

### 三种非酿酒酵母对贵人香白葡萄酒发酵进程及挥发性组分的影响

周洪江, 姜文广, 阮仕立, 李记明

### Influence of Three Non-*Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Volatile Components of Italian Riesling White Wines

ZHOU Hongjiang, JIANG Wenguang, RUAN Shili, and LI Jiming

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022010164>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### SPME-GC-MS与电子鼻结合分析不同酵母混菌发酵猕猴桃酒的挥发性香气物质

Analysis of Volatile Aroma Compounds in Kiwi Wine Co-Fermentation with Different Yeasts by SPME-GC-MS Combined with Electronic Nose

食品工业科技. 2021, 42(16): 119-128

#### 蜜桔果酒用非酿酒酵母的分离鉴定、发酵特性及挥发性香气成分分析

Isolation, Identification, Fermentation Characteristics and Volatile Aroma Components Analysis of non-*Saccharomyces* for Tangerine Wine

食品工业科技. 2019, 40(7): 124-130

#### 3株非酿酒酵母在模拟葡萄汁中的生长特性与发酵香气

Growth characteristics and fermentation aroma compounds of three non-*Saccharomyces* in model synthetic medium

食品工业科技. 2018, 39(9): 111-118, 123

#### 一株非酿酒酵母分离鉴定及多菌种混菌发酵对葡萄酒香气的影响研究

Study on isolation and identification of a non-*Saccharomyces cerevisiae* and the effect of multi-strain mixed fermentation on wine aroma

食品工业科技. 2018, 39(11): 113-120

#### 酵母及原料品种对猕猴桃酒挥发性成分的影响

Effects of Yeast and Raw Material Varieties on Volatile Components of Kiwifruit Wine

食品工业科技. 2019, 40(3): 216-223

#### 3种干燥方式对香菇挥发性物质及感官特性的影响

Effects of Three Drying Processes on Volatile Substances and Sensory Characteristics in *Lentinus edodes*

食品工业科技. 2019, 40(24): 262-269



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

周洪江, 姜文广, 阮仕立, 等. 三种非酿酒酵母对贵人香白葡萄酒发酵进程及挥发性组分的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 163-172. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010164

ZHOU Hongjiang, JIANG Wenguang, RUAN Shili, et al. Influence of Three Non-*Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Volatile Components of Italian Riesling White Wines[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 163-172. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010164

· 生物工程 ·

# 三种非酿酒酵母对贵人香白葡萄酒发酵进程及挥发性组分的影响

周洪江, 姜文广, 阮仕立, 李记明\*

(烟台张裕集团有限公司, 山东省葡萄酒微生物发酵技术重点实验室, 山东烟台 264001)

**摘要:** 本文以‘贵人香’葡萄为原料, 利用三种商业化非酿酒酵母(戴尔有孢圆酵母、美极梅氏酵母和耐热克鲁维酵母)与酿酒酵母混合发酵酿制白葡萄酒, 并对酵母的发酵进程、葡萄酒理化指标、挥发性物质含量以及香气感官品质进行比较, 旨在阐述非酿酒酵母/酿酒酵母混合发酵对白葡萄酒香气质量的影响。结果表明, 三种非酿酒酵母与酿酒酵母的混合发酵均能顺利完成, 但美极梅氏酵母易受到酿酒酵母的抑制。理化指标检测结果显示混合发酵白葡萄酒的酒精含量低于酿酒酵母单独发酵。挥发性香气物质采用气相色谱-离子迁移谱技术进行检测, 共检测到 34 种化合物, 接种美极梅氏酵母的葡萄酒中己酸乙酯、异戊酸乙酯、乙酸己酯、 $\gamma$ -壬内酯、 $\delta$ -辛内酯、己醇、芳樟醇等物质的信号强度最高, 整体香气风格最突出。接种戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母的酒样中辛酸乙酯、乙酸丙酯、丙酸乙酯、 $\alpha$ -松油烯等组分的含量较高, 香气感官特征存在相似性, 且均优于酿酒酵母单独发酵的葡萄酒。主成分分析结果能较好地区分不同混合发酵工艺生产的葡萄酒。综上, 非酿酒酵母/酿酒酵母混合发酵对提升白葡萄酒香气质量有积极作用。

**关键词:** 白葡萄酒, 戴尔有孢圆酵母, 美极梅氏酵母, 耐热克鲁维酵母, 发酵进程, 挥发性物质

中图分类号: TS261

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)20-0163-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010164



本文网刊:

## Influence of Three Non-*Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Volatile Components of Italian Riesling White Wines

ZHOU Hongjiang, JIANG Wenguang, RUAN Shili, LI Jiming\*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Wine Microbial Fermentation Technology,

Yantai Changyu Group Co., Ltd., Yantai 264001, China)

**Abstract:** In this study, three commercial non-*Saccharomyces* yeasts, i.e., *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans* were tested in combination with *Saccharomyces cerevisiae* to produce Italian Riesling white wines, with the fermentation progress, physical and chemical indexes of white wine, volatile profile and aromatic property of resulting white wines determined and compared, in order to elucidate their influences on the aroma quality of white wines. Results showed that, all fermentations were completed successfully, but the growth of *M. pulcherrima* was more easily inhibited by the proliferation of *S. cerevisiae*. Moreover, the ethanol concentrations of white wines from mixed fermentations were lower than that of *S. cerevisiae* single inoculation. Volatile compounds were detected by HS-GC-IMS, and a total of 34 volatiles were obtained. Wines inoculated with *M. pulcherrima* contained the highest signal intensities of ethyl caproate, ethyl isovalerate, ethyl 2-methylbutyrate, hexyl acetate,  $\gamma$ -nonolactone,  $\delta$ -octanolactone, hexanol, 2,3-butanedione and linalool, the overall aromatic property was greatly enhanced. Wines conducted by mixed fermentation using *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* and *L. thermotolerans*/*S. cerevisiae* contained higher intensities of ethyl octanoate, propyl acetate, ethyl propionate and  $\alpha$ -terpinene, and the aroma and sensory characteristics of these two pairs

收稿日期: 2022-01-20

基金项目: 山东省泰山产业领军人才工程专项经费资助(tscy20150212); 烟台市科技创新发展计划项目(2020XCZX029)。

作者简介: 周洪江(1964-),男,博士,高级工程师,研究方向:葡萄酒酿造,E-mail:zhouhj@changyu.com.cn。

\*通信作者: 李记明(1966-),男,博士,研究员,研究方向:葡萄栽培和葡萄酒酿造,E-mail:zyljm@163.com。

were similar, both better than the wine fermented singly by *S. cerevisiae*. Moreover, principal component analysis could better distinguish the wines produced by different mixed fermentation processes. In conclusion, this study showed that the mixed fermentation using non-*Saccharomyces* yeasts/*S. cerevisiae* pairs played an important role in the improvement of the aroma of white wine.

**Key words:** white wine; *Torulaspora delbrueckii*; *Metschnikowia pulcherrima*; *Lachancea thermotolerans*; fermentation progress; volatile components

香气是决定葡萄酒品质的重要指标,是上百种挥发性化合物相互作用的结果,也是吸引消费者和增强市场竞争力的重要因素<sup>[1]</sup>。在葡萄酒酿造中,接种商业化酿酒酵母并使其主导完成酒精发酵是常规操作,这是基于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的若干优良酿造特性,如发酵完全、酒精产率高、发酵可重复性强、抑制杂菌生长等<sup>[2]</sup>,但是只接种商业化酿酒酵母带来的共性问题产品风格单一、缺乏典型性<sup>[3]</sup>。将非酿酒酵母与酿酒酵母联合使用,发挥每种酵母的酿造特性和优势,形成对酒体的提升是解决以上问题的有效方法<sup>[4]</sup>。

非酿酒酵母是一类自然存在于浆果、果梗表面、果园土壤或酿酒环境中可参与葡萄酒发酵的微生物,在发酵过程中会产生甘油、酯类、高级醇、萜类化合物等代谢产物,并且能够分泌糖苷酶、脂肪酶、蛋白酶等多种酶类,通过酶的活性反应将果实中的香气前体物质分解并释放出香气组分,从而影响葡萄酒的香气、风味和复杂性。随着研究者对非酿酒酵母的深入研究,非酿酒酵母的潜在应用价值受到越来越多的关注<sup>[4-5]</sup>。目前葡萄酒酿造领域研究较多的非酿酒酵母主要有孢圆酵母属(*Torulaspora*)<sup>[6]</sup>、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)<sup>[7]</sup>、假丝酵母属(*Candida*)<sup>[8]</sup>、毕赤酵母属(*Pichia*)<sup>[9]</sup>、美奇酵母属(*Metschnikowia*)<sup>[10]</sup>、克鲁维酵母属(*Lachancea*)<sup>[11]</sup>等,它们以不同的代谢机制影响着果酒的风味。Azzolini 等发现 *T. delbrueckii* 和酿酒酵母混合发酵能够增加芳香醇类和酯类的合成量,明显提升葡萄酒的香气和复杂性,以及缓和葡萄酒的发酵进程<sup>[6]</sup>。Whitener 等证实某些特定的戴尔有孢圆菌株可生成高浓度的萜烯化合物,如  $\alpha$ -萜品醇、芳樟醇、香叶醇等,从而提高葡萄酒的品种香气<sup>[12]</sup>。Hranilovic 等研究发现美极梅氏酵母(*M. pulcherrima*)与酿酒酵母顺序接种发酵葡萄酒时,能够促进三羧酸循环代谢产物的合成,如富马酸、琥珀酸、甘油等,同时增加多种乙酸酯、高级醇等挥发性组分的产量<sup>[10]</sup>。Ciani 等发现耐热克鲁维酵母(*L. thermotolerans*)与酿酒酵母实施混合发酵时可以改善影响葡萄酒品质和感官质量,如增加萜烯、异丁酸等芳香化合物,限制乙酸、乙醛等物质的合成,还能提高甘油、葡萄花色苷和多糖的含量<sup>[11]</sup>。但是非酿酒酵母目前在红葡萄酒酿造中研究及应用较多,白葡萄酒中涉及较少,急需开展相关研究。

挥发性组分的测定利用气相色谱-离子迁移谱(Gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-

IMS)技术完成,这是近年出现的检测风味化合物的新手段。GC-IMS 的分析原理是样品经气相色谱分离后,先经 IMS 离子源进行离子化然后进入漂移区,根据在漂移区的迁移速率不同,不同物质按照先后顺序到达检测器,从而被检测。相较于气相色谱,该技术具有灵敏度高、检测速度快、检测限低、样品无需复杂预处理、可用于现场快速检测等优势<sup>[13-14]</sup>。本研究以在烟台种植的“贵人香”葡萄为酿造原料,测试三种商业化非酿酒酵母,即戴尔有孢圆酵母(*T. delbrueckii*)、美极梅奇酵母(*M. pulcherrima*)和耐热克鲁维酵母(*L. thermotolerans*)与酿酒酵母混合发酵对白葡萄酒的理化指标、挥发性组分和感官品质的影响,以酿酒酵母单独发酵的白葡萄酒为对照,分析比较三种非酿酒酵母间的区别,及其对解决白葡萄酒香气淡、风格典型性不突出问题的贡献,以期为在白葡萄酒中酿造应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

贵人香 酿造葡萄品种,采自烟台莱州,2019 年 9 月完成成熟采摘。果实理化指标:总糖 189 g/L,总酸 6.1 g/L(以酒石酸计),pH3.51;酿酒酵母 *S. cerevisiae* Lalvin D21、美极梅奇酵母 *M. pulcherrima* Flavia® MP346 加拿大 Lallemend 公司;戴尔有孢圆酵母 *T. delbrueckii* Prelude™、耐热克鲁维酵母 *L. thermotolerans* Concerto™ 丹麦科汉森公司;n-酮 C4~C9 色谱纯,国药化学试剂北京有限公司;葡萄糖、酵母粉、琼脂等培养基成分 分析纯,国药化学试剂北京有限公司。

FlavourSpec® GC-IMS 联用仪(配有 CTC 自动顶空进样器、Laboratory Analytical Viewer(LAV)分析软件及 Library Search 定性软件的 GC-IMS 系统)

德国 G.A.S 公司;20 mL 顶空进样瓶 宁波哈迈仪器科技有限公司;酸度计 FE28 梅特勒集团。

### 1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 WL 营养培养基(1 L):葡萄糖 50 g,酵母粉 5 g,胰蛋白胨 5 g,磷酸二氢钾 550 mg,氯化钙 125 mg,氯化铁 2.5 mg,氯化钾 425 mg,硫酸锰 2.5 mg,硫酸镁 125 mg,溴甲酚绿 22 mg,琼脂 20 g, pH6.5, 121 °C 灭菌 20 min。

赖氨酸琼脂培养基(1 L):D-葡萄糖 10 g,DL-蛋氨酸 2 mg,DL-色氨酸 2 mg,L-组氨酸 1 mg,对氨基苯甲酸 200  $\mu$ g,泛酸 2 mg,生物素 20  $\mu$ g,叶酸 2  $\mu$ g,烟酸 400  $\mu$ g,盐酸吡哆醇 400  $\mu$ g,核黄素 200  $\mu$ g,盐



酸硫胺素 400  $\mu\text{g}$ , 肌醇 10 mg, 硼酸 500  $\mu\text{g}$ , 碘化钾 100  $\mu\text{g}$ , 氯化铜 40  $\mu\text{g}$ , 氯化铁 200  $\mu\text{g}$ , 钼酸钠 200  $\mu\text{g}$ , 硫酸锌 400  $\mu\text{g}$ , 硫酸锰 400  $\mu\text{g}$ , 磷酸氢二钾 150 mg, 磷酸二氢钾 850 mg, 氯化钙 100 mg, 硫酸镁 500 mg, 赖氨酸盐酸盐 2.5 g, 氯化钠 100 mg, 琼脂 20 g, pH 自然, 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min。

**1.2.2 白葡萄酒发酵** 将新鲜葡萄破碎挤压出葡萄汁入发酵罐中, 加入  $\text{SO}_2$  并使其浓度达到 50 mg/L, 再加入 30 mg/L 的果胶酶于 5  $^{\circ}\text{C}$  下反应 12 h, 分离出上清液。添加适量蔗糖, 使还原糖浓度达到 210 g/L。将经过上述处理的葡萄汁等分为 8 份, 6 份用于非酿酒酵母/酿酒酵母混合发酵, 2 份为酿酒酵母单独发酵, 即每组发酵酒样均有 2 组平行样品。

每份葡萄汁倒入 20 L 小型发酵罐中, 进行葡萄酒发酵实验。所有酵母在使用前均需要进行充分活化, 即将酵母置于 20% 蔗糖水溶液中, 30  $^{\circ}\text{C}$  下轻轻搅拌至酵母产生丰富气泡, 而后直接接种于葡萄酒中。为便于区分四种发酵葡萄酒, 对其进行代码命名。将接种美极梅奇酵母 Flavia®MP346、戴尔有孢圆酵母 Prelude™ 和耐热克鲁维酵母 Concerto™ 的混合发酵葡萄酒分别用 M1、M2、M3 表示, 酿酒酵母 Lalvin D21 单独发酵的葡萄酒用 M4 表示。

M1、M2、M3 中先分别上述接种商业化非酿酒酵母, 接种量为 250 mg/L, 24 h 后接种酿酒酵母 Lalvin D21, 接种量为 300 mg/L。20  $^{\circ}\text{C}$  恒温发酵, 并监测白葡萄酒中的酵母增殖情况和还原糖浓度变化情况, 直至还原糖浓度小于 4 g/L。M4 中酿酒酵母的接入量为 250 mg/L, 其它处理与以上三种样品完全相同。上述样品中酵母增殖情况通过检测酵母的活细胞数进行表征, 测定方法见 1.2.3; 还原糖浓度测定方法见 1.2.4。

发酵结束后将  $\text{SO}_2$  加入到酒样品中, 使游离  $\text{SO}_2$  浓度达到 30 mg/L, 所有样品均保存于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中, 待后续完成理化指标以及挥发性香气组分测定。

**1.2.3 酵母活细胞数的测定方法** WL 鉴别培养基和赖氨酸琼脂培养基分别应用于酿酒酵母和非酿酒酵母的菌落计数, 并采用梯度稀释法对它们在发酵过程中的增殖情况进行培养和计数<sup>[15]</sup>。取 5 mL 酒样, 用无菌生理盐水梯度稀释后(稀释倍数为  $10^0\sim 10^8$ ), 涂布于 WL 营养培养基, 在 28  $^{\circ}\text{C}$  好氧条件下培养 48 h 后统计酿酒酵母的数目。相同的酒样经无菌生理盐水梯度稀释后, 涂布于赖氨酸培养基, 在 28  $^{\circ}\text{C}$  好氧条件下培养 72 h 后统计非酿酒酵母的数量。菌体量的表示方法为 CFU/mL。

**1.2.4 理化指标测定** 酒精度、总糖、总酸、挥发酸的测定方法参照《葡萄酒、果酒通用分析方法》(GB/T 15038-2006)执行。其中: 酒精度采用密度瓶法; 总糖采用斐林氏剂滴定法测定, 以葡萄糖计; 挥发酸和总酸: 采用氢氧化钠滴定法测定, 分别以乙酸和酒石酸计。pH 采用酸度计测定。每个样品检测 3 次。

**1.2.5 挥发性组分分析** 取 1 mL 样品, 放入 20 mL 顶空进样瓶中, 保温孵化后经顶空进样, 用气相离子迁移谱仪 FlavourSpec®进行测试<sup>[16]</sup>。每个样品分析 3 次。

顶空进样条件: 顶空孵化于 60  $^{\circ}\text{C}$ , 孵化 10 min; 振荡加热; 顶空进样针温度为 65  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量为 100  $\mu\text{L}$ , 不分流模式。

GC 条件: 载气为高纯氮气(纯度  $\geq 99.999\%$ ), 流速设定为 2 mL/min, 保持 2 min, 8 min 上升至 30 mL/min, 10 min 第二次上升至 150 mL/min, 保持 150 mL/min, 持续 10 min。

IMS 条件: 漂移管长度 98 mm; 漂移管温度 45  $^{\circ}\text{C}$ ; 管内线性电压 5 kV/cm; 漂移气为  $\text{N}_2$ (纯度  $\geq 99.999\%$ ), 漂移气流速 150 mL/min; 放射源为 3H; 离子化模式为正离子。

**1.2.6 香气感官质量评价** 利用定量描述分析法对白葡萄酒进行香气感官质量分析, 由 15 位具有葡萄酒品评经验的品评者(6 名女性, 9 名男性, 年龄 21~52 岁)组成感官评价小组。在正式品评之前, 小组成员先接受葡萄酒描述性感官分析的培训, 通过进行多次检验与讨论, 品评小组确定了葡萄酒中主要的香气属性特征, 包括果香、花香、植物香、蜂蜜、化学味及整体香气。品评实验在感官评价室进行, 室温 20  $^{\circ}\text{C}$ , 通风良好, 无噪音, 无任何气味。以 3 位数字随机编码 12 份葡萄酒样品, 平均分为 2 组呈送给评价员。评价员按顺序闻香, 并采取 10 点制打分, 0 表示无, 9 表示特征性最强。0.0~3.0: 香气属性微弱; 3.1~6.0: 香气属性强度适中, 与其它属性平衡; 6.1~9.0: 呈现典型的、浓郁的属性香气, 且与其它属性协调。

## 1.3 数据处理

样品中挥发性组分的鉴定通过 GC-IMS 联用仪自带分析软件 LAV(Laboratory Analytical Viewer)、定性软件 GC×IMS Library Search(内置 NIST2014、IMS 数据库)完成。运用 LAV 中插件 Reporter 进行样品 GC-IMS 谱图对比, 用插件 Gallery Plot 进行 GC-IMS 指纹图谱的对比。

采用设备自带的 Laboratory Analytical Viewer (LAV) 分析软件及 Library Search 定性软件对葡萄酒的风味物质成分进行分析, 以 n-酮 C4~C9 为外标参照物, 通过插值法计算迁移时间与保留指数(RI)的对应关系, 获得 RI 值, 并利用软件内置的 NIST 数据库和 IMS 数据库对物质进行定性分析。

采用 SPSS Statistics 21.0 软件对获取的葡萄酒样品的各指标数据做方差分析(ANOVA)和显著性差异( $P<0.05$ )分析。利用 SPSS Statistics 21.0 软件中的主成分分析方法(PCA), 对所得葡萄酒的香气成分指标进行降维处理, 旋转方法采用最大方差法。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵过程跟踪情况

分别使用 WL 鉴别培养基和赖氨酸琼脂培养基

对酿酒酵母和非酿酒酵母细胞增殖情况进行培养和统计。酿酒酵母在赖氨酸培养基上不能生长,因而可以利用该培养基对非酿酒酵母的活细胞数进行统计;而两类酵母在 WL 培养基上的菌落形态及颜色差异较大,因而可以利用 WL 培养基对酿酒酵母的生长情况进行计数。

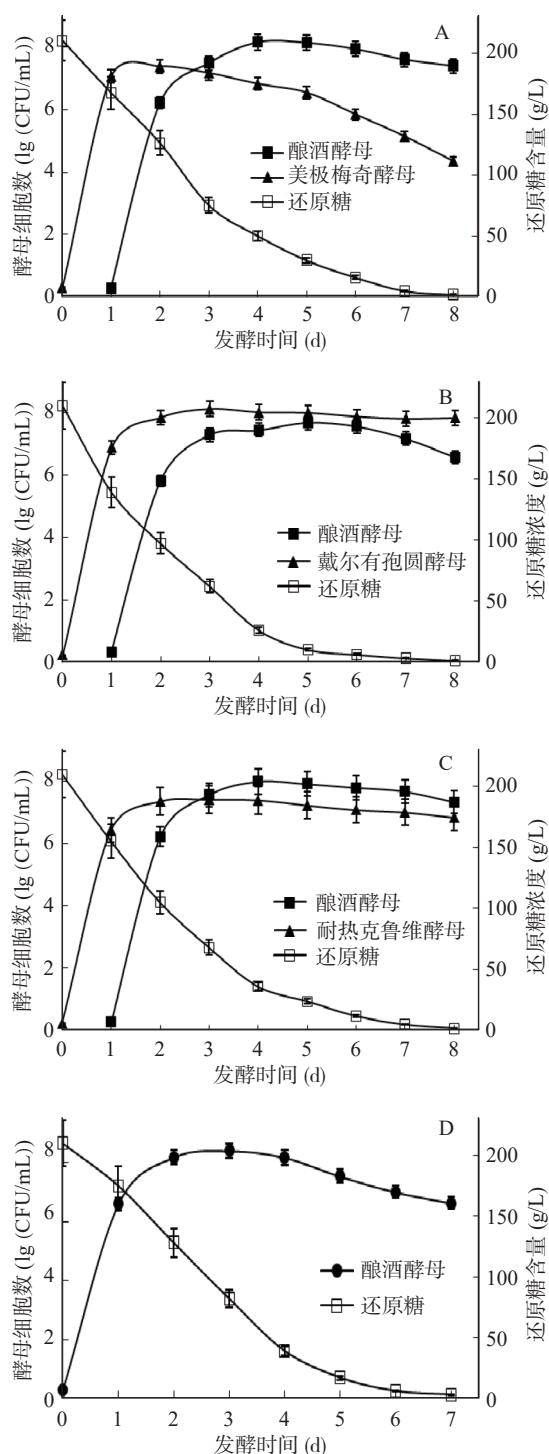


图1 白葡萄酒中酵母的增殖进程和还原糖代谢过程

Fig.1 Growth kinetics of yeasts and sugar consumption in white wines.

注: A、B、C、D 分别代表 M1(美极梅奇酵母—酿酒酵母混合发酵)、M2(戴尔有孢圆酵母—酿酒酵母组合)、M3(耐热克鲁维酵母—酿酒酵母)和 M4(酿酒酵母单独发酵)。

四种白葡萄酒发酵过程中的酵母细胞生长和还原糖消耗情况见图1。在混合发酵样品中,非酿酒酵母优先接种,从图1A、1B和1C中可以看出,美极梅奇酵母、戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母均能较好地适应各自的发酵环境,在微氧条件下快速繁殖,细胞数量急剧增加。发酵24 h后接种 Lalvin D21,它能够耐受非酿酒酵母产生的竞争性抑制,自接种之初便维持较高的发酵速率。非酿酒酵母在与酿酒酵母共发酵的环境中表现不同,戴尔有孢圆酵母的活细胞数仍在稳步增加,耐热克鲁维酵母也能实现较好的生长,美极梅奇酵母却被明显抑制,活细胞数在混合发酵24 h后开始下降。美极梅奇酵母、戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母分别于第2、3和3 d达到峰值,活细胞数分别达到7.39、8.12和7.40 lg(CFU/mL)。酿酒酵母在M1、M2、M3三个混合发酵样品中达到生长峰值均在第4~5 d,活细胞数分别是8.17、7.68和9.98 lg(CFU/mL)。随着发酵的进行,醪液中的糖分和营养素大部分被消耗掉,酵母开始衰老死亡,数量逐渐减少。所有混合发酵样品均在第8 d完成发酵。由图1D可知,M4酒样中的酿酒酵母D21在接种3 d时活细胞数达到最高,之后菌体数量缓慢下降,并于第7 d完成发酵。综上,混合发酵较之M4样品延长了1 d。此外,针对还原糖的消耗而言,在M1、M2和M3葡萄酒中,两种酵母从共存起始至发酵结束(第2~8 d),还原糖消耗速率分别是23.6、19.8和21.9 g/(L·d),而对照样品(M4)中还原糖代谢速率为29.6 g/(L·d),说明酿酒酵母单独发酵时能够更快速的利用糖类促进自身的生长及乙醇的合成。

## 2.2 白葡萄酒理化指标比较

发酵结束后对葡萄酒的理化指标进行检测,结果经均值化处理和标准差计算后见表1。所有样品的总糖含量都低于4 g/L,表明发酵比较充分,残糖含量较低,均为干型葡萄酒。酒精度在10.81%vol~11.58%vol之间,M4酒样最高,M1最低。pH在3.45~3.60范围内,M1、M2和M4之间差异较小,M3最低。

表1 不同发酵模式酿造贵人香白葡萄酒理化指标

Table 1 Compositional profile of Italian Riesling white wines resulting from different fermentations

| 项目            | M1( <i>M. pulcherrima</i> /<br><i>S. cerevisiae</i> ) | M2( <i>T. delbrueckii</i> /<br><i>S. cerevisiae</i> ) | M3( <i>L. thermotolerans</i> /<br><i>S. cerevisiae</i> ) | M4( <i>S. cerevisiae</i><br>单独发酵) |
|---------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 酒精度<br>(%vol) | 10.81±0.07 <sup>a</sup>                               | 11.02±0.09 <sup>a</sup>                               | 11.17±0.10 <sup>a</sup>                                  | 11.58±0.06 <sup>b</sup>           |
| 总糖<br>(g/L)   | 1.14±0.02 <sup>b</sup>                                | 0.97±0.04 <sup>a</sup>                                | 1.59±0.04 <sup>c</sup>                                   | 2.21±0.02 <sup>d</sup>            |
| 总酸<br>(g/L)   | 5.52±0.05 <sup>a</sup>                                | 5.69±0.04 <sup>b</sup>                                | 6.37±0.05 <sup>d</sup>                                   | 5.85±0.05 <sup>c</sup>            |
| pH            | 3.54±0.02 <sup>b</sup>                                | 3.60±0.02 <sup>c</sup>                                | 3.45±0.02 <sup>a</sup>                                   | 3.58±0.02 <sup>b</sup>            |
| 挥发酸<br>(g/L)  | 0.30±0.03 <sup>b</sup>                                | 0.19±0.02 <sup>a</sup>                                | 0.27±0.03 <sup>b</sup>                                   | 0.38±0.02 <sup>b</sup>            |

注: 同行不同小写字母(a~d)表示差异显著( $P<0.05$ )。



总酸在 5.52~6.37 g/L 之间,以 M3 最高,证实了耐热克鲁维酵母具有产酸能力。挥发酸的浓度在 0.19~0.38 g/L 之间,M4 葡萄酒的该数值较高。

2.3 白葡萄酒挥发性组分的比较

发酵结束后,利用 GC-IMS 对白葡萄酒的挥发性香气组分进行检测,结果以三维谱图(保留时间,迁移时间和峰强度)形式呈现。为了更直观地反映每种葡萄酒挥发性组分的差异,使用俯视图进行表示(图 2),这是通过对离子迁移时间和反应离子峰(RIP)的归一化而获得的横坐标 1.0 处的红色垂直线是反应离子峰(RIP)。每个 RIP 代表一种风味化合物,颜色表示其信号强度。红色表示高浓度,白色表示低浓度,红色越深表示该挥发性组分的浓度越高。根据挥发性化合物气相色谱保留时间和离子迁移时间对葡萄酒挥发性香气化合物进行分析,共计鉴定出 34 种挥发性化合物,包括酯类、醇类、醛类、酮类、酸类和萜

烯类物质。每种化合物的检测结果经均值化处理和标准差计算后见表 2。由表中数据可以看出,接种不同非酿酒酵母发酵葡萄酒的挥发性成分信号强度差异较大。此外,利用挥发性指纹图谱快速对比出不同葡萄酒样品风味物质之间的差异(图 3),图中每一行代表一个葡萄酒挥发性组分的全部信号峰,每一列代表同一挥发性有机物在不同样品中的信号峰强度。从图中可以清晰看出每种葡萄酒的完整挥发性组分信息以及样品之间挥发性组分的差异。

2.3.1 酯类 酯类物质是贵人香白葡萄酒的最主要风味物质,对酒的整体香气具有重要贡献<sup>[17]</sup>。本研究共检测到 16 种酯类物质,信号强度最高的是乙酸乙酯、乙酸异戊酯和己酸乙酯。表 2 结果显示,M4 的酯类信号总强度最低,而混合发酵则显著提高了多种挥发性酯类化合物的信号强度,包括异丁酸乙酯、乙酸异丁酯、异戊酸乙酯、己酸乙酯、己酸丙酯、庚酸

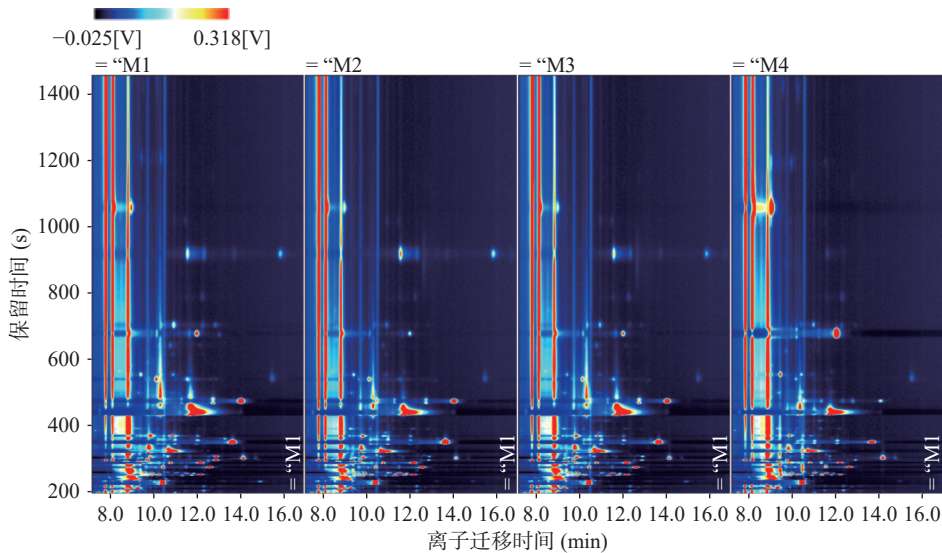


图 2 不同发酵模式酿造贵人香白葡萄酒中挥发性化合物的 GC-IMS 图谱

Fig.2 GC-IMS patterns of volatile compounds in Italian Riesling white wines resulting from different fermentations

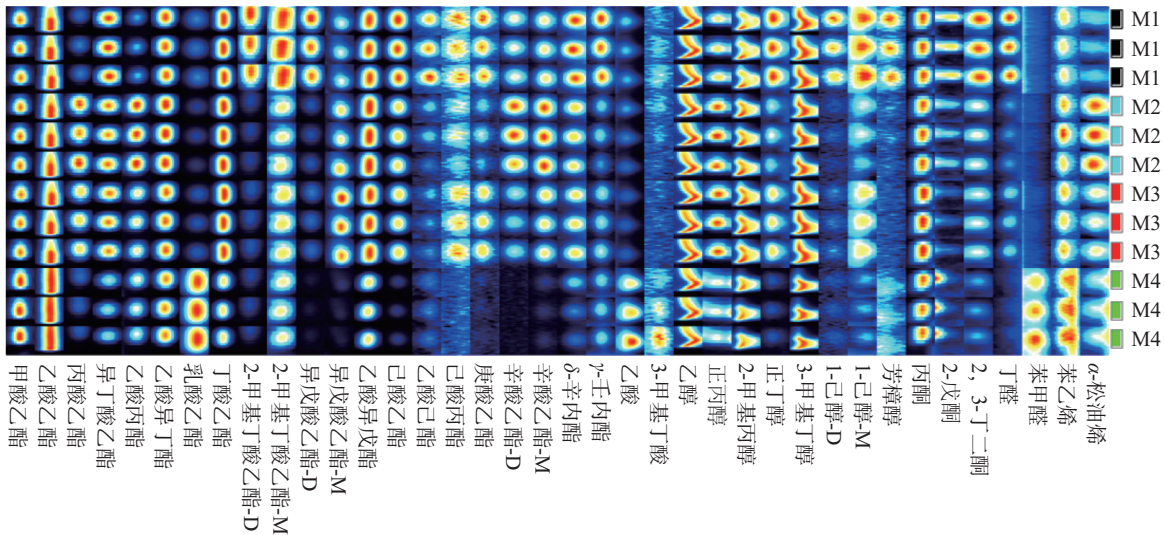


图 3 混合发酵对贵人香白葡萄酒挥发性指纹图谱的影响

Fig.3 Gallery plot of volatile fingerprints of Italian Riesling white wines resulting from combined fermentations.

表 2 不同发酵模式酿造贵人香白葡萄酒挥发性组分的信号强度

Table 2 Signal intensities of volatile compounds detected in Italian Riesling white wine resulting from different fermentations by GC-IMS

| 名称            | RI     | Rt[s]    | Dt[RIPrel] | M1(美极梅奇酵母—<br>酿酒酵母混合发酵)       | M2(戴尔有孢圆酵母—<br>酿酒酵母混合发酵)      | M3(耐热克鲁维酵母—<br>酿酒酵母混合发酵)     | M4<br>(酿酒酵母发酵)                |
|---------------|--------|----------|------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 甲酸乙酯          | 848.2  | 211.49   | 1.1939     | 1276.299±9.399 <sup>a</sup>   | 1241.547±6.537 <sup>a</sup>   | 1273.753±0.629 <sup>a</sup>  | 1642.781±34.681 <sup>b</sup>  |
| 乙酸乙酯          | 898.0  | 227.125  | 1.3371     | 5430.237±27.668 <sup>c</sup>  | 5511.540±33.356 <sup>b</sup>  | 5352.809±31.948 <sup>a</sup> | 6414.599±51.375 <sup>d</sup>  |
| 丙酸乙酯          | 965.2  | 249.461  | 1.4557     | 132.556±7.547 <sup>a</sup>    | 495.766±26.520 <sup>c</sup>   | 390.136±9.946 <sup>b</sup>   | 143.853±19.224 <sup>a</sup>   |
| 异丁酸乙酯         | 975.3  | 253.37   | 1.5634     | 833.566±15.364 <sup>c</sup>   | 694.242±15.284 <sup>b</sup>   | 708.369±7.922 <sup>b</sup>   | 351.073±10.378 <sup>a</sup>   |
| 乙酸丙酯          | 985.5  | 257.558  | 1.4802     | 203.474±6.197 <sup>a</sup>    | 696.791±17.062 <sup>d</sup>   | 427.585±6.860 <sup>c</sup>   | 381.127±13.573 <sup>b</sup>   |
| 乙酸异丁酯         | 1024.3 | 275.706  | 1.6166     | 1502.254±24.918 <sup>b</sup>  | 1696.477±10.202 <sup>c</sup>  | 1480.418±7.490 <sup>b</sup>  | 1377.935±4.909 <sup>a</sup>   |
| 丁酸乙酯          | 1047.8 | 288.549  | 1.562      | 2101.968±20.282 <sup>b</sup>  | 2083.595±6.253 <sup>b</sup>   | 2112.306±16.534 <sup>b</sup> | 1162.130±1.941 <sup>a</sup>   |
| 2-甲基丁酸乙酯-D    | 1060.9 | 296.367  | 1.6547     | 567.068±15.663 <sup>c</sup>   | 79.014±1.857 <sup>a</sup>     | 102.596±3.126 <sup>b</sup>   | 77.275±3.212 <sup>a</sup>     |
| 2-甲基丁酸乙酯-M    | 1061.4 | 296.646  | 1.2471     | 362.249±2.928 <sup>b</sup>    | 231.761±12.486 <sup>a</sup>   | 241.497±3.314 <sup>a</sup>   | 233.271±5.301 <sup>a</sup>    |
| 异戊酸乙酯-M       | 1076.2 | 306.139  | 1.2676     | 430.034±9.175 <sup>c</sup>    | 540.958±32.282 <sup>b</sup>   | 668.260±19.793 <sup>a</sup>  | 81.844±11.132 <sup>d</sup>    |
| 异戊酸乙酯-D       | 1079.1 | 308.093  | 1.6561     | 535.696±23.943 <sup>d</sup>   | 97.636±0.425 <sup>b</sup>     | 139.844±5.657 <sup>c</sup>   | 25.890±1.861 <sup>a</sup>     |
| 乙酸异戊酯         | 1132.0 | 350.252  | 1.7488     | 4715.746±43.751 <sup>b</sup>  | 5299.046±17.373 <sup>c</sup>  | 4712.587±17.382 <sup>b</sup> | 2583.968±16.408 <sup>a</sup>  |
| 己酸乙酯          | 1242.8 | 474.71   | 1.7997     | 3468.321±95.262 <sup>c</sup>  | 2430.952±81.462 <sup>b</sup>  | 2458.746±40.740 <sup>b</sup> | 333.189±7.164 <sup>a</sup>    |
| 乙酸己酯          | 1294.4 | 553.668  | 1.4006     | 213.379±9.052 <sup>b</sup>    | 99.657±11.754 <sup>a</sup>    | 95.817±4.259 <sup>a</sup>    | 91.329±0.499 <sup>a</sup>     |
| 己酸丙酯          | 1326.9 | 615.748  | 1.3985     | 46.126±2.781 <sup>b</sup>     | 39.543±5.196 <sup>b</sup>     | 44.041±3.032 <sup>b</sup>    | 23.113±3.682 <sup>a</sup>     |
| 庚酸乙酯          | 1339.1 | 641.191  | 1.3879     | 153.506±4.925 <sup>d</sup>    | 80.604±8.129 <sup>b</sup>     | 131.916±0.581 <sup>c</sup>   | 40.288±2.721 <sup>a</sup>     |
| 乳酸乙酯          | 1355.7 | 677.215  | 1.5373     | 1050.559±40.806 <sup>c</sup>  | 440.974±69.681 <sup>a</sup>   | 671.717±20.116 <sup>b</sup>  | 2084.326±103.962 <sup>d</sup> |
| 辛酸乙酯-D        | 1460.0 | 916.348  | 2.0329     | 552.955±10.434 <sup>c</sup>   | 778.693±55.406 <sup>d</sup>   | 430.659±10.262 <sup>b</sup>  | 78.758±11.050 <sup>a</sup>    |
| 辛酸乙酯-M        | 1460.6 | 917.746  | 1.4854     | 1173.887±18.114 <sup>b</sup>  | 1583.512±2.330 <sup>c</sup>   | 1173.823±48.099 <sup>b</sup> | 218.811±13.384 <sup>a</sup>   |
| 乙醇            | 939.2  | 240.248  | 1.1435     | 4020.230±28.754 <sup>b</sup>  | 3934.437±15.038 <sup>ab</sup> | 3964.408±4.555 <sup>b</sup>  | 3874.101±85.086 <sup>a</sup>  |
| 正丙醇           | 1055.8 | 293.263  | 1.1125     | 119.124±3.253 <sup>a</sup>    | 147.094±5.169 <sup>ab</sup>   | 153.451±1.681 <sup>c</sup>   | 145.049±2.230 <sup>b</sup>    |
| 2-甲基丙醇        | 1100.3 | 323.449  | 1.3725     | 3651.056±13.562 <sup>c</sup>  | 3331.052±26.194 <sup>b</sup>  | 3820.058±11.496 <sup>d</sup> | 2755.692±25.781 <sup>a</sup>  |
| 正丁醇           | 1152.6 | 370.075  | 1.3916     | 570.335±12.216 <sup>d</sup>   | 297.237±21.545 <sup>b</sup>   | 396.681±4.453 <sup>c</sup>   | 111.520±1.225 <sup>a</sup>    |
| 3-甲基丁醇        | 1217.6 | 442.659  | 1.502      | 10383.752±43.768 <sup>d</sup> | 8765.068±322.467 <sup>b</sup> | 9968.186±32.221 <sup>c</sup> | 6649.563±40.652 <sup>a</sup>  |
| 1-己醇-M        | 1367.0 | 702.387  | 1.3262     | 309.178±10.634 <sup>d</sup>   | 184.282±21.794 <sup>b</sup>   | 254.326±6.806 <sup>c</sup>   | 117.738±2.155 <sup>a</sup>    |
| 1-己醇-D        | 1367.6 | 703.785  | 1.6482     | 140.871±12.035 <sup>c</sup>   | 48.005±2.788 <sup>a</sup>     | 64.879±3.073 <sup>b</sup>    | 52.709±3.398 <sup>ab</sup>    |
| 丙酮            | 838.5  | 208.419  | 1.1149     | 835.888±3.153 <sup>c</sup>    | 819.219±5.141 <sup>b</sup>    | 927.716±8.116 <sup>d</sup>   | 753.608±4.257 <sup>a</sup>    |
| 丁醛            | 907.7  | 230.197  | 1.2894     | 74.903±2.623 <sup>d</sup>     | 37.335±1.883 <sup>b</sup>     | 46.374±1.317 <sup>c</sup>    | 26.143±1.934 <sup>a</sup>     |
| 2-戊酮          | 990.7  | 259.792  | 1.363      | 58.615±2.844 <sup>c</sup>     | 40.945±1.649 <sup>b</sup>     | 26.222±2.774 <sup>a</sup>    | 37.359±1.614 <sup>b</sup>     |
| 2,3-丁二酮       | 991.5  | 260.125  | 1.2283     | 207.208±1.355 <sup>d</sup>    | 124.886±4.863 <sup>b</sup>    | 136.324±0.580 <sup>c</sup>   | 81.609±2.663 <sup>a</sup>     |
| 苯甲醛           | 1579.9 | 1192.805 | 1.1559     | 270.582±9.996 <sup>b</sup>    | 207.669±16.451 <sup>a</sup>   | 221.189±5.744 <sup>ab</sup>  | 618.388±46.517 <sup>c</sup>   |
| 乙酸            | 1521.8 | 1058.988 | 1.1544     | 1638.746±75.454 <sup>b</sup>  | 1245.911±120.067 <sup>a</sup> | 1048.425±49.542 <sup>a</sup> | 4284.770±637.668 <sup>c</sup> |
| 3-甲基丁酸        | 1682.7 | 1429.927 | 1.2275     | 111.586±8.143 <sup>ab</sup>   | 99.087±4.746 <sup>a</sup>     | 98.406±3.018 <sup>a</sup>    | 153.298±34.885 <sup>b</sup>   |
| $\alpha$ -松油烯 | 1172.7 | 391.136  | 1.1925     | 36.655±3.917 <sup>a</sup>     | 85.482±3.708 <sup>c</sup>     | 60.353±0.848 <sup>b</sup>    | 58.140±0.657 <sup>b</sup>     |
| 苯乙烯           | 1260.3 | 499.304  | 1.202      | 75.069±1.775 <sup>a</sup>     | 94.132±5.839 <sup>c</sup>     | 84.323±4.198 <sup>b</sup>    | 128.771±2.130 <sup>d</sup>    |
| 芳樟醇           | 1585.9 | 1206.797 | 1.2152     | 204.053±3.530 <sup>c</sup>    | 113.489±14.431 <sup>a</sup>   | 93.218±9.566 <sup>a</sup>    | 180.751±5.085 <sup>b</sup>    |
| $\delta$ -辛内酯 | 1286.4 | 540.148  | 1.2969     | 692.942±29.431 <sup>c</sup>   | 532.894±11.685 <sup>b</sup>   | 520.414±5.789 <sup>b</sup>   | 252.350±42.375 <sup>a</sup>   |
| $\gamma$ -壬内酯 | 1367.4 | 703.271  | 1.4048     | 630.982±20.481 <sup>c</sup>   | 285.277±45.961 <sup>a</sup>   | 355.095±4.377 <sup>b</sup>   | 349.477±8.100 <sup>b</sup>    |

注: RI为保留指数, Rt为保留时间, Dt为迁移时间, [RIP rel]指归一化处理; M表示单体, D为二聚体; 同行不同小写字母(a~c)表示差异显著( $P<0.05$ )。

乙酯和辛酸乙酯。以己酸乙酯为例, 该物质能够散发出花香果香等气息, 其在 M4 中的强度为 333.19, 接种了三种商业化非酿酒酵母, 即美极梅奇酵母、戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母进行混合发酵后, 该物质在 M1、M2 和 M3 的强度分别提升了 9.4、7.3 和 7.4 倍。就三种混合发酵的葡萄酒而言, M1 和 M2 酒样中的挥发性酯类总强度最高, M3 次之。丁酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯和乙酸异戊酯能够释放类似草莓、香蕉、青苹果等果香香气, 乙酸异丁酯呈花香<sup>[18]</sup>, 这些酯类化合物在 M1 和 M2 样品中的浓度较高, 可能增强上述两种葡萄酒的果香或花香, 提高其风味复

杂性。

2.3.2 醇类 葡萄酒中的挥发性醇类化合物主要来源于发酵、氨基酸的转化及亚麻酸降解物的氧化<sup>[19]</sup>。当酒中的高级醇质量浓度适中时, 有助于提高葡萄酒的风味复杂性, 但当其浓度过高时, 就会对感官质量带来负面影响。贵人香白葡萄酒中共检测出 6 种醇类物质, 总强度最高的是 M1, M3 次之, 最低的是 M4。M1 样品显著提升了正丁醇、3-甲基丁醇和正己醇和含量, 其它两组混合发酵主要增加了丙醇和 2-甲基丙醇的合成量。乙醇含量在各样品间的差异较小。

**2.3.3 醛酮类** 贵人香葡萄酒中还检测到了 2 种醛类化合物(丁醛、苯甲醛)和 3 种酮类(丙酮、2-戊酮、2,3-丁二酮)。苯甲醛具有苦杏仁气味<sup>[20]</sup>,在 M4 酒样中信号强度最高(618.388),分别是 M1、M2 和 M3 样品的 2.3、3.0 和 2.8 倍。2-戊酮具有果香味,丁二酮散发黄油味<sup>[20]</sup>,这两种酮类组分在 M1 样品中信号强度最高,可能使得 M1 风味更复杂。它们在 M2 和 M3 中含量差异较小,在 M4 中浓度最低。

**2.3.4 其它挥发组分** 除挥发性酯类、醇类、醛类、酮类物质以外,白葡萄酒中还检测出 2 种挥发酸类(乙酸、3-甲基丁酸)、3 种萜烯和杂环类物质( $\alpha$ -松油烯、苯乙烯、芳樟醇)和 2 种内酯类化合物( $\delta$ -辛内酯和  $\gamma$ -壬内酯)。乙酸是具有典型酸味的化合物,在 M4 样品中信号强度最高(4284.770),分别是 M1、M2 和 M3 样品的 2.6、3.4 和 4.1 倍。萜烯类和杂环类化合物会为葡萄酒带来一定程度的花香甜味和草木味<sup>[11]</sup>,富含这类化合物可能会赋予葡萄酒更加丰富的香气风格。与酿酒酵母单独发酵相比,戴尔有孢圆酵母—酿酒酵母混合发酵提升了  $\alpha$ -松油烯的含量(M2 样品),美极梅奇酵母—酿酒酵母混合发酵则增加了芳樟醇的合成量(M1 样品)。 $\alpha$ -松油烯和芳樟醇分别具有柠檬、铃兰气味<sup>[9,21]</sup>,可能增强上述两种葡萄酒的果香或花香,增强其风味特征。

## 2.4 主成分分析

为了进一步了解混合发酵对白葡萄酒中香气成

分的变化,对其进行主成分分析(PCA)。由图 4 可得,PC1 和 PC2 对总方差的解释率分别为 52.3% 和 37.5%,该两个主成分对初始数据总方差的解释率为 89.8%,能体现葡萄酒的香气成分信息。

酒样 M1 位于载荷图中的第一象限,并与 PC1 和 PC2 正向端含量较高的相关变量有关,包括己酸乙酯、异丁酸乙酯、异戊酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、庚酸乙酯、乙酸己酯、 $\gamma$ -壬内酯、 $\delta$ -辛内酯、己醇、丁醇、3-甲基丁醇、2-戊酮、2,3-丁二酮、芳樟醇。酒样 M2 和 M3 比较类似,分布在第四象限,与 PC2 负向端含量较高的辛酸乙酯、乙酸丙酯、丙酸乙酯、 $\alpha$ -松油烯、丙酮、丙醇有关。M4 与其它酒样的香气成分含量差异较大,位于第三象限,与 PC1 负向端含量较高的甲酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、乙酸、3-甲基丁酸、苯甲醛、苯乙烯有关。

## 2.5 香气感官质量分析

虽然采用 HS-GC-IMS 对不同混合发酵模式的贵人香白葡萄酒挥发性成分进行了检测分析,但其结果不能完全体现出酒体的整体香气质量,因此由一个训练有素的 15 人小组对酒体香气进行感官评估分析,评价样品的香气特征,包括果香、花香、植物香、蜂蜜、化学味及整体香气,结果如图 5 所示。

酒样 M1 具有浓郁的果香,中等强度的花香,以及一定强度的蜂蜜、植物和化学味,整体香气质量得分最高。酒样 M2 和 M3 的香气质量的评分结果比

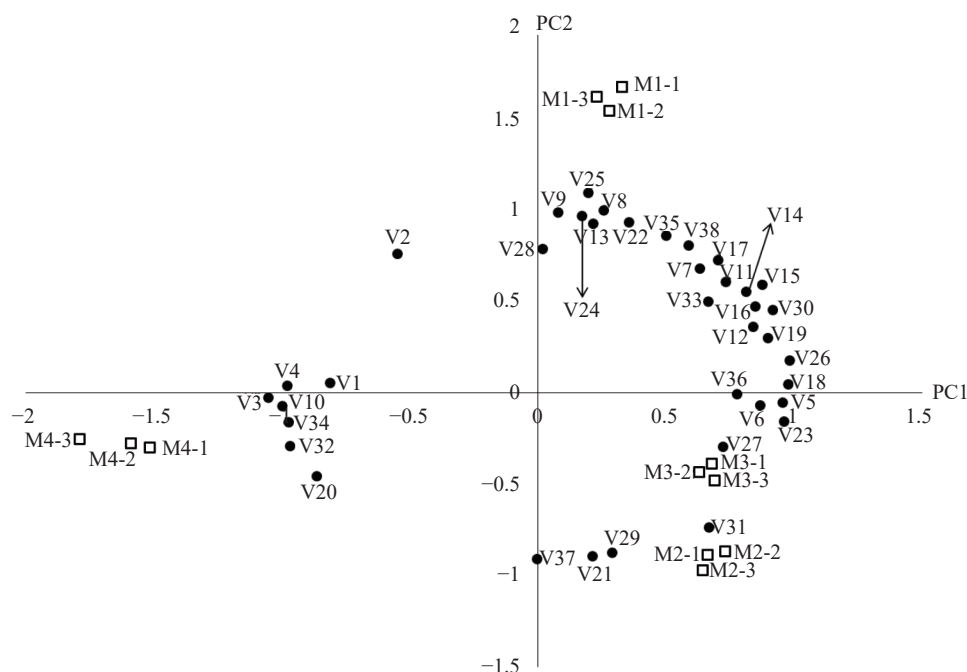


图 4 贵人香白葡萄酒 PCA 分类结果及与香气组分的对应关系

Fig.4 PCA score plots of Italian Riesling white wines resulting from different fermentations and corresponding loadings of volatile variables.

注: V1: 3-甲基丁酸, V2: 芳樟醇, V3: 苯甲醛, V4: 乙酸, V5: 辛酸乙酯-M, V6: 辛酸乙酯-D, V7: 1-己醇-M, V8: 1-己醇-D, V9:  $\gamma$ -壬内酯, V10: 乳酸乙酯, V11: 庚酸乙酯, V12: 己酸丙酯, V13: 乙酸己酯, V14:  $\delta$ -辛内酯, V15: 己酸乙酯, V16: 3-甲基丁醇, V17: 丁醇, V18: 乙酸异戊酯, V19: 2-甲基丙醇, V20: 苯乙烯, V21:  $\alpha$ -松油烯, V22: 异戊酸乙酯-D, V23: 异戊酸乙酯-M, V24: 2-甲基丁酸乙酯-M, V25: 2-甲基丁酸乙酯-D, V26: 丁酸乙酯, V27: 乙酸异丁酯, V28: 2-戊酮, V29: 乙酸丙酯, V30: 异丁酸乙酯, V31: 丙酸乙酯, V32: 乙酸乙酯, V33: 乙醇, V34: 甲酸乙酯, V35: 丁醛, V36: 丙酮, V37: 丙醇, V38: 2,3-丁二酮。



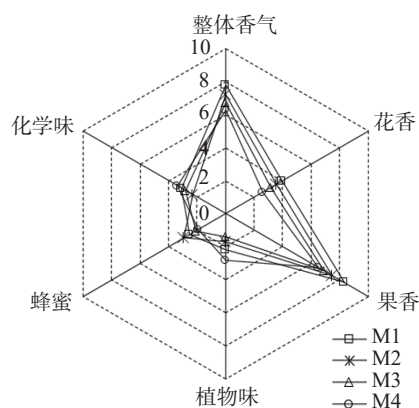


图5 贵人香白葡萄酒香气品质定量分析结果

Fig.5 Average values of sensory evaluation scores of Italian Riesling white wines resulting from different fermentations.

较相似,果香、花香的评分值是分别为 M1 的 83.1%~90.4%、84.9%~89.8%,但以上两种属性的评分 M2 均高于 M3,而 M3 的化学味强度高于 M2。M4 在花香和果香属性上的得分都低于其他三个酒样,植物味和化学味评分均最高,整体香气得分最低。

### 3 讨论

#### 3.1 混合发酵对酵母细胞增殖的影响

在混菌发酵的环境中,非酿酒酵母和酿酒酵母的共生可能会有多种表现,如相互促进、互不干扰或产生抑制。在本文研究的混合发酵组合中,戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母能够更好地与酿酒酵母共存,其自身的增殖未受到明显影响,在发酵结束时两种非酿酒酵母在各自发酵环境中的活细胞数仍然达到  $6.31 \times 10^7$  和  $9.77 \times 10^6$  CFU/mL。据文献报道,该两类非酿酒酵母均属于温和发酵型酵母<sup>[11]</sup>,增殖速率较慢,与酿酒酵母协同发酵时容易被酿酒酵母抑制,但某些菌株能够分泌杀同环境中其它微生物的分泌物,以保障自身的优势存活<sup>[22-23]</sup>。在本研究中戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母在混合发酵葡萄酒环境中的增殖均未见明显抑制作用,可能也是上述原因所致。与以上结果形成鲜明对比的是 M1 样品,美极梅奇酵母的增殖被酿酒酵母显著抑制,前者在发酵结束时的活细胞数仅为其峰值时的 0.9%。该研究结果与 Alexandre 团队<sup>[24]</sup>和 Sun 等<sup>[25]</sup>比较一致,这可能与酿酒酵母分泌的某些针对美极梅奇酵母生长有关的杀杀毒素或代谢物有关,使其在与酿酒酵母竞争的生长环境中处于劣势,活细胞数迅速下降。

#### 3.2 混合发酵对基本理化指标的影响

本研究测试了三种非酿酒酵母与酿酒酵母混合发酵对白葡萄酒基本组成的影响,发现与酿酒酵母单独发酵相比,混合发酵明显降低了酒体的酒精浓度。之所以出现上述结果,与它们利用糖类合成酒精的能力不及酿酒酵母有关<sup>[26]</sup>。而挥发酸浓度下降则与所用酿造菌种低产乙酸的能力有关,虽然较早的研究一度认为发酵时混入非酿酒酵母是造成葡萄酒品质低劣的主要原因,但随着研究的逐步深入,研究者和酿

酒师发现在酿造实践中非酿酒酵母能够改善葡萄酒的风味物质组成,如增加挥发性酯类含量,降低乙酸含量,从而改善产品的整体品质<sup>[11,27]</sup>。再者,利用 GC-IMS 获得的挥发性物质数据也能说明该问题, M1、M2 和 M3 酒样中的乙酸信号强度显著低于 M4,说明混合发酵在一定程度上限制了乙酸的合成。本文中所测试的三种商业化非酿酒酵母,即美极梅奇酵母、戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母均属于低产乙酸的菌株,对提高白葡萄酒的品质具有积极作用。

#### 3.3 混合发酵对挥发性组分的影响

挥发性香气化合物的种类、含量及相互作用是形成葡萄酒香气特征的化学基础,因此对挥发性组分进行有效分析是阐明葡萄酒香气特征的前提。本研究运用 GC-IMS 技术分析不同葡萄酒的挥发性香气指纹图谱,通过信号峰的数量和信号强度进而综合判断不同混合发酵模式对葡萄酒香气化合物的影响和差异。

近年来非酿酒酵母引起广泛关注的一个重要原因是其对葡萄酒香气的积极影响,有望增加多种有益挥发性物质的含量,如酯类、醇类、萜烯、硫醇等,从而提升果酒的香气复杂性和品种特异性<sup>[4,11]</sup>。以本研究中涉及的三种非酿酒酵母为例,据报道,戴尔有孢圆酵母和酿酒酵母混合发酵能够在一定程度上降低葡萄酒中乙醛、乙酸和部分高级醇的生成量,增加乳酸乙酯、己酸乙酯等乙酯类化合物浓度,并能释放较高浓度的萜烯<sup>[11]</sup>。但也有文献指出戴尔有孢圆酵母对葡萄酒香气无影响甚至有负面作用,可能与菌株特异性和发酵条件特异性等有关<sup>[4]</sup>。据研究,美极梅奇酵母与酿酒酵母混合接种时可以增加酯类、萜烯、中链脂肪酸和高级醇产量,提高葡萄酒中的果香特征和总体得分<sup>[28]</sup>。利用耐热克鲁维酵母作为产香酵母与酿酒酵母实施混合发酵时可以提高萜烯、异丁酸等挥发性组分的生成量,同时减少乙酸、乙醛等物质的合成<sup>[11,29]</sup>。

从本研究获得的实验结果来看,较之酿酒酵母单独发酵,接种戴尔有孢圆酵母的葡萄酒提升了丙酸乙酯、乙酸异丁酯、乙酸异戊酯、异丁酸乙酯、辛酸乙酯、己酸乙酯、 $\delta$ -辛内酯、2,3-丁二酮、 $\alpha$ -松油烯等多种酯类、酮类化合物的含量,但是对萜烯类化合物的释放程度低于酿酒酵母单独发酵。萜烯类物质一般都具有果香花香特征,多以非挥发性糖苷结合态存在,只有降解成挥发性游离态时才能增强感官香气。本研究中测试的商业化戴尔有孢圆酵母适应葡萄酒发酵环境时可能未完全激活其  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性,所以未能将萜烯类前体物质进行彻底分解<sup>[30]</sup>。M3 样品的检测结果与 M2 具有一定的相似性,因此在主成分分析时二者位于同一象限,距离接近。接种美极梅奇酵母的葡萄酒则全面提升了挥发性酯类、醇类、醛酮类的含量,多种具有花香、果香、品种香的化合物均在 M1 样品中信号强度最大,如异丁酸乙酯、乙

酸异丁酯、2-甲基丁酸乙酯、己酸乙酯、 $\delta$ -辛内酯、乙酸己酯、己酸丙酯、庚酸乙酯、3-甲基丁醇、己醇、2-戊酮、2,3-丁二酮、芳樟醇等。不同非酿酒酵母的生理活性及代谢过程不同,对风味物质的影响也不同<sup>[1]</sup>。本研究中 M1 酒样中挥发性芳香化合物的强度最高,说明该商业化美极梅奇酵母虽然不能完全适应与酿酒酵母共存的葡萄酒发酵环境,但能仍高效合成与香气合成有关的酶类,如酯酶、脂肪酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶等,因此能较充分的分解多种香气前体物质,从而生成较多的芳香化合物<sup>[31]</sup>。

### 3.4 白葡萄酒感官评定与香气组分之间的关系

香气感官质量分析结果表明非酿酒酵母-酿酒酵母混合发酵对提升葡萄酒的香气品质贡献较大,因为混合发酵葡萄酒的评分均高于酿酒酵母单独发酵。M1 贵人香白葡萄酒总体评分最高, M2 次之,其次是 M3,得分最低的是 M4。品评结果与本实验中 GC-IMS 挥发性组分测定结果基本符合, M1 生成了丰富的酯类和萜烯类化合物,如己酸乙酯、异丁酸乙酯、异戊酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、 $\gamma$ -壬内酯、 $\delta$ -辛内酯、芳樟醇,以上这些挥发性化合物具有多样的水果香气和花香<sup>[1]</sup>,因而能够赋予 M1 酒样更浓郁的上述两种属性。M2 和 M3 样品中大多数化合物的信号强度低于 M1,所以在多个香气属性上的评分均低于 M1。M4 样品中含有较高浓度的乙酸异丁酯、乙酸、丙酮等具有溶剂气味的挥发性组分<sup>[1]</sup>,因此化学味最为强烈,造成其总体香气得分较低。

## 4 结论

本研究比较三种商业化非酿酒酵母,即戴尔有孢圆酵母、美极梅奇酵母和耐热克鲁维酵母分别与酿酒酵母混合发酵对贵人香白葡萄酒品质的影响,特别是对发酵进程、挥发性组分含量和香气质量的影响。研究结果显示,在混合发酵过程中,美极梅奇酵母易被酿酒酵母所抑制,最大活细胞数仅有酿酒酵母的 16.6%;而其它两种产香酵母则能与酿酒酵母良好共存。就挥发性组分而言,美极梅奇酵母能够增加贵人香白葡萄酒中多种与花香、果香有关的挥发性酯类、萜烯类化合物的合成量,如己酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、芳樟醇等,显著提高了产品的感官品质。戴尔有孢圆酵母和耐热克鲁维酵母对白葡萄酒的香气品质提高也有贡献,增强了产品的复杂性,整体香气得分分列第 2 和第 3 位。本研究对指导白葡萄酒及其他果酒的酿造生产具有重要的理论价值和借鉴意义,也凸显了根据发酵目的合理选择酿造微生物的重要性。

### 参考文献

[1] FENG Y, LIU M, OUYANG Y, et al. Comparative study of aromatic compounds in fruit wines from raspberry, strawberry, and mulberry in central Shaanxi area[J]. Food & Nutrition Research, 2015, 59(1): 29290.

[2] BEN A N, GARGOURI M. Microbial and enzymatic tech-

nologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses[J]. Food and Bioprocesses, 2015, 94: 675-706.

[3] SUN S Y, CHE C Y, SUN T F, et al. Evaluation of sequential inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on the chemical and aromatic profiles of cherry wines[J]. Food Chemistry, 2013, 138(4): 2233-2241.

[4] 战吉宸, 曹梦竹, 游义琳等. 非酿酒酵母在葡萄酒酿造中的应用[J]. 中国农业科学, 2020, 53(19): 4057-4069. [ZHAN Jicheng, CAO Mengzhu, YOU Yilin, et al. Research advance on the application of non-*Saccharomyces* in winemaking[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(19): 4057-4069.]

[5] 谭凤玲, 王宝石, 胡培霞等. 非酿酒酵母在葡萄酒混菌发酵中的应用及其挑战[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(22): 282-286. [TAN Fengling, WANG Baoshi, HU Peixia, et al. Application and challenge of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast in the mixed fermentation of fruit wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(22): 282-286.]

[6] AZZOLINI M, TOSI E, LORENZINI M, et al. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(2): 277-293.

[7] CAPOZZI V, BERBEGAL C, TUFARIELLO M, et al. Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni* autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations[J]. LWT, 2019, 109: 241-249.

[8] ENGLEZOS V, TORCHIO F, CRAVERO F, et al. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. LWT, 2016, 73: 567-575.

[9] KONG C L, LI A H, SU J, et al. Flavor modification of dry red wine from Chinese spine grape by mixed fermentation with *Pichia fermentans* and *S. cerevisiae*[J]. LWT, 2019, 109: 83-92.

[10] HRANILOVIC A, GAMBETTA J M, JEFFERY D W, et al. Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 329: 108651.

[11] CIANI M, COMITINI F. Yeast interactions in multi-starter wine fermentation[J]. Current Opinion in Food Science, 2015, 1: 1-6.

[12] WHITENER M E B, STANSTRUP J, CARLIN S, et al. Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2017, 23(2): 179-192.

[13] WANG S, CHEN H, SUN B. Recent progress in food flavor analysis using gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS)[J]. Food Chemistry, 2020, 315 126158.

[14] GU S, ZHANG J, WANG J, et al. Recent development of HS-GC-IMS technology in rapid and non-destructive detection of quality and contamination in agri-food products[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021, 144: 116435.

[15] LI H, JIANG D, LIU W, et al. Comparison of fermentation behaviors and properties of raspberry wines by spontaneous and

controlled alcoholic fermentations[J]. *Food Research International*, 2020, 128: 108801.

[16] LIU W, LI H, JIANG D, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and malolactic fermentation on fermentation kinetics and sensory property of black raspberry wines[J]. *Food Microbiology*, 2020, 91: 103551.

[17] LI H, TAO Y S, WANG H, et al. Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China)[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(1): 287–292.

[18] CAPONE S, TUFARIELLO M, SICILIANO P. Analytical characterisation of Negroamaro red wines by "Aroma Wheels"[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2906–2915.

[19] 原苗苗, 姜凯凯, 孙玉霞等. 戴尔有孢圆酵母对葡萄酒香气的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 99–105. [YUAN Miaomiao, JIANG Kaikai, SUN Yuxia, et al. Effects of *Torulaspora delbrueckii* on wine aroma[J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 99–105.]

[20] GONZÁLEZ Á M, GONZÁLEZ-BARREIRO C, CANCHO-GRANDE B, et al. Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(3): 890–898.

[21] SIEBERT T E, BARTER S R, DE BARROS LOPES M A, et al. Investigation of 'stone fruit' aroma in Chardonnay, Viognier and botrytis Semillon wines[J]. *Food Chemistry*, 2018, 256: 286–296.

[22] VILLALBA M L, SUSANA SÁEZ J, DEL MONACO S, et al. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 217: 94–100.

[23] PORTER T J, DIVOL B, SETATI M E. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance[J]. *Food Research International*, 2019, 119: 378–389.

[24] SADOUDI M, TOURDOT-MARÉCHAL R, ROUSSEAU S, et al. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analy-

sis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts[J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(2): 243–253.

[25] SUN S Y, GONG H S, JIANG X M, et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines[J]. *Food Microbiology*, 2014, 44: 15–23.

[26] CIANI M, MORALES P, COMITINI F, et al. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(642): 555.

[27] LAI Y T, HSIEH C W, LO Y C, et al. Isolation and identification of aroma-producing non-*Saccharomyces* yeast strains and the enological characteristic comparison in wine making[J]. *LWT*, 2022, 154: 112653.

[28] VARELA C, BARKER A, TRAN T, et al. Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 252: 1–9.

[29] HRANILOVIC A, ALBERTIN W, CAPONE D L, et al. Impact of *Lachancea thermotolerans* on chemical composition and sensory profiles of Merlot wines[J]. *Food Chemistry*, 2021, 349: 129015.

[30] TONDINI F, LANG T, CHEN L, et al. Linking gene expression and oenological traits: Comparison between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 294: 42–49.

[31] WINDHOLTZ S, REDON P, LACAMPAGNE S, et al. Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide[J]. *LWT*, 2021, 149: 111781.