doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2026.22.034

降甲醇酵母分离筛选与其混菌发酵对脐橙酒品质的影响

许嘉欣　战吉宬　邓乔允　周　慧　沈　菊　陈威豪　游义琳　黄卫东
（中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京　100083）

摘要：为提升脐橙酒的安全性与风味品质，降低酒中的甲醇含量，从湖南省崀山地区 4 种脐橙品种的果园土壤、果皮及自然发酵酒中分离酵母菌株，建立共 164 株酵母的菌种库；用含外源甲醇的模拟发酵培养基对菌株进行 2 轮降解甲醇能力的筛选，得到 2 株具有高甲醇降解能力的本土非酿酒酵母菌株 *Pichia kluyveri* UT002 和 *Metschnikowia pulcherrima* U405；将优选菌株应用于真实脐橙汁中与商业酿酒酵母 QA23 进行混菌发酵。试验结果表明，与空白对照组相比，UT002 和 U405 在模拟发酵培养基中的甲醇降解率分别为 34.63%、17.74%。在真实脐橙汁发酵中，2 株酵母与 QA23 的顺序接种发酵在有效降低甲醇含量的同时能提升果酒香气，其中 S+M(X)组具有最高的甲醇降解率 7.14%，S+P(X)组的挥发性化合物总量和酯类物质含量最高，S+M+P(X)组在闻香评价中整体喜好性最高。

关键词：脐橙酒；甲醇降解；非酿酒酵母；混菌发酵
中图分类号：TS261.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-1298(2026)22-0387-12　　**OSID**：

Isolation and Screening of Methanol-reducing Yeast and Impact of Mixed-culture Fermentation on Quality of Navel Orange Wine

Xu Jiaxin　Zhan Jicheng　Deng Qiaoyun　Zhou Hui　Shen Ju　Chen Weihao　You Yilin　Huang Weidong
(*College of Food Science and Nutritional Engineering*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100083, *China*)

Abstract: Aiming to improve the safety and flavor quality of navel orange wine and reduce methanol content in fruit wine, yeast strains were isolated from orchard soil, fruit peels, and spontaneously fermented wine of four navel orange varieties in the Langshan area of Hunan Province, establishing a yeast strain library comprising 164 isolates. Using a simulated fermentation system supplemented with exogenous methanol, two rounds of screening for methanol degradation ability were performed, yielding two indigenous non-Saccharomyces yeast strains with high methanol-degrading capability: *Pichia kluyveri* UT002 and *Metschnikowia pulcherrima* U405. The selected strains were then used in mixed-culture fermentation with commercial *Saccharomyces cerevisiae* QA23 in fresh navel orange juice. The results showed that, compared with the blank control, UT002 and U405 achieved methanol degradation rates of 34.63% and 17.74%, respectively, in the simulated fermentation system. In the fermentation of fresh navel orange juice, sequential inoculation of these two yeasts with QA23 effectively reduced methanol content while improving the aromatic profile of the wine. Among the trials, the S+M(X) group showed the highest methanol degradation rate (7.14%), the S+P(X) group exhibited the highest total volatile compounds and ester content, and the S+M+P(X) group showed the highest overall preference in the aroma evaluation.

Key words: navel orange wine; methanol degradation; non-Saccharomyces yeast; mixed-culture fermentation

收稿日期：2026-03-23　修回日期：2026-05-24
基金项目：国家重点研发计划项目(2023YFD2100304)
作者简介：许嘉欣(2000—)，女，硕士生，主要从事微生物资源开发与果酒酿造研究，E-mail：1183230226@qq.com
通信作者：战吉宬(1972—)，男，教授，博士生导师，主要从事葡萄酒酿造、果蔬营养与健康研究，E-mail：zhanjicheng@cau.edu.cn

0 引言

脐橙酒是一种重要的脐橙果实深加工产品,感官风味与安全性是决定脐橙酒品质的核心。在发酵过程,果实原料中的果胶经果胶甲酯酶(Pectin methylesterase,PME)作用降解产生的甲醇,是果酒产品安全性的关键风险指标。过量甲醇对人体视觉及神经系统具有明确毒性,会导致受害者出现意识丧失、呼吸困难、视力模糊等多种症状,甚至失明、腹痛、腹泻和呕吐等,严重的还会危及生命[1]。目前国内对葡萄酒、果酒中甲醇含量均有限定,文献[2]规定葡萄酒中甲醇含量:白、桃红葡萄酒≤250 mg/L,红葡萄酒≤400 mg/L;文献[3]规定果酒中甲醇含量≤0.4 g/L。针对果酒中甲醇的控制,现有研究主要集中于发酵工艺优化和酿酒酵母改良两方面。在工艺方面,选用果胶含量较低的酿酒果实原料[4-5]、降低发酵温度[6-7]、选择合适的果胶酶种类和添加量[8]、添加膨润土[9]等被证实能有效降低果酒中的甲醇含量。而酵母改良主要通过诱发酵母突变减少酵母由甘氨酸代谢产生的甲醇。近年来,通过物理诱变(如常压室温等离子体)或基因编辑手段改良酵母降低甲醇生成的研究取得了新进展[10]。然而,这些方法可能引入外源物质,或在一定程度上限制了风味多样性的发展,或面临突变方向的不可控性,在强调天然与微生物多样性的现代酿造理念中存在一定局限。甲醇水平主要受果胶降解调控、酵母菌株本身贡献较弱的观点仍被广泛认可[11],因此利用酵母降解在发酵过程中产生的甲醇是一种新角度。其中,相较于工程改造,从丰富的自然环境微生物资源中筛选出具有降解甲醇潜力的天然酵母菌株是更加简便安全的方法,为果酒甲醇减控提供了一条更具应用潜力的生物解决途径,然而目前相关研究还十分欠缺。

在葡萄酒等果酒酿造中,利用本土筛选出的非酿酒酵母与酿酒酵母进行混菌发酵,已成为提升产品风味复杂性[12]与区域特色[13]的有效策略。一些本土非酿酒酵母菌株具有降解有害物质[14-15]、提高甘油[16-17]及酯类物质含量[18-19]等优良特性,从而显著提高果酒的安全性,改善风味轮廓。然而,大部分非酿酒酵母发酵性能较差,酒精生成效率较低,无法独立完成发酵。因此,利用酿酒酵母与具有功能特性的非酿酒酵母进行混菌发酵是提升果酒安全性和风味的一种可行方法。

本文从湖南省邵阳市新宁县崀山地区 4 种脐橙品种果园土壤、果皮及自然发酵酒中分离酵母菌株,经 WL 培养基初步鉴定后,通过分子生物学方法确定菌株种属;在添加外源甲醇的模拟发酵培养基中,对菌株进行降解甲醇能力的初筛与复筛;将其应用于真实脐橙汁的混菌发酵中,测定脐橙酒基本理化指标、甲醇含量、挥发性化合物含量并进行闻香评价,综合评价其在脐橙酒中的应用潜力。以期筛选得到具有高降解甲醇能力的优良酵母菌株,为开发低甲醇、高品质的特色脐橙酒提供核心菌种资源和重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 脐橙样品、脐橙汁与所用酵母

脐橙采自湖南省邵阳市新宁县崀山镇脐橙果园,品种分别为纽荷尔、福本、奈维林娜、崀丰;脐橙汁产自湖南省邵阳市新宁县崀山镇,由湖南山之良科技有限公司提供的 NFC 全果压榨脐橙汁。

商业酿酒酵母 QA23、D254、L13、B2,加拿大 Lallemand 公司;商业酿酒酵母 F15,法国 Laffort 公司;商业酿酒酵母 SY 葡萄酒果酒专用酵母,中国安琪酵母股份有限公司。

野生酿酒酵母,选自本课题组前期从宁夏产区分离建立的本土野生酵母菌种资源库。

1.1.2 培养基

WL 固体培养基:WL 营养琼脂培养基 80.25 g/L;YPD(Yeast extract peptone dextrose,酵母浸出粉胨葡萄糖)液体培养基:葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母浸粉 10 g/L;模拟发酵培养基:无氨基酵母氮源培养基 6.7 g/L,葡萄糖 50 g/L,果糖 50 g/L,加 0.5 mol/L的 NaOH 溶液调 pH 值为 5.8,121℃高压灭菌 20 min,冷却至室温后加入 0.22 μm 聚醚砜滤膜过滤除菌后的甲醇,至培养基中的甲醇浓度为 400 mg/L。

1.1.3 试剂

偏重亚硫酸钾,爱赛科有限公司;WL 营养琼脂培养基、葡萄糖、果糖、蛋白胨、酵母浸粉,北京奥博星生物技术有限责任公司;无氨基酵母氮源培养基,北京索莱宝科技有限公司;M5 超光速 mix,北京聚合美生物科技有限公司;果胶酶,上海源叶生物科技有限公司;甲醇,上海泰坦科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

PAL-1 型手持糖度计,日本 Atago 公司;Aminex HPX-87H 液相色谱柱(300 mm×7.8 mm),美国 Bio-Rad 公司;Waters-2695 型高效液相色谱仪、Waters-2414 型示差检测器,美国 Waters 公司;7890A-5975C 型气相色谱-质谱联用仪、DB-17MS 型毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)、DB-WAX 型超高惰性柱(30 m×0.53 mm×1.00 μm),

美国 Agilent 公司；Nexis GC－2030 型气相色谱仪、HS－20 NX 型顶空进样器，日本 Shimadzu 公司。

1.3　方法

1.3.1　脐橙野生酵母分离纯化及鉴定

1.3.1.1　样品处理及发酵工艺

脐橙自然发酵醪处理：挑选成熟、完整、无腐烂的脐橙，去皮破碎后取 400 mL 发酵醪置于 500 mL 无菌发酵罐，添加 120 mg/L 偏重亚硫酸钾以避免杂菌污染，15 min 后加 50 mg/L 果胶酶，25℃恒温发酵，于第 0、2、4、6、10、14 天取样。带渣发酵至第 5 天过滤，分离清汁继续发酵，每日早晚各压帽 1 次。用手持糖度计监测每日白利糖度（Degrees Brix）变化，连续 3 d 不下降即视为酒精发酵结束。

脐橙果皮处理：取 2 g 果皮样品加入到 500 mL YPD 液体培养基中，于 28℃、160 r/min 恒温振荡培养箱培养 12 h。

脐橙果园土壤处理：在脐橙果树根部除去表层约 3 cm 浮土处、地面掉落腐烂果实处取 5 g 土样，混合均匀后取 2 g 土壤样品加入到 500 mL YPD 液体培养基中，于 28℃、160 r/min 恒温振荡培养箱培养 12 h。

1.3.1.2　菌株筛选、鉴定与纯化

脐橙自然发酵醪：分别在第 0、2、4、6、10、14 天取样。

脐橙果皮和土壤：28℃、160 r/min 恒温振荡培养箱培养 12 h 后取样。

取样后，用无菌蒸馏水进行梯度稀释。选择合适稀释度，取 100 μL 稀释液涂布于 WL 平板上，28℃倒置培养 48 h。选取菌落数为 30～300 个的平板，挑取其中大小、形态、颜色等不同的单菌落，转接至新 WL 平板划线纯化，相同条件培养 48 h。每株菌纯化 2～3 次。

菌株的分子生物学鉴定：参照文献[20]的方法，并略作调整，提取基因组 DNA，并进行 PCR 扩增及测序。

1.3.2　降解甲醇酵母筛选

1.3.2.1　菌株初筛

将同一脐橙品种中筛选到的同一种属的酵母分为一组，共 41 组，取本实验室课题组原有菌种资源库中的 60 株野生酿酒酵母，按照不同产地来源（HJZ－W、HW－W、ZHYS－W、HJZ－R、JX－R、ZHYS－R）进行分组，共 6 组，并取 6 种商业酿酒酵母（F15、L13、B2、D254、QA23、安琪）各自为一组，共 6 组，总计 53 组发酵组，按组进行模拟发酵培养基下的发酵，每组设置 3 个平行。选择文献[3]中甲醇最大限量 0.4 g/L 为模拟发酵培养基中的甲醇浓度，在 50 mL 模拟发酵培养基中，分别接种 2% 的初始接种菌液（OD_{600} 为 1）。其中，对于菌株数量为 1 株的组，直接接入 2% OD_{600} 为 1 的菌液；对于菌株数量大于 1 株的组，先将组内各个菌株预培养到 OD_{600} 为 1，再各取 2% 的菌液等体积混合后接入新的 YPD 液体培养基中再次培养至 OD_{600} 为 1，取 2% 的菌液作为初始接种菌液；并设置其他条件一样、未接种任何菌株的空白对照组，主要目的为排除非生物因素（如物理挥发、化学降解等）对培养基中甲醇含量的影响，从而准确可靠地将发酵后甲醇含量的变化归因于酵母菌株的生物代谢作用[21]，在甲醇降解率计算中，都以相应空白对照组的甲醇含量为对照进行计算，计算公式为

$$D = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

式中　C_0——空白对照组甲醇含量

C_1——试验组甲醇含量

D——甲醇降解率，%

25℃恒温培养箱中发酵 14 d 后，测定模拟发酵培养基中的剩余甲醇含量，进行初筛，以此评估各组酵母菌株甲醇降解能力。

1.3.2.2　菌株复筛

选取初筛分组中剩余甲醇含量较低的发酵组，将组内的酵母分别进行单一菌株的模拟发酵培养基发酵，每组设置 3 个平行。在 50 mL 模拟发酵培养基中，分别接种 2% 预培养的菌液（OD_{600} 为 1），并设置其他条件一样、未接种任何菌株的空白对照组。25℃恒温培养箱中发酵 14 d 后，测定模拟发酵培养基中的剩余甲醇含量，进行复筛，得到降解甲醇能力较强的菌株。

1.3.3　优选菌株与商业酿酒酵母混菌发酵

1.3.3.1　脐橙酒发酵方案

用 4 层纱布过滤脐橙汁，将清汁和果渣分离，取 400 mL 清汁，加白砂糖调糖度为 20.0°Brix 后，进行巴氏杀菌（65℃，30 min），冷却至室温，果胶酶按浓度 50 mg/L 添加，45℃水浴活化 2 h。按照表 1 发酵试验组设置向各发酵罐中接入对应的发酵菌株预培养菌液（OD_{600} 为 1），启动发酵进程，每组设置 3 个平行。在 25℃下发酵，每日早晚各压帽 1 次。监测每日糖度变化，连续 3 d 不下降即为发酵结束。分别于第 0、2、4、6、8、10 天取样，测定甲醇含量。发酵结束后，取样冻存于－20℃，用于理化指标和挥发性化合物的分析，剩余样品加入 120 mg/L 偏重亚硫酸钾后封瓶，置于 4℃冰箱中用于闻香评价。

1.3.3.2　脐橙酒理化指标测定

糖度：使用手持糖度计测定。葡萄糖、果糖、甘

表 1 发酵试验组设置

Tab. 1 Fermentation experimental groups

组别	发酵方式	发酵菌株	接种方式[22-23]
S	单菌株发酵	QA23	2% QA23
S+M(X)	顺序接种	QA23+U405	2% U405+4 d 后接种 2% QA23
S+P(X)	顺序接种	QA23+UT002	2% UT002+4 d 后接种 2% QA23
S+M+P(X)	顺序接种	QA23+U405+UT002	1% U405+1% UT002+4 d 后接种 2% QA23
S+M(T)	同时接种	QA23+U405	1% U405+1% QA23
S+P(T)	同时接种	QA23+UT002	1% UT002+1% QA23
S+M+P(T)	同时接种	QA23+U405+UT002	0.5% U405+0.5% UT002+1% QA23

注:QA23 为商业酿酒酵母,U405 为美极梅奇酵母,UT002 为克鲁维毕赤酵母。

油和酒精:使用高效液相色谱法进行测定;色谱条件:色谱柱温度 55℃;检测器温度 40℃;等度洗脱,流动相为 5 mM H_2SO_4 溶液,流速 0.5 mL/min;进样量10 μL。依据保留时间定性,以峰高定量。

1.3.3.3 甲醇含量测定

使用气相色谱法对脐橙酒中甲醇含量进行测定。

顶空条件:氮气为载气,样品瓶加压 125 kPa,恒温炉温度 75℃,样品流路温度 85℃,传输线温度 95℃,样品瓶恒温时间 20 min,进样时间 0.50 min。

色谱条件:高纯氮气(99.999%)作载气,流速 24.0 mL/min,进样口温度 220℃,分流比 1∶20,检测器温度 220℃,氢气流速 32.0 mL/min,空气流速 200.0 mL/min。柱温箱程序升温:初始 40℃保持 4 min,以 20℃/min 升至 80℃并保持 2 min,再以 30℃/min 升至 200℃,保持 1 min。依据保留时间定性,以峰面积定量。

1.3.3.4 挥发性化合物测定

参照 Ding 等[24]的方法,并加以修改。使用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(Headspace solid phase microextraction - gas chromatography - mass spectrometry,HS-SPME-GC-MS)对脐橙酒中的挥发性化合物进行测定。

样品前处理:将 1.5 g 氯化钠与 5 mL 脐橙酒样品置于顶空瓶中,并加入 15 μL 3-辛醇(1 g/L)作为内标,将 250℃老化 30 min 的萃取头插入顶空瓶中,以 40℃、250 r/min 条件平衡 15 min,在 40℃下吸附萃取 30 min,进样分析。

GC-MS 条件:进样口 250℃,氦气为载气,流速 1.0 mL/min,不分流进样;升温程序:50℃保持 5 min,以 5℃/min 升至 230℃保持 70 min;检测器 250℃,全扫描模式,电子电离源,离子源 230℃,电子能量为 70 eV,传输线 280℃,四极杆 150℃,扫描范围 29~500 amu。

1.3.3.5 闻香评价

闻香评价小组由 12 名食品专业研究生及科研人员组成(6 男 6 女,年龄 22~30 岁),所有评价者均无嗅觉或味觉功能障碍,且在评价前一周内未服用影响感官判断的药物或食用辛辣刺激性食品。评价者需通过基础嗅觉与味觉敏感性筛选测试,正确率≥80%者方可入选。正式评价前进行 2 轮培训,培训后采用内部一致性检验(Cronbach's α)评估闻香评价小组的可靠性,结果显示所有香气维度的 Cronbach's α 系数均大于 0.8,表明评价小组具有良好的一致性。

正式评价时,采用五点强度法对脐橙酒香气的 6 个方面(酒精气味、甜香、酸味、果香、花香、草本植物香气)进行评分,同时每位评价者需对 7 款样品进行整体喜好性排序。

1.4 数据处理

每个脐橙酒发酵组设置 3 个平行。使用 R 语言进行方差分析(ANOVA),当 $p<0.05$ 时认为差异具有统计学显著性。每个试验设 3 个平行,结果以平均值±标准偏差(Mean±SD)表示。统计图使用 Origin 2024 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 脐橙野生酵母菌种库建立

2.1.1 自然发酵脐橙酒可溶性固形物含量

由图 1 可知,4 个品种脐橙汁初始可溶性固形

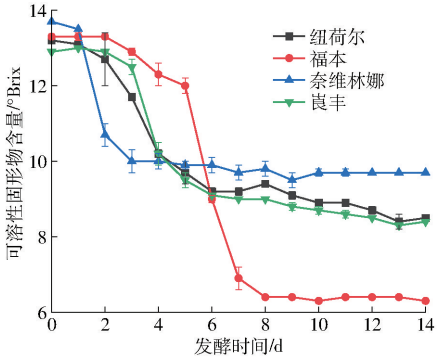


图 1 不同品种脐橙酒自然发酵过程中可溶性固形物含量变化曲线

Fig. 1 Changes curves in soluble solids content during spontaneous fermentation of different navel orange wine varieties

物含量较为接近，介于 12.9 ~ 13.7°Brix 之间，随着发酵的进行，各品种的可溶性固形物含量均呈下降趋势，但其变化幅度、速率和最终稳定值呈现品种差异，表明不同脐橙品种的自然发酵进程存在明显差异。对比各品种发酵过程可发现，福本品种表现出持续且较强的自然发酵潜力，而纽荷尔与崀丰品种虽能维持一定发酵活性，但后期发酵能力有限。奈维林娜品种自然发酵能力相对较弱，可能与脐橙汁营养成分组成、野生酵母群落结构有关。

2.1.2　野生酵母菌株分离与鉴定

从各脐橙品种分离得到的菌株种属及数量统计如表 2 所示，从纽荷尔、福本、奈维林娜、崀丰 4 个脐橙品种的自然发酵脐橙酒、新鲜成熟脐橙的果皮、脐橙果园土壤中取样，共分离得到 164 株酵母，其中 49 株来自纽荷尔脐橙，32 株来自福本脐橙，39 株来自奈维林娜脐橙，44 株来自崀丰脐橙。共计获得 16 个种属的酵母菌，均为非酿酒酵母。

从菌株总体组成来看，克鲁维毕赤酵母为最优势菌种，共分离到 33 株，占总数的 20.1%。其次为美极梅奇酵母和桔库尔兹曼氏酵母，分别为 23、20 株，占总数的 14.0%、12.2%。三者合计占比 46.3%，接近总数的一半，表明它们可能在脐橙果实表面和果园土壤微生物群落中占据主导地位，对脐橙酒自然发酵的启动具有潜在的重要影响。

表 2　各脐橙品种野生酵母的菌株种属及数量统计

Tab. 2　Species and counts of wild yeast strains isolated from different navel orange cultivars

菌株名称	菌株种属	各品种分离得到的菌株数量/株				总计
		纽荷尔	福本	奈维林娜	崀丰	
热带假丝酵母	*Candida tropicalis*	7	—	—	—	7
果实棒孢酵母	*Clavispora fructus*	3	2	2	2	9
汉逊德巴利酵母	*Debaryomyces hansenii*	5	1	6	2	14
仙人掌有孢汉逊酵母	*Hanseniaspora opuntiae*	2	1	5	9	17
泰国有孢汉逊酵母	*Hanseniaspora thailandica*	—	—	1	—	1
葡萄汁有孢汉逊酵母	*Hanseniaspora uvarum*	2	—	—	2	4
桔库尔兹曼氏酵母	*Kurtzmaniella quercitrusa*	4	6	6	4	20
美极梅奇酵母	*Metschnikowia pulcherrima*	6	6	6	5	23
果生迈耶氏酵母	*Meyerozyma carpophila*	—	—	1	—	1
克鲁维毕赤酵母	*Pichia kluyveri*	10	4	9	10	33
库德里阿兹威毕赤酵母	*Pichia kudriavzevii*	5	—	—	—	5
西方毕赤酵母	*Pichia occidentalis*	2	—	1	—	3
星形假丝酵母	*Starmerella bacillaris*	—	—	1	—	1
中间松谷氏酵母	*Sungouiella intermedia*	3	2	1	4	10
戴尔有孢圆酵母	*Torulaspora delbrueckii*	—	6	—	2	8
异常威克汉姆酵母	*Wickerhamomyces anomalus*	—	4	—	4	8
总计		49	32	39	44	164

注：—表示在该品种中未分离出该种属的酵母。

2.2　降解甲醇酵母筛选结果与分析

2.2.1　菌株初筛

14 d 发酵结束后，所有发酵组甲醇含量均低于初始添加量，但不同菌株甲醇降解能力存在显著差异，结果如图 2 所示，其中，F 为来自福本脐橙的菌株，I 为来自奈维林娜脐橙的菌株，L 为来自崀丰脐橙的菌株，U 为来自纽荷尔脐橙的菌株；Ct 为热带假丝酵母，Cf 为果实棒孢酵母，Dh 为汉逊德巴利酵母，Ho 为仙人掌有孢汉逊酵母，Ht 为泰国有孢汉逊酵母，Hu 为葡萄汁有孢汉逊酵母，Kq 为桔库尔兹曼氏酵母，Mp 为美极梅奇酵母，Mc 为果生迈耶氏酵母，Pkl 为克鲁维毕赤酵母，Pku 为库德里阿兹威毕赤酵母，Po 为西方毕赤酵母，Sb 为星形假丝酵母，Si 为中间松谷氏酵母，Td 为戴尔有孢圆酵母，Wa 为异常威克汉姆酵母。空白对照组 14 d 后的甲醇含量也下降至 248.87 mg/L，这可能是因为甲醇本身具有较强的挥发性，但仍高于大部分酵母菌株发酵组的甲醇含量，表明某些酵母菌株具有降解甲醇的能力，甲醇含量降低并非仅由挥发作用导致。

从各脐橙品种分离得到的酵母菌株来看，其降解能力呈现明显的品种与菌株种属特异性。在福本组中，异常威克汉姆酵母（FWa）降解率最高，为 12.21%，克鲁维毕赤酵母（FPkl）次之，降解率为 8.70%。奈维林娜组的克鲁维毕赤酵母（IPkl）的降解率最高，为 23.30%。纽荷尔组的降解能力整体最为突出，其中美极梅奇酵母（UMp）的降解率最高，为 34.57%，其次是葡萄汁有孢汉逊酵母（UHu）和克鲁维毕赤酵母（UPkl），降解率分别为 32.04%

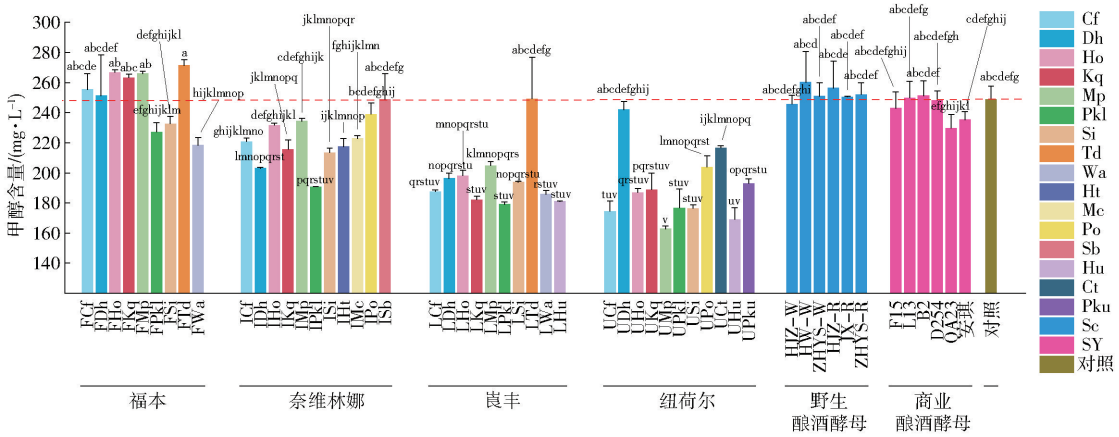


图 2 分组发酵后模拟体系中甲醇含量

Fig. 2 Methanol content in model system after grouped fermentation

和 28.95%。而崑丰组同样是克鲁维毕赤酵母(LPkl)的降解率最高,为 27.97%。值得注意的是,克鲁维毕赤酵母在各脐橙品种中均表现出优良的甲醇降解能力和跨品种应用发酵的潜力。

而野生酿酒酵母(Sc)与商业酿酒酵母(SY)中各组的甲醇含量均较高,整体降解率普遍低于野生酵母菌株,甚至有部分组的甲醇含量超过空白对照组,仅有少量酵母菌株具有较弱的甲醇降解能力,其中商业酿酒酵母 QA23 的降解率最高,为 7.70%。

从初筛结果可得,大部分野生非酿酒酵母具有降解甲醇的能力,其中表现最为突出的是来自纽荷尔的美极梅奇酵母(UMp)、葡萄汁有孢汉逊酵母(UHu)和克鲁维毕赤酵母(UPkl),以及来自崑丰的克鲁维毕赤酵母(LPkl)。这些菌株在完成酒精发酵的同时还能有效降低甲醇含量,为开发低甲醇含量的脐橙酒提供了关键的功能菌株。

2.2.2 菌株复筛

基于初筛结果并考虑酒精发酵性能,对甲醇降解能力较强的美极梅奇酵母(Mp)、葡萄汁有孢汉逊酵母(Hu)和克鲁维毕赤酵母(Pkl)3 个种属的所有菌株进行复筛,以评估其具体菌株的甲醇降解能力,并筛选出最优单菌株,结果如图 3 所示,不同菌株甲醇降解能力间存在显著差异。

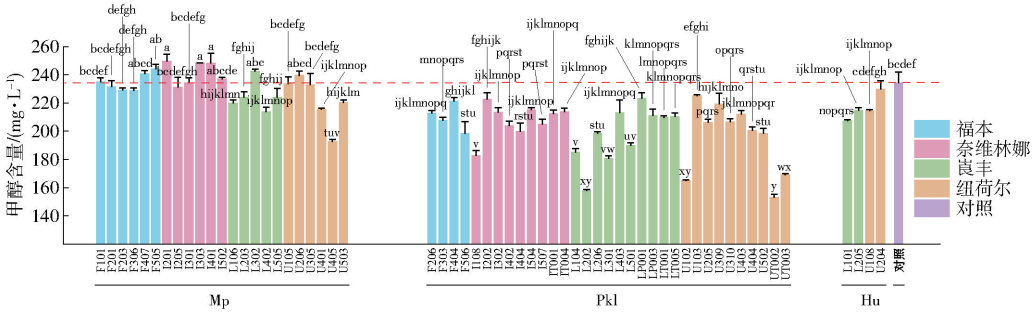


图 3 单一菌种发酵后模拟体系中甲醇含量

Fig. 3 Methanol content in model system after single-strain fermentation

克鲁维毕赤酵母(Pkl)组表现出最优且最稳定的甲醇降解能力,33 个菌株的甲醇降解率为 3.97% ~ 34.63%,所有菌株的甲醇含量均低于空白对照组,证实了克鲁维毕赤酵母甲醇降解能力的普遍有效性。其中,UT002 的降解能力最强,降解率为 34.63%。美极梅奇酵母(Mp)组的降解能力存在较大的菌株间差异。虽然部分菌株,如 U405 的甲醇降解率为 17.74%,具有较强的甲醇降解能力,但仍有菌株甲醇含量高于空白对照组,如 I201、I303,表明美极梅奇酵母的降解能力不够稳定。葡萄汁有孢汉逊酵母(Hu)组所有菌株的甲醇含量均低于空白对照组,降解率为 1.85% ~ 11.47%,表明其整体降解能力介于 Pkl 与 Mp 组之间。

复筛试验结果进一步明确了克鲁维毕赤酵母(Pkl)作为高效降解甲醇菌株的优势,不仅整体降解效率高,且菌株间性能相对稳定,其中 UT002(降解率为 34.63%)展现出很高的应用潜力。而美极梅奇酵母(Mp)中的高效菌株 U405(降解率为 17.74%)可以和 UT002 进行混菌发酵,改善和丰富脐橙酒的风味。

2.3 混菌发酵脐橙酒理化指标分析

然而,大部分非酿酒酵母酒精生成效率较低,

无法独立完成发酵，需要与酿酒酵母进行混菌发酵以保证酒精发酵顺利完成。因此，将克鲁维毕赤酵母 UT002、美极梅奇酵母 U405 与商业酿酒酵母中降解甲醇能力最强的 QA23 进行混菌发酵试验，进一步评价其在真实脐橙汁中的甲醇降解能力和发酵特性。

2.3.1　脐橙酒发酵过程中可溶性固形物含量

不同混菌发酵组合的可溶性固形物含量变化曲线如图 4 所示。同时接种组与单菌发酵组（仅接种 QA23）的发酵轨迹几乎重合，糖分消耗极快，第 4 天即降至 7.0°Brix 左右并趋于稳定。顺序接种组则呈现典型的“两阶段”特征：前 4 d 仅接种非酿酒酵母，可溶性固形物含量下降极为缓慢，表明其单独发酵能力有限；第 4 天接种 QA23 后迅速激活，可溶性固形物含量快速降低，第 8 ~ 10 天发酵完成。

这种差异表明，同时接种条件下，强势的 QA23 迅速占据主导地位，抑制了非酿酒酵母的生长与代谢，使非酿酒酵母在同时接种组中未能充分发挥作用。这解释了为何同时接种组甲醇降解率（0.99% ~ 3.65%）远低于顺序接种组（6.85% ~ 7.14%）。因此，同时接种组较低的甲醇降解效果主要归因于接种策略限制了非酿酒酵母的生长，而非菌株自身能力不足。

2.3.2　脐橙汁和各脐橙酒发酵组中葡萄糖、果糖、甘油、乙醇含量

由表 3 可知，所有发酵组合均完全代谢葡萄糖。

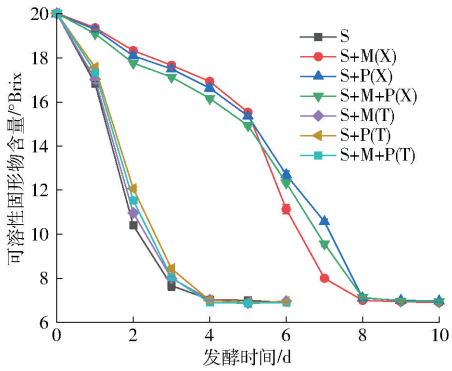


图 4　脐橙酒发酵过程中可溶性固形物含量变化曲线

Fig. 4　Changes curves in soluble solids content during fermentation of navel orange wine

但不同接种方式对果糖利用效率影响显著，顺序接种组中 S + M(X) 的果糖剩余仅 0.06 g/L，而其他各组果糖含量均维持在约 3.00 g/L 的较高水平，表明特定顺序接种（先 U405 后 QA23）能有效促进果糖完全消耗。所有混菌发酵组均完成酒精发酵，最终乙醇含量（酒精度，下同）为 13.42 ~ 13.78% vol。QA23 单菌发酵组乙醇含量最高，为 13.78% vol，各混菌发酵组略低但组间差异不显著，表明引入非酿酒酵母未对整体产酒精能力造成负面影响。各组的甘油产量之间也存在显著差异。顺序接种组显著高于同时接种组，其中 S + M + P(X) 甘油含量最高，为 7.25 g/L，而同时接种组中 S + P(T)、S + M + P(T) 较低，分别为 5.58、5.79 g/L。这表明，顺序接种策略有利于提高甘油含量，对提升酒体饱满度和口感圆润度有积极意义。

表 3　脐橙汁和各脐橙酒发酵组中葡萄糖、果糖、甘油、乙醇含量

Tab. 3　Contents of glucose, fructose, glycerol, and ethanol in navel orange juice and various fermentation groups

化合物	脐橙汁	S	S + M(X)	S + P(X)	S + M + P(X)	S + M(T)	S + P(T)	S + M + P(T)
葡萄糖含量/(g·L^{-1})	(77.38 ±0.30)^{a}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
果糖含量/(g·L^{-1})	(70.50 ±0.32)^{a}	(3.06 ±0.02)^{b}	(0.06 ±0.01)^{c}	(3.03 ±0.05)^{b}	(3.00 ±0.01)^{b}	(3.05 ±0.03)^{b}	(3.05 ±0.02)^{b}	(3.01 ±0.03)^{b}
甘油含量/(g·L^{-1})	(0.28 ±0.01)^{f}	(6.45 ±0.04)^{e}	(6.89 ±0.04)^{b}	(6.98 ±0.05)^{b}	(7.25 ±0.07)^{a}	(6.50 ±0.03)^{c}	(5.58 ±0.04)^{e}	(5.79 ±0.05)^{d}
乙醇含量/% vol	(0.29 ±0.01)^{e}	(13.78 ±0.08)^{a}	(13.42 ±0.12)^{d}	(13.55 ±0.07)^{bcd}	(13.46 ±0.07)^{cd}	(13.62 ±0.09)^{abc}	(13.64 ±0.02)^{ab}	(13.60 ±0.07)^{bc}

注：同一行不同字母上角表示数据之间存在显著性差异（$p < 0.05$）；N. D. 表示未检出。

2.3.3　脐橙酒发酵过程中甲醇含量

果酒发酵过程中，甲醇含量与酵母种类及其接种方式密切相关。如图 5 所示，所有发酵组甲醇含量在发酵初期均呈下降趋势。在发酵前 4 d，各组甲醇含量均明显降低；第 4 ~ 6 天，单菌发酵 S 组和顺序接种 X 组的甲醇含量上升，而同时接种 T 组持续下降；第 6 天后，X 组甲醇含量重新下降，在第 10 天发酵结束时，X 组中 S + M(X) 组甲醇含量最低（137.11 mg/L），其次为 S + M + P(X) 组（137.54 mg/L）。

这表明，顺序接种混菌发酵方式在降低甲醇含量方面优于同时接种及单菌发酵，可能是因为同时接种时酿酒酵母在发酵初期就占据优势，抑制了具有甲醇降解能力的非酿酒酵母生长代谢。具体而言，先接种 U405 的 S + M(X) 组甲醇降解效果最好，而先接种 UT002 的 S + P(X) 组和先同时接种两种非酿酒酵母的 S + M + P(X) 组的甲醇含量也维持在

极低水平,且三者之间无显著差异,表明筛选出的 2 株非酿酒酵母 U405 与 UT002 均具备在实际混菌发酵中降解甲醇的能力。

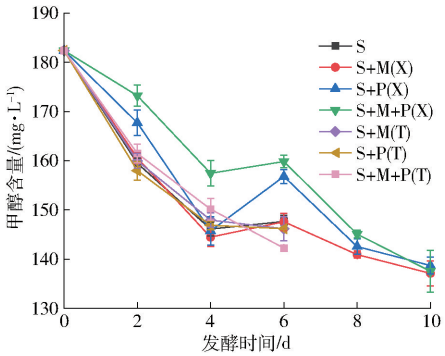


图 5 脐橙酒发酵过程中甲醇含量变化曲线

Fig. 5 Changes curves in methanol content during fermentation of navel orange wine

2.3.4 脐橙汁和各脐橙酒发酵组中的挥发性香气化合物

2.3.4.1 总体分析

挥发性香气化合物的种类和含量是评价果酒香气品质的重要因素[25]。运用 HS - SPME - GC - MS 法共检出 80 种挥发性化合物,包括酯类 25 种、醇类 11 种、醛酮类 6 种、酸类 6 种、萜烯类 30 种和其他类 2 种。脐橙汁和各脐橙酒中挥发性化合物的种类和数量如表 4 所示,各挥发性化合物相对含量如表 5 所示。通过气味活性值(Odor activity value, OAV)分析可知,本研究共有 25 种 OAV 大于 1.0(表示该物质对香气具有重要贡献)的物质,分别为乙酸异戊酯、己酸乙酯、乙酸苯乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、D-柠檬烯、芳樟醇等。

表 4 脐橙汁和各脐橙酒发酵组中挥发性化合物种类和数量

Tab. 4 Types and quantities of volatile compounds in navel orange juice and various fermentation groups

种类	各组中挥发性化合物种类数量/种							
	脐橙汁	S	S+M(X)	S+P(X)	S+M+P(X)	S+M(T)	S+P(T)	S+M+P(T)
酯类	16	10	14	18	18	13	14	14
高级醇类	9	6	5	4	4	5	5	5
醛酮类	5	2	1	2	2	2	1	1
挥发酸类	1	4	2	4	3	3	5	3
萜烯类	18	15	13	12	13	15	15	11
其他类	0	1	1	1	1	2	1	2
总计	49	38	36	41	41	40	41	36

表 5 脐橙汁和各脐橙酒发酵组的部分挥发性化合物相对含量

Tab. 5 Relative contents of some volatile compounds in navel orange juice and various fermentation groups

挥发性化合物名称	挥发性化合物相对含量/(μg·L⁻¹)								阈值/(μg·L⁻¹)*	香气描述**
	脐橙汁	S	S+M(X)	S+P(X)	S+M+P(X)	S+M(T)	S+P(T)	S+M+P(T)		
乙酸异丁酯	(5.58 ± 0.41)^{c}	(7.16 ± 0.76)^{c}	(70.95 ± 9.66)^{a}	(36.03 ± 4.15)^{b}	(29.63 ± 1.87)^{b}	(8.13 ± 0.48)^{c}	(11 ± 1.14)^{c}	(12.91 ± 1.68)^{c}	66	香蕉、甜果香
丁酸乙酯	(82.61 ± 3.55)^{a}	(51.74 ± 4.39)^{c}	(61.28 ± 3.09)^{b}	(42.01 ± 3.29)^{d}	(37.26 ± 2.91)^{d}	(41.88 ± 2.72)^{d}	(44.82 ± 3.25)^{cd}	(46.33 ± 2.25)^{cd}	20	苹果、香蕉果香
乙酸异戊酯	(434.52 ± 19.2)^{e}	(424.57 ± 39.98)^{e}	(1 024.34 ± 68.06)^{d}	(4 333.9 ± 301.15)^{a}	(3 559.27 ± 167.28)^{b}	(398.06 ± 33.86)^{e}	(2 414.59 ± 231.31)^{c}	(2 192.44 ± 175.94)^{c}	160	香蕉、梨果香
己酸乙酯	(12.07 ± 1.04)^{d}	(535.04 ± 41.07)^{ab}	(588.18 ± 59.77)^{a}	(486.59 ± 23.77)^{bc}	(399.52 ± 7.95)^{c}	(449.79 ± 11.09)^{bc}	(600.62 ± 33.76)^{a}	(588.93 ± 49.64)^{a}	14	菠萝、香蕉、苹果香
辛酸甲酯	(8.39 ± 1.02)^{c}	N. D.	(214.28 ± 21.14)^{a}	(111.74 ± 10.17)^{b}	(112.55 ± 7.36)^{b}	(129.86 ± 3.73)^{b}	(185.87 ± 17.73)^{a}	(137.97 ± 14.61)^{b}	200	柑橘、甜橙果香
乙酸苯乙酯	(193.28 ± 13.9)^{c}	(139.97 ± 9.95)^{c}	(436.61 ± 49.9)^{c}	(3 471.14 ± 298.12)^{a}	(3190.62 ± 212.57)^{a}	(155.28 ± 8.77)^{c}	(1 926.34 ± 46.36)^{b}	(1 785.51 ± 191.58)^{b}	250	玫瑰花香、蜂蜜香
辛酸乙酯	N. D.	(4 721.35 ± 274.92)^{ab}	(4 093.49 ± 402.4)^{bc}	(4 710.96 ± 335.13)^{ab}	(3 714.98 ± 78.41)^{c}	(4 019.29 ± 291.32)^{bc}	(5 282.85 ± 342.21)^{a}	(4 381.09 ± 549.79)^{abc}	5	菠萝果香、奶油香
癸酸乙酯	N. D.	(1 019.64 ± 56.62)^{bcd}	(1 025.77 ± 73.65)^{bcd}	(1 387.61 ± 96.22)^{a}	(936.51 ± 8.53)^{cd}	(767.52 ± 28.03)^{d}	(1 292.33 ± 183.71)^{ab}	(1 073.03 ± 179.34)^{bc}	150	葡萄、苹果香
苯甲酸乙酯	N. D.	(564.55 ± 31.46)^{c}	(1 080.5 ± 103.26)^{a}	(756.12 ± 63.91)^{b}	(660.66 ± 30.02)^{bc}	(686.51 ± 18.25)^{bc}	(572.13 ± 37.22)^{c}	(658.12 ± 84.33)^{bc}	67	樱桃、果香
戊酸乙酯	N. D.	N. D.	(2.1 ± 0.8)^{b}	N. D.	(5.21 ± 0.07)^{a}	(1.2 ± 0.06)^{c}	N. D.	(4.97 ± 0.3)^{a}	1.5	苹果、果香
酯类总计	900.29	7531.77	8 730.29	15 644.94	12 874.47	6 722.25	12 514.45	11 069.69		

续表 5

挥发性化合物名称	挥发性化合物相对含量/(μg·L^{-1})								阈值/(μg·L^{-1})*	香气描述**
	脐橙汁	S	S+M(X)	S+P(X)	S+M+P(X)	S+M(T)	S+P(T)	S+M+P(T)		
异戊醇	(159.6±5.16)^{d}	(4 604.4±201.31)^{a}	(4 722.51±141.38)^{a}	(3 109.98±180.1)^{c}	(2 699.48±200.37)^{c}	(4 101.41±259.82)^{b}	(4 084.3±87.51)^{b}	(4 364.25±112.83)^{ab}	30 000	酒香、溶剂味、指甲油味
1-己醇	(210.33±6.7)^{a}	(164.05±7.72)^{b}	(115.25±3.12)^{d}	(65.55±4.19)^{e}	(65.25±3.14)^{e}	(152.13±3.23)^{b}	(116.3±1.63)^{cd}	(133.52±12.78)^{c}	1100	青草香
1-辛醇	(37.98±5.34)^{b}	(49.97±6.31)^{a}	N. D.	(22.18±1.31)^{c}	(17.34±1.28)^{c}	(38.02±0.62)^{b}	(36.34±1.7)^{b}	(48.47±1.04)^{a}	110	柑橘、甜橙果香
高级醇类总计	446.1	5 113.7	5 569.29	3 446.99	3 111.69	4 644.21	4 559.82	4 912.83		
己醛	(4.93±1.92)^{a}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	4.5	青草香
3-**辛酮**	(169.29±3.34)^{a}	(105.35±1.29)^{b}	(105.39±6.68)^{b}	(114.88±0.54)^{b}	(109.18±1.91)^{b}	(103.31±1.17)^{b}	(103.47±4.13)^{b}	(115.42±10.35)^{b}	28	蘑菇、土腥味
辛醛	(1.93±0.99)^{a}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	0.7	柑橘、柠檬香
2-**壬酮**	N. D.	(129.06±7.98)^{a}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	5	奶酪、果香
醛酮类总计	186.1	234.41	105.39	142.01	129.24	108.72	103.47	115.42		
辛酸	N. D.	(206.77±20.81)^{b}	(117.57±17.45)^{c}	(122.79±11.6)^{c}	(124.73±16.82)^{c}	(154.36±6.91)^{bc}	(347.81±43.61)^{a}	(235.13±59.96)^{b}	500	奶酪、酸败味,有坚果香
挥发酸类总计	3.26	448.75	152.05	573.14	160.79	203.84	611.66	331.89		
月桂烯	(47.52±1.75)^{a}	(26.22±2.91)^{b}	(19.62±2.05)^{de}	(21.77±0.33)^{bcde}	(18.96±1.12)^{e}	(25.03±0.59)^{bc}	(20.79±1.86)^{cde}	(23.67±0.92)^{bcd}	13	草本、香料香
D-**柠檬烯**	(84.57±3.31)^{c}	(145.24±18.85)^{b}	(210.44±20.16)^{a}	(191.16±17.65)^{a}	(137.99±12.77)^{b}	(130.24±10.38)^{b}	(125.3±11.85)^{bc}	(130.15±23.52)^{b}	10	柑橘、甜橙香
芳樟醇	(580.97±30.18)^{a}	(430.66±19.93)^{b}	(332.79±5.21)^{d}	(372.96±28.35)^{cd}	(329.55±18.88)^{d}	(423.52±7.63)^{bc}	(456.62±10.38)^{b}	(442.84±9.17)^{b}	6	柑橘、花香、薰衣草香
(－)-松油烯-4-醇	(918.52±33.56)^{a}	(765.09±37.39)^{c}	(727.82±18.82)^{cd}	(817.6±60.91)^{bc}	(634.04±38.6)^{d}	(750.54±23.11)^{c}	(963.63±29.32)^{a}	(878.25±12.55)^{ab}	170	胡椒、木香
D-**香芹酮**	(149.01±10.41)^{b}	N. D.	(361.64±28.53)^{a}	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	50	葛缕子、莳萝香
(－)-香芹酮	N. D.	(374.92±37.81)^{a}	N. D.	N. D.	N. D.	(251.68±24.53)^{b}	N. D.	N. D.	50	留兰香、薄荷香
香叶醇	N. D.	(20.25±3.62)^{b}	N. D.	N. D.	N. D.	(7.48±0.23)^{c}	(25.43±1.66)^{ab}	(26.98±4.84)^{a}	7.5	玫瑰花香
柠檬醛	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	(15.14±2.2)^{a}	N. D.	3	柑橘、柠檬香
香茅醇	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	(105.86±5.03)^{a}	N. D.	N. D.	8	玫瑰花香
萜烯类总计	2 490.78	1 949.59	2 022.2	1 812.33	1 449.31	1 882.16	1 776.56	1 650.04		
2-**甲氧基-4-乙烯基苯酚**	N. D.	(309.22±10.42)^{b}	(382.81±42.32)^{a}	(300.65±20.61)^{b}	(281.94±14.17)^{b}	(297.38±14.06)^{b}	(320.03±22.58)^{b}	(331.77±19.36)^{ab}	3	焙烤香、坚果香、丁香香
4-**乙基-2-甲氧基苯酚**	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	(2±0.17)^{b}	N. D.	(18.07±14.83)^{a}	1.4	香辛料、烟熏味、草药香
其他类总计	0	309.22	382.81	300.65	281.94	299.38	320.03	349.84		
总计	4 026.53	15 587.44	16 962.03	21 920.06	18 007.44	13 860.56	19 885.99	18 429.71		

注：1、仅列出核心挥发性化合物，而不同种类化合物总计为该类别所有化合物总和；化合物名称加粗表示该化合物的 OAV 大于 1.0，下划线表示该发酵组中该化合物的 OAV 大于 0.1；同一行中不同字母上标表示数据之间存在显著性差异，$p<0.05$；N. D. 表示未检出。

2、* 表示各物质的感官阈值，参考《化合物香味阈值汇编(原书第二版)》(里奥·范海默特 著，刘强 冒德寿 汤峨 译)；** 表示各物质的风味特征，参考 https://www.perflavory.com，引用日期为 2025－11－30。

酯类物质是果酒香气的重要组成部分，为酒体带来丰富的果香和花香[26]。发酵结束后，酯类物质总量最高的是 S+P(X)组(15 644.94 μg/L)，其次是 S+M+P(X)组(12 874.47 μg/L)。与单菌发酵

S 组相比,大部分混菌发酵组均能显著提升酯类总量,其中 S + P(X)组增幅最高,达 107.72%。其中,共有 10 种酯类物质的 OAV 超过 1.0,包括癸酸乙酯(葡萄、苹果香)、辛酸乙酯(菠萝、奶油香)、乙酸异戊酯(香蕉、梨果香)、乙酸苯乙酯(玫瑰花香、蜂蜜香)等。高级醇类物质在其总量低于 300 mg/L 时可增强香气复杂性,但当总量超过 400 mg/L 时则产生不良气味[27]。各试验组高级醇类总量均低于 400 mg/L,最高的是 S + M(X)组(5 569.29 μg/L)。其中,1-己醇(青草香)、异戊醇(酒香)和 1-辛醇(柑橘、甜橙果香)的 OAV 均大于 0.1,通过协同作用影响整体香气轮廓。醛酮类物质对果酒香气具有重要且复杂的影响,是构成果酒风味的关键化合物类别[28]。各试验组醛酮类物质含量均较低,范围为 103.47 ~ 234.41 μg/L。3-辛酮(蘑菇、土腥味)的 OAV 在各组中均大于 1。己醛(青草香)和辛醛(柑橘香)仅在脐橙汁中检出,OAV 分别为 1.10 和 2.76,发酵后基本消失。挥发酸类物质在适量时能够提高果酒香气的复杂性和层次感,但过量时易带来酸败味、刺激性酸味等不良气味[29]。其中,只有辛酸的 OAV 超过 0.1,在 S + P(T)组中含量最高,除酸味外,还可能带来奶酪与坚果香。萜烯类物质是果酒典型花香、脐橙品种香的重要来源[30]。芳樟醇(柑橘、花香)在所有组中 OAV 均远大于 1,在脐橙汁中含量最高。D-柠檬烯在顺序接种组中含量较高,与脐橙汁相比,保留并增强了柑橘香气。

结果表明,不同混菌发酵方式对脐橙酒香气的影响存在显著差异。单菌发酵 S 组的挥发性化合物的分布较为单一,乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯等酯类 OAV 较低;同时接种 T 组能适度提升香气,但酯类的合成效率不及顺序接种组;而顺序接种 X 组的挥发性化合物总量最高,显著提升酯类和萜烯类物质含量,果香花香浓郁,脐橙品种香突出,层次复杂,极大提升了脐橙酒的香气品质。

2.3.4.2 主成分分析

为探究不同试验组之间香气组成的差异性,选取 OAV 大于 0.1 的 37 种香气物质进行主成分分析(PCA)。结果如图 6 所示,前 2 个主成分总贡献率为 63.7%,其中 PC1 贡献 43.2%,PC2 贡献 20.5%。由图 6 可知,所有顺序接种组 S + M(X)、S + P(X)及 S + M + P(X)均集中于第一象限,其主要香气贡献来源于癸酸乙酯、苯甲酸乙酯、辛酸甲酯、D-柠檬烯、乙酸丙酯、乙酸异戊酯和乙酸苯乙酯,其香气轮廓主要归因于酯类(花果甜香)和萜烯类(脐橙果香)的协同作用;脐橙汁组位于第二象限,与乙酸丁酯、乙酸己酯、(-)-α-松油醇及戊酸乙酯具有较强关联;S 组分布于第三象限,其香气特征与月桂烯、芳樟醇、1-己醇、1-辛醇、(-)-香芹酮及香叶醇密切相关;而 3 个同时接种组 S + M(T)、S + P(T)和 S + M + P(T)组则集中于第四象限,由于酿酒酵母的快速主导,其香气轮廓更接近于 S 组,主要关联物质为 2-甲氧基-4-乙烯基苯酚、异戊醇、辛酸乙酯和己酸乙酯,香气多样性较低。

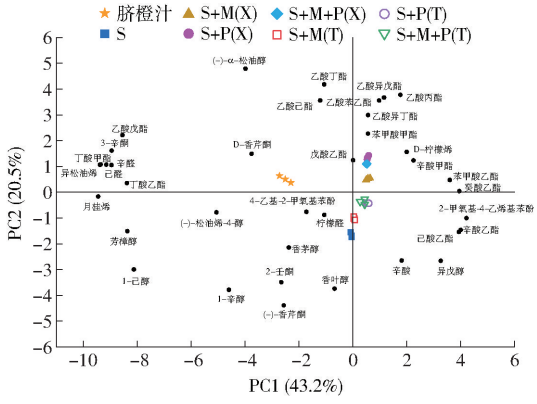


图 6 脐橙汁和各脐橙酒发酵组挥发性化合物 PCA 图

Fig. 6 PCA plot of volatile compounds in navel orange juice and various fermentation groups

分析表明,7 个发酵组与脐橙汁在香气轮廓上均呈现明显差异。此外,在不同发酵处理组中,顺序接种 X 组、同时接种 T 组以及单菌发酵 S 组之间也有较大差异。X 组不仅保留了特征萜烯类物质(脐橙品种香),还提高了酯类含量,共同构成了复杂花果香。而在闻香评价中整体喜好性最高的 S + M + P(X)组位于顺序接种组的核心区域,因 UT002 与 U405 的协同作用,形成了更均衡丰富的香气轮廓,从而在感官上获得了最高接受度。综上,顺序接种混菌发酵可以提高脐橙酒的香气多样性,为开发具有本土特色的脐橙酒提供更多的可能性。

2.3.5 闻香评价

闻香评价是基于人体感官对果酒香气进行直接感知和评估的一种方法,对于提升果酒品质、满足消费者需求有着重要作用。结果如图 7 所示,所有顺序接种 X 组的酒精气味均高于单菌发酵 S 组和同时接种 T 组。与 S 组相比,X 组在酒精气味、甜香、酸味、果香、花香、草本植物香气方面均有所增强,仅有 S + M(X)组的草本植物香气部分略有降低;而 T 组各香气则普遍呈下降趋势。而在 X 组中,S + M + P(X)组在甜香、果香和草本植物香气方面表现最为突出,S + P(X)组的花香得分最高,两者在酸味方面获得了同样的最高分数。综合来看,顺序接种 X 组在整体香气与协调性上明显优于 S 组和同时接种 T 组,尤其是 S + P(X)和 S + M + P(X)组,表现更佳。

同时,每位小组成员都对 7 款样品进行了整体

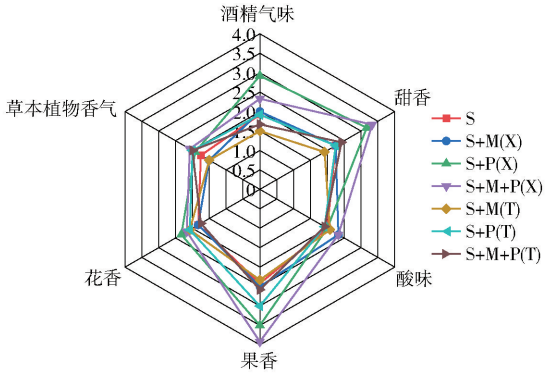


图 7　脐橙酒闻香评价雷达图

Fig. 7　Aroma profile radar chart of navel orange wine

喜好性排序(1 表示最喜欢,7 表示最不喜欢)。各样品的整体喜好性排序统计如表 6 所示。S + M + P(X)组的平均排名最低(1. 58),获得“最喜欢”次数最多(6 次),整体喜好性最高;S + P(X)组平均排名为 2. 67,获得 4 次“最喜欢”评价,整体喜好性次之。而 S + M(T)组的平均排名最高(5. 67),有 5 位评价员将其评为“最不喜欢”,整体喜好性最低。综合来看,顺序接种方式(尤其是 S + M + P(X)与 S + P(X))显著提升了脐橙酒的整体喜好性,而同时接种 3 株酵母的方式(S + M + P(T))则导致喜好性大幅下降。这一结果与香气维度评分趋势一致,即顺序接种组在果香、甜香等关键香气上表现更优,从而获得了更高的整体喜好性。

表 6　各样品整体喜好性排序统计

Tab. 6　Overall preference ranking statistics for each sample

样品	平均排名	标准差	最喜欢(1)次数	最不喜欢(7)次数	整体喜好性排序
S + M + P(X)	1. 58	0. 67	6	0	1
S + P(X)	2. 67	1. 92	4	1	2
S + P(T)	4. 25	2. 09	2	2	3
S	4. 33	1. 37	0	1	4
S + M(X)	4. 33	1. 56	0	2	5
S + M + P(T)	5. 17	1. 11	0	1	6
S + M(T)	5. 67	1. 83	0	5	7

注:平均排名数值越小表示整体喜好性越高。S 与 S + M(X)平均排名相同,但 S 的最不喜欢(7)次数更少,故 S 排在前面。

3　结束语

从湖南省崀山地区 4 种脐橙品种果园土壤、果皮及自然发酵酒中分离酵母菌株,建立共 164 株酵母菌种库,并用添加外源甲醇的模拟发酵培养基对菌株进行 2 轮降解甲醇能力的筛选,共筛选出 2 株高甲醇降解能力的本土非酿酒酵母菌株 *Pichia kluyveri* UT002 和 *Metschnikowia pulcherrima* U405,与空白对照组相比,UT002 和 U405 在模拟发酵培养基中的甲醇降解率分别为 34. 63%、17. 74%,充分证明了其降解甲醇的潜力。将其应用于真实脐橙汁与商业酿酒酵母 QA23 进行混菌发酵,发现 UT002 和 U405 均具有降解甲醇的能力,2 株酵母与 QA23 的顺序接种发酵在有效降低甲醇含量的同时能提升果酒香气,突出脐橙品种香,其中 S + M(X)组具有最高的甲醇降解率 7. 14%,S + P(X)组的挥发性化合物总量和酯类物质含量最高,S + M + P(X)组在闻香评价中整体喜好性最高,具有开发低甲醇、高品质的特色优质脐橙酒的巨大应用潜力。需要注意的是,真实脐橙汁发酵中最佳的甲醇降解率(7. 14%)与模拟体系中的数值存在显著差异,表明从简化的模拟体系到复杂的真实发酵基质之间存在诸多影响因素。模拟体系下的高甲醇降解率主要验证了菌株自身降解外源甲醇的代谢潜力;而在真实脐橙汁的混菌发酵中,甲醇含量是果胶水解生成、酵母通过甘氨酸代谢产生的少量内源性甲醇、酵母代谢降解三者动态平衡的综合结果,同时复杂的脐橙汁基质成分和混菌发酵环境下菌株间的竞争关系也会深刻影响非酿酒酵母的生长代谢活性。因此,真实发酵中相对较低的降解率客观反映了该条件下的实际代谢平衡。

参　考　文　献

[1]　彭寅啸, 俸斌, 黄智, 等. 果酒生产中甲醇控制技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(8): 199 – 206.
Peng Yinxiao, Feng Bin, Huang Zhi, et al. Research progress of methanol control technology in fruit wine production[J]. Food Research and Development, 2024, 45(8): 199 – 206. (in Chinese)
[2]　GB/T 15037—2006 葡萄酒[S].
[3]　NY/T 1508—2017 绿色食品 果酒[S].
[4]　Chandel V, Biswas D, Roy S, et al. Current advancements in pectin: extraction, properties and multifunctional applications [J]. Foods, 2022, 11(17): 2683.
[5]　Blumenthal P, Steger M C, Einfalt D, et al. Methanol mitigation during manufacturing of fruit spirits with special consideration of novel coffee cherry spirits[J]. Molecules, 2021, 26(9): 2585.
[6]　张香. 椪柑酒中甲醇、杂醇油生成规律及调控研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
Zhang Xiang. Study on the laws and regulations of methanol and fusel oil formation in ponkan wine[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021. (in Chinese)
[7]　郑升海, 田树林, 王宇, 等. 响应面优化桑葚白兰地原料酒发酵工艺[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(14): 152 – 159.
Zheng Shenghai, Tian Shulin, Wang Yu, et al. Response surface optimization of fermentation of mulberry brandy base wine

[J]. Food Research and Development, 2022, 43(14): 152 – 159. (in Chinese)
[8] 张会香, 程鑫, 林楠, 等. 百香果果壳发酵低甲醇含量果酒工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(12): 153 – 159.
Zhang Huixiang, Cheng Xin, Lin Nan, et al. Process optimization on low methanol content of fermented fruit wine with passion fruit shells[J]. Food Research and Development, 2023, 44(12): 153 – 159. (in Chinese)
[9] Han Y, Wang Y, Li J, et al. Evaluating the effect of bentonite, malic acid on pectin methyl esterase, methanol in fermented apple juice[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 109: 104468.
[10] Shen J, Huang W, You Y, et al. Controlling strategies of methanol generation in fermented fruit wine: pathways, advances, and applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2024, 23(6): e70048.
[11] 余淑琪, 丘佳慧, 杜芷君, 等. 发酵果酒中甲醇的研究进展及控制方法[J]. 中国酿造, 2024, 43(7): 33 – 40.
Yu Shuqi, Qiu Jiahui, Du Zhijun, et al. Research progress and control methods of methanol in fermented fruit wine[J]. China Brewing, 2024, 43(7): 33 – 40. (in Chinese)
[12] Zhao L Z, Chen J, Wei X Y, et al. Response of alcohol fermentation strains, mixed fermentation and extremozymes interactions on wine flavor[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1532539.
[13] Yang L, Zhu X, Mao Y, et al. Effect of different inoculation strategies of mixed culture *Saccharomyces cerevisiae*/*Oenococcus oeni* on the aroma quality of Chardonnay wine[J]. Food Research International, 2024, 190: 114636.
[14] Lea J M, Pereira V, Miranda A, et al. Impact of indigenous non-Saccharomyces yeasts isolated from Madeira Island vineyards on the formation of ethyl carbamate in the aging of fortified wines[J]. Processes, 2021, 9(5): 799.
[15] Wang B, Tan F, Chu R, et al. The effect of non-Saccharomyces yeasts on biogenic amines in wine[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 116: 1029 – 1040.
[16] 李甜, 雷雨, 李东, 等. 不同非酿酒酵母与酿酒酵母顺序发酵对茵红李果酒风味的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 179 – 187.
Li Tian, Lei Yu, Li Dong, et al. Impact of sequential fermentation with different non-Saccharomyces yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma of yinhong plum wine[J]. Food Science, 2023, 44(24): 179 – 187. (in Chinese)
[17] Vicente J, Fernando C, Santos A, et al. High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3): 1196.
[18] Wang Y, Fu Y, Zhang Q, et al. Enhancement of ester biosynthesis in blueberry wines through co-fermentation via cell-cell contact between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Research International, 2024, 179: 114029.
[19] 石金琴, 刘新宇, 海超, 等. 非酿酒酵母混合发酵对果酒增香的研究进展[J]. 中国酿造, 2025, 44(7): 20 – 25.
Shi Jinqin, Liu Xinyu, Hai Chao, et al. Research progress on the enhancement of aroma in fruit wine by non-*Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentation[J]. China Brewing, 2025, 44(7): 20 – 25. (in Chinese)
[20] GB/T 41219—2021 酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母的鉴定方法[S].
[21] Wang Y, Li R, Zhao F, et al. Metabolic engineering of *Komagataella phaffii* for the efficient utilization of methanol[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 198.
[22] Sun W, Chen X, Feng S,et al. Effect of sequential fermentation with indigenous non-Saccharomyces cerevisiae combinations and *Saccharomyces cerevisiae* on the chemical composition and aroma compounds evolution of kiwifruit wine[J]. Food Chemistry, 2024, 460: 140758.
[23] 方裕理, 张雨, 李彦中, 等. 桑葚酒发酵工艺条件优化及其品质分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(12): 137 – 142.
Fang Yuli, Zhang Yu, Li Yanzhong, et al. Optimization of fermentation process and quality analysis of mulberry wine[J]. China Brewing, 2023, 42(12): 137 – 142. (in Chinese)
[24] Ding B, Xiong L, Zhao S, et al. Impact of co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* on the metabolic characteristics of the flavor compounds in mulberry wine[J]. Frontiers in Nutrition, 2025, 12: 1559599.
[25] He Y, Wang X, Li P, et al. Research progress of wine aroma components: a critical review[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134491.
[26] 张博钦, 方梓庄, 成池芳, 等. 5 株低产乙醇的非酿酒酵母筛选及其酿造特性[J]. 食品科学, 2021, 42(8): 114 – 121.
Zhang Boqin, Fang Zizhuang, Cheng Chifang, et al. Screening of five non-Saccharomyces strains with low ethanol yield and evaluation of their oenological properties[J]. Food Science, 2021, 42(8): 114 – 121. (in Chinese)
[27] 袁倩, 李嘉欣, 柳秉红, 等. 不同酵母多糖添加条件下早酥梨–美乐低醇复合果酒品质研究[J]. 农业机械学报, 2024, 55(5): 419 – 430.
Yuan Qian, Li Jiaxin, Liu Binghong, et al. Quality of low-alcohol zaosu pear-merlot wine under different yeast polysaccharide addition conditions[J]. Transaction of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2024, 55(5): 419 – 430. (in Chinese)
[28] 温锦丽, 孙怡宁, 原鹏强, 等. 不同商用酿酒酵母对软枣猕猴桃果酒有机酸和挥发性物质的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 240 – 251.
Wen Jinli, Sun Yining, Yuan Pengqiang, et al. Effect of different commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains on the organic acids and aromatic substances of actinidia arguta wines[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(20): 240 – 251. (in Chinese)
[29] He W, Liu S, Heponiemi P, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* strains on chemical composition and sensory quality of ciders made from Finnish apple cultivars[J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128833.
[30] 张慧敏, 潘秋红. 葡萄酒中挥发性萜烯物质的产生机制及影响因素研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 249 – 258.
Zhang Huimin, Pan Qiuhong. Advances in understanding the formation mechanism of terpenoids during winemaking and factors influencing it[J]. Food Science, 2021, 42(13): 249 – 258. (in Chinese)