

## 发酵过程中原花色素对酵母氧化状态的影响

李静媛 贾博 刘兴艳 战吉成 黄卫东\*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

**摘要:** 【目的】研究葡萄酒发酵过程中原花色素对酿酒酵母氧化状态的影响。【方法】以一株商业酵母和一株实验室筛选酵母为研究对象,向模拟葡萄汁培养基中添加 0.1、1.0 g/L 原花色素,考察发酵末期酵母活菌数和存活率,以及不同时期酵母超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活性和丙二醛(MDA)的含量。【结果】原花色素可以提高发酵末期活菌的数量及存活率,同时会提高胞内 SOD 和 CAT 的活性,降低胞内 MDA 的含量,而且原花色素含量越高作用越明显。【结论】在发酵过程中原花色素可以清除细胞内活性氧,对细胞产生保护作用,进而保证发酵顺利进行。

**关键词:** 酿酒酵母,原花色素,氧化还原,发酵

## Effect of proanthocyanidins on oxidation of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation

LI Jing-Yuan JIA Bo LIU Xing-Yan ZHAN Ji-Cheng HUANG Wei-Dong\*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the effect of proanthocyanidins on the growth and oxidation status of *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation process. 【Methods】Two strains of *Saccharomyces cerevisiae* (one industrial strain AWRI R<sub>2</sub> and one newly selected strain BH<sub>8</sub>) were chosen in this study, and proanthocyanidins were added into model synthetic medium to give a final concentration of 0.1 and 1.0 g/L. Cell growth at the end of the fermentation and the activity of superoxide

基金项目: 高等学校博士学科点青年教师专项科研项目(No. 20070019049); 中国农业大学博士科研专项项目(No. KYCX 2010065)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62737024; 信箱: huanggdw@263.net

收稿日期: 2013-01-04; 接受日期: 2013-03-19

dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) content at different fermentation stages were determined. **[Results]** Proanthocyanidins could increase the viable count and survival rate of the yeast, enhance the activity of SOD and CAT, and decrease the concentration of intracellular MDA. In addition, the effect of proanthocyanidins was positively associated with their concentrations. **[Conclusion]** Adding proanthocyanidins can scavenge intracellular reactive oxygen species (ROS) to protect cells and process of the fermentation.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Proanthocyanidins, Oxidation, Fermentation

葡萄酒发酵过程中, 酵母会受到多种胁迫因素的影响, 例如高温、酒精和渗透压等。这些因素都会影响酵母的活性和发酵性能, 最终会影响葡萄酒的质量<sup>[1]</sup>。氧化胁迫是由多种逆境因子生物学作用的一个共性机理, 例如高温、酒精、重金属都可以造成细胞产生活性氧<sup>[2]</sup>。活性氧(ROS)是细胞的代谢副产物, 是分子氧经单电子还原而生成的一系列具有不配对电子的化学性质活泼的原子团或分子, 包括超氧阴离子( $O_2^-$ )、羟基自由基( $OH\cdot$ )、过氧化氢分子( $H_2O_2$ )等。不同的 ROS 的化学性质有所不同, 而且细胞对不同种类、程度和形式的活性氧会表现不同的生物学效应, 包括调整抗氧化酶合成水平, 改变生长速度以及底物消耗速率等<sup>[3]</sup>。在正常生理条件下 ROS 的产生和清除维持平衡。但在逆境胁迫条件下, 这一平衡会被破坏, 继而 ROS 含量会增加, 造成细胞膜的氧化降解, 引起细胞死亡<sup>[4]</sup>。

生命有机体在进化过程中形成并发展了清除活性氧的系统, 包括抗氧化酶系统和非酶抗氧化系统<sup>[5]</sup>。其中, 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶是清除 ROS 的最有效方式, 其活性变化能直接反应微生物细胞对氧化胁迫应答水平的指标<sup>[6]</sup>。对于非酶抗氧化系统, 文献报道抗坏血酸盐、类黄酮、谷胱甘肽等具有清除 ROS 的作用<sup>[5]</sup>。丙二醛(MDA)是自由基作用于脂质发生过氧化的终产物, 能结合膜上的蛋白, 使之失去活性破坏膜结构。通常情

况下, 研究者把 MDA 含量作为判断细胞膜氧化损伤程度的指标<sup>[7]</sup>。

原花色素由黄烷-3-醇组成, 是一类多酚类物质, 首先存在于葡萄皮、籽及枝干中, 之后在发酵过程中会浸出进入发酵液<sup>[8-10]</sup>。原花色素不仅赋予葡萄酒收敛性还参与葡萄酒结构和颜色的形成<sup>[11-12]</sup>。同时也具有较强的抗氧化功能<sup>[13]</sup>, 能够有效清除和抑制人体内自由基, 抑制低密度脂蛋白氧化, 具有抗癌、抗衰老及心血管保护作用<sup>[14]</sup>。有研究表明一些多酚物质如酚酸、花色苷等对细菌生长和活性有影响<sup>[11,15]</sup>。但是, 尚未见有报道涉及原花色素对酵母生长及其氧化状态的影响。本文以酵母为研究对象, 首次通过在模拟发酵培养基中添加原花色素, 考察了发酵过程中原花色素对酵母生长和抗氧化作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 酵母菌种

本文选择一株商业酵母和一株实验室筛选菌株为试验用菌株。

*Saccharomyces cerevisiae* AWRI R<sub>2</sub> (简称 A 菌株)是一株商业葡萄酒酿酒酵母, 由 Marivin (Australian)公司商业化, 因具有良好的发酵性能在许多葡萄酒厂中广泛使用。

*Saccharomyces cerevisiae* BH<sub>8</sub> (简称 B 菌株)分离自北京产红葡萄酒酿造品种——“北红”葡萄汁的自然发酵液, 为本实验室分离菌种。该菌种

经中国科学院微生物研究所鉴定为酿酒酵母,在模拟培养基中可以将糖完全转化为酒精。

## 1.2 原花色素的制备和处理浓度的确定

试验中所使用的原花色素经乙酸乙酯和 TSK HW-(50) F<sup>[16]</sup>柱纯化后纯度达 98%,平均聚合度约 5.5。原花色素的结构以 C、EC、ECG 为起始单元, C、EC、ECG、EGC 为延伸单元。

为了确定原花色素的处理浓度,选择一个菌株,考察了 4 个不同原花色素浓度(0.01、0.10、1.00、5.00 g/L)对酵母发酵活性的影响。试验结果表明,不同浓度原花色素均可以加快发酵速率,但在发酵初期较低的两个浓度(0.01、0.10 g/L)和另外两个较高的浓度(1.00、5.00 g/L)的影响作用明显不同。另外,考虑到在红葡萄酒发酵过程中原花色素的浓度约在 0.2–0.8 g/L<sup>[17]</sup>,所以我们选择原花色素的试验处理浓度为 0.1 g/L 和 1.0 g/L。

## 1.3 模拟葡萄汁培养基(MSM)

模拟培养基的配制参照 Marullo 等<sup>[18]</sup>的方法,略有改动。原花色素添加到培养基中,终浓度分别为 0.1 和 1.0 g/L。

酵母接种之前,培养基用 0.45 μm 膜进行过滤灭菌。

## 1.4 发酵试验

在接种前,酵母种子液在 YPD 液体培养基中培养 14 h 至对数中后期,之后转接到含有不同浓度原花色素的模拟培养基中,接种量为 1%,28 °C 静置培养,发酵过程中定期取样。

## 1.5 活菌数及存活率的测定

收集培养至对数后期的酵母菌。根据具体生长情况,稀释菌液至合适的倍数。取相同体积的稀释菌液与 0.1%美蓝染色液混合均匀。取一定量菌液至血球计数板,在显微镜下,40 倍观察,计活菌数及总菌数。

存活率=酵母活菌数/酵母总菌数×100%。

## 1.6 梯度点样法

收集培养至对数后期的酵母菌液,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清。菌液经无菌水洗涤 2 次,用无菌水重悬并 10 倍梯度稀释,依次取 3.5 μL 菌液点于 YPD 平板。在 28 °C 倒置培养 3–5 d 后,观察并拍照记录结果。

## 1.7 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的测定

菌体与含 5 mmol/L DTT 的 PBS 磷酸缓冲液(pH 7.8)混合,加入 0.5 μm 的玻璃珠(Sigma)后 0 °C 超声破碎,离心取上清液用于酶活测定。

SOD 活性的测定按 Almeselmani 等<sup>[19]</sup>和 Cakmak 等<sup>[20]</sup>的方法,以抑制 NBT 光化还原 50% 为 1 个酶活力单位;CAT 酶活的测定按 Aebi<sup>[21]</sup>的方法,以 1 min 内 OD<sub>240</sub>减少 0.1 为 1 个酶活力单位。

## 1.8 丙二醛(MDA)的测定方法

菌体与 0.7 mL 10%的 TCA 混合,加入 0.5 μm 玻璃珠(Sigma)后 0 °C 超声破碎,离心取上清液用于含量测定。按照 Herdeiro 等<sup>[22]</sup>的方法测定 MDA。分别测定 450、532 和 600 nm 波长下的吸光值后,用公式  $6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$  来计算 MDA 的值。

## 1.9 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度测定按照 Bradford<sup>[23]</sup>方法。

## 1.10 数据分析

3 次重复试验,使用 SPSS 统计分析软件对数据采取 ANOVA 和 S-N-K 分析方法,0.05 显著水平。

# 2 结果与分析

## 2.1 菌株生长情况

从表 1 可以看出,在发酵后期原花色素对酵母有明显的保护作用,而且原花色素含量越高其保护作用越明显。当发酵液中含有 1 g/L 原花色素

表 1 发酵后期(12 d)不同浓度的原花色素对酵母活菌数及存活率的影响  
Table 1 Effect of different concentrations of proanthocyanidins on the cell growth at the end of fermentation (12 d)

	A		B	
	活菌数 Viable count ( $10^6$ /mL)	存活率 Cell survival rate (%)	活菌数 Viable count ( $10^6$ /mL)	存活率 Cell survival rate (%)
对照 Control	6.375±0.210a	31.10±1.02	8.00±0.22a	37.13±1.02
0.1 g/L	11.625±0.190b	56.73±0.93	11.00±0.27b	51.06±1.25
1.0 g/L	15.00±0.25c	73.20±1.22	15.25±0.25c	70.78±1.16

素时, 发酵末期(12 d)酵母 AWRI R<sub>2</sub> 和 BH<sub>8</sub> 的活菌数分别为  $15 \times 10^6$ /mL 和  $15.25 \times 10^6$ /mL, 存活率分别为 73.2% 和 70.78%, 比对照分别增加了 135% 和 90.6%。从数据分析的结果可知, 不同浓度原花色素的处理对酵母活性的影响具有显著性差异( $P < 0.05$ )。从图 1 的梯度点样结果也可以

得到以上的结论, 原花色素培养的细胞在 YPD 平板上生长的菌落数要多于对照, 且原花色素的浓度与酵母菌落的数量成正比。

## 2.2 超氧化物歧化酶(SOD)的活性

从图 2 可以看出, 原花色素的添加会提高 SOD 的活性。在发酵初期 0.1 g/L 原花色素的促

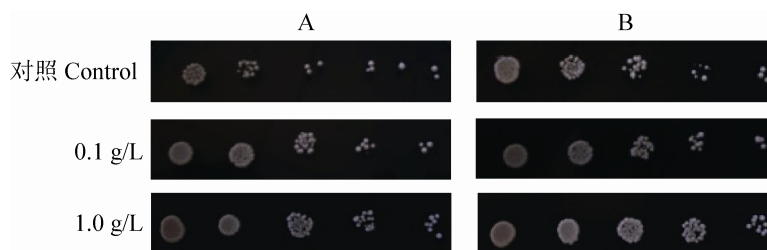


图 1 发酵末期(12 d)梯度点样结果

Fig. 1 Cell spot assay on the solid YPD plates at the end of fermentation

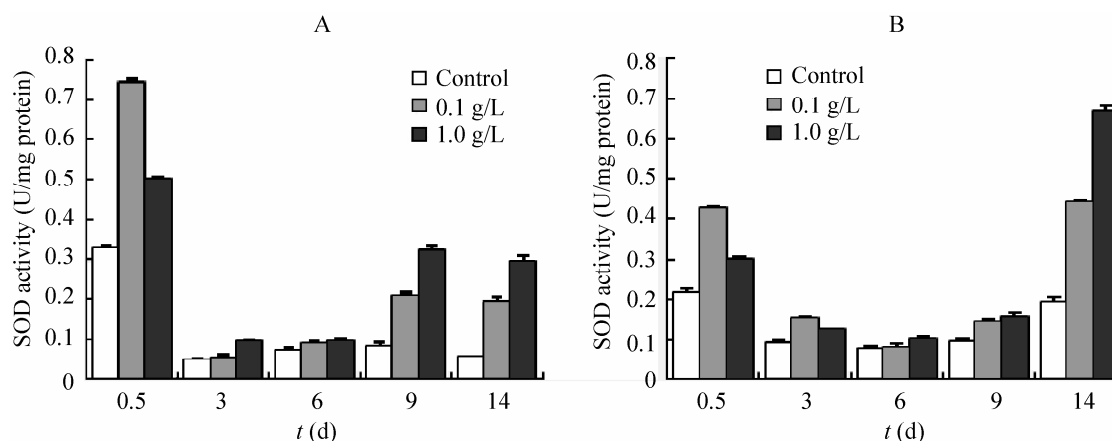


图 2 发酵过程中不同浓度的原花色素对酵母 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effect of different concentrations of proanthocyanidins on the SOD activity in fermentation

进作用最明显, 之后的发酵阶段, 1.0 g/L 原花色素的促进作用较明显。从整个发酵过程看, 在发酵初期和末期, 酶活性较高且不同浓度原花色素的影响作用明显, 具有显著差异( $P<0.05$ ); 而在发酵中期, 酶活性较低且原花色素的作用不明显( $P>0.05$ )。

### 2.3 过氧化氢酶的活性

如图 3 所示, 在发酵开始的 0.5 d, 添加原花色素的发酵体系中酵母 CAT 活性略低于对照, 活性在 0.01 U/mg protein 左右。通过数据分析可知各处理之间无显著差异( $P>0.05$ )。随着发酵的进

行, 酶活性不断提高, 两株酿酒酵母的过氧化氢酶活性最高均可达到 0.12 U/mg protein。同时, 用原花色素处理的酵母 CAT 活性高于对照, 不同处理之间差异显著( $P<0.05$ ), 这说明原花色素能够提高发酵体系中酵母 CAT 的活性。

### 2.4 丙二醛的含量

如图 4 所示, 原花色素的添加会降低细胞内 MDA 的含量, 与对照相比差异显著( $P<0.05$ )。对于酵母 A, 1.0 g/L 原花色素作用更明显, 胞内 MDA 含量最低。而对于酵母 B, 两个浓度原花色素之间的影响作用无显著差异( $P>0.05$ )。图 4 结

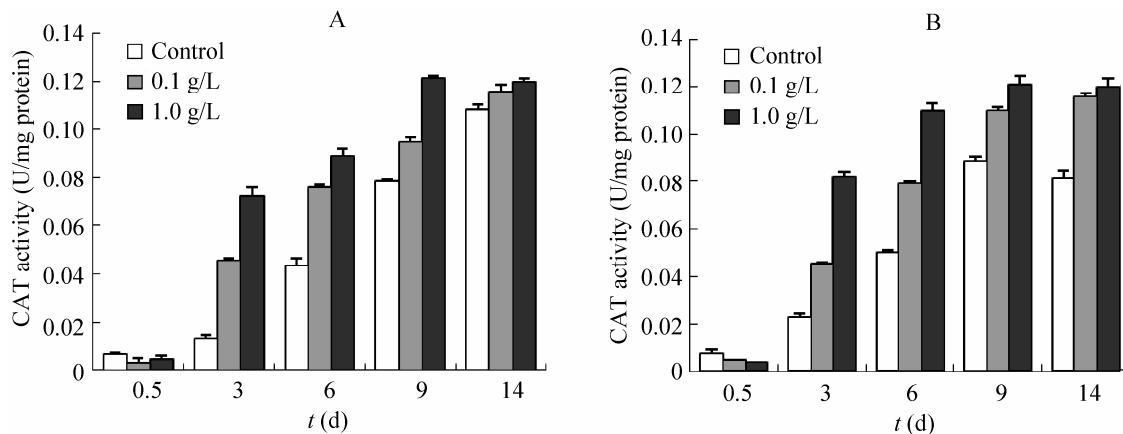


图 3 发酵过程中不同浓度原花色素对酵母 CAT 活性的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of proanthocyanidins on the CAT activity in fermentation

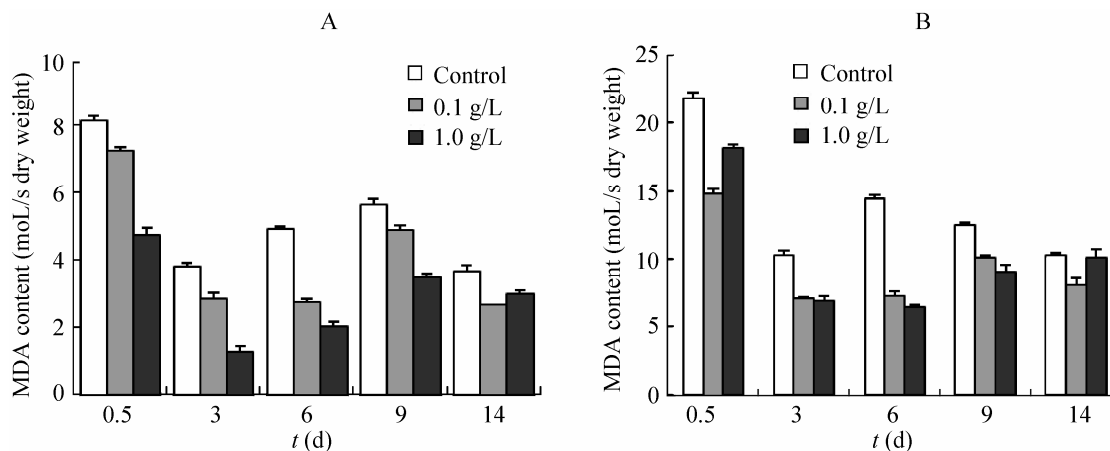


图 4 发酵过程中不同浓度原花色素对酵母胞内 MDA 的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of proanthocyanidins on the MDA content in fermentation

果说明原花色素处理可通过减少膜脂的过氧化来降低胁迫造成的伤害。

### 3 讨论

生物体氧化还原状态对于细胞适应外界环境起到重要的指示作用<sup>[24-25]</sup>。氧化胁迫对酵母造成的伤害除了导致酵母的蛋白质变性、影响细胞膜的流动性,还能引起酵母细胞内 ROS 含量的增加。ROS 不仅氧化修饰氨基酸残基,破坏蛋白质的构象,还会使细胞膜氧化降解,使质膜透性增大,从而对细胞造成伤害,引起细胞死亡。

SOD 酶将  $O_2^-$  降解为分子氧和过氧化氢,再进一步由 CAT 酶降解为水。酵母 SOD 和 CAT 酶活性的升高在降低活性氧的伤害方面起到重要作用。MDA 是膜脂过氧化产物,其含量多少是膜受损伤程度的标志<sup>[5]</sup>。Leikert 等<sup>[26]</sup>观察到红酒多酚可以提高内皮细胞的内皮型 NO 合酶的蛋白表达,并提高 NO 的释放。苗升浩等<sup>[27]</sup>研究显示虾青素作用于内皮细胞 24 h 后可以显著提高过氧化氢酶和 SOD-1 的蛋白表达。应晨江等<sup>[28]</sup>研究表明绿茶茶多酚和红茶茶多酚均能上调血管内皮细胞中过氧化氢酶蛋白的表达,表明茶多酚能影响 ROS 的清除。

有研究证明,原花色素可通过清除人体内活性氧而对人体起到保护作用<sup>[14]</sup>。那么原花色素对酵母在胁迫条件下的保护作用是否也与清除 ROS 能力有关?添加原花色素后,发酵过程中 SOD 和 CAT 酶活性会提高(图 2、3),所以在胁迫条件下,原花色素可通过提高两者活性来清除活性氧。通过分析膜脂的过氧化产物——MDA,添加原花色素降低了胁迫条件下 MDA 含量(图 4)。膜脂氧化降解的减少,是 SOD 和 CAT 共同作用的结果,这可能是酵母在发酵后期酒精耐受性能提高的原因之一,从而使酵母活菌数和存活率提高。

本文首次利用葡萄汁模拟培养基研究原花色素对酵母的抗氧化作用。通过以上结果我们看出原花色素可通过调节活性氧代谢酶的活性,甚至有可能改变蛋白表达而体现抗氧化性。在实际生产中我们可以通过控制原花色素的浸出量或外加原花色素来提高酵母抗逆性,改善发酵性能和速率,同时提高葡萄酒的品质。

### 参考文献

- [1] Cardona F, Carrasco P, Pérea-Ortín JE, et al. A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 114: 83–91.
- [2] Costa V, Ferreira-Moradas P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insight into ageing, apoptosis and diseases[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2001, 22: 217–246.
- [3] 燕国梁, 华兆哲, 堵国成, 等. 不同活性氧化胁迫下 *Bacillus* sp. F26 以抗氧化物酶合成为特征的应激响应[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(4): 627–634.
- [4] 周丛照. 酿酒酵母氧化应激系统的结构生物学基础[J]. *中国科学技术大学学报*, 2008, 38(8): 923–929.
- [5] Costa V, Ferreira-Moradas P. Oxidative stress and signaltransduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insight into ageing, apoptosis and diseases[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2001, 22: 217–246.
- [6] Farr S, Kogoma T. Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. *Microbiology Review*, 1991, 55: 561–585.
- [7] Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF. Protection of cells from menadione-induced apoptosis by inhibition of lipid peroxidation[J]. *Toxicology*, 2003, 191: 77–88.
- [8] Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F, et al. Polymeric proanthocyanidins from grape skins[J]. *Phytochemistry*, 1996, 43: 509–512.
- [9] Souquet JM, Labarbe B, Le Guernevé C, et al. Phenolic composition of grape stems[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 1076–1080.
- [10] Sun BS, Pinto T, Leandro MC, et al. Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1999, 50: 179–184.
- [11] Vivas N, Lonvaud-Funel A, Glories Y. Effect of phenolic acid and anthocyanins on growth, viability

- and malolactic activity of a lactic acid bacterium[J]. Food Microbiology, 1997, 14: 291–300.
- [12] Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolome B, et al. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, tempranillo, and cabernet sauvignon[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 6475–6481.
- [13] Rigo A, Vianello F, Clementi G, et al. Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48: 1996–2002.
- [14] Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis[J]. Trends in Food Science and Technology, 2000, 11: 152–160.
- [15] Nikitina VS, Kuz'mina LY, Melent'ev AI, et al. Antibacterial activity of polyphenolic compounds isolated from plants of geraniaceae and rosaceae families[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2007, 43: 629–634.
- [16] Labarbe B, Cheynier V, Brossand F, et al. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according their degree of polymerization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 2719–2723.
- [17] Gachons CP, Kennedy JA. Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 5877–5881.
- [18] Marullo P, Bely M, Masneuf-Pomarede I, et al. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains[J]. FEMS Yeast Research, 2004, 4: 711–719.
- [19] Almeselmani M, Deshmukh PS, Sairam RK, et al. Protective of antioxidant enzymes under high temperature stress[J]. Plant Science, 2006, 171: 382–388.
- [20] Cakmak I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. Plant Physiology, 1992, 98(4): 1222–1227.
- [21] Aebi H. Catalase *in vitro*[J]. Methods in Enzymology, 1984, 105: 121–126.
- [22] Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, et al. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1760: 340–346.
- [23] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248–254.
- [24] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life[J]. Plant Physiology, 2006, 141: 312–322.
- [25] Shao HB, Chu LY, Lu ZH, et al. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 4(1): 8–14.
- [26] Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells[J]. Circulation, 2002, 106(13): 1614–1617.
- [27] 苗升浩, 孙秀发, 应晨江. 虾青素对内皮细胞过氧化氢酶和超氧化物歧化酶-1表达的影响[J]. 华中医学杂志, 2004, 28(2): 79–80.
- [28] 应晨江, 左学志, 叶晓蕾, 等. 茶多酚对内皮细胞和过氧化氢酶表达的影响[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(5): 623.