

白葡萄酒蛋白质稳定的新展望——酶解法

王 华¹, 丁刚¹, 范英华²

(1. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 威龙葡萄酒有限公司, 山东 龙口 265701)

摘要: 白葡萄酒易出现蛋白质沉淀, 而传统除去蛋白质的方法无非是在葡萄酒中加入明胶或膨润土将葡萄酒中的蛋白质除掉。当然这是保持了葡萄酒的稳定性, 但另一方面将葡萄酒中稳定性蛋白质也除掉了, 这就降低了葡萄酒的营养价值。使用蛋白质酶解法可将葡萄酒中蛋白质水解成小肽, 这样既可使得葡萄酒具有很好的稳定性, 又可以提高葡萄酒的营养价值。

关键词: 葡萄酒; 蛋白质; 蛋白质水解酶

中图分类号: TS262.6 TQ920.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2002)02-0069-03

New Prospect of Protein Stability in White Wine ——Proteolysis

WANG Hua¹, DING Gang¹ and FAN Ying-hua²

(1. College of Enology North-West Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shanxi 712100;

2. Grand Dragon Wine Co. Ltd., Longkou, Shandong 265701, China)

Abstract: Protein tends to precipitate in white wine. The traditional ways to remove protein are to add gelatin or bentonite to white wine. In one way the wine is stable, but in other way it also removes the stable protein in wine. So this way lowers the quality of wine. Using proteolysis can hydrolyzes protein in to small peptides, which can make the wine stable and at the same time can improve the nutritive value.

Key words: wine; protein; proteolytic enzyme

白葡萄酒是用白葡萄汁经过酒精发酵后获得的酒精饮料产品。在发酵过程中, 不存在葡萄汁对葡萄固体部分的浸渍现象。由于白葡萄酒果香浓郁, 颜色宜人, 口感爽快, 深受广大消费者的喜爱。但白葡萄酒存在着潜在的蛋白质不稳定性。葡萄酒中的蛋白质主要是葡萄细胞及酵母裂解和自溶产生的多肽。葡萄酒中蛋白质的等电点在 2.5~ 8.7 之间, 平均分子量为 20000~ 40000 道尔顿^[1]。幼年的白葡萄酒在贮藏过程中, 常常会形成雾状絮凝, 尔后变为沉淀, 加热或加单宁会加重这种沉淀, 这就是蛋白质产生的破败病。葡萄酒中并不是所有的蛋白质都不稳定, 它分为稳定蛋白质和不稳定蛋白质, 只有不稳定的蛋白质才产生沉淀。现在葡萄酒厂防治蛋白质破败病的方法主要是加膨润土, 最大限度的除掉酒中的蛋白质。当然葡萄酒是稳定了, 但是酒的质量有所降低, 同时酒中一些有营养价值的蛋白质也被除掉了。而国外正在试用酶解法来分解酒中的蛋白质, 提高酒稳定性的同时, 也提高了白葡萄酒的营养价值^[1~4]。

1 白葡萄酒中蛋白质胶体的性质

葡萄酒可以看成是蛋白质的一种分散系统。在这种分散系统中, 蛋白质分子颗粒是分散相 (disperse phase), 酒溶液是分散介质。就其分散程度来说, 蛋白质溶液属于胶体系统 (Colloidal system)。但是, 它的分散相质点是分子, 它是由蛋白质水溶剂(酒液)所构成的均相系统^[5]。

分散相质点在胶体系统中保持稳定需要具备 3 个条件。

1.1 分散相的质点大小在 1~ 100 nm 范围内, 这样大小的质点在动力学上是稳定的, 介质分子对这种质点碰撞的合力不等于

零, 使它能在介质中做不断的布朗运动 (Brown movement)^[5~7]。

1.2 分散相的质点带有同种电荷, 互相排斥, 不易聚集成大颗粒而沉淀^[5~7]。

1.3 分散相的质点能与溶剂形成溶剂化层, 例如与水形成水化层 (hydration mantle), 质点有了水化层, 互相间不易靠拢而聚集^[5~7]。

2 葡萄酒中蛋白质不稳定的原因

在葡萄酒发酵或贮藏过程中, 由于破坏了蛋白质在葡萄酒中的胶体性质, 故经常产生蛋白质的不稳定。究其原因主要有以下几点。

2.1 蛋白质易变性, 故在剧冷或剧热的条件下蛋白质可能变性而产生沉淀。同时, 蛋白质的溶解度也受有机溶剂的影响。葡萄酒中的酒精含量较高, 而酒精属于有机溶剂, 也能使蛋白质缓慢变性, 从而使其溶解度下降, 这样蛋白质便沉淀出来^[6,8~9]。

2.2 由于葡萄酒中含有少量的单宁, 此外, 橡木塞中也含有少量的单宁, 当葡萄酒中的蛋白质与单宁接触时, 蛋白质就会与单宁发生化学反应, 形成难溶物质而沉淀出来^[6,8~9]。

2.3 葡萄酒中还有许多带负电荷的胶体物质, 如磷酸铁或硫化铜, 而蛋白质胶体带正电荷, 故前者能破坏蛋白质的水化层, 而使蛋白质不稳定, 二者相互结合而沉淀出来^[6,8~9]。

3 防治葡萄酒蛋白质破败病的传统方法

3.1 葡萄醪主发酵结束后立即倒罐, 以缩短酒液与酒脚接触的时间, 避免酵母自溶后过多的蛋白质进入葡萄酒中^[5~8]。

收稿日期: 2002-01-04

作者简介: 王华(1959-), 女, 农学硕士, 在职博士研究生, 教授, 硕士研究生导师, 获国家级教学成果二等奖、陕西省政府高等教学成果特等奖、陕西教委音像教材三等奖, 西北农林大学教学成果二等奖。主持课题多项, 获省科技进步二等奖, 发表学术论文 20 余篇。

3.2 在葡萄酒中加入明胶或膨润土, 除去酒中多余的蛋白质, 使葡萄酒澄清稳定^[5-8]。

以上的传统方法最大的弊端是虽然稳定了葡萄酒, 但是降低了葡萄酒的口感质量, 同时也把葡萄酒中稳定的蛋白质除掉了, 降低了葡萄酒的营养质量。

4 新型酶法防治蛋白质的破败病

能水解蛋白质的酶称为蛋白质水解酶。因为蛋白质是由氨基酸通过肽键连接起来的一种多肽大分子, 因此, 可以找出一种或几种非专一酶切位点的酶对葡萄酒中的蛋白质进行酶切, 将酒中的蛋白质分子切成小的肽段或是氨基酸, 这样既可以防治酒中蛋白质的不稳定性, 同时又可以增加酒中多肽或氨基酸的含量, 提高酒的营养价值^[1-3,8]。

4.1 蛋白质混合物的分离方法

这里将介绍几种蛋白质在溶液中的下列性质分离混合物的方法: (1) 分子的大小; (2) 溶解度; (3) 电荷; (4) 吸附性质; (5) 对其他分子的生物亲和力等^[1,8-10]。

4.1.1 根据分子大小不同的分离方法

蛋白质分子最明显的特征之一就是颗粒大, 并且不同类的蛋白质在分子大小方面有着一定的差别, 因此, 可以利用一些简便的方法使蛋白质和其他小分子的物质分开, 并使蛋白质混合物得以分离。

4.1.2 透析和分离

透析 (dialysis) 和超滤 (ultrafiltration) 就是利用蛋白质分子不能透过半透膜的性质, 使蛋白质和其他分子物质如无机盐、单糖、水等分开。

4.1.3 密度梯度离心

蛋白质颗粒的沉降不仅决定于它的大小, 而且也取决于它的密度。如果蛋白质颗粒在具有密度梯度 (density gradient) 的介质中时, 质量和密度大的颗粒比质量和密度小的颗粒沉降得快, 并且蛋白质颗粒沉降到与自身密度相等的介质梯度时, 即停止不前, 最后各种蛋白质在离心管 (常用塑料) 中分离成各自独立的区带 (zone)。分成区带的蛋白质可以在管底刺一个小孔逐滴放出, 分步收集, 每个组分进行小样分析以确定区带位置。

4.1.4 凝胶过滤

即凝胶过滤层析 (gel filtration chromatography), 也称分子排阻层析 (molecular-exclusion chromatography), 分子筛层析 (molecular-sieve chromatography) 或凝胶渗透层析 (gel permeation chromatography)。这是根据分子分离蛋白质混合物最有效的方法之一。

4.2 溶解度差别的分离方法

利用蛋白质的溶解度的差别来分离各种蛋白质是实践中最常用的方法。影响蛋白质溶解度的外界因素很多, 其中主要有: (1) 溶液的 pH, (2) 离子强度, (3) 介电常数, (4) 温度。但在同一的特定的外界条件下, 不同蛋白质具有不同的溶解度, 这是因为溶解度取决于它们本身的分子结构^[1,9-10]。

4.2.1 等电点沉淀和 pH 值控制

蛋白质是带有正电荷和负电荷基团的两性电解质, 带电基团的电荷数量则因 pH 值不同而变化。当蛋白质趋于等电点 pH 值时, 蛋白质的静电荷为零, 由于相邻蛋白质分子将没有静电斥力而趋于结聚而沉淀, 因此它的溶解度达到最低点, 借此来分离出蛋白质。

4.2.2 蛋白质的盐溶与盐析

低浓度时, 中性盐可以增加蛋白质的溶解度, 这种现象称为盐溶 (salting in)。当溶液中的离子强度增加到一定的数值时, 蛋白质的溶解度开始下降, 很多蛋白质可以从溶液中沉淀出来, 这种现象称之为盐析。盐析法是蛋白质制品的分离和纯化过程中最常用的方法。

4.2.3 有机溶剂分级法

与水相溶的有机溶剂 (如甲醇、乙醇和丙醇等) 能使蛋白质在水中的溶解度显著下降。它引起蛋白质沉淀的主要原因之一是改变介质的介电常数 (dielectric constant), 从而使蛋白质沉淀出来。

4.3 根据电荷不同的分离方法

根据蛋白质的电荷不同即酸碱性质不同, 分离蛋白质混合物的方法有电泳和离子交换层析两类^[1,9-10]。

4.3.1 电泳: 在外加电场的作用下, 带电颗粒, 例如不处于等电状态的蛋白质分子, 将向与其电性相反的电极移动, 从而将带电荷不一样的蛋白质分离开来, 这种分离蛋白质的方法就是电泳分离法。

4.3.2 离子交换法: 这种方法是通过离子交换树脂的吸附与解析将不同电荷的蛋白质分离开来。

4.4 蛋白质的选择吸附分离

某些物质, 例如极性的硅胶和氧化铝以及非极性的活性炭的粉末具有吸附能力, 能够将其他种类的分子吸附在其粉末颗粒的表面, 而吸附力的强弱又因被吸附的物质性质不同而异。因此可以根据蛋白质的吸附性质不一样将蛋白质分离开来^[1,8-10]。

4.5 根据对配基的生物学特异性的分离方法——亲和层析

亲和层析是分离蛋白质的一种极为有效的方法。它是基于某种蛋白质所具有的生物学特异性, 即它与另一种称之为配基的分子能特异非共价地结合, 只需一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来, 且纯度很高^[1,9-10]。

5 测定蛋白质的氨基酸序列

测定蛋白质的一级结构, 要求样品必须是均一的 (homogeneous), 纯度应在 97% 以上, 同时必须知道分子量。测定蛋白质中氨基酸序列的一般步骤如下^[9-10]。

5.1 测定蛋白质分子中多肽链的数目。根据蛋白质末端残基 (氨基酸残基或羧基残基) 的摩尔数和蛋白质的分子量可以确定蛋白质分子中的多肽链的数目。

5.2 拆分蛋白质分子的多肽链。如果蛋白质分子是由几条不同的多肽链构成的, 则必须把这些多肽链拆开并单独分离出来, 然后测定每条多肽链的氨基酸序列。

5.3 测定多肽链的氨基酸组成。经分离提纯的多肽链一部分样品进行完全水解, 测定它的氨基酸组成, 并计算出氨基酸成分分子比。

5.4 分析多肽链的 N 末端和 C 末端残基。多肽链的另一部分样品进行 N 末端和 C 末端残基的鉴定, 以便建立两个重要的氨基酸顺序参考点。

5.5 断裂多肽链内的二硫键。这可以用甲酸氧化或用巯基化合物还原实现。

5.6 多肽链断裂成肽。用两种或几种不同的断裂方法 (指断裂点不一样), 将多肽链样品降解成两套或几套肽段或称肽碎片, 并将这样肽段分离开来。

5.7 测定各个肽段的氨基酸顺序。目前最常用的是 Edman 降解

法,此法还有酶解法、气相色谱-质谱联用法等。

5.8 确定肽段在多肽链中的次序。利用两套或几套肽段的氨基酸顺序彼此间有交错重叠,可拼凑出整条多肽链的氨基酸顺序。

5.9 确定原多肽链中二硫键的位置。

6 选择适当的酶,酶解所提出的蛋白质

这一步是关键,根据所测的蛋白质的氨基酸顺序找出适当的酶进行酶切,将大分子的蛋白质切成小分子的多肽,从而使得葡萄酒的蛋白质稳定,同时提高葡萄酒的质量。目前最常用的蛋白质水解酶主要有以下几种。

6.1 胰蛋白酶(trypsin):这是最常用的蛋白质水解酶,专一性强,只断裂赖氨酸或精氨酸的羧基形成的肽键^[1,8-10]。

6.2 糜蛋白酶(chymotrypsin):此酶的专一性不如胰蛋白酶。它与断裂苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸等疏水性氨基酸的羧基参与有关。断裂键邻近的基团是碱性的,裂解能力增加;是酸性的裂解能力将减弱^[1,8-10]。

6.3 嗜热菌蛋白酶(thermolysin):是一个含金属锌和钙的蛋白酶。Zn是酶活力必需的,Ca与酶的热稳定性有关。此酶的作用专一性较差,常用于断裂短的多肽链或大肽段^[1,8-10]。

6.4 胃蛋白酶(pepsin):它专一性与糜蛋白酶类似,但它要求被断裂键的两侧的残基都是疏水性的氨基酸,如苯丙氨酸-苯丙氨酸。此外与糜蛋白酶不同的是酶作用的最适pH值,前者是pH 2,而后者是pH 8~9。此外还有其他的一些酶^[1,8-10]。

根据Elizabeth等人研究报道,葡萄酒中的热不稳定性蛋白质对蛋白质水解酶具有抵抗作用。一般的热不稳定性蛋白质的平均分子量是32000和24000,这些蛋白质具有抵抗水解酶的原因是因为它们是球状蛋白质,蛋白质的水解酶切点比较少,故不易被蛋白酶水解掉^[1-3]。但是应用适当的方法使蛋白质变性,从而改变蛋白质的空间结构,暴露出较多空间酶切位点,将蛋白质水解成小肽。这样既防止葡萄酒的蛋白质不稳定性,同时又提高了葡萄酒中氨基酸的含量,增强了葡萄酒的营养价值。在这一方面,国内外的研究报道都较少,故在研究和应用方面都有很大的前途

[1-4,8]。

7 小结

白葡萄酒具有蛋白质的稳定性这是众所周知的,而除去葡萄酒中蛋白质的传统方法主要是在葡萄酒中加入膨润土或明胶将稳定和不稳定的蛋白质除掉,这样虽然提高了葡萄酒的稳定性,但同时将葡萄酒中稳定性的蛋白质也除掉了。而蛋白质酶解法则具有上述两种优点,即可以水解蛋白质,将其切成小肽,提高葡萄酒的稳定性,同时又可以提高葡萄酒中的氨基酸的含量,增强葡萄酒的营养价值。

参考文献:

[1] Elizabeth J. Waters, William Wallace, and Patrick J. Williams. Identification of Heat-Unstable Wine Protein and Their Ruidance to Peptidases[J]. J. Agric. Food Chem. 1992, 40, 1514- 1519.

[2] Hsu. J- c. Heatherbell, . DA. Isolation and characterization of souble proteins in grape, grape - juice, and wine[J]. Am. H. Enol. Vitic, 1987, 38, 6- 10.

[3] Modra, E. J.; Williams, P. J. Are proteases active in wines and juices?[J]. Aust Grapegrower Winemaker, 1988, 292, 42- 46.

[4] Waters, E. C., Wallace. W., Williams, P. J. Heat haze characteristics of fractionated wine protein[J]. Am. J. Enol. Vitic. 1991, 42, 123- 127.

[5] 李记明,袁春龙.葡萄酒化学[C].葡萄酒学院内部资料.1996, 193- 194.

[6] 李华.葡萄酒工艺学[M].西安:陕西人民出版社,2000.

[7] 李华.葡萄酒酿造与质量控制[M].杨凌:天则出版社,1992.

[8] Roger B. BOULTON Vernon L. Singleton Linda F. Bisson Ralph E. Kunkee. Principles and Practices of Winemaking[J]. New York: CHAPMAN& HAIL. 1995, 339- 343.

[9] 沈同,王镜岩.生物化学[M].北京:高等教育出版社,1990. 210- 220.

[10] 陈毓荃.生化研究技术[M].北京:中国农业出版社,1993. 20- 41.

酿酒科技杂志社邮购书刊

书刊名	邮购价
《酿酒科技精选(1980~1985)》	20元/册
《酿酒科技》1998年合订本	58元/册
《酿酒科技》1999年合订本	60元/册
《酿酒科技》2000年合订本	65元/册
《酿酒科技》2001年	65元/年
《酒眼观潮》—酒界营销参考书	40元/册
《酿酒活性干酵母的生产与应用技术》	12元/册
《世界蒸馏酒的风味》	6元/册
《中国酒曲》	35元/册

需订阅以上书刊者,请直接汇款到本刊社邮购。地址:贵阳市沙冲中路58号(550002);电话:(0851)5796163;传真(0851)5776394

《酿酒科技》征订启事

2002年报刊订阅工作已经结束,因错过订阅时间,漏订本刊的读者,可直接汇款到本刊订阅,全年邮购价65元(含邮费)。2001年《酿酒科技》精装合订本已开始发行,订价70元/册(含邮费),凡需订阅者,请直接汇款到酿酒科技杂志社订阅。联系人:吴萍,请注明种类和年份。

近来,因邮局开展电子汇兑业务,我们收到部分汇单,无省市县地址,无法投递书刊,望汇款后未收到书刊的读者及时与本刊联系。请读者今后在办理电子汇兑业务时务请监督经办人将项目打印齐全。

酿酒科技杂志社发行部