

模拟葡萄汁中添加可同化氮对酵母菌酒精发酵的影响

张 瑾^{a,b}, 王国栋^b, 惠竹梅^a

(西北农林科技大学 a 葡萄酒学院, b 理学院, 陕西杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**研究添加可同化氮对模拟葡萄汁酒精发酵的影响,确定利于酵母菌酒精发酵的可同化氮水平,为葡萄酒酿造过程中可同化氮的添加提供依据。**【方法】**设计 3 种氮素添加方式,分析不同质量浓度可同化氮和添加处理下模拟葡萄汁的酒精发酵过程及产物的差异,对各处理酒精发酵过程中的酵母菌数量和还原糖含量及酒精发酵结束后的游离氨基酸、铵态氮、有机酸、香气成分含量进行测定和分析。**【结果】**随着可同化氮质量浓度的升高,酵母菌数量增加,酒精发酵速率增大,二次添加可同化氮使酵母菌数量增加较快,糖消耗速率增大;可同化氮质量浓度为 240 mg/L 时,有机酸的总生成量最高,二次添加可同化氮降低了有机酸的总生成量,提高了乳酸、乙酸和琥珀酸的生成量,但柠檬酸的生成量有所降低;可同化氮质量浓度的升高有利于生成较多的香气成分,二次添加处理可以提高高级醇和酯类的生成量,但对酸类生成量无明显影响。**【结论】**可同化氮是酵母菌进行正常酒精发酵必需的大量营养元素,可同化氮质量浓度低于 90 mg/L 时,添加有机氮(氨基酸)和无机氮(铵态氮)均能促进酵母菌完成酒精发酵,可同化氮质量浓度的升高有利于生成较多的香气成分。

[关键词] 模拟葡萄汁;可同化氮;酒精发酵;香气成分

[中图分类号] S663.109.9;TS262.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)03-0160-07

Influence of addition of assimilable nitrogen on alcoholic fermentation in chemically defined must by wine yeasts

ZHANG Jin^{a,b}, WANG Guo-dong^b, XI Zhu-mei^a

(a College of Enology, b College of Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The influence of addition of nitrogen on alcoholic fermentation was studied. Comparing the fermentation products, the good level of nitrogen concentration was found which will provide a basis of additional assimilable nitrogen in brewing process. **【Method】** In this experiment, the chemically defined musts were in different concentrations of assimilable nitrogen fermentated. **【Result】** The results showed that during fermentation the yeast number was growing up as the assimilable nitrogen concentration increased. The fermentation rate and the sugar consumption rate of additional treatments were higher before addtion; the total organic acids was the highest with the assimilable nitrogen concentration at 240 mg/L, additional treatment reduced the amount of citric acid and increased the lactic acid, acetic acid and succinic acid; the formation of aroma components benefited from the increasing assimilable nitrogen concentration. The additional treatments improved the formation of higher alcohols and esters, but the effect on the amount of acids was not obvious. **【Conclusion】** The yeast assimilable nitrogen was one of the necessary nutrients for yeasts in alcoholic fermentation. When the content of yeast assimilable nitrogen was at 90 mg/L, addition of amino acids and ammonium promoted the yeast to finish the alcoholic fermentation.

* [收稿日期] 2009-07-28

[基金项目] 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目(01140303);现代农业产业技术体系建设专项基金项目(Z225020901)

[作者简介] 张 瑾(1984—),女,陕西兴平人,在读硕士,主要从事发酵微生物研究。E-mail:jinzhangnwsuaf@yahoo.cn

[通信作者] 惠竹梅(1969—),女,陕西耀县人,副教授,博士,主要从事葡萄生理生态、葡萄与葡萄酒品质研究。

E-mail:xizhumei@nwsuaf.edu.cn

The productions of aroma components grew up as the levels of yeast assimilable nitrogen increased.

Key words: chemically defined must; assimilable nitrogen; alcoholic fermentation; aroma component

氮素营养是酵母菌进行正常酒精发酵所必需的重要营养元素之一^[1]。葡萄中基本的氮素化合物包括脯氨酸、游离 α -氨基酸、铵态氮和少量小分子多肽等。脯氨酸是亚氨基酸,在无氧条件下不能被酵母所利用。因此,除脯氨酸外,游离 α -氨基酸、铵态氮和小分子多肽被称为酵母菌可同化氮(Yeast assimilable nitrogen, YAN)^[2]。葡萄汁中的可同化氮含量随葡萄品种、成熟度及产地气候、土壤条件和葡萄园管理水平等的不同而有所差异。葡萄汁中的酵母菌要完成酒精发酵过程,就必需一定量的氮素营养,若同化氮含量不足,会造成酒精发酵停滞和 H_2S 产生^[3-5]。施肥是提高葡萄果实氮素含量的主要途径之一。然而,果实生长后期若大量施入氮肥,会使果实含糖量降低,着色不良,降低果实品质。大量施氮肥还会对葡萄酒发酵后期氨基甲酸乙酯的形成带来潜在风险^[6]。目前,国外一些研究者指出,在酒精发酵开始前期或中期,向可同化氮含量不足的发酵体系中添加铵盐或者氨基酸,可避免酒精发酵停滞带来的诸多问题。有报道指出,添加氨基酸和铵态氮会影响酒精的发酵速率及其醇类、酯类物质的含量^[7-8],但尚未见可同化氮素质量浓度和种类对葡萄酒中有机酸、高级醇及酯类含量影响的报道。基于以上原因,本研究以模拟葡萄汁为试材,研究了不同质量浓度可同化氮对酵母菌酒精发酵结束后有机酸、高级醇、酯类含量的影响,并对二次添加和一次添加进行了比较分析,旨在为葡萄酒酿造过程中氨基酸和铵态氮的添加提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

模拟葡萄汁配制参考文献[1,5,9-11],分别由储液Ⅰ、储液Ⅱ和储液Ⅲ组成。其中储液Ⅰ:在375 mL蒸馏水中加入200 g葡萄糖,定容至500 mL;储液Ⅱ:在250 mL蒸馏水中加入6 g酒石酸、3 g苹果酸、0.5 g柠檬酸;储液Ⅲ:在250 mL蒸馏水中加入6 mg肌醇、0.2 g氯化钙、可同化氮 YAN,其中可同化氮 YAN 的成分为丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸,以磷酸氢二铵(DAP)作无机氮源。

将储液Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ混合后,用KOH调节pH至3.25,0.45 μm 滤膜过滤除菌,现用现配。

1.2 试验设计

试验设90,240,300和400 mg/L 4组可同化氮质量浓度水平,分别用YAN₉₀、YAN₂₄₀、YAN₃₀₀和YAN₄₀₀表示。各组中可同化氮含量如下(其中有机氮和无机氮的比例为3:2):

YAN₉₀:0.074 g 丙氨酸、0.098 g 精氨酸、0.015 g 天冬酰胺、0.025 g 天冬氨酸、0.112 g 谷氨酰胺、0.075 g 谷氨酸、0.051 g 丝氨酸、0.049 g 苏氨酸、0.172 g DAP;

YAN₂₄₀:0.198 g 丙氨酸、0.262 g 精氨酸、0.040 g 天冬酰胺、0.066 g 天冬氨酸、0.297 g 谷氨酰胺、0.200 g 谷氨酸、0.135 g 丝氨酸、0.129 g 苏氨酸、0.457 g DAP;

YAN₃₀₀:0.247 g 丙氨酸、0.327 g 精氨酸、0.049 g 天冬酰胺、0.083 g 天冬氨酸、0.372 g 谷氨酰胺、0.250 g 谷氨酸、0.169 g 丝氨酸、0.161 g 苏氨酸、0.571 g DAP;

YAN₄₀₀:0.330 g 丙氨酸、0.436 g 精氨酸、0.066 g 天冬酰胺、0.110 g 天冬氨酸、0.496 g 谷氨酰胺、0.334 g 谷氨酸、0.225 g 丝氨酸、0.215 g 苏氨酸、0.762 g DAP。

酒精发酵开始72 h后,对YAN₉₀进行可同化氮二次添加,添加至可同化氮质量浓度为240 mg/L。添加方式有3种:①YAN_{90A}:添加1.275 g 苏氨酸;②YAN_{90B}:添加0.714 g DAP;③YAN_{90C}:添加0.765 g 苏氨酸和0.286 g DAP。以未添加处理的YAN_{90CK}作为对照。

1.3 试验设备

SS325 高压蒸汽灭菌锅,TOMY;MJ-250B型霉菌培养箱,上海跃进医用光学器械厂;SENCO W201 旋转蒸发仪,上海申生科技有限公司;pHS-3C型精密pH计,上海雷磁仪器厂;电热恒温水浴箱,北京市长风仪器仪表有限公司;GC/MS仪(Thermo Trace GC ultra-DSQ),美国Finnigan公司;Auto Analyzer3流动分析仪,德国BRAN LU-EBBE公司,配置有采样器、AA3泵、AA3化学模块、AA3数字比色计4个模块,双通道,含AACE操作软件;510型高效液相色谱仪,Waters公司;121MB型氨基酸分析仪,美国贝克曼公司;AIR TECH超净工作台,北京格瑞恩科技有限公司。

1.4 试验内容与方法

1.4.1 酵母菌计数 选用 Uvaferm 酵母干粉,活化后接入模拟葡萄汁中,于 27 ℃下恒温发酵。酒精发酵启动后,每天进行酵母菌的稀释平板计数^[11-12],每处理 3 次重复。

1.4.2 测定指标与方法 在酒精发酵过程中监测还原糖含量,发酵结束后测定游离氨基酸、铵态氮、有机酸和香气成分含量。其中还原糖含量采用菲林试剂热滴定法测定,游离氨基酸采用 121MB 型氨基酸分析仪测定,铵态氮采用 AA3 流动分析仪测定,有机酸采用高效液相色谱法测定^[13]。每处理 3 次重复。

1.4.3 香气成分的测定 香气成分采用固相微萃取法结合 GC-MS 进行测定。在萃取过程中加入内标物质 2-辛醇对香气成分进行半定量分析。

(1)香气成分提取。采用固相微萃取法,取模拟发酵汁 10 mL 于顶空瓶中,同时加入 2-辛醇做内标物质,其质量浓度为 2.367 mg/L,在超声波下平衡 10 min 后将老化(于 250 ℃下老化 1 h)的 PA 萃取头穿过封垫,置于封闭顶空瓶的上部顶空处,在 45 ℃下吸附 30 min,每处理 3 次重复。

(2)GC/MS 分析。色谱条件:色谱柱进样口温度为 250 ℃,柱温箱起始温度 40 ℃,保留时间 1.5 min,以 6 ℃/min 升温至 220 ℃,保留 5 min;载气 He,恒流 1 mL/min;不分流进样 1 min,分流比 10:1。

质谱条件:电离方式 EI,电离电压 70 eV,离子源温度 250 ℃,连接杆温度 220 ℃。扫描范围:33~450 amu。

各组分质谱经 Nist02 图谱检索及资料分析,采用内标法(2-辛醇)进行半定量分析,即通过比较待测组分与内标物峰面积的比值(校正因子为 1^[14]),计算待测组分的含量。计算公式如下:

待测组分含量/(μg · L⁻¹)=待测组分的峰面积 × 内标物浓度(mg/L) × f × 1 000/内标峰面积。
式中:f 为各组分对内标物的校正因子。

2 结果与分析

2.1 可同化氮质量浓度水平对酵母菌数量的影响

由图 1 可以看出(图中箭头为二次添加时间点),随着可同化氮质量浓度的升高,酵母菌数量增加。酒精发酵开始后,YAN₂₄₀ 和 YAN₃₀₀ 中的酵母菌数量在 50 h 后达到稳定,YAN₄₀₀ 在 100 h 后达到稳定。YAN_{90A}、YAN_{90B} 和 YAN_{90C} 在添加 72 h 后,酵母繁殖时间延长,于 100 h 后达到稳定。100 h 后各处理组中酵母菌数量从高到低依次为:YAN₄₀₀ > YAN_{90C} > YAN_{90B} > YAN_{90A} > YAN₃₀₀ > YAN₂₄₀ > YAN_{90CK}。二次添加(YAN_{90A}、YAN_{90B} 和 YAN_{90C})使酵母菌数量升高,且明显高于一次添加的同一质量浓度水平处理组(YAN₂₄₀)。二次添加处理中,同时添加苏氨酸和磷酸氢二铵(YAN_{90C})的酵母菌数量,较单独添加苏氨酸(YAN_{90A})或磷酸氢二铵(YAN_{90B})的处理高。说明可同化氮含量越高越有利于酵母菌的大量繁殖,并可延长酵母菌的繁殖时间,二次添加可以提高可同化氮的利用效率,苏氨酸和 DAP 在酵母菌的利用过程中相互促进,有利于各自利用率的提高。

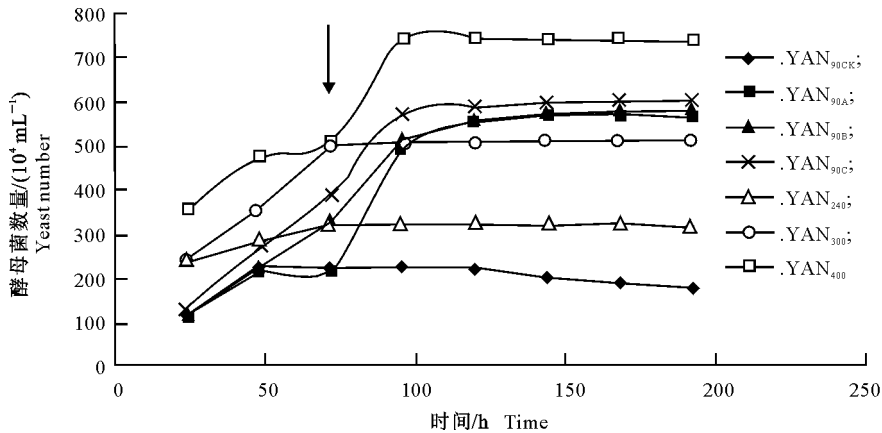


图 1 不同可同化氮水平对酵母菌数量的影响

Fig.1 Number of *Saccharomyces cerevisiae* at different levels of yeast assimilable nitrogen concentrations

2.2 可同化氮质量浓度水平对酵母菌糖代谢的影响

由图 2 可以看出(图中箭头为二次添加时间

点),除 90 mg/L 可同化氮的对照处理外,其余处理的酒精发酵周期均约为 700 h;随着可同化氮质量浓度的升高,酵母菌对糖的消耗速率随之增高,各处理

糖含量从高到低依次为: $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240} > YAN_{90CK}$; 72 h 后二次添加处理中的还原糖被逐渐消耗,而对照组出现发酵停滞,其中以 YAN_{90C} 处理组中糖的消耗速率最高。酒精发酵结束后,除 90 mg/L 可同化氮的对照处理外,各处理组的还原糖含量均降低至 4 g/L 左右。该结果说明,可同化氮能促进酵母菌的糖代谢过程,当可同化氮质量浓度为 90 mg/L 时,酵母菌无法进行正常糖代谢而表现为酒精发酵停滞。二次添加可同化氮可使酵母菌完成酒精发酵,同时添加苏氨酸和 DAP 的二次添加处理,可以提高酵母菌对糖的消耗速率。

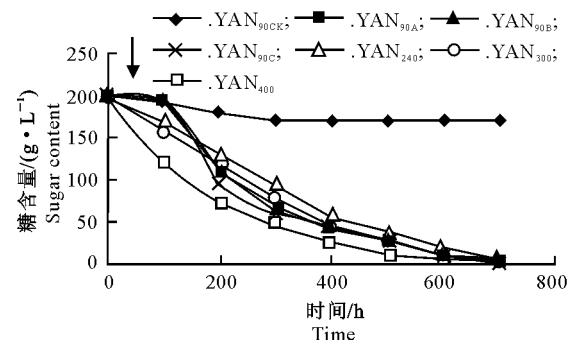


图 2 不同可同化氮质量浓度水平对糖含量的影响
Fig.2 Sugar content at different levels of yeast assimilable nitrogen concentrations

2.3 酒精发酵前后模拟葡萄汁中铵态氮和氨基酸含量的变化

由表 1 和表 2 可以看出,酒精发酵结束后,铵态氮的利用率均在 90% 以上;新生成的氨基酸有谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、胱氨酸、赖氨酸和组氨酸。一次添加可同化氮处理中,新生成氨基酸的总量从高到低依次为 $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240}$; 精氨酸被酵母菌完全消耗。二次添加可同化氮处理中,新生成氨基酸的总量从高到低依次为 $YAN_{90A} > YAN_{90C} > YAN_{90B}$; 精氨酸亦被酵母菌完全消耗。该结果说明,模拟葡萄汁中的铵态氮利用率较氨基酸高,可同化氮质量浓度的升高促进了氨基转移反应的进行,且精氨酸可优先为酵母菌所利用。

表 1 酒精发酵前后铵态氮含量的变化

Table 1 Changes of ammonium content at fermentation			
处理 Treatment	铵态氮/(mg·L ⁻¹) Ammonium nitrogen		铵态氮消耗率/% Ammonium nitrogen consumption
	FS	FE	
YAN_{90A}	18.232	1.174	93.561
YAN_{90B}	93.906	1.458	98.447
YAN_{90C}	48.553	1.183	97.563
YAN_{240}	48.440	1.377	97.157
YAN_{300}	60.529	1.565	97.414
YAN_{400}	80.744	2.236	97.232

注:FS: 发酵开始;FE: 发酵结束。下表同。
Note: FS: Fermentation start; FE: Fermentation end. The following table is same.

表 2 酒精发酵前后氨基酸含量的变化

氨基酸/(mg·L ⁻¹) Amino acid	YAN_{90A}		YAN_{90B}		YAN_{90C}		YAN_{240}		YAN_{300}		YAN_{400}	
	FS	FE	FS	FE	FS	FE	FS	FE	FS	FE	FS	FE
天冬氨酸 Asp.	25	1.063	25	0.634	25	0.831	66	3.014	83	2.932	110	3.800
苏氨酸 Thr.	1 324	24.369	49	1.325	814	5.959	129	5.755	161	6.457	215	8.780
丝氨酸 Ser.	51	15.232	51	1.492	51	2.943	135	7.147	169	8.379	225	11.729
谷氨酸 Glu.	75	5.610	75	4.334	75	6.155	200	5.854	250	8.802	334	13.778
脯氨酸 Pro.	0	0.634	0	0.819	0	0.738	0	1.672	0	2.741	0	2.801
甘氨酸 Gly.	0	0.985	0	0.541	0	1.133	0	0.280	0	0.532	0	0.734
丙氨酸 Ala.	74	2.271	74	1.990	74	2.24	198	8.687	247	9.475	330	15.04
胱氨酸 Cyr.	0	0.382	0	0.119	0	0.124	0	0.234	0	0.602	0	0.322
赖氨酸 Lys.	0	0.527	0	0.456	0	0.191	0	0.248	0	0.436	0	0.269
组氨酸 His.	0	0.173	0	0.040	0	0.066	0	0.293	0	0.356	0	0.211
精氨酸 Arg.	98	0	98	0	98	0	262	0	327	0	436	0

2.4 可同化氮质量浓度水平对有机酸含量的影响

由图 3 可知,在一次添加可同化氮处理的模拟汁中,有机酸总含量从高到低依次为 $YAN_{240} > YAN_{400} > YAN_{300}$ 。随着可同化氮质量浓度的升高,酒石酸、苹果酸和琥珀酸的含量随之升高;乳酸和乙酸含量从高到低依次为 $YAN_{300} > YAN_{400} > YAN_{240}$ 。二次添加处理的乳酸、乙酸和琥珀酸含量明显高于一次添加;苹果酸含量的变化不明显;酒石

酸和柠檬酸含量低于一次添加。说明二次添加使有机酸的总生成量减少,柠檬酸的生成量降低,但可以提高乳酸、乙酸和琥珀酸的生成量。

2.5 添加可同化氮对模拟汁香气成分的影响

由表 3 可以看出,6 组处理共检测出香气成分 30 种。高级醇 12 种,其含量占总香气成分的 33%~52%;酯类 6 种,占总香气成分的 39%~50%;酸类 4 种,占总香气成分的 6%~14%。在一

次添加可同化氮处理中,生成香气种类由多到少依次为 $YAN_{300} > YAN_{240} > YAN_{400}$,香气成分总含量由高到低依次为 $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240}$ 。说明

可同化氮质量浓度的升高,有利于香气成分含量的提高,但不利于增加香气种类。

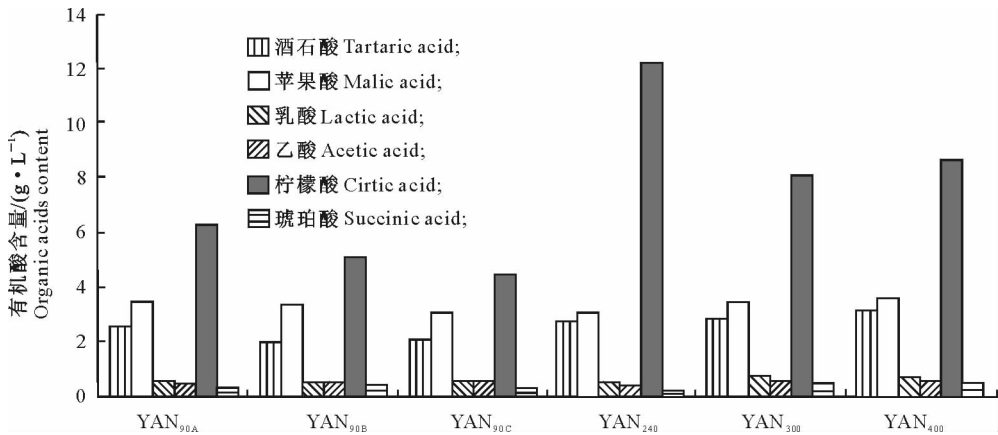


图 3 不同可同化氮质量浓度水平对有机酸含量的影响

Fig. 3 Organic acids contents at different levels of assimilable nitrogen concentration

2.5.1 高级醇 由表 3 可以看出,一次添加可同化氮处理时的高级醇总含量由高到低依次为: $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240}$;二次添加的高级醇总含量明显高于一次添加。高级醇中含量较高的苯乙醇具有花粉、花香的特点,其含量由高到低依次为 $YAN_{300} > YAN_{240} > YAN_{400}$,二次添加使苯乙醇的生成量有所提高;另一含量较高的十二醇在浓度高时,会有令人不快的气味,在低浓度时则具有花香的特点,其含量随着可同化氮质量浓度的升高而升高。说明可同化氮质量浓度的升高,有利于生成较多的高级醇,而较高的可同化氮质量浓度,也会增加十二醇带来的负作用。

2.5.2 酯类 由表 3 可以看出,在一次添加可同化氮处理中,酯类总含量从高到低依次为 $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240}$;二次添加处理中的酯类总含量明显高于一次添加处理。其中含量较高的乙酸乙酯具

有甜香、果香的特点,辛酸乙酯具有菠萝、梨和令人愉悦的花香等特点,二者含量从高到低均表现为 $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240}$,二次添加可提高二者的生成量。说明可同化氮质量浓度的升高及二次添加,有利于生成较多的酯类,促进葡萄酒优良酯类的生成。

2.5.3 酸类 由表 3 可以看出,在一次添加处理中,挥发酸类总含量从高到低依次为 $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240}$ 。在二次添加和一次添加处理中,挥发酸类总含量的差异并不明显。乙酸具有醋味,辛酸具有奶酪味、涩味、腐败味等特点,二者含量从高到低均表现为 $YAN_{400} > YAN_{300} > YAN_{240}$,二次添加可同化氮有利于乙酸的生成,但对辛酸的生成无明显影响。说明可同化氮质量浓度较高时,会促进不愉悦滋味物质的生成,从而对葡萄酒香气产生负面影响。

表 3 不同可同化氮质量浓度水平对香气物质含量的影响

Table 3 Effects of different levels of yeast assimilable nitrogen concentration on contents of aroma components

香气成分 Aroma component	RT	分子质量 Molecular formula	分子式 Molecular weight	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Content					
				YAN _{90A}	YAN _{90B}	YAN _{90C}	YAN ₂₄₀	YAN ₃₀₀	YAN ₄₀₀
醇类 Alcohols									
2-甲基-1-丙醇 2-methyl-1-propanol	7.28	74	C ₄ H ₁₀ O	43	57	62	12	41	18
2-甲基-1-丁醇 2-methyl-1-butanol	10.2	88	C ₅ H ₁₂ O	676	319	626	112	257	217
2,3-丁二醇 2,3-Butanediol	18.83	90	C ₄ H ₁₀ O ₂	27	23	16	17	14	80
2-呋喃甲醇 2-furanmethanol	21.77	98	C ₅ H ₆ O ₂	20	11	17	65	14	53
苯乙醇 Phenyleth alcohol	27.18	122	C ₈ H ₁₀ O	120	96	116	72	101	51
十二醇 Dodecanol	28.24	186	C ₁₂ H ₂₆ O	173	102	147	136	137	164

续表 3 Continued table 3

香气成分 Aroma component	RT	分子质量 Molecular formula	分子式 Molecular weight	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Content					
				YAN _{90A}	YAN _{90B}	YAN _{90C}	YAN ₂₄₀	YAN ₃₀₀	YAN ₄₀₀
醇类 Alcohols									
丙三醇 Glycerin	34.78	92	C ₃ H ₈ O ₃	132	87	134	117	142	270
正丙醇 Propanol	5.8	60	C ₃ H ₈ O	—	8	—	—	—	—
3-甲基-1-丁醇 3-methyl-1-Butanol	10.17	88	C ₅ H ₁₂ O	—	319	—	112	255	229
1-丁醇 1-Butanol	8.44	74	C ₄ H ₁₀ O	—	—	9	—	7	—
2-乙基-1-己醇 2-ethyl-1-Hexanol	17.51	130	C ₈ H ₁₈ O	—	—	14	—	15	—
1,3-丙二醇 1,3-Propanediol	32.32	76	C ₃ H ₈ O ₂	—	—	—	10	—	—
小计 Total				1 191	1 022	1 141	653	983	1 082
酯类 Esters									
乙酸甲酯 Acetic acid methyl ester	12.76	74	C ₃ H ₆ O ₂	16	10	—	—	10	—
乙酸乙酯 Acetic acid ester	2.89	88	C ₄ H ₈ O ₂	841	1 039	965	624	874	1 563
辛酸乙酯 Octanoic acid ethyl ester	16.1	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	21	32	22	17	22	24
癸酸乙酯 Decanoic acid ethyl ester	21.1	200	C ₁₂ H ₂₄ O	11	18	—	—	8	—
邻苯二甲酸二丁酯 Dibutylphthalate	39.57	278	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	11	13	14	16	13	17
十六酸甲酯 Hexadecanoic acid methyl ester	32.98	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	—	—	—	10	—	—
小计 Total				900	1 112	1 001	667	927	1 604
酸类 Acids									
乙酸 Acetic acid	16.68	60	C ₂ H ₄ O ₂	101	108	82	17	94	385
辛酸 Octanoic acid	30.1	144	C ₈ H ₁₆ O ₂	25	39	36	31	41	49
癸酸 Decenoic acid	35.07	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	—	13	56	102	94	—
十二酸 Dodecanoic acid	37.12	200	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	9	11	10	13	16	17
小计 Total				135	171	184	163	245	451
酮类 Ketones									
2 辛酮 2-Octanone	12.14	128	C ₈ H ₁₆ O	64	71	60	69	67	59
3-羟基-2-丁酮 3-hydroxy-2-butanone	12.33	88	C ₄ H ₈ O ₂	36	54	32	29	34	61
1-羟基-2-丙酮 1-hydroxy-2-Propanone	12.9	74	C ₃ H ₆ O ₂	—	—	—	37	—	—
1,3-二羟基-2-丙酮 1,3-dihydroxy-2-Propanone	30.68	90	C ₃ H ₆ O ₃	—	29	—	16	30	39
小计 Total				100	154	92	151	131	159
其他 Others									
乙醛 Acetaldehyde	1.81	44	C ₂ H ₄ O	43	83	89	72	65	—
2,4-二甲基苯酚 2,4-dimethyl-Phenol	34.76	206	C ₁₄ H ₂₂ O	—	—	—	78	23	—
5-甲基-2-呋喃甲醛 5-methyl-2-Furancboxal- dehyde	19.72	110	C ₆ H ₆ O ₂	29	12	20	58	23	85
正十四烷 Tetradecane	15.06	198	C ₁₄ H ₃ O	12	11	13	—	—	—
小计 Total				84	106	122	208	111	85
总计 Sum				2 410	2 565	2 540	1 842	2 397	3 381

注:“—”表示未检出。
Note:“—”mean not detected.

3 讨 论

可同化氮是酵母菌进行酒精发酵的大量营养元素。本试验研究发现,随着可同化氮质量浓度的升

高,酵母菌数量升高;无论添加有机氮(氨基酸)还是无机氮(铵态氮),都会促进酵母菌的生长繁殖;可在同化氮质量浓度低于 90 mg/L 时,会出现酒精发酵停滞,该研究结果与 Bisson^[4]等的研究结果一致。

同时一些研究者也指出,酵母菌完成酒精发酵所需的可同化氮质量浓度为 100~150 mg/L,当可同化氮质量浓度低于该值时,应对葡萄汁进行可同化氮素添加处理,使其含量达到 250~300 mg/L,通常认为,可同化氮含量在这一范围时,会产生相对清爽、果香浓郁的香气^[15-16],然而当可同化氮质量浓度达到 450~500 mg/L 时,会导致某些不良香气成分的生成^[2,17-18]。Oshita 等^[19]对¹³C 标记氨基酸和高级醇转化反应的研究表明,可同化氮不足时,酵母菌利用糖生成大量 α -酮酸进入氨基酸合成途径;相反,可同化氮充足时,酵母无需利用糖支路进行氨基酸的合成,因此会生成大量的高级醇和酯类。

本试验表明,可同化氮质量浓度升高和二次添加可以提高香气成分的生成量,该结果也与 Jiménez-Martí 等^[1]的研究结果相近。另外,由于不同菌种的使用,使高级醇和酯类的合成并不随着可同化氮质量浓度的升高而升高,而是在可同化氮质量浓度为 200~300 mg/L 时达到最高^[20]。本试验中,苯乙醇生成量的变化也有类似结果,这也许是因为充足的可同化氮有利于氨基转移反应的发生,从而降低了高级醇的生成。因此,当发酵菌种一定时,可同化氮质量浓度影响着葡萄酒的感官品质,可以通过合理添加氨基酸和铵态氮对葡萄酒的品质进行控制。

4 结 论

1) 随着可同化氮质量浓度的升高,酵母菌数量增加,糖的消耗速率增加。可同化氮质量浓度低于 90 mg/L,在酒精发酵过程中出现发酵停滞现象,需添加可同化氮才能使酒精发酵得以完成。二次添加可同化氮可使酵母菌数量增加,糖消耗速率增大。

2) 酒精发酵启动后,酵母菌优先利用铵态氮形式的氮源。二次添加可同化氮的发酵速率较一次添加快,表现为酵母菌数量多,数量保持稳定时间长。

3) 可同化氮质量浓度为 240 mg/L 时,有机酸的总生成量最高,二次添加可同化氮降低了柠檬酸的生成量,但有利于提高乳酸、乙酸和琥珀酸的生成。

4) 可同化氮质量浓度的升高,有利于生成较多的香气成分,二次添加处理可以提高高级醇和酯类的生成量,而对酸类的生成量影响不明显。

[参考文献]

[1] Jiménez-Martí E, Aranda A, Mendes-Ferreira A, et al. The na-

ture of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and levels of several volatile compounds [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 92: 61-75.

- [2] Ugliano M, Henschke P A, Herderich M J, et al. Nitrogen management is critical for wine flavour and style [J]. *Australian Wine Research Institute Report*, 2007, 22(6): 24-30.
- [3] Jiranek V, Langridge P, Henschke P A. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium [J]. *Am J Enol Vitic*, 1995, 46(1): 75-83.
- [4] Bisson L F. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes [G]// Rantz J, Ed. *Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wine*. Davis, USA: American Society for Enology and Viticulture Publisher, 1991: 78-89.
- [5] Arias-Gil M, Garde-Cerdán T, Ancín-Azpilicueta C. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2007, 103: 1312-1318.
- [6] Garde-Cerdán T, Ancín-Azpilicueta C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation [J]. *Food Science and Technology*, 2008, 41: 501-510.
- [7] Hernández-Orte P, Bely M, Cacho J, et al. Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strain during fermentation in controlled synthetic media [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2006, 12: 150-160.
- [8] Beltran G, Esteve-Zarzoso B, Rozès N, et al. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 996-1002.
- [9] Riou C, Nicaud J M, Barre P, et al. Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation [J]. *Yeast*, 1997, 13: 903-915.
- [10] Vilanova M, Ugliano M, Varela C, et al. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts [J]. *Appl Microbiol Viotechnol*, 2007, 77: 145-157.
- [11] 薛 波, 李二娟, 付瑞鹏, 等. 葡萄酒相关酵母菌特性的研究 [C]//李华. 第六届国际葡萄与葡萄酒学术研讨会论文集. 西安: 陕西人民出版社, 2009: 147-153.

Xue B, Li E J, Fu R P, et al. Study on Stress Resistance of Wine-related Yeast [C]//Li H, Ed. *Proceedings of the Sixth International Symposium on Viticulture and Enology*. Xi'an: Shaanxi People's Publishing House, 2009: 147-153. (in Chinese)

(下转第 172 页)