

低果胶酯酶活性果胶酶生产菌株的筛选及应用

卫晓涵, 张玉姣, 纪超凡, 董亮, 林心萍, 张素芳*

(大连工业大学食品学院 海洋食品加工与安全控制全国重点实验室 国家海洋食品工程技术研究中心
海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034)

摘要 因软枣猕猴桃果胶含量较高,故在果汁加工时需加入果胶酶,然而在提高其出汁率和澄清效果的同时,会导致甲醇含量增多的安全问题,亟需开发低果胶酯酶活性的新型果胶酶。通过透明圈法初筛和 DNS 法复筛,从郫县豆瓣酱中共筛选到 30 株具有果胶酶活性的菌株,选择果胶酶活力最高的前 10 株细菌进行研究,经鉴定均为芽孢杆菌属,其中贝莱斯芽孢杆菌 W6 具有最低的果胶酯酶活性和最高的果胶酶活性。随后将贝莱斯芽孢杆菌 W6 所产果胶酶 PBV 应用于软枣猕猴桃果汁加工。与商品果胶酶相比,PBV 处理的果汁具有更高的出汁率和澄清效果。甲醇含量方面,PBV 处理的果汁[(147.30±1.70)mg/L]与未经果胶酶处理的果汁[(135.04±1.70)mg/L]无显著差异,而商品果胶酶处理的果汁甲醇含量显著升高,其中夏盛果胶酶 PXS 处理的果汁甲醇含量[(229.85±12.99)mg/L]高于 PBV 组。此外,经 PBV 处理还能增加软枣猕猴桃果汁中的黄酮物质。本研究结果可为挖掘果胶酶生产微生物提供新思路,为软枣猕猴桃的精深加工产品开发提供技术参考。

关键词 果胶酯酶; 果胶酶; 芽孢杆菌; 甲醇; 软枣猕猴桃

文章编号 1009-7848(2025)02-0213-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.019

软枣猕猴桃(*Actinidia arguta*),在我国东北地区种植量高,其果皮光滑无毛可食用,果肉酸甜可口^[1],具有丰富的营养价值与药用价值,被誉为“水果之王”“健康之果”,深受消费者的喜爱。然而,软枣猕猴桃为呼吸跃变型果实,其果皮薄、易软化,保质期短,不易贮藏和运输^[2]。将软枣猕猴桃加工成果汁,不仅可以减少资源浪费,还能保留猕猴桃原有营养物质和风味,同时还可以作为果酒、果醋等产品的生产原料,延长产业链,提高果品的附加值^[3]。然而,软枣猕猴桃果胶含量较高(约占果实的 3.30%)^[4],使得产品存在出汁率低、过滤效果差及保存过程中易浑浊等问题。

果胶是由 D-半乳糖醛酸以 α -1,4 糖苷键连接而成的生物大分子^[5]。果胶酶水解果胶可以软化果肉组织,提高出汁率,增强澄清效果,还能够改良果汁的口感并保留更多的营养物质。目前果胶酶已广泛应用于食品工业中的果汁澄清和加工领域^[6]。果胶酶是含有果胶解聚酶和果胶酯酶的复合酶^[7],果胶解聚酶通过催化水解果胶分子中的 α -

1,4 糖苷键,将其分解为半乳糖醛酸等物质;果胶酯酶则对果胶骨架上的甲基酯键进行脱酯化,生成果胶酸和甲醇,这是高果胶含量水果果汁和果酒加工中最主要的甲醇来源。在应用果胶酶提高果汁品质的同时,应考虑其造成果汁甲醇含量升高的安全问题。选择性筛选低果胶酯酶活性的果胶酶生产菌株,成为高果胶含量水果深加工中甲醇消减策略至关重要的环节。目前的商业化果胶酶一般由霉菌类生产^[8],然而细菌与其相比具有生长速度快,发酵成本低,易于菌株改良,产酶时间短等特点,成为挖掘新型产果胶酶微生物的最佳来源^[9]。

蚕豆富含大量果胶^[10],由其发酵制成的郫县豆瓣酱蕴含丰富的微生物酶系,是筛选果胶酶生产菌株的极佳来源。本研究以郫县豆瓣酱为对象,筛选低果胶酯酶活性的果胶酶生产菌株,并将其所产的果胶酶用于软枣猕猴桃果汁处理,同时以商品果胶酶作为对照,分析其对软枣猕猴桃果汁甲醇含量、出汁率、澄清度、生物活性物质和抗氧化能力的影响,以期对软枣猕猴桃精深加工产品的开发提供新型微生物果胶酶。

收稿日期: 2024-07-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072185)

第一作者: 卫晓涵,女,硕士生

通信作者: 张素芳 E-mail: zhangsf@dlpu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 郫县豆瓣酱,由四川省成都市郫都区某豆瓣酱厂提供。软枣猕猴桃,大连市本地农贸市场。

1.1.2 试剂 商品果胶酶,夏盛(北京)生物技术开发有限公司(型号:FDY-2212)和诺维信(中国)生物技术有限公司(型号:Pectinex Ultra Clear);甲醇(色谱级),安谱(上海)实验科技股份有限公司;叔戊醇(色谱级),麦克林(上海)生化科技有限公司;果胶、革兰氏碘液、硝酸钠,阿拉丁(上海)生化科技股份有限公司;酵母提取物、DNS试剂、GoldView I型核酸染色剂、果胶酯酶(PE)活性检测试剂盒,索莱宝(北京)科技有限公司;琼脂粉,奥博星(北京)生物技术有限责任公司;LB肉汤,海博(青岛)生物技术有限公司;Tris、EDTA、蛋白酶K、RNase A (10 mg/mL)、50×TAE缓冲液 Tris饱和酚溶液、醋酸钠、TE缓冲液,生工生物工程(上海)股份有限公司;2×Taq Master Mix (Dye Plus),诺唯赞(南京)生物科技股份有限公司;DL 2000 DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司;Genview 原装琼脂糖,GEN-VIEW SCIENTIFIC INC;其它均为分析纯级试剂。

1.1.3 培养基

1.1.3.1 初筛培养基 果胶 2.0 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $NaNO_3$ 3.0 g/L, $FeSO_4$ 0.001 g/L, 琼脂粉 2 g/L, pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

1.1.3.2 复筛培养基 果胶 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, NaCl 2.0 g/L, K_2HPO_4 1.0 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/L, pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min。

1.1.3.3 LB培养基 NaCl 10.0 g/L, 胰蛋白胍 10.0 g/L, 酵母浸粉 5.0 g/L, pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min(固体培养基则在液体培养基基础上添加琼脂粉 20.0 g/L)。

1.2 仪器与设备

光学显微镜,德国徕卡仪器有限公司;DNA浓度测定仪,赛默飞世尔科技公司;PCR仪,美国伯乐公司;水平电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像仪,以色列DNR公司;全自动超高清

菌落计数器,法国Interscience公司;多功能酶标仪 Infinite M200,瑞士TECAN;冷冻高速离心机,美国Thermo Scientific公司;GC2030岛津气相色谱仪,日本SHIMAZU公司。

1.3 方法

1.3.1 郫县豆瓣酱中细菌的分离 取10 g郫县豆瓣酱样品置于灭菌袋中,加入20 mL灭菌水,用无菌拍打均质机充分振荡混匀。室温静置20 min,待酱渣沉降后取1 mL上清液进行梯度稀释,分别取100 μ L不同稀释度溶液,均匀涂布于LB平板上,37 °C倒置培养24 h,每12 h观察一次平板上的菌株形态,选取菌落数为30~300的平板,挑取不同形态的单菌落于LB平板划线并分离纯化3代,直至得到纯种单菌落,随后挑取单菌落接种于LB肉汤中,37 °C,200 r/min培养至菌液浑浊,镜检确认无污染后,添加体积分数为20%甘油后冻存于-80 °C保藏备用。

1.3.2 产果胶酶菌株的初筛 将1.3.1节分离到的菌株于LB平板活化2代,挑取纯种单菌落接种于LB肉汤中,菌株于37 °C条件下200 r/min振荡培养至 $OD_{600nm} \approx 0.8$ 得到种子液,经过离心(10 000 r/min,10 min,4 °C),获得无细胞上清液。采用双层牛津杯法^[11],将50 μ L无细胞上清液注入以果胶为唯一碳源的培养基孔内,37 °C静置24 h后,加入碘液浸没平板,室温下静置10 min。通过观察是否存在透明圈以初步判断菌株是否存在果胶酶活性^[12],并测量透明圈的直径。

1.3.3 产果胶酶菌株的复筛

1.3.3.1 粗酶液的制备 选取能够产生透明圈的细菌,按照1.3.2节所述来制备种子液,以8%的接种量将种子液接入装有30 mL发酵培养基的250 mL锥形瓶中,37 °C,200 r/min振荡培养72 h,所得发酵液于4 °C下,9 000 r/min离心15 min,上清液即为产果胶酶菌株发酵产生的粗酶液,用于果胶酶活力的测定,以筛选出酶活力最高的菌株。

1.3.3.2 果胶酶活性的测定 参考Miller^[13]的方法进行果胶酶活性的测定。根据半乳糖醛酸标准曲线计算果胶酶活力。在50 °C的条件下,1 mL酶液每分钟水解果胶底物生成1 μ g半乳糖醛酸的能力定义为1个酶活力单位(U)。

1.3.3.3 果胶酯酶活性的测定 参考索莱宝果胶

酯酶(PE)活性检测试剂盒的 NaOH 滴定法进行果胶酯酶活性测定。在 50 ℃下每分钟消耗 1 μmol NaOH 的量定义为一个酶活力单位(U)。

1.3.4 菌株鉴定

1.3.4.1 形态学鉴定 对分离的菌株观察分离纯化后的菌落形态特征,从菌落大小、形状、边缘、光泽和颜色等方面观察并采集图像。取单菌落于 40×物镜下,对菌体的形态进行观察并采集图像。

1.3.4.2 分子生物学鉴定 菌株基因组 DNA 的提取采用玻璃珠破碎法^[14]。细菌 16S rDNA PCR 扩增参考董乃慧等^[15]的方法。取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,剩下的 45 μL PCR 产物送至测序公司进行测序。将测序结果提交至美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 GenBank 数据库采用基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)进行比对分析。

1.3.5 贝莱斯芽孢杆菌 W6 产果胶酶在软枣猕猴桃果汁中的应用

1.3.5.1 贝莱斯芽孢杆菌 W6 产果胶酶液的制备

参考 1.3.2 节所述的种子液制备方法,将贝莱斯芽孢杆菌 W6 种子液接种于装有 2 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中,进行产果胶酶的扩大培养,发酵罐参数参考林格儿等^[16]的研究并略有修改,发酵结束后将发酵液离心(离心参数参考 1.3.3.1 节所述),参考于振林等^[17]的方法,通过硫酸铵分级盐析和透析除盐,得到贝莱斯芽孢杆菌 W6 产生的果胶酶粗酶液。

1.3.5.2 软枣猕猴桃果汁的工艺流程 软枣猕猴桃→挑选→清洗→榨汁破碎→果胶酶解(50 ℃,4 h)→4 层纱布过滤→软枣猕猴桃果汁。以 2 种商品果胶酶作为对照,根据果胶酶添加种类的不同,将软枣猕猴桃果汁分为 4 组:1)不添加果胶酶,命名 NP;2)贝莱斯芽孢杆菌 W6 产果胶酶,命名 PBV;3)诺维信果胶酶,命名 PNW;4)夏盛果胶酶,命名 PXS。通过调整果胶酶液的添加量以确保每个试验组中的果胶酶活性为 6 000 U/mL。

1.3.5.3 出汁率的测定 参考文献[18]测定出汁率,计算方法见式(1)。

$$\text{出汁率}(\%) = m_1/m_2 \times 100 \quad (1)$$

式中: m_1 和 m_2 分别是猕猴桃果汁和果浆的质

量,g。

1.3.5.4 澄清度的测定 参考 Chen 等^[19]的方法,以蒸馏水为参比,测定 4 种猕猴桃果汁在波长 680 nm 处的吸光度。

1.3.5.5 甲醇含量的测定 使用岛津 GC-2030 气相色谱仪配备 HS-10 顶空进样器进行甲醇含量的测定。标准曲线的绘制:配制 10,20,50,100,200 mg/L 的甲醇工作液,各加入 100 μL 叔戊醇溶液(1 000 mg/L)作为内标,测定不同含量甲醇工作液得到质量浓度和峰面积对应的标准曲线。样品前处理:取 5 mL 样品于 20 mL 顶空瓶中,加入 100 μL 叔戊醇溶液(1 000 mg/L)作为内标,混匀后进行顶空气相测定,采用内标法测定样品的甲醇含量。气相色谱参数:色谱柱为 HP-FFAP(30 m×0.32 mm×0.25 μm);载气为高纯氮气;进样口温度和检测器温度分别为 220 ℃和 235 ℃;分流比为 29.8:1;分流流量为 24 mL/min。温度程序:40 ℃保持 3 min,以 3.5 ℃/min 的速率升温至 65 ℃,再以 20 ℃/min 升温至 220 ℃保持 5 min。顶空参数:平衡温度为 80 ℃,平衡时间为 40 min,传输线温度为 105 ℃,定量环温度为 100 ℃。

1.3.5.6 生物活性物质和抗氧化活性的测定 总酚含量测定采用福林-酚比色法并稍作修改^[20],结果以每升猕猴桃酒中没食子酸当量表示,单位为 mg GAE/L。总黄酮含量采用氯化铝比色法测定^[21],结果以每升猕猴桃酒中芦丁当量表示,单位为 mg RE/L。DPPH 和 ABTS 自由基清除能力测定参考 Zheng 等^[22]的方法并稍作修改,DPPH 自由基清除能力结果以没食子酸当量表示,单位为 mg GAE/L;ABTS 自由基清除能力结果以维生素 E 当量表示,单位为 mg TE/L。

1.3.6 数据处理 在本研究中,所有试验均一式 3 份,结果以平均值±标准偏差表示。试验数据使用 SPSS 27.0 进行统计分析,采用单因素方差分析和邓肯检验确定各组间的显著差异,当 $P < 0.05$ 时,认为结果具有统计学意义。使用 GraphPad9.5.0 软件绘图。使用 TBtools 制作热图。

2 结果与讨论

2.1 产果胶酶菌株的初筛

碘液染色法原理是通过在以果胶为唯一碳源

的培养基上,果胶酶液能够将培养基中的果胶物质分解成小分子物质,碘液可将其小分子物质氧化,而果胶等大分子聚合物无法被氧化,在含酶的位置就会出现透明圈,从而筛选出产果胶酶的菌株^[23]。本研究从郫县豆瓣酱中共分离得到了45株细菌,果胶酶生产菌株在初筛培养基上产生透明

圈的阳性结果如图1a所示,通过碘液染色法初筛得到30株产果胶酶的菌株,透明圈直径大小如图1b所示,30株细菌透明圈直径均在20.00 mm以上,说明其在平板中水解果胶能力均较强,随后通过摇瓶发酵复筛进一步确定在液体条件下产果胶酶的能力。

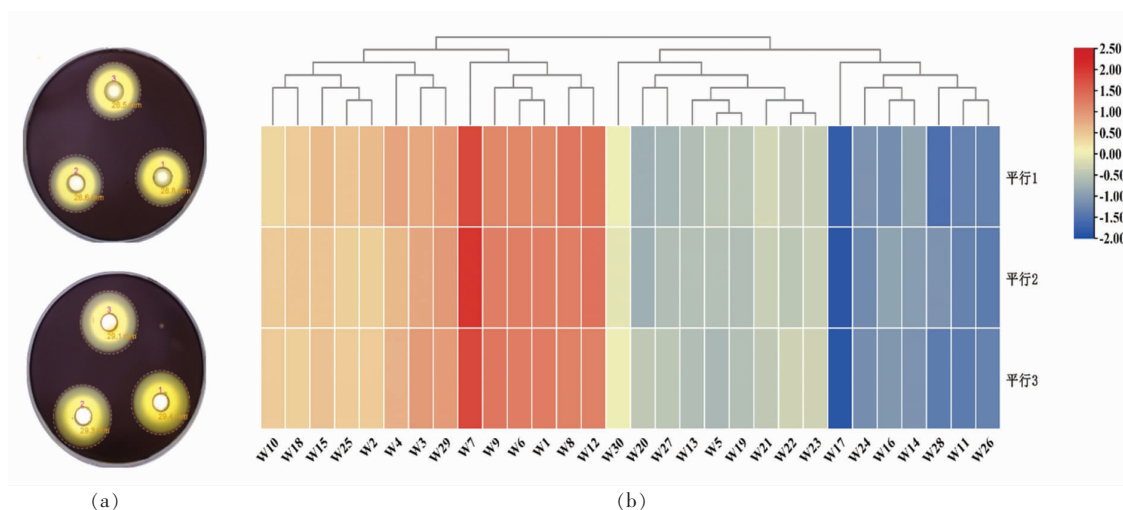


图1 果胶酶生产菌株在初筛培养基上产生透明圈的阳性结果(a)和透明圈直径热图(b)

Fig.1 The positive result of pectinase-producing strains producing transparent circles on primary screening medium (a) and heat map based on diameters of transparent circles (b)

2.2 产果胶酶菌株的复筛

将初筛获得的30株具有果胶酶活性的菌株均经过摇瓶发酵后,采用DNS法测定其果胶酶活性。由图2a可以看出,30株菌的果胶酶活相差较大,其中W6酶活最高 $[(638.16 \pm 15.94) \text{U/mL}]$,W12酶活最低 $[(14.09 \pm 4.17) \text{U/mL}]$ 。Haile等^[24]从牛油果皮中筛选到一株粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),其果胶酶酶活为 5.41 U/mL ;Kc等^[25]从土壤中分离到一株曲霉属(*Aspergillus* spp.),酶活为 106.7 U/mL ;何海燕等^[23]从缫丝废水中筛选到一株沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*),酶活为 5.25 U/mL 。本研究筛选到的W6菌株的果胶酶活性高于上述所报道的酶活。

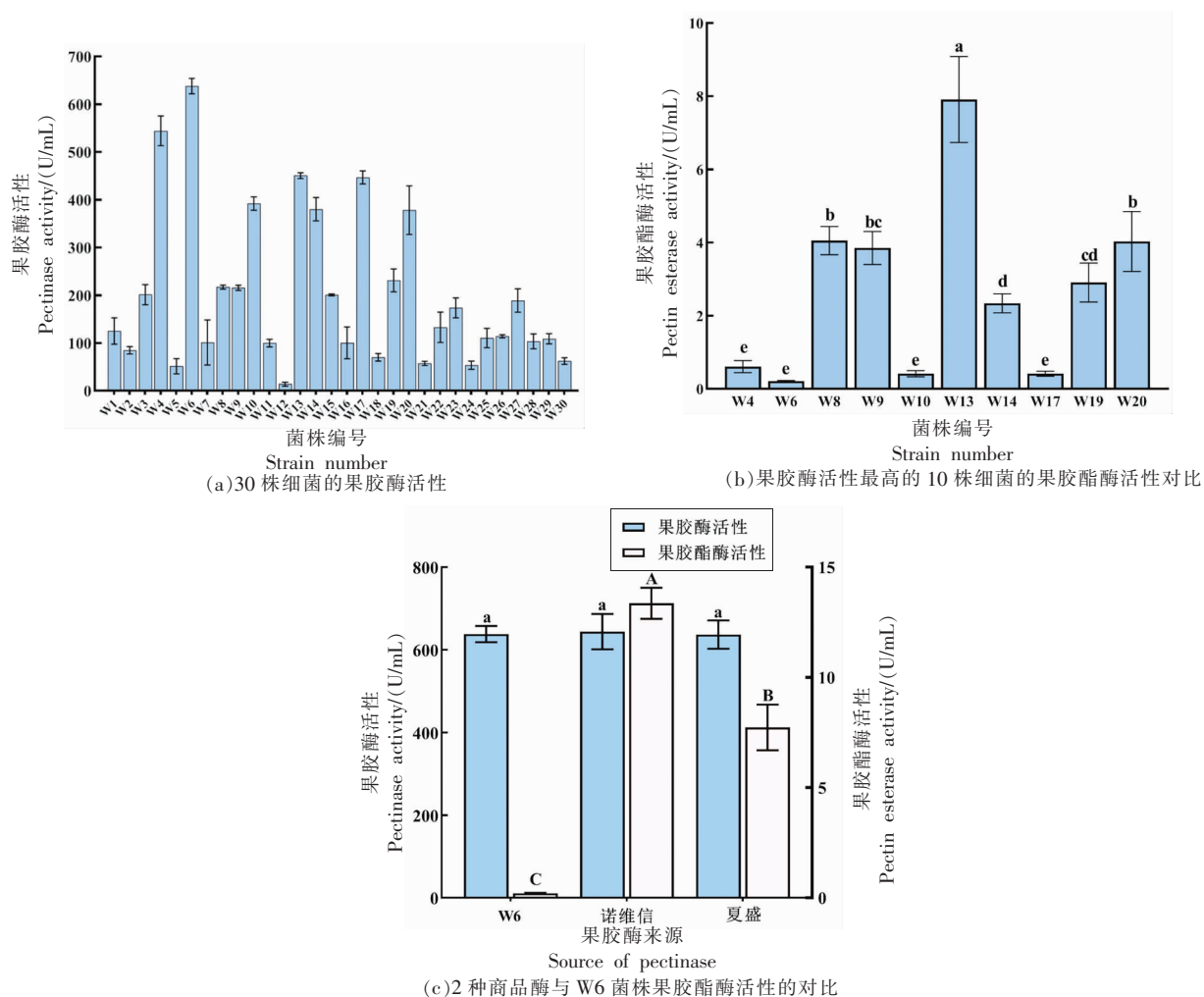
选取果胶酶活性最高的10株细菌作为进一步研究对象,测定果胶酯酶活性,结果如图2b所示,果胶酯酶活性在 $0.21 \sim 7.59 \text{ U/mL}$ 范围内。其中,W6果胶酯酶活性最低,为 $(0.21 \pm 0.02) \text{ U/mL}$,同时W6果胶酶活性又是最高,因此W6是一

株具有低果胶酯酶活性的高产果胶酶的菌株。同时,在将两种商品果胶酶活性调整至与菌株W6产生的果胶酶活性一致的基础上,测定了2种商品果胶酶的果胶酯酶活性,如图2c所示,W6的果胶酯酶活性显著低于两种商品果胶酶。

2.3 菌株鉴定结果

2.3.1 形态学鉴定 本研究以传统发酵食品郫县豆瓣酱为主要研究材料,通过采用牛津杯法进行初筛、DNS法进行复筛,选取果胶酶活性最高的10株细菌,采用平板划线(LB琼脂)方法进行菌种纯化,经平板划线纯化后获得单菌落,10株菌在LB平板上均显示典型的芽孢杆菌形态。部分菌株的平板图及镜检图如图3所示。

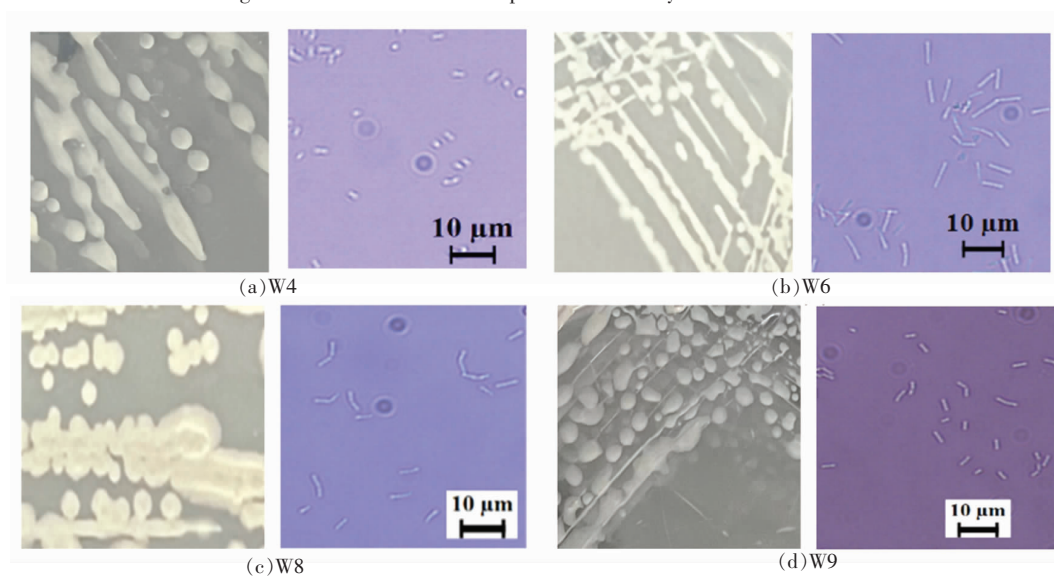
2.3.2 菌株的分子学鉴定 提取10株细菌的基因组,以其为模板,采用引物27F和1492R进行16S rDNA的PCR扩增,PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图4所示。所有细菌在1500 bp左右均可以观察到一条清晰的条带。



注:图 2b 中不同小写字母表示 10 株细菌的果胶酯酶活性存在显著性差异($P<0.05$);图 2c 中不同小写字母表示 3 种果胶酶的果胶酯酶活性存在显著性差异($P<0.05$),不同大写字母表示 3 种果胶酶的果胶甲酯酶活性存在显著性差异($P<0.05$)。

图 2 菌株果胶酶活性的测定

Fig.2 The determination of pectinase activity of the strains



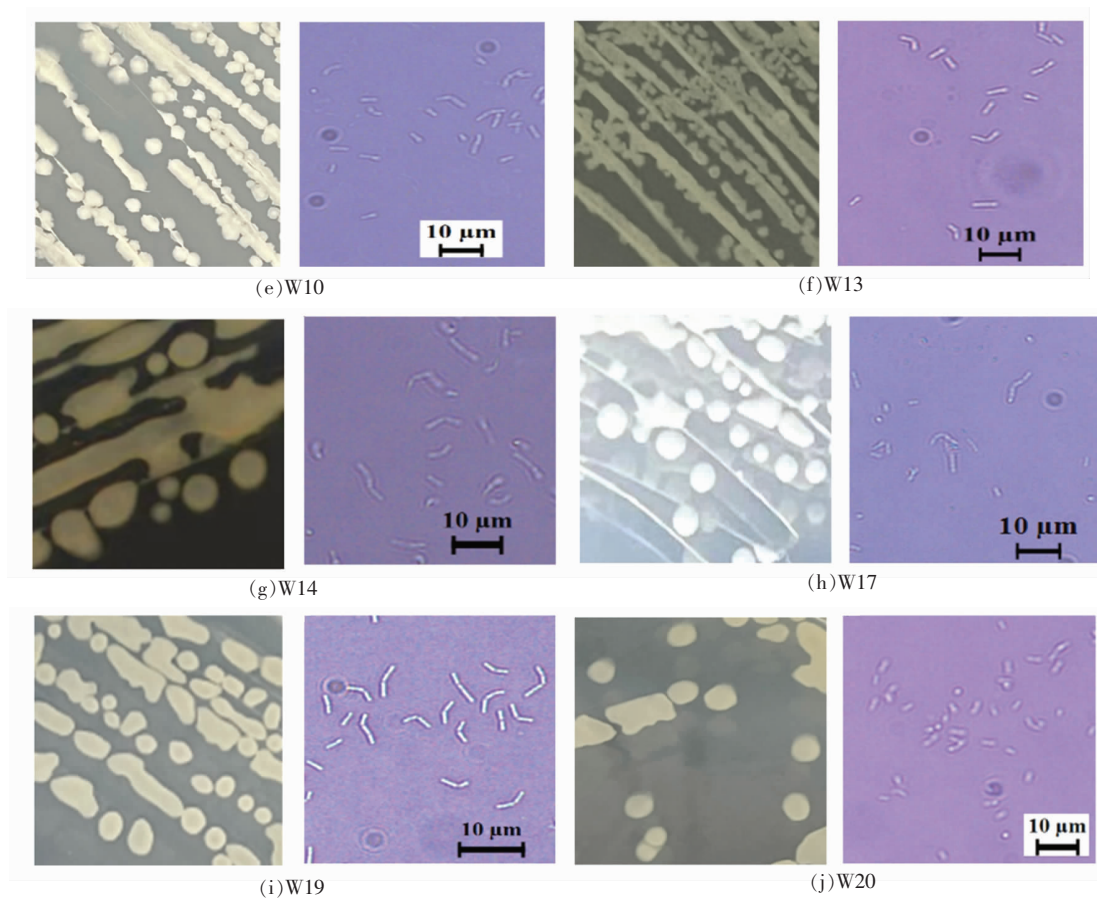
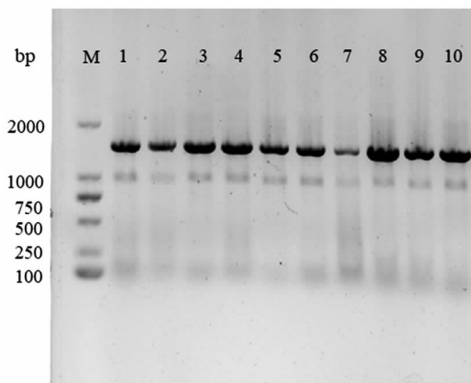


图3 分离菌株形态学及细菌镜检(40×)观察

Fig.3 Morphology and bacterial microscopic (40×) observation of isolated strains



注:M. DL 2000 DNA Marker; 泳道 1~10. W4、W6、W8、W9、W10、W13、W14、W17、W19、W20。

图4 分离菌株 16S rDNA PCR 产物电泳图

Fig.4 Electrophoresis of 16S rDNA PCR products from isolated strains

利用 BLAST 分析菌株的测序结果如表 1 所示,10 株产果胶酶的细菌均属于芽孢杆菌属。从种层面看,可分为 5 种。其中,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)4 株,贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)2 株,特基拉芽孢杆菌 2 株(*Bacillus tequilensis*),解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)1 株,耐盐芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)1 株。

杨逸飞等^[26]从海南土样中筛选出一株果胶酶产生菌株,经鉴定为农研所芽孢杆菌(*Bacillus niabensis*);Zhang 等^[27]从龙舌兰芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)中获得果胶酶;Rahman 等^[28]从韩国泡菜中分离到一株产果胶酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)并应用于苹果汁澄清。本研究筛选到的菌株与已报道的产果胶酶细菌菌株在属水平较为一致。

表 1 细菌 16S rDNA 序列分析结果

Table 1 Results of 16S rDNA sequence analysis for bacteria

菌株编号	16S rDNA 鉴定结果	同源性/%	参考菌株
W4	特基拉芽孢杆菌(<i>Bacillus tequilensis</i>)	100.00	OR056167.1
W6	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	100.00	CP053764.1
W8	枯草芽孢杆菌枯草亚种(<i>Bacillus subtilis</i> subsp.)	100.00	MN865922.1
W9	耐盐芽孢杆菌(<i>Bacillus halotolerans</i>)	100.00	MT539148.1
W10	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)	100.00	MT626060.1
W13	枯草芽孢杆菌枯草亚种(<i>Bacillus subtilis</i> subsp.)	100.00	MT605301.1
W14	解淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	100.00	MT613661.1
W17	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	100.00	OQ692432.1
W19	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	100.00	MT534552.1
W20	特基拉芽孢杆菌(<i>Bacillus tequilensis</i>)	100.00	KT720350.1

2.4 贝莱斯芽孢杆菌 W6 产果胶酶在软枣猕猴桃果汁中的应用

2.4.1 贝莱斯芽孢杆菌 W6 粗果胶酶液的制备

通过扩大培养和简单纯化最终得到由贝莱斯芽孢杆菌 W6 产生的粗果胶酶制品 PBV, 其果胶酶活为 $(4\ 433.38 \pm 632.33)$ U/mL, 果胶酯酶活性为 (0.59 ± 0.11) U/mL^[29]。

2.4.2 出汁率和澄清度的测定

4 种软枣猕猴桃果汁的出汁率和澄清度如图 5a 所示。澄清度是由果汁中悬浮物和果肉的含量决定的, 果汁中大量的悬浮固体会影响澄清度^[30]。软枣猕猴桃果汁经果胶酶酶解后澄清度显著升高, PBV 和 PXS 果汁澄清度显著高于 PNW 和 NP 组。

果胶酶通过软化果肉和去除果皮, 在提高出汁率方面起着重要作用^[31]。软枣猕猴桃果汁出汁率在 66.56%~85.66% 范围内。经果胶酶处理后软枣猕猴桃果汁出汁率均显著升高, 其中 NP 组最低, PBV 组最高, 其出汁率是 NP 组的 1.33 倍, Jiang 等^[32]发现果胶酶应用于火龙果汁中使产量增加了 16%。因此综合两个指标来看, 贝莱斯芽孢杆菌 W6 产果胶酶水解猕猴桃果胶的能力优于商品果胶酶。

2.4.3 甲醇含量的测定

4 种软枣猕猴桃果汁的甲醇含量如图 5b 所示。未经果胶酶处理的软枣猕猴桃果汁中甲醇含量为 (135.04 ± 1.70) mg/L, 其甲醇含量较高可能是因为本研究软枣猕猴桃是通过带皮榨汁方式得到果汁, 而软枣猕猴桃果皮中含有大量的果胶, 在贮藏过程中发生了解聚和去甲

基化作用^[33-34]。经果胶酶酶解后, PXS 组和 PNW 组甲醇含量均显著升高, 尤其是 PXS 组, 其甲醇含量为 (229.85 ± 12.99) mg/L。候彦喜等^[35]使用商品果胶酶处理蜜瓜汁时也发现了相同的结果。PBV 处理的软枣猕猴桃果汁甲醇含量为 (147.30 ± 6.30) mg/L, 与 NP 组相比无显著差异, PXS 组甲醇含量高于 PBV 组 0.56 倍, 故 PBV 处理与商品果胶酶处理相比能显著减少甲醇的生成, 提高软枣猕猴桃果汁的安全性。

2.4.4 生物活性物质和抗氧化活性的测定

总酚和总黄酮是猕猴桃果汁中的重要生物活性物质, 对人体健康和预防疾病有积极影响, 它们是评价感官质量、香气形成和抗氧化能力的重要指标^[35]。如图 5c 所示, 4 种软枣猕猴桃果汁的总酚含量无显著差异, 而 PBV 组总黄酮含量显著高于 NP 和 PNW 组, 其中 PBV 组为 (172.33 ± 16.88) mg RE/L, 而 NP 组为 (131.89 ± 3.66) mg RE/L。

ABTS 自由基清除能力和 DPPH 自由基清除能力是衡量果汁抗氧化活性的两个重要指标。如图 5d 所示, 4 种软枣猕猴桃果汁的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力均无显著差异。因此 PBV 处理不仅能够保留软枣猕猴桃果汁的营养成分和抗氧化活性, 还能够进一步增加黄酮物质。

3 结论

通过透明圈法初筛和 DNS 法复筛从郫县豆瓣酱中筛选出 30 株产果胶酶的细菌, 选择果胶酶活力最高的前 10 株细菌进一步测定果胶酯酶活

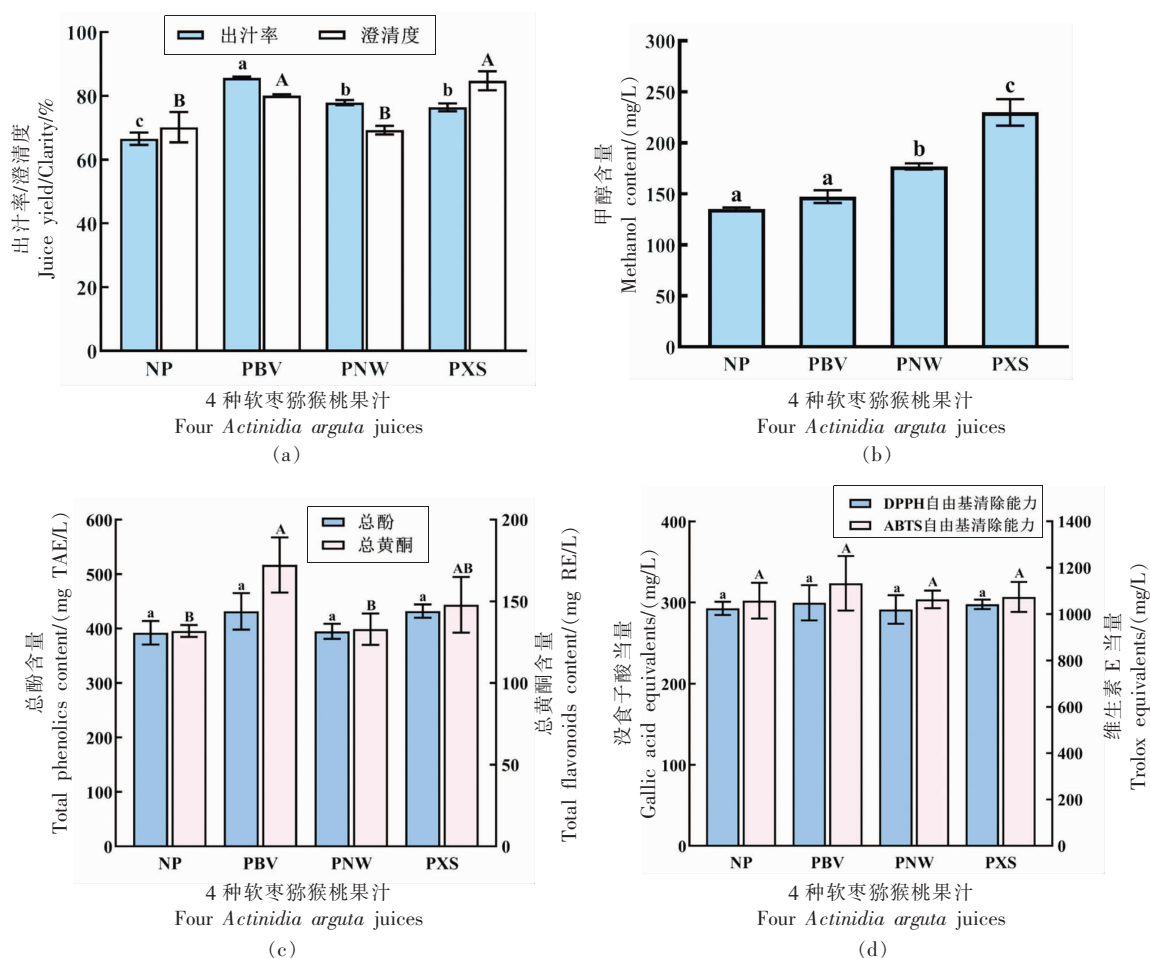


图5 4种软枣猕猴桃果汁的出汁率和澄清度(a),甲醇含量(b),总酚和总黄酮含量(c)及ABTS、DPPH自由基清除能力(d)

Fig.5 Juice yield and clarity (a), methanol content (b), total phenolics content and total flavonoids content (c), and ABTS and DPPH free radical scavenging ability (d) of four *Actinidia arguta* juices

性和菌种鉴定,经鉴定其均为芽孢杆菌属。其中包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)4株,贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)2株,特基拉芽孢杆菌2株(*Bacillus tequilensis*),解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)1株,耐盐芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)1株。其中贝莱斯芽孢杆菌W6具有最低的果胶酯酶活性和最高的果胶酶活性,通过扩大培养和简单纯化得到由贝莱斯芽孢杆菌W6产生的果胶酶命名为PBV,并将其应用于软枣猕猴桃果汁中。结果表明,与商品果胶酶相比,PBV处理的软枣猕猴桃果汁具有更高的出汁率和澄清效果。在甲醇含量方面,PBV处理的果汁[(147.30±6.30)mg/L]与未经果胶酶处理的果汁

[(135.04±1.70)mg/L]无显著差异,而商品果胶酶处理后的果汁甲醇含量显著升高,其中夏盛果胶酶处理后的果汁甲醇含量[(229.85±12.99)mg/L]高于PBV组的0.56倍。此外,经PBV处理还能够增加软枣猕猴桃果汁中的黄酮物质。综上所述,PBV处理在提高软枣猕猴桃品质的同时还能够解决果胶酯酶作用造成甲醇含量升高的安全问题。本研究为产果胶酶微生物资源的挖掘提供了新的思路,为今后微生物果胶酶在以软枣猕猴桃为代表的高果胶水果的精深加工中应用提供理论依据,以期提高产品质量和安全性,为其产业链延长提供技术参考。

参 考 文 献

- [1] 黄国辉. 软枣猕猴桃产业发展现状与问题[J]. 北方果树, 2020, 1: 41-43.
HUANG G H. Industry development status and problems of *Actinidia arguta* [J]. Northern Fruits, 2020, 1: 41-43.
- [2] FISK C L, MCDANIEL M R, STRIK B C, et al. Physicochemical, sensory, and nutritive qualities of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* 'Ananasnaya') as affected by harvest maturity and storage[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3): S204-S210.
- [3] 吕晓冬, 叶更新, 杨艺新, 等. 猕猴桃果汁加工工艺研究进展[J]. 保鲜与加工, 2023, 23(4): 55-61.
LÜ X D, YE G X, YANG Y X, et al. Research progress on processing technology of kiwifruit juice [J]. Storage and Process, 2023, 23(4): 55-61.
- [4] WOJDYŁO A, NOWICKA P, OSZMIAŃSKI J, et al. Phytochemical compounds and biological effects of *Actinidia* fruits[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 194-202.
- [5] 罗君兰, 刘玉珍, 熊华, 等. 不同提取方法对白木通果胶的结构及凝胶性与乳化性的影响[J]. 南昌大学学报(理科版), 2020, 44(5): 430-438.
LUO J L, LIU Y Z, XIONG H, et al. Effects of different extraction methods on the structure and gelation and emulsification of *Akebia trifoliata* var. *australis* pectin[J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2020, 44(5): 430-438.
- [6] SHARMA H P, PATEL H, SUGANDHA. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices - A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(6): 1215-1227.
- [7] JIAO S L, LI Y, WANG Z S, et al. Optimization of enzyme - assisted extraction of bioactive - rich juice from *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne by response surface methodology[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(9): e14638.
- [8] DINU D, NECHIFOR M T, STOIAN G, et al. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16 [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 131 (2): 128-137.
- [9] BIJESH K, SEBASTIAN D. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species[J]. Bioscience Biotechnology Research Communications, 2018, 11(1): 18-30.
- [10] FAZIO A, LA TORRE C, DALENA F, et al. Screening of glucan and pectin contents in broad bean (*Vicia faba* L.) pods during maturation[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246 (2): 333-347.
- [11] HANNAN A, BAJWA R, LATIF Z. Status of *Aspergillus niger* strains for pectinases production potential[J]. Pak J Phytopathol, 2009, 21(1): 77-82.
- [12] KOBAYASHI T, HATADA Y, HIGAKI N, et al. Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1999, 1427(2): 145-154.
- [13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] 徐文欢, 吴若菡, 李采婵, 等. 传统虾酱中酵母菌分离鉴定及碳源利用特性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 303-309.
XU W H, WU R H, LI C C, et al. Separation and identification of yeast from traditional shrimp paste and their carbon utilization characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 303-309.
- [15] 董乃慧, 薛思宇, 董亮, 等. 氨基甲酸乙酯降解菌株的分离鉴定及其在白酒中的应用[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 410-422.
DONG N H, XUE S Y, DONG L, et al. Isolation and identification of strains degrading ethyl carbamate and its application in chinese liquor[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 410-422.
- [16] 林格儿, 刘宏, 刘海杰, 等. 暹罗芽孢杆菌高产 γ -聚谷氨酸的发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3335-3345.
LIN G E, LIU H, LIU H J, et al. Optimization of fermentation conditions for poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus siamensis* [J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3335-3345.
- [17] 于振林, 刘亚琼, 王颀, 等. 白地霉红枣果胶酶的分离纯化及酶学性质的研究[J]. 食品科技, 2017, 42(10): 253-261.

- YU Z L, LIU Y Q, WANG J, et al. Purification and enzymatic properties of jujube pectinase from *galactomyces candidum*[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(10): 253–261.
- [18] DARAH I, NISHA M, LIM S H. Enhancement of polygalacturonase production from *Enterobacter aerogenes* NBO2 by submerged fermentation[J]. Advanced Studies in Biology, 2013, 5(5): 173–189.
- [19] CHEN X X, PENG M D, WU D H, et al. Physicochemical indicators and sensory quality analysis of kiwi wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, 46(11): e17132.
- [20] NAVAJAS -PORRAS B, PÉREZ -BURILLO S, MORALES-PÉREZ J, et al. Relationship of quality parameters, antioxidant capacity and total phenolic content of EVOO with ripening state and olive variety[J]. Food Chemistry, 2020, 325: 126926.
- [21] WU Y M, XU L Q, LIU X Y, et al. Effect of thermosonication treatment on blueberry juice quality: Total phenolics, flavonoids, anthocyanin, and antioxidant activity [J]. LWT – Food Science and Technology, 2021, 150: 112021.
- [22] ZHENG X Q, CHI H, MA S, et al. Identification of novel α -glucosidase inhibitory peptides in rice wine and their antioxidant activities using *in silico* and *in vitro* analyses[J]. LWT– Food Science and Technology, 2023, 178: 114629.
- [23] 何海燕, 付跃, 覃拥灵. 缫丝废水发酵产果胶酶菌种选育[J]. 蚕业科学, 2020, 46(4): 493–499.
- HE H Y, FU Y, QIN Y L. Screening and breeding of a *Bacillus Safensis* strain producing pectinase by filature wastewater[J]. Science of Sericulture, 2020, 46(4): 493–499.
- [24] HAILE S, MASI C, TAFESSE M. Isolation and characterization of pectinase –producing bacteria (*Serratia marcescens*) from avocado peel waste for juice clarification[J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 1–15.
- [25] KC S, UPADHYAYA J, JOSHI D R, et al. Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains[J]. Fermentation, 2020, 6(2): 59.
- [26] 杨逸飞, 雷雨田, 赵天恒, 等. 果胶酶产生菌的筛选鉴定和酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(9): 47–51.
- YANG Y F, LEI Y T, ZHAO T H, et al. Screening, identification and enzymatic properties of pectinase–producing bacterium[J]. China Brewing, 2021, 40(9): 47–51.
- [27] ZHANG G, LI S G, XU Y B, et al. Production of alkaline pectinase: A case study investigating the use of tobacco stalk with the newly isolated strain *Bacillus tequilensis* CAS-MEI-2-33[J]. BMC Biotechnology, 2019, 19(1): 1–11.
- [28] RAHMAN M S, KIM Y K, KHAN M M, et al. Purification and identification of novel alkaline pectinase PNs31 from *Bacillus subtilis* CBS31 and its immobilization for bioindustrial applications [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2020, 37(11): 1942–1950.
- [29] WEI X H, HAO J, XIONG K X, et al. Effect of pectinase produced by *Bacillus velezensis* W17-6 on methanol content and overall quality of kiwifruit wine[J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104180.
- [30] SITI RASHIMA R, ONG W L, AINA NADIAH Z, et al. Effects of acidified blanching water and pectinase enzyme pretreatments on physicochemical properties and antioxidant capacity of *Carica papaya* juice[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(4): 1684–1695.
- [31] BORA S J, HANDIQUE J, SIT N. Effect of ultrasound and enzymatic pre-treatment on yield and properties of banana juice[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 37: 445–451.
- [32] JIANG Y, XU Y H, LI F, et al. Pectin extracted from persimmon peel: A physicochemical characterization and emulsifying properties evaluation[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101: 105561.
- [33] EINHORN-STOLL U, KUNZEK H. The influence of the storage conditions heat and humidity on conformation, state transitions and degradation behaviour of dried pectins[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(3): 856–866.
- [34] BRUMMELL D A. Cell wall disassembly in ripening fruit[J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(2): 103–119.
- [35] 侯彦喜, 王明瑞, 李欣, 等. 果胶酶澄清蜜瓜汁过程中甲醇含量的变化[J]. 食品与机械, 2023, 39(4): 32–36.
- HOU Y X, WANG M R, LI X, et al. Changes of methanol content during pectinase clarification of

- honey melon juice[J]. Food & Machinery, 2023, 39 (4): 32–36.
- [36] SKINNER M A, LOH J M, HUNTER D C, et al. Gold kiwifruit (*Actinidia chinensis* ‘Hort16A’) for immune support[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2011, 70(2): 276–280.

Screening of Pectinase-producing Strains with Low Pectin Esterase Activity and Its Application

WEI Xiaohan, ZHANG Yujiao, JI Chaofan, DONG Liang, LIN Xinping, ZHANG Sufang*
(Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, National Engineering Research Center of Seafood, SKL of Marine Food Processing & Safety Control, School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning)

Abstract *Actinidia arguta* boasts a high pectin content, so processing it into juice requires the addition of pectinase to improve juice yield and clarity. However, it raises safety concerns due to increased methanol content, there is an urgent need for the development of a novel pectinase with low pectin esterase activity. In this study, a total of 30 strains with pectinase activity were screened from Pixian bean paste through the transparent circle and DNS methods. The top 10 strains with the highest pectinase activity were selected for further study and all of them were identified as *Bacillus* spp., in which *Bacillus velezensis* W6 had the lowest pectin esterase activity and the highest pectinase activity. Subsequently, the pectinase named PBV produced by *B. velezensis* W6 was applied to *A. arguta* juice processing. Compared with the juice treated with commercial pectinase, the *A. arguta* juice treated with PBV demonstrated higher juice yield and clarity. In terms of methanol content, there was no significant difference between the PBV-treated juice (147.30 mg/L) and non-pectinase-treated juice (135.04 mg/L), whereas the methanol content of the commercial pectinase-treated juice was significantly increased, with the methanol content of the Sunson pectinase-treated juice (229.85 mg/L) being 0.56 times higher than that of the PBV group. In addition, PBV treatment also increased the flavonoids in *A. arguta* juice. These findings offer innovative insights into pectinase production microorganisms and serve as a valuable theoretical and technical reference for the development of deep processing products of *A. arguta*.

Keywords pectin esterase; pectinase; *Bacillus*; methanol; *Actinidia arguta*