

# 酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶性质研究

杨芮<sup>1</sup>, 吕珍<sup>1</sup>, 文彦<sup>1</sup>, 李凯<sup>1</sup>, 朱成龙<sup>1</sup>, 刘树文<sup>1,2,\*</sup>

(1.西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2.陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**以26株野生酒类酒球菌为研究对象, 通过测定 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性筛选出8株高酶活力菌株。进而以2株商业菌株为对照, 分析温度、pH值、酒精体积分数、葡萄糖、果糖以及模拟酒条件对8株高酶活菌株中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响。结果表明: CS-1b酶活性性质最优, 其酶活性性质为: 最适pH值为5, 最适温度为30℃, 在葡萄酒pH值和温度下均有较高酶活; 高酒精度对该酶有强烈抑制作用; 低质量浓度葡萄糖和果糖对该酶有轻微激活作用, 高质量浓度葡萄糖和果糖均有轻微抑制作用; 菌株CS-1b在模拟酒条件下可保持较高酶活力3.755 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ , 相对酶活力为34.55%。

**关键词:**葡萄酒; 酒类酒球菌;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 酶活性

## $\beta$ -Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni*

YANG Rui<sup>1</sup>, LÜ Zhen<sup>1</sup>, WEN Yan<sup>1</sup>, LI Kai<sup>1</sup>, ZHU Cheng-long<sup>1</sup>, LIU Shu-wen<sup>1,2,\*</sup>

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, China)

**Abstract:** In this study, 8 strains of *Oenococcus oeni* with the highest  $\beta$ -glycosidase activity were obtained by measuring  $\beta$ -glycosidase activity in 26 wild *Oenococcus oeni* strains and the effects of temperature, pH, alcohol concentration, glucose, fructose and wine-model conditions on  $\beta$ -glycosidase activity from the selected strains were investigated using two commercial strains as controls. The results showed that strain CS-1b exhibited the best enzymatic properties among the tested strains under the optimum conditions of pH 5 and 30 °C and it retained high  $\beta$ -glycosidase activity under wine-model conditions of pH and temperature. The  $\beta$ -glycosidase activity was slightly activated by lower concentrations of glucose or fructose but slightly inactivated at higher concentrations. Higher concentrations of alcohol strongly inhibited its activity. Under wine-model conditions, the  $\beta$ -glycosidase activity of this strain was 3.755  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ , accounting for 34.55% of the original activity.

**Key words:** wine; *Oenococcus oeni*;  $\beta$ -glycosidase; enzyme activity

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0206-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323043

葡萄浆果中大量香气前体物质以不可感知的 $\beta$ -葡萄糖苷结合态存在<sup>[1-2]</sup>,  $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)可将其水解生成游离态香气物质, 形成浓郁、丰富的葡萄酒香气<sup>[3]</sup>, 因此 $\beta$ -葡萄糖苷酶是非常重要的糖苷水解酶。

为提高葡萄酒香气质量,  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究得到越来越多的重视, 大量研究关注于黑曲霉、酵母菌、乳酸菌等微生物中 $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[4-6]</sup>, 国内对黑曲霉中 $\beta$ -葡萄糖苷酶研究较多, 但其存在食品安全隐患, 在食品加工中受到限制<sup>[7]</sup>。酿酒酵母中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性较低, 并

且主要集中于细胞内<sup>[8]</sup>, 胞内酶只有在酵母自溶的情况下才能够将香气前体物质酶解为游离态, 释放香气。

与酵母中 $\beta$ -葡萄糖苷酶相比, 酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的应用有更多优势。作为触发和完成苹果酸乳酸发酵(Malolactic fermentation, mLF)的主要菌株, 酒类酒球菌是在酒精发酵结束后接种于葡萄酒<sup>[9]</sup>中, 其生长环境比酒精发酵的葡萄醪环境稳定, 因此不易在酶的作用下生成不利于葡萄酒质量的副产物。并且一些酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶具有较高活性<sup>[10-11]</sup>, 能够提高葡萄酒香气<sup>[12]</sup>。因而酒

收稿日期: 2012-12-02

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD31B07); 中央高校基本科研业务费专项(2109021104);

国家现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-30-ch-03)

作者简介: 杨芮(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为酿酒微生物。E-mail: yangrui0421@gmail.com

\*通信作者: 刘树文(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为酿酒微生物。E-mail: liushuwen@nwsuaf.edu.cn

类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的相关研究得到越来越多的关注<sup>[13-15]</sup>。

综上所述,从自然界中直接筛选在葡萄酒酿造环境中仍有高效 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的酒类酒球菌可作为增加葡萄酒香气,提高葡萄酒质量的直接方法。此方法在提高葡萄酒香气质量的同时,既可以节约购买商业 $\beta$ -葡萄糖苷酶制剂的成本,又可以保证葡萄酒生成的安全性。但目前国内鲜有关于酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的研究,基于 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的酒类酒球菌筛选工作更为稀少。

本实验对酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的性质进行探究,通过分析葡萄酒相关因素(pH值、温度、酒精体积分数、葡萄糖、果糖)以及模拟酒环境对酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响,了解酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的性质,进而筛选出具有优良 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的酒类酒球菌,从而为酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的后续研究以及优良酒类酒球菌的筛选提供参考,为葡萄酒实际生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

2株商业菌株(OENO2和VD)、26株野生酒类酒球菌、CS菌株和ME菌株分别分离自2010年陕西赤霞珠葡萄酒和2010年陕西美乐葡萄酒。

### 1.2 培养基与试剂

改良MRS培养基(1L):酵母浸出物5g、牛肉膏10g、胰蛋白胨15g、乙酸钠5g、柠檬酸铵2g、硫酸锰0.05g、硫酸镁0.2g、葡萄糖20g、吐温-80 1mL、番茄汁100mL, pH4.8。

对硝基苯酚- $\beta$ -D-葡萄糖苷( $p$ -NPG) 美国Sigma公司;其他均为分析纯试剂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌种活化与发酵培养

将保藏的菌株接种于改良MRS液体培养基活化,26℃培养,活化两次后接种于改良MRS液体培养基中培养48h。

#### 1.3.2 菌体收集及酶活力测定

于14000r/min离心5min收集发酵液中菌体,加入0.85g/100mL NaCl清洗菌体2次。

实验中改进Grimaldi等<sup>[10]</sup>所用的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力测定方法,反应在PCR管中进行反应,并使用Nanodrop微量紫外分光光度计测定吸光度。反应体系(80 $\mu$ L)包括:50 $\mu$ L磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(0.1mol/L柠檬酸、0.2mol/L  $K_2HPO_4$ , pH 4.0)、10 $\mu$ L 20mmol/L  $p$ -NPG溶液、20 $\mu$ L菌液(菌体溶于磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液),于37℃条件下

反应1h后,立即加入120 $\mu$ L的0.5mmol/L  $Na_2CO_3$ 溶液终止反应,放置至室温,于2500r/min离心18min,转移上清液至另一PCR管中,于403nm波长使用微量紫外分光光度计测定上清液的吸光度,测定3个重复。空白对照为未加入乳酸菌的反应体系,其他处理相同。

酶活力单位定义:以 $p$ -NPG为底物,在上述反应条件下,1min内1g干重菌体催化生成1 $\mu$ mol对硝基苯酚(dNP)的酶量为1个酶活力单位。

#### 1.3.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶学性质研究

##### 1.3.3.1 pH值对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响

在不同pH值(2.6、3.0、3.4、3.8、4.0、4.2、4.6、5.0、5.4、5.8、6.2、6.6、7.0)下反应1h,测定酶活力。

##### 1.3.3.2 酒精体积分数对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响

在不同酒精体积分数(4%、6%、8%、10%、12%、14%)下反应1h,测定酶活性,对照为未加酒精所测酶活力,其相对酶活力为100%。

##### 1.3.3.3 葡萄糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响

在不同葡萄糖质量浓度(0.1、2、7.5、20g/L)下反应1h,测定酶活性,对照为未加入葡萄糖所测酶活,其相对酶活力为100%。

##### 1.3.3.4 果糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响

在不同果糖质量浓度(0.1、2、7.5、20g/L)下反应1h,测定酶活性,对照未加果糖所测酶活,其相对酶活力为100%。

##### 1.3.3.5 温度对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响

通过温度梯度PCR仪设定反应温度梯度,将温度梯度分别设为15、20、25、30、32、35.2、39.3、44.9、49、51.9、54℃,反应1h,测定酶活力。

##### 1.3.3.6 模拟酒环境对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响

将模拟酒体系<sup>[12]</sup>设定为:酒精体积分数11%、葡萄糖2g/L、果糖2g/L、pH3.5,于20℃反应1h,测定酶活,对照为单因素试验中所测得的最高酶活力,其相对酶活力为100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性

$p$ -NPG为底物,在37℃、pH4反应条件下测定28株酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性,酶活力测定结果见表1。28株酒类酒球菌酶活力范围为3.349~7.974 $\mu$ mol/(g·min),其中菌株商业菌株OENO2和VD表现出的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性较低,分别为4.784 $\mu$ mol/(g·min)和3.349 $\mu$ mol/(g·min)。野生菌株CS-1b酶活力最高,为7.974 $\mu$ mol/(g·min)。由于本实验中的野生酒类酒球菌都具有 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性,这些菌株具有通过水解香气前体物质释放葡萄酒香气物质的潜力。与本实验结果相似,8株分离自卡斯蒂利亚-拉

曼哈地区的酒类酒球菌都具有 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力<sup>[16]</sup>,但10株分离自意大利威尼托地区的野生酒类酒球菌中仅有5株菌株具有 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性<sup>[8]</sup>。与酿酒酵母相比,含有 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的酒类酒球菌比例较高,但不同地区的野生酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力大小有差异。

表1 酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性  
Table 1  $\beta$ -glycosidase activity in 8 *Oenococcus oeni* strains

菌株	酶活力/( $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ )	菌株	酶活力/( $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ )	菌株	酶活力/( $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ )	菌株	酶活力/( $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ )
CS-1b	7.974 $\pm$ 0.113 <sup>a</sup>	CS-1a	5.603 $\pm$ 0.083 <sup>c</sup>	CS-4a	4.974 $\pm$ 0.025 <sup>f</sup>	ME-5d	4.681 $\pm$ 0.079 <sup>im</sup>
CS-7a	6.915 $\pm$ 0.171 <sup>b</sup>	ME-2a	5.348 $\pm$ 0.097 <sup>b</sup>	ME-6b	4.959 $\pm$ 0.138 <sup>j</sup>	ME-3a	4.670 $\pm$ 0.053 <sup>im</sup>
CS-2a	6.494 $\pm$ 0.076 <sup>c</sup>	ME-2b	5.312 $\pm$ 0.069 <sup>ab</sup>	CS-11a	4.913 $\pm$ 0.111 <sup>jk</sup>	CS-7b	4.603 $\pm$ 0.157 <sup>m</sup>
CS-8a	5.883 $\pm$ 0.114 <sup>d</sup>	ME-5e	5.159 $\pm$ 0.095 <sup>ab</sup>	ME-4d	4.910 $\pm$ 0.128 <sup>jk</sup>	ME-4a	4.291 $\pm$ 0.199 <sup>g</sup>
CS-6a	5.823 $\pm$ 0.105 <sup>de</sup>	CS-11b	5.078 $\pm$ 0.118 <sup>g</sup>	OENO2	4.784 $\pm$ 0.049 <sup>kl</sup>	ME-1b	4.052 $\pm$ 0.052 <sup>o</sup>
CS-3b	5.758 $\pm$ 0.116 <sup>de</sup>	ME-5c	5.054 $\pm$ 0.062 <sup>l</sup>	CS-6c	4.779 $\pm$ 0.089 <sup>kl</sup>	CS-8b	4.011 $\pm$ 0.106 <sup>o</sup>
ME-3d	5.678 $\pm$ 0.114 <sup>de</sup>	ME-1a	4.977 $\pm$ 0.082 <sup>l</sup>	ME-6d	4.696 $\pm$ 0.065 <sup>im</sup>	VD	3.349 $\pm$ 0.059 <sup>o</sup>

注:小写字母不同,表示差异显著( $P < 0.05$ )。

葡萄酒是一个复杂的反应体系,葡萄酒条件下的pH值、温度、酒精体积分数、葡萄糖、果糖等因素都可能影响酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力。由于不同酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的含量和细胞中所处位置有差异性,并且 $\beta$ -葡萄糖苷酶具有多种存在形式,葡萄酒相关因素对不同菌株中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的影响程度有差异性<sup>[17-19]</sup>。因此需要通过分析葡萄酒相关因素对各菌株中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响,以筛选出具有最优 $\beta$ -葡萄糖苷酶性质的菌株。实验中设想分离自不同葡萄酒中酒类酒球菌的 $\beta$ -葡萄糖苷酶性质可能具有差异,因此分别从分离自赤霞珠葡萄酒和美乐葡萄酒的酒类酒球菌中选取4株酶活力最高菌株,根据表1测定结果,所选取菌株包括:CS-1b、CS-7a、CS-2a、CS-8a、ME-3d、ME-2a、ME-2b、ME-5e。随后以选取菌株为实验材料,OENO2和VD为对照菌株,进一步研究单因素(pH值、温度、酒精体积分数、葡萄糖、果糖)以及模拟酒条件对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响。

## 2.2 pH值对 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活性的影响

pH值是影响菌株 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的重要因素,由于葡萄酒为低pH值环境,酵母菌<sup>[22]</sup>和乳酸菌<sup>[6,23]</sup>中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力都受到葡萄酒pH值的抑制。 $\beta$ -葡萄糖苷酶分子上带有许多酸性、碱性氨基酸残基,pH值的变化会影响这些氨基酸残基的解离状态,因而可能直接影响底物的结合和进一步催化反应,也可能影响到酶的空间结构,进而影响到酶的活性<sup>[20-21]</sup>。 $\beta$ -葡萄糖苷酶的催化位点在其适应的pH值下含有可质子化的氨基酸,表现出催化活性。由于菌株间 $\beta$ -葡萄糖苷酶构象、所含氨基酸残基和催化位点的差异,pH值对不同菌株中 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活力的影响程度有差异性。本实验中研究了pH值对10

株酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的影响情况,由图1可知,pH值对供试菌株中酶活力的影响具有相似性和差异性。随pH值变化,酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力呈钟罩形曲线,pH2.6几乎完全抑制菌株酶活,随后酶活力随pH值升高而升高;大部分菌株的酶活在pH5.0左右最高,商业菌株OENO2表现出两个峰值(pH4.0和pH5.8),所有菌株都在pH4.0~5.8保持高酶活;pH值高于5.8时,酶活随pH值升高下降较为迅速。葡萄酒中pH值一般为3.0~4.0,此pH值范围内酶活随pH值下降迅速下降,在葡萄酒pH值下菌株CS-1b的酶活力最高,酶活力范围为1.927~7.974 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。

Mesas等<sup>[24]</sup>对酒类酒球菌ST81中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的研究表明,酶活最适pH值为5.0,与本实验测定结果一致,菌株ST81在pH2.6~3.0条件下,酶活几乎为零,相比之下,本实验中酒类酒球菌在低pH值下仍可保持一定 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力。Michlmayr等<sup>[25]</sup>测定了pH值对一株短乳杆菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的影响,此菌株在葡萄酒pH(3.0~4.0)下,相对酶活力在4%以下,而本实验中菌株CS-1b中 $\beta$ -葡萄糖苷酶在葡萄酒pH值下,相对酶活力为18.40%~73.36%,比上述中的短乳杆菌和酒球菌ST81对低pH值的适应性高。因此CS-1b可在低pH值保持一定催化能力,具有应用前景。

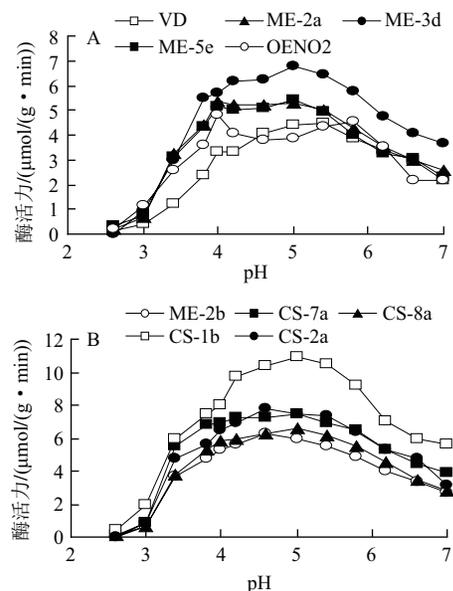


图1 pH值对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响  
Fig.1 Effect of pH on  $\beta$ -glycosidase activity

## 2.3 乙醇对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响

酒精发酵(AF)过程中,酒类酒球菌的生长受到抑制<sup>[26]</sup>,AF结束后,随苹果酸乳酸发酵的开始,酒类酒球菌数量增加。在苹果酸乳酸发酵环境中,酒精体积分数一般为12%~14%,大量研究表明乙醇是影响酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的重要因素之一<sup>[2,10]</sup>,乙醇能够改变反

应基质的极性,从而改变酶的构象及其活性中心,进而抑制酶的活性<sup>[20]</sup>。本实验通过设定酒精体积分数梯度分析乙醇对酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响。由图2可知,酒精体积分数对供试菌株中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力均有强抑制作用,并随酒精体积分数升高, $\beta$ -葡萄糖苷酶活力迅速降低。在酒精体积分数为4%时,大部分菌株中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力已经受到强烈抑制,但对菌株CS-7a和CS-1b仅有轻微抑制作用,菌株仍可保持94.79%以上酶活力;酒精体积分数高于4%时, $\beta$ -葡萄糖苷酶活力迅速下降,其中商业菌株VD中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力下降最明显,在酒精体积分数为8%时,相对酶活力仅为17.66%;而菌株ME-2b和CS-1b在酒精体积分数为12%时,相对酶活力仍可保持17.72%以上;酒精体积分数为14%时,酶活受到强烈抑制,供试菌株相对酶活力仅为3.7%~12.21%之间。葡萄酒中酒精体积分数一般为12%左右,所有供试菌株的相对酶活力为7.0%~19.2%,因此葡萄酒条件下的高酒精体积分数强烈抑制供试菌株的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力,其中ME-2b和CS-1b是受到抑制最小的菌株,相对酶活力为17.7%~19.2%,CS-1b表现出最大酶活力,酶活力为1.53 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。

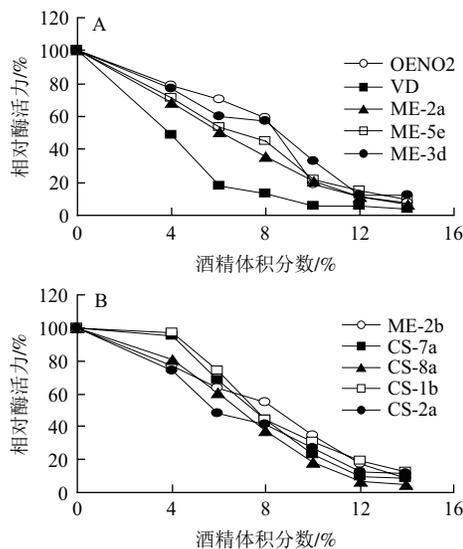


图2 酒精对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响  
Fig.2 Effect of ethanol on  $\beta$ -glycosidase activity

乙醇对不同来源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的抑制作用不同, Mateo等<sup>[20]</sup>研究了乙醇对5株非酿酒酵母中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的影响,在0%~20%的酒精体积分数下,5株非酿酒酵母都可维持60%以上酶活力。因此,与酵母菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶相比,葡萄酒酒精体积分数(12%)对本实验中的10株酒类酒球菌有明显抑制。

#### 2.4 葡萄糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响

酒精发酵结束后,苹果酸乳酸发酵环境中含有少量葡萄糖。研究表明葡萄糖明显抑制商业 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力<sup>[17]</sup>,葡萄糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶的抑制机理为非竞争性抑

制,由于底物和抑制剂与酶的结合位点不同,酶可以同时与抑制剂以及底物结合,这种结合引起糖苷酶分子构象变化,进而抑制酶活力<sup>[27]</sup>。实验中通过设定葡萄糖质量浓度梯度分析葡萄糖对酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的影响。由图3可知,葡萄糖对酒类酒球菌的影响具有菌株相似性和差异性。低质量浓度葡萄糖(0.1g/L)对酶活影响较小,除商业酒类酒球菌VD的相对酶活力降至66.14%,其余菌株的相对酶活力为80%以上,菌株CS-1b和CS-7a中 $\beta$ -葡萄糖苷酶有轻微激活,分别上升25.34%和4.13%。随葡萄糖质量浓度增加,酶活力下降,在葡萄糖质量浓度为7.5g/L时,大部分菌株(除OENO2和CS-1b外)相对酶活力迅速下降至27.26%~44.19%之间,葡萄糖质量浓度为20g/L时,相对酶活力仅为20.11%~30.99%。葡萄糖对菌株OENO2和CS-1b的抑制作用较弱,在葡萄糖质量浓度为20g/L时,相对酶活分别为56.33%和74.30%。干葡萄酒中葡萄糖质量浓度不高于2g/L<sup>[9]</sup>,葡萄糖质量浓度为2g/L时,菌株相对酶活为52.57%~111.24%,CS-1b的相对酶活力最高,为111.24%,酶活力也为最高,为8.871 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。

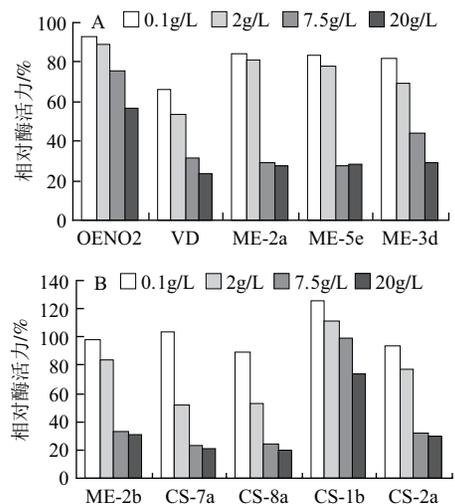


图3 葡萄糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响  
Fig.3 Effect of glucose on  $\beta$ -glycosidase activity

酵母菌所处的酒精发酵环境中含有高质量浓度葡萄糖,高质量浓度的葡萄糖能够明显抑制酵母菌的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力<sup>[4]</sup>。与酵母菌相比,乳酸菌所处环境中的葡萄糖质量浓度低,可是低葡萄糖质量浓度仍然对某些酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力产生抑制作用<sup>[24,28]</sup>。然而,低质量浓度葡萄糖( $\leq 2\text{g/L}$ )能够轻微激活菌株CS-1b的酶活,表明菌株CS-1b中 $\beta$ -葡萄糖苷酶有较好的应用前景。

#### 2.5 果糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响

AF后,糖在葡萄酒环境下的主要存在形式是果糖,与葡萄糖相似,果糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶的抑制机理也是非竞争性抑制,果糖对乳酸菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的抑制作用在一些研究中得到证实<sup>[5,25]</sup>。本实验通过设定果糖浓

度梯度, 研究果糖对酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的影响。由图4可知, 果糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性抑制作用低于葡萄糖的抑制作用。低质量浓度果糖(0.1~2.0g/L)不影响或轻微激活 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性, 随果糖质量浓度升至7.5g/L, 除菌株VD酶活性得到激活, 其余菌株酶活性降低。高质量浓度果糖(20g/L)对酶活的抑制作用不显著, 相对酶活力为52.06%~105.82%。干葡萄酒中果糖质量浓度为2g/L以下<sup>[9]</sup>, 在果糖质量浓度为2g/L时, 菌株相对酶活力为93.98%~134.56%, 其中菌株VD相对酶活力最高, 为134.56%, 菌株CS-1b的酶活最高, 为8.927 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ , 相对酶活力为111.24%。

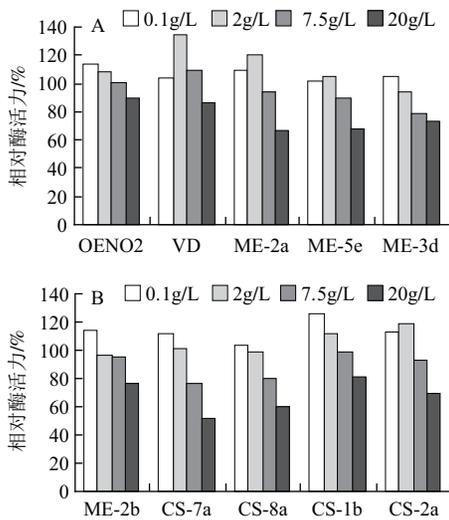


图4 果糖对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响

Fig.4 Effect of fructose on  $\beta$ -glycosidase activity

## 2.6 温度对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响

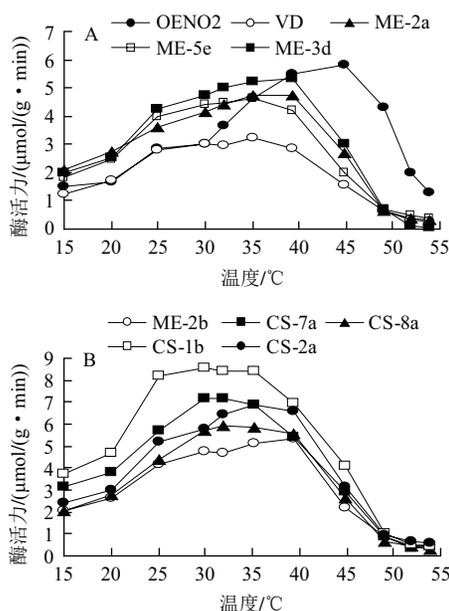


图5 温度对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响

Fig.5 Effect of temperature on  $\beta$ -glycosidase activity

由图5可知,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力随反应温度升高而升高, 商业酒类酒球菌OENO2的酶活在44.9 $^{\circ}\text{C}$ 达到最大值; 其余菌株的酶活在32~39.3 $^{\circ}\text{C}$ 之间达到最大, 并且在25~39.3 $^{\circ}\text{C}$ 之间可保持较高酶活。酶在过高温度下会发生变性, 即有活性的酶含量降低。菌株OENO2的酶活在温度超过44.9 $^{\circ}\text{C}$ 后迅速降低, 其他菌株的酶活在39.3 $^{\circ}\text{C}$ 时开始随温度上升而下降, 到49 $^{\circ}\text{C}$ 时几乎完全失活。通常将苹果酸乳酸发酵温度控制在20 $^{\circ}\text{C}$ 左右<sup>[9]</sup>。MLF温度(20 $^{\circ}\text{C}$ )下, 除OENO2相对酶活力(28.34%)较低, 其余菌株相对酶活力在44.10%~58.29%之间, 其中ME-2a的相对酶活力最高, 为58.29%, CS-1b的酶活力最高, 为4.666 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ , 相对酶活力较高, 为54.52%。

在MLF温度(20 $^{\circ}\text{C}$ )下, Michlmayr等<sup>[25]</sup>所研究的短乳杆菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的相对酶活为25%左右, Michlmayr等<sup>[28]</sup>所研究的酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的相对酶活力约为15%, Grimaldi等<sup>[11]</sup>所筛选的高酶活商业酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的相对酶活力低于28%。相比之下, 本研究所筛选出的高酶活菌株CS-1b可在MLF温度下保持较大活力, 具有良好的应用前景。

## 2.7 模拟酒环境对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的影响

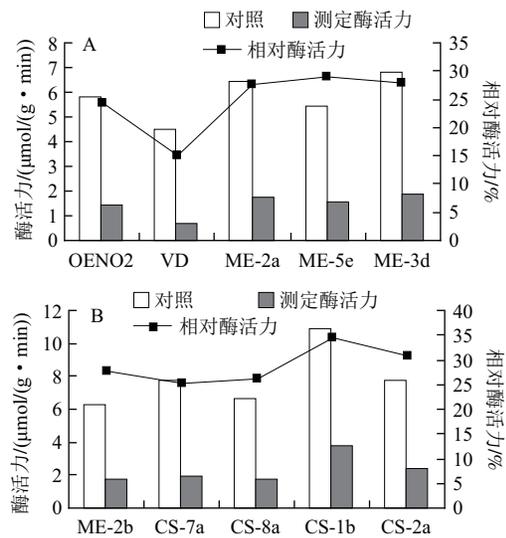


图6 模拟酒环境对 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性影响

Fig.6 Effect of wine-model concentrations on  $\beta$ -glycosidase activity

在葡萄酒环境中, 酒类酒球菌中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性并非只受到单一因素的影响, 而是受到各因素共同作用。本实验将反应体系pH值、酒精体积分数、糖质量浓度、酒精体积分数调至与葡萄酒环境相一致, 测定 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性, 探究葡萄酒相关因素对酒类酒球菌 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的综合影响。由图6可知, 所测定的10株酒类酒球菌相对酶活力范围为15.03%~34.55%, 酶活力范围为0.677~3.755 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。其中, 商业菌株VD的相对酶活力和酶活力最低, 分别为15.03%和0.677 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ , 菌株CS-1b的酶活力和相对酶活力均为最高, 分别为

34.55%和3.755 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。根据单因素试验和模拟酒实验结果,CS-1b中 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力显著高于其他菌株酶活,具有葡萄酒工业生产应用前景。

由于葡萄酒环境比模拟酒环境复杂很多,模拟酒条件下测定的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性不能准确反应菌株对糖苷结合态物质的水解能力,另外,天然底物和底物p-NPG所测定的 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解能力也有差异<sup>[29]</sup>,因此,为更准确研究CS-1b的水解能力和香气释放能力,后续研究将关注于CS-1b在葡萄酒环境中对天然底物的水解反应,从而准确探究其水解释放香气物质的能力及其应用前景。

### 3 结论

本实验首次以分离自陕西葡萄酒的酒类酒球菌为实验材料,分析菌株 $\beta$ -葡萄糖苷酶性质,并筛选出具有最优 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力的菌株。实验结果表明28株供试酒类酒球菌都具有 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性, $\beta$ -葡萄糖苷酶活力范围为3.349~7.974 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ,酶活力具有菌株差异性。其中商业酒类酒球菌OENO2和VD的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力低,并且受葡萄酒条件强烈抑制。因此,若需在MLF过程中提升葡萄酒香气,应优选具有高 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的酒类酒球菌启动发酵,或在使用OENO2和VD时添加 $\beta$ -葡萄糖苷酶制剂,从而增加葡萄酒香气,提升葡萄酒质量。实验中大多数野生菌株的酶活高于商业菌株酶活,野生菌株酶活性质为:最适pH值为4.6左右;最适温度为32~39.3 $^{\circ}\text{C}$ ;低质量浓度糖对酶活影响小,高质量浓度糖对大多数菌株的酶活有较强抑制;酒精强烈抑制酶活,酒精体积分数14%几乎完全抑制酶活力;模拟酒环境下,菌株相对酶活力为25.27~34.55%。

本研究中野生菌株CS-1b表现出最优 $\beta$ -葡萄糖苷酶性质,酶活力为7.974 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ,其最适pH值为5,最适温度为30 $^{\circ}\text{C}$ ,在葡萄酒pH值和温度下有较高酶活,受高体积分数酒精明显抑制,低质量浓度葡萄糖和果糖对酶活力有激活作用,模拟酒条件下,酶活力为3.755 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ,相对酶活力为34.55%,具有葡萄酒工业生产应用前景。后续研究可关注于CS-1b在葡萄酒环境中对天然底物的水解反应,从而准确探究其香气释放能力及其应用前景。

### 参考文献:

- RODRÍGUEZ M E, LOPES C, VALLES S, et al. Selection and preliminary characterization of  $\beta$ -glycosidases producer Patagonian wild yeasts[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(6/7): 812-820.
- WINTERHALTER P, SKOUROUMOUNIS G. Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation[J]. Biotechnology of Aroma Compounds, 1997, 55: 73-105.
- BOIDO E, LLORET A, MEDINA K, et al. Effect of  $\beta$ -glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2344-2349.
- GONZÁLEZ-POMBO P, FARIÑA L, CARRAU F, et al. A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 385-389.
- BAFFI M A, TOBAL T, LAGO J H G, et al. A novel  $\beta$ -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: characterization and application in winemaking[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(7): C997-C1002.
- CAPALDO A, WALKER M E, FORD C M, et al.  $\beta$ -Glucosidase metabolism in *Oenococcus oeni*: cloning and characterization of the phospho- $\beta$ -glucosidase CelD[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 69(1/2): 27-34.
- 谢爽.  $\beta$ -葡萄糖苷酶在食品增香中的应用[J]. 中外食品, 2004(12): 44-45.
- BARBAGALLO R N, SPAGNA G, PALMERI R, et al. Assessment of  $\beta$ -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(3): 292-296.
- 李华. 葡萄酒工艺学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- GRIMALDI A, BARTOWSKY E, JIRANEK V. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(2): 233-244.
- GRIMALDI A, BARTOWSKY E, JIRANEK V. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(5): 1061-1069.
- HERNANDEZ-ORTE P, CERSOSIMO M, LOSCOS N, et al. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria[J]. Food Research International, 2009, 42(7): 773-781.
- MATTHEWS A, GRIMALDI A, WALKER M, et al. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 5715-5731.
- ACEBRÓN I, CUIEL J A, DE LAS RIVAS B, et al. Cloning, production, purification and preliminary crystallographic analysis of a glycosidase from the food lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* CECT 748(T)[J]. Protein Expression Purification, 2009, 68(2): 177-182.
- MATTHEWS A, GRBIN P R, JIRANEK V. A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2006, 12(3): 235-244.
- RUIZ P, IZQUIERDO P M, SESEÑA S, et al. Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(2/3): 230-235.
- PÉREZ-MARTÍN N F, SESEÑA S, IZQUIERDO P M, et al. Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4): 1423-1432.
- MESAS J M, RODRÍGUEZ M C, ALEGRE M T. Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra[J]. Letter in Applied Microbiology, 2011, 52(3): 258-268.
- BARTOWSKY E, BORNEMAN A. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(3): 441-447.
- MATEO J J, PERIS L, IBANEZ C, et al. Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Bobal musts[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2011, 38(2): 347-354.
- 周晓云. 酶学原理与酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- BARBAGALLO R N, SPAGNA G, PALMERI R, et al. Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for oenological applications[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(1): 58-66.
- CAPALDO A, WALKER M E, FORD C M, et al.  $\beta$ -Glucosidase metabolism in *Oenococcus oeni*: cloning and characterisation of the phospho- $\beta$ -glucosidase bglD[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 476-482.
- MESAS J M, RODRÍGUEZ M C, ALEGRE M T. Basic characterization and partial purification of  $\beta$ -glucosidase from cell-free extracts of *Oenococcus oeni* ST81[J]. Letter in Applied Microbiology, 2012, 55(3): 247-255.
- MICHLMAYR H, SCHÜMANN C, DA SILVA N M B B, et al. Isolation and basic characterization of a  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 550-559.
- 张春晖, 李华. 葡萄酒微生物学[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2003.
- BARBAGALLO R N, SPAGNA G, PALMERI R, et al. Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for oenological applications[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(1): 58-66.
- MICHLMAYR H, SCHUMANN C, WURBS P, et al. A  $\beta$ -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(7): 1281-1289.
- GAGNE S, LUCAS P M, PERELLO M C, et al. Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 218-228.