



# 高耐酸酒酒球菌常压室温等离子体诱变选育及其苹果酸-乳酸发酵研究

张莉方, 徐宁莉, 陶瑾, 胡蕾, 张国强\*

安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽 芜湖 241000

张莉方, 徐宁莉, 陶瑾, 胡蕾, 张国强. 高耐酸酒酒球菌常压室温等离子体诱变选育及其苹果酸-乳酸发酵研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 4000-4015.

ZHANG Lifang, XU Ningli, TAO Jin, HU Lei, ZHANG Guoqiang. Atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and malolactic fermentation of highly acid-tolerant *Oenococcus oeni*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 4000-4015.

**摘要:**【目的】为选育出高度耐酸性酒酒球菌(*Oenococcus oeni*)突变菌株, 研究其胁迫耐受性能及苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)能力。【方法】以酒酒球菌 SD-2a 为出发菌株, 通过常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变技术, 筛选高耐酸性酒酒球菌突变菌株, 并探究其乙醇耐受性及在模拟酒和葡萄酒条件下的 MLF 能力。【结果】经过 ARTP 诱变处理后, 利用 pH 3.0 的胁迫传代培养和分离纯化等, 获得了 5 株  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性较好的耐酸突变菌株, 且在高乙醇浓度下表现出了较好的耐乙醇性。其中突变菌株 ARTP-2 在模拟酒中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性和 L-苹果酸累积降解量最高, 且其在葡萄酒中 L-苹果酸降解速率快于出发菌株, 在第 18 天完成 MLF, 发酵后的葡萄酒香气成分的含量显著高于接种 SD-2a 的酒样。【结论】突变菌株 ARTP-2 具有良好的胁迫耐受性和 MLF 能力, 对葡萄酒的香气起到积极的作用, 为进一步开发优质的 MLF 商业发酵剂奠定基础。

**关键词:** 常压室温等离子体诱变; 酒酒球菌; 耐酸; L-苹果酸;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 香气成分

资助项目: 安徽省高校重大项目(2022AH04136); 芜湖市科技计划(2022cg19); 国家级大学生创新创业训练计划(202110363058); 校级科研项目(Xjky2022091)

This work was supported by the Major Project of Anhui University (2022AH04136), the Wuhu Science and Technology Plan Project (2022cg19), the National Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (202110363058), and the University-level Scientific Research Project (Xjky2022091).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-553-2871254, E-mail: guoqiang2008@163.com

Received: 2023-03-07; Accepted: 2023-04-18; Published online: 2023-04-21

# Atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and malolactic fermentation of highly acid-tolerant *Oenococcus oeni*

ZHANG Lifang, XU Ningli, TAO Jin, HU Lei, ZHANG Guoqiang \*

College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

**Abstract:** [Objective] To breed highly acid-tolerant strains of *Oenococcus oeni* and study their stress tolerance and malolactic fermentation (MLF) performance. [Methods] The mutagenesis of *O. oeni* SD-2a was carried out with the atmospheric and room temperature plasma (ARTP) method. The ethanol tolerance of the mutants and the MLF performance of the mutants in simulated wine and wine were investigated. [Results] After ARTP mutagenesis, five acid-tolerant mutants with high  $\beta$ -glucosidase activity were isolated by subculture under stress (pH 3.0). The mutants showed strong ethanol tolerance at high ethanol concentrations. Among them, the mutant ARTP-2 had the highest  $\beta$ -glucosidase activity and L-malic acid cumulative degradation in the simulated wine. Moreover, it demonstrated faster L-malic acid degradation rate in wine than *O. oeni* SD-2a and completed MLF on day 18. The total concentration of aroma components in the wine fermented by ARTP-2 was significantly higher than that by *O. oeni* SD-2a. [Conclusion] The mutant ARTP-2 had strong stress tolerance and MLF performance and played a positive role in wine aroma. The findings laid a foundation for the further development of high-quality commercial fermenters for MLF.

**Keywords:** atmospheric and room temperature plasma (ARTP); *Oenococcus oeni*; acid tolerance; L-malic acid;  $\beta$ -glucosidase; aroma components

葡萄酒的发酵过程主要包括酒精发酵和苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)。其中 MLF 是红葡萄酒发酵必不可少的环节<sup>[1]</sup>,一旦酒精发酵结束, MLF 就会开始<sup>[2]</sup>。它能将其中的 L-苹果酸转化为 L-乳酸,使葡萄酒的酸度下降,同时也能产生香味物质,提高葡萄酒的风味<sup>[3]</sup>。

在 MLF 中,乳酸菌是主要的微生物,其中酒球菌(*Oenococcus oeni*)是主导菌<sup>[4]</sup>。酒球菌经常面临恶劣的葡萄酒环境,例如低 pH 值、高乙醇浓度和高二氧化硫等<sup>[5]</sup>,而低 pH 值是葡萄酒中 MLF 主要面临的恶劣环境,为了克服酒

球菌所面临的这一恶劣环境,需要选育出抗性菌株,而传统野生抗性菌株的筛选在短期内较难实现,诱变育种能够高效地在短时间内选育出目标菌株。因此本研究选用诱变育种的方法,提高菌株的抗性。

常压室温等离子体(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)诱变技术具有突变率高、诱变速度快、操作简单和绿色无污染等优点<sup>[6-7]</sup>。该方法不仅克服了传统的化学诱变技术环境污染大、突变单一的问题,而且还克服了传统的物理诱变技术不稳定、变异率低的弊端。另外,与离子注入诱变技术相比,该技术不会因真

空环境中的低温和离子束所引起的温度过高而导致细胞失去活性,因此,利用该诱变技术可以显著地改善细胞的存活和诱变效果<sup>[8]</sup>。目前,ARTP 诱变技术在菌株选育方面已是较为成熟的技术,但关于酒酒球菌诱变选育的方法,除了离子注入诱变和紫外诱变外<sup>[9-11]</sup>,其他研究鲜有报道,目前尚未有报道利用 ARTP 诱变技术选育酒酒球菌。因此,通过 ARTP 诱变技术筛选酒酒球菌耐酸菌株,对酒酒球菌优良菌株的开发和提高葡萄酒品质意义重大。

为获得高耐酸性酒酒球菌,本研究以酒酒球菌 SD-2a 作为出发菌株,首次尝试利用 ARTP 诱变技术筛选耐酸突变菌株,并对突变菌株做进一步的耐酸和耐乙醇评价。比较出发菌株和突变菌株在模拟酒和葡萄酒条件下的 MLF 能力,分析突变菌株对葡萄酒香气成分的影响,为进一步开发优质 MLF 商业发酵剂和葡萄酒的发酵奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 出发菌株

酒酒球菌 SD-2a<sup>[12-15]</sup>,本实验室保存;葡萄酒,本实验室自酿。

#### 1.1.2 试剂和培养基

酸性番茄培养基(acid tomato medium, ATB) (g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.038, 番茄汁 250 mL, pH 4.8; 固体培养基是在液体培养基的基础上添加 28 g 琼脂。

模拟酒培养基(1 L)<sup>[3]</sup>: 葡萄汁 10 mL, 酵母浸粉 4 g, L-苹果酸 3 g, D-葡萄糖 2 g, D-果糖 2 g, CH<sub>3</sub>COONa 2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.05 g, pH 3.4。110 °C 灭菌 10 min, 冷却至室温添加

100 mL 无水乙醇。

#### 1.1.3 主要仪器和设备

ARTP 诱变仪,清华大学无锡应用技术研究院; HSP-70BE 恒温恒湿培养箱,上海力辰邦西仪器科技有限公司; DGL-35B 立式蒸汽灭菌器,江苏登冠医疗器械有限公司; UV-5200 紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司; SpectraMax M5 多功能酶标仪,上海赛默飞世尔仪器有限公司; LGJ-10 台式离心机,北京松源华兴科技发展有限公司; LGJ-12 真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司; S-4800 扫描电子显微镜,日立公司。安捷伦 7890B-7000D 气质联用仪,安捷伦科技有限公司。

### 1.2 菌株活化

将-80 °C 保存的酒酒球菌 SD-2a 解冻,以 2% (体积分数)的接种量,接种至 ATB 液体培养基中,28 °C 静置培养。转接 2 次后,用 0.85% 的生理盐水洗菌并稀释至合适梯度,涂布于 ATB 固体培养基上,培养 5-8 d。挑选生长较大的单菌落接种至 2 mL 的 ATB 液体培养基中,28 °C 静置培养 3 d 后,转接至 100 mL 的 ATB 液体培养基中进行扩大培养。28 °C 静置培养至对数生长期,待用。

### 1.3 ARTP 诱变

取上述生长至对数期的菌液,离心 (8 000 r/min, 15 min) 弃去上清液,收集菌体。用 0.85% 的生理盐水洗涤 2 次并调节菌液 OD<sub>600</sub> 在 0.6-0.8 之间,待用。

在无菌的环境内,将 10 μL 的菌液均匀涂布于 ARTP 专用的无菌小铁片上<sup>[16]</sup>,并将其置于 ARTP 诱变仪对应的凹槽内进行诱变处理。将装有 990 μL ATB 液体培养基的 EP 管依次置于 ARTP 诱变仪相应凹槽的下面。该诱变工作气体是 99.99% 的高纯度氮气,工作参数: 120 W 功率, 10 L/min 气流量,照射距离 2 mm<sup>[17]</sup>,温

度 $<30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。诱变时间依次为 0、15、30、45、60、90、120 s。诱变结束后, 每个 EP 管振荡 2 min, 确保金属小铁片上的菌体可以完全洗脱至 EP 管内。将洗脱液进行梯度稀释, 分别为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ , 然后将其分别涂布于 ATB 固体培养基上, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下培养 5–8 d, 而对照组是未经过 ARTP 处理的菌悬液, 各梯度做 3 组平行, 其致死率按以下公式计算:

致死率(%)=[(未诱变处理的菌落数–诱变处理后的菌落数)/未诱变处理的菌落数] $\times 100$

#### 1.4 耐酸突变菌株筛选

挑取平板上经诱变处理长出的较大的单个菌落, 分别接种到 pH 3.0 的 ATB 液体培养基中,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  静置培养。将能够在 pH 3.0 条件下生长的菌株转接到相同条件的胁迫环境(pH 3.0 的 ATB 液体培养基)中, 进行传代培养, 获得生长性能稳定的突变菌株后, 通过平板涂布, 分离纯化, 保藏菌株。

酒酒球菌的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与其酸胁迫耐受性相关<sup>[18]</sup>, 为了准确筛选出 MLF 能力强的突变菌株, 将传代后生长性能稳定的突变菌株, 测定其在 pH 3.0 条件下的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性, 最终确定 5 株活性较好的突变菌株。

#### 1.5 扫描电镜分析

参考田甜甜<sup>[7]</sup>的方法, 利用 S-4800 扫描电子显微镜进行观察。

#### 1.6 最低 pH 值耐受性

为进一步探究突变菌株可耐受的最低 pH 值, 将获得的耐酸突变菌株活化后, 置于 pH 3.0 的 ATB 液体培养基中, 待菌株生长至对数期后, 以 5% (体积分数) 的接种量转接至 pH 2.9 的 ATB 液体培养基中, 如此以 0.1  $\Delta\text{pH}$  单位逐渐降低 ATB 液体培养基的 pH 值, 直至所有菌株不再生长, 测定  $OD_{600}$ 。

#### 1.7 乙醇耐受性

为考察突变菌株的乙醇耐受性, 将突变菌株活化后, 以 5% (体积分数) 的接种量接种于含有 10%、12%、14%、16% 乙醇的 ATB 液体培养基中,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养, 测定  $OD_{600}$ 。

#### 1.8 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定

$\beta$ -葡萄糖苷酶活性采用谢昉书等<sup>[3]</sup>的方法进行测定, 回归方程为  $y=0.018\ 5x+0.033\ 2$ ,  $R^2=0.999\ 9$ , 线性关系良好。

#### 1.9 L-苹果酸含量测定

L-苹果酸的测定采用 L-苹果酸含量测定试剂盒说明书。

#### 1.10 MLF 试验

##### 1.10.1 模拟酒发酵

将获得的突变菌株和出发菌株进行模拟酒发酵试验,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  发酵培养, 测定  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活力。此外, 每天定时取样, 测定 L-苹果酸的含量。

##### 1.10.2 葡萄酒发酵

将突变菌株和出发菌株接种于酒精发酵结束后的葡萄酒中,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  发酵培养, 同时以未接菌的作为对照组, 每天定时取样, 测定 L-苹果酸的含量。

#### 1.11 葡萄酒香气成分分析

待 L-苹果酸降解完成后, 取降酸效果最好的突变菌株进行香气成分分析。香气成分参照白雪菲等<sup>[19]</sup>的方法进行测定。

#### 1.12 数据处理

采用 Origin 2018 和 SPSS 20.0 进行图形的绘制和统计处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 ARTP 诱变时间的确定

由图 1 可知, 酒酒球菌 SD-2a 的致死率随 ARTP 诱变处理时间的增加而提高。当诱变处

理时间为 15 s 时, 其致死率高达 84.11%; 当诱变处理时间为 30 s 时, 致死率已达到 98.33%; 当诱变处理时间增加到 45 s 时, 菌株的致死率达到 99.05%。研究表明, 诱变致死率在 80%–90% 之间时, 更有利于菌株的筛选效率<sup>[17]</sup>。此外, 死亡率过高, 菌株的生长性能可能会发生较大的变化, 不利于目的菌株的筛选。因此, 本研究选择了 15 s 作为最佳诱变时间。

## 2.2 耐酸突变菌株的筛选

采用上述方法对酒酒球菌 SD-2a 进行诱变, 通过 pH 3.0 酸胁迫传代培养, 分离纯化后, 测定突变菌株的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性。最终获得了 5 株在酸胁迫条件下生长性能和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性较好的突变菌株: ARTP-1、ARTP-2、ARTP-3、ARTP-4、ARTP-5。

结果表明, 在 pH 3.0 胁迫环境下, 所有突变菌株的耐酸性能较好, 其稳定期生物量明显高于出发菌株, 出发菌株的生长性能受到抑制, 如图 2A 所示。由图 2B 可知, 5 株突变菌株的表现出较高的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性。其中,

ARTP-2 活性最高, 为 1.81  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ , 显著高于出发菌株( $P<0.05$ ), ARTP-3 活性最低, 为 1.35  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ , 与出发菌株相比差异不明显, 保留了较好的活性。结果表明, ARTP-1、ARTP-2、ARTP-3、ARTP-4、ARTP-5 在 pH 3.0 条件下均表现出较好的耐酸性。

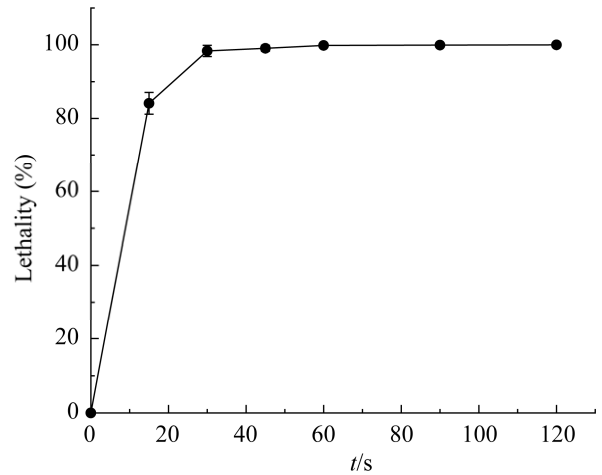


图 1 诱变处理时间对酒酒球菌 SD-2a 致死率的影响  
Figure 1 Effect of mutagenesis treatment time on the lethality of *Oenococcus oeni* SD-2a (mean $\pm$ SD,  $n=3$ ).

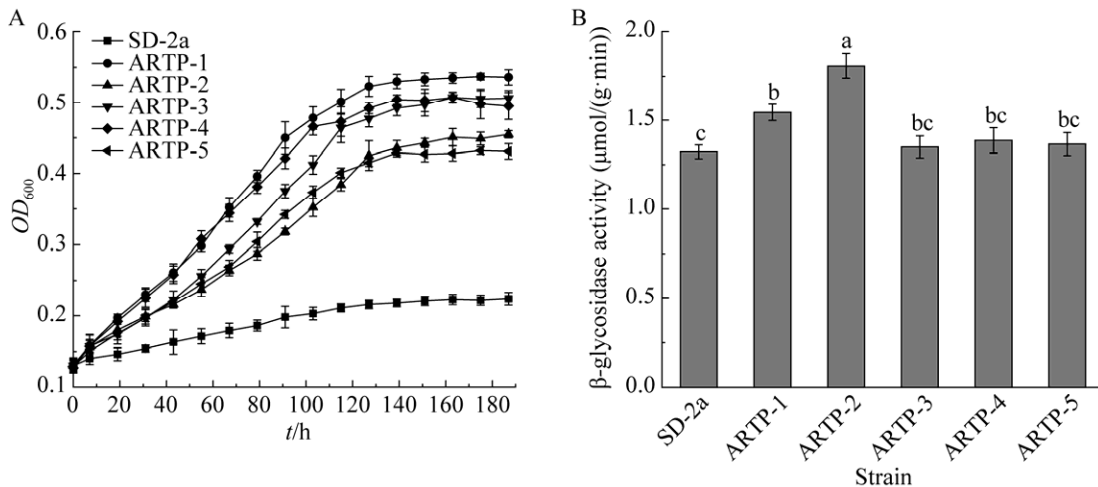


图 2 所有菌株生长曲线及  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性

Figure 2 Growth curves and  $\beta$ -glucosidase activities of all strains (mean $\pm$ SD,  $n=3$ ). A: Growth curves of all strains at pH 3.0. B:  $\beta$ -glucosidase activities of all strains at pH 3.0. Different letters (a, b, c) indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

### 2.3 扫描电镜

由图 3 可知, 通过观察出发菌株 SD-2a 和 5 株突变菌株在 pH 3.0 时的菌落形态, 发现 5 株突变菌株的菌落形态和出发菌株基本一致, 均为白色凸起、不透明且边缘完整。由于培养基中添加了溴甲酚紫作为指示剂, 而突变菌株可以将培养基中的 L-苹果酸转化为 L-乳酸, 使得培养基中的 pH 升高, 因而培养基颜色由黄色变为紫色,

这也说明了 5 株突变菌株都可以进行 MLF。扫描电镜结果显示, 在 pH 3.0 条件下 5 株突变菌株均呈圆桶形、短链状, 且各短链细胞之间相互无黏附, 表面光滑基本无皱缩。在相同条件下, 出发菌株 SD-2a 的细胞体积发生皱缩, 细胞表面已逐渐水解, 甚至出现断裂。结果表明, 大多数出发菌株细胞在 pH 3.0 条件下不能正常生长, 进而解释了突变菌株具有更强的耐酸性。

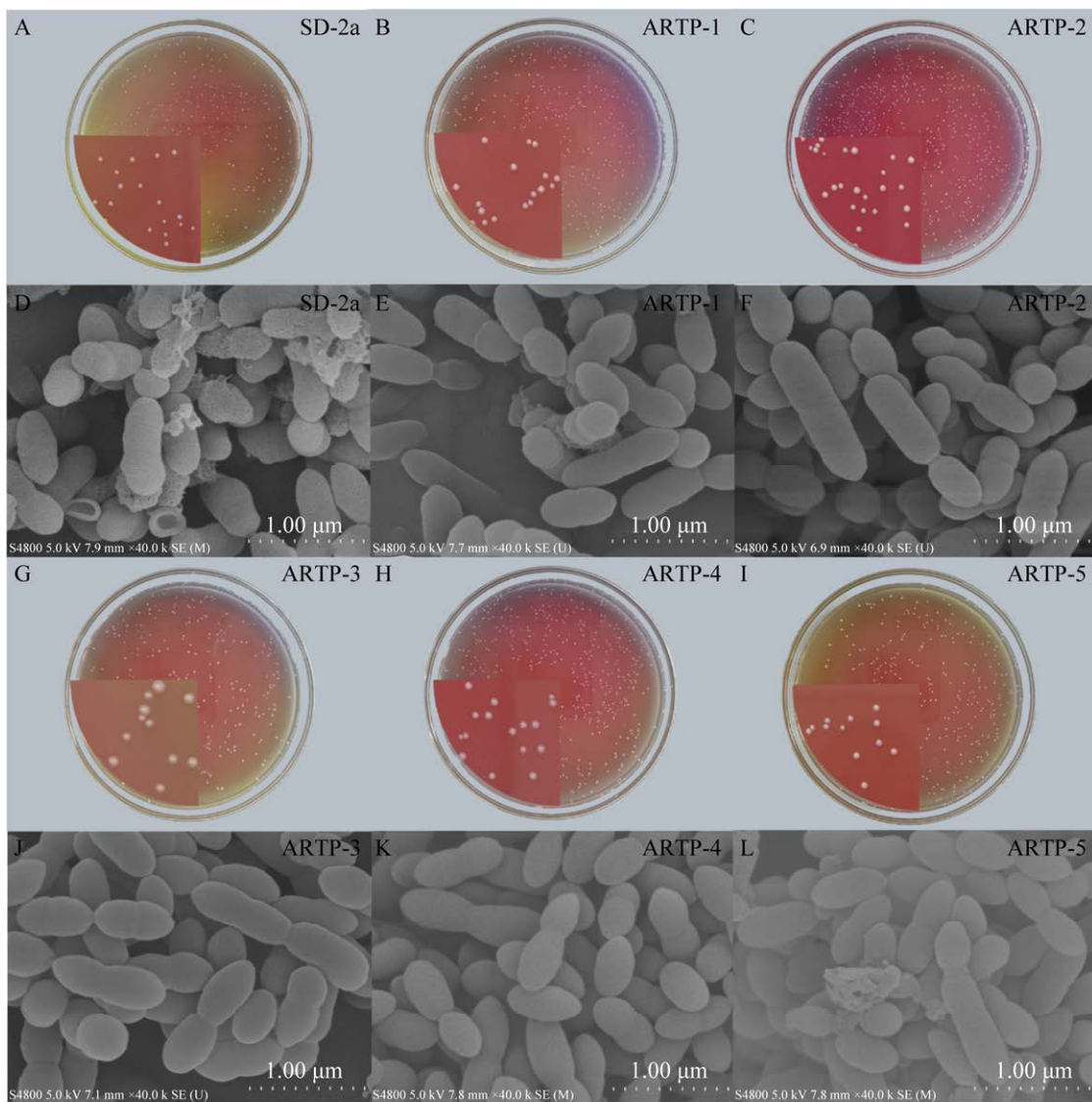


图 3 所有菌株在 pH 3.0 条件下的菌落形态及细胞形态

Figure 3 Colony morphology and cell morphology of all strains at pH 3.0. A, D: *O. oeni* SD-2a. B, E: ARTP-1. C, F: ARTP-2. G, J: ARTP-3. H, K: ARTP-4. I, L: ARTP-5.

## 2.4 最低 pH 值耐受性

葡萄酒的 MLF 通常在 pH 3.2–3.5 范围内进行<sup>[20]</sup>。当 pH<3.2 时，酒酒球菌的生长性能受到抑制，存活率降低。所以酒酒球菌能否在低 pH 值条件下生长，直接关系到 MLF 能否成功进行。为进一步考察 5 株突变菌株的酸耐受性，将所有突变菌株分别接种于 pH 3.0 的 ATB 液体培养基中，并分别逐次传代转接至较低的 pH 值 (2.9、2.8、2.7、2.6) 的 ATB 液体培养基中，同时测定其生长性能。由图 4 可知，5 株突变菌株在 pH 2.6 和 pH 2.7 的 ATB 液体培养基中的生长性能均显著下降，尤其是在 pH 2.6 时所有菌株几乎都不再生长。当 pH 大于 2.7 时，ARTP-1、ARTP-3、ARTP-4、和 ARTP-5 这 4 株菌株不能

良好地适应高酸环境，相较于其余 4 株菌株 ARTP-2 生长性能较为良好，能够较好地适应高酸环境。

## 2.5 乙醇耐受性

由图 5 可知，当乙醇含量增大时，菌株的生物量下降，表明乙醇对酒酒球菌的生长均有明显的抑制作用，而相同乙醇体积分数条件下，5 株突变菌株在稳定期的生物量差异较小。当乙醇含量为 10% 时，5 株诱变菌株的生长性能和出发菌株无明显的差异。随着乙醇含量的进一步提高 5 株突变菌株的乙醇耐受性与出发菌株逐渐拉开差距，5 株突变菌株的生长性能逐渐高于出发菌株，这表明 5 株突变菌株表现出了较好的乙醇耐受性。

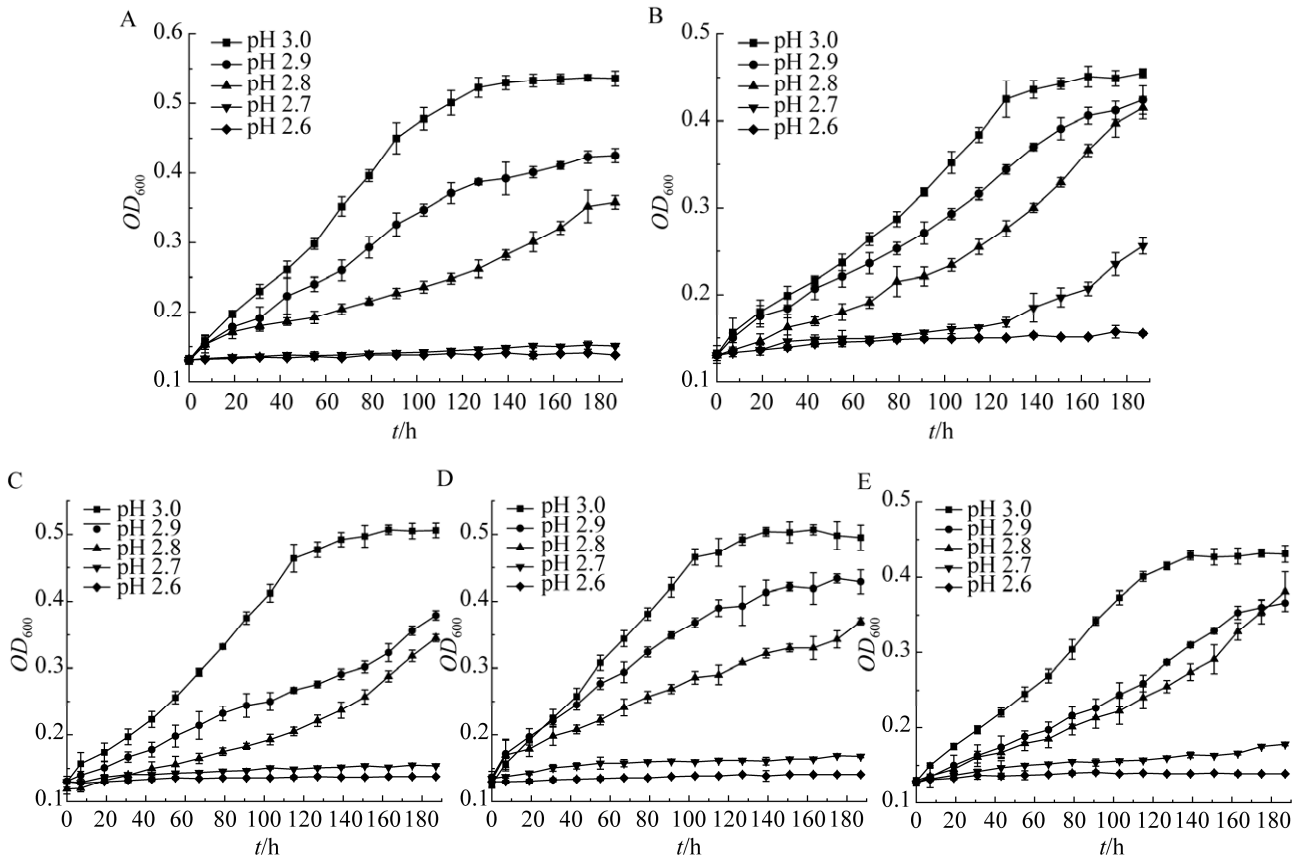


图 4 各突变菌株在不同 pH 下的生长曲线

Figure 4 Growth curves of different mutant strains at different pH (mean±SD,  $n=3$ ). A: ARTP-1. B: ARTP-2. C: ARTP-3. D: ARTP-4. E: ARTP-5.

葡萄酒中的恶劣环境, 使得其有很多限制性因素抑制酒球菌的生长, 除了 pH 这一关键因素外, 乙醇的含量也是一个重要的影响因素<sup>[15]</sup>, 葡萄酒中的乙醇含量一般在 8%–14%之间, 而本研究中的 5 株突变菌株表现出了很强的乙醇耐受性, 这表明突变菌株能够在葡萄酒环境中顺利启动 MLF。

## 2.6 MLF 能力

### 2.6.1 模拟酒 MLF 能力

在葡萄酒 MLF 过程中, L-苹果酸转换为了 L-乳酸, 达到了降酸效果, 进而改善了葡萄的口感。而  $\beta$ -葡萄糖苷酶参与了各种功能性糖苷前体<sup>[21-22]</sup>和潜在有害代谢物的降解<sup>[23]</sup>, 研究表

明, 酒球菌中的  $\beta$ -葡萄糖苷酶可以水解葡萄酒中无味的糖基化前体, 增加萜烯类物质, 从而增强葡萄酒的香气特征<sup>[23-24]</sup>。

因此, 为了进一步验证突变菌株的 MLF 能力, 将酒球菌菌株接种于模拟酒培养基中, 测定其 L-苹果酸含量和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性。由图 6A 可知, 随着发酵时间的延长, L-苹果酸的累积降解量逐渐增加。5 株突变菌株的 L-苹果酸降解量高于出发菌株, 其中突变株 ARTP-2 的累积苹果酸降解量最高, 为 2.70 g/L, 是出发菌株的 2.55 倍。由图 6B 可知, 在模拟酒条件下, ARTP-2 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力最高, 与其余菌

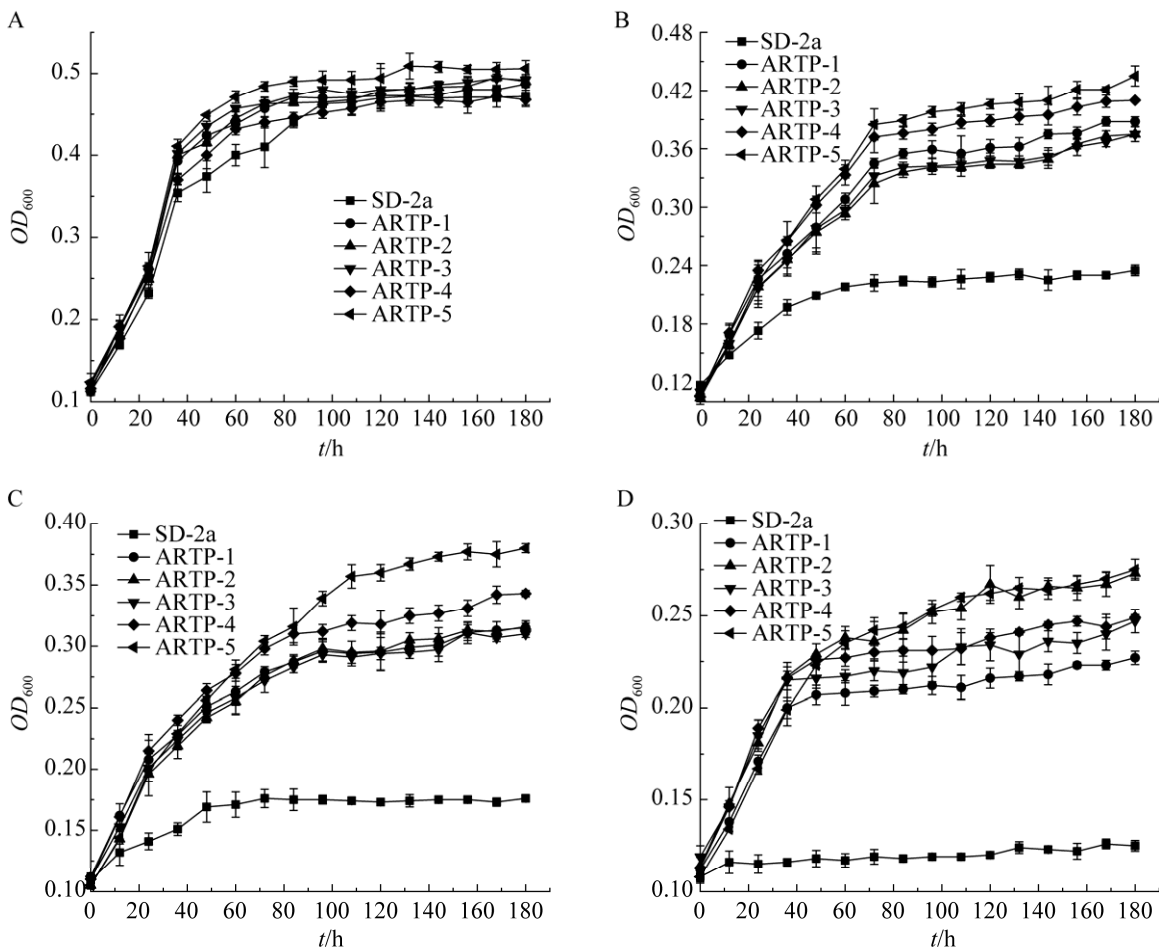


图 5 所有菌株在不同乙醇体积分数下的生长曲线

Figure 5 Growth curves of all strains at different volume fractions of ethanol (mean $\pm$ SD,  $n=3$ ). A: 10% ethanol. B: 12% ethanol. C: 14% ethanol. D: 16% ethanol.



株存在显著性差异, 酶活为  $1.66 \mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ , 是出发菌株的 1.77 倍。而突变株 ARTP-3、ARTP-5 和 ARTP-6 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与出发菌株无显著性差异, 表明其仍保有  $\beta$ -葡萄糖苷

酶活性。结果表明, 经过 ARTP 诱变, 得到的突变菌株具有较好的耐酸性能, 并且具有较好的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活力, 这为接下来研究突变菌株应用于葡萄酒的 MLF 奠定了基础。

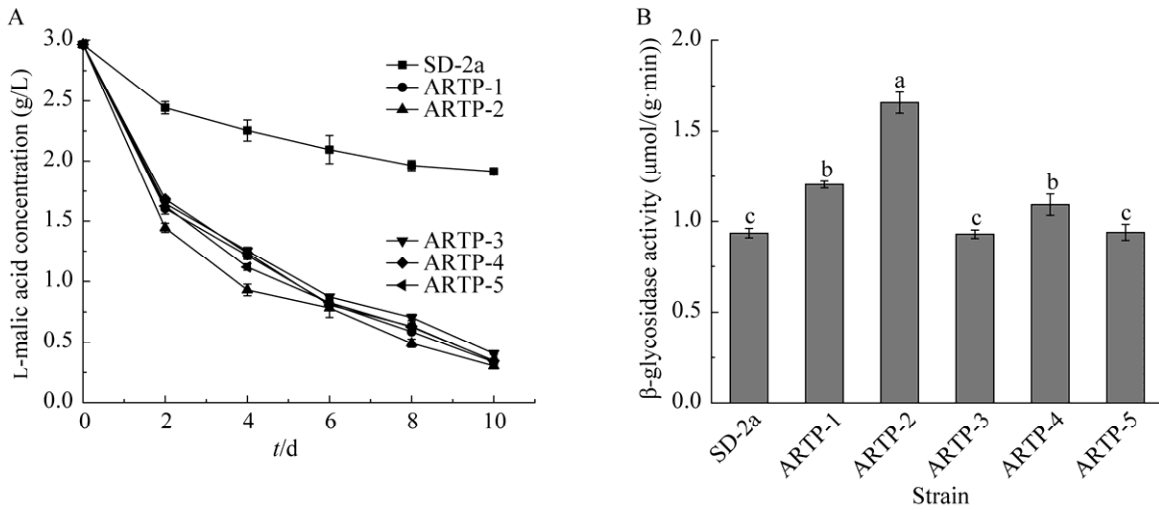


图 6 所有菌株在模拟酒中 L-苹果酸降解速率和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性

Figure 6 L-malate degradation rates and  $\beta$ -glycosidase activities of all strains in simulated wine (mean $\pm$ SD,  $n=3$ ). A: Degradation rates of L-malic acid in simulated wine for all strains. B:  $\beta$ -glucosidase activities of all strains in simulated wine. Different letters (a, b, c) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

### 2.6.2 葡萄酒 MLF 能力

由图 7 可知, 在葡萄酒中, 出发菌株 SD-2a 和突变株 ARTP-1、ARTP-2、ARTP-3、ARTP-4、ARTP-5 均具有 L-苹果酸的降解能力, 表明其均能启动并完成 MLF, 且 5 株诱变菌株的 MLF 能力高于出发菌株, 其中突变菌株 ARTP-2 发酵速率最快, 完成 MLF 在 18 d。突变菌株 ARTP-1 完成 MLF 在 23 d, 突变菌株 ARTP-3 完成 MLF 在 24 d, 突变菌 ARTP-4 和 ARTP-5 完成 MLF 在 26 d, 出发菌株 SD-2a 在 30 d 完成 MLF。这表明突变株 ARTP-2 在葡萄酒环境中仍能表现出良好的 MLF 能力。

### 2.7 葡萄酒香气成分分析

以上研究表明, 突变菌株 ARTP-2 在葡萄酒中 MLF 速率最快。因此, 对接种出发菌株 SD-2a 和突变菌株 ARTP-2 进行 MLF 的葡萄酒做香气

成分分析, 如表 1 所示。结果表明, 在葡萄酒中共检测出 55 种香气化合物, 包括 18 种酯类、15 种醇类、8 种醛酮类、7 中萜烯类、7 种酸

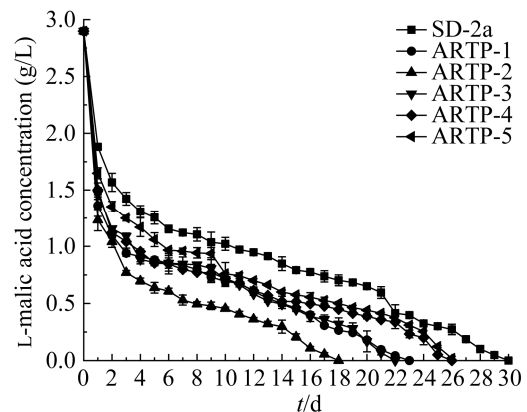


图 7 葡萄酒中 L-苹果酸降解速率

Figure 7 Degradation rate of L-malic acid in wine (mean $\pm$ SD,  $n=3$ ).

类。接种 ARTP-2 的葡萄酒样检测出 46 种香气成分, 香气成分总含量为 443.16 mg/L; 接种 SD-2a 的葡萄酒样检测出 37 种香气成分, 香气成分总含量为 383.36 mg/L; 对照组检出 26 种香气成分, 香气成分总含量为 358.99 mg/L。接种 ARTP-2 的葡萄酒香气成分的总量最高。

酯类物质是葡萄酒中含量较高的香气化合物, 能够丰富酒体的香气成分。在 3 组葡萄酒(接种 ARTP-2 进行 MLF、接种 SD-2a 进行 MLF、对照组)中, 分别检测到 17 种、12 种、9 种酯类, 其总含量分别为 46.47、23.36、21.27 mg/L。乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯和辛酸乙酯等酯类物质是主要香气贡献者(OAV>1)。其中乙酸乙酯和乙酸异戊酯具有香蕉和甜果香, 乙酸苯乙酯和辛酸乙酯具有玫瑰花香和果香。与 SD-2a 组相比, 接种 ARTP-2 进行 MLF 的葡萄酒中, 酯类物质的种类和含量均增加, 其中乙酸乙酯、乙酸异戊酯、乙酸苯乙酯、丁二酸乙酯、威士忌内酯和乳酸异戊酯的含量显著高于 SD-2a 组( $P<0.05$ ), 且新增了癸酸异戊酯、癸酸乙酯、壬酸乙酯、3-甲基丁酸乙酯和 2-甲基丁酸乙酯, 丰富了葡萄酒的果香和花香味。

醇类物质在葡萄酒中占比最大。研究表明, 高级醇含量超过 400 mg/L 时会给葡萄酒带来令人不愉悦的风味<sup>[25-26]</sup>。在 3 组葡萄酒中, 分别检测到 13 种、12 种和 11 种醇类, 其总含量分别为 377.71、346.76、329.98 mg/L, 均低于 400 mg/L。异戊醇和苯乙醇的含量占比最高, 含量分别在 130.60–137.42 mg/L 和 145.71–175.79 mg/L 之间, 其中异戊醇具有苦味和指甲油的刺激性气味, 对葡萄酒的风味造成了负面影响<sup>[27]</sup>; 苯乙醇则会给葡萄酒带来蜂蜜、玫瑰花和丁香花的香味。与 SD-2a 组相比, 接种 ARTP-2 进行 MLF 的葡萄酒, 正己醇、正辛醇、正壬醇和 2-乙基己醇的含量显著

增加( $P<0.05$ ), 其中正己醇会增加葡萄酒的花香、果香和青草香, 正辛醇会给葡萄酒带来淡淡的茉莉和柠檬的清香, 正壬醇和 2-乙基己醇则带有蔷薇和甜果的香气。

醛酮类物质可以起到改善葡萄酒的香气的作用。在 3 组葡萄酒中, 分别检测到 7 种、6 种和 4 种醛酮类物质, 其总含量分别为 11.57、7.34、5.51 mg/L。ARTP-2 组的壬醛和正癸醛是主要香气组成(OAV>1), 且含量显著高于 SD-2a 组( $P<0.05$ ), 为葡萄带来柑橘香和玫瑰香。但是有研究认为壬醛和癸醛对葡萄酒的感官质量没有显著的影响<sup>[28]</sup>。与 SD-2a 组相比, 经 MLF 后的 ARTP-2 组葡萄酒中的醛酮类物质增加量较多。

脂肪酸能够使葡萄酒的香气更加复杂, 适量的脂肪酸可以维持酒体的平衡, 使得葡萄酒具有清新的果香, 对葡萄酒的风味起到了一定的改善作用<sup>[29]</sup>。但脂肪酸通常被认为会给葡萄酒带来脂肪、腐败等令人不快的香气<sup>[30]</sup>。在 3 组葡萄酒中, 分别检测到 2 种、5 种和 3 种脂肪酸类物质, 其总含量分别为 1.20、5.38、2.23 mg/L。研究表明, 在近于香气阈值时, 脂肪酸可使酒体的香味变得更加复杂, 使得乳酪、黄油等香味增强<sup>[31]</sup>。在 ARTP-2 组葡萄酒中所检测出的脂肪酸种类最少, 只检测出了月桂酸和辛酸, 其含量分别为 0.68、0.52 mg/L, 接近阈值。

萜烯类物质对葡萄酒的花香和果香特征有着更为明显的影响。由表 1 可知, 萜烯类物质仅在 ARTP-2 和 SD-2a 组葡萄酒中检测出来, 这表明接种酒酒球菌进行 MLF, 可以增加萜烯类物质的含量, 其中 D-柠檬烯和  $\beta$ -大马烯酮只在 ARTP-2 组出现。因其阈值较低, 即使较小的含量也会对葡萄酒的感官具有较大的影响, 能够提高葡萄酒的柑橘香、柠檬香和玫瑰香。研究表明,  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解异戊二烯类糖苷产生无味的前体物质, 通过进一步的酸作用后产生了

$\beta$ -大马烯酮<sup>[29]</sup>。这也与上述 ARTP-2 具有较高  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性相对应。综上所述, 利用

ARTP-2 对葡萄酒进行 MLF, 能够显著提高酒体的香气成分。

表 1 葡萄酒香气成分含量及香气活度值

Table 1 Wine aroma content and aroma activity values

Aroma compounds	ARTP-2		SD-2a		CK		Threshold Odor (mg/L)	Odor descriptor
	c(OAV)/(mg/L)	>1	c(OAV)/(mg/L)	>1	c(OAV)/(mg/L)	>1		
Ethyl acetate	19.72±0.41a	>1	11.13±0.25b	>1	10.44±0.53b	>1	7.5	Fruity, sweet
Isopentyl acetate	5.87±0.13a	>1	2.41±0.14b	>1	1.92±0.10c	>1	0.03	Banana, peer sweet
Phenylethyl acetate	4.46±0.07a	>1	2.15±0.08b	>1	1.74±0.11c	>1	0.25	Fruity, Rose
Diethyl succinate	6.7±0.13a	<0.1	3.52±0.26b	<0.1	3.88±0.19b	<0.1	200	Fruity, floral
Ethyl caprylate	2.45±0.03a	>1	1.21±0.04a	>1	0.73±0.02b	>1	0.6	Fruity, floral
Whiskey lactone	0.49±0.01a	>1	0.09±0.01b	>1	ND	–	0.067	Cocoa beans, lactone
Ethyl isopentylsuccinate	0.15±0.02c	–	0.4±0.01b	–	0.49±0.04a	–	–	–
Ethyl hexanoate	1.94±0.10a	>1	0.86±0.10a	>1	0.81±0.08a	>1	0.026	Fruity, floral
Isoamyl decanoate	0.27±0.03	–	ND	–	ND	–	–	Rose
Ethyl caprate	0.17±0.01	0.1–1	ND	–	ND	–	0.2	Coconut, floral
Ethyl nonanoate	0.32±0.02	0.1–1	ND	–	ND	–	1.3	Fruit, rose, waxy
Propanoic acid, 2-hydroxy-3-methylbutylester	0.36±0.01a	>1	0.15±0.02b	0.1–1	ND	–	0.2	Creamy, nut
Ethyl 2-hydroxy-4-methyl valerate	ND	–	0.14±0.01	–	ND	–	–	–
Ethyl 3-methylbutyrate	0.18±0.02	>1	ND	–	ND	–	0.1	Apple, mulberry
Ethyl 2-methylbutyrate	0.6±0.06	>1	ND	–	ND	–	0.018	Apple, tasting green
Ethyl phenylacetate	0.17±0.02	>1	ND	–	ND	–	0.073	Rose
Ethyl propanoate	0.67±0.05a	0.1–1	0.51±0.11a	0.1–1	0.41±0.09a	0.1–1	1.8	Fruity, bitter
Ethyl heptanoate	1.95±0.11a	>1	0.77±0.17a	>1	0.86±0.11a	>1	0.22	Strawberry, fruity
Isobutanol	10.32±0.32b	0.1–1	17.02±0.70a	0.1–1	17.38±0.57a	0.1–1	40	Solvent, green
Isoamyl alcohol	137.42±5.61a	>1	133.16±6.78a	>1	130.60±6.95a	>1	30	Whiskey, banana, bitter, nail polish
N-hexyl alcohol	17.32±0.55a	>1	14.23±0.65b	>1	12.83±0.82c	>1	8	Fruity, floral, green
N-heptanol	1.438±0.07a	>1	1.32±0.17a	>1	0.71±0.08b	>1	0.2	Lemon, orange
1-octanol	1.31±0.05a	>1	0.96±0.05b	>1	0.78±0.07c	>1	0.04	Jasmine, lemon
1-nonanol	1.91±0.06a	>1	1.27±0.10b	>1	0.86±0.14c	>1	0.6	Fruit, rose
Phenethyl alcohol	175.79±8.79a	>1	167.32±8.77a	>1	145.71±5.36b	>1	14	Rose, honey, clove

(待续)

(待续 1)

Aroma compounds	ARTP-2		SD-2a		CK		Threshold Odor (mg/L)	Odor descriptor
	<i>c</i> (OAV)/(mg/L)	>1	<i>c</i> (OAV)/(mg/L)	>1	<i>c</i> (OAV)/(mg/L)	>1		
Dodecanol	1.44±0.09a	>1	1.41±0.11a	>1	1.08±0.09b	>1	1	Floral
2,3-butanediol	0.35±0.03a	<0.1	0.31±0.04a	<0.1	ND	–	120	Fruity, creamy, plastic
3-methyl-1-pentanol	ND	–	1.06±0.11	>1	ND	–	1	Fruity
2,6,8-trimethyl-4-nonanol	ND	–	0.22±0.01	–	ND	–	–	–
2-ethyl-1-hexanol	2.88±0.15a	0.1–1	0.64±0.08b	<0.1	0.48±0.08b	<0.1	8	Mushroom, fruity, sweet
Benzyl alcohol	20.49±0.95a	0.1–1	17.86±1.01b	<0.1	19.56±0.96ab	<0.1	200	Fruity, burnt
1-(1-methylethoxy)-2-propanol	6.56±0.10	–	ND	–	ND	–	–	–
1-[(1-methoxy-2-propanyl)oxy]-2-propanol	0.35±0.01	–	ND	–	ND	–	–	–
Lauric acid	0.68±0.10a	0.1–1	0.27±0.04b	0.1–1	ND	–	1.5	Laurel oil
Bitter	0.52±0.06	>1	ND	–	ND	–	0.5	Rancid, cheese
Decanoic acid	ND	–	0.26±0.03	0.1–1	ND	–	1	Caramel, milk, rancid, fatty
Myristic acid	ND	–	1.27±0.23a	–	0.32±0.03b	–	–	Milk, waxy
Palmitic acid	ND	–	3.27±0.18a	–	1.03±0.16b	–	–	Fatty, rancid, fruity, sweet
Nonanoic acid	ND	–	ND	–	0.88±0.05	–	–	–
2-ethylhexanoic acid	ND	–	0.31±0.02	–	ND	–	–	–
Benzaldehyde	0.28±0.04	0.1–1	ND	–	ND	–	2	Almond, nut, cherry
Nonanal	2.64±0.17a	>1	1.93±0.20b	>1	1.58±0.10c	>1	0.015	Orange, rose, sweet
Decanal	0.68±0.04a	>1	0.34±0.03b	>1	ND	–	0.01	Orange, rose
4-propylbenzaldehyde	5.39±0.11a	–	3.62±0.13b	–	3.02±0.04c	–	–	–
2,4-dimethylbenzaldehyde	1.09±0.11a	–	0.59±0.05b	–	0.52±0.04b	–	–	Almond
3-carboxybenzaldehyde	ND	–	0.36±0.03	–	ND	–	–	–
Acetophenone	1.11±0.01	–	ND	–	ND	–	–	–
2-methyl-4-undecanone	0.39±0.03b	–	0.5±0.02a	–	0.4±0.04b	–	–	–
D-limonene	0.93±0.05	>1	ND	–	ND	–	0.01	Sweet, orange, rose
Citronellol	0.60±0.02a	>1	0.52±0.03a	>1	ND	–	0.04	Green, lemon, rose
Terpineol	0.34±0.01	>1	ND	–	ND	–	0.33	spicy
β-damascenone	0.33±0.01	–	ND	–	ND	–	–	Apple, peach
Propylene tetramer	1.65±0.03	–	ND	–	ND	–	–	–
N-isophytol	0.22±0.01	–	ND	–	ND	–	–	–
Myrcenol	2.13±0.05	–	ND	–	ND	–	–	–
Totals	443.16a	–	383.36b	–	358.99c	–	–	–

ND: The substance was not detected; –: The relevant literature was consulted; Different letters (a, b, c) indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论与结论

MLF 是酿酒过程中最难控制的步骤之一，有效的 MLF 并不容易实现<sup>[32]</sup>。尽管相较于其他乳酸菌，酒酒球菌能够较好地适应葡萄酒的环境，但是在葡萄酒的 MLF 过程中，酒酒球菌不可避免地受到低 pH 值和高乙醇等胁迫因素的影响，进而导致了 MLF 进程缓慢、延长或不完整，这会增加葡萄酒病害的发生可能。因此，为了能够顺利进行 MLF，需要筛选酒酒球菌抗性菌株。

目前国内外在酒酒球菌抗性菌株的筛选仍然集中在野生优良菌株的筛选，而通过诱变育种的手段选育抗性菌的研究较少。陈其玲<sup>[9]</sup>以酒酒球菌 SX-1a、SX-1b 和 CS-1b 为出发菌株，通过离子注入诱变共筛选出了 5 株能够耐受 pH 3.0 的突变菌株，突变菌株的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性在 0.49–1.07  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$  之间，是出发菌株 1.32–4.47 倍。吴晓秋等<sup>[10]</sup>以酒酒球菌 SD-2a 为出发菌株，采用紫外诱变筛选出了 3 株酸和乙醇耐受的酒酒球菌抗性菌株。在模拟酒中，苹果酸最终含量是出发菌株的 84.9%–86.0%，但其  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与出发菌株之间无显著性差异。邵睿等<sup>[11]</sup>以酒酒球菌 SD-2a 为出发菌株，通过紫外诱变筛选出了 3 株能够耐受 14%乙醇的突变菌株，在模拟酒中，突变菌株 UVe2 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性最高，为 1.07 U/g，是出发菌株的 1.16 倍，苹果酸最终含量是出发菌株的 0.46 倍。

本研究通过 ARTP 诱变，低 pH 值条件下传代培养及分离纯化等处理，筛选出了 5 株酸胁迫耐受性高于出发菌株的突变菌株，对其在胁迫条件下的生长性能、 $\beta$ -葡萄糖苷酶活性及 MLF 过程中的 L-苹果酸降解速率和香气成分进行分析。研究结果发现，5 株突变菌株在 pH 3.0 具有良好的生长性能，最低可耐受 pH 2.6 的胁迫环境，且表现出了较强的乙醇耐受性，可耐

受 16%的乙醇。通过对突变菌株在模拟酒的条件下的 L-苹果酸的降解速率和  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性进行分析，结果发现突变菌株的降酸速率显著高于出发菌株，其中突变株 ARTP-2 的累积苹果酸降解量最高，为 2.70 g/L，是出发菌株的 2.55 倍，且其  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与其余菌株存在显著性差异，为 1.66  $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ ，是出发菌株的 1.77 倍。与吴晓秋等<sup>[10]</sup>和邵睿等<sup>[11]</sup>通过紫外诱变筛选的抗性菌株相比，本研究通过 ARTP 诱变筛选所获得突变菌株可耐受 pH 值更低、可耐受的乙醇浓度更高，且突变菌株 ARTP-2 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性较出发菌株显著提高。但与陈其玲<sup>[9]</sup>的离子注入诱变所获耐酸菌株的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性相比尚有差距，推测可能不仅与诱变手段有关，还可能与出发菌株的选择及出发菌株对诱变剂的敏感度有关。此外，本研究对突变菌株在葡萄酒 MLF 过程中的降酸速率进行测定，发现突变菌株 ARTP-2 的降酸速率最快，在 18 d 完成 MLF。通过对接种突变菌株 ARTP-2 的葡萄酒进一步进行香气成分分析，结果表明，接种突变菌株 ARTP-2 进行 MLF 的酒样香气成分的种类共 46 种，总量共 443.16 mg/L，种类和含量均显著高于出发菌株酒样，不仅新增了癸酸异戊酯、D-柠檬烯和  $\beta$ -大马烯酮等香气成分，还显著增加了乙酸乙酯、乙酸异戊酯和乙酸苯乙酯等香气成分的含量，赋予了葡萄酒香蕉、柠檬、玫瑰等果香和花香。谢昉书<sup>[33]</sup>在探究酒酒球菌突变菌株 b1 对葡萄酒香气成分的影响中，香气成分的总含量为 92 361.98  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。与之相比，本研究香气成分的总量更高。综上所述，本研究通过 ARTP 诱变技术筛选所获得突变菌株 ARTP-2 不仅酸胁迫耐受性高于出发菌株，而且 MLF 能力显著优于出发菌株，能更好地适应葡萄酒环境，丰富葡萄酒的香气成分，具有发展成商业发酵剂的可能。

## 参考文献

- [1] 祝霞, 赵丹丹, 李俊娥, 毛亚玲, 韩舜愈, 杨学山. *O. oeni* 糖苷酶活性对干白葡萄酒萜烯类香气的影响[J]. 农业机械学报, 2021, 52(8): 363-373.  
ZHU X, ZHAO DD, LI JE, MAO YL, HAN SY, YANG XS. Effect of glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on terpene aroma compounds of dry white wine[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(8): 363-373 (in Chinese).
- [2] 陆文轩, 张碧颖, 巴旦加布, 石侃, 刘树文. 植物乳杆菌在不同品种葡萄酒中苹果酸乳酸发酵性能的评价[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(12): 82-89, 96.  
LU WX, ZHANG BY, BAD JB, SHI K, LIU SW. Evaluation on malolactic fermentation performance of *Lactobacillus plantarum* in wine fermentation with different grape varieties[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(12): 82-89, 96 (in Chinese).
- [3] 谢昉书, 文向圆, 刘树文. 酒酒球菌(*Oenococcus oeni*)耐酸突变株苹果酸-乳酸发酵能力分析[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 93-101.  
XIE FS, WEN XY, LIU SW. Malolactic fermentation ability of acid-tolerant mutant strain of *Oenococcus oeni*[J]. Food Science, 2019, 40(2): 93-101 (in Chinese).
- [4] BECH-TERKILSEN S, WESTMAN JO, SWIEGERS JH, SIEGUMFELDT H. *Oenococcus oeni*, a species born and moulded in wine: a critical review of the stress impacts of wine and the physiological responses[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2020, 26(3): 188-206.
- [5] LORENTZEN MPG, LUCAS PM. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(7): 2937-2945.
- [6] 李文鑫, 曾伟主, 周景文. 高产辅酶 Q10 类球红细菌的选育及发酵优化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(23): 34-41, 56.  
LI WX, ZENG WZ, ZHOU JW. Breeding and fermentation optimization of *Rhodobacter sphaeroides* with high yield of coenzyme Q10[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(23): 34-41, 56 (in Chinese).
- [7] 田甜甜. 青梅酒酿酒酵母的选育及耐酸机制解析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2020.  
TIAN TT. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for greengage wine and its mechanism of acid tolerance[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2020 (in Chinese).
- [8] 成晓艳, 张丁洁, 田艾迪, 刘瑛, 陈佳璐, 陈莹莹, 洛雪. 优化乳杆菌高产共轭亚油酸的研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(10): 391-405.  
CHENG XY, ZHANG DJ, TIAN AD, LIU Y, CHEN JL, CHEN YY, LUO X. Research progress on optimization of *Lactobacillus* for high yield of conjugated linoleic acid[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(10): 391-405 (in Chinese).
- [9] 陈其玲. 基于全基因组关联性分析的酒酒球菌抗酸基因研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016.  
CHEN QL. A genome-wide-association study identifies target of acid tolerance genes in *Oenococcus oeni*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [10] 吴晓秋, 刘龙祥, 邵睿, 张倩, 张韩杰, 满强, 赵望锋. 紫外诱变法选育酒酒球菌酸-乙醇胁迫耐受菌株[J]. 食品科技, 2022, 47(4): 14-19.  
WU XQ, LIU LX, SHAO R, ZHANG Q, ZHANG HJ, MAN Q, ZHAO WF. Breeding of acid-ethanol stress tolerance *Oenococcus Oeni* by UV mutagenesis[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(4): 14-19 (in Chinese).
- [11] 邵睿, 张倩, 宋炜钰, 吴晓秋, 刘龙祥. 紫外诱变法选育酒酒球菌乙醇胁迫耐受菌株及其发酵性能研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 71-75.  
SHAO R, ZHANG Q, SONG WY, WU XQ, LIU LX. Breeding of *Oenococcus oeni* strain with ethanol tolerance by UV mutagenesis and its fermentation performance[J]. China Brewing, 2022, 41(7): 71-75 (in Chinese).
- [12] YANG K, LIU MM, WANG J, HASSAN H, ZHANG J, QI YM, WEI XY, FAN MT, ZHANG GQ. Surface characteristics and proteomic analysis insights on the response of *Oenococcus oeni* SD-2a to freeze-drying stress[J]. Food Chemistry, 2018, 264: 377-385.
- [13] QI YM, LIU D, YU HP, ZHANG GQ, FAN MT. Identification and characterization of the small heat shock protein Hsp20 from *Oenococcus oeni* SD-2a[J]. Current Microbiology, 2020, 77(11): 3595-3602.
- [14] YANG K, LIU MM, YANG JP, WEI XY, FAN MT, ZHANG GQ. Physiological and proteomic responses of freeze-dried *Oenococcus oeni* SD-2a with ethanol-acclimations[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 129: 109425.
- [15] YANG K, DAI XJ, FAN MT, ZHANG GQ. Influences of acid and ethanol stresses on *Oenococcus oeni* SD-2a

- and its proteomic and transcriptional responses[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(7): 2892-2900.
- [16] 席志文, 黄林娜, 翟一畅, 惠丰立. ARTP-DES 连续诱变选育高产  $\epsilon$ -聚赖氨酸突变株[J]. *食品科学*, 2020, 41(14): 131-137.
- XI ZW, HUANG LN, ZHAI YC, HUI FL. Sequential mutagenesis treatment with atmospheric and room temperature plasma and diethyl sulfate for enhanced microbial production of  $\epsilon$ -poly-L-lysine[J]. *Food Science*, 2020, 41(14): 131-137 (in Chinese).
- [17] 凌思雨, 王洲, 张会敏, 李闯, 刘庆涛, 刘艳, 薛正莲. 常压室温等离子体诱变与微生物微液滴培养选育谷胱甘肽高产菌株[J]. *食品科学*, 2023, 44(4): 200-208.
- LING SY, WANG Z, ZHANG HM, LI C, LIU QT, LIU Y, XUE ZL. Breeding of high yield glutathione strain by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and microbial microdroplet culture system[J]. *Food Science*, 2023, 44(4): 200-208 (in Chinese).
- [18] 陈其玲, 任晓宁, 王玲, 田雨, 赵美静, 宋巧智, 刘树文. 酒球菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性与耐酸胁迫能力的相关性分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 115-120.
- CHEN QL, REN XN, WANG L, TIAN Y, ZHAO MJ, SONG QZ, LIU SW. Correlation between  $\beta$ -glucosidase activity and acid stress tolerance in *Oenococcus oeni*[J]. *Food Science*, 2017, 38(2): 115-120 (in Chinese).
- [19] 白雪菲, 金刚, 刘思, 马雯, 张众, 王卉青, 张军翔. 低温条件下希氏乳杆菌 Q19 苹果酸-乳酸发酵特性及其对葡萄酒香气成分的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 146-152.
- BAI XF, JIN G, LIU S, MA W, ZHANG Z, WANG HQ, ZHANG JX. Malolactic fermentation characteristics of *Lactobacillus hilgardii* Q19 at low temperature and its effect on aroma components in wine[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 146-152 (in Chinese).
- [20] ACEVEDO W, CAÑÓN P, GÓMEZ-ALVEAR F, HUERTA J, AGUAYO D, AGOSIN E. L-malate (-2) protonation state is required for efficient decarboxylation to L-lactate by the malolactic enzyme of *Oenococcus oeni*[J]. *Molecules*, 2020, 25(15): 3431.
- [21] VERNOCCHI P, PATRIGNANI F, NDAGIJIMANA M, LOPEZ CC, SUZZI G, GARDINI F, LANCIOTTI R. Trebbiano wine produced by using *Saccharomyces cerevisiae* strains endowed with  $\beta$ -glucosidase activity[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(3): 1565-1571.
- [22] ZHAO HY, LI YQ, LIU LX, ZHENG MN, FENG ZJ, HU K, TAO YS. Effects of inoculation timing and mixed fermentation with *Pichia fermentans* on *Oenococcus oeni* viability, fermentation duration and aroma production during wine malolactic fermentation[J]. *Food Research International*, 2022, 159: 111604.
- [23] FIA G, MILLARINI V, GRANCHI L, BUCALOSSI G, GUERRINI S, ZANONI B, ROSI I. Beta-glucosidase and esterase activity from *Oenococcus oeni*: screening and evaluation during malolactic fermentation in harsh conditions[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 89: 262-268.
- [24] ZHANG J, WANG TR, ZHAO N, XU JN, QI YM, WEI XY, FAN MT. Performance of a novel  $\beta$ -glucosidase BGL0224 for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon wines[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 144: 111244.
- [25] 董超, 黄蓉, 姜娇, 秦义, 刘延琳, 宋育阳. 粟酒裂殖酵母和戴尔有孢圆酵母混合发酵对赤霞珠桃红葡萄酒品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(3): 206-216.
- DONG C, HUANG R, JIANG J, QIN Y, LIU YL, SONG YY. Influence of mixed fermentation with *Schizosaccharomycete spombe* and *Torulaspora delbrueckii* on the quality of cabernet sauvignon rosé wine[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(3): 206-216 (in Chinese).
- [26] 李毅丽, 李红玉, 贺艳楠, 高山. 混菌发酵对昌黎赤霞珠葡萄酒品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(21): 54-60.
- LI YL, LI HY, HE YN, GAO S. Effect of mixed fermentation on quality of Cabernet Sauvignon wine in Changli region[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(21): 54-60 (in Chinese).
- [27] 浩楠, 唐雅利, 邱子轩, 赵雨竹, 管雪强, 刘树文, 石侃. 贺兰山东麓中部产区优良抗逆葡萄酒乳酸菌的分离筛选及酿酒特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.034093.
- HAO N, TANG YL, QIU ZX, ZHAO YZ, GUAN XQ, LIU SW, SHI K. Screening and fermentation characteristic of lactic acid bacteria from the central Helan Mountain's East Foothill wine region [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.034093 (in Chinese).
- [28] HONG MN, LI J, CHEN YW, QI BY, HUANG YP, WU J, YUE HB, TONG ZQ, LIU YN, WANG F. Impact of mixed non-*Saccharomyces* yeast during fermentation on volatile aroma compounds of Vidal

- Blanc icewine[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 145: 111342.
- [29] 张杰. 酒酒球菌  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学性质、催化机理及应用探究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2021.  
ZHANG J. Enzymatic characteristics, catalytic mechanism and application of  $\beta$ -glucosidase from *Oenococcus oeni*[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [30] 孙丽君, 廖祖宋, 陈文, 张众, 李伟, 夏鸿川, 张军翔. 卷叶病对蛇龙珠葡萄酒香气特征的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(2): 119-130.  
SUN LJ, LIAO ZS, CHEN W, ZHANG Z, LI W, XIA HC, ZHANG JX. Effect of grapevine leafroll disease on aroma profile of cabernet gernischt wine[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(2): 119-130 (in Chinese).
- [31] 陈学莲, 藏伟, 刘宇, 姜站站, 彭帅, 王婧. 生物动力种植模式对‘赤霞珠’葡萄酒酵母菌群和香气成分的影响[J]. *食品科学*, 2023. DOI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221230.1058.025.html>.
- CHEN XL, ZANG W, LIU Y, JIANG ZZ, PENG S, WANG J. Effects of biodynamic vineyard managements on yeast community and aroma components in Cabernet Sauvignon' wine[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2023. DOI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221230.1058.025.html> (in Chinese).
- [32] 刘龙祥, 彭帅, 赵红玉, 袁林, 李华, 王华. 基于 RNA-seq 分析酒酒球菌 SD-2a 酸胁迫应答机制[J]. *食品科学*, 2022, 43(12): 153-162.  
LIU LX, PENG S, ZHAO HY, YUAN L, LI H, WANG H. Acid stress response mechanism in *Oenococcus oeni* SD-2a analyzed by RNA sequencing[J]. *Food Science*, 2022, 43(12): 153-162 (in Chinese).
- [33] 谢昉书. 诱变酒酒球菌菌株苹果酸-乳酸发酵及其对葡萄酒香气的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018.  
XIE FS. Malolactic fermentation ability of mutagenesis of *Oenococcus oeni* and its effect on wine aroma[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).