

苹果酒发酵过程中绿原酸胁迫对酿酒酵母生理特性的影响

杨超¹, 肖媚¹, 张茵^{1,2}, 彭帮柱^{1*}

(¹华中农业大学食品科学技术学院 武汉 430070

²西安彩虹星球农业科技有限公司 西安 710061)

摘要 在苹果酒发酵过程中,酿酒酵母会对各种胁迫和环境变化做出代谢应答。绿原酸是苹果和苹果酒中含量相对较高的一种苹果多酚类物质。本文以绿原酸为代表性苹果多酚,考察不同质量浓度的绿原酸胁迫对酿酒酵母生理特性的影响。结果表明:酿酒酵母 CICC 31084 在绿原酸胁迫下,主要通过改变胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和胞内丙二醛(MDA)含量来提高酿酒酵母的抗逆能力。其中,SOD 活性随着绿原酸质量浓度的升高而逐渐增强;低质量浓度绿原酸(0.01 g/L)胁迫促使酿酒酵母的 CAT 活性增强;绿原酸胁迫降低了发酵前期 MDA 的含量,发酵后期 MDA 的含量增加。苹果酒中关键香气物质的质量浓度随发酵时间的延长逐渐升高,在发酵中期达到最大值后逐渐降低。相关性分析表明,关键香气物质苯乙醇、乙酸苯乙醇、癸酸乙酯、乙酸异戊酯的质量浓度与绿原酸质量浓度成正相关关系,相关系数分别为 0.133,0.253,0.026,0.114;辛酸乙酯、正己酸乙酯的质量浓度与绿原酸质量浓度呈负相关关系,相关系数分别为-0.012,-0.248。

关键词 苹果酒;酿酒酵母;绿原酸;生理特性;香气成分

文章编号 1009-7848(2022)01-0116-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.01.013

苹果中富含维生素、矿物质、多酚等营养物质,其发酵制品苹果酒中含有大量的氨基酸和有机酸等物质,具有较高的保健价值,产量仅次于葡萄酒^[1]。多酚类化合物具有极强的抗氧化作用,酚类物质的种类及含量被用于评价果酒的品质^[2-4]。苹果中多酚类物质有儿茶素类、原花青素类、酚酸类、黄酮醇类、花色苷类、二氢查耳酮类等^[5-7]。绿原酸作为苹果多酚中的代表性物质,是一种羟基肉桂酸类多酚,因芳香环上的邻羟基而具有很高的抗氧化活性^[8]。绿原酸在苹果和苹果酒中含量相对较高^[9],其在苹果中含量为 0.02~4.39 mg/g DW^[10-11],其在苹果酒中含量为 24.84~90 mg/L^[12]。在苹果酒发酵过程中,绿原酸会不断的被酿酒酵母代谢,最终存在于苹果酒中。

在苹果酒发酵过程中,绿原酸的含量会随着发酵时间的延长而有所降低^[13]。Nguela 等^[14]研究了酵母和多酚之间的相互作用,发现多酚类化合物引起酵母的生长和代谢紊乱可能主要与它们和酵母细胞的质膜相互作用有关,从静止、中期到发酵

结束,酵母菌会表现出适应性反应,从而降低死亡率。通过探究原花色素对酿酒酵母的影响,发现原花色素可以提高发酵末期酿酒酵母的数量和存活率,同时会提高胞内超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性,降低胞内丙二醛(MDA)的含量,其作用效果与浓度相关^[15]。Jia 等^[16]研究原花色素在铜胁迫下对葡萄酒酵母的生长和酒精发酵的影响,发现原花色素和 Cu²⁺均可在发酵初期对酵母细胞的生长、CO₂ 释放量、糖消耗和乙醇生成产生明显的抑制作用,原花色素可以提高葡萄酒酵母在铜胁迫下抵抗有害作用的能力,并维持细胞的代谢活性。通过转录组学分析原花色素对酿酒酵母的影响,发现原花色素作用涉及 6 个代谢途径,包括维生素 B₆、硫胺素、氨基酸、氨酰基-tRNA、碳水化合物和类固醇代谢途径。作者提出原花色素可以作为细胞外激活剂来增强维生素 B₆、硫胺素、碳水化合物和类固醇的代谢效率^[17]。

在发酵过程中,酿酒酵母能对各种物质的胁迫和环境的变化做出相应的代谢应答。当菌体受到外界胁迫时,酿酒酵母会通过改变其细胞结构和生理生化指标等来抵御外界伤害并维持自身活性^[18]。SOD 与 CAT 是生物氧化防御系统的抗氧化物酶^[19-20],MDA 作为脂类物质的氧化产物可以体

收稿日期:2021-01-20

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31972063)

作者简介:杨超(1996—),男,硕士生

通信作者:彭帮柱 E-mail: bzpeng@mail.hzau.edu.cn

现生物体内氧化应激程度。为探究苹果多酚物质在发酵过程中对酿酒酵母生理特性的影响,本研究通过在苹果酒发酵体系中加入不同质量浓度的绿原酸,揭示酿酒酵母在绿原酸胁迫下的代谢应答,以期阐明苹果酒发酵过程中多酚影响酿酒酵母的代谢规律和机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) CICC 31084, 中国工业微生物菌种保藏管理中心。红富士苹果, 中国山东烟台, 色泽红润, 无虫害和机械损伤, 4℃冷藏备用。

绿原酸(纯度为 98%), 上海阿拉丁生化科技有限公司; 过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、总蛋白定量测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所。3-辛醇(纯度为 98%)、酵母膏、蛋白胨、无水葡萄糖、氯化钠, 国药化学试剂有限公司。PBS 磷酸盐缓冲剂, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

气相色谱-质谱联用仪 Agilent6890N/5975, 美国 Agilent 公司; 纤维萃取头 50/30 μm DVB/CAR/PDMS, 美国 Supelco 公司; LDZX-50KBS 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; SPX-250B 生化培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 1510 全波长读数仪, Thermo Fisher Scientific 公司; UV3600 紫外分光光度计, 英国爱丁堡公司; 恒温水浴锅, 常州奥华仪器有限公司; JYZ-V906 榨汁机, 九阳股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 苹果汁的制备 参考肖媚等^[7]的方法, 略作修改。将红富士苹果洗净、切块、榨汁后用纱布过滤, 取 200 mL 于 500 mL 锥形瓶中, 分装。65℃水浴锅中恒温水浴 30 min, 并不断搅拌使其受热均匀。水浴灭菌结束后, 置于无菌操作台紫外杀菌 15 min, 将绿原酸溶于超纯水后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。待苹果汁自然冷却后, 加入终质量浓度分别为 0, 0.1, 1.0 g/L 的绿原酸。

1.3.2 苹果汁的发酵 将酿酒酵母菌种接种于

150 mL 液体 YPD 培养基中(酵母膏 1%, 蛋白胨 2%, 无水葡萄糖 2%, 121℃灭菌 20 min), 于 28℃、120 r/min 培养 20 h, 酵母活化培养两代后, 用无菌水洗涤 2 次, 收集菌体, 用适量灭菌苹果汁复溶后以 1% 接种量加入到含有不同质量浓度绿原酸的苹果汁中, 28℃下静置培养。每隔 1 d 取样, 并置于-20℃保存待用。

1.3.3 超氧化物歧化酶(SOD)的测定 超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化酶, 能够催化超氧阴离子歧化, 生成过氧化氢以及单质氧。水溶性四唑盐 WST-1 能够和超氧阴离子反应生成水溶性的染料^[21]。首先解冻发酵样品, 取发酵液 5 mL, 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。菌液经 4℃ PBS 溶液洗涤 2 次, 用 PBS 溶液重悬。采用高通量组织研磨仪破碎酵母细胞, 破碎条件参考文献^{[22]~[23]}, 重复 3 次。破碎后的酿酒酵母细胞于 4℃ 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液并参照 SOD 试剂盒说明进行测定。

1.3.4 过氧化氢酶(CAT)的测定 采用钼酸铵法测定过氧化氢酶(Catalase, CAT), 通过加入钼酸铵能迅速终止 CAT 分解 H₂O₂ 的反应, 剩余的 H₂O₂ 与钼酸铵作用产生淡黄色的络合物, 于 405 nm 波长处测定其变化量, 计算酿酒酵母中 CAT 的酶活^[23-24]。发酵样品处理方法同 1.3.3 节所述, 并参照 CAT 试剂盒说明进行测定。

1.3.5 丙二醛(MDA)的测定 过氧化脂质降解产物中的丙二醛(MDA)可与硫代巴比妥酸(TBA)发生缩合反应, 形成红色产物, 在 532 nm 波长处有最大吸收峰^[23-24]。发酵样品处理方法同 1.3.3 节所述, 并参照 MDA 试剂盒说明进行测定。

1.3.6 苹果酒发酵过程中主要香气成分的测定

1.3.6.1 香气成分富集 参照 Yang 等^[25]方法, 采用顶空固相微萃取法(HS-SPME)富集苹果酒中的香气成分, 将 4.8 mL 苹果酒发酵上清液和 0.2 mL 质量浓度为 327.2 $\mu\text{g/L}$ 的内标物 3-辛醇加入到 15 mL 装有磁性转子的顶空瓶中, 加入 2 g 的 NaCl, 于 45℃条件下平衡 10 min 后采用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头顶空萃取 40 min。

1.3.6.2 香气成分检测 将已吸附苹果酒香气成分的萃取头插入气相色谱柱进口, 250℃下解析 5 min。色谱柱为 HP-5MS 弹性石英毛细管柱(30

m×0.25 mm×0.25 μm), 气相色谱条件和质谱条件参考杨颖迪等^[22]和叶叶叶^[26]的方法。

1.3.6.3 香气成分定性与定量 通过对比 NIST 05 质谱数据库进行定性分析, 试验结果保留 Qual>60 的鉴定结果; 以 3-辛醇为内标物, 通过对样品液中定性检测出来的醇类、酸类、酯类等物质的峰面积按公式(1)计算出各香气成分的含量。

$$C_1(\mu\text{g/L}) = \frac{A_1 \times C_0}{A_0} \quad (1)$$

式中, C_1 ——香气成分质量浓度 ($\mu\text{g/L}$); C_0 ——内标物质质量浓度 ($\mu\text{g/L}$); A_1 ——香气成分峰面积; A_0 ——内标物质峰面积。

1.4 数据处理

以上所有试验重复至少 3 次, 采用 Excel 2016 处理试验数据, 用 Origin 2018 绘图, SPSS 11.0 (IBM 公司) 对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 检测平均值的显著性水平 (S-N-K 法), 显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 绿原酸胁迫对酿酒酵母超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 是生物氧化防御系统的抗氧化酶^[19]。发酵过程中, 绿原酸胁迫对酿酒酵母的 SOD 活性影响如图 1 所示。从图 1 可以看出, 在发酵第 1 天, 不同质量浓度间 SOD 活性具有显著差异 ($P < 0.05$), 1.0 g/L 绿原酸促进作用最为明显, 且此时 SOD 酶活达到最高值 (20.19 ± 1.61) U/mg 蛋白。在发酵第 2 天, 对照组 (0 g/L 绿原酸)、0.01 g/L 绿原酸、0.1 g/L 绿原酸发酵体系中, 酿酒酵母胞内 SOD 活性逐渐增强, 而 1.0 g/L 绿原酸发酵体系中 SOD 活性开始减弱。发酵 4 d 后, 不同质量浓度绿原酸发酵体系中酿酒酵母胞内 SOD 活性均逐渐降低, 然而均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。上述结果分析表明绿原酸的存在提高了酿酒酵母胞内 SOD 活性。

2.2 绿原酸胁迫对酿酒酵母过氧化氢酶 (CAT) 活性的影响

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 在酿酒酵母对 H_2O_2 引起的氧化胁迫中起着至关重要的作用^[20], 通过测定在不同质量浓度绿原酸胁迫下酿酒酵母

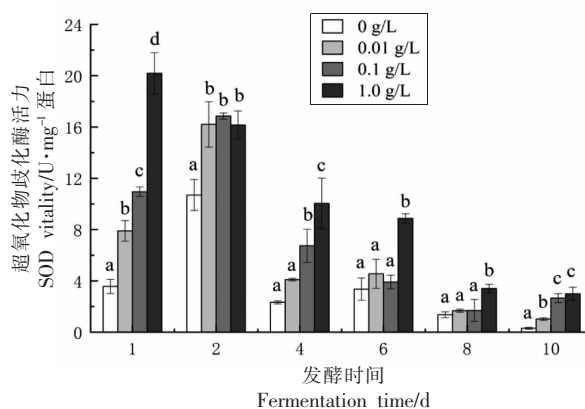


图 1 不同质量浓度绿原酸胁迫对酿酒酵母 CICC 31084 的 SOD 活性的影响

Fig.1 Effects of different mass concentrations of chlorogenic acid on SOD activity of *Saccharomyces cerevisiae* CICC 31084

胞内抗氧化酶活性, 探究绿原酸对酿酒酵母的氧化胁迫。由图 2 可知, 发酵过程中酿酒酵母 CAT 活性均呈先降低后升高的趋势。在发酵第 1 天, 不同质量浓度绿原酸作用下酿酒酵母 CAT 活性与对照组均有显著差异 ($P < 0.05$)。在低质量浓度 0.01 g/L 绿原酸作用下酿酒酵母 CAT 活性高于对照组, 而在质量浓度为 0.1, 1.0 g/L 绿原酸作用下酿酒酵母 CAT 活性均低于对照组。发酵 2 d 后, 酿酒酵母 CAT 活性开始降低, 在发酵 4~6 d, CAT 活性降为最低, 最低值分别为 (4.27 ± 0.43) U/mg 蛋白 (0 g/L 绿原酸), (4.57 ± 0.06) U/mg 蛋白 (0.01 g/L 绿原酸), (1.31 ± 0.08) U/mg 蛋白 (0.1 g/L 绿原酸), (0.40 ± 0.02) U/mg 蛋白 (1.0 g/L 绿原酸)。发酵后期, 酿酒酵母 CAT 活性显著增强, 在绿原酸质量浓度为 0.01, 0.1 g/L 的作用下, 酿酒酵母活性高于对照组, 高质量浓度 1.0 g/L 绿原酸低于对照组 ($P < 0.05$)。结果分析表明, 低质量浓度绿原酸 (0.01 g/L) 会提高整个发酵周期酿酒酵母 CAT 活性, 而高质量浓度绿原酸 (1.0 g/L) 胁迫会降低酿酒酵母 CAT 活性。

2.3 绿原酸胁迫对酿酒酵母胞内丙二醛 (MDA) 含量的影响

丙二醛 (MDA) 作为膜脂氧化的主要产物之一, 可以用来判断酿酒酵母细胞膜氧化损伤程度^[27]。发酵过程中不同质量浓度的绿原酸对酿酒酵母胞内 MDA 含量的影响, 如图 3 所示。从图 3

可知,发酵过程中酿酒酵母胞内 MDA 含量呈现逐渐增加的变化趋势。在发酵前期,绿原酸的添加降低了酿酒酵母胞内 MDA 的含量,高质量浓度 1.0 g/L 绿原酸作用下 MDA 含量最低,为 (0.24 ± 0.02) nmol/mg,与对照组相比具有显著差异 ($P < 0.05$)。发酵 1 d 后细胞胞内 MDA 含量缓慢增加。发酵 8 d 时,MDA 含量快速增加,分别达到最高值 $(8.64 \pm$

$0.30)$ nmol/mg (0 g/L 绿原酸), (12.42 ± 0.23) nmol/mg (0.01 g/L 绿原酸), (13.38 ± 0.27) nmol/mg (0.1 g/L 绿原酸), (11.40 ± 0.48) nmol/mg (1.0 g/L 绿原酸)。发酵末期,细胞体内 MDA 含量降低,不同质量浓度绿原酸作用 MDA 含量均高于对照组,且有显著差异 ($P < 0.05$)。结果表明,绿原酸的存在会降低发酵前期 MDA 含量,提高发酵后期 MDA 含量。

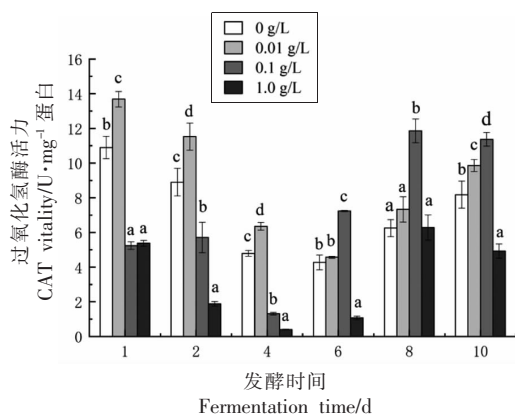


图 2 不同质量浓度绿原酸胁迫对酿酒酵母 CICC 31084 的 CAT 活性的影响

Fig.2 Effects of different mass concentrations of chlorogenic acid on CAT activity of *Saccharomyces cerevisiae* CICC 31084

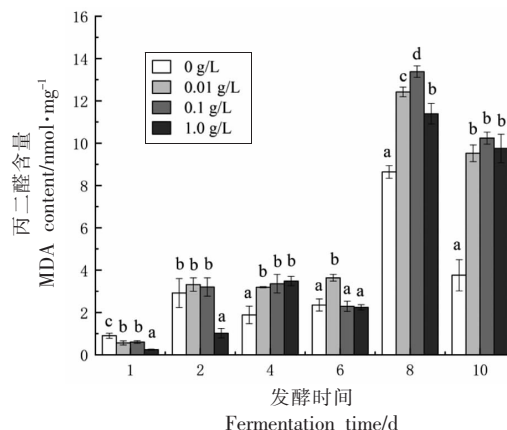


图 3 不同质量浓度绿原酸胁迫对酿酒酵母 CICC 31084 胞内 MDA 的影响

Fig.3 Effects of different mass concentrations of chlorogenic acid on intracellular MDA of *Saccharomyces cerevisiae* CICC 31084

2.4 绿原酸胁迫对苹果酒发酵过程中关键香气生成的影响

香气物质是影响苹果酒品质的重要因素之一,根据前期文献资料选取苯乙醇、辛酸乙酯、正己酸乙酯、癸酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯为苹果酒关键香气成分进行监测分析^[28]。添加不同质量浓度绿原酸对苹果酒关键香气成分的影响,如图 4 所示,各关键香气物质质量浓度随着苹果酒发酵时间的延长逐渐升高,在发酵中期达到最大值,后逐渐降低趋于稳定。

苯乙醇(2-phenylethanol)变化如图 4a 所示。外源绿原酸的添加促进苯乙醇的生成。0.1 g/L 外源绿原酸发酵体系中苯乙醇含量均高于对照组(0 g/L 外源绿原酸),且变化趋势与对照组一致,在发酵前 4 d 苯乙醇含量逐渐增加,发酵 4 d 后苯乙醇含量呈现波动变化。在 1.0 g/L 外源绿原酸发酵体系中,发酵 1 d 的苯乙醇含量低于对照组,发酵 1 d 后苯乙醇含量逐渐增加且高于对照组,发酵 8 d

后苯乙醇含量降低。发酵结束时,质量浓度为 0.1, 1.0 g/L 的外源绿原酸发酵体系中苯乙醇含量高于对照组,分别为 $(10\ 324.63 \pm 34.14)$ $\mu\text{g/L}$ (0.1 g/L 外源绿原酸), $(10\ 183.36 \pm 124.71)$ $\mu\text{g/L}$ (1.0 g/L 外源绿原酸), $(9\ 514.63 \pm 424.26)$ $\mu\text{g/L}$ (0 g/L 外源绿原酸)。

发酵过程中辛酸乙酯(Ethyl octanoate)含量变化如图 4b 所示。在 0 g/L 外源绿原酸发酵体系中,辛酸乙酯含量逐渐增加,发酵 2 d 后趋于稳定,在发酵 6 d 后辛酸乙酯含量逐渐降低。在 0.1 g/L 外源绿原酸发酵体系中,辛酸乙酯含量在整个发酵过程中均高于对照组,发酵第 4 天时辛酸乙酯含量达到最高值,且明显高于对照组,低质量浓度外源绿原酸促进辛酸乙酯的生成,发酵 4 d 后辛酸乙酯含量逐渐减少。在 1.0 g/L 外源绿原酸发酵体系中,发酵前期辛酸乙酯含量逐渐增加且低于对照组,发酵 4 d 后辛酸乙酯含量高于对照组,发酵第 6 天辛酸乙酯含量达到最高,而最高值低于 0.1

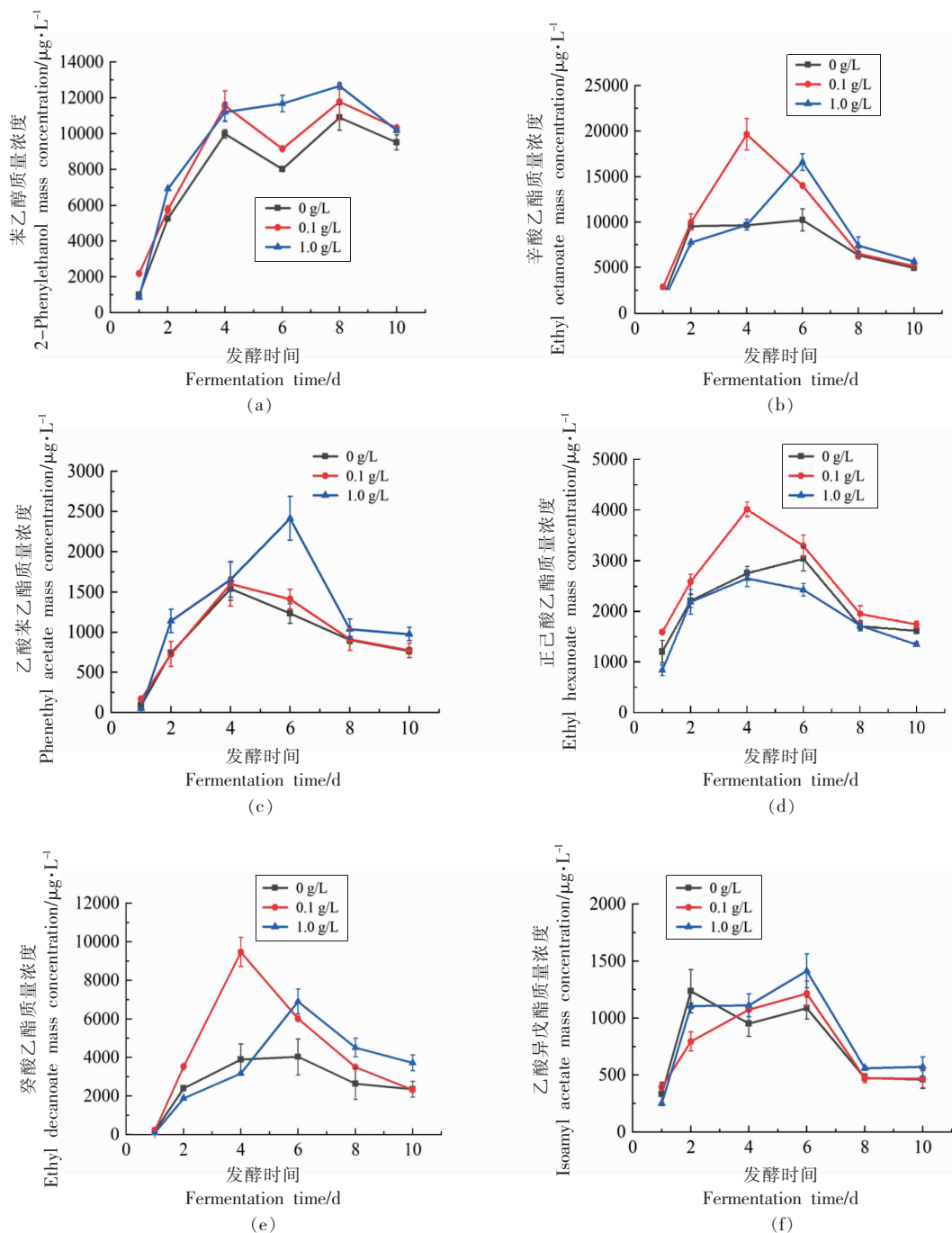


图4 苹果酒发酵过程中添加不同质量浓度绿原酸对关键香气生成的影响

Fig.4 Effects of different mass concentrations of chlorogenic acid on key aroma component productions of *Saccharomyces cerevisiae* during cider fermentation

g/L 外源绿原酸发酵体系中辛酸乙酯含量的最高值,发酵6d后辛酸乙酯含量逐渐降低。发酵结束时,辛酸乙酯含量分别为 $(4\ 950.53\pm 71.42)\mu\text{g/L}$ (0 g/L 外源绿原酸), $(5\ 161.59\pm 79.07)\mu\text{g/L}$ (0.1 g/L

外源绿原酸), $(5\ 639.33\pm 20.51)\mu\text{g/L}$ (1.0 g/L 外源绿原酸)。在发酵后期,辛酸乙酯质量浓度逐渐降低,不同质量浓度绿原酸作用无显著差异。

发酵过程中乙酸苯乙酯 (Phenethyl acetate

concentration)含量变化如图 4c 所示。0.1 g/L 外源绿原酸发酵体系中乙酸苯乙酯含量变化趋势与对照组一致,在发酵前 4 d 乙酸苯乙酯含量逐渐增加,至第 4 天达到最高值,后逐渐降低,且整个发酵过程中各发酵时间点乙酸苯乙酯含量略微高于对照组。在 1.0 g/L 外源绿原酸发酵体系中,乙酸苯乙酯含量在发酵初期第 1 天时低于对照组,发酵 1 d 后乙酸苯乙酯含量逐渐增加,且明显高于对照组,发酵 6 d 后乙酸苯乙酯含量达到最高值,后逐渐降低。发酵结束时,乙酸苯乙酯含量分别为(765.49±36.69)μg/L(0 g/L 外源绿原酸),(772.39±40.66)μg/L(0.1 g/L 外源绿原酸),(977.37±5.39)μg/L(1.0 g/L 外源绿原酸)。

发酵过程中正己酸乙酯(Ethyl hexanoate)含量变化如图 4d 所示。正己酸乙酯含量呈先逐渐增加后逐渐降低的变化趋势。0.1 g/L 外源绿原酸的添加明显促进整个发酵过程中正己酸乙酯的生成,而 1.0 g/L 外源绿原酸的添加抑制了整个发酵过程中正己酸乙酯的生成。发酵结束时,正己酸乙酯含量分别为(1 613.55±42.43)μg/L(0 g/L 外源绿原酸),(1 739.7873±67.44)μg/L(0.1 g/L 外源绿原酸),(1 343.82±45.97)μg/L(1.0 g/L 外源绿原酸)。

发酵过程中癸酸乙酯(Ethyl decanoate)含量变化如图 4e 所示。0 g/L 外源绿原酸发酵体系中,癸酸乙酯含量缓慢增加,发酵 6 d 后癸酸乙酯含量逐渐降低。在 0.1 g/L 外源绿原酸发酵体系中,癸酸乙酯含量在整个发酵过程中均高于对照组,发酵第 4 天时癸酸乙酯含量达到最高值,且明显高于对照组,发酵 4 d 后癸酸乙酯含量逐渐降低。

在 1.0 g/L 外源绿原酸发酵体系中,发酵前期癸酸乙酯含量逐渐增加且低于对照组,发酵 4 d 后癸酸乙酯含量高于对照组,发酵第 6 天癸酸乙酯含量达到最高,最高值低于 0.1 g/L 外源绿原酸发酵体系癸酸乙酯含量的最高值,发酵 6 d 后癸酸乙酯含量逐渐降低。发酵结束时,癸酸乙酯含量分别为(2 350.5±413.66)μg/L(0 g/L 外源绿原酸),(2 314.97±45.40)μg/L(0.1 g/L 外源绿原酸),(3 719.39±416.24)μg/L(1.0 g/L 外源绿原酸)。

发酵过程中乙酸异戊酯(Esoamyl acetate)含量变化如图 4f 所示。发酵过程中乙酸异戊酯含量呈先增加后逐渐降低的变化趋势。发酵前期不同质量浓度外源绿原酸作用效果较复杂,在发酵前 3 d,添加外源绿原酸发酵体系中乙酸异戊酯含量低于对照组,此阶段 0.1 g/L 外源绿原酸发酵体系中乙酸异戊酯含量明显小于对照组,发酵第 4 天时添加外源绿原酸发酵体系中乙酸异戊酯含量开始高于对照组。发酵中后期,外源绿原酸存在促进乙酸异戊酯生成的作用,促进效果与质量浓度成正比。发酵结束时,乙酸异戊酯含量分别为(458.56±78.07)μg/L(0 g/L 外源绿原酸),(467.44±80.53)μg/L(0.1 g/L 外源绿原酸),(571.44±84.50)μg/L(1.0 g/L 外源绿原酸)。

对苹果酒发酵过程中不同质量浓度外源绿原酸与关键香气物质生成量进行相关性分析,相关系数如表 1 所示。由表 1 可知,苹果酒发酵过程中苯乙醇、乙酸苯乙醇、癸酸乙酯、乙酸异戊酯质量浓度与外源绿原酸质量浓度成正相关关系,相关系数分别为 0.133,0.253,0.026,0.114。辛酸乙酯、

表 1 苹果酒发酵过程中外源绿原酸质量浓度与关键香气成分生成量之间相关系数

Table 1 Correlation coefficient between chlorogenic acid mass concentration and key aroma component production during cider fermentation

	绿原酸质量浓度	苯乙醇	辛酸乙酯	乙酸苯乙酯	正己酸乙酯	癸酸乙酯	乙酸异戊酯
绿原酸质量浓度	1	0.133	-0.012	0.253	-0.248	0.026	0.114
苯乙醇		1	0.548*	0.749**	0.430	0.696**	0.337
辛酸乙酯			1	0.840**	0.897**	0.931**	0.834**
乙酸苯乙酯				1	0.688**	0.804**	0.797**
正己酸乙酯					1	0.795**	0.774**
癸酸乙酯						1	0.627**
乙酸异戊酯							1

注:**. 在 $P < 0.01$ 水平显著相关;* 在 $P < 0.05$ 水平显著相关。

正己酸乙酯与外源绿原酸质量浓度呈负相关关系,相关系数分别为-0.012,-0.248。

3 结论

苹果酒发酵过程中,酿酒酵母 CICC 31084 在绿原酸胁迫下,主要通过改变胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和胞内丙二醛(MDA)含量来提高酿酒酵母的抗逆能力。其中,SOD 活性随着绿原酸质量浓度的升高而逐渐增加;低质量浓度绿原酸胁迫促使酿酒酵母的 CAT 活性增加,高质量浓度绿原酸胁迫降低了 CAT 活性。绿原酸胁迫降低了发酵前期 MDA 含量,发酵后期 MDA 含量逐渐增加。苹果酒发酵过程中各关键香气物质的质量浓度随发酵时间的延长逐渐升高,在发酵中期,各香气物质的质量浓度达到最大值,后逐渐降低并趋于稳定。相关性分析表明关键香气物质苯乙醇、乙酸苯乙醇、癸酸乙酯、乙酸异戊酯的质量浓度与外源绿原酸质量浓度成正相关关系;辛酸乙酯、正己酸乙酯的质量浓度与外源绿原酸质量浓度呈负相关关系。

参 考 文 献

- [1] 聂继云. 苹果的营养与功能[J]. 保鲜与加工, 2013, 13(6): 56-59.
NIE J Y. Nutritional components of apple and their physiological functions to human health[J]. Storage and Process, 2013, 13(6): 56-59.
- [2] GUERRINI S, MANGANI S, ROMBOLI Y, et al. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* strains on health-promoting compounds in wine[J]. Fermentation-Basel, 2018, 4(2): 26.
- [3] GUO J, YUE T L, YUAN Y H. Impact of polyphenols on the headspace concentration of aroma compounds in apple cider[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(4): 1635-1642.
- [4] ZUO W F, ZHANG T L, XU H F, et al. Effect of fermentation time on nutritional components of red-fleshed apple cider[J]. Food and Bioproducts Processing, 2019, 114: 276-285.
- [5] TSAO R, YANG R, CHRISTOPHER J, et al. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(21): 6347-6353.
- [6] 田兰兰, 刘婧琳, 郑战伟, 等. 苹果多酚组分及其生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 552-557.
TIAN L L, LIU J L, ZHENG Z W, et al. Research progress of compounds and physiological functions of apple polyphenol[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12): 552-557.
- [7] 肖媚, 李闽, 张菡, 等. 绿原酸对酿酒酵母发酵特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 88-93.
XIAO M, LI M, ZHANG H, et al. Effect of chlorogenic acid on fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2021, 42(6): 88-93.
- [8] SATO Y, ITAGAKI S, KUROKAWA T, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 403(1/2): 136-138.
- [9] MINNAAR P P, JOLLY N P, PAULSEN V, et al. *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in sequential fermentations: Effect on phenolic acids of fermented Kei-apple (*Dovyalis caffra* L.) juice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 257: 232-237.
- [10] 韩明虎, 王春林, 胡浩斌, 等. 庆阳红富士苹果中多酚类成分组成及含量分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(20): 244-248.
HAN M H, WANG C L, HU H B, et al. Analysis of composition and content of polyphenols in Qingyang red fuji apple[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(20): 244-248.
- [11] LIAUDANSKAS M, VISKELIS P, KVIKLYS D, et al. A comparative study of phenolic content in apple fruits [J]. International Journal of Food Properties, 2015, 18(5): 945-953.
- [12] 哈之才. 寒富苹果酒发酵过程中多酚变化规律研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
HA Z C. Study on the change of polyphenols in the fermentation process of Hanfu apple wine [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.
- [13] YE M Q, YUE T L, YUAN Y H. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(14): 2951-2957.
- [14] NGUELA J M, VERNHET A, JULIEN-ORTIZ A,

- et al. Effect of grape must polyphenols on yeast metabolism during alcoholic fermentation [J]. *Food Research International*, 2019, 121: 161–175.
- [15] 李静媛, 贾博, 刘兴艳, 等. 发酵过程中原花色素对酵母氧化状态的影响[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2288–2294.
- LI J Y, JIA B, LIU X Y, et al. Effect of proanthocyanidins on oxidation of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2288–2294.
- [16] JIA B, LIU X Y, ZHAN J C, et al. The effect of proanthocyanidins on growth and alcoholic fermentation of wine yeast under copper stress[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(6): M1319–M1324.
- [17] LI J Y, ZHU K L, ZHAO H W. Transcriptome analysis reveals the protection mechanism of proanthocyanidins for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 12.
- [18] 刘兴艳. 低 pH 对酿酒酵母酒精发酵的影响及酵母应答酸胁迫机制初探[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- LIU X Y. Effect of low pH on alcoholic fermentation and primary study of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [19] MEDINAS D B, AUGUSTO O. Mechanism of the peroxidase activity of superoxide dismutase 1[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49(4): 682–682
- [20] NISHIMOTO T, WATANABE T, FURUTA M, et al. Roles of catalase and trehalose in the protection from hydrogen peroxide toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biocontrol Science*, 2016, 21(3): 179–182.
- [21] 鄢娜. 右美托咪定对大鼠肾缺血再灌注损伤后所致肝肾损伤的保护作用研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2014.
- YAN N. Study on protective effects of dexmedetomidine on renal ischemia-reperfusion-injury-induced kidney and liver injury in rats[D]. Beijing: Chinese PLA Medical School, 2014.
- [22] 杨颖迪. 酿酒酵母合成苹果酒特征香气的代谢机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- YANG Y D. Study on metabolic mechanism of cider characteristic aroma by *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [23] 肖媚. 绿原酸胁迫对酿酒酵母生理和发酵特性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- XIAO M. Effect of chlorogenic acid stress on physiology and fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.
- [24] 王莉娟. 大豆肽的制备及其体内外抗氧化活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- WANG L J. The preparation of soy peptides and study on its antioxidant effect *in vitro* and *in vivo* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
- [25] YANG Y D, LI M, ZHANG Z, et al. Correlation analysis of key enzyme activities and aroma compounds during fermentation of simulated juice system with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Lwt—Food Science and Technology*, 2019, 108: 214–220
- [26] 叶萌祺. 苹果酒酿造过程香气物质调控及 FT-NIRS 分析方法研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- YE M Q. The regulation of cider aroma compounds and the determination based on fourier transform near infrared spectroscopy[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015.
- [27] 张佰清, 王嵘. 脉冲强光对啤酒酵母细胞损伤及通透性的影响[J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 111–114.
- ZHANG B Q, WANG R. Damage of *Saccharomyces cerevisiae* cell and permeability induced by pulsed light irradiation[J]. *Food Science*, 2013, 34(21): 111–114.
- [28] 张建萍, 蔡望秋, 陈尚龙, 等. 黄精苹果酒的研制及挥发性成分分析[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(15): 165–170.
- ZHANG J P, CAI W Q, CHEN S L, et al. Preparation of cider with treated *Polygonatum sibiricum* and analysis of its volatile compounds[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(15): 165–170.

Effects of Chlorogenic Acid Stress on the Physiological Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* during the Fermentation of Cider

Yang Chao¹, Xiao Mei¹, Zhang Han^{1,2}, Peng Bangzhu^{*}

(¹College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

²Rainbow Star Agricultural Technology Co. Ltd., Xi'an 710061)

Abstract In the process of cider fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* will make metabolic responses to various stresses and environmental changes. Chlorogenic acid is a relatively high content of apple polyphenols in apples and cider. This study selected chlorogenic acid as a representative apple polyphenol to investigate the effects of different concentrations on the physiological characteristic of *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that *Saccharomyces cerevisiae* CI-CC 31084 improved the resistance to stress by changing the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and the content of intracellular malondialdehyde (MDA) under the stress of chlorogenic acid. Among them, SOD activity gradually increased with the increase of chlorogenic acid's concentration. The stress of low concentration of chlorogenic acid (0.01 g/L) promoted the increase of CAT activity of *Saccharomyces cerevisiae*. The content of MDA was reduced in the early fermentation stage, and increased in the late fermentation stage under the stress of chlorogenic acid. With the extension of the fermentation time, the concentration of key aroma substances in cider gradually increased, which reached the maximum in the middle of fermentation, and then gradually decreased and stabilized. Correlation analysis showed that the concentration of key aroma substances, such as phenylethyl alcohol, phenylethyl acetate, isoamyl acetate, and ethyl caprate were positively correlated with the concentration of chlorogenic acid, the correlation coefficients respectively were 0.133, 0.253, 0.026, 0.114; ethyl caprylate and ethyl caproate were negatively correlated with the concentration of chlorogenic acid, the correlation coefficients were -0.012 and -0.248.

Keywords cider; *Saccharomyces cerevisiae*; chlorogenic acid; physiological characteristics; aroma components