

优良非酿酒酵母的筛选及其在发酵过程中酯酶活力的变化

严幻汝, 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 为探究本土非酿酒酵母菌株在酒精发酵过程中的生长状况及风味酶活力变化规律,从河西走廊葡萄酒产区自然发酵酒样中筛选高产酯酶和醇酰基转移酶菌株,并分别接种于模拟葡萄汁进行发酵,动态监测菌株生长动力学、发酵动力学和酶活力。结果表明,HX-6 和 HX-7 菌株的 C₂~C₆ 酯酶总活力较高(102.69,102.51 mU/mL),且 HX-6 的醇酰基转移酶活力最高(3.46 U/mL)。经 26S rDNA D1/D2 区域序列分析鉴定,均为戴尔有孢圆酵母(*Torulasporea delbrueckii*)。本土 HX-6、HX-7 菌株和商业 TD-n 菌株发酵动力学及生物量分析证实,3 株菌均不能独立完成酒精发酵。酶活力动态监测结果显示,HX-6 菌株在模拟红葡萄酒和白葡萄酒发酵条件下,C₂~C₆ 酯酶累积活力(143.74,121.85 mU/mL)和醇酰基转移酶累积活力(15.75,12.74 U/mL)均最高。HX-7 菌株在模拟红葡萄酒发酵条件下 C₆ 酯酶累积活力相对较高(86.63 mU/mL)。研究结果说明优选的本土非酿酒酵母菌株具有良好的葡萄酒增香酿造应用潜力。

关键词 本土非酿酒酵母;酯酶;醇酰基转移酶;发酵;酶活力

文章编号 1009-7848(2024)12-0193-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.12.017

香气是决定葡萄酒风味品质的关键指标之一,其种类和含量受葡萄品种、发酵微生物、酿造工艺等诸多因素影响^[1]。酿酒微生物在发酵过程中产生的挥发性化合物是葡萄酒的主体香气成分^[2],特别是乙酸酯和脂肪酸乙酯等酯类物质能够呈现令人愉快的果香和花香^[3],加之它们的质量浓度常处于阈值左右,其种类和含量发生微小的变化就会对酒体的香气产生显著影响,进而引起葡萄酒风格和典型性的多元化改变。

酿酒过程中酯类化合物的合成积累与酿酒微生物分泌的醇酰基转移酶(alcohol acyltransferase, AAT, EC 2.3.1.84)^[4]和酯酶(esterase, EC 3.1.1.3)^[2]密切相关。AAT 可以催化醇类和乙酰辅酶 A,通过醇乙酰基转移酶途径生成乙酸乙酯、乙酸异丁酯和乙酸异戊酯等,是乙酸酯化合物生成的关键酶^[5]。Kong 等^[6]测定了发酵毕赤酵母和酿酒酵母混菌发酵过程中 AAT 的累积酶活力,结果发现其显著影响葡萄酒中果味酯的产生。在葡萄酒

低 pH 值条件下,酯酶既能催化短-中-长链脂肪酸与醇类直接生成酯类物质,也能调节酯类物质水解平衡的能力^[2]。研究发现部分非酿酒酵母(non-*Saccharomyces yeasts*)菌株可以在酒精发酵前期产生活力较高的酯酶,促进酯类物质的生成^[7]。Wang 等^[8]、Aponte 等^[9]、Kong 等^[10]将酯酶活力较高的非酿酒酵母菌株用于同时或顺序发酵,对改善葡萄酒感官特性具有积极作用。进一步的研究显示,已适应产区自然环境的本土非酿酒酵母菌株,可以更好地呈现葡萄酒的微生物风土特色^[11]。分离自产地的异常威克汉姆酵母^[8]、戴尔有孢圆酵母、葡萄酒有孢汉逊酵母、耐热克鲁维酵母^[12]、葡萄汁有孢汉逊酵母和毕赤克鲁维酵母^[13]分别与酿酒酵母混菌发酵,可以丰富和提高葡萄酒的香气复杂性及浓郁度。

目前国内外针对非酿酒酵母菌株的研究主要集中于高产 β -葡萄糖苷酶本土菌株筛选^[14-15]、混菌发酵及香气品质调控等方面^[10,16]。有关高产酯酶和 AAT 的本土非酿酒酵母菌株分离、鉴定及酿酒应用研究还较为欠缺。河西走廊葡萄酒产区历史悠久,酵母资源丰富,具备筛选优良非酿酒酵母的资源优势。开展高产酯类物质相关风味酶非酿酒酵母菌株的优选工作,对酿造具有产区特色的高品质葡萄酒有重要意义。本试验对前期分离保存的非酿酒酵母菌株进行酯酶和 AAT 活力定性、定

收稿日期: 2023-12-26

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(32260637);
甘肃省葡萄酒产业发展基金项目(20180820-08,20180820-07,GCJ-2019-125-1);张掖市重大技术攻关揭榜挂帅制项目(ZY2023JBGS04)

第一作者: 严幻汝,女,硕士生

通信作者: 杨学山 E-mail: yangxs@gsau.edu.cn

量分析,筛选高产酶活力菌株。将优选菌株分别接种于模拟葡萄汁体系,评估其发酵动力学和酶活力的动态变化,旨在为充分利用产区特色微生物资源酿造优质葡萄酒提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试菌株 本土菌株:912株供试菌株由实验室前期从河西走廊莫高、祁连、国风和紫轩葡萄酒厂的主栽酿酒葡萄品种自然发酵酒样中分离纯化,-80℃保藏于40%灭菌甘油管中。并根据菌株来源,初步以子产区酒厂名称+葡萄品种首字母+菌株顺序命名。例如:GFC-1,GF代表国风葡萄酒厂,C表示赤霞珠,1代表菌株序号。

商业非酿酒酵母:戴尔有孢圆酵母(TD-n),购于法国Laffort公司。

1.1.2 培养基 YPD培养基:酵母浸粉10g/L,蛋白胨20g/L,葡萄糖20g/L,自然pH值,固体培养基加入琼脂20g/L,121℃灭菌20min。

WL培养基:购于北京奥博星生物技术有限责任公司。称取本样品80.25g,加入1L蒸馏水中,加热煮沸溶解,121℃灭菌15min。

酯酶初筛培养基^[17]:蛋白胨10g/L,NaCl5g/L,CaCl₂·2H₂O0.1g/L,吐温8010g/L,琼脂20g/L,pH6.8,121℃灭菌20min。

发酵培养基^[18]:酵母浸粉10g/L,蛋白胨20g/L,NH₄NO₃3g/L,KH₂PO₄4g/L,葡萄糖20g/L,MgSO₄·7H₂O0.5g/L,吐温8010mL/L。

模拟葡萄汁配方参考马腾臻^[19]方法。其中葡萄糖为115g/L,果糖115g/L。用0.5mol/LNaOH调节pH值至3.5。

1.1.3 试剂 酵母浸粉、蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;无水葡萄糖、柠檬酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、吐温80、氯化镁,天津拜伦斯生物技术有限责任公司;对硝基苯酚(*p*-NP)、4-硝基苯基乙酸酯(*p*-nitrophenyl acetate,*p*-NPA)、4-硝基苯基丁酸酯(*p*-Nitrophenyl hexanoate,*p*-NPB)、4-硝基苯基己酸酯(*p*-nitrophenyl butyrate,*p*-NPH)、5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸(dithionitrobenzoic acid,DTNB),上海源叶生物科技有限公司;正丁醇,天津市光复科技发展有限公司;乙酰辅酶A

(acetyl coenzyme A,acetyl-CoA),合肥博美生物有限公司;AAT活性测定试剂盒,苏州格锐思生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LDZX-50KBS立式高压蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;pHS-3CpH计,上海雷磁责任有限公司;GZX-GF10-II恒温培养箱,上海跃进医疗器械有限公司;电子天平,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;SW-CJ-1FD超净工作台,上海跃进医疗器械有限公司;TU-1810可见分光光度计,上海元析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酵母菌株活化 本土菌株:接种环依次吸取1~2环4℃解冻的甘油管保藏菌液,分别涂布于WL培养基,28℃培养3d后,挑取形态典型的菌落接入50mL灭菌YPD液体培养基中,28℃恒温培养48h,用于后续试验。

商业非酿酒酵母:戴尔有孢圆酵母活性干粉(0.3g/L)溶于10倍体积蒸馏水中,28℃恒温水浴20min;再加入等体积模拟葡萄汁,25℃恒温水浴15min。

1.3.2 高产酯酶菌株的筛选

1.3.2.1 定性筛选 将活化后的菌液依次点涂于酯酶初筛培养基,28℃恒温培养72h。具有酯酶活力的酵母菌株会对底物进行水解,在菌落周围出现乳白色晕圈或沉淀^[9]。

1.3.2.2 酯酶活力定量测定 参考Perez-Martin等^[20]方法,略作修改。供试菌株活化后,按5%接种量接入50mL发酵培养基,28℃培养48h。吸取发酵液5mL于离心管中,8000r/min,4℃离心15min,取上清液即为粗酶液。5mL离心管中加入1.72mLpH5.0柠檬酸-磷酸缓冲液(0.1mol/L),200μL粗酶液分别与80μL4-硝基苯乙酸酯(*p*-NPA)、4-硝基苯丁酸酯(*p*-NPB)和4-硝基苯己酸酯(*p*-NPH)乙醇溶液(25mmol/L)混合,50℃反应30min,加入200μLNa₂CO₃(0.5mol/L)溶液终止反应,在400nm波长处测定吸光度。对照组用缓冲液代替粗酶液。每个样品3组平行。

根据标准曲线($y=0.0151x-0.0038$, $R^2=0.9994$)计算最终酶活力。1个单位酯酶活力定义(U):50℃条件下,每分钟释放1μmol对硝基苯酚

所需的酶量。

1.3.3 高产 AAT 菌株的筛选

1.3.3.1 定性初筛 参考 Goulet 等^[21]、Kruis 等^[5]方法,略作修改。48 孔板中加入 2.5 mL MgCl₂ 溶液、50 μL 丁醇、150 μL 菌液、150 μL 乙酰辅酶 A,30 °C 恒温反应 30 min,加入 100 μL DTNB,28 °C 恒温培养 24 h 后观察颜色变化,如果颜色变为黄色,则代表菌株具有 AAT 活力;如果无变化,则代表菌株无 AAT 活力。

1.3.3.2 AAT 活力定量测定 按照 AAT 活力测定试剂盒推荐方法进行。在比色皿中依次加入菌液和试剂 1、2、3,30 °C 条件下反应 10 min,立即在 412 nm 处测定吸光度 A₁,加入试剂 4 混匀,30 °C 条件下反应 10 min,于 412 nm 处测定吸光度 A₂。

1.3.4 菌株形态培养及分子生物学鉴定 参考侯晓瑞等^[22]方法,根据菌株在 WL 培养基上的菌落颜色和形态,初步进行酵母种属判定。参考王春晓等^[23]方法,提取菌株基因组 DNA,进行 26S rDNA D1/D2 区测序鉴定。

1.3.5 优选菌株在模拟葡萄汁发酵体系中的发酵动力学及酶活力变化

1.3.5.1 发酵过程 CO₂ 失重动力学 参考 Rossouw 等^[24]方法,在 20 mL 无菌小样品瓶中进行菌株纯种微规模发酵。无菌小瓶中装入 16 mL 模拟葡萄汁,顶部装有穿孔硅塞密封,并插入一次性无菌针头进行排气。菌株接种量均为 1×10⁶ CFU/mL。

模拟红葡萄酒发酵条件:加入 30 mg/L SO₂、25 °C 控温发酵。模拟白葡萄酒发酵条件:加入 50 mg/L SO₂、20 °C 控温发酵^[25]。每组样品 3 个平行。每隔 24 h 测量由 CO₂ 释放造成的无菌小样品瓶质量损失。如果连续 3 d 没有观察到重量减轻,判定为发酵停滞。

1.3.5.2 菌株生物量测定 采用平板计数法检测菌落数量。每隔 48 h 取发酵液,梯度稀释至 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 后涂布于 WL 培养基。记录不同发酵条件中酵母细胞生长状况。

1.3.5.3 还原糖、酒精含量测定 参考《葡萄酒、果酒通用分析方法》(GB/T 15038-2006)^[26]每隔 48 h 取样测定还原糖、酒精含量。

1.3.5.4 发酵过程中酶活力测定 每隔 48 h 监测不同发酵条件中酯酶和 AAT 活力,酶活力测定参考 1.3.2.2 节和 1.3.3.2 节的方法进行。

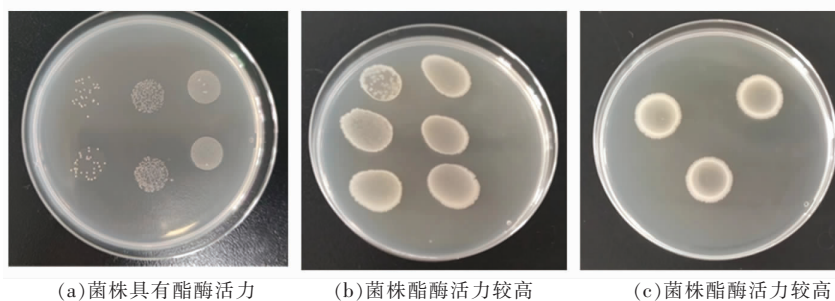
1.4 统计分析

试验数据使用 Microsoft Office Excel 2010、Origin 2021 进行统计处理和绘图,采用 Tbttools 软件进行热图聚类分析。

2 结果与分析

2.1 产酯酶酵母菌株定性筛选

将保藏备用的 912 株酵母菌株分批活化,点涂于酯酶初筛培养基,28 °C 恒温培养 72 h。如图 1 所示,菌落周围出现晕圈或者沉淀则证明该菌株具有一定酯酶活力。



(a) 菌株具有酯酶活力 (b) 菌株酯酶活力较高 (c) 菌株酯酶活力较高

图 1 酯酶平板初筛选结果

Fig.1 Screening of non-*Saccharomyces* yeasts with high esterase production

初步定性筛选出高产酯酶菌株 51 株,其中分离自国风子产区葡萄酒样的菌株占比最高(39.2%),GFC 为 21.6%,GFM 为 17.6%;分离自紫轩子产区葡萄酒样的菌株占比次之(31.4%),

ZXM 为 25.5%,ZXW 为 5.9%;莫高子产区葡萄酒样占比较低(15.7%),MGH 为 5.9%,MGG 为 9.8%;祁连子产区葡萄酒样占比最低(13.7%),QLS 为 5.9%,QLG 为 7.8%。由此可知,分离自不同产区

菌株产酯酶能力存在差异。分析不同发酵时期菌株数量可知,第2天(发酵前期)高产酯酶菌株共8株;第4,6天(发酵中期)高产酯酶菌株共38

株;第8,10天(发酵后期)高产酯酶菌株共5株。表明菌株产酯酶能力还受到发酵环境动态变化的影响。

表1 不同产区酒样产酯酶菌株初筛结果

Table 1 Screening of esterase-producing strains in different wine areas

发酵时期/ d	产酯酶 能力	菌株数											
		莫高黑		莫高贵		祁连蛇		祁连贵		紫轩美乐	紫轩威	国风赤	国风美乐
		比诺	MGH	人香	MGG	龙珠	QLS	人香	QLG	ZXM	代尔	ZXW	霞珠
2	+	4	2	1	0	9	1	1	1	5			
2	+++	0	0	0	0	6	0	0	0	2			
4	+	1	3	1	2	16	3	8	9	9			
4	+++	0	2	1	0	6	0	0	0	1			
6	+	3	5	1	4	4	9	20	15				
6	+++	2	3	1	3	1	3	10	5				
8	+	1	2	1	1	2	1	2	1				
8	+++	1	0	1	1	0	0	1	1				
10	+	1	1	0	1	0	1	0	1				
10	+++	0	0	0	0	0	0	0	0				

注:“+”表示出现酯酶活力;“+++”表示高酯酶活力。

2.2 菌株酯酶活力定量分析

采用 p -NP 比色法对 51 株非酿酒酵母菌株酯酶活力(C_2 、 C_4 、 C_6)进行定量测定,并对结果进行聚类分析。如图 2 所示,供试菌株 C_2 酯酶活力在 19.75~45.72 mU/mL 之间,GFC-6 菌株酶活力最高(45.72 mU/mL),MGH-11 次之(45.24 mU/mL); C_4 酯酶活力在 14.22~30.52 mU/mL 之间,GFC-6 菌株最高(30.52 mU/mL),MGH-11 菌株次之(29.79 mU/mL); C_6 酯酶活力在 18.93~33.64 mU/mL 之间,QLG-6 菌株最高(33.64 mU/mL),GFM-23 菌株次之(29.70 mU/mL)。整体分析,MGH-11 和 GFC-6 菌株酯酶总活力(C_2 、 C_4 、 C_6 之和)处于供试菌株前 2 位,分别为 102.69 mU/mL 和 102.51 mU/mL。

2.3 产 AAT 菌株定性筛选

以酯酶活力较高的 51 株菌为供试菌株进行 AAT 活力定性筛选。AAT 催化乙酰 CoA 和醇类生成酯类物质和 CoA,生成的 CoA 具有还原性,可与 DTNB 作用生成黄色化合物,按显色等级可对菌株产 AAT 情况进行初步定性分析。如图 3 所示,4 株菌株存在较为明显的颜色变化。

2.4 菌株 AAT 活力定量测定

为了更准确表征筛选菌株的 AAT 活力,将定

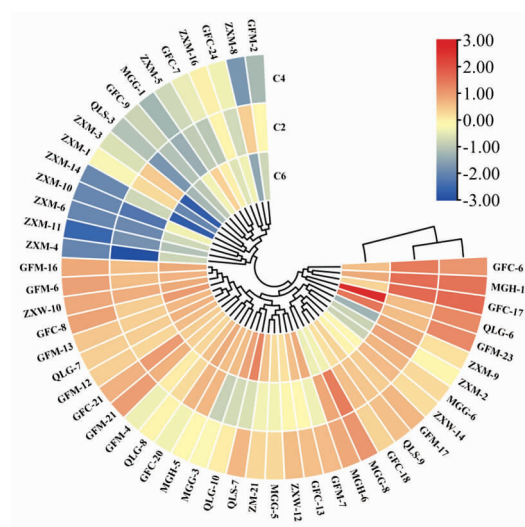
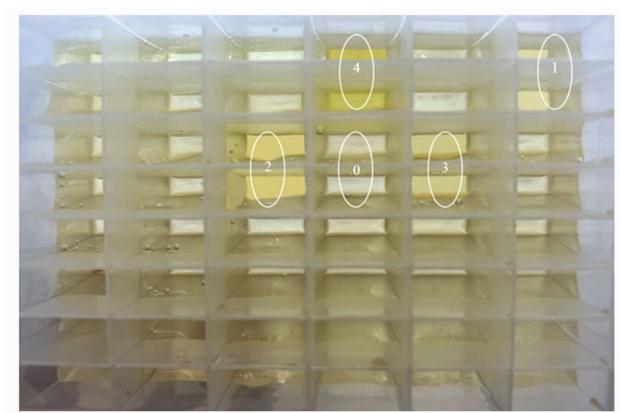


图2 菌株粗酶液酯酶活力热图聚类分析

Fig.2 Heat map clustering analysis for esterase activity of the tested strains

性显色的 4 株菌株进行酶活力定量测定。由图 4 可知,菌株 GFC-6(3.46 U/mL)、ZXM-11(1.89 U/mL)、QLS-23(0.84 U/mL)、ZXW-10(0.62 U/mL)之间的 AAT 活力有显著差异($P<0.05$)。

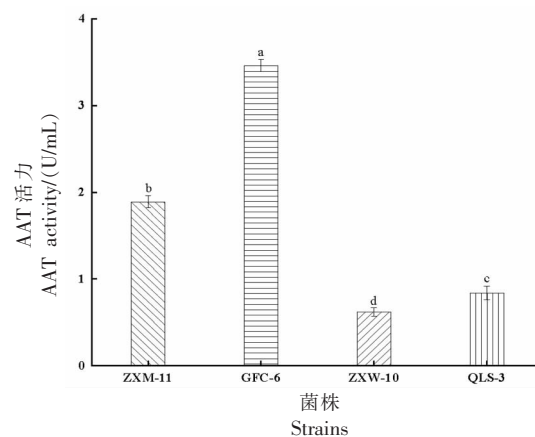
结合菌株酯酶活力测定结果综合分析,选择 AAT 活力最高的 GFC-6 菌株和酯酶总活力最高的 MGH-11 菌株,进行后续试验。为便于后期应用,将 GFC-6、MGH-11 菌株分别命名为 HX-6、



注:0:空白对照;1:++;2:++;3:+++;4:++++。

图 3 菌株 AAT 活力 48 孔板定性初筛显色结果

Fig.3 Screening of non-*Saccharomyces* yeasts with high alcohol acyltransferase production



注:a,b,c,d 表示各菌株之间具有显著差异($P < 0.05$)。

图 4 菌株 AAT 活力

Fig.4 Activity of alcohol acyltransferase of non-*Saccharomyces* yeasts autochthonous strains

HX-7。

2.5 优选菌株分子生物学鉴定

将优选菌株涂布于 WL 培养基,28 °C 培养 72 h 后的菌落形态见图 5。HX-6、HX-7 菌落(图 5a、5b)为奶油色带淡淡绿色,球形突起、表面光滑、不透明、奶油状,符合戴尔有孢圆酵母(*Torulospira delbrueckii*)的菌落形态特征。

将 HX-6 和 HX-7 菌株的 26S rDNA D1/D2 区域序列提交 NCBI,通过 BLAST 与 GenBank 数据库中已发表的 26S rDNA D1/D2 区域序列进行同源性比较,利用 Mega 7.0 构建系统发育树。由图 6 可知,HX-6 菌株与戴尔有孢圆酵母 LC015348.1 同源性为 99%,HX-7 菌株与戴尔有孢圆酵母 LC015336.1 同源性为 99%,由此确定 HX-6 和 HX-7 菌株均为戴尔有孢圆酵母。

2.6 模拟葡萄汁发酵动力学及生物量分析

HX-6、HX-7 和商业 TD-n 菌株在模拟葡萄汁发酵体系中纯种发酵动力学和生物量如图 7 所示。由图 7a、7b 可知,3 株菌的生物量均呈现出先上升后下降的趋势,均在第 8 天达到最大值,随后迅速下降。在模拟红葡萄酒发酵条件下 HX-6、HX-7、TD-n 菌株最大值分别为 5.32×10^7 、 4.73×10^7 、 4.40×10^7 CFU/mL,在模拟白葡萄酒发酵条件下 HX-6、HX-7、TD-n 最大值分别为 4.83×10^7 、 4.45×10^7 、 3.85×10^7 CFU/mL。但模拟白葡萄酒发酵条件下 3 株菌株起酵较慢,主要是受到发酵温度

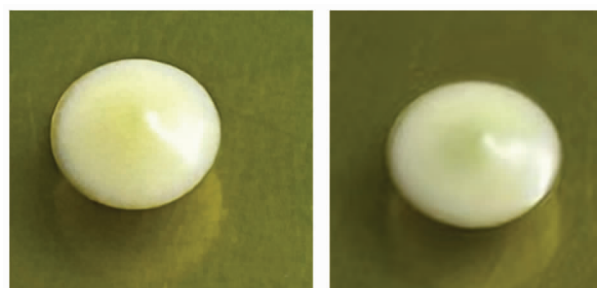


图 5 优选菌株在 WL 培养基上的形态

Fig.5 Colony morphology of selected non-*Saccharomyces* yeast strains on WL medium

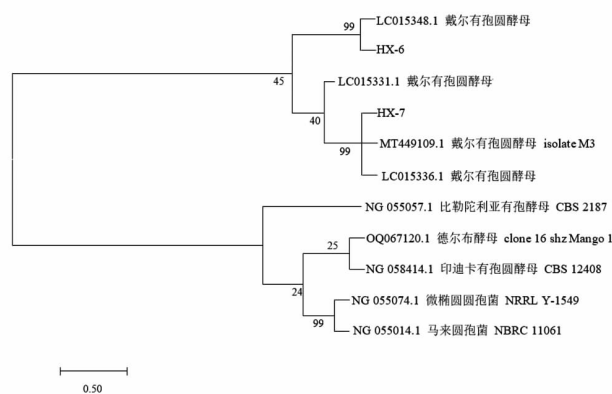


图 6 基于 26S rDNA 序列的酵母菌株系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree based on 26S rDNA sequence analysis of the selected strains

较低(20 °C)的影响。发酵过程中 HX-6 菌株 CO₂ 质量损失最大,即发酵能力最强;但 HX-6、HX-7、

TD-n 菌株均在第 16 天发酵停滞。还原糖含量及酒精含量变化如图 7c、7d 所示,第 1~4 天还原糖含量缓慢下降,酒精度逐步上升;第 6~10 天酒精度大幅上升。发酵停滞时,3 株菌株在模拟红葡萄酒和白葡萄酒发酵条件下还原糖含量依次为:

TD-n (128.06, 135.22 g/L) > HX-7 (122.21, 126.20 g/L) > HX-6 (115.81, 118.81 g/L)。总体分析,与 TD-n 菌株相比,2 株本土菌株发酵速度相对较快。

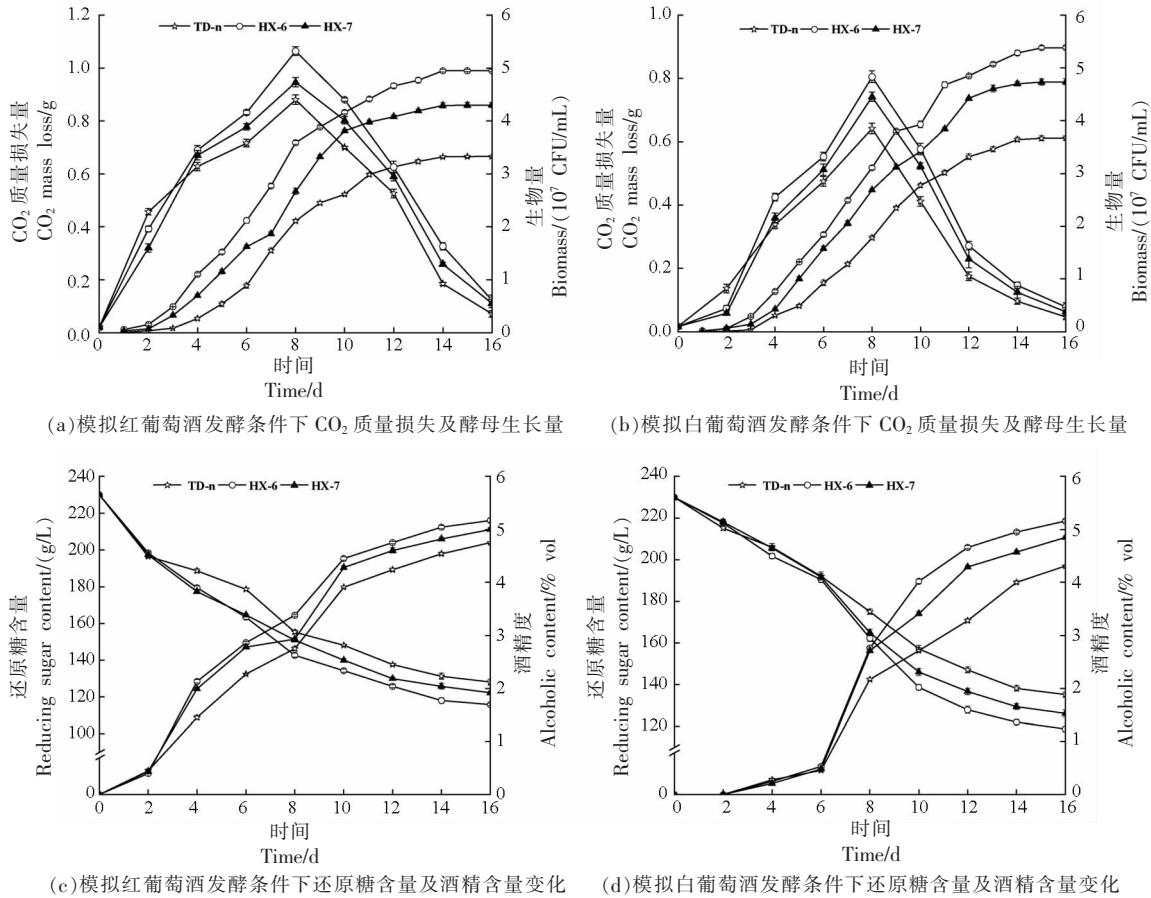


图 7 模拟葡萄汁发酵动力学及酵母生物量

Fig.7 Fermentation kinetics and yeast biomass of the three strains inoculated into simulated grape juice

2.7 模拟葡萄酒汁发酵体系中酯酶活力

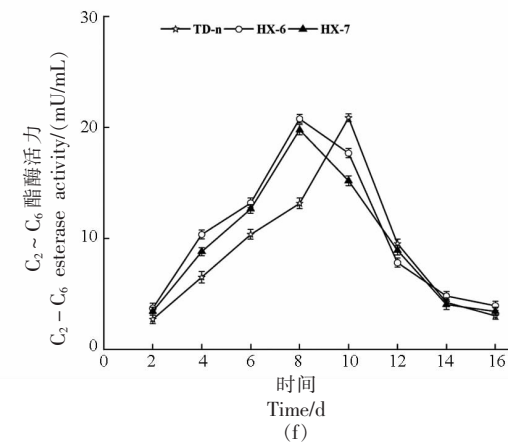
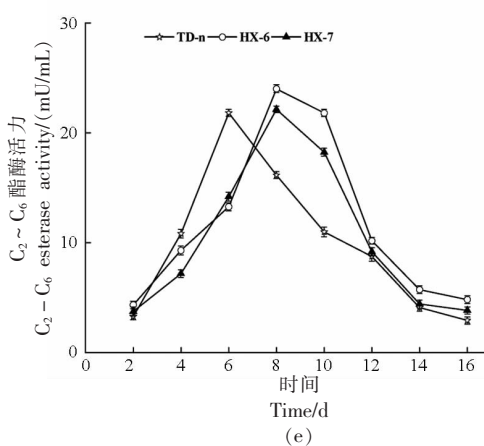
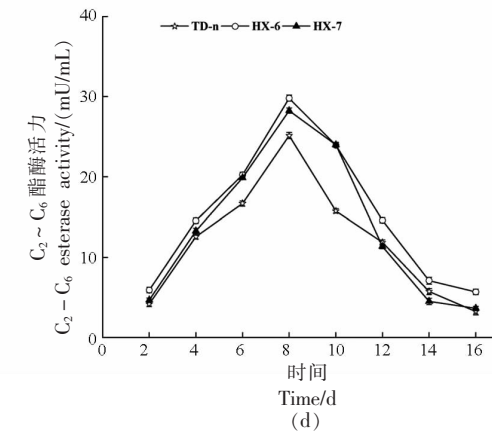
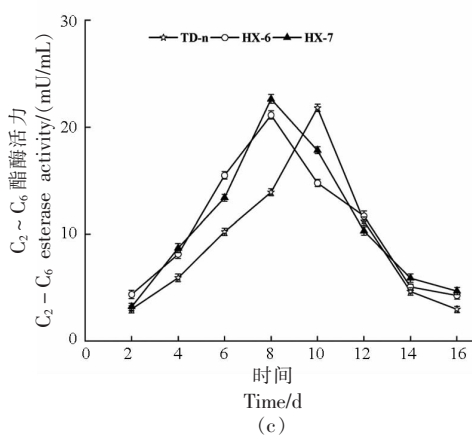
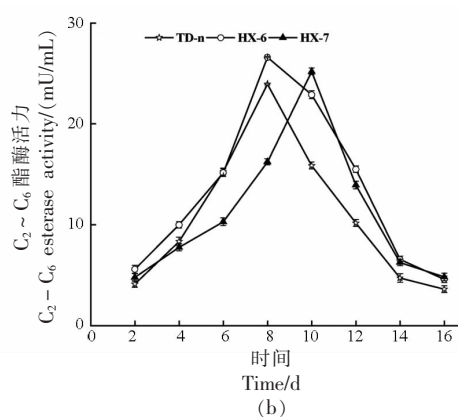
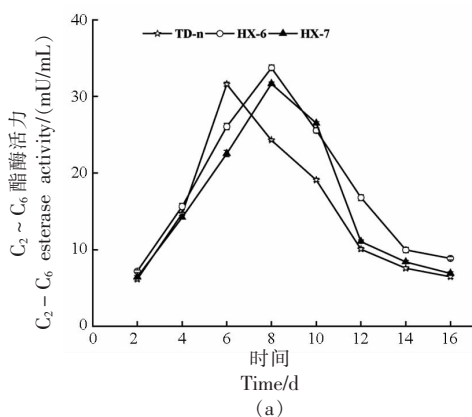
如图 8 所示,各菌株在酒精发酵过程中酯酶活力动态变化趋势基本相似,第 6~10 天酶活力达到最高峰,随后逐渐下降,直至发酵停滞。在模拟红葡萄酒发酵条件下,TD-n 菌株在第 6 天 (31.59 mU/mL),HX-6、HX-7 则在第 8 天 (33.73, 31.66 mU/mL) C₂ 酯酶活力达到最大值;HX-6、TD-n 菌株 C₄ 酯酶活力均在第 8 天达到最大值 (26.61, 23.94 mU/mL),HX-7 则在第 10 天达到最大值 (25.18 mU/mL);HX-7、HX-6 菌株 C₆ 酯酶活力均在第 8 天达到最大值 (22.62, 21.12 mU/mL),TD-n

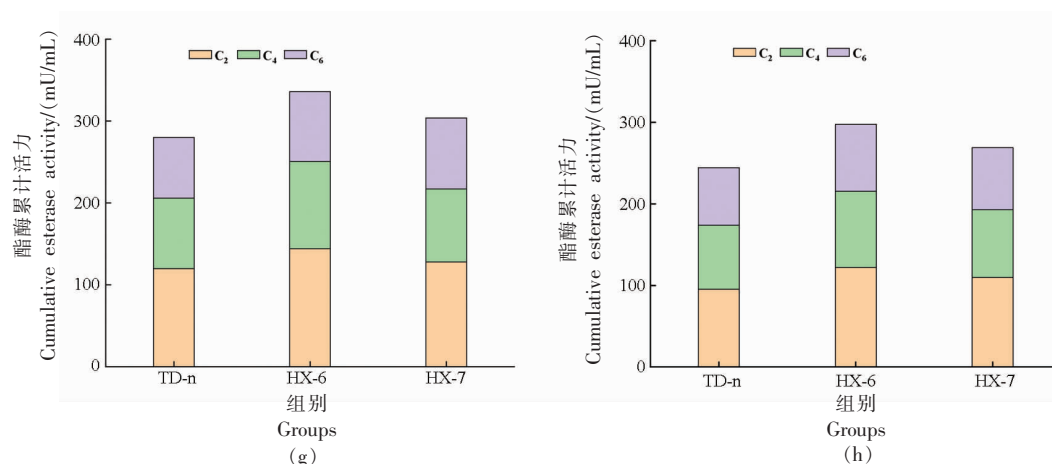
则第 10 天 (21.79 mU/mL) 达到最大值。在模拟白葡萄酒发酵条件下,3 株菌株 C₂ 酯酶活力均在第 8 天达到最大值 (29.82, 28.25, 25.15 mU/mL); TD-n 菌株 C₄ 酯酶活力在第 6 天达到最大值 (21.82 mU/mL),HX-6、HX-7 菌株均在第 8 天达到最大值 (24.02, 22.14 mU/mL);HX-6、HX-7 C₆ 酯酶活力均在第 8 天达到最大值 (20.78, 19.78 mU/mL),TD-n 则第 10 天达到最大值 (20.87 mU/mL)。由此表明,同一种属的不同菌株酯酶活力在发酵过程中也会存在一定差异。

本试验旨在探究本土非酿酒酵母在真实酿酒

环境中的生存能力以及发酵过程中风味酶的累积效应,从而评价其在葡萄酒增香酿造中的应用潜力。由于发酵在16 d时才基本停滞,试验共需取样8次,且所测酯酶种类较多(C_2 、 C_4 和 C_6),为便于直观比较各菌株的酯酶总活力,参考祝霞等^[27]方法,采用累积酶活力(mU/mL),即同一菌株、3种酶的8次测定结果逐次相加,表征不同菌株之间

的差异。由图8G、H可知,HX-6菌株的 C_2 酯酶累积活力在模拟红葡萄酒发酵条件下达到143.74 mU/mL,在模拟白葡萄酒发酵条件中达到121.85 mU/mL;在模拟红葡萄酒发酵条件下,HX-7菌株的 C_6 酯酶累积活力(86.63 mU/mL)比HX-6菌株(84.90 mU/mL)略高。





注:a~c:模拟红葡萄酒发酵条件下C₂~C₆酯酶活力;d~f:模拟白葡萄酒发酵条件下C₂~C₆酯酶活力;g:模拟红葡萄酒发酵条件下酯酶累积活力;h:模拟白葡萄酒发酵条件下酯酶累积活力。

图8 模拟葡萄汁发酵体系中酯酶活力变化

Fig.8 Evolution of esterase activities of tested strains during simulated grape juice fermentation systems

2.8 模拟葡萄汁发酵体系中 AAT 活力

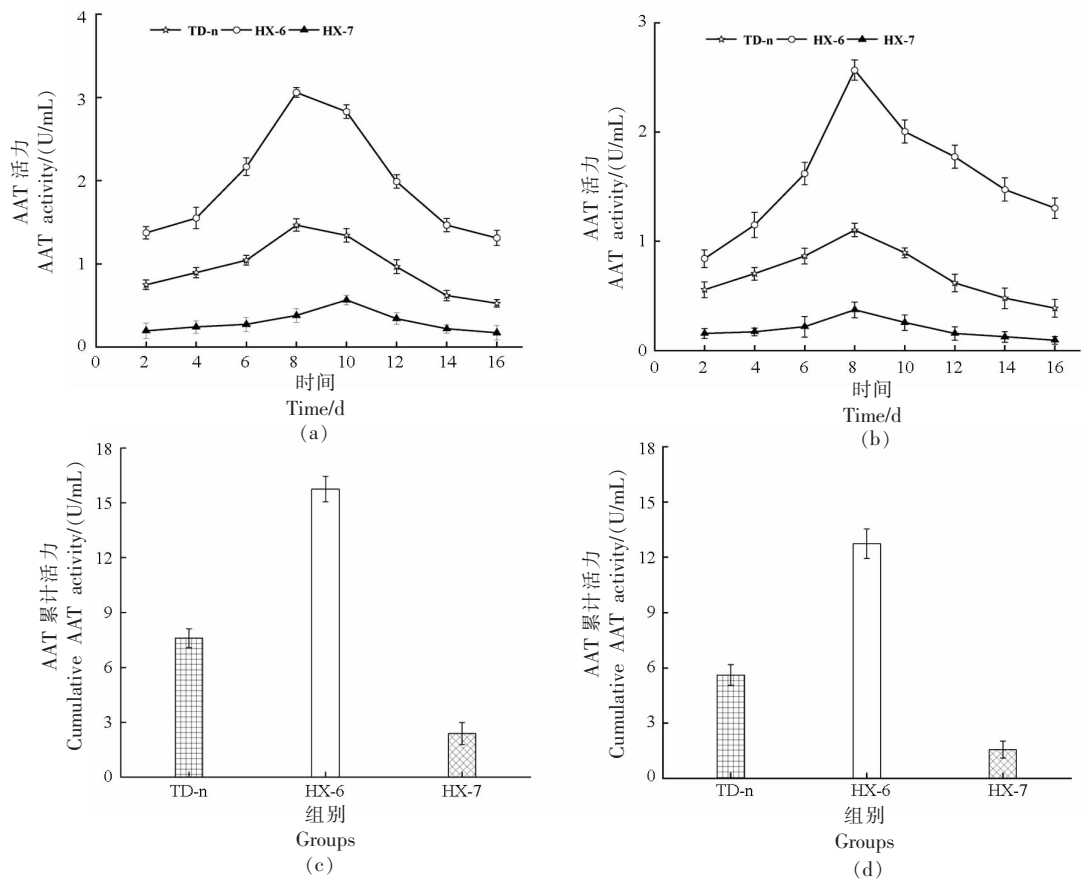
在不同发酵条件下,各菌株在发酵过程中酶活力呈现先增加后降低的趋势。在模拟红葡萄酒发酵条件下(图9a),HX-6、TD-n菌株的酶活力均在第8天达到最大值(3.06,1.47 U/mL),HX-7菌株则在第10天达到最大值(0.57 U/mL);在模拟白葡萄酒发酵条件下(图9b),HX-6、TD-n、HX-7菌株 AAT 活力均在第8天达到最大值(2.57,1.10,0.37 U/mL)。供试菌株的 AAT 活力均存在显著差异($P < 0.05$),即 HX-6 > TD-n > HX-7 菌株;不同菌株的 AAT 累积活力如图9c、9d所示,3株菌株在模拟红葡萄酒发酵条件下 AAT 累积活力(15.75,7.61,2.39 U/mL)整体高于模拟白葡萄酒发酵条件时(12.74,5.61,1.56 U/mL)。

3 讨论

越来越多研究显示,本土非酿酒酵母对提高产区葡萄酒复杂性具有重要意义^[28],其发酵产生的酯类已被证明对葡萄酒质量有积极影响^[2]。酿酒葡萄中酯类物质含量相对较低,但在发酵过程中可以通过合成风味酶产生大量的酯类物质^[29]。总体而言,酿酒过程中酯类物质的酶促积累是包括酯酶的合成和水解以及 AAT 合成反应平衡的结果^[6]。酯类化合物在酵母细胞内形成后,需要转移释放到细胞外才能被消费者感知。脂肪酸乙酯的转移率随着碳链长度的增加而降低,其中己酸乙

酯为100%、辛酸乙酯为54%~68%、癸酸乙酯为8%~17%,长链脂肪酸乙酯全部留在细胞中^[30]。所以,研究C₂~C₆酯酶活力对葡萄酒香气品质提升具有重要意义。李婷等^[31]研究发现,优选的高产酯酶非酿酒酵母与酿酒酵母混菌发酵时有较高的酯酶活力,对葡萄酒增香酿造具有积极贡献。祝霞等^[32]研究结果显示,本土酒球菌ZX-1菌株在发酵过程中具有较高的C₂~C₆酯酶累积活力,可有效提高霞多丽干白葡萄酒中果香和花香类化合物含量。AAT由ATF1、LgATF1和ATF2基因编码。Gethins等^[33]观察到抑制ATF1会减少乙酸乙酯的产生,而Lin等^[34]、Yin等^[35]过表达酿酒酵母和马克斯克鲁维酵母ATF1后,酵母菌株所产乙酸酯、总酯含量显著增加。乙酸酯对葡萄酒的香气至关重要,其可以更好的呈现愉悦的果香,直接影响葡萄酒的芳香特征和感官特性^[2]。徐晓裕等^[36]、Goulet等^[21]表明AAT活力极大地影响酯类物质的生成,使得葡萄酒具有良好的香气品质。本试验从实验室保存的912株菌株中获得了2株高产酯类风味酶非酿酒酵母菌株,从而为葡萄酒增香酿造奠定了基础。

研究酿酒过程中酯类风味酶的活力演变对葡萄酒的花果香味形成至关重要,因为其在发酵过程中受到诸多因素影响^[8]。Ma等^[2]将发酵毕赤酵母和酿酒酵母进行混菌发酵,发现C₂~C₈各酯酶累积活力存在明显差异。任学梅^[25]研究表明,戴尔有



注:a, c:模拟红葡萄酒发酵条件下 AAT 活力、AAT 累积活力;b, d:模拟白葡萄酒发酵条件下 AAT 活力、AAT 累积活力。

图9 模拟葡萄汁发酵体系中 AAT 活力变化

Fig.9 Evolution of alcohol acyltransferase activities of tested strains during simulated grape juice fermentation systems

孢圆酵母在模拟红葡萄酒发酵条件中纯种发酵,酯酶累积活力 $C_2 > C_4 > C_6$ 。本试验发现在模拟白葡萄酒发酵条件下 HX-6 菌株的 $C_2 \sim C_6$ 酯酶累积活力低于模拟红葡萄酒发酵条件,3 株菌株在模拟红葡萄酒发酵条件下 AAT 累积活力整体高于模拟白葡萄酒发酵条件时,这可能与白葡萄酒发酵条件中较低的发酵温度和较高的 SO_2 相关,与 Escríbano 等^[37]测定 97 株非酿酒酵母菌株风味酶活力,各菌株的酶活力受发酵条件的影响相一致。除此之外,本试验还发现菌株酯酶和 AAT 活力与酒精发酵过程酵母菌株细胞的生长密切相关,在发酵第 6~10 天菌株生物量达到最大值,而 3 株菌株酯酶和 AAT 活力也在第 6~10 天为最高,与发酵动力学变化趋势相一致。同时,在酯酶活力定量测定时,HX-7 菌株的 $C_2 \sim C_6$ 酯酶总活力略高于 HX-6 菌株,但在模拟葡萄汁酒精发酵时,HX-7 菌株

的酯酶累积活力却低于 HX-6,表现出菌株间的酶活力对不同酿造生境的适应性存在差异,突显了酿酒时选择适宜发酵剂的必要性。后续研究将着重进行优选菌株与酿酒酵母混合发酵动力学、酶活力、酯类物质及葡萄酒香气特征的关联分析。

4 结论

从甘肃河西走廊葡萄酒产区自然发酵酒样分离纯化的 912 株酵母菌株中,筛选、鉴定出 2 株高产酯类物质风味酶本土非酿酒酵母菌株。其中, HX-6 菌株具有较高的酯酶和 AAT 活力, HX-7 菌株的 $C_2 \sim C_6$ 酯酶总活力最高。经 26S rDNA D1/D2 区域序列分析鉴定, HX-6 和 HX-7 菌株均为戴尔有孢圆酵母。在模拟葡萄汁酒精发酵条件下, HX-6、HX-7 菌株的 $C_2 \sim C_6$ 酯酶累积活力显著高于 TD-n 菌株; TD-n 菌株的 AAT 累积活力低于

HX-6 但高于 HX-7 菌株。综合分析,优选的本土戴尔有孢圆酵母 HX-6 和 HX-7 菌株,在模拟葡萄酒发酵体系中呈现了较高的酯酶或 AAT 活力,具有良好的酿酒生产应用潜力。

参 考 文 献

- [1] PADILLA B, GIL J V, MANZANARES P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 411-418.
- [2] MA D C, YAN X, WANG Q Q, et al. Performance of selected *P. fermentans* and its excellular enzyme in co-inoculation with *S. cerevisiae* for wine aroma enhancement [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 86: 361-370.
- [3] HU K, JIN G J, MEI W C, et al. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum/S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement[J]. *Food Chemistry*, 2018, 239(11): 495-501.
- [4] LEE J W, SEO H, YOUNG C, et al. Probing specificities of alcohol acyltransferases for designer ester biosynthesis with a high-throughput microbial screening platform[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(12): 4655-4667.
- [5] KRUIS A J, LEVISSON M, MARS A E, et al. Ethyl acetate production by the elusive alcohol acetyltransferase from yeast[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 92-101.
- [6] KONG C L, MA N, YIN J, et al. Fine tuning of medium chain fatty acids levels increases fruity ester production during alcoholic fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128897.
- [7] 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.
- [8] WANG J, YAN J J, ZHANG W J, et al. Comparison of potential *Wickerhamomyces anomalus* to improve the quality of Cabernet Sauvignon wines by mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 173: 114285.
- [9] APONTE M, BLAIOTTA G. Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of Taurasi DOCG[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 809.
- [10] KONG C L, LI A H, JIN G J, et al. Evolution of volatile compounds treated with selected non-*Saccharomyces* extracellular extract during Pinot noir winemaking in monsoon climate[J]. *Food Research International*, 2019, 119: 177-186.
- [11] LIU P T, LU L, DUAN C Q, et al. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 71: 356-363.
- [12] ZHANG B Q, TANG C, YANG D Q, et al. Effects of three indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and their pairwise combinations in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* on volatile compounds of Petit Manseng wines[J]. *Food Chemistry*, 2022, 368: 130807.
- [13] 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-Food Science and Technology*, 2022, 154: 112653.
- [14] 马得草, 游灵, 李爱华, 等. 高产 β -葡萄糖苷酶野生酵母的快速筛选及其糖苷酶酿造适应性研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(1): 129-135.
MA D C, YOU L, LI A H, et al. Rapid screen of wild yeast with high β -glucosidase activity and evaluation of its glycosidase in winemaking[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2018, 46(1): 129-135.
- [15] HONG M N, LI J, CHEN Y W. Characterization of tolerance and multi-enzyme activities in non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Vidal Blanc icewine fermentation[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(11): e13027.
- [16] HU K, ZHU X L, MU H, et al. A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: Its application potential in wine aroma enhancement[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2016, 62(2): 169-176.
- [17] NECHITA A, RAZVAN F V, PASA R, et al.

- Oenological characterization of some yeast strains isolated from the IASI vineyard romania[J]. *Romanian Journal of Horticulture*, 2020, 1(1): 141–148.
- [18] 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.
- [19] 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 during alcoholic fermentation of ‘Cabernet Gernischt’ wine[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015.
- [20] PEREZ-MARTIN F, SESENA S, IZQUIERDO P M, et al. Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 163(2): 153–158.
- [21] GOULET C, KAMIYOSHIHARA Y, LAM N B, et al. Divergence in the enzymatic activities of a tomato and *Solanum pennellii* alcohol acyltransferase impacts fruit volatile ester composition[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 153–162.
- [22] 侯晓瑞, 王婧, 杨学山, 等. 甘肃河西走廊葡萄酒产区高产 β -葡萄糖苷酶酵母菌株筛选[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 139–143.
- HOU X R, WANG J, YANG X S, et al. Screening of yeast strains producing β -glucosidase from Hexi Corridor wine-producing regions of Gansu province[J]. *Food Science*, 2014, 35(23): 139–143.
- [23] 王春晓, 何宇淋, 唐佳代, 等. 贵州传统小曲酵母菌分子指纹图谱分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(2): 165–172.
- WANG C X, HE Y L, TANG J D, et al. Molecular fingerprinting analysis of yeasts isolated from traditional Guizhou Xiaoqu, a traditional fermentation starter[J]. *Food Science*, 2023, 44(2): 165–172.
- [24] ROSSOUW D, BAUER F F. Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity[J]. *Food Microbiology*, 2016, 55: 32–46.
- [25] 任学梅. 高产风味酶非酿酒酵母筛选、鉴定及其在葡萄酒增香酿造中的应用[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2022.
- REN X M. Screening and identification of non-*Saccharomyces* yeast with high yield flavor enzyme and its application in wine aroma enhancement brewing[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2022.
- [26] 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: China Standard Publishing House, 2006: 2–8.
- [27] 祝霞, 赵丹丹, 李俊娥, 等. *O.oeni* 糖苷酶活性对干白葡萄酒萜烯类香气的影响[J]. *农业机械学报*, 2021, 52(8): 363–373.
- ZHU X, ZHAO D D, LI J E, et al. Effect of glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on terpene aroma compounds of dry white wine[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2021, 52(8): 363–373.
- [28] BINATI R L, INNOCENTE G, GATTO V, et al. Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking[J]. *Food Research International*, 2019, 122: 432–442.
- [29] LAI, Y T, HOU C Y, LIN S P, et al. Sequential culture with aroma-producing yeast strains to improve the quality of Kyoho wine[J]. *Journal of Food Science*, 2023, 88(3): 1114–1127.
- [30] PRUSOVA B, HUMAJ J, SOCHOR J, et al. Formation, losses, preservation and recovery of aroma compounds in the winemaking process[J]. *Fermentation*, 2022, 8(3): 93.
- [31] 李婷, 陈景桦, 马得草, 等. 优选非酿酒酵母与酿酒酵母在模拟葡萄汁发酵中生长动力学及酯酶活性分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(22): 60–66.
- LI T, CHEN J H, MA D C, et al. Growth kinetics and esterase activities of selected non-*Saccharomyces* yeast and *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of model grape juice[J]. *Food Science*, 2017, 38(22): 60–66.
- [32] 祝霞, 赵丹丹, 李俊娥, 等. 河西走廊产区酒球菌酯酶活性对葡萄酒酯类香气物质的影响[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(1): 315–322.
- ZHU X, ZHAO D D, LI J E, et al. Effects of esterase activity of *alcoholicus* in Hexi Corridor pro-

- duction areas on ester aroma compounds in wine[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2021, 37(1): 315–322.
- [33] GETHINS L, GUNESER O, DEMIRKOL A, et al. Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. Yeast, 2015, 32(1): 67–76.
- [34] LIN M, WALKER M E, JIRANEK V, et al. Genomic analysis of *Kazachstania aerobia* and *Kazachstania servazzii* reveals duplication of genes related to acetate ester production[J]. Microbial Genomics, 2023, 9(6): 001029.
- [35] YIN H, LIU L P, YANG M, et al. Enhancing medium-chain fatty acid ethyl ester production during beer fermentation through EEB1 and ETR1 overexpression in *Saccharomyces pastorianus*[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2019, 67(19): 5607–5613.
- [36] 徐晓裕, 万瑞琪, 马延琴, 等. 非酿酒酵母菌的分离鉴定及产酯关键酶活性的研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 58–64.
- XU X Y, WAN R Q, MA Y Q, et al. Isolation and identification of non-*Saccharomyces cerevisiae* and key enzyme activity for ester production[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 58–64.
- [37] ESCRIBANO R, GONZALEZ -ARENZANA L, GARIJO P, et al. Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(6): 1555–1564.

Screening of Superior Non-*Saccharomyces* Yeast and Its Esterase Activity Changes during Fermentation

Yan Huanru, Zhu Xia, Yang Xueshan*

(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract In order to explore the growth characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts and the evolution of their flavor enzyme activity during alcohol fermentation, autochthonous strains with high esterase and alcohol acyltransferase production were isolated from spontaneous fermentation of wine grapes in Hexi Corridor region of Gansu Province. The selected non-*Saccharomyces* yeast strains were inoculated into simulated grape juice and the growth kinetics, fermentation kinetics and flavor enzyme activity of these strains were dynamically monitored in the process of fermentation. Results showed that autochthonous HX-6 and HX-7 strains had higher total C₂-C₆ esterase activity (102.69, 102.51 U/mL), while HX-6 strain had the highest alcohol acyltransferase activity (3.46 U/mL). These two strains were identified as *Torulopsis delbrueckii* through sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA. The result of fermentation kinetics and biomass analysis for autochthonous HX-6, HX-7 strains and commercial strains TD-n confirmed that all three strains could not independently complete alcohol fermentation. Dynamic detection of enzyme activity showed that the cumulative activities of C₂-C₆ esterase (143.74, 121.85 mU/mL) and alcohol acyltransferase (15.75, 12.74 U/mL) were the highest during simulated wine fermentation triggered by HX-6 strain. The cumulative activity of C₆ esterase (86.63 mU/mL) of HX-7 strain was high in the process of simulated red wine fermentation. Based on comprehensive analysis, the selected non-*Saccharomyces* yeasts autochthonous strains have application potential for wine aroma enhancement.

Keywords non-*Saccharomyces* yeasts autochthonous strain; esterase; alcohol acyltransferase; fermentation; enzyme activity