

中条山野生葡萄产香酵母的筛选及其混菌发酵对葡萄酒香气成分的影响

柴红^{#1}, 师守国^{#2}, 李善菊², 李新^{*2}

1 山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 晋中 030801

2 运城学院生命科学系, 山西 运城 044000

柴红, 师守国, 李善菊, 李新. 中条山野生葡萄产香酵母的筛选及其混菌发酵对葡萄酒香气成分的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 262-272.

CHAI Hong, SHI Shouguo, LI Shanju, LI Xin. Mixed fermentation with an aroma-producing yeast strain screened from the wild grape on Zhongtiao Mountain affects aromatic components of the wine[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 262-272.

摘要: 【背景】产香酵母可赋予葡萄酒独特的香气, 因此, 分离筛选优良产香酵母对酿造具有地域风味的特色葡萄酒具有重要意义。【目的】从中条山野生葡萄中筛选产香酵母, 进行种群鉴定和生理生化特性研究, 并将其应用于葡萄酒发酵过程, 研究其对葡萄酒香气成分的影响。【方法】采用稀释涂布平板法从中条山野葡萄中分离筛选酵母菌, 对其进行分子生物学鉴定。优选其中具有显著香气的产香酵母, 与酿酒酵母 F15 进行混合发酵, 采用气相色谱质谱联用(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)对香气成分进行分析, 采用半定量法测定香气成分含量。【结果】共分离获得各种菌株 13 株, 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列分析表明它们分布于 *Issatchenkia*、*Torulaspora*、*Pichia*、*Saccharomyces* 和 *Rhodotorula* 等 5 个不同属内。优选其中一株香气较为浓郁的酵母菌株 *Issatchenkia orientalis* strain XS-6 开展研究, 结果发现该菌株最高耐受乙醇浓度为 8%, 最高耐受 NaCl 浓度为 6%, 最适生长温度为 38 °C。与酿酒酵母 F15 混菌发酵的葡萄酒中共检测出 31 种香气成分。香气物质总含量较单菌发酵增加 19.8%, 其中 11 种香气成分含量增加明显, 尤其是具有玫瑰香气的苯乙醇。醇类与酯类物质含量较单菌发酵增加 19.6%, 并发现了香草酸乙酯(ethyl vanillate)、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)等 7 种新的酯类物质。【结论】产香酵母 XS-6 对乙醇、NaCl、温度等具有良好的耐受性, 而且与酿酒酵母 F15 混菌发酵对西拉葡萄酒香气成分

资助项目: 山西省服务产业创新学科群项目(特色农产品发展, 2018); 山西省回国留学人员科研资助项目(2020-142); 嗜盐微生物资源利用山西省科技创新人才团队项目(2022); 运城市科技计划(YCKJ-2021034)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Fund of Shanxi Key Subjects Construction (2018), the Scientific Research Fund for Returned Scholars of Shanxi Province (2020-142), the Shanxi Scientific and Technological Innovation Team of Halophiles Resources Utilization (2022), and the Yuncheng Science and Technology Project (YCKJ-2021034).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: lixin-eva@163.com

Received: 2022-04-11; Accepted: 2022-07-30; Published online: 2022-08-29

具有明显的影响, 可能在改善葡萄酒风味方面具有潜在的应用价值。

关键词: 中条山野生葡萄; 产香酵母; 混菌发酵; 东方伊萨酵母; 香气成分

Mixed fermentation with an aroma-producing yeast strain screened from the wild grape on Zhongtiao Mountain affects aromatic components of the wine

CHAI Hong^{#1}, SHI Shouguo^{#2}, LI Shanju², LI Xin^{*2}

1 College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

2 Life Sciences Department, Yuncheng College, Yuncheng 044000, Shanxi, China

Abstract: [Background] Aroma-producing yeast can endow wine with unique aroma. Therefore, the isolation and screening of excellent aroma-producing yeast strains is of great significance for brewing the wine with regional characteristic flavor. [Objective] Aroma-producing yeast strains were screened from the wild grape growing on Zhongtiao Mountain, identified, and characterized for the physiological and biochemical properties. Further, we applied the strain with the strongest aroma to wine fermentation and studied its effect on aromatic components of the wine. [Methods] The aroma-producing yeast strains were isolated with plate-streaking method and then identified based on the molecular evidence. The strain with the strongest aroma was used for mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* F15. The aroma components of the wine were analyzed by gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). The content of aroma components was determined with semi-quantitative method. [Results] A total of 13 strains was isolated. The D1/D2 region sequence of the 26S rRNA gene indicated that these strains belonged to five genera of *Issatchenkia*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, and *Rhodotorula*. The strain *Issatchenkia orientalis* XS-6 with the strongest aroma was selected for further study. It could tolerate the highest ethanol concentration of 8% and NaCl concentration of 6% and showcased the most vigorous growth at 38 °C. A total of 31 aroma components were detected in wine fermented with *I. orientalis* XS-6 and *S. cerevisiae* F15. The total content of aroma substances in the wine produced by mixed fermentation increased by 19.8% compared with that by single strain fermentation. The total content of aroma compounds increased by 19.8%, and the content of 11 aroma components, especially phenylethanol with rose aroma, increased significantly. The content of alcohols and esters increased by 19.6%, and seven new esters such as ethyl vanillate and dibutyl phthalate were detected. [Conclusion] The aroma-producing yeast strain XS-6 has good tolerance to ethanol, NaCl, and temperature. Mixed fermentation of XS-6 with *S. cerevisiae* F15 significantly affects the aromatic components of Syrah wine, which suggests that XS-6 may have a potential application value in improving wine flavor.

Keywords: wild grape on Zhongtiao Mountain; aroma-producing yeast; mixed fermentation; *Issatchenkia orientalis*; aroma components

优质葡萄酒的酿造不仅与葡萄种类有关,也与酿酒葡萄中天然存在的各种微生物密切相关^[1]。优良酵母菌是葡萄酒酿造过程中的关键微生物,对葡萄酒的口感、香气都具有重要影响^[2-3]。野生葡萄生长环境恶劣,表皮上附着丰富多样且具有地域特色的酵母菌,其中包括可在发酵过程中产生浓厚香气的产香酵母。葡萄酒发酵过程中多种微生物的相互作用^[4-5],造就了葡萄酒复杂的口感及香气,其中产香酵母的代谢是葡萄酒中风味物质形成的主要原因^[6]。优良的产香酵母不仅能赋予葡萄酒独特的香气,还有利于改善葡萄酒的品质,因此,筛选获得不同种群的产香酵母对酿造具有地域风味的特色葡萄酒具有重要意义。

多年来,人们在葡萄酒香气和品质提升等方面做了部分相关研究。葛含静^[7]从西安特有的葡萄品种户太八号发酵液中分离获得了一株酿酒酵母,发现其应用于葡萄酒发酵过程中可显著提升酒的口感和香气。马娜等^[8]通过添加不同比例胶红酵母与酿酒酵母进行混菌发酵,发现葡萄酒的花香与果香气得到明显增强。赵美等^[9]则将粟酒裂殖酵母与酿酒酵母混菌发酵葡萄酒,结果发现不仅葡萄酒的色度值及花色苷含量有所增加,酒体的果香及花香浓郁程度也有明显提升。

地处山西省南部的中条山,气候特征与地理环境独特,生长着大量的野生葡萄,是获得产香酵母的重要来源。本研究通过人工分离的方式筛选具有产浓郁香气的酵母菌株,对其进行分子生物学鉴定,并将筛选出的产香酵母与酿酒酵母混合发酵西拉葡萄酒,研究其对葡萄酒香气成分的影响,以期为酿造具有地域风味的特色葡萄酒提供理论依据和菌株资源储备。

1 材料与方法

1.1 原料和菌种

原料取自山西省运城市绛县中条山上的野

生葡萄,以及运城市临猗县的“西拉”酿酒葡萄。菌种采用市售通用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) F15。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

YPD 液体培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 酵母浸膏 10.0。固体培养基加琼脂 20.0 g/L, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min 后备用。无水硫酸钠、焦亚硫酸钾、二氯甲烷、2-辛醇, 北京索莱宝科技有限公司; 酵母菌 DNA 提取试剂盒, 广州飞扬生物工程有限公司。恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; PCR 扩增仪, 杭州博日科技有限公司; 电泳仪和凝胶成像分析仪, 北京六一生物科技有限公司; 气相色谱质谱联用仪和高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 产香酵母的分离筛选

取 1 mL 中条山野生葡萄汁接种于 50 mL 的 YPD 液体培养基中, 于 28 °C、150 r/min 富集培养 48 h。采用稀释涂布平板法进行菌株分离, 对纯化获得的菌株进行产香筛选, 主要包括香气浓郁程度感官评定^[10]和产酯能力测定^[11]。

1.3.2 产香酵母菌的种群鉴定

采用酵母 DNA 提取试剂盒对纯化菌株进行 DNA 提取。以酵母 DNA 为模板, 对菌株 26S rRNA 基因 D1/D2 区片段进行 PCR 扩增。扩增采用通用引物 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGG AGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTC AAGACGG-3')。PCR 反应体系(20.0 μL): 基因组 DNA 1.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, *ExTaq* Polymerase 0.1 μL, 10×*ExTaq* Buffer 2.0 μL, dNTPs Mixtures 1.6 μL, ddH₂O 13.3 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 36 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 扩增产物经电泳检测后, 送北京三博远志责任有限公司进行基因测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对, 采用 MEGA 11 软件进行系统发育分析, 确定其种群属性。

1.3.3 产香酵母生长耐受性分析

(1) 研究菌株对乙醇的耐受程度

灭菌后的 YPD 液体培养基中分别加入体积浓度为 0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16% 的乙醇, 将产香酵母菌按 1% 的接种量分别接种, 于 28 °C、150 r/min 振荡培养 24 h 后, 分别测量 OD_{560} 值。

(2) 研究菌株对 NaCl 的耐受程度

分别配制 NaCl 质量浓度为 0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14% 的 YPD 液体培养基, 接种后于 28 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 分别测量 OD_{560} 值。

(3) 研究菌株对温度的耐受程度

将产香酵母接种后, 分别置于 22、26、30、34、38、42、46 °C 等不同温度下 150 r/min 振荡培养 24 h, 分别测量 OD_{560} 值。

(4) 研究菌株对葡萄糖的耐受程度

将产香酵母分别接种于葡萄糖质量浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25%、30% 的 YPD 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 培养 24 h, 分别测量 OD_{560} 值。

以上实验均做 3 次重复。

1.3.4 产香酵母与酿酒酵母混合发酵西拉葡萄酒

取 0.1 g 酿酒酵母 F15 粉溶于 100 mL 葡萄糖溶液, 并接种于 YPD 液体培养基中, 同时将菌株 XS-6 接种于另一 YPD 液体培养基中, 分别于 28 °C、150 r/min 培养至菌液浓度达到 10^7 CFU/mL 左右备用。将西拉酿酒葡萄破碎除梗后分装于两个发酵罐中, 其中一个罐中接种 1% 的酿酒酵母 F15; 另一个罐中则混合接种 0.5% 的酿酒酵母 F15 和 0.5% 的产香酵母

XS-6。上述发酵均在 20 °C 条件下进行, 以上实验均做 3 次重复。

1.3.5 葡萄酒香气成分分析

葡萄酒发酵完成后, 加入内标 2-辛醇 (1 mg/mL), 采用液液萃取法对酒样中的香气成分进行提取^[12], 利用气相色谱质谱联用 (gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS) 对其中的挥发性成分进行分析^[13-14], 样品重复进样 3 次, 结果取平均值。色谱条件: DB-17ms 毛细管柱 (30 m×250 μm×250 μm); 程序升温: 40 °C 稳定 5 min, 首先以 9 °C/min 升温至 80 °C, 然后以 6 °C/min 升温至 150 °C, 最后以 8 °C/min 升温至 220 °C 保持 10 min。进样量 2 μL, 进样口温度 270 °C, 载气为 He 气, 流速 0.5 mL/min。质谱条件: EI 电离源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 溶剂延迟 6 min, 质量扫描范围: 30–550 amu。通过 Nist 谱库检索得到数据, 筛选出匹配度高于 80% 的香气成分, 并以内标法对各组分的相对含量进行半定量计算。

2 结果与分析

2.1 产香酵母的分离筛选结果

分离获得各种菌株 13 株, 种群鉴定发现它们分布于 *Issatchenkia*、*Torulaspora*、*Pichia*、*Saccharomyces* 和 *Rhodotorula* 等 5 个不同属 (表 1)。采用嗅闻法^[10]对菌株进行筛选, 结果发现菌株 XS-3 和 XS-5 呈臭味, XS-4 等 3 株菌株无明显气味, 剩余菌株均呈现出不同程度的清香味和酒香味, 其中 XS-1、XS-2、XS-11、XS-13 香气较淡且香气层次感较为单一; XS-9 与 XS-10 香气虽然富有层次感, 但持续时间较短。经过优选发现, 菌株 XS-6 具有较为浓郁的香气且持续时间较长, 结合产酯能力测定结果 (表 1), 因此选择菌株 XS-6 开展后续研究。

表 1 酵母菌株香气评价

Table 1 Aroma evaluation of the yeast strains

菌株 Strain	基因登录号 GenBank accession No.	清香 Faint scent	酒香 Bouquet of wine	水果香 Fruity	臭味 Stink	无气味 No smell	总酯 Total ester (g/L)
<i>Torulaspota delbrueckii</i> strain XS-1	ON680871	+					0.95
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain XS-2	ON680872	+					0.71
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-3	ON680873				+		0.74
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-4	ON680874					+	0.42
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-5	ON680875				+		1.41
<i>Issatchenkia orientalis</i> strain XS-6	OM230173	+	+++				1.76
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-7	ON680876		+				1.13
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-8	ON680877					+	0.69
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-9	ON680878	+	+				1.37
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-10	ON680879	+	+				1.36
<i>Pichia kudriavzevii</i> strain XS-11	ON680880		+				1.58
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain XS-12	ON680881					+	0.88
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain XS-13	ON680882	+					0.64

+: 气味浓郁程度

+: The intensity of the smell.

2.2 菌落形态特征

对筛选获得的菌株 XS-6 的菌落形态和细胞形态进行观察, 结果如图 1 所示。菌株 XS-6 在 YPD 培养基上菌落呈乳白色, 表面光滑不湿润, 易被挑起, 中间有突起。显微镜观察发现菌株 XS-6 细胞呈椭圆形, 大小约为 $10\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, 属于典型的酵母菌形态。

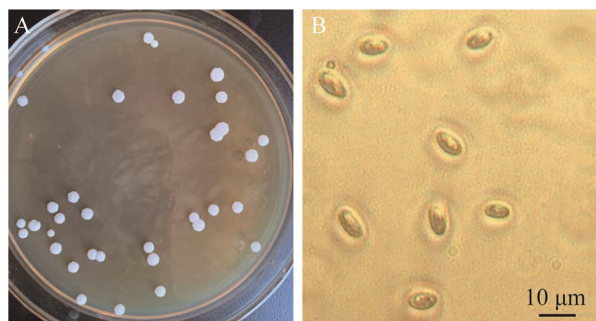


图 1 菌株 XS-6 的菌落形态(A)及细胞形态(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and cell morphology (B) of the strain XS-6.

2.3 菌株 XS-6 种群鉴定结果

PCR 扩增得到大小为 611 bp 的 DNA 片段, 片段回收纯化后进行测序, 测序结果提交 GenBank 数据库, 获得基因登录号为 OM230173。选取相似性较高的基因序列, 利用 MEGA 11 构建菌株 XS-6 的系统发育树, 结果如图 2 所示。菌株 XS-6 与 *Issatchenkia* 属内各菌株相似性最高, 均为 97% 以上, 系统发育分析归于同一分支。结合形态学特征观察结果, 确定其为东方伊萨酵母属成员, 命名为 *Issatchenkia orientalis* strain XS-6。

2.4 菌株 XS-6 耐受性分析结果

不同因素对菌株 XS-6 生长繁殖的影响如图 3 所示。随着乙醇浓度升高, 菌株 XS-6 生长繁殖受到了明显抑制。当乙醇浓度大于 8% 时, 生长基本趋于停滞(图 3A)。无盐条件下, 产香酵母 XS-6 生长最佳; 当 NaCl 浓度大于 6% 时, 菌株繁殖能力显著降低(图 3B)。如图 3C 所示,

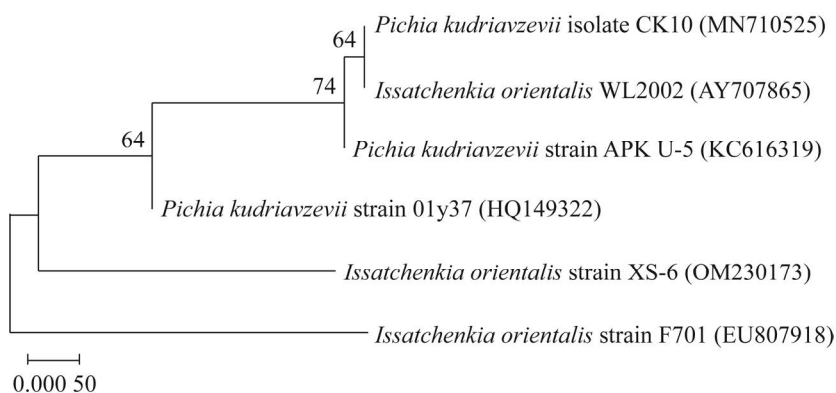


图2 菌株XS-6基于26S rRNA基因序列构建的系统发育树 括号中的序号代表菌株的序列登录号; 分支点数字代表亲缘关系的置信度; 标尺长度代表遗传距离

Figure 2 Phylogenetic tree of the strain XS-6 based on 26S rRNA gene sequence. The contents in parentheses are accession numbers of the strain; Branch point number represents the confidence level of kinship; Scale length represents genetic distance.

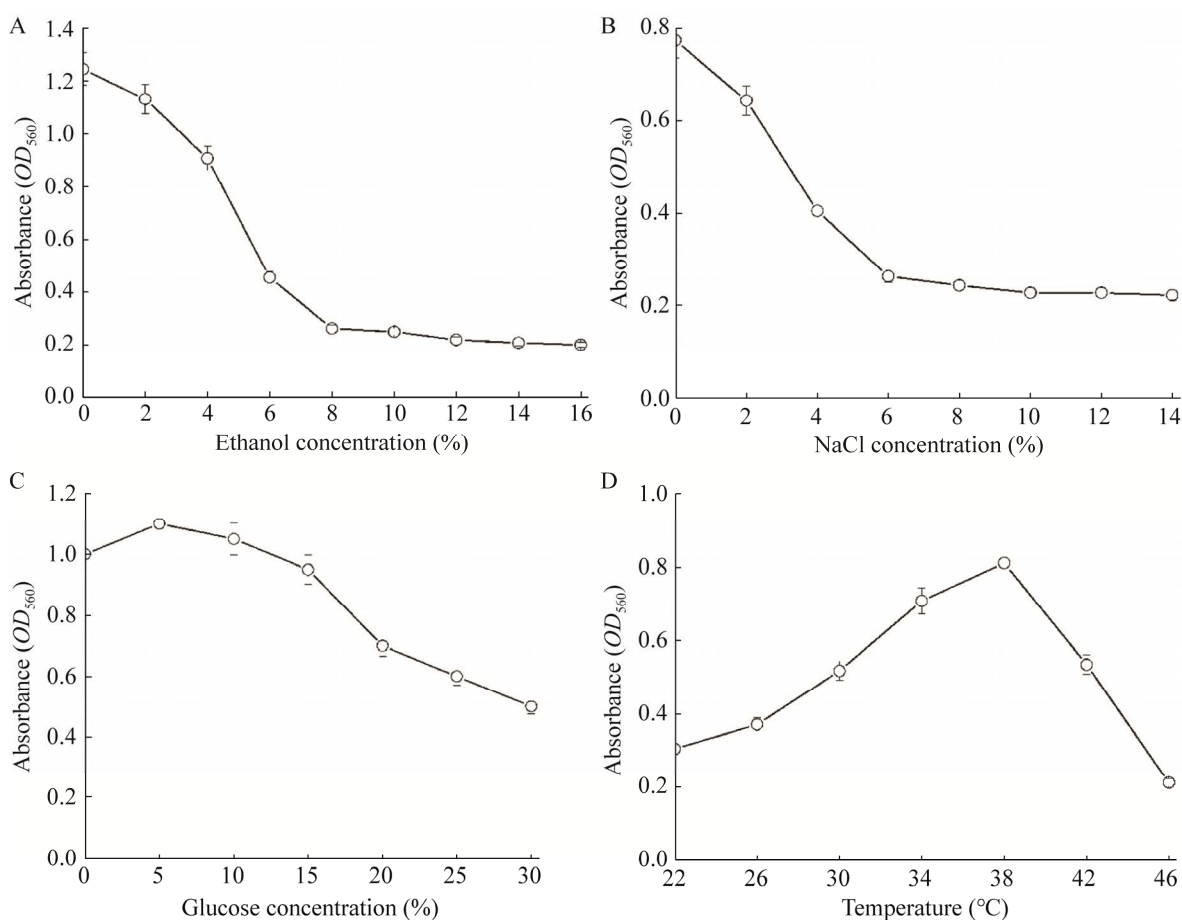


图3 乙醇(A)、NaCl(B)、葡萄糖(C)和温度(D)对菌株XS-6生长繁殖的影响

Figure 3 Effect of the ethanol (A), NaCl (B), glucose (C) and temperature (D) on the growth of the strain XS-6.

当葡萄糖浓度在 0–20%范围时, 菌株 XS-6 的葡萄糖耐受性相对较好; 高于 20%时耐受性有所下降。菌株 XS-6 在 30–42 °C 范围内生长良好, 最适生长温度为 38 °C; 高于 42 °C 时, 菌株生长繁殖能力明显下降(图 3D)。

2.5 菌株 XS-6 与酿酒酵母 F15 混菌发酵对葡萄酒香气成分的影响

单菌发酵和混菌发酵的两种葡萄酒酒样中共测出 38 种香气成分, 其中醇类物质含量最高, 达到 87%以上(表 2)。单菌发酵的葡萄酒中香气成分总含量为 69 832.91 $\mu\text{g/L}$, 其中酯类物质为 4 275.84 $\mu\text{g/L}$, 醇类物质为 61 343.04 $\mu\text{g/L}$, 酸类为 273.33 $\mu\text{g/L}$, 烷烃类物质为 1 897.33 $\mu\text{g/L}$, 其他物质 2 043.37 $\mu\text{g/L}$ 。菌株 XS-6 与 F15 混菌发酵的葡萄酒酒样中, 检测出香气物质总含量为 83 676.92 $\mu\text{g/L}$, 其中酯类物质为 5 448.56 $\mu\text{g/L}$, 醇类物质为 72 999.18 $\mu\text{g/L}$, 酸类物质为 254.33 $\mu\text{g/L}$, 烷烃类物质为 3 746.68 $\mu\text{g/L}$, 其他物质 1 228.17 $\mu\text{g/L}$ 。对比发现, 混菌发酵酒样中香气含量大幅度增加, 各种香气物质较单菌发酵共增加了 13 844.01 $\mu\text{g/L}$, 增加约 19.8%, 其中醇类与酯类物质含量较单菌发酵增加 19.6%。

研究发现, 混菌发酵不仅能使葡萄酒香气物质含量得到明显提高, 而且产生的香气物质种类也有一定增加(表 2)。混菌发酵酒样中共检测出 31 种香气成分, 较单菌发酵增加了 7 种。其中, 香草酸乙酯、三氟乙酸十六烷基酯、邻苯二甲酸二丁酯、乙酸三十烷酯、4-羟基丁酸乙酰酯、三氟乙酸十八烷基酯、七氟丁酸十八烷基酯等 7 种酯类化合物是单菌发酵酒样中未发现的。醇类物质种类方面, 两种酒样均发现了 2,3 丁二醇、苯乙醇等 5 种化合物的存在。此外, 共检测出 9 种烷烃类物质, 其中单菌发酵 4 种。其他物质方面, 混菌发酵较单菌发酵多 1 种, 而且发现了 1-二十碳烯、二十六碳-1-烯等 2 种新物质。

3 讨论与结论

发酵菌种的选择是葡萄酒香气形成的关键因素, 因此, 发掘野生产香酵母资源, 不断优化发酵菌种是实现葡萄酒风味多样化的重要手段。本研究从中条山野生葡萄中分离筛选获得了一株产香酵母菌株 XS-6, 基因测序分析表明其为东方伊萨酵母(*Issatchenkia*)属成员。菌株 XS-6 最适生长温度为 38 °C, 而且在 42 °C 时仍生长良好; 酒精、NaCl、葡萄糖耐受性研究表明, 该菌株可在酒精浓度 0–8%、NaCl 浓度 0–6%和高浓度葡萄糖的环境中生长, 显示出较好的生长和发酵特性, 这与部分研究结果^[15–16]基本一致。东方伊萨酵母是一种能够在高温条件下生长并可释放多种挥发性物质的非酿酒酵母菌, 极具工业应用潜力^[17]。目前针对东方伊萨酵母的研究多数集中在其生物多样性方面, 而将其应用于葡萄酒发酵的研究却相对较少。

本研究将筛选获得的产香酵母菌株 *Issatchenkia orientalis* strain XS-6 应用于西拉葡萄酒的混菌发酵过程, 结果发现实验酒样中香气物质种类及含量均有一定提升, 其中苯乙醇含量增加约 20%。张文文等^[18]将东方伊萨酵母和酿酒酵母混合发酵杨梅酒发现, 混菌发酵同样使苯乙醇含量明显增加。Dutraive 等^[19]研究发现, 将非酿酒酵母与酿酒酵母混菌发酵除可提高苯乙醇含量外, 还可产生多种具有蜂蜜、玫瑰、丁香花等香气的化合物。作为一类高级醇, 苯乙醇是葡萄酒的特征香气之一, 具有令人愉悦的玫瑰风味, 是酵母菌生长代谢的重要产物, 对葡萄酒风味的形成具有重要影响, 其浓度过高或者过低都会对葡萄酒风味产生不良影响^[20]。有研究发现, 当高级醇浓度低于 300 mg/L 时, 对葡萄酒的香气构成具有积极作用^[21]。除苯乙醇外, 本研究发现, 混菌发酵的

表 2 两种西拉葡萄酒样品香气成分分析

Table 2 Aroma contents of two Syrah wines

类型 Kind	化合物 Chemicals	香气特征 Aroma characteristics	单菌发酵 Single strain fermentation ($\mu\text{g/L}$)	混菌发酵 Mixed fermentation ($\mu\text{g/L}$)
醇类化合物 Alcohols	2,3-butanediol	Fruity	10 353.79	10 753.31
	3-methylthiopropanol	Onion, meaty	2 079.12	1 261.21
	Phenethyl alcohol	Rose	45 219.7	55 026.08
	Hydroxyphenethyl alcohol	—	2 385.01	4 047.14
酯类化合物 Esters	Tryptophol	Mild bitter	1 305.42	1 911.44
	Diethyl succinate	Fruity, bouquet of wine	556.87	623.50
	Ethyl succinyl chloride	—	995.45	1 470.45
	Ethyl acetamidoacetate	—	165.95	134.49
	Ethyl vanillate	Light coffee flavor	—	228.22
	Seventeen dichloroacetate	—	225.64	—
	Hexadecyl trifluoroacetate	—	—	228.46
	Octadecyl 2,2,2-trifluoroacetate	—	—	329.67
	Mono (carboxymethyl) phthalate	—	160.83	—
	Dibutyl phthalate	—	—	217.70
	Triacetyl acetate	—	—	188.66
	Butanoic acid, 4-hydroxy	—	—	1 953.08
	Gamma-butyrolactone	Sweet	1 794.02	—
	Seventeen dichloroacetate	—	225.64	—
	Mono-iso-butyl phthalate	—	151.44	—
	Heptafluorobutyric acid, n-octadecyl ester	—	—	74.33
酸类化合物 Acids	Octanoic acid	Fruity	206.59	254.33
	Nonahexacontanoic acid	Light sour	66.74	—
烷烃类化合物 Alkanes	Dodecane	—	—	662.22
	Tridecane	—	215	311.79
	Tetradecane	—	1 124.02	1 303.94
	Pentadecane	—	493.29	625.55
	Heneicosane	—	65.02	109.28
	Tricosane	—	—	169.94
	Tetracosane	—	—	244.95
	Pentacosane	—	—	215.41
	Tetratetracontane	—	—	103.60
	其他类物质 Others	1-nonadecene	—	172.50
Eicosene		—	—	49.04
<i>Cis</i> -9-tricosene		—	290.04	28.15
Trans-squalene		Plastic flavor	472.79	156.43
Hexacos-1-ene		—	—	197.91
Oleamide		Faint smell	946.26	676.27
Acetyloxolan-2-one		Fruity, Jammy	161.78	—
总计 Total	38		69 832.91	83 676.92

—: None.

葡萄酒中 2,3-丁二醇、酪醇、色醇等物质的含量也都有不同程度的增加,这不仅可以赋予葡萄酒一种淡苦味,还可更好地平衡葡萄酒中尖锐的香气^[22]。

产香酵母对葡萄酒香气的影响不仅体现在其能增加醇类物质含量,而且更多的是其酯化能力方面。研究表明,产香酵母可产生多种酶类,其中糖苷酶能水解原料中的非挥发性糖苷类前体物质,使其转换为各种酯类物质,不同种类的酯类物质赋予了葡萄酒更多的花香及果香气^[23]。本研究对产香酵母 XS-6 与酿酒酵母混菌发酵的酒样香气成分进行定性定量分析,结果表明,其中酯类物质的含量和种类较单菌发酵均有明显增加,而且出现了 7 种新的酯类物质,尤其是其中的香草酸乙酯,其自身产生的烧烤和烟熏味可赋予葡萄酒浓厚的立体口感^[24]。Lleixà 等^[25]在葡萄酒发酵过程中接种产香酵母 *Hanseniaspora vineae*,葡萄酒总酯含量明显提高,研究发现这可能是与其自身可分泌酯酶并通过酶促反应转化释放出更多的酯类物质有关。

目前对产香酵母资源的发掘利用还远远不够,而土著微生物在特色葡萄酒的酿造中具有种群优势,在发酵体系中可能处于更有利的地位^[26],因此,筛选和驯化性状稳定的野生产香酵母应用于葡萄酒发酵过程中,可能是解决葡萄酒风味一致化的一条重要途径。本研究发现产香酵母菌 *Issatchenkia orientalis* strain XS-6 与其他产香酵母在某些方面上具有相似性,但也存在其独有的特性,可能在葡萄酒发酵工业领域具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] 余欢,管敬喜,杨莹,黄晓云,成果,谢太理,谢林君. 7株野生葡萄酒酵母对‘桂葡3号’干白葡萄酒香气成分的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 251-258.
YU H, GUAN JX, YANG Y, HUANG XY, CHENG G, XIE TL, XIE LJ. Effects of seven wild wine yeast strains on the aroma compounds of ‘guipu 3’ dry white wines[J]. Food Science, 2019, 40(4): 251-258 (in Chinese).
- [2] 赵悦,孙庆扬,杨宽,朱怡凡,毛如志,邵建辉,何霞红. 云南葡萄酒产区酵母多样性及特色菌种酿酒应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 350-356.
ZHAO Y, SUN QY, YANG K, ZHU YF, MAO RZ, SHAO JH, HE XH. Research progress of wine yeast diversity in Yunnan wine producing regions and characteristic yeast strains in wine making application[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(4): 350-356 (in Chinese).
- [3] 吴启凤,李红梅,杨胜涵,曹海鹏. 水晶葡萄酒酵母菌的分离筛选及酿酒性能研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(7): 65-69.
WU QF, LI HM, YANG SH, CAO HP. Isolation and screening of *Saccharomyces cerevisiae* from Shuijing grapes and its oenological characteristics[J]. China Brewing, 2019, 38(7): 65-69 (in Chinese).
- [4] 丁银霆,魏如腾,宋英琿,李华,王华. 葡萄生态系统中自然微生物群落多样性及其代谢酶系统的研究现状[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2837-2852.
DING YT, WEI RT, SONG YH, LI H, WANG H. Research status of the diversity of natural microbial community and metabolic enzyme system in grape ecosystem[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2837-2852 (in Chinese).
- [5] BANILAS G, SGOUROS G, NISIOTOU A. Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates[J]. Microbiological Research, 2016, 193: 1-10.
- [6] YAN SB, CHEN XS, XIANG XB. Improvement of the aroma of lily rice wine by using aroma-producing yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* HN₀₀₆[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 89.
- [7] 葛含静. 户太八号葡萄酒本土酵母筛选[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8): 133-139.
GE HJ. Screening of domestic yeast for production of wine with No.8 Hutai grape[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(8): 133-139 (in Chinese).
- [8] 马娜,王星晨,孔彩琳,陶永胜. 胶红酵母与酿酒酵母共发酵对干红葡萄酒香气与色泽的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 97-104.
MA N, WANG XC, KONG CL, TAO YS. Effect of mixed culture fermentation with *Rhodotorula*

- mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and color of red wine[J]. Food Science, 2021, 42(2): 97-104 (in Chinese).
- [9] 赵美, 田秀, 李敏, 高娉娉, 梁丽红, 韩舜愈, 王婧. 粟酒裂殖酵母与酿酒酵母共同接种发酵对‘黑比诺’干红葡萄酒品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 108-116.
ZHAO M, TIAN X, LI M, GAO PP, LIANG LH, HAN SY, WANG J. Effect of mixed culture fermentation with *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* on the quality of ‘pinot noir’ dry red wine[J]. Food Science, 2021, 42(24): 108-116 (in Chinese).
- [10] 刘文丽, 孙舒扬, 贡汉生, 车长远, 金成武. 不同酿酒酵母发酵的干红樱桃酒酒体成分及感官质量分析[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 157-161, 166.
LIU WL, SUN SY, GONG HS, CHE CY, JIN CW. The compositional profile and sensory analysis of cherry wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(1): 157-161, 166 (in Chinese).
- [11] 李欢欢, 曾雪莹, 谢娟, 刘玲, 徐学锋. 产香酵母的筛选鉴定及产酯条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(6): 87-92.
LI HH, ZENG XY, XIE J, LIU L, XU XF. Screening and identification of aroma-producing yeasts and optimization of ester production conditions[J]. China Brewing, 2022, 41(6): 87-92 (in Chinese).
- [12] 曾游, 丁怡, 彭程. 一种液-液萃取测定葡萄酒中主要挥发性成分的快速定量分析方法[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 281-288.
ZENG Y, DIING Y, PENG C. A method for fast quantitative analysis of major wine volatile compounds based on liquid-liquid extraction[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 281-288 (in Chinese).
- [13] OLIVEIRA I, FERREIRA V. Modulating fermentative, varietal and aging aromas of wine using non-*Saccharomyces* yeasts in a sequential inoculation approach[J]. Microorganisms, 2019, 7(6): 164.
- [14] SCHUEUERMANN C, KHAKIMOV B, ENGELSEN SB, BREMER P, SILCOCK P. GC-MS metabolite profiling of extreme southern pinot noir wines: effects of vintage, barrel maturation, and fermentation dominate over vineyard site and clone selection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(11): 2342-2351.
- [15] 荆雄, 杨辉, 苏文, 董腾达, 黄莎莎. 非酿酒酵母与酿酒酵母混合发酵柿子酒特性的研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(12): 52-56.
JING X, YANG H, SU W, DONG TD, HUANG SS. Fermentation performances of persimmon wine with mixed yeasts of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Brewing, 2018, 37(12): 52-56 (in Chinese).
- [16] 于洋, 栗春燕, 陈晶瑜. 3株葡萄酒非酿酒酵母的生长与发酵特性[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 106-111.
YU Y, SU CY, CHEN JY. Growth and fermentation characteristics of three non-*Saccharomyces* wine yeasts[J]. Food Science, 2015, 36(19): 106-111 (in Chinese).
- [17] 刘婷婷, 曾驰, 杨团元, 宋瑶, 刘超帝, 缪礼鸿. 白云边酒优势酵母菌的分离鉴定及其发酵特征分析[J]. 中国酿造, 2013, 32(12): 116-120.
LIU TT, ZENG C, YANG TY, SONG Y, LIU CD, MIAO LH. Isolation and identification of the dominant yeast from fermented grains of Baiyunbian liquor and the analysis of fermentation characteristics[J]. China Brewing, 2013, 32(12): 116-120 (in Chinese).
- [18] 张文文, 翁佩芳, 吴祖芳. 东方伊萨酵母和酿酒酵母混合发酵杨梅酒的发酵效率及风味特征分析[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 144-151.
ZHANG WW, WENG PF, WU ZF. Fermentation efficiency and flavor characteristics of bayberry wine with mixed starter culture of *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2019, 40(18): 144-151 (in Chinese).
- [19] DUTRAIVE O, BENITO S, FRITSCH S, BEISERT B, PATZ CD, RAUHUT D. Effect of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts on Riesling wine chemical composition[J]. Fermentation, 2019, 5(3): 79.
- [20] 彭璐, 明红梅, 陶敏, 任清, 熊堂语, 王轩, 俞飞. 樱桃酒酿造用产香酵母的筛选及其特征香气成分分析[J]. 中国酿造, 2020, 39(11): 36-42.
PENG L, MING HM, TAO M, REN Q, XIONG TY, WANG X, YU F. Screening of aroma-producing yeast for cherry wine brewing and analysis of its characteristic aroma components[J]. China Brewing, 2020, 39(11): 36-42 (in Chinese).
- [21] 徐晴芳, 王华艳, 陆开祥, 苏海泽, 蔡建. 玫瑰蜜低醇桃红葡萄酒香气物质组成及酿酒酵母对其的影响[J]. 中国果菜, 2020, 40(9): 49-55.
XU QF, WANG HY, LU KX, SU HZ, CAI J. Aroma compounds composition of “rose honey” low-alcohol rose wine and the influence of commercial yeast strain[J]. China Fruit & Vegetable, 2020, 40(9): 49-55

- (in Chinese).
- [22] PALMIERI A, PETINE M. Tryptophol and derivatives: natural occurrence and applications to the synthesis of bioactive compounds[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(3): 490-530.
- [23] 王伟, 俞志敏, 侯英敏, 堵国成, 李宪臻. 产香酵母 *Pichia myanmarensis* LX15 的分离纯化及对精酿啤酒风味物质形成的影响[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(4): 34-40.
WANG W, YU ZM, HOU YM, DU GC, LI XZ. Isolation and properties of aroma-producing *Pichia myanmarensis* and the effects of the formation of aromatic substances in craft-brewed beer[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(4): 34-40 (in Chinese).
- [24] 于海燕, 张妮, 许春华. 樱桃酒发酵过程中的主要香气成分及其变化[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(10): 159-163.
YU HY, ZHANG N, XU CH. Aromatic compounds and variation of the compounds during fermentation of cherry wine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(10): 159-163 (in Chinese).
- [25] LLEIXA J, MARTIN V, del C PORTILLO M, CARRAU F, BELTRAN G, MAS A. Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 338.
- [26] 闫兴敏, 姜娇, 高辉, 白稳红, 王平来, 刘延琳. 优良本土酿酒酵母的酿酒特性及产香能力初析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(4): 62-68.
YAN XM, JIANG J, GAO H, BAI WH, WANG PL, LIU YL. Oenological properties of superior indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and their production of volatile compounds[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(4): 62-68 (in Chinese).