

## 调查研究

## 国产和进口蜂蜜中嗜渗酵母的鉴定及污染水平调查

袁家鑫<sup>1</sup>,王胤臻<sup>1</sup>,阎贺静<sup>1</sup>,肖艳霞<sup>2</sup>,张玉梅<sup>2</sup>,王海洋<sup>2</sup>,柳吉芹<sup>2</sup>,高飞<sup>2</sup>,崔宗岩<sup>2</sup>,钱云开<sup>2</sup>

(1. 河北科技师范学院食品科技学院,河北秦皇岛 066004;2. 秦皇岛海关技术中心,河北秦皇岛 066004)

**摘要:**目的 对国内外蜂蜜中分离的嗜渗酵母进行鉴定,了解其污染水平。方法 选取916批国产和进口蜂蜜,根据GB 14963—2011《食品安全国家标准 蜂蜜》和GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》对蜂蜜样品中嗜渗酵母计数,并计算出嗜渗酵母检出率。对分离菌株通过26S rDNA PCR鉴定属种。通过吸光度法和重铬酸钾比色法对部分分离酵母菌株耐高糖和产酒精能力进行检测。结果 在916批次蜂蜜中,共检出嗜渗酵母36批,检出率为3.93%,超标率为3.49%;其中国产蜜786批,共检出嗜渗酵母33批,检出率为4.20%,嗜渗酵母计数为 $2.5\times 10^2\sim 7\times 10^4$  CFU/g;进口蜜130批,共检出嗜渗酵母3批,检出率为2.31%,嗜渗酵母计数 $1\times 10^1\sim 7\times 10^1$  CFU/g。分离得到5株嗜渗酵母,1株为假霉蚜虫酵母,3株为蜂蜜接合酵母,1株为木兰假丝酵母,所试验菌株对高浓度糖耐受性良好并且全都有一定的产酒精能力。结论 蜂蜜存在着被嗜渗酵母污染的可能,需要加强控制和管理;蜂蜜可以作为筛选耐渗透压菌种的来源,选育蜂蜜嗜渗酵母有助于蜂蜜食品发酵工业的发展和优秀产品的研发。

**关键词:**蜂蜜;嗜渗酵母;菌种鉴定;耐高糖;污染

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)07-0827-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.07.009

**Identification and contamination level of osmophilic yeast in domestic and imported honey**

YUAN Jiixin<sup>1</sup>, WANG Yinzheng<sup>1</sup>, YAN Hejing<sup>1</sup>, XIAO Yanxia<sup>2</sup>, ZHANG Yumei<sup>2</sup>, WANG Haiyang<sup>2</sup>,  
LIU Jiqin<sup>2</sup>, GAO Fei<sup>2</sup>, CUI Zongyan<sup>2</sup>, QIAN Yunkai<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Hebei Qinhuangdao 066004, China; 2. Qinhuangdao Customs Technical Center, Hebei Qinhuangdao 066004, China)

**Abstract: Objective** Osmophilic yeast in honey at home and abroad was identified, and the contamination levels of honey was understood. **Methods** A total of 916 batches of domestic and imported honey were selected, and osmophilic yeast was counted according to GB 14963—2011 “National Standard Food Safety -Honey” and GB 4789.2—2022 “National Standard Food Safety -Determination of the total number of colonies for microbial Inspection”, and the detection rate of osmophilic yeast was calculated. The species of isolated strains were identified by 26S rDNA PCR. The ability of some yeast strains to tolerate high sugar and produce alcohol were tested by absorbance and potassium bichromate colorimetry. **Results** In 916 batches of honey, 36 batches of osmophilic yeast were detected, the detection rate was 3.93%, and the over-standard rate was 3.49%. Among 786 batches of domestic honey, 33 batches of osmophilic yeast were detected, the detection rate was 4.20%, with osmophilic yeast from  $2.5\times 10^2$  to  $7\times 10^4$  CFU/g. Three osmophilic yeasts were detected in 130 batches of imported honey, the detection rate was 2.31%, with osmophilic yeasts from  $1\times 10^1$  to  $7\times 10^1$  CFU/g. Five osmophilic yeast strains were isolated, one was *Moesziomyces aphidis/Pseudozyma sp.*, and three were *Zygosaccharomyces mellis*. One was *Candida magnoliae*, and all of the tested strains were well tolerant to high glucose concentrations and had some capacity to produce alcohol. **Conclusion** Honey may be contaminated by osmophilic yeast, so it is necessary to strengthen its control and management. Honey can be used as a source for screening osmolal-resistant strains, and the selection of osmophilic yeast is helpful to the development of honey food fermentation industry

收稿日期:2024-01-17

基金项目:海关总署科研项目(2022HK023)

作者简介:袁家鑫 女 硕士生 研究方向为食品质量与安全 E-mail:yuanjy990416@163.com

通信作者:钱云开 男 高级工程师 研究方向为食品安全和微生物检测 E-mail:qyk-1@163.com

and the research and development of excellent products.

**Key words:** Honey; osmophilic yeast; strain identification; high glucose tolerance; contaminate

蜂蜜是一种天然的营养食品,是从昆虫中获取的传统食品之一。它是蜜蜂通过采集植物的花粉或分泌物结合蜜蜂自身产生物质而形成的一种甜味物质。从花蜜到蜂蜜的转化过程中,蜂蜜会与各种微生物接触,有产蜜的植物携带微生物、蜂肠道微生物以及蜂巢环境微生物等<sup>[1-2]</sup>。由于蜂蜜水分活度较低、渗透压较高,pH低,并含有抗菌化合物,使微生物在蜂蜜中的生长繁殖受限<sup>[3]</sup>。一般适宜微生物生长的渗透压为 $3.001\times 10^6\sim 6.001\times 10^6$  Pa,而蜂蜜的渗透压约 $1.050\times 10^7$  Pa。仅少数酵母和霉菌能在 $4.001\times 10^6\sim 9.001\times 10^6$  Pa的溶液中生长<sup>[4]</sup>,嗜渗酵母是能够耐受蜂蜜的高糖环境的主要微生物之一。嗜渗酵母是一类能够在自然或者人为高渗透压条件下正常生长繁殖的酵母,作为蜂蜜需要控制的主要腐败菌之一,嗜渗酵母在一定条件下会使蜂蜜发酵,对蜂蜜质量的影响较大。在以往的研究中,有多种嗜渗酵母从蜂蜜中分离纯化出来,在德国和匈牙利蜂巢和蜂蜜中分离的8株八孢裂殖酵母(*Schizosaccharomyces octosporus*)和5株未被描述的酵母菌株,该新种属于接合酵母(*Zygosaccharomyces*)分支,所有的分离株都表现出明显的嗜渗特性<sup>[5-6]</sup>。目前,经报道的从蜂蜜中分离的酵母达到20余种<sup>[6-8]</sup>。

在以往对蜂蜜的研究中,主要是对其物化性质以及特殊成分和功能进行探索,而关于蜂蜜中微生物及嗜渗酵母的研究较少。本研究对近5年内实验室收集的国产蜜和进口蜜共916批进行嗜渗酵母检测与鉴定,样品来源涵盖了国产蜂蜜的主要产区和主要进口国家,蜂蜜样品量大并且种类丰富,为国内外蜂蜜污染嗜渗酵母的情况提供了参考数据,具有重要统计学意义;同时从中分离纯化嗜渗酵母,采用26S rDNA测序对所分离嗜渗酵母进行分子生物学鉴定,并对分离嗜渗酵母的高糖耐受性及产酒精能力进行测定。一方面,调查蜂蜜嗜渗酵母的污染情况,为后续蜂蜜安全性生产、贮存等方面提供理论依据;同时也为嗜渗酵母在食品发酵产品的研究和生物工程开发微生物资源提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 蜂蜜样品

从秦皇岛海关技术中心保存的蜂蜜样品中选取国产和进口蜂蜜916批,具体信息如下:大洋洲

78批(新西兰、澳大利亚);欧洲37批(德国、比利时、俄罗斯、意大利);亚洲796批(中国786批、泰国、日本、韩国)和北美洲5批(美国、加拿大)。其中包括一些特色蜜如麦卢卡、康蜜乐、红柳桉及国内洋槐蜜、枣花蜜等。蜂蜜样品生产日期均为2019—2023年,保质期12~24个月不等,样品均为常温避光防潮密封保存。

#### 1.1.2 培养基

氯硝胺18%甘油(DG18)培养基(g/L):酪蛋白胨5.0;无水葡萄糖10.0;磷酸二氢钾1.0;硫酸镁( $MgSO_4\cdot H_2O$ )0.5;氯硝胺0.002;琼脂15;氯霉素0.1(北京陆桥技术股份有限公司)。

酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, YPD)培养基(g/L):葡萄糖20.0;酵母浸出粉5.0;蛋白胨10.0;琼脂14.0(北京陆桥技术股份有限公司)。

葡萄糖浓度为300、450、600、750、900 g/L的YPD培养基。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

TD5002C电子天平(精密度0.01 g;天津天美衡基仪器有限公司);BHC-1300IIAZ生物安全柜(苏州苏洁医疗器械有限公司);YCP-50生化恒温培养箱(长沙华曦电子科技有限公司);DM3000生物显微镜(德国徕卡仪器有限公司);PCR-9700 PCR仪(上海赛默飞世尔科技有限公司);Biospec-mini型紫外分光光度计(日本岛津公司);Multifuge X3R高速冷冻离心机(上海赛默飞世尔科技有限公司)。

葡萄糖、甘油(分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司);酵母基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司);酵母通用引物NL1:5'-GCATATCAATAAGCGGAAAAAG-3',NL4:5'-GGTCCGTGTTTCAAG-3'<sup>[9]</sup>(北京擎科生物科技股份有限公司);Taq DNA聚合酶(大连宝生物工程有限公司);2%重铬酸钾溶液(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);浓硫酸(分析纯,天津凯信化学工业有限公司);无水乙醇溶液(色谱级,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 嗜渗酵母的分离纯化

取蜂蜜样品25 g加入225 mL 30%葡萄糖溶液中,充分振荡混匀,制成1:10的均匀稀释液,移液枪吸取1 mL加入9 mL葡萄糖溶液中,充分混匀制成1:100均匀稀释液;将不同浓度稀释液各取100  $\mu$ L

涂布于 DG18 培养基, 25 °C 培养 5~7 d。挑选具有典型酵母特征的单菌落在 YPD 培养基上多次划线, 进行分离纯化, 在光学显微镜下观察酵母形态, 确定无杂菌后接种于 YPD 斜面培养基 28 °C 培养 3 d 后于 4 °C 保存备用。典型的嗜渗酵母在 DG18 培养基上呈现为圆形、中心隆起、不透明、边缘整齐的菌落, 直径 1~2 mm。

### 1.2.2 嗜渗酵母检出率

根据 GB 14963—2011《食品安全国家标准 蜂蜜》和 GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》的规定对蜂蜜样品进行嗜渗酵母计数, 并计算出嗜渗酵母检出率。

### 1.2.3 嗜渗酵母 DNA 的提取

将分离纯化的待鉴定酵母菌株重新接种至 YPD 培养基培养 3 d, 挑取单菌落, 用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取酵母 DNA。

### 1.2.4 26S rDNA PCR 扩增

选用酵母菌通用引物 26S rDNA NL1-NL4 (5'-GCATATCAATAAGCGGAAAAAG-3'/5'-GGTCCGTGTTCAAG-3') 进行 PCR 扩增。

PCR 扩增体系 (50  $\mu$ L): *Taq* DNA 聚合酶 25  $\mu$ L, 引物 NL1 2  $\mu$ L, 引物 NL4 2  $\mu$ L, DNA 4  $\mu$ L, 灭菌蒸馏水 17  $\mu$ L。

PCR 反应程序: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

将 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。获得的基因序列在美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GenBank 数据库中进行 BLAST 序列比对, 并用 MEGA11 软件构建系统发育树。

### 1.2.5 嗜渗酵母高糖耐受性试验

方法参考文献[10]的方法并做适当修改: 将实验菌株在 YPD 培养基中活化 3 代, 并将对数生长期的菌株 (600 nm 处的吸光度达到 0.6~0.8) 按 3% 的接种量, 分别接种于起始葡萄糖浓度为 300、450、600、750、900 g/L 的 YPD 液体培养基, pH 5.0, 于 28 °C, 150 r/min 条件下恒温培养 3 d, 测定 600 nm 处的吸光度值, 实验重复 3 次并绘制菌株葡萄糖耐受性曲线。

### 1.2.6 嗜渗酵母产酒精试验

参考文献[11], 采用重铬酸钾比色法测定产乙醇能力。根据表 1 乙醇标准曲线反应体系, 加入重铬酸钾和浓硫酸, 静置后测定反应液在 600 nm 的吸光度。以乙醇体积为横坐标、反应液 OD<sub>600</sub> 为纵坐标, 绘制乙醇标准曲线, 得出回归方程。以酿酒

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, SC) 为对照质控菌株, 取发酵液稀释, 按同样方法测定 OD<sub>600</sub>, 根据回归方程算出样品中的酒精含量。

表 1 乙醇标准曲线反应体系

Table 1 Ethanol standard curve reaction system

编号	0	1	2	3	4	5
0.1%(V/V)标准乙醇溶液/mL	0	0.5	1	1.5	2	2.5
水/mL	5	4.5	4	3.5	3	2.5

### 1.3 统计学分析

使用 Excel 2021 软件对试验数据进行处理, 绘制折线图和标准曲线; 实验重复 3 次, 使用 SPSS 24.0 软件通过 ANOVA 分析和邓肯检验进行统计学分析, 并检验其显著性,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 国内外蜂蜜产品嗜渗酵母检出率

在 916 批次蜂蜜中, 检出含嗜渗酵母的蜂蜜 36 批次, 检出率为 3.93%, 超标 32 批次 (>200 CFU/g), 超标率为 3.49%。

其中国产蜜 786 批次, 共检出嗜渗酵母 33 批次, 检出率为 4.20%, 嗜渗酵母计数范围为  $2.5 \times 10^2 \sim 7 \times 10^4$  CFU/g; 进口蜜 130 批次, 共检出嗜渗酵母 3 批次, 检出率为 2.31%, 嗜渗酵母计数为  $1 \times 10^1 \sim 7 \times 10^1$  CFU/g, 具体阳性样品信息如表 2。

### 2.2 嗜渗酵母分离株菌落形态

根据菌株形态特征, 共从 DG18 平板分离出 16 株酵母, 将菌株分别划线接种至 YPD 平板上培养 72 h 后, 可见单菌落出现, 表面光滑湿润, 颜色为乳白色不透明, 边缘整齐, 中心凸起, 易挑起, 符合酵母的菌落特征 (图 1)。

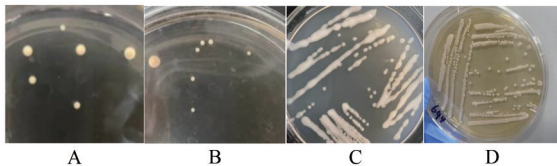
后续选择长势较好的菌株 221、3301、3303、3601、644 进行分子鉴定及酵母特性实验。

### 2.3 嗜渗酵母分离株的分子鉴定及系统进化树分析

采用 BLAST 工具对所得序列进行比对, 并通过 Mega 软件——NJ 法构建系统进化树 (图 2)。系统进化树表明, 菌株 221 与假霉属 (*Pseudozyma* sp.) 等聚于同一个分支, 亲缘关系最近, 菌株 3301、3303 和 3601 来源于同一支 (图 2), 菌株 644 与木兰假丝酵母同源性最高, 结合 BLAST 结果来看 (表 3), 可以确定菌株 221 为假霉蚜虫酵母 (*Moesziomyces aphidis*/*Pseudozyma* sp., *M. aphidis*)、菌株 3301、3303、3601 为蜂蜜接合酵母 (*Zygosaccharomyces mellis*, *Z. mellis*), 菌株 644 为木兰假丝酵母 (*Candida magnoliae*, *C. magnoliae*)。 *M. aphidis* 是一种环境酵母, 通常存在

表2 2019—2023年国产和进口蜂蜜中嗜渗酵母阳性样品信息

产地	数量/批次	生产年份	检测日期	嗜渗酵母计数/CFU/g	生产年份	检测日期	嗜渗酵母计数/CFU/g	超标数量/批次
国产								
黑龙江	7	2020	2021.01.15	$1.2 \times 10^3$	2023	2023.09.15	$2.5 \times 10^2$	7
			2021.01.15	$2.5 \times 10^2$		2023.09.21	$4.0 \times 10^2$	
			2021.08.18	$2.5 \times 10^2$		2023.10.16	$9.0 \times 10^2$	
			2023.08.07	$1.5 \times 10^3$				
江西	1	2021	2021.06.07	$2.5 \times 10^2$				1
广东	1	2021	2021.06.22	$7.0 \times 10^2$				1
大连	1	2021	2021.06.28	$8.5 \times 10^2$				1
云南	3	2021	2021.07.26	$1.7 \times 10^3$	2021	2021.07.26	$1.9 \times 10^3$	3
			2021.07.26	$6.0 \times 10^2$				
贵州	1	2021	2021.09.08	$3.2 \times 10^3$				1
北京	7	2021	2021.09.21	$6.5 \times 10^2$	2022	2022.08.09	$1.2 \times 10^3$	7
			2021.10.20	$9.8 \times 10^3$		2022.08.10	$9.0 \times 10^2$	
			2022.08.09	$2.5 \times 10^3$		2022.08.24	$5.6 \times 10^4$	
			2022.08.09	$1.7 \times 10^3$				
青海	2	2021	2021.10.11	$1.7 \times 10^4$	2022	2022.03.13	$2.9 \times 10^3$	2
安徽	3	2022	2022.04.22	$9.2 \times 10^3$	2022	2022.07.25	$7.0 \times 10^4$	3
			2022.07.25	$1.7 \times 10^4$				
山东	2	2022	2022.08.12	$8.3 \times 10^3$	2023	2023.08.23	$2.5 \times 10^2$	2
陕西	2	2022	2023.01.12	$4.5 \times 10^2$	2023	2023.11.20	$7.4 \times 10^3$	2
广西	1	2022	2023.02.06	$1.3 \times 10^3$				1
浙江	1	2023	2023.08.07	$7.0 \times 10^2$				1
福建	1	2019	2023.02.21	$1.5 \times 10^2$				0
进口								
俄罗斯	3	2019	2022.03.03	$1.0 \times 10^1$	2019	2022.03.03	$7.0 \times 10^1$	0
			2022.03.06	$1.6 \times 10^1$				
合计	36							32



注:A、B为DG18培养基;C、D为YPD培养基上菌株221和644的菌落形态

图1 嗜渗酵母在DG18、YPD培养基上的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of osmophilic yeast on DG18 and YPD media

于植物的叶子、土壤和花朵中,也可以作为环境病原体<sup>[12]</sup>。2013年SUGITA等<sup>[13]</sup>报道了在血液中首次分离到假酶类菌作为人类病原体。SAKSINCHAI等<sup>[8]</sup>从泰国原生蜂蜜中分离出的*Z. mellis*具有极强的渗透耐受性,能够造成高糖食品的腐败。*C. magnoliae*被研究作为一种耐渗透压酵母,并且可以还原糖而产生赤藓糖醇<sup>[14]</sup>。

#### 2.4 嗜渗酵母高糖耐受性

选取4株嗜渗酵母分离株(221、3301、3601、644)进行高糖耐受性试验。分别改变YPD培养基中葡萄糖浓度(300、450、600、750、900 g/L),根据各菌株在高糖环境中的生长量来判断菌株的耐糖程度。试验结果显示(图3),4株试验菌株均能在高糖条件中存活和生长,生长量随着葡萄糖浓度的增大而降低,不同嗜渗酵母表现出不同的高糖耐受

性。菌株644高糖耐受性最好,在300~750 g/L葡萄糖浓度时生长均优于其他菌株,菌株3301和3601次之,菌株221生长最差。但2株*Z. mellis*在900 g/L葡萄糖浓度下生长情况优于其他菌株。

#### 2.5 嗜渗酵母产酒精含量

采用重铬酸钾比色法绘制乙醇标准曲线,所得的回归方程为 $y=0.0776x+0.004$ , $R^2=0.9907$ ,根据回归方程计算出72 h酵母发酵母中的酒精含量。从酒精产率结果来看(表4),分离得到的4株嗜渗酵母酒精产率均达到6%左右,高于质控菌株(4.56%),可见分离菌株在一定条件下能够发酵产生酒精造成食品污染。

### 3 讨论

嗜渗酵母作为一类能够在自然或者人为高渗透压条件下正常生长繁殖的酵母,其生存能力较强,且很难在早期被检测到,当温度适宜并且蜂蜜水分含量超过33%时,嗜渗酵母会大量繁殖并且使蜂蜜发酵<sup>[15]</sup>,导致蜂蜜腐败变质,产生气泡和酒味。不仅降低了蜂蜜的品质和价值,还会给企业造成一定经济损失,对国际贸易也会产生负面影响<sup>[16-17]</sup>。国际食品法典委员会标准要求蜂蜜在贮存、销售及运输过程中不得发酵或发生风味变化,因此,嗜渗酵母被列为蜂蜜需要控制的主要腐败菌之一,也是

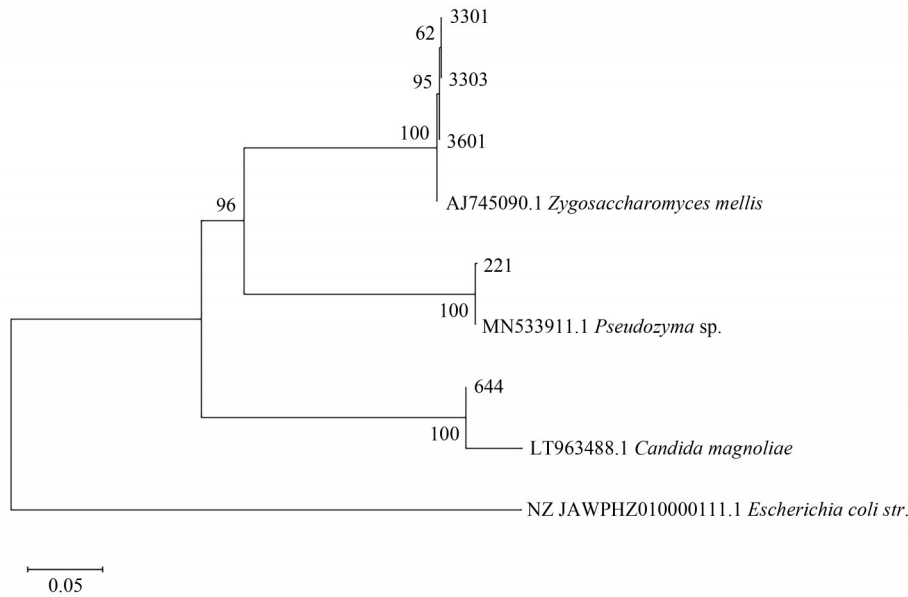


图2 基于26S rDNA基因序列菌株221、3301、3303、3601、644系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of strains 221, 3301, 3303, 3601, 644 based on 26S rDNA gene sequence

表3 嗜渗酵母分离菌株221、3301、3303、3601、644与Genbank参考菌株比对结果

Table 3 Isolates 221, 3301, 3303, 3601, 644 were compared with genbank reference strains

菌株	比对结果	同源率/%	参考菌株
221	<i>Moesziomyces aphidis</i> <i>Pseudozyma sp.</i>	100	MN533911.1 <i>Pseudozyma sp.</i>
3301	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	99.83	AJ745090.1 <i>Z. mellis</i>
3303	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	99.83	AJ745090.1 <i>Z. mellis</i>
3601	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	100	AJ745090.1 <i>Z. mellis</i>
644	<i>Candida magnoliae</i>	100	LT963488.1 <i>C. magnoliae</i>

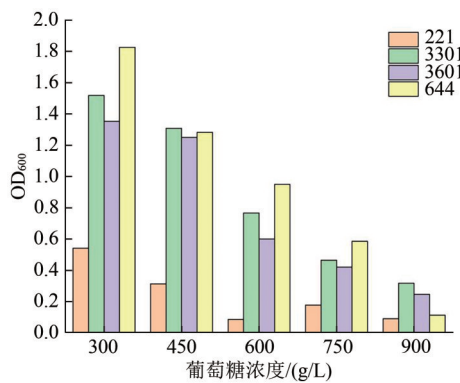


图3 嗜渗酵母耐高糖生长情况

Figure 3 Growth tolerance of osmophilic yeast to high sugar

近十年来被各国列为蜂蜜进出口检验的重要检测指标<sup>[18]</sup>。GB 14963—2011《食品安全国家标准 蜂蜜》提出有关于嗜渗酵母的检验方法,在微生物限量中明确指出嗜渗酵母计数应不得超过 200 CFU/g。

本研究对国内外不同地域和不同种类的蜂蜜进行嗜渗酵母计数,嗜渗酵母的检出率为 3.93%,超标率为 3.49%。蒋波等<sup>[19]</sup>和刘晓晖等<sup>[20]</sup>曾对蜂蜜中嗜渗酵母的污染情况进行统计,均未有嗜渗酵母的检出。本实验嗜渗酵母检出率较高,可见所检国内外蜂蜜产品均存在着较大的被嗜渗酵母污染的可能,嗜渗酵母的检测对于蜂蜜也显得尤为重要。同时蜂蜜中嗜渗酵母的产生条件多样,与地理差异及生产日期并无本质关联,本实验部分嗜渗酵母从过保质期样品中检出,这可能与存放时间过长、样品湿度和温度发生变化有关。嗜渗酵母与菌落总数和霉菌计数作为蜂蜜中常见的微生物指标不合格因素,应该作为重要的风险因素进行重点关注与控制研究。

嗜渗酵母的存在对蜂蜜的感官和品质具有潜在的不良影响<sup>[21]</sup>。同时,嗜渗酵母可用于蜂蜜酒<sup>[22]</sup>、蜂蜜醋<sup>[23]</sup>以及相关产品的研究和开发,从食品工业的角度来看具有一定的积极作用。本研究通过对嗜渗酵母分离株进行高糖耐受性和产酒精试验发现,4株试验菌株均能在 900 g/L 高糖条件中存活和生长,高糖耐受性的优劣是决定酵母能否在高渗环境中产生作用的首要因素,徐伟等<sup>[24]</sup>在东北黑蜂椴树蜜中分离出 1 株酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),可在 800 g/L 葡萄糖培养基中生长。

表4 嗜渗酵母分离株产酒精含量

Table 4 Osmophilic yeast produces alcohol content

	221	3301	3601	644	SC
反应液 OD <sub>600</sub>	0.523±0.06 <sup>b</sup>	0.542±0.01 <sup>a</sup>	0.526±0.03 <sup>b</sup>	0.506±0.04 <sup>c</sup>	0.358±0.01 <sup>d</sup>
酒精含量(% ,V/V)	6.69	6.93	6.72	6.47	4.56

注:同行不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

LIU 等<sup>[25]</sup>曾在蜂蜜中分离筛选出 6 株 *Z. mellis* 并对其高糖耐受性进行试验,结果表明 *Z. mellis* 糖耐受性可达 500~700 g/L,本研究中 *Z. mellis* 糖耐受性可达 900 g/L 甚至更高。有研究表明,在高渗环境下酵母菌自身存在的系统会出现几种信号传导途径和分子机制应答<sup>[26]</sup>,通过在细胞内快速累积一些与高渗特性相关的小分子物质,如甘油<sup>[27]</sup>、海藻糖<sup>[28]</sup>和糖醇<sup>[29]</sup>等来调节胞内外压力的平衡,从而对渗透压进行调节,以适应在高渗环境中的生长。这种调节系统的表达方式和强弱程度不同,因此酵母对外界环境表现出的耐渗性也有明显差异。同时从蜂蜜中分离得到的 4 株嗜渗酵母都有一定的产酒精能力,酒精产率均达到 6% 左右。在高渗透压环境下,嗜渗酵母有利于食品发酵和工业生产乙醇。在孟加拉国蜂蜜分离出的 8 株嗜渗酵母中,其中 5 株有较高的发酵能力,并且 1 株的发酵效率最高,乙醇产量达到 33.48%(V/V)<sup>[30]</sup>,该菌株可用于增加乙醇的生产,因此蜂蜜可以作为酵母工业应用中具有价值的潜在新来源<sup>[31]</sup>。

本研究通过对国内外不同地域和不同种类蜂蜜进行嗜渗酵母的计数、分离鉴定以及耐高糖和产酒精试验,为国内外蜂蜜污染嗜渗酵母的情况提供了参考数据,表明嗜渗酵母存在污染蜂蜜造成其腐败变质的风险。因此,需要加强对蜂蜜中嗜渗酵母的控制和管理,增加嗜渗酵母的检测频率和除菌工艺,提升蜂蜜品质。同时,蜂蜜可以作为筛选耐渗透压菌种的来源,选育蜂蜜嗜渗酵母有助于蜂蜜食品发酵工业的发展和优秀产品的研发。国内有关于嗜渗酵母的报道较少,对嗜渗酵母相关特性还有待进一步研究。

## 参考文献

- [ 1 ] DENISE D O S, MENDES H F, ADOLFO S M, et al. Microbial communities associated with honey bees in Brazil and in the United States [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021, 52 (3): 2097-2115.
- [ 2 ] GALANIS A, VARDAKAS P, RECZKO M, et al. Bee foraging preferences, microbiota and pathogens revealed by direct shotgun metagenomics of honey [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(7): 2506-2523.
- [ 3 ] SERGIO E, FERNANDO J, LUCIANO F, et al. Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 347: 109200.
- [ 4 ] 魏颖. 蜂蜜国家标准探讨 [J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41 (10): 235-239.  
WEI Y. Discussion on national standard of honey [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(10): 235-239.
- [ 5 ] BRYSCH-HERZBERG M, TOBIAS A, SEIDEL M, et al. *Schizosaccharomyces osmophilus* sp nov, an osmophilic fission yeast occurring in bee bread of different solitary bee species [J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(4): foz038.
- [ 6 ] CADEZ N, FUELOEP L, DLAUCHY D, et al. *Zygosaccharomyces favi* sp nov., an obligate osmophilic yeast species from bee bread and honey [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 107(3): 645-654.
- [ 7 ] SINACORI M, FRANCESCA N, ALFONZO A, et al. Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin [J]. *Food Microbiology*, 2014, 2014, 38: 284-294.
- [ 8 ] SAKSINCHAI S, SUZUKI M, CHANTAWANNAKUL P, et al. A novel ascosporegenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand [J]. *Fungal Diversity*, 2012, 52 (1): 123-139.
- [ 9 ] 王虎玄, 刘婷, 马原, 等. 陕西浓缩海红果汁中高渗酵母的分离鉴定 [J]. *陕西科技大学学报*, 2017, 35(6): 114-119.  
WANG H X, LIU T, MA Y, et al. Isolation and identification of hyperosmotic yeast from concentrated fruit juice of Shaanxi province [J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2017, 35(6): 114-119.
- [ 10 ] 刘灿珍, 董书甲, 姜凯凯, 等. 5 株非酿酒酵母的耐受性及发酵特性研究 [J]. *中国酿造*, 2017, 36(10): 42-46.  
LIU C Z, DONG S J, JIANG K K, et al. Study on tolerance and fermentation characteristics of 5 strains of non-*Saccharomyces cerevisiae* [J]. *China Brewing*, 2017, 36(10): 42-46.
- [ 11 ] 张玲玲, 宋璐, 孙京格, 等. 酿酒酵母筛选及乙醇发酵条件的优化 [J]. *中国调味品*, 2023, 48(7): 56-60.  
ZHANG L L, SONG L, SUN J G, et al. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* and optimization of ethanol fermentation conditions [J]. *China Condiment*, 2023, 48(7): 56-60.
- [ 12 ] TELLES J P, RIBEIRO V S T, KRAFT L, et al. *Pseudozyma* spp. human infections: A systematic review [J]. *Medical Mycology*, 2021, 59(1): 1-6.
- [ 13 ] SUGITA T, TAKASHIMA M, POONWAN N, et al. The first isolation of ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica* [J]. *Microbiology and Immunology*, 2013, 47(3): 183-190.
- [ 14 ] PARK E H, LEE H Y, RYU Y W, et al. Role of osmotic and salt stress in the expression of erythrose reductase in *Candida magnoliae* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21(10): 1064-1068.
- [ 15 ] 浦德雄, 何丽, 徐鸿, 等. 油菜蜂蜜中耐高渗酵母菌的分离与鉴定 [J]. *蜜蜂杂志*, 2015, 35(5): 5-7.  
PU D X, HE L, XU H, et al. Isolation and identification of hyperosmolytic yeast from rape honey [J]. *Journal of Bee*, 2015, 35(5): 5-7.
- [ 16 ] MATRAXIA M, ALFONZO A, PRESTIANNI R, et al. Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production [J]. *Food Microbiology*, 2021, 99(10): 103806.
- [ 17 ] CAI R H, ZHANG M M, NIU Y J, et al. Antifungal activity and

- mechanism of citral, limonene and eugenol against *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. LWT, 2019, 106: 50-56.
- [18] WANG H X, SUN H M. Potential use of electronic tongue coupled with chemometrics analysis for early detection of the spoilage of *Zygosaccharomyces rouxii* in apple juice [J]. Food Chemistry, 2019, 290: 152-158.
- [19] 蒋波, 李琼琼, 张芝华, 等. 市售蜂蜜中污染微生物的调查分析[J]. 上海预防医学, 2022, 34(1): 77-80.
- JIANG B, LI Q Q, ZHANG Z H, et al. Investigation and analysis of contaminating microorganisms in commercial honey [J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2022, 34(1): 77-80.
- [20] 刘晓晖, 付婧超, 李井涛, 等. 2018年A省市售蜂蜜中嗜渗酵母的风险暴露评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(6): 1454-1457.
- LIU X H, FU J C, LI J T, et al. Risk exposure assessment of osmophilic yeast in honey sold in A province and city in 2018 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(6): 1454-1457.
- [21] 王凯, 胡福良. 蜂蜜中嗜渗酵母的来源及其与蜂蜜品质的关系[J]. 蜜蜂杂志, 2012, 32(11): 9-10.
- WANG K, HU F L. Source of osmophilic yeast in honey and its relationship with honey quality [J]. Journal of Bee, 2012, 32(11): 9-10.
- [22] 张丽珍, 曾志将, 颜伟玉, 等. 山乌柏蜂蜜酒的酿造工艺研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(9): 180-183.
- ZHANG L Z, ZENG Z J, YAN W Y, et al. Study on the brewing technology of Chinese Sapium Chinese honey wine [J]. China Brewing, 2010, 29(9): 180-183.
- [23] 史莹, 张丽珍, 曾志将, 等. 山乌柏蜂蜜酒酿造酵母的筛选、鉴定及应用[J]. 中国食品学报, 2013, 13(10): 197-204
- SHI Y, ZHANG L Z, ZENG Z J, et al. Screening, identification and application of *saccharomyces sapiens* brews [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(10): 197-204.
- [24] 徐伟, 杜娇, 杜鹃, 等. 东北黑蜂椴树蜜中耐高糖酵母菌分离鉴定及透射电子显微镜观察[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(8): 51-56.
- XU W, DU J, DU J, et al. Isolation, identification and transmission electron microscope observation of *Saccharomyces* tolerant to high glucose in the honey of Linden tree [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(8): 51-56.
- [25] LIU G L, BI X Y, TAO C L, et al. Comparative transcriptomics analysis of *Zygosaccharomyces mellis* under high-glucose stress [J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(1): 54-62.
- [26] STRATFORD M, STEELS H, NOVODVORSKA M, et al. Extreme osmotolerance and halotolerance in food-relevant yeasts and the role of glycerol-dependent cell individuality [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3238.
- [27] XUE S J, CHEN L, JIANG H, et al. High pullulan biosynthesis from high concentration of glucose by a hyperosmotic resistant, yeast-like fungal strain isolated from a natural comb-honey [J]. Food Chemistry, 2019, 286: 123-128.
- [28] JIANG H, LIU G L, CHI Z, et al. Genetics of trehalose biosynthesis in desert-derived *Aureobasidium melanogenum* and role of trehalose in the adaptation of the yeast to extreme environments [J]. Current Genetics, 2017, 64: 479-491.
- [29] LWATA K, MAEDA M, KASHIWAGI Y, et al. Isolation of *Zygosaccharomyces siamensis* *kiy1* as a novel arabitol-producing yeast and its arabitol production [J]. AMB Express, 2023, 13(1): 76.
- [30] MUKTIR R F, Chowdhury M K, Uddin A. Isolation and characterization of osmophilic fermentative yeasts from Bangladeshi honeys [J]. Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics, 2019, 2(3): 123-127.
- [31] ZIUZIA P, JANIEC Z, WRÓBEL-KWIATKOWSKA M, et al. Honey's yeast—New source of valuable species for industrial applications [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(9): 7889.