

# 葡萄酒酿造用商业果胶酶中主要功能酶活性研究

姜文广 李记明 赵 虎 于 英

(烟台张裕集团有限公司技术中心, 山东 烟台 264000)

**摘要:** 对8种商业果胶酶中聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶裂解酶(PL)、果胶甲酯酶(PME)、纤维素酶、内切-1-4-β-D-木聚糖酶以及β-D-葡萄糖苷酶共6种酶的活性进行测定并进行使用效果估测。结果表明,不同商业果胶酶中的此6种酶活性存在差异,聚半乳糖醛酸酶活性最强,其次是内切-1-4-β-D-木聚糖酶和果胶甲酯酶酶活,而β-D-葡萄糖苷酶活性较低,与红葡萄酒用果胶酶相比较,白葡萄酒用果胶酶中纤维素酶活性较低。

**关键词:** 果胶酶; 酶活性; 葡萄酒酿造

中图分类号:TS262.6;TS261.4;TQ920;Q55 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)12-0027-04

## Study on Enzymatic Activities of Commercial Pectinase Used in Wine-making

JIANG Wenguang, LI Jiming, ZHAO Hu and YU Ying

(Technology Center, Changyu Group Company Ltd, Yantai, Shandong 264001, China)

**Abstract:** In this study, six different enzymatic activities (polygalacturonase, pectin lyase, pectin methylesterase, cellulase, endo-1-4-β-D-xylanase, and β-D-glucosidase) in 8 commercial pectinase were determined and their wine-making performance were estimated. The results showed that there were some significant difference in six enzymatic activities among 8 pectinase, polygalacturonase had the highest activity, and then followed endo-1-4-β-D-xylanase and pectin methylesterase, and β-D-glucosidase had lower activity. Compared with pectinase used for red grape wine production, pectinase used for white grape wine production had lower cellulase activity.

**Key words:** pectinase; enzymatic activities; wine-making

通常情况下,葡萄中含有的大量果胶会导致澄清困难、出汁率低、过滤效率低等问题。同时,在浸渍过程中,这些存在于葡萄皮和果肉中的大量果胶会阻碍色素和单宁的浸提、溶解和稳定,从而增加了葡萄酒酿造的难度<sup>[1]</sup>。

果胶酶是现代葡萄酒酿造中的重要辅料,能分解葡萄原料中的果胶。果胶酶是能够分解果胶物质的多种酶的总称,其大多数是由黑曲霉(*Aspergillus niger*)经特殊工艺而制成。传统果胶酶主要成分为纤维素和半纤维素,主要用于澄清葡萄汁,而专业果胶酶是由果胶裂解酶(Pectin lyase)、多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase)、β-葡聚糖酶(β-Glucanase)、果胶甲酯酶(Pectin methylesterase)等多种酶复合而成<sup>[2]</sup>。不同的酶作用于果胶长链的不同部位。在葡萄酒生产过程中,使用果胶酶不仅能够改善葡萄酒的澄清效果,而且还具有促进有益物质释放、提高葡萄出汁率、增强葡萄酒的色泽和香气等多重效果<sup>[3]</sup>。

在葡萄酒酿造过程中,采用果胶酶处理发酵醪是非

常必要的。当在适当工艺阶段添加果胶酶后,果胶较为快速地分解,使得葡萄汁澄清和过滤更为容易,同时大大提升了出汁率,从而提高自流酒产量。此外,还可更好地浸提出葡萄中的有益多酚物质,释放出香气成分<sup>[2,4]</sup>。在此过程中,果胶裂解酶(PL)可使果胶的长链分子链断裂,形成众多的短链果胶分子;而果胶酯酶(PE)和聚半乳糖醛酸酯酶(PG)的主要作用是将短链果胶水解成更小的分子,使其得以凝聚并沉降分离<sup>[1]</sup>。由于PG的专一性对果胶的酯化度要求不如PL高,在澄清果汁方面注重以PG为主的酶组成,而在提高浸出汁,特别是自流汁方面更注重使用以PL为主的酶制剂<sup>[5]</sup>。

目前,我国葡萄酒酿造用的果胶酶主要来源于国外,不同品牌果胶酶活性的报道往往采用不同酶活单位(主要据生产商而定),难以进行同类产品间的比较<sup>[6]</sup>。因此,本研究通过对商业果胶酶中主要功能酶活性的检测,了解不同产品间酶活性的差异,并用于初步评估其酿酒使用效果,为葡萄酒的酿造使用提供理论指导。

基金项目:国家认定企业技术中心创新能力建设专项(2007406)、山东省重点产业振兴和技术改造专项投资项目(鲁发改投资[2010]1460号)。

收稿日期:2012-08-16

作者简介:姜文广(1981-),男,硕士研究生,工程师。

通讯作者:李记明,博士,研究员。

优先数字出版时间:2012-10-19;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121019.0925.002.html>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

果胶酶样品:本研究共检测了8种不同商业果胶酶(P-1~P-8),均购于2010年,具体样品信息见表1。

表1 所检测的8种商业酶制剂信息

编号	包装	推荐用量	年份	用途
P-1	液体	10~30 mL/L	2010	白葡萄酒
P-2	液体	10~30 mL/L	2010	红葡萄酒
P-3	粉末状	30~40 mg/L	2010	红葡萄酒
P-4	粉末状	20 mg/L	2010	红葡萄酒
P-5	粉末状	20 mg/L	2010	红葡萄酒
P-6	粉末状	20 mg/L	2010	红葡萄酒
P-7	粉末状	5~10 mg/L	2010	白葡萄酒
P-8	粉末状	30~50 mg/L	2010	红葡萄酒

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 聚半乳糖醛酸酶(PG)活力测定

参照张飞<sup>[7]</sup>等的检测方法,将商业用酶制剂用蒸馏水稀释至1 mg/mL,然后取1 mL加入到5 mL果胶溶液(10 g/L,pH5.0)和4 mL磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH5.0)的混合底物溶液中,于50℃水浴中反应30 min,空白样品在反应前加入等量酶液并煮沸5 min。反应结束后,立即用DNS法测定生成的还原糖含量。在上述反应条件下,规定1 h分解果胶产生1 mg半乳糖醛酸所需的酶量为1个酶活单位。

#### 1.2.2 果胶裂解酶(PL)活力测定

参照文献<sup>[8]</sup>,将商业酶制剂用蒸馏水稀释至10 mg/mL,然后取0.5 mL酶溶液加入到2 mL果胶溶液(0.5%,pH3.5)中,空白样品在加入等量酶液后立即煮沸5 min灭活,后于40℃保温10 min进行反应。反应结束后,取上述反应混合物0.5 mL加入到4.5 mL,0.01 mol/L HCl溶液中,充分混合后终止反应。最后在235 nm处测定吸光值,同时作平行样品测定。酶活定义:在pH3.5和25℃下,每1 min释放1 μmol不饱和半乳糖醛酸所需的酶量为1个酶活单位。

#### 1.2.3 果胶甲酯酶(PME)活力测定

参照文献<sup>[9]</sup>,将商业酶制剂用蒸馏水稀释至1 mg/mL,然后取1 mL加入到5 mL果胶溶液(10 g/L,pH3.5)和4 mL柠檬酸-柠檬酸钠(pH3.5)的混合底物溶液中,于45℃水浴中反应1 h,空白样品在反应前加入等量酶液并煮沸5 min。反应结束后,加热煮沸5 min终止酶反应,冷却后取5 mL反应液置于碘量瓶中,用0.05 mol/L氢氧化钠标准溶液滴定至粉红色,记录空白和样品消耗NaOH标准溶液的体积。酶活力单位为在45℃、pH3.5的条件下,每1 min释放1 μmol羧酸所需的酶量。

#### 1.2.4 纤维素酶活力测定

采用DNS法,具体参照标准NY/T912—2004<sup>[9]</sup>。将

商业用酶制剂用蒸馏水稀释至1 mg/mL,然后取2 mL加入到5 mL DNS试剂和2 mL 8.0 g/L羧甲基纤维素钠(溶解于pH5.5的乙酸-乙酸钠缓冲溶液)的混合底物溶液中,于37℃水浴中反应30 min。反应结束后,加热煮沸5 min终止酶反应,冷却后加水定容至25 mL。以标准空白样为空白参照,在540 nm处测定吸光度 $A_{B_0}$ 。

#### 1.2.5 内切-1-4-β-D-木聚糖酶活力测定

采用DNS法,具体参照标准GB/T23874—2009<sup>[10]</sup>。将商业用酶制剂用蒸馏水稀释至10 mg/mL,然后取2 mL加入到5 mL DNS试剂和2 mL木聚糖(10 g/L)的混合底物溶液中,于37℃水浴中反应30 min。反应结束后加热煮沸5 min终止酶反应,冷却后加水定容至25 mL。以标准空白样为空白参照,在540 nm处测定吸光度 $A_{B_0}$ 。酶活单位为标准条件下,每1 s生成1 nmol木糖所需的酶量。

#### 1.2.6 β-D-葡萄糖苷酶活力测定

以对硝基甲苯-β-D-吡喃葡萄糖苷为底物,具体参照文献<sup>[6]</sup>。将商业用酶制剂用蒸馏水稀释至10 mg/mL,然后取0.1 mL加入到2 mL 5 mmol/L对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷溶液中(溶解于pH4.2乙酸-乙酸钠缓冲液),于50℃下反应30 min,空白样品在反应前加入等量酶液并煮沸5 min。反应结束后加入4 mL碳酸钠溶液(1 mol/L)终止反应,并测定在400 nm下的OD值。酶活力定义:每1 min水解1 μmol对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷所需的酶量为1个酶活单位。

## 2 结果与分析

### 2.1 聚半乳糖醛酸酶(PG)

PG是一种水解酶,作用于果胶酸并水解聚半乳糖醛酸中的半乳糖醛酸残基间的α-(1→4)糖苷键<sup>[11]</sup>。图1为8种商业果胶酶中聚半乳糖醛酸酶活性测定结果。

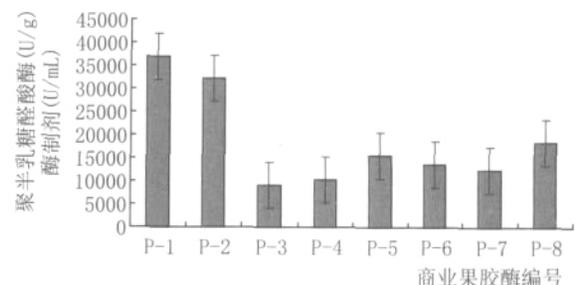


图1 8种商业果胶酶中聚半乳糖醛酸酶活性测定结果

从图1可看出,8种商业果胶酶中PG酶活性相比较,两种液体果胶酶P-1和P-2中PG酶活性较高,分别为36838 U/mL和32196 U/mL,明显高于固体果胶酶,具有较强的澄清果汁能力。6种固体果胶酶中,P-8的PG酶活性最高为18363 U/g,为P-3的2倍多,其次是P-5(15383 U/g),而P-3和P-4最低,仅为9068 U/g和

10298 U/g。

## 2.2 果胶甲酯酶(PME)

PME 也属水解酶类,其作用是水解果胶分子聚半乳糖醛酸聚糖中甲酯化的羧基,使其甲酯化的糖醛酸残基生成聚半乳糖醛酸和甲醇,可加速 PG 降解果胶速度<sup>[12]</sup>。图 2 为 8 种商业果胶酶中果胶甲酯酶活性测定结果。

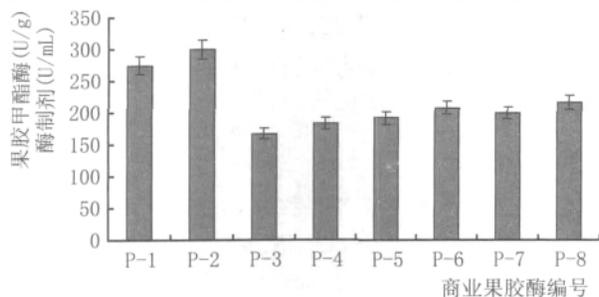


图 2 8 种商业果胶酶中果胶甲酯酶活性测定结果

由图 2 看出,8 种商业果胶酶中果胶甲酯酶活性相比较,同样发现:两种液体果胶酶 P-1 和 P-2 中果胶甲酯酶活性较高,分别为 275 U/mL 和 300 U/mL。6 种固体果胶酶相比较,P-8 的果胶甲酯酶活性最高为 217 U/g,其次是 P-6(208 U/g);而 P-3 和 P-4 最低,仅为 167 U/g 和 183 U/g。可推测出,两种液体果胶酶 P-1 和 P-2 具有较强的澄清果汁能力,其次是 P-8,而澄清能力较低的为 P-3 和 P-4。

## 2.3 果胶裂解酶(PL)

PL 作用于去酯化的多聚半乳糖醛酸第 5 位的  $\beta$ -碳原子,使  $\beta$ -碳原子上的 H 转移到糖苷键的氧原子上,在半乳糖醛酸的 C-4 和 C-5 之间形成双键,从而导致  $\alpha$ -1,4 糖苷键断裂<sup>[5]</sup>。图 3 为 8 种商业果胶酶中果胶裂解酶活性测定结果。

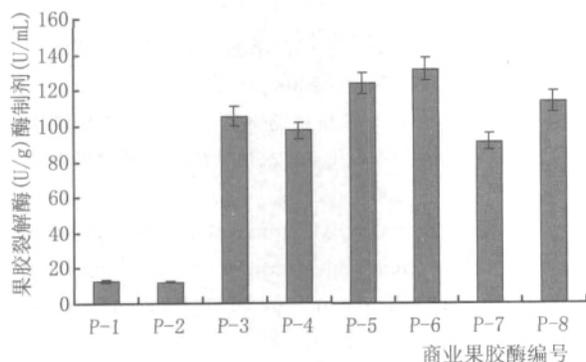


图 3 8 种商业果胶酶中果胶裂解酶活性测定结果

从图 3 可看出,8 种商业果胶酶中 PL 酶活性相比较,结果显示:两种液体果胶酶 P-1 和 P-2 中果胶裂解酶活性极低,分别为 12.7 U/mL 酶制剂和 12.2 U/mL 酶制剂,要明显低于粉末状固体果胶酶。6 种固体果胶酶相比较,P-6 和 P-5 中果胶裂解酶活性较高分别为 171 U/g

和 133 U/g,是两种液体果胶酶的 10 倍多;而 P-7 较低,为 90.9 U/g。

## 2.4 纤维素酶

纤维素酶的主要功能是降解纤维素和裂解植物及其果细胞壁,主要用于红葡萄汁的浸提和色泽的稳定<sup>[13]</sup>。图 4 为 8 种商业果胶酶中纤维素酶活性测定结果。

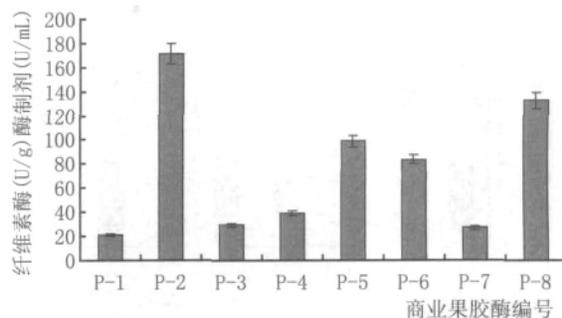


图 4 8 种商业果胶酶中纤维素酶活性测定结果

从图 4 可看出,8 种商业果胶酶中纤维素酶活性相比较,结果显示:用于白葡萄酒酿造的两种果胶酶 P-1 和 P-7 中纤维素酶活性最低,分别为 21.6 U/mL 和 27.1 U/mL,可减少葡萄皮中酚类物质的提取。6 种干红葡萄酒酿造用果胶酶相比较,P-2 和 P-8 中纤维素酶活性较高,为 171.6 U/g 和 123.5 U/g,具有较强的酚类物质浸提能力,而 P-3 和 P-4 中较低,仅为 29.3 U/g 和 39.3 U/g。

## 2.5 内切-1-4- $\beta$ -D-木聚糖酶

木聚糖酶是一种重要的半纤维素酶,能将木聚糖降解成寡糖和单糖,裂解植物细胞壁,有效降解可溶性果胶及不溶性果胶,使果实细胞释放出更多内含物<sup>[13]</sup>。8 种商业果胶酶中内切-1-4- $\beta$ -D-木聚糖酶活性测定结果见图 5。

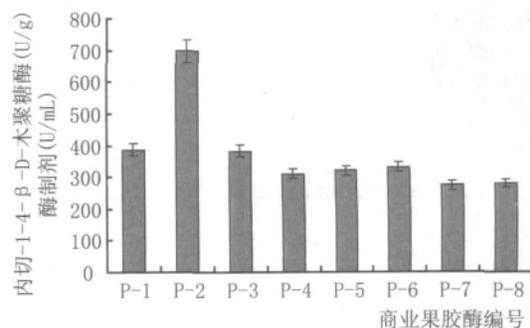


图 5 8 种商业果胶酶中内切-1-4- $\beta$ -D-木聚糖酶活性测定结果

从图 5 可看出,8 种商业果胶酶中内切-1-4- $\beta$ -D-木聚糖酶活性相比较,结果显示:P-2 中内切-1-4- $\beta$ -D-木聚糖酶活性较高,为 697 U/g,其次是 P-1 和 P-3,分别为 386 U/g 和 381 U/g;而 P-7 和 P-8 中相对较低,仅为 280 U/g 和 274 U/g。

## 2.6 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶

酿酒葡萄中的萜烯类等化合物主要以无气味的糖苷前体物形式存在。在酒的酿造及陈酿过程中,葡萄果实中积累的大量糖苷结合态香气化合物通过酶或酸的作用裂解糖苷键可以产生游离态的芳香成分,从而增强或改善葡萄酒的风味<sup>[14]</sup>。图6为8种商业果胶酶中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性测定结果。

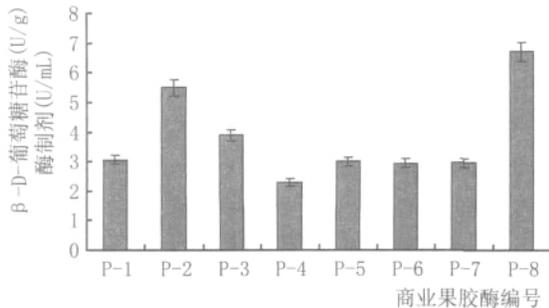


图6 8种商业果胶酶中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性测定结果

从图6可知,8种商业果胶酶中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性相比较,结果显示:8种酶制剂中糖苷酶活性均较低,其中,P-8和P-2中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性较高,为6.67 U/g和5.49 U/g,而P-4中最低,仅为2.28 U/g。

### 2.7 各类酶综合技术效果评价

表2归纳了不同功能酶对于酿酒不同技术工艺的影响(参照Guerin等<sup>[6]</sup>),可看出PG、PME、PL3种酶对葡萄酒沉淀、澄清、压榨、提取颜色工艺具有作用;纤维素酶和木聚糖酶主要对葡萄酒压榨和提取颜色工艺具有作用; $\beta$ -D-葡萄糖苷酶主要对葡萄酒压榨、提取颜色、释放香气物质工艺具有作用。

表2 各种功能酶潜在技术效果

功能酶种类	沉淀	澄清	压榨	提取颜色	释放香气	过滤
聚半乳糖醛酸酶(PG)	*	*	*	*		*
果胶甲酯酶(PME)	*	*	*	*		*
果胶裂解酶(PL)	*	*	*	*		*
纤维素酶			*	*		
木聚糖酶			*	*		
$\beta$ -D-葡萄糖苷酶			*	*	*	

注: \*表示有作用。

PG、PME、PL酶检测结果表明,相同用量情况下,果胶酶P-1和P-2中PG和PME酶活性较强,而PL酶活性极低,具有较好澄清果汁能力;果胶酶P-5、P-6和P-8中3种酶含量均较高,对葡萄酒澄清、提高浸出汁等均有较好效果(见表2);而果胶酶P-3和P-4中3种酶含量相对较低。

纤维素酶和半纤维素酶的酶活显著低于果胶酶的活性,这些酶是辅助果胶酶的,它们的主要作用在于降解纤维素和半纤维素。相同用量情况下,果胶酶P-2中纤维素酶和木聚糖酶活性均最高,可推测出其对葡萄酒压榨

和提取颜色具有良好的效果(见表2)。果胶酶P-8和P-2中 $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性较高,对葡萄酒的品种香气水解释放具有一定的效果。

### 3 结论

本实验首次对商业酶制剂中主要功能酶活性进行研究,因此,还不能确定这些酶活研究能否与生产商所给出的技术性能相吻合。鉴于此,今后将会对研究中所涉及的部分酶制剂进行进一步研究,以确定它们与生产商给出的技术性能之间的相关性。

### 参考文献:

- [1] 俞惠明,蔡建林,刘宗芳,等.果胶酶在葡萄酒酿造中的作用及其实际应用[J].中外葡萄与葡萄酒,2010(7):65-68.
- [2] Rogerson F S S, Vale E, Grande H J, et al. Alternative processing of port-wine using pectolytic enzymes [J]. Cienciay Tecnologia Alimentaria, 2000, 2(5):222-227.
- [3] Guerrand D, Gervais J P. Extraction of red wine phenolics during fermentation:a new pectinase preparation[J]. The Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker, 2002(11):60-64.
- [4] Ducasse M-A, Canal-Llauberes R-M, de Lumley M, et al. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines [J]. Food Chemistry, 2010, 118(2):369-376.
- [5] 薛长湖,张永勤,李兆杰,李志军.果胶及果胶酶研究进展[J].食品与生物技术学报,2005,24(6):94-99.
- [6] Guerin L, Sutter D H, Demois A, et al. Determination of activity profiles of the main commercial enzyme preparations used in winemaking[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2009, 60:322-331.
- [7] 张飞,岳田利,费坚,等.果胶酶活力的测定方法研究[J].西北农业学报,2004,13(4):134-137.
- [8] 李鸿玉,李祖明.果胶酶及其应用[M].北京:知识产权出版社,2010:153.
- [9] 中华人民共和国农业部.饲料添加剂-纤维素酶活力的测定分光光度法 NY/T 912-2004 [S]. 2005.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.饲料添加剂木聚糖酶活力的测定分光光度法 GB/T 23874-2009[S].2009.
- [11] Carptian C, Gibeaut D M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth[J]. The Plant Journal, 1993, 3(1):1-30.
- [12] Marin-Rodriguez M C, Orchard J, Seymour G B. Pectatylases, cell wall degradation and fruit softening [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(377):2115-2119.
- [13] 俞中.新型果浆酶[J].食品工业科技,2000,21(6):56-57.
- [14] Palomo S E, Hidalgo m C, Gonzá lez V, et al. Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases [J]. Food Chemistry, 2005, 92(4):627-635.