

苹果酸-乳酸菌的有关物质代谢

刘芳

(北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081)

摘要: 对乳酸菌在葡萄酒苹果酸-乳酸发酵过程中的有关物质代谢, 包括苹果酸代谢、柠檬酸与糖的共代谢、含N化合物的代谢、细菌素的产生等进行了概述。

关键词: 微生物; 乳酸菌; 葡萄酒; 物质代谢

中图分类号: TS262.6; TS261.4; TS262.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286(2004)02-0028-03

Relative Substance Metabolism of Malolactic Bacteria

LIU Fang

(College of Life Science & Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: The relative substance metabolism of lactic bacteria in malolactic fermentation of grape wine included the metabolism of malic acid, the collective metabolism of citric acid and sugar, the metabolism of N-contained compounds, and the production of bacteriocin etc. were introduced in this paper. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; lactic bacteria; grape wine; substance metabolism

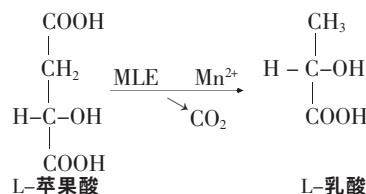
苹果酸-乳酸菌是葡萄酒生产中能进行苹果酸-乳酸发酵(Malolactic fermentation, MLF), 将酒中具有尖酸口味特征的苹果酸降解为弱酸——乳酸并释放出CO₂的乳酸菌, 一般分属于乳杆菌属、明串珠菌属、片球菌属和酒球菌属, 为兼性厌氧型微生物, 嗜酸, 呈球状或杆状, 成对或成链状, 不运动, 革兰氏阳性, 生存和生长需要低浓度的氧, 具有不同的耐受酒精度、温度、pH、SO₂的能力。菌种不同, 其代谢特性具有较大差异, 而菌种发酵特性的好坏直接关系到葡萄酒口感、风味等质量的优劣。本文对苹果酸-乳酸菌在苹果酸-乳酸发酵过程中的有关物质代谢进行了概述。

1 苹果酸代谢(MLF机理)

苹果酸是葡萄酒中的四大固定酸之一, 其生理代谢活跃, 极易被乳酸菌分解利用。MLF, 就是苹果酸-乳酸细菌分解酒中L-苹果酸产生L-乳酸并释放出CO₂的过程。通常菌体密度达10⁶ cfu/ml时, 苹果酸开始被分解, 细菌细胞数达10⁷~10⁸ cfu/ml时, 苹果酸被大量分解^[1]。这也表明苹果酸的分解与细菌的增殖并不同步, Costello (1983), Wibowo等推测, 可能是因为在葡萄酒中存在着抑制苹果酸-乳酸菌分解苹果酸的物质, 抑制物质使菌体的相关酶类处于不活跃或阻遏状态, 通过早期生长去除这些物质后, 才使酶类被激活, 从而开始分解苹果酸^[2]。

根据对微生物体内酶的认识及酶所催化的反应机制研究, 参与葡萄酒MLF过程中苹果酸向乳酸的转变的酶可能有: 苹果酸-乳酸酶(MLE)、苹果酸酶(EM)、苹果酸脱氢酶(MDH)、草酰乙酸脱羧酶(OADC)、乳酸脱氢酶(LDH)、烟酰胺核苷酸转氢酶(TH)等。

国内外研究人员对MLF代谢途径进行了研究, 认为葡萄酒中苹果酸向乳酸的转化途径可能有3种^[1], 但葡萄酒苹果酸-乳酸菌体内具有2种LDH, 即L-LDH和D-LDH, 可将丙酮酸同时转化为D-乳酸和L-乳酸。研究证实, MLF过程中, 苹果酸-乳酸菌只能分解L-苹果酸, 生成L-乳酸。所以, L-苹果酸向L-乳酸的转变, 即MLF是L-苹果酸在乳酸菌MLE催化下直接转变成L-乳酸的过程^[1]。



Lanvand-Funed等从葡萄酒中分离出的肠膜状明串珠菌(*Leuc.mesenteroides*)中分离纯化了MLE。研究表明, 该酶为诱导酶, 只有当苹果酸和可发酵糖存在时, 细菌才能在胞内合成, 分子量为235000, pI为4.35, 酶活最适pH为5.75。MLE为多酶复合体, 并与乳酸脱氢酶紧密结合; NAD⁺为辅酶, Mn²⁺为激活剂。MLE只能将L-苹果酸转变成L-乳酸而不生成D-乳酸^[3-6]。

草酸铵盐、1,6-二磷酸果糖、L-乳酸为MLE的非竞争性抑制剂, 琥珀酸、柠檬酸和酒石酸为该酶的竞争性抑制剂。

2 柠檬酸与糖的共代谢

葡萄酒酒精发酵结束后, 酒中常含有1~5 mM的柠檬酸及10 mM左右的残糖(葡萄糖、果糖及阿拉伯糖等)。苹果酸-乳酸菌可以分解代谢柠檬酸生成乳酸以及双乙酰、乙偶姻等风味物质, 对葡萄酒的感官品质具有重要影响。在低pH值条件下, 当基质中无可发酵糖时, 苹果酸-乳酸菌几乎不分解柠檬酸, 而当有可发酵糖存在时, 细菌对柠檬酸和葡萄糖的分解代谢速度都提高, 细菌生长比率与生长量均明显增大。因此, 细菌对柠檬酸-葡萄糖进行着共代谢(co-metabolism)。共代谢首先在乳品发酵过程中得到研究和证实, 并已证明这种现象也存在于葡萄酒MLF过程中。在柠檬酸-葡萄糖共代谢途径中, 两者的影响是相互的^[7]。柠檬酸刺激了细菌对糖的代谢, 提高了细菌生长量和生长速率。糖代谢也改变了柠檬酸的代谢途径, 柠檬酸进入细胞后, 在柠檬酸裂解酶的作用下分解成乙酸和草酰乙酸, 后者脱羧生成丙酮酸, 在糖代谢产生的NADH₂的作用下, 被还原生成乳酸, 使共代谢过程中, 柠檬酸代谢产物中乳

收稿日期: 2003-07-17

作者简介: 刘芳(1975-), 女, 河北人, 硕士, 助教。

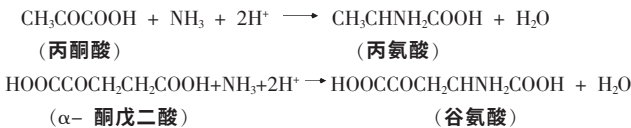
酸产率提高。

不同属的苹果酸-乳酸细菌及同属的不同菌株,发酵特性均不相同^[2,8]。酒类酒球菌MLF期间,柠檬酸的降解与苹果酸的降解相比被延迟,柠檬酸代谢最主要的呈香副产物是双乙酰(2,3-丁二酮)及其衍生物(乙偶姻、2,3-丁二醇)。生成的双乙酰的含量在其阈值范围之内(小于5 mg/L),有利于葡萄酒风味复杂性的形成,对酒香有一定的增进作用;当其含量超过阈值时,就会使酒出现奶油味,破坏酒的香气。MLF过程中产生的双乙酰的最大浓度取决于葡萄酒中氧气的浓度和葡萄酒的氧化还原能力,酒中双乙酰的最终浓度也取决于SO₂浓度。在pH3.5,30℃,0.1 M 苹果酸缓冲条件下,双乙酰与SO₂结合(k(f)=7.2×10³/M),所以,葡萄酒在贮藏期间SO₂浓度降低,双乙酰浓度会再次升高^[9]。

3 含N化合物的代谢

3.1 氨基酸代谢

乳酸菌生长代谢过程中,氨与糖解或其他有机物分解产生的酮酸进行反应可生成初生氨基酸,如:



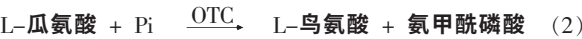
经转氨酶作用,初生氨基酸也可作为直接合成次生氨基酸的前体,如谷氨酸是合成脯氨酸、鸟氨酸和精氨酸的前体,等等^[10]。根据氨基酸合成来源可归为下列5族,组氨酸另成体系,共生成20种氨基酸,见表1。

3.2 精氨酸代谢

精氨酸,是葡萄汁和葡萄酒中以相当数量存在的一种氨基酸。西班牙的Puri等经过3年连续测定,发现酿酒葡萄品种雷司令、赤霞珠、Moristel中,精氨酸含量相当高,且在Tempranillo葡萄中,精氨酸含量占了游离氨基酸的62%^[11]。由于在葡萄酒酿造过程中,精氨酸可被一些葡萄酒乳酸菌所代谢,代谢产物瓜氨酸可作为生成致癌物质——氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate,EC)的前体物。所以,近年来随着对葡萄酒和其他酒类产品质量控制要求的进一步提高,人们对乳酸菌精氨酸的代谢研究也更加深入。

Liu等对精氨酸代谢与精氨酸脱亚胺途径酶的产生之间的相关性进行了研究^[12]。发现3种酶——精氨酸脱亚胺酶(arginine deiminase,ADI)、鸟氨酸转氨甲酰酶(ornithine transcarbamylase,OTC)和氨基甲酸激酶(carbamate kinase,CK),在35种葡萄酒乳酸菌细胞提取物中均具有活性。这些酶存在于所有的异型发酵乳杆菌和绝大多数明串珠菌中,但在所有的同型发酵乳杆菌和片球菌中并未检测到。研究结果也表明,精氨酸降解、氨和瓜氨酸的形成与精氨酸脱亚胺酶的产生具有很好的相关性,而在精氨酸降解中并未检测到精氨酸酶和脲酶存在,因此认为精氨酸代谢主要通过精氨酸脱亚胺途径,而并不通过精氨酸酶代谢反应(Arginase-catalyzed reaction)^[13]。另外,其他众多学者的研究结果也很好地支持了精氨酸代谢的脱亚胺途径学说。

Liu等提出的酒类酒球菌降解精氨酸的脱亚胺途径(arginine deiminase pathway,简称ADI途径)表示如下^[14]:



精氨酸脱亚胺酶、鸟氨酸转氨甲酰酶是诱导酶,只有当培养基中加入精氨酸时,细胞才能合成这两种酶,氨基甲酸激酶为结构酶。按照ADI途径,1 mol的精氨酸理论上可以生成2 mol的NH₃和分别为1 mol的鸟氨酸、ATP和CO₂。这种化学计量关系在一些酒类酒球菌、布氏乳杆菌等细菌的精氨酸代谢研究中都得到了证实^[13]。但是,不同菌株具有不同代谢特性。Granchi L等对几个酒类酒球菌菌株的精氨酸代谢研究结果表明,形成的瓜氨酸与利用的精氨酸之间的分子比率上具有很大差异,范围在0.02~0.33。一些菌株能释放出高数量的氨,另有可能是由于它们具有降解丝氨酸的能力。但同时也发现,在ADI途径中有少量的瓜氨酸(占代谢总量的4%~28%)从细菌的胞内分泌到培养基中。Orduna等对诱导葡萄酒MLF的多种商品菌株的精氨酸代谢进行了检测,对其分泌和利用EC前体物——瓜氨酸的能力进行了评价。研究发现,所有被测菌株都从精氨酸降解中向介质中分泌瓜氨酸。在精氨酸含量丰富的培养基中,乳酸菌处于生长阶段时瓜氨酸被贮存在胞内,在细胞溶解时则被释放出来^[15]。并且,这些分泌的瓜氨酸还可被乳酸菌重新利用,如布氏乳杆菌可进行再同化吸收,但明串珠菌不会^[14]。另外,一些不能利用精氨酸的酒类酒球菌菌株也可以降解瓜氨酸完全再生为鸟氨酸、氨和CO₂,对此进一步分析表明,该类乳酸菌利用瓜氨酸,可使乳酸菌从瓜氨酸代谢中获得额外能量用于生长,因此,瓜氨酸的减少也避免了葡萄酒中自然存在的瓜氨酸生成氨基甲酸乙酯的可能性。

氨基甲酸乙酯,自从1943年Nettle ship 实验证明其具有致癌作用后,1971年Lofroth和Gejvall在发酵食品中发现了EC,并检测了葡萄酒中的EC含量^[16]。美国的研究者们对葡萄酒中的EC也作了大量的研究,认为精氨酸代谢会产生EC的前体如瓜氨酸、脲、氨甲酰磷酸、N-氨甲酰α-和β-氨基酸及尿素等,这些化合物可以与酒精自发地反应生成EC,因此,有些国家对一些发酵产品的EC含量水平作出了明确规定,在美国,限定葡萄酒中的EC含量必须在

表 1	氨基酸合成谱系		
前体	氨基酸		族别
α -酮戊二酸	$\rightarrow$ 谷氨酸	谷氨酰胺 脯氨酸 精氨酸 赖氨酸	谷氨酸族
草酰乙酸	$\rightarrow$ 天门冬氨酸	赖氨酸(细菌) 苏氨酸$\rightarrow$异亮氨酸 蛋氨酸	天门冬氨酸族
磷酸烯醇式丙酮酸 + 磷酸赤藓糖	$\rightarrow$	色氨酸 酪氨酸 苯丙氨酸	芳香族氨基酸族
3-磷酸甘油酸	丝氨酸 $\rightarrow$	甘氨酸 半胱氨酸	丝氨酸族
丙酮酸	$\rightarrow$	丙氨酸 缬氨酸 亮氨酸	丙氨酸族
磷酸核糖焦磷酸 + ATP	$\rightarrow$ 组氨酸		

15 ng/ml以下。葡萄酒MLF过程中乳酸菌降解精氨酸产生的瓜氨酸作为EC形成的前体物,对EC的产生具有重要的作用,不同菌株EC生成量差异很大。也有研究表明,酒中的EC主要是酒精发酵过程中酵母菌活动引起的,甚至EC的含量与MLF无关^[1]。因此,乳酸菌降解精氨酸的能力应该被充分评定,包括应用于苹果酸乳酸菌株的筛选标准方面。

3.3 胺类的生成

葡萄酒MLF过程中,由于苹果酸-乳酸菌的生长代谢,会使酒中的氨基酸含量发生显著变化。某些氨基酸在葡萄酒苹果酸-乳酸菌相关酶的作用下发生脱羧反应,可生成相应的胺类化合物^[15]。酒类酒球菌9204的组胺脱羧酶(Histidine decarboxylase, HDC)被纯化、克隆和基因测序。表明其由 α , β 2个亚单位组成,并以六聚体形式存在;Hdc基因编码一个315 aa的多肽,酒类酒球菌9204 HDC作为一种前体物proHDC p16(Mr 205000)被合成。这些结果证明,红葡萄酒MLF的主要乳酸菌能够产生组胺^[17,18]。另外,Vidal等对226个酒样、186个酒样分别进行了组胺和酪胺的测定。结果表明,组胺含量范围从痕量到25 mg/L和34 mg/L,红、白、桃红葡萄酒中平均含量为4.07 mg/L, 0.81 mg/L和0.86 mg/L,酪胺含量范围从痕量到7.80 mg/L,红、白、桃红酒中平均含量为3.03 mg/L, 1.49 mg/L, 1.66 mg/L。进一步研究测定发现,在所有酒样中,组胺、酪胺含量呈高度正相关;在白、桃红酒中,两者含量与挥发酸之间呈高度正相关,而在红葡萄酒中则呈高度负相关。在所有酒样中,组胺、酪胺含量与MLF强度呈正相关,组胺含量与乳酸/苹果酸比率也具有很好的相关性^[19]。

组胺的产生不仅与菌株特性有关,也取决于前体物的数量及存在的酵母菌皮的作用,这些因素增加了介质中组氨酸的含量。控制细菌生长速率和总生物量的乙醇、pH也是很重要的因素。pH和低乙醇浓度促进组胺的产生,特别是在营养最贫乏(无葡萄糖、无L-苹果酸)的条件下,可能会导致组胺的大量产生。另外,酿酒工艺也可能影响到葡萄酒中最终胺类的浓度。

组胺作为非风味性物质,在葡萄酒中普遍存在,特别是存在于经MLF的红葡萄酒中,所以,启动MLF的菌株筛选方面,具有HDC活性的细菌也应该避免使用。

4 细菌素的产生

乳酸菌代谢可以产生有机酸、双乙酰、细菌素等多种代谢产物。细菌素是细菌代谢过程中合成并分泌到环境中的一类对同种或亲缘关系较近的种有抑制作用的杀菌蛋白或多肽物质。随着研究的进展,已发现了一些对食品腐败微生物和病原微生物具有广谱抑菌活性的细菌素。因而,目前普遍认为,由发酵产生的细菌素对于改善各种发酵食品的质量和安全性具有重要的意义。到目前为止,已有40余种乳酸菌细菌素被报道描述。除了乳球菌属细菌素、片球菌属细菌素、乳杆菌属细菌素外,明串珠菌属细菌素也是研究报道较多的一类。

明串珠菌是从葡萄酒发酵中发现的乳酸菌。很早人们就认识到明串珠菌属细菌素这种有机体具有抗菌活性,然而在多数情况下,此类抑菌物不是细菌素,而是乙酸和双乙酰。已报道的明串珠菌细菌素有mesenterocin 5, leucocin A, leuconocin S和carnocin,但只是一般特性的描述,缺乏完整的生化遗传特性。其中,leucocin A表现出一个抗广谱革兰氏阳性菌的活性。它是由L-gelidium UAL187产生的细菌素,分子量为3900 Da,热稳定性为60℃, 30 min,对淀粉酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶敏感,在MRS液体培养基中对数前期产生,可对明串珠菌、乳杆菌、片球菌、单核细胞增生利斯特氏菌、粪肠球菌等产生抑制作用^[20]。

参考文献:

- [1] 李华.现代葡萄酒工艺学[M].西安:陕西人民出版社,2001.
- [2] 张春晖.中国优良酒类酒球菌的分离筛选及MLF研究[C].西北农林科技大学博士论文,2001.
- [3] Arthurs C E M, Lloyd D. Kinetics, stereospecificity, and expression of the malolactic enzyme[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(8): 3360-3363.
- [4] Labarre C, Guzzo J, Cavin J F, et al. Cloning and characterization of the genes encoding the malolactic enzyme and the malate permease[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(4): 1274-1284.
- [5] Vaillant H, Formisyn P. Purification of the malolactic enzyme from a Leuconostoc oenos strain and use in a membrane reaction for achieving the malolactic fermentation of wine[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1996, 24(3): 217-223.
- [6] Zapparoli G, Torriani S, Pesente P, et al. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of Oenococcus oeni in wine[J]. Lett. Appl. Microbiol., 1998, 27: 243-246.
- [7] 朱宝镛.葡萄酒科学与工艺[M].北京:轻工业出版社,1992.
- [8] 张春晖,李华.酒明串珠菌31DH酿酒特性的研究[J].微生物学报, 1997, 24(1): 14-18.
- [9] Nielsen J C, Richelieu M. Control of flavor development in wine during and malolactic fermentation by Oenococcus oeni[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(2): 740-745.
- [10] 郝余祥.微生物学[M].杨凌:天则出版社,1990.
- [11] Puri Hernandez Orte, Ana Guitart, Juan Cacho. Changes of concentration of amino acids during ripening of grapes in the Denomination d'Origine somontano (Spain)[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1999, 50(2): 144-154.
- [12] Arena M E, Saguir F M, Manca de Nadra M C. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine[J]. Int. J. Food Microbiol., 1999, 52(3): 155-161.
- [13] Liu S Q, Pritchard G G, Hardman M J, et al. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(1): 310-316.
- [14] Liu S Q, Pritchard G G, Hardman M J, et al. Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway of the arginase-urease pathway[J]. J. Appl. Bacteriol., 1996, 81(5): 486-492.
- [15] Orduna R M de, Liu S Q, Patchett M L, et al. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiol. Lett., 2000, 183(1): 31-35.
- [16] 陆健.酒精饮料中的氨基甲酸乙酯[J].江苏食品与发酵, 1994, (3): 27-29.
- [17] Coton E, Rollan G C, Lonvaud Funel A. Histidine carboxylase of Leuconostoc oenos 9204: purification, kinetic properties, and cloning and nucleotide sequence of the hdc gene[J]. J. Appl. Microbiol., 1998, 84(2): 143-151.
- [18] Lonvaud Funel A, Joyeux A. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of Leuconostoc oenos[J]. J. Appl. Bacteriol., 1994, 77(4): 401-407.
- [19] Vidal Carou M C, Codony Salcedo R, Marine Font A. Histamine and tyramine in Spanish wines: relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malolactic fermentation intensity[J]. Food Chemistry, 1990, 35(3): 217-227.
- [20] 李平兰,张旄,江汉湖.乳酸菌细菌素研究进展[J].微生物通报, 1998, 25(5): 295-298.