

葡萄酒酿造乳酸菌的分离鉴定及糖苷酶活分析

潘超^{1,3}, 高庆超^{2,3}, 梁颖^{1,2,3}, 张志勇^{1,2,3}, 施露^{2,3}, 李亚辉^{1,2,3*}

¹ 江苏大学食品与生物工程学院 江苏镇江 212001

² 江苏省食品质量安全重点实验室 南京 210014

³ 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所 南京 210014)

摘要 从自然发酵葡萄酒中分离出 1 株乳酸菌,通过形态观察和分子生物学鉴定,评价乳酸菌的 α -L-阿拉伯糖苷酶活、 α -L-鼠李糖苷酶活性和 β -D-葡萄糖苷酶活性。结果显示,分离菌株为短乳杆菌,其具有 α -L-阿拉伯糖苷酶活性、 α -L-鼠李糖苷酶活性和 β -D-葡萄糖苷酶活性,且在生长平台期酶活较高,主要存在于菌株胞内和完整的细胞中。不同碳源对菌株的上述 3 种酶活的影响也不同,与葡萄糖为碳源相比,纤维二糖、熊果苷对菌株 β -D-葡萄糖苷酶活有一定的促进作用,而对 α -L-阿拉伯糖苷酶活有一定的抑制作用;熊果苷对菌株 α -L-鼠李糖苷酶活有促进作用,而纤维二糖对菌株 α -L-鼠李糖苷酶活有抑制作用。本研究结果为开发新的葡萄酒酿造乳酸菌株及提高葡萄酒品质提供了理论参考。

关键词 葡萄酒; 香气; 短乳杆菌; 鉴定; 糖苷酶; 酶活

文章编号 1009-7848(2023)04-0345-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.032

香气是葡萄酒的重要感官属性之一。葡萄和葡萄酒中的香气成分包括游离态挥发性香气物质和结合态非挥发性香气物质^[1]。游离态香气物质可以在常温状态下挥发出来而被感知,而结合态香气物质不具有香气,只有降解释放出游离态香气物质后才能被感知^[2]。由于葡萄酒中大部分呈香物质以结合态形式存在,因此要改善和增强葡萄酒的香气,必需将其中的结合态香气物质转化为游离态香气物质^[3-4]。

结合态香气物质主要以糖苷的形式存在,糖苷主要包括单糖苷和双糖苷,很少见三糖苷^[5]。单糖苷由糖苷配体和葡萄糖糖基以 1-4 糖苷键结合形成,糖苷配体主要为萜烯类、芳香烃类和脂肪醇等挥发性香气物质,单糖苷可直接在 β -D-葡萄糖苷酶作用下水解释放出挥发性香气物质和葡萄糖^[6-7]。双糖苷是在单糖苷的葡萄糖上再连接一个其它糖形成,在 α -L-阿拉伯糖苷酶、 α -L-鼠李糖苷酶等酶作用下降解释放出相应的糖基和单糖苷,并在 β -D-葡萄糖苷酶作用下水解产生挥发性香气物质和葡萄糖^[8-9]。葡萄汁及葡萄酒中结合态

香气物质主要以双糖苷形式存在,其含量远远大于单糖苷含量^[10-11]。在整个香气物质释放过程中 α -L-阿拉伯糖苷酶、 α -L-鼠李糖苷酶是双糖苷降解产香的前提,而 β -D-葡萄糖苷酶是糖苷降解产生挥发性香气物质的关键酶^[12-14]。

目前对葡萄酒酿造中糖苷酶的研究主要集中在对酿酒乳酸菌酒类酒球菌 β -D-葡萄糖苷酶的研究^[15-18]。而对葡萄酒中大量存在的双糖苷降解所必需的 α -L-阿拉伯糖苷酶和 α -L-鼠李糖苷酶的研究还较少,从而不能对酿酒乳酸菌降解糖苷产香进行全面的评价。本文以从葡萄酒自然苹果酸发酵中分离出的菌株为研究对象,对其进行形态观察,并用分子生物学方法进行分子鉴定,然后评价其 α -L-阿拉伯糖苷酶活、 α -L-鼠李糖苷酶活和 β -D-葡萄糖苷酶活,以期增加葡萄酒香气和提高葡萄酒整体品质提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基与试剂

供试菌株,由本实验室从自然发酵葡萄酒中分离。

ATB 培养基:葡萄糖 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g/L、盐酸半胱氨酸 0.5 g/L、番茄汁 250 mL/L,用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 4.8,121 °C 灭菌 20

收稿日期: 2022-04-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31901675)

第一作者: 潘超,男,硕士生

通信作者: 李亚辉 E-mail: liqianhao217@126.com

min。

对硝基苯基- β -葡萄糖苷,北京威知生物科技有限公司;对硝基苯基- α -L-鼠李糖苷、对硝基苯基- α -L-阿拉伯糖苷,北京中成谨念科技有限公司;溶菌酶,上海生工生物工程股份有限公司;葡萄糖、纤维二糖、熊果苷,上海源叶生物科技有限公司;细菌基因组提取试剂盒,上海生物工程股份有限公司;胶回收试剂盒,宝生物(大连)有限公司;其它试剂均为国产分析纯级。

1.2 仪器与设备

UV-1700 紫外-可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;AGPB-10 型 pH 计,德国 Sartorius 公司;;LIOO-JS500 双目显微镜,无锡万物生态科技有限公司;PCR 仪、PRO-3 型垂直平板电泳仪、GelDocEQ 型凝胶成像仪,BIO-RAD 公司;超声波细胞破碎仪,南京先欧仪器;DSX-280B 型式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗;SW-CJ-2G 型超净工作台、LRH-150 型生化培养箱,苏州净化设备;DH-420A 电热恒温培养箱,北京科伟永兴仪器有限公司;3K15 型高速冷冻离心机,美国 Sigma 公司;IMS-40 型制冰机,常熟市雪科电器公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的分离、鉴定

1.3.1.1 分离及形态观察 将新鲜葡萄酒发酵液置于密闭玻璃容器中,于 25 °C 培养箱中恒温放置,进行自然苹果酸乳酸发酵。2 d 后每隔 1 d 取样 100 μ L,共取 5 次。取出样品均匀涂布于 ATB 固体培养基上,分离纯化得到纯培养物,经革兰氏染色和显微镜形态观察后进行鉴定。

1.3.1.2 分子生物学鉴定 菌株培养 12~14 h,用细菌基因组提取试剂盒提取菌株基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR。反应体系 25 μ L,扩增反应体系见表 1。PCR 扩增反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后在 72 °C 延伸 1.5 min。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,用 DNA 胶回收试剂盒进行切胶回收,送上海生工生物工程股份有限公司测序。将测定后的序列登录美国国立生物技术信息(National center for biotechnology information,NCBI)进行 Blast 比对,采用 Mega5.0 软件中的邻接法(Neighbor joining,NJ)构

表 1 16S rDNA PCR 扩增体系

Table 1 PCR amplification system of 16S rDNA PCR

PCR 反应体系	用量/ μ L
2 \times Tap Primx	12.5
DNA 模板	0.5
引物 27F (5'-AGAGTFI'GATCCTG GCTCAG-3')	0.5
引物 1492R (5'-TACGGYTAC CTTGTTACGACTT-3')	0.5
ddH ₂ O	11.0

建系统发育树,用 DNAMAN V 9.0.1 软件进行多序列比对。

1.3.2 菌株生长曲线测定 将分离纯化的菌株接入液体 ATB 培养基中,37 °C 培养 20 h 后以 0.1% 的接种量分别接入 100 mL 含有不同碳源(葡萄糖 10 g/L、纤维二糖 10 g/L、熊果苷 10 g/L)的 ATB 液体培养基中,37 °C 条件下静置培养,每隔 5 h 分别取样测定其 OD_{600nm} 值,绘制生长曲线。

1.3.3 样品前处理

1) 不同碳源、不同生长时期菌体的处理 按 0.1% 接种量接入分别含有葡萄糖、纤维二糖和熊果苷为碳源的 ATB 液体培养基中,37 °C 条件下静置培养。分别在菌体对数生长期、稳定期和衰亡期取样,待用。

2) 酶活定位测定样品处理 酶活定位测定样品处理参照 Barbagallo 等^[19]的方法,并稍加改动。分别取 1 mL 上述菌液,5 000 \times g 离心 15 min (4 °C),得菌液上清和菌体完整细胞。菌液上清直接用于酶活测定,完整细胞悬浮于 1 mL 蒸馏水中,用于酶活测定。另取 1 mL 上述菌液,离心获得菌体完整细胞,然后悬浮于 1 mL PBS 1 \times buffer (NaCl 140 mmol/L,KCl 2.7 mmol/L,Na₂HPO₄ 10 mmol/L,KH₂PO₄ 1.8 mmol/L,pH 7.4),将菌体悬浮液在冰浴条件下超声波破碎 20 min (100 W,间隔 2 s)得细胞破碎液,用于酶活测定。

1.3.4 糖苷酶活测定 酶活测定方法参照 Li 等^[20]方法,并有所改动。取 50 μ L 待测样品于试管中,分别添加 50 μ L 含有不同底物(对硝基苯- β -D-葡萄糖苷、对硝基苯基- α -L 鼠李糖苷、对硝基苯基- α -L-阿拉伯糖苷)的 2 \times 柠檬酸磷酸缓冲液(pH 5.0,底物浓度 10 mmol/L)混合均匀,在 37 °C

水浴中反应 1 h 后 $14\ 000\times g$ 离心 15 min ($4\ ^\circ\text{C}$), 取出上清, 加入 $200\ \mu\text{L}\ 1\ \text{mol/L}\ \text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液终止反应, 然后在波长 $400\ \text{nm}$ 处比色。对照组为蒸馏水代替样品。菌体干重测定方法: 取不同生长时期菌液 $30\ \text{mL}$ 测定其酶活, 离心 $10\ \text{min}\ (5\ 000\times g, 4\ ^\circ\text{C})$ 得菌体, 烘干至恒重, 称重。酶活定义: 在上述反应条件下, 每克菌(干重)作用下每分钟生成对硝基苯酚的量, 酶活单位为 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。每个样品重复测定 3 次。

1.4 数据统计分析

用 SPSS 18.0 和 Origin 9.0 数据处理软件进行数据处理及统计分析。

2 结果与分析

2.1 分离菌株鉴定结果

2.1.1 形态观察 分离菌株的菌落形态和细胞形态分别见图 1a 和图 1b 所示。由图 1a 可知, 分离菌株的菌落呈圆形、凸起、乳白色、湿润、边缘整齐、不透明, 菌落背面为白色。图 1b 为革兰氏染色后显微镜下分离菌株的细胞形态, 革兰氏染色后菌体呈紫色, 可以判定该菌株为革兰氏染色阳性菌。菌体无芽孢, 外形为杆状, 成对或呈短链分布, 初步鉴定为杆菌。

2.1.2 分子生物学鉴定结果 对分离菌株进行 16S rDNA PCR 扩增、系统发育树构建和序列比对, 结果见图 2、图 3 和图 4。

分离菌株的 16S rDNA PCR 扩增结果如图 2 所示。Marker 内含分子质量为 $100, 250, 500, 750, 1\ 000\ \text{bp}$ 和 $2\ 000\ \text{bp}$ 的片段, PCR 扩增得到的基因片段长度在 $1\ 500\ \text{bp}$ 左右, 与预测基因相符。

对分离菌株 16S rDNA PCR 扩增产物进行测序, 将序列在 NCBI 中进行 BLAST 序列比对, 选取同源性较高的菌株构建系统发育树, 结果如图 3 所示。分离菌株与短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 自然聚为 1 支, 结合形态观察, 可以判定分离菌株为短乳杆菌。

从 GenBank 中下载短乳杆菌 16S rDNA 基因序列, 并与分离菌株 16S rDNA 序列进行比对, 结果如图 4 所示。分离菌株 16S rDNA PCR 扩增产物长度为 $1\ 461\ \text{bp}$, 与短乳杆菌 16S rDNA 序列的同源性为 99.55% , 说明分离菌株为短乳杆菌。

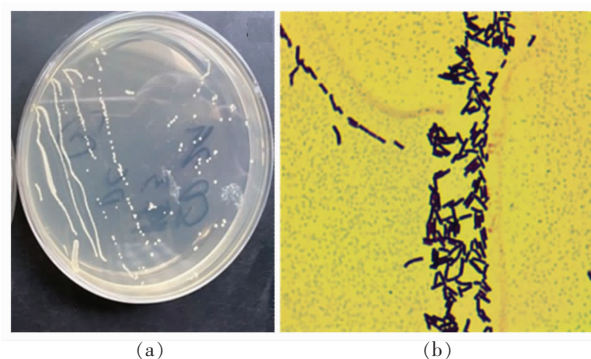


图 1 分离菌株的菌落形态(a)和细胞形态(b)

Fig.1 Colony morphology (a) and cell morphology (b) of isolated strain

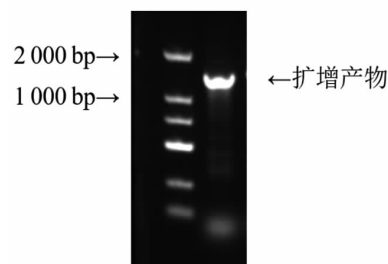


图 2 分离菌株的 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of PCR amplification products of 16S rDNA of isolated strain

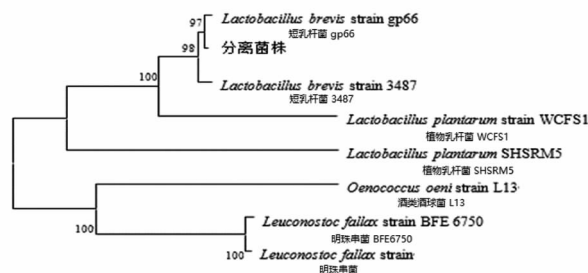


图 3 基于 16S rDNA 序列分离菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of isolated strains based on 16S rDNA sequence

2.2 不同碳源下菌株生长曲线

将分离菌株在含有不同碳源(葡萄糖、纤维二糖和熊果苷)的 ATB 培养基中培养, 测定其生长曲线, 见图 5。由图 5 可知, 以葡萄糖为碳源时, 分离菌株对数生长期为 $0\sim 20\ \text{h}$, 稳定期为 $20\sim 30\ \text{h}$, $30\ \text{h}$ 后 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值迅速下降为衰亡期。以纤维二糖、熊果苷为碳源时, 对数生长期为 $0\sim 15\ \text{h}$, 稳定期为



图4 16S rDNA PCR 扩增产物序列比对

Fig.4 Sequence alignment of PCR amplification products of 16S rDNA

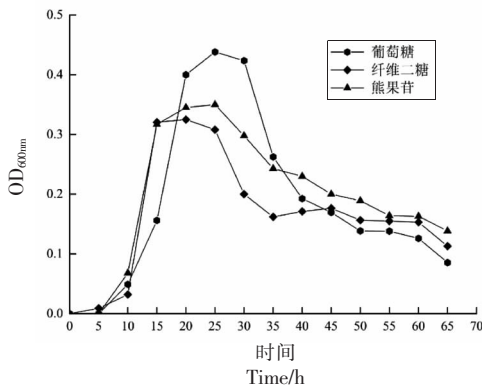


图5 分离菌株在不同碳源下的生长曲线
Fig.5 Growth curves of isolated strain with different carbon sources

15~25 h, 25 h 后为衰亡期。以纤维二糖、熊果苷为碳源时菌体在对数生长期生长速度明显快于以葡萄糖为碳源时的生长速度, 而在稳定期时菌体总量明显低于以葡萄糖为碳源时的菌体总量。整体看, 分离菌体以葡萄糖为碳源时生长最好, 其次是以熊果苷为碳源时生长好。

2.3 不同碳源时β-D-葡萄糖苷酶活

对分离菌株以不同碳源培养时的β-D-葡萄糖苷酶活进行测定, 结果见图6。图6a显示分离菌株以葡萄糖为碳源时在对数中期(15 h)、末期(20 h)、稳定中期(25 h)、末期(30 h)和衰亡期(35 h)培养液上清、完整细胞和细胞破碎液的酶活。在

同一生长时期, 完整细胞酶活最高, 其次是破碎液酶活, 上清液酶活最低($P \leq 0.05$)。在不同生长时期, 对数中期和稳定中期上清液酶活显著高于其它3个时期($P \leq 0.05$); 完整细胞和破碎液酶活具有相同的变化趋势, 在稳定中期酶活最高, 其次是在对数中期、对数末期、稳定末期和衰亡期。图6b和6c分别显示分离菌株以纤维二糖、熊果苷为碳源时在对数末期(15 h)、稳定中期(20 h)、末期(25 h)和衰亡期(30 h)培养液上清、完整细胞和细胞破碎液的酶活。可以看出, 以纤维二糖为碳源时, 在同一生长时期, 破碎液酶活显著高于完整细胞酶活, 完整细胞酶活显著高于上清液酶活($P \leq 0.05$)。在不同生长时期, 稳定末期上清液酶活最高, 完整细胞在稳定中期酶活最高, 其次是在对数中期、对数末期、衰亡期最低, 破碎液在稳定中期和末期最高, 其次是对数末期、衰亡期。以熊果苷为碳源时, 在同一生长时期, 完整细胞酶活最高, 其次是破碎液酶活, 上清液酶活最低, 且具有显著性差异($P \leq 0.05$)。在不同生长时期, 上清液酶活无显著差异($P > 0.05$), 完整细胞和破碎液在稳定末期最高。图6d对比了分离菌株在不同碳源培养下对数末期β-D-葡萄糖苷酶活, 由熊果苷为碳源时上清液酶活最高, 其次是纤维二糖为碳源, 葡萄糖为碳源时酶活最低; 在熊果苷为碳源时完整细胞酶活最高, 其次是葡萄糖为碳源, 纤维二糖为碳源时酶活最低; 而在纤维二糖为碳源时破碎液酶活

最高,其次是熊果苷为碳源,葡萄糖为碳源时酶活最低($P \leq 0.05$)。

上述结果表明,以葡萄糖、纤维二糖和熊果苷为碳源时,分离菌株 β -D-葡萄糖苷酶活主要存在于细胞内和完整细胞中,较少存在于细胞外;细胞内和完整细胞 β -D-葡萄糖苷酶活在菌株生长平台期较高。这与李亚辉等^[21-22]报道的酒类酒球菌 SD-2a 和 31MBR 的 β -D-葡萄糖苷酶活一致。对比不同碳源的酶活可知,随着碳源的变化,菌株不同位置的 β -D-葡萄糖苷酶活也发生一定的变化,尤其是与单糖葡萄糖为碳源相比,当以熊果苷为碳源时,菌株胞内、胞外和完整细胞的 β -D-葡萄糖

糖苷酶活都显著提高。当以纤维二糖为碳源时,菌株胞外和胞内酶活显著提高,而完整细胞酶活显著降低。这说明分离菌株的 β -D-葡萄糖苷酶既是组成型酶,又是诱导酶。纤维二糖由 2 个葡萄糖通过 1,4 糖苷键结合而成,熊果苷是葡萄糖和对苯酚通过 1,4 糖苷键结合而成,在这两种含有糖苷键碳源的诱导下,菌株需要具有更高的 β -D-葡萄糖苷酶活来降解糖苷键,才能获得其生存所需要的单糖^[23]。当纤维二糖为碳源时,完整细胞酶活显著降低,可能是因纤维二糖抑制了菌株体内磷酸烯醇式丙酮酸转移酶系统中转运酶、磷酸化酶或 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶的表达所致^[24]。

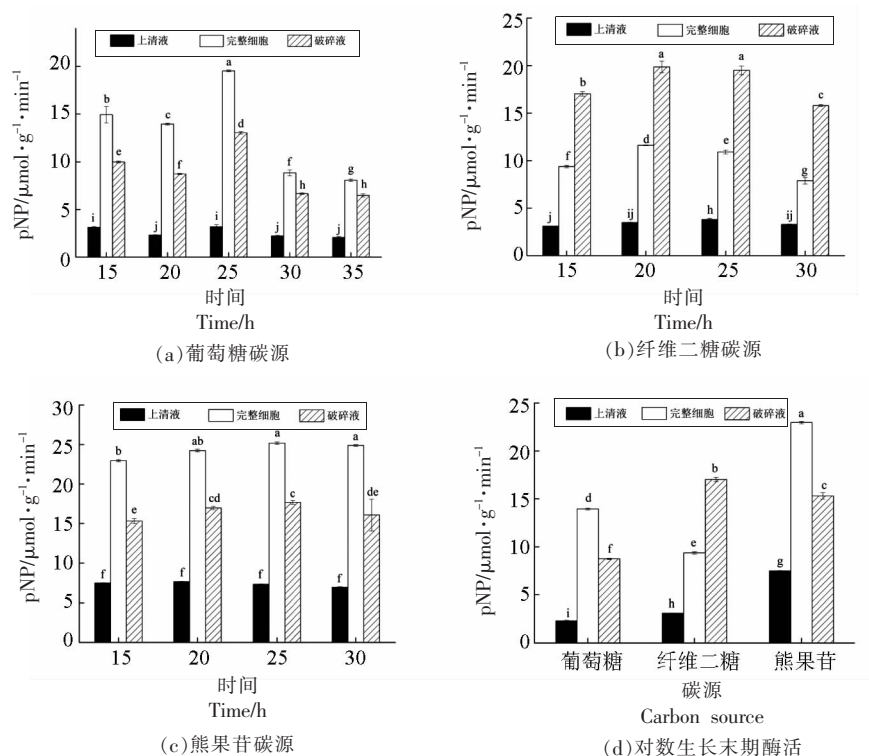


图 6 分离菌株在不同碳源时 β -D-葡萄糖苷酶活

Fig.6 β -D-glucosidase activity of isolated strain with different carbon source

2.4 不同碳源时 α -L-鼠李糖苷酶活

对分离菌株以不同碳源培养时的 α -L-鼠李糖苷酶活进行测定,结果如图 7 所示。图 7a 显示分离菌株以葡萄糖为碳源时,在对数中期(15 h)、末期(20 h),稳定中期(25 h)、末期(30 h)和衰亡期(35 h)培养液上清、完整细胞和细胞破碎液的酶活。图 7b 和 7c 分别显示分离菌株以纤维二糖、熊果苷为碳源时,在对数末期(15 h),稳定中期

(20 h)、末期(25 h)和衰亡期(30 h)培养液上清、完整细胞和细胞破碎液的酶活。在同一生长时期,图 7a、7b 和 7c 中上清液酶活均显著低于完整细胞和破碎液酶活($P \leq 0.05$),而完整细胞酶活和破碎液酶活间无显著差异($P > 0.05$)。在不同生长时期,图 7a、7b 和 7c 中相同处理的酶活具有相似的变化趋势,随培养时间的延长,上清液酶活逐渐升高,完整细胞酶活和破碎液酶活均随培养时间的

延长先升高后降低,图7a和7b在稳定中期最高,图7c在稳定末期最高。图7d对比分离菌株在不同碳源培养时对数末期 α -L鼠李糖苷酶活。在熊果苷为碳源时上清液酶活最高,其次是葡萄糖为碳源,纤维二糖为碳源时酶活最低;完整细胞酶活和破碎液酶活无显著差异,且具有相同变化趋势,在葡萄糖和熊果苷为碳源时酶活较高,纤维二糖为碳源时酶活较低。

这些结果也表明,以葡萄糖、纤维二糖和熊果苷为碳源时,分离菌株 α -L-鼠李糖苷酶活主要存在于细胞内和完整细胞中,较少存在于细胞外;细胞

内和完整细胞的酶活在菌株生长平台期较高。与葡萄糖为碳源相比,纤维二糖抑制菌株胞外、胞内和完整细胞的 α -L-鼠李糖苷酶活,而熊果苷促进菌株胞外、胞内和完整细胞的 α -L-鼠李糖苷酶活。这可能与糖效应(Glucose effect),又称碳代谢抑制(Carbon catabolite repression, CCR)理论有关,纤维二糖降解产生两分子的葡萄糖,而熊果苷降解产生1分子葡萄糖,糖效应理论认为大量单糖的存在会抑制微生物合成,降解其它碳源产生单糖的酶^[25]。

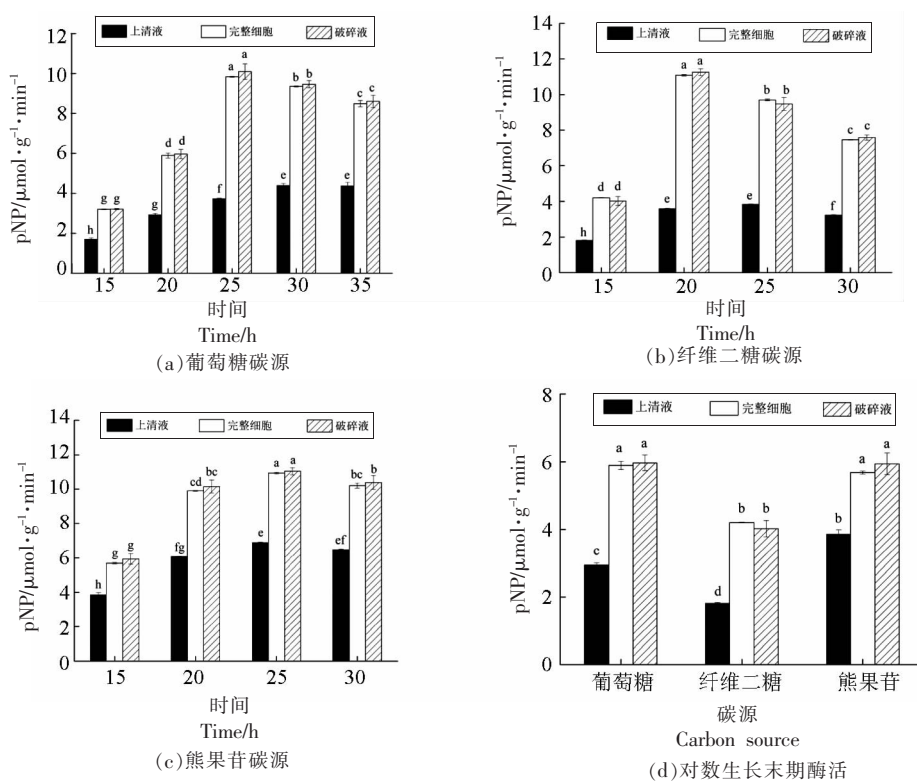


图7 分离菌株在不同碳源时 α -L鼠李糖苷酶酶活

Fig.7 α -L-rhamnosidase activity of isolated strain with different carbon source

2.5 不同碳源时 α -L-阿拉伯糖苷酶活

测定分离菌株以不同碳源培养时的 α -L-阿拉伯糖苷酶活,结果如图8所示。图8a显示分离菌株以葡萄糖为碳源时,在对数中期(15 h)、末期(20 h),稳定中期(25 h)、末期(30 h)和衰亡期(35 h)培养液上清、完整细胞和细胞破碎液的酶活。图8b和8c分别显示分离菌株以纤维二糖、熊果苷为碳源时,在对数末期(15 h),稳定中期(20 h)、末期(25 h)和衰亡期(30 h)培养液上清、完整细胞和细

胞破碎液的酶活。在同一生长时期,图8a、8b和8c中完整细胞酶活最高,其次是破碎液酶活,上清液酶活最低($P \leq 0.05$)。在不同生长时期,图8a、8b和8c中相同处理的酶活具有相似的变化趋势,随着培养时间的延长,上清液酶活逐渐升高,完整细胞酶活和破碎液酶活均随培养时间的延长先升高后降低,在稳定中期和稳定末期达到最高。图8d对比分离菌株在不同碳源培养下对数末期 α -L-阿拉伯糖苷酶活。在熊果苷为碳源时上清液酶活最

高,葡萄糖和纤维二糖为碳源时酶活较低,且两者无显著差异($P>0.05$);在葡萄糖为碳源时完整细胞和破碎液酶活最高,其次是熊果苷为碳源,纤维二糖为碳源时两者酶活最低。

这些结果同样表明,以葡萄糖、纤维二糖和熊果苷为碳源时,分离菌株 α -L-阿拉伯糖苷酶活主

要存在于细胞内和完整细胞,且在生长平台期较高。与葡萄糖为碳源相比,纤维二糖、熊果苷为碳源抑制了菌株胞内和完整细胞的 α -L-阿拉伯糖苷酶活,而熊果苷促进了菌株胞外的 α -L-阿拉伯糖苷酶活。

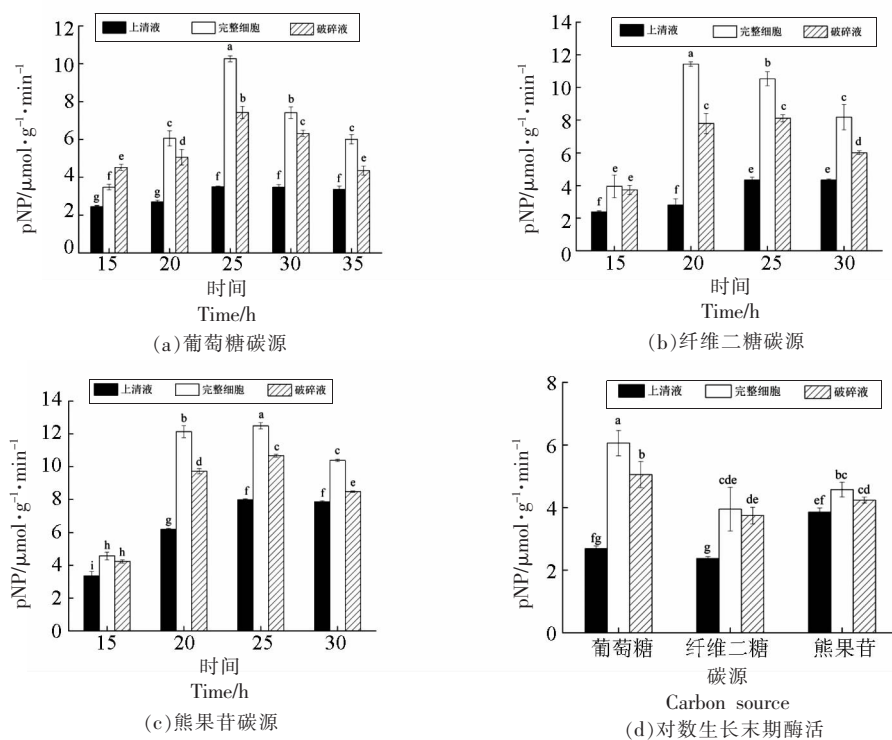


图 8 分离菌株在不同碳源下 α -L-阿拉伯糖苷酶酶活

Fig.8 α -L-arabinosidase activity of isolated strain with different carbon source

3 结论

从自然苹果酸乳酸发酵的葡萄酒中分离出 1 株乳酸菌,经形态观察和分子生物学鉴定确定为短乳杆菌。对其 α -L-阿拉伯糖苷酶活、 α -L-鼠李糖苷酶活和 β -D-葡萄糖苷酶活进行测定,评价分离菌株在葡萄酒发酵中降解糖苷产香的能力。结果显示,分离菌株具有 α -L-阿拉伯糖苷酶活、 α -L-鼠李糖苷酶活和 β -D-葡萄糖苷酶 3 种酶活,生长平台期酶活较高,且主要存在于菌株胞内和完整细胞,胞外酶活较低。不同碳源对菌株的 3 种酶活也有不同影响,与葡萄糖为碳源相比,纤维二糖、熊果苷对菌株 β -D-葡萄糖苷酶活有一定的促进作用;纤维二糖对菌株 α -L-鼠李糖苷酶活有抑制作用,而熊果苷对菌株 α -L-鼠李糖苷酶活有促

进作用;纤维二糖、熊果苷对菌株 α -L-阿拉伯糖苷酶活有一定的抑制作用。本研究结果为开发新的葡萄酒酿造乳酸菌株以及增加葡萄酒香气,提高葡萄酒品质提供参考。

参 考 文 献

- [1] 汤晓宏, 胡文效, 蒋锡龙, 等. 葡萄酒酿造过程中产 β -葡萄糖苷酶酵母菌研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(4): 7-12.
TANG X H, HU W X, JIANG X L, et al. Research progress on β -glucosidase-producing yeast in the brewing process of wine [J]. China Brewing, 2020, 39(4): 7-12.
- [2] 李华, 高丽. β -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展

- [J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 107-114.
- LI H, GAO L. Research advance on methods of determining β -glucosidase activity[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(2): 107-114.
- [3] 王玉霞. 阿氏丝孢酵母 (*Trichosporon asahii*) β -葡萄糖苷酶及葡萄糖苷类风味物质水解机制的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- WANG Y X. β -Glucosidase from *Trichosporon asahii* and the mechanism of hydrolysis of aroma glycosides [D]. Wuxi: Jiangnan university, 2012.
- [4] HELMUT K, GOTTFRIED U, JURGEN F. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine [M]. Second Edition. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2017: 43-64.
- [5] CAPPELLO M S, ZAPPAROLI G, LOGRIECO A, et al. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 243: 16-27.
- [6] CID A G, GOLDNER M C, DA Z M, et al. The Effect of endozym β -split, a commercial enzyme preparation used for aroma release, on tannat wine glycosides[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2016, 33(1): 51-57.
- [7] 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, 2010, 99(5): 1061-1069.
- [8] PALMED R, SPAGNA G. β -Glucosidase intracellular and acellular form for winemaking application[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 382-389.
- [9] 杨世玲, 刘树文. 酒酒球菌 β -葡萄糖苷酶研究进展: 第九届国际葡萄与葡萄酒学术研讨会论文集[C]. 西安: 西北农林科技大学, 2018: 264-272.
- YANG S L, LIU S W. Research advance on β -glucosidase of *Oenococcus oeni*: The Collection of Essays of Proceedings of the 9th International Symposium on Grape and Wine[C]. Xi'an: Northwest A&F University, 2018: 264-272.
- [10] 张阳, 江璐, 郭志君, 等. 利用 β -葡萄糖苷酶提高葡萄酒香气的研究进展[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 316-324.
- ZHANG Y, JIANG L, GUO Z J, et al. Improving wine aroma by using beta-glucosidase: A review[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 316-324.
- [11] LIU J B, ZHU X L, ULLAH N, et al. Aroma glycosides in grapes and wine[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(2): 248-259.
- [12] 彭帅, 樊明涛, 张庭静, 等. 熊果苷诱导植物乳杆菌 β -D-葡萄糖苷酶对葡萄酒香气的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(19): 170-175.
- PENG S, FAN M T, ZHANG T J, et al. Influence of β -D-glycosidase enzymes induced by arbutin on aroma of grape wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(19): 170-175.
- [13] 曾子毅, 丁诗瑶, 卢向阳, 等. 几株植物乳杆菌 β -葡萄糖苷酶的特性研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 82-86.
- ZENG Z Y, DING S Y, LU X Y, et al. Characteristics of β -glucosidase from *Lactobacillus plantarum*[J]. China Brewing, 2019, 38(1): 82-86.
- [14] 周俊, 夏秀东, 李亚辉, 等. 产 β -D-葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选, 鉴定及系统发育分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 119-131.
- ZHOU J, XIA X D, LI Y H, et al. Screening, identification and phylogenetic analysis of Lactic acid bacteria producing β -D-glucosidase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(12): 119-131.
- [15] WANG J F, YANG S L, MENG Q, et al. Molecular characterization and genetic expression profiles of two glycosidases from different *Oenococcus oeni* strains[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 6(3): 2320-3528.
- [16] ZHANG J, ZHAO N, XU J, et al. Homology analysis of 35 β -glucosidases in *Oenococcus oeni* and biochemical characterization of a novel β -glucosidase BGL0224[J]. Food Chemistry, 2020, 334: 127593.
- [17] MATURANO C, SAGUIR F M. Influence of glycosides on behavior of *Oenococcus oeni* in wine conditions: Growth, substrates and aroma compounds[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(8): 151.
- [18] 陈其玲, 任晓宁, 王玲, 等. 酒酒球菌 β -葡萄糖苷酶活性与耐酸胁迫能力的相关性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 133-138.
- CHENG Q L, REN X Y, WANG L, et al. Correlation between β -glucosidase activity and acid stress tolerance in *Oenococcus oeni* [J]. Food Science, 2017, 38(2): 133-138.

- [19] BARBAGALLO R N, SPAGNA G, PALMERI R, et al. Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(3): 292-296.
- [20] LI N, WANG Q Q, XU Y H, et al. Increased glycosidase activities improved the production of wine varietal odorants in mixed fermentation of *P. fermentans* and high antagonistic *S. cerevisiae*[J]. *Food Chemistry*, 2020, 332(2): 127426.
- [21] 李亚辉, 董梅, 崔禾苗, 等. 酒球菌 SD-2a 的 β -D-葡萄糖苷酶活性研究[J]. *食品科技*, 2013, 38(8): 48-52.
- LI Y H, DONG M, CUI H M, et al. Assessment of β -D-glucosidase activity of *Oenococcus oeni* SD-2a[J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(8): 48-52.
- [22] 李亚辉, 崔禾苗, 董梅, 等. 酒球菌 31MBR 的 β -D-葡萄糖苷酶活性[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(8): 799-802.
- LI Y H, CUI H M, DONG M, et al. Assessment of β -D-glucosidase activity of *Oenococcus oeni* 31MBR[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(8): 799-802.
- [23] LI Y H, WANG Y, FAN L L, et al. Assessment of β -D-glucosidase activity and bgl gene expression of *Oenococcus oeni* SD-2a[J]. *PLoS, One*, 2020, 15(10): 1-15.
- [24] DEUTSCHER J, FRANCKE C, POSTMA P W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(4): 939-1031.
- [25] ADNAN M, ZHENG W, ISLAM W, et al. Carbon catabolite repression in filamentous fungi[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 48.

Isolation, Identification and Analysis of Glycosidase Activity of Lactic Acid Bacteria from Wine

Pan Chao^{1,3}, Gao Qingchao^{2,3}, Liang Ying^{1,2,3}, Zhang Zhiyong^{1,2,3}, Shi Lu^{2,3}, Li Yahui^{1,2,3*}

¹College of Food and Bioengineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu

²Jiangsu Key Laboratory of Food Quality and Safety, Nanjing 210014

³Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract A strain of lactic acid bacteria isolated from wine natural fermentation was identified through morphological observation and molecular biology, also the α -L-arabinosidase activity, α -L-rhamnosidase activity and β -D-glucosidase activity of which were determined to evaluate its glycosidase activity. Results showed that the isolated strain was *Lactobacillus brevis* and it possessed α -L-arabinosidase activity, α -L-rhamnosidase activity and β -D-glucosidase activity. These enzymes showed high activities at the stationary phase of growth, and mainly existed in the intracellular form and intact cells of the strain. Three carbon sources showed different effects on the enzyme activities of isolated strain. Compared with glucose as carbon source, cellobiose and arbutin promoted β -D-glucosidase activity, while they inhibited α -L-arabinosidase activity. Arbutin promoted the α -L-rhamnosidase activity, while cellobiose inhibited the α -L-rhamnosidase activity. This study provided a theoretical basis for developing new lactic acid bacteria strains in wine making and improving the wine quality.

Keywords wine; aroma; *Lactobacillus brevis*; identification; glycosidase; enzyme activity