

优选本土乳酸菌-酵母接种时序对模拟红葡萄酒混菌发酵特性的影响

姜 娇^{1,2,3}, 史学容¹, 柴梦森¹, 黄 蓉¹, 张艾霞¹, 宋育阳^{1,2,3}, 秦 义^{1,2,3}, 刘延琳^{1,2,3*}

¹西北农林科技大学葡萄酒学院 陕西杨凌 712100

²陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心 陕西杨凌 712100

³西北农林科技大学宁夏贺兰山东麓葡萄酒试验示范站 宁夏永宁 750104)

摘要 为探究混菌发酵对葡萄酒理化指标及酒样颜色的影响,利用 3 株优选乳酸菌 6-20、GZC3、V22 与酿酒酵母 CECA 进行同时和顺序发酵,综合探究乳酸菌-酵母接种时序对模拟红葡萄酒混菌发酵的影响。结果表明,各混菌组合间具有良好适配性,发酵期间乳酸菌与酵母菌体数量基本维持在 10^6 CFU/mL 以上,整体发酵周期约 15 d 左右,酒样的基本理化指标均符合国家葡萄酒相关标准。先接种乳酸菌的组合有利于苹果酸-乳酸发酵迅速触发;反之则更利于酒精发酵,尤其是 CECA/6-20 复合发酵组,先接种 CECA 较先接种 6-20 的处理,能够使得酒精发酵时长缩短 2~4 d。不同的接种方式及发酵组合对酒样颜色和总酚均具有显著影响,其中在接种 GZC3 4 d 后接种酵母菌发酵组的酒样颜色最深。本文首次系统研究本土乳酸菌与酵母菌的接种时序对模拟葡萄酒发酵特性的影响,旨在为葡萄酒生产的提质增效及我国酿酒微生物种质资源的良性发展提供一定的参考依据。

关键词 酿酒酵母; 乳酸菌; 混菌发酵; 接种时序; 理化指标

文章编号 1009-7848(2023)11-0114-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.012

传统优质红葡萄酒的酿造在酒精发酵(Alcoholic fermentation, AF)结束后往往需要自发或接种乳酸菌进行苹果酸-乳酸发酵(Malolactic fermentation, MLF)。乳酸菌的生长通常会受到酵母代谢物及恶劣的葡萄酒生境的胁迫,导致 MLF 周期的延长^[1],如高酒精度会导致 MLF 难以启动、发酵缓慢、甚至中止。MLF 管理不当还可能会产生一些葡萄酒不良代谢物,如生物胺等,严重影响了酒厂的经济效益,制约了葡萄酒行业的发展。将乳酸菌提前接入发酵体系,不仅可以促进乳酸菌尽快适应葡萄酒环境,确保发酵的顺利进行,还能够最大化地保留各菌株的发酵特征^[2],对缩短葡萄酒酿造周期具有十分重要的现实意义。

混菌发酵时接种顺序是影响发酵酒质量的重要因素之一,除了传统的顺序接种外,乳酸菌还可

与酵母同时、在 AF 前、在酵母接种 24 h 后、在 AF 进行约 2/3 时接种于发酵液中^[3],且不同的接种顺序对菌体数目的影响也存在差异。Lucio 等^[4]在葡萄汁接种乳酸菌 3 d 后接种酿酒酵母,测定菌株生长动力学,发现在酵母前接种乳酸菌较常规发酵而言,酵母会更早发生衰亡。适宜的接种顺序还可能助于丰富葡萄酒的风味结构,提高葡萄酒的品质^[5-7]。Lucio 等^[4]在混菌发酵结束后还检测了 pH 值、乳酸、柠檬酸、苹果酸等物质的含量,发现最终葡萄酒酸度有所增加。王嘉伟^[8]的研究表明乳酸菌-酵母菌共发酵苹果酒时,能显著降低果酒总酸含量,柔化果酒的口感,明显提升其口感。这表明乳酸菌接种时序对酒体总酸的影响较为复杂,还需进一步探究。另外,混合发酵能够有效促进丙酮酸和乙醛的合成,增加锦葵色素衍生物花色苷(Vitisins)的含量,从而改善葡萄酒颜色的作用^[9]。袁晓龙等^[10]发现混菌发酵的不同接种顺序对梨酒基础理化指标及颜色等品质指标的影响存在差异。因此,明确乳酸菌接种时序对葡萄酒酿造的影响,是研发混菌发酵配套工艺技术体系的重要内容。

本研究采用商业酿酒酵母与 3 株优选乳酸菌以不同组合、不同顺序接种于模拟红葡萄酒中,定时监控发酵进程,测定发酵后部分理化指标和花

收稿日期: 2022-11-18

基金项目: 国家自然科学基金联合基金重点项目(U21A20269);中央高校基本科研业务费(2452018118);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2021JQ-136);陕西省引进国外博士专项资助项目(F2020221005)

第一作者: 姜娇,女,博士,讲师

通信作者: 刘延琳 E-mail: yanlinliu@nwsuaf.edu.cn

色苷含量的变化,对应分析 CIELab 颜色参数,寻找二者之间的相关性,综合探究不同菌株组合及接种方式对葡萄酒理化指标及酒样颜色的影响。本研究通过优化葡萄酒酿造工艺,优选出最佳的酵母-本土乳酸菌的混菌发酵接种方式,缩短发酵周期,降低酿造成本,推动酵母-本土乳酸菌混菌发酵的实际应用,为我国葡萄酒产区酿造独特风格的干红葡萄酒提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 商业酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)CECA,安琪酵母有限公司;本土优选植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)6-20^[11]、本土优选酒酒球菌(*Oenococcus oeni*)GZC3^[12],均源于西北农林科技大学葡萄酒学院微生物种质资源室;商业植物乳杆菌 V22,科汉森有限公司。

1.1.2 试剂 蛋白胨、酵母浸粉、牛肉膏,北京奥博星生物技术有限公司;琼脂,北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖、磷酸氢二钾、柠檬酸氢二铵、七水合硫酸镁、硫酸锰、放线菌酮,Sigma Aldrich 公司;吐温 80,天津市天力化学试剂有限公司;天然葡萄皮色素,San Jqaquin 公司;苹果酸试剂盒(K-LAL-116A),Megazyme 公司。

1.1.3 仪器 Elx800 酶标仪,美国 BioTek 公司;SX-500\700 高压蒸汽灭菌锅,日本 TOMY 公司;UV1800 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;MQL-61R 恒温培养箱,上海旻泉仪器有限公司;PB-10 pH 计,德国 Sartorius 公司;6890-5975 液相色谱仪,德国安捷伦公司。

1.2 试验方法

1.2.1 配制模拟红葡萄汁培养基 在模拟白葡萄汁^[13]的基础上,添加 10 g/L 天然葡萄皮色素,混匀,制成模拟红葡萄汁,调整其糖含量为 200 g/L、苹果酸为 3 g/L、总酚和总花色苷均为 2 276 mg/L,pH 值为 3.8,0.22 μm 过滤除菌后待用。

1.2.2 种子液制备 取-80℃冰箱保藏的酵母及乳酸菌的甘油保藏液,分别划线于 YPD 和 MRS 固体培养基,其中 MRS 培养基添加 20 μg/mL 放线菌酮,以排除真菌对乳酸菌生长的干扰。酵母菌在 30℃、150 r/min 摇床培养 24 h,乳酸菌在 25℃

静置培养 48 h 后,分别挑取形态整齐的单菌落转接于 50 mL YPD 液体和 MRS 液体培养基中,用与上述相同培养条件制成种子液备用。

1.2.3 发酵方案 酵母菌与乳酸菌接种量均控制在 2×10⁶ CFU/mL 左右,按表 1 方案分别接种于 150 mL 的红模拟葡萄汁中。

表 1 接种方案

Table 1 Inoculation modalities

组别代号	酿酒酵母接种时间/d			乳酸菌接种时间/d		
	0	2	4	0	2	4
Y	x					
Y+B	x			x		
Y+B/2 d	x				x	
Y+B/4 d	x					x
B+Y/2 d		x		x		
B+Y/4 d			x	x		

注:Y. 酿酒酵母,B. 乳酸菌,其中,B1. V22,B2. 6-20,B3. GZC3;x. 接种。所有处理均以酵母纯种发酵(Y)为对照,发酵温度为 25℃,每组 3 次重复。

1.2.4 发酵监测 发酵期间,每 24 h 使用 DNS 比色法^[14]测定还原糖含量,待残糖含量小于 4 g/L 且不再降低时视为酒精发酵结束。每 48 h 取酒样进行梯度稀释(10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵)后,用于计菌落数,其中酵母菌用 YPD 固体培养基平板进行计数,乳酸菌用添加 20 mg/L 放线菌酮的 MRS 培养基平板进行计数。将点涂稀释菌液后的平板置于 37℃ 的培养箱中培养后计算菌落数。在发酵的 4 个关键时期(启酵前、发酵初期、发酵旺盛期及发酵末期)进行取样,使用苹果酸试剂盒测苹果酸含量变化。发酵结束后参照 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》分析酒样的总酸、挥发酸、pH 值等指标^[15];使用福林酚法^[16]测定总酚含量;pH 示差法^[17]进行总花色苷含量的测定;CIELab 相关参数参考李运奎等^[18]的方法测定。

1.2.5 数据处理 使用 Microsoft Office Excel 软件进行数据统计;IBM SPSS Statistics 22 软件进行 One-Way ANOVA 显著性分析;Prism 8.0.1 软件绘制数据图;Adobe Photoshop CS6 软件模拟酒样的特征颜色。

2 结果与分析

2.1 混菌发酵过程检测

首先探究了乳酸菌-酵母混菌发酵对 AF 的影响。所有处理最终酒样残糖均低于 4.0 g/L (图 1), 说明 AF 顺利完成, 且乳酸菌的接入时间不影响 AF 顺利完成, 这与 Massera 等^[19]和闫彬等^[20]的结果一致。乳酸菌的接种时间会影响 AF 的发酵周期, 如多数处理在 15 d 左右完成 AF, 然而 B2+Y/2 d 与 B2+Y/4 d (图 1e) 处理 AF 耗时延缓 2~4

d。与发酵周期相对应, 上述 2 个处理的酵母菌落水平也始终低于其它处理 (图 1b), 这说明本土乳酸菌菌株 6-20(B2) 可能抑制酵母菌的生长。此外, 不同混菌组合在 AF 不同阶段的发酵速率也存有差异。比如, 相较于 CECA 纯种发酵, AF 前接种乳酸菌会减缓酵母的起酵, 而一旦进入 AF 旺盛期后发酵速率则显著加快 (图 1a、图 1c), 表明酵母-乳酸菌菌株间的相互作用会影响酵母发酵速率, 这与 King 等^[21]的结果一致。

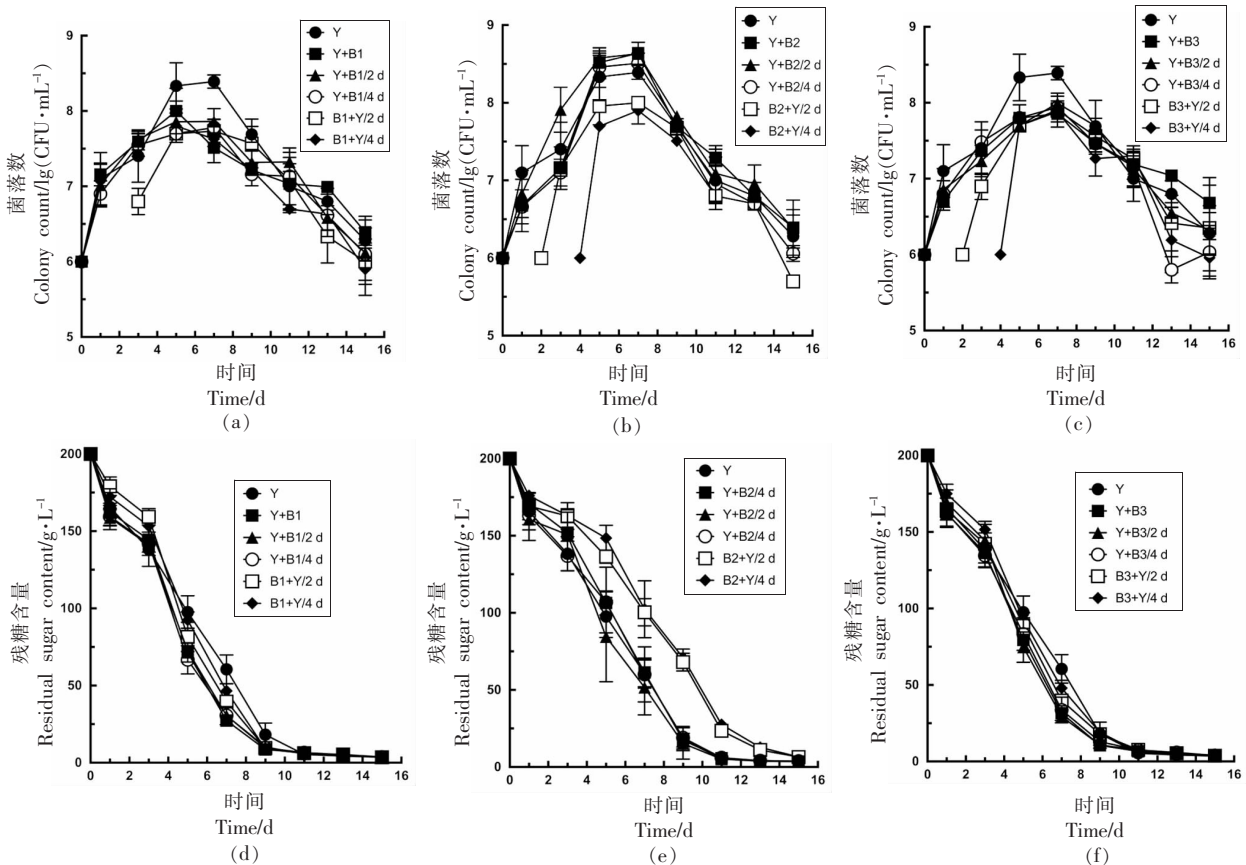


图 1 不同发酵处理后酵母菌数(a~c)与糖含量(d~f)变化

Fig.1 Changes in yeast count (a~c) and sugar content (d~f) after different fermentation treatments

L-苹果酸是葡萄酒产生强烈尖酸味的重要组成部分之一, 其在葡萄酒发酵期间的变化是衡量苹果酸发酵是否启动和完成的重要依据^[22]。在探究混菌发酵对 MLF 发酵的影响 (图 2) 时发现, 各混菌发酵组对 MLF 在不同阶段的发酵速率也存在差异, 乳酸菌的接种时间会显著影响 L-苹果酸的降解速率。如在 AF 发酵结束后, 先接种乳酸菌 4 d 后接种酵母菌时, L-苹果酸含量降解速率更为彻底,

由最初的 3 g/L 降到 0.3 g/L 左右 (图 2d、2e、2f); 而在先接种酵母的发酵中, L-苹果酸含量仅降到 0.5 g/L 左右 (图 2d、2e、2f), 说明先接种乳酸菌更有利于 MLF 的进行。此外, MLF 与 AF 同时进行的发酵中, AF 发酵结束后, L-苹果酸含量约为 0.5 g/L 左右 (图 2d、2e、2f), 而先接种乳酸菌发酵组的 L-苹果酸的降解更为彻底, 表明先接种乳酸菌组的 MLF 时长相对先接酵母菌发酵组的较短。这

是由于随着 AF 发酵的进行, 酵母的发酵活力的不断提高, 酒精含量逐渐增加, 强化了对乳酸菌的生长的胁迫, 使得 MLF 发酵速率变慢, 从而导致后接乳酸菌苹果酸降解速率始终低于其它处理。发酵期间乳酸菌菌落水平间也存在差异, 在整个发酵期间商业乳酸菌 V22 (B1) 和本土乳酸菌 GZC3 (B3) 的菌落数变化趋势大致相似 (图 2a、

2c), 而本土乳酸菌 6-20(B2) 的菌落数在发酵旺盛期明显高于另外 2 株 (图 2b), 表明酵母对菌株 6-20 的抑制作用更小。另外, 相同接种方式下引起乳酸菌菌落数及发酵速率差异的潜在原因, 除了乳酸菌与酵母的相互作用外, 还可能与菌株特异性相关^[23-24]。

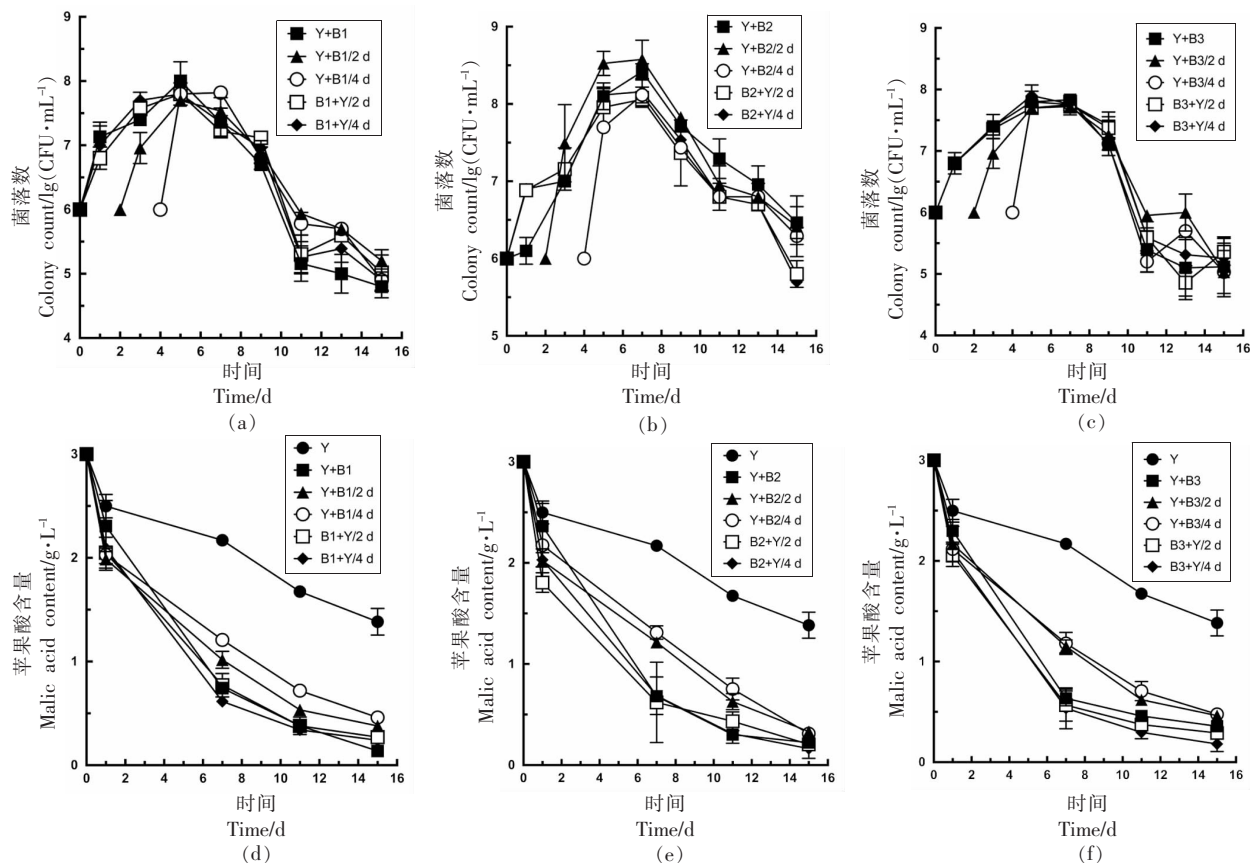


图 2 不同发酵处理下乳酸菌数(a~c)与苹果酸含量(d~f)变化

Fig.2 Changes in the number of lactic acid bacteria (a~c) and malic acid content (d~f) under different fermentation treatments

由图 1、图 2 综合可知, 各处理的发酵曲线均正常, 大多数处理发酵结束时的残糖、苹果酸符合国标(GB/T 15037-2006《葡萄酒》)要求, 说明本试验所使用 3 株乳酸菌与酿酒酵母之间存在良好适配性, 在发酵时间充足时均能够顺利完成发酵。先接乳酸菌的处理中酵母菌落水平始终较低, AF 较其它接种方式缓慢, 更有利于 MLF 迅速进行; 先接酵母菌则有相反的结果, 这与李凭等^[25]的研究结果一致。乳酸菌与酵母同时接种情况下, 其 AF

与 MLF 速率均较高, 原因可能是相同数量级的乳酸菌与酵母同时接入, 各菌株所需的营养物质比其它接种方式中更丰富, 更利于菌株间的协同作用的发生^[26], 在一定程度上还可以抵消不同菌株之间的竞争造成的负面影响。

2.2 理化指标

2.2.1 常规理化指标 发酵结束后对酒样的基本理化指标进行测定(表 2), 不同发酵处理间的总酸、挥发酸含量存在显著差异。各发酵组的总酸含

量在 4.66~5.25 g/L(以酒石酸计)之间,挥发酸含量则为 0.32~0.55 g/L(以乙酸计),均符合葡萄酒国家标准(GB/T 15037-2006《葡萄酒》)。乳酸菌的接种时间对葡萄酒酸度的影响也存在差距,除 Y+B3/2 d、Y+B3/4 d 外,其余先接酵母处理组的总酸含量均低于对应菌株同时接种及先接乳酸的处理;此外,先接乳酸菌后酵母菌的接入时间越迟,其酒样的总酸含量越高;而较 Y 处理(4.48 g/L)而言,虽然 Y+B2、Y+B3/2 d 和 Y+B3/4 d 总酸有所

增加,但无显著差异,表明混菌发酵体系中越早接入乳酸菌,最终葡萄酒的酸度就越高。不同的乳酸菌菌株对葡萄酒酸度的影响也大不相同,如在各混菌发酵组中,Y+B1、B1+Y/2 d、Y+B3/2 d、B3+Y/2 d 与 B3+Y/4 d 的挥发酸含量均高于 Y,且彼此间存在显著差异;而其它处理的挥发酸均与低于或等于 Y,这表明酒球菌 GZC3(B3)与 2 株植物乳杆菌相比,混菌发酵时更易产挥发酸,这与 Valdés 等^[27]和 Lucio 等^[28]的研究结果一致。

表 2 不同处理酒样的理化指标

Table 2 Physicochemical parameters of wines using different inoculation approaches

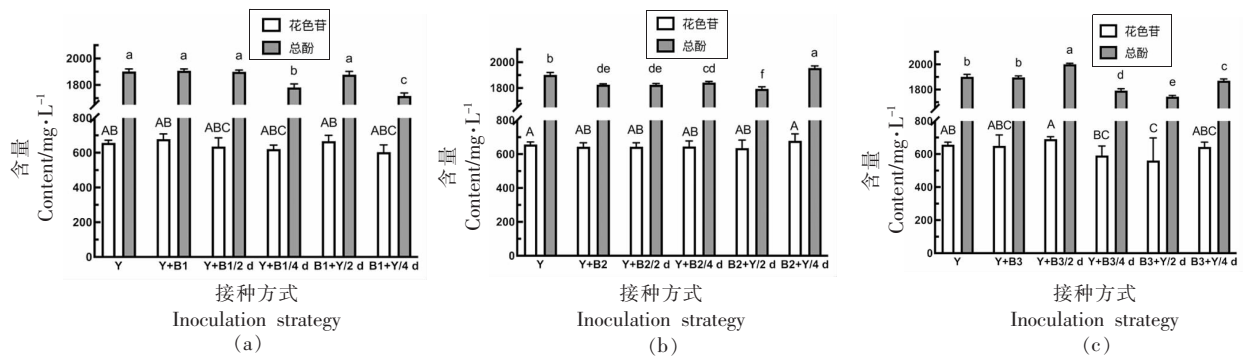
组别代号	pH 值	总酸/g·L ⁻¹	挥发酸/g·L ⁻¹
Y	3.84 ± 0.01 ^{defg}	4.48 ± 0.00 ^a	0.46 ± 0.06 ^j
Y+B1	3.83 ± 0.01 ^{abcde}	4.54 ± 0.03 ^{ab}	0.49 ± 0.03 ^{ij}
Y+B1/2 d	3.81 ± 0.01 ^{bcdef}	4.75 ± 0.02 ^{abc}	0.48 ± 0.01 ^{sh}
Y+B1/4 d	3.80 ± 0.01 ^{efhi}	4.61 ± 0.02 ^{ab}	0.41 ± 0.01 ^{de}
B1+Y/2 d	3.77 ± 0.00 ^{ab}	4.93 ± 0.02 ^{cd}	0.32 ± 0.02 ^c
B1+Y/4 d	3.76 ± 0.02 ^{cddefg}	5.15 ± 0.03 ^{de}	0.46 ± 0.05 ^b
Y+B2	3.83 ± 0.03 ^{ghi}	4.66 ± 0.08 ^{ab}	0.41 ± 0.03 ^{fg}
Y+B2/2 d	3.82 ± 0.03 ^{abc}	4.74 ± 0.04 ^{bc}	0.53 ± 0.03 ^{fg}
Y+B2/4 d	3.80 ± 0.02 ^{hi}	4.66 ± 0.02 ^{ab}	0.39 ± 0.03 ^{ef}
B2+Y/2 d	3.77 ± 0.00 ^{ab}	4.82 ± 0.05 ^{cd}	0.54 ± 0.02 ^d
B2+Y/4 d	3.75 ± 0.01 ^{defghi}	4.89 ± 0.05 ^{de}	0.44 ± 0.02 ^c
Y+B3	3.83 ± 0.00 ^a	4.58 ± 0.01 ^{ab}	0.55 ± 0.02 ^{hi}
Y+B3/2 d	3.81 ± 0.01 ^{ij}	4.80 ± 0.01 ^{ab}	0.36 ± 0.02 ^{sh}
Y+B3/4 d	3.81 ± 0.01 ^{abcd}	4.64 ± 0.02 ^{ab}	0.50 ± 0.02 ^{de}
B3+Y/2 d	3.74 ± 0.01 ^{ab}	4.97 ± 0.01 ^{ef}	0.24 ± 0.01 ^c
B3+Y/4 d	3.72 ± 0.00 ^{efgh}	5.25 ± 0.06 ^f	0.44 ± 0.01 ^a

注:表中不同的字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2.2 总酚与总花色苷 红葡萄酒酚类物质是颜色和风味的重要指标,也是葡萄酒的研究热点之一。本研究不同处理间的总酚及花色苷含量存在差异(图 3),所有处理的总酚与花色苷质量浓度均低于初始质量浓度(2 276 mg/L 与 885 mg/L),总酚含量最高的为 Y+B3/2 d 处理(2 001.27 mg/L),含量最低的是 B1+Y/4 d 处理(1 717.10 mg/L)。与 Y 处理(1 901.88 mg/L)相比,大部分处理的总酚水平下降,可能是发酵过程中乳酸菌代谢释放的丙酮酸、乙醛等次级产物到发酵体系中,与发酵液中的多酚类物质发生反应,合成聚合色素等大分子衍生物^[29-30]。不同菌株在相同发酵体系的

总酚含量也存在差异。如 6-20 与 GZC3 参与的混菌发酵组的总酚水平较 Y 显著下降;而 V22 相关的混菌发酵的总酚水平与 Y 的差异较小。

花色苷与红葡萄酒酒体颜色具有很强的相关性。不同处理间的总花色苷含量在不同但差异不显著(图 3)。其中,Y+B3/2 d 处理花色苷含量最高,为 690.10 mg/L,含量最低的是 B3+Y/2 d 处理(560.65 mg/L),而绝大多数处理的花色苷含量与 Y 处理(656.98 mg/L)相近。花色苷含量减少的原因可能是 AF 期间酵母与花色苷发生聚合反应,对花色苷产生吸附作用^[31]。相比之下,B2 与酵母菌无论以任何方式接种,对总花色苷的含量影响都



注:不同的大写字母表示不同处理酒样的花色苷具有显著差异($P<0.05$);不同的小写字母表示不同处理酒样的总酚具有显著性差异($P<0.05$)。

图 3 不同处理酒样的总酚与总花色苷含量

Fig.3 Total phenols and total anthocyanins content of wines samples with different treatments

很小。

2.2.3 CIELab 颜色参数 葡萄酒的质量与红葡萄酒的色彩强度呈正相关^[32],而葡萄酒的颜色主要取决于酒体中的花色苷、酚类物质、单宁的水平^[33],花色苷含量会影响葡萄酒的 CIELab 颜色参数^[34]。CIELab 三维空间坐标包括亮度(L^*)、红/绿颜色参数(a^*)和黄/蓝颜色参数(b^*)。其中, L^* 与葡萄酒的颜色深浅相关, a^* 、 b^* 值与颜色的强度高及颜色饱和度相关^[35]。

由表 3 可知,各酒样间的亮度 L^* 差异最为显

著,B1+Y/4 d 处理的亮度最高为 22.4,颜色最明亮;B3+Y/2 d 处理的亮度最低,颜色最暗;而 Y 处理为 14.6,颜色适中。 a^* 大部分在 40.0 左右且彼此间存在差异显著,说明各酒样酒体颜色红色调占比较大。 b^* 整体较低,在 3.8~18.2 之间,说明酒体颜色中黄色分量较小,且差异并不显著。雷用东等^[31]曾表示 C^*_{ab} 值越大,酒颜色越集中,色彩饱和度越高,而本试验中不同处理间 C^*_{ab} 约在 30~51.2 之间且无显著差异,表明酒样的色度较分散,色彩饱和度较低。此外,不同处理间色调 h_{ab} 均低于

表 3 不同处理酒样的 CIELAB 参数

Table 3 CIELAB parameters of wines using different inoculation approaches

组别代号	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h_{ab}	ΔE^*_{ab}
Y	14.6 ± 0.7 ^f	42.6 ± 0.5 ^c	6.3 ± 0.3 ^a	43.1 ± 0.6 ^b	8.4 ± 0.3 ^a	0.0
Y+B1	16.5 ± 8.1 ^f	42.8 ± 4.6 ^{bc}	10.4 ± 7.9 ^a	44.4 ± 6.2 ^b	12.8 ± 9.1 ^a	10.4 ± 4.3 ^a
Y+B1/2 d	18.8 ± 11.5 ^{cd}	43.9 ± 9.1 ^{ab}	10.7 ± 12.6 ^a	45.9 ± 12.1 ^{ab}	11.6 ± 11.8 ^a	13.1 ± 13.3 ^a
Y+B1/4 d	22.1 ± 4.6 ^{def}	47.7 ± 4.2 ^{ab}	18.2 ± 5.8 ^a	51.2 ± 5.9 ^{ab}	20.6 ± 4.7 ^a	15.1 ± 8.2 ^a
B1+Y/2 d	12.8 ± 2.3 ^{csdef}	40.4 ± 1.9 ^{ab}	6.1 ± 3.7 ^a	40.9 ± 2.3 ^{ab}	8.4 ± 4.8 ^a	4.2 ± 2.8 ^a
B1+Y/4 d	22.4 ± 5.8 ^{bcddef}	47.0 ± 4.2 ^a	16.8 ± 5.5 ^a	50.0 ± 5.8 ^a	19.3 ± 4.5 ^a	14.0 ± 8.5 ^a
Y+B2	19.5 ± 7.6 ^{bcddef}	46.2 ± 4.9 ^a	9.7 ± 4.2 ^a	47.2 ± 5.7 ^{ab}	11.5 ± 3.6 ^a	7.1 ± 9.8 ^a
Y+B2/2 d	18.5 ± 6.1 ^{abcde}	45.1 ± 4.2 ^a	8.6 ± 3.6 ^a	46.0 ± 4.8 ^a	10.6 ± 3.4 ^a	6.1 ± 7.3 ^a
Y+B2/4 d	17.7 ± 7.0 ^{abcde}	43.7 ± 3.2 ^a	7.3 ± 3.6 ^a	44.4 ± 3.8 ^a	9.3 ± 3.8 ^a	5.4 ± 6.8 ^a
B2+Y/2 d	12.6 ± 1.9 ^{abc}	41.7 ± 1.0 ^a	4.3 ± 2.0 ^a	41.9 ± 1.2 ^a	5.8 ± 2.5 ^a	3.2 ± 2.5 ^a
B2+Y/4 d	12.6 ± 2.9 ^{ab}	41.7 ± 1.6 ^a	4.2 ± 3.0 ^a	42.0 ± 2.0 ^a	5.7 ± 3.7 ^a	6.9 ± 7.4 ^a
Y+B3	9.8 ± 3.4 ^{bcddef}	40.6 ± 1.7 ^{ab}	4.7 ± 2.4 ^a	40.9 ± 1.9 ^{ab}	6.4 ± 3.1 ^a	5.6 ± 4.1 ^a
Y+B3/2 d	8.2 ± 3.6 ^{ab}	39.7 ± 2.4 ^a	3.8 ± 3.4 ^a	39.9 ± 2.5 ^a	5.4 ± 4.8 ^a	7.8 ± 4.6 ^a
Y+B3/4 d	7.7 ± 4.4 ^{abcd}	39.1 ± 5.0 ^a	5.4 ± 4.5 ^a	39.6 ± 5.0 ^a	7.9 ± 6.5 ^a	9.1 ± 5.4 ^a
B3+Y/2 d	4.0 ± 2.5 ^{abcde}	28.3 ± 14.1 ^a	8.0 ± 6.9 ^a	31.0 ± 10.1 ^a	21.7 ± 25.7 ^a	19.4 ± 12.8 ^a
B3+Y/4 d	4.2 ± 2.3 ^{abcd}	25.8 ± 17.1 ^a	9.0 ± 8.2 ^a	30.2 ± 10.5 ^a	28.6 ± 35.9 ^a	10.2 ± 8.2 ^a

注:表中不同的字母表示差异显著($P<0.05$)。

30°, 说明酒体颜色倾向于新红葡萄酒的紫红色。而总色差 ΔE_{ab}^* 表示酒样间颜色总体差异程度,其值越大,差异越显著,一般来说,6以上的色差将带来强烈的色彩差异感^[36]。本试验中各处理与Y处理的色差值在3.2~19.4之间,说明不同菌株及接种顺序处理的酒体颜色存在显著差异。

CIELab参数只能给出酒样颜色参数,并无法对酒样颜色进行直观表征,因此使用Photoshop软

件对酒样的颜色进行模拟(图4)。除B3+Y/2 d和B3+Y/4 d外,其它处理较Y处理酒样颜色偏红;同时接种及先接酵母菌的处理,其酒样颜色普遍比先接乳酸菌处理的明亮,且倾向于红色。此外,相同接种方式下不同菌株对红葡萄酒颜色的影响也不同,如接入V22(B1)与6-20(B2)的处理,其颜色普遍比接种GZC3(B3)的处理更显明亮,这与 L^* 、 a^* 、 b^* 所呈现出来的结果相符合。

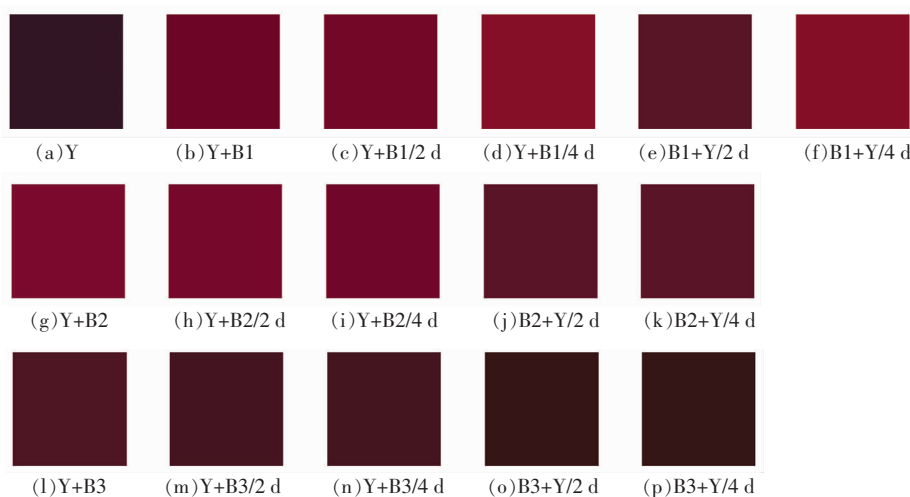


图4 不同处理酒样的特征颜色图

Fig.4 Feature color of wines with different treatments

2.2.4 总酚、总花色苷含量与颜色参数的相关性

由表4可知,不同接种方式下的葡萄酒的CIELab参数之间有一定的相关性,总酚与总花色苷含量间虽存在显著相关性,但与各个CIELab颜色参数不存在显著关系,而与 C_{ab}^* 参数间的相

性很强, L^* 与 a^* 、 b^* 、 C_{ab}^* 及 h_{ab} 无显相关性,而 a^* 、 b^* 、 C_{ab}^* 及 h_{ab} 间存在极显著正相关,说明葡萄酒颜色越红、越深,酒体越倾向于瓦红或砖红,这与李运奎等^[18]的研究结果一致。

表4 总酚含量、总花色苷含量与CIELAB参数的相关系数

Table 4 Pearson correlation coefficients between total phenols and total anthocyanins and CIELAB parameters

	总酚	总花色苷	L^*	a^*	b^*	C_{ab}^*	h_{ab}
总酚	1.000	0.509**	-0.181	-0.064	-0.314*	-0.122	-0.220
总花色苷		1.000	0.110	0.058	0.000	0.067	0.013
L^*			1.000	0.808**	0.693**	0.915**	0.126
a^*				1.000	0.266*	0.965**	-0.442**
b^*					1.000	0.498**	0.723**
C_{ab}^*						1.000	-0.198
h_{ab}							1.000

注:*代表在 $P<0.05$ 水平显著相关,**代表在 $P<0.01$ 水平显著相关。

3 结论

本试验所选菌株各混菌组合间具有良好适配

性,相关指标均符合国家葡萄酒标准(GB/T 15037-2006《葡萄酒》)。相比于传统的顺序发酵而

言,先接种乳酸菌的组合有利于 MLF 迅速进行,反之则更利于 AF;同时接入二者对 AF 和 MLF 无显著影响。酒样颜色受菌株组合和接种方式显著影响,其中乳酸菌与酵母同时接种的处理,酒样颜色普遍比先接种乳酸菌的处理明亮。未来可进一步探索本土乳酸菌与酵母菌的接种方式及接种比例复合效果对葡萄酒品质的影响,以期探索更多节约酿造时间,降低酿造成本最优的混菌发酵工艺,为酿造具有本土产区区域特色风格的干红葡萄酒提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 浩楠, 马腾臻, 杨学山, 等. 不同接种方式下小片球菌 C30 对‘赤霞珠’葡萄酒品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(1): 71-78.
HAO N, MA T Z, YANG X S, et al. Effects of different inoculation methods on the quality of ‘Cabernet Sauvignon’ wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(1): 71-78.
- [2] CARRETE R, TERESA V M, BORDONS A, et al. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(2): 155-159.
- [3] 陈莹, 宋茂华, 李泽福, 等. 理想苹果酸-乳酸发酵中乳酸菌接种时机的选择[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2010(9): 53-56.
CHEN Y, SONG M H, LI Z F, et al. Selection of inoculating time of lactic acid bacteria in ideal malolactic fermentation [J]. Chinese and Foreign Grape and Wine, 2010(9): 53-56.
- [4] LUCIO O, PARDO I, HERAS J M, et al. Influence of yeast strains on managing wine acidity using *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Control, 2018, 92: 471-478.
- [5] 王伟雄, 古丽米热·祖努纳, 杜展成, 等. 新视角探析微生物对葡萄酒品质的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2020, 11(6): 78-83.
WANG W X, GULIMIRE Z N N, DU Z C, et al. A new perspective on the effects of microorganisms on wine quality [J]. Chinese and Foreign Grapes and Wine, 2020, 11(6): 78-83.
- [6] 曲昆生, 曲天波, 曲林, 等. 苹果酸-乳酸发酵对威代尔冰酒香气的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 36-42.
QU K S, QU T B, QU L, et al. Effect of malolactic fermentation on the aroma of Widale ice wine [J]. Chinese Brewing, 2019, 38(9): 36-42.
- [7] MARIANA T, LUCA D F, MARIA T, et al. Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66(12): 406-412.
- [8] 王嘉伟. 酵母-乳酸菌共发酵低醇苹果酒的研制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
WANG J W. Development of low-alcohol cider co-fermentation with yeast and lactic acid bacteria [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2015.
- [9] JUAN M D F, ANTONIO M, IRIS L, et al. Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality [J]. European Food Research and Technology, 2017, 243(12): 2175-2185.
- [10] 袁晓龙, 边名鸿, 刘茗铭, 等. 酿酒酵母与产香酵母混合发酵鸭梨酒工艺条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 184-190.
YUAN X L, BIAN M H, LIU M M, et al. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma-producing yeast co-fermented pear wine [J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(6): 184-190.
- [11] 梁丰. 酿酒乳酸菌的分离鉴定与多样性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
LIANG F. Isolation identification and diversity of *Lactobacillus* from brewing [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2016.
- [12] 陶丽娜. 本土酿酒乳酸菌的筛选和耐受性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
TAO L N. Study on the screening and tolerance of native lactic acid bacteria [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2017.
- [13] MAURICIO J C, ORTEGA J M. Nitrogen compounds in wine during its biological aging by two flour film yeasts: An approach to accelerated biological aging of dry sherry-type wines [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 53(2): 159-167.
- [14] 王春晓, 江璐, 刘延琳. DNS 法监控葡萄酒发酵进程的应用研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(9): 24-27.

- WANG C X, JIANG L, LIU Y L. Application of DNS method to monitor wine fermentation process[J]. Chinese Brewing, 2012, 31(9): 24-27.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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, 2017.
- The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. General analysis methods for wine and fruit wine: GB/T 15038-2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [16] 王华. 葡萄酒分析检测[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 71-82.
- WANG H. Wine analysis and detection[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 71-82.
- [17] 李斌斌, 张亚飞, 白友强, 等. 发酵前冷浸渍工艺结合橡木片处理对于红葡萄酒品质的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(8): 151-156.
- LI B B, ZHANG Y F, BAI Y Q, et al. Effect of fermentation cold dipping process combined with oak sheet treatment on the quality of dry red wine[J]. Food Industry Technology, 2020, 41(8): 151-156.
- [18] 李运奎, 韩富亮, 张予林, 等. 基于CIELAB色空间的红葡萄酒颜色直观表征[J]. 农业机械学报, 2017, 48(6): 301-306.
- LI Y K, HAN F L, ZHANG Y L, et al. Visual color characterization of red wine based on CIELAB color space[J]. Journal of Agricultural Machinery, 2017, 7(6): 301-306.
- [19] MASSERA A, SORIA A, CATANIA C, et al. Simultaneous inoculation of Malbec (*Vitis vinifera*) musts with yeast and bacteria: Effects on fermentation performance, sensory and sanitary attributes of wines[J]. Food Technology and Biotechnology, 2009, 47(2): 192-201.
- [20] 闫彬, 贺银凤. 乳酸菌与酵母菌共生机理综述[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 277-281.
- YAN B, HE Y F. Review on symbiosis mechanism of lactic acid bacteria and yeast[J]. Food Science, 2012, 33(3): 277-281.
- [21] KING S, BEELMAN R. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1986, 37(7): 53-60.
- [22] ABRAHAMSE C E, BARTOWSKY E J. Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: Influence on chemical composition[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(1): 255-265.
- [23] 张晓松, 孙艳梅, 胡振生, 等. 都柿果酒在酿制过程中总酚和花色苷含量和抗氧化活性[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(3): 120-124.
- ZHANG X S, SUN Y M, HU Z S, et al. Antioxidant activity and content of total hydroxybenzene and anthocyanins in persimmon wine during brewing process[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(3): 120-124.
- [24] 胡冀太, 杜金华, 何桂芬. 果酒酵母对发酵山楂酒品质及抗氧化性的影响[J]. 酿酒, 2012, 39(5): 52-56.
- HU J T, DU J H, HE G F. Effects of wine yeast on quality and antioxidant activity of fermented hawthorn wine[J]. Wine Making, 2012, 39(5): 52-56.
- [25] 李凭, 李彤, 高莹莹, 等. 葡萄汁酵母和植物乳杆菌混合发酵对葡萄酒发酵的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(3): 138-142.
- LI P, LI T, GAO Y Y, et al. Effects of grape juice yeast and *Lactobacillus plantarum* on wine fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(3): 138-142.
- [26] MINNAAR P P, DU P H W, JOLLY N P, et al. Non-Saccharomyces yeast and lactic acid bacteria in co-inoculated fermentations with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the phenolic content of Syrah wine[J]. Food Chemistry: X, 2019, 4: 100070.
- [27] VALDÉS H D, BRAVO B M, DELFEDERICO L, et al. Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentation in Patagonian red wines revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with two targeted genes[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2015, 21(1): 49-56.
- [28] LUCIO O, PARDO I, KRIEGER W S, et al. Selection of *Lactobacillus* strains to induce biological acidification in low acidity wines[J]. Food Science and Technology, 2016, 73(12): 334-341.
- [29] 王宏, 陈晓艺, 张军翔. 贺兰山东麓年轻红葡萄酒的CIELab颜色空间特征[J]. 食品科学, 2014, 35

- (9): 20–23.
- WANG H, CHEN X Y, ZHANG J X. CIELab color space characteristics of young red wine from the eastern slope of Helan Mountain[J]. Food Science, 2014, 35(9): 20–23.
- [30] RINALDI A, PICARIELLO L, SOARES S, et al. Effect of oxidation on color parameters, tannins, and sensory characteristics of Sangiovese wines[J]. European Food Research and Technology, 2021, 247(12): 2977–2991.
- [31] 雷用东, 邓小蓉, 罗瑞峰, 等. 3种颜色体系在食品应用中的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 241–246.
- LEI Y D, DENG X R, LUO R F, et al. Research progress of three color systems in food application[J]. Food Science, 2016, 37(1): 241–246.
- [32] 张波, 韩舜愈, 马腾臻, 等. 红葡萄酒中花色苷衍生物结构研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(5): 284–295.
- ZHANG B, HAN S Y, MA T Z, et al. Progress in structural structure of colorin derivatives in red wine[J]. Food Science, 2018, 39(5): 284–295.
- [33] PREZMAGARIO S, GONZLEZSANJOS M L. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines[J]. Food Chemistry, 2003, 81(2): 301–306.
- [34] 韩富亮, 李杨, 李记明, 等. 红葡萄酒花色苷结构和颜色的关系研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 328–336.
- HAN F L, LI Y, LI J M, et al. Research progress on the relationship between anthocyanins structure and color of red wine[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2011, 30(3): 328–336.
- [35] 梁娜娜, 韩深, 何非, 等. 几种红葡萄酒过程中花色苷组成与CIELab参数的相关分析[J]. 中国酿造, 2014, 33(1): 48–55.
- LIANG N N, HE S, HE F, et al. Correlation analysis of anthocyanins composition and CIELab parameters in wine making of several red grapes[J]. Chinese Brewing, 2014, 33(1): 48–55.
- [36] ZAPPAROLI G, TOSI E, AZZOLINI M, et al. Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines[J]. South African Journal for Enology and Viticulture, 2009, 30(1): 49–55.

Effects of Inoculating Timing of Selected Indigenous Lactic Acid Bacteria and Yeast on Fermentation in Red Synthetic Grape Juice Medium

Jiang Jiao^{1,2,3}, Shi Xuerong¹, Chai Mengmiao¹, Huang Rong¹, Zhang Aixia¹,
Song Yuyang^{1,2,3}, Qin Yi^{1,2,3}, Liu Yanlin^{1,2,3*}

¹College of Enology, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi

²Shaanxi Grape and Wine Engineering Technology Research Center, Yangling 712100, Shaanxi

³Ningxia Helan Mountain's East Foothill Wine Experiment and Demonstration Station of Northwest A & F University, Yongning 750104, Ningxia)

Abstract Lactic acid bacteria can be inoculated at different stages of alcoholic fermentation during winemaking, but the influence of inoculation timing of indigenous lactic acid bacteria on wine is not well defined. The aim of this study was to investigate the influence of inoculation timing of Chinese indigenous lactic acid bacteria and commercial yeast on physiochemical parameters and the color of synthetic red grape juice. Three selected lactic acid bacteria 6–20, GZC3 and V22 were used to ferment the synthetic medium with *Saccharomyces cerevisiae* CECA. Two inoculation strategies were applied in the fermentation, including simultaneous and sequential inoculation, with single fermentation as the control. The sequential inoculation includes inoculating *Saccharomyces cerevisiae* 2 and 4 days prior to inoculating lactic acid bacteria and vice versa. The fermentation process was monitored by regularly measuring residual sugar, malic acid, and the colony numbers of both yeast and bacteria. After completion of fermentation, basic physiochemical parameters such as total acidity, volatile acidity, and pH were measured. Following this, total polyphenols and anthocyanins were determined by the Forlin phenol method and pH-differential method, respectively. Color parameters were then obtained through

CIELab color space. Further, the correlation between color parameters and anthocyanin content was analyzed to evaluate wine color characteristics. Finally, Adobe Photoshop CS6 software was used to intuitively simulate the color of each wine sample. Results showed that there were significant differences in fermentation characteristics of simulated wine fermented by different inoculation strategies and these were strain-dependent. All strain pairs successfully completed alcohol fermentation (AF) in approximately 15 days. Malolactic fermentation (MLF) occurs simultaneously with or earlier than AF, depending on the inoculation timing of lactic acid bacteria. Not surprisingly, MLF was completed together with AF, or shortly after the depletion of residual sugar. Early inoculation of lactic acid bacteria was more conducive to MLF, whilst inoculation of yeast prior to lactic acid bacteria was more beneficial to AF. Particularly for CECA/6-20 mixed fermentations, AF took 2-4 days less when inoculating CECA prior to the inoculation of 6-20 compared to the rest inoculation strategies. Simultaneous inoculation of both *S. cerevisiae* and lactic acid bacteria had no significant effect on overall fermentation duration. The basic physicochemical parameters of all wine samples met the relevant national wine standards. In addition, the total phenol content and total anthocyanin level of most fermentation groups decreased significantly, and there was a significant correlation between these two parameters, though their correlation to CIELab color parameters was weak. With regard to wine colors, sequential inoculation resulted in darker colors compared to the simultaneous inoculation group. Interestingly, wine color was also species-specific, in particular, samples inoculated with *Oenococcus oeni* GZC3 were generally darker than that inoculated with *Lactobacillus plantarum* V22 and 6-20. To conclude, this study clearly proved that our selected indigenous lactic acid bacteria strains were compatible with the commercial yeast CECA regardless of inoculation timing, thereby reducing the overall fermentation duration. Co-fermentation of yeast and bacteria would impact certain physicochemical parameters of wine. This study provides theoretical support and reference for efficient local production of high-quality red wine as well as helps promote the wide application of indigenous wine in China.

Keywords *Saccharomyces cerevisiae*; lactic acid bacteria; mixed fermentation; inoculation timing; physicochemical parameters