

# 外源褪黑素对酿酒酵母发酵及抗氧化体系的影响

王成, 战吉成, 刘兴艳, 赵芳, 孙翔宇, 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:** 本文研究了外源褪黑素对酿酒酵母发酵能力、主发酵产物、抗氧化体系和抗氧化能力的影响, 并测定了褪黑素含量的变化。发现对照组在发酵的第 8 d 发酵基本停止, 处理组直到发酵的第 14 d 发酵终止, 但最终的 CO<sub>2</sub> 总失重量、残糖和酒精含量无显著影响。褪黑素在发酵的第 8 d 及以后能显著地降低海藻糖、甘油的生成量, 发酵第 8 d 时, 对照组甘油含量达到最大值 6.25 g/L, 而低、中、高浓度褪黑素处理组甘油含量比对照组分别低 7.57%、12.29%、11.99%。低浓度的褪黑素能刺激酵母超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性提高, 减少丙二醛(MDA)的积累, 发酵结束时低、中浓度褪黑素处理组 SOD 酶活分别比对照组高 68.15%和 59.89%, 低、中、高褪黑素处理组 CAT 酶活分别是对照组的 2.85、2.87、1.84 倍, 同时高浓度褪黑素处理组的 MDA 含量只有对照组的 71.44%。发酵液抗氧化能力随褪黑素浓度增加而增强, 褪黑素含量在发酵过程中逐渐降低, 后期趋于稳定。

**关键词:** 褪黑素; 酒精发酵; 海藻糖; 甘油; 抗氧化体系

文章编号: 1673-9078(2015)4-102-108

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.017

## Effect of Exogenous Melatonin on Ethanol Fermentation and Antioxidant Activity of *Saccharomyces cerevisiae*

WANG Cheng, ZHAN Ji-cheng, LIU Xing-yan, ZHAO Fang, SUN Xiang-yu, HUANG Wei-dong

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

**Abstract:** The effect of exogenous melatonin on ethanol fermentation ability, major fermentation products, antioxidant system, and total antioxidant ability of *Saccharomyces cerevisiae* was investigated; in addition, the melatonin content in *S. cerevisiae* was determined. The results showed that fermentation ended on day 8 in the control group, while it continued until day 14 in the treatment groups; however, the total CO<sub>2</sub> weight loss, residual sugar content, and alcohol content did not differ significantly between the control and melatonin treatment groups at the end of fermentation. There was a significant decrease in the production of trehalose and glycerol in the treatment groups (after day 8) compared to that observed in the control. The glycerol content in the groups treated with low, medium, and high concentrations of melatonin was observed to be lower by 7.57%, 12.29%, and 11.99%, respectively, compared to that in the control group, which attained a maximum level of 6.25 g/L on day 8. Low concentration melatonin treatment stimulated the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes, and reduced the accumulation of malondialdehyde (MDA) during fermentation. The activity of the SOD was increased in the 0.01 and 1 mg/L melatonin treatment groups by 68.15% and 59.89%, respectively, compared to that in the control; conversely, the CAT activity in the low, medium, and high melatonin treatment groups was observed to increase by 2.85-, 2.87-, and 1.84-fold, respectively, compared to that in the control at the end of fermentation. MDA content in the high melatonin treatment group was 71.44% that of the control (at the end of fermentation). There was an increase in the antioxidant activity of the broth treated with melatonin corresponding to the increase in melatonin concentration. Melatonin concentration gradually decreased during fermentation to reach a steady state level towards the end of the process.

**Key words:** melatonin; ethanol fermentation; trehalose; glycerol; antioxidant system

褪黑素, 又叫松果体素, 是动物体和人体内一种

收稿日期: 2014-08-05

基金项目: 科技部十二五科技支撑计划项目(2012BAD31B07); 农业部公益性行业专项(201303073-2)

作者简介: 王成(1986-), 男, 在读博士研究生, 研究方向: 酿酒酵母逆境生理代谢

通讯作者: 黄卫东(1961-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 酿酒葡萄逆境生理, 酿酒酵母逆境生理代谢

广泛存在的具有生理功能的生物胺类物质, 生理作用非常广泛<sup>[1]</sup>。目前已知的褪黑素的生理功能主要有调节生物体的昼夜节律、缓解睡眠障碍、抗氧化等, 褪黑素及其代谢产物都有强大的自由基清除能力, 而且能够诱导生物体相关抗氧化酶活性增强<sup>[2]</sup>、增强免疫作用、抗肿瘤、抗衰老等, 特别是对阿尔茨海默病有明显的效果<sup>[3]</sup>。近些年研究发现, 在植物体内也广泛存在褪黑素, 而且褪黑素对植物体的生理调节作用也

非常广泛<sup>[4]</sup>。最近研究发现在许多天然食品中含有褪黑素,其含量足可以保证人体的正常生理需求,如水稻、葡萄、苹果、樱桃等食物中均含有褪黑素。有研究已经表明,通过进食富含褪黑素的食物,能增加人体尿液中相关的褪黑素代谢产物<sup>[5]</sup>,与保健品功能相当,而且通过日常饮用含有褪黑素的食物来补充褪黑素是一种更加环保、绿色、自然的保健方式,更符合未来的发展方向。

葡萄酒本身作为一种健康饮品,里面含有许多功能性成分,如多酚类、黄酮醇、黄烷醇、花色苷、白藜芦醇等营养成分,但葡萄酒中成分有上千种,活性物质非常多,褪黑素就是近几年新发现的葡萄酒中的功能性成分<sup>[6]</sup>。但有关葡萄酒中褪黑素的研究还停留在表面没有深入,葡萄酒中的褪黑素到底是如何产生的现在还存在分歧,Rodriguez-Naranjo<sup>[7]</sup>等认为褪黑素是发酵过程中产生的,酿酒酵母在其中起决定性作用。也有研究表明褪黑素可能是作为一种信号分子参与了酿酒酵母的发酵过程<sup>[8]</sup>。褪黑素及其代谢产物也是一种非常强的抗氧化物质,有研究发现葡萄相关产品中褪黑素与其抗氧化能之间存在一定相关性<sup>[9]</sup>。但目前尚无外源添加褪黑素对酿酒酵母发酵进程及抗氧化的相关研究报道。

本文通过外源添加不同褪黑素,研究其对酿酒酵母发酵能力、主要逆境发酵代谢产物及抗氧化体系的影响,初步探讨褪黑素对酿酒酵母的作用,同时测定了褪黑素的含量变化,希望能为将来开发富含褪黑素的保健葡萄酒的研发提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验菌株

试验所用菌种为商业酿酒酵母“RED FRUIT”(Saccharomyces cerevisiae)由意大利英纳帝斯(enartis)公司提供,中文名为“红果香”。

#### 1.1.2 培养基和缓冲溶液

YPD 液体培养基(用于种子培养):酵母浸粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%。

YPD 固体培养基(用于菌种保存):酵母浸粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%,琼脂粉2%。

模拟葡萄汁培养基(MSM培养基)可以模拟标准葡萄汁的主要成分,同时排除酚类、花色苷等物质的干扰适于研究酿酒酵母的发酵特性。配制参考Marullo等<sup>[10]</sup>的方法,模拟葡萄汁的成分为(g/L):葡萄糖(100),果糖(100),酒石酸(3),柠檬酸(0.3),L-苹果酸(0.3),

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.2)。氮源(190 mg total N/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.3 g)和Asn (0.6 g)。无机盐(mg/L): MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (4), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (4), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1), KI (1), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.4), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O (1), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (1)。维生素(mg/L): 肌醇(300), 生物素(0.04), 硫酸铵(1), 吡哆醇(1), 烟酸(1), 泛酸(1), 脂肪酸(mg/L): 棕榈酸(1), 棕榈烯酸(0.2), 硬脂酸(3), 油酸(0.5), 亚油酸(0.5), 亚麻酸(0.2)。pH值调整为3.3。

PBS缓冲溶液: 0.05 mol/L, 用磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配制而成, pH 7.0。

### 1.2 试剂和仪器设备

#### 1.2.1 试剂

褪黑素、葡萄糖、果糖、甘油、乙醇、海藻糖标样购于美国Sigma公司,其他试剂均为分析纯级别。

#### 1.2.2 仪器设备

恒温摇床培养箱、超净工作台、紫外分光光度仪、Shinadzu220万分之一天平、飞鸽牌冷冻离心机、超低温冰箱、Waters 高效液相色谱、安捷伦1200系列液相系统、安捷伦6460三重四极杆串联质谱仪。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌种采集、活化与接种方法

取微量商业菌株干粉,接入到35℃温水中活化30 min,在超净工作台上用接种环将活化好的菌体划线接种到YPD固体培养基中,于培养箱中28℃培养48 h。将培养好的菌种用接种环接种到YPD液体培养基中,用恒温摇床培养箱120 r/min培养12 h,在培养基OD<sub>600</sub>值达到1.4左右时,取1%的量接种到含有MSM培养基(400 mL)的厌氧发酵瓶中。

#### 1.3.2 外源褪黑素处理方法

褪黑素用50%的酒精溶液溶解,取500 mg褪黑素标品溶解于10 mL的50%酒精溶液中,制成50 mg/mL的褪黑素母液。用10 mL的离心管梯度稀释成三个不同浓度,分别加入相应的MSM培养基中,每个培养基中加入0.8 mL,使最终的褪黑素浓度分别达到100 mg/L、1 mg/L、0.01 mg/L。以加入稀释液(50%酒精溶液)0.8 mL的培养基为对照。将所有发酵瓶放于摇床培养箱中28℃,120 r/min,发酵时间14 d,每天定时取样,每个样品设三个平行。

#### 1.3.3 主要发酵产物的高效液相色谱测量方法

参照Moreira等<sup>[11]</sup>的方法并稍作修改,采用高效液相色谱法(Waters-2695)测定酵母主要代谢产物(海藻糖、甘油、乙醇),色谱条件:Bio-Rad HPX-87H色谱柱(300 mm×7.8 mm),示差检测器(RID,

waters-2414)。柱温 55 °C, 流速 0.5 mL/min, 等度洗脱, 进样量 10 μL, 以峰面积外标法定量。

流动相: 0.005 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 流动相经溶剂过滤器过滤, 滤膜为 0.22 μm 水相膜 (四氟乙烯膜)。

### 1.3.4 酿酒酵母发酵特性的测定方法

通过测定发酵过程中 CO<sub>2</sub> 的释放速率和释放总量来评估酵母的发酵能力, 每天定时取发酵瓶于精密天平 (精确到 0.01 g) 上称重, 称重前摇晃发酵瓶至 CO<sub>2</sub> 泡沫不再产生, 记录样品每天的 CO<sub>2</sub> 减重量。

### 1.3.5 酿酒酵母抗氧化体系的测定方法

#### 1.3.5.1 酿酒酵母总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测定方法

粗酶液制备: 取 2 mL 发酵液 4000 r/min 离心 5 min, 上清液另存, 菌体用无菌水 3 mL 4000 r/min 离心清洗 2 遍, 去掉上层清洗无菌水, 菌体加入 2 mL 预冷的 pH7.0 的 PBS 缓冲溶液, 涡旋混匀, 加入酸洗

$$\text{总SOD活力 (U/mg protein)} = \frac{\text{对照管OD} - \text{测定管OD}}{\text{对照管OD}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积 (mL)}}{\text{取样量 (mL)}} \div \text{待测样本蛋白浓度 (mg protein/mL)}$$

#### 1.3.5.2 酿酒酵母过氧化氢酶 (CAT) 测定方法

粗酶液的提取参考 1.3.5.1。CAT 的测定采用钼酸铵比色法, 底物溶液为 60 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (用高锰酸钾标定), PBS 为 60 mmol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> (pH 7.8)。3 组试管分别标记为空白管 1、空白管 2 和测试管, 均加入 0.5 mL 60 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 再向空白管 1 中加入 0.5 mL 50 mmol/L 钼酸铵溶液和 0.3 mL 煮沸的粗酶液, 空

$$\text{酵母CAT酶活力 (U/mg protein)} = \frac{\text{空白管1OD值} - \text{测定管OD值}}{\text{空白管2OD值}} \times 271 \times \frac{1}{60 \times \text{取样量}} \div \text{蛋白浓度 (mg protein/mL)}$$

#### 1.3.5.3 发酵过程中丙二醛 (MDA) 的测定方法

酵母 MDA 的提取方法同参考 1.3.5.1 中的方法。取粗提液 2 mL (对照加 2 mL 蒸馏水), 加入 2 mL 0.6% 硫代巴比妥酸 (TBA), 混匀物于沸水浴上反应 10 min,

$$\text{MDA含量 (nmol/mg protein)} = \text{MDA浓度} \times \text{提取液体积} / \text{样品重量} / \text{蛋白浓度}$$

#### 1.3.5.4 蛋白浓度测定方法

蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝显色法。在干净的试管中分别加入浓度为 0.1 g/L 的标准蛋白溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mL, 加入相应体积的双蒸水使总体积达到 1 mL, 再加入 0.01% 5 mL 考马斯亮蓝试剂, 充分摇匀后, 1 h 以内 595 nm 处比色。以 A<sub>595</sub> 为纵坐标, 标准蛋白含量为横坐标, 绘制标准曲线, 建立方程。酵母菌体重悬于 50 μL 溶液 (20% 甘油, 10 mmol/L Tris pH 7.5, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT) 即为待测母液。取 20 μL 至试管中, 加入 980 μL 双蒸水达溶液总体积达到 1 mL。分别加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂, 充分摇匀, 595 nm 下读数。结合标准曲线计算待测样品的蛋白质浓度 (μg/mL)。

玻璃珠一勺 (直径 450-500 μm), 超声破碎 (冰浴, 开 3 s, 停 3 s, 180 个循环), 低温离心 (0 °C, 12000 r/min, 20 min), 分离上清液, 得到粗酶液。

T-SOD 的测定采用羟胺法: 测定管和对照管分别加入 1 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.8), 依次向测定管中加入 100 μL 的粗酶液, 对照管中加入 100 μL 的双蒸水, 然后对照管和测定管分别加入 0.1 mL 10 mmol/L 的盐酸羟胺, 0.1 mL 7.5 mmol/L 的黄嘌呤, 0.1 mL 0.023 U/mL 的黄嘌呤氧化酶, 涡旋混匀 28 °C 恒温水浴 30 min, 再分别加入 2 mL 3.3 g/L 的对氨基苯磺酸和 2 mL 10 g/L 的甲萘胺, 混匀 15 min 后, 以蒸馏水调零, 测定 550 nm 处的 OD 值。规定每毫克蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 酶活力单位。

计算公式:

白管 2 中加入 0.5 mL 50 mmol/L 钼酸铵溶液和 0.3 mL PBS, 测试管中加入 3 mL 提取酶液, 涡旋均匀后在 28 °C 下水浴 15 min, 然后立即加入 0.5 mL 50 mmol/L 钼酸铵溶液摇匀。与前 2 管一起用分光光度计在 410 nm 处测定吸光度。以每毫克蛋白每秒钟分解 1 μmol 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量为一个酶活力单位 (U)。按照下列公式计算酶活

迅速冷却后再离心, 取上清液测定 450 nm, 532 nm, 600 nm 波长下的吸光值, 以 0.6% TBA 溶液为空白。

$$\text{MDA浓度 (nmol/mL)} = 6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$$

#### 1.3.5.5 发酵过程中总抗氧化能力 (T-AOC) 测定方法

测定方法采用 FRAP 法, 该法原理为 Fe<sup>3+</sup>-三吡啶三吡啶 (tripyrindyl-triazine, TPTZ, Sigma) 可被样品中还原物质还原为二价铁形式, 呈现出明显的蓝色, 并于 593 nm 处具有最大光吸收, 根据吸光度的大小计算样品抗氧化活性的强弱。步骤如下: 取适量 1 mL 发酵液, 加入 1.8 mL TPTZ 工作液 (由 0.3 mol/L 醋酸盐缓冲液 25 mL、10 mmol/L TPTZ 溶液 2.5 mL、20 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 溶液 2.5 mL 组成), 混匀后 28 °C 反应 10 min, 593 nm 测定吸光度, 以 1.0 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 为标准, 以达到同样吸光度所需 FeSO<sub>4</sub> 的毫摩尔数表示样品的抗氧化活性。规定在 28 °C 时, 每分钟每毫升发酵液使反应体系的吸光度

值每增加0.01时为一个总抗氧化能力单位。

### 1.3.6 褪黑素的高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 检测方法

参考 Kocadagli 等<sup>[12]</sup>的方法, 并稍作修改。取 1.3.5.1 中的上清液 1 mL 于 5 mL 的离心管中, 加入 3 mL 50% 的乙醇水溶液, 涡旋混匀 30 s, 取 1 mL 过 0.22 μm 有机相膜 (四氟乙烯膜), 进 LC-MS 检测。

LC-MS 检测条件: 液相色谱为 Agilent1200 系列 HPLC system, 质谱为 Agilent 6460 triple quadruple mass spectrometer (Waldborn, Germany)。色谱柱为 VP-ODS 岛津 9022005 (150×2.0 mm)。流动相为水:乙腈=65%:35% (V:V), 均含有 0.3% 的甲酸。流速 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL。

质谱条件: 干燥气 N<sub>2</sub>, 流速 10 L/min, 温度 375 °C。喷射电压 1000 V, 正向毛细管电压 4000 V, 检测模式为多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 碎裂电压 70 V, 以主要的碎片离子 m/z 174.2 为定性依据, 外标法定量。

### 1.3.7 数据处理

所有试验重复三次, 数据统计分析利用 SPSS 17.0 软件 ANOVA 和 Duncan 分析方法, 0.05 显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度外源褪黑素对酿酒酵母发酵性能的影响

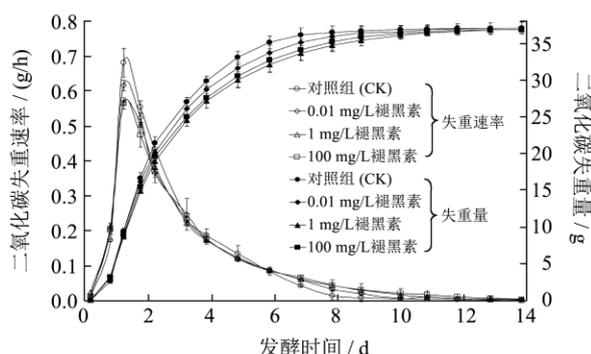


图 1 不同浓度外源褪黑素对酿酒酵母发酵过程中二氧化碳失重的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of exogenous melatonin on CO<sub>2</sub> mass loss during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

酿酒酵母在酒精发酵的过程中会大量产生 CO<sub>2</sub>, 产生的速率和最终的生成总量可以直接反应酵母的发酵速度和发酵活力, 是评价酿酒酵母发酵能力最简便快速的方法。从图 1 可以发现, 酵母在发酵的第 29 h 达到了发酵高峰, 此时酵母适应了模拟葡萄汁培养基

高渗透压和低 pH 的胁迫逆境, 开始快速发酵, 随后随着发酵的进行, 发酵速度逐渐减慢, 对照组在发酵的第 8 d CO<sub>2</sub> 已经几乎不再变化, 说明发酵已经趋于终止, 而处理组则直到第 14 d, 发酵才完全终止。经过褪黑素处理的酿酒酵母相比对照组能有效地降低发酵高峰, 同时在发酵的后期延长发酵时间, 使得整个发酵期间 CO<sub>2</sub> 的失重速率曲线较为平缓, 使发酵进行的更加平稳和缓和, 有利于葡萄酒中风味物质的产生和营养物质的保存。但最终的 CO<sub>2</sub> 总生成量, 对照组和处理组无显著性差异, 说明褪黑素处理对最终的发酵无明显影响。

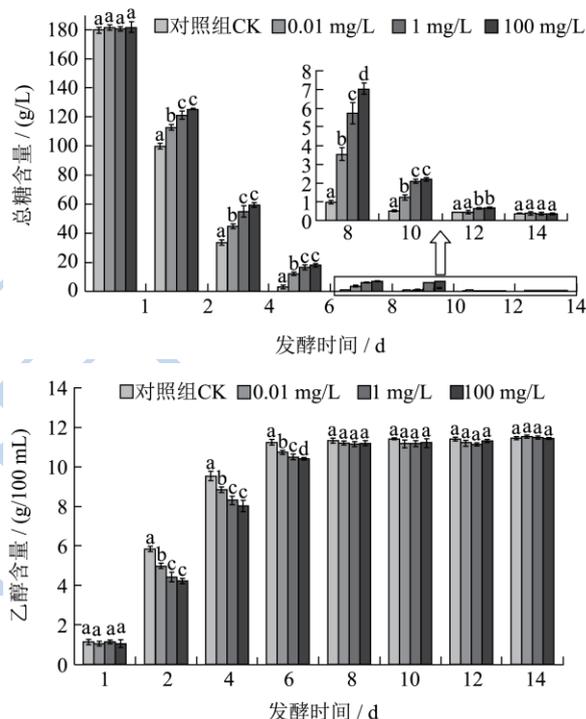


图 2 不同浓度外源褪黑素对酿酒酵母发酵过程中总糖和乙醇含量的影响

Fig.2 Effect of various concentrations of exogenous melatonin on the content of total sugar and ethanol produced during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

注: 不同字母之间表示显著性差异 (p<0.05)。

酿酒酵母发酵过程中的糖分的减少和酒精的增加可以更直接地表明酵母酒精发酵的能力。从图 2 中可以看出随着发酵的进行, 糖分不断减少, 酒精不断增加, 发酵的后期残糖和酒精度都趋于平缓。褪黑素处理组在发酵的第 2 d 到第 12 d 总糖的含量均明显高于对照组 (p<0.05), 其中发酵的第 4 d, 低、中、高浓度褪黑素处理组的总糖含量分别比对照组高 33.88%、63.85%、76.72%, 说明处理组总糖消耗慢于对照组, 发酵过程减缓。这从酒精的生成量也能得到印证, 发酵第 4 d 时, 低、中、高浓度褪黑素处理组的酒精生

成量分别比对照组低 6.78%、12.80%、15.70%，在发酵的第 6 d，对照组酒精含量就基本达到稳定，而处理组则在第 8 d 及以后达到稳定，对照组酒精生产量明显快于处理组。而且无论是总糖含量还是酒精生产量，在处理组之间也存在着褪黑素浓度越高，发酵进程越慢的趋势。

从图 1 和图 2 的结果，我们可以发现，酿酒酵母在经褪黑素处理后，其发酵的进程减慢，且褪黑素浓度越高，其发酵进程越慢，但最终的酒精度、残糖及 CO<sub>2</sub> 生成量却并无显著差别。表明褪黑素处理使得发酵的进程变得更加平缓、柔和，这会有利于发酵过程的控制，而且发酵过程越长，在真实葡萄酒发酵过程中，越有利于多酚、黄烷醇等营养物质的保留，也能更多产生甘露糖等酵母代谢产物，也越有利于提高葡萄酒的品质。为了研究褪黑素能减缓发酵过程的原因，我们进一步深入分析了酵母发酵过程中主要的逆境代谢产物甘油和海藻糖的变化及褪黑素对酿酒酵母抗氧化体系的影响。

## 2.2 不同浓度外源褪黑素对酿酒酵母发酵产物海藻糖和甘油的影响

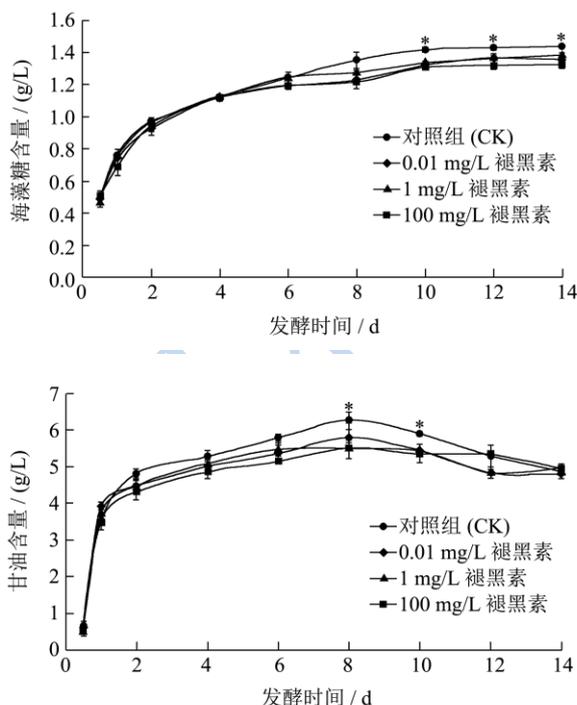


图 3 不同浓度外源褪黑素对酿酒酵母发酵过程中海藻糖和甘油含量的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of exogenous melatonin on the content of trehalose and glycerol during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

海藻糖、甘油是酿酒酵母在酒精发酵过程中主要的逆境代谢产物，其含量与酵母适应逆境胁迫的能力密切相关。当酵母面临高温、酒精等胁迫时，会在不同程度上引起细胞内海藻糖浓度的上升。海藻糖具有在胁迫条件下防止细胞内蛋白质聚集和帮助蛋白质正确折叠的功能，高水平的海藻糖可保护蛋白质避免变性，抑制变性蛋白质的聚合<sup>[13]</sup>。甘油作为一种渗透调节剂，其主要作用是平衡外界的高渗透压胁迫，并且甘油的合成可以平衡 NADH/NAD 和氧化还原电位，也是酵母适应渗透压胁迫能力的主要指标，甘油和海藻糖可以有效地降低酵母细胞受到的逆境胁迫，使得发酵快速进行。

从图 3 中可以看出，随着发酵的进行，发酵液中海藻糖、酒精都在不断积累，甘油在发酵的第 8 d 达到高峰，随后缓慢地下降。而海藻糖含量不断积累，在后期趋于稳定。褪黑素处理组的海藻糖积累量在发酵的中后期（第 6 d 以后）明显低于处理组 ( $p < 0.05$ )，在发酵结束时，对照组海藻糖含量达到 1.44 g/L。甘油在发酵的初期快速产生，说明发酵的初期，渗透压胁迫是酵母面对的主要逆境条件，从而迫使酵母快速做出应答，合成甘油。在发酵期间，对照组褪黑素含量均高于处理组，特别是第 8 d 和第 10 d，对照组甘油的生成量明显高于处理组 ( $p < 0.05$ )，发酵第 8 d 时，对照组甘油含量达到最大值 6.25 g/L，而低、中、高浓度褪黑素处理组甘油含量比对照组分别低 7.57%、12.28%、11.99%。发酵后期各处理组之间甘油含量无显著性差异。

酵母在逆境胁迫的条件下会产生甘油和海藻糖来保护细胞不受逆境的损害，外源褪黑素的存在使得甘油和海藻糖的生成量降低，表明在外源褪黑素存在的条件下，酵母受到的逆境胁迫减少。这可能是由于褪黑素本身具有很强的抗氧化能力，从而减少了酵母的氧化胁迫，也可能是由于褪黑素的存在诱导了酵母自身抗氧化体系的增强，因此我们进一步研究了褪黑素与酵母抗氧化体系之间的关系。

## 2.3 不同浓度外源褪黑素对酿酒酵母抗氧化体系的影响

酵母在酒精发酵的过程中会遇到多种环境胁迫因子的影响，其中氧化胁迫就是最重要的胁迫条件，高温、酒精、重金属等因素都会引起强烈的氧化胁迫，氧化胁迫可以导致胞内活性氧的水平提高，而活性氧会破坏蛋白质，造成酵母细胞失水，而且还会引起细胞内膜脂的过氧化降解，造成细胞死亡。酵母为了应

抗氧化胁迫的逆境, 酵母的自身抗氧化酶体系就会得到表达, 从而清除体内的活性氧, 酵母的主要抗氧化酶包括 SOD 和 CAT<sup>[14]</sup>。SOD 广泛存在于生物体内, 能特异性地清除体内的氧自由基。CAT 是一种末端氧化酶, 以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为底物, 并将其分解成 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>, 消除体内活性氧。SOD 和 CAT 是细胞抵抗活性氧胁迫最直接有效的方式, 因此它们的活性变化能够直接地反应酵母细胞对氧化胁迫应答的水平指标。MDA 是自由基作用于脂质发生过氧化的终产物, 它能与膜上的蛋白质和酶结合, 使之失去活性破坏膜结构, MDA 含量可以作为判断细胞膜氧化损伤程度的指标。

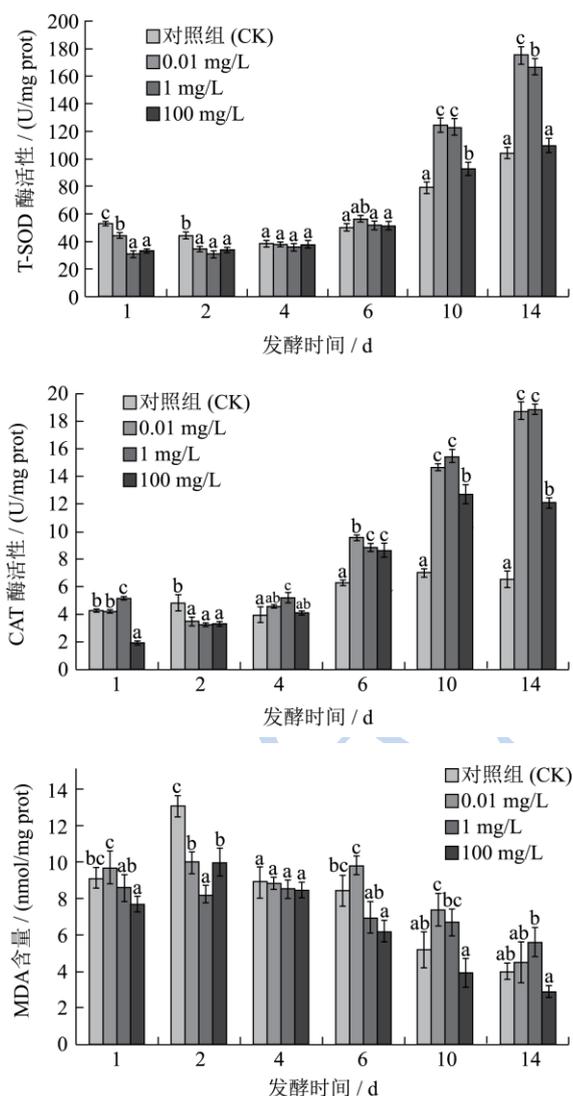


图4 不同浓度外源褪黑素对酿酒酵母发酵过程中酵母 SOD、CAT 酶活性及 MDA 含量的影响

Fig4 The effect of different concentrations of exogenous melatonin on SOD and CAT activities and MDA content during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

注: 不同字母之间表示显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

从图4中可以发现, 在发酵的中后期, 酵母的 SOD

和 CAT 酶活性增高, 说明在发酵的中后期酵母对逆境胁迫的能力增强。在发酵的第 8 d 及以后, 处理组的 SOD 酶活性明显高于对照组 ( $p < 0.05$ ), 在发酵的第 14 d, 低浓度和中浓度褪黑素处理组 T-SOD 酶活分别比对照组高 68.15% 和 59.88%, 说明外源褪黑素处理能刺激酵母 SOD 酶活性增高, 从而提高细胞的抗氧化能力, 增强细胞活力, 从而延长了发酵时间, 与图 1 的结果相互印证。而且 0.01 mg/L 和 1 mg/L 两个褪黑素浓度处理组 SOD 酶和 CAT 酶活性明显高于 100 mg/L 的处理组和对照组 ( $p < 0.05$ ), 在发酵第 14 d 时, 低、中、高褪黑素处理组 CAT 酶活分别是对照组的 2.85、2.87、1.84 倍。推测可能是低浓度的褪黑素处理能更有效地诱导酵母抗氧化酶体系的启动, 已有文献报道褪黑素能诱导动物和植物体内抗氧化相关酶活性提高<sup>[8]</sup>。而高浓度的褪黑素由于本身就具有很强的抗氧化能力, 从而消除了一部分细胞内的活性氧, 从而使酵母体内相关抗氧化酶活性降低。随着发酵的进行, MDA 的含量呈现缓慢下降的趋势, 在发酵的初期, 酵母体内 MDA 含量较高, 100 mg/L 浓度褪黑素处理组相比较其他处理, MDA 含量明显偏少, 在发酵结束时, 高浓度褪黑素处理组的 MDA 含量只有对照组的 71.44%, 说明高浓度的褪黑素能有效减少 MDA, 保护细胞免受氧化伤害, 而对照组和 0.01 mg/L 和 1 mg/L 两个褪黑素浓度处理组之间 MDA 含量差异不显著。

中低浓度的褪黑素能有效地刺激酵母抗氧化相关酶 (SOD、CAT) 的表达, 从而增强酵母的抗氧化能力。而高浓度的褪黑素由于本身具有强大的抗氧化能力, 可以直接保护酵母减少氧化胁迫。这说明低浓度与高浓度褪黑素影响酵母的抗氧化作用机制是不一样的。

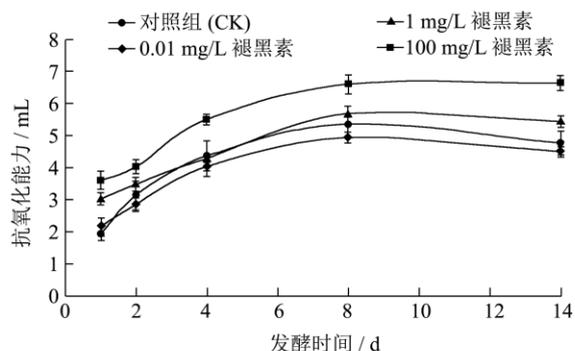


图5 不同浓度外源褪黑素对发酵液总抗氧化能力的影响  
Fig5 Effect of different concentrations of exogenous melatonin on the total antioxidant capacity (T-AOC) of the broth during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

发酵液的总抗氧化能力 (T-AOC) 可以直接说明

褪黑素对模拟葡萄汁抗氧化能力的贡献程度。在酿酒酵母酒精发酵的过程中,随着发酵的进行,酵母的次级代谢产物逐渐排出体外进入发酵液,会增加发酵液的总抗氧化能力。从图5可以看出,随着发酵的进行,发酵液的抗氧化能力不断增强,在发酵的初始,100 mg/L 浓度褪黑素处理组总抗氧化能力大于其他处理,且在整个发酵过程中,高浓度褪黑素组都要远远高于其他处理组,在发酵结束时,中浓度和高浓度褪黑素处理组抗氧化能力分别比对照组高 39.56% 和 14.22%,说明褪黑素本身具有较强的抗氧化活性,而低浓度组由于褪黑素含量较少,与对照组之间无显著差异。外源的褪黑素能有效地增加发酵液的抗氧化能力。

#### 2.4 发酵过程中褪黑素含量的变化

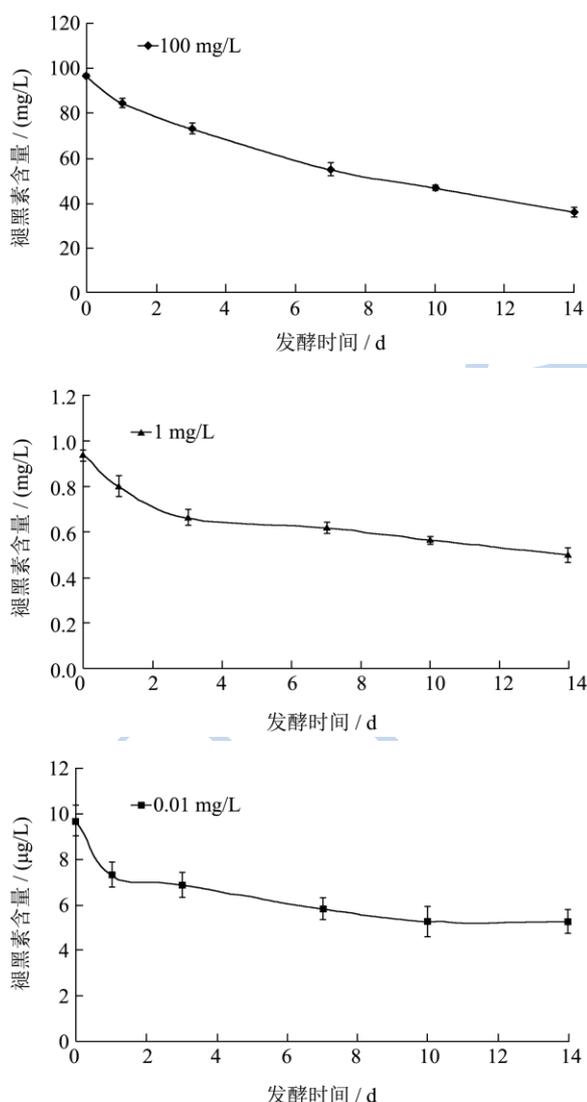


图6 外源褪黑素含量在发酵过程中的变化

Fig.6 Changes in exogenous melatonin concentration during *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

从图6中可以看出,外源褪黑素在加入模拟葡萄

汁培养基后,会随着发酵的进行逐渐消耗。总褪黑素消耗量 100 mg/L 处理组>1 mg/L 处理组>0.01 mg/L 处理组,1 mg/L 和 0.01 mg/L 处理组在发酵的前期消耗迅速,说明在发酵前期,酵母在经受较为严酷的逆境胁迫时,褪黑素的迅速降低与此可能存在一定关联,值得深入研究。在发酵结束时,不同浓度处理组分别还剩余 36 mg/L、0.5 mg/L、5.2 μg/L 的褪黑素,在发酵的后期,褪黑素的含量趋于稳定,变化不大。

### 3 结论

不同浓度的外源褪黑素处理对酿酒酵母最终的酒精生产能力和发酵性能无显著影响,但能减弱发酵高峰,延长发酵时间,使发酵进行的更加缓和,同时外源褪黑素会降低酵母甘油、海藻糖等逆境代谢产物的积累。中低浓度的褪黑素会诱导酵母提高 SOD、CAT 等抗氧化相关酶活性增加,并减少 MDA 的产生,高浓度褪黑素具有强抗氧化作用,会增强发酵液的抗氧化能力,同时在发酵的过程中,褪黑素本身会逐渐消耗,并在发酵的后期趋于稳定。总之,外源添加褪黑素会增强酵母适应胁迫逆境的能力,有利于发酵的进行。在将来的研究中,外源褪黑素添加对真实果汁发酵的影响是否与模拟汁相似?其对酵母的作用机制是什么?这些将是未来的研究方向。外源添加褪黑素进行果酒的酿制,从而开发富含褪黑素的保健果酒也将是未来的研究热点。

### 参考文献

- [1] Paredes S D, Korkmaz A, et al. Phytomelatonin: a review [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(1): 57-69
- [2] Reiter R J, Paredes S D, Manchester L C, et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 44(4): 175-200
- [3] Braam W, Smits M G, Didden R, et al. Exogenous melatonin for sleep problems in individuals with intellectual disability: a meta-analysis [J]. Developmental Medicine and Child Neurology, 2009, 51(5): 340-349
- [4] Janas K M, Posmyk M M. Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application [J]. Acta Physiol Plant, 2013, 35(12): 3285-3292
- [5] Johns N P, Johns J, Porasuphatana S, et al. Dietary intake of melatonin from tropical fruit altered urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin in healthy volunteers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(4): 913-919
- [6] Rodriguez-Naranjo M I, Gil-Izquierdo A, Troncoso A M, et

- al. Melatonin: a new bioactive compound in wine [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, 22(4-5): 603-608
- [7] Rodriguez-Naranjo M I, Gil-Izquierdo A, Troncoso A M, et al. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines [J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(4): 1608-1613
- [8] Rodriguez-Naranjo M I, Torija M J, Mas A, et al. Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions [J]. *Journal of Pineal Research*, 2012, 53(3): 219-224
- [9] Vitalini S, Gardana C, Simonetti P, et al. Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity [J]. *Journal of Pineal Research*, 2013, 54(3): 322-333
- [10] 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(7): 711-719
- [11] Moreira N, Mendes F, Hogg T, et al. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 103(3): 285-294
- [12] Kocadagli T, Yılmaz C, Gokmen V. Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2014, 153: 151-156
- [13] Jung Y J, Park H D. Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (ATH1) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(23-24): 1855-1859
- [14] Nagamiya K, Motohashi T, Nakao K, et al. Enhancement of salt tolerance in transgenic rice expressing an *Escherichia coli* catalase gene, katE [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2007, 1(1): 49-55