

酒酒球菌 31MBR 的 β -D-葡萄糖苷酶活性

李亚辉, 崔禾苗, 董梅, 樊明涛*

(西北农林科技大学 食品学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 以对-硝苯- β -葡萄糖苷为底物, 采用分光光度法对酒酒球菌 31MBR 的 β -D-葡萄糖苷酶活性进行了初步研究。结果表明: 酒酒球菌 31MBR 具有很高的 β -D-葡萄糖苷酶活性, 该酶为胞内酶, 且主要为可溶性酶, 酶活在对数生长中期最高且随着生长时间的延长呈下降趋势。 β -D-葡萄糖苷酶为结构酶, 但在纤维二糖和熊果苷的诱导下酶活均有不同程度的提高。酒酒球菌 31MBR 具有 β -D-葡萄糖苷酶活性对增加葡萄酒香气和提高葡萄酒品质具有重要意义。

关键词: 酒酒球菌; β -D-葡萄糖苷酶; 酶活定位; 酶活诱导

中图分类号: TS 26 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)08—0799—04

Assessment of β -D-Glucosidase Activity of *Oenococcus oeni* 31MBR

LI Ya-hui, CUI He-miao, DONG Mei, FAN Ming-tao*

(College of Food Science and Engineering, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: β -D-glucosidase activity of *Oenococcus oeni* 31MBR was assayed spectrophotometrically with synthetic substrate p-nitrophenyl β -D-glucopyranoside. Results showed that *Oenococcus oeni* 31MBR exhibited considerable β -D-glucosidase activity, which was mainly intracellular form and soluble enzyme. Enzyme activity was highest at the mid-log phase, and showed a downtrend after this period. β -D-glucosidase of *Oenococcus oeni* 31MBR was constitutive, however, increased enzyme activities were observed when induced with both arbutin and cellobiose. *Oenococcus oeni* 31MBR proved potential for aroma enhancement during malolactic fermentation, this is significant for winemaking.

Keywords: *Oenococcus oeni*, β -D-glucosidase, localization, induction

优质葡萄酒不仅表现在外观、口感等方面, 更体现在香气方面, 香气是影响葡萄酒质量的主要因素之一^[1]。葡萄浆果中存在着结合态和游离态两大类呈香物质^[2-3]。结合态呈香物质的含量比游离态呈

香物质要丰富得多, 并且大部分以糖苷的形式存在。结合态呈香物质虽没有香气, 但经过分解可以释放出游离态香气物质, 大大增强和改善葡萄酒的风味^[4-5], 因此结合态呈香物质又被称为风味前体物

收稿日期: 2012-11-12

基金项目: 国家葡萄产业技术体系专项项目(nycytx-30-ch-03)。

作者简介: 李亚辉(1985—), 男, 河南平顶山人, 工学博士, 主要从事食品生物技术方面的研究。E-mail: liqianhao217@126.com

* 通信作者: 樊明涛(1963—), 男, 陕西富平人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: fanmt@nwsuaf.edu.cn

质是葡萄酒香气的一个重要来源。葡萄酒中糖苷类物质的分解主要分为弱酸水解和酶促水解^[6-8]。酸解发生缓慢,对温度、pH 等均有严格的要求,且会影响释放出物质的性质,产生不良风味^[9-10],因此不适用于葡萄酒酿造工业中应用。而酶解则是一种接近于自然、温和的水解方法,极具商业化应用前景。在葡萄酒酿造中一般采用酶解的方法来分解风味前体物质增强葡萄酒香气^[9,11-12]。糖苷类物质的酶解需要多种酶的共同参与,其中 β -D-葡萄糖苷酶是结合态香气释放的关键酶^[3]。

微生物中 β -D-葡萄糖苷酶酶活高的菌株主要是霉菌^[13],而乳酸菌中也有一些菌株具有较高的糖苷酶活性。酒酒球菌 31MBR 是在我国广泛应用的一株商业葡萄酒酿造乳酸菌,具有良好的苹果酸乳酸发酵性能。但目前关于该菌 β -D-葡萄糖苷酶活性的研究还未见报道。作者对酒酒球菌 31MBR 进行了 β -D-葡萄糖苷酶活的定位测定、不同生长时期酶活的测定以及酶的诱导测定。这对开发酒酒球菌 31MBR 的新功能,增强葡萄酒的香气、提高中国地区葡萄酒的品质具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酒酒球菌 31MBR;西北农林科技大学葡萄酒学院微生物实验室保藏。

对-硝苯- β -葡萄糖苷(p-NPG):美国 Sigma 公司;葡萄糖、纤维二糖、熊果苷:美国 Amersc 公司;其他试剂均为西陇化学试剂。

ATB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L,葡萄糖 10 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, pH 值调至 4.8, 121 °C 灭菌 20 min。

DH-420A 电热恒温培养箱:北京科伟永兴仪器有限公司;HC-3018R 高速冷冻离心机:安徽中科中佳科学仪器有限公司;HS-840 μ 型水平层流单人净化工作台:苏州净化设备有限公司;UV-3802H 紫外可见分光光度仪:上海尤尼柯仪器有限公司;VC-130 超声波细胞破碎仪:美国 Sonics & Materials 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化及生长曲线测定 将冷冻保藏的 31MBR 菌株于 ATB 培养基中 25 °C 静置培养,然后在同样培养基中再转接 2 次,分别培养 2 d。将活化

好的菌悬液以 1% 接种体积分数转接至 100 mL ATB 培养基中,25 °C 静置培养,每隔 4 h 测定一次 OD_{600} 值,直至 OD_{600} 值稳定。

1.2.2 β -D-葡萄糖苷酶活测定方法 酶活测定方法参照 Barbagallo^[14]略作修改。0.5 mL 处理样品与 0.5 mL 2 \times 底物磷酸柠檬酸缓冲液(pH 5.0, p-NPG 5 mmol/L)混合均匀,30 °C 水浴反应 1 h,离心 10 min (4 °C, 10 000 g) 得上清液,上清液中加入 2 mL Na_2CO_3 (1 mol/L)终止反应,最后在 400 nm 下比色。标准曲线由不同浓度(0~200 μ mol/L)的对硝基苯酚(p-NP)与 Na_2CO_3 (1 mol/L)混合在 400 nm 下比色获得。菌体干重由 50 mL 菌液离心、烘干、称重获得。酶活单位定义为:p-NP μ mol/(g \cdot min)。

1.2.3 31MBR 不同部位酶活的测定 将酒酒球菌 31MBR 培养至 36 h(对数生长末期),按下列步骤分别获得菌液上清液、完整细胞、细胞破碎液上清液和细胞破碎液沉淀 4 个处理样品。取 1 mL 菌液离心 10 min(4 °C, 5 000 g),得菌体和培养基上清液。菌体用 NaCl(150 mmol/L)洗涤两次得完整细胞。完整细胞悬浮于 1 mL PBS buffer (NaCl 140 mmol/L; KCl 2.7 mmol/L; Na_2HPO_4 10 mmol/L; KH_2PO_4 1.8 mmol/L; pH 7.4),超声波 100 W 破碎 10 min,然后离心 10 min(4 °C, 10 000 g)得破碎上清液和破碎沉淀。按照 1.2.2 方法分别测不同样品的酶活。

1.2.4 31MBR 不同生长阶段酶活的测定 分别在对数生长期(20 h)、对数生长末期(36 h)和稳定期(50 h)取样,按照 1.2.3 方法分别测菌液上清液、完整细胞和细胞破碎液酶活。

1.2.5 31MBR 葡萄糖苷酶的诱导测定 分别以葡萄糖(10 g/L)、纤维二糖(10 g/L)、熊果苷(10 g/L)、葡萄糖(5 g/L)加熊果苷(5 g/L)和葡萄糖(5 g/L)加纤维二糖(5 g/L)作为培养基中的碳源,培养酒酒球菌 31MBR 至对数生长末期(36 h),按照 1.2.3 方法分别测菌液上清液、完整细胞和细胞破碎液的酶活。

2 结果与分析

2.1 酒酒球菌 31MBR 生长曲线

由图 1 可知,8~36 h 为 31MBR 的对数生长期,36 h 之后为稳定期。因此作者分别在 20 h(对数生长期)、36 h(对数生长末期)和 50 h(稳定期)取样测定 31MBR 不同生长时期的酶活。

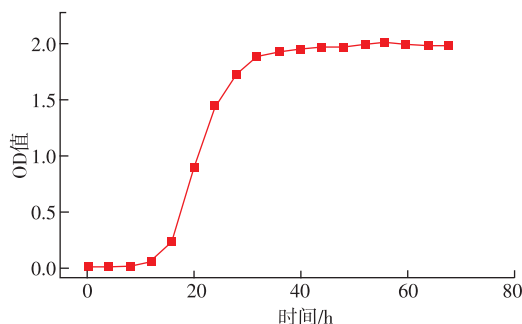


图 1 31MBR 生长曲线

Fig. 1 Growth curve of 31MBR

2.2 31MBR 不同部位的酶活

图 2 显示了酒酒球菌 31MBR 的 β -D-葡萄糖苷酶定位测定结果。菌液上清液中酶活很低,几乎为零,说明在 31MBR 生长过程中分泌到胞外的 β -D-葡萄糖苷酶很少,该酶不是胞外酶。细胞破碎后,细胞结构被破坏,酶蛋白释放出来,离心得到的上清液和沉淀中均有酶活,说明 β -D-葡萄糖苷酶主要为胞内酶。而破碎液上清中的酶活显著高于沉淀中的酶活,说明了胞内的 β -D-葡萄糖苷酶为可溶性的非膜结合酶,而另一部则可能是膜结合酶。值得注意的是,31MBR 的完整细胞也具有一定的酶活,这可能是细胞通过磷酸烯醇式丙酮酸转移酶系统来实现的^[15-17]。完整细胞具有 β -D-葡萄糖苷酶活对于葡萄酒酿造具有重要意义,可以使该乳酸菌在实现降酸的同时,进一步释放结合态的风味物质,改善葡萄酒的香气。

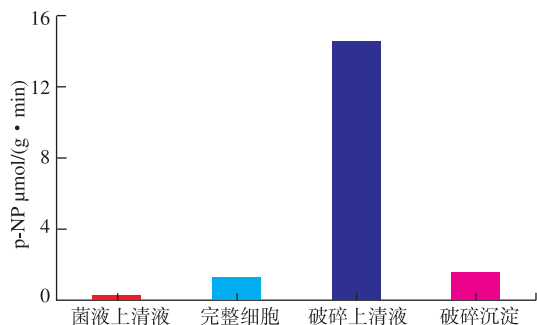


图 2 31MBR β -D-葡萄糖苷酶活定位

Fig. 2 Enzyme localization of 31MBR

2.3 31MBR 不同生长阶段的酶活

图 3 显示了 31MBR 菌液上清液、完整细胞和细胞破碎液在对数生长中期(20 h)、末期(36 h)和稳定期(50 h)的酶活。由图 3 可知,菌液上清液在三个不同时期的酶活都几乎为零,这和结果 2.2 一致,

说明该酶不是胞外酶,且酶的位置没有随着生长时期的变化而发生变化。同时可以看出,完整细胞和破碎液的酶活在对数生长中期最高,且随着生长时间的延长呈下降趋势。

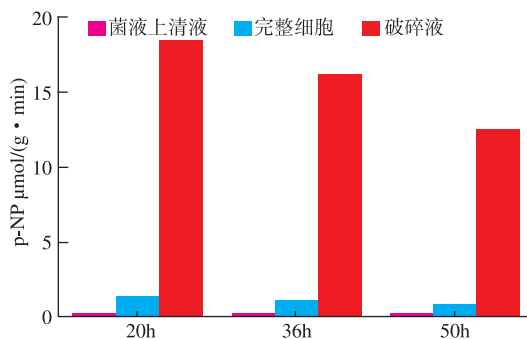


图 3 31MBR 不同生长阶段酶活

Fig. 3 Enzyme activity at different period of 31MBR

2.4 31MBR 糖苷酶的诱导

微生物来源的糖苷酶除了是结构酶外,还可能是在碳源诱导下产生的诱导酶。图 4 显示了 31MBR β -D-葡萄糖苷酶在不同碳源诱导下的实验结果。由图 4 可知,在有熊果苷作为碳源时菌液上清液的酶活显著高于其他试验组的酶活。这是因为熊果苷在分解产生葡萄糖的同时产生了对羟基苯酚,和对硝基苯酚一样在碱性条件下产生黄色而造成酶活测定结果较高。菌液上清液在不同试验组中较低的酶活和酶活定位的结果一致,说明了糖苷酶的位置没有随着碳源的变化而发生变化。

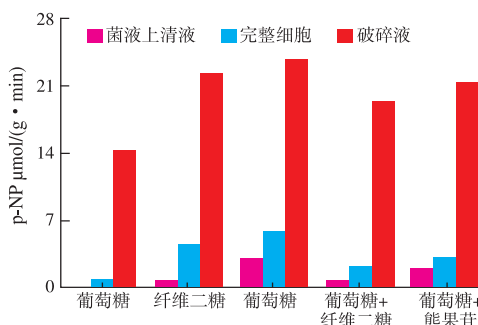


图 4 31MBR β -D-葡萄糖苷酶的诱导

Fig. 4 Induction of β -D-glucosidase activity from 31MBR

对于细胞破碎液来说,以葡萄糖作为碳源时有较高的酶活,这说明了 31MBR 的胞内 β -D-葡萄糖苷酶是结构酶。但在有纤维二糖或熊果苷作为碳源时其酶活显著高于以葡萄糖作为碳源时的酶活,且有熊果苷作为碳源时的酶活要高于有纤维二糖作

为碳源时的酶活,说明在含糖苷键碳源的诱导下酶活会有不同程度的提高。这种现象可能是葡萄糖代谢产物的阻遏作用造成的。完整细胞呈现出和破碎液完全一样的趋势。

3 结 语

酿酒球菌 31MBR 的 β -D-葡萄糖苷酶为胞内

酶,且主要为可溶性的非膜结合酶。31MBR 的完整细胞具有一定的酶活,对于葡萄酒酿造具有重要意义。31MBR 的 β -D-葡萄糖苷酶位置不随生长时期和碳源的变化而发生变化。酶活在对数生长中期最高且随着生长时间的延长呈下降趋势。该酶为结构酶,但在纤维二糖和熊果苷的诱导下酶活有不同程度的提高。

参 考 文 献:

- [1] Bartowsky E J, Bomneman A R. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011, 92: 441-447.
- [2] 韩笑, 陈介南, 王义强, 等. β -葡萄糖苷酶基因的克隆与表达研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 3: 8-12.
HAN Xiao, CHEN Jie-nan, WANG Yi-qiang, et al. Research advances of β -glucosidase gene cloning and expression[J]. **Biotechnology Bulletin**, 2008, 3: 8-12. (in Chinese)
- [3] 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): 107-113.
LI Hua, GAO Li. Research advance on methods of determining β -glucosidase activity [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(2): 107-113. (in Chinese)
- [4] Memahan H, Zoecklein B W, Fugelsang K, et al. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 1999, 23: 198-203.
- [5] Williams P J, Cynkar W, Francis I L, et al. Quantification of glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl glucose[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1995, 43: 121-128.
- [6] D'Incecco N, Bartowsky E, 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.
- [7] Olguin N, Alegret J O, Bordons A, et al. β -Glucosidase Activity and bgl gene expression of *Oenococcus oeni* strains in model media and cabernet sauvignon wine[J]. **American Journal of Enology and Viticulture**, 2011, 62: 99-105.
- [8] Spano G, Rinaldi A, Ugliano M, et al. A beta-glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2005, 98: 855-861.
- [9] Michlmary H, Schumann C, Wurbs P, et al. A beta-glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2010, 26: 1281-1289.
- [10] Spagna G, Romagnoli D, Angela M, et al. A simple method for purifying glycosidases: α -L-arabinofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1998, 22: 298-304.
- [11] Mateo J J, Jimenez M. Monoterpenes in grape juice and wines[J]. **Journal of Chromatography A**, 2000, 881: 557-567.
- [12] Michlmary H, Schumann C, Barreira N M, et al. Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2010, 108: 550-559.
- [13] 朱龙宝, 汤斌, 陶玉贵, 等. 黑曲霉 β -葡萄糖苷酶基因克隆及在毕赤酵母中分泌表达[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(9): 973-977.
ZHU Bao-long, TANG Bin, TAO Yu-gui, et al. Cloning and secreting expression of the β -Glucosidase gene from *Aspergillus niger* in *Pichia pastores* GS115[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(9): 973-977. (in Chinese)
- [14] Barbagallo R, 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: 292-296.
- [15] Capaldo A, Walker M E, Ford C M, et al. bglD β -Glucoside metabolism in *Oenococcus oeni*: cloning and characterisation of the phospho- β -glucosidase bglD[J]. **Food Chemistry**, 2011, 125: 476-482.
- [16] Capaldo A, Walker M E, Ford C M, et al. CelD beta-Glucoside metabolism in *Oenococcus oeni*: cloning and characterization of the phospho-beta-glucosidase CelD[J]. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 2011, 69: 27-34.
- [17] 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: 939-1031.