DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2018.05.002

高产 GSH 果酒酵母的筛选及对苹果酒褐变的抑制

徐菁苒[1,2]，毛 健[*1,2]，刘双平[1,2]，周志磊[1,2]

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室,江南大学,江苏 无锡 214122;2. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要：褐变是果酒生产与贮存过程中的一个重要问题。为了找到替代二氧化硫的天然抗氧化物质,并利用生物方法达到抑制果酒褐变的效果,探究了谷胱甘肽(GSH)对多酚褐变的抑制效果,以苹果酒为研究对象,通过比较 14 株酿酒酵母发酵力、耐受性、产 GSH 能力和发酵所得苹果酒的理化指标分析,筛选出一株高产 GSH 的苹果酒酵母 Y-18。结果表明,GSH 抑制褐变效果优于抗坏血酸和 L-半胱氨酸,Y-18 菌株产 GSH 能力约为其它菌株的 1.5~2 倍，其发酵苹果酒的褐变值显著低于对照菌株,果香浓郁,协调性较好。Y-18 菌株能在降低果酒褐变值的同时保持良好的发酵特性,为高品质果酒的开发提供参考。

关键词：苹果酒;褐变;果酒酵母;谷胱甘肽;筛选;发酵

中图分类号:TQ 92　**文献标志码**:A　**文章编号**:1673—1689(2018)05—0455—08

Study on the Screening of High GSH-Yielding Wine Yeast and Its Effect on Wine Browning

XU Jingran[1,2]，*MAO Jian*[*1,2]，*LIU Shuangping*[1,2]，*ZHOU Zhilei*[1,2]

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food and Science Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Browning of mostly fruit wine constitutes a well-known problem in the wine industry. In order to find an alternative natural antioxidants of SO_2 and explore the biological method to inhibit browning of wine, effect of GSH to polyphenol browning were discussed. Apple fruit wine was used as research object in the experiments and fourteen fruit wine yeast strains were used in the test. The fermentation capacity, tolerance to ethanol and pH, glutathione production capacity were used as selective standards. With specific selectivity method, strain Y-18 was selected as the optimal apple cider yeast. The results showed that GSH showed better inhibitory effect on browning than ascorbic acid andL- cysteine. The GSH yield of Y-18 strain was 1.5~2 times than others, while its cider has a good taste with color valuesignificantly lower than other strains. In summary, Y-18 strain showed

收稿日期：2015-09-03

基金项目：国家 863 计划项目（2013AA102203-06）；国家自然科学基金项目（31571823,31271839）；中央高校基本科研业务费项目（JUSRP11509）。

*** 通信作者**：毛 健(1970—),男,江苏无锡人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail:biomao@263.net

引用本文：徐菁苒,毛健,刘双平,等. 高产 GSH 果酒酵母的筛选及对苹果酒褐变的抑制[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(05):455-462.

good fermentation characteristics while reducing cider browning,which provided an effective reference for the development of high-quality wine.

Keywords: apple cider,browning,fruit wine yeast,GSH,screening,fermentation

苹果酒是用苹果汁发酵制得的一种营养丰富、低酒精度的发酵制品,是仅次于葡萄酒的第二大果酒。苹果酒富含氨基酸、维生素、矿物质以及钙、铁、磷、钾等成分,不仅口感醇厚,酒香协调,且具有一定保健功效[1]。褐变是苹果酒生产与贮存过程中的一个重要问题,既影响酒体色泽、酒质和风味,又会造成一些营养物质的损失[2-3]。褐变的实质是苹果及苹果酒中的多酚物质发生氧化,在生产过程中,既存在酶促褐变又有非酶促褐变[4-5]。目前,抑制果酒褐变主要有物理、化学 2 种方法,其中在酿造及贮存过程中普遍应用的一种化学添加剂就是 SO_2,SO_2 虽具有很好的抗氧化性,但大量研究结果表明,它对人体健康会产生很大的危害[6-7]。随着社会发展,健康观念已越来越深入人心,人们对化学合成抑制剂的安全疑虑日益增加[8],为此,找到替代 SO_2 的天然抗氧化物质,并利用生物方法达到抑制褐变的效果,已经成为果酒行业的研究热点。

谷胱甘肽(GSH)是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸缩合形成的三肽化合物,具有抗氧化、清除自由基、解毒等生理功能[9-10]。目前,利用微生物的物质代谢进行 GSH 生物合成已得到广泛的应用,发酵法生产 GSH 所用的菌种以酿酒酵母最为常见,主要通过 γ-谷氨酰循环进行代谢[11]。因此,具有高 GSH 合成能力的菌株是提高 GSH 合成效率的关键。研究表明,GSH 具有抑制果酒褐变的功效,表现出较强的抗氧化性[12]。而作为酵母菌的代谢产物,在不引入外源物质的前提下,通过筛选一株高产 GSH 的果酒酵母,利用微生物代谢抑制苹果酒在发酵过程中的多酚褐变,从而减少 SO_2 等抗氧化剂的使用。

本文中探究了 GSH 对多酚褐变的抑制效应,并以 14 株果酒酵母作为实验材料,筛选出一株高产 GSH 的酵母菌株 Y-18,该菌株能在降低果酒褐变值的同时保持较好的发酵特性。此研究利用生物方法减少褐变对果酒品质的影响,为高品质果酒的开发提供参考,在提高果酒安全性的前提下降低成本,具有广阔的研究前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料 新鲜富士苹果,购自市场,4 ℃保藏,使用前在 25 ℃室温放置 2 h。

1.1.2 酵母菌株 01 号(31814 菌株)、02 号(31906 菌株)、03 号(31693 菌株),购自中国工业微生物菌种保藏管理中心;04# 号 (2.2076 菌株)、05# 号(2.3848 菌株)、06# 号(2.2084 菌株)、07# 号(2.3851 菌株),购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;Y1401、Y1402、Y1403、Y-18、Y-RW、Y-SY、Y 菌株,实验室保藏菌株,14 株酵母菌均为酿酒酵母属(*Saccharomyces cerevisiae*)。

1.1.3 主要试剂 葡萄糖、酵母膏、蛋白胨、琼脂粉、硫酸铵、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸镁、无水乙醇、柠檬酸、三氯乙酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙酸钠、磷酸、抗坏血酸、亚硫酸钠购自国药集团;5,5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸)、L-半胱氨酸、谷胱甘肽,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.1.4 主要仪器 Waters 2695 型高效液相色谱仪,沃特世(Waters)科技有限公司产品;立式压力蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造;榨汁机,苏泊尔股份有限公司产品;恒温培养箱,上海森信实验仪器有限公司产品;恒温摇床,上海合恒仪器设备有限公司产品;7230G 可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司产品;HG101-2 电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司产品;冷冻离心机,德国 eppendorf 公司产品;FA2004N 电子分析天平,梅特勒-托利多爱仪器(上海)有限公司产品;HH-S2 系列恒温水浴锅,上海百典仪器设备有限公司产品;KQ-700E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司产品;85-2 型恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司产品。

1.2 培养基

1.2.1 YPD 固体培养基 酵母粉 10 g/L,鱼粉蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L;pH 自然,

0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.2.2 YPD 液体培养基 酵母粉 10 g/L,鱼粉蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L;pH 自然,0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.2.3 摇瓶培养基 葡萄糖 30 g/L,酵母粉 10 g/L,硫酸铵 6 g/L,磷酸氢二钾 3 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L,硫酸镁 0.1 g/L;0.1 MPa 灭菌 15 min。

1.2.4 苹果汁活化培养基 调节苹果汁糖度为 20° Brix,用柠檬酸调整培养基 pH 3.5,酵母菌接种体积分数为5%,在 25 ℃下发酵培养 24 h。

1.2.5 苹果汁发酵培养基 调节鲜榨苹果汁糖度为 20°Brix,调整培养基 pH 3.5,酵母菌按体积分数 5%的接种量接入苹果汁,在 25 ℃下发酵。

1.3 实验方法

1.3.1 GSH 对鲜榨苹果汁褐变的抑制效果 新鲜苹果,经自来水清洗、去核、切块、榨汁、离心、过滤后,分别加入抗氧化剂 GSH、抗坏血酸(VC)、L-半胱氨酸(L-cys)、二氧化硫(SO_2),浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mmol/L。以空白为对照,立即测定试样品在 420 nm 下的光密度值(OD 值);其余样品倒在培养皿,敞口放置在室温下以便充分氧化褐变,24 h 后测定各试样 OD_{420} 值。褐变值的变化率表示不同抗氧化剂对鲜榨苹果汁褐变的抑制效果,每个试样 3 次重复,取平均值。

$$A_2=A_1-A_0 \quad (1)$$

$$I=A_2/A_0\times100\% \quad (2)$$

式中,A_0 为 0 h OD_{420} 值;A_1 为 24 h 后 OD_{420} 值;A_2 为△OD_{420} 值;I 为△OD_{420} 变化率。

1.3.2 果酒酵母发酵力测定 挑取酵母菌斜面种子一环接种于 YPD 液体培养基中,30 ℃摇瓶振荡培养 24 h,作为种子液。将种子液按 10%接种体积分数接种到 YPD 液态发酵培养基中,在 25 ℃静态发酵,每隔 24 h 称一次质量,计算各株酵母菌发酵时产生 CO_2 的质量。

1.3.3 果酒酵母耐受性测定 分别以不同乙醇和 pH 值作为酵母菌生长和发酵的影响因素,通过测定发酵 24 h 后发酵液的 OD_{600} 值,比较 14 株酿酒酵母在不同影响因素中的耐受性[13]。

1.3.4 果酒酵母产 GSH 能力测定 将种子液以 10%的接种体积分数接种于 pH 3.5 和 pH 6.5 的摇瓶培养基中,在 30 ℃、150 r/min 摇床中振荡培养 48 h,测定生物量、酵母发酵液及胞内 GSH 的质量浓度。

1.3.5 果酒酵母发酵性能测定

1)果汁培养基调配

分别用蔗糖和 1 mol/L 的苹果酸调节果汁糖度为 20°Brix,pH 值为 3.5。

2)苹果酒发酵

取 500 mL 的三角瓶,加入 400 mL 苹果汁,按 5%的接种体积分数接入酵母种子液,在 25 ℃下恒温发酵,发酵初期微晃瓶体,使附着在瓶壁的酵母脱落,在发酵过程中每天取样测定理化指标,当渣完全沉淀且无气泡产生时则认为发酵结束。

1.4 测定方法

1.4.1 HPLC 法测定发酵液中 GSH 质量浓度

1)色谱条件:色谱柱:Athena C18-WP,流动相为 0.05 mol/L pH 5.6 醋酸钠缓冲液和甲醇(V/V=90∶10),流速为 1.0 mL/min,紫外检测波长 330 nm,进样量 20 μL,柱温 40.0 ℃[14]。

2)样品处理:取 1 mL 样品,加入 1 mL 10%三氯乙酸,在转速 10 000 r/min 下离心 8 min,沉淀蛋白质。取 1 mL 上清液,加入 0.5 mL 500 μmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 溶液,混合均匀,加入 20 μL 纯水,再加入 0.5 mL 0.01 mol/L DTNB,振荡均匀,室温反应 5 min,再加入 0.1 mL 7.0 mol/L 磷酸溶液酸化,10 000 r/min 离心 8 min,上清液用 0.22 μm 微孔滤膜后进行 HPLC 分析[14]。

1.4.2 菌体生物量测定 将 25 mL 菌体培养液倒于已知重量的干净离心管中,在转速 8 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液,并加入适量蒸馏水洗涤 2 次,置于干燥箱中在 105 ℃下烘干至恒重,总质量与离心管质量量之差即菌体干重,由此计算培养液的菌体生物量。

1.4.3 胞内 GSH 质量浓度测定 取 10 mL 发酵液,在转速 8 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液,收集菌体。加入适量蒸馏水洗涤 2 次后,加入 10 mL 40%乙醇溶液,振荡器混合均匀,室温下抽提 2 h,在转速 8 000 r/min 离心 10 min 得上清液,稀释后进行 HPLC 测定[15]。

1.4.4 发酵液色度的测定 取果汁或果酒发酵液,于 8 000 r/min 下离心 10 min,将上清液在 420 nm 波长处测定吸光度,以吸光度值表示色度[16]。

1.4.5 果酒理化指标测定 还原糖、酒精度参照 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》测定。

甘油质量浓度测定:高效液相色谱法[17]。

2 结果与分析

2.1 GSH 对多酚褐变的抑制效果

以鲜榨苹果汁为研究对象,以 VC、L-cys 及 SO_2 为对照,探讨 GSH 对多酚褐变的抑制效果,试验结果见图 1。可以看出,作为应用最广泛的化学添加剂,SO_2 表现出最强的抑制作用。但大量研究结果表明,SO_2 对人体健康会产生很大的危害,这一缺点在一定程度上限制了它的使用。VC 的抑制褐变效果较差,VC 极易氧化分解,又可与游离氨基酸反应,生成色素,随着时间的延长,反而会使色泽加深[18]。L-cys 对苹果汁的抑制效果稍优于 VC,但加入 L-cys 后,果汁中的氨基酸含量增加,加重了美拉德反应,果汁颜色有变红的趋势,限制了 L-cys 的应用。

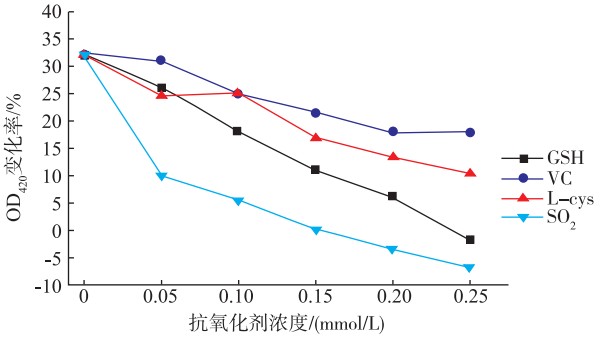


图 1 不同抗氧化剂对鲜榨苹果汁褐变的影响

Fig. 1 Effect of different antioxidants on browning degree of fresh apple juice

由图可知,GSH 对苹果汁褐变的抑制效果仅次于 SO_2,且随着浓度的增加,褐变度趋于线性降低。GSH 由于含有巯基而具有还原性,可以抑制果汁及果酒褐变。在引起褐变的酶促氧化过程中,GSH 对多酚氧化酶的活性有一定抑制作用,在一定程度上抑制了酶促氧化。GSH 可结合酚类物质氧化后生成的醌,形成无色的羟醌类物质,降低了果汁及果酒的褐变度[18]。GSH 作为一种具有抗氧化、清除自由基作用的天然酶促褐变抑制剂,可用其代替传统化学抗氧化剂 SO_2 用于苹果汁及苹果酒酿造生产。

2.2 高产谷胱甘肽果酒酵母的筛选

2.2.1 酵母菌株发酵力比较 酵母菌的发酵力是反映酵母对各种糖类的发酵能力的重要指标。以 CO_2 失重量为指标衡量酵母菌的发酵速率,是衡量酵母产酒能力的一个重要指标。14 株酿酒酵母菌株发酵力结果见图 2,由图可见,14 株酿酒酵母的发酵能力有显著差别,试验菌株 Y1401、01、Y-18、06# 的发酵力较强于其它菌株,且在第 4 天 CO_2 失重量达到最大,之后趋于平缓。

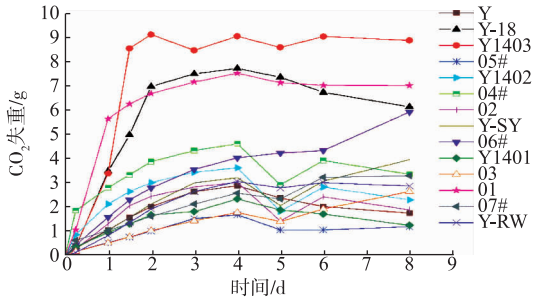


图 2 不同酵母菌株发酵力

Fig. 2 Fermentation capacity of different yeasts

2.2.2 酵母菌耐乙醇能力比较 一般来说,酵母细胞的发酵能力与菌株对酒精的耐性成正相关。由图 3 可知,不同酵母菌对乙醇的耐受性不同,随着培养基中乙醇浓度的增加,酵母菌发酵液的 OD_{600} 值不断降低,在乙醇浓度大于 10%时,酵母细胞的生长受到了很大抑制。从整个变化趋势来看,耐乙醇能力较强的酵母菌为 01、06#、Y1403、Y-18、02 菌株。

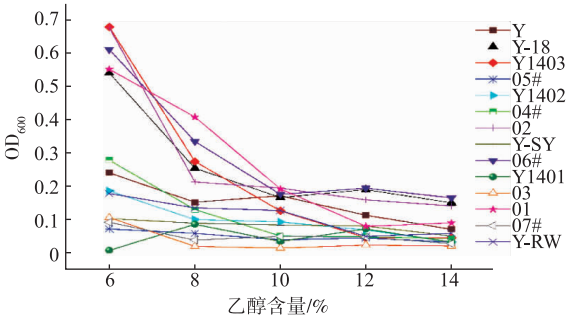


图 3 不同乙醇浓度下酵母的耐受性

Fig. 3 Tolerance of yeasts under different ethanol concentration

2.2.3 酵母菌 pH 耐受性 随着培养基 pH 值的降低,14 株酿酒酵母的生长能力整体呈下降趋势,在 pH 2.0~3.0 之间,酵母菌的生长受到很大程度抑制,由于此范围并不是苹果酒酿造的最适 pH 范围,所以不会对苹果酒发酵产生不良影响,见图 4。Y-18 对 pH 的耐受性较强,OD 值的波动较平缓,这说明 Y-18 菌株对酸性环境的适应能力较强于其它菌株。

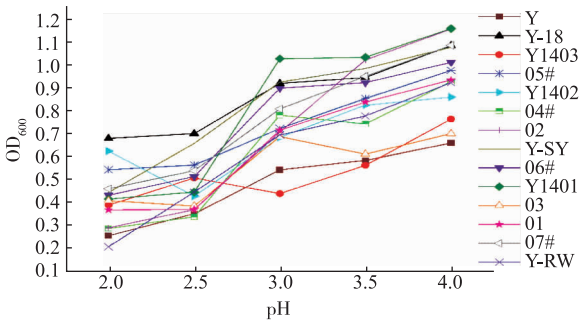


图 4　不同 pH 值下酵母菌的耐受性

Fig. 4　Tolerance of yeasts to pH

2.2.4　酵母菌产 GSH 能力分析　对 14 株酿酒酵母的生物量和产 GSH 能力进行测定,结果发现不同酵母菌产 GSH 能力有较大差别,且 pH 对发酵液中 GSH 的质量浓度影响较大。pH 是微生物生长的一个重要的环境条件,对微生物的生长、发育以及代谢过程都有很大的影响。当细胞处于不正常的环境中时,出于保护自身的本能和抵御外界环境伤害的需要,细胞可能会对其代谢产物的合成和分泌做出调整。研究表明,GSH 在微生物抵抗酸胁迫过程中具有积极作用[19]。苹果酒发酵 pH 为 3.2~4.2,当酵母细胞遭遇低 pH 胁迫时,细胞能以增加 GSH 合成并向胞外分泌 GSH 的方式来响应和抵御外界 pH 的不断降低。

由表 1 可以看出,在 pH 3.5 条件下,酵母菌发酵液中的 GSH 质量浓度显著高于 pH 6.5 时的 GSH 质量浓度,说明酸性环境刺激了酵母菌向胞外分泌 GSH 能力,而不同酵母细胞对外界环境的响应能力差异较大。在 pH 3.5 条件下,发酵液中 GSH 质量浓度及胞外胞内 GSH 质量浓度较高的菌株为 Y-18、03、04#、01、02、RW、06#、07# 菌株,其中 Y-18 及 03 菌株发酵液的GSH 质量浓度显著高于其它菌株。目前,针对 GSH 胞外释放的研究较少,促进 GSH 向胞外分泌的方法主要有 2 种:胁迫控制及表面活性剂处理。江洁[20]等研究发现,在加入 0.3%Triton X-100 后,胞外 GSH 质量浓度最高可达到 29.03 mg/L,但细胞生长受到了很大程度的抑制,酿酒酵母 Y-18 在未经表面活性剂处理的条件下 GSH 胞外质量浓度达到 29.5 mg/L,表现出一定的优越性。

表 1　不同酵母菌株生物量及 GSH 质量浓度的比较

Table 1　Comparison of biomass and GSH content among different yeast strains

菌株	pH 3.5			pH 6.5		
	生物量/(g/L)	发酵液 GSH 产量/(mg/L)	GSH 总量/(mg/L)	生物量/(g/L)	发酵液 GSH 产量/(mg/L)	GSH 总量/(mg/L)
Y1403	4.19	14.29	29.04	3.93	4.68	10.73
07#	3.34	16.63	23.42	4.27	4.78	16.01
Y-RW	3.62	16.7	30.59	4.85	6.71	25.85
Y-18	4.09	29.5	44.89	4.06	9.54	28.02
01	2.22	17.6	21.36	2.9	5.57	9.76
06#	3.62	16.47	28.96	4.42	4.43	19.4
04#	3.35	17.87	24.20	3.51	7.04	24.66
Y-SY	4.89	15.64	28.25	5.59	4.82	22.51
05#	3.31	15.64	30.84	4.17	4.64	21.23
Y	4.15	15.65	35.49	4.35	4.32	15.81
03	3.52	33.76	43.95	4.22	20.5	32.37
02	4.01	16.71	22.78	5.72	4.77	10.82
Y1402	3.29	14.82	22.21	4.2	6.27	21.92
Y1401	4.06	14.98	27.75	5.36	4.6	30.12

综合考虑酵母菌的发酵力、耐受性及产 GSH 能力,筛选酿酒酵母 Y-18 作为高产 GSH 的果酒酵母菌株,该菌株在苹果酒发酵 pH 范围内有优良的发酵性能,产 GSH 能力显著强于其它菌株。

2.3　高产 GSH 果酒发酵苹果酒的性能测定

2.3.1　发酵过程中还原糖、乙醇的变化　对 Y-18 菌株和 4 株发酵力或产 GSH 能力较强的对照菌 03、04#、06#、02 进行苹果酒发酵试验,从图 5 可以

看出,酵母菌在前 4 d 还原糖量迅速下降,酒精分数近似线性增长,主发酵进行到第 5 天后还原糖量和酒精分数趋于平缓。通过与对照菌株比较可以发现,03 菌株发酵能力较弱，不适合苹果酒发酵,而 Y-18 菌株的发酵度平缓,能更好地防止杂菌污染,发酵结束后酒精度达到 11%左右，是优良的酵母菌种。

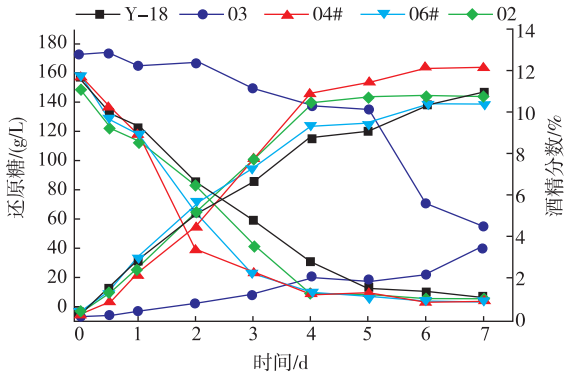


图 5　发酵过程中的还原糖、酒精度变化曲线

Fig. 5　Curve of reducing sugar and alcohol concentration in fermentation

2.3.2　*发酵过程中甘油质量浓度的变化*　甘油是酵母菌酒精发酵过程中的副产物,具有甜味,可用于平衡酒中的酸感,增加口感复杂性,是高品质果酒的重要成分。由图 6 可知,酵母菌在第 1 天甘油质量浓度迅速增加,之后波动较小。菌株 Y-18 发酵结束后,发酵液中甘油质量浓度为 5.6 g/L,约为对照菌的 1.5~2 倍。研究表明,当酵母细胞处于高渗透压环境时，甘油被诱导合成以提高胞内渗透压,其对细胞中的酶和生物大分子的结构进行较大程度的保护。因此,发酵过程中能生产甘油的酵母通常具有一定的渗透压耐受能力[21]。

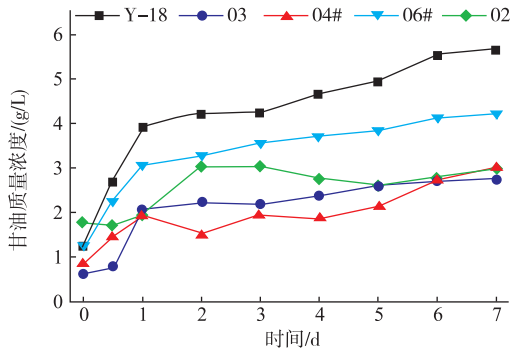


图 6　发酵过程中的甘油质量浓度变化曲线

Fig. 6　Curve of glycerin content in fermentation

2.3.3　*发酵过程中色度的变化*　在果酒发酵过程中,既有酶促褐变又有非酶促褐变。酶促褐变主要发生在果酒发酵的前期,参与酶促褐变的酶主要是多酚氧化酶(PPO),它能催化酚类物质氧化成醌类物质,醌类物质易进一步聚合形成黑色素。非酶促褐变主要有美拉德反应、焦糖化反应、抗坏血酸氧化分解反应、多元酚氧化缩合反应等[22]。

苹果酒发酵液的色度变化如图 7 所示。随着发酵时间的推移,4 株对照菌发酵液的色度呈先下降后趋于平缓的趋势,Y-18 菌株发酵液色度下降趋势显著。在发酵过程中,Y-18 菌株发酵液的色度维持在较低水平,在第 5 天色度降低 40.4%,发酵结束后色度显著低于其余对照菌株。

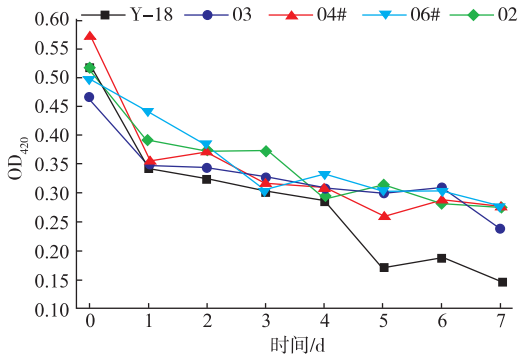


图 7　发酵过程中的色度变化曲线

Fig. 7　Curve of color value in fermentation

2.3.4　*发酵过程中 GSH 质量浓度的变化*　在苹果酒发酵过程中,发酵液中 GSH 质量浓度处于动态变化中,GSH 主要由酵母菌代谢产生，其参与发酵过程中的抗氧化过程,GSH 可结合酚类物质氧化后生成的醌,形成无色的羟醌类物质,对果酒褐变的抑制及抗氧化性的提高影响显著。由图 8 可以看出,不同酵母菌发酵液的 GSH 质量浓度各不相同,但趋势较为一致,在第 2 天,GSH 质量浓度达到最高值。研究表明,不同酵母菌发酵的果酒 GSH 质量浓度差异较大,Giuseppe[23]等对发酵结束的白葡萄酒中的 GSH 质量浓度进行测定,发现其质量浓度仅为 0~2 mg/L,且随着陈化时间的延长逐渐减少。Y-18 菌株在发酵过程中发酵液的 GSH 质量浓度最高可达 14.39 mg/L,具有明显的优势。发酵结束后 Y-18 菌株发酵苹果酒的 GSH 质量浓度为 5.82 mg/L，显著高于其它对照菌株。

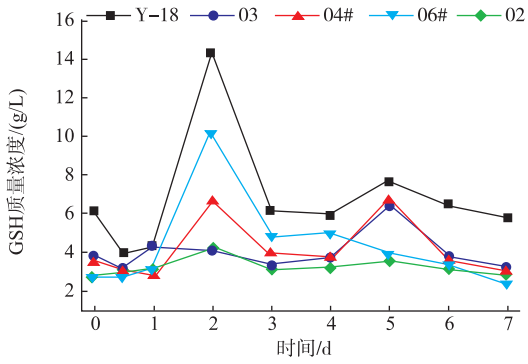


图 8　发酵过程中的 GSH 质量浓度变化曲线

Fig. 8　Curve of GSH content in fermentation

2.3.5　不同酵母菌发酵苹果酒的感官特征

不同酵母发酵苹果酒的感官分析见表 2。

表 2　不同酵母菌发酵苹果酒感官分析

Table 2　Organoleptic evaluation of the cider brewed by different yeast strains

酵母菌	外观	香气	口感
Y-18	淡黄色,澄清透明	果香浓郁,协调性较好	口感清爽,绵长协调
03	浅黄色,澄清透明	酒香不足	异味较重,味较酸
04#	中黄色,澄清透明,有光泽	果香味一般	口感绵长,后味较弱
06#	浅黄色,澄清透明	酒香明显,果香较弱	酒体醇厚,较丰富
02	金黄色,微带橙色	酒香浓郁,果香明显	酒体清爽,口感平衡

3　结　语

考察了 GSH 对多酚褐变的抑制效应。结果表明,与常用护色剂 SO_2、VC、L-cys 相比,GSH 抑制苹果汁褐变能力优于 VC 和 L-cys,是一种很强的还原剂。

以 14 株果酒酵母为备选菌株,比较了酵母菌的发酵力、耐酒精、耐 pH 能力,结果表明,菌株 Y1401、01、Y-18、06# 的发酵力较强。耐乙醇能力较强的酵母菌为 01、06#、Y1403、Y-18、02 菌株。pH 是微生物生长的一个重要的环境条件,在 pH 2.0~3.0 之间,酵母菌的生长受到一定程度抑制,而 Y-18 菌株对 pH 的耐受性较强,对酸性环境的适应能力较强于其它菌株。

通过对 14 株酿酒酵母产 GSH 能力进行比较,结果发现,在 pH 3.5 条件下,酸性环境刺激酵母菌向胞外分泌 GSH,发酵液中 GSH 质量浓度及 GSH 质量浓度较高的菌株为 Y-18、03、04#、01、02、Y-RW、06#、07#,其中 Y-18 及 03 菌株发酵液的 GSH 质量浓度显著高于其它菌株。综合以上指标,选择 Y-18 作为高产 GSH 的果酒酵母菌株,用于苹果酒发酵试验。

本试验对 Y-18 菌株和 4 株发酵力或产 GSH 能力较强的对照菌 03、04#、06#、02 进行苹果酒发酵试验。结果表明,Y-18 菌株的发酵度平缓,发酵结束后酒精分数达到 11%左右,是优良的酵母菌种。发酵过程中能生产甘油的酵母通常具有一定的渗透压耐受能力,菌株 Y-18 发酵苹果酒甘油质量浓度为 5.6 g/L,约为其它菌株的 1.5~2 倍。随着发酵时间的推移,4 株对照菌发酵液的色度呈先下降后趋于平缓的趋势,Y-18 菌株发酵液色度显著低于其它菌株。而 GSH 质量浓度在发酵过程中处于动态变化,在第 2 天达到最高值,Y-18 菌株发酵液中 GSH 质量浓度最高达 14.39 mg/L。

综上,GSH 对抑制多酚褐变具有较好的效果,而高产 GSH 果酒菌株 Y-18 能在降低果酒褐变值的同时保持良好的发酵特性,在提高果酒安全性的前提下利用生物方法减少褐变对果酒品质的影响,从而为高品质果酒的开发提供新的思路和参考。

参考文献:

[1] RUAN Shili, WANG Xirui, LIU Debing, et al. Research and development prospect of cider production technology[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2000, 20(4): 27-29. (in Chinese)

[2] 舒念辉. 野木瓜发酵褐变机理及控制研究[D]. 重庆:西南大学,2012.

[3] ENGELA C, FLORIAN F, WESSEL J. Role of glutathione in winemaking: a review[J]. **Food Chemistry**, 2013, 61(2): 269-277.

[4] PIERGIORGIO C, ROBERTO Z. Biotechnological strategies for controlling wine oxidation[J]. **Food Engineering Reviews**, 2013, 5(4): 217-229.

[5] HU Jing, XIE Bangxiang, HE Bin, et al. Research progress of browning and control method in fruit wine[J]. **Food and Fermentation Technology**, 2013, 49(6): 94-98. (in Chinese)

[6] ZHANG Jie, DONG Wenbin, ZHANG Dawei. Research progress in reducing or replacing sulphur dioxide in fruit wine industry [J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2010(3): 96-102. (in Chinese)

[7] MARIA S, STAMATINA K, LOANNIS M, et al. A natural alternative to sulphur dioxide fur red wine production: influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content[J]. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2008, 21: 660-666.

[8] TANG Guifang, ZHAO Qiuyan, QIAO Mingwu. Comparison of inhibition methods of enzymatic browning for apple juice [J]. **Food Science**, 2008, 24(10): 122-126. (in Chinese)

[9] IZAWA S, INOUE Y, KIMURA A. Oxidative stress response in yeast: effect ofglutathione on adaptation tohydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **FEBS Lett**, 1995, 368: 73-76.

[10] YANG Hailin, ZHANG Yuran, XIN Yu. An efficient method for glutathione extraction from dried Saccharomycescells [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(6): 895-900. (in Chinese)

[11] CHEN Jian, WEI Gongyuan, LI Yin, et al. Progress in glutathione production by microbial fermentation [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2004, 23(5): 104-110. (in Chinese)

[12] VANESSA W, SANDRA V D, et al. Effect of glutathione addition in sparkling wine[J]. **Food Chemistry**, 2014, 15: 391-398.

[13] ZHAO Xiangjie, TU Guoquan, XIAO Gengsheng, et al. Isolation of a yeast strain for mulberry fruit wine and determination of its tolerance[J]. **Liquor-making Science & Technology**, 2007(1): 28-35. (in Chinese)

[14] WANG Xiaona, XU Xiaomin, XU Bo, et al. Determination of the reduced and oxidized glutathione in L02 cells by HPLC [J]. **Journal of Shihezi University (Natural Science)**, 2013, 31(4): 484-488. (in Chinese)

[15] LI Ming, CHI Jiao, ZHANG Bo, et al. Screening strain and study on the fermentation process of glutathione-production by yeast [J]. **Food and Fermentation Technology**, 2013, 49(2): 9-13. (in Chinese)

[16] RWABAHIZI S, WOFLSTAD R E. Effect of mold stability of strawberry juice and concentrate [J]. **Journal of Food Science**, 1988, 53(3): 857-858.

[17] HUANG Haitao, YANG Lijia, DING Zhongtao. Determination of sugar, glycerol and ethanol in ratafeewith highperformance liquid chromatography[J]. **Journal of Yunnan University**, 2002, 24(5): 375-377. (in Chinese)

[18] GAO Yuanjun, NAN Haijuan, HAO Yaqin. Studies on quality preservation of fresh-cut apples[J]. **Food Science**, 2006, 27(8): 254-258. (in Chinese)

[19] PABLO M R, CECILIA l. Muglia, Frans J. de Bruijn, et al. Glutathione is involved in environmental stress responses in Rhizobium tropici, including acid tolerance[J]. **Journal of Bacteriology**, 2000, 182(6): 1748-1753.

[20] GANG Jie, SHAN Lifeng, WU Genghong, et al. Effect of pH value and surfactants on glutathione biosynthesis by *Saccharromyces cerevisiae*[J]. **Food Science**, 2009, 30(19): 223-226. (in Chinese)

[21] XUE Junxia, XU Yanwen, PEI Yingfang, et al. High-yield glycerol from wine yeast saccharomyces[J]. **Journal of Microbiology**, 2008, 28(5): 77-82. (in Chinese)

[22] HAO Huiying, ZHAO Guangao. Phenolics and browning in ciders[J]. **Liquor Making**, 2002, 29(2): 63-65. (in Chinese)

[23] GIUSEPPE D L, EMANUELE B, GIULIANO D, et al. Evolution of phenolics and glutathione in Verdicchio wine obtained with maceration under reductive conditions[J]. **Food Science and Technology**, 2013, 53: 54-60.