

蛋白酶在酒类生产中的应用现状

陈 飞 吴生文 张志刚

(四特酒有限责任公司,江西 樟树 331200)

摘 要: 蛋白酶在白酒、果酒及啤酒生产中应用广泛。对蛋白酶在提高白酒出酒率及香味物质浓度、提高葡萄酒澄清效果、以及啤酒泡沫稳定性等方面的应用现状作了概述,并探讨了其在白酒生产中的研究方向。

关键词: 蛋白酶; 白酒; 果酒; 啤酒; 应用现状; 研究方向

中图分类号:TS262.3;TS261.4;TS262.5

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2011)01-0082-03

Present Status of the Application of Protease in Wine Production

CHEN Fei, WU Sheng-wen and ZHANG Zhi-gang

(Saint Liquor Co.Ltd, Zhangshu, Jiangxi 331200, China)

Abstract: Protease is widely used in the production of liquor, fruit wine, and beer. In this paper, the roles of protease in improving liquor yield and flavoring substance concentration, in improving the clarifying effects of wine, and in improving beer foam stability were elaborated. And its application in liquor production was discussed.

Key words: protease; liquor; fruit wine; beer; application status; research direction

中国酿酒历史悠久,而酿酒技术的研究也由以节约粮食、提高出酒率为中心的技术革新时期发展到从科学的总结传统工艺入手,以质量为中心的技术革新时期^[1]。尤其是随着现代生物技术以及色谱检测手段的发展,将此两种技术与酒的酿造技术相结合,已经成为当今酒类研究的重要趋势。酿酒作为微生物形成的多酶体系,目前对发酵酶和酶系统的深入认识还比较少^[2],而蛋白酶作为白酒酿造酶研究的新贵,在其他类型酒中的研究也越来越受到重视。本文以白酒、果酒与啤酒为例,简要论述了蛋白酶在酒类酿造过程中的作用机理及应用现状,并探讨了蛋白酶在白酒生产中的研究方向。

1 蛋白酶的基本性质

蛋白酶是水解蛋白质肽键酶的总称。根据酶作用 pH 的不同,将其分为酸性蛋白酶(pH 2.5~3)、中性蛋白酶(pH 7 左右)和碱性蛋白酶(pH 8 以上)。根据其来源不同又可以分为胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、生姜蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶等。

2 酸性蛋白酶在白酒酿造中的应用

白酒生产中酒醅酸度较高、曲在培养过程中亦要生酸,因此,白酒生产中存在的蛋白酶主要是酸性蛋白酶。随着生产和科技的迅猛发展,酸性蛋白酶在白酒酿造中的应用,国内外已进行了试探性的工作和研究,有的已见成效^[3-4]。酸性蛋白酶在白酒生产过程中被广泛应用,主要是由于它具有多方面的作用效果。

2.1 促进微生物生长,提高原材料的利用率

在现代白酒酿造过程中,提高酒精发酵速度,增加醪液中的酒精含量,实现高效率酒精发酵,这对提高设备利用率、降低能耗和生产成本,增加经济效益具有十分重要的意义。但在白酒酿造过程中经常会出现原料利用率愈来愈低,发酵速度越来越慢,发酵程度越来越不完全,其主要原因有两个方面:一方面是由于淀粉质原料中的蛋白质对淀粉具有一定的包裹作用,因而阻碍了糖化酶对淀粉的完全水解;另一方面则是由于发酵醪中氮源的含量,从而影响了酵母可吸收氮的水平,对酵母菌的生长与代谢产生的显著影响^[5-6]。因此,在酿造白酒过程中添加适量的酸性蛋白酶,一方面能有效地水解原料中的微量蛋白质,破坏原料颗粒质间包膜结构,使醪液中可利用糖增加,从而提高原料出酒率;另一方面,由于蛋白质的水解作用,增加了醪液中可被酵母利用的有机氮源氨基酸,促进酵母生长繁殖,减轻酵母细胞氨基酸合成代谢的负荷,减少能量消耗,使醪液中的糖更多的转化为酒精从而提高原料出酒率^[7]。

在促进微生物生长方面,Kolothie mannial 等研究了在酒精发酵中外加蛋白酶对酵母菌生长的影响,结果表明,加入蛋白酶后能使原料中的蛋白质得以更好地分解,为酵母菌提供了更多的游离氨基酸。在未加蛋白酶的发酵液中,24 h 可达到酵母细胞数的最大值(1.5×10^8 个/g 发酵液),但该数值在此后的时间内几乎无大的变化。添加了蛋白酶之后,24 h 后酵母细胞数仍在增加,48 h 后可达 4.1×10^8 个/g 发酵液,为不加酶的 2.7 倍^[8]。在提高出

收稿日期:2010-09-01

作者简介:陈飞(1986-),男,江西九江人,硕士,主要从事白酒工艺及酿酒微生物的研究。

酒率方面,肖冬光等通过在发酵开始时添加 14 U/g 的酸性蛋白酶的三角瓶实验发现,玉米原料的相对出酒率提高了 4.34%,周期缩短 12 h 左右。在其随后的放大实验中,相对出酒率提高范围在 2.99%~5.73% 以内,周期缩短 10~16 h^[9-10]。促进微生物生长与提高原材料利用率二者是相辅相成的,只有促进了微生物的生长,才能提高原材料的利用率。

2.2 提供生香前体物质和风味物质,与白酒香型相关

白酒中的香味成分复杂,一般有醇类、酯类、酸类、醛酮类化合物、缩醛类、芳香族化合物、含氮化合物和呋喃化合物等,因此,作为其中某些香味成分的前体物质,氨基酸在发酵醪中的浓度会显著影响酒中的风味物质。酸性蛋白酶在酿酒的酸性环境中,能将原料蛋白质水解成氨基酸,再经过不同微生物及酶的代谢,生成多种香味物质。例如,甘氨酸、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸和半胱氨酸等分解代谢可转变为丙酮酸,而丙酮酸除转变为乙醇外,还可转化为乙酸、丁酸、己酸、乳酸等有机酸,丙氨酸和苏氨酸可代谢转变为丙醇,缬氨酸转化为异丁醇,异亮氨酸转化为异戊酸,苯丙氨酸转变为苯乙醇等,这些物质作为多种生香物质前体,可转化为多种酯及其他香味物质^[11-12]。

李长文等通过白酒酿造过程中,杂醇油生成因素的研究直接证明了正丙醇、异丁醇、异戊醇的量与蛋白酶的量关系密切,并进一步的证明这 3 种物质的合成与物料中的发酵力、糖化力、蛋白分解力的协同作用有关^[13]。四特集团的陈全庚等亦认为,特香型酒特征香味成分正丙醇的合成与蛋白酶相关^[14]。此外,通过对大曲的酶系研究发现酱香型曲的酸性蛋白酶含量最高,清香型曲的含量最低,兼香型的中温曲其酸性蛋白酶含量低于兼香型高温曲的酸性蛋白酶含量^[15],因此,酸性蛋白酶也与香型具有一定相关性。

3 蛋白酶在果酒中的应用

果酒是以水果为原料发酵而酿成的酒,由于葡萄酒的产量、质量和品种、名声都远远超过其他水果酒,自然也就成为果酒类的代表。

3.1 葡萄酒不稳定因素分析

葡萄酒作为一种成分复杂的胶体溶液,胶体的稳定性对于保持葡萄酒的质量具有重要作用。葡萄酒的不稳定性包括微生物不稳定性及非微生物不稳定性。葡萄酒非生物不稳定性是指在没有微生物的作用下,蛋白质、酒石酸盐、重金属离子、色素等成分受外界环境或内部因素影响而发生的程度不同的物理化学变化。该变化使葡萄酒出现浑浊、沉淀等现象,严重时会影响产品的感官质量。因此,葡萄酒在装瓶之前必须保证质量的稳定,并保证装瓶后在极端条件下仍能保持长期稳定,对于不稳定的葡萄酒必须进行相应的稳定性处理。其中的蛋白质是仅次于酒石酸影响葡萄酒稳定性的问题^[16]。

葡萄酒中产生的沉淀主要是葡萄细胞及酵母裂解和自溶产生的蛋白质,含量为 15~230 mg/L,此类蛋白质的等电点在 pH 2.5~8.7,平均分子量为 20~40 kDa^[17]。当酒中的 pH 值接近酒中所含蛋白质的等电点时,易发

生沉淀,此外蛋白质还可以和酒中的某些金属离子、盐类等物质聚集在一起而产生沉淀,从而引起葡萄酒出现浑浊现象。因此,通过添加一定量的蛋白酶可以将酒样中的大分子蛋白质分解为小分子多肽和氨基酸,改善葡萄酒中胶体稳定性和热稳定性,提高葡萄酒的非生物稳定性,改善葡萄酒的风味,提高葡萄酒的营养价值。在葡萄酒生产中应用最广的蛋白酶是木瓜酶和生姜蛋白酶。

3.2 蛋白酶在葡萄酒生产中的应用

木瓜蛋白酶是一种巯基蛋白酶,具有较宽的底物特异性,在酸性、中性、碱性环境下均能分解蛋白质。张传军的“酶法提高白葡萄酒质量稳定性的研究”发现,当加酶量为 0.6% (w/v),酶反应 pH 6.5,在 45 °C 反应 38 h 后,白葡萄酒中的蛋白含量降低为 0.31 g/L,氨基酸含量升高至 6.7 mg/L,可有效减少白葡萄酒中非稳定蛋白含量^[18]。生姜蛋白酶是继木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等后发现的一种新的植物蛋白酶,被认为是木瓜蛋白酶家族的又一新成员^[19]。柴丽娟等通过向红葡萄酒中添加生姜蛋白酶来研究其对红葡萄酒的澄清效果,结果表明,红葡萄酒中添加 0.25 μg/mL 生姜蛋白酶,作用 12~30 d,生姜蛋白酶对红葡萄酒的 pH 变化趋势影响不显著,可以保持红葡萄酒色调稳定,多酚指数的变化趋势平稳,酒体协调细腻,感官分析符合葡萄酒 GB15073 中华人民共和国国家标准;生姜蛋白酶可以增加单宁色素-蛋白质复合沉淀物,减少红葡萄酒中色素物质的含量,进一步使葡萄酒的颜色变浅;同时生姜蛋白酶澄清红葡萄酒时,也可以将酒样中的大分子蛋白质分解为小分子多肽和氨基酸,增加可溶性多肽和氨基酸的量,进而减少蛋白质沉淀的量,提高红葡萄酒的澄清度^[20]。

4 蛋白酶在啤酒中的应用

啤酒作为风行世界、男女老弱皆宜的营养饮料,是大麦发芽的辅料糖化后,加啤酒花和酵母发酵而制成的。啤酒是含酒精度数最低的一种酒,只有 3%vol~5%vol,又有丰富的营养成分,除水和碳水化合物外,还含有酒花、蛋白质、二氧化碳、丰富的氨基酸、钙、磷和维生素等,因此素有“液体面包”的美誉。对于如何提高啤酒泡沫的稳定性是啤酒工业界以及各国科研人员研究的热点。

4.1 影响啤酒泡沫稳定性的因素

啤酒泡沫作为影响啤酒质量的一个重要指标,其影响因素很多。当啤酒开启时,瓶中压力消失,溶入啤酒中的 CO₂ 就慢慢的释放出来,而啤酒中的蛋白质等成分会在酒液表面形成一层表面张力,从而形成泡沫,因此,啤酒成分中的蛋白质和多肽在起泡过程中起关键作用。关于啤酒蛋白尤其是泡沫蛋白的研究,国外学者已有很多报道,而我国的研究才刚刚起步^[21-22]。目前,各国学者普遍认为,在泡沫形成与稳定中起主要作用的是分子量为 40 kDa 的蛋白 Z 和分子量为 17 kDa 的脂类转移蛋白 1 (LTP1),且疏水性多肽的性能而非多肽的大小对啤酒的稳定性起关键的作用。由于 LTP1 具有不同的疏水性和表面张力,因此,在啤酒泡沫的稳定性方面具有广泛的作用。

4.2 酵母蛋白酶 A 在啤酒中的应用

啤酒泡沫中的酵母蛋白酶 A 原从酵母活细胞内输送到胞外会自动水解转化成活性形式,从而将啤酒中的泡沫活性蛋白降解,且其改变的是麦汁多肽疏水性性能,而非麦汁多肽分子的大小。也就是说,这些物质的结构只有微小的变化,但改变了这些分子的发泡性能,从而显著的降低了啤酒的泡沫稳定性^[23-24]。王肇悦等通过测定纯生啤酒存放过程中酵母蛋白酶 A 活性的变化、泡沫持性衰减及蛋白含量的变化,进一步说明酵母蛋白酶 A 以及蛋白种类与含量对纯生啤酒泡沫稳定性的影响及其相互关系。同时,对不同存放时期纯生啤酒样品中蛋白质进行电泳鉴定的结果也显示,存放 3 个月后的纯生啤酒中,脂肪转运蛋白 1(LTP1)完全消失,因此表明, LTP1 是影响啤酒泡沫稳定性的主要蛋白^[25]。而王德良、陈旭等通过一系列系统的实验,包括外加蛋白酶 A、温度梯度热处理等方法来研究啤酒残留蛋白酶 A 的酶活和啤酒泡沫的稳定性;蛋白酶 A 专一抑制剂梯度处理来分析蛋白酶 A 残留酶活与对应啤酒泡沫稳定性的相关性。其结果表明,纯生啤酒的蛋白酶 A 的酶活高低直接决定纯生啤酒的泡沫稳定性,为蛋白酶 A 是影响纯生啤酒泡沫稳定性的关键因素提供了最为直接的数据证明^[26-27]。因此,要提高纯生啤酒的泡沫稳定性,只有从酵母蛋白酶 A 入手,才能真正解决这一问题。

5 讨论

蛋白酶在果酒及啤酒中的研究较白酒深入,这主要是由于蛋白酶在果酒及啤酒中的作用较白酒单一,而酒用酸性蛋白酶在白酒酿造的发酵过程中起着复杂的协同作用,具有溶解发酵原料的颗粒、促进微生物繁殖、分解蛋白质生成香味物质、降解酵母菌体蛋白等多种功能。虽然蛋白酶在白酒应用中的范围越来越广泛,但对于大多数研究者来说,蛋白酶始终都是在宏观方面进行研究,即只以蛋白酶类做为研究对象,而忽略蛋白酶的多样性。这主要是由于白酒酿造过程是一个由多种微生物在复杂环境下进行代谢繁殖的过程,蛋白质的种类、来源、产生方式及其浓度在整个发酵过程中的作用机理是极其多样化的,因此,在关注宏观应用方面的同时,也应加强微观机理方面的研究,即将蛋白酶的研究具体化、细致化,从单一微生物、单一蛋白酶出发,进一步深化蛋白酶在白酒中的应用机理研究,达到宏观与微观研究的有机结合,并最终拓展到酿酒微生物种群、酿酒酶系、酿酒环境三者之间的关系中来,进一步推动现代生物工程技术在传统产业中的应用发展。

参考文献:

- [1] 沈怡方.我国白酒生产技术进步的回眸[J].酿酒科技,2008,(6):24-28.
- [2] 徐岩.现代生物技术的发展思考传统白酒酿造技术的研究[J].酿酒,2003,(2):15-16.
- [3] 周恒刚.白酒生产和酸性蛋白酶[J].酿酒,1991,(3):5-8.

- [4] 阎致远,王祥河.酸性蛋白酶的性质及其在白酒生产中应用的研究[J].酿酒科技,1995,(6):16-17.
- [5] 许宏贤,段刚.酸性蛋白酶与无机氮源对酒精发酵和 DDGS 影响的比较[J].酿酒,2006,33(4):35-38.
- [6] 李兰.酸性蛋白酶在生料酿酒中的应用研究[J].四川食品与发酵,2002,(3):23-26.
- [7] 王彦荣,孟祥春,任连彬,许丽霞,姜淑荣.酸性蛋白酶生产与应用的研究[J].酿酒,2003,30(3):16-18.
- [8] Kolothe, T., Yoshimoto, T., Nucheotide sequence of the gene encoding pepstatin insensitive and acid Protease B, Scytalidopepsin B, of Scytalidium lignicolum[J]. Biosci. Biotech. Biochem, 1996, (64): 1210-1211.
- [9] 肖冬光,赵华,赵树欣,郭波,张维,邹海晏.酒用酸性蛋白酶在酒精生产中应用技术的初步研究.三角瓶发酵试验[J].酿酒科技,2000,(3):35-38.
- [10] 肖冬光,赵华,翟建新,邹海晏.酒用酸性蛋白酶在酒精生产中应用技术的初步研究.酒精生产应用试验[J].酿酒科技,2000,(4):34-36.
- [11] 唐胜球,董小英,许梓荣.酒用酸性蛋白酶的研究进展[J].酿酒科技,2005,(1):41-44.
- [12] 魏炜,张洪渊,戴森,樊林.酸性蛋白酶的性质及其在白酒酿造中的作用[J].酿酒科技,1997,(6):18-20.
- [13] 李长文,梁慧珍,马树奎.固态白酒发酵中多因素对杂醇油生成影响的研究[J].酿酒,2006,33(6):43-46.
- [14] 陈全庚,陈光汉,袁菊如,徐国良,李雄辉.“四特型”白酒特征香味成分正丙醇的确认及形成机理初探[J].酿酒科技,1995,(3):60-61.
- [15] 范文来,徐岩.大曲酶系研究的回顾与展望[J].酿酒,2000,138(3):35-40.
- [16] 张明霞.白葡萄酒中不稳定蛋白的研究进展[J].酿酒,2006,33(5):89-92.
- [17] 李华.多糖对葡萄糖感官质量的作用[J].酿酒,2001,28(6):65-67.
- [18] 张传军.酶法提高白葡萄酒质量稳定性的研究[J].中国酿造,2009,(6):65-68.
- [19] 冯敏,唐春红.生姜蛋白酶的研究概述[J].中国食品添加剂,2008,(6):58-60.
- [20] 柴丽娟,陈述云,袁继鑫,李岩,乔圆,赵冬艳,唐晓珍.生姜蛋白酶对红葡萄酒澄清效果的研究[J].酿酒,2009,36(6):59-62.
- [21] Kapp G.R., B.C.W., The foaming properties of proteins isolated from barley[J]. Science Agric Food, 2002, 82(11): 1276-1281.
- [22] 叶俊华,顾国贤,陆健.啤酒及其泡沫中蛋白组分的比较分析[J].无锡轻工大学学报,2003,22(6):46-49.
- [23] 王德良,杨毅,贾凤超,林智平,张五九.蛋白酶 A 与啤酒泡沫稳定性(二)[J].啤酒科技,2004,(5):11-15.
- [24] 王德良,杨毅,贾凤超,林智平,张五九.蛋白酶 A 与啤酒泡沫稳定性(一)[J].啤酒科技,2004,(1):11-15.
- [25] 王肇悦,何国庆,刘中山,杨璐芳,熊皓平.纯生啤酒存放过程中泡沫稳定性与酵母蛋白酶 A 以及蛋白含量与组成变化的研究[J].中国食品学报,2006,6(4):96-100.
- [26] 陈旭,王德良,杨海燕,李建飞,王晓娟,王志萍.蛋白酶 A 与纯生啤酒泡沫稳定性及蔗糖转化酶的关系研究[J].酿酒科技,2009,(1):44-49.
- [27] 王德良,何春燕,李建飞,何熙,李惠萍.蛋白酶 A 与纯生啤酒泡沫稳定性的关系研究[J].啤酒科技,2008,(2):44-48.