

复合酵母菌的接种方式对水蜜桃酒品质的影响

罗倩, 吴祖芳*, 翁佩芳

(宁波大学 食品与药学院, 浙江 宁波 315832)

摘要: 为探究复合酵母菌(东方伊萨酵母(Io)和酿酒酵母(PY01))接种方式对水蜜桃果酒发酵产 β -葡萄糖苷酶活性及挥发性风味物质的影响, 采用 3 种不同接种方式(同时接种 Io 和 PY01、接种 Io 48 h 后接种 PY01、接种 PY01 48 h 后接种 Io)发酵水蜜桃酒, 并以单菌种发酵为对照, 发酵期间比较产 β -葡萄糖苷酶的活性差异, 一个月后通过气相色谱-质谱法(GC-MS)测定挥发性风味物质的组成差异. 结果表明, 5 组理化指标无明显差别, 样品中共检出 64 种挥发性风味物质, 其中酯类及醇类物质含量较高. 接种 Io 48 h 后接种 PY01 组有效增加了 β -葡萄糖苷酶活性, 感官分析结果表现也最优, 而且该组酯类物质种类最为丰富, 相对含量高达 93.16%, 香气组分明显优于其他处理组. 同时主成分分析结果表明, 接种 Io 48 h 后接种 PY01 组与其他组差异显著, 能有效解决水蜜桃酒口感单一的问题. 综合结果, 不同接种方式发酵的水蜜桃酒具有差异明显的风味质量特征, 接种 Io 48 h 后接种 PY01 组能有效促进挥发性风味物质释放, 增加水蜜桃酒香气物质的复杂性, 提升水蜜桃酒香气质量, 可为水蜜桃果酒品质提升提供新的依据和手段.

关键词: 酵母; 混菌发酵; 水蜜桃酒; 顺序接种; 风味物质

中图分类号: TS255.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2022) 05-0001-09

水蜜桃(*Prunus persica*)色泽鲜艳, 营养丰富, 属呼吸跃变型水果, 极易变软腐烂^[1], 将其加工为水蜜桃酒, 在延长货架期的同时, 能够最大限度保留其水分载体, 是一种较为理想的加工方式. 果酒发酵是很复杂的生化过程, 易受多种因素影响, 如酵母菌种类、原料种类^[2]、接种方式等. 酵母菌生长代谢过程中产生的一系列风味物质在果酒风味方面起着关键性作用^[3]. 但由于酿酒酵母发酵能力过强, 导致生化反应复杂程度下降, 酒体口味单一同质化^[4]. 近年来, 人们越来越重视非酿酒酵母在酿酒过程中的应用. 酵母菌混合发酵可有效降低果酒有机酸及乙醇产量^[5], 增强酒体香气特征^[6], 进而改善果酒风味与口感^[7]. 然而混菌发酵中组合比例、接种顺序等均会对结果产生较大影响, 如过高比例的非酿酒酵母接种易产生一些不好的次级代谢物^[8]; 共同发酵时, 酿酒酵母会对非酿酒酵母产生一定抑制作用, 而不同顺序接种能延长非酿

酒酵母生长期, 从而更大程度保留酒中原果香特征. 曾朝珍等^[9]研究发现, 先接种非酿酒酵母 24 h 后接种酿酒酵母, 能够促进苹果白兰地中香气物质的合成, 改善酒体风味和品质. Lee 等^[10]以同时接种发酵组为对照发现, 在酿酒酵母发酵 7 d 后, 接种非酿酒酵母得到的木瓜酒风味独特, 品质优良.

β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)是一种风味酶, 能够通过水解糖苷前体释放风味物质, 进而丰富果酒风味^[11], 在食品增香中有广泛应用. 研究表明, 相比酿酒酵母, 非酿酒酵母具有较高的分泌 β -葡萄糖苷酶能力^[12], 且 β -葡萄糖苷酶在东方伊萨酵母中有较高的活性^[13]. 香气特征是果酒的重要品质特征之一, 果酒发酵过程中产生的挥发性化合物是果酒香气特征的主要贡献者. 酿酒酵母主要完成乙醇发酵, 非酿酒酵母则是将原料中的前体物质转化为风味物质, 并合成多种酶, 从而影响果酒色泽和风味等^[14]. Renault 等^[15]研究发现, 与酿

收稿日期: 2021-07-08.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31471709).

第一作者: 罗倩(1997-), 女, 安徽六安人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品生物技术研究. E-mail: 1535000488@qq.com

*通信作者: 吴祖芳(1963-), 男, 浙江奉化人, 教授, 主要研究方向: 食品生物技术研究. E-mail: wzfwpf@163.com

酒酵母纯种发酵相比,混合发酵能够增多一种特定的乙基酯,从而增强葡萄酒的复杂性和果味。而东方伊萨酵母除了能产生较多高级醇物质以外^[16],还具有耐热、耐酸、产酯能力强等特点^[17]。

本研究选用酿酒酵母 PY01 以及东方伊萨酵母 Io, 按照不同接种方式混合菌种来发酵水蜜桃果酒, 同时以 2 种菌单独发酵为对照, 研究果酒发酵过程中产 β -葡萄糖苷酶活性的影响; 通过气相色谱-质谱法(GC-MS)测定水蜜桃酒中挥发性风味物质, 探究不同接种方式发酵水蜜桃酒香气成分差异, 以期为提升水蜜桃酒品质作为理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用水蜜桃: 购买于浙江省宁波市奉化区种植基地, 选取 9~10 成熟(外观微黄, 略带红色, 柔软多汁, 桃香浓郁)的水蜜桃^[18]。

菌种: 酿酒酵母 PY01(*Saccharomyces cerevisiae*, PY01)及东方伊萨酵母 Io(*Issatchenkia orientalis*, Io)均保存于宁波大学食品生物技术实验室。

试剂: YPD 培养基, β -GC 活性检测试剂盒, 北京 Solarbio 科技有限公司; 柠檬酸(食品级), 江苏科伦多食品配料有限公司; 果胶酶, 源叶生物科技有限公司; 偏重亚硫酸钾、3,5-二硝基水杨酸、异抗坏血酸钠均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 乙醇检测试剂盒, 爱尔兰 Megazyme 公司。

1.2 仪器与设备

多功能榨汁机, 韩国惠人电子有限公司; Spectramax190 型全波长酶标仪, 美国美谷分子仪器 Molecular Devices 有限公司; 7890B-7000C 气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪, 美国 Agilent 公司; DVB/CAR/PDMS 萃取头(50/30 μm), 美国 Supelco 公司。

1.3 方法

1.3.1 水蜜桃酒酿造流程

9~10 成熟水蜜桃→清洗去核→破碎打浆→偏重亚硫酸钾、异抗坏血酸钠抑菌护色→果胶酶酶解→过滤→调节 pH、含糖量→巴氏灭菌→接种酵母主发酵→后发酵→壳聚糖下胶→澄清过滤→灭菌→陈酿→灌装→成品^[19]。

PY01 和 Io 的接种比例为 1:1, 种子液浓度分别为 6×10^5 、 6×10^6 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$, 不同接种方式处理组

编号见表 1。

表 1 2 种酵母菌接种方式及编号

编号	接种方式
I1	Io 单独发酵
P1	PY01 单独发酵
PI1	PY01、Io 同时接种
PI2	接种 Io 后 48 h 接种 PY01
PI3	接种 PY01 后 48 h 接种 Io

1.3.2 水蜜桃酒部分理化指标、酵母菌发酵效率和活菌数量及 β -葡萄糖苷酶的测定

还原糖含量采用 DNS 法^[20]; 酒精度采用爱尔兰 Megazyme 公司乙醇测定试剂盒测定; pH 采用 PHS-3C 型 pH 计测定; 总酸采用 GB/T 12456-2008 酸碱滴定法测定^[21]。酵母菌发酵效率的测定采用 CO_2 失重法, 每 24 h 测定 1 次, 以发酵时间为横坐标, CO_2 释放量为纵坐标, 绘制不同接种方式酵母菌发酵效率变化曲线。酵母菌活菌数量测定采用酵母菌平板计数法; β -葡萄糖苷酶活性采用北京 Solarbio 科技有限公司 β -GC 活性检测试剂盒测定。

1.3.3 水蜜桃果酒挥发性成分测定

前处理: 取 5 mL 发酵水蜜桃果酒样品放入 20 mL 顶空进样小瓶内, 其气相部分(顶空)导入顶空进样装置连接的气相色谱。

GC-MS 分析-顶空进样以及定性定量分析参照杨海宁等^[22]的方法。

1.3.4 感官评定

参照 GB 15038-2006 和李华敏等^[23]的评定方法并稍作修改; 由 12 位年龄在 21~36 岁训练有素的感官品评员(6 名女性和 6 名男性)分别从香气(花香、果香、乙醇香)、口感(甜度、酸度)、外观(酒体澄清度、色泽)等方面对水蜜桃酒进行综合评价打分。实验重复 3 次, 打分为 10 分制, 即 0~3 为低强度, 4~6 为中强度, 7~10 为高强度。

1.3.5 数据处理

所有实验均重复 3 次取平均值。对挥发性风味物质进行主成分分析, 采用软件 OriginPro 8.5 作图, SPSS 25.0 进行统计方差分析。

2 结果与分析

2.1 总糖、还原糖、乙醇以及 pH 的分析

表 2 列示了不同接种方式水蜜桃酒发酵结束

后的部分理化指标。Io 参与发酵的酒精度含量明显低于 PY01 单独发酵组; 混菌发酵组中, PI2 酒精度最低, PI1 次之, 这与 Varela 等^[24]报道中采用同时或顺序接种的混合发酵可有效降低乙醇含量的结果一致。同时 PI2 还原糖含量明显低于其他处理组, 说明 PI2 顺序发酵方式能够在发酵过程中消耗更多的糖。每组间 pH 和总酸含量差异不大, 均符合 2015 版果酒行业标准^[25]。

表 2 5 种发酵酒样的部分理化指标

组别	pH	还原糖/(g·L ⁻¹)	总酸/(g·L ⁻¹)	酒精度/%
I1	4.07±0.05 ^c	4.187 61±0.09 ^b	5.437 5±0.08 ^b	10.86±0.08 ^b
P1	4.15±0.07 ^{bc}	4.471 76±0.06 ^a	5.625 0±0.07 ^a	12.76±0.26 ^a
PI1	4.16±0.16 ^b	4.454 36±0.22 ^a	5.175 0±0.04 ^c	11.88±0.14 ^b
PI2	4.12±0.06 ^{bc}	3.239 03±0.12 ^a	5.631 3±0.10 ^a	11.62±0.11 ^c
PI3	4.23±0.15 ^a	4.129 00±0.05 ^b	5.212 5±0.12 ^{bc}	11.96±0.33 ^b

注: 数据为平均值±标准差, 同列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 接种方式对酵母菌发酵效率的影响

酵母菌发酵过程中的主要产物有 CO₂, 因此检测发酵过程中的 CO₂ 失重能够很好地反映其发酵效率。不同接种方式酵母菌发酵效率变化如图 1 所示, 由图可知, P1 组单独发酵失重最多, I1 组单独发酵失重最少, 即 PY01 发酵效率高于 Io。非酿酒酵母前期生长较快, 后期酿酒酵母较强的生存能力和对其他微生物的抑制能力逐渐发挥作用, 生长速度加快^[26], PI1 的趋势与此一致。PI2 由于 Io 的存在前期上升缓慢, 48 h 接种 PY01 后迅速增长。

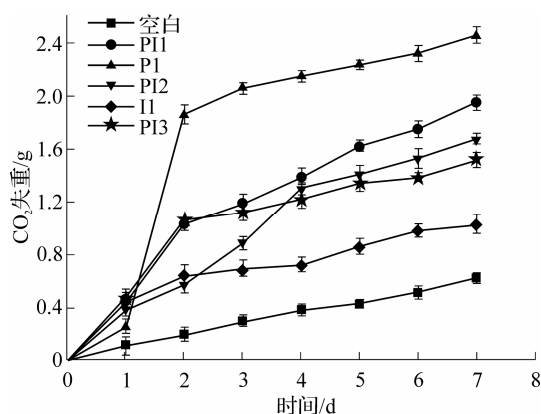


图 1 接种方式对酵母菌发酵效率的影响

2.3 接种方式对酵母菌活菌数量的影响

接种方式对酵母菌活菌数影响如图 2 所示。发酵初期, 2 种菌均能适应发酵环境且迅速生长, 单菌发酵中 PY01 生长速率高于 Io。由图 2(a)可以看

出, PI1-Io 组在第 1 天生长到峰值后开始下降, 5 d 后平缓上升, 这说明其前期生长受到了 PY01 的阻碍。可能是受到 Io 限制的原因, 该组 PY01 前期生长弱于 PY01 单菌发酵, PY01 于第 5 天达到峰值 (8.1×10^7 CFU·mL⁻¹), 而后逐渐趋于稳定。图 2(b)表示 2 组顺序发酵酵母菌活菌数量变化, 初期 Io 迅速生长到峰值 (2.7×10^7 CFU·mL⁻¹), 而接种 PY01 后, 由于受到其阻碍活菌数开始下降, PY01 迅速生长, 与 PI1 基本一致。PI3 接种 Io 后趋势与 PI2-Io 组相似。由上可知, 酿酒酵母与非酿酒酵母同时存在时, 易受其阻碍导致生长缓慢, 而先接种非酿酒酵母后 48 h 接种酿酒酵母能够有效缓解此现象, 对果酒的风味多样性有积极贡献^[27]。

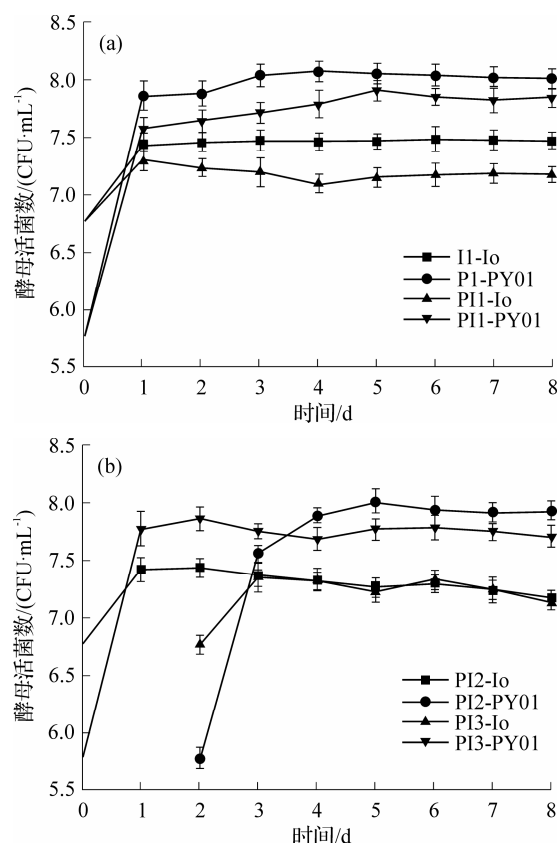


图 2 接种方式对酵母菌活菌数量的影响

2.4 β-葡萄糖苷酶活性分析

由图 3 可知, 在整个发酵过程中, β-葡萄糖苷酶活力先升后降, 第 1 周几组上升趋势差异小。单菌发酵组酶活力较低, PI2 组 β-葡萄糖苷酶活力于第 2 周上升至峰值 $10.34 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 高于其他处理组, 说明混菌发酵能够促进 β-葡萄糖苷酶的增长, 其中先接种 Io 48 h 后接种 PY01 更有利于 β-葡萄糖苷

酶的积累. 高 β -葡萄糖苷酶活性能够有效促进香气化合物的释放^[28], 混合发酵体系的高糖苷酶活性有利于增加葡萄酒的品种香和香气复杂度.

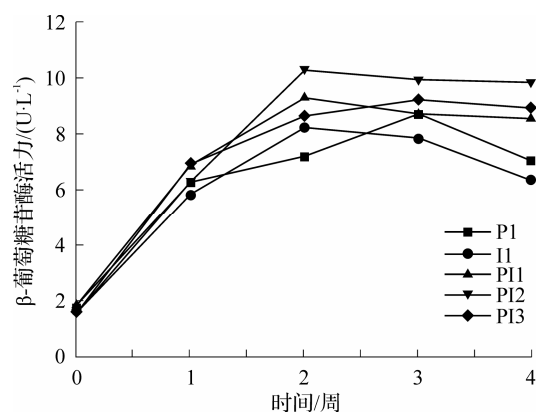


图3 接种方式对水蜜桃酒 β -葡萄糖苷酶活力的影响

2.5 接种方式对发酵水蜜桃酒挥发性风味物质产生的影响

果酒中风味物质的组成及其含量显著影响酒的品质, 同时也会影响消费者的购买欲^[29]. 采用

GC-MS 对不同接种方式发酵水蜜桃酒挥发性风味物质进行测定, 结果见表 3. 通过对不同接种方式发酵水蜜桃酒部分挥发性物质的聚类分析, 混菌发酵的 3 组风味物质有一定的相似性, 但 PI2 的物质浓度略高, 单菌发酵组风味相似性较低.

由表 3 可知, 5 种不同接种方式发酵后得到的水蜜桃酒共检出 64 种挥发性风味物质, 其中酯类 42 种、醇类 5 种、酸类 7 种、醛酮类 3 种和其他类 7 种, 贡献显著的特征香气成分为癸酸乙酯、乙酸乙酯和苯乙醇等.

酯类物质由酵母菌在乙醇发酵过程中催化高级醇和脂而形成^[30], 是水蜜桃酒中种类最多的香气物质, 对香气特征起决定性作用. 混菌发酵有效增加了酯类物质的种类及含量, PI1 组中酯类物质种类及相对含量较低, PI2 组的酯类物质种类及相对含量最高, 达到了 93.16%, 这主要归因于癸酸乙酯、月桂酸乙酯以及乙酸乙酯的贡献, 这与文献报道中采用顺序接种发酵玫瑰葡萄酒增加酒体酯

表 3 不同接种方式发酵水蜜桃酒部分挥发性风味物质相对含量

类别	编号	名称	相对含量/%					气味描述
			P1	I1	PI1	PI2	PI3	
酯类	ES1	4,7,10,13-十六烯酸甲酯	—	—	—	0.31	—	醚似香味, 微带果香的酒香
	ES2	苯甲酰二乙酸酯	0.09 ^d	0.13 ^c	0.16 ^b	0.28 ^a	0.13 ^c	
	ES3	丙烯酸正丁酯	—	—	—	0.11	—	
	ES4	乙酸乙酯	2.48 ^b	1.02 ^d	1.91 ^c	3.62 ^a	1.86 ^c	绿香蕉甜味
	ES5	乙酸异戊酯	0.15 ^d	0.35 ^b	0.18 ^d	0.39 ^a	0.24 ^c	
	ES6	正己酸乙酯	0.40 ^d	0.79 ^{bc}	0.86 ^b	1.39 ^a	0.73 ^b	
	ES7	甲酸 2-乙基己酯	—	0.31 ^b	—	0.92 ^a	—	菠萝、香蕉甜味
	ES8	辛酸甲酯	0.02 ^b	0.03 ^b	0.05 ^{ab}	0.08 ^a	0.03 ^{ab}	
	ES9	2-乙基己基乙酸酯	0.09 ^d	0.26 ^b	0.16 ^c	0.29 ^a	0.14 ^c	
	ES10	丁二酸二乙酯	0.28 ^b	0.28 ^b	0.35 ^b	0.48 ^a	0.29 ^b	青草、柑橘、脂肪味
	ES11	乙酸苄酯	0.01 ^b	0.06 ^a	0.03 ^b	0.03 ^b	0.03 ^b	
	ES12	苯甲酸乙酯	0.46 ^c	0.54 ^b	0.43 ^c	0.76 ^a	0.49 ^c	
	ES13	壬酸乙酯	0.26 ^c	0.25 ^c	0.42 ^b	0.60 ^a	0.27 ^c	草木味
	ES14	苯乙酸乙酯	—	—	—	0.11	—	
	ES15	草酸双(2-苯基乙基)酯	—	—	0.31 ^b	0.47 ^a	—	
	ES16	8-甲基壬酸甲酯	0.10 ^d	0.17 ^{bc}	0.16 ^c	0.21 ^b	0.37 ^a	茉莉花甜味
	ES17	癸酸乙酯	49.06 ^b	44.71 ^c	42.65 ^{bc}	52.66 ^a	41.72 ^b	
	ES18	棕榈酸乙酯	0.66 ^c	0.78 ^d	1.46 ^a	1.05 ^c	1.29 ^b	
	ES19	辛酸 3-甲基丁酯	0.15 ^{ab}	0.15 ^a	0.13 ^{ab}	0.12 ^{ab}	0.09 ^b	薄荷、啤酒味
	ES20	辛酸 2-甲基丁酯	0.11 ^c	0.14 ^b	0.50 ^a	0.03 ^d	0.13 ^{bc}	
	ES21	十四酸乙酯	1.02 ^c	4.75 ^a	0.84 ^c	2.22 ^b	0.58 ^d	

续表

类别	编号	名称	相对含量/%					气味描述
			P1	I1	PI1	PI2	PI3	
酯类	ES22	癸酸异丁酯	0.19 ^b	0.18 ^b	3.49 ^a	0.21 ^b	0.30 ^b	杏白兰地味
	ES23	丙位癸内酯	0.14 ^b	0.15 ^b	0.28 ^a	0.14 ^b	0.09 ^b	桃子、杏子、椰子奶油香
	ES24	月桂酸乙酯	21.98 ^b	13.56 ^c	8.57 ^d	13.44 ^c	26.13 ^a	奶油、水果香
	ES25	癸酸 3-甲基丁酯	0.38 ^b	0.28 ^b	6.40 ^a	0.15 ^b	0.38 ^b	乳酪、香蕉味
	ES26	异氰酸甲酯	0.94 ^a	—	—	0.82 ^a	0.80 ^a	
	ES27	丁酸乙酯	0.09 ^b	—	0.11 ^b	0.16 ^a	—	菠萝、苹果香
	ES28	乙酸 3-甲基戊酯	0.21 ^b	—	—	0.32 ^a	—	
	ES29	苯乙酸苯乙酯	0.65 ^a	—	—	0.23 ^c	0.35 ^b	蜂蜜、花草、热带水果味
	ES30	癸酸甲酯	—	0.13 ^{cd}	0.31 ^{ab}	0.64 ^a	0.28 ^{bc}	葡萄酒香
	ES31	蓖麻醇酸乙酯	0.23 ^b	—	—	0.89 ^a	0.13 ^b	
	ES32	癸酸正丙酯	—	—	0.25 ^a	0.32 ^a	—	绿色蔬菜味
	ES33	十一酸乙酯	0.14 ^c	—	0.26 ^b	0.39 ^a	—	椰子、干酪香
	ES34	癸酸 2-甲基丁酯	0.11 ^c	—	1.76 ^a	0.47 ^b	0.18 ^c	
	ES35	十三烷酸乙酯	—	—	—	0.38 ^a	0.23 ^b	
	ES36	巴豆酸乙酯	0.02 ^b	—	0.04 ^{ab}	—	0.05 ^a	焦糖、朗姆酒味
	ES37	正辛酸异丁酯	0.04 ^b	0.10 ^c	0.19 ^a	—	0.09 ^b	花果香
	ES38	辛酸乙酯	11.28 ^d	18.44 ^a	12.18 ^c	8.10 ^e	12.90 ^b	果味, 葡萄酒味
	ES39	苯甲酸 2-乙基己酯	—	—	—	0.33	—	啤酒味
	ES40	庚酸乙酯	—	0.04	—	—	—	香蕉、草莓、朗姆酒味
	ES41	十二烷基异戊酯	—	0.30	—	—	—	油桃、葡萄酒味
	ES42	氯乙酸 2-乙基己基酯	—	—	1.24 ^a	—	0.50 ^b	
	合计		91.74	87.91	85.68	93.16	90.81	
醇类	AL1	苣醇	—	0.11 ^b	—	0.22 ^a	0.01 ^c	玫瑰香
	AL2	苯乙醇	0.12 ^c	0.91 ^a	1.03 ^c	1.29 ^a	0.66 ^b	玫瑰、面包味
	AL3	二氢-β-紫罗兰醇	—	0.44 ^a	0.24 ^b	0.24 ^c	—	紫罗兰香
	AL4	芳樟醇	—	0.04 ^b	—	0.12 ^a	—	柑橘、柠檬、木质香
	AL5	2-甲基-1-丁醇	0.70	—	—	—	—	果香, 威士忌酒香
	合计		0.82	1.50	1.27	1.87	0.67	
酸类	AC1	2-乙基丁酸	—	—	—	0.03	—	果味, 乳脂奶酪味
	AC2	3-甲基戊酸	—	—	—	0.05	—	酸奶、水果味
	AC3	己酸	0.04 ^c	0.11 ^b	0.13 ^b	0.20 ^a	0.06 ^c	乳酪果味
	AC4	3-氯-2-甲氧基-5-吡啶硼酸	0.43 ^b	—	—	0.04 ^c	0.76 ^a	
	AC5	癸酸	0.17 ^d	0.63 ^b	0.74 ^a	0.76 ^a	0.25 ^c	柑橘味
	AC6	辛酸	0.24 ^b	0.72 ^a	0.33 ^b	0.63 ^a	—	玫瑰、蘑菇香
	AC7	2-氯-2-苯乙酯乙酸	0.27 ^c	0.39 ^b	—	—	0.84 ^a	
	合计		1.15	1.85	1.20	1.71	1.91	
醛酮类	AK1	苯乙酮	0.02	0.03	—	0.04	—	杏仁、水果味
	AK2	桃醛	0.13 ^b	0.03 ^c	0.04 ^c	0.35 ^a	0.07 ^{bc}	桃子、椰子、奶油香
	AK3	苯甲醛	—	0.60 ^b	5.04 ^a	0.29 ^c	0.78 ^b	杏仁、樱桃、松木香
	合计		0.15	0.66	5.08	0.68	0.85	

续表

类别	编号	名称	相对含量/%					气味描述
			P1	I1	PI1	PI2	PI3	
其他类物质	OT1	2,3-二甲氧基-1,4-二氧杂环己烷	—	—	0.90	—	—	甘草味
	OT2	2-庚基-1,3-二氧杂环庚烷	0.09 ^c	0.62 ^a	0.26 ^b	—	0.09 ^c	
	OT3	1,1,2,3,3-五甲基环丁烷	1.81 ^c	3.86 ^a	2.09 ^b	1.38 ^d	1.82 ^c	
	OT4	苯乙烯	0.01 ^b	0.03 ^{ab}	0.01 ^b	0.04 ^a	0.03 ^{ab}	香脂花甜
	OT5	苜基肼	0.01 ^c	0.20 ^b	—	0.32 ^a	—	
	OT6	丁香酚	0.13 ^c	0.24 ^b	0.34 ^a	0.25 ^b	0.21 ^b	甜味
	OT7	茶香螺烷	0.09	—	—	0.54	—	薄荷香草味
	合计		2.14	4.95	3.60	2.53	2.15	

注: “—”表示未检出, 同行中不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 香气描述参考网址 <http://thegoodscentscompany.com/>.

类物质含量的研究结果一致^[31].

醇类物质是乙醇发酵期间的副产物, 当其在含量较低的情况下, 能够有效增加酒体的复杂性, 然而含量高时, 会对酒体香气有消极影响^[32]. PI2 组苯乙醇的相对含量最高. 苯乙醇不仅能够赋予酒体玫瑰花香, 还能作为其他易挥发风味物质的溶剂^[33], 丰富酒体层次. 酸类物质能赋予水蜜桃酒果香, 各组间酸类及醛酮类物质相对含量差异不大. 其中, 2-乙基丁酸、3-甲基戊酸为 PI2 组所特有, 赋予酒体新鲜水果味. 醛类物质在微生物作用下易被还原为酸类^[34], 故含量较少. 结果表明, 在 I₀ 发酵后 48 h 接种 PY01 顺序发酵能有效增加挥发性风味物质对酒体的积极影响.

2.6 多元统计分析

为了更直观地分析不同接种方式发酵酒体呈香物质的差异性, 对各组挥发性风味物质相对含量进行主成分分析^[35], 得到主成分特征值、贡献率、得分图、载荷图(表 4 和图 4). 由表 4 可知, 主成分 1、2 的贡献率分别为 51.1% 和 32.2%, 累积贡献率 83.3%, 说明前 2 个主成分能够有效解释变量信息.

表 4 主成分特征值及贡献率

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
1	11.731	51.1	51.1
2	7.436	32.2	83.3

从图 4(a)可以观察到, 混菌发酵组位于同一象限, 且距离近, 说明其风味特征等也较为接近, 但其与单菌发酵组距离较远, 而且 2 组单菌发酵组也

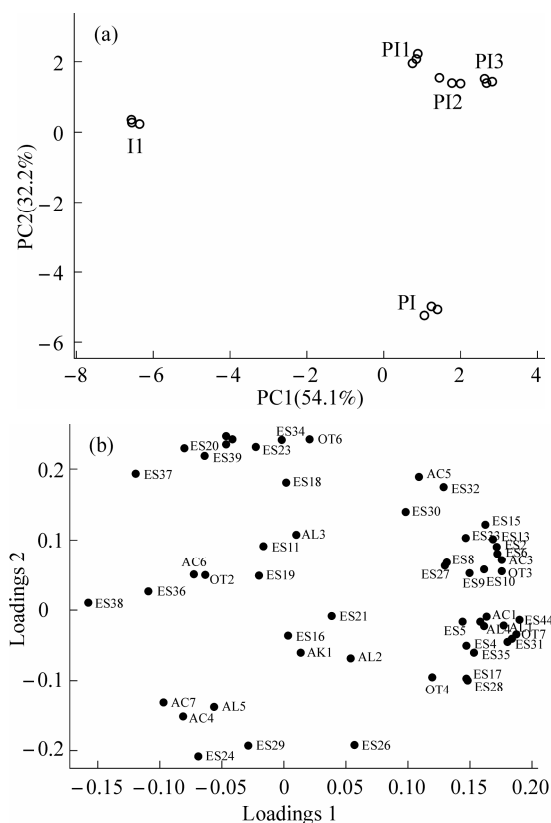


图 4 不同接种方式发酵水蜜桃酒 PCA 得分(a)和载荷(b)

位于不同象限, 而且 2 组单菌发酵组也各自位于不同象限, 其风味特征差异较大, 这与聚类分析结果一致. PI 在第一成分上得分与 PI2 较为接近, 可能是因为 PI2 前期 I₀ 消耗较快, 48 h 后接种的 PY01 后期起主导作用.

载荷系数的大小反映了初始变量(各挥发性风味物质)与主成分之间的相关性, 主成分对该变量

的代表性强弱与载荷系数呈正相关^[36]。从载荷图4(b)可以看出, 第一主成分与大部分酯类物质和苯乙醇呈正相关, 与辛酸和巴豆酸乙酯等则呈负相关。第二主成分与桃醛和棕榈酸乙酯等正相关, 与苯乙醇和苯乙烯等其他类物质负相关。有些挥发性风味物质的数量变化在主成分分析分离中没有主要影响或贡献, 因此在载荷图中未观察到。PI2组在第一、第二主成分上得分都较高, 说明该组发酵后呈香物质含量较高。综合图4(a)可以说明, 接种Io 48 h后接种PY01能够有效改善水蜜桃酒品质风味单一的问题。

为进一步确定对风味贡献较大的物质, 可生成一个变量投影重要性(Variable Important for the Projection, VIP)评分图^[37], 由此来量化每个变量对分类的贡献, 通常VIP值越大, 变量在不同组间差异就越显著。计算得出, VIP>1的有11种挥发性风味物质, 其中十四酸乙酯、辛酸甲酯、乙酸乙酯、壬酸乙酯的VIP值都超过了1.4, 是区分不同处理组香气特征的主要成分。而且在PI2组中的这些物质含量都较高, 说明该组香气特征比其他处理组突出。

2.7 感官评定结果

从香气、口感、外观对不同接种方式发酵水蜜桃酒进行感官评分(图5)。在澄清度色泽方面, 几组差异不大。因为混菌发酵能够产生更高含量的酒精, 所以混菌发酵组乙醇香和花香都高于单菌组。混菌发酵中, PI2酯类物质含量较高, 故该组果香得分最高, 但该组发酵过程中消耗了更多的糖, 导致甜度得分较低。Io发酵主要带来的是果味和酸度, 故I1组酸度高。综合感官分析可知, 在整体上PI2

组表现最优, 即接种非酿酒酵母Io后48 h接种酿酒酵母PY01能够有效丰富酒体的果香、花香, 从而增加水蜜桃酒风味的复杂性和协调性。

3 结论

选用酿酒酵母PY01结合非酿酒酵母东方伊萨酵母Io进行混合发酵研究表明, 各组间pH及总酸无太大差别, Io的参与降低了水蜜桃酒的酒精度, 先接种非酿酒酵母48 h再接种酿酒酵母酒精度和还原糖最低, β -葡萄糖苷酶活性最高。混菌发酵组挥发性风味物质种类高于单菌发酵组, 且先接种非酿酒酵母48 h后接种酿酒酵母组挥发性风味物质种类最多, 该组酯类物质种类(37种)及相对含量(93.16%)也最高。该复合菌接种方式有效增加了水蜜桃酒中的癸酸乙酯、月桂酸乙酯、乙酸乙酯以及苯乙醇等物质相对含量, 赋予酒体浓郁的奶油、水果香气、葡萄白兰地香韵, 丰富了水蜜桃酒香气层次。主成分和感官分析表明, 先接种非酿酒酵母48 h后接种酿酒酵母组香气特点最为明显, 综合感官得分最高。综上所述, 东方伊萨酵母Io和酿酒酵母PY01混菌发酵能够产生更多的香气物质, 而且优先接种Io后48 h接种PY01发酵组能够更大程度地发挥2种菌的生长优势, 有利于 β -葡萄糖苷酶的积累, 更大程度上促进水蜜桃酒挥发性风味物质的释放, 增加酯类物质对水蜜桃酒香气的积极影响, 发酵完成后的酒体香气更为浓郁, 有利于提升水蜜桃酒品质。本研究优先接种东方伊萨酵母Io后48 h接种酿酒酵母PY01发酵水蜜桃酒取得良好的效果, 为提升水蜜桃果酒品质提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 丁丽玲, 卢建兰, 林佩霞. 桃的贮藏保鲜与加工[J]. 新农村, 2017(8):35-36.
- [2] Heras-Roger J, Díaz-Romero C, Darias-Martín J. A comprehensive study of red wine properties according to variety[J]. Food Chemistry, 2016, 196:1224-1231.
- [3] Sieuwerts S, de Bok F A M, Hugenholtz J, et al. Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(16):4997-5007.
- [4] Steensels J, Verstrepen K J. Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial

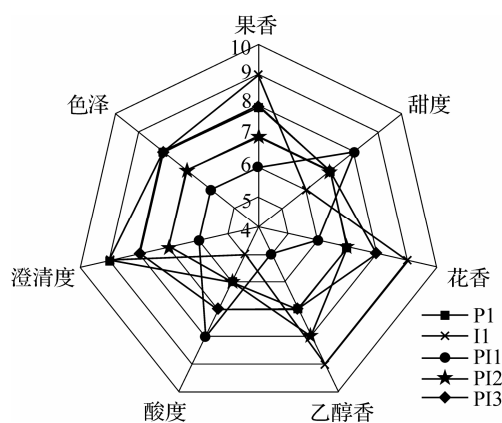


图5 不同接种方式发酵水蜜桃酒感官评分图

- fermentations[J]. Annual Review of Microbiology, 2014, 68:61-80.
- [5] di Maio S, Polizzotto G, di Gangi E D, et al. Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of south-eastern Sicily (Italy): Preservation and economic potential[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e30428.
- [6] 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.
- [7] Liu S X, Laaksonen O, Yang B R. Volatile composition of bilberry wines fermented with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in pure, sequential and simultaneous inoculations[J]. Food Microbiology, 2019, 80:25-39.
- [8] Comitini F, Gobbi M, Domizio P, et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Microbiology, 2011, 28(5):873-882.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Villena M A, Iranzo J F Ú, Pérez A I B. β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3):420-425.
- [12] Belda I, Ruiz J, Alastruey-Izquierdo A, et al. Unraveling the enzymatic basis of wine “flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7:12. DOI:10.3389/fmicb.2016.00012
- [13] 覃秋杏, 韩小雨, 黄卫东, 等. 非酿酒酵母产生的 β -葡萄糖苷酶在发酵酒中的应用[J]. 食品科学, 2020, 41(16):1-13.
- [14] Assis M O, Santos A P C, Rosa C A, et al. Impact of a non-*Saccharomyces* yeast isolated in the equatorial region in the acceptance of wine aroma[J]. Food and Nutrition Sciences, 2014, 5(9):759-769.
- [15] 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, 207:40-48.
- [16] 张文文, 翁佩芳, 吴祖芳. 东方伊萨酵母和酿酒酵母混合发酵杨梅酒的发酵效率及风味特征分析[J]. 食品科学, 2019, 40(18):144-151.
- [17] 刘超帝, 缪礼鸿, 陈瑾, 等. 耐高温酵母菌的筛选及其乙醇发酵特性[J]. 食品科学, 2016, 37(19):128-134.
- [18] Liu Q Y, Weng P F, Wu Z F. Quality and aroma characteristics of honey peach wines as influenced by different maturity[J]. International Journal of Food Properties, 2020, 23(1):445-458.
- [19] 刘沁源, 吴祖芳, 翁佩芳. 水蜜桃酒速酿酵母菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 核农学报, 2020, 34(7):1480-1490.
- [20] 杨宁, 王伟明, 姚琳, 等. 3,5-二硝基水杨酸法测定发酵型果露酒中总糖含量[J]. 中国酿造, 2018, 37(1):181-184.
- [21] 中国食品发酵工业研究院. 食品中总酸的测定[Z]. 2008.
- [22] 杨海宁, 宁豫昌, 王昌毓, 等. 接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株对发酵鲢鱼鱼露品质的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(10):2013-2022.
- [23] 李华敏, 孙舒扬, 黄萍萍, 等. 戴尔有孢圆酵母 WA19 与酿酒酵母 F33 混合发酵在樱桃酒酿造中的应用[J]. 食品科学, 2018, 39(24):123-130.
- [24] Varela C, Sengler F, Solomon M, et al. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*[J]. Food Chemistry, 2016, 209(15):57-64.
- [25] NY/T 1508-2017. 绿色食品果酒[S].
- [26] Ciani M, Beco L, Comitini F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(2):239-245.
- [27] Zhang B Q, Luan Yu, Duan C Q, et al. Use of *Torulaspora delbrueckii* co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* strains with different aromatic characteristic to improve the diversity of red wine aroma profile[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:606. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00606.
- [28] Baffi M A, Tobal T, Henrique J, et al. A novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(7):C997-C1002.
- [29] Rognså G H, Rathe M, Petersen M A, et al. From wine to wine reduction: Sensory and chemical aspects[J]. International Journal of Gastronomy and Food Science, 2017, 9:62-74.
- [30] 陈玉香. 红曲黄酒中酵母产特征酯类物质合成机理研究[D]. 福州: 福州大学, 2014.

- [31] Muñoz-Redondo J M, Puertas B, Cantos-Villar E, et al. Impact of sequential inoculation with the non-*Saccharomyces* *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* combined with *Saccharomyces cerevisiae* strains on chemicals and sensory profile of rosé wines[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(5):1598-1609.
- [32] 杨婕, 王玉华, 米兰, 等. 耐热克鲁维酵母与酿酒酵母顺序接种发酵对霞多丽干白葡萄酒感官品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(18):144-154.
- [33] Zhang C Y, Qi Y N, Ma H X, et al. Decreased production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* for Chinese rice wine fermentation by deletion of Bat aminotransferases[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2015, 42(4):617-625.
- [34] di Cagno R, Surico R F, Paradiso A, et al. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 128(3): 473-483.
- [35] 刘彬球, 陈孝权, 吴晓刚, 等. PCA 和 PLS-DA 用于晒青毛茶级别分类研究[J]. *茶叶科学*, 2015, 35(2):179-184.
- [36] 鲁榕榕, 马腾臻, 张波, 等. 大豆蛋白澄清剂对‘赤霞珠’干红葡萄酒品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(3):135-145.
- [37] 尹洪旭, 杨艳芹, 姚月凤, 等. 基于气相色谱-质谱技术与多元统计分析对不同栗香特征绿茶判别分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(4):192-198.

Effects of inoculation pattern of mixed yeasts on the quality of honey peach wine

LUO Qian, WU Zufang*, WENG Peifang

(College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: The present study was aimed to investigate the effects of different inoculation methods of co-fermentation on β -glucosidase activity and volatile flavor compounds of honey peach fruit wine. The honey peach wine was fermented by three different inoculation ways, including simultaneous inoculation of Io and PY01, inoculation of PY01 after 48 hours of fermentation with Io, and inoculation of Io after 48 hours of fermentation with PY01. Single inoculation of PY01 or Io was used as the control. The activities of β -glucosidase in honey peach wine were compared during fermentation, and the composition of volatile flavor compounds was determined by GC-MS. The results showed that there was no significant difference in physical and chemical indexes among the five tested groups. A total of 64 kinds of volatile flavor substances were detected in 5 groups of samples, among which esters and alcohols had higher contents. Following Io inoculation for 48 hours, the activity of β -glucosidase was effectively increased by inoculation of PY01, and the sensory analysis results were also the highest. Moreover, the esters in this group were the most abundant, with the relative content of 93.16%. The aroma components were also significantly better than those in other treatment groups. Furthermore, the inoculation of PY01 after 48 hours of fermentation with Io group was significantly different from other groups, which could effectively solve the problem of single taste of honey peach wine. In summary, significant variations in flavor quality characteristics existed among peach wines fermented with different inoculation methods. The inoculating PY01 after 48 hours fermentation with Io sequential inoculation effectively released volatile flavor substances, thus increasing the complexity and aroma quality of honey peach wine. The study can provide a new basis and means for improving the quality of honey peach wine.

Key words: yeast; mixed bacteria fermentation; peach wine; sequential inoculation fermentation; flavor substances

(责任编辑 章践立)