

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2019.04.006

文章编号:2095-6002(2019)04-0042-07

引用格式:李爱华,汪兴杰,刘浩,等. 酵母胞外酶处理对模拟葡萄汁发酵过程中辛酸乙酯和乙酸苯乙酯生成的影响[J]. 食品科学技术学报,2019,37(4):42-48.



LI Aihua, WANG Xingjie, LIU Hao, et al. Influence of yeast extracellular enzymes on formation of ethyl octanoate and phenylethyl acetate during model grape juice fermentation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019,37(4):42-48.

酵母胞外酶处理对模拟葡萄汁发酵过程中 辛酸乙酯和乙酸苯乙酯生成的影响

李爱华¹, 汪兴杰², 刘浩², 陶永胜^{2,3,*}

(1. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100;

3. 陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 分析两株优选非酿酒酵母胞外酶处理对酒精发酵过程中辛酸乙酯和乙酸苯乙酯生成的影响,旨在揭示其增香酿造的应用潜力。提取葡萄汁有孢汉逊和发酵毕赤两株酵母胞外酶,以模拟葡萄汁为发酵基质,添加目标香气成分对应糖苷底物,按照 β -D-葡萄糖苷酶活5 U/L的标准添加酵母胞外酶、AR2000酶和果胶酶制剂,酿酒酵母启动酒精发酵,每隔24 h取样进行目标香气物质的GC-MS定量分析。结果表明,两株酵母胞外酶均表现出较高的风味酶活性,葡萄汁有孢汉逊胞外酶中 α -L-阿拉伯糖苷酶、 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-半乳糖苷酶活性较高,发酵毕赤胞外酶中 β -D-葡萄糖苷酶、酯酶和蛋白酶活性较高。发酵过程中辛酸与辛酸乙酯的最大生成区间是发酵的第4~8天,而后趋于下降,而苯乙醇和乙酸苯乙酯的最大生成区间是发酵的第6~14天,之后趋于平稳。相比于商业糖苷酶和果胶酶,葡萄汁有孢汉逊和发酵毕赤胞外酶促进辛酸乙酯和乙酸苯乙酯生成的效果更好,其中促进辛酸乙酯的生成量接近对应糖苷水解最大生成量的3倍;葡萄汁有孢汉逊和发酵毕赤胞外酶促进苯乙醇的生成量远大于糖苷最大生成量,发酵结束时促进乙酸苯乙酯的生成量接近空白对照生成量的2倍。葡萄汁发酵过程中,优选酵母胞外酶处理主要是从促进酵母酯代谢的角度促进辛酸乙酯和乙酸苯乙酯的生成,且促进生成量远高于对应糖苷的水解生成量,因此有利于葡萄酒相关酯类的生成。

关键词: 葡萄酒; 模拟发酵; 酵母胞外酶; 辛酸乙酯; 乙酸苯乙酯

中图分类号: TS261.4

文献标志码: A

香气是葡萄酒的重要感官特征,葡萄酒中香气物质主要分为品种香气成分、发酵香气成分和陈酿香气成分。品种香气成分的前体主要是糖苷结合态的香气化合物,香气糖苷是结合态的香气物质,发酵过程中酵母分泌的糖苷酶能够促进葡萄香气糖苷的

水解,释放出游离的品种香气成分,表现出典型的品种香气特征^[1]。发酵香气成分主要来源于酵母主导的葡萄糖代谢路径^[2]。其中,酯类物质虽然在含量上低于高级醇含量,但由于其嗅觉阈值较低,因此是发酵香气成分中主要的呈香物质,且通常是果香

收稿日期:2018-09-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31771966);中央高校科研业务费专项(2452017151)。

第一作者:李爱华,女,实验师,硕士,主要从事食品成分检测分析方面的研究。

*通信作者:陶永胜,男,教授,博士,主要从事葡萄酒、果酒酿造与风味化学方面的研究。

的贡献者^[3]。辛酸乙酯是葡萄酒发酵中果香酯类的代表性物质,在模拟葡萄酒中的嗅觉阈值仅为 $2 \sim 5 \mu\text{g/L}$ ^[4-6],而检出量通常高于阈值,因此是葡萄酒果香和花香的有力贡献者,并且葡萄酒发酵过程中辛酸的合成及其顺利乙酸酯化是酵母风味物质代谢的典型示例。乙酸苯乙酯作为苯乙基类化合物的重要呈香物质,呈现令人愉悦的甜香^[7-8],在葡萄酒中的检出量通常为几十 $\mu\text{g/L}$,而嗅觉阈值为 $250 \mu\text{g/L}$ ^[7,9],香气活性值在 $0.1 \sim 1$ 之间。研究认为糖苷前体水解和酵母代谢是乙酸苯乙酯生成的限速底物苯乙醇在发酵过程中的主要来源^[10]。因此研究辛酸乙酯和乙酸苯乙酯在发酵过程中的生成过程,有助于了解酵母发酵特性,从而优化发酵工艺。

由于单一酿酒酵母菌株的发酵,易造成葡萄酒风味质量的单一化和趋同化^[11-12],最近十年,一些具有较高风味酶活性的非酿酒酵母菌株引起了研究者的注意,优选非酿酒酵母与酿酒酵母的混合发酵成为增加葡萄酒风味复杂性的研究热点^[13-14]。深入研究发现,混合发酵表现出增香效果的同时,非酿酒酵母过多地参与发酵有可能给葡萄酒带来异味,如动物、真菌等气味^[15]。为了避免非酿酒酵母在混合发酵中的负面作用,本研究在酿酒酵母发酵过程中添加优选野生酵母的胞外酶提取物,研究其对辛酸乙酯和乙酸苯乙酯生成的影响。实验以模拟葡萄汁为发酵基质,添加 *n*-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷,采用优选非酿酒酵母胞外酶促进酿酒酵母发酵过程中辛酸乙酯、乙酸苯乙酯的生成,实验同时以商业糖苷酶和果胶酶处理为参照,探究优选酵母胞外酶处理对两种果香酯类物质生成的影响,为优选酵母及其胞外酶进行葡萄酒增香酿造提供理论和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 酵母与酶制剂

酿酒酵母活性干粉 ACTIFLORE F33 购自法国 Laffort 公司;商业果胶酶(LAFASE HE GRAND CRU)购自法国 Laffort 公司, β -D-葡萄糖苷酶的活性 300 U/g ;商业糖苷酶制剂 AR2000 购于荷兰 DSM 集团, β -D-葡萄糖苷酶的活性 1000 U/g 。

1.2 仪器与试剂

GC-MS-QP2020 气质联用仪,日本岛津公司;UV-2750 型紫外分光光度计,日本岛津公司;TGL-

16M 型台式高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;DGX-9243BC 型鼓风干燥箱、NRY-2102C 型立式恒温摇床、MP-250B 型恒温培养箱,均为上海南荣实验室设备有限公司。

酵母浸粉,北京奥博星生物技术有限公司;葡萄糖,天津科密欧化学试剂有限公司;果糖,北京索莱宝科技有限公司;一水合柠檬酸、硫酸镁、氯化铵、磷酸二氢钾、无水硫酸钠、氯化钠和无水乙醇,四川西陇化学试剂有限公司;酒石酸、单宁酸和亚硫酸(SO_2 含量不低于 6%),天津天力化学试剂有限公司;氢氧化钠,广州市金华大化学试剂有限公司。

n-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷(纯度 $\geq 98\%$),苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(纯度 $\geq 98\%$),L-苹果酸,均购自上海源叶生物科技有限公司;辛酸(纯度 $\geq 98\%$)、辛酸乙酯(纯度 $\geq 98\%$)、苯乙醇(纯度 $\geq 99\%$)、乙酸苯乙酯(纯度 $\geq 98\%$)和 2-辛醇(纯度 $\geq 99\%$),均购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 非酿酒酵母胞外酶提取物制备及其酶活测定

发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*)和葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)是以葡萄酒、果酒增香酿造为目标由实验室优选获得^[13,16]。酵母胞外酶液参照 Sun 等^[17]方法制备,粗酶液经 PEG 20000 浓缩 20 倍,分析糖苷酶、酯酶和蛋白酶的活性。

糖苷酶活性分析:反应体系为 0.75 mL $\text{pH} = 5.0$ 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液,分别添加 0.25 mL $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 待测糖苷酶的对底物,对硝基苯- β -D-葡萄糖苷、对硝基苯基- α -L-阿拉伯糖苷、对硝基苯基- β -D-半乳糖苷、对硝基苯基- β -D-木糖苷和对硝基苯基- α -L-鼠李糖苷,同时分别添加 0.1 mL 酵母胞外粗酶液。 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 30 min ,反应结束后加入 1 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸钠终止反应,随后测定反应液在 400 nm 的吸光值。其中,以蒸馏水代替反应底物作为对照组,每个样品重复 3 次。一个单位 β -D-葡萄糖苷酶酶活单位定义为:在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下,每分钟催化生成 $1 \mu\text{mol}$ 对硝基苯酚所要的酶量。

酯酶活性分析:参照 Pérez-Martín 等^[18]的测定方法,以 C4 碳链长度的酯水解能力表示。

蛋白酶活性分析:参照 Guleria 等^[19]的测定方法,一个单位蛋白酶活性定义为在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,每分钟催化生成 $1 \mu\text{mol}$ 酪氨酸所需的酶量。

1.3.2 模拟发酵体系中的酶促水解实验

模拟葡萄汁的配制参考 Chassagne 等^[20], 略作修改。模拟葡萄汁以水为溶剂, 1 L 组分包括 110 g 葡萄糖, 110 g 果糖, 3 g 酒石酸, 0.3 g 苹果酸, 0.5 g 氯化铵, 0.6 g 酵母浸粉, 2.0 g 单宁酸, 2.0 g 磷酸二氢钾, 0.2 g 硫酸镁。充分混匀后, 用 2 mol/L NaOH 调节 pH 值至 3.4, 灭菌后备用。

香气糖苷标准品的配制方法参考 Hampel 等^[21], n-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷的配置浓度分别为 1.33 mg/mL 和 6.09 mg/mL。模拟葡萄汁分别添加两种香气糖苷标准品溶液各 1 mL/L, 再添加 SO₂ 60 mg/L, 30 min 后不同处理按 β -D-葡萄糖苷酶活 5 U/L 分别添加商业糖苷酶制剂 AR2000、果胶酶 (PEC)、葡萄汁有孢汉逊酵母胞外酶提取液 (HU)、发酵毕赤酵母胞外酶提取液 (PF) 于模拟葡萄汁中, 同时以未添加香气糖苷和酶制剂的模拟葡萄汁为对照 (CK)。12 h 后接种活化酿酒酵母 200 mg/L 启动发酵。发酵实验在 20 °C 恒温条件进行。发酵过程中, 每隔 48 h 测定酒精度和还原糖消耗量, 测定方法参考文献^[22]。同时留存发酵葡萄汁 50 mL 于 -20 °C 冷冻, 用于香气成分分析。当发酵液比重降为 0.992 ~ 0.994, 且残糖 < 2 g/L, 终止发酵。

1.3.3 香气成分分析

模拟发酵样品中香气物质采用固相微萃取 (solid phase micro-extraction) 提取, 进行 GC-MS 分析, 具体方法参照 Wang 等^[23]。

SPME 方法: 在 15 mL 装有磁力搅拌子的顶空瓶中加入 8 mL 酒样 (含内标物) 或标准品溶液, 加入 2.0 g NaCl, 然后将顶空瓶放入电磁搅拌器上水浴, 40 °C 条件下平衡 15 min; 插入萃取纤维 CAR/DVB/PDMS (50 μ m/30 μ m 萃取头, Supelco 公司, USA), 40 °C 吸附 30 min, 立即将萃取头在 GC 进样口解吸 8 min, 用于 GC-MS 分析。

GC-MS 分析条件: 无分流进样; 色谱柱为 DB-WAXETR 气相色谱柱 (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m, Agilent J&W 公司, USA); 柱升温程序为以 3.0 °C/min 从 40 °C 升至 130 °C, 再以 4 °C/min 从 130 °C 升至 250 °C, 保持 8 min。离子源温度 250 °C, 连接杆温度 250 °C, 进样口温度 250 °C, 电压 70 eV, 质谱扫描范围 25 ~ 350 u, 扫描速率 0.2 次/s。

定性定量方法: 采用与香气标准品保留时间对比的方法定性, 以 2-辛醇为内标, 采用内标-标准曲线法定量。

1.4 数据分析方法

采用 SPSS 19.0 软件进行目标香气物质数据的单因素方差分析和多重比较, 采用 Origin Pro 9.3 绘制目标香气物质含量的动态变化图。

2 结果与分析

2.1 酵母胞外提取物中酶活分析

表 1 是两株酵母胞外提取物中酶活分析结果, 两株酵母分泌的胞外酶中与葡萄酒风味形成直接相关的酶有糖苷酶、酯酶和蛋白酶。

表 1 酵母胞外提取物中的酶活分析

Tab. 1 Enzyme activities of yeasts' extracellular extracts

U/L

酶类型	葡萄汁有孢汉逊酵母胞外酶酶活 (HU)	发酵毕赤酵母胞外酶酶活 (PF)
β -D-葡萄糖苷酶	19.78 \pm 1.53a	31.18 \pm 1.46b
α -L-阿拉伯糖苷酶	29.59 \pm 2.72a	15.32 \pm 1.29b
α -L-鼠李糖苷酶	32.07 \pm 2.37a	15.86 \pm 1.12b
β -D-木糖苷酶	27.99 \pm 1.41a	30.06 \pm 2.24a
β -D-半乳糖苷酶	24.5 \pm 1.42a	19.41 \pm 1.51b
酯酶 (C4 底物)	22.42 \pm 2.12a	40.45 \pm 3.30b
蛋白酶	55.78 \pm 3.66a	71.56 \pm 4.56b

同一行数据不同字母表示差异性显著水平 ($P < 0.05$)。

实验检测了 5 种糖苷酶的酶活, 结果显示两株酵母胞外酶中糖苷酶的活性较高, 并且差异显著, 其中 PF 中 β -D-葡萄糖苷酶活性较高, 而 HU 中 α -L-阿拉伯糖苷酶、 α -L-鼠李糖苷酶和 β -D-半乳糖苷酶的

活性较高。而对于酯酶和蛋白酶, PF 中的活性明显高于 HU 的。酵母胞外酶中的酶活及其差异最终将影响代谢产物的生成, 实验将分析胞外酶处理对辛酸乙酯和乙酸苯乙酯生成的影响。

2.2 发酵过程中还原糖消耗和酒精生成的变化

模拟发酵体系中还原糖消耗和酒精生成的动态变化分别如图 1(a) 和图 1(b)。发酵结束时, 各处理的还原糖消耗总量基本一致, 但酒精最终生成量略有

不同, 酵母胞外酶处理的酒精度略有降低。酵母胞外酶处理组 HU 和 PF 在发酵中期, 即第 4 ~ 12 天, 还原糖消耗更快, 且酒度生成速度也更快, 说明酵母胞外酶处理明显影响了酒精发酵进程。

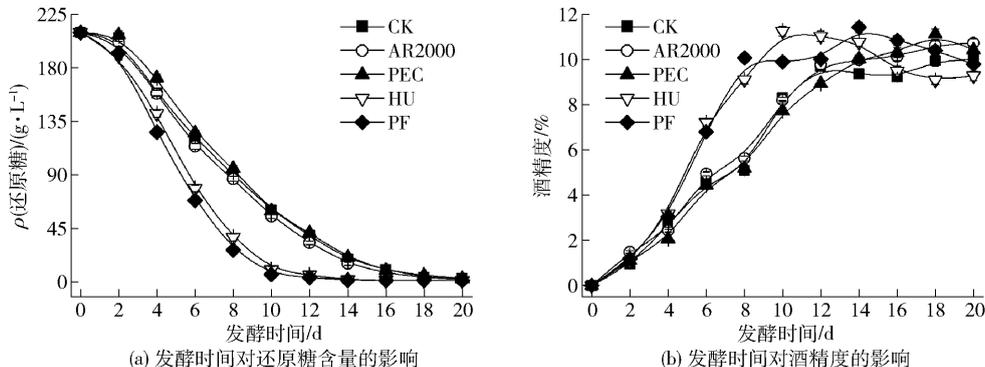


图 1 模拟发酵过程中还原糖的消耗过程和酒度的生成过程

Fig. 1 Residual sugar consumption and alcohol degree formation during simulated fermentation

2.3 目标香气物质的生成过程分析

图 2 是目标香气物质在对照和酶处理发酵过程中的生成过程。

总体上, 辛酸、辛酸乙酯、苯乙醇和乙酸苯乙酯的含量均呈现先增后减并趋于稳定的动态变化趋势。辛酸乙酯在发酵后期的含量下降幅度虽然比乙酸苯乙酯大, 但辛酸乙酯的最终生成量明显高于乙

酸苯乙酯。

不同酶制剂处理对目标香气成分的生成过程及其最终生成量均有促进作用, 其中 HU 和 PF 胞外酶在发酵过程中对目标香气成分生成的促进作用表现明显。HU 和 PF 在发酵后期对辛酸乙酯的促进生成量虽低于 AR2000, 但显著高于 PEC, 而 HU 和 PF 促进乙酸苯乙酯的作用最为显著, 发酵结束时的酶

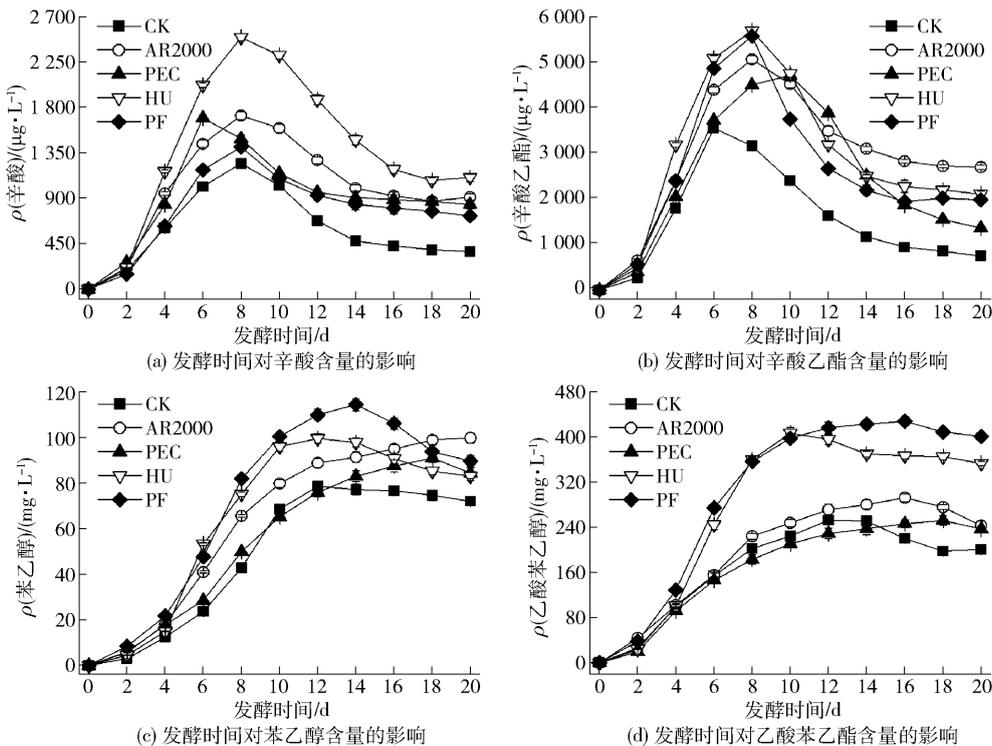


图 2 模拟发酵过程中目标香气物质的生成过程

Fig. 2 Progress of objective aroma compounds during simulated fermentation

促增量分别达到了CK生成量的1.76和2.00倍。由图2可见,辛酸与辛酸乙酯的最大生成区间是发酵的第4~8天,而后趋于下降,而苯乙醇和乙酸苯乙酯的最大生成区间是发酵的第6~14天,之后趋于平稳。相比于发酵过程中的最大生成量,本研究对目标香气成分在发酵结束时的损失率进行了计

算,结果见表2。总体上,不同处理间的损失率差异显著,其中以CK的损失率最大,而尤以辛酸和辛酸乙酯的损失率最大。比较而言,HU和PF处理有助于辛酸乙酯和乙酸苯乙酯的生成,AR2000处理在辛酸乙酯生成上优于HU和PF处理,但在乙酸苯乙酯的生成上HU和PF处理优于AR2000处理。

表2 发酵结束时目标香气物质的损失率

Tab. 2 Loss rate of objective aroma compounds at the end of fermentation

酶制剂处理	ω (辛酸)	ω (辛酸乙酯)	ω (苯乙醇)	ω (乙酸苯乙酯)	%
CK	70.08 ± 0.35a	79.01 ± 0.41a	8.40 ± 0.02c	20.54 ± 0.10a	
AR2000	47.03 ± 0.24e	46.74 ± 0.29e	—	16.90 ± 0.03b	
PEC	50.52 ± 0.16c	71.10 ± 0.49b	7.20 ± 0.03d	6.06 ± 0.09e	
HU	55.68 ± 0.18b	63.00 ± 0.31d	16.58 ± 0.16b	13.18 ± 0.10c	
PF	48.35 ± 0.23d	64.51 ± 0.39c	21.60 ± 0.13a	6.25 ± 0.06d	

同一列数据不同字母表示差异性显著水平($P < 0.05$);“—”表示没有损失。

2.4 目标香气物质的生成来源分析

假设目标香气物质的生成来源有3部分,纯酵母发酵代谢、糖苷前体水解和酶制剂促进生成,因此用目标香气物质的量来比较生成量之间的差别。发酵结束时各处理组中辛酸、辛酸乙酯、苯乙醇、乙酸苯乙酯的物质质量分析结果见表3。可以确定,(辛酸+辛酸乙酯)和(苯乙醇+乙酸苯乙酯)的纯发酵生成量远高于对应

香气糖苷——n-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷和苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷的完全水解的最大生成量。n-辛基- β -D-葡萄糖苷水解和苯基- β -D-葡萄糖苷完全水解后生成对应香气物质的含量分别为4.6 $\mu\text{mol/L}$ 和23.8 $\mu\text{mol/L}$,而在对照的纯酵母发酵代谢中,发酵结束时(辛酸+辛酸乙酯)的生成量为6.9 $\mu\text{mol/L}$,而(苯乙醇+乙酸苯乙酯)的生成量达到了591.1 $\mu\text{mol/L}$ 。

表3 模拟发酵过程中目标香气物质的最大生成量

Tab. 3 Maximal content of objective compounds during simulated fermentation

酶制剂		c (辛酸)	c (辛酸乙酯)	c (苯乙醇)	c (乙酸苯乙酯)
	糖苷最大水解生成量	4.6		23.8	
CK	实测值	8.64 ± 0.28 d	20.63 ± 0.54 d	644.02 ± 15.80 d	1.54 ± 0.04 d
AR2000	实测值	11.93 ± 0.27 b	29.38 ± 0.52 b	817.79 ± 18.50 b	1.78 ± 0.04 c
	与对照差值	3.29 ± 0.01 b	8.75 ± 0.02 b	173.77 ± 2.70 b	0.24 ± 0.01 b
PEC	实测值	11.76 ± 0.22 b	27.35 ± 0.73 c	745.60 ± 16.29 c	1.54 ± 0.05 d
	与对照差值	3.12 ± 0.06 b	6.72 ± 0.19 c	101.58 ± 1.49 c	—
HU	实测值	17.30 ± 0.25 a	33.03 ± 0.41 a	815.91 ± 16.04 b	2.48 ± 0.06 b
	与对照差值	8.66 ± 0.01 a	12.40 ± 0.14 a	171.89 ± 0.24 b	0.94 ± 0.02 a
PF	实测值	9.75 ± 0.22 c	32.36 ± 0.21 a	937.46 ± 22.26 a	2.60 ± 0.05 a
	与对照差值	1.11 ± 0.06 c	11.73 ± 0.33 a	329.44 ± 6.46 a	1.06 ± 0.01 a

同一行数据不同字母表示差异性显著水平($P < 0.05$);“—”表示无差值。

在目标香气物质最大生成量时,辛酸乙酯的物质质量是辛酸的2~3倍,而乙酸苯乙酯的量远低于苯乙醇。由表3分析可见,不同酶制剂处理均促进了辛酸和辛酸乙酯的生成,其中PEC处理促进量最低,HU促进辛酸的生成量最大,HU和PF显著促进了辛酸乙酯的生成,促进量接近对应糖苷水解最大生成量的3倍,说明酵母胞外酶处理主要是从促进酵母酯代谢的角度促进辛酸乙酯的生成,有利于葡萄酒相关酯类的生成。酶制剂处理也不同程度地促

进了发酵过程中苯乙醇的生成,增加量由大到小依次为PF、AR2000、HU、PEC,促进量远大于对应糖苷水解最大生成量。尽管乙酸苯乙酯含量远低于苯乙醇含量,但实验数据不难看出,优选酵母胞外酶处理显著增加了乙酸苯乙酯的含量,而PEC处理没有促进作用。本研究推断,酶制剂处理促进苯乙醇生成的作用主要是促进了酵母合成苯乙醇的代谢,对应糖苷前体的水解仅占其中一小部分,可以肯定优选酵母胞外酶处理具有大幅促进乙酸苯乙酯生成的优势。

3 结 论

辛酸乙酯和乙酸苯乙酯是葡萄酒中花香和果香的重要贡献者,在本研究的模拟发酵体系中,二者的含量均呈现先增后减的变化趋势。酯类物质在发酵后期的损失可能与发酵过程中 CO₂ 逸失有关^[18]。本研究中,酶制剂处理在模拟发酵体系中均大幅增加了目标香气物质的最终生成量,但大部分是促进了酵母酯类代谢的生成量,这不仅与酶制剂中糖苷酶的活性有关,还可能与 AR2000 酶^[24]、HU 和 PF 中存在的酯酶、蛋白酶等有关。相比于 AR2000 酶和果胶酶,两种非酿酒酵母胞外酶在促进辛酸乙酯大幅生成之外,还极大促进了乙酸苯乙酯生成,使乙酸苯乙酯的最终生成量达到了 350 ~ 400 μg/L,超过了其在葡萄酒中的嗅觉阈值。因此非酿酒酵母胞外酶对辛酸乙酯和乙酸苯乙酯表现出更全面的促进能力,更适合于葡萄酒的增香酿造。

两种典型酯类物质及其前体物质在发酵过程中最大生成量来源的分析发现,辛基类(辛酸 + 辛酸乙酯)和苯基类(苯乙醇 + 乙酸苯乙酯)香气物质除来源于葡萄汁的纯酒精发酵作用和酶制剂对香气糖苷的水解外,还大量来源于酶制剂对酵母酯类代谢的促进作用,添加香气糖苷的水解产物仅在目标香气物质生成量中占很小一部分。因此,优选酵母胞外酶在葡萄汁发酵过程中促进相关酯类香气物质生成的机理值得进一步深入研究揭示。

模拟葡萄汁发酵过程中,相比于 AR2000 和 PEC, HU 和 PF 促进辛酸乙酯、辛酸、乙酸苯乙酯和苯乙醇生成的效果更好。优选酵母胞外酶对目标酯类物质促进生成的作用主要表现在促进酵母酯类物质代谢的生成量上,对应糖苷前体的水解仅占其中一小部分,所以优选酵母胞外酶处理具有促进葡萄酒发酵过程中相关酯类物质生成的增香应用潜力。

参考文献:

[1] DZIADAS M, JELEŃ H H. Comparison of enzymatic and acid hydrolysis of bound flavor compounds in model system and grapes[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 412–418.

[2] STYGER G, PRIOR B, BAUER F F. Wine flavor and aroma[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(9): 1145–1159.

[3] GÜRBÜZ O, ROUSEFF J M, ROUSEFF R L. Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sau-

vignon wines using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(11): 3990–3996.

[4] PENG C T, WEN Y, TAO Y S, et al. Modulating the formation of Meili wine aroma by prefermentative freezing process[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(7): 1542–1553.

[5] CULLERÉ L, ESCUDERO A, CACHO J, et al. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(6): 1653–1660.

[6] FERREIRA V, LOPEZ R, CACHO J F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(11): 1659–1667.

[7] LI H, TAO Y S, WANG H, et al. Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli county (China) [J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(1): 287–292.

[8] WANG X J, TAO Y S, WU Y, et al. Aroma compounds and characteristics of noble-rot wines of Chardonnay grapes artificially botrytized in the vineyard[J]. *Food Chemistry*, 2017, 226: 41–50.

[9] LOPEZ R, AZNAR M, CACHO J, et al. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 966(1): 167–177.

[10] ROBINSON A L, BOSS P K, SOLOMON P S, et al. Origins of grape and wine aroma: part 1. chemical components and viticultural impacts[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2014, 65(1): 1–24.

[11] BAFFI M A, TOBAL L T, HENRIQUE J, et al. A novel β-glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: characterization and application in winemaking[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76: 997–1002.

[12] GONZALEZ-POMBO P, FARINA L, CARRAU F, et al. A novel extracellular beta-glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(1): 385–389.

[13] LÓPEZ M C, MATEO J J, MAICAS S. Screening of beta-glucosidase and beta-xylosidase activities in four non-saccharomyces yeast isolates[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(8): C1696–C1704.

[14] HU K, QIN Y, TAO Y S, et al. Potential of glycosidase from non-saccharomyces isolates for enhancement of wine aroma[J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(4): M935–M943.

- [15] COMITINI F, GOBBI M, DOMIZIO P, et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(5): 873–882.
- [16] 马得草, 游灵, 李爱华, 等. 高产 β -葡萄糖苷酶野生酵母的快速筛选及其糖苷酶酿造适应性研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(1): 129–135.
- MA D C, YOU L, LI A H, et al. Rapid screen of wild yeast with high β -glucosidase activity and evaluation of its glycosidase in winemaking[J]. *Journal of Northwest A&F University (Nature Science Edition)*, 2018, 46(1): 129–135.
- [17] SUN W X, HU K, ZHANG J X, et al. Aroma modulation of Cabernet Gernischt dry red wine by optimal enzyme treatment strategy in winemaking [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 1248–1256.
- [18] PÉREZ-MARTÍN F, SESEÑA S, IZQUIERDO P M, et al. Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 163(2/3): 153–158.
- [19] GULERIA S, WALIA A, CHAUHAN A, et al. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 232(2016): 134.
- [20] CHASSAGNE D, VERNIZEAU S, NEDJMA M, et al. Hydrolysis and sorption by *Saccharomyces cerevisiae* strains of Chardonnay grape must glycosides during fermentation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(2): 212–217.
- [21] HAMPEL D, ROBINSON A L, JOHNSON A J, et al. Direct hydrolysis and analysis of glycosidically bound aroma compounds in grapes and wines; comparison of hydrolysis conditions and sample preparation methods [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2014, 20(3): 361–377.
- [22] 王华. 葡萄酒分析检验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 113–135.
- WANG H. Wine analysis[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2011: 113–135.
- [23] WANG X C, LI A H, DIZY M, et al. Evaluation of aroma enhancement for “Ecolly” dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula mucilaginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 550–559.

Influence of Yeast Extracellular Enzymes on Formation of Ethyl Octanoate and Phenylethyl Acetate During Model Grape Juice Fermentation

LI Aihua¹, WANG Xingjie², LIU Hao², TAO Yongsheng^{2,3,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

3. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, China)

Abstract: To reveal the application potential of two yeast extracellular enzymes in winemaking for aroma enhancement, the influence of the formation of ethyl octanoate and phenylethyl acetate in model winemaking by enzyme treatment was evaluated. Extracellular extracts of *Hanseniaspora waurum* and *Pichia fermentans* were prepared. The model grape juice with respective glycosides of target compounds was used as the fermentation medium, and then various enzyme preparations (yeast extracellular enzyme, commercial glycosidase, and pectinase) were added with equivalent β -D-glucosidase activity 5 U/L. Moreover, commercial *Saccharomyces cerevisiae* was inoculated to conduct the alcoholic fermentation. And fermentative juice sampled during fermentation were analyzed by GC-MS every 24 h to obtain aroma compounds. The results showed that both yeast extracellular extracts gave high activities of flavor enzymes. The activities of α -L-arabinosidase, α -L-rhamnosidase, and β -D-galactosidase in *Hanseniaspora waurum* extracellular enzyme were higher, while those of β -D-glucosidase, esterase, and protease were higher in *Pichia fermentans* extracellular enzyme. The highest producing range of octanoic acid and ethyl octanoate was located from the 4th to 8th day during fermentation, and then the content declined. While the highest producing

(下转第 65 页)

Effect of Different Sugars on Flavor Stability of Green Tea Beverage

WANG Jieqiong^{1,2}, YANG Yue^{2,3}, YE Qingqing^{1,2}, WANG Fang²,

ZENG Liang¹, DAI Qianying^{3,*}, XU Yongquan^{2,*}, YIN Junfeng²

(1. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China;

2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The poor stability of flavor during shelf life has been one of the main factors restricting the development of green tea beverages. Therefore, in order to improve the flavor stability of green tea beverage during shelf life, the changes of the sensory quality and the main quality chemical composition of green tea beverages supplemented with different sugars such as sucrose, maltose, fructose, and glucose during high temperature sterilization conditions (135 °C, 15 s) and storage process (4 °C and 38 °C, 28 d) were analyzed, and the potential mechanism was also discussed. The results showed that green tea beverages underwent significant deterioration in flavor quality during high-temperature sterilization and storage process, and supplementing with different sugars helped to increase the quality stability of green tea beverages. The addition of sucrose in green tea beverages was more stable in sensory quality and appearance color and the addition of sucrose and maltose in green tea beverages was more conducive to maintaining the stability of flavor and main flavor components. Based on the analysis of flavor change mechanism of green tea beverages, we found that sucrose, maltose, fructose and glucose had protective effect on EGCG under the condition of high temperature treatment, and maltose had better protective effect. In summary, adding sucrose and maltose can improve flavor stability of green tea beverages.

Keywords: green tea beverage; sugar; storage; flavor stability; catechin

(责任编辑:檀彩莲)

(上接第48页)

range of phenyl ethanol and phenylethyl acetate sited from 6th to 14th day during fermentation, and then stabilized. Comparing with AR2000 and pectinase, the enhancement of target esters by *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia fermentans* extracellular enzyme was better. The enhancement of ethyl octanoate was nearly 3 times of the possible level of the respective glycoside hydrolysis. The improved content of phenyl ethanol by *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia fermentans* extracellular enzyme was greater than the possible level of the respective glycoside hydrolysis, and the content of phenylethyl acetate in the end of fermentation by *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia fermentans* extracellular enzyme was nearly 2 times of the level in control. During grape juice fermentation treated by *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia fermentans* extracellular enzyme, the enhancement of ethyl octanoate and phenylethyl acetate was mainly at the promotion of yeast ester metabolism, and the promotion effect was much stronger than the hydrolysis of the respective glycosides, so yeast extracellular enzymes are helpful to produce relative wine esters.

Keywords: wine; simulated fermentation; yeast extracellular enzyme; ethyl octanoate; phenylethyl acetate

(责任编辑:李 宁)