



www.enogrup.com

Комплексные технологические решения

Инструментарий винодела

Методы тестирования белковой
стабильности



Белковые помутнения в винах

Мутность, вызванная белками, являются одним из распространённым видом помутнений, встречающимся в бутилированных белых и розовых винах. Мутность вина в бутылке всегда вызывает недовольство потребителей, что сопряжённо с возвратом вина и излишними затратами. Для предотвращения этой проблемы, в виноделии много лет применяется оклейка вин бентонитом.

Однако повышенные дозировки бентонита негативно влияют на органолептические свойства вина, в то время как, низкие дозировки не гарантируют белковой стабильности вина в сложных условиях транспортировки и хранения в торговле. Высокие дозировки бентонита приводят к потере объема вина, которые оцениваются от 3% до 5%, что представляет собой наиболее значительную стоимость использования этого препарата при обработке. Утилизация осадков отработанного бентонита, также представляет проблему и вызывает дополнительные затраты.

Белковые помутнения
вызванные нагревом

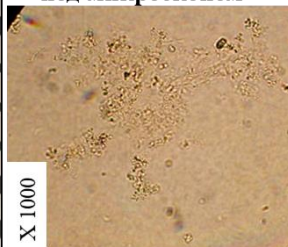


20°C

40°C

80°C

Белковый осадок
под микроскопом



X 1000

Белковые помутнения вызванные
выделением танинов из пробки



Что является источником белков?

Белки, вызывающие помутнения, попадают в вино исключительно из винограда, они обладают молекулярной массой 20-30 kDa, являются представителями Тауматин-подобных белков и Хитиназ. Их синтез связан с патологическими изменениями, происходящими при поражении винограда *Vitis vinifera* микроорганизмами или при повреждении растения во время сбора урожая.

Бета-глюканазы могут также вызывать нестабильность, но встречаются в незначительных концентрациях в вине, и, следовательно, они не вносят значительный вклад. Концентрация белков, зависит от сорта винограда, условий сезона, болезни виноградной лозы и условий переработки. На протяжении длительного времени культивации виноградное растение адаптировалась, эти белки

могут образовываться, даже если нет возбудителей, стимулирующего их синтез.

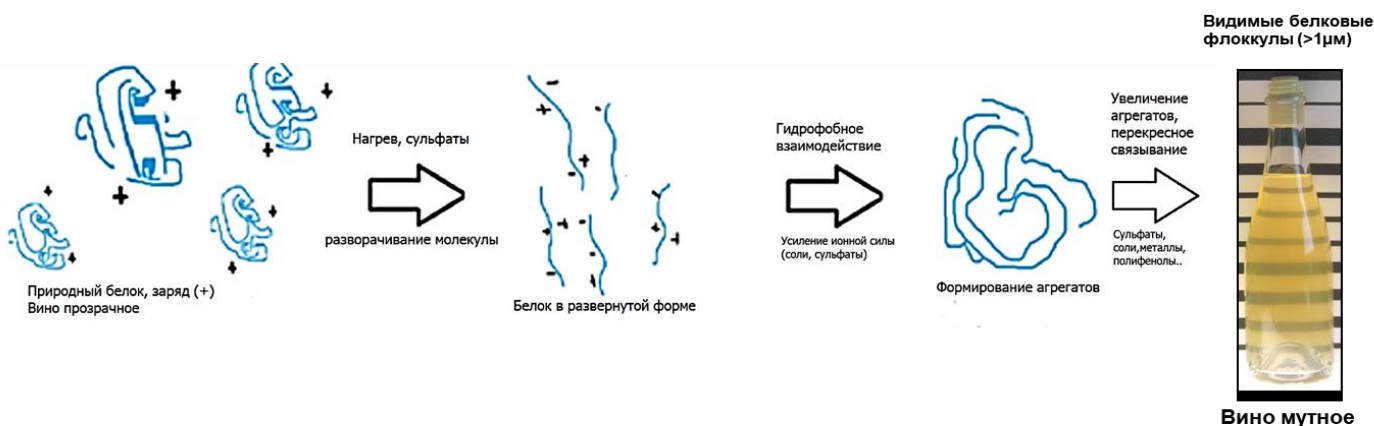
Хитиназы и Тауматины устойчивы к грибковым инфекциям вследствие их глобулярной структуры и наличия многочисленных дисульфидных мостиков, и, следовательно, протеазы грибов, таких как *Aspergillus niger*, не могут эффективно разрушать эти белки.

Что вызывает белковые помутнения?

Белки в среде рН вина обладают положительным зарядом, и отталкивают друг друга. Чем они меньше, тем легче они остаются во взвешенном состоянии. Температура играет очень важную роль в структуре белков. Хитиназы более чувствительны к нагреву, чем Тауматины, и могут денатурировать в течение нескольких минут при температуре выше 40 °С. Денатурация приводит к изменению структуры, белок разворачивается и теряет свой глобулярный вид, а также свое специфическое действие (например, ферментативное действие). Денатурация также вызывает активацию тех частей молекулы белка, которые в обычной форме не контактируют со средой. Если эти части белка являются гидрофобными, они присоединяют смежные белки, которые также имеют активные гидрофобные части. Они теряют свою гидрофильность и образуют агрегаты. Чем больше эти агрегаты, тем более заметными они становятся невооруженным глазом. Только белки, которые денатурируют, вызывают помутнения.

В вине много веществ с отрицательными зарядами молекул, которые могут связываться с белками и тем самым снижать электростатическое отталкивание (сульфаты, полифенолы, полисахариды, органические кислоты). Сернистые соединения играют основную роль в образовании белковых агрегатов.

Исследования показали, что изменение рН вина также могут привести к разворачиванию структуры белковых молекул. Белковые агрегаты могут также связываться с другими компонентами вина, такими как, например, полифенолы, с образованием еще более крупных полимеров, которые в конечном итоге становятся видимыми невооруженным глазом и выпадают в осадок.



Методы определения белковой нестабильности

Определение дозировки бентонита необходимой для белковой стабилизации вина, является непростым вопросом – на него влияет множество факторов. Для определения начального уровня белковой нестабильности и определения необходимой дозировки бентонита было разработано множество методов. Как правило в производственных условиях применяют тепловые тесты или тесты, основанные на различных реактивах способных реагировать с термолабильными белками.

Метод	Принцип действия	Результат
Тепловой тест	Вино подвергается нагреву, после охлаждается и определяется наличие мутности. Температура и время нагрева и охлаждения образца варьируют в широком диапазоне	Выпадение термолабильных белков, растворимых в обычных условиях, но нестабильных при нагреве и их реакция с полисахаридами и полифенолами
Трихлоруксусная кислота - ТСА	Добавление в пробу вина трихлоруксусной кислоты, нагрев 2-5 мин, охлаждение, определение мутности	Денатурация всех белков в пробе вина в кислотных условиях
«Бентотест»	Добавление в пробу вина фосфомолибденовой кислоты, инкубация при нормальных условиях, наблюдение мутности	Денатурация всех белков в пробе вина в кислотных условиях
Реакция с этанолом	Внесение в пробу вина увеличивающихся со временем дозировок этанола	Осаждение не растворимых белков и коллоидов в условиях pH вина
Таниновый тест Proteotest	Внесение в пробу вина раствора танина, с нагревом или без, наблюдение мутности	Все белки в пробе реагируют с Танином и выпадают в осадок.

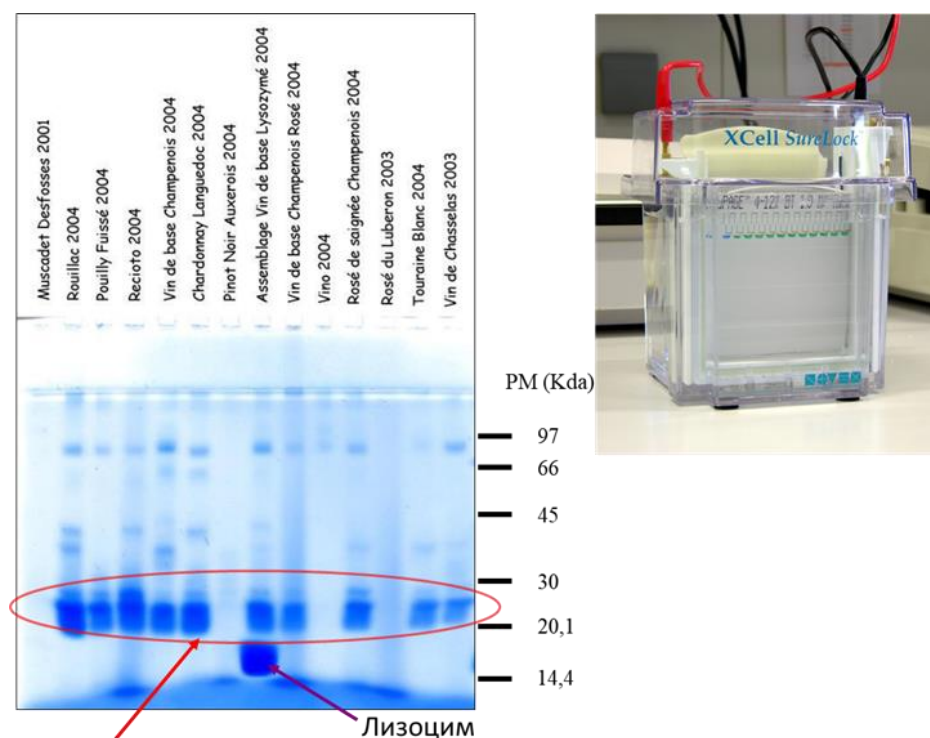
Это хорошие тесты? Да, но есть нюансы.

Каждый из этих методов обладает определенным уровнем не точности, так как выпадение термолабильных белков происходит принудительно в стрессовых условиях. Химический состав белковых осадков при этом значительно отличается от осадков, обнаруживаемых в бутылках в естественных условиях. Принудительное осаждение белков во время тестирования приводит к образованию осадков с повышенным содержанием белков, полисахаридов и полифенолов по отношению к осадкам, полученным естественным путем. В реакцию также вступают белки, которые не обнаруживаются в естественном осадке в разлитом вине.

Такие результаты заставляют применять завышенные дозы бентонита, которые негативно действуют на органолептические свойства вина.

А какой тест самый точный?

Одним из наиболее точных современных методов определения содержания белков является электрофорез белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) — метод основанный на движении заряженных биологических макромолекул в постоянном электрическом поле. Разделение в полиакриламидном геле происходит за счёт различий заряда разделяемых молекул и отличий молекулярных масс, а также от конфигурации молекул. Данный метод позволяет проводить качественное и количественное определение белков, определять их молекулярную массу, он применяется в основном, в исследовательских целях.



Хитиназы и Тауматин-подобные белки (20-30 KDa) вызывающие белковые помутнения

Электрофореграмма демонстрирующая наличие белков, вызывающих помутнение в различных образцах вин.

Какой тест самый распространенный?

Тепловой тест является наиболее распространенным в виноделии методом определения белковой стабильности. Он проводится путем нагревания образца вина при высокой температуре в течение определенного времени, при этом происходит денатурация тепло-лабильных белков с образованием мутности и осадка. Тепловой тест позволяет имитировать образование белковых помутнений и определить дозировку оклеивающих веществ необходимых для устранения нестабильных при нагревании белков.

На сегодня не существует стандартного протокола для выполнения теплового теста, множество исследователей и производителей вина в разных странах используют разные методики в которых отличается температура и время нагрева:

- 35°C в течение 1 месяца (Росock et al., 2006)
- Вариации от 35°C до 20°C в течение 8 дней (Росock et al., 2006)
- 60°C в течение 24ч (Toland et al., 1996)
- 80°C в течение 5мин (Dubourdieu et al., 1988)
- 80°C в течение 2ч (Росock et al., 2006)
- 80°C в течение 6ч + 4°C в течение 12ч (Dawes et al., 1994)
- 80°C в течение 6ч (Росock et al., 2006)
- 80°C в течение 30 мин (Dubourdieu et al., 1988) (Enartis)
- 90°C в течение 1ч + 4°C в течение 6ч (Sarmiento et al., 2000)

- Добавление танина из расчёта 500 мг/л + 80°C на 5 мин (Dubourdieu et al., 1988)
- Добавление 250 мг/л галлового танина + 80°C 30 мин (ENARTIS)

Большинство вариантов тестов обладают определенными недостатками, различные белки вызывающие помутнения обладают различной чувствительностью к нагреву и соответственно к образованию осадков, например, при низкой температуре проведения теста (до 40°C), не происходит осаждение тауматин-подобных белков, которые могут позже вызвать помутнения в розлитом вине в течении более длительного времени хранения.

Один из наиболее часто используемых тестов разработан Росock в 2006 году, при котором вино нагревают при 80 °C в течение 6 часов. Одним из недостатков этого теста является увеличение окисления фенольных веществ и их конденсация с белками при высоких температурах, что может вызвать повышенное осаждение белка и, таким образом, результаты будут завышены.

Время и температура охлаждения также имеет большое влияние на результаты тепловых тестов. При проведении теста с нагревом вина до 80 °C, увеличение времени охлаждения (18 часов) и низкая температура охлаждения (+4°C) значительно усиливает интенсивность помутнения, соответственно выбор дозировки бентонита также будет завышен. Согласно некоторым исследованиям, тест при котором образец нагревался 2 часа при 80 °C, а затем охлаждался в течение 3 часов при 20 °C (испытание на нагрев в течение 5 часов) позволяет получить наилучшую сходимость в определении дозировки бентонита для стабилизации вина. К сожалению большим недостатком этого теста является время, необходимое для его проведения.

Так много вариантов. Какой выбрать?

Тесты по определению белковой нестабильности рекомендуемые Энартис

Тепловой тест

- Гомогенизируйте вино, которое необходимо проанализировать.
- Отфильтруйте 20 мл вина на мембране 0,45 микрон.
- Проверьте мутность отфильтрованного вина с помощью турбидиметра (T1): результат должен быть близок к 0 NTU.
- Поместите пробу вина (20 мл), в котором была определена мутность T1, в пробирку и нагрейте его на водяной бане при 80 °C в течение 30 минут.
- После охлаждения пробирки до комнатной температуры, определите мутность (T2).

Вино устойчиво к белковым помутнениям отношении белков, если: $T2-T1 < 2$ NTU

Тепловой тест с танином

- Гомогенизируйте вино, которое нужно проанализировать.
- Отфильтруйте 20 мл вина на мембране 0,45 микрон и добавьте его в пробирку.
- Добавить в пробирку 2,5% по объему отфильтрованного на мембране 0,45 микрон раствора галлового танина (ENARTIS TAN BLANC) концентрацией 100 г/л и определить мутность (T1).
- Нагреть пробирку на водяной бане при 80 °C в течение 30 минут, содержащую 20 мл вина, с раствором танина.
- После охлаждения пробирки с пробой при комнатной температуре, определить мутность (T2).

Вино устойчиво к белковым помутнениям отношении белков, если: $T2-T1 < 10$ NTU

Для получения более точного результата по определению белковой стабильности вина, или выбора дозировки оклеивающих веществ, рекомендовано одновременно проводить 2 этих теста и сверять их результаты.

Пример:

Тепловой тест 1,5 NTU СТАБИЛЬНО
Тепловой тест 14 NTU СТАБИЛЬНО НЕ ПОЛНОСТЬЮ

Еще больше полезной информации?
Мы рядом: info@enogrup.com