

# 烟台贵人香葡萄自然发酵醪中本土酿酒酵母的选育及酿造特性研究

程仕伟<sup>1</sup>, 韩鹏<sup>2</sup>, 屈慧鸽<sup>1</sup>, 宋建强<sup>1</sup>, 姜文广<sup>2</sup>, 于英<sup>2</sup>, 李记明<sup>2</sup>

(1. 鲁东大学生命科学学院/应用微生物研究所, 山东烟台 264025)

(2. 烟台张裕集团有限公司/山东省葡萄酒微生物发酵技术重点实验室, 山东烟台 265709)

**摘要:** 自葡萄原料生产地选育优良酿造特性的本土酵母是开发地方特色葡萄酒品种的重要措施。本研究以烟台地区贵人香葡萄自然发酵醪为材料, 筛选酿酒酵母并对其发酵特点和耐受能力进行测定, 进而选育本土酿酒酵母用于霞多丽干白和赤霞珠干红葡萄酒的酿造试验。采用孟加拉红选择性培养基筛选本土酵母菌, 并经 WL 鉴定培养基和 5.8S ITS 序列鉴定获得 12 株酿酒酵母。通过测定发酵后残糖量和酒精度及耐受能力(酒精度、SO<sub>2</sub>、酸、高糖), 选育 4 株酵母用于酿造霞多丽干白葡萄酒, 对酒样指标、主要挥发物和香气组分分析, 显示菌株 YGF2、YGF5 和 YGF10 的酿造特性和发酵指标较好, 并用于酿造赤霞珠干红葡萄酒。结果表明菌株 YGF2 酿造的葡萄酒质量较好, 香气浓郁, 部分指标优于商品酿酒酵母, 具备生产区域特色葡萄酒的潜力。

**关键词:** 酿酒酵母; 酿造特性; 本土酵母; 葡萄酒酿造; 贵人香

文章编号: 1673-9078(2016)3-170-176

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.028

## Screening and Brewing Characteristics of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from the Mash of Spontaneous Fermentation of Italian Riesling Grapes

CHENG Shi-wei<sup>1</sup>, HAN Peng<sup>2</sup>, QU Hui-ge<sup>1</sup>, SONG Jian-qiang<sup>1</sup>, JIANG Wen-guang<sup>2</sup>, YU Ying<sup>2</sup>, LI Ji-ming<sup>2</sup>

(1. Institute of Applied Microbiology, College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China) (2. Shandong

Key Lab of Grape Wine Microbial Fermentation Technology, Changyu Group Co. Ltd, Yantai 264001, China)

**Abstract:** Screening of indigenous yeasts with good fermentation characteristics from grape growing areas is an important method for the development of wine varieties with local characteristics. In this paper, the mash of spontaneous fermentation of Italian Riesling grapes (Yantai region) was used as the material to screen *Saccharomyces cerevisiae*; its fermentation characteristics and alcohol tolerance were measured and, consequently, indigenous yeast strains were selected for the brewing test of Chardonnay dry white and Cabernet Sauvignon dry red wines. Rose Bengal Agar selective medium was used for the screening of indigenous yeasts and twelve *S. cerevisiae* strains were obtained using Wallerstein Laboratory (WL) medium and 5.8S internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis. After the residual sugar, alcohol content, and alcohol tolerance were determined (alcohol content, SO<sub>2</sub>, organic acid, and high concentration of glucose), four *S. cerevisiae* strains were selected to produce Chardonnay dry white wine. Wine sample index, main volatiles, and aroma component were analyzed and strains YGF2, YGF5, and YGF10 presented relatively good brewing characteristics. They were then used for the production of Cabernet Sauvignon dry red wine. The results showed that the wine produced by strain YGF2 presented a relatively good quality and a rich aroma. Strain YGF2 exhibited some better indices than the commercial yeasts and presented a potential to produce a wine with local characteristics.

**Key words:** brewing characteristics; indigenous yeast; Italian Riesling; *S. cerevisiae*; wine production

葡萄酒的香气成分决定着葡萄酒的风味特征和典型性, 其来源和组成主要受葡萄品种、生态条件、

收稿日期: 2015-05-12

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2013M531646); 山东省博士后创新项目专项(201303009); 烟台市科技发展计划项目(2014LGS010)

作者简介: 程仕伟(1976-), 男, 博士后, 副教授, 研究方向为发酵工程

果实成熟质量及酿造工艺技术等因素影响<sup>[1]</sup>。酵母菌是影响葡萄酒品质的重要因素, 葡萄酒中许多重要的香气组分如挥发酸、酯类、高级醇等的组成与含量比例都与酵母菌有密切关系。采用不同酵母且相同葡萄原料发酵生产的葡萄酒, 在色泽、香气、感官质量以及出酒率等方面都存在较大的差异<sup>[2]</sup>。

酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 是葡萄酒酿造中起主导作用的微生物, 直接影响葡萄酒的产量、质量和经济性。各种酿酒酵母的发酵特性和代谢途径存在不同, 产生的代谢物也不尽相同, 因此作用于葡萄原料中香气物质前体生成的发酵香气差异较大, 从而生产的葡萄酒具有一些不同的风味特征, 对葡萄酒特色形成至关重要<sup>[3,4]</sup>。然而目前我国葡萄酒产业的一个突出问题是多数葡萄酒生产厂为保证发酵速率和产品质量稳定, 大量使用进口的活性酿酒酵母, 导致葡萄酒品质严重同质化, 一定程度上降低了本土酿酒酵母对葡萄酒香气的贡献, 缺乏拥有核心竞争力的地域特色葡萄酒品种<sup>[5]</sup>。

优良的本土酿酒酵母菌缺乏在一定程度上制约我国葡萄酒产业的发展。从不同产区不同品种的葡萄中筛选出适应当地气候、土壤和葡萄品种的优良酿造葡萄酒酵母, 对于充分利用本国微生物资源, 开发特色优质葡萄酒具有重要意义<sup>[6,7]</sup>。烟台处于与法国著名葡萄酒产区波尔多地区同一纬度的北纬 37.5 度附近, 三面环海, 气候温和, 加上丘陵低山的沙质土壤, 具备海岸葡萄酒“阳光、沙砾和海洋”的三大要素, 是中国葡萄酒的发祥地, 如今也是中国最大的葡萄酒生产基地。烟台作为我国重要的酿酒葡萄种植和葡萄酒生产区, 蕴藏着丰富的本土酵母资源, 通过该产区酿酒葡萄自然发酵过程中的酿酒酵母特性研究, 选育优良酵母菌种进而为生产地域特色的葡萄酒提供良好保证。贵人香葡萄原产意大利, 于 1892 年引入山东烟台, 并在我国北方葡萄产区均有栽培, 其在烟台地区的长期种植使得选育独特的本土酿酒酵母成为可能。本文通过筛选烟台贵人香葡萄自然发酵醪中的酿酒酵母, 研究其发酵特性并进行葡萄酒酿造试验, 以期获得高品质的葡萄酒酿造酵母。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

贵人香、霞多丽和赤霞珠酿酒葡萄来自烟台张裕集团有限公司的烟台地区种植基地, 商品酿酒酵母 D254、RC212、CY3079 和 RHST 分别购自 Laffort 公司和 Lallemend 公司, 所用试剂均为分析纯或生物纯。

### 1.2 酿酒酵母筛选与鉴定

新采摘贵人香酿酒葡萄装入 5 L 事先灭菌的玻璃瓶, 现场捣碎后用 8 层无菌纱布封口。在 28 °C 下自然发酵 3 d 后, 取样并稀释涂布孟加拉红培养基平板, 28 °C 下培养 2~3 d 至长出单菌落。挑取部分单菌落转

接 WL 培养基平板, 28 °C 下培养 5 d 后观察菌落形态, 并结合 5.8 S ITS 序列的菌特征确定其菌属<sup>[5]</sup>。

所用的孟加拉红培养基 (g/L): 葡萄糖 10,  $K_2HPO_4$  1,  $MgSO_4$  0.5, 蛋白胨 5, 孟加拉红 0.0133, 氯霉素 0.1, 琼脂 20, pH 6.5。WL 培养基 (g/L): 酵母粉 4, 蛋白胨 5, 葡萄糖 50,  $KH_2PO_4$  0.55, KCl 0.425,  $CaCl_2$  0.125,  $MgSO_4$  0.125,  $FeCl_3$  0.0025,  $MnSO_4$  0.0025, 溴甲酚绿 0.022, 琼脂 20, pH 5.5。

### 1.3 酿酒酵母的发酵性能测定

筛选的酿酒酵母首先经活化培养基活化 20 h, 接种环蘸取菌种入 10 mL 发酵培养基试管, 以商品酵母 D254 为对照, 28 °C 恒温培养, 发酵 6 d 后测定还原糖和酒精度。采用 DNS 比色法测定还原糖的含量, 重铬酸钾比色法测定酒精度。发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 200, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, pH 6.5。

### 1.4 酿酒酵母的耐受力测定

采用不同乙醇浓度 (10% vol、13% vol、16% vol、19% vol)、柠檬酸浓度 (2%、5%、8%、11%)、 $SO_2$  浓度 (60 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L) 和葡萄糖浓度 (200 g/L、300 g/L、400 g/L、500 g/L) 的 10 mL 发酵培养基 (内装有杜氏管), 接种已活化的菌液一环, 以商品化酵母 D254 为对照, 28 °C 恒温培养并定期记录结果, 依据杜氏管充满  $CO_2$  气体时间来判定酿酒酵母的耐受力。

### 1.5 酿造生产霞多丽干白和赤霞珠干红葡萄酒

#### 1.5.1 菌种制备

供试酿酒酵母经活化培养基活化 20 h 后, 在 8 °C 和 10000 r/min 下离心 5 min 收集菌体, 加无菌水混旋后离心洗涤 2 次, 收集菌体备用。活化培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, pH 6.5。

#### 1.5.2 酿造霞多丽干白葡萄酒

破碎压榨后的霞多丽葡萄汁 (初始糖度为 207 g/L, 总酸为 5.88 g/L) 装入 10 L 发酵容器中, 装液量为 7 L, 添加  $SO_2$  至终浓度为 60 mg/L, 接入酿酒酵母菌种, 定期称重并用糖度计检测发酵程度。发酵终止后收集葡萄酒, 分析检测。

#### 1.5.3 酿造赤霞珠干红葡萄酒

赤霞珠葡萄 (初始糖度为 205 g/L, 总酸为 5.64 g/L) 破碎除梗装入 20 L 发酵容器中, 装液量为 14 L, 添加  $SO_2$  至终浓度为 60 mg/L, 接入酿酒酵母菌种,

定期称重并用糖度计检测发酵程度。发酵终止后倒瓶去皮渣, 取样分析检测。

### 1.6 葡萄酒的分析检测方法

#### 1.6.1 酒度、总酸、挥发酸、pH 和残糖的测定

样品经 10000 r/min 离心 5 min 后, 采用葡萄酒分析仪 (WineScan™, 丹麦 FOSS) 测定。

#### 1.6.2 甘油含量测定

采用高效液相色谱法测定: 离心后的葡萄酒样经 0.45 μm 滤膜过滤后直接进样, 色谱柱: shim-pack, clc-NH<sub>2</sub> (15 cm×6.0 mm), 柱检测器: 折光指数检测器, 流动相: 75%乙腈和 25%水, 流速: 2 mL/min, 进样量 20 ul, 柱温为室温。

#### 1.6.3 花色苷、总酚、色度和单宁含量测定

紫外分光光度计法<sup>[8]</sup>。

#### 1.6.4 主要挥发物总量的测定

气相色谱测定, 备有氢火焰离子化检测器, Varian CP3800, 色谱柱: CP-WAX57CB。

#### 1.6.5 香气成分含量测定

固相微萃取后气相色谱检测香气成分: 载气流速 0.8 mL/min, 分流比 30:1, 尾吹 25 mL/min, 氢气流速 30 mL/min, 空气流速 300 mL/min, 检测器温度 250 °C, 进样口温度 250 °C, 柱温起始温度 50 °C, 恒温 1 min, 以 4 °C/min 程序升温至 220 °C, 继续恒温 5 min。SPME 条件: 取样品 5 mL 置于 15 mL 萃取瓶中, 加入 2 g NaCl, 封口, 置磁力搅拌器上 (40 °C) 加热搅拌, PDMS 萃取头萃取 30 min。

### 1.7 数据分析

所有实验数据均做三个平行, 采用 SPSS 13.0 和 Excel 2003 进行 T 检验和单因素方差分析其差异显著水平, 并计算平均值和标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酿酒酵母的筛选与鉴定

自然发酵 3 d 后的贵人香酒样稀释涂布孟加拉红培养基, 培养长出的单菌落划线转接 WL 培养基平板, 在 28 °C 下培养 5 d 的菌落形态, 见图 1。文献表明 WL 培养基对酿酒酵母的鉴别准确度可达 100%<sup>[9]</sup>, 筛选的 12 株酵母菌在 WL 培养基上均呈奶油色且稍带绿色、表面光滑、不透明, 具备典型酿酒酵母的形态特征。

为进一步验证结果准确性, 随机选取 2 株酵母菌 (YGF2 和 YGF6) 进行 5.8S ITS 序列鉴定, 在

Genbank 上序列比对, 与 *S. cerevisiae* (KP204935.1 和 KP723682.1) 同源性达 99%, 并利用 MEGA6.06 构建系统发育树 (图 2), 确定为酿酒酵母。综上判定筛选的酵母菌株为酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)。

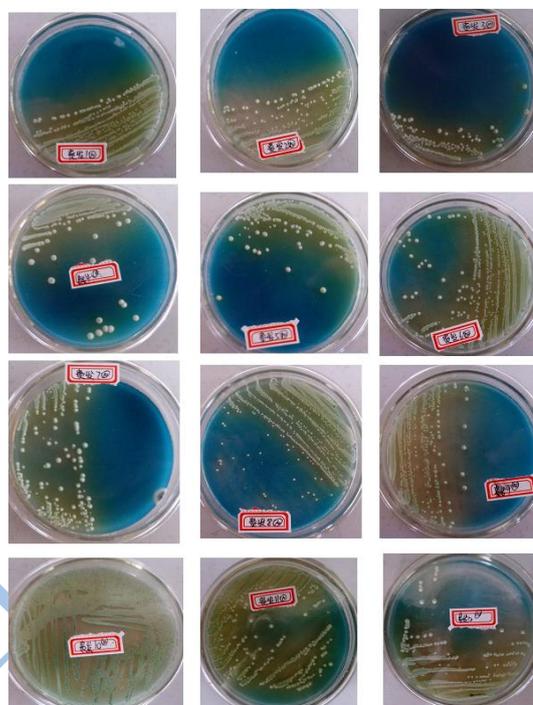


图 1 本土酵母在 WL 培养基上的生长形态

Fig.1 Growth morphology of indigenous yeasts in WL medium

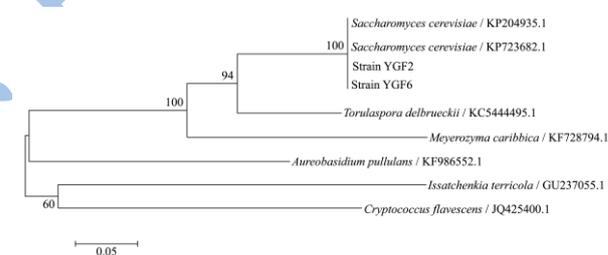


图 2 系统进化树的同源性比较

Fig.2 Homology comparison with phylogenetic tree

### 2.2 酿酒酵母的发酵性能

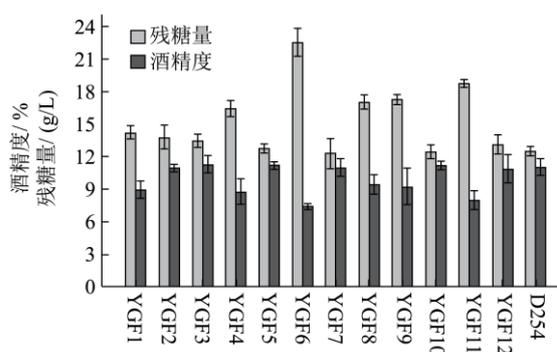


图 3 发酵液中的残糖量与酒精度

Fig.3 Amount of residual sugar and alcohol in the broth

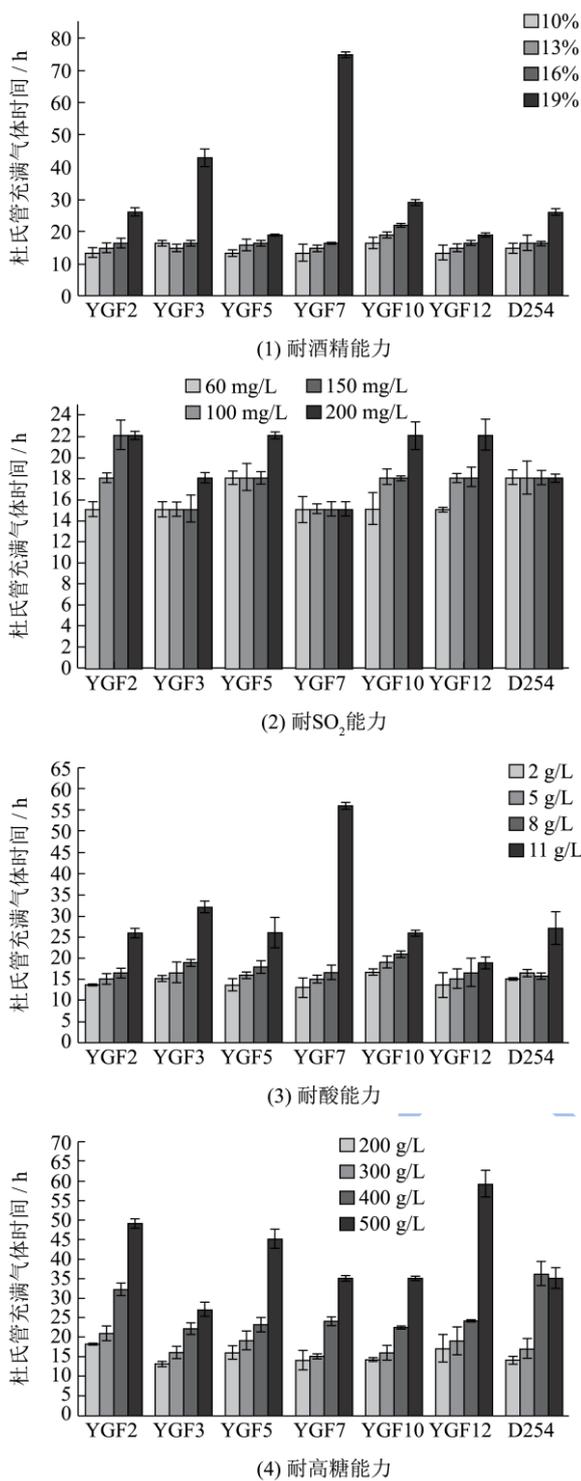


图4 酿酒酵母的耐受能力比较

Fig.4 *S. cerevisiae* tolerance capability

采用发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 200, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, pH 6.5。以商品化酿酒酵母 D254 作为对照, 以残糖量和酒精体积分数为评价指标, 发酵 6 d 后供试菌株的发酵性能比较见图 3。由图 3 可以看出, 酿酒酵母 YGF2、YGF3、YGF5、YGF7、YGF10 和 YGF12 的发酵后残糖与酒精体积分数与 D254 的发酵后数据差异不显著 ( $p>0.05$ ), 故作为后续深入研究的

菌株。除此之外, 其余菌株的发酵样残糖量偏高且酒精度低, 尤其是酵母 YGF6 的发酵样残糖量高达 22.47 g/L, 酒精度只有 7.37%。与烟台蛇龙珠葡萄自然发酵醪中选育的酿酒酵母发酵特性类似<sup>[10]</sup>, 发酵 6 d 后的残糖量未达到干酒的标准, 原因可能是发酵培养基组分与葡萄原料成分差异较大所致。

### 2.3 酿酒酵母的耐受能力比较

酿酒酵母耐受能力比较见图 4。酿酒酵母 YGF7 耐受高浓度酒精的能力较差, 在 19% 酒精度下杜氏管充满气体的时间超过 75 h, 其余菌株的酒精耐受能力则能够满足实际生产应用需求。供试菌株的耐受 SO<sub>2</sub> 能力差异不显著, 起酵速率快 (杜氏管充满气体时间均未超过 24 h)。与耐受 SO<sub>2</sub> 能力类似的, 酿酒酵母对酸的耐受力除 YGF7 稍弱外, 其余菌株均差异不大。酿酒酵母 YGF3、YGF7、YGF10 的耐受高糖能力较强, 其次是菌株 YGF2 和 YGF5, 而 YGF12 耐受高浓度糖 (500 g/L) 的能力最差。

### 2.4 选育的酿酒酵母酿造霞多丽干白葡萄酒

综合酿酒酵母发酵特性和耐受能力的结果, 选取 YGF2、YGF3、YGF5 和 YGF10 进行霞多丽干白葡萄酒的酿造试验, 并以干白酿造过程中常用的进口商品酵母 RHST 和 CY3079 作为对照, 按照 10% 体积浓度 (种子培养液/发酵葡萄汁) 接入酵母菌, 其酒样的发酵参数指标见表 1, 主要挥发物结果分析见表 2, 香气组分含量见表 3。

由表 1 可以看出, 选育的本土酿酒酵母酿造的葡萄酒酒度和 pH 与商品化酵母无明显差异。菌株 YGF3 和 YGF5 的发酵样总酸含量略高于商品酵母, 而 YGF2 的发酵样低于商品酵母 RHST 和 CY3079。挥发酸含量指标中, YGF3 和 YGF10 的数值略高于商品酵母的发酵样, 分别为 0.56 和 0.51 g/L, 但在感官品尝不明显范畴内。所有供试菌株制备的霞多丽葡萄酒的残糖量均低于 4 g/L, 达到干酒要求; 一定量甘油含量对葡萄酒的感官品质具有积极作用, 对于甘油含量而言, 除菌株 YGF5 与 RHST 差异不明显外, 其余菌株与商业对照菌株均差异极显著 ( $p<0.01$ ), 最高为 YGF5 的发酵酒样, 为 6.4 g/L, 其次为商品酵母 RHST (6.2 g/L)。

一定含量的高级醇不仅可以增加葡萄酒总体风格和香气的协调性, 赋予葡萄酒以醇厚、丰满的口感, 同时还突出了葡萄酒风格的典型性。但是高级醇含量过高或过低也会对葡萄酒的风味产生不良影响, 在葡萄酒中的含量一般在 80~540 mg/L 之间<sup>[11]</sup>。由表 2 可

以看出, 供试酵母发酵酒样的主要挥发物总量均小于 540 mg/L, 对葡萄酒的香气具有积极作用, 但是具体指标间存在一定差异。如酵母 YGF3、YGF5 和 YGF10 发酵酒样的乙醛含量分别为 130.21 mg/L、110.85 mg/L 和 166.10 mg/L, YGF2、YGF3 和 YGF10 的乙酸乙酯含量分别为 59.73 mg/L、54.27 mg/L 和 58.30 mg/L,

均显著高于商品酵母。除此之外, 所有本土酵母的发酵酒样正丙醇含量均高于商品酵母, 而 YGF3 和 YGF10 的糠醛含量也显著高于商品酵母。对于特定测定指标而言, 不同酿酒酵母菌株的发酵酒样存在差异, 个别参数差异显著, 这可能是造成葡萄酒香气和风味不同的原因之一。

表 1 干白葡萄酒的发酵参数指标

Table 1 Fermentation parameter of dry white wine

测定指标	选用酵母					
	YGF2	YGF3	YGF5	YGF10	RHST	CY3079
酒度/%	10.52±0.11	10.28±0.31	10.32±0.42	10.30±0.21	10.26±0.53	10.38±0.39
总酸/(g/L)	5.89±0.21 <sup>ab</sup>	6.38±0.11 <sup>b</sup>	6.32±0.01 <sup>b</sup>	6.10±0.12	6.18±0.09	6.08±0.04
挥发酸/(g/L)	0.41±0.05	0.56±0.04	0.41±0.07	0.51±0.09	0.44±0.04	0.43±0.08
pH	3.57±0.06	3.67±0.08	3.62±0.03	3.62±0.04	3.61±0.06	3.64±0.07
残糖/(g/L)	2.08±0.09 <sup>ab</sup>	3.84±0.07 <sup>ab</sup>	2.51±0.05 <sup>ab</sup>	3.08±0.07 <sup>b</sup>	2.90±0.05	2.75±0.03
甘油/(g/L)	5.01±0.11 <sup>ab</sup>	4.55±0.04 <sup>ab</sup>	6.40±0.09 <sup>b</sup>	4.56±0.07 <sup>ab</sup>	6.20±0.07	3.81±0.09

注: a为供试组与RHST的对照组差异显著 ( $p<0.05$ ); b为供试组与CY3079的对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。

表 2 干白葡萄酒的主要挥发物分析

Table 2 Analysis results for the main volatiles of dry white wine

测定指标 /(mg/L)	选用酵母					
	YGF2	YGF3	YGF5	YGF10	RHST	CY3079
乙醛	60.07±0.72 <sup>ab</sup>	130.21±5.15 <sup>ab</sup>	110.85±3.79 <sup>ab</sup>	166.10±6.53 <sup>ab</sup>	92.31±7.36	73.26±3.19
乙酸乙酯	59.73±1.33 <sup>ab</sup>	40.18±2.07 <sup>ab</sup>	54.27±3.61 <sup>ab</sup>	58.30±1.79 <sup>ab</sup>	46.63±2.52	43.89±2.85
正丙醇	38.05±1.12 <sup>ab</sup>	43.81±3.46 <sup>ab</sup>	56.75±3.21 <sup>ab</sup>	38.86±2.49 <sup>ab</sup>	26.98±1.57	24.12±1.89
异丁醇	12.65±0.74 <sup>ab</sup>	29.46±1.87 <sup>a</sup>	35.01±1.53 <sup>ab</sup>	26.48±1.22 <sup>a</sup>	48.06±3.49	27.40±1.65
活性戊醇	19.91±0.69 <sup>b</sup>	13.68±1.12 <sup>ab</sup>	18.04±1.25 <sup>b</sup>	12.40±0.47 <sup>ab</sup>	20.82±3.05	15.37±1.31
异戊醇	120.59±4.72 <sup>b</sup>	97.42±3.29 <sup>a</sup>	107.80±2.34 <sup>ab</sup>	88.45±2.55 <sup>ab</sup>	117.81±4.38	99.17±3.64
糠醛	78.57±1.86 <sup>ab</sup>	93.93±3.97 <sup>ab</sup>	24.28±0.66 <sup>ab</sup>	136.09±4.59 <sup>ab</sup>	69.57±2.72	63.07±1.95
总量	389.57±5.92 <sup>a</sup>	448.69±8.15 <sup>ab</sup>	407.00±10.06 <sup>ab</sup>	526.68±9.44 <sup>ab</sup>	422.18±8.75	346.28±9.39

注: a为供试组与RHST的对照组差异显著 ( $p<0.05$ ); b为供试组与CY3079的对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。

表 3 干白葡萄酒的香气组分含量分析

Table 3 Analysis for the content of aroma components in dry white wine

测定指标 /(mg/L)	选用酵母					
	YGF2	YGF3	YGF5	YGF10	RHST	CY3079
乙酸乙酯	2.43±0.07 <sup>ab</sup>	0.73±0.03 <sup>ab</sup>	1.33±0.11 <sup>b</sup>	1.72±0.09 <sup>a</sup>	1.35±0.07	1.62±0.04
乳酸乙酯	-	0.01±0.01	-	0.08±0.01	-	-
正己醇	2.32±0.16 <sup>a</sup>	4.73±0.33 <sup>ab</sup>	1.30±0.07 <sup>b</sup>	2.33±0.11 <sup>a</sup>	1.24±0.05	2.22±0.13
辛酸乙酯	0.65±0.03 <sup>b</sup>	0.43±0.08	0.40±0.06	0.72±0.05 <sup>b</sup>	0.54±0.02	0.35±0.02
癸酸乙酯	1.40±0.04 <sup>a</sup>	1.47±0.06 <sup>a</sup>	0.94±0.09 <sup>b</sup>	1.23±0.07	1.13±0.07	1.25±0.09
丁二酸乙酯	90.82±1.23 <sup>ab</sup>	82.44±0.95 <sup>ab</sup>	101.37±1.09 <sup>ab</sup>	80.53±2.15 <sup>a</sup>	87.56±1.26	78.44±4.79
乙酸苯乙醇	44.79±0.04 <sup>ab</sup>	38.83±0.07 <sup>a</sup>	47.53±0.07 <sup>ab</sup>	34.77±0.05 <sup>b</sup>	32.73±0.04	40.29±0.09
月桂酸乙酯	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.42±0.02 <sup>ab</sup>	0.25±0.03	0.17±0.01 <sup>ab</sup>	0.23±0.01	0.32±0.01
苯乙醇	27.46±0.05 <sup>ab</sup>	12.32±0.02 <sup>a</sup>	15.37±0.02 <sup>ab</sup>	12.39±0.04 <sup>a</sup>	10.76±0.01	11.23±0.03
十四酸乙酯	0.23±0.01 <sup>b</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.02 <sup>b</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.29±0.02	0.13±0.01
辛酸	37.97±0.15 <sup>ab</sup>	31.85±0.04 <sup>a</sup>	29.41±0.07 <sup>b</sup>	31.45±0.05 <sup>a</sup>	28.57±0.07	32.23±0.03
十六酸乙酯	15.44±0.06 <sup>ab</sup>	17.86±0.03 <sup>ab</sup>	13.69±0.08	10.72±0.02 <sup>ab</sup>	12.77±0.03	13.67±0.09

注: a为供试组与RHST的对照组差异显著 ( $p<0.05$ ); b为供试组与CY3079的对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。

对于白葡萄酒而言, 发酵阶段产生主要挥发物、酯和酸等是其最主要的香气物质<sup>[12]</sup>。供试菌株的香气组分以丁二酸乙酯、乙酸苯乙醇、苯乙醇、辛酸和十六酸乙酯的含量居多, 而乳酸乙酯微量且部分酒样中未见检出, 其余香气组分含量相对较少(表3)。YGF3发酵样品的正己醇(4.73 mg/L)、YGF5的丁二酸乙酯(101.37 mg/L)和乙酸苯乙醇(47.53 mg/L)、YGF2的苯乙醇(27.46 mg/L)和辛酸(37.97 mg/L)及乙酸苯乙醇(44.79 mg/L)含量明显高于商品酵母组, 因此选育的酿酒酵母酿造特性与商品酵母存在一定差异。

发酵酒样的感官品评由9名从事葡萄酒研究多年的专家组成, 其中5名来自企业的酿酒工程师组成,

具有较高的权威性和合理性。从外观、香气和口感三个方面进行感官测评, 酿酒酵母 YGF2、YGF5 和 YGF10 的发酵酒样香气浓郁且以 YGF2 为佳, 其平均得分分别为 84.5、80.6 和 82.2, 不同于商品酵母 RHST (80.4) 和 CY3079 (82.9) 的发酵酒样。

### 2.5 选育的酿酒酵母酿造赤霞珠干红葡萄酒

以干红葡萄酒酿造中常用的进口商品酵母 RC212 和 D254 作为对照, 对本土酿酒酵母 YGF2、YGF5 和 YGF10 进行赤霞珠干红葡萄酒的酿造试验, 按照 10% 体积浓度(种子培养液/发酵葡萄汁)接入酵母菌, 发酵参数指标见表 4, 香气组分分析见表 5。

表 4 干红葡萄酒的发酵参数指标

Table 4 Fermentation parameters of dry red wine

测定指标	选用酵母				
	YGF2	YGF5	YGF10	D254	RC212
酒度/%	10.8±0.01 <sup>a</sup>	10.5±0.04 <sup>a</sup>	10.1±0.09	9.7±0.04	10.4±0.09
总酸/(g/L)	8.72±0.04 <sup>ab</sup>	8.57±0.18 <sup>a</sup>	8.56±0.02 <sup>a</sup>	7.55±0.06	8.18±0.07
挥发酸/(g/L)	0.59±0.01 <sup>a</sup>	0.51±0.01 <sup>b</sup>	0.63±0.01 <sup>a</sup>	0.47±0.01	0.63±0.01
残糖/(g/L)	3.35±0.01 <sup>ab</sup>	3.53±0.02 <sup>ab</sup>	3.57±0.02 <sup>b</sup>	3.73±0.01	3.88±0.05
色度	10.45±0.03 <sup>a</sup>	11.88±0.01 <sup>ab</sup>	9.01±0.02 <sup>ab</sup>	11.33±0.03	10.46±0.01
总酚/(mg/L)	868.00±7.93 <sup>a</sup>	986.72±10.15 <sup>b</sup>	749.28±10.15 <sup>ab</sup>	947.52±8.41	865.48±5.88
单宁/(mg/L)	958.95±6.54 <sup>a</sup>	1116.38±11.29	873.36±7.14 <sup>ab</sup>	1038.21±9.54	961.35±6.47
花色苷/(mg/L)	336.19±2.26	378.14±1.52 <sup>b</sup>	283.13±3.79 <sup>ab</sup>	359.42±2.48	330.64±4.63

注: a为供试组与D254的对照组差异显著 ( $p<0.05$ ); b为供试组与RC212的对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。

表 5 干红葡萄酒的香气组分含量分析

Table 5 Analysis for the content of aroma components of dry red wine

测定指标 (mg/L)	选用酵母				
	YGF2	YGF5	YGF10	D254	RC212
乙酸己酯	-	0.01±0.01	-	0.01±0.01	-
乳酸乙酯	88.53±2.14 <sup>b</sup>	96.88±0.49 <sup>ab</sup>	92.14±1.27 <sup>b</sup>	90.56±1.81	94.79±0.74
正己醇	22.23±0.25 <sup>ab</sup>	14.62±0.73 <sup>ab</sup>	9.44±0.08 <sup>ab</sup>	19.53±0.23	11.84±0.31
辛酸乙酯	2.02±0.08 <sup>ab</sup>	1.34±0.11 <sup>ab</sup>	2.42±0.03 <sup>ab</sup>	2.87±0.05	3.01±0.09
癸酸乙酯	3.52±0.14 <sup>ab</sup>	1.33±0.06 <sup>ab</sup>	2.01±0.04	1.88±0.12	2.01±0.05
丁二酸乙酯	19.47±0.23 <sup>ab</sup>	12.46±0.15 <sup>ab</sup>	14.39±0.345 <sup>ab</sup>	11.64±0.08	13.06±0.17
乙酸苯乙醇	3.37±0.13 <sup>ab</sup>	1.36±0.05 <sup>b</sup>	2.34±0.06 <sup>ab</sup>	1.71±0.21	2.99±0.03
月桂酸乙酯	0.30±0.02	0.31±0.01	0.29±0.01	0.23±0.01	0.32±0.02
苯乙醇	80.22±2.39 <sup>ab</sup>	54.98±1.15 <sup>ab</sup>	87.47±1.76 <sup>ab</sup>	72.72±3.21	60.56±1.33
十四酸乙酯	0.31±0.02	0.15±0.05 <sup>ab</sup>	0.24±0.01 <sup>b</sup>	0.27±0.01	0.31±0.03
辛酸	9.87±0.09 <sup>a</sup>	10.23±1.04 <sup>a</sup>	10.01±0.07 <sup>a</sup>	12.99±1.15	10.50±1.04
十六酸乙酯	12.57±1.04 <sup>b</sup>	12.47±1.16 <sup>b</sup>	11.39±0.09 <sup>b</sup>	11.98±0.06	14.49±1.53

注: a为供试组与D254的对照组差异显著 ( $p<0.05$ ); b为供试组与RC212的对照组差异显著 ( $p<0.05$ )。

由表 4 可看出, 供试酵母的发酵酒样残糖量均小于 4 g/L, 达到干酒水平, 对于酒精度、总酸、挥发酸

指标来说,各菌株酿造的葡萄酒存在一定差异。酚类物质作为一大类复杂并具有抗氧化性的物质,主要参与形成葡萄酒的味道、骨架、结构和颜色等,对红葡萄酒的特征和质量尤其重要<sup>[13]</sup>。属于黄酮类酚的花色苷在带皮发酵过程中通过浸渍作用进入到酒中从而赋予了红葡萄酒绚丽的色泽<sup>[14]</sup>,单宁支撑红葡萄酒的陈酿熟成且具有抗氧化等生物活性。酵母 YFF10 发酵酒样的单宁、色度、总酚和花色苷含量均低于商品化酵母,分别为 873.36 mg/L、9.01 mg/L、749.28 mg/L 和 283.13 mg/L,品相略差。

从外观、香气和口感三个方面,由 9 名从事葡萄酒研究多年的专家(5 名来自企业的酿酒工程师)进行发酵酒样的感官品评,一致认定酿酒酵母 YGF2 的口感独特,呈浓郁花香,略带生青,其平均得分为 87.5,高于商品酵母 D254 (85.8) 和 RC212 (84.1) 的发酵酒样,具备酿造特色葡萄酒的潜力。菌株 YGF5 和 YGF10 发酵酒样的品评得分为 81.5 和 85.3,得分低于商品酵母的发酵样。

从赤霞珠葡萄酒的香气指标分析结果(表 5)可以看出,酵母 YGF2 酒样的乳酸乙酯(88.53 mg/L)和辛酸含量(9.87 mg/L)低于其余组,而正己醇、癸酸乙酯、丁二酸乙酯、乙酸苯乙醇和苯乙醇的含量则高于商品酵母对照和其余本土酵母组。苯乙醇是干红葡萄酒的重要香气组分之一,可呈现独特的玫瑰香气,酵母 YGF2 的酒样苯乙醇含量高达 80.22 mg/L,显著高于商品酵母的发酵酒样( $p < 0.01$ )。因此可判定上述香气组分含量差异是导致酵母 YGF2 酿造的葡萄酒感官评定效果好的重要原因。

### 3 结论

将烟台产区贵人香葡萄自然发酵醪液稀释涂布孟加拉红选择性培养基筛选酵母菌,通过 WL 培养基和 5.8S ITS 鉴定得到 12 株酿酒酵母。本土酿酒酵母经发酵性能和耐受能力测定,确定菌株 YGF2、YGF3、YGF5 和 YGF10 的总体性能指标较好,用于酿造霞多丽干白葡萄酒,对葡萄酒的发酵参数、主要挥发物和香气组分含量分析,确定菌株 YGF2、YGF5 和 YGF10 具备酿造干白葡萄酒的应用潜力,以 YGF2 为最优。以本土酵母 YGF2、YGF5 和 YGF10 为供试组,商品酵母 D254 和 RC212 为对照组,进行赤霞珠干红葡萄酒酿造试验,发现 YGF2 的酒样质量较好,口感独特且呈浓郁花香。总体结果显示菌株 YGF2 的发酵指标和酿造特性较好,部分指标优于商品化酿酒酵母,利用其酿造的干白和干红葡萄酒中苯乙醇和丁二酸乙酯的含量较高,玫瑰香气浓郁,口感圆润,具备生产地

方名优特色葡萄酒的潜力。本研究作为建立烟台地区特色葡萄酒的技术与标准体系提供数据支撑,有关菌株 YGF2 的遗传稳定性等特性研究和利用其进行规模化酿造试验正在深入进行中。

### 参考文献

- [1] Maro ED, Ercolini D, Coppola S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(2): 201-210
- [2] Ocón E, Garijo P, Sanz S, et al. Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination [J]. Food Control, 2013, 34(2): 261-267
- [3] SáCorreia I, Guerreiro JF, Loureiro-Dias MC, et al. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) [M], 2014, Pages 849-855
- [4] Genisheva Z, Mota A, Mussatto SI, et al. Integrated continuous wine making process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(1): 1-9
- [5] 程仕伟,韩鹏,赵慧,等.赤霞珠葡萄自然发酵过程中的酿酒酵母筛选及其发酵特性[J].酿酒科技,2015,249(3):16-19  
CHENG Shi-wei, HAN Peng, ZHAO Hui, et al. Screening of *S. cerevisiae* strains in natural fermentation process of *Cabernet Sauvignon* grape and study of their fermenting properties [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 249(3): 16-19
- [6] Lage P, Barbosa C, Mateus B, et al. *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 172: 62-69
- [7] Li X, Chan L J, Yu B, et al. Fermentation of three varieties of mango juices with a mixture of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Williopsis saturnus* var. *mrakii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 158(1): 28-35
- [8] Hosu A, Cristea V M, Cimpoi C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks [J]. Food Chemistry, 2014, 150: 113-118
- [9] 杨莹,徐艳文,薛军侠.WL 营养琼脂对葡萄酒相关酵母的鉴定效果验证[J].微生物学杂志,2007,27(5):75-78  
YANG Ying, XU Yan-wen, XUE Jun-xia. Validate the identification effect of wl nutrient agar on wine yeast [J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 75-78

- [10] 韩鹏,程仕伟,姜文广,等.蛇龙珠葡萄(烟台产区)自然发酵醪中选育的酿酒酵母发酵特性研究[J].中国酿造, 2014, 33(11):37-40  
HAN Peng, CHENG Shi-wei, JIANG Weng-guang, *et al.* Fermentation characteristics of *Saccharomyce scerevisiae* screened by spontaneous fermentation with *Cabernet Gernischt* grapes (Yantai region) [J]. China Brewing, 2014, 33(11): 37-40
- [11] Wah TT, Walaisr S, Assavanig A, et al. Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 160(3): 282-289
- [12] Revi M, Badeka A, Kontakos S, et al. Effect of packaging material on enological parameters and volatile compounds of dry white wine [J]. Food Chemistry, 2014, 152: 331-339
- [13] Morata A, Vejarano R, Ridolfi G, et al. Reduction of 4-ethylphenol production in red wines using HCDC+ yeasts and cinnamyl esterases [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(2): 99-104
- [14] 郝笑云,王宏,张军翔.酚类物质对红葡萄酒颜色影响的研究进展[J].现代食品科技,2013,29(5):1192-1197  
HAO Xiao-yun, WANG Hong, ZHANG Jun-xiang. Research progress of influence of phenolic compounds on color of grape wine [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1192-1197