

酿酒酵母抗氧化活性与发酵香气化合物研究

杨学山^{1,2} 李洁春¹ 杨 柳¹ 李俊娥¹ 祝 霞^{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: 以添加不同质量浓度水溶性 β -葡聚糖的模拟葡萄汁为试材, 接种酿酒酵母启动酒精发酵, 分别在第 2、3、4、7 天检测供试菌株的抗氧化活性, 并于发酵结束后采用 HS-SPME-GC-MS 测定发酵酒样的挥发性香气化合物, 探讨菌株抗氧化活性和挥发性香气物质之间的相关性。结果表明, 外源性添加水溶性 β -葡聚糖处理组酵母细胞中的 ATP 酶、SOD 酶活力和还原型谷胱甘肽含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 活性氧和丙二醛含量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。300 mg/L 水溶性 β -葡聚糖可以明显提高模拟葡萄汁发酵酒样中挥发性香气化合物的含量, 尤其是辛酸乙酯、癸酸乙酯等花果香类物质较对照组显著增加 ($P < 0.05$), 且与酿酒酵母细胞的 ATP 酶、SOD 酶活力和 GSH 含量呈正相关。综上, 质量浓度为 300 mg/L 的水溶性 β -葡聚糖, 能够明显增强酿酒酵母细胞的抗氧化能力, 增加模拟葡萄汁发酵酒样中酯类、高级醇类物质的含量, 具有提高葡萄酒发酵香气化合物的应用潜力。

关键词: 水溶性 β -葡聚糖; 酿酒酵母; 抗氧化活性; 挥发性香气化合物

中图分类号: TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2023)09-0423-08 OSID: 

Antioxidant Activity and Fermentation Aroma Compounds of *Saccharomyces cerevisiae* in Simulated Wine

YANG Xueshan^{1,2} LI Jiechun¹ YANG Liu¹ LI Jun'e¹ ZHU Xia^{1,2}

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

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

Abstract: Water-soluble β -glucan with different concentrations was added to the simulated grape juice and then inoculated with *S. cerevisiae* Aroma White strain to start alcohol fermentation. The antioxidant activities of the tested strain were detected on the 2nd, 3rd, 4th and 7th day of fermentation process respectively, and the volatile aroma compounds in the final simulated wine samples were determined by headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography – mass spectrometry (HS – SPME – GC – MS) to clarify the correlation between the antioxidant activities and aroma compounds. The results showed that the activities of adenosine triphosphatase (ATPase), superoxide dismutase (SOD) and the content of glutathione (GSH) in yeast strain cells treated with water-soluble β -glucan were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$), while the contents of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$). Water-soluble β -glucan with concentration of 300 mg/L significantly increased the content of volatile compounds, especially linalool, phenylethanol, ethyl octanoate and ethyl decanoate with floral and fruity. These compounds were positively correlated with the activities of ATPase and SOD as well as the content of GSH in *S. cerevisiae* cells. To sum up, water-soluble β -glucan with concentration of 300 mg/L can significantly enhance the antioxidant capacity of *S. cerevisiae* Aroma White strain cells, remarkably increase the contents of esters and higher alcohols in simulated wine samples, and it had the application potential to improve the fermented aroma of the wines.

Key words: water-soluble β -glucan; *Saccharomyces cerevisiae*; antioxidant activity; volatile aroma compounds

收稿日期: 2023-03-09 修回日期: 2023-03-29
基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(31760454、32060581)、甘肃省自然科学基金项目(20JR10RA527)和甘肃省葡萄酒产业发展基金项目(20180820-08、20180820-07、GJJ-2019-125-1)
作者简介: 杨学山(1977—),男,教授,主要从事葡萄酒酿造微生物及风味品质调控研究,E-mail: yangxs@gsau.edu.cn
通信作者: 祝霞(1977—),女,教授,主要从事葡萄与葡萄酒风味品质调控研究,E-mail: zhux@gsau.edu.cn

0 引言

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)在酒精发酵过程中代谢产生的高级醇、酯、醛、酸等化合物,是塑造葡萄酒香气风格与典型性的关键因子^[1-2]。但在葡萄酒酿造过程中,发酵菌株会受到高糖、低 pH 值、乙醇、氧化胁迫等因素的影响,导致细胞内的抗氧化防御系统失衡,产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS),破坏细胞脂质、蛋白质和 DNA 等细胞成分,抑制菌株的生长和发酵^[3-4]。此外,ROS 还会干扰辅助因子的平衡,改变或破坏靶分子结构,导致关键酶活力降低或丧失,影响发酵香气物质的合成^[5]。因此,提高发酵过程中酿酒酵母菌株的抗氧化能力,保持其较高的细胞活力对葡萄酒酿造具有重要意义。目前,国际葡萄与葡萄酒组织已批准酵母多糖作为发酵助剂应用于酿酒生产^[6],加之使用绿色安全、便捷、可控和通用性较强,使其成为提升葡萄酒品质的研究热点。

酵母细胞壁多糖主要包括甘露聚糖(30%)和β-葡聚糖(40%~50%)。其中可溶性的甘露聚糖在葡萄酒酿造过程中的品质提升作用及机理已报道较多^[7],而对β-葡聚糖的研究却主要集中在抗感染、提高机体免疫力等生物保健领域^[8-10]。β-葡聚糖可通过芬顿(Fenton)反应和增强超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶等抗氧化酶的活性,提高·OH 和 O₂⁻·的清除率^[11]。除此之外,β-葡聚糖的羟基还可与金属离子结合,抑制·OH 的产生,防止脂质过氧化的连锁反应^[8]。大多数β-1,3-葡聚糖难溶于水、黏度大^[12],不适宜在葡萄酒酿造过程中直接使用。已有研究表明,通过超声波降解或生物酶水解后,β-1,3-葡聚糖分子的平均聚合度和分枝度会明显降低,可以显著改善其溶解性,且在体外对 ABTS⁺·、·OH、DPPH 自由基、O₂⁻·均具有良好的清除作用^[12-13],但其在葡萄酒酿造过程中对酿酒酵母菌株的抗氧化活性及发酵香气化合物的影响尚不明确。

在葡萄酒实际酿造生产中,不同葡萄品种间的酶类和非酶类抗氧化成分组成相对复杂且差异较大。而人工配制的模拟葡萄汁成分明确,既可以满足微生物生长的营养需求,又可以消除发酵体系中其他抗氧化成分对试验结果的影响。为此,本文以模拟葡萄汁为试材,在酒精发酵前添加不同质量浓度的水溶性β-葡聚糖,探究其对酵母细胞的抗氧化活性和挥发性香气化合物的影响规律,以期为进一步解析水溶性β-葡聚糖对葡萄酒发酵香气化合物的促进作用机制及其生产应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酿酒酵母菌株 Aroma White,购自意大利 Enartis 公司。

水溶性β-葡聚糖 SG 90,购于安琪酵母股份有限公司;糖链结构以β-1,3 糖苷键为主,含有部分β-1,6 糖苷键支链,纯度 85% 以上,分子质量 200~500 ku,具有良好的水溶性,推荐用量 200~500 mg/L。

苯乙醇、正戊醇、正辛醇、乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、乙酸己酯、癸酸乙酯、辛酸乙酯、己酸乙酯、丁酸乙酯等香气标准品均购自美国 Sigma 公司。

SOD、ATP 酶活力测定试剂盒,还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、ROS、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;L-苹果酸、纤维二糖、肌醇、B 族维生素、生物素等均为国产分析纯,购自上海源叶生物科技有限公司;柠檬酸、硫酸镁、硫酸锰、酒石酸氢钾、偏重亚硫酸钠等常规试剂均为国产分析纯,购自天津光复化工研究所。

1.2 仪器与设备

TRACE1310-ISQ 型气相色谱-质谱仪,美国 Thermo Scientific 公司;DB-WAX 型气相色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),美国 Agilent Technologies 公司;固相微萃取头,50/30 μm DVB/CAR-PDMS,上海安谱科学仪器有限公司;DK-S12 型电热恒温水浴锅,上海森信试验仪器有限公司;PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;LRH-150 型生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 模拟葡萄汁体系构建

模拟葡萄汁的配制参考文献[14]的方法。其中葡萄糖 100 g/L、果糖 100 g/L;磷酸氢二铵 1 500 mg/L、磷酸二氢钾 750 mg/L、硫酸钾 500 mg/L、氯化钙 0.117 mg/L;肌醇 20 mg/L、维生素 B₅ 15 mg/L、维生素 B₁ 0.25 mg/L、维生素 B₆ 0.25 mg/L、生物素 0.003 mg/L、维生素 B₃ 2 mg/L;L-苹果酸 3.0 g/L、柠檬酸 300 mg/L、酒石酸氢钾 2.5 g/L。模拟汁添加 40 mg/L SO₂(偏重亚硫酸钠计),NaOH 调节 pH 值至 3.5。

1.3.2 酿酒酵母菌株活化与模拟葡萄汁发酵

按产品说明书推荐方法对酿酒酵母菌株进行活化。将活性干酵母溶于 10 倍体积无菌水中,37℃静置 20 min,再加入等体积的模拟汁,28℃活

化 25 min。根据课题组前期研究结果^[15],将活化后的 Aroma White 菌株(0.2 g/L),接种于分别添加 300、400、500 mg/L 水溶性 β -葡聚糖的模拟葡萄汁中,以未添加水溶性 β -葡聚糖为对照(CK),20℃ 恒温培养箱进行酒精发酵,残糖质量浓度小于 4 g/L 时结束发酵。从接入酿酒酵母菌株(0 h)开始,每隔 24 h 测定酵母细胞的生物量(以 600 nm 波长处的吸光度(OD_{600})表征),绘制 Aroma White 菌株生长曲线。平行重复 3 次,结果取平均值。下同。

1.3.3 酿酒酵母细胞抗氧化活性测定

1.3.3.1 Aroma White 细胞中 ATP 酶活力测定

分别在发酵的第 2(初期)、3(中前期)、4(中期)、7 天(末期)取样(下同)。参照文献[16]的方法并做修改,10 mL 发酵样液在 3 500 r/min 条件下离心 10 min 后倾倒上清液,收集酵母细胞;ATP 酶活力测定不能引入磷,因此用 5 mL 0.9% NaCl 洗涤 3 次后,称量,再次加入 0.9% NaCl,冰水浴超声破碎(4℃,功率 360 W,开启 5 s,停止 7 s,共计 1 min),制成 0.063 g/mL 的匀浆。其余操作按照试剂盒说明书进行。

1.3.3.2 Aroma White 细胞中 SOD 酶活力测定

参照文献[16]的方法并做修改,收集酵母细胞,准确称取组织质量,用 20 倍体积的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline,PBS)以 1 000 r/min 离心 10 min 洗涤酵母细胞,重复 2 次后,再加入 20 倍体积的 0.9% NaCl,以 3 500 r/min 离心 10 min,冰水浴条件下超声破碎,制成 10% 的组织匀浆,将匀浆稀释 5 倍,按照试剂盒说明书进行测定。

1.3.3.3 Aroma White 细胞中 GSH 含量测定

按照 1.3.3.2 节的方法,制成 10% 的细胞匀浆,按照南京建成试剂盒说明书进行测定。

1.3.3.4 Aroma White 细胞中 ROS 含量测定

取发酵样液,3 500 r/min 离心 10 min 收集细胞,PBS 洗涤 1~2 次,将离心收集的细胞用 PBS 重悬,按照试剂盒说明书加入荧光探针(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate,DCFH-DA),按预试验确定的浓度 10 μ mol/mL 进行试验。在最佳激发波长 500 nm、最佳发射波长 525 nm 条件下进行荧光检测。

1.3.3.5 Aroma White 细胞中 MDA 含量测定

按照 1.3.3.2 节的方法制成 10% 的细胞匀浆,参照 MDA 含量测定试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 挥发性香气物质分析

参考文献[17]的香气物质萃取方法及 GC-MS(气相色谱-质谱联用)条件,并略作修改。

1.3.4.1 香气成分富集

取 8 mL 待测酒样,添加 2.5 g NaCl、10 μ L 2-辛醇(质量浓度为 81.06 mg/L),放入恒温加热磁力搅拌器中,40℃ 水浴平衡 30 min,插入萃取针(旋出萃取头),顶空萃取 30 min。

1.3.4.2 GC-MS 条件

GC 条件:色谱柱 DB-WAX 60 m $\times$ 2.5 mm $\times$ 0.25 μ m,进样口温度 240℃,传输线温度 230℃,离子源温度 250℃,不分流进样;载气(He)流速 1 mL/min;进样时间 5 min;柱温升温程序:40℃ 保持 5 min,以 3.5℃/min 升至 180℃,保持 15 min。

MS 条件:电子轰击离子源(EI);电子能量 70 eV;传输线温度 180℃;离子源温度 200℃;质谱扫描范围 50~350 m/z。

定性定量分析:通过 NIST-11、Wiley 及香精香料谱库对香气化合物质谱图进行初步检索比对,并结合人工图谱解析进行定性分析,确认各个香气物质的化学成分。对已有标准品的高级醇、酯类和萜烯类等化合物,利用标准曲线($R^2 > 0.995$)定量,无标准品的化合物采用化学结构、官能团相似、碳原子数相近的标准物质进行半定量。

1.4 数据分析

测定均重复 3 次,取平均值,试验数据用 Microsoft Excel 2010 计算标准偏差,采用 SPSS 19.0 进行方差分析,用 Duncan's 多重差异显著分析;并用 Origin 2018 作图。

2 结果与分析

2.1 水溶性 β -葡聚糖对 Aroma White 菌株生长的影响

由图 1 可知,在整个酒精发酵过程中,不同质量浓度的水溶性 β -葡聚糖对 Aroma White 菌株生物量均具有明显的促进作用。发酵 3 d 后,酵母细胞的生长趋于稳定;在发酵时间为第 7 天时,酿酒酵母细

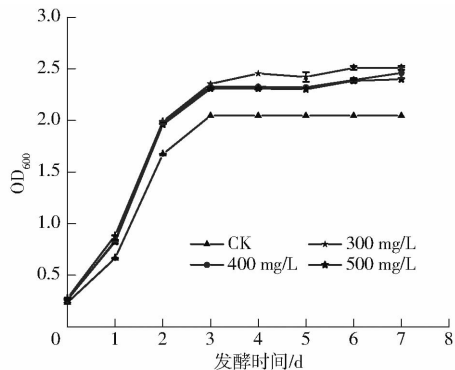


图 1 水溶性 β -葡聚糖对酿酒酵母生物量的影响
Fig.1 Effects of water-soluble β -glucan on biomass of *S. cerevisiae* strains

胞的 OD₆₀₀ 由大到小依次为 300 mg/L (2.509)、400 mg/L (2.461)、500 mg/L (2.398)、CK (2.046)。与 CK 相比,分别提高 22.63%、20.28% 和 17.20%。综合分析,在模拟葡萄汁酒精发酵时添加水溶性 β-葡聚糖有利于 Aroma White 菌株的生长,且添加量为 300 mg/L 时效果最佳。

2.2 水溶性 β-葡聚糖对 Aroma White 菌株抗氧化能力的影响

2.2.1 ATP 酶活力

ATP 酶广泛存在于细胞膜系统上,在能量转换、物质运输传递方面起着至关重要的作用,主要通过调节细胞内外渗透压平衡和细胞膜结构与功能的完整性维持细胞正常的生理活性^[18]。如图 2(不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平下组内差异显著,下同)所示,受试组酵母细胞的 ATP 酶活力在中、后期显著升高($P < 0.05$),在第 4 天时明显高于对照组($P < 0.05$),分别比 CK 增加 39.59%、36.43% 和 21.90%。不同质量浓度的水溶性 β-葡聚糖处理组之间也存在差异,其中 300 mg/L 处理组在酒精发酵第 7 天时,ATP 酶活力最高,比 CK 显著增加 57.04%;400 mg/L 和 500 mg/L 处理组比 CK 分别提高 37.24% 和 30.13%。

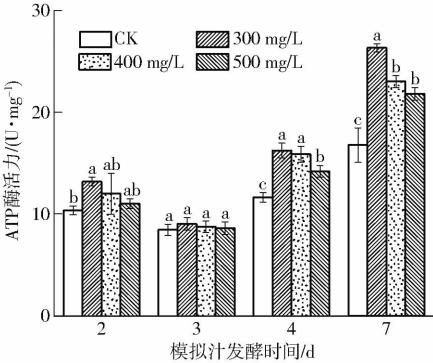


图 2 水溶性 β-葡聚糖对酿酒酵母细胞中 ATP 酶活力的影响

Fig.2 Effects of water-soluble β-glucan on ATPase activity in *S. cerevisiae* Aroma White strain cells

2.2.2 SOD 酶活力

SOD 酶作为酵母的主要抗氧化酶,能特异性地清除体内的氧自由基,SOD 酶活力的变化能够直接地反映酵母细胞对氧化胁迫应答的水平^[19]。从图 3 可知,在发酵的前期和中期,酵母细胞中的 SOD 酶活力增高。在发酵的第 2 天,300 mg/L 和 400 mg/L 水溶性 β-葡聚糖处理组 SOD 酶活力分别比 CK 增加了 24.85% 和 12.25%;酒精发酵第 4 天,300 mg/L 处理组 SOD 酶活力最高,比 CK 提高 22.43%。说明外源性添加水溶性 β-葡聚糖能增加菌株 SOD 酶活力,从而提高细胞的抗氧化能力。

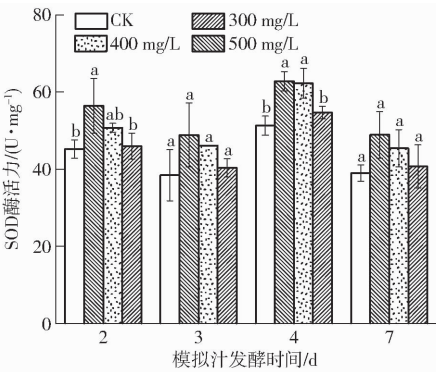


图 3 水溶性 β-葡聚糖对酿酒酵母细胞中 SOD 酶活力的影响

Fig.3 Effects of water-soluble β-glucan on SOD activity in *S. cerevisiae* Aroma White strain cells

2.2.3 GSH 含量

还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化性谷胱甘肽(Glutathione oxidized, GSSG)的氧化还原平衡对于调节细胞 ROS 水平至关重要,其中 GSH 可将部分巯基形成的二硫桥还原,防止含巯基的蛋白质与酶免受过氧化物的损害^[20-22]。由图 4 可知,各处理组细胞中 GSH 含量(质量比)在发酵过程中均高于 CK($P < 0.05$),酒精发酵第 7 天,300 mg/L 处理组的 GSH 含量最高,比 CK 提高 76.50%,表明水溶性 β-葡聚糖作为氧化刺激物,可以通过氧化应激来诱导提高 GSH 的合成代谢。综上,在酒精发酵前添加水溶性 β-葡聚糖可明显促进酵母细胞中 GSH 的含量,且质量浓度为 300 mg/L 时效果最佳。

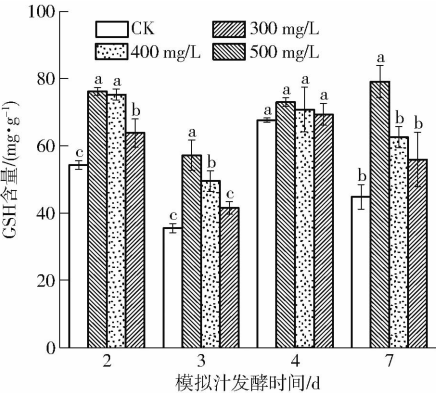


图 4 水溶性 β-葡聚糖对酿酒酵母细胞中 GSH 含量的影响

Fig.4 Effects of water-soluble β-glucan on GSH content in *S. cerevisiae* Aroma White strain cells

2.2.4 ROS 含量

在正常的生理代谢活动中,适宜水平的 ROS 可 作为细胞信号传导、基因表达和调控动态氧化平衡的媒介。当细胞内 ROS 含量过高时,会攻击 DNA 与蛋白质,并通过诱发过氧化作用影响细胞膜的流动性与稳定性^[23]。图 5 表明,在酒精发酵过程中,酵母细胞中的 ROS 含量逐渐降低(以荧光值表征细

胞内 ROS 含量)。在发酵第 2 天时,处理组细胞中的 ROS 含量均显著低于 CK ($P < 0.05$);第 3 天时,各组细胞中 ROS 含量由小到大依次为 300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、CK,300 mg/L 处理组较 CK、400 mg/L 和 500 mg/L 处理组分别降低 44.14%、16.95% 和 21.20%;在第 7 天,各处理组中 ROS 含量无明显差异,但与 CK 差异显著 ($P < 0.05$)。

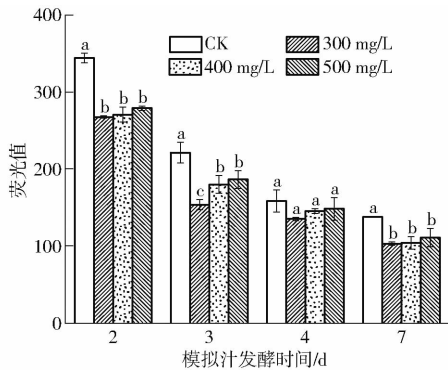


图 5 水溶性 β -葡聚糖对酿酒酵母细胞中 ROS 含量的影响
Fig. 5 Effects of water-soluble β -glucan on ROS in *S. cerevisiae* Aroma White strain cells

2.2.5 MDA 含量

酿酒酵母细胞在发酵过程中可以产生氧自由基,攻击生物膜的多不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化作用。MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一,可作为评价其作用强弱的重要指标^[20,22]。由图 6 可知,酒精发酵前添加水溶性 β -葡聚糖会降低酿酒酵母细胞内 MDA 含量。在发酵的第 2 天,处理组与 CK 不显著,第 3、4 天,处理组的 MDA 含量均显著低于 CK ($P < 0.05$)。其中第 4 天时,供试组 MDA 含量由小到大依次为 300 mg/L 组 (1.49 mg/g)、500 mg/L 组 (2.17 mg/g)、400 mg/L 组 (2.74 mg/g)、CK 组 (4.22 mg/g),其中 300 mg/L 处理组较对照组显著降低 64.69%。由此表明,添加水溶性 β -葡聚糖在酒精发酵(AF)前期和中期显著减弱了膜脂过氧化反应,减弱了 MDA 对酵母细胞膜的损伤,且以添加

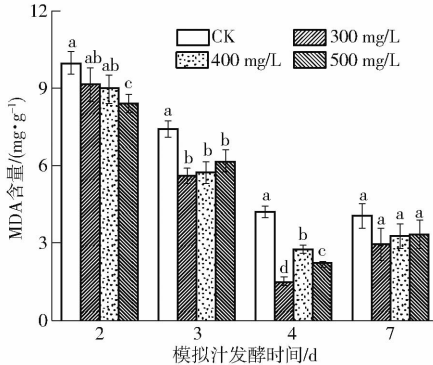


图 6 水溶性 β -葡聚糖对酿酒酵母细胞中 MDA 含量的影响
Fig. 6 Effects of water-soluble β -glucan on MDA content in *S. cerevisiae* Aroma White strain cells

质量浓度为 300 mg/L 时效果最佳。

2.3 水溶性 β -葡聚糖对挥发性香气化合物的影响

外源性添加不同质量浓度的水溶性 β -葡聚糖模拟汁发酵酒样中的主要香气物质 GC-MS 检测结果如图 7(图中星号表示处理组与 CK 或处理组之间差异显著 ($P < 0.05$),ns 表示处理组之间差异不显著 ($P > 0.05$))所示。试验共检测出 89 种香气化合物,其中酯类 37 种、高级醇类 21 种、酸类 15 种、萜烯类 4 种、其他类 13 种。

酯类物质对葡萄酒的花果香气具有积极贡献,主要包括乙酸酯、脂肪酸乙酯和其他酯类。本试验共检出 4 种乙酸酯,占酯类物质总量的 9.42% ~ 16.42%。各处理组之间乙酸酯类物质总量之间无显著差异 ($P > 0.05$),但与 CK 相比,水溶性 β -葡聚糖处理组的乙酸乙酯含量分别显著增加 19.84%、9.55% 和 31.32% (图 7a)。与 CK 相比,300 mg/L 和 400 mg/L 处理组中脂肪酸乙酯含量分别显著增加了 47.32% 和 51.42% (图 7b)。各处理组中辛酸乙酯和癸酸乙酯的含量最高,尤其是辛酸乙酯含量比 CK 分别提升 45.39%、47.65% 和 51.42%。酯类物质总质量浓度由高到低为 400 mg/L 组 (10 626.40 $\mu\text{g/L}$)、300 mg/L 组 (10 434.24 $\mu\text{g/L}$)、500 mg/L 组 (9 096.53 $\mu\text{g/L}$)、CK 组 (6 509.88 $\mu\text{g/L}$) (图 7d)。

在所有的发酵酒样中,异戊醇的含量最高,约占高级醇类化合物含量的 55% 以上。其次是苯乙醇和异丁醇。300 mg/L 和 400 mg/L 处理组之间的异戊醇含量没有显著差异,但显著高于 CK ($P < 0.05$) (图 7e)。各试验组共检出 14 种酸类物质,质量浓度依次为 913.91、1 120.29、1 187.56、1 214.85 $\mu\text{g/L}$ (图 7f)。与对照组相比,300、400、500 mg/L 处理组的辛酸含量分别提升 28.88%、27.42%、29.94%,但均未超过感官阈值,对葡萄酒香气不存在负面影响。处理组萜烯类物质比 CK 显著增加,但是各处理组之间不存在显著差异 ($P > 0.05$) (图 7g)。

参考文献[1]的方法,选择所有风味活性值 (Odor activity value, OAV) 大于 0.1 的发酵香气成分进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA)。由图 8 可知,PC1 和 PC2 分别占数据总体方差的 61.04% 和 25.45%,二者累计贡献率为 86.49%,可明显区分水溶性 β -葡聚糖处理组与 CK 酒样。辛酸乙酯、辛酸、癸酸乙酯,花香、热带水果、脂肪味及 300 mg/L 和 400 mg/L 处理组酒样主要分布在第一象限;己酸乙酯和 500 mg/L 处理组酒样分布在第四象限,而 CK 酒样分布在第三象限且无任何香气成分分布。总体分析,水溶性 β -葡聚糖处理

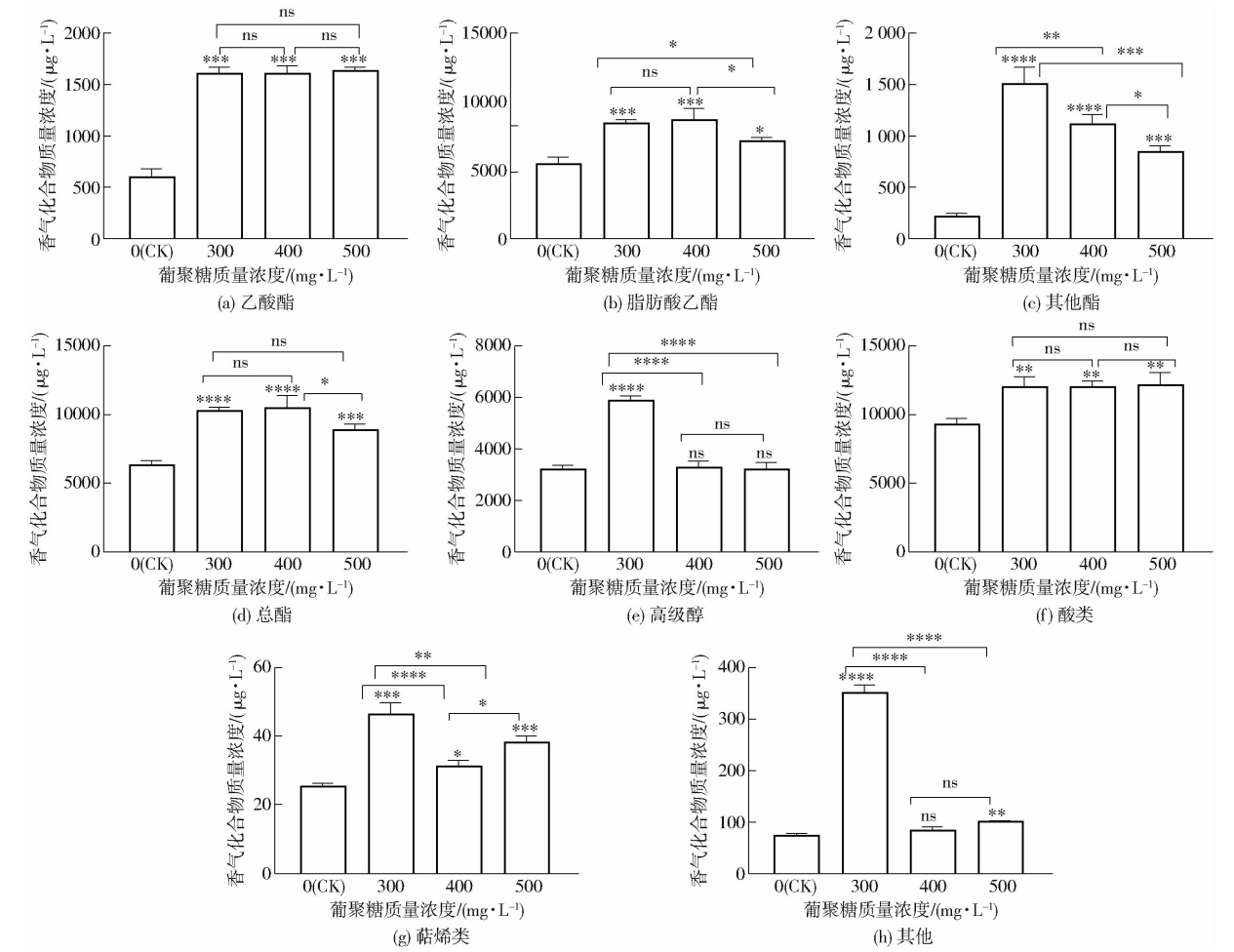


图 7 不同处理组酒样的挥发性香气物质

Fig. 7 Volatile aroma compounds in wine samples treated with water-soluble β -glucan

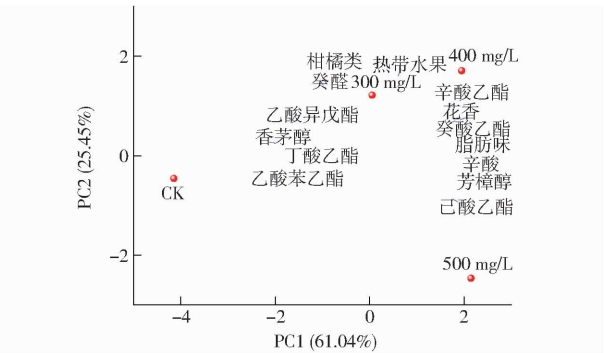


图 8 水溶性 β -葡聚糖处理酒样中香气化合物及香气特征的主成分分析

Fig. 8 PCA analysis of aroma compounds in wine samples treated with water-soluble β -glucan

有利于促进辛酸乙酯、癸醛、丁酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸、芳樟醇等香气化合物的生成,酒样的花香、热带水果和柑橘类香气潜在特征较 CK 更加突出。

2.4 酿酒酵母细胞 ATP 酶活力及抗氧化能力与挥发性香气化合物的相关性分析

将增香效果最突出的 300 mg/L 水溶性 β -葡聚糖处理组中,OAV 大于 0.1 的挥发性香气化合物,分别与酿酒酵母细胞 ATP 酶活力及抗氧化能力进

行 Pearson 相关性分析。结果表明(图 9),辛酸乙酯质量浓度与 ATP 酶活力存在强正相关性($r = 0.92$),与 ROS 质量浓度和 MDA 含量存在强负相关($r < -0.9$)。辛酸乙酯质量浓度与 SOD 酶活力和 GSH 含量均存在较强正相关性($r > 0.8$),辛酸、辛酸乙酯、芳樟醇质量浓度与 ROS 含量和 MDA 含量存在较强的负相关性($r < -0.8$),乙酸异戊酯质量

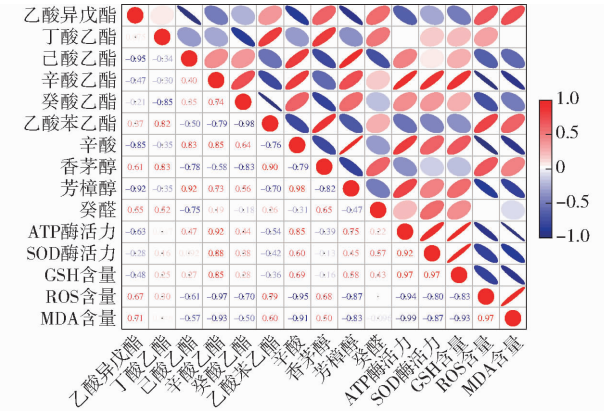


图 9 酿酒酵母细胞抗氧化能力与挥发性香气化合物的相关性热图

Fig. 9 Heat map of correlation between aroma compounds and antioxidant capacity of *S. cerevisiae* Aroma White

浓度与 MDA 和 ROS 含量存在正相关性($r > 0.6$), 这可能与酿酒酵母细胞合成分泌的酯酶对不同酯类底物的水解平衡有密切关系。

3 讨论

文献[18]发现细胞对大部分的外界胁迫反应都集中在线粒体,尤其是在电子传递链(Electron-transport chain,ETC)上。外界的胁迫使酵母细胞的 ATP 需求增加,当线粒体无法产生足够的 ATP 支撑细胞抵抗胁迫时,就会影响到细胞增殖。本试验结果表明,外源性添加水溶性 β -葡聚糖可以显著增加酿酒酵母 ATP 酶活力,以利于增强线粒体功能来提高细胞对多种胁迫的耐受性。GSH 可使细胞内巯基酶的活性基团维持还原状态,保证了抗氧化酶发挥生理功能^[21];同时 GSH 自身也可够清除 ROS 自由基,延迟细胞凋亡^[24]。本试验中,水溶性 β -葡聚糖能显著提高酿酒酵母细胞中 SOD 和 GSH 活性($P < 0.05$),降低 MDA 水平,且与其抗氧化能力之间存在一定剂量-效应关系。其中 300 mg/L 水溶性 β -葡聚糖处理组中抗氧化酶活力较高,尤其是发酵中、末期,GSH 对细胞维持较高水平的抗氧化能力具有积极作用,从而使发酵菌株保持较高的生物量,有利于合成和分泌更多的挥发性香气化合物。

本试验进一步证实,添加 300 mg/L 的水溶性 β -葡聚糖后,模拟汁发酵酒样中的乙酸酯、脂肪酸乙酯类和高级醇的含量显著增加($P < 0.05$)。究其原因,可能与水溶性 β -葡聚糖提高了 ATP 酶的活力有关^[25]。活力显著增高的 ATP 酶可催化产生更多的 ATP 参与脂肪酸活化,并促进酯化反应的进行,提高了酒样中己酸乙酯、丁酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯等中链脂肪酸乙酯的含量。水溶性 β -葡聚糖处理组中高级醇含量显著高于对照组($P < 0.05$),也可能与 *S. cerevisiae* 中 ATP 酶活力增强,分解更多的 ATP 有利于为 Ehrlich 途径提供

能量^[26]。此外,模拟汁发酵酒样也检测到了微量的萜烯类化合物,300 mg/L 处理组中萜烯类化合物含量较对照组增加 80.10%,这与发酵过程酵母中的 ROS 降低,减少了萜烯类等香气物质的氧化降解作用直接相关^[27],也与文献[28]研究证明 GSH 可以降低某些重要的酯类、萜烯类等香气化合物的氧化损失结果一致。

相关性热图分析结果表明,300 mg/L 水溶性 β -葡聚糖处理对苯乙醇、正辛醇的生成促进作用最为明显,表明水溶性 β -葡聚糖处理有利于促进酵母细胞的 Harris 代谢途径,提升酒样的醇香和花香。脂肪酸参与酯类物质生成,是合成酯类风味化合物不可或缺的前体物质,其含量对于水果香气特征的感知至关重要^[29]。水溶性 β -葡聚糖处理组的辛酸含量较对照组均有增加,同时引起了辛酸乙酯含量较对照组均显著增加。其中 300 mg/L 处理组辛酸乙酯含量增加最为明显,推测可能是水溶性 β -葡聚糖促进了酵母脂肪酸的代谢,进一步转化生成了脂肪酸乙酯,这与文献[30]的研究结果类似。但抗氧化活性与其他酯类化合物的转化水解平衡,尤其对酯酶活力的调控关系需要进一步探讨。

4 结束语

在模拟葡萄汁中外源性添加水溶性 β -葡聚糖,能够促进酒精发酵过程中酵母细胞的生长,有效降低细胞内 ROS 的积累,使 ATP 酶活力、SOD 酶活力和 GSH 含量保持相对较高的水平,抑制 MDA 的生成,具有良好的抗氧化能力。同时,300 mg/L 水溶性 β -葡聚糖还可以明显提高模拟葡萄汁发酵酒样中酯类、高级醇类物质的含量,且与酿酒酵母细胞的抗氧化能力呈高度正相关。综合分析,外源性添加 300 mg/L 水溶性 β -葡聚糖,可以促进酿酒酵母的生长、提高细胞抗氧化水平,增强发酵香气化合物的合成,具有应用在葡萄酒/果酒增香酿造的潜力。

参 考 文 献

[1] 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)

[2] 祝霞,赵丹丹,李俊娥,等. *O. oeni* 糖苷酶活性对干白葡萄酒萜烯类香气的影响[J]. 农业机械学报, 2021,52(8): 363 – 373.
ZHU Xia, ZHAO Dandan, LI June, et al. Effect of glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on terpene aroma compounds of dry white wine[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(8): 363 – 373. (in Chinese)

[3] FABRIZIO P, BATTISTELLA L, VARDAVAS R, et al. Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Cell Biology, 2004, 166(7): 1055 – 1067.

[4] YALCINKAYA T, UZILDAY B, OZGUR R, et al. Lipid peroxidation-derived reactive carbonyl species (RCS): their interaction with ROS and cellular redox during environmental stresses[J]. Environmental and Experimental Botany, 2019, 165(6): 139 – 149.

[5] NEDOVIC V, GIBSON B, MANTZOURIDOU T F, et al. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes [J]. Yeast, 2015, 32(1): 173 – 216.

[6] 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.
- [7] 门颖. 酵母甘露糖蛋白对葡萄酒品质影响的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学,2015.
MEN Ying. Study on the effect of yeast mannose glycoprotein on the quality of wine[D]. Ji'nan: Qilu University of Technology, 2015. (in Chinese)
- [8] DALONSO N, GOLDMAN G H, GERN R M. β -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons[J]. Applied Microbiology & Biotechnology,2015,99(19): 7893–7906.
- [9] LIU F, WANG Z Z, LIU J, et al. Radioprotective effect of orally administered beta-d-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2018,115: 572–579.
- [10] KOGAN G, STAŠKO A, BAUEROVÁ K, et al. Antioxidant properties of yeast (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis[J]. Carbohydrate Polymers,2005,61(1): 18–28.
- [11] TANG Q, HUANG G, ZHAO F, et al. The antioxidant activities of six (1 $\rightarrow$ 3)- β -d-glucan derivatives prepared from yeast cell wall[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2017,98: 216–221.
- [12] ZHENG Z M, HUANG Q L, LUO X G, et al. Effects and mechanisms of ultrasound and alkali assisted enzymolysis on production of water soluble yeast β -glucan[J]. Bioresource Technology,2019,273(10): 394–403.
- [13] 杨学山, 祝霞, 李颖, 等. 葡萄酒泥酵母制备水溶性 β -D-葡聚糖工艺优化及其纯化后抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2016,37(14): 24–31.
YANG Xueshan, ZHU Xia, LI Ying, et al. Purification and antioxidant activities of water-soluble β -D-glucan from waste wine yeast[J]. Food Science,2016,37(14): 24–31. (in Chinese)
- [14] 马腾臻. ‘蛇龙珠’葡萄酒酒精发酵过程中品种香气释放调控研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学,2015.
MA Tengzhen. Release of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation of *Cabernet gernischt* wine[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University,2015. (in Chinese)
- [15] 李洁春, 宋欣莞, 杨学山, 等. 水溶性 β -葡聚糖对霞多丽干白葡萄酒香气的影响[J]. 食品与发酵工业,2021,47(22): 134–140.
LI Jiechun, SONG Xinyuan, YANG Xueshan, et al. Effects of water-soluble β -glucan on aroma compounds of Chardonnay dry white wine[J]. Food and Fermentation Industries,2021,47(22): 134–140. (in Chinese)
- [16] 符安. 全氟辛酸对酿酒酵母的生理毒性作用[D]. 广州: 暨南大学,2016.
FU An. Physiological toxicity of Pentadecafluorooctanoic acid on *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Guangzhou: Jinan University, 2016. (in Chinese)
- [17] 祝霞, 王诗, 赵丹丹, 等. 苹果酸-乳酸发酵对美乐低醇桃红葡萄酒香气的影响[J]. 农业机械学报,2020,51(11): 338–348.
ZHU Xia, WANG Shi, ZHAO Dandan, et al. Effect of malolactic fermentation on volatile compounds of Merlot low alcohol rose wine[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2020,51(11): 338–348. (in Chinese)
- [18] ARIÑO J, RAMOS J, SYCHROVA H. Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts[J]. Yeast,2019,36(4): 177–193.
- [19] LI K, ZHANG J W, LIU C G, et al. Elucidating the molecular mechanism of TEMPOL-mediated improvement on tolerance under oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chemical Engineering Science,2020,211(16): 1153–1158.
- [20] CHEN H, CAO X, ZHU N Q, et al. A stepwise control strategy for glutathione synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* based on oxidative stress and energy metabolism[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2020,36(8): 1–10.
- [21] HINOJOSA-NOGUEIRA D, PÉREZ-BURILLO S, RUFIÁN-HENARES J Á, et al. Characterization of rums sold in Spain through their absorption spectra, furans, phenolic compounds and total antioxidant capacity[J]. Food Chemistry,2020,323: 1153–1158.
- [22] BAHUT F, ROMANET R, SIECZKOWSKI N, et al. Antioxidant activity from inactivated yeast: expanding knowledge beyond the glutathione-related oxidative stability of wine[J]. Food Chemistry,2020,325: 126941.
- [23] MIYAKE T, HAZU T, YOSHIDA S, et al. Glutathione transport systems of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,1998,62(10): 1858–1864.
- [24] ALEGRE Y, FERREIRA V, HERNÁNDEZ-ORTE P. How does the addition of antioxidants and other sulfur compounds affect the metabolism of polyfunctional mercaptan precursors in model fermentations? [J]. Food Research International,2019,122: 1–9.
- [25] MASSERA A, ASSOFF 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—Food Science and Technology,2021,142: 111069.
- [26] CARPENA M, FRAGA-CORRAL M, OTERO P, et al. Secondary aroma: influence of wine microorganisms in their aroma profile[J]. Foods,2020,10(1): 51–59.
- [27] PATEL P, HERBST-JOHNSTONE M, LEE S A, et al. Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(12): 7280–7288.
- [28] TOMAŠEVIĆ M, GRACIN L, ČURKO N, et al. Impact of pre-fermentative maceration and yeast strain along with glutathione and SO₂ additions on the aroma of *Vitis vinifera* L. Pošip wine and its evaluation during bottle aging[J]. LWT—Food Science and Technology,2017,81: 67–76.
- [29] PERESTRELO R, FERNANDES A, ALBUQUERQUE F F, et al. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: identification of the main odorants compounds[J]. Analytica Chimica Acta,2006,563(1–2): 154–164.
- [30] 葛正凯, 黄倩, 李洁, 等. 不同抗氧化剂对白葡萄酒品质的影响[J]. 中国酿造,2020,39(10): 136–144.
GE Zhengkai, HUANG Qian, LI Jie, et al. Effect of different antioxidant on white wine quality[J]. China Brewing,2020,39(10): 136–144. (in Chinese)