

葡萄酒中溶菌酶测定方法的研究

徐 丽, 宋才湖, 谭文琦, 吕 宁*, 籍奇岩
(青岛海关技术中心, 青岛 266001)

摘 要: **目的** 探究影响葡萄酒中溶菌酶的测定因素。**方法** 应用标准 SN/T 4675.12—2016《出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法》检测葡萄酒中溶菌酶含量。通过在白葡萄酒中添加不同浓度水平的单宁, 考察单宁对溶菌酶测定的影响。**结果** 在白葡萄酒样品中添加浓度水平为 0.5 g/L 的单宁, 溶菌酶回收率为 35.4%~39.8%; 添加浓度水平 1.0 g/L 的单宁, 溶菌酶回收率为 12.7%~13.9%; 添加浓度水平 3.0 g/L 以上的单宁, 溶菌酶未检出。样品中的溶菌酶含量随单宁添加量的增加而降低。**结论** 红葡萄酒中的单宁会影响溶菌酶的测定结果。

关键词: 葡萄酒; 溶菌酶; 单宁; 高效液相色谱法

Research of the determination of lysozyme in the wine

XU Li, SONG Cai-Hu, TAN Wen-Qi, LV Ning*, JI Qi-Yan

(Technical Center of Qingdao Customs, Qingdao 266001, China)

ABSTRACT: Objective To explore the factors affecting the determination of lysozyme in wine. **Methods** The content of lysozyme in wine was detected by liquid chromatography with the standard SN/T 4675.12—2016 *Determination of lysozyme in export wine-Liquid chromatography*. The effect of tannin on the determination of lysozyme in white wine was investigated by adding different concentration levels of tannin. **Results** The recoveries of lysozyme were 35.4%–39.8% when tannin concentration of 0.5 g/L was added to the white wine samples. The lysozyme recoveries were 12.7%–13.9% when 1.0 g/L tannin was added. Lysozyme was not detected when tannin was added above 3.0 g/L. The content of lysozyme in the samples was decreased with the increase of tannin content.

Conclusion The tannin in red wine can affect the results of lysozyme determination.

KEY WORDS: wine; lysozyme; tannin; high performance liquid chromatography

0 引 言

葡萄酒是以新鲜的葡萄或葡萄汁为原料, 经过全部或部分发酵酿制而成的酒精饮品。葡萄酒历史悠久、营养丰富, 深受人们的喜爱^[1]。葡萄酒除具有可预防心脑血管疾病的功效外, 还具有阻碍血小板凝集、防止低密度脂蛋白的氧、活性氧消除等功能兼具助消化、滋补与防治贫血、

抗癌、抗炎症、抗神经退行性疾病等保健作用^[2]。

溶菌酶是在生物体内广泛分布的一种能水解微生物细胞壁黏多糖的碱性水解酶, 具有抗菌、消炎和抗病毒等作用^[3], 主要来源是蛋清, 作为一种天然的防腐剂, 溶菌酶已广泛应用于水产、食品、葡萄酒及饮料等行业^[4]。在葡萄酒酿造过程中通常加入溶菌酶与二氧化硫联合作用, 溶菌酶可以提高酒精发酵后葡萄酒蛋白质稳定性, 对苹果

基金项目: 食品安全标准体系系统评估研究(2019YFC1605200)、国家十三五重点研发计划(2019YFC1605205)

Fund: Supported by System Evaluation of Food Safety Standard System (2019YFC1605200), and National 13th Five-Year Plan for Key R&D (2019YFC1605205)

*通信作者: 吕宁, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全, 色谱分析。E-mail: 12216226@qq.com

*Corresponding author: LV Ning, Senior Engineer, Technical Center of Qingdao Customs, Qingdao 266001, China. E-mail: 12216226@qq.com

酸、乳酸、革兰氏阳性菌起到抗菌抑制作用,可降低挥发酸和生物胺的生成,同时还能提高葡萄酒泡沫的持久性^[5],提高酒体的品质。但是溶菌酶的使用存在一些争议,因为研究显示,溶菌酶有可能会引起婴幼儿等易过敏人群的过敏反应^[6-7]。GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定溶菌酶在发酵酒中的最大用量为500 mg/kg^[8]。目前,我国检测葡萄酒中溶菌酶的标准仅有SN/T 4675.12—2016《出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法》,该标准修改采用自国际葡萄与葡萄酒组织标OIV-MA-AS315-14《Dosage du lysozyme dans le vin par HPLC》,两标准在技术内容上保持一致。在应用上述两项标准的实际检测过程中发现,红葡萄酒的添加回收率偏低,白葡萄酒、红葡萄酒的检测存在明显差异。庞世琦等^[9]、葛淑丽等^[10]的研究也表明,红葡萄酒在检测过程中回收率仅有60%左右,对于原因的探究较少。

红葡萄酒与白葡萄酒的酿造过程类似,只是红葡萄酒在发酵时葡萄果皮、果肉、果核在一起共同发酵,酒精发酵作用和固体物质的浸渍作用同时存在。红葡萄酒的成分较复杂,除含量最多的水和发酵酒精外还含有单宁、有机酸等上千种物质。单宁是白葡萄酒与红葡萄酒的主要差异性成分之一,它是葡萄酒中重要的酚类物质,有沉淀蛋白质、提高结构感、稳定色素、抗氧化、抗自由基、抗菌作用^[11-13]。有研究^[14]按照单宁的化学结构,将酚类分为水解单宁和缩合单宁。葡萄酒中的水解单宁主要是发酵储存过程中橡木桶通过浸渍带入葡萄酒中^[15],而缩合单宁主要来源于葡萄的果皮、果籽和果梗^[16-17]。酿造工艺的不同是造成白葡萄酒的单宁含量远低于红葡萄酒中的单宁含量的重要原因之一。红葡萄酒中的单宁含量大约在1000~5000 mg/L。通过分析认为红葡萄酒溶菌酶测定中回收率低很可能是由其中含有的单宁引起。本研究通过实验验证单宁对溶菌酶的影响,以期建立葡萄酒中溶菌酶更加完善的检测方法,满足食品或专业实验室对葡萄酒中溶菌酶检测的需求。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乙腈、盐酸(分析纯,美国 Mreda 公司);酒石酸、无水乙醇、三氟乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);溶菌酶标准物质(CAS: 12650-88-3,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

1100 高效液相色谱仪(配备荧光检测器,美国 Agilent 公司);X205 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);BASIC 涡旋振荡器(德国 IKA 公司);KQ-500DE 型超声水浴锅(昆山市超声仪器公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 溶菌酶的测定

参考 SN/T 4675.12—2016《出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法》进行测定,检测器选用荧光检测器。

1.2.2 单宁对葡萄酒中溶菌酶测定的影响

选取回收率达到90%以上的白葡萄酒,做不同水平的单宁添加后,再进行溶菌酶回收率实验,每个水平添加样品进行6次独立平行测定。

2 结果与分析

2.1 不同葡萄酒中溶菌酶回收率

选用西拉干红葡萄酒(R1)、赤霞珠干红葡萄酒(R2)、黑皮诺干红葡萄酒(R3)、梅洛干红葡萄酒(R4)、雷司令干白葡萄酒(W1)、霞多丽干白葡萄酒(W2)、甜白葡萄酒(W3)、起泡葡萄酒(W4)作为代表样品,选择3个不同水平进行添加实验,考察不同品种葡萄酒的溶菌酶回收率。每个水平添加样品进行6次单独平行测定。添加水平为500 mg/L的样品添加色谱图见图1,添加回收率见表1。

结果显示,白葡萄酒与起泡酒的回收率在90.4%~97.2%之间,相对标准偏差为0.96%~1.43%,均满足实验室检测要求,而红葡萄酒的回收率较低,均不超过30%,这与庞世琦^[9]的研究结果一致;不同品种的红葡萄酒的回收率也存在着差异:在添加水平为200、500 mg/L时,黑皮诺干红葡萄酒、梅洛干红葡萄酒的回收相对较高,西拉干红葡萄酒、赤霞珠干红葡萄酒完全没有回收,出现这一现象可能与不同品种葡萄酒中的单宁含量有关。

2.2 单宁对葡萄酒中溶菌酶测定的影响

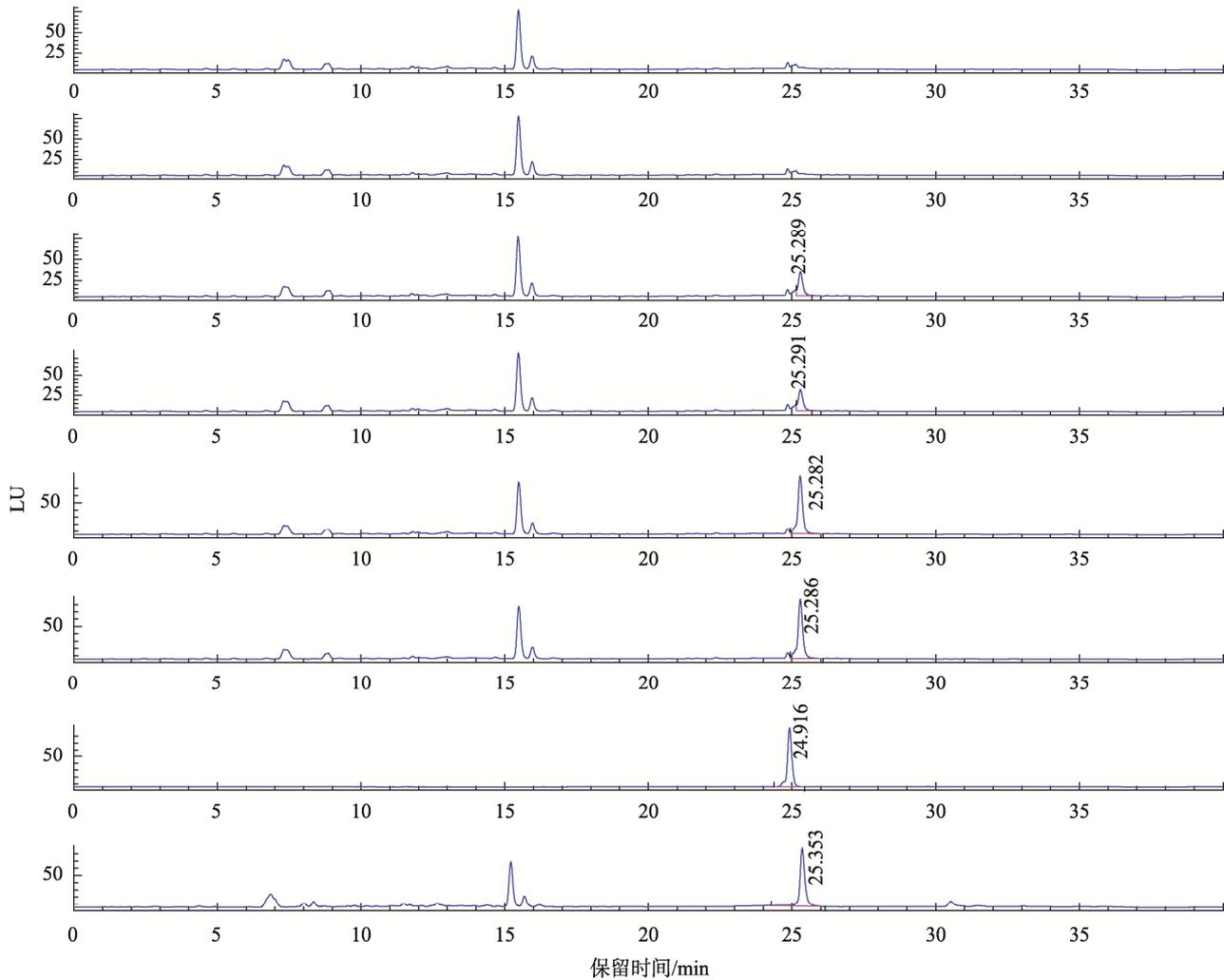
为验证单宁对葡萄酒中溶菌酶测定的影响,同一溶菌酶添加浓度500 mg/L下样品色谱图见图2,添加回收率见表2。

结果显示,添加0.5 g/L的单宁,回收率为35.4%~39.8%,添加1.0 g/L的单宁后,回收率为12.7%~13.9%;添加3.0 g/L以上的单宁,溶菌酶完全未检出。

以上结果表明,单宁确实会对葡萄酒中溶菌酶的测定带来影响,使结果偏低。这与红葡萄酒中溶菌酶回收率偏低的现象一致,说明葡萄酒中单宁影响了溶菌酶的测定。

3 结论与讨论

采用 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中对发酵酒的限量要求,配合溶菌酶的超量和超范围使用监管工作,需要科学的检验方法标准支持。本研究确认单宁对溶菌酶测定有影响,是造成红葡萄酒中溶菌酶回收率低的重要因素,为相关研究和标准修订提供了一个思路。



注: 色谱图自上而下分别为 R1、R2、R3、R4、W1、W2、W3、W4。

图1 葡萄酒样品添加色谱图

Fig.1 Chromatograms of wine sample addition

表1 葡萄酒中的溶菌酶回收率和相对标准偏差(n=6)

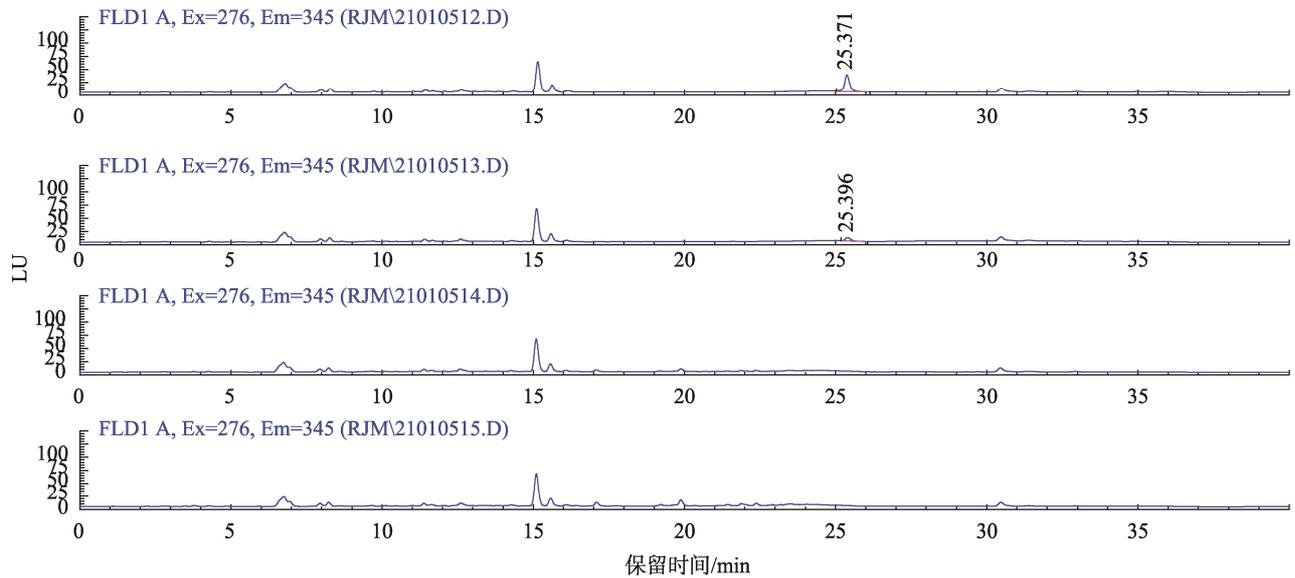
Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of lysozyme in wine (n=6)

添加水平 /(mg/L)	样品	本底值 /(mg/L)	平均测定值 /(mg/L)	回收率 /%	RSD/%
	R1	ND	ND	ND	—
	R2	ND	ND	ND	—
	R3	ND	ND	ND	—
	R4	ND	ND	ND	—
50	W1	ND	45.2	90.4	1.25
	W2	ND	46.8	93.6	0.96
	W3	ND	45.5	91.0	1.04
	W4	ND	46.1	92.2	1.15
200	R1	ND	ND	ND	—
	R2	ND	ND	ND	—
	R3	ND	22.5	11.2	2.02

表1(续)

添加水平 /(mg/L)	样品	本底值 /(mg/L)	平均测定值 /(mg/L)	回收率 /%	RSD/%	
	R4	ND	10.3	5.15	2.33	
	W1	ND	187	93.5	1.43	
	W2	ND	192	96.0	1.12	
	W3	ND	182	91.0	0.96	
	W4	ND	181	90.5	1.33	
	500	R1	ND	ND	ND	—
		R2	ND	ND	ND	—
		R3	ND	150	30.0	1.87
R4		ND	106	21.2	1.62	
	W1	ND	486	97.2	1.01	
	W2	ND	484	96.8	1.10	
	W3	ND	472	94.4	1.26	
	W4	ND	464	92.8	1.22	

注: ND 表示未检出; —表示未计算。



注: 自上而下单宁添加量分别为 0.5、1.0、3.0、5.0 g/L。

图 2 葡萄酒样品添加色谱图

Fig.2 Chromatograms of wine sample addition

表 2 白葡萄酒中添加单宁后的溶菌酶回收率和相对标准偏差(n=6)

Table 2 Recovery and relative standard deviations of lysozyme in white wine with tannin addition (n=6)

添加单宁 /(g/L)	样品	添加值 /(mg/L)	平均测定值 /(mg/L)	回收率 /%	RSD/%
0.5	W1	500	177	35.4	1.16
	W3	500	199	39.8	1.32
1.0	W1	500	63.6	12.7	2.21
	W3	500	69.5	13.9	2.15
3.0	W1	500	ND	ND	—
	W3	500	ND	ND	—
5.0	W1	500	ND	ND	—
	W3	500	ND	ND	—

注: ND 表示未检出; —表示未计算。

参考文献

[1] 高尧来, 温其标, 张福艳. 葡萄酒中的多酚类物质及其保健功能[J]. 食品与发酵工业, 2002, (8): 68–72.
GAO YL, WEN QB, ZHANG FY. Polyphenols in wine and their health functions [J]. Food Ferment Ind, 2002, (8): 68–72.

[2] 陈健敏, 黄子尧, 黄玮玥, 等. 2 种品牌不同价格葡萄酒中酚类物质及其抗氧化特性[J]. 南昌大学学报(工科版), 2019, 41(2): 113–119.
CHEN JM, HUANG ZR, HUANG WY, *et al.* Phenols and antioxidant properties in two different brands of wine [J]. J Nanchang Univ (Eng Sci Ed), 2019, 41(2): 113–119.

[3] 卢冬梅, 王霆. 溶菌酶的抗病毒作用及其抗艾滋病毒应用[J]. 广东

药学, 2005, (5): 62–64.

LU DM, WANG T. Antiviral effect and anti-HIV application of lysozyme [J]. Guangdong Pharm J, 2005, (5): 62–64.

[4] 赵红艳, 王爱平. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. 职业与健康, 2008, 24(1): 74–75.
ZHAO HY, WANG AP. Application of lysozyme in the food industry [J]. Occup Health, 2008, 24(1): 74–75.

[5] 倪琰, 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.
NI Y, ZHONG LR. Application of lysozyme in the wine production [J]. Sino-Overseas Grapevine Wine, 2003, (5): 66–67.

[6] 宁亚维, 杨正, 马梦戈, 等. 食品中常见过敏原及检测技术研究进展[J/OL]. 食品科学, 1-13[2021-03-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201120.1515.089.html>.
NING YW, YANG Z, MA MG, *et al.* Research progress of common allergens and detection technology in food [J/OL]. Food Sci, 1-13[2021-03-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20201120.1515.089.html>.

[7] 葡萄酒中蛋清溶菌酶可能引起过敏[EB/OL]. [2012-04-17]. <http://www.9928.tv/news/jiuwenhua-jiuzhishi/63712.html>. [2021-01-19].
Egg white lysozyme in wine may cause allergies [EB/OL]. [2012-04-17]. <http://www.9928.tv/news/jiuwenhua-jiuzhishi/63712.html>. [2021-01-19].

[8] 国家食品药品监督管理局食品安全监管司. 食品添加剂使用标准[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.
Department of Food Safety Supervision, State Food and Drug Administration. Food additives standard [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2011.

[9] 庞世琦, 刘青, 刘朝霞, 等. 高效液相色谱法测定葡萄酒中溶菌酶的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3067–3071.
PANG SQ, LIU Q, LIU ZX, *et al.* Determination of lysozyme in wines by

- high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(8): 3067–3071.
- [10] 葛淑丽, 杨健, 赵琴, 等. 发酵酒中溶菌酶的快速检测研究[J]. *食品与发酵科技*, 2018, 54(3): 106–110.
GE SL, YANG J, ZHAO Q, *et al.* Rapid detection of lysozyme in fermented alcoholic drink by high performance liquid chromatography [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2018, 54(3): 106–110.
- [11] 李华. 葡萄酒中的丹宁[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2002, (3): 137–141.
LI H. Tannins in wines [J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agri For (Nat Sci Ed)*, 2002, (3): 137–141.
- [12] 袁缓缓, 王晓宇, 陈彤国, 等. 红葡萄酒涩感研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2019, 45(13): 269–274.
YUAN HH, WANG XY, CHEN TG, *et al.* Research progress on red wine astringency [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2019, 45(13): 269–274.
- [13] 田超, 侯红萍. 红葡萄酒发酵前处理技术研究进展[J]. *酿酒科技*, 2017, (11): 103–108.
TIAN C, HOU HP. Research progress in pretreatment of grape before fermentation [J]. *Liq Mak Sci Technol*, 2017, (11): 103–108.
- [14] 回学宽, 王艳丽, 祝贺, 等. 葡萄酒中酚类物质的研究进展[J]. *中国果菜*, 2019, 11(39): 66–67.
HUI XK, WANG YL, ZHU H, *et al.* Progress in polyphenol of wines [J]. *China Fruit Veget*, 2019, 11(39): 66–67.
- [15] 李辉, 李超, 张梦园, 等. 葡萄酒中单宁涩感评价及结构分析研究进展[J]. *中国酿造*, 2017, 36(6): 14–18.
LI H, LI C, ZHANG MY, *et al.* Research progress in astringency evaluation and structure analysis of tannin in wine [J]. *China Brew*, 2017, 36(6): 14–18.
- [16] PRIEUR C, RIGAUD J, CHEYNIER V, *et al.* Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 781–784.
- [17] SOUQUET JM, CHEYNIER V, BROSSAUD F, *et al.* Polymeric proanthocyanidins from grape skins [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 509–512.

(责任编辑: 王欣)

作者简介



徐丽, 工程师, 主要研究方向为食品检测, 色谱分析。
E-mail: sdxuli@sina.com.cn

吕宁, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全, 色谱分析。
E-mail: 12216226@qq.com