

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

李 婷¹, 陈景桦¹, 马得草¹, 王星晨¹, 陶永胜^{1,2,*}

(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)

摘 要:目的: 探究非酿酒酵母与酿酒酵母混合发酵过程中酵母的生长状况及酯酶活性的变化规律。方法: 通过测定川南白酒窖池中分离的非酿酒酵母在液体发酵培养基中的酯酶活性, 从中优选1株高产酯酶的酵母, 经26S rDNA D1/D2区域序列分析鉴定种属。随后利用模拟葡萄汁进行优选酵母和酿酒酵母的混合发酵, 设立同时接种、提前48 h接种和提前96 h接种优选酵母3个实验处理, 以两株酵母的纯发酵为对照, 研究发酵过程中的酵母生长动力学及不同碳链长度底物(C₂~C₈)对应的酯酶活性变化。结果: 优选的非酿酒酵母为发酵毕赤酵母。酵母生长动力学研究发现, 单一酿酒酵母的发酵速率最快, 但混合发酵中的酵母数量更多, 尤其是提前96 h接种。模拟发酵处理中, 同时接种处理的酯酶活性累积量最大(574 mU/mL), 酯酶活性在C₂~C₈有底物特异性, 其中C₈酯酶活性累积量最高(178~227 mU/mL), C₂酯酶活性累积量最低(46~66 mU/mL)。结合发酵动力学与发酵中酯酶活性变化, 发现酯酶活性与酵母的生长状况有关, 当酵母生长达到稳定期, 酯酶活性达到最大值。结论: 优选酵母与酿酒酵母的同时接种发酵具有较高的C₄~C₈酯酶活性累积量, 有增香酿造的应用潜力。

关键词: 非酿酒酵母; 发酵毕赤酵母; 酯酶; 模拟葡萄汁; 生长动力学

Growth Kinetics and Esterase Activities of Selected Non-*Saccharomyces* Yeast and *Saccharomyces cerevisiae* in the Fermentation of Model Grape Juice

LI Ting¹, CHEN Jinghua¹, MA Decao¹, WANG Xingchen¹, TAO Yongsheng^{1,2,*}

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, China)

Abstract: Objective: The aim of this study was to explore the growth and esterase activities in the mixed culture fermentation of non-*Saccharomyces* yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. Methods: Esterase activities of non-*Saccharomyces* yeast from southern Sichuan liquor pits were measured in liquid fermentation medium. One yeast strain with the highest esterase activity was selected and identified through sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA. Then, the alcoholic fermentation of mixed cultures of the isolate and *S. cerevisiae* were performed in model grape juice medium to explore the yeast growth kinetics and the evolution of esterase activities from substrates with different carbon chain lengths (C₂~C₈). Three experimental groups were set up by inoculating the non-*Saccharomyces* yeast strain 48 and 96 h before or at the same time as *S. cerevisiae*, and their pure cultures were used as controls. Results: The isolate was identified as *Pichia fermentans*. The fermentation rate of pure *S. cerevisiae* was the fastest. The yeast population in mixed culture fermentation was higher, especially with 96 h sequential inoculation. During fermentation, the highest esterase activities were accumulated with simultaneous inoculation (574 mU/mL). The C₈ substrate accumulated the highest esterase activity (178~227 mU/mL), while the C₂ accumulated esterase activity was the lowest (46~66 mU/mL). Comparison of the cell growth kinetics and the evolution of esterase activities during fermentations revealed that esterase activities were correlated with the growth of yeasts and arrived at the highest value in the stationary growth phase. Conclusion: The simultaneous inoculation of the isolate and *S. cerevisiae* in model juice with higher C₄~C₈ accumulated esterase activities has a good application potential for aroma enhancement.

Key words: non-*Saccharomyces*; *Pichia fermentans*; esterase; model grape juice; yeast growth kinetics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722010

收稿日期: 2016-12-11

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD0400504-01); 杨凌示范区科技计划项目(2016NY-23)

作者简介: 李婷(1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事葡萄酒酿造学研究。E-mail: li1991681017@126.com

*通信作者: 陶永胜(1977—), 男, 教授, 博士, 主要从事葡萄酒酿造与风味化学研究。E-mail: taoyongsheng@nwsuaf.edu.cn

中图分类号: TS261.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 22-0060-07

引文格式:

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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722010. <http://www.spkx.net.cn>

LI Ting, CHEN Jinghua, MA Decao, 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. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201722010. <http://www.spkx.net.cn>

酿酒酵母由于发酵纯净、发酵彻底、酒精转化率高而成为葡萄酒酒精发酵过程中的优势菌株。但研究发现, 单一酿酒酵母的酒精发酵常常会给葡萄酒带来香气单一、风味同质化的问题, 不利于葡萄酒地域风格和酒庄特色的形成^[1]。而其他非酿酒酵母在酒精发酵中虽然存活时间短, 酒精耐受力差^[2], 但它们中的一些能促进更多风味成分的生成, 尤其是酯类、醇类等物质^[3]。有研究将季也蒙有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora guilliermondii*) 和异常毕赤酵母 (*Pichia anomala*) 与酿酒酵母进行混合酒精发酵, 发现与单一酿酒酵母发酵相比, 乙酸酯类物质的含量明显提高^[4]; 德尔布有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*) 和酿酒酵母混合发酵, 丙酸乙酯、异丁酸乙酯、乙酸异戊酯等酯类物质的含量也均有不同程度的增加, 增强了葡萄酒香气的复杂度^[5]。研究发现, 酯类化合物是构成葡萄酒风味的重要香气物质, 占发酵挥发性物质的30%左右, 尤其是含量较低的乙醇酯可以带来令人愉悦的水果类香气^[6], 酯类物质对葡萄酒香气的复杂度具有重要贡献^[6-7]。

葡萄酒中酯类物质的合成、积累过程与葡萄酒中微生物的酯酶活性密切相关^[6]。在葡萄酒酿造过程低pH值条件下, 酯酶可以将酸类和醇类化合物通过直接酯化作用转化合成酯类物质, 也可以水解相应的酯类物质, 改变葡萄酒中一些挥发性酯类物质的含量 (如辛酸乙酯、癸酸乙酯、乳酸乙酯、琥珀酸乙酯等), 调节酯类的合成-水解平衡的状态^[8-9]。Bardi等^[10]研究发现葡萄汁酒精发酵期间有较高的酯酶活性, Pénicaud等^[11]也研究证实了酿酒酵母细胞中酯酶的存在。有研究发现, 非酿酒酵母参与下的混合酒精发酵能提高酯酶活性, 使葡萄酒的香气更为浓郁持久, 风格多样化^[3]。Kurita^[12]将异常毕赤酵母与酿酒酵母进行混合酒精发酵, 发现产生了更高活性的乙酸乙酯水解酯酶。近些年来, 葡萄酒酿造学领域关于酯酶的研究大多数集中在与苹果酸-乳酸发酵阶段 (MLF) 有关的乳酸杆菌、酒酒球菌等方面^[13-14], 虽然启动葡萄酒酒精发酵中的酵母酯酶活性的研究较多^[15-16], 但是关于非酿酒酵母及其混合发酵过程中酯酶活性变化的研究尚鲜见报道。

我国是白酒生产大国, 酯类物质是白酒主要的呈香物质, 白酒窖池中拥有非常丰富的非酿酒酵母资源。针

对白酒中非酿酒酵母应用于葡萄酒, 以及发酵过程中酯酶活性变化的研究鲜有报道, 本实验将优选于川南白酒窖池中高产酯酶的发酵毕赤酵母与酿酒酵母在模拟葡萄汁溶液中进行混合酒精发酵, 研究混合发酵过程中酵母的生长状况以及C₂~C₈底物特异性的酯酶活性变化, 研究结果对于非酿酒酵母在葡萄酒增香酿造中的应用具有理论和实践的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株: 川南白酒窖池中分离的35株非酿酒酵母; 法国Laffort葡萄酒辅料公司的Actiflore F5商业酿酒酵母。

培养基: YPD培养基^[17]: 酵母浸粉1%, 蛋白胨2%, 葡萄糖2%; WL营养培养基^[18]: 酵母浸粉0.4%, 蛋白胨0.5%, 葡萄糖5%, 琼脂2%, 储液A (磷酸二氢钾5.5 g, 氯化钾4.25 g, 氯化钙1.25 g, 硫酸镁1.25 g, 定容至400 mL, 121 °C灭菌20 min后4 °C保存) 40 mL/1 000 mL, 储液B (氯化铁0.25 g, 硫酸锰0.25 g, 定容至100 mL, 121 °C灭菌20 min后4 °C保存) 1 mL/1 000 mL, 储液C (0.44 g溴甲酚绿溶于10 mL无菌水和10 mL 95%酒精中) 1 mL/1 000 mL; 液体发酵培养基^[19]: 吐温80 1%, 酵母浸粉1%, 蛋白胨2%, 葡萄糖2%, NH₄NO₃ 0.3%, KH₂PO₄ 0.4%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%。

葡萄糖、酵母浸粉、蛋白胨、琼脂、氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸镁、磷酸二氢钾、柠檬酸、磷酸氢二钠、氢氧化钠等 (均为分析纯) 天津化学试剂有限公司; 对硝基苯基乙酸酯 (*p*-nitrophenyl acetate, *p*-NPA)、对硝基苯基丁酸酯 (*p*-nitrophenyl butyrate, *p*-NPB, 纯度99%)、对硝基苯基己酸酯 (*p*-nitrophenyl hexanoate, *p*-NPH, 纯度98%)、对硝基苯基辛酸酯 (*p*-nitrophenyl octanoate, *p*-NPO, 纯度97%) 北京百灵威科技有限公司; Premix Ex Taq™、6×DNA Loading Buffer、2 000 bp DNA Marker, 引物NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 仪器与设备

SX-500高压灭菌锅 日本Tomy公司; SW-CJ-1FD超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; BX51光学显微镜 日本Olympus公司; MP-250B霉菌培养箱、NRY-2102C恒温培养摇床 上海南荣实验室设备有限公司; TGL-16M台式高速冷冻离心机 长沙湘仪仪器有限公司; HH-S6电热恒温水浴锅 北京科伟永兴仪器有限公司; Cary 60紫外-可见分光光度计 美国瓦里安技术中国有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酵母培养

将35株非酿酒酵母接入YPD培养基28℃活化48 h, 按5%接种量转接YPD培养基, 在28℃、180 r/min条件下培养24 h, 再按10%接种量接入液体发酵培养基, 28℃、150 r/min摇床培养72 h。将YPD培养48 h的菌株进行WL平板划线, 在28℃培养3 d后观察菌落形态, 取液体发酵液利用光学显微镜观察细胞形态。

1.3.2 高产酯酶酵母的筛选

对川南白酒窖池分离的非酿酒酵母进行酯酶活性的测定, 筛选出酯酶活性最高的菌株, 参照Pérez-Martín等^[7]方法, 并略有改动。具体方法为: 取液体发酵液5 mL, 加入等体积的玻璃珠破碎20 min, 8 000 r/min、4℃离心15 min留上清液得粗酶液。取860 μL pH 5.0的柠檬酸-磷酸缓冲液, 100 μL粗酶液与40 μL的25 mmol/L *p*-NPB混合均匀, 在37℃条件下反应60 min, 然后加入100 μL的0.5 mol/L的NaOH溶液终止反应。对照组用缓冲液代替粗酶液。每个样品3组平行, 在400 nm波长处测定吸光度。一个单位(U)酯酶活性定义为: 37℃条件下, 每分钟释放1 μmol对硝基苯酚所需的酶量。

1.3.3 优选酵母的鉴定

酵母DNA的提取采用石英砂破壁法^[20]。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增体系(25 μL): Premix Ex TaqTM 12.5 μL, 引物NL1和NL4各1 μL, DNA模板1 μL, 双蒸水9.5 μL。PCR扩增程序: 95℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 53℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 循环36次; 72℃保持10 min。扩增产物在电压120 V, 电流100 mA, 1%琼脂糖凝胶电泳40 min, 置于全自动凝胶成像仪内进行分析拍照。序列分析: 用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。根据测序结果从GenBank核酸序列数据库中进行同源序列搜索, 确定优选菌株的种属。

1.3.4 模拟葡萄酒酒精发酵

1.3.4.1 实验设计

模拟葡萄酒培养基^[21]: 100 g/L葡萄糖, 100 g/L果糖, 0.2 g/L柠檬酸, 3 g/L苹果酸, 2.5 g/L酒石酸氢

钾, 1.1 g/L K₂HPO₄, 1.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.4 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.04 g/L H₃BO₃, 0.84 g/L脯氨酸等。

将优选酵母与酿酒酵母活化扩增培养, 酵母数量达到1.0×10⁹ CFU/mL。设3个混合发酵处理: 两种酵母同时接种(S0)、提前48 h接种优选酵母(S48)后接种酿酒酵母、提前96 h接种优选酵母(S96)后接种酿酒酵母。单一酵母在葡萄汁中的接种量为1.0×10⁶ CFU/mL, 接种比例为优选酵母与酿酒酵母1:1, 以酿酒酵母(*S. cerevisiae*)和发酵毕赤酵母(*P. fermentans*)纯发酵为对照, 22℃培养发酵。

1.3.4.2 酵母计数

发酵中的活菌数采用平板计数法^[22], 酵母总数采用血球计数法^[17]。

1.3.4.3 模拟葡萄酒酒精发酵过程中酯酶活性的测定

模拟葡萄酒酒精发酵过程中利用不同链长的对硝基苯酯(C₂~C₈)为底物, 测定酯酶活性变化过程, 方法同1.3.2节。底物: *p*-NPA(C₂)、*p*-NPB(C₄)、*p*-NPH(C₆)、*p*-NPO(C₈)。

2 结果与分析

2.1 高产酯酶菌株的筛选

测定川南白酒窖池中分离的35株非酿酒酵母的酯酶活性, 并以酿酒酵母F5为对照, 结果见表1。结果显示, 仅有1株酵母Z9Y-3比F5的酯酶活性高5%, 达到62.12 mU/mL。因此, 筛选出高产酯酶的菌株Z9Y-3。

表1 不同酵母的酯酶活性
Table 1 Esterase activities of different yeast strains

酵母	酯酶活性/ (mU/mL)	酵母	酯酶活性/ (mU/mL)	酵母	酯酶活性/ (mU/mL)
Z9Y-3	62.12±3.40	Z8Y-12	38.41±0.45	SZ8Y-2-a	31.18±0.55
F5	59.23±2.21	BC	38.17±0.37	S433Y-13	27.48±0.62
Z9Y-6	53.60±1.71	S633Y-28-1	36.82±0.23	H7Y-9-a	26.74±4.54
Z8Y-17	50.75±0.80	H6Y-22-B	35.30±0.22	W8Y-18-1	24.99±2.42
W8Y-14	46.57±1.81	SZ8Y-2	34.55±0.16	H1Y-31	23.97±0.38
W8Y-21	45.56±3.15	Z5Y-38	33.37±1.42	W8Y-5-1-A	23.82±0.59
W8Y-18	43.66±2.52	Z9Y-7	33.24±1.12	W8Y-10	23.57±0.92
H7Y-7	43.56±2.22	S532Y-19	33.13±0.37	HX	23.08±0.28
G8Y-2	43.39±0.21	Z9Y-91	32.99±1.28	W8Y-3	21.02±0.00
H5Y-28	41.22±1.23	G8M-28	32.75±0.05	Z8Y-32	18.95±0.46
S433Y-29-C	40.39±0.88	H9Y-8	32.72±1.65	JH	10.89±0.05
W8Y-6	40.13±0.21	A1	31.62±1.48	H5Y-27	3.04±0.10

2.2 优选酵母菌株的鉴定

Z9Y-3菌(图1a)呈米白色, 表面粗糙、有褶皱, 边缘粗糙; 细胞(图1b)呈椭圆状。根据测序结果, 利用BLAST软件与GenBank核酸序列数据库中已发表的菌株进行核苷酸同源性对比, 发现Z9Y-3的基因与发酵毕赤酵母(*P. fermentans*)的KU820951.1基因的同源性达到99%, 因此可确定优选酵母为发酵毕赤酵母。

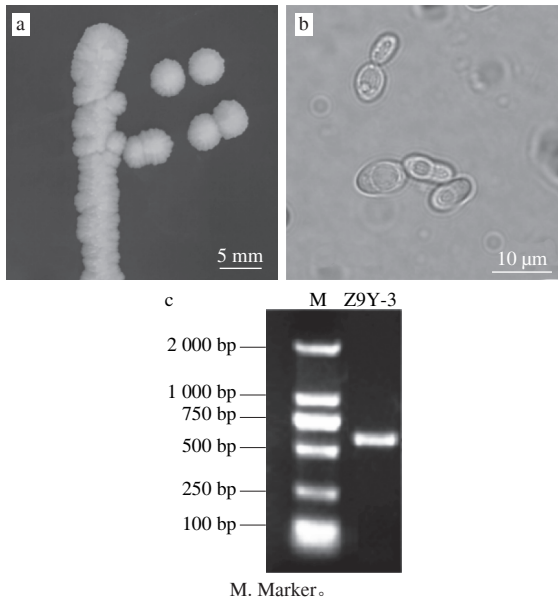
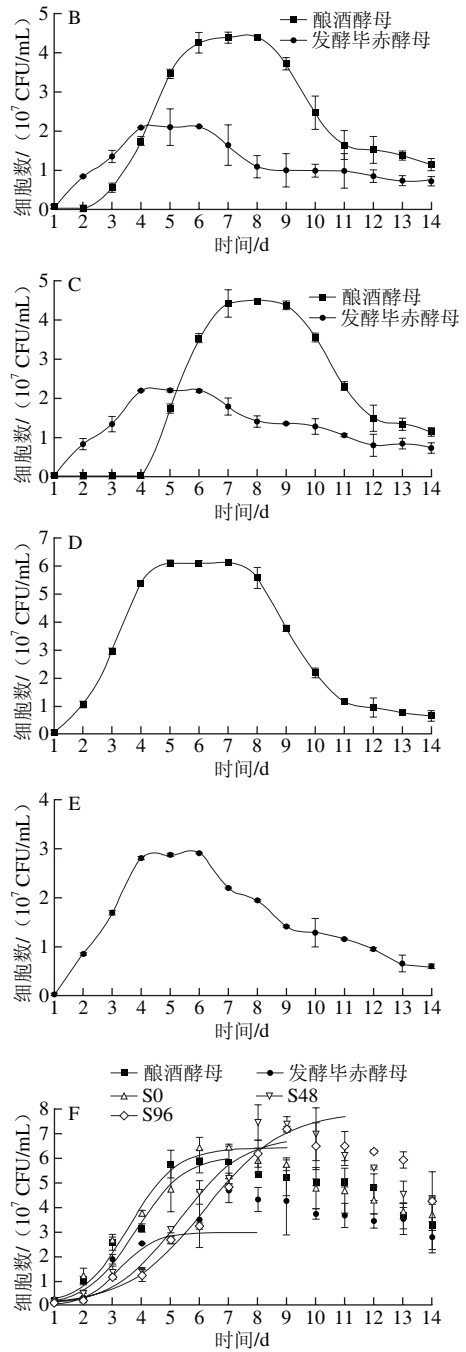
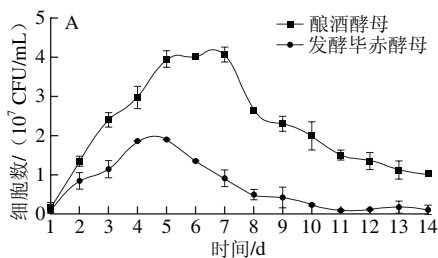


图1 优选酵母菌株Z9Y-3的菌落形态(a)、细胞形态(b)及PCR扩增产物电泳图(c)

Fig.1 Colony, cell morphology and gel electrophoresis of PCR amplified product of isolate Z9Y-3

2.3 模拟葡萄酒酒精发酵过程中酵母生长动力学

同时接种处理(图2A),酿酒酵母快速生长,在第5天达到稳定期,而发酵毕赤酵母在10 d后仅有少量存在。顺序接种处理中(图2B、C),酿酒酵母接种后分别在第5、6天开始占主导地位,到达稳定期,而发酵毕赤酵母受到抑制开始下降,但一直存活。混合发酵中无论是酿酒酵母还是发酵毕赤酵母数量与酿酒酵母(图2D)和发酵毕赤酵母(图2E)纯发酵相比,都明显减少,说明两种酵母之间存在明显的竞争关系。图2F为模拟葡萄酒酒精发酵的动力学曲线,使用前9 d的数据进行拟合。启动发酵时,单一酿酒酵母发酵速率快,但在稳定期混合发酵的酵母数量均超过单一酵母纯发酵,其中提前96 h接种处理酵母数量最高,约 7.9×10^7 CFU/mL。由表2可知,各酵母生长模型的 R^2 达到0.93~0.99,拟合度较高,能够较好地反映模拟葡萄酒酒精发酵过程中酵母的生长规律。其中酿酒酵母发酵和发酵毕赤酵母的各项发酵参数(X_m 、 B 、 k)相差较大,说明两种酵母在发酵过程中的生长模型完全不同。对于混合发酵而言,同时接种(S0)与酿酒酵母发酵的酵母生长模型较为接近,而顺序接种(S48和S96)发酵模式下的酵母生长模型与酿酒酵母发酵存在明显区别。



A.S0处理; B.S48处理; C.S96处理; D.单一酿酒酵母处理; E.单一发酵毕赤酵母处理; F.生长动力学曲线。

图2 模拟葡萄酒酒精发酵过程中酵母生长曲线及生长动力学曲线

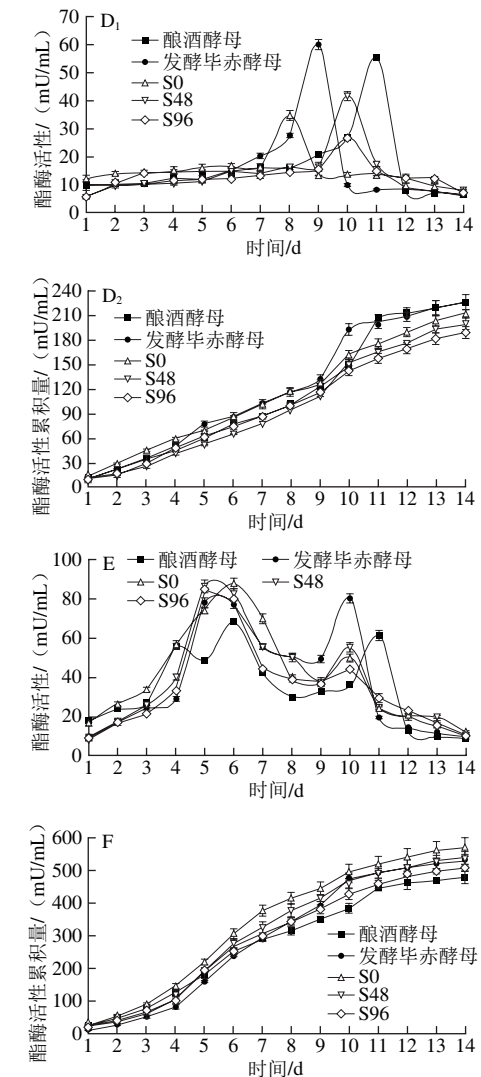
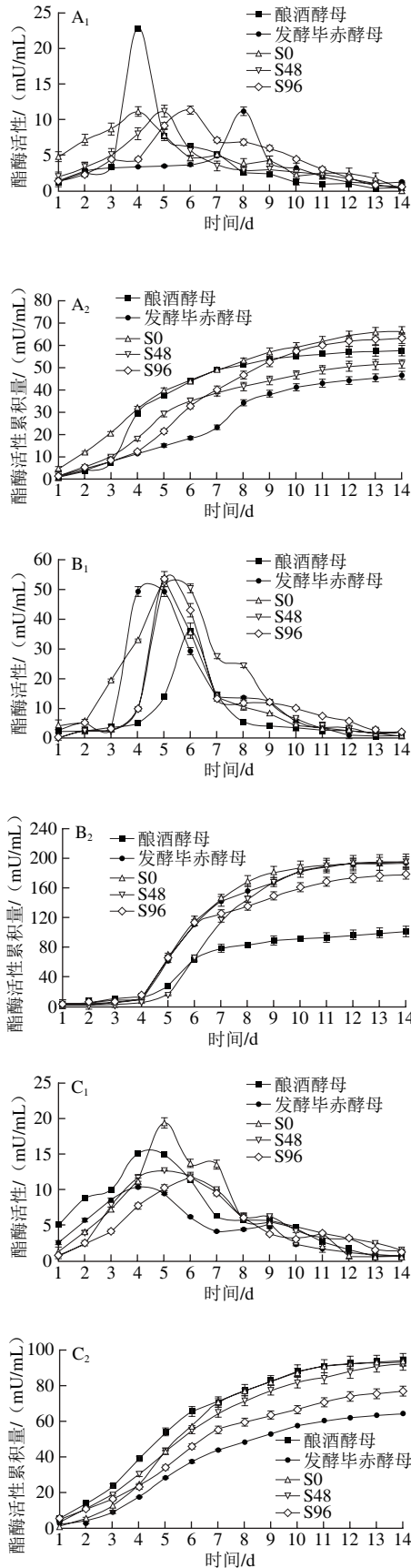
Fig.2 Yeasts growth curves and yeast growth kinetics

表2 模拟葡萄酒酒精发酵的动力学参数
Table 2 Kinetic parameters for alcoholic fermentation of model grape juice

参数	酿酒酵母	发酵毕赤酵母	S0	S48	S96
X_m / (10^7 CFU/mL)	6.106 38	2.970 35	6.416 79	6.882 2	7.897 2
B	96.435 7	239.184 35	85.818 61	123.262 09	99.014
k	1.202 89	1.685 28	1.249	0.914 68	0.742 0
R^2	0.959 3	0.931 77	0.993 84	0.956 04	0.983

注: X_m 为最大菌体浓度; B 为常数; k 为最大比生长速率; R^2 为拟合度。

2.4 模拟发酵过程的酯酶活性



A. C_2 为底物; B. C_4 为底物; C. C_6 为底物; D. C_8 为底物; E. $C_2 \sim C_8$ 酯酶活性总和; F. $C_2 \sim C_8$ 酯酶活性累积量总和。下标1.酯酶活性; 2.酯酶活性累积量。

图3 模拟葡萄汁酒精发酵中酯酶活性变化与累积过程

Fig. 3 Evolution of esterase activities and accumulation process in the alcoholic fermentation of model grape juice

如图3A所示, 在同时接种的混合发酵中酯酶活性在启动发酵时高于其他处理, 而单一酿酒酵母在发酵第4天酯酶活性达到最大(22.70 mU/mL), 3个实验组的酯酶活性分别在第4天(11.07 mU/mL)、第5天(11.13 mU/mL)、第6天(11.31 mU/mL)达到最大值, 同时接种处理的酯酶活性累积量最高(66.19 mU/mL)。如图3B所示, 5个处理酯酶活性变化趋势一致, 同时接种(54.23 mU/mL)和提前96 h接种(53.45 mU/mL)酯酶活性相接近, 但同时接种处理的酯酶活性累积量(199.48 mU/mL)高于提前96 h接种处理(178.33 mU/mL), 而酿酒酵母纯发酵的酯酶活性(36.03 mU/mL)及累积量(101.04 mU/mL)最低。如图3C所示, 同时接种的酯酶活性(19.43 mU/mL)虽

然高于其他处理,但酿酒酵母纯发酵的酯酶活性累积量(94.40 mU/mL)高于同时接种处理(93.76 mU/mL)。如图3D所示,5个发酵处理在第8~11天酯酶活性达到最大值,发酵毕赤酵母的酯酶活性(59.88 mU/mL)和酯酶活性累积量(226.04 mU/mL)最高,混合发酵中同时接种的酯酶活性累积量最高(213.43 mU/mL)。

不同发酵处理酯酶活性变化趋势大致相同(图3E),在发酵第5~6天酯酶活性最大,混合发酵中的最高酯酶活性大致相同,但在发酵后期同时接种的酯酶活性累积量达到最高(图3F)。研究底物特异性发现,5个处理酯酶活性累积量 C_8 (178~227 mU/mL) > C_4 (101~200 mU/mL) > C_6 (64~95 mU/mL) > C_2 (46~66 mU/mL)。结合酵母生长动力学(图2F)研究发现,当5个处理中在发酵1~4 d酵母开始缓慢生长,数量开始增多,酯酶活性也开始增加(图3A₁、B₁、C₁),而当酵母生长到一定数量,达到稳定期时(4~7 d),酯酶活性达到最大值,随后酵母开始衰亡,酯酶活性也随之下降。综上所述,同时接种处理为最优发酵方式,酯酶活性累积量最高,表明非酿酒酵母的加入提高了酯酶活性。

3 讨论

受气候等生态条件的影响,我国大部分葡萄酒产区酿酒葡萄的成熟度在许多年份不够理想,导致所酿葡萄酒的品种香气不明显。通过酿酒微生物和发酵条件等“后天”因素,可一定程度上弥补我国葡萄酒存在的“先天”香气不足。采用优选非酿酒酵母菌株与酿酒酵母的混合发酵来提高葡萄酒香气复杂度是目前研究开发的前沿技术^[5]。本实验针对前期从川南白酒窖池中优选的一株高产酯酶的发酵毕赤酵母,研究其与酿酒酵母混合酒精发酵过程中酵母的生长动力学,探索应用该酵母菌株进行混合发酵的最优接种方式。Ciani等^[23]研究发现,混合发酵中酿酒酵母的数量低于单一酿酒酵母(非酿酒酵母与酿酒酵母接种比例1:1),但酵母总数高于单一酿酒酵母纯发酵,其中3个同时接种处理的非酿酒酵母(*H. uvarum*、*T. delbrueckii*、*Kluyveromyces thermotolerans*)在10~14 d开始慢慢衰亡,而顺序接种的非酿酒酵母存活时间更长(21~28 d)。Imma等^[24]研究酒精发酵动力学发现,单一酿酒酵母的发酵速率最快,其次是混合发酵(葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母的接种比例9:1),而葡萄汁有孢汉逊酵母(*H. uvarum*)未能完成发酵,速率最慢。不同的是,Comitini等^[2]发现同时接种处理的接种比例为1:1时,两种非酿酒酵母(*Candida zemplinina*、*Lachancea thermotolerans*)对酿酒酵母的生长并无影响,而葡萄汁有孢汉逊酵母的接种比例变大时(100:1或

10 000:1),其酵母的存在会抑制酿酒酵母的生长代谢。Rojas等^[4]发现,同时接种发酵中的酿酒酵母在第3天表现出优势,而发酵毕赤酵母在第5天衰亡。本实验研究发现,同时接种处理(发酵毕赤酵母与酿酒酵母接种比例1:1)的酿酒酵母数量低于单一酿酒酵母发酵,优选的发酵毕赤酵母从第11天开始衰亡至无法检出,而顺序接种(接种比例1:1)发酵中,酿酒酵母在第5~6天开始占主导地位,控制整个发酵过程,发酵毕赤酵母一直存活,其中提前96 h处理酵母数量最多。本实验的研究结果与上述研究有所不同,可能是从川南白酒窖池中优选得到的发酵毕赤酵母,其长期处于白酒酿造环境,具有不同的生长特性所导致。

混合发酵主要通过提高发酵香气来改善葡萄酒的香气质量,虽然高级醇是发酵香气中含量最高的成分,但酯类是其最重要的呈香物质,主要有乙酸酯和乙醇酯两大类。酒精发酵过程中除酿酒酵母之外,其他酵母的参与常常会导致乙酸及其酯类的增加,乙酸乙酯是其中含量最高的酯类。乙酸乙酯的质量浓度过高(大于100 mg/L)会产生一种类似于指甲油的不良气味^[6]。此外,陈酿过程中过多的乙酸酯类发生水解,会产生大量的乙酸,带来葡萄酒的氧化气息^[25]。葡萄酒中乙醇酯虽然含量较低,但由于其较低的气味阈值它们具有潜在的香气活性^[6]。例如,中链脂肪酸乙酯在葡萄酒中的质量浓度低于1.5 mg/L,但是它们的嗅觉阈值较低,微小的含量变化都会提高其气味活性,给葡萄酒带来果香^[26-27]。因此,本实验采用 C_2 ~ C_8 的底物水解特异性研究优选菌株的酯酶活性,揭示其混合发酵过程中合成相应碳链乙醇酯的能力。近些年来,与葡萄酒相关的酯酶研究主要集中在乳酸杆菌、酒球菌等方面,而非酿酒酵母的酯酶研究相对较少。Sumby等^[13]研究乳酸杆菌和酒球菌的酯酶水解不同碳链长度的底物特异性发现, C_2 ~ C_{10} 酯酶均有活性,并且酯酶活性 $C_2 > C_4 > C_6 > C_8 > C_{10}$ 。而Esteban Torres等^[28]发现乳酸杆菌酯酶活性 $C_4 > C_8 > C_2$ 。Bardi等^[10]发现酿酒酵母在酒精发酵过程中酯酶活性的变化与酵母的生长及辛酸的释放有关,但未涉及混合发酵过程中酯酶活性的变化。本实验研究发现,接种优选发酵毕赤酵母能提高混合发酵中酯酶活性累积量,尤其是同时接种处理,最高酯酶活性累积量达到574 mU/mL。不同碳链底物水解能力对应的酯酶活性累积量, C_8 (178~227 mU/mL) > C_4 (101~200 mU/mL) > C_6 (64~95 mU/mL) > C_2 (46~66 mU/mL)。结合混合发酵过程中酵母生长的动力学研究结果,酯酶活性的变化与酵母的生长有关,酒精发酵中酵母生长达到稳定期时(4~7 d),混合发酵处理中酯酶活性达到最大值。本研究中,优选发酵毕赤酵母与酿酒酵母同时接种的混合发酵表现出了较高的 C_4 ~ C_8 酯酶活性累积量,具有提高

葡萄酒中中链脂肪酸乙酯含量的潜力。后续研究将着重进行混合发酵中酯酶活性、酯类物质,以及葡萄酒香气特征的关联分析。

参考文献:

- [1] VIANA F, GIL J V, GENOVÉS S, et al. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits[J]. Food Microbiology, 2008, 25(6): 778-785. DOI:10.1016/j.fm.2008.04.015.
- [2] COMITINI F, GOBBI M, DOMIZIO P, et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Microbiology, 2011, 28: 873-882. DOI:10.1016/j.fm.2014.05.007.
- [3] JOHNSON E A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts: the ascomycetes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 503-517. DOI:10.1007/s00253-012-4497-y.
- [4] ROJAS V, GIL J V, PIÑAGA F, et al. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86(1/2): 181-188. DOI:10.1016/S0168-1605(03)00255-1.
- [5] RENAULT P, COULON J, REVEL G D, et al. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*, wine fermentation is linked to specific esters enhancement[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 207: 40-48. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037.
- [6] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.12.004.
- [7] PÉREZ-MARTÍN F, SESEÑA 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(2/3): 153-158. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.024.
- [8] POZO-BAYÓN M A, G-ALEGRÍA E, POLO M C, et al. Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(22): 8729-8735. DOI:10.1021/jf050739y.
- [9] UGLIANO M, MOIO L. Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(26): 10134-10139. DOI:10.1021/jf0514672.
- [10] BARDI L, CRIVELLI C, MARZONA M. Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(12): 1171-1176. DOI:10.1139/cjm-44-12-1171.
- [11] PNICAUD C, LANDAUD S, JAMME F, et al. Physiological and biochemical responses of, *Yarrowia lipolytica*, to dehydration induced by air-drying and freezing[J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): 111138-111138. DOI:10.1371/journal.pone.0111138.
- [12] KURITA O. Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(4): 1051-1058. DOI:10.1139/cjm-44-12-1171.
- [13] SUMBY K M, GRBIN P R, JIRANEK V. Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 413-422. DOI:10.1111/jam.12060.
- [14] DARSONVAL M, ALEXANDRE H, GRANDVALET C. Genetically engineered *Oenococcus oeni* strains to highlight the impact of estA2 and estA7 esterase genes on wine ester profile[J]. Food Microbiology, 2016, 60: 21-28. DOI:10.1016/j.fm.2016.06.012.
- [15] LILLY M, BAUER F F, LAMBRECHTS M G, et al. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates[J]. Yeast, 2006, 23(9): 641-659. DOI:10.1002/yea.1382.
- [16] VAQUERO M E, BARRIUSO J, MEDRANO F J, et al. Heterologous expression of a fungal sterol esterase/lipase in different hosts: effect on solubility, glycosylation and production[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(6): 637-643. DOI:10.1016/j.jbiosc.2015.04.005.
- [17] 王星晨, 胡凯, 陶永胜. 葡萄汁有孢汉逊酵母和酿酒酵母的混合酒精发酵动力学[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 103-108. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201603020.
- [18] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201423028.
- [19] 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. DOI:10.1111/lam.12527.
- [20] 周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体DNA的方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 89-92. DOI:10.3969/j.issn.0253-2654.2004.04.021.
- [21] CONTRERAS A, HIDALGO C, SCHMIDT S, et al. The application of non-*Saccharomyces*, yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 205: 7-15. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027.
- [22] 王华. 葡萄酒分析检验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [23] CIANI M, BECO L, COMITINI F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(2): 239-245. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012.
- [24] IMMA A, MARÍA B, NICOLÁS R, et al. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations[J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(2): 215-224. DOI:10.1007/s00217-010-1272-0.
- [25] LILLY M, LAMBRECHTS M G, PRETORIUS I S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 744-753. DOI:10.1128/AEM.66.2.744-753.2000.
- [26] KNIGHT M J, BULL I D, CURNOW P. The yeast enzyme Eht1 is an octanoyl-CoA: ethanol acyltransferase that also functions as a thioesterase[J]. Yeast, 2014, 31(12): 463-474. DOI:10.1002/yea.3046.
- [27] SAERENS S M G, DELVAUX F R, VERSTREPEN K J, et al. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbial Biotechnology, 2010, 3(2): 165-177. DOI:10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x.
- [28] ESTEBANTORRES M, LANDETE J M, REVERÓN I, et al. A *Lactobacillus plantarum* esterase active on a broad range of phenolic esters[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2015, 81(9): 3235-3242. DOI:10.1128/AEM.00323-15.