

黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶对葡萄酒酶解增香调控及香气物质的影响\*桑苇<sup>1</sup>, 唐柯<sup>1</sup>, 徐岩<sup>1</sup>, 王栋<sup>1</sup>, 李记明<sup>2</sup>

1(工业生物技术教育部重点实验室、江南大学生物工程学院酿酒微生物与酶技术研究室, 江苏 无锡, 214122)

2(烟台张裕葡萄酒股份有限公司, 山东 烟台, 264000)

**摘 要** 采用 Kramer 感官品评, 并结合顶空固相微萃取气相色谱质谱 (SPME-GC-MS) 联用方法, 研究黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶对赤霞珠葡萄酒酶解增香调控的最佳条件及香气物质影响。结果表明, 酶解增香处理的最佳条件为酶解温度 45 ℃、酶解时间 4.0 h、加酶量 4.0 U/mL。酶解样品经 SPME-GC-MS 检测分析, 共定性出 59 种呈香物质, 方差分析得知其中 35 种物质酶解前后具有显著性差异。香气物质相对含量总量增加 24.59%, 其中以萜烯及 C13-降异戊二烯类物质增量最为明显, 为 118.54%。酶解处理对提高葡萄酒中典型性香气, 进一步改善葡萄酒风味起到积极影响。

**关键词**  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 气相色谱质谱联用; Kramer 感官品评; 增香调控

香气是葡萄酒的重要感官指标, 对葡萄酒的风格和品质有重要的影响<sup>[1]</sup>。葡萄酒香气根据来源不同分为品种香、发酵香和陈酿香<sup>[2]</sup>。葡萄酒中的香气成分主要以游离态和结合态香气前体物质的形式存在, 结合态物质本身没有香气, 必须经过分解释放才能产生香气。通常葡萄浆果中以葡萄糖苷键形式存在的结合态香气物质的含量比游离态的呈香物质要丰富, 如单萜烯基- $\beta$ -葡萄糖苷、以 S-半胱氨酸形式存在的硫醇等, 这些风味前体物质的含量远多于挥发性的萜烯化合物<sup>[3-4]</sup>。由于结合态香气物质本身没有香气且不挥发或难挥发<sup>[5]</sup>, 为使这些香气分子释放, 就需要打断结合香气分子的糖苷键, 从而释放出具有浓郁香气且易挥发的糖苷配基。糖苷配基主要包括萜烯类化合物、脂肪醇类、芳香烃类衍生物等,  $\beta$ -葡萄糖苷酶则是这些香气分子释放过程酶系中最重要的酶之一<sup>[6-8]</sup>。

$\beta$ -葡萄糖苷酶是芳香前体水解、结合态糖苷配基释放的关键酶<sup>[9]</sup>。1837 年 Liebig 和 Wöhler<sup>[10]</sup> 在苦杏仁汁中首次发现了  $\beta$ -葡萄糖苷酶。González Pombo<sup>[11]</sup>、Pardo García<sup>[12]</sup> 等用  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解酶系处理麝香 (Muscat) 葡萄酒, GC-MS 分析结果表明, 经酶处理后葡萄酒的香气成分芳樟醇、香叶醇、 $\alpha$ -松油醇、芳樟醇氧化物等含量明显提高。Baffi<sup>[13]</sup> 等人筛选出

产自出芽短梗霉的  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 对葡萄酒加酶处理后单萜类物质含量亦有显著提升。郭慧女<sup>[14]</sup> 等研究了黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶对麝香葡萄酒中结合态香气提取物质的酶解作用效果, 水解断裂产生典型的萜烯、醇类、酯类等化合物, 释放出令人愉快的香气物质。

$\beta$ -葡萄糖苷酶是风味修饰中的关键酶, 对葡萄酒香气的提升具有十分重要的作用, 但由于我国葡萄酒工业起步较晚, 目前葡萄酒用商业酶制剂基本都为国外所垄断。本课题组在前期研究中从葡萄园环境中筛选得到 1 株高产  $\beta$ -葡萄糖苷酶的黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 且酶具有较好的应用特性<sup>[14]</sup>。本研究则利用这株黑曲霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 采用 Kramer 感官评定的方法研究  $\beta$ -葡萄糖苷酶对赤霞珠葡萄酒酶解增香调控的最佳条件, 并采用固相微萃取结合气相色谱质谱联用 (SPME-GC-MS) 分析酶解处理对葡萄酒香气物质的影响, 旨在为风味酶的国产化应用以及葡萄酒的工业化酶解增香提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

赤霞珠干红葡萄酒, 2013 年产, 张裕葡萄酒股份有限公司; 黑曲霉产  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 电泳纯级别; 无水 NaCl, 分析纯, 上海国药集团; 内标物 2-辛醇 (2-Octanol), 色谱纯, Sigma-Aldrich 公司。

### 1.2 仪器与设备

气相色谱质谱联用仪 GC 6890N-MSD 5975, 美国

第一作者: 硕士研究生 (徐岩教授和王栋副教授为通讯作者, E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn, dwang@jiangnan.edu.cn)

\* 国家 863 计划项目 (2013AA102108); 山东省泰山学者计划

收稿日期: 2015-01-25, 改回日期: 2015-02-12

Agilent 公司;DB-FFTP 色谱柱(60 m × 0.25 mm × 0.25 μm),美国 J&W 公司;Milli-Q 超纯水系统,美国 Millipore 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 葡萄酒酶解反应实验

经单因素酶解实验,选择合适的酶解温度、酶解时间及加酶量 3 个因素,设计  $L_9(3^4)$  正交实验<sup>[15]</sup>,实验设计如表 1、表 2 所示。

表 1 正交实验设计  
Table 1 Orthogonal test

水平	温度/℃	时间/h	加酶量/(U · mL <sup>-1</sup> )
1	40	3.0	3.0
2	45	4.0	3.5
3	50	5.0	4.0

表 2 正交实验样品编号  
Table 2 Sample number of the orthogonal test

序号	温度/℃	时间/h	加酶量/(U · mL <sup>-1</sup> )	样品编号
1	1(40)	1(3.0)	1(3.0)	A
2	1(40)	2(4.0)	2(3.5)	B
3	1(40)	3(5.0)	3(4.0)	C
4	2(45)	1(3.0)	2(3.5)	D
5	2(45)	2(4.0)	3(4.0)	E
6	2(45)	3(5.0)	1(3.0)	F
7	3(50)	1(3.0)	3(4.0)	G
8	3(50)	2(4.0)	1(3.0)	H
9	3(50)	3(5.0)	2(3.5)	I

1.3.2 Kramer 感官顺位评定

15 名经过 1 年以上感官品评培训的品评员,在室内温度适宜,阳光充足条件下,对已随机编号的正交实验酶解处理的 9 个样品及空白对照样品(J)进行闻香,并按照香气浓度强弱程度进行打分排序。

利用 SPSS Statistics 19.0 软件 Duncan 多重比较方法处理 Kramer 感官品评数据<sup>[16]</sup>,得到实验条件下 β-葡萄糖苷酶对葡萄酒酶解增香调控的最佳条件。

1.3.3 HS-SPME 分析条件

在最佳条件酶解反应后,样品待 HS-SPME 分析。

顶空固相微萃取条件:45 ℃ 预热 2.5 min,萃取吸附 45 min,GC 解析 5 min,用于 GC-MS 分析。

1.3.4 GC-MS 分析条件<sup>[17]</sup>

GC 条件:样品经 DB-FFTP 色谱柱分离;进样口温度 250 ℃,不分流;载气为 He,流速 2 mL/min;柱温升温程序:初始温度 50 ℃,稳定 2 min 后,以 4 ℃/min 速率升温至 230 ℃,保持 15 min。分离后的样品经过 MSD5975 检测。

MS 条件:EI 电离源,电子能量 70 eV,离子源温度为 230 ℃,扫描范围 30.00 ~ 500.00 amu。每个样品重复测定 3 次求取平均值。

1.3.5 物质定性与半定量方法

物质定性:香气活性成分的定性通过与 NIST 05 质谱库(Agilent Technologies Inc.)中标准谱图进行检索比对,并根据改进的 Kovats<sup>[18]</sup>法计算得到各物质保留指数(RI)进行确认。

组分峰面积的相对含量:在待测酒样中加入 2-辛醇(2-Octanol)内标,进 GC-MS 分离。计算公式为:

$$X_i = (A_i/A_s) \times C_s$$

其中  $X_i$  为待测物质相对含量; $C_s$  为内标物质浓度; $A_i$  为待测物质峰面积; $A_s$  为内标物质峰面积。

2 结果与分析

2.1 Kramer 感官顺位评定结果及分析

酒样按照正交设计实验中的条件处理结束后,进行 Kramer 感官品评。在进行感官品评时,品评员得到随机排序编号的样品后,按照香气强弱程度将样品先大致分为强、中、弱 3 组,再在 3 组组内进行比较排序,确定所有样品香气强弱顺序,最终所有样品按照香气由弱到强进行排列。对于不同样品,如无法区别时,在评价时注明相同同级。

15 名感官品评员对 10 个葡萄酒样品的香气强弱程度进行 Kramer 感官评定,结果如表 3 所示。由表 3 中看出,15 名品评员对 10 个葡萄酒样品进行较好排序,无相同同级。

表 3 Kramer 感官顺位评定结果(香气由弱到强)排序  
Table 3 Kramer sensory evaluation result  
(weak to strong)

品评员	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	I	H	J	A	B	C	D	G	E	F
2	J	A	C	D	I	F	B	E	H	G
3	A	D	I	J	F	B	E	C	G	H
4	J	A	D	I	H	C	B	E	F	G
5	A	J	B	H	C	I	F	G	D	E
6	I	J	B	C	A	H	F	D	E	G
7	J	I	G	A	C	B	F	D	E	H
8	H	A	I	J	D	G	B	C	F	E
9	C	B	F	A	J	E	I	D	H	G
10	A	F	J	G	C	E	B	I	H	D
11	A	C	G	J	I	H	F	B	E	D
12	B	J	I	D	F	A	E	G	C	H
13	J	B	F	A	H	I	C	E	G	D
14	H	B	A	I	J	D	E	C	F	G
15	I	H	J	F	A	B	C	G	D	E

利用 SPSS Statistics 19.0 软件 Duncan 多重比较方法处理 Kramer 感官品评数据,得到表 4。依据品评员数  $n=15$ ,样品数  $m=10$ ,查表<sup>[19]</sup>,得到显著性水平临界值。 $\alpha=0.01$  显著水平:上段为 49~116,下段为 57~108。由表 4 中  $R_{\max}=R_E=123>116$ , $R_{\min}=R_J=41<49$ ,15 名品评员排序有效,在  $P=0.01$  具有显著性差异。10 个样品依显著性划分为 3 组:样品 A、J 样品为一组,样品 B、C、D、F、H、I 为一组,样品 E、G 为一组,且组内无显著差异。

表 4 10 个葡萄酒样品位级及位级和  
Table 4 Rank and rank sum of ten samples

品评员	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	4	5	6	7	9	10	8	2	1	3
2	2	7	3	4	8	6	10	9	5	1
3	1	6	8	2	7	5	9	10	3	4
4	2	7	6	3	8	9	10	5	4	1
5	1	3	5	9	10	7	8	4	6	2
6	5	3	4	8	9	7	10	6	1	2
7	4	6	5	8	9	7	3	10	2	1
8	2	7	8	5	10	9	6	1	3	4
9	4	2	1	8	6	3	10	9	7	5
10	1	7	5	10	6	2	4	9	8	3
11	1	8	2	10	9	7	3	6	5	4
12	6	1	9	4	7	5	8	10	3	2
13	4	2	7	10	8	3	9	5	6	1
14	3	2	8	6	7	9	10	1	4	5
15	5	6	7	9	10	4	8	2	1	3
R Sum	45	72	84	103	123	93	116	89	59	41

2.2 酶解增香最佳条件的确定

根据 Kramer 感官顺位评定得到样品的位级和,对赤霞珠葡萄酒酶解增香的正交实验结果进行极差分析,结果如表 5 所示。

表 5 正交实验极差分析  
Table 5 Experiment result of orthogonal design and range analysis

序号	温度/℃	时间/h	加酶量/ (U·mL <sup>-1</sup> )	样品编号	位级和
1	1(40)	1(3.0)	1(3.0)	A	45
2	1(40)	2(4.0)	2(3.5)	B	72
3	1(40)	3(5.0)	3(4.0)	C	84
4	2(45)	1(3.0)	2(3.5)	D	103
5	2(45)	2(4.0)	3(4.0)	E	123
6	2(45)	3(5.0)	1(3.0)	F	93
7	3(50)	1(3.0)	3(4.0)	G	116
8	3(50)	2(4.0)	1(3.0)	H	89
9	3(50)	3(5.0)	2(3.5)	I	59
$K_1$	201.00	264.00	227.00		
$K_2$	319.00	284.00	234.00		
$K_3$	264.00	236.00	323.00		
R	39.33	16.00	32.00		

比较表 5 中的极差差异,可知影响葡萄酒酶解增香 3 个因素的主次顺序为酶解温度、加酶量、酶解时间。其中酶解温度为主要影响因素,可见酶的活性与作用环境温度相关性较大,加酶量次之。综合正交实验极差分析结果,可得 3 个实验因素的最优组合为  $A_2B_2C_3$ ,即在酶解温度 45℃、酶解时间 4.0 h、加酶量 4.0 U/mL 条件下处理的葡萄酒。

2.3 酶解处理对赤霞珠干红葡萄酒香气物质的影响

依据酶解增香调控的优化条件实验结果,处理赤霞珠干红葡萄酒,研究酶解处理对赤霞珠葡萄新酒香气物质的影响。对酶解前后样品中的挥发性物质进行定性及组分峰面积的相对含量比较,数据进行单因素方差分析,结果如表 6 所示。

对添加黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶实验前后的酒样经 GC-MS 检测分析,共定性得到 59 种呈香物质。单因素方差分析结果表明,共 35 种物质在处理前后具有显著性差异( $P<0.05$ ),其中 23 种物质具有极显著差异( $P<0.01$ )。酶解处理后香气物质相对总量与对照相比增加 24.59%,其中萜烯及 C13-降异戊二烯类物质相对含量增加 118.54%,醇类物质相对含量增加 19.12%,芳香族类化合物相对含量增加 17.24%,酯类物质相对含量增加 16.04%,这 4 类物质相对含量占总含量的 94.64%。

在所有香气物质中,萜烯及 C13-降异戊二烯类物质相对含量增加最为明显突出,且都具有显著性差异。萜烯及 C13-降异戊二烯类物质是形成和决定葡萄酒品种香气关键的因素,通常都具有浓郁的香气及较低的感官阈值<sup>[20]</sup>,是酿酒葡萄原料中潜在的非常重要的香气成分,对葡萄酒品质起着举足轻重的作用<sup>[21]</sup>。萜烯类化合物多以无味的糖苷态形式存在,通过外源添加糖苷酶则是释放游离态萜烯化合物的有效方法。从表 6 可以看出,经酶解后的葡萄酒样品,萜烯类物质相对含量均有明显提升。含量增加最多的是 4-萜品醇,其相对含量增加 682%,可以释放松节油、核仁等香气;其次是  $\alpha$ -松油醇,其相对含量增加 239%,具有茴香,薄荷的香气特征;香叶醇相对含量增加 205%,能够释放玫瑰花、天竺葵香气;香叶基丙酮相对含量增加 150%,具有木兰花香气; $\beta$ -紫罗兰酮相对含量增加 113%,表现出紫罗兰花香的香气特征;香叶醛相对含量增加 51%,具有薄荷,柠檬等香气; $\beta$ -大马酮相对含量增加 43%,能够释放浓郁的蜂蜜香气。本实验与 Baffi<sup>[13]</sup>研究来源于出芽短梗霉的  $\beta$ -葡萄糖苷酶作用结果相比,更多地释放了 4-萜品醇、 $\beta$ -紫罗兰酮、 $\beta$ -大马酮等香气物质。萜烯类香气的释放,也使葡萄酒品种香更加馥郁丰富。

由以上结果可知,来源于黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶对结合态萜烯类物质具有很强的作用效果,有效地水解结合态前体物质糖苷键,促使糖苷配基及香气小分子的释放,对提高葡萄酒中典型性香气,建立葡萄酒独特风格起到积极影响。

表 6 糖苷酶处理前后对比结果及显著性分析

Table 6 One-way analysis of variance of aroma compounds content before and after $\beta$ - glucosidase processing							
中文名称	英文名称	RI(lit)	RI(cal)	处理前相对含量	处理后相对含量	显著性	
酯类	Ester						
乙酸乙酯	Ethyl acetate	907	915	1 042.03 $\pm$ 68.64	1 044.15 $\pm$ 54.18	0.974	
丁酸乙酯	Ethyl butyrate	1 028	1 029	18.32 $\pm$ 3.87	21.42 $\pm$ 4.31	0.017	
戊酸乙酯	Ethyl valerate	1 133	1 127	2.28 $\pm$ 0.26	7.02 $\pm$ 1.25	0.005	
己酸乙酯	Ethyl hexanoate	1 220	1 217	539.27 $\pm$ 32.57	624.12 $\pm$ 57.06	0.179	
庚酸乙酯	Ethyl heptanoate	1 332	1 335	5.42 $\pm$ 1.60	4.89 $\pm$ 1.61	0.561	
乳酸乙酯	Ethyl lactate	1358	1362	368.74 $\pm$ 71.21	623.90 $\pm$ 81.13	0.037	
辛酸甲酯	Methyl octanoate	1 387	1 386	7.87 $\pm$ 1.17	8.16 $\pm$ 1.96	0.737	
辛酸乙酯	Ethyl octanoate	1 438	1 436	2 795.87 $\pm$ 187.69	2 711.38 $\pm$ 191.97	0.585	
己酸异戊酯	Isopentyl hexanoate	1 453	1 454	11.05 $\pm$ 2.77	16.20 $\pm$ 2.62	0.411	
壬酸乙酯	Ethyl nonanoate	1 528	1 536	8.59 $\pm$ 1.07	12.21 $\pm$ 1.67	0.026	
丙酸癸酯	Decyl propionate	-	1 552	6.54 $\pm$ 1.21	3.32 $\pm$ 1.01	0.014	
乳酸异戊酯	Isoamyl lactate	1 563	1 579	7.23 $\pm$ 1.16	7.64 $\pm$ 1.46	0.191	
癸酸甲酯	Methyl decanoate	1 590	1 596	4.23 $\pm$ 0.82	5.62 $\pm$ 0.91	0.213	
癸酸乙酯	Ethyl decanoate	1 636	1 638	1 083.56 $\pm$ 124.68	1 378.40 $\pm$ 101.92	0.069	
辛酸异戊酯	Isoamyl octanoate	1 667	1 669	23.45 $\pm$ 2.36	71.10 $\pm$ 13.58	0.000	
水杨酸甲酯	Methyl salicylate	1 755	1 764	20.86 $\pm$ 3.53	138.15 $\pm$ 19.55	0.000	
月桂酸乙酯	Ethyl laurate	1 842	1 850	31.04 $\pm$ 6.68	73.78 $\pm$ 11.80	0.001	
癸酸异戊酯	Isopentyl caprate	1 860	1 869	3.92 $\pm$ 0.81	22.87 $\pm$ 2.58	0.000	
肉豆蔻酸乙酯	Ethyl myristate	2 032	2 029	16.03 $\pm$ 4.56	63.11 $\pm$ 15.34	0.000	
十五酸乙酯	Ethyl pentadecanoate	2 161	2 140	1.64 $\pm$ 0.23	16.72 $\pm$ 4.72	0.001	
棕榈酸乙酯	Ethyl palmitate	2 189	2 167	97.35 $\pm$ 11.31	199.31 $\pm$ 28.52	0.001	
对甲基苯甲酸乙酯	Ethyl 4-methylbenzoate	-	2 234	ND	7.11 $\pm$ 1.92	0.000	
琥珀酸单乙酯	Ethyl hydrogen succinate	2 268	2 257	44.11 $\pm$ 11.74	55.92 $\pm$ 16.27	0.370	
硬脂酸乙酯	Ethyl octadecanoate	2 295	2 304	4.52 $\pm$ 0.98	8.48 $\pm$ 1.16	0.005	
亚油酸乙酯	Ethyl linoleate	2 362	2 358	6.67 $\pm$ 1.33	11.82 $\pm$ 2.56	0.033	
邻苯二甲酸二异丁酯	Diisobutyl phthalate	2 389	2 380	12.57 $\pm$ 2.65	14.82 $\pm$ 3.47	0.425	
醇类	Alcohol						
异丁醇	Isobutanol	1 099	1 093	233.56 $\pm$ 24.67	413.20 $\pm$ 33.42	0.008	
正丁醇	1-Butanol	1 146	1 156	ND	6.23 $\pm$ 1.19	0.005	
异戊醇	Isoamyl alcohol	1 215	1 220	3 616.53 $\pm$ 515.42	3 903.80 $\pm$ 506.17	0.529	
庚醇	1-Heptanol	1 225	1 224	ND	314.70 $\pm$ 32.69	0.002	
3-甲基戊醇	3-Methyl-1-pentanol	1 331	1 330	ND	5.62 $\pm$ 0.73	0.010	
正己醇	1-Hexanol	1 360	1 360	56.17 $\pm$ 18.63	82.52 $\pm$ 19.91	0.026	
正辛醇	1-Octanol	1 553	1 560	4.33 $\pm$ 0.97	6.32 $\pm$ 1.15	0.100	
2,3-丁二醇	2,3-Butanediol	1 583	1 584	122.96 $\pm$ 13.40	70.29 $\pm$ 10.35	0.021	
月桂醇	1-Dodecanol	1 772	1 779	3.26 $\pm$ 2.42	3.52 $\pm$ 2.61	0.276	
6-甲基庚醇	6-Methyl-1-heptanol	-	2 085	2.51 $\pm$ 0.62	5.74 $\pm$ 0.89	0.003	
萜烯 C13-降异戊二烯	Terpenes						
$\beta$ -紫罗兰酮	$\beta$ -Ionone	1 486	1 496	1.52 $\pm$ 0.31	3.23 $\pm$ 0.66	0.012	
4-萜品醇	4-Terpineol	1 612	1 618	0.77 $\pm$ 0.12	6.02 $\pm$ 0.17	0.001	
$\alpha$ -松油醇	$\alpha$ -Terpineol	1 689	1 699	1.14 $\pm$ 0.31	3.86 $\pm$ 0.52	0.008	
香叶醛	Geranial	1 715	1 716	0.57 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.13	0.019	
$\beta$ -大马酮	$\beta$ -Damascenone	1 823	1 829	9.13 $\pm$ 0.12	13.04 $\pm$ 0.21	0.004	
香叶醇	Geraniol	1 837	1 844	1.21 $\pm$ 0.13	3.69 $\pm$ 0.19	0.010	

续表 6

中文名称	英文名称	RI(lit)	RI(cal)	处理前相对含量	处理后相对含量	显著性
香叶基丙酮	Geranylacetone	1 842	1 848	2.06 ± 0.32	5.14 ± 0.45	0.006
酸类	Acid					
乙酸	Acetic acid	1 436	1 459	183.21 ± 16.45	191.78 ± 11.32	0.737
异丁酸	Isobutanoic acid	1 563	1 568	11.33 ± 1.36	29.07 ± 2.30	0.011
己酸	Hexanoic acid	1 835	1 836	46.43 ± 6.92	56.06 ± 7.42	0.056
辛酸	Octanoic acid	2 060	2 048	320.97 ± 17.82	320.42 ± 18.83	0.896
癸酸	n-Decanoic acid	2 280	2 266	111.60 ± 7.36	157.13 ± 7.64	0.016
肉豆蔻酸	Tetradecanoic acid	-	2 558	ND	14.71 ± 1.37	0.000
呋喃	Furan					
呋喃甲醛	Furfural	1 461	1 483	25.42 ± 2.70	30.7 ± 2.13	0.082
芳香族	Benzene ring					
苯甲醛	Benzaldehyde	1 528	1 544	19.33 ± 2.80	21.12 ± 2.14	0.423
甲基萘	1-Methyl-naphthalene	-	1 858	8.82 ± 0.75	13.66 ± 0.80	0.020
苯甲醇	Benzyl alcohol	1 865	1 865	9.32 ± 0.85	31.60 ± 1.26	0.000
2-苯基喹啉	2-Phenyl quinoline	-	1 884	5.82 ± 0.80	7.22 ± 0.89	0.246
苯乙醇	Phenylethyl alcohol	1 903	1 909	2 738.96 ± 164.16	3 188.42 ± 160.95	0.392
内酯	Lactone					
γ-丁内酯	γ-Butyrolactone	1 639	1 651	ND	9.26 ± 1.32	0.000
威士忌内酯	Whiskey lactone	1 910	1 941	5.32 ± 0.77	7.01 ± 0.89	0.245
其他	Other					
2,5,5-三甲基-1,6-庚二烯	2,5,5-Trimethyl-1,6-heptadiene	-	1 754	2.27 ± 0.92	2.06 ± 0.95	0.233
2-甲基苄胺	2-Methyl-benzenemethanamine	-	1 812	38.50 ± 6.95	46.46 ± 6.63	0.376

注:ND 未检测到;RI(lit)文献中的保留指数;RI(cal)通过 Kovats 法计算得到。

3 结论

本研究采用黑曲霉 β-葡萄糖苷酶,研究其对葡萄酒增香调控最佳条件及酶解对香气物质的影响。采用 Kramer 感官品评的方法,确定了 β-葡萄糖苷酶酶解增香调控的最佳条件为酶解温度 45 ℃、酶解时间 4.0 h、加酶量 4.0 U/mL。对添加黑曲霉 β-葡萄糖苷酶实验前后的酒样经 GC-MS 检测分析,共定性得到 59 种呈香物质。方差分析结果表明有 35 种物质在处理前后具有显著差异( $P < 0.05$ ),其中 23 种物质具有极显著差异( $P < 0.01$ )。β-葡萄糖苷酶对结合态萜烯类物质具有良好的水解作用,这些物质含量的增加对葡萄酒风味改变都起到积极作用和影响。

参 考 文 献

[1] 于静,李景明,吴继红,等. 葡萄酒芳香物质研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2005(3):48-51.

[2] Ribéreau-Gayon P, D Dubourdieu, A Lonvaud. Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications [M]. John Wiley & Sons,2006:262-275.

[3] 问亚琴,崔婧,潘秋红. 葡萄果实糖苷键合态萜烯物质的研究进展[J]. 园艺学报,2012,39(9):1 679-1 686.

[4] Styger G, Prior B, Bauer F F. Wine flavor and aroma[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,2011,

38(9): 1 145-1 159.

[5] Mateo J J, Jiménez M. Monoterpenes in grape juice and wines[J]. Journal of Chromatography A,2000,881(1): 557-567.

[6] Ünal M Ü, Aksoy V A, Şener A. Isolation, purification and determination of some biochemical properties of β-glucosidase from Muscat of Bornova grape[J]. European Food Research and Technology,2014,238(1): 9-15.

[7] 潘利华,罗建平. β-葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学,2007,27(12):803-807.

[8] 李远华. β-葡萄糖苷酶的研究进展(综述)[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(4):421-425.

[9] Cairns J R K, Esen A. β-Glucosidases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences,2010,67(20):3 389-3 405.

[10] Wöhler F, Liebig J. Ueber die bildung des bittermande-loels[J]. Annalen der Physik,1837,117(6):345-366.

[11] González-Pombo P, Fariña L, Carrau F, et al. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidases[J]. Food Chemistry,2014,143:185-191.

[12] Pardo-García A I, de la Hoz K S, Zalacain A, et al. Effect of vine foliar treatments on the varietal aroma of Monastrell wines [J]. Food Chemistry,2014,163:258-266.

[13] Baffi M A, Tobal T, Lago J H G, et al. Wine aroma improvement using a β-glucosidase preparation from

- Aureobasidium pullulans* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(2): 493–501.
- [14] 郭慧女, 康文怀, 徐岩, 等. 微生物  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶对玫瑰香(Muscat)葡萄结合态香气物质的影响[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(1): 81–84.
- [15] 朱凤妹, 刘长江, 李军. 原生质体融合曲霉菌株  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学性质及对葡萄酒增香调控作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
- [16] 魏永义, 张臻. 排序检验法在食醋感官评价中的应用[J]. *中国调味品*, 2013, 38(3): 98–99.
- [17] 王蓓, 唐柯, 聂尧, 等. 搅拌棒吸附萃取-气质联用分析威代尔冰葡萄酒挥发性成分[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(11): 131–137.
- [18] Cates V E, Meloan C E. Separation of sulfones by gas chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1963, 11: 472–478.
- [19] 孙水华. 食品感官分析与实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [20] 范刚, 王可兴, 潘思轶. 水果中糖苷键合态香气物质的研究进展[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(24): 5 100–5 111.
- [21] Winterhalter P, Rouseff R. Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction [M]. Amer Chemical Society, 2002.

## Effects of $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* on flavoring regulation and aroma compounds of wine

SANG Wei<sup>1</sup>, TANG Ke<sup>1</sup>, XU Yan<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>1</sup>, LI Ji-ming<sup>2</sup>

1(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; Centre for Brewing Science and Enzyme Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(Center of Science and Technology, ChangYu Group Company Ltd., Yantai 264000, China)

**ABSTRACT** The effect of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* on flavor regulation and aroma compounds of Cabernet Sauvignon was analyzed using Kramer sensory evaluation and SPME-GC-MS. The optimized hydrolysis conditions were incubation at 45°C for 4.0 h with enzyme dosage of 4.0 U/mL. A total of 59 aroma compounds were detected and 35 components showed significant differences after treatment. The total relative content of compounds increased 24.59%. The most obvious changes appeared in C<sub>13</sub>-norisoprenoids and terpenes incremental, which increased 118.54%. Enzymatic treatment had positive effects on typical aroma improvement and flavor enhancement in wine.

**Key words**  $\beta$ -glucosidase; SPME-GC-MS; Kramer sensory evaluation; flavoring regulation