

利用 β -葡萄糖苷酶提高葡萄酒香气的研究进展

张阳, 江璐, 郭志君, 赵益梅, 刘庆, 闵卓

(茅台学院酿酒工程系, 贵州仁怀 564500)

摘要: 葡萄酒中的萜类物质大多以结合态糖苷的形式存在, 不易释放, 而 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)是水解葡萄酒中结合态挥发性芳香化合物的关键酶, 对葡萄酒香气的提升具有十分重要的作用。然而, 由于葡萄糖或葡萄酒中高浓度的葡萄糖、乙醇以及低pH条件对该酶的活性及稳定性产生巨大的抑制或破坏作用, 因此其在葡萄酒中的应用受到极大限制。近年来, 针对如何提高 β -葡萄糖苷酶在葡萄酒复杂生境中的活性及稳定性, 研究者们做了大量的工作。本文在阅读大量文献的基础上, 对通过 β -葡萄糖苷酶产生菌的筛选、酶固定化技术、酿酒酵母细胞表面展示技术以及蛋白质的半理性化设计等不同策略来提高 β -葡萄糖苷酶在葡萄酒复杂生境下的活性及稳定性方面的研究进行了综述, 在此基础上, 对利用 β -葡萄糖苷酶来提高葡萄酒香气做了展望。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 葡萄酒; 香气; 酿酒酵母表面展示技术; 固定化酶

文章编号: 1673-9078(2020)04-316-324

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.041

Improving Wine Aroma by Using Beta-Glucosidase: a Review

ZHANG Yang, JIANG Lu, GUO Zhi-jun, ZHAO Yi-mei, LIU Qing, MIN Zhuo

(Department of Brewery Engineering, Moutai Institute, Renhuai 564500, China)

Abstract: Most of the terpenoids in wine exist in the form of bound glycosides, which are not easily released. β -glucosidase is a key enzyme in the hydrolysis of bound volatile aromatic compounds in wine, which plays an important role in the improvement of wine aroma. However, its application in wine is largely limited due to the great inhibition or destruction of high glucose, ethanol and low pH in wine on its activity and stability. In recent years, researchers have done a lot of work on how to improve the activity and stability of β -glucosidase in the complex winemaking conditions. On the basis of reading a large number of literatures, we have summarized the research advances of different strategies to improve the β -glucosidase activity and stability in the complex winemaking conditions, including the screening of β -glucosidase producing bacteria, enzyme immobilization technology, *Saccharomyces cerevisiae* cell-surface display technology and semi-rational design of protein. In addition, the use of β -glucosidase to improve the aroma of wine has been proposed.

Key words: beta-glucosidase; wine; aroma; yeast cell-surface display technology; enzyme immobilization technology

引文格式:

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 Yang, JIANG Lu, GUO Zhi-jun, et al. Research advances on improving wine aroma by using beta-glucosidase [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 316-324

β -葡萄糖苷酶(beta-glucosidase, BGL, EC3.2.1.21), 又称葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 它能够水解结合于末端、非还原性的 β -葡萄糖苷键, 同时释放出 β -葡萄糖和相应的配基。BGL的来源相当广泛, 在古生菌^[1]、细菌^[2]、真核生物^[3]、病毒^[4]以及一些尚未定义的物种^[5]中均有发现, 根据其保守结构域的不同, 被分为8种不同的糖苷水解酶(Glycoside Hydrolase, GH)家族, 包括GH1、GH2、GH3、GH5、GH9、GH30、GH116和NC(non classified)等(CAZy;

收稿日期: 2019-10-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872049)

作者简介: 张阳(1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 葡萄酒微生物

通讯作者: 闵卓(1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 葡萄与葡萄酒学

<http://www.cazy.org/>), 其中, GH3家族成员最多, 其次是GH1家族。不同GH家族的BGL在酶的活性、特异性以及酶抑制剂或激活剂方面均呈现出较大差异^[6]。长期的研究发现, BGL在生物能源以及食品工业生产中具有广泛的应用价值, 如可被用来提高生物乙醇产率、改良果汁风味及增加果酒香气等。葡萄酒作为一种集色泽、香气和口感于一体的世界性饮品, BGL在其香气的释放方面发挥至关重要的作用。目前已发现葡萄酒中的香气物质有1300多种, 主要包含萜类、酯类和醇类等^[7], 其中萜类物质因感官阈值低, 香味浓郁, 常被用作葡萄果实及葡萄酒品种香气的特征化合物, 然而在葡萄酒中萜类物质主要是以不具挥发性的糖苷形式存在, 对葡萄酒的香气没有直接贡献。

糖苷通过酸水解或酶水解使之变成游离态,然而酸水解会造成糖苷配体结构的改变,从而导致不良风味的形成^[8],因此酶水解对葡萄酒中萜类物质的释放更有应用价值。水解结合态萜类物质的酶主要包括 α -L-鼠李糖苷酶(EC 3.2.1.40)、 α -L-阿拉伯糖苷酶(EC 3.2.1.21)、 β -D-洋芹糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)。当糖苷与单糖连接时,只需要BGL即可水解,如果是二糖连接,则需要 α -L-鼠李糖苷酶、 α -L-阿拉伯糖苷酶或 β -D-洋芹糖苷酶将外糖切割掉以后,再由BGL切割释放糖苷配体,从而赋予酒体其独特的香气。可见,无论是单糖苷还是双糖苷,在风味前体的整个酶促水解过程中,BGL都起着至关重要的作用,其活性直接影响着萜类香气的释放^[9]。

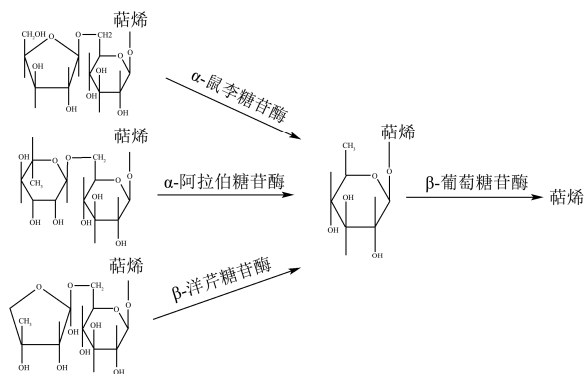


图1 双糖风味前体的水解过程

Fig.1 Sequential enzymatic hydrolysis of disaccharidic flavour precursors

葡萄酒中的环境复杂,如发酵初期高浓度的葡萄糖、发酵后期高浓度的乙醇以及低pH等因素,都极大的限制了BGL的活性^[10,11]。在早期的研究中,植物来源的内源BGL在果汁加工或葡萄酒酿造过程中活性低,主要是由于它们的最适pH在4.0~6.0之间,而在低pH的果汁中,大多数的BGL只有5%~15%的残余活性^[12],另一方面其对底物的特异性高,只能水解 β -D-糖苷键连接的伯醇,如香叶醇、橙花醇、香茅醇等,另外还会受到高浓度葡萄糖的强烈抑制^[13,14]。随后研究发现来源于黑曲霉中BGL有更广泛的适用性,是目前普遍使用的商业酶制剂,但这类从黑曲霉中获得的商业酶制剂会夹杂着少量其他的酶类,而这些酶在葡萄酒发酵过程中,会带来不良的风味物质^[15,16]。近期的研究发现,从酵母中也能获得高活性的BGL,但这些BGL不会对葡萄酒的风味产生不良影响,因此具有替代黑曲霉商业酶制剂的潜能^[17,18]。

葡萄酒复杂的环境使得BGL的应用受到限制,因此,如何提高BGL的活性和稳定性以促进葡萄酒香气成分的释放成为现今提高葡萄酒质量的研究热点。近年来,研究者们试图通过各种不同手段来达到

此目的,主要包括了对BGL生产菌的筛选、酶固定化以及蛋白质半理性化设计等。本文将对BGL的研究现状及其在葡萄酒中的应用前景做一概述。

1 β -葡萄糖苷酶的筛选

BGL最初来源于植物,如苦杏仁、大豆以及苹果籽等,然而,来源于植物的BGL产量不高,且表现出低酶活、稳定性差等特性,因此人们将目光转移至微生物中,其中包括曲霉属、木霉属、酵母、乳酸菌以及芽孢杆菌属^[19],而在葡萄酒领域中,BGL的研究主要集中在酿酒酵母、非酿酒酵母以及酒球菌三大类。

1.1 酿酒酵母

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在葡萄酒发酵过程中具有非常重要的作用,它将葡萄汁中的绝大部分糖转化为酒精和二氧化碳,同时生成甘油、高级醇、醛、酯等代谢产物,直接影响了葡萄酒的色泽、香气及口感,决定着葡萄酒的质量^[20]。然而,大多数酿酒酵母中不存在BGL^[21],因此,筛选出具有BGL活性的酿酒酵母对提升葡萄酒质量起着重要的作用。

Chaves-Lopez等人^[22]从传统的哥伦比亚低酒精发酵饮料中筛选出一株可以改善葡萄酒香气的热带酿酒酵母,研究发现该酿酒酵母可以产BGL,其发酵的葡萄酒中具有较高含量的萜烯。此外,Gamero等人^[23]将*S. cerevisiae*、*S. uvarum*和*S. kudriavzevii*这三种酵母属进行杂交,得到一株具备高活性BGL的三倍体酵母。Schmidt等人^[24]的研究发现酿酒酵母中EXG1所编码的外切 β -葡聚糖苷酶底物比较广泛,可以水解以O-糖苷形式链接的糖苷类物质,因此作者认为风味物质的产生是由 β -葡聚糖苷酶的水解引起的。

1.2 非酿酒酵母

酿酒酵母普遍不具备合成BGL的能力,而大多数非酿酒酵母(non-*Saccharomyces*)都可以合成BGL^[21]。通过对160株酵母菌产BGL的能力进行分析,发现BGL大多存在于非酿酒酵母中,表明非酿酒酵母在葡萄酒香气释放方面发挥重要作用^[25]。因此,非酿酒酵母作为葡萄酒发酵过程中BGL的一个重要来源,得到了广泛关注。Sabel等^[21]从异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)AS1中提取的BGL不仅具有阿拉伯糖苷酶的特性,而且具有木糖苷酶的特性,并且可在干型葡萄酒中保持较高活性,但会受到葡萄糖的强烈抑制。Hu等^[26]在一株孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)内发现了具有极高活性的

BGL, 它可葡萄酒模拟溶液中稳定存在, 且受葡萄糖的抑制作用较弱。Mateo 等^[27]也从一株 *H. uvarum* 中提纯得到了 BGL, 该 BGL 对葡萄糖具有很强的耐受性, 但却受到乙醇的强烈抑制。Belancic 等^[28]从范丽德巴利酵母(*Debaryomyces vanrijae*)胞外提取的 BGL 不仅具有较高活性, 而且对葡萄糖和乙醇都具有耐受性。另外, 从近玫色锁掷孢酵母(*Sporidiobolus pararoseus*)胞外筛选得到的 BGL, 除了对葡萄糖和乙醇具有耐受性外, 还能适应低温以及低 pH 等环境, 进一步的研究发现它能够显著增加葡萄酒中香叶醇、芳樟醇、 α -松油醇、橙花醇等物质的含量^[29,30]。另外, 将葡萄酒发酵前后糖和乙醇的变化规律与 BGL 的特性相结合, 分别将来自 *Hanseniaspora* sp. BC9 的 BGL (耐葡萄糖, 不耐乙醇) 用于发酵初期, 将来自异常毕赤酵母(*Pichia anomala*) MDD24 中的 BGL (不耐葡萄糖, 耐乙醇) 用于发酵后期, 结果显示两者的结合能显著增加香气的成分和含量^[31,32]。Lopez 等^[33]的研究发现部分非酿酒酵母(如 *H. uvarum* HI07、*H. vineae* G26 和 P38) 不仅具备高活性的糖苷酶, 而且能顺利将糖转化为酒精, 独立完成发酵。

分别将阿萨丝孢酵母(*Trichosporon asahii*) 所表达的 β -葡萄糖苷酶 BG1、BG2 及黑曲霉(*Aspergillus niger*) 所表达的 β -葡萄糖苷酶 AS 作为酶制剂加入到蛇龙珠葡萄汁中进行发酵, 结果发现加入 BG1 的葡萄酒中香气成分最高, 在低 pH 和高浓度的葡萄糖条件下, BG1 的稳定性也最好, 同时对花色苷的降解作用也最小, 有利于红葡萄酒的发酵^[34], 而莫氏假丝酵母(*Candida molischiana*) 所表达的 BGL 对花色苷的降解能力强, 有利于白葡萄酒的酿造^[35]。因此 BGL 在被用于提升葡萄酒香气的同时, 可能也会对葡萄酒颜色的稳定性造成一定影响。

人们发现利用非酿酒酵母与酿酒酵母混合发酵, 既可以提高葡萄酒香气的释放, 又同时保证葡萄酒较高的发酵效率。Cordero-Bueso 等^[36]以 BGL 的活性为首要筛选条件, 从 504 株非酿酒酵母中筛选到高活性的德布尔有孢酵母(*Torulaspora delbrueckii*) CLI 918, 将其与酿酒酵母进行混合发酵后, 葡萄酒中的花香和水果香明显增加。近几年的研究发现, 酒香型酵母与酿酒酵母的混合发酵, 对葡萄酒香气含量的增加及其复杂性的提升具有更加明显的作用^[37], 同时, 非酿酒酵母与酿酒酵母接种的比例和接种的顺序也会对葡萄酒的成分和香气造成很大的影响^[38]。

1.3 酒酒球菌

苹果酸乳酸发酵(MLF)能够改善葡萄酒的香气

特征, 提升葡萄酒的感官品质, 而酒酒球菌是 MLF 的主要启动者和执行者。研究发现, BGL 广泛存在于从商业 MLF 发酵剂中分离得到的乳杆菌属以及片球菌属中^[39], 且主要存在于细胞壁和细胞内^[40], 其活性大小强烈依赖于葡萄酒环境, 如 pH, 乙醇以及残糖浓度等^[41]。在添加了 Muscat 葡萄品种糖苷提取物的模拟葡萄酒中, 使用四种商业酒酒球菌启动 MLF, 首次检测到了萜烯的释放, 并且发现不同菌株的 BGL 活性和对不同底物的水解程度存在差异, 推断可能与菌株的个体特征和糖苷配基的化学结构有关^[42]。Boido 等人^[43]也发现游离糖苷配基的释放量与他们的糖基化前体的降解量不一致。随后, 该研究团队又对不同酒酒球菌处理红葡萄酒芳香前体及相应挥发性化合物的效果进行研究, 证实了之前研究所得出的结论, 即 MLF 期间糖苷的水解程度与菌株及底物的化学结构相关, 并且在 MLF 完成后检测萜烯醇的糖苷前体下降量最大, 相应的挥发性芳香化合物如芳樟醇, 法尼醇, 以及 β -大马酮的含量增加^[44]。Pérez-Martín 等人^[45]利用具有较高 BGL 活性的酒酒球菌 Da32 和 Ab11 启动 MLF, 结果发现葡萄酒的香气更加浓郁, 尤其是花香, 更进一步说明了酒酒球菌对葡萄酒香气的特征起着重要作用。Hernandez-Orte 等研究者^[46]用酒酒球菌, 短乳杆菌和干酪乳杆菌启动的模拟葡萄酒的苹果酸乳酸发酵, 在此期间检测到了多种挥发性化合物(如萜烯, 降碳倍半萜, 酚类化合物以及香草醛)的释放。Michlmayr 等人^[47]研究发现, 来源于酒酒球菌的 BGL 和阿拉伯糖苷酶能够释放大量的单萜烯, 并且发现用酶处理过的雷司令葡萄酒其典型的葡萄品种香气更突出。

2 β -葡萄糖苷酶的固定化

2.1 固定化酶

酶的固定化是指利用物理或化学的方法使酶与水不溶性大分子载体结合或把酶包埋在其中。酶经固定化后, 具有稳定性增加, 易从反应系统中分离, 易于控制, 能反复多次使用等优点^[48]。因此, 将 BGL 固定到载体上, 可以减少葡萄酒中各种不利因素(比如高浓度的酒精、葡萄糖, 低 pH 等)对酶活性的制约。

在葡萄酒领域, BGL 是通过两种形式进行固定化的, 一种是将 BGL 直接固定到海藻酸钠^[49]、A-568 树脂^[50]、壳聚糖小球^[51]、羟磷灰石^[52]和壳聚糖凝胶^[53]等单一的固定载体上。将 BGL 固定到这些载体上之后, 其在葡萄酒中的稳定性都有一定提高, 当固定到壳聚糖凝胶上时还能够显著降低酶的释放。近期的研

究发现将 BGL 固定到新型材料 Eupergit C 上,大大提高了 BGL 的稳定性,能够耐受 100 g/L 的葡萄糖、18% 浓度的酒精以及 PH<3.0 的溶液,基本上克服了 BGL 在葡萄酒中应用的壁垒^[54]。

另一种方式是先将两种固定化载体连接起来,然后将 BGL 固定到载体上。Romo-Sanchez 等人^[55]将 BGL 分别固定在海藻酸-几丁质和壳聚糖-几丁质上,进行比对发现,在达到同样水解效果的前提下,使用壳聚糖-几丁质作为固定化材料效果更佳,并且酶的使用剂量比游离酶少了 367 倍,大大节省了酶的使用成本。

然而,由于固定化酶需要的酶为纯化酶,且固定化材料的价格较为昂贵等因素,在利用非生物载体固定 BGL 来增加葡萄酒香气的研究也逐渐减少。

2.2 酿酒酵母表面展示技术

细胞表面展示技术是一种新的基因操作手段,使表达的多肽以融合蛋白的形式展现在核糖体^[56]、病毒^[57,58]或细胞表面^[59],保持相对独立的空间结构和生物活性,以此研究多肽的性质、相互识别作用^[60],筛选特定功能的多肽结构^[61],实现蛋白的固定化和定向进化^[62]。该技术发展极为迅速,给生物学诸多领域的研究带来了重大而深远的影响,被誉为生命科学研究中一次技术上的重大突破。作为噬菌体表面展示技术和细菌表面展示技术的有益补充,酵母表面展示技术以其较为完善的蛋白质翻译后修饰和分泌机制、安全无毒等独特的优越性,近年来颇受关注。

酿酒酵母表面展示技术是将目标蛋白与酿酒酵母细胞壁蛋白融合,再由胞壁蛋白通过共价键和非共价键两种形式连接在细胞壁上,共价键又分为 GPI 连接和 alkali-sensitive 连接,两者的区别在于 GPI 连接是胞壁蛋白连接到 β -1,6-葡聚糖后,然后由 β -1,6-葡聚糖连接到 β -1,3-葡聚糖上,而 alkali-sensitive 连接是胞壁蛋白通过 alkali-sensitive 键直接连接到 β -1,3-葡聚糖上,胞壁蛋白大多是以 GPI 连接的形式存在^[63,64];絮凝素 FLO1 则是通过疏水作用和磷酸化作用以非共价键形式连接到胞壁最外层的甘露糖蛋白上^[65,66]。

相对于传统的固定化技术,酿酒酵母细胞表面展示技术中,酿酒酵母在表面可以形成类似细胞内环境的“真空层”,将 BGL 展示在酿酒酵母细胞表面,可以削弱外界环境对 BGL 的抑制作用,进而增加了酶的稳定性^[67]。目前 BGL 在酵母细胞表面展示技术研究主要集中在筛选合适的锚定蛋白、启动子^[68]以及 N 端信号肽^[69]来提高酶活,而该技术在葡萄酒领域的应用还未见报道。

3 β -葡萄糖苷酶的半理性化设计

近代生物学的发展使人们认识到蛋白质进化大多是由于基因的改变造成了蛋白特性的变化,而蛋白的特性和蛋白的 3D 结构有着密不可分的关系^[70]。目前,BGL 的定向进化主要通过以下两种方法:第一:对 BGL 基因进行随机突变,再施加外界压力,有目的的获得目标功能的蛋白^[71];第二:基于序列和蛋白结构等数据信息,对 BGL 基因进行定点突变以获得所需功能的蛋白,该方法称作半理性设计^[72]。

对于定向筛选,需要建立足够大的突变体库,但目前仍缺乏高效、高通量的筛选方法。因此,基于数据驱动与结构信息的半理性设计开始崭露头角。随着 NCBI 数据库以及 PDB 数据库中 BGL 基因和晶体结构的日益增多,衍生出了一种新型的蛋白定向进化策略,其特点是在生物信息学的基础上,利用计算机模拟并预测蛋白可能发生的构象变化来指导蛋白的定向进化,该方法侧重于构建高质量的小型突变体库,降低高通量筛选的压力。从实用的角度来看,半理性蛋白质工程不需要建立庞大的突变库来获取所需的功能,可有效地消除解决了高通量筛选的困难^[73]。

3.1 葡萄糖耐受性

葡萄糖作为 BGL 的水解产物,具有反馈抑制效应,限制了其实际应用效能,因此了解葡萄糖对 BGL 的影响机制,有针对性的对酶进行定向改造非常重要。研究发现,当葡萄糖浓度低至 0.01 M 时,几乎所有 GH3 家族的 BGL 活性均会遭受强烈抑制,而 GH1 家族的 BGL 在葡萄糖浓度达到 0.3 M 甚至 0.6 M 时仍保持较高活性^[6,74]。Giuseppe 等^[75]通过分析两个家族 BGL 的晶体结构发现 GH1 家族的 BGL 具有狭窄的袋口和较长的催化通道,使得葡萄糖分子难以占据催化位点,而 GH3 家族 BGL 袋口宽大,容易被葡萄糖分子占据,因此受到葡萄糖的抑制。

同时,Larue 等人^[76]对黑曲霉 GH3 家族的 BGL 基因进行随机突变,发现位于袋口 305 位置上的酪氨酸被突变为半胱氨酸时,袋口间的距离缩小,对葡萄糖的耐受性有所提高,因此,更进一步证明催化位点袋口大小是影响 BGL 对葡萄糖耐受强弱的直接因素。总之,对蛋白晶体结构的解析为 BGL 进行半理性化或者理性化设计提供了理论基础。

3.2 乙醇耐受性

在葡萄酒发酵过程中,乙醇的浓度逐渐增大。长期以来,人们从自然发酵的葡萄酒中筛选到了一些耐

乙醇的 BGL, 但尚缺乏深入的研究。近期 Fang 等^[72]通过 Discovery Studio (DS) 软件对 BGL 的氨基酸序列进行扫描, 并对某些不稳定的氨基酸进行定点突变, 发现增加氨基酸之间的疏水力和氢键后, 可以使 BGL 对乙醇的耐受性增强。同时 Karnaouri 等人^[77]在研究用甲醇作为有机溶剂来考察糖苷酶的特性时发现了甲基-葡萄糖苷键的存在, 这表明了 BGL 对有机溶剂的耐受性可能与其转糖苷能力有一定的关系。

3.3 低温耐受性

BGL 的最适温度大多高于 45 °C, 而葡萄酒的发酵温度一般低于 30 °C, 因此如何克服温度限制是个具有挑战的问题。在葡萄酒领域中, 迄今未见利用低温作为限制因素来筛选 BGL 的报道, 但有研究者针对嗜冷性的 BGL 的结构进行了解析: Miao 等^[78]通过将嗜冷细菌南极微球菌 (*Micrococcus antarcticus*) 的 β -D-葡萄糖苷酶 BglU 与嗜温、嗜热菌中的 β -D-葡萄糖苷酶 BglB 和 GlyTn 进行对比发现, BglU 结构中有一个独特的由 35 个氨基酸组成的无规则卷曲 L3, 将其缩短会降低其在低温下的催化活性。而位于 299 位置的 His 负责其热稳定性的调控, 将其突变为 Tyr 后, 酶的最适温度提高。反之, 将 BglB 的 Tyr301 突变为 His 后, 酶的最适温度从 45 °C 降低到 35 °C^[79]。另外, 也有研究者利用分子动力学分析了南极杆菌 (*Exiguobacterium antarcticum*) B7 的 BGL 晶体结构, 发现具有嗜冷性的 BGL 可形成特殊的四聚体结构, 蛋白表面有更多的疏水区暴露, 同时盐桥数量减少^[80]。这些研究为进行 BGL 的低温耐受性改造提供了新策略。

4 展望

为了应对葡萄酒的复杂环境, 通过各种手段提高 BGL 的活性以及稳定性是亟待解决的问题。综上所述, 在葡萄酒发酵过程中, BGL 主要是以酶或者酶的保护剂两种形式被添加到发酵液中的, 如图 2 所示。在利用商业酵母较强的发酵能力基础上, 筛选具有高活性 BGL 的非酿酒酵母进行混合发酵, 从而使葡萄酒的风味更加复杂, 香气更加浓郁是必然趋势^[81]。其次, 随着基因工程技术的成熟, 可以将 BGL 基因导入到酿酒酵母细胞中, 弥补大多数酿酒酵母不存在该基因的不足。另一方面, 也可利用纤维小体技术将 BGL 展示在酿酒酵母表面外, 同时还可以将木糖酶、阿拉伯糖苷酶、洋芹糖苷酶等展示在胞外以提高葡萄酒香气的浓郁度^[82]。总之, 运用各种技术手段的共同目标都是为了提高葡萄酒的品质, BGL 作为葡萄酒风

味修饰的关键酶, 在葡萄酒工业中具有极大的应用潜力。

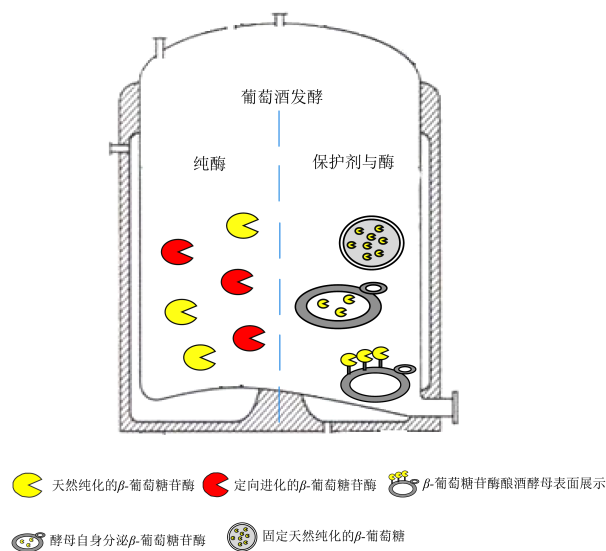


图 2 β -葡萄糖苷酶在葡萄酒中的添加形式

Fig.2 The form of BGL added to the wine during fermentation

参考文献

- [1] DiRuggiero J, Dunn D, Maeder D L, et al. Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic archaea [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(4): 684-693
- [2] Barabote R D, Xie G, Leu D H, et al. Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations [J]. *Genome Research*, 2009, 19(6): 1033-1043
- [3] Malboobi M A, Lefebvre D D. Isolation of cDNA clones of genes with altered expression levels in phosphate-starved *Brassica nigra* suspension cells [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28(5): 859-870
- [4] Antwerpen M H, Georgi E, Zoeller L, et al. Whole-genome sequencing of a pandoravirus isolated from keratitis-inducing acanthamoeba [J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(2): e00136-15
- [5] Nyssönen M, Tran H M, Karaöz U, et al. Coupled high-throughput functional screening and next generation sequencing for identification of plant polymer decomposing enzymes in metagenomic libraries [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 4(6): 282
- [6] Matsuzawa T, Jo T, Uchiyama T, et al. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic beta-glucosidase Td2F2 [J]. *The FEBS Journal*, 2016, 283(12): 2340-2353

- [7] 祝霞,韩舜愈,冒秋丹等. 蛇龙珠干红葡萄酒发酵过程中游离态和键合态香气物质的变化分析[J]. 食品科学, 2013, 34(14):192-197
ZHU Xia, HAN Shun-yu, MAO Qiu-dan, et al. Changes in free and bound aromatic compounds of cabernet gemischt dry red wine during fermentation [J]. Food Science, 2013, 34(14): 192-197
- [8] Williams P, Strauss C, Wilson B, et al. Use of C18 R. P. liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines [J]. Journal of Chromatography A, 1982, 235(2): 471-480
- [9] Hjelmeland A K, Ebeler S E. Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: A review [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2015, 66(1): 1-11
- [10] Unal M U, Aksoy V A, Sener A. Isolation, purification and determination of some biochemical properties of beta-glucosidase from muscat of Bornova grape [J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(1): 9-15
- [11] Baffi M A, Tobal T J, Ghilardi Lago H, et al. Wine aroma improvement using a beta-glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(2): 493-501
- [12] Pogorzelski E, Wilkowska A. Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: A review [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2007, 22(4): 251-254
- [13] Bayonove C, Gunata Z, Cordonnier R. Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans le développement de l'arôme du jus de muscat avant fermentation: la production des terpénols [J]. Bulletin de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 1984. 57: 741-758
- [14] Aryan A P, Wilson B, Strauss C R, et al. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their β -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An assessment of possible applications in enology [J]. American Journal of Enology & Viticulture, 1987, 38(3): 182-188
- [15] Eschstruth A, Divol B. Comparative characterization of endo-polygalacturonase (Pgu1) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(3): 623-634
- [16] Lao C L, Lopez-Tamames E, Lamuela-Raventos R M, et al. Pectic enzyme treatment effects on quality of white grape musts and wines [J]. Journal of Food Science, 1997, 62(6): 1142-1149
- [17] Steensels J, Verstrepen K J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations [J]. Annual Review of Microbiology, 2014, 68(1): 61-80
- [18] Suarez-Lepe J A, Morata A. New trends in yeast selection for winemaking [J]. Trends In Food Science & Technology, 2012, 23(1): 39-50
- [19] 杨绍青,江正强. 微生物 β -葡萄糖苷酶的研究进展[C]. 第三届全国酶制剂研究开发应用技术研讨会, 2012:234-242
YANG Shao-qing, JIANG Zheng-qiang. Research progress on microbial β -glucosidases [C]. The 3rd National Symposium on Application Technology of Enzyme Preparation Research and Development, 2012: 234-242
- [20] Suárezlepe J A, Morata A. New trends in yeast selection for winemaking [J]. Trends in Food Science & Technology, 2012, 23(1): 39-50
- [21] Sabel A, Martens S, Petri A, et al. *Wickerhamomyces anomalus* AS1: A new strain with potential to improve wine aroma [J]. Annals of Microbiology, 2014, 64(2): 483-491
- [22] Chaves-Lopez C, Serio A, Osorio-Cadavid E, et al. Volatile compounds produced in wine by Colombian wild *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(4): 733-740
- [23] Gamero A, Hernandez-Orte P, Querol A, et al. Effect of aromatic precursor addition to wine fermentations carried out with different *Saccharomyces* species and their hybrids [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(1): 33-44
- [24] Schmidt S, Rainieri S, Witte S, et al. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* glucosidase that hydrolyzes flavonoid glucosides [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(5): 1751-1757
- [25] A. Mendes Ferreira, M. C. Climaco, A. Mendes Faia. The role of non-saccharomyces species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components-a preliminary study [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(1): 67-71
- [26] Hu K, Qin Y, Tao Y S, et al. Potential of glucosidase from non-saccharomyces isolates for enhancement of wine aroma [J]. Journal of Food Science, 2016, 81(4): M935-M943
- [27] Mateo J J, Stefano R Di. Description of the beta-glucosidase activity of wine yeasts [J]. Food Microbiology, 1997, 14(6):

- 583-591
- [28] Belancic A, Gunata Z, Vallier M J, et al. Beta-glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(5): 1453-1459
- [29] 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
- [30] Baffi M A, Martin N, Tobal T M, et al. Purification and characterization of an ethanol-tolerant beta-glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(7): 1681-1691
- [31] Swangkeaw J, Vichitphan S, Butzke C E, et al. The characterisation of a novel *Pichia anomala* beta-glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine [J]. Annals of Microbiology, 2009, 59(2): 335-343
- [32] Swangkeaw J, Vichitphan S, Butzke C E, et al. Characterization of beta-glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(2): 423-430
- [33] Lopez S, Mateo J J, Maicas S. Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aroma-enhancing properties in muscat wines [J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2014, 35(2): 292-303
- [34] Wang Y, Zhang C, Li J, et al. Different influences of beta-glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of cabernet gernischt and possible reason [J]. Food Chemistry, 2013, 140(1-2): 245-254
- [35] Genoves S, Gil J V, Manzanares P, et al. Candida molischiana beta-glucosidase production by *Saccharomyces cerevisiae* and its application in winemaking [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(6): 2096-2100
- [36] Cordero-Bueso G, Esteve-Zarzoso B, Mariano Cabellos J, et al. Biotechnological potential of non-saccharomyces yeasts isolated during spontaneous fermentations of malvar (*Vitis vinifera* cv. L.) [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(1): 193-207
- [37] Steensels J, Daenen L, Malcorps P, et al. Brettanomyces yeasts - from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 206: 24-38
- [38] Maturano Y P, Assof M, Fabani M P, et al. Enzymatic activities produced by mixed saccharomyces and non-saccharomyces cultures: Relationship with wine volatile composition [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 108(5): 1239-1256
- [39] Grimaldi A, McLean H, Jiranek V. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni* [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2000, 51(4): 362-369
- [40] 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(3-4): 292-296
- [41] 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
- [42] Ugliano M, Genovese A, Moio. 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
- [43] Boido E, Lloret A, Medina K, et al. Effect of ss-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
- [44] Ugliano M, Moio L. The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86(14): 2468-2476
- [45] Pérez-Martín F, Izquierdo-Cañas P M, Seseña S, et al. Aromatic compounds released from natural precursors by selected *Oenococcus oeni* strains during malolactic fermentation [J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(3): 609-618
- [46] Hernandez-Orte P, Lapena A C, Escudero A, et al. Effect of micro-oxygenation on the evolution of aromatic compounds in wines: Malolactic fermentation and ageing in wood [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2009, 42(1): 391-401
- [47] Michlmayr H, Eder R, Kulbe K D, et al. Beta-glycosidase activities of *Oenococcus oeni*: Current state of research and future challenges [J]. Mitteilungen Klosterneuburg, 2012, 62(3): 87-96
- [48] 魏明,杨超英,钱森和.固定化亚油酸异构酶制备及其性质

- [J].食品科学,2012,33(7):153-157
- WEI Ming, YANG Chao-ying, QIAN Sen-he. Preparation and properties of immobilized linoleate isomerase [J]. Food Science, 2012, 33(7): 153-157
- [49] Vasserot Y, Arnaud A, Galzy P. Evidence for muscat marc monoterpenol glucosides hydrolysis by free or immobilized yeast beta-glucosidase [J]. Bioresource Technology, 1993, 43(3): 269-271
- [50] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, et al. A very efficient beta-glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(8): 2336-2340
- [51] Gallifuoco A, Alfani F, Cantarella M, et al. Immobilized beta-glucosidase for the winemaking industry: Study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors [J]. Process Biochemistry, 1999, 35(1-2): 179-185
- [52] Riccio P, Rossano R, Vinella M, et al. Extraction and immobilization in one step of two beta-glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(3-4):123-129
- [53] Spagna G, Barbagallo R N, Greco E, et al. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(1): 80-89
- [54] Gonzalez-Pombo P, Farina 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
- [55] Romo-Sanchez S, Arevalo-Villena M, Garcia Romero E, et al. Immobilization of beta-glucosidase and its application for enhancement of aroma precursors in muscat wine [J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7(5): 1381-1392
- [56] Irving R A, Coia G, Roberts A, et al. Ribosome display and affinity maturation: From antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics [J]. Journal of Immunological Methods, 2001, 248(1-2): 31-45
- [57] Grabherr R, Ernst W, Oker-Blom C, et al. Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins [J]. Trends in Biotechnology, 2001, 19(6): 231-236
- [58] Bratkovic T. Progress in phage display: Evolution of the technique and its applications [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(5): 749-767
- [59] Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren P A, et al. Display of proteins on bacteria [J]. Journal of Biotechnology, 2002, 96(2): 129-154
- [60] Rockberg J, Lofblom J, Hjelm B, et al. Epitope mapping of antibodies using bacterial surface display [J]. Nature Methods, 2008, 5(12): 1039-1045
- [61] Govarts C, Somers K, Hupperts R, et al. Exploring cDNA phage display for autoantibody profiling in the serum of multiple sclerosis patients - Optimization of the selection procedure [J]. Autoimmunity, Part A: Basic Principles and New Diagnostic Tools, 2007. 1109: 372-384
- [62] Matsui K, Hirayama T, Kuroda K, et al. Screening for candidate genes involved in tolerance to organic solvents in yeast [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(1): 75-79
- [63] Klis F M, Boorsma A, Groot De P W J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2006, 23(3): 185-202
- [64] Lesage G, Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006, 70(2): 317-343
- [65] Sim L, Groes M, Olesen K, et al. Structural and biochemical characterization of the N-terminal domain of flocculin Lg-Flo1p from *Saccharomyces pastorianus* reveals a unique specificity for phosphorylated mannose [J]. Febs Journal, 2013, 280(4): 1073-1083
- [66] El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Vincent S P, et al. Forces in yeast flocculation [J]. Nanoscale, 2015, 7(5): 1760-1767
- [67] Hasunuma T, Yamada R, Kondo A. Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts [M]. John Wiley & Sons, Inc, 2014.
- [68] Inokuma K, Hasunuma T, Kondo A. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7(1): 8
- [69] Inokuma K, T Bamba, J Ishii, et al. Enhanced cell-surface display and secretory production of cellulolytic enzymes with *Saccharomyces cerevisiae* Sed1 signal peptide [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(11): 2358-2366
- [70] Packer M S, Liu D R. Methods for the directed evolution of proteins [J]. Nature Reviews Genetics, 2015, 16(7): 379-394
- [71] Ratananikom K, Choengpanya K, Tongtubtim N, et al. Mutational analysis in the glycone binding pocket of *Dalbergia cochinchinensis* β -glucosidase to increase catalytic

- efficiency toward mannosides [J]. Carbohydrate Research, 2013, 373(373C): 35-41
- [72] Fang W, Yang Y, Zhang X X, et al. Improve ethanol tolerance of beta-glucosidase Bgl1A by semi-rational engineering for the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 227: 64-71
- [73] 刘震, 朱秋亭, 石贤爱, 等. β -葡萄糖苷酶体外分子改造研究进展[J]. 福州大学学报, 2015, 4: 565-571
- LIU Zhen, ZHU Qiu-xiang, SHI Xian-ai, et al. Development in molecular modification of β -glucosidase *in vitro* [J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition), 2015, 4: 565-571
- [74] Guo B, Amano Y, Nozaki K. Improvements in glucose sensitivity and stability of *Trichoderma reesei* beta-glucosidase using site-directed mutagenesis [J]. Plos One, 2016, 11(1): e0147301
- [75] Giuseppe de P O, Campos Brasil Souza T d A, Moreira Souza F H, et al. Structural basis for glucose tolerance in GH1 beta-glucosidases [J]. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2014, 70: 1631-1639
- [76] Larue K, Melgar M, Martin J J Vincent. Directed evolution of a fungal beta-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 52
- [77] Karnaouri A, Topakas E, Paschos T, et al. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 beta-glucosidase from *Myceliophthora thermophila* [J]. PeerJ, 2013, 1(1): e46
- [78] Miao L L, Hou Y J, Fan H X, et al. Molecular structural basis for the cold adaptedness of the psychrophilic beta-Glucosidase BglU in *Micrococcus antarcticus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(7): 2021-2030
- [79] Souza V P, Ikegami C M, Arantes G M, et al. Protein thermal denaturation is modulated by central residues in the protein structure network [J]. Febs Journal, 2016, 283(6): 1124-1138
- [80] Zanphorlin L M, Giuseppe de P O, Honorato R V, et al. Oligomerization as a strategy for cold adaptation: Structure and dynamics of the GH1 beta-glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7 [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23776
- [81] Liu N, Qin Y, Song Y Y, et al. Aroma composition and sensory quality of cabernet sauvignon wines fermented by indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains in the eastern base of the Helan mountain, China [J]. International Journal of Food Properties, 2016, 19(11): 2417-2431
- [82] Fan L H, Zhang Z J, Yu X Y, et al. Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(33): 13260-13265

(上接第 156 页)

- [20] Araújo, Paula A, Machado I, et al. Combination of selected enzymes with cetyltrimethylammonium bromide in biofilm inactivation, removal and regrowth [J]. Food Research International, 2017, 95: 101-107
- [21] 林镗, 占伟海, 李小四, 等. Benzonase 酶对金黄色葡萄球菌生物膜的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 20: 3006-3009
- LIN Zhuo, ZHAN Wei-hai, LI Xiao-si, et al. Effect of benzonase on biofilms of *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2014, 20: 3006-3009
- [22] Tapia-Rodriguez M R, Hernandez-Mendoza A, Gonzalez-Aguilar G A, et al. Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces [J]. Food Control, 2017, 75: 255-261
- [23] Harmsen M, Lappann M, Susanne K, et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(7): 2271-2279
- [24] Cai L, Hua H, Lu Q, et al. Morphophysiological responses of detached and adhered biofilms of *Pseudomonas fluorescens* to acidic electrolyzed water [J]. Food Microbiology, 2019, 82: 89-98
- [25] Leckbach Y, Li Z, Xu D, et al. *Salvia officinalis* extract mitigates the microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm [J]. Bioelectrochemistry, 2019, 128: 193-203
- [26] Izano E A, Amarante M A, Kher W B, et al. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(2): 470-476