

文章编号:1673-1689(2009)04-0438-06

葡萄酒风味修饰研究进展

康文怀^{1,2}, 徐岩^{*1,2}, 赵光鳌^{1,2}

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 葡萄与葡萄酒中香气成分以游离态和结合态存在。作者阐述了大量存在的结合态香气, 即风味前体物的结构、含量及其研究方法, 并论述了葡萄酒中风味修饰机制; 介绍了关键酶, 即 β -D-葡萄糖苷酶的相关特性及其来源, 并对风味前体物的研究前景做了展望。

关键词: 葡萄; 葡萄酒; 风味前体物; β -D-葡萄糖苷酶

中图分类号: TS 262. 6

文献标识码: A

Advances in Wine Flavor Improvement

KANG Wen-huai^{1,2}, XU Yan^{*1,2}, ZHAO Guang-ao^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The aroma of grapes and wine includes aromatic free volatiles and non-volatile, odorless precursors, which may be hydrolyzed during the winemaking process. We reviewed the structure, content, research methodology of glycoconjugated aroma compounds, and improvement mechanism of wine flavor also discussed. Furthermore, this review was included the characterization and source of the key enzyme (β -D-glucosidase). Finally, the prospects of flavor precursor was suggested.

Key words: grape, wine, flavor precursor, β -D-glucosidase

香气是影响葡萄酒质量的关键因素。优质葡萄酒不仅表现在外观、口感等方面, 而且更体现在香气方面^[1]。香气来源可分为 3 类, 即品种香气、发酵香气与陈酿香气^[2]。品种香气的研究大多集中于以游离态形式存在的香气成分, 而植物材料大量存在的却是无味的、键合糖苷的风味前体物^[3]。对其结构解析、配基种类和含量等方面的阐述, 有利于拓展糖苷类风味化学的研究领域。生物技术在酶

工程方面的研究已取得显著进展, 利用其研究风味物质定向修饰机制, 风味前体物的酶促水解, 葡萄酒香气种类的改善和含量的变化, 不仅可促进结合态风味前体的水解, 形成大量具挥发性游离态的风味物质, 而且可显著提高其品种香气的香味值(OAVS), 对实现葡萄酒风味的定向修饰具有重要意义。

目前, 国外对葡萄与葡萄酒中风味前体物及其风味修饰中的关键酶(如 β -D-葡萄糖苷酶^[4])已有

收稿日期: 2008-07-08

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(NCET04-0498)。

作者简介: 康文怀(1971-), 男, 工学博士, 山西高平人, 主要从事葡萄与葡萄酒方面的研究。

* 通讯作者: 徐岩(1962-), 男, 安徽合肥人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物酶生物催化、发酵工程、农产品深加工等领域的研究。Email: yxu@jiangnan.edu.cn

很多报道;国内对 β -D-葡萄糖苷酶的研究起步较晚^[5],对风味前体物的研究甚少。作者主要介绍了国内外在葡萄酒风味化学方面的研究概况,介绍了葡萄及葡萄酒中存在的风味前体物结构、含量、研究方法等,阐述了生物技术在葡萄酒风味研究中的应用,并介绍其水解机制、相关酶类及其酶的来源,以期推动对葡萄与葡萄酒中风味前体物的相关研究,达到实现葡萄酒风味物质定向修饰的目的。

1 糖苷类风味物质

人们对糖苷类风味化学的研究始于 1969 年,Francis 和 Allcock 等^[6-7]首次在玫瑰中证实了糖苷类风味前体物的存在。后期大量研究表明^[2-3],植物材料中的风味物质主要以非挥发性的、无味的、键合糖苷的形式存在和积累的。影响葡萄酒感官质量的关键因素,即浓郁的品种香气则来源于葡萄中游离态和结合态风味物质。其风味物质主要包括萜类物质、甲氧基吡嗪、 C_{13} -降异戊二烯衍生物、含硫醇功能的硫化物等^[2,8]。Williams(1982)^[9]首次对葡萄中的糖苷类风味物质进行了分离和测

定,即利用固相吸附剂对其进行吸附、分离,测定其水解产物 β -D-葡萄糖,并计算总含量。诸多研究证实,杏、桃、猕猴桃、杨梅等水果中普遍存在糖苷类风味前体物。一般而言,以结合态存在的风味物质的含量是游离态的 2~8 倍^[3]。

1.1 糖苷类风味物质结构

葡萄糖苷常分为双糖苷及单糖苷,极少见三糖苷,其结构见图 1^[10]。风味前体物的结构包括糖配体和配基,其糖配体包括 β -D-葡萄糖、鼠李糖、芹菜糖、洋芹糖等;配基包括单萜类物质(monoterpenes)、 C_{13} -降异戊二烯衍生物(C_{13} -norisoprenoids)、脂肪族化合物(aliphatic)、酚(phenols)、芳香族化合物等挥发性物质。

不同品种葡萄及其酿造的葡萄酒,其风味前体物配基差异很大。例如亚历山大(Alexandria)葡萄中单萜物质游离态和结合态质量浓度分别为 1513, 4040 $\mu\text{g/L}$;而品种西拉(Syrah)则分别为 13, 91 $\mu\text{g/L}$,二者相差近百倍^[2]。不同地域、栽培、管理等条件对糖苷类风味物质含量以及配基部分影响也很大,如提高日照时数可以促进雷司令(Riesling)葡萄中 C_{13} -降异戊二烯衍生物含量的增加^[3,8]。

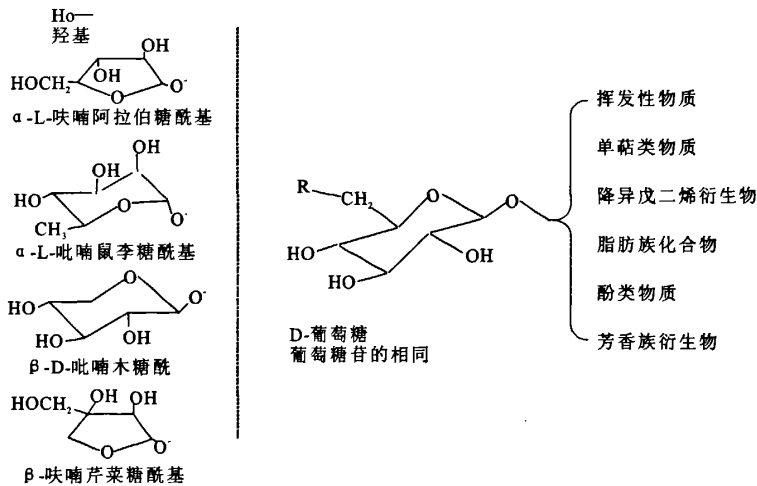


图 1 葡萄中风味前体物中的单糖苷或双糖苷

Fig. 1 Mono- and disaccharide sugar moieties that have been identified as flavour precursors in grapes

1.2 糖苷类风味物质的研究

糖苷类风味物质分析步骤包括分离、水解、测定等^[3],见图 2。首先需对不同植物材料中风味前体物进行吸附、分离,吸附剂常用 C_{18} 反相吸附剂、XAD-2 树脂等,洗脱剂常用乙醇、甲醇、戊烷等,从而可获得糖苷类风味前体物。通过对所获得混合物进行水解可获得相应的糖配体及配基,其水解方式分为酸解和酶促水解。酶促水解所需条件温和,产物更接近实际,但需相应的酶(如关键酶 β -D-葡

萄糖苷酶);而酸解对产物影响大,但简单易行。对水解后糖配体的测定可分析糖苷类风味前体物总含量,对配基的研究可了解其种类和含量等。

若对某物质结构进行鉴定,尚需进一步分离纯化。常用技术包括液相色谱(LC)、高效液相色谱(HPLC),尺寸排阻色谱(SEC, Size Exclusive Chromatography),逆流色谱(CCC, Countercurrent Chromatography)等。获得物质单体后,则可对其结构进行分析,常用技术包括质谱(MS)、傅傅

里叶变换红外光谱法 (FTIS, Fourier Transform Infrared Spectroscopy)、核磁共振 (NMR, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) 等。

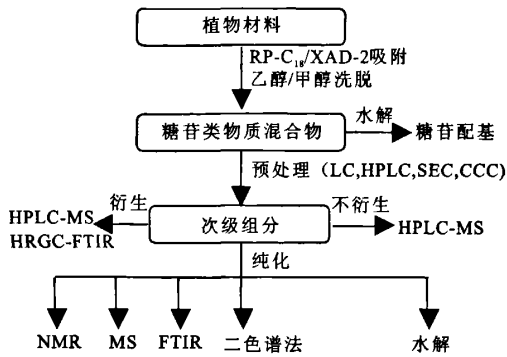


图2 糖苷类风味物质分析

Fig. 2 Analysis of glycoconjugated aroma compounds

早期研究大都集中于对萜类物质的研究。如 Stahl-Biskup 等阐述了糖苷类单萜物质的分布与结构,介绍了来源于不同植物的 22 种糖苷类单萜,其配基主要是香叶醇(geraniol),橙花醇(nerol),里哪醇(linalool), α -萜品醇(terpineol),同时也包括一些不常见的单萜类物质结构。随后对糖苷类风味物质进行的研究,其配基涵盖了萜类及非萜类物质。Biskup(1993)报道了从 150 余种植物材料中发现了约 200 种配基,并论述了该类物质形成、化学组成以及其在生物学中的作用。

Williams 及其合作者对葡萄及葡萄酒中糖苷类风味物质进行了大量研究,但主要集中于糖苷类物质总量的研究,而对其配基部分的组成及其含量涉及较少^[9, 12-15]。以顶空固相微萃取技术(HS-SPME)、气质联用(GC-MS)、闻香技术(GC-Olfactory)等为现代化的分析手段的出现为拓

展糖苷类风味物质研究内容和深度提供了技术保证。如 Villena 等(2005,2007)年在对 Williams 法改进的基础上,利用 C_{18} 固相萃取小柱对糖苷类风味物质吸附分离,并利用酸性条件下水解方式,快速测定了^[16-17]葡萄或葡萄酒中风味前体物的总量; Lopez 等(2004)利用弱酸水解 Tempranillo 和 Grenach 葡萄中的葡萄糖苷,再结合 GC 初步研究了结合态的种类和含量^[18]。虽然开展了一些糖苷类风味物质的研究,但涉及领域主要集中于该国主栽葡萄品种。而我国目前利用 GC-MS 等技术对糖苷类风味物质中糖苷配基的种类和含量的研究鲜见报道。

2 生物技术在葡萄酒风味修饰中的应用

随着现在生物技术的发展,其在葡萄与葡萄酒行业中得到了广泛的应用,如果胶酶制剂的应用已成为葡萄酒酿造过程的重要环节。针对利用现在生物技术来修饰葡萄酒风味,前人做了许多有益探索,利用相关酶来分解不具挥发性的风味前体物,从而达到修饰葡萄酒风味的目的。

2.1 风味修饰机制及其关键酶

葡萄酒中糖苷类物质的分解方式可划分为弱酸水解与酶促水解两类。弱酸水解缓慢,对葡萄酒酿造不具有应用价值,若水解温度过高,甚至会产生不良风味;酶促水解比较温和,具商业化应用前景^[19]。对单糖苷类风味前体物而言,其酶促水解主要是在 β -D-葡萄糖苷酶作用下,移除相应的糖配体,则可形成具挥发性物质成分。对双糖苷类风味前体物而言,其酶促水解需经历两步^[20],见图 3。

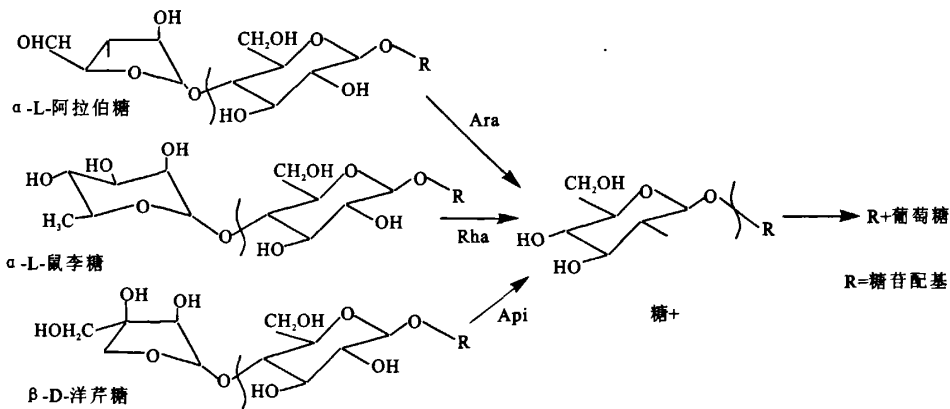


图3 风味前体物酶促水解机制

Fig. 3 Mechanism of enzymatic hydrolysis of flavor precursor

首先在相应酶 α -阿拉伯糖苷酶(α -arabinosidase, Ara), α -鼠李糖苷酶(α -rhamnosidase, Rha),或 β -洋芹糖苷酶(β -apiosidase, Api)的作用下,形成 β -D-葡萄糖单糖苷;随后在 β -D-葡萄糖单糖苷酶(β G)作用下,移除相应的糖配体(β -D-葡萄糖),将其相应的糖苷配基释放出来。可见,在整个酶促水解过程中,其关键酶是 β -D-葡萄糖苷酶。

诸多学者对相关酶类进行了研究。Arevalo (2005)^[21]对 β -D-葡萄糖苷酶在葡萄酒工艺的应用做了初步的探讨;Martino A^[22]等对 β -D-葡萄糖苷酶的固定化进行了研究;Barbagallo R. N^[19]等从黑曲霉(*Aspergillus niger*)及酵母(yeast)中筛选了多株菌株,并研究了其特性;Spano G(2005)^[23]对来源于乳酸菌的葡萄糖苷酶基因进行了研究;Spagna G等研究了相关酶(α -L-arabinofuranosidase, beta-D-glucopyranosidase等)的纯化及其酶特性。结果表明^[24-25],来源于*Aspergillus spp*的 β -D-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21),其平均相对分子质量为120 000,IP为4.2,蛋白质一级结构中包含有较高比例的谷氨酸和天冬氨酸; β -L-鼠李糖苷酶(EC 3.2.1.55)^[25](β -L-Rhamnopyranoside)的IP为6.0,平均相对分子质量为90 000,最优温度为40℃; α -阿拉伯糖苷酶(Ara, EC 3.2.1.55)平均相对分子质量为61 000,IP为3.5。

不同 β -D-葡萄糖苷酶(β G)的底物选择性也存在很大差异。花色苷是红色葡萄酒中的主要呈色物质,其配糖体常为单糖或双糖,其双糖苷花色苷一般仅存在于特定葡萄属(如*V. riparia*和*V. rupestris*)中^[2]。一般 β G常会诱导花色苷形成游离态花色苷,这不利于红葡萄酒中颜色的稳定,而对白葡萄酒影响甚微。Le Traon-Masson (1998)^[26]详细研究了来源于*Aspergillus niger*酶制剂中两种 β G(即 β G-A, β G-B)。结果表明, β G-A对纤维二糖(cellobiose)和香叶酰基- β -D-葡萄糖苷(geranyl- β -D-glucoside)具很高活性,对锦葵色素3-O-葡萄糖苷(malvidin-3-O-glucoside)活性很弱; β G-B对锦葵色素3-O-葡萄糖苷活性强。可见 β G-A对呈色物质花色苷的降解非常缓慢,而对糖苷类风味前体物则具有较高活性,这展示了 β G-A在红葡萄酒酿造中也具有良好应用前景。此外,酶在葡萄酒酿造中应用中也会受到葡萄糖底物的抑制。在甜型葡萄酒中,其酶促反应受到抑制,而在干型葡萄酒中则会增强其萜类物质的含量。

2.2 风味修饰中的酶技术

许多研究也表明,利用酶可不成程度地促进葡

萄酒风味前体物释放。如Martino (2000)^[27]利用来源于黑曲霉的经纯化后的 β -D-葡萄糖苷酶制剂对白葡萄酒(品种Falanghina)香气的影响,结果表明,酶处理后葡萄酒中单萜物质含量(里哪醇; α -松油醇;香茅醇;橙花醇;香叶醇)是原有含量的两倍,即其香味值(OAVS)可增加两倍,葡萄酒果香更加浓郁。Spagna G.等^[24](2002)研究表明,游离态或固定态的酶制剂能够促进葡萄酒中挥发性物质显著增加(约4倍),尤其对于Moscato葡萄酒,其萜醇(里哪醇、香茅醇、橙花醇、香叶醇)含量显著增加。

Palomo等^[28]以多种葡萄品种(Airen, Macabeo, Albillo, Chardonnay)为试材,使用含 β -D-葡萄糖苷的酶制剂水解风味前体物,以GC手段来分析香气变化。研究表明,其键合的葡萄糖苷的香气物质略有增加;主成分分析表明,品种香气特征高于酶处理对其产生的影响;采用广义最小二乘法来分析感官品尝结果,发现酶处理后的葡萄酒与对照相比,其感官特征不同,具有较浓郁的花香、果香,还有一些甜型、成熟果香。

可见,其酶制剂的使用能增加香气浓郁程度,但针对不同葡萄品种,其香气增加的成分和强度迥异,需全面了解葡萄糖苷类风味物质的配基的种类和含量,才能挥发 β -D-葡萄糖苷酶的最大作用。

2.3 酶的来源

β -D-葡萄糖苷酶作为葡萄酒香气修饰的关键酶,其来源是多样的^[3,20],主要包括植物材料、丝状真菌、酵母菌、乳酸菌等^[20]。

许多植物材料(如杏仁、葡萄、木瓜)中含有 β -D-葡萄糖苷酶,但其在葡萄酒条件下,基本不表现为活性^[3]。如Williams (1993)^[29]研究表明,葡萄中的内源 β -D-葡萄糖苷酶最佳pH为5.0,且受底物葡萄糖抑制非常明显。

研究表明,丝状真菌(*Filamentous fungi*)不仅是许多酶制剂(果胶酶等)的重要来源,也可作为外源 β -D-葡萄糖苷酶重要来源^[3,30]。Cabaroglu T (2003)^[31]利用丝状真菌所产 β -D-葡萄糖苷酶来增加葡萄酒的香气。研究表明,源于曲霉(*Aspergillus Spp.*)的 β -D-葡萄糖苷酶与源于植物或酵母菌的酶相比,在葡萄酒pH值条件下其活性强,性质稳定,具良好的商业应用前景。许多酶制剂也大都源于丝状真菌中的黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[32],黑曲霉被认为是一种较安全的微生物,其生产的酶制剂被广泛用于工业化生产。研究证实,许多酶制剂中含有 β -D-葡萄糖苷酶^[26, 30, 33-35]。葡萄酒风味修

饰所需的阿拉伯糖苷酶、鼠李糖苷酶、芹菜糖苷酶等也常来源于丝状真菌^[36]。

β -D-葡萄糖苷酶也可来源于酵母菌^[17]。Spagna^[5](2002)利用 Rosi 等提出的方法,从 463 株菌中对产 β -D-葡萄糖苷酶的菌株进行了筛选。结果表明,仅有 18% 左右的酵母菌具有 β -D-葡萄糖苷酶活性,其中仅有 3 株 Y8 (*Hanseniaspora uvarum*); ALA1 (*S. cerevisiae*), AL112 (*Pichia anomala*) 有较高的 β -D-葡萄糖苷酶活性。此外,许多乳酸菌也具有 β -D-葡萄糖苷酶活性,如 Barbagallo 对野生 *Oenococcus oeni* 进行了筛选,并对产 β -D-葡萄糖苷酶活性相对较高菌株进行了研究。

此外,酶制剂安全性问题也是值得关注的。

3 展望

对葡萄与葡萄酒中糖苷类风味前体的研究具有十分重要的理论和应用价值。现代分析技术的发展为深入研究葡萄与葡萄酒中糖苷类风味前体的种类、含量、鉴定其物质提供了有效手段,进

一步可深入调查我国主栽葡萄品种如赤霞珠、蛇龙珠、龙眼等的游离态和结合态香气成分,进而还可考察不同栽培措施、酿造工艺对游离态和结合态香气成分影响。这对拓展糖苷类风味化学的研究领域,深化风味前体物的研究具有重要理论价值,对提高葡萄酒产品质量具有重要意义。

对风味修饰中相关酶及其酶学性质的研究,可加深对利用酶定向修饰葡萄酒香气机制的理解。不同类型酶的底物存在较大差异,筛选适宜的微生物或其他材料,使其所产关键酶(如 β -D-葡萄糖苷酶)表现出良好的底物选择性(如分解风味前体物,却不分解或轻微水解花色素苷)。同时深化相关酶系的研究,如 β -D-葡萄糖苷酶、 α -阿拉伯糖苷酶(α -arabinosidase, Ara)、 α -鼠李糖苷酶(α -rhamnosidase, Rha)、或 α -洋芹糖苷酶(α -apiosidase, Api)等的纯化、固定化、及其酶学性质,将能更好地促进潜在香气的定向释放。利用现代化香气分析手段,分析或监测相关酶系对葡萄酒中风味前体的水解,达到葡萄酒香气定向释放的目的,将对相关酶制剂在葡萄酒行业的应用产生深远的影响。

参考文献(References):

- [1] Jackson R S. Wine Tasting: A professional handbook[M]. California: Elsevier Academic Press, 2002.
- [2] P Ribereau-Gayon, Glories Y, Majuean A. Handbook of enology 2: the chemistry of wine stabilization and treatments [M]. New York: Wiley, 2000.
- [3] Berger R G. Advances in biochemical engineering biotechnology: biotechnology of aroma compounds[M]. Berlin: Springer, 1997.
- [4] Spagna G, Romagnoli D, Angela M, et al. A simple method for purifying glycosidases: α -arabinofuranosidase and β -glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1998,22(5): 298-304.
- [5] 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.
- [6] Francis M J O, Allcock C. Geraniol β -D-glycoside occurrence and synthesis in rose flowers[J]. **Phytochemistry**, 1969,8(8):1339-1345.
- [7] Francis M J O, Allcock C. Monoterpene β -D-glycosides in roses: isolation and formation from DL-2-14c mevalonate[J]. **Biochemical Journal**, 1969,113(3):38-42.
- [8] Berger R G. Flavours and Fragrances[M]. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2007.
- [9] Williams P J, Strauss C R, Wilson B, et al. Use of C_{18} reversed-phase liquid-chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines[J]. **Journal of Chromatography**, 1982,235(2):471-480.
- [10] DIncecco 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(3):257-265.
- [11] Maicas S, Mateo J J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005,67(3):322-335.
- [12] Francis I L, Sefton M A, Williams P J. Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolyzed precursor fractions from semillon, chardonnay and sauvignon blanc grape juices[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 1992,59(4): 511-520.
- [13] Sefton M A, Francis I L, Williams P J. The volatile composition of chardonnay juices - a study by flavor precursor analysis[J]. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1993,44(4):359-370.

- [14] Strauss C R, Wilson B, Williams P J. Novel monoterpene diols and diol glycosides in vitis-vinifera grapes[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1988,36(3):569-573.
- [15] Wilson B, Strauss C R, Williams P J. The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulp fractions of some white grape varieties[J]. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1986,37(2):107-111.
- [16] Villena M A, Iranzo J F U, Otero R R C, et al. Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β -glucosidase activity in wine yeasts[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2005,99(3):558-564.
- [17] Villena M A, Iranzo J F U, Perez A I B. β -glucosidase activity in wine yeasts; application in enology[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007,40(3):420-425.
- [18] Lopez R, Ezpeleta E, Sanchez I, et al. Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry[J]. **Food Chemistry**, 2004,88(1):95-103.
- [19] Barbagallo R N, Spagna G, Palmeri R, et al. Selection, characterization and comparison of [β]-glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004,35(1):58-66.
- [20] Palmeri R, Spagna G. β -glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007,40(3):382-389.
- [21] Arevalo V M. Estudio de la actividad β -glucosidasica en levaduras vinicas y su aplicacion en Enologia (Spanish text, Spain)[D]. Spain; Universidad de Castilla - La Mancha, 2005.
- [22] Martino A, Pifferi P G, Spagna G. Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation: optimization of the immobilization process on chitosan[J]. **Process Biochemistry**, 1996,31(3):287-293.
- [23] Spano G, Rinaldi A, Ugliano M, et al. A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2005,98(4):855-861.
- [24] 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.
- [25] Kamiya S, Esaki S, Shiba N. Syntheses of several β -L-rhamnopyranosides[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1987,51(8):2207-2214.
- [26] Le Traon-Masson M P, Pellerin P. Purification and characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation; affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1998,22(5):374-382.
- [27] Martino A, Schiraldi C, Di Lazzaro A, et al. Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*[J]. **Process Biochemistry**, 2000,36(1-2):93-102.
- [28] Palomo E S, Hidalgo M C D M, Gonzalez-Vinas M A, et al. Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases[J]. **Food Chemistry**, 2005,92(4):627-635.
- [29] Williams P J, Sefton M A, Marinos V A. Recent Developments in Flavor and Fragrance Chemistry [M]. Weinheim: VCH, 1993.
- [30] Himmel M E. Isolation and characterization of two forms of β -D-glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. **Appl Biochem Biotech**, 1993,39/40213-225.
- [31] Cabaroglu T, Selli S, Canbas A, et al. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003,33(5):581-587.
- [32] Fu-Mian C, Pifferi P G, Setti L, et al. Immobilization of an anthocyanase (β -glucosidase) from *Aspergillus niger*[J]. **Italian Journal of Food Science**, 1994,6(1):31-42.
- [33] Martino A, Durante M, Pifferi P G, et al. Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation[J]. **Process Biochemistry**, 1996,31(3):281-285.
- [34] Martino A, Pifferi P G, Spagna G. The separation of pectinylase from β -glucosidase in a commercial preparation[J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 1994,61(3):255-260.
- [35] Watanabe T, Sato T, Yoshioka S, et al. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1992,209(2):651-659.
- [36] Spagna G, Barbagallo R N, Martino A, et al. A simple method for purifying glycosidases; [α]-l-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2000,27(7):522-530.

(责任编辑:李春丽)