

## 摘要

猕猴桃果酒生产过程中缺乏专用发酵菌株且容易发生褐变，导致酒体缺乏典型性、风味不足、色泽变暗等问题。为此，本研究旨在筛选发酵性能优良的酵母以丰富猕猴桃果酒的风味化合物组成、提高其典型性；同时，探究导致猕猴桃果酒褐变的主要因素并找到有效的褐变抑制剂，以稳定猕猴桃果酒的颜色品质，为猕猴桃果酒品质改善提供一定的理论依据，主要研究内容与结果如下：

(1) 从猕猴桃自然发酵液中逐级筛选出 2 株发酵性能优良的本土酿酒酵母，综合菌株发酵猕猴桃果酒的理化及感官品质，最终确定 XX-16 为最佳猕猴桃果酒酿酒酵母。与 3 株对照菌株相比，XX-16 提前 0.5 d 完成主发酵，且其发酵的猕猴桃果酒的总酚含量最高，为  $740.51 \text{ mg GAE} \cdot \text{L}^{-1}$ ；体外抗氧化活性最强，还原力、ABTS<sup>+</sup>及 DPPH 自由基清除活性分别为  $635.75$ 、 $603.21$ 、 $743.35 \text{ mg VC} \cdot \text{L}^{-1}$ ；萜烯种类最丰富，有 22 种，且含量最高，为  $757.53 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ；感官评分最高，为 89.83 分。结合气味活性值和偏最小二乘回归分析，明确了 XX-16 可以通过丰富猕猴桃果酒中的酯类和萜烯类呈香物质来提高酒体品质。

(2) 筛选出 1 株高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶且耐受性强的非酿酒酵母 N-12，具有丰富猕猴桃果酒风味化合物组成的潜力。将 N-12 与 XX-16 以不同接种方式混菌发酵猕猴桃果酒，通过理化及感官品质分析，确定最佳接种方式为先接种 N-12，48 h 后接种 XX-16。与 XX-16 纯种发酵猕猴桃果酒相比，最佳接种方式所得猕猴桃果酒 (NX48) 的风味化合物组成更加丰富，新增了龙脑、桉叶油素、1,4-桉叶素等 15 种萜烯化合物，萜烯含量提高了 14.06 倍；酯类及风味化合物的总含量分别提高了 17.33%、43.87%；香气更加丰富怡人，感官评分提高了 13.00 分。结合气味活性值和偏最小二乘法判别分析，确定了芳樟醇、 $\alpha$ -松油醇、桉叶油素、(Z)-6-壬烯-1-醇、龙脑、异龙脑、 $\beta$ -月桂烯、大马士酮和癸醛是 NX48 猕猴桃果酒的关键香气成分。

(3) 探究了不同褐变抑制剂在抑制猕猴桃果酒褐变中的应用潜力及猕猴桃果酒褐变的主导因素。通过监测褐变度确定了猕猴桃果酒的褐变主要发生在储存阶段，该阶段的褐变度变化值是主发酵阶段的 10.53 倍。进一步测定了添加 VC、GSH、EDTA 和 SO<sub>2</sub>（以偏重亚硫酸钾加入）4 种褐变抑制剂的猕猴桃果酒储存阶段的褐变度变化，结果表明仅 SO<sub>2</sub> 能够有效抑制猕猴桃果酒的褐变，当添加量为  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时，猕猴桃果酒的褐变度最低，与对照相比，储存末期的褐变度变化率降低了 14.53%。相关性分析显示，褐变度与总酚含量呈极显著负相关，相关系数为 -0.830，明确了酚类化合物是猕猴桃果酒存储期间褐变的主导因素。

**关键词：**猕猴桃果酒；酵母； $\beta$ -葡萄糖苷酶；混菌发酵；褐变抑制

## Abstract

The lack of special fermented strains in the production of kiwi fruit wine and the wine prone to browning leads to the problems that lack of typicality, insufficient flavor and darkening of wine color. Thus, the purpose of this study was to screen yeasts with excellent fermented performance to enrich the composition of flavor compounds and improve the typicality of kiwi fruit wine, explore the main factors leading to the browning of kiwi fruit wine and find effective browning inhibitor to stabilize the color quality of the kiwi fruit wine, providing a theoretical basis for improving the quality of kiwi fruit wine. The main contents and results of this study were as follows:

(1) The 2 native *Saccharomyces cerevisiae* with excellent fermentation performance were selected step by step from the natural fermentation broth of kiwi, the *S. cerevisiae* XX-16 was determined as the preferred strain for kiwi fruit wine brewing based on the physicochemical and sensory quality of kiwi fruit wine. Compared with the 3 control strains, the main fermentation time of XX-16 was reduced by 0.5 d, and the total phenolic content of kiwi fruit wine fermented by XX-16 was higher, at 740.51 mg GAE·L<sup>-1</sup>; the strongest antioxidant activity in vitro with reducing power, ABTS<sup>+</sup>, and DPPH free radical scavenging activity of 635.75, 603.21, and 743.35 mg VC·L<sup>-1</sup>, respectively; the most abundant terpene of 22 species and the highest terpene content of 757.53 μg·L<sup>-1</sup>; the highest sensory score of 89.83 points. By combining the odor activity value and partial least squares regression analysis, it was indicated that XX-16 could improve the quality of wine body through enriching the aroma-active compounds of esters and terpenes in kiwi fruit wine.

(2) The non-*Saccharomyces* N-12 with high β-D-glucosidase enzyme activity and strong tolerance was screened out, which had the potential to enrich the volatile flavor compounds of kiwi fruit wine. N-12 was mixed with XX-16 to fermented kiwi fruit wine in different inoculation methods, the optimal inoculation method was XX-16 inoculated 48 h after N-12 based on the physicochemical and sensory quality of kiwi fruit wine. Compared with XX-16 pure breed fermented kiwi fruit wine (NX48), the wine fermented with the optimal inoculation method had a richer flavor compound composition, with 15 new terpenes appeared, such as borneol, cineole and 1,4-cineole, the content of terpenes increased by 14.06-fold; the total content of esters and flavor compounds increased by 17.33% and 43.87%, respectively; the aroma was more abundant and pleasant with the sensory score increased by 13.00 points. Linalool, α-terpineol, eucalyptol, nonenol, borneol, isoborneol, myrcene, beta-damascenone and decanal were the key aroma compounds of NX48 kiwi fruit wine by combining the odor activity value and partial least squares discriminant analysis.

(3) The potential application of different browning inhibitors in inhibiting the browning of kiwi fruit wine and the main factors leading to the browning of kiwi fruit wine was explored. It was determined that the browning of kiwi fruit wine mainly occurred during the storage by monitoring the browning degree, and the change value of browning degree during this stage was 10.53 times that of the main fermentation stage. The browning degree of kiwi fruit wine added with VC, GSH, EDTA and SO<sub>2</sub> (added in the form of potassium metabisulfite) during

storage was monitored, the results showed that only SO<sub>2</sub> could effectively inhibit the browning of kiwi fruit wine, the browning degree of kiwi fruit wine was the lowest when the addition amount of SO<sub>2</sub> was 150 mg·L<sup>-1</sup>, and compared with the control, the change rate of browning degree at the end of storage was reduced by 14.53%. Correlation analysis showed that there was an extremely significant negative correlation between browning degree and total phenolic content, with a correlation coefficient of -0.830, which indicated that phenolic compounds were the main factors leading to the browning of kiwi fruit wine during storage.

**Keywords:** kiwi fruit wine; yeast; β-D-glucosidase; mixed fermentation; browning inhibition

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 猕猴桃及猕猴桃果酒产业现状 .....	1
1.1.1 猕猴桃产业现状.....	1
1.1.2 猕猴桃果酒生产过程中存在的问题.....	1
1.2 影响果酒香气品质的因素 .....	1
1.2.1 品种香气.....	2
1.2.2 酿造香气.....	2
1.2.3 陈酿香气.....	3
1.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶对果酒香气的影响 .....	4
1.3.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶的来源 .....	4
1.3.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用机理 .....	4
1.3.3 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶非酿酒酵母在果酒酿造的应用 .....	5
1.4 果酒褐变的机理及抑制.....	5
1.4.1 果酒的褐变机理.....	5
1.4.2 果酒中常用的褐变抑制剂.....	7
1.5 立题背景与意义.....	8
1.6 主要研究内容.....	8
第二章 材料与amp;方法 .....	10
2.1 实验材料与amp;仪器.....	10
2.1.1 主要原料.....	10
2.1.2 主要试剂.....	10
2.1.3 培养基的制备.....	10
2.1.4 主要仪器设备.....	11
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 猕猴桃果酒酿造工艺.....	11
2.2.2 酿酒酵母的筛选及其发酵猕猴桃果酒品质分析 .....	12
2.2.3 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶非酿酒酵母的筛选及其在猕猴桃果酒酿造中的应用 .....	12
2.2.4 猕猴桃果酒褐变主导因素的确定及褐变抑制剂对酒体品质的影响 .....	14
2.3 分析方法.....	14
2.3.1 基本理化指标的测定.....	14
2.3.2 总酚含量的测定.....	14
2.3.3 体外抗氧化活性的测定.....	15

2.3.4 呈味物质的测定 .....	15
2.3.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的测定 .....	16
2.3.6 褐变度的测定与分析方法 .....	16
2.3.7 褐变因素的测定 .....	17
2.3.8 挥发性风味化合物的测定与分析方法 .....	17
2.3.9 感官品评 .....	17
2.3.10 数据分析 .....	18
第三章 结果与讨论 .....	19
3.1 酿酒酵母的筛选及其发酵猕猴桃果酒品质的分析 .....	19
3.1.1 酿酒酵母的筛选 .....	19
3.1.2 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的基本理化指标 .....	20
3.1.3 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的总酚及体外抗氧化活性 .....	20
3.1.4 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的呈味物质 .....	21
3.1.5 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的挥发性风味化合物 .....	23
3.1.6 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的感官品评 .....	26
3.1.7 基于 PLSR 分析猕猴桃果酒的呈香呈味物质对感官品质的贡献 .....	26
3.1.8 小结 .....	27
3.2 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶非酿酒酵母的筛选及其在猕猴桃果酒酿造中的应用 .....	28
3.2.1 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶非酿酒酵母的筛选 .....	28
3.2.2 混菌发酵过程中酵母的生物量变化 .....	30
3.2.3 混菌发酵猕猴桃果酒的基本理化指标及感官品评 .....	31
3.2.4 混菌发酵对猕猴桃果酒的总酚及体外抗氧化活性的影响 .....	32
3.2.5 混菌发酵对猕猴桃果酒有机酸和单体酚的影响 .....	33
3.2.6 混菌发酵对猕猴桃果酒挥发性风味化合物的影响 .....	34
3.2.7 混菌发酵猕猴桃果酒呈香物质的 PLS-DA 分析 .....	36
3.2.8 小结 .....	38
3.3 猕猴桃果酒褐变主导因素的确定及褐变抑制剂对酒体品质的影响 .....	38
3.3.1 猕猴桃果酒褐变发生阶段的确定 .....	38
3.3.2 褐变抑制剂对猕猴桃果酒褐变度的影响 .....	39
3.3.3 $\text{SO}_2$ 对猕猴桃果酒挥发性风味化合物的影响 .....	40
3.3.4 $\text{SO}_2$ 对猕猴桃果酒感官品质的影响 .....	42
3.3.5 褐变抑制剂对猕猴桃果酒褐变因素的影响 .....	43
3.3.6 猕猴桃果酒褐变因素与褐变度的相关性分析 .....	46
3.3.7 小结 .....	47
主要结论与展望 .....	48

主要结论.....	48
展望.....	49
参考文献.....	50
附录 B:附表.....	56

## 第一章 绪论

### 1.1 猕猴桃及猕猴桃果酒产业现状

#### 1.1.1 猕猴桃产业现状

猕猴桃富含维生素 C (Vitamin C, VC)、维生素 E (Vitamin E, VE)、酚类等生物活性物质,且其风味独特,深受消费者青睐<sup>[1]</sup>。近年来,随着栽培和管理技术的改进,猕猴桃产量大幅提高,出现供过于求的现象<sup>[2]</sup>。世界粮农组织的统计数据显示,2022 年全球猕猴桃产量约为 440 万吨,中国作为猕猴桃第一生产大国,生产量占全球总产量的 50%。猕猴桃为季节性水果,采后贮藏过程中容易软化腐烂,这限制了猕猴桃果实的贮藏、运输与销售,造成猕猴桃资源的浪费和不可避免的经济损失。因此,有必要开发猕猴桃深加工产品,如果脯、果汁、果酱、果酒等。其中,猕猴桃果酒不仅保留了猕猴桃中的大部分营养成分,且具有猕猴桃的独特香气,显示出良好的商业前景<sup>[3,4]</sup>。

#### 1.1.2 猕猴桃果酒生产过程中存在的问题

目前国内外对猕猴桃果酒的研究侧重于不同猕猴桃原料、商业果酒酵母以及酿造工艺对猕猴桃果酒品质的影响。Huang 等<sup>[5]</sup>的研究表明不同品种猕猴桃发酵的猕猴桃果酒的酒精度、总酚含量、有机酸、单体酚及挥发性香气成分存在较大差异。Li 等<sup>[6]</sup>考察了 6 种不同商业果酒酵母发酵猕猴桃果酒的特性,发现不同菌株发酵的猕猴桃果酒的酒精度、总酚含量、DPPH 自由基清除活性及风味组成均有差异。Qi 等<sup>[7]</sup>比较了浸渍处理和不做浸渍处理对猕猴桃果酒香气品质的影响,结果表明与不做浸渍处理相比,浸渍处理对猕猴桃果酒香气成分有积极作用,使萜烯含量显著增加。

猕猴桃果酒的酿造历史悠久,但其在果酒市场上的占比不高,不具备影响力和竞争力。目前猕猴桃果酒酿造中普遍存在的共性问题有:(1) 缺乏专用酿酒酵母。目前市场上还没有用于猕猴桃果酒酿造的专用酿酒酵母,猕猴桃果酒生产中使用的酵母多为商业果酒酵母,致使猕猴桃果酒的特色风味无法被充分体现,很大程度上导致了猕猴桃果酒同质化、缺乏典型性,严重影响了猕猴桃果酒的品质。(2) 键合态香气物质未能充分释放。研究表明猕猴桃果实中含有丰富的无味糖苷键合态香气物质,这些物质经过  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶解后可释放出游离态香气物质。然而,目前很少有研究将  $\beta$ -葡萄糖苷酶应用于猕猴桃果酒的酿造,导致猕猴桃果酒风味不足。(3) 容易氧化褐变。猕猴桃果酒在生产过程中容易发生褐变,褐变不仅会使酒体色泽发暗,降低其外观美感,同时可能会导致酒体产生氧化味,降低其香气品质。

### 1.2 影响果酒香气品质的因素

根据香气的来源可将果酒香气分为品种香气、酿造香气和陈酿香气三类。其中品种香气是来自于酿造原料自身的香气,与原料的品质有关;酿造香气是发酵过程中由酵母代谢产生的,主要由酵母及酿造工艺决定;陈酿香气是果酒陈酿过程中,相关成分发生

氧化或酯化等反应形成的独特香气。

### 1.2.1 品种香气

品种香气又称品种风味或原始酒香。水果中风味化合物的存在形式一般有 2 种，一种以游离态形式存在，具有挥发性，直接促成水果风味；另一种以键合态形式存在，不具有挥发性，对香气无直接贡献作用<sup>[8]</sup>。键合态香气物质一般以糖苷或半胱氨酸衍生物的形式存在<sup>[9]</sup>。糖苷键合态香气物质是由一个苷元（游离态香气物质）通过糖苷键与糖基相连构成的，通过酶促反应或化学反应后可释放出具有挥发性的苷元<sup>[8]</sup>，已鉴定出的苷元有直链醇类、萜烯类、莽草酸代谢物及降异戊二烯化合物等，糖基大多是单糖和双糖，极少部分是三糖<sup>[10]</sup>。

研究发现，葡萄中的键合态香气物质含量是游离态香气物质的 10 倍以上，这使其成为葡萄酒风味化合物的一个重要潜在来源<sup>[1]</sup>。近年来陆续出现猕猴桃中键合态香气物质的相关报道。Garcia 等<sup>[11,12]</sup>先后用 Rapidase AR2000 酶水解软枣猕猴桃和毛花猕猴桃中的键合态香气物质，并利用气相色谱-质谱联用仪分析释放的游离态香气物质。结果表明，软枣猕猴桃和毛花猕猴桃中分别检测出 89 种和 91 种键合态香气物质，前者主要包括醇类、萜烯类和苯类化合物，后者主要包括醇类、萜烯类和酚类化合物。赵宁<sup>[13]</sup>的研究表明黄金果猕猴桃和海沃德猕猴桃中不仅含有丰富的游离态香气物质，同时还含有丰富的键合态香气物质，在黄金果猕猴桃和海沃德猕猴桃中分别检出 49 种和 37 种键合态香气物质，包括醇类、醛类、酮类、萜烯类、酸类、酚类、呋喃类和苯环类，其中萜烯类是最具代表性的键合态香气物质。

### 1.2.2 酿造香气

#### (1) 酿酒酵母

酵母是酒精发酵过程中的主角，在决定果酒质量方面发挥着关键作用。过去葡萄酒酿造方式为自然发酵，参与自然发酵的微生物的复杂性常常导致葡萄酒质量的不确定性。经过长期的探索，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*）以其出色而一致的发酵特性得到了酿酒学家们的认可，被广泛用于发酵且达到了理想的酿造特性<sup>[14]</sup>。采用人工筛选或商业化酿酒酵母接种发酵无疑是葡萄酒酿造行业一项重要的技术革新。然而，随着单一商业酵母的大量使用，葡萄酒品质逐渐单一化，风味缺乏典型性及地域特色<sup>[15]</sup>，猕猴桃果酒等其它果酒亦是如此。

越来越多的研究表明，从特定原料中筛选出的本土酵母能够很好地适应相应原料的酿造环境，产出的果酒香气浓郁且具有特色风味。与商业酵母相比，本土酵母发酵的果酒更好地保留了原料的典型性，具有更明显的地域特性。Tufariello 等<sup>[16]</sup>评估了 15 株本土酿酒酵母对黑曼罗葡萄酒香气品质的影响，结果表明各菌株发酵葡萄酒的芳香特征各不相同，主要表现在乙酸酯、脂肪酸乙酯及高级醇含量不同，且 6 株表型较好的菌株发酵的葡萄酒均具有良好的感官品质。García 等<sup>[17]</sup>使用本土酿酒酵母发酵玛娃白葡萄品种，所获得的葡萄酒具有令人愉悦的芳香特征。Çelik 等<sup>[18]</sup>比较了 3 株本土酿酒酵母和 1 株商业酿酒酵母发酵的葡萄酒的理化品质及感官特性，结果表明使用本土酿酒酵母发酵的

葡萄酒具有独特的感官特性，其中本土酿酒酵母 1281 发酵的葡萄酒在花香、果香、平衡感及整体品质方面得分最高，发酵性能最优。可见，筛选优良本土酿酒酵母是提高猕猴桃果酒香气品质、增加猕猴桃果酒典型性的关键，然而目前关于本土酿酒酵母用于猕猴桃果酒酿造的研究有限。

### (2) 非酿酒酵母

一般从酿酒相关环境中分离出的除酿酒酵母属以外的所有酵母统称非酿酒酵母。与酿酒酵母相比，非酿酒酵母因其发酵性能差、发酵速度慢且对恶劣条件的耐受性较差而被认为是具有负面影响的酵母<sup>[19]</sup>。如今，越来越多的研究表明非酿酒酵母具有对果酒发酵有益的酶。德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)、念珠菌属 (*Candida*) 或毕赤酵母属 (*Pichia*) 具有不同的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性，可以水解糖苷前体，从而释放芳香化合物<sup>[20]</sup>。除具有  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的酵母之外，具有果胶分解活性的酵母也倍受关注。将具有果胶酶活性的马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 与酿酒酵母混菌发酵可以提高葡萄酒自流酒的体积，同时产生更多的苯乙醇和乙酸苯乙酯，改善了葡萄酒的感官特性<sup>[21]</sup>。此外，非酿酒酵母成员丰富，在酿酒中使用非酿酒酵母可为特色果酒的开发提供更多可能性，这满足当下消费者对新颖风格果酒日益增长的需求。但并非所有非酿酒酵母对发酵都是有益的，Han 等<sup>[22]</sup>发现葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*, *H. uvarum*) H30 和酿酒酵母混菌发酵的葡萄酒具有令人不愉快的气味，原因可能是其异戊醇含量过高。因此选择合适的非酿酒酵母是提高猕猴桃果酒香气品质及风味典型性的又一有效措施。

### (3) 酿造工艺

研究表明，优化酿造工艺可以丰富果酒中的香气化合物组成，提高果酒的风味品质。酿造工艺包括原料处理方式、发酵温度、pH 值、酵母接种量、含糖量、酶制剂等因素。田甜甜<sup>[23]</sup>将青梅以不同的方式处理后进行青梅酒发酵，结果表明清汁发酵彻底，产酒率高，但口味较淡；浊汁发酵的青梅酒澄清度略差；而果肉发酵的青梅酒香气浓郁、有青梅酒独特的杏仁香气。同时，田甜甜等<sup>[24]</sup>还对青梅酒的发酵温度、料液比和含糖量 3 个发酵条件进行工艺优化，结果表明在最佳工艺下获得的青梅酒中含更多的酯类和萜烯类化合物。Sun 等<sup>[25]</sup>在赤霞珠葡萄酒酿造的不同阶段添加不同的酶制剂，结果表明同时添加酶制剂和酿酒酵母可以丰富葡萄酒的香气成分，*H. uvarum* 胞外酶可以促进葡萄中的化合物与发酵过程中产生的化合物之间的协同作用，增强酒体的花果香。

## 1.2.3 陈酿香气

陈酿过程有利于提高果酒的酒体稳定性、增加酒体的香气复杂性、提升酒体的整体风味品质。陈酿香气因陈酿容器、陈酿时间等而不同。

在果酒产业中，国内外主要的陈酿方式为橡木桶陈酿。木桶木材的结构（纹理、孔隙度和渗透性）和化学成分（多酚、单宁和挥发性化合物）会影响葡萄酒在木桶中发生的复杂生化过程，从而改变葡萄酒的成分并增加其稳定性<sup>[26]</sup>。何非等<sup>[27]</sup>研究了 3 个产地和 2 种烘烤水平的 6 种橡木桶陈酿对“美乐”干红葡萄酒香气组分的影响，结果表明葡萄酒中呋喃类和大多数挥发性酚类物质受橡木烘烤度影响。Caldeira 等<sup>[28]</sup>用 6 种不同来

源的橡木及 1 种栗木分别制成木桶来陈酿白兰地，且每种木材分别有 3 种烘烤水平（轻度、中度和重度），结果表明不同来源的木材可导致白兰地之间香草、木本、焦糖、烧焦等香气的差异，在重度烘烤的橡木桶中陈酿的白兰地呈现出最浓郁的香草、木本、辛辣、焦糖、烧焦、烟熏的气味。马腾臻等<sup>[29]</sup>探究了陈酿时间对贵人香起泡葡萄酒品质的影响，结果表明乙酸乙酯、丁酸乙酯的含量随陈酿时间的延长而下降甚至消失，而辛酸乙酯、丙酸辛酯、丁二酸二乙酯的含量升高。

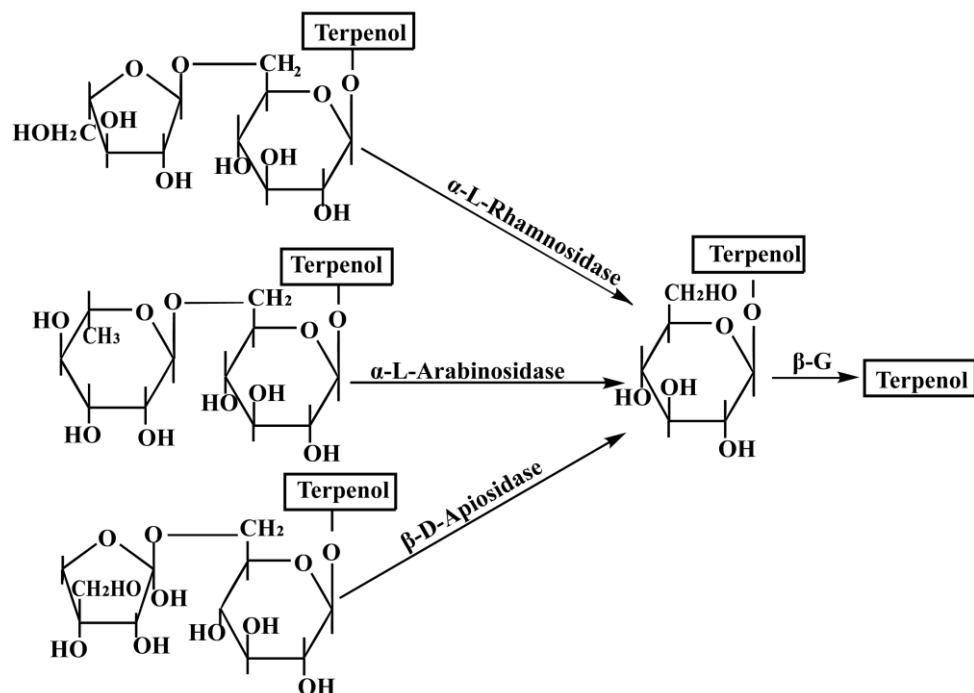
### 1.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶对果酒香气的影响

#### 1.3.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶的来源

$\beta$ -葡萄糖苷酶（ $\beta$ -D-Glucosidase,  $\beta$ -G）属于纤维素酶类，是纤维素分解酶系中重要的组成成分之一，能够水解结合于末端非还原性的  $\beta$ -D-葡萄糖苷键，释放  $\beta$ -D-葡萄糖和相应的游离态香气物质<sup>[30]</sup>。 $\beta$ -G 的来源极其广泛，包括植物、酵母菌、细菌等生物<sup>[31,32]</sup>，酵母是果酒酿造过程中  $\beta$ -G 的主要生产者<sup>[33]</sup>。研究表明霉菌具有较高的  $\beta$ -G 活性，但其较差的水解专一性会导致色素和酚类物质的降解，影响葡萄酒的颜色稳定性、产生不良风味<sup>[34]</sup>。酿酒酵母也能产生  $\beta$ -G，总体而言，野生酿酒酵母的  $\beta$ -G 活性高于商业酿酒酵母<sup>[33]</sup>，且只有少部分酿酒酵母含有编码  $\beta$ -G 的基因<sup>[35]</sup>。与酿酒酵母相比，非酿酒酵母具有更高的  $\beta$ -G 活性，并能有效增强葡萄酒的香气复杂性<sup>[32,33]</sup>。

#### 1.3.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶的作用机理

水果的品种香气可分为游离态和键合态两类，其中游离态具有挥发性，容易被嗅觉感知，赋予葡萄酒独特的香气；而占大多数的糖苷键合态香气物质（风味前体物质）只有在酸解或酶解的作用下才能转化为游离态香气物质而被感知<sup>[36]</sup>。酸解易使香气物质发生分子重排，与之相比，酶解所释放的香气物质更为自然<sup>[31]</sup>。糖苷键合态香气物质包括单糖苷形式和双糖苷形式，促进糖苷键合态香气物质水解的酶主要有 4 种： $\beta$ -G、 $\alpha$ -L-鼠李糖苷酶（ $\alpha$ -L-Rhamnosidase, Rha）、 $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷酶（ $\alpha$ -L-Arabinosidase, Ara）、 $\beta$ -D-芹菜糖苷酶（ $\beta$ -D-Apiosidase, Api）。糖苷键合态香气物质的酶解过程如图 1-1 所示，对以单糖苷形式存在的风味前体物质而言，其水解只需要  $\beta$ -G 的作用；对于双糖苷风味前体物质而言，酶水解需要经历两步，首先在 Ara 或 Rha 或 Api 的作用下使糖苷键断裂，形成对应的单糖苷，然后在  $\beta$ -G 作用下，彻底水解单糖苷并释放出相应的游离态香气物质。不管是水果原料中单糖苷的水解还是双糖苷的水解， $\beta$ -G 都是两个过程中的关键酶<sup>[37,38]</sup>。

图 1-1 糖苷化合物的酶解过程<sup>[38]</sup>Figure 1-1 Enzymatic hydrolysis process of glycoside compounds<sup>[38]</sup>

### 1.3.3 产 $\beta$ -葡萄糖苷酶非酿酒酵母在果酒酿造的应用

当下具有  $\beta$ -G 活性的非酿酒酵母已被广泛用于果酒酿造，以促进香气物质的产生，提高果酒的风味品质。Hu 等<sup>[39]</sup>评估了一株高产  $\beta$ -G 的胶红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*, *R. mucilaginosa*) 的糖苷酶提取物和商业酶制剂对葡萄酒香气的影响，发现与商业酶制剂相比，*R. mucilaginosa* 糖苷酶提取物对苯类化合物和 C13-去甲异戊二烯的糖苷表现出高度的特异性。Lee 等<sup>[40]</sup>将具有  $\beta$ -G 活性的异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*, *W. anomalus*) 与酿酒酵母共发酵葡萄酒，结果表明，与酿酒酵母纯种发酵葡萄酒相比，混菌发酵葡萄酒显示出更高的芳樟醇、香茅醇和香叶醇含量，且在感官评价中，混菌发酵葡萄酒的风味、口感和总体得分均更高。Han 等<sup>[22]</sup>筛选出 1 株具有  $\beta$ -G 活性且表型良好的光滑念珠菌 (*Candida glabrata*) D18，将其与酿酒酵母顺序接种发酵琼瑶浆葡萄酒，显著提高了琼瑶浆葡萄酒中大马士酮和芳樟醇的含量，增加了香气化合物的总含量，同时提高了琼瑶浆葡萄酒的花果香、典型性和复杂性。猕猴桃与葡萄相似，都含有丰富的键合态香气物质，因此有必要探究产  $\beta$ -G 非酿酒酵母对猕猴桃酒香气品质的影响。

## 1.4 果酒褐变的机理及抑制

### 1.4.1 果酒的褐变机理

果酒的褐变根据作用机理不同可分为酶促褐变和非酶褐变，酶促褐变贯穿于果酒的整个酿造过程，且随着果酒的持续发酵，酶促褐变会逐渐削弱，果酒的褐变转变为以非酶褐变为主导。

### (1) 酶促褐变

酶促褐变主要发生在果酒生产前期，即果汁加工过程中。催化果汁褐变的氧化还原酶主要有 3 种，包括多酚氧化酶 (Polyphenoloxidase, PPO)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 和苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia lyase, PAL) [41]。其中 PPO 被认为是导致酶促褐变最重要的氧化还原酶，PPO 引起的酶促褐变必须同时具备三个条件：氧气、PPO 及多酚物质 [42,43]。在完整的植物细胞中，多酚物质和 PPO 呈区域性分布而不能相互接触，无褐变现象 [44]。如图 1-2 所示，在果汁加工过程中，当有氧气存在且细胞组织被破坏时，PPO 便可催化单酚羟基化为邻二酚，并催化邻二酚脱氢为邻醌，邻醌会进一步与氨基酸、蛋白质等物质缩合或自身聚合生成棕色物质，最终导致果酒褐变 [42,45]。

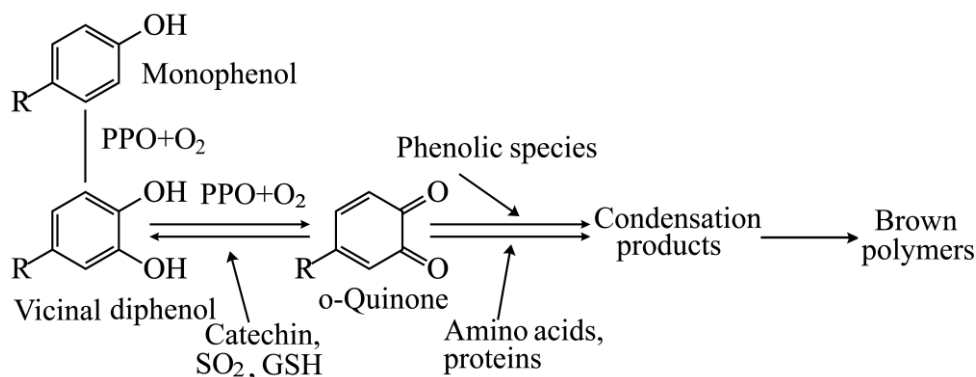


图 1-2 果汁中 PPO 参与的酚类物质的酶促褐变

Figure 1-2 Enzymatic browning of phenolic compounds involved in PPO in fruit juice

### (2) 非酶褐变

非酶褐变，即没有酶参与的褐变反应，果酒中已知的非酶褐变主要分为酚类的非酶褐变和其它物质的非酶褐变。

#### ① 酚类物质的非酶褐变

葡萄酒中的 (-)-表儿茶素、(+)-儿茶素、没食子酸和咖啡酸是最容易被氧化的酚类物质，这些物质依次被氧化为半醌自由基和苯醌，同时氧气被还原为过氧化氢，整个反应过程由  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$  的氧化还原循环催化 [42]。在此过程中形成的醌类物质由于具有较强的亲和力而不能稳定存在，醌类物质之间会发生缩合作用，形成有色的大分子物质。此外，在该反应中形成的聚合物的氧化还原电位低于初始酚类物质，这使其更容易被氧化，进而加速聚合过程，形成更多的聚合物和过氧化氢 [46]。过氧化氢会与  $\text{Fe}^{2+}$  结合生成羟基自由基 (芬顿反应)，羟基自由基是一种强氧化剂，能够非特异性地氧化果酒中的几乎所有有机成分，如乙醇、有机酸、酒石酸和糖类可被分别氧化为乙醛、酮酸、乙醛酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛，其中醛类可以与黄烷醇反应生成黄橙色的黄嘌呤化合物，导致果酒褐变 [47]。

#### ② 其它物质的非酶褐变

果酒中发生的非酶褐变除了酚类物质参与的褐变途径之外，还存在其它褐变途径，如美拉德反应、焦糖化、抗坏血酸 (VC) 降解等。涉及的主要成分包括还原糖、氨基酸和 VC，这些成分的含量和活性决定了非酶褐变的程度和速率 [46]。美拉德反应由还原糖

与氨基酸、蛋白质经过一系列缩合、脱水、重排及聚合反应生成黑色物质<sup>[42]</sup>。焦糖化反应是指糖类化合物被加热或稀酸溶液处理后,经过脱水、缩合等多个步骤反应生成棕色物质的反应<sup>[48]</sup>。VC 可经过氧化、水解、缩合、聚合形成褐色素,同时 VC 还可以与氨基酸、蛋白质发生美拉德反应<sup>[48,49]</sup>。

### 1.4.2 果酒中常用的褐变抑制剂

在果酒生产过程中,褐变会导致果酒的色泽发生变化,降低产品的感官特性,是果酒生产中长期存在的棘手问题。目前,二氧化硫、还原型谷胱甘肽、VC 和乙二胺四乙酸是果酒中最常用的褐变抑制剂。

#### (1) 二氧化硫

二氧化硫(SO<sub>2</sub>)通常以亚硫酸盐的形式添加于果酒的生产过程中。SO<sub>2</sub>可以通过抑制 PPO 的活性来减少果酒的褐变现象,也可将醌类化合物转化为无色酚类物质,抑制邻醌发生缩合反应,从而防止褐色物质的形成<sup>[46]</sup>。同时,SO<sub>2</sub>还能够参与羰基化合物的加成反应,形成非挥发性亚硫酸氢盐加合物,从而防止果酒产生不愉快的感官特性<sup>[42]</sup>。但是,随着科学研究的不断深入,以 SO<sub>2</sub> 为代表的亚硫酸盐被报道具有致毒性和致敏性,使其在食品中的添加量不断受到限制,其添加量通常为 50~200 mg·L<sup>-1</sup>。因此,在果酒生产过程中减少 SO<sub>2</sub> 的使用或找到其替代品十分紧迫,但目前 SO<sub>2</sub> 仍然被认为是控制果酒氧化褐变、保持果酒感官特性的最有效工具<sup>[50]</sup>。

#### (2) 还原型谷胱甘肽

还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)可以避免由于酚类化合物的氧化而导致的醌类化合物发生聚合,从而抑制深色聚合物的形成<sup>[41]</sup>。谷胱甘肽的亲核中心为巯基,具有强亲核作用,能够迅速与咖啡酸等酚类物质氧化形成的醌类化合物反应,形成无色且不易氧化的葡萄反应产物(Grape reaction product, GRP)<sup>[50]</sup>。Hosry 等<sup>[51]</sup>的研究表明 GSH 能有效抑制白葡萄酒的褐变,且对白葡萄酒的感官品质有改善作用。Motta 等<sup>[47]</sup>研究了瓶装时添加 20 mg·L<sup>-1</sup> GSH 的葡萄酒储存期间的褐变度变化,结果发现,储存 8 个月后其褐变度(A<sub>420</sub>)显著低于对照酒(不添加 GSH),而储存 12 个月后其褐变度与对照酒无显著差异。

#### (3) VC

VC 天然存在于水果中,通常在压榨破碎过程中,VC 由于清除氧或还原酚类化合物形成的邻醌衍生物而被迅速消耗<sup>[42]</sup>,其添加量通常为 50~150 mg·L<sup>-1</sup><sup>[52]</sup>。闫公昕等<sup>[53]</sup>的研究发现添加 VC 不仅可以降低沙棘酒的褐变度,同时可以减少沙棘酒中 5-HMF 的产生。然而有研究表明,在含有儿茶素和绿原酸的模拟葡萄酒系统中,添加 VC 后模拟体系的褐变率更高<sup>[54]</sup>。Chinnici 等<sup>[55]</sup>的研究表明在白葡萄酒模拟体系中添加 VC 时,在储存前 30 d 能够有效抑制褐变,但储存 120 d 后褐变率反而高于对照体系。

#### (4) 乙二胺四乙酸

乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)是一种金属螯合剂,通常以 EDTA-2Na 形式添加于果酒加工过程中。EDTA 在室温下容易与铁、铜、钙等金属离子螯合,形成不活泼的水溶性络合物,从而抑制氧化和电子转移,防止金属离子引起的褐

变<sup>[46]</sup>。EDTA 还可以通过抑制 PPO 的活性来降低猕猴桃果酒酿造过程中的褐变程度<sup>[56]</sup>。有研究表明, 50°C条件下, 在含 100 mmol·L<sup>-1</sup> 4-甲基儿茶酚、12% (v·v<sup>-1</sup>) 乙醇、8 g·L<sup>-1</sup> 酒石酸, pH 为 3.6 的模拟葡萄酒中添加 EDTA 可有效减少乙醛的生成, 而在室温条件下, 乙醛的生成增加<sup>[57]</sup>。闫公昕的研究表明添加 EDTA-2Na 能够有效抑制沙棘酒的褐变, 且 EDTA-2Na 质量浓度越高抑制效果越好<sup>[53]</sup>。

由于果酒内源环境(酚类、糖类、氨基酸、VC、pH 等)和外源条件(温度、光照、溶解氧水平等)的不同, 导致各褐变抑制剂对不同果酒的色泽影响不同, 有必要研究不同褐变抑制剂对猕猴桃果酒品质的影响, 找出能够有效抑制猕猴桃果酒褐变的褐变抑制剂。

## 1.5 立题背景与意义

2022 年全球猕猴桃总产量约为 440 万吨, 我国作为猕猴桃第一生产大国, 年总产量约为 220 万吨。将猕猴桃加工成果酒不仅可以解决猕猴桃采收期短、不耐储存运输造成的资源浪费问题, 还可以提高猕猴桃的附加值。然而目前关于猕猴桃果酒的研究较少, 仍有诸多瓶颈问题阻碍着猕猴桃果酒产业的发展, 如缺乏专用酿酒酵母、键合态香气物质开发不足、易发生褐变等。

目前猕猴桃果酒酿造所使用的菌株多为商业果酒酿酒酵母, 很大程度上导致了猕猴桃果酒品质同质化, 典型性不足, 严重影响了猕猴桃果酒的香气品质; 猕猴桃果实中含有丰富的无味糖苷键合态香气物质, 这些物质可被酵母产生的  $\beta$ -G 水解释放出游离香气物质。然而, 酿酒酵母常常低产甚至无  $\beta$ -G 活性, 而非酿酒酵母常被报道具有较强的  $\beta$ -G 活性, 将其与酿酒酵母进行混菌发酵可促进猕猴桃中键合态香气物质水解释放出游离态香气物质; 同时, 猕猴桃果酒在生产过程中会发生严重的褐变, 导致其颜色发暗、感官品质降低。

为此, 本研究旨在筛选发酵性能优良的本土酿酒酵母及产  $\beta$ -G 的非酿酒酵母来提高猕猴桃果酒的典型性、改善其风味品质; 同时明确猕猴桃果酒生产过程中导致褐变的主要因素并找到可行的褐变抑制剂。本研究可为解决猕猴桃果酒生产过程中的瓶颈问题提供理论支撑, 有助于推动我国猕猴桃产业发展、振兴乡村经济。同时为其它典型性欠佳、风味不足、易褐变果酒的研发提供参考。

## 1.6 主要研究内容

本研究首先筛选出 1 株适于猕猴桃果酒酿造的本土酿酒酵母, 进一步筛选产  $\beta$ -G 的非酿酒酵母进行混菌发酵, 考察混菌发酵对猕猴桃果酒品质的影响; 同时探究褐变抑制剂对猕猴桃果酒品质的影响及导致褐变的主要因素, 为改善猕猴桃果酒品质、推动猕猴桃果酒产业发展提供依据。主要研究内容如下:

### (1) 酿酒酵母的筛选及其发酵猕猴桃果酒品质分析

从不同原料中经多级筛选出 2 株表型较优的本土酿酒酵母, 以 2 株商业果酒酵母和 1 株产香酵母为对照, 综合比较各酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的理化及感官品质, 确定最适宜猕猴桃果酒酿造的酿酒酵母, 明确影响猕猴桃果酒感官品质的关键化合物。

(2) 产  $\beta$ -G 非酿酒酵母的筛选及其在猕猴桃果酒酿造中的应用

筛选高产  $\beta$ -G 且耐受性强的非酿酒酵母, 将其与最佳酿酒酵母混菌发酵猕猴桃果酒, 监测发酵过程中微生物的动态变化, 测定不同接种方式发酵猕猴桃果酒的理化指标并进行感官品评, 探究混菌发酵对猕猴桃果酒品质的影响。

(3) 猕猴桃果酒褐变主导因素的确定及褐变抑制剂对酒体品质的影响

考察添加不同褐变抑制剂的猕猴桃果酒储存过程中的褐变度及储存末期的褐变因素, 找出具有褐变抑制效果的褐变抑制剂, 并考察此褐变抑制剂对猕猴桃果酒品质的影响, 同时明确导致猕猴桃果酒褐变的主要因素。

## 第二章 材料与amp;方法

### 2.1 实验材料与amp;仪器

#### 2.1.1 主要原料

本研究中所使用的黄心猕猴桃汁由四川广元猕猴桃果园提供，均为去皮后的完整果肉榨成的汁（简称猕猴桃汁）。共有三批猕猴桃汁，由于采收时间及气候环境等客观原因，每批猕猴桃汁的基本理化指标及感官品质均有差异。如表 2-1 所示，第一批和第二批猕猴桃汁的品质较为接近，品质较好，分别用于酿酒酵母筛选相关内容（2.2.2）和混菌发酵相关内容（2.2.3）；第三批猕猴桃汁与前两批差异较大，用于褐变抑制相关内容（2.2.4）。酿酒酵母的筛选原料为四川广元猕猴桃果园提供的新鲜猕猴桃，包括黄心猕猴桃和红心猕猴桃。商业果酒酿酒酵母 AQ-sy（简称 AQ）和 71B，分别购自安琪股份有限公司和帝伯仕公司；产香酵母 JN3（酿酒酵母）和 91 株非酿酒酵母，均由实验室提供。

表 2-1 实验所用猕猴桃汁信息

Table 2-1 Information of juice used in the experiment

项目	第一批	第二批	第三批
总酸 (g·L <sup>-1</sup> , 以酒石酸计)	13.90±0.05	13.63±0.11	13.80±0.12
总糖 (g·L <sup>-1</sup> , 以葡萄糖计)	105.00±0.21	111.30±0.31	110.50±0.05
色泽	黄色	黄色	浅黄色
感官品质	果香浓郁	果香浓郁	香气单薄, 涩味重

#### 2.1.2 主要试剂

蔗糖、果胶酶（酶活：30000 U·g<sup>-1</sup>）和偏重亚硫酸钾均为食品级，分别购于云南滇鹏糖业有限公司、帝斯曼（中国）有限公司和江苏采薇生物科技有限公司；葡萄糖、酵母膏、胰蛋白胨、琼脂粉为生化试剂，福林酚、碳酸钠、铁氰化钾、氯化钠、磷酸二氢钾、硫酸铵、三氯乙酸、硫酸镁等常规化学试剂均为分析纯，购自中国国药集团化学试剂有限公司；奎尼酸、柠檬酸、苹果酸等有机酸、没食子酸、原儿茶酸、儿茶素等单体酚、3,5-二硝基水杨酸、2,2-联苯基-1-苦基肼基（2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH）、2,2'-联氮双-（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）二铵盐 [2,2'-azinobis（3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid）ammonium salt, ABTS]、VC、EDTA、GSH、5-HMF 为基准试剂纯，2-辛醇为色谱纯，购自上海麦克林生化科技有限公司；七叶苷、4-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷（*p*-nitrophenyl-β-D-glu-copyranoside, *p*-NPG）、对硝基苯酚（*p*-nitrophenyl, *p*-NP）为分析纯，购自阿拉丁（上海）生物科技有限公司；甲醇、甲酸均为色谱纯，购自上海泰坦科技股份有限公司，WLN 培养基购自海博生物技术有限公司。

#### 2.1.3 培养基的制备

##### (1) YPD 培养基

葡萄糖 2.0%、胰蛋白胨 2.0%、酵母提取物 1.0%，固体培养基中另加琼脂 2.0%，115°C灭菌 20 min。

### (2) 七叶苷培养基

七叶苷 0.3%，氯化铁 0.05%，氯化钠 0.2%，硫酸镁 0.05%，磷酸二氢钾 0.1%，用氯化钠调整 pH 为 5.0，琼脂 2%，115°C灭菌 20 min。

### (3) 发酵培养基

葡萄糖 2.0%，蛋白胨 2.0%，酵母提取物 1.0%，磷酸二氢钾 0.4%，硫酸铵 0.3%，吐温 80 2.0 mL·L<sup>-1</sup>，自然 pH，115°C灭菌 30 min。

## 2.1.4 主要仪器设备

表 2-2 实验所用仪器信息

Table 2-2 Information of instruments used in the experiment

仪器	型号	公司名称
隔水式恒温培养箱	GHP-9050	上海一恒科学仪器有限公司
低温培养箱	LRH-250CL	上海一恒科学仪器有限公司
显微镜	M150	麦克奥迪实业集团有限公司
洁净工作台	JB-CJ-1FC	苏州佳宝净化工程设备有限公司
PCR 仪	AG 22331 Hamburg	德国 Eppendorf 公司
台式高速冷冻离心机	H1750R	长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪
高速冷冻离心机	Thermo Frescol17	闵龙生物科技（上海）有限公司
组合式摇床	HYL-C	太仓市强文实验设备有限公司
精密电子天平	EL204	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
电子天平	PR2202ZH/E	奥豪斯仪器（常州）有限公司
数显恒温水浴锅	JJ-6B	常州金坛精达仪器制造有限公司
冰箱	BCD-576WDPU	青岛海尔股份有限公司
高压蒸汽灭菌器	MLS-3781L-PC	松下健康医疗器械（上海）有限公司
酶标仪	EPOCH2T	美国 BioTek 公司
pH 计	PHS-3E	MettlerToledo 公司
紫外可见分光光度计	T6 新世纪	北京普析通用仪器有限责任公司
超声波清洗器	KQ-300DE	昆山市超声仪器有限公司
高效液相色谱分析仪	Agilent 1260	美国 Agilent 科技有限公司
游离氨基酸分析专用	Agilent 1100	美国 Agilent 科技有限公司
高效液相色谱仪	Agilent 1100	美国 Agilent 科技有限公司
气质联用仪	QP2010Ultra	美国 Agilent 科技有限公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 猕猴桃果酒酿造工艺

除特殊说明外，本研究中猕猴桃果酒的酿造工艺均如下：每升猕猴桃汁中添加蔗糖 105 g（使总糖含量达 200~220 g·L<sup>-1</sup>）、偏重亚硫酸钾 100 mg、果胶酶 1 g，搅拌均匀后密闭常温酶解 4 h，即为初始发酵液。500 mL 三角瓶装初始发酵液 300 mL（60%装液系数），酿酒酵母的接种量始终为 1×10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>，于 20°C低温培养箱进行酒精发酵。通过测定 CO<sub>2</sub> 质量损失来监测发酵过程，即每 12 h 称重发酵体系，至失重小于 0.2 g 时结束发酵。

## 2.2.2 酿酒酵母的筛选及其发酵猕猴桃果酒品质分析

### (1) 菌株的分离纯化

将果园提供的黄心猕猴桃和红心猕猴桃分别带皮榨汁后，调整总糖含量达到 200~220 g·L<sup>-1</sup>，偏重亚硫酸钾 100 mg·L<sup>-1</sup>、果胶酶 1 g·L<sup>-1</sup>，常温下酶解 4 h 后分别量取 100 mL 调整后的成分于 250 mL 三角瓶中，于 20°C 恒温培养箱自然发酵。待瓶内有气泡产生时，分别取摇匀的发酵液 0.1 mL 稀释涂布，将不同梯度的稀释液涂布于含 10% (v·v<sup>-1</sup>) 乙醇、25 μg·L<sup>-1</sup> 氯霉素的 YPD 平板上，30°C 培养 48~72 h。挑选具有典型酵母形态特征的单菌落进行平板划线分离，直至纯化。

### (2) 菌株的初筛

用液体 YPD 培养分离纯化后的菌株，使其密度达到 1×10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>，并以 3% 的接种量接入含 7 mL 处理猕猴桃汁(调整猕猴桃汁总糖 200 g·L<sup>-1</sup>，偏重亚硫酸钾 100 mg·L<sup>-1</sup>，果胶酶 1 g·L<sup>-1</sup>，密闭常温酶解 4 h 后过滤所得的液体)的试管中，试管内有倒扣且充满处理猕猴桃汁的杜氏小管。在 30°C 条件下静置培养，每 2 h 观察产气情况。选取产气速度快，产气能力最强的 20 株菌株进行下一步实验。

### (3) 菌株的复筛

将初筛获得菌株进行 ITS rDNA 分子生物学菌种鉴定，将鉴定结果为酿酒酵母的菌株进行猕猴桃果酒酿造，通过测定 CO<sub>2</sub> 质量损失来监测发酵过程。感官品评小组对不同酿酒酵母发酵的酒样进行嗅觉测试，进一步测定嗅觉评价较高酒样的基本理化指标，初步选择综合性能最优的 2 株本土酿酒酵母用于猕猴桃果酒酿造。

### (4) 不同来源酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的理化及感官品质分析

将复筛所得的 2 株本土酿酒酵母 GC-31 和 XX-16 与 2 株商业果酒酵母 AQ、71B 及 1 株实验室保藏的产香酵母 JN3 进行猕猴桃果酒酿造，通过测定 CO<sub>2</sub> 质量损失来监测发酵过程。对于 12°C 存放 21 d 的酒样的常规理化指标(发酵周期、总糖、总酸、酒精度、褐变度 A<sub>420</sub>)、总酚、体外抗氧化活性、呈味物质(单体酚、有机酸、游离氨基酸)和挥发性风味化合物进行测定，并对 5 种酒样进行感官品评，全面评估 5 株酿酒酵母发酵酒样的品质，确定最适宜猕猴桃果酒酿造的酿酒酵母。

同时，通过气味活性值(Odor activity value, OAV)确定各猕猴桃果酒的呈香物质(OAV>1)，采用偏最小二乘回归(Partial least squares regression, PLSR)分析猕猴桃果酒的呈香呈味物质对感官品质的贡献，找出决定猕猴桃果酒感官品质的关键化合物。

## 2.2.3 产 β-葡萄糖苷酶非酿酒酵母的筛选及其在猕猴桃果酒酿造中的应用

### (1) 产 β-G 非酿酒酵母的初筛

将 180 μL 七叶苷培养基添加到 96 孔板中，培养基凝固后，将从实验室获得的 91 株非酿酒酵母在液体 YPD 中于 30°C、220 r·min<sup>-1</sup> 条件下活化 36 h 后所得菌株培养液接种于 96 孔板中，每个孔 20 μL，将 96 孔板置于 30°C 培养箱中培养 24 h。根据颜色深浅初步判定酶活力大小，以显示深黑色的为高产 β-G 潜力菌株。

### (2) 产 β-G 非酿酒酵母的复筛

将初筛得到的高产  $\beta$ -G 潜力菌株经液体 YPD 活化后以 5% 的接种量接入 30 mL 发酵培养基中，于 30°C、220 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 72 h，取发酵液于 10000×g 离心 10 min，收集上清液，即为粗酶液，测定  $\beta$ -G 活性，以酶活最高的 3 株菌株进行下一轮筛选。

### (3) 产 $\beta$ -G 非酿酒酵母的耐受性测试

对复筛所得的产  $\beta$ -G 能力强的 3 株非酿酒酵母进行酒精、pH 和 SO<sub>2</sub> 耐受性测试，以确定最具应用潜力的非酿酒酵母。

#### ① 酒精耐受性

调整液体 YPD 的乙醇体积分数为 0、2%、4%、6%、8%、10%、12% (v·v<sup>-1</sup>)，以 2% 的接种量接入活化 24 h 的菌株，于 30°C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养 24 h，测定生长液在 600 nm 处的吸光度。

#### ② pH 耐受性测试

将活化 24 h 的菌株以 2% 的接种量接种于 5 mL pH 分别为 3.0、3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、5.8 (自然 pH) 液体 YPD 中，于 30°C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养 24 h，测定生长液在 600 nm 处的吸光度。

#### ③ SO<sub>2</sub> 耐受性测试

将活化 24 h 的菌株以 2% 的接种量接种于 5 mL SO<sub>2</sub> 浓度分别为 0、50、100、150、200 mg·L<sup>-1</sup> 的液体 YPD 中，于 30°C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养 24 h，测定生长液在 600 nm 处的吸光度。本研究中 SO<sub>2</sub> 均以偏重亚硫酸钾加入，理论上偏重亚硫酸钾的 SO<sub>2</sub> 含量为 57%，由于损耗等原因，实际按 50% 计算，即 1 mg 偏重亚硫酸钾可产生 0.5 mg SO<sub>2</sub>。

### (4) 混菌发酵接种方式的确定

将最佳非酿酒酵母 N-12 与酿酒酵母 XX-16 混菌发酵猕猴桃果酒，以 XX-16 纯种发酵或 N-12 纯种发酵为对照，接种方式信息如表 2-3 所示。XX-16 的接种量始终为 1×10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>，N-12 的接种量始终为 1×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>。通过测定 CO<sub>2</sub> 的质量损失来监测发酵过程。对发酵过程中酵母的生长曲线进行测定，测定各猕猴桃果酒的基本理化指标并进行感官品评。除猕猴桃汁及接种方式不同之外，其余发酵条件均与 2.2.1 中严格一致。

表 2-3 接种方式信息

Table 2-3 Information of inoculation method

发酵类别	发酵方式	接种方法	酒样名称
纯种	酿酒酵母纯种	只接种 XX-16	CX
	非酿酒酵母纯种	只接种 N-12	CN
混菌	同时接种	N-12 和 XX-16 同时接种	NX
	顺序接种 (间隔 24 h)	先接种 N-12, 24 h 后接种 XX-16	NX24
	顺序接种 (间隔 48 h)	先接种 N-12, 48 h 后接种 XX-16	NX48

### (5) 混菌发酵对猕猴桃果酒品质的影响

为考察混菌发酵对猕猴桃果酒品质的影响，对不同接种方式发酵酒样的挥发性风味化合物、总酚及体外抗氧化活性、有机酸及单体酚进行测定分析。同时利用偏最小二乘法判别分析 (Partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 猕猴桃果酒中的呈香物

质，以对不同接种方式发酵的酒样进行风味识别。

## 2.2.4 猕猴桃果酒褐变主导因素的确定及褐变抑制剂对酒体品质的影响

### (1) 猕猴桃果酒的酿造

除使用的猕猴桃汁不同外，猕猴桃果酒的酿造工艺与 2.2.1 中严格一致，酿造酵母为 XX-16。

### (2) 褐变发生阶段的确定

监测猕猴桃果酒主发酵及储存过程中褐变度 ( $A_{420}$ ) 的变化，主发酵过程中每 1 d 取样一次，储存过程中每 15 d 取样一次，样品于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待测。

控制储存过程中的装液系数与主发酵过程中一致，均为 60%，同时较高的顶空氧可加速氧化进程，缩短观察周期。储存方法为：将 150 mL 猕猴桃果酒装入 250 mL 的透明密封玻璃瓶中，于  $25^{\circ}\text{C}$  恒温储存 90 d。通过褐变度变化值大小来确定褐变主要发生阶段。

### (3) 褐变抑制剂对褐变度的影响

在完成主发酵且经过滤的猕猴桃果酒中分别添加 VC、EDTA、GSH、 $\text{SO}_2$ （以偏重亚硫酸钾加入）4 种褐变抑制剂，每种抑制剂均有 3 种添加浓度，分别为 50、100、 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，储存方法同上。以不添加褐变抑制剂的猕猴桃果酒作为对照，通过比较褐变度来确定最具应用潜力的褐变抑制剂。

### (4) $\text{SO}_2$ 对猕猴桃果酒挥发性风味化合物及感官品质的影响

对初始酒样（储存 0 d）、储存末期（90 d）的对照酒样及添加  $\text{SO}_2$  的酒样的风味化合物进行测定，同时进行感官品评，以明确  $\text{SO}_2$  对猕猴桃果酒品质的影响。

### (5) 褐变主导因素的确定

考察添加 4 种褐变抑制剂的酒样储存末期时的褐变因素（总酚、VC、5-HMF、还原糖及单体酚），同时将褐变度和褐变因素进行相关性分析，找出导致猕猴桃果酒储存过程中褐变的主要因素。

## 2.3 分析方法

### 2.3.1 基本理化指标的测定

pH、总糖、总酸、乙醇含量的测定参考 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》<sup>[58]</sup>。

### 2.3.2 总酚含量的测定

总酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 法，参考 CujicN 等<sup>[59]</sup>的方法并进行修改。于 10 mL 棕色离心管中加入 0.5 mL 用蒸馏水稀释 10 倍的酒样、0.5 mL 用蒸馏水稀释 3 倍的 Folin-Ciocalteu 试剂。反应 4 min 后加入 1.5 mL  $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的碳酸钠溶液。室温避光孵育 2 h 后，用酶标仪测定反应液在 765 nm 处的吸光度。用没食子酸 ( $0\sim 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 校准标准曲线，总酚含量以没食子酸当量 ( $\text{mg GAE}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 表示。

### 2.3.3 体外抗氧化活性的测定

样品的体外抗氧化活性参照 Du 等<sup>[60]</sup>的测定方法并略微修改。以 VC 为标准品, 分别得到标准曲线为:  $y_{\text{DPPH}}=0.1474x-0.0663$ ,  $R^2=0.9999$ ;  $y_{\text{ABTS}^+}=3.5453x+5.4683$ ,  $R^2=0.9956$ ;  $y_{\text{还原力}}=1935.6x-8.8056$ ,  $R^2=0.9982$ 。结果均以 VC 当量 ( $\text{mg VC}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 表示。

#### (1) DPPH 自由基清除活性

于 10 mL 棕色离心管中加入 2 mL  $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DPPH 乙醇溶液和 2 mL 稀释 100 倍的酒样, 混匀后避光反应 30 min, 用全波长酶标仪测定反应液在 517 nm 处的吸光度。DPPH 清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100 \quad (1.1)$$

式中:  $A_0$ : 2.0 mL 无水乙醇+2.0 mL DPPH 乙醇溶液的吸光度;

$A_x$ : 2.0 mL 待测样品+2.0 mL DPPH 乙醇溶液的吸光度;

$A_{x0}$ : 2.0 mL 待测样品+2.0 mL 无水乙醇的吸光度。

#### (2) ABTS<sup>+</sup>自由基清除活性

将  $14 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ABTS 溶液和  $4.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  过硫酸钾溶液等体积混合, 避光放置 12~16 h, 使用前用蒸馏水稀释 (约 85 倍), 使得稀释液在 734 nm 处的吸光度为  $0.700\pm 0.020$ , 即为 ABTS<sup>+</sup>溶液。反应体系含有 2.90 mL ABTS<sup>+</sup>溶液、0.025 mL 用蒸馏水稀释 4 倍的待测样品和 0.075 mL 水, 6 min 后测量反应液在 734 nm 处的吸光度。ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_x - A_{x0}}{A_0}\right) \times 100 \quad (1.2)$$

式中:  $A_0$ : 2.90 mL ABTS<sup>+</sup>+0.1 mL 水的吸光度;

$A_x$ : 2.90 mL ABTS<sup>+</sup>+0.025 mL 待测样品+0.075 mL 水的吸光度;

$A_{x0}$ : 2.975 mL 水+0.025 mL 待测样品的吸光度。

#### (3) 还原力的测定

于 10 mL 棕色离心管中依次加入 0.9 mL 蒸馏水、0.1 mL 待测样品和 2.5 mL  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸缓冲液 (pH 6.6) 和 2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液, 摇匀后于  $50^\circ\text{C}$  水浴 20 min, 然后加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸, 摇匀后于  $6000\times g$  离心 5 min。取 2.5 mL 上清液于新的 10 mL 棕色离心管中, 并加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁, 摇匀后在 700 nm 处测定吸光度。空白测定: 在相同条件下, 用 0.1 mL 蒸馏水代替 0.1 mL 待测样品。

### 2.3.4 呈味物质的测定

#### (1) 有机酸

用高效液相色谱法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 测定样品中的奎尼酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、丙酸、正丁酸和富马酸。将样品经  $0.22 \mu\text{m}$  水系微孔滤膜过滤后直接进样, 色谱柱: Acclaim 有机酸分析柱  $5 \mu\text{m}$  ( $4.0\times 250 \text{ mm}$ ); 流动相 A: 5% 甲醇-95% 磷酸水溶液 (0.05%) 混合; 流动相 B: 20% 甲醇-80% 磷酸水溶液 (0.05%) 混合; 流速:  $0.60 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 检测波长: 210 nm; 进样体积:

20  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱程序：0~5 min, 100% A, 0% B; 5~15 min, 90% A, 10% B; 15~45 min, 0% A, 100% B; 45~50 min, 0% A, 100% B; 50~60 min, 100% A, 0% B; 60~65 min, 100% A, 0% B。

### (2) 单体酚

采用 HPLC 对没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、丁香酸、香草酸和表儿茶素进行定量分析, 参照 Yang 等<sup>[61]</sup>的方法并进行。

### (3) 游离氨基酸

采用 HPLC 测定样品中的游离氨基酸。将样品用 5% 三氯乙酸稀释 5 倍, 室温静置 1 h, 然后于 10000 $\times$ g 离心 10 min, 并用 0.22  $\mu\text{m}$  水系微孔滤膜过滤。进样体积: 10  $\mu\text{L}$ ; 流速: 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 色谱柱: Agilent Hypersil ODS 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 脯氨酸为 262 nm, 其余氨基酸为 338 nm; 流动相 A (pH 7.2): 27.6  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸钠-三乙胺-四氢呋喃 (500:0.11:2.5, v:v:v); 流动相 B (pH 7.2): 80.9  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸钠-甲醇-乙腈 (1:2:2, v:v:v)。洗脱程序: 0 min, 92% A, 8% B; 17 min, 50% A, 50% B; 20.1 min, 0% A, 100% B; 24.0 min, 100% A, 0% B。

本实验中所有 HPLC 测定的项目均通过对比标准品的保留时间进行定性, 通过外标法进行定量。

## 2.3.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的测定

### (1) $\beta$ -G 酶活力单位定义

酶活力单位 (U) 定义为 pH 5.0、50 $^{\circ}\text{C}$  反应条件下, 1 min 水解 *p*-NPG 产生 1  $\mu\text{mol}$  *p*-NP 所需的酶量。

### (2) $\beta$ -G 酶活力测定方法

$\beta$ -G 酶活力测定参考杨丽霞<sup>[62]</sup>的方法并稍作修改。取 0.1 mL 酶液与 0.2 mL 35  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  *p*-NPG (pH 5.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液配制) 混匀, 于 50 $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 后立即取出, 加入 1.5 mL 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的碳酸钠溶液终止反应并显色, 于 400 nm 波长处测定吸光度。以加热失活的酶液按照相同的处理作为空白。

### (3) 标准曲线的测定

准确配制 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 *p*-NP 母液, 再分别吸取 0、2、4、6、8、10、12、20、40 mL 母液于 100 mL 容量瓶中, 用 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的碳酸钠定容成质量浓度分别为 0、20、40、60、80、100、120、200、400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 *p*-NP 标准溶液, 混匀后于波长 400 nm 处测定吸光度。以 *p*-NP 质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线为  $y=0.0020x-0.0054$ ,  $R^2=0.9999$ 。

## 2.3.6 褐变度的测定与分析方法

猕猴桃果酒的褐变度参考 Webber 等<sup>[50]</sup>的方法测定并稍作修改。取于 10000 $\times$ g 离心 10 min 后的酒样 3 mL, 以等体积蒸馏水为空白, 用紫外分光光度计测定酒样在 420 nm 处的吸光度, 即为酒样的褐变度。褐变度变化值 ( $\Delta B$ ) =  $B_1 - B_0$ ,  $B_1$  为酒样储存节点的褐变度,  $B_0$  为初始酒样的褐变度; 褐变抑制效果用褐变度变化率表征:

$$\text{褐变度变化率 (\%)} = \left( \frac{\Delta B_0 - \Delta B_1}{\Delta B_0} \right) \times 100 \quad (1.3)$$

式中： $\Delta B_0$ ：对照酒（不添加褐变抑制剂）的褐变度变化值；

$\Delta B_1$ ：待测酒（添加褐变抑制剂）的褐变度变化值。

### 2.3.7 褐变因素的测定

#### (1) VC

猕猴桃果酒中 VC 含量的测定参考钱志瑶等<sup>[63]</sup>的方法。色谱条件如下：流动相 A：0.05%草酸水溶液；流动相 B：甲醇；流动相比例：A:B=98:2 (v:v)；柱温：25℃；流速：0.7 mL·min<sup>-1</sup>；检测波长：245 nm；进样体积：10 μL。标准曲线为  $y=0.033x+0.0741$ ， $R^2=0.9992$ 。

#### (2) 5-HMF

采用 HPLC 法测定猕猴桃果酒中 5-HMF 的含量<sup>[64]</sup>。色谱条件如下：流速：1.0 mL·min<sup>-1</sup>；柱温：30℃；流动相 A：乙腈，流动相 B：蒸馏水；流动相比例：A:B=20:80 (v:v)；等度洗脱时间：10 min；进样体积：10 μL；检测波长：280 nm。标准曲线为  $y=0.026x+0.2951$ ， $R^2=0.9992$ 。

#### (3) 还原糖

猕猴桃果酒中的还原糖含量采用 DNS 法测定，标准曲线为  $y=0.3344x-0.0006$ ， $R^2=0.9962$ 。

#### (4) 总酚及单体酚

总酚及单体酚的测定方法分别与 2.3.2、2.3.4 中一致。

### 2.3.8 挥发性风味化合物的测定与分析方法

采用气相色谱-质谱联用仪 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 对猕猴桃果酒中的挥发性风味化合物进行测定，参考 Tian 等<sup>[24]</sup>的方法进行。

定性定量：通过与 NIST05 质谱库 (Agilent Technologies Inc) 中的标准光谱进行检索比对，并根据改进 Kovats 的方法计算每种挥发性风味化合物的保留指数 (RI) 确认化合物种类<sup>[65]</sup>，各挥发性风味化合物的含量根据内标法计算<sup>[66]</sup>。

各挥发性风味化合物对猕猴桃果酒香气的贡献率用 OAV 衡量， $OAV>1$  的物质为呈香物质，OAV 越大的挥发性风味化合物对酒体的整体香气贡献越大<sup>[67]</sup>。计算公式： $OAV=c/t$ ，式中  $c$  是样品中各挥发性风味化合物的含量 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )， $t$  是挥发性风味化合物的气味阈值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )，气味阈值取自文献中可用的信息<sup>[68,69]</sup>。

### 2.3.9 感官品评

猕猴桃果酒的感官品评参考 Yang 等<sup>[61]</sup>的方法并进行修改。由 20 名评委 (10 名女性和 10 名男性，年龄在 20~50 岁之间) 组成的训练有素的品评小组对酒样的感官品质进行评估。在不同样品的评估之间提供漱口水，以避免余味的残留效应。小组成员给出猕猴桃果酒的感官品质得分，包括香气、可接受性、典型性、酸度和色泽的评分 (表 2-4)。

表 2-4 猕猴桃果酒感官评分标准

Table 2-4 The standard for sensory evaluation of kiwi fruit wine

感官属性	感官描述	得分
香气 (30 分)	花果香突出, 优雅, 酒香浓郁	20~30
	花果香较淡	10~20
	花果香很淡	0~10
可接受性 (20 分)	酒体饱满, 协调醇厚, 涩度甜度适中	15~20
	酒体较清淡、较酸、较甜	10~15
	酒体很清淡、太甜或太苦	0~10
典型性 (20 分)	具有猕猴桃的独特风格, 典型特色突出	15~20
	猕猴桃的独特风格不足	10~15
	猕猴桃的独特风格很不足, 无典型特色	0~10
酸度 (20 分)	酸度适中	15~20
	较酸	10~15
	尖酸	0~10
色泽 (10 分)	黄色	8~10
	黄棕色	5~8
	棕色	0~5

### 2.3.10 数据分析

数据以平均值±标准差表示, 在结果与讨论以平均值出现; 用 Origin 软件作图; 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析、Pearson 相关性分析; 使用 The UnscramblerX 10.4 软件进行偏最小二乘回归 PLSR 分析; 利用 SIMCA 14.1 软件做 PLS-DA 分析。

## 第三章 结果与讨论

### 3.1 酿酒酵母的筛选及其发酵猕猴桃果酒品质的分析

#### 3.1.1 酿酒酵母的筛选

##### (1) 菌株的分离纯化

通过观察菌株在 YPD 平板上的菌落特征, 从红心和黄心猕猴桃自然发酵液中共挑选出 104 株具有典型酵母形态特征的菌株, 编号分别为 GC-1~GC-58, XX-1~XX-46。

##### (2) 菌株的初筛

在发酵过程中, 酵母将糖转化成酒精和 CO<sub>2</sub>, 杜氏小管中产生气泡的速率和体积能直接反映出菌株的发酵能力。104 株菌株的杜氏小管产气实验结果如表 3-1 所示, 以 10 h 内最先产气充满杜氏小管的 20 株菌株作为发酵力强的菌株进行下一级筛选。

表 3-1 杜氏小管产气实验结果

Table 3-1 Results of gas production test with Durham tubes

发酵时间 (h)	产气量	菌株数
8	+	42
	++	9
	+++	15
	++++	2
10	+	29
	++	28
	+++	9
	++++	20
12	+	17
	++	24
	+++	27
	++++	31

注: “+、++、+++、++++” 分别表示产气量约等于杜氏小管体积的 1/4、2/4、3/4、4/4; 未展示产气量小于杜氏小管体积 1/4 的菌株数。

##### (3) 菌株的复筛

ITS rDNA 序列鉴定结果表明 20 株发酵力较强的菌株均为酿酒酵母, 将这 20 株酿酒酵母用于猕猴桃果酒酿造, 对所得酒样进行嗅觉测试, 并进一步测定嗅觉评价良好的酒样的基本理化指标(表 3-2)。本土酿酒酵母 GC-31 和 XX-16 发酵的酒样花果香突出, 酒体醇厚, 且总酸含量较低, 主发酵周期均为 5.0 d, 因此, 初步选择 GC-31 和 XX-16 作为猕猴桃果酒酿造的酿酒酵母。

表 3-2 复筛酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的嗅觉评价与基本理化指标

Table 3-2 Olfactory evaluation and basic physicochemical indicators of kiwi fruit wines fermented by further screened *S. cerevisiae*

样品名称	酒精度 (% (v·v <sup>-1</sup> ))	总糖 (g·L <sup>-1</sup> )	总酸 (g·L <sup>-1</sup> )	发酵周期 (d)	嗅觉评价
GC-4	10.7±0.1	4.33±0.13	15.97±0.08	4.5±0	花果香突出
GC-10	10.3±0.2	4.21±0.10	16.12±0.04	5.5±0	花果香突出
GC-31	10.6±0.1	3.22±0.11	15.46±0.05	5.0±0	花果香突出, 酒体醇厚
XX-9	10.4±0.3	3.32±0.15	15.57±0.10	5.5±0	花果香突出
XX-12	10.8±0.1	4.03±0.14	16.12±0.09	6.0±0	花果香较突出, 醇香较差
XX-16	10.8±0.1	3.83±0.11	15.46±0.03	5.0±0	花果香突出, 酒体醇厚

### 3.1.2 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的基本理化指标

以 2 株商业果酒酵母 AQ、71B 和 1 株实验室保藏的产香酵母 JN3 为对照, 比较了 5 株酿酒酵母发酵的猕猴桃果酒的基本理化指标 (表 3-3)。2 株本土酿酒酵母 GC-31 和 XX-16 的发酵力更强, 较其余 3 株酿酒酵母提前 0.5 d 完成主发酵, 这可能是因为二者均分离自猕猴桃原料中, 能更好地适应发酵环境, 从而快速完成发酵。5 种酒样的酒精度在 10.6%~10.8% (v·v<sup>-1</sup>) 之间, 彼此之间无显著差异, 总酸含量在 15.24~16.01 g·L<sup>-1</sup> 之间, 而猕猴桃汁的总酸含量为 13.90 g·L<sup>-1</sup>, 这表明酒样中的大部分酸来自原料本身。与猕猴桃汁相比, 酒样的褐变度 A<sub>420</sub> 均显著升高, 增加了 0.048~0.104。颜色是果酒的重要指标, 为味觉和风味感官特征提供视觉指导, 影响着消费者的喜好。因此, 有必要采取措施抑制猕猴桃果酒的褐变。

表 3-3 猕猴桃汁及不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的基本理化指标

Table 3-3 Basic physicochemical indicators of kiwi juice and kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae*

样品名称	发酵周期 (d)	酒精度 (% (v·v <sup>-1</sup> ))	总糖 (g·L <sup>-1</sup> )	pH	总酸 (g·L <sup>-1</sup> )	A <sub>420</sub>
猕猴桃汁	nd	nd	105.6±0.21 <sup>a</sup>	3.31±0.01 <sup>b</sup>	13.90±0.05 <sup>e</sup>	0.553±0.001 <sup>e</sup>
AQ	5.5±0 <sup>a</sup>	10.6±0.1 <sup>a</sup>	5.54±0.18 <sup>b</sup>	3.24±0.01 <sup>e</sup>	15.24±0.02 <sup>d</sup>	0.640±0.001 <sup>b</sup>
JN3	5.5±0 <sup>a</sup>	10.8±0.1 <sup>a</sup>	3.91±0.13 <sup>e</sup>	3.27±0.01 <sup>cd</sup>	16.01±0.07 <sup>a</sup>	0.657±0.001 <sup>a</sup>
71B	5.5±0 <sup>a</sup>	10.7±0.1 <sup>a</sup>	3.83±0.13 <sup>e</sup>	3.26±0.01 <sup>d</sup>	15.48±0.04 <sup>b</sup>	0.603±0.001 <sup>d</sup>
GC-31	5.0±0 <sup>b</sup>	10.6±0.1 <sup>a</sup>	5.11±0.12 <sup>c</sup>	3.28±0.01 <sup>c</sup>	15.48±0.03 <sup>b</sup>	0.601±0.005 <sup>d</sup>
XX-16	5.0±0 <sup>b</sup>	10.8±0.1 <sup>a</sup>	4.38±0.17 <sup>d</sup>	3.35±0.01 <sup>a</sup>	15.33±0.03 <sup>c</sup>	0.607±0.003 <sup>c</sup>

注: “nd”: 未检测; 每一列中不同字母表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 3.1.3 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的总酚及体外抗氧化活性

酚类对人体有多种有益作用, 如抗氧化活性、抗菌活性等<sup>[70]</sup>。如图 3-1 所示, 5 种猕猴桃果酒的总酚含量及 3 项体外抗氧化活性指标均显著低于猕猴桃汁, 这是由于酿造过程中酚类物质发生了氧化, 导致体外抗氧化活性降低。GC-31 和 XX-16 发酵的酒样的总酚含量分别为 733.30、740.51 mg GAE·L<sup>-1</sup>, 显著高于 3 株对照菌株发酵的酒样 (638.27~666.66 mg GAE·L<sup>-1</sup>)。同时, XX-16 发酵的酒样的体外抗氧化活性显著高于其余 4 株酿酒酵母发酵的酒样, 其还原力、ABTS<sup>+</sup>及 DPPH 自由基清除活性分别为 635.75、

603.21、743.35 mg VC·L<sup>-1</sup>。

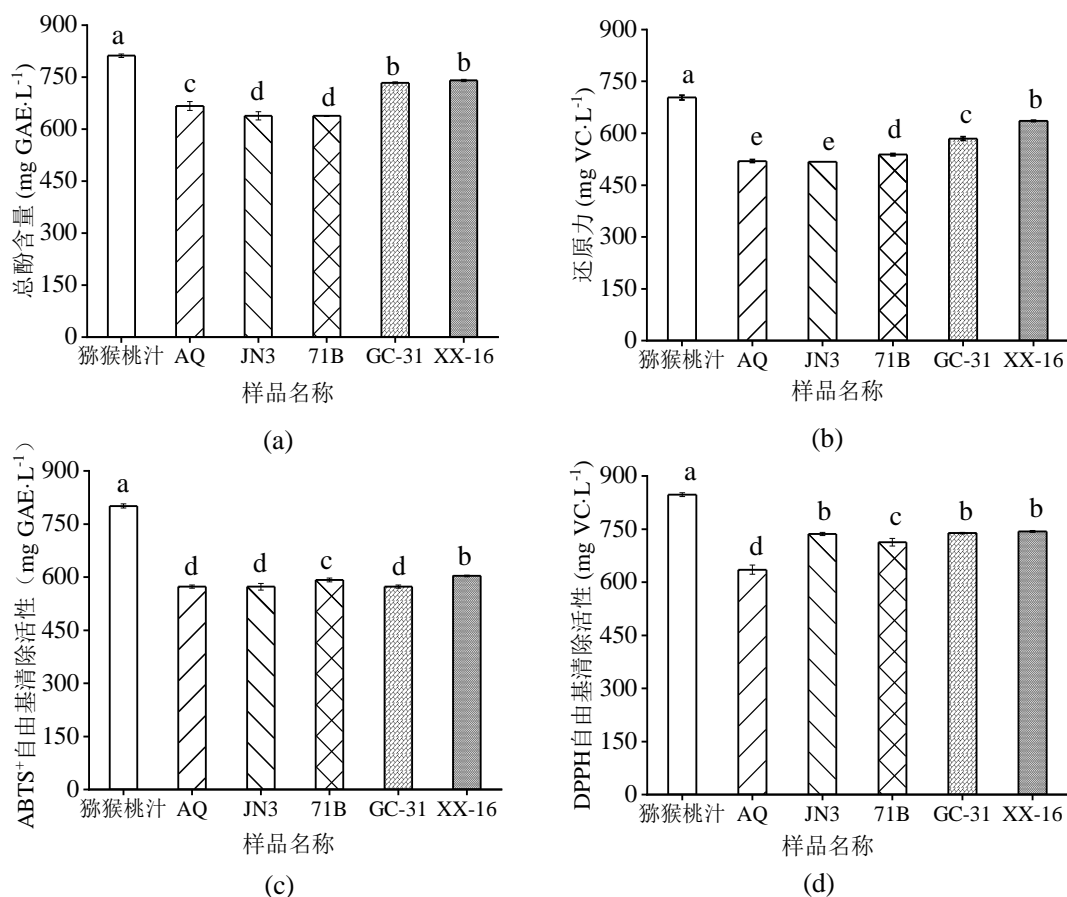


图 3-1 猕猴桃汁及不同酿酒酵母发酵的猕猴桃果酒的总酚含量及体外抗氧化活性  
Figure 3-1 Total phenolic content and antioxidant activity in vitro of kiwi juice and kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae*

注：各图中不同字母表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 3.1.4 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的呈味物质

#### (1) 有机酸

果酒中的有机酸对口感的平衡有着至关重要的作用，如果酸度过高，果酒会尖酸且令人不快，酸度过低则会使酒体寡淡乏味<sup>[71]</sup>。如表 3-4 所示，奎尼酸、柠檬酸和苹果酸是猕猴桃汁和酒样中的主要有机酸，其占猕猴桃汁总有机酸的 92.59%，在酒样中的占比为 87.01%~88.70%。猕猴桃汁中未检出琥珀酸，而在酒样中其含量在 1.14~1.47 g·L<sup>-1</sup> 之间，说明琥珀酸主要由酵母在发酵过程中代谢产生。有研究显示，琥珀酸含量增加是导致卡瓦酒总酸含量增加的主要原因<sup>[72]</sup>。乙酸是监控葡萄酒生产过程是否被细菌污染以及储存过程中是否酸败变质的重要指标，巴西立法对葡萄汁和葡萄酒中乙酸含量的限制分别为 0.25、1.50 g·L<sup>-1</sup><sup>[73]</sup>。本研究中猕猴桃汁和 5 种酒样中的乙酸含量较低，在 0.031~0.090 g·L<sup>-1</sup> 之间，表明发酵环境良好。

表 3-4 猕猴桃汁及不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的有机酸

Table 3-4 Organic acids of kiwi juice and kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae*

有机酸	猕猴桃汁	AQ	JN3	71B	GC-31	XX-16
奎尼酸 (g·L <sup>-1</sup> )	8.94±0.20 <sup>c</sup>	9.79±0.21 <sup>ab</sup>	9.94±0.23 <sup>a</sup>	9.85±0.23 <sup>ab</sup>	9.54±0.19 <sup>ab</sup>	9.46±0.20 <sup>b</sup>
柠檬酸 (g·L <sup>-1</sup> )	7.67±0.17 <sup>a</sup>	7.30±0.19 <sup>bc</sup>	7.40±0.21 <sup>ab</sup>	7.19±0.22 <sup>bc</sup>	7.06±0.19 <sup>c</sup>	7.32±0.18 <sup>bc</sup>
苹果酸 (g·L <sup>-1</sup> )	2.41±0.16 <sup>c</sup>	3.08±0.15 <sup>b</sup>	3.55±0.14 <sup>a</sup>	2.50±0.13 <sup>c</sup>	3.55±0.16 <sup>a</sup>	2.90±0.17 <sup>b</sup>
乳酸 (g·L <sup>-1</sup> )	0.16±0.03 <sup>c</sup>	0.54±0.05 <sup>b</sup>	0.54±0.06 <sup>b</sup>	0.70±0.06 <sup>a</sup>	0.52±0.04 <sup>b</sup>	0.52±0.05 <sup>b</sup>
乙酸 (g·L <sup>-1</sup> )	0.044 ±0.001 <sup>c</sup>	0.058 ±0.002 <sup>b</sup>	0.090 ±0.002 <sup>a</sup>	0.031 ±0.003 <sup>c</sup>	0.038 ±0.002 <sup>d</sup>	0.046 ±0.001 <sup>c</sup>
琥珀酸 (g·L <sup>-1</sup> )	-	1.15±0.13 <sup>b</sup>	1.14±0.15 <sup>b</sup>	1.47±0.14 <sup>a</sup>	1.18±0.15 <sup>b</sup>	1.30±0.15 <sup>ab</sup>
丙酸 (g·L <sup>-1</sup> )	0.37±0.02 <sup>a</sup>	0.26±0.03 <sup>b</sup>	0.27±0.04 <sup>b</sup>	0.18±0.01 <sup>c</sup>	0.26±0.03 <sup>b</sup>	0.27±0.02 <sup>b</sup>
丁酸 (g·L <sup>-1</sup> )	0.93±0.03	0.63±0.02 <sup>a</sup>	0.61±0.02 <sup>a</sup>	0.52±0.03 <sup>b</sup>	0.56±0.03 <sup>b</sup>	0.52±0.03 <sup>b</sup>
富马酸 (mg·L <sup>-1</sup> )	0.22±0.02 <sup>c</sup>	0.91±0.05 <sup>d</sup>	1.01±0.02 <sup>c</sup>	2.33±0.02 <sup>a</sup>	0.98±0.02 <sup>c</sup>	1.24±0.02 <sup>b</sup>
总计 (g·L <sup>-1</sup> )	20.52 ±0.50 <sup>c</sup>	22.82 ±0.38 <sup>b</sup>	23.54 ±0.40 <sup>a</sup>	22.44 ±0.37 <sup>b</sup>	22.71 ±0.35 <sup>b</sup>	22.33 ±0.35 <sup>b</sup>

注：“-”：未检测到；每一行中不同字母表示存在显著差异 ( $P<0.05$ )。

### (2) 单体酚

酚类化合物是植物性食物中普遍存在的次生代谢物,通常作为褐变抑制剂对抗自由基、活性氧 (ROS) 和促氧化剂产生的氧化应激来保护植物性食物免受氧化<sup>[74]</sup>。越来越多的证据表明,长期摄入酚类化合物可以降低癌症、心血管疾病 (CVD)、II 型糖尿病、认知功能受损等慢性疾病的发病率<sup>[75]</sup>。如表 3-5 所示,5 种酒样的没食子酸和咖啡酸的含量均高于猕猴桃汁,可能是随着发酵的进行,猕猴桃果肉中的没食子酸和咖啡酸不断浸出到发酵液中<sup>[76]</sup>。5 种酒样的绿原酸含量无显著差异,且与猕猴桃汁相当,说明酒精发酵过程中酿酒酵母对绿原酸的含量无显著影响,其主要来源于原料本身。XX-16 发酵的酒样的表儿茶素含量显著高于其它 4 种酒样,5 种酒样的表儿茶素含量均显著低于猕猴桃汁,说明表儿茶素在酿造过程中发生了氧化。

表 3-5 猕猴桃汁及不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的单体酚 (mg·L<sup>-1</sup>)Table 3-5 Monomeric phenols of kiwi juice and kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae* (mg·L<sup>-1</sup>)

单体酚	猕猴桃汁	AQ	JN3	71B	GC-31	XX-16
没食子酸	3.25±0.17 <sup>d</sup>	5.32±0.15 <sup>a</sup>	4.83±0.16 <sup>c</sup>	4.83±0.18 <sup>c</sup>	4.95±0.16 <sup>bc</sup>	5.19±0.09 <sup>ab</sup>
儿茶素	6.14±0.21 <sup>b</sup>	6.95±0.14 <sup>a</sup>	6.10±0.16 <sup>b</sup>	5.04±0.21 <sup>d</sup>	5.89±0.18 <sup>bc</sup>	5.62±0.22 <sup>c</sup>
绿原酸	3.10±0.11 <sup>a</sup>	3.36±0.33 <sup>a</sup>	3.43±0.41 <sup>a</sup>	3.14±0.19 <sup>a</sup>	3.34±0.31 <sup>a</sup>	3.28±0.24 <sup>a</sup>
咖啡酸	2.35±0.21 <sup>b</sup>	11.38±0.22 <sup>a</sup>	11.73±0.24 <sup>a</sup>	11.86±0.26 <sup>a</sup>	11.34±0.21 <sup>a</sup>	11.43±0.27 <sup>a</sup>
表儿茶素	9.57±0.17 <sup>a</sup>	6.88±0.15 <sup>c</sup>	7.06±0.16 <sup>c</sup>	7.12±0.18 <sup>c</sup>	6.99±0.16 <sup>c</sup>	8.28±0.11 <sup>b</sup>
总计	24.40±0.24 <sup>d</sup>	33.88±0.10 <sup>a</sup>	33.0±0.14 <sup>b</sup>	31.84±0.19 <sup>c</sup>	32.52±0.10 <sup>b</sup>	33.80±0.52 <sup>a</sup>

注：每一行中不同字母表示存在显著差异 ( $P<0.05$ )。

### (3) 游离氨基酸

氨基酸是重要的风味前体物质,能够代谢产生高级醇及其相关酯类和脂肪酸<sup>[23]</sup>。如表 3-6 所示,在猕猴桃果酒和猕猴桃汁中均检测到 18 种氨基酸。与猕猴桃汁相比,经过发酵后,酒样中大部分氨基酸的含量均显著降低,部分氨基酸的含量在不同酿酒酵母发酵的酒样中差异显著,如蛋氨酸在 XX-16 和 AQ 发酵的酒样中的含量分别为 0.78、

17.27 mg·L<sup>-1</sup>；赖氨酸在 GC-31 和 AQ 发酵的酒样中的含量分别为 1.61、10.69 mg·L<sup>-1</sup>。GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中的脯氨酸含量分别为 151.42、136.74 mg·L<sup>-1</sup>，显著高于猕猴桃汁及其它 3 株酵母发酵的酒样，说明 GC-31 和 XX-16 具有产脯氨酸的特性。脯氨酸可赋予酒体甜味，对酒体品质具有积极影响。

表 3-6 猕猴桃汁及不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的游离氨基酸 (mg·L<sup>-1</sup>)

Table 3-6 Free amino acids of kiwi juice and kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae* (mg·L<sup>-1</sup>)

名称	猕猴桃汁	AQ	JN3	71B	GC-31	XX-16
天冬氨酸	59.77±1.71 <sup>a</sup>	18.99±1.68 <sup>b</sup>	18.32±1.69 <sup>b</sup>	10.97±1.66 <sup>c</sup>	12.38±1.61 <sup>c</sup>	19.82±1.73 <sup>b</sup>
谷氨酸	176.68±2.03 <sup>a</sup>	26.44±2.00 <sup>c</sup>	23.25±2.01 <sup>c</sup>	31.78±1.98 <sup>b</sup>	33.96±1.93 <sup>b</sup>	32.23±2.05 <sup>b</sup>
丝氨酸	34.83±1.31 <sup>a</sup>	4.72±0.89 <sup>c</sup>	4.34±0.86 <sup>c</sup>	5.93±0.77 <sup>c</sup>	9.58±1.02 <sup>b</sup>	8.23±0.93 <sup>b</sup>
组氨酸	17.33±0.92 <sup>c</sup>	19.71±0.89 <sup>b</sup>	13.84±0.90 <sup>e</sup>	16.21±0.87 <sup>cd</sup>	27.07±0.82 <sup>a</sup>	15.06±0.94 <sup>de</sup>
甘氨酸	10.82±0.65 <sup>a</sup>	8.90±0.62 <sup>b</sup>	8.46±0.63 <sup>b</sup>	8.34±0.60 <sup>b</sup>	7.99±0.55 <sup>b</sup>	5.55±0.67 <sup>c</sup>
苏氨酸	30.43±1.12 <sup>b</sup>	33.55±1.09 <sup>a</sup>	22.42±1.10 <sup>c</sup>	23.85±1.07 <sup>c</sup>	22.53±1.02 <sup>c</sup>	18.18±1.14 <sup>d</sup>
精氨酸	114.95±0.82 <sup>a</sup>	7.65±0.79 <sup>c</sup>	1.38±0.80 <sup>d</sup>	10.16±0.77 <sup>b</sup>	8.54±0.72 <sup>c</sup>	8.74±0.84 <sup>c</sup>
丙氨酸	80.53±1.26 <sup>a</sup>	6.81±1.23 <sup>cd</sup>	3.57±1.24 <sup>e</sup>	8.83±1.21 <sup>bc</sup>	6.51±1.16 <sup>d</sup>	10.53±1.28 <sup>b</sup>
酪氨酸	20.01±1.36 <sup>c</sup>	26.15±1.33 <sup>b</sup>	29.68±1.34 <sup>a</sup>	6.15±0.89 <sup>c</sup>	8.14±1.26 <sup>e</sup>	12.04±1.38 <sup>d</sup>
半胱氨酸	2.15±0.66 <sup>c</sup>	7.85±0.63 <sup>a</sup>	3.18±0.64 <sup>c</sup>	5.34±0.61 <sup>b</sup>	2.84±0.56 <sup>c</sup>	4.75±0.68 <sup>b</sup>
缬氨酸	25.49±0.98 <sup>a</sup>	22.07±0.95 <sup>b</sup>	1.01±0.96 <sup>f</sup>	15.38±0.93 <sup>c</sup>	6.66±0.88 <sup>c</sup>	9.37±1.00 <sup>d</sup>
蛋氨酸	16.00±0.83 <sup>b</sup>	17.27±0.80 <sup>a</sup>	3.68±0.61 <sup>c</sup>	1.32±0.46 <sup>d</sup>	3.17±0.54 <sup>c</sup>	0.78±0.20 <sup>d</sup>
色氨酸	8.31±0.54 <sup>a</sup>	4.32±0.51 <sup>b</sup>	2.01±0.52 <sup>d</sup>	0.76±0.33 <sup>e</sup>	2.71±0.44 <sup>cd</sup>	3.43±0.56 <sup>c</sup>
苯丙氨酸	19.57±1.12 <sup>a</sup>	9.91±1.09 <sup>b</sup>	7.92±1.10 <sup>c</sup>	6.09±1.07 <sup>d</sup>	4.73±1.02 <sup>de</sup>	3.18±0.67 <sup>e</sup>
异亮氨酸	11.45±0.72 <sup>a</sup>	5.69±0.69 <sup>c</sup>	3.60±0.70 <sup>d</sup>	6.68±0.67 <sup>c</sup>	10.82±0.62 <sup>a</sup>	8.55±0.74 <sup>b</sup>
亮氨酸	28.67±1.06 <sup>a</sup>	10.71±1.03 <sup>c</sup>	5.18±0.75 <sup>d</sup>	9.52±1.01 <sup>c</sup>	4.20±0.96 <sup>d</sup>	19.62±1.08 <sup>b</sup>
赖氨酸	20.33±0.77 <sup>a</sup>	10.69±0.74 <sup>b</sup>	9.28±0.75 <sup>c</sup>	8.59±0.72 <sup>c</sup>	1.61±0.67 <sup>d</sup>	8.84±0.79 <sup>c</sup>
脯氨酸	9.94±1.69 <sup>c</sup>	5.61±0.88 <sup>f</sup>	24.15±1.77 <sup>c</sup>	18.81±1.64 <sup>d</sup>	151.42±1.59 <sup>a</sup>	136.74±1.71 <sup>b</sup>
总计	687.25 ±19.55 <sup>a</sup>	247.03 ±17.84 <sup>c</sup>	185.26 ±18.37 <sup>d</sup>	194.71 ±17.26 <sup>d</sup>	324.86 ±17.37 <sup>b</sup>	325.62 ±18.45 <sup>b</sup>

注：每一行中不同字母表示存在显著差异 ( $P<0.05$ )。

### 3.1.5 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的挥发性风味化合物

#### (1) 挥发性风味化合物组成

5 株酿酒酵母发酵的猕猴桃果酒的挥发性风味化合物测定结果如表 B-1 所示，共鉴定出 104 种挥发性风味化合物，AQ、JN3、71B、GC-31 和 XX-16 发酵的酒样的挥发性风味化合物种类数分别为 61、57、49、78、78，总含量依次为 13188.57、25639.38、30154.85、8493.81、12445.34  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该结果表明不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的挥发性风味化合物的种类和含量具有显著差异，说明酿酒酵母对猕猴桃果酒的挥发性风味化合物组成有着重要影响。

#### ① 酯类

酯类是果酒花果香的重要贡献者，酯类的种类和含量不同会导致果酒的香气品质不同。AQ、JN3、71B、GC-31 和 XX-16 发酵的酒样的酯类种类数分别为 22、18、16、25、

22, 酯类总含量依次为 1328.11、2207.62、1773.90、2320.94、1694.34  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。显然, 71B 发酵的酒样的酯类种类最少, AQ 发酵的酒样的酯类含量最低, 而 GC-31 发酵的酒样的酯类种类最多且含量最高。5 种酒样中的酯类均以乙酸乙酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸苯乙酯含量较高, 该结果表明猕猴桃果酒中的酯类以乙酯类为主。

### ②萜烯类

大多数萜烯类化合物具有抗菌、抗氧化和抗肿瘤活性, 且对酒体的香气品质具有积极影响<sup>[77]</sup>。5 种猕猴桃果酒中共检测出 29 种萜烯类化合物, AQ、JN3、71B、GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中萜烯类化合物的种类数分别为 6、8、3、20、22 种, 萜烯总含量依次为 74.21、158.58、33.91、358.25、757.53  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 该结果表明 GC-31 和 XX-16 发酵的酒样的萜烯种类更加丰富且含量更高, 其中 XX-16 尤为突出。GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中含有丰富的 4-萜烯醇(含量分别为 102.55、193.24  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和  $\alpha$ -松油醇(含量分别为 110.84、266.01  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 然而这 2 种化合物在其它 3 株酵母发酵的酒样中含量很少乃至没有。仅在 GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中检测到龙脑, 龙脑一般以键合态形式存在于水果中, 推测 GC-31 和 XX-16 具有产  $\beta$ -G 的特性, 能够水解猕猴桃汁中的龙脑苷释放出游离态龙脑。以上结果表明, 优良本土酿酒酵母对猕猴桃果酒的萜烯组成有着重要影响。黄佳<sup>[76]</sup>用商业酿酒酵母 WLP775 发酵华优猕猴桃所得的酒样中有 10 种萜烯类化合物, 而赵宁<sup>[13]</sup>用 WLP775 发酵徐香猕猴桃所得的酒样中有 7 种萜烯类化合物, 可见本研究中 GC-31 和 XX-16 发酵的猕猴桃果酒萜烯种类非常丰富。

### ③醇类、醛酮类、酸类及其它类风味化合物

醇类是 5 种猕猴桃果酒中含量最高的挥发性风味化合物, 在 AQ、JN3、71B、GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中醇类化合物的含量分别为 10229.08、19437.80、25177.80、4534.97、8079.06  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 可见 JN3 和 71B 表现出高产醇类化合物的特点, 而 GC-31 则呈现出低产醇类化合物的特点。适当的醇类化合物对果酒的香气特征具有积极影响, 如增强果酒的花果香及香气复杂性, 但过量的醇类化合物会对果酒品质产生负面影响, 如异丁醇和异戊醇会使酒体呈现苦涩味<sup>[78,79]</sup>。5 种酒样中的醇类化合物均以异丁醇、异戊醇和苯乙醇的含量最高, 其中苯乙醇具有蜂蜜和玫瑰香气<sup>[67]</sup>, 对猕猴桃果酒的香气品质有积极影响。

乙醛、壬醛和大马士酮在 5 种酒样中均被检测到, 其中乙醛在 GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中的含量显著低于其它 3 株酵母发酵的酒样。乙醛在低浓度下会产生令人愉悦的水果香气, 但在高浓度下会有刺鼻的刺激性气味<sup>[80]</sup>。

5 种酒样中共检测出 8 种酸类化合物, JN3 发酵的酒样的酸类化合物含量最高, 而 GC-31 发酵的酒样的酸类化合物含量最低。辛酸、正癸酸、己酸、壬酸、异丁酸和乙酸是 5 种酒样共有的酸类化合物, 均以辛酸含量最高。

5 种酒样的其它类挥发性风味化合物均以 4-乙基愈创木酚最具代表性, 其在 JN3 发酵的酒样中含量最高, 为 113.29  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### (2) 呈香物质

挥发性风味化合物的含量不能作为判定果酒香气品质的依据, 通常认为  $OAV > 1$  的挥发性风味化合物对果酒的香气才有实质性贡献<sup>[67]</sup>。由表 3-7 可知, 5 种酒样中共有 27 种呈香物质, 其中 5 种酒样共有的呈香物质为乙酸甲酯、乙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸苯乙酯、异戊醇、正己醇、苯乙醇、乙醛、壬醛、大马士酮和 4-乙炔基愈创木酚, 认为这 15 种物质是猕猴桃果酒的重要香气成分, 该结果表明, 猕猴桃果酒的重要香气成分以酯类化合物为主。5 种酒样中  $OAV > 1$  的萜烯化合物共有 5 种, 包括  $\beta$ -月桂烯、芳樟醇、 $\alpha$ -松油醇、龙脑和香茅醇。其中, 龙脑是 XX-16 发酵的酒样中独有的呈香物质(GC-31 发酵的酒样中虽检测到龙脑, 但其  $OAV < 1$ )。据报道, 龙脑具有抗真菌、杀虫、抗细菌和抗氧化活性, 并有助于提升酒体的香气复杂性<sup>[69]</sup>。 $\beta$ -月桂烯、 $\alpha$ -松油醇是 GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中特有的萜烯类呈香物质, 除此之外, GC-31 和 XX-16 发酵的酒样中芳樟醇的  $OAV$  均显著大于其它 3 株酵母发酵的酒样。总体而言, XX-16 发酵的酒样中的呈香物质种类最多, 有 24 种, 这些呈香物质使其酒体花果香浓郁, 香气丰富, 具有出色的香气品质。

表 3-7 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒中的呈香物质

Table 3-7 Aroma-active compounds of kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae*

序号	呈香物质	香气描述	阈值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	OAV				
				AQ	JN3	71B	GC-31	XX-16
1	乙酸甲酯	nf	2.00	4.75	7.01	6.30	2.35	3.75
2	乙酸乙酯	果香、甜味 <sup>[61]</sup>	5.00	115.62	157.25	126.19	77.99	106.65
3	异丁酸乙酯	nf	0.02	89.56	<1	<1	84.31	74.88
4	丁酸乙酯	苹果 <sup>[67]</sup>	0.90	13.50	17.10	10.22	31.13	19.77
5	乙酸异戊酯	香蕉 <sup>[61]</sup>	0.15	615.12	805.35	509.90	1857	1030
6	己酸乙酯	苹果皮、果香 <sup>[67]</sup>	1.00	96.16	120.79	80.57	409.93	177.03
7	庚酸乙酯	果香 <sup>[61]</sup>	1.90	<1	<1	<1	1.18	4.18
8	辛酸乙酯	nf	19.30	10.16	18.83	14.05	44.23	22.67
9	癸酸乙酯	nf	5.00	24.74	29.84	35.76	36.12	29.40
10	乙酸苯乙酯	苹果、玫瑰 <sup>[61]</sup>	19.00	4.37	8.36	17.66	3.19	5.07
11	芳樟醇	花香、薰衣草 <sup>[67]</sup>	0.80	5.33	7.94	<1	14.28	20.92
12	龙脑	樟脑气息 <sup>[69]</sup>	14.00	<1	<1	<1	<1	1.79
13	$\beta$ -月桂烯	nf	1.20	<1	<1	<1	2.47	2.72
14	$\alpha$ -松油醇	花香、甜味、 茴香、薄荷 <sup>[69]</sup>	4.60	<1	<1	<1	24.10	57.83
15	香茅醇	甜味、柠檬味 <sup>[69]</sup>	10.60	1.53	2.10	<1	1.41	1.95
16	异戊醇	威士忌、麦芽香、 醇香 <sup>[61]</sup>	4.00	1856	3345	3436	829.81	1498
17	异丁醇	醇香 <sup>[61]</sup>	550.00	1.71	2.74	2.93	<1	<1
18	正己醇	树脂、花香 <sup>[67]</sup>	5.60	52.55	69.02	62.49	29.11	42.15
19	苯乙醇	蜂蜜、香料、 玫瑰、紫丁香 <sup>[67]</sup>	564.23	2.40	6.61	16.10	1.18	1.95
20	乙醛	nf	2.00	11.08	22.07	18.89	3.68	6.81
21	癸醛	nf	2.00	<1	2.45	3.30	2.29	<1
22	壬醛	脂肪味、柑橘、 草本植物香 <sup>[67]</sup>	1.00	8.31	11.70	14.15	14.77	9.34
23	2,5-二甲基苯 甲醛	nf	0.15	98.04	151.37	<1	56.04	124.47

表 3-7 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒中的呈香物质 (续表)

Table 3-7 Aroma-active compounds of kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae* (continued)

序号	呈香物质	香气描述	阈值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	OAV				
				AQ	JN3	71B	GC-31	XX-16
24	大马士酮	烤苹果、花香、 蜂蜜 <sup>[69]</sup>	0.90	41.77	63.51	66.01	37.48	41.97
25	$\beta$ -紫罗酮	紫罗兰、甜味、 果香 <sup>[81]</sup>	3.50	<1	<1	<1	1.16	1.67
26	辛酸	奶酪香 <sup>[81]</sup>	1405.00	<1	1.62	1.15	<1	<1
27	4-乙基愈创木酚	烟熏、坚果 <sup>[82]</sup>	12.02	3.72	9.42	7.67	2.02	3.55

注：“nf”未找到；OAV 值以平均值表示，大于 1000 时以整数表示。

### 3.1.6 不同酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的感官品评

对 5 株酿酒酵母发酵的猕猴桃果酒进行感官品评，结果如图 3-2 所示。XX-16 发酵的酒样的感官评分最高，为 89.83 分，其次是 GC-31 和 JN3。XX-16 发酵的酒样的典型性得分亦最高，为 18.60 分，说明使用优良本土酿酒酵母可以提高猕猴桃果酒的典型性。5 种酒样的酸度得分均较低，这与其过高的总酸含量有关，其中以 JN3 和 GC-31 发酵的猕猴桃果酒的酸度得分最低，这与二者较高的苹果酸含量有关，苹果酸酸味强烈，会使酒体口感具有刺激性。AQ 和 71B 发酵的猕猴桃果酒的感官得分总分较低，其中 71B 发酵的猕猴桃果酒的香气评分仅为 15.30，这可能是由于其醇类含量极高、酯类和萜烯类化合物种类较少，导致酒体香气组成不协调、香气单薄。

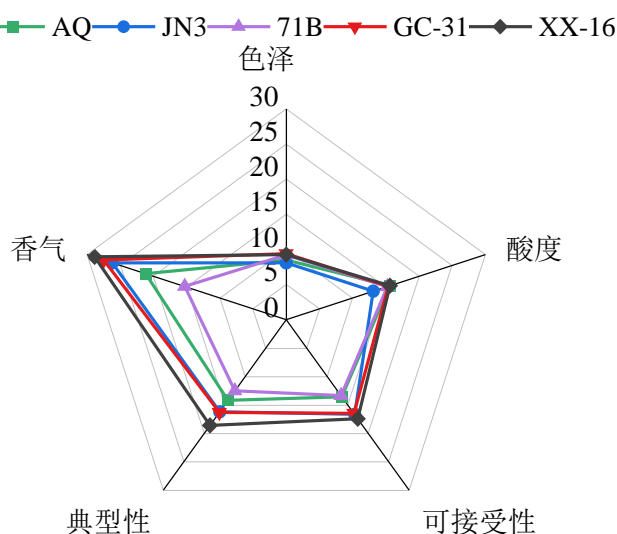


图 3-2 不同酿酒酵母发酵的猕猴桃果酒的感官评分雷达图

Figure 3-2 Sensory evaluation score radar of kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae*

### 3.1.7 基于 PLSR 分析猕猴桃果酒的呈香呈味物质对感官品质的贡献

采用 PLSR 对猕猴桃果酒的呈香呈味物质与感官品质进行相关性分析，以明确猕猴桃果酒的呈香呈味物质对感官品质的影响。如图 3-3 所示，内椭圆代表 50% 的解释方差，外椭圆为单位圆，代表 100% 的解释方差。位于两个椭圆之间的指标被认为与感官品质相关，而位于内椭圆内的指标与感官品质的相关性较低。呈香呈味物质与感官品质矩阵

之间的 PLSR 建模提供了一个双因素模型,解释了 X(27 种呈香物质和 32 种呈味物质) 64%的方差和 Y(5 种感官属性) 78%的方差。大多数自变量和因变量位于内椭圆和外椭圆之间,表明 PLSR 模型可以很好地解释它们之间的相关性。

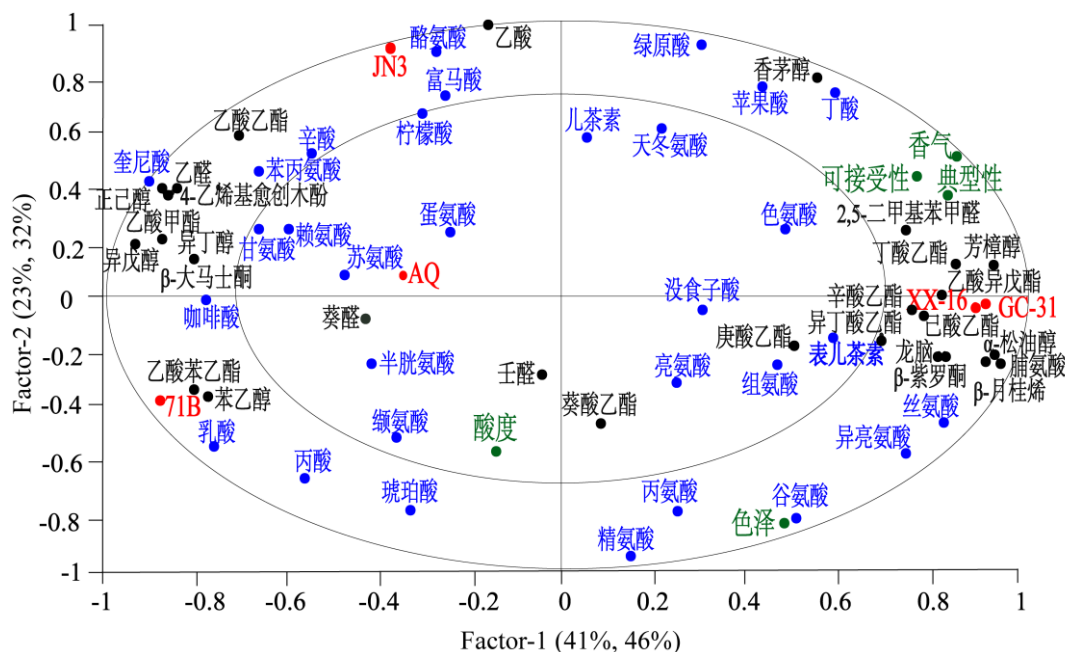


图 3-3 不同酿酒酵母发酵的猕猴桃果酒的呈香、呈味物质与感官品质之间的 PLSR 分析

Figure 3-3 PLSR analysis between aroma-active compounds, taste compounds and sensory quality of kiwi fruit wines fermented by different *S. cerevisiae*

该模型将 5 种酒样分为 4 类, XX-16 和 GC-31 发酵的酒样为第一类,二者与香气、可接受性和典型性有很好的相关性,且这 3 个感官属性与大多数酯类和萜烯类化合物高度相关,包括辛酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯、异丁酸乙酯、芳樟醇、 $\alpha$ -松油醇、龙脑和  $\beta$ -月桂烯,还与呈味物质脯氨酸、异亮氨酸和丝氨酸相关。该结果表明,酯类和萜烯类化合物对猕猴桃果酒的香气、可接受性和典型性具有重要贡献,是决定猕猴桃果酒感官品质的关键化合物;本土酿酒酵母 GC-31 和 XX-16 可以通过丰富猕猴桃果酒的酯类和萜烯类呈香物质来提高酒体品质。第二类是 JN3 发酵的酒样,其品质与酪氨酸、乙酸、富马酸相关。第三类是 71B 发酵的酒样,其品质与苯乙醇、乙酸苯乙酯、乳酸、丙酸、咖啡酸和琥珀酸等化合物相关。第四类是 AQ 发酵的酒样,位于内椭圆,不能被该模型很好地解释。猕猴桃果酒的色泽与谷氨酸高度相关,该模型未找到与酸度相关的呈味化合物。

### 3.1.8 小结

本小节从不同品种猕猴桃自然发酵液中分离得到 104 株菌株,通过产气实验、嗅觉测试、基本理化指标测定初步获得 2 株发酵性能优良的本土酿酒酵母 GC-31 和 XX-16。以 2 株商业果酒酵母和 1 株实验室保藏的产香酵母为对照,全面比较了 5 株酿酒酵母发酵猕猴桃果酒的理化及感官品质。

结果表明,本土酿酒酵母 XX-16 和 GC-31 均较 3 株对照菌株提前 0.5 d 完成主发酵,二者发酵的猕猴桃果酒的总酚含量更高,分别为 733.30、740.51 mg GAE·L<sup>-1</sup>。与其

余 4 株酿酒酵母相比, XX-16 发酵的猕猴桃果酒的体外抗氧化活性最强, 还原力、ABTS<sup>+</sup> 及 DPPH 自由基清除活性分别为 635.75、603.21、743.35 mg VC·L<sup>-1</sup>; 萜烯种类最丰富, 有 22 种, 且含量最高, 为 757.53 μg·L<sup>-1</sup>; 感官评分最高, 为 89.83 分。综合表明 XX-16 为最佳猕猴桃果酒酿酒酵母。

结合 OAV 和 PLSR 确定了酯类和萜烯类化合物对猕猴桃果酒的香气、可接受性和典型性具有重要贡献, 是决定猕猴桃果酒感官品质的关键化合物; 本土酿酒酵母 GC-31 和 XX-16 可通过丰富猕猴桃果酒的酯类和萜烯类呈香物质来提高酒体品质。

## 3.2 产 β-葡萄糖苷酶非酿酒酵母的筛选及其在猕猴桃果酒酿造中的应用

### 3.2.1 产 β-葡萄糖苷酶非酿酒酵母的筛选

#### (1) 产 β-G 非酿酒酵母的初筛

观察 91 株非酿酒酵母在七叶苷培养基上培养 24 h 后的显色情况, 颜色越深则表明菌株产 β-G 的能力越强。不同菌株的显色情况有着明显差异 (图 3-4), 其中有 20 株菌株在 24 h 内呈深黑色, 为高产 β-G 潜力菌株。

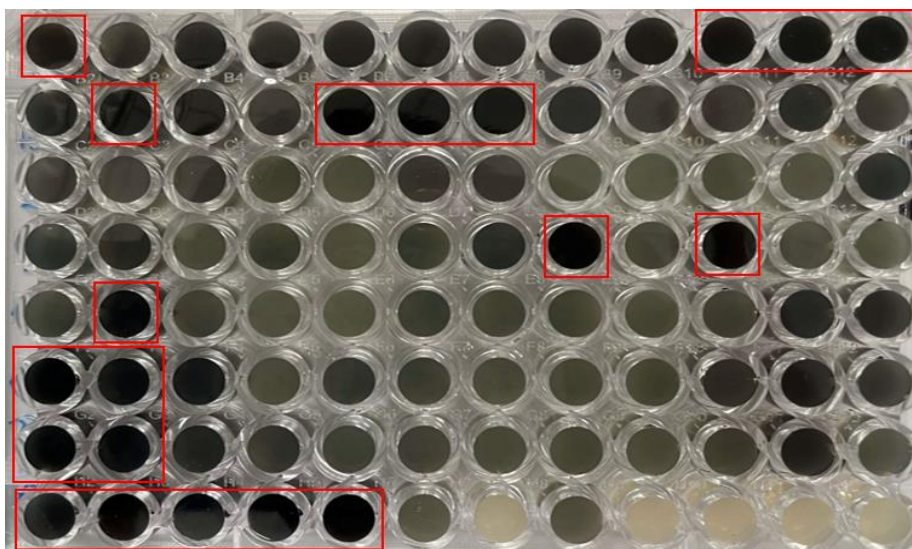


图 3-4 非酿酒酵母在七叶苷培养基中的显色筛选

Figure 3-4 Coloring screening of non-Saccharomyces in esculin medium

#### (2) 产 β-G 非酿酒酵母的复筛

对初筛得到的 20 株非酿酒酵母及酿酒酵母 GC-31 和 XX-16 产 β-G 能力进行测定, 结果如表 3-8 所示。GC-31 和 XX-16 的 β-G 酶活力分别为 10.92、16.36 U·mL<sup>-1</sup>, 证实了前文推测二者具有 β-G 活性的猜想, 与非酿酒酵母相比, 二者的酶活力极低。20 株产 β-G 潜力菌株中有 10 株 *W. anomalus*、1 株 *H. uvarum*、1 株丝孢酵母 (*Trichosporon coremiiforme*, *T. coremiiforme*) 和 8 株卡利比克迈耶氏酵母 (*Meyerozyma caribbica*, *M. caribbica*)。相较于其它非酿酒酵母, *W. anomalus* 表现出较高的 β-G 活性, 其中菌株 N-12、N-18 和 N-19 的 β-G 活性最高, *W. anomalus* 为一级安全微生物, 可应用于酿酒。据报道, *W. anomalus* 的代谢产物及分泌的酶类对酿造酒的香气、风味具有积极影响, 目前 *W. anomalus* 已被广泛用于葡萄酒、啤酒等酒类酿造<sup>[35,83,84]</sup>。但 *W. anomalus* 在

猕猴桃果酒中的应用鲜有报道，有必要探究其对猕猴桃果酒品质的影响。

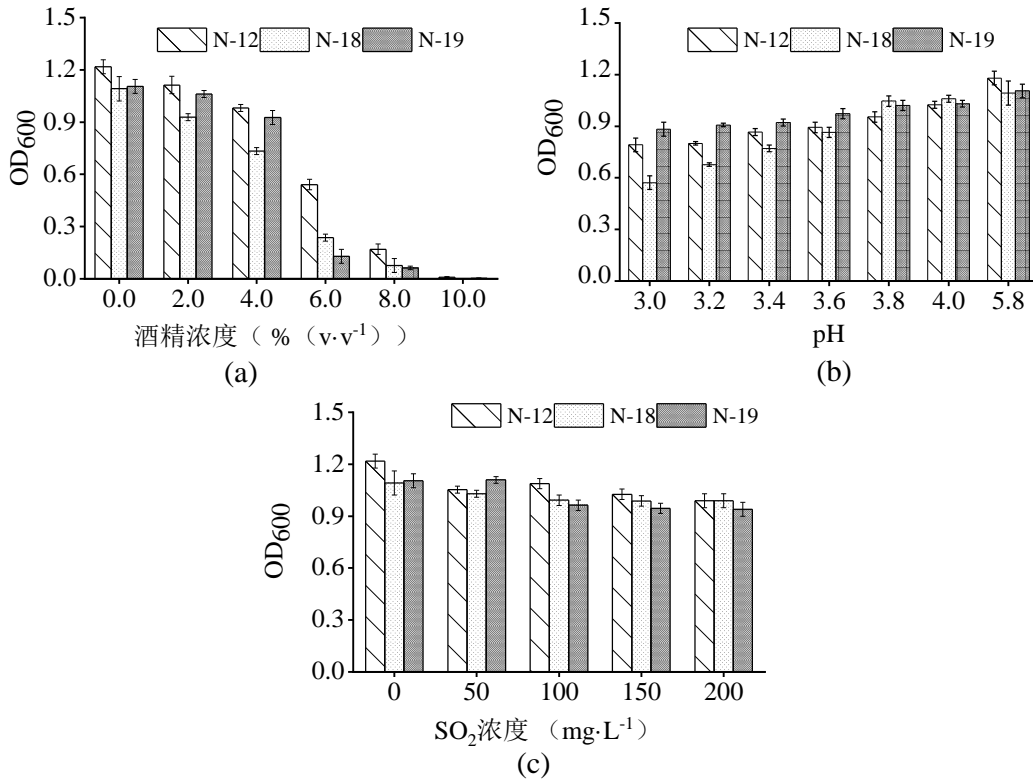
表 3-8 酵母的  $\beta$ -G 酶活 ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

Table 3-8  $\beta$ -G enzyme activity of yeasts ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

菌株编号	菌株名称	酶活	菌株编号	菌株名称	酶活
N-1	<i>W. anomalus</i>	145.36 $\pm$ 3.16	M-3	<i>M. caribbica</i>	79.43 $\pm$ 2.19
N-10	<i>W. anomalus</i>	164.36 $\pm$ 2.35	M-14	<i>M. caribbica</i>	55.13 $\pm$ 2.06
N-11	<i>W. anomalus</i>	166.88 $\pm$ 4.25	M-15	<i>M. caribbica</i>	69.66 $\pm$ 3.12
N-12	<i>W. anomalus</i>	173.10 $\pm$ 0.59	M-26	<i>M. caribbica</i>	63.22 $\pm$ 4.13
N-14	<i>W. anomalus</i>	144.21 $\pm$ 2.33	M-27	<i>M. caribbica</i>	57.30 $\pm$ 1.99
N-17	<i>W. anomalus</i>	166.20 $\pm$ 4.05	M-38	<i>M. caribbica</i>	48.33 $\pm$ 2.44
N-18	<i>W. anomalus</i>	170.29 $\pm$ 3.21	M-39	<i>M. caribbica</i>	51.42 $\pm$ 2.35
N-19	<i>W. anomalus</i>	168.44 $\pm$ 5.84	M-40	<i>M. caribbica</i>	62.28 $\pm$ 2.77
L-2	<i>H. uvarum</i>	112.42 $\pm$ 2.18	M-41	<i>W. anomalus</i>	143.37 $\pm$ 3.12
Y-11	<i>T. coremiiforme</i>	73.21 $\pm$ 2.42	M-42	<i>W. anomalus</i>	147.22 $\pm$ 3.04
GC-31	<i>S. cerevisiae</i>	10.92 $\pm$ 1.93	XX-16	<i>S. cerevisiae</i>	16.36 $\pm$ 2.43

### (3) 产 $\beta$ -G 非酿酒酵母的耐受性测试

非酿酒酵母在果酒酿造过程中常常面临着酒精、pH、 $\text{SO}_2$  等环境的胁迫，因此进一步对上述 3 株高产  $\beta$ -G 非酿酒酵母进行耐受性测试，以选出最具应用潜力的菌株。3 株菌株的酒精、pH、 $\text{SO}_2$  耐受性测试结果如图 3-5 所示，菌株培养液的  $\text{OD}_{600}$  均随着酒精浓度的升高而下降，表明 3 株非酿酒酵母的生长均受酒精抑制。当酒精浓度为 8% ( $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$ ) 时，N-12 菌株培养液的  $\text{OD}_{600}$  为 0.170，显著高于其余 2 株非酿酒酵母。当酒精浓度为 10% ( $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$ ) 时，3 株非酿酒酵母基本停止生长。随着 pH 的降低，3 株非酿酒酵母的生长均受到抑制，pH 为 3.0 时，N-12 和 N-19 表现出较高的生长量。3 株非酿酒酵母的生长均随  $\text{SO}_2$  浓度的升高而降低， $\text{SO}_2$  浓度为 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，N-12 和 N-18 表现出较高的生长量。以上结果表明 N-12 的综合耐受性最强，因此选择非酿酒酵母 N-12 与酿酒酵母 XX-16 混菌发酵猕猴桃果酒。

图 3-5 高产  $\beta$ -G 非酿酒酵母的耐受性测试Figure 3-5 The tolerance test of non-*Saccharomyces* with high yield of  $\beta$ -G

注：(a) 酒精耐受性；(b) pH 耐受性；(c) SO<sub>2</sub> 耐受性。

### 3.2.2 混菌发酵过程中酵母的生物量变化

混菌发酵过程中，非酿酒酵母与酿酒酵母在不同接种方式下的生长代谢及相互作用不同，产生的代谢物有差异，从而对感官品质造成不同影响<sup>[85,86]</sup>。

在不同接种方式下，猕猴桃果酒发酵过程中酵母的生物量变化如图 3-6 所示。在纯种发酵过程中，酿酒酵母 XX-16 的生物量在发酵前 2 d 迅速上升，在发酵 2~6 d 生物量基本保持不变（发酵周期为 6 d），完成主发酵后 XX-16 的生物量出现轻微的增长趋势，随后开始降低，说明酿酒酵母已经开始凋亡。对于非酿酒酵母 N-12，其生物量在发酵过程中呈现先快速增长后缓慢降低的趋势，其最大生物量为  $7.61 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup>。在有氧条件下，N-12 在液体 YPD 培养基中于 30°C 培养 18 h 的生物量达  $4.13 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>，这说明 N-12 在发酵过程中生长受到环境因素的严重抑制，抑制因素可能包括低温、无氧及较高的总酸环境。

在混菌发酵过程中，XX-16 及 N-12 的生物量相较于纯种发酵均有所降低，但总体而言对 N-12 的抑制作用更加显著，这与非酿酒酵母较差的耐受性相关。混菌发酵方式中，N-12 和 XX-16 间隔 48 h 接种发酵过程中的 N-12 生物量最大。无论是混菌发酵还是纯种发酵，XX-16 和 N-12 的生物量均呈现先增加后降低的趋势。混菌发酵中，N-12 的生物量在发酵第 6~8 d 迅速降低，原因可能是发酵后期较高的酒精度对 N-12 产生毒害作用，导致其死亡，类似的变化趋势在 Li 的研究中也有报道<sup>[87]</sup>。然而有研究表明 *W. anomalus* 和酿酒酵母混菌发酵 24 h 后，*W. anomalus* 就出现生长停滞和死亡现象<sup>[88]</sup>，

这与本研究不一致，原因可能是不同 *W. anomalus* 酒精耐受性存在差异。

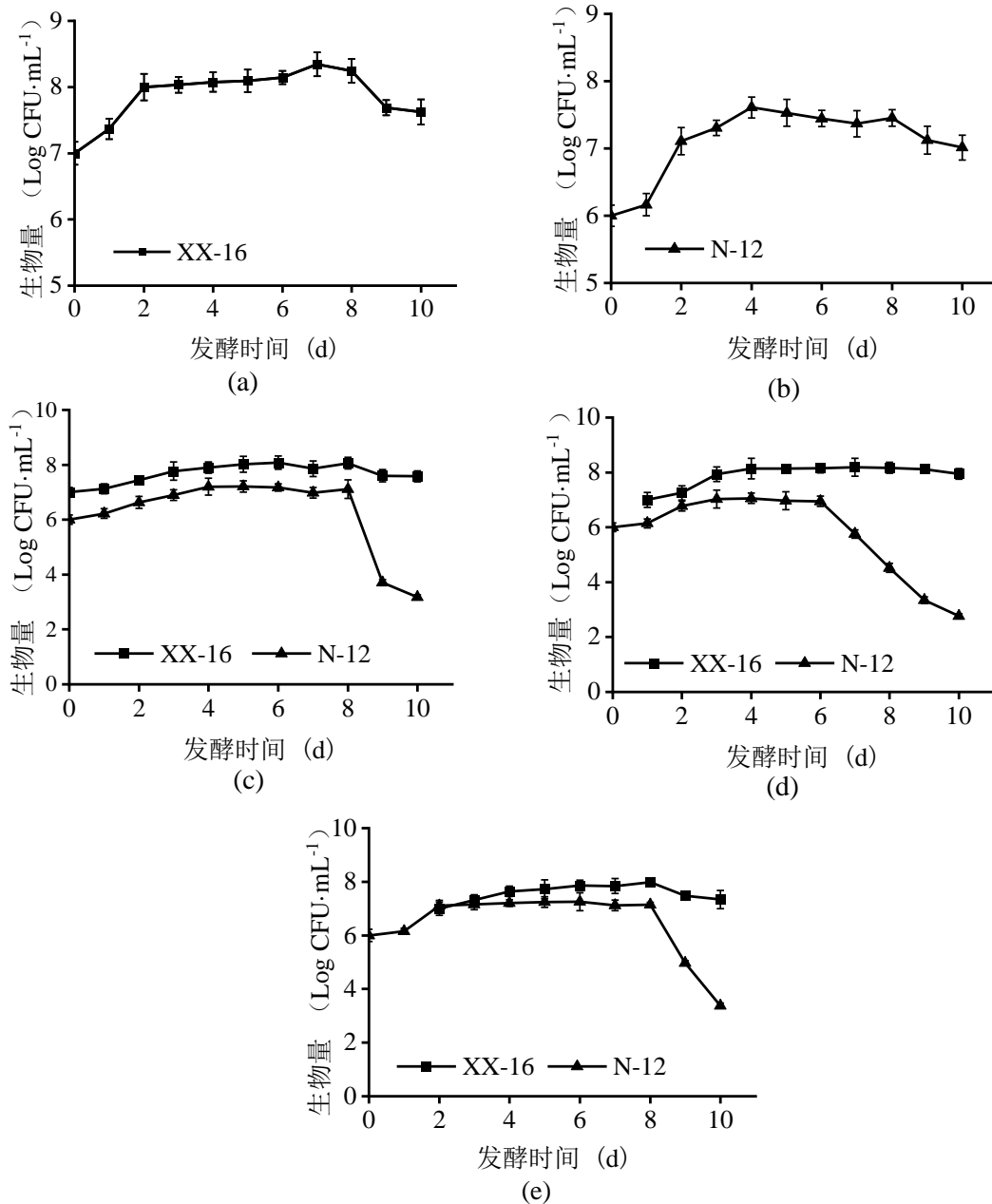


图 3-6 不同接种方式发酵猕猴桃果酒中酵母的生长曲线

Figure 3-6 Growth curve of yeasts of kiwi fruit wines fermented with different inoculation methods

注：(a) XX-16 纯种发酵；(b) N-12 纯种发酵；(c) 同时接种发酵；

(d) 顺序接种（间隔 24 h）发酵；(e) 顺序接种（间隔 48 h）发酵。

### 3.2.3 混菌发酵猕猴桃果酒的基本理化指标及感官品评

将酿酒酵母 XX-16 与非酿酒酵母 N-12 以不同接种方式发酵猕猴桃果酒，发酵过程中的 CO<sub>2</sub> 生成量如图 3-7 所示。XX-16 纯种发酵中 CO<sub>2</sub> 生成速率最快，于第 6 d 完成发酵。N-12 纯种发酵中 CO<sub>2</sub> 生成速率极其缓慢，发酵 10 d 时 CO<sub>2</sub> 生成量仅为 4.54 g，说明 N-12 的生长代谢受到严重抑制。有研究表明在厌氧条件下，*W. anomalus* 通常表现出较低的生长速率和代谢物产量<sup>[89]</sup>。相比于 XX-16 纯种发酵，混菌发酵的周期均有所延长，CO<sub>2</sub> 生成速率及总生成量均显著降低，3 种混菌发酵结束时的 CO<sub>2</sub> 生成量彼此之间

无显著差异。与顺序接种相比，同时接种发酵猕猴桃果酒的起酵有所延迟，该现象可能是由于酿酒酵母和非酿酒酵母同时接种时，二者相互抑制作用更强，导致发酵滞缓。

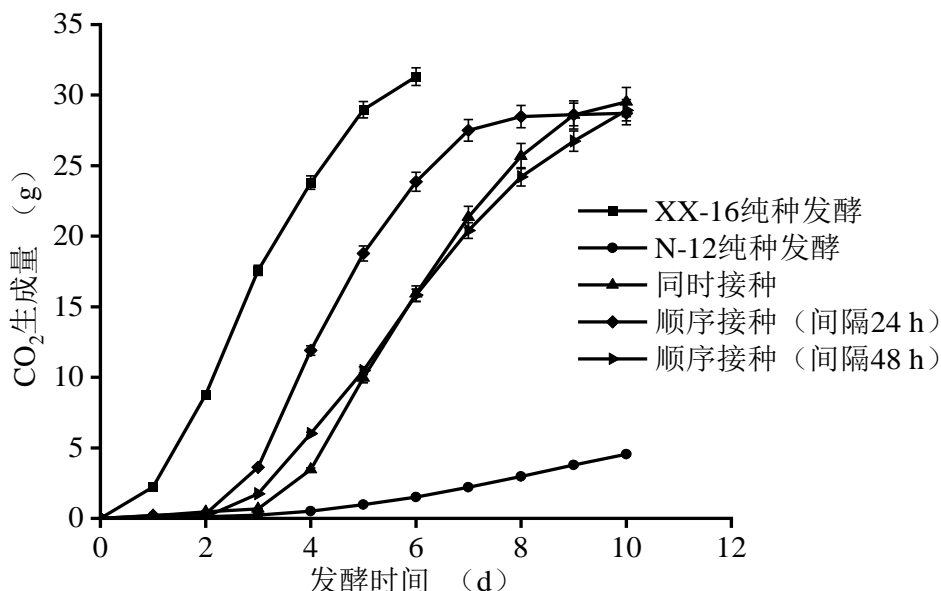


图 3-7 不同接种方式发酵猕猴桃果酒的 CO<sub>2</sub> 生成量

Figure 3-7 CO<sub>2</sub> production of kiwi fruit wines brewed by different inoculation methods

不同接种方式发酵猕猴桃果酒的基本理化指标及感官品评结果如表 3-9 所示。CX 酒样的酒精度显著高于混菌发酵酒样，混菌发酵会降低酒精度这一现象在米酒、龙眼酒中均有报道<sup>[90,91]</sup>。CN 酒样的总糖含量为 166.87 g·L<sup>-1</sup>，酒精度仅为 1.8% (v·v<sup>-1</sup>)，混菌发酵酒样的总糖含量与 CX 酒样无显著差异、总酸含量介于纯种发酵酒样之间。感官品评结果表明，NX48 酒样的花果香浓郁、香气丰富怡人，得分最高，相较于 CX 酒样提高了 13.00 分，所对应的接种方式最佳，即先接种 N-12，48 h 后接种 XX-16。与同时接种相比，顺序接种在提高果酒品质方面是更好的选择，这可能是因为顺序接种中非酿酒酵母的生物量更大，代谢产物更丰富，进而对果酒品质具有更积极的影响。

表 3-9 不同接种方式发酵猕猴桃果酒的理化指标及感官品评

Table 3-9 Physicochemical indicators and sensory evaluation of kiwi fruit wines fermented by different inoculation methods

样品名称	酒精度 (% (v·v <sup>-1</sup> ))	总糖 (g·L <sup>-1</sup> )	总酸 (g·L <sup>-1</sup> )	香气描述	感官评分
CX	12.1±0.1 <sup>a</sup>	3.59±0.06 <sup>b</sup>	15.90±0.07 <sup>a</sup>	有花果香	80.23±2.10 <sup>c</sup>
CN	1.8±0.1 <sup>d</sup>	166.87±2.01 <sup>a</sup>	14.08±0.13 <sup>c</sup>	香气单薄	70.44±1.55 <sup>d</sup>
NX	11.4±0.1 <sup>b</sup>	3.61±0.54 <sup>b</sup>	15.56±0.13 <sup>b</sup>	有花果香	80.73±1.34 <sup>bc</sup>
NX24	11.1±0.1 <sup>c</sup>	4.44±0.08 <sup>b</sup>	15.79±0.10 <sup>ac</sup>	有明显花果香	83.33±1.33 <sup>b</sup>
NX48	11.2±0.1 <sup>c</sup>	4.92±0.04 <sup>b</sup>	15.69±0.18 <sup>ab</sup>	花果香浓郁，香气丰富怡人	93.23±1.44 <sup>a</sup>

注：每一列中不同字母表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ )；CX、CN、NX、NX24 和 NX48 分别为 XX-16 纯种、N-12 纯种、同时接种、顺序接种 (间隔 24 h) 和顺序接种 (间隔 48 h) 发酵的猕猴桃果酒。

### 3.2.4 混菌发酵对猕猴桃果酒的总酚及体外抗氧化活性的影响

不同接种方式发酵猕猴桃果酒的总酚含量及体外抗氧化活性如表 3-10 所示，CN 酒

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/055301103103011113>