

doi: 10.6041/j.issn.1000-1298.2024.02.035

ORP 阶段性控制提高葡萄酒中链脂肪酸乙酯和高级醇含量研究

靳国杰^{1,2} 王馨茹¹ 瞿嘉宁¹ 何双¹ 陈小敏¹ 张瑞霞¹ 杨华峰³

(1. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学宁夏贺兰山东麓葡萄酒试验示范站, 永宁 740104;

3. 新疆乡都酒业有限公司, 焉耆 841100)

摘要: 氧化还原电位(Oxidation-reduction potential, ORP)反映了发酵系统的氧化还原状态,与酵母代谢以及香气化合物合成密切相关,其水平在各酒精发酵阶段存在差异。为了实现 ORP 在不同发酵阶段的科学控制,通过气相色谱-质谱(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和感官量化分析法在葡萄酒酒精发酵的不同阶段控制不同水平的 ORP,观察酵母生长、香气化合物合成以及感官品质的变化。结果表明,在 0~48 h 阶段 ORP 的变化对酵母活菌数和香气化合物含量的影响远高于其他阶段。提高此阶段 ORP 有利于酵母生长和糖消耗,而较低 ORP 有利于香气化合物合成。与对照相比,0 mV(0~48 h)-自然条件(48~96 h)-自然条件(96 h 至发酵结束)处理组可显著提高中链脂肪酸乙酯中的己酸乙酯、癸酸乙酯含量;0 mV-0 mV-60 mV 处理组可显著提高乙酸酯含量;60 mV-0 mV-60 mV 处理组可显著提高高级醇含量。0 mV-自然条件-自然条件处理增强了赤霞珠葡萄酒中红色水果香气和爱格丽葡萄酒花果类香气,并减弱了爱格丽葡萄酒的动物类气味。ORP 的阶段性控制为葡萄酒发酵过程的精准调控提供了依据,为提高葡萄酒香气化合物含量以改善葡萄酒的香气质量提供了基础。

关键词: 葡萄酒; 氧化还原电位; 阶段性控制; 酒精发酵; 香气化合物

中图分类号: TS262.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-1298(2024)02-0353-10

OSID:



Increasing Medium-chain Fatty Acid Ethyl Esters and Higher Alcohols in Wine with Phased Control of Oxidation-reduction Potential

JIN Guojie^{1,2} WANG Xinru¹ QU Jianing¹ HE Shuang¹ CHEN Xiaomin¹ ZHANG Ruixia¹ YANG Huafeng³

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

2. Ningxia Helan Mountain's East Foothill Wine Experiment and Demonstration Station,

Northwest A&F University, Yongning 740104, China

3. Xinjiang Xiangdu Winery Co., Ltd., Yanqi 841100, China)

Abstract: The oxidation-reduction potential (ORP) reflects the oxidation-reduction state of the fermentation system, which is closely related to yeast metabolism and aroma compound synthesis, and the ORP level varies during each phase of alcohol fermentation. In order to realize the effective control of ORP in different fermentation phases, different levels of ORP were controlled during different phases of wine alcohol fermentation, and the effects on yeast growth, aroma compound synthesis and sensory quality were observed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and sensory quantitative analysis. Results showed that during 0~48 h, the number of viable yeast and the content of aroma compounds in yeast were greatly affected by the change of ORP than other fermentation phases. Increasing ORP at this phase was beneficial to yeast growth and sugar consumption, while reducing ORP was beneficial to the synthesis of aroma compounds. Compared with the control, at the level of 0 mV (0~48 h)-natural conditions (48~96 h)-natural conditions (96 h to the end of fermentation), the contents of ethyl hexanoate and ethyl decanoate can be significantly increased. The content of acetates

收稿日期: 2023-11-13 修回日期: 2023-12-16

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2023-JC-YB-145)、国家自然科学基金项目(31801528)、新疆维吾尔自治区重大科技专项(2022A02002-4)、陕西省科技创新团队项目(2023-CX-TD-59)和新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2020B01005-2)

作者简介: 靳国杰(1983-),男,副教授,主要从事葡萄酒微生物与风味研究, E-mail: jingj@nwsuaf.edu.cn

can be significantly increased at the level of 0 mV - 0 mV - 60 mV , and the content of higher alcohols can be significantly increased at the level of 60 mV - 0 mV - 60 mV. The treatment of 0 mV - natural conditions - natural conditions enhanced the aroma of red fruits in Cabernet Sauvignon wine and the fragrance of flowers and fruits in Ecolly wine , while weakened the odor of animals in Ecolly wine. The phased control of ORP provided a basis for the precise regulation of wine fermentation , and laid a foundation for improving the aroma quality of wine by increasing the content of aroma compounds in wine.

Key words: wine; ORP; phased control; alcohol fermentation; aroma compounds

0 引言

葡萄酒挥发性香气化合物与葡萄酒的风味特征和典型性密切相关,对葡萄酒的风格和质量起着重要的作用^[1]。根据其来源,可分为3类:品种香气化合物、发酵香气化合物和陈酿香气化合物。发酵香气化合物主要来自于葡萄酒发酵过程,包括酯、醇、酸、醛、酮等挥发性次级代谢产物^[2]。其性质和数量与多种因素有关,例如葡萄汁的氮含量、发酵温度和酵母菌株等^[3-5]。

氧化还原电位(Oxidation-reduction potential, ORP)反映参与细胞内代谢的整体电子转移和氧化还原平衡,是决定介质氧化或还原性质的物理化学参数之一^[6]。ORP可以在细胞外环境中检测到,并可以作为细胞间代谢净结果的指标^[7]。ORP不仅代表发酵系统的氧化还原状态,还影响微生物的生长和代谢产物的合成^[8]。与自然 ORP (*Pichia fermentans*(Pf) 与 *Saccharomyces cerevisiae* 共发酵中为 -150 ~ -105 mV, *Hanseniaspora uvarum* (Hu) 与 *S. cerevisiae* 共发酵中为 -141 ~ -107 mV) 相比,当 ORP 为 -100 mV 或 -50 mV 时, Pf 和 Hu 在各自的通气混合发酵中存活时间少 1 d^[9]。研究表明,改变发酵过程中的氧化还原状态可提高目标产物的产率,并且控制微生物所在环境的 ORP 可以间接影响生物细胞内氧化还原平衡^[10]。与自然 ORP 相比,在甜高粱汁(总糖质量浓度 300 g/L) 超高重力发酵过程中控制 ORP 为 -150 mV 时乙醇浓度和乙醇产率分别提高了 17% 和 31%^[11]。在 -400 ~ -200 mV 范围内, -400 mV 是重组大肠杆菌发酵生产琥珀酸的最优 ORP,此时琥珀酸质量浓度(28.6 g/L) 和琥珀酸产率(0.33 g/(L·h)) 都最高^[12]。在葡萄酒发酵香气化合物合成过程中涉及一系列氧化还原反应,这些反应受细胞内氧化还原状态和细胞外环境的影响^[13]。近年来,ORP 在提高葡萄酒香气化合物含量方面受到了广泛的关注。已经证明,将合成葡萄汁的 ORP 控制在 0 mV 时,中链脂肪酸乙酯含量可达到最高水平^[8]。

在发酵的不同阶段,ORP 水平不同。自然状态下 ORP 从初始发酵时的 150 mV 呈快速下降趋

势,然后保持在 -120 mV 左右接近稳定的水平,发酵至 5 d 时 ORP 开始缓慢上升^[9]。然而,自然状态下各阶段的 ORP 水平不一定是香气化合物合成量最高的水平。控制各阶段 ORP 水平可以改变酵母细胞代谢流的方向,进而影响香气化合物的生成。以前的研究仅限于将 ORP 全程控制在一个恒定的水平来分析其对香气化合物的影响,目前还没有人进行 ORP 阶段性控制对葡萄酒香气化合物影响的研究。

本文研究整个发酵阶段的前、中、后 3 个时期,发酵液的 ORP 处于 0、60 mV 或自然条件(Natural conditions, NC) 时,不同阶段不同 ORP 水平组合对酵母生长和香气化合物分布的影响,以期建立科学的 ORP 控制策略提供基础。在合成葡萄汁的研究基础上,选择最适 ORP 组合并应用在真实葡萄酒酿造中。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

爱格丽和赤霞珠葡萄于 2021 年 8 月采自新疆鄯善楼兰酒庄,卫生状况良好。爱格丽:还原糖质量浓度 126.5 g/L,总酸质量浓度 3.96 g/L(酒石酸计);赤霞珠:还原糖质量浓度 255.6 g/L,总酸质量浓度 5.4 g/L(酒石酸计)。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Actiflore F5 购自法国 Lafford 公司。

葡萄糖、果糖、蛋白胨、酵母浸粉、琼脂、氢氧化钠、过氧化氢(均为分析纯)购于天津北辰方正试剂厂;乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸异丁酯、乙酸苯乙酯、丁酸乙酯、月桂酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、异丁醇、异戊醇、1-辛醇、里哪醇、 β -大马酮、苯甲醇、苯乙醇等(均为色谱纯,纯度 97% 以上)购于美国 Sigma - Aldrich 公司。

1.1.2 试验设备

固相微萃取(Solid-phase microextraction, SPME)装置配有 57330 - U 型联用手柄、DVB/CAR/PDMS 型萃取纤维(50/30 μ m, 2 cm),美国 Supelco 公司;QP2020 型气相色谱-质谱联用仪,日本岛津公司;DB - WAX 型毛细管柱(60 m \times 0.25 mm,

0.25 μm)、Cary-60UV-vis 型紫外-可见分光光度计,美国安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 接种方法与发酵策略

将酿酒酵母 F5 按 5% 的接种比例接种于 YPD 培养基(酵母浸出粉胨葡萄糖培养基)中,于 28℃ 静置活化 48 h。随后,将活化液按 5% 的接种比例接种于 YPD 液体培养基中,于 28℃、180 r/min 扩培 48 h。合成葡萄汁配方参考文献[14]。

合成葡萄汁发酵:将扩培液按照 5×10^6 个/mL 的接种量添加至 1.2 L 合成葡萄汁中,在装有合成葡萄汁的广口瓶上方插入发酵栓、氧化还原电极、取样阀,并置于恒温摇床上,于 22℃、90 r/min 下培养。完成接种后,每隔 12 h 对发酵中的合成汁取样并测量指标。本实验对 ORP 控制分 3 个阶段,依次为 0~48 h、48~96 h、96 h 至发酵结束,并且设定的 ORP 分别为 0、60 mV 和 NC(自然条件 ORP)。不添加氧化剂(H_2O_2)的为空白对照组。共有 27 种发酵策略,每一酿造处理重复 2 次。处理编号命名规则示例:60-0-NC 表示 3 个阶段分别处于 60、0 mV 和自然 ORP 条件。

真实葡萄汁发酵:赤霞珠和爱格丽葡萄酒的酿造均在新疆鄯善楼兰酒庄进行。葡萄经除梗破碎后送入 3 000 L 发酵罐,加入 60 mg/L SO_2 ,冷浸渍 24 h 后,收集自流汁和一次压榨汁并混合,接种酿酒酵母启动发酵。不进行 ORP 调控的发酵作为对照组。酒样保藏在 4℃ 环境下自然澄清,翌年 3 月进行分析。

1.2.2 氧化还原电位检测与控制

发酵罐装有 ORP 电极(501 型,上海雷磁股份有限公司),用于细胞外 ORP 测量。在合成葡萄汁发酵过程中每间隔 10 min 测定 ORP,直至发酵完成。当测量的 ORP 水平低于设定值时,通过向发酵罐中补充过滤灭菌的 H_2O_2 进行 ORP 控制^[8](0 mV 和 60 mV)。由于真实葡萄汁发酵周期较长,每 1 h 测定 ORP。当 ORP 水平低于设定值时,通过开放式循环进行 ORP 控制,待比重降至 1.052 时,停止操作。

1.2.3 葡萄酒理化分析

参考文献[15]的试验方法进行还原糖、总酸和挥发酸质量浓度等基本理化指标的检测。采用酶标仪法^[16]测定乙醇体积分数。使用 Wallerstein(WL)营养琼脂培养基监测酵母菌生物量的演化。

1.2.4 挥发性香气分析

使用顶空-固相微萃取/气相色谱-质谱(HS-SPME/GC-MS)分析挥发性香气化合物,如文

献[17]所述,并做了一些修改。通过将保留时间和质谱与 Wiley 谱库及质谱自带的 NIST 谱库物质进行比较来鉴定芳香化合物;使用内标-标准曲线方法进行定量分析。

1.2.5 感官分析

葡萄酒由专门小组成员(8 名女性和 7 名男性)进行分析,这些小组成员经过 30 d 的葡萄酒标准香气物质闻香训练,接受 54 种香气的套件培训,当小组成员对香气的识别度达到 95% 及以上时方可进行感官分析。感官分析时,样品被随机编号,将酒样倒入黑色郁金香杯中,品鉴员静置酒样闻香 5~8 s,然后晃动酒杯闻香 5~10 s,不同样品闻香间隔 1~2 min。品鉴员用 5~6 个标准香气物质中的特征词汇对样品香气特征进行描述,采用五点标度法打分:“1”弱,“2”略弱,“3”中等,“4”略强烈,“5”强烈。综合品尝组成员对香气特征词汇的使用频率和强度平均值对香气特征进行量化,量化强度计算公式为^[18]

$$M = \sqrt{FI} \times 100\% \quad (1)$$

式中 M ——量化强度, %

F ——使用频率, %

I ——强度平均值, %

1.2.6 数据分析

使用 Microsoft Excel 进行数据整理和统计,使用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行方差分析(ANOVA)和 Turkey 检验。所有显著性检验均在 $P \leq 0.05$ 的水平上进行。通过主成分分析(PCA)对香气化合物进行数据分析,以确定葡萄酒香气化合物与 ORP 组合之间的分布规律。

2 结果与讨论

2.1 ORP 阶段性控制对酵母生长、糖消耗以及基本理化指标的影响

合成葡萄汁发酵过程中,ORP 阶段性控制的动态变化如图 1 所示。除对照组外,当某一阶段 ORP 处于自然条件时,此时的 ORP 水平均能下降至 0 mV 或一直保持在 0 mV 以下的水平。在酒精发酵过程中,对照组 ORP 的变化呈碗状,这与之前的报道类似^[19]。发酵至 24 h 时,各组活细胞密度均达到 2×10^7 CFU/mL(图 2a)。就发酵第 1 阶段而言,将 ORP 控制在 60 mV 时细胞数最先达到峰值,整个酒精发酵过程基本保持较高糖消耗速率。类似地,0 mV 的处理会加速第 1 阶段糖消耗(图 2b)。第 1 阶段较高的 ORP 水平促进了酵母生物量的形成,这与文献[20]的研究结果一致。第 1 阶段 0 mV 平均糖消耗速率最高,60 mV 下的糖消耗与 NC 类似。

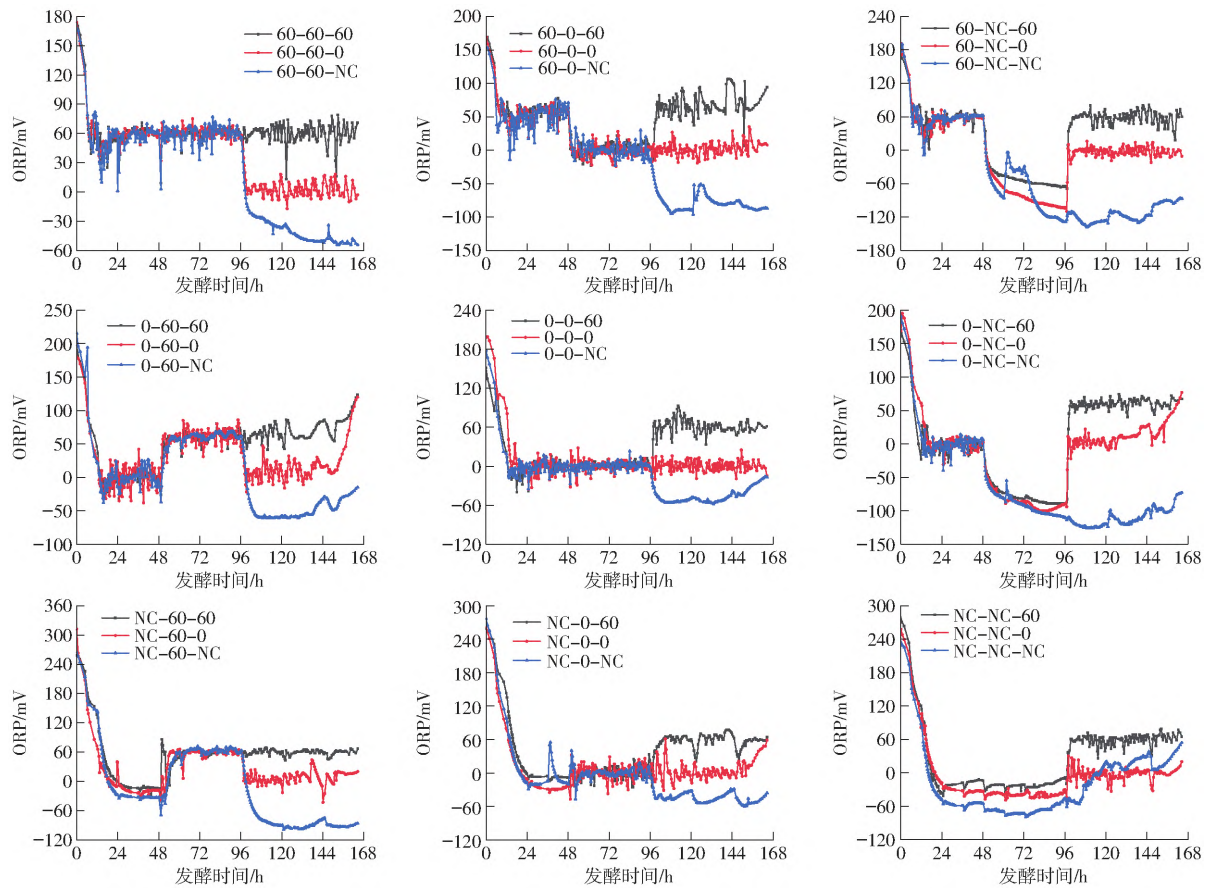


图1 酒精发酵过程中 ORP 变化曲线

Fig. 1 Variations of ORP during alcohol fermentation

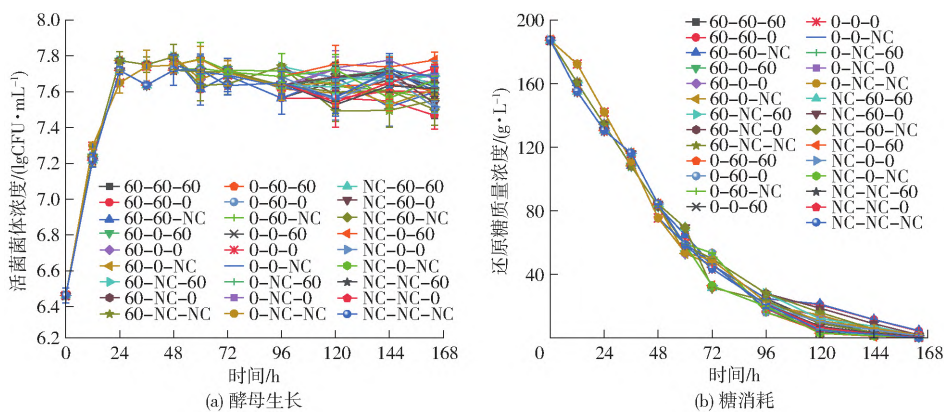


图2 酒精发酵过程中的酵母生长和糖消耗

Fig. 2 Yeast growth and sugar consumption in alcohol fermentation

将前两个阶段控制在高 ORP 水平的 60-60-0、60-60-NC 处理组的最终糖质量浓度仍高于 2 g/L。而 0-60-60、0-0-60、NC-60-60、NC-0-60 控制水平与其他处理相比提前完成了发酵(在 144 h 时还原糖质量浓度低于 2 g/L)。且除 NC-NC-60 和 0-NC-60 外,第 3 阶段 ORP 为 60 mV 的糖消耗比相同处理下 0 mV 时更快。总体而言,不同阶段 ORP 的改变对酵母生长和糖消耗速率影响各不相同。

不同 ORP 控制水平下最终葡萄酒的基本理化指标如表 1 所示。观察到葡萄汁中总酸质量

浓度在不同 ORP 水平下具有极显著差异,其质量浓度为 9.05 ~ 10.48 g/L,均大于 9 g/L。在 60-60-NC、0-NC-NC、NC-60-NC 控制水平下总酸含量较高,而在 60-0-60、0-60-60 中较低,这可能是因为发酵第 3 阶段 ORP 处于低水平时酵母菌株释放了较多的有机酸。各样品间挥发酸和乙醇含量的最终测量结果差别不大,挥发酸质量浓度范围为 0.05 ~ 0.09 g/L,乙醇体积分数范围为 11.1% ~ 12%。挥发酸是由微生物产生的腐败代谢产物之一,其含量过高会影响葡萄酒品质^[21]。

表 1 不同 ORP 控制下葡萄汁基本理化指标

Tab. 1 Basic physical and chemical indexes of grape juice under different ORP controls

处理编号	残糖质量浓度/(g·L ⁻¹)	总酸质量浓度/(g·L ⁻¹)	挥发酸质量浓度/(g·L ⁻¹)	乙醇体积分数/%
60-60-60	(0.67 ± 0.04) ^{efg}	(9.70 ± 0.05) ^{defghi}	(0.08 ± 0.01) ^{abc}	11.80 ^{abc}
60-60-0	(4.33 ± 0.07) ^b	(9.85 ± 0.12) ^{cdefg}	0.07 ^{bed}	(11.90 ± 0.14) ^{ab}
60-60-NC	(4.63 ± 0.01) ^a	(10.24 ± 0.12) ^{ab}	(0.09 ± 0.01) ^a	(11.70 ± 0.14) ^{abcd}
60-0-60	(0.76 ± 0.03) ^e	(9.31 ± 0.09) ^{no}	0.06 ^{de}	12.00 ^a
60-0-0	(1.40 ± 0.03) ^d	(9.65 ± 0.06) ^{fghijkl}	0.06 ^{de}	(11.90 ± 0.14) ^{ab}
60-0-NC	(0.67 ± 0.07) ^{efg}	(9.87 ± 0.09) ^{cdef}	0.07 ^{bed}	12.00 ^a
60-NC-60	(1.31 ± 0.01) ^d	(9.80 ± 0.03) ^{cdefgh}	0.08 ^{ab}	11.80 ^{abc}
60-NC-0	(1.94 ± 0.06) ^c	(9.52 ± 0.06) ^{ijklmn}	0.08 ^{ab}	11.40 ^{cde}
60-NC-NC	(1.40 ± 0.03) ^d	(9.71 ± 0.02) ^{defghij}	0.08 ^{ab}	11.60 ^{abcd}
0-60-60	(0.43 ± 0.07) ^{hij}	(9.05 ± 0.01) ^o	0.06 ^{de}	(11.50 ± 0.14) ^{bcde}
0-60-0	(0.66 ± 0.06) ^{efg}	(9.67 ± 0.13) ^{efghijk}	0.06 ^{de}	(11.50 ± 0.14) ^{bcde}
0-60-NC	(0.36 ± 0.03) ^{ij}	(9.75 ± 0.01) ^{cdefghi}	(0.08 ± 0.01) ^{abc}	(11.50 ± 0.14) ^{bcde}
0-0-60	(0.43 ± 0.01) ^{hij}	9.56 ^{hijklmn}	0.06 ^{de}	(11.50 ± 0.14) ^{bcde}
0-0-0	(0.54 ± 0.03) ^{fghi}	(9.94 ± 0.01) ^{cde}	0.05 ^e	(11.10 ± 0.14) ^e
0-0-NC	(0.27 ± 0.07) ^{jk}	(9.90 ± 0.07) ^{cdef}	0.07 ^{bed}	11.80 ^{abc}
0-NC-60	(0.54 ± 0.06) ^{fghi}	(9.67 ± 0.10) ^{efghijk}	0.06 ^{de}	11.60 ^{abcd}
0-NC-0	(0.48 ± 0.06) ^{ghij}	(9.90 ± 0.07) ^{cdef}	(0.07 ± 0.01) ^{cd}	11.40 ^{cde}
0-NC-NC	(1.94 ± 0.06) ^c	(10.48 ± 0.06) ^a	(0.07 ± 0.01) ^{cd}	11.60 ^{abcd}
NC-60-60	(0.53 ± 0.07) ^{fghi}	(9.77 ± 0.04) ^{cdefghi}	0.06 ^{de}	11.40 ^{cde}
NC-60-0	(1.37 ± 0.01) ^d	(9.67 ± 0.10) ^{efghijk}	0.06 ^{de}	11.40 ^{cde}
NC-60-NC	(0.56 ± 0.08) ^{efghi}	(10.01 ± 0.08) ^{bc}	0.06 ^{de}	(11.30 ± 0.14) ^{de}
NC-0-60	(0.63 ± 0.07) ^{efgh}	(9.38 ± 0.05) ^{mn}	(0.07 ± 0.01) ^{cd}	(11.70 ± 0.14) ^{abcd}
NC-0-0	(1.39 ± 0.01) ^d	(9.97 ± 0.01) ^{bed}	0.06 ^{de}	11.60 ^{abcd}
NC-0-NC	(0.57 ± 0.01) ^{efghi}	(9.44 ± 0.04) ^{klmn}	0.07 ^{bed}	11.80 ^{abc}
NC-NC-60	(0.72 ± 0.06) ^{ef}	(9.42 ± 0.01) ^{lmn}	0.06 ^{de}	(11.90 ± 0.14) ^{ab}
NC-NC-0	(0.41 ± 0.07) ^{ij}	9.39 ^{mn}	0.07 ^{bed}	(11.50 ± 0.14) ^{bcde}
NC-NC-NC	(0.14 ± 0.06) ^k	(9.58 ± 0.03) ^{ijk}	0.06 ^{de}	(11.70 ± 0.14) ^{abcd}

注: 总酸以酒石酸计 挥发酸以乙酸计; 同列数据不同字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

2.2 ORP 阶段性控制对芳香化合物含量的影响

共鉴定出 17 种挥发性有机化合物, 包括 6 种乙醇酯、3 种乙酸酯以及 4 种醇类等。高级醇在所有葡萄酒中含量最多, 其次是酯和脂肪酸。

2.2.1 乙醇酯

在不同的 ORP 控制水平下, 乙醇酯的总含量具有显著变化(图 3a)。经对比后发现, 第 1 阶段 ORP 处于自然条件(略微降低至 0 mV 以下)或 0 mV 均能得到较高含量的乙醇酯。除了 NC-0-0 组将乙醇酯质量浓度提高 1.9% 外, 所有处理组都使乙醇酯含量降低。月桂酸乙酯质量浓度在 NC-0-0 的控制水平下显著提高 16.9%。乙醇酯的合成在较高 ORP 控制水平下会受到抑制, 这与之前的报道一致, 添加氧气会损失一半的乙醇酯^[22]。中链脂肪酸乙酯, 包括己酸乙酯、辛酸乙酯和癸酸乙酯, 在白酒、啤酒和葡萄酒等酒精饮料中表现出茴香籽香气、酸苹果香气和花香^[23]。尽管这些酯类含量很少, 但由于阈值较低, 最终气味活性值(OAV)较高, 其含量的微小变化会影响发酵饮料的最终风味和味道^[24]。

中链脂肪酸乙酯具有较大的分子量, 挥发性较低, 且香气更持久^[25], 是葡萄酒中重要的香气化合物。本研究检测到的中链脂肪酸乙酯中己酸乙酯和癸酸乙酯的 OAV 大于 1, 并且 0-NC-NC 与 NC-0-0 处理组显著提高了这两种中链脂肪酸乙酯含量。这与之前的研究结果相似, 将 ORP 全程控制在 0 mV 时可提高中链脂肪酸乙酯的含量^[8]。与中链脂肪酸乙酯变化类似, 中链脂肪酸含量在 0-NC-NC、NC-0-0 控制水平下得到提高。这也验证了脂肪酸作为脂肪酸乙酯的前体物质影响着最终脂肪酸乙酯含量的结果^[26]。

2.2.2 乙酸酯

乙酸酯来源于乙酰辅酶 A 和乙醇或高级醇在酵母代谢过程中的反应, 赋予葡萄酒花果类香气^[27]。乙酸酯是酵母生产的一种主要酯类, 含量低时会产生“果味”香气, 但质量浓度超过 200 mg/L 时会出现类似溶剂的气味^[28]。本研究中乙酸乙酯质量浓度在 0-0-60 控制水平下的酒样中最高但仍低于 50 mg/L, 这表明它对葡萄酒香气有积极的

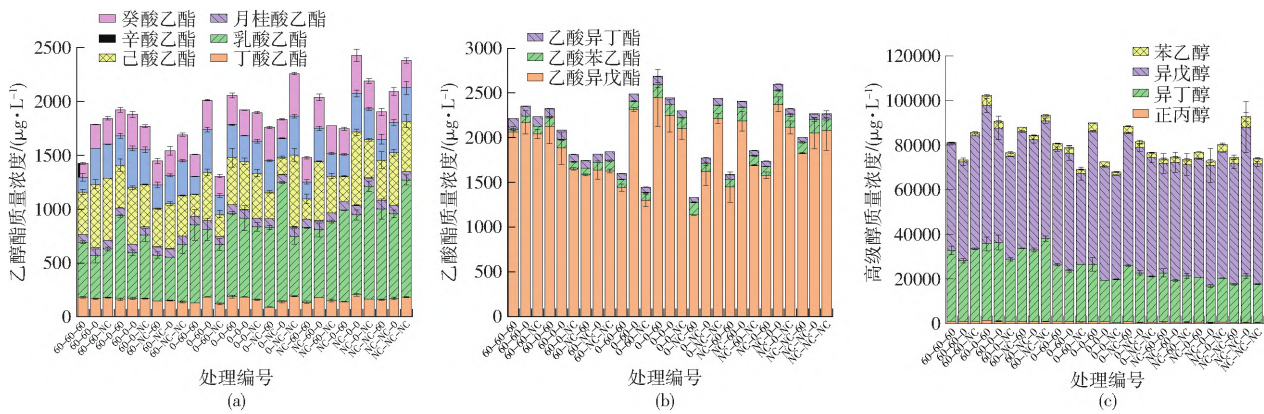


图3 不同 ORP 控制下葡萄汁的乙醇酯、乙酸酯和高级醇含量

Fig. 3 Contents of ethanol ester, acetate and higher alcohols in grape juice under different ORP controls

贡献。将第 1 阶段 ORP 控制在 60 mV 时,可得到较高的乙酸乙酯含量。乙酸乙酯的含量远高于其他乙酸酯含量,占总乙酸酯的 90% 以上,但由于乙酸乙酯的阈值较高,它的 OAV 在所有乙酸酯中并不是最高的。在不同的 ORP 控制水平下,乙酸酯(除乙酸乙酯)总含量变化如图 3b 所示。经对比后发现,0-0-60、NC-0-0、0-60-0 等处理组显著提高了葡萄酒中乙酸酯的总含量。当第 1 阶段 ORP 处于自然条件时,能得到较高的乙酸异戊酯和乙酸苯乙酯含量。所检测到的香气化合物中乙酸异戊酯的 OAV 最高,在 0-0-60 处理组其质量浓度高达 2.45 mg/L。乙酸异戊酯具有较强的新鲜果香,可赋予葡萄酒香蕉、梨、苹果的酸甜味^[29]。乙酸苯乙酯是葡萄酒中一种重要的香气化合物,赋予“花香”、“果香”和“蜂蜜”样香气,提高它的含量对于增强令人愉悦的果香很重要^[27]。

2.2.3 高级醇

大部分研究认为高级醇有助于产生新鲜的果味,在质量浓度低于 300 mg/L 时赋予葡萄酒复杂的芳香宜人的特性。然而,葡萄酒中高级醇的质量浓度超过 400 mg/L,会给感官质量带来负面影响^[30]。不同 ORP 下生成的最终葡萄酒样品中的高级醇含量如图 3c 所示。在这项研究中,高级醇的总质量浓度范围为 67.90 ~ 102.36 mg/L,可能对葡萄酒香气有积极影响。当第 1 阶段和第 3 阶段 ORP 均处于 60 mV 时,能得到较高含量的高级醇(除 60-60-60 组外),其中 60-0-60 处理组将高级醇质量浓度提高 38%。第 2 阶段 ORP 处于自然条件(逐渐下降至 0 mV 以下),所测得的高级醇含量较高。高级醇的增加可能是由于在较高 ORP 条件下生物量的增加,也可能由于支链氨基酸的摄取,如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的摄取增加^[31]。本研究所测得高级醇的主要成分是异丁醇和异戊醇,这两种高级醇含量在 60-0-60 控制

水平下均得到显著提高,异丁醇和异戊醇主要呈现苦杏仁味、生青味^[32]。有研究分析了高级醇含量与感官分析结果,发现当异丁醇和异戊醇含量升高时,感官分析上得分会降低^[33]。在 60-0-60 处理下生成的正丙醇质量浓度是对照的 2.91 倍。丙醇具有辛辣、粗糙的口感^[34],较高浓度的丙醇对感官质量的影响也不利。

获得的主成分分析解释了总方差的 70% (图 4a)。PC1 解释了总方差的 47.8%,PC2 解释了总方差的 21.2%。明显看出,OAV 大于 1 的香气化合物都位于 PC1 正半轴的 NC-0-0、0-NC-NC、0-0-60、NC-60-0、NC-NC-0 附近,说明了较低 ORP 控制水平可增加香气化合物含量,赋予葡萄酒复杂的发酵香气特征。根据 PCA 分析可知,NC-0-0 和 0-NC-NC 控制水平下产生了较多的中链脂肪酸和乙醇酯;0-0-60 控制水平下乙酸异戊酯和乙酸乙酯含量较高;NC-60-0 控制水平下乙酸苯乙酯和辛酸乙酯含量较高;NC-NC-0 控制水平下产生了较多的辛酸和高级醇(图 4b)。通过层次聚类可以观察到 60-60-60 组与对照以及其他处理组明显分隔开,并且此 ORP 梯度水平下香气化合物含量较低。

2.3 赤霞珠和爱格丽葡萄酒感官分析

根据上述实验结果,大多处理组中乙醇酯的含量显著降低,而乙醇酯对于葡萄酒香气非常重要,选择一种 ORP 组合来提高乙醇酯含量势在必行。在 0-NC-NC 控制水平下合成的乙醇酯含量较高,并且只需在发酵第 1 阶段将 ORP 控制在 0 mV 这种控制模式经济且易操作。因此,进一步利用赤霞珠和爱格丽真实葡萄汁进行发酵,真实葡萄酒的香气化合物含量如表 2 所示。0-NC-NC 处理组显著提高了赤霞珠干红葡萄酒中异戊酸乙酯、乙酸苯乙酯、异戊醇的含量,同时显著增加了爱格丽干白葡萄酒中辛酸乙酯、异戊醇、苯甲醇含量。

续表 2

香气化合物	赤霞珠		爱格丽		
	C1	C2	G1	G2	
乙酸酯	乙酸乙酯	(56 659.22 ± 1 049.43) ^b	(64 370.35 ± 1 342.59) ^a	(27 053.32 ± 1 135.94) ^a	(28 891.47 ± 2 421.97) ^a
	乙酸异丁酯	(488.38 ± 3.92) ^a	(490.37 ± 0.38) ^a	(536.07 ± 4.13) ^a	(564.75 ± 14.36) ^a
	乙酸异戊酯	(1 934.6 ± 40.16) ^a	(2 046.68 ± 42.38) ^a	(1 667.32 ± 66.89) ^a	(1 542.57 ± 87.4) ^a
	乙酸己酯	(6.91 ± 0.43) ^a	(6.38 ± 0.49) ^a	(4.76 ± 0.35) ^a	(1.74 ± 0.16) ^b
	总和	(59 089.11 ± 1 093.94) ^b	(66 913.77 ± 1 384.86) ^a	(29 261.47 ± 1 199.03) ^a	(31 000.53 ± 2 523.99) ^a
乙醇酯	丁酸乙酯	(1 611.3 ± 82.73) ^a	(1 532.61 ± 0.8) ^a	(1 338.3 ± 50.88) ^a	(1 198.06 ± 69.6) ^a
	己酸乙酯	(411.94 ± 9.57) ^a	(387.27 ± 11.84) ^a	(639.28 ± 39.43) ^a	(650.73 ± 43.08) ^a
	辛酸乙酯	(384.87 ± 0.36) ^a	(412.95 ± 17.2) ^a	(686.32 ± 73.45) ^b	(986.79 ± 52.08) ^a
	癸酸乙酯	(129.01 ± 6.78) ^a	(159.78 ± 14.94) ^a	(471.81 ± 56.76) ^a	(390.92 ± 28.3) ^a
	异戊酸乙酯	(214.72 ± 5.01) ^b	(254.59 ± 8.24) ^a	(190.34 ± 14.96) ^a	(180.19 ± 15.36) ^a
	月桂酸乙酯			(81.34 ± 2.25) ^a	(91.28 ± 5.56) ^a
总和	(2 751.83 ± 185.72) ^a	(2 747.2 ± 53.02) ^a	(3 407.37 ± 203.32) ^a	(3 497.96 ± 167.14) ^a	
其他酯类	乳酸乙酯	(59 572.22 ± 1 836.25) ^a	(61 943.17 ± 1 509.63) ^a	(5 129.43 ± 144.58) ^a	(34 114.6 ± 658.14) ^b
	辛酸甲酯	(16.95 ± 0.04) ^a	(16.75 ± 0.13) ^a	(14.76 ± 0.23) ^a	(15.2 ± 0.07) ^a
	癸酸甲酯	(3.1 ± 0.05) ^a	(3.31 ± 0.13) ^a	(3.89 ± 0.14) ^a	(3.82 ± 0.13) ^a
	水杨酸甲酯			(86.86 ± 1.66) ^b	(135.98 ± 9.41) ^a
	琥珀酸二乙酯	(3 992.08 ± 65) ^b	(4 585.66 ± 39.14) ^a		
总和	(63 584.35 ± 1 901.23) ^a	(66 548.89 ± 1 549.02) ^a	(5 243.69 ± 147.45) ^a	(34 289.84 ± 647.39) ^b	
醛酮	壬醛	(1.91 ± 0.31) ^a	(1.87 ± 0.03) ^a	(2.43 ± 0.21) ^a	(2.04 ± 0.12) ^a
	总和	(1.91 ± 0.31) ^a	(1.87 ± 0.03) ^a	(2.43 ± 0.21) ^a	(2.04 ± 0.12) ^a
苯衍生物	乙酸苯乙酯	(32.67 ± 0.31) ^b	(40.52 ± 0.07) ^a	(62.76 ± 5.3) ^a	40.25 ± 2.02) ^b
	苯甲醇	(1 627.22 ± 17.44) ^a	(1 437.44 ± 123.34) ^a	(1 945.05 ± 15.44) ^b	(3 708 ± 53.91) ^a
	苯乙醇	(10 018.15 ± 140.66) ^b	(12 680.57 ± 132.55) ^a	(7 851.49 ± 171.3) ^a	(9 147.24 ± 499.41) ^a
	总和	(11 678.04 ± 123.52) ^b	(14 158.52 ± 386.82) ^a	(9 872.06 ± 192.06) ^b	(12 905.85 ± 451.85) ^a

注: C1: 赤霞珠对照组; C2: 赤霞珠 0 - NC - NC 处理组; G1: 爱格丽对照组; G2: 爱格丽 0 - NC - NC 处理组。数据后不同字母表示同种葡萄酒、同种化合物不同处理间差异显著。

图 5 显示了在对照 NC - NC - NC(1) 和处理 0 - NC - NC(2) 的控制水平下获得的赤霞珠和爱格丽葡萄酒香气的量化强度。发酵而成的葡萄酒香气特征主要包括红色水果、热带水果、仁果、花卉、香料、干果和动物类香气。对于赤霞珠葡萄酒来说,干

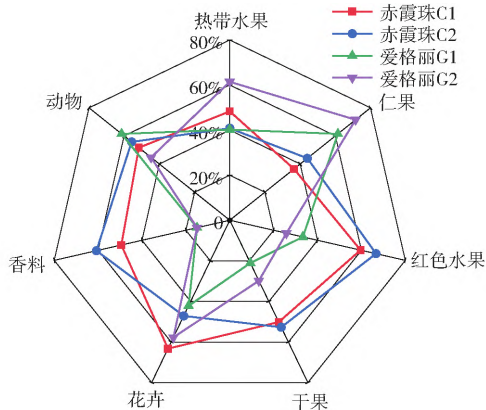


图 5 对照(C1、G1)、0 - NC - NC(C2、G2) 发酵条件下发酵获得的赤霞珠和爱格丽葡萄酒香气特征的量化强度

Fig. 5 MF values of aroma characteristics of Cabernet Sauvignon and Ecolly obtained under fermentation conditions of control (C1, G1) and 0 - NC - NC(C2, G2)

果和动物类香气受到的影响很小,受影响较大的是花卉和香料类香气。在 0 - NC - NC 控制水平下发酵生产的葡萄酒具有较浓郁的红色水果和香料味,热带水果香气略低于在对照条件所生产的葡萄酒。对于爱格丽葡萄酒来说,热带水果、花卉以及动物气味在两种控制状态下具有显著差异。0 - NC - NC 的控制水平降低了葡萄酒中使人不愉快的动物气味,使热带水果和花卉香味更加突出。苯乙醇和辛酸乙酯含量的增加可能是导致花卉类香气特征增强的原因。

2.4 葡萄酒香气化合物与感官特征关系

利用 PCA 研究感官属性和挥发性香气化合物之间的关系(图 6)。PC1 占总方差的 74.8%, PC2 占总方差的 20.7%。从图 6 可知, PC2 将赤霞珠葡萄酒的对照和处理组明显分隔开。乙酸乙酯、橙花叔醇、丁酸乙酯、乙酸异戊酯、异戊酸乙酯、α-香茅醇、1-己醇含量与赤霞珠 C2 含量呈正相关,说明它们是影响赤霞珠 C2 整体香气的主要挥发物。其中,红色水果和香料味也是影响赤霞珠 C2 感官品质的重要特征。相比之下,赤霞珠 C1 出现在这些物质的另一侧,主要与一些酯类和醇类相关,有助于

- [12] LIU Rongming , LIANG Liya , JIANG Min , et al. Effects of redox potential control on succinic acid production by engineered *Escherichia coli* under anaerobic conditions [J]. *Process Biochemistry* , 2014 , 49(5) : 740 – 744.
- [13] DZIALO M C , PARK R , STEENSELS J , et al. Physiology , ecology and industrial applications of aroma formation in yeast [J]. *FEMS Microbiology Reviews* , 2017 , 41(Supp. 1) : S95 – S128.
- [14] ROSSOUW D , JOLLY N , JACOBSON D , et al. The effect of scale on gene expression: commercial versus laboratory wine fermentations [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2012 , 93(3) : 1207 – 1219.
- [15] 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、果酒通用分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社 2006.
- [16] PAIS T F M , VIDIGAL S S M P , TÓTH I V , et al. Sequential injection system for the enzymatic determination of ethanol in alcoholic beverages with in-line dilution [J]. *Food Control* , 2013 , 30(2) : 616 – 620.
- [17] 马娜 , 王星晨 , 孔彩琳 , 等. 胶红酵母与酿酒酵母共发酵对干红葡萄酒香气与色泽的影响 [J]. *食品科学* , 2021 , 42(2) : 97 – 104.
- MA Na , WANG Xingchen , KONG Cailin , et al. Effect of mixed culture fermentation with *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and color of red wine [J]. *Food Science* , 2021 , 42(2) : 97 – 104. (in Chinese)
- [18] 王倩倩 , 覃杰 , 马得草 , 等. 优选发酵毕赤酵母与酿酒酵母混合发酵增香酿造爱格丽干白葡萄酒 [J]. *中国农业科学* , 2018 , 51(11) : 2178 – 2192.
- WANG Qianqian , QIN Jie , MA Decao , et al. Aroma enhancement of Ecolly dry white wine by co-inoculation of selected *Pichia fermentans* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Scientia Agricultura Sinica* , 2018 , 51(11) : 2178 – 2192. (in Chinese)
- [19] LIU Chenguang , LIN Yen-Han , BAI Fengou. Global gene expression analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown under redox potential-controlled very-high-gravity conditions [J]. *Biotechnology Journal* , 2013 , 8(11) : 1332 – 1340.
- [20] LIU Chenguang , HAO Xuemi , LIN Yen-Han , et al. Redox potential driven aeration during very-high-gravity ethanol fermentation by using flocculating yeast [J]. *Scientific Reports* , 2016 , 6(1) : 25763.
- [21] TUFARIELLO M , FRAGASSO M , PICO J , et al. Influence of non-*Saccharomyces* on wine chemistry: a focus on aroma-related compounds [J]. *Molecules* , 2021 , 26(3) : 644.
- [22] VARELA C , TORREA D , SCHMIDT S A , et al. Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Food Chemistry* , 2012 , 135(4) : 2863 – 2871.
- [23] SHI Wenqi , LI Jie , CHEN Yanfang , et al. Enhancement of C6 – C10 fatty acid ethyl esters production in *Saccharomyces cerevisiae* CA by metabolic engineering [J]. *LWT—Food Science and Technology* , 2021 , 145: 111496.
- [24] SAERENS S , DELVAUX F , VERSTREPEN K J , et al. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2008 , 74(2) : 454 – 461.
- [25] KNIGHT M J , BULL I D , CURNOW P. The yeast enzyme *Eht1* is an octanoyl-CoA: ethanol acyltransferase that also functions as a thioesterase [J]. *Yeast* , 2014 , 31(12) : 463 – 474.
- [26] SAERENS S M G. The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity [J]. *Journal of Biological Chemistry* , 2006 , 281(7) : 4446 – 4456.
- [27] SWIEGERS J H , BARTOWSKY E J , HENSCHKE P A , et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 2005 , 11(2) : 139 – 173.
- [28] LLEIXÀ J , MARTÍN V , PORTILLO M , et al. Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Frontiers in Microbiology* , 2016 , 7: 338.
- [29] LIU Peitong , LU Lin , DUAN Changqing , et al. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation [J]. *LWT—Food Science and Technology* , 2016 , 71: 356 – 363.
- [30] SWIEGERS J H , PRETORIUS I S. Yeast modulation of wine flavor [J]. *Advances in Applied Microbiology* , 2005 , 57: 131 – 175.
- [31] SHEKHAWAT K , BAUER F F , SETATI M E. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2017 , 101(6) : 2479 – 2491.
- [32] RADMILA P , TATJANA P , MARIJA K. Effect of fermentation temperature on polyphenolic composition and sensory properties of red Vranac wines [J]. *Acta Agriculturae Serbica* , 2011 , 16(32) : 145 – 154.
- [33] MORTON I. Volatile compounds in foods and beverages [M]. New York: Food Science & Technology , 1991: 784.
- [34] POLÁSKOVÁ P , HERSZAGE J , EBELER S E. Wine flavor: chemistry in a glass [J]. *Chemical Society Reviews* , 2008 , 37(11) : 2478 – 2489.