

# 瓶装葡萄酒蛋白破败的研究进展

赵文英<sup>1,2</sup>, 李 华<sup>2</sup>

(1. 中北大学化工与环境学院, 山西 太原 030051; 2. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 瓶装葡萄酒中的蛋白质破败是由葡萄酒中的蛋白缓慢变性, 形成不规则的浑浊沉淀而引起的。酒中的绝大部分蛋白来源于葡萄浆果, 其中葡萄致病相关蛋白( PR 蛋白) 含量最高。葡萄 PR 蛋白等电点低, 分子量小, 对蛋白酶和低 pH 值具有高抗性。PR 蛋白的形成与环境条件, 以及葡萄成熟过程中的病理情况相关。葡萄酒中与蛋白破败有关的大部分蛋白, 其前体属于葡萄 PR 蛋白。葡萄酒蛋白破败的产生不仅依赖于蛋白质, 而且还要受到非蛋白因素的影响。虽然膨润土对去除酒中的问题蛋白很有效, 但该方法对葡萄酒质量有不利的影响, 而且在下胶处理中还损失了 3%~10% 体积的葡萄酒。对现有使用方法进行改进, 可提高酒质、节约成本、保护环境, 发展膨润土取代技术。

**关键词:** 白葡萄酒; 蛋白破败; 膨润土

中图分类号: TS262.6; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2007)08-0138-04

## Research Advance in Protein Haze in Bottled Grape Wine

ZHAO Wen-ying<sup>1,2</sup> and LI Hua<sup>2</sup>

(1. College of Chemical Engineering of Middle-north University, Taiyuan, Shanxi 030051; 2. College of Enology, Northwest Agriculture & Forestry Technology University, Yanglin, Shanxi 712100, China)

**Abstract:** Protein haze in bottled grape wine is induced by slow denaturation and aggregation of proteins. The protein in wine is mainly composed of grape pathogenesis-related (PR) protein, which has the properties including low isoelectric points, low molecular weight, and high resistance to proteolysis and to low pH values. The formation of PR protein is closely related with the environmental conditions and the pathogens during its mature process. The precursor of most proteins related to protein haze is PR protein. The development of protein haze is not only dependent on protein but also influenced by other factors. Bentonite could eliminate protein haze effectively. However, the use of such method could also damage grape wine quality and 3%~10% grape wine might loss during the treatment. Therefore, the traditional treatment method should be improved to save cost, improve wine quality and protect environment.

**Key words:** white grape wine; protein haze; bentonite

葡萄酒中的蛋白含量很少(15~230 mg/L), 但它却直接影响着酒的澄清和稳定, 尤其在白葡萄酒中, 蛋白破败始终是一个令人头疼的问题。由于贮存条件不当, 蛋白质破败可在装瓶后, 由葡萄酒蛋白的缓慢变性, 形成了不规则的浑浊沉淀而引起。消费者难以接受令人不悦的雾浊, 从而降低了其商业价值<sup>[1]</sup>。目前, 葡萄酒厂为了保证酒的澄清度, 普遍采用膨润土下胶的方法来去除酒中的问题蛋白以防蛋白破败的发生。但膨润土处理葡萄酒时, 由于其吸附不具选择性, 不仅吸附了蛋白质, 而且吸附了许多重要的风味物质, 故对葡萄酒质量影响

很大; 另外, 由于膨润土的吸水膨胀性强, 沉降特性差, 使用现有的下胶方法, 总有 3%~10% 体积的葡萄酒会渗入膨润土而损失掉; 再者, 废弃的膨润土还会涉及环境污染问题。所以, 为了提高酒质, 节约成本, 保护环境, 我们需要改进现有的膨润土使用方法, 同时发展膨润土取代技术。因此, 研究瓶装白葡萄酒蛋白破败问题具有重要的技术和经济价值。

### 1 葡萄酒中蛋白来源

葡萄酒中的蛋白质是葡萄浆果蛋白和酵母自溶释

收稿日期: 2007-03-09

作者简介: 赵文英(1977-), 女, 山西临汾人, 讲师, 研究方向为葡萄酒工艺学, Email: zwr1zwy2@sohu.com。

放出的蛋白的混合体。其实酵母可以从两方面影响酒体蛋白:一是酵母自溶,将自身的蛋白组分释放进入酒体。二是酵母分泌蛋白酶,将葡萄蛋白分解变成葡萄酒蛋白。Bayly 和 Berg (1967) 研究白葡萄酒中的蛋白组分时,发现酵母在发酵过程中释放出的蛋白量很少。Lee (1986) 认为酒中的绝大部分蛋白来源于葡萄浆果,而且整个蛋白水平受品种、成熟度和气候的影响。Ferreira (2000) 采用蛋白免疫的方法也证明了酒中的绝大部分蛋白来源于葡萄浆果,但研究发现这些蛋白在酒的酿造过程中几乎全部丧失原型,而且酒中游离蛋白的水平下降了。其原因是:在发酵过程中,由于蛋白酶和低 pH 值的作用,葡萄蛋白被分解或变性;一半左右的蛋白与葡萄的多酚物质结合在一起;一部分可溶性蛋白通过与单宁结合沉淀了下来<sup>[2]</sup>。

## 2 葡萄浆果蛋白质的特性

成熟葡萄果汁中可溶性蛋白的电泳图谱非常简单,以少量低分子量蛋白为主。葡萄浆果在转色期后总蛋白量会有明显增加,而且在葡萄成熟过程中会大量合成特定的蛋白质<sup>[3]</sup>。这些成熟期大量合成的蛋白质已被鉴定,其中葡萄致病相关蛋白(PR 蛋白)含量最高<sup>[4]</sup>。

葡萄浆果中的致病相关蛋白显酸性,分子量小,对蛋白酶降解和低 pH 值具有高抗性。其主要包括 PR-5 (类奇甜蛋白以及渗透蛋白)、PR-2( $\beta$ -1,3-葡聚糖酶)、PR-3 和 PR-4 蛋白(几丁质酶)。PR 蛋白在葡萄藤叶以及浆果中以发育依赖性和可诱导的方式表达,人们认为,这些蛋白在叶和果实部位的表达,扮演着抗真菌以及抗其他逆境条件的角色。因为它们对于蛋白水解和葡萄酒特有的低 pH 值条件具有天然的抗性,所以葡萄酒的酿造过程也可以被视为纯化葡萄 PR 蛋白的一个策略。在葡萄成熟过程中积累最多的两种可溶性蛋白是几丁质酶和类奇甜蛋白,其中一半的可溶性蛋白是几丁质酶。研究表明,化学刺激、创伤、真菌感染和厌氧条件都可以诱导 PR 蛋白在叶子和未成熟果实中表达<sup>[5]</sup>。

PR 蛋白在葡萄浆果中的表达水平和比例依赖于地域、气候以及农业实践等因素。早有研究表明,葡萄成熟度越高,葡萄酒中可溶性蛋白含量就越高。而且在植物生长过程中,主导的环境条件将决定成熟的果实中积累的主要蛋白的种类<sup>[6]</sup>。Girbau 等在研究葡萄白粉病和灰霉病对 PR 蛋白含量的影响时,发现感染白粉病的葡萄在自流汁中类奇甜蛋白的含量有所增加,而且在整个发酵过程中含量都很大,所制葡萄酒蛋白破败现象严重。而在感染灰霉病的葡萄中 PR 蛋白的检出量却很少<sup>[7]</sup>。因此,在成熟葡萄浆果中,其蛋白质存在的实际形式与环境条件及植物生长过程中的病理情况相关。

## 3 形成瓶装葡萄酒蛋白破败的原因

蛋白破败是否与蛋白总量呈线性相关,是否可据此判断怎样的蛋白水平可以使瓶装葡萄酒保持澄清稳定。早在 1965 年,Moretti 和 Bayly 就提出葡萄酒中的蛋白总量不能成为推测蛋白破败是否发生的依据。而这一观点也得到了后人的证实。

近年来,多项研究证实葡萄酒中与蛋白破败有关的大部分蛋白,其前体属于葡萄致病相关蛋白(PR 蛋白)。葡萄酒蛋白分子量较低,在 11.2~65 KDa 之间,等电点也较低,在 4.1~5.8 之间,而且对蛋白酶水解和低 pH 值具有高抗性,这正是植物 PR 蛋白共有的特性。PR 蛋白在葡萄酒发酵过程中生存了下来,这样就形成了触发蛋白破败的潜在因素。Waters 等通过免疫和 N 末端氨基酸序列检测实验证明了主要的形成胶状薄雾的蛋白质是几丁质酶(PR-3 家族)以及类奇甜蛋白和渗透蛋白(PR-5 家族)<sup>[8]</sup>。Ferreira 等对利用不同的葡萄品种,采用不同的工艺过程制得的葡萄酒进行了蛋白分析,发现它们基本上是由相同的 PR 蛋白构成的。这些蛋白是在葡萄生长过程中形成的,而且在葡萄的发酵过程中,进行了有限的变性和降解,最终成为了酒中共有的特征蛋白组分<sup>[9]</sup>。

尽管蛋白破败依赖于这些特征蛋白,但也要受到非蛋白因素的影响。Lagace(1990)提出高乙醇含量和低 pH 值是蛋白破败的原因。Sarmento(2000)实验表明,pH 值和贮存温度对形成蛋白破败起显著作用。Mesquita(2001)通过实验观察到 PR 蛋白组分基本相同的葡萄酒,其蛋白破败模型却不同。而用牛血清蛋白和其他酒的蛋白替换酒中原有的蛋白,发现随着温度升高,所形成的蛋白破败模型基本上没有发生变化。其实验还表明,蛋白破败是由低 pH 值和高浓度的多糖引起的,增加 pH 值或降低多糖的含量会减少高温情况下蛋白的聚集,但酒精含量却不能影响结果。这些研究结果均说明,蛋白破败不是由特征蛋白本身决定的,而是受到诸如酒的酸碱度和多糖等因素的影响<sup>[10]</sup>。

多糖和多酚是影响葡萄酒感官特征的重要组分物质,它们同时也参与了蛋白破败的形成,并影响着下胶处理的效率<sup>[11]</sup>。一些酒中的多糖物质,如酵母甘露蛋白、阿拉伯半乳糖蛋白,在葡萄酒 pH 值范围内带负电荷。结果导致这些多糖同酒中的其他物质发生静电和离子作用力,形成可溶的或不可溶的聚合体。研究表明,酒泥可以提高特征蛋白的热稳定性,其原因并非酵母去除了不稳定的特征蛋白或具有水解蛋白的活性,而是它释放出了甘露糖蛋白。Waters 分离得到了这种天然的蛋白雾浊保护因子,该大分子化合物是由蛋白和多糖组成的<sup>[12]</sup>。

多酚在葡萄酒 pH 值范围内不带电荷或带微弱的负电荷, 因此主要的物化作用力不是离子力和静电引力, 而更可能是氢键力和疏水作用力, 如原花色苷与蛋白之间的作用力主要就是氢键力和疏水作用力。Waters 测定出天然和热诱导产生的雾浊沉淀中原花青素的含量在 0.02 % ~ 4.9 % 之间<sup>[13]</sup>。

总之, 葡萄酒中的蛋白破败不仅依赖于蛋白质, 而且要受到非蛋白因素的影响, 其形成机制尚无定论, 很多问题需要我们进一步求证。

#### 4 解决蛋白破败问题的现状及展望

目前, 葡萄酒厂普遍采用膨润土下胶的方法来防止葡萄酒中蛋白破败的发生。膨润土的化学组成通式为  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。各地膨润土的化学组成差别很大。膨润土中同晶置换的现象极为普遍, 其置换的结果会使电荷不平衡, 从而易于吸附阳离子。由于膨润土属于 3 层结构的粘土矿物, 其结构单元是由两层  $\text{Si-O}_4$  四面体中间夹着一层  $\text{Al-O}_6$  八面体构成的, 所以可称为 2 1 型层状硅酸盐。由于相邻两层间均为  $\text{O}^{2-}$  而不能形成氢键, 故层间结合力较弱, 且水分子易于进入晶层之间, 从而表现出较强的吸水能力。无水时膨润土的晶层间距离为 0.9 ~ 1 nm, 吸附了有机阳离子后可增大至 2 nm, 含水时为 4 nm 左右<sup>[14]</sup>。由于酒中的特征蛋白在酸性条件下带正电荷, 因此可被膨润土吸附。虽然膨润土对去除酒中的问题蛋白很有效, 但由于其吸附不具选择性, 不仅吸附了蛋白质, 而且吸附了许多重要的风味物质, 所以对葡萄酒的质量影响很大; 另外, 由于膨润土的吸水性很强, 总有 3 % ~ 10 % 体积的葡萄酒会渗入膨润土而损失掉, 从而增加了生产成本。而且酒厂为了确保葡萄酒的澄清度, 膨润土的添加量也是逐年增加。那么就需要从提高膨润土的使用效率、发展膨润土取代技术两方面入手, 以提高酒质, 节约成本。

由于现有的膨润土使用方法比较粗放, 可以通过化学工程手段来提高膨润土的使用效率, 以减少酒的损失, 同时降低对环境的污染程度。澳大利亚葡萄酒研究所和阿德莱德大学化学工程学院已合作开展了这方面的研究。他们首先建立了蛋白吸附模型, 发现特征蛋白在几分钟之内就完成了吸附, 而在现有的实际操作中, 膨润土与酒体接触的时间通常为 1 ~ 2 周。接着确立膨润土吸附葡萄酒特征蛋白的最佳条件。比如葡萄酒温度较高时, 蛋白吸附量就较大。然后改进膨润土的投加方式, 如采用连续的添加系统。该系统可降低膨润土与葡萄酒的接触时间, 最小接触时间不到 2 min。实验结果表明, 该系统同现在使用的方法对提高蛋白的稳定性一样有效, 而且可明显地减少葡萄酒的损失量。他们还研究

了如何使膨润土再生。实验表明, NaOH 就可以解决这个问题。在我国尚未见此方面的报道, 因此有必要尽快对此进行深入研究, 发展具有自主知识产权的高效率下胶处理系统及装置。

在发展膨润土取代技术方面, 人们尝试了各种方法, 其中包括超滤、使用替代性吸附剂、蛋白酶、加热、添加具蛋白保护活性的多糖等。在评述这些技术之前, 首先要说明通过基因工程的手段来降低 PR 蛋白的表达量, 显然是行不通的。因为 PR 蛋白表达水平低的葡萄浆果必然会降低抗真菌感染的能力, 造成葡萄低产。当前生产中均以酒质为代价进行妥协, 在不牺牲植物的天然抵抗能力和产量的前提下, 减少 PR 蛋白积累。此外, 还依赖于在葡萄种植业实践、酿酒学研究及杀真菌剂应用之间的精细平衡。从酿酒学的角度来看, 我们希望能酿酒工艺上, 有更好的办法来解决蛋白不稳定的问题。

对葡萄酒进行超滤处理, 虽然能去除蛋白, 但是同样会对酒体的感官品质影响很大, 且会增加生产成本。利用单宁可以同蛋白结合形成沉淀, 可以把单宁从葡萄籽中提取出来, 然后进行固定, 让其吸附葡萄酒中的特征蛋白, 从而达到蛋白稳定的目的。但是, 这种吸附剂经循环再生之后, 结合蛋白质的能力就显著降低了。Pashova (2004) 提出, 用装有二氧化锌粉末的柱子来进行过滤处理。结果表明, 总的蛋白量降低了 50 % ~ 70 %, 蛋白稳定性得到了显著提高。而且对柱体进行加热循环处理, 可增加柱体的吸附能力。二氧化锌可以选择性的吸附 20 ~ 70 Kda 的蛋白, 该处理不会影响酒体的物化性质<sup>[15]</sup>。Vincenzi (2005) 报道了利用几丁质去除特定蛋白以增强葡萄酒蛋白稳定性的研究。他们分别用几丁质和膨润土对装瓶前的白葡萄酒进行下胶处理, 结果表明, 几丁质去除的蛋白量小于 29 %, 蛋白破败率却下降了 80 %。虽然膨润土处理也没有发生蛋白破败现象, 但几乎去除了全部蛋白, 且对酒质的影响要远大于前者。这一实验表明, 几丁质可以选择性的去除特征蛋白组分。经电泳实验也证明了几丁质确实具有特异的吸附性能, 并认定被几丁质吸附的蛋白为 PR-4 蛋白 (chitinase), 并且将几丁质固定在柱子上, 还可以实现重复使用。该方法很有应用前景, 尚需进一步优化实验条件, 以待大规模生产的检验<sup>[16]</sup>。

人们也希望利用蛋白酶来分解酒中的蛋白, 使它变成小分子肽链或者氨基酸。但实践证明该方法是不太成功的, 因为葡萄酒中的蛋白是 PR 蛋白, 本身具有抗蛋白酶分解的特性, 另外, 这些蛋白酶还必须在低温条件下工作, 同时酶活也受到了限制。但蛋白酶同其他处理相结合, 却有着很好的应用前景。Pocock 认为在对葡萄酒



进行短时间加热的过程中加入蛋白酶,可降低30%~60%膨润土的用量,且该方法不会改变酒的风味<sup>[17]</sup>。此外,美国专利公告US 2003/0165592 A1中有一篇有关在发酵前添加蛋白酶,以降低膨润土使用量的报道。该文认为在发酵前,蛋白酶的抑制剂还没有形成,有利于蛋白酶水解作用的发挥。而且蛋白酶还可作为葡萄汁发酵过程中的抗起泡剂。结合Vincenzi(2005)的研究,可以考虑采用几丁质为吸附材料在发酵前对PR蛋白进行特异性吸附。笔者认为,发酵前PR蛋白还可能具有一定的酶活性,根据酶和底物的特异性结合,首先去除一部分PR蛋白。这样不但会大大降低后期膨润土的用量,而且对酒质的影响也降到了最低程度。该研究思路值得进一步的实验论证。

在葡萄酒中添加具有蛋白保护活性的多糖来解决蛋白破败问题是具有潜力的研究方向之一。这些活性多糖并不能阻止蛋白的热变性,而是同酒中的问题蛋白竞争性结合一些未知的物质,这样可降低蛋白破败絮状物颗粒的大小,使肉眼无法观察到雾浊,同时多糖本身仍保持溶解状态。有人发现苹果中的阿拉伯半乳糖蛋白和塞内加尔的树胶具有蛋白保护因子的作用。Waters(2000)利用外加的酵母甘露糖蛋白来阻止蛋白破败的发生<sup>[18]</sup>。现在国外已生产了过量表达活性甘露糖蛋白的酵母菌株。目前该方法存在的问题是,这些蛋白保护因子在短中期稳定性较好,但在长期贮存过程中,仍存在轻微的蛋白破败现象。因此,深入蛋白保护活性多糖的研究仍是重要的科研方向之一。

总之,为避免瓶装葡萄酒蛋白破败的发生,今后需要改进膨润土的现有使用方法,并不断发展膨润土取代技术。

#### 参考文献:

- [1] 李华.现代葡萄酒工艺学(第二版)[M].西安:陕西人民出版社,2000.
- [2] Ferreira RB., Picarra-Pereira MA., Monteiro S. et al. The wine proteins[J]. Trends in Food Science & Technology, 2002, (12): 230-239.
- [3] Tattersall DB., Heeswijck R., Hoj PB. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes[J]. Plant Physiology, 1997, (114): 759-769.
- [4] Robinson SP., Davies, C. Molecular biology of grape berry ripening[J]. Australian Journal of Grape Wine Research, 2000, (6): 175-188.
- [5] Ferreira RB., Monteiro SS., Antonieta Pic M., et al. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability[J]. TRENDS in Biotechnology, 2004, (22): 168-173.
- [6] Monteiro, S. et al. Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes[J]. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 4046-4053.
- [7] Girbau T., Stummer BE., Pocock KF., et al. The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze-forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine[J]. Australian Journal of Grape & Wine Research, 2004, (2): 125-133.
- [8] Waters EJ., Shirley NJ., Williams PJ. Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, (44): 3-5.
- [9] Ferreira RB., Monteiro S., Picarra-Pereira MA., et al. Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2000, (51): 2-28.
- [10] Mesquita PR., Picarra-Pereira MA., Monteiro, et al. Effect of wine composition on protein stability[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, (52): 324-336.
- [11] Santoro, M. Fractionation and characterization of must and wine proteins[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1995, (46): 250-254.
- [12] Waters E J., Wallace W., Tate ME., Williams PJ. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, (41): 724-730.
- [13] Waters EJ., Peng Z., Pocock KF., Williams PJ. Proteins in white wine, I: procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein hazes and its relationship to protein instability[J]. Australian Journal of Grape Wine Research, 1995, (1): 86-93.
- [14] 鞠建英.膨润土在工程中的开发与应用[M].北京:中国建材工业出版社,2003.
- [15] Pashova V., Guell C., Lopez F. White wine continuous protein stabilization by packed column[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004, (52): 1558-1563.
- [16] Vincenzi S., Polesani M., Curioni A. Removal of specific protein components by chitin enhances protein stability in a white wine[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2005, (56): 246-254.
- [17] Pocock KF., Høj PB., Adams KS., et al. Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2003, (9): 56-63.
- [18] Waters E., Dupin I., Stockdale V. Preventive action of polysaccharides against protein haze in white wines[J]. Vignevini. 2000, (27): 47-49.