

电子鼻对酿酒酵母菌株产香特性的评价

刘宁¹, 马捷¹, 刘延琳^{1,2,*}

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2.陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:利用电子鼻PEN3系统对不同酿酒酵母酿制葡萄酒的芳香成分进行检测分析。通过电子鼻系统动态采集葡萄酒试样的芳香成分, 利用主成分分析(PCA)、线性判断分析(LDA)进行数据分析, 两种分析方法都能较好的区分不同酵母对应的葡萄酒试样, 表明酿酒酵母的产香能力具有菌株多态性, 而电子鼻能够对其差异进行检测并加以区分。同时结合 Loadings 分析方法得知, 除 7 号(对硫化物灵敏)、9 号(对有机硫化物灵敏)和 10 号(对烷烃灵敏)外, 其他的传感器在菌株的产香差异分析中起主要作用。

关键词: 电子鼻; 酵母; 葡萄酒; 检测

Evaluation of Aroma-producing Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Electronic Nose

LIU Ning¹, MA Jie¹, LIU Yan-lin^{1,2,*}

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

2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-viniculture, Yangling 712100, China)

Abstract : An electronic nose (PEN3) was used to characterize and classify wines fermented by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The aroma components emanating from the wines were dynamically sampled by a PEN3 system and analysis of the acquired data was made comparatively using principal component analysis (PCA) and linear discrimination analysis (LDA). The results showed that electronic nose was able to differentiate the wine samples following either analysis of PCA or LDA. The aroma-producing characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* was of strain-specific diversity. Meanwhile loadings analysis showed most of the tested sensors played an important role in analyzing aroma difference, with exception of the seventh, ninth and tenth sensors.

Key words : electronic nose ; yeast ; wine aroma ; detection

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)02-0164-04

葡萄或葡萄汁转化为葡萄酒, 其本质是酵母菌等微生物代谢的过程。酵母菌将葡萄浆中糖类转化成乙醇、CO₂ 和其他副产物, 并获得生长繁殖所需的能量。同时, 将含氮化合物和硫化物转化成葡萄酒的风味与香气物质。在葡萄汁中接种不同种类的酵母菌可以生产香气特性差异显著的葡萄酒^[1], 这主要是因为酵母菌的活性和代谢产生的挥发性香气成分的种类和含量不同造成的^[2-4], 例如酿酒酵母可直接代谢生成乙醛或乙酸, 或者代谢某些酶^[5-7], 如 β -葡萄糖苷酶^[6]可以分解结合态的风味前体物质糖苷键释放出游离态的风味物质, 肉桂酸脱羧酶则可将阿魏酸转变为具有马厩味的 4- 乙基苯酚^[7]等。

近年来, 葡萄酒香气质量的评定主要有两种途径: 第一种就是依据接受培训组成的品尝专家, 这种方

法可以对葡萄酒进行分类, 然而在标准化、小组成员培训的质量以及评价的稳定性和再现性等方面存在问题; 第二种就是依据现代仪器分析技术, 例如气相色谱-质谱联用仪(GC-MS), 具有高准确、高稳定和高成本的特点。这一技术可用于食品和饮料的挥发性物质鉴定, 缺点就是在数据分析过程需要时间较多^[8]。

电子鼻作为分析香气组成的第三种途径, 它是 20 世纪 90 年代发展起来的新颖的分析、识别和检测复杂嗅味和挥发性成分的仪器, 是根据仿生学原理, 由传感器阵列和自动化模式识别系统组成^[9]。电子鼻与色谱仪、光谱仪等化学分析仪器不同, 其检测的数据不是样品中某种或某几种成分的定性和定量结果, 而是挥发性成分的整体信息, 也就是一种“指纹数据”^[10]。它模拟人

收稿日期: 2010-09-21

基金项目: 国家现代农业(葡萄)产业技术体系建设专项(nycyt-30)

作者简介: 刘宁(1985—), 女, 博士研究生, 研究方向为酿酒微生物。E-mail: liuning85@nwsuaf.edu.cn

* 通信作者: 刘延琳(1966—), 女, 教授, 博士, 研究方向为葡萄酒及酿酒微生物。E-mail: yanlinliu@nwsuaf.edu.cn

和动物的嗅觉神经系统,“闻到”目标的总体气息,根据不同的气味测到不同的信号,将这些信号与经学习建立的数据库中的信号加以比较,进行识别判断,因而具有类似鼻子的功能^[11]。目前国内外对电子鼻的研究比较活跃,如牛肉^[12]、茶叶^[10,13-14]以及水果^[10,15-16]等食品方面,主要是为其进行等级划分和新鲜度的判断。但由于葡萄酒的复杂性,电子鼻技术在葡萄酒质量检测中的应用还不多^[17-19]。近年来,相较于电子鼻在奶制品^[20]、醋^[21]和白酒^[22]等方面的应用,国内关于此仪器在葡萄酒方面的研究尚属空白。

本实验利用电子鼻技术对10株酿酒酵母酿制的葡萄酒样品和2个商品葡萄酒酒样的香气组成加以分析,进而评价这10株酿酒酵母的产香特性,这为电子鼻在酿酒酵母对葡萄酒香气影响的研究和我国本土优质酿酒酵母的筛选,提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2008年在御马用10株不同酿酒酵母酿制的干白葡萄酒,干白葡萄酒酒样分别编号为1~10,对应的酿酒酵母分别为LFP529、LFE1219、LFA711、LFE1217、LFE1215、VL1(活性干酵母)、LFN524、LFP509、LFN518、LFP504 自制;贺兰山美域珍藏系列(21)和经典系列(22)的霞多丽干白葡萄酒各一瓶 广夏(银川)贺兰山葡萄酿酒有限公司;酒样均以霞多丽葡萄为原料酿制。

1.2 仪器与设备

PEN3 电子鼻 德国 Airsense 公司。该电子鼻的传感器阵列由10个不同的金属氧化物传感器组成,传感器对某一大类芳香物质响应显著,具体见表1^[16]。

表1 电子鼻不同传感器对应香气种类
Table 1 Aroma types corresponding to different sensors of E-nose

阵列序号	传感器名称	对应香气
1	W1C	芳香成分
2	W5S	灵敏度大,对氮氧化合物很灵敏
3	W3C	氨水,对芳香成分灵敏
4	W6S	主要对氨气有选择性
5	W5C	烷烃芳香成分
6	W1S	对甲烷灵敏
7	W1W	对硫化物灵敏
8	W2S	对醇类物质灵敏
9	W2W	芳香成分,对有机硫化物灵敏
10	W3S	对烷烃灵敏

1.3 检测条件

用微量移液器取各样品10mL,分装于20mL试管,用封口膜密封,静置、待测。在电子鼻测定之前对待

测样品进行轻微振荡,电子鼻设置的检测时间30s,清洗时间300s,采用直接顶空吸气法,在室温(20)条件下,对样品进行检测。每个样品做两个平行。

1.4 数据分析

本实验采用的主要分析方法有:主成分分析法(PCA)、线性判别法(LDA)和负荷加载分析法(Loadings)。在用PCA进行分析时,若两主成分的贡献率小于95%,则表示分析中有干扰成分的作用,从而说明该方法在数据分析中不合适;LDA是DFA(识别因子法)的第一步,LDA分析注重类别的分类以及各种组之间的距离分析;Loadings分析与PCA是相关的,它们都基于同一种算法,但不同的是,本实验的算法主要是对传感器进行研究,利用该方法可以确认特定样品下各传感器的相对重要性。

2 结果与分析

2.1 Loadings 分析

通过Loadings分析(图1),可以得出电子鼻的10个传感器分别对样品的PCA主成分分析的贡献率:8号传感器对第一主成分贡献率最大,7号传感器对第二主成分贡献率最大;2、4、6、7、8、9、10号传感器对第一主成分贡献率都较大;7、9、10号对第一和第二主成分的贡献率都比较大,这3个传感器对应的点在第一象限中距离很近,说明这3个传感器的响应值并不是菌株香气的特征信号;1、3、5号主要影响第二主成分而对于第一主成分负影响,说明这3个传感器是第二主成分的特征信号,如果样品的第二主成分值比较大的话,就说明1、3、5号传感器的响应值比较大;同样的2、4、6、8号主要影响第一主成分,是第一主成分的特征信号,如果样品的第一主成分值比较大的话,就说明2、4、6、8号传感器的响应值比较大。这样,根据不同传感器对不同物质的特异敏感度,可以确定哪些物质对各试样间的差异有主要贡献。

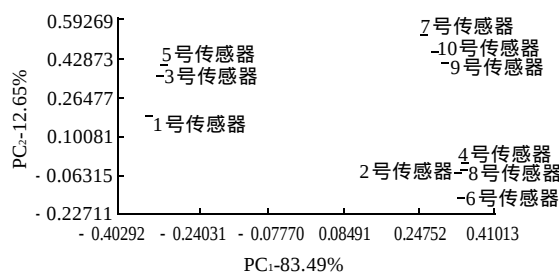


图1 Loadings 传感器贡献率

Fig.1 The Loading analysis related to the first principal component (PC₁) and the second principal component (PC₂)

2.2 主成分分析

主成分分析法又称降维映射法,其实质是寻找在最小均方意义下最能够代表原始数据的投影方法。经PCA分析后的各个样品间的区分度都在0.95以上,如表2所示,可见PCA分析可将所有的样品较为准确的区分。

表2 PCA分析的数据矩阵
Table 2 Discrimination power of PCA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	21	22
1		0.999	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	1.000
2	0.999		1.000	0.999	0.999	0.992	0.995	0.985	0.998	0.997	1.000	0.999
3	1.000	1.000		0.999	0.990	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000	0.999
4	0.999	0.999	0.999		0.999	0.999	0.998	0.998	0.999	0.998	1.000	0.999
5	1.000	0.999	0.990	0.999		0.998	0.999	0.997	0.999	0.999	1.000	0.999
6	0.999	0.992	0.999	0.999	0.998		0.996	0.978	0.999	0.998	1.000	1.000
7	0.999	0.995	0.999	0.998	0.999	0.996		0.997	0.997	0.997	1.000	0.999
8	0.999	0.985	0.999	0.998	0.997	0.978	0.997		0.997	0.995	1.000	0.998
9	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.997	0.997		0.998	1.000	0.999
10	0.999	0.997	0.999	0.998	0.999	0.998	0.997	0.995	0.998		1.000	0.999
21	0.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		1.000
22	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000	0.999	0.998	0.999	0.999	1.000	

表2说明12个样品的香气特征各不相同,然而为了进一步探测样品具体的香气特征数值,则需要结合主成分分析图。图2中,根据各样品的分布区域在横纵坐标上的投影可以得出各菌株对应酒样的香气组成,主要是第一、第二主成分的组成。

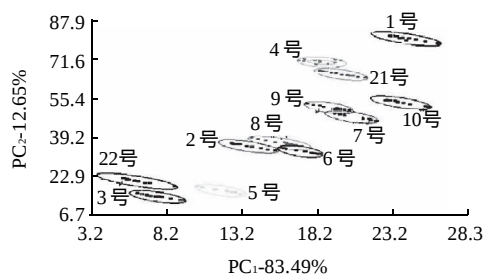


图2 试样的PCA图
Fig.2 PCA graph of samples

由图2可以看出,通过对第一主成分和第二主成分的分析,这两种主要成分贡献率可以达到96.14%,大于90%,所以这两个主成分已经基本代表了样品的主要信息特征。其中第一主成分(横坐标)占83.49%,第二主成分(纵坐标)占12.65%,取自12~22s时间段的各自样品点分布于各自的区域,说明电子鼻可以非常明显的区分出这10种干白酒样。第一主成分所占的贡献率很大,样品点主要分布在右部分和靠近原点的左下部分,而图2的左上部分(结合图1传感器贡献率,1、3、5号传感器响应大,2、4、6、8号传感器响应小)和右下部

分(1、3、5号响应小,2、4、6、8号响应大)基本没有样本点分布,说明样品点之间香气的种类以及之间的比例和权重相差不大,但是传感器的总体响应强度不同,菌株之间产香气的差别主要体现在浓度而不是种类上。由图2可以看出,1、4、10、21号样品的香气浓度比较大,而3、5、22的香气浓度比较低。4号样品更倾向于拥有1、3、5号传感器所感应的香气,而10号样品更倾向于拥有2、4、6、8号传感器所感应的香气。

2.3 LDA线性判别分析

按照线性判别分析方法,第一、第二主成分总的区分贡献率达83.59%,第一主成分区分贡献率达60.41%,第二主成分区分贡献率达23.18%。很明显,通过LDA分析也可以清楚的区分出多数酒样,同时也可以看出贺兰山商业酒样与实验酒样间的差异,但是8号LFP509对应的酒样和9号LFN518的酒样出现完全重合的现象,表明按照LDA分析,菌株LFP509和LFN518对应酒样的香气种类大致相同。

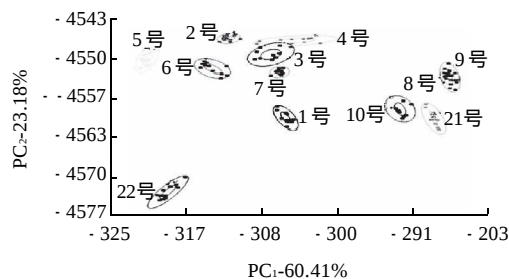


图3 试样的LDA图
Fig.3 LDA graph of samples

3 讨论

3.1 不同酵母产香特性

通过PCA,可以探测出不同的酿酒酵母对应于不同的葡萄酒香气。在PCA主成分分析中,图2表明不同酵母酿制的葡萄酒的香气各有不同并且它们之间的分辨率都在0.95以上,可明显区分这10株酿酒酵母菌株对应酒样的香气。根据PCA分析图,可大致得出产香能力排序,菌株1(LFP529) > 10(LFP504) > 21(贺兰山美域珍藏霞多丽干白) > 4(LFE1217) > 9(LFN518) > 6(VL1) > 8(LFP509) > 2(LFE1219) > 5(LFE1215),而菌株3(LFA711)酿制的葡萄酒香气与22号贺兰山美域经典系列霞多丽干白难以区分。

3.2 实验酵母对应酒样与商业酒样的比较

在实验过程中,加入了两个商业干白酒样,在PCA和LDA的分析中,待测的试样与商业酒样的香气测定分布区域没有重叠,说明实验酒样与商业酒样的香气组

成及含量不同。在 PCA 分析图中,发现 21 号贺兰山美域优质葡萄酒酒样和 4 号 LFE1217 对应的酒样分布较为接近,两个样品的香气成分的组成和含量大致相似;1 号菌株对应酒样的香气浓度明显高于 21 号,而供试的其他菌株也大多相对于 22 号要好。

3.3 电子鼻在酿酒酵母产香特性区分中的应用

研究表明,电子鼻可以应用于不同酵母酿制葡萄酒香气的检测,而在采样时间 12 ~ 22s 时,数据较为稳定并有较高的敏感度。应用电子鼻系统的 LDA 分析和 PCA 分析都能准确的判别出不同酵母对应的酒样;Loadings 分析则表明各传感器对主成分的贡献率,在判断过程中起较大的作用,这将有助于对酵母间产生的差异香气进一步认识。虽然传感器不能像质谱仪一样对香气物质成分进行准确的定性,不能对酵母产香特性进行详细的分析,但是电子鼻携带方便、测定时间短,从实验结果可以看出,电子鼻可以对于香气大致种类以及浓度进行有效的预测,这对于菌株的大量筛选工作中对菌株进行产香评价很有益处,因此电子鼻在葡萄酒香气研究中的应用推广,还需要结合传感器和模型识别的优化以及实验条件等方面做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 杨莹,徐艳文,薛军侠,等.葡萄酒相关酵母的香气形成及香气特征[J].微生物学通报,2007,34(4):757-760.
- [2] COMUZZO P, TAT L, TONIZZO A, et al. Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility[J]. Food Chemistry, 2006, 99(2): 217-230.
- [3] MOLINA A M, GUADALUPE V, VARELA C, et al. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains[J]. Food Chemistry, 2009, 117(2): 189-195.
- [4] LOUW C, GRANGE D L, PRETORIUS I S, et al. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 125(4): 447-461.
- [5] GIL J V, MANZANARES P, GENOVES S, et al. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103(1): 57-68.
- [6] VILLENA M A, IRANZO J F, PÉREZ A. β -Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 420-425.
- [7] MORATA A, GONZÁLEZ C, SUAREZ-LEPE J A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1): 144-152.
- [8] GARCA M, ALEIXANDRE M, GUTIÉRREZ J, et al. Electronic nose for wine discrimination [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 113(2): 911-916.
- [9] 唐月明,王俊.电子鼻技术在食品检测中的应用[J].农机化研究,2006(10):169-172.
- [10] PENZA M, CASSANO G, TORTORELLA F, et al. Classification of food, beverages and perfumes by WO_3 thin-film sensors array and pattern recognition techniques[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2001, 73(1): 76-87.
- [11] MCKELLAR R C, RUPASINGHE H P, LU Xuewen, et al. The electronic nose as a tool for the classification of fruit and grape wines from different Ontario wineries[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(14): 2391-2396.
- [12] PANIGRAHI S, BALASUBRAMANIAN S, GU H, et al. Neural-network-integrated electronic nose system for identification of spoiled beef [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2006, 39(2): 135-145.
- [13] YU Huichun, WANG Jun. Discrimination of Longjing green-tea grade by electronic nose[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 122(1): 134-140.
- [14] 于慧春,王俊,张红梅,等.龙井茶叶品质的电子鼻检测方法[J].农业机械学报,2007,38(7):103-106.
- [15] DI NATALE C, MACAGNANO A, DAVIDE F, et al. An electronic nose for food analysis[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1997, 44(1/3): 521-526.
- [16] BENEDETTI S, BURATTI S, SPINARDI A, et al. Electronic nose as a non-destructive tool to characterise peach cultivars and to monitor their ripening stage during shelf-life[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 47(2): 181-188.
- [17] LOZANO J, SANTOS J P, HORRILLO M C. Classification of white wine aromas with an electronic nose[J]. Talanta, 2005, 67(3): 610-616.
- [18] DI NATALE C, DAVIDE F, DAMICO A, et al. An electronic nose for the recognition of the vineyard of a red wine[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1996, 33(1/3): 83-88.
- [19] WIES C, DANIEL C, BOB D, et al. Feasibility study on the use of a head space mass spectrometry electronic nose (MS e-nose) to monitor red wine spoilage induced by *Brettanomyces* yeast[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 124(1): 167-171.
- [20] 贾宗艳,任发政,郑丽敏.电子鼻技术及在乳制品中的应用研究进展[J].中国乳品工业,2006,34(4):35-38.
- [21] ZHANG Qinqi, ZHANG Shunping, XIE Changsheng, et al. Characterization of Chinese vinegars by electronic nose[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 119(2): 538-546.
- [22] 史志存,李建平.电子鼻及其在白酒识别中的应用[J].仪表技术与传感器,2000(1):34-37.