

刘晓柱, 张远林, 李银凤, 等. 高产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的诱变选育及对刺梨果酒香气特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 118–125. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120115

LIU Xiaozhu, ZHANG Yuanlin, LI Yinfeng, et al. Breeding of High Yield β -glucosidase Yeast by Mutagenesis and Its Effect on the Aroma Characteristics of *Rosa roxburghii* Tratt Wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 118–125. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120115

· 生物工程 ·

高产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的诱变选育及对刺梨果酒香气特性的影响

刘晓柱, 张远林, 李银凤, 于志海, 黄名正*

(贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵州贵阳 550000)

摘要:为分析 β -葡萄糖苷酶对刺梨果酒香气特性的影响, 以一株产 β -葡萄糖苷酶异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*, *W.anomalus*) C4 菌株为出发菌株, 采用化学诱变剂甲基磺酸乙酯对其进行化学诱变, 以进一步提高其 β -葡萄糖苷酶活性。将 *W.anomalus* C4 菌株、突变菌株 *W.anomalus* E3 菌株纯种或与酿酒酵母以混合发酵形式发酵刺梨果酒。对硝基苯基- β -D 吡喃葡萄糖苷显色法 (p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, p-NPG) 检测刺梨果酒发酵过程中 β -糖苷酶活性变化; 顶空固相微萃取-气相质谱联用法测定各组刺梨果酒挥发性香气成分。甲基磺酸乙酯诱变得一株产 β -葡萄糖苷酶性能稳定, 酶活为 (55.05±0.74) U/L 的突变菌株 *W.anomalus* E3。与 *W.anomalus* C4 菌株相比, *W.anomalus* E3 菌株的酶活提高了 31.70%。在刺梨果酒发酵过程中, *W.anomalus* β -葡萄糖苷酶活性逐渐增大, 第 10 d 达到最大值, 然后迅速降低。接种 *W. anomalus* C4、及其突变菌株 E3 可降低刺梨果酒包括总酸、挥发酸、pH 在内的酸度值以及总糖含量; 同时还可增加刺梨果酒中挥发性酯类、醇类物质的种类和含量以及主要香气成分风味活性值 (OAV)。因此, 接种产 β -葡萄糖苷酶 *W. anomalus* 菌株有助于调节刺梨果酒的香气特性, 增加刺梨果酒的复杂性和丰富度。

关键词: β -葡萄糖苷酶, 异常威克汉姆酵母, 甲基磺酸乙酯诱变, 刺梨果酒, 香气特性

中图分类号: TS261

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)19-0118-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120115



本文网刊:

Breeding of High Yield β -glucosidase Yeast by Mutagenesis and Its Effect on the Aroma Characteristics of *Rosa roxburghii* Tratt Wine

LIU Xiaozhu, ZHANG Yuanlin, LI Yinfeng, YU Zhihai, HUANG Mingzheng*

(College of Food & Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550000, China)

Abstract: To analyze the effects of β -glucosidase on the aroma characteristics of *Rosa roxburghii* Tratt (*Rosa roxburghii*) wine, a strain of *Wickerhamomyces anomalus* (*W. anomalus*) C4 producing β -glucosidase was used as the starting strain, and its β -glucosidase activity was further improved by mutagenesis using ethylmethanesulfonate (EMS). *R. roxburghii* wine was produced via pure or mixed inoculation of *W. anomalus* or together with *Saccharomyces cerevisiae*. The β -glucosidase producing ability was examined using p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside colorimetry. Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and gas phase mass spectrometry (GC-MS) were performed to determine the volatile aroma substances of each group of *R. roxburghii* wine. A mutant strain *W.anomalus* E3 with stable β -glucosidase produced activity was obtained using the mutagenic agent EMS, and the enzyme activity of *W.anomalus* E3 was (55.05±1.74) U/L, which increased 31.70% compared with the starting strain *W.anomalus* C4. β -glucosidase activity increased gradually, reached its maximum at the 10th day, and then decreased rapidly during the fermentation process of *R. roxburghii* wine. Inoculation

收稿日期: 2020-12-14

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合平台人才 [2017]5789、黔科合平台人才 [2018]5603); 贵州理工学院高层次人才科研启动项目 (XJGC20190625); 贵州省教育厅创新群体重大项目 (黔教合 KY 字 [2017]046)。

作者简介: 刘晓柱 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酿酒微生物资源开发与应用, E-mail: liuxiaozhu_840914@163.com。

* 通信作者: 黄名正 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品风味化学, E-mail: huangmingzheng@vip.163.com。

with *W.anomalous* C4 and E3 could reduce the acidity value including total acid, volatile acid and pH of the *R. roxburghii* wine, and the total sugar content was also decreased. Moreover, inoculation with *W.anomalous* C4 and E3 also regulate the aroma characteristics, such as increasing the volatile ester and alcohol content and the OAVs of the main aroma components. Therefore, it was helpful to regulate the aroma characteristics and increase the complexity and richness of the *R. roxburghii* wine when inoculation with *W.anomalous* strain producing β -glucosidase.

Key words: β -glucosidase; *Wickerhamomyces anomalous*; ethyl methyl sulfonate mutagenesis; *Rosa roxburghii* Tratt wine; aroma characteristics

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)是一种兼具营养价值和药用价值的蔷薇科(Rosaceae)蔷薇属(*Rosa*)植物,广泛分布于我国西南地域,如贵州、四川、重庆等^[1]。目前对刺梨的研究主要集中在活性成分^[2]、香气特性^[3]以及基因功能^[4]等领域的研究,而对刺梨微生物资源的筛选、鉴定及应用等方面的研究还比较少。谢丹等^[5]、刘晓柱等^[6]采用高通量测序方法分析了刺梨果渣自然发酵过程中细菌群落结构和多样性的变化;刘晓柱等^[7]结合了高通量测序技术鉴定了刺梨自然发酵过程中非酿酒酵母多样性变化,并采用纯培养技术从中分离到 5 类可培养非酿酒酵母菌。赵湖冰等^[8]、刘晓柱等^[9]则深入分析了刺梨葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)的生理特性,并采用混合接种形式进行了刺梨果酒的发酵,发现接种刺梨野生酵母影响刺梨果酒的基本理化特性,并可调节刺梨果酒的香气特性。上述研究表明,刺梨果实上蕴含着丰富的微生物资源,亟待进一步深入的研究。

挥发性风味物质的种类及其含量是食品饮料的一项重要评价指标^[10-11]。然而水果中的一些风味物质通常以稳定的前体形式存在,只有这些风味前体物质被水解,其芳香类配体风味物质才能被释放出来^[12]。 β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)是一类可水解含 β -D-葡萄糖苷键底物的水解酶,能够释放出具有香气特性游离糖苷配体,促进香气物质的产生,被广泛用于果汁、果酒等食品领域的增香^[13-15]。 β -葡萄糖苷酶普遍存在于微生物细胞中,具有酶活性高、底物特异性强、易纯化等特点,近年来受到广泛的关注^[16]。但目前分析 β -葡萄糖苷酶对刺梨果酒香气特性影响方面的研究还比较少。

课题组前期从“贵农五号”刺梨果实上分离保存的酵母菌资源库中筛选到一株产 β -葡萄糖苷酶异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalous*)。化学诱变因其诱变率高、操作简单而被广泛用于各类微生物的选育研究中^[17]。本研究采用化学诱变方法对一株产 β -葡萄糖苷酶 *W. anomalous* 菌株进行化学诱变,进一步提高其 β -葡萄糖苷酶活性。将该菌株及其诱变高产 β -葡萄糖苷酶菌株用于发酵刺梨果酒,顶空固相微萃取-气相质谱联用法检测刺梨果酒挥发性香气成分,进而分析 β -葡萄糖苷酶对刺梨果酒香气特性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

W.anomalous C4 菌株分离于“贵农五号”刺梨,保

存于本实验室;酿酒酵母 ZYMAFLORE X16 (*S.cerevisiae* X16) 法国 LAFFORT 公司;对硝基苯基- β -D 吡喃葡萄糖苷(p-nitrophenyl-D-glucopyranoside, p-NPG)、对硝基苯酚木糖苷(p-nitrophenolxyloside, p-NPX)、对硝基苯酚阿拉伯呋喃糖苷(p-nitrophenolarabinoglycoside, p-NPAG)、对硝基苯酚鼠李糖苷(p-nitrophenolrhamnoside, p-NPR)、甲基磺酸乙酯(ethylmethanesulfonate, EMS)、环己酮 分析纯,上海源叶生物科技有限公司;果胶酶(食品级,500 U/mg)、偏重亚硫酸钾(食品级)、蛋白胨、酵母粉、葡萄糖以及其它常规试剂 试剂纯,贵州博奥瑞杰生物科技有限公司。

GR60DA 型高压蒸汽灭菌锅 北京盛科信德科技有限公司;H5300 型紫外分光光度计 日本日立公司;雷磁 PHSJ-3F 型 pH 仪 上海仪电科学仪器股份有限公司;ZD-85A 型恒温摇床 常州朗越仪器制造有限公司;DHP-420 型恒温培养箱 天津天泰仪器有限公司;SA402B 型电子舌味觉分析系统 日本 INSENT 公司;TQ8040NX 型气相质谱联用仪 日本岛津仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 YPD 培养基:酵母粉 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L,固体培养基另加入琼脂粉 20 g/L,pH 自然,115 °C,0.1 MPa 灭菌 30 min,备用。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA):马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,pH 自然,115 °C,0.1 MPa 灭菌 30 min,备用。

1.2.2 菌株活化 将-80 °C 保存的 *W.anomalous* C4 菌株、*S.cerevisiae* X16 菌株划线于 YPD 固体培养基,28 °C 恒温倒置培养 48 h,4 °C 保存,用于菌株的诱变及刺梨果酒的发酵。

1.2.3 生长曲线测定 菌株生长曲线的测定参考刘晓柱等^[9]方法,以 *S.cerevisiae* X16 菌株为对照,每组平行重复 3 次。

1.2.4 菌株化学诱变 取对数生长期的 *W.anomalous* C4 菌株培养液,4000 r/min 离心收集菌体细胞,生理盐水洗涤 2 次,菌体细胞悬浮于生理盐水中使其浓度为 10^8 CFU/mL。

参考温智慧等^[18]方法对 *W.anomalous* C4 菌株进行化学诱变。取制备好的 *W.anomalous* C4 菌悬液,加入 EMS 使其终浓度分别为 0%、1%、2%、3%。

28 ℃ 温育 1 h。4000 r/min 离心收集细胞,弃上清至废液收集瓶中。重悬细胞于 5% 硫代硫酸钠溶液中,洗涤 2 次,然后再把菌体悬浮于生理盐水中,并稀释成 10^{-1} ~ 10^{-5} 浓度,涂布于 YPD 固体培养基上,28 ℃ 恒温倒置培养 48 h,计算 EMS 诱变致死率。致死率(%)=(对照组菌落数-处理组菌落数)/对照组菌落数。

1.2.5 突变菌株筛选 初筛:将 EMS 诱变后的 *W.anomalus* C4 菌株单克隆,挑至以 p-NPG 为底物的 96 孔板 PDA 培养基中,28 ℃ 培养 72 h,加入 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,观察各孔显色情况,挑选颜色较深的菌落继续进行复筛检测。

复筛:挑取初筛显色较深的 *W.anomalus* C4 菌株单克隆至 YPD 液体培养基中,28 ℃,180 r/min 培养 72 h,4000 r/min 离心收集上清液,作为粗酶液,用于测定菌株糖苷酶活性。

1.2.6 糖苷酶活性测定 β -葡萄糖苷酶活性测定按照参考文献方法^[19]进行。酶活力单位(U)定义为 pH5.0、50 ℃ 条件下,1 min 水解 p-NPG 产生 1 μmol p-NP 所需酶量。

分别取 300 μL 粗酶液于 1.5 mL 离心管中,a.加入 100 μL p-NPX、37 ℃ 反应 1 h,加入 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,静置 5 min,400 nm 处测定 OD 值,计算菌株 β -D-木糖苷酶活性;b.加入 300 μL p-NPAG 底物溶液,37 ℃ 反应 30 min,加入 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应,静置 15 min,405 nm 处测量 OD 值,计算菌株 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性;c.加入 150 μL p-NPR,45 ℃ 水浴保温 20 min,加入 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应,静置 15 min、测量 OD_{405} 值,计算菌株 α -L-鼠李糖苷酶活性。

相对酶活(relative enzyme activity, REA)计算如公式 1 所示:

$$\frac{EA_s}{EA_c} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: EA_s , 各实验组酶活; EA_c , 各对照组酶活。

突变菌株的酶活测定实验中,以突变前菌株的酶活为对照;

1.2.7 菌株遗传稳定性实验 将诱变后产 β -葡萄糖苷酶菌株接种于 YPD 液体培养基中,连续培养 8 代,每一代培养条件为:28 ℃,180 r/min,培养 72 h,以第一代菌株的酶活为对照,按照 1.2.6 方法测定各代菌株 β -葡萄糖苷酶的相对活性。

1.2.8 不同酵母菌发酵刺梨果酒的制备 取新鲜成熟刺梨,榨汁,加入 100 mg/L 的偏重亚硫酸钾、20 mg/L 的果胶酶过夜处理,加入白砂糖调整糖度至 24°Brix,分成五组,置于 2 L 无菌三角瓶中,每组平行重复三次。第一组(*S.cerevisiae*X16 组):接种 10^7 CFU/mL 的 *S.cerevisiae* X16;第二组(*W.anomalus* C4 组):接种 10^8 CFU/mL 的 *W.anomalus* C4 酵母;第三组(*W.anomalus* E3 组):接种 10^8 CFU/mL 的 *W.anomalus* E3

酵母;第四组(*S.cerevisiae* X16 + *W.anomalus* C4 组):同时接种 10^8 CFU/mL 的 *W.anomalus* C4 菌株和 10^7 CFU/mL 的 *S.cerevisiae* X16;第五组(*S.cerevisiae* X16 + *W.anomalus* E3 组):同时接种 10^8 CFU/mL 的 *W.anomalus* E3 菌株和 10^7 CFU/mL 的 *S.cerevisiae* X16 菌株。各组于 25 ℃ 恒温静置发酵。发酵结束后,取刺梨原酒,5000 r/m 离心 10 min,取上清用于各种指标检测。

1.2.9 刺梨果酒相关指标的测定

1.2.9.1 β -葡萄糖苷酶活性的测定 在刺梨果酒发酵过程中,于发酵第 0、2、4、6、8、10、12、14、16 d 分别取样,以第 10 d 的酶活为对照,采用 1.2.6 方法检测刺梨果酒发酵过程中 β -葡萄糖苷酶相对酶活的变化。

1.2.9.2 刺梨果酒基本理化指标的测定 刺梨果酒酒精度、总糖、总酸、挥发酸含量的测定采用酒类国际检测分析方法进行^[20];pH 测定采用 pH 计进行。

1.2.9.3 刺梨果酒感官特性的测定 量取各组刺梨酒 80 mL,加入至电子舌专用烧杯中,按照电子舌系统仪器使用说明书对各组刺梨果酒进行检测。采样时间为 120 s,采样速度为 1 次/s,每个样品平行测定 3 次,每个平行重复采集 4 次^[8]。

1.2.9.4 刺梨果酒挥发性香气物质的测定^[21] 量取 8 mL 各组刺梨果酒,加入 1.0 g NaCl、50 μL 环己酮内标(273.5 mg/L),密封置于 45 ℃ 水浴中,平衡 30 min。插入固相微萃取头对挥发性香气成分进行顶空萃取,萃取结束后,将萃取头插入 GC 进样口进行挥发性香气成分的解吸附。

GC 条件:进样口温度 240 ℃,进样时间 2 min,不分流进样,载气为氦气,恒线速度模式(35 cm/s),吹扫流速 3 mL/min,分流比 20:1。色谱柱为 InertCap Wax 毛细管柱(60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm),升温程序 40 ℃ 保持 3 min,3 ℃/min 升至 230 ℃,保持 8 min。

MS 条件为:EI 离子源,电子能量 70 eV,离子源温度 200 ℃,接口温度 250 ℃,全扫描模式(Q3 Scan),溶剂延迟 2 min。

挥发性成分经 GC-MS 分析后,通过与美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)谱库进行匹配,从而对挥发性成分进行定性分析;挥发性成分的定量分析采用内标法,计算公式如公式 2 所示:

$$\rho_i = \frac{A_i}{A_s} \times \rho_s \quad \text{式(2)}$$

式中: A_s , 内标物的峰面积; A_i , 未知物的峰面积; ρ_s , 内标物的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; ρ_i , 未知物的质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

香气活力值的计算:查阅各挥发性香气成分阈值,计算各香气成分风味活性值(odour activity value, OAV)。计算公式如公式 3 所示:

$$OAV = C_i / OT_i \quad \text{式 (3)}$$

式中: C_i 为香气成分质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; OT_i 为香气成分阈值, mg/L 。

1.3 数据分析

Excel 2010 对数据进行处理和作图; 数据结果以平均值 \pm 标准差表示, SPSS 21.0 对数据进行显著性分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 菌株生长曲线

W.anomalus C4 菌株的生长曲线如图 1 所示, 包含了适应期、对数生长期和稳定期。其中 0~4 h 为适应期, 4~20 h 为对数生长期, 20 h 以后为稳定期。因此, 本实验选择细胞生长旺盛的对数生长中期(12 h)进行 EMS 化学诱变实验。

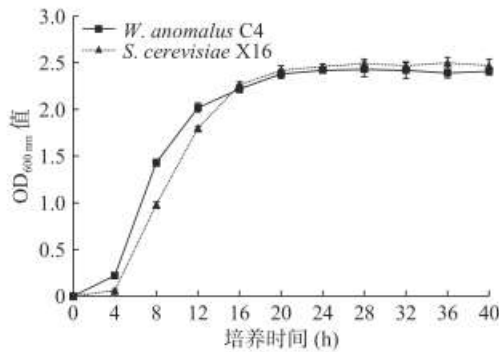


图 1 *W.anomalus* C4 菌株生长曲线
Fig.1 Growth curves of *W.anomalus* C4

2.2 诱变浓度的选择

不同浓度诱变剂 EMS 对 *W.anomalus* C4 菌株致死率如图 2 所示, 随着 EMS 浓度增加, 菌株致死率增大。EMS 浓度为 1% 时, 菌株致死率为 81%, 浓度为 2% 时, 致死率达到 93%, 而 3% 的 EMS 致死率达到 100%。通常情况下, 75%~85% 的致死率, 正突变率较高, 有利于筛选到优良性状菌株^[22]。因此本研究选择 1% 的 EMS 作为诱变浓度。

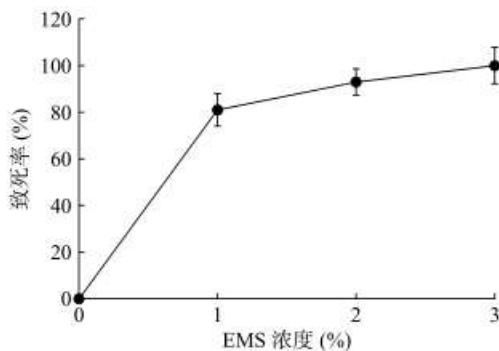


图 2 不同浓度 EMS 对 *W.anomalus* C4 菌株致死率影响
Fig.2 Effects of different concentrations of EMS on the fatality rate of *W.anomalus* C4

2.3 突变菌株的筛选

采用 p-NPG 法对 EMS 诱变的 *W.anomalus* C4 菌株进行筛选, 得到三株 β -葡萄糖苷酶活性较

高菌株, 编号为 D7、E3、F7 的酶活为(48.96 \pm 0.95)、(55.05 \pm 0.74)、(54.25 \pm 0.26)U/L(图 3)。其中 E3 菌株酶活最高, 较出发菌株 *W.anomalus*C4(41.80 \pm 0.25)U/L 提高了 31.70%, 因而选择 E3 菌株做后续分析。

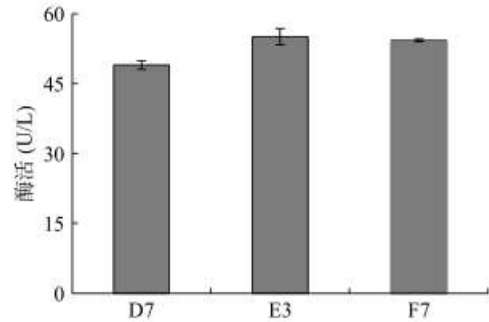


图 3 三株突变菌株 β -葡萄糖苷酶活性
Fig.3 β -glucosidase activity of three mutant strains

与出发菌株 *W.anomalus* C4 相比, EMS 诱变明显提高了 *W.anomalus* E3 菌株的 β -葡萄糖苷酶活性。*W.anomalus* E3 菌株的 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶、 β -D-木糖苷酶以及 α -L-鼠李糖苷酶活性与亲本 *W.anomalus* C4 菌株相比, 没有显著差别(图 4)。

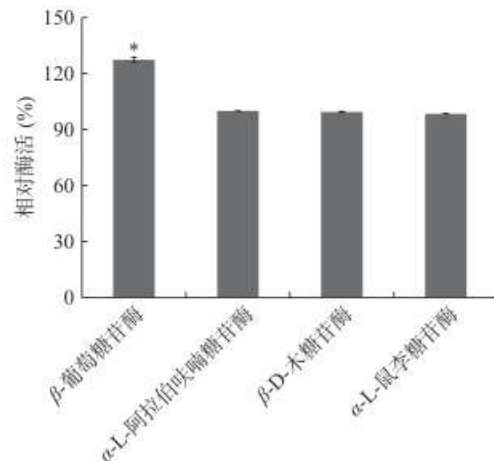


图 4 *W.anomalus* E3 菌株糖苷酶活性分析
Fig.4 Analysis of glucosidase production of *W.anomalus* E3 strain

注: 与对照组相比, *代表差异显著, $P < 0.05$ 。

2.4 突变菌株遗传稳定性分析

将 *W.anomalus* E3 菌株传代培养, 各代菌株 β -葡萄糖苷酶活性如图 5 所示, 菌株 *W.anomalus* E3 传至 8 代, 各代菌株的 β -葡萄糖苷酶均保持着较高的活性, 且与亲本菌株 *W.anomalus* C4 之间无显著性差异, 因此菌株产 β -葡萄糖苷酶遗传稳定性较好。

2.5 *W.anomalus* E3 菌株对刺梨果酒品质影响

2.5.1 β -葡萄糖苷酶活性变化 刺梨果酒发酵过程中, β -葡萄糖苷酶活性变化如图 6 所示, 在发酵的前 10 d, β -葡萄糖苷酶活性逐渐增加, 第 10 d 达到最大值。接着, β -葡萄糖苷酶活性迅速降低, 直至发酵终点。我们的前期研究发现, 低于 10%(V/V)的乙醇可

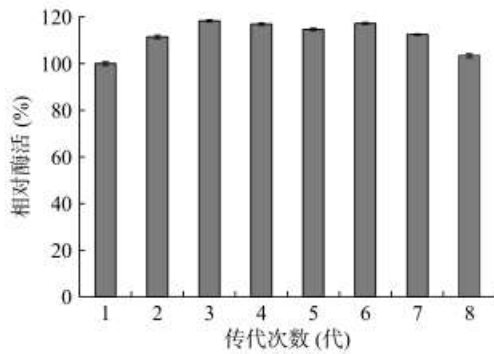


图5 *W.anomalus* E3 菌株 β -葡萄糖苷酶稳定性分析
Fig.5 Stability analysis of β -glucosidase production of *W.anomalus* E3

提高 β -葡萄糖苷酶活性,而高于 10%(V/V)的乙醇则抑制 β -葡萄糖苷酶活性^[23]。因而在刺梨果酒发酵第 10 d,其发酵液中乙醇浓度可能为 10%(V/V)左右,故 β -葡萄糖苷酶活性达到最大值。随着发酵的不断进行,发酵液中乙醇浓度继续增大,则反过来抑制 β -葡萄糖苷酶活性。当然,其它因素也可能影响 β -葡萄糖苷酶活性,如发酵液中葡萄糖也可调节 β -葡萄糖苷酶的活性,随着发酵的不断进行,葡萄糖被不断分解利用,其抑制效果逐渐被解除, β -葡萄糖苷酶活性逐渐增大,在发酵第 10 d 葡萄糖等营养逐渐被耗尽,菌体活性受到影响,故而 β -葡萄糖苷酶活性逐渐降低。

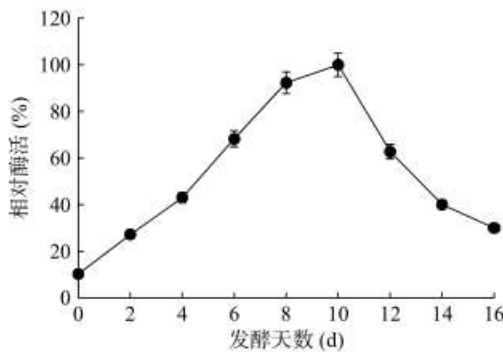


图6 刺梨果酒发酵过程中 β -葡萄糖苷酶活性变化分析
Fig.6 Changes of β -glucosidase activity during the fermentation of *Rosa roxburghii* wine

2.5.2 刺梨果酒基本理化指标 各组刺梨果酒基本理化参数如表 1 所示,接种 *W.anomalus* C4、*W.anomalus* E3 可明显降低发酵刺梨果酒的酸度值(总酸含量、挥发酸含量和 pH)以及总糖含量。研究表明,

表 1 刺梨果酒基本理化指标值

Table 1 Physical and chemical indicators of *R. roxburghii* wine

组别	酒精度	pH	总糖含量(g/L)	总酸含量(g/L)	挥发酸含量(g/L)
<i>S.cerevisiae</i> X16	12.1±0.14	3.20±0.03	12.59±0.07	3.69±0.02	0.70±0.02
<i>W.anomalus</i> C4	11.9±0.25	3.43±0.02*	9.88±0.05*	3.42±0.05*	0.62±0.02*
<i>W.anomalus</i> E3	11.6±0.33	3.43±0.03*	9.73±0.02*	3.46±0.02*	0.61±0.02*
<i>S.cerevisiae</i> X16+ <i>W.anomalus</i> C4	11.9±0.21	3.41±0.02*	9.81±0.03*	3.41±0.05*	0.64±0.02*
<i>S.cerevisiae</i> X16+ <i>W.anomalus</i> E3	11.8±0.12	3.43±0.02*	9.91±0.04*	3.46±0.06*	0.62±0.02*

注: *表示差异显著, $P < 0.05$ 。

接种纯种 *W.anomalus* 可降低空心李果酒总酸含量,但混合接种发酵空心李果酒总酸含量则没有明显降低^[21]。Ye 等^[24]采用纯种 *W.anomalus* 以及与 *S.cerevisiae* 混合发酵的苹果酒(Cider)总酸含量也表现出明显降低的特点。推测 *W.anomalus* 菌株具有降低发酵果酒酸度特性。

2.5.3 刺梨果酒电子感官特性 各组发酵刺梨果酒电子感官特性结果如图 7 所示,除酸味值外,各组发酵刺梨果酒在苦味、涩味、后味、鲜味、丰富度以及咸味之间无区别。酿酒酵母发酵刺梨果酒酸度高于其它四组刺梨果酒。

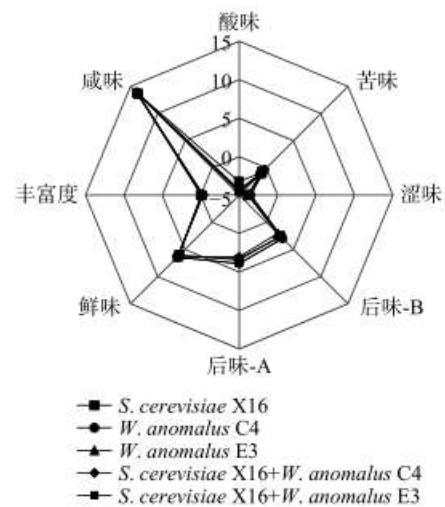


图7 刺梨果酒电子感官特性

Fig.7 Electronic sensory properties of *R. roxburghii* wine

2.5.4 刺梨果酒挥发性香气特性 采用 HS-SPME-GC-MS 方法分析了各组刺梨果酒挥发性香气物质种类与含量。*S. cerevisiae* X16 发酵刺梨果酒中检测到的挥发性物质种类最少,为 26 种;接种 *W.anomalus* C4 菌株或 E3 菌株发酵刺梨果酒挥发性物质种类增多,*W. anomalus* C4 组、*W. anomalus* E3 组、*S. cerevisiae* X16 + *W. anomalus* C4 组、*S. cerevisiae* X16 + *W. anomalus* E3 组分别为 46、47、56、48 种。

酯类化合物为各类发酵果酒中重要的香味物质,通常具有花香和水果香^[25]。接种 *W. anomalus* 可显著增加刺梨果酒中酯类香气化合物的含量,其中接种纯种 *W. anomalus* E3 组刺梨果酒酯类香气物质含量最高。乙酸乙酯是发酵果酒中最主要的酯类香气化合物之一,具有菠萝、甜果香味,阈值 150 mg/L 左

右^[26]。在葡萄酒中, 乙酸乙酯含量在 80 mg/L 左右时, 可较好的赋予葡萄酒水果香味, 还可以增加酒体的复杂性。采用纯种 *S. cerevisiae* X16 发酵生产的刺梨果酒中未检测到乙酸乙酯, 而四组接种 *W. anomalous* 发酵生产的刺梨果酒中乙酸乙酯含量均显著增加, 其中接种纯种 *W. anomalous* C4 发酵的刺梨果酒中乙酸乙酯含量最高, 为(33.84±2.51)mg/L。研究表明, *W. anomalous* 是乙酸乙酯良好的生产者, 某些菌株合成的乙酸乙酯高达 150 mg/L。乙酸乙酯的阈值为(150~200)mg/L, 但过高浓度的乙酸乙酯则使得酒体具有腐败特性^[27]。本研究中, 接种 *W. anomalous* 生产的刺梨果酒, 其乙酸乙酯浓度为 30 mg/L 左右, 因而有助于增加刺梨果酒的水果香味特性。

醇类化合物由酒精发酵过程中, 酵母菌代谢产生, 对酒体的香气特性具有重要影响^[28]。接种纯种 *W. anomalous* C4、*W. anomalous* E3 菌株以及混合接种 *W. anomalous* C4 菌株, 均明显提高了刺梨果酒中醇类香气化合物的含量(图 8)。但混合接种 *W. anomalous* E3 酵母, 发酵刺梨果酒中醇类香味化合物未显著提高。

研究表明, 提高 β -葡萄糖苷酶活性可促进萜烯类化合物的释放^[29]。本研究发现, 与亲本 *W. anomalous* C4 菌株(0.83±0.05)mg/L 相比, 化学诱变提高 β -葡萄糖苷酶活性, 可使 *W. anomalous* E3 菌株(1.16±0.09)mg/L 发酵刺梨果酒中芳樟醇含量提高。但接种产 β -葡萄糖苷酶菌株(*W. anomalous* C4、E3)发酵的刺梨果酒中仅检测到芳樟醇这一种萜烯类化合物, 未发现其它类的萜烯类化合物, 其原因还需要做进一步的分析。

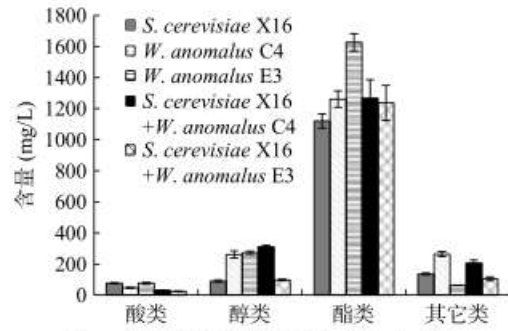


图 8 刺梨果酒挥发性香气化合物含量

Fig.8 Volatile aroma compounds contents of *R. roxburghii* wine

此外, 接种纯种 *W. anomalous* C4 菌株、混合接种 *W. anomalous* C4 菌株明显提高发酵刺梨果酒中其它类化合物的含量。因而接种 *W. anomalous* C4 菌株、E3 菌株显著可增加刺梨果酒中挥发性酯类、醇类以及其它类物质含量, 降低挥发性酸类物质含量(图 8)。

进一步分析各组发酵刺梨果酒的主要风味化合物 OAV 值, 从而评价不同发酵方式对刺梨果酒香气特性贡献度^[30-31]。OAV 大于 1 时, 表明该化合物对酒体香气贡献度突出, 反之 OAV 小于 1, 该化合物对酒体香气贡献度不突出^[15]。*S. cerevisiae* X16 纯种发酵刺梨果酒 OAV 大于 1 的化合物为 12 种, 接种 *W. anomalous* C4 菌株发酵刺梨果酒 OAV 大于 1 的化合物为 18 种, 接种 *W. anomalous* E3 菌株发酵刺梨果酒 OAV 大于 1 的化合物为 18 种, 共同接种 *S. cerevisiae* X16 与 *W. anomalous* C4 菌株发酵刺梨果酒 OAV 大

表 2 不同酵母发酵刺梨果酒主要风味化合物 OAV 值

Table 2 The odour activity values (OAVs) for main compounds of *R. roxburghii* wine fermentation with different yeasts

序号	挥发性化合物	阈值(mg/L)	OAV				
			<i>S. cerevisiae</i> X16	<i>W. anomalous</i> C4	<i>W. anomalous</i> E3	<i>S. cerevisiae</i> X16 + <i>W. anomalous</i> C4	<i>S. cerevisiae</i> X16 + <i>W. anomalous</i> E3
1	己酸	3	0.91	1.18	1.33	0.81	0.68
2	辛酸	10	2.01	2.33	3.04	1.95	1.43
3	癸酸	6	3.66	3.45	3.07	1.45	1.05
4	异丁醇	75	0.12	0.23	0.20	0.22	/
5	芳樟醇	0.02	/	41.3	58	36.75	50.25
6	苯乙醇	10	6.61	6.03	6.90	8.17	6.30
7	正己醇	1.10	/	8.07	5.90	6.74	4.46
8	正癸醇	0.40	8.33	/	17.12	4.31	/
9	异戊醇	60	/	2.62	/	3.14	/
10	正辛醇	0.80	/	/	2.65	1.66	1.63
11	乙酸己酯	0.67	/	12.03	21.56	14.46	22.21
12	乙酸异丁酯	1.60	0.98	1.23	1.35	1.66	1.29
13	乙酸异戊酯	0.16	382.31	543.79	515.93	570.19	508.56
14	乙酸苯乙酯	1.80	7.63	5.91	9.75	9.06	8.09
15	乙酸乙酯	12	/	2.82	1.85	2.54	2.07
16	丁酸乙酯	0.08	27.8	27.15	22.88	33.23	27.26
17	己酸乙酯	0.08	516.61	668.51	585.78	591.99	482.20
18	辛酸乙酯	0.58	837.62	1054.66	1031.97	932.42	761.21
19	癸酸乙酯	0.50	954.99	732.26	1066.86	897.37	722.68
20	乳酸乙酯	3.50	8.43	7.46	/	/	/
21	肉桂酸乙酯	0.01	611.8	804	684.50	751.20	814

于1的化合物为18种,共同接种 *S. cerevisiae* X16 与 *W. anomalus* E3 菌株发酵刺梨果酒 OAV 大于1的化合物为16种。与接种 *S. cerevisiae* X16 组相比,接种 *W. anomalus* 可显著增加芳樟醇、正己醇、乙酸异戊酯、乙酸乙酯、乙酸己酯等香气化合物的 OAV。相反,乳酸乙酯化合物的 OAV 在接种 *W. anomalus* 组中明显降低表 2。

3 结论

采用化学诱变剂甲基磺酸乙酯,诱变得到一株产 β -葡萄糖苷酶性能稳定,酶活为(55.05±0.74) U/L 的突变菌株 *W. anomalus* E3。与 *W. anomalus* C4 菌株相比,*W. anomalus* E3 菌株酶活提高了 31.70%。在刺梨果酒发酵过程中,*W. anomalus* β -葡萄糖苷酶活性逐渐增大,第 10 d 达到最大值,然后迅速降低。接种 *W. anomalus* C4、及其突变菌株 E3 可降低刺梨果酒包括总酸含量、挥发酸含量、pH 在内的酸度值以及总糖含量;同时还可增加刺梨果酒中挥发性酯类、醇类物质的种类和含量以及主要香气成分风味活性值(OAV)。因此,接种产 β -葡萄糖苷酶 *W. anomalus* 菌株有助于调节刺梨果酒的香气特性,增加刺梨果酒的复杂性和丰富度。

参考文献

[1] Wang L, Li C, Huang Q, et al. Polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia and regulates colon microbiota in diabetic db/db mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(1): 147-159.

[2] Liu M H, Zhang Q, Zhang Y H, et al. Chemical analysis of dietary constituents in *Rosa roxburghii* and *Rosa sterilis* fruits[J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1204.

[3] 彭邦远,张洪礼,孙小静,等.热处理刺梨汁香气物质的 SPME-GC-MS 检测与主成分分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(6): 230-236. [Peng Bangyuan, Zhang Hongli, Sun Xiaojing, et al. Analysis of volatile aroma compounds of heated *Rosa roxburghii* Tratt juice by solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and principal component analysis[J]. *Food Science*, 2018, 39(6): 230-236.]

[4] Huang X, Yan H, Zhai L, et al. Characterization of the *Rosa roxburghii* Tratt transcriptome and analysis of MYB genes[J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0203014.

[5] 谢丹,刘晓燕,毕远林,等.基于高通量测序分析刺梨果渣自然发酵过程中细菌群落结构及多样性[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(22): 110-114. [Xie Dan, Liu Xiaoyan, Bi Yuanlin, et al. Bacterial community structure and diversity during *Rosa roxburghii* pomace fermentation based on high-throughput sequencing analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(22): 110-114.]

[6] 刘晓柱,张远林,李银凤,等.高通量测序技术分析刺梨自然发酵过程中细菌多样性[J]. *中国酿造*, 2020, 39(8): 82-85. [Liu Xiaozhu, Zhang Yuanlin, Li Yinfeng, et al. Analysis of bacterial diversity during natural fermentation of *Rosa roxburghii* based on high-throughput sequencing[J]. *China Brewing*, 2020, 39(8): 82-85.]

[7] 刘晓柱,李银凤,于志海,等.刺梨自然发酵过程中非酿酒酵母多样性分析[J]. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1696-1708. [Liu Xiaozhu, Li Yinfeng, Yu Zhihai, et al. Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts during natural fermentation of *Rosa roxburghii*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(8): 1696-1708.]

[8] 赵湖冰,黎华,田野,等.一株刺梨非酿酒酵母的分离鉴定、生理特性及混菌发酵研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(16): 114-120. [Zhao Hubing, Li Hua, Tian Ye, et al. Isolation, identification, physiological characteristics and mixed fermentation of a non-*Saccharomyces cerevisiae* from *Rosa roxburghii*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(16): 114-120.]

[9] 刘晓柱,赵湖冰,李银凤,等.一株刺梨葡萄汁有孢汉逊酵母的鉴定及酿酒特性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(8): 97-104. [Liu Xiaozhu, Zhao Hubing, Li Yinfeng, et al. Identification and oenological properties analysis of a strain of *Hanseniaspora uvarum* from *Rosa roxburghii*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(8): 97-104.]

[10] 马媛,耿伟涛,王金菊,等.乳酸菌代谢与食品风味物质的形成[J]. *中国调味品*, 2019, 44(1): 159-163, 172. [Ma Yuan, Geng Weitao, Wang Jinju, et al. Lactic acid bacteria metabolism and formation of food flavor substances[J]. *China Condiment*, 2019, 44(1): 159-163, 172.]

[11] Albertin W, Zimmer A, Miot-Sertier C, et al. Combined effect of the *Saccharomyces cerevisiae* lag phase and the non-*Saccharomyces* consortium to enhance wine fruitiness and complexity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, 101(20): 7603-7620.

[12] Cui C H, Jeon B M, Fu Y, et al. High-density immobilization of a ginsenoside-transforming β -glucosidase for enhanced food-grade production of minor ginsenosides[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(17): 7003-7015.

[13] 刘晓柱,张远林,黎华,等. β -葡萄糖苷酶在酒类酿造中研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(6): 8-12. [Liu Xiaozhu, Zhang Yuanlin, Li Hua, et al. Research progress on β -glucosidase in alcoholic drink-brewing[J]. *China Brewing*, 2020, 39(6): 8-12.]

[14] 张阳,江璐,郭志君,等.利用 β -葡萄糖苷酶提高葡萄酒香气的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(4): 316-324. [Zhang Yang, Jiang Lu, Guo Zhijun, et al. Improving wine aroma by using β -glucosidase: A review[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(4): 316-324.]

[15] Vervoort Y, Herrera-Malaver B, Mertens S, et al. Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus* β -glucosidase and its potential for bioflavouring[J]. *Journal of Applied Microbiology*. 2016, 121(3): 721-33.

[16] 汤晓宏,胡文效,蒋锡龙,等.葡萄酒酿造过程中产 β -葡萄糖苷酶酵母菌研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(4): 7-12. [Tang Xiaohong, Hu Wenxiao, Jiang Xilong, et al. Research progress on β -glucosidase-producing yeast in the brewing process of wine[J]. *China Brewing*, 2020, 39(4): 7-12.]

[17] 倪晓丰,赵宾,王东旭,等.硫酸二乙酯化学诱变选育高核糖核酸酿酒酵母及培养基组成优化[J]. *中国酿造*, 2018, 37(8): 32-36. [Ni Xiaofeng, Zhao Bin, Wang Dongxu, et al. Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high RNA content by DES chemical

- mutagenesis and optimization of medium components[J]. *China Brewing*, 2018, 37(8): 32–36.]
- [18] 温智慧, 李敬知, 冯瑞琪, 等. EMS 诱变高异丁醇耐受性酿酒酵母的筛选[J]. *中国酿造*, 2018, 37(10): 66–71. [Wen Zhihui, Li Jingzhi, Feng Ruiqi, et al. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* with high isobutanol tolerance by EMS mutagenesis[J]. *China Brewing*, 2018, 37(10): 66–71.]
- [19] 张媛媛, 苏敏, 朴春红, 等. 微生物来源的 β -葡萄糖苷酶在食品工业中应用进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(16): 329–335. [Zhang Yuanyuan, Su Min, Piao Chunhong, et al. Progress on the β -Glucosidase from microorganisms and its applications in food industry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(16): 329–335.]
- [20] OIV. 2019. Compendium of international methods for wine and must analysis (Vol. 1). Paris, France.
- [21] 刘晓柱, 黎华, 李银凤, 李婷婷, 等. 接种异常威克汉姆酵母对空心李果酒理化特性及香气组分的影响[J]. *食品科技*, 2020, 45(11): 21–27. [Liu Xiaozhu, Li Hua, Li Yinfeng, et al. Effects of inoculation *Wickerhamomyces anomalus* on the physicochemical property and aroma profile of *Prunus Salicina* Lindl. cv ‘Kongxinli’ fruit wine[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(11): 21–27.]
- [22] 王婧, 张莉, 张宏海, 等. 产 β -葡萄糖苷酶酿酒酵母菌株的化学诱变选育及产酶条件优化[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(9): 139–146. [Wang Jing, Zhang Li, Zhang Honghai, et al. Chemical mutation of strain and optimization of production β -Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(9): 139–146.]
- [23] Liu X Z, Li Y F, Yu Z H, et al. Screening and characterisation of β -glucosidase production strains from *Rosa roxburghii* Tratt[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2021, 17(1): 1–9.
- [24] Ye M, Yue T, Yuan Y. Effects of sequential mixed cultures of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on apple cider fermentation[J]. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(6): 873–82.
- [25] Pérez-Torrado R, Barrio E, Querol A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids[J]. *Crit Rev Food Science and Nutrition*, 2018, 58(11): 1780–1790.
- [26] 阎贺静, 张鸣宇, 孙康, 等. 野生酿酒酵母和葡萄汁有抱汉逊酵母混菌发酵对玫瑰香葡萄酒香气的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(11): 165–171. [Yan Hejing, Zhang Mingyu, Sun Kang, et al. Effects of the co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* on aroma of Muscat wine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(11): 165–171.]
- [27] Beatriz Padilla, Jose V. Gil, Paloma Manzanares. Challenges of the non-conventional yeast *Wickerhamomyces anomalus* in winemaking[J]. 2018, 4(3).
- [28] Escribano-Viana R, González-Arenzana L, Portu J, Garijo P, et al. Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- *Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts[J]. *Food Research International*, 2018, 112: 17–24.
- [29] Baffi M A, Tobal T, Henrique J, et al. A novel β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and application in winemaking[J]. *Journal of Food Science* 2011, 76(7): C997–1002.
- [30] 李红娟, 孔维府, 周新明, 等. 蛇龙珠新品系葡萄酒香气成分分析及评价[J]. *中国酿造*, 2020, 39(12): 164–170. [Li Hongjuan, Kong Weifu, Zhou Xinming, et al. Analysis and evaluation of aroma components in wine brewed with new variety of Cabernet Gernischt[J]. *China Brewing*, 2020, 39(12): 164–170.]
- [31] 刘政海, 董志刚, 李晓梅, 等. 黄土高原地区干红葡萄酒香气组分分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(24): 204–209. [Liu Zhenghai, Dong Zhigang, Li Xiaomei, et al. Aroma components of dry red wine brewed by different grape varieties in Loess Plateau[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(24): 204–209.]