韩爽, 郭文韬, 王晓琴, 等. 高产 β-D-葡萄糖苷酶的本土非酿酒酵母菌株的筛选及发酵性能研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(12): 178−191. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050232

HAN Shuang, GUO Wentao, WANG Xiaoqin, et al. Screening of Indigenous Non-*Saccharomyces* Yeast Strains with High β-D-Glucosidase Activity and Investigation of Their Fermentation Characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(12): 178−191. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050232

·生物工程·

高产 β-D-葡萄糖苷酶的本土非酿酒酵母菌株的筛选及发酵性能研究

韩　爽[1,2], 郭文韬[1,2], 王晓琴[1,2,3], 崔文文[1,2], 郑远会[1,2], 李金宸[1,2], 刘梦瑶[1,2], 孙宝国[1,2], 黄明泉[1,2], 周志磊[4], 孟　楠[1,2,*]

(1.北京工商大学老年营养与健康教育部重点实验室, 北京 100048;
2.北京工商大学中国轻工业酿酒分子工程重点实验室, 北京 100048;
3.中国农业大学营养与健康系, 北京 100193;
4.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘　要: 为挖掘发酵性能良好且能够有效改善葡萄酒香气的本土非酿酒酵母菌株，本研究对采集自贺兰山东麓的非酿酒酵母（non-*Saccharomyces*）菌株进行 β-D-葡萄糖苷酶酶活性测试和酿酒环境耐受性测试，对筛选出的菌株进行分子生物学鉴定，并将所筛选的非酿酒酵母与酿酒酵母进行模拟葡萄汁的混菌发酵，监测发酵过程中菌群变化，并检测糖、总酸、pH 和酒精度等基本发酵参数。采用气相色谱-质谱联用（Gas Chromatography-Mass Spectrometry，GC-MS）技术检测香气物质并开展聚类分析（Cluster Analysis，CA）和主成分分析（Principal Component Analysis，PCA）。结果显示，筛选出 4 株高产 β-D-葡萄糖苷酶且环境耐受性能较强的非酿酒酵母（RICNA-GM003、RICNA-GM005、RICNA-GM006、RICNA-GM008）均为有孢汉逊酵母（*Hanseniaspora*），与酿酒酵母纯种发酵相比，有孢汉逊酵母参与发酵能够延长发酵周期，提高发酵基质中糖的利用率，降低酒精度，改变模拟葡萄酒香气物质组成，提高酯类物质和酮类物质的含量，增加酒体果香、花香强度及酒体香气复杂性。其中，ICNA-GM003+Sc 实验组发酵周期最长，定殖能力最强，酒体香气最为丰富，发酵性能表现最为突出。本土有孢汉逊酵母在混菌发酵中展现出改善葡萄酒香气复杂性的巨大潜力。该研究为本土酵母种质资源挖掘、实现葡萄酒风格差异化与品质提升奠定了基础。

关键词: 非酿酒酵母, 葡萄酒, β-D-葡萄糖苷酶, 香气物质, 耐受性
中图分类号: TS262.6　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)12−0178−14
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050232
本文网刊:

Screening of Indigenous Non-*Saccharomyces* Yeast Strains with High β-D-Glucosidase Activity and Investigation of Their Fermentation Characteristics

HAN Shuang[1,2], GUO Wentao[1,2], WANG Xiaoqin[1,2,3], CUI Wenwen[1,2], ZHENG Yuanhui[1,2], LI Jinchen[1,2], LIU Mengyao[1,2], SUN Baoguo[1,2], HUANG Mingquan[1,2], ZHOU Zhilei[4], MENG Nan[1,2,*]

(1.Key Laboratory of Elderly Nutrition and Health, Ministry of Education, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
2.Key Laboratory of Brewing Molecular Engineering of China Light Industry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
3.Department of Nutrition and Health, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

收稿日期: 2025−05−26
基金项目: 国家自然科学基金项目（32472672）。
作者简介: 韩爽（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程, E-mail: 15127637329@163.com。
*** 通信作者:** 孟楠（1992−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 葡萄酒风味解析及品质调控, E-mail: mengn@btbu.edu.cn。

4.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: To investigate indigenous non-*Saccharomyces* yeast strains with high β-D-glucosidase activity and desirable fermentation characteristics, this study evaluated the enzymatic activity and environmental tolerance of non-*Saccharomyces* strains isolated from the eastern foothills of Helan Mountain. Selected strains were identified using molecular biological methods and combined with *Saccharomyces cerevisiae* to simulate grape juice fermentation. Microbial community dynamics were monitored during fermentation, and key oenological parameters, including sugar content, total acidity, pH, and alcohol degree, were analyzed. Aroma compounds were detected using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and data were further examined using cluster analysis (CA) and principal component analysis (PCA). It was found that four strains exhibiting high β-D-glucosidase activity and strong environmental resilience—RICNA-GM003, RICNA-GM005, RICNA-GM006, and RICNA-GM008—were identified as *Hanseniaspora*. Compared with pure *S. cerevisiae* fermentation, the use of *Hanseniaspora* significantly extended the fermentation cycle, improved sugar utilization, reduced alcohol levels, altered the aroma profile of the simulated wine, increased the concentrations of esters and ketones, and enhanced aroma intensity and complexity, especially in fruity and floral notes. Among the experimental groups, RICNA-GM003 combined with *S. cerevisiae* (RICNA-GM003+Sc) showed the longest fermentation duration, the strongest colonization ability, the most complex aroma profile, and the best overall fermentation performance. Indigenous *Hanseniaspora* yeasts demonstrated great potential for enhancing wine aroma complexity through mixed-culture fermentation. This study provides a foundation for developing local yeast resources and promotes wine style diversification and quality improvement.

Key words: non-*Saccharomyces*; wine; β-D-glucosidase; aroma compounds; stress tolerance analysis

葡萄酒是以葡萄或葡萄汁为原料，经过全部或部分发酵酿制而成，具有一定酒精度的发酵酒[1]。酿酒酵母属是最常见的一类酵母，具有较强的发酵性能和酒精耐受性，在葡萄酒酿造过程中起着关键作用。然而，使用单一酿酒酵母发酵，虽有利于控制发酵过程，但容易造成葡萄酒风味特征同质化、地域性风格欠缺等问题，限制了葡萄酒风格的多样性[2]。

非酿酒酵母（non-*Saccharomyces*）是指除酿酒酵母属以外的、具有酒精发酵功能的酵母菌，通常具有酒精耐受能力差、发酵能力弱的特点，主要作用于葡萄酒酒精发酵的前期。在研究初期，非酿酒酵母曾被认为是导致葡萄酒发酵延迟、产生不良风味的原因，被认为是不受欢迎的腐败酵母菌[3]，但随着研究深入，研究者们发现利用非酿酒酵母进行发酵可以增加甘油、总酸、挥发性酯类含量，降低乙酸、乙醛含量，形成稳定的吡喃花青素等，从而改善葡萄酒的香气复杂性，调节葡萄酒的口感平衡，增强葡萄酒的颜色稳定性，进而改善酒的整体品质[4]。Muñoz-Redondo 等[5]发现与酿酒酵母纯种发酵相比，美极梅奇酵母（*Metschnikowia pulcherrima*）与酿酒酵母进行混菌发酵降低了葡萄酒的乙醛水平，增加了花青素和单宁的含量，进而调节葡萄酒的口感平衡和颜色的稳定。非酿酒酵母菌株主要从环境、葡萄表皮、生产器具上分离、纯化、筛选而得，因此具有产地依赖性，是实现葡萄酒产区风格化和典型性的重要因素之一。ZHANG 等[6]从新疆葡萄产区筛选出中国本土非酿酒酵母属 *Torulaspora delbrueckii*，与酿酒酵母进行顺序接种发酵，增加了葡萄酒中大部分乙酯和挥发性脂肪酸的浓度，贡献了菠萝、花香等香气；LI 等[7]从河北怀来葡萄产区筛选出两种非酿酒酵母（*Hanseniaspora vineae* 和 *T. delbrueckii*），与酿酒酵母混合发酵可以改善长相思干型葡萄酒的香气复杂性，有效地增加了水果香、花香和甜香的风味特征，增加葡萄酒中的酯类和萜烯含量。因此，筛选提升葡萄酒香气复杂性和丰富度的本土非酿酒酵母菌株，对提高葡萄酒的产区典型性、促进产区风格表达具有重要的作用[8]。

葡萄酒中的香气化合物以游离态和结合态两种方式存在，其中游离态香气化合物具有挥发性，可以直接产生香气；结合态香气化合物不具备挥发性，但是在发酵过程中经酶解或酸解可转化为游离态香气化合物，从而增加葡萄酒的香气强度[9−10]。由此可知，结合态香气物质是葡萄酒重要的香气前体物。部分非酿酒酵母可以分泌 β-D-葡萄糖苷酶，该酶可通过酶促反应将糖苷结合态物质中的糖苷键催化水解，产生苷元与糖基，使香气物质以游离态的形式释放，从而提高葡萄酒的花香、果香等香气特征[11]，改善葡萄酒感官品质。因此，筛选能够分泌 β-D-葡萄糖苷酶的本土非酿酒酵母菌株对于葡萄酒增香具有积极作用[12]。

综上所述，本研究以采集自怀涿盆地、贺兰山东麓、碣石山、蓬莱、天山北麓 5 个国内葡萄酒产区的 β-D-葡萄糖浓度苷酶酶活力较高的非酿酒酵母为研究对象，通过探究菌株对酿酒环境的耐受性与 β-D-葡萄糖浓度苷酶酶活力，筛选获得耐受性能良好的非酿酒酵母菌株进行葡萄酒模拟发酵实验，采用气相色谱-质谱联用（Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC-MS）风味分析技术对酒样进行香气物质解析，探究不同非酿酒酵母菌株混菌发酵对葡萄酒风味的影响，最终获得酿酒性能与产香性能优良的非酿酒酵母菌株，以此提升葡萄酒非酿酒酵母菌株的丰富度，为国内非酿酒酵母选择提供理论依据，为本土非

酿酒酵母的商业化发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

赤霞珠葡萄(含糖量为 198 g/L, pH3.75) 北京市密云区爱斐堡酒庄; 商业酿酒酵母英纳帝斯酵母白香郁 爱赛科有限公司; 本土非酿酒酵母 实验室保存的筛选自贺兰山东麓的菌株, 分别是 RICNA-GM001、RICNA-GM002、RICNA-GM003、RICNA-GM004、RICNA-GM005、RICNA-GM006、RICNA-GM007、RICNA-GM008(依次简称为 GM001、GM002、GM003、GM004、GM005、GM006、GM007、GM008); 氯化铵、磷酸氢二钾、酒石酸、焦亚硫酸钾、对硝基苯酚(p-NP)、碳酸钠、磷酸钠, 葡萄糖、果糖、琼脂粉、柠檬酸、DL-苹果酸、肌醇、烟酸、泛酸钙、盐酸吡哆醇、生物素、麦角甾醇、油酸钠、吐温 80、KH_2PO_4、KH_2SO_4、$MgSO_4·7H_2O$、$CaCl_2·2H_2O$、NaCl、$MnSO_4·H_2O$、$ZnSO_4$、$CuSO_4·5H_2O$、KI、$CoCl_2·6H_2O$、H_3BO_3、$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$、NH_4Cl、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、色氨酸、丙氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、甘氨酸、赖氨酸、半胱氨酸、氢氧化钠、斐林试剂Ⅰ、斐林试剂Ⅱ、次甲基蓝指示剂、分析级无水乙醇 北京迈瑞达科技有限公司; 对硝基苯-β-D-葡萄糖苷(p-NPG) 上海源叶生物科技有限公司; 蛋白胨 北京索莱宝科技有限公司; 酵母浸粉、色谱级无水乙醇 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; WL 固体鉴别培养基粉末 上海麦克林生化科技股份有限公司; 高纯氦气(纯度 99.999%)、正构烷烃(C_7~C_{25}) 坛墨质检科技股份有限公司; 2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus) P520 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

KG-SX-500 高压蒸汽灭菌锅 日本 Tomy Digital Biology 公司; DHP-9082B 电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; THZ-C-1 恒温振荡器 苏州培英实验设备有限公司; SpectraMax® M2e 酶标仪 北京五洲东方科技发展有限公司; CR22N 台式高速冷冻离心机 工机控股株式会社; PHS-25/3C/3E/2F pH 计 上海雷磁公司; 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪 美国安捷伦有限公司; MF859 细菌/真菌 DNA 提取试剂盒 北京聚合美生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株筛选

1.2.1.1 培养基的制备 YPD 培养基: 葡萄糖 2.0%、蛋白胨 2.0%、酵母浸粉 1.0%, 琼脂 2.0%(仅固体培养基添加), 121 ℃ 灭菌 20 min; 发酵培养基: 葡萄糖 2.0%、蛋白胨 2.0%、酵母浸粉 1.0%、NH_4Cl 0.3%、KH_2PO_4 0.4%, 121 ℃ 灭菌 20 min; WL 固体鉴别培养基: 80 g WL 固体鉴别培养基粉末溶于 1 L 超纯水, 溶解混匀后 121 ℃ 灭菌 20 min。

1.2.1.2 酵母菌耐受性测试 酵母菌环境耐受性测试条件按照表 1 配制不同梯度的改性 YPD 培养基。按 2.5% 的接种量向改性 YPD 液体培养基中接种非酿酒酵母菌株, 28 ℃、180 r/min 培养 24 h, 测定不同改性 YPD 培养基菌液的 OD_{600} 值, 判断其耐受性。由于 GM002 菌株对 SO_2 耐受性较强, 因此增加改性 YPD 培养基中 SO_2 浓度至 1500、2000 mg/L。

表 1 酵母环境耐受性测试条件

Table 1 Test conditions for environmental tolerance of yeast

梯度	温度(℃)	葡萄糖浓度(g/L)	SO_2浓度(mg/L)	pH	乙醇浓度(%vol)
0(对照组)	28	20	0	6	0
1	5	100	800	2.0	2
2	10	150	850	2.5	4
3	15	200	900	3.0	6
4	20	250	950	3.5	8
5	25	300	1000	4.0	10
6	–	–	–	–	12

注: "–"表示无数据; 表2同。

1.2.1.3 β-D-葡萄糖苷酶提取 将活化好的菌液以 2.5% 接种量接种于发酵培养基中, 使待发酵菌液初始 OD_{600} 值为 0.1~0.2, 在 28 ℃、180 r/min 条件下振荡培养 72 h 后取样, 于 4 ℃、8000 r/min 离心 15 min, 取上清液作为粗酶液, 使用 0.45 μm 无菌过滤膜对粗酶液进行过滤, 获得 β-D-葡萄糖苷酶粗提取液。

1.2.1.4 β-D-葡萄糖苷酶酶活测定 吸取 0.75 mL 柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH5)和 0.25 mL 1 mmol/L p-NPG 于离心管中混匀, 再加入 0.1 mL 待测 β-D-葡萄糖苷酶提取液, 构建反应体系。将反应体系于 40 ℃ 反应 30 min, 加入 1 mL 0.5 mol/L Na_2CO_3 标准溶液终止反应, 测定反应体系的 OD_{400} 值。以 OD_{400} 值为纵坐标, 等浓度梯度稀释的 p-NP 溶液浓度为横坐标, 绘制对硝基苯酚标准曲线来计算 p-NP 溶液浓度, 标准曲线回归方程为 y=0.1192x−0.0084, 相关系数为 0.9994, 表明吸光度值与对硝基苯酚含量成线性关系。最终计算待测样品中 β-D-葡萄糖苷酶酶活(每分钟生成 1 mmol p-NP 所需酶量), 计算公式如下:

$$酶活(U/mL) = C×V/(t×0.1)×N \quad 式(1)$$

式中, C 为 p-NP 浓度(mmol/L); V 是反应体系的体积(mL); N 是 β-葡萄糖苷酶提取液稀释倍数; t 为反应时间(min); 0.1 是所取 β-葡萄糖苷酶提取液体积。

1.2.1.5 β-D-葡萄糖苷酶耐受性测试 根据表 2 改变 β-D-葡萄糖苷酶酶活测定的反应体系条件, 并按照 1.2.1.4 测定酶活力。

1.2.1.6 菌株的鉴定 用细菌/真菌 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, −20 ℃ 储藏备用。用通用引物 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')对菌株的 26S rDNA 基因序列进行 PCR 扩增并测序。

表 2　β-D-葡萄糖苷酶酶活耐受性测试条件

Table 2　Testing conditions for β-D-glucosidase activity tolerance

梯度	温度（℃）	葡萄糖浓度（g/L）	pH	乙醇浓度（%vol）	SO_2浓度（mg/L）
1	10	0（对照组）	2	0（对照组）	0（对照组）
2	20	100	3	4	100
3	30	200	4	8	200
4	40（对照组）	300	5（对照组）	12	300
5	50	400	6	16	400
6	60	500	7	20	500
7	–	600	–	–	600
8	–	–	–	–	700
9	–	–	–	–	800
10	–	–	–	–	900
11	–	–	–	–	1000

PCR 扩增体系：20 μL 2×Phanta Flash Master Mix（Dye Plus）P520，NL-1 和 NL-4 引物各 2 μL，DNA 模板 2 μL，ddH_2O 2 μL。PCR 扩增条件：98 ℃ 预变性 30 s；98 ℃ 条件下 10 s，55 ℃ 条件下 5 s，72 ℃ 条件下 5 s，循环 30 次；72 ℃ 条件下 1 min。电泳检测扩增结果合格后，由生工生物（上海）完成测序。将测序结果在 NCBI 上的 GenBank 数据库中进行基本局部比对搜索工具（basic local alignment search tool，BLAST）比对，用 MEGA11.0 软件采用邻接法（neighbor-joining，NJ）构建系统发育树。

1.2.2　发酵试验

1.2.2.1　模拟葡萄汁制备　模拟葡萄汁配方：含氮量为 300 N/L，葡萄糖 100 g/L、果糖 100 g/L、柠檬酸 6 g/L、DL-苹果酸 6 g/L、肌醇 20 mg/L、烟酸 2 mg/L、泛酸钙 1.5 mg/L、盐酸吡哆醇 0.25 mg/L、生物素 0.005 mg/L、麦角甾醇 15 mg/L、油酸钠 5 mg/L、吐温 80 0.5 mg/L、KH_2PO_4 750 mg/L、KH_2SO_4 500 mg/L、$MgSO_4·7H_2O$ 250 mg/L、$CaC1_2·2H_2O$ 155 mg/L、NaC1 200 mg/L、$MnSO_4·H_2O$ 4 mg/L、$ZnSO_4$ 4 mg/L、$CuSO_4·5H_2O$ 1 mg/L、KI 1 mg/L、$CoCl_2·6H_2O$ 0.4 mg/L、H_3BO_3 1 mg/L、$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 1 mg/L、NH_4Cl 781.2 mg/L、脯氨酸 861 mg/L、谷氨酰胺 709.8 mg/L、精氨酸 52.5 mg/L、色氨酸 252 mg/L、丙氨酸 205.8 mg/L、谷氨酸 168 mg/L、丝氨酸 109.2 mg/L、苏氨酸 109.2 mg/L、亮氨酸 73.92 mg/L、天冬氨酸 63 mg/L、缬氨酸 63 mg/L、苯丙氨酸 54.6 mg/L、异亮氨酸 46.2 mg/L、组氨酸 46.2 mg/L、甲硫氨酸 46.2 mg/L、酪氨酸 25.2 mg/L、甘氨酸 25.2 mg/L、赖氨酸 25.2 mg/L、半胱氨酸 16.8 mg/L。配制完成后使用 NaOH 将模拟葡萄汁 pH 调整至 3.3，并使用 0.22 μm 无菌过滤器进行过滤灭菌。

1.2.2.2　模拟葡萄汁发酵工艺　将过滤灭菌后的模拟葡萄汁分装至 250 mL 发酵瓶中，每瓶 200 mL；采用连续接种发酵方法，首先接种非酿酒酵母，接种浓度为 $1×10^6$ cfu/mL，2 d 后接种浓度为 $1×10^6$ cfu/mL 的商业酿酒酵母，于 25±1 ℃、165 r/min 条件进行模拟发酵，每组设定 3 个生物学平行。以商业酿酒酵母纯种发酵为对照组，接种浓度为 $1×10^6$ cfu/mL，与非酿酒酵母接种时间一致。发酵期间，每隔 24 h 监测发酵体系的温度和失重，采用 CO_2 累计失重统计法和平板菌落计数法进行模拟发酵过程中的生长动力学监测，当连续 2~3 d 发酵瓶质量未发生明显变化（失重质量<0.3 g）则停止发酵，对发酵液进行 4 ℃，8000 r/min 离心 15 min，收集上清液于−20 ℃ 保存待测。

1.2.3　指标检测与分析

1.2.3.1　理化指标检测　根据 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法的检测方法》和 GB 5009.225-2023《食品安全国家标准 酒和食用酒精中乙醇浓度的测定》[13−14]，分别对模拟发酵液的残糖、酒精度与可滴定酸进行测定，同时使用 pH 计检测酒样的 pH。

1.2.3.2　挥发性香气化合物　采用顶空固相微萃取（headspace-solid phase microextraction，HS-SPME）结合 GC-MS 技术，参照 Lan 等[15] 方法分析模拟酒样的挥发性成分。将 8 mL 样品、3 g 氯化钠、1 mg/L 3-辛醇（内标化合物）置于 20 mL 进样小瓶中，40 ℃ 下平衡 30 min 后，将 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 三相萃取头插入小瓶顶空，在 40 ℃、500 r/min 条件下提取挥发性化合物 30 min。然后将萃取头插入 GC 进样器进行 8 min 热解吸。色谱柱为 HP-INNOWAX 毛细管色谱柱（60 m×0.25 mm×0.25 μm），载气为高纯氦气（纯度 99.999%），流速 1 mL/min。检测程序：起始温度 50 ℃，保温 1 min，3 ℃/min 升温至 220 ℃，保温 5 min，不分流进样。MSD 传输线加热器温度为 250 ℃，离子源温度 250 ℃，四极杆温度 150 ℃，离子源能量 70 eV，质量扫描范围 m/z 30~350。定性定量方法：根据 NIST 20 谱库检索、保留指数、香气属性比对和标准品比对四种方式定性样品的香气成分。对模拟发酵酒样进行半定量分析，挥发性香气化合物半定量计算公式如下：

$$C_i = A_i/A_s \times C_s \qquad 式（2）$$

式中，C_i 为挥发性香气化合物的相对质量浓度（mg/L）；A_i 为待测挥发性物质峰面积；A_s 为内标物质的峰面积；C_s 为 3-辛醇（内标化合物）的含量（mg/L）。

1.3　数据处理

折线图、柱形图、韦恩图与 PCA 图采用 Origin Pro 2021（Origin Lab 公司，美国马萨诸塞州）完成。热图采用 Chiplot（https://www.chiplot.online/）绘制。发育树采用 MEGA11.0 软件（MEGA Software Team，亚利桑那州立大学）采用邻接法（neighbor-joining，NJ）构建。差异显著水平采用 Duncan 检验，设置为 $P<0.05$，利用 SPSS 27 软件（IBM 公司，美国纽约州

阿蒙克市)进行统计分析。所有实验均进行 3 次独立重复,实验结果均以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 菌株耐受性分析

在葡萄酒发酵环境中,非酿酒酵母的生长状态主要受到温度、葡萄糖浓度、pH、乙醇浓度、SO_2 浓度的影响[16]。对 8 株非酿酒酵母菌株的温度、葡萄糖浓度、pH、乙醇浓度、二氧化硫浓度的耐受性进行测试,结果如表 3 所示。

为保证葡萄酒香气的浓郁度和愉悦度,葡萄酒发酵温度一般控制在 15~25 ℃,低于酵母生长的最适温度,因此,耐受低温是酵母菌株的重要性能之一。结果表明,随着发酵体系温度的降低,菌株活力减弱,这与冯文倩等[16] 的研究结果相一致。其中,GM002 在 15 ℃ 和 20 ℃ 时的 OD_{600} 显著低于(P<0.05)其他菌株,耐低温性最差。GM004 在15 ℃ 时的 OD_{600} 显著高于(P<0.05)其他菌株,耐低温性最强。在葡萄酒发酵温度下(15~25 ℃),GM001、GM003、GM004、GM006、GM007、GM008的菌株活力较强。在葡萄酒酿造过程中,糖是酒精发酵的基础,也是酵母菌的主要能量来源,但是,待发酵的葡萄醪或葡萄汁中,糖含量一般为 180~240 g/L,可能造成渗透胁迫阻碍酵母生长[17]。糖耐受性结果表明,随着发酵体系葡萄糖浓度的升高,菌株活力逐渐减弱,与董琦楠等[18] 研究结果一致。在 150~250 g/L 的葡萄糖浓度下,GM003、GM004 的 OD_{600} 显著高于(P<0.05)其他菌株,糖耐受性最强,GM001、GM002、GM005、GM006、GM008 菌株的耐受性次之。pH 耐受性实验结果表明,pH 低于 6 时,随着 pH 的降低,菌株活力逐渐减弱,与姚红红等[19] 报道一致。在葡萄酒发酵体系的 pH 条件(3.0~4.0)下,除 GM007 菌株(pH3 和 pH3.5)的 OD_{600} 显著(P<0.05)低于其他菌株外,其他菌株无明显突出优势。酒精度随葡萄酒发酵进程不断升高,为保证非酿酒酵母菌株尽可能长时间的参与发酵过程,对 8 株非酿酒酵母菌株进行酒精耐受性检测。结果表明,随着发酵体系乙醇浓度的升高,菌株活力逐渐减弱,与马延琴等[20] 报道一致。在 12%vol 条件下,GM007的 OD_{600} 显著高于(P<0.05)其他菌株,对乙醇耐受能力最强,而 GM001、GM006、GM008 则较弱。向葡萄酒中添加 SO_2 具有抑菌、抗氧化的作用,可保证葡萄酒的稳定性和维持葡萄酒品质[21]。结果表明,随着发酵体系 SO_2 浓度的升高,菌株活力受 SO_2 抑制而逐渐减弱,与陈益萱等[22] 研究结果一致。GM002在 2000 mg/L SO_2 浓度下仍具有较强活性,耐受能力过强,难以人工终止发酵,而 GM005、GM006、GM007、GM008 硫浓度耐受能力适中,符合葡萄酒酿造体系。综合 8 株非酿酒酵母菌株对温度、葡萄糖浓度、乙醇浓度、pH 及 SO_2 浓度的耐受能力,根据上述菌株的筛出频率,选出综合耐受性表现较好的 5 株菌株:GM003、GM004、GM005、GM006、GM008。

2.2 菌株中 β-D-葡萄糖苷酶酶活耐受性分析

β-D-葡萄糖苷酶是非酿酒酵母产生的、可催化裂解糖苷态香气前体物转化为游离态香气物质的重要功能酶,为此,将探究 8 株非酿酒酵母菌株所产 β-D-葡萄糖苷酶经过不同温度、葡萄糖浓度、pH、乙醇浓度、SO_2 浓度处理后的耐受能力(表 4)。

β-D-葡萄糖苷酶的温度耐受性实验结果显示,GM003 和 GM005 所产 β-D-葡萄糖苷酶对低温的耐受性较强,在 10 ℃ 环境下依然有较强的酶活力,GM005 和 GM006 所产 β-D-葡萄糖苷酶对高温的耐受性较强,在 60 ℃ 依然具有较强的酶活力,8 株菌在葡萄酒酿造温度范围内均具有活性,且差异不明显。β-D-葡萄糖苷酶对糖的耐受性实验结果显示,GM003、GM005、GM008 所产 β-D-葡萄糖苷酶对糖含量耐受能力较强,在葡萄酒酿造条件下表现出较强的酶活力。β-D-葡萄糖苷酶对 pH 的耐受性实验结果表明,在葡萄酒发酵体系的 pH 条件(3.0~4.0)下,除 GM004 表现出很强的酶活力以外,其他 7 株菌的酶活力无显著性差异(P<0.05)。β-D-葡萄糖苷酶对乙醇浓度的耐受性实验结果表明,随着乙醇浓度的提高,GM002、GM003、GM005、GM006、GM007、GM008 均表现出较强的酶活耐受能力,而 GM001、GM004 酶活耐受能力则相对较弱。β-D-葡萄糖苷酶对 SO_2 的耐受性实验结果显示,随着 SO_2 浓度的提高,8 株菌的 β-D-葡萄糖苷酶酶活力减弱,其中 GM001、GM002、GM003、GM005、GM006、GM008 的 β-D-葡萄糖苷酶对 SO_2 的耐受性相对较强。综合 8 株非酿酒酵母菌株所产 β-D-葡萄糖苷酶酶活对温度、糖、乙醇、pH 及 SO_2 的耐受能力,选出综合耐受性表现出较好的 5 株菌株:GM002、GM003、GM005、GM006、GM008。

研究表明,酵母和其糖苷酶的最适温度分别为 20~30 ℃ 和 40~50 ℃,最适 pH 为 5.0~6.0[23]。本研究发现在最适条件下实验菌株与酶的活性与文献[23] 报道基本一致,然而由于葡萄酒在发酵过程中处于低温与低 pH 环境,酵母菌株与相关酶的活性普遍会随着温度与 pH 的降低而降低[16,24],且实验菌株与相关酶的活性在低 pH 条件下同样展现出与现有研究相同的规律。在高糖、高醇、高硫等环境下,酵母菌株与酶的活性普遍会随着相关因素浓度的提高而降低[19,25],且实验菌株与相关酶的活性同样符合现有研究结果。基于葡萄酒发酵体系的环境条件,结合上述菌株环境耐受性能与 β-D-葡萄糖苷酶酶活耐受性能结果,最终选择 GM003、GM005、GM006、GM008 四株非酿酒酵母菌株进行菌种鉴定和产香性能分析。

2.3 菌株鉴定

对耐受性实验筛选获得的 GM003、GM005、GM006 和 GM008 4 株菌进行菌种鉴定,通过提取 DNA、16S rDNA 基因测序、序列比对及构建系统进化树(图 1)可知,菌株 GM003、GM005、GM006 和

表 3　非酿酒酵母菌株温度、葡萄糖浓度、pH、乙醇浓度、SO_2 浓度耐受能力测试结果

Table 3　Tolerance ability of non-*Saccharomyces* to temperature, glucose concentration, pH, ethanol concentration and SO_2 concentration

条件		不同编号菌株的OD_{600}							
		GM001	GM002	GM003	GM004	GM005	GM006	GM007	GM008
温度(℃)	5	0.0035±0.0003^{dB}	0.0046±0.0024^{cAB}	0.0095±0.0044^{dA}	0.0095±0.0044^{dA}	0.0034±0.0003^{dB}	0.0053±0.0024^{eAB}	0.0055±0.0019^{dAB}	0.0064±0.0017^{dAB}
	10	0.0016±0.0013^{dB}	0.0016±0.0003^{cB}	0.0239±0.0243^{dA}	0.0257±0.0041^{dA}	0.0238±0.0063^{dA}	0.0180±0.0127^{eAB}	0.0076±0.0073^{dAB}	0.0074±0.0048^{dAB}
	15	0.3007±0.0379^{cB}	0.0550±0.0259^{cE}	0.1003±0.0246^{cDE}	0.4045±0.0132^{cA}	0.0927±0.0146^{cDE}	0.1945±0.0282^{dC}	0.1497±0.0570^{cCD}	0.1955±0.0807^{cC}
	20	1.1226±0.0602^{aAB}	0.8924±0.0593^{bC}	1.2238±0.0249^{aA}	1.1587±0.08559^{aAB}	1.1438±0.0629^{aAB}	1.2189±0.0419^{aA}	1.1429±0.0349^{aAB}	1.1149±0.0192^{aB}
	25	1.0941±0.0567^{aB}	1.2591±0.0407^{aA}	1.2613±0.0066^{aA}	1.1595±0.0233^{aB}	1.1019±0.0350^{aB}	1.1083±0.0467^{bB}	1.1047±0.0079^{aB}	1.1143±0.0252^{aB}
	28(对照)	0.9010±0.0232^{bC}	1.1953±0.0510^{aA}	0.9048±0.0379^{bC}	0.9871±0.0280^{bB}	0.9153±0.0235^{bC}	0.9409±0.0096^{cBC}	0.8937±0.0274^{bC}	0.9895±0.0295^{bB}
	20(对照)	0.9810±0.0574^{cdC}	1.4037±0.0173^{aA}	1.0696±0.0133^{cdB}	1.0454±0.0470^{cBC}	1.0931±0.0159^{bB}	1.0847±0.0174^{abB}	0.8761±0.0563^{bcD}	1.0237±0.0277^{bBC}
葡萄糖浓度(g/L)	100	1.1873±0.0188^{aC}	1.2436±0.0042^{bB}	1.3371±0.0525^{aA}	1.3080±0.0175^{aA}	1.1592±0.0015^{aCD}	1.1908±0.0013^{aC}	1.0688±0.0116^{aE}	1.1446±0.0224^{aD}
	150	1.0931±0.0168^{bB}	1.1275±0.0155^{cB}	1.2552±0.0106^{abA}	1.2100±0.0218^{bA}	1.0663±0.0136^{bB}	1.0755±0.1029^{abB}	0.9265±0.0252^{bC}	1.0406±0.07297^{bB}
	200	1.0591±0.0133^{bcAB}	1.0145±0.0234^{dB}	1.1649±0.0824^{bcA}	1.1451±0.0128^{bA}	1.0040±0.0363^{cB}	0.9808±0.1321^{bcBC}	0.8382±0.0232^{cD}	0.8955±0.0314^{cCD}
	250	0.9733±0.0378^{deAB}	0.8974±0.0200^{eB}	1.0588±0.0606^{cdA}	1.0248±0.0674^{cA}	0.8891±0.0257^{dB}	0.9086±0.1107^{cdB}	0.7560±0.0084^{dC}	0.7479±0.0195^{dC}
	300	0.9340±0.0266^{eA}	0.8086±0.0346^{fBC}	0.9945±0.1394^{dA}	0.8995±0.0181^{dAB}	0.7627±0.0176^{eC}	0.7757±0.0449^{dC}	0.6329±0.0288^{eD}	0.6086±0.0114^{eD}
pH	2	0.0064±0.0014^{dE}	0.0144±0.0008^{cE}	0.0093±0.0027^{dE}	0.0927±0.0138^{dC}	0.0424±0.0153^{eD}	0.1226±0.0148^{dB}	0.0082±0.0057^{dE}	0.3357±0.0181^{eA}
	2.5	0.9549±0.0184^{cA}	0.8261±0.2561^{bAB}	0.9203±0.0127^{cAB}	0.9009±0.0430^{cAB}	0.9196±0.0079^{dAB}	0.8015±0.0275^{cAB}	0.7444±0.0333^{cB}	0.9340±0.0389^{dA}
	3	1.0050±0.0043^{bAB}	1.0638±0.0107^{abA}	1.0041±0.0651^{bAB}	0.9621±0.0439^{bcB}	1.0502±0.0097^{cA}	1.0172±0.0180^{bAB}	0.8331±0.0314^{bC}	1.0122±0.0155^{cAB}
	3.5	1.0429±0.0370^{abB}	1.1474±0.1238^{aA}	1.0696±0.0303^{aAB}	0.9742±0.0371^{bBC}	1.0643±0.0310^{bcAB}	1.0364±0.0114^{abB}	0.8948±0.0501^{abC}	1.0733±0.0085^{bAB}
	4	1.0557±0.0300^{aBCD}	1.1806±0.1410^{aA}	1.0752±0.0063^{aBCD}	0.9961±0.0029^{abCD}	1.1121±0.0091^{aAB}	1.0649±0.0214^{aBCD}	0.9794±0.0266^{aD}	1.0831±0.0085^{abBC}
	6(对照)	1.0790±0.0340^{aA}	1.1805±0.1601^{aA}	1.0781±0.0085^{aA}	1.0454±0.0470^{aAB}	1.0931±0.0159^{abA}	1.0717±0.0456^{aA}	0.9387±0.0959^{abB}	1.1196±0.0184^{aA}
	0(对照)	1.0974±0.0244^{aC}	1.4467±0.0260^{aA}	1.2046±0.0607^{aB}	1.0454±0.0470^{aC}	1.0931±0.0159^{aC}	1.0561±0.0355^{aC}	0.9846±0.0248^{aD}	1.1700±0.0230^{aB}
	2	1.0784±0.0179^{aBCD}	1.3205±0.0031^{bA}	1.0303±0.0588^{bE}	1.0263±0.0326^{aDE}	1.1186±0.0335^{aBC}	1.0090±0.0147^{aE}	1.0473±0.0514^{aCDE}	1.0958±0.0100^{bBC}
	4	0.9524±0.0248^{bAB}	1.0794±0.0383^{cA}	1.0016±0.0305^{bAB}	0.9328±0.0133^{bB}	0.7888±0.1859^{bC}	0.9150±0.0268^{bBC}	0.7868±0.0695^{bC}	0.9606±0.0373^{cAB}
乙醇浓度(%vol)	6	0.0054±0.0031^{cC}	0.0144±0.0030^{dC}	0.9326±0.0042^{cA}	0.0119±0.0068^{cC}	0.0051±0.0027^{cC}	0.0817±0.0911^{cB}	0.0047±0.0018^{cC}	0.0024±0.0011^{dC}
	8	0.0042±0.0025^{cA}	0.0056±0.0013^{dA}	0.0038±0.0012^{dA}	0.0193±0.0072^{cA}	0.0081±0.0062^{cA}	0.0026±0.0006^{dA}	0.0240±0.0018^{cA}	0.0031±0.0030^{dA}
	10	0.0021±0.0014^{cB}	0.0073±0.0008^{dAB}	0.0110±0.0104^{dAB}	0.0165±0.0061^{cA}	0.0062±0.0046^{cAB}	0.0059±0.0061^{dAB}	0.0115±0.0018^{cAB}	0.0018±0.0013^{dB}
	12	0.0022±0.0014^{cC}	0.0147±0.0074^{dB}	0.0106±0.0018^{dBC}	0.0151±0.0068^{cB}	0.0082±0.0084^{cBC}	0.0028±0.0021^{dC}	0.0327±0.0102^{cA}	0.0019±0.0013^{dC}
	0(对照)	1.0744±0.0182^{aBC}	1.3549±0.0158^{aA}	0.9270±0.1504^{aCD}	1.1050±0.0136^{aB}	1.0277±0.0627^{aBCD}	0.9748±0.0862^{aBCD}	0.8716±0.0712^{aD}	1.0580±0.1300^{aBC}
	800	0.0133±0.0188^{bE}	1.1441±0.0377^{bA}	0.0518±0.0522^{bE}	0.0069±0.0037^{bE}	0.5255±0.0136^{bD}	0.6495±0.0339^{bBC}	0.6976±0.0877^{bB}	0.5820±0.1197^{bCD}
	850	0.0084±0.0088^{bE}	1.1463±0.0214^{bA}	0.0543±0.0560^{bE}	0.0140±0.0055^{bE}	0.3124±0.0139^{cD}	0.4840±0.0350^{cC}	0.5674±0.0701^{cB}	0.4478±0.0417^{bC}
	900	0.0095±0.0106^{bF}	1.1026±0.0174^{bcA}	0.0045±0.0020^{bF}	0.0116±0.0018^{bF}	0.1804±0.0180^{dE}	0.3374±0.0242^{dD}	0.5463±0.0648^{cB}	0.4389±0.0522^{bC}
SO_2(mg/L)	950	0.0243±0.0206^{bE}	1.0933±0.0609^{bcA}	0.0073±0.0043^{bE}	0.0135±0.0075^{bE}	0.1203±0.0033^{eD}	0.3162±0.0626^{dC}	0.5302±0.0300^{cB}	0.2625±0.0672^{cC}
	1000	0.0072±0.0022^{bD}	1.0737±0.0415^{cA}	0.0042±0.0028^{bD}	0.0087±0.0028^{bD}	0.0275±0.0131^{fD}	0.0805±0.0108^{eC}	0.0260±0.0133^{dD}	0.1680±0.0115^{cB}
	1500		0.8359±0.0278^{d}						
	2000		0.5844±0.0184^{e}						

注：小写字母代表同一菌株在不同条件梯度下的OD_{600}值存在显著性差异（P<0.05）；大写字母代表8株菌株在同一条件下的OD_{600}值存在显著性差异（P<0.05）。

表 4　非酿酒酵母所产 β-D-葡萄糖苷酶酶活温度、葡萄糖浓度、pH、乙醇浓度、SO_2 浓度耐受性测试结果

Table 4　Temperature, glucose concentration, pH, ethanol concentration and SO_2 concentration tolerance of β-D-glucosidase activity produced by non-*Saccharomyces*

条件	梯度	不同编号菌株的酶活(U)							
		GM001	GM002	GM003	GM004	GM005	GM006	GM007	GM008
温度(℃)	10	0.2042±0.0354^{bC}	0.2446±0.0035^{cAB}	0.2762±0.0106^{bcA}	0.2471±0.0027^{abAB}	0.2759±0.0324^{bA}	0.2476±0.0071^{bAB}	0.2510±0.0076^{aAB}	0.2247±0.0091^{bcBC}
	20	0.2388±0.0281^{abA}	0.2475±0.0194^{cA}	0.2637±0.0054^{cA}	0.2524±0.0023^{aA}	0.2655±0.0140^{bA}	0.2740±0.0199^{abA}	0.2751±0.0449^{aA}	0.2404±0.0172^{bA}
	30	0.2510±0.0174^{aAB}	0.2697±0.0220^{bcAB}	0.2772±0.0212^{bcAB}	0.2387±0.0143^{abB}	0.2689±0.0158^{bAB}	0.3099±0.0892^{abA}	0.2472±0.0085^{aAB}	0.2410±0.0102^{bB}
	40(对照)	0.2482±0.0130^{aBC}	0.2926±0.0221^{bAB}	0.3283±0.0420^{aA}	0.2195±0.0215^{abcC}	0.3301±0.0238^{aA}	0.3513±0.0862^{aA}	0.2869±0.0124^{aABC}	0.2566±0.0186^{bBC}
	50	0.2665±0.0233^{aB}	0.3513±0.0349^{aA}	0.3080±0.0107^{abAB}	0.2164±0.0303^{bcC}	0.3439±0.0381^{aA}	0.3470±0.0397^{aA}	0.2774±0.0227^{aB}	0.3410±0.0046^{aA}
	60	0.2053±0.0060^{bC}	0.2553±0.0013^{cAB}	0.2204±0.0068^{dBC}	0.1946±0.0270^{cC}	0.2703±0.0297^{bA}	0.2664±0.0136^{abA}	0.1810±0.0155^{bC}	0.2017±0.0399^{cC}
葡萄糖浓度(g/L)	0(对照)	0.2482±0.0130^{aBC}	0.2926±0.0221^{aAB}	0.3283±0.0420^{aA}	0.2195±0.0215^{cC}	0.3301±0.0238^{aA}	0.3513±0.0862^{aA}	0.2869±0.0124^{aABC}	0.2566±0.0186^{aBC}
	100	0.1654±0.0064^{bE}	0.1975±0.0051^{bBCD}	0.3371±0.0111^{aA}	0.1764±0.0059^{bDE}	0.2156±0.0125^{bB}	0.2100±0.0237^{bBC}	0.1877±0.0145^{bCDE}	0.2115±0.0116^{bB}
	200	0.1675±0.0083^{bC}	0.1888±0.0066^{bcAB}	0.1926±0.0097^{bAB}	0.1764±0.0077^{bBC}	0.1965±0.0073^{bcA}	0.1749±0.0100^{bcBC}	0.1831±0.0162^{bcABC}	0.1925±0.0060^{bcAB}
	300	0.1647±0.0029^{bB}	0.1844±0.0065^{bcdAB}	0.1871±0.0133^{bA}	0.1779±0.0021^{bAB}	0.1875±0.0083^{cA}	0.1721±0.0184^{bcAB}	0.1755±0.0067^{bcAB}	0.1886±0.0145^{bcA}
	400	0.1640±0.0054^{bC}	0.1831±0.0065^{bcdA}	0.1839±0.0074^{bA}	0.1707±0.0051^{bBC}	0.1794±0.0044^{cdAB}	0.1679±0.0077^{bcBC}	0.1629±0.0034^{cdC}	0.1862±0.0114^{bcA}
	500	0.1627±0.0053^{bB}	0.1761±0.0088^{cdAB}	0.1782±0.0143^{bAB}	0.1737±0.0014^{bAB}	0.1797±0.0082^{cdAB}	0.1588±0.0189^{bcB}	0.1671±0.0130^{cdAB}	0.1868±0.0148^{bcA}
	600	0.1361±0.0118^{cD}	0.1686±0.0142^{dAB}	0.1761±0.0072^{bA}	0.1516±0.0104^{cBCD}	0.1660±0.0107^{dABC}	0.1436±0.0051^{cCD}	0.1507±0.0098^{dBCD}	0.1803±0.0252^{cA}
pH	2	0.2008±0.0134^{cA}	0.2259±0.0296^{bA}	0.2075±0.0288^{bA}	0.2118±0.0364^{cA}	0.2593±0.0326^{bA}	0.2100±0.0150^{cA}	0.1589±0.0237^{bA}	0.2249±0.0372^{cdA}
	3	0.2125±0.0259^{bcB}	0.2297±0.0124^{bB}	0.2213±0.0155^{bB}	0.3853±0.0450^{aA}	0.2902±0.0261^{abB}	0.2428±0.0353^{bcB}	0.2386±0.0321^{aB}	0.1973±0.0479^{dB}
	4	0.2381±0.0245^{abA}	0.2831±0.0112^{aA}	0.2376±0.0218^{abA}	0.3952±0.1039^{aA}	0.3068±0.0015^{abA}	0.2923±0.0112^{aA}	0.2520±0.0174^{aA}	0.3056±0.0101^{aA}
	5(对照)	0.2699±0.0205^{aB}	0.2642±0.0075^{aB}	0.2740±0.0563^{aAB}	0.3700±0.0180^{abA}	0.3194±0.0556^{aB}	0.2984±0.0211^{aAB}	0.2528±0.0574^{aB}	0.2938±0.0138^{abB}
	6	0.2540±0.0092^{aB}	0.2710±0.0091^{aAB}	0.2393±0.0165^{abAB}	0.3574±0.0225^{abA}	0.2773±0.0201^{abAB}	0.2542±0.0035^{bAB}	0.2598±0.0122^{aB}	0.2462±0.0160^{bcB}
	7	0.2423±0.0116^{abAB}	0.2605±0.0131^{aAB}	0.2116±0.0056^{bB}	0.2803±0.0211^{bcA}	0.2530±0.0161^{bAB}	0.2502±0.0134^{bAB}	0.2294±0.0135^{aAB}	0.2497±0.0153^{bcB}
	0(对照)	0.2482±0.0130^{aBC}	0.2926±0.0221^{aAB}	0.3283±0.0420^{aA}	0.2195±0.0215^{aC}	0.3301±0.0238^{aA}	0.3513±0.0862^{aA}	0.2869±0.0124^{aBC}	0.2566±0.0186^{aABC}
乙醇浓度(%vol)	4	0.1974±0.0045^{bC}	0.2124±0.0253^{bBC}	0.2198±0.0037^{bBC}	0.2082±0.0217^{abBC}	0.2319±0.0012^{bAB}	0.2303±0.1488^{bAB}	0.2253±0.0113^{bB}	0.2523±0.0091^{aA}
	8	0.1900±0.0149^{bC}	0.2114±0.0094^{bB}	0.2164±0.0110^{bB}	0.1919±0.0052^{abC}	0.2251±0.0051^{bB}	0.2135±0.1059^{bB}	0.2178±0.0043^{bB}	0.2440±0.0038^{abA}
	12	0.1883±0.0043^{bB}	0.2080±0.0312^{bAB}	0.2091±0.0289^{bAB}	0.1875±0.0057^{abB}	0.2240±0.0062^{bA}	0.2224±0.2523^{bAB}	0.2144±0.0095^{bAB}	0.2403±0.0037^{abA}
	16	0.1846±0.0105^{bC}	0.2187±0.0102^{bA}	0.2084±0.0069^{bAB}	0.1890±0.0229^{abBC}	0.2146±0.0120^{bA}	0.2169±0.1737^{bA}	0.2143±0.0081^{bA}	0.2320±0.0057^{bcA}
	20	0.1639±0.0118^{cC}	0.2092±0.0054^{bAB}	0.1972±0.0362^{bABC}	0.1767±0.0254^{bBC}	0.2131±0.0131^{bAB}	0.2112±0.1972^{bAB}	0.2111±0.0112^{bAB}	0.2212±0.0136^{cA}
	0(对照)	0.2482±0.0130^{hBC}	0.2926±0.0221^{gAB}	0.3283±0.0420^{eA}	0.2195±0.0215^{fC}	0.3301±0.0238^{hA}	0.3513±0.0862^{gA}	0.2869±0.0124^{eABC}	0.2566±0.0186^{fBC}
SO_2(mg/L)	100	0.9558±0.0310^{aABC}	1.0062±0.0205^{aA}	0.8968±0.0360^{aBCD}	0.8111±0.0677^{aDEF}	0.8809±0.0026^{aCDE}	0.9826±0.0755^{aAB}	0.7628±0.0342^{aF}	0.8004±0.0641^{aEF}
	200	0.7887±0.0103^{bB}	0.9126±0.0623^{bA}	0.8734±0.0190^{aA}	0.7731±0.0242^{aB}	0.8114±0.0200^{bB}	0.9205±0.0237^{abA}	0.7545±0.0090^{aB}	0.7964±0.0460^{aB}
	300	0.7742±0.0345^{bcB}	0.8690±0.0136^{bcA}	0.8587±0.0428^{abA}	0.7778±0.0333^{aB}	0.7863±0.0220^{bcB}	0.8468±0.0343^{bA}	0.7357±0.0583^{aB}	0.7803±0.0233^{aB}
	400	0.751±0.01518^{cBC}	0.7961±0.0488^{cdAB}	0.8184±0.0490^{bA}	0.7615±0.0153^{aABC}	0.7580±0.0192^{cABC}	0.7675±0.0536^{cABC}	0.7221±0.0256^{aC}	0.7584±0.0214^{aABC}
	500	0.6465±0.0385^{dCD}	0.7476±0.0094^{dAB}	0.6947±0.0322^{cBC}	0.6955±0.0586^{bBC}	0.6577±0.0291^{dCD}	0.7677±0.0191^{cA}	0.6276±0.0070^{bD}	0.6681±0.0418^{bCD}
	600	0.6467±0.0166^{dCD}	0.7282±0.0225^{dAB}	0.6932±0.0248^{cB}	0.5690±0.0158^{cF}	0.6507±0.0049^{dC}	0.7329±0.0059^{cdA}	0.6051±0.0304^{bcE}	0.6135±0.0268^{cDE}
	700	0.6123±0.0153^{dAB}	0.6045±0.1123^{eAB}	0.6488±0.0283^{cAB}	0.5667±0.0206^{cB}	0.5774±0.0529^{eAB}	0.6681±0.0243^{dA}	0.5674±0.0167^{cB}	0.6292±0.0124^{bcAB}
	800	0.5127±0.0184^{eBC}	0.5447±0.0259^{efAB}	0.5007±0.0340^{dBC}	0.4790±0.0298^{dC}	0.4900±0.0296^{fC}	0.5697±0.0049^{eA}	0.4372±0.0179^{dD}	0.5087±0.0187^{dBC}
	900	0.4647±0.0173^{fAB}	0.4881±0.0090^{fA}	0.4984±0.0140^{dA}	0.4256±0.0106^{eBC}	0.4858±0.0188^{fA}	0.4835±0.0527^{fA}	0.4014±0.0136^{dC}	0.4370±0.0215^{eBC}
	1000	0.4073±0.0076^{gD}	0.4787±0.0087^{fA}	0.4570±0.00415^{dAB}	0.4171±0.0207^{eCD}	0.4419±0.0187^{gBC}	0.4835±0.0336^{fA}	0.3985±0.0192^{dD}	0.4100±0.0114^{eCD}

注：小写字母代表同一菌株在不同条件梯度下的酶活(U)存在显著性差异(P<0.05)；大写字母代表8株菌株在同一条件下的酶活(U)存在显著性差异(P<0.05)。

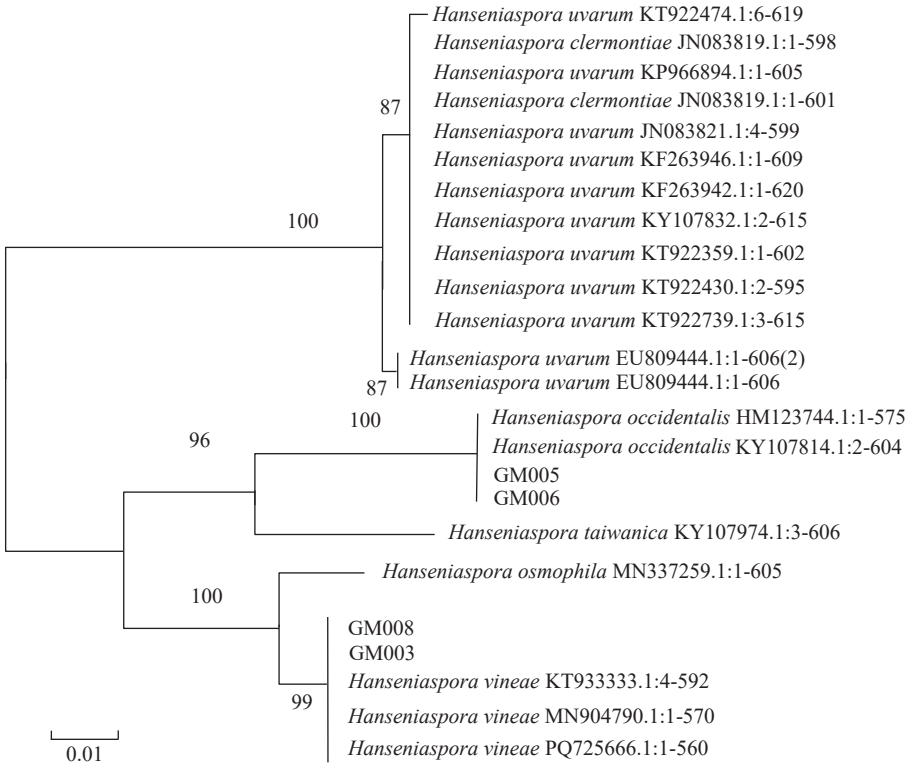


图 1　基于 26S rDNA 基因序列菌株 GM003、GM005、GM006 和 GM008 的系统发育树

Fig.1　Phylogenetic tree of strains GM003, GM005, GM006 and GM008 based on 26S rDNA gene sequences

GM008 均被鉴定为有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora*)，其中 GM003 和 GM008 属于葡萄园有孢汉逊酵母(*H. vineae*)，GM005 和 GM006 属于西方有孢汉逊酵母(*H. occidentalis*)。

2.4　模拟发酵生长动力学分析

图 2 展示了模拟发酵过程中 CO_2 累计失重变化，酿酒酵母纯种发酵需 11 d 完成发酵，除 GM003+Sc 实验组外，其余发酵组合均于 12 d 前完成发酵，而 GM003+Sc 于第 27 d 才完成发酵。由此可知，添加 *Hanseniaspora* 会延长发酵周期。与文献 [26-27] 报道的酿酒酵母与耐热克鲁维酵母(*Lachancea thermotolerans*)、美极梅奇酵母(*Metschnikowia* spp.)和星状芽孢杆菌(*Starmerella bacillaris*)混菌发酵可将发酵时间延长至 14 d 以上的结果一致，这种情况可能是由于非酿酒酵母的死亡和自溶为酿酒酵母带来了额外的营养来源[26−27]。对模拟发酵过程中各实验组和对照组中酵母菌群进行监测发现，在 GM003+Sc 实验组中，GM003 在发酵过程中一直处于主导地位，从发酵第 19 d 后才开始出现菌落数下降的现象，到发酵第 23 d 死亡并消失(图 3b)；GM005+Sc、GM006+Sc 实验组中的 *Hanseniaspora* 在发酵第 3~5 d，菌落数下降，第 6 d 彻底消失(图 3c~图 3d)；GM008+Sc 实验组中的非酿酒酵母从发酵第 3 d 开始菌落数下降，第 4 d 彻底消失(图 3e)。综上，GM003 在发酵体系中存活的时间明显长于其他菌株，这可能与 2.1 和 2.2 中 GM003 菌株酒精浓度耐受能力强于其余菌株有关。

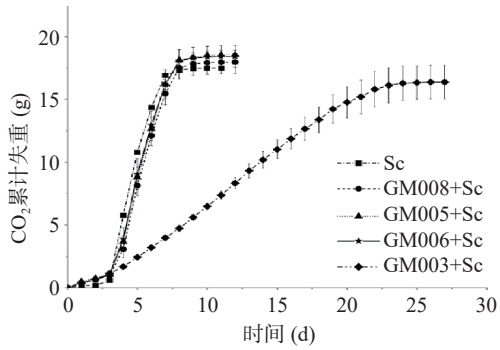


图 2　模拟发酵酒 CO_2 累计失重

Fig.2　Accumulated weight loss of CO_2 of simulated fermented wine

2.5　模拟发酵酒样理化指标分析

对模拟酒样的残糖量、酒精浓度、总酸含量与 pH 进行检测(表 5)。所有酒样的残糖量均小于 4 g/L，说明均发酵完全，其中 Sc 与 GM008+Sc 组的残糖量显著(P<0.05)高于其他组，GM005+Sc 的残糖含量最低，说明 GM003、GM005 和 GM006 参与发酵可提高发酵基质中糖的利用率。对酒精度分析发现，GM006+Sc、GM005+Sc 和 Sc 组酒精度较高，并且三者之间无显著差异，而 GM003+Sc 和 GM008+Sc 的酒精度显著低于(P<0.05)其他三组。结合残糖量综合分析可知，酿酒酵母的产酒精率较高，非酿酒酵母产酒精率较低，更多地将糖代谢生成其他副产物[8]。对酒样的总酸含量与 pH 进行分析发现，Sc、GM005+Sc、GM006+Sc 和 GM008+Sc 的总酸含量无显著性差异，但是 GM003+Sc 的总酸含量显著高于(P<0.05)其他实验组，pH 也最低。

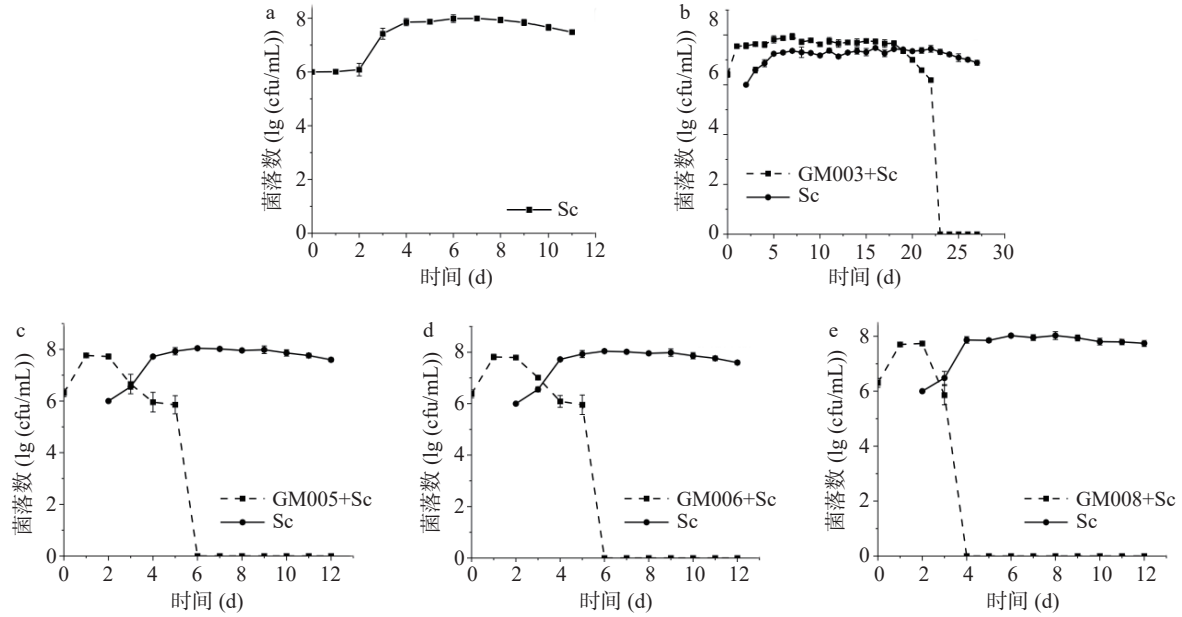


图 3 模拟发酵过程中菌群浓度监测

Fig.3 Monitoring of yeast concentration in simulated fermentation

注: a. 酿酒酵母纯种发酵; b. GM003+Sc 混菌发酵; c. GM005+Sc 混菌发酵; d. GM006+Sc 混菌发酵; e. GM008+Sc 混菌发酵。

表 5 模拟发酵酒样理化指标

Table 5 Physical and chemical indicators of simulated fermented wine samples

指标	Sc	GM003+Sc	GM005+Sc	GM006+Sc	GM008+Sc
残糖量(g/L)	2.83±0.29^{a}	1.67±0.58^{b}	0.40±0.17^{c}	1.83±0.29^{b}	2.87±0.32^{a}
酒精浓度(%vol)	10.91±0.45347^{a}	9.22±0.38^{b}	11.01±0.34^{a}	11.16±0.42^{a}	9.51±0.71^{b}
总酸(g/L)	10.31±0.34^{b}	15.2±0.94^{a}	9.93±0.10^{b}	9.84±0.11^{b}	10.24±0.038^{b}
pH	3.21±0.042^{ab}	3.01±0.025^{d}	3.18±0.015^{bc}	3.15±0.029^{c}	3.26±0.035^{a}

注: 不同字母表示不同组别之间理化指标存在显著性差异(P<0.05)。

2.6 模拟发酵酒样香气分析

为进一步探究 4 株 *Hanseniaspora* 参与混菌发酵对模拟葡萄酒发酵香气的影响, 采用 HS-SPME-GC-MS, 结合 NIST 谱库检索、保留指数对比以及标准品鉴定等手段, 对模拟发酵酒样中的挥发性香气化合物进行定性与半定量分析。对照组(Sc)检测到 28 种香气化合物, 包括 13 种酯类、6 种高级醇类、6 种脂肪酸类、1 种酮类和 2 种芳香族类, 而 *Hanseniaspora* 与酿酒酵母的混菌发酵组检测到的香气化合物种类均有 29 种以上, 明显多于对照组(图 4), 说明 *Hanseniaspora* 参与发酵可提高酒体的香气复杂性, 与前人结果一致, Testa 等[10] 发现接种 *Hanseniaspora guilliermondii* 与酿酒酵母混菌发酵会增加香气化合物浓度, 并通过感官分析验证了在持久性、柔和度、花香、果香等属性的增强, 赋予葡萄酒更丰富的香气轮廓。对比分析对照组与实验组模拟酒样中的香气化合物可知, 5 种酒样共有的香气物质是 16 种, 对照组(Sc)中独有的香气物质是 2 种, 分别是辛酸异丁酯和 3-乙氧基丙醇; GM008+Sc 实验组独有的香气物质是 3 种, 分别是辛酸 3-甲基丁酯、丙醇和庚醇; GM005+Sc 实验组独有的香气物质是戊酸; GM003+Sc 实验组独有的香气物质是 5 种, 分别是乙酸甘油酯、丁二酸二乙酯、2-甲基丁酸、苯甲醛与丁内酯(图 5); GM006+Sc 实验组没有独有的香气物质。

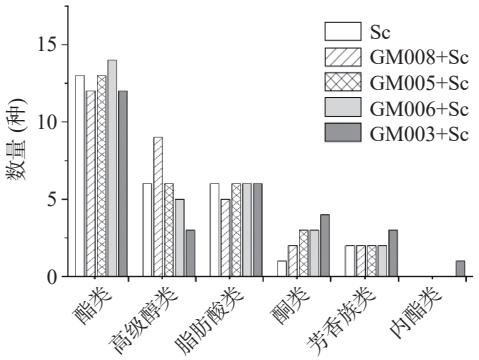


图 4 模拟酒样的香气成分种类柱状图

Fig.4 Bar chart of aroma compounds in simulated wine

模拟酒样香气物质的半定量结果如表 6 所示, GM003+Sc 实验组的香气物质总浓度最高, 显著高于(P<0.05)其他实验组与对照组(Sc), 说明缓慢的发酵过程可能有利于发酵体系中香气物质的产生和积累[29]。按照香气化合物种类分析可知, 酯类是葡萄酒中重要的香气化合物, 主要由醇类与酸类经酯化反应产生, 多呈现果香、花香、甜香等香气特征。所有实验组中酯类含量均高于对照组, 且 GM003+Sc 和 GM005+Sc 实验组中酯类物质的总含量显著突出

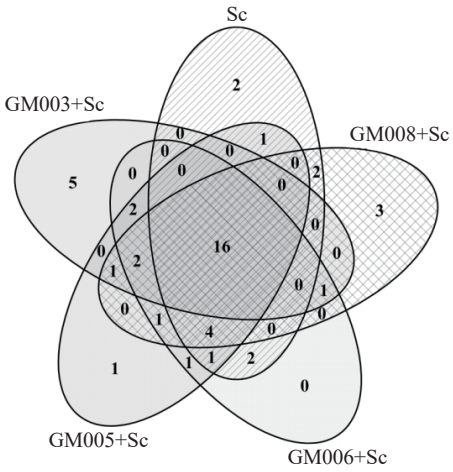


图 5　模拟酒样的香气成分韦恩图

Fig.5　Venn diagram of aroma compounds in simulated wine

(P<0.05)，其中乙酸乙酯仅在实验组中检测到且含量较高，可赋予酒样清新的甜香和果香香气。高级醇类化合物主要通过酵母代谢产生，也是酯类物质的前体物，通过氨基酸分解代谢（“Ehrlich”反应）、糖酵解和三羧酸循环的合成代谢途径（Harris 途径）产生，低浓度的高级醇含量可增加葡萄酒香气的复杂性[30]。结果表明，所有实验组高级醇类总浓度均低于对照组，且 GM008+Sc 实验组中高级醇含量最低，香气物质较为丰富。酸类物质能够增加葡萄酒中黄油、奶酪等风味特征，本实验中的实验组与对照组之间脂肪酸的含量均无显著性差异，但 GM003+Sc 实验组的乙酸和异丁酸含量显著高于(P<0.05)其他组，赋予酒样酸乳酪的香气特征。在所有组别中共检测到 3 种芳香族化合物，其中苯甲醛仅在 GM003+Sc 实验组中检测到，且 GM003+Sc 实验组中乙酸苯乙酯的含量显著高于(P<0.05)其他组，赋予酒样杏仁、甜香和玫瑰花香等香气特征。β-D-葡萄糖苷酶可以将芳香族化合物、单萜烯和 C13-降异戊二烯等糖苷结合态香气物质释放出来[12]，但由于这些化合物主要来自葡萄果皮中香气糖苷前体物质的水解[31]，而模拟葡萄汁不含有该前体物，所以未检测出萜烯类化合物。酮类主要产生于发酵和陈酿过程，可赋予葡萄酒优雅独特的香气[32]，乙偶姻可赋予酒样黄油的香气特征，且在 GM003+Sc 实验组含量显著高于(P<0.05)其他实验组。丁内酯仅在 GM003 中检测到，可为酒体贡献脂肪香气。*Hanseniaspora* 菌株赋予了葡萄酒更高浓度水平的酯类化合物，降低了高级醇类以及一些脂肪酸的含量，使得酒体香气更加协调，与前人研究结果基本一致[33−35]。酮类主要产生于发酵和陈酿过程，可赋予葡萄酒优雅独特的香气[32]。

依据模拟酒样香气物质的半定量结果进行聚类分析（图 6），分析发现对照组酒样具有较高浓度的 1-辛醇、1-壬醇、异戊醇等高级醇，以及乙酸异戊酯、乙酸异丁酯、壬酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸乙酯、月桂酸乙酯高级脂肪酸乙酯类物质。而 GM003+Sc 实验组中乙酸乙酯、L(-)-乳酸乙酯、丁二酸二乙酯等短链脂肪酸酯，苯甲醛、乙酸苯乙酯等芳香族化合物含量较高，而庚酸乙酯、辛酸乙酯、辛酸等碳链较长的化合物浓度则相对较低，与对照组和其他实验组中香气化合物差异显著，这可能与该发酵组较长的发酵时间与菌株独特的发酵生长规律等生长动力学特征有关。由此可知，GM003 参与混菌发酵可提高葡萄酒香气物质的种类和香气复杂性。GM008+Sc、GM006+Sc、GM005+Sc 3 个实验组之间香气物质种类和浓度相似度较高，差异性较小。

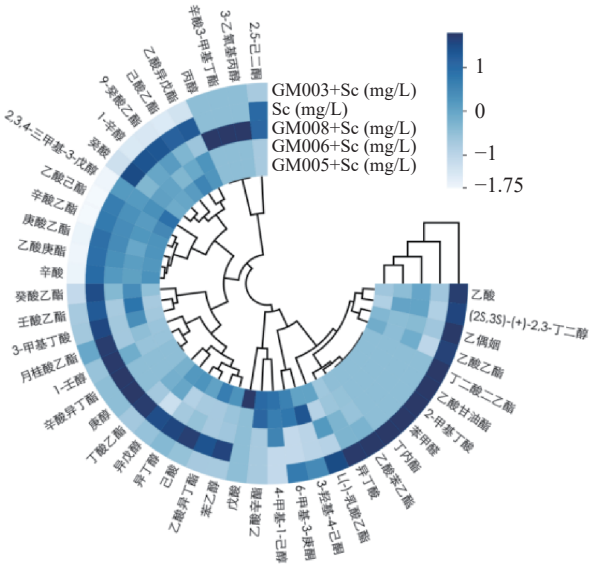


图 6　模拟酒样香气化合物聚类分析

Fig.6　Cluster analysis of aroma compounds in simulated wine samples

对实验组和对照组进行主成分分析（PCA），如图 7 所示，模拟酒样的累计方差为 72.1%，且 PC1 和 PC2 分别占总方差的 52.7% 和 19.4%。5 个发酵组模拟酒样分布在四个象限，Sc 对照组与 GM003+Sc 实验组分别单独位于第一象限和第二象限，通过香气化合物的分布可知，月桂酸乙酯、异丁醇、己酸、壬酸乙酯、乙酸异丁酯、9-癸酸乙酯、2,5-己二酮、庚醇、异丁醇、1-壬醇、异戊醇、苯乙醇、3-甲基丁酸、癸酸、乙酸异戊酯、己酸乙酯与 1-辛醇集中分布于第一象限，表明这些香气物质与 Sc 对照组的香气特征呈现高度正相关关系。其中酯类物质，如月桂酸乙酯、己酸乙酯等为酒体贡献出香蕉、花香等香气特征，赋予对照组典型的发酵香气，而较高浓度的高级醇，如庚醇、1-壬醇、异戊醇会带给酒体杂醇油味，使酒体香气品质下降[36]。乙酸乙酯、L(-)-乳酸乙酯、(2S,3S)-(+)-2,3-丁二醇、乙酸、乙偶姻、苯甲醛、丁内酯、乙酸甘油酯、2-甲基丁酸、乙酸苯乙酯、丁二酸二乙酯、异丁酸集中分布于第二象限，与 GM003+Sc 实验组香气特征呈现高度正相关关系。其中乙酸乙酯、乙酸苯乙酯、丁二酸二乙酯等赋予酒样菠萝的清爽果香香气和玫瑰的花香，乳酸乙酯、乙

表 6　模拟发酵酒香气化合物的定性、定量结果

Table 6　Qualitative results and quantitative analysis of aroma compounds in simulated fermented wine

序号	挥发性香气化合物	CAS	保留指数		定性方式	香气特征	定量结果（mg/L）				
			计算RI	RI_{ref}			Sc	GM008+Sc	GM006+Sc	GM005+Sc	GM003+Sc
1	乙酸乙酯	141-78-6	922	900	MS, RI, S	甜香、果香	–	5.99±0.70^{b}	3.89±0.46^{c}	6.057±0.73^{b}	18.32±1.050^{a}
2	乙酸异丁酯	110-19-0	1031	1020	MS, RI	甜香、香蕉	0.091±0.010^{a}	–	–	0.060±0.0042^{b}	–
3	丁酸乙酯	105-54-4	1053	1048	MS, RI, S	菠萝	0.16±0.029^{a}	–	0.19±0.056^{a}	0.18±0.018^{a}	–
4	乙酸异戊酯	123-92-2	1136	1132	MS, RI, S	香蕉、甜香	3.54±0.24^{a}	1.61±0.69^{c}	2.52±0.18^{b}	2.50±0.46^{b}	0.90±0.070^{c}
5	己酸乙酯	123-66-0	1245	1244	MS, RI, S	甜香、菠萝	1.011±0.097^{a}	0.69±0.22^{bc}	0.74±0.20^{ab}	0.88±0.082^{ab}	0.44±0.14^{c}
6	乙酸己酯	142-92-7	1283	1282	MS, RI, S	青苹果、香蕉	0.014±0.0024^{a}	0.012±0.00033^{ab}	0.011±0.0010^{b}	0.013±0.0010^{ab}	–
7	庚酸乙酯	106-30-9	1344	1329	MS, RI, S	菠萝	0.026±0.0043^{a}	0.023±0.0024^{ab}	0.020±0.0019^{b}	0.022±0.00075^{ab}	0.010±0.0037^{c}
8	L(-)-乳酸乙酯	687-47-8	1357	1356	MS, RI	奶香、果香	–	0.0088±0.00076^{b}	–	0.0075±0.0027^{b}	0.019±0.0040^{a}
9	乙酸庚酯	112-06-1	1384	1386	MS, RI, S	绿叶、杏	0.023±0.0048^{a}	0.018±0.0020^{b}	0.016±0.0029^{b}	0.017±0.0015^{b}	–
10	辛酸乙酯	106-32-1	1447	1446	MS, RI, S	果香、脂肪香	3.44±0.79^{a}	3.021±0.53^{a}	2.81±0.65^{a}	2.87±0.41^{a}	0.27±0.17^{b}
11	乙酸辛酯	112-14-1	1485	1483	MS, RI, S	花香、泥土、蘑菇	–	–	0.0066±0.00094^{a}	0.0063±0.0010^{a}	–
12	乙酸甘油酯	106-61-6	1516	–	MS	–	–	–	–	–	0.0050±0.00029
13	壬酸乙酯	123-29-5	1546	1531	MS, RI, S	果香、玫瑰	0.011±0.0036^{a}	–	0.0084±0.0013^{a}	–	–
14	辛酸异丁酯	5461-06-3	1561	1551	MS, RI, S	果香	0.0077±0.0029	–	–	–	–
15	癸酸乙酯	110-38-3	1649	1645	MS, RI, S	甜香、苹果香	0.99±0.36^{a}	0.42±0.11^{bc}	0.66±0.15^{b}	0.38±0.017^{bc}	0.19±0.071^{c}
16	辛酸3-甲基丁酯	2035-99-6	1667	1664	MS, RI, S	甜香、菠萝、椰子	–	0.0057±0.0062	–	–	–
17	丁二酸二乙酯	123-25-1	1690	1690	MS, RI	果香、苹果	–	–	–	–	0.0049±0.00083
18	9-癸酸乙酯	67233-91-4	1701	1703	MS, RI, S	果香、脂肪香	0.11±0.048^{a}	0.067±0.076^{ab}	0.050±0.034^{ab}	0.067±0.029^{ab}	0.011±0.0094^{b}
19	月桂酸乙酯	106-33-2	1853	1839	MS, RI, S	甜香、花香	0.10±0.029^{a}	0.024±0.015^{b}	0.031±0.019^{b}	0.027±0.018^{b}	0.044±0.011^{b}
	酯类化合物总含量						9.54±1.45^{c}	11.89±2.26^{bc}	10.95±1.59^{bc}	13.090±1.012^{b}	20.22±1.25^{a}
20	丙醇	71-23-8	1054	1037	MS, RI, S	醇香、略带果香	–	0.23±0.034	–	–	–
21	异丁醇	78-83-1	1103	1108	MS, RI, S	醇香	0.92±0.16^{a}	0.64±0.20^{a}	0.62±0.27^{a}	0.76±0.12^{a}	0.68±0.14^{a}
22	异戊醇	123-51-3	1217	1206	MS, RI, S	香蕉香、蜂蜜	4.78±0.74^{a}	2.085±0.20^{c}	3.26±0.29^{b}	3.51±0.64^{b}	2.74±0.65^{bc}
23	3-乙氧基丙醇	111-35-3	1387	1375	MS, RI	果香	0.034±0.0061	–	–	–	–
24	庚醇	111-70-6	1463	1463	MS, RI, S	绿叶	–	0.013±0.0067	–	–	–
25	4-甲基-1-己醇	818-49-5	1464	1445	MS, RI	汗味	–	0.020±0.0043^{a}	0.02122±0.00698^{a}	0.024±0.0030^{a}	–
26	(2S,3S)-(+)-2,3-丁二醇	19132-06-0	1553	1548	MS, RI	–	–	0.0099±0.0018^{b}	0.009854±0.000695^{b}	–	0.028±0.0067^{a}

续表 6

序号	挥发性香气化合物	CAS	保留指数		定性方式	香气特征	定量结果(mg/L)				
			计算RI	RI_{ref}			Sc	GM008+Sc	GM006+Sc	GM005+Sc	GM003+Sc
27	2,3,4-三甲基-3-戊醇	3054-92-0	1557	–	MS	果香	0.016±0.0024^{a}	0.016±0.0056^{a}	0.01743±0.00756^{a}	0.022±0.0029^{a}	–
28	1-辛醇	111-87-5	1566	1558	MS, RI, S	柑橘、香草	0.030±0.0053^{a}	0.015±0.0013^{b}	0.01558±0.00256^{b}	0.015±0.0032^{b}	–
29	1-壬醇	143-08-8	1668	1643	MS, RI	花香、玫瑰	0.042±0.012^{a}	0.0078±0.0031^{b}	–	–	–
	高级醇类化合物总含量						5.82±0.92^{a}	3.034±0.36^{c}	3.95±0.57^{bc}	4.33±0.76^{b}	3.45±0.79^{bc}
30	乙酸	64-19-7	1471	1427	MS, RI, S	刺鼻酸味	0.21±0.028^{b}	0.30±0.082^{b}	0.24±0.027^{b}	0.21±0.046^{b}	0.54±0.063^{a}
31	异丁酸	79-31-2	1585	1544	MS, RI, S	酸乳酪	0.011±0.0018^{b}	0.011±0.0017^{b}	0.0077±0.0018^{b}	0.0072±0.00056^{b}	0.032±0.0056^{a}
32	3-甲基丁酸	503-74-2	1687	1644	MS, RI	酸臭	0.013±0.0062^{a}	–	0.0062±0.0022^{b}	–	–
33	戊酸	109-52-4	1687	1686	MS, RI, S	腐烂味道	–	–	–	0.0076±0.00093^{a}	–
34	2-甲基丁酸	116-53-0	1688	1665	MS, RI, S	乳酪、果香	–	–	–	–	0.013±0.0042
35	己酸	142-62-1	1863	1863	MS, RI, S	青苹果香	0.085±0.010^{a}	0.062±0.019^{a}	0.060±0.019^{a}	0.068±0.0051^{a}	0.062±0.016^{a}
36	辛酸	124-07-2	2077	2060	MS, RI, S	脂肪香	0.28±0.046^{a}	0.21±0.069^{a}	0.20±0.081^{a}	0.22±0.042^{a}	0.045±0.028^{b}
37	癸酸	334-48-5	2289	2265	MS, RI, S	脂肪香	0.064±0.018^{a}	0.032±0.022^{ab}	0.039±0.022^{ab}	0.036±0.017^{ab}	0.016±0.002^{b}
	脂肪酸类化合物总含量						0.66±0.10^{ab}	0.62±0.058^{ab}	0.55±0.10^{ab}	0.54±0.061^{b}	0.71±0.10^{a}
38	2,5-己二酮	110-13-4	1267	–	MS, S	–	0.0053±0.00016^{a}	0.0055±0.000201^{a}	–	–	–
39	6-甲基-3-庚酮	624-42-0	1267	1262	MS, RI	–	–	–	0.0056±0.00012^{a}	0.0051±0.00018^{b}	0.0054±0.00035^{ab}
40	乙偶姻	513-86-0	1305	1303	MS, RI, S	黄油味	–	0.0079±0.00254^{b}	0.0069±0.0013^{b}	0.010±0.0017^{b}	0.074±0.014^{a}
41	3-羟基-4-己酮	4984-85-4	1387	–	MS	–	–	–	0.0098±0.011^{a}	0.0042±0.0022^{ab}	0.0060±0.0019^{ab}
	酮类化合物总含量						0.0053±0.00016^{c}	0.013±0.0025^{bc}	0.022±0.011^{b}	0.019±0.0027^{b}	0.085±0.013^{a}
42	苯甲醛	100-52-7	1546	1530	MS, RI, S	杏仁	–	–	–	–	0.042±0.032
43	乙酸苯乙酯	103-45-7	1837	1827	MS, RI, S	甜香、玫瑰、蜂蜜、果香	0.282±0.028^{b}	0.16±0.054^{b}	0.17±0.068^{b}	0.20±0.036^{b}	1.12±0.19^{a}
44	苯乙醇	60-12-8	1935	1905	MS, RI, S	玫瑰、甜香、蜂蜜	0.95±0.12^{a}	0.64±0.23^{b}	0.65±0.13^{b}	0.77±0.09^{ab}	0.63±0.14^{b}
	芳香族类化合物总含量						1.23±0.15^{b}	0.80±0.28^{c}	0.82±0.20^{c}	0.97±0.13^{bc}	1.80±0.19^{a}
45	丁内酯	96-48-0	1658	1635	MS, RI	脂肪	–	–	–	–	0.0055±0.0017
	内酯类化合物总含量						–	–	–	–	0.0055±0.0017^{a}
	总含量						17.26±2.59^{b}	16.36±2.92^{b}	16.29±2.43^{b}	18.96±1.83^{b}	26.27±2.086^{a}

注：R_{Iref}表示文献中报道的相同型号规格色谱柱的保留指数，该列数据全部来源于 https://www.nist.gov/；定性方式中，MS表示采用NIST 20质谱库定性，匹配度≥500；RI表示保留指数定性；S表示采用标准品定性；香气特征来源于参考文献[25,28]和http://www.perflavory.com/；挥发性化合物分类总含量加粗显示；“–”表示无数据；同行不同字母代表差异显著（P<0.05）。

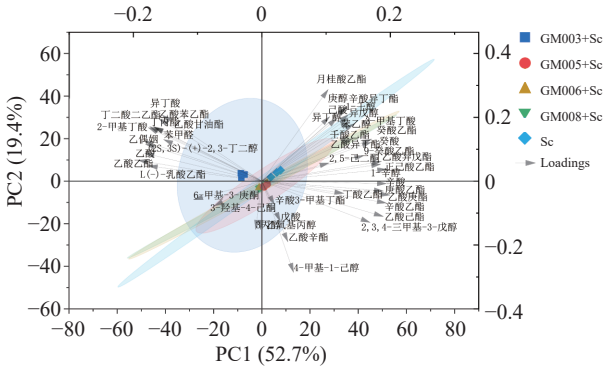


图 7　模拟酒样香气化合物主成分分析

Fig.7　Principal component analysis of aroma compounds in simulated wine samples

偶姻、2-甲基丁酸、异丁酸等物质为酒样提供酸乳酪、奶香、甜香等香气特征。而 GM006+Sc、GM005+Sc、GM008+Sc 实验组混合分布于 PC2 的负半轴，由此可知 GM006+Sc、GM005+Sc、GM008+Sc 实验组具有一定的相似性，但仍与 Sc 对照组明显不同。由此分析可知，4 株 *Hanseniaspora* 参与混菌发酵的实验组与酿酒酵母单菌发酵的对照组明显不同，且 GM003+Sc 实验组最为独特，为挖掘独具特色的本土非酿酒酵母奠定了基础。

3　结论

本研究从我国贺兰山东麓产区筛选获得 4 株高产 *β*-D-葡萄糖苷酶且在葡萄酒酿造所需温度、葡萄糖浓度、pH、乙醇浓度、二氧化硫浓度条件下活性良好的 *Hanseniaspora* 菌株。与酿酒酵母进行模拟葡萄汁的混菌发酵实验，以酿酒酵母纯种发酵为对照组，结果显示，*Hanseniaspora* 参与混菌发酵显著延长发酵周期，其中 GM003+Sc 实验组发酵周期最长，为 27 d，并且 GM003 成为优势菌。对模拟酒样中香气物质的种类、含量进行检测结合 PCA 分析可知，对照组与 4 个混菌发酵实验组的差异较大，说明 *Hanseniaspora* 可显著改变葡萄酒的香气物质组成。GM008+Sc、GM006+Sc、GM005+Sc 实验组香气化合物种类与浓度差异性较小，相似度较高；GM003+Sc 实验组中乙酸乙酯、乙酸苯乙酯等酯类，乙偶姻等酮类与芳香族类化合物浓度显著高于对照组及其他实验组。本试验筛选得到的 4 株高产 *β*-D-葡萄糖苷酶的本土非酿酒酵母 GM003、GM005、GM006、GM008 均具有参与葡萄酒酿造的性能，且 GM003 菌株可显著提高酯类、酮类、芳香族类香气物质的含量，具有提高葡萄酒香气强度和丰富度的潜力，丰富了国内产区本土非酿酒酵母微生物资源。后续可通过葡萄酒发酵实验进一步验证 GM003、GM005、GM006、GM008菌株的产香特性，并结合中试或工业化生产探索菌株的生产价值和商业化价值。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 张春芝, 江志国. 微生物对葡萄酒香气的影响综述[J]. 中国酿造, 2013, 32(9): 28−31. [ZHANG Chunzhi, JIANG Zhiguo. Review of microbial effects on wine aroma[J]. China Brewing, 2013, 32(9): 28−31.]

[2] 王栋, 梁进忠, 刘玉杰, 等. 葡萄酒酿酒酵母选育与非酿酒酵母混菌发酵研究进展[J]. 酿酒科技, 2023(10): 89−96. [WANG Dong, LIANG Jinzhong, LIU Yujie, et al. Research progress in breeding of *Saccharomyces cerevisiae* and mixed fermentation with non-*Saccharomyces* yeasts[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2023(10): 89−96.]

[3] 卜光明, 周化斌, 周茂洪, 等. 酿造酒中非酿酒酵母的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 346−352. [BU Guangming, ZHOU Huabin, ZHOU Maohong, et al. Research progress on the non-*Saccharomyces* in the brewing wine fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 346−352.]

[4] CIANI M, MACCARELLI F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 14(2): 199−203.

[5] 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.

[6] ZHANG Boqin, TANG Chong, YANG Dongqing, et al. Effects of three indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and their pairwise combinations in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* on volatile compounds of Petit Manseng wines[J]. Food Chemistry, 2022, 368: 130807.

[7] LI Linbo, YUAN Chenyang, ZHANG Lei, et al. The impact of simultaneous inoculation with *Torulaspora delbrueckii* and *Hanseniaspora uvarum* combined with *Saccharomyces cerevisiae* on chemical and sensory quality of Sauvignon Blanc wines[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1413650.

[8] KONG Cailin, LI Aihua, SU Jun, et al. Flavor modification of dry red wine from Chinese spine grape by mixed fermentation with *Pichia fermentans* and *S. cerevisiae*[J]. LWT, 2019, 109: 83−92.

[9] PARKER M, CAPONE D L, FRANCIS I L, et al. Aroma precursors in grapes and wine: Flavor release during wine production and consumption[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(10): 2281−2286.

[10] TESTA B, LOMBARDI S J, IORIZZO M, et al. Use of strain *Hanseniaspora guilliermondii* BF1 for winemaking process of white grapes *Vitis vinifera* cv Fiano[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(3): 549−561.

[11] HASLBECK K, JEREBIC S, ZARNKOW M. Characterization of the unfertilized and fertilized hop varieties progress and jallertauer tradition – analysis of free and glycosidic-bound flavor compounds and *β*-Glucosidase activity[J]. Brewing Science, 2017(70): 148-158.

[12] 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研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 306−314. [QIN Qiuxing, HAN Xiaoyu, HUANG Weidong, et al. Progress in the application of *β*-glucosidase produced by non-*Saccharomyces cerevisiae* yeasts in beer and wine[J]. Food Science, 2022, 43(3): 306−314.]

[13] 中国轻工业联合会. 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, 2006. ［China National Light Industry Council. GB/T 15038-2006 Analytical methods of wine and fruit wine[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006.］
［14］ 国家市场监督管理总局. GB 5009.225-2023 食品安全国家标准 酒和食用酒精中乙醇浓度的测定[S]. 北京：中国标准出版社, 2023. ［State Administration for Maket Regulation. GB 5009.225-2023 National food safety standard Determination of Ethanol concentration in alcoholic beverages and edible alcohol[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.］
［15］ LAN Yibin, QIAN Xu, YANG Zhongjun, et al. Striking changes in volatile profiles at sub-zero temperatures during over-ripening of ‘Beibinghong’ grapes in Northeastern China[J]. Food Chemistry, 2016, 212: 172−182.
［16］ 冯文倩, 王倩, 刘延琳, 等. 低产乙醇本土有孢汉逊酵母的筛选及酿造特性[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(21): 9−17. ［FENG Wenqian, WANG Qian, LIU Yanlin, et al. Screening and oenological properties of *Hanseniaspora strains* with low ethanol yield[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(21): 9−17.］
［17］ 王映璐. 环渤海地区酿酒酵母的优选及发酵性能研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学, 2021. ［WANG Yinglu. Studies on optimization and fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* from circum-Bohai Sea region[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.］
［18］ 董琦楠, 叶冬青, 梁艳英, 等. 高产酸本土非酿酒酵母菌株的筛选及发酵性能研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(8): 70−75. ［DONG Qinan, YE Dongqing, LIANG Yanying, et al. Screening and fermentation performance of native non-*Saccharomyces cerevisiae* with high lactic acid production[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 70−75.］
［19］ 姚红红, 任学梅, 严幻汝, 等. 甘肃河西走廊葡萄酒产区高产糖苷酶非酿酒酵母菌株筛选及其酿酒适应性分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(16): 49−58. ［YAO Honghong, REN Xuemei, YAN Huanru, et al. Screening of non-*Saccharomyces* yeasts endowed with high glucosidase activity and their adaptability to wine biotope in Hexi Corridor of Gansu Province[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(16): 49−58.］
［20］ 马延琴, 徐晓裕, 李甜, 等. 酿酒葡萄表皮产酶非酿酒酵母的筛选及其产酶特性研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(12): 149−154. ［MA Yanqin, XU Xiaoyu, LI Tian, et al. Screening of non-*Saccharomyces cerevisiae* from wine grape epidermis and its enzyme-producing ability[J]. China Brewing, 2021, 40(12): 149−154.］
［21］ 董书甲, 任辉, 刘露, 等. 葡萄酒酿造中常用辅料及应用研究[J]. 安徽农业科学, 2024, 52(22): 1−7,19. ［DONG Shujia, REN Hui, LIU Lu, et al. Research on common auxiliary materials and their applications in wine making[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2024, 52(22): 1−7,19.］
［22］ 陈益萱, 翟金玲. 哈密瓜野生型戴尔有孢圆酵母的筛选及鉴定[J/OL]. 热带生物学报, 1−11[2026-04-08]. https://doi. org/10.15886/j.cnki.rdswxb.20240161. ［CHEN Y X, ZHAI J L. Screening and characterization of wild type yeast *Torulaspora delbrueckii* from Cantaloupe[J/OL]. Journal of Tropical Biology, 1−11[2026-04-08]. https://doi.org/10.15886/j.cnki.rdswxb.20240161.］
［23］ 张媛媛, 苏敏, 朴春红, 等. 微生物来源的 β-葡萄糖苷酶在食品工业中应用进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 329−335. ［ZHANG Yuanyuan, SU Min, PIAO Chunhong, et al. Progress on the β-glucosidase from microganisms and its applications in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(16): 329−335.］
［24］ 高娉娉, 朱亚同, 刘宇, 等. 高产酸性 β-葡萄糖苷酶的优良本土酵母菌株筛选、鉴定及酶学性质分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(12): 30−36. ［GAO Pingping, ZHU Yatong, LIU Yu, et al. Selection, identification and enzymatic property analysis of excellent native yeast strains with high acidic β-glucosidase productivity[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(12): 30−36.］
［25］ 周迪, 卢玲, 王岚. 贺兰山东麓产区非酿酒酵母筛选及发酵特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(1): 72−80. ［ZHOU Di, LU Ling, WANG Lan. Screening and fermentation characteristics of non-*Saccharomyces* yeasts from eastern foot of Helan Mountain[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(1): 72−80.］
［26］ BINATI R L, LEMOS W J F J, LUZZINI G, et al. Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea* thermotolerans, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 318: 108470.
［27］ BOWEN A J, REYNOLDS A G. Odor potency of aroma compounds in Riesling and vidal Blanc table wines and icewines by gas chromatography–olfactometry–mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(11): 2874−2883.
［28］ ［ENGLEZOS V, POLLON M, RANTSIOU K, et al. *Saccharomyces cerevisiae-Starmerella bacillaris* strains interaction modulates chemical and volatile profile in red wine mixed fermentations[J]. Food Research International, 2019, 122: 392−401.
［29］ MASSERA A, ASSOF M, SARI S, et al. Effect of low temperature fermentation on the yeast-derived volatile aroma composition and sensory profile in Merlot wines[J]. LWT, 2021, 142: 111069.
［30］ 赵海霞, 王晓蕾, 张琇. 贺兰山东麓鲜食葡萄优良本土酿酒酵母的筛选和发酵特性研究[J]. 中国酿造, 2025, 44(1): 73−79. ［ZHAO Haixia, WANG Xiaolei, ZHANG Xiu. Screening and fermentation characteristics of superior indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from table grapes in the eastern foothills of Helan Mountain[J]. China Brewing, 2025, 44(1): 73−79.］
［31］ 李玥玥, 王燕荣. 非酿酒酵母对葡萄酒品质影响研究进展[J]. 农产品加工, 2024(19): 85−88,93. ［LI Yueyue, WANG Yanrong. Research progress on the effect of non-*Saccharomyces cerevisiae* on wine quality[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2024(19): 85−88,93.］
［32］ 刘霞, 朱涛涛, 贾玉莹, 等. 河西走廊产区赤霞珠干红葡萄酒陈酿过程香气特征分析[J]. 中国酿造, 2024, 43(8): 106−114. ［LIU Xia, ZHU Taotao, JIA Yuying, et al. Analysis on aroma characteristics of Cabernet Sauvignon dry red wine in Hexi Corridor during ageing[J]. China Brewing, 2024, 43(8): 106−114.］
［33］ del FRESNO J M, LOIRA I, ESCOTT C, et al. Application of *Hanseniaspora vineae* yeast in the production of rosé wines from a blend of tempranillo and albillo grapes[J]. Fermentation, 2021, 7(3): 141.
［34］ VALERA M J, OLIVERA V, BOIDO E, et al. Wine aroma characterization of the two main fermentation yeast species of the apiculate genus *Hanseniaspora*[J]. Fermentation, 2021, 7(3): 162.
［35］ CAMELEYRE M, LYTRA G, TEMPERE S, et al. Olfactory impact of higher alcohols on red wine fruity ester aroma expression in model solution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(44): 9777−9788.