园　艺　学　报　2011，38（7）：1397－1406　　　　http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica　　　　E-mail: yuanyixuebao@126.com

葡萄与葡萄酒单萜化合物的研究进展

涂　崔，潘秋红，朱保庆，吴玉文，王志群，段长青*

（中国农业大学食品科学与营养工程学院，葡萄与葡萄酒研究中心，北京 100083）

摘　要：单萜化合物是葡萄与葡萄酒中一类典型香气成分，以游离态和结合态形式存在。重点阐述了葡萄果实单萜化合物的生物合成途径及其关键酶——单萜合成酶的研究进展，葡萄果实与葡萄酒中的单萜化合物及其影响因素，糖苷结合态单萜化合物的结构、含量及其分析方法，并对单萜化合物的研究前景进行了展望。

关键词：葡萄；葡萄酒；单萜化合物；糖苷结合态

中图分类号：S 663.1　　　**文献标识码**：A　　　**文章编号**：0513-353X（2011）07-1397-10

Progress in Study of Monoterpene Compounds in Grape and Wine

TU Cui，PAN Qiu-hong，ZHU Bao-qing，WU Yu-wen，WANG Zhi-qun，and DUAN Chang-qing*

（*Center for Viticulture and Enology*，*College of Food Science and Nutritional Engineering*，*China Agricultural University*，*Beijing* 100083，*China*）

Abstract：Monoterpene compounds are a kind of typical aroma components in grapes and wine，with both free and bound forms. This review focuses on progress of monoterpene biosynthesis pathway and the key enzyme-monoterpene synthase in grapes，classification of monoterpene compounds as well as the structure，content，research methodology of glycosidically conjugated monoterpenes in grapes and wine. Also，the prospect of monoterpenes research is suggested.

Key words：grapes；wine；monoterpene compounds；glycosidically conjugated aroma compounds

萜类（terpenes，terpenoids）化合物是植物次生代谢产物最大的一个家族，在自然界中广泛分布，以异戊二烯（isoprene，C_5）为基本单元，也称为类异戊二烯（isoprenoids）化合物（Glasby，1982）。葡萄和葡萄酒香气中有 1 300 多种挥发性化合物，萜类化合物因具浓郁香味，感官阈值低，是麝香型葡萄及其葡萄酒的典型香气成分。葡萄果实萜类化合物中含量最丰富的是单萜（monoterpene，$2 \times C_5$），主要存在于果皮中（Wilson et al.，1986），常被用作葡萄果实及葡萄酒品种香气鉴别的特征化合物。根据单萜化合物化学结构的不同，可以大体分为 3 类：（1）游离态；（2）多羟化体；（3）糖苷结合态（Maicas & Mateo，2005），其含量与组成受葡萄品种、果实成熟度、种植环境和栽培模式的影响（Cabrita et al.，2006）。根据果实中游离态单萜物质的含量，欧亚种酿酒葡萄品种被分为麝香型（游离态单萜化合物总量高达 6 mg · L^{-1}）、非麝香芳香型（游离态单萜化合物总量达 1 ~ 4 mg · L^{-1}）和非芳香型（游离态单萜化合物总量低于 1 mg · L^{-1}）（Ebeler & Thorngate，

收稿日期：2010－04－09；**修回日期**：2011－06－08

基金项目：国家农业产业技术体系专项（nycytx-30）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：chqduan@yahoo.com.cn）

2009）。对麝香型酿酒葡萄来说，随着葡萄果实成熟，游离态和结合态单萜总体含量逐渐上升（Wilson et al.，1984，1986）。产区因素对葡萄果实单萜化合物的种类影响较小，同一品种不同产区的葡萄，单萜化合物的组成非常相似，但含量差别大，较高的温度、较充足的光照以及适度缺水等栽培条件有利于葡萄果实中单萜化合物的积累（Marais et al.，1999；Koundouras et al.，2006）。葡萄酒中的单萜化合物直接来源于葡萄果实，主要以无气味的糖苷态形式存在。在葡萄酒酿造及陈酿过程中，葡萄果实中积累的大量糖苷结合态单萜化合物通过糖苷酶或酸的作用裂解糖苷键可以产生游离态的单萜类芳香成分，从而增强或改善葡萄酒的风味（Mateo & Jiménez，2000）。可见，解析葡萄果实发育过程中单萜类化合物的合成与调控，探索单萜化合物在葡萄果实发育和葡萄酒酿造过程中的变化规律，对葡萄及其产品的风味研究有重要意义。本文旨在分析目前葡萄与葡萄酒中单萜化合物的相关研究成果，阐述葡萄与葡萄酒中各类单萜化合物及其影响因素，以期为进一步深入研究和葡萄酒生产提供参考。

1　葡萄果实单萜化合物的生物合成途径

植物萜类化合物通过两个途径合成，（1）位于质体中的脱氧－木酮糖－5－磷酸/甲基磷酸赤藓糖途径（1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/methyl-erythritol-4-phosphate pathway，DXP/MEP）（Rohmer et al.，1993）；（2）位于细胞质中的甲羟戊酸（mevalonate pathway，MVA）途径（Chappell，1995）。

葡萄单萜化合物通过质体中的 DXP/MEP 途径在果实的中果皮和外果皮合成。由丙酮酸（pyruvic acid）和 3－磷酸甘油醛（3-phosphate glyceraldehyde）开始，在 1－脱氧－木酮糖－5－磷酸合酶（1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase，DXS）的作用下转化成 1－脱氧－木酮糖－5－磷酸（1-deoxy-D-xyulose-5-phosphate，DXP），之后 1－脱氧－木酮糖－5－磷酸还原异构酶（1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase，DXR）催化将 DXP 转化成 2－C－甲基－赤藓糖醇－4－磷酸（2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate，MEP）。MEP 经 4－二磷酸胞苷－2－C－甲基－赤藓糖醇合酶（4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase，CMS）环化作用下生成 4－二磷酸胞苷－2－C－甲基－赤藓糖醇（4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol，CDP-ME），之后在 4－二磷酸胞苷－2－C－甲基赤藓糖激酶（4-diphosphocytidyl-2-C-metllyl-D-erythritol kinase，CMK）的作用下，生成 4－二磷酸胞苷－2－C－甲基－赤藓糖醇－2－磷酸（4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphate，CDP-ME2P），再经过 2－C－甲基赤藓糖醇－2,4－环二磷酸合酶（2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase，MCS）催化，生成 2－C－甲基－D－赤藓糖醇－2,4－环二磷酸（2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate，ME-2,4CPP），进一步在 1－羟基－2－甲基－2－（*E*）－丁烯基－4－二磷酸合酶[1-hydroxy-2-methyl-2-（*E*）-butenyl-4-diphosphate synthase，HDS]作用下，形成 1－羟基－2－甲基－2－（*E*）－丁烯－4－二磷酸[1-hydroxy-2-methyl-2-（*E*）-butenyl-4-diphosphate，HMBPP]，并在异戊烯基单磷酸激酶（isopentenyl monophosphate kinase，IPK）的作用下催化形成中间体异戊烯基焦磷酸（isopentenyl pyrophosphate，IPP，C_5）及其双键异构体二甲基烯丙基焦磷酸（dimethylallyl pyrophosphate，DMAPP，C_5），最后各 1 分子的两同分异构中间体IPP和DMAPP在香叶基二磷酸合酶（geranyl diphosphate synthase，GPPS）的作用下经头尾缩合生成香叶基二磷酸 （geranyldiphosphate，GPP）（Withers & Keasling，2007）。GPP是所有单萜化合物生物合成的底物，在单萜合成酶（monoterpene synthase，mono-TPS）作用下催化合成一系列单萜化合物。

单萜合成酶（monoterpene synthase）是葡萄果实单萜化合物生物合成途径的关键酶，具有多产物生成的特点，以GPP为底物，可催化产生一系列链状、单环和二环的烯类、醇类和二磷酸脂的产

物（Croteau et al.，1980）。在单萜合成酶催化合成各种单萜化合物的过程中，底物GPP会形成3种不同的过渡态阳离子，不同结构的单萜产物其合成机制不尽相同（Croteau，1986，1987；Degenhardt et al.，2009）：其中，GPP直接离子化形成的香叶基阳离子（geranyl cation），以及香叶基阳离子进一步异构化形成的里那基阳离子（linalyl cation），均可作为单萜合成酶的直接底物被催化合成一系列链状单萜化合物（acyclic monoterpenes）（图1，A）；而由GPP合成环状单萜（图1，B），则必须先经过一系列化学反应形成含一个六碳环的α－萜品基阳离子（α-terpinyl cation），后者才能够在单萜合成酶作用下生成各式各样的环状单萜化合物（cyclic monoterpenes）（Croteau et al.，1980；Croteau，1986，1987）。随着大量有益单萜化合物的发现，单萜合成酶已成为单萜化合物生物合成和调控研究的焦点。Bohlmann等（1998）依据蛋白序列的相似性将编码萜类合成酶（terpene synthase，TPS）的基因分为6个亚家族，分别为*Tps-a*、*Tps-b*、*Tps-c*、*Tps-d*、*Tps-e*、*Tps-f*。其中，被子植物和裸子植物中编码单萜合成酶的基因分别被划分为*Tps-b*和*Tps-d*。之后，Dudareva等（2003）发现一个新的TPS亚家族，并将之定义为*Tps-g*，且研究发现，*Tps-g*基因所编码的酶，有的能利用GPP合成单萜，有的能利用法呢基二磷酸（farnesyl diphoshate，FPP）合成倍半萜。与*Tps-b*和*Tps-d*不同的是，这个新的*Tps-g*亚家族缺少后两个亚家族的特征结构域RRx8W。

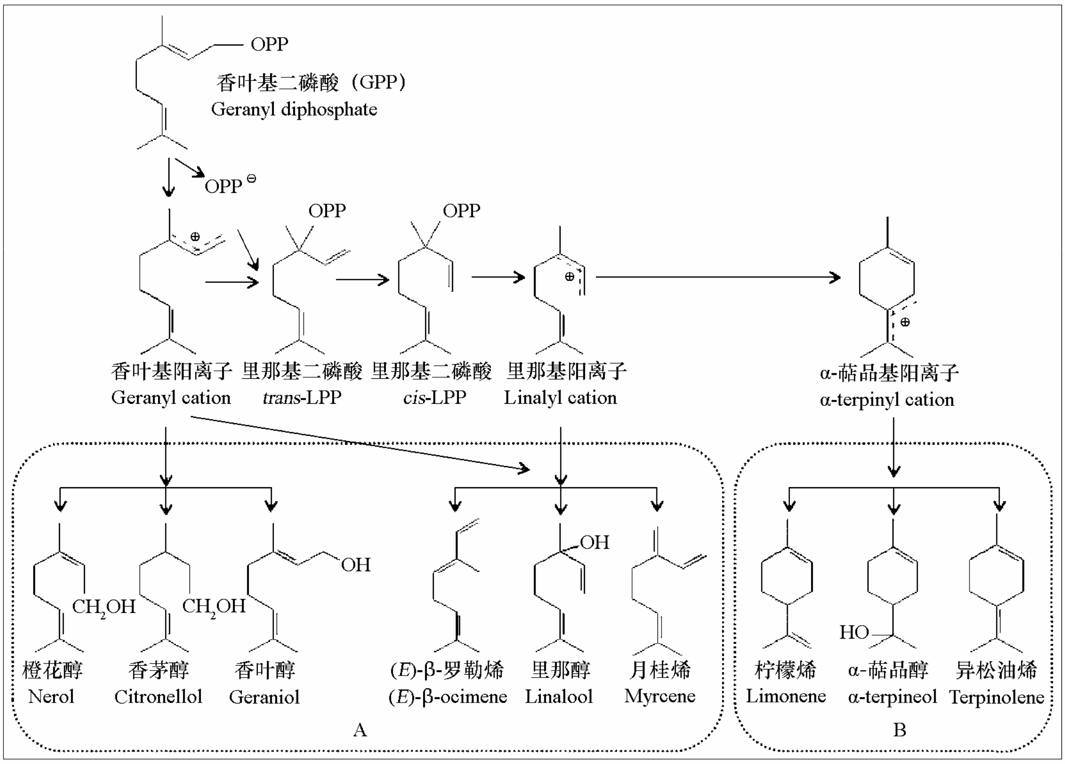

图 1　单萜合成酶催化香叶基二磷酸合成单萜化合物的反应机制

Fig. 1　The reaction mechanisms of all monoterpene synthases start with the ionization of the geranyl diphosphate（GPP）substrate

在葡萄果实中，目前只有一条单萜合成酶基因——（－）－*α*－萜品醇[（-）-*α*-terpineol]合成酶基因功能被验证，由 Martin 和 Bohlmann（2004）从酿酒葡萄品种‘琼瑶浆’（Gewürztraminer）中分离得到。在验证该单萜合成酶基因功能的过程中，克隆得到两条非常相似的基因编码序列，转录翻译得到的氨基酸序列只有两个氨基酸不同，推断很可能是同一个基因。且经产物检验发现，此

单萜合成酶可催化 GPP 产生了 14 种单萜，包括 3 种主要产物：（－）－α－萜品醇[（-）-α-terpineol]（50.1%），1,8－桉油精（1,8-cineol）（11.8%），（+）－β－蒎烯[（+）-β-pinene]（8.5%）和 11 种微量产物：（－）－α－侧柏烯[（-）-α-thujene]，（－）－α－蒎烯[（-）-α-pinene]，β－月桂烯（β-myrcene），桧烯（sabinene），（－）－β－蒎烯[（-）-β-pinene]，（－）－柠檬烯[（-）-limonene]，萜品烯（terpinolene），（－）－反式桧烯水合物[（-）-*trans*-sabinene hydrate]，（+）－顺式桧烯水合物[（+）-*cis*-sabinene hydrate]，（－）－顺式桧烯水合物[（-）-*cis*-sabinene hydrate]，以及（+）－α－萜品醇[（+）-α-terpineol]（Martin & Bohlmann，2004）。Lücker 等（2004）用 Northern 技术检测了此基因在酿酒葡萄品种琼瑶浆果实发育期的表达，研究显示该基因在‘琼瑶浆’葡萄果实的整个发育过程中没有信号检出。目前，本实验室已克隆到一条葡萄单萜合成酶基因，并经体外酶活反应验证发现，该酶能催化 GPP 和 FPP 分别生成里那醇（linalool）和（*E*）－橙花叔醇[（*E*）-nerolidol]。此外，葡萄果实还有两条被验证功能的基因编码倍半萜合成酶，分别是（+）－valencene 合成酶和（－）－germacrene D 合成酶（Lücker et al.，2004）。

葡萄果实单萜化合物的合成代谢具有如下特点：(1) 同工酶很多，家族庞大；(2) 底物和产物都具有多样性；(3) 产物含量低，定量较为困难。迄今，关于葡萄果实中单萜化合物的生物合成及其调控网络仍有许多未解的领域，有待于深入研究。

2　葡萄果实中单萜化合物的种类

2.1　游离态

对葡萄果实品种香贡献最大、最常见的单萜化合物主要以游离态形式存在，包括单萜烯及其单氧化物（主要为单萜醇、单萜醚和单萜醛）。从结构来看，可分为链状单萜和环状单萜两大类。葡萄果实中常见的链状单萜主要有里那醇（linalool）、香叶醇（geraniol）、橙花醇（nerol）、β－香茅醇（β-citronellol）和 β－月桂烯（β-myrcene）；常见的环状单萜包括单环和二环的烯类、醇类以及一些环醚氧化物，主要有 β－柠檬烯（β-limonene）、α－蒎烯（α-pinene）、α－萜品醇（α-terpineol）、吡喃型氧化里那醇（pyran linalool oxide）、呋喃型氧化里那醇（furan linalool oxide）、橙花醚（nerol oxide）及氧化玫瑰（rose oxide）等（Degenhardt et al.，2009）。游离态单萜化合物能直接刺激人的嗅觉细胞，多为葡萄浆果和葡萄酒带来花香和果香。如香叶醇（geraniol）具有淡甜的玫瑰花香气；橙花醇（nerol）具有青甜的橙花和玫瑰花香气；α－萜品醇（α-terpineol）具有带甜的浓青香和木青番；柠檬烯（limonene）具有令人愉快的柠檬香气。其中里那醇（linalool）气味最重，具有玫瑰木的气味，存在于所有葡萄品种中（Ribereau-Gayon et al.，2000；Jackson，2002）。

2.2　多羟化体

多羟化体是单萜化合物的多氧化形式，在葡萄果实中存在但种类很少。虽然多羟化体单萜化合物自身不会为葡萄果实品种香提供直接贡献，但因其结构不稳定，可脱羟基还原为具有挥发性的游离态形式而影响果实香气，例如，diendiol（3,7-dimethylocta-1,5-diene-3,7-diol）可转化成脱氢芳樟醇（hotrienol）和橙花醚（nerol oxide）（Williams et al.，1980；Strauss et al.，1988）。

2.3　糖苷结合态

人们对糖苷类风味化学的研究始于 1969 年，Francis 和 Allcock（1969）首次在玫瑰中证实了糖苷类风味前体物的存在。随后大量研究表明，植物材料中的风味物质主要以非挥发性的、无气味的、键合糖苷的形式贮存和转运（Berger，2007）。从 20 世纪 80 年代早期，大量有关葡萄果实中单萜糖

苷结合态风味物质的报道开始出现，糖苷结合态也被认为是葡萄果实中单萜的贮存和运输的主要形式（Williams et al.，1982a；Dimitriadis & Williams，1984；Gunata et al.，1985）。Stahl-Bishop 等（1993）阐述了糖苷类单萜物质的分布与结构，介绍了来源于不同植物的 22 种糖苷类单萜，其配基主要是香叶醇（geraniol），橙花醇（nerol），里那醇（1inalool），α－萜品醇（α-terpineol），同时也包括一些不常见的单萜类物质结构。所有的葡萄都含有相似的糖苷，但以麝香型品种的含量最高。通常结合态单萜物质比游离态单萜物质更普遍，所以结合态单萜物质构成了葡萄中重要的潜在的芳香成分（Spagna et al.，1998）。一般而言，以结合态存在的单萜的含量是游离态的 2～8 倍（Berger，2007）。

糖苷结合态单萜化合物的结构包括糖配体和配基，其糖配体包括 β－D－葡萄糖（β-D-glucose）、α－L－阿拉伯糖（α-L-arabinose）、α－L－鼠李糖（α-L-rhamnose）、β－D－洋芹糖（β-D-apiose）等。其中，葡萄糖苷常分为双糖苷及单糖苷，极少见三糖苷，且与其他植物相比，葡萄中存在的双糖苷比单糖苷更多（Maicas & Mateo，2005）。配基主要为萜醇（terpenols）及相应的氧化还原产物，也包括萜二醇（terpenic diols）和萜三醇（terpenic triols）和里那醇氧化物等环氧化物（Aryan et al.，1987；Gunata et al.，1990；Gunata et al.，1998；Fernandez et al.，2003）。糖苷类单萜物质因葡萄品种而异（Mateo & Jiménez，2000）。

2.4　葡萄果实发育过程中单萜化合物的变化

对麝香型酿酒葡萄来说，葡萄果实成熟过程中游离态和糖苷结合态单萜香气成分的积累是从转色期开始的，并且随着葡萄果实的成熟总体含量逐渐上升，直到葡萄成熟（Wilson et al.，1984，1986；Ebeler & Thorngate，2009）。本实验室的研究表明，‘琼瑶浆’（Gewürztraminer）葡萄中游离态单萜化合物与果实糖积累表现相关，在糖度达到最高时它们的含量也缓慢升到最高，之后迅速下降（张明霞，2007）。Fenoll 等（2009）对‘玫瑰香’（Muscat Hamburg）葡萄果实发育过程中游离和糖苷结合态单萜化合物种类和含量的变化进行了研究，发现玫瑰香葡萄发育过程中，除香叶醇（geraniol）外，所有游离态单萜的含量都呈上升趋势；除香叶醇（geraniol）、α－萜品醇（α-terpineol）与柠檬醛（citral）在转色期略有下降外，所有糖苷结合态单萜的含量都逐渐上升；至果实成熟阶段，除里那醇（1inalool）、二烯二醇（diendiolⅠ和 diendiolⅡ）之外，其他所有糖苷结合态单萜含量远高于游离态含量。特别指出的是，柠檬烯（limonene）只以游离态的形式存在，未检测到结合态。通过计算香气贡献值，里那醇对整个玫瑰香葡萄果实香气的贡献最大，此外，对葡萄果实品种香气具有贡献的单萜还有玫瑰醚（rose oxide）、柠檬醛（citral）、香叶醇（geraniol）、橙花醇（nerol）及香茅醇（citronellol）（Fenoll et al.，2009）。而关于非芳香型葡萄品种如‘赤霞珠’（Cabernet Sauvignon）的最新研究发现，游离态单萜的合成量自转色期开始下降，并且转色之后再没有新的单萜合成（Kalua & Boss，2009，2010）。

3　葡萄酒中的单萜化合物

葡萄酒中的单萜化合物直接来源于葡萄果实，不受破碎、浸提或发酵的影响，尽管微生物也可合成单萜化合物，但目前仍无酿酒酵母产生此类化合物的研究报道（Mateo & Jiménez，2000）。因此，单萜的种类与含量可用来确定单品种葡萄酒的葡萄品种来源。本实验室通过对比我国主要的酿酒葡萄品种“三珠”——‘赤霞珠’（Cabernet Sauvignon）、‘品丽珠’（Cabernet Franc）和‘蛇龙珠’（Cabernet Gernischet）酿造的单品种新酒的香气成分发现，单萜化合物可作为鉴别这 3 个单品种酒的特征香气成分。其中，橙花醇（nerol）、β－香茅醇（β-citronellol）和 4－松油烯醇（4-terpinenol）

只在蛇龙珠酒中被检出，而 α－萜品烯（α-terpinene）只出现在赤霞珠酒和品丽珠酒中（Zhang et al.，2007）。

葡萄中的单萜化合物主要以无气味的糖苷前体物形式存在。在酒的酿造及陈酿过程中，葡萄果实中积累的大量糖苷结合态单萜化合物通过酶或酸的作用裂解糖苷键可以产生游离态的单萜类芳香成分，从而增强或改善葡萄酒的风味。葡萄果实自身含有糖苷酶，但这些酶的最适活性在 pH 5.0，而葡萄醪一般为 pH 3.0 ~ 3.5，所以这些内源酶对葡萄醪中糖苷态的香气前体物质的作用被限制（Mateo & Jiménez，2000；张明霞 等，2008；Zhang et al.，2011）。此外，酿酒酵母也可产生糖苷酶，但在甜葡萄酒酿造应用中这些酶的活性会受到葡萄糖底物的抑制，仅在干型葡萄酒中才能起到增强单萜物质含量的效用。故为了加强葡萄酒的品种香气，常常添加外源糖苷酶或选择增香酵母促进香气浓郁的萜烯化合物的释放（Gunata et al.，1990）。近年来，糖苷酶活力较高的酿酒酵母如 VL1、Q23 与 EC1118 等在葡萄酒酿造过程中的应用以及新的耐高糖和酒精的糖苷酶的开发成为研究的热点（Zoecklen et al.，1997；Yanai & Sato，1999；Gil et al.，2005）。本实验室通过比较糖苷酶 Dp368 和 AR2000 对白葡萄汁、甜白葡萄酒和干白葡萄酒香气的影响得出：两种糖苷酶对葡萄汁中单萜类物质作用最为明显，Dp368 处理后的小白玫瑰葡萄汁中 β－柠檬烯（β-limonene）、里那醇（linalool）、香叶醇（geraniol）和脱氢芳樟醇（hotrienol）的香气值都大于 1。AR2000 处理的琼瑶浆甜白葡萄酒中乙酸橙花酯（neryl acetate）和乙酸香叶酯（geranyl acetate）的含量显著增加（张明霞，2007）。

虽然糖苷酶制剂的使用能增加香气浓郁程度，但针对不同葡萄品种，其香气增加的成分和强度不同，需全面了解葡萄糖苷类风味物质的配基的种类和含量，才能挥发 β－D－葡萄糖苷酶的最大作用。Spagna 等（2002）研究表明，游离态或固定态的酶制剂能够促进葡萄酒中挥发性物质显著增加（约 4 倍），尤其对于 Moscato 葡萄酒，其萜醇（里那醇、香茅醇、橙花醇、香叶醇）含量显著增加。Palomo 等（2005）以多种葡萄品种（Airen、Macabeo、Albillo、Chardonnay）为试材，使用含 β－D－葡萄糖苷酶的酶制剂水解风味前体物，以 GC 手段来分析香气变化。研究表明品种香气特征高于酶处理对其产生的影响；酶处理后的葡萄酒与对照相比，其感官特征不同，具有较浓郁的花香、果香，还有一些甜型、成熟果香。

4 糖苷结合态单萜化合物的提取与分析

4.1 糖苷结合态单萜化合物的提取

糖苷类风味物质分析步骤包括分离、水解、测定等（图 2）（Maicas & Mateo，2005；Ibarz et al.，2006）。

首先需对葡萄与葡萄酒中糖苷结合态单萜进行吸附、分离，吸附剂常用C_{18}反相吸附剂、Amberlite XAD-2 树脂、反相硅胶等，洗脱剂常用乙醇、戊烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇等。

Ibarz等（2006）对比了不同固相萃取吸附剂对糖苷类风味前体物的吸附能力，LiChrolut EN聚合树脂的提取效率最高，是Amberlite XAD-2 树脂和C_{18}吸附剂的 2 ~ 6 倍；而对极性较低的化合物而言，C_{18}的吸附剂的选择性萃取最佳。

此外，Bureau 等（1996）年提出了通过微波提取糖苷结合态单萜化合物的方法，虽然与固相萃取法相比，微波提取法需要对提取物进一步纯化，然而却具有简单、快速及保证材料完整性的优势。

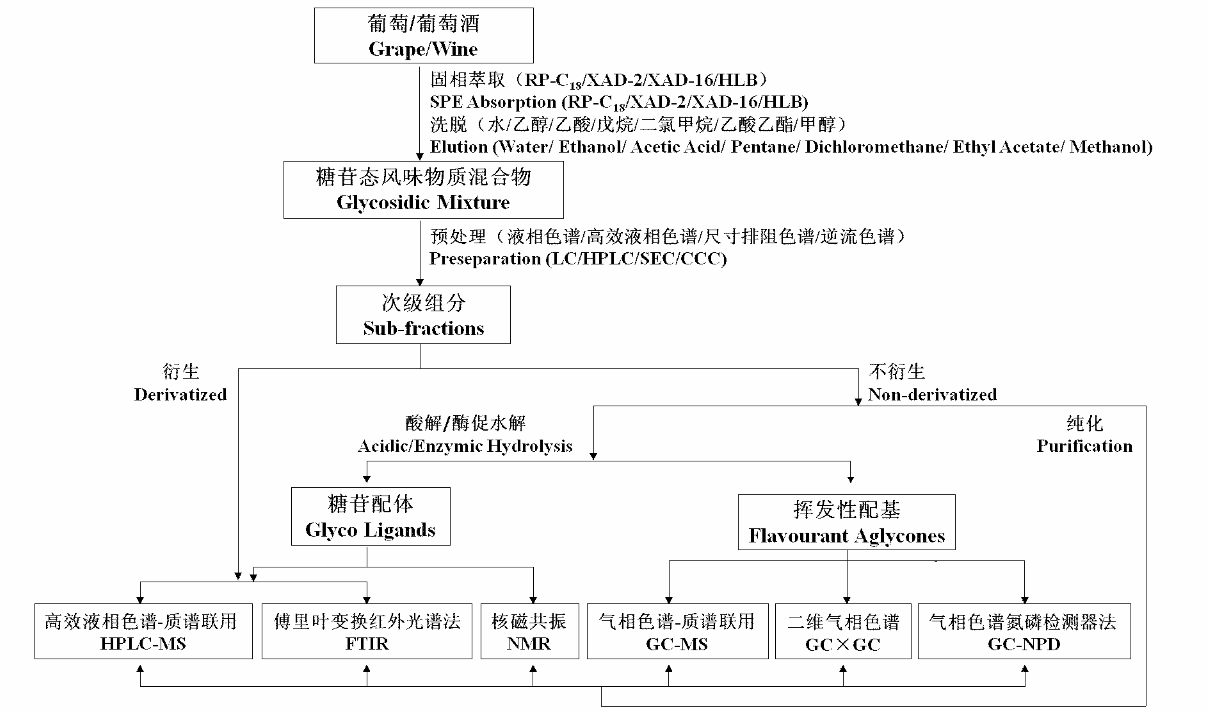

图 2　糖苷类风味物质的提取与分析

Fig. 2　Isolation and analysis of glycosidically conjugated aroma compounds

4.2　糖苷结合态单萜化合物的水解

糖苷结合态单萜化合物通过糖苷酶或酸的作用裂解糖苷键释放并且发生分子间互相转化，通过对所获得糖苷风味前体物混合物进行水解可获得相应的糖配体及配基，对水解后糖配体的测定可分析糖苷结合态单萜化合物的总含量，对配基的研究可了解其种类和含量等。水解方式分为酸解和酶促水解（Ibarz et al.，2006）。其中，酸解简单易行，但对产物影响大，可能导致单萜化合物发生重排，若水解温度过高，甚至会产生不良风味；而酶促水解所需条件温和，产物更接近实际。其中对单糖苷类单萜化合物而言，需要相应的 β – D – 葡萄糖苷酶作用，移除相应的糖配体，则可形成具挥发性物质成分。对双糖苷类单萜化合物而言，其酶促水解需经历两步（Palmeri & Spagna，2007）。首先在相应酶 α – L – 阿拉伯糖苷酶（α-L-arabinosidase）、α – L – 鼠李糖苷酶（α-L-rhamnosidase）或 β – D – 洋芹糖苷酶（β-D-apiosidase）的作用下，形成 β – D – 葡萄糖单糖苷；随后在 β – D 葡萄糖单糖苷酶（β-D-glucosidase）作用下，移除相应的糖配体（β – D – 葡萄糖），将其相应的糖苷配基释放出来。可见，在整个酶促水解过程中，其关键酶是 β – D – 葡萄糖苷酶。

4.3　糖苷结合态单萜化合物的分析

Williams等（1982a，1982b，1995）和Wilson等（1984，1986）对葡萄及葡萄酒中糖苷类风味物质进行了大量研究，但主要集中于糖苷类物质总量的研究。Villena等（2007）在对Williams法改进的基础上利用C_{18}固相萃取小柱对糖苷类风味物质吸附分离，并利用酸性条件下水解方式快速测定了葡萄或葡萄酒中风味前体物的总量，而对其配基部分的组成及其含量涉及较少。Lopez等（2004）利用弱酸水解Tempranillo和Grenach葡萄中葡萄糖苷，再结合GC初步研究了糖苷类风味物质的种类和含量。

若对某物质结构进行鉴定，尚需进一步分离纯化。常用技术包括液相色谱（LC）、高效液相色谱（HPLC），尺寸排阻色谱（SEC，Size Exclusive Chromatography），逆流色谱（CCC，Countercurrent

Chromatography）等。获得物质单体后，则可对其结构进行分析，常用技术包括质谱（MS）、傅里叶变换红外光谱法（FTIR，Fourier Transform Infrared Spectroscopy）、核磁共振（NMR，Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy）等（Maicas & Mateo，2005；Ibarz et al.，2006；康文怀 等，2009）。

5 展望

单萜化合物是麝香型葡萄及其酒的典型香气化合物，它的组成和来源非常复杂，主要以游离态和无气味的糖苷结合态形式存在于葡萄与葡萄酒中。现代分析技术的提高，为葡萄与葡萄酒中单萜香气成分的种类、含量及其结构鉴定的深入研究提供了有效手段。深入调查我国主栽葡萄品种如赤霞珠、蛇龙珠、龙眼等的游离态和结合态单萜香气成分，进一步考察不同栽培措施、酿造工艺、陈酿方式对游离态和结合态单萜香气成分的影响，将为全面评价葡萄果实与葡萄酒的香气潜质提供理论指导。此外，葡萄果实单萜代谢途径及其代谢调控网络的研究仍是一项极具挑战性的工作。随着功能基因组学的发展，转录组学和代谢组学方法的结合应用将成为寻找单萜代谢途径相关基因的有效途径。目前的研究热点集中在通过基因重组技术优化单萜合成代谢途径中的关键反应步骤以及原核表达获取大量酶和特定的单萜产物上，后续研究可以从限速酶、转录因子、转运蛋白以及代谢途径的限制作用等方面进一步阐明该代谢途径的分子调控机制。

References

Aryan A P，Wilson B，Strauss C R，Williams P J. 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and comparison of their *β*-glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology. American Journal of Enology and Viticulture，38：182–188.

Berger R G. 2007. Flavours and Fragrances. Verlag Berlin Heidelberg：Springer.

Bohlmann J，Meyer-Gauen G，Croteau R. 1998. Plant terpenoid synthases：Molecular biology and phylogenetic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences，USA，95：4126–4133.

Bureau S，Razungles A，Baumes R，Bayonove C. 1996. Glycosylated flavor precursor extraction by microwaves from grape juice and grapes. Journal of Food Science，61：557–561.

Cabrita M J，Freitas A M C，Laureano O，Di Stefano R. 2006. Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars. Journal of the Science of Food and Agriculture，86：922–931.

Chappell J. 1995. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. Plant Physiol，107：1–6.

Croteau R. 1986. Evidence for the ionization steps in monoterpene cyclization reactions using 2-Fluorogeranyl and 2-Fluorolinalyl pyrophosphates as substrates. Archives of Biochemistry and Biophysics，251：777–782.

Croteau R. 1987. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. Chemical Reviews，87：929–954.

Croteau R，Felton M，Ronald R C. 1980. Biosynthesis of monoterpenes-conversion of the acyclic precursors geranyl pyrophosphate and nerylpyrophosphate to the rearranged monoterpenes fenchol and fenchone by a soluble enzyme preparation from fennel（*Foeniculum vulgare*). Archives of Biochemistry and Biophysics，200：524–533.

Degenhardt J，Köllner T G，Gershenzon J. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. Phytochemistry，70：1621–1637.

Dimitriadis E，Williams P J. 1984. The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpene flavorants of grapes. American Journal of Enology and Viticulture，35：66–71.

Dudareva N，Martin D，Kish C M，Kolosova N，Gorenstein N，Fäldt J，Miller B，Bohlmann J. 2003. （*E*）-*β*-Ocimene and Myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in Snapdragon：Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. The Plant Cell，15：1227–1241.

Ebeler S E，Thorngate J H. 2009. Wine chemistry and flavor：Looking into the crystal glass. Journal of Agricultural and Food Chemistry，57 (18)：8098–8108.

Fenoll J，Manso A，Hellín P，Ruiz L，Flores P. 2009. Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening. Food Chemistry，114：420 – 428.

Fernandez M，Di Stefano R，Briones A. 2003. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from Muscat must by different yeast species. Food Microbiology，20：35 – 41.

Francis M J O，Allcock C. 1969. Geraniol *β*-D-glycoside occurrence and synthesis in rose flowers. Phytochemistry，8 (8)：1339 – 1345.

Gil J V，Manzanares P，Genoves S，Valles S，Gonzalez-Candelas L. 2005. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. International Journal of Food Microbiology，103：57 – 68.

Glasby J S. 1982. Encyclopaedia of the terpenoids. Chichestar. England：John Wiley and Sons.

Gunata Y Z，Bayonove C L，Baumes R L，Cordonnier R E. 1985. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. Journal of Chromatography A，331：83 – 90.

Gunata Y Z，Bayonove C L，Tapiero C，Cordonnier R E. 1990. Hydrolysis of grape monoterpenyl *β*-D-glucosides by various *β*-glucosidases. Journal of Agricultural and Food Chemistry，38：1232 – 1236.

Gunata Y Z，Blondeel C L，Vallier M J，Lepoutre J P，Sapis J C，Watanabe N. 1998. An endoglycosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandrie，hydrolysing potentially aromatic disscharide glycosides. Journal of Agricultural and Food Chemistry，46：2748 – 2753.

Ibarz M J，Ferreira V，Hernández-Orte P，Loscos N，Cacho J. 2006. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. Journal of Chromatography A，1116：217 – 229.

Jackson R S. 2002. Wine tasting：A professional handbook. California：Elsevier Academic Press.

Kalua C M，Boss P K. 2009. Evolution of volatile compounds during the development of Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry，57：3818 – 3830.

Kalua C M，Boss P K. 2010. Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. Australian Journal of Grape and Wine Research，16：337 – 348.

Kang Wen-huai，Xu Yan，Zhao Guang-ao. 2009. Advances in wine flavor improvement. Journal of Food Science and Biotechnology，28 (4)：438 – 443. (in Chinese)

康文怀，徐　岩，赵光鳌. 2009. 葡萄酒风味修饰研究进展. 食品与生物技术学报，28 (4)：438 – 443.

Koundouras S，Marinos V，Gkoulioti A，Kotseridis Y，Leeuwen C V. 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of Nonirrigates cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. Journal of Agricultural and Food Chemistry，54：5077 – 5086.

Lopez R，Ezpeleta E，Sanchez I. 2004. Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. Food Chemistry，88 (1)：95 – 103.

Lücker J，Bowen P，Bohlmann J. 2004. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases：Functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. Phytochemistry，65：2649 – 2659.

Maicas S，Mateo J J. 2005. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices：A review. Applied Microbiology and Biotechnology，67：322 – 335.

Marais J，Hunter J J，Hasbroek P D. 1999. Effect of canopy microclimate，season and region on Sauvignon Blanc grape composition and wine quality. South African Journal for Enology & Viticulture，29：19 – 30.

Martin D M，Bohlmann J. 2004. Identification of *Vitis vinifera* (-)-*α*-terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization of recombinant terpene synthase. Phytochemistry，65：1223 – 1229.

Mateo J J，Jiménez M. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. Journal of Chromatography A，881：557 – 567.

Palmeri R，Spagna G. 2007. *β*-glucosidase in cellular and acellular form for wine making application. Enzyme and Microbial Technology，40 (3)：382 – 389.

Palomo E S，Hidalgo M C D M，Gonzalez-Vinas M A. 2005. Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. Food Chemistry，92 (4)：627 – 635.

Ribereau-Gayon P，Glories Y，Majuean A. 2000. The chemistry of wine stabilization and treatments. Handbook of Enology. New York：John Wiley & Sons：187 – 255.

Rohmer M，Knani M，Simonin P，Sutter B，Sahm H. 1993. Isopenoid biosynthesis in bacteria：A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Journal of Biochemistry，295：517 – 524.

Spagna G，Romagnoli D，Angela M. 1998. A simple method for purifying glycosidases：α-arabinofuranosidase and β-glucopyranosidase from Aspergillus niger to increase the aroma of wine. Enzyme and Microbial Technology，22 (5)：298 – 304.

Stahl-Bishop E，Intert F，Holthuijzen J，Stengele M，Schulz G. 1993. Glycosidically bound volatiles-a review，1986 – 1991. Journal of Flavours and Fragrances，8：61 – 80.

Spagna G，Barbagallo R N，Greco E. 2002. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological applieation immobilised by inclusion in chitosan gels. Enzyme and Microbial Technology，30 (1)：80 – 89.

Strauss C R，Wilson B，Williams P J. 1988. Novel monoterpene diols and diol glycosides in *Vitis vinifera* grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry，36：569 – 573.

Villena M A，Iranzo J F U，Perez A I B. 2007. β-glucosidase activity in wine yeasts：Application in enology. Enzyme and Microbial Technology，40 (3)：420 – 425.

Williams P J，Cynkar W，Francis I L，Gray J D，Hand P G，Coombe B G. 1995. Quantification of glycosides in grapes，juices，and wines through a determination of glycosyl glucose. Journal of Agricultural and Food Chemistry，43：121 – 128.

Williams P J，Strauss C R，Wilson B. 1980. Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of Muscat grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry，28：766 – 771.

Williams P J，Strauss C R，Wilson B，Massy-Westropp P. 1982a. A Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. Phytochemistry，21：2013 – 2020.

Williams P J，Strauss C R，Wilson B，Massy-Westropp R A. 1982b. Use of C_{18} reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and norisoprenoid precursors from grape juice and wines. Journal of Chromatography A，235：471 – 480.

Wilson B，Strauss C R，Williams P J. 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry，32：919 – 924.

Wilson B，Strauss C R，Williams P J. 1986. The distribution of free and glycosidically bound monoterpenes among skin，juice and pulp fractions of some white grape varieties. American Journal of Enology and Viticulture，37：107 – 111.

Withers S T，Keasling J D. 2007. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. Applied Microbiology and Biotechnology，73 (5)：980 – 990.

Yanai T，Sato M. 1999. Isolation and properties of β-glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. American Journal of Enology and Viticulture，50：231 – 235.

Zhang Ming-xia. 2007. Changes of aromatic compounds in wine with emphasis on key enological practices [Ph.D.Dissertation]. Beijing：China Agricultural University. (in Chinese)

张明霞. 2007. 葡萄酒香气变化规律研究——着重与关键酿造工艺对葡萄酒香气的影响[博士论文]. 北京：中国农业大学.

Zhang M，Xu Q，Duan C，Qu W，Wu Y. 2007. Comparative study of aromatic compounds in young red wines from cabernet sauvignon，cabernet franc，and cabernet gernischet varieties in China. Journal of Food Science，72：248 – 252.

Zhang Ming-xia，Wu Yu-wen，Duan Chang-qing. 2008. Progress in study of aromatic compounds in grape and wine. China Agricultura Sinica，41(7)：2098 – 2104. (in Chinese)

张明霞，吴玉文，段长青. 2008. 葡萄与葡萄酒香气物质研究进展. 中国农业科学，41(7)：2098 – 2104.

Zhang M，Pan Q，Yan G，Duan C. 2011. Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. Food Chemistry，125：743 – 749.

Zoecklein B W，Marcy J E，Williams J M，Jasinski Y. 1997. Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose，potential volatile terpenes，and selected aglycones of white Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. Journal of Food Composition and Analysis，10：55 – 65.