

德尔布有孢圆酵母与酿酒酵母 纯种及混合发酵苹果酒过程中的酶活变化

曾朝珍, 康三江, 张霁红, 张芳, 张海燕, 袁晶, 宋娟

(甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所, 甘肃省果蔬贮藏加工技术创新中心, 甘肃兰州 730070)

摘要: 本研究以富士苹果为原料, 将德尔布有孢圆酵母 (*Torulaspora delbrueckii*) 与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 按纯培养和混合培养 (MST1: 10^5 cfu/mL *S.cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *T. delbrueckii*; MST2: 10^4 cfu/mL *S.cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *T. delbrueckii*) 接种到苹果汁中, 研究不同发酵方式酿造苹果酒中 β -葡萄糖苷酶、果胶酶、蛋白酶及淀粉酶活性的变化。研究表明: 在纯培养中, 除了 α -淀粉酶和果胶酶以外, 酿酒酵母 32168 产生的 β -葡萄糖苷酶、酸性蛋白酶的最大酶活性值及酶曲线下面积都高于德尔布有孢圆酵母 1004, 最大酶活性值为 2.03 nmol/(min·mL) 和 43.93 nmol/(min·mL), 酶曲线下面积为 10.65 和 223.73。而果胶酶曲线下面积在德尔布有孢圆酵母 1004 中较高, 达到了 14.17, 而 α -淀粉酶无明显差异。混合培养中, 除了酸性蛋白酶和 α -淀粉酶以外, β -葡萄糖苷酶和果胶酶最大的酶活性值及酶曲线下面积都高于纯培养, 最大酶活性值最高为 2.37 nmol/(min·mL) 和 4.56 mg/(h·mL), 酶曲线下面积最大为 15.11 和 19.71。德尔布有孢圆酵母与酿酒酵母纯培养与混合培养在整个发酵过程中都产生了大量的酶活性物质, 这些酶有助于催化苹果汁中天然前体聚合物的水解和提高苹果酒的品质, 而混合接种可以作为不同于酿酒酵母纯种发酵的另一种发酵方式。

关键词: 德尔布有孢圆酵母; 酿酒酵母; 混合发酵; 酶活性

文章编号: 1673-9078(2020)01-143-149

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.020

Enzyme Activity Production by Pure and Mixed Cultures of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* during Cider Fermentation

ZENG Chao-zhen, KANG San-jiang, ZHANG Ji-hong, ZHANG Fang, ZHANG Hai-yan, YUAN Jing, SONG Juan

(Agricultural Product Storage and Processing Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Gansu Innovation Center of Fruit and Vegetable Storage and Processing, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In this paper, Fuji apple was used as raw material and the changes of β -glucosidase, pectinase, protease and amylase activities in pure and mixed cultures (MST1: 10^5 cfu/mL *Saccharomyces cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *Torulaspora delbrueckii*; MST2: 10^4 cfu/mL *Saccharomyces cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *Torulaspora delbrueckii*) during apple juice fermentation were studied. The results showed that in pure culture, except for α -amylase and pectinase, the maximum enzyme activities of β -glucosidase and acid protease produced by *S. cerevisiae* 32168 were higher than those of *T. delbrueckii* 1004, the maximum activity level were 2.03 nmol/(min·mL) and 43.93 nmol/(min·mL), respectively; the areas under the enzyme curve were 10.65 and 223.73, respectively. The area under the pectinase curve was higher in *T. delbrueckii* 1004, reaching 14.17, while there was no significant difference in α -amylase. In the mixed culture, except for acid protease and α -amylase, the maximum enzyme activity values of β -glucosidase and pectinase were higher than those of the pure culture and the maximum enzyme activity value was up to 2.37 nmol/(min·mL) and 4.56mg/h·mL, respectively; the areas under the enzyme curve were up to 15.11 and 19.71, respectively. A lot of enzymes were produced by pure and mixed of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* throughout the fermentation process. These enzymes help to catalyze the hydrolysis of natural precursor polymers in apple juice and improve the quality of cider. The mixed inoculation can be used as another different fermentation method from the pure fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: *Torulaspora delbrueckii*; *Saccharomyces cerevisiae*; mixed fermentation; enzyme activity

苹果酒酿造过程是一个复杂的微生物代谢过程,

收稿日期: 2019-08-01

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-27)

作者简介: 曾朝珍(1981-), 男, 副研究员, 研究方向: 食品发酵

通讯作者: 康三江(1977-), 男, 研究员, 研究方向: 果蔬贮藏加工

中间产物多, 产品成分及品质受原料品种、菌种、发酵工艺等因素影响较大。在所有这些因素中, 酵母对风味产生起着至关重要的作用^[1]。其中, 非酿酒酵母 (*non-saccharomyces*) 作为菌种发酵剂被应用到果酒酿造中且对果酒品质至关重要的作用已得到肯定^[2-4]。人

们普遍认为非酿酒酵母能够分泌糖苷酶、果胶酶、蛋白酶以及脂肪水解酶等多种酶类,从而代谢产生多种酯类和醇类等挥发性香气物质,使酒体有更浓郁的发酵香味,整体质量得到提升。但是,由于非酿酒酵母的酒精发酵力较弱及单一菌株发酵的苹果酒香气单薄,而多种菌株混合发酵可以增加香气的复杂性,使挥发性香气成分的种类和含量都有所增加,因此,国内外学者一般是发酵过程中将非酿酒酵母与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)混合使用以改善苹果酒香气质量^[5-7]。许多关于果酒酿造的相关研究表明,非酿酒酵母(假丝酵母属、德巴利酵母属、有孢汉逊酵母属、汉逊酵母属、克勒克氏酵母属、梅奇酵母属、毕赤酵母属、裂殖酵母属、德尔布有孢酵母属和接合酵母属)能够在发酵过程中以较高浓度存在更长的时间^[8],因此,他们可以影响果酒的成分组成^[9]。混合发酵中酿酒酵母与非酿酒酵母的生长、代谢、相互作用机制及香气成分影响已有报道^[10-13]。而果酒酿造中酿酒酵母与非酿酒酵母混合发酵中相关酶活性的研究较少。本文拟对德尔布有孢圆酵母(*Torulasporea delbrueckii*)与酿酒酵母在苹果酒纯种及混合发酵中相关酶活性(β -葡萄糖苷酶、果胶酶、蛋白酶及淀粉酶)的研究,评价不同发酵方式中相关酶活性的产生能力,为实现苹果酒液态发酵的稳定性和可操控性提供理论依据和实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

富士苹果,采自甘肃庆阳市;酿酒酵母 32168、德尔布有孢圆酵母 1004,中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)提供; β -葡萄糖苷酶试剂盒、酸性蛋白酶试剂盒、 α -淀粉酶试剂盒、果胶酶试剂盒,苏州科铭生物技术有限公司提供。

1.2 仪器与设备

Breville-BJE500F 型榨汁机,澳大利亚铂富公司;LRH-70 型恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;YXQ-LS-75G 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;DK-S24 数显恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;Multiskan GO 1510 全波长酶标仪、MIRCOCL 17R 离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 苹果酒发酵

富士苹果经破碎、榨汁,在 70 °C 杀菌 20 min 后

冷却至室温。苹果汁成分为 13 Brix,总酸度为 3.6 g/L, pH 值为 4.0。在 500 mL 三角瓶中装入 350 mL 苹果汁,然后将德尔布有孢圆酵母(CICC 1004)与酿酒酵母(CICC 32168)按纯培养(CICC 1004 和 CICC 32168)和混合培养(MST1: 10^5 cfu/mL *S.cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *T. delbrueckii*; MST2: 10^4 cfu/mL *S.cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *T. delbrueckii*)接种到苹果汁中,在 20 °C 下进行恒温发酵,建立纯培养及混合培养体系,每隔 24 h 定期从所有发酵液中取 10 mL 样品,用于测定不同发酵方式酿造苹果酒过程中 β -葡萄糖苷酶、果胶酶、酸性蛋白酶及 α -淀粉酶的活性变化。

1.4 发酵产物分析

乙醇、残糖、总酸等理化指标依据 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》进行测定^[14], pH 采用 METTLER TOLEDO pH 计进行测定,酵母发酵力的测定采用失重法,以二氧化碳挥发产生的失重来衡量酵母发酵力的大小,每隔 24 h 称重 1 次,直至发酵结束^[15]。

1.5 酶活性测定

酶活性以每毫升上清液的单位表示: U/mL。测定三个参数以评估酶活性:酶曲线下面积(AUEC)为测定第一天至最后一天酶活性随时间变化的绘制图表下面积;在发酵的时间过程中最大的酶活性;最大酶活性发酵时间。

1.5.1 β -葡萄糖苷酶活性测定

β -葡萄糖苷酶分解对-硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷生成对-硝基苯酚,后者在 400 nm 有最大吸收峰,通过测定吸光值升高速率来计算 β -葡萄糖苷酶活性,其含量测定参考文献 Chassagne (2005)报道的方法^[16]。

1.5.2 果胶酶活性测定

果胶酶水解果胶生成半乳糖醛酸,具有还原性醛基,与 DNS 试剂反应生成红棕色物质,在 540 nm 有特征吸收峰,测定 540 nm 处吸光值变化计算果胶酶活性,其含量测定参考文献 Oliveira (2006)报道的方法^[17]。

1.5.3 酸性蛋白酶活性测定

酸性蛋白酶活性采用茚三酮比色法进行测定,其含量测定参考文献 Mendoza (2007)报道的方法^[18]。

1.5.4 α -淀粉酶活性测定

α -淀粉水解酶催化淀粉水解生成还原糖,还原糖还原 3,5-二硝基水杨酸生成棕红色物质,在 540 nm 有吸收峰;通过测定 540 nm 吸光度增加速率,计算淀粉酶活性,其含量测定参考文献 Vazquez (2003)报道

的方法^[19]。

2018 软件对实验数据进行作图分析。

1.6 数据处理

实验数据通过 Excel 2003 进行汇总处理, 采用 DPS V.7.05 进行显著性差异分析 ($p < 0.05$) 及 origin

2 结果与分析

2.1 不同发酵方式苹果酒理化成分的变化

表 1 德尔布有孢圆酵母和酿酒酵母纯种及混合发酵苹果酒理化成分

Table 1 Physicochemical components of apple cider fermented by pure and mixed of *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae*

项目	Sc32168	Td1004	MST1	MST2
乙醇/(% vol)	10.80±0.20 ^a	8.4±0.40 ^b	8.80±0.20 ^b	10.60±0.20 ^a
残糖/(g/L)	8.84±0.22 ^b	5.36±0.35 ^c	7.77±0.45 ^b	12.97±0.39 ^a
pH 值	3.83±0.01 ^b	3.91±0.00 ^a	3.76±0.00 ^c	3.75±0.00 ^d
总酸/(g/L)	4.62±0.00 ^b	5.01±0.39 ^b	5.01±0.00 ^b	6.55±0.39 ^a

注: MST1: 10^5 cfu/mL *S.cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *T. delbrueckii*; MST2: 10^4 cfu/mL *S.cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *T. delbrueckii*; 不同小写字母代表差异显著 ($p < 0.05$)。

表 1 中是不同发酵方式下苹果酒中乙醇, 残糖, 可溶性固形物、pH 及总酸的最终值。MST2 发酵苹果酒乙醇值与酿酒酵母 32168 产生的乙醇值差异不显著 ($p > 0.05$), 分别为 10.6% 和 10.8%; 而德尔布有孢圆酵母 1004 纯种发酵产生的乙醇最低为 8.4%, 且与 MST1 差异不显著 ($p > 0.05$)。残糖 MST2 含量最高, 其残糖含量为 12.97 g/L, 德尔布有孢圆酵母 1004 最低, 其残糖含量为 5.36 g/L, 而 MST1 和酿酒酵母 32168 含量次之 (7.77 g/L 和 5.36 g/L) 且差异不显著 ($p > 0.05$)。PH 值在不同发酵苹果酒之间差异显著 ($p < 0.05$), 其中 MST2 具有最低的 PH 值为 3.75, 而对于总酸, MST2 含量最高为 6.55 g/L, 且与其它含量之间差异显著 ($p < 0.05$)。

酵结束二氧化碳挥发产生失重, 以失重来衡量酵母发酵力的强弱。不同接种方式发酵苹果酒过程中酒精发酵力的变化如图 1。图 1 结果表明, 纯培养酿酒酵母 32168 酒精发酵力较强, 二氧化碳挥发产生失重在发酵 3 d 达到最高为 5.52 g, 并且在第 8 d 发酵结束, 而德尔布有孢圆酵母 1004 直到第 5 d 二氧化碳挥发失重才达到最高为 5.52 g, 并且在第 8 d 发酵并未结束。对于混合发酵 MST1 和 MST2, 其酒精发酵力变化相似, 在第 4 d 二氧化碳挥发失重达到最高, 分别为 4.64 g 和 4.8 g, 且在第 8 d 发酵并未结束。

2.2 不同接种方式发酵苹果酒过程中酒精发酵力的变化

非酿酒酵母与酿酒酵母在混菌发酵过程中会发生相互作用并影响各自在发酵过程中的生长及代谢^[20,21]。这种影响尤其反应在酒精发酵力的变化上。酿酒酵母 32168 在第 8 d 二氧化碳失重不再变化而发酵结束, 而其它发酵由于二氧化碳失重还在变化并未发酵结束, 从而导致混合发酵中残糖的含量与酿酒酵母 32168 相比含量较高 (表 1)。本研究最终发酵产物的分析显示出酿酒酵母具有相当大的影响, 这尤其反映在乙醇的最终生成速率上。与纯酿酒酵母 32168 相比, 接种比例的影响也是明显的, 其使混合发酵比纯酿酒酵母具有更高的总酸和更低的 pH。这与非酿酒酵母通常产生高浓度乙酸有关^[22]。根据报道, 德尔布有孢圆酵母在正常或高糖葡萄汁发酵中生成较低的乙酸^[23], 但最近的报道显示, 一些德尔布有孢圆酵母菌株能够产生与商业酿酒酵母菌株相似甚至更高水平的挥发性酸^[24]。

醇力的变化

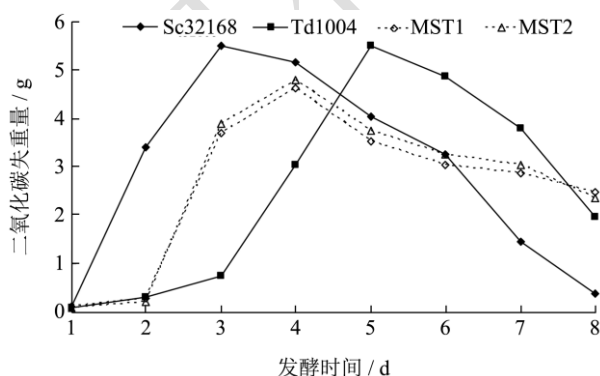


图 1 不同接种方式发酵苹果酒过程中酒精发酵力的变化

Fig.1 Changes of alcohol fermentation capacity during fermentation of apple cider in different inoculation methods

在厌氧条件下酵母发酵产生酒精与二氧化碳, 发

2.3 不同接种方式发酵苹果酒过程中相关酶

活性变化

表 2 纯培养及混合培养下相关酶活性最大值及对应酶曲线下面积 (AUEC)

发酵条件	β -葡萄糖苷酶/[nmol/(min·mL)]		酸性蛋白酶/[nmol/(min·mL)]	
	最大值	酶曲线下面积	最大值	酶曲线下面积
Sc32168	2.03±0.02 (1) [△]	10.65±0.26 ^b	43.93±1.22 (2)	223.73±2.50 ^a
Td1004	1.97±0.05 (3)	10.31±0.29 ^b	38.44±1.36 (1)	199.09±1.30 ^b
MST1 [#]	2.35±0.04 (6)	15.11±0.02 ^a	31.33±1.11 (1)	185.69±0.18 ^c
MST2 [#]	2.37±0.09 (4)	14.33±0.05 ^a	38.14±0.19 (1)	221.39±0.05 ^a
发酵条件	α -淀粉酶/[mg/(min·mL)]		果胶酶/[mg/(h·mL)]	
	最大值	酶曲线下面积	最大值	酶曲线下面积
Sc32168	0.04±0.00 (1)	0.27±0.01 ^a	3.68±0.05 (1)	13.30±0.15 ^d
Td1004	0.04±0.00 (2)	0.27±0.01 ^a	3.38±0.05 (1)	14.17±0.05 ^c
MST1 [#]	0.04±0.00 (3)	0.28±0.00 ^a	4.56±0.06 (3)	18.31±0.08 ^b
MST2 [#]	0.05±0.00 (1)	0.29±0.01 ^a	4.55±0.07 (1)	19.71±0.10 ^a

注: [#]: MST1: 10⁵ cfu/mL *S.cerevisiae*/10⁶ cfu/mL *T. delbrueckii*; MST2: 10⁴ cfu/mL *S.cerevisiae*/10⁶ cfu/mL *T. delbrueckii*. [△]括号中的值表示每个条件下最大酶活性的发酵天数。不同小写字母代表差异显著 ($p < 0.05$)。

由表 2 结果可知, 对苹果酒发酵过程中相关酶活性变化的统计分析显示, 在整个实验过程中, 不同发酵方式下不同酶活性都存在显著差异 ($p < 0.05$)。所有的发酵过程中除了 β -葡萄糖苷酶以外, 酸性蛋白酶、 α -淀粉酶、果胶酶在第 1 d 到第 3 d 具有最大的酶活性。在纯培养中, 除了 α -淀粉酶以外, 酿酒酵母 32168 产生的 β -葡萄糖苷酶、酸性蛋白酶和 α -淀粉酶的酶活性最大值都高于德尔布有孢圆酵母 1004。混合培养中, β -葡萄糖苷酶和果胶酶最大的酶活性值都高于纯培养, 酸性蛋白酶最大的酶活性值低于纯培养, 而 α -淀粉酶无明显差异 ($p > 0.05$)。不同酶曲线下面积结果表明, 在纯培养发酵中, 酿酒酵母 32168 的 β -葡萄糖苷酶和酸性蛋白酶的酶曲线下面积高于德尔布有孢圆酵母 1004, 而果胶酶曲线下面积在德尔布有孢圆酵母 1004 中较高, 而 α -淀粉酶曲线下面积在酿酒酵母 32168 和德尔布有孢圆酵母 1004 中相同。混合培养中, 除了酸性蛋白酶以外, β -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶和果胶酶的曲线下面积都高于纯培养, MST2 中酸性蛋白酶、 α -淀粉酶和果胶酶的曲线下面积都高于 MST1。

2.4 不同接种方式发酵苹果酒过程中 β -葡萄糖苷酶活性变化

图 2 结果表明, 混合培养 MST1 和 MST2 具有最高的 β -葡萄糖苷酶曲线下面积值且差异不显著 ($p > 0.05$), 比德尔布有孢圆酵母 1004 发酵曲线下面积分别高了 47% 和 39%。德尔布有孢圆酵母 1004 发酵 β -葡萄糖苷酶曲线下面积最小, 酿酒酵母 32168 发酵次之。当将酿酒酵母 32168 和德尔布有孢圆酵母

1004 进行混合发酵苹果酒后, β -葡萄糖苷酶活性显著增加且与纯发酵差异显著 ($p < 0.05$)。因此, 本研究表明混菌处理由于 β -葡萄糖苷酶活性较高从而对香气糖苷的水解更为彻底, 能够增加香气成分的含量, 对苹果酒香气质量的提升作用要高于酿酒酵母单菌株发酵。

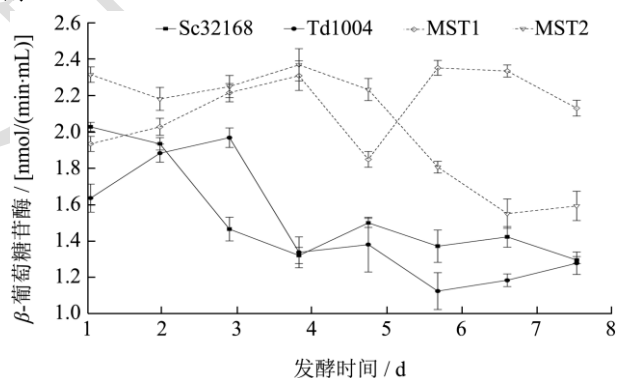


图 2 不同接种方式发酵苹果酒过程中 β -葡萄糖苷酶活性变化
Fig.2 Changes of β -glucosidase activity during fermentation of cider by different inoculation methods

研究发酵过程中酶活性的变化是非常重要的, 因为在整个发酵过程中酶活性值是波动的^[25]。本研究在对不同接种方式发酵苹果酒中酶活性变化的研究发现在酒精发酵阶段酶活性值是不恒定的, 表明发酵过程中发生了许多生化反应。Blasco 等认为酵母是葡萄酒酿造过程中的主要酶源^[26], 本研究中酶活性的最大值与酵母发酵动力学特征有关。在二氧化碳失重量减少之前检测到最大值, 除了混合发酵 MSH1 中的 β -葡萄糖苷酶活性。Winterhalter 及 Fernández 等发现酿酒酵母具有较低的 β -葡萄糖苷酶活性^[27,28], 而本研究关于酿酒酵母表达的 β -葡萄糖苷酶的结果与上述发现相矛

盾,而与 Agnès 等发现的三种表现出高 β -葡萄糖苷酶活性的酿酒酵母菌株的结果一致^[29]。大多关于葡萄酒酿造条件下 β -葡萄糖苷酶活性的研究表明,这些酶在葡萄酒的酸碱度下不稳定,能被高浓度的乙醇或糖抑制^[30]。本研究中 β -葡萄糖苷酶活性在 MSH2 显示出比 MSH1 更低的 β -葡萄糖苷酶活性水平,因为在 MSH2 产生较高的乙醇及高残糖量,影响了这种酶的活性。

2.5 不同接种方式发酵苹果酒过程中果胶酶

活性变化

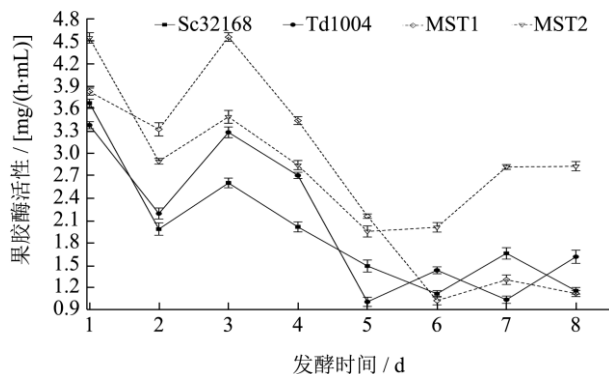


图3 不同接种方式发酵苹果酒过程中果胶酶活性变化

Fig.3 Changes of pectinase activity during fermentation of cider in different inoculation methods

由图3结果可知,混合培养 MST1 和 MST2 具有最高的果胶酶曲线下面积且差异不显著 ($p>0.05$),比德尔布有孢圆酵母 1004 发酵曲线下面积分别高了 30% 和 39%。酿酒酵母 32168 发酵果胶酶曲线下面积最小,德尔布有孢圆酵母 1004 发酵次之。当将酿酒酵母 32168 和德尔布有孢圆酵母 1004 进行混合发酵苹果酒后,果胶酶活性显著增加且与纯种发酵差异显著 ($p<0.05$)。此结果表明,混合条件影响果胶酶的表达且果胶酶在发酵起始阶段含量相对较高,但是随着发酵的进行果胶酶活性逐渐降低。混合发酵也影响果胶酶的活性,在本研究中 MST2 的果胶酶 AUEC 值高于 MST1。

2.6 不同接种方式发酵苹果酒过程中酸性蛋白酶活性变化

图4结果表明,不同接种方式发酵苹果酒过程中酸性蛋白酶在发酵前3d都具有较高的酶活性,同时酸性蛋白酶活性随着发酵时间的延长呈现逐渐降低的趋势。酿酒酵母 32168 纯培养发酵具有最高的酸性蛋白酶曲线下面积,混合培养 MST1 发酵的酸性蛋白酶曲线下面积比 MST2 高,但是与酿酒酵母 32168 纯培

养发酵相比分别降低了 17% 和 1%,与德尔布有孢圆酵母 1004 发酵相比, MST1 降低了 7%,而 MST2 反而增加了 12%。此结果表明在混合培养发酵中德尔布有孢圆酵母对酸性蛋白酶总活性的贡献较多。混合发酵也影响酸性蛋白酶的活性,在本研究中 MST2 的蛋白酶 AUEC 值高于 MST1。非酿酒酵母可以产生胞外蛋白酶^[31],这与非酿酒酵母对该酶总活性的贡献有关。

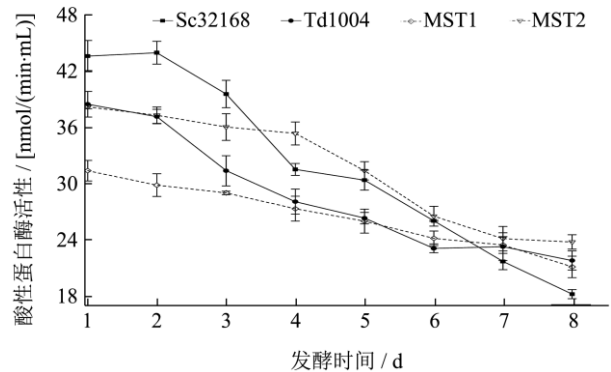


图4 不同接种方式发酵苹果酒过程中酸性蛋白酶活性变化

Fig.4 Changes of acid protease activity during fermentation of cider in different inoculation methods

2.7 不同接种方式发酵苹果酒过程中 α -淀粉酶活性变化

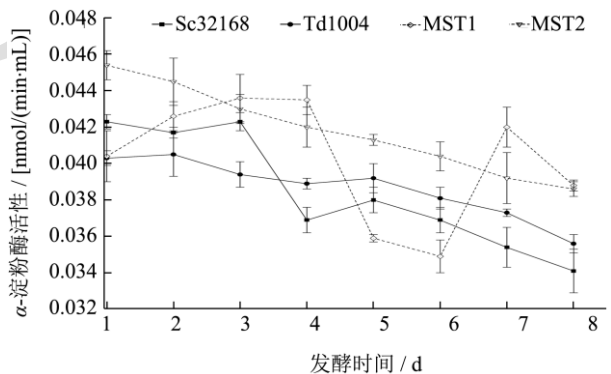


图5 不同接种方式发酵苹果酒过程中 α -淀粉酶活性变化

Fig.5 Changes of α -amylase activity during fermentation of cider in different inoculation methods

由图5结果可知,不同接种方式发酵苹果酒过程中 α -淀粉酶活性随着发酵时间的延长呈现逐渐降低的趋势。虽然 α -淀粉酶活性值较低,但在整个发酵过程中都检测到了其酶活值。另外,混合发酵 MST1 和 MST2 的 α -淀粉酶曲线下面积虽然比纯种发酵的曲线下面积略高,但是不同接种方式发酵苹果酒过程中 α -淀粉酶曲线下面积差异不显著。

3 结论

3.1 酿酒酵母和非酿酒酵母在苹果酒发酵过程中产生了一些与聚合物水解有关的酶, 这些酶有助于前体物质的水解, 从而影响苹果酒的芳香特性和品质。

3.2 在混合培养物中, 用 MST2 (10^4 cfu/mL *S.cerevisiae*/ 10^6 cfu/mL *T. delbrueckii*) 获得测定的几乎所有 4 种酶活性的最高值。这些结果表明, 该接种方式可以作为不同于酿酒酵母纯种发酵的另一种发酵方案。但是该发酵方案最终对苹果酒品质的改变效应将有待于进一步系统研究。

3.3 本研究的结果有助于更好地理解酵母酶活性在苹果酒发酵过程中发生的变化影响, 从而提高我们对微生物相互作用的理解。而在该过程中发生的不同接种方式及酶活性对苹果酒风味物质的影响需要进一步研究。

参考文献

- [1] Mateo J, Maicas S. Application of *non-Saccharomyces* yeasts to wine-making process [J]. *Fermentation*, 2016, 2(3): 1-13
- [2] Medina K, Boido E, Fariña, L, et al. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae* [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2513-2521
- [3] Gobbi M, Comitimi F, Domizio P, et al. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine [J]. *Food Microbiology*, 2013, 33(2): 271-281
- [4] Sun S Y, Gong H S, Jiang X M, et al. Selected *non-Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines [J]. *Food Microbiology*, 2014, 44: 15-23
- [5] Lee P R, Hui S, Kho C, et al. Yeast ratio is a critical factor for sequential fermentation of papaya wine by *Williopsis saturnus* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 6(4): 385-393
- [6] Ciani M, Beco L, Comitini F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multi-starter wine yeast fermentations [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 108(2): 239-245
- [7] Contreras A, Hidalgo C, Schmidt S, et al. The application of *non-Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 205: 7-15
- [8] Zott K, Claisse O, Lucas P, et al. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(5): 559-567
- [9] Fleet G H. Wine yeasts for the future [J]. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(7): 979-995
- [10] Kemsawasd V, Branco P, Alneida M G, et al. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(14): 1-8
- [11] Wang C, Mas A, Esteve-Zaraoso B. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 206: 67-74
- [12] 曾朝珍, 康三江, 李明泽, 张霁红, 张海燕, 张芳. 苹果白兰地酿造中酿酒酵母与异常汉逊酵母的相互作用 [J]. *酿酒科技*, 2017, 8: 32-37
- [13] ZENG Chao-zhen, KANG San-jiang, LI Ming-ze, et al. Interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala* during apple brandy fermentation [J]. *Liquor-Making Science & Technology* 2017, 8: 32-37
- [13] 曾朝珍, 康三江, 张霁红, 张芳, 张海燕, 李明泽. 异常汉逊酵母与酿酒酵母混菌发酵对苹果白兰地风味物质的影响 [J]. *食品工业科技*, 2018, 39(5): 250-255
- [13] ZENG Chao-zhen, KANG San-jiang, ZHANG Ji-hong, et al. Effect of mixed cultured of *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* on flavor compounds during apple brandy fermentation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(5): 250-255
- [14] GB/T 15038-2006, 葡萄酒、果酒通用分析方法[S]
- [14] GB/T 15038-2006, Analytical Methods of Wine and Fruit Wine [S]
- [15] 唐洁, 王海燕, 徐岩. 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵对白酒液态发酵效率和风味物质的影响 [J]. *微生物学通报*, 2012, 39(7): 921-930
- [15] TANG Jie, WANG Hai-Yan, XU Yan. Effect of mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala* on fermentation efficiency and flavor compounds in Chinese liquor [J]. *Microbiology China*, 2012, 39(7): 921-930
- [16] Chassagne D, Vemizeau S, Nedjma M, et al. Hydrolysis and sorption by *Saccharomyces cerevisiae* strains of Chardonnay grape must glycosides during fermentation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(2): 212-217
- [17] Oliveira K F, Malavolta L, Souza C S, et al. Pectinolytic

- activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(4): 633-640
- [18] Mendoza L M, de Nadra M C, Farías M E. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(7):1057-1063
- [19] Vazquez F, Vallejo Herrera M D, de Figueroa L I C, et al. Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 16:283-297
- [20] Viana F, Gil J V, Genovés S, et al. Rational selection of *non-Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(6): 778-785
- [21] 曾朝珍,康三江,张霁红,等.混菌发酵体系中异常汉逊酵母生长抑制机制研究[J].*中国农业科技导报*,2019,21(3):48-53
ZENG Chao-zhen, KANG San-jiang, ZHANG Ji-hong, et al. Mechanism of early growth arrests of *Hansenula anomala* in mixed Culture with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2019, 21(3):48-53
- [22] Fleet G, Heard G. Yeasts: Growth during fermentation [J]. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 1993, 86(1-2): 42-43
- [23] Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, et al. Impact of mixed *Torulaspota delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 122(3): 312-320
- [24] Renault P, Miot-Sertier C, Marullo P, et al. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 134(3): 201-210
- [25] Zamuz S, Sestelo A B F, Poza M, et al. Enzymes as potential markers of wine aging [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2004, 110(3): 220-226
- [26] Blasco L, Veiga-Crespo P, Poza M, et al. Hydrolases as markers of wine aging [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2006, 22(11): 1229-1233
- [27] Winterhalter P, Skouroumounis G K. Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1997,55: 73-105
- [28] Fernández M, Úbeda J F, Briones A I, et al. Typing of *non-Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 59(1-2): 29-36
- [29] Agnès D, Ziya G, Sapis J C, et al. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of muscat wine [J]. *American Journal of Enology & Viticulture*, 1994, 45(3): 291-296
- [30] 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
- [31] Dizy M, Bisson L F. Proteolytic activity of yeast stains during grape juice fermentation [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2000, 51(2): 155-167

(上接第 241 页)

- [23] 钟瑾,刘一达,肖愈.辣椒籽中生物活性成分及其功能活性研究进展[J].*食品与机械*,2019,5:231-236
ZHONG Jin, LIU Yi-da, XIAO Yu. Advances in the study of bioactive components and their functional activities in pepper seeds [J]. *Food and Machinery*, 2019, 5: 231-236
- [24] Zou Y, Ma K, Tiang M X. Chemical composition and nutritive value of hot pepper seed (*Capsicum annuum*) grown in Northeast region of China [J]. *Food Science and Technology*, 2015, 35 (4): 659-663
- [25] 刘姗,杨柳,何述栋,等.杏鲍菇料酒的研制及风味研究[J].*食品与发酵工业*,2019,45(4):123-128
LIU Shan, YANG Liu, HE Shu-dong, et al. Development and flavor study of apricot and abalone mushroom liquor [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2019, 45(4): 123-128
- [26] 李春宇.《贵州糍粑辣椒》食品安全地方标准制定工作的研究[J].*食品安全导刊*,2017,11:64-65
LI Chun-yu.《Guizhou Ciba Chili》study on the establishment of local food safety standards [J]. *Food Safety Guide*, 2017, 11: 64-65