

酶在葡萄酒生产中的应用

刘富兵, 刘延琳*

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西省葡萄-葡萄酒工程中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 酶作为高效生物催化剂广泛用于葡萄酒酿造的各个工艺环节中, 包括果汁澄清、浸渍、葡萄酒过滤、尿素脱除等。酶的使用不仅增加了葡萄酒理化性质的稳定性, 而且大大改善了葡萄酒的香气和色泽, 提高了葡萄酒的质量。国际葡萄和葡萄酒组织(OIV)规定了在酿酒过程中可以使用以下4种不同来源的酶制剂: 来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)的果胶酶(pectinase); 来自木霉菌(*Trichoderma harzianum*)的 β -葡聚糖酶(β -glucanase); 来自发酵乳杆菌(*Laetobacillus fermentum*)的尿素酶(urease); 来自鸡蛋清的溶菌酶(lysozyme)。本文简要介绍了果胶酶、葡萄糖苷酶、葡聚糖酶、溶菌酶和尿素酶等的基本特性, 讨论了它们在葡萄酒生产中的运用及其对葡萄酒质量的影响。

关键词: 葡萄酒; 果胶酶; β -葡聚糖酶; β -葡萄糖苷酶; 溶菌酶; 尿素酶

Application of Enzymes in Wine Production

LIU Fu-bing, LIU Yan-lin*

(Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: As efficient biocatalysts, enzymes are widely used in the winemaking process, including juice clarification, extraction, filtration, urea removal and so on. The application of enzymes can not only increase the stability of wine physicochemical properties, but also improve the aroma and color of wine. International Vine and Wine Organization (OIV) provides four enzymes which can be used in the winemaking process from four kinds of sources: pectinase from *Aspergillus niger*; β -glucanase from *Trichoderma*; urease from *Lactobacillus fermentum* and lysozyme from egg white. This article has briefly described basic characteristics of pectinase, glucosidase, glucanase, lysozyme and urea enzymes, as well as their application wine production and impact on wine quality.

Key words: wine; pectinase; β -glucanase; β -glucosidase; lysozyme; urea enzyme

中图分类号: Q814.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)09-0392-07

doi:10.7506/spkx1002-6630-201309075

酶在葡萄酒酿造中发挥着重要的作用。酶的使用不仅可以提高葡萄酒的澄清效果、促进葡萄皮中色素物质的释放, 提高浸渍效果而且有利于葡萄酒稳定性的提高, 最终实现生产高质量葡萄酒的目的。商业酶制剂作为高效生物催化剂广泛用于葡萄酒酿造的各个工艺环节中, 如澄清、过滤、浸渍、生物稳定性处理等。这些酶制剂的使用在提高葡萄酒的营养保健价值方面效果也十分显著。

1 果胶酶

果胶是细胞壁的主要构成部分, 是一种链状的大分子物质, 存在于所有的果实中, 影响果汁的压榨与澄清效果。果胶酶是一种复合酶, 能分解葡萄原料中的果

胶。传统果胶酶是由单一的纤维素和半纤维素酶构成, 主要用来澄清葡萄汁, 而专业的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)、果胶甲基酯酶(pectin methylesterase)等多种酶复合而成^[1]。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^[2]。

1.1 果胶酶对果汁浸提和澄清的影响

葡萄酒酿造的浸渍阶段添加果胶酶, 不仅果汁总产量会有很大提高^[3], 而且酒中苯衍生物、乙酸乙酯、醋酸苯乙酯等含量会明显增高^[4], 这些物质可以很好地改善葡萄酒的品质。当果胶酶质量浓度为0.02~0.04g/L, 稳定

收稿日期: 2012-04-27

基金项目: 国家现代农业(葡萄)产业技术体系建设专项(CARS-30-jg-3)

作者简介: 刘富兵(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为葡萄酒微生物。E-mail: lfb1986@126.com

*通信作者: 刘延琳(1966—), 女, 教授, 博士, 研究方向为葡萄酒及酿酒微生物。E-mail: yanlinliu@nwsuaf.edu.cn

处理4~10h, 果汁产量可以提高15%以上^[1]。Armada等^[4]评估了在工业实验中, 室温条件下采用发酵前浸泡, 利用2种商业果胶酶处理3h对葡萄酒酿造工艺参数的影响。统计分析和感官评定显示: 生产的葡萄酒在总的可溶固形物和最终的感官质量方面发生了显著的改变。与对照相比在香气和味觉质量上达到了更高的质量水平。结果同时证明酶添加结合动态浸渍处理使出汁率明显提高。另外添加果胶酶可以降低葡萄汁的黏度, 并导致颗粒状物质聚集, 其中泥沙和颗粒容易通过沉淀去除, 使葡萄汁达到很好的澄清效果。

1.2 果胶酶对多酚物质的影响

葡萄酒中的多酚物质主要是在浸渍阶段和发酵期间从葡萄皮和葡萄籽中浸提获得的。多酚物质具有很强的抗氧化性, 不仅能使血液中的高密度脂蛋白(HDL)升高, 有效降低血胆固醇、防治动脉粥样硬化, 而且还能抑制血小板的凝集, 防止血栓形成^[5]。在赤霞珠和蛇龙珠葡萄原料中加入不同浓度的果胶酶, 会使发酵速率比未加果胶酶的更快, 干浸出物含量和总酚含量增加, 并且降低了酒中挥发酸含量, 提高葡萄酒质量^[6]。Ducasse等^[7]研究果胶酶对2004—2006年份陈酿20个月后的梅鹿辄葡萄酒中多酚和多聚糖物质的影响, 酶处理的酒中含有更多的鼠李聚糖半乳糖醛酸、阿拉伯糖、半乳糖和少量的多聚糖, 酶处理改变了酒中多酚物质的组成, 同时酒的色度增强。

不同成分的果胶酶可以促进果皮中不同酚类物质的释放及其分子的变化。梅鹿辄和赤霞珠在果胶酶处理早期花青素从果皮中释放出来, 但是在进一步的酶处理过程中被降解掉; 黄酮醇从糖基化变为去糖基化, 酚酸包括水杨酸和羟基肉桂酸随着单糖的释放而被释放出来; 在酶催化果皮细胞壁降解的同时, 许多酚酸可能从木质素中释放出来, 在酶催化降解酰化花青素过程中会释放出香豆酸^[8]。所以可以运用多种果胶酶处理分别促使果皮中不同酚类物质的释放及其分子的变化, 进而达到更好的效果。但是浸提酶和澄清酶一般不会同时使用, 因为同时使用可能会抑制糖苷酶促进香气物质的释放^[4]。果胶酶和表面活性肽结合使用对提高葡萄皮色素及多酚物质的浸提效果非常显著, 但是在酿酒实践中还需要做进一步的研究。同时添加果胶酶和表面活性肽也可能成为将来干红酿造浸渍过程中的一种新的方法^[9]。

白藜芦醇是存在于葡萄皮中的一种重要的强抗氧化物质, 它具有很好的保健功能。白藜芦醇二聚体是白藜芦醇被4-羟基芪过氧化物酶氧化所形成的。在某些方面, 白藜芦醇二聚体与白藜芦醇相比具有更强的生物活性, 如抗氧化、抗菌、抗HIV等^[10-11]。在葡萄原料浸渍阶段使用果胶酶, 有利于胞内有益物质溶出, 增加葡萄酒中白藜芦醇的含量。不同的果胶酶和酵母在葡萄酒发

酵中对白藜芦醇含量有不同的影响。王蕾等^[12]采用高效液相色谱直接进样分析, 测定了3种果胶酶处理、4种酵母发酵的葡萄酒中白藜芦醇、 ϵ -白藜芦醇二聚体、 δ -白藜芦醇二聚体等葡萄主要芪化物的含量。结果表明: 7种葡萄酒中都含有较多的白藜芦醇、 ϵ -白藜芦醇二聚体和 δ -白藜芦醇二聚体。不同果胶酶、酵母的选用均能影响到葡萄酒中的白藜芦醇、 ϵ -白藜芦醇二聚体、 δ -白藜芦醇二聚体的浸出效果。Ultrazyme Premium果胶酶酒样中 ϵ -白藜芦醇二聚体含量为2.187mg/L, 而Ex-v酒样中为1.926mg/L, 96酵母酒样中白藜芦醇含量为1.193mg/L, 而CMS酒样仅为0.682mg/L, δ -白藜芦醇二聚体在D254酵母酒样中的含量为2.297mg/L, 而在Oneferm Color酒样中仅为1.850mg/L。Ultrazyme Premium果胶酶和D254、796酵母对果皮中上述芪化物的浸提效果较好。因此在酿造过程中酵母菌株、果胶酶的选择对葡萄酒中的重要有益物质的影响也不应忽视。

1.3 果胶酶对色素物质的影响

不同的酿酒工艺、不同酿酒酵母及果胶酶处理对葡萄色素的浸提作用及引起颜色变化的情况也各不相同。果胶酶对颜色的影响略高于酵母; 不同的酵母可以促进果香及乙醇的生成, 不同的果胶酶对单宁、色素的浸提, 酒液的澄清能力也各不相同。

Vázquez等^[13]研究了6种酿酒方法对葡萄酒的酚类化合物和颜色特性的影响。并且评估了这些方法对酒成熟过程中颜色稳定性的影响。不过这一研究结果更加强调了选择合适的酿酒方法对酿造优质干红葡萄酒重要的重要性。Kelebek等^[14]采用了一种快速的高效液相色谱-二极管阵列检测器检测方法来分析2种果胶酶处理的葡萄酒中花青素的含量, 可检测到的花青素化合物有13种, 与对照相比, 果胶酶处理使葡萄酒含有更高的色泽强度。

不同酵母和果胶酶对原料葡萄色素的浸提作用及引起颜色变化的情况各不相同。王建刚等^[15]研究了蛇龙珠干红葡萄酒酿造过程中颜色的变化规律。在发酵前期红色色调值迅速上升, 颜色在第3天最深; 后期逐渐下降; 黄色色调值逐渐上升; 果胶酶对颜色的影响略高于酵母; Zymaflore F15酵母促进果香的生成; 而Actiflore F33酵母转化乙醇能力较高; Lafase HE果胶酶对单宁、色素的浸提更加有利; 而Optizyme果胶酶有利于酒液的澄清; Zymaflore F15酵母与Lafase HE果胶酶组合, 更适于酿造更显果香、圆润、平衡和醇厚的蛇龙珠干红葡萄酒。另外葡萄酒酿造过程中添加酶和单宁可以促进红酒的成熟, 因为它导致了若干稳定的主要颜色聚合物的形成^[13]。

2 糖苷酶

目前, 国外对葡萄与葡萄酒中风味前体物及其风味

修饰中的关键酶(如 β -D-葡萄糖苷酶)已有很多报道^[16];而国内对 β -D-葡萄糖苷酶的研究起步较晚^[17]。 β -D-葡萄糖苷酶作为葡萄酒香气修饰的关键酶,其来源多样^[18-19]。与萜烯类香气前体物质有密切关系,可以水解糖苷键将香气物质从结合态变成游离态,从而达到增香的目的,已被广泛应用到食品工业领域^[20]。

2.1 糖苷酶对香气物质的影响

许多研究证明利用 β -D-葡萄糖苷酶可不同程度地促进葡萄酒风味前体物释放。如Martino等^[21]利用来源于黑曲霉的经纯化后的 β -D-葡萄糖苷酶制剂来研究其对白葡萄酒香气的影响,结果表明,酶处理后葡萄酒中单萜物质含量(里哪醇、 α -松油醇、香茅醇、橙花醇、香叶醇)是原有含量的2倍,即其香味值(OAVS)可增加2倍,葡萄酒果香更加浓郁。游离态或固定态的酶制剂能够促进葡萄酒中挥发性物质显著增加(约4倍),尤其对于莫斯卡托葡萄酒,其萜醇(里哪醇、香茅醇、橙花醇、香叶醇)含量显著增加^[22]。

Palomo等^[23]以多个葡萄品种(阿依伦、阿尔比约、霞多丽)为试材,使用含 β -D-葡萄糖苷酶制剂水解风味前体物,以GC手段来分析香气变化,得到的香气物质略有增加;主成分分析表明,品种香气特征高于酶处理对其产生的影响;采用广义最小二乘法来分析感官品尝结果,发现酶处理后的葡萄酒与对照相比,具有较浓郁的花香、果香。

祝霞等^[24]采用顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用技术(HS/SPME-GC/MS),分析了 β -D-葡萄糖苷酶处理对贵人香干白葡萄酒香气物质的影响。检索定性出未加酶贵人香干白葡萄酒香气物质组分有55种,加酶处理的贵人香干白葡萄酒香气物质组分68种,主要包括醇类、萜类、酯类、醛类、酮类及酸类化合物。经过AR2000 β -D-葡萄糖苷酶处理后的葡萄酒中,新增了律草烯、乙酸叶醇酯、罗勒烯、金合欢烯、月桂烯醇、二氢月桂烯、紫苏醇、甜橙醛共8种萜类化合物。感官评价结果显示,糖苷酶处理对贵人香干白葡萄酒的香气品质具有良好的修饰作用。González-Pombo等^[25]从陆生伊萨(*Issatchenkia terricola*)胞外提取纯化的 β -葡萄糖苷酶在100g/L葡萄糖、18%酒精、60mg/L偏亚硫酸氢盐环境中表现出了很积极的活性,而且在pH值大于3.0的酸性条件下活性依然相对比较稳定。将其固定于环氧琼脂糖凝胶(epoxy-activated Eupergit C)中大大改善了它的稳定性,通过GC-MS分析葡萄酒的香气,结果显示酶处理显著增加了单萜类化合物的数量,表现出固定化酶在葡萄酒香气形成中的运用潜能。

Kang Wenhui等^[26]第一次建立一种方法——HS-SPME(顶空固相微萃取)和GC-MS(气相色谱-质谱联用)联用来描述葡萄中自由态的和结合态的挥发性化合物。通过比较

高浓度的葡萄汁自由的和结合态的香气物质,显示不挥发的配糖体被认为是形成香气的前提物质。通过建立标准校正曲线,在所有被鉴定的化合物中有11种被完全定量,其他的被半定量。在麝香葡萄中使用了3种不同的糖苷酶,总共有38种挥发性物质被鉴定出来,包括萜烯类、高级醇类、碳六化合物和酚类物质。不同的酶对各种香气有显著性的影响。主成分分析显示商业酶(Rapidase AR2000; produced by DSM)水解香气特性明显好于其他酶产品。

2.2 糖苷酶基因在酿酒酵母中的表达及运用

因为大部分酵母属菌株表现不出 β -葡萄糖苷酶活性,所以非酵母属的 β -糖苷酶在葡萄酒香气中的发展显得越来越重要。从葡萄汁和发酵过程中分离出的酵母菌在低pH值、高体积分数酒精和高葡萄糖中只有少部分酶能够表现出积极活性^[25]。因此将外源 β -糖苷酶基因导入酿酒酵母中表达应用便成为克服酿酒酵母这一自身缺陷的一种方法。王立梅等^[27]通过反转录PCR法成功地扩增出日本曲霉呋喃 β -果糖苷酶基因,基因片断长度为1917bp,编码638个氨基酸。将所得片段定向克隆到pYX212载体上,并转化至酿酒酵母中进行表达,获得的转化子平均酶活为26.4U/mg。Michlmayr等^[28]将酒球菌的 β -葡萄糖苷酶基因ATCC BAA-1163进行克隆并让其在大肠杆菌中表达。表达分泌的糖苷酶特性与短乳杆菌(*L.brevis*)和肠系膜明串珠菌(*L.mesenteroides*)中分离出的 β -糖苷酶特性相似,最佳pH值为5.0~5.5, $K_m=0.17$ mmol/L。在存在酒精条件下测定了其活性,随着酒精体积分数升高, β -糖苷酶相对活性逐渐降低,当酒精体积分数约为25%时酶的活性丧失,原因可能是高体积分数酒精导致了糖苷酶基因的错误折叠。

Villena等^[29]研究了酿酒酵母 β -葡萄糖苷酶在酿酒过程中的运用。选择适当的菌株之后,优化了酶合成的条件:在有氧条件下,向培养基中添加纤维二糖以诱导胞外酶的产生,在生长了42h时酶产量达到了最大值。酶被纯化后,测定了其生化特性。并且将纯化的酶运用到实验室酿酒中,同时以广泛使用的来源于真菌的各种商业酶制剂相为对照,通过气相色谱和质谱法分析检测萜烯类物质含量。结果显示2种酶处理均促进了香气前体物质的释放,增加了葡萄酒中挥发性物质成分,而且挥发性物质成分比较相似,酶处理与葡萄酒香气物质含量具有很好的相关性。这一结果也表明来自酿酒酵母的酶可以替代商业酶制剂用在葡萄酒酿造中。

3 葡聚糖酶

β -葡聚糖是酵母菌等真菌细胞壁的主要组成部分,而 β -葡聚糖酶是木霉属所产可以用来降解 β -葡聚糖。传

统的葡聚糖酶用来改善受灰霉菌感染的葡萄所酿的酒。因为灰霉菌会分泌葡聚糖到果汁中导致过滤阻塞。酵母菌的细胞壁由葡聚糖链和甘露糖蛋白组成。自然情况下酵母自溶是一个很漫长的过程。自溶对葡萄酒质量有很多好处,自溶中释放的多糖可以改善酒的口感,释放的甘露糖蛋白可以改变葡萄酒蛋白的稳定性,释放的一些自溶物质可以改善葡萄酒的风味和复杂性。自溶释放很多氨基酸和核苷酸到酒中,这对于乳酸发酵来说是非常有利的,但同时它们也是许多细菌和酒香酵母的营养物质,会增加酒香酵母污染的风险性。目前商业 β -葡聚糖酶在过滤、澄清、陈酿等环节中已被广泛使用。

3.1 β -葡聚糖酶抗葡萄酒腐败菌

Enrique等^[30]评估了商业 β -葡聚糖酶制剂抗葡萄酒腐败菌(*Cryptococcus albidus*、*Dekkera bruxellensis*、*Pichia membranifaciens*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Zygosaccharomyces bailii*、*Zygosaccharomyces bisporus*)的能力。用不同酵母菌种检测显示它们对 β -葡聚糖酶制剂有不同的敏感性。虽然在实验室条件下葡萄酒腐败实验表明 β -葡聚糖酶制剂对*Dekkera bruxellensis*和*Zygosaccharomyces bailii*的抗菌效率有所下降,但是 β -葡聚糖酶制剂的添加对葡萄酒的参数没有影响,而且这一结果表明 β -葡聚糖酶制剂在葡萄酒中作为抗微生物制剂运用的可能,同时表明控制腐败酵母的抗微生物酶应值得进一步研究。 β -葡聚糖酶除了改善过滤效果外,不会引起任何葡萄酒化学组成的重大改变。在皮渣浸泡之后的琼瑶浆葡萄汁中添加了3种葡聚糖酶(Glucanex、Novoferm 12L和 Trenolin Buckett),Trenolin Buckett处理的酒被认为具有更理想的香气和水果味。

3.2 外源 β -葡聚糖酶基因的表达

张强等^[31]用刚果红法测定 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的酶活力,研究重组酿酒酵母(*S.cerevisiae*)菌株SC- β G分泌表达的重组 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的部分酶学性质,并与源菌株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)表达的原始酶的性质进行比较。结果表明,重组酶保持了与原始酶相同的底物专一性。重组酶的最适反应温度为35℃,而原始酶为55℃。重组酶的热稳定性也发生了改变,40℃热处理20min只保留63.4%的最初酶活力,但温度再升高时对热处理敏感度降低,70℃的热处理20min仍保留45.9%的最初酶活力;而原始酶50℃时稳定,60℃以上的热处理酶活力损失很大。与原始酶相比,重组酶的最适pH值下降为pH5.0,而原始酶为pH6.5;相比原始酶在pH7.0有最大稳定性,重组酶在pH5.5时有最大稳定性。重组 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的最适反应条件与原始酶相比更接近啤酒的实际生产条件。

4 溶菌酶

溶菌酶又称胞壁质酶,是一种安全性很高的天然抗菌酶制剂产品,已受到相关国际管理机构(WHO、FDA等)的认可。溶菌酶分子质量为14.6kD,能水解细菌细胞壁黏多糖结构,主要对革兰氏阳性菌起作用。该酶制剂是在2001年批准用于酿酒工业的,最大使用剂量不超过500g/t酒。目前,溶菌酶主要用于3个方面:苹果酸-乳酸发酵(MLF)启动的预防性调控;酒精发酵停滞或延缓过程中对葡萄酒的保护;MLF结束后对葡萄酒微生物的稳定。在MLF之前或结束后预防细菌腐败,不仅可以保障葡萄酒良好的感官品质,而且还能提升葡萄酒的卫生健康质量。因为腐败细菌除了产生过量的醋酸,还会产生生物胺,这种物质极易引起人体过敏反应,如头痛、呼吸紊乱、心悸、血压变化等。因此,采用一定的措施控制腐败细菌的生长很有必要^[32]。

在葡萄酒酿造中,未发酵的葡萄汁中除了酵母菌外,乳酸菌是数量最多的微生物。片球菌属(*Pediococcus*)、魏丝氏菌属(*Weissella*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)都是胞外多糖黏液、生物胺、乙酸和其他异味的产生者,都会导致葡萄酒不同类型的腐败。不同的方法通常被用来控制微生物的生长如加热葡萄汁、添加亚硫酸盐或者来自蛋清的溶菌酶。然而,由于存在健康风险,亚硫酸盐的使用量应该降低。

4.1 溶菌酶控制葡萄酒的腐败

在葡萄原汁中加入100~150mg/L的溶菌酶,可以抑制乳酸菌(LAB)的生长;当酒精发酵(AF)完成,通过正常的接种启动苹果酸-乳酸发酵,在白葡萄酒中加大溶菌酶的剂量至500mg/L,就可完全抑制MLF;如果AF中止,加入250~350mg/L的溶菌酶可抑制在重新启动AF阶段内的LAB的生长,从而能简化除去酒中过量的挥发酸的工艺,当LAB超过160CFU/mL时,溶菌酶的量应增大到500mg/L;一旦MIF完成后,若加入250~300mg/L的溶菌酶则可大大减少稳定葡萄酒所需的SO₂用量^[33]。

Blättel等^[34]研究了一种来自链霉菌属*Streptomyces* sp. B578的溶菌酶用于控制葡萄酒中的乳酸菌。这份研究中描述了来自于*Streptomyces* sp.菌株B578的胞外酶,它几乎能够溶解所有的与葡萄酒相关的乳酸菌和革兰氏阴性醋酸菌。这种分解酶在酿酒条件下,如亚硫酸盐和乙醇存在、低温、低pH值条件下均表现出积极的活性。胞外酶组成分析表明,它和不同的细胞壁水解酶具有协同作用功能。可以看出,*Streptomyces* sp. B578的溶菌酶是一个用来控制葡萄酒腐败细菌的很有前景的工具。Lasanta等^[35]报道,利用0.0625g/L的溶菌酶可以很好控制甜型葡萄酒中乳酸菌的生长。而且,当溶菌酶和产膜酵母混合

添加,葡萄酒中挥发酸含量可以明显降低。Azzolini等^[36]研究了在不同酿酒工艺条件下溶菌酶对乳酸菌的抑制效果。通过2株菌和红葡萄酒的对照实验证明红葡萄酒中添加溶菌酶可以很好的抑制野生型的乳酸菌生长,同时表明工艺类型对溶菌酶的抑菌效果有很大的影响。

4.2 溶菌酶对SO₂的替代作用

Gerbaux等^[37]曾在法国勃艮第产区的黑比诺葡萄酒中添加溶菌酶LYSO-Easy,并与传统的SO₂控制法进行对比。在黑比诺葡萄酒中添加125g/t溶菌酶LYSO-Easy就可有效抑制细菌的生长;若想达到同样控制效果,需要添加50g/t的SO₂。虽然,溶菌酶由于自身特点(只对革兰氏阳性菌有溶菌作用,不具有抗氧化性),还不能完全取代SO₂,但它可以作为SO₂的天然、强有力的补充,使SO₂的使用量大大降低^[33]。Cejudo-Bastante等^[38]在干白酿造中用溶菌酶和单宁酸取代SO₂研究其对氨基酸消耗和生物胺生成的影响。在不同的酿酒酵母中,SO₂或者溶菌酶对发酵过程中氮的消耗有不同的影响,然而单宁酸对其没有实质的影响。与添加溶菌酶比较,使用SO₂可以增加丙氨酸和谷氨酰胺的消耗量,无论溶菌酶还是SO₂处理对最终酒中的生物胺含量都没有影响。

4.3 溶菌酶活性及其对葡萄酒的影响

鸡蛋清溶菌酶在葡萄酒酿造中用来控制野生乳酸菌的生长。Guzzo等^[39]研究了葡萄酒中酚类物质对蛋清溶菌酶的抑制效果。结果表明酚类物质的存在可以降低溶菌酶活力,从而降低了实验乳酸菌的死亡率。该研究证明了溶菌酶抗乳酸菌活性大小与葡萄浸渍过程中释放的低分子量花青素的总量相关。Tolin等^[40]还建立了一种用质谱分析法快速检测经鸡蛋清溶菌酶处理过的葡萄酒中的鸡蛋蛋白质的方法。通过LC-MS可以检测到最低0.05g/L的量,而传统的酶联免疫法最低检测量在0.50g/L,这种方法明显优于传统的酶联免疫法。通过这种方法的建立,对葡萄酒中残留鸡蛋蛋白过敏的现象可以很好地避免。

Eggert等^[41]研究了溶菌酶与葡萄酒中物质的相互作用。1000mg/L的溶菌酶添加量对葡萄酒中多酚的含量,葡萄酒颜色及其抗氧化能力都没有影响。酚类物质没有与溶菌酶发生共价结合。同时在模拟实验中溶菌酶的活性没有受到锦葵色素葡萄糖苷和白藜芦醇的影响,然而在红葡萄酒中pH值和乙醇含量对溶菌酶的活性有非常大的影响。

5 尿素酶

酵母在精氨酸代谢过程中会生成尿素,当葡萄酒中尿素含量过高时,酒精会与尿素生成氨基甲酸酯,EC具有很强的致癌性。尿素酶能将尿素转化为氨离子和CO₂,使用尿素酶可以降解酒中的尿素,进而控制EC的生成。

大部分尿素酶最适pH6~7,所以它们在酒中一般不表现出活性。Suzuki等^[42]最早在乳酸杆菌属中发现了一种最适pH值为2.4可以用于葡萄酒中的尿素酶。1997年OIV批准这种酶可以运用于葡萄酒生产。同时,OIV规定尿素酶必须来源于发酵乳杆菌,最大使用量为75mg/L。当葡萄酒中尿素含量超过3mg/L时就得使用尿素酶处理。当尿素含量显著降低时,必须过滤除去尿素酶,如果不去除可能会给消费者带来健康问题。虽然使用尿素酶可以很好地降低葡萄酒中尿素的含量,但在实际中技术和成本是主要的应用限制因素。有研究者正试图利用甲醇酸单胞菌(*Acidomonas methanolica*)生产尿素酶,以期研制出适用性更强、性价比更高的酶产品^[32]。而Andrich等^[43]将酸性尿素酶共价结合在不同大小的壳聚糖颗粒上,将这种结合物置于4℃、150~170d,其活性降低不到5%。所以由此看来这种固定化酶的使用将大大提高酶的使用效率,并且会节约更多的成本,具有非常重要的研究价值,应用前景也将非常广阔。

6 其他酶制剂的应用现状

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。王华等^[44]使用蛋白质酶解法可将葡萄酒中蛋白质水解成小肽,这样既可使葡萄酒具有很好的稳定性,又可以提高葡萄酒的营养价值。张传军^[45]利用木瓜蛋白酶水解白葡萄酒中非稳定蛋白,通过大量实验确定了酶反应最佳条件为:加酶量为0.6g/100mL,在45℃反应38h,酶反应pH6.5。此条件下,白葡萄酒中的蛋白含量降低为0.31g/L,氨基酸含量升高至6.7mg/L。

7 结语

酶作为高效生物催化剂在葡萄酒酿造中发挥着重要的作用。酶的使用不仅增加了葡萄酒理化性质的稳定性,而且大大改善了葡萄酒的香气和色泽,提高了葡萄酒的质量。果胶酶的使用,提高了出汁率和澄清效果,有利于浸提多酚物质,这样获得的葡萄酒,单宁、色素含量和色度更高,颜色更深,抗氧化能力更强;糖苷酶主要促进了葡萄酒香气前体物质的释放,增加了酒的香气成分;葡聚糖酶可以改善澄清、过滤、和陈酿效果;溶菌酶不仅可以防止葡萄酒腐败,而且可以作为SO₂天然有力的补充,降低因SO₂使用而带来的健康风险;尿素酶的使用可降低葡萄酒中氨基甲酸乙酯(可能致癌的物质)的含量,对消费者健康也大有裨益。在深入研究酶作用机

理与葡萄原料组分的基础上,专业高效商业酶制剂的研发势头强劲,市场上已近出现很多的满足多样化需求的酶制剂产品,例如DSM、Beverage Supply Group等公司都能够提供专业的高质量葡萄酒生产全过程所用的酶试剂。这些酶制剂的运用能够更有效地浸提出活性抗氧化物质(白藜芦醇等),改善葡萄酒风味、色泽、稳定性,有利于葡萄酒的陈酿后熟等过程,进而可以不断提高葡萄酒的营养保健价值。

参考文献:

- [1] GRANDE H, ROGERSON F, SILVA M, et al. Alternative processing of port-wine using pectolytic enzymes[J]. *Cienciay Tecnología Alimentaria*, 2000, 2: 222-227.
- [2] PUÉRTOLAS E, SALDAÑA G, CONDÓN S, et al. A comparison of the effect of macerating enzymes and pulsed electric fields technology on phenolic content and color of red wine[J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(9): 647-652.
- [3] ESPEJO F, ARMADA S. Effect of enzyme addition in the making of pedro ximenez sweet wines using dynamic pre-fermentative maceration[J]. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 2010, 31(2): 133-142.
- [4] ARMADA L, FERNANDEZ E, FALQU E. Influence of several enzymatic treatments on aromatic composition of white wines[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43(10): 1517-1525.
- [5] LEIGHTON F, CUEVAS A, GUASCH V, et al. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans[J]. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 1999, 25(2/3): 133-141.
- [6] 屈慧鸽, 李荣, 缪静, 等. 果胶酶对红葡萄酒主要成分的影响[J]. *酿酒科技*, 2005(8): 71-73.
- [7] 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.
- [8] ARNOUS A, MEYER A S. Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L.) by multicomponent enzymes treatment[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49(1): 68-77.
- [9] CABEZA M S, MER N M G, MART N M C, et al. Effect of a pectinase-surfactin preparation on extraction of pigments and total polyphenol from Malbec grape skins[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2009, 60(4): 477-483.
- [10] BILLARD C, IZARD J C, ROMAN V, et al. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, *e*-viniferin and vine-shots derived polyphenols (Vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes[J]. *Leukemia & Lymphoma*, 2002, 43(10): 1991-2002.
- [11] BARJOT C, TOURNAIRE M, CASTAGNINO C, et al. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol [J]. *Life Sciences*, 2007, 81(23): 1565-1574.
- [12] 王蕾, 刘行之, 王琴飞, 等. 不同果胶酶和酵母菌对葡萄酒中白藜芦醇及其二聚体的影响[J]. *食品科技*, 2008(10): 41-44.
- [13] VÁZQUEZ E S, SEGADA S R, FERNÁNDEZ I O. Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(5): 789-802.
- [14] KELEBEK H, CANBAS A, CABAROGLU T, et al. Improvement of anthocyanin content in the cv. Öküzgözü wines by using pectolytic enzymes[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(1): 334-339.
- [15] 王建刚, 刘玉田, 时磊, 等. 酵母菌和果胶酶对干红葡萄酒发酵浸提的影响[J]. *酿酒科技*, 2010(8): 40-42.
- [16] SPAGNA G, ROMAGNOLI D, ANGELA M, et al. A simple method for purifying glycosidases: α -L-arabinofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine. Part I[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 22(5): 298-304.
- [17] BARBAGALLO R N, SPAGNA G, PALMERI R, et al. Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(3): 292-296.
- [18] WINTERHALTER P, SKOUROUMOUNIS G. *Biotechnology of aroma compounds*[M]//BERGER R G. *Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin, Germany: Springer Published, 1997.
- [19] PALMERI R, SPAGNA G. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(3): 382-389.
- [20] SUN Aidong, GE Yiqiang, NI Yuanying, et al. An analysis of the enzymolysis effect of β -glucosidase from different source on bound form aromatic components of sweet orange juice (peel)[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2001, 27(11): 1-4.
- [21] MARTINO A, SCHIRALDI C, DI LAZZARO A, et al. Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*[J]. *Process Biochemistry*, 2000, 36(1): 93-102.
- [22] SPAGNA G, BARBAGALLO R N, GRECO E, et al. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30(1): 80-89.
- [23] PALOMO E S, HIDALGO M, GONZALEZ-VINAS M, et al. Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases[J]. *Food Chemistry*, 2005, 92(4): 627-635.
- [24] 祝霞, 韩舜愈, 蒋玉梅, 等. 酶解处理对贵人香干白葡萄酒香气物质的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2011(2): 129-134.
- [25] GONZÁLEZ-POMBO P, FARIÑA L, CARRAU F, et al. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(1): 385-389.
- [26] KANG Wenhui, XU Yan, QIN Ling, et al. Effects of different β -D-glycosidases on bound aroma compounds in muscat grape determined by HS-SPME and GC-MS[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2010, 116(1): 70-77.
- [27] 王立梅, 齐斌, 周惠明. 日本曲霉呋喃果糖苷酶基因克隆及在酿酒酵母中的表达[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(2): 62-66.
- [28] MICHELMAYR H, SCHMANN C, WURBS P, et al. A β -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(7): 1281-1289.
- [29] VILLENA M A, IRANZO J F Ú, PÉREZ A I B. β -Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(3): 420-425.
- [30] ENRIQUE M, IBÁÑEZ A, MARCOS J, et al. β -Glucanases as a tool for the control of wine spoilage yeasts[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(1): 41-45.

- [31] 张强, 陈启和, 何国庆. 工业酿酒酵母重组 β -1,3-1,4-葡聚糖酶部分酶学性质的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 170-172.
- [32] 王显苏, 朱虹. 酶制剂在葡萄酒酿造中的应用[J]. 酿酒科技, 2009, 181(7): 52-55.
- [33] 倪瑛, 钟立人. 溶菌酶在葡萄酒生产中的应用[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003(5): 66-67.
- [34] BLÄTTEL V, WIRTH K, CLAUS H, et al. A lytic enzyme cocktail from *Streptomyces* sp. B578 for the control of lactic and acetic acid bacteria in wine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(5): 839-848.
- [35] LASANTA C, ROLDÁN A, CARO I, et al. Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of sherry wines[J]. Food Control, 2010, 21(11): 1442-1447.
- [36] AZZOLINI M, TOSI E, VENERI G, et al. Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios[J]. South African Journal for Enology & Viticulture, 2010, 31(2): 99-105.
- [37] GERBAUX V, VILLA A, MONAMY C, et al. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1997, 48(1): 49-54.
- [38] CEJUDO-BASTANTE M, SONNI F, CHINNICI F, et al. Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines[J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(10): 1501-1507.
- [39] GUZZO F, CAPPELLO M, AZZOLINI M, et al. The inhibitory effects of wine phenolics on lysozyme activity against lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(3): 184-190.
- [40] TOLIN S, PASINI G, CURIONI A, et al. Mass spectrometry detection of egg proteins in red wines treated with egg white[J]. Food Control, 2012, 23(1): 87-94.
- [41] EGGERT K, RAWEL H, NIKFARDJAM M, et al. Interactions between lysozyme and wine components[J]. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 2006, 102(10): 472-478.
- [42] SUZUKI K, BENNO Y, MITSUOKA T, et al. Urease-producing species of intestinal anaerobes and their activities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 37(3): 379-382.
- [43] ANDRICH L, ESTI M, MORESI M. Urea degradation kinetics in model wine solutions by acid urease immobilised onto chitosan-derivative beads of different sizes[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(5): 397-405.
- [44] 王华, 丁刚, 范英华. 白葡萄酒蛋白质稳定的新展望: 酶解法[J]. 酿酒科技, 2002(2): 69-71.
- [45] 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): 65-67.