

优良本土酿酒酵母的酿造特性研究

刘沛通¹, 丁子元¹, 于庆泉², 范佳硕¹, 乔岩², 王海绮², 郑晓卫^{1*}

¹中粮营养健康研究院有限公司 北京 102209

²中粮长城桑干酒庄(怀来)有限公司 河北张家口 075499)

摘要 开发优良的本土酵母对充分发挥我国葡萄酒的风土特征,改变国外商业酵母垄断的局面具有重要意义。本研究通过小试发酵从 11 株本土酵母中筛选出 2 株发酵和产香性能良好的本土酵母 60258 和 60268,应用 2 个品种的葡萄(白葡萄品种“雷司令”和红葡萄品种“西拉”)进行中试酿造。结果表明:60258 可以稳定的高产酯类物质,在“雷司令”和“西拉”中的乙酸酯总量分别是商业酵母的 3 倍和 1.6 倍,其乙酯产量是商业酵母乙酯总量的近 2 倍,可以显著提升葡萄酒的花香和果香风味特征;60268 可以高产甘油,更适合提升红葡萄品种的香气品质。2 株酵母在实际生产中具有较大的应用前景。

关键词 本土酵母;酿酒酵母;葡萄酒;酯类物质;酿造特性

文章编号 1009-7848(2023)01-0204-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.020

酵母菌是葡萄酒发酵中的核心微生物,代谢葡萄中的糖生成酒精,同时产生多种风味物质,影响葡萄酒的香气和口感^[1]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是参与葡萄酒酒精发酵的核心酵母菌^[2],在发酵过程中可以代谢合成醇类、酸类、酯类、醛类、萜烯类等多种风味物质,构成了葡萄酒的主要香气风格,为葡萄酒带来独特而又复杂的风味^[3]。醇类物质主要包括己醇、苯乙醇、异戊醇等高级醇,含量适中(<400 mg/L)的高级醇可增加葡萄酒香气的复杂性^[4]。乙酸酯类和乙酯类物质是葡萄酒中主要的酯类化合物,前者包括乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯等,后者包括己酸乙酯、辛酸乙酯等,为葡萄酒带来果香、花香等愉快的风味^[5]。挥发性脂肪酸以己酸、辛酸、癸酸等为主,可保持葡萄酒的平衡感,增加葡萄酒的香气复杂度^[4]。

近年来,“风土”成为表征葡萄酒产区特征的关键词。作为葡萄酒酿造中的关键微生物之一,产区本土酿酒酵母直接影响葡萄酒的风土特征^[6-7]。酿酒酵母在全世界不同葡萄酒产区具有显著的地理分化现象^[8-12],不同产区的酿酒酵母种群间表现出较高的遗传差异^[13]。如:Börlin 等^[6]研究发现,在同一产区的不同地块,酿酒酵母种群间也存在显

著的遗传差异。Schuller 等^[14]甚至在同一地块的不同取样点之间发现了酿酒酵母的遗传差异性。产区本土酿酒酵母会显著影响葡萄酒的香气风格和口感特性,不同遗传性状的本土酵母可以突出葡萄酒的产区风格,形成葡萄酒的风土特征^[15]。

当前,我国葡萄酒工厂普遍使用进口商业活性干酵母进行酿造生产。商业活性干酵母可以加强发酵过程控制,降低腐败风险,应对葡萄酒香气不可预测的变化。然而,研究表明,长期连续使用商业酵母,显著降低了葡萄酒的香气复杂性和本土菌株的多样性,极大削弱了葡萄酒的风土特征^[16-17]。本土酵母具有独特的区域特性^[18]。我国本土酵母资源丰富、种类繁多,是我国种业资源的重要部分,筛选和应用本土酵母有利于不同产区葡萄酒风格的表达,发挥我国葡萄酒产区的风土特征。本研究通过小试发酵、中试酿造评价本土酵母的发酵特性和产香特性,旨在获得性能优良的本土酵母,为提升本土葡萄酒的香气丰富度和复杂度,提高葡萄酒品质提供优良的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:“雷司令”葡萄(2020 年采收于河北沙城,还原糖 221.1 g/L)、“西拉”葡萄果实(2020 年采收于河北沙城,还原糖 238.0 g/L)。

试验菌株:11 株本土酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)筛选自 3 个不同葡萄酒产区的

收稿日期:2022-01-04

基金项目:中国博士后科学基金面上资助项目(2019M660956)

第一作者:刘沛通,女,博士生,工程师

通信作者:郑晓卫 E-mail: zhengxiaowei@cofco.com

自然发酵过程中,保藏于中粮营养健康研究院酒业技术中心(表 1)。

表 1 本土酿酒酵母分离来源

分离产区	来源葡萄	编号
河北	赤霞珠	60124
宁夏	赤霞珠	60177
宁夏	赤霞珠	60182
宁夏	赤霞珠	60196
山东	马瑟兰	60208
宁夏	赤霞珠	60244
宁夏	赤霞珠	60250
河北	赤霞珠	60258
宁夏	赤霞珠	60268
宁夏	赤霞珠	60276
山东	马瑟兰	60282

商业酿酒酵母(*S. cerevisiae*)VL2、商业酿酒酵母(*S. cerevisiae*)RX60,法国 Laffort 公司;商业酿酒酵母(*S. cerevisiae*)EC1118,法国 Lallemand 公司。

YPD 培养基(1 L):酵母浸粉 10 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,pH 6.0,115 °C 高压灭菌 20 min。

葡萄汁模拟培养基(1 L):葡萄糖 100 g,果糖 100 g,柠檬酸 0.3 g,L-苹果酸 0.3 g,酒石酸 3 g,一水合硫酸锰 4 mg,COCl₂·6H₂O 0.4 mg,一水合硫酸锌 4 mg,(NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O 1 mg,五水合硫酸铜 1 mg,硫酸铵 0.3 g,天冬酰胺 0.6 g,磷酸二氢钾 2 g,碘化钾 1 mg,硼酸 1 mg,肌醇 0.3 g,对氨基苯甲酸 1 mg,生物素 0.04 mg,维生素 B₁ 1 mg,维生素 B₆ 1 mg,泛酸 1 mg,烟酸 1 mg,pH 值调至 5.8,过滤除菌。

1.2 仪器与设备

安捷伦 1260 系列高效液相色谱仪、可变波长紫外检测器(G7114A)、示差折光检测器(G7162A)、8890-5977B 气相色谱-质谱联用仪,美国 Agilent 公司;T6 新世纪紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器公司;离子交换色谱柱 HPX-87H(300 mm×7.8 mm),美国 Bio-Rad Laboratories 公司;HP-INNOWAX (60 m×0.25 mm,0.25 μm)毛细管柱,美国 J&W Scientific 公司;二

乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷萃取头,美国 Supelco 公司;PAL-RSI85-SPME 自动进样器,瑞士 CTC Analytics 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化 取保藏菌株在 YPD 固体培养基上划线培养获得单菌落,挑取单菌落接种于 5 mL YPD 液体培养基中,28 °C,180 r/min 培养至对数中期。以 1%接种量转接于 200 mL YPD 液体培养基中,28 °C,180 r/min 培养至对数中期。

1.3.2 小试发酵试验 低温(4 °C)离心(8 000 r/min,10 min)收集菌体,经无菌水洗涤后以 10⁶ CFU/mL 接种于 300 mL 葡萄汁模拟培养基中,使用发酵栓液封,静置培养 10 d 左右(25 °C),至最终还原糖含量小于 4 g/L 即为发酵终点。在发酵过程中,测定菌体密度(OD_{600 nm})及发酵液还原糖含量以监测发酵进程^[19]。发酵结束后离心取上清葡萄酒,分别检测理化指标(3 mL 葡萄酒)及挥发性物质含量(15 mL 葡萄酒)。每个处理设置 3 个生物学重复。

1.3.3 中试酿造试验 分别使用“雷司令”葡萄和“西拉”葡萄在长城桑干酒庄中试平台进行 100 L 中试酿造试验。葡萄果实经过穗选、粒选后,“雷司令”葡萄轻度破碎,入气囊压榨机,取自流汁入发酵容器,澄清后分离清汁转至 100 L 发酵罐;“西拉”葡萄除梗、破碎后,加入 100 L 发酵罐进行 5 d 冷浸渍(10 °C),自然回温至 20 °C 左右,带皮发酵。

取保藏菌株和商业酵母在 YPD 固体培养基上划线培养获得单菌落,挑取单菌落接种于 5 mL YPD 液体培养基中,于 28 °C 下 180 r/min 培养至对数中期。以 1%接种量转接于 200 mL YPD 液体培养基中,于 28 °C 下 180 r/min 培养至对数中期,以 10⁶ CFU/mL 活菌数接种于 5 L 葡萄汁中,静置培养 24 h,温度回升至 22 °C 后,得到活化的本土酵母和商业酵母种子液。之后将其加入 100 L 发酵罐中启动发酵,“雷司令”发酵温度 14 °C 左右,“西拉”发酵温度 26~28 °C。发酵过程中监测温度和比重,发酵结束(还原糖质量浓度<4 g/L)后,取 20 mL 葡萄酒检测理化指标(3 mL 葡萄酒)及挥发性物质含量(15 mL 葡萄酒)。每个处理设置 3 个生物学重复。

1.3.4 葡萄酒理化指标分析 葡萄酒总酸、挥发

酸测定参考国标方法(GB/T 15038-2006)^[19]。

使用 0.22 μm 滤膜过滤发酵结束后的葡萄酒,使用高效液相色谱 1200 测定葡萄糖、果糖、甘油、乙醇及有机酸(乙酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸)含量^[20]。进样量 2 μL ,流动相为 5 mmol/L 的 H_2SO_4 溶液,离子交换色谱柱 HPX-87H(300 mm \times 7.8 mm),等度洗脱,流速 0.6 mL/min。

乙醇、果糖、葡萄糖、甘油使用示差折光检测器测定,柱温 45 $^\circ\text{C}$,分析时间 30 min;有机酸使用可变波长紫外检测器测定,柱温 60 $^\circ\text{C}$,分析时间 30 min。每个样品设置 2 个独立重复。

1.3.5 葡萄酒挥发性物质分析 参考 Lan 等^[21]的方法检测葡萄酒中的挥发性物质。使用 50/30 μm 二乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷萃取头萃取。15 mL 样品瓶中加入 1 g 氯化钠和 10 μL 内标(4-甲基-2-戊醇),将 5 mL 待测葡萄酒迅速加入样品瓶后拧紧密封。180 r/min 平衡 30 min (40 $^\circ\text{C}$),将已活化过的萃取头(270 $^\circ\text{C}$ 老化 1 h)插入样品瓶的顶空部分,搅拌萃取 30 min(40 $^\circ\text{C}$)后,将萃取头插入气相色谱-质谱进样口,热解吸 8 min(250 $^\circ\text{C}$),不分流进样。

用气相色谱和质谱联用仪检测葡萄酒中挥发性物质。具体条件为:使用 HP-INNOWAX 毛细管柱,高纯氦气作为载气,流速 1 mL/min。柱温箱按照以下升温程序运行:5 min(40 $^\circ\text{C}$)后以 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 200 $^\circ\text{C}$,保持 2 min。质谱接口温度为 280 $^\circ\text{C}$,离子源温度为 230 $^\circ\text{C}$,电离方式 EI,离

子能量 70 eV,质量扫描范围 20~450 u。每个样品设置 2 个独立重复。

对于已有标准品的物质,依据已建立的相同色谱条件下该化合物的保留时间、保留指数和质谱信息进行定性分析。使用化合物在模拟酒溶液中的标准曲线进行定量。

1.4 数据处理与分析

使用 Microsoft Excel 2013 作图。使用 SPSS 25.0 进行单因素方法分析(ANOVA),采用 Duncan 检验两两比较 ($P < 0.05$)。使用 <https://www.metaboanalyst.ca/>进行 PLSDA 分析^[22]。

2 结果与分析

2.1 本土酵母的小试发酵试验

分析 11 株本土酵母的小试发酵表现,检测其发酵葡萄酒的理化指标及挥发性物质,筛选发酵性能和产香性能良好的本土酵母。

2.1.1 酵母的生长及发酵特性 11 株本土酵母发酵结束时葡萄酒中残糖含量均小于 4 g/L,符合干型葡萄酒的标准^[19](表 2)。8 株本土酵母的最大生物量显著高于商业酵母。60250、60276 和 60282 的最大生物量显著低于商业酵母,且达到最大生物量的时间早于商业酵母。11 株本土酵母中,60177、60258 的最大生长速率最高,其中 60258 的最大发酵速率也最高,具有较强的生长发酵活力。

表 2 酒精发酵中不同酵母菌株生长及发酵动力学参数

Table 2 Growth and fermentation kinetic parameters of different yeasts during alcoholic fermentation

菌株	残糖/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	最大生物量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	达到最大生物量 的时间/h	最大生长速率/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	最大发酵速率/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
60124	0.26 \pm 0.01 ^e	8.05 \pm 0.32 ^{bc}	179	0.017	1.81
60177	0.25 \pm 0.01 ^e	7.92 \pm 0.21 ^c	179	0.019	1.79
60182	0.55 \pm 0.01 ^e	7.89 \pm 0.11 ^c	179	0.016	1.77
60196	0.2 \pm 0.01 ^e	7.95 \pm 0.16 ^c	179	0.015	1.87
60208	0.07 \pm 0.01 ^g	8.11 \pm 0.25 ^{ab}	179	0.015	1.85
60244	0.44 \pm 0.01 ^d	8.26 \pm 0.34 ^a	179	0.017	1.86
60250	1.14 \pm 0.02 ^b	7.55 \pm 0.33 ^c	155	0.011	1.75
60258	2.02 \pm 0.02 ^a	8.15 \pm 0.08 ^{ab}	179	0.019	1.94
60268	0.7 \pm 0.01 ^e	7.9 \pm 0.11 ^c	179	0.018	1.84
60276	0.66 \pm 0.01 ^e	7.42 \pm 0.21 ^c	155	0.012	1.77
60282	0.2 \pm 0.01 ^e	7.4 \pm 0.31 ^c	155	0.014	1.78
EC1118	0.13 \pm 0.01 ^f	7.71 \pm 0.13 ^d	179	0.017	1.78

注:数据为“平均值 \pm 标准差”;同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2.1.2 葡萄酒的理化指标 箱式图展示了不同酵母菌株发酵葡萄酒中乙醇、甘油和主要有机酸(乙酸、苹果酸、柠檬酸和琥珀酸)的含量分布(图 1)。11 株本土酵母和 1 株商业酵母的乙醇产量相似,从 9.18~9.52 g/L 不等。所有酵母的甘油产量均处于正常范围(5~14 g/L)^[4]。乙酸是葡萄酒中主要的挥发酸,各酵母的乙酸产量在 0.2~0.7 g/L,对葡萄酒香气有积极贡献^[23]。柠檬酸、苹果酸和琥珀酸是

葡萄酒中重要的非挥发性酸。柠檬酸在葡萄酒中的含量一般为 0.1~0.7 g/L^[4],12 种葡萄酒的柠檬酸含量处于正常范围。苹果酸的含量通常为 2~6.5 g/L^[24],60124 的苹果酸含量过高(7.75 g/L),其余 10 株本土酵母的苹果酸产量均在正常范围内。琥珀酸在葡萄酒中的含量通常为 0.5~1.5 g/L^[25],所有葡萄酒的琥珀酸含量均正常。

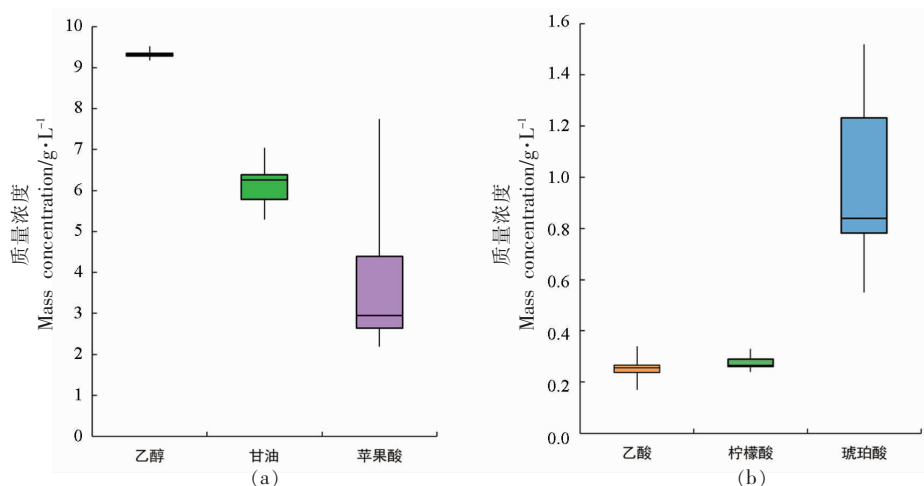


图 1 不同酵母菌株发酵葡萄酒的乙醇、甘油和主要有机酸含量箱式图

Fig.1 Boxplots of the concentration of ethanol, glycerol and main organic acids in wines fermented with different yeast strains

2.1.3 挥发性物质含量 测定酒精发酵结束时葡萄酒中的挥发性物质,共检测到 20 种香气物质,包括 6 种高级醇,9 种酯类,3 种挥发性脂肪酸和 1 种萜烯类物质。基于挥发性物质的聚类分析,根据酵母的香气风格可以分为 2 个大类(图 2)。

Cluster1 类物质主要由乙酯类物质(乙酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯)、乙酸酯类物质(乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯)、其它酯类物质(癸酸异戊酯、辛酸异戊酯)、高级醇(异丁醇、异戊醇)和萜烯类物质(香茅醇)组成。60258 和 60268 的 Cluster1 类物质含量显著高于其余本土酵母和商业酵母。

Cluster2 类物质主要包括高级醇(丁醇、辛醇、癸醇)和挥发性脂肪酸(己酸、辛酸、癸酸、异戊酸)。与商业酵母和其它本土酵母相比,60124 和 60250 的 Cluster2 类物质含量较高。

根据挥发性物质的香气特征,将主要的呈香物质整理为 6 个香气类型,即果香、花香、脂肪味、

化学味、生青味和焦糖味^[26]。将气味相似的呈香物质香气值累加到一起后,得到不同酵母发酵葡萄酒的特征香气雷达图(图 3)。

本土酵母 60258、60250、60268、60282、60244 等 10 株本土酵母的花香果香得分高于商业酵母,而 60250 的脂肪味得分较高,会给葡萄酒带来不愉悦的风味。综合评价,60268、60258 的花香果香得分高,且不良风味较少;挥发性物质分析也表明其高产酯类物质(图 2),具有发酵优良葡萄酒的潜力,可进行下一步的中试酿造试验。

2.2 优选本土酵母的中试酿造试验

研究 60258 和 60268 在白葡萄品种“雷司令”和红葡萄品种“西拉”中的发酵和产香特性。

2.2.1 酵母的生长及发酵特性 分别监测“雷司令”和“西拉”发酵中的比重,可以看出,本土酵母 60258、60268 均可正常完成发酵(图 4)。在“雷司令”发酵中,60258、60268 与商业酵母的发酵趋势基本一致;在“西拉”发酵中,发酵初期 60268 的发

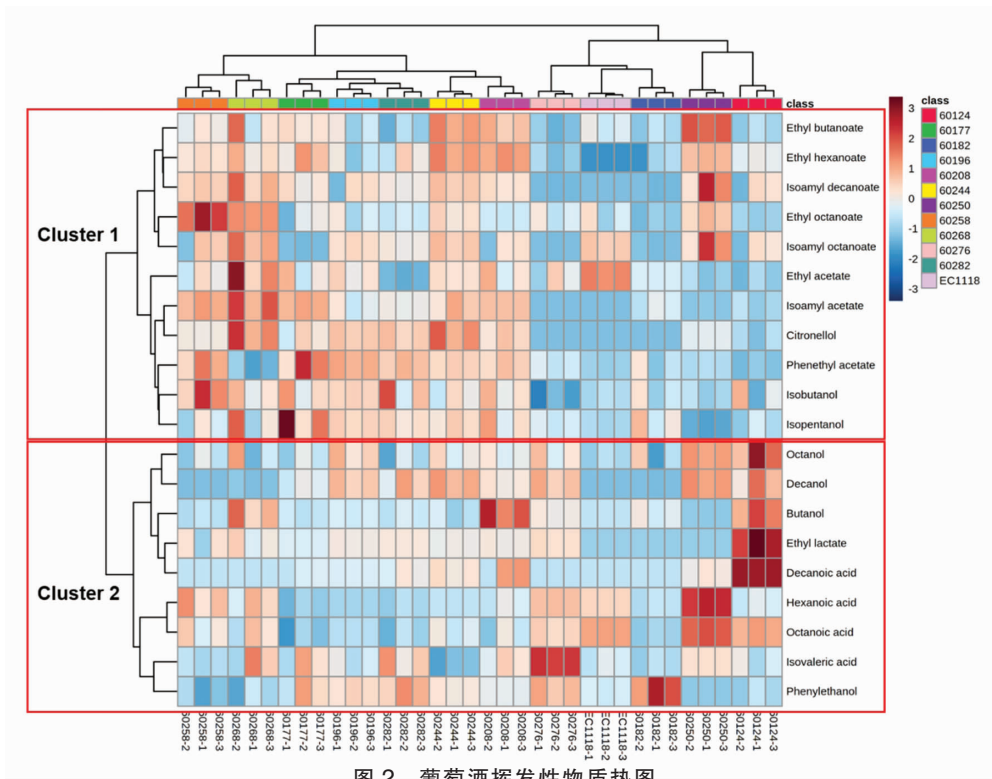


图2 葡萄酒挥发性物质热图

Fig.2 The heatmap of volatile compounds in wines

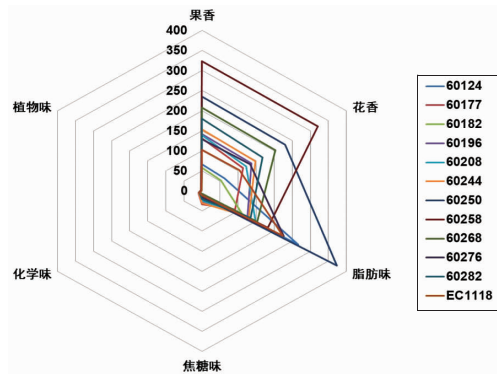
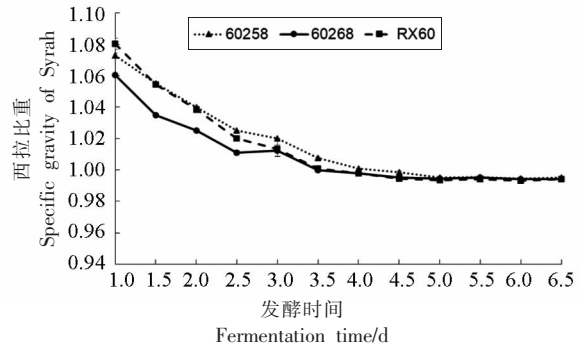
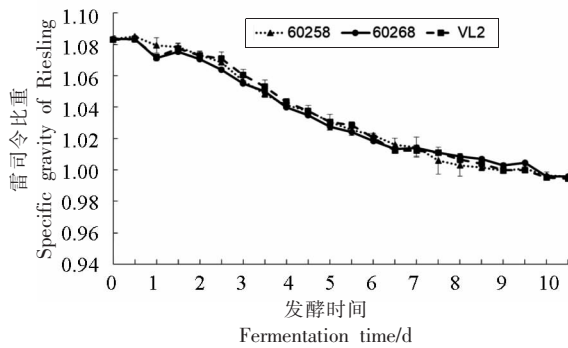


图3 基于香气活性值的葡萄酒香气雷达图

Fig.3 Aromatic series of wines based on OAVs



(a) (b)

图4 “雷司令”(a)和“西拉”(b)发酵过程中的比重变化

Fig.4 Specific gravity of Riesling (a) and Syrah (b) during fermentation

表 3 葡萄酒理化指标
Table 3 Physicochemical parameters of wine

指标	雷司令			西拉		
	60258	60268	VL2	60258	60268	RX60
酒精(V/V)/%	10.5 ± 0.14 ^b	11.35 ± 0.21 ^a	11.45 ± 0.21 ^a	13.21 ± 0.06 ^{BC}	13.14 ± 0.10 ^C	13.34 ± 0.06 ^{AB}
总糖/g·L ⁻¹	3.05 ± 0.49 ^a	2.45 ± 0.07 ^a	3.85 ± 0.19 ^a	2.96 ± 0.12 ^A	2.66 ± 0.01 ^C	2.91 ± 0.07 ^B
总酸/g·L ⁻¹	7.05 ± 0.07 ^c	8.15 ± 0.07 ^a	7.75 ± 0.07 ^b	8.08 ± 0.11 ^A	8.29 ± 0.06 ^A	7.52 ± 0.35 ^B
挥发酸/g·L ⁻¹	0.10 ± 0.01 ^c	0.20 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^B	0.28 ± 0.01 ^A	0.23 ± 0.01 ^B
pH	3.31 ± 0.01 ^a	3.27 ± 0.11 ^b	3.27 ± 0.01 ^b	3.50 ± 0.01 ^B	3.51 ± 0.01 ^B	3.58 ± 0.02 ^A
甘油/g·L ⁻¹	5.30 ± 0.13 ^c	7.31 ± 0.04 ^a	5.96 ± 0.21 ^b	8.36 ± 0.03 ^B	9.31 ± 0.20 ^A	8.51 ± 0.38 ^B
柠檬酸/g·L ⁻¹	0.3 ± 0.01 ^b	0.34 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.02 ^{ab}	0.37 ± 0.03 ^A	0.39 ± 0.01 ^A	0.32 ± 0.01 ^B
苹果酸/g·L ⁻¹	3.45 ± 0.17 ^a	3.4 ± 0.14 ^a	3.01 ± 0.14 ^b	3.49 ± 0.08 ^A	3.54 ± 0.08 ^A	3.34 ± 0.08 ^B

注:数据为“平均值±标准差”;同行小写字母不同表示“雷司令”之间差异显著,大写字母不同表示“西拉”之间差异显著($P < 0.05$)。

酵速率显著高于 60258 和商业酵母,随着发酵时间的延长,3 株酵母的发酵速率趋于一致。

2.2.2 葡萄酒的理化指标 发酵结束后,本土酿酒酵母发酵的葡萄酒中还原糖含量均低于 4 g/L,完成发酵(表 3)。总酸、挥发酸等理化指标处于正常范围内^[9]。在“雷司令”葡萄酒中,60258 的酒精产量显著低于其余酵母,然而在“西拉”葡萄酒中并未存在该现象。与商业酵母相比,本土酿酒酵母 60268 发酵的“雷司令”和“西拉”葡萄酒的甘油产量较高,存在显著性差异。60258 和 60268 的苹果酸产量显著高于商业酵母,60268 的柠檬酸产量显著高于 60258 和商业酵母,在 2 个品种的葡萄酒中的表现一致。

2.2.3 葡萄酒挥发性物质分析 发酵结束后,从葡萄酒中共检测到 17 种挥发性物质,包括 4 种高级醇、10 种酯类和 3 种酸类物质(表 4)。

己醇和苯乙醇在“西拉”和“雷司令”葡萄酒中的含量超出了阈值(表 4)。在“雷司令”葡萄酒中,60258 的己醇产量显著高于其它 2 株酵母,苯乙醇产量也显著高于 60268。在“西拉”葡萄酒中,60258 的己醇和苯乙醇产量分别是商业酵母的 2.2 倍和 1.6 倍。60258 和 60268 在“西拉”葡萄酒中高产异戊醇,且含量超出阈值,显著高于商业酵母。其中 60258 的异戊醇含量是商业酵母的 1.97 倍。

“雷司令”和“西拉”葡萄酒中的乙酸乙酯、乙酸异戊酯和乙酸苯乙酯含量均高出阈值(表 4)。60258 在“雷司令”葡萄酒中的乙酸己酯含量超出

阈值,是商业酵母的 3.92 倍。60258 高产乙酸酯,其在“雷司令”、“西拉”葡萄酒中的乙酸酯产量均显著高于商业酵母。

“雷司令”和“西拉”葡萄酒中的己酸乙酯和辛酸乙酯均高于阈值(表 4)。60258 在雷司令中辛酸乙酯的产量是商业酵母的 1.8 倍,在“西拉”葡萄酒中是商业酵母的 1.7 倍。

己酸、辛酸和癸酸是在“雷司令”和“西拉”葡萄酒中的浓度均高于阈值(表 4)。在“雷司令”葡萄酒中,商业酵母的挥发性脂肪酸产量最高,在“西拉”葡萄酒中,60258 产生更多的挥发性脂肪酸。

为了进一步分析不同酵母对葡萄酒风格的影响,分别基于“雷司令”和“西拉”葡萄酒中的挥发性物质进行偏最小二乘分析(图 5、图 6)。由图可知,不同酵母发酵葡萄酒的风格有显著区分。在“雷司令”葡萄酒中,挥发性脂肪酸(辛酸、癸酸)和酯类物质(乙酸酯)是不同酵母间差异的主要挥发性物质。在“西拉”葡萄酒中,高级醇(辛醇、己醇、异戊醇)和酯类物质(辛酸乙酯)是造成酵母间差异的主要物质。整体而言,在“雷司令”葡萄酒中,本土酵母 60258、60268 可产生较高浓度的总酯、乙酸酯等;在“西拉”葡萄酒中,本土酵母 60258、60268 可产生较高浓度的酯类物质(辛酸乙酯、乙酸异戊酯等)。

根据挥发性物质的香气特征,将主要的呈香物质整理为 6 个香气类型,将气味相似的呈香物质香气值累加到一起后,得到不同酵母发酵葡萄

表4 酒精发酵结束后“雷司令”和“西拉”葡萄酒中的挥发性物质含量

质量浓度/mg·L ⁻¹	雷司令			西拉			阈值/ mg·L ⁻¹	香气 分类	参考 文献
	60258	60268	VL2	60258	60268	RX60			
高级醇									
乙醇	3.6 ± 0.38 ^a	2.42 ± 0.08 ^b	2.61 ± 0.06 ^b	10.81 ± 0.53 ^A	5.24 ± 0.18 ^B	4.9 ± 0.24 ^B	1.1	3	[27]
1-辛醇	0.69 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.01 ^c	0.48 ± 0.1 ^b	1.47 ± 0.06 ^A	0.79 ± 0.03 ^B	0.51 ± 0.09 ^C	0.8	2	[28]
2-苯乙醇	267.33 ± 27.12 ^a	151.16 ± 10.36 ^b	292.19 ± 13.01 ^a	259.15 ± 4.83 ^A	267.39 ± 10.67 ^A	224.11 ± 26.56 ^B	10	2	[29]
异戊醇	29.14 ± 0.6 ^c	29.72 ± 1.08 ^c	40.17 ± 0.3 ^a	102.31 ± 5.46 ^A	64.6 ± 8.73 ^B	52.06 ± 5.53 ^C	60	4, 5, 6	[27]
高级醇总量	300.76 ± 26.88 ^b	183.64 ± 11.53 ^c	335.46 ± 12.88 ^a	373.74 ± 0.04 ^A	338.02 ± 2.15 ^B	281.59 ± 32.42 ^C			
乙酸酯									
乙酸乙酯	22.26 ± 0.39 ^a	7.87 ± 0.03 ^b	7.75 ± 0.61 ^b	38.8 ± 0.86 ^A	18.01 ± 2.82 ^B	25.86 ± 0.86 ^C	7.5	1, 5	[29]
乙酸己酯	4.67 ± 0.35 ^a	1.48 ± 0.06 ^b	1.19 ± 0.19 ^b	1.45 ± 0.44 ^A	0.75 ± 0.06 ^B	1.07 ± 0.13 ^{AB}	1.5	1, 2	[27]
乙酸异戊酯	4.71 ± 0.71 ^a	2.15 ± 0.03 ^b	2.55 ± 0.06 ^b	11.07 ± 1.07 ^A	7.36 ± 1.28 ^B	9.38 ± 0.8 ^A	0.16	1	[30]
2-乙酸苯乙酯	14.63 ± 0.01 ^a	3.31 ± 0.12 ^b	3.8 ± 0.11 ^c	33.17 ± 1.69 ^A	12.68 ± 1.25 ^B	17.17 ± 0.78 ^C	0.25	1, 2, 4	[29]
乙酸酯总量	46.27 ± 1.44 ^a	14.81 ± 0.07 ^b	15.29 ± 0.62 ^b	84.49 ± 0.68 ^A	38.8 ± 2.73 ^C	53.48 ± 0.85 ^B			
乙酯									
己酸乙酯	4.29 ± 0.15 ^a	1.51 ± 0.1 ^c	1.93 ± 0.24 ^b	3.12 ± 0.3 ^A	2.73 ± 0.02 ^B	2.29 ± 0.03 ^C	0.08	1	[30]
辛酸乙酯	10.26 ± 0.96 ^c	4.17 ± 0.1 ^c	5.83 ± 0.39 ^b	7.62 ± 0.06 ^A	5.1 ± 0.21 ^B	4.54 ± 0.18 ^C	0.002	1, 2	[29]
十二酸乙酯	0.27 ± 0.01 ^a	0.1 ± 0.01 ^c	0.17 ± 0.01 ^b	0.26 ± 0.15 ^A	0.17 ± 0.03 ^A	0.13 ± 0.02 ^A	1.5	1, 6	[31]
乙酯总量	14.82 ± 0.82 ^a	5.78 ± 0.19 ^b	7.93 ± 0.61 ^c	11 ± 0.51 ^A	8 ± 0.22 ^B	6.97 ± 0.14 ^C			
其它酯类									
己酸异戊酯	0.4 ± 0.25 ^c	0.68 ± 0.03 ^{ab}	0.93 ± 0.09 ^a	0.11 ± 0.01 ^A	0.23 ± 0.23 ^A	0.29 ± 0.29 ^A			
辛酸异戊酯	0.06 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0 ^b	0.06 ± 0 ^a	0.05 ± 0.02 ^A	0.04 ± 0 ^A	0.03 ± 0.01 ^A	0.125	1, 4, 6	[32]
癸酸异戊酯	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0 ^b	0.02 ± 0 ^b	0.02 ± 0.01 ^A	0.01 ± 0 ^{AB}	0.01 ± 0.00 ^B			
酯类总量	61.57 ± 2 ^a	21.32 ± 0.15 ^b	24.22 ± 1.33 ^c	95.56 ± 1.23 ^A	47.15 ± 2.74 ^C	60.87 ± 1.3 ^B			
挥发性脂肪酸									
己酸	120.89 ± 7.19 ^a	73.25 ± 1.42 ^b	115.82 ± 12.27 ^a	138.53 ± 3.94 ^A	96.68 ± 5.2 ^B	88.42 ± 2.79 ^{BC}	0.42	6	[30]
辛酸	659.71 ± 39.44 ^a	396.84 ± 25.66 ^b	746.82 ± 18.93 ^d	322.88 ± 5.73 ^A	287.57 ± 2.5 ^B	258.94 ± 6.75 ^C	0.5	6	[30]
癸酸	105.2 ± 5.04 ^a	55.44 ± 5.38 ^b	67.33 ± 0.12 ^b	20.9 ± 0.67 ^A	19.49 ± 4.51 ^{AB}	12.98 ± 0.58 ^C	1	6	[30]
挥发性脂肪酸总量	885.8 ± 27.22 ^a	525.54 ± 29.63 ^b	929.97 ± 6.54 ^b	482.32 ± 9 ^A	403.74 ± 1.81 ^B	360.34 ± 8.96 ^C			

注:加粗物质表示其含量高于阈值。数据为“平均值±标准差”;同行小写字母不同表示“雷司令”之间差异显著,大写字母不同表示“西拉”之间差异显著($P < 0.05$)。对该化合物按照香气类别进行分组,1=果香(Fruity),2=花香(Floral),3=植物味(Herbaceous),4=焦糖味(Caramel),5=化学味(Chemical),6=脂肪味(Fatty)。

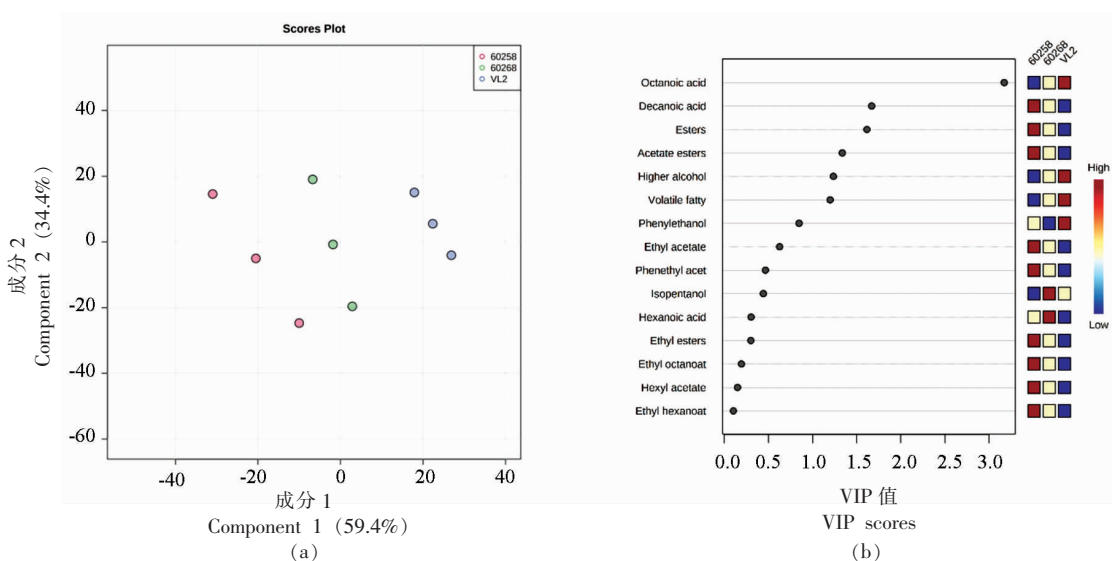


图 5 基于“雷司令”葡萄酒挥发性物质的偏最小二乘判别分析

Fig.5 Partial least squares – discriminant analysis (PLS-DA) based on the volatile compounds in the Riesling wine

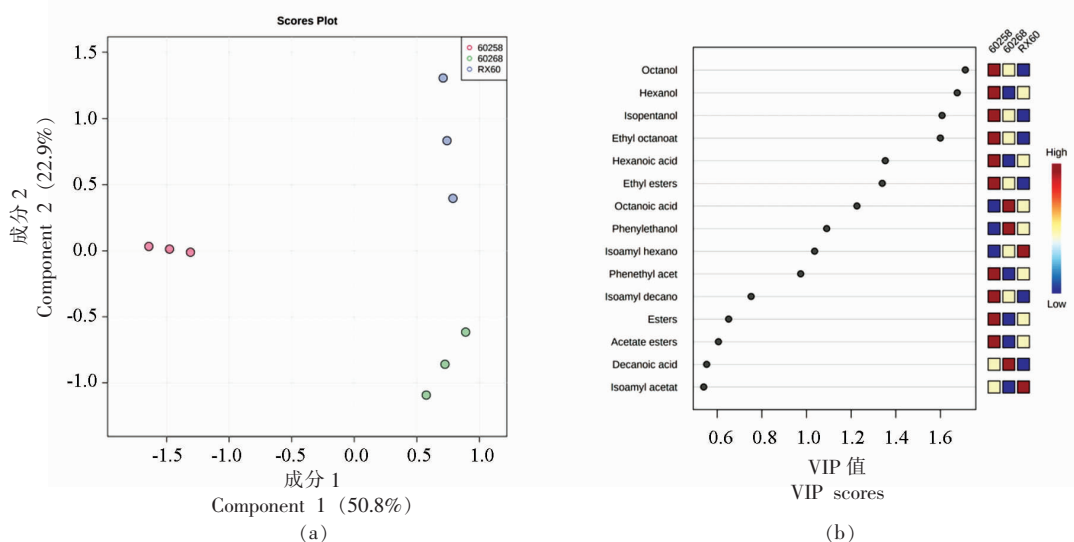


图 6 基于“西拉”葡萄酒挥发性物质的偏最小二乘判别分析

Fig.6 Partial least squares–discriminant analysis (PLS-DA) based on the volatile compounds in the Syrah wine

酒的特征香气雷达图(图 7)。在“雷司令”葡萄酒中(图 7a),本土酵母 60258 果香和花香较强,脂肪味较弱。而本土酵母 60268 的果香和花香均弱于商业酵母。在“西拉”葡萄酒中(图 7b),本土酵母 60258、60268 果香和花香较强,优于商业酵母。

3 讨论

葡萄酒产区不同的微气候塑造了不同特点的本土酵母,表现出各异的区域特征,从而影响葡萄酒最终的香气特性和口感特性。本研究中,采用小

试发酵试验评估了 11 株本土酵母的发酵特性和产香特性。11 株本土酵母中均可完成干型葡萄酒的发酵(残糖含量<4 g/L)^[19],其中 60258 生长活力和发酵活力较强(表 2)。11 株本土酵母的乙醇产量与商业酵母相似,甘油、有机酸(乙酸、柠檬酸和琥珀酸)产量均处于葡萄酒的正常范围内(图 1)。通过挥发性物质聚类分析将 11 株本土酵母分为两大类,其中 60258 和 60268 高产酯类物质,60124 和 60250 高产高级醇和挥发性脂肪酸(图 2)。结合基于葡萄酒香气雷达图,最终筛选出 2 株

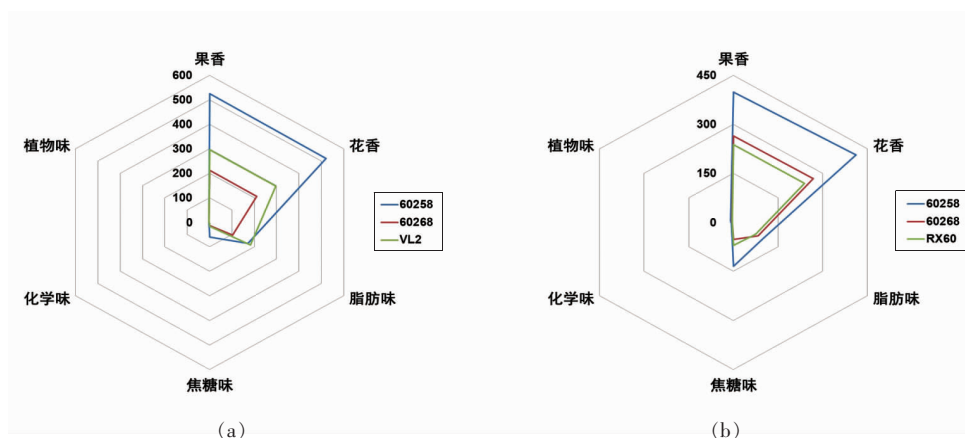


图7 基于香气活性值的“雷司令”(a)和“西拉”(b)葡萄酒香气雷达图

Fig.7 Aromatic series of Riesling (a) and Syrah (b) wine based on OAVs

果香、花香得分最高,且脂肪味和化学味得分较低的本土酵母(60258和60268)进行中试酿造试验。60258和60268在“雷司令”和“西拉”中的发酵趋势一致(图4),均可完成干型葡萄酒的发酵。甘油主要在酒精发酵初期产生,是酵母正常发酵副产物之一,具有甜味和黏稠度,可提高葡萄酒圆润饱满的口感^[33]。葡萄酒中的甘油通常为4~15 g/L^[4]。60268在“雷司令”和“西拉”中的甘油产量分别是商业酵母的1.2倍和1.1倍,在一定程度上可以改善葡萄酒的口感(表3)。柠檬酸和苹果酸是葡萄酒中重要的非挥发性酸。柠檬酸由酵母在发酵初期产生,在葡萄酒中的含量为0.1~0.7 g/L^[4]。2株本土酵母的柠檬酸产量均在正常范围,显著低于商业酵母。苹果酸具有生青味和尖苛感,可通过苹果酸-乳酸发酵被乳酸菌降解为更为柔和的乳酸^[24]。酒精发酵结束后,60258和60268的苹果酸含量显著高于商业酵母(表3),可为苹果酸-乳酸发酵提供更多的底物。

高级醇主要由酿酒酵母通过 Ehrlich 途径代谢氨基酸生成^[34],是葡萄酒中重要的发酵香气物质。当高级醇浓度适宜时可增加葡萄酒香气的复杂性,然而当质量浓度高于400 mg/L时,会给葡萄酒带来不愉快的醇味和溶剂味^[4]。中试酿造结果表明,60258高产己醇和苯乙醇(表4)。己醇为葡萄酒贡献植物味,苯乙醇给葡萄酒带来玫瑰花香和蜂蜜味^[35]。这也导致了西拉葡萄酒中60258的高级醇总量显著高于商业酵母,而并未超过400 mg/L,不会给葡萄酒带来不良风味^[4]。60268在

雷司令葡萄酒中的高级醇产量较低,然而在西拉葡萄酒中其产量显著高于商业酵母,可以增加葡萄酒的香气复杂性(表4)。

酯类物质主要包括乙酸酯和乙酯^[5]。乙酸酯由高级醇和乙酰辅酶A在醇酰基转移酶的催化下缩合而成,主要包括乙酸乙酯、乙酸己酯、乙酸异戊酯、2-乙酸苯乙酯等^[4],可为葡萄酒带来果香、花香^[35-37]。60258在“雷司令”中的乙酸己酯含量是商业酵母的3.92倍,该物质可为葡萄酒贡献苹果、樱桃等果香^[35]。60258在“雷司令”和“西拉”中的乙酸酯总量分别是商业酵母的3倍、1.6倍。60268的乙酸酯总量与商业酵母无显著性差异。乙酯由脂酰CoA和乙醇在酰基转移酶的作用下缩合而成,常见乙酯包括丁酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯和十二酸乙酯^[4-5]。60258在“雷司令”和“西拉”中均高产辛酸乙酯,提升葡萄酒的花香、果香^[36],这也导致其乙酯产量显著高于其余2株酵母,是商业酵母乙酯总量的近2倍。与60258不同,60268的乙酯产量较低(表4)。60258高产酯类物质,也使其与60268和商业酵母的风格显著区分开(图5、图6)。结合葡萄酒香气雷达图(图7)可看出,60258的果香和花香得分高于商业酵母和60268,与小试结果一致(图3)。60258可较稳定地高产酯类物质。

挥发性脂肪酸为葡萄酒带来奶酪味、脂肪味等香气特征^[4]。在2种葡萄酒中,60258产生的挥发性脂肪酸总量均显著高于商业酵母,而60268仅在“西拉”葡萄酒中高产挥发性脂肪酸(表4),

可在一定程度上提升葡萄酒的香气复杂性和平衡性。

整体来看,60258 可稳定产生丰富的酯类、高级醇类及其它挥发性物质,赋予葡萄酒愉悦的果香和花香。60268 高产甘油,在红葡萄酒品种“西拉”中的香气表现优于白葡萄品种“雷司令”(图7)。

4 结论

开发中国本土酵母资源,筛选应用优良本土酵母,对充分发挥葡萄酒的风土特征,改变国外商业酵母垄断的局面具有重要意义。本研究通过小试发酵从 11 株本土酵母中筛选出 2 株发酵和产香性能良好的本土酵母 60258 和 60268,应用 2 个品种的葡萄(白葡萄品种“雷司令”和红葡萄品种“西拉”)进行中试酿造。结果表明:60258 可以稳定地高产酯类物质,提升葡萄酒的花香和果香风味特征;60268 可以高产甘油,更适合提升红葡萄酒的香气品质。2 株酵母在实际生产中具有较大的应用前景。

参 考 文 献

- [1] HOWELL K S, COZZOLINO D, BARTOWSKY E J, et al. Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation [J]. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6(1): 91-101.
- [2] MORRISON-WHITTLE P, GODDARD M R. From vineyard to winery: A source map of microbial diversity driving wine fermentation [J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(1): 75-84.
- [3] 张明霞, 吴玉文, 段长青. 葡萄与葡萄酒香气物质研究进展[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 2098-2104.
ZHANG M X, WU Y W, DUAN C Q. Progress in study of aromatic compounds in grape and wine[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(7): 2098-2104.
- [4] SWIEGERS J H, BARTOWSKY E J, HENSCHKE P A, et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2005, 11(2): 139-173.
- [5] SUMBY K M, GRBIN P R, JIRANEK V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 1-16.
- [6] BÖRLIN M, VENET P, CLAISSE O, et al. Cellar-associated *Saccharomyces cerevisiae* population structure revealed high-level diversity and perennial persistence at Sauternes wine estates[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(10): 2909-2918.
- [7] GUZZON R, LABAGNARA T, TOFFANIN A, et al. Oenological characterisation of indigenous strains of *S. cerevisiae* isolated in a biodynamic winery in the Cortona DOC area[J]. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(12): 963-967.
- [8] LEGRAS J L, GALEOTE V, BIGEY F, et al. Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(7): 1712-1727.
- [9] LITI G, CARTER D M, MOSES A M, et al. Population genomics of domestic and wild yeasts[J]. *Nature*, 2009, 458(7236): 337-341.
- [10] GAYEVSKIY V, GODDARD M R. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6: 1281-1290.
- [11] KNIGHT S, GODDARD M R. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(2): 361-370.
- [12] LIU D, LEGRAS J L, ZHANG P, et al. Diversity and dynamics of fungi during spontaneous fermentations and association with unique aroma profiles in wine[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 338: 108983.
- [13] DRUMONDE-NEVES J, FRANCO-DUARTE R, VIEIRA E, et al. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* populations from vineyards of the Azores Archipelago: Geography vs Ecology[J]. *Food Microbiology*, 2018, 74: 151-162.
- [14] SCHULLER D, CASAL M. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis [J]. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2007, 91(2): 137-150.
- [15] KNIGHT S, KLAERE S, FEDRIZZI B, et al. Regional microbial signatures positively correlate with

- differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(3): 1–10.
- [16] BELTRAN G, TORIJA M J, NOVO M, et al. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25(2): 287–293.
- [17] CALABRETTI A, LA CARA F, SORRENTINO A, et al. Characterization of volatile fraction of typical Irpinian wines fermented with a new starter yeast[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1433–1442.
- [18] LIU D, ZHANG P, CHEN D, et al. From the vineyard to the winery: How microbial ecology drives regional distinctiveness of wine[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1–13.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 葡萄酒、果酒通用分析方法: GB/T 15038–2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 1–56.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. Analytical methods of wine and fruit wine: GB/T 15038–2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006: 1–56.
- [20] VERWAAL R, WANG J, MEIJNEN J P, et al. High-level production of beta-Carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(13): 4342–4350.
- [21] LAN Y B, QIAN X, YANG Z J, et al. Striking changes in volatile profiles at sub-zero temperatures during over-ripening of 'Beibinghong' grapes in Northeastern China[J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 172–182.
- [22] XIA J, SINELNIKOV I V, HAN B, et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: 1–7.
- [23] LAMBRECHTS M G, PRETORIUS I S. Yeast and its importance to wine aroma[J]. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*, 2000, 21: 97–129.
- [24] VOLSCHEK H, VAN VUUREN H J J. Malic acid in wine: Origin, function and metabolism during vinification[J]. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 2006, 27(2): 123–136.
- [25] CHIDI B S, BAUER F F, ROSSOUW D. Organic acid metabolism and the impact of fermentation practices on wine acidity – A review[J]. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 2018, 39(2): 315–329.
- [26] 蔡建. 发酵前处理工艺对天山北麓葡萄酒香气改良研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- CAI J. Study on aroma quality improvement for Cabernet sauvignon wines based on pre-fermentation technology from north slope of Tianshan mountains [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.
- [27] PEINADO R A, MORENO J, BUENO J E, et al. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration[J]. *Food Chemistry*, 2004, 84(4): 585–590.
- [28] PEINADO R A, MAURICIO J C, MORENO J. Aromatic series in sherry wines with gluconic acid subjected to different biological aging conditions by *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*[J]. *Food Chemistry*, 2006, 94(2): 232–239.
- [29] GUTH H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(8): 3027–3032.
- [30] NOGUEROL-PATO R, GONZÁLEZ-ÁLVAREZ M, GONZÁLEZ-BARREIRO C, et al. Aroma profile of garnacha tintorera-based sweet wines by chromatographic and sensorial analyses [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(4): 2313–2325.
- [31] CAI J, ZHU B Q, WANG Y H, et al. Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters [J]. *Food Chemistry*, 2014, 154: 217–229.
- [32] FERREIRA V, LÓPEZ R, CACHO J F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(11): 1659–1667.
- [33] 刘青, 刘朝霞, 李志勇, 等. 国产葡萄酒中甘油含量的调查与分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(2): 171–175.
- LIU Q, LIU Z X, LI Z Y, et al. Investigation of glycerol content in domestic wines[J]. *Chinese Jour-*

- nal of Food Hygiene, 2015, 27(2): 171–175.
- [34] HAZELWOOD L A, DARAN J M, VAN MARIS A J A, et al. The ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2259–2266.
- [35] PEINADO R A, MORENO J, BUENO J E, et al. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration[J]. Food Chemistry, 2004, 84(4): 585–590.
- [36] GUTH H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(8): 3027–3032.
- [37] NOGUEROL-PATO R, GONZÁLEZ-ÁLVAREZ M, GONZÁLEZ-BARREIRO C, et al. Aroma profile of Garnacha Tintorera-based sweet wines by chromatographic and sensorial analyses[J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2313–2325.

Studies on Oenological Characteristics of High-quality Chinese Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains

Liu Peitong¹, Ding Ziyuan¹, Yu Qingquan², Fan Jiashuo¹, Qiao Yan², Wang Haiqi², Zheng Xiaowei^{1*}

¹Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209

²COFCO Greatwall Chateau Sungod (Huailai) Co. Ltd., Zhangjiakou 075499, Hebei

Abstract Exploring excellent indigenous yeast is of great significance for strengthening the terroir of wine and breaking the situation of foreign commercial yeast monopoly. The fermentation and aroma production characteristics of eleven Chinese indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains were evaluated in this study. Two indigenous yeasts (60258 and 60268) with high-quality oenological characteristics were obtained and then applied for further pilot fermentation with two different grape varieties (Riesling and Syrah). 60258 could accumulate higher amounts of esters, as it produced 3 times and 1.6 times more acetate esters than commercial yeasts in Riesling and Syrah wine, respectively. It also generated near 2 times ethyl esters than commercial yeasts, which promoted the floral and fruity profiles of wine significantly. 60268 produced more glycerol than commercial yeasts, and it was more suitable for red wine making than white wine. The two indigenous yeasts could be a valuable tool to modulate the volatile profiles of wine and had great application prospect in industrial production.

Keywords indigenous yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; wine; esters; oenological characterisation