

宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒丰度优势菌株与其关键风味化合物相关性研究

周 慧 黄卫东 游义琳 战吉宸

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 为确定宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒发酵过程的风味优势菌群, 本文将宁夏银川产区赤霞珠自然发酵过程的丰度优势菌株进行单菌株发酵, 结合使用气相色谱-离子迁移谱和气相色谱-质谱联用仪技术对葡萄酒中的挥发性化合物进行定性定量分析检测, 探究宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒酒精发酵过程丰度优势菌株对最终赤霞珠葡萄酒中关键风味化合物的贡献, 为进一步研究发酵核心菌群对产区葡萄酒香气的作用机制奠定基础。结果表明, 不同菌株对葡萄酒风味的影响不同, 且单一菌株无法产生所有关键风味化合物, 即葡萄酒最终风味并非由单一菌株所决定。其中葡萄酒有孢汉逊酵母、美极美奇酵母、耐热拉钱斯氏酵母、葡萄园有孢汉逊酵母、根灌浅黄隐球酵母和野生酿酒酵母 D213、D501、E325、F319 和 F513 是宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒中关键特征香气的高产菌株。

关键词: 酵母; 赤霞珠葡萄酒; 关键风味化合物; 宁夏银川产区; 离子迁移色谱

中图分类号: Q939.99; S-3

文献标识码: A

文章编号: 1000-1298(2026)10-0395-08

OSID:



Correlation between Abundance-dominant Strains and Their Key Flavor Compounds in Cabernet Sauvignon Wines from Yinchuan, Ningxia, China

ZHOU Hui HUANG Weidong YOU Yilin ZHAN Jicheng

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

Abstract: Ningxia Yinchuan appellation is one of the core wine producing regions in China. A certain degree of research has been carried out on microorganisms in Yinchuan appellation in recent years, but the current mechanism regarding the role of microorganisms in shaping the flavor profile of wines is unknown, which restricts the directed regulation of fermentation microorganisms aimed at strengthening the appellation profile. The dominant strains in the natural alcohol fermentation process of Cabernet Sauvignon wine were used for single-strain fermentation, and then gas chromatography – ion mobility spectrometry (GC – IMS) and gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS) were used to qualitatively and quantitatively analyze volatile compounds in Cabernet Sauvignon wine, and investigate the contribution of dominant strains during alcohol fermentation to the key flavor compounds in the final Cabernet Sauvignon wine from Yinchuan, Ningxia. The results showed that different strains had different effects on wine flavor. Moreover, a single strain cannot produce all the key flavor compounds, which meant the final flavor of wine was formed by the interaction of multiple strains. Among them, *Hanseniaspora uvarum* (R – Hu), *Metschnikowia pulcherrima* (R – Mp), *Lachancea thermotolerans* (R – Lt), *Hanseniaspora vineae* (R – Hv), *Papiliotrema flavescens* (R – Pf), and wild *Saccharomyces cerevisiae* D213, D501, E325, F319 and F513 were the high-yielding strains with the key aroma characteristics in Cabernet Sauvignon wine from Yinhuan, Ningxia. R – Hu produced high levels of β -damascone, R – Mp produced high levels of ethyl hexanoate and ethyl decanoate, R – Lt produced high levels of phenylethanol, R – Hv produced high levels of isoamyl acetate, R – Pf produced high levels of ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl acetate and phenylethanol, D213 produced high levels of ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl acetate and phenylethanol, D501 produced high levels of isoamyl

收稿日期: 2025-02-17 修回日期: 2025-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(U21A20269)

作者简介: 周慧(2000—), 女, 硕士生, 主要从事葡萄酒微生物研究, E-mail: huizhou200916@163.com

通信作者: 战吉宸(1972—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事葡萄酒酿造、果蔬营养与健康研究, E-mail: zhanjicheng@cau.edu.cn

alcohol and phenylethanol. E325 produced high yield of ethyl n-caproate, ethyl octanoate, ethyl decanoate and isoamyl alcohol, F319 produced high yield of ethyl n-caproate and F513 produced high yield of isoamyl alcohol.

Key words: yeast; Cabernet Sauvignon wine; key flavor compounds; Ningxia Yinchuan appellation; ion mobility chromatography

0 引言

宁夏贺兰山东麓葡萄酒产区是公认的最适合种植酿酒葡萄和生产优质品质葡萄酒的黄金地带之一,也是我国核心葡萄酒产区之一,在国内国际上享有盛誉。银川产区作为贺兰山东麓葡萄酒的核心产区,具有优良的地理区位优势 and 气候条件^[1],这给银川产区提供了丰富的微生物资源,并形成其独特的“微生物风土”。近年来,国内外学者围绕银川产区“微生物风土”展开多项研究,从其丰富的微生物资源中筛选出许多优秀的酿酒菌株,并构建了本土葡萄酒微生物种质资源库^[2-5]。酵母菌是葡萄酒酒精发酵过程中的核心菌群,其通过多种代谢作用,将葡萄汁中的还原糖、氨基酸等前体物质转化为酯类、高级醇类和脂肪酸类物质等,形成葡萄酒的风味特征^[6-7]。GAO 等^[8]选择产区本地酿酒酵母作为发酵剂改善了葡萄酒的香气轮廓,并保存葡萄品种的香气。研究表明,非酿酒酵母由于含有丰富的酶,往往能产生更多的挥发性芳香化合物改善葡萄酒香气^[7]。如 *Hanseniaspora spp.* 可以增加乙酸酯、挥发性酸类和高级醇的浓度,从而增加酒的香气的复杂性^[9-10]; *Metschnikowia pulcherrima* 可以增加脂肪酸乙酯类和高级醇的浓度^[11-12]; *Lanchancea thermotolerans* 可以增加萜烯、乳酸和挥发性硫醇类物质浓度,从而改善酒的风味^[13]。葡萄酒为复杂的混菌发酵体系,前期非酿酒酵母占据主导优势,后期由于非酿酒酵母酒精耐受力较低,酿酒酵母占据主导优势完成酒精发酵。但微生物菌群对葡萄酒风味特征的具体影响及其作用机制尚未明确。

葡萄酒中风味化合物主要包括各种酯类、酸类、醇类及醛酮类物质等。不同风味化合物成分及其浓度形成了不同风味特征,从而决定葡萄酒品质。研究表明,构成葡萄酒芳香和风味特征的化合物大约有 1 000 种^[14]。但其中的关键风味化合物对葡萄酒风味起着决定性作用,例如用 24 种关键风味化合物构建的风味化合物图谱与桃红葡萄酒的香气在质量上有很高相似性^[15],可通过控制关键风味化合物特征控制葡萄酒质量。因而,解析产区微生物菌群如何影响葡萄酒风味特征可以从产区微生物菌群对关键风味化合物特征的影响上着手。赤霞珠是宁夏银

川产区主栽的红葡萄品种之一,葛谦等^[16]对宁夏贺兰山东麓石嘴山、银川、永宁、青铜峡和红寺堡 5 个不同产区的赤霞珠葡萄酒风味进行分析,发现相较于其他产区,银川市产区的赤霞珠葡萄酒中具有更高的乙基酯类化合物含量。GAO 等^[17]对北京房山产区和宁夏银川产区的赤霞珠葡萄酒风味进行分析,发现银川产区表现出更高的醇类(如苯乙醇、3-甲基-1-丁醇和 1-丁醇)、酸类(如己酸和苯甲酸)、酯类(包括乙酸异戊酯、癸酸乙酯、辛酸乙酯)、苯甲醛、苯酚和苯乙醚;而北京房山产区表现出含有更高的醇类(1-辛醇、2-壬醇、1-戊醇等)、酸类(辛酸和癸酸)、酯类(丁酸乙酯、水杨酸甲酯、癸酸异丁酯等)、醛酮类(β -大马士酮、 α -紫罗兰酮、壬醛等)和烃类(环辛四烯和 1,1,6-三甲基-1,2-二氢萘)。

根据文献[18-20]并结合预试验,明确宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒中关键的风味化合物包括乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、丁酸乙酯、正己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、异丁醇、异戊醇、苯乙醇、正己酸、辛酸和 β -大马士酮。本研究选用实验室前期已明确宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒自然发酵过程中的本土丰度优势菌株进行单菌株发酵,结合使用气相色谱-离子迁移谱和气相色谱-质谱联用仪技术分析葡萄酒中的风味化合物,尤其是关键风味化合物,建立发酵过程中丰度优势菌群与关键风味化合物的相关性。以期确定宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒发酵过程的风味优势菌群,为进一步研究发酵核心菌群对产区葡萄酒香气的作用机制奠定基础,并为银川产区葡萄酒风格质量的定向调控提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

赤霞珠葡萄汁:宁夏银川产区 2022 年份赤霞珠压榨后,冻存于 -20℃ 冰箱;酵母菌株:实验室前期从宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒自然发酵过程筛选出的占主导优势的酵母菌株,冻存于 -80℃ 冰箱。菌株具体信息见表 1。

葡萄糖、果糖、柠檬酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸标品,购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。3-辛醇作为内标,购自阿拉丁生化科技股份有限公司。

表 1 菌株信息

Tab.1 Information of strains

编号	菌株拉丁名	菌株中文名	来源
F221	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	德尔布有孢酵母	志辉源石酒庄赤霞珠
F125	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	美极梅奇酵母	志辉源石酒庄赤霞珠
D415	<i>Lachancea thermotolerans</i>	耐热拉钱斯氏酵母	贺金樽酒庄赤霞珠
D116	<i>Hanseniaspora vineae</i>	葡萄园有孢汉逊酵母	贺金樽酒庄赤霞珠
E401	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	葡萄酒有孢汉逊酵母	君祥酒庄赤霞珠
E301	<i>Papiliotrema flavescens</i>	根灌浅黄隐球酵母菌	君祥酒庄赤霞珠
F319	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酿酒酵母	志辉源石酒庄赤霞珠
F513	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酿酒酵母	志辉源石酒庄赤霞珠
D213	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酿酒酵母	贺金樽酒庄赤霞珠
D501	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酿酒酵母	贺金樽酒庄赤霞珠
E325	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酿酒酵母	君祥酒庄赤霞珠
BDX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	酿酒酵母	商业酿酒酵母

1.2 仪器与设备

PAL-1 型手持糖度计:日本爱拓 ATAGO 公司;Waters-2695 型高效液相色谱仪:美国 Waters 公司;Flavour Spec1 H1-00053 型气相-离子迁移色谱仪:德国 G. A. S. 公司;MXT-WAX 毛细管柱:美国 Restek 公司;7890A-5975C 型气相-质谱联用仪:美国 Agilent Technologies 公司;DB-17MS 毛细管柱:美国 Agilent Technologies 公司;DVB/CAR/PDMS 萃取头(50/30 μm, 1 cm):上海安谱实验科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 糖度检测

用手持糖度计对发酵过程取样进行糖度检测。

1.3.2 葡萄酒基本理化指标检测

使用 Waters 2695-2414 型高效液相色谱仪联用示差折光检测器对样品中葡萄糖、果糖、甘油和酒精进行检测。具体方法参照文献[21],并略作修改。色谱柱型号为 Aminex HPX-87H(300 mm×7.8 mm)离子交换柱,柱温为 55℃。示差折光检测器温度为 40℃。流动相为 5 mmol/L 的 H₂SO₄溶液,等度洗脱,流速为 0.5 mL/min。样品进样量为 10 μL。

使用 Waters 2695-2996 型高效液相色谱仪联用光电二极管阵列检测器对样品中柠檬酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸和醋酸 6 种有机酸进行检测。具体方法参照文献[22],并略作修改。色谱柱型号为 Aminex HPX-87H(300 mm×7.8 mm)离子交换柱,柱温为 60℃。光电二极管阵列检测器检测波长为 210 nm。流动相为 5 mmol/L 的 H₂SO₄溶液,等度洗脱,流速为 0.6 mL/min。进样量为 10 μL。

1.3.3 葡萄汁发酵

选取的酿酒酵母和非酿酒酵母均为前期筛选在

自然发酵期间占主导优势的酵母菌株(丰度优势菌株),并以商业酿酒酵母 BDX 作为对照。具体发酵方案为:将冻存于-20℃冰箱赤霞珠葡萄汁于室温条件解冻,0.45 μm 聚醚砜膜过滤除菌后分装。按比例 2% 将扩大培养的单菌株酵母液体培养液接种于除菌后的葡萄汁中,于(23±1)℃进行酒精发酵。定期监测糖度变化,当糖度连续 2 d 基本不变,即认为酒精发酵结束。酒精发酵结束后,取样冻存于-20℃冰箱,用于后续基本理化指标、挥发性化合物等指标检测。具体发酵组如表 2 所示,每组设置 3 个平行。

表 2 发酵试验组设置

Tab.2 Setting of experimental group for fermentation		
组别	菌株编号	发酵方式
R-Hu	E401(葡萄酒有孢汉逊酵母)	单菌株发酵
R-Td	F221(德尔布有孢酵母)	单菌株发酵
R-Mp	F125(美极梅奇酵母)	单菌株发酵
R-Lt	D415(耐热拉钱斯氏酵母)	单菌株发酵
R-Hv	D116(葡萄园有孢汉逊酵母)	单菌株发酵
R-Pf	E301(根灌浅黄隐球酵母菌)	单菌株发酵
D213	D213(酿酒酵母)	单菌株发酵
D501	D501(酿酒酵母)	单菌株发酵
E325	E325(酿酒酵母)	单菌株发酵
F319	F319(酿酒酵母)	单菌株发酵
F513	F513(酿酒酵母)	单菌株发酵
BDX	BDX(酿酒酵母)	单菌株发酵

1.3.4 发酵酒样中挥发性香气成分气相色谱-离子迁移谱(Gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)定性检测

取 500 μL 的样品用娃哈哈水稀释 10 倍,加入 20 μL 的 3-辛醇(内标,初始浓度为 1 g/L)。具体仪器条件参照文献[23],并略作修改。

GC-IMS 条件:上述处理后样品置于 20 mL 顶

空瓶,以 40℃、500 r/min 条件下孵育 15 min。自动顶空进样量 500 μL 分析时间 40 min,不分流进样。载气/漂移气为 N₂,漂移管温度为 45℃,漂移气流速为 150 mL/min,进样针温度为 85℃,孵化转速为 500 r/min。色谱柱型号为 MXT-WAX (15 m × 0.53 mm, 1.0 μm),柱温 60℃。

化合物鉴定通过 GC-IMS 仪器配套的 VOCAL 软件,内置的 IMS 数据库和 NIST 数据库对物质进行分析。

1.3.5 发酵酒样中挥发性香气成分气相色谱-质谱联用仪 (Gas chromatography - mass spectrometry, GC-MS)定性定量检测

取 5 mL 样品过 0.45 μm 针筒式滤膜过滤器后,置于 20 mL 顶空瓶中,向顶空瓶中加 1.0 g 氯化钠,再加入 20 μL 的 3-辛醇(内标,初始浓度为 1 g/L),待上机检测。具体仪器条件参照文献[24],并略作修改。

顶空固相微萃取条件:以 40℃、250 r/min 条件平衡 15 min,然后固相微萃取的纤维头在 40℃下萃取 30 min,立即将萃取头在 GC 进样口解吸 5 min。使用的萃取头型号为 DVB/CAR/PDMS (50/30 μm, 1 cm)。色谱条件:色谱柱为 DB-17MS 型 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm);升温程序:初始温度设为 50℃,并保持 5 min;以 5℃/min 升至 230℃,并保持 70 min。载气(He)流速 1.0 mL/min,不分流进样方式。质谱条件:采用全扫描模式,离子源温度为 230℃,电子电离能量为 70 eV。传输线温度为 280℃,四极杆温度为 150℃,扫描质量范围(质荷比 *m/z*)为 29~500 amu。

化合物鉴定通过将挥发性化合物的质谱图结果与 NIST 17 标准谱库进行比对检索,选取匹配度大于 80% 的物质,从而对各检测出的挥发性化合物的成分进行定性。将测定出的挥发性化合物的峰面积与内标 3-辛醇的峰面积进行比较,对各检测出的挥发性化合物的成分进行定量。

使用 IBM SPSS Statistics 26 软件对每种香气化合物浓度从 0~1 进行归一化处理。具体步骤为:①通过 SPSS 软件的描述统计功能确定某种香气化合物数据集中最大值 $x_{\max}$ 和最小值 $x_{\min}$ 。②使用归一化公式,通过 SPSS 软件的计算变量功能,创建一个新的变量存储归一化结果,即

$$N = \frac{x - x_{\min}}{x_{\max} - x_{\min}}$$

式中 N ——归一化结果
 x ——初始数据

1.4 数据分析

使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行基本数据

处理和单因素方差显著性差异分析。每个发酵组设置 3 个平行, $p < 0.05$ 表明数据间具有显著性差异,结果采用平均值标准偏差 (Mean ± SD) 表示。使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件绘制统计图。GC-IMS 数据分析通过 GC-IMS 配套的 VOCAL 软件中的 Reporter 插件查看各发酵组间二维差异图以及 Gallery Plot 插件生成指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 发酵菌株发酵动力学分析

发酵过程糖度变化表示酒精发酵的进程,当糖度基本稳定(每天变化值小于 0.2°Brix)时视为酒精发酵结束,各发酵组糖度变化如图 1 所示。初始赤霞珠葡萄汁糖度为 27°Brix。从图 1 可以看出,各非酿酒酵母间酒精发酵能力具有显著性差异。其中 R-Hu 组和 R-Mp 组的发酵进程相似,在酒精发酵的第 8 天就停止发酵,整个过程糖度只降低 7°Brix。R-Td 组、R-Lt 组和 R-Hv 组发酵进程相似,在酒精发酵的第 16~18 天停止发酵,整个过程糖度消耗 12.5~14.3°Brix。而 R-Pf 组的糖度变化与酿酒酵母相似,在第 18 天完成酒精发酵,最终糖度为 8.0°Brix。而从银川产区筛选的各野生酿酒酵母 (D213、E325、F319、F513 和 D501) 和商业酿酒酵母 (BDX) 间酒精发酵能力具有相似性,在第 18 天完成酒精发酵,最终糖度为 8.0°Brix 左右。

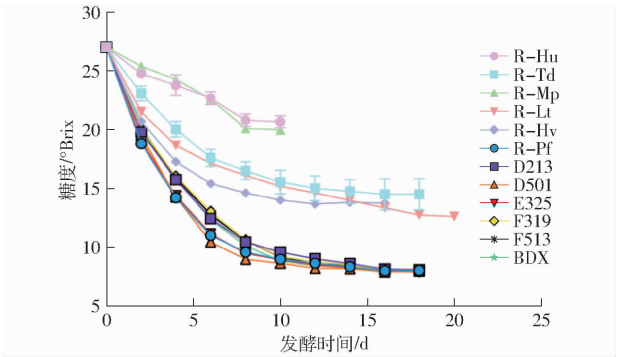


图 1 发酵过程糖度变化

Fig. 1 Changes in sugar content during fermentation

2.2 葡萄酒基本理化性质分析

发酵结束后取样,对初始葡萄汁和葡萄酒进行基本理化性质分析。各发酵组的基本理化指标如表 3 所示。宁夏银川产区的 2022 年份赤霞珠葡萄汁中葡萄糖含量为 117.23 g/L,果糖含量为 104.96 g/L,柠檬酸含量为 0.41 g/L,酒石酸含量为 2.01 g/L,苹果酸含量为 0.66 g/L,琥珀酸含量为 2.61 g/L。从表 3 各发酵组葡萄糖和果糖残留含量可以看出,各野生酿酒酵母和商业酿酒酵母均独立完成了酒精发酵,发酵结束后残糖含量均低于 4.00 g/L,最终产生

表 3 葡萄汁和葡萄酒基本理化性质

Tab.3 Basic physicochemical indexes of grape juice and wine

名称	葡萄汁	葡萄酒												
		R-Hu	R-Td	R-Mp	R-Lt	R-Hv	R-Pf	D213	D501	E325	F319	F513	BDX	
葡萄糖含量/ (g·L ⁻¹)	(117.33 ± 22.22) ^a	(91.08 ± 7.45) ^b	(30.18 ± 10.30) ^c	(76.06 ± 4.08) ^b	(21.74 ± 0.97) ^c	(18.90 ± 0.81) ^{cd}	(0.00 ± 0.38) ^d	(0.00 ± 0.10) ^d	(0.00 ± 0.03) ^d	(0.00 ± 0.52) ^d	(0.00 ± 0.03) ^d	(0.00 ± 0.08) ^d	(0.00 ± 0.02) ^d	
果糖含量/ (g·L ⁻¹)	(104.96 ± 9.75) ^a	(100.42 ± 6.29) ^a	(68.62 ± 9.36) ^b	(106.85 ± 2.37) ^a	(43.07 ± 1.31) ^c	(64.97 ± 0.82) ^b	(0.00 ± 0.72) ^d	(0.00 ± 0.05) ^d	(0.00 ± 0.00) ^d	(0.00 ± 0.00) ^d	(0.00 ± 0.30) ^d	(0.02 ± 0.15) ^d	(0.00 ± 0.00) ^d	
甘油含量/ (g·L ⁻¹)	(0.79 ± 0.09) ^f	(4.38 ± 0.17) ^e	(4.29 ± 0.70) ^e	(5.19 ± 0.20) ^d	(9.25 ± 0.13) ^a	(5.11 ± 0.08) ^d	(7.41 ± 0.19) ^b	(7.36 ± 0.17) ^b	(6.43 ± 0.37) ^c	(7.05 ± 0.10) ^b	(7.14 ± 0.04) ^b	(7.11 ± 0.18) ^b	(6.82 ± 0.05) ^{bc}	
酒精含量/%	—	(5.49 ± 0.06) ^d	(9.62 ± 1.63) ^c	(6.04 ± 0.33) ^d	(11.04 ± 0.09) ^b	(9.51 ± 0.20) ^c	(14.76 ± 0.12) ^a	(14.41 ± 0.12) ^a	(15.00 ± 0.17) ^a	(14.59 ± 0.14) ^a	(14.98 ± 0.11) ^a	(14.76 ± 0.09) ^a	(14.95 ± 0.06) ^a	
柠檬酸含量/ (g·L ⁻¹)	(0.41 ± 0.02) ^a	(0.59 ± 0.06) ^a	(0.41 ± 0.04) ^a	(0.63 ± 0.04) ^a	(0.33 ± 0.01) ^a	(0.46 ± 0.05) ^a	(0.31 ± 0.00) ^a	(0.31 ± 0.00) ^a	(0.31 ± 0.00) ^a	(0.31 ± 0.00) ^a	(0.31 ± 0.00) ^a	(0.31 ± 0.00) ^a	(0.31 ± 0.00) ^a	
酒石酸含量/ (g·L ⁻¹)	(2.01 ± 0.06) ^a	(1.14 ± 0.05) ^b	(0.81 ± 0.03) ^d	(0.92 ± 0.06) ^c	(0.74 ± 0.04) ^{de}	(0.82 ± 0.03) ^d	(0.65 ± 0.00) ^{ef}	(0.69 ± 0.05) ^{ef}	(0.62 ± 0.00) ^f	(0.65 ± 0.00) ^{ef}	(0.65 ± 0.01) ^{ef}	(0.64 ± 0.01) ^{ef}	(0.62 ± 0.01) ^f	
苹果酸含量/ (g·L ⁻¹)	(0.66 ± 0.33) ^e	(0.56 ± 0.03) ^{ef}	(0.31 ± 0.01) ^f	(1.26 ± 0.16) ^d	(0.33 ± 0.01) ^f	(0.31 ± 0.00) ^f	(3.03 ± 0.03) ^b	(3.47 ± 0.07) ^a	(2.66 ± 0.04) ^c	(2.97 ± 0.06) ^b	(2.54 ± 0.02) ^c	(2.95 ± 0.02) ^b	(2.52 ± 0.06) ^c	
琥珀酸含量/ (g·L ⁻¹)	(2.61 ± 0.41) ^e	(2.62 ± 0.25) ^c	(3.86 ± 0.29) ^d	(2.90 ± 0.21) ^c	(4.77 ± 0.58) ^c	(3.66 ± 0.38) ^d	(6.55 ± 0.06) ^{ab}	(5.98 ± 0.07) ^b	(6.62 ± 0.08) ^a	(6.53 ± 0.02) ^{ab}	(6.58 ± 0.05) ^{ab}	(6.84 ± 0.09) ^a	(7.03 ± 0.03) ^a	
乳酸含量/ (g·L ⁻¹)	—	(0.38 ± 0.03) ^c	(1.15 ± 0.29) ^b	(0.33 ± 0.00) ^c	(1.52 ± 0.11) ^a	(0.68 ± 0.06) ^c	(0.36 ± 0.01) ^c	(0.36 ± 0.00) ^c	(0.34 ± 0.00) ^c	(0.35 ± 0.01) ^c	(0.38 ± 0.01) ^c	(0.37 ± 0.01) ^c	(0.41 ± 0.02) ^c	
醋酸含量/ (g·L ⁻¹)	—	(0.30 ± 0.01) ^b	(0.45 ± 0.30) ^{ab}	(1.16 ± 0.18) ^{ab}	(0.51 ± 0.04) ^{ab}	(1.06 ± 0.43) ^{ab}	(0.90 ± 0.04) ^{ab}	(0.45 ± 0.07) ^{ab}	(0.83 ± 0.09) ^{ab}	(0.89 ± 0.02) ^{ab}	(1.00 ± 0.07) ^{ab}	(1.13 ± 0.12) ^{ab}	(1.03 ± 0.01) ^{ab}	

注：- 表示未检测到该物质。同一行不同字母表示数据间存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

14% ~ 15% 酒精。而非酿酒酵母中除 R-Pf 组外，均无法独立完成酒精发酵。R-Pf 组发酵结束后酒样中残糖含量低于 4.00 g/L，最终产生 14.76% 酒精。其余非酿酒酵母结束后酒样中还残留大量还原糖，残糖含量为 64.81 ~ 191.50 g/L，仅产生 5.49% ~ 11.04% 酒精。发酵后酒样中醋酸含量为 0.30 ~ 1.16 g/L，均符合 GB/T 15037《葡萄酒》中对葡萄酒中醋酸含量的要求。

2.3 不同发酵组挥发性化合物差异谱图及指纹图谱分析

为初步明确接种不同菌株得到的赤霞珠葡萄酒中的挥发性成分是否具有差异,对各发酵酒中挥发性化合物进行 GC-IMS 分析,用 Reporter 插件生成二维差异谱图,从而直观地展示出各发酵组间挥发性化合物相对含量的差异。以 R-Hu 组谱图作为参比,扣除 R-Hu 组得到其他接种非酿酒酵母发酵组差异谱图,结果如图 2a 所示。与 R-Hu 组相比,挥发性化合物浓度相同则扣除后的背景为白色,化合物浓度越高则红色越深,而化合物浓度越低则蓝色越深。从图 2a 可看出,非酿酒酵母组间挥发性化合物相对含量具有明显差异性,其中 R-Lt 组、R-Hv 组和 R-Pf 组的挥发性化合物相对含量明显高于其他非酿酒酵母组。对于酿酒酵母组间,以 BDX

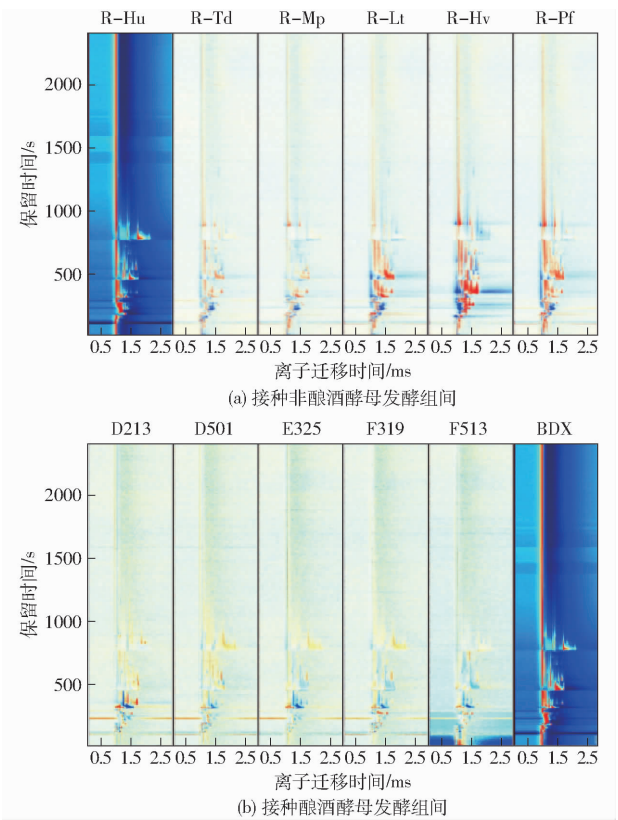


图 2 不同发酵组葡萄酒 GC-IMS 差异谱图

Fig.2 GC-IMS spectra of wines from different fermentation groups

组的谱图作为参比,扣除 BDX 组得到其他接种酿酒酵母发酵组的差异谱图,如图 2b 所示。酿酒酵母组间挥发性化合物相对含量也具有一定差异,其中 D213 组的挥发性化合物相对含量稍高于参比组,而其他组部分挥发性化合物相对含量可能稍低于参比组。由此说明了葡萄酒复杂多样的香气与参与酒精发酵过程的微生物密切相关^[25-27]。

进一步探究各发酵组的酒样中各种挥发性风味物质组成及其差异情况,利用 Gallery Plot 插件并以正构酮 C4~C9 作为外标,通过对比各挥发性化合物的离子迁移时间与保留时间,对酒样中的挥发性化合物进行定性分析,并生成指纹图谱。

图 3a 为接种非酿酒酵母的赤霞珠葡萄酒中挥发性化合物结果(其中,1 表示 R-Hv 组的特征区域;2 表示 R-Hu、R-Mp、R-Lt 和 R-Pf 的特征区域;3 表示非酿酒酵母各组共有的挥发性化合物)。接种非酿酒酵母的赤霞珠葡萄酒中共检测出 47 种物质,其中包括 24 种酯类、13 种醛酮类、5 种醇类和 5 种其他类物质。从图 3a 可看出,接种了非酿酒酵母的赤霞珠葡萄酒中含有的挥发性化合物相对含量存在较明显差异,既有共同的挥发性化合物区域,也有各自的特征挥发性化合物区域。其中左侧 3 号边框框出的部分是非酿酒酵母各组共有的挥发性化合物,主要包括 2-己醇、2-甲基丁酸己酯、2-壬酮、2-甲

基-1-丙醇、丙酸乙酯、乙酸乙酯和庚醛,但各非酿酒酵母组在这些挥发性成分的含量上具有差异性。右侧 1 号边框框出部分为非酿酒酵母 R-Hv 组的特征区域,主要包括乙酸丙酯、乙酸丁酯、乙酸己酯、乙酸异丁酯、乙酸甲酯等乙酸酯类物质,2-甲基戊酸乙酯、2-羟基丙酸乙酯、丙酸乙酯、丙烯酸乙酯等短链脂肪酸乙酯类物质,和 2-戊醇、2-丁醇、1-己醇等醇类物质。中间 2 号边框框出部分为非酿酒酵母 R-Hu、R-Mp、R-Lt 和 R-Pf 的特征区域,其中 R-Pf 组在丁酸乙酯、2-戊酮和己醛含量上相对更高;R-Lt 组在 2-丙烯酸丁酯、3-甲基丁酸乙酯和丙酸乙酯含量上相对更高;R-Hu 组在 2,4-己二烯醛、丙醛含量上相对更高。

接种酿酒酵母的赤霞珠葡萄酒中挥发性化合物结果如图 3b 所示(其中,1 表示 D213 的特征区域;2 表示酿酒酵母各组共有的挥发性化合物)。在接种酿酒酵母的赤霞珠葡萄酒中共检测出 42 种物质,其中包括 20 种酯类、13 种醛酮类、4 种醇类和 5 种其他类物质。从图 3b 可看出,接种了酿酒酵母的赤霞珠葡萄酒中含有的挥发性化合物相对含量差异较小。其中左侧 2 号边框框出部分为酿酒酵母各组共有的挥发性化合物,主要包括乙酸乙酯、丙酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸丁酯、2-甲基丁酸己酯、己醛、庚醛、2-壬酮、3-羟基-2-丁酮、2-甲基-1-丙醇、2-

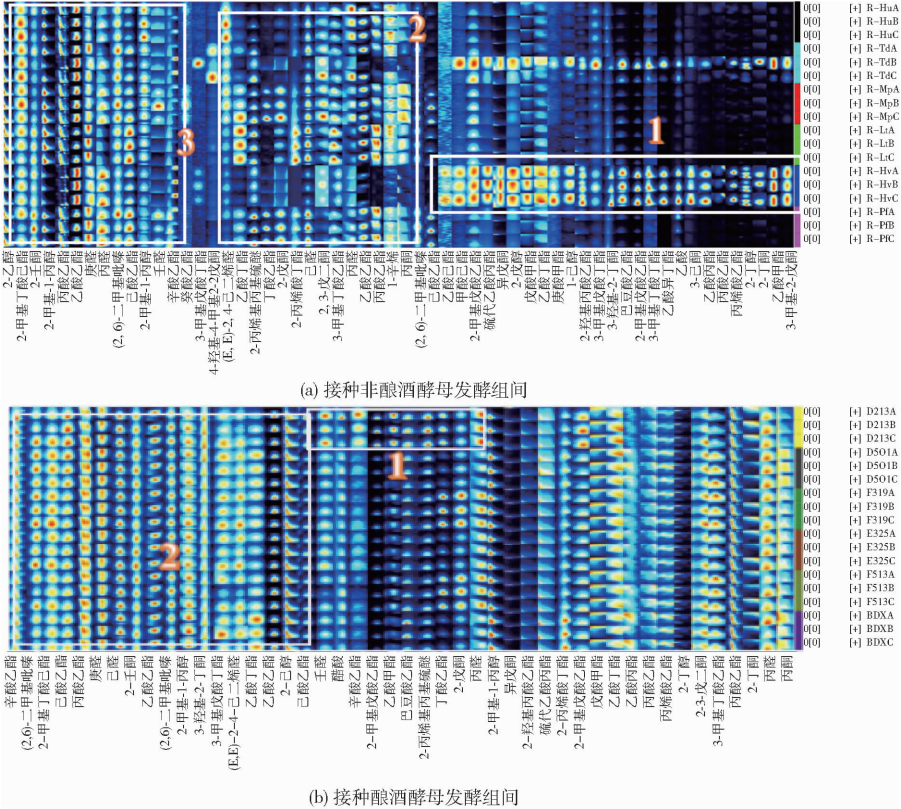


图 3 不同发酵组葡萄酒 GC-IMS 指纹图谱

Fig. 3 GC-IMS fingerprints of wines from different fermentation groups

己醇、2,6-二甲基吡嗪,且各组在这些挥发性成分的含量上差异性较小。而右侧 1 号边框框出部分为野生酿酒酵母 D213 组的特征区域,主要包括辛酸乙酯、己酸乙酯、2-甲基戊酸乙酯、巴豆酸乙酯、乙酸甲酯、壬醛、2-丙烯基丙基硫醚、醋酸。

综上所述,无论酿酒酵母还是非酿酒酵母,对最终的葡萄酒香气成分都具有贡献。但不同菌株影响的具体香气成分不同,且非酿酒酵母间挥发性成分差异显著^[28],对葡萄酒风味差异性影响更大。

2.4 丰度优势菌株对宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒特征香气的表达

从图 2 和图 3 可看出,各发酵组最终酒样香气成分丰富且复杂。但葡萄酒风味特征除了与挥发性化合物种类及其相对含量有关,还与其气味活性值 (Odorant activity value, OAV, 即化合物浓度/感觉阈值) 相关。其中, $0.1 \leq OAV \leq 1$ 的香气成分对葡萄酒总体风味贡献较为重要,而 $OAV \geq 1$ 的香气成分可认为是酒体关键风味化合物。相关研究显示,关键风味化合物对葡萄酒风味具有重要意义^[15]。由于目前 GC-IMS 数据库尚不完全,有部分检测出的挥发性化合物无法进行定性,因而用 GC-MS 进行定性定量分析。

各处理组间物质含量相差较大,为使各指标处于同一数量级,对所得数据进行归一化处理。其中,参考 DU 等^[29]研究,一种风味化合物的归一化值大于 0.7 的菌株可被确定为该风味化合物的高生产者。各丰度优势菌株对关键特征香气的表达如图 4 所示。从图 4 可看出,R-Hv 组的乙酸异戊酯归一化值为 0.93,可以认为非酿酒酵母 R-Hv 是高产乙酸异戊酯的菌株;非酿酒酵母 R-Hu 组的 β -大马士酮归一化值为 0.91,即菌株 R-Hu 是高产 β -大马士酮的菌株。而 R-Mp 组、E325 组和 F319 组的正己酸乙酯归一化值分别为 0.78、0.75 和 0.76,可以认为非酿酒酵母 R-Mp 和野生酿酒酵母 E325、F319 是高产正己酸乙酯的菌株。R-Pf 组、D213 组和 E325 组的辛酸乙酯归一化值分别为 0.81、0.93 和 0.84,即非酿酒酵母 R-Pf 和野生酿酒酵母 D213、E325 是高产辛酸乙酯的菌株。R-Mp 组、

R-Pf 组、D213 组和 E325 组的癸酸乙酯归一化值分别为 0.82、0.76、0.71 和 0.75,可以认为非酿酒酵母 R-Mp、R-Pf 和野生酿酒酵母 D213、E325 是高产癸酸乙酯的菌株。D213 组的乙酸苯乙酯归一化值为 0.96,可以认为其是高产乙酸苯乙酯的菌株。

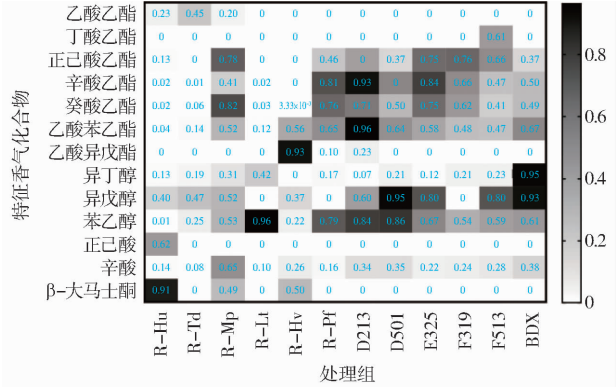


图 4 丰度优势菌株对赤霞珠关键特征香气的表达
Fig.4 Expression of key characteristic aroma of Cabernet Sauvignon by abundance dominant strains

综上所述,不同菌株对赤霞珠葡萄酒中的关键风味化合物的贡献不同,且单菌株无法产生所有关键特征香气成分。因而,最终葡萄酒风味是多菌株共同作用的结果。

3 结束语

探究了从宁夏银川产区赤霞珠分离筛选得到的丰度优势菌株对赤霞珠葡萄酒中关键风味化合物的贡献。不同菌株对赤霞珠葡萄酒中的关键风味化合物的贡献不同。银川赤霞珠葡萄酒发酵过程丰度优势菌群中,非酿酒酵母 R-Hu、R-Mp、R-Lt、R-Hv、R-Pf 和各野生酿酒酵母 D213、D501、E325、F319 和 F513 是宁夏银川产区赤霞珠葡萄酒中关键特征香气的高产菌株。其中 R-Hu 高产 β -大马士酮,R-Mp 高产正己酸乙酯和癸酸乙酯,R-Lt 高产苯乙醇,R-Hv 高产乙酸异戊酯,R-Pf 高产辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸苯乙酯和苯乙醇,D213 高产辛酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸苯乙酯和苯乙醇,D501 高产异戊醇和苯乙醇,E325 高产正己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯和异戊醇,F319 高产正己酸乙酯,F513 高产异戊醇。

参 考 文 献

[1] CHEN Renwei, ZHANG Xiaoyu, YANG Yu, et al. Analyses of vineyard microclimate in the eastern foothills of the Helan mountains in Ningxia region, China[J]. Sustainability, 2023, 15(17): 12740.

[2] YANG Hui, WANG Zheng, ZHANG Zhong, et al. Diversity of ‘Cabernet Sauvignon’ grape epidermis and environmental bacteria in wineries from different sub-regions of the eastern foothills of Helan mountain, Ningxia[J]. Foods, 2024,13(2): 252.

[3] LI Ruirui, FENG Danping, WANG Hui, et al. Genetic diversity of non-Saccharomyces yeasts associated with spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon wines from Ningxia, China[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1253969.

[4] LIU Junyu, LI Ruirui, LI Ying, et al. Selection of indigenous saccharomyces cerevisiae strains with good oenological and aroma characteristics for winemaking in Ningxia China[J]. Food Chemistry: X, 2024, 23: 101693.

[5] ZHANG Jing, WANG Xuerong, ZHANG Fang, et al. Influence of an indigenous yeast, CECA, from the Ningxia wine region of China, on the yeast community dynamics and aroma of Cabernet Sauvignon wines[J]. LWT, 2023, 189: 115506.

[6] DI CAGNO R, FILANNINO P, GOBBETTI M. Lactic acid fermentation drives the optimal volatile flavor-aroma profile of pomegranate juice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 248: 56 – 62.

[7] HE Yang, WANG Xinyuan, LI Penghui, et al. Research progress of wine aroma components: a critical review[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134491.

[8] GAO Jie, WANG Mingfei, HUANG Weidong, et al. Indigenous saccharomyces cerevisiae could better adapt to the physicochemical conditions and natural microbial ecology of prince grape must compared with commercial saccharomyces cerevisiae FX10[J]. Molecules, 2022, 27(20): 6892.

[9] MORATA A, LOTIA I, ESCOTT C, et al. Applications of metschnikowia pulcherrima in wine biotechnology[J]. Fermentation, 2019, 5(3): 63.

[10] WANG Chunxiao, GARCIA-FERNANDEZ D, MAS A, et al. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1156.

[11] 魏昭, 吴蕊, 王权, 等. 美极梅奇酵母在发酵果酒中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(24): 248 – 254.

WEI Zhao, WU Rui, WANG Quan, et al. Research progress on the application of *Metschnikowia pulcherrima* in fermented fruit wine[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(24): 248 – 254. (in Chinese)

[12] DUARTE F L, EGIPTO R, MARGARIDA BALEIRAS-COUTO M. Mixed fermentation with metschnikowia pulcherrima using different grape varieties[J]. Fermentation, 2019, 5(3): 59.

[13] BORREN E, TIAN Bin. The important contribution of non-saccharomyces yeasts to the aroma complexity of wine: a review [J]. Foods, 2020, 10(1): 13.

[14] STYGER G, PRIOR B, BAUER F F. Wine flavor and aroma[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(9): 1145.

[15] FERREIRA V, ORTIN N, ESCUDERO A, et al. Chemical characterization of the aroma of Grenache rose wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(14): 4048 – 4054.

[16] 葛谦, 王小丽, 王云霞, 等. 宁夏贺兰山东麓不同产地‘赤霞珠’葡萄酒挥发性香气物质特征分析[J]. 中国酿造, 2022, 41(2): 98 – 106.

GE Qian, WANG Xiaoli, WANG Yunxia, et al. Characteristics analysis of volatile aroma substances in ‘Cabernet Sauvignon’ wines from different producing regions at the eastern foot of Helan mountain in Ningxia[J]. China Brewing, 2022, 41(2): 98 – 106. (in Chinese)

[17] GAO Jie, GENG Huiying, CHAI Ruru, et al. Fungal community composition and its relationship with volatile compounds during spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon from two Chinese wine-growing regions[J]. Foods, 2024, 13(1): 106.

[18] 金刚, 张雪, 谷晓博, 等. 贺兰山东麓不同子产区赤霞珠葡萄自然发酵对葡萄酒香气的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(7): 153 – 160.

JIN Gang, ZHANG Xue, GU Xiaobo, et al. Effects of spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon from different sub-regions of Helan Mountain east foothill on wine aroma[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(7): 153 – 160. (in Chinese)

[19] 郭方圆. 不同种植模式下自然发酵的赤霞珠葡萄酒中酵母多样性比较及香气分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2023.

[20] 刘佳禾. 银川产区葡萄酒自然发酵体系中酵母种群多样性及对风味贡献的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2024.

[21] HAN Xiaoyu, QING Xin, YANG Siyu, et al. Study on the diversity of non-saccharomyces yeasts in Chinese wine regions and their potential in improving wine aroma by β -glucosidase activity analyses[J]. Food Chemistry, 2021, 360: 129886.

[22] 沈燕, 张正文, 刘兴凯, 等. 高效液相色谱检测葡萄及葡萄酒中 7 种有机酸方法的建立[J]. 食品安全导刊, 2023 (16): 76 – 79.

SHEN Yan, ZHANG Zhengwen, LIU Xingkai, et al. Establishment the method of seven kinds of organic acids in grape and wine by high performance liquid chromatography[J]. China Food Safety Magazine, 2023(16): 76 – 79. (in Chinese)

[23] 马宁原. 不同发酵方式对黄桃酒风味的影响及其呈香机理研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2023.

[24] GAO Jie, WU Tianyang, GENG Huiying, et al. Elucidating the relationship between microbial communities and the formation of flavour metabolites in Cabernet Sauvignon wine through metagenomic analysis[J]. LWT, 2024, 213: 117076.

[25] LIU Shuxun, LOU Ying, LI Yixian, et al. Aroma characteristics of volatile compounds brought by variations in microbes in winemaking[J]. Food Chemistry, 2023, 420: 136075.

[26] WANG Meiqi, WANG Jiarong, CHEN Jiawei, et al. Effect of commercial yeast starter cultures on Cabernet Sauvignon wine aroma compounds and microbiota[J]. Foods, 2022, 11(12): 1725.

[27] 张倩玮, 张凡, 宋昊, 等. 微生物手段改善葡萄酒萜烯类化合物香气特征研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2024, 60(5): 108 – 114.

ZHANG Qianwei, ZHANG Fan, SONG Hao, et al. Research progress on microbial methods to improve aroma characteristics of terpenes in wine[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2024, 60(5): 108 – 114. (in Chinese)

[28] 邵建波, 李印所, 薛永春, 等. 非酿酒酵母在葡萄酒中的作用研究进展[J]. 现代食品, 2024, 30(15): 82 – 87.

SHAO Jianbo, LI Yinsuo, XUE Yongchun, et al. Research progress on the role of non-saccharomyces cerevisiae in wine[J]. Modern Food, 2024, 30(15): 82 – 87. (in Chinese)

[29] DU Rubing, JIANG Jian, QU Guanyi, et al. Directionally controlling flavor compound profile based on the structure of synthetic microbial community in Chinese liquor fermentation[J]. Food Microbiology, 2023, 114: 104305.