

山乌柏蜂蜜酒酿造酵母的筛选、鉴定及应用

史莹 张丽珍 曾志将 王子龙 颜伟玉*

(江西农业大学蜜蜂研究所 南昌 330045)

摘要 目的:从天然蜂蜜中筛选1株适合山乌柏蜂蜜酒酿造的酵母,采用分子生物学方法进行鉴定,同时分析蜂蜜酒香味成分。方法:以自然发酵的陈旧蜂蜜酵母菌进行富集培养和划线分离,通过镜检、杜氏管发酵法进行初筛,通过产酒精能力、耐性能力、发酵力测试以及凝聚性比较进行复筛。通过26S rDNA D1/D2区序列测定、系统发育分析,对所筛选的酵母菌进行分子生物学鉴定,并采用气相色谱-质谱法分析山乌柏蜂蜜酒香味成分。结果:从自然发酵的蜂蜜中分离出39株酵母菌,通过复筛得到1株适合山乌柏蜂蜜酿酒的优良酵母S2。该酵母菌在30%(质量分数)糖,20%(体积分数)酒精,200 mg/L NaHSO₃, pH 4.0条件下发酵7 d,可产酒精13.12%(体积百分数),且酒香浓郁。该酵母菌与季也蒙毕赤酵母(EU177574)和毕赤酵母(FN398021)的遗传距离最近,相似性均为99%。从山乌柏蜂蜜酒中鉴定出55种香味化合物,占总香味成分的97.74%。结论:所筛选的酵母菌S2(JX233487)最适合山乌柏蜂蜜的酿造,该菌株被鉴定为毕赤酵母属。山乌柏蜂蜜酒中的香味成分主要是醇类和酯类。

关键词 乌柏蜂蜜酒; 酵母; 分离; 鉴定; 香味分析
文章编号 1009-7848(2013)10-0197-08

山乌柏(*Sapium discolor*)又名野乌柏、山柳、山杠、红心乌柏,属于大戟科,广泛分布于我国热带和亚热带地区,是我国南方各省的主要蜜源植物之一^[1],在山区分布众多。山乌柏蜂蜜呈浅琥珀色,具有轻微的酸气味,润喉性差,结晶粒粗^[2]。虽然山乌柏蜂蜜产量较大,但产品销售情况不佳。将山乌柏蜂蜜酿造成酒,可以增加养蜂者的收入,促进养蜂业的发展。蜂蜜酒是由蜂蜜经水或是果汁稀释后发酵而成,被认为是人类酿造的第一种酒精饮料,约有1万年的历史^[3]。我国的蜂蜜酒研究始于20世纪80年代。黄书青等最早对几种蜂蜜的酿酒效果进行了比较^[4]。近年来有关蜂蜜酒的研究也较多,主要是针对蜂蜜酒的发酵菌株和发酵工艺^[5-7]。

作者之前对山乌柏蜂蜜酒的酿造酵母和工艺进行了研究,结果发现黄酒酵母较适用于山乌

柏蜂蜜酒的酿制,但在驯化过程中酿酒酵母菌株的优良性状可能部分丧失,从而影响发酵产品的质量^[8]。本实验中对天然蜂蜜中分离到的39株酵母进行筛选,以期得到1株发酵力强,耐高渗,耐酒精,产酒率高并适合发酵乌柏蜜酒的酵母菌株,确定其种属地位,分析山乌柏蜂蜜酒香味成分,旨在为山乌柏蜂蜜深加工奠定基础。

1 材料

1.1 菌种

菌株分离源:放置数年的乌柏蜜、洋槐蜜、荆条蜜、荷树蜜、荔枝蜜、荞麦蜜、紫云英蜜、枣花蜜、雪脂莲蜜、益母草蜜、野菊花蜜、枸杞蜜、黄芪蜜、党参蜜、土黄连蜜、野桂花蜜(购买后经常规理化指标分析,符合蜂蜜国家标准 GB 18796-2005)。对照菌株(CK):湖北安琪酵母有限公司葡萄酒活性干酵母。

1.2 培养基

沙堡弱培养基:蛋白胨 1 g,琼脂 2.5 g,蒸馏水 100 mL,葡萄糖 4 g,煮沸溶解,高压 115 ℃ 20 min。麦芽汁液体培养基:氯霉素 0.1 g,麦芽膏粉 130 g,最终 pH 6.0,1 L 水溶解。麦芽汁琼脂培养

收稿日期:2012-10-19

资助项目:江西省教育厅项目(GJJ11406);国家现代蜂产业技术体系(No.CARS-45)

作者简介:史莹,女,1986年出生,硕士生

通讯作者:颜伟玉

基:氯霉素 0.1 g, 麦芽膏粉 130 g, 最终 pH 6.0, 琼脂 15 g, 1 L 水溶解, 灭菌备用。山乌柏蜂蜜(糖度 25°Bx, pH 4.0)。

1.3 主要试剂

引物 NL-1 和 NL-4 由 Invitrogen 公司合成。生理盐水、无水酒精、偏重亚硫酸、醋酸、柠檬酸、NaOH、邻苯二甲酸氢钾、酚酞、EDTA、氯仿等为分析纯试剂。酵母基因组 DNA 提取试剂盒、Taq 酶、dNTP 等购于 TaKaRa 公司。

1.4 主要仪器与设备

凝胶成像仪(Fine-doX3)、PCR 扩增仪(ependorf)、电泳仪, 北京六一仪器厂; SPME 装置, 美国 Supelco; PDM 萃取头, 美国 Supelco; Trace MS 联用仪, 美国 Thermo Finnigan; 电子天平、紫外-可见分光光度计、显微镜、手持测糖仪、精密 pH 计、酒精密度瓶; 离心机、培养箱、超净工作台、生化培养箱、恒温干燥箱、恒温水浴锅、立式压力蒸汽灭菌器、恒温摇床等。

2 方法

2.1 酵母菌分离纯化

取自然发酵的山乌柏蜂蜜发酵液 1 mL, 梯度稀释至 10^{-7} 。选择 10^{-3} ~ 10^{-4} 稀释度, 取稀释的 50 μ L 菌液涂布于麦芽汁培养基和沙氏培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 待长出菌落, 挑选整齐的单菌落, 将单菌落划线分离 2~3 次, 直至菌落形态和菌体形态基本一致, 经显微镜检验为纯种后转于麦芽汁琼脂斜面, 4 $^{\circ}$ C 保存^[9]。菌种用阿拉伯数字 S1, S2, S3, S4... 依次编号。

2.2 酵母菌的初筛

取 10 mL 糖度为 10°Brix 的麦芽汁液体培养基, 灭菌, 冷却后接种 8% 酵母菌, 比较酵母菌在杜氏管中的产气情况, 筛选产气量大, 起酵时间在 48 h 内的酵母菌株。记录发酵时间和产气情况, 重复 3 次。活化条件: 10°Brix 麦芽汁液体培养基 28 $^{\circ}$ C 震荡 10 h, 接种量 8%; 发酵条件: 13°Brix 麦芽汁 28 $^{\circ}$ C 静置发酵 48 h^[10]。

2.3 酵母菌的复筛

2.3.1 高渗耐受性 采用杜氏发酵管法测定酵母菌耐高渗能力。将分离菌接种到 40% 乌柏蜜试管中, 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h。在 660 nm 处测定 OD 值。试管

连续培养, 观察泡沫产生情况。根据气体产生的速度和产气量, 比较不同酵母菌株的耐高渗能力。

2.3.2 酒精耐受性 从实际生产而言, 要想采用直接发酵法生产出酒精度较高, 品味良好的蜂蜜酒, 一般要将酵母菌直接置于 25%~30% 的蜜汁中培养^[11-12]。酵母发酵能力在很大程度上取决于它对酒精耐受力的大小^[13]。本实验中采用 30% 蜂蜜、20% 酒精环境下筛选酵母菌。

取已灭菌的试管数支, 以无菌操作将酵母菌接入体积分数为 20% 乙醇和无菌麦芽汁培养基中, 摇匀, 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 然后在 660 nm 处测 OD 值, 同时观察气泡产生的情况。

2.3.3 pH 耐受性 耐酸酵母是指在 pH ≤ 4 的环境下, 可以生长或代谢的酵母^[14-15]。本试验中采用 pH 4.0 的环境培育筛选酵母菌。将分离菌接种到 pH 4.0 的麦芽汁液体培养基中, 培养 24 h, 在 660 nm 处测 OD 值, 观察气泡产生情况。

2.3.4 SO₂ 耐受性 采用添加 200 mg/L NaHSO₃ 的方法, 比较 OD 值和产气时间。将酵母菌接入含 200 mg/L NaHSO₃ 的麦芽汁培养基中, 在相同条件下培养, 于 660 nm 处测 OD 值。同时观察杜氏管中的气泡产生情况(产气时间和产气量), 筛选所需酿造菌株。

2.3.5 发酵性能的测定 将山乌柏蜜起始糖度调整为 25%, 75 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min, 冷到 28 $^{\circ}$ C 左右, 加入 0.15% 阿米诺酶, 分别接入 5 种活化的优良菌种(S2, S11, S21, S33, S37) 和 0.2% 葡萄酒活性干酵母(CK), 28 $^{\circ}$ C, 发酵 7 d, 测定蜂蜜酒的酒精度、残糖、酸度和总酯等理化指标。

酒精度的测定: 密度瓶法^[16]; pH 值的测定: 采用 pH 计法; 总糖的测定: 手持测糖仪; 酸度的测定: 滴定中和法^[17]; 总酯的测定: 蒸馏皂化法^[18]。

葡萄酒活性干酵母的复水活化: 取干酵母, 按 1:20 的比例投放于 2% 蔗糖水溶液中, 调制成乳液, 在 36~40 $^{\circ}$ C 水浴中活化 30 min, 摇匀备用。

2.4 酵母菌发酵力测试

采用 CO₂ 失重法^[19-20], 将活化好的优选酵母菌液和 CK 菌液接入已灭菌的麦芽汁培养基中, 接种完毕, 称重发酵瓶, 28 $^{\circ}$ C 培养, 连续发酵 12 d, 然后每天称重 1 次。称重前先摇晃瓶子, 除去二氧化碳。以产生 CO₂ 的量(发酵瓶失重)为纵坐标, 发酵

时间为横坐标,绘制发酵速率曲线。

2.5 凝聚性测定

将活化好的菌株和CK分别接种于麦芽汁液体培养基中,28℃培养5d。取培养液置离心管中,3500 r/min离心15 min,收集酵母细胞。用无菌水洗涤2~3次,取酵母泥1g,放入15 mL离心管中,加入10 mL pH 4.5的醋酸缓冲溶液,摇匀,使其成悬浮状态,20℃水浴中静置20 min。将此悬浮液连续摇动5 min,让酵母重新悬浮,再静置,记录10 min时沉淀酵母的容积,即酵母细胞沉淀的体积,本斯值。凝聚性强弱依据本斯值来确定^[21]。

2.6 山乌柏蜂蜜酒酵母菌的分子生物学鉴定

为进一步确定优良酵母的种属地位,从酵母菌初筛、复筛的实验结果中挑选1株代谢旺盛的供试酵母菌,用无菌水洗涤。用酵母基因组DNA试剂盒提取酵母的DNA。以扩增酵母菌26S rDNA序列的通用引物设计PCR扩增引物,上游引物5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3',下游引物5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'。PCR反应体系25 μL,其中10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTP 2.0 μL,10 μmol/L上、下游引物各0.5 μL,酵母基因组DNA 1.0 μL,Tag DNA聚合酶0.5 μL,其余为ddH₂O。反应条件:94℃变性3 min;94℃变性50 s,55℃复性50 s,72℃延伸1.5 min,共30个循环;72℃延伸10 min。扩增产物与PGEM easy-T载体连接(美国Promega),阳性克隆经酶切鉴定后在Invitrogen公司测序。所得序列

用Blast软件与GeneBank中的其它酵母菌26S rDNA序列进行比对,找出与其相似性最高的序列及酵母菌种类,用MEGA 4.0软件采用邻近法(Neighbor-Jointing)进行系统进化树的构建与分析^[22]。

2.7 山乌柏蜂蜜酒香味成分的GC-MS分析

2.7.1 山乌柏蜂蜜酒的制备 将山乌柏蜜调整为起始糖度25%,接种量8%,0.15%阿米诺酶,pH 4.0,28℃恒温,发酵7d,澄清后备用。

2.7.2 山乌柏蜂蜜酒香气成分分析 采用固相微萃取技术提取香气成分。量取8 mL山乌柏蜂蜜酒样品,加入15 mL的顶空瓶中,40℃水浴下插入萃取头,吸附30 min,取出萃取头,将其插入GC进样口,250℃条件下解吸30 min,用于GC-MS分析。

气相色谱条件:色谱柱PEG,30 m×0.25 mm×0.25 μm;程序升温,40℃保持4 min,6℃/min升至90℃,10℃/min升温至230℃,保持5 min;载气He,流速0.80 mL/min,不分流。质谱条件:EI电离源,电子能量70 eV,离子源温度200℃。

3 结果与分析

3.1 蜂蜜酵母菌的分离纯化

选择分离较好的稀释度平板,初步分离到39株酵母菌(见表1)。通过沙氏培养基得到酵母22株,占筛选总菌数的56.41%。由麦芽汁培养基培养的酵母17株,占43.59%。

表1 酵母菌的分离

Table 1 Isolation of yeast strains

| 培养基 | 颜色 | 细胞形状 | 生殖特征 | 菌株数 |
|--------|-----|------|--------|-----|
| 沙氏培养基 | 白色 | 椭圆形 | 两端出芽 | 8 |
| | 乳白色 | 椭圆形 | 单、多端出芽 | 9 |
| | 淡黄色 | 圆形 | 两端出芽 | 5 |
| 麦芽汁培养基 | 乳白色 | 圆形 | 多端出芽 | 9 |
| | 白色 | 卵圆形 | 两端出芽 | 3 |
| | 淡黄色 | 椭圆形 | 单、多端出芽 | 3 |
| | 黄色 | 椭圆形 | 两端出芽 | 2 |

3.2 分离菌的初筛

以起酵时间为指标。从分离的39株酵母菌中

筛选出起酵时间在24 h以内的酵母菌。将分离菌28℃发酵48 h,用杜氏管检测,结果有5株分离菌

产气充满杜氏管,说明这些酵母菌起酵能力较强,有较好的发酵力和发酵度。筛选菌产气情况见表2。

表2 酵母菌起酵时间

Table 2 Ferment time of yeast strains

| 起酵时间/h | 产气情况 | 菌株数 |
|--------|------|-----|
| 24 | + | 3 |
| 24 | ++ | 4 |
| 24 | +++ | 2 |
| 48 | + | 4 |
| 48 | ++ | 7 |
| 48 | +++ | 3 |

注:“+”产气量为杜氏小管体积的1/3;“++”产气量为杜氏小管体积的2/3;“+++”产气量为杜氏小管满体积。

3.3 分离菌的复筛

3.3.1 耐受力 分离菌的耐性实验结果见表3。发酵24 h后,酵母S2具有良好的耐性。S11在30%糖含量的山乌柏蜂蜜稀释液培养环境下,产气量为杜氏小管体积的2/3;S21在20%酒精,200 mg/L NaHSO₃条件下,产气量为杜氏小管体积的2/3;S33在30%糖含量的蜂蜜溶液、pH 4.0条件下,产气量为杜氏小管体积的2/3;S37在200 mg/L NaHSO₃培养实验中,产气量为杜氏小管体积的2/3。经综合分析,S2适合山乌柏蜂蜜酒耐性需求。

表3 分离菌耐性测定结果

Table 3 Tolerance results of yeast strains

| 菌株 | 耐高渗 | 耐酒精 | 耐SO ₂ | 耐pH值 |
|-----|-----|-----|------------------|------|
| S2 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| S11 | ++ | +++ | +++ | +++ |
| S21 | +++ | ++ | ++ | +++ |
| S33 | ++ | +++ | +++ | ++ |
| S37 | +++ | +++ | ++ | +++ |

注:“+”产气量为杜氏小管体积的1/3;“++”产气量为杜氏小管体积的2/3;“+++”产气量为杜氏小管满体积。

3.3.2 发酵性能的测定 将分离的优选菌发酵7d,其常规指标测定结果见表4。S11酵母发酵液残糖高;S33酵母发酵液酒精度低,残糖高,酸度较高,总脂低;S21酵母发酵液残糖低,总酯低;S37酵母发酵液酒精度高,残糖低,总酯较高;S2发酵7d后酒精度最高达13.12%,酯含量最高达

2.3%,其酸度最低。与葡萄酒活性干酵母(CK)相比,S2产酒高,酸度低,总酯高,残糖低。可见葡萄酒酵母利用较多的糖来生长繁殖,而不是转化为酒精,从而降低了酒精转化率。其他4种酵母的酒精度均低于葡萄酒活性干酵母。最终选择S2酵母作为生产乌柏蜂蜜酒的菌种。

表4 不同酵母菌对山乌柏蜂蜜酒发酵的影响

Table 4 Effects of different yeast for *Sapium discolor* mead fermentation

| 菌株 | 酒精度 (体积分数)/% | 残糖/% | 酸度/% | 总酯/% |
|-----|-----------------|------|-------|------|
| S2 | 13.12 | 9.0 | 0.053 | 2.30 |
| S11 | 11.50 | 10.0 | 0.056 | 1.84 |
| S21 | 11.97 | 9.0 | 0.057 | 1.53 |
| S33 | 9.35 | 11.5 | 0.058 | 1.22 |
| S37 | 12.66 | 9.0 | 0.059 | 1.92 |
| CK | 12.73 | 9.6 | 0.059 | 1.84 |

3.4 发酵力测试

发酵力是在一定时间内,酵母对可发酵性糖的利用能力,是酵母主要的性能之一^[20]。由图1可知,S2发酵力强,发酵12 d,发酵力达11.761 g。发酵旺盛期是前4 d,第4天发酵力最高达2.772 g。对照葡萄酒活性干酵母的发酵力是10.289 g。

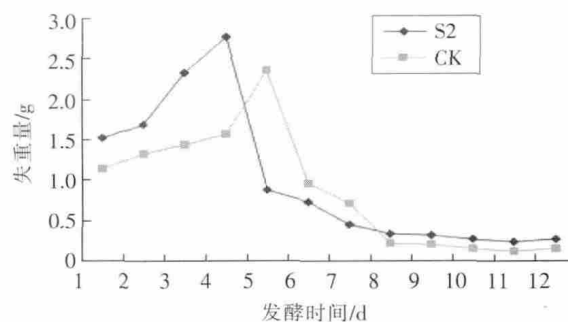


图1 酵母菌S2发酵力曲线图

Fig.1 The fermentation capacity curve of yeast S2

3.5 凝聚性测定

研究表明,酵母的凝聚性能对蜂蜜酒酿造十分重要。凝聚性适中的酵母不仅有利于优化生产工艺,而且能改善酒风味。在酿造过程中,如果凝聚性太强就可能产生较早的沉降,从而影响发酵

度。若搅拌则会增加动力消耗,影响产品风味^[20]。凝聚性也是酵母菌选种的一项重要指标。酵母菌 S2 凝聚性测定结果见表 5。S2 的凝聚性较高,略高于葡萄酒活性干酵母,有利于山乌柏蜂蜜酒的澄清和沉淀,节约成本。

3.6 酵母菌的分子鉴定

使用引物 NL-1 和 NL-4 对 S2 酵母的 26S RdnaD1/D2 基因序列进行扩增,其测序结果如下:

```

1   GGTCCGTGTT TCAAGACGGG CGGTTTGGGA TCATTATGCC AGCATCCTTG
51  ATAAAATCGC AGTCCTCGGT CTAGGCAGGC AGCATCAACG CAGGCTATAA
101 CACTTCACCG AAGTAAAGTC ACATTCTAC GCCATTATCC TACCGCCCAA
151 ACCGATGCTG GCCCGATAAG CTGCGGGTCA CCCC GCCACG AAGGCAAGGC
201 TCACAAAATA TCGAGTCTGA TCTCAAACCC TTCCTTTTCG ACAATTTTAC
251 GTACTTTTTT ACTCTTTTTT CAAAGTTCTT TTCATCTTTC CATCACTGTA
301 CTTGTTTCGCT ATCGGTCTCT CGCCAATATT TAGCTTTAGA TGAATTTAC
351 CACCCACTTA GAGCTGCATT CCCAAACAAC TCGACTCTTC GAAAGCACCT
401 TACATAGAATT GGGCATCTCA TCGCACGGGA TTCTCACCCCT CTGTGACGTC
451 CTGTTCCAAG AAACATAGAC AAGAGCCAAC CCCAAGGTTA CAATCTTCAA
501 ATTACAATC GGACACCGAA GGCGCCAGAT TTCAAATTTG AGCTTTTGCC
551 GCTTCACTCG CCGCTACTAA GGCAATCCCT GTTGGTTTCT TTTCTCCGC
601 TTATTGATAT GCA
    
```

将所获菌株的 26S rDNA ITS 序列(GenBank 登录号 JX233487)与 NCBI 中相似性较高的几株酵母菌的 26S rDNA ITS 序列进行比对,酵母菌 S2 与已报道的季也蒙毕赤酵母(*Pichia-guilliermondii*)(EU177574)的亲缘关系最近,两者的 26S

表 5 酵母菌凝聚性能测定结果
Table 5 The flocculability detection results in Microzyme

| 酵母 | 本斯值/mL | 凝聚性 |
|----|--------|-----|
| S2 | 1.8 | 较强 |
| CK | 1.6 | 较强 |

注:本斯值大于 2 mL 为凝聚性强,小于 0.5 mL 为凝聚性弱^[11]。

rDNA 相似性为 99%;与已发表的毕赤酵母(*Pichia*)(FN398021)的 26S rDNA 相似性也为 99%。据此可认为 S2 菌株属于酵母属的毕赤酵母属(*Pichia*)。用 Mega 4.0 软件构建系统进化树,如图 2 所示。

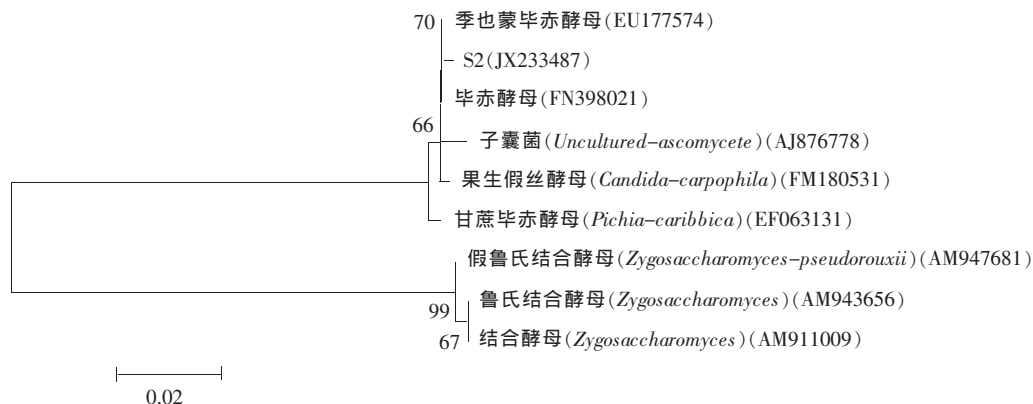


图 2 不同酵母菌株的 26S rDNA 系统发育进化树

Fig.2 The phylogenetic tree for 26S rDNA System of different yeast strains

3.7 山乌柏蜂蜜酒香味成分的GC-MS分析

山乌柏蜂蜜酒主要香味成分的GC-MS分析总离子流图见图3。共检出65种香味成分物质,

这些香味物质的质谱图与NIST标准谱的匹配度均在80%以上。

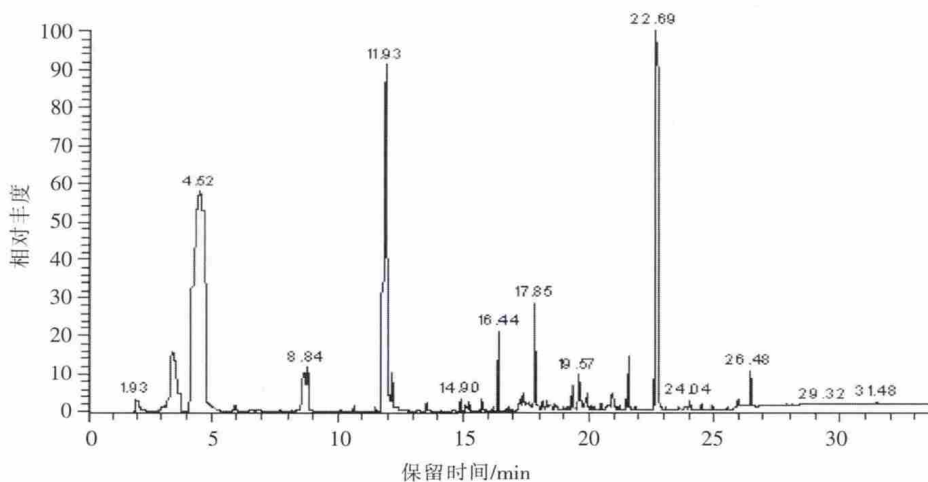


图3 山乌柏蜂蜜酒香味成分的GC-MS分析总离子流图

Fig.3 GC/MS total ion chromatogram of aroma components in *Sapium discolor* honey mead

表6列出检出的山乌柏蜂蜜酒中的香味成分。其中检出保留时间及峰面积的有61种,确定化合物成分的55种,其含量占挥发性成分的97.74%,包括醇类化合物21种,占22.83%;酯类化合物17种,占14.88%;醛类化合物4种,占2.32%;烃类化合物5种,占0.92%;酚类化合物4

种,占0.79%;酮类化合物2种,占0.37%;酸类化合物1种,占0.07%。超过1%保留峰面积的主要香气成分9种,占总体香气成分的89.01%,主要为乙醇(41.93%)、异戊醇(21.37%)、苯乙醇(8.86%)、乙酸乙酯(7.97%)、异丁醇(3.22%)、苯甲醛(1.87%)、乙酸异戊酯(1.48%)和辛酸乙酯(1.27%)。

表6 山乌柏蜂蜜酒香味成分

Table 6 Aroma components of *Sapium discolor* mead

| 序号 | 时间/min | 香味成分 | 相对含量/% | 序号 | 时间/min | 香味成分 | 相对含量/% |
|----|--------|-----------|--------|----|--------|---------------|--------|
| 1 | 11.93 | 异戊醇 | 21.37 | 28 | 8.84 | 乙酸异戊酯 | 1.48 |
| 2 | 4.51 | 乙醇 | 41.93 | 29 | 10.44 | 丙烯酸丁酯 | 0.13 |
| 3 | 6.86 | 丙醇 | 0.15 | 30 | 11.81 | 丙酸异戊酯 | 0.1 |
| 4 | 8.68 | 异丁醇 | 3.22 | 31 | 12.18 | 己酸乙酯 | 1.04 |
| 5 | 10.17 | 丁醇 | 0.07 | 32 | 13.22 | 2-羧基丙酸乙酯 | 0.09 |
| 6 | 22.69 | 苯乙醇 | 8.86 | 33 | 14.9 | 乳酸乙酯 | 0.24 |
| 7 | 16.87 | 庚醇 | 0.21 | 34 | 16.44 | 辛酸乙酯 | 1.27 |
| 8 | 17.11 | 氧化芳樟醇 | 0.34 | 36 | 17.78 | 2-羟基-4-甲基戊酸乙酯 | 0.22 |
| 9 | 17.38 | 2-乙基-1-己醇 | 0.34 | 37 | 19.38 | 癸酸乙酯 | 0.35 |
| 10 | 14.1 | 4-戊烯-1-醇 | 0.01 | 38 | 19.89 | 丁二酸二乙酯 | 0.24 |
| 11 | 19.69 | 壬醇 | 0.22 | 39 | 21.45 | 4-羟基丁酸乙酯 | 0.17 |
| 12 | 20.19 | 萜品醇 | 0.06 | 40 | 21.6 | 对乙基苯甲酸苯乙酯 | 0.88 |
| 13 | 20.46 | 甲硫基丙醇 | 0.13 | 41 | 17.85 | 苯甲醛 | 1.87 |
| 14 | 20.97 | 香茅醇 | 0.36 | 42 | 24.04 | 肉桂醛 | 0.24 |
| 15 | 21.51 | 异香叶醇 | 0.27 | 43 | 15.72 | 壬醛 | 0.2 |

(续表6)

| 序号 | 时间/min | 香味成分 | 相对含量/% | 序号 | 时间/min | 香味成分 | 相对含量/% |
|----|--------|-----------|--------|----|--------|------------------|--------|
| 16 | 18.15 | 芳樟醇 | 0.24 | 44 | 7.73 | 己醛 | 0.01 |
| 17 | 18.36 | 辛醇 | 0.15 | 45 | 17.94 | 2H-2-甲基-3[2H]-噻酮 | 0.12 |
| 18 | 18.64 | 2,3-丁二醇 | 0.09 | 46 | 13.6 | 3-羟基-2-丁酮 | 0.25 |
| 19 | 23.91 | 橙花醇 | 0.09 | 47 | 24.51 | 2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 | 0.11 |
| 20 | 26.11 | 2,3-二氢法尼醇 | 0.11 | 48 | 23.61 | 苯酚 | 0.08 |
| 21 | 24.88 | 柏木脑 | 0.1 | 49 | 26.34 | 对特丁基苯酚 | 0.09 |
| 22 | 15.12 | 己醇 | 0.07 | 50 | 26.48 | 2,4-二特丁基苯酚 | 0.51 |
| 23 | 3.41 | 乙酸乙酯 | 7.97 | 51 | 16.21 | 四甲苯 | 0.14 |
| 24 | 5.93 | 乙酸异丁酯 | 0.3 | 52 | 15.2 | 1-乙基-2,3-二甲基苯 | 0.15 |
| 25 | 6.56 | 丁酸乙酯 | 0.1 | 53 | 17.47 | 4-甲基茛 | 0.17 |
| 26 | 7.53 | 乙酸丁酯 | 0.01 | 54 | 20.75 | 萘 | 0.06 |
| 27 | 25.98 | 棕榈酸乙酯 | 0.29 | 55 | 22.91 | 辛酸 | 0.07 |

4 结论与讨论

从陈旧蜂蜜中分离出 39 株酵母菌,通过镜检、杜氏管发酵法进行初筛,得到 5 株酵母菌。通过产酒精能力测、耐性能力、发酵力测试以及凝聚性比较,进行复筛,得到 1 株适合山乌柏蜂蜜酿酒的优良酵母 S2。采用 26S rDNA D1/D2 区序列分析,对优选的酵母菌株进行分子生物学鉴定,结果该酵母菌 S2 与季也蒙毕赤酵母 (*Pichia-guilliermondii*) (EU177574) 的遗传距离最近,两者的同源位 99%,经鉴定为毕赤酵母属 (*Pichia*)。

由实验分离筛选的酿酒酵母均来自自然发酵的蜂蜜,与葡萄酒活性干酵母相比,起酵时间较早,在工业生产上可大大缩短主发酵时间。在山乌柏蜂蜜起始糖度 25%,接种量 8%,0.15%阿米诺酶,pH 4.0,28℃条件下发酵 7 d,结果酒精度为 13.12%,残糖量为 9.0 g/L,达到国家标准(GB15037-2006 葡萄酒产酒精度 7.0 以上)的要求,所酿制的蜂蜜酒具有独特的蜂蜜和酒香味。

蜂蜜酒香气是评判酒品质的一个重要的感官指标。芳香物质是构成蜂蜜和蜂蜜酒的重要成分。通过 GC-MS 技术分析山乌柏蜂蜜酒香气成分,结果表明醇类和酯类含量最高,共鉴定出 55 种香味化合物,占总香气成分的 97.74%,包括酯类、醇类、醛类、烃类、酚类和酸类。其中酯类和醇类含量高,主要赋予山乌柏蜂蜜酒的酒香味。影响山乌柏蜂蜜酒香气形成的因素主要有:蜂蜜原料、菌种和发酵工艺条件等,其中工艺条件和菌种是影响山乌柏蜂蜜酒香气的决定因素。感官特征由香气成分的数量、感觉阈值、种类及各成分间相互作用决定^[23]。本研究仅在特定菌种和发酵水平条件下分析山乌柏蜂蜜酒香气成分,其主要差异是部分醇酯类、绝大多数的醛酮和萜烯类物质的差别。己酸乙酯(1.48%)具有较强的新鲜果香和蜂蜜香气^[24],可构成山乌柏蜂蜜酒典型香气成分。在酿制时把握香气成分形成的关键点,对山乌柏蜂蜜酒的生产有着重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 陈崇羔. 蜂产品加工学[M]. 福州:福建科学技术出版社, 1999.
- [2] 邓仁根, 赵雅俊, 余艳锋. 江西省蜂业发展现状与趋势分析[J]. 中国农业资源与区划, 2010, (8): 54-57.
- [3] 田景芝, 缪晓青, 吴珍红. 蜂蜜酒的研究进展[J]. 中国蜂业, 2009, 60(2): 13-15.
- [4] 黄书青. 蜂蜜酒的研制[J]. 食品科学, 1986, (12): 31-33.
- [5] 胡述云, 贾宝林. 纯发酵蜂蜜酒工艺的研究[J]. 中国酿造, 1988, 7(5): 23-27.
- [6] 杨茂森, 王鑫. 蜂蜜酒快速酿造法及其应用研究[J]. 中国蜂业, 1994, 124(5): 10-11.

- [7] 王淼. 蜂蜜酒发酵菌株选育研究[J]. 蜜蜂杂志, 2006, 26(11): 6-7.
- [8] 张丽珍, 曾志将, 颜伟玉, 等. 山乌柏蜂蜜酒的酿造工艺研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(9): 180-183.
- [9] 方心芳. 应用微生物学实验法[M]. 北京: 中国财政经济出版社 1962.
- [10] 牛广财, 朱丹, 王军, 等. 沙棘果酒优良酵母菌的筛选及分子生物学鉴定[J]. 中国食品学报, 2009, 9(6): 60-65.
- [11] 赵红梅, 刘景武, 张伟. 耐高渗酵母的分离、筛选及鉴定[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(6): 34-37.
- [12] 赵硕. 耐高渗(高糖)酵母菌株的选育[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [13] 隋玉洁, 李伟林. 一株耐酒精酵母菌的选育研究[J]. 酿酒, 2011, 38(4): 39-41.
- [14] Jones R. Specific and nonspecific inhibitory effects of ethanol on yeast growth[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, (9): 334-338.
- [15] 张勤. 耐酸酵母的选育及初步应用[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [16] GB/T15038 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
- [17] 张永凤, 卢红梅. 优良醋酸菌的分离和纯化[J]. 食品研究与开发, 2007, 128(10): 89-91.
- [18] 天津轻工业学院, 大连轻工业学院, 无锡轻工大学, 等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1980.
- [19] 赫林. 食品微生物实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [20] 段开红, 田瑞华, 万永青, 等. 一株沙棘果酵母菌株的分子鉴定及发酵特性研究[J]. 酿酒科技, 2009, 178(4): 51-53.
- [21] Harry van Keulen, Donald GL, Kathleen EZ, et al. Yeast present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2003, 83: 149-154.
- [22] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [23] 刘淑琴, 倪莉. 酒类香气物质研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 335-337.
- [24] 李峰, 明艳红, 李媛媛, 等. 产果香菌株的初步鉴定及香味成分分析[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 219-223.

Isolation, Identification of Honey Yeast for *Sapium Discolor* Mead and Application

Shi Ying Zhang Lizhen Zeng Zhijiang Wang Zilong Yan Weiyu*

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract Objective: The super yeast for *Sapium discolor* mead were screened from natural honey and identified by molecular biology, and analyzed the components of aroma in mead. Methods: The yeast strains were isolated from natural fermentation old honey by enrichment culturing and lineation separating, and screened preliminarily by microscopy and Du's small pipe fermentation. The yeast strains were secondary screened by alcoholic yield test, tolerance test, fermentation capacity and floeculability comparison, then was identified by 26S rDNA D1/D2 domain sequences and phylogenetic dendrogram construction. Aroma components of *Sapium discolor* mead was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results: 39 yeast were isolated form natural fermented honey. 1 yeast strains had been screened and labeled S2 as optimal yeast. 7d fermentation of yeast strain S2 in the 30% sugar concentration, 20% alcohol, 200 mg/L SO₂ and pH 4.0 conditions, ethanol concentration was 13.12%, the mead had typical flavor. Yeast S2 had the nearest heredity distance with *Pichia-guilliermondii* and *Pichia*, and their gene sequence homology comparison were 99%. 55 compounds were identified form *Sapium discolor* mead and the relative contents of aroma components were 97.74%. Conclusions: The screened yeast S2 was the most suitable strain for mead, and it was identified as *Pichia*. The most aroma components of the mead were alcohols and esters.

Key words *Sapium discolor* mead; yeast; isolation; identification; aroma analysis