

葡萄酒中的生物胺的生产与工艺控制

张春晖 西北农林科技大学葡萄酒学院 杨凌 712100

夏双梅 信阳农业高等专科学校植科系 信阳 464000

张军翔 宁夏农学院园林系 永宁 750105

摘 要 生物胺存在于多种发酵食品中,人体吸收过量的生物胺后会引起不良的生理反应,在葡萄酒苹果酸-乳酸发酵(MLF)过程中,有些乳酸菌能够对氨基酸脱羧产生生物胺。利用PCR与DNA探针技术能够快速检测葡萄酒中的组胺产生菌。工艺上采用接种进行MLF,并在MLF完成后对乳酸菌进行有效清除,可以显著降低葡萄酒中生物胺的含量。

关键词 生物胺 乳酸菌 苹果酸-乳酸发酵 葡萄酒

Abstract Several kinds of fermented foods would contain biogenic amines, the over absorption of which would have undesirable physiological effects on human beings. In winemaking biogenic amines could be produced during malolactic fermentation(MLF) decarboxylated by lactic acid bacteria in wine. Histamine-producing strains could be detected by PCR test or DNA probe technology. In order to lower biogenic amine concentration in wine, inoculated MLF was proposed, so as to effectively eliminate of lactic acid bacteria from wine after MLF.

Key words Biogenic amines Lactic acid bacteria Malolactic fermentation Wine

在发酵食品如酸奶、发酵香肠、泡菜及葡萄酒中,大都含有生物胺。胺在生物活性细胞中具有重要的生理功能。但当人体吸收过量的生物胺时,可能会引起头痛、呼吸紊乱、心悸、血压变化等过敏性反应。生物胺在人体细胞内会被一些酶促代谢反应降解,但酒精和乙醛能抑制这些酶的活性,从而降低了脱毒效率^[1]。

酒精发酵结束后,几乎所有红葡萄酒和部分白葡萄酒需要进行苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)。是在乳酸菌的作用下,将葡萄酒中苹果酸脱羧生成乳酸和CO₂的过程,二元酸向一元酸的转变,降低了酒的酸度,提高了葡萄酒的风味复杂性和微生物稳定性^[1]。能够进行的乳酸菌包括酒球菌(*Oenococcus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)和片球菌(*Pediococcus*)等属的细菌。由于酒球菌属细菌通常能够耐受较高的酒精度和较低的pH,生产上通常接种该属细菌进行MLF^[3]。葡萄酒中的乳酸菌不仅能够分解苹果酸,而且还会对酒中的氨基酸进行脱羧反应,产生生物胺^[4]。氨基酸向生物胺的转变可使环境pH上升,因而有利于乳酸菌在酸性环境中的生长和存活。

1 葡萄酒中的生物胺

在发酵前的葡萄汁中,存在着甲胺、乙胺、苯乙胺、异戊胺和1,5-戊二胺(尸胺)等胺类物质,在发酵过程中这些生物胺能够被微生物降解;在MLF后的葡萄酒中,乳酸菌将氨基酸脱羧,生成组胺、酪胺、腐胺、尸胺及苯乙胺等,其中,前三种是葡萄酒中最主要的生物胺^[4]。Souffleros等对葡萄酒中生物胺的分析表明,

酒精发酵后的葡萄酒中生物胺含量很低,而MLF后的葡萄酒中,生物胺的含量都有不同程度的升高^[4]。Lonvand-Funel等研究表明,葡萄酒中的生物胺随着酒种、产区和酿造工艺等的不同,含量变化很大^[5]。

MLF结束后,酒中所有的乳酸菌都变成了有害菌,应及时除去,以防止乳酸菌代谢葡萄酒中的其他成分。生产上通常采用的添加SO₂的方法不能完全去除酒中的乳酸菌,酒中的部分具有生物活力但不能被培养分离的(non-cultivable)乳酸菌悬浮在葡萄酒中,它们仍能够对酒中的氨基酸进行代谢。在法国Burgundy地区的研究表明,霞多丽(Chardonnay)和黑比诺(Pinot noir)葡萄酒中的组胺、酪胺和腐胺在MLF后和葡萄酒老熟过程中的含量都有所增加^[5]。

2 生物胺的生成

2.1 生物胺产生的条件

乳酸菌对氨基酸脱羧产生生物胺需要两个基本条件^[5]:(1)乳酸菌具有氨基酸脱羧酶活力。不同种间和菌株间的乳酸菌,氨基酸脱羧能力差异很大;(2)基质中有足够的氨基酸,葡萄酒中氨基酸丰度与葡萄汁的营养组分(与葡萄品种和营养状况有关)和酒精发酵过程中酵母的代谢有关。因为酵母在酒精发酵过程中改变了葡萄汁中的含氮化合物的组成,它们能够利用有些氨基酸,也能通过酵母的自溶作用释放一些氨基酸。当葡萄酒在酒精发酵结束后与酵母酒脚一起贮存,酵母自溶释放的多肽和游离氨基酸能够被乳酸菌水解和脱羧,这也解释了为什么带酒脚贮存的葡萄酒中生物胺含量通常较高的原因。

组胺是葡萄酒中最重要的生物胺成分之一,在葡萄酒中的平均含量约为 5mg/L ^[6]。长期以来,酿酒学家认为只有 *pediococcus* 属细菌能够产生组胺, *Oenococcus* 属细菌不产生组胺。但 Conton 等^[7] 研究表明, *Oenococcus* 属有些菌株具有组氨酸脱羧酶 (histidine decarboxylase, HDC) 活性,能够在过程中生成组胺。此外, *Lactobacillus* 和 *Leuconostoc* 属的一些菌株也有 HDC 活性,因此也能产生组胺^[5,6]。

2.2 组氨酸脱羧酶的生化特性

许多乳酸菌属细菌具有氨基酸脱羧酶活力,该脱羧酶需要 5'-磷酸吡哆醛 (PLP) 作为辅酶,这与转氨酶 催化氨基酸转氨基作用)情况类似。在哺乳动物中,HDCs 被 PLP 激活,而在产生荚膜梭菌 (*Clostridium oerfringens*)、乳杆菌 (*Lactobacillus*)、微球菌 (*Micrococcus* sp.) 及酒类球菌 (*Oenococcus oeni*) 中发现 HDCs 并不依赖 PLP^[8]。通过对酒类球菌的 HDC 研究表明,HDC 是一种异构酶,最适酶活 pH 值为 4.8。组胺是 HDC 的竞争性抑制剂,柠檬酸和 L-乳酸也能抑制完整细胞和无细胞提取物中的 HDC 的活性,但在葡萄酒中, 2g/L 的 L-乳酸只能抑制 22% 的酶活性,通过变性凝胶电泳分析显示,HDC 是由分子量分别约为 28,000 (α 链) 和 11,000 (β 链) 的两个亚基组成,进一步的研究表明,酒类球菌和布氏乳杆菌 (*Lb. buchneri*) 的 HDC 均为六聚体结构 $[\alpha\beta]_6$ 。两者 α 链氨基酸序列的同源性为 80%, β 链的同源性为 94%^[7,9]。

2.3 影响生物胺产生的环境因素

2.3.1 pH

环境条件尤其是葡萄酒的 pH 对生物胺的产生起着至关重要的调节作用,pH 不仅对酒中的乳酸菌类具有选择作用,同时还影响着细菌的代谢活力和代谢方向,当葡萄酒 pH 值低于 3.5 时, *Pediococcus* 属细菌生长受到强烈抑制, *Oenococcus* 属细菌成为 MLF 的主导菌,此时酒中的生物胺主要是由 *oenococcus* 属细菌产生的;当 MLF 完成以后,葡萄酒的 pH 值上升 通常高于 3.5),处于潜伏状态的 *pediococcus* 属细菌快速繁殖,由于此时营养缺乏,属细菌就会分解酒中的氨基酸产生生物胺^[2,5]。此外,如果在较高 pH 值条件下进行 MLF,葡萄酒中的乳酸菌菌群非常复杂,除了酒类球菌外,其他种的乳酸菌也有可能参与这一过程,这就增加了不良微生物 (如产生生物胺的乳酸菌) 感染的几率,容易造成酒中生物胺的含量升高。另外,在较高 pH 的条件下, SO_2 的抑菌效果降低,MLF 结束数月后仍然有相当数量的乳酸菌存在于葡萄酒中,即便这些残存的微生物不增殖,潜伏菌群具有较强的代谢活性,他们仍然能够产生组胺。在营养匮乏的环境下乳酸菌能够利用氨基酸脱羧获得能量,因此,具有氨基酸脱羧活性的乳酸菌可能比没有这种活性的乳酸菌的存活时间更长。一般来说,白葡萄酒比红葡萄酒的 pH 值低 (酸度高),前者生物胺的含量通常也低于后者^[5]。近年来,为了迎合消费者的需求,葡萄酒的酸度与以前相比总体有所降低。在原料处理方面,为了获得较高的糖度和更高浓度的香气前体物、增加葡萄酒中酚类物质的含量,常常对葡萄果延迟采收,这种原料酿造的葡萄酒的 pH 较高 (酸度较低),有时会导致 MLF 后生物胺含量的

升高。

2.3.2 代谢底物

在葡萄酒环境下,苹果酸-乳酸菌优先利用苹果酸和可发酵糖作为能源物质。当 MLF 结束后,乳酸菌缺乏可发酵的糖和苹果酸等发酵底物,他们就能利用氨基酸作为能源物质,这样生物胺的生成量就会增加。这表明在没有其他底物可以供代谢需要时,乳酸菌对氨基酸的脱羧反应可以作为一条额外的能量产生途径。这也解释了为什么在 MLF 结束后 绝大部分能源物质被代谢消耗),不及时抑菌、杀菌,葡萄酒中的生物就会上升的原因^[5,10]。

3 生物胺产生菌的检测

采用分子对有害细菌进行早期、快速检测是当前葡萄酒微生物发展的一个重要方向。目前,建立在 DNA 杂交基础上的基因探针技术已经用于葡萄酒中生物胺产生菌的检验。通过对 *Lactobacillus* 30A *Lb. buchneri* 及 *C. perfringens* 的 HDC 氨基酸序列和 *hdcA* 基因的核苷酸序列比较,发现了基因内的保守区,据此选择引物并以 *O. oeni* DNA 作为模板进行 PCR 反应,然后用扩增子作为 DNA 探针与供试菌株的杂交^[11]。该方法特异性强,灵敏度高,无论菌株的来源 (啤酒、酸奶、葡萄酒等) 如何,只要具有 HDC 活性,就能通过 DNA 探针进行检测。

DNA 探针技术已经用于检测葡萄酒中的组胺产生菌。特异性的 *hdc* 探针可以用于菌落杂交 (colony hybridization),杂交结果表明组胺产生菌占总菌数的百分比,为了快速确定葡萄酒中组胺产生菌的频率,Coton 等建立了直接 PCR 实验法,该方法避免了菌落杂交所要求的细菌平板培养,而且能够对低菌密度的样品进行快速检测^[12],他们对不同葡萄酒产区的 118 个酒样中的乳酸菌进行了检测,发现在所有产区都有组胺产生菌,约一半的供试酒样 (49%) 中含这类细菌,采用 *hdc* DNA 探针进行 DNA/DNA 杂交证实,平均 80% 的细菌具有产生组胺的能力^[12]。由此可见,能够产生组胺的乳酸菌的出现频率是很高的。在所有杂交中,“*hdc*”杂交阳性的菌落经鉴定后均为 *O. oeni*,实验阳性的葡萄酒不仅含有组胺,同时还含有酪胺、腐胺等生物胺类;试验阴性的葡萄酒都不含有组胺和其他生物胺。

此外,从葡萄酒中还分离到具有鸟氨酸脱羧酶活性的 *O. oeni* 菌株,分离到产酪胺的短乳杆菌 (*Lb. brevis*) 和希氏乳杆菌 (*Lb. hilgardii*)。另外研究发现,产酪胺能力强的菌株同时也能产生苯乙胺^[5]。目前,还不能对酪胺和腐胺产生菌株进行快速检测,因此有必要对相关的脱羧酶及其编码基因进行研究。

4 控制生物胺形成的工艺措施

4.1 接种无 HDC 活性的菌株进行 MLF

虽然对葡萄酒中生物胺的含量目前还没有明确的限定,但为了给消费者提供高质量的产品,葡萄酒生产者应该重视这一问题,已经证实葡萄酒中的生物胺主要是由乳酸菌产生的,这些自然的生物胺产生菌广泛地存在于葡萄酒中^[13]。如果 MLF 采用自然发酵 (非接种发酵) 则自然乳酸菌的发酵特性就无法控制。

因此,生产上应采用接种无 HDC 活性的乳酸菌进行 MLF^[2,5],这也是目前控制葡萄酒中生物胺含量的最为有效的方法。

目前,接种前无须活化的直投式 (direct inoculation) 苹果酸-乳酸菌发酵剂已经商业化生产,这使得 MLF 的生产操作大为简化,供生产上接种的菌珠不仅要求有良好的酿造学特性,而且还要无 HDC 活性,Lonvaud - Funel 研究发现,接种优选菌珠进行 MLF 后的葡萄酒,其生物胺含量显著低于自然 MLF 葡萄酒中的含量,这可能是因为接种的乳酸菌抑制并消除了葡萄酒中的自然菌群,也可能是由于接种的乳酸菌降解了自然菌群产生的生物胺^[5]。其中,第二种假设已经引起关注,通过对产生组胺和酪胺微生物的研究发现,凡能够降解生物胺的菌珠均无组氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或鸟氨酸脱羧能力^[5]。

4.2 MLF 的终止

MLF 结束后,乳酸菌群体数量并不迅速下降,如果不及时采取终止措施,乳酸菌就会利用葡萄酒中的氨基酸生成生物胺。这就要求在 MLF 结束后立即对乳酸菌进行清除,可以采用的工艺方法包括^[2,6]:

(1) 添加足够的 SO₂, MLF 结束后立即调整总 SO₂ 至 100mg/L 或游离 SO₂ 至 30mg/L。较高浓度的 SO₂ 可以抑制葡萄酒 LAB 的生长,该方法简单、最有效,在生产上广为采用;

(2) 尽早下胶、倒罐、去酒脚、澄清或进行瞬间高温灭菌;

(3) 在 15℃ 左右低温贮酒;

(4) 添加化学抑制剂。美国允许在葡萄酒中添加富马酸 (5g/L) 抑制细菌的生长。此外还可以添加 Velcorin[®], Velcorin 在 SO₂ 存在的条件下可以用于抑制细菌和酵母;

(5) 添加细菌素,乳酸链球菌素 (Nisin)、植物乳杆菌素 (Plantaricin) 和片球菌素 (Pediocin) 可以抑制葡萄酒 LAB 的生长。酒类酒球菌对 Nisin 非常敏感,5U/ml 的 Nisin 可完全抑制其生长,Plantaricin 可以抑制多种乳酸杆菌,Pediocin 可以抑制片球菌;

(6) 添加溶菌酶。该酶对乳酸菌具有很好的溶菌效果,随着 pH 的增加,酶活增强,使用溶菌酶可以降低 SO₂ 的用量而且不影响葡萄酒的感官质量,溶菌酶的用量:白葡萄酒 250 ~ 500mg/L,红葡萄酒 125 ~ 250mg/L。

参考文献

- 1 Silla Santos, M.H. Biogenic amines: their importance in Food. Int J Food Microbial, 1996, 29: 213 ~ 213.
- 2 王华, 张春晖, 李华. 乳酸菌在葡萄酒酿造中的应用. 西北农业大学学报, 1996(6): 92 ~ 98.
- 3 张春晖, 王华, 李华. 苹果酸-乳酸发酵对葡萄酒品质的影响. 西北农业大学学报 1999(6): 92 ~ 98.
- 4 Soufleros E, Barrios ML, Bertrand A. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. Am J Enol Vitic, 1998, 49, 266 ~ 278.
- 5 Lonvand - Funel A. Biogenic anines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett, 2001, 199: 1 ~ 13.
- 6 Boulton R B, Singleton V L, Bisson L F et al. Principles and practices of winemaking. New York: Chapman&hall, 1995.
- 7 Coton E, Rollan G C, lonvand - Funel A. Hisidine decarboxylasw activity of leuconotoc oenos 9204. purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sepuence of the hdc gene. J Appl, Microbiol, 1988, 84: 143 ~ 151.
- 8 Snell E E. Vitamin B6 and decarboxylation of hisidine. Ann N Y Acid Sci, 1990, 585, 1 ~ 12.
- 9 Rollan G C, Coton E, Lonvand - Funel A. Histidine decarboxylase activity of leuconoloc oenos 9204. Food Microbiol, 1995, 12: 455 ~ 461.
- 10 张春晖, 李华. 葡萄酒苹果酸-乳酸发酵能量产生机理. 生物工程进展, 2001(5): 72 ~ 74.
- 11 LeJeune C, Lonvand - Funel A, Ten Brink B et al. Declopmnt of a detection system for histamine decarboxylating jactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. J Appl Microbiol, 1995. 78: 316 ~ 326.
- 12 Coton E, Rollan G C, Bertrand et al. Histamijne0producing lactic acid bacteria in wines: early detection frepency and distribution Am. JEnol Vitic, 1998, 49: 199 ~ 204.
- 13 Lonvand - Funel A, Joyeux A. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine - producing strain of Leuconotoc oenos. JAppl Bactrtiol, 1994, 77: 401 ~ 407.

纳豆激酶的研究进展

陈志文 徐尔尼 肖美燕 南昌大学生命科学与食品工程学院 南昌 330047

摘 要 纳豆激酶有很强的溶血栓能力,跟传统的一些溶栓剂相比,具有安全性好、成本低、口服有效等优点,极有可能开发为新一代的溶栓剂。本文介绍了纳豆激酶的分离纯化技术、生化特性 并对纳豆激酶的活性测定方法、影响纳豆激酶稳定性的因素及提高纳豆激酶产量的几种途径等最新研究成果进行了综述。

关键词 纳豆激酶 活性测定 稳定性因素 高产量

Abstract Compared with some traditional thrombolytics, nattokinase, which is found to be a strong fibrinolytic