

本土酵母 NX11424 对赤霞珠葡萄酒发酵中酵母菌多样性及香气成分的影响

冯丹萍¹, 何荣荣¹, 程思琦², 孙悦^{*1}

1 宁夏大学食品与葡萄酒学院, 宁夏 银川 750021

2 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

冯丹萍, 何荣荣, 程思琦, 孙悦. 本土酵母 NX11424 对赤霞珠葡萄酒发酵中酵母菌多样性及香气成分的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3722-3739

Feng Danping, He Rongrong, Cheng Siqi, Sun Yue. Effects of indigenous yeast NX11424 inoculation on the yeast diversity and aroma compounds during Cabernet Sauvignon wine fermentation[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3722-3739

摘要: 【背景】NX11424 酵母是一株具有良好发酵特性且能赋予赤霞珠葡萄酒浓郁果香的宁夏本土酿酒酵母。【目的】解析 NX11424 酵母发酵的赤霞珠葡萄酒中的水果香气特征。【方法】以赤霞珠为材料, 设置 3 个发酵处理: 自然发酵、灭菌接种 NX11424 的发酵和直接接种 NX11424 的发酵, 利用 26S rDNA D1/D2 区测序分析法鉴定发酵过程中酵母菌的种类, 并通过顶空固相微萃取和气相色谱-质谱联用技术定量测定不同发酵处理下赤霞珠葡萄酒的香气成分及含量。【结果】三个发酵处理下赤霞珠葡萄酒各理化指标无显著性差异。所分离到的酵母菌鉴定为 2 属 3 种: 葡萄酒有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和布拉迪酵母(*Saccharomyces boulardii*, *S. boulardii*); 这 2 属 3 种均存在于自然发酵中, 接种发酵中仅存在 *H. uvarum* 和 *S. cerevisiae* 两种酵母。三个发酵处理下的赤霞珠葡萄酒中香气物质种类无差异, 均为 69 种; 其中, 酯类 28 种, 醇类 25 种, 有机酸 5 种, 萜烯类 2 种和其他类化合物 9 种; 但各发酵处理下香气物质的含量存在显著差异。聚类分析表明, 69 种香气成分被聚为 3 类。第 1 类香气物质包括香茅醇、丙醇等 9 种成分, 其中 7 种香气物质的含量在灭菌接种发酵中较高; 第 2 类香气物质包括己酸乙酯、棕榈酸乙酯等 31 种成分, 其含量均在直接接种发酵中较高; 第 3 类香气物质包括丁酸乙酯、乳酸乙酯等 29 种成分, 其中 27 种香气物质的含量在自然发酵中较高。虽然直接接种发酵处理中酵母菌的多样性低于自然发酵处理, 但是该处理的赤霞珠葡萄酒中酯类香气物

基金项目: 国家自然科学基金(31960473); 宁夏回族自治区重点研发计划重大项目(2020BCF01003); 宁夏大学引进人才科研项目

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31960473); Major Research and Development Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2020BCF01003); Scientific Research Project for Talents Introduced by Ningxia University

*Corresponding author: E-mail: yuesun@nxu.edu.cn

Received: 2022-01-18; Accepted: 2022-03-24; Published online: 2022-04-20

质含量较多, 水果香气浓郁, 对赤霞珠葡萄酒香气的改善更明显。【结论】NX11424 与发酵中的其他本土酵母间的相互作用可以改善葡萄酒的质量, 为宁夏本土酵母 NX11424 在赤霞珠葡萄酒酿造过程中改善葡萄酒质量奠定了坚实的基础。

关键词: 赤霞珠; 葡萄酒; 香气; NX11424; 酵母

Effects of indigenous yeast NX11424 inoculation on the yeast diversity and aroma compounds during Cabernet Sauvignon wine fermentation

FENG Danping¹, HE Rongrong¹, CHENG Siqu², SUN Yue^{*1}

1 School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750012, Ningxia, China

2 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: [Background] The indigenous *Saccharomyces cerevisiae* NX11424 in Ningxia enjoys a reputation in fermentation, as it endows the Cabernet Sauvignon wine with strong fruit aroma. [Objective] To investigate the fruit aroma characteristics of Cabernet Sauvignon wine fermented with NX11424. [Methods] Cabernet Sauvignon was used for wine fermentation. Three fermentation conditions were designed: spontaneous fermentation, inoculation with NX11424 after grape sterilization, direct inoculation with NX11424. 26S rDNA D1/D2 sequencing was used to analyze and identify the yeast species during wine fermentation. The aroma components of Cabernet Sauvignon wine fermented under different conditions were determined by head space-solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Results] The physicochemical indexes of wine fermented under the three conditions showed no significant difference. The isolated yeasts belong to 3 species in 2 genera: *Hanseniaspora uvarum*, *S. cerevisiae*, and *S. boulardii*. All the 3 species were detected in spontaneous fermentation and only *H. uvarum* and *S. cerevisiae* in fermentation with NX11424. A total of 69 kinds of aroma components were identified respectively in the wine fermented under the three conditions: 28 esters, 25 alcohols, 5 organic acids, 2 terpenes, and 9 others. There were no significant differences in species of these aroma components among different treatments but significant differences in the content of them. Cluster analysis showed that these 69 kinds of aroma components were clustered into 3 clades. Clade I contained 9 components such as citronellol and propanol, among which 7 had high content in the wine fermented by inoculation with NX11424 after grape sterilization. The 31 components in clade II such as ethyl hexanoate and ethyl palmitate had high content in the wine fermented by in direct inoculation with NX11424. Clade III had 29 components such as ethyl butanoate and ethyl lactate, among which 27 had high content in the wine under spontaneous fermentation. Although the yeast diversity under direct inoculation fermentation was lower than that under spontaneous fermentation, the wine fermented by direct inoculation showed high content of esters and strong fruit aroma. [Conclusion] The interaction between NX11424 and other indigenous yeast during wine fermentation could improve wine quality. This study lays a solid foundation for using *S.*

cerevisiae NX11424 to improve wine quality of Cabernet Sauvignon wine.

Keywords: Cabernet Sauvignon; wine; aroma; NX11424; yeasts

酵母菌是酒精发酵过程中将糖转化为乙醇、CO₂、甘油、醇、酯类等物质的重要微生物,酵母菌的多样性可有效增加葡萄酒风味的复杂度,也可能影响葡萄酒质量的稳定性^[1-2]。根据葡萄酒在酒精发酵过程中是否接种酵母菌,可将其分为自然发酵和接种发酵。自然发酵由葡萄醪中的本土酵母菌群完成酒精发酵,而接种发酵是由接种的酵母菌及本土酵母菌群协同完成^[3-4]。目前,我国葡萄酒工业上大多接种国外商业酵母进行葡萄酒的生产,虽然此方法易于控制,可有效保证发酵过程中微生物性能的稳定性,确保产品最终的质量,但是容易造成产品同质化及产区风格特色不突出等问题。

由于本土酵母菌在葡萄酒的酿造过程中可以突出葡萄品种的风味,赋予葡萄酒产品的独特性和风味的多样性。因此,越来越多的国内外研究者开始研究本土酵母菌在酿造过程中对葡萄酒香气物质和感官质量的影响^[3,5-10]。宋茹茹等^[6]研究表明,戴尔有孢圆酵母(*Torulasporea delbrueckii*)与酿酒酵母 RC212 顺序接种发酵有利于干红葡萄酒中酯类、醇类及萜烯类化合物的生成,尤其是脂肪酸乙酯的生成,可以提高干红葡萄酒中的花香、果香味,其感官评价表明 *T. delbrueckii* 与 RC212 顺序接种发酵可以使赤霞珠和梅鹿辄葡萄酒酒体更丰满,浓郁度、整体接受度更高,尤其是对梅鹿辄干红葡萄酒香气的影响更明显。Bageri 等^[7]在 Priorat 产区葡萄酒厂使用本土酵母进行单菌和混菌发酵实验,结果表明,生产出的大多数葡萄酒在感官品评上是不同的,如 Priorat 产区的葡萄酒具有高酒精含量和饱满酒体的特点。我国研究学者发现不同地区(昌黎地区、贺兰山东麓葡萄酒产

区)的本土酵母可以突出葡萄酒的品种香气,并对玫瑰香、赤霞珠和梅鹿辄干红葡萄酒具有增香的效果^[8-10]。我国葡萄酒产区丰富且各具特色,酵母资源极其丰富,利用优良酿酒特性的本土酵母塑造产区或地域典型葡萄酒的相关研究尚处于起步阶段。因此,迫切需要这方面的研究,为酿造具有产区典型性风味的葡萄酒提供理论基础。

NX11424 酵母是一株具有良好的高糖、高酸耐受力 and 挥发酸低、发酵力强、能赋予赤霞珠葡萄酒浓郁果香的宁夏本土酿酒酵母^[11]; NX11424 现已被安琪酵母股份有限公司商业化,名为 CECA。为了在产区特色化发展的基础上促进本土酵母菌株的推广与应用,本研究以宁夏贺兰山东麓产区‘赤霞珠’葡萄为原料,接种 NX11424 (以自然发酵和灭菌接种发酵为对照),研究直接接种 NX11424 酵母与对照处理酵母菌群结构差异;同时,测定不同发酵处理对香气成分的影响,以及对主要香气物质种类、风味物质的影响,进而阐明本土酵母 NX11424 在发酵赤霞珠葡萄酒时产水果香气的特性,以期为本土酵母 NX11424 提升赤霞珠葡萄酒品质提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

赤霞珠葡萄,2019年宁夏贺兰山东麓产区赤霞珠葡萄糖(265.1±87.40)–(284.85±13.3) g/L,总酸(5.50±0.01)–(7.70±0.01) g/L, pH 为(3.65±0.00)–(3.80±0.64),发酵罐为5 L的圆形玻璃发酵罐,入罐体积为3.5 L。

酵母菌株:安琪酵母 CECA (NX11424, 该

菌株分离自宁夏广夏三基地)。

YEPD 培养基: 酵母浸粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L。1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 添加 100 mg/L 的氯霉素以排除细菌的干扰。配制固体培养基时加入 20 g/L 的琼脂。

WLN 营养琼脂培养基: 酵母菌株的初步形态分类用 WLN 营养培养基^[12], 调 pH 至 6.5, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 添加 100 mg/L 的氯霉素。

酵母浸粉、蛋白胨和氯霉素, 北京索莱宝科技有限公司; 葡萄糖, 上海广诺化学科技有限公司; WLN 营养培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

生化培养箱, 常州诺基仪器有限公司; 干式恒温器, 上海巴玖实业有限公司; PCR 仪, 耶拿分析仪器股份公司; 全自动凝胶成像仪, 北京赛智创业科技有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 葡萄酒分析仪, BioSystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 发酵试验

试验设置 3 种发酵处理: A: 自然发酵; B: 灭菌接种 NX11424 酵母发酵; C: 直接接种 NX11424 酵母发酵。用无菌自封袋将成熟的葡萄原料在无菌状态下进行除梗破碎, 发酵体积为 3.5 L, 每个处理设置 2 个发酵重复; 3 组发酵分别加入偏重亚硫酸钾 60 mg/L 和果胶酶 20 mg/L, 常温浸渍 24 h。自然发酵不做处理; 接种发酵在葡萄破碎后的第 2 天进行接种, 接种量为 10⁶ CFU/mL; 灭菌接种发酵的葡萄用 75%酒精灭菌处理后与直接接种发酵同一时间接种, 接种量为 10⁶ CFU/mL。所有发酵均于 25–28 °C 控温发酵, 采用比重法对发酵进程进行监控, 直至发酵液比重数值在 0.993–0.996 时视为发酵结束^[13]。

1.2.2 菌落计数与酵母菌分离

在发酵过程中的第 2、4 和 6 天, 取样并进行梯度稀释, 通常稀释至 10⁻⁴–10⁻⁷, 涂布于 WLN 营养琼脂培养基上(加入 100 mg/L 氯霉素, 抑制细菌和霉菌的生长), 28 °C 培养 5 d, 参照《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》(GB 4789.2—2016)^[14] 平板计数法进行菌落计数。根据菌落的颜色和形态不同, 每个时期挑选 20 个酵母单菌落进行划线纯化^[15–17]。经纯化后的酵母菌于 20% 的无菌甘油中 –20 °C 保藏备用。

1.2.3 理化指标

发酵结束后的游离 SO₂、总 SO₂、总糖、总酸、pH、酒精度、挥发酸等理化指标参照国标《GB/T 15038—2006 葡萄酒、果酒通用分析法》^[18] 测定, 甘油质量浓度测定通过葡萄酒分析仪检测。

1.2.4 挥发性香气物质含量测定

挥发性香气物质含量测定采取顶空固相微萃取和气相色谱-质谱联用(head space solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)方法^[19–21]。

1.2.5 香气评价

Odor activity value (OAV) 评价香气物质对酒整体香气的贡献, 一般认为 OAV 大于 1 对酒整体香气有贡献, 挥发性成分的 OAV=香气物质的含量/香气物质的感官阈值^[22]。

1.2.6 酵母菌 DNA 提取

酵母菌 DNA 的提取采用石英砂破壁法^[23]。

1.2.7 26S rDNA D1/D2 序列分析^[24]

PCR 扩增 26S rDNA D1/D2 区的引物为 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA G-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。PCR 反应体系 (25 μL): 10×Easy Taq Buffer 2.5 μL, NL1 和 NL4 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 10×Easy Taq Buffer Polymerase 0.25 μL, 酵母菌 DNA 模板 1 μL,

ddH₂O 18.25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 80 s, 36 次循环; 72 °C 8 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳进行验证,然后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行检测。

1.3 数据处理

所得数据通过 Microsoft Office 2016 和 OriginPro 8.1 软件进行基本数据处理和图表制作;采用 R 统计分析软件 pheatmap 包进行香气成分聚类热图分析。

2 结果与分析

2.1 酒精发酵过程中的比重变化

研究采取比重法监控发酵进程,不同发酵处理的发酵曲线如图 1 所示。从发酵曲线可以看出,3 个发酵处理的比重变化趋势相似,在发酵的第 3-5 天时比重下降最快,发酵速度最快;第 6 天比重下降趋势减缓,发酵速度开始减慢,直至 16-17 d 全部发酵结束。自然发酵在第 5 天后比重下降速度较接种发酵缓慢,可能是与自然发酵中非酿酒酵母较多有关,非酿酒酵母比酿酒酵母发酵力弱,所以酒精发酵较缓慢,而且发酵时间比接种发酵延长了 1 d。灭菌接种发酵在第 4 天后比自然发酵和直接接种发酵速度更快。

表 1 发酵过程中酵母菌总数变化

Table 1 Changes in the total number of yeasts during fermentation (CFU/mL)

发酵时期 Fermentation periods	自然发酵 Spontaneous fermentation (A)	灭菌接种 Inoculation with NX11424 after grape sterilization (B)	直接接种 Direct inoculation of NX11424 (C)
发酵初期 Early stage of fermentation (2 d)	4.81±0.20a	4.98±0.89a	4.54±0.11a
发酵中期 Middle stage of fermentation (4 d)	9.06±0.48a	8.24±0.14a	8.79±0.11a
发酵后期 Late stage of fermentation (6 d)	8.12±0.96a	8.45±0.72a	8.90±0.03a

注:表中数值为平均值±标准偏差;同行不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$

Note: Number in the table means mean±standard deviation; Different lowercase letters in the same line indicate significant differences, $P < 0.05$.

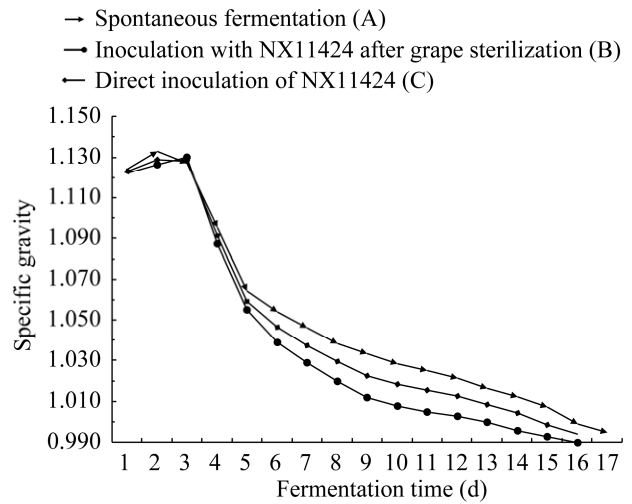


图 1 三个不同处理下葡萄酒酒精发酵过程中比重变化

Figure 1 The change of specific gravity of wine during alcohol fermentation under three different treatments.

2.2 酵母菌群总数动态变化分析

在自然发酵中,酵母菌总数呈现出先增多后减少的趋势,在发酵第 4 天酵母菌总数达到最大值,如表 1 所示。在接种发酵中,酵母菌总数呈逐渐上升的趋势,灭菌接种发酵和直接接种发酵均在发酵第 6 天酵母菌总数达到最大值。在发酵不同时期,3 组发酵的酵母菌总数差异不显著。

2.3 三种发酵处理下酵母菌种类差异

研究共分离得到 180 个酵母单菌落(3 个发酵处理×3 个时期×20 个酵母单菌落/时期=180 个), 经 WLN 营养培养基初步分离和 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列分析, 将分离到的酵母菌鉴定为 2 属 3 种, 即 *H. uvarum*、*S. cerevisiae* 和 *S. Boulardii* (图 2)。这 2 属 3 种均存在于自然发酵中, 而接种发酵中仅存在 *H. uvarum* 和 *S. cerevisiae* 两种酵母, 即接种发酵中酵母菌的多样性低于自然发酵, 可能是由于接种 *S. cerevisiae* 改变了自然发酵的菌系组成, 表现出协同或拮抗作用^[25]。非酿酒酵母在各发酵处理的初期占明显优势。随着发酵的进行, 非酿酒酵母的比例下降, 酿酒酵母逐渐占据主导地位并完成酒精发酵。其中, 在发酵第 2 天, 自然发酵中的非酿酒酵母菌数量占比(72.5%)远高于灭菌接种发酵和直接接种发酵。

2.4 三种发酵处理下赤霞珠葡萄酒香气物质差异

三个不同处理下的酒样乙醇体积分数范围

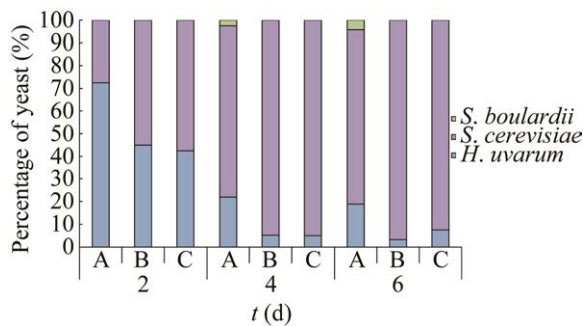


图 2 不同处理下酿酒酵母与非酿酒酵母的比例
A: 自然发酵; B: 灭菌接种发酵; C: 直接接种发酵

Figure 2 The proportion of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* under different treatments. A: Spontaneous fermentation; B: Inoculation with NX11424 after grape sterilization; C: Direct inoculation of NX11424.

为(15.90±0.14%)–(16.75±0.21%), 游离 SO₂ 质量浓度为(30.20±10.89)–(34.15±2.76) mg/L, 残糖质量浓度为(3.68±0.85)–(12.25±3.89) g/L, 总酸质量浓度为(6.80±0.00)–(6.90±0.00) g/L, pH 范围为(3.93±0.01)–(3.97±0.03), 挥发酸质量浓度为(0.31±0.09)–(0.40±0.01) g/L, 甘油质量浓度为(11.01±0.16)–(11.30±0.30) g/L, 各酒样理化指标属于正常范围。基于此, 利用 HS-SPME-GC-MS 技术对 3 个不同处理下赤霞珠葡萄酒的香气成分进行了定性定量分析。香气是判断葡萄酒品质的重要指标之一, 差异化的香气特征是不同的葡萄酒品质的重要表征。表 2 列出了香气成分的含量、阈值及香气特征。本研究中共定性并定量出 69 种香气成分, 主要包括 28 种酯类、25 种醇类、5 种有机酸、2 种萜烯类物质和 9 种其他类化合物。各处理间香气物质组成种类无明显差异, 但香气物质含量存在较大差异: 自然发酵最高, 灭菌接种发酵次之, 直接接种发酵最低。

酯类物质是葡萄酒香气中的重要组成部分, 主要在葡萄酒微生物发酵和陈酿过程中产生, 可以赋予葡萄酒愉悦的果香和花香, 对葡萄酒香气的形成起着至关重要的作用^[45]。本研究共检测出 28 种酯类物质, 多数酯类物质呈现出花香和果香(表 2), 大部分酯类物质的 OAV<1, 即不单独对葡萄酒风味产生突出贡献。其中, 棕榈酸乙酯、2-甲基丙酸乙酯等酯类物质含量在直接接种 NX11424 酵母的葡萄酒中显著高于自然发酵和灭菌接种发酵, 进一步增加了酒中苹果、菠萝、奶油等香气。

高级醇是酵母氨基酸代谢的副产物, 对葡萄酒香气产生重要的影响作用。高级醇的含量低于 300 mg/L 时可以增加葡萄酒香气的复杂性, 但当含量高于 400 mg/L 时会给葡萄酒带来刺激的气味^[11]。由表 2 可知, 苯乙醇、

表 2 不同处理下赤霞珠葡萄酒中香气物质的含量和气味活性值(OAV)分析

物质名称 Compound name	阈值 Threshold ($\mu\text{g/L}$) ^[7,26-44]	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)		香气特征 ^[7,26-44] Characterization ^[7,26-44]		气味活性值 Odor activity value (OAV)	
		自然发酵 Spontaneous fermentation	灭菌接种 Inoculation with NX11424 after grape sterilization	直接接种 Direct inoculation of NX11424	自然发酵 Spontaneous fermentation with NX11424 of after grape sterilization	灭菌接种 Inoculation with NX11424 after grape sterilization	直接接种 Direct inoculation
醇类 Alcohols							
丙醇 1-propanol	50 000	4 461.75±385.60a	5 410.14±826.75a	4 729.76±525.58a	清新醇香 Fresh, alcoholic 醇味, 草药 Alcoholic, herbal 淡甜味, 醇香 Mild sweet, alcoholic	0.09	0.11 0.09
正丁醇 1-butanol	150 000	4 579.73±76.77a	3 964.06±414.98b	3 551.27±169.53c	生土豆味, 蒜味 Raw potato, garlic 辛辣, 青草香 Pungent, herbal 威士忌, 香蕉 Whisky, banana	0.03	0.03 0.02
异丁醇 Isobutanol	75 000	93 579.94±8 396.56a	65 778.33±3 234.68b	92 243.93±8 616.54a	草本植物 Herbal	1.25	0.88 1.23
3-甲基-丙醇 Methionol	1 000	7 083.24±1 291.13a	5 831.19±567.36a	5 434.39±890.57a	辛辣, 青草香 Pungent, herbal	7.08	5.83 0.09
正戊醇 N-pentyl alcohol	1 000	84.78±10.06a	88.08±3.67a	93.15±9.66a	辛辣, 青草香 Pungent, herbal	0.08	0.09 0.09
异戊醇 Isopentanol	7 000	512 262.74± 30 286.59a	395 786.25± 31 393.46b	485 110.38± 46 835.43a	威士忌, 香蕉 Whisky, banana	73.18	56.54 69.30
正己醇 1-hexanol	8 000	2 006.81±127.42a	1 951.72±228.65a	2 052.69±165.04a	草本植物 Herbal	0.25	0.24 0.26
3-甲基-1-戊醇 3-methylpentanol	1 000	232.41±18.92b	263.19±22.51a	191.64±12.53c	辛辣, 青草香 Pungent, herbal	0.23	0.26 0.19
4-甲基-1-戊醇 4-methylpentanol	50 000	68.53±5.81a	67.63±2.45ab	61.89±1.44b	杏仁, 烤面包 Almond, bready	0.00	0.00 0.00
E-2-己烯-1-醇 (E)-2-hexen-1-ol	17	3.62±0.14a	4.38±0.33a	5.28±0.48a	青草味 Herbal	0.21	0.26 0.31
反-3-己烯醇 (E)-3-hexen-1-ol	1 000	47.24±4.81b	50.98±6.76b	59.31±4.55a	青草味, 脂香 Herbal, oil	0.05	0.05 0.06
正庚醇 1-heptanol	2 500	10.79±1.30b	14.78±1.26a	16.34±1.59a	生青, 甜味 Fresh cut grass, sweet	0.00	0.01 0.01

(待续)

(续表 2)									
2-庚醇	2 500	4.17±0.40a	3.39±0.48a	3.96±0.76a	柠檬, 柑橘	0.00	0.00	0.00	0.00
2-heptanol					Lemon, citrus				
苯甲醇	200 000	823.20±112.91a	601.33±165.53a	730.59±218.26a	果香, 烘烤	0.00	0.00	0.00	0.00
Benzyl alcohol					Fruity, bake				
正辛醇	900	7.08±0.60a	8.38±1.08a	8.58±1.84a	茉莉香, 柠檬味, 柑橘, 玫瑰味	0.01	0.01	0.01	0.01
1-octanol					Jasmine, lemon, citrus, rose				
3-辛醇	1	6.63±0.41a	6.58±1.35a	6.98±3.50a	蘑菇味道	6.63	6.58	6.98	6.98
1-octen-3-ol					Mushroom				
苯乙醇	1 400	172 651.68±39 503.91a	105 164.18±10 165.83b	150 745.05±24 889.76ab	玫瑰, 花粉香, 花香, 香水	123.32	75.12	107.68	107.68
Phenylethyl alcohol					Rose, pollen, floral, perfumy				
(Z)-6-壬烯-1-醇	-	5.76±1.00b	5.72±0.40b	8.23±0.85a	油脂, 甜瓜	-	-	-	-
(Z)-6-nonen-1-ol					Oil, melon				
1-壬醇	58	1.34±0.22a	1.31±0.14a	1.71±0.25a	玫瑰香味	0.02	0.02	0.03	0.03
1-nonanol					Rose flower				
2-壬基醇	120	1.32±0.03a	0.81±0.19b	1.09±0.35ab	柑橘香, 果香	0.01	0.01	0.01	0.01
2-nonanol					Citrus, fruity				
α -松油醇	250	3.81±0.5a	5.37±2.39a	4.01±2.89a	花香, 甜味, 蘑菇	0.02	0.02	0.02	0.02
α -terpineol					Floral, sweet, mushroom				
4-萜烯醇	5 000	0.8±0.06a	0.91±0.19a	0.97±0.21a	花香, 肉豆蔻	-	-	-	-
4-terpinenol					Floral, nutmeg				
香茅醇	40	3.94±0.44a	4.33±0.48a	3.88±0.32a	青草, 柠檬, 蔷薇, 丁花香	0.10	0.11	0.10	0.10
Citronellol					Herbal, rose, lemon, clove				
芳樟醇	6	2.23±0.12a	1.94±0.27a	2.11±0.33a	玫瑰, 荔枝, 花香, 麝香	0.37	0.32	0.35	0.35
Linalool					Rose, lychee, floral, muscat				

(待续)

		(续表 2)						
1-癸醇	400	2.30±0.13a	2.37±0.12a	2.46±0.06a	甜味, 果香, 花香	0.01	0.01	0.01
1-decanol					Sweet, fruity, floral			
乙酸乙酯	7500	152.144.46± 19.971.37a	128.886.41± 8.471.58a	138.943.36± 12.538.99a	果香	20.29	17.18	18.53
Ethyl acetate					Fruity			
乳酸乙酯	157.810	3.125.615.81± 123.348.04a	3.009.443.31±882 310.77a	1.852.697.06± 1.231.154.06a	优雅的果香	19.81	19.07	11.74
Ethyl lactate					Elegant fruity			
2-甲基丙酸乙酯	15	92.01±8.74b	66.29±3.51c	108.52±9.40a	成熟水果的香气	6.13	4.42	7.23
Ethyl isobutanoate					Ripe fruit			
乙酸异丁酯	40	72.01±4.72a	58.81±3.58a	75.22±14.49a	香蕉	1.80	1.47	1.88
Isobutyl acetate					Banana			
丁酸乙酯	35	328.67±33.43a	273.05±13.47a	322.95±34.61a	果香, 草莓, 青苹果	9.39	7.80	9.23
Ethyl butanoate					Fruity, strawberry, green apple			
2-甲基丁酸乙酯	18	24.14±2.51a	14.76±0.77b	21.44±1.37a	甜水果, 青苹果香	1.34	0.82	1.19
Ethyl 2-methylbutanoate					Sweet fruity, green apple			
3-甲基丁酸乙酯	3	39.3±3.7a	22.82±1.06c	32.15±3.59b	浆果, 黑莓	13.10	7.61	10.72
Ethyl 3-methylbutanoate					Berry, blackberry			
乙酸异戊酯	50	769.34±26.6c	1.042.22±69.47a	910.2±23.51b	香蕉味, 水果香气	15.39	20.84	18.20
Isoamyl acetate					Banana, fruity			
己酸甲酯	-	1.51±0.06a	1.02±0.12b	1.15±0.09b	乙醚的化学香气	-	-	-
Methyl hexanoate					Ether chemical			
己酸乙酯	14	296.62±17.5a	314.6±14.29a	336.63±49.99a	草莓, 青苹果	21.19	22.47	24.05
Ethyl hexanoate					Strawberry, green apple			
乙酸己酯	45	1.5±0.17a	2.04±0.43a	2.09±0.31a	苹果, 茴芹	0.03	0.05	0.05
Hexyl acetate					Apple, anise			
丁二酸二乙酯	15	7.550.52±289.26b	16.425.35±4.822.9a	8.311.66±2.336.96b	水果清香	503.37	1.095.02	554.11
(琥珀酸二乙酯)					Fruity			
Diethyl succinate								

(待续)

		(续表 2)						
庚酸乙酯	300	1.25±0.17a	1.28±0.16a	1.74±0.35a	菠萝, 香蕉	0.00	0.00	0.01
Ethyl heptanoate					Pineapple, banana,			
辛酸甲酯	200	0.96±0.06a	0.63±0.08b	0.74±0.14b	水果, 柑橘香,	0.00	0.00	0.00
Methyl octanoate					甜橙香			
苯甲酸乙酯	570	2.3±0.15ab	2.19±0.01b	2.47±0.14a	Fruity, citrus, sweet orange	0.00	0.00	0.00
Ethyl benzoate					淡水果味			
辛酸乙酯	600	337.89±24.15a	305.49±32.35a	333.83±80.65a	Sweet fruity	0.56	0.51	0.56
Ethyl octanoate					菠萝, 梨, 花香			
苯乙酸乙酯	250	4.64±0.51a	3.63±0.16b	4.15±0.21ab	Pineapple, pear, floral	0.02	0.01	0.02
Ethyl phenylacetate					蜂蜜, 花香			
乙酸苯乙酯	250	57.48±7.87a	39.77±2.89b	47.21±2.60b	Honey, floral	0.23	0.16	0.19
Phenethyl acetate					玫瑰, 茉莉花, 蜂蜜			
9-乙基癸烯酸乙酯	100	6.02±0.62b	11.3±1.02a	11.94±0.54a	Rose, jasmine, honey	0.06	0.11	0.12
Ethyl 9-decenoate					温柏果香			
己酸异戊酯	200	0.42±0.04ab	0.37±0.03b	0.49±0.08a	Quince	0.00	0.00	0.00
Isoamyl hexanoate					香蕉, 果香			
壬酸乙酯	13 000	1.23±0.18a	0.85±0.11b	1.46±0.23a	Banana, fruity	0.00	0.00	0.00
Ethyl nonanoate					玫瑰花香, 果香			
2-羟基-4-甲基戊酸乙酯	39	131.64±18.23a	67.74±9.75b	74.44±13.56b	Rose flower, fruity	-	-	-
Ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate					-			
癸酸乙酯	125	1.09±0.10a	1.14±0.08a	1.24±0.09a	脂肪香, 果香	1.51	1.52	1.84
Ethyl decanoate					Fatty, fruity			
辛酸异戊酯	125	1.09±0.10a	1.14±0.08a	1.24±0.09a	花香, 果香, 奶油	0.01	0.01	0.01
Isoamyl octanoate					Floral, fruity, cream			

(待续)

		(续表2)					
月桂酸乙酯	1 500	8.36±2.51b	12.19±1.07a	13.99±1.41a	花香, 果香, 奶酪 Floral, fruity, cheesy	0.01	0.01
Ethyl dodecanoate							
癸酸异戊酯	3 000	0.59±0.12a	0.61±0.04a	0.74±0.06a	玫瑰花香 Rose flower	0.00	0.00
Isopentyl decanoate							
肉豆蔻酸乙酯	2 000	4.31±1.48b	4.44±0.78b	7.54±1.08a	鸢尾花, 紫罗兰 Iris, violet	0.00	0.00
Ethyl tetradecanoate							
棕榈酸乙酯	1.5	154.56±117.05b	168.76±34.34b	407.94±52.74a	苹果, 菠萝味, 奶油, 蜡香 Apple, pineapple, cream, waxy	103.04	112.51
Ethyl hexadecanoate							
乙酸(g/L)	200 000	0.89±0.04a	0.73±0.16a	0.89±0.12a	醋酸味 Vinegar	0.00	0.00
Acetic acid (g/L)							
异戊烷酸	61	1 803.78±99.73a	1 068.43±121.42b	1 780.57±244.26a	-	29.57	29.19
Isopentanoic acid							
己酸	420	1 266.33±343.4a	1 178.05±141.22a	1 432.66±265.97a	奶酪, 腐臭 Cheese, rancid	3.02	2.80
Hexanoic acid							
辛酸	500	670.32±294.84a	633.66±63.38a	715.68±118.33a	奶酪味, 涩味 Cheese, astringent	1.34	1.27
Octanoic acid							
正癸酸	1 000	133.72±20.63a	127.90±15.87a	137.30±9.29a	酸腐味, 脂肪味 Rancid, fatty	0.13	0.13
N-decanoic acid							
萜烯类	100	1.03±0.37b	1.74±0.05a	1.07±0.09b	汽油, 矿物质 Gasoline, mineral substance	0.01	0.01
Terpenols Styrene							
萜品油烯	200	712.78±73.09b	816.65±82.18ab	877.76±52.68a	新鲜, 木质, 甜味, 松木 Fresh, woody, sweet, pine	3.56	4.08
Terpinolene							
其他化 合物	-	0.72±0.04b	0.59±0.03b	0.9±0.10a	-	-	-
4-异丙基甲苯							
P-cymene							
Iscellane- ous	14 100	424.37±63.61a	214.22±107.96b	250.44±23.45b	焦糖, 木质, 烤面包 Caramel, woody, bready	0.03	0.02
Furfural							

(待续)

(续表 2)								
苯甲醛	2 000	5.07±0.60a	3.96±0.43a	4.03±0.90a	杏仁	0.00	0.00	0.00
Benzaldehyde					Almond			
苯乙醛	5	48.15±8.55a	31.81±2.53b	40.93±5.06ab	玫瑰花香, 风信子香, 9.63 蜂蜜, 水果香味	6.36	8.19	8.19
Phenylacetaldehyde					Rose, hyacinthu, honey, fruity			
β-大马士酮	6	4.49±0.48a	4.15±0.46a	4.39±0.25 a	水果罐头, 干杏	0.69	0.73	0.73
β-damascenone					Tinned fruit, almond			
愈创木酚	9.5	3.5±0.64a	2.5±0.25b	3.68±0.42a	酚类气味	0.26	0.39	0.39
Guaiacol					Phenolic			
苯酚	25 000	30.28±3.90a	19.09±0.92b	22.48±1.72b	香料, 试剂味	0.00	0.00	0.00
Phenol					Spices, reagent			
4-乙基苯酚	440	1.95±0.10a	1.66±0.01b	1.7±0.02b	葡萄汁味	0.00	0.00	0.00
4-ethylphenol					Grape juice			
3-乙基苯酚	-	1.72±0.05a	1.57±0.01b	1.58±0.00b	-	-	-	-
3-ethylphenol								

注: 同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); -: 未查阅到相关资料

Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences ($P<0.05$); -: No related information is available.

3-甲硫基-丙醇、异戊醇等是影响葡萄酒香气的主要高级醇(OAV>1), 给葡萄酒带来青草、醇香、玫瑰等花香, 该类物质的含量在直接接种发酵和自然发酵中不存在显著性差异($P<0.05$), 但明显高于灭菌接种发酵中高级醇类物质的含量, 说明直接接种 NX11424 酵母可通过与其他野生酵母间的互作, 促进葡萄酒香气的表达, 使葡萄酒与自然发酵有更相似的风味特征。

酸类化合物可以增加葡萄酒中黄油、奶酪等特征风味, 但酸类物质浓度过高也会使葡萄酒产生“汗臭味”和“脂肪味”等不良气味。本研究表明, 直接接种发酵可以增加葡萄酒中酸类化合物的含量, 但各组别间差异不显著。

萜烯类物质具有浓郁的香味且感官阈值较低, 由表 2 可知, 本实验共检测到的 2 种萜烯类物质分别是苯乙烯和萜品油烯, 具有甜味和松木等香气^[26-27]; 直接接种发酵中的萜品油烯含量显著高于自然发酵和灭菌接种发酵, 为葡萄酒带来了甜味和松木等香气。

利用 R 软件对 3 个不同发酵处理的赤霞珠葡萄酒中香气成分进行热图聚类分析, 依据赤霞珠葡萄酒中香气成分在 3 个不同发酵处理中的质量浓度进行划分, 探究不同发酵处理下赤霞珠葡萄酒中主要香气成分间差异。由图 3 可知, 69 种香气成分被聚为 3 类。

第 1 类香气成分包括香茅醇、丙醇、 α -松油醇等 9 种物质, 其中香茅醇、丙醇、 α -松油醇、丁二酸二乙酯(琥珀酸二乙酯)、苯乙烯、3-甲基-1-戊醇、乙酸己酯 7 种物质含量在灭菌接种发酵中较高。其香气成分主要表现为清新醇香。灭菌接种发酵处理方式虽然保证了葡萄酒发酵过程的稳定性, 但抑制了葡萄酒挥发性物质的生成, 导致葡萄酒中挥发性物质含量普遍减少, 部分香气物质含量低于阈值(表 2), 而且难以感知。

第 2 类香气成分含量在直接接种发酵中较高, 包括己酸乙酯、棕榈酸乙酯、正庚醇等 31 种香气物质, 其香气成分主要表现为馥郁的花香、浓郁的果香气味(成熟水果、淡水果、甜水果的香气)、草本植物和脂肪的香气等, 增加了葡萄酒香气的复杂性、多样性和愉悦性。研究表明, 葡萄酒中微量特征香气成分是构成不同葡萄酒香气和风格的重要因素^[44,46]。本研究中, 直接接种发酵虽然香气物质总含量较低, 但发酵中形成的酯类香气物质含量多。其中, 反-3-己烯醇、(Z)-6-壬烯-1-醇、2-甲基丙酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯的含量显著高于自然发酵和灭菌接种发酵(表 2), 尤其是其中微量特征香气成分棕榈酸乙酯显著高于自然发酵和灭菌接种发酵, 香气阈值非常低, 其含量是其香气阈值的 272 倍, 给葡萄酒带来了奶油和甜果的香气, 该微量特征香气成分是造成 3 种不同发酵处理下赤霞珠葡萄酒香气差异的重要因素。此外, 正丁醇、3-甲基-1-戊醇等具有不良风味的挥发性物质含量在直接接种发酵中显著低于自然发酵和灭菌接种发酵(表 2), 直接接种发酵方式利于赤霞珠葡萄酒中水果香气特征的形成, 抑制了葡萄酒中不良风味的产生。Ellena 等研究表明, 将不同酵母菌株组合在一起进行混合发酵可以有效地改变葡萄酒挥发性物质成分和感官特征^[47]。葡萄酒发酵中, 接种的酵母与其他本土酵母在发酵中的相互作用与葡萄酒质量的关系值得深入研究。

第 3 类香气成分在自然发酵中含量较高, 包括正丁醇、乳酸乙酯、丁酸乙酯等 29 种物质(图 3)。其中正丁醇、丁酸乙酯、苯甲醛、3-乙基苯酚、2-羟基-4-甲基戊酸乙酯、己酸甲酯、辛酸甲酯、苯酚等 27 种物质相对含量显著高于灭菌接种发酵和直接接种发酵。其香气成分主要表现为丰富的花香(玫瑰、风信子)、果香

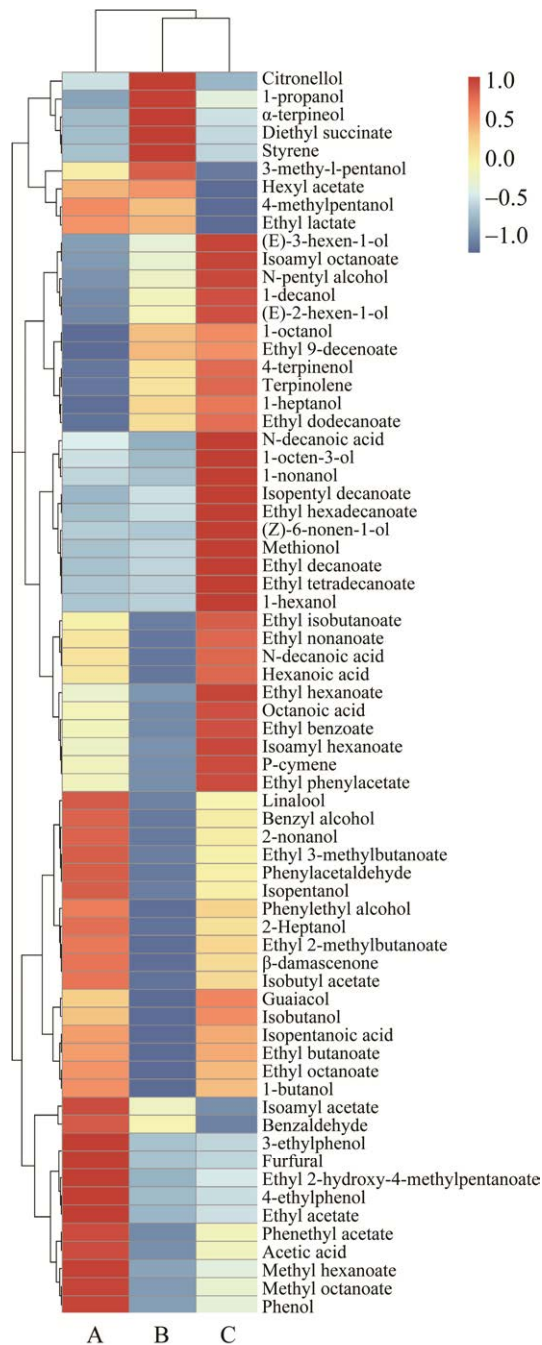


图 3 三种发酵处理下赤霞珠葡萄酒中香气成分热图聚类分析 A: 自然发酵; B: 灭菌接种发酵; C: 直接接种发酵

Figure 3 Clustering analysis of aroma components in Cabernet Sauvignon wine under three treatments by heat map. A: Spontaneous fermentation; B: Inoculation with NX11424 after grape sterilization; C: Direct inoculation of NX11424.

(荔枝、柑橘、樱桃、草莓、黑莓、青苹果等)及麝香和坚果香等。这可能是由于丰富的本土酵母菌资源使自然发酵中挥发性物质含量增高^[8-10]。研究表明,葡萄酒中香气物质的生成是 *S. cerevisiae* 与非酿酒酵母协同作用下产生的,葡萄汁有孢汉逊酵母在葡萄酒发酵过程中具有增香酿造的潜力,在葡萄酒风味的形成上起到了重要作用等^[48-49]。本研究中,葡萄汁有孢汉逊酵母在自然发酵中的占比显著高于其他 2 个发酵处理,该酵母在葡萄酒整体香气形成中的作用有待深入研究。

3 讨论与结论

赤霞珠是我国葡萄酒产区酿酒葡萄的主栽品种,目前多数企业都以生产干红为主,造成了我国赤霞珠葡萄酒同质化现象严重,而酿酒葡萄品种、接种酵母、酿造工艺等因素的差异化均对葡萄酒品质及葡萄酒风味的多样性造成影响^[50]。因此,打造具有产区特色的优质葡萄酒,对我国后续开发和酿造具有中国本土风土特色的葡萄酒具有重要意义。本文对本土优选酵母菌 NX11424 发酵的赤霞珠葡萄酒在发酵过程中的酵母群落演替与香气特征进行了全面研究,结果表明,直接接种 NX11424 与发酵中的其他本土酵母相互作用,使贺兰山东麓赤霞珠葡萄酒具有浓郁水果香气特征。总而言之,充分开发利用本土酵母资源,合理运用混菌发酵,降低发酵过程中的不可控因素,优选本土酵母混菌,提升本土葡萄酒产区特色,仍是有效解决当前葡萄酒同质化问题的手段之一^[8]。

葡萄酒的发酵过程涉及不同酵母、种之间的相互作用,监控酵母菌在发酵过程中的动态变化以及不同酵母间的相互作用,是有效调节葡萄酒风味的必要手段。本研究设置 3 个不同的发酵处理,通过利用 26S rDNA 基因 D1/D2

区测序分析法鉴定发酵过程中酵母菌的种类,并通过顶空固相微萃取和气相色谱-质谱联用技术定量测定不同发酵处理下赤霞珠葡萄酒的香气成分及含量。研究表明,接种发酵中的酵母菌多样性低于自然发酵,与何荣荣等研究结果一致^[4]。张文静等^[10]研究表明,本土酵母混菌发酵可以提高葡萄酒风味的复杂性和果香性,如 *Pichia kluyveri* 和 *S. cerevisiae* 的混合发酵,能够最大限度地发挥 *P. kluyveri* 的产香特性,显著提高发酵酒样中的酯类物质等含量,使葡萄酒的果香和花香显著增强^[6];研究表明,本土酵母与发酵中的其他酵母间的相互作用可以增强特定地区葡萄酒发酵香气及复杂性,生产出具有产区特色葡萄酒^[10,51-52]。例如,萨伦托地区生产的葡萄酒挥发性特征与用于发酵过程的酵母地理来源密切相关,证实了“区域特定”酵母在增强区域产品识别标志及酿造产区特色方面的潜力^[52]。本研究中,NX11424 酿造的葡萄酒果香和花香突出,同时具有宁夏地区赤霞珠葡萄酒的典型芳香特征^[53]。灭菌接种发酵的处理方式会导致葡萄酒香气和种类无突出特色,虽然自然发酵的葡萄酒具有特殊的风土,但发酵过程中容易受到不稳定因素的影响,如产区特性不明显、酒精耐受度不高、发酵不完全等因素;而直接接种 NX11424 发酵的赤霞珠葡萄酒通过接种本土酵母可以稳定发酵过程,保留住本土特色,还可以改善葡萄酒中的水果香气特征。其中,部分酯类物质含量显著高于自然发酵和灭菌接种发酵,增加葡萄酒香气的复杂性、多样性和愉悦性,醇类物质含量明显高于灭菌发酵,使葡萄酒与自然发酵有更相似的风味特征,这与之前的研究结果^[53]相似。本研究结果表明,直接接种本土酵母 NX11424 在产区特色葡萄酒酿造工业中具有应用潜力。

此外,利用本土酵母资源发酵,对葡萄酒的

表现力及风土的融合在国内外也有报道^[6,8-10,51-53]。本研究结果表明,直接接种本土酵母 NX11424 在葡萄酒酿造过程中可使果香和花香突出,同时,NX11424 酿造的葡萄酒具有宁夏地区赤霞珠葡萄酒的典型芳香特征^[53],因此,NX11424 在酿造具有鲜明区域特质葡萄酒工业生产中具有较大的应用潜力。虽然也有其他研究表明本土酵母与发酵中的其他酵母间的相互作用可以增强葡萄酒发酵香气及复杂性,生产出产区特色葡萄酒^[8,53],但不同发酵处理中香气成分含量变化是否与不同酵母菌的种类及丰度有关,以及微生物群落间的相互作用关系与 NX11424 发酵的赤霞珠葡萄酒中水果香气的形成机制也有待进一步研究。本研究可为我国优良本土酵母的选育及风格多样化的葡萄酒酿造提供理论指导和技术支持。

REFERENCES

- [1] Spencer J, Spencer A, Laluce C. Non-conventional yeasts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(2): 147-156
- [2] 张红梅, 郭俊艳, 于莲波, 朱立红. 葡萄酒生产及对微生物的控制[J]. 食品工业, 2003, 24(04): 27-28
Zhang HM, Guo JY, Yu LB, Zhu LH. Wine production and control of microorganisms[J]. Food Industry, 2003, 24(04): 27-28 (in Chinese)
- [3] Maurizio C, Angela C, Francesca C, Laura C, Gabriella S, Patrizia R. Yeast interactions in inoculated wine fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 555
- [4] 何荣荣, 彭婧, 孙悦. 接种发酵和自然发酵中酿酒酵母菌株多样性比较[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1211-1221
He RR, Pen J, Sun Y. Yeasts diversity of inoculated and spontaneous fermentations[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1211-1221 (in Chinese)
- [5] Suzzi G, Arfelli G, Schirone M, Corsetti A, Perpetuini G, Tofalo R. Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d'Abruzzo red wine quality[J]. Food Research International, 2012, 46(1): 22-29
- [6] 宋茹茹, 段卫朋, 祝霞, 刘琦, 杨学山, 韩舜愈. 戴尔有孢圆酵母与酿酒酵母顺序接种发酵对干红葡萄酒香

- 气的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(24): 1-9
- Song RR, Duan WP, Zhu X, Liu Q, Yang XS, Han SY. Effects of sequential inoculation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on aroma profile of dry red wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(24): 1-9 (in Chinese)
- [7] Bageri B, Bauer FF, Setail ME. The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1988
- [8] Padilla B, Zulian L, Fereres A, Pastor R, Estveet-Zarzoso B, Beltran G, Mas A. Sequential inoculation of native non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* strains for wine making[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1293
- [9] 阎贺静, 时月, 刘畅, 赵琳琳. 玫瑰香干红葡萄酒自然发酵过程中优势酵母分离鉴定及其应用潜力分析[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 117-124
- Yan HJ, Shi Y, Liu C, Zhao LL. Screening, identification and potential use of indigenous yeasts from muscat wine spontaneous fermentation[J]. Food Science, 2017, 38(22): 117-124 (in Chinese)
- [10] 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 YY. 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)
- [11] Liu PT, Lu L, Duan CH, Yan GL. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation[J]. Food Science and Technology, 2016, 71: 356-363
- [12] Pallmann CL, Brown JA, Olineka TL, Cocolin L, Mills DA, Bisson LF. Use of w1 medium to profile native flora fermentations[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52(3): 198-203
- [13] 蒋文鸿, 严斌, 陶永胜. 昌黎赤霞珠葡萄相关酿酒酵母的分离与筛选[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 202-206, 209
- Jiang WH, Yan B, Tao YS. Isolation and screening of *Saccharomyces cerevisiae* from grape harvested in changli[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(12): 202-206, 209 (in Chinese)
- [14] GB 4789.2—2016, 食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- GB 4789.2—2016, National Food Safety Standard Food Microbiological Examination Determination of Total Colony[S]. Beijing: China Standard Press, 2016 (in Chinese)
- [15] Eva V, Brigitte C, Dorit S, Margarida C, Sylvie D. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts[J]. FEMS Yeast Research, 2007, 7(2): 317-329
- [16] 王泽举, 刘延琳, 刘爱国, 韩娜. 新疆葡萄酒自然发酵过程酵母菌的种类和动态变化[J]. 华中农业大学学报, 2008(5): 664-667
- Wang ZJ, Liu YL, Liu AG, Han N. Survey on yeast population dynamics during wine spontaneous fermentation in xinjiang[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008(5): 664-667 (in Chinese)
- [17] Tofalo R, Perpetuini G, Fasoli G, Schirone M, Corsetti A, Suzzi G. Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns[J]. Food Microbiology, 2014, 39(1): 7-12
- [18] GB/T 15038—2006, 葡萄酒、果酒通用分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006
- GB/T 15038-2006, General analysis method for wine and fruit wine[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006 (in Chinese)
- [19] Cai J, Zhu BQ, Wang YH, Lu L, Lan YB, Reeves MJ, Duan CQ. Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters[J]. Food Chemistry, 2014, 154: 217-229
- [20] Lan YB, Xiang XF, Qian X, Wang JM., Liu T, Sun LB, Shi Y, Reynolds AG. Duan CQ. Characterization and differentiation of key odor-active compounds of ‘Beibinghong’ icewine and dry wine by gas chromatography-olfactometry and aroma reconstitution[J]. Food Chemistry, 2019, 287: 186-196
- [21] 郭静娴, 谢涵, 华玉波, 石英, 吴广枫, 段长青, 兰义宾. 不同酵母对赤霞珠桃红葡萄酒香气的影响[J]. 中国酿造, 2021, 40(4): 50-55
- Guo JX, Xie H, Hua YB, Shi Y, Wu GF, Duan CQ, Lan YB. Effect of different yeast strains on aroma compounds in fresh Cabernet Sauvignon rose wine[J]. China Brewing, 2021, 40(4): 50-55 (in Chinese)
- [22] Zhu JC, Niu YW, Xiao ZB. Characterization of the key aroma compounds in laoshan green teas by application of odour activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry (GC-MS-O) and comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry (GC×GC-qMS)[J]. Food Chemistry, 2021, 339, 128136

- [23] Sun Y, Qin Y, Peil YF, Wang G, Joseph CML, Bisson LF, Liu YL. Evaluation of chinese *Saccharomyces cerevisiae* wine strains from different geographical origins[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2017, 68(1): 73-80
- [24] Wang CX, Wu C, Qiu SY. Yeast diversity investigation of *vitis davidii* f6ex during spontaneous fermentations using culture-dependent and high-throughput sequencing approaches[J]. Food Research International, 2019, 126: 108582
- [25] Francesca C, Mirko G, Paola D, Cristina R, Livio L, Ilaria Maurizio C. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 873-882
- [26] 段丽丽, 姜良珍, 何莲, 田怡, 王淑雅, 杨晓仪, 易宇文. 气相色谱-质谱法分析酒花对葡萄酒香气成分的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(13): 176-183
- Duan LL, Jiang LZ, He L, Tian Y, Wang SY, Yang XY, Yi YW. Analysis of the effect of hops on the aromatic components in grape wine by GC-MS[J]. Food Research and Development, 2020, 41(13): 176-183 (in Chinese)
- [27] 段雪荣, 陶永胜, 杨雪峰, 兰圆圆, 徐川. 不同成熟度赤霞珠葡萄所酿酒香气质量分析[J]. 中国食品学报, 2012, 12(11): 9
- Duan XR, Tao YS, Yang XF, Lan YY, Xu C. Aroma quality analysis of wines from Cabernet Sauvignon grapes with different maturities[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(11): 9 (in Chinese)
- [28] Vararu F, Moreno-garcia J, Zamfir CL, Cotea VV, Moreno J. Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting musts with starter cultures of commercial yeast strains[J]. Food Chemistry, 2016, 197(Pt A): 373-381
- [29] Englezos V, Torchio F, Cravero F, Marengo F, Giacosa S, Gerbi V, Rantsiou K, Rolle L, Coccolin L. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 73: 567-575
- [30] 唐国冬, 廖欣怡, 郑雅轩, 陶永胜, 杨继红. 低温对赤霞珠葡萄酒香气和单体酚含量的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 48-54
- Tang GD, Liao XY, Zheng YX, Tao YX, Yang JH. Effect of cryogenic treatment on aroma compounds and monophenols in Cabernet Sauvignon grape[J]. Food Science, 2017, 38(20): 48-54 (in Chinese)
- [31] Lukic L, Radeka S, Grozaj N, Staver M, Persuric D. Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest[J]. Food Chemistry, 2016, 196(APR.1): 1048-1057
- [32] 王华, 李华, 刘拉平, 张莉, 王贞强. 菠萝果酒香气成分的 GC-MS 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(4): 144-146
- Wang H, Li H, Liu LP, Zhang L, Wang ZQ. Analysis of aroma components of pineapple wine by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Northwest University: Natural Science Edition, 2005, 33(4): 144-146 (in Chinese)
- [33] 赵昊, 王雪薇, 宋晶晶, 王伟雄, 武运, 薛洁. 不同品种葡萄酒香气特征及成分分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2020(6): 28-33
- Zhao H, Wang XW, Song JJ, Wang XW, Wu Y, Xue J. Analysis of aroma components of different variety wines[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2020(6): 28-33 (in Chinese)
- [34] Jiang B, Xi Z, Luo M, Zhang Z. Comparison on aroma compounds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China [J]. Food Research International, 2013, 51(2): 482-489
- [35] Loueds M, Luis Z, Juan M, Manuel M. Analytical study of aromatic series in sherry wines subjected to biological aging[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7356-7361
- [36] Juan JR-B, Hector MC-V, Juan PP-T, Jian C. Bound aroma compounds of gual and listan blanco grape varieties and their influence in the elaborated wines[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1153-1162
- [37] Noguero-pato R, Gonzalez-barreiro C, Cancho-grande B, Santiago JL, Martinez MC. Aroma potential of brancellao grapes from different cluster positions[J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 112-124
- [38] Cullere L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(6): 1653-1660
- [39] Wang XC, Li AH, Dizey M, Ullah N, Sun WX, Tao YS. Evaluation of aroma enhancement for "Ecolly" dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Chemistry, 2017, 228(AUG.1): 550-559
- [40] Wang XJ, Tao YS, Wu Y, An RY, Yue ZY. Aroma compounds and characteristics of noble-rot wines of Chardonnay grapes artificially botrytized in the vineyard[J]. Food Chemistry, 2017(JUL.1), 226: 41-50

- [41] Guth H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(8): 3027-3032
- [42] 左俊伟, 亓相媛, 赵彩云, 张军翔, 薛洁. 宁夏贺兰山东麓产区霞多丽、贵人香干白葡萄酒香气成分分析[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(10): 149-155
Zuo JW, Qi XY, Zhao CY, Zhang JX, Xue J. Analysis on aroma composition in chardonnay and riesling dry white wines from eastern region of ningxia hlean mountain[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(10): 149-155 (in Chinese)
- [43] 陶永胜, 彭传涛. 中国霞多丽干白葡萄酒香气特征与成分关联分析[J]. *农业机械学报*, 2012, 43(3): 130-139
Tao YS, Pen CT. Correlation analysis of aroma characters and volatiles in chardonnay dry white winea from five districts in china[J]. *Transactions of The Chinese Society of Agricultural Machinery*, 2012, 43(3): 130-139 (in Chinese)
- [44] 李艳霞. 三种干红葡萄酒中香气成分的分析[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2006
Li YX. Analysis of aroma components in dry red wine fermented with three species[D]. Beijing: Master's Thesis of China Agricultural University, 2006 (in Chinese)
- [45] Maria C, Maria FC, Paz O, Raquel AN, Paula GO, Miguel AP, Jesus SG. Secondary aroma: influence of wine microorganisms in their aroma profile[J]. *Foods*. 2021, 10(1): 51
- [46] 李景明, 于静, 吴继红, 葛毅强. 不同酵母发酵的赤霞珠干红葡萄酒香气成分研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(2): 185-189
Li JM, Yu J, Wu JH, Ge YQ. Study on aromatic components of Cabernet Sauvignon dry red wine fermented with different species of yeast strains[J]. *Food Science*, 2009, 30(2): 185-189 (in Chinese)
- [47] Ellena SK, Jan H, Travis B, Francia IL, Susan EP, Pretorius LS. Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. *sauvignon blanc* wines[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(22): 10829-10837
- [48] Mohand S, Raphaelle TM, Sandrine R, Damien S, Joan-josep GC, Jordi B, Stefania V, Remi GS, Josep C, Herve A. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts[J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(2): 243-253
- [49] 陶永胜, 朱晓琳, 马得草, 胡凯, 彭传涛. 葡萄汁有孢汉逊酵母糖苷酶增香酿造葡萄酒的潜力分析[J]. *农业机械学报*, 2016, 47(10): 280-286
Tao YS, Zhu XL, Ma DC, Hu K, Pen CT. Application of glycosidase from *Hanseniaspora uvarvm* on wine aroma enhancement[J]. *Transactions of The Chinese Society of Agricultural Machinery*, 2016, 47(10): 280-286 (in Chinese)
- [50] 赵雪平, 郑海武, 雷蕾, 李婷, 张美枝, 李正英. 本土酿酒酵母发酵梅鹿辄干红动态变化研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(8): 105-110
Zhao XP, Zhen HW, Lei L, Li T, Zhang MZ, Li ZY. Study on the dynamic change of merlot red fermented by local *saccharomyces cerevisiae*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(8): 105-110 (in Chinese)
- [51] Maria T, Maria AC, Franceso G, Carla P, Simonetta C, Patrizia R, Mariana T, Giovanni M, Francesco G. Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamaro wines[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 58(1): 35-48
- [52] Zhang B, Tang C, Yang D, Liu H, Xue J, Duan C, Yan G. Effects of three indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and their pairwise combinations in cofermentation with *Saccharomyces cerevisiae* on volatile compounds of Petit Manseng wines[J]. *Food Chemistry*, 2022. 368, 130807
- [53] Liu N, Qin Y, Song YY, Tao YS, Sun Y, Liu YL. Aroma composition and sensory quality of cabernet sauvignon wines fermented by indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains in the eastern base of the helan mountain, china[J]. *International Journal of Food Properties*, 2016. 19(11), 2417-2431