

С. П. АВАКЯНЦ

## О ФЕРМЕНТАХ ВИНОГРАДНОГО СОКА И ВИНА

(Представлено академиком А. И. Опариным 23 III 1971)

Согласно мнению А. И. Опарина (<sup>1</sup>), в процессах, происходящих при переработке сырья в пищевой промышленности, в том числе и в виноделии, большую роль играют ферменты. В винограде были найдены очень активные оксидазы: полифенолоксидаза, пероксидаза, каталаза, аскорбатоксидаза, оксидаза диоксифумаровой кислоты, оксидаза гликолевой кислоты (<sup>2</sup>). Большая часть их адсорбирована на твердых частях виноградной ягоды. Обнаружены также дегидрогеназы яблочной, янтарной, винной и лимонной кислот (<sup>2</sup>). В цитоплазме и вакуолях клеток винограда локализована  $\beta$ -фруктофуранозидаза (<sup>3</sup>). Протеолитическая активность винограда в основном сосредоточена в кожце (<sup>4</sup>). При брожении окислительные ферменты инактивируются (<sup>5</sup>).

В вине ферменты были впервые исследованы А. И. Опариным и сотрудниками (<sup>5</sup>). Авторы обнаружили инвертазу,  $\beta$ -глюкозидазу, протеазу, пероксидазу. Н. М. Спсакян и сотрудники (<sup>6</sup>) нашли в винах активность эстераз. Есть данные (<sup>7</sup>), что в винах активны фосфатазы, фенолоза, протеиназа и сахараза. Ферменты вина исследованы недостаточно, хотя предполагается их участие в процессе созревания вин.

Нами были исследованы некоторые ферменты виноградного сока и вина, их изменение при брожении и выдержке вина на дрожжах.

Для исследований был использован виноград сорта Шардонэ. Полученное из него осветленное сусло без сульфитации сбраживали дрожжами *Saccharomyces vini* штамм Московский. Наряду с этим поставили опыты по 30-дневной выдержке при 25° дрожжей *Saccharomyces vini* в сухом вине и в имитирующей вино модельной среде, спиртуозностью 10 об. % рН 3, включающей 4 г/л винной, 3 г/л яблочной, 1 г/л лимонной и 1 г/л уксусной кислот, 1 г/л сернокислого калия, 0,25 г/л сернокислого магния.

Из виноградного сока и вина ферменты выделяли путем высаливания сернокислым аммонием при  $t = 4^\circ$  и пропускания через колонну с сефадексом Г-25. Для изолирования ферментов дрожжей суспензию клеток трижды раздавливали в камере при  $t = -70^\circ$  (<sup>8</sup>). Из полученного экстракта ферменты высаливали и обессоливали на сефадексе. В белковых фракциях после гелевой фильтрации определяли содержание белков по Лоури (<sup>9</sup>) и активность ферментов.

Активность протеиназы, пептидазы, эстераз и  $\beta$ -фруктофуранозидазы определяли по методикам, модифицированным нами (<sup>10</sup>). Алкогольдегидрогеназу — по Рэкери (<sup>11</sup>), сукцинатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу — по Элосу (<sup>12</sup>), глутаматдегидрогеназу и аланиндегидрогеназу — по В. Л. Кретовичу и сотрудников (<sup>13, 14</sup>), малатдегидрогеназы по С. П. Колоник и Н. О. Каплан (<sup>15</sup>), пероксидазу — по Д. М. Михлину и З. С. Броницкой (<sup>16</sup>), полифенолоксидазу — по С. Пуксу (<sup>17</sup>).

Расчет величин для дрожжей сделан на 1 г сухого веса, для среды и вина — на 1 л. Содержание белков приведено в мг. Активность протеиназы выражена в мг гидролизованного белка за время инкубации 1 час. Активность пептидазы — в миллиграммах образовавшегося за 2 часа инкубации аминокислотного азота. Активность пероксидазы — в миллилитрах 0,01 *N* раствора

Таблица 1

Изменение активности ферментов при брожении виноградного сока (сусла)

| Ферменты                                  | Виноградное<br>сусло | Сусло на 3-й<br>день броже-<br>ния | Сусло на 7-й<br>день броже-<br>ния | Вино |
|-------------------------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|------|
| О-дифенолоксидаза                         | 270                  | 6                                  | 0                                  | 0    |
| Алкогольдегидрогеназа                     | 0                    | 0                                  | 2                                  | —    |
| Малатдегидрогеназа                        | 7,6                  | 0                                  | 3,0                                | 4,0  |
| НАД-глутаматдегидрогеназа                 | 7,0                  | 0                                  | 0                                  | 0    |
| НАД-Н <sub>2</sub> -глутаматдегидрогеназа | 3,0                  | 1,5                                | 8,0                                | 2,0  |
| Аланиндегидрогеназа                       | 2,0                  | 2,0                                | 1,6                                | 8    |
| Сукцинатдегидрогеназа                     | 740                  | 668                                | 205                                | 250  |
| Лактатдегидрогеназа                       | 720                  | 76                                 | 108                                | 70   |
| β-Фруктофуранозидаза                      | 7,4                  | 8,3                                | 6,4                                | 16,0 |
| Протеиназа                                | 0,12                 | 0                                  | 0,28                               | 0,26 |

иода, соответствующего количеству окислившейся аскорбиновой кислоты за 2 мин. За единицу активности дегидрогеназ принимали такое количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на единицу в 1 мин.

Нами установлено (табл. 1), что в винограде активно функционируют L-лактат: НАД-оксидоредуктаза (КФ 1.1.1.27), сукцинат: акцептор — оксидоредуктаза (КФ 1.3.99.1), L-малат: НАД-оксидоредуктаза декарбоксилирующая (КФ 1.1.1.38), L-глутамат: НАДФ-оксидоредуктаза (дезаминирующая) (КФ 1.4.1.3.), L-аланин — НАД-оксидоредуктаза (КФ 1.4.1.1). Глутаматдегидрогеназа специфична к НАД и НАД-Н<sub>2</sub>, а аланиндегидрогеназа к НАД-Н<sub>2</sub>, они не исследовались ранее в винограде. Значительной активностью в соке обладает О-дифенолоксидаза, причем активность повышается после выделения и очистки, так как в соке О-дифенолоксидаза частично ингибируется хинонами.

В винограде активны β-фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26) и протеиназа, которая катализирует гидролиз γ-глобулина из крови человека.

При спиртовом брожении ферментный состав сока претерпевает большие изменения (табл. 1). Уже на 3 сутки почти в 50 раз падает активность О-дифенолоксидазы, определяемая в изолированном из суслы ферментном препарате, а на 7 день она полностью исчезает. Наши данные подтверждают наблюдение А. К. Родоцуло (<sup>2</sup>). В первый период брожения происходит падение активности и других ферментов: дегидрогеназ, протеиназ и β-фруктофуранозидазы, видимо, вследствие адсорбции их размножающимися дрожжевыми клетками (<sup>18</sup>).

В дальнейшем дрожжи выделяют в окружающую среду многие ферменты. Полученные результаты позволяют заключить, что ферменты вина состоят в меньшей мере из ферментов винограда, а главным образом из ферментных систем дрожжей. Указанное является экспериментальным подтверждением высказанной в 1947 г. идеи А. И. Опарина о том, что дрожжи служат источником ферментов в вине.

Считается (<sup>3, 5</sup>), что выдержка вина на дрожжах улучшает качество вин. Нами установлено (табл. 2), что при выдержке дрожжей в вине и имитирующей ее модельной среде происходят глубокие ферментативные превращения. Из дрожжей в вино и среду переходят белковые вещества, часть которых одновременно гидролизуются протеолитическими ферментами. В клетках выдержанных дрожжей заметно активируются протеиназа и пептидаза. В пекарских дрожжах обнаружены активная протеиназа А и неактивные предшественники протеиназ В и С, связанные с ингибитором белковой природы (<sup>19</sup>). Возможно, что в винных дрожжах также существуют фермент-ингибиторные комплексы, которые при выдержке распадаются, т. е. регуляция протеолитических ферментов в клетках винных дрожжей осуществляется путем связи протеаз с белками и поддержанием определен-

Изменение активности ферментов при выдержке дрожжей в вине и модельной среде

| Показатели            | Дрожжи      |                | Среда            |                |
|-----------------------|-------------|----------------|------------------|----------------|
|                       | До выдержки | После выдержки | Вино до выдержки | После выдержки |
| Содержание белков     | 28,2        | 14,4           | 7,5              | 19,0           |
| Активность ферментов: |             | 19,6           |                  | 7,5            |
| протеиназы            | 1,2         | 1,7<br>2,1     | 0,48             | 2,7<br>9,0     |
| пептидазы             | 0,75        | —<br>2,3       | 6,7              | 4,5<br>14,0    |
| пероксидазы           | 9,6         | 3,6<br>4,0     | 55               | 30<br>80       |
| алкогольдегидрогеназы | 2,8         | 1,19<br>0,66   | 4,0              | 4,4<br>19,0    |
| глютаматдегидрогеназы | 9,4         | 0,9<br>0,8     | 4,2              | 2,2<br>20,0    |
| сукцинатдегидрогеназы | 55,4        | 3,3<br>2,6     | 3,7              | 3,7<br>30,0    |
| лактатдегидрогеназы   | 118         | 3,3<br>1,3     | 2,5              | 3,7<br>30,0    |

Примечание. Над чертой — при выдержке в вине, под чертой — в модельной среде.

ного pH. В процессе выдержки дрожжей в вине активные протеолитические ферменты гидролизуют белки, в результате чего происходит активация протеиназ и пептидаз, которые катализируют процессы автолиза клеток. При распаде дрожжевой клетки ее протеолитические ферменты переходят в вино и среду, где ускоряют гидролиз белков и пептидов, приводящий к обогащению вина аминокислотами.

После 1 месяца выдержки в дрожжевых клетках заметно снижается активность оксидоредуктаз. В модельной среде накапливаются пероксидаза, дегидрогеназы этанола, глютаминовой, янтарной и молочной кислот. Переход этих ферментов в вино не всегда обнаруживается, видимо, вследствие того, что компоненты вина вызывают ингибирование пероксидазы и дегидрогеназ. Наблюдаемое обогащение вина протеиназами и некоторыми дегидрогеназами значительно ускоряет процессы его созревания. Наряду с этим, ферментативные реакции, улучшающие качество вина, по-видимому, протекают непосредственно в дрожжевых клетках.

Расчеты показывают, что определенная доля оксидоредуктаз дрожжей инактивируется, другая часть выделяется из клеток в среду. Таким образом, при автолизе дрожжей в клетках резко снижается активность ферментов, принимающих участие в биологическом окислении и в других важных биосинтетических процессах. Вместе с тем у дрожжевых клеток не отмечается полной инактивации ключевого фермента аминокислотного метаболизма — глютаматдегидрогеназы и ферментов дыхательной цепи, являющейся путем окисления различных клеточных субстратов и основным механизмом для консервации энергии в клетках.

Выражаю глубокую благодарность А. И. Опарину и В. Л. Кретовичу за внимание и интерес к работе.

Всесоюзный заочный институт  
пищевой промышленности  
Москва

Поступило  
22 III 1971

# ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. И. Опарин, Задачи биохимии в пищевой промышленности, Доклад на пленарном заседании IX менделеевского съезда по общей и прикладной химии, «Наука», 1965.
- <sup>2</sup> А. К. Родопуло, О биохимических процессах в виноделии, М., 1962.
- <sup>3</sup> A. W. Niels, *Biochim. et biophys. acta*, **128**, № 1, 124, 196 (1966).
- <sup>4</sup> R. Cordonnier, A. Dugal, *Ann. Techn. Agric.*, **17**, 3, 189 (1968).
- <sup>5</sup> А. И. Опарин, А. Л. Курсанов и др., Биохимия виноделия, сборн. 2, 1947, стр. 69.
- <sup>6</sup> Н. М. Сисакян, Е. М. Попова и др., Биохимия виноделия, сборн. 2, 1948, стр. 69.
- <sup>7</sup> S. Pallavicini, *Riv. viticoli e enol.*, **19**, № 12, 492 (1966).
- <sup>8</sup> В. И. Любимов, Н. П. Львов, Прикладная биохимия и микробиология, **4**, 5, 592 (1968).
- <sup>9</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, № 1, 265 (1951).
- <sup>10</sup> С. П. Авакянц, Новые методы биохимических исследований вина, М., 1968.
- <sup>11</sup> E. Racker, *J. Biol. Chem.*, **184**, 313 (1950).
- <sup>12</sup> H. A. Ellis, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **85**, № 2, 561 (1959).
- <sup>13</sup> В. Р. Шатилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, Биохимия, **34**, 2, 409 (1969).
- <sup>14</sup> В. Р. Шатилов, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович, ДАН, **178**, № 2, 482 (1968).
- <sup>15</sup> S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, **1** (1955).
- <sup>16</sup> Д. М. Михлин, З. С. Броновицкая, Биохимия, **14**, в. 4, 379 (1949).
- <sup>17</sup> C. Roux, *Ann. Techn. Agric.*, **15**, № 2, 199 (1966).
- <sup>18</sup> А. Т. Курсанов, Е. И. Исаева, Биохимия, **9**, в. 5, 273 (1944).
- <sup>19</sup> J. F. Lenney, J. M. Dalbeck, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **129**, № 1, 407 (1969).