

文章编号:1673-1689(2007)02-0107-08

# $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展

李 华, 高 丽

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 介绍了葡萄和葡萄酒中  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究概况, 理化性质、酶活测定方法, 以及不同来源的酶活检测的研究概况, 并且经过分析提出以对硝基苯基  $\beta$ -D-葡萄糖苷(pNPG)为底物检测葡萄浆果中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的关键影响因素: 粗酶液的制备、酶最适反应温度、最佳反应时间、缓冲液类型和 pH 及最佳吸收波长。

**关键词:** 葡萄;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 活性

**中图分类号:** Q 55

**文献标识码:** A

## Research Advance on Methods of determining $\beta$ -Glucosidase Activity

Li Hua, GAO Li

(College of Enology, Northwest University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Aroma is one of the important factors that determining the character and quality of wine.  $\beta$ -glucosidase is a kind of key enzyme which releasing aroma precursors. In this manuscript, the progresses of the chemical properties, determination methods, and the source of  $\beta$ -glucosidase were reviewed. On the other hand, the key factors that involve in the  $\beta$ -glucosidase determination method with p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside as substrate as follow: temperature, reaction time, buffer type, pH and absorb wavelength.

**Key words:** grape;  $\beta$ -glucosidase; activities

典型的葡萄酒风味主要源于葡萄中的挥发性化合物, 然而葡萄浆果中存在着游离态和结合态两大类呈香物质。游离态呈香物质可以直接从葡萄酒中挥发出来, 使人产生嗅觉反应。结合态呈香物质没有香气, 必须经过分解释放出游离态呈香物质才能产生香气, 因此结合态呈香物质又被称为风味前体物质(Flavorprecursor)。通常, 以结合态形式存在的风味前体物质的含量比那些游离态的呈香物质要丰富得多。由于大部分呈香物质是以糖苷的结合态形式存在的, 没有芳香气味, 所以为了增

强和改善葡萄酒的香气, 必须将葡萄中的这些结合态呈香物质分解, 释放出游离态的呈香物质。酶解可以分解这类结合态的香气前体物质, 增加和改良葡萄汁和葡萄酒的花香和果香, 并且产生的香气浓郁、自然<sup>[1]</sup>。糖原的酶解需要各种酶, 大概可以分为两步<sup>[2]</sup>: 第一步:  $\alpha$ -L 鼠李糖苷酶、 $\alpha$ -L 阿拉伯糖苷酶、 $\beta$ -D 芹菜糖苷酶使糖链和鼠李糖、阿拉伯糖、芹菜糖和  $\beta$ -D 葡萄糖苷断裂, 鼠李糖、阿拉伯糖、芹菜糖和  $\beta$ -D 葡萄糖苷被释放出来; 第二步:  $\beta$ -D 葡萄糖苷酶作用后释放出单萜类物质。其中  $\beta$ -D 葡萄糖苷

收稿日期: 2006-12-29.

作者简介: 李华(1959-), 男, 重庆梁平人, 教授, 博导, 主要从事分子生物学及葡萄与葡萄酒方面研究. Email: putj@263.net

酶是结合态香气释放的关键酶,因此建立葡萄浆果和葡萄酒中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性的快速准确的分析方法和研究酿酒酵母和乳酸菌中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活

性,对于增强葡萄酒中的香气和提高葡萄酒的质量意义重大。

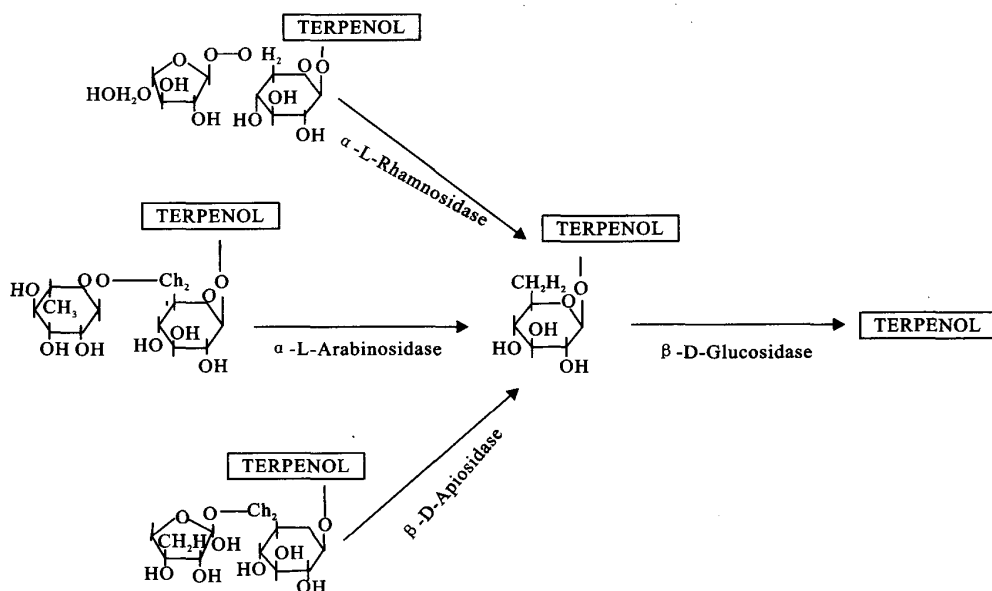


图1 香气前体物质的分解过程

Fig. 1 Sequential enzymatic hydrolysis of disaccharidic flavour precursors

## 1 $\beta$ -葡萄糖苷酶介绍

$\beta$ -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21),其英文名是 $\beta$ -glucosidase,属于水解酶类,又称 $\beta$ -D-葡萄糖苷水解酶,别名龙胆二糖酶、纤维二糖酶和苦杏仁苷酶,是纤维素分解酶系中重要组成成分之一。它属于纤维素酶类,能催化水解芳基或羟基与糖基原子团之间的糖苷键生成葡萄糖<sup>[3]</sup>。

根据其底物特异性将 $\beta$ -葡萄糖苷酶归类于羟基 $\beta$ -葡萄糖苷酶、纤维二糖酶、或水解羟基- $\beta$ 糖基和寡聚糖的酶类。又据 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因序列的不同有 $\beta$ -葡萄糖苷酶A和 $\beta$ -葡萄糖苷酶B之分。两者尽管同属 $\beta$ -葡萄糖苷酶,但其底物特异性却不尽相同<sup>[4]</sup>。

### 1.1 相对分子质量

$\beta$ -葡萄糖苷酶的相对分子质量一般在40 000~300 000之间。不同来源酶的相对分子质量由于其结构和组成不同而差异很大。如汪大受<sup>[5]</sup>从康氏木霉培养液中分离提纯的 $\beta$ -葡萄糖苷酶,测得其相对分子质量为77 000;而王沁<sup>[6]</sup>从黑曲霉发酵液中分离提纯了该酶,共得到4种酶组分,经凝胶电泳鉴定均为单一谱带,且其相对分子质量分别为

77 000, 67 000, 73 000, 43 000。宛晓春<sup>[7]</sup>从黑曲霉中纯化的酶用SDS凝胶电泳和凝胶过滤测得该相对分子质量在120 000左右;陈向东<sup>[4]</sup>研究日本根霉IF05318中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶是一种四聚体,由4个相对分子质量为 $1.0 \times 10^5$ 的相同大小的亚基组成。Day<sup>[8]</sup>等人从Agrobacterium中分离出的 $\beta$ -葡萄糖苷酶是一种二聚体,单体相对分子质量为50 000。从樱桃果实中分离的 $\beta$ -葡萄糖苷酶是一种相对分子质量为68 000左右的单体蛋白<sup>[11]</sup>。黑麦秧苗中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶是一全酶,相对分子质量为300 000,是由相对分子质量为60 000的单体所组成的低聚体<sup>[9]</sup>。

### 1.2 最适pH值及pH值稳定性

大部分 $\beta$ -葡萄糖苷酶均为酸性蛋白,等电点在酸性范围,并且变化不大,一般在3.5~5.5之间,最适pH值大都在酸性范围内<sup>[4-11]</sup>,但也可以超过7.0,而且酸碱耐受性强。如Paavilainen<sup>[10]</sup>等人从Alkalophilus中就分离出细胞外 $\beta$ -葡萄糖苷酶,其最适pH值就在6~9之间,而在pH值4.0~10.2以外还具有一定的催化活性。

### 1.3 最适温度及热稳定性

$\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度分布在30~110℃。

一般来说,来自古细菌的 $\beta$ -葡萄糖苷酶其热稳定性和最适温度要高于普通来源的葡萄糖苷酶。如古细菌 *Pyrococcus furiosus* 的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的最适温度是102~105℃,100℃时的半衰期为85 h<sup>[10]</sup>。

#### 1.4 底物专一性

几乎所有的 $\beta$ -葡萄糖苷酶对底物糖基结构的专一性都较差,能降解C-S键、C-N键、C-F键等,有些对糖基部分的C<sub>1</sub>和C<sub>2</sub>结构也不专一,能同时水解 $\beta$ -葡萄糖苷键和 $\beta$ -半乳糖苷糖,有些甚至C<sub>6</sub>位的专一性也不高,能水解木糖<sup>[10]</sup>。但在所有底物中, $\beta$ -葡萄糖苷酶对纤维二糖的活性最强,对人工合成的底物对硝基苯- $\beta$ -D-葡萄糖苷(pNPG)表现出较高的酶活性<sup>[8]</sup>。

#### 1.5 金属离子、抑制剂

葡萄糖是 $\beta$ -葡萄糖苷酶的典型抑制剂, $\delta$ -葡萄糖酸内酯、对氯高汞苯甲酸、异丙基- $\beta$ -D-硫代葡萄糖苷对一定来源的酶表现出抑制作用。 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、SDS、EDTA和脲对大部分酶抑制作用较明显。 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 对一定来源的酶有明显的激活作用<sup>[5-6]</sup>。

## 2 葡萄和葡萄酒中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究

葡萄酒中的萜烯类化合物的水解通过两种方式,一类是酸解,一类是酶解。酶解和酸解相比具有高效、专一性强、条件温和、副作用小、糖原分子不会发生重排等特点<sup>[12]</sup>,因此在实际应用中一般采用酶解方法来分解结合态呈香物质,增强和改善葡萄酒香气。但是内源的 $\beta$ -葡萄糖苷酶在典型葡萄酒的低pH、高酒精浓度、葡萄糖存在和无氧密闭环境中,活性受到抑制、没有活性或者活性很低<sup>[13-15]</sup>。微生物来源的糖苷酶活性受抑制的程度与菌株的种类和特性有关<sup>[16-18]</sup>。例如,Delcroix等<sup>[17]</sup>检测了3株*Saccharomyces cerevisiae*菌株的 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性,得出95%的菌株在葡萄酒的环境下没有酶水解活性;相反地Rosi等<sup>[19]</sup>发现*Debaryomyces hansenii*的最佳pH是3.2。现在一些国家法律允许通过含有一定 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的酵母菌乳酸菌来增强和改良葡萄酒的香气,但是在酿酒工艺过程中通过添加混合酶制剂来改良葡萄酒的香气是不合法的<sup>[20]</sup>。近年来,许多学者致力于调查来源于葡萄酒的酵母菌<sup>[21,22]</sup>、乳酸菌<sup>[23-25]</sup>的葡萄糖苷酶活性,或者在葡萄酒中筛选葡萄糖苷酶活性高的酵母菌<sup>[21]</sup>、乳酸菌<sup>[23,24]</sup>,来改良和增强葡萄汁和葡萄酒的香气。Mateo等<sup>[21]</sup>检测了一些

酵母菌株中的糖苷酶活性,发现*Saccharomyces*的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与葡萄糖含量有关,在200 g/L的糖含量的培养基中酶活性减少40%,但在50%~5%酒精度的培养基中酶活性受到抑制,因此该菌株适用于葡萄酒发酵的初期。*Oenococcus oeni*具有 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性,且酶活性在典型的葡萄酒环境pH(3.0~4.0)、残糖质量浓度大于20 g/L、酒精体积分数12%,仍具有很好的水解活性<sup>[23]</sup>。这说明*O. oeni*在葡萄酒发酵后期可以作为一种葡萄糖苷酶来源。

## 3 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的测定

### 3.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的测定方法

目前对于 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的测定方法很多,概括起来主要有电化法、荧光法、分光光度法等<sup>[26]</sup>。

1) Barush和Swiain法,也就是分光光度法:它以水杨苷作底物,将水杨苷裂解为水杨醇和葡萄糖,然后将酶解产物中的水杨醇用4-氨基安替比林显色,再用分光光度法比色测定;或者对所产生的葡萄糖用DNS试剂显色后进行比色测定;也可用熊果苷( $\beta$ -葡萄糖苷-对苯二酚)作为底物,对产生的葡萄糖可用碘量法加以测定。

2) 荧光法:用4-甲基伞形酮 $\beta$ -D-葡萄糖苷作为底物,经 $\beta$ -葡萄糖苷酶作用,专一地分解为4-甲基伞形酮,利用伞形酮(7-羟基香豆素)与4-甲基伞形酮具强烈荧光的特点,通过测定酶解游离出的4-甲基伞形酮的荧光吸光度来计算酶的活性。

3) 比色法,以对硝基苯基 $\beta$ -D-葡萄糖苷(pNPG)为底物进行酶解,底物水解后释放出来的对硝基苯酚在400~420 nm可见光范围内有特征吸收峰,可直接在400~420 nm之间比色测定。

4) 最近梁华正<sup>[28]</sup>等人研究了以京尼平苷为底物检测 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性的一种新方法。京尼平苷经 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解后产生京尼平,京尼平能与氨基酸反应生成稳定的蓝色,在590 nm处有特征吸收峰。 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力在0.05~1 U/mL范围内呈线性关系,最低检出限为0.02 U/mL。

另外还有电化法,该方法是以扁桃苷为底物,根据所产生的氢化物,用与自发(内)电解池相联结的一对银-铂电极的发放来测定其 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性(Guilbault, 1969)。

以水杨苷为酶反应底物的Barush和Swiain法检测的是经 $\beta$ -葡萄糖苷酶水解底物产生的极微量的葡萄糖,反应易受干扰,且检测灵敏度不高<sup>[31]</sup>。荧光法最初用于酶含量低的高等动物组织中的 $\beta$

葡萄糖苷酶的监测,灵敏度高且快速,但是由于实验过程操作复杂,且重现性不好<sup>[27]</sup>,现在应用不多。以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶底物的比色法最为普遍,且在实验中该方法操作简单,快速,灵敏度

高,重现性好。以京尼平苷为底物检测 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性的方法与pNPG法相比,灵敏度低,但是精密度和准确度较好,结果稳定。

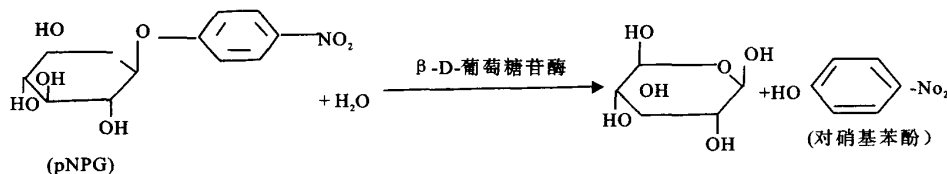


图2  $\beta$ 葡萄糖苷酶催化对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷(pNPG)水解反应的方程式<sup>[27]</sup>

Fig. 2 The chemical equation of  $\beta$ -D-glucosidase hydrolysis para-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucoside (pNPG)

### 3.2 微生物的 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性的测定

微生物中 $\beta$ 葡萄糖苷酶含量丰富,并且和葡萄酒中内源的糖苷酶相比,在葡萄酒低pH、高酒精浓度、葡萄糖存在并且是无氧密闭的环境下,活性高,增香效果好<sup>[19-25]</sup>。微生物中 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性检测普遍采用以对硝基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷为酶底物的比色法<sup>[21-25,29]</sup>。Mcmahon<sup>[30]</sup>等采用此方法检测10株不同的霉菌,其中7株菌株的 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性在575~2650 nmol/mL,且实验数据重现性好。

另外,国内也有采用以水杨酸为底物,然后通过DNS法测定还原糖含量来计算酶活性<sup>[31]</sup>。该实验检测的是反应生成的极微量的葡萄糖,反应易受干扰,且检测灵敏度不高,误差大,不适用于植物中低含量的葡萄糖苷酶的检测。

### 3.3 植物组织中 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性的测定

**3.3.1 葡萄浆果中 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性的测定** 目前葡萄和葡萄汁、葡萄酒中 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性的检测方法有两种:一种是以对硝基苯- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷为酶底物的比色法测定 $\beta$ 葡萄糖苷酶的活性<sup>[32-36]</sup>;另一种是将香叶脂、醇花脂、香茅脂、2-苯基-乙基-里哪脂、 $\alpha$ -松油脂加入酶提取液中,酶反应条件与比色法相似,然后用己糖激酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶检测葡萄糖的生成量<sup>[35]</sup>。以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶反应底物的缺点是酶解反应生成的对硝基苯酚在溶液中显黄色,与禾秆黄颜色的葡萄汁和葡萄酒颜色相近,其颜色干扰对硝基苯酚在400 nm左右的吸光度。Tate等<sup>[33]</sup>研究以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶底物检测发酵玫瑰香型葡萄汁中的糖苷酶活性,没有直接检测葡萄汁和葡萄酒中的 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性。检测时先处理样品以减少葡萄汁、葡萄酒本来的颜色和蛋白质的干扰,初

步分离纯化出纯度较高的 $\beta$ 葡萄糖苷酶,然后再检测酶活性。

**3.3.2 其它植物组织中 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性的测定方法** 王夫华等<sup>[37]</sup>用以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶底物的比色法,测定了不同品种的茶鲜叶 $\beta$ 葡萄糖苷酶的活性。江昌俊等<sup>[26]</sup>以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶底物,研究了茶叶中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性的测定条件。该实验研究了缓冲液pH值、底物浓度、反应温度和时间等条件对酶活性的影响。结果表明,20 mg茶树鲜叶粗酶提取液在pH值为5.0~6.0的缓冲液中,酶反应底物浓度为10 mmol/L,49℃条件下反应120 min,在400 nm检测下,能得到最佳酶活检测方法。董尚胜<sup>[38]</sup>等研究了茉莉花 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性测定条件,实验结果得出,在405 nm处对硝基苯酚的吸收波长与浓度线性相关性最好;比色稀释液pH为10、12时吸光度最大,显色效果最好;反应温度和时间是30℃、37℃条件下8 h内的酶促反应线性关系较好,且37℃的产物生成速度较快,45℃条件下2~8 h的产物生成速度缓慢,且生成总量低于37℃的。宋晓青<sup>[7]</sup>也选用以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶底物的比色法,探讨了蜡梅花 $\beta$ 葡萄糖苷酶的活性检测方法。

## 4 用比色法测定 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性时的影响因素

目前微生物和植物中糖苷酶活性分析检测以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷为酶底物的比色法最为普遍,且在实验中该方法操作简单,快速,灵敏度高,重现性好。但是在测定过程中发现因不同来源的酶理化性质有所差异,具体检测中条件各不相同。葡萄汁和葡萄酒中的 $\beta$ 葡萄糖苷酶活性检测,

可从以下几个方面优化。

4.1 粗酶液制备

在测定 β-葡萄糖苷酶活性时,粗酶液的提取方法可以分为两大类。一类是先把提取材料制作成冰丙酮粉末,室温干燥,保存备用<sup>[37-40]</sup>。另一种方法是把新鲜材料采摘后立刻在-20℃保存,制成酶粗提液后测定酶活<sup>[26,36,41]</sup>。另外 pvp 的加入量也直接影响 β-葡萄糖苷酶活性大小。董尚胜<sup>[21]</sup>等发现,在茶叶和茉莉花制作 β-葡萄糖苷酶粗提液时,pvp 的加入量与材料等量,则酶活性最大,加入 pvp 量比材料量大时对酶活影响不大。

表 2 不同 PVP 加入量对 β-D-葡萄糖苷酶活性的影响

Tab.2 Effect of P)VP concentration on β-D-glucosidase activity

| PVP 加入量/g | 活性单位/(△OD/(mL·h)) | 相对酶活性/% |
|-----------|-------------------|---------|
| 0         | 0.0292            | 100     |
| 1.25      | 0.0304            | 104     |
| 2.50      | 0.0404            | 138     |
| 3.75      | 0.0372            | 127     |
| 5.00      | 0.0385            | 132     |

4.2 底物浓度

底物浓度是决定酶反应速度的因素。在低的底物浓度时,反应速度与底物浓度成正比;当底物浓度增大时,增加底物浓度,反应速度虽随之增加,但不再与底物浓度成正比;当底物浓度增加到一定程度以后,反应速度不受底物浓度的影响而趋于恒定,达到了测定酶活性时底物过量的要求。以 pNPG 为底物检测酶活时,底物浓度常取 0.1~10 mmol/L<sup>[42]</sup>。车健美<sup>[43]</sup>等研究得出尖孢镰刀菌中 β-D-葡萄糖苷酶活性在底物浓度达到 4 mmol/L 时,酶活力达到最大;底物浓度继续增加,酶活力基本保持不变。

4.3 最适温度

每一种酶在一定条件下,只有在某一温度时表现最大活性,即最适温度。但它受其他条件如底物作用时间和 pH 值等的影响而改变。当其他规定条件不变时,温度每改变 1℃,反应速度可相差 10% 以上,所以反应须在恒温槽内进行,且所有试剂应该在反应开始前就达到需要的温度。有时,温度也可以人为规定为 20℃、30℃等。以水杨素为底物测 β-葡萄糖苷酶活性时最适温度为 50℃<sup>[10]</sup>。李平<sup>[42]</sup>以 pNPG 为酶底物在 pH 4.5、保温 10 min 后测得黑曲霉中的 β-葡萄糖苷酶最适温度为 50℃。

车健美<sup>[25]</sup>等以 pNPG 为底物研究尖孢镰刀菌中 β-D-葡萄糖苷酶活性时得到,随着温度的升高,酶活力逐渐增大,但是当温度升高到 50℃时,酶活力开始下降。

4.4 反应时间

精确反应时间。由于反应速度是通过测定一定时间内底物或者产物量变化而求得的,因此计时的精确性十分重要。如果保温 10 min,计时误差达 1 min,那么仅计时引起的测定误差就达 10%<sup>[44]</sup>。李平<sup>[42]</sup>得出保温 10 min 是酶最佳反应时间。

4.5 缓冲液类型和 pH 值的选择

酶的活性与作用底物的氢离子浓度有很大关系。同一种酶在不同 pH 值下测定的活性不同。只有在某种缓冲液和某种 pH 值范围内才表现出最大活性,即所谓最适 pH 值。一般认为酶分子处在最适 pH 值时,其活性基因的解离状态最易与底物结合;而处在其他 pH 值时,改变了活性基因的解离状态,酶和底物结合减弱,活性就降低。pH 值对酶稳定性影响很大,在最适 pH 值的一侧或两侧都可能导致酶的不可逆破坏。宋晓青<sup>[8]</sup>在蜡梅花 β-葡萄糖苷酶的活性分析、分离纯化与性质的初步研究硕士论文中,分别对醋酸-醋酸钠、柠檬酸-磷酸二钠和柠檬酸-柠檬酸三钠 3 种缓冲液在 pH 值 4、5、6 时的酶活性作了研究。从试验结果发现,当 pH 为 5.0 时,各缓冲液处理的酶活力均达到最高,且柠檬酸-柠檬酸三钠处理的酶活力均明显高于其余 2 种缓冲液。这可能是由于柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液可以作为螯合剂,起到络合金属离子,防止酶聚合失活的作用<sup>[44]</sup>。由此可见,pH5.0 的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液用于提取、测定蜡梅 β-葡萄糖苷酶活性效果最好。

4.6 最佳吸收波长的选择

选择最佳波长,对硝基苯酚在 400~420 nm 可见光范围内有特征吸收峰。目前,用比色法即以对硝基苯基-β-D-葡萄糖苷为酶底物检测-β-D-葡萄糖苷酶活性,检测所用的波长不一样。董尚胜等测定茉莉花中 β-D-葡萄糖苷酶活性时得到的对硝基苯酚的最佳波长是 405 nm<sup>[39]</sup>。江昌俊等测定茶叶中的 β-D-葡萄糖苷酶活性时得到的对硝基苯酚的最佳波长是 400 nm<sup>[26]</sup>。

5 讨 论

据报道,已检出的葡萄酒中的挥发性香气成分有 800 多种<sup>[45-47]</sup>,主要包括萜烯类、脂类、醛酮类及醇类等,其中含量较高的萜烯类香气的生成主要依

赖于 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的催化作用。因此确定葡萄酒中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的测定方法,将对今后进一步研究葡萄酒中香气成分和香气形成的机理具有重要意义。目前茶叶、茉莉花和蜡梅花中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性的测定方法研究比较成熟,但是国内关于葡萄酒中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的活性测定方法的

研究还未见报道。使用比色法检测不同来源的糖苷酶活性的测定条件控制各不相同,因此葡萄浆果中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定条件也需要深入研究,从而建立快速准确的酶活检测方法,进一步优化葡萄酒的工艺,增强葡萄酒的香气。

## 参考文献(References):

- [1] Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, et al. A very efficient  $\beta$ -Glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and precursors of wines and fruit juices[J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44: 2336—2340.
- [2] Gunata Y Z, Bitteur S, Brillouet, et al. Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape[J]. *Cabohyd Res*, 1988, 184: 139—149.
- [3] 李远华.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(4): 421—425.  
LI Yuan-hua. Research Progress on  $\beta$ -glucosidase [J]. *Journal of anhui agricultural university*, 2002, 29(4): 421—425. (in Chinese)
- [4] 陈向东, 藤尾雄策. 日本根霉 IF05318 胞外 $\beta$ -葡萄糖苷酶的纯化及部分特性[J]. 微生物学报, 1997, 37: 368—373.  
CHEN Xing-dong, Yusaku Fujio. Purification and some properties of extracellular  $\beta$ -glucosidase from rhizopus japonicus IFO5318[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1997, 37: 368—373. (in Chinese)
- [5] 汪大受. 康氏木霉纤维素中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的提纯与性质[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 12(3): 687—691.  
WANG Da-shou. The purify and character of  $\beta$ -Glucosidase in Wooden mildew cellulose[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1998, 12(3): 687—691. (in Chinese)
- [6] 王沁, 赵学慧. 黑曲霉 $\beta$ -葡萄糖苷酶的纯化与性质[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1992, 31(6): 687—691.  
WANG Qin, Zhao Xue-hui. Purification and properties of  $\beta$ -Glucosidase from aspergillus niger[J]. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 1992, 31(6): 687—691. (in Chinese)
- [7] 宛晓春. 水果风味及风味酶的研究[D]. 无锡: 无锡轻工业大学, 1992.
- [8] 宋晓青. 腊梅花 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性分析、分离纯化与性质的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [9] 张喆, 赵红, 周兴旺, 等. 福寿螺 $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化及性质的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(2): 287—291.  
ZHANG Zhe, ZHAO Hong, ZHOU Xin-wang, et al. Preliminary studies on isolation, purification and some properties of  $\beta$ -Glucosidase from ampullarium crossean[J]. *Journal of xiamen university(natural science)*, 1999, 38(2): 287—291. (in Chinese)
- [10] 彭喜春, 彭志英.  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究现状及应用前景[J]. 江苏食品与发酵, 2001, (4): 22—25.  
PENG Xi-chun, PENG Zhi-ying. The current researching situation, the applying and the prospect of  $\beta$ -glucosidase [J]. *Jiangsu Food and Fermentation*, 2001, (4): 22—25. (in Chinese)
- [11] 陈清西, 石艳. 福寿螺 $\beta$ -葡萄糖苷酶在脲溶液中失活动力学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(1): 102—106.  
CHEN Qin-xi, SHI Yan. Kinetics of Inactivation of  $\beta$ -glucosidase from ampullarium crossean in urea solutions[J]. *Journal of Xiamen University(Natural Science)*, 2000, 2000, 39(1): 102—106. (in Chinese)
- [12] Williams P J, Strauss C R, Wilson B. Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of Muscat grapes[J]. *J Agric Food Chem*, 1980, 28: 766—771.
- [13] Mateo J J, Jimenez M. Monoterpene in grape juice and wines[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 881: 557—567.
- [14] Gunata Y Z. Recherches sur la fraction liee de nature glycosidique de l'arome du raisin ; importance des terpenylglycosides, action des glycosidase[D]. Montpellier: Universite des Sciences et Techniques du Languedoc, 2000.
- [15] Selli S, Cabaroğlu T, Canbas A, et al. Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasi grown in central Anatolia

- [J]. *Food Chemistry*, 2004, 85: 207—213.
- [16] 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]. *Am J Enol Vitic*, 1987; 38: 1982—1988.
- [17] Delcroix A, Gunata Z, Sapis J C, et al. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of muscat wine[J]. *Am J Enol Vitic*, 1994; 45: 291—296.
- [18] Rosi I, Vinella M, Domizio P. Characterization of β-glucosidase activity in yeasts of oenological origin[J]. *J Appl Bacteriol*, 1994, 77: 519—527.
- [19] Rosi I, Vinella M, Gheri, et al. Enzymatic hydrolysis of monoterpene glycosides of different grape varieties by an immobilized yeast β-glucosidase [C]. *Proceedings for the 4th International symposium on cool climate viticulture and enology*, Vol V1, 1997, 84—89.
- [20] Gunata Z, Bayonove C, Baumes R, et al. Stability of free and bound fractions of some aroma components of grape cv. Muscat during the wine processing[J]. *Am J Enol Vitic*, 1986, 37: 112—114.
- [21] Mateo J J, Stefano R D. Description of the β-glucosidase activity of wine yeasts[J]. *Food Microbiology*, 1997, 14: 583—591.
- [22] Gunata Z, Dugelay I, Vallier M J, et al. Multiple forms of glycosidases in an enzyme preparation from *Aspergillus niger*: Partial characterization of a β-glucosidase[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 21: 39—44.
- [23] 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: 233—244.
- [24] 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 Microb Technol*, 2004, 34: 292—296.
- [25] Incecco N, Bartowsky B, Kassara S, et al. Release of glycosidically bound flavour compounds of chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation[J]. *Food Microbiology*, 2004, 21: 257—265.
- [26] 江昌俊, 李叶云. 茶叶中 β-D-葡萄糖苷酶活性测定条件的研究[J]. 安徽农业大学学报, 1999, 26(2): 212—215.  
JIANG Chang-jun, LI Ye-yun. Studies on testing conditions of β-D-Glucosidase activity in tea[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 1999, 26(2): 212—215. (in Chinese)
- [27] Robinson D. The fluorimetric determination of β-Glucosidase: its occurrence in the tissues of animals, including insects [J]. *Biochemistry Journal*, 1956, 63: 39—42.
- [28] 梁华正, 刘富梁, 彭玲西等. 京尼平苷为底物测定 β-葡萄糖苷酶活力的方法[J]. 食品科学, 2006, 27(4): 182—185.  
LIANG Hua-zheng, LIU Fu-liang, PING Lin-xi, et al. Method for Determination of β-glucosidase Activity for Geniposide[J]. *Food Science*, 2006, 27(4): 182—185. (in Chinese)
- [29] Van den Bremt K, Delvaux F R, Verachtert H, et al. Biongeneration of flavors: performance of candida methanolovescens strains in nonalcoholic beer[J]. *American Society of Brewing Chemist Inc*, 2001, 80—83.
- [30] McMahon H, Zochlein B W, Fugelsang K, et al. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria[J]. *J Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 23: 198—203.
- [31] 陈守文, 陈九武, 赵山. 利用黑曲霉 β-葡萄糖苷酶改善葡萄酒的风味[J]. 中国酿造, 1993, (3): 17—19.  
CHEN Shou-wen, CHEN Jiu-wu, ZHAO Shan. Using *Aspergillus niger* β-Glucosidase improve the flavor of wine[J]. *China Brewine*, 1993, (3): 17—19. (in Chinese)
- [32] Williams P J, W Cynkar, IL Francis, et al. Quantification of glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl glucose[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43: 121—128.
- [33] Tate D, Reynold A D. Validation of a rapid method for measuring β-Glucosidase activity in fermenting grape musts[J]. *Am J Enol Vitic*, 2006, 57(1): 60—68.
- [34] Sefton M A. Hydrolytically-released volatile secondary metabolites form a juice sample of *Vitis vinifera* grape cvs merlot and cabernet sauvignon[J]. *Aust J Grape wine Res*, 1998, 4: 30—38.
- [35] Lecas M, Gunata Y Z, Sapis J C, et al. Purification and partial characterization of β-glucosidase from grape[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30: 451—454.
- [36] 余兴. 葡萄生育期及采后紫外处理后白藜芦醇及其糖苷的变化研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2005.

- [37] 王华夫,游小清. 茶叶中 $\beta$ 葡萄糖苷酶活的测定[J]. 中国茶叶,1996,(3):16—17.  
WANG Hua-fu, YOU Xiao-qin. Determining  $\beta$ -Glucosidase activity of tea[J]. **China Tea**, 1996,(3):16—17. (in Chinese)
- [38] 董尚胜,童启庆,渡边修治,等. 茉莉花中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的探讨[J]. 福建茶业,1997,(4):23—25.  
DONG Shang-shen, TONG Qi-qin, Du B X Z. Discus condition of determining  $\beta$ -Glucosidase activity jasminum sambac ait [J]. **Fujian Tea**, 1997,(4):23—25. (in Chinese)
- [39] 董尚胜,童启庆,渡边修治等. 茉莉花粗酶液提取条件对 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 中国茶叶加工,1997,(2):32—33.  
DONG Shang-shen, TONG Qi-qin, DU B X Z. Extraction condition of Jasminum sambac ait thick enzyme effect  $\beta$ -Glucosidase activity[J]. **China Tea Process**, 1997,(2):32—33. (in Chinese)
- [40] Gunata YZ, Bayonove CL, Taiero C, et al. Hydrolysis of grape monoterpenyle  $\beta$ -Glucosidase by various glucosidases[J]. **J Agric Food Chem**, 1990,36:1232—1236.
- [41] Gunata Z, Blondeel C, Vallier MJ, et al. An Endoglycosidase from grape berry skin of cv. M. Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides[J]. **J Agric Food Chem**, 1998,46:2748—2753.
- [42] 李平,宛晓春,丁霄霖,等. 黑曲霉 $\beta$ 葡萄糖苷酶的活力测定和酶学性质[J]. 安徽农业大学学报,1998,25(3):304—309.  
LI Pin, WAN Xiao-chun, DING Xiao-lin. Determine and Characteristics of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* [J]. **Journal of Anhui Agricultural University**, 1998,25(3):304—309. (in Chinese)
- [43] 车健美,刘波,朱育请,等. 尖孢镰刀菌中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性测定条件的研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(1):126—128.  
CHE Jian-mei, LIU Bo, ZHU Yu-jin. Studies on testing conditions for  $\beta$ -D-glucosidase activity in fusarium oxysporum[J]. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**, 2006,28(1):126—128. (in Chinese)
- [44] 罗贵民,曹淑桂,张今. 酶工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [45] 李华. 现代葡萄酒工艺学[M]. 西安:山西人民出版社,2000.
- [46] 李华. 葡萄酒品尝学[M]. 北京:中国青年出版社,1992.
- [47] Selli S, Cabaroglu T, Canbas A, et al. Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasi grown in central Anatolia [J]. **Food Chemistry**, 2004,85:207—213.

(责任编辑:杨萌)