

主要酿造因子对野生酵母 β -葡萄糖苷酶产量的影响

王玉霞¹, 张超^{2,*}

(1. 宜宾学院生命科学与食品工程学院, 发酵资源与利用四川省高校重点实验室,
生物工程研究所, 四川宜宾 644000;

2. 宜宾学院生命科学与食品工程学院, 发酵资源与利用四川省高校重点实验室,
食品科学与工程研究所, 四川宜宾 644000)

摘要: 实验考察了典型葡萄酒酿造因子糖、酸、醇对野生酵母 β -葡萄糖苷酶产量的影响, 以评价菌株在葡萄酒酿造条件下的应用性能。结果表明, 各菌株 β -葡萄糖苷酶主要定位在胞内, 总酶活力以 *H. uvarum* 菌株的 0.51 U/mL 为最高, *P. fermentans* 菌株最小。各酿造因子对菌株产 β -葡萄糖苷酶产量的影响差异较大。较高初始糖含量和低 pH 条件对各菌株产酶都有显著地抑制作用, 其中 *P. fermentans* 菌株受抑制作用最大, 在 pH 3.0 条件下受抑制程度达到了 63.50%~84.32%, *Saccharomyces* 和 *Hanseniaspora* 两属酵母受影响较小, 且 *H. uvarum* 在酸性条件下的产酶量最高。较低浓度的乙醇(5%)对菌株产酶有一定的促进作用, 随着乙醇含量的增加, 各菌株产酶量都受到了显著抑制, *P. fermentans* 菌株甚至没有酶的产生。综合各因子对各菌株产酶量的影响情况, *H. uvarum* 菌株以较优表现显示出其较好的应用前景。

关键词: 野生酵母, β -葡萄糖苷酶, 酿造因子

Effect of oenological factors on the productions of β -glucosidases from wild yeasts

WANG Yu-xia¹, ZHANG Chao^{2,*}

(1. Key Laboratory of Fermentation Resources and Application of Institutes of Higher Learning in Sichuan, School of Life Science and Food Engineering, Institute for Bioengineering, Yibin University, Yibin 644000, China;

2. Key Laboratory of Fermentation Resources and Application of Institutes of Higher Learning in Sichuan, School of Life Science and Food Engineering, Institute for Food Science and Engineering, Yibin University, Yibin 644000, China)

Abstract: The main objective of this study was to investigate the potential applications of wild yeast strains by assaying the enzyme production under simulated oenological conditions. The results indicated that most β -glucosidases were intracellular activity. The highest total activity of *H. uvarum* was detected, 0.51 U/mL. A remarkable variability in the effects of oenological factors on the production of β -glucosidase were observed among yeast strains. The significant inhibitions on the β -glucosidase productions were observed under high sugar and low pH conditions. The strongest inhibition on *P. fermentans* was observed, for 63.50%~84.32% inhibition in comparison with control at pH 3.0, followed by *Saccharomyces* and *Hanseniaspora*. Furthermore, *H. uvarum* exhibited highest β -glucosidase production under the low pH conditions. Under the low concentration of alcohol (5%), the productions of yeast β -glucosidase were increased. But the β -glucosidases production decreased with increasing the concentration of alcohol, even no β -glucosidase activity could be detected for *P. fermentans* strain. In conclusion, the better performances endowed *H. uvarum* strain some potential application.

Key words: wine yeast; β -glucosidase; oenological factors

中图分类号: TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)14-0205-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.14.037

收稿日期: 2014-01-06 * 通讯联系人

作者简介: 王玉霞(1974-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 酿造工艺与微生物。

基金项目: 四川省教育厅重点项目(13ZA0197); 博士启动项目(2012B17); 发酵与资源利用四川省重点实验室开放基金重点项目(2011KFZ002)。

来自水果等原料的香气物质, 以游离态和结合态两种方式存在。游离态香气物质直接呈现出能被感知的气味, 而含量较多的无色、无味、不具挥发性结合态的香气多数为糖苷类物质, 必须经过水解才能使香气表现出来^[1-3]。糖苷类风味物质的水解分为酸水解和酶水解两类。其中作用温和、反应迅速、高效率的酶水解, 在生产中倍受青睐^[4]。 β -D-葡萄糖苷

酶(EC 3.2.1.21)是一类能水解糖链非还原末端糖苷键的一类水解酶。因广泛用于果汁、果酒等结合态风味物质的水解,释放香气成分而被称为风味酶。糖苷类风味物质的水解涉及多种酶的参与, β -葡萄糖苷酶是其中的关键酶^[5-6]。

β -葡萄糖苷酶在自然界的分布非常广泛,包括植物、动物、昆虫、丝状真菌、酵母菌、细菌等^[1-7]。与植物、动物、昆虫以及细菌相比,酵母细胞所具有的培养、生长特性,使从酵母菌中筛选比活高、特性优良的 β -葡萄糖苷酶成为优势。尤其是从酿造环境中筛选能体现区域酒种风格的优良酵母,这个优势就更为明显^[8-9]。

实验通过考察典型葡萄酒酿造因子糖、酸、醇对酵母 β -葡萄糖苷酶产量的影响,评价酵母菌株在葡萄酒酿造中的应用潜能,为产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

所用菌株 分离自果园土壤,鉴定为*Hanseniaspora uvarum*、*Saccharomyces cerevisiae*和*Pichia fermentans*菌株;酵母粉、蛋白胨、琼脂粉 英国Oxoid公司,分析纯;葡萄糖、磷酸氢二钠、柠檬酸、无水乙醇、浓盐酸、氢氧化钠、酒石酸钠、咪唑、GSH、曲通、甲苯、乙醇 中国医药集团上海化学试剂公司,分析纯;pNPG(p-nitrophenyl- β -D-glycoside) Sigma-Aldrich,分析纯;其余所有试剂 均为分析纯。

HX-9080B-2型生化恒温培养箱 上海福码实验设备有限公司;PB2002-N型称量天平、AB204-E型分析天平、320-S型精密pH计Delta 瑞士Mettler Toledo公司;SS325型高压蒸汽全自动灭菌锅 日本Tomy公司;无菌超净工作台 苏州净化设备厂;酶标仪 美国Thermo公司;3K型冷冻高速离心机 德国Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 β -葡萄糖苷酶活力测定 pH5.0 P-C缓冲溶液:称取 Na_2HPO_4 3.689g、 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 1.01g溶于100mL蒸馏水中,调pH至5.0并定容。底物(pNPG)工作液:准确称取150.65mg pNPG,完全溶解于100mL pH5.0的P-C缓冲液中备用。

酶活测定:将菌株28℃静置培养3d的发酵液4℃,8000×g离心5min,取5 μ L上清液与100 μ L底物pNPG溶液(5mmol/L)混匀,50℃保温30min,加入200 μ L 1mol/L Na_2CO_3 中止反应并显色,将反应液在400nm下用酶标仪测定吸光值^[10]。

酶活力单位定义:在标准检测条件下,每分钟水解产生1 μ mol的pNP所用的酶量为一个酶活单位^[10]。

1.2.2 培养基 液体YPD(w/v):酵母粉1%,蛋白胨2%,葡萄糖2%。依据葡萄酒平均pH(3.5~4.0)、葡萄酒平均糖含量(20%)、普通葡萄酒酒度(12%),分别对选择的代表菌株进行不同逆境条件下产酶情况的考察。产酶条件分别选培养初始条件为葡萄糖含量20%(200g/L),pH3.0、4.0、5.0以及5%、10%、15%的乙醇浓度。以5%接种量分别接种各类培养基,28℃,

200r/min摇瓶培养,三次重复。每天测定酶产量,连续9d,以考察产酶量的最大时间及各菌株产酶差异情况。对照为2%葡萄糖的普通YPD培养基,pH自然,不加乙醇。在考察20%葡萄糖初始含糖量对菌株产酶情况影响实验中,实验测定酶产量的同时,监控测定培养基pH变化情况。

1.2.3 酶在细胞的定位 YPD培养基50mL/250mL三角瓶,5%接种量,30℃,200r/min,培养48h。

取1mL细胞培养液8,000×g、4℃条件下离心15min,取上清液并测定酶活(胞外);收集细胞用无菌水清洗两次、8,000×g、4℃条件下离心10min后,弃去上清液,向沉淀中加入0.2mL P-C缓冲溶液(pH5.0),漩涡振荡均匀,按常规方法测定酶活(细胞膜)。

另取5mL细胞培养液8,000×g、4℃条件下离心15min,收集细胞用无菌水清洗两次、8,000×g、4℃条件下离心10min后,向细胞沉淀中加入1mL咪唑、50 μ L GSH、10 μ L曲通、50 μ L甲苯:乙醇(1:4,v/v),漩涡振荡5min,8,000×g、4℃条件下离心5min后收集沉淀,加入5mL无菌冰水摇匀后,取1mL冰水溶液离心并用冰水洗涤数次,收集沉淀,加入0.2mL P-C缓冲溶液(pH5.0),溶液按常规方法测定酶活(细胞内)^[11]。所有测定均重复三次。

1.3 数据统计

实验数据应用SPSS19.0进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 酶在细胞的定位

在对各野生菌株产酶情况考察之前,首先分析了不同产酶菌株 β -葡萄糖苷酶在细胞中的定位情况。从图1中数据分析在胞内、细胞膜和细胞外 β -葡萄糖苷酶活力分布情况,可以得出,所有参试种属菌株的酶都主要定位在细胞内,约占了全部酶活的39.30%~47.35%,其中胞内酶活比例占的最大的是*P. fermentans*酵母,最低的是*S. cerevisiae*酵母。*S. cerevisiae*和*H. uvarum*酵母胞外酶活比例较大,最小的是*P. fermentans*酵母,只有21.25%的 β -葡萄糖苷酶活在细胞培养上清液中存在。三个菌株定位在细胞膜的 β -葡萄糖苷酶差异不是很大,集中在28.45%~32.80%这个小范围内。

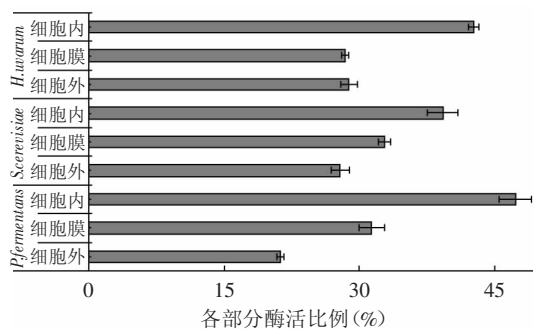


图1 菌株 β -葡萄糖苷酶定位情况

Fig.1 Enzyme location of different yeast strains

然而从各菌株总酶活情况可以得出(图2),三个菌株的总酶活*H. uvarum*最大,达到0.51U/mL,其次是

S. cerevisiae 菌株 (0.43U/mL), 最低的是 *P. fermentans* 0.22U/mL, 只有最高总酶活力 *H. uvarum* 菌株的42.55%。

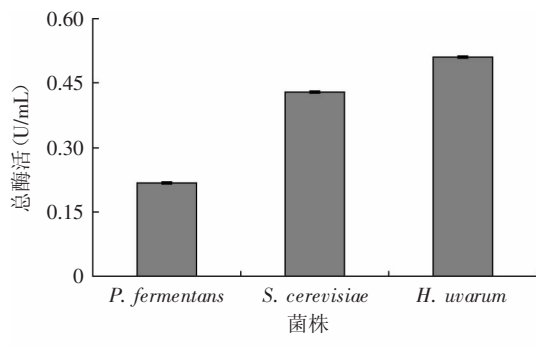


图2 菌株 β -葡萄糖苷酶总酶活
Fig.2 Total enzymatic activities from different yeast strains

2.2 酿造因子对酶产量的影响

2.2.1 200g/L葡萄糖对各菌株产酶的影响 从表1数据可以看出,与对照培养基相比,菌株在高糖培养条件下,生长过程中pH都比较低。这是由于高碳氮比培养条件下,微生物代谢过程菌体产酸能力提高,以及菌体在高糖环境下,自身对这种胁迫效应的一种保护机制。

表2数据展示了各菌株在高糖和对照培养基中产酶变化情况。三个菌株在高糖条件下的产酶量分别为 *P. fermentans* 菌株0.045~0.140U/mL, *H. uvarum* 菌株0.206~1.750U/mL, *S. cerevisiae* 菌株0.100~1.110U/mL, 而对照培养基中的产酶量分别为 *P. fermentans* 菌株0.137~0.741U/mL, *H. uvarum* 菌株0.415~2.520U/mL,

表1 高糖条件下各菌株发酵过程中pH变化情况

Table 1 pH change of different strains with high glucose fermentation

时间 (d)	<i>P. fermentans</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>H. uvarum</i>	
	HS	CK	HS	CK	HS	CK
1	4.5	5.8	4.5	6.2	4.5	6.2
2	4.0	5.8	4.5	6.2	4.5	6.2
3	4.0	5.8	4.5	5.8	4.0	5.8
4	4.0	5.8	4.5	5.4	4.0	5.8
5	4.0	5.8	4.5	5.4	4.5	5.4
6	4.0	5.8	4.5	5.8	4.5	6.2
7	4.0	5.4	4.5	6.2	4.5	6.7
8	4.0	5.8	4.5	6.7	4.5	7.0
9	4.0	5.8	4.0	6.7	4.0	7.2

注: HS, 高糖培养基; CK, 对照培养基。

S. cerevisiae 菌株0.346~2.443U/mL。与对照相比,高浓度葡萄糖含量对各菌株产 β -葡萄糖苷酶能力都表示出了显著的抑制作用。其中受高葡萄糖影响最强的是 *P. fermentans* 菌株,与对照培养基相比,高糖条件下产酶量减少了67.15%~81.54%,其次是 *S. cerevisiae* 菌株的48.28%~71.10%。 *H. uvarum* 在三个菌株中表现最优,在对照和高糖条件下产酶量都显著高于其他菌株,在两种培养条件下的最大产酶量分别为1.75U/mL和2.52U/mL。在测试期间内,高糖初始条件对 *H. uvarum* 菌株产酶的抑制作用,除第1d外(50.36%),基本在50%范围以下,远低于 *P. fermentans* 和 *S. cerevisiae* 菌株。由此可见,在相同培养条件下,

表2 高糖条件下各菌株产酶情况比较

Table 2 Comparison the enzyme production of different strains under high glucose concentration

时间 (d)	培养基	<i>P. fermentans</i>		<i>H. uvarum</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
		(U/mL)	抑制程度 (%)	(U/mL)	抑制程度 (%)	(U/mL)	抑制程度 (%)
1	高糖	0.045 ^{c2}	67.15	0.206 ^{a2}	50.36	0.100 ^{b2}	71.10
	ck	0.137 ^{c1}	—	0.415 ^{a1}	—	0.346 ^{b1}	—
2	高糖	0.050 ^{c2}	65.03	0.323 ^a	19.25	0.120 ^{b2}	66.67
	ck	0.143 ^{b1}	—	0.400 ^a	—	0.360 ^{a1}	—
3	高糖	0.060 ^{c2}	70.00	0.429 ^a	21.43	0.200 ^{b2}	52.94
	ck	0.200 ^{b1}	—	0.546 ^a	—	0.425 ^{a1}	—
4	高糖	0.065 ^{c2}	74.10	0.528 ^a	20.00	0.300 ^b	48.28
	ck	0.251 ^{b1}	—	0.660 ^a	—	0.580 ^a	—
5	高糖	0.070 ^{c2}	79.41	0.620 ^a	49.30	0.400 ^b	67.21
	ck	0.340 ^{b1}	—	1.223 ^a	—	1.220 ^a	—
6	高糖	0.097 ^{c2}	79.79	1.120 ^{a2}	42.21	0.640 ^{b2}	63.84
	ck	0.480 ^{c1}	—	1.938 ^{a1}	—	1.770 ^{b1}	—
7	高糖	0.120 ^{c2}	81.54	1.610 ^{a2}	31.20	0.890 ^{b2}	59.56
	ck	0.650 ^{c1}	—	2.340 ^{a1}	—	2.201 ^{b1}	—
8	高糖	0.140 ^{c2}	81.08	1.750 ^{a2}	29.15	1.110 ^{b2}	51.32
	ck	0.740 ^{c1}	—	2.470 ^{a1}	—	2.280 ^{b1}	—
9	高糖	0.140 ^{c2}	81.11	1.720 ^{a2}	31.75	1.100 ^{b2}	54.97
	ck	0.741 ^{b1}	—	2.520 ^{a1}	—	2.443 ^{a1}	—

注: 字母表示同类培养条件下不同菌株间显著性分析; 数字表示同菌株不同培养基间显著性分析(5%); 抑制程度, 表示高糖条件下产酶量与对照条件下产酶量的差值占对照酶量的百分比; *表示酶产量较对照增加百分比; 表3、表4同。

*H. uvarum*菌株显著高于其他菌株,表现出了较优于其他菌株的应用性能。

2.2.2 低pH对各菌株产酶的影响 由表3可知,分属于三个种的参试菌株的产酶情况,都显著受到低pH的强烈抑制,其中pH3.0对各菌株的产酶量影响最大。与对照相比,在pH3.0条件下,*P. fermentans*受到的抑制作用达到了63.50%~84.32%,其次是*S. cerevisiae*菌株的59.76%~82.08%。受抑制程度最小的是*H. uvarum*菌株,产酶量达到了0.078~0.871U/mL (pH3.0条件下),0.320~1.613U/mL (pH4.0条件下),0.331~1.964U/mL (pH5.0条件下)。随着pH升高,各菌株产酶量显著增加。在相同pH条件下,三个菌株的产

酶量差异较大,其中*H. uvarum*菌株比*P. fermentans*和*S. cerevisiae*菌株的产酶量要高,且达到了显著差异水平,三个菌株产酶量从高到低的顺序是*H. uvarum*菌株、*S. cerevisiae*菌株、*P. fermentans*菌株。与其他菌株相比,*H. uvarum*菌株在低pH条件下较好地产酶特性,显示出此菌较好地低pH条件下的应用潜能。

2.2.3 乙醇对各菌株产酶的影响 从不同浓度乙醇实验结果(见表4)可以得出,低浓度乙醇对各菌株的产酶都有一定程度的促进作用。含有初始浓度5%乙醇的培养条件下,三个菌株的产酶量,在前期基本都有显著地增加,其中*P. fermentans*菌株在第5d的增幅最大,达到了61.75%,其次是*S. cerevisiae*菌株第3d

表3 不同初始pH条件下各菌株产酶情况
Table 3 Production of enzyme with different start pH values

时间(d)	初始pH	<i>P. fermentans</i>		<i>H. uvarum</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
		(U/mL)	抑制程度(%)	(U/mL)	抑制程度(%)	(U/mL)	抑制程度(%)
1	3	0.045 ^{c4}	67.15	0.078 ^{a3}	81.20	0.062 ^{b4}	82.08
	4	0.090 ^{c3}	34.31	0.320 ^{a2}	22.89	0.230 ^{b3}	33.53
	5	0.119 ^{b2}	13.14	0.331 ^{a2}	20.24	0.330 ^{a2}	4.62
	ck	0.137 ^{c1}	—	0.415 ^{a1}	—	0.346 ^{b1}	—
2	3	0.042 ^{c2}	70.63	0.148 ^{a3}	63.00	0.101 ^{b4}	71.94
	4	0.103 ^{c1}	27.97	0.330 ^{a2}	17.50	0.310 ^{b3}	13.89
	5	0.128 ^{c1}	10.49	0.365 ^{a12}	8.75	0.350 ^{b2}	2.78
	ck	0.143 ^{b1}	—	0.400 ^{a1}	—	0.360 ^{a1}	—
3	3	0.073 ^{c4}	63.50	0.202 ^{a3}	63.00	0.171 ^{b3}	59.76
	4	0.135 ^{c3}	32.50	0.430 ^{a2}	21.25	0.380 ^{b2}	10.59
	5	0.150 ^{c2}	25.00	0.506 ^{a12}	7.33	0.406 ^{b1}	4.47
	ck	0.200 ^{b1}	—	0.546 ^{a1}	—	0.425 ^{a1}	—
4	3	0.086 ^{c3}	65.74	0.311 ^{a3}	52.88	0.226 ^{b2}	61.03
	4	0.213 ^{c2}	15.14	0.515 ^{a2}	21.97	0.470 ^{b1}	18.97
	5	0.232 ^{c12}	7.57	0.560 ^{a2}	15.15	0.513 ^{b1}	11.55
	ck	0.251 ^{b1}	—	0.660 ^{a1}	—	0.580 ^{a1}	—
5	3	0.095 ^{c4}	72.06	0.413 ^{a3}	66.23	0.280 ^{b4}	77.05
	4	0.260 ^{c3}	23.53	0.841 ^{a2}	31.23	0.600 ^{b3}	50.82
	5	0.323 ^{c2}	5.00	0.918 ^{a2}	24.94	0.843 ^{b2}	30.90
	ck	0.340 ^{b1}	—	1.223 ^{a1}	—	1.220 ^{a1}	—
6	3	0.107 ^{c4}	77.71	0.614 ^{a4}	68.32	0.397 ^{b4}	77.57
	4	0.310 ^{c3}	35.42	1.200 ^{a3}	38.08	1.000 ^{b3}	43.50
	5	0.386 ^{c2}	19.58	1.412 ^{a2}	27.14	1.334 ^{b2}	24.63
	ck	0.480 ^{c1}	—	1.938 ^{a1}	—	1.770 ^{b1}	—
7	3	0.111 ^{c4}	82.92	0.840 ^{a4}	64.10	0.521 ^{b4}	76.33
	4	0.370 ^{c3}	43.08	1.580 ^{a3}	32.48	1.400 ^{b3}	36.39
	5	0.465 ^{c2}	28.46	1.712 ^{a2}	26.84	1.608 ^{b2}	26.94
	ck	0.650 ^{c1}	—	2.340 ^{a1}	—	2.201 ^{b1}	—
8	3	0.116 ^{c4}	84.32	0.871 ^{a4}	64.74	0.529 ^{b3}	76.80
	4	0.368 ^{c3}	50.27	1.613 ^{a3}	34.70	1.470 ^{b2}	35.53
	5	0.476 ^{c2}	35.68	1.945 ^{a2}	21.26	1.630 ^{b2}	28.51
	ck	0.740 ^{c1}	—	2.470 ^{a1}	—	2.280 ^{b1}	—
9	3	0.129 ^{c4}	82.59	0.840 ^{a4}	66.67	0.506 ^{b4}	79.29
	4	0.380 ^{c3}	48.72	1.566 ^{a3}	37.86	1.490 ^{b3}	39.01
	5	0.456 ^{c2}	38.46	1.964 ^{a2}	22.06	1.610 ^{b2}	34.10
	ck	0.741 ^{b1}	—	2.520 ^{a1}	—	2.443 ^{a1}	—

的增加量54.10%。随着培养基中乙醇浓度的增加各菌株产酶量都受到了强烈的抑制,其中最强的是 *P. fermentans* 菌株,在10%和15%乙醇浓度下,甚至没有 β -葡萄糖苷酶的产生,而 *H. uvarum* 和 *S. cerevisiae* 菌株产酶量都显著低于对照,且10%乙醇浓度对酶产生的抑制程度达到了90%以上。从酶学性质角度分析,高浓度醇对酶蛋白有一定的变性作用,从而导致酶活力的损失。本实验中高浓度乙醇对酶产量的影响,是酶受乙醇的变性失活作用和酵母细胞产酶受抑制两方面的综合影响效果。在一定浓度乙醇存在条件下, *H. uvarum* 菌株产酶量表现显著高于 *S. cerevisiae* 菌株的特性,这将在一定程度上赋予其

酿造条件下较好的应用前景。

3 讨论

综合糖、pH、醇三因子对各菌株产酶情况考察结果,可以得出各酿造因子对菌株的影响程度各不相同。pH实验中,随着pH的降低,所有菌株的产酶量都受到强烈的抑制。醇实验中,在5%醇浓度下,一定时期内,参试菌株的产酶量都高于对照。乙醇虽然是一种胁迫因子,但在一定浓度范围内,也是一种有效提高细胞通透性的试剂,低浓度条件下因为对细胞的伤害作用较小,相反在一定程度上却提高了细胞膜的通透性,使得细胞内物质渗到胞外的量较正常情况有所增加,而表现出胞外发酵上清液中酶量的增

表4 不同醇浓度对各菌株产酶情况的影响

Table 4 Production of enzyme from different strains with different ethanol concentrations

时间(d)	乙醇浓度(%)	<i>P. fermentans</i>		<i>H. uvarum</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
		(U/mL)	抑制程度(%)	(U/mL)	抑制程度(%)	(U/mL)	抑制程度(%)
1	5	0.100 ^{c2}	27.01	0.177 ^{a2}	57.35	0.156 ^{b2}	54.91
	10	0		0.1083	73.98	0.1143	67.05
	15	0		0.0264	93.73	0.0354	89.88
	ck	0.137 ^{bl}	—	0.415 ^{al}	—	0.346 ^{bl}	—
2	5	0.201 ^{cl}	28.86*	0.788 ^{al}	49.24*	0.712 ^{bl}	49.44*
	10	0		0.1283	83.76	0.1313	81.56
	15	0		0.033 ^{bl}	95.81	0.045 ^{al}	93.68
	ck	0.143 ^{c2}	—	0.400 ^{a2}	—	0.360 ^{a2}	—
3	5	0.330 ^{cl}	39.39*	1.120 ^{al}	51.25*	0.926 ^{bl}	54.10*
	10	0		0.146 ^{bl}	86.96	0.161 ^{a3}	82.61
	15	0		0.0504	95.54	0.0494	94.71
	ck	0.200 ^{bl}	—	0.546 ^{a2}	—	0.425 ^{a2}	—
4	5	0.570 ^{cl}	55.96*	1.320 ^{al}	50.00*	1.050 ^{bl}	44.76*
	10	0		0.160 ^{bl}	87.88	0.175 ^{a3}	83.33
	15	0		0.0573	95.68	0.0564	94.67
	ck	0.251 ^{bl}	—	0.660 ^{a2}	—	0.580 ^{a2}	—
5	5	0.889 ^{cl}	61.75*	1.440 ^{al}	15.07*	1.170 ^{bl}	4.10
	10	0		0.166 ^{bl}	88.47	0.185 ^{a2}	84.84
	15	0		0.059 ^{bl}	95.90	0.065 ^{a2}	94.67
	ck	0.340 ^{bl}	—	1.223 ^{a2}	—	1.220 ^{al}	—
6	5	1.040 ^{cl}	53.85*	1.620 ^{a2}	16.41	1.400 ^{bl}	20.90
	10	0		0.171 ^{bl}	91.18	0.189 ^{a3}	89.32
	15	0		0.063 ^{bl}	96.75	0.078 ^{a4}	95.59
	ck	0.480 ^{c2}	—	1.938 ^{al}	—	1.770 ^{bl}	—
7	5	1.170 ^{cl}	44.44*	1.935 ^{a2}	17.31	1.745 ^{bl}	20.72
	10	0		0.171 ^{bl}	92.69	0.188 ^{a3}	91.46
	15	0		0.072 ^{bl}	96.92	0.096 ^{a4}	95.64
	ck	0.650 ^{c2}	—	2.340 ^{al}	—	2.201 ^{bl}	—
8	5	1.200 ^{cl}	38.33*	2.066 ^{a2}	16.36	1.843 ^{bl}	19.17
	10	0		0.176 ^{bl}	92.87	0.189 ^{a3}	91.71
	15	0		0.081 ^{bl}	96.72	0.110 ^{a4}	95.18
	ck	0.740 ^{c2}	—	2.470 ^{al}	—	2.280 ^{bl}	—
9	5	1.260 ^{cl}	41.19*	2.071 ^{a2}	17.82	1.849 ^{bl}	24.31
	10	0		0.180 ^{bl}	92.86	0.199 ^{a3}	91.85
	15	0		0.090 ^{bl}	96.43	0.142 ^{a4}	94.19
	ck	0.741 ^{bl}	—	2.520 ^{al}	—	2.443 ^{al}	—

加。但随着浓度的升高,表现出对细胞生长、代谢的较强的抑制作用,以致*P. fermentans*菌株在高浓度乙醇存在条件下,已经检测不到酶的产生^[12]。

4 结论

β -葡萄糖苷酶在细胞中的定位情况显示,三个菌株的 β -葡萄糖苷酶都主要定位在胞内。总酶活最大的是*H. uvarum*菌株,达到了0.51U/mL,其次是*S. cerevisiae*菌株。高糖和低pH对各菌株产酶能力影响各不相同。*H. uvarum*菌株无论是在高糖还是对照条件下,分别以1.750U/mL和2.520U/mL的产酶量显著高于其他菌株,且在最低pH3.0的条件下产酶量也显著高于其他菌株,充分显示出较强的应用潜能。在发酵前期,较低浓度乙醇(5%)对所有菌株的产酶量都有一定的促进作用,然而随着乙醇浓度的升高,各菌株产酶量迅速下降,甚至没有 β -葡萄糖苷酶的产生(*P. fermentans*)。*H. uvarum*在对照、高糖以及低pH条件下,产酶量显著高于其他菌株的较好表现,急需在进一步研究中进行考察,从而挖掘其酿造应用潜能。由于酿造因子单因子条件下,菌株产酶情况差异较大,因此需要在后期研究中进一步考察菌株在实际酿造条件下的产酶情况,以全面探索菌株的酿造特性,以及对酿造环境中结合态风味前体的释放情况等。

参考文献

- [1] Berger R G. Advances in biochemical engineering biotechnology: Biotechnology of aroma compounds[M]. Berlin: Springer, 1997.
- [2] Abbott N A, Coombe B G, Williams P J. The contribution of hydrolyzed flavor precursors to quality differences in shiraz juice and wines - an investigation by sensory descriptive analysis[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1991, 42(3): 167-174.
- [3] Francis I, Sefton M, Williams P. A study by sensory descriptive analysis of the effects of oak origin, seasoning, and heating on the aromas of oak model wine extracts[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1992, 43(1): 23.
- [4] Barbagallo R N, Spagna G, Palmeri R, et al. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(1): 58-66.
- [5] Liebig J, Wohler F. The composition of bitter almonds[J]. Annalen, 1837, 22(1): 1-24.
- [6] Feldwisch J, Vente A, Zettl R, et al. Characterization of two membrane-associated β -glucosidases from maize (*Zea mays* L.) coleoptiles[J]. Biochemical Journal, 1994, 302(Pt 1): 15.
- [7] Palmeri R, Spagna G. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 382-389.
- [8] Villena M A, Iranzo J F Ú, Pérez A I B. β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 420-425.
- [9] McMahon H, Zoecklein B, Fugelsang K, et al. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 23(3): 198-203.
- [10] Wang Y, Li J, Xu Y. Characterization of novel β -glucosidases with transglycosylation properties from *Trichosporon asahii* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(20): 11219-11227.
- [11] Faia A M, Ferreira A M, Climaco M C. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(1): 67-71.
- [12] M Graça da Silveira M V S R, Maria C Loureiro-Dias, Frans M Rombouts, et al. Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6087-6093.
- [1] Berger R G. Advances in biochemical engineering biotechnology: Biotechnology of aroma compounds[M]. Berlin: Springer, 1997.
- [2] Abbott N A, Coombe B G, Williams P J. The contribution of hydrolyzed flavor precursors to quality differences in shiraz juice and wines - an investigation by sensory descriptive analysis[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1991, 42(3): 167-174.
- [3] Francis I, Sefton M, Williams P. A study by sensory descriptive analysis of the effects of oak origin, seasoning, and heating on the aromas of oak model wine extracts[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1992, 43(1): 23.
- [4] Barbagallo R N, Spagna G, Palmeri R, et al. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(1): 58-66.
- [5] Liebig J, Wohler F. The composition of bitter almonds[J]. Annalen, 1837, 22(1): 1-24.
- [6] Feldwisch J, Vente A, Zettl R, et al. Characterization of two membrane-associated β -glucosidases from maize (*Zea mays* L.) coleoptiles[J]. Biochemical Journal, 1994, 302(Pt 1): 15.
- [7] Palmeri R, Spagna G. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 382-389.
- [8] Villena M A, Iranzo J F Ú, Pérez A I B. β -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 420-425.
- [9] McMahon H, Zoecklein B, Fugelsang K, et al. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 23(3): 198-203.
- [10] Wang Y, Li J, Xu Y. Characterization of novel β -glucosidases with transglycosylation properties from *Trichosporon asahii* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(20): 11219-11227.
- [11] Faia A M, Ferreira A M, Climaco M C. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(1): 67-71.
- [12] M Graça da Silveira M V S R, Maria C Loureiro-Dias, Frans M Rombouts, et al. Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6087-6093.

(上接第204页)

汁率的影响[J]. 保鲜与加工, 2008(4): 48-50.

[3] Dernir N, Sarioglu K, Mutle M, et al. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part3. Immobilized Pectinase for mash treatment[J]. Journal of Food Engineering, 2001, 47(4): 275-280.

[4] Perez S, Rodríguez-Carvajal MA, Doco T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function[J]. Biochimie, 2003, 85: 109-121.

[5] 何翠蝉, 杨柳, 周家华, 等. 果胶酶提高油桃出汁率的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011(9): 298-305.

[6] 杨辉, 陈永康, 张智锋, 等. 果胶酶提高苹果出汁率工艺条件的优化[J]. 食品科技, 2006(5): 76-78.

[7] 杨辉, 陈合, 石振海. 果胶酶在苹果酒生产中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2003(12): 110-112.

[8] 薛长湖, 张永勤, 李兆杰. 果胶及果胶酶研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 94-98.

[9] 陈娟, 阚健全, 杜木英, 等. 果胶酶制剂及其在果浆出汁和果汁澄清方面的应用[J]. 中国食品添加剂, 2006(3): 119-124.

[10] 孙畅, 孙春玉, 马骥, 等. 果胶酶提高软枣猕猴桃出汁率研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 115-117.

[11] RAIP, MAJUMDAR G C, DASGUPTAS, et al. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 64(3): 397-403.

[12] SARTOGLU K, DEMIR N, ACAR J, et al. The use of commercial pectinase in the fruit juice industry, part 2: determination of the kinetic behavior of immobilized commercial pectinase[J]. Food Engineering, 2001, 47(4): 271-274.

[13] 汪志君, 韩永斌, 顾振新, 等. 响应面法优化猕猴桃果浆酶解工艺参数研究[J]. 食品科学, 2006(10): 326-330.

[14] 曾荣, 陈金印, 李平. 美味猕猴桃果实后熟过程中主要品质指标的变化[J]. 江西农业大学学报: 自然科学版, 2002, 24(5): 587-590.

[15] Lee S K, Kader A A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops[J]. Postharvest Biology & Technology, 2000, 20: 207-220.