

# 柠檬形克勒克酵母和酿酒酵母混合发酵对脐橙全果酒风味物质的影响

郑淑丹, 陈钢\*, 阙发秀, 万聆, 邓山鸿, 简素平

(食品科学与技术国家重点实验室(南昌大学), 江西 南昌, 330047)

**摘 要** 探究非酿酒酵母和酿酒酵母在混合培养时的接种顺序对酵母生长及风味物质的影响。采用柠檬形克勒克酵母和酿酒酵母混合同时、混合顺序, 以及其单独发酵的方式进行脐橙全果酒的酿造, 通过顶空固相微萃取-气质联用技术及主成分分析法对酒中的风味物质进行分析和比较。4 种脐橙全果酒中共检测出 38 种香气成分, 包括醇类 9 种、酯类 11 种、萜烯类 9 种、酮和酚 5 种, 其中萜烯类所占比例最大(30% 以上)。混合顺序发酵酒中风味物质种类和含量均最高(37 种, 21.957 mg/L), 混合同时发酵酒次之(35 种, 20.704 mg/L), 且混合发酵酒中酯类和萜烯类显著高于单独发酵。采用混合顺序发酵的方式, 使风味物质得到了改善, 所得脐橙全果酒香气更浓郁, 为酿造品质更佳的脐橙全果酒提供理论依据。

**关键词** 脐橙全果酒; 柠檬形克勒克酵母; 混合发酵; 风味物质; 主成分分析

果酒是由酵母经过一系列复杂的微生物反应发酵而来的, 酵母在整个过程中起着关键作用。依据酵母的功能特点, 一类是酿酒酵母, 其具有较高的酒精发酵力, 发酵效率也较快<sup>[1]</sup>; 另一类是非酿酒酵母, 可以产生多种酶类(蛋白酶、酯酶、糖苷酶、果胶酶等), 其中糖苷酶能水解原料中的非挥发性糖苷类前体物质, 使其转换为各种风味物质, 如酯、高级醇、萜烯类等<sup>[2-3]</sup>。因此, 充分利用两类酵母的特性进行混合发酵实现“取长补短”, 不仅可以增加风味物质的生成, 还可以降低乙酸、乙醛等异味物质的含量, 从而改善果酒的口感和风味<sup>[4-5]</sup>。有研究表明, 在混合同时发酵的过程中, 非酿酒酵母在发酵初期发挥着主要作用, 但因其耐酒精力较差、对营养物质的竞争力弱等缺陷<sup>[6-7]</sup>, 在发酵 1~3 d 后, 酿酒酵母将其取代成为优势菌株, 限制了非酿酒酵母对果酒风味物质形成的贡献<sup>[8]</sup>。因此, 本论文研究了非酿酒酵母和酿酒酵母在混合培养时的接种顺序对酵母生长及风味物质的影响, 使两种酵母的特性得以充分展现, 从而为酿造品质更佳的脐橙果酒提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

脐橙, 江西省赣州地区信丰市; 食品级白砂糖, 深圳安泰生物科技有限公司; 酿酒酵母、柠檬形克勒克

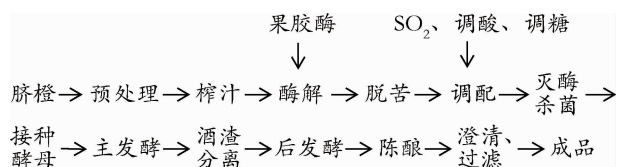
酵母(*K. apiculata*) 1466, 中国工业菌种保藏中心; 果胶酶(酶活力 > 50 000 U/g), 上海源聚生物科技有限公司; 偏重亚硫酸钾(食品级), 长沙科迪亚实业有限公司; 3-辛醇(色谱纯), 美国 Sigma 公司;  $\beta$ -环糊精(分析纯), 广州一码生物有限公司; 赖氨酸培养基(LYS)、酵母浸出粉胨葡萄糖(YPD)培养基、营养琼脂(WL)培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

HR1882 型榨汁机, 飞利浦(中国)投资有限公司; MP2002 电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; WYT-J 型手持糖度计, 成都光学厂; SPX-250B-Z 型生化培养箱, 上海博迅实业有限公司; pH S22 型数显酸度计, Sartorius 公司; 酒精计, 上海精密科学仪器有限公司; VS-1300 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 微量移液器, 上海热电仪器有限公司; 5975-6890N GC-MS 联用仪, 美国 Agilent 公司; 二甲基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷萃取头, 美国 Supelco 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 脐橙全果酒酿造工艺流程<sup>[9]</sup>



#### 1.3.2 脐橙全果酒的接种方式

酵母活化: 将酿酒酵母和柠檬形克勒克酵母分别

第一作者: 硕士研究生(陈钢教授为通讯作者, E-mail: nc\_chengang\_edu@163.com)。

收稿日期: 2019-02-15, 改回日期: 2019-03-19

划线于 YPD 固体培养基上,在恒温箱中(30 ℃)培养 48 h。随后分别取一环平板活化的酵母于 50 mL YPD 液体培养基中,在恒温振荡培养箱中(30 ℃, 150 r/min)培养 24 h,将培养好的酵母放在冰箱中(4 ℃)保藏备用。

接种方式:同时接种,将酿酒酵母和柠檬形克勒克酵母同时接入 200 mL 的脐橙全果酒发酵液中,接种量均为 6 lg CFU/mL。

顺序接种:先接种柠檬形克勒克酵母(6 lg CFU/mL), 72 h 后再接种酿酒酵母(6 lg CFU/mL)。

以酿酒酵母和柠檬形克勒克酵母的单独发酵作为对照,接种量均为 6 lg CFU/mL。

### 1.4 指标测定

#### 1.4.1 常规理化成分分析<sup>[10]</sup>

酒精度,酒精计法;糖度,手持折光仪法;残糖含量,斐林试剂滴定法;SO<sub>2</sub>测定,直接碘量法;pH 值,采用 pH S22 型酸度计定。理化指标重复测定 3 次。

#### 1.4.2 酵母计数

由于酿酒酵母在赖氨酸琼脂培养基(LYS)上不能生长,所以用赖氨酸培养基对非酿酒酵母进行计数,用 WL 培养基对酿酒酵母进行计数,均采用平板计数法。

#### 1.4.3 GC-MS 分析<sup>[11-12]</sup>

将固相微萃取萃取头在 GC-MS 仪的进样口老化,老化温度 250 ℃,老化时间 30 min,载气流速 1.0 mL/min。

取 10 mL 脐橙酒样于 25 mL 螺口进样瓶中,加入内标物 3-辛醇(400 μg/L) 5 μL 和 0.1 g/mL NaCl 溶液,密封置于 45 ℃水浴中平衡 30 min。平衡后插入经过老化处理的固相微萃取头,顶空萃取 40 min 后,再将萃取头插入 GC 进样口,解吸 5 min。

##### 1.4.3.1 色谱条件

色谱柱 DB-5MS(30 m×0.25 mm,0.25 mm);升温程序:40 ℃保持 3 min,以 3 ℃/min 的速率升到 160 ℃,保持 2 min,然后以 8 ℃/min 的速率升至 230 ℃,保持 3 min;He 流量 1.0 mL/min;无分流进样;进样口温度:250 ℃。

##### 1.4.3.2 质谱条件

电子电离源;离子源温度 230 ℃;接口温度 250 ℃;电子能量 70 eV;灯丝发热电流 0.25 mA;扫描速率全程 33~450 m/z。

##### 1.4.3.3 香气成分分析

定性定量分析:运用计算机谱库(NIST/WILEY)

进行初步检索及资料分析,并结合已有的相关文献进行定性分析。可根据内标物 3-辛醇(400 μg/L)进行定量分析,采用峰面积法计算出其含量。气味活度值(odour activity value, OAV)分析如公式(1)。

$$OAV = \frac{\rho}{T}$$

(1)

式中:ρ,香气物质质量浓度,mg/L;T,感官阈值,mg/L。

主成分分析:采用 SPSS 17.0 软件,对不同香气成分进行主成分分析。

#### 1.4.4 感官评定

参照 GB/T 10220—2012《感官分析方法学总论》要求组建感官评定小组(20 人)<sup>[13]</sup>,参考 GB/T 15038—2006 制定评分标准,并依据该标准对脐橙全果酒进行感官评分,取其平均值作为评分结果。感官评分标准见表 1。

表 1 脐橙酒感官评分标准

Table 1 Sensory evaluation standards of navel orange wine		
项目	感官描述	评分/分
外观	澄清、透明、有光泽、色泽诱人	16~20
	澄清、无夹杂物、色泽较好	11~15
	浑浊、有杂物、色泽不自然	<10
香气	果香酒香浓郁优雅,协调悦人	26~30
	果香酒香良好,较悦人	21~25
	果香酒香较淡	16~20
	果香酒香不足	<15
滋味	酒味醇厚、柔和、让人余味无穷	36~40
	酒质柔和、不涩不苦、酸甜度适中	31~35
	调和适当、纯正无杂	26~30
	略苦、涩、酸、酒质较淡	21~25
	苦、涩、酸明显,带有异味	<20
典型性	典型完美、独具一格	9~10
	典型明确、风格良好	7~8
	有典型性,但不够显著	5~6
	失去本品典型性	<4

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵过程中酵母数量的变化

酵母对果酒最终风味特性的贡献在很大程度上取决于发酵过程中酵母数量的持久性。发酵过程中酵母数量的动态变化如图 1、图 2 所示。在酿酒酵母和柠檬形克勒克酵母的单独发酵过程中,前 48 h 内 2 种酵母均处于快速增长阶段,但柠檬形克勒克酵母的生长速率要低于酿酒酵母。酿酒酵母在第 3 天达到最大值(8.26 lg CFU/mL),而柠檬形克勒克酵母的最大值(7.41 lg CFU/mL)则在第 5 天达到。

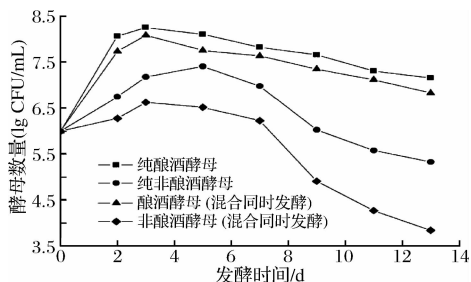


图1 不同培养条件下混合同时发酵过程中酵母的变化

Fig. 1 Yeast quantity in mixed simultaneous fermentation under different inoculating conditions

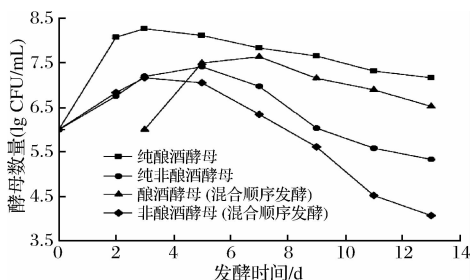


图2 不同培养条件下混合顺序发酵过程中酵母的变化

Fig. 2 Yeast quantity in mixed sequential fermentation under different inoculating conditions

当酿酒酵母和柠檬形克勒克酵母混合发酵时,由于营养物质、空间的竞争,以及酵母之间的相互抑制,两种酵母的最大细胞量均比单独发酵时小<sup>[14]</sup>。当两种酵母同时接种时,酿酒酵母优先利用营养物质而迅速增值,而柠檬形克勒克酵母则由于较弱的竞争力以及酿酒酵母代谢物的抑制,生长较为缓慢<sup>[15]</sup>。当2种酵母顺序接种时,使柠檬形克勒克酵母生长到一定数量后,再接种酿酒酵母,从而减弱柠檬形克勒克酵母的劣势,延长了其生长时间。

## 2.2 香气成分分析

高级醇是由相应的氨基酸通过 Ehrlich 途径转化,或是糖的分解代谢产生的<sup>[16]</sup>,是果酒中的主要香气物质。异丁醇、异戊醇、2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇在不同方式发酵的脐橙全果酒中含量均较高,均具有水果的甜香和醇香,且能持久保存<sup>[17]</sup>,是脐橙果酒典型的香气成分。另外,2-癸醇只在非酿酒酵母单独发酵和顺序发酵时发现,而1-壬醇只存在于酿酒酵母单独发酵和同时发酵中。酿酒酵母生成高级醇的能力较强<sup>[18]</sup>,单独发酵时,酿酒酵母合成的高级醇是柠檬形克勒克酵母的1.5倍。另外,同时发酵时高级醇的含量相比酿酒酵母单独发酵增加了3.17%,可能

是由于发酵后期柠檬形克勒克酵母衰亡,其自身分解为营养物质被酿酒酵母所利用<sup>[19]</sup>。但是,顺序发酵时某些高级醇的含量却有所下降,这与柠檬形克勒克酵母将其转化为酯类有关<sup>[20]</sup>。

酸类物质是酵母代谢的次级产物,也是合成酯的前体物质。当有非酿酒酵母存在时,会将大部分乙酰辅酶A用于酯的合成,而合成脂肪酸的乙酰辅酶A不足,从而导致酸类物质含量偏低<sup>[7]</sup>。脐橙全果酒中存在的酸类为乙酸、己酸和辛酸,这些酸少量存在时可以为脐橙酒带来一定的乳酪、脂肪香味,但含量过高则会对酒体的香气和品质带来负面影响<sup>[21]</sup>。因此,混合发酵在减少酸类物质产生不良影响方面具有一定作用。

酯类物质是果酒中香气成分的重要贡献者。脐橙全果酒中乙酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸乙酯的含量最高,为增添酒中香气的复杂性和典型性有一定的贡献<sup>[22]</sup>。非酿酒酵母的产酯能力高于酿酒酵母,在发酵过程中能产生更多的酶,从而将醇和酸通过酯酶合成途径转化为酯<sup>[23]</sup>。因此,混合发酵酒中大多数酯类物质的含量均高于单独发酵酒,且混合顺序发酵时含量更多。表明先接种柠檬形克勒克酵母,延长了其存活时间,有利于合成更多的酯类物质<sup>[24]</sup>。

萜烯类物质在赋予果酒花果的芳香方面起着重要作用。脐橙全果酒中萜烯类化合物含量均占香气成分的30%以上。顺序发酵酒中的萜烯类物质的种类和含量均最多,且里哪醇、D-柠檬烯的含量要明显高于同时发酵,反式相芹醇也只存在于混合顺序发酵酒中,这些萜烯类化合物可以给予脐橙全果酒更独特更浓郁的橙香和甜香<sup>[25]</sup>(表2)。

## 2.3 气味活度值(OAV)分析

香气成分浓度和贡献率并不一定成正比,还与其阈值有关。OAV反映了香气成分挥发性的大小及难易程度,能较客观地体现香气成分对酒风味的影响<sup>[26]</sup>。当OAV值>1时,其对香气的呈现有较大的贡献。

由表3分析可知,醇类物质的OAV值均<1,但在协调脐橙酒的口感和风味方面起着不可忽视的作用。酸类物质中,乙酸的OAV值>1,但过量的乙酸会使果酒产生不愉快的脂肪味和刺鼻的味道<sup>[21]</sup>,混合顺序发酵酒中乙酸的OAV值最低,有利于减少其带来的不良风味。酯类物质中,辛酸乙酯、己酸乙酯、乙酸异戊酯、丁酸乙酯的OAV值均>1。其中,乙酸异戊酯和己酸乙酯的OAV值较大,且混合发酵酒中

表 2 脐橙全果酒风味物质

Table 2 Flavor components of different navel orange wine

化合物名称	酿酒酵母单独发酵		柠檬形克勒克酵母单独发酵		混合同步发酵		混合顺序发酵	
	含量/ (mg · L <sup>-1</sup> )	相对 含量/%	含量/ (mg · L <sup>-1</sup> )	相对 含量/%	含量/ (mg · L <sup>-1</sup> )	相对 含量/%	含量/ (mg · L <sup>-1</sup> )	相对 含量/%
醇类								
异戊醇	1.653	9.51	1.016	5.89	1.718	8.30	1.472	6.70
异丁醇	1.584	9.12	0.901	5.22	1.692	8.17	1.511	6.88
苯乙醇	1.217	7.01	0.825	4.78	1.236	5.97	1.094	4.98
正辛醇	0.079	0.45	0.041	0.24	0.071	0.34	0.077	0.35
正己醇	0.574	3.30	0.327	1.89	0.726	3.51	0.681	3.10
异丙醇	0.126	0.73	0.064	0.37	0.086	0.42	0.153	0.70
2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇	1.743	10.03	1.207	6.99	1.657	8.00	1.368	6.23
2-癸醇	—	—	0.152	0.88	—	—	0.218	0.99
1-壬醇	0.025	0.14	—	—	0.037	0.18	—	—
合计	7.001	40.30	4.533	26.27	7.223	34.89	6.574	29.94
酸类								
乙酸	1.863	10.72	1.217	7.05	1.495	7.22	1.102	5.02
己酸	0.791	4.55	0.632	3.66	0.408	1.97	0.314	1.43
辛酸	0.235	1.35	0.113	0.65	0.161	0.78	0.129	0.59
丁酸	—	—	0.062	0.36	0.078	0.38	0.045	0.20
合计	2.889	16.63	2.024	11.73	2.142	10.35	1.59	7.24
酯类								
苯甲酸乙酯	0.025	0.14	0.047	0.27	0.033	0.16	0.041	0.19
癸酸乙酯	0.212	1.22	0.665	3.85	0.463	2.24	0.994	4.53
辛酸乙酯	0.752	4.33	0.681	3.95	0.925	4.47	1.104	5.03
己酸乙酯	0.024	0.14	0.038	0.22	0.067	0.32	0.079	0.36
乙酸苯乙酯	0.044	0.25	0.126	0.73	0.163	0.79	0.192	0.87
乙酸异戊酯	0.064	0.37	0.078	0.45	0.187	0.90	0.201	0.92
乙酸乙酯	0.637	3.67	1.209	7.01	1.925	9.30	2.143	9.76
乙酸己酯	0.083	0.48	0.092	0.53	0.104	0.50	0.117	0.53
丁酸乙酯	0.022	0.13	0.056	0.32	0.033	0.16	0.049	0.22
月桂酸乙酯	—	—	0.067	0.39	0.037	0.18	0.058	0.26
丙酸香芹酯	—	—	0.118	0.68	0.079	0.38	0.121	0.55
合计	1.863	10.72	3.177	18.41	4.016	19.40	5.099	23.22
萜烯类								
里哪醇	1.665	9.58	2.079	12.05	1.953	9.43	2.174	9.90
4-萜品醇	0.837	4.82	1.002	5.81	1.014	4.90	1.155	5.26
香茅醇	0.301	1.73	0.452	2.62	0.541	2.61	0.663	3.02
香叶醇	0.142	0.82	0.128	0.74	0.115	0.56	0.138	0.63
β-松油醇	0.428	2.46	0.799	4.63	0.497	2.40	0.621	2.83
D-柠檬烯	1.737	10.00	1.916	11.10	2.048	9.89	2.189	9.97
橙花叔醇	0.464	2.67	0.781	4.53	0.884	4.27	1.007	4.59
薄荷醇	—	—	0.061	0.35	0.054	0.26	0.068	0.31
反式香芹醇	—	—	0.147	0.85	—	—	0.131	0.60
合计	5.574	32.08	7.365	42.68	7.106	34.32	8.146	37.10
其他								
乙偶姻,3-羟基丁酮	0.046	0.26	0.022	0.13	0.073	0.35	0.096	0.44
薄荷酮	—	—	0.033	0.19	0.021	0.10	0.057	0.26
对乙基苯酚	—	—	0.102	0.59	0.07	0.34	0.196	0.89
2,4-二叔丁基苯酚	—	—	—	—	0.053	0.26	0.072	0.33
4-乙基愈创木酚	—	—	—	—	—	—	0.127	0.58
合计	0.046	0.26	0.157	0.91	0.217	1.05	0.548	2.50
总计	17.373		17.256		20.704		21.957	

注：“—”代表未检测出。下同。

其值明显高于单独发酵酒,赋予脐橙全果酒更浓郁的花果香、茴香和蜜糖味。除纯酿酒酵母发酵酒中的橙花叔醇外,萜烯类化合物的 OAV 值均 > 1,对整体物质结构起着重要作用。*D*-柠檬烯和里哪醇被视为脐

橙全果酒的特征香气成分,嗅觉阈值低,OAV 值高,赋予其愉悦的甜香、花果香,以及独特的脐橙风味<sup>[25]</sup>。酯类和萜烯类物质大多数情况下,混合顺序发酵酒中含量最高,OAV 值最大,香气特征最突出。

表 3 脐橙全果酒风味物质的 OAV 分析

Table 3 OAVs of flavor components in different navel orange wine

化合物名称	酿酒酵母 单独发酵	柠檬形克勒克酵母 单独发酵	混合同时 发酵	混合顺序 发酵	嗅觉阈值/ (mg · L <sup>-1</sup> )	香气描述
醇类						
异戊醇	0.055	0.034	0.057	0.049	30	水果香、醇香、刺激味
异丁醇	0.040	0.023	0.042	0.038	40	甜香、杏仁香
苯乙醇	0.168	0.114	0.171	0.151	7.23	花香、玫瑰香
正辛醇	0.176	0.091	0.158	0.171	0.45	柑橘、甜草香
正己醇	0.072	0.041	0.091	0.085	8	果香、清香
异丙醇	0.252	0.128	0.172	0.306	0.5	醇香
2-癸醇	-	0.380	-	0.545	0.4	橙花香
1-壬醇	0.431	-	0.638	-	0.058	水果香、蔷薇香
酸类						
乙酸	3.881	2.535	3.115	2.296	0.48	醋香
己酸	0.264	0.211	0.136	0.105	3	脂肪、奶酪味
辛酸	0.470	0.226	0.322	0.258	0.5	奶油味
酯类						
苯甲酸乙酯	0.100	0.188	0.132	0.164	0.25	甜香
癸酸乙酯	0.757	2.375	1.654	3.550	0.28	菠萝香、脂肪味
辛酸乙酯	1.292	1.170	1.589	1.897	0.582	百合花香、香蕉、梨香
己酸乙酯	1.714	2.714	4.786	5.643	0.014	香蕉、青苹果、茴香
乙酸苯乙酯	0.176	0.504	0.652	0.768	0.25	花果香、蜜糖味
乙酸异戊酯	2.133	2.600	6.233	6.700	0.03	新鲜香蕉味
乙酸乙酯	0.085	0.161	0.257	0.286	7.5	果香、甜香
乙酸己酯	0.055	0.061	0.069	0.078	1.5	苹果、梨香
丁酸乙酯	1.100	2.800	1.650	2.450	0.02	香蕉、菠萝、草莓香
月桂酸乙酯	-	0.045	0.025	-	1.5	花果香、奶香、甜香
萜烯类						
里哪醇	66.600	83.160	78.120	86.960	0.025	花香、果香
4-萜品醇	3.348	4.008	4.056	4.620	0.25	百合花香、清香
香茅醇	3.010	4.520	5.410	6.630	0.1	柠檬香、玫瑰香、清香
香叶醇	4.733	4.267	3.833	4.600	0.03	热带水果香、青草香
β-松油醇	2.140	3.995	2.485	3.105	0.2	玫瑰花香、清香
<i>D</i> -柠檬烯	115.800	127.733	136.533	145.933	0.015	甜橙、青草、花香
橙花叔醇	0.663	1.116	1.263	1.439	0.7	柑橘、苹果、花香、甜香

2.4 主成分分析

为进一步探究 4 种脐橙全果酒的差异所在,对酒中的风味物质含量进行主成分分析。主成分 1 和主成分 2 的方差贡献率分别为 57.57%,30.26%,二者累计贡献率已达到 87.83%,基本可以体现脐橙全果酒中的风味物质信息,因此选取前 2 个主成分进行分析。

因子载荷系数反映了脐橙全果酒中各风味物质对各主成分的影响,相关系数越大,该物质在主成分中的代表性就越强<sup>[27]</sup>。里哪醇(0.985)、4-萜品醇

(0.986)、薄荷酮(0.974)、癸酸乙酯(0.961)、香茅醇(0.941)、丙酸香芹酯(0.949)、乙酸苯乙酯(0.943)、薄荷醇(0.957)、橙花叔醇(0.960)和对乙基苯酚(0.968)与主成分 1 高度正相关;而乙酸(-0.966)、己酸(-0.863)、辛酸(-0.895)和 1-壬醇(-0.584)与主成分 1 呈高度负相关;异戊醇(0.916)、异丁醇(0.968)、正辛醇(0.963)、正己醇(0.983)、乙偶姻(0.860)和苯乙醇(0.906)与主成分 2 呈高度正相关;β-松油醇(-0.788)、反式香芹醇(-0.568)、丁酸乙酯(-0.577)和苯甲酸乙酯(-0.611)与主成分

2 高度负相关。

这4种方式发酵的脐橙全果酒整体风味有较大的差异。混合发酵的脐橙酒均位于第一象限,主要风味物质比较接近。混合顺序发酵酒中萜烯类物质(里哪醇、4-萜品醇、香茅醇、薄荷醇、橙花叔醇)对其影响更大,而醇类物质(正己醇、异丙醇)在混合同时发酵酒中更丰富。柠檬形克勒克酵母单独发酵酒位于第四象限, $\beta$ -松油醇、苯甲酸乙酯、丁酸乙酯、反式香芹醇、月桂酸乙酯、2-癸醇、丙酸香芹酯是其主要风味物质;而纯酿酒酵母发酵酒则位于第二象限,主要风味物质为辛酸、乙酸、1-壬醇、苯乙醇、异戊醇(图3、图4)。

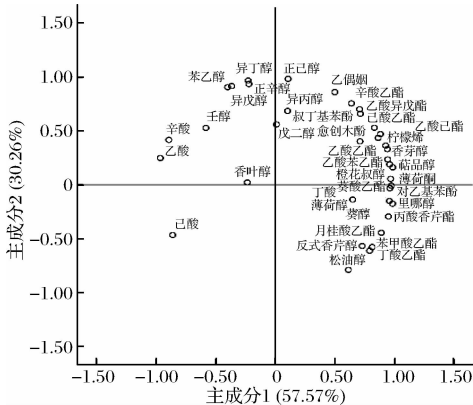


图3 不同挥发性成分的主成分分析  
Fig. 3 Principal component analysis of different volatile components

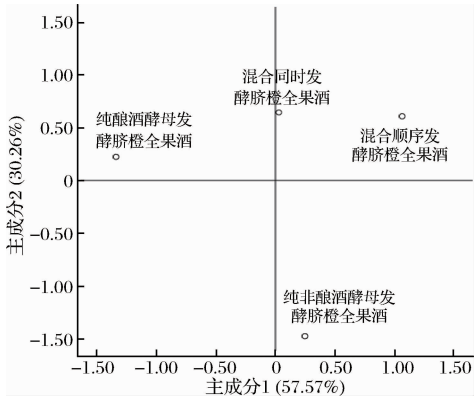


图4 不同酒样的主成分分析  
Fig. 4 Principal component analysis of different wine samples

2.5 不同方式发酵脐橙全果酒感官评定

由表4可知,4种脐橙全果酒外观评分上比较接近,但在香气和典型性方面有显著的差异,纯酿酒酵母发酵酒得分最低,混合顺序发酵酒则最高。由于柠檬形克勒克酵母单独发酵时不彻底,所得脐橙全果酒在滋味呈现上较差。综合分析看来,混合顺序发酵的脐橙全果酒感官评分最高(89.87),且色泽澄清透明、酒体丰满、脐橙香气特征突出、风格典型独特。

3 结论

不同接种方式发酵对脐橙全果酒风味物质的研究表明,采用先接种柠檬形克勒克酵母72 h后再接种酿酒酵母的混合顺序发酵,减弱了非酿酒酵母

表4 不同方式发酵脐橙全果酒感官评定表

酒样	项目得分				总分
	外观	香气	滋味	典型性	
酿酒酵母单独发酵	16.84 ± 0.64	23.94 ± 0.83	36.07 ± 0.80	7.68 ± 0.52	84.53
柠檬形克勒克酵母单独发酵	16.63 ± 0.69	25.27 ± 0.75	34.36 ± 0.85	7.72 ± 0.56	83.98
混合同时发酵	16.77 ± 0.65	26.51 ± 0.77	36.84 ± 0.91	8.04 ± 0.48	88.16
混合顺序发酵	16.90 ± 0.71	27.43 ± 0.69	37.19 ± 0.87	8.35 ± 0.45	89.87

的劣势,在确保发酵顺利完成的情况下使其发挥更有效的作用。通过GC-MS进行香气成分的鉴定,并结合气味活度值(OAV)进行分析,4种接种方式发酵的脐橙全果酒中共检测到38种香气成分,包括醇类9种、酯类11种、萜烯类9种、酮和酚类5种,其在定性和定量上均有一定的差异。虽然高级醇在果酒中的含量较高,但因其OAV值均<1,所以香气特征不明显。混合顺序发酵酒中酸类物质含量最低,减少了其含量过高产生的不良影响。混合发酵酒中大多数酯类物质含量均高于单独发酵,且混合顺序发酵酒中含

量更多。其中,辛酸乙酯、己酸乙酯、乙酸异戊酯、丁酸乙酯的OAV值均>1,增添了脐橙全果酒中香气的复杂性和典型性。萜烯类化合物所占比例最大,OAV值均>1,且混合顺序发酵酒中其种类和含量均最丰富,对脐橙全果酒独特风味的呈现起着重要作用。通过主成分分析,4种方式发酵的脐橙全果酒在整体风味上有较大差异,混合发酵酒的主要风味物质相接近,纯酿酒酵母发酵酒的风味最差,其结果与感官评分一致。综合分析看来,混合顺序发酵的脐橙全果酒,在柠檬形克勒克酵母和酿酒酵母的协同作用下,

有效地促进了更多酯类、萜烯类物质的合成,增加了香气成分的种类,改善了果酒的品质和风味,风格更加典型独特。

### 参 考 文 献

- [1] 颜兵,江月,梁若楠,等. 酿酒酵母和异常汉逊酵母在酿酒过程中的相互作用[J]. 安徽农业科学,2016(2): 107-109.
- [2] JOHNSON E A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts: The ascomycetes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2013,97(17):503-517.
- [3] 崔艳,刘金福. 非酿酒酵母在葡萄酒酿造中应用的研究现状[J]. 中国酿造,2010,29(11):13-16.
- [4] ANDORRÀ L, BERRADRE M, ROZÈS N, et al. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentation[J]. European food research and technology,2010,231(2):215-224.
- [5] JOLLY N P, VARELA C, PRETORIUS I S. Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered[J]. FEMS Yeast Research, 2014, 14(2): 215-237.
- [6] COMITINI F, GOBBI M, DOMIZIO P, et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multi starter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Microbiology,2011,28(5):873-882.
- [7] LEE P R, CHONG I S M, YU B, et al. Effects of sequentially inoculated *Williopsis saturnus* and *Saccharomyces cerevisiae* on volatile profiles of papaya wine[J]. Food Research International, 2012,45(1):177-183.
- [8] ANDORRÀ I, BERRADRE M, MAS A, et al. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile[J]. Food Sciences and Technology,2012,49(1):8-13.
- [9] 蒋继丰,方伟,张海龙,等. 椪柑果酒酿造工艺参数的优化[J]. 中国酿造,2017,36(1):186-190.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 15038—2006 葡萄酒果酒通用试验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [11] RODRIGUEZ-CAMPOS J, ESCALONA-BUENDIA H B, CONTRERAS-RAMOS S M, et al. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa[J]. Food Chemistry,2012,132(1):277-288.
- [12] 陈臣,牟德华,张哲琦,等. 溶剂萃取与顶空固相微萃取检测欧李果酒中香气成分的研究[J]. 酿酒科技,2013,12:89-93.
- [13] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 10220—2012, 感官分析方法学总论[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [14] CIANI M, COMITINI F, MANNAZZU I, et al. Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine making[J]. FEMS Yeast Research,2010, 10(2):123-133.
- [15] WANG C X, MAS A, ESTEVE-ZARZOSO B. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology,2015, 206:67-74.
- [16] 曾朝珍,康三江,张霁红,等. 异常汉逊酵母与酿酒酵母混菌发酵对苹果白兰地风味物质的影响[J]. 食品工业科技,2018,39(5):250-255.
- [17] 杨旭,陈亮,辛秀兰,等. 果汁发酵和带渣发酵蓝靛果酒香气成分分析[J]. 食品科学,2014,35(12):115-119.
- [18] 唐洁,王海燕,徐岩. 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵对白酒液态发酵效率和风味物质的影响[J]. 微生物学通报,2012,39(7):921-930.
- [19] LEE P R, ONG Y L, YU B, et al. Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*[J]. Food Microbiology, 2010,27(7):853-861.
- [20] MOREIRA N, MENDES F, PINHO P G D, et al. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must[J]. International Journal of Food Microbiology,2008,124(3):231-238.
- [21] 卢柯,乔慧,薛楚然,等. 基于 SBSE-GC/MS 的荔枝白兰地香气成分分析[J]. 中国酿造,2014,33(3):137-140.
- [22] 杨婷,祝霞,赵宾宾,等. 不同酿酒酵母对甜瓜酒香气品质的影响分析[J]. 食品科学,2015,36(14):145-150.
- [23] RENAULT P, COULON J, DE-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,2015,4(37):40-48.
- [24] 贾言言,刘四新,李卓婷,等. 非酵母属酵母的接种顺序对混合发酵菠萝酒香气成分的影响[J]. 食品科学,2015,36(17):152-157.
- [25] SELLI S, CANBAS A, VARLET V, et al. Characterization of the most odor-active volatiles of orange wine made from a Turkish cv. Kozan (*Citrus sinensis* L. Osbeck)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56(1):227-234.

[26] 李凯,田淑芬,黄建全,等. 二氧化碳浸渍法和传统法酿造条件下玫瑰香葡萄酒香气成分的对比分析[J]. 食品与发酵工业,2018,44(4):204-211.

[27] 杨婷,祝霞,赵宾宾,等. 不同酿酒酵母对甜瓜酒香气品质的影响分析[J]. 食品科学,2015,36(14):145-150.

## Effects of co-fermentation of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* on flavor components of navel orange wine

ZHENG Shudan, CHEN Gang<sup>\*</sup>, QUE Faxiu,  
WAN Ling, DENG Shanhong, JIAN Suping

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047)

**ABSTRACT** The effects of inoculating non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* together on yeast growth and flavor components of wines were investigated. The whole navel orange wines were brewed by *Kloeckera apiculata*, *S. cerevisiae*, and simultaneous or sequential inoculation of these two strains. The flavor components of wines were determined by HS-SPME, GC-MS, and principal component analysis. A total of 38 flavor components were detected in the four kinds of whole navel orange wines, including nine alcohols, 11 esters, nine terpenes, four acids, and five ketones and phenols. Among them, terpenes accounted for the highest proportion (>30%). Wines fermented by sequential inoculation had the most abundant flavor substances (37 types) and the highest concentration (21.957 mg/L), while simultaneously inoculated wines had 35 types of flavor substances with a total concentration of 20.704 mg/L. Furthermore, the types and contents of esters and terpenes in mixed strains fermented wines were higher than those in single-strain fermented wines. In conclusion, sequentially inoculated fermentation improved flavor components of wines, which provides theoretical basis for brewing whole navel orange wines with better quality.

**Key words** navel orange wine; *Kloeckera apiculata*; mixed fermentation; flavor components; principal component analysis

(上接第 100 页)

## Enhanced biosynthesis of mannitol in *Leuconostoc* sp. expressed *mtld-mlp*

JIN Hongxing<sup>\*</sup>, WANG Xing, PENG Yuwei

(School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

**ABSTRACT** In order to further increase mannitol production from sucrose in *Leuconostoc* sp., a *mtld-mlp* expression cassette was site-directly integrated onto its chromosome. The resulting strains,  $\Delta aldH::(mtld-mlp)$ ,  $\Delta aldH::(mtld-mlp) \Delta dts::amy$ ,  $\Delta aldH::(mtld-mlp) \Delta dts::(mtld-mlp)$ , and  $\Delta dts1 \Delta D-ldh \Delta pat::mdh \Delta stpk::mdh \Delta fk::mdh \Delta aldH::(mtld-mlp)$  produced 42.63, 43.47, 45.74 and 47.26 g/L mannitol from 90 g/L sucrose. In comparison, wild type only produced 31.48 g/L mannitol. In conclusion, increasing the synthetic route of mannitol from glucose is one of the means to increase its production.

**Key words** mannitol; *Leuconostoc* sp.; glucose; mannitol-1-phosphate dehydrogenase; mannitol-1-phosphatase