

共接种发酵对模拟葡萄汁发酵香气物质的影响

杨 柳, 徐彬艳, 石 琳, 张 璇, 祝 霞, 杨学山*

(甘肃农业大学食品科学与工程学院 兰州 730070)

摘要 为探究酿酒酵母与酒酒球菌共接种对模拟葡萄汁发酵香气物质的影响,在酒精发酵过程中,分别接种本土酒酒球菌 MG-1、GF-2 和商业菌株 VP41 启动苹果酸-乳酸发酵。采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术 (HS-SPME-GC-MS) 测定酒样挥发性香气化合物,通过多元统计分析揭示不同菌株组合及接种时间对发酵香气物质的影响。结果显示,酿酒酵母与酒酒球菌共接种酒样中挥发酸、残糖含量分别显著降低了 6.67%~15.56% 和 18.75%~40.63% ($P < 0.05$), 发酵香气物质种类和含量明显增加。正交偏最小二乘-判别分析结合香气物质气味活性值 (OAV) 分析表明,不同酒酒球菌菌株共接种处理组间的共有差异物质为 11 种,尤其是酿酒酵母 VW 菌株接种 48 h 后再接种酒酒球菌 MG-1 菌株的共接种处理组 (VM48) 酒样中,己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯和苯乙醇含量显著增加了 46.16%~237.41%, 酒体热带水果、红色水果和花香特征更加突出。研究结果可为葡萄酒酿造过程中应用优良本土酒酒球菌菌株与酿酒酵母菌株进行共接种发酵提供理论依据。

关键词 酿酒酵母; 本土酒酒球菌; 共接种发酵; 发酵香气物质; 正交偏最小二乘-判别分析

文章编号 1009-7848(2024)08-0279-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.08.027

香气是决定葡萄酒质量及消费者喜好的关键指标之一^[1]。在葡萄酒发酵过程中,由微生物合成或转化的高级醇、酯、有机酸、醛类等挥发性化合物,可使不同产地、年份、品种及类型的葡萄酒具有强烈的酒香特征^[2]。然而,葡萄质量、发酵菌种、酿造工艺、陈酿条件等因素均可以改变发酵香气化合物的种类和含量,进而影响酒体感官特征的协调性和典型性。由酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*, *O. oeni*) 主导的苹果酸-乳酸发酵 (Malolactic fermentation, MLF), 在将口感较为刺激的 *L*-苹果酸转变为 *L*-乳酸, 在提高了酒体圆润度的同时,还可以合成多种挥发性物质, 增加香气浓郁度和复杂性^[3]。此外,酒酒球菌还能够分解酒精发酵产生的乙醛,有助于减少发酵过程中的 SO_2 添加量^[4]。

MLF 作为生产优质葡萄酒的必须工艺环节,其能否成功启动及顺利完成主要取决于酒酒球菌菌株的发酵特性和接种时间^[5]。在实际生产中,为避免酒酒球菌对酒精发酵 (Alcoholic fermenta-

tion, AF) 的影响,通常在 AF 结束后进行 MLF^[5]。然而,在顺序接种时,由于酒体乙醇含量高、可利用营养物质水平低,加之低 pH 值、高 SO_2 质量浓度及酵母细胞产生的中链脂肪酸等因素的影响,使 MLF 面临迟滞甚至失败的风险^[6]。有研究表明,若在 AF 过程中接种酒酒球菌,可使酒酒球菌逐步适应不断增加的乙醇胁迫,且发酵醪中存在更多的必需氨基酸、维生素和矿物质,更有利于菌株生长,显著缩短 MLF 发酵时间,降低生产成本^[7]。此外,酒酒球菌可以在 MLF 期间修饰酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 衍生的挥发性化合物,对葡萄酒的香气物质和感官特征产生独特影响^[8]。在共接种发酵过程中,由于不同来源葡萄表皮附着的野生酿酒微生物存在一定的种属差异,影响了酿酒酵母菌株与酒酒球菌菌株混菌发酵调控香气化合物相关研究结果的一致性^[9]。选择人工配制的模拟葡萄汁接种发酵,更有利于探讨特定酿酒酵母与酒酒球菌菌株组合对发酵酒样香气质量的真实贡献。

近年来,由于商业酒酒球菌菌株的大量推广应用,使发酵酒体的同质化日趋严重,无法满足消费者日益增加的多元化需求。本土酒酒球菌菌株对提高葡萄酒质量并赋予其独特“风土”特色的贡献已得到充分证明^[10-12]。本试验以分离鉴定自甘肃

收稿日期: 2023-08-12

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32060581, 32260637); 甘肃省葡萄酒产业发展基金项目 (20180820-08, 20180820-07, GCJ-2019-125-1)

第一作者: 杨柳,男,硕士生

通信作者: 杨学山 E-mail: yangxs@gsau.edu.cn

河西走廊产区的2株本土酒酒球菌(MG-1、GF-2)、1株商业酒酒球菌(VP41)为供试菌株,与商业酿酒酵母(VW、AW)菌株共接种发酵,通过多元统计分析方法比较不同发酵模式下酒样发酵香气物质的差异,探究酿酒酵母菌株与酒酒球菌菌株共接种发酵菌株组合和接种时间对发酵香气物质的影响,以期为甘肃河西走廊葡萄酒产区优良酒酒球菌菌株产业化应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 酿酒酵母 白佳酿(Vintage white, VW)、白香郁(Aroma white, AW)为甘肃河西走廊产区葡萄酒生产企业酿造优质干葡萄酒主要使用的2株商业酵母菌株,购于意大利 Enartis 公司。

1.1.2 酒酒球菌 本土酒酒球菌菌株分别标记为MG-1、GF-2,由甘肃省葡萄与葡萄酒工程学重点实验室鉴定并保存,具有良好的发酵耐受性^[13-14]。商业酒酒球菌菌株VP41,购于上海杰兔责任有限公司。

1.1.3 试剂 L-苹果酸检测试剂盒,爱尔兰 Megazyme 公司;果糖、纤维二糖、肌醇、维生素 B₆、维生素 B₃、维生素 B₁、泛酸钙、对氨基苯甲酸、L-苹果酸、钼酸钠,均为分析纯级,上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、盐酸半胱氨酸、酒石酸氢钾、硫酸镁、硫酸锰、柠檬酸、偏重亚硫酸钠,均为分析纯级,天津市光复精细化工研究所;乙酸己酯、乙酸乙酯、辛酸乙酯、苯乙醇、辛酸等香气标准品和2-辛醇,均为色谱纯级,美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

AL104 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;UV-6100 紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;TRACE 1310-ISQ GC-MS 仪、ISQ 型单四极杆质谱仪,美国 Thermo Scientific 公司;50/30 μm DVB/CAR/PDMS 固相微萃取头,美国 Surpelco 公司;PHS-3C 精密 pH 计,上海雷磁责任有限公司;LDZX 立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;HWS 恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;SW-CJ-2FD 超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;SPX-150-II 生化培养箱,上

海跃进医疗器械有限公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基及模拟葡萄汁的配制 本土酒酒球菌的扩大培养采用 ATB 培养基^[14],ATB 培养基配方如下:葡萄糖 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,盐酸半胱氨酸 0.5 g/L,硫酸镁 0.2 g/L,硫酸锰 0.05 g/L,番茄汁 25%;固体培养基添加琼脂 20 g/L。使用 1 mol/L NaOH 分别将液体培养基和固体培养基 pH 值调至 4.8 和 5.0,121 °C 灭菌 20 min。

参照马腾臻^[15]的配方构建模拟葡萄汁体系。

1.3.2 菌种活化

1.3.2.1 酿酒酵母菌株活化 按照 0.2 g/L 的添加量称取活性干酵母于锥形瓶内,加入 10 倍体积无菌水,于 37 °C 条件下活化 15~20 min 后;加入等体积模拟葡萄汁,于 28 °C 条件下活化 15 min。

1.3.2.2 本土酒酒球菌菌株培养 挑取斜面保存的 MG-1、GF-2 菌株接种于液体 ATB 培养基,28 °C 厌氧培养至对数期($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 1.2$),转接于模拟葡萄汁体系。商业酒酒球菌 VP41 活化:按照说明书推荐的方法进行。

1.3.3 模拟葡萄汁发酵 所有处理组均按 1×10^6 CFU/mL 剂量分别接种酿酒酵母菌株后,将 5 L 棕色发酵瓶置于 20 °C 环境下进行控温发酵。按照表 1 接种方案,除 VW 组和 AW 组作为对照外,其余共接种处理组在 AF 24,48,72 h 时分别按 1×10^7 CFU/mL 剂量接入相应的酒酒球菌菌株,继续 20 °C 控温发酵。还原糖含量 < 4 g/L 且 L-苹果酸含量 < 0.2 g/L 时添加 50 mg/L SO₂(以偏重亚硫酸钠质量计)结束发酵,取样分析。所有处理均重复 3 次。

1.3.4 指标测定 参照 L-苹果酸检测试剂盒推荐方法测定酒样中 L-苹果酸含量。还原糖、总酸、挥发酸含量和 pH 值参照《葡萄酒、果酒通用分析方法》(GB/T 15038-2006) 中的方法进行测定^[16]。酒精度参照《食品安全国家标准 酒中乙醇浓度的测定》(GB 5009.225-2016)中的方法进行测定^[17]。

1.3.5 香气物质测定

1.3.5.1 顶空固相微萃取条件 参照祝霞等^[18]的方法,并略作修改。取 8 mL 酒样于 15 mL 顶空瓶中,加入 2.4 g 氯化钠和 20 μL 2-辛醇(质量浓度为 81.06 mg/L),加磁力搅拌转子,置于恒温磁力搅拌器中,40 °C 下水浴平衡 30 min 后顶空萃取 30

表 1 不同菌株组合编号和接种时间

Table 1 Combination number of different bacterial strains and inoculation time

接种时间/h	菌株组合编号							
	VW+MG-1	VW+GF-2	VW+VP41	AW+MG-1	AW+GF-2	AW+VP41	VW	AW
0	VW	VW	VW	AW	AW	AW	VW	AW
24	VM24	VG24	VP24	AM24	AG24	AP24	/	/
48	VM48	VG48	VP48	AM48	AG48	AP48	/	/
72	VM72	VG72	VP72	AM72	AG72	AP72	/	/

注:“/”表示在 AF 24,48,72 h 不接种酒球菌。VW 和 AW 代表仅接种酿酒酵母菌株的试验组。

min。萃取结束后,取出萃取头插入 GC 进样口解析 5 min。

1.3.5.2 GC-MS 条件 参照祝霞等^[8]的方法,并略作修改。毛细管色谱柱为 DB-WAX (60 m×2.5 mm×0.25 μm);升温程序:40 ℃保持 5 min,以 3.5 ℃/min 升温至 180 ℃,保持 15 min。进样口温度 240 ℃,载气为高纯氮气,流速 1 mL/min,不分流进样。质谱条件:电子轰击离子源(EI),离子源温度 250 ℃,连接杆温度 180 ℃,电子轰击能 70 eV,全扫描模式,扫描范围 30~350 *m/z*。

1.3.5.3 定性与定量分析 香气物质质谱图通过 NIST-II、Wiley 及香精香料谱库进行初步检索对比,并结合人工图谱解析进行定性分析,确认各个香气物质的化学成分,最终采用正、反匹配度大于 700 的鉴定结果。利用标准曲线($R^2>0.995$)对已有标准品化合物进行定量,无标准品的化合物采用化学结构、官能团相似、碳原子数相近的标准物质进行半定量。香气物质气味活性值 (Odor active value, OAV)按下式计算^[19]。

$$OAV = \frac{\text{香气物质含量}}{\text{嗅觉阈值}} \quad (1)$$

1.4 数据处理

通过 Microsoft Office Excel 2010 进行基本数据处理,采用 IBM SPSS Statistics 25.0 进行单因素方差分析 (Duncan 法, $P<0.05$,差异显著)和 *t*-检验 ($P<0.05$)、SIMCA 14.1 进行正交偏最小二乘-判别分析 (Orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)、Origin 2021 绘制柱状图、韦恩图及主成分分析 (Principal component analysis, PCA)。

2 结果与分析

2.1 共接种处理对发酵时间及酒样理化指标的影响

不同处理组酒样的相关指标结果如表 2 所示。酿酒酵母 AW 与 VW 菌株完成 AF 时间存在明显差异,尤其是 AW 菌株需要 14 d 才能完成 AF,这可能与菌株对发酵温度的敏感性有关,而未观察到酒球菌接种对 AF 时间有明显影响。所有共接种处理组均在 25 d 内完成 MLF (*L*-苹果酸含量 <0.2 g/L),其中 MG-1 菌株共接种处理组均在 6 d 内完成 MLF;GF-2 菌株共接种处理组均在 20 d 内完成 MLF;与 MG-1、GF-2 菌株共接种处理组相比,VP41 菌株共接种处理组完成 MLF 所需时间更长,尤其是 AP72 处理组需要 25 d 完成 MLF。在所有处理组均完成 AF (残糖含量 <4 g/L)时,与 VW 组和 AW 组相比,共接种处理组残糖含量均显著降低 ($P<0.05$),MLF 后酒样 pH 值均显著升高 ($P<0.05$),总酸含量 (以酒石酸含量计)和挥发酸含量 (以乙酸含量计)均显著降低 ($P<0.05$)。

2.2 发酵香气物质分析

2.2.1 不同接种时间对发酵香气物质的影响 葡萄酒酿造相关微生物菌株发酵产生的挥发性香气物质主要包括脂肪酸乙酯、乙酸酯、高级醇和挥发性脂肪酸等化合物,通过协同或平衡作用构成了酒样的香气多样性和复杂性^[20]。酵母和细菌的相互作用会影响这些化合物在葡萄酒中的含量,决定葡萄酒的香气轮廓。本试验所有供试酒样中共检测到 42 种挥发性香气化合物。其中,MG-1 菌株共接种发酵酒样中脂肪酸乙酯 13 种、乙酸酯 4 种、高级醇 9 种、挥发性脂肪酸 5 种、苯乙基类化

表2 不同发酵处理模拟酒的相关指标

Table 2 Physicochemical parameters of simulated wines obtained by different fermentation treatments

处理	AF 时间/d	MLF 时间/d	残糖含量/ (g/L)	酒精度/% vol	pH 值	总酸含量/ (g/L)	挥发酸含量/ (g/L)	L-苹果酸 含量/(g/L)
AW	14.00		3.20 ± 0.05 ^b	10.37 ± 0.15 ^a	3.54 ± 0.02 ^f	7.21 ± 0.03 ^a	0.59 ± 0.02 ^a	2.62 ± 0.01 ^a
AM24	14.00	6.00	2.60 ± 0.05 ^d	10.00 ± 0.20 ^b	3.68 ± 0.02 ^{cd}	5.40 ± 0.01 ^{cd}	0.53 ± 0.01 ^{cd}	0.17 ± 0.00 ^d
AM48	14.00	6.00	2.40 ± 0.05 ^e	9.93 ± 0.12 ^b	3.68 ± 0.01 ^{cd}	5.37 ± 0.01 ^d	0.50 ± 0.02 ^e	0.15 ± 0.00 ^f
AM72	14.00	6.00	2.60 ± 0.05 ^d	9.87 ± 0.12 ^b	3.68 ± 0.01 ^d	5.37 ± 0.02 ^d	0.51 ± 0.01 ^{de}	0.12 ± 0.00 ⁱ
AG24	14.00	8.00	2.40 ± 0.05 ^e	9.93 ± 0.12 ^b	3.80 ± 0.01 ^a	5.09 ± 0.03 ^f	0.51 ± 0.01 ^e	0.16 ± 0.00 ^e
AG48	14.00	9.00	1.90 ± 0.05 ^b	9.87 ± 0.12 ^b	3.79 ± 0.01 ^a	5.05 ± 0.02 ^g	0.51 ± 0.01 ^{de}	0.13 ± 0.00 ^b
AG72	14.00	8.00	2.00 ± 0.05 ^g	9.93 ± 0.12 ^b	3.78 ± 0.01 ^a	5.10 ± 0.02 ^f	0.50 ± 0.02 ^e	0.12 ± 0.00 ^j
AP24	14.00	13.00	2.00 ± 0.06 ^g	10.00 ± 0.20 ^b	3.73 ± 0.01 ^b	5.42 ± 0.01 ^c	0.54 ± 0.01 ^{bc}	0.16 ± 0.00 ^e
AP48	14.00	17.00	2.00 ± 0.07 ^g	9.93 ± 0.12 ^b	3.73 ± 0.01 ^b	5.37 ± 0.01 ^d	0.55 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.00 ^f
AP72	14.00	25.00	2.00 ± 0.08 ^g	10.07 ± 0.12 ^b	3.73 ± 0.01 ^b	5.31 ± 0.01 ^e	0.55 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.00 ^g
VW	8.00		3.50 ± 0.05 ^a	10.40 ± 0.10 ^a	3.44 ± 0.01 ^g	6.81 ± 0.03 ^b	0.45 ± 0.01 ^f	2.49 ± 0.01 ^b
VM24	8.00	6.00	2.10 ± 0.05 ^f	10.00 ± 0.20 ^b	3.62 ± 0.01 ^e	4.34 ± 0.02 ^j	0.39 ± 0.01 ⁱ	0.18 ± 0.00 ^e
VM48	8.00	6.00	2.10 ± 0.05 ^f	9.93 ± 0.12 ^b	3.62 ± 0.01 ^e	4.29 ± 0.03 ^k	0.40 ± 0.01 ^{hi}	0.16 ± 0.00 ^e
VM72	8.00	6.00	2.40 ± 0.05 ^e	9.93 ± 0.12 ^b	3.62 ± 0.02 ^e	4.41 ± 0.02 ⁱ	0.39 ± 0.01 ⁱ	0.10 ± 0.00 ^j
VG24	8.00	11.00	2.60 ± 0.05 ^d	9.87 ± 0.12 ^b	3.79 ± 0.02 ^a	4.22 ± 0.01 ^l	0.39 ± 0.01 ⁱ	0.18 ± 0.00 ^e
VG48	8.00	14.00	2.70 ± 0.05 ^e	9.93 ± 0.12 ^b	3.79 ± 0.01 ^a	4.20 ± 0.02 ^l	0.38 ± 0.01 ⁱ	0.17 ± 0.00 ^d
VG72	8.00	20.00	2.40 ± 0.05 ^e	10.00 ± 0.20 ^b	3.79 ± 0.02 ^a	4.19 ± 0.02 ^l	0.39 ± 0.01 ⁱ	0.16 ± 0.00 ^e
VP24	8.00	12.00	2.40 ± 0.06 ^e	9.87 ± 0.12 ^b	3.70 ± 0.01 ^c	4.46 ± 0.02 ^h	0.42 ± 0.01 ^g	0.15 ± 0.00 ^f
VP48	8.00	15.00	2.40 ± 0.07 ^e	9.93 ± 0.12 ^b	3.70 ± 0.01 ^{cd}	4.46 ± 0.01 ^h	0.42 ± 0.01 ^g	0.14 ± 0.00 ^g
VP72	8.00	20.00	2.40 ± 0.08 ^e	9.93 ± 0.12 ^b	3.70 ± 0.01 ^{cd}	4.47 ± 0.01 ^h	0.42 ± 0.01 ^{gh}	0.14 ± 0.00 ^g

注:表中同一列数据后的不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$);结果以平均值±标准差表示。

合物4种;GF-2菌株共接种发酵酒样中脂肪酸乙酯15种、乙酸酯2种、高级醇9种、挥发性脂肪酸5种、苯乙基类化合物4种;VP41菌株共接种发酵酒样中脂肪酸乙酯10种、乙酸酯2种、高级醇9种、挥发性脂肪酸4种、苯乙基类化合物4种。

由图1a可知,与VW、AW组相比,MG-1菌株共接种处理组的脂肪酸乙酯含量均显著增加($P<0.05$),其中VM48处理组增加最明显(高于VW组69.33%)。在MG-1菌株与酿酒酵母AW菌株共接种的处理组中未观察到乙酸酯含量的显著增加,而VM48、VM72处理组的乙酸酯含量显著增加($P<0.05$)。与VW组相比,VM48处理组的高级醇含量增加了67.23%,其余共接种处理组高级醇含量呈下降趋势。除VM24、VM48处理组外,其余共接种处理组的挥发性脂肪酸含量显著增加($P<0.05$)。与AW组相比,AM72处理组挥发性脂肪酸含量增加了68.89%。苯乙基类化合物在所有

共接种处理组中均呈上升趋势,其中VM48处理组增加了66.24%。整体而言,VM48处理组对脂肪酸乙酯、乙酸酯、高级醇、苯乙基类化合物生成的促进作用最明显,具有赋予酒样浓郁花香、果香、醇香等^[21-23]特征的潜力。

由图1b可知,与VW、AW组相比,GF-2菌株共接种处理组的脂肪酸乙酯含量均呈上升趋势,除VG72处理组外,其余共接种处理组均显著增加($P<0.05$)。与VG24、VG48、VG72处理组相比,GF-2菌株与酿酒酵母AW菌株共接种发酵更有利于脂肪酸乙酯的生成。与AW组相比,AG48、AG72处理组的脂肪酸乙酯含量分别增加了58.34%、75.60%。GF-2菌株与酿酒酵母AW菌株共接种处理组的高级醇含量呈下降趋势,其中AG24、AG48处理组的高级醇含量显著降低($P<0.05$)。GF-2菌株与酿酒酵母VW菌株共接种处理组的高级醇含量变化受接种时间影响,VG48、

VG72 处理组的高级醇含量显著增加 ($P<0.05$), VG24 处理组的高级醇含量显著降低 ($P<0.05$)。与 VW、AW 组相比, VG72、AG48 处理组的苯乙基类化合物含量显著增加 ($P<0.05$)。整体而言, AG72 处理组有利于促进脂肪酸乙酯的生成, 同时避免了挥发性脂肪酸的过量产生, 有利于发酵酒样形成更加平衡和丰富的果香和花香^[21-23]特征。

由图 1c 可知, 与 VW、AW 组相比, 除 VP24、AP72 处理组外, 其余 VP41 菌株共接种处理组的脂肪酸乙酯含量显著增加 ($P<0.05$), 其中 VP72 处理组脂肪酸乙酯含量增加了 42.71%。VP41 菌株共接种发酵对乙酸酯含量的影响与接种的酿酒酵母菌株有关, 其中 VP24、VP48、VP72 处理组的乙酸酯含量显著下降 ($P<0.05$), 而 AP24、AP48、AP72 处理组的乙酸酯含量显著增加 ($P<0.05$)。VP41 菌株共接种处理组中仅 VP72、AP48 处理组观察到高级醇含量显著增加 ($P<0.05$)。VP41 菌株共接种发酵对挥发性脂肪酸含量的影响也与接种的酿酒酵母菌株有关, AP24、AP48、AP72 处理组中观察到挥发性脂肪酸含量显著增加 ($P<0.05$), 而 VP24 处理组观察到挥发性脂肪酸含量显著降低 ($P<0.05$)。整体而言, VP72 处理组对脂肪酸乙酯生成的促进作用最大, 同时避免了挥发性脂肪酸的过量产生, 有利于提升酒样的果香品质^[21-23]。

综上所述, 分别选择 MG-1、GF-2、VP41 菌株各自共接种处理组中, 挥发性化合物种类和含量最高的 VM48、AG72、VP72 组酒样 GC-MS 检测数据进行下一步分析, 探讨不同酒球菌菌株共接种发酵对酒样挥发性香气化合物代谢差异的影响。

2.2.2 共接种处理组挥发性差异物质筛选 O-PLS-DA 属于有监督统计的分析方法, 相比于 PCA 和偏最小二乘判别分析法 (Partial least square-discriminant analysis, PLS-DA), 可以通过设置预设分类变量来剔除未控制变量对数据造成的影响, 能进一步挖掘数据信息和量化各处理组间的差异程度, 最大程度诠释组间差异^[24-26]。

将 VM48、VP72、AG72 处理组分别与各自对照组 (VW、AW) 进行 OPLS-DA 分析, 从而筛选共接种处理组与 VW 组、AW 组的潜在差异代谢物, 结果如图 2 所示。OPLS-DA 模型中 R^2X 和 R^2Y 分

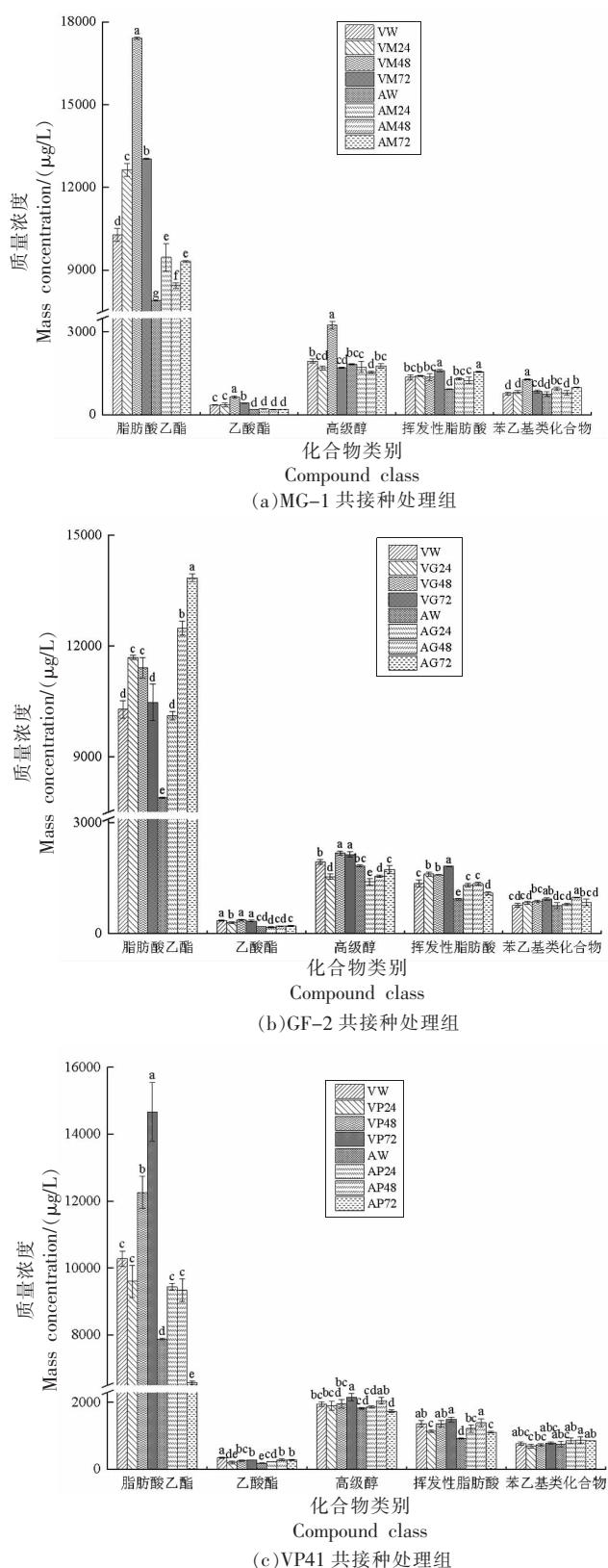


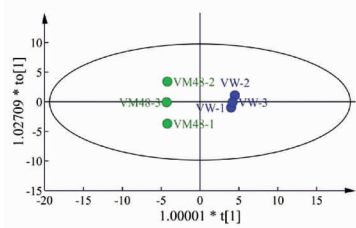
图 1 不同发酵处理酒样发酵香气物质含量

Fig.1 Contents of fermentative aroma compounds in different simulated wine samples

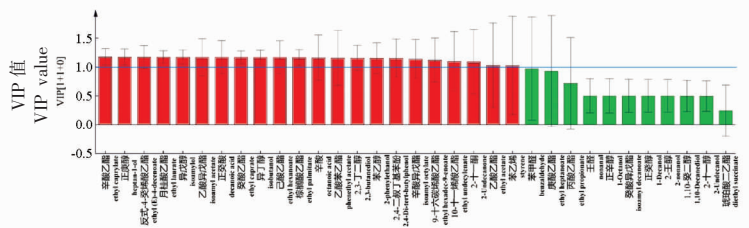
别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, Q^2 表示模型的预测能力,理论上 R^2 和 Q^2 越接近 1.0 说明模型越好,越低说明模型的拟合准确性越差;通常情况下 R^2 和 Q^2 高于 0.5(50%)较好,且两者差值不应太大^[26]。图 2a 是 VM48 处理组与对照组 (VW) 的差异分析 ($Q^2:0.998;R^2X:0.949;R^2Y:0.999$);图 2c 是 AG72 处理组与对照组 (AW) 的差异分析 ($Q^2:0.999;R^2X:0.976;R^2Y:1.000$);图 2e 是 VP72 处理组与对照组 (VW) 的差异分析 ($Q^2:0.988;R^2X:0.889;R^2Y:0.998$),结果表明所有模型都具有良好的拟合及预测能力。

变量投影重要度 (Variable importance for the projection, VIP) 值越大,贡献率越大。通常 $VIP>1$ 为常见的差异代谢物筛选标准^[26]。此外,为使分析结果更准确,采用 t -检验 ($P<0.05$) 结合 $VIP>1$ 筛选关键差异代谢物。由图 2b 可知,VM48 处理组

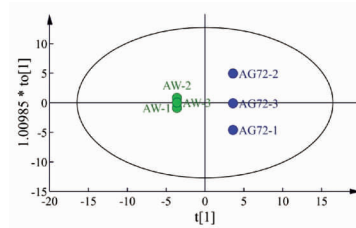
与 VW 组之间的关键差异代谢物有 22 种,与 VW 组相比,VM48 处理组的己酸乙酯、乙酸异戊酯、异丁醇等 18 种关键差异代谢物显著增加 ($P<0.05$),棕榈酸乙酯、9-十六碳烯酸乙酯、正癸酸、正庚醇含量显著降低 ($P<0.05$);由图 2d 可知,AG72 处理组与 AW 组之间的关键差异代谢物有 16 种,与 AW 组相比,AG72 处理组的癸酸乙酯、月桂酸乙酯、辛酸异戊酯等 13 种关键差异代谢物显著增加 ($P<0.05$),异戊醇、正庚醇含量显著降低 ($P<0.05$);由图 2f 可知,VP72 处理组与 VW 组之间的关键差异代谢物有 19 种,与 VW 组相比,VP72 处理组的己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯等 6 种关键差异代谢物显著增加 ($P<0.05$),丙酸乙酯、乙酸乙酯、正庚醇等 11 种关键差异代谢物显著降低 ($P<0.05$)。



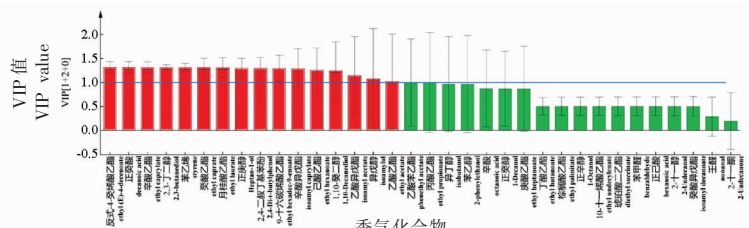
(a)VM48 与 VW OPLS-DA 得分图



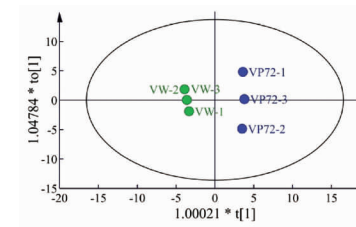
(b)VM48 与 VW OPLS-DA 的 VIP 值



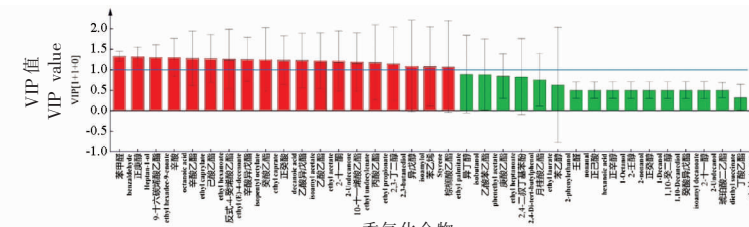
(c)AG72 与 AW OPLS-DA 得分图



(d)AG72 与 AW OPLS-DA 的 VIP 值



(e)VP72 与 VW OPLS-DA 得分图



(f)VP72 与 VW OPLS-DA 的 VIP 值

注:红色柱子代表 $VIP \geq 1$ 的化合物,绿色柱子代表 $VIP < 1$ 的化合物,蓝线是 $VIP=1$ 的分界线。

图 2 不同酒球菌菌株发酵处理酒样香气物质的 OPLS-DA

Fig.2 OPLS-DA of aroma compounds in simulated wines co-inoculated with different *Oenococcus oeni* strains

采用韦恩图分析不同酒酒球菌菌株共接种处理组之间的差异物质,从而探究共接种发酵及酒酒球菌菌株对香气物质的影响。由图 3 可知,不同酒酒球菌菌株共接种处理组之间的共有差异物质为 11 种(己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、反式-4-癸烯酸乙酯、9-十六碳烯酸乙酯、乙酸异戊酯、辛酸异戊酯、正庚醇、2,3-丁二醇、正癸酸、苯乙烯),表明共接种发酵对酯类香气物质的生成具有显著影响,尤其是脂肪酸乙酯。此外,棕榈酸乙酯、异丁醇、乙酸苯乙酯、苯乙醇是 VM48 处理组特有的差异物质;1,10-癸二醇是 AG72 处理组特有的差异物质;丙酸乙酯、苯甲醛是 VP72 处理组特有的差异物质,体现了不同菌株对香气物质的代谢影响具有特异性。

2.2.3 不同酒酒球菌菌株共接种发酵酒样香气特征分析 为了进一步比较不同酒酒球菌菌株共接种处理组之间的香气特征差异,将对照组(VW、AW)、VM48、AG72、VP72 处理组的特征香气物质(OAV>0.1)进行主成分分析,结果如图 4 所示。PC1 和 PC2 方差贡献率分别为 76.52%和 14.10%,前 2 个主成分可以解释总方差的 90.62%。不同处理组可以在 PC1 上观察到明显差异,其中 VM48 处理组与对照组(VW、AW)、AG72、VP72 处理组区分明显。VW、VP72 位于 PC2 正半轴,AW、AG72、VM48 位于 PC2 负半轴。此外,可以观察到 VW 组的周围分布有正癸酸(脂肪、令人不愉悦的气味,OAV=0.79);VP72 处理组的周围分布有癸酸乙酯(果香、玫瑰,OAV=14.86);辛酸乙酯(苹果、梨、花香、甜味,OAV=1567.32)、己酸乙酯(花香、果香、草莓,OAV=235.75)、乙酸苯乙酯(玫瑰、热带水果、蜂蜜,OAV=0.65)、丁酸乙酯(草莓、香蕉、苹果,OAV=2.34)主要分布在 VM48 处理组周围。综合分析可得,与 VW 组和 AW 组相比,共接种发酵有利于促进特征香气物质的生成;同时,与 GF-2、VP41 菌株共接种发酵(AG72、VP72)相比,MG-1 菌株共接种发酵(VM48)对脂肪酸乙酯生成的促进作用更大,且抑制了正癸酸的生成,更有利于赋予酒样浓郁的花香、苹果、梨、草莓、甜味、热带水果、坚果味等特征。

结合 VIP 值(VIP>1)、t-检验(P<0.05)、OAV 值(OAV>0.1)分析可得,己酸乙酯、辛酸乙酯、癸

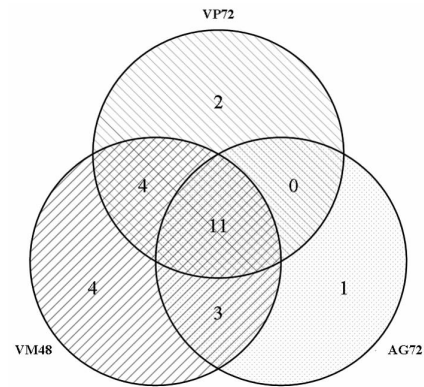


图 3 不同酒酒球菌菌株共接种处理组差异香气物质韦恩图

Fig.3 Venn diagram of differential aroma compounds in simulated wines co-inoculated with different *Oenococcus oeni* strains

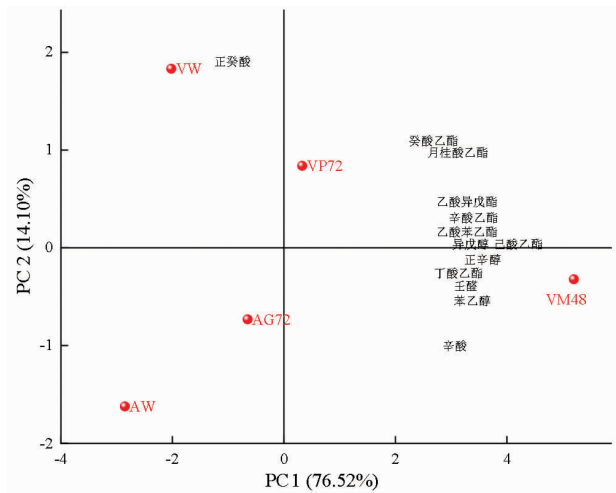


图 4 不同酒酒球菌菌株共接种处理组风味物质(OAV>0.1)的主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of flavor compounds (OAV>0.1) in simulated wines co-inoculated with different *Oenococcus oeni* strains

酸乙酯、乙酸异戊酯、正癸酸是区分共接种处理组(VM48、VP72、AG72)和 VW 组、AW 组的关键差异风味物质,乙酸苯乙酯、苯乙醇是区分 VM48 处理组和 AG72、VP72 处理组的关键差异风味物质。综合分析,共接种发酵具有提升酒样花香(玫瑰)、苹果、梨、香蕉、草莓等香气特征的潜力。

3 讨论

在共接种发酵过程中,酿酒酵母与酒酒球菌

菌株之间的相互作用可能会影响酿酒酵母的生长和 AF 时间^[27-30]。本研究中未观察到共接种发酵对 AF 的显著影响,且酒酒球菌在 AF 早期进行共接种发酵时,能显著缩短总发酵时间,这与 Tristezza 等^[27]、Raffaele 等^[10]的研究结果一致。与 GF-2、VP41 菌株相比, MG-1 菌株与酿酒酵母(VW、AW)菌株共接种 MLF 时间更短,表明 MG-1 菌株与酿酒酵母(VW、AW)菌株的相容性更佳。本试验的所有共接种处理组均在 25 d 内完成 MLF,这意味着在实际生产中可以尽早对葡萄酒进行分装、澄清和添加 SO₂, 避免其它不良微生物的生长繁殖,提高葡萄酒的微生物稳定性。从成本角度来看,缩短总发酵时间可以降低能源消耗,降低企业的生产成本。

酿酒酵母与酒酒球菌共接种发酵对挥发酸(以乙酸含量计)含量的影响一直是学者们关注的重点。Lucio 等^[31]的研究结果显示,在葡萄汁存在可发酵糖的情况下,酵母菌和乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)共接种发酵会导致乙酸含量增加。然而, Onetto 等^[32]的研究指出,乙酸含量增加可能是由于柠檬酸降解或戊糖代谢造成,选择同型乳酸发酵的 LAB 和酿酒酵母共接种发酵可以降低乙酸含量。本试验中共接种处理组的挥发酸含量均显著降低,证实了在可发酵糖的存在下进行共接种发酵的可行性。

研究表明,当高级醇含量低于 300 mg/L 时,通常认为其有助于葡萄酒的香气复杂性,赋予酒体一定的醇香特征^[33]。本试验结果显示,部分处理组(VM48、VG48、VG72、VP48、VP72、AP24、AP48)高级醇含量增加,其中 VM48 处理组增加最显著(1.67 倍),其余处理组高级醇含量降低。其中,异戊醇是含量最多的高级醇,且不同共接种处理组之间的高级醇含量差异主要是由异戊醇含量变化引起。异戊醇在酿酒酵母细胞中通过 Ehrlich 途径由亮氨酸降解产物合成,酒酒球菌与酿酒酵母之间的相互作用和营养物质竞争可以影响异戊醇的合成^[34]。此外,共接种发酵酒样中 2,3-丁二醇含量明显增加,有助于增强酒样奶油味^[35]。挥发性脂肪酸是葡萄酒中产生脂肪、腐臭和黄油味的原因^[36]。本试验结果显示,正癸酸被鉴定为区分 MLF 酒样和未 MLF 酒样的关键差异风味物质,而在与酿酒

酵母 VW 菌株共接种的处理组中含量显著降低,避免了酒样的花香和果香被高含量的挥发性脂肪酸所掩盖,从而导致酒样更加复杂^[34]。值得注意的是,VM48 处理组的乙酸苯乙酯、苯乙醇含量显著增加,具有赋予酒样玫瑰、热带水果、蜂蜜、花香等香气特征的潜力。

酿酒酵母与酒酒球菌共接种发酵期间,菌株之间的互利共生通常会对挥发性香气化合物的生物转化产生积极影响^[27]。特别是酒酒球菌的酯酶活性和柠檬酸代谢会提高酯类物质的含量^[37-38],加之不同酒酒球菌菌株在 MLF 期间的发酵特性差异,会显著影响酒体的感官特性^[38]。本试验结果显示, MG-1、GF-2、VP41 3 个菌株与酿酒酵母(VW、AW)菌株共接种发酵对脂肪酸乙酯生成的促进作用呈现出了接种菌株和接种时间的差异,可能是因为菌株之间的相互作用、营养竞争和风味酶活性变化所致^[35-39]。辛酸乙酯、癸酸乙酯、己酸乙酯被鉴定为共接种处理组(VM48、VP72、AG72)与 VW 组和 AW 组的关键差异风味物质,其含量不仅在共接种处理组中显著增加而且高于嗅觉阈值,有助于酒样花香和果香的形成,这与前人观察到的研究结果一致^[7,40]。值得注意的是,VM48 处理组的乙酸异戊酯含量显著增加(2.33 倍且 OAV>1),这可能与其前体物质异戊醇含量的显著增加有关,可赋予酒样香蕉味特征^[41]。综上所述,本试验证实了酿酒酵母与本土酒酒球菌的共接种发酵可以提高发酵效率;促进高级醇、脂肪酸乙酯的生成,提高酒样的果香和花香特征。然而,本研究的结果还需在更复杂的真实葡萄酒生产实践中进一步验证,尤其是酿酒酵母与酒酒球菌之间的代谢相互作用调控机制值得深入研究。

4 结论

本研究采用酿酒酵母与本土酒酒球菌共接种发酵,并基于多元统计分析了共接种发酵对发酵香气物质的影响。结果表明:共接种发酵不仅有助于缩短总发酵时间,降低挥发酸含量的生成,而且对酒样中脂肪酸乙酯类化合物的生成具有明显促进作用。在共接种发酵过程中,不同菌株组合和酒酒球菌接种时间对发酵酒样的挥发性化合物影响较为显著。通过 OPLS-DA 结合 OAV 值,筛选出区

分共接种处理组(VM48、AG72、VP72)和VW组、AW组的5种关键差异风味物质,主要包括己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸异戊酯、正癸酸;区分VM48处理组和AG72、VP72处理组的2种关键差异风味物质,分别是乙酸苯乙酯、苯乙醇。总体而言,VM48处理组显著增强了己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、苯乙醇含量,具有增强发酵酒样果香浓郁度和香气特征复杂性的良好应用前景。

参 考 文 献

- [1] 李华, 王华, 刘拉平, 等. 爱格丽白葡萄酒香气成分的GC/MS分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1250-1254.
LI H, WANG H, LIU L P, et al. Analysis of aroma components of Ecolly dry white wine by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(6): 1250-1254.
- [2] 代晨曦. 葡萄酒苹果酸-乳酸发酵过程中乳酸菌与风味物质的相关性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
DAI C X. Correlation between lactic acid bacteria and flavoring substances in wine malolactic fermentation process[D]. Shihezi: Shihezi University, 2019.
- [3] 张春晖, 罗耀文, 李华. 葡萄酒苹果酸-乳酸发酵代谢机理[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(5): 64-67.
ZHANG C H, LUO Y W, LI H. Metabolic mechanism of malolactic fermentation in wine[J]. Food and Fermentation Industries, 1999, 25(5): 64-67.
- [4] WANG S Y, LI S Y, ZHAO H F, et al. Acetaldehyde released by *Lactobacillus plantarum* enhances accumulation of pyranoanthocyanins in wine during malolactic fermentation[J]. Food Research International, 2018, 108: 254-263.
- [5] 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 the timing of lactic acid bacteria inoculation in ideal malolactic fermentation[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2010(9): 53-56.
- [6] TORRES-GUARDADO R, ESTEVE-ZARZOSO B, REGUANT C, et al. Microbial interactions in alcoholic beverages[J]. International Microbiology, 2021, 25(1): 1-15.
- [7] VILELA A. Modulating wine pleasantness throughout wine-yeast co-inoculation or sequential inoculation[J]. Fermentation, 2020, 6(1): 22-41.
- [8] 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.
- [9] BARTOWSKY E J, COSTELLO P J, CHAMBERS P J. Emerging trends in the application of malolactic fermentation [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2015, 1(21): 663-669.
- [10] RAFFAELE G, TOMAS R, ROBERTO L. Impact of different temperature profiles on simultaneous yeast and bacteria fermentation[J]. Annals of Microbiology, 2020, 70(1): 134-152.
- [11] FRANQUÈS J, ARAQUE I, PALAHÍ E, et al. Presence of *Oenococcus oeni* and other lactic acid bacteria in grapes and wines from Priorat (Catalonia, Spain) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 100(81): 326-334.
- [12] PETRUZZI L, CAPOZZI V, BERBEGAL C, et al. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 995-1008.
- [13] 王诗, 王璐璐, 赵丹丹, 等. 甘肃河西走廊产区本土酒球菌对赤霞珠干红葡萄酒香气品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 245-251.
WANG S, WANG L L, ZHAO D D, et al. Influence of native *Oenococcus oeni* in Hexi corridor of Gansu province on the aroma quality of *Cabernet Sauvignon* dry red wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(15): 245-251.
- [14] 祝霞, 王璐璐, 赵丹丹, 等. 甘肃河西走廊葡萄酒产区本土酒球菌发酵耐受性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 159-164.
ZHU X, WANG L L, ZHAO D D, et al. Analysis of fermentation tolerance of native *Oenococcus oeni* in Hexi corridor of Gansu province[J]. Food Science, 2020, 41(18): 159-164.
- [15] 马腾臻. ‘蛇龙珠’葡萄酒酒精发酵过程中品种香气释放调控研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
MA T Z. Release of varietal aroma compounds dur-

- ing alcoholic fermentation of 'Cabernet Gernischt' wine[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局, 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: 2-8.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, National Standardization Administration. General analytical methods for wine and fruit wines: GB/T 15038-2006 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2006: 2-8.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会. 酒中乙醇浓度的测定: GB 5009.225-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3-4.
National Health and Family Planning Commission. Determination of ethanol concentration in wine: GB 5009.225-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 3-4.
- [18] 祝霞, 刘琦, 赵丹丹, 等. 干白葡萄酒增香酿造工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2019, 35(18): 282-291.
ZHU X, LIU Q, ZHAO D D, et al. Parameter optimization aroma enhancement fermentation technology of dry white wine[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2019, 35(18): 282-291.
- [19] 宋欣莞, 李洁春, 杨学山, 等. 不同复配比例对早酥梨-猕猴桃复合果酒香气化合物的影响[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(4): 39-50.
SONG X Y, LI J C, YANG X S, et al. Effects of different blended ratios on aroma compounds of Zao-su pear-Kiwi mixed fruit wine[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2021, 57(4): 39-50.
- [20] 王媛, 祝霞, 杨学山, 等. 混菌发酵对美乐低醇桃红葡萄酒香气的影响[J]. 核农学报, 2018, 32(11): 2195-2207.
WANG Y, ZHU X, YANG X S, et al. Effects of co-fermentation on volatile compounds of Merlot low alcohol rose wine[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(11): 2195-2207.
- [21] 朱子健, 陈思雨, 粟俊, 等. 刺葡萄酒酒精发酵过程中氨基酸组成与果香酯类物质生成的关联分析[J]. 中国农业科学, 2020, 53(11): 2272-2284.
ZHU Z J, CHEN S Y, SU J, et al. Correlation analysis between amino acids and fruity esters during spine grape fermentation[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(11): 2272-2284.
- [22] 王倩倩, 覃杰, 马得草, 等. 优选发酵毕赤酵母与酿酒酵母混合发酵增香酿造爱格丽干白葡萄酒[J]. 中国农业科学, 2018, 51(11): 2178-2192.
WANG Q Q, QIN J, MA D C, et al. Aroma enhancement of Ecolly dry white wine by co-inoculation of selected *Pichia fermentans* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(11): 2178-2192.
- [23] 尹荐, 陶永胜, 孙玮璇, 等. 优选非酿酒酵母胞外酶增香酿造干白葡萄酒效果[J]. 农业工程学报, 2020, 36(4): 278-286.
YIN J, TAO Y S, SUN W X, et al. Effect of aroma enhancement for dry white wine by selected non-*Saccharomyces* extracellular enzymes[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2020, 36(4): 278-286.
- [24] 谭凤玲, 詹萍, 王鹏, 等. 基于感官评价及GC-MS结合OPLS-DA分析热杀菌对蟠桃汁呈香品质的影响[J]. 中国农业科学, 2022, 55(12): 2425-2435.
TAN F L, ZHAN P, WANG P, et al. Effects of thermal sterilization on aroma quality of flat peach juice based on sensory evaluation and GC-MS combined with OPLS-DA[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(12): 2425-2435.
- [25] 白晓璇, 凌梦琪, 陈柏年, 等. 添加葡萄籽单宁对橡木桶陈酿'赤霞珠'和'马瑟兰'干红葡萄酒香气的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 251-257.
BAI X X, LING M Q, CHEN B N, et al. Effect of grape seed tannin addition before barrel aging on the aroma of 'Cabernet Sauvignon' and 'Marselan' dry red wine[J]. Food Science, 2022, 43(18): 251-257.
- [26] 欧阳红军, 刘义军, 袁源, 等. HS-SPME-GC-MS结合OPLS-DA分析提取方法对牛油果油挥发性香气化合物的影响[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 779-788.
OUYANG H J, LIU Y J, YUAN Y, et al. HS-SPME-GC-MS coupled with OPLS-DA to analyze the effects of extraction methods on volatile aroma compounds of avocado oil[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(3): 779-788.
- [27] TRISTEZZA M, DI FEO L, TUFARIELLO M, 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: 406-412.

- [28] MENDOZA L M, DE NADRA M C M, FARÍAS M E. Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance: Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts [J]. *Food Research International*, 2010, 43(8): 1990–1998.
- [29] OSBORNE J P, EDWARDS C G. Inhibition of malolactic fermentation by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation under low- and high-nitrogen conditions: A study in synthetic media [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2006, 12(1): 69–78.
- [30] NEHME N, MATHIEU F, TAILLANDIER P. Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35(7): 685–693.
- [31] LUCIO O, PARDO I, KRIEGER-WEBER S, et al. Selection of *Lactobacillus* strains to induce biological acidification in low acidity wines [J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2016, 100(73): 334–341.
- [32] ONETTO C A, BORDEU E. Pre-alcoholic fermentation acidification of red grape must using *Lactobacillus plantarum* [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 108(6): 1469–1475.
- [33] 袁林, 赵红玉, 刘龙祥, 等. 苹果酸-乳酸发酵对葡萄酒中活性成分的影响 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(7): 358–364.
- YUAN L, ZHAO H Y, LIU L X, et al. Effect of malolactic fermentation on the active ingredients in wine [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(7): 358–364.
- [34] DIEZ-OZAETA I, LAVILLA M, AMÁRITA F. Effect of inoculation strategy with autochthonous *Oenococcus oeni* strains on aroma development in Rioja Alavesa Tempranillo wines [J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2022, 162: 113399–113411.
- [35] ANTALICK G, PERELLO M C, DE REVEL G. Co-inoculation with yeast and LAB under winery conditions: Modification of the aromatic profile of Merlot wines [J]. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2013, 34(2): 223–232.
- [36] CAÑAS P M I, PÉREZ-MARTÍN F, ROMERO E G, et al. Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 156(3): 245–254.
- [37] PAN W, JUSSIER D, TERRADE N, et al. Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values [J]. *Food Research International*, 2011, 44(3): 660–666.
- [38] DEVI A, ARCHANA K M, BHAVYA P K, et al. Non-anthocyanin polyphenolic transformation by native yeast and bacteria co-inoculation strategy during vinification [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(3): 1162–1170.
- [39] BRIZUELA N S, BRAVO-FERRADA B M, POZO-BAYÓN M Á, et al. Changes in the volatile profile of Pinot Noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains [J]. *Food Research International*, 2018, 106: 22–28.
- [40] KNOLL C, FRITSCH S, SCHNELL S, et al. Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines [J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2011, 44(10): 2077–2086.
- [41] LASIK-KURDYŚ M, MAJCHER M, NOWAK J. Effects of different techniques of malolactic fermentation induction on diacetyl metabolism and biosynthesis of selected aromatic esters in cool-climate grape wines [J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2549–2564.

Effects of Co-inoculated Fermentation on Fermentation Aroma of Simulated Grape Juice

Yang Liu, Xu Binyan, Shi Lin, Zhang Xuan, Zhu Xia, Yang Xueshan*
(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract To investigate the effect of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) and *Oenococcus oeni* on aroma compounds of simulated grape juice, autochthonous *Oenococcus oeni* strains MG-1, GF-2 and commercial strain VP41 were inoculated respectively during alcoholic fermentation to trigger malolactic fermentation. The volatile aroma

compounds in simulated wine samples were determined by headspace–solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry (HS–SPME–GC–MS) technique, and the influences of different strain combinations and inoculation time on the fermentation aroma compounds was revealed by multivariate statistical analysis. Results showed that co-inoculum of *S. cerevisiae* and *Oenococcus oeni* led to 6.67%–15.56% and 18.75%–40.63% reduction in the contents of volatile acids and residual sugars, respectively ($P<0.05$), and increased significantly ($P<0.05$) the type and content of fermentation aromatic substances. Orthogonal partial least squares–discriminant analysis combined with odor active value of aroma substances showed that there were 11 common differential substances between the co-inoculated treatments of different *Oenococcus oeni* strains, especially in the wine sample of co-inoculated treatment of *S. cerevisiae* VW inoculated for 48 h followed by *Oenococcus oeni* MG–1 strain (VM48), contents of ethyl hexanoate, ethyl caprylate, ethyl caprate, isoamyl acetate, phenethyl acetate and 2–phenylethanol were significantly increased by 46.16%–237.41% ($P<0.05$), and the tropical fruit, red fruit and floral characteristics of wine were more prominent. Results of this study provide a theoretical basis for co-inoculation fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strains and excellent autochthonous *Oenococcus oeni* strains in the winemaking process.

Keywords *Saccharomyces cerevisiae*; *Oenococcus oeni* autochthonous strain; co-inoculation fermentation; fermentation aroma compounds; orthogonal partial least squares–discriminant analysis