

# 柠檬形克勒克酵母对葡萄酒风味的影响

韩姗姗, 刘树文, 张振文

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** Klockera apiculata 1466 纯种发酵和与 *Saccharomyces cerevisiae* 按不同时间、不同比例接种进行混菌发酵试验研究。结果表明, 与 *S. cerevisiae* 纯种发酵酒相比, *K. apiculata* 纯种发酵酒中酯类和酸类物质的含量提高了 104.73% 和 119.8%, *K. apiculata* 是一类产酸菌; 当添加该酵母和酿酒酵母混合发酵时, 酒样中高级醇和甘油含量显著增多, 酸类和酯类的含量减少, 说明混合发酵有益于高级醇和甘油的生成。

**关键词:** 葡萄酒; 柠檬形克勒克酵母; 酿酒酵母; 挥发性物质

中图分类号: TS261.1; TS262.6; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2008)03-0056-03

## Effects of Klockera apiculata Fermentation on Grape Wine Taste

HAN Shan-shan, LIU Shu-wen and ZHANG Zhen-wen

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

**Abstract:** The experiments of *Klockera apiculata* fermentation (pure species fermentation) and mixed species fermentation (*K. apiculata* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* at different ratio and different inoculation time) were carried out. The results indicated that compared with *S. cerevisiae* fermentation, *K. apiculata* fermentation could increase ester content and acid content by 104.73% and 119.8% respectively, *K. apiculata* was a acid-producing strain, however, mixed fermentation of *K. apiculata* and *S. cerevisiae* would significantly increase higher alcohols and glycerin content and decrease esters and acids content, which proved that mixed fermentation was beneficial to the formation of higher alcohols and glycerin.

**Key words:** grape wine; *Klockera apiculata*; *saccharomyces cerevisiae*; volatile compounds

近年来, 对非酿酒酵母的应用成为新的研究热点。Kourkoutas(2004)和 Granchi(2002)等研究发现一些非酿酒酵母 non-*saccharomyces* 有着良好的发酵特性, 在葡萄酒发酵过程中发挥着重要作用, 能对葡萄酒的风味和质量产生积极影响<sup>[1-4]</sup>。关于哪些属、种的非酿酒酵母对葡萄酒品质有益及如何在发酵过程合理使用亟需进一步研究。目前, 国内关于混菌发酵的研究仍处于起步阶段。传统观点认为, 非酿酒酵母的一般特性是发酵不彻底、发酵效率较低、不耐酒精、发酵副产物较多。报道较多的对果酒风味有积极影响的非酿酒酵母有柠檬形克勒克酵母<sup>[1,5]</sup>(*K. apiculata*)、德巴利酵母属<sup>[6-7]</sup>如 *Debaryomyces vanriji*、假丝酵母属等。

本文将 *K. apiculata* 与酿酒酵母 *S. cerevisiae* 按不同接种时间和不同接种比例相结合进行发酵试验, 通过对各处理酒样的挥发性物质进行 GC-MS 分析, 探讨 *K. apiculata* 对葡萄酒风味物质的影响, 为 *K. apiculata* 在发酵酒中的深入研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 西北农林科技大学葡萄酒学院微生物实验室提供。

柠檬形克勒克酵母 *K. apiculata* 1466, 购于中国工业菌种保藏中心。

### 1.2 葡萄原料

赤霞珠(CS), 1998年定植。

### 1.3 发酵试验

按照小容器酿造法<sup>[8]</sup>进行, 接种量 4%, 发酵温度 18~20℃, 容器 3L。

#### 1.3.1 工艺路线

果实采收 预冷 榨汁, 立即添加 60 mg/L SO<sub>2</sub> 澄清 接种, 纯汁发酵(18~20℃) 还原糖 2 g/L 时, 终止发酵 陈酿阶段

##### 1.3.1.1 纯菌种发酵

纯种 CY 3079 发酵(样品编号 1#), 纯种 *K. apiculata* 1466 发酵(样品编号 2#)。

基金项目: 陕西省 2007 年“13115”科技创新工程重大科技专项项目计划 2007ZDKG-09。

收稿日期: 2007-12-19

作者简介: 韩姗姗(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为葡萄与葡萄酒学。

通讯作者: 张振文, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为葡萄与葡萄酒学。

### 1.3.1.2 混合菌种发酵

*K. apiculata* 1466 与 *S. cerevisiae* 以不同的接种时间、不同比例接种。混合发酵试验设计方案见表 1。

表 1 混菌发酵试验设计

接种比例 <i>K. apiculata</i> : <i>S. cerevisiae</i>	接种时间		
	同时接种	间隔 3 d 接种	间隔 6 d 接种
1:3	3#	6#	9#
1:1	4#	7#	10#
3:1	5#	8#	11#

### 1.3.2 测定方法

采用固相微萃取-气质联用法<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2.1 SPME 萃取

在 15 mL 装有磁力搅拌器的顶空瓶中加入 2.0 g NaCl, 10 mL 酒样, 0.1 mL 内标(2-辛醇, 约 0.5 mg/mL), 45 °C 平衡 10 min, 插入 PDMS 纤维头, 于 45 °C 吸附 15 min, GC 解吸 2 min, 用于 GC-MS 分析。

#### 1.3.2.2 GC-MS 分析

色谱条件: 分流方式不分流, 色谱柱为 DB-Wax (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。程序升温: 40 °C 保持 3 min, 以 5 °C/min 的升温速度升至 120 °C, 再以 8 °C/min 的升温速度升至 230 °C, 保持 10 min。载气为 He, 体积流量为 1 mL/min, 进样口温度为 250 °C。质谱条件为: EI<sup>+</sup> 电离源, 电子能量为 70 eV, 灯丝流量为 0.20 mA。检测器电压为 350 V, 扫描范围为 33 ~ 450 AMU, 离子源温度为 200 °C。

#### 1.3.3 数据处理

试验数据处理由 Xcalibur 软件系统完成。挥发性物质(含酸类、醇类和酯类物质)定性: 未知化合物经计算机检索同时与 NIST library(107 k compounds)和 Wiley library(320 k compounds, version 6.0)相匹配。经当匹配度和纯度大于 800(最大值 1000)的鉴定结果才予以报道。用峰面积归一法计算各化学成分的相对含量。

## 2 结果与分析

在自然发酵的葡萄酒中, *K. apiculata* 不会被葡萄酒酵母所压制, 即使人为将 *S. cerevisiae* 接种于葡萄汁中, 在发酵过程中野生的或人工添加的葡萄酒酵母也不会抑制 *K. apiculata* 的生长进而影响到其特性的发挥, H. Erten(2002)的研究表明, 低温有利于高级醇、酯等芳香类物质的生成<sup>[10]</sup>。

通过对 1# ~ 11# 酒样的挥发性物质进行 GC-MS 分析发现, 各个处理之间有如下特点。

### 2.1 挥发性成分 图 1)

如图 1 所示, 各处理酒样挥发性成分的种类大致相似, 即酯类最多, 其次为醇类, 除去含量较少的酚类等物

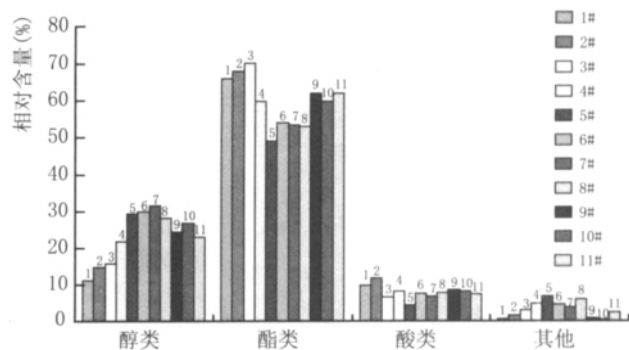


图 1 各发酵酒样中的挥发性物质

质外, 最少的为酸类。各酒样之间主要香气成分的种类差别不大, 相同成分含量有较大差异。

### 2.2 纯种发酵和混合发酵酒样中主要挥发性物质浓度

根据预试验的结果, 从发酵角度而言, 7# 即 *K. apiculata* 1466 接种 3 d 后再按 1:1 比例添加 *S. cerevisiae* 的顺序发酵方案, 其结果较为理想, 混合菌具有较高的产酒率和有机酸分解率, 产生的挥发酸较少, 发酵时间为 9 d, 总糖小于 4.0 g/L。因此, 我们重点对 1#、2# 和 7# 进行分析。

经 GC-MS 鉴定出 1# 酒样的挥发性物质进行测定, 结果见表 2。

检测结果表明, 挥发性物质的种类为 44 种, 2# 为 42 种, 7# 为 45 种。这些成分中, 有 32 种成分为 3 个处理酒样所共有, 这表明各酒样中除了具有一些共同的风味特征之外, 还有其各自的香气特点。根据表 2, 1# 样品中醇类物质的相对百分含量约为 21.91%, 酯类物质为 67.58%, 酸类物质 10.21%, 甘油含量 0.241%; 2# 样品中醇类 15.535%, 酯类 70.776%, 酸类 12.233%, 甘油含量 1.45%; 7# 样品中醇类 32.618%, 酯类 55.405%, 酸类 7.145%, 甘油的相对含量为 3.874%。

可以看出, 与 *S. cerevisiae* 纯种发酵酒相比, *K. apiculata* 纯种发酵酒中酯类和酸类物质的含量提高了 104.73% 和 119.8%。*K. apiculata* 是一类产酸菌。当添加该酵母和酿酒酵母混合发酵时, 酒样中高级醇和甘油含量显著增多, 分别是 2# 样的 2.1 和 2.67 倍, 酸类和酯类的含量相比而言是减少的, 说明混合发酵有益于高级醇和甘油的生成。苯乙醇在 1#、2# 和 7# 酒样中含 2.11%、0.855% 和 2.83%, 构成了高级醇类物质的主要成分, 具有玫瑰香、紫罗兰香、茉莉香、香料辛辣味等香气, 在葡萄酒中有较高含量, 对葡萄酒的香气感官特征有重要的作用。本实验中, 3 种发酵液中检测出的乙酯含量分别为 43.83%、52.05% 和 35.78%, 主要是 9-癸烯酸乙酯, 己酸乙酯和辛酸乙酯。高级醇的含量和性质对于酒的香味影响很大, 而甘油是继乙醇之后, 葡萄酒中最重要的成分, 可增加酒的醇厚感。

表2 纯种发酵1#、2#和混合发酵7#酒样中共有的主要挥发性物质浓度

组分名称	相对含量 (%)			
	1#	2#	7#	
醇类	异丁醇	0.51	0.261	0.537
	异戊醇	7.62	3.577	9.23
	1-己醇	0.58	0.302	0.811
	1-庚醇	0.24	0.177	0.295
	2,3-丁二醇	0.04	0.063	0.116
	1-癸醇	0.05	0.03	0.042
	苯乙醇	2.11	0.855	2.83
	月桂醇	0.45	0.27	0.411
	正丙醇	0.25	0.21	0.316
	乙醇	10.06	9.79	18.03
合计	21.91	15.535	32.618	
酯类	乙酸异丁酯	0.24	0.219	0.242
	9-癸烯酸乙酯	10.72	7.144	4.422
	丁酸乙酯	0.376	0.49	0.695
	乙酸异戊酯	12.1	9.773	12.676
	己酸乙酯	8.53	15.01	12.624
	乙酸己酯	6.35	6.571	5.31
	庚酸乙酯	0.05	0.03	0.06
	乙酸庚酯	0.366	0.063	0.284
	辛酸乙酯	23.59	28.83	17.04
	乙酸辛酯	0.084	0.042	0.074
	7-辛烯酸乙酯	0.084	0.03	0.074
	水杨酸甲酯	4.61	2.055	1.04
	月桂酸乙酯	0.304	0.292	0.39
	乙酸乙酯	0.05	0.177	0.421
乳酸乙酯	0.126	0.05	0.053	
合计	67.58	70.776	55.405	
羧酸类	己酸	0.72	1.074	0.734
	辛酸	4.72	6.289	4.01
	癸酸	2.97	3.087	1.148
	9-癸烯酸	1.455	1.564	1.074
	棕榈酸	0.115	0.042	0.042
	乙酸	0.23	0.177	0.137
合计	10.21	12.233	7.145	
其他	甘油	0.241	1.45	3.874

### 3 结论

酵母菌种类是影响葡萄酒二类香气的重要因素之一,同一酵母属的各种酿酒酵母所产生的挥发性物质有较大差别,从而对葡萄酒的风味产生影响,不同属酵母所产生的挥发性物质的差异更大。与葡萄酒酵母相比,尖端酵母(*Kllockera apiculata*)形成更多的酯和醇,并且在非酿酒酵母属中产高级醇能力最强<sup>[11,12]</sup>。

本文用 *K. apiculata* 和 *S. cerevisiae* 以不同时间和不同比例相结合进行发酵试验,发酵试验所用的葡萄汁未经灭菌处理,能最大限度地模拟实际生产。通过对发酵酒样的挥发性成分进行 GC-MS 分析,发现有 32 种成分为 1#、2# 和 7# 酒样所共有,与 *S. cerevisiae* 纯种发

酵酒相比, *K. apiculata* 纯种发酵酒中酯类和酸类物质的含量提高了 104.73% 和 119.8%。*K. apiculata* 是一类产酸菌。当添加该酵母和酿酒酵母混合发酵时,酒样中高级醇和甘油含量显著增多,分别是 2# 样的 2.1 倍和 2.67 倍,酸类和酯类的含量相较而言减少了,说明混合发酵有益于高级醇和甘油的生成。

酒的感官特征是由香气物质的种类、数量、单个物质的嗅觉阈值及其之间的相互作用决定的,因此,要确定 *K. apiculata* 对香气的贡献大小必须与下一步的感官品尝分析相结合完成。

### 参考文献:

- [1] N. P. Jolly, O. P. H. Augustyn, I. S. Pretorius. The effect of non-saccharomyce yeasts on fermentation and wine quality [J]. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2003, 24: 55- 62.
- [2] K. Kapsopolou, A. Mourtzini, M. Anthoulas, et al. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007, 23: 735- 739.
- [3] Braulio Esteve-Zarzoso, Paloma Manzanares, Daniel Ram?n, et al. The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking [J]. INTERNATL MICROBIOL, 1998, 1: 143- 148.
- [4] Maurizio Ciani, Luca Beco, Francesca Comitini. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108: 239- 245.
- [5] 何义, 林杨, 张伟, 等. 果酒研究进展 [J]. 酿酒科技, 2006, (4): 91- 95.
- [6] 朱一松, 赵光鳌, 帅桂兰. *Debaryomyces vanriji* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 的混合培养及其对葡萄酒风味的影响 [J]. 酿酒科技, 2003, (4): 70- 72.
- [7] Mar í a Ar é valo Villena, Juan F. ú beda Iranzo, Sarath B. Gundllapallib, et al. Characterization of an exocellular -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39: 229- 234.
- [8] 李华. 小容器酿造葡萄酒 [J]. 酿酒科技, 2002, (4): 70- 74.
- [9] Wang L, Xu Y, Zhao G et al. Rapid analysis of flavour volatile in apple wine using headspace solid-phase microextraction [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2004, 110(1): 57- 65.
- [10] H. Erten. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kllockera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, 18: 373- 378.
- [11] 宫英振, 王颀, 李长文, 等. 苹果酒的香气 [J]. 酿酒科技, 2003, (4): 68- 70.
- [12] J. V. GIV, J. J. Mateo, M. Jimenez, et al. Aroma compounds in wine as influenced by Apiculate yeasts [J]. Journal of Food Science, 1996, 61(6): 1247- 1249.