

马克斯克鲁维酵母协同台湾根霉固态发酵产 β -葡萄糖苷酶工艺优化及应用

雷青青, 付哲洋, 吴鑫颖*, 蔡洪露, 肖甜甜, 王爱灵

(贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州省生态特色食品新质化加工与贮藏全省重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为提高 β -葡萄糖苷酶产量, 利用前期研究筛选得到的一株高产 β -葡萄糖苷酶的马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 协同台湾根霉 (*Rhizopus formosensis*) Q303进行固态发酵。通过单因素与响应面试验优化发酵条件, 并将所得粗酶液应用于白酸汤制备。采用基于超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 的植物广泛靶标代谢组学技术测定白酸汤中的挥发性风味物质, 结合多元统计分析及方差分析筛选显著差异挥发性风味物质。结果表明, 产 β -葡萄糖苷酶的最佳发酵条件为: 26%荞麦壳、1.5%玉米浆、料液比10:9 (g/mL)、马克斯克鲁维酵母及台湾根霉接种量分别为3.0%和0.4%、发酵温度24℃、发酵时间74 h。在此优化条件下, β -葡萄糖苷酶活性可达 (197.02 ± 2.34) U/g, 为优化前的15.27倍。添加 β -葡萄糖苷酶制备的白酸汤中共检测出槲皮素、花青素等40种显著差异挥发性风味物质, 与对照组对比发现 β -葡萄糖苷酶可有效水解释放花翠素-3-*O*-葡萄糖苷等结合态糖苷类风味前体物质。该研究为 β -葡萄糖苷酶的高效生产和白酸汤风味的丰富与调控提供新思路。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 台湾根霉; 马克斯克鲁维酵母; 协同固态发酵; 工艺优化; 白酸汤

Process Optimization of β -Glucosidase Production by Solid-State Fermentation of *Kluyveromyces marxianus* Co-fermented with *Rhizopus formosensis* and Its Application

LEI Qingqing, FU Zheyang, WU Xinying*, CAI Honglu, XIAO Tiantian, WANG Ailing

(Guizhou Key Laboratory of New Quality Processing and Storage of Ecological Specialty Food,

School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025)

Abstract: To enhance β -glucosidase yield, a high-yield β -glucosidase strain of *Kluyveromyces marxianus*, previously screened in preliminary studies, was co-cultured with *Rhizopus formosensis* Q303 in solid-state fermentation. Fermentation conditions were optimized through single-factor experiments and response surface methodology, and the crude enzyme solution was applied to prepare white sour soup. The volatile flavor compounds in white sour soup were determined using plant broad-targeted metabolomics technology based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and the significantly different volatile flavor compounds were screened by combining multivariate statistical analysis and variance analysis. The results indicated that the optimal fermentation conditions for β -glucosidase production were as follows: buckwheat hulls 26%, corn wort 1.5%, solid and liquid ratio 10:9 (g/mL), *K. marxianus* inoculum 3.0%, *R. formosensis* Q303 inoculum 0.4%, fermentation temperature 24℃, and time 74 h. Under these optimal conditions, the β -glucosidase activity reached (197.02 ± 2.34) U/g, which was 15.27 times that before optimization. A total of 40 significantly different volatile flavor compounds, including quercetin and anthocyanins, were detected in white sour soup prepared with β -glucosidase. Compared with the control group, it was found that β -glucosidase could effectively hydrolyze and release binding glycoside flavor precursors such as anthocyanin-3-*O*-glucoside. This study provided new ideas for the efficient production of β -glucosidase and the enrichment and regulation of the flavor of white sour soup.

Keywords: β -glucosidase; *Rhizopus formosensis*; *Kluyveromyces marxianus*; solid-state co-fermentation; process optimization; white sour soup

收稿日期: 2025-09-25

基金项目: 贵州大学引进人才科研项目 (贵大基合字 (2022) 2号)

第一作者简介: 雷青青 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工与安全。E-mail: 2804536104@qq.com

*通信作者简介: 吴鑫颖 (1975—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品功能微生物及风味。E-mail: ce.xywu@gzu.edu.cn

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.04.013

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 0254-5071 (2026) 04-0094-08

引文格式:

雷青青, 付哲洋, 吴鑫颖, 等. 马克斯克鲁维酵母协同台湾根霉固态发酵产 β -葡萄糖苷酶工艺优化及应用[J].中国酿造, 2026, 45(4): 94-101. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.04.013. <https://www.chinabrewing.net.cn>LEI Qingqing, FU Zheyang, WU Xinying, et al. Process optimization of β -glucosidase production by solid-state fermentation of *Kluyveromyces marxianus* co-fermented with *Rhizopus formosensis* and its application[J]. China Brewing, 2026, 45(4): 94-101. (in Chinese with English abstract) DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.04.013. <https://www.chinabrewing.net.cn>

β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21) 是一种能水解 β -1,4-葡萄糖苷键的酶, 可分解多种糖苷类化合物, 在化妆品、食品和医药等领域有重要应用价值^[1-3]。在食品工业中, 其常作为风味酶使用^[4], 通过水解糖苷键释放风味前体^[5], 增强食品风味。例如, 该酶能水解茶叶和葡萄汁中的糖苷, 提升茶香和果汁风味, 并将黄酮类化合物转化为生物利用度更高的苷元, 增强饮料的健康功能^[6-8]。 β -葡萄糖苷酶可从植物、动物或微生物中获取, 其中, 微生物发酵法因其成本低、效率高的优势而受到广泛关注^[9]。该技术通常以液态发酵为主, 不同菌株的产酶能力差异显著, 酶活性范围为28.15~140 U/mL^[10-11]。孔晓双等^[12]采用鲁戈斯芽孢杆菌 (*Bacillus rugosus*) 进行液态发酵后, β -葡萄糖苷酶活性可达 (5.640 $\pm$ 0.085) U/mL。张玉千等^[13]以棘孢曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 进行液态发酵产 β -葡萄糖苷酶, 优化工艺后其酶活性可达29.23 U/mL。相较于液态发酵, 固态发酵具有原料预处理简单、所产酶活高、污染少, 并可利用农业副产物等优势^[14]。固态发酵产酶的研究常以麦麸、啤酒糟等农业副产品为低成本底物, 利用黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、酵母等微生物生产如阿魏酸酯酶等多种酶类, 研究重点包括菌株筛选、发酵条件优化及相关酶的应用探索^[15-17]。如利用黑曲霉对油菜秸秆进行固态发酵, 优化后 β -葡萄糖苷酶活性可达127.4 U/g以上, 显示出良好应用潜力^[18]。史通等^[19]通过优化黑曲霉与里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 协同固态发酵玉米芯工艺, 使 β -葡萄糖苷酶活性显著提升至132.45 U/g。固态发酵产 β -葡萄糖苷酶的研究虽已取得明显进展, 但目前菌种使用仍较为集中, 主要以黑曲霉为主, 且多为单一菌种发酵, 针对酵母及其他菌种的协同发酵研究相对有限。

白酸汤 (又称米酸汤), 是贵州特色传统发酵食品之一, 以糯米粉为原料, 经自然发酵制成, 口感清爽柔和, 酸中带甜, 香气融合米香与乳酸芳香, 并具有一定的保健功能^[20]。然而, 目前市面上的白酸汤产品在风味层次上仍显单一, 整体风味丰富度尚有提升空间。针对此问题, 现有的研究方向主要围绕原材料的替换、辅料的添加以及优势微生物筛选等, 有研究采用添加其他材料如石斛花从而增加了白酸汤风味和营养成分^[21]。吴茂钊等^[22]采用从白酸汤中筛选的优势菌进行发酵,

有效提高了酸汤的风味品质。这些研究从原辅料调控和功能菌株选育等角度, 为白酸汤风味优化提供了重要路径。然而, 在现有体系中, 关于酶在风味形成过程中的具体作用机制及其潜在影响有待进一步揭示。

课题组前期研究从贵州传统苗家白酸汤中筛选出一株优势菌株——马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)^[23], 经测定其具有较强的 β -葡萄糖苷酶分泌能力。鉴于该酵母自身淀粉降解能力较弱, 本研究以荞麦粉和荞麦壳为发酵基质, 引入具备高效淀粉水解能力的台湾根霉 (*Rhizopus formosensis*) 进行协同固态发酵, 通过单因素与响应面试验优化发酵工艺, 进一步提升 β -葡萄糖苷酶活性。并将所得粗酶液应用于白酸汤制备过程, 利用超高效液相色谱-质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 技术测定白酸汤中的挥发性风味物质, 结合正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)、变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 及方差分析筛选显著差异挥发性风味物质, 评估 β -葡萄糖苷酶在提升酸汤风味方面的应用潜力, 以期在传统酸汤中功能微生物的开发与应用奠定技术基础, 也为绿色、高效的 β -葡萄糖苷酶生产提供一种可行的固态发酵工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马克斯克鲁维酵母、台湾根霉 (*Rhizopus formosensis*) Q303 本实验室保藏; 白酸汤母液 贵州省凯里市某知名酸汤企业。

对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, PNP) (分析纯) 上海源叶生物科技有限公司; 对硝基苯酚 (分析纯) 上海易恩化学技术有限公司; 无水乙酸钠 (分析纯) 成都金山化学试剂有限公司; 冰乙酸 (分析纯) 上海麦克林生化科技股份有限公司; 甲醇、乙腈 (均为色谱纯) 德国CNW公司; 葡萄糖、无水碳酸钠 (均为分析纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 孟加拉红培养基 上海博微生物科技有限公司; 2-氯苯丙氨酸 (内标) 美国Sigma公司。

酵母浸出粉胨葡萄糖 (yeast extract peptone dextrose, YPD) 培养基: 酵母浸粉10 g, 蛋白胨20 g, 葡萄糖20 g, 蒸馏水1 000 mL, 115 °C 灭菌20 min。

初始固态发酵培养基: 荞麦粉10 g, 填充剂 (荞麦壳-麸皮质量比为1:1) 10 g, 按照料液比10:9 (g/mL) 添加18 mL 蒸馏水, 于121 °C 灭菌50 min。

1.2 仪器与设备

LDZF-75L高压蒸汽灭菌锅 上海东亚压力容器制造有限公司; SHP-250智能生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; ExionLC AD超高效液相色谱、Trap 6500+高灵敏度质谱仪 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司; ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 沃特世科技 (上海) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 固态发酵产β-葡萄糖苷酶工艺流程

分别取-80 °C 保藏的马克斯克鲁维酵母与台湾根霉甘油菌各一支, 解冻后, 无菌操作下分别吸取100 μL菌液, 均匀涂布于相应的固体平板: 酵母采用YPD平板, 台湾根霉采用孟加拉红培养基平板。将平板置于28 °C 恒温培养箱中培养24~48 h。待平板长出形态清晰的单一菌落后, 用无菌接种环挑取典型单菌落, 划线转接至新的平板中, 于相同条件下继续培养。上述纯化步骤重复2~3次, 直至获得形态均一、无杂菌污染的单菌落。将活化后的马克斯克鲁维酵母接种于YPD液体培养基中, 28 °C 振荡培养12 h, 制备浓度为 1×10^8 CFU/mL的菌悬液。将活化后的台湾根霉接种于孟加拉红培养基, 在相同温度下培养48 h, 随后用无菌水冲洗收集, 获得浓度为 1×10^8 个/mL的孢子悬浮液。将接种量为10% (V/V) 的马克斯克鲁维酵母菌悬液和0.4% (V/V) 的台湾根霉孢子悬浮液共同接种于已灭菌的初始固态发酵培养基中, 置于25 °C 恒温生化培养箱内培养72 h。发酵结束后, 取10 g 发酵产物加入50 mL 0.1 mol/L、pH 5.0的醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 室温下振荡浸提2 h, 经滤纸过滤后得到粗酶液, 经测定初始β-葡萄糖苷酶活性为 (12.9 ± 2.17) U/g。

1.3.2 固态发酵条件优化

1.3.2.1 单因素试验

参考文献[24-26], 考察以下不同条件对产β-葡萄糖苷酶活性的影响: 发酵方式 (台湾根霉单一发酵、马克斯克鲁维酵母单一发酵、先添加台湾根霉发酵8 h后, 再加入马克斯克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母与台湾根霉同时加入)、碳源种类 (大米粉、玉米粉、小麦粉、荞麦粉)、填充剂质量比 (麸皮: 荞麦壳=1:0、0:1、4:1、1:4、1:1, m/m) 及添加量 (10%、16%、21%、26%、31%)、台湾根霉接种量 (0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)、氮源种类 (硫酸铵、蛋白胨、玉米浆和酵母浸粉) 及添加

量 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、4.0%)、料液比 (10:3、10:5、10:7、10:9、10:11、10:13, g/mL)、马克斯克鲁维酵母接种量 (1.0%、2.5%、5.0%、8.0%、10.0%、13.0%、15.0%)、发酵温度 (20、25、30、35、40 °C)、发酵时间 (24、36、48、72、96 h)。

1.3.2.2 响应面试验

基于单因素试验结果, 选取填充剂添加量 (A)、马克斯克鲁维酵母接种量 (B)、发酵温度 (C)、发酵时间 (D) 为自变量, 以β-葡萄糖苷酶活性 (Y) 为响应值, 采用Design-Expert设计模型, 进行4因素3水平Box-Behnken试验, 因素与水平见表1。

表1 发酵条件优化Box-Behnken响应面试验因素及水平
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken response surface tests for fermentation conditions optimization

因素	水平		
	-1	0	1
A填充剂添加量/%	21	26	31
B马克斯克鲁维酵母接种量/%	1.0	2.5	5.0
C发酵温度/°C	20	25	30
D发酵时间/h	48	72	96

1.3.3 β-葡萄糖苷酶活性测定

参考夏俊芳等^[27]的方法并略作修改。取0.1 mL粗酶液, 加入0.2 mL 5 mmol/L PNPG溶液与0.7 mL醋酸缓冲液混匀, 于45 °C 水浴30 min, 加入2 mL 0.5 mol/L碳酸钠溶液显色, 9 mL蒸馏水混匀, 在410 nm波长处测定吸光度。以对硝基苯酚配制标准溶液, 绘制标准曲线, 回归方程为 $y = 1.3638x + 0.0031$, 决定系数 $R^2 = 0.9998$ 。β-葡萄糖苷酶活性的定义: 在上述反应条件下, 1 min内水解PNPG生成1 μmol对硝基苯酚所需要的酶量。

1.3.4 粗酶液发酵制备白酸汤

将煮沸后的米汤倒入发酵缸中, 冷却至室温后接入白酸汤母液, 并添加10% (V/V) 粗酶液 (采用蒸馏水浸提最佳条件下获得的发酵培养物), 混匀, 于28~30 °C 条件下静置发酵72 h, 制得添加粗酶液发酵的白酸汤样品, 同时以不添加粗酶液传统方法发酵的白酸汤作为对照。

1.3.5 白酸汤挥发性风味物质分析

采用基于UPLC-MS/MS的植物广泛靶向代谢组学技术^[28]分析传统发酵白酸汤和添加粗酶液发酵白酸汤中的挥发性风味物质含量差异, 以探究粗酶液对白酸汤风味的影响。

1.3.5.1 样品前处理

将白酸汤样品置于冰水中超声15 min, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 吸取上清液稀释5倍后经0.22 μm 微孔滤膜过滤, 装入进样瓶, 上机检测。

1.3.5.2 UPLC-MS/MS条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温40℃; 流动相为0.1%甲酸溶液(A)和乙腈(B), 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 98% A; 0.5~10 min, 98%~50% A; 10~13 min, 50%~5% A; 13~15 min, 5%~98% A。流速为0.4 mL/min; 进样器温度4℃, 进样量4 μL。

电喷雾离子源; 喷雾电压+5 500/-4 500 V; 气帘气压力35 psi; 离子源温度400℃。

1.3.5.3 定性定量

使用质谱自带软件SCIEX Analyst Work Station Software 1.6.3进行数据采集, 将结果与美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)标准谱库检索比对, 依据保留时间进行定性。采用内标法定量。

1.4 数据处理

每组实验重复3次, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过SPSS Statistics 27.0.1和Design-Expert 8.0.1对数据进行显著性分析($P < 0.05$ 认为差异显著)。使用SIMCA 14.1对白酸汤挥发性风味物质进行OPLS-DA模型构建, 以VIP>1、 $P < 0.05$ 为条件筛选显著差异挥发性风味物质。采用Origin 2022软件绘图。

2 结果与分析

2.1 固态发酵条件单因素试验结果

由图1A可知, 台湾根霉与马克斯克鲁维酵母同时加入发酵体系时获得的酶活性最高, 为(13.80±0.26) U/g, 台湾根霉的添加时间对β-葡萄糖苷酶活性无显著影响($P > 0.05$)。酶活性的显著提升可能是两菌共培养产生的多种酶类和代谢产物协同促进的结果。为简化实验步骤, 本研究采用两菌同时加入作为最佳接种方式。

由图1B可知, 整个发酵过程中, 碳源为荞麦粉时所产β-葡萄糖苷酶活性始终高于其他3组, 酶活性最大值为(49.65±0.87) U/g, 这可能是由于荞麦中含有丰富的膳食纤维、抗性淀粉等, 有利于发酵菌种的生长^[29]。赵明谋等^[30]以荞麦为基质发酵生产纳豆激酶取得了良好的效果, 酶活性高达152.5 U/mL, 可见荞麦作为发酵基质有益于微生物的生长代谢。因此选择荞麦粉作为最优碳源。

由图1C可知, 仅荞麦壳作为培养基填充剂时, β-葡萄糖苷酶活性最高, 为(75.49±3.96) U/g。原因可能在于二者颗粒特性不同: 荞麦壳大而坚硬, 麸皮细软。仅用麸皮填充过于密实, 易导致供氧不足; 而荞麦壳能形成更多空隙, 利于氧气输送, 满足台湾根霉生长所需, 更有利于其液化糖化作用, 进而为马克斯克鲁维酵母提

供可发酵糖奠定了基础。Zhao Chi等^[31]利用台湾根霉及酿酒酵母发酵黄酒的研究也证明了台湾根霉降解淀粉为可发酵糖从而供给酵母利用的协同作用。由图1D可知, 当填充剂添加量为10%~31%时, β-葡萄糖苷酶活性先升高后降低, 当填充剂添加量为26%时, β-葡萄糖苷酶活性最高, 为(110.06±3.42) U/g。因此选择26%添加量的荞麦壳作为最优填充剂。

由图1E可知, 台湾根霉接种量为0.2%~0.5%, β-葡萄糖苷酶活性先升高后降低, 当台湾根霉接种量为0.4%, β-葡萄糖苷酶活性最高, 为(92.34±2.86) U/g。因此选择最优台湾根霉接种量为0.4%。

由图1F可知, 氮源为玉米浆时所产β-葡萄糖苷酶活性显著高于其他3组($P < 0.05$), 为(138.69±6.18) U/g。可能是因为玉米浆不仅含有氮源, 还提供还原糖、乳酸和维生素等营养成分, 对微生物生长代谢具有重要促进作用^[32]。有机氮源的整体效果优于无机氮源, 该结果与顾斌涛等^[33]的研究结果一致。由图1G可知, 当氮源(硫酸铵)添加量为0.5%~4.0%, β-葡萄糖苷酶活性先升高后降低, 当氮源添加量为1.5%, β-葡萄糖苷酶活性最高, 为(187.79±6.30) U/g。因此选择1.5%添加量的玉米浆作为最优氮源。

由图1H可知, 随着料液比的变化, β-葡萄糖苷酶活性先升高后降低, 当料液比为10:9(g/mL)时, β-葡萄糖苷酶活性最高, 达(177.55±1.32) U/g。过低的料液比会导致培养基通气度降低, 物料黏性增加, 易结团, 从而影响微生物的生长与代谢; 过高的料液比又会导致培养基过于干燥而不能满足微生物生长所需的水分。因此选择10:9(g/mL)作为最优料液比。

由图1I可知, 马克斯克鲁维酵母接种量为1.0%~15.0%, β-葡萄糖苷酶活性先升高后降低, 当接种量为2.5%时β-葡萄糖苷酶活性最高, 为(172.81±21.14) U/g, 表明此时其与台湾根霉的协同作用效果最佳。然而, 随着接种量进一步增加, 可能因培养基中营养成分限制, 反而抑制了菌株的生长与代谢, 导致酶活性下降, 说明两者比例需协调才能充分发挥协同效应。因此选择最优马克斯克鲁维酵母接种量为2.5%。

由图1J可知, 发酵温度为20~40℃, β-葡萄糖苷酶活性先升高后降低, 当发酵温度为25℃时, β-葡萄糖苷酶活性达到最高, 为(192.60±5.04) U/g。因此选择最优发酵温度为25℃。

由图1K可知, 发酵时间为24~96 h, β-葡萄糖苷酶活性随发酵进行逐步上升, 在72 h时趋于稳定, 因此为兼顾酶活性和发酵效率, 最终选择72 h作为最优发酵时间。

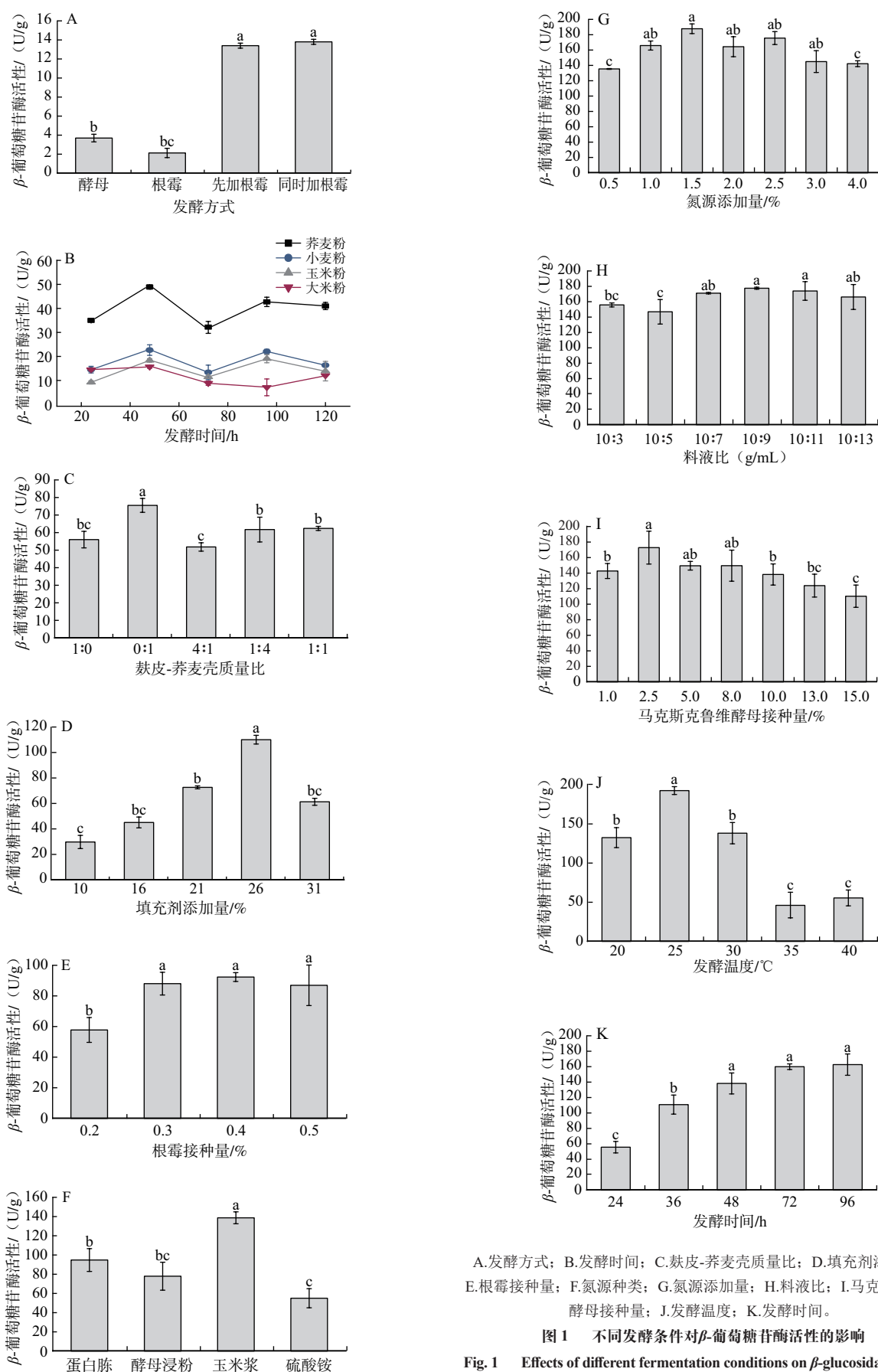


图1 不同发酵条件对β-葡萄糖苷酶活性的影响
A.发酵方式; B.发酵时间; C.麸皮-荞麦壳质量比; D.填充剂添加量; E.根霉接种量; F.氮源种类; G.氮源添加量; H.料液比; I.马克斯克鲁维母接种量; J.发酵温度; K.发酵时间。

Fig. 1 Effects of different fermentation conditions on β-glucosidase activity

2.2 固态发酵条件响应面试验结果

表2 发酵条件优化Box-Behnken响应面试验设计与结果
Table 2 Design and results of Box-Behnken response surface tests for fermentation conditions optimization

试验号	A	B	C	D	β -葡萄糖苷酶活性/(U/g)
1	1	-1	0	0	58.94
2	0	0	0	-1	27.02
3	0	0	1	1	93.10
4	1	0	0	1	61.80
5	0	0	1	-1	98.09
6	0	0	0	0	203.34
7	-1	0	0	-1	32.71
8	0	0	0	0	184.30
9	0	0	0	0	202.14
10	0	-1	0	1	128.77
11	0	1	1	0	113.70
12	0	0	-1	1	131.58
13	0	1	0	-1	156.12
14	-1	-1	0	0	69.02
15	1	1	0	0	27.82
16	1	0	-1	0	87.90
17	-1	0	-1	0	76.20
18	-1	1	0	0	36.17
19	1	0	1	0	89.49
20	0	1	-1	0	117.85
21	0	1	0	1	194.87
22	-1	0	1	0	69.87
23	-1	0	0	1	39.75
24	0	-1	1	0	90.97
25	0	0	-1	-1	117.07
26	0	-1	0	-1	172.36
27	0	-1	-1	0	109.68

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	62 626.94	14	4 473.35	3.800	0.013 0	*
A	71.30	1	71.30	0.061	0.809 8	
B	23.49	1	23.49	0.020	0.890 0	
C	602.93	1	602.93	0.510	0.487 9	
D	180.19	1	180.19	0.150	0.702 5	
AB	0.75	1	0.75	0.001	0.980 3	
AC	15.68	1	15.68	0.013	0.910 0	
AD	192.38	1	192.38	0.160	0.910 0	
BC	53.00	1	53.00	0.045	0.693 1	
BD	1 694.97	1	1 694.97	1.440	0.835 5	
CD	95.06	1	95.06	0.081	0.253 3	
A ²	59 262.91	1	59 262.91	50.340	<0.000 1	**
B ²	4 949.95	1	4 949.95	4.200	0.062 8	
C ²	8 874.48	1	8 874.48	7.450	0.018 3	*
D ²	5 929.63	1	5 929.63	5.040	0.044 4	*
残差	14 126.38	12	1 177.20			
失拟项	13 897.97	10	1 389.90	12.220	0.079	
纯误差	227.41	2	113.70			
所有项	76 753.32	26				

注：*，显著（ $P<0.05$ ）；**，极显著（ $P<0.01$ ）。

基于单因素试验结果，以 β -葡萄糖苷酶活性（ Y ）为响应值，以填充剂添加量（ A ）、马克斯克鲁维酵母接种量（ B ）、发酵温度（ C ）、发酵时间（ D ）4个因素为自变量，应用Design-Expert 8.0.1设计模型，进行4因素3水平Box-Behnken响应面试验，结果见表2，方差分析结果见表3。

利用软件对表2结果进行多元二次回归拟合，得到的二次多项式回归方程为： $Y=196.59+2.44A+1.40B-7.09C+3.88D+0.43AB+1.98AC+6.94AD+3.64BC+20.59BD-4.88CD-105.41A^2-30.46B^2-40.56C^2-33.34D^2$ 。由表3可知，回归模型显著（ $P=0.013<0.05$ ），失拟项不显著（ $P=0.079>0.05$ ），回归方程决定系数 $R^2=0.816$ ，说明该模型可靠，拟合度良好。由 P 值可知，二次项 A^2 对 β -葡萄糖苷酶活性影响极显著（ $P<0.01$ ），二次项 C^2 和 D^2 对 β -葡萄糖苷酶活性影响显著（ $P<0.05$ ），其他项对结果影响不显著。由 F 值可知，4个因素对 β -葡萄糖苷酶活性影响主次顺序为发酵温度（ C ）>发酵时间（ D ）>填充剂添加量（ A ）>马克斯克鲁维酵母接种量（ B ）。

利用Design-Expert 8.0.1得到产 β -葡萄糖苷酶最佳发酵工艺条件为：填充剂添加量26.28%，马克斯克鲁维酵母接种量3.3%，发酵温度24.55℃，发酵时间73.91 h，计算得到该条件下 β -葡萄糖苷酶活性的预测值为197.11 U/g。为方便实际操作，将发酵条件修正为填充剂添加量26%，马克斯克鲁维酵母接种量3.0%，发酵温度24℃，发酵时间74 h，在此优化条件下进行3次验证实验，得到 β -葡萄糖苷酶活性的实际值为（197.02±2.34）U/g，与预测值相差不大，验证了模型可靠性。与优化前的酶活性（12.90 U/g）相比提升了15.27倍。

2.3 白酸汤中挥发性风味物质分析

利用UPLC-MS/MS技术从白酸汤中共检测出挥发性风味物质186种，包括醇类16种、酸类59种、酚类88种、其他23种。基于检测结果构建OPLS-DA模型，以传统发酵白酸汤为对照，以VIP>1、 $P<0.05$ 为条件共筛选出40种显著差异挥发性风味物质。由图2a可知，与传统发酵的白酸汤相比，添加粗酶液的白酸汤中有33种物质含量明显降低，其中糖苷类或可能被 β -葡萄糖苷酶作用的物质有异槲皮苷^[6]、花翠素-3- O -葡萄糖苷、天竺葵素-3- O -葡萄糖苷、芍药素-3-葡萄糖苷、槲皮素-7-葡萄糖苷和橙皮素-7- O -葡萄糖苷等。经 β -葡萄糖苷酶作用后，槲皮素、橙皮素以及花青素等在自然中常以结合糖苷形式存在的物质才能被释放出来^[34]。而槲皮素等含量下降，这应该和它们进一步转化和降解有关。结合图2b可知，槲皮素、橙皮素、花翠素等物质降解后相关成分也发生了变化，如二氢杨梅素、阿魏酸等下游降解物发生了含量积累，这有助于增强酸汤的风味丰富性并提高其抗氧化活性。马

懿等^[35]研究中指出二氢杨梅素能够增加梨酒的抗氧化活性,同时还能使乙酸乙酯等挥发性风味物质含量增加,从而丰富梨酒风味。而肉桂酸甲酯则能增加果香,带来樱桃和芳香酯香气^[36]。阿魏酸是风味前体物质,同时还具有优异的抗氧化能力^[37]。除此以外,这些物质的后续降解产物,如咖啡酸、香草酸等对风味也具有重要作用。如葡萄酒中添加咖啡酸能够提高酯类含量,从而增强其花香、果香和甜香^[38]。香草酸作为一种常用食品调味剂的芳香酚酸,还具备营养保健和辅助治疗的潜力^[39],原儿茶酸和儿茶酚等物质的抗氧化活性也能增强食品的健康特性^[40]。本研究结果印证了Wang Hongling等^[41]利用 β -葡萄糖苷酶提升龙井茶风味方法的有效性。综上, β -葡萄糖苷酶通过降解结合糖苷,对白酸汤风味的丰富与增强具有一定的贡献作用。

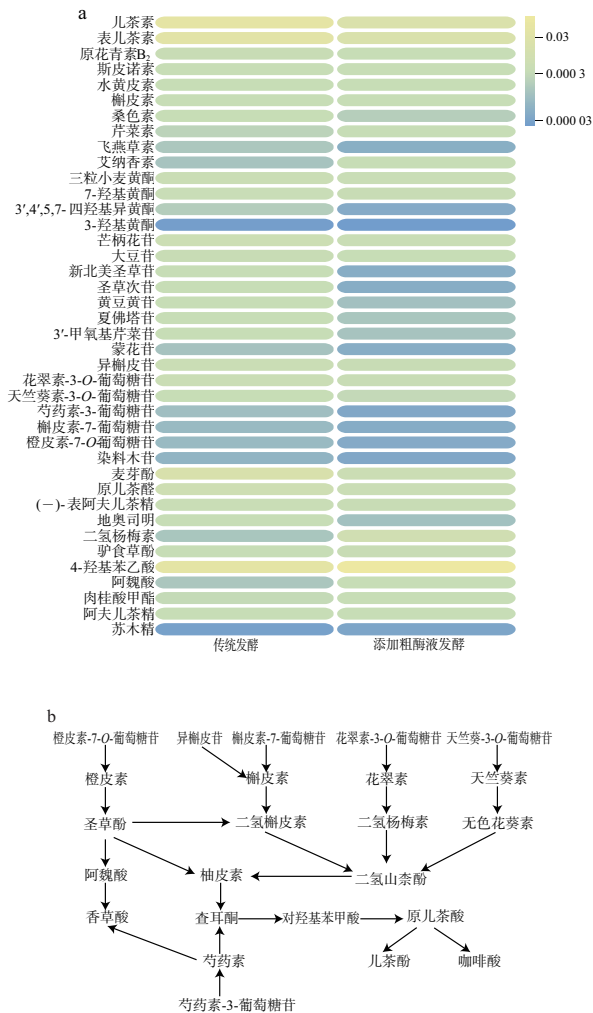


图2 白酸汤中显著差异挥发性风味物质含量变化(a)及结合糖苷可能降解途径(b)

Fig. 2 Changes in significantly different volatile flavor compounds content (a) and possible degradation pathways of binding glycosides (b) in fermented sour soup

3 结论

本研究利用马克斯克鲁维酵母与台湾根霉协同发酵产 β -葡萄糖苷酶,通过单因素及响应面实验得到最优发酵条件为:荞麦粉作为碳源,荞麦壳作为填充剂,填充量为26%,玉米浆作为氮源,添加量1.5%,台湾根霉接种量0.4%,马克斯克鲁维酵母接种量3.0%,料液比为10:9(g/mL),发酵温度24℃,发酵时间74h,得到 β -葡萄糖苷酶活性为 (197.02 ± 2.34) U/g,为优化前的15.27倍,显著提高了马克斯克鲁维酵母生产 β -葡萄糖苷酶的能力。进一步将所得粗酶液应用于白酸汤发酵体系,结果显示其可有效水解释放结合态糖苷类风味前体物质,丰富了白酸汤的风味多样性,证实了 β -葡萄糖苷酶在提升发酵食品风味方面的应用潜力。本研究结果为微生物协同产酶及风味强化提供了可行路径,下一步研究可解析关键风味物质的释放机制及代谢途径,将有助于深化对酶法风味调控的理解,为发酵食品的风味定向设计提供理论依据。

参考文献:

- [1] KANNAN P, SHAFREEN M M, ACHUDHAN A B, et al. A review on applications of β -glucosidase in food, brewery, pharmaceutical and cosmetic industries[J]. Carbohydr Res, 2023, 530: 108855.
- [2] SCHMIDT S, YANG N, GRÖGER H, et al. Treatment of fruit juices with β -glucosidase for release of aroma precursors[J]. Food Chem, 2025, 491: 145212.
- [3] 荆丰雪, 钟斌, 万娅琼, 等. 微生物源 β -葡萄糖苷酶在发酵食品中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(24): 8041-8049.
- [4] BEZUS B, DE OVALLE S, GONZÁLEZ-POMBO P, et al. Production and characterization of a novel cold-active β -glucosidase and its influence on aromatic precursors of Muscat wine[J]. Food Biosci, 2023, 53: 102572.
- [5] 缪月梅. 产 β -葡萄糖苷酶非酿酒酵母分离鉴定及对发酵芒果汁香气影响[D]. 海口: 海南大学, 2023.
- [6] ZHAO Y, ZHANG B, GU H, et al. A mutant GH3 family β -glucosidase from *Oenococcus oeni* exhibits superior adaptation to wine stresses and potential for improving wine aroma and phenolic profiles[J]. Food Microbiol, 2024, 119: 104458.
- [7] SU E, XIA T, GAO L, et al. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage[J]. Food Bioprod Process, 2010, 88(2/3): 83-89.
- [8] BODAKOWSKA-BOCZNIEWICZ J, GARNCAREK Z. Use of naringinase to modify the sensory quality of foods and increase the bioavailability of flavonoids: a systematic review[J]. Molecules, 2025, 30(11): 2376.
- [9] 任建伟. β -葡萄糖苷酶高产菌株选育及发酵条件优化[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [10] 史通, 宋向阳, 欧阳嘉, 等. 黑曲霉与里氏木霉混合发酵产 β -葡萄糖苷酶[J]. 林产化学与工业, 2013, 33(5): 101-105.
- [11] 陈光, 赵文萱, 孙旸. 一种突变黑曲霉菌株及应用: CN109161481A[P]. 2019-01-08.
- [12] 孔晓双, 黄新新, 董应宏, 等. 一株产 β -葡萄糖苷酶甘草内生菌的筛选、全基因组分析及产酶优化[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 279-294.

- [13] 张玉千, 周学, 夏文静, 等. 棘孢曲霉液体发酵产 β -葡萄糖苷酶培养基的优化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(11): 208-212.
- [14] 何小艳, 郭倩, 胡骏鹏, 等. 响应面法优化黑曲霉产 β -葡萄糖苷酶的发酵工艺[J]. 化学与生物工程, 2025, 42(5): 43-48.
- [15] MISHRA A, SINGH R, CHOUDHARY P K, et al. Application of rice husk carbon source for cellulolytic enzyme production under solid state fermentation via expired yeast probiotic juice[J]. J Food Meas Charact, 2026, 20: 1001-1011.
- [16] COSTA R D S, DE ALMEIDA S S, CAVALCANTI E D C, et al. Enzymes produced by solid state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads[J]. Food Res Int, 2021, 140: 109843.
- [17] 王薪喻, 李海鹏, 宋大鹏, 等. 高产单宁酶的黑曲霉菌株鉴定及其固态发酵产酶条件优化[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2025, 56(4): 670-680.
- [18] 汪洲, 肖玲玲, 冯玉枚, 等. 利用油菜秸秆固态发酵生产 β -葡萄糖苷酶的工艺优化[J]. 农产品加工, 2017(12): 26-28.
- [19] 史通, 宋向阳, 欧阳嘉, 等. 黑曲霉与里氏木霉固态混合发酵产 β -葡萄糖苷酶[J]. 生物加工过程, 2013, 11(5): 11-15.
- [20] 肖甜甜, 干昭波, 吴君海, 等. 贵州米酸汤中呈味物质对滋味的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(10): 303-313.
- [21] 苑静, 唐国芳, 张建炆, 等. 贵州白酸汤添加石斛花后品质及风味的提升研究[J]. 美食研究, 2024, 41(1): 67-77.
- [22] 吴茂钊, 王斌, 杜江, 等. 苗族白酸汤中优势乳酸菌及酵母菌的筛选与应用[J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 163-171.
- [23] 肖甜甜, 冯子娟, 邱树毅, 等. 苗家白酸汤中微生物群落多样性研究及其优势微生物的筛选[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(1): 1-11; 45.
- [24] BOONDAENG A, KEABPIMAI J, TRAKUNJAE C, et al. Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus* sp. IN5: parameter optimization and application[J]. Heliyon, 2024, 10(5): e26601.
- [25] 王振丽, 李书华, 王婷婷. β -葡萄糖苷酶固体发酵培养条件的优化[J]. 食品安全导刊, 2021, 29: 141-144.
- [26] ALIYAH A, ALAMSYAH G, RAMADHANI R, et al. Production of α -amylase and β -glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob[J]. Energy Procedia, 2017, 136: 418-423.
- [27] 夏俊芳, 古丽娜孜, 李璟瑜. 赤霞珠葡萄自然发酵过程中高产 β -葡萄糖苷酶酵母菌株筛选分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 134-140.
- [28] ZHA H, CAI Y, YIN Y, et al. SWATHtoMRM: Development of high-coverage targeted metabolomics method using SWATH technology for biomarker discovery[J]. Anal Chem, 2018, 90(6): 4062-4070.
- [29] 朱永乐, 王柳岑, 王晶晶, 等. 荞麦乳酸菌固态发酵工艺的优化[J]. 食品科技, 2022, 47(4): 79-85.
- [30] 赵明谋, 邹颖, 林恋竹, 等. 纳豆菌液态发酵荞麦产纳豆激酶及其代谢特性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 178-185.
- [31] ZHAO C, SU W, MU Y, et al. Effects of Jiuqu inoculating *Rhizopus oryzae* Q303 and *Saccharomyces cerevisiae* on chemical components and microbiota during black glutinous rice wine fermentation[J]. Int J Food Microbiol, 2023, 385: 110012.
- [32] 雷一鸣, 夏舒. 有机氮源在微生物发酵中的应用分析[J]. 食品安全导刊, 2021(9): 146; 148.
- [33] 顾斌涛, 熊大维. 里氏木霉固态发酵产 β -葡萄糖苷酶的研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(18): 1-3.
- [34] 倪湾, 李伊涵. 洋葱槲皮素的生理功能及在食品中的应用[J]. 中国食品, 2024(24): 104-106.
- [35] 马懿, 喻康杰, 肖雄峻, 等. 二氢杨梅素对梨酒抗氧化活性及风味物质的影响[J]. 食品工业科技, 2023, 44(10): 107-115.
- [36] YAN N, XU C, XIONG S, et al. Comprehensive characterization and comparison of aroma profiles of *Tricholoma matsutake* soup during the cooking process by HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-MS[J]. Foods, 2025, 14(9): 1478.
- [37] FANG D, ZENG Z, LU J, et al. Simultaneous production of food additives ferulic acid and xylose from wheat bran by bifunctional enzyme catalysis[J]. Food Biosci, 2025, 71: 107124.
- [38] WU L, ZHENG F, LI H, et al. Effect of hydroxycinnamic acids on ester-improving and aroma-enhancing of Cabernet Sauvignon red wine and its mechanism[J]. Food Res Int, 2025, 217: 116763.
- [39] KAUR J, GULATI M, SINGH S K, et al. Discovering multifaceted role of vanillic acid beyond flavours: nutraceutical and therapeutic potential[J]. Trends Food Sci Tech, 2022, 122: 187-200.
- [40] KUMARI S, TRIPATHI A D, NANDAN A, et al. Development of Mango-Mentha functional ready-to-serve (RTS) beverage and its shelf-life evaluation[J]. Discov Appl Sci, 2025, 7(7): 669.
- [41] WANG H L, QI X H, GAO S, et al. Characterization of a novel multifunctional β -glucosidase/xylanase/feruloyl esterase and its effects on improving the quality of Longjing tea[J]. Food Chem, 2024, 453: 139637.