

葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母混合发酵对嘎啦苹果酒品质的影响

张阳¹, 蒋媛², 贾伟豪³, 鞠延仑³, 房玉林³, 闵卓^{1*}

(1. 茅台学院酿酒工程系, 贵州仁怀 564500) (2. 宁夏食品检测研究院国家市场兼管重点实验室, 宁夏银川 750000) (3. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西咸阳 712100)

摘要: 以嘎啦苹果为实验材料, 探究了葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) (云-268) 与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 混合发酵对苹果酒基本理化指标、酚类物质、香气物质及感官特性的影响。结果表明, 相比于酿酒酵母单一发酵, 混合发酵苹果酒中乙醇和总酸含量显著降低 ($P<0.05$), 降幅分别为 8.72% 和 9.02%, 总酚含量显著增加 ($P<0.05$), 增幅为 23.01%; 其香气物质种类 (36 种) 明显多于单一发酵苹果酒 (31 种), 其中香气活度值 OAV>1 的物质有 12 种; 进一步分析发现, 混合发酵苹果酒中具果香味的乙酸酯类和花香味的萜烯类等物质含量显著提高 ($P<0.05$), 具酸腐味的脂肪酸类物质含量显著降低 ($P<0.05$), 对具青草味的 C6 醇类物质含量影响不大; 感官品评结果表明混合发酵苹果酒酒液澄清、禾秆黄色、入口酸度中等偏低, 甜度适中, 口感平衡, 具有丰富的果香味。因此, 葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母混合发酵 (1:1) 能够明显提高苹果酒的品质, 增加其发酵香, 为低醇果香味的苹果酒酿造奠定了一定的研究基础。

关键词: 葡萄汁有孢汉逊酵母; 酿酒酵母; 混合发酵; 嘎啦苹果酒

文章编号: 1673-9078(2023)05-53-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0695

Effect of Mixed Fermentation of *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* on the Quality of Gala Cider

ZHANG Yang¹, JIANG Yuan², JIA Weihao³, JU Yanlun³, FANG Yulin³, MIN Zhuo^{1*}

(1. Department of Brewing Engineering, Moutai Institute, Renhuai 564500, China)

(2. Ningxia Food Testing Research Institute, National Key Laboratory for Market Management, Yinchuan 750000, China)

(3. College of Enology, Northwest A&F University, Xianyang 712100, China)

Abstract: Using Gala apples as experimental materials, the effects of mixed fermentation with *Hanseniaspora uvarum* yun-268 in grape juice and *Saccharomyces cerevisiae* on the basic physical and chemical indicators, phenolic substances, aroma substances, and sensory properties of cider were evaluated. Compared with single fermentation using *S. cerevisiae*, mixed fermentation with *H. uvarum* and *S. cerevisiae* significantly decreased the content of ethanol and total acids by respectively 8.72% and 9.02% ($P<0.05$) but significantly increased the content of total phenols by 23.01% ($P<0.05$). The diversity of aroma substances (36 types) was significantly higher in mixed-fermented cider than in single-fermented cider (31 types), and the odor activity value (OAV) of 12 types of substances exceeded 1. Further analysis revealed that the content of acetates (fruity fragrance) and terpenes (floral fragrance) was significantly increased ($P<0.05$), the content of fatty acids with sour taste was significantly decreased ($P<0.05$), and little effect was noted on the content of C6 alcohols with grassy taste in mixed-fermented cider.

引文格式:

张阳, 蒋媛, 贾伟豪, 等. 葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母混合发酵对嘎啦苹果酒品质的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 53-61.

ZHANG Yang, JIANG Yuan, JIA Weihao, et al. Effect of mixed fermentation of *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* on the quality of gala cider [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 53-61.

收稿日期: 2022-05-23

基金项目: 遵义市科学技术局、茅台学院市校联合科技研发资金项目 (遵市科合 HZ 字[2020]314 号); 贵州省科技支撑计划 (黔科合支撑[2020]1Y132 号; 黔科合支撑[2021]一般 115)

作者简介: 张阳 (1987-), 男, 博士, 研究方向: 酿酒酵母种质创制与应用, E-mail: zhangyang@mtxy.edu.cn

通讯作者: 闵卓 (1990-), 女, 博士, 研究方向: 果酒原料品质提升, E-mail: minzhuo@mtxy.edu.cn

In addition, sensory evaluation revealed that mixed fermentation enhanced the fruity flavor of cider, characterized as clear, straw-yellow, medium-to-low in acidity, moderately sweet, well-balanced, and rich in fruity aroma. Therefore, a 1:1 co-fermentation scheme with *H. uvarum* yun-268 and *S. cerevisiae* may considerably improve cider quality and increase fermentation aroma. These findings provide a certain theoretical basis for the brewing of low-alcohol cider with fruity aroma.

Key words: *H. uvarum*; *S. cerevisiae*; mixed fermentation; Gala cider

苹果, 是蔷薇科苹果属植物的果实, 富含多糖、蛋白质、脂肪、纤维素、氨基酸、维生素和多种矿物质元素, 具有较高的营养和保健价值^[1]。我国作为苹果生产的第一大国, 至今已有两千多年的栽培历史, 栽培面积和产量稳居世界首位^[2], 前期主要推广和生产鲜食品种。近些年, 采用苹果等非粮水果原料酿造酒的前景十分广阔, 对缓解粮食危机, 充分利用苹果等资源, 有效提高水果精深加工技术水平具有重要的意义。苹果酒已成为仅次于葡萄酒的世界第二大果酒^[3], 近年来凭借良好的口感和保健价值深受消费者喜爱。

苹果酒营养丰富, 口感良好, 但仍存在香气不足、特征不典型等问题。酵母菌可将葡萄汁中的糖转化为酒精和二氧化碳, 并且促进高级醇、甘油、醛类物质、酯类物质的产生, 对葡萄酒的色泽、香气、口感等产生巨大影响^[4-6]。研究表明, 相对于酿酒酵母, 某些非酿酒酵母可产生丰富的有利于水解香气前体的糖苷酶, 同时, 非酿酒酵母的某些代谢产物(如甘油、酯类)能增加果酒的独特风味, 对其感官品质具有积极的影响, 但其发酵能力相对较弱, 因此, 使用酿酒酵母和非酿酒酵母进行混合发酵已成为一个发展趋势^[7,8]。Bely 等^[9]发现用戴尔有孢圆酵母(*Torulasporea delbrueckii*)与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)混合发酵的葡萄酒, 其丙酸乙酯、异丁酸乙酯、二氢肉桂酸乙酯和乙酸异丁酯含量显著提高, 果香味更浓, 香气的复杂度更高。张文静等^[10]采用本土毕赤克鲁维酵母(*Pichia kluyveri*) HS-2-1 与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) NX11424 混合发酵“赤霞珠”葡萄酒, 发现混合发酵可增强葡萄酒的果香和花香。马娜等^[11]将具有高糖苷酶活性的胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*) 北-29 和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 共发酵, 发现不仅可显著增强干红葡萄酒的果香和花香, 而且有利于葡萄酒色泽的改善。目前, 混合发酵多应用于葡萄酒, 在苹果酒中的报道较少。

本研究以嘎啦苹果为实验材料, 用实验室前期筛选获得的葡萄汁有孢圆酵母(云-268)^[12]与酿酒酵母混合发酵, 以酿酒酵母单一发酵为对照组, 分别对所酿苹果酒的基本理化指标、酚类物质、香气物质等进行测定, 并进行感官评定, 旨在为多菌株混合发酵

苹果酒的品质提升, 奠定一定的实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苹果原料: 嘎啦苹果(陕西省渭南市大荔县)。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*): LALVIN Rhone 2323(丹麦); 葡萄汁有孢圆酵母(*Hanseniaspora uvarum*): 云-268(实验室保存)^[12]。

试剂: 果胶酶(酶活 8 600 U/g), 丹麦维诺酿公司; 皂土, 法国 LAFFORT 公司; 亚硫酸(含 6% SO₂), 一水柠檬酸、乙醇、D-异抗坏血酸钠、次甲基蓝、甲醇、山梨酸钾、酒石酸, 均为分析纯, 购自麦克林试剂公司。

多酚标准物: 没食子酸、原花青素 B1、原儿茶酸、绿原酸、儿茶素、原花青素 B2、龙胆酸、表儿茶素、咖啡酸、反式对香豆酸、芦丁、虎杖苷、反式阿魏酸、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、杨梅酮、根皮苷、白藜芦醇、槲皮素、芹菜素、山奈酚均为色谱纯, 购买自 Sigma Aldrich 公司。

1.2 主要仪器设备

AUX320 分析天平, 日本岛津公司; UPLC1-Class 超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; KH-500DE 超声波清洗机, 昆山合创超声仪器有限公司; Gary-60 紫外可见分光光度计, 安捷伦科技(中国)有限公司; TRACE1310-ISQLT 气相色谱质谱联用仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 手持折光仪, 立辰科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 苹果酒酿造工艺及操作要点

操作要点: 如图 1 所示, 先对苹果进行清洗和分选, 清除病果和生青果。将筛选后的苹果切块进行护色处理: 放入抗氧化剂(1.5%柠檬酸和 0.05%异抗坏血酸混合溶液)中浸泡 15 min, 护色后捞出苹果块, 快速控水并榨汁。将获得的苹果汁和果浆液加入至 10 L 的玻璃发酵罐中并按照 1.2 mg/L 的质量浓度添加 SO₂ 防止氧化。果浆入罐后添加 60 mg/L 果胶酶并放

置于-4℃冷库中静置 24 h。静置后对果浆进行第二次压榨，把果渣和果汁分离，取上层清液发酵。每组酒样按照 0.2 g/L 添加酿酒酵母。整个发酵过程的温度控制在 18℃左右，以获得更好的口感；每日监测比重值和含糖量，并记录发酵液的颜色、香气和口感。当残糖降至 45 g/L 时，添加 SO₂ 和山梨酸钾以终止发酵，此时比重在 1.025~1.030 之间。进行转罐，转罐后放入 4℃冷库中。防止苹果酒因含糖量过高产生二次发酵。静置后加入皂土进行澄清处理，然后再次转罐，在 4℃酒窖陈酿 12 个月，经过巴氏杀菌后无菌灌装，即得苹果酒。每个酿造处理重复 3 次。

1.3.2 试验设计

根据酵母菌种的不同，共进行两组发酵试验。普

通组选用酿酒酵母 Rhone 2323（丹麦）（0.2 mg/L）进行发酵，增香组选用葡萄汁有孢汉逊酵母（云-268，中国）和酿酒酵母 Rhone 2323（丹麦）混合发酵，接种比例为 1:1，接种时机为先接种有孢汉逊酵母（云-268）48 h 后再接种 Rhone 2323 至苹果醪中进行发酵^[13]，每种酵母添加量均为 0.1 mg/L。

1.3.3 分析检测

苹果酒中的还原糖、酒精度、总酸、总酚参照 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》^[14]进行测定。可溶性固形物采用手持折光仪进行测定，pH 采用精密酸度计进行测定。

酚类组成的测定参考曹铭的方法^[1]，香气物质的测定参考荆思思等^[15]的方法。

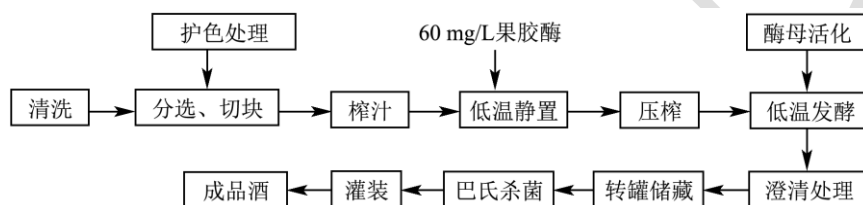


图 1 苹果酒酿造步骤

Fig.1 Cider wine making steps

表 1 苹果酒感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation standards of cider

项目	评价标准	得分/分
色泽(10分)	金黄色、有光泽	9~10
	淡黄色、有光泽	6~8
	琥珀色或褐色、略失光	3~5
	无苹果的典型特征、无光泽	1~2
澄清度(10分)	澄清、无可见杂质	10
	不澄清、无光泽	0~9
香气(10分)	清爽的苹果香气、愉悦的酒精度	8~10
	果香浓郁、酒精度适中、无异味	5~7
	果香均衡、酒精度寡淡、令人不悦	2~4
	无怡人的香气、口感粗糙	1
风味平衡(10分)	酒精度适中、爽口、宜人	9~10
	温和的酒精、清爽、良好的甜酸平衡	6~8
	酒精度适中、微酸、无污染物、有涩味	3~5
	酒精度低、偏酸、有涩味	2
回味(10分)	酸、苦、涩、有怪味	1
	回味宜人、无怪味	9~10
	回味中等，宜人，有苹果典型味感	5~8
	回味短，有苹果典型味感	2~4
总体评价(10分)	不愉快、有怪味	1
	对苹果酒的总体印象进行品评	1~10

1.3.4 感官品评

由 20 位有果酒品鉴经验并受过相关培训的人员组成品鉴组, 参照山东省苹果酒地方标准 DB37/T 804-2007《苹果酒》^[16], 按照表 1 的感官评分标准, 分别从色泽、澄清度、香气、风味平衡、回味和总体评价等六个方面进行打分, 各项满分均为 10 分, 总分 60 分。

1.3.5 数据处理

采用 GraphPad Prism 7.0 进行数据处理和图形绘制; 利用统计分析软件 IBM SPSS Statistics 21.0 进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 酵母菌种对苹果酒理化指标的影响

如表 2 所示, 嘎啦苹果果汁还原糖含量为 114.67 g/L, 经酵母菌的发酵作用, 普通组和增香组原酒中的还原糖含量分别降至 38.5 g/L 和 44.18 g/L。酿酒酵母作为主要发酵微生物, 由于两组苹果酒同时开始发酵并于同时终止发酵, 在增香组中由于葡萄汁有孢汉逊酵母(云-268)的大量接入到苹果汁中, 导致酿酒酵母发酵延后, 最终导致在相同的发酵时间内, 增香组中的还原糖高于普通组^[17]。因此, 在发酵速率上, 增香组低于普通组; 发酵结束后, 普通组和增香组苹果酒的酒精度分别为 6.19%(V/V)和 5.66%(V/V), 前者显著高于后者 ($P<0.05$), 其主要原因是由于增香组中云-268 酵母为非酿酒酵母, 其产酒精能力较低, 最终导致苹果酒的酒度较低^[18]。

嘎啦果汁的可溶性固形物含量为 13.6 Brix, 经酵母菌的发酵作用, 普通组和增香组原酒中的可溶性固形物含量分别降至 4.21 Brix 和 4.56 Brix。发酵终止后,

增香组的可溶性固形物含量高于普通组, 与还原糖消耗表现一致, 其主要是由于发酵前期只添加了葡萄汁有孢汉逊酵母, 发酵性能较弱、导致增香组发酵速度较慢, 可溶性固形物含量高于普通组, 该结果与崔艳等^[19]利用葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母混酿造低醇葡萄酒的研究结果相似。

表 2 两种苹果酒的基本理化指标测定结果

Table 2 Determination results of the physico-chemical indexes of the two kinds of ciders

指标	嘎啦苹果汁	普通酵母	混合酿造
还原糖/(g/L)	114.67±1.53	38.5±1.32 ^b	44.00±1.50 ^a
可溶性固形物/Brix	13.60±0.75	4.21±0.15 ^b	4.56±0.11 ^a
总酸/(g/L)	3.25±0.08	5.65±0.12 ^b	5.14±0.11 ^a
酒精度/(%V/V)		6.19±0.15 ^a	5.65±0.12 ^b

注: 同一行中不同字母表示数据之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。

对总酸来说, 普通组和增香组的总酸在发酵结束后都有显著的提升, 其主要原因是发酵酸的大量产生, 如发酵产生的有机酸, 如乳酸、柠檬酸、乙酸、琥珀酸等有机酸^[20]。增香组的总酸低于普通组, 主要是由于酿酒酵母的产酸能力较强, 该结果与利用葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母对刺梨酒进行混合发酵的研究结果一致^[21]。

2.2 酵母菌种对苹果酒多酚组成的影响

如表 3 所示, 在嘎啦苹果汁、普通组和增香组原酒中均检测到 7 种酚类物质, 分别为羟基苯甲酸类的没食子酸、原二茶酸; 羟基肉桂酸类的绿原酸、咖啡酸; 黄烷-3-醇类的儿茶素、表儿茶素以及原花青素 B2 等单宁物质组成, 除儿茶素和表儿茶素外, 其余 5 种酚类物质在普通组和增香组均呈现显著差异 ($P<0.05$)。

表 3 两种苹果酒的多酚类物质含量

Table 3 The phenolic content of two ciders

酚类物质	保留时间/min	平均质量浓度/(mg/L)			
		嘎啦果汁	普通组	增香组	
羟基肉桂酸类	绿原酸	9.68	46.77±0.66 ^a	34.78±1.20 ^c	43.45±1.57 ^b
	咖啡酸	15.31	4.68±0.11 ^a	3.32±0.43 ^c	4.16±0.09 ^b
羟基苯甲酸类	没食子酸	6.44	4.80±1.03 ^c	5.49±0.74 ^b	8.34±0.85 ^a
	原儿茶酸	8.99	2.87±0.94 ^c	3.39±0.05 ^b	4.11±0.52 ^a
黄烷-3-醇类	儿茶素	10.91	3.69±0.21 ^b	3.59±0.11 ^a	3.62±0.87 ^a
	表儿茶素	14.32	9.10±0.15 ^a	4.43±0.68 ^b	4.39±0.14 ^b
	原花青素 B2	11.78	0.78±0.46 ^c	5.94±0.28 ^b	6.89±0.48 ^a
合计		72.69±3.56 ^a	60.94±3.49 ^b	74.96±4.52 ^a	

注: 同一行中不同字母表示数据之间存在显著性差异 ($P<0.05$)。

增香组中没食子酸含量显著高于普通组,原因是苹果汁的没食子酸与吡喃形式的六元糖醇形成的酯,属于非类黄酮酚的一种糖苷形式,在糖苷酶或酸水解的作用下,生成没食子酸和糖醇^[22],而葡萄汁有孢汉逊酵母可以大量分泌糖苷酶^[23],进而导致了增香组中没食子酸的含量高于普通组。羟基肉桂酸类多酚物质在苹果汁中的初始总量为 51.45 mg/L,其中绿原酸的含量最高,为 46.77 mg/L。相比嘎啦果汁,羟基肉桂酸类的绿原酸和咖啡酸在发酵结束后显著降低,可能是羟基肉桂酸类酚酸在多酚氧化酶的作用下发生了降解,且酿酒酵母中的多酚氧化酶代谢效率较高,导致普通组中的绿原酸含量低于增香组^[24]。

儿茶素和表儿茶素是苹果汁中主要的黄烷-3-醇类多酚物质,总量为 12.79 mg/L,经酒精发酵后,儿茶素的含量没有发生明显的变化;表儿茶素的含量显著的降低,主要是表儿茶素大量的聚合形成原花青素

B2,导致原花青素 B2 含量从 0.78 mg/L 升高至 5.94~6.89 mg/L。总体来说,增香组发酵对于酚类物质的含量具有明显的提升作用。

2.3 酵母菌种对苹果酒香气成分的影响

为分析葡萄汁有孢汉逊酵母(云-268)对苹果果酒香气物质的影响,利用 SPME-GC-MS 技术测定普通组与增香组苹果酒的挥发性香气物质成分。结果如表 4 所示,普通组共检测出 31 种挥发性成分,其中 C6 醇类 5 种,高级醇类 11 种,乙酸酯类 4 种,脂肪酸乙酯类 1 种,其他酯类 2 种,挥发性脂肪酸类 4 种,羰基化合物 2 种,萜烯类 2 种。增香组共检测出 36 种挥发性成分,其中 C6 醇类 5 种,高级醇类 12 种,乙酸酯类 5 种,脂肪酸乙酯类 2 种,其他酯类 3 种,挥发性脂肪酸类 4 种,羰基化合物 3 种,萜烯类 2 种。在香气组分种类上,增香组高于普通组。

表 4 两款苹果酒中香气化合物测定结果

Table 4 The aroma compounds in two ciders

类别	序号	挥发性化合物	保留指数(RI) ^[a]	CAS 号	阈值	平均质量浓度/($\mu\text{g/L}$)		香气描述	OAV
						普通组	增香组		
C6 醇	1	(Z)-3-己烯-1-醇	1 387	928-96-1	400	113.03 \pm 25.12 ^b	131.24 \pm 25.19 ^a	生青味、脂肪味	
	2	(E)-3-己烯-1-醇	1 365	928-97-2	1 000	7 957.05 \pm 483 ^a	7 591.23 \pm 193 ^a	青草味、生青味	>1
	3	(E)-2-己烯-1-醇	1 409	928-95-0	400	34.34 \pm 1.29 ^a	34.88 \pm 0.59 ^a	生青味	
	4	(Z)-2-己烯-1-醇	1 417	928-94-9	-	56.64 \pm 4.29 ^a	55.92 \pm 3.57 ^a	-	
	5	1-己醇	1 353	111-27-3	8 000	5 341.55 \pm 4.29 ^b	5 919.49 \pm 384 ^a	青草味、生青味	
小计						13 502.61 \pm 517.99 ^a	13 732.76 \pm 606.35 ^a		
高级醇	6	2-庚醇	1 319	543-49-7	200	6.42 \pm 0.59 ^b	8.36 \pm 0.81 ^a	霉味、蘑菇味	
	7	异戊醇	1 220	123-51-3	60 000	154 868.67 \pm 1 258.00 ^a	83 387.85 \pm 2 479.00 ^b	溶剂味、酒精味、指甲油味	>1
	8	正戊醇	1 256	71-41-0	64 000	174.92 \pm 12.35 ^b	2 625.48 \pm 283.01 ^a	苦杏仁味、香酯味	
	9	3-甲基-3-丁烯醇	1 256	763-32-6	600	54.91 \pm 5.19 ^a	40.73 \pm 3.28 ^b	-	
	10	3-甲基戊醇	1 328	589-35-5	500	66.96 \pm 6.28 ^a	39.00 \pm 4.92 ^b	辛辣味、溶剂味、生青味	
	11	1-庚醇	1 455	111-70-6	200	22.69 \pm 2.84 ^b	36.18 \pm 5.19 ^a	油腻味	
	12	1-辛烯 3-醇	1 451	3391-86-4	20	ND	98.38 \pm 4.29	蘑菇味	>1
	13	苯甲醇	1 892	100-51-6	200 000	90.24 \pm 8.29 ^a	70.16 \pm 7.49 ^b	烘烤味、果香	
	14	2-苯乙醇	1 928	60-12-8	14 000	23 682.86 \pm 1 394.00 ^a	19 108.06 \pm 2 183.03 ^b	玫瑰花、蜂蜜	>1
	15	3-甲基-2-丁醇	1 322	598-75-4	-	153.72 \pm 38.27 ^b	1 735.37 \pm 125 ^a	-	
	16	异丁醇	1 111	78-83-1	75 000	29 042.44 \pm 2 482.01 ^a	22 322.27 \pm 1,928.01 ^b	酒精味、溶剂味、生青味	
17	(E)-2-辛烯醇	1 614	18409-17-1	-	8.87 \pm 2.14 ^b	123.42 \pm 10.24 ^a	-		
小计						208 172.7 \pm 5 209.95 ^a	129 595.26 \pm 7 034.22 ^b		
乙酸酯	18	乙酸丙酯	951	109-60-4	240	2 711.84 \pm 103.56 ^b	4 773.70 \pm 384.46 ^a	梨、蜜糖、香蕉	>1
	19	乙酸异戊酯	1 122	123-92-2	160	ND	671.14 \pm 45.29	香蕉味	>1
	20	乙酸己酯	1 273	142-92-7	1 500	36.83 \pm 1.29 ^b	2 578.18 \pm 102.29 ^a	苹果、樱桃	>1
	21	乙酸异丁酯	999	110-19-0	1 600	51.94 \pm 7.52 ^b	185.93 \pm 18.92 ^a	香蕉、菠萝、草莓	
	22	乙酸乙酯	885	141-78-6	7 500	6 235.07 \pm 2 123.04 ^a	7 502.18 \pm 678.05 ^b	指甲油、果香	>1
小计						9 035.68 \pm 2 235.37 ^b	15 689.13 \pm 1 228.96 ^a		

续表 4

类别	序号	挥发性化合物	保留指数(RI) ^[a]	CAS 号	阈值	平均质量浓度/(μg/L)		香气描述	OAV
						普通组	增香组		
脂肪酸乙酯	23	乳酸乙酯	1 350	97-64-3	154 636	2 894.38±291.02 ^a	2 022.54±198.01 ^b	果香、奶油味	
	24	辛酸乙酯	1 437	106-32-1	580	ND	32.99±3.29	香蕉、梨、花香	
	小计						2 894.38±291.04 ^a	2 055.53±201.29 ^b	
其他酯	25	辛酸异戊酯	1 659	2035-99-6	-	9.80±1.93 ^b	11.27±2.53 ^a	-	
	26	水杨酸甲酯	1 792	119-36-8	-	7.36±0.38 ^a	7.37±0.28 ^a	-	
	27	丁二酸二乙酯	1 681	123-25-1	-	ND	65.00±4.48	-	
	小计						17.16±2.31 ^b	83.64±7.29 ^a	
脂肪酸	28	异丁酸	1 590	79-31-2	2 300	1 894.26±281.05 ^a	1 254.37±193.06 ^b	酸腐味、奶酪味	
	29	异戊酸	1 683	503-74-2	3 000	1 195.47±179.06 ^a	721.22±94.29 ^b	酸腐味	
	30	己酸	1 860	142-62-1	420	4 634.38±1 281.05 ^a	2 418.50±987.05 ^b	酸腐味、奶酪味	>1
	31	辛酸	2 075	124-07-2	500	7 059.19±382.05 ^a	4 052.98±192.09 ^b	酸腐味、奶酪味、脂肪味	>1
	小计						14 783.3±1 123.02 ^a	8 447.07±1 466.29 ^b	
羰基化合物	32	3-庚酮	1 659	106-35-4	-	ND	12.29±0.15	-	
	33	正辛醛	1 283	124-13-0	2.5	ND	164.22±12.34	柑橘	>1
	34	糠醛	1 471	98-01-1	14 100	66.03±6.25	ND	烘烤味	
	35	癸醛	1 499	112-31-2	10	3.03±0.55 ^b	3.22±0.68 ^a	生青味	
	小计						69.06±6.8 ^b	179.73±3.17 ^a	
萜烯	36	里那醇	1 547	78-70-6	25	0.03±0.01 ^b	0.46±0.01 ^a	花香、麝香	
	37	香茅醇	1 770	106-22-9	100	162.86±28.29 ^b	1 085.43±129 ^a	玫瑰花香	>1
	小计						162.89±28.30 ^b	1 085.89±129.01 ^a	

注：^[a] RI 为该物质在 HP-innowax 色谱柱上的保留指数；“ND”表示未检出，“-”表示未查阅到该物质的香气阈值或香气描述，香气物质感觉阈值和香气描述参考文献^[26,30]。同一行中不同字母表示数据差异显著 ($P<0.05$)。

C6 醇主要来源于苹果果实中，贡献青草、青苔等绿叶香气，这类香气物质主要是由亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸降解产生的^[25]。普通组和增香组中都含有 C6 醇类香气，但其香气总量差异不显著 ($P>0.05$)，Hu 等^[26]利用葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母按照 1:2 的比例混合发酵‘爱格丽’白葡萄酒，也获得了类似的结果，该类香气属于品种香气，因此发酵过程中所用酵母对其影响不大。

嘎啦苹果属于醇香型苹果，其高级醇的种类及含量也远超于其他苹果种类^[27]。除来源于果实外，高级醇更多来自于发酵过程中，主要是糖代谢和氨基酸分解代谢途径生成相应的 α -酮酸，再经脱羧作用产生^[28]，可以为苹果酒提供更为明显的发酵香气^[29]。在普通组和增香组中发现异戊醇、异丁醇、2-苯乙醇分别占高级醇总含量为 99.7% 和 96.3%，其中 2-苯乙醇具有蜂蜜香、玫瑰香以及甜香味^[30]，是苹果酒的重要香气物质。在 OAV 大于 1 的高级醇类物质中，如异戊醇、2-苯乙醇等，普通组显著高于增香组，除此之外，2-庚醇、3-甲基-3-丁烯醇、3-甲基戊醇、苯甲醇等多数醇类物质也呈现出此规律，其主要原因是非酵

母属酵母相比酵母属酵母产生更高的酯类物质和更低的醇类物质^[31]。

酯类化合物是苹果酒中最重要的一类风味化合物，酯类化合物主要来自于发酵过程，主要包括乙酸酯类和乙醇酯类，呈现出果香和花香，给酒体带来怡人的香气^[30,32]；根据表 4，发现苹果酒中的酯类主要是由乙酸酯和直链脂肪酸乙酯组成，普通组中的乙酸酯类和直链脂肪酸乙酯类分别占总酯类的 75.63% 和 24.23%，增香组中的乙酸酯类和直链脂肪酸乙酯类分别占总酯类的 88.00% 和 11.53%。OAV>1 的酯类物质主要是乙酸酯类的乙酸丙酯、乙酸异戊酯、乙酸己酯和乙酸乙酯，主要给苹果酒带来红色水果的香气，如香蕉、草莓、樱桃、梨等，通过对比普通组和增香组的上述 4 种酯类物质，发现增香显著高于普通组，除 OAV>1 的酯类物质外，其他增香组中的酯类物质含量也远高于普通组，因此葡萄汁有孢汉逊酵母可以产生更高的酯类物质，Hu 等^[26]利用葡萄汁有孢汉逊酵母云 268 与酿酒酵母混合发酵爱格丽白葡萄和赤霞珠红葡萄，发现云-268 对乙酸酯类和乙酯类的调节更具有特异性，更进一步证实了云-268 对苹果酒果香的提

升具有重要的作用。

脂肪酸类化合物也是苹果酒中一类重要的挥发性香气成分,主要来源于酒精发酵过程,由酵母代谢产生,主要呈现出酸腐味、醋味、奶酪味等,当其含量低于阈值时,这些物质可以增加果酒香气的复杂性,但如果高于阈值则会给酒的香气带来负面影响^[33]。OAV>1的挥发性脂肪酸主要是辛酸和己酸,普通组和增香组的辛酸和己酸含量都远超其阈值,然而,相比普通组,增香组的所有挥发酸含量都显著的低于普通组。由此可见,挥发性脂肪酸主要是由酿酒酵母代谢产生,通过云-268与酿酒酵母的混合发酵可以显著的降低挥发性脂肪酸的含量,减弱其负面影响。该研究结果与张俊杰等^[34]利用葡萄汁有孢汉逊酵母 B₂-13 发酵苹果酒产挥发性脂肪酸的结果一致,但云-268 酵母对于苹果酒酯类香气的影响远大于 B₂-13。

本研究中羰基类化合物主要是由醛类和酮类组成,其中醛类主要是由一些中链醛类组成,由于含量较低,对感官特征影响较小,如正辛醛、癸醛等。糠醛只在普通组种检测到,可能是普通组在发酵过程速度过快,发酵温度过高,导致木糖等五碳糖通过酸催化降解产生糠醛^[35]。

萜烯类物质具有较低的感官阈值,表现出优雅的花香,常作为果实或果酒的重要特征化合物^[36]。在苹果果实中,常以糖苷结合态水溶性结构的形式存在,不具有挥发性,需要在酸水解或者酶水解的作用下,变成可挥发性的游离态形式存在^[37]。葡萄汁有孢汉逊酵母云-268 具有较高的 β -葡萄糖苷酶分泌能力^[26],导致增香组中萜烯物质的含量显著高于普通组。总体来说,通过葡萄汁有孢汉逊酵母云-268 与酿酒酵母的混合发酵,有效提高了苹果酒的酯类以及萜烯类,降低了脂肪酸等不良的挥发性物质,为优质苹果酒的酿造奠定了一定的基础。

2.4 酵母菌种对苹果酒感官的影响

品鉴小组根据表 1,对两款苹果酒进行品评,得分情况如图 2。苹果酒总体上酒液澄清,色泽饱满,香气以花果香为主,口感为半甜型,酸度适中,较为清爽。两款酒各有特点,在色泽、香气、澄清度、口感、平衡等方面,增香组得分均高于普通组(图 2a)。根据两款苹果酒香气的具体分类和打分,得到图 2b 的香气特征雷达图。普通酵母组原酒特点为:酒液澄清、浅黄色,香气以水果香气为主,伴随有生青味,入口酸度中等偏高、甜度适中、口感略显粗糙,酒精度适中无明显的辛辣感,对其中的香气特征细分,发

现该组苹果酒柑橘类香气较弱,有明显的热带水果味,花香味较弱,且水果罐头的蒸煮味和香料味较为强烈,略带有还原味,香气质量一般。

增香酵母组原酒特点为:酒液澄清、禾秆黄色,香气以发酵香气为主,并具有丰富的果香味,入口酸度中等偏低、甜度适中,入口柔顺,口感更加平衡。对其香气特征细分,该组苹果酒柑橘类香气明显,花香味突出,带有香料味和植物类香气,香气浓郁饱满,质量较高。

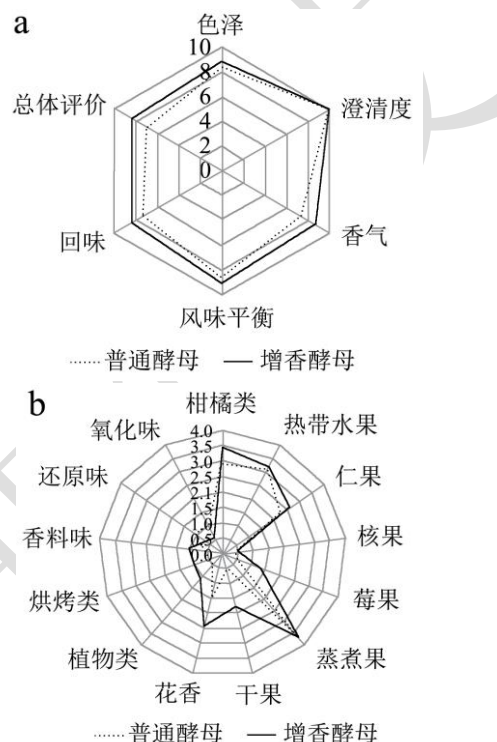


图 2 两种苹果酒感官评价雷达图 (a) 及香气特征 (b)

Fig.2 Radar map (a) and aroma characteristics (b) of sensory evaluation of two ciders

3 结论

本实验研究了葡萄汁有孢汉逊酵母-云-268 与酿酒酵母 Rhone 2323 混合发酵对嘎啦苹果酒的影响,与酿酒酵母 Rhone 2323 纯培养相比,葡萄汁有孢汉逊酵母和酿酒酵母顺序接种,有利于降低苹果酒的酒度,提高发酵香,尤其是具有果香味的乙酸酯类和花香味的萜烯类等物质,其次,对挥发性脂肪酸的产生具有一定的抑制作用;增香组利用了混合发酵方式,其苹果酒的总酚略有升高,对于苹果酒的抗氧化功效也具有一定的积极作用。因此,采用葡萄汁有孢汉逊酵母云-268 与酿酒酵母 Rhone 2323 混合发酵为低醇且具有浓郁果香味的高品质苹果酒的生产 and 应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] 曹铭. 苹果酒和苹果醋在发酵过程中品质特性变化的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [2] Serra A T, Matias A A, Frade R, et al. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 - Antioxidant and antiproliferative activities [J]. Journal of Functional Foods, 2010, 2(1): 46-53.
- [3] 吴荣荣. 我国苹果酒的发展现状及面临的问题[J]. 现代农村科技, 2010, 15: 71-72.
- [4] Tesnière C. Importance and role of lipids in wine yeast fermentation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(20): 8293-8300.
- [5] Coi A L, Bigey F, Mallet S, et al. Genomic signatures of adaptation to wine biological aging conditions in biofilm-forming flor yeasts [J]. Molecular Ecology, 2017, 26(7): 2150-2166.
- [6] Puertas B, Jimenez-Hierro M J, Cantos-Villar E, et al. The influence of yeast on chemical composition and sensory properties of dry white wines [J]. Food Chemistry, 2018, 253: 227-235.
- [7] Padilla B, Gil J V, Manzanares P. Past and future of non-saccharomyces yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 411.
- [8] Kong C L, Li A H, Jin G J, et al. Evolution of volatile compounds treated with selected non-saccharomyces extracellular extract during Pinot noir winemaking in monsoon climate [J]. Food Research International, 2019, 119: 177-186.
- [9] Renault P, Coulon J, Revel G et al. Increase of fruity aroma during mixed *T-delbrueckii/S-cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 207(17): 40-48.
- [10] 张文静, 杨诗妮, 杜爽, 等. 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.
- [11] 马娜, 王星晨, 孔彩琳, 等. 胶红酵母与酿酒酵母共发酵对干红葡萄酒香气与色泽的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 97-104.
- [12] Hu K, Qin Y, Tao Y S, et al. Potential of glycosidase from non-saccharomyces isolates for enhancement of wine aroma [J]. Journal of Food Science, 2016, 81(4): M935-M943.
- [13] 王星晨, 胡凯, 陶永胜. 葡萄酒有孢汉逊酵母和酿酒酵母的混合酒精发酵动力学[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 103-108.
- [14] 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, 2008.
- [15] 荆思思, 倪小凡, 王庶, 等. 甘露糖蛋白对'赤霞珠'葡萄酒中糖酸和香气的影响[J]. 中国酿造, 2022, 41(1): 143-148.
- [16] DB37/T 804-2007, 苹果酒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [17] Maurizio C, Francesca C, Ilaria M, et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-saccharomyces yeasts in winemaking [J]. Fems Yeast Research, 2010, 10(2): 123-133.
- [18] Langenberg A K, Bink F J, Wolff L, et al. Glycolytic functions are conserved in the genome of the wine yeast *Hanseniaspora uvarum*, and pyruvate kinase limits its capacity for alcoholic fermentation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(22): e01580-17.
- [19] 崔艳, 刘尚, 邓琪缘, 等. 葡萄酒有孢汉逊酵母与酿酒酵母混酿低醇葡萄酒[J]. 食品工业, 2020, 41(8): 60-64.
- [20] 孙慧焯. 不同方法降解苹果酒中有机酸的比较和优化[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [21] 刘晓柱, 赵湖冰, 李银凤, 等. 一株刺梨葡萄酒有孢汉逊酵母的鉴定及酿酒特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8): 97-104.
- [22] Kammerer D, Claus A, Carle R, et al. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(14): 4360-4367.
- [23] 陶永胜, 朱晓琳, 马得草, 等. 葡萄酒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.
- [24] Podsędek A, Wilska-Jeszka J, Anders B, et al. Compositional characterisation of some apple varieties [J]. European Food Research & Technology, 2000, 210(4): 268-272.
- [25] Benkwitz F, Tominaga T, Kilmartin P A, et al. Identifying the chemical composition related to the distinct aroma characteristics of New Zealand *Sauvignon blanc* wines [J]. American Journal of Enology & Viticulture, 2012, 63(1): 62-72.
- [26] Hu K, Jin G J, Xu Y H, et al. Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Research International, 2018, 108: 119-127.
- [27] 孙中贯, 刘琳, 王亚平, 等. 酿酒酵母高级醇代谢研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 429-447.
- [28] 汪立平, 徐岩, 王栋, 等. 苹果酒香气成分研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(7): 59-65.
- [29] Gonzalez R, Morales P. Wine secondary aroma:

- understanding yeast production of higher alcohols [J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1449-1450.
- [30] Cai J, Zhu B Q, Wang Y H, et al. 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.
- [31] 汪立平,徐岩.混菌发酵对苹果酒香气物质及发酵效率的影响[J].*食品科学*,2005,26(10):151-155.
- [32] 韦广鑫,杨笑天,周永文,等.葡萄酒中酯类化合物研究进展[J].*食品工业科技*,2015,36(14):394-399.
- [33] Swiegers J H, Bartowsky E J, Henschke P A, et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2005, 11(2): 139-173.
- [34] 张俊杰,尚益民,彭姗姗,等.产香酵母的筛选及其苹果酒发酵特性[J].*中国酿造*,2019,38(8):31-35.
- [35] Pereira V, Albuquerque F M, Ferreira A C, et al. Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions [J]. *Food Research International*, 2011, 44(1): 71-76.
- [36] 张阳,江璐,郭志君,等.利用 β -葡萄糖苷酶提高葡萄酒香气的研究进展[J].*现代食品科技*,2020,36(4):316-324.
- [37] 阎贺静,张鸣宇,孙康,等.野生酿酒酵母和葡萄汁有孢汉逊酵母混菌发酵对玫瑰香葡萄酒香气的影响[J].*食品与发酵工业*,2020,46(11):165-171.