

酵母细胞诱导自溶对葡萄酒泥溶出物抑制酪氨酸酶作用的影响

张佳萌, 毕雯, 黄志程, 李明*

通化师范学院食品科学与工程学院, 吉林 通化

收稿日期: 2025年4月16日; 录用日期: 2025年5月17日; 发布日期: 2025年5月26日

摘要

本试验以葡萄酒泥为原料, 测定诱导自溶对山葡萄酒泥溶出物抑制酪氨酸酶作用的影响, 通过单因素试验考察了固体含量、pH值、NaCl浓度、培养温度、培养时间对抑制率的影响, 在单因素基础上, 通过正交试验确定了诱导自溶处理葡萄酒泥的最佳条件。结果为: 固体含量为15% (w/v)、pH值为5、NaCl浓度为3% (w/v)、培养温度为35℃、培养时间8 h, 在此条件下, 酒泥溶出物对酪氨酸酶的抑制率最大, 效果最好。

关键词

葡萄酒泥, 酪氨酸酶, 抑制率

The Impact of Yeast Cell Induced Autolysis on the Inhibition of Tyrosinase by Wine Lees Solubles

Jiameng Zhang, Wen Bi, Zhicheng Huang, Ming Li*

College of Food Science and Engineering, Tonghua Normal University, Tonghua Jilin

Received: Apr. 16th, 2025; accepted: May 17th, 2025; published: May 26th, 2025

Abstract

In this experiment, wine lees were used as raw materials to determine the effect of induced autoly-

*通讯作者。

文章引用: 张佳萌, 毕雯, 黄志程, 李明. 酵母细胞诱导自溶对葡萄酒泥溶出物抑制酪氨酸酶作用的影响[J]. 食品与营养科学, 2025, 14(3): 450-457. DOI: 10.12677/hjfn.2025.143051

sis on the inhibition of tyrosinase by *Vitis amurensis* wine lees extracts. The effects of solid content, pH value, NaCl concentration, culture temperature and culture time on the inhibition rate were investigated through single factor experiments. On the basis of single factors, the optimal conditions for induced autolysis treatment of wine lees were determined through orthogonal experiments. The results showed that the solid content was 15% (w/v), pH value was 5, NaCl concentration was 3% (w/v), culture temperature was 35°C, and culture time was 8 h. Under these conditions, the inhibition rate of wine lees extract on tyrosinase was the highest and the effect was the best.

Keywords

Wine Lees, Induced Autolysis, Inhibition Rate

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

葡萄是世界上产量最大的水果之一，年产量约为 6500 万 t，其中 80%用于酿酒、13%作为鲜果食用、7%用于加工果汁及其它葡萄产品[1]。近年来葡萄酒泥在葡萄酒酿造中应用越来越广泛[2]。葡萄酒酿造过程中会产生大量的废弃物，如葡萄梗、葡萄皮渣、酒泥等，占葡萄酒产量的 20%~30% [3]。葡萄酒泥是葡萄酒发酵结束后、贮藏期间以及过滤或者离心后得到的沉淀物和残渣，占葡萄酒产量的 2%~6% [4]。葡萄酒泥是葡萄酒酿造过程中产生的主要副产物之一，据统计加工一万吨葡萄酒，产生的酒泥约在 600 吨以上，含有果胶、蛋白质、多酚等物质[5]。从植物组织中提取得到的果胶已作为凝胶剂、增稠剂、稳定剂等被广泛应用于食品、化妆品行业[6]。且葡萄酒泥是一种主要由酵母细胞及其代谢物组成的泥膏状物质，富含多酚和酵母多糖，具有一定的抗氧化能力，当其作用于表皮时，有助于修复皮肤表层胶原蛋白，抑制黑色素形成，有美白、抗衰老以及其他美容功能[7]。与其他食品废弃物相比，酒泥拥有非常丰富的活性成分，因此它作为高附加值产品的开发值得深入研究[8]。

自溶是发生在生物体消亡阶段的一种内在的反应和现象，在无外来干预的情况下可自发发生，大多数微生物为单细胞生物，微生物的自溶一般为其细胞受到环境的胁迫或者细胞衰老死亡而使得细胞自身溶酶体释放水解酶到细胞质中，导致细胞质内的物质被水解留下空壳或者裂解的一种自然降解过程[9]。根据发生方式则可分为诱导自溶(Induced autolysis)和自然自溶(Natural autolysis) [10]。近年来，诱导自溶的手段不断被开发利用，比如添加无机盐等化学物质、酸解、添加外源酶和高压均质等[11]。

本研究采用诱导自溶法促进酒泥酵母细胞的解体，释放细胞内的活性成分，为酒泥在化妆品开发中的应用提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料与仪器

葡萄酒泥：源自公酿 28 号葡萄酒沉淀物；酪氨酸酶(500 u/mg)：上海士锋生物科技有限公司；酪氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、盐酸、氢氧化钠、氯化钠等试剂均为国产分析纯。

电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)；电热恒温水浴锅(上海高质精密仪器有限公司)；TGL-16M 离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市

予华仪器有限责任公司); 722N 分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司制造); PHS-3G pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

2.2. 试验方法

2.2.1. 操作步骤

葡萄酒泥→预处理→离心分离→调节固体含量→调节 pH 值→加入缓冲液→诱导自溶→离心分离→上清液→加入缓冲液→水浴锅恒温→测定吸光度。

2.2.2. 操作要点

1) 葡萄酒泥预处理

酒泥与蒸馏水 1:1 混合, 通过 80 筛过滤网过滤, 离心机 3000 r/min 离心 5 min, 取沉淀(酒泥)备用。

2) 诱导自溶处理

取适量酒泥与水混合, 配制成固体含量为 15% (w/v) 的悬浮液, 用 1:1 HCl 将 pH 调至 5, 加入 NaCl, 使 NaCl 浓度为 3% (w/v), 在 35℃ 条件下搅拌培养 8 h, 之后, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液按 1.4 方法测酪氨酸酶抑制率。

2.3. 试验设计

2.3.1. 单因素试验设计

取适量酒泥与水混合, 配制成固体含量分别为 5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v)、20% (w/v)、25% (w/v) 的悬浮液, pH 值分别调整至 3、4、5、6、7, 加入 NaCl, 使 NaCl 浓度分别为 1% (w/v)、2% (w/v)、3% (w/v)、4% (w/v)、5% (w/v), 分别在 5℃、45℃、55℃、65℃、75℃ 条件下搅拌培养 8 h、16 h、24 h、32 h、40 h。

2.3.2. 正交试验

根据单因素试验结果选择 NaCl 浓度、pH、固体含量、培养温度四个因素进行正交试验, 设计 $L_9^{(3^4)}$ 四因素三水平正交试验(如表 1), 选出抑制率最高时诱导自溶条件。

Table 1. Factors and levels of orthogonal experiment
表 1. 正交试验因素水平表

水平	因素			
	NaCl (w/v) A	pH B	固体含量(w/v) C	培养温度(℃) D
1	2	4	10	35
2	3	5	15	55
3	4	6	20	75

2.4. 酪氨酸酶抑制率测定[12] [13]

分别配制 pH 6.8 的 PBS(磷酸盐缓冲液)、1.0 mg/mL 的 L-酪氨酸溶液和 70 μg/mL 的酪氨酸酶溶液。按照以下配比加样。

测试样 1: 4.0 mL PBS + 1.0 mL 酪氨酸酶溶液 + 1.0 mL L-酪氨酸溶液;

测试样 2: 5.0 mL PBS + 1.0 mL 酪氨酸溶液;

测试样 3: 1 mL 诱导自溶离心上清液 + 3.0 mL PBS + 1.0 mL 酪氨酸酶溶液 + 1.0 mL L-酪氨酸溶液;

测试样 4: 1 mL 诱导自溶离心上清液 + 4.0 mL PBS + 1.0 mL 酪氨酸溶液。

将各测试样混匀后, 置 37℃ 水浴中 30 min, 在 475 nm 处测吸光度($A_1 \sim A_4$)。

按下式计算酪氨酸酶抑制率:

$$I = [1 - (A_3 - A_4) / (A_1 - A_2)] \times 100\%$$

3. 结果与分析

3.1. 单因素试验结果与分析

3.1.1. 固体含量对酪氨酸酶抑制率的影响

由图 1 可知, 当固体含量由 5% 上升至 15% 时, 酪氨酸酶抑制率随着固体含量的上升而逐渐增大。在固体含量达到 15% 时, 抑制率达到最大值。当固体含量由 15% 增加至 25% 时, 酪氨酸酶抑制率随固体含量的增加而下降。说明酒泥溶出物对酪氨酸酶的抑制率并不会随着固体含量的增加而上升。

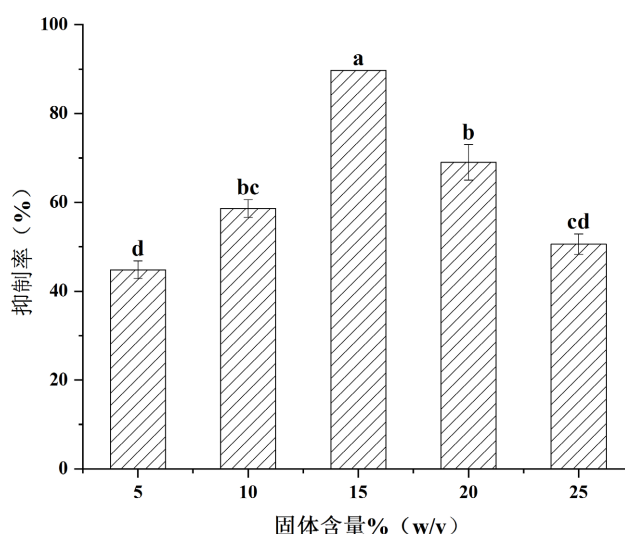


Figure 1. The effect of solid content on inhibition rate

图 1. 固体含量对抑制率的影响

3.1.2. pH 值对酪氨酸酶抑制率的影响

由图 2 可知, 当 pH 值由 3 上升到 5 时, 酪氨酸酶抑制率随着 pH 值的上升而逐渐增大。在 pH 值达到 5 时, 抑制率达到最大值。当 pH 值由 5 上升至 7 时, 酪氨酸酶抑制率有所下降。其原因可能是当 pH 值为 5 时, 达到了酒泥中酵母细胞内自溶酶的适宜 pH 值, 自溶酶充分水解底物, 产生大量能够抑制酪氨酸酶的活性物质, 而当 pH 偏离 5 时, 自溶酶活性均降低, 影响自溶效果[12]。

3.1.3. NaCl 浓度对酪氨酸酶抑制率的影响

由图 3 可知, 当诱导自溶 NaCl 浓度由 1% 上升至 2% 时, 酪氨酸酶抑制率随着 NaCl 浓度的上升而减小。当诱导自溶 NaCl 浓度由 2% 上升至 3% 时, 酪氨酸酶抑制率随着 NaCl 浓度的上升而增大, 抑制率达到最大值。当诱导自溶 NaCl 浓度由 3% 上升至 5% 时, 酪氨酸酶抑制率随着 NaCl 浓度的上升而逐渐减小。这主要是由于 NaCl 有利于酵母细胞的质壁分离, 从而促进酵母细胞内的自溶酶与底物的充分接触[12]。当 NaCl 添加量小于 3% 时, 适量的盐浓度能够较明显地促进酶促反应, 而当 NaCl 添加量大于 3% 时, 较大的盐浓度会抑制自溶酶的活性。

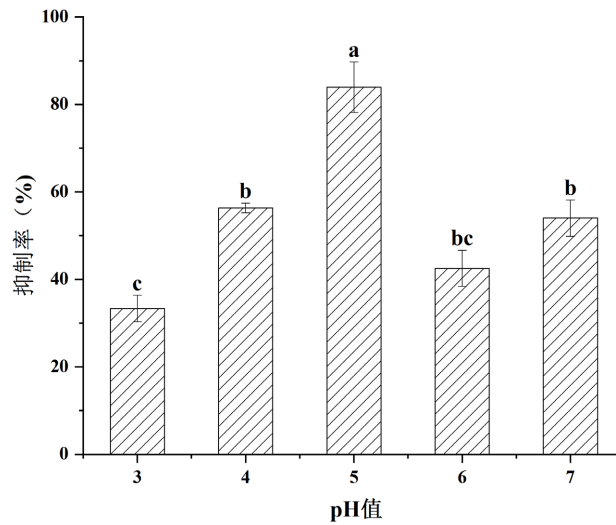


Figure 2. The effect of pH value on inhibition rate
图 2. pH 值对抑制率的影响

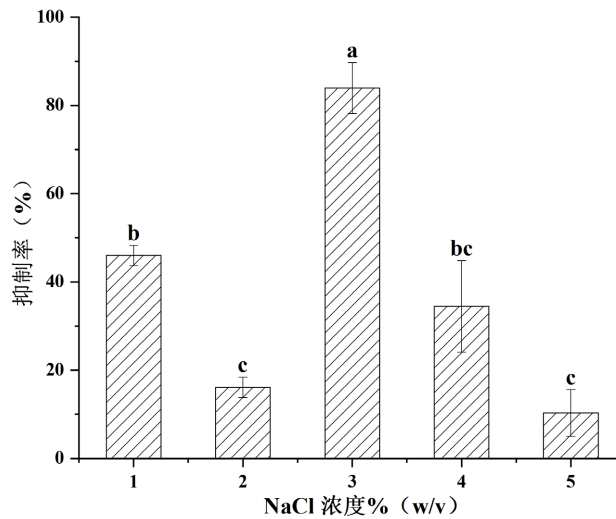


Figure 3. The effect of NaCl concentration on inhibition rate
图 3. NaCl 浓度对抑制率的影响

3.1.4. 培养温度对酪氨酸酶抑制率的影响

由图 4 可知, 当培养温度由 35℃ 上升至 55℃ 时, 酪氨酸酶抑制率随着培养温度的上升而逐渐增大。在固体含量达到 55℃ 时, 抑制率达到最大值。当培养温度从 55℃ 上升至 75℃ 时, 酪氨酸酶抑制率随着培养温度的升高而下降。当培养温度在 35℃~55℃ 范围时, 随着温度的升高, 酒泥酵母细胞内的自溶酶的活性也逐渐上升, 酶促反应速度加快, 活性物质产量也逐渐提高, 使酒泥溶出物的酪氨酸酶抑制率也随之增加。当温度超过 55℃ 时, 较高的温度抑制了自溶酶的活性, 导致酒泥溶出物的酪氨酸酶抑制率下降。

3.1.5. 培养时间对酪氨酸酶抑制率的影响

由图 5 可知, 当诱导自溶培养时间为 8 h, 16 h, 24 h 时, 酪氨酸酶抑制率值接近, 抑制效果没有显著差异。当培养时间从 24 h 增加到 40 h 时, 酪氨酸酶抑制率显著下降。说明诱导自溶时间不易过长, 使溶出物发生变化, 降低抑制率。

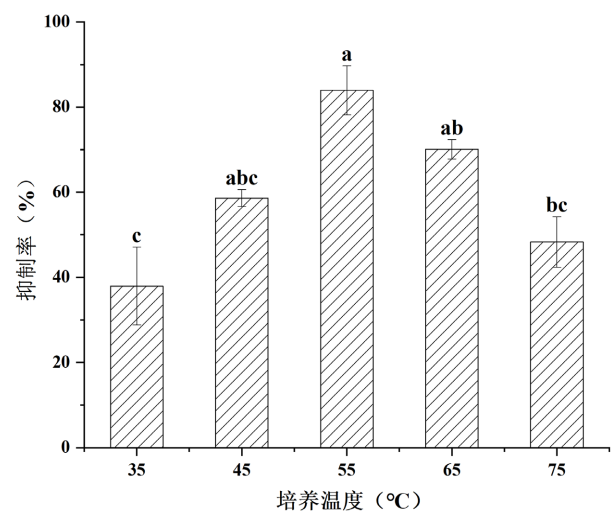


Figure 4. The effect of culture temperature on inhibition rate
图 4. 培养温度对抑制率的影响

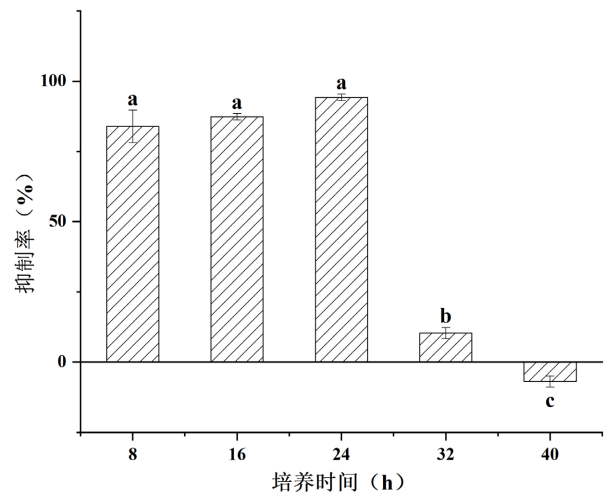


Figure 5. The effect of culture time on inhibition rate
图 5. 培养时间对抑制率的影响

3.2. 正交试验结果与分析

通过单因素试验结果可知，由于培养时间在 24 h 内对抑制率的影响不显著，因此选择 NaCl 浓度(A)、pH 值(B)、固体含量(C)、培养温度(D)进行 L₉^(3⁴)四因素三水平正交试验，结果如表 2 所示。

Table 2. Results of orthogonal experiment
表 2. 正交试验结果

试验号	NaCl 浓度(w/v) (A)	pH 值 (B)	固体含量(w/v) (C)	培养温度(°C) (D)	抑制率 (%)
1	2	2	3	1	71.3
2	1	1	1	1	38.1
3	2	1	2	3	58.6
4	2	3	1	2	54

续表

5	3	1	3	2	33.2
6	3	2	1	3	14.9
7	3	3	2	1	59.8
8	1	2	2	2	71.3
9	1	3	3	3	14.9
k1	41.43	43.30	35.67	56.40	
k3	61.30	52.50	63.23	52.83	
k4	35.97	42.90	39.80	29.47	
R	25.33	9.60	27.56	26.93	C > D > A > B

由表 2 可知, 各因素影响效果大小为 $C > D > A > B$, 即固体含量 > 培养温度 > NaCl 浓度 > pH 值。其中效果最好的组合是 $A_2B_2C_2D_1$, 即在 NaCl 浓度为 3% (w/v)、pH 值为 5、固体含量为 15% (w/v)、培养温度为 35℃时, 诱导自溶对酪氨酸酶抑制率的影响效果最好。由于最佳组合在正交试验中并未出现, 故与正交试验结果表里抑制率最高的两组 $A_2B_2C_3D_1$ 、 $A_1B_2C_2D_2$ 做验证试验。结果如表 3。

验证试验 $A_2B_2C_2D_1$ 即在 NaCl 浓度为 3% (w/v)、pH 值为 5、固体含量为 15% (w/v)、培养温度为 35℃时, 抑制率为 81.6%。比正交试验最优组合抑制效果好, 故验证试验为最佳抑制效果组合。

Table 3. Validation test results of table 2 orthogonal experiment results

表 3. 验证试验结果表 2 正交试验结果

试验号	组合	抑制率(%)
1	$A_2B_2C_3D_1$	71.3
2	$A_1B_2C_2D_2$	71.3
3	$A_2B_2C_2D_1$	81.6

4. 结论

以酪氨酸酶抑制率为指标, 采用单因素试验和正交试验, 确定了诱导自溶法处理葡萄酒泥的最佳条件为: NaCl 浓度为 3% (w/v)、pH 值为 5、固体含量为 15% (w/v)、培养温度为 35℃, 培养时间 8 h, 在此条件下, 酒泥溶出物对酪氨酸酶的抑制率最大, 效果最好。

基金项目

通化师范学院 2024 年大学生创新创业训练计划(202410202015)。

参考文献

- [1] 李春阳, 许时婴, 王璋. 从葡萄废弃物中提取分离多酚类生物活性物质[J]. 食品科技, 2004, 29(6): 88-93.
- [2] 屈慧鸽, 肖波, 张玉香, 等. 葡萄酒在酒泥上陈酿研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 7(4): 322-325.
- [3] 郭志君, 张王飞, 江璐, 房玉林. 葡萄酒泥高价值产物开发及生物炼制研究概况[J]. 机械, 2021, 37(5): 221-226.
- [4] Ros, D.C., Cavinato, C., Pavan, P. and Bolzonella, D. (2016) Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Co-Digestion of Winery Wastewater Sludge and Wine Lees: An Integrated Approach for Sustainable Wine Production. *Journal of Environmental Management*, **203**, 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.03.029>
- [5] 杜鑫. 葡萄酒泥中原花青素、果胶和酒石酸的提取工艺[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 西北师范大学, 2023.
- [6] 赵俭波, 姜建辉, 秦少伟, 等. 慕萨莱思酒泥原花色素、果胶、酒石酸联产工艺[J]. 食品工业, 2019, 40(5): 15-20.

-
- [7] 袁佳璐, 王志磊, 袁春龙, 等. 赤霞珠葡萄酒泥的改性处理及性能研究[J]. 食品科技, 2022, 47(3): 71-76.
 - [8] 高学峰, 杨继红, 王华. 葡萄和葡萄酒生产中副产物综合利用的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 289-295.
 - [9] 吴书建, 刘小玲. 自溶现象与机理研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(8): 187-192.
 - [10] Alexandre, H. and Guilloux-Benatier, M. (2006) Yeast Autolysis in Sparkling Wine—A Review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **12**, 119-127. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x>
 - [11] 杨更. 脉冲电场对诱导酿酒酵母自溶及其自溶产物品质影响的研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2020.
 - [12] 李颖, 郭晓, 张彦芳, 等. 葡萄酒泥酵母诱导自溶工艺的条件优化[J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 6(3): 155-159.
 - [13] 杨宇, 宋孟霜, 陈婕, 等. 白鲜皮抑制酪氨酸酶作用研究及其美白面膜制备[J]. 广州化工, 2021, 49(12): 88-89, 124.