

# 不同初始酵母可同化氮浓度对苹果酒发酵过程中硫化氢生成量的影响

宋洋波<sup>1,2</sup>, 张碧颖<sup>2</sup>, 石侃<sup>2</sup>, 任小莉<sup>1</sup>, 刘丽媛<sup>3</sup>, 周慧<sup>3</sup>, 许丹<sup>4\*</sup>, 刘树文<sup>2\*</sup>

(1. 青海大学农牧学院, 青海西宁 810016) (2. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100)

(3. 吐鲁番市葡萄产业发展促进中心, 新疆吐鲁番 838000) (4. 青海大学医学部公共卫生系, 青海西宁 810016)

**摘要:** 初始酵母可同化氮浓度和组成可影响对酿酒酵母发酵动力学和硫化氢生产。该研究旨在探讨苹果酒发酵过程中, 初始酵母可同化氮浓度、发酵中氮源组成对抑制硫化氢及发酵动力学的影响。通过添加磷酸氢二铵调整初始酵母可同化氮浓度, 酵母在低浓度、中浓度和高浓度下发酵苹果酒, 测定发酵特性、硫化氢释放量及四种氮源组分。初始酵母可同化氮浓度与 H<sub>2</sub>S 释放(释放变化及总量)之间存在复杂关系, 其中, H<sub>2</sub>S 释放量最高的是中浓度处理, 为 288.25 μg/100 mL, 而最低为高处理, 为 44.13 μg/100 mL。仅低浓度处理条件下, 发酵速率[3.84 g/(d L)]对 H<sub>2</sub>S 的生成速率[31.68 μg/(d 100 mL)]有极其显著影响 ( $R^2=0.95$ ,  $P<0.0001$ )。四种不同类型的 YAN 组分在发酵过程中的吸收和释放规律不同。该研究证实, YAN 初始浓度对 H<sub>2</sub>S 的产生、动力学和每种类型 YAN 的摄取曲线都有决定性的影响, 这表明在苹果酒发酵中, 磷酸氢二铵是避免 H<sub>2</sub>S 释放的有效氮源。该试验为苹果酒工业发酵提供了理论基础。

**关键词:** 苹果; 苹果酒; 发酵过程; 硫化氢; 酵母可同化氮源

文章编号: 1673-9078(2023)03-66-74

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0477

## Effects of Initial Yeast Assimilable Nitrogen Concentration on Hydrogen Sulfide Formation during Cider Fermentation

SONG Yangbo<sup>1,2</sup>, ZHANG Biying<sup>2</sup>, SHI Kan<sup>2</sup>, REN Xiaoli<sup>1</sup>, LIU Liyuan<sup>3</sup>, ZHOU Hui<sup>3</sup>, XU Dan<sup>4\*</sup>, LIU Shuwen<sup>2\*</sup>

(1.College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China) (2.College of Faculty,

Northwest A&F University, Yangling 712100, China) (3.Turpan Grape Industry Development and Promotion Center,

Turpan 838000, China) (4.Department of Public Health, Medical College, Qinghai University, Xining 810016, China)

**Abstract:** The initial concentration and composition of yeast assimilable nitrogen (YAN) can affect cider fermentation kinetics and hydrogen sulfide production by *Saccharomyces cerevisiae*. The aim of this study was to investigate how initial YAN concentration affects hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) production and fermentation kinetics in cider fermentation. The initial YAN concentration was adjusted by adding diammonium phosphate, and the yeast fermented cider at low (86 mg N/L), medium (208 mg N/L), and high (433 mg N/L) concentrations. The fermentation characteristics, amount of H<sub>2</sub>S released, and four types of nitrogen-derived compounds were measured. There is a complex relationship between the initial YAN concentration and H<sub>2</sub>S release (release change and total amount). The highest H<sub>2</sub>S release was obtained with the medium concentration treatment, which was 288.25 μg/100 mL, whereas the lowest H<sub>2</sub>S release was obtained in the high concentration

引文格式:

宋洋波,张碧颖,石侃,等.不同初始酵母可同化氮浓度对苹果酒发酵过程中硫化氢生成量的影响[J].现代食品科技,2023,39(3):66-74.

SONG Yangbo, ZHANG Biying, SHI Kan, et al. Effects of initial yeast assimilable nitrogen concentration on hydrogen sulfide formation during cider fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 66-74.

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 宁夏回族自治区科技重大专项子课题 (2016BZ0603); 国家重点研发计划项目 (2016YFD0400504); 国家葡萄产业技术体系建设项目 (CARS-30-jp-3); 青海大学青年科研基金重点项目 (2021-QNY-1); 青海大学青年科研基金项目 (2021-QYY-4)

作者简介: 宋洋波 (1985-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵微生物及利用, E-mail: 99281645@qq.com

通讯作者: 许丹 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: 373114814@qq.com; 共同通讯作者: 刘树文 (1965-), 男, 博士, 教授,

研究方向: 葡萄酒微生物, E-mail: liushuwen@nwsuaf.edu.cn

treatment, at 44.13  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ . Only under low concentration treatment conditions did the fermentation rate [3.84 g/(d L)] have a markedly significant effect on the  $\text{H}_2\text{S}$  production rate [31.68  $\mu\text{g}/(\text{d } 100\text{ mL})$ ] ( $R^2=0.95, P<0.0001$ ). The absorption and release patterns of four different types of YAN components differed during the fermentation process. The results of this study confirm that the initial concentration of YAN has a strong influence on the production, kinetics, and uptake profile of each type of YAN, suggesting that the use of diammonium phosphate as a nitrogen is an effective way to avoid  $\text{H}_2\text{S}$  release during cider fermentation.

**Key words:** apple; cider; fermentation process;  $\text{H}_2\text{S}$ ; yeast assimilable nitrogen

充足的酵母可同化氮源 (Yeast Assimilable Nitrogen, YAN) 是酵母正常生长和代谢的必要条件<sup>[1]</sup>。特别是果酒的发酵中, 足量 YAN 可使酿酒酵母充分利用糖, 并最大限度地减少硫化氢的产生<sup>[2]</sup>。酿酒苹果的 YAN 含量普遍介于 9~249 mg N/L 之间, 平均值为 59 mg N/L, 且大部分酿酒苹果品种 YAN 含量低于 140 mg N/L, 而这一含量是果酒发酵 YAN 最低水平要求, 即可完全利用糖, 但生产  $\text{H}_2\text{S}$ <sup>[3]</sup>, 此外, 酿酒酵母仅能利用苹果汁中的部分含氮化合物, 其中酵母可同化氮源主要为氨基酸和铵离子<sup>[4]</sup>。谷氨酸、天冬酰胺和铵盐为酿酒酵母首选氮源, 通过消耗此类氮源酵母实现最佳生长; 脯氨酸、尿囊素和尿素为非优选氮源<sup>[5]</sup>。

$\text{H}_2\text{S}$  为酵母菌代谢的产物, 通常形成于酵母菌发酵合成含硫氨基酸的过程, 可引起苹果酒的感官品质缺陷<sup>[6]</sup>。苹果酒发酵中, 影响酿酒酵母产生硫化氢的原因很多, 其中主要原因是苹果汁中 YAN 的水平, 此外, 杀菌剂中的硫元素<sup>[3]</sup>、发酵产生的二氧化碳(挥发和携带作用)、发酵温度、发酵时间与停止、pH 值、维生素、金属离子等皆可影响  $\text{H}_2\text{S}$  的释放量<sup>[7,8]</sup>。有研究称磷酸氢二铵 (Diammonium Phosphate, DAP) 是葡萄酒发酵中  $\text{H}_2\text{S}$  和其发酵衍生挥发物的有效调节剂<sup>[9]</sup>, 而磷酸氢二铵也是苹果酒生产中最常见的氮源补充剂。

因此, 本研究选择 UCD522, 一株广泛用于苹果酒工业生产的商业酿酒酵母(高产硫化氢), 经此酵母发酵而成的苹果酒香气浓郁。研究通过添加磷酸氢二铵形成不同初始 YAN 浓度的苹果汁对 UCD522 在苹果酒发酵中发酵动力学和  $\text{H}_2\text{S}$  产生的影响, 并监测了 UCD522 利用复杂氮化合物(尿素、精氨酸、铵盐和主要氨基氮)的特征及氮同化多样性, 比较 UCD522 对总 YAN 和单个氮组分的消耗情况。本试验证实了高浓度的 YAN 可使 UCD522 完成苹果酒发酵并有效降低  $\text{H}_2\text{S}$  的产量。

## 1 材料和方法

### 1.1 原料和试剂

酿酒酵母菌株 UCD522 由加州大学戴维斯分校葡

萄栽培与酿造系培养保藏中心提供。

葡萄糖、酵母浸粉、蛋白胨、焦亚硫酸钾、磷酸氢二铵、没食子酸、福林-酚试剂、 $\beta$ -巯基乙醇、异丙醇、无水乙醇美国 Sigma-Aldrich 公司。所有试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Lancman 6-Easy-Feed 升降碾压机, 斯洛文尼亚 Lancman 公司; Oesco81.3 cm 型号 7876 架式布料压滤机, 美国 Oesco 公司; PAL-1 糖度计, 日本 ATAGO 公司; UX420 天平, 日本岛津公司; Branstead Lab-Line Shakers 恒温振荡培养箱, 美国 Branstead 公司; 120D 硫化氢检测计, 日本 Komyo Kitagawa 公司; UV-1800 紫外分光光度计, 日本岛津公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 苹果汁制备

苹果 (*Malus domestica* Borkh) 于 2016 年从美国纽约州伊萨卡的康奈尔大学农业研究实验站果园提供。使用压榨将苹果制成果浆, 再利用和架式布料压滤机过滤, 最终获得苹果原汁。果汁化学成分为 YAN=63.70 mg N/L, 可溶性固形物浓度=12.95 Brix, 可滴定酸度为 3.45 g/L, pH 值为 4.15, 总多酚(按 Folin-Ciocalteu 法测定)=1.10 g 没食子酸当量/L; 二氧化硫以 160 mg/L (亚硫酸氢钾) 添加, 以抑制杂菌生长。所有发酵均使用同批苹果原汁, 果汁贮存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。

#### 1.3.2 发酵与采样

利用磷酸氢二铵将果汁中 YAN 浓度分别调整为低浓度 (86 mg N/L)、中浓度 (208 mg N/L) 和高浓度 (433 mg N/L), 其他发酵条件相同。 $4\text{ }^\circ\text{C}$  下, 酵母细胞保存于酵母提取物葡萄糖 (YEPD) 培养基上(葡萄糖 20 g/L; 酵母浸粉 10 g/L; 蛋白胨 20 g/L; 琼脂 20 g/L)。

发酵前, 在  $28\text{ }^\circ\text{C}$  下, 摇床(转速: 200 r/min), 酵母菌株接种于 5 mL YEPD 培养基中(5:1 管体积/培养基比例)进行了 48 h 发酵种子培养。接种物浓度约为  $1\times 10^7$  CFU/mL,  $\text{OD}_{600\text{ nm}}=0.8$ 。发酵种子保持在  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 当天使用。1 mL 的发酵种子接种至装有

99 mL 苹果汁的 250 mL 的三角瓶。20 °C 下进行苹果酒发酵,所有浓度处理发酵均进行三次重复试验。在发酵 24 h、72 h 和结束时取样。样品在 4 °C, 12 000 r/min 的条件下离心 5 min, 取上清液, 置于 -20 °C 下保存以备分析。

### 1.3.3 监测与测定项目及方法

#### 1.3.3.1 发酵监测

采用 CO<sub>2</sub> 失重法测定发酵速率,每 24 h 测定一次。当连续两天失重量小于 0.01 g 时,即认为发酵完成。

#### 1.3.3.2 H<sub>2</sub>S 释放量的监测

将醋酸铅选择性气体检测计(硫化氢)(Komyo Kitagawa, 日本)插入三角瓶的橡胶塞中,用于测定 H<sub>2</sub>S 的释放量。检测计中的色带长度与 H<sub>2</sub>S 释放量成正比,如其他文献<sup>[10]</sup>所述。当色带至刻度的末端时,替换检测计。每 24 h 进行一次读数,直至发酵完成。

#### 1.3.3.3 YAN 浓度的测定

发酵过程中,在三个时间点(24 h、72 h 和结束时)采样,并进行分析,以确定 YAN、PAN(主要氨基氮)、铵盐、尿素和精氨酸的浓度。样品在 4 °C, 12 000×g 的条件下离心 5 min, 取上清液,保存于

-20 °C。YAN 定量,使用 K-LARGE 试剂盒测定尿素、精氨酸、铵盐的浓度;使用 K-PANOPA 测定 PAN 浓度(K-LARGE 和 K-PANOPA 试剂盒, Megazyme, 威克洛, 爱尔兰)。尿素、精氨酸和氨的转化率与 NADPH 的偶联消耗量成正比,NADPH 的偶联消耗量可通过在 340 nm 处吸收光的增加量来测定。PAN 组中游离氨基酸的氨基与 N-乙酰基-L-半胱氨酸和邻苯二甲醛反应生成异吲哚衍生物,可通过在 340 nm 吸光度的增加量测定,计算方法见说明书。

## 1.4 数据分析

采用 JMP Pro 和 R Studio 3.4.4 进行数据分析并绘图。方差分析采用单因素方差分析, *t* 检验显著性定义为  $P < 0.05$ , 标准误差为 95% 置信水平。线性回归分析,以确定系数 ( $R^2$ ,  $P < 0.05$ ) 评价回归质量。每组数据均进行三次重复,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵特征

表 1 不同 YAN 起始浓度下 UCD522 菌株的发酵速率、发酵时间、二氧化碳总量产量

Table 1 Fermentation rate, fermentation time, and total carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) production of UCD522 strain under each DAP treatment

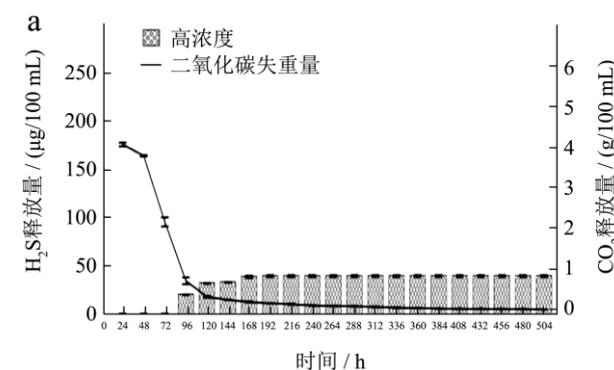
浓度/(mg N/L)	发酵时间/h	二氧化碳总量/(g/L)	发酵速率/(g/(d L))
86 (低浓度)	144.00±0.00 <sup>c</sup>	20.32±0.19 <sup>c</sup>	3.84±0.00 <sup>c</sup>
208 (中浓度)	222.00±12.00 <sup>a</sup>	60.32±4.97 <sup>a</sup>	6.96±0.03 <sup>b</sup>
433 (高浓度)	102.00±12.00 <sup>b</sup>	40.06±0.39 <sup>b</sup>	9.60±0.05 <sup>a</sup>

注:数值表示为平均值±标准差( $n=3$ );同列右肩不同小写字母的值与指定 YAN 处理内的对照显著不同(采用 Tukey's 显著性差异检验,  $P < 0.05$ )。

在各浓度处理条件下,UCD522 的发酵特性不同。与中、高浓度处理相比,低浓度处理的发酵速率相对较慢(表 1)。三个浓度处理中,中浓度处理的发酵时间最长,为 222 h 左右,总 CO<sub>2</sub> 失重最大(60.32 g/L)。而高浓度处理的发酵速率最快,发酵时间最短,为 102 h。由图 1 可知,当 UCD522 开始释放 H<sub>2</sub>S,其发酵速率逐渐下降;YAN 浓度和总 H<sub>2</sub>S 释放量之间存在非线性关系,高浓度处理的总 H<sub>2</sub>S 释放量低于其他处理。不同浓度处理对苹果酒发酵动力学有较大的影响,发酵速率随 YAN 起始浓度增加而增加,与前人研究结论一致<sup>[11]</sup>。结果证实,在苹果酒发酵过程中,YAN 起始浓度可有效影响 UCD522 的 H<sub>2</sub>S 释放量(图 1)。

已有研究表明,硫化氢的溶解度极低,且易挥发,在发酵过程中可随二氧化碳的释放被带出发酵液,这表明更高的发酵速率可提高硫化氢的释放速率<sup>[12]</sup>。然而,在本研究中,低浓度处理下,发酵速率与 H<sub>2</sub>S 释放速率极其显著相关( $R^2=0.95$ ,  $P < 0.001$ ) (图 2)。

然而,在中、高浓度处理下,为观察到二者之间的相关性( $P$  值分别为 0.431 4 与 0.241 4) (图 2)。因此,研究结果表明发酵速率与 H<sub>2</sub>S 的释放速率仅在特定条件下存在相关性(图 2),由此确定二氧化碳的释放不能对苹果酒中 H<sub>2</sub>S 起净化作用。虽然本研究未能提供更多证据解释二者的相互关系,但确定了在仅低浓度条件下,UCD522 的发酵速率与硫化氢的释放速率之间存在正相关性。



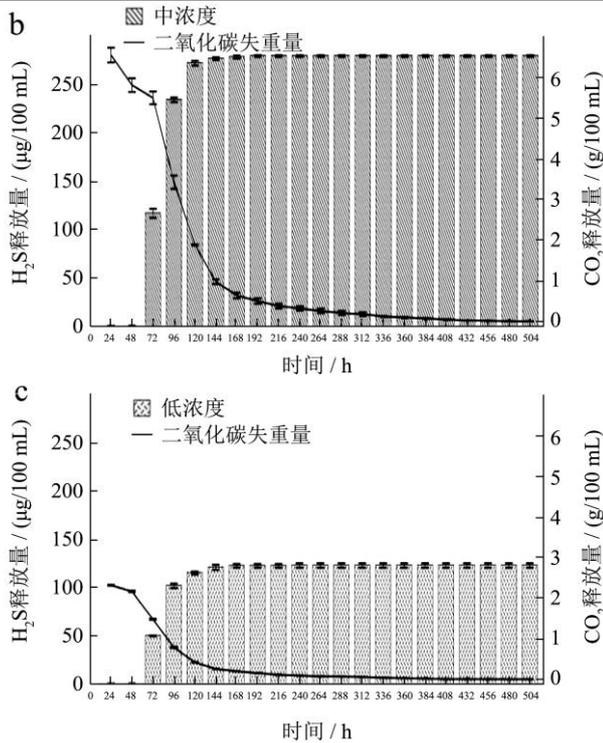


图1 433 (a)、208 (b)、86 mg N/L (c) 处理下的UCD522 酵母菌株发酵失重和硫化氢释放量的比较

Fig.1 Comparison of fermentation weight loss and hydrogen sulfide release of UCD522 yeast strain under 433 (a), 208 (b), and 86 mg N/L (c) treatments

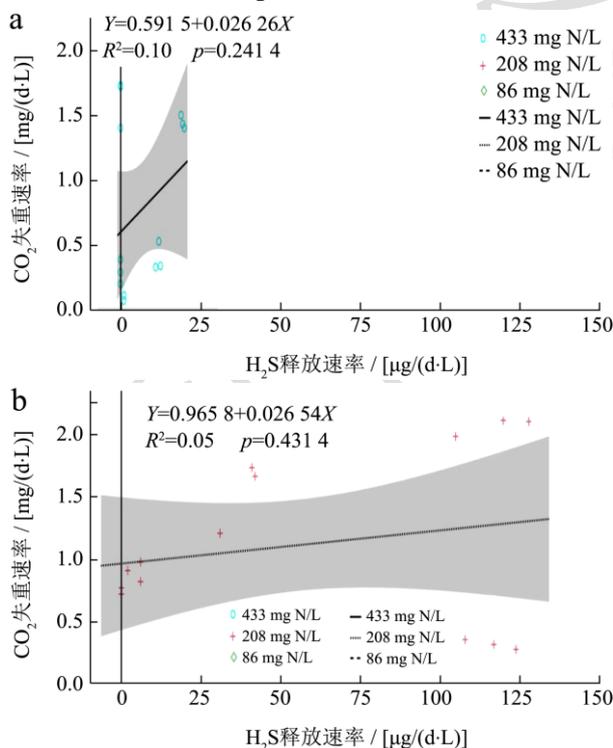


图2 UCD522 酵母在不同处理下 H<sub>2</sub>S 产生率和 CO<sub>2</sub> 损失率的线性回归和相关性

Fig.2 Linear regression and correlation of H<sub>2</sub>S production rate and CO<sub>2</sub> loss rate for UCD522 yeast at each treatment

注: a-c 分别为 433、208、86 mg N/L, 观察点总数 45。

## 2.2 硫化氢的释放

不同 YAN 起始浓度对 UCD522 发酵产 H<sub>2</sub>S 有影响。表 2 显示, 中浓度下的 UCD522 释放硫化氢持续时间最长 (132 h), 硫化氢释放总量最高 (288.25 µg/100 mL), 硫化氢释放速率最快[2.20 µg/(h·100 mL)]。相反, 低和高浓度处理的硫化氢释放持续时间较短 (分别为 96 h 和 120 h), 硫化氢释放总量较低 (分别为 123.75 和 44.13 µg/100 mL), 硫化氢释放速度较慢(分别为 1.32 和 0.35 µg/(h·100 mL))。不同 YAN 初始浓度下, UCD522 硫化氢释放总量的排序为: 高<低<中, 在高处理下, UCD522 硫化氢释放总量低于其他处理, 此结果与其它相关研究报道的发现一致<sup>[13]</sup>。中浓度与高浓度相比, 硫化氢的释放总量从 288.25 µg/100 mL 降至 44.13 µg/100 mL, 减少 6 倍以上 (表 2)。

图 1 显示了不同浓度下, UCD522 发酵苹果酒中发酵失重与 H<sub>2</sub>S 释放量之间的动态关系。发酵初期, 低和中浓度处理下, 发酵至第 72 h UCD522 开始释放硫化氢; 高浓度处理下, UCD522 被推迟至第 96 h 开始释放硫化氢, 说明在果酒发酵过程中高 YAN 起始浓度可延迟酿酒酵母释放硫化氢<sup>[14]</sup>。所有浓度处理发酵在第 192 h 后均无 H<sub>2</sub>S 释放 (图 1)。正如图 1 和表 2 所示, 低、中浓度处理下, 发酵至第 72 h 当 YAN 将耗尽, 酿酒酵母形成 H<sub>2</sub>S, 且释放速率较快; 在中浓度处理下, UCD522 释放硫化氢的总量最高, 是低浓度处理下该指标的增加 2~3 倍。综上, 当氮源不足时, 酵母细胞开始累积硫化物并转化为硫化氢(挥发性气体), 且扩散至发酵液中<sup>[15]</sup>。

表 2 3 种 YAN 起始浓度处理下, UCD522 酵母释放硫化氢的速率和时长、释放总量

Table 2 H<sub>2</sub>S production rate and duration, total H<sub>2</sub>S production of UCD522 yeast under three DAP treatments

浓度/(mg N/L)	时长/h	释放总量/( $\mu$ g/100 mL)	释放速率/[ $\mu$ g/(d 100 mL)]
86 (低浓度)	96.00 $\pm$ 9.60 <sup>b</sup>	123.75 $\pm$ 3.95 <sup>b</sup>	31.68 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>
208 (中浓度)	132.00 $\pm$ 13.96 <sup>a</sup>	288.25 $\pm$ 17.88 <sup>a</sup>	52.80 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
433 (高浓度)	120.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	44.13 $\pm$ 5.48 <sup>c</sup>	8.40 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>

注: 数值表示为平均值 $\pm$ 标准差 ( $n=3$ ); 同列右肩不同小写字母的值与指定 YAN 处理内的对照显著不同 (采用 Tukey's 显著性差异检验,  $P<0.05$ )。

由于苹果汁中 YAN 的含量较低<sup>[3]</sup>, 所以利用添加磷酸氢二铵调整苹果汁 YAN 起始浓度对抑制酿酒酵母在苹果酒发酵中释放 H<sub>2</sub>S 极为关键。其他研究报告, YAN 起始浓度与 H<sub>2</sub>S 的释放总量之间相关性较差<sup>[16]</sup>。Vos 等<sup>[17]</sup>的早期结果证实, 在果酒发酵中, YAN 浓度与 H<sub>2</sub>S 的释放量之间存在负相关。然而, 本研究结果仅与葡萄酒的相关报道结果部分一致。对比低、中浓度处理的结果表明, 补充磷酸氢二铵可导致 UCD522 硫化氢释放总量增加。此外, 在相同 YAN 初始浓度条件下, UCD522 发酵苹果酒时硫化氢释放总量低于发酵葡萄酒<sup>[12]</sup>。造成此差异的原因可能是果汁特性对酵母菌株的影响。总而言之, 三种浓度处理下, YAN 的耗尽导致 UCD522 开始释放 H<sub>2</sub>S, 并持续释放至第 168 h。据报道, 在缺氮的情况下, 亚硫酸盐还原酶活性是 H<sub>2</sub>S 释放总量增加的主要原因<sup>[18]</sup>。

发酵中, 除了添加磷酸氢二铵可调节酿酒酵母释放 H<sub>2</sub>S, 其他营养或维生素的缺乏也可对酵母产生胁迫, 进而使酵母产生无氮调节形成 H<sub>2</sub>S<sup>[19]</sup>。Bohlscheidt 等<sup>[20]</sup>报告生物素的增加, 降低了氮缺乏情况下 H<sub>2</sub>S 的释放。报道中出现差异的原因包括实验菌株遗传和发酵环境两方面。由于遗传变异不同, 酵母菌株对氮补充的反应不同<sup>[21]</sup>。影响 H<sub>2</sub>S 形成的其他因素有: YAN 补充的时间<sup>[22]</sup>、发酵条件 (大小、温度、搅拌) 以及其他营养素的组成, 如维生素<sup>[19]</sup>或硫源<sup>[15]</sup>。注意, 上述研究对 H<sub>2</sub>S 进行定量方法不同, 也可导致其结论差异。上述因素对苹果酒发酵的相关影响需要进行更全面的研

究。发酵液中, 不同 YAN 水平通过转录调控来调节酵母的硫酸盐同化途径。YAN 补充剂可上调硫酸盐同

化途径中的基因表达水平<sup>[15]</sup>, 这与目前对酵母菌氮代谢的认识是一致的。酵母主要在其生长指数期和稳定期利用 YAN 进行繁殖和蛋白质合成<sup>[23]</sup>, 蛋白质合成速度的加快导致消耗含硫氨基酸, 因此在指数和稳定期观测到硫酸盐同化途径的上调表达<sup>[24]</sup>。YAN 的缺乏导致氨基酸前体的数量不足, 从而导致过量 H<sub>2</sub>S 的释放<sup>[2]</sup>。然而, 目前无研究确定苹果酒发酵过程中避免 H<sub>2</sub>S 释放所需的最小 YAN 量, 但本研究结果表明, 在 UCD522 菌株发酵过程中, YAN 的浓度应远高于 208 mg N/L。

### 2.3 酵母菌可同化氮消耗量

为了进一步探究 UCD522 在苹果酒发酵过程中如何消耗酵母可同化氮源, 所以分别测定发酵第 24 h、第 72 h 和结束时的 YAN 残留量 (表 3)。由表 3 可知, 在不同的时间点, YAN 消耗率可影响 UCD522 硫化氢的释放。中浓度处理下, 接种后 24 h 内 YAN 下降 43.79%; 高浓度处理下, 此时段 YAN 下降 53.97%; 相反, 此时段低浓度处理的 YAN 总浓度增加 8.00%, 达 92.88 mg N/L。72 h 时, 低和中浓度处理的 YAN 浓度分别为 5.04 mg N/L 与 6.08 mg N/L; 而高浓度处理的 YAN 浓度最高, 为 18.54 mg N/L。在最初的 72 h 内, 酵母菌消耗了 94.14% 到 97.08% 左右的 YAN 起始总量 (以中浓度处理为最高, 达 97.08%)。发酵结束时, 低、中和高浓度处理中的 YAN 浓度各上升至 6.86、21.39 和 142.56 mg N/L (表 3)。对于这三种处理, H<sub>2</sub>S 的生产始于 YAN 耗尽 (图 1 和表 3), 此时 YAN 水平低于 140 mg N/L-酿酒酵母果酒发酵所需最低 YAN 浓度。

表 3 3 种不同处理下发酵过程中不同时间总酵母可同化氮 (YAN) 的残留量

Table 3 The residual total Yeast Assimilable Nitrogen at different time throughout fermentation under three different treatments

处理	24 h/(mg N/L)	72 h/(mg N/L)	结束时/(mg N/L)
86 (低浓度)	92.88 $\pm$ 3.91	5.04 $\pm$ 0.21	6.86 $\pm$ 0.18
208 (中浓度)	116.91 $\pm$ 1.76	6.08 $\pm$ 0.32	21.39 $\pm$ 0.75
433 (高浓度)	199.29 $\pm$ 5.74	18.54 $\pm$ 0.79	142.56 $\pm$ 4.11

注: 数值表示为平均值 $\pm$ 标准差 ( $n=3$ )。

2.4 酵母菌可同化氮的组成变化

分析 PAN、铵盐、尿素和精氨酸，四种 YAN 组

分在苹果酒发酵过程中与 H<sub>2</sub>S 生成的关系。本研究发  
发现发酵液中 PAN 和铵盐是主要的 YAN 组分，其次是  
尿素（图 3），精氨酸含量最低。

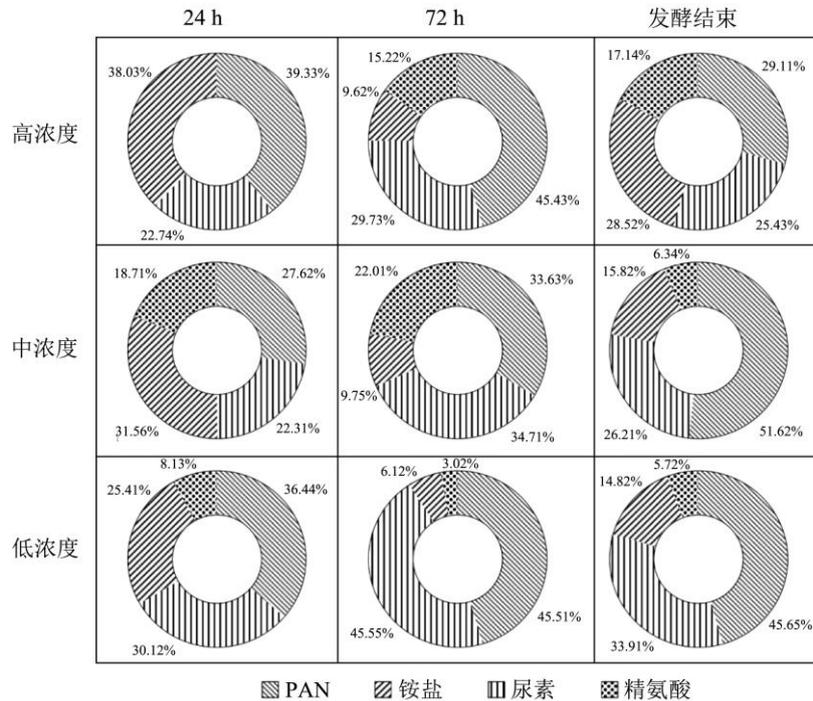


图 3 比较在 24 h、72 h 和发酵结束时铵盐、尿素、精氨酸和 PAN 占实时 YAN 总浓度的百分比 (n=3)

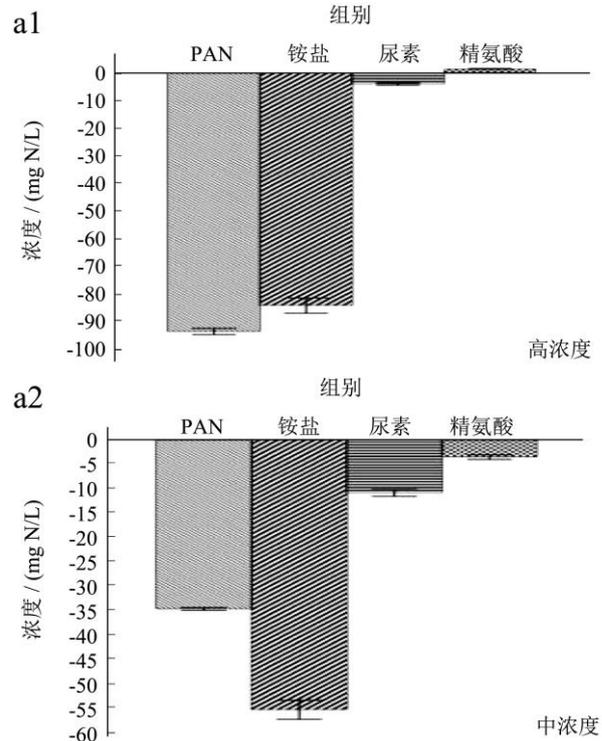
Fig.3 Comparison of average ammonia, urea, L-arginine and PAN percentage of total YAN concentration observed at 24-hour, 72-hour and end of fermentations (n=3)

注：水平行是相同的处理，垂直列是相同的时间点。

发酵前 72 h, UCD522 消耗了大部分的 PAN 和铵盐。铵盐仅占总 YAN 的 9.75% (图 3)。其次，低浓度下，PAN 的最低浓度下降到 5.04 mg N/L 以下 (占总 YAN 的 45.55%) (图 3 和图 4)。而发酵结束时，三个浓度处理 YAN 残余量中 PAN 水平均有不同程度的升高。仅高浓度处理发酵结束后，铵盐增加量最大。精氨酸含量较低，浓度低于 5.76 mg N/L。低与中浓度处理的整个发酵过程中，尿素和精氨酸浓度都在持续下降；而高浓度处理中，两种组分先下降，从 72 h 上升直至发酵结束 (图 4)。仅高浓度处理，自 72 h 后，所有四种类型的 YAN 组分的浓度持续增加直至发酵结束。

表 3 和图 3 表明，当 YAN 总浓度低于 100 mg N/L 时，YAN 主要组分为 PAN 和尿素，范围从 54.54% (高浓度处理，结束) 到 91.06% (低浓度处理，72 h)。在整个发酵过程中，不同处理显著影响 UCD522 对四种氮源的利用。从发酵的 24 h 到 72 h，高浓度处理条件下，PAN (107.54 mg N/L) 作为酵母首选氮源，其次是铵盐 (84.34 mg N/L)；而中浓度处理中，UCD522 优先利用铵盐 (56.49 mg N/L) 而不是 PAN (35.44 mg N/L)；在低浓度处理条件下，酵母菌首先消耗 PAN

(53.09 mg N/L)，其次是铵盐 (10.60 mg N/L)。所有浓度处理，在此阶段发酵过程中，尿素仅被消耗 21.34 mg N/L (低浓度处理) (图 4a)。



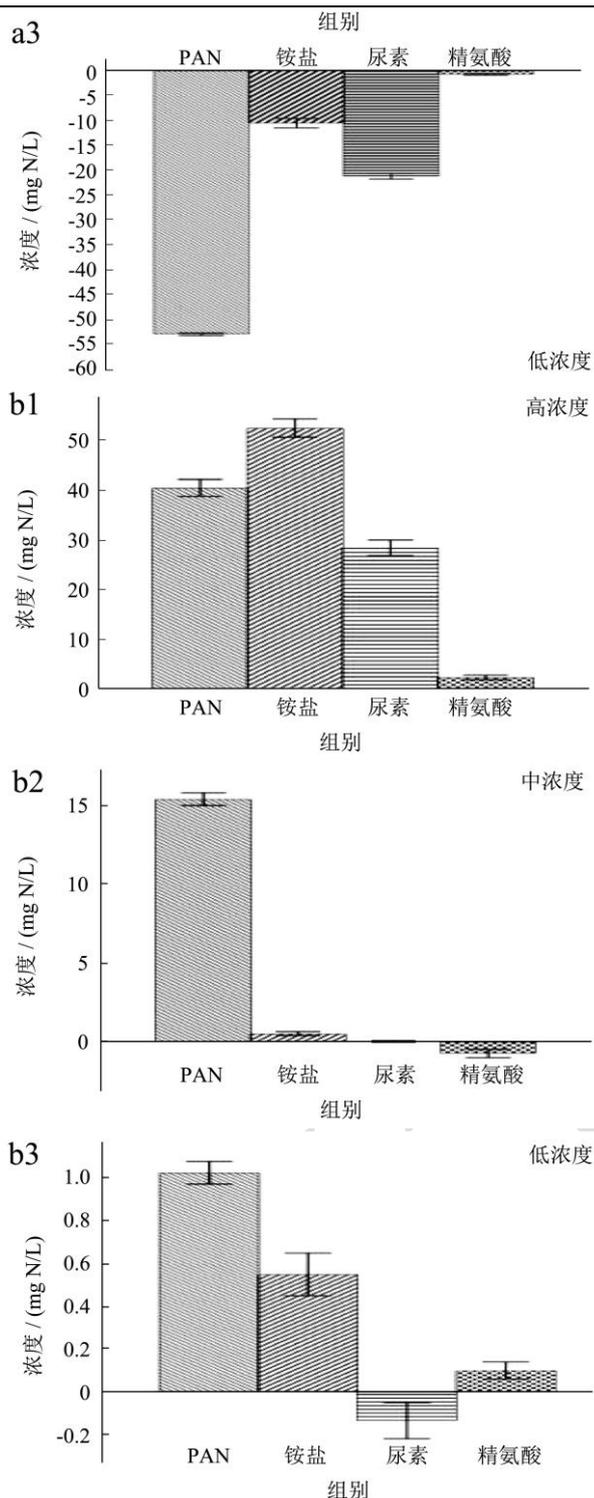


图 4 4 种氮源在 24~72 h (a) 和 72 h 至发酵结束 (b) 期间的浓度变化 ( $n=3$ )

Fig.4 The profile of 4 types of nitrogen source during 24-hour to 72-hour (a) and 72-hour to end of fermentation (b) ( $n=3$ )

注: 每个垂直列是相同的处理, 每个水平垂直行是相同的苹果酒发酵阶段, 平均值 $\pm$ SEM。

从 72 h 至发酵结束期间, 由于受到酵母自溶的影响, 可观察 YAN 浓度升高 (表 3)。总的趋势是 PAN 的释放量高于其他氮源, 分别为 40.53、15.50 和

1.02 mg N/L, 对应高、中、低浓度处理。铵盐释放量变化趋势类似, 但差异较大, 分别为高浓度 52.56 mg N/L, 中浓度 0.53 mg N/L, 低浓度 0.55 mg N/L, 高浓度处理与其他浓度处理相差近 100 倍。同时, 尿素和精氨酸释放量较低。

高浓度下, UCD522 分泌的四种 YAN 组分浓度由高至低依次为铵盐、PAN、尿素和精氨酸。中浓度处理中, 酵母主要释放 PAN, 而其他 YAN 组分则以极低的水平释放。相反, UCD522 在此期间消耗部分精氨酸 (0.74 mg N/L)。最后, 仅低浓度处理下, UCD522 释放大量 PAN 的同时, 消耗尿素 (0.09 mg N/L) (图 4b)。因此, 四种 YAN 组分的含量不仅受 YAN 起始浓度的影响, 还受酵母自溶的影响。

研究发现, 铵盐为 UCD522 同化的主要 YAN 组分。图 4 中的结果证明在三种浓度处理下, 铵盐作为的主要 YAN 组分, 在发酵的前 72 h 被 UCD522 大量利用于生物量的形成。这种偏好刺激酵母菌的生长, 并导致 YAN 的总体利用率增加。含硫氨基酸是 PAN 的组成成分, 其消耗是导致产生  $H_2S$  的重要原因之一<sup>[25]</sup>。铵盐的加入延迟了 PAN 的吸收 (图 4a), 是由于 UCD522 更倾向于代谢无机氮, 其次是 PAN。所有浓度处理发酵, 自 24 h 后, UCD522 消耗大量 PAN 分, 且释放不同量的  $H_2S$  (图 1)。如, 中浓度处理, UCD522 消耗大部分 PAN, 导致其  $H_2S$  释放量最高 (表 2 和图 4a)。因此, 在苹果汁发酵过程中, 优化铵态氮的来源可以降低  $H_2S$  的含量。

不同 YAN 初始浓度处理, 皆在发酵接近或达到稳定期后, 酵母自溶释放 YAN 组分。除 PAN 外, UCD522 释放其他 YAN 组分的趋势差异较大。如, 在发酵结束时, 仅高浓度处理 UCD522 菌株释放四种氮源 (图 4b)。酿酒酵母释放氮源通常发生在发酵的后期, 这是由于高累积乙醇浓度造成的膜通透性增加和溶质有效转运减少<sup>[26]</sup>。Valero 等<sup>[27]</sup>证实某些氨基酸作为 NAD(P)H 再氧化的一种机制被积极释放。

尿素与精氨酸被认为是酵母菌的非首选氮源<sup>[28]</sup>。本研究发现二者的消耗量远低于铵盐和 PAN, 特别是高浓度处理下, UCD522 仅释放少量  $H_2S$ 。其原理是, 当存在铵盐和 PAN 等优选氮源时, 抑制代谢非优选氮源的氮分解代谢阻遏通路 (Nitrogen Catabolite Repression, NCR)<sup>[28]</sup>。另外, 由于酒精发酵中酿酒酵母只可同化精氨酸四分子氮中的三个, 所以精氨酸并非酵母优选氮源<sup>[29]</sup>。在生产条件下, 酵母菌更倾向于同化铵盐和 PAN<sup>[23]</sup>。正如 Ough 报告<sup>[30]</sup>, 酒精发酵过程中, 尿素被尿素酰胺酶羧化, 通过别法酯产生两分子氨。但精氨酸的代谢与此反应的衔接存在不确定

性,导致尿素过量积累,随之释放在苹果汁/苹果酒中(图4b)。此外,如前所述,发酵环境既影响尿素的释放率,又影响其重吸收率,而高浓度的铵盐抑制酵母对尿素的重吸收<sup>[31]</sup>。综上,酿酒酵母代谢尿素和精氨酸极为复杂性,因此在本试验中,YAN初始浓度并非唯一决定因素。

### 3 结论

研究表明,苹果酒发酵过程中,不同YAN初始浓度对UCD522的发酵动力学和H<sub>2</sub>S的形成具有较强的调节作用。苹果汁中的YAN初始浓度与UCD522的H<sub>2</sub>S释放量不具相关性,其中,中浓度处理H<sub>2</sub>S释放量最高,为288.25 μg/100 mL(H<sub>2</sub>S释放时长为132 h左右);而高浓度处理最低,为44.13 μg/100 mL;仅在低浓度处理发酵中,发酵速率[3.84 g/(d L)]与H<sub>2</sub>S生成速率[31.68 μg/(d·100 mL)]呈正相关(R<sup>2</sup>: 0.95, P<0.000 1)。同时,进一步证实苹果酒发酵的前72 h,酵母UCD522能够有效地利用氮源,总YAN消耗率为94.14%以上,包括铵、PAN、尿素和精氨酸;自第72 h以后释放至少6.86 mg N/L的YAN组分。通过分析UCD522在苹果酒发酵中对YAN组分的同化与释放,可为苹果酒发酵中YAN的补充策略提供理论。综上,本研究为苹果酒发酵提供实验依据,同时为抑制H<sub>2</sub>S形成与苹果酒发酵YAN管理提供理论基础,可建立更优的苹果酒发酵控制管理系统。

### 参考文献

- [1] Crápin L, Sanchez I, Nidelet T, et al. Efficient ammonium uptake and mobilization of vacuolar arginine by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during wine fermentation [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 1-13.
- [2] Boudreau T F, Peck G M, O'Keefe S F, et al. The interactive effect of fungicide residues and yeast assimilable nitrogen on fermentation kinetics and hydrogen sulfide production during cider fermentation: Fungicide residues, YAN and cider fermentation [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(2): 693-704.
- [3] Boudreau T F, Peck G M, O'Keefe S F, et al. Free amino nitrogen concentration correlates to total yeast assimilable nitrogen concentration in apple juice [J]. *Food Science and Nutrition*, 2018, 6(1): 119-123.
- [4] Ye M, Yue T, Yuan Y. Changes in the profile of volatile compounds and amino acids during cider fermentation using dessert variety of apples [J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 239(1): 67-77.
- [5] Zhang W, Cheng Y, Li Y, et al. Adaptive evolution relieves nitrogen catabolite repression and decreases urea accumulation in cultures of the Chinese rice wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* XZ-11 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(34): 9061-9069.
- [6] Linderholm A, Dietzel K, Hirst M, et al. Identification of MET10-932 and characterization as an allele reducing hydrogen sulfide formation in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(23): 7699-7707.
- [7] Duan W, Roddick F A, Higgins V J, et al. A parallel analysis of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions [J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2004, 62(1): 35-41.
- [8] Nowak A, Kusewicz D, Kalinowska H, et al. Production of H<sub>2</sub>S and properties of sulfite reductase from selected strains of wine-producing yeasts [J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 219(1): 84-89.
- [9] Alberti A, Vieira R G, Drilleau J F, et al. Apple wine processing with different nitrogen contents [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2011, 54(3): 551-558.
- [10] Ugliano M, Kolouchova R, Henschke P A. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(3): 423-429.
- [11] Albertin W, Marullo P, Aigle M, et al. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2772-2784.
- [12] Ugliano M, Fedrizzi B, Siebert T, et al. Effect of nitrogen supplementation and *Saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in shiraz fermentation and wine [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(11): 4948-4955.
- [13] Spiropoulos, Tanaka J, Flerianos I, et al. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces* [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2000, 51(3): 233-248.
- [14] Gardner J M, Poole K, Jiranek V. Practical significance of relative assimilable nitrogen requirements of yeast: a preliminary study of fermentation performance and liberation of H<sub>2</sub>S [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2002, 8(3): 175-179.

- [15] Li Y, Zhang Y, Ye D, et al. Impact of serine and serine synthesis genes on H<sub>2</sub>S release in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation [J]. Food Microbiology, 2022, 103: 103961.
- [16] Moreira N, Mendes F, Pereira O, et al. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 458(1): 157-167.
- [17] Vos P J A, Gray R S. The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1979, 30(3): 187-197.
- [18] Cordente A G, Heinrich A, Pretorius I S, et al. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production [J]. FEMS Yeast Research, 2010, 9(3): 446-459.
- [19] Wang X D, Bohlscheid J C, Edwards C G. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(3): 349-359.
- [20] Bohlscheid J C, Fellman J K, Wang X D, et al. The influence of nitrogen and biotin interactions on the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(2).
- [21] Ugliano M, Henschke P A. Comparison of three methods for accurate quantification of hydrogen sulfide during fermentation [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 660(1-2): 87-91.
- [22] Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Inês A, et al. The timing of diammonium phosphate supplementation of wine must affects subsequent H<sub>2</sub>S release during fermentation [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 540-549.
- [23] Bell S J, Henschke P A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005, 11(3): 242-295.
- [24] Mendes-Ferreira A, DelOlmo M, Garcia-Martinez J, et al. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(9): 3049-3060.
- [25] Linderholm A L, Findleton C L, Gagandeep K, et al. Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(5): 1418-1427.
- [26] Monteiro F F, Bisson L F. Nitrogen supplementation of grape juice. II. Effect on amino acid and urea release following fermentation [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1992, 1: 11-17.
- [27] Valero E, Millán C, Ortega J M, et al. Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains: amino acids in wine after fermentation [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83(8): 830-835.
- [28] Zhao X, Zou H, Chen J, et al. The modification of Gat1p in nitrogen catabolite repression to enhance non-preferred nitrogen utilization in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 21603.
- [29] Martín O, Brandriss M C, Schneider G, et al. Improved anaerobic use of arginine by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1623-1628.
- [30] Ough C S, Huang Z, An D, et al. Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1991, 42(1): 26-40.
- [31] Pretorius I S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking [J]. Yeast, 2000, 16(8): 675-729.