

宁夏贺兰山东麓葡萄酒酵母菌的筛选及应用

周桂珍^{1,2}, 杨伟明³, 杨建兴⁴, 徐佳敏^{1,2}, 周婷^{1,2}, 申鹏森^{1,2}, 田晓菊^{*1,2}

1 宁夏大学食品与葡萄酒学院, 宁夏 银川 750021

2 宁夏食品微生物应用技术与安全控制重点实验室, 宁夏 银川 750021

3 宁夏志辉源石葡萄酒庄有限公司, 宁夏 银川 750021

4 宁夏食品检测研究院(国家市场监管枸杞及葡萄酒质量安全重点实验室), 宁夏 银川 750000

周桂珍, 杨伟明, 杨建兴, 徐佳敏, 周婷, 申鹏森, 田晓菊. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒酵母菌的筛选及应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 553-572.

ZHOU Guizhen, YANG Weiming, YANG Jianxing, XU Jiamin, ZHOU Ting, SHEN Pengsen, TIAN Xiaojie. Screening and application of wine yeasts at the eastern foot of Helan Mountain in Ningxia Hui Autonomous Region[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 553-572.

摘要:【背景】宁夏贺兰山东麓是中国生态最佳、酿酒葡萄质量最优产区之一, 也是中国“葡萄酒地理标志产品”保护区域之一。【目的】筛选宁夏本土优良酵母菌株, 比较分析各个酿酒酵母菌株对赤霞珠葡萄酒香气质量的影响, 并结合感官评价筛选对葡萄酒风味影响较大的酿酒酵母菌株。

【方法】将筛选出的 11 株起酵速度快, 而且对高浓度酒精、SO₂ 和葡萄糖及低酸环境有较强耐受力的酵母菌株进行 26S rDNA 鉴定, 确定酵母种类。不同酿酒酵母发酵的赤霞珠葡萄酒通过顶空固相微萃取和气相色谱-质谱联用技术测定其香气化合物。【结果】筛选出 11 株可在 15%酒精度、500 g/L 葡萄糖、350 mg/L SO₂ 和 pH 3.0 环境下生长的酵母菌株, 对其进行 26S rDNA 鉴定, 确定 10 株酵母菌株 H5、G9、G3、X8、G14、L10、H3、X11、Z17、Z24 为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 一株酵母菌 L1 为发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*)。测定的所有香气化合物中, 酯类物质是赤霞珠葡萄酒香气物质的主要组分, 其次是醇类。其中, 乙酸乙酯、乙酸异戊酯、正己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、1-辛烯-3-醇和 β-大马士酮等的香气活性值较高, 对赤霞珠葡萄酒的香气贡献最大, 赋予葡萄酒苹果味、香蕉味、蘑菇味、茴香味、甜味等令人愉快的气味。对不同酿酒酵母赤霞珠葡萄酒样香气物质进行聚类分析发现, 酒样 G14 和 H3 与商业酵母 XR 最为接近, 在对赤霞珠葡萄酒特征香气影响方面较一致。【结论】酿酒酵母 G14 和 H3 具有良好的酿酒潜力, 可以作为本土优良酵母用于葡萄酒发酵, 为提高宁夏地区葡萄酒质量奠定基础。

关键词: 优良酵母菌; 赤霞珠葡萄酒; 香气化合物

资助项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2020BFH02006)

This work was supported by the Key Research and Development Project of Ningxia Hui Autonomous Region (2020BFH02006).

*Corresponding author. E-mail: txj_552@163.com

Received: 2022-05-12; Accepted: 2022-06-16; Published online: 2022-11-17

Screening and application of wine yeasts at the eastern foot of Helan Mountain in Ningxia Hui Autonomous Region

ZHOU Guizhen^{1,2}, YANG Weiming³, YANG Jianxing⁴, XU Jiamin^{1,2}, ZHOU Ting^{1,2}, SHEN Pengsen^{1,2}, TIAN Xiaoju^{*1,2}

1 School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 Ningxia Key Laboratory for Food Microbial-Applications Technology and Safety Control, Yinchuan 750021, Ningxia, China

3 Ningxia Zhihuiyuanshi Chateau Co., Ltd., Yinchuan 750021, Ningxia, China

4 Ningxia Food Testing and Research Institute (Key Laboratory of Quality and Safety of Wolfberry and Wine for State Administration for Market Regulation), Yinchuan 750000, Ningxia, China

Abstract: [Background] The eastern foot of Helan Mountain in Ningxia was once regarded as the “golden zone” for wine grape growth and thus boasts high-quality wine. Wine produced in this area got the tile of geographical indication product and therefore this area was included in the protection catalogue for the product. **[Objective]** To screen excellent native yeast strains in Ningxia, compare and analyze the influence of each *Saccharomyces cerevisiae* strain on the aroma quality of Cabernet Sauvignon, and select strains with great influence on wine flavor according to sensory evaluation. **[Methods]** The 26S rDNA sequencing was performed on the 11 selected strains which featured rapid fermentation at the early stage and strong tolerance to high alcohol concentration, SO₂, glucose, and low acid environment for identification. The aroma compounds of Cabernet Sauvignon fermented by different strains were determined by head space-solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **[Results]** Eleven yeast strains which were tolerant to 15% alcohol, 500 g/L glucose, 350 mg/L SO₂, and pH 3.0 were screened out, among which 10 (H5, G9, G3, X8, G14, L10, H3, X11, Z17, and Z24) were identified as *S. cerevisiae* and one (L1) was *Pichia fermentans*. Esters were the main aroma compounds of Cabernet Sauvignon, followed by alcohols. Among them, ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, 1-octene-3-alcohol and β -damascone had high odor activity values and contributed the most to the aroma of Cabernet Sauvignon, endowing the wine with pleasant apple aroma, banana aroma, mushroom aroma, anise aroma, and sweetness. Cluster analysis of aroma components of Cabernet Sauvignon samples fermented with different *S. cerevisiae* stains revealed that the wine samples fermented with G14 and H3 were the closest to the wine fermented with the commercial yeast XR and the three showed consistent influence on the characteristic aromas of Cabernet Sauvignon. **[Conclusion]** *S. cerevisiae* G14 and H3 have huge potential for brewing, particularly for wine fermentation, which can help improve the quality of wine in Ningxia.

Keywords: excellent yeasts; Cabernet Sauvignon wine; aroma compounds

自然界中广泛分布着天然土著葡萄酒相关酵母菌,主要分布在含糖偏酸性环境中,如水果、蔬菜的表面和果园的土壤中等,不同地区、不同生态环境均可筛选出具有本土特色的优良酵母菌^[1]。优良天然酵母的筛选需经过抗性评价,并比较发酵和产香能力,才能用于酿造具有产地特色的名酒。评价优良酿酒酵母菌株的主要标准是生长速率快和较高浓度葡萄糖、SO₂的耐受性,此外还应该具备较高的酒精转化率、较好的发酵稳定性和能够发酵完全等特性^[2]。在实际生产中,酵母菌株应具有以下特点:生长温度最适范围为10–30 °C, pH 最适范围为3.2–5.4,可以耐受12%–20% (体积分数)的酒精、20%–50%的糖和50–300 mg/L的SO₂等,并且能够发酵生成10%–17.5% (体积分数)的酒精度^[3]。

近几十年,国内外许多专家通过筛选优良酵母并研究其特性,甚至对优良酵母菌进行改良,筛选培育出能够满足消费者口味的特色菌株,逐渐用于葡萄酒生产中,以提高酒的特色和整体风味,并明显改善酒的风味特征。雷静等^[4]从无核白葡萄自然发酵液中筛选出一株产香较好的酵母菌株,该菌株能明显地提高葡萄酒的总酯含量。王红等^[5]选育出的优良酵母 WHH-1、WHH-4、Y-6 和 ZYFJQ 发酵力高、抗性强、产香好,有望在酒精生产、香味物质生产、葡萄酒酿造等领域广泛应用。宫雪等^[6]筛选到2株高产甘油、低产H₂S优良酵母菌株H02、E22且发酵性能良好,具有发展成为商业酵母的潜在能力。Clemente-Jimenez 等^[7]用分离出的一株耐酒精度好的优良酵母菌连续发酵干白型葡萄酒,发现其可以迅速起酵且产生大量的芳香物质,可有效改进葡萄酒的品质。

本研究从宁夏贺兰山东麓葡萄园中采集酿酒葡萄果实、葡萄叶子和葡萄园土壤样品,从中筛选出优良的酿酒酵母和非酿酒酵母,并对

酿酒酵母进行赤霞珠葡萄酒发酵,以期筛选出可酿造优质葡萄酒的酿酒酵母菌株,对充分利用本土微生物资源、开发特色优质葡萄酒具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验筛选样品采集于宁夏贺兰山东麓地区葡萄园土壤、酿酒葡萄果实和葡萄叶片。从28个葡萄果实样品、21个葡萄园土壤样品、23个葡萄叶片样品中分离得到了106株本土酵母菌。

YPD培养基、WL培养基、赖氨酸培养基参考文献[8]配制;氯化钠、无水乙醇、葡萄糖,均为分析纯。立式压力蒸汽灭菌器,苏州安泰空气技术有限公司;洁净工作台,合肥艾本森科学仪器有限公司;生化培养箱,上海博讯实业有限公司;光学显微镜,上海一恒科学仪器有限公司;紫外分光光度计,北京普析仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌的分离

在无菌条件下分别称取1.0、10.0、5.0 g采集的土样、新鲜酿酒葡萄果实、新鲜叶片,分装于90 mL 无菌水的锥形瓶中,振荡摇匀,制备成菌悬液,对菌悬液进行梯度稀释,选取梯度为10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷的菌液,吸取0.1 mL均匀涂布于YPD固体培养基,于28 °C培养1–3 d,观察菌落颜色及形态大小,挑取具有酵母菌典型特征且形态差异比较明显的单个菌落,于光学显微镜下观察细胞形态,对可能的酵母菌菌落进行分离纯化。

1.2.2 酵母菌的初步鉴定

将初步筛选得到的酵母菌接种于WL固体培养基,28 °C培养2–3 d,观察形态及颜色,判断是否为酿酒酵母菌株。因为非酿酒酵母可利

用赖氨酸作为氮源生长, 所以将酵母菌接种于赖氨酸固体培养基 28 °C 培养 5 d 后观察, 能够在赖氨酸固体培养基上生长的鉴定为非酿酒酵母^[8], 培养 5 d 后未出现菌落的则继续培养, 直到 15 d 后仍不能在赖氨酸平板固体培养基上生长的可确定为酿酒酵母^[9]。

1.2.3 酵母菌的初筛

将所有分离纯化的酵母菌株用接种针挑取单个菌落, 接入到含有倒置杜氏小管的 YPD 液体培养基试管中, 于 28 °C 恒温静置培养, 每个实验平行 3 次。每 12 h 观察一次杜氏管内产气情况, 筛选出起酵速度快、产气多的酵母菌株进行复筛。

1.2.4 酵母菌的复筛

将斜面保藏的酵母菌株接种在 YPD 液体培养基中活化, 在 28 °C 恒温培养箱中静置培养 2 d 后获得种子液。

1) 耐酒精性能实验

将种子液以 2% 的接种量接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 分别加入无水乙醇, 调整培养基初始酒精体积分数为 6%、9%、12%、15%、18%, 同时以商业酿酒酵母 XR 作为对照, 实验平行 3 次, 并以未加酒精的 YPD 培养基作为空白对照。28 °C 恒温静置培养 48 h, 利用紫外分光光度计测定 OD_{600} 。

2) 耐 SO₂ 性能实验

将种子液以 2% 的接种量接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 分别加入浓度为 6% 的亚硫酸, 调整培养基中 SO₂ 初始浓度为 70、140、210、280、350 mg/L, 同时以商业酿酒酵母 XR 作为对照, 实验平行 3 次, 并以未加亚硫酸的 YPD 培养基作为空白对照。28 °C 恒温静置培养 48 h, 利用紫外分光光度计测定 OD_{600} 。

3) 耐酸性能实验

将种子液以 2% 的接种量接种于 5 mL YPD

液体培养基中, 用柠檬酸调节 pH, 调节培养基中初始 pH 值为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0, 同时以商业酿酒酵母 XR 作为对照, 实验平行 3 次, 并以未调节 pH 的 YPD 培养基作为空白对照。28 °C 恒温培养 48 h, 利用紫外分光光度计测定 OD_{600} 。

4) 耐高糖性能实验

将种子液以 2% 的接种量接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 用葡萄糖调整初始糖浓度为 300、350、400、450、500 g/L, 同时以商业酿酒酵母 XR 作为对照, 实验平行 3 次, 并以未加葡萄糖的 YPD 培养基作为空白对照。28 °C 恒温培养 48 h, 利用紫外分光光度计测定 OD_{600} 。

1.2.5 酵母菌的分子生物学鉴定

对筛选得到的酵母菌进行 26S rDNA 基因 D1/D2 区域的序列分析鉴定。

1) 酵母菌 DNA 的提取

将分离得到的菌株用 YPD 液体培养基活化 48 h, 12 000 r/min 离心 1 min, 舍弃上清液后加 600 μL 山梨醇缓冲液和 50 U 溶壁酶到菌体沉淀物中, 振荡使其混合均匀。30 °C 水浴 30 min 后于 4 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体沉淀, 使用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取酵母基因组 DNA。提取完成后溶解于 TE 缓冲液中 -20 °C 保存备用。

2) 酵母菌 26S rDNA 的 PCR 扩增^[10-12]和鉴定

正向引物为 NL1: 5'-GCATATCAATAAGCG GAGGAAAAG-3'; 反向引物为 NL4: 5'-GGTCC GTTTC AAGACGG-3'。PCR 反应体系(25 μL): 预混液 12.5 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 加双蒸水至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果采用 NCBI 中 BLAST 进行同源序列比对, 使用 MEGA 7.0 软件中的邻接法进行系统发育

树的构建, 最终确定酵母菌种类。

1.2.6 酿酒酵母的赤霞珠葡萄酒发酵实验

选取成熟、完整、无病害的赤霞珠葡萄果粒, 手工破碎后对其进行 2 层纱布过滤, 取 100 mL 上清液倒入三角瓶中于 121 °C 灭菌 15 min, 待其冷却后备用。

将保藏的 10 株斜面试管菌种活化后分别接入 10 mL YPD 液体培养基, 于 28 °C 恒温培养箱静置培养 24 h, 在无菌条件下取 1 mL 接种至 100 mL 葡萄汁培养基, 28 °C 静置培养, 测其菌体细胞浓度, 达到 10^7 CFU/mL 时待用。

拣选成熟、完整、无病害的赤霞珠果实, 除梗破碎后, 分装于 500 mL 三角瓶中, 加入 60 mg/L SO_2 和 40 mg/L 果胶酶, 调整葡萄汁 pH 值至 3.3, 放置 8 h 后, 将酵母菌种子液按 1% 的接种量分别接种于葡萄汁中, 于 26 °C 恒温培养箱中发酵。每种酿酒酵母进行 2 个发酵重复实验, 待残糖下降至 4 g/L 时发酵结束, 过滤澄清后取样测定各项指标。

1.2.7 赤霞珠葡萄酒基本理化指标的测定

取不同菌株发酵的酒样在 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后测定各项理化指标, 每个酒样重复 3 次。总酸、总糖、酒精度和挥发酸含量参照国标 GB/T 15038—2006 《葡萄酒、果酒通用分析方法》^[13] 中的方法进行

测定, pH 值使用 pH 计测定。

1.2.8 赤霞珠葡萄酒挥发性成分的测定

样品的前处理与 GC-MS 分析条件参照 Jiang 等^[14]的方法, 定性、定量参照范光森等^[15]的方法, 略有修改。

1.2.9 赤霞珠葡萄酒感官评价

赤霞珠葡萄酒发酵结束后, 由 10 位具有丰富品酒经验的教师和学生对不同酿酒酵母菌株发酵的酒液进行感官评价^[13]。

1.2.10 数据处理

利用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS Statistics 26.0 对所得数据进行基本处理, 利用 MEGA 7.0 对酵母菌序列进行分析对比, 构建系统发育树; 利用 SPSS Statistics 26.0 软件进行差异显著性分析; 利用 Origin 2021 软件对葡萄酒中挥发性物质进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离结果

从贺兰山东麓银川、贺兰、永宁、青铜峡、红寺堡这 5 个产区的葡萄果实、葡萄叶片和葡萄园土壤中共分离出酵母菌 106 株, 对其进行编号, 结果见表 1。将酵母菌纯化后对其进行形态观察及显微镜镜检, 多数为出芽繁殖的椭圆形菌株(图 1)。

表 1 酵母菌的分离结果

Table 1 Strain separation results

采样地点	菌株来源	数量	编号
Location	Strains source	Number	No.
银川	赤霞珠、美乐、霞多丽、蛇龙珠、叶片、土壤	19	G1-G27
Yinchuan	Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Serpentine, leaves, soil		
贺兰	赤霞珠、蛇龙珠、叶片、土壤	24	H1-H24
Helan	Cabernet Sauvignon, Serpentine, leaves, soil		
永宁	赤霞珠、美乐、蛇龙珠、叶片、土壤	17	X1-X17
Yongning	Cabernet Sauvignon, Merlot, Serpentine, leaves, soil		
青铜峡	美乐、赤霞珠、西拉、叶片、土壤	21	L1-L21
Qingtongxia	Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon, leaves, soil		
红寺堡	马涩兰、品丽珠、美乐、西拉、赤霞珠、叶片、土壤	27	Z1-Z19
Hongsibu	Marselan, Cabernet Franc, Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon, leaves, soil		

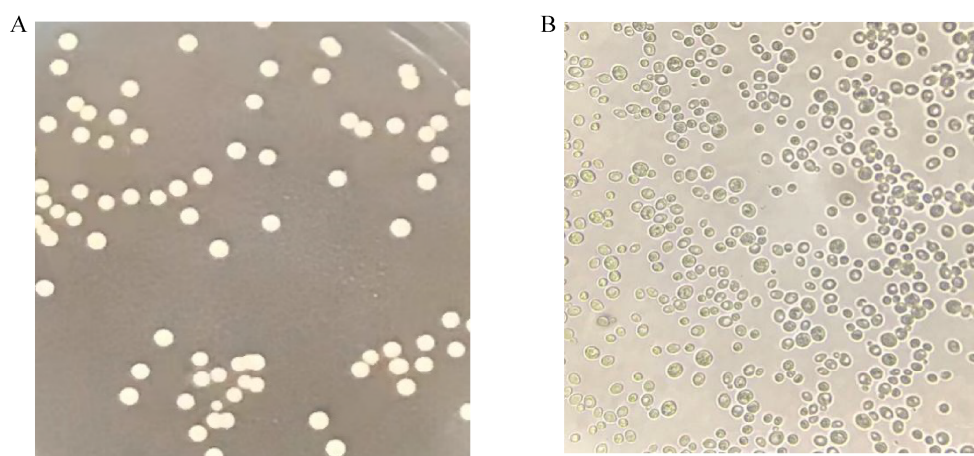


图1 酵母菌在 YPD 培养基上的菌落特征(A)及显微镜下的形态(B, 40×)

Figure 1 Colony characteristics of yeasts on YPD medium (A) and morphology under microscope (B, 40×).

2.2 酵母菌的初步鉴定结果

对初步筛选得到的 106 株酵母菌在 WL 培养基和赖氨酸培养基上进行初步分类鉴定。酵母菌在 WL 培养基上菌落颜色为奶油色带绿色、浅黄色, 菌落形态为球形突起, 不透明, 奶油状(图 2)。在赖氨酸培养基上, 有 87 株酵母菌不能生长, 确定为酿酒酵母, 19 株酵母菌可以生长,

确定为非酿酒酵母(表 2)。

2.3 酵母菌的初筛结果分析

由表 3 可知, 菌株发酵到 12 h 时, 只有 5 株菌产气并能充满杜氏小管, 说明这 5 株菌起酵速度最快, 发酵最旺盛。随着培养时间的变化, 有 24 株菌在发酵 24 h 后杜氏小管里充满气体, 说明这些菌株生长速度较快, 发酵力较强。当发酵

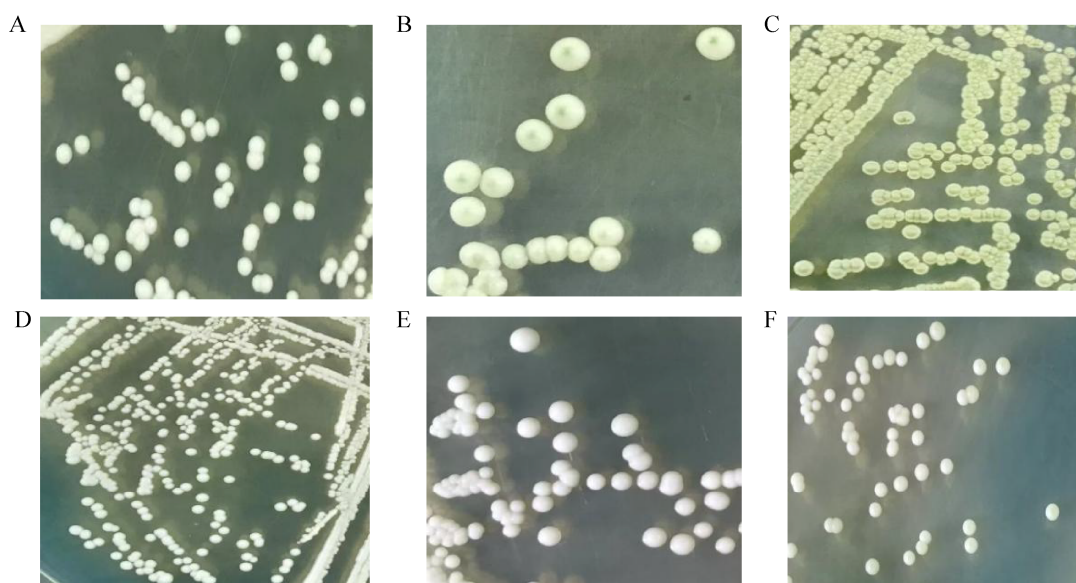


图2 部分菌株在 WL 培养基上的菌落特征 A、B、D、E、F: 酿酒酵母. C: 非酿酒酵母

Figure 2 Colony characteristics of some strains on WL medium. A, B, D, E, F: *Saccharomyces cerevisiae*. C: Non-*Saccharomyces cerevisiae*.

表 2 酵母菌在赖氨酸培养基上的生长情况

Table 2 Growth of yeasts on lysine medium

菌株生长情况	菌株编号	数量
Strains growth	Strains No.	Number
未生长	G14, H3, H9, Z9, G3, G5, G6, G9, G15, H1, H5, H12, L6, L10, L13, L14, L17, L21, Z8, Z17,	87
No growth	Z24, X8, X11, X12, X14, G2, G8, G11, G13, G18, H2, H7, H8, H13, H14, H16, Z3, Z4, Z6, Z11, Z14, Z16, Z18, Z21, Z22, L2, L7, L9, L15, L18, L19, L20, X1, X4, X6, X16, Z19, G1, G4, G10, G12, G19, H4, H6, H11, H17, H19, H20, H24, X2, X7, X10, X15, X17, L3, L4, L5, L12, Z1, Z2, Z5, Z7, Z10, Z12, Z13, Z20, Z25	
生长	G16, G17, H18, H21, L8, Z15, X9, H15, H23, H22, X3, X13, G7, H10, H12, L11, L16, L1, X5	19
Growth		

表 3 酵母菌发酵力实验结果

Table 3 Determination of fermentation ability of yeast strains

气体充满时间	菌株数量	菌株编号
Gas filling time (h)	Number of strains	Strains No.
0-12	5	G14, H3, H9, L8, Z9
12-24	24	G3, G5, G6, G9, G15, H1, H5, H12, L1, L6, L10, L11, L13, L14, L17, L21, Z8, Z17, Z24, X3, X8, X11, X12, X14
24-36	43	G2, G7, G8, G11, G13, G16, G17, G18, H2, H7, H8, H10, H12, H13, H14, H16, H18, H21, H22, H23, Z3, Z4, Z6, Z11, Z14, Z15, Z16, Z18, Z21, Z22, L2, L7, L9, L15, L16, L18, L19, L20, X1, X4, X5, X9, X13
36-48	4	X6, X16, H15, Z19
48-60	30	G1, G4, G10, G12, G19, H4, H6, H11, H17, H19, H20, H24, X2, X7, X10, X15, X17, L3, L4, L5, L12, Z1, Z2, Z5, Z7, Z10, Z12, Z13, Z20, Z25

时间到 36 h 时, 有 43 株菌的杜氏小管里充满气体, 说明它们活力较强。培养 48 h 时, 有 4 株菌发酵产生的气体充满杜氏小管, 说明这些菌株能在 48 h 内完成起酵。通常情况下, 能在 48 h 内开始发酵的菌株其发酵能力都满足优良酵母菌的特性^[16]。因此, 筛选出在 48 h 内杜氏管充满气体的 76 株菌做下一步实验。

2.4 酵母菌的复筛结果分析

1) 耐酒精性能实验

由表 4 可知, 菌株 G16、G17、H18、H21、L8、Z15 仅在 6% 酒精浓度下微量生长, 说明其最大酒精耐受浓度为 6%。11 株酵母菌能在酒精浓度为 6%~15% 的培养基中生长, 但不能在酒精浓度为 18% 的培养基中生长, 与商业酵母 XR 一致, 表明其酒精耐受性最高为 15%。26 株酵母菌能在酒精浓度为 18% 的培养基中微量生长,

优于商业酵母 XR。本实验筛选出能在酒精浓度为 15% 的培养基中生长的菌株, 共 37 株, 这些菌株具有良好的耐酒精性能, 淘汰掉 39 株酒精耐受性低于 15% 的酵母菌株, 其耐酒精性能较弱, 不能适应葡萄酒发酵环境。

2) 耐 SO₂ 性能实验

由表 5 可知, 有 6 株菌在 SO₂ 含量为 210 mg/L 的培养基中仅少量生长, 说明二氧化硫最大耐受上限是 210 mg/L。有 15 株菌可以在 SO₂ 含量为 280 mg/L 的培养基中明显生长, 在 SO₂ 浓度为 350 mg/L 的培养基中少量生长。菌株 L18、G8、L6、Z9、H8 可以在 SO₂ 浓度为 280 mg/L 的培养基中少量生长, 有 14 株菌耐受性能最好, 可以在 SO₂ 浓度为 350 mg/L 的培养基中大量生长, 与对照菌株 XR 耐受性相同。因此筛选这 14 株菌做下一步耐酸性能实验。

表 4 酵母菌株耐酒精性能实验结果

Table 4 Determination of alcohol tolerance of yeast strains

菌株编号 Strains No.	培养基酒精浓度 Alcohol concentration of medium (%)				
	6	9	12	15	18
G16, G17, H18, H21, L8, Z15	*	-	-	-	-
X9, H15, H23	+	*	*	*	-
H22, X3, X13, G7	+	*	-	-	-
H10, H12, L11, L14, L16	+	*	*	-	-
H9, L15, X5, X6, X12, Z8	+	-	-	-	-
G15, G18, Z16, Z23, L17	++	*	*	-	-
H2, H7, H13, H14, L9, L20, X16, Z4, Z6	++	*	*	*	*
G3, H3, H5, L10	+++	+++	+	+	*
H1, H16, X11, Z21, Z24	+++	++	+	*	*
G5, G6, G11, G13, L2, Z3, L13, Z11, Z18,	+++	+	*	-	-
Z17, L1, L7, L19, L21, G2, G9, G14	+++	+	+	*	*
Z14, Z22, H8, L18, G8, L6	+++	*	*	*	-
Z19, X4, X1, X14,	+++	-	-	-	-
Z9, X8, XR	+++	++	+	*	-

-: 不生长, $OD_{600} \leq 0.1$; *: 微量生长, $0.1 < OD_{600} < 0.3$; +: 生长, $0.3 < OD_{600} < 0.5$; ++: 明显生长, $0.5 < OD_{600} < 1.0$; +++: 大量生长, $OD_{600} > 1.0$. 下同

-: No growth, $OD_{600} \leq 0.1$; *: Trace growth, $0.1 < OD_{600} < 0.3$; +: Growth, $0.3 < OD_{600} < 0.5$; ++: Significant growth, $0.5 < OD_{600} < 1.0$; +++: Substantial growth, $OD_{600} > 1.0$. The same below.

表 5 酵母菌株耐 SO₂ 性能实验结果Table 5 Determination of SO₂ tolerance of yeast strains

菌株编号 Strains No.	培养基 SO ₂ 含量 SO ₂ content of medium (mg/L)				
	70	140	210	280	350
H2, H13, H14, L20, Z4, Z6	+++	++	*	-	-
X9, H15, X16, H23, L9, G3, H7	+++	++	++	+	*
L7, L19, L21, G2, Z14, Z22	+++	+++	++	+	*
L18, G8	++	++	+	*	-
L6, Z9, H8	+++	+++	++	*	-
G3, G9, G14, H3, H5, L10, H1, H16, X8, X11, Z21, Z24, Z17, L1, XR	+++	+++	+++	+++	+++

3) 耐酸性能实验

由表 6 可知, 当 pH 范围在 3.0–4.0 时, H5、L10 等 11 株酵母菌株均能大量生长; 随着生长环境 pH 值的降低, H5、L10、G3、G9、Z17、X8、Z24、X1、H3、L1、G14 的生长均受到了抑制; 当 pH 值达到 2.0 时, 菌株 H5、L10、G3、

G9、Z17、X8、H3、L1、G14 只能微量生长, 与对照菌株 XR 耐酸性能相同; 而 Z24、X1 则不能在 pH 2.0 的环境中生长。菌株 H1、H16、Z21 在 pH 3.0 时只能微量生长, 当 pH 值减小到 2.0 时菌株完全不能生长, 说明其耐酸性能较弱, 均低于商业酵母 XR。葡萄酒发酵过程中,

表 6 酵母菌株低 pH 耐受性结果

Table 6 Determination of low pH tolerance of yeast strains

菌株编号 Strains No.	pH				
	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
H1, H16, Z21	-	-	*	++	+++
H5, L10	*	+	+++	+++	+++
G3, G9, Z17, X8	*	+	+++	+++	+++
Z24, X11	-	++	+++	+++	+++
H3, L1, G14, XR	*	++	+++	+++	+++

pH 值最好控制在 3.3–3.5 之间, 因为酵母菌比细菌耐酸性更强, 在这个酸度范围内杂菌的生命活动受到抑制, 但酵母菌仍可正常发酵^[17]。本实验筛选出的 11 株可以在 pH 3.0 环境中正常生长的菌株用来进行下一步实验。

4) 耐高糖性能实验

耐高糖性能实验中, 被测菌株在葡萄糖浓度分别为 300、350、400、450、500 g/L 这 5 个梯度的培养条件下, 其 OD_{600} 均大于 1.0, 生长旺盛, 说明这些菌株耐高糖能力较强, 与商业酵母 XR 相一致。一般酿酒葡萄的含糖量在 22%–30% 之间, 鲜食葡萄的含糖量相对较低, 在 10%–15% 之间, 冰葡萄含糖量高达 33%–44%^[18], 所以本实验的 11 株供试菌株均符合高糖耐受性能的要求。

2.5 酵母菌的鉴定结果分析

将复筛得到的 11 株菌的 26S rDNA 基因序列结果在 NCBI 网站上进行序列相似性比对, 比较得到 10 株酵母菌 H5、G9、G3、X8、G14、L10、H3、X11、Z17、Z24 的 26S rDNA 基因片段与酿酒酵母相似性最高, 达到 99%; 酵母菌株 L1 与发酵毕赤酵母相似性最高, 高达 99%。用 MEGA 7.0 构建系统发育树, 如图 3 所示, 最终确定 10 株酵母菌株 H5、G9、G3、X8、G14、L10、H3、X11、Z17、Z24 均为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 1 株酵母菌 L1 为发酵毕赤酵母 (*Pichia fermentans*)。

2.6 葡萄酒理化指标分析

由表 7 可知, 不同本土酿酒酵母发酵赤霞珠葡萄酒的基本理化指标中, 酒精度范围在 12.45%–14.41% (体积分数) 之间, 其中菌株 X11 所酿的葡萄酒酒精度显著高于商业酵母 XR, H3 与 XR 无显著性差异。11 株酿酒酵母酿造的葡萄酒残糖含量均低于 4 g/L, 符合葡萄酒标准。总酸含量在 5.49–6.47 g/L 范围内, G9、H5、L10、X8、Z17、Z24 与商业酵母无显著差异。挥发酸在 0.25–0.57 g/L 范围内, 含量相对较低的是 H5、L10、X8、Z17。pH 值在 3.20–3.47 范围内, H3 与商业酵母 XR 间无显著性差异。因此, 筛选出来的本土酵母均满足发酵标准, 可用于赤霞珠葡萄酒发酵。

2.7 葡萄酒挥发性成分结果分析

以赤霞珠为原料, 采用包括商业酵母 XR 在内 11 株酿酒酵母进行葡萄酒发酵实验, 发酵获得的酒液利用顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱联用法测定其挥发性物质含量。实验中共鉴定出 55 个挥发性化合物, 其中酯类物质 18 种、醇类物质 16 种、酸类物质 5 种、酮醛类物质 4 种、其他类型化合物 12 种。

1) 酯类物质

本实验中不同酿酒酵母菌株发酵的赤霞珠葡萄酒酯类物质总含量有所差异 (表 8), 在 8 994.67–24 452.37 $\mu\text{g/L}$ 之间, 其中酯类物质总含量最高的是 G14, 其次为商业酵母 XR、H3 等。所有赤霞珠葡萄酒酒样中, 乙酸乙酯、乙酸异戊酯、正己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、月桂酸乙酯等是酯类物质的重要组成物质, 各个酒样中均有较高的含量。其中, 乙酸乙酯是含量最高的酯类物质, 菌株 G14 所酿造的葡萄酒中这类物质含量最高, 高于商业酵母 XR, 赋予葡萄酒菠萝、水果香气。其次是辛酸乙酯, 菌株 X8、G9、Z24、H3、G14 所酿葡萄酒中该物质含量均

高于商业酵母 XR, 赋予葡萄酒菠萝味、梨味、果香味和花香味。所有葡萄酒酒样中乙酸乙酯、乙酸异戊酯、正己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯的 OAV 值均大于 1.0, 是葡萄酒中花香、果香的

主要贡献物质。各个酒样中苯乙酸乙酯和月桂酸乙酯的 OAV 值均大于 0.1, 是葡萄酒潜在的增香物质, 在酒样中起到协同增香的作用, 增加了葡萄酒的花香味和果香味。

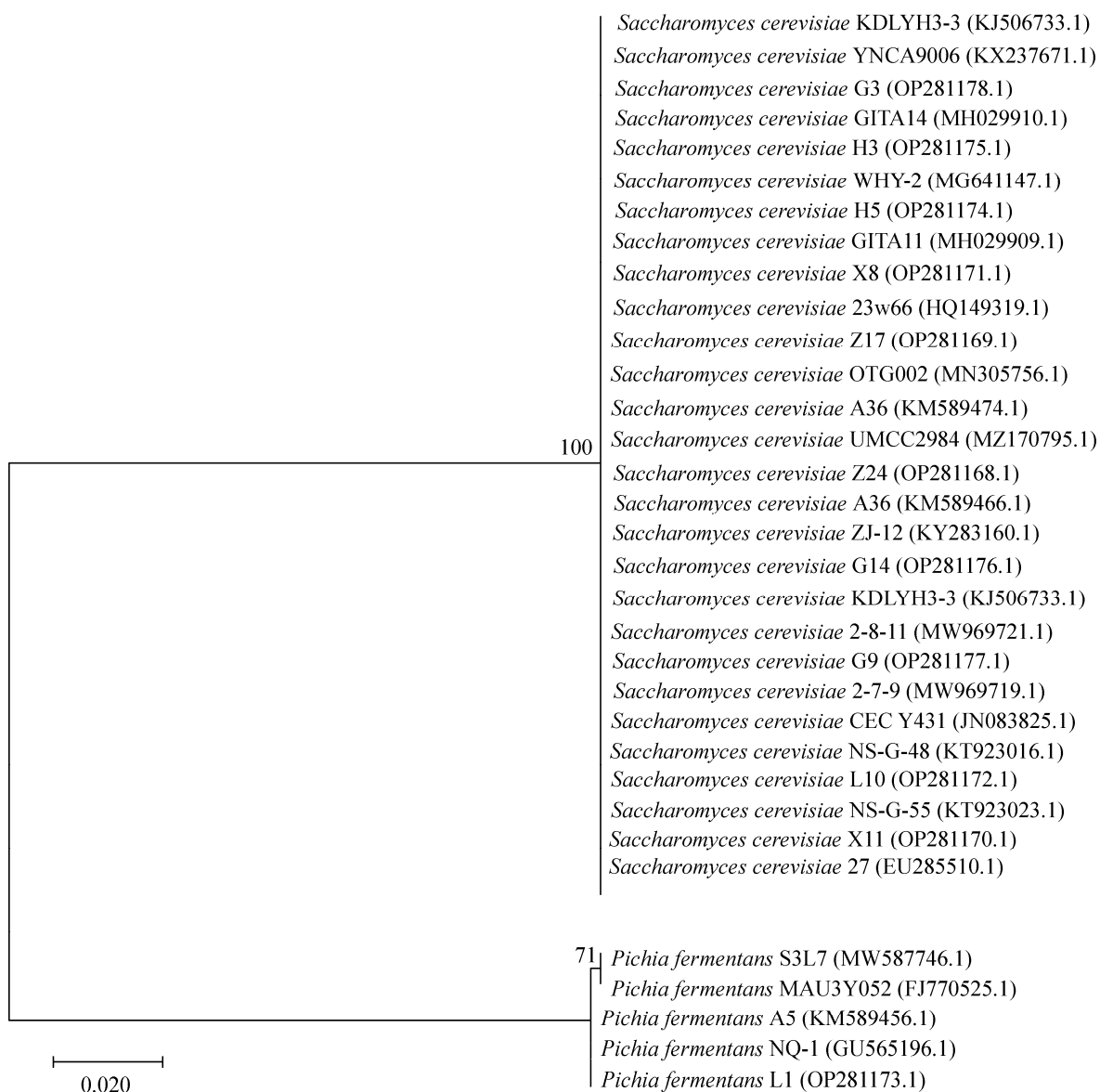


图 3 酵母菌株基于 26S rDNA 序列构建的系统发育树 分支处数值表示经邻接法 1 000 次计算后的 bootstrap 数值; 括号中序号表示菌株 GenBank 登录号; 0.020 标尺为遗传差异度

Figure 3 Phylogenetic tree constructed by yeast strain 26S rDNA sequence. The value at the branch represents the bootstrap value or the evolutionary tree constructed by the adjacency method after 1 000 calculations; The serial number in parentheses indicates the GenBank accession number of the strain; 0.020 indicates genetic variation.

表 7 不同酵母酿造赤霞珠葡萄酒的理化性质

Table 7 Physicochemical parameters of Cabernet Sauvignon wines with different yeasts

菌株编号 Strain No.	酒精度 Alcoholic strength (%)	总糖 Total sugar (g/L)	总酸(以酒石酸计) Total acid (as tartaric acid) (g/L)	挥发酸(以乙酸计) Volatile acid (as acetic acid) (g/L)	pH
G3	12.55±0.23g	1.86±0.23f	5.49±0.19e	0.46±0.04bc	3.36±0.01c
G9	13.82±0.12d	2.43±0.05b	6.47±0.13a	0.39±0.08cd	3.39±0.02bc
G14	12.45±0.32ef	2.66±0.14a	5.63±0.09de	0.54±0.02ab	3.37±0.03bc
H3	14.30±0.11bc	2.05±0.06de	5.67±0.29de	0.39±0.06cd	3.42±0.01ab
H5	13.03±0.15f	2.75±0.04a	6.18±0.07ab	0.32±0.02de	3.20±0.01d
L10	13.52±0.17e	2.02±0.08ef	6.24±0.15ab	0.33±0.04de	3.37±0.01bc
X8	13.28±0.39f	2.75±0.17a	5.82±0.09cd	0.35±0.01de	3.38±0.05bc
X11	14.41±0.28a	2.33±0.19bc	6.02±0.07bc	0.57±0.04a	3.35±0.02c
Z17	14.09±0.39c	2.01±0.28ef	6.19±0.24ab	0.25±0.02e	3.37±0.03bc
Z24	13.77±0.42d	2.44±0.28b	6.17±0.13ab	0.48±0.02abc	3.39±0.03bc
XR	13.46±0.33b	2.21±0.27cd	6.42±0.14a	0.51±0.04ab	3.47±0.04a

同列不同小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

2) 醇类物质

11 株酿酒酵母发酵的赤霞珠葡萄酒醇类物质总含量也有所差异(表 9),其中菌株 X11、G14、G9 的酒样醇类总含量高于商业酵母 XR, 酒样 H5、L10、Z17 醇类含量相对较低。醇类物质中异戊醇是含量最高的挥发性物质, 其赋予葡萄酒奶酪的香味, 但因其感官阈值较高, 为 30 mg/L, 计算得到 OAV 值 <1.0 , 因此对葡萄酒的香气贡献不突出, 是潜在的呈香物质。所有酒样中(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇是对葡萄酒香气贡献较大的醇类, 酒样 G14、X11 中该物质高于商业酵母 XR, 其赋予葡萄酒黄油味和奶油味。1-辛烯-3-醇具有典型的蘑菇香味, 在各个酒样中差异明显, 在酒样 H3、G14 中含量较高, 优于商业酵母 XR, 其 OAV 值 >1.0 , 对葡萄酒香气贡献较突出。具有玫瑰花味和甜味的苯乙醇在各个酒样中差异较大, 在 2 363.42–6 952.32 $\mu\text{g/L}$ 之间, 其中含量最高的是 X11、G14, 但因其感官阈值较高, OAV 值 <1.0 , 对葡萄酒的香气贡献不明显。醇类物质含量较高的还有异丁醇和 3-甲硫基丙醇, 均对葡萄酒起到了辅助增香的作用。

3) 酸类物质和醛酮类物质

本实验中所有葡萄酒样共检测到 5 种酸类物质(表 10)和 4 种酮醛类物质(表 11), 分别是乙酸、棕榈油酸、辛酸、2-甲基己酸、正己酸和乙醛、庚醛、3-羟基丁醛、2-辛酮。庚醛在除 XR 外其他 10 个酒样中均被检测到, 含量较高的是酒样 H3 和 G14, 计算其 OAV 值 >1.0 , 对葡萄酒香气贡献较明显, 赋予葡萄酒脂肪、柑橘味。辛酸在酒样 Z24 中未检测到, 乙醛在 G3 中未检测到, 2-辛酮在各个酒样中均有不同含量, 它们赋予葡萄酒奶酪味、花香味和果香味, 因其 OAV 值均 >0.1 , 所以对葡萄酒香气贡献不突出。

4) 其他物质

在萜烯类和异戊二烯类物质(表 12)、烷烃类(表 13)、内酯类和其他香气物质(表 14)中, 比较突出的呈香物质是 β -大马士酮, 其在酒样 H3 中含量最高, 在酒样 G14 与 XR 中含量基本一致。因其感官阈值较低, OAV 值 >1.0 , 对葡萄酒香气贡献较突出, 赋予葡萄酒花香味、甜味、蜂蜜味。含量较高的还有异佛尔酮、香叶基丙酮、芳樟醇、香茅醇, 其含量在各个酒样中差异不大,

表 8 不同酿酒酵母菌株发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分酯类物质比较
Table 8 Comparison of esters of volatile components in Cabernet Sauvignon wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)												
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR		
乙酸乙酯	9 411.56±	10 468.59±	14 602.65±	14 590.07±	7 760.68±	11 213.01±	10 319.22±	11 641.67±	8 632.20±	12 624.83±	13 540.99±		
Ethyl acetate	184.51	725.41	1 150.91	1 006.76	703.10	1 076.28	997.86	617.05	358.07	1 047.79	746.56		
乙酸异戊酯	1 176.58±	828.36±	1 362.37±	857.21±	819.81±	234.54±	895.40±	1 020.51±	588.92±	937.74±	698.49±		
Esoamyl acetate	79.51	32.03	179.59	85.45	109.66	13.02	134.59	83.13	32.85	153.34	288.17		
正己酸乙酯	451.70±	600.38±	720.31±	425.27±	52.96±	380.33±	570.98±	446.91±	474.71±	612.33±	670.29±		
Ethyl n-hexanoate	12.81	58.85	126.46	59.39	10.63	16.55	48.87	46.29	20.07	16.07	84.04		
庚酸乙酯	2.39±	6.86±	4.36±	5.08±	-	5.53±	5.25±	5.47±	7.22±	6.8±	6.08±		
Ethyl heptanoate	0.19	0.58	0.56	0.53	-	1.61	1.02	1.27	1.71	0.63	1.10		
辛酸甲酯	5.28±	7.67±	7.61±	6.59±	11.01±	5.69±	8.43±	6.70±	6.89±	7.46±	23.76±		
Methyl octanoate	0.12	0.87	1.49	0.96	5.16	0.81	0.62	0.80	0.58	0.25	0.89		
辛酸乙酯	2 403.40±	3 684.32±	4 185.53±	3 993.70±	133.63±	2 487.87±	3 452.27±	1 979.93±	2 627.83±	3 917.97±	3 392.45±		
Ethyl octanoate	52.86	87.20	557.09	618.93	20.89	118.94	343.59	20.39	146.20	207.91	189.88		
己酸异戊酯	8.37±	12.37±	14.64±	11.98±	3.99±	9.74±	14.37±	12.50±	13.44±	19.24±	16.22±		
Isoamyl caproate	0.15	1.59	0.64	2.31	1.16	1.08	2.34	1.42	1.92	1.56	0.56		
7-辛酸乙酯	-	2.51±	2.38±	4.16±	-	-	3.32±	2.57±	2.58±	5.46±	3.35±		
7-Ethyl octanoate													
壬酸乙酯	6.72±	17.36±	7.77±	12.06±	3.31±	10.97±	13.07±	6.83±	15.21±	18.82±	25.99±		
Ethyl pelargonate	0.95	0.29	0.15	1.11	1.87	1.14	2.84	1.15	1.29	1.15	2.67		
癸酸乙酯	2 286.33±	2 330.05±	3 414.36±	2 469.53±	2 448.24±	2 087.93±	2 316.06±	1 676.41±	2 365.72±	2 813.47±	3 571.15±		
Ethyl caprate	98.34	80.85	135.04	267.18	9.31	190.91	231.29	100.28	176.66	300.34	83.50		
辛酸异戊酯	32.38±	41.99±	51.06±	40.90±	7.39±	33.33±	32.91±	35.56±	39.68±	42.71±	37.28±		
Isoamyl caprylate	1.44	1.54	2.83	4.14	2.43	5.66	10.44	0.89	11.40	5.12	0.70		
丁二酸二乙酯	53.69±	42.91±	55.75±	49.40±	2.13±	24.87±	69.22±	30.39±	27.91±	34.81±	23.23±		
Diethyl succinate	2.31	2.57	2.54	9.03	0.98	2.77	15.26	1.17	10.12	1.47	6.61		
乙基 9-癸烯酸酯	127.90±	170.67±	219.84±	124.62±	-	87.80±	165.60±	122.15±	175.06±	245.41±	5.66±		
Ethyl 9-decenoate	3.52	13.27	14.43	24.33	-	12.91	13.79	10.16	6.39	24.11	1.48		
苯乙酸乙酯	2.40±	2.86±	2.30±	3.78±	4.86±	3.32±	2.93±	5.75±	3.10±	2.70±	7.42±		
Ethyl phenylacetate	0.42	0.42	0.24	1.61	1.50	1.25	0.25	1.01	0.99	0.27	0.36		
乙酸苯乙酯	160.61±	101.73±	159.39	114.42±	130.04±	64.46±	104.95±	368.97±	62.57±	101.69±	69.12±		
Phenethyl acetate	5.37	10.07	±8.17	21.58	26.01	6.91	9.52	104.26	9.39	9.10	12.23		

(待续)

(续表 8)

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration (µg/L)													
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR			
月桂酸乙酯	576.16±	362.82±	601.27±	372.58±	111.46±	276.04±	382.81±	281.45±	380.74±	354.78±	981.11±			
Ethyl laurate	45.86	21.49	19.37	55.47	19.05	21.17	37.22	37.78	40.11	31.87	104.44			
癸酸异戊酯	15.57±	16.38±	19.55±	21.92±	-	9.36±	13.11±	13.81±	12.97±	15.54±	13.08±			
Isoamyl caprate	0.32	2.00	1.50	5.77	-	1.31	0.34	1.09	0.47	1.19	0.54			
棕榈酸乙酯	23.84±	27.95±	21.23±	32.32±	5.16±	15.72±	22.15±	19.79±	27.21±	24.05±	45.50±			
Ethyl palmitate	0.88	2.38	1.09	10.70	1.02	1.22	1.92	3.23	2.60	0.63	0.63			
合计	16 744.88	18 725.78	24 452.37	23 135.59	11 494.67	16 950.51	18 392.05	17 677.37	15 463.96	21 785.81	22 611.49			
Total (µg/L)														

-: Not detected in the sample.

表 9 不同酿酒酵母菌株发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分醇类物质比较

Table 9 Comparison of alcohols as volatile components in Cabernet Sauvignon wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration (µg/L)													
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR			
异丁醇	288.36±	330.32±	247.49±	332.94±	854.34±	287.34±	322.63±	307.20±	356.84±	355.94±	383.95±			
Isobutanol	24.58	51.60	11.13	27.71	102.07	27.99	2.32	37.28	27.12	19.74	94.72			
正丁醇	13.30±	14.77±	16.30±	-	25.34±	16.05±	-	11.59±	9.78±	13.21±	15.91±			
N-butanol	0.48	1.98	1.07	-	10.98	3.07	-	1.97	2.04	2.02	0.63			
异戊醇	7 520.34±	8 575.23±	8 431.35±	7 650.35±	5 194.31±	6 400.89±	8 349.73±	9 906.03±	7 180.77±	8 384.25±	8 326.16±			
Isoamyl alcohol	167.30	92.17	714.72	285.27	115.24	224.19	228.23	629.78	171.39	313.92	329.29			
3-甲基-1-戊醇	16.22±	23.29±	18.29±	21.91±	2.14±	13.83±	24.79±	16.58±	15.49±	18.23±	5.88±			
3-methyl-1-pentanol	0.10	4.31	1.05	6.15	1.01	1.33	5.49	0.90	0.62	1.67	0.42			
正己醇	58.85±	79.97±	56.43±	95.29±	51.22±	65.79±	73.49±	84.73±	81.03±	97.45±	42.37±			
N-hexanol	1.13	9.14	5.36	16.73	15.27	12.25	8.15	10.41	0.73	25.47	5.61			
1-辛烯-3-醇	-	54.52±	91.69±	101.28±	74.09±	44.32±	54.45±	-	77.99±	54.53±	84.44±			
1-octen-3-ol		9.06	0.87	15.61	10.57	10.45	4.88		9.66	8.76	16.79			

(待续)

(续表 9)

物质名称	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)											
Compound name	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR	
异辛醇	2.91±	2.36±	5.91±	9.16±	4.75±	5.18±	1.83±	3.72±	3.32±	-	5.51±	
Isooctanol	0.07	0.32	0.46	3.04	0.13	1.99	0.49	1.01	0.51		0.17	
正庚醇	15.00±	8.78±	12.19±	14.37±	6.99±	9.17±	15.92±	15.13±	12.18±	12.71±	18.53±	
N-heptanol	0.73	3.47	0.47	3.26	0.47	2.10	1.18	0.23	5.78	1.64	3.21	
(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇	167.20±	149.67±	323.86±	162.42±	44.00±	98.25±	128.52±	296.78±	162.17±	131.48±	171.40±	
(2R,3R)-(-)-2,3-butanediol	31.37	5.33	13.71	18.02	9.83	1.72	28.85	58.38	16.87	11.98	19.75	
2,3-丁二醇	46.31±	45.25±	123.57±	92.93±	18.32±	39.49±	42.15±	110.93±	50.05±	62.07±	421.32±	
2,3-butanediol	1.19	0.22	7.08	16.20	2.50	6.64	5.77	12.58	11.31	12.99	102.57	
1,2,3-丁三醇	4.05±	4.79±	15.77±	7.95±	1.46±	7.22±	5.37±	13.80±	3.58±	5.92±	6.43±	
1,2,3-butanetriol	0.14	0.16	1.32	2.27	0.21	1.91	0.75	1.48	0.46	0.68	0.15	
山梨醇	24.99±	-	36.18±	46.19±	32.99±	32.85±	21.82±	23.18±		15.77±	34.00±	
Sorbitol	0.34		2.62	10.56	5.34	4.24	6.85	9.20		1.12	1.56	
3-甲基丙醇	122.39±	107.18±	65.22±	93.66±	121.30±	83.15±	132.53±	113.05±	71.51±	64.45±	45.34±	
3-methylthiopropanol	2.28	2.10	2.22	1.56	11.29	1.04	3.18	10.53	2.79	6.34	4.35	
3,7-二甲基-6-辛烯-1-醇	3.34±	3.63±	3.73±	4.31±	1.68±	2.70±	4.15±	3.92±	3.35±	3.19±	7.21±	
3,7-dimethyl-6-octen-1-ol	0.46	0.25	0.49	0.84	0.27	0.93	0.23	0.21	0.30	0.18	1.78	
苯甲醇	2.60±	2.07±	4.21±	4.82±	3.16±	3.91±	2.26±	-	2.30±	-	3.48±	
Benzyl alcohol	0.47	0.42	0.52	0.57	1.02	0.55	1.01		0.57		0.94	
苯乙醇	2 863.10±	3 136.34±	3 100.13±	2 672.51±	2 363.42±	2 435.15±	2 944.87±	6 952.32±	2 442.86±	2 937.88±	4 178.88±	
Phenylethanol	341.39	132.66	132.66	252.92	104.96	236.25	378.75	110.37	216.66	130.46	202.44	
合计 Total ($\mu\text{g/L}$)	11 148.96	12 538.17	12 552.32	11 310.09	8 799.51	9 545.29	12 124.51	17 858.96	10 473.22	12 465.13	11 650.21	

-: Not detected in the sample.

表 10 不同酿酒酵母菌株发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分酸类物质比较

Table 10 Comparison of volatile component acids in Cabernet Sauvignon wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)										
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR
乙酸 Acetic acid	181.49± 56.29	243.32± 22.02	179.94± 45.84	320.38± 86.55	173.18± 12.78	216.17± 26.70	214.83± 16.22	161.38± 21.37	226.26± 18.37	229.60± 11.93	256.84± 14.39
棕榈油酸 Palmitoleic acid	2.01±	2.40±	4.09±	2.91±	2.92±	2.85±	3.19±	2.82±	1.82±	2.69±	4.61±
辛酸 Bitter	40.23± 5.56	34.29± 2.35	35.82± 4.54	52.87± 11.55	59.20± 5.23	24.49± 5.98	30.87± 12.52	35.20± 9.48	26.90± 9.12	-	8.55± 2.56
2-甲基己酸 2-methylhexanoic acid	42.26± 2.88	54.97± 5.17	36.79± 5.64	71.05± 14.83	32.55± 4.81	39.65± 5.64	53.31± 7.96	47.85± 0.47	53.47± 11.16	56.91± 5.23	47.98± 9.56
正己酸 N-hexanoic acid	34.20± 1.87	20.71± 2.15	36.82± 2.78	28.81± 9.36	16.40± 2.06	21.97± 6.47	27.17± 10.10	23.17± 2.40	25.76± 1.08	27.12± 3.28	19.52± 1.76
合计 Total ($\mu\text{g/L}$)	300.19	355.69	293.46	476.02	284.25	305.13	329.37	270.42	334.21	316.32	337.50

-: Not detected in the sample.

表 11 不同酿酒酵母菌株发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分酮醛类物质比较

Table 11 Comparison of ketones and aldehydes as volatile components in Cabernet Sauvignon wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)										
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR
乙醛 Acetaldehyde	-	16.80± 0.47	19.84± 2.48	15.63± 2.41	17.49± 2.17	23.89± 7.52	33.26± 9.61	28.96± 2.41	37.53± 1.11	19.80± 0.96	25.28± 0.60
庚醛 Heptanal	6.77± 1.08	5.66± 0.23	7.10± 1.14	10.15± 4.49	5.63± 1.20	5.05± 0.87	6.71± 0.38	8.63± 1.88	4.43± 0.13	6.35± 0.12	-
3-羟基丁醛 3-hydroxybutyraldehyde	31.70± 4.64	27.38± 3.30	45.12± 6.43	36.14± 9.60	27.74± 4.39	25.83± 1.48	29.96± 4.24	15.09± 1.06	30.95± 1.98	39.52± 1.72	4.49± 0.17
2-辛酮 2-octanone	18.67± 5.05	15.52± 1.04	19.03± 4.48	30.00± 14.90	30.71± 7.02	21.58± 5.41	16.61± 2.04	15.13± 0.32	16.13± 2.80	15.27± 0.67	13.22± 0.35
合计 Total ($\mu\text{g/L}$)	57.14	65.36	91.09	91.92	81.57	76.35	86.54	67.81	89.04	80.94	42.99

-: Not detected in the sample.

其 OAV 值 >0.1 , 赋予葡萄酒木香和花果香, 增加了葡萄酒的复杂性。

聚类分析结果显示(图 4), 以商业酵母 XR 作为参考, 酒样 G14 与其最接近, 其次是酒样 H3, 它们之间相似性较高且处于同一分支, 说明酒样 G14 与 XR、H3 在赤霞珠葡萄酒挥发性物质影响方面是一致的。酒样 L10 和 G3、Z17 和 G9, 以及 X8、Z24 和 X11 分别处于同 3 个分支, 与 XR 距离较远, 说明这 7 株酿酒酵母菌株与商业酵母在对赤霞珠葡萄酒挥发性成分影响方面差异较大。

2.8 葡萄酒感官评价结果分析

对不同酿酒酵母菌株酿造的赤霞珠葡萄酒进行感官评价, 并对其评价指标得分结果进行了雷达图分析。由图 5 可以看出, 所有赤霞珠葡萄酒整体有较好的色泽和澄清度, 与商业酵母 XR 酒样相比, 评分较高的酒样是 G14 和 H3。在各个评价指标中, 酒样 G14 和 H3 的香气优雅度和浓郁度、口感浓郁度等都高于酒样 XR。其他酒样与商业酵母相比缺乏优雅度和浓郁度, 酒体结构感不突出且典型性不强。

表 12 不同酿酒酵母菌株发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分萜烯类和异戊二烯类物质比较

Table 12 Comparison of terpenoids and isoprenoids as volatile components of Cabernet Sauvignon wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)										
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR
异佛尔酮 Isophorone	1.33±	2.78±	6.89±	5.39±	3.68±	1.39±	2.22±	2.90±	-	1.66±	1.92±
β -大马士酮 β -damascone	0.17	0.40	1.02	2.93	0.53	0.27	0.94	0.92		0.03	0.06
香叶基丙酮 Geranyl acetone	3.31±	1.69±	4.07±	6.19±	2.79±	3.25±	3.39±	3.11±	2.21±	3.12±	4.12±
芳樟醇 Linalool	0.20	0.58	1.14	3.29	0.95	0.95	1.46	1.42	0.30	0.59	0.96
香茅醇 Citronellol	5.66±	7.21±	-	7.33±	7.97±	3.71±	-	5.91±	6.10±	5.81±	8.76±
合计 Total ($\mu\text{g/L}$)	0.32	0.48		2.44	1.52	1.04		1.53	1.54	0.04	1.02
	7.50±	10.11±	21.91±	9.27±	4.82±	8.95±	7.32±	25.74±	7.71±	6.71±	9.82±
	0.15	0.82	2.15	1.60	1.63	1.23	1.77	8.94	1.55	1.45	1.95
	5.84±	-	8.37±	12.29±	7.59±	-	6.10±	6.85±	7.49±	-	8.07±
	0.46		1.03	4.03	1.56		0.96	0.97	2.97		0.12
	23.64	21.79	41.24	40.47	26.85	17.30	19.03	44.51	23.51	17.30	32.69

-: Not detected in the sample.

表 13 不同酿酒酵母菌株发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分烷烃类物质比较

Table 13 Comparison of alkanes as volatile components in Cabernet Sauvignon wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)										
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR
正十二烷 N-dodecane	-	18.09±	12.09±	20.68±	9.01±	20.05±	21.10±	3.28±	19.36±	20.44±	2.50±
正十四烷 N-tetradecane		0.84	1.10	7.93	1.25	0.42	2.32	1.10	1.52	0.54	0.06
合计 Total ($\mu\text{g/L}$)	2.66±	13.06±	9.73±	19.59±	2.33±	16.14±	13.65±	4.92±	15.99±	15.20±	11.61±
	0.46	2.05	1.83	4.19	0.72	1.92	1.34	0.42	1.79	1.59	0.96
	2.66	31.15	21.82	40.27	11.34	36.19	34.75	8.20	35.35	35.64	14.11

-: Not detected in the sample.

表 14 不同酿酒酵母菌株发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分内酯类和其他类物质比较

Table 14 Comparison of volatile components of Cabernet Sauvignon wines fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains lactones and other substances

物质名称 Compound name	质量浓度 Mass concentration ($\mu\text{g/L}$)										
	G3	G9	G14	H3	H5	L10	X8	X11	Z17	Z24	XR
γ -丁内酯 γ -butyrolactone	39.31±	39.91±	66.35±	29.43±	9.29±	38.02±	31.71±	39.81±	30.10±	41.85±	55.38±
其他 Others	3.47	1.53	6.07	7.57	1.22	4.48	3.79	3.89	2.93	7.30	10.41
橙花醚 Nerolidol	2.86±	3.87±	3.13±	-	5.41±	3.12±	1.92±	2.47±	2.19±	2.90±	-
苯乙烯 Styrene	0.38	0.30	0.44		2.03	0.52	1.07	0.54	0.92	0.04	
甲氧基苯酚 Methoxyphenoxime	1.91±	2.30±	-	4.29±	2.54±	3.17±	-	1.57±	2.98±	2.16±	-
2,4-二叔丁基酚 2,4-di-tert-butylphenol	0.46	0.46		2.02	0.98	0.98		0.96	1.03	0.01	
合计 Total ($\mu\text{g/L}$)	18.30±	30.71±	32.88±	31.21±	20.29±	24.01±	35.45±	23.94±	29.69±	34.13±	26.01±
	2.57	1.81	5.42	11.86	4.05	1.51	3.17	1.69	4.11	0.91	9.53
	12.22±	16.49±	13.38±	9.88±	11.65±	9.22±	19.3±	14.43±	10.71±	19.57±	31.01±
	0.59	0.26	2.26	2.22	1.99	1.17	8.21	2.95	0.46	0.42	8.23
	35.29	2.83	49.39	45.38	39.89	39.52	56.67	42.41	45.57	58.76	57.02

-: Not detected in the sample.

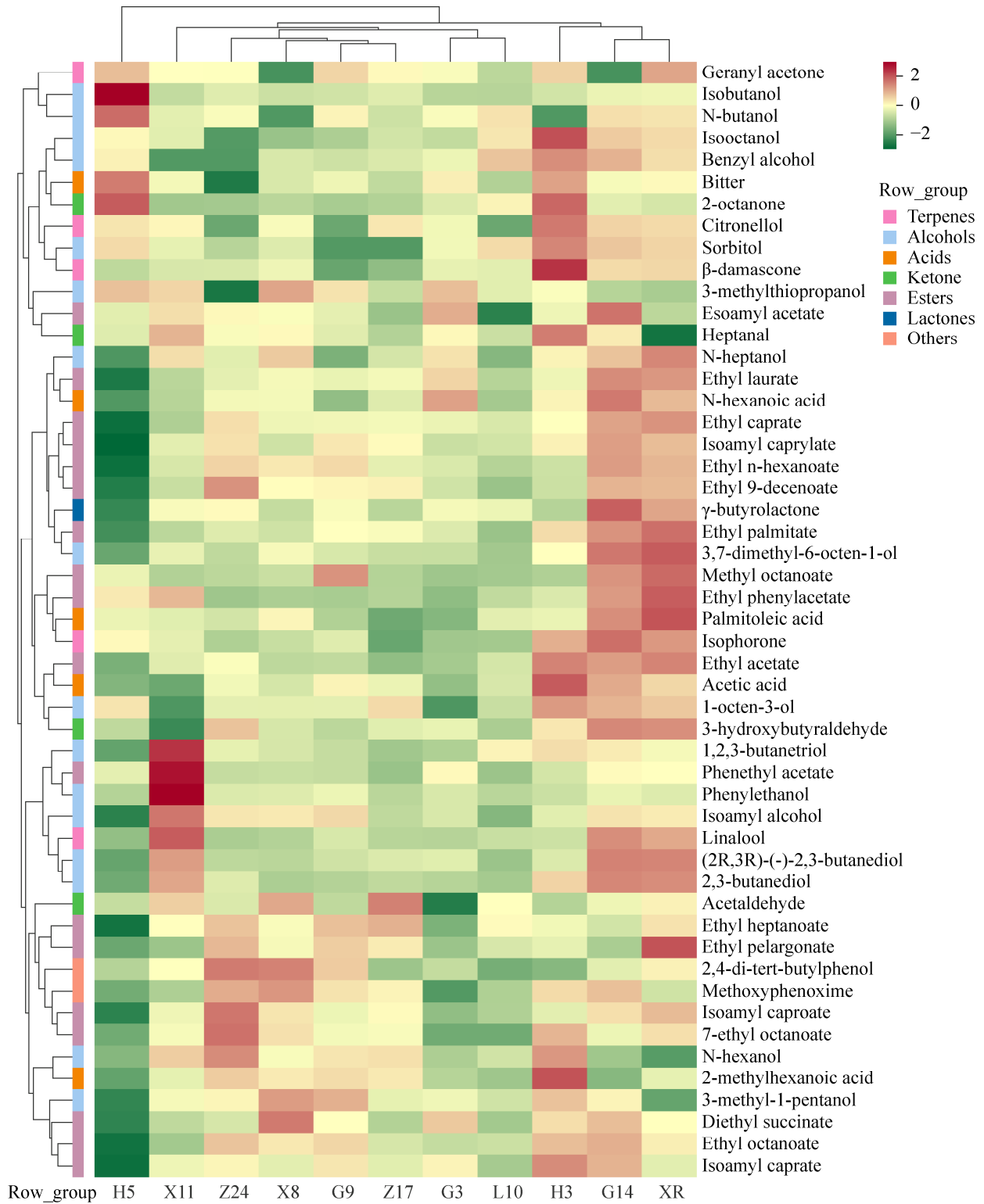


图 4 不同酿酒酵母发酵赤霞珠葡萄酒挥发性成分的聚类分析

Figure 4 Cluster analysis of volatile components in Cabernet Sauvignon wine fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains.

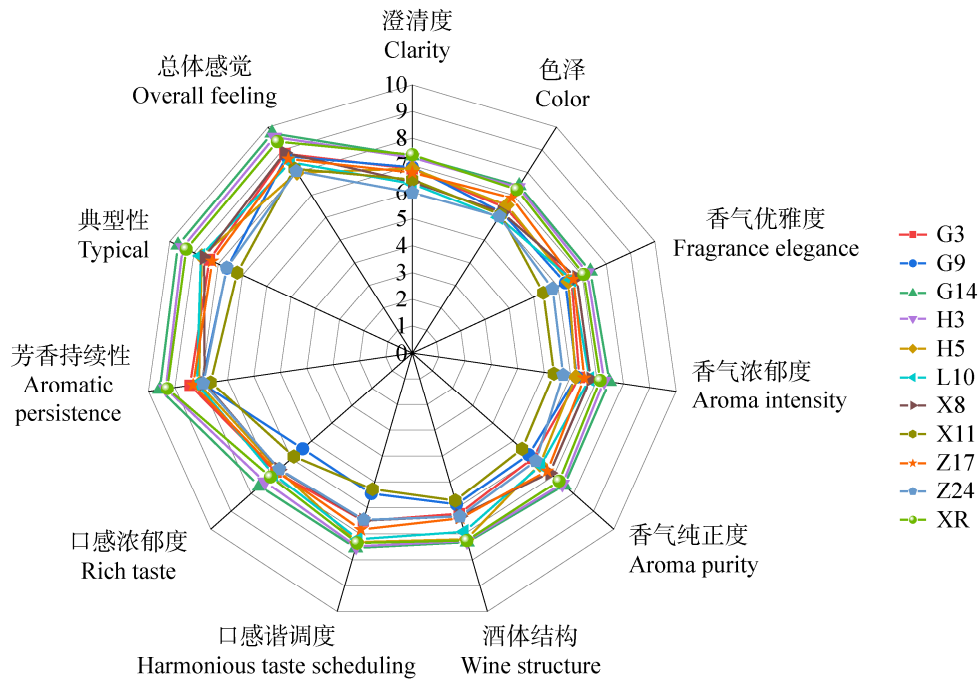


图5 不同酿酒酵母发酵的葡萄酒感官分析雷达图

Figure 5 Radar chart of sensory analysis of wine fermented by different *Saccharomyces cerevisiae*.

3 讨论与结论

传统的酵母鉴定依赖于形态和生理特征,是一个相对费时费力的过程,而分子生物学技术加快和提高了鉴定过程的可靠性,26S rDNA 基因 D1/D2 结构域的序列分析用于酵母物种鉴定^[19]。葡萄酒发酵对环境要求很高,在发酵过程中,进行发酵的酵母必须能够耐受低 pH 值、高糖、高硫和高乙醇浓度^[20]。本实验从宁夏贺兰山东麓采集的酿酒葡萄果实、叶子、葡萄园土壤样品中分离筛选出 106 株酵母菌,经过发酵力实验和耐受性实验,最终筛选出 11 株起酵速度快,并且可在 15%酒精浓度、500 g/L 葡萄糖浓度、350 mg/L SO₂ 和 pH 3.0 环境下生长的酵母菌株,利用 26S rDNA D1/D2 序列分析进行了分类鉴定,最终确定 10 株酵母菌株 H5、G9、G3、X8、G14、L10、H3、X11、Z17、Z24 为酿酒酵母(*S. cerevisiae*),1 株酵母菌 L1 为发酵毕赤酵母(*P. fermentans*),可用于葡萄酒发

酵。张家晨^[21]通过研究也得到了相似的结果,分离出了 3 株可在 16%酒精浓度、100 mg/L SO₂ 和 pH 3.0 环境下生长的酵母菌。乔喜玲^[22]通过发酵力实验和耐受性实验,筛选出 2 株酵母菌,其可耐受 16%酒精浓度、400 mg/L SO₂、60%葡萄糖和 pH 1.7 酸性环境。何曼^[23]筛选出一株酵母菌株 J24,其在糖浓度为 500 g/L、SO₂ 浓度为 200 mg/L、酒精浓度 15%、pH 2.5 的环境中有较高活性,特性优良,适合进行葡萄酒发酵。王凤梅等^[24]对内蒙古西部地区分离得到的 6 株酿酒酵母进行了发酵特性的比较,最终筛选出 2 株酵母菌可耐受 16%酒精浓度、200 mg/L SO₂ 浓度、50%葡萄糖和 pH 2.0 的酸性环境,并且具有良好的发酵能力。综合比较发现,本实验所筛选的 11 株酵母菌均具有良好的耐受性,可以满足葡萄酒发酵的环境。

在葡萄酒酿造中,由于酿酒酵母菌株有着较高的酒精转化率、优良的酒精耐受性和发酵的纯净度,在葡萄酒酿造中一直占据着主流位置。但

由于商用酿酒酵母发酵的果酒挥发性香气物质含量较少, 缺少酯香, 导致口感和风味不佳, 不能很好地满足市场的需求^[25]。因此, 本实验通过对本土酿酒酵母 H5、G9、G3、X8、G14、L10、H3、X11、Z17、Z24 与商业酵母 XR 进行赤霞珠葡萄酒发酵实验发现, 酿酒酵母 G14 和 H3 所发酵的酒样香气最突出, 优于商业酵母 XR。在测定的所有香气化合物中, 正己酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸乙酯、 β -大马士酮、1-辛烯-3-醇等物质香气活性值较高, 对赤霞珠葡萄酒的香气贡献最大, 赋予葡萄酒苹果味、香蕉味、蘑菇味、茴香味、甜味等令人愉快的气味。对各个酒样香气物质进行聚类分析发现, 酒样 G14 和 H3 与商业酵母 XR 最为接近, 在对赤霞珠葡萄酒特征香气影响方面较一致。结合葡萄酒感官评价结果综合分析, 本土酿酒酵母 G14 和 H3 更适合赤霞珠葡萄酒的发酵。

因此, 本研究从葡萄园土壤、葡萄和树叶中分离到酵母菌落, 利用 26S rDNA D1/D2 序列分析进行了分类鉴定。选取 10 株酿酒酵母菌进行葡萄酒发酵, 采用顶空固相微萃取(HS-SPME)结合气相色谱-质谱(GC-MS)对发酵后的葡萄酒进行挥发性成分分析, 再结合感官评价筛选出 2 株发酵风味好的酵母菌株 G14 和 H3, 为地方特色葡萄酒酵母菌的筛选提供理论基础和研究依据, 同时为进一步提升宁夏地区赤霞珠葡萄酒质量奠定基础。

REFERENCES

- [1] 王可. 优良酵母菌株发酵特性研究[D]. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 2011.
WANG K. Research on the fermentation characters of fine yeast strains[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Polytechnic University, 2011 (in Chinese).
- [2] VATS P, BANERJEE UC. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(2): 211-217.
- [3] 凌云. 昌黎葡萄酒产区酿酒葡萄果表酵母菌的分离及发酵性能[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016.
LING Y. Screening and fermentation characteristics of yeast strains from wine grape skin in Changli region[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [4] 雷静, 吴斌, 郭峰, 韩琛, 陈雅, 阿依加马丽. 无核白甜葡萄酒产香酵母菌种筛选及其发酵性能研究[J]. 酿酒科技, 2016(3): 45-48.
LEI J, WU B, GUO F, HAN C, CHEN Y, A Y. Screening of a yeast strain with aroma-producing capability for seedless white grape wine & study of its fermenting performance[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2016(3): 45-48 (in Chinese).
- [5] 王红, 刘天明, 刘思喜. 天然优良葡萄酒酵母发酵特性研究[J]. 酿酒科技, 2012(9): 75-77.
WANG H, LIU TM, LIU SX. Research on fermenting properties of natural excellent wine yeast[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2012(9): 75-77 (in Chinese).
- [6] 宫雪, 江璐, 刘宁, 刘延琳. 高产甘油低产 H₂S 葡萄酒优良酵母菌株筛选及其酿酒特性[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 132-136.
GONG X, JIANG L, LIU N, LIU YL. Screening and evaluation of yeast strains for producing wine higher in glycerol and lower in hydrogen sulphide[J]. Food Science, 2015, 36(19): 132-136 (in Chinese).
- [7] CLEMENTE-JIMENEZ JM, MINGORANCE-CAZORLA L, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ S, LAS HERAS-VÁZQUEZ FJ, RODRÍGUEZ-VICO F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98(3): 301-308.
- [8] 李艺凡, 薛逸轩, 赵璐, 王菁, 肖世娣, 张博, 张惠玲. 一株非酿酒酵母分离鉴定及多菌种混菌发酵对葡萄酒香气的影响研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(11): 113-120.
LI YF, XUE YX, ZHAO L, WANG J, XIAO SD, ZHANG B, ZHANG HL. Study on isolation and identification of a non-*Saccharomyces cerevisiae* and the effect of multi-strain mixed fermentation on wine aroma[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(11): 113-120 (in Chinese).
- [9] 王晓昌. 宁夏贺兰山东麓非酿酒酵母的分离鉴定与发酵特性研究[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2016.
WANG XC. Isolation and identification of non-*Saccharomyces cerevisiae* from east foot of Helanshan mountains of Ningxia and fermentation characteristics[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2016 (in Chinese).
- [10] 王晓娥, 陈长武. 东北山葡萄酒酵母菌基因组 DNA 提

- 取方法的比较研究[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(6): 1017-1019.
- WANG XE, CHEN CW. A comparative study of genomic DNA extraction methods of Northeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2014, 41(6):1017-1019 (in Chinese).
- [11] 周小玲, 沈微, 饶志明, 王正祥, 诸葛健. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2004(4): 89-92.
- ZHOU XL, SHEN W, RAO ZM, WANG ZX, ZHUGE J. A rapid method for the extraction of fungal chromosomal DNA[J]. Microbiology China, 2004(4): 89-92 (in Chinese).
- [12] 刘素玲, 冉玉平, 曾蔚, 张浩, 代亚玲, 李明远, 贾文祥. 一种适用于 PCR 反应的酵母菌、无绿藻及丝状真菌 DNA 提取方法[J]. 中国真菌学杂志, 2006(6): 340-342.
- LIU SL, RAN YP, ZENG W, ZHANG H, DAI YL, LI MY, JIA WX. A method for extracting DNA from yeast, green-free algae and filamentous fungi suitable for PCR reactions[J]. Chinese Journal of Mycology, 2006(6): 340-342 (in Chinese).
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T15038-2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T15038-2006 General analytical methods for wine and fruit wines[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2006 (in Chinese).
- [14] JIANG B, ZHANG ZW. A preliminary study of aroma composition and impact odorants of cabernet franc wines under different terrain conditions of the loess plateau region (China)[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2018, 23(5): 1096.
- [15] 范光森, 许岱, 富志磊, 许春艳, 滕超, 孙宝国, 李秀婷. 古井贡酒曲中酵母的分离及其产香挥发性风味物质分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 220-229.
- FAN GS, XU D, FU ZL, XU CY, TENG C, SUN BG, LI XT. Screen of aroma-producing yeast strains from gujinggong daqu and analysis of volatile flavor compounds produced by them[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(7): 220-229 (in Chinese).
- [16] 张超, 王玉霞, 刘树文. 葡萄酒酵母选育研究进展[J]. 南方农业, 2007, 1(2): 44-48.
- ZHANG C, WANG YX, LIU SW. Research progress of wine yeast selection and breeding [J]. South China Agriculture, 2007, 1(2): 44-48 (in Chinese).
- [17] 栗甲, 李娇娇, 施云鹏. 葡萄酒发酵过程比重与还原糖消耗及酒精生成量关系研究[J]. 酿酒科技, 2015(2): 76-77, 80.
- LI J, LI JJ, SHI YP. The relationship between the proportion and reducing sugar consumption and alcohol yield in the fermenting process of grape wine[J]. Liqueur-Making Science & Technology, 2015(2): 76-77, 80 (in Chinese).
- [18] 王雪薇, 杜展成, 武运, 薛洁. 葡萄酒功能性微生物选育研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2018(6): 87-91.
- WANG XW, DU ZC, WU Y, XUE J. Research progress on functional microbial breeding of wine[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2018(6): 87-91 (in Chinese).
- [19] BAFFI MA, SANTOS BEZERRA C, ARÉVALO-VILLENNA M, ISABEL BRIONES-PÉREZ A, GOMES E, SILVA R. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard[J]. Annals of Microbiology, 2011, 61(1): 75-78.
- [20] SWIEGERS JH, PRETORIUS IS. Yeast modulation of wine flavor[J]. Advances in Applied Microbiology, 2005, 57: 131-175.
- [21] 张家晨. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒产区微生物多样性研究及菌库的建立[D]. 林芝: 西藏农牧学院硕士学位论文, 2021.
- ZHANG JC. Study on microbial diversity and establishment of bacterial resource bank in wine region of Helan Mountain in Ningxia[D]. Linzhi: Master's Thesis of Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, 2021 (in Chinese).
- [22] 乔喜玲. 干红葡萄酒酿酒酵母的优选及其酿酒特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2020.
- QIAO XL. Selection of dry red wine *Saccharomyces cerevisiae* and its brewing characteristics[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [23] 何曼. 昌黎产区野生酵母多样性及其发酵特性分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院硕士学位论文, 2019.
- HE M. Diversity and fermentation characteristics of wild yeast in Changli production area[D]. Qinhuangdao: Master's Thesis of Hebei Normal University of Science & Technology, 2019 (in Chinese).
- [24] 王凤梅, 马利兵. 内蒙古西部地区本土葡萄酒酿酒酵母发酵特性研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 204-208.
- WANG FM, MA LB. Fermentative characteristics of indigenous wine *Saccharomyces cerevisiae* isolated from western area of Inner Mongolia[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 204-208 (in Chinese).
- [25] 张翠英. 优良果酒酵母的分离选育及发酵性能研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2006.
- ZHANG CY. Isolation and selection of excellent fruit wine yeast and fermentation performance research. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2006 (in Chinese).