

耐热克鲁维酵母在葡萄酒酿造中的研究进展

董琦楠^{1,4}, 李莹¹, 叶冬青^{*1,2}, 刘延琳^{*1,3}

1 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100

2 广西农业科学院广西果蔬贮藏与加工新技术重点实验室, 广西 南宁 530007

3 西北农林科技大学宁夏贺兰山东麓葡萄酒试验站, 宁夏 银川 750104

4 内蒙古农业大学职业技术学院, 内蒙古 包头 014109

董琦楠, 李莹, 叶冬青, 刘延琳. 耐热克鲁维酵母在葡萄酒酿造中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1941-1954

Dong Qinan, Li Ying, Ye Dongqing, Liu Yanlin. Research progress of *Lachancea thermotolerans* in winemaking[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1941-1954

摘要: 耐热克鲁维酵母(*Lachancea thermotolerans*)是一种具有优良酿造学特性的非酿酒酵母(non-*Saccharomyces cerevisiae*), 近年来由于其对葡萄酒的发酵进程及香气、滋味等感官特性均有着重要影响而受到越来越多的关注。耐热克鲁维酵母突出的特点表现为高产乳酸、甘油、2-苯乙醇及乙酯类香气成分, 低产乙醇及挥发酸类物质, 并且相关研究显示不同耐热克鲁维酵母发酵对葡萄酒的影响存在明显的菌株特异性。文章围绕耐热克鲁维酵母的菌株多样性、其对葡萄酒质量的影响及在混合发酵中的应用等方面进行综述, 以期为本土耐热克鲁维酵母菌株性状的筛选、产酸及产香机制的解析提供参考依据, 促进我国酿酒微生物种质资源的良性发展。

关键词: 非酿酒酵母; 耐热克鲁维酵母; 生物增酸; 低醇; 乳酸

基金项目: 宁夏回族自治区重大研发计划(2022BBF02015); 国家自然科学基金(U21A20269, 32160555); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-29)

Supported by: Key Research and Development Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2022BBF02015); National Natural Science Foundation of China (U21A20269, 32160555); Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs: China Agricultural Research System (CARS-29)

*Corresponding authors: E-mail: LIU Yanlin: yanlinliu@nwsuaf.edu.cn; YE Dongqing: yedongqing@nwsuaf.edu.cn

Received: 2021-07-19; Accepted: 2021-12-29; Published online: 2022-02-08

Research progress of *Lachancea thermotolerans* in winemaking

DONG Qinan^{1,4}, LI Ying¹, YE Dongqing^{*1,2}, LIU Yanlin^{*1,3}

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

2 Guangxi Key Laboratory of Fruits and Vegetables Storage-Processing Technology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

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

4 Vocational and Technical College of Inner Mongolia Agricultural University, Baotou 014109, Inner Mongolia, China

Abstract: *Lachancea thermotolerans*, a species of non-*Saccharomyces* yeast, has attracted increasing attention because of its excellent enological characteristics such as enhancing aroma and taste. It is characterized by high production of lactic acid, glycerol, 2-phenylethanol, and ethyl esters while low production of ethanol and volatile acids during the fermentation of wine. The available studies have proved the distinct performance among different strains of *L. thermotolerans* in fermentation. We reviewed the studies about the strain diversity, effect on wine quality, and application in co-fermentation of *L. thermotolerans*. This review provides a basis for screening the traits and exploring the mechanism of acid and aroma production of the indigenous *L. thermotolerans*, which will promote the sound development of microbial germplasm resources for winemaking in China.

Keywords: non-*Saccharomyces* yeast; *Lachancea thermotolerans*; biological acidification; low production of ethanol; lactic acid

葡萄酒的发酵过程由多种微生物综合作用, 具有物种和数量的多样性、生物间相互作用复杂性和代谢产物动态性变化等特点; 其中, 起主导作用的微生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)具有较强的定殖及酒精发酵能力, 而非酿酒酵母(除酿酒酵母以外的其他酵母的统称)则是一类发酵能力相对较弱的酵母, 主要在酒精发酵的前期起作用^[1]。一些非酿酒酵母由于其代谢的特异性而在发酵过程中能生成更多的甘油、高级醇、醛及酯等物质, 增加葡萄酒的风味^[2]。

近年来, 受全球气候变暖等众多因素的影响, 我国西部葡萄酒产区葡萄原料糖分过高、酸度过低的现象愈发突出, 使得葡萄酒在口感上失去平衡的同时也易被微生物污染。为解决这一问题, 需要对葡萄酒进行增酸处理。目前较

为普遍的增酸方法包括物理增酸、化学增酸及生物增酸三类。化学方法通过添加酒石酸调节酸度, 但可能会引起酒石沉淀, 进而对葡萄酒产生复杂影响, 并且添加量受到法律的严格限制^[3]。物理增酸采用离子交换法, 但其价格昂贵且易引入大量金属离子, 影响葡萄酒的品质^[4]。然而利用部分非酿酒酵母发酵产生的乳酸口感柔和、性质稳定、不易被微生物利用^[5], 使得非酿酒酵母在葡萄酒增酸中的应用得到越来越多的关注^[2,6-7]。本团队在近几年的研究中对各类非酿酒酵母在葡萄酒中的应用进行了一定程度的探索, 包括戴尔有孢圆酵母(*Torulaspora debrueckii*)^[8]、毕赤克鲁维酵母(*Pichia kluyveri*)^[9]、耐热克鲁维酵母^[10]、有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora*)^[11]及东方伊萨酵母(*Issatchenkia occidentalis*)^[12]等多种非酿酒酵母, 发现不同种

属的非酿酒酵母具有不同的酿造特性, 其中耐热克鲁维酵母 LT1 在生物酸化葡萄酒的应用中具有极大潜力^[7]。相关研究表明, 耐热克鲁维酵母在提高葡萄酒酸度、降低 pH 的同时, 也能够增加葡萄酒的香气^[5,13-15], 相对于其他非酿酒酵母, 该酵母具有较强的发酵能力且对酒精和 SO₂ 耐受性较高^[16-17]。本团队从分离自我国葡萄酒主产区的耐热克鲁维酵母菌株中筛选获得了具有稳定增酸及增香性能的菌株, 将其应用在我国西北产区红色酿酒品种的发酵, 已初步取得一定成效^[10,18]。

利用耐热克鲁维酵母发酵进行葡萄酒的生物酸化及增香修饰已成为新酿造技术应用的热点。本文在介绍耐热克鲁维酵母多样性的基础上, 重点分析其对葡萄酒品质的影响及在混合接种酿造中的应用, 旨在为耐热克鲁维酵母在我国葡萄酒行业中的应用提供参考。

1 耐热克鲁维酵母的命名、特征及多样性

“*Lachancea*”这一概念最早在 2003 年由 Kurtzman 提出, 目前共有 11 个种, 包括被重新划分为 *Lachancea* 的 5 个种: *L. cidri* (*Zygosaccharomyces cidri*)、*L. fermentati* (*Z. fermentati*)、*L. thermotolerans* (*Z. thermotolerans* 或 *Kluyveromyces thermotolerans*)、*L. kluyveri* (*S. kluyveri*) 和 *L. waltii* (*K. waltii*), 以及后续分离鉴定出的 6 个种: *L. meyersii*、*L. quebecensis*、*L. dasiensis*、*L. nothofagi*、*L. lanzarotensis* 和 *L. mirantina*^[19]。*Lachancea* 广泛地分布在植物、昆虫、土壤和食物中, 在种层面上, 耐热克鲁维酵母和 *L. fermentati* 在生态环境中的分布最广, 最常见于葡萄醪中^[19]。耐热克鲁维酵母最早由 Filipov 在 1932 年从李子酱中分离, 命名为 “*Zygosaccharomyces thermotolerans*”, 之后又在

1972 年被归为克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*), 最终在 2003 年重新经过多基因序列分析及系统发育树分析后由克鲁维酵母属被正式确立为 “*Lachancea*”, 命名为 “*Lachancea thermotolerans*”^[20], 但由于目前国内对其开发应用的程度不高, 所以一般文献中依旧称其为 “耐热克鲁维酵母”^[21]。

耐热克鲁维酵母在显微镜下细胞呈球形或椭圆形, 大小为 (3–6) μm × (6–8) μm, 略小于酿酒酵母细胞^[20]。在 WL 营养琼脂培养基 (Wallersteins laboratory nutrient agar, WLN) 培养 3–7 d 后, 其菌落形态呈球形突起, 最顶圈呈灰绿色, 次外圈呈深绿, 最外圈淡黄绿色, 表面光滑、不透明、奶油状^[18], 与其他酵母的形态差异较明显, 因此可以利用 WLN 培养基对耐热克鲁维酵母进行初步鉴别。耐热克鲁维酵母在生态环境中分布较广, 曾在葡萄醪、果汁、湖水、树莓及可可发酵罐等环境中被分离出来^[19]。耐热克鲁维酵母对环境也具有较高的适应能力, 遇到营养胁迫时, 与酿酒酵母一样能积累一定量的海藻糖及谷胱甘肽保护细胞^[22]。当外界环境条件恶劣时, 则会生成子囊孢子并附着在环境中进入休眠期以抵御不良环境, 当条件适宜时则会重新进入生长期^[20]。此外, 耐热克鲁维酵母在大部分研究中被证实为单倍体^[23-25], 由于单倍体在各类环境中都具有较好的适应能力^[26], 因此, 这一特性也有利于其更好地适应各类复杂环境。

利用线粒体基因多态性分析、多位点微卫星序列标记 (simple sequence repeat, SSR)、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 片段分析及 *Sau3AI* 酶切分子分型技术 (sau-PCR) 等分析方法对不同地理区域及不同生态来源的耐热克鲁维酵母进行种内菌株多态性鉴定, 发现该菌种不同地理区域的分离株之间的群体结构具有显著差异, 受地理起源和生

态环境影响较大^[23,25,27]。出现在人类活动的环境,如葡萄和葡萄酒中的主要为驯化类群,体现出人类活动对该酵母的驯化作用^[19-20,24]。

Binati 等对来自人类活动环境中(葡萄醪、葡萄表皮等)分离的多株耐热克鲁维酵母菌株进行了生理特性的鉴定,发现其在基因分型、发酵特征及酶活特性上存在巨大差异,这表明参与葡萄酒发酵过程的耐热克鲁维酵母具有明显的基因和表型多态性^[27]。大量研究数据支撑了这一结论,如耐热克鲁维酵母种内差异体现在耐受能力(渗透压、乙醇和二氧化硫)^[23-24]、发酵能力^[23]和影响葡萄酒质量安全及风味的物质产量(硫化氢、生物胺、乳酸、挥发性物质)^[23-24,27-28]等方面。为了研究种内表型多态性的差异机制,有研究对表型差异较大的耐热克鲁维酵母进行了全基因组测序,证明表型和基因型多样性呈一定程度的正相关性,并发现与表型相关的基因序列存在种内多态性^[27,29]。

尽管目前不少研究证明了耐热克鲁维酵母表型多态性和基因多态性之间的重要联系,但在表型与其基因型之间作用机制层面的研究程度依然较浅,特别是备受关注的增酸和增香等热点表型上,仅有几篇文章进行了酶活程度上的探讨,缺乏从基因及代谢调控水平解析其差异机制的研究,进而阻碍了对耐热克鲁维酵母进行更广泛开发与利用,这与目前耐热克鲁维酵母基因组信息等基础研究较少有关。相较于酿酒酵母,耐热克鲁维酵母作为近年来葡萄酒研究领域新兴的热点微生物之一,鉴于其研究价值与范围的限制,目前报道的仅对菌株 CBS6340、高产乳酸菌株 SOL13 及低产乳酸菌株 COLC27 进行了全基因组测序^[29-30],代谢通路的未知阻碍了表型与基因型关系的深入研究,挖掘工作仍需研究人员的进一步拓展。

2 耐热克鲁维酵母对葡萄酒质量的影响

研究表明,耐热克鲁维酵母能够明显改善葡萄酒的质量。目前市场上已经推出 3 款含有耐热克鲁维酵母的商业活性干酵母,分别为纯种耐热克鲁维酵母:ConcertoTM;混合型菌剂:Viniflora[®]Rhythm,由耐热克鲁维酵母及酿酒酵母组成;MelodyTM,由耐热克鲁维酵母、戴尔有孢圆酵母及酿酒酵母组成^[31]。不同菌株在特定的发酵策略及发酵条件下,表现出特定的酿造学性状,如降低生物胺(ConcertoTM)^[32]、乙醇(ConcertoTM)^[14]及氨基甲酸乙酯(ConcertoTM)^[33]的含量,增加甘油(TH941、IWB-TY1240)^[17,34]和乳酸(TH941、LT101、UCD602)^[17,35]的产量,增强葡萄酒的果味和口感(ConcertoTM、LT101)^[5],以及增加葡萄酒的香气复杂性和强度(LT197、LT101)^[13]等。在 Web of Science 及 CNKI 以耐热克鲁维酵母为关键词检索得到 2003–2021 年期间 187 篇文献中的关键词后,利用 VOSviewer 进行统计聚类并合并选取出现频率较高的关键词,发现耐热克鲁维酵母共现较强的关键词为混合发酵、酒精发酵、乳酸、风味香气、戴尔有孢圆酵母、葡萄酒酸化等,表明耐热克鲁维酵母的研究主要集中在混合发酵增酸及提高香气等方面。

2.1 生物增酸

适宜的酸度是高品质葡萄酒的基础,面对全球众多炎热产区葡萄酒酸度不足的现状,利用产酸非酿酒酵母发酵产生乳酸的方法逐渐成为葡萄酒增酸工艺革新的热点。乳酸是一种稳定的有机酸,不易被其他微生物利用,能使葡萄酒的口感更圆润;耐热克鲁维酵母在目前研究中被认为是最具增酸潜质的一种^[5],其在葡萄酒发酵过程中产生的乳酸范围约为 0.22 g/L (ConcertoTM)–16.6 g/L (P-HO9)^[15,22,24-25,27,29,31],而乳酸在酿酒

酵母中产量普遍不超过 0.2 g/L^[5,15]。除了不同菌株造成的差异外, 发酵时期^[36]、接种量、混合发酵的接种时间间隔^[13,17]及不同发酵条件^[37]等因素也对乳酸的产生有影响。在整个酒精发酵过程中, 耐热克鲁维酵母主要在前 6 天生成乳酸, 之后基本保持稳定^[36]。Comitini 等在混合发酵中发现, 增加耐热克鲁维酵母的接种量及其与酿酒酵母接种的时间间隔能够显著增加酒样中的乳酸含量^[13]。相对于混合酿造, 耐热克鲁维酵母 (Concerto™) 在灭菌的葡萄汁中纯种发酵产生的乳酸含量比对照组增加了一倍^[37]。此外, 耐热克鲁维酵母也可以降解少量的苹果酸^[15,38], 比如商业菌剂 Viniflora® Rhythm 能够降解 20% 的苹果酸^[31]。然而, 由于乳酸的生成比少量苹果酸降解对葡萄酒的影响更大, 耐热克鲁维酵母依然能有效增加酒样中的总酸并降低 pH 值^[32,39-40]。

增酸作为耐热克鲁维酵母最热点的表型之一, 其产生及调控机制深受关注。目前的研究认为, 耐热克鲁维酵母细胞内存在的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH, EC 1.1.1.27) 具有较高活性, 能够直接将糖酵解途径 (embden-meyerh of pathway, EMP) 过程中产生的丙酮酸转化为乳酸, 并与乙醇支路产生竞争^[41], 这与酿酒酵母细胞中乳酸积累导致的 LDH 反馈抑制机制不同^[42-43]。最近的一项研究通过对高产乳酸和低产乳酸的 2 株耐热克鲁维酵母基因组序列及 *ldh* 基因的转录水平研究发现, 发酵中期的 *ldh* 基因高表达可能是该菌株高产乳酸的原因^[29], 其中 *ldh2* 基因的调控与乳酸产量的高低相关性最强^[44]。此外, 有研究表明在厌氧条件下, 耐热克鲁维酵母的乳酸脱氢酶具有更高的表达量, 这表明厌氧条件对其乳酸代谢具有积极作用^[45]。然而, 基于目前耐热克鲁维酵母基因操作技术尚不成熟, 无法通过在其胞内增加 *ldh* 基因表达量来验证结果, 因此, 乳酸的产生和

调控机制还需要更深入的研究来提供更加直接的证据。

2.2 低产乙醇

酿酒酵母在发酵过程中的主要反应有以下几步: 葡萄糖经糖酵解途径转化为中间代谢产物丙酮酸, 丙酮酸由丙酮酸脱羧酶催化还原生成乙醛, 乙醛再经乙醇脱氢酶还原生成乙醇^[46]。由于耐热克鲁维酵母在 9% 的乙醇条件下不能生长, 并且该酵母的乳酸代谢支路能够与乙醇支路产生一定的竞争^[17,41], 因此利用耐热克鲁维酵母纯种发酵产生的乙醇含量一般为 9%–10%^[17,23,27]。这一特性也使得其在啤酒、甜酒或起泡酒等低酒精度饮料中具有一定的应用价值^[47]。目前研究中影响乙醇产生的因素主要为菌株^[16]、混合发酵接种比例及接种时间间隔^[35]、发酵体系中氧气浓度^[34]、发酵温度^[48]及发酵基质^[49]等。在混合发酵中, 耐热克鲁维酵母与酿酒酵母混合接种的体系中能够降低 0.20%–0.76% (体积分数) 的乙醇^[15,35,49-50]。随着酿酒酵母接入时间的延后^[35]及耐热克鲁维酵母与酿酒酵母比例的增加^[51-52], 混合发酵酒样最终的乙醇浓度越低; 而随着通入氧气浓度的增加, 最终酒样乙醇的浓度越低^[34]; 随着发酵温度的降低, 乙醇产量也有一定程度的降低^[48]; 发酵基质中某些氨基酸(天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺及谷氨酸)的添加也可以降低乙醇产量^[49]。

2.3 提高甘油产量

甘油是酵母在酒精发酵过程中最主要的副产物之一, 当其浓度超过感官阈值(5.2 g/L)时, 能够显著改善葡萄酒的酒体与丰满度^[53]。近年来不少研究表明, 耐热克鲁维酵母能够有效增加葡萄酒中的甘油产量, 其中耐热克鲁维酵母与酿酒酵母的接种比例^[13,35]、发酵体系的溶氧量^[34]及发酵温度^[48]等因素都会影响最终酒样中的甘油产量。如在发酵初期接入耐热克鲁维酵母

(LT97)的比例越大,最终甘油产量越多^[13];减少发酵过程中的溶氧量,能够增加甘油产量^[34]。研究发现,耐热克鲁维酵母(LT101)在低温下(20 °C)发酵时的甘油产量比 30 °C 条件下高 0.56 g/L^[48]。此外,耐热克鲁维酵母与酿酒酵母(EC 1118)混合发酵时,混酿组的甘油产量比对照组显著提高 0.69 g/L (LT97)–3.30 g/L (LT101)^[16,54]。

2.4 低产挥发酸

挥发酸是体现葡萄酒“健康”状况的重要指标,是指在一定条件下从葡萄酒中蒸馏出来的各种低沸点酸的总和,其中乙酸为主要成分,约占总含量的 90%^[55]。研究表明,在纯种发酵中,耐热克鲁维酵母比酿酒酵母显著降低 0.12 g/L (Concerto™)–0.71 g/L (LT103)的挥发酸^[13,31–32],并且相比于其他非酿酒酵母处于较低水平^[36,56]。然而在混合发酵中,耐热克鲁维酵母能够降低 0.40–0.50 g/L (CHKt 421)的挥发酸^[57]。除了菌株^[31–32],接种比例^[51–52]、发酵基质^[49,57]及发酵体系的溶氧量^[34,58]等因素都会影响挥发酸的产量。随着耐热克鲁维酵母与酿酒酵母接种比例的增加,酒样中最终挥发酸产量逐渐降低(CLI-P218、RCKT4 和 RCKT5)^[51–52]。当在混合发酵体系中加入部分氨基酸(缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸及苯丙氨酸)时,最终挥发酸产量比对照组显著降低 0.15 g/L^[49]。此外,发酵过程中溶氧量的增加会导致挥发酸产量的增加^[34],这可能与耐热克鲁维酵母中乳酸加氧酶(lactate 2-monooxygenase, EC 1.13.12.4)的存在有关^[59]。

2.5 提升香气质量

挥发性香气物质是影响葡萄酒品质的重要因素之一,包括高级醇、酯、萜烯及脂肪酸类物质,这些物质在葡萄酒风格和质量方面起着重要的作用^[60]。研究表明,耐热克鲁维酵母能降低葡萄酒中的高级醇含量^[28]。与酿酒酵母相比,耐热克鲁维酵母(Concerto™)纯种发酵处理中高

级醇产量降低 49 mg/L,其中 3-甲基丁醇含量降低 20 mg/L^[15]。酿酒酵母与耐热克鲁维酵母(CBS 2860)混合发酵的酒样中最终产生的总高级醇的浓度降低 55 mg/L^[61]。

2-苯乙醇是一种令人愉悦的具有玫瑰、紫罗兰香气的挥发性物质^[60],对葡萄酒香气有积极影响。相关研究表明,耐热克鲁维酵母参与发酵的酒样中 2-苯乙醇产量比 *S. cerevisiae* 纯种发酵高 10% (LT101)^[13]–25% (LT97)^[48]。Benito 等发现,顺序接种耐热克鲁维酵母(CECT 12672)的酒样中的 2-苯乙醇含量比同时接种更高^[62]。此外,随着体系溶氧量的增加,2-苯乙醇的产量也有所增加^[58]。Shekhawat 等在研究时发现,耐热克鲁维酵母能够增加参与半胱氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸及 β -丙氨酸代谢的基因的表达量,并且所有参与苯丙氨酸转化为苯乙醇的基因表达均上调,这一结果也支持了该酵母具有提高 2-苯乙醇产量的能力^[63]。

酯类物质由酰基辅酶 A、脂肪酸和醇类在相关酶的催化作用下生成,能够为葡萄酒带来果香和花香^[61]。研究发现,耐热克鲁维酵母(Concerto™)参与发酵的酒样中,乙酯总量增长了 30%^[64],其中差异最大的物质为乳酸乙酯及丁酸乙酯^[15]。Chen 等研究发现,接种耐热克鲁维酵母发酵的酒样中乳酸乙酯含量增加 32 mg/L,这可能得益于耐热克鲁维酵母发酵过程中乳酸产量的增加^[65]。

萜烯类化合物感官阈值低,是麝香型葡萄及其葡萄酒的典型香气成分。酵母可以通过二磷酸异戊烯途径(isopentene diphosphate pathway, IPP)生物合成萜烯类化合物^[5]。研究发现,在混合发酵中,耐热克鲁维酵母(Concerto™)能够增加 15%的总萜烯含量,其中芳樟醇和橙花醇的增加量较显著^[15],这可能与其较高的 β -葡萄糖苷酶的活性有关^[13]。 β -葡萄糖苷酶能够水解单葡萄糖

昔以释放挥发性单萜,对葡萄酒的香气具有积极贡献。Porter 等对比了克鲁维酵母属下不同种酵母的发酵特性,发现不论是纯种发酵还是混合发酵,仅耐热克鲁维酵母具有 β -葡萄糖苷酶活性^[16]。

2.6 其他

多糖是构成葡萄酒中大分子物质的主要成分之一,具有降低葡萄酒收敛性、提高稳定性和改善口感等作用,研究表明耐热克鲁维酵母能够增加葡萄酒中多糖和甘露糖蛋白^[48,66]的含量。与酿酒酵母对照组相比,耐热克鲁维酵母(LT101)参与的实验组酒样中多糖浓度显著增加^[66],顺序接种 24 h 时多糖的产量最高,而不同发酵温度对多糖的产量无显著影响^[48]。

红葡萄酒的颜色取决于葡萄皮中浸渍提取出的花色苷及其在葡萄酒中的稳定性^[67]。酵母在代谢过程中的一部分酶能够促进葡萄皮中酚类化合物的释放^[68],同时一些代谢物也可以作为前体物质与葡萄花青素结合生成稳定的加成物(如 vitisin A 和 B),增强花色苷的稳定性^[69]。有研究表明,耐热克鲁维酵母能够增加混合发酵酒样中的花色苷浓度^[65,69]及颜色强度^[62],这可能是由于花色苷分子在较低的 pH 值下显色较高,而耐热克鲁维酵母在发酵过程中生成的乳酸能够有效降低酒样中的 pH 值,使得酒样中红色调和紫色调增加^[62]。Escribano-Viana 等的研究则发现,耐热克鲁维酵母参与发酵的酒样中 vitisin B 含量最高,对葡萄酒颜色的稳定具有积极作用^[69]。

3 耐热克鲁维酵母的混合发酵

3.1 耐热克鲁维酵母与其他酵母的混合发酵策略

在葡萄酒酿造过程中,纯种耐热克鲁维酵母进行酒精发酵耗时长,并且当葡萄汁中含糖量较高时难以完成发酵,因此多采用与其他酵母混合

发酵的策略。目前,应用较多的主要是耐热克鲁维酵母和酿酒酵母的混合发酵,对混菌发酵过程中接种时间间隔和接种比例的优化是最重要的问题之一^[13,48]。图 1 总结了近年来研究报道的主要接种策略,接种时间间隔从同时接种到间隔 96 h,耐热克鲁维酵母与酿酒酵母的接种比例从 1:1 逐渐提高到 $10^4:1$ 。尽管不同研究中使用的耐热克鲁维酵母菌株不同,但大多数菌株在降低 pH 值、增加乳酸及甘油产量的能力是一致的,并且在降高级醇、增酯等香气物质方面均具有一定的潜力^[15-16,21,32-33,39-41,48,61-62,64,70-72]。

利用耐热克鲁维酵母与酿酒酵母顺序接种(先接种耐热克鲁维酵母,后接种酿酒酵母,后同)会使得整体发酵时间比接种纯种酿酒酵母长 2-4 d^[15]。一般酿酒酵母发酵时糖的消耗量呈指数型减少,但纯种耐热克鲁维酵母发酵时对糖的消耗则为线性降低,并且在发酵 20 d 后仍有残糖剩余^[38]。因此,实际生产中往往需要将耐热克鲁维酵母与酿酒酵母混合发酵以促使发酵顺利完成。纯种发酵中,耐热克鲁维酵母(TH941)在发酵前期与酿酒酵母(SCM 952)对照组中的酵母数量相似,但随着发酵的进行,耐热克鲁维酵母的细胞存活率缓慢下降;混合发酵中,顺序接种酿酒酵母后,耐热克鲁维酵母的细胞数量呈指数下降趋势,导致发酵后期酒样中乳酸产量的减少^[17]。Gobbi 等将耐热克鲁维酵母(LT101)与酿酒酵母(EC 1118)以 10:1 的比例进行混合发酵时发现,同时接种处理下耐热克鲁维酵母的菌体减少量达 1×10^3 CFU/mL,而顺序接种的情况下,该酵母菌体数量的减少仅为 1×10^1 CFU/mL^[48]。

与酿酒酵母纯种发酵相比,接入耐热克鲁维酵母的混合发酵能够降低葡萄酒中的酒精浓度和挥发酸产量^[5,15],同时增加乳酸、甘油、2-苯乙醇和总酸的含量^[35,73],增降的幅度取决于耐热克鲁维酵母与酿酒酵母的接种比例^[13]及顺序发

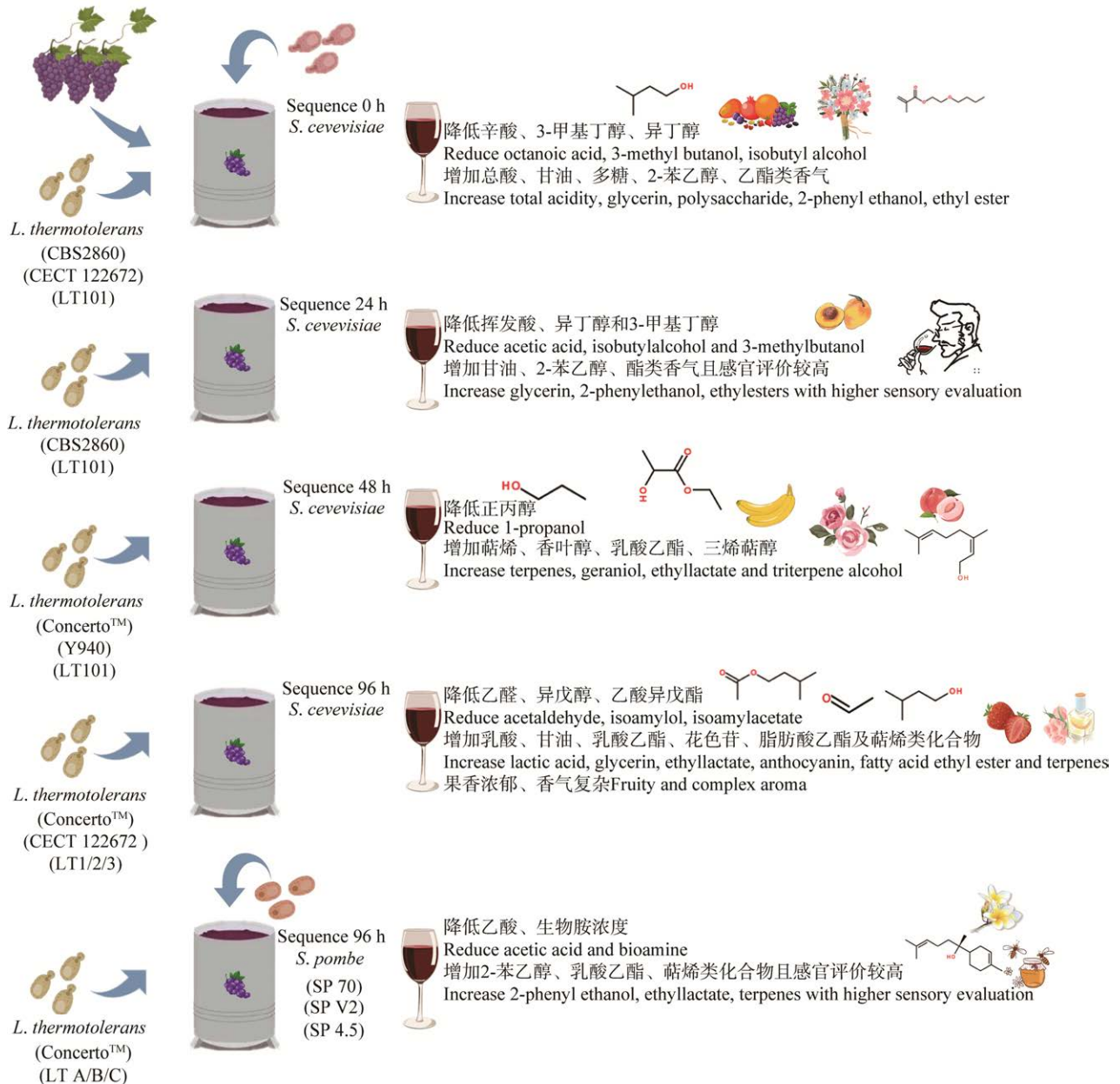


图1 *L. thermotolerans* 混菌发酵策略对葡萄酒品质的影响

Figure 1 Effects of mixed fermentation with *L. thermotolerans* on wine quality.

醇时二者接种的间隔时间^[48,61],其中接种时间间隔对酒样的影响更为显著。Gobbi 等发现,在顺序接种中,酒样中乳酸产量随着接种间隔的增加而增加,当顺序接种间隔时间为 24 h 时,酒样中(LT101) 2-苯乙醇及乙酯类香气显著^[48]。Balicki 等的研究也表明,在接种间隔时间为 24 h

时,葡萄酒的感官评价最高^[61]。Benito 等在雷司令葡萄汁中对耐热克鲁维酵母(Concerto™)进行 48 h 的顺序接种发酵,结果发现酒样中的萜烯及具有桃、杏等香气的三烯醇类物质的产量显著增加^[15]。部分研究将接种时间间隔增加至 96 h 后发现,酒样中的乳酸乙酯产量显著提高^[62,71]。在

接种比例方面, 大部分研究均使用 1:1 或 10:1 (耐热克鲁维酵母:酿酒酵母)的方式进行接种, 在相同的接种时间间隔下, 接种比例的不同对酒样影响较小^[13]。Comitini 等的研究结果显示, 当耐热克鲁维酵母(LT97)与酿酒酵母(EC 1118)的接种比例为 $10^2:1$ 和 $10^4:1$ 时, 混合发酵体系中的 pH 值能够显著降低, 但其他物质间的产量无显著差异; 除上述 2 种方式之外, 也有部分研究探索了不同发酵温度对混合发酵的影响, 相比于 20 °C 发酵, 30 °C 发酵酒样中的甘油含量显著增加^[13]。

使用耐热克鲁维酵母与粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)混合发酵可在酒精发酵的同时完成苹果酸乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)^[40]。在这一过程中, 粟酒裂殖酵母能够完全消耗苹果酸, 实现微生物稳定并降低酒样中生物胺和氨基甲酸乙酯的浓度^[32-33]。耐热克鲁维酵母在产生乳酸降低 pH 值的同时也能带来更多的复杂香气, 二者不同特性的融合使得其混合发酵策略对葡萄酒的质量产生积极影响^[15,33]。

除此之外, 利用耐热克鲁维酵母与其他非酿酒酵母及酿酒酵母进行混合接种的三元发酵也有研究, Vaquero 等对耐热克鲁维酵母分别与戴尔有孢圆酵母、美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)、葡萄酒有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora vineae*)及酿酒酵母的三元混合结果表明, 耐热克鲁维酵母与美极梅奇酵母能够产生一定的协同效应, 能够产生 3.2 g/L 的乳酸、降低 0.33 的 pH 值, 并有效增加酒样的感官特性^[50]。

3.2 混合发酵中影响耐热克鲁维酵母生长的因素

在葡萄酒发酵过程中, 非酿酒酵母通常会在发酵前期衰亡, 致死因素包括其本身较低的乙醇耐受性、发酵系统中较低浓度的溶氧量及不同菌株间的相互作用, 如菌株之间的营养竞争、有害

代谢物质的积累、细胞间接触作用及其他菌种分泌的抗菌肽等; 通常这些因素并非单独存在, 而是综合作用于整个发酵过程^[74]。

早期的研究认为, 抑制酵母生长的主要因素是酒精发酵产生的高浓度乙醇, 其能够破坏酵母的细胞膜结构并影响糖酵解过程中相关酶的活性^[75]。最近的一项研究表明, 含氧量作为酵母糖代谢过程中的关键因素, 对耐热克鲁维酵母的生存活性具有更显著的影响^[45]。相关研究表明, 在缺氧条件下耐热克鲁维酵母的活细胞量仅为 10^7 CFU/mL, 当增加溶氧量后, 细胞浓度则能够达到 10^{10} CFU/mL^[34]。耐热克鲁维酵母也具备一定程度的氧化应激能力, 在厌氧条件下其细胞内一些编码过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和过氧化物酶及与细胞聚集、死亡和对渗透胁迫的反应相关的基因均显著上调^[63]。

除了氧气和营养物质的消耗及有毒化合物的积累外, 不同酵母间的竞争也是导致耐热克鲁维酵母衰亡的原因之一^[76]。发酵液的糖浓度及其可利用的氧气浓度导致了不同酵母对葡萄糖的摄取率存在差异, 在耐热克鲁维酵母与酿酒酵母混合发酵的过程中, 二者对葡萄糖的摄取率会影响其各自在混菌体系中争夺空间的能力, 进而影响其衰亡程度^[77]。此外, 酵母细胞间的物理接触会抑制耐热克鲁维酵母的可培养性并改变酵母的代谢^[74,78]。酿酒酵母所分泌的一些分子量介于 2-10 kDa 的蛋白类物质会诱导耐热克鲁维酵母的衰亡^[79], 这类物质来自糖酵解酶甘油-3-磷酸脱氢酶的抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs), 被称为“糖霉素”(saccharomycin)^[80]。在混合发酵初期, 酿酒酵母为了获取营养并维持细胞稳态, 会上调参与内吞的蛋白、增加营养利用率的蛋白及细胞拯救和抗应力蛋白的表达, 同时下调参与脯氨酸合成和酵母凋亡的蛋白; 在发酵末期, 即耐热克鲁维酵母大量衰亡的阶段, 为了

保证生存状态,酿酒酵母会上调参与蛋白合成的蛋白,并下调参与应激反应的蛋白^[81]。然而,混合发酵过程中不同酵母菌之间的相互影响依然存在复杂的作用机制,关于耐热克鲁维酵母与其他菌株的相互作用仍需进一步研究。

4 总结与展望

耐热克鲁维酵母作为一种能够显著降低葡萄酒 pH 值、乙醇、乙酸浓度,增加乳酸、甘油、多糖、乙酯类及 2-苯乙醇等优良香气物质含量的非酿酒酵母,目前从实验室小试水平到工业生产规模的混合发酵试验在逐渐增多。将耐热克鲁维酵母与酿酒酵母混合发酵能在一定程度上增加葡萄酒的独特风味,也有望作为缓解部分炎热产区(如新疆、宁夏)葡萄原料酸度不足的一种可选方法,但生产应用尚需进行更为严谨的实验室研究和大规模应用试验。

受限于研究手段,目前对耐热克鲁维酵母在葡萄酒发酵中的研究以应用层面为主,针对乳酸、香气代谢调控机制及与其他菌种间的相互作用仍有待深入挖掘。国内对本土耐热克鲁维酵母资源的利用还十分有限,由于耐热克鲁维酵母受地理起源影响较大,菌株的基因型及表型存在特异性,而土著微生物能在本土葡萄酒的酿造中具有更好的定殖能力,在发酵体系中更有利于保持竞争优势,因此,筛选和培育性状稳定的本土优良耐热克鲁维酵母是解决菌株特异性这一问题的关键途径。为获得本土优质耐热克鲁维酵母,未来应加强对国内葡萄酒主要产区耐热克鲁维酵母的筛选,获得具有稳定增酸及增香效果的菌株,并结合基因组、转录组和蛋白质组等技术手段进一步解析其产酸与产香机制,不断挖掘菌株的优良特性,以促进我国酿酒微生物种质资源的良性发展。

REFERENCES

- [1] 卜光明,周化斌,周茂洪,杨海龙. 酿造酒中非酿酒酵母的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 346-352
Bu GM, Zhou HB, Zhou MH, Yang HL. Research progress on the non-*Saccharomyces* in the brewing wine fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 346-352 (in Chinese)
- [2] 战吉成,曹梦竹,游义琳,黄卫东. 非酿酒酵母在葡萄酒酿造中的应用[J]. 中国农业科学, 2020, 53(19): 4057-4069
Zhan JC, Cao MZ, You YL, Huang WD. Research advance on the application of non-*Saccharomyces* in winemaking[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(19): 4057-4069 (in Chinese)
- [3] Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE. Principles and Practices of Winemaking[M]. Boston, MA: Springer, 1999
- [4] Palacios VM, Caro I, Pérez L. Application of ion exchange techniques to industrial process of must acidification[J]. Separation and Purification Methods, 2001, 30(1): 143-156
- [5] Benito S. The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(16): 6775-6790
- [6] 覃秋杏,韩小雨,黄卫东,战吉成,游义琳. 非酿酒酵母产生的 β -葡萄糖苷酶在发酵酒中的应用[J/OL]. 食品科学, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201211.1614.008.html>
Tan XQ, Han XY, Huang WD, Zhan JC, You YL. Application of β -glucosidase produced by non-*Saccharomyces cerevisiae* in fermented wine[J/OL]. Food Science, 2021. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201211.1614.008.html> (in Chinese)
- [7] 谭凤玲,王宝石,胡培霞,刘成功,张明霞. 非酿酒酵母在葡萄酒混菌发酵中的应用及其挑战[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(22): 282-286
Tan FL, Wang BS, Hu PX, Liu CG, Zhang MX. Application and challenge of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast in the mixed fermentation of fruit wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(22): 282-286 (in Chinese)
- [8] 杨诗妮,叶冬青,贾红帅,张文静,宋育阳,刘延琳. 本土戴尔有孢圆酵母在葡萄酒酿造中的应用潜力[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 108-115
Yang SN, Ye DQ, Jia HS, Zhang WJ, Song YY, Liu YL. Oenological potential of indigenous *Torulaspora delbrueckii* for winemaking[J]. Food Science, 2019,

- 40(18): 108-115 (in Chinese)
- [9] 张文静, 杨诗妮, 杜爽, 姜娇, 叶冬青, 刘延琳. 本土毕赤克鲁维酵母与酿酒酵母混合发酵葡萄酒的增香潜力分析[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 84-90
Zhang WJ, Yang SN, Du S, Jiang J, Ye DQ, Liu YL. Potential application of mixed starter cultures of indigenous *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae* to wine aroma enhancement[J]. Food Science, 2020, 41(12): 84-90 (in Chinese)
- [10] 董琦楠, 叶冬青, 梁艳英, 姜娇, 刘延琳. 高产酸本土非酿酒酵母菌株的筛选及发酵性能研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(8): 70-75
Dong QN, Ye DQ, Liang YY, Jiang J, Liu YL. Screening and fermentation performance of native non-*Saccharomyces cerevisiae* with high lactic acid production[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 70-75 (in Chinese)
- [11] 冯文倩, 王倩, 刘延琳, 宋育阳, 姜娇, 伍新宇, 秦义. 低产乙醇本土有孢汉逊酵母的筛选及酿造特性[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(21): 9-17
Feng WQ, Wang Q, Liu YL, Song YY, Jiang J, Wu XY, Qin Y. Screening and oenological properties of *Hanseniaspora* strains with low ethanol yield[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(21): 9-17 (in Chinese)
- [12] 郝爱玲, 冯莉, 秦义, 宋育阳, 刘延琳. 降解柠檬酸酵母菌的筛选及其发酵性能研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(11): 72-80
Hao AL, Feng L, Qin Y, Song YY, Liu YL. Studies on selection and fermentation characteristics of citric acid-degradation yeast[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(11): 72-80 (in Chinese)
- [13] Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 873-882
- [14] Ciani M, Morales P, Comitini F, Tronchoni J, Canonico L, Curiel JA, Oro L, Rodrigues AJ, Gonzalez R. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 642
- [15] Benito S, Hofmann T, Laier M, Lochbühler B, Schüttler A, Ebert K, Fritsch S, Röcker J, Rauhut D. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(5): 707-717
- [16] Porter TJ, Divol B, Setati ME. Investigating the biochemical and fermentation attributes of *Lachancea* species and strains: deciphering the potential contribution to wine chemical composition[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 290: 273-287
- [17] Kapsopoulou K, Mourtzini A, Anthoulas M, Nerantzis E. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(5): 735-739
- [18] 黄英子. 冰酒发酵过程中酵母菌的多样性及动态变化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2013
Huang YZ. Diversity and dynamic change of yeasts during icewine fermentation[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2013 (in Chinese)
- [19] Porter TJ, Divol B, Setati ME. *Lachancea* yeast species: origin, biochemical characteristics and oenological significance[J]. Food Research International, 2019, 119: 378-389
- [20] Lachance MA, Kurtzman CP. Chapter 41-*Lachancea* Kurtzman(2003)[A]//Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The Yeasts[M]. 5th ed. London: Elsevier, 2011: 511-519
- [21] 杨婕. 基于耐热克鲁维酵母混菌发酵对提升冰酒感官品质的影响效应[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2020
Yang J. Effect of *Lachancea thermotolerans* mixed fermentation on improving sensory quality of ice wine[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [22] De Anchieta Câmara Jr A, Maréchal PA, Tourdot-Maréchal R, Husson F. Dehydration stress responses of yeasts *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: effects of glutathione and trehalose biosynthesis[J]. Food Microbiology, 2019, 79: 137-146
- [23] 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
- [24] Hranilovic A, Gambetta JM, Schmidtke L, Boss PK, Grbin PR, Masneuf-Pomarede I, Bely M, Albertin W, Jiranek V. Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 14812
- [25] Freel KC, Friedrich A, Hou J, Schacherer J. Population genomic analysis reveals highly conserved mitochondrial

- genomes in the yeast species *Lachancea thermotolerans*[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(10): 2586-2594
- [26] Gerstein AC, Jean-Sébastien M. Small is the new big: assessing the population structure of microorganisms[J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20(21): 4385-4387
- [27] Binati RL, Innocente G, Gatto V, Celebrin A, Polo M, Felis GE, Torriani S. 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
- [28] Escribano R, González-Arenzana L, Portu J, Garijo P, López-Alfaro I, López R, Santamaría P, Gutiérrez AR. Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(6): 1521-1531
- [29] Gatto V, Binati RL, Lemos WJF Jr, Basile A, Treu L, De Almeida OGG, Innocente G, Campanaro S, Torriani S. New insights into the variability of lactic acid production in *Lachancea thermotolerans* at the phenotypic and genomic level[J]. *Microbiological Research*, 2020, 238: 126525
- [30] Malpertuy A, Llorente B, Blandin G, Artiguenave F, Wincker P, Dujon B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 10. *Kluyveromyces thermotolerans*[J]. *FEBS Letters*, 2000, 487(1): 61-65
- [31] Du Plessis HW, Du Toit M, Hoff JW, Hart RS, Ndimba BK, Jolly NP. Characterisation of non-*Saccharomyces* yeasts using different methodologies and evaluation of their compatibility with malolactic fermentation[J]. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 2017, 38(2): 46-63
- [32] Benito Á, Calderón F, Palomero F, Benito S. Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2015, 20(6): 9510-9523
- [33] Benito Á, Calderón F, Benito S. Combined use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in winemaking. beneficial effects determined through the study of wines' analytical characteristics[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2016, 21(12): 1744
- [34] Shekhawat K, Porter TJ, Bauer FF, Setati ME. Employing oxygen pulses to modulate *Lachancea thermotolerans*-*Saccharomyces cerevisiae* Chardonnay fermentations[J]. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(2): 93-102
- [35] Hranilovic A, Albertin W, Capone DL, Gallo A, Grbin PR, Danner L, Bastian SEP, Masneuf-Pomarede I, Coulon J, Bely M, et al. Impact of *Lachancea thermotolerans* on chemical composition and sensory profiles of Merlot wines[J]. *Food Chemistry*, 2021, 349: 129015
- [36] Morata A, Bañuelos MA, Vaquero C, Loira I, Cuerda R, Palomero F, González C, Suárez-Lepe JA, Wang J, Han SY, et al. *Lachancea thermotolerans* as a tool to improve pH in red wines from warm regions[J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245(4): 885-894
- [37] Bañuelos MA, Loira I, Escott C, Del Fresno JM, Morata A, Sanz PD, Otero L, Suárez-Lepe JA. Grape processing by high hydrostatic pressure: effect on use of non-*Saccharomyces* in must fermentation[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, 9(10): 1769-1778
- [38] Kapsopoulou K, Kapaklis A, Spyropoulos H. Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(8/9): 1599-1602
- [39] Benito Á, Calderón F, Benito S. The combined use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans*-effect on the anthocyanin wine composition[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2017, 22(5): 739
- [40] Benito Á, Calderón F, Benito S. *Schizosaccharomyces pombe* biotechnological applications in winemaking[A]// Singleton TL. *Schizosaccharomyces Pombe*[M]. New York: Humana Press, 2018: 217-226
- [41] Adams MJ, Buehner M, Chandrasekhar K, Ford GC, Hackert ML, Liljas A, Rossmann MG, Smiley IE, Allison WS, Everse J, et al. Structure-function relationships in lactate dehydrogenase[J]. *PNAS*, 1973, 70(7): 1968-1972
- [42] Pacheco A, Talaia G, Sá-Pessoa J, Bessa D, Gonçalves MJ, Moreira R, Paiva S, Casal M, Queirós O. Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2[J]. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(3): 375-381
- [43] Turner TL, Lane S, Jayakody LN, Zhang GC, Kim H, Cho W, Jin YS. Deletion of JEN1 and ADY2 reduces lactic acid yield from an engineered *Saccharomyces cerevisiae*, in xylose medium, expressing a heterologous lactate dehydrogenase[J]. *FEMS Yeast Research*, 2019, 19(6): foz050
- [44] Sgouros G, Mallouchos A, Filippousi ME, Banilas G, Nisiotou A. Molecular characterization and enological potential of a high lactic acid-producing *Lachancea*

- thermotolerans* vineyard strain[J]. Foods: Basel, Switzerland, 2020, 9(5): 595
- [45] Shekhawat K, Bauer FF, Setati ME. The transcriptomic response of a wine strain of *Lachancea thermotolerans* to oxygen deprivation[J]. FEMS Yeast Research, 2020, 20(7): foaa054
- [46] Flores CL, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(4): 507-529
- [47] Zdaniewicz M, Satora P, Pater A, Bogacz S. Low lactic acid-producing strain of *Lachancea thermotolerans* as a new starter for beer production[J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 256
- [48] Gobbi M, Comitini F, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine[J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 271-281
- [49] Fernandes T, Silva-Sousa F, Pereira F, Rito T, Soares P, Franco-Duarte R, Sousa MJ. Biotechnological importance of *Torulaspora delbrueckii*: from the obscurity to the spotlight[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(9): 712
- [50] Vaquero C, Loira I, Heras JM, Carrau F, González C, Morata A. Biocompatibility in ternary fermentations with *Lachancea thermotolerans*, other non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to control pH and improve the sensory profile of wines from warm areas[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 656262
- [51] Morales ML, Fierro-Risco J, Ríos-Reina R, Ubeda C, Paneque P. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* co-inoculation on volatile profile in fermentations of a must with a high sugar content[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 427-435
- [52] Nally MC, Ponsone ML, Pesce VM, Toro ME, Vazquez F, Chulze S. Evaluation of behaviour of *Lachancea thermotolerans* biocontrol agents on grape fermentations[J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 67(1): 89-96
- [53] Lubbers S, Verret C, Voilley A. The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine[J]. LWT - Food Science and Technology, 2001, 34(4): 262-265
- [54] Vaquero C, Loira I, Bañuelos MA, Heras JM, Cuerda R, Morata A. Industrial performance of several *Lachancea thermotolerans* strains for pH control in white wines from warm areas[J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 830
- [55] 杨华峰, 杜文华, 刘忠义. 初始含糖量和二氧化硫对冰红酒挥发酸的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 177-179
- Yang HF, Du WH, Liu ZY. Effect of original sugar content and sulfur dioxide on volatile acid of the red icewine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(3): 177-179 (in Chinese)
- [56] Toh DWK, Chua JY, Lu YY, Liu SQ. Evaluation of the potential of commercial non-*Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(5): 2049-2059
- [57] Escott C, Morata A, Ricardo-Da-Silva JM, Callejo MJ, González M, Suarez-Lepe JA. Effect of *Lachancea thermotolerans* on the formation of polymeric pigments during sequential fermentation with *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2018, 23(9): 2353
- [58] Shekhawat K, Bauer FF, Setati ME. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(6): 2479-2491
- [59] Hayaishi O, Sutton WB. Enzymatic oxygen fixation into acetate concomitant with the enzymatic decarboxylation of L-lactate[J]. Journal of the American Chemical Society, 1957, 79(17): 4809-4810
- [60] Lyu JH, Chen S, Nie Y, Xu Y, Tang K. Aroma release during wine consumption: factors and analytical approaches[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128957
- [61] Balicki EK, Tanguler H, Jolly NP, Erten H. Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. emir wine fermentation[J]. Yeast: Chichester, England, 2016, 33(7): 313-321
- [62] Benito Á, Calderón F, Palomero F, Benito S. Quality and composition of airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Technology and Biotechnology, 2016, 54(2): 135-144
- [63] Shekhawat K, Patterton H, Bauer FF, Setati ME. RNA-seq based transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in mixed-culture fermentations under anaerobic conditions[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 145
- [64] Hranilovic A, Li S, Boss PK, Bindon K, Ristic R, Grbin PR, Van Der Westhuizen T, Jiranek V. Chemical and sensory profiling of Shiraz wines co-fermented with commercial non-*Saccharomyces* inocula[J]. Australian

- Journal of Grape and Wine Research, 2018, 24(2): 166-180
- [65] Chen K, Escott C, Loira I, Del Fresno JM, Morata A, Tesfaye W, Calderon F, Suárez-Lepe JA, Han SY, Benito S. Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines[J]. Food Microbiology, 2018, 69: 51-63
- [66] Domizio P, Liu Y, Bisson LF, Barile D. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine[J]. Food Microbiology, 2014, 43: 5-15
- [67] Božič JT, Butinar L, Albrecht A, Vovk I, Korte D, Vodopivec BM. The impact of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts on wine colour: a laboratory study of vinylphenolic pyranoanthocyanin formation and anthocyanin cell wall adsorption[J]. LWT, 2020, 123: 109072
- [68] Zhang PZ, Ma W, Meng YQ, Zhang YF, Jin G, Fang ZX. Wine phenolic profile altered by yeast: mechanisms and influences[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(4): 3579-3619
- [69] Escribano-Viana R, Portu J, Garijo P, López R, Santamaría P, López-Alfaro I, Gutiérrez AR, González-Arenzana L. Effect of the sequential inoculation of non-*Saccharomyces/Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of tempranillo wines[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 773
- [70] 王玉华, 盛文军, 李敏, 米兰, 蒋玉梅, 王婧. 耐热克鲁维酵母和粟酒裂殖酵母顺序接种发酵对美乐干红葡萄酒品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 102-111
Wang YH, Sheng WJ, Li M, Mi L, Jiang YM, Wang J. Effect of sequential fermentation with *Lachancea thermotolerans* and *Schizosaccharomyces pombe* on the quality of merlot dry red wine[J]. Food Science, 2019, 40(8): 102-111 (in Chinese)
- [71] 杨婕, 王玉华, 米兰, 李爱霞, 王婧. 耐热克鲁维酵母与酿酒酵母顺序接种发酵对霞多丽干白葡萄酒感官品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 144-154
Yang J, Wang YH, Mi L, Li AX, Wang J. Effects of sequential fermentation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* on the quality of Chardonnay dry white wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(18): 144-154 (in Chinese)
- [72] 王婧, 李敏, 高娉娉, 赵美, 杨婕. 耐热克鲁维酵母和戴尔有孢圆酵母在冰葡萄酒酿造中的应用潜力[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(1): 79-87
Wang J, Li M, Gao PP, Zhao M, Yang J. Application potential of *Lachancea thermotolerans* and *Torulaspora delbrueckii* on ice wine fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(1): 79-87 (in Chinese)
- [73] Vilela A. *Lachancea thermotolerans*, the non-*Saccharomyces* yeast that reduces the volatile acidity of wines[J]. Fermentation, 2018, 4(3): 56
- [74] Petitgonnet C, Klein GL, Roullier-Gall C, Schmitt-Kopplin P, Quintanilla-Casas B, Vichi S, Julien-David D, Alexandre H. Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome[J]. Food Microbiology, 2019, 83: 122-133
- [75] Cot M, Loret MO, François J, Benbadis L. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol[J]. FEMS Yeast Research, 2007, 7(1): 22-32
- [76] Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism[J]. Yeast: Chichester, England, 2003, 20(4): 331-341
- [77] Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. The relative glucose uptake abilities of non-*Saccharomyces* yeasts play a role in their coexistence with *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(4): 543-550
- [78] Luyt NA, Beaufort S, Divol B, Setati ME, Taillandier P, Bauer FF. Phenotypic characterization of cell-to-cell interactions between two yeast species during alcoholic fermentation[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2021, 37(11): 186
- [79] Albergaria H, Francisco D, Gori K, Arneborg N, Gírio F. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(3): 965-972
- [80] Branco P, Francisco D, Monteiro M, Almeida MG, Caldeira J, Arneborg N, Prista C, Albergaria H. Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(1): 159-171
- [81] Peng CT, Andersen B, Arshid S, Larsen MR, Albergaria H, Lametsch R, Arneborg N. Proteomics insights into the responses of *Saccharomyces cerevisiae* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Lachancea thermotolerans*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2019, 95(9): f126