

УДК 663.252.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ФРУКТОВЫХ ВИН

А.А. ВОЛЧОК¹, А.М. РОЖКОВА¹, И.Н. ЗОРОВ¹, С.С. ЩЕРБАКОВ³, А.П. СИНИЦЫН^{1,2}

(¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; ³ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

*Проведено исследование воздействия новых мультиэнзимных композиций, применяемых при изготовлении фруктовых вин на стадии получения сусла, на качество готовой продукции. Изучаемые ферментные комплексы были ранее получены в ходе селекции и при помощи генной инженерии из микроскопического гриба *Penicillium verruculosum*, секретирующего эффективный комплекс целлюлаз.*

Приведены основные характеристики мультиферментных комплексов, а также представлены характеристики полученных с их использованием фруктовых вин, что дает возможность судить о потенциальных возможностях использования данных ферментных препаратов в промышленных масштабах. В ходе работы регистрировался выход сусла из мезги после ферментативной обработки и такие показатели, как относительная вязкость сусла, содержание в нем взвесей. В готовых винах определяли ряд физико-химических показателей и цветовые характеристики.

Полученные данные достоверно подтверждают эффективность использования новых мультиферментных комплексов в винодельческой промышленности.

*Ключевые слова: ферментные препараты, ферментативная обработка, *Penicillium verruculosum*, фруктовые вина, виноделие.*

Технология изготовления фруктовых вин характерна своей специфичностью, связанной с применением сырья, различного по химическому составу и требующего разных условий и методов переработки. Производство вин этого типа часто бывает сопряжено с такими трудностями, как небольшой выход сусла из плодовой мезги, сложности прессования, замедленное осветление сусла, возникновение помутнений и изменение цветовых характеристик продукта [4].

На данный момент наиболее эффективным решением данных технологических проблем многими производителями признана ферментативная обработка сырья, предшествующая процессам прессования и фильтрации [7, 9]. В последние 5–10 лет на рынке вспомогательных материалов предлагается большое разнообразие ферментных препаратов, нацеленных на облегчение осветления сусла, стабилизацию вин против помутнений коллоидной природы, достижение гармоничного и разнообразного аромата готового продукта [1]. В связи с возрастающей потребностью производителей в ферментных комплексах, обладающих набором необходимых для достижения положительных результатов активностей в оптимальном соотноше-

нии, в лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха (ИНБИ РАН) непрерывно ведутся работы по получению новых ферментных препаратов. Исследования действия на различные плодовые субстраты ферментных комплексов, эффективно гидролизующих пектин и целлюлозосодержащее сырье, позволили получить данные о целесообразности их использования в винодельческом производстве.

В качестве объектов исследования выступали ферментные препараты ВІ 3-227.7 и ВІ 3-227.4, полученные на основе рекомбинантного штамма *Penicillium Verruculosum* и давшие наилучшие результаты по выходу сока из плодовой мезги, а также увеличению содержания в сусле восстанавливающих сахаров в ранее проводимых экспериментах [5].

Методика исследования

В качестве плодового и ягодного сырья использовали рябину сортовую, желтую сливу и садовую черную смородину. Все субстраты были получены и переданы для исследований работниками МСХА имени К.А. Тимирязева.

Исследуемые ферментные препараты были получены путем котрансформации целевыми плазмидами с генами пектин-лиазы *P. canescens* (peIA), бета-глюкозидазы *A. niger* (bgIII) с трансформирующей плазмидой pSTA 10 ауксотрофного штамма-реципиента *P. verruculosum* 537. Процессы создания рекомбинантных штаммов и ферментных препаратов, их свойства, а также методы определения ферментативных активностей подробно описаны в работе [3]. Препараты представляли собой кремевый порошок (лиофилизат культуральной жидкости рекомбинантных штаммов плесневого гриба *P. verruculosum*), легко растворимый в воде. В таблице 1 приведены их основные характеристики.

Т а б л и ц а 1

Характеристики изучаемых мультиферментных комплексов*

Показатель	Ферментный препарат	
	ВІ_3-227.4	ВІ_3-227.7
Концентрация белка, мг/г препарата	854 ± 39,77	503 ± 33,60
Целлюлазная (МКЦ) активность, ед/г препарата	3346 ± 388,84	3194 ± 310,6
Целлюлазная (КМЦ) активность, ед/г препарата	170 ± 19,92	174 ± 14,90
β-глюкозидазная активность, ед/г препарата	3999 ± 388,11	395 ± 25,49
Пектинлиазная активность, ед/г препарата	2694 ± 388,38	1164 ± 113,2
Киланазная активность, ед/г препарата	3490 ± 288,28	5310 ± 334,9

* МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза; КМЦ — карбоксиметил-целлюлоза.

Образцы фруктовых вин получали в лабораторных условиях по технологическим схемам, представленным в таблице 2. При изготовлении вин использовали препараты, наиболее эффективно проявившие себя в предварительных испытаниях с точки зрения повышения выхода сусла из мезги [5].

Схемы изготовления фруктовых вин в лабораторных условиях

Рябина сортовая, сухой виноматериал		Черная смородина, слива, сладкие некрепленые виноматериалы	
Технологическая схема без стадии ферментативной обработки мезги	Технологическая схема, включающая в себя стадию ферментативной обработки мезги	Технологическая схема без стадии ферментативной обработки мезги	Технологическая схема, включающая в себя стадию ферментативной обработки мезги
1. Мойка сырья, сортировка		1. Мойка сырья, сортировка	
2. Дробление, внесение в мезгу воды с таким расчетом, чтобы концентрация титруемых кислот в конечном продукте составляла 5 г/дм ³		2. Дробление, внесение в мезгу воды с таким расчетом, чтобы концентрация титруемых кислот в конечном продукте составляла 6,8 г/дм ³	
3. Сульфитация мезги (K ₂ S ₂ O ₅ , «Мегахим», РФ) до 80 мг/дм ³		3. Сульфитация мезги (K ₂ S ₂ O ₅ , «Мегахим», РФ) до 80 мг/дм ³	
4. Мацерация мезги в течение 24 ч при 25°С	4. Мацерация мезги в присутствии ферментного препарата В1 3-227.7 (0,03% от массы мезги) в течение 24 ч при 25°С	4. Мацерация мезги в течение 24 ч при 50°С (для сливы), при 25°С (для черной смородины)	4. Мацерация мезги в присутствии ферментного препарата В1 3-227.4 (0,03% от массы мезги) в течение 24 ч при 50°С (для сливы), при 25°С (для черной смородины)
5. Прессование мезги (лабораторный механический пресс вместимостью 1,5 дм ³)		5. Прессование мезги (лабораторный механический пресс вместимостью 1,5 дм ³)	
6. Внесение в сусло сахара до 220 г/дм ³ (сахарный сироп 80%), сульфитация сусла до 120 мг/дм ³		6. Внесение в сусло сахара до 220 г/дм ³ (сахарный сироп 80%), сульфитация сусла до 120 мг/дм ³	
7. Осветление отстаиванием (24 ч), отделение осадка		7. Осветление отстаиванием (24 ч), отделение осадка	
8. Сбраживание сусла до содержания в нем 15 г/дм ³ сахара при 20°С. Внесение винных дрожжей «France universal» (произв. Франция) 500 г/625 дм ³ , внесение в сусло 0,6 г/дм ³ (NH ₄) ₂ PO ₄ (Sigma, USA)		8. Сбраживание сусла до содержания в нем 15 г/дм ³ сахара при 20°С. Внесение винных дрожжей «France universal» (произв. Франция) 500 г/625 дм ³ , внесение в сусло 0,6 г/дм ³ (NH ₄) ₂ PO ₄ (Sigma, USA)	
9. Дображивание в течение 15 сут.		9. Внесение сахара (сахарный сироп 80%) до концентрации 150 г/дм ³ , дображивание в течение 30 сут.	
10. Осветление отстаиванием (24 ч), отделение осадка		10. Осветление отстаиванием (24 ч), отделение осадка	
11. Фильтрация виноматериала (если требуется), хранение в закупоренных стеклянных бутылках при 4°С		11. Фильтрация виноматериала (если требуется), хранение в закупоренных стеклянных бутылках при 4°С	

Содержание взвесей в образцах сусла определяли гравиметрически, отделяя взвеси центрифугированием.

Содержание взвесей рассчитывали по формуле:

$$C = (m_2 - m_1) \cdot 100/V,$$

где m_2 — масса центрифужной пробирки с осадком взвесей, г; m_1 — масса пустой центрифужной пробирки, г; V — объем пробы, см³.

Для определения вязкости сусла образцы предварительно центрифугировали при 8000 об/мин. в течение 10 мин. Вискозиметр Оствальда термостатировали при 20°С, вносили 5 см³ анализируемого раствора и инкубировали 5 мин. Определяли время истечения раствора в двух повторностях.

Вязкость образцов сусла определяли, исходя из калибровочной кривой вискозиметра, построенной с использованием жидкостей с известной вязкостью.

Определение характеристик окраски вин проводилось спектрометрическим экспресс-методом по специальным формулам [6].

Физико-химические показатели образцов вин определяли в соответствии с государственными стандартами РФ [2]. Массовую концентрацию сахаров в виноматериалах определяли методом Шомоди-Нельсона [8]. Используемые в экспериментах реактивы были марки х.ч. и ч.д.а «Диам», «Реахим», Helicon (Россия), Panreac (Испания).

Результаты и их обсуждение

В таблице 3 представлены результаты замеров выхода из плодовой мезги самотечных и прессовых фракций сусла в процессе изготовления вин. Показан выход сусла в дм³ в пересчете на 1 т сырья. Стоит также заметить, что в ходе эксперимента использовалась мезга, разбавленная водой, по причине чрезмерной кислотности субстратов.

Т а б л и ц а 3

Выход сусла из мезги в ходе изготовления фруктовых вин

Субстрат	Ферментный препарат	Выход самотечных фракций сусла из 1 т мезги, дм ³	Выход прессовых фракций сусла из 1 т мезги, дм ³	Общий выход сусла из 1 т мезги, дм ³
Рябина сортовая	ВІ 3-227.7	358*	414	772,1
	Без ф.п.	228,9	524,3	753,3
Слива	ВІ 3-227.4	710,9	147,7	858,6
	Без ф.п.	242,7	316,4	559
Черная смородина	ВІ 3-227.4	618,2	242,7	860,9
	Без ф.п.	545,5	275	820,5

* Здесь и далее доверительный интервал соответствует точности прибора: ±5 дм³ (0,005 дм³ · 1000, где 1000 — поправочный коэффициент при пересчете на 1 т мезги).

Как видим из таблицы, использование ферментных препаратов в технологии приготовления фруктовых вин заметно увеличило выход самотечных, наиболее ценных фракций суслу. Общий выход суслу также возрос, но этот показатель сглажен большим выходом прессовых фракций из образцов мезги, не обработанной ферментными препаратами.

В таблице 4 представлены результаты, полученные в результате измерения относительной вязкости суслу из различных видов сырья и количества в нем взвесей.

Т а б л и ц а 4

Физические свойства полученного плодового суслу

Ферментный препарат, используемый в процессе настаивания суслу на мезге	Показатели самотечных фракций суслу		Показатели прессовых фракций суслу	
	вязкость суслу, сПз	массовая концентрация взвесей в сусле, г/100 см ³	вязкость суслу, сПз	массовая концентрация взвесей в сусле, г/100 см ³
<i>Рябина сортовая</i>				
ВІ 3-227.7	0,28 ± 0,021	1,03 ± 0,11	0,39 ± 0,031	2,03 ± 0,14
Без ф.п.	0,33 ± 0,021	1,184 ± 0,12	0,46 ± 0,038	2,18 ± 0,15
<i>Слива желтая</i>				
ВІ 3-227.4	0,74 ± 0,035	1,93 ± 0,12	1,06 ± 0,1	2,93 ± 0,17
Без ф.п.	0,79 ± 0,041	2,17 ± 0,13	1,11 ± 0,13	3,17 ± 0,16
<i>Черная смородина</i>				
ВІ 3-227.4	0,31 ± 0,025	1,47 ± 0,12	0,43 ± 0,034	2,47 ± 0,19
Без ф.п.	0,38 ± 0,026	1,87 ± 0,13	0,53 ± 0,042	2,87 ± 0,15

Преимуществами ферментативной предобработки сырья относительно неферментированных образцов стали более низкая вязкость, объяснимая меньшим содержанием в сусле биополимеров, а также снижение концентрации взвесей в ферментированном сусле.

Выбранный для обработки черной смородины и сливы ферментный препарат ВІ 3-227.4 характерен выраженными β-глюкозидазной и пектин-лиазной активностями и позволяет добиться видимого разжижения богатых пектиновыми веществами субстратов (3–8% пектиновых веществ от массы сырого вещества) в короткий срок. Для ферментативной обработки рябины, содержащей комплекс целлюлозы и гемицеллюлоз, целесообразно использовать ферментный препарат ВІ 3-227.7, отличающийся набором соответствующих активностей, а также включающий в себя пектинлиазу. Качественные характеристики полученных виноматериалов представлены в таблице 5.

По результатам физико-химической оценки образцов виноматериалов можно судить о целесообразности применения ферментных комплексов с точки зрения изменения качества получаемого продукта. Ферментированные вина обладают более

Физико-химические характеристики полученных фруктовых вин

Показатель	Образцы фруктовых вин					
	сухое вино, рябина сортовая		сладкое вино, слива желтая		сладкое вино, черная смородина	
	В1 3-227.7	Без ф.п.	В1 3-227.4	Без ф.п.	В1 3-227.4	Без ф.п.
Объемная доля этилово- го спирта, % об.	12,70 ± 0,40	12,70 ± 0,30	13,53 ± 0,30	13,50 ± 0,55	14,44 ± 0,30	14,40 ± 0,40
Массовая концентрация приведенного экстракта, г/дм ³	13,53 ± 1,03	13,53 ± 0,90	13,53 ± 0,80	13,57 ± 0,77	14,44 ± 0,69	14,45 ± 1,09
Массовая концентрация сахаров, г/дм ³	0,38 ± 0,07	0,37 ± 0,06	100 ± 3,1	101 ± 3,5	100 ± 2,80	101,5 ± 3,09
Массовая концентрация титруемых кислот, г/дм ³	5,33 ± 0,24	5,39 ± 0,29	6,63 ± 0,36	6,72 ± 0,29	7,80 ± 0,33	7,87 ± 0,36
Массовая концентрация летучих кис- лот в пересче- те на уксусную кислоту, г/дм ³	0,48 ± 0,013	0,55 ± 0,015	0,38 ± 0,012	0,43 ± 0,014	0,25 ± 0,010	0,34 ± 0,014
Общее содер- жание SO ₂ , мг/дм ³	100 ± 9,98	101,8 ± 9,50	113 ± 10,18	112,6 ± 9,67	116 ± 9,30	117 ± 11,50
Содержание свободного SO ₂ , мг/дм ³	44,2 ± 2,31	44,8 ± 2,66	67,8 ± 3,51	67,6 ± 3,20	69,6 ± 2,90	70,2 ± 2,88
Интенсив. цвета	1,967 ± 0,023	1,067 ± 0,025	0,179 ± 0,006	0,121 ± 0,003	6,283 ± 0,230	6,117 ± 0,220
Оттенок	0,83 ± 0,05	0,73 ± 0,05	2 ± 0,10	1,96 ± 0,09	0,93 ± 0,09	0,92 ± 0,09

насыщенным цветом; кроме того, в опытных образцах виноматериалов было зафиксировано незначительное снижение концентрации летучих кислот, предельное содержание которых в продукте строго регламентировано.

Увеличение интенсивности цвета образцов фруктовых вин, изготовленных по схемам, включающим в себя ферментативную обработку мезги, происходит благодаря мацерирующему эффекту мультиферментных комплексов.

Применение новых мультиферментных комплексов позволяет более полно раскрыть свойства, присущие различному плодovому и ягодному сырью. Образцы плодovых вин, полученных с помощью ферментных препаратов, обладали более ярким ароматом и полным насыщенным вкусом по сравнению с контрольными.

Выводы

В лабораторных условиях был изготовлен ряд образцов фруктовых вин, в технологию которых была включена стадия мацерации в присутствии новых ферментных препаратов, сочетающих в себе целлюлолитические, гемицеллюлолитические и пектинлиазную активности, соотношение которых определило их специфичность для используемого плодovого сырья. В результате удалось увеличить выход продукта из плодovой мезги и получить легкоосветляемые вина с меньшим содержанием летучих кислот и повышенной интенсивностью окраски. В ферментированном сусле было зафиксировано меньшее содержание взвесей по сравнению с контрольными образцами (без фермента), опытные образцы сусла отличались меньшей вязкостью. Ферментативная обработка мезги позволила улучшить органолептические характеристики плодovых вин.

Полученные в ходе проведенной работы данные говорят об эффективности использования мультиферментных комплексов нового поколения в технологии фруктовых вин.

Библиографический список

1. Агеева Н.М., Маркосов В.А. Влияние ферментных препаратов на состав ароматообразующих компонентов в красных столовых винах // Журнал «Виноделие и Виноградарство». 2013. № 3. С. 19–22.
2. Аштакин В.В. Контроль качества продукции физико-химическими методами. М.: ДеЛи принт. 2005. Т. 4. С. 85–95.
3. Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н. и др. Создание комплексных ферментных препаратов пектиназ и целлюлаз для переработки свекловичного жома. // Журнал «Прикладная биохимия и микробиология». 2012. Т. 48. № 5. С. 543.
4. Волчок А.А., Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Синецын А.П. Ферментные комплексы нового поколения для соковой промышленности // Журнал «Биотехнология». 2013. № 5. С. 78–89.
5. Волчок А.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Щербаков С.С., Синецын А.П., Бушина Е.В. Использование ферментных комплексов нового поколения для обработки различных плодovо-ягодных субстратов // Журнал «Виноделие и Виноградарство». 2012. № 1. С. 20–21.
6. Мехузла Н.А. Сборник международных методов анализа и оценки вин и сусел. М.: «Пищевая промышленность», 1993. 319 с.
7. Liew Abdullah A.G., Sulaiman N.M., Aroua M.K., Megat Mohd Noor M.J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. Journal of Food Engineering. 2007. 81. P. 65–71.
8. Nelson N.J. Biol. Chem. 1944. 153. P. 375–379.
9. Ranveer Singh Jayani, Shivalika Saxena, Reena Gupta. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry. 2005. 40. P. 2931–2944.

THE USE OF NEW MULTI-ENZYME COMPLEXES IN THE PRODUCTION OF FRUIT WINES

A.A. VOLCHOK¹, A.M. ROZHKOVA¹, I.N. ZOROV¹,
S.S. SHCHERBAKOV³, A.P. SINITSYN^{1,2}

(¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS; ²Lomonosov Moscow State University;
³Russian Timiryazev State Agrarian University)

*This work presents the study results on the impact of new multi-enzymatic preparations on the final product quality when they are used in the production of the wort for fruit wines. The studied enzymes were developed during selection and gene engineering from micro-fungus *Penicillium verruculosum* which secretes efficient cellulasic complex.*

This article provides the main characteristics of multi-enzyme complexes and results of in-lab fruit-wine production with enzymatic agents use, which provides an opportunity for the use of the enzymes in the industrial-scale production. In the course of the experiment the yield of must, its relative viscosity and suspended particles content in fermented samples were registered. A number of physical and chemical parameters and color intensity characteristic of final beverage were recorded.

Obtained data clearly shows high efficiency of usage of new-generation enzymatic agents in fruit-wine industry.

*Key words: enzyme preparations, enzymatic treatment, *Penicillium verruculosum*, fruit-wines, wine making.*

Волчок Анастасия Александровна — асп., и. о. м. н. с. Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Института биохимии им. А.Н. Баха (119071, Москва, Ленинский проспект 33, стр. 2; тел.: (906) 783-17-44; e-mail: pank-net@mail.ru).

Рожкова Александра Михайловна — к. х. н., ст. науч. сотр. Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Института биохимии им. А.Н. Баха (119071, Москва, Ленинский проспект 33, стр. 2; тел.: (910) 464-47-91; e-mail: amrojkova@yahoo.com).

Зоров Иван Никитич — к. х. н., ст. науч. сотр. Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Института биохимии им. А.Н. Баха (119071, Москва, Ленинский проспект 33, стр. 2; тел.: (903) 687-44-00; e-mail: inzorov@mail.ru).

Шербаков Сергей Сергеевич — д. т. н., проф. кафедры виноградарства и виноделия РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, Тимирязевская 49; тел.: (910) 456-35-67; e-mail: sov06@yandex.ru).

Синицын Аркадий Пантелеймонович — д. х. н., зав. лабораторией биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Института биохимии им. А.Н. Баха (119071, Москва, Ленинский проспект 33, стр. 2); зав. лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета, МГУ имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы 1/3; тел.: (916) 611-48-57; e-mail: apsinityn@gmail.com).

Volchok Anastasiya Alexandrovna — PhD-student, the acting researcher, A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS (119071, Moscow, Leninskiy prospect 33/2b, tel.: +7 (906) 783-17-44; e-mail: nanka-net@mail.ru).

Rozhkova Aleksandra Mikhailovna — PhD in Chemical Sciences, leading researcher, A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS (119071, Moscow, Leninskiy prospect 33/2b, tel.: +7 (910) 464-47-91; e-mail: amrojkoval@yahoo.com).

Zorov Ivan Nikitich — PhD in Chemical Sciences, leading researcher, A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS (119071, Moscow, Leninskiy prospect 33/2b, tel.: +7 (903) 687-44-00; e-mail: inzorov@mail.ru).

Shcherbakov Sergey Sergeevich — Doctor of Technical Sciences, Professor, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; tel.: +7 (910) 456-35-67; e-mail: sov06@yandex.ru).

Sinitsyn Arkadiy Panteleimonovich — Doctor of Chemical Sciences, Head of the Laboratory of Biotechnology, A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS (119071, Moscow, Leninskiy prospect 33/2b); Head of the Laboratory of Physics and Chemistry of Polymer Enzymic Transformation, The Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1/3; tel.: +7 (916) 611-48-57; e-mail: apsinityn@gmail.com).