

富含 β -葡萄糖苷酶的酒香酵母在酿酒领域中的应用

葛有辉¹,王德良²,曹 健¹

(1.河南工业大学,河南 郑州 450051;2.中国食品发酵工业研究院,北京 100027)

摘要: 酒香酵母具有产 β -葡萄糖苷酶和改善发酵制品香气的特性,因此在啤酒、葡萄酒、果酒等发酵酿造酒方面有许多应用。综述了酒香酵母属的分类、产香机制以及选育高产 β -葡萄糖苷酶菌种的方法,并介绍了该属酵母在酿造酒领域的一些应用研究。

关键词: 微生物; 酒香酵母; β -葡萄糖苷酶; 酿酒

中图分类号:Q93-3;TS261.1;TS262.2

文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2011)02-0096-04

The Application of *Brettanomyces* Rich in β -glucosidase in the Field of Liquor-making

GE You-hui¹,WANG De-liang² and CAO Jian¹

(1.He'nan University of Technology, Zhengzhou, He'nan 450051;2.China National Research Institute of Food and Fermentation Industry, Beijing 100027, China)

Abstract: *Brettanomyces* has the characteristics of producing β -glucosidase and improving the aroma of fermented products, therefore, it has a number of outstanding applications in beer, wine and fruit wine. This paper reviewed the classification of the genus *Brettanomyces*, aroma producing mechanism and the method of screening for β -glucosidase high-yield strains, and introduced the application research of *Brettanomyces* in the field of liquor-making.

Key words: microbe; *Brettanomyces*; β -glucosidase; liquor-making

葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21),又称 β -D-葡萄糖苷水解酶,是纤维素分解酶系中重要组成成分之一,可水解结合于末端、非还原性的 β -D-糖苷键,同时释放 β -D-葡萄糖和相应的配基^[1]。 β -葡萄糖苷酶的应用非常广泛,被用来增香、分解纤维质产酒精、改善发酵制品的风味等方面。近年来对于高产 β -葡萄糖苷酶的微生物在酿酒领域方面尤其是在啤酒、葡萄酒、果酒方面的研究倍受关注。

1 产 β -葡萄糖苷酶酒香酵母属的研究

产生 β -葡萄糖苷酶的微生物主要有细菌如乳酸菌和芽孢杆菌、酵母中的酿酒酵母属和酒香酵母属、黑曲霉、根霉、木霉等。 β -葡萄糖苷酶普遍存在于酵母中,尤其是酿酒酵母和酒香酵母,不同的菌种酶活不同,非酿酒酵母往往显示出比酿酒酵母更高的活性。L.Daenen 等^[2]对酿酒酵母和酒香酵母属中 58 株菌的 β -葡萄糖苷酶活性进行比较,研究表明,酶活最高的是 *Brettanomyces custersii*,酒香酵母比酿酒酵母更有效地水解酒花中具有与糖苷键结合的香气物质。

1.1 酒香酵母属的分类研究

酒香酵母属(*Brettanomyces*)于 1904 年被 Claussen 首次提出,随着该属中酵母的种类被不断发现,Custers 在 1940 年进行了该属的第一次分类学研究,描述了 *Brettanomyces bruxellensis*、*Brettanomyces claussenii*、*Brettanomyces lambicus*、*Brettanomyces anomalus* 等酵母的出芽繁殖方式^[3]。

此后, Van der Walt 和 Van der Kerken 发现酒香酵母属中的 2 个种 *Brettanomyces bruxellensis* 和 *Brettanomyces intermedius* 具有产生子孢子的形式,因此 Van der Walt 在 1964 年提出德克酵母属(*Dekkera*)以包含这些酵母中产孢子的有性形式^[4]。经历了几次整理后目前酒香酵母属/德克酵母属(*Brettanomyces*/*Dekkera*)包括以下 5 个种:*Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces bruxellensis*^[5-6]。最后 2 个种的有性型为:布鲁塞尔德克酵母(*Dekkera bruxellensis*),异型德克酵母(*Dekkera anomala*)。另外,3 个种:*Brettanomyces naardenensis*、*Brettanomyces*

收稿日期:2010-09-25

作者简介:葛有辉(1984-),男,在读硕士研究生。

通讯作者:王德良,北京市朝阳区霄云路 32 号中国食品发酵工业研究院酿酒部。

custersainus、*Brettanomyces nanus* 被认为是不完全形态的酵母^[7]。

酒香酵母属较难被分离,因为该属酵母的出现率低且在一般的培养基中生长缓慢。酒香酵母的营养要求较低,能在山梨酸、乙醇、放线菌酮等抗菌药物存在下生长,目前分离该酵母的培养基主要有 DBDM 培养基、WLN 培养基等。

1.2 酒香酵母属的产香机制

酒香酵母的产香机制在多篇文献中均有不同程度的描述,其机制如下:许多植物、花朵、水果等用于发酵酿造的原材料中存在有结合态糖苷键形式的风味前体化合物,这些物质是无味的,而且多是潜在的香气物质。酒香酵母中的糖苷酶具有较高的活性,通过酶的水解作用将二糖或三糖中的糖苷键解开,释放出挥发性的香气化合物,增加了发酵产物的香气,赋予了发酵制品典型的风味。在酶水解这些风味前体物的机制过程中需要特定的几种糖苷酶,主要是 α -L-阿拉伯糖苷酶、 α -L-鼠李糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶,其中 β -葡萄糖苷酶是结合态糖苷物释放出香气成分的关键酶。

在酿造酒类过程中,原材料中含有多种多样的不挥发的糖苷物,这些物质没有香气特征,曾被视为是无用的物质,目前的研究证明,它们是产香过程中不可缺少的反应底物,在发酵过程中经过酶的作用,能引起香气上一些相当大的变化。葡萄酒香气是葡萄中的物质彼此相互进行复杂作用的体现,它形成于发酵过程中,并在储藏过程中进一步得到提升。萜烯类物质是葡萄酒和葡萄风味的主要呈香物质,在葡萄中主要以糖苷键的形式存在^[8]。H. H. Baek 等^[9]从酿造葡萄酒的原料圆叶葡萄中能分离到游离的或是以糖苷键结合的挥发性复合物,这些复合物主要有 2,5-二甲基-4-羟基-3-呋喃酮,其他的香气物质还有邻氨基苯乙酮、2-苯基乙醇等也都以游离或结合的形式存在。其中,以葡萄糖苷结合态的形式存在的 2-苯基乙醇含量较高,且多数同时还与单萜类物质相结合。对乙炔基愈创木酚是葡萄汁中的潜在的香气物质之一,以结合态形式存在。以上这些糖苷复合物在酿造过程中经微生物的相关酶水解后产生挥发性的复合物,从而对酒体的香气产生影响。

2 选育高产 β -葡萄糖苷酶菌种的研究

在酿酒生产中, β -葡萄糖苷酶对风味前体物进行水解并释放出香气物质,从而改变发酵产物的风味,在生产中发挥了明显的作用。因此,筛选出 β -葡萄糖苷酶活性高的酵母菌能使产品的附加值升高,具有积极的意义。

目前,高产 β -葡萄糖苷酶菌种的选育主要采用的是

传统方法,即在筛选平板上进行初筛,然后经过 β -葡萄糖苷酶的活性测定来得到高产菌株。所采用的初筛培养基主要有以下几种:

①纤维素-刚果红培养基:培养基中的纤维素能和刚果红结合形成红色物质,经微生物酶作用后将纤维素降解为纤维二糖,不能形成红色物质,因此可形成无色透明圈。吴小刚等^[10]、余伟等^[11]采用该培养基筛选出了产 β -葡萄糖苷酶活性较高的菌。

②以七叶灵和三价铁为显色底物的培养基:在培养基中七叶灵被微生物的 β -葡萄糖苷酶水解为七叶苷原,可以和三价的铁作用呈棕黑色,菌落周围呈棕黑色的圈。袁晓华^[1]采用添加七叶灵和三价铁(柠檬酸铁)的培养基从土壤中筛选出产 β -葡萄糖苷酶酶活较高的一株菌,经鉴定为斜卧青霉。赵林果等^[12]以该培养基为初筛培养基对 11 株黑曲霉所产的酶活进行了比较,并验证了七叶灵作为显色底物的灵敏性和专一性。

③以对硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(p-NPG)为显色底物的培养基:采用添加 p-NPG 的培养基,p-NPG 可被 β -葡萄糖苷酶水解为对硝基苯酚(p-NPh),p-NPh 在碳酸钠的作用下可形成黄色的透明圈。如杨胜远^[13]、Hernandez^[14]等人的研究。

④以 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷(4-MUG)为荧光底物的培养基:培养基中的 4-MUG 被微生物释放的 β -葡萄糖苷酶水解后释放 4-甲基伞形酮(4-MU),在紫外线下能观察到菌落周围的荧光圈的大小。万振堂等^[15]以该培养基为初筛培养基筛选出了一株酶活较高的植物乳杆菌 KLDS1.0320,国外还如 Hernandez^[14]、L. Daenen 等人^[2]的研究。

采用纤维素-刚果红培养基比较直观、准确,但操作复杂;采用含七叶灵的培养基结果快速准确,简便直观,灵敏度高,非常适用于大规模的菌种筛选;采用添加 p-NPG 的培养基灵敏度比较高,但操作复杂,而且透明圈和培养基的颜色相似因此不便于分辨;采用含 4-MUG 的培养基灵敏度高,快速,但成本昂贵。目前国内外常用的方法中添加七叶灵和 4-MUG 的培养基为最佳。

β -葡萄糖苷酶活性的测定方法很多,概括起来主要有水杨苷比色法、4-MUG 荧光法、p-NPG 比色法、京尼平苷比色法^[16]等。目前,国内的主要测定方法是水杨苷 DNS 显色法,国外主要采用 p-NPG 比色法。p-NPG 比色法操作简单快速,灵敏度高,重现性好;而水杨苷 DNS 显色法检测的灵敏度不高,易受干扰,重现性差。

3 富含 β -葡萄糖苷酶的酒香酵母在酿造酒中的应用

关于 *Brettanomyces/Dekkera* 属在酿造酒领域的应用

方面,追踪酒香酵母属的生长代谢及产香过程对于研究具有较高附加值的特制啤酒变得非常有意义。国外这方面已经有许多尝试并获得了许多颇受好评的产品。

3.1 葡萄酒中酒香酵母特征风味的形成

酒香酵母曾经被认为是污染菌,酒香酵母在葡萄酒酿酒过程中对酒体的风味、色泽等方面的败坏作用不可忽视,很多文献均报道了酒香酵母的败坏作用在世界范围内的广泛性。但是近年来越来越多的研究表明,酒香酵母都没有被视为常见污染菌,而它在香气方面的突出作用则引起了越来越多的重视。酒香酵母在葡萄酒中的作用主要是引起了挥发酚化合物和葡萄酒“*Brettanomyces* 特征风味”的形成^[7]。这种所谓的酒香酵母特征风味主要是由挥发酚、某些脂肪酸等共同作用形成的一种特殊的风味。

酒香酵母在葡萄酒的后酵过程中产生的挥发性的酚物质尤其是乙基苯酚能影响葡萄酒的风味,造成变味、失味。酚类形成的过程如下:酚酸类物质(如对羟基桂皮酸)广泛存在于葡萄汁和葡萄果实中,和酒石酸、花青素等物质一起被酯化为相应的酯类。随后在肉桂酰酯酶的作用下释放出相应的游离酸,这些游离酸(p-香豆酸、阿魏酸、咖啡酸)被脱羧成羟基苯乙烯物质(4-乙烯苯酚、4-乙基愈创木酚、4-乙基儿茶酚等)然后被还原成相应的乙基衍生物(4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚、4-乙基苯磷二酚)^[6]。

这些挥发酚化合物的香气阈值范围为:4-乙烯苯酚 440~600 $\mu\text{g/L}$ 、4-乙基愈创木酚 33~110 $\mu\text{g/L}$ 、4-乙基苯酚 30~60 $\mu\text{g/L}$ 、4-乙基-2-甲氧基苯酚 20 $\mu\text{g/L}$ 、4-乙基苯磷二酚 10 $\mu\text{g/L}$ ^[17]。香气阈值随葡萄酒的种类、人们感觉的灵敏度等因素的变化而变化。例如酒香酵母 *Dekkera/Brettanomyces* 在 Bordeaux 红葡萄酒中 4-乙基苯酚的产量,在感官上可接受的最佳阈值为 620 $\mu\text{g/L}$,4-酚醛和 4-乙基苯酚的混合物阈值却为 426 $\mu\text{g/L}$ ^[18],低于这些阈值,挥发酚可以对葡萄酒的香气产生有利的影响,增加许多特别的风味且被消费者所喜爱,当超过这一阈值就会令人感到不愉快的感觉。而定义这些阈值的难度在于不同的葡萄酒具有不同的阈值。因此,在葡萄酒酿造过程中如何有效控制酒香酵母和这些挥发酚物质的变化是控制葡萄酒质量的重要的环节。

3.2 酒香酵母在啤酒和其他酿造酒方面的应用

Gilliland, R.B.^[19] 首次描述了酒香酵母属在啤酒后酵过程中的作用,在此过程中酒香酵母缓慢发酵并代谢产生出典型的风味。1992 年 Chatonnet 等人的研究表明, *Brettanomyces.lambicus* 和 *Brettanomyces.bruxellensis* 在酿酒酵母完成主酵阶段后的酵母群落中居于主要地位,

它们对啤酒风味的影响很复杂,酒香酵母在长时间的后酵中通过释放异戊酸和挥发酚影响着啤酒的风味^[18]。在一种特殊的比利时淡色啤酒(一种特拉普啤酒)的生产中,酒香酵母出现在后酵阶段,且酒香酵母和酿酒酵母一起被用来提高风味,并产生出一种非常独特的比利时特拉普啤酒的风味^[20]。

L.Daenen^[21]在对酿酒酵母和酒香酵母的筛选中得到的 β -葡萄糖苷酶活性最好的菌是 *Brettanomyces custersii* LD72 和 *Saccharomyces cerevisiae* LD25,在啤酒生产过程中,二者能水解酒花中的糖苷键化合物并释放出挥发性的香气物质,改善啤酒的香气,增加特征性的风味物质。比利时酸性淡啤是一种特殊类型的啤酒,它的特点具有葡萄酒的酸感,这种酸性的淡爽啤酒是许多微生物共同发酵作用的结果。酒香酵母在发酵的第三个阶段成为优势菌,其中该属中的 *Brettanomyces.lambicus* 和 *Brettanomyces.bruxellensis* 是最重要的两个种。酒香酵母和一种片球菌(*Pediococcus*)相互作用对比利时淡爽啤酒的风味起到了重要的作用^[21]。Lambic 啤酒在长达一年的自然发酵过程中,其中微生物主要有酒香酵母、乳酸菌、醋酸菌等,在 4 到 8 个月的主发酵结束后,酒香酵母逐渐成为酒体中的优势菌群,它和其他细菌一起作用形成了 Lambic 酒的古老的风味^[22]。

Matilda 是位于芝加哥的 Goose Island 酿造厂生产出的一种特制啤酒,它具有淡淡的水果香和略酸的口感特征^[23]。其主发酵过程由一株比利时酵母菌株完成,在后酵过程中由酒香酵母继续发酵 3 周而制成。当风味形成后离心除去绝大多数的酒香酵母,包装后随着保存时间越长风味也在不断的成熟,最后形成了典型的“Brett”啤酒。酒香酵母在酿造过程中产生了复杂的香气,能将有机酸和浓郁的水果香气结合起来形成普通啤酒所没有的风味,因此该啤酒一经推出便屡获金奖。

在苹果酒的发酵过程中,酒香酵母属对于其香气的形成和提升起着非常重要的作用。酒香酵母在爱尔兰苹果酒酿造的后酵阶段成为优势菌群,而且从发酵 12 天到第 22 天,酒香酵母的数量增加到了菌体总数的 90%,成为主要菌群。一直到成熟期的第 9 个月,该酵母依然处于优势地位^[24]。在法国苹果酒和爱尔兰苹果酒的酿造过程中,酒香酵母对其总体风味的形成都起到了积极的作用。

4 展望

关于酒香酵母属很多方面的研究例如酒香酵母的生长繁殖、代谢途径等都尚未完善,因此还需要进一步的研究。尽管该属酵母的污染问题仍然是葡萄酒生产中存在的普遍问题,但是相关的控制策略已经较为完备。酒香酵

母在酿酒工业上的应用已经崭露头角,尤其是在啤酒领域的应用已取得很多成果。除此之外,酒香酵母还涉及到燃料乙醇、发酵食品等多个方面,随着研究的不断深入,酒香酵母的应用领域将会越来越广。

参考文献:

- [1] 袁晓华.β-葡萄糖苷酶产生菌的筛选、培养条件优化及β-葡萄糖苷酶应用研究[D].济南:山东大学,2009.
- [2] L.Daenen, D.Saison, F.Sterckx, F.R.Delvaux, H.Verachtert, G.Derdelinckx. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008,104:478-488.
- [3] N.Rodrigues,G. Goncalves,S. Pereira-da-Silva,M. Malfeito-Ferreira,V. Loureiro. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*[J].*Journal of Applied Microbiology* ,2001,90:588-599.
- [4] J.P.VAN DER WALT. *Dekkera*, A new genus of the *Saccharomycetaceae*[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*,1964,30:273-280.
- [5] Kurtzman,C.P.,Fell,J.W.The yeasts.A taxonomic study[M].fourth edition.Amsterdam,The Netherlands:Elsevier Science Publisher, 1998.
- [6] A.Oelofse, I.S.Pretorius, M.du Toit. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: A Synoptic Review[J]. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 2008,29(2):128-143.
- [7] Clive de W, Blackburn.Food Spoilage Microorganisms[M].CRC Press,2006,366-370.
- [8] Gunata,Y.Z.,Bayonove,C.L.,Baumes,R.L.and Cordonnier, R.E. The aroma of grapes.1.Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. [J].*J Chromatogr*,1985,331:83-90.
- [9] H.H.Baek, K.R.Cadwallader. Contribution of free and glycosidically bound volatile compounds to the aroma of Muscadine grape juice[J]. *Journal of Food Science*,1999,64(3):441-444.
- [10] 吴小刚,曾莹,周丽明,李彦,何平.β-葡萄糖苷酶高产菌的筛选[J].*中国酿造*,2005,(9):14-16.
- [11] 余伟,王宏勋,张晓昱. 高产β-葡萄糖苷酶药用真菌菌株的筛选[J].*食品开发与机械*,2008,(7):10-14.
- [12] 赵林果,孟鹏,李丽娟,余世袁.利用七叶灵显色技术检验和判断β-葡萄糖苷酶的研究[J].*食品与发酵工业*,2008,34(12):163-166.
- [13] 杨胜远,刘玉燕,梁智群.β-葡萄糖苷酶产生菌的分离筛选[J].*工业微生物*,2002,32(4):36-38.
- [14] Hernandez,L.F,Espinosa,J.C. , Fernandez Gonzalez,M, Briones A. Beta-glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain[J].*Int Food Microbiol*,2003,(80):171-176.
- [15] 万振堂,杨丽杰.产胞外β-葡萄糖苷酶乳酸菌的筛选及其酶学性质的初步研究[J].*食品与发酵工业*,2009,35(4):28-32.
- [16] 梁华正,刘富梁,彭玲西,吴志梅.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.
- [17] Curtin,C.D, Bellon,J.R., Coulter,A.D, Cowey,G.D, Robinson,E. M.C, de Barros Lopes, M.A.,Goddén, P.W, Henschke P.A. Pretorius,I.S. The six tribes of 'Brett' in Australia-Distribution of genetically divergent *Dekkera bruxellensis* strains across Australian winemaking regions[J]. *Aus.Wine Ind.J*,2005,20:28-36.
- [18] P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J.N. Boidron, M. Pons. The origin of ethyl-phenols in wine[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,1992,60:165-178.
- [19] Gilliland, R.B. *Brettanomyces* I.Occurrence,characteristics,and effects on beer flavour[J]. *J.Inst.Brew*,1961,67:257-261.
- [20] Verachtert,H, Dawoud,E. Microbiology of lambic-type beers[J]. *J Appl Bacteriol*, 1984,57:11-12.
- [21] H.Martens, D.Iserentant, H.Verachtert. Microbiological aspects of a mixed yeast-bacterial fermentation in the production of a specialbelgian acidic ale[J].*J. Inst. Brew*. 1997,103:85-91.
- [22] Kumara,H, Verachtert,H. Identification of lambic superattenuating microorganisms by the use of selective antibiotics[j]. *J.Inst.Brew*,1991,97:181-185.
- [23] Mary,P. *Brettanomyces* in modern beer production[J].*The Brewer & Distiller International*,2008,4(8):33-34.
- [24] W.F.Morrissey, B.Davenport, A.Querol, A.D.W.Dobson. The role of indigenous yeasts in traditionala Irish cider fermentations[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004,97:647-655.

景芝酒业通过标准化验收

本刊讯 据《华夏酒报》报道 2010年12月19日,山东省质量技术监督局组织标准化专家对山东景芝酒业股份有限公司创建实施企业标准化体系进行验收,专家组通过审查该企业标准体系资料及运行记录、查看生产现场和技术中心实验室等,对该公司标准化工作给予了高度评价。

企业标准化是以企业的生产、技术、经营活动的全过程控制为内容制定标准和贯彻标准的活动,旨在构筑企业经营管理的秩序。景芝酒业高度重视企业标准化建设工作,专门成立了企业标准化委员会,建立了技术标准、工作标准与管理标准两个专业委员会,为构建企业标准化体系提供了可靠的组织基础。最终,该公司以高分通过国家AAAA级标准化良好行为企业、山东省食品生产标准化示范项目、山东省首家节能标准化体系验收。(冯英木、逢顺路文、小小荐)

来源:华夏酒报 2010-12-24