

葡萄汁有孢汉逊酵母糖苷酶增香酿造葡萄酒的潜力分析

陶永胜^{1,2} 朱晓琳¹ 马得草¹ 胡凯¹ 彭传涛¹

(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: 评价了优选葡萄汁有孢汉逊酵母分泌的糖苷酶用于干红葡萄酒的增香酿造效果。实验以陕西杨凌黑比诺葡萄为原料, 采用优选菌株糖苷粗酶进行发酵前处理, 酿造干红葡萄酒, 并以 AR2000 酶处理为对照, 实验中糖苷酶的酿造环境耐受性分析以 β -葡萄糖苷酶的酶活表示。葡萄酒香气成分采用固相微萃取-气相色谱-质谱联用仪 (SPME-GC-MS) 检测, 香气特征采用感官量化品评法分析。结果表明, 优选菌株糖苷酶更多地水解葡萄中去甲基异戊二烯和一些萜烯类的糖苷, 催化水解 C_6 化合物前体较少, 所酿酒表现出温带水果、小浆果和花香特征; 而 AR2000 酶在大量水解萜烯类香气糖苷的同时, 水解大量 C_6 化合物前体, 导致所酿酒生青味突出。因此, 优选菌株糖苷酶有良好的增香酿造潜力。

关键词: 葡萄汁有孢汉逊酵母; 糖苷酶; 葡萄酒香气; 气相色谱-质谱联用仪; 感官分析

中图分类号: TS262.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2016)10-0280-07

Application of Glycosidase from *Hanseniaspora uvarum* on Wine Aroma Enhancement

Tao Yongsheng^{1,2} Zhu Xiaolin¹ Ma Decao¹ Hu Kai¹ Peng Chuantao¹

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

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

Abstract: The potential of glycosidase from one selected *Hanseniaspora uvarum* strain to enhance aroma of *Pinot Noir* dry red wine was evaluated. The tolerance of glycosidase extract obtained from this isolate was assayed in winemaking-like conditions, and the activity of glycosidase was expressed by β -glucosidase. Normal harvested *Pinot Noir* grapes in Yangling of Shaanxi Province, China, were destemmed and crushed, and then the crude *H. uvarum* glycosidase was added to the must prior to alcohol fermentation to make dry red wine. The treatment with commercial enzyme preparation AR2000 and that without adding enzyme were set as comparisons. In April of the following year, aromatic components of wines were detected by SPME-GC-MS, and the aroma characteristics were quantified by a trained tasting panel. The results indicated that glycosidase from *H. uvarum* showed a relative stability at acidic pH as well as tolerance to ethanol and glucose. The enzyme treatment gave wine more complexity and greater amounts of aromatic components. The AR2000 treatment strongly encouraged the release of varietal compounds in wine, such as terpenols that presented as fruity and floral, and C_6 compounds that were responsible for green trait. Additionally, the AR2000 treatment also improved alcohol and ester contents. In contrast, the treatment with *H. uvarum* glycosidase yielded wine with the highest level of C_{13} -norisoprenoids and some terpenols, but lower contents of C_6 and higher alcohol compounds. Finally, wine sensory analysis revealed that the treatment with *H. uvarum* glycosidase gave wine more complex and elegant aroma, with much temperate fruit, berry, and floral characteristics, whereas the AR2000 treatment yielded wine with prominent green characteristics. Therefore, the glycosidase of *H. uvarum* has the potential to improve quality of wine aroma.

Key words: *Hanseniaspora uvarum*; glycosidase; wine aroma; GC-MS; sensory analysis

收稿日期: 2016-04-02 修回日期: 2016-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371724)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(2014YQ005)

作者简介: 陶永胜(1977—),男,教授,博士,主要从事葡萄酒酿造与风味化学研究, E-mail: taoyongsheng@nwsuaf.edu.cn

引言

源于葡萄果实的品种香气是葡萄酒的重要香气特征,而葡萄酒香气还来源于酿造过程中葡萄香气糖苷前体的水解^[1]。香气糖苷没有挥发性,只有经酸解或酶解释放出游离态成分,才能表现出香气特征^[2]。酿造过程中果实和酵母菌的糖苷酶催化水解是游离香气成分最主要的释放方式^[3],其中 β -葡萄糖苷酶是此过程的关键酶。葡萄酒酿造环境,如高糖、高酒度、低pH值和含多酚物质等,限制了葡萄浆果和酵母菌糖苷酶的活性^[4-5],所以一般酿酒过程中的糖苷酶不足以充分水解香气糖苷,尤其对于不完全成熟的葡萄原料,致使所酿酒缺乏典型的品种香气特征。目前,在葡萄酒酿酒过程中使用的一些外源糖苷酶制剂,大多数来源于黑曲霉(*Aspergillus niger*)或哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*),主要用于提高出汁率、增加颜色、澄清和增强香气等^[6]。然而研究发现,霉菌糖苷酶专一性差,在催化葡萄香气糖苷水解的同时,会分解色素或酚酸类糖苷,产生挥发性酚类化合物,从而导致葡萄酒色素不稳定并产生不良气味^[5]。近些年有研究证实,非酿酒酵母(non-*Saccharomyces*)所产糖苷酶对酿酒环境的适应性比酿酒酵母的更强^[7],适宜于葡萄酒的增香酿造。例如,LÓPEZ等^[8]筛选出汉逊酵母(*Hanseniaspora*)应用于Muscat葡萄酒的增香酿造,并验证其所产糖苷酶活力及其水解特性。陶永胜等^[9]评价了野生胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)的糖苷酶对媚丽新酒中香气糖苷的水解潜力。

我国季风气候区大部分葡萄酒产区在葡萄成熟季多雨,导致酿酒葡萄在未完全成熟之前采收,酿造过程香气糖苷水解不充分,所酿葡萄酒缺乏品种香气特征。陕西杨凌地区是典型的季风气候区,酿酒葡萄成熟季节雨热同季,张晓等^[10]曾对杨凌黑比诺干红葡萄酒的香气成分进行分析,结果显示新酒中品种香气成分的浓度高于嗅觉阈值的较少,葡萄酒典型的品种香气特征弱。本文提取优选葡萄酒有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)分泌的糖苷酶,采用 β -葡萄糖苷酶活评价其酿酒环境适应性,并将其应用于陕西杨凌地区黑比诺干红葡萄酒的酿造过程,通过所酿酒的香气成分和香气特征的量化分析来评价其增香酿造潜力。

1 材料与方法

1.1 葡萄原料

黑比诺葡萄200 kg,含糖质量浓度180.48 g/L,

含酸质量浓度8.25 g/L(酒石酸计),于2014年8月人工采自陕西省杨凌区曹新庄葡萄园(34°18'N, 108°05'E)。

1.2 生化试剂

红葡萄酒酒精发酵用活性干酵母ACTIFLORE F33,购于法国Laffort公司。

商业糖苷酶制剂AR2000(黑曲霉糖苷酶提取物,以 β -葡萄糖苷酶表示的酶活250 U/g),购于荷兰DSM公司。

分析纯化学试剂:亚硫酸溶液(含SO₂ 6%),蛋白胨,葡萄糖,NH₄NO₃,KH₂PO₄,MgSO₄·7H₂O,吐温-80,NaAc,Na₂CO₃,(NH₄)₂SO₄,Na₂HPO₄,柠檬酸,NaCl和无水乙醇购于天津化学试剂公司。p-硝基苯基- β -D-葡萄糖苷(pNPG)购于北京Sigma-Aldrich公司。

色谱纯化学标准品:乙酸乙酯、乙酸异丁酯、丁酸乙酯、1-丙醇、1-己醇、异丁醇、乙酸异戊酯、1-丁醇、异戊醇、己酸乙酯、(Z)-3-己烯-1-醇、3-辛醇、辛酸乙酯、里哪醇、异丁酸、2,3-丁二醇、4-松油烯醇、2,3-二氢咪喃酮、癸酸乙酯、香叶醇、琥珀酸二乙酯、3-甲硫基-1-丙醇、 β -大马酮、 β -紫罗兰酮、橙花叔醇、月桂酸乙酯、己酸、1-十二醇、9-癸稀酸乙酯、苯甲醇、苯乙醇、辛酸、乙酸己酯和1-辛烯-3-醇等色谱纯标品购于北京Sigma-Aldrich公司。

1.3 优选菌株

优选酵母菌株筛选自云南省弥勒县东风农场葡萄园,该菌株已在中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号CCTCC NO:M 2013658。根据该菌株在WL鉴别培养基上的菌落形态和细胞形态(图1),经26S rRNA分子测序,其序列与GenBank中葡萄酒有孢汉逊酵母(*H. uvarum*)JQ678682.1的序列100%匹配。

1.4 糖苷粗酶液的制备

糖苷酶提取:上清液取自优选酵母菌株72 h发酵培养基(2%蛋白胨、2%葡萄糖、0.3% NH₄NO₃、0.4% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、1% 吐温-80,10%接种量),添加经研磨的(NH₄)₂SO₄至80%饱和度,4℃下盐析12 h后,离心上清液(4℃下14 000 r/min离心10 min)收集沉淀,并用0.1 mol/L的醋酸钠缓冲液(pH值5.0)溶解。最后超滤移除分子量小于10 kDa的物质,适当浓缩,得到糖苷酶提取液。

糖苷粗酶的酶活:酶活以 β -葡萄糖苷酶表示,采用pNPG法检测。将200 μ L酶液与1 mmol/L 250 μ L pNPG于pH值5.0的750 μ L柠檬酸-磷酸缓冲液中反应30 min,然后加入1.0 mL 1 mol/L的

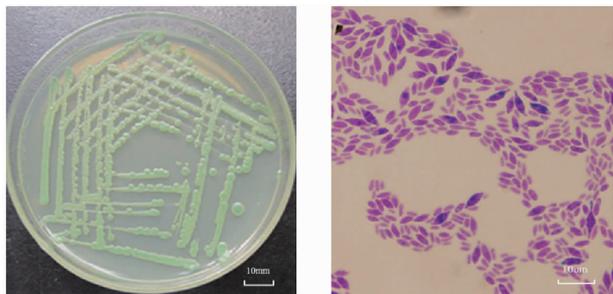


图1 菌株 WL 培养基菌落形态(28℃下 72 h 培养)和革兰氏染色的细胞显微形态(10 × 100 倍)

Fig.1 Colony morphology of *H. uvarum* strain on WL medium agar plate (72 h old at 28°C) and its cell morphology following Gram staining (10 × 100 times)

Na_2CO_3 终止反应,并用分光光度计测 400 nm 处吸光度,即为产物对硝基苯酚(pNP)浓度。优选菌株糖苷酶以 β -糖苷酶表示的酶活力为 0.464 U/mL, β -葡萄糖苷酶活力单位(U)定义为:40℃下 1 min 内催化生成 1 μmol pNP 所要的酶量。

1.5 糖苷酶耐受性

不同浓度葡萄糖对酶活力的影响:按葡萄糖质量分数 0、2.5%、5.0%、10.0%、15.0%、20.0%、30% 配制 pH 值 5.0 的柠檬酸-磷酸(PC)缓冲液,采用上述方法测定酶活,以 pH 值 5.0 不加葡萄糖的缓冲液酶活为标准活性(100%)。

不同浓度乙醇对酶活力的影响:在 pH 值 5.0 的 PC 缓冲液中,按体积分数 0、5%、10%、15%、20% 加入无水乙醇,按上述方法测定酶活,以 pH 值 5.0 不加乙醇的缓冲液酶活为标准活性。

不同 pH 值对各酶活力的影响:将 PC 缓冲液配成 pH 值分别为 3.0、3.5、4.0、4.5 的缓冲体系,按常规方法测定酶活,以 pH 值 5.0 的缓冲液酶活为标准活性。

葡萄酒酿造综合环境对酶活力的影响:将 PC 缓冲液配成含 20% 葡萄糖、10% 乙醇、pH 值 3.0 体系,测定 16 d 内酶活变化,以 pH 值 5.0 下不加葡萄糖和乙醇的缓冲液酶活为标准活性。

1.6 葡萄酒增香酿造

黑比诺葡萄除梗破碎后,装入 50 L 玻璃罐中,添加 SO_2 50 mg/L,30 min 后按 20 U/L 添加糖苷酶液或酶制剂,15℃ 下浸渍 12 h 后,添加活性干酵母 200 mg/L 启动酒精发酵,添加白砂糖调整最终酒精度至 12% vol。发酵温度控制在 25 ~ 27℃,发酵持续 7 ~ 8 d,当含糖质量浓度低于 2 g/L 时,进行皮渣分离,葡萄酒转入干净玻璃罐中,补加 SO_2 50 mg/L,4℃ 下密封贮藏,期间进行 2 ~ 3 次自然澄清转罐。实验以不添加酶的处理为空白对照(CK),以添加 AR2000 酶制剂的处理为对比,每处理重复 3 次。酿造次年 4

月份进行供试酒样的香气成分和香气特征分析。

1.7 香气成分分析

1.7.1 固相萃取条件

在 15 mL 装有磁力搅拌子的顶空瓶中加入 10 mL 葡萄酒和内标溶液,按 2.0 g 加入 NaCl,然后将顶空瓶放入电磁搅拌器上水浴,40℃ 平衡 10 min,打开搅拌器开关,插入萃取纤维(Polydimethylsiloxane, PDMS),40℃ 吸附 30 min,立即将萃取头在 GC 进样口解吸 3 min,用于 GC-MS 分析。每个酒样的萃取操作重复 2 次。

1.7.2 GC-MS 分析

GC-MS 仪器:TRACE DSQ,美国 Thermo-Finnigan 公司;色谱柱:DB-Wax 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm , J&W, Folsom, USA)。载气:He,流速为 1 mL/min。柱温升温程序:40℃ 保持 3 min,然后以 4℃/min 升至 160℃,再以 7℃/min 升至 230℃,保持 8 min。样品注射体积为 1 μL ,不分流进样。质谱范围:33 ~ 450 amu,连接杆温度 230℃,注射器温度 250℃。离子源温度 230℃,电子源电离轰击,电子源电压 70 eV,灯丝流量 0.20 mA,检测器电压 350 V,质谱扫描范围 33 ~ 450 amu,扫描速率 1 次/s。

1.7.3 香气成分定性定量方法

定性分析:以质谱自带的 NIST 2.0 谱库或相关文献进行检索,以标准物质保留时间和保留指数确认定性结果。无对应标准物质的香气化合物如表 1 所示。

定量分析:采用内标-标准曲线法定量,3-辛醇用作内标物质,标准曲线采用五点法绘制。对于无标准物质的挥发性成分,计算时采用与其化学结构相似物质的标准曲线。

1.8 香气特征感官分析

葡萄酒香气特征的感官量化分析参照文献[11]中的方法进行。品尝小组由 30 名葡萄酒专业的学生组成,通过葡萄酒标准香气物质培训直到对葡萄酒香气特征辨别分析结果的偏差小于整体平均值的 5%。在分析过程中,采用完全随机区组设计,每个成员需用标准香气物质中的 5 ~ 8 个特征词汇来描述葡萄酒的香气特征。实验要求品尝员对供试酒样的香气特征用“五点标度法”量化(“1”—弱;“2”—较弱;“3”—中等;“4”—较强;“5”—强)。香气的量化强度值为该香气特征词汇的使用频率和强度平均值的综合体现,采用的计算公式为

$$M = \sqrt{FI} \times 100\%$$

式中 F ——某一香气特征使用人数占总人数比值
 I ——某一香气特征的平均强度与最大强度的比值

表 1 供试酒样香气成分 GC-MS 检测浓度
Tab. 1 Concentrations of volatile compounds detected in sample wines by GC-MS

成分类别	化合物	保留指数	质量浓度/(mg·L ⁻¹)			嗅觉阈值	气味描述	
			对照	有孢汉逊酵母糖苷酶	AR2000 酶制剂			
品种香气成分	C ₆ 化合物	1-己醇	1 392	8.919 ± 0.527 ^a	15.200 ± 0.963 ^b	25.578 ± 1.241 ^c	8 mg/L	生青,果香,醇香,甜味
		(E)-3-己烯-1-醇	1 401	0.619 ± 0.014 ^b	0.702 ± 0.022 ^c	0 ^a	0.4 mg/L	青草,草药
		(Z)-3-己烯-1-醇	1 415	2.585 ± 0.144 ^b	1.760 ± 0.152 ^a	5.437 ± 0.261 ^c	0.4 mg/L	青草,草药
		(Z)-2-己烯-1-醇	1 435	0.538 ± 0.011 ^c	0.382 ± 0.008 ^b	0 ^a	0.4 mg/L	青草,草药
	萜烯类	里哪醇氧化物	1 448	0.295 ± 0.018 ^c	0.030 ± 0.002 ^a	0.167 ± 0.010 ^b	0.5 mg/L	玫瑰,木头
		里哪醇	1 600	0.049 ± 0.003 ^a	0.102 ± 0.013 ^b	0.157 ± 0.009 ^c	0.025 mg/L	玫瑰香型,花香,果香
		乙酸里哪醇酯	1 606	0.017 ± 0.002 ^a	0.061 ± 0.004 ^b	0.089 ± 0.006 ^c		
		4-松油烯醇	1 633	0.111 ± 0.007 ^b	0.065 ± 0.006 ^a	0.154 ± 0.007 ^c	0.11 ~ 0.4 mg/L	清香,木头,土壤
		香叶醇	1 814	0 ^a	0.083 ± 0.004 ^c	0.066 ± 0.003 ^b	0.03 mg/L	热带水果,青草
	去甲基异戊二烯	β-紫罗兰酮	1 574	0.001 ^a	0.005 ^c	0.002 ^b	0.09 μg/L	悬钩子,紫罗兰,甜果
		β-大马酮	1 832	0.002 ^a	0.008 ^b	0.002 ^a	0.05 μg/L	树皮,桃罐头,烤苹果,干杏
		苯甲醇	1 896	0 ^a	1.500 ± 0.139 ^b	3.920 ± 0.128 ^c	200 mg/L	杏仁,脂肪味
	苯衍生物	苯乙醇	1 931	70.556 ± 2.502 ^a	79.998 ± 2.637 ^b	87.563 ± 1.911 ^c	14 mg/L	花香
		挥发性酚	2,4-二叔丁基苯酚	2 330	0.160 ± 0.017 ^a	0.475 ± 0.028 ^b	0.980 ± 0.106 ^c	0 ~ 0.2 mg/L
	其他	2,3-二氘呋喃酮	1 643	0 ^a	0.410 ± 0.022 ^b	0.458 ± 0.029 ^c	50 mg/L	牛奶,奶酪
		3-甲基-1-丙醇	1 738	0.050 ± 0.007 ^a	0.089 ± 0.005 ^b	0.095 ± 0.008 ^b	1.0 mg/L	生土豆,大蒜
合计			83.945 ± 3.237 ^a	100.906 ± 4.007 ^b	124.705 ± 3.723 ^c			
高级醇	1-丙醇	1 036	7.884 ± 0.233 ^a	9.006 ± 0.177 ^b	10.007 ± 0.408 ^c	50 mg/L	新鲜,醇香	
	异丁醇	1 108	30.047 ± 2.201 ^b	25.600 ± 1.355 ^a	52.566 ± 3.685 ^c	40 mg/L	甜香,醇香	
	1-丁醇	1 165	1.878 ± 0.041 ^b	1.291 ± 0.012 ^a	1.324 ± 0.017 ^a	150 mg/L	药味,醇香,辛辣	
	异戊醇	1 230	129.75 ± 8.616 ^a	150.071 ± 8.014 ^b	168.131 ± 6.625 ^c	30 mg/L	醇香,刺激味,苦味,香蕉	
	3-乙氧基-1-丙醇	1 409	0.002 ^a	0.007 ^b	0.002 ^a	0.1 mg/L		
	1-辛烯-3-醇	1 449	0.002 ^a	0.007 ^b	0.002 ^a		蔬菜,生青,脂肪	
	2,3-丁二醇	1 598	1.585 ± 0.014 ^a	3.521 ± 0.008 ^c	2.514 ± 0.016 ^b	120 mg/L	黄油,奶酪,化学味	
	1-十二醇	1 981	0.014 ± 0.002 ^a	0.041 ± 0.001 ^b	0.041 ± 0.001 ^b	1.0 mg/L	高浓度不舒适,低浓度花香	
	酯类	乙酸乙酯	885	20.571 ± 3.028 ^a	23.015 ± 0.853 ^a	27.52 ± 0.979 ^b	7.5 mg/L	果香,甜香
		乙酸异丁酯	999	0.172 ± 0.014 ^a	0.190 ± 0.011 ^b	0.247 ± 0.013 ^c	1.6 mg/L	草莓,果香,花香
丁酸乙酯		1 026	1.233 ± 0.087 ^b	0.964 ± 0.102 ^a	1.937 ± 0.173 ^c	0.02 mg/L	酸果香,草莓,果香	
乙酸异戊酯		1 132	0.824 ± 0.049 ^a	0.779 ± 0.048 ^a	1.338 ± 0.021 ^b	0.03 mg/L	果香,新鲜香蕉	
己酸乙酯		1 244	0.195 ± 0.014 ^b	0.224 ± 0.012 ^{bc}	0.156 ± 0.012 ^{ab}	0.014 mg/L	青苹果,果香,草莓,茴香	
乙酸己酯		1 287	0.038 ± 0.001 ^b	0.008 ± 0.001 ^a	0.055 ± 0.004 ^c	1.5 mg/L	舒适的果香,梨	
辛酸乙酯		1 446	0.479 ± 0.021 ^a	0.547 ± 0.077 ^a	0.741 ± 0.083 ^b	0.005 mg/L	果香,甜香,茴香,蜡味	
癸酸乙酯		1 651	0.031 ± 0.001 ^b	0.085 ± 0.003 ^c	0.020 ± 0.001 ^a	0.2 mg/L	果香,脂肪,舒适,蜡味	
琥珀酸二乙酯		1 701	6.806 ± 0.194 ^a	10.196 ± 0.237 ^b	10.136 ± 0.718 ^b	200 mg/L	生青果香	
9-癸烯酸乙酯		1 711	0.002 ^a	0.007 ^b	0.008 ^c	0.1 mg/L	生青果香脂肪	
脂肪酸	月桂酸乙酯	1 849	0.007 ^a	0.013 ^b	0.016 ± 0.001 ^c	1.5 mg/L	甜,花香,果香,奶酪	
	异丁酸	1 618	0.014 ± 0.001 ^a	0.096 ± 0.005 ^c	0.072 ± 0.007 ^b	8.1 mg/L	酚,化学味,脂肪	
	己酸	1 863	0.873 ± 0.031 ^a	1.200 ± 0.018 ^c	1.140 ± 0.022 ^b	0.42 mg/L	奶油,腐败味	
	辛酸	2 083	5.060 ± 0.154 ^a	6.230 ± 0.107 ^b	6.609 ± 0.149 ^c	0.5 mg/L	腐败味,刺激味,奶油,脂肪	
合计			207.467 ± 14.702 ^a	233.098 ± 11.041 ^a	284.582 ± 12.935 ^b			

注:表中同一行数据上角不同字母表示差异性显著;保留指数通过 DB-Wax 柱计算。

1.9 数据处理方法

采用主成分分析(Principal component analysis, PCA)进行不同处理供试酒样中香气成分分布规律的研究,数据处理采用 SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行。

2 结果与讨论

2.1 优选菌株糖苷酶的酿酒环境耐受性

图 2 为葡萄糖、乙醇、pH 值和保存时间对优选菌株糖苷酶活性的影响。虽然葡萄糖对大多数微生

物所产糖苷酶具有很强的抑制作用^[12],但本研究发现在10%的糖质量分数下相对酶活在80%以上,在20%的糖质量分数下相对酶活仍可达到75%。随着缓冲液中乙醇体积分数的不断升高,相对酶活在10%的乙醇体积分数下降至83%。这与LÓPEZ等^[8]对汉逊酵母所产糖苷酶的耐受性研究结果相符,即在10%的乙醇体积分数下糖苷酶的活性可维持在80%以上。另有研究表明,一些微生物所产糖苷酶在pH值3.0时具有较低酶活(小于50%)^[13-14]。但是本研究发现,即便在较低的pH值下此优选菌株糖苷酶的活性仍在95%以上。由于酿酒环境是上述抑制因素的综合体系,本实验评价了优选菌株糖苷酶在20%葡萄糖、10%乙醇和pH值3.0的综合条件下,酶活随保存时间的变化趋势。如图2所示,即使到第10天相对酶活仍维持在80%以上。因此,优选菌株糖苷粗酶对葡萄酒酿造环境具有良好的耐受性。

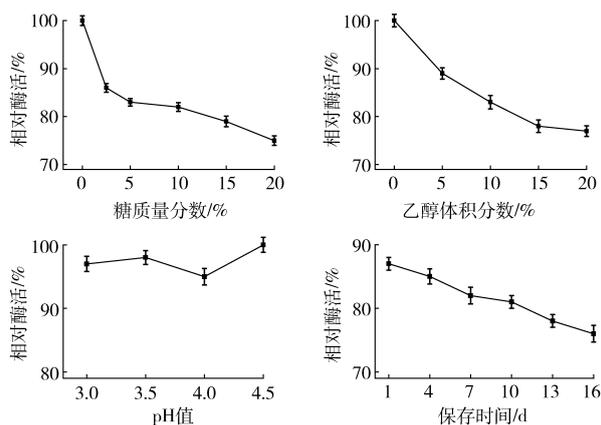


图2 葡萄糖、酒精、pH值和保存时间对于菌株β-葡萄糖苷酶活力的影响

Fig.2 Effects of glucose, ethanol, pH value and storage time on β-glycosidase activities of *H. uvarum*

2.2 葡萄酒香气成分分析

供试酒样的香气成分GC-MS检测结果见表1,嗅觉阈值和香气特征参照TAO等^[15-16]和PENG等^[11]的研究。其中,(E)-3-己烯-1-醇、(Z)-2-己烯-1-醇、里哪醇氧化物、乙酸里哪醇酯、2,4-二叔丁基苯酚、3-乙氧基-1-丙醇的定性鉴定无标准品。品种香气成分主要是葡萄皮中香气糖苷前体物质的水解产物,对葡萄酒的品种和区域典型性起决定性作用;而发酵香气成分主要为酿酒酵母在酒精发酵过程中积累的副产物,故分开讨论。

2.2.1 品种香气成分

葡萄酒品种香气主要包括萜烯类、去甲基异戊二烯化合物、C₆化合物和苯衍生物等,葡萄酒中这些化合物的含量受葡萄品种、葡萄园生态环境、栽培模式和成熟度等因素的影响。本实验中,3个酒样中

品种香气成分的总质量浓度分别为83.945、100.906、124.705 mg/L,所检化合物包括4种C₆化合物、6种萜烯醇、2种去甲基异戊二烯化合物、2种苯衍生物、1种挥发性酚和2种其他化合物,酶处理对品种香气成分的含量影响很大。

萜烯类糖苷主要来源于葡萄果皮细胞的次级代谢,根据此类化合物的浓度不同可将葡萄品种分为玫瑰香型(6 mg/L以上)、非玫瑰香型(1~4 mg/L)和非芳香型(0~1 mg/L)^[4]。本实验中,检测所得6种萜烯类化合物的总质量浓度均小于1 mg/L,其中AR2000酶制剂对萜烯类化合物的水解作用最强。HERNÁNDEZ等^[17]研究认为葡萄汁有孢汉逊酵母释放的糖苷酶,能够促进萜烯类糖苷的水解,释放出气味活性成分,与此结果相似,本研究中优选菌株糖苷酶处理明显增加了酒样中乙酸里哪醇酯、里哪醇和香叶醇的含量,带给葡萄酒玫瑰和柠檬的香气特征。但与对照和AR2000酶处理相比,优选菌株糖苷酶的处理降低了4-松油烯醇的含量,故而由该成分带来的土壤和木头味减弱。

去甲基异戊二烯化合物主要来源于葡萄果皮中类胡萝卜素的分解,葡萄酒中最常见的3种该类化合物是α-紫罗兰酮、β-紫罗兰酮和β-大马酮^[18],它们赋予葡萄酒紫罗兰花香和甜果香气。本研究在供试酒样中检测到β-紫罗兰酮和β-大马酮,其含量均高于阈值。优选菌株糖苷酶促使此类化合物前体的分解,质量浓度达到13 μg/L,远高于AR2000酶处理(4 μg/L)和CK(3 μg/L)的酒样;并且该处理酒样中β-大马酮质量浓度达到了8 μg/L,而其嗅觉阈值仅为0.05 μg/L。ESCUDERO等^[19]认为β-大马酮对香气贡献有很重要的作用,其本身能带给葡萄酒强烈的甜果香和花香。

C₆化合物是一类带给葡萄酒生青气味的品种香气成分^[20],本实验中,AR2000酶处理酒样中的C₆化合物含量最高,这可能与该酶大量水解C₆化合物的糖苷前体物质有关。供试酒样中苯甲醇和苯乙醇的含量占品种香气总含量的70%以上,尤其是苯乙醇,含量超过其嗅觉阈值,带给葡萄酒玫瑰花和新鲜面包的香气特征。这与SELLI等^[21]的研究结果相符,即在萜烯类物质含量不丰富的非芳香型葡萄酒中,苯衍生物香气糖苷的水解产物往往较高。此外,供试酒样中检测到2,4-二叔丁基苯酚、2,3-二氢吡喃酮和3-甲硫基-1-丙醇,由于其含量远低于阈值,故其香气贡献很小。

为了揭示酶处理对品种香气成分整体的影响,对供试酒样品种香气成分数据进行主成分分析,结果见图3。分析可见,AR2000酶处理在PC1正向

端,该酶促进了大多数萜烯醇、苯衍生物、C₆化合物等前体物质的水解,优选菌株糖苷酶处理位于 PC2 的正向端,促进了去甲基异戊二烯类前体物质的水解。AR2000 酶制剂的香气糖苷水解能力最强,但优选菌株糖苷酶的具有水解专一性。

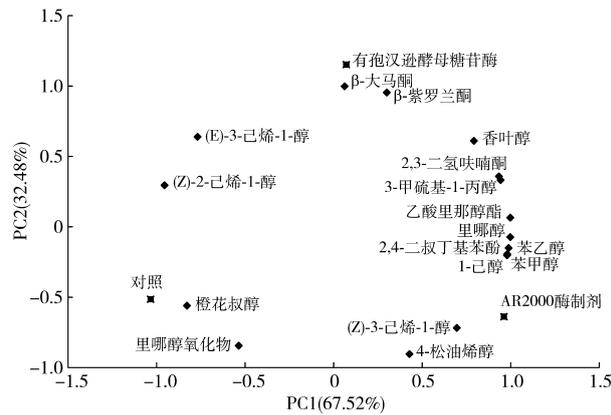


图 3 前 2 个主成分上的品种香气化合物载荷值和酒样分布

Fig. 3 Varietal compounds loadings and wine samples distribution in the first two PCs

2.2.2 发酵香气成分

供试酒样中共检测到 8 种高级醇、11 种酯类和 3 种脂肪酸,发酵香气成分的总质量浓度分别为 207.467、233.098、284.582 mg/L。高级醇含量占发酵香气成分总量的 80% 以上,AR2000 酶处理样品中异戊醇和异丁醇含量均超过其阈值。RIBEREAU 等^[22]研究认为低于 300 mg/L 的高级醇会增强葡萄酒香气的复杂性,而超过 400 mg/L 则有杂醇气味。本实验中 AR2000 酶处理中高级醇含量最高,可能由于此酶含有蛋白酶活性,加强了酵母菌对氨基酸的分解代谢。酯类物质是葡萄酒香气的重要化合物,能赋予葡萄酒水果味和甜香味^[23]。本实验中,酶处理增加了酯类物质的含量,有 5 种酯类化合物的浓度高于其阈值,表现出香气活性。脂肪酸根据其浓度不同能赋予葡萄酒果香、奶酪、脂肪和腐败味^[24]。实验中,酶处理使脂肪酸的含量升高,AR2000 酶处理酒样中含量最高。

图 4 的主成分分析结果展示了酶处理对发酵香气成分的影响,可见酶处理明显增加了发酵成分含量。AR2000 酶处理与大部分酯类、高级醇和所有脂肪酸共处于 PC1 的正向端,表明该酶处理促进了发酵过程中酯类和高级醇的生成,这与 FIA 等^[25]认为一些用于葡萄酒酿造的商业酶制剂具有少量酯化酶和蛋白酶活性的结论相符。优选酵母糖苷酶处理位于 PC2 的正向端,仅增加了己酸乙酯、癸酸乙酯和 2 种低含量高级醇。

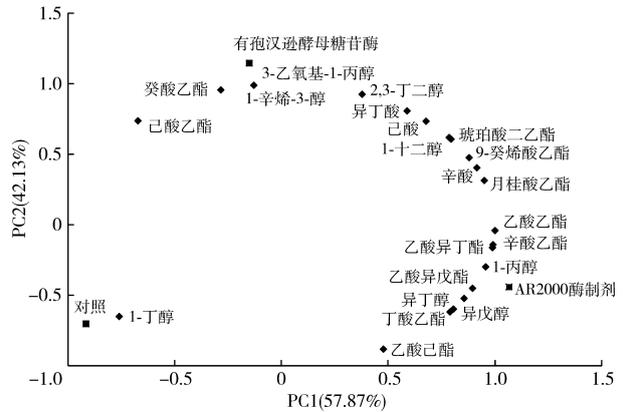


图 4 前 2 个主成分上的发酵香气载荷值和酒样分布

Fig. 4 Fermentative compounds loadings and wine samples distribution in the first two PCs

2.3 葡萄酒香气特征

供试酒样香气特征的感官量化分析结果见图 5,在不同处理酒样间差异性分析结果显示,AR2000 处理酒样中,温带酸果味突出,但生青味最重,这与该酶促进 C₆化合物前体大量水解有关;优选酵母糖苷酶处理增加了果香、花香和坚果味,生青味最弱,香气最为愉悦;对照酒样的主要香气特征是果香、薄荷和生青味。

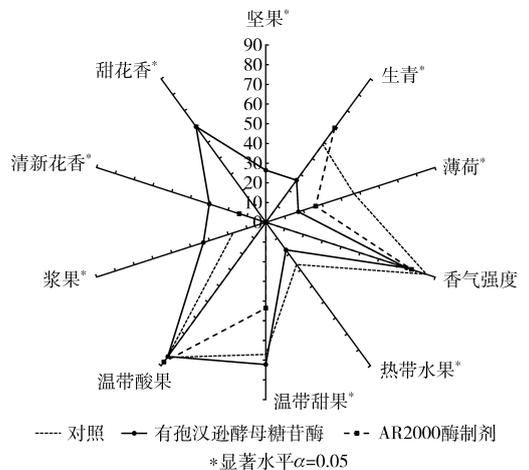


图 5 黑比诺葡萄酒不同处理下香气感官特征的量化强度值 MF (%)

Fig. 5 Quantitative value MF (%) of aroma characteristics from different treatments of Pinot Noir wine

3 结束语

优选葡萄汁有孢汉逊酵母分泌的糖苷酶具有良好的葡萄酒酿造环境适应性。应用该酶的粗提液进行干红葡萄酒的增香酿造,优选菌株糖苷酶催化水解香气糖苷的能力在整体上弱于 AR2000 糖苷酶制剂,但其水解香气糖苷的类别具有选择性,主要促进去甲基异戊二烯类和一些萜烯类糖苷的水解,对 C₆化合物糖苷的水解作用较弱,从而增加葡萄酒的温带水果和花香特征。因此,优选葡萄汁有孢汉逊酵母的糖苷粗酶具有葡萄酒增香酿造的应用潜力。

参 考 文 献

- 1 GÜNATA Y Z, BAYONOVE C L, BAUMES R L, et al. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components[J]. *Journal of Chromatography A*, 1985, 331:83–90.
- 2 RODRÍGUEZ-BENCOMO J J, SELLI S, MUÑOZ-GONZÁLEZ C, et al. Application of glycosidic aroma precursors to enhance the aroma and sensory profile of dealcoholised wine[J]. *Food Research International*, 2013, 51(2):450–457.
- 3 CABAROGLU T, SELLI S, CANBAS A, et al. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(5):581–587.
- 4 MATEO J, JIMENEZ M. Monoterpenes in grape juice and wines[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 881(2):557–567.
- 5 LOSCOS N, HERNANDEZ P, CACHO J, et al. Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(16):6674–6684.
- 6 DUCASSE M A, LLAUBERES R M, LUMLEY M. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(2):369–376.
- 7 JOLLY N, AUGUSTYN O, PRETORIUS S. The role and use of *non-Saccharomyces* yeasts in wine production[J]. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2006, 27(1):15–39.
- 8 LÓPEZ S, MATEO J J, MAICAS S. Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aroma-enhancing properties in muscat wines[J]. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 2014, 35(2):292–302.
- 9 陶永胜, 牟含, 李国, 等. 野生胶红酵母糖苷酶水解媚丽新酒中香气糖苷的研究[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(12):249–254.
TAO Yongsheng, MU Han, LI Guo, et al. Catalytic hydrolysis of aroma glycosides in Meili young wine using glycosidase from wild *Rhodotorula mucilaginosa* [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(12):249–254. (in Chinese)
- 10 张晓, 张振文. 黑比诺干红葡萄酒芳香物质的定性分析[J]. *西北农业学报*, 2007, 16(5):214–217.
ZHANG Xiao, ZHANG Zhenwen. Qualitative analysis of aroma components of *Pinot Noir* dry red wines [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2007, 16(5):214–217. (in Chinese)
- 11 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.
- 12 LU W Y, LIN G Q, YU H L, et al. Facile synthesis of alkyl β -D-glucopyranosides from D-glucose and the corresponding alcohols using fruit seed meals[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzym.*, 2007, 44(2):72–77.
- 13 KRISCH J, BENCSIK O, PAPP T, et al. Characterization of a β -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete *Rhizomucor miehei*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114:555–560.
- 14 CHEN L, LI N, ZONG M H. A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: purification and characterization [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(1):127–132.
- 15 TAO Y S, LI H, WANG H, et al. Volatile compounds of young Cabernet Sauvignon red wine from Changli County (China) [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21(8):689–694.
- 16 TAO Y S, ZHANG L. Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine in Changli County (China) [J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2010, 43(10):1550–1556.
- 17 HERNÁNDEZ-ORTE P, CERSOSIMO M, LOSCOS N, et al. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(3):1064–1077.
- 18 BOIDO E, LLORET A, MEDINA K, et al. Aroma composition of *Vitis vinifera* Cv. Tannat; the typical red wine from Uruguay [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(18):5408–5413.
- 19 ESCUDERO A, FARINA E, CAMPO L, et al. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(11):4501–4510.
- 20 FERREIRA V, FERNÁNDEZ P, PEÑA C, et al. Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1995, 67(3):381–392.
- 21 SELLI S, CABAROGLU T, CANBAS A, et al. Effect of skin contact on the aroma composition of the musts of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Bornova and Narince grown in Turkey[J]. *Food Chemistry*, 2003, 81(3):341–347.
- 22 RIBERAU-GAYON P, GLORIES Y, MAUJEAN A, et al. Varietal aroma [M] // RIBÉREUA-GAYON P, GLORIES Y, MAUJEAN A, et al. *Handbook of enology. Vol. 2, the chemistry of wine: stabilization and treatments*. New York: John Wiley and Sons Ltd., 2000:187–206.
- 23 SUMBY K M, GRBIN P, JIRANEK V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1):1–16.
- 24 ROCHA S M, COUTINHO P, BARROS A, et al. Establishment of the varietal volatile profile of musts from white *Vitis vinifera* L. varieties[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(9):1667–1676.
- 25 FIA G, CANUTI V, ROSI I. Evaluation of potential side activities of commercial enzyme preparations used in winemaking[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(8):1902–1911.