

O. oeni 糖苷酶活性对干白葡萄酒萜烯类香气的影响

祝霞^{1,2} 赵丹丹¹ 李俊娥¹ 毛亚玲¹ 韩舜愈^{1,2} 杨学山^{1,2}

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 甘肃省葡萄与葡萄酒工程学重点实验室, 兰州 730070)

摘要: 由酒酒球菌 (*O. oeni*) 引发的苹果酸-乳酸发酵 (MLF) 在降低葡萄酒酸度的同时, 还伴随着多种糖苷酶的合成释放, 该过程对源自葡萄中的键合态香气前体物质转化产生积极影响。以分离、鉴定的 2 株本土 *O. oeni* 菌株 ZX-1、GF-2 为研究对象, 以商业菌株 VP41 为对照, 分析探讨单一发酵条件 (初始 pH 值、乙醇体积分数、SO₂ 添加量和发酵温度) 及复合酿酒条件对供试菌株的 β-D-葡萄糖苷酶及双糖苷酶活力累积量的影响, 通过微酿试验分析供试菌株接种发酵后的霞多丽干白葡萄酒中萜烯类香气物质的变化。结果表明: 随着乙醇体积分数及 SO₂ 添加量的增加, 菌株的糖苷酶活力累积量均呈先上升、后下降的变化趋势; 较高 pH 值条件更有利于 *O. oeni* 菌株糖苷酶的合成; β-D-葡萄糖苷酶和双糖苷酶活力累积量对发酵温度的响应存在差异。在复合酿酒条件下, 本土 *O. oeni* 菌株的双糖苷酶活力累积量显著高于商业菌株 VP41 ($P < 0.05$), 而 β-D-葡萄糖苷酶活力累积量则略低于 VP41。SO₂ 添加量对所有供试菌株的糖苷酶活性均有极显著影响 ($P < 0.01$), pH 值、乙醇体积分数对菌株 ZX-1、GF-2 和 VP41 的糖苷酶活性有显著影响 ($P < 0.05$), 发酵温度仅对菌株 ZX-1、VP41 的 β-D-葡萄糖苷酶和 VP41 的双糖苷酶活性有显著影响 ($P < 0.05$)。菌株的最佳产酶条件为: 乙醇体积分数 12%、SO₂ 添加量 30 mg/L、pH 值 3.6、发酵温度 22℃, 在此条件下, 菌株 GF-2 的双糖苷酶活力累积量最高 (46.137 mU/mL), 其次是 ZX-1 (45.932 mU/mL) 和 VP41 (37.011 mU/mL)。微酿试验萜烯类化合物分析结果显示, 本土 *O. oeni* ZX-1 发酵后的酒样中虽然萜烯类物质种类仅次于 VP41 处理后的酒样, 但酒样中的总含量却较高, α-松油醇、香茅醇、大马士酮、芳樟醇等萜烯类物质的质量浓度高于阈值, 有效提升了品种香气特征。

关键词: 葡萄酒; 酒酒球菌; β-D-葡萄糖苷酶; α-L-鼠李糖苷酶; α-L-阿拉伯糖苷酶; 萜烯类

中图分类号: TS262.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298 (2021) 08-0363-11

OSID:



Effect of Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on Terpene Aroma Compounds of Dry White Wine

ZHU Xia^{1,2} ZHAO Dandan¹ LI June¹ MAO Yaling¹ HAN Shunyu^{1,2} YANG Xueshan^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

2. Gansu Key Laboratory of Viticulture and Enology, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Malolactic fermentation (MLF) carried out by *Oenococcus oeni* (*O. oeni*) is the main method to reduce the acidity of the wine. Meanwhile, the synthesis and release of a variety of glycosidase will have a positive effect on the conversion of glycosylated precursor compounds originated from grapes. In this experiment, two *O. oeni* autochthonous strains ZX-1 and GF-2 isolated and identified from Hexi Corridor Region and the commercial strain VP41 were used as test and control strains, respectively. To analyze and discuss the effects of single fermentation conditions (initial pH value, ethanol concentration, SO₂ addition and fermentation temperature) and the compound fermenting condition on the cumulative β-D-glucosidase and diglycosidase activities of the tested *O. oeni* strains. The changes of terpene aroma substances in the Chardonnay dry white wine fermented by the tested strains were analyzed by the microvinification experiment. The results showed that the cumulative glycosidase activity of the all tested strains was increased first and then decreased with the increase of ethanol concentration and SO₂ addition.

收稿日期: 2020-11-12 修回日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (31760454, 32060581)、甘肃省重点研发计划项目 (17YF1NA060)、甘肃省自然科学基金项目 (20JR10RA527) 和甘肃省葡萄酒产业发展基金项目 (20180820-07, 20180820-08)

作者简介: 祝霞 (1977—), 女, 副教授, 主要从事葡萄与葡萄酒风味品质调控研究, E-mail: zhux@gsau.edu.cn

通信作者: 杨学山 (1977—), 男, 副教授, 主要从事葡萄酒酿造微生物及风味品质调控研究, E-mail: yangxs@gsau.edu.cn

Higher pH value was more conducive to the synthesis of glycosidase produced by *O. oeni* strains, and there were differences in the response regulation of β -D-glucosidase and diglycosidase activity to fermentation temperature. Under the compound fermenting condition, diglycosidase activity of the *O. oeni* autochthonous strains were significantly higher than that of the commercial strain VP41 ($P < 0.05$), but β -D-glucosidase activity were slightly lower than that of strain VP41. The SO_2 addition had a very significant impact on the glycosidase activity of the all tested strains ($P < 0.01$), and the pH value and ethanol concentration had a significant impact on the glycosidase activity of strains ZX-1, GF-2 and VP41 ($P < 0.05$). The fermentation temperature only had a significant effect on the β -D-glucosidase activity of strain ZX-1 and VP41 as well as the diglycosidase activity of VP41 ($P < 0.05$). The optimum conditions for glycosidase production of the tested strains were ethanol concentration of 12%, SO_2 addition of 30 mg/L, pH value of 3.6, and fermentation temperature of 22°C. Under the above conditions, the highest cumulative diglycosidase activity produced by strain GF-2 was 46.137 mU/mL, followed by ZX-1 of 45.932 mU/mL and VP41 of 37.011 mU/mL. Results of the microvinification experiment showed that although the types of terpene compounds in the wine sample fermented by *O. oeni* autochthonous strain ZX-1 were less than that in VP41 fermented wine, the total content of terpenes were higher. The contents of α -terpineol, citronellol, damastone and linalool in the ZX-1 fermented wine were higher than the threshold, which effectively enhanced the varietal aroma characteristics of Chardonnay dry white wine.

Key words: wine; *Oenococcus oeni*; β -D-glucosidase; α -L-rhamnosidase; α -L-arabinosidase; terpenes

0 引言

萜烯类化合物能够赋予葡萄及葡萄酒典型的品种特征^[1],它们在葡萄成熟过程中逐渐积累,并且以糖苷配基的形式直接连接在 β -D-葡萄糖上形成单糖苷,连接有单糖苷配基的葡萄糖可进一步与 α -L-呋喃阿拉伯糖、 α -L-吡喃鼠李糖、 β -D-呋喃芹菜糖等键合生成双糖苷或三糖苷^[2]。糖苷测定分析表明,葡萄中的双糖苷键合态香气前体物含量最高,单糖苷次之,三糖苷最低^[3],且键合态的糖苷类化合物只有转化为游离态的香气成分才会被消费者感知。单糖苷类香气前体物质可由 β -葡萄糖苷酶直接酶解;双糖苷化合物首先在 α -L-鼠李糖苷酶、 α -L-阿拉伯糖苷酶等外切酶的作用下生成 β -D-葡萄糖单糖苷,然后在 β -D-葡萄糖苷酶作用下释放出具有挥发性的糖苷配基^[4-5]。因此,特异性的单糖苷酶和双糖苷酶被认为是释放萜烯类化合物的有效工具。

酿酒酵母可以分泌糖苷酶,但在高糖、高酒精、高多酚以及低 pH 值的酿酒工艺条件下无法保持其高效的催化活性^[6-7]。此外,一些非酿酒酵母也可以合成活力较高的 β -葡萄糖苷酶,但其生长仅局限于酒精发酵开始阶段,随着酒精含量的增加,非酿酒酵母数量会急剧下降^[8]。苹果酸-乳酸发酵(Malolactic fermentation, MLF)是酿造优质干红和部分干白葡萄酒所必需的生产工艺^[9],*O. oeni*菌株在生物降酸的同时还可以合成释放糖苷酶,从而丰富和提升酒体的香气品质^[9-13]。文献[12]提出,评价优良*O. oeni*菌株发酵特性时,不能只局限于 β -D-葡

萄糖苷酶,还应考虑 α -L-阿拉伯糖苷酶和 α -L-鼠李糖苷酶的活性。文献[14]研究表明,*O. oeni*糖苷酶具有较强的菌株依赖性,供试菌株中90%的菌株具有活性较高的 α -L-鼠李糖苷酶,50%左右的菌株 α -L-阿拉伯糖苷酶活性较高。因此,有必要对菌株合成糖苷酶特性进行系统分析,以便在用于发酵剂之前进行合理选择。

为了在日益全球化的葡萄酒市场中寻求独特之处,分离筛选优良本土*O. oeni*、酿造代表产区风格的葡萄酒已成为研究者关注的焦点^[15-21]。本文以分离筛选的本土*O. oeni*菌株为试验对象,以商业菌株VP41为对照,探讨各酿造因子对供试菌株糖苷酶活性的影响,动态监测发酵过程中菌株糖苷酶活性的变化,并在优化后的酿造条件下进行霞多丽干白葡萄酒MLF,分析比较MLF前后酒样中萜烯类物质的变化,以期挖掘本土菌株酿造特性、生产代表河西走廊产区的葡萄酒提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本土酒酒球菌菌株:GF-2、ZX-1、QL-11、MG-1菌株分离自甘肃省河西走廊产区葡萄酒生产企业自然启动MLF酒样,由北京六合华大基因科技有限公司进行种属鉴定。16S rDNA测序结果显示,GF-2、ZX-1、QL-11、MG-1与模式菌株*Oenococcus oeni* DSM 20252(T)相似度分别达到99.84%、99.34%、99.78%、99.58%。

商业酒酒球菌:VP41,购自上海杰兔责任有限公司。

商业酿酒酵母:ES488,购自意大利 Enartis 公司。

酿酒葡萄:选用 2019 年产自甘肃省莫高葡萄种植基地的霞多丽葡萄,含糖量约为 21.3°Brix,总酸质量浓度 6.87 g/L(以酒石酸计),pH 值 3.36。

1.2 培养基与试剂

酸性番茄培养基(ATB)配制参考文献[16]的方法。

参考文献[18]的方法进行模拟汁培养基的配制:葡萄糖 1 g/L、果糖 1 g/L、L-苹果酸 2 g/L、海藻糖 1 g/L、酒石酸 1 g/L、柠檬酸 1 g/L、乙酸钠 0.14 g/L、酵母浸粉 4.0 g/L、水解酪蛋白 2.5 g/L、KH₂PO₄ 0.3 g/L、KCl 0.22 g/L、L-型半胱氨酸盐酸 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.065 g/L、MnSO₄·4H₂O 0.015 g/L、CaCl₂ 0.065 g/L、甘油 3 mL/L。

香气标准品:香茅醇、橙花醇、芳樟醇、 α -松油醇、 β -紫罗兰酮、反式橙花叔醇等香气化合物和内标物 2-辛醇标准品(美国 Sigma 公司)。

其他试剂:L-苹果酸检测试剂盒(爱尔兰 Megazyme 公司);对硝基苯酚(*p*-NP)、对硝基苯酚- β -D-葡萄糖苷(*p*-NPG)、4-硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷、4-硝基苯基- α -L-吡喃阿拉伯糖苷(上海源叶有限责任公司);氢氧化钠、柠檬酸、磷酸二氢钾、碳酸钠,均为分析纯试剂(天津光复精细化工研究所)。

1.3 仪器与设备

SPX-150-II 型生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);pHS-3C 型 pH 计(上海雷磁责任有限公司);TU-1810 型可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);LDZX-50KBS 型高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);GZX-GF101-II 型恒温干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);H2050R 型高速冷冻离心机(长沙湘仪仪器有限公司)。

1.4 试验方法

1.4.1 标准曲线制备

参考文献[22]的方法并略作修改。当 *p*-NP 浓度在 10~80 μ mol/L 范围时,400 nm 处 OD 值与浓度回归方程为: $y=0.0076x+0.0199$, $R^2=0.9974$,线性关系良好,可用作后续试验中糖苷酶活性的计算。

1.4.2 菌种活化

参考文献[20]的方法挑取斜面上保存的菌种置于灭菌后的 ATB 培养基内,在 28℃ 下培养,待生长至对数期时(600 nm 处 OD 值约 1.1),进行后续

试验接种。

1.4.3 糖苷酶活性测定方法

(1) β -D-葡萄糖苷酶活力

参考文献[14]的方法并略作修改。以对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷为底物,反应体系(2.5 mL)为:从模拟汁培养基中取 1 mL 的培养液,加 1 mL 柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH 值 5.0)和 0.5 mL *p*-NPG 溶液,混合后于 50℃ 条件反应 30 min,然后 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 2 mL 的 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应。在 400 nm 波长处测定吸光度。

酶活力单位(U)定义为:每 1 min 每 1 mL 菌体细胞水解相应底物生成 *p*-NP 所需要的酶量(μ mol)。

(2) α -L-鼠李糖苷酶活力

参考文献[23]的方法。以 4-硝基苯基- α -L-吡喃鼠李糖苷为底物,反应体系(3.5 mL)为:取 0.4 mL 的培养液,加 1 mL 柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH 值 5.0)和 0.1 mL 底物(1.5 mmol/L)溶液,混合后于 50℃ 条件下反应 30 min 后 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 2 mL 0.5 mol/L Na₂CO₃ 终止反应。在 400 nm 波长处测定吸光度。

(3) α -L-阿拉伯糖苷酶活力

参考文献[24]的方法。以 4-硝基苯基- α -L-吡喃阿拉伯糖苷为底物,反应体系(2.1 mL)为:取 0.4 mL 的培养液,加 1 mL 柠檬酸-磷酸缓冲溶液(pH 值 5.0)和 0.1 mL 底物(1.5 mmol/L)溶液,混合后于 50℃ 条件下反应 30 min,然后 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入 0.6 mL 饱和硼砂溶液终止反应。在 400 nm 波长处测定吸光度。

1.4.4 本土酒球菌菌株酶活力评价

利用模拟汁体系对 4 株本土 *O. oeni* 及 1 株商业 *O. oeni* 菌株的 3 种糖苷酶(β -D-葡萄糖苷酶、 α -L-鼠李糖苷酶和 α -L-阿拉伯糖苷酶)活力进行测定,分析比较供试菌株酶活性变化规律,筛选产酶活性较高的菌株。试验平行重复 3 次。

1.4.5 各酿造因子对菌株糖苷酶活性的影响

(1)初始 pH 值

将鉴定所得 *O. oeni* 菌株经 ATB 斜面培养、ATB 液体培养基活化后,取处于对数生长期的供试菌株以 1×10^7 CFU/mL 的接种量,分别接种于 pH 值为 3.0、3.2、3.4、3.6、3.8 的模拟汁培养基中(HCl 或 NaOH 调整 pH 值),28℃ 静置培养,每隔 48 h 测定发酵液中糖苷酶活性。试验重复 3 次,下同。

(2)乙醇体积分数

将培养至对数生长期的 *O. oeni* 菌株,以 1×10^7 CFU/mL 的接种量分别接种于乙醇体积分数为

6%、8%、10%、12%、14% 的模拟汁培养基中,28℃ 静置培养,每隔 48 h 测定发酵液中糖苷酶的活性。

(3) 发酵温度

待 *O. oeni* 菌株培养至对数生长期,以 1×10^7 CFU/mL 的接种量接种于模拟汁培养基中,分别置于 18、20、22、25、28℃ 培养箱静置培养,每隔 48 h 测定发酵液中糖苷酶的活性。

(4) SO₂ 添加量

以 1×10^7 CFU/mL 的接种量,将培养至对数生长期的 *O. oeni* 菌株,分别接种于 SO₂ 添加量(亚硫酸钠调节)为 15、30、45、60、75 mg/L 的模拟汁培养基中,28℃ 静置培养,每隔 48 h 测定发酵液中糖苷酶的活性。

1.4.6 复合试验设计

根据单因素试验结果,对 pH 值、乙醇体积分数、发酵温度、SO₂ 添加量 4 个因素进行 L₉(3⁴) 正交试验设计。

1.4.7 微酿试验

菌株活化:参考厂家说明书推荐方法进行酿酒酵母菌株活化。按推荐用量(0.2 g/L)将 ES488 干酵母菌粉溶于 10 倍体积无菌水中,37℃ 静置溶解 20 min,再加入等体积的葡萄汁于 28℃ 活化 25 min。酒酒球菌菌株活化参照 1.4.2 节的方法进行。

葡萄酒微酿试验:参照文献[25]完成霞多丽干白葡萄酒酒精发酵后,选择产酶性能优良的 *O. oeni* 菌株,按 1×10^7 CFU/mL 的接种量进行接种,以商业菌 VP41 作为对照。自接入菌株开始,每隔 48 h 取样,测定 L-苹果酸质量浓度,小于 0.2 g/L 时结束 MLF。取样测定理化指标和萜烯类香气化合物。

理化指标测定:酒精度、残糖含量、pH 值、总酸含量、挥发酸含量和总 SO₂ 含量检测均参照文献[26]中的试验方法进行。L-苹果酸含量测定参考 L-苹果酸检测试剂盒说明书进行。

挥发性香气化合物含量的测定:参照文献[25]的香气物质萃取方法及气相色谱-质谱联用仪(Gas chromatography and mass spectrometry, GC-MS)条件,进行香气成分富集和定性定量分析。于 15 mL 的顶空瓶中加入 2.5 g 氯化钠、8 mL 酒样、20 μL 2-辛醇(质量浓度 81.06 mg/L),加磁力搅拌转子后封口,放入恒温加热磁力搅拌器中,40℃ 水浴平衡 30 min,然后插入萃取针顶空萃取 30 min。

(1) GC-MS 条件

GC 条件:色谱柱 DB-WAX 60 m × 2.5 mm × 0.25 μm,不分流进样;载气(He)流速 1 mL/min;进样口温度 240℃,解析时间 5 min;柱温升温程序:

50℃ 保持 5 min,以 3.5℃/min 升至 180℃,保持 15 min。

MS 条件:电子轰击离子源(EI);电子能量 70 eV;传输线温度 180℃;离子源温度 200℃;质谱扫描范围 50~350(质荷比)。

(2) 定性与定量分析

定性分析:采用与标准香气成分保留时间(RT)对比的方法结合 NIST-11、Wiley 及香精香料标准谱库检索比对结果进行挥发性香气化合物定性分析。

定量分析:对于已有标准品的香气化合物通过内标标准曲线法进行定量分析,其他香气化合物含量利用内标法进行相对定量分析,内标物为 2-辛醇。

1.4.8 试验数据处理

对试验所得数据采用 Microsoft Office Excel 2010、Origin 2018 进行基本处理和制图,IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行多重比较(Duncan 法, $P < 0.05$)及差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 本土酒酒球菌菌株糖苷酶活性测定

分别将供试菌株接种于模拟汁培养基中进行发酵,每隔 48 h 取样,测定酶活力。由于 MLF 在 14 d 时基本结束,发酵过程中共需取样 7 次,且所测酶种类较多(3 种),为便于直观比较各菌株的酶活性,参照文献[27]的方法,采用酶活力累积量(mU/mL),即同一菌株、同一种酶的 7 次测定结果逐次相加,表征分析不同菌株之间的差异(表 1),下同。

表 1 5 株 *O. oeni* 糖苷酶活性测定
Tab.1 Determination of glycosidase activities of five *O. oeni* strains mU/mL

菌株	糖苷酶活力累积量		
	β-D-葡萄糖苷酶	α-L-鼠李糖苷酶	α-L-阿拉伯糖苷酶
GF-2	(14.34~45.79) ^B	(6.96~19.90) ^{AB}	(7.11~19.29) ^{AB}
ZX-1	(9.35~45.93) ^C	(5.90~17.66) ^C	(6.92~18.96) ^{BC}
QL-11	(9.87~40.82) ^D	(4.74~14.66) ^{DE}	(7.26~16.34) ^D
MG-1	(9.59~38.94) ^E	(4.30~15.12) ^D	(6.17~16.28) ^E
VP41	(14.03~60.63) ^A	(8.80~18.56) ^A	(10.70~15.78) ^A

注:同列数据不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

由表 1 可知,对 4 株供试本土 *O. oeni* 的 3 种糖苷酶活性比较发现,菌株 GF-2、ZX-1 的 β-D-葡萄糖苷酶、α-L-鼠李糖苷酶活性最高值都分别显著高于菌株 QL-11、MG-1 的最大酶活性($P < 0.05$)。QL-11、MG-1 的 3 种酶活性测定值都低于菌株 VP41 的酶活性。因此,选择菌株 GF-2、ZX-1 为后续的测试菌株。

2.2 各发酵条件对本土酒酒球菌菌株糖苷酶活性的影响

结合态香气双糖苷酶解时,首先由双糖苷酶作用于相应的阿拉伯糖、鼠李糖基等糖基配体,使双糖苷变为单糖苷;然后再由 β -D-葡萄糖苷酶断裂糖苷键,生成游离芳香苷元和葡萄糖^[28]。因此采用双糖苷酶活力累积量(mU/mL)(α -L-鼠李糖苷酶和 α -L-阿拉伯糖苷酶活力累积量之和)和 β -D-葡萄糖苷酶活力累积量(mU/mL),分别直观表征在不同发酵条件下供试菌株之间的糖苷酶活性差异。

2.2.1 初始 pH 值

由图 1(图中不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平下组内(相同横坐标、不同图例)差异显著,不同大写字母表示在 $P < 0.05$ 水平下组间(相同图例、不同横坐标)差异显著,下同)所示,随着 pH 值的增加,供试菌株的 β -D-葡萄糖苷酶和双糖苷酶活力累积量都呈现增加趋势,且菌株 VP41 的 2 种酶活性低于菌株 ZX-1、GF-2 的酶活性。供试菌株在 pH 值为 3.6 或 3.8 时具有最大的 β -D-葡萄糖苷酶活力累积量,且在不同的 pH 值梯度下,菌株 GF-2 的 β -D-葡萄糖苷酶活力比 ZX-1 和 VP41 的酶活性显著较高。VP41 的最大双糖苷酶活力累积量

(19.440 mU/mL)出现在 pH 值为 3.8,ZX-1、GF-2 的最大双糖苷酶活力累积量则是在 pH 值为 3.6 时产生(32.964、22.718 mU/mL)。当初始 pH 值为 3.0 时,VP41 比 ZX-1 表现出更强的酶活特性;除 pH 值 3.0 以外,菌株 ZX-1 的双糖苷酶活性在不同 pH 值下都显著高于其它供试菌株($P < 0.05$)。

2.2.2 乙醇体积分数

由图 2 可知,不同菌株在不同乙醇体积分数影响下的 β -D-葡萄糖苷酶活力累积量不同。本土 *O. oeni* 菌株 ZX-1、GF-2 在乙醇体积分数为 8% 时产生最大 β -D-葡萄糖苷酶活力累积量(24.570、30.166 mU/mL),对照菌株 VP41 的最大 β -D-葡萄糖苷酶活力累积量在乙醇体积分数为 6% 时产生(17.202 mU/mL),且在乙醇体积分数为 6%~8% 时,VP41 的 β -D-葡萄糖苷酶活力累积量显著低于本土 *O. oeni* 的酶活力累积量($P < 0.05$)。乙醇体积分数为 6%~12% 时,菌株 GF-2 的双糖苷酶活力累积量均高于菌株 ZX-1 和 VP41 的酶活力累积量,但当乙醇体积分数达到 14% 时,VP41 的双糖苷酶活力累积量显著高于 2 株本土 *O. oeni*,表明商业菌株 VP41 在较高乙醇体积分数的葡萄酒中更有利于品种香的释放。此时,GF-2 的双糖苷酶活力累

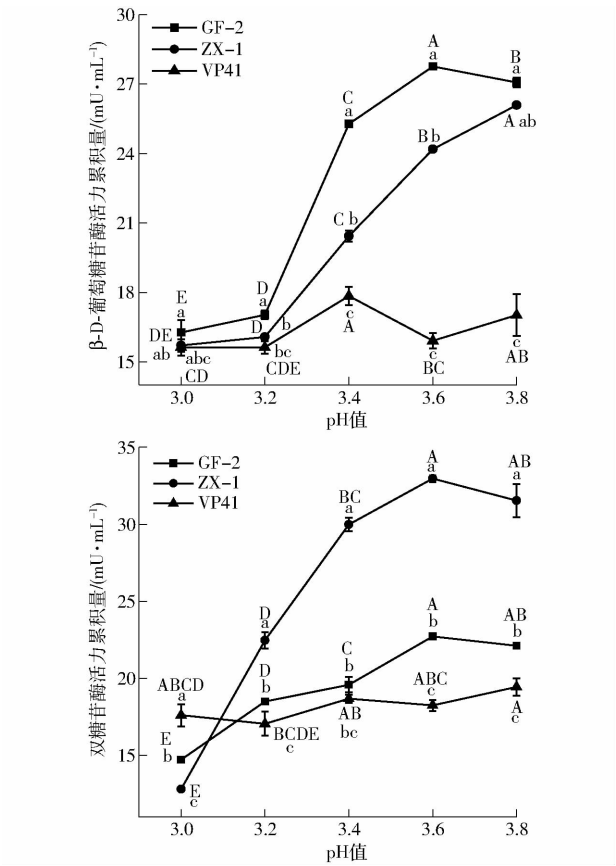


图 1 初始 pH 值对菌株糖苷酶活性的影响
Fig.1 Effect of initial pH values on cumulative glycosidase activity of *O. oeni* strains

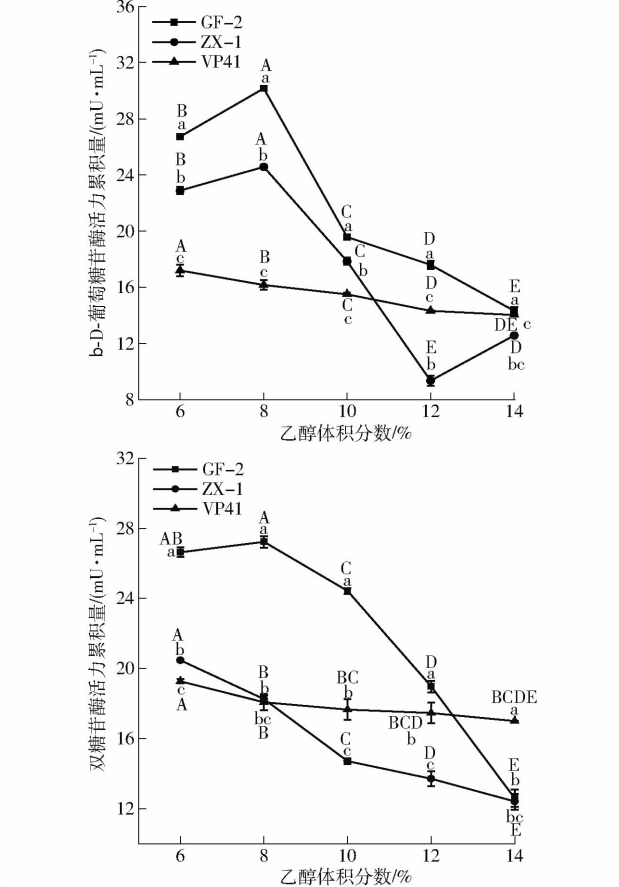


图 2 乙醇体积分数对菌株糖苷酶活性的影响
Fig.2 Effect of ethanol concentration on cumulative glycosidase activity of *O. oeni* strains

积量显著下降,与 ZX-1 无显著差异($P < 0.05$)。

2.2.3 SO₂添加量

图3为SO₂添加量对供试菌株糖苷酶活力的影响。供试菌株在SO₂添加量为30 mg/L时有最大β-D-葡萄糖苷酶活力累积量,且GF-2的β-D-葡萄糖苷酶活力累积量(30.933 mU/mL)显著高于ZX-1和VP41菌株;SO₂添加量为45~75 mg/L时,ZX-1与VP41的β-D-葡萄糖苷酶活力累积量差异不显著($P < 0.05$)。在SO₂添加量为15~45 mg/L时,ZX-1的双糖苷酶活力累积量显著高于GF-2和VP41,当SO₂添加量为60~75 mg/L时,商业菌株VP41的双糖苷酶活力累积量显著高于本土*O. oeni*。

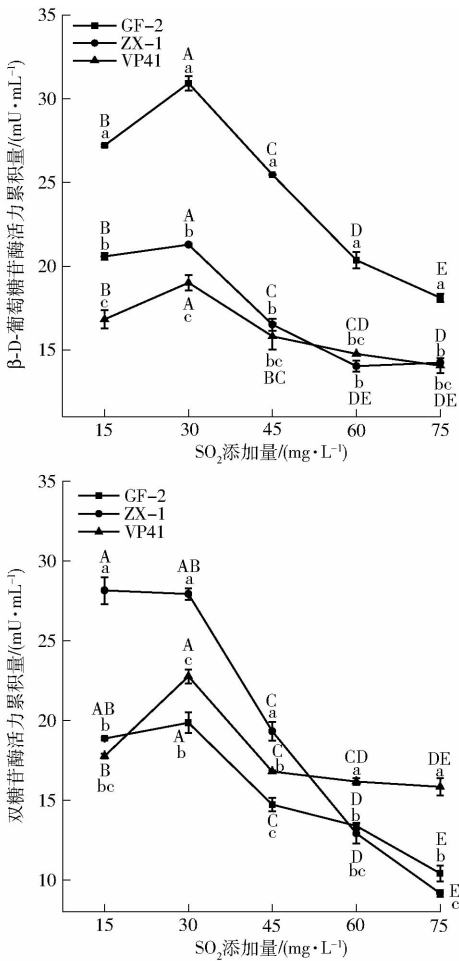


图3 SO₂添加量对菌株糖苷酶活性的影响

Fig.3 Effect of SO₂ addition on cumulative glycosidase activity of *O. oeni* strains

2.2.4 发酵温度

发酵温度是葡萄酒酿造过程中最可控的因素之一,不适宜的发酵温度会导致杂菌的生长,从而破坏葡萄酒的感官质量^[10]。*O. oeni*的最适生长温度是25~28℃,而葡萄酒的MLF温度为18~22℃,综合考虑,选择在18~28℃不同的温度下,对菌株酶活性变化情况进行测定分析。

由图4可知,在不同发酵温度下,本土*O. oeni*

菌株与商业菌株的β-D-葡萄糖苷酶活力累积量不同。菌株VP41在22℃时有最大β-D-葡萄糖苷酶活力累积量(60.637 mU/mL),而本土*O. oeni*菌株的最大酶活性则是在20℃产生,且菌株ZX-1和GF-2的最大酶活性没有显著性差异($P < 0.05$)。虽有研究证明28℃为*O. oeni*菌株较适宜的生长温度,但28℃时本土*O. oeni*菌株与商业菌株的β-D-葡萄糖苷酶活性较低。菌株VP41的最大双糖苷酶活性在28℃产生(29.695 mU/mL)。本土*O. oeni*菌株在22℃时双糖苷酶活力累积量最小,最大酶活性在18℃时产生。

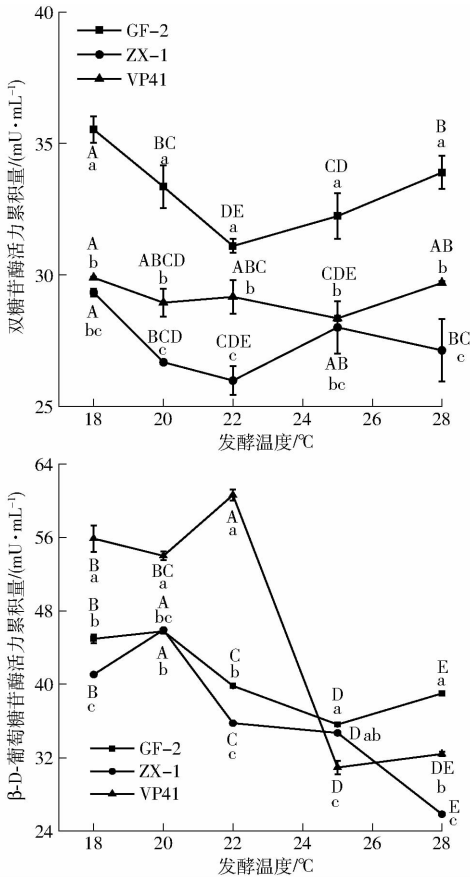


图4 发酵温度对菌株糖苷酶活性的影响

Fig.4 Effect of fermentation temperature on cumulative glycosidase activity of *O. oeni* strains

2.3 复合发酵条件下菌株酶活性的测定

葡萄酒酿造过程中,多个发酵参数会协同影响*O. oeni*的生长,*O. oeni*对葡萄酒生境的耐受能力决定着MLF的进展程度。因此,在复合发酵条件下测定供试菌株的酶活性,对依据酿造风格选择MLF菌株更具有参考价值^[28]。根据单因素试验结果,pH值选取3.4、3.6、3.8共3个水平,虽然较高浓度的乙醇会抑制*O. oeni*的生长,但大部分干型葡萄酒的酒精度在10~15% vol之间,为了模拟真实的葡萄酒环境,结合单因素试验结果,选取乙醇体积分数10%、12%和14%共3个水平进行后续试验。结合

干型葡萄酒酿造工艺的要求,选择 SO₂添加量为 30、45、60 mg/L 进行复合因子发酵试验。28℃是*O. oeni* 菌株生长的较佳培养温度,但过高的发酵温度存在挥发酸过量的风险^[15]。因此,结合葡萄酒 MLF 的实际情况,在复合发酵试验设计时选择发酵温度为 18、20、22℃。

2.3.1 β-D-葡萄糖苷酶活性

由表 2 可知,乙醇体积分数为 12% 时,供试菌株有最大的 β-D-葡萄糖苷酶活力累积量,分别为 22.716 mU/mL(ZX-1)、23.990 mU/mL(GF-2)、23.506 mU/mL(VP41);当 SO₂添加量为 30 mg/L 时,ZX-1 的 β-D-葡萄糖苷酶活力累积量为 25.507 mU/mL,GF-2 的 β-D-葡萄糖苷酶活力累积

量为 27.914 mU/mL,VP41 的 β-D-葡萄糖苷酶活力累积量为 29.529 mU/mL;与 pH 值 3.4、3.8 相比,pH 值为 3.6 时,供试菌株的 β-D-葡萄糖苷酶活力累积量达到最大值,且在发酵温度 22℃ 时,菌株的酶活性也较好。

从极差 *R* 可以看出,不同发酵因素对菌株 ZX-1 的 β-D-葡萄糖苷酶活性影响从大到小依次为:SO₂添加量、发酵温度、pH 值、乙醇体积分数;对菌株 GF-2 的 β-D-葡萄糖苷酶活性影响从大到小依次为:SO₂添加量、pH 值、乙醇体积分数、发酵温度;对 VP41 菌株 β-D-葡萄糖苷酶活性影响从大到小依次为:SO₂添加量、发酵温度、乙醇体积分数、pH 值。

表 2 β-D-葡萄糖苷酶活性测定正交试验结果与极差分析

Tab.2 Visual analysis of orthogonal experiment for cumulative β-D-glucosidase activity								
试验 序号	乙醇体积 分数/%	SO ₂ 添加量/ (mg·L ⁻¹)	pH 值	发酵温度/℃	β-D-葡萄糖苷酶活力累积量/(mU·mL ⁻¹)			
					ZX-1	GF-2	VP41	
1	10	30	3.4	18	24.087	26.566	30.112	
2	10	45	3.6	20	19.566	23.412	18.898	
3	10	60	3.8	22	19.420	19.865	19.067	
4	12	30	3.6	22	30.112	31.947	32.983	
5	12	45	3.8	18	19.712	20.242	18.898	
6	12	60	3.4	20	18.323	19.781	18.637	
7	14	30	3.8	20	22.322	25.231	25.492	
8	14	45	3.4	22	19.950	19.873	19.213	
9	14	60	3.6	18	19.175	19.021	18.438	
<i>k</i> ₁	21.024	25.507	20.787	20.991				
<i>k</i> ₂	22.716	19.743	22.951	20.070				
<i>k</i> ₃	20.482	18.973	20.485	23.161				
<i>R</i> _{ZX-1}	2.234	6.534	2.466	3.091				
<i>k</i> ₁	23.281	27.914	22.073	21.943				
<i>k</i> ₂	23.990	21.175	24.793	22.808				
<i>k</i> ₃	21.375	19.556	21.779	23.895				
<i>R</i> _{GF-2}	2.615	8.358	3.014	1.952				
<i>k</i> ₁	22.693	29.529	22.654	22.483				
<i>k</i> ₂	23.506	19.003	23.440	21.009				
<i>k</i> ₃	21.047	18.714	21.152	23.754				
<i>R</i> _{VP41}	2.459	10.815	2.288	2.745				

由表 3 可知,SO₂添加量对供试菌株的 β-D-葡萄糖苷酶活性有极显著影响(*P* < 0.01)。pH 值、发酵温度、乙醇体积分数对菌株 ZX-1 和 VP41 的 β-D-葡萄糖苷酶活性有显著影响(*P* < 0.05);pH 值、乙醇体积分数对菌株 GF-2 的 β-D-葡萄糖苷酶活性有显著影响(*P* < 0.05)。

2.3.2 双糖苷酶活性

在复合发酵条件下,菌株的双糖苷酶活性表现出相似性,即在乙醇体积分数为 12%、SO₂添加量为 30 mg/L、pH 值 3.6、发酵温度 22℃ 的条件下,具有

最大的双糖苷酶活力累积量。由表 4 可知,供试菌株的双糖苷酶活力累积量有差异,从大到小依次为 GF-2(46.576 mU/mL)、ZX-1(46.806 mU/mL)、VP41(36.774 mU/mL)。

从极差 *R* 可以看出,不同发酵因素对菌株 ZX-1 双糖苷酶活性影响从大到小依次为:SO₂添加量、pH 值、乙醇体积分数、发酵温度;对菌株 GF-2 双糖苷酶活性影响从大到小依次为:SO₂添加量、pH 值、乙醇体积分数、发酵温度;对菌株 VP41 双糖苷酶活性影响从大到小依次为:SO₂添加量、乙醇体积

表 3 β -D-葡萄糖苷酶活性测定正交试验方差分析

Tab. 3 Variance analysis of orthogonal experiment for cumulative β -D-glucosidase activity determination

菌株	因素	偏差平方和	自由度	<i>F</i>	显著性
ZX-1	乙醇体积分数	8.142	2	0.294	*
	SO ₂ 添加量	76.518	2	2.767	**
	pH 值	10.858	2	0.393	*
	发酵温度	15.104	2	0.346	*
	误差	110.62	8		
GF-2	乙醇体积分数	10.947	2	0.290	*
	SO ₂ 添加量	117.911	2	3.119	**
	pH 值	16.569	2	0.438	*
	发酵温度	5.740	2	0.152	
	误差	151.19	8		
VP41	乙醇体积分数	9.410	2	0.147	*
	SO ₂ 添加量	227.844	2	3.551	**
	pH 值	8.104	2	0.126	*
	发酵温度	11.326	2	0.176	*
	误差	256.68	8		

注：**表示影响极显著($P < 0.01$)，*表示影响显著，下同。

表 4 双糖苷酶活性测定正交试验结果与极差分析

Tab. 4 Visual analysis of orthogonal experiment for cumulative diglycosidase activity

试验序号	乙醇体积分数/%	SO ₂ 添加量/ (mg·L ⁻¹)	pH 值	发酵温度/℃	双糖苷酶活力累积量/(mU·mL ⁻¹)		
					ZX-1	GF-2	VP41
1	10	30	3.4	18	44.388	40.397	31.486
2	10	45	3.6	20	32.184	35.362	24.517
3	10	60	3.8	22	30.757	32.660	22.360
4	12	30	3.6	22	46.806	46.576	36.774
5	12	45	3.8	18	31.778	33.436	21.800
6	12	60	3.4	20	31.095	32.208	22.414
7	14	30	3.8	20	38.970	37.266	29.820
8	14	45	3.4	22	31.900	32.637	22.322
9	14	60	3.6	18	30.711	31.893	19.842
<i>k</i> ₁	35.777	43.388	35.794	35.626			
<i>k</i> ₂	36.559	31.954	36.567	34.083			
<i>k</i> ₃	33.860	30.854	33.835	36.488			
<i>R</i> _{ZX-1}	2.699	12.534	2.732	2.405			
<i>k</i> ₁	36.140	41.413	35.081	35.242			
<i>k</i> ₂	37.406	33.812	37.944	34.945			
<i>k</i> ₃	33.932	32.254	34.454	37.291			
<i>R</i> _{GF-2}	3.474	9.159	3.490	2.346			
<i>k</i> ₁	26.121	32.694	25.407	24.376			
<i>k</i> ₂	26.996	22.879	27.045	25.584			
<i>k</i> ₃	23.995	21.539	24.660	27.152			
<i>R</i> _{VP41}	3.001	11.155	2.385	2.776			

萄酒 MLF, 并进行萜烯类物质检测分析。

2.5 微酿试验

2.5.1 MLF 后葡萄酒理化指标

霞多丽干白葡萄酒的基本理化指标见表 6。由表 6 可知, 各酒样中 L-苹果酸质量浓度均小于

分数、发酵温度、pH 值。

由表 5 可知, SO₂添加量对供试菌株的双糖苷酶活性影响极显著($P < 0.01$)。pH 值、乙醇体积分数对菌株 ZX-1 和 GF-2 的双糖苷酶活性有显著影响($P < 0.05$); 发酵温度、乙醇体积分数对菌株 VP41 的双糖苷酶活性有显著影响($P < 0.05$)。

2.4 验证试验

根据正交试验结果, 选择受试组中 β -D-葡萄糖苷酶活性和双糖苷酶活性最高的发酵条件, 即乙醇体积分数为 12%、pH 值为 3.6、SO₂添加量为 30 mg/L、发酵温度为 22℃ 的复合条件下, 将发酵菌株分别接种于模拟汁中, 进行验证试验, 平行重复 3 次。结果表明 ZX-1、GF-2 和 VP41 的 β -D-葡萄糖苷酶活力累积量平均值分别为 30.020、29.884、33.032 mU/mL, 双糖苷酶活力累积量平均值分别为 45.932、46.137、37.011 mU/mL, 均高于正交试验其他处理组。由此确定在该条件下进行霞多丽干白葡

0.2 g/L, 表明 MLF 成功完成。pH 值升高 0.11 ~ 0.16, 总酸质量浓度降低 2.48 ~ 2.62 g/L。挥发酸含量虽然有所升高, 但质量浓度最大值为 0.42 g/L (< 1.2 g/L), 均符合 GB/T 15037—2006 的要求。供试本土 *O. oeni* 菌株在第 12 天完成 MLF, 商业菌

表 5 双糖苷酶活性测定正交试验方差分析					
Tab.5 Variance analysis of orthogonal experiment for cumulative diglycosidase activity					
菌株	因素	偏差平方和	自由度	<i>F</i>	显著性
ZX-1	乙醇体积分数	11.571	2	0.144	*
	SO ₂ 添加量	289.038	2	3.579	**
	pH 值	11.900	2	0.148	*
	发酵温度	8.905	2	0.111	
	误差	321.41	8		
GF-2	乙醇体积分数	18.522	2	0.384	*
	SO ₂ 添加量	144.101	2	2.983	**
	pH 值	20.767	2	0.430	*
	发酵温度	9.789	2	0.203	
	误差	193.21	8		
VP41	乙醇体积分数	14.295	2	0.222	*
	SO ₂ 添加量	222.533	2	3.459	**
	pH 值	8.923	2	0.139	
	发酵温度	11.624	2	0.181	*
	误差	257.38	8		

表 6 苹果酸-乳酸发酵前后干白葡萄酒样理化指标

Tab.6 Physical and chemical indexes of dry white wine samples before and after MLF

理化指标	MLF 前	MLF 后			
		CK	GF-2	ZX-1	VP41
pH 值	(3.54 ± 0.014) ^{DE}	(3.59 ± 0.028) ^{CD}	(3.70 ± 0.007) ^A	(3.67 ± 0.014) ^{AB}	(3.65 ± 0.014) ^{ABC}
残糖质量浓度/(g·L ⁻¹)	(1.25 ± 0.212) ^A	(1.15 ± 0.212) ^{ABC}	(1.10 ± 0.141) ^{ABCD}	(0.75 ± 0.354) ^{CDE}	(1.15 ± 0.212) ^{AB}
酒精度/% vol	(11.20 ± 0.014) ^A	(11.18 ± 0.035) ^{AB}	(11.10 ± 0.042) ^{BC}	(11.09 ± 0.035) ^{CD}	(11.09 ± 0.035) ^{CDE}
总酸质量浓度/(g·L ⁻¹)	(7.62 ± 0.014) ^A	(7.57 ± 0.148) ^{AB}	(5.07 ± 0.014) ^{CD}	(5.00 ± 0.156) ^{CDE}	(5.14 ± 0.148) ^C
挥发酸质量浓度/(g·L ⁻¹)	(0.30 ± 0.001) ^{CD}	(0.29 ± 0.028) ^{DE}	(0.42 ± 0.014) ^A	(0.40 ± 0.001) ^{AB}	(0.34 ± 0.028) ^C
总 SO ₂ 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	(41.75 ± 0.043) ^A	(40.84 ± 0.039) ^{AB}	(42.20 ± 0.015) ^C	(45.04 ± 0.028) ^E	(39.13 ± 0.011) ^{CD}
L-苹果酸质量浓度/(g·L ⁻¹)	(3.55 ± 0.022) ^A	(3.41 ± 0.011) ^B	(0.10 ± 0.007) ^{CD}	(0.08 ± 0.001) ^{DE}	(0.13 ± 0.011) ^C

注:同行数据不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

表 7 各处理酒样中萜烯类物质含量的变化							μg/L
Tab.7 Changes of terpenes in wine samples with different treatments							
编号	香气物质	阈值	质量浓度				
			CK	GF-2	ZX-1	VP41	
1	叶醇	400	(81.993 ± 1.903) ^A	(20.735 ± 0.256) ^B	(17.306 ± 1.046) ^{CD}	(18.169 ± 0.257) ^{BC}	青草、药草、绿叶味
2	α-松油醇	250	(68.215 ± 1.310) ^D	(179.218 ± 1.431) ^C	(263.398 ± 1.061) ^A	(245.689 ± 0.497) ^B	紫丁香味
3	香茅醇	40	(25.162 ± 1.411) ^C	(22.759 ± 0.243) ^D	(61.425 ± 1.090) ^A	(41.190 ± 0.472) ^B	柠檬、柑橘香
4	大马士酮	0.05	(1.126 ± 1.014) ^D	(29.323 ± 0.026) ^A	(28.093 ± 0.067) ^{AB}	(21.505 ± 0.060) ^C	花香、果香、紫丁香
5	香叶基丙酮	60	(85.154 ± 0.671) ^A	(7.117 ± 0.022) ^B	(3.173 ± 0.029) ^{CD}	(3.241 ± 0.125) ^C	青草味、果香味
6	乙酸叶醇酯	/	(78.824 ± 1.783) ^D	(87.157 ± 0.108) ^C	(92.357 ± 0.140) ^{AB}	(92.407 ± 0.061) ^A	/
7	乙酸香叶酯	/	(8.408 ± 0.428) ^{AB}	-	(8.561 ± 0.001) ^A	(5.060 ± 0.130) ^C	花香、果香
8	橙花醇	/	-	-	(1.473 ± 0.001) ^A	(1.226 ± 0.041) ^B	花香、木香、柑橘香、 柠檬香
9	β-紫罗兰酮	/	(7.817 ± 0.002) ^A	-	-	-	紫罗兰
10	反式-橙花叔醇	700	-	-	-	(10.034 ± 0.104) ^A	玫瑰、苹果、青草味
11	芳樟醇	15	(5.752 ± 0.402) ^D	(27.328 ± 0.182) ^A	(23.799 ± 0.198) ^B	(20.628 ± 0.120) ^C	玫瑰花香、柑橘味、果香
12	甲酸芳樟酯	/	-	(1.457 ± 0.001) ^B	-	(4.369 ± 0.059) ^A	/
13	甲酸香茅酯	/	-	(18.397 ± 0.100) ^A	(16.312 ± 0.142) ^B	-	/
总计			362.451 ± 6.702	393.491 ± 2.908	515.897 ± 1.893	463.518 ± 2.165	

注:“-”表示样品中未检测到该物质;“/”表示未查到相关阈值或香气信息。

株 VP41 则在第 14 天完成 MLF。

2.5.2 萜烯类化合物 GC-MS 检测

不同处理条件下,各处理组中萜烯类化合物含量的变化情况见表 7。ZX-1 处理组中萜烯类物质的总含量最高,质量浓度为 515.897 μg/L,而 VP41 处理组中的萜烯类物质种类最多(11 种)。2.3 节的研究表明,虽然在不同复合条件下,菌株 VP41 的双糖苷酶活力累积量显著低于本土 *O. oeni* ($P < 0.05$),但其 β-D-葡萄糖苷酶在最优复合条件下显著高于本土 *O. oeni* 的酶活力累积量 ($P < 0.05$)。萜烯类物质在葡萄果实中主要以双糖苷的形式存在,在葡萄酒中双糖苷酶作用生成的单糖苷物质由 β-D-葡萄糖苷酶进一步水解,生成游离态的萜烯类物质。本土 *O. oeni* 发酵后的酒样中虽然萜烯类物质种类仅次于 VP41 处理后的酒样,但酒样中的总含量却较高,α-松油醇、香茅醇、大马士酮、芳樟醇等萜烯类物质的质量浓度高于其阈值,具有

潜在的花香味。

3 讨论

3.1 酿造因子对 *O. oeni* 糖苷酶活性的影响

一些葡萄酒成分,如糖和乙醇,或酿酒过程中的温度和 pH 值等因素均会影响糖苷的活性^[14]。本试验选择糖苷酶活性表现较好的 2 株本土 *O. oeni* (GF-2、ZX-1) 和商业菌株 VP41,分析初始 pH 值、乙醇体积分数、SO₂ 添加量、发酵温度等对菌株的糖苷酶活性特性进行分析。结果发现不同酿造因子对同一菌株的糖苷酶活性影响不同,且存在着显著差异 ($P < 0.05$)。文献[2]研究表明,pH 值是抑制 *O. oeni* 菌株酶活性的重要因子,与菌株酶活性呈正相关,这与本试验中供试菌株在 pH 值为 3.6~3.8 时,菌株的酶活力累积量最高的结果相一致。同时在本试验中当乙醇体积分数为 6%~8% 时,菌株糖苷酶活性最大;乙醇体积分数为 10%~14% 时,糖苷酶活性缓慢下降,与文献[29]中乙醇影响 *O. oeni* 菌株的生长参数,却不影响酶活性的研究结果存在差异。可能是因为乙醇改变了细胞膜的通透性,从而使胞内酶和底物之间更容易接触^[14]。同时酶活性的降低可以解释为蛋白质变性的结果。文献[16]的研究强调了添加 SO₂ 可能有助于调节 MLF 期间 *O. oeni* 的糖苷酶活性,本研究发现菌株在 30 mg/L 时有最大酶活性,得到了类似的结果。发酵温度是葡萄酒酿造过程中最可控的因素之一,菌株 VP41 在 22℃ 时有最大 β-D-葡萄糖苷酶活性,而本土 *O. oeni* 菌株的最大酶活性则是在 20℃ 产生,虽有研究证明 28℃ 为 *O. oeni* 菌株较适宜的生长温度,但本土 *O. oeni* 菌株与商业菌株的 β-D-葡萄糖苷酶活性较低;菌株 VP41 的最大双糖苷酶活性在 28℃ 产生,本土 *O. oeni* 菌株最大双糖苷酶活性在 18℃ 产生,这提示在葡萄酒实际生产中,应根据发酵菌株特点选择最适宜的发酵温度。

3.2 *O. oeni* 对葡萄酒萜烯类物质的影响

萜烯类化合物气味阈值低、风味强烈、感官特征明显,主要以糖苷态的形式存在于葡萄果皮中。*O. oeni* 在 MLF 过程中降低葡萄酒酸度的同时伴随着一系列的代谢活动,其中大量的酶代谢使得产生的挥发性化合物浓度远超过其阈值,致使葡萄

酒香气浓郁度增加。本试验接种不同 *O. oeni* 菌株分别对霞多丽干白葡萄酒进行 MLF,结果表明本土菌株处理的酒样虽然萜烯类物质种类仅次于 VP41 处理后的酒样,但酒样中的总含量却较高,α-松油醇、香茅醇、大马士酮、芳樟醇等萜烯类物质的含量高于其阈值,这与菌株具有的糖苷酶活性及类型有关。文献[30]发现,MLF 后酒样中 β-大马士酮的浓度明显增加,表明该化合物的形成可能与参与的菌株的水解活性有关。文献[15]发现接种 *O. oeni* MS46 的葡萄酒 MLF 后的酒样中形成了 β-香茅醇(柑橘香味),可能是经菌株 MS46 的糖苷酶对底物释放后合成。本研究正如预期,MLF 后萜烯类化合物质量浓度明显增加,与文献[11]的结果相一致。

4 结论

(1)在单因素条件下,供试菌株糖苷酶活性变化趋势具有菌株相似性,在不同梯度条件下产酶活性具有一定的菌株差异性。当 pH 值为 3.6 时本土 *O. oeni* 菌株的糖苷酶活性均具有最大酶活性,且菌株 ZX-1、GF-2 的两种酶活性高于商业菌株 VP41 的酶活性;乙醇体积分数在 6%~8% 时,供试菌株的糖苷酶都有最大酶活性;SO₂ 添加量为 30 mg/L 时,供试菌株的 β-D-葡萄糖苷酶和双糖苷酶的酶活性均达到峰值;本土 *O. oeni* 的 β-D-葡萄糖苷酶在 20℃ 时产生的酶活性最高,菌株 VP41 在 22℃ 下酶活性有最大值。复合酿造因子试验结果表明,在 pH 值 3.6、乙醇体积分数为 12%、SO₂ 添加量为 30 mg/L、发酵温度为 22℃ 的发酵条件下,供试菌株均有最大酶活力累积量,但本土 *O. oeni* 菌株的糖苷酶活力累积量高于商业菌株 VP41。

(2)霞多丽干白葡萄酒微酿试验结果表明,供试本土菌株具有良好的 L-苹果酸降解能力。萜烯类化合物 GC-MS 分析结果显示,本土 *O. oeni* ZX-1 发酵后的酒样中虽然萜烯类物质种类仅次于 VP41 处理后的酒样,但酒样中的总含量却最高(质量浓度 515.897 μg/L),α-松油醇、香茅醇、大马士酮、芳樟醇等萜烯类物质的质量浓度高于其阈值,具有潜在的花香味,这与供试菌株的风味酶活性累积量变化规律相一致。

参 考 文 献

- [1] PARKER M, CAPONE D L, FRANCIS I L, et al. Aroma precursors in grapes and wine: flavor release during wine production and consumption[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 66(10): 1-23.
- [2] BAUER R, DICKS L. Control of malolactic fermentation in wine: a review[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2017, 25(2): 74-88.
- [3] SCHIEVANO E, D'AMBROSIO M, MAZZARETTO I, et al. Identification of wine aroma precursors in Moscato Giallo grape juice: a nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry tandem study[J]. Talanta, 2013, 116: 841-851.

- [4] RODRÍGUEZ-BENCOMO J J, CABRERA-VALIDO H M, PÉREZ-TRUJILLO J P, et al. Bound aroma compounds of Gual and Listán blanco grape varieties and their influence in the elaborated wines[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1153–1162.
- [5] RODRÍGUEZ-BENCOMO J J, MUÑOZ-GONZÁLEZ C, UJAR-ORTIZ I, et al. Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(13): 2484–2494.
- [6] IGNACIO B, JAVIER R, ESTEBAN-FERNÁNDEZ A. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement[J]. Molecules, 2017, 22(2): 189–218.
- [7] LAMBRECHTS M G, PRETORIUS I S. Yeast and its importance to wine aroma—a review[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2019, 21(1): 97–129.
- [8] ESCRIBANO R, GONZÁLEZ-ARENZANA L, PORTU J, et al. Wine aromatic compound production and fermentative behavior within different non-*Saccharomyces* species and clones[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(6): 1521–1531.
- [9] MICHLMAYR H, NAUER S, BRANDES W, et al. Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 80–87.
- [10] 杨芮, 吕珍, 文彦, 等. 酒类酒球菌中 β -葡萄糖苷酶性质研究[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 206–211.
YANG Rui, LÜ Zhen, WEN Yan, et al. β -glycosidase activity of *Oenococcus oeni*[J]. Food Science, 2013, 34(23): 206–211. (in Chinese)
- [11] BOIDO E, LLORET A, MEDINA K, et al. Effect of β -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.
- [12] GAGNÉ S, LUCAS P M, PERELLO M C, et al. Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* train collection tested with synthetic and natural substrates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 110(1): 218–228.
- [13] MALHERBE S, TREDOUX A G J, NIEUWOUDT H H, et al. Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(3): 477–944.
- [14] 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.
- [15] MATURANO C, FABIANA M S. Influence of glycosides on behavior of *Oenococcus oeni* in wine conditions: growth, substrates and aroma compounds[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(8): 151–161.
- [16] 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(3–4): 292–296.
- [17] SICO M A, BONOMO M G, SALZANO G. Isolation and characterization of *Oenococcus oeni* from Aglianico wines[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(9): 1829–1835.
- [18] 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.
- [19] 余东亮, 石侃, 孟强, 等. 昌黎产区酒类酒球菌 (*Oenococcus oeni*) 的遗传多样性及系统发育分析[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 137–143.
YU Dongliang, SHI Kan, MENG Qiang, et al. Genetic diversity and phylogeny of *Oenococcus oeni* strains isolated from winemaking regions of Changli, Hebei Province[J]. Food Science, 2019, 40(16): 137–143. (in Chinese)
- [20] 祝霞, 王璐璐, 赵丹丹, 等. 甘肃河西走廊葡萄酒产区本土酒球菌发酵耐受性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 159–164.
ZHU Xia, WANG Lulu, ZHAO Dandan, et al. Analysis of fermentation tolerance of native *Oenococcus oeni* in Hexi Corridor of Gansu Province[J]. Food Science, 2020, 41(18): 159–164. (in Chinese)
- [21] 张煜晨, 张丹丹, 林可, 等. 苹果酸-乳酸发酵中乳酸菌的分离及其对葡萄酒香气成分的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 84–92.
ZHANG Yuchen, ZHANG Dandan, LIN Ke, et al. Isolation of lactic acid bacteria from malolactic fermentation and their effect on the aroma compounds of wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(15): 84–92. (in Chinese)
- [22] 薛雪. 宁夏银川产区葡萄酒优良酒球菌的筛选及其发酵性能的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
XUE Xue. The screening and fermentation performance of *Oenococcus oeni* from Ningxia Yinchuan wine product region[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018. (in Chinese)
- [23] YADAV S, YADAV V, YADAVA S, et al. Purification and functional characterisation of an α -L-rhamnosidase from *Penicillium citrinum* MTCC–3565[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(7): 1404–1410.
- [24] NUMAN M T, BHOSLE N B. α -L-Arabinofuranosidases; the potential applications in biotechnology[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(4): 247–260.
- [25] 祝霞, 刘琦, 赵丹丹, 等. 干白葡萄酒增香酿造工艺参数优化[J]. 农业工程学报, 2019, 35(18): 282–291.
ZHU Xia, LIU Qi, ZHAO Dandan, et al. Parameter optimization aroma enhancement fermentation technology of dry white wine [J]. Transactions of the CSAE, 2019, 35(18): 282–291. (in Chinese)
- [26] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. GB/T 15038—2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [27] 李婷, 陈景桦, 马得草, 等. 优选非酿酒酵母与酿酒酵母在模拟葡萄汁发酵中生长动力学及酯酶活性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 60–66.
LI Ting, CHEN Jinghua, MA Decao, et al. Growth kinetics and esterase activities of selected non-*Saccharomyces* yeast and *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of model grape juice[J]. Food Science, 2017, 38(22): 60–66. (in Chinese)
- [28] SARRY J E, GUENATA Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors[J]. Food Chemistry, 2004, 87(4): 509–521.
- [29] RODRÍGUEZ M E, LOPES C A, VALLES S, et al. Characterization of α -rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(6): 2206–2213.
- [30] UGLIANO M, GENOVESE A, MOIO L. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(17): 5073–5078.