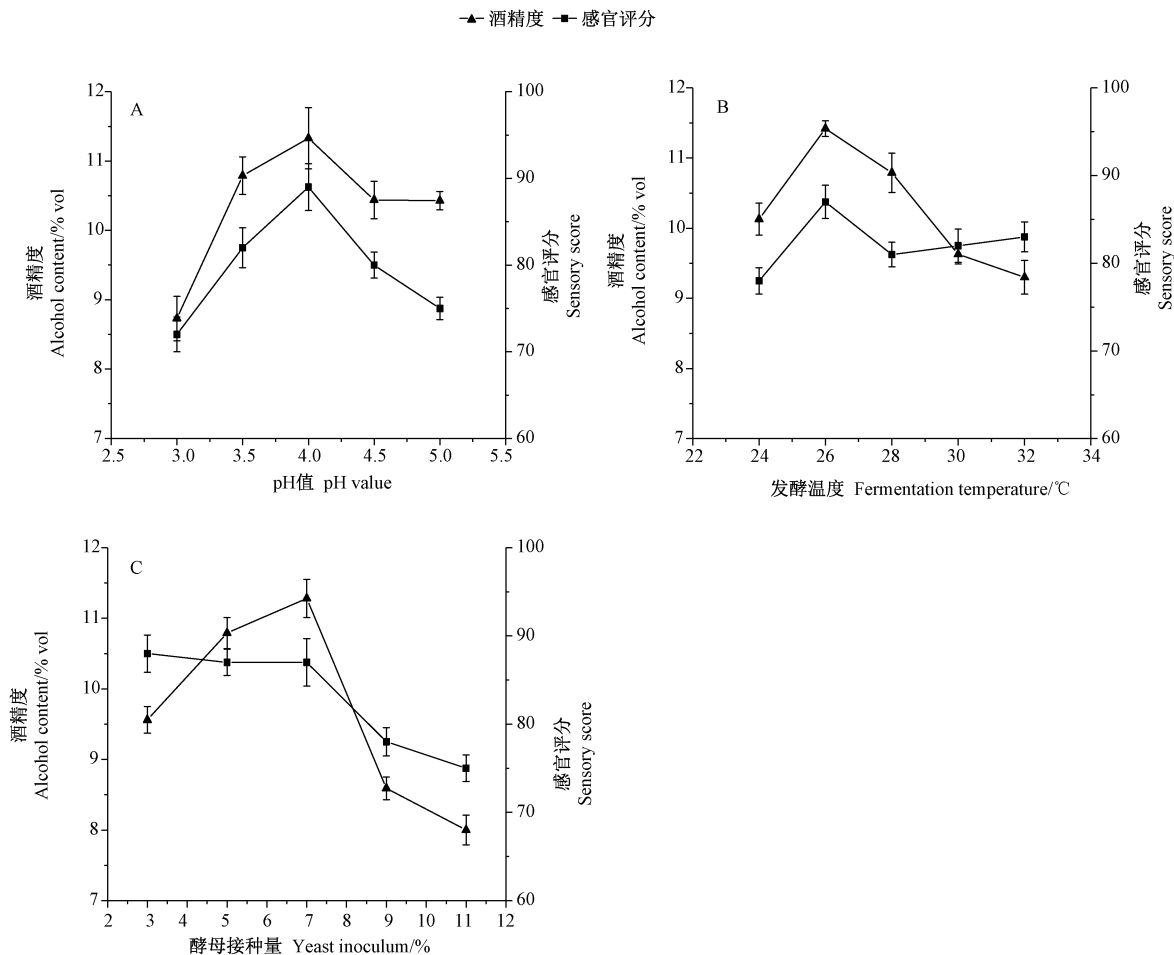


图4 初始 pH 值(A)、主发酵温度(B)、酵母接种量(C)对水蜜桃酒发酵的影响

Fig.4 Effect of initial pH value(A), main fermentation temperature (B) and yeast inoculum (C) on the fermentation of peach wine

表8 成品酒部分指标检测结果

Table 8 Test results of some indicators of finished wine

	酒精度 Alcohol content /% vol	总糖(以葡萄糖计) Total sugar (in terms of glucose) /(g·L ⁻¹)	总酸(以酒石酸计) Total acid (calculated as tartaric acid) /(g·L ⁻¹)	干浸出物 Dry extract /(g·L ⁻¹)	菌落总数 Total number of colonies /(CFU·mL ⁻¹)	大肠菌群数 Number of coliforms /(MPN·mL ⁻¹)	感官评分 Sensory score
检测值 Detected value	12.78±0.37	6.71±0.15	6.05±0.11	35.2±0.2	8.0±0.8	<3.0	95.0±2.1
标准值 Standard value	7~18	4.1~12.0(半干型)	4.0~9.0	≥12.0	≤50	≤3.0	-

3 讨论

本试验从水蜜桃自然发酵醪中分离筛选出适用于发酵水蜜桃酒的专用酵母菌株 PY01, 其耐受 12% vol 的酒精度, 可在 5 d 内使发酵液酒精度快速升至 12% vol 以上, 酿造的水蜜桃酒口感香甜、风味纯正。比较发现, 酵母菌发酵能力的优劣与其对酒精的耐受能力

相关, 目标菌株 PY01 发酵能力较强, 其对高浓度酒精的强耐受性可显著提高酒精产量, 是发酵工业特别是酒类生产中的重要特性^[21]。同时, PY01 菌株酿造水蜜桃酒主发酵周期短于蒋锡龙等^[13]和李泽霞等^[9]的研究结果, 其发酵速度快的特点在果酒的实际生产中可提高设备利用率, 节约生产成本^[39]。PY01 菌株酿造的水蜜桃酒风味纯正可能是因为该菌株筛选于水蜜桃自然发酵醪, 存在于原材料中的酵母菌经过长期选

择,已经适应了桃的品质与特征,通过一系列生物代谢过程可产生新的营养物质与风味成分。

本试验通过分子生物学技术对 PY01 菌株进行鉴定,其 26S rDNA D1/D2 区序列长度为 593 bp,通过 BLAST 比对,鉴定结果为酵母属酿酒酵母菌。这与张春芝等^[18]从不同菌落类型中筛选出具有代表性的 6 株酿酒酵母,其 26S rDNA D1/D2 PCR 扩增引物大小均为 500~700 bp 的研究结果较一致。酵母菌鉴定比较复杂,采用传统方法分类相当困难,通过分子手段鉴定准确性很高^[17]。

在目标菌株 PY01 的筛选中,可靠灵敏的筛选系统是关键。本试验首先根据各菌株细胞与菌落特征进行分离筛选;其次,采用 TTC 法与杜氏小管法检验菌株的发酵性能,受氢体 TTC 被醇脱氢酶还原后呈红色,反映酵母菌产酒精能力的大小^[19],用于酿酒用途的酵母菌至少要在 48 h 内发酵产气,反映起酵速度^[21];再用含不同酒精度的培养基筛选出耐酒精能力强的菌株;随后在实际酿造中对比不同菌株的发酵能力;最后利用 GC-MS 分析发酵液风味,进行感官评定,由此系统获得的目标菌株 PY01 具备果酒酿造的基本要求,能快速酿造香气浓郁、典型性好的水蜜桃酒。但本研究未对分离筛选出的 PY01 菌株利用诱变等手段进行改育,因此对利用该菌种发酵提高水蜜桃酒品质特征以及功能性成分尚有待进一步研究。

4 结论

本研究获得 1 株专用酵母菌 PY01 (*Saccharomyces cerevisiae* PY01) 可适用于快速酿造水蜜桃酒。通过响应面法优化,采用 PY01 酿酒酵母发酵水蜜桃酒最佳发酵工艺为:接种量 6.2%、初始糖度 22°Brix,初始 pH 值 3.9,主发酵温度 26℃,发酵时间 5 d。在此条件下酿造出的水蜜桃酒颜色金黄透明、桃香浓郁、口感醇厚,各项理化指标均符合 NY/T 1508-2017 绿色果酒行业新标准。本研究结果为水蜜桃酒产业化发展提供了优质的专用酵母菌与一定的工艺基础。

参考文献:

[1] 吕道坤,吴成德,江龙表,汪德英,吴大军. 奉化水蜜桃产业现状与发展策略[J]. 宁波农业科技, 2009(3):19-30

[2] 吴大军. 奉化水蜜桃的品牌打造之路[J]. 浙江林业, 2015(10):32-33

[3] 何晨,吉姆·哈迪,曾令文. 水蜜桃酒的酿造工艺研究[J]. 食品科技, 2017, 42(8):109-114

[4] 吴颢,荆红彭,陈晓明,刘明,张世杰,郭意如. 桃果酒的发酵

工艺研究[J]. 酿酒科技, 2017(4):88-91

[5] 江青优,丁六申,潘军,裘洁洁. 宁波市奉化水蜜桃产业面临的问题及对策[J]. 农村经济与科技, 2017, 28(1):151-152

[6] 康孟利,凌建刚,林旭东,俞静芬. 水蜜桃果酒开发前景探讨[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(24):22-23

[7] 康孟利,林旭东,凌建刚,俞静芬,朱麟. 干白水蜜桃酒发酵关键工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10):98-100

[8] Davidovic S M, Veljovic M S, Pantelic M M, Baosic R M, Natic M M, Dabic D C, Pecic S P, Vukosavljevic P V. Physicochemical, antioxidant and sensory properties of peach wine made from Redhaven cultivar[J]. Journal of Agricultural and Foodchemistry, 2013, 61(6):1357-1363

[9] 李泽霞,王新磊,胡铁功,王明远. 蜜桃酒酿造菌种的筛选[J]. 酿酒科技, 2017(9):44-47

[10] Nikolaou E, Soufleros E H, Bouloumpasi E, Tzanetakis N. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results [J]. Food Microbiol, 2006, 23(2):205-211

[11] Oliveira M E S, Pantoja L, Duarte W F, Collela C F, Valarelli L T, Schwan R F, Dias D R. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation [J]. Food Research International, 2011, 44(7):2391-2400

[12] Wei J P, Zhang Y X, Yuan Y H, Dai L, Yue T L. Characteristic fruit wine production via reciprocal selection of juice and non-*Saccharomyces species* [J]. Food Microbiology, 2019, 79:66-74

[13] 蒋锡龙,魏彦锋,孙玉霞,史红梅,董兴,李彦奎. 桃果酒酿酒酵母选育及酿造条件研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19):156-160

[14] 舒学香,周文,隋明. 猕猴桃果酒发酵专用酵母的筛选[J]. 江苏调味副食品, 2018(2):9-10

[15] 赵光全,向泽攀,胡文艺,罗鸿. 我国果酒酿造工艺现状及发展趋势[J]. 农产品加工, 2018(1):68-69

[16] Takush D G, Osborne J P. Impact of yeast on the aroma and flavour of Oregon Pinot Noir wine [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2012, 18(2):131-137

[17] 王志恒,冯翠娥,王冲,罗慧,邹芳,刘雅琴,魏玉清. 宁夏玉泉营地区酿酒葡萄酒酵母菌的分离筛选及分子鉴定[J]. 中国酿造, 2018, 37(1):112-115

[18] 张春芝,莫寅斌,江志国,章洋. 宁夏甜瓜酒优良酵母菌的筛选及鉴定[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(4):163-167

[19] 王梅,张彭湃,帅桂兰. TTC 在黄酒精母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001(5):62-64

[20] 李艳,萧永坚,罗格罗. 青梅果酒酵母的筛选与发酵工艺优化[J]. 酿酒科技, 2016(2):65-71

[21] 郝瑶,王陶,李文,李同祥,袁航. 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

[22] 白梦洋,吴祖芳,李若云,翁佩芳,张鑫. 混合培养条件下酿酒酵母菌与毕赤酵母菌的相互影响[J]. 食品科学, 2017, 38(12):9-14

[23] 王毓宁,李鹏霞,胡花丽,李志强,赵延存,孙娅,康军凯. 水蜜桃果酒生产工艺研究[J]. 酿酒, 2012, 39(4):76-77

[24] Plotka-Wasylyka J, Simeonov V, Namiesnik J. Characterization of

- home-made and regional fruit wines by evaluation of correlation between selected chemical parameters [J]. *Microchemical Journal*, 2018, 140:66-73
- [25] 中国绿色食品发展中心. NY/T 1508-2017 绿色食品 果酒[S]. 北京:中国标准出版社, 2017
- [26] 刘忠义, 欧昌荣, 汤海青, 曹锦轩, 殷居易. 3, 5-二硝基水杨酸法测定葡萄酒中总糖含量的条件优化[J]. *核农学报*, 2013, 27(11): 1717-1723
- [27] 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
- [28] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2016
- [29] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S]. 北京:中国标准出版社, 2016
- [30] 张文文, 翁佩芳, 吴祖芳. 东方伊萨酵母和酿酒酵母混合发酵杨梅酒的发酵效率及风味特征分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(18): 144-151
- [31] 李志宇, 都振江, 王俊芳, 张将, 刘洪勇, 王世平, 王恒振. 摘叶对赤霞珠葡萄及所酿葡萄酒品质的影响[J]. *核农学报*, 2018, 32(11): 2178-2186
- [32] 王媛, 祝霞, 杨学山, 黎洁, 任超, 秦丽, 韩舜愈. 混菌发酵对美乐低醇桃红葡萄酒香气的影响[J]. *核农学报*, 2018, 32(11):2195-2207
- [33] 李蕊蕊, 赵新节, 原苗苗, 姜凯凯, 孙玉霞. 加热处理对蜂蜜酒香气物质的影响[J]. *核农学报*, 2019, 33(3):545-554
- [34] Reddy L V A, Reddy O V S. Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2011, 89(4):487-491
- [35] Longo R, Blackman J W, Antalick G, Torley P J, Rogiers S Y, Schmidtke L M. A comparative study of partial dealcoholisation versus early harvest: Effects on wine volatile and sensory profiles [J]. *Food Chemistry*, 2018, 261:21-29
- [36] Čakara U, Grozdanič B, Pejinc B, Vasič V, Čakara M, Petrović A, Djordjević B. Impact of vinification procedure on fruit wine inhibitory activity against α -glucosidase [J]. *Food Bioscience*, 2018, 25:1-7
- [37] 杨玉霞, 康超, 段振华, 朱香滢, 李定金. 响应面法优化百香果酒发酵工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(8):167-189
- [38] 魏玉洁, 邹弯, 王威, 张亚南, 王德良, 武运, 薛洁. 新疆地产葡萄酒优良酿酒酵母菌的筛选[J]. *酿酒科技*, 2016(5):42-47
- [39] 赵晓莉, 周广麒, 梁颖, 倪静洁, 刘潇婷, 张妍. 快速酿造葡萄酒酵母的筛选[J]. *大连轻工业学院学报*, 2005(2):132-134

Screening, Identification and Optimization of Fermentation Conditions of Yeast Strains for Rapid Brewing of Honey Peach Wines

LIU Qinyuan WU Zufang* WENG Peifang

(College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315800)

Abstract: In order to obtain a special yeast strain that can quickly brew high-quality peach wines, the spontaneous fermented mash of the peaches was used as the raw material. Preliminary screening of strains by TTC chromogenic method and Durham tube method was conducted. Third-stage re-screening of strains through analysis of alcohol tolerance, fermentation speed and wine production capacity, flavor and sensory of fermentation liquor were also carried out, and *Saccharomyces cerevisiae* PY01 with high quality and efficiency was obtain. Response surface optimization was used to optimize the brewing process, in which, the initial pH value, main fermentation temperature and yeast inoculation amount were chosen as the influencing factors, and the alcohol content as the response value. The results showed that the optimum fermentation parameters for PY01 strain fermented peach wines were determined as follows, the initial pH 3.9, the fermentation temperature 26°C and the yeast inoculum 6.2%. Under the optimized process conditions, alcohol yield of the peach fermented wines was 12.78% vol, the total sugar content was 6.17 g·L⁻¹. This is a semi-dry peach fermented wine with a pure flavor and a mellow taste. This study provided references for strain selection and processing optimization for industrial production of the peach wines.

Keywords: peach wines, *Saccharomyces cerevisiae*, screening, flavor analysis, response surface