

文章编号:1000-8551(2020)04-0805-11

超声波辅助液-液萃取结合 GC 检测 单萜化合物工艺优化

刘琦^{1,3} 祝霞^{2,3} 赵丹丹^{2,3} 王璐璐^{2,3} 韩舜愈^{2,3} 杨学山^{2,3,*}

(¹甘肃农业大学生命科学技术学院,甘肃兰州 730070;²甘肃农业大学食品科学与工程学院,
甘肃兰州 730070;³甘肃省葡萄与葡萄酒工程学重点实验室,甘肃兰州 730070)

摘要:为优化超声波辅助液-液萃取(LLE)结合气相色谱(GC)检测酿酒酵母菌株合成单萜化合物的工艺条件,本试验以模拟葡萄汁为原料,研究超声功率、超声时间、NaCl添加量和萃取剂体积对萃取效果的影响,在单因素试验的基础上,采用响应面优化超声辅助萃取模拟葡萄酒中单萜化合物的萃取工艺。结果表明,模拟葡萄汁单萜类化合物最佳萃取工艺参数为,超声功率405 W、超声时间15 min、NaCl添加量4.9 g、萃取剂体积15.5 mL,在此萃取条件下结合GC可从模拟葡萄汁发酵酒样中检测出芳樟醇、 α -萜品醇、香茅醇、香叶醇4种单萜物质,总含量高达46.29 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,进一步证实了酿酒酵母可以从头合成单萜化合物。本研究结果为深入探究酿酒酵母菌株单萜化合物合成代谢机制提供了理论依据。

关键词:酿酒酵母;单萜化合物;液-液萃取;超声波;响应面

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.04.0805

品种香气决定了葡萄酒的特点和典型性^[1],构成品种香气的物质主要包括萜烯类化合物、降异戊二烯等。其中,单萜化合物感官阈值较低,具有浓郁的花香、果香味^[2-3],如芳樟醇具有轻微的柑橘味和淡淡的玫瑰花香, α -萜品醇具有类似紫丁香花香、百合花香,香茅醇具有柠檬和柑橘香,香叶醇具有玫瑰花香,且它们的感官阈值在18~400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,远低于葡萄酒中其他香气物质,是葡萄酒品种香气最主要的贡献者^[4-5]。早期研究认为,葡萄酒中的单萜化合物主要来自酿酒葡萄原料本身,而主导葡萄酒发酵的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞内不存在单萜合成酶,不能合成单萜化合物^[6-7]。但Camesasca等^[8]研究发现酿酒酵母BY4743菌株可在不含单萜前体物质的模拟葡萄汁中从头合成单萜化合物。此外,Carrau等^[9]将酿酒酵母菌株M522接种到化学合成的模拟葡萄汁中,发酵结束后在其发酵液中检出了葡萄酒中常见的芳樟醇、 α -萜品醇、香叶醇、香茅醇等4种单萜化合物,且适当增加模拟汁中可同化氮含量以及减少发酵

过程中通氧量均有利于单萜物质的积累。但酿酒酵母产生的单萜化合物含量较少^[8-9],因此,建立准确、高效、重复性高的单萜物质检测方法将有助于进一步深入研究其代谢机制。

气相色谱(gas chromatography, GC)具有操作简单、仪器价格和样品检测费用较低以及易于实现等优点,现已被广泛应用于葡萄酒香气分析领域^[10]。通常在气相色谱分析之前需对样品中的香气物质进行富集处理,以满足分析检测,目前主要使用的香气富集方法有顶空固相微萃取(headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)^[11]、低沸点有机溶剂的液-液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)^[12]、固相微萃取^[13]等。LLE主要利用“相似相溶”原理对香气物质进行富集浓缩,由于单萜化合物在有机相中的分配系数较高,因而可用于单萜化合物的萃取研究。Andujar-Ortiz等^[14]结合气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)技术,比较了LLE、固相萃取(solid-phase extraction, SPE)以及

收稿日期:2018-11-13 接受日期:2019-02-24

基金项目:国家自然科学基金地区基金项目(31660455,31760454),甘肃省重点研发计划(17YF1NA060),甘肃省葡萄酒产业发展基金(2018-07; 2018-08)

作者简介:刘琦,男,主要从事生物化学研究。E-mail: liuqi_gsau@163.com

*通讯作者:杨学山,男,副教授,主要从事葡萄酒风味品质调控研究。E-mail: yangxs@gsau.edu.cn

HS-SPME 3 种前处理方法在葡萄酒香气物质检测中的效果,结果表明,LLE 显现出良好的线性与重复性,萃取效果较好。然而,LLE 也存在一些弊端,如使用有机溶剂量大、操作步骤繁琐且耗时长等^[15]。目前,超声波在分离提取研究中应用较多,主要是利用超声波产生的“空化效应、热效应、强化扩散”等多种效应增强萃取过程中的传质作用,增大待分离物质分子运动频率和速度,使目标成分更容易进入溶剂,从而提高萃取效率^[16-17]。罗静等^[18]利用超声辅助处理提取鲜桃果实中挥发性物质,Porto 等^[19]比较单纯浸渍与超声辅助法提取大麻中挥发性萜类化合物,Li 等^[20]利用超声辅助法提取葡萄果皮中花青素,上述研究均表明,超声辅助提取能明显提高目标成分的提取含量,大大缩短提取时间。但目前超声波辅助提取技术在葡萄酒香气富集前处理中应用较少。

在葡萄酒发酵过程中,葡萄果实中的单萜化合物前体物质会被酿酒酵母菌株产生的 β -糖苷酶水解释放,会对酿酒酵母菌株合成单萜化合物的检测产生影响。故本试验拟采用无糖苷前体的模拟葡萄汁体系,通过单因素及响应面试验优化超声辅助 LLE 的香气检测前处理工艺,并结合 GC 外标定量法,建立一种相对准确、高效、可同时检测多种单萜化合物的方法,探讨酿酒酵母菌株从头合成单萜化合物的能力,旨在为深入研究酿酒酵母菌株单萜化合物合成机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

酿酒酵母菌株 LA-FR,购自上海鼎唐国际贸易有限公司。

1.2 试剂与仪器

主要试剂:芳樟醇、 α -萜品醇、香叶醇、香茅醇标准品,均购自美国 Sigma 公司;二氯甲烷,国产色谱纯;NaCl 为国产分析纯。

主要仪器:PHS-3C pH 计,上海雷磁有限责任公司;PAL-2 数显手持糖度计,日本爱宕 ATAGO 公司;L550 台式低速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;JY96-IIN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;RE600A 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Clarus500 GC-FID,美国 PerkinElmer 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 模拟葡萄汁的配制 参考刘琦等^[21]的方法。碳源:葡萄糖 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、纤维二糖 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;氮源:磷

酸氢二铵 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;酸:酒石酸氢钾 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、L-苹果酸 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柠檬酸 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;矿物质:磷酸氢二钾 $1.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硫酸镁 $1.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, SO_2 添加量为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3.2 酿酒酵母菌株活化与模拟汁发酵 参考王媛等^[22]的方法并略做修改。将酿酒酵母干粉溶于 10 倍体积无菌水中,37℃ 静置溶解 20 min,再加入等体积的模拟葡萄汁于 28℃ 活化 25 min,按推荐用量 ($0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 将活化好的酿酒酵母菌株接种到模拟葡萄汁中,置于 28℃ 恒温培养箱发酵 5 d,待发酵结束后取模拟酒样离心 ($4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min),取上清液用于后续试验。

1.3.3 气相色谱-氢火焰离子化检测器 (gas chromatography-hydrogen flame ionization detector, GC-FID) 分析条件 参考李艳等^[10]的方法并略作修改。色谱柱为 DB-WAX ($60 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$);载气:氮气,流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;升温程序:初始温度为 40℃,保持 5 min,以 $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 180℃,保持 1 min,以 $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 230℃,保持 1 min;1 μL 样品分流进样,分流比为 5:1;进样口温度:250℃;检测温度:280℃;尾吹: $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;氢气流量: $45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,空气流量: $450 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3.4 单萜化合物标准曲线的建立 以二氯甲烷为溶剂配制不同种类单萜化合物的标准品溶液,先配制浓度为 $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,再将其用二氯甲烷分别稀释 2、10、20、100、200 和 1 000 倍,利用 GC-FID 测定相应的峰面积,以标准品质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,试验重复 3 次。

1.3.5 单萜化合物含量计算 根据 GC-FID 所测模拟酒样品中芳樟醇、 α -萜品醇、香茅醇、香叶醇 4 种单萜物质的峰面积,结合标准曲线计算得到测定样品中各单萜化合物的含量,并以样品中检出的单萜化合物的总量作为考查指标进行 LLE 工艺条件优化。

1.3.6 单因素试验设计

1.3.6.1 超声功率对单萜化合物萃取的影响 取 1.3.2 获得的模拟酒样上清液 15 mL 于 50 mL 锥形瓶中,加入等体积的二氯甲烷和 4.5 g NaCl,涡旋震荡 5 min,超声萃取 15 min,超声功率分别为 300、400、500、600 W。然后将萃取体系 $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,抽提得到上层水相并重复上述操作进行第二次萃取,合并 2 次萃取后的有机相,旋蒸 (20℃) 浓缩至约 1 mL,再用二氯甲烷复溶至 3 mL,吸取复溶液 1 μL 进行气相色谱分析。试验重复 3 次,比较单萜含量,确定较佳超声功率值。

1.3.6.2 超声时间对单萜萃取的影响 取 1.3.2 获得的模拟酒样上清液 15 mL 于 50 mL 锥形瓶中,加入等体积的二氯甲烷和 4.5 g NaCl,涡旋震荡 5 min,超声萃取,超声功率 400 W,超声时间分别为 5、10、15、20 min。其余操作同 1.3.6.1,比较单萜含量,确定较佳超声时间。

1.3.6.3 NaCl 添加量对单萜萃取的影响 取 1.3.2 获得的模拟酒样上清液 15 mL 于 50 mL 锥形瓶中,加入等体积的二氯甲烷,NaCl 的添加量分别为 3.0、4.5、6.0、7.5 g,涡旋震荡 5 min,超声时间 15 min,超声功率 400 W。其余操作同 1.3.6.1,比较单萜含量,确定

较佳 NaCl 添加量。

1.3.6.4 萃取剂体积对单萜萃取的影响 取 1.3.2 获得的模拟酒样上清液 15 mL 于 50 mL 锥形瓶中,分别加入 5、10、15、20 mL 二氯甲烷和 4.5 g NaCl,涡旋震荡 5 min,超声时间 15 min,超声功率 400 W。其余操作同 1.3.6.1,比较单萜含量,确定较佳萃取剂体积。

1.3.7 响应面试验设计 在单因素试验结果的基础上,利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面试验设计,以单萜含量为响应值,设计 4 因素 3 水平响应面试验进行萃取条件的优化(表 1)。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface test

水平 Level	因素 Factors			
	超声功率 A Ultrasonic power/W	超声时间 B Ultrasonic time/min	NaCl 添加量 C Addition of NaCl/g	萃取剂体积 D Extractor volume/mL
-1	300	10	3.0	10
0	400	15	4.5	15
1	500	20	6.0	20

1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2010 对试验所得数据进行分析 and 制图,用 IBM SPSS Statistics 20 进行显著性分析(Duncan 法, $P < 0.05$),采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面试验设计及回归分析。

2 结果与分析

2.1 单萜物质的标准曲线

由表 2 可知,4 种单萜化合物标准曲线线性范围

表 2 单萜物质的 GC-FID 分析结果

Table 2 GC-FID analysis results of monoterpenes

单萜名称 Monoterpene name	保留时间 Retention time/min	线性方程 Linear equation	R^2	检出限 Detection limit/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	线性范围 Linearity range/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	相对标准偏差 RSD/%
芳樟醇 Linalool	11.610	$y = 6.921x + 231.30$	0.996 2	6.96	8.700~4 350	6.75
α -萜品醇 α -terpineol	12.276	$y = 5.317x + 175.10$	0.998 3	18.66	23.325~46 655	6.83
香茅醇 Citronellol	13.710	$y = 6.678x + 71.98$	0.999 3	13.71	17.140~4 285	6.35
香叶醇 Geraniol	14.465	$y = 6.830x - 15.68$	0.999 6	17.58	21.975~43 955	10.06

满足检测要求,且其决定系数(R^2)均在 0.996 2~0.999 6 范围内,表明线性关系良好。试验的重复性用相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)来表示,4 种单萜标准曲线的 RSD 在 6.35%~10.06% 范围内,表明试验重复性较好,可用于这 4 种单萜物质的定量分析。

2.2 单因素试验结果与分析

2.2.1 超声功率对单萜化合物萃取的影响 由图 1-A 可知,随着超声功率从 300 W 增大至 600 W,单萜含量呈先增加后减小的趋势,且超声功率为 400 W 时,单萜含量达到最大,为 $41.003 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。超声辅助提取主要是利用超声波产生的机械作用和空化效应促使有

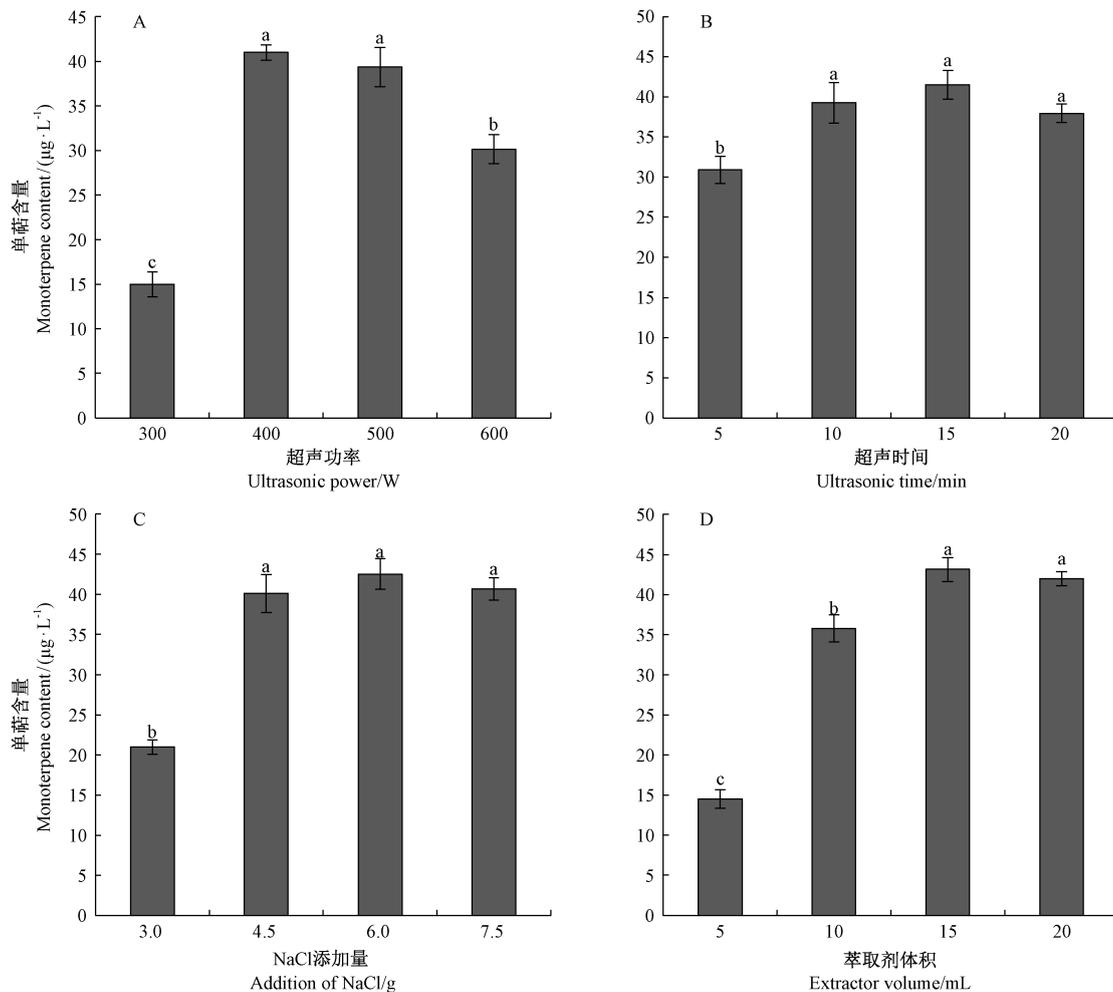
效成分进入溶剂,但当超声功率过高时可能会破坏有效成分的结构,同时可能有其他杂质溶入,导致提取效果降低^[23-24],因此后续试验的超声功率选择400 W较适宜。

2.2.2 超声时间对单萜化合物萃取的影响 由图1-B可知,随着超声时间的延长,单萜含量缓慢上升,当超声时间为15 min时,单萜含量最高,但当超声时间超过15 min时,单萜含量降低,这可能是由于超声时间过长,超声过程中产生的热量导致溶液温度升高,增加了单萜物质的挥发,从而造成检出的单萜含量降低,所以后续试验的超声时间选择15 min较佳。

2.2.3 NaCl添加量对单萜化合物萃取的影响 在LLE过程中添加无机盐是常见的提高萃取效率的措施,无机盐在水相中以水合离子的形式存在,促使水相中微量的香气物质进入有机相,从而提高萃取效

果^[25-26]。由图1-C可知,当NaCl添加量从3.0 g增加至4.5 g时,单萜含量增加了91.27%,当继续加大NaCl添加量,单萜含量变化较小。添加适量的NaCl能明显提高萃取效果,这主要是由于中性盐溶于水相后形成的阴阳离子会破坏香气物质在水相中的溶解平衡,降低其在水相中的溶解度,且NaCl溶于水会增加溶液的极性,促使水相中极性较低的香气物质聚集和释放^[27-28]。当添加4.5 g NaCl时,溶液已接近饱和状态,继续添加NaCl对萃取效率提升较小,因此萃取过程中添加4.5 g NaCl较为合适。

2.2.4 萃取剂体积对单萜化合物萃取的影响 由图1-D可知,单萜含量随萃取剂体积的增加而迅速升高,且当二氯甲烷体积为15 mL时单萜含量最高,此时单萜含量为 $43.15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,当二氯甲烷体积超过15 mL时,单萜含量出现略微下降,这可能是由于LLE的步



注:不同小写字母表示各水平间存在显著性差异($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate that there are significant differences between different levels at 0.05 level.

图1 单因素试验结果

Fig.1 Results of the single factor test

骤较多,且二氯甲烷沸点低、易挥发,随着萃取剂体积的增加,萃取过程中溶剂损失也随之增加,导致可检测出的单萜含量减少,因此选择二氯甲烷体积为 15 mL 较为适宜。

2.3 响应面法优化 LLE 工艺

2.3.1 响应面试验结果 以单因素试验结果为基础,通过响应面试验优化模拟酒样中单萜化合物的萃取工艺,响应面的具体因素水平组合及试验结果如表 3 所示。

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Response surface test design and results

序号 Number	因素 Factors				单萜含量 Monoterpene content/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
	超声功率 <i>A</i> Ultrasonic power	超声时间 <i>B</i> Ultrasonic time	NaCl 添加量 <i>C</i> Addition of NaCl	萃取剂体积 <i>D</i> Extractor volume	
1	1	0	1	0	31.56
2	0	0	0	0	44.53
3	0	0	0	0	45.67
4	-1	0	-1	0	22.70
5	1	0	-1	0	32.01
6	0	1	1	0	36.42
7	0	-1	-1	0	33.34
8	0	0	0	0	44.42
9	0	0	1	1	41.32
10	0	-1	0	-1	31.98
11	-1	0	0	-1	25.49
12	-1	-1	0	0	21.48
13	0	-1	0	1	37.60
14	0	-1	1	0	36.79
15	0	1	0	1	32.55
16	0	1	0	-1	34.64
17	0	0	1	-1	40.73
18	0	0	-1	1	38.44
19	-1	1	0	0	26.91
20	0	0	0	0	44.64
21	0	0	-1	-1	31.05
22	1	0	0	1	30.33
23	1	1	0	0	26.59
24	1	0	0	-1	29.74
25	-1	0	0	1	27.27
26	0	1	-1	0	34.19
27	0	0	0	0	45.32
28	-1	0	1	0	28.16
29	1	-1	0	0	25.18

2.3.2 响应面回归模型的方差分析及显著性检验

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 所得结果进行回归建模分析,并对所得回归模型做方差分析及显著性检验,结果如表 4 所示,其中交互项 AB、AC、

AD、BC 的 *P* 值均大于 0.05,说明它们之间的交互作用不显著,属于模型中的冗余参数,因而需对回归模型进一步优化。回归模型经逐步优化后得到表 5,相比优化前的回归模型,其矫正决定系数 R_{Adj}^2 变大,变

异系数变小,表明模型更优,对试验结果的拟合度更高。由表 5 和表 6 可知,模型通过检验 ($P < 0.0001$),具有统计学意义。模型失拟项不显著,即试验中的数据可以用模型来解释。决定系数 $R^2 = 0.9707$,修正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9517$,表明回归方程对该试验数据的拟合度较高,能解释试验中 97.07% 的全部变异, $R^2_{pred} = 0.8826$,进一步说明该模型具有

良好的可信度,因而可利用该模型进行 LLE 的工艺参数优化。经回归建模分析,最终得到的响应面回归方程为 $Y = -356.263 + 1.108A + 9.361B + 21.187C + 7.010D - 0.010AC - 0.077BD - 0.227CD - 0.001A^2 - 0.271B^2 - 1.395C^2 - 0.153D^2$,由回归分析结果可知,4 个因素对萃取效率影响的主次顺序为超声功率>NaCl 添加量>萃取剂体积>超声时间。

表 4 回归模型方差分析及显著性检验

Table 4 Variance analysis and significance test of regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	1 381.03	14	98.64	37.49	<0.0001	**
A	45.63	1	45.63	17.34	0.001	**
B	2.03	1	2.03	0.77	0.3951	
C	45.05	1	45.05	17.12	0.001	**
D	16.05	1	16.05	6.10	0.027	*
AB	4.04	1	4.04	1.54	0.2357	
AC	8.73	1	8.73	3.32	0.0899	
AD	0.35	1	0.35	0.13	0.7193	
BC	0.37	1	0.37	0.14	0.7125	
BD	14.86	1	14.86	5.65	0.0323	*
CD	11.56	1	11.56	4.39	0.0547	*
A ²	1 104.68	1	1 104.68	419.82	<0.0001	**
B ²	297.19	1	297.19	112.95	<0.0001	**
C ²	63.91	1	63.91	24.29	0.0002	**
D ²	95.40	1	95.40	36.26	<0.0001	**
残差 Residual	36.84	14	2.63			
失拟项 Lack of fit	35.64	10	3.56	11.85	0.147	
纯误差 Pure error	1.20	4	0.30			
总和 Cor total	1 417.87	28				

注: * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

Note: * indicates significant difference at 0.05 level, ** indicate extremely significant difference at 0.01 level. The same as following.

2.3.3 响应面交互作用分析结果 响应面分析图中,颜色从蓝色到红色变化表示单萜含量从低到高,响应面为凸面表示试验指标具有最大值,响应面坡度越大,即因素对试验结果的影响越显著;等高线的形状可直观反映因素间交互作用的强弱,椭圆表示因素间交互作用较强,接近圆形则表示因素间交互作用较弱^[29-30]。图 2-a 沿 A 轴方向较陡,沿 C 轴方向较为平缓,表明与 NaCl 添加量相比,超声功率对单萜含量影响更大,且在不同 NaCl 添加量的条件下,超声功率变化对单萜含量影响较小,即超声功率与 NaCl 添加量 2 个因素间的交互作用较弱。由图 2-b 可知,随着超声

时间的延长,单萜含量呈先增大后减小的趋势,并在 15 min 附近具有最大值。当萃取剂体积增加到约 15 mL 时,单萜含量达到最大值,继续增加萃取剂体积,单萜含量变化较小。在不同超声时间下,萃取剂体积对单萜含量影响较大,即超声时间和萃取剂体积间的交互作用较强。由图 2-c 可知,NaCl 添加量和萃取剂体积对单萜含量影响的趋势相似,均对单萜含量影响较大,等高线为椭圆,说明二者交互作用明显,且响应图 中所反映的因素间的交互作用与回归方程的显著性分析结果一致。

表 5 优化回归模型方差分析及显著性检验

Table 5 Variance analysis and significance test of optimized regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	显著性 Significance
模型 Model	1 376.26	11	125.11	51.12	<0.000 1	**
A	45.63	1	45.63	18.64	0.000 5	**
B	2.03	1	2.03	0.83	0.375 7	
C	45.05	1	45.05	18.41	0.000 5	**
D	16.05	1	16.05	6.56	0.020 2	*
AC	8.73	1	8.73	3.57	0.076 1	
BD	14.86	1	14.86	6.07	0.024 7	*
CD	11.56	1	11.56	4.72	0.044 2	*
A ²	1 104.68	1	1 104.68	451.39	<0.000 1	**
B ²	297.19	1	297.19	121.44	<0.000 1	**
C ²	63.91	1	63.91	26.11	<0.000 1	**
D ²	95.40	1	95.40	38.98	<0.000 1	**
残差 Residual	41.60	17	2.45			
失拟项 Lack of fit	40.40	13	3.11	10.33	0.183	
纯误差 Pure error	1.20	4	0.30			
总和 Cor total	1 417.87	28				

表 6 回归模型可信度分析

Table 6 Confidence analysis of regression model

项目 Projects	Mean	SD	CV	<i>R</i> ²	<i>R</i> _{Adj.} ²	<i>R</i> _{pred} ²
结果 Results	33.829	1.564	4.62%	0.970 7	0.951 7	0.882 6

2.3.4 响应面工艺优化与验证试验 对回归方程进

行最大值求解得到最优工艺参数,为了验证回归模型所确定的最优条件的正确性,结合实际操作对最优参数略作调整后,进行 3 次验证试验,验证试验所得单萜含量为 44.06 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,与理论预测值相近,误差较小(表 7)。由此可见,该回归模型所优化的工艺参数具有较高的可行性,可应用于实际萃取。

表 7 最优工艺参数及验证试验结果

Table 7 Optimal process parameters and results of verification tests

	超声功率 <i>A</i> Ultrasonic power/W	超声时间 <i>B</i> Ultrasonic time/min	NaCl 添加量 <i>C</i> Addition of NaCl/g	萃取剂体积 <i>D</i> Extractor volume/mL	单萜含量 Monoterpene content /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
预测值 Predicted value	405.81	15.04	4.91	15.43	46.29
试验值 Experimental value	405	15	4.90	15.5	44.06

3 讨论

定性定量分析依旧是葡萄酒香气研究的热点与难点,尽管现已开发出多种新型香气富集设备和方法,但各有优缺点。LLE 作为一种传统技术在挥发性物质萃取中已有广泛应用。牛云蔚等^[31]比较了 LLE、搅拌棒吸附萃取 HS-SPME3 种香气富集方法对樱桃酒香气成分的影响,结果表明,用 3 种方法萃取后经 GC-MS 检

出的香气物质差异较大,其中 HS-SPME 处理后检出的香气物质总量最高,LLE 处理后检出的香气物质种类最多。Ivanova 等^[32]通过 LLE 结合 GC-MS 技术建立了一种分离和检测葡萄酒中挥发性成分的分析方法,利用该方法绘制的标准曲线 *R*² 在 0.995 1~0.999 2 范围内,且样品检测 RSD<10%,表明该方法重复性较好。Cabredo-Pinillos 等^[33]在进行葡萄酒中挥发性化合物的提取研究中比较己烷、石油醚、戊烷、二氯甲烷和乙醚 5 种有机溶剂的萃取效果,其中二氯甲烷萃取

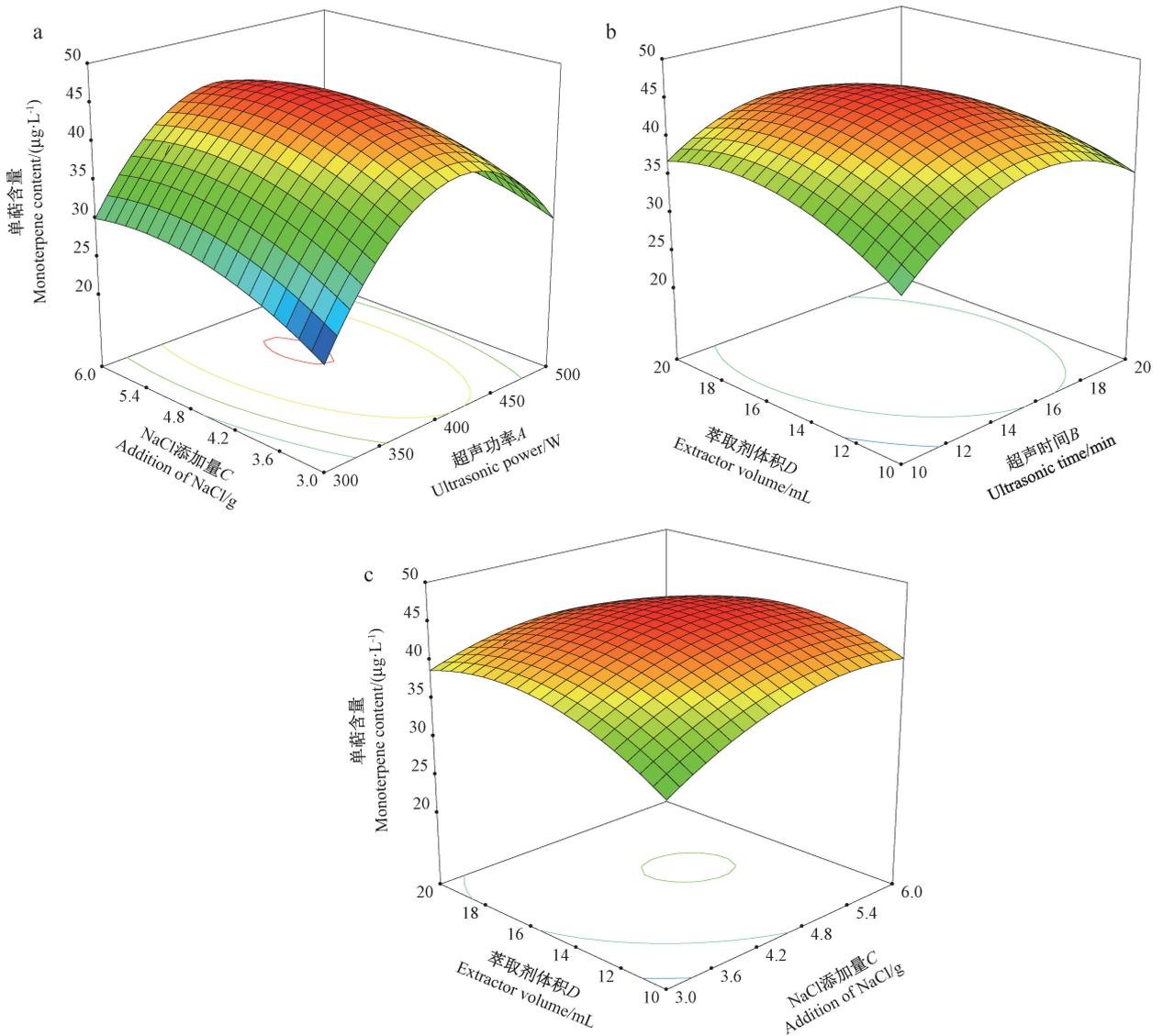


图2 各因素间交互作用对单萜含量影响的响应面

Fig.2 Response surface of interaction between various factors on monoterpene content

效果最佳。此外,不同溶剂在萃取过程中基质效应差异较大,对目标物质分析产生的干扰也明显不同,影响分析结果的准确性^[34]。二氯甲烷与单萜化合物极性相似,萃取过程中产生的基质效应较弱,当选用乙醇、丙酮、石油醚等溶剂萃取时,基质效应较强,导致萃取效果不佳,因此本研究选择二氯甲烷作为单萜化合物的萃取剂。

前人研究表明,葡萄酒中的单萜化合物绝大部分来自葡萄果实中以糖苷态形式存在的单萜前体物质,在发酵过程中经酿酒酵母产生的糖苷酶将其水解并释放^[1,35]。近年来有文献报道,葡萄酒中的单萜化合物并非只来自葡萄原料本身,酵母细胞也可能合成少量单萜化合物。早前有学者指出,仅有几种非酿酒酵母

(*non-Saccharomyces cerevisiae*)可以合成微量单萜化合物,如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、戴尔有孢圆酵母(*Torulaspora delbrueckii*)、柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata*)、美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)等^[9]。原苗苗等^[36]在模拟葡萄汁中比较了3株非酿酒酵母的产香特性,在其发酵液中共检测出7种单萜化合物,表明非酿酒酵母确实能从头合成单萜化合物,且不同非酿酒酵母合成单萜化合物的能力也有差异,其中浅白隐球酵母产单萜能力最强,在其发酵液中共检测到 $0.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单萜化合物;此研究选用的对照菌株为酿酒酵母DV10,在其发酵液中也检测到单萜化合物,且单萜物质的含量高于3种非酿酒酵母,所以酿酒酵母也可以从头合成单萜物质。在本

研究中检测到 $44.06 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单萜化合物,进一步证实酿酒酵母菌株可以从头合成单萜化合物,但酿酒酵母合成单萜化合物的合成途径与内在机制尚不清楚。Carrau 等^[9]在研究酿酒酵母合成单萜化合物时发现,酿酒酵母细胞内存在与甲基巴豆酰-CoA 羧化酶(methyl crotonyl-CoA carboxylase, MCC)具有同源性的几种蛋白序列,该酶是亮氨酸分解代谢以及单萜化合物合成的关键酶,对酿酒酵母蛋白质序列进行 Blast 比对发现,酿酒酵母细胞中确实存在与其他物种 MCC 同源的蛋白序列,因而推测酿酒酵母合成单萜化合物可能与其细胞内亮氨酸分解代谢有关,但该途径尚未得到进一步证实。此外,酿酒酵母还具有代谢补充单萜的能力,如香叶醇可在发酵过程中转化为香茅醇,香茅醇可转化为芳樟醇,少量香叶醇也可异位成芳樟醇^[37-38],还有文献报道,芳樟醇可环化成 α -萜品醇,橙花醇可异构成香叶醇和 α -萜品醇等^[39]。因此本研究在模拟葡萄汁中检出的单萜化合物可能有不同的来源,有些单萜可能是酵母从头合成,有些单萜可能是其他单萜经酿酒酵母生物转化而来,酿酒酵母菌株合成与转化单萜化合物的内在机制尚不清楚,有待后续深入探究。

4 结论

本试验利用气相色谱建立了芳樟醇、 α -萜品醇、香叶醇、香茅醇 4 种单萜化合物的标准曲线,通过单因素和响应面试验对模拟酒中单萜化合物的萃取工艺进行优化,得到的最优萃取工艺参数为:超声功率 405 W,超声时间 15 min,NaCl 添加量 4.9 g,萃取剂体积 15.5 mL,在此条件下结合 GC 检测,建立了一种相对高效且准确性、重复性高的单萜化合物检测方法。利用本试验建立的方法,在模拟葡萄酒中检测到有少量单萜化合物生成,证实了 LA-FR 酿酒酵母菌株可以从头合成单萜化合物,进而为深入研究单萜化合物合成机制奠定了一定的理论基础。

参考文献:

[1] Swiegers J H, Bartowsky E J, Henschke P A, Pretorius I S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2010, 11(2): 139-173

[2] 彭涛涛,刘浩,牟含,胡凯,安然,陶永胜. 媚丽葡萄酒品种香气成分的气味贡献研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(10): 230-239

[3] Schievano E, D' Ambrosio M, Mazzaretto I, Ferrarini R, Magno F, Mammi S. Identification of wine aroma precursors in Moscato

Giallo grape juice: A nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry tandem study [J]. Talanta, 2013, 116(22): 841-851

[4] 林雯雯,楼舒婷,孙玉敬,叶兴乾. 超声波处理对鲜榨橙汁中主要香气成分的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(5): 245-251

[5] Takoi K, Koie K, Itoga Y. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of Hopped beer [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(8): 5050-5058

[6] Fischer M J C, Meyer S, Claudel P, Bergdoll M, Karst F. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(8): 1883-1892

[7] Herrero O, Ramón D, Orejas M. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for de novo production of aromatic monoterpenes in wine[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(2): 78-86

[8] Camesasca L, Minteguiaga M, Fariña L, Salzman V, Aguilar P S, Gaggero C. Overproduction of isoprenoids by *Saccharomyces cerevisiae* in a synthetic grape juice medium in the absence of plant genes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 282(6): 42-48

[9] Carrau F M, Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, Dellacassa E. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts[J]. Fems Microbiology Letters, 2005, 243(1): 107-115

[10] 李艳,周立华. 单萜烯物质检测方法建立及自选酵母 KDLYS9-16 对单萜烯产生的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 124-129

[11] Petropulos V I, Bogeve E, Stafilov T, Stefova M, Siegmund B, Pabi N. Study of the influence of maceration time and oenological practices on the aroma profile of Vranec wines[J]. Food Chemistry, 2014, 165(3): 506-514

[12] Ivanova V, Stafilov T, Vojnoski B, Bíró I, Bufa A, Kilár F. Validation of a method for analysis of aroma compounds in red wine using liquid-liquid extraction and GC-MS [J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(6): 1427-1434

[13] Metafa, Maria. Comparison of solid-phase extraction sorbents for the fractionation and; determination of important free and glycosidically-bound varietal aroma; compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Central European Journal of Chemistry, 2013, 11(2): 228-247

[14] Andujar-Ortiz I, Moreno-Arribas M V, Martín-Álvarez P J, Pozo-Bayón M A. Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography-mass spectrometry analysis of wine volatile compound [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(43): 7351-7357

[15] Ortega-Heras M, González-Sanjosé M L, Beltrán S. Aroma composition of wine studied by different extraction methods [J]. Liquor Making, 2007, 458(1): 85-93

[16] 湛含辉,曹江,龚兴艳,罗彦伟. 超声波空化效应强化吸附传质的过程研究 [J]. 湖南科技大学学报(自然科学版), 2008, 23(4): 85-88

[17] Zhu W L, Xue X P, Zhang Z J. Ultrasonic-assisted extraction

- structure and antitumor activity of polysaccharide from *Polygonum multiflorum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91(10): 132-142
- [18] 罗静, 方金豹, 谢汉忠, 黄玉南, 王超, 乔成奎. 超声波辅助萃取桃果实挥发性物质的效果[J]. 果树学报, 2014, 31(5): 828-835
- [19] Porto C D, Decorti D, Natolino A. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from industrial *Cannabis sativa* L. inflorescences [J]. International Journal of Applied Research in Natural Products, 2014, 7(1): 8-14
- [20] Li Z, Pan Q H, Cui X Y, Duan C Q. Optimization on anthocyanins extraction from wine grape skins using orthogonal test design [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(4): 1047-1053
- [21] 刘琦, 祝霞, 赵丹丹, 王璐璐, 杨学山. 葡萄酒泥酵母海藻糖提取工艺优化及对 3 株非酿酒酵母乙醇耐受性的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 4(53): 152-158
- [22] 王媛, 祝霞, 杨学山, 黎洁, 任超, 秦丽, 韩舜愈. 混菌发酵对美乐低醇桃红葡萄酒香气的影响[J]. 核农学报, 2018, 32(11): 2195-2207
- [23] 黄湛媛, 李丽, 熊宇飞, 方旭波, 陈小娥, 余辉. 超声辅助竹节虾头酶解及抗氧化肽分离研 [J]. 核农学报, 2017, 31(8): 1556-1566
- [24] Afshari K, Samavati V, Shahidi S A. Ultrasonic-assisted extraction and *in-vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74(3): 558-567
- [25] 郭亚芸, 丁燕, 史红梅, 韩晓梅, 王哲. 分散液液微萃取与 GC-MS 联用分析葡萄酒中苯醚甲环唑残留[J]. 核农学报, 2017, 31(11): 2194-2199
- [26] Campone L, Piccinelli A L, Rastrelli L. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the identification and the accurate quantification by isotope dilution assay of ochratoxin A in wine samples [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399(3): 1279-1286
- [27] 黎国富, 杨劲, 赵浩如. 盐析辅助均相液液萃取法在体内药物分析中的应用进展[J]. 药学进展, 2010, 34(7): 313-318
- [28] Liu G Z, Zhou N Y, Zhang M S, Li S J, Tian Q Q, Chen J T, Chen B, Wu Y N, Yao S Z. Hydrophobic solvent induced phase transition extraction to extract drugs from plasma for high performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(3): 243-249
- [29] 张文婷, 孔秀林, 孙健, 徐飞, 朱红, 岳瑞雪, 张毅, 钮福祥. 响应面法优化甘薯叶片多酚提取工艺[J]. 核农学报, 2018, 32(12): 2397-2450
- [30] 杨开, 徐梦婷, 王玗紫, 董晓莉, 孙培龙. 牛樟芝总三萜超声提取及体外活性研究[J]. 核农学报, 2018, 32(1): 112-122
- [31] 牛云蔚, 周璇, 肖作兵, 陈合兴. 萃取方法对樱桃酒香气成分的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(12): 247-254
- [32] Ivanova V, Stafilov T, Vojnoski B, Bíró I, Bufa A, Kílár F. Validation of a method for analysis of aroma compounds in red wine using liquid-liquid extraction and GC-MS [J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(6): 1427-1434
- [33] Cabredo-Pinillos S, Cedrón-Fernández T, González-Briongos M, Puente-Pascual L, Sáenz-Barrio C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples: Optimisation of the method [J]. Talanta, 2006, 69(5): 1123-1129
- [34] 刘绍文. 葡萄及相关基质中农药残留分析方法建立与应用研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2016: 13-16
- [35] 李蔚. 外源茉莉酸甲酯对‘蛇龙珠’酿酒葡萄单萜化合物和 β -葡萄糖苷酶的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017: 1-7
- [36] 原苗苗, 赵新节, 姜凯凯, 孙玉霞, 王世平. 3 株非酿酒酵母在模拟葡萄汁中的生长特性与发酵香气[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 111-123
- [37] Gamero A, Manzanares P, Querol A, Belloch C. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 92-97
- [38] GarcíaMoruno E, Ribaldone M, Stefano R D, Conterno L, Gandini A. Study of five strains of *Saccharomyces cerevisiae* with regard to their metabolism towards geraniol [J]. Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin, 2002, 36(4): 221
- [39] King A, Richard D J. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*[J]. Yeast, 2010, 16(6): 499-506

Optimization of Ultrasonic-assisted Liquid-liquid Extraction Combined With GC for the Detection of Monoterpene Compounds

LIU Qi^{1,3} ZHU Xia^{2,3} ZHAO Dandan^{2,3} WANG Lulu^{2,3}

HAN Shunyu^{2,3} YANG Xueshan^{2,3,*}

(¹ College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070;

² College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070;

³ Gansu Key Lab of Viticulture and Enology, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: In order to optimize the technological conditions of ultrasonic-assisted liquid-liquid extraction combined with gas chromatography (GC) for the detection of monoterpenes compounds synthesized by *Saccharomyces cerevisiae* strains, the effects of ultrasonic power, ultrasonic time, NaCl addition and extractor volume on the extraction effect were investigated with simulated grape juice as raw material. The extraction process of monoterpenes was optimized by response surface methodology based on single factor experiments. The results showed that the optimum extraction parameters were ultrasonic power 405 W, ultrasonic time 15 min, NaCl addition 4.9 g and extractor volume 15.5 mL. Under this extraction condition, linalool, α -terpineol, citronellol and geraniol could be detected in simulated wine by GC. The total content of these monoterpenes was up to $46.29 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, which further confirmed that *Saccharomyces cerevisiae* could synthesize monoterpenes. The results of this study gives theoretical supports for further exploring the mechanism of monoterpenes biosynthesis and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* strains.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, monoterpene compound, liquid-liquid extraction, ultrasonic wave, response surface