

河西走廊产区酒球菌酯酶活性对葡萄酒酯类香气物质的影响

祝霞^{1,2}, 赵丹丹¹, 李俊娥¹, 韩舜愈^{1,2}, 杨学山^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省葡萄与葡萄酒工程学重点实验室, 兰州 730070)

摘要: 试验以 2 株本土 *O. oeni* GF-2、ZX-1 和商业菌株 VP41 为供试菌株, 在模拟酒中动态监测苹果酸-乳酸发酵过程中菌株的 C₂、C₄、C₆ 酯酶活性, 分析比较不同初始 pH 值、乙醇浓度、SO₂ 添加量和发酵温度对菌株产酶规律的影响; 通过微酿试验探讨供试菌株对霞多丽干白葡萄酒香气品质的影响。结果表明, 在不同 pH 值条件下, 本土 *O. oeni* 菌株的酯酶活性明显高于商业菌株 VP41, 其中 ZX-1 的最大酯酶活性比 VP41 的高出约 63.42%; 乙醇浓度 8% 时, 所有供试菌株均具有最大酯酶活性, 且本土 *O. oeni* 菌株具有更强的产酶能力; 在不同 SO₂ 添加量影响下, 2 株本土 *O. oeni* 的酯酶累积活性均显著高于 VP41 ($P < 0.05$); 18、22 °C 发酵温度下, GF-2 的酯酶活性显著高于菌株 VP41 ($P < 0.05$)。供试菌株的总酯酶活性依次为 ZX-1、GF-2、VP41; 最佳产酶条件均为乙醇浓度 12%、pH 值 3.6、SO₂ 添加量 30 mg/L、发酵温度 22 °C, 其中以 ZX-1 的酯酶活性累计量最高 (620.97 mU/mL)。与商业菌株 VP41 相比, 经本土 GF-2、ZX-1 菌株发酵的酒样具有更浓郁的果香和良好的余香持久性。综合分析, 本土与商业 *O. oeni* 菌株均可以成功完成苹果酸-乳酸发酵, 尤其是 ZX-1 菌株具有较强的产酯酶能力, 可有效提升霞多丽干白葡萄酒中的果香和花香类化合物含量, 明显增强酒体的地域风格和典型性。

关键词: 酶; 活性; 葡萄酒; 酒球菌; 苹果酸-乳酸发酵; 酯类化合物

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.037

中图分类号: TS261

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2021)-01-0315-08

祝霞, 赵丹丹, 李俊娥, 等. 河西走廊产区酒球菌酯酶活性对葡萄酒酯类香气物质的影响[J]. 农业工程学报, 2021, 37(1): 315-322. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.037 http://www.tcsae.org

Zhu Xia, Zhao Dandan, Li Jun'e, et al. Effects of esterase activity of alcoholicus in Hexi Corridor production areas on ester aroma compounds in wine[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(1): 315-322. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.01.037 http://www.tcsae.org

0 引言

酿酒葡萄在发酵微生物的作用下发生一系列复杂生物转化反应, 形成种类丰富、特征各异的挥发性香气化合物, 是赋予葡萄酒风格和典型性的关键因素^[1]。由 *O. oeni* 触发的苹果酸-乳酸发酵 (Malolactic Fermentation, MLF) 具有降低酸度^[2]、增加生物稳定性^[3]、改善酒体色泽^[4]、修饰葡萄酒风味等作用, 是酿造优质干红和部分干白葡萄酒的必要生产工艺^[5]。受种植和栽培条件影响, 河西走廊产区葡萄酒普遍存在香气强度低, 余香持久性差的质量缺陷。优良的微生物菌株不但能顺利启动并完成发酵, 而且还能合成和释放促进香气化合物生物转化的糖苷酶、酯酶等风味酶, 提升葡萄酒的香气品质^[6-7]。已有研究表明酯类化合物具有较低的阈值和浓郁的水果香味, 其浓度的变化对葡萄酒香气的浓郁度和持久性具有重要影响^[8]。葡萄酒发酵过程中酯酶的潜在底物特异性决定了酯类化合物的种类和含量, 对葡萄酒特征香气的形成具有

重要贡献^[9]。与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 相比, *O. oeni* 合成的酯酶在高糖、高酒精度及低 pH 值的葡萄酒生境中可保持更高的催化活性^[10]。然而 *O. oeni* 的生长和代谢受到葡萄酒发酵条件 (温度、pH 值、SO₂ 浓度和乙醇浓度) 的直接影响, 且 *O. oeni* 的抗胁迫能力因菌株而异。Sico 等^[11]的研究表明温度和乙醇浓度对 *O. oeni* 菌株酯酶活性的影响不同, 供试菌株在 30~40 °C 之间的酯酶活性最大, *O. oeni* 的生长随着乙醇浓度的升高呈线性下降。此外, 葡萄酒中富含多种 *O. oeni* 酯酶作用的底物, 这些底物的种类和数量也决定着酯酶活性的强弱。Sumbly 等^[9]对 *O. oeni* C₂~C₁₀ 酯酶活性研究发现, 其对不同碳链长度的底物反应具有特异性。酯酶的潜在底物特异性决定了葡萄酒中酯类化合物的构成, 且其含量与碳链长度成反比^[12]; 同时脂溶性酯类物质的跨膜转运会随着碳链长度的增加而大幅下降, 其中己酸乙酯可以 100% 释放到细胞外, 而癸酸乙酯只有 8%~17% 被转移^[13]。由于只有被高效释放到细胞外的酯类才可被消费者感知, 因此, *O. oeni* 在 MLF 过程中主要通过 C₂~C₆ 酯酶影响酯类香气物质的合成。此外, 菌株间代谢能力的差异会影响合成酯酶的活性及底物特异性, 进而影响葡萄酒的香气特征^[14]。目前, 国内相关研究主要集中在对不同商业 *O. oeni* 在 MLF 中的降酸作用以及对葡萄酒香气品质的影响, 但对于本土 *O. oeni* 菌株的发酵特性及其在干白葡萄酒中的应用, 尤其是菌株对酯类香气化合物的修饰机制还鲜有报道。本试验通过在模拟酒中动态监测 MLF 中 2 株本土和 1 株商业 *O. oeni*

收稿日期: 2020-08-17 修订日期: 2020-12-15

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (31760454, 32060581); 甘肃省重点研发计划项目 (17YF1NA060); 甘肃省葡萄酒产业发展基金项目 (20180820-07, 20180820-08)

作者简介: 祝霞, 副教授, 主要从事葡萄与葡萄酒风味品质调控研究。

Email: zhux@gsau.edu.cn

*通信作者: 杨学山, 副教授, 主要从事葡萄酒酿造微生物及风味品质调控研究。Email: yangxs@gsau.edu.cn

菌株对不同碳链长度底物 (C₂~C₆) 的酯酶活性, 分析供试菌株在不同酿造因子影响下的产酶规律特征, 探索酯类化合物与 *O.oeni* 菌株酯酶活性的响应机制, 以期为代表河西走廊产区风土的典型葡萄酒提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本土酒球菌菌株: GF-2、ZX-1、QL-11、MG-1 由甘肃省葡萄与葡萄酒重点实验室分离鉴定并保存。商业酒球菌: VP41, 购自上海杰兔责任有限公司。商业酿酒酵母: ES488, 购自意大利 Enartis 公司。霞多丽酿酒葡萄: 2019 年产自甘肃莫高酒业有限公司葡萄种植基地, 含糖量约为 21.3 °Brix, 总酸 6.87 g/L (以酒石酸计), pH 值 3.36。

1.2 培养基与试剂

ATB 培养基配制参考 Sumbly 等^[4]的方法配制: 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, MnSO₄·4H₂O 0.05 g/L, 盐酸半胱氨酸 0.5 g/L, 番茄汁质量分数 25%。液体培养基使用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 4.8, 固体培养基加 20 g/L 的琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

参考 Sico 等^[11]方法进行模拟酒培养基的配制: 葡萄糖 1 g/L、果糖 1 g/L、L-苹果酸 2 g/L、海藻糖 1 g/L、酒石酸 1 g/L、柠檬酸 1 g/L、乙酸钠 0.14 g/L、酵母浸粉 4.0 g/L、水解酪蛋白 2.5 g/L、KH₂PO₄ 0.3 g/L、KCl 0.22 g/L、L-型半胱氨酸盐酸 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.065 g/L、MnSO₄·4H₂O 0.015 g/L、CaCl₂ 0.065 g/L、甘油 3 mL/L。

香气标准品: 乙酸戊酯、乙酸庚酯、3-羟基丁酸乙酯、己酸甲酯、苯乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸己酯、乙酸乙酯、庚酸乙酯、辛酸乙酯等香气标准品和内标物 2-辛醇均购自美国 Sigma 公司。

其他试剂: 4-硝基苯基乙酸酯 (*p*-nitrophenyl acetate, *p*-NPA)、4-硝基苯基己酸酯 (*p*-nitrophenyl butyrate, *p*-NPB)、4-硝基苯基丁酸酯 (*p*-Nitrophenyl hexanoate, *p*-NPH), 购自上海源叶有限责任公司; 氢氧化钠、柠檬酸、磷酸二氢钾、碳酸钠, 均为分析纯试剂, 购自甘肃中瑞化工有限公司。

1.3 仪器与设备

SPX-150-II 生化培养箱 (上海跃进医疗器械有限公司), PHS-3CpH 计 (上海雷磁责任有限公司), TU-1810 可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司), SW-CJ-2FD 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), LDZX-50KBS 高压蒸汽灭菌锅 (上海申安医疗器械厂), H2050R 高速冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司), TRACE 1310-ISQ 气相色谱质谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司), ISQ 型单四级杆质谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司)。

1.4 试验方法

1.4.1 高产酯酶本土酒球菌菌株筛选

挑取斜面保存的菌种接种于 ATB 培养基, 28 °C 培养至 OD₆₀₀ 约为 1.1 (菌落数约为 10⁷ CFU/mL) 时, 转接于

模拟酒体系, 28 °C 发酵 14 d, 每隔 48 h 取样。为便于直观比较各菌株不同酯酶活性, 参考李婷等^[13]方法, 采用酶活性累积量 (mU/mL), 即同一菌株、同一种酶的 7 次测定结果逐次相加, 表征比较 4 株本土 *O.oeni* 及 1 株商业 *O.oeni* 菌株酯酶活性的差异。各样重复 3 次。

为提高样品酶活性测定效率、缩短反应时间, 参照 Matthews 等^[12]方法并进行优化。优化后酶活性测定体系为: 分别将 80 μL 25 mmol/L 的 *p*-NPA、*p*-NPB 和 *p*-NPH, 与 200 μL 菌悬液、1 820 μL pH 值为 5.0 的柠檬酸-磷酸缓冲液混合均匀, 50 °C 反应 30 min, 再加入 200 μL Na₂CO₃ 溶液 (0.5 mol/L) 终止反应, 400 nm 波长测定处吸光值。根据标准曲线 ($y=2.264\ 9x-0.006\ 2$, $R^2=0.999\ 1$) 计算最终酶活性。酶活性单位的定义 (U): 50 °C 条件下, 每 mL 菌体细胞每 min 释放 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量 (μmol/(min·mL))。

1.4.2 不同发酵因子对菌株酯酶活性的影响

将 *O.oeni* 菌株经 ATB 培养基活化、扩培后, 以 1×10⁷ CFU/mL, 依次接种于同一因子的不同处理水平组模拟酒中, 其中初始 pH 值为 3.0、3.2、3.4、3.6、3.8 (HCl 或 NaOH 调整), 乙醇体积分数为 6%、8%、10%、12%、14% (无水乙醇调节), SO₂ 添加量为 15、30、45、60、75 mg/L (用 Na₂S₂O₅ 调节), 发酵温度为 18、20、22、25、28 °C。每隔 48 h 取样, 分别测定发酵液中 C₂、C₄、C₆ 酯酶活性, 以各处理水平条件下 C₂、C₄、C₆ 酯酶的总和为依据, 筛选较佳产酶条件。试验重复 3 次。

1.4.3 正交试验设计

根据单因素试验结果, 并结合葡萄酒 MLF 过程中 pH 值、乙醇浓度、SO₂ 添加量、发酵温度等的实际参数水平, 采用 L₉(3⁴) 正交试验 (表 1), 分析供试菌株的总酯酶活性 (C₂、C₄、C₆ 酯酶之和) 的变化规律。

表 1 L ₉ (3 ⁴)正交试验因素水平				
Table 1 Factors and levels of the L ₉ (3 ⁴) orthogonal design				
水平 Level	因素 Factor			
	初始 pH 值 Initial pH value	乙醇体积分数 Ethanol content/%	SO ₂ 添加量 SO ₂ addition/ (mg·L ⁻¹)	发酵温度 Fermentation temperature/°C
1	3.4	10	30	18
2	3.6	12	45	20
3	3.8	14	60	22

1.4.4 微酿试验

1) 菌株活化

ES488 酿酒酵母菌株参考刘琦^[14]方法, 按推荐用量 (0.2 g/L) 加入等体积的葡萄汁于 28 °C 活化 25 min 后接种, 酒球菌菌株活化同 1.4.1。

2) 酵母菌菌株活化

参照干白葡萄酒生产工艺^[15], 在除梗、破碎的霞多丽葡萄中加入果胶酶 (20 mg/L) 和 60 mg/L SO₂ 后, 对其进行压榨、皮渣分离, 装入 5 L 发酵瓶中 4 °C 澄清, 按 0.2 g/L 接种酿酒酵母 ES488, 在试验优化的最优产酶条件下进行酒精发酵 (Alcoholic Fermentation, AF) 至残糖质量浓度 4.0 g/L 时, 进行倒罐处理去酒泥, 将 *O.oeni* 菌株 ZX-1、GF-2 按 1×10⁷ CFU/mL 进行接种, 以商业菌株

VP41 作为参考。自接入菌株开始，每隔 48 h 取样，测定 L-苹果酸质量浓度<0.2 g/L 时结束 MLF 发酵。取样测定理化指标和挥发性香气化合物。

3) L-苹果酸和干白葡萄酒理化指标测定

L-苹果酸含量检测参考试剂盒说明书进行。参照《葡萄酒分析检验》及 GB/T 15038-2006^[16]中的方法进行残糖、酒精度、pH 值、总酸、挥发酸、总 SO₂ 等指标测定。

4) 挥发性香气化合物测定

参照刘琦^[14]香气物质萃取方法及气相色谱-质谱 (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) GC-MS 条件，于 15 mL 的顶空瓶中加入 2.5 g 氯化钠、8 mL 酒样、20 μL 2-辛醇 (浓度 81.06 mg/L)，加磁力搅拌转子后封口，放入恒温加热磁力搅拌器中，40 ℃水浴平衡 30 min 后，顶空萃取 30 min。

GC-MS 条件：色谱柱 DB-WAX 60 m×2.5 mm×0.25 μm，不分流进样。载气 (He) 流速 1 mL/min，进样口温度 240 ℃，解析时间 5 min；柱温升温程序：50 ℃保持 5 min，以 3.5 ℃/min 升至 180 ℃，保持 15 min；质谱为电子轰击离子源 (Electron Impact, EI)，电子能量 70 eV，传输线温度 180 ℃，离子源温度 200 ℃，扫描范围 50~350 m/z。

定性与定量分析：采用与标准香气成分保留指数 (Retention Index, RI) 对比的方法结合 NIST-11、Wiley 及香精香料标准谱库检索比对结果进行挥发性香气化合物的定性分析。对于已有标准品的香气化合物通过内标标准曲线法进行定量，其他香气化合物含量利用内标法进行相对定量分析，内标物为 2-辛醇。

1.4.5 感官评价

参照 Englezos 等^[17]的方法。9 名经过葡萄酒品鉴培训的人员 (5 女，4 男) 对随机编号的各酒样进行 3 轮盲品。根据评价标准从外观、香气和口感 3 个方面，使用 10 分结构化数值尺度来量化 (表 2)。0~10 表示感觉强烈程度逐渐增大。

表 2 葡萄酒感官评价标准

Table 2 Criteria for sensory evaluation of wine

评价项目 Evaluation item	评价角度 Evaluation aspect	评价标准 Evaluation criterion
外观 (20 分) Appearance(20 points)	澄清度、颜色强度	色泽鲜明光亮，呈紫红色、宝石红色 (10) 澄清透明、无明显悬浮物 (10)
香气 (30 分) Aroma(30 points)	花香、果香、脂肪味、浓郁度	具有优雅、愉悦、和谐的花果香 (10) 脂肪、奶油味突出 (10) 香气浓郁、复杂 (10) 醇厚协调、愉悦优雅 (10) 酒体丰满、圆润 (10)
口感 (50 分) Taste (50 points)	甜味、酸度、余味长短、平衡感	酸甜适中、平衡感良好 (10) 酒香留口、余味悠长 (10) 风格典型、独特 (10)

1.4.6 试验数据处理

对试验所得数据采用 Microsoft Office Excel 2010，Origin 2018 进行基本处理和作图，IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行多重比较 (Duncan 法， $P<0.05$) 及差异

显著性分析。

2 结果与分析

2.1 高产酯酶本土酒球菌菌株筛选

由表 3 可知，对 4 株供试本土 *O.oeni* 的 3 种酯酶活性比较发现，菌株 GF-2、ZX-1 的 C₂、C₄、C₆ 酯酶活性均显著高于菌株 QL-11、MG-1 的酶活性 ($P<0.05$)。与商业菌株 VP41 相比，菌株 GF-2、ZX-1 的酯酶活性明显较高 ($P<0.05$)，QL-11、MG-1 的酯酶活性则低于菌株 VP41。因此，选择菌株 GF-2、ZX-1 为后续供试菌株。

表 3 5 株 *O.oeni* (4 株本土菌株+1 株商业菌株) 酯酶活性测定
Table 3 Determination of esterase activities of five *O.oeni* strains (Four autochthonous strains and one commercial strain)

菌株 Strain	酯酶活性 Esterase activity/(mU·mL ⁻¹)		
	C ₂	C ₄	C ₆
GF-2	404.11±25.27 ^A	278.29±3.28 ^B	412.52±0.79 ^A
ZX-1	407.15±1.36 ^B	311.31±2.60 ^A	419.66±4.53 ^A
QL-11	312.11±7.07 ^D	204.56±0.22 ^D	341.36±3.28 ^C
MG-1	279.01±3.96 ^E	197.75±2.72 ^E	364.28±0.56 ^B
VP41	317.88±1.36 ^C	230.69±5.21 ^C	232.37±2.83 ^D

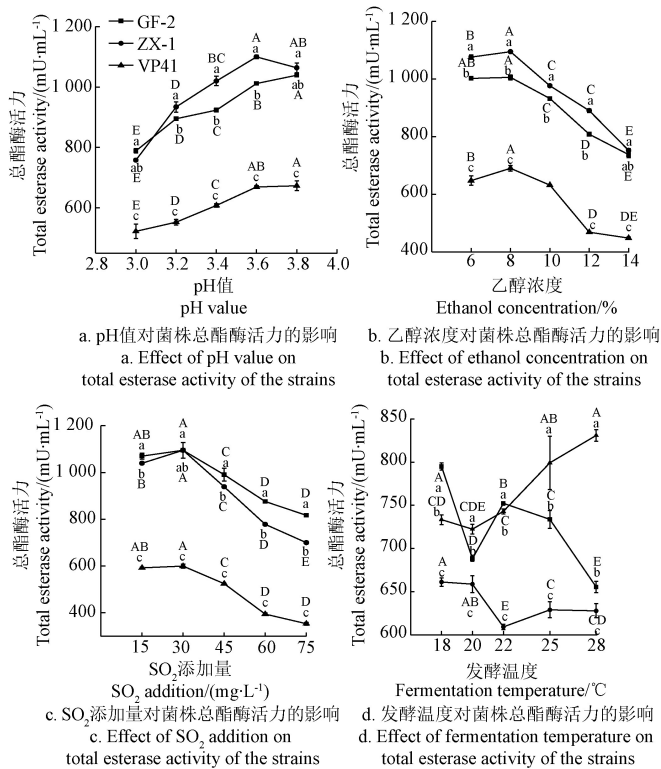
注：字母 A~E 表示在 $P<0.05$ 水平下组间具有显著性差异，下同。
Notes: Alphabet A to E indicate significant differences between groups at the $P<0.05$ level, the same below.

2.2 不同发酵条件对本土酒球菌酯酶活性的影响

由图 1a 可知，pH 值对供试菌株的 3 种酯酶活性影响显著。本土 *O.oeni* 菌株 (GF-2、ZX-1) 均在 pH 值 3.6 时具有最大酯酶累积活性，而商业菌株 VP41 产生最大酯酶活性的 pH 值为 3.8；在不同 pH 值条件下，本土 *O.oeni* 菌株的酯酶活性明显高于 VP41，其中 ZX-1 的最大酯酶活性 (1 099.97 mU/mL) 比 VP41 的 (673.06 mU/mL) 高出约 63.42%。pH 值较低时 (3.0)，菌株 GF-2 比 ZX-1 具有更好的产酯酶能力；但随 pH 值升高，ZX-1 的酯酶活性上升更快。乙醇浓度与菌株酯酶累积活性呈负相关变化 (图 1b)。供试菌株均在乙醇浓度 8% 时均产生了最大酯酶活性，分别为 1 076.17 mU/mL (ZX-1)、1 001.96 mU/mL (GF-2)、647.58 mU/mL (VP41)，且相互间差异显著 ($P<0.05$)。在不同乙醇浓度梯度下，本土 *O.oeni* 的酯酶活性均显著高于商业菌株 VP41。

如图 1c 所示，随着 SO₂ 添加量的增加，供试菌株的酯酶活性均呈现先上升后下降的趋势，在 SO₂ 添加量为 30 mg/L 时，所有菌株均表现出最大酶活性。当 SO₂ 添加量在 15~75 mg/L 范围内时，本土 *O.oeni* 的酯酶累积活性均显著高于 VP41 的酶活性 ($P<0.05$)。在 SO₂ 添加量为 75 mg/L 条件下，菌株 ZX-1、GF-2 的酯酶累积活性分别是商业菌株 VP41 的 1、1.3 倍。不适宜的发酵温度会导致杂菌的生长或发酵延迟，从而破坏葡萄酒的感官质量^[18]。*O.oeni* 的最适生长温度是 25~28 ℃，而葡萄酒的 MLF 温度一般为 18~22 ℃，因此，选择在 18~28 ℃不同温度下，对菌株酯酶活性变化情况进行测定分析。由图 1d 可知，随着发酵温度的升高，菌株 VP41 的酯酶累积活性逐渐升高，且在 28 ℃时产生最大酶活性 (830.86 mU/mL)，

而本土 *O.oeni* 在 18 ℃ 时有最大酯酶活性, 分别为 661.20 mU/mL (ZX-1)、794.88 mU/mL (GF-2)。其中在 18、22 ℃ 发酵温度下, GF-2 的酯酶活性显著高于菌株 VP41 ($P<0.05$)。



注: 字母 a~c 表示在 $P<0.05$ 水平下组内具有差异显著性; 字母 A~E 表示在 $P<0.05$ 水平下组间具有差异显著性。下同。图 a 乙醇浓度 10%, SO₂ 添加量 45 mg·L⁻¹, 发酵温度 22 ℃; 图 b 初始 pH 值 3.4, SO₂ 添加量 45 mg·L⁻¹, 发酵温度 22 ℃; 图 c 初始 pH 值 3.4, 乙醇浓度 10%, 发酵温度 22 ℃; 图 d 初始 pH 值 3.4, 乙醇浓度 10%, SO₂ 添加量 45 mg·L⁻¹。
Notes: Alphabet a to c indicate significant differences within the group at $P<0.05$ level; alphabet A to E indicate significant differences between groups at the $P<0.05$ level. The same as below. Fig. a: ethanol concentration 10%, SO₂ addition 45 mg·L⁻¹, fermentation temperature 22 ℃; Fig. b: initial pH value 3.4, SO₂ addition 45 mg·L⁻¹, fermentation temperature 22 ℃; Fig. c: initial pH value 3.4, ethanol concentration 10%, fermentation temperature 22 ℃; Fig. d: initial pH value 3.4, ethanol concentration 10%, SO₂ addition 45 mg·L⁻¹.

图 1 发酵条件对菌株酯酶活力累积过程的影响

Fig.1 Effect of fermentation conditions on cumulative process of esterase activity from strains

2.2 复合发酵条件下菌株酯酶活性

O.oeni 在葡萄酒中的生长代谢, 不仅受到葡萄酒复杂基质的影响, 还与发酵参数间的协同作用有关^[19]。因此, 分析复合发酵条件下各菌株的酯酶活性, 可反应葡萄酒酿造过程中 *O.oeni* 的实际发酵行为。

由表 4 可知, 不同复合发酵条件下各菌株的酯酶活性累积量不同, 而在相同发酵参数下菌株间的酶活性也存在差异, 供试菌株总酯酶活性依次为 ZX-1>GF-2>VP41。从极差可知, 不同发酵因素对菌株 ZX-1 酯酶活性累积量影响的主次顺序为: SO₂ 添加量、pH 值、乙醇浓度、发酵温度; 影响菌株 GF-2 产酯酶活性的主要因素为: SO₂ 添加量、乙醇浓度、pH 值、发酵温度; 菌株 VP41 影响因素的主次顺序为: SO₂ 添加量、发酵温度、pH 值、乙醇浓度。所有供试菌株的最优产酶条

件均为: 乙醇浓度 12%、pH 值 3.6、SO₂ 添加量 30 mg/L、发酵温度 22 ℃。

表 4 酯酶活性累积量测定的正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal experiment for cumulative esterase activity

试验号 Experiment number	乙醇体积分数 Ethanol content/%	SO ₂ 添加量 SO ₂ addition/(mg·L ⁻¹)	pH 值 pH value	发酵温度 Fermentation temperature/℃	总酯酶活性 Total esterase activity/(mU·mL ⁻¹)		
					ZX-1	GF-2	VP41
1	10	30	3.4	18	565.68	514.87	371.26
2	10	45	3.6	20	453.16	467.67	348.46
3	10	60	3.8	22	429.52	458.29	345.21
4	12	30	3.6	22	620.97	587.55	429.04
5	12	45	3.8	18	419.98	459.25	338.64
6	12	60	3.4	20	447.55	419.18	328.38
7	14	30	3.8	20	516.55	490.91	392.17
8	14	45	3.4	22	432.80	422.23	334.63
9	14	60	3.6	18	428.31	418.14	327.82
k_1	482.79	567.73	482.01	471.33			
k_2	496.17	435.32	500.82	472.42			
k_3	459.22	435.19	455.35	494.43			
R_{ZX-1}	36.96	132.61	45.47	23.16			
k_1	480.27	531.11	452.09	464.09			
k_2	488.66	449.71	491.12	459.25			
k_3	443.76	431.87	469.48	489.36			
R_{GF-2}	44.91	99.24	39.03	30.11			
k_1	354.96	397.49	344.78	345.91			
k_2	365.35	340.56	368.43	356.32			
k_3	351.54	333.80	358.68	369.63			
R_{VP41}	13.81	63.69	23.67	23.72			

由表 5 可知, SO₂ 添加量对所有供试菌株的酯酶活性有极显著影响 ($P<0.01$)。pH 值、乙醇浓度对菌株 ZX-1、GF-2 的酯酶活性有显著影响 ($P<0.05$); 发酵温度、pH 值对菌株 VP41 的酯酶活性有显著影响 ($P<0.05$)。

表 5 酯酶活性正交试验方差分析

Table 5 Variance analysis of orthogonal experiment for esterase activity

菌株 Strain	因素 Factor	偏差平方和 Deviation sum of squares	自由度 Degrees of freedom	F 值 F value	显著性 Significance
ZX-1	乙醇浓度	2 099.19	2	0.20	*
	SO ₂ 添加量	35 118.56	2	3.40	**
	pH 值	3 131.62	2	0.30	*
	发酵温度	1 019.65	2	0.10	
	误差	41 369.02	8		
GF-2	乙醇浓度	3 420.27	2	0.59	*
	SO ₂ 添加量	16 792.21	2	2.79	**
	pH 值	2 293.79	2	0.38	*
	发酵温度	1 568.39	2	0.26	
	误差	24 074.66	8		
VP41	乙醇浓度	310.42	2	0.13	
	SO ₂ 添加量	7 341.99	2	3.14	**
	pH 值	848.94	2	0.36	*
	发酵温度	848.22	2	0.36	*
	误差	9 349.57	8		

注: “***”表示影响极显著 ($P<0.01$), “**”表示影响显著 ($P<0.05$)。
Notes: The sign “***” means the impact is extremely significant ($P<0.01$), and “**” means the impact is significant ($P<0.05$).

2.3 微酿试验结果

根据正交试验结果, 在最优产酯酶条件下对霞多丽干白葡萄酒进行 MLF, 分析酯类物质的变化特征, 比较验证各菌株对葡萄酒香气品质的影响作用。

2.3.1 葡萄酒理化指标

由表 6 可知, 各酒样中 L-苹果酸质量浓度均 <0.2 g/L,

表明 MLF 成功完成，且主要理化指标均符合国标（GB/T15037-2006）要求。与对照未接种 MLF 组（CK）相比，MLF 发酵后，霞多丽干白葡萄酒 pH 值升高 0.11~0.16，总酸质量浓度降低 2.48~2.62 g/L。虽然酒样中挥

发酸含量有所升高，但最大值为 0.42 g/L（<1.2 g/L），符合国标要求。此外，本土 *O.oeni* 菌株在第 12 d 就可完成 MLF，而商业菌株则需 14 d，因此本土菌株可更快地适应葡萄酒生境，具有更高的发酵效率。

表 6 苹果酸-乳酸发酵前后干白葡萄酒样理化指标
Table 6 Physical and chemical indexes of dry white wine samples before and after malolactic fermentation

理化指标 Physical and chemical index	MLF 前 Before MLF	MLF 后 After MLF			
		CK	GF-2	ZX-1	VP41
pH 值 pH value	3.54±0.01 ^{DE}	3.59±0.03 ^{CD}	3.70±0.01 ^A	3.67±0.01 ^{AB}	3.65±0.01 ^{ABC}
残糖 Residual sugar/(g·L ⁻¹)	1.25±0.21 ^A	1.15±0.21 ^{BC}	1.10±0.14 ^{ABCD}	0.75±0.35 ^{CDE}	1.15±0.21 ^{AB}
酒精度 Ethanol concentration/%	11.20±0.01 ^A	11.18±0.06 ^{AB}	11.10±0.04 ^{BC}	11.09±0.04 ^{CD}	11.09±0.04 ^{CDE}
总酸 Total acid/(g·L ⁻¹)	7.62±0.01 ^A	7.57±0.15 ^{AB}	5.07±0.01 ^{CD}	5.00±0.16 ^{CDE}	5.14±0.15 ^C
挥发酸 Volatile acid/(g·L ⁻¹)	0.30±0.00 ^{CD}	0.29±0.03 ^{DE}	0.42±0.01 ^A	0.40±0.00 ^{AB}	0.34±0.03 ^C
总 SO ₂ Total SO ₂ /(mg·L ⁻¹)	41.75±0.04 ^A	40.84±0.04 ^{AB}	42.20±0.02 ^C	45.04±0.03 ^E	39.13±0.01 ^{CD}
L-苹果酸 L-malic acid/(g·L ⁻¹)	3.55±0.02 ^A	3.41±0.01 ^B	0.10±0.01 ^{CD}	0.08±0.00 ^{DE}	0.13±0.01 ^C

2.3.2 葡萄酒样中酯类化合物分析

1) 酯类化合物 GC-MS 检测结果

气味活性值（Odor Activity Value，OAV）是评价单一香气化合物对整体香气的贡献程度的指标。研究发现，OAV 值>0.1 的香气成分通过叠加作用，也对葡萄酒香气特征具有积极贡献。表 7 为不同处理条件下，各酒样中主要酯类物质（OAV>0.1）的总含量依次为 ZX-1>GF-2>VP41>CK。菌株 VP41 的酯类化合物含量

显著低于本土 *O.oeni* 菌株（*P*<0.05），与酶活性累积量测定结果一致。尤其是 ZX-1 处理组的乙酸异戊酯、乙酸己酯、乙酸辛酯、乙酸苯乙酯等具有潜在花香和果香味的物质含量显著增加（*P*<0.05）。总体而言，虽然商业与本土菌株发酵后酒样中的主要酯类物质种类差别不大，但其含量却存在显著差异（*P*<0.05）。总体而言，本土 *O. oeni* 菌株更有利于酯类香气的合成释放。

表 7 各处理酒样中主要酯类物质的变化
Table 7 Changes of main esters in wine samples with different treatments

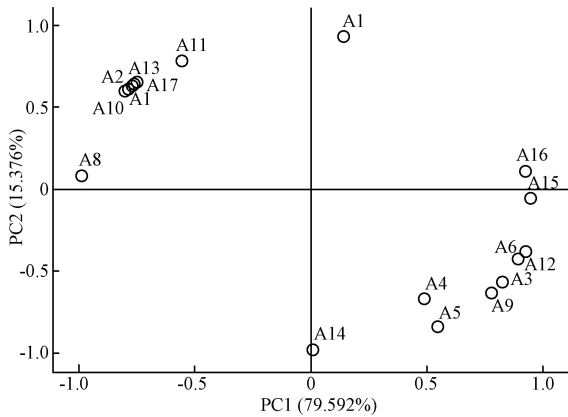
编号 Number	香气物质 Aroma compounds	阈值 ^[20-23] Threshold value/(μg·L ⁻¹)	香气物质质量浓度 Contents of aroma compounds/(μg·L ⁻¹)				香气描述 Odor description
			CK	GF-2	ZX-1	VP41	
A1	乙酸乙酯	7 500	971.77±37.46 ^A	911.97±0.51 ^{BC}	917.21±1.48 ^B	591.22±2.25 ^D	菠萝、清漆、香脂
A2	乙酸异丁酯	200	755.99±32.68 ^A	50.22±0.49 ^{BC}	52.82±0.95 ^B	49.93±1.65 ^{BCD}	甜香、香蕉、果香
A3	乙酸己酯	5	50.41±2.69 ^D	2 904.81±1.31 ^A	2 858.23±1.89 ^B	2 727.64±0.91 ^C	苹果、樱桃
A4	乙酸辛酯	12	37.43±6.09 ^D	58.77±1.51 ^C	106.90±1.30 ^A	84.16±0.68 ^B	苹果、甜橙、梨、茉莉香
A5	乙酸异戊酯	30	3 952.85±68.33 ^D	5 057.50±8.54 ^C	5 490.95±35.44 ^B	5 733.94±4.30 ^A	果香、香蕉味
A6	乙酸苯乙酯	250	180.54±7.12 ^D	887.18±1.32 ^A	754.49±1.15 ^B	713.28±4.11 ^C	花香
A7	丁酸乙酯	35	951.07±31.59 ^A	96.35±0.52 ^{BC}	80.01±0.50 ^B	67.87±0.17 ^{BCD}	香蕉、草莓味
A8	丁二酸二乙酯	1 200	153.40±5.22 ^A	17.87±0.02 ^{CD}	21.399±0.41 ^C	95.89±1.30 ^B	水果、青草、葡萄香
A9	己酸乙酯	100	865.58±16.07 ^D	1 879.15±1.40 ^C	2 024.31±14.32 ^A	1 942.82±2.90 ^B	香蕉、青苹果
A10	庚酸乙酯	400	157.80±12.27 ^A	4.14±0.11 ^{BC}	4.80±0.16 ^B	2.42±0.32 ^{BCD}	水果香、白兰地
A11	辛酸甲酯	200	32.54±9.00 ^A	23.58±0.13 ^{ABC}	25.03±0.07 ^{AB}	20.59±0.18 ^{BCD}	柑橘香
A12	辛酸乙酯	600	428.60±17.60 ^D	4 621.69±1.28 ^B	4 857.45±15.40 ^A	3 517.10±3.67 ^C	菠萝、梨、花香
A13	辛酸戊酯	125	56.22±5.10 ^A	9.48±0.02 ^{BC}	11.33±0.06 ^B	7.07±0.00 ^{BCD}	水果香、青草香、脂肪香
A14	壬酸乙酯	1 300	85.38±1.13 ^D	92.36±1.82 ^C	173.75±0.28 ^B	222.36±1.70 ^A	果香、蜡香、酯香、青草、香蕉、葡萄味
A15	癸酸乙酯	200	593.31±23.89 ^D	1 172.97±2.98 ^B	1 319.87±15.70 ^A	805.05±1.31 ^C	果香、脂肪味
A16	月桂酸乙酯	83	19.08±0.92 ^D	239.82±2.65 ^A	121.06±0.08 ^B	79.50±0.92 ^C	甜香、蜂蜡香
A17	棕榈酸乙酯	1 500	51.56±3.34 ^A	11.76±0.11 ^B	10.16±0.05 ^{BC}	7.92±0.04 ^{BCD}	苹果、菠萝味
总计 Total			9 343.53±280.50	18 039.62±24.72	18 829.77±89.24	16 668.76±26.41	

2) 主成分分析

对检测到的 17 种主要酯类化合物进行主成分分析，得到 PC1 和 PC2 的方差贡献率分别为 79.592%、15.376%，累积方差贡献率为 94.968%。各酯类化合物在 PC1 和 PC2 上的因子载荷图见图 2。由图 2 可知，PC1 正半轴上除了得分较高的乙酸己酯（苹果、樱桃）、乙酸异戊酯（香蕉，果香）、己酸乙酯（香蕉，青苹

果）、辛酸乙酯（水果香，白兰地）等，乙酸苯乙酯（花香）、癸酸乙酯（果香，脂肪味）、乙酸乙酯（菠萝，清漆，香脂）等得分也较高，即 PC1 正半轴除了酯类化合物的特有水果香外还带有花香、脂香。同理，PC1 负半轴包括乙酸异丁酯（甜香，果香）、丁酸乙酯（香蕉，草莓）、棕榈酸乙酯（苹果，菠萝）等果香，同时，丁二酸二乙酯（青草，葡萄，水果香）、

辛酸戊酯（青草香，脂肪香，水果香）等具有特殊的青草香气特征。



注：A1~A17 同表 7。

Notes: A1 to A17 are consistent with Table 7.

图 2 酯类化合物主成分分析的因子载荷图

Fig.2 Factor loadings plot of PCA for esters compounds

图 2 得到 PC1 和 PC2 的累积方差为 94.968%。GF-2、ZX-1 分布在 PC1 正半轴，CK、VP41 两个处理组处于 PC1 负半轴，这与具有果香味的化合物（乙酸己酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯）的含量有关。分布于 PC1 正半轴的 GF-2、ZX-1 处理组的上述香气化合物含量明显高于处于负半轴的 CK 和 VP41。表明接种 *O.oeni* 进行 MLF 对酒样酯类挥发性香气化合物的影响显著。且 3 株供试菌株在 PCA 图中呈分散型分布，特别是商业与本土菌株发酵酒样间的酯类物质构成特征存在明显差异，而本土菌株 ZX-1 与 GF-2 间的差异较小。

3) 葡萄酒样感官分析

对发酵酒样中的感官特征进行分析（图 3）后表明经过 MLF 后的霞多丽干白葡萄酒果香、花香味更突出。ZX-1 组最典型，其次为 GF-2、VP41 组，与未接种 MLF 组（CK）差异较大，这主要是由于各菌株所具有的酯酶活性不同，进而导致了酯类香气物质的水解平衡差异，最终形成风格各异的香气品质。与 CK 相比，MLF 后 3 个处理组酒样在外观（色泽、澄清度）方面均无明显变化；本土 *O.oeni* 菌株 GF-2、ZX-1 发酵酒样的典型性、余味长短无明显差异，但均高于商业菌株 VP41 和 CK 处理组。综合分析，利用本土 *O.oeni* 进行 MLF 后的葡萄酒花果香突出，酒体协调性、典型性较强。

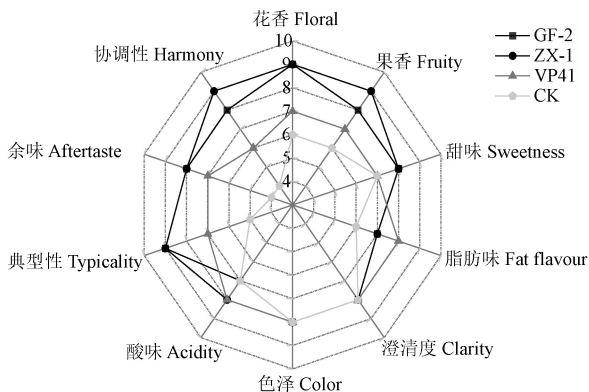


图 3 霞多丽干白葡萄酒酯类物质雷达图

Fig.3 Radar map of ester compounds in Chardonnay dry white wine

3 讨论

Betteridge 等^[24]研究发现，*O.oeni* 对葡萄酒生境具有良好的耐胁迫能力，是进行 MLF 的主导菌，可产生一系列具有潜在底物特异性的酯酶。*O.oeni* 的酯酶活性受多种因素的影响，如温度^[20]、pH 值^[2]、乙醇等^[17]。本研究发现 pH 值对所有供试 *O.oeni* 菌株的酯酶活性影响均较显著，低 pH 值（3.0~3.2）明显抑制菌株酶活性。低浓度乙醇可提高膜的渗透性，使细胞内酯酶和底物之间更易接触，进而释放出更多产物。试验表明当乙醇浓度为 8% 时，供试菌株有最大酯酶活性，然而随着乙醇浓度的增加，膜结构被破坏，致使菌株的酯酶活性降低^[4]。但这与 Rodríguez 等^[25]认为不同乙醇浓度可影响 *O.oeni* 菌株的生长参数，却不影响酯酶活性的研究结果存在差异，这可能是因为试验菌株间的特性差异及选取乙醇浓度范围不同导致的。SO₂ 分子可穿过细胞膜，扩散进入细胞，影响 *O.oeni* 生长和其产酶能力^[26]，因此随着 SO₂ 浓度的增加，供试菌株的酯酶累积活性也有所降低，但 *O.oeni* 对 SO₂ 的敏感性取决于菌株和培养条件^[27]。通常情况下，酿酒过程中 *O.oeni* 面临着多个酿造因子的协同作用，与单一因素作用相比，复合条件下菌株的酯酶活性显著降低^[28]。因此，酿造因子之间的交互作用及其对 *O.oeni* 菌株合成分泌酯酶的内在作用机制，有待进一步研究。

酯类化合物对葡萄酒香气品质的形成具有重要作用，赋予酒体浓郁的果香和花香气味^[29-31]。González-Centeno 等^[22]分别将霞多丽葡萄酒置于橡木桶和不锈钢桶中进行 MLF，结果显示，在橡木桶中进行 MLF 的葡萄酒坚果味更浓郁，而在不锈钢桶中进行 MLF 的霞多丽葡萄酒柑橘味和花香味更突出。Gambetta 等^[23]报道指出，霞多丽葡萄酒进行 MLF 后，在直链脂肪酸乙酯中，辛酸乙酯、癸酸乙酯、己酸乙酯等物质的含量高于阈值，使葡萄酒呈现了梨、苹果、菠萝或花香等香气特征。曲昆生等^[32]对比了 MLF 发酵前后“威代尔”冰白葡萄酒的香气化合物差异，与只进行酒精发酵的酒样相比，经过 MLF 处理的酒样中苹果酸含量有所下降，脂肪酸乙酯类物质含量提高了 34.71%，葡萄酒的果香味强度增加，这与本试验结果一致。影响葡萄酒中酯类化合物种类和数量因素很多（葡萄品种、酵母菌和乳酸菌的选择），其净积累量决定于酵母菌和乳酸菌的酯酶催化合成与水解能力之间的平衡^[33]。我们的工作进一步证实，葡萄酒中表达的酯酶活性水平具有菌株依赖性。因此，可以通过酶基因结构、转录调控和动力学等方面的研究，深入探讨葡萄酒 MLF 条件下酯类物质产生差异的原因。

4 结论

1) 供试菌株在不同酿造因子下呈现出不同的酯酶活性，其中 SO₂ 添加量对 *O. oeni* 菌株产酶能力影响极显著 ($P<0.01$)，pH 值影响显著 ($P<0.05$)，乙醇浓度与发酵

温度分别对本土和商业菌株影响显著 ($P<0.05$)。复合发酵试验结果表明:供试菌株总酯酶活性依次为 ZX-1、GF-2、VP41, 影响 ZX-1 酯酶活性累积量的主次因素顺序为: SO_2 添加量、pH 值、乙醇浓度、发酵温度; 最优的产酶条件为: 乙醇浓度 12%、pH 值 3.6、 SO_2 添加量 30 mg/L、发酵温度 22 $^{\circ}\text{C}$, 此条件下 ZX-1 的酯酶活性可达 620.97 mU/mL, 表现出较强的葡萄酒生境适应能力。

2) 霞多丽干白葡萄酒微酿试验结果表明, 供试 *O.oeni* 菌株具有较好的 L-苹果酸降解能力, 能够顺利完成苹果酸-乳酸发酵, 且各酒样的理化指标均符合国标要求。气质联用及主成分分析显示, 苹果酸-乳酸发酵对酒样的酯类香气物质影响显著, 且经不同 *O.oeni* 菌株发酵酒样间的酯类化合物种类及含量也不相同, 特别是本土与商业菌株间的差异显著 ($P<0.05$)。因此, 使用具有较高酯酶活性的本土 *O.oeni* 菌株进行苹果酸-乳酸发酵, 更有利于河西走廊产区高品质葡萄酒的酿造生产。

参考文献

- [1] Fia G, Millarini V, Granchi L, et al. Beta-glucosidase and esterase activity from *Oenococcus oeni*: Screening and evaluation during malolactic fermentation in harsh conditions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 89: 262-268.
- [2] Bonomo M G, DI Tomaso K, Calabrone L, et al. Ethanol stress in *Oenococcus oeni*: Transcriptional response and complex physiological mechanisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(1): 2-15.
- [3] Antalick G, Perello M C, DE Revel G. Characterization of fruity aroma modifications in red wines during malolactic fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(50): 12371-12383.
- [4] Sumby K M, Grbin P R, Jiranek V. Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgarii*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(2): 413-422.
- [5] Liu P T, Zhang B Q, Duan C Q, et al. Pre-fermentative supplementation of unsaturated fatty acids alters the effect of overexpressing ATF1 and EEB1 on esters biosynthesis in red wine[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 120: 108925-108935.
- [6] Padilla B, Gil J V, Manzanares P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(1): 411-431.
- [7] Sumby K M, Grbin P R, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects[J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 1-16.
- [8] Alem H, Rigou P, Schneider R, et al. Impact of agronomic practices on grape aroma composition: A review[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 87(4): 1-17.
- [9] Sumby K M, Bartle L, Grbin P R, et al. Measures to improve wine malolactic fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(6): 2033-2051.
- [10] Maturano C, Fabiana M S. Influence of glycosides on behavior of *Oenococcus oeni* in wine conditions: Growth, substrates and aroma compounds[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(8): 151-161.
- [11] Sico M A, Bonomo M G, Salzano G. Isolation and characterization of *Oenococcus oeni* from Aglianico wines[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(9): 1829-1835.
- [12] Matthews A, Grbin P R, Jiranek V. Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(2): 329-337.
- [13] 李婷, 陈景桦, 马得草, 等. 优选非酿酒酵母与酿酒酵母在模拟葡萄汁发酵中生长动力学及酯酶活性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 60-66.
Li Ting, Chen Jinghua, Ma Decao, et al. Yeast growth kinetics and esterase activities of the selected non-*Saccharomyces* yeast and *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of model grape juice[J]. Food Science, 2017, 38(22): 60-66. (in Chinese with English abstract).
- [14] 刘琦. 不同酿造因子对‘贵人香’干白葡萄酒挥发性香气化合物的影响研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
Liu Qi. Study on the Influence of Different Brewing Factors on Volatile Aroma Compounds in ‘Italian Riesling’ Dry White Wine[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019. (in Chinese with English abstract).
- [15] 李华. 现代葡萄酒工艺学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中国国家标准化管理委员会: GB/T15037—2006 葡萄酒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [17] Englezos V, Cachón D C, Rantsiou K, et al. Effect of mixed species alcoholic fermentation on growth and malolactic activity of lactic acid bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 50(8): 2344-2349.
- [18] Cinquanta L, DE Stefano G, Formato D, et al. Effect of pH on malolactic fermentation in southern Italian wines[J]. European Food Research and Technology, 2018, 244(7): 1261-1268.
- [19] 祝霞, 王璐璐, 赵丹丹, 等. 甘肃河西走廊葡萄酒产区本土酒球菌发酵耐受性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 159-164.
Zhu Xia, Wang Lulu, Zhao Dandan, et al. Analysis on fermentation tolerance of native *Oenococcus oeni* in Hexi corridor of Gansu province[J]. Food Science, 2020, 41(18): 159-164. (in Chinese with English abstract)
- [20] Lasik M. The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: A review[J]. European Food Research and Technology, 2013, 237(6): 843-850.
- [21] Bonomo M G, Tomaso K, Calabrone L, et al. Ethanol stress in *Oenococcus oeni*: Transcriptional response and complex physiological mechanisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(1): 2-15.
- [22] González-Centeno M R, Chira K, Teissedre P L. Ellagitannin content, volatile composition and sensory profile of wines from different countries matured in oak barrels subjected to different toasting methods[J]. Food Chemistry, 2016(210): 500-511.
- [23] Gambetta J M, Bastian S E P, Cozzolino D, et al. Factors influencing the aroma composition of Chardonnay wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014(28): 6512-6534.
- [24] Betteridge A L, Sumby K M, Sundstrom J F, et al. Application of directed evolution to develop ethanol tolerant *Oenococcus oeni* for more efficient malolactic fermentation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 68(3): 292-304.
- [25] Rodríguez M E, Lopes C A, Valles S, et al. Characterization of α -rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(6): 2206-2213.
- [26] Miranda-Castilleja D E, Martínez-Peniche R Á, Aldrete-Tapia J A, et al. Distribution of native lactic acid bacteria in wineries of queretaro, mexico and their resistance to wine-like conditions[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(3): 1432-1442.
- [27] Carreté R, Vidal M T, Bordons A, et al. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*[J]. FEMS Microbiol Letters, 2002, 211(2): 155-159.
- [28] Janssens L, Pooter H L D, Schamp N M, et al. Production of flavours by microorganisms[J]. Process Biochemistry, 1992, 27(4): 195-215.
- [29] Sumby K M, Grbin P R, Jiranek V. Validation of the use of

- multiple internal control genes, and the application of real-time quantitative PCR, to study esterase gene expression in *Oenococcus oeni*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4): 1039-1047.
- [30] Darsonval M, Alexandre H, Grandvalet C. Genetically engineered *Oenococcus oeni* strains to highlight the impact of EstA2 and EstA7 esterase genes on wine ester profile[J]. Food Microbiology, 2016, 60: 21-28.
- [31] 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, 2017, 66(10): 1-23.
- [32] 曲昆生, 曲天波, 曲林, 等. 苹果酸-乳酸发酵对威代尔冰酒香气的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 36-42.
Qu Kunsheng, Qu Tianbo, Qu Lin, et al. Effect of malolactic fermentation on volatile compounds of Vidal ice wine[J]. China Brewing, 2019, 38(9): 36-42. (in Chinese with English abstract).
- [33] Howell K S, Klein M, Swiegers J H, et al. Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5420-5426.

Effects of esterase activity of *alcoholicus* in Hexi Corridor production areas on ester aroma compounds in wine

Zhu Xia^{1,2}, Zhao Dandan¹, Li Jun'e¹, Han Shunyu^{1,2}, Yang Xueshan^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Gansu Key Lab of Viticulture and Enology, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of fermentation conditions on the cumulative esterase activity of *Oenococcus oeni* (*O.oeni*) autochthonous strains in the Hexi Corridor region, particularly in the aromaticesters of Chardonnay dry white wine during the Malolactic Fermentation (MLF). Two *O. oeni* autochthonous strains, such as GF-2 and ZX-1, were preserved by the Gansu Key Lab Viticulture and Enology, and one commercial strain VP41 was used to test strains. The esterase activities of various carbon chain length substrates (C₂, C₄, C₆) were detected in the simulated wine during MLF process. The fermentation conditions were selected to analyze the esterase characteristics produced by the *O. oeni* strains, including the initial pH value, ethanol concentration, SO₂ addition, and fermentation temperature. A microvinification experiment was performed to explore the modification effect of the tested strains on the aroma quality of Chardonnay dry white wine. The esterase activities of *O. oeni* autochthonous strains were significantly higher than those of commercial strain VP41 under different pH values, where the maximum esterase activity of ZX-1 was about 63.42% higher than that of VP41. When the concentration of ethanol was 8%, all the tested strains produced the maximum esterase activity, indicating the *O.oeni* autochthonous strain had strong esterase producing ability. Under the different SO₂ additions, the cumulative esterase activities of two *O. oeni* autochthonous strains were significantly higher than that of VP41 ($P<0.05$), while, the esterase activity of GF-2 was significantly higher than those of strain VP41 at 18 and 22 °C ($P<0.05$). Results of compound fermentation showed that the total esterase activity originated from ZX-1 was the highest, followed by GF-2 and VP41. There were different effects of the major and secondary factors on the esterase activity of each strain. An optimum condition was obtained for the esterase production of all tested strains: the ethanol concentration of 12%, pH value of 3.6, SO₂ addition of 30 mg/L, and the fermentation temperature of 22 °C. The highest esterase activity of ZX-1 was 620.97 mU/mL, indicating that a strong adaptability to wine habitat. In the microvinification of chardonnay dry white wine, esters were identified in the wine samples after MLF. There were richer variety aroma and better fragrance persistence in the wines that fermented by autochthonous strains GF-2 and ZX-1, compared with the commercial strain VP41. Both *O.oeni* autochthonous and commercial strains can successfully complete MLF, especially ZX-1 has strong esterase production capability, depending mainly on the fermentation conditions. Therefore, the ZX-1 can be used to effectively improve the content of fruit and floral aroma compounds in the Chardonnay dry white wine, thereby to enhance the regional microbial terroir characteristics of wines. The *O. oeni* autochthonous strain ZX-1 was more suitable to be used as the MLF starter of dry white wine in the Hexi Corridor of Gansu Province.

Keywords: enzymes; activity; wine; *Oenococcus oeni*; malolactic fermentation; ester compound