

# 刺梨自然发酵制酒过程中化学成分、 抗氧化活性及优势菌的变化

彭欢, 黄子健, 吴涛, 刘亮秀, 陈国浚, 杨翕淼, 廖振林, 方祥, 王洁\*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 该研究以刺梨为原料, 通过自然发酵制成刺梨果酒, 对其感官、理化性质(总酸、pH、还原糖、酒精度)、抗氧化成分、体外抗氧化活性和微生物多样性进行研究。结果表明, 整个发酵过程中果酒的总酸含量从 9.20 g/L 上升至 29.69 g/L, pH 值从 3.26 上升至 3.50, 还原糖含量从 24.43 g/L 下降至 9.17 g/L, 酒精度为从 5.72%vol 上升至 9.81%vol; 同时总酚含量(以没食子酸计算)为 0.90~5.48 mg/mL, 总黄酮含量(以芦丁计算)为 0.46~5.43 mg/mL, 抗坏血酸含量为 0.89~3.37 mg/mL。发酵 23 d 后的刺梨果酒色泽微黄, 澄清透明、香气浓郁且口感清爽。体外抗氧化活性表明刺梨发酵过程中的抗氧化能力随着发酵时间的延长先上升后降低, 这一趋势与抗氧化成分变化趋势一致。抗氧化物质以及三种自由基清除率的变化表明刺梨发酵期间抗氧化活性的变化与总酚、总黄酮、抗坏血酸含量变化均显著相关。通过微生物多样性分析表明刺梨发酵中真菌主要为酿酒酵母, 而细菌主要为乳酸片球菌和棘皮鞘氨醇单胞菌。

**关键词:** 刺梨果酒; 抗氧化; 理化性质; 自然发酵

文章编号: 1673-9078(2023)02-205-213

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0317

## Changes in Chemical Composition, Antioxidant Activity and Dominant Microbes during the Wine Production with *Rosa roxburghii* Tratt via Natural Fermentation

PENG Huan, HUANG Zijian, WU Tao, LIU Liangxiu, CHEN Guojun, YANG Ximiao, LIAO Zhenlin, FANG Xiang, WANG Jie\*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** In this study, *Rosa roxburghii* Tratt was used to produce wine via natural fermentation. The sensory, physico-chemical properties (total acid, pH, reducing sugar and alcohol content), antioxidant components, *in vitro* antioxidant activity and microbial diversity were examined. The results showed that total acid content increased from 9.20 g/L to 29.69 g/L, pH value increased from 3.26 to 3.50, reducing sugar content decreased from 24.43 g/L to 9.17 g/L, alcohol content increased from 5.72%vol to 9.81%vol, with the total phenolic content (calculated in gallic acid) being 0.90~5.48 mg/mL, the total flavonoid content (calculated in rutin) being 0.46~5.43 mg/mL, and the ascorbic acid content being 0.89~3.37 mg/mL during the fermentation. After 23 days of fermentation, *Rosa roxburghii* Tratt fruit wine had a yellow color, and was clear and transparent, with strong aroma and refreshing taste. The *in vitro* antioxidant activity analyses showed that the antioxidant capacity of the wine increased firstly and then decreased with the extension of fermentation time, which was consistent with the changing trend of antioxidant components. The changes of antioxidant substances and scavenging rates of three kinds of free radicals indicated that the changes of antioxidant activities during *Rosa roxburghii* Tratt fermentation were significantly correlated with the changes of the total phenolic, total

引文格式:

彭欢,黄子健,吴涛,等.刺梨自然发酵制酒过程中化学成分、抗氧化活性及优势菌的变化[J].现代食品科技,2023,39(2):205-213

PENG Huan, HUANG Zijian, WU Tao, et al. Changes in chemical composition, antioxidant activity and dominant microbes during the wine production with *Rosa roxburghii* Tratt via natural fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 205-213

收稿日期: 2022-03-21

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2020B020226008); 广州市科技计划项目(201904010274)

作者简介: 彭欢(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: phuan2022@163.com

通讯作者: 王洁(1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 微生物学, E-mail: jiewang@scau.edu.cn

Flavonoid and ascorbic acid contents. The analysis of microbial diversity showed that *Saccharomyces cerevisiae* was the dominant fungi in *Rosa roxburghii* Tratt fermentation, whilst the dominant bacteria were *Petiococcus acidilactici* and *Sphingomonas echinoderma*.

**Key words:** *Rosa roxburghii* Tratt wine; antioxidant; physical and chemical properties; natural fermentation

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)又称为刺石榴、木梨子、送春归,是一种表面带刺、果肉酸甜可口的蔷薇科植物,主要分布在四川、贵州和湖南等地,少量分布于云南<sup>[1]</sup>。刺梨果肉不仅含有丰富的维生素 C、氨基酸和微量元素,享有“三王水果”美誉<sup>[2]</sup>,而且含有丰富刺梨多糖、类黄酮、多酚和有机酸等,具有抗氧化性、增强免疫力、防治癌症和预防动脉硬化等保健功能<sup>[3-6]</sup>。由于潜在的“药食两用”价值,刺梨作为国内饮料、酒类以及营养保健品产业的一种重要原料,已被开发研制成多种产品,如刺梨果脯、刺梨果酒、刺梨糕胶、刺梨口服液、刺梨冻干粉胶囊以及刺梨复合维生素 C 等<sup>[7]</sup>。

刺梨果酒是对刺梨进行一定的发酵加工而制成的,保留了刺梨原有的维生素、氨基酸和矿物质,使其既有悦人的刺梨原果香又有协调的酒香,同时还能增强免疫力,起到保健、养生、健体作用。目前关于刺梨果酒的研究主要集中在刺梨果酒的工艺优化方面,如赵驰等<sup>[8]</sup>以刺梨原汁为原料,蜂蜜为微生物碳源进行发酵,通过感官评定和理化性质来优化发酵工艺;韦唯等<sup>[9]</sup>以理化成分和感官评价为刺梨果酒品质的评价指标,结果表明不同发酵因素和不同发酵方式对刺梨酒品质有较大影响;贺红早等<sup>[10]</sup>对全果发酵、无籽刺梨果汁发酵以及无籽刺梨汁渣混合发酵的次生代谢产物进行了定量测定,结合感官指标对 3 个处理的发酵产品进行综合分析。然而,刺梨酒发酵过程中的理化性质、抗氧化活性、微生物多样性等研究较少。

自然发酵是利用天然微生物发酵来获得最终产物,是一种历史比较悠久的传统发酵方式;通过自然发酵后,食品中的多数营养成分和活性功能会得到提高和改善<sup>[11]</sup>。新鲜刺梨果实在自然条件下酿制成刺梨果酒,不仅能最大限度的保留刺梨本身的营养价值,还能改善刺梨原本的苦涩味。鉴于此,本文监控刺梨自然发酵制酒过程中的总酸、还原糖、酒精度等理化指标及总酚、总黄酮等抗氧化成分的含量及抗氧化能力的动态变化,并对抗氧化成分与抗氧化能力进行相关性分析,为进一步阐明刺梨果酒保健功能机理和综合开发提供理论基础;与此同时,进一步深入研究刺梨自然发酵制酒过程中微生物群落动态变化,明确刺梨果酒发酵的主要优势菌株,对刺梨酿酒适制性菌种的选育及刺梨果酒品质的控制具有重要的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

刺梨,购买于贵州贵阳市;蔗糖、白醋,市购;甲醇、乙腈,色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;芦丁标准品(含量>98%)、鞣花酸标准品(含量>98%),阿拉丁;葡萄糖、亚硝酸钠、碳酸钠、硝酸铝、硫酸铁、过硫酸钾、琼脂、氢氧化钠、LB 肉汤培养基,分析纯,广州化学试剂厂;微生物检测配套试剂(革兰氏染色液)、MRS 肉汤培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,广东环凯微生物有限公司;通用引物 ITS1、ITS4、27F、1492R、Taq 酶,生工生物工程(上海)股份有限公司;真菌基因组 DNA 提取试剂盒,杭州博日科技有限公司。

### 1.2 主要仪器设备

BSM-2200.2 型电子天平,上海卓精电子科技有限公司;e2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;TG-16W 台式高速离心机,长沙湘智离心机仪器有限公司;TP600 型 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;DYY-8C 电泳仪,北京六一生物科技有限公司;WB-2000 型水浴锅,郑州长城科工贸有限公司;YXQ-LS-50A 立式压力蒸汽灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司;SPX-250BIII 生化培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司;THZ-300C 恒温培养摇床,上海一恒科学仪器有限公司;BA310-T 电子显微镜,麦克奥迪(成都)仪器有限公司。

### 1.3 主要试验方法

#### 1.3.1 刺梨自然发酵

称取 1 kg 新鲜刺梨,去除表面小刺,洗净后阳光暴晒 2 h,使其表面水分蒸干。将处理好的刺梨放入已灭菌 2 L 发酵坛中,加入 1 500 mL 40%蔗糖溶液和 50 g 白醋,水封后进行自然发酵。每隔 3 d 从发酵坛中分别取 3 份发酵液,每份 800~1 000  $\mu$ L 置于-20  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

#### 1.3.2 微生物的分离与鉴定

##### 1.3.2.1 微生物的分离

每隔 4 d 取 10 mL 刺梨自然发酵液,用无菌生理盐水进行不同梯度稀释,并将合适梯度的稀释液分别与 MRS、PDA 培养基及 LB 培养基混匀倾注于平板,



将平板倒置于厌氧袋,放入 37 ℃培养箱培养。48 h 后,计算各个平板菌落总数<sup>[12]</sup>,挑取不同形态的菌落进行划线纯化。

1.3.2.2 微生物的鉴定

将(1.3.2.1)纯化的菌落革兰氏染色<sup>[13,14]</sup>。同时将菌落液体培养基扩大培养,取菌液 800 μL 于 1.5 mL EP 管中,10 000 r/min 离心 10 min,吸净上清液。细菌就在沉淀中加无菌的 1% SDS 20 μL,振荡 6 min,65 ℃水浴 5 min,加入 480 μL 无菌水混匀即为该菌的基因组,以基因组为模板,使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') PCR 扩增

16s rDNA 序列<sup>[15]</sup>;真菌则用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取该菌的基因组,以基因组为模板,使用通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') PCR 扩增 ITS 序列<sup>[16]</sup>。将提取的细菌和真菌 DNA 送至擎科生物科技有限公司测序,通过与 NCBI 数据库比对,建立进化树分析菌株亲缘关系。

1.3.3 感官评定

参考韦唯等<sup>[9]</sup>的评分标准进行适当修改,选择 10 人组建感官评定小组,依据感官评分标准对刺梨酒进行感官评定,取其平均值作为最终评分结果。感官评分标准如表 1。

表 1 刺梨果酒的感官评定标准

Table 1 *Rosa roxburghii* Tratt wine sensory scoring criteria

| 指标        | 评价标准                         | 得分/分  |
|-----------|------------------------------|-------|
| 色泽(10 分)  | 微黄、金黄色,清亮                    | 8~10  |
|           | 色泽较暗、呈褐色                     | 1~7   |
| 澄清度(10 分) | 澄清透明、有光泽、无明显悬浮物及沉淀           | 8~10  |
|           | 轻微失光或有沉淀物                    | 1~7   |
| 香气(10 分)  | 有悦人清雅的刺梨原果香与协调的酒香,气味适中,无异香   | 8~10  |
|           | 有刺梨果香或酒香,但不明显,香气稍淡,无异香       | 4~7   |
|           | 无果香或酒香,有异香                   | 1~3   |
| 滋味(20 分)  | 醇美柔和爽口,具有刺梨果酒的典型风格,酸甜适中,无苦涩味 | 18~20 |
|           | 口味相对爽口协调,酒味或果味较淡,略有苦涩味       | 13~17 |
|           | 口味不协调,苦涩味明显,感觉刺口             | 7~12  |
|           | 口味粗糙,苦涩味较重                   | 1~6   |

1.3.4 化学成分含量测定

1.3.4.1 基本成分测定

采用 pH 计和糖度仪分别测定刺梨果酒的 pH 值和还原糖度;采用酒精计法测定刺梨果酒酒精度,参考国标 GB 5009.225-2016;采用酸碱滴定法测定总酸含量,参考国标 GB 12456-2021。

1.3.4.2 总酚含量测定

分别准确吸取 10 μL 的样品、不同含量的没食子酸标准溶液(0、100、200、300、400、500 μL)于不同 10 mL 的容量瓶中,加入 2.5 mL 的 ϕ=50%福林酚溶液和 2 mL 的 m=7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液,定容后 37 ℃水浴 30 min,测量其在 765 nm 的吸光度值。以没食子酸含量为横坐标,吸光度值 OD<sub>765</sub> 为纵坐标作标准曲线,以没食子酸标准曲线计算刺梨果酒中总酚含量<sup>[17]</sup>。实验重复 3 次。

1.3.4.3 总黄酮含量测定

分别准确吸取 0.5 mL 的样品、不同含量的芦丁标准溶液(0.0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mL)于 10 mL 的容量瓶中,迅速加入 m=5% NaNO<sub>2</sub> 溶液和

m=10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液各 0.5 mL 混匀后静置 5 min;加入 m=4% NaOH 溶液 4 mL,用 ϕ=60%乙醇定容,摇匀后静置 5 min,测量在 510 nm 处的吸光度值。以芦丁含量为横坐标,吸光度值 OD<sub>510</sub> 为纵坐标,作标准曲线,以芦丁标准曲线计算刺梨果酒中总黄酮含量<sup>[18]</sup>。实验重复 3 次。

1.3.4.4 抗坏血酸含量测定

高效液相色谱条件为 C18 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm),柱温为 30 ℃;检测波长为 265 nm,进样量为 10 μL;流动相为 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液(pH 值 2.0):乙腈=97:3,流速 1 mL/min。准确吸取 250、125、50、25、5 μL 的 20 mg/mL 抗坏血酸母液,超纯水制得 5.0、2.5、1.0、0.5、0.1 mg/mL 的抗坏血酸标准溶液。记录抗坏血酸(Vc)的色谱峰面积,以 Vc 色谱峰面积为纵坐标,对 Vc 浓度作图,绘制抗坏血酸标准曲线,根据标准曲线计算发酵液中 Vc 的含量<sup>[19]</sup>。实验重复 3 次。

1.3.5 抗氧化能力的测定

1.3.5.1 DPPH 自由基清除率的测定

取待测酒液 2 μL,加入 3 mL DPPH·溶液

(0.2 mmol/L), 加  $\phi=95\%$  乙醇至 4 mL 反应体系。涡旋震荡混匀后, 置于室温下避光反应 30 min 后测其在 517 nm 处的吸光度<sup>[20,21]</sup>。蒸馏水代替样品作为空白对照,  $\phi=95\%$  乙醇代替 DPPH 溶液用作自身对照。实验重复 3 次。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$B=[1-(A_t-A_r)/A_0]\times 100\% \quad (1)$$

式中:

$B$ ——DPPH 自由基清除率, %;

$A_t$ ——样品反应溶液的吸光度;

$A_r$ ——自身对照溶液的吸光度, 其中包括 3.998 mL 95% 乙醇溶液和 2  $\mu$ L 样品溶液;

$A_0$ ——空白对照溶液的吸光度, 其中包括 3 mL DPPH 和 2  $\mu$ L 50% 乙醇溶液。

### 1.3.5.2 ABTS 自由基清除率的测定

准确吸取 2.5 mL ABTS 溶液和 2.5 mL 过硫酸钾溶液 (5 mmol/L) 于同一试管中, 混合均匀, 在室温黑暗中静置 12 h, 用 PBS 缓冲液 (pH 值 7.4) 稀释至吸光度为 0.7 的工作液, 备用。取 1  $\mu$ L 的样品及 3 mL ABTS 工作液于试管中, 蒸馏水调至总体积为 4 mL。振荡混匀后放入 30  $^{\circ}$ C 恒温热水浴中静置 5 min, 在波长 734 nm, 测定在波长 734 nm 处样品溶液的吸光度<sup>[20,21]</sup>。实验重复 3 次。ABTS 自由基清除率计算公式如下:

$$C=[1-(A_t-A_r)/A_0]\times 100\% \quad (2)$$

式中:

$C$ ——ABTS 自由基清除率, %;

$A_t$ ——样品反应溶液的吸光度;

$A_r$ ——自身对照溶液的吸光度, 其中包括 1  $\mu$ L 的样品补加蒸馏水至 4 mL;

$A_0$ ——空白对照溶液的吸光度, 其中包括 3 mL 的 ABTS 工作液和用 1 mL 的蒸馏水。

### 1.3.5.3 羟基自由基清除率的测定

无菌水将  $H_2O_2$  溶液 (8.8 mmol/L) 稀释 10 倍备用。取 10  $\mu$ L 待测液, 依次加入  $H_2O_2$  工作液、9 mmol/L 乙醇水杨酸和 9 mmol/L  $FeSO_4$  溶液各 1 mL, 蒸馏水调至总体积为 4 mL 反应体系。充分振荡混匀, 置于 37  $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中, 静置 30 min, 测定其在波长 510 nm 处的吸光度<sup>[20,21]</sup>。蒸馏水代替待测液作为空白对照组, 蒸馏水代替  $H_2O_2$  溶液作为自身对照组。实验重复 3 次。羟基自由基清除率计算公式如下:

$$D=[1-(A_t-A_r)/A_0]\times 100\% \quad (3)$$

式中:

$D$ ——羟基自由基清除率, %;

$A_t$ ——样品反应溶液的吸光度;

$A_r$ ——自身对照溶液的吸光度;

$A_0$ ——空白对照溶液的吸光度。

## 1.3.6 数据处理与分析

实验结果以平均值 $\pm$ 标准误表示, 利用 Graph Pad Prism 7 统计软件进行绘图。采用 DPS 9.01 分析软件对数据进行差异显著性分析及相关性分析, 以  $P<0.05$  为样本间有显著差异。利用 MEGA 7 绘制进化树, 分析菌株的亲缘关系远近。

## 2 结果与讨论

### 2.1 刺梨果酒的感官评定

刺梨发酵液的感官评定依据同一个感官评价表作为评分标准, 从外观、滋味和香气等多方面来对刺梨发酵液进行评分, 得到的数据具有一定参考价值。如表 2 所示, 发酵前 23 d, 随着发酵天数的延长, 刺梨果酒的综合评价越来越好, 发酵 23 d 和更长时间的果酒感官评定分数无明显差别。果酒的生产主要经历两个阶段: 酒精发酵和陈酿。在酒精发酵阶段, 微生物将糖类分解并转化为酒精。发酵结束后进入陈酿阶段, 这个阶段发生的一些化学反应不仅可以减少挥发酸、杂醇油等不良风味物质, 提升果酒的香气和口感, 酒体更澄清, 品质更好<sup>[22]</sup>。

表 2 刺梨果酒的感官评定结果

Table 2 Sensory evaluation of *Rosa roxburghii* Tratt wine

| 发酵时间/d | 分数            |
|--------|---------------|
| 11     | 33 $\pm$ 1.62 |
| 14     | 36 $\pm$ 2.05 |
| 17     | 38 $\pm$ 1.70 |
| 23     | 40 $\pm$ 1.62 |
| 27     | 39 $\pm$ 1.80 |
| 30     | 40 $\pm$ 1.73 |

### 2.2 刺梨果酒中化学成分的变化

在发酵过程中, 刺梨果酒总酸、pH 值、还原糖、酒精度等理化指标均发生了变化。随着发酵天数的增加, 总酸含量总体呈现上升的趋势 (图 1a), 发酵 23 d 时的总酸含量较初始值上升了 2.01 倍, 随后趋于稳定; 发酵液 pH 值呈现上升趋势 (图 1b), pH 值在 30 d 仅从 3.20 增加至 3.50, 变化不大, 说明刺梨果实发酵过程中有效酸的变化幅度较小<sup>[23]</sup>。在发酵过程中, 总酸含量增加可能是乳酸菌<sup>[24]</sup>和酵母菌<sup>[25]</sup>发酵作用产酸导致的; 在刺梨果实发育过程中由于抗坏血酸的不断积累, 导致总酸含量随着果实发育不断增加<sup>[26]</sup>, 因此刺梨发酵过程中总酸含量变化也可能部分来源于发酵过程产生的抗坏血酸含量的增加。

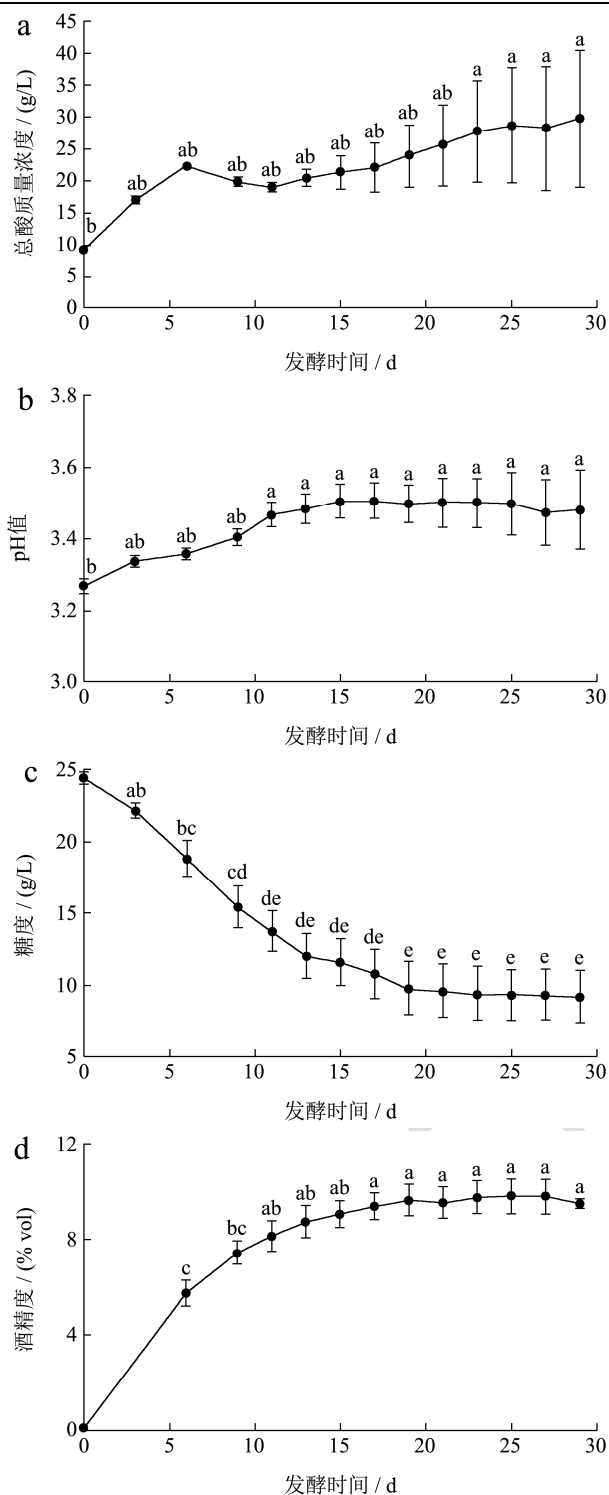


图1 刺梨发酵制酒过程中总酸(a)、pH值(b)、还原糖(c)及酒精精度(d)含量的变化

Fig.1 Changes in the contents of total acid (a), pH (b), total sugar (c) and alcohol (d) during the fermentation of *Rosa roxburghii* Tratt

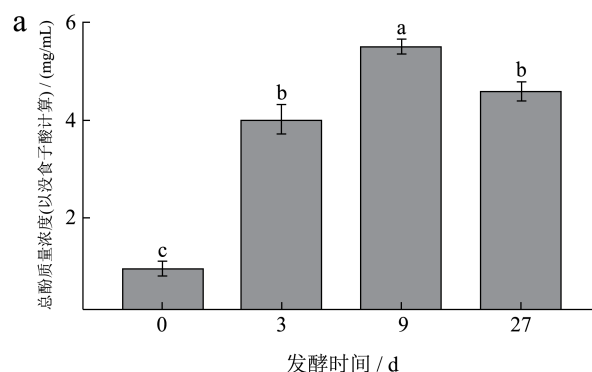
注：不同小写字母表示组内差异显著 ( $P < 0.05$ )，相同小写字母表示组内差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

发酵过程中还原糖的含量随着发酵天数的延长，呈现出总体下降的趋势（图 1c），而酒精度则呈现出上

升趋势（图 1d）。在第 13 天，发酵液还原糖含量迅速下降 50.88%，第 29 天发酵液还原糖含量缓慢下降 23.58%；在发酵第 20 天，酒精含量快速上升至 9.63%vol，但第 29 天，酒精含量仅上升 1.76%，接近发酵终点。发酵过程中还原糖和酒精度的含量与酵母菌的生长有关<sup>[23]</sup>。在发酵初期，酵母菌处于对数生长期，需要消耗大量的糖来用于自身生长代谢，而在发酵后期，随着酒精含量升高，酵母菌生长速度下降，耗糖量也下降，所以还原糖含量下降趋势变缓。

### 2.3 刺梨果酒中抗氧化成分的变化

在发酵过程中，刺梨果酒中总酚、总黄酮和抗坏血酸含量均发生了变化。随着发酵时间的延长，总酚、总黄酮和抗坏血酸含量呈现显著先升高后降低的趋势（图 2）。总酚含量第 9 天上升 5.05 倍，随后下降 16.91%（图 2a）；总黄酮含量第 9 天上升 10.37 倍，随后下降 1.91%（图 2b）；抗坏血酸含量第 9 天上升 2.53 倍，随后下降 5.73%（图 2c）。Filannino 等<sup>[27]</sup>研究乳酸菌发酵樱桃汁和西兰花浓浆过程中酚酸和类黄酮的代谢时发现乳酸菌在代谢过程中将大分子的酚类物质水解成小分子酚类，使总酚含量增加；Danyue Zhao 等<sup>[28]</sup>研究乳酸菌代谢茶酚类物质的能力时发现细菌改变酚类的成分以及使总酚含量的升高；有文献报道细菌酶能够将多酚代谢成酚酸和其他小分子<sup>[29]</sup>。因此，我们推测刺梨自然发酵前期总酚含量增加可能是微生物将大分子酚类物质转化成小分子酚类物质而导致的。第 9 天总酚含量下降，可能是酒精发酵过程中酚类化合物与蛋白质甚至酵母菌的结合或吸附，诱导了这些化合物的损失<sup>[30]</sup>。总黄酮含量的变化与 Escudero-López 等<sup>[31]</sup>的研究一致：发酵过程中乙醇的存在有助于从刺梨的果肉中提取类黄酮；在第 9 天总黄酮含量降低可能是由于长时间发酵导致黄酮类化合物的分解。在刺梨果实中，抗坏血酸含量非常高<sup>[32]</sup>，发酵过程中酒精使其溶解在发酵液中，因此抗坏血酸含量增加；发酵后期抗坏血酸含量下降，可能有一些维生素发生了降解<sup>[33]</sup>。



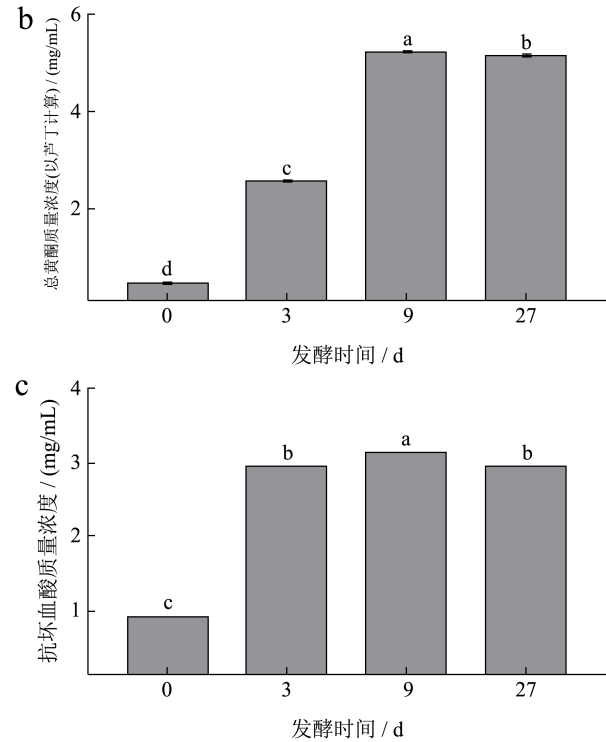


图2 刺梨发酵制酒过程中总酚(a)、总黄酮(b)、抗坏血酸(c)含量的变化

Fig.2 Changes in the contents of total phenol (a), total flavonoid (b) and ascorbic acid (c) during the fermentation of *Rosa roxburghii* Tratt

注: 不同小写字母表示组内差异显著 ( $P<0.05$ ), 相同小写字母表示组内差异不显著 ( $P>0.05$ )。

## 2.4 刺梨果酒抗氧化活性能力的变化

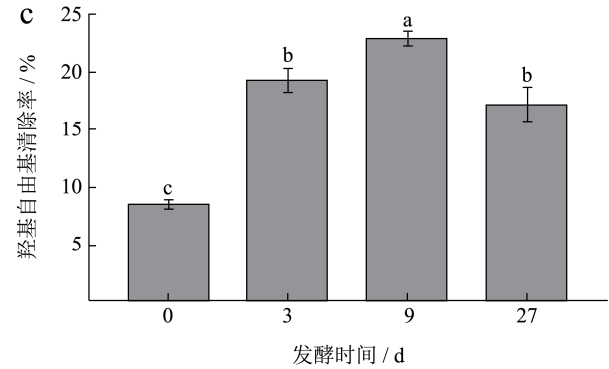
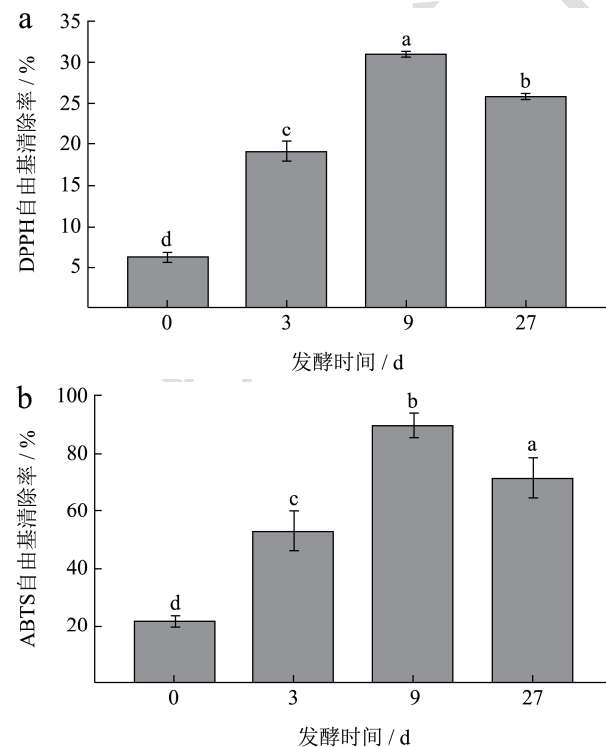


图3 刺梨发酵制酒过程中 DPPH 自由基清除率(a)、ABTS 自由基清除率(b)、羟基自由基清除率(c)变化

Fig.3 Changes in DPPH free radical scavenging rate (a), ABTS free radical scavenging rate (b), hydroxyl free radical scavenging rate (c) during the fermentation of *Rosa roxburghii* Tratt

注: 不同小写字母表示组内差异显著 ( $P<0.05$ ), 相同小写字母表示组内差异不显著 ( $P>0.05$ )。

DPPH、ABTS 自由基清除能力和羟基自由基清除率变化趋势能够反映抗氧化活性能力的变化趋势<sup>[34]</sup>。随着发酵天数延长, 刺梨自然发酵液的 DPPH 自由基清除率(图 3a)、ABTS 自由基清除率(图 3b)和羟基自由基清除率(图 3c)呈现显著先上升后降低的趋势。在第 9 天时各清除率达到最高值, DPPH 自由基清除率为 30.82%, ABTS 自由基清除率为 89.80%, 羟基自由基清除率为 22.90%, 随后各清除率逐渐下降, 这种趋势与付龙威等<sup>[35]</sup>的研究结果一致: 这可能与酚类物质的变化趋势有关。另外, 刺梨发酵后的自由基清除能力增加这一变化与侯金丽等<sup>[36]</sup>研究刺梨植物乳杆菌饮料时结果相同。

## 2.5 抗氧化物质含量变化与抗氧化活性变化的相关性分析

### 的相关性分析

表3 刺梨果酒中抗氧化物质含量变化与抗氧化活性变化的相关性

| Table 3 Correlation between changes in the contents of antioxidant substance and antioxidant activity in <i>Rosa roxburghii</i> Tratt wine |         |         |         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|
| 项目                                                                                                                                         | 总黄酮含量   | 总酚含量    | 抗坏血酸含量  |
| DPPH 自由基清除率                                                                                                                                | 0.935** | 0.942** | 0.823** |
| ABTS 自由基清除率                                                                                                                                | 0.929** | 0.940** | 0.818** |
| 羟基自由基清除率                                                                                                                                   | 0.544*  | 0.932** | 0.906** |

注: \*\*表示在 0.01 水平(双侧)上极显著相关; \*表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关。

研究表明刺梨果实的抗氧化能力是多物质协同作

用的结果,其中总酚、总黄酮和 Vc 起着决定性作用,且总酚和总黄酮的贡献大于 Vc<sup>[37,38]</sup>。我们发现:刺梨自然发酵制酒过程中总酚含量和抗坏血酸含量的变化与三种自由基清除率的变化都呈极显著的正相关关系(表 3),其中,总酚含量与三种自由基清除率的变化相关系数都大于 0.90 以上( $P<0.01$ ),说明酚类物质含量的变化是影响刺梨发酵酒发酵过程中抗氧化活性变化的主要因素<sup>[39,40]</sup>。此外,总黄酮含量的变化

与 DPPH、ABTS 和羟基自由基清除率的变化都有显著正相关关系( $P<0.05$ ),说明黄酮类化合物对刺梨发酵酒中抗氧化活性起着重要作用<sup>[41]</sup>。综上所述说明发酵过程中抗氧化活性的变化与刺梨果酒中多酚、总黄酮和抗坏血酸含量变化有一定相关性。

## 2.6 刺梨发酵过程中的微生物分析

### 2.6.1 发酵过程中的优势菌菌落总数变化

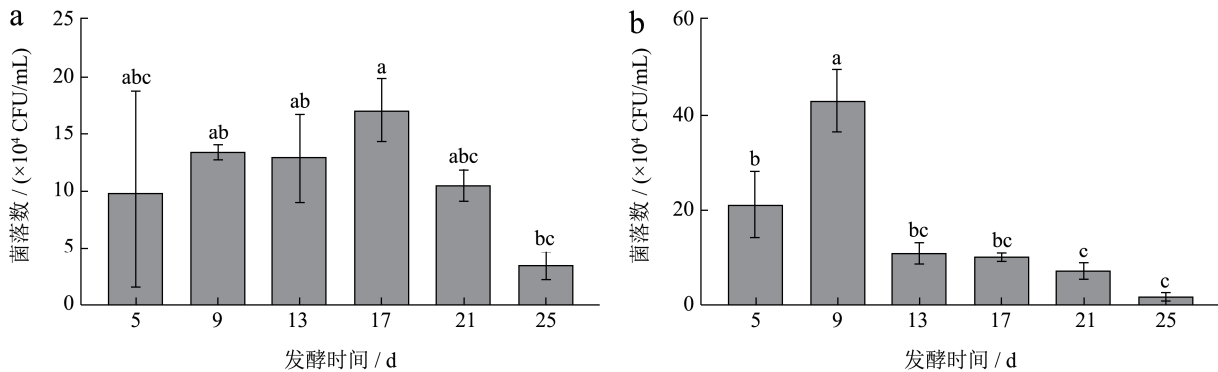


图 4 刺梨发酵制酒过程中酵母菌(a)和乳酸菌(b)菌落总数

Fig.4 Changes in total number of yeast (a) and lactic acid bacteria (b) during the fermentation of *Rosa roxburghii* Tratt

注:不同小写字母表示组内差异显著( $P<0.05$ ),相同小写字母表示组内差异不显著( $P>0.05$ )。

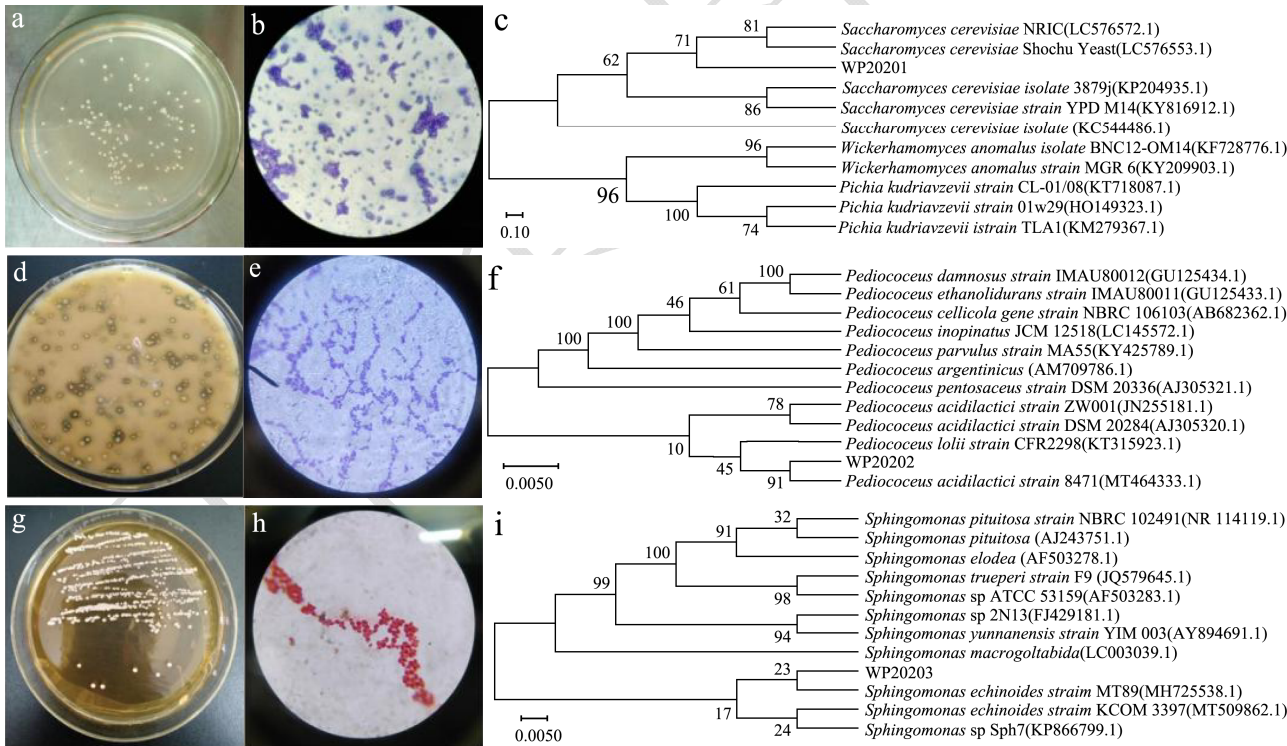


图 5 刺梨发酵制酒样品中的 1 株真菌及 2 株细菌的鉴定

Fig.5 Identification of one fungus and two bacteria from the fermentation of *Rosa roxburghii* Tratt

注: a 真菌的菌落形态; b 真菌革兰氏染色图; c 真菌的 ITS 系统进化树; d 细菌 1 的菌落形态; e 细菌 1 革兰氏染色图; f 细菌 1 的 16S rDNA 系统进化树; g 细菌 2 的菌落形态; h 细菌 2 革兰氏染色图; i 细菌 2 的 16S rDNA 系统进化树。

在发酵过程中进行代谢的微生物种类繁多,发酵过程中的主要微生物包括乳酸菌类和各类酵母菌等<sup>[42,43]</sup>。刺梨发酵过程中,如图 4 所示,酵母菌菌落

总数在发酵前 17 d 增长至  $1.70 \times 10^5$  CFU/mL,第 17 天后下降 80%;乳酸菌菌落总数在第 0~9 天内迅速增长至  $4.27 \times 10^5$  CFU/mL,而第 9~13 天乳酸菌减少



75.19%, 后 13 d 缓慢减少。在发酵前期, 发酵液中营养物和还原糖含量丰富, 酵母菌和乳酸菌繁殖快, 且乳酸菌的生长速率比酵母菌快, 这是因为乳酸菌的糖代谢能力比酵母菌的强<sup>[44]</sup>; 第 9 天酵母菌产生酒精使发酵液中酒精度浓度增大, 抑制了乳酸菌的生长繁殖, 而酵母菌的酒精耐受性比乳酸菌的强, 酵母菌生长繁殖数量依然增加。随着发酵液中的营养成分不断减少, 酵母菌和乳酸菌生长进入衰亡期。

### 2.6.2 特定优势菌的菌种鉴定

从刺梨发酵制酒样品中分离到的 1 株真菌及 2 株细菌, 真菌菌落形态为圆形隆起、直径为 (3±1) mm、表面光滑、湿润粘稠、边缘整齐、乳白色、不透明、菌落背面为黄色、革兰氏染色试验呈紫色 (图 5a~b), ITS 序列与酿酒酵母 SH-4 菌株同源性达 99.75% (图 5c), 因此确定该菌为酿酒酵母, 命名为 WP20201; 细菌 1 菌落形态为圆形, 颜色呈白色 (图 5d), 革兰氏染色试验呈紫色 (图 5e), 16s rDNA 序列比对与乳酸片球菌 8471 同源性达 99.79% (图 5f), 鉴定该菌为乳酸片球菌, 命名为 WP20202; 细菌 2 菌落形态为呈圆形, 中等大小, 凸起, 白色, 边缘整齐, 直径 (3±1) mm, 菌落背面为白色 (图 5g), 革兰氏染色为红色 (图 5h), 16s rDNA 序列与棘皮鞘氨醇单胞菌 MT89 的同源性达 100% (图 5i), 将该菌定为棘皮鞘氨醇单胞菌, 命名为 WP20203。

## 3 结论

本文以刺梨为原料, 经过 23 d 自然发酵后果酒有最佳的品质, 酒体颜色金黄, 有比较悦人的果香与酒香, 味道醇美柔和爽口, 酸甜适中, 具有刺梨果酒的典型风格。发酵过程中, 总酸含量呈现上升的趋势, pH 值呈现上升趋势, 还原糖含量呈现下降趋势, 酒精度总体呈上升趋势; 总酚、总黄酮和抗坏血酸含量先升高后降低; DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率和羟基自由基清除率呈显著先上升后降低的趋势, 这与样品中的总酚、总黄酮和抗坏血酸含量变化呈显著相关; 酵母菌和乳酸菌总数先上升后下降, 其优势酵母为酿酒酵母, 优势细菌为乳酸片球菌和棘皮鞘氨醇单胞菌。研究结果为进一步阐明刺梨果酒保健功能机理和综合性开发提供理论基础和技术依据, 同时为优化刺梨发酵工艺提供依据。然而, 刺梨发酵制酒过程中酿酒酵母/乳酸片球菌/棘皮鞘氨醇单胞菌数量的动态变化、营养成分变化等特征还有待于后续进一步研究。

## 参考文献

- [1] 夏仕青, 张爱华. 刺梨的营养保健功能及其开发利用研究进展[J]. 贵州医科大学报, 2018, 43(10): 1129-1132
- [2] 代甜甜, 杨小生. 刺梨化学成分及药理活性研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2015, 37(4): 93-97
- [3] Wang L, Zhang B, Xiao J, et al. Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit [J]. Food Chemistry, 2018, 249(30): 127-135
- [4] X Zhou, G Zhu, Y Yang, et al. Optimization of enzymatic-assisted extraction of polysaccharides from *Roxburgh rose* pomace and its antioxidant activity [C]// E3S Web of Conferences, 2019
- [5] Ma Y X, Zhu Y, Wang C F, et al. The aging retarding effect of 'Long-Life CiLi' [J]. Mechanisms of Ageing and Development, 1997, 96: 171-180
- [6] Zhang C, Liu X, Qiang H, et al. Inhibitory effects of *Rosa roxburghii* Tratt juice on in vitro oxidative modification of low density lipoprotein and on the macrophage growth and cellular cholesteryl ester accumulation induced by oxidized low density lipoprotein [J]. International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine, 2001, 313(1): 37-43
- [7] 秦龙龙, 周瑞丽. 刺梨的营养保健功能及应用发展趋势[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(13): 212-214
- [8] 赵驰, 苏伟, 母应春, 等. 刺梨蜂蜜果酒酿造工艺优化[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(6): 31-38
- [9] 韦唯, 江帆, 袁振辉, 等. 不同发酵方式对刺梨果酒品质的影响[J]. 食品科技, 2020, 45(3): 105-113
- [10] 贺红早, 张玉武, 刘盈盈, 等. 无籽刺梨果酒酿制工艺优化初探[J]. 酿酒科技, 2015, 11: 91-93
- [11] 隋双, 周赛楠, 王萍. 笃斯越橘恒温自然发酵的主要微生物初步鉴定及应用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(9): 102-110
- [12] 郝林, 孔庆学, 方详. 食品微生物学实验技术[D]. 北京: 中国农业大学出版社, 2016
- [13] 巴尼特 J A. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [15] 陈海彬. 一株产抗菌肽鼠李糖乳杆菌的筛选及其抗菌肽的分离纯化[D]. 广州: 华南农业大学, 2019
- [16] 于志海, 岳利容, 王青, 等. 一株刺梨酿酒酵母的鉴定及酿酒潜力分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(1): 70-75

- [17] 牛雪.福林酚法测定葡萄酒总酚的优化研究[D].银川:宁夏大学,2015
- [18] 魏永生,王永宁,石玉平.分光光度法测定总黄酮含量的实验条件研究[J].青海大学学报(自然科学版), 2003,3:61-63
- [19] 王海佳.紫外分光光度法研究维生素 C 的稳定性及蔬果和果汁中含量的测定[D].太原:山西医科大学,2015
- [20] Hongyan Wu, Mingming Li, Xiuru Yang, et al. Extraction optimization, physicochemical properties and antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from Roxburgh rose (*Rosa roxburghii* Tratt.) leaves [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 517-529
- [21] Li C, Huang Q, Fu X, et al. Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* L [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 75: 298-305
- [22] 宋永民,刘代成.刺梨果酒制作工艺的优化研究[J].山东农业科学,2008,3:109-112
- [23] 姚敏.刺梨果酒技术研究-发酵过程成分变化及与刺梨浸泡酒的营养、风味、滋味比较[D].贵阳:贵州大学,2015
- [24] 刘晓燕,谢丹,马立志,等.刺梨果渣发酵前后活性成分及抗氧化能力的比较研究[J].食品科技,2021,46(2):16-24
- [25] 李玉珠,龙谋,汤艳燕,等.玫瑰茄浸提及其发酵酒工艺优化及发酵前后有机酸和酚酸的比较[J].食品科学,2018,39(4):66-75
- [26] 安华明,刘明,杨曼,等.刺梨有机酸组分及抗坏血酸含量分析[J].中国农业科学,2011,44(10):2094-2100
- [27] Filannino P, Bai Y, Cagno R D, et al. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree [J]. Food Microbiology, 2015, 46: 272-279
- [28] Danyue Zhao, Nagendra P Shah. Lactic acid bacterial fermentation modified phenolic composition in tea extracts and enhanced their antioxidant activity and cellular uptake of phenolic compounds following *in vitro* digestion [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 20: 182-194
- [29] Barthelmebs L, Divies C, Cavin J. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism [J]. Appl Environ Microb, 2000, 66(8): 3368-3375
- [30] Talcott S T, Lee J H. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice [J]. J. Agric Food Chem, 2002, 50: 3186-3192
- [31] Escudero-López B, Cerrillo I, Herrero-Martín G, et al. Fermented orange juice source of higher carotenoid and flavanone contents [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(37): 8773-8782
- [32] Liu M H, Zhang Q, Zhang Y H, et al. Chemical analysis of dietary constituents in *Rosa roxburghii* and *Rosa sterilis* fruits [J]. Molecules, 2016, 21(9): 1204
- [33] Klopotek Y, Otto K, Bohm V. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 5640-5646
- [34] 熊巧仪,刘丁群,鲁敏.刺梨自然发酵后抗氧化物质含量与抗氧化活性分析[J].食品研究与开发,2018,39(1):147-151
- [35] 付龙威,汤晓娟,林祥娜,等.枇杷酵素自然发酵过程中有机酸及其抗氧化活性的研究[J].食品研究与开发,2021,42(4):42-47,54
- [36] 侯金丽.刺梨植物乳杆菌发酵饮料的研制及其抗氧化作用[J].食品科技,2022,47(2):140-146
- [37] 周广志,鲁敏,安华明.刺梨果实发育过程中主要活性物质含量及其抗氧化性分析[J].食品科学,2018,39(22):20-25
- [38] Jingyu He, Yuanhe Zhang, Na Ma, et al. Comparative analysis of multiple ingredients in *Rosa roxburghii* and *R. sterilis*, fruits and their antioxidant activities [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27: 29-41
- [39] Verzelloni E, Tagliazucchi D, Conte A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar [J]. Food Chemistry, 2007, 105(105): 564-571
- [40] 贾仕杰,张海华,张焕,等.东北 6 种红树莓叶酚类化合物的鉴定及抗氧化活性分析[J].食品科学,2019,40(20):227-233
- [41] 张汇慧,吴彩娥,范龚健,等.刺梨黄酮的精制及其抗氧化活性比较[J].南京林业大学学报(自然科学版),2015,39(3):101-105
- [42] Aguiar F, Menezes V, Rogez H. Spontaneous postharvest fermentation of açai (*Euterpe oleracea*) fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 86: 294-299
- [43] Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, et al. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 220: 63-72
- [44] 杨贵,张宿义,赵金松,等.一种调味白酒发酵过程中微生物菌群结构及代谢研究[J].食品与发酵工业,2022,14:209-217