

Stabilizace révových vín hydrolyzou zákalotvorných bílkovin imobilizovaným proteolytickým preparátem

663.256.15

Ing. JIŘÍ VAJČNER, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha;

Ing. JAROSLAVA TURKOVÁ, CSc., Ústav organické chemie a biochemie ČSAV, Praha;

Prof. Ing. VLADIMÍR KRUMPHANZL, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Zákaly révových vín jsou velmi různorodé. Má na ně vliv přítomnost mnoha látek, jako je obsah bílkovin, tříslovin, železa, mědi, barviva, slizovitých látek, kyselost vína atd. V podstatě lze zákaly révových vín rozdělit do čtyř hlavních skupin:

- a) bílkovinné zákaly,
- b) kovové zákaly,
- c) krystalické zákaly,
- d) mikrobiologické zákaly.

Vylučování bílkovinných zákalů se v první fázi projevuje opalizujícím závojem, který se po krátkém čase usadí jako vláknitá usazenina. Skutečnou příčinou dodatečných bílkovinných zákalů nejsou většinou samotné bílkoviny, ale produkty vzniklé kondenzací bílkovin s tříslovinami, popřípadě za katalytického působení některých iontů těžkých kovů. Vedle fyzikálních vlivů vedoucích ke shlukování, se uplatňují i chemické reakce, které podporují odvodnění a také vysrážení koloidů.

Stabilitu vína proti bílkovinným zákalům je možno zvýšit:

- a) odstraněním nebo snížením obsahu přítomných bílkovin,

- b) odstraněním nebo snížením obsahu polyfenolických látek,

- c) odstraněním nebo snížením obsahu těžkých kovů.

Stabilita vína se rovněž podpoří snižováním hodnoty rH a vlivu kyslíku na víno. Sníží se tím možnost oxidace kovů na vyšší, podstatně reaktivnější mocenství, omezí se tvorba kondenzovaných tříslovin a stabilizuje se vzniklý tříslobílkovinný komplex.

K odstranění nebo snížení obsahu bílkovin a jejich komplexu byla vypracována řada metod, z nichž nejdůležitější jsou: stabilizace bentonitem, stabilizace tepelným opracováním a stabilizace některými činidly, jako je tanin a želatina, kaolin, křemelina, živočišné uhlí, modré čiření a jiné. Frakce bílkovin rozpuštěné ve víně mohou mít kladný nebo záporný náboj, což závisí na pH vína. Jejich izoelektrické body se nacházejí v širokém rozmezí pH od 3 do 7,5. Bentonit ve víně má záporný náboj, proto se sorbují jen frakce bílkovin s kladným nábojem [1].

Enzymové přípravky, které katalyzují hydrolyzu bílkovin a polysacharidů, jsou schopny zvýšit stabilitu vína vůči zákalům. Proteolytické enzymy katalyzují hydrolyzu bílkovin, peptidů, amidů a esterů aminokyselin. Po-

užití proteolytických enzymových preparátů ke stabilizaci vína uvádí několik autorů [2, 3, 4, 5].

Možnosti širšího použití enzymů jako katalyzátorů pro chemické reakce v průmyslových procesech se dosud nemohly uplatnit především pro malou stabilitu enzymů, jejich vysokou cenu a neúsporný způsob použití. Připravíme-li však imobilizovaný enzym vazbou na nerozpustný nosič, získáme heterogenní specifický katalyzátor, který lze použít, je-li dostatečně stálý, opakovatelně. Z reakční směsi můžeme pak vázaný enzym oddělit filtrací nebo odstředěním. V kolonovém uspořádání máme možnost kontinuální katalýzy, která umožňuje automatizaci katalyzovaných procesů [6].

Kyselé proteinasy pepsinového typu se vyznačují řadou specifických vlastností vytvářejících určité potíže při imobilizaci. V neutrálním a alkalickém prostředí jsou nestálé a v mnoha případech se inaktivují. Tato vlastnost je na závadu při použití většiny běžných metod imobilizace. V kyselém prostředí, kde jsou poměrně stálé, dochází k protonizaci jejich aminoskupin, což znesnadňuje acylaci a alkylaci [7]. Způsob vazby popsaný Hasselbergerem [8] je založen na principu aktivace nosiče $TiCl_4$ ve vodném prostředí, kdy se na povrchu nosiče vytvoří vrstvička TiO_2 , na který se enzym komplexně váže. Vazba enzymu tímto způsobem probíhá v slabě kyselém prostředí (pH 4,5), což je vhodné pro imobilizaci kyselých proteinas. Další výhodou této metody je, že nosič po ztrátě aktivity navázaného enzymu se dá regenerovat pouhým vyžháním při teplotě 538 °C a promytím vodou.

EXPERIMENTÁLNÍ PROVEDENÍ

Materiál: surová proteinasa z *Aspergillus oryzae* poskytnuta VNI biotechniky, Moskva, SSSR, silikagel L, velikost částic 40–90 μm , Lachema, n. p., Brno, víno bílé, Rulandské bílé, MVZ Znojmo, ročník 1979

1. ANALYTICKÉ METODY

a) Stanovení proteolytické aktivity vázaného enzymu

Proteolytická aktivita byla stanovena modifikovanou [9] metodou podle Ansona [10]. K 2 ml roztoku denaturovaného hemoglobinu příslušného pH, vytemperovaného na 37 °C bylo přidáno známé množství nosiče s navázaným enzymem. Po 10 minutách inkubace při 37 °C za míchání, bylo štěpení hemoglobinu ukončeno přidáním 5 ml 5% kyseliny trichloroctové. Po 30 minutách stání byla sraženina odfiltrována a ve filtrátu byla měřena absorbance při 280 nm proti blanku, který byl připraven obdobným postupem, jen bez přítomnosti enzymu.

b) Stanovení množství navázaného enzymu metodou Lowryho [11]

K navážce nosiče s navázaným enzymem bylo přidáno 0,5 ml 1 N NaOH. Po dvou hodinách stání bylo přidáno 5 ml Fehlingova roztoku (směs 50 ml 2% Na_2CO_3 a 1 ml roztoku obsahujícího 0,5 g vinanu sodného a 0,25 g $CuSO_4$ v 50 ml). Po dalších dvou hodinách stání bylo přidáno 0,5 ml Folinova činidla a po hodině stání měřena absorbance při 500 nm proti blanku připraveném obdobně, jen s použitím nosiče bez bílkoviny. Množství bílkoviny bylo odečteno z kalibrační křivky.

2. VAZBA KYSELÉ PROTEINASY Z ASPERGILLUS ORYZAE NA SILIKAGEL AKTIVOVANÝ $TiCl_4$

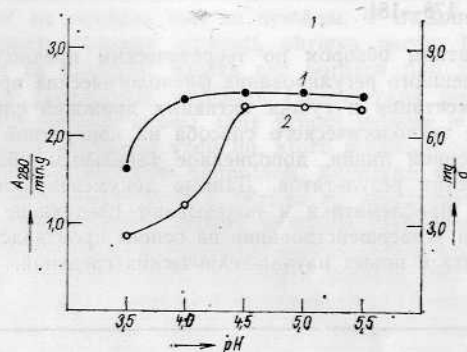
a) Aktivace nosiče

100 g silikagelu bylo suspendováno v 300 ml destilované vody. Za neustálého míchání a chlazení na teplo-

tu 5–10 °C bylo během 10 min přidáno 50 ml $TiCl_4$. Suspenze byla míchána za chlazení dalších 30 min a pak při laboratorní teplotě ještě 30 min. Aktivovaný silikagel byl promyt vodou, vyžhán hodinu při 538 °C, znovu promyt vodou a vyžhán půl hodiny při 538 °C a po dalším promytí vodou vysušen v sušárně při 105 °C.

b) Vazba proteinasy na aktivovaný nosič v závislosti na pH vazby

1 g aktivovaného nosiče byl suspendován vždy v 10 ml roztoku 100 mg surové proteinasy v 0,1 M octanovém pufru obsahujícím 1 M NaCl. pH bylo upraveno na 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5. Po 24 h třepání za laboratorní teploty byla vazba ukončena a imobilizovaný enzym promyt 0,1 M octanovým pufrům pH 4,5 obsahujícím 1 M NaCl do negativní reakce na enzym v eluátu (obr. 1).

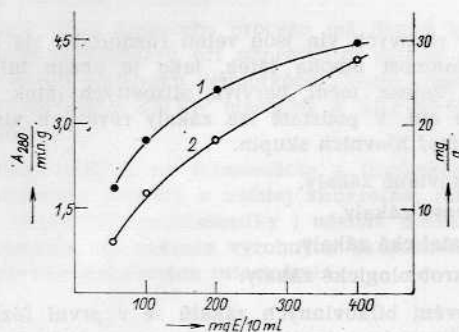


Obr. 1. Vazba proteinasy z *A. oryzae* na silikagel v závislosti na pH vazby

1 proteolytická aktivita ($A_{280}/\text{min. g}$, substrát hemoglobin pH 4),
2 množství bílkoviny v mg navázané na g suchého nosiče.

c) Vazba proteinasy na aktivovaný nosič v závislosti na koncentraci enzymu ve vazebném roztoku

1 g aktivovaného nosiče byl suspendován vždy v 10 ml roztoku obsahujícím 50, 100, 200 a 400 mg enzymu v 0,1 M octanovém pufru pH 4,5 obsahujícím 1 M NaCl. Po 24 hodinách třepání za laboratorní teploty byla vazba ukončena a imobilizovaný enzym promyt obdobně jako v předchozím případě (obr. 2).



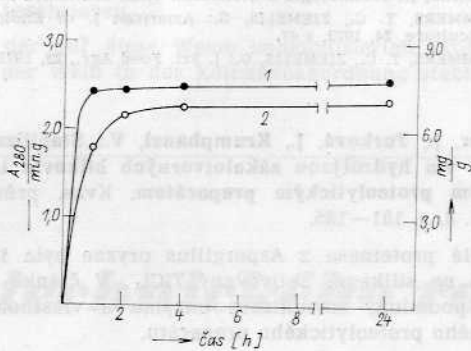
Obr. 2. Vazba proteinasy z *A. oryzae* na silikagel v závislosti na koncentraci enzymu ve vazebném roztoku

1 proteolytická aktivita ($A_{280}/\text{min. g}$, substrát hemoglobin pH 4),
2 množství bílkoviny v mg navázané na g suchého nosiče.

d) Vazba proteinasy na aktivovaný nosič v závislosti na době vazby

1 g aktivovaného nosiče byl suspendován vždy v roztoku 100 mg proteinasy v 10 ml 0,1 M octanovém pufru pH 4,5 obsahujícím 1 M NaCl. Vazba probíhala za labo-

ratorní teploty 1, 2, 4 a 24 hodin. Další postup byl analogický předchozímu (obr. 3).

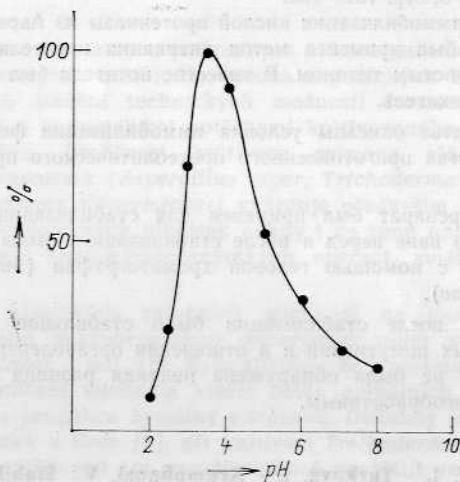


Obr. 3. Vazba proteinasy z *A. oryzae* na silikagel v závislosti na době vazby

1 proteolytická aktivita ($A_{280}/\text{min. g}$ substrát hemoglobin pH 4),
2 množství bílkoviny v mg navázané na g suchého nosiče.

e) pH aktivní křivka imobilizované proteinasy

Proteolytická aktivita vázaného enzymu byla stanovena roztoky denaturovaného hemoglobinu pH 2–9 (obr. 4).



Obr. 4. pH aktivní závislost proteinasy z *A. oryzae* imobilizované na silikagel (proteolytická aktivita stanovena roztoky denaturovaného hemoglobinu pH 2–9)

f) Závislost aktivity imobilizované proteinasy na teplotě

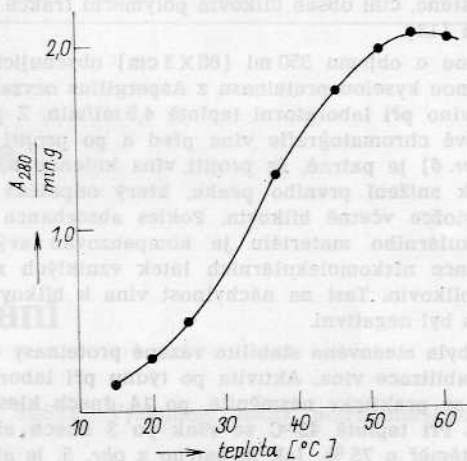
Byla sledována proteolytická aktivita (hemoglobin pH 4) imobilizované proteinasy na teplotě v rozmezí 15–60 °C (obr. 5).

3. STABILIZACE VÍNA IMOBILIZOVANOU PROTEINASOU PROTI BÍLKOVINNÝM ZÁKALŮM

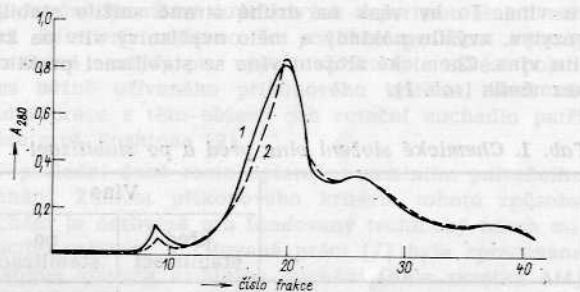
Kolona o objemu 350 ml (60×3 cm) byla naplněna imobilizovanou proteinasou o aktivitě 2,4 $A_{280}/\text{min. g}$. Tímto sloupcem protékalo víno Rulandské bílé, 4,5 ml/min při laboratorní teplotě. Víno před vstupem i po výstupu z kolony bylo průběžně kontrolováno na stabilitu proti bílkovinným zákalům. K testování byly použity běžné metody používané ve vinařské praxi [12]: tepelný test s přidávkem nasyceného roztoku síranu amonného, test s použitím fosfomolybdenanu sodného a wolframanu sodného, test s použitím 10% kyseliny fosfomolybdenové.

4. SLEDOVÁNÍ OBSAHU BÍLKOVIN GELOVOU CHROMATOGRAPHIÍ [13]

Na kolonku Sephadexu G-25 (fine) (32×2 cm) bylo aplikováno vždy 5 ml vína. Kolonka byla promývána 3% kyselinou octovou. Frakce 4 ml za 2 minuty byly měřeny při 280 nm proti blanku 3% kyselině octové (obr. 6).



Obr. 5. Závislost proteolytické aktivity (hemoglobin pH 4) proteinasy z *A. oryzae* imobilizované na silikagel v závislosti na teplotě



Obr. 6. Gelová chromatografie vína

Sephadex G-25 (fine), kolonka 32 × 2 cm, aplikováno 5 ml vína, eluce 3% kyselinou octovou, frakce 4 ml/2 min.

1 víno před stabilizací, 2 víno po stabilizaci.

DISKUSE

Pro přípravu imobilizované kyselé proteinasy z *Aspergillus oryzae* byl vybrán způsob vazby založený na aktivaci nosiče TiCl_4 popsáný *Hasselbergerem* [8]. Jako nosič byl použit silikagel o velikosti částic 40–90 μm . Vazba enzymu byla optimalizována.

Ze závislosti vazby enzymu na pH ve vazebném roztoku (obr. 1) je zřejmé, že optimální pH pro vazbu je 4,5–5,5. Vazba v kyselejším prostředí probíhá pomaleji, kdežto v oblasti nad pH 6 nastává již inaktivace proteinasy.

Závislost množství enzymu vázaného na nosič a jeho aktivity na množství enzymu přítomného v reakční směsi je uvedena na obr. 2. Množství navázaného enzymu i aktivity s koncentrací enzymu ve vazebném roztoku roste.

Vazba enzymu na aktivovaný nosič proběhne prakticky během jedné hodiny, jak je patrné z obr. 3. Z průběhu pH aktivní křivky obr. 4 je zřejmé, že imobilizovaný enzym má pH optimum při pH 3,5. pH révových vín se pohybuje kolem hodnoty 4. Z toho vyplývá, že použitá proteinasa z *Aspergillus oryzae* je vhodná pro štěpení bílkovin vína.

Možnost sledování bílkovin ve víně gelovou chromatografií uvádí Sommers [13]. Průběh gelové chromatografie vína na Sephadexu G-25 (fine) je uveden na obr. 6. První peak, který odpovídá látkám s molekulovou hmotností nad 4000 náleží bílkovinám, polymérním fenolickým látkám a celé řadě polysacharidových látek, které také absorbují ultrafialové světlo [14]. Jak bylo zjištěno, činí obsah bílkovin polymerní frakce pouze asi 30 % [13].

Kolonou o objemu 350 ml (60×3 cm) obsahující imobilizovanou kyselou proteinasu z *Aspergillus oryzae* protékalo víno při laboratorní teplotě 4,5 ml/min. Z průběhu gelové chromatografie vína před a po projití kolonou (obr. 6) je patrné, že projití vína kolonou mělo za následek snížení prvního peaku, který odpovídá polymerní složce včetně bílkovin. Pokles absorbance vysokomolekulárního materiálu je kompenzován zvýšením absorbance nízkomolekulárních látek vzniklých rozštěpením bílkovin. Test na náchylnost vína k bílkovinným zákalům byl negativní.

Dále byla sledována stabilita vázané proteiny v průběhu stabilizace vína. Aktivita po týdnu při laboratorní teplotě se prakticky nezměnila, po 14 dnech klesla asi o 15 %. Při teplotě 45 °C se však po 3 dnech aktivita snížila téměř o 75 %. Jak je patrné z obr. 5, je aktivita imobilizované kyselé proteiny z *Aspergillus oryzae* při teplotě kolem 10 °C, která odpovídá sklepní teplotě, velmi nízká. Pro praktické využití tohoto způsobu stabilizace vína by bylo lépe použít proteinasu s daleko větší aktivitou při teplotách 10–20 °C nebo použít ohřevu vína. To by však na druhé straně snížilo stabilitu enzymu, zvýšilo náklady a mělo nepříznivý vliv na kvalitu vína. Chemické složení vína se stabilizací prakticky nezměnila (tab. 1).

Tab. 1. Chemické složení vína před a po stabilizaci

	Vino	
	před stabilizací	po stabilizaci
Měrná hmotnost	0,99419	0,99460
Alkohol (obj. %) [g/l]	12,47	12,55
Extraktový zbytek [g/l]	18,10	18,50
Veškeré kyseliny [g/l]	5,30	5,25
Těkavé kyseliny [g/l]	0,70	0,61
SO ₂ volný [mg/l]	38,00	35,00
SO ₂ celkový [mg/l]	97,00	90,00
Cukr [g/l]	4,50	4,30

Vino ošetřené imobilizovanou kyselou proteinasou z *Aspergillus oryzae* bylo stabilní vůči bílkovinným zákalům. Ze senzoričského hlediska nebyl pozorován rozdíl mezi vínem stabilizovaným a nestabilizovaným.

Literatura

- [1] DATUNAŠVILI, E. N.: Vinoděljje i Vinogradarstvo SSSR, 5, 1975, s. 49.
- [2] JOSLYN, M.: Indust. Eng. Chem., 41, 1947, s. 567.
- [3] NANUTAŠVILI, T. S., SAMADAŠVILI, C. V.: Symp. Proizvodstvo i primnenienie preparatov, Varna 1974.
- [4] DATUNAŠVILI, E. N., PAVLENKO, N. M.: Voprosy vinogradstva i vinoděljja, Simferopol 1971.
- [5] DATUNAŠVILI, E. N., JEŽOV, V. N., VOROVJEVA, E. B., RAGIMOV, H. K.: Vinoděljje i Vinogradarstvo SSSR, 7, 1976, s. 14.
- [6] TURKOVÁ, J.: Chem. listy, 65, 1971, s. 922.
- [7] KRYLOVA, J. I., KOZLOV, L. B., ANTONOV, V. K.: Bioorgan. Chimija, 2, 1976, s. 273.
- [8] HASSELBERGER, F. X., ALLEN, B., PARUCHURI, E. K., CHARLES, M., COUGHLIN, R. W.: Biochem. and Biophys. Res. Commun., 57, 1974, s. 1054.
- [9] TURKOVÁ, J., MIKEŠ, O., GANČEV, V., BOUBLÍK, M.: Biochem. Biophys. Acta, 178, 1969, s. 100.
- [10] ANSON M. L.: J. Gen. Physiol., 22, 1939, s. 79.

- [11] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, P. J.: Biol. Chem., 248, 1961, s. 196.
- [12] FARKAŠ, J.: Technológia a biochémia vína, Bratislava 1973.
- [13] SOMMERS, T. C., ZIEMELIS, G.: American J. of Enology and Viticulture, 24, 1973, s. 47.
- [14] SOMMERS, T. C., ZIEMELIS, G.: J. Sci. Food Agr., 23, 1972, s. 441.

Vajčner, J., Turková, J., Krumphanzl, V.: Stabilizace révových vín hydrolýzou zákalotvorných bílkovin imobilizovaným proteolytickým preparátem. Kvas. prům., 27, 1981, č. 8, s. 181–185.

Kyselá proteinasu z *Aspergillus oryzae* byla imobilizována na silikagel aktivovaný TiCl₄. V článku se popisují podmínky imobilizace enzymu a vlastnosti připraveného proteolytického preparátu.

Takto imobilizovanou proteinasou bylo stabilizováno víno v kolonovém uspořádání. Bílkoviny ve víně před a po stabilizaci byly sledovány gelovou chromatografií na Sephadexu G-25 (fine). Víno ošetřené imobilizovanou proteinasou bylo stabilní vůči bílkovinným zákalům.

Вайчнер, И. - Туркова, И. - Крумphanzl, В.: Стабилизация виноградного вина гидролизом белков, образующих коллоидно-белковые помутнения с помощью иммобилизованого протеолитического препарата. Квас. прум., 27, 1981, № 8, стр. 181—185.

Для иммобилизации кислой протеиназы из *Aspergillus oryzae* был применен метод активации носителя четыреххлористым титаном. В качестве носителя был применен силикагель.

В статье описаны условия иммобилизации фермента и свойства приготовленного протеолитического препарата.

Этот препарат был применен для стабилизации вина. Белки в вине перед и после стабилизации были исследованы с помощью гелевой хроматографии (Sephadex G-25, fine).

Вино после стабилизации было стабильное против белковых помутнений и в отношении органолептических свойств не была обнаружена никакая разница между вином необработанным.

Vajčner, J. - Turková, J. - Krumphanzl, V.: Stabilization of grape wine by hydrolysis of turbidity-forming proteins by immobilized proteolytic preparation. Kvas. prům., 27, 1981, No. 8, pp. 181–185.

Acid proteinase from *Aspergillus oryzae* was immobilized on silicagel carrier activated by titanium chloride. Conditions of immobilization of enzyme and properties of prepared proteolytic preparation are described in the article.

By thus immobilized acid proteinase the wine was stabilized in column setting.

Proteins in wine before and after stabilization were followed by gel chromatography on Sephadex G-25 (fine). to protein turbidity and the organoleptic properties remained original.

Wine treated by immobilized proteinase was stable.

Vajčner, J. - Turková, J. - Krumphanzl, V.: Stabilisierung der Rebenweine durch die Hydrolyse trübungsbildender Proteine mit immobilisiertem proteolytischem Präparat. Kvas. prům., 27, 1981, No. 8, S. 181–185.

Saure Proteinase aus *Aspergillus oryzae* wurde durch TiCl₄ aktivierten Silikagel immobilisiert. Im Artikel

werden die Bedingungen der Enzymimmobilisierung und die Eigenschaften des hergestellten proteolytischen Präparats beschrieben.

Von der auf diese Weise immobilisierten Proteinase wurde der Wein in der Kolonnenanordnung stabilisiert.

Die im Wein enthaltenen Proteine wurden vor und nach der Stabilisierung mit Hilfe der Gelchromatographie auf Sephadex G-25 (fine) untersucht.

Der mit der immobilisierten Proteinase behandelte Wein war gegenüber den Proteintrübungen stabil.