

# 葡萄酒发酵过程中白藜芦醇含量变化的研究

高年发, 陈志頔, 姜 丽, 张 健

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222)

**摘 要:** 跟踪 2005 年河北沙城、昌黎、天津蓟县和宁夏御马葡萄产区的干红葡萄酒生产过程, 分别采集以赤霞珠葡萄为原料的不同发酵时期的样品, 用高效液相色谱检测白藜芦醇含量, 研究葡萄酒发酵过程中白藜芦醇含量的变化规律。结果表明, 尽管不同产地在发酵过程中生成的白藜芦醇含量有所不同, 但都随着果胶酶添加和酵母发酵的进行, 白藜芦醇总含量逐渐上升, 至主发酵时白藜芦醇总含量达到最高, 进入苹果酸-乳酸发酵后, 白藜芦醇含量有所下降并维持一定的水平。

**关键词:** 葡萄酒; 发酵过程; 白藜芦醇; 含量变化

中图分类号: TS262.6; TQ920; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2006) 12- 0033- 04

## Study on the Change of Resveratrol Content in the Fermentation of Grape Wine

GAO Nian-fa, CHEN Zhi-di, JIANG Li and ZHANG Jian

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, Bioengineering College of Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

**Abstract:** Through the tracking of dry red claret production process in Hebei Shacheng, Changli, Tianjin Jixian and Ningxia Yuma in 2005 and by gathering claret samples (Cabernet sauvignon as raw materials) in different fermentation periods, resveratrol content were measured by HPLC and the content change rules were studied. The results indicated that resveratrol content in different producing areas varied during the fermentation and it increased gradually along with the fermentation and the addition of pectase and it reached the highest level up to chief fermentation, then it decreased and maintained a certain level till malolactic fermentation.

**Key words:** grape wine; fermentation process; resveratrol; content change

葡萄酒具有很高的营养价值, 其含有糖类、果胶质、醇类、有机酸、无机物质、微量元素和几十种氨基酸和多种维生素, 还含有许多对人体有益的物质, 是其他食品没有的, 如粘液质和白藜芦醇, 其中白藜芦醇更是最近几年来全世界研究的热点, 它被看好为治疗癌症和心血管疾病最具前途的新型药品, 美国政府已将“葡萄酒的保健效果”研究课题经费 200 万美元正式列入国家预算, 这是第一次酒类的正面效果被作为正式研究课题并由政府投资<sup>[1]</sup>。

白藜芦醇广泛存在于葡萄皮中, 是植物体在应激霉菌感染和作用时产生的一种非类黄酮植物抗毒素, 以反式白藜芦醇苷、顺式白藜芦醇苷、反式白藜芦醇、顺式白藜芦醇 4 种形式同时存在于天然的葡萄和葡萄酒中, 且均有抗氧化效能。反式醇(苷)在紫外照射下可以等摩尔转化为顺式体, 但顺式异构体光敏性强、极不稳定

(Trela, 1995), 所以自然界中的白藜芦醇均以反式异构体形态存在, 顺式体非常少。国外报道葡萄酒中白藜芦醇含量受到葡萄品种、葡萄皮总酚含量、病害侵染、果胶酶使用和酿造方式等众多因素的影响, 其中葡萄品种和病害侵染的影响尤为明显<sup>[2,3]</sup>。葡萄酒酿造过程中白藜芦醇总含量是如何变化的? 有什么规律? 它受葡萄品种、葡萄产地、果胶酶使用、酿造工艺等又有什么影响等方面的研究未见详细的报道, 2004 年和 2005 年, 笔者跟踪研究河北沙城、昌黎、天津蓟县和宁夏御马葡萄产区的干红葡萄酒生产过程, 分别采集以山葡萄、赤霞珠和梅鹿辄葡萄为原料的不同发酵时期的样品, 用高效液相色谱检测白藜芦醇含量, 研究葡萄酒发酵过程中白藜芦醇含量的变化以及如何受生产工艺的影响。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 实验材料与amp;设备

收稿日期: 2006-07-10

作者简介: 高年发(1945-)男, 江苏省人, 教授、博士生导师, 主要从事发酵工程的教学科研工作。

实验材料:反式白藜芦醇(Sigma),反式白藜芦醇苷(天津尖峰药业),娃哈哈纯净水,色谱纯乙腈,色谱纯甲醇;检测样品取自沙城、昌黎、蓟县和宁夏4个葡萄酒产地(2005年),包括山葡萄、赤霞珠和梅鹿辄3个品种。

检测设备:高效液相色谱仪(安杰伦公司),色谱柱: C<sub>18</sub> 250×4.6 mm。

## 1.2 实验方法

色谱条件1为<sup>[89]</sup>:流动相为40%Vol的乙腈水溶液,流速0.6 mL/min,柱温25℃,检测波长为306 nm,进样量20 μL。确立第2套高效液相色谱法(HPLC)测定葡萄酒中的白藜芦醇。

色谱条件2为<sup>[10~12]</sup>:流动相A为水,用磷酸调节pH值至2.4,流动相B为含20%Vol的乙腈溶液。起始为82%流动相A,18%流动相B;保持5~10 min时,流动相A为77%,流动相B为23%;15 min时流动相A为75%,流动相B为25%;20 min时流动相A为68%,流动相B为32%;30 min时流动相A为100%,流动相B为0%;35 min时流动相A为82%,流动相B为18%。流速为1 mL/min,柱温25℃,检测波长为306 nm,进样量20 μL。

确立的两种方法中,方法1用于测定反式醇(苷)向顺式结构转化的转化率曲线,然后由转化率方程再综合方法2,分别绘制出反式白藜芦醇苷、顺式白藜芦醇苷、反式白藜芦醇、顺式白藜芦醇的标准曲线。

试样采集方法:跟踪2005年河北沙城、昌黎、天津蓟县和宁夏御马葡萄产区的干红葡萄酒生产过程,分别采集葡萄汁以及主发酵中、主发酵结束时、苹果酸-乳酸发酵中和进入原酒陈酿时的酒样。

试样的预处理方法:10000 r/min离心15 min,0.45 μm膜过滤后直接进样。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱检测条件的确定

#### 2.1.1 色谱条件1下白藜芦醇标准曲线的绘制

将不同浓度的白藜芦醇溶液从低浓度到高浓度依次进样,计算各自峰面积(每个样平均进3次,取平均值),做各物质的(峰面积-浓度)标准曲线,结果见表1。

表1 色谱条件1下白藜芦醇定性定量实验结果

组分	保留时间 (min)	回归方程	R <sup>2</sup>
反式白藜芦醇苷	4.833	y=2E-08x-0.0046	0.9941
顺式白藜芦醇苷	5.33	y=6E-09x+0.0016	0.9992
反式白藜芦醇	9.845	y=2E-08x+0.0023	0.9983
顺式白藜芦醇	12.233	y=9E-09x+0.0009	0.9949

注: y: 峰面积(AU·S); x: 白藜芦醇的浓度(g/L)。

从表1中的线性回归方程可知,在实验样品的浓度

范围内,4种物质均线性关系良好,在该色谱条件下可以得到令人满意的结果,白藜芦醇及其异构体、衍生物共4种物质的相对标准偏差为1.9%~4.3%,回收率为96%~104.5%。

#### 2.1.2 转化率曲线的绘制

配制一定浓度的反式白藜芦醇、反式白藜芦醇苷溶液,在紫外灯下照射,使它们异构为白藜芦醇和白藜芦醇苷,每隔10 min取一次样进行检测,绘制出反式白藜芦醇的转化率曲线(图2)和反式白藜芦醇苷的转化率曲线(图1)。

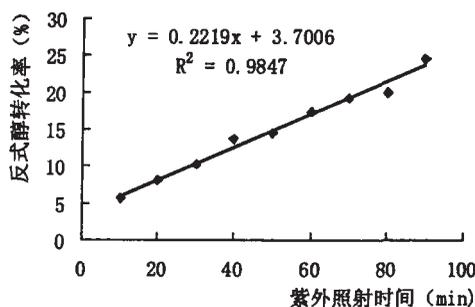


图1 反式醇的转化率曲线

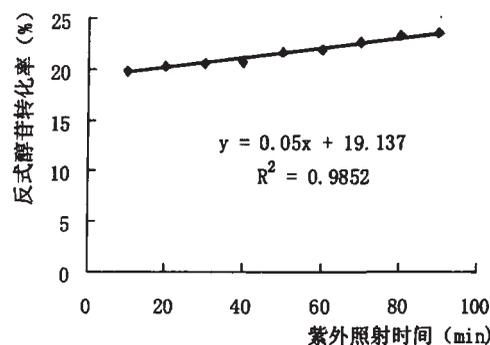


图2 反式醇苷的转化率曲线

#### 2.1.3 色谱条件2下白藜芦醇标准曲线的绘制

制备方法同2.1.1,在色谱条件2下白藜芦醇的标准曲线实验结果见表2。

表2 色谱条件2下白藜芦醇定性定量实验结果

组分	保留时间 (min)	回归方程	R <sup>2</sup>
反式白藜芦醇苷	14.700	Y=0.000005x-0.0005	0.9998
顺式白藜芦醇苷	22.076	Y=0.0000016x+0.0001	0.9827
反式白藜芦醇	24.498	Y=0.000004x+0.000011	0.9993
顺式白藜芦醇	25.713	Y=0.0000017x+0.0001	0.9831

注: y: 白藜芦醇的浓度(g/L); x: 峰面积(AU·S)。

从表2中的回归方程可知,在实验样品的浓度范围内可以得到令人满意的结果,相对标准偏差为1.2%~3.9%,回收率为95.5%~103.5%。

2.2 基地、工厂葡萄酒酿造过程中白藜芦醇的变化(品种为赤霞珠,2005年)

2.2.1 河北沙城产地(图 3~ 图 6)

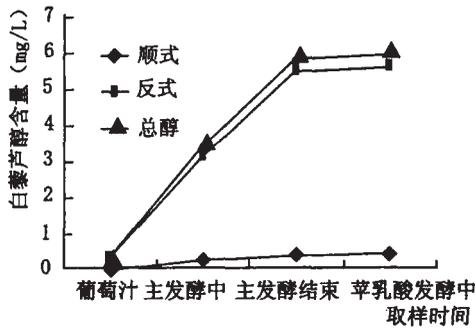


图 3 工厂发酵罐中白藜芦醇(苷)的变化

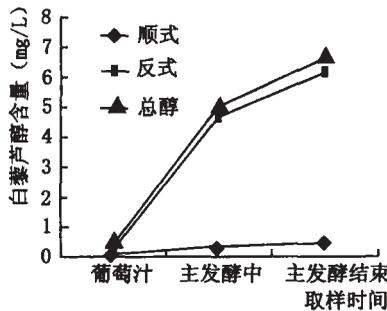


图 4 基地 1 号发酵罐中白藜芦醇(苷)的变化

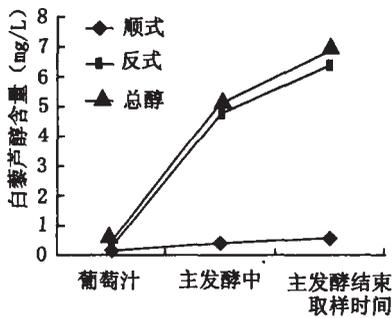


图 5 基地 4 号发酵罐中白藜芦醇(苷)的变化

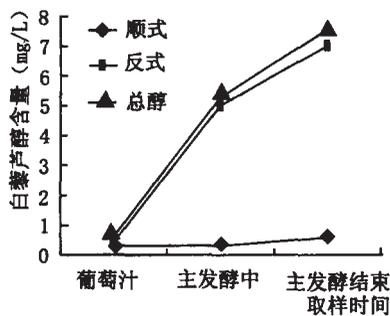


图 6 基地 5 号发酵罐中白藜芦醇(苷)的变化

2.2.2 宁夏产地(图 7, 图 8)

从图 3~ 图 8 中的结果可以看出: 不论是基地还是工厂, 或者是沙城还是宁夏, 在整个葡萄酒酿造过程中顺式白藜芦醇(苷)含量都很少, 反式白藜芦醇(苷)的含量及其变化趋势决定了总醇的含量及变化趋势。顺式白藜芦醇(苷)的含量在整个发酵过程中变化不明显。

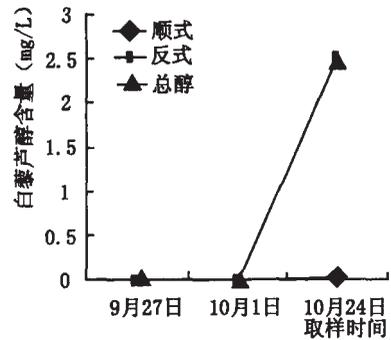


图 7 工厂发酵罐中白藜芦醇(苷)的变化

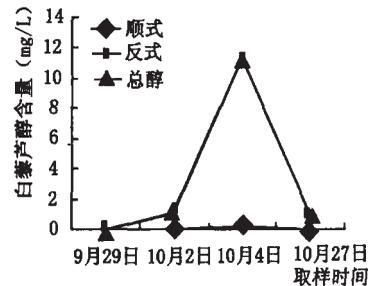


图 8 基地发酵罐中白藜芦醇(苷)的变化

因此在研究整个葡萄酒酿造过程中白藜芦醇变化时, 应分析比较白藜芦醇总醇的含量。

2.3 葡萄酒酿造过程中白藜芦醇(总醇)含量的变化(图 9, 葡萄品种为赤霞珠)

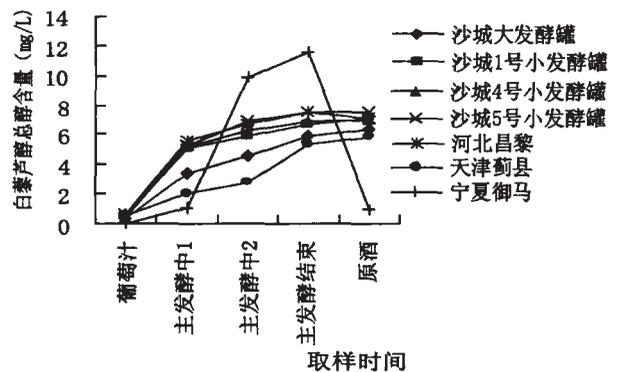


图 9 各产地葡萄酒酿造过程中白藜芦醇(总醇)含量的变化

从图 9 可看出, 尽管不同产地, 在发酵过程中生成的白藜芦醇含量有所不同, 但都随着果胶酶的添加和酵母发酵的进行, 白藜芦总醇含量逐渐上升, 至主发酵时白藜芦总醇含量达到最高, 进入苹果酸-乳酸发酵后, 白藜芦醇含量略有下降并维持一定的水平。这种变化规律可解释为: 当葡萄除梗破碎成汁时, 白藜芦醇(苷)及其衍生物是存在于葡萄皮和籽中与 - 葡萄糖苷、单宁及花青素等结合的非黄酮类的多酚化合物, 没有游离进入葡萄汁; 当添加果胶酶(葡聚糖酶)和酵母进行发酵时, 在酶解作用下, 使白藜芦醇(苷)及其衍生物的单体释放出来, 进而被发酵所生成的酒精反复萃取进入葡萄酒

中,随着酒精生成量的增加,它们的含量也增加;当主发酵完成,除去皮渣后进入苹果酸-乳酸发酵,由于轻度氧化的作用,白藜芦醇(苷)及其衍生物的含量略有下降并维持一定水平,若发酵条件控制合适,白藜芦(总)醇含量不会发生显著变化。

值得注意的是宁夏御马的检测结果,在发酵过程中白藜芦(总)醇最大峰值曾达到 11.52 mg/L,后发酵过程中(取样时忘了补加 SO<sub>2</sub>)使其损失殆尽,原酒中的含量仅为 0.91 mg/L。沙城地区 1 号、4 号和 5 号小发酵罐中的白藜芦(总)醇含量要明显高于大罐,这是由于小发酵罐中使用的是基地葡萄,其质量优于大发酵罐的缘故。

### 3 结论

3.1 灵活使用两种色谱检测方法来绘制准确的反式白藜芦醇苷、顺式白藜芦醇苷、反式白藜芦醇和顺式白藜芦醇的标准曲线。由于整个葡萄酒酿造过程中顺式白藜芦醇(苷)含量不仅很少,而且含量在整个发酵过程中变化不明显。因此在研究整个葡萄酒酿造过程中白藜芦醇变化时,应分析比较白藜芦醇总醇的含量。

3.2 尽管不同产地在发酵过程中生成的白藜芦醇含量有所不同,但都随着果胶酶的添加和酵母发酵的进行,白藜芦总醇含量逐渐上升,至主发酵时白藜芦总醇含量达到最高,进入苹果酸-乳酸发酵后,白藜芦醇含量有下降并维持一定的水平。

### 参考文献:

- [1] 赵光鳌,尹卓容,张继明,等.葡萄酒酿造学-原理及应用[M].北京:轻工业出版社,2001.
- [2] 陈曾三.葡萄酒功能性研究最新动向[J].酿酒,1998,(5): 53-55.
- [3] 刘树文,王华.葡萄与葡萄酒中白藜芦醇的研究进展[J].西北植物学报,1999,19(5): 144-148.
- [4] 李华.现代葡萄酒工艺学[M].西安:陕西人民出版社,2000.
- [5] 尉亚辉,刘兴旺,李华.白藜芦醇的研究进展[J].西北农业大学学报,1999,27(2): 188-195.
- [6] 于贞,张影陆,赵光鳌.葡萄酒中白藜芦醇的分析[J].工业微生物,2001,31(4): 34-36.
- [7] 闫静,王振月,刘丹宁,等.白藜芦醇及其甙的生物活性研究进展[J].中医药学报,2000,(2): 39-40.
- [8] 江文沁,沈金芳.白藜芦醇的药理活性及作用机制[J].药学进展,2003,27(3): 159-162.
- [9] 李记明,赵光鳌,等.干红葡萄酒中白藜芦醇的含量与分布实验研究[J].中外葡萄与葡萄酒,2004,(2): 8-10.
- [10] 李景明,倪元颖,蔡同一,梁学军.发酵工艺条件对葡萄酒中白藜芦醇的影响[J].工艺技术,2004,25(4): 113-114.
- [11] 韩雅珊,陈雷,戴蕴青.高效液相色谱法测定葡萄酒中的白藜芦醇[J].色谱,1999,17(4): 366-367
- [12] 王华,尉亚辉.葡萄酒中白藜芦醇的 HPLC 测定[J].西北农业大学学报,1999,(4): 83-86.

(上接第 32 页)

了诱变致死率与正变率的模拟曲线,并利用此模型选育出一株优良的桑椹果酒专用酵母。

该酵母具有起酵速度快、产酒度高、高级醇含量适中,所产果酒澄清度高、风味佳,是代替葡萄酒干酵母进行桑椹果酒发酵的理想选择。在进入工业应用前还应 ME44 酵母进行更细致的遗传性能及各种耐性试验。

### 参考文献:

- [1] 杨明琰,郭爱莲,沈俭,等.高产 SOD 酵母菌的诱变选育及发酵条件研究[J].食品科学,2005,26(10): 147-150.
- [2] 杜金华,张开利,杜连祥.UV 诱变法选育 pof- 糖化酵母[J].食品与发酵工业,1995,(6): 33-38.
- [3] 顾蕾,陆玲,袁生.红酵母原生质体制备及其紫外诱变育种的研究[J].食品工业科技,2004,(4): 60-65.
- [4] 董新姣,范茂水,金阳邵.染料脱色菌无花果曲霉的微波诱变育种[J].江西科学,2006,24(2): 120-123.
- [5] Hong SM, Park JK, Lee YO. Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids[J]. Water Res, 2004, 38(6): 1615-1625.
- [6] 李永泉,翁醒华,贺筱蓉.微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋

白酶高产菌[J].微生物学报,1999,39(2): 181-184.

- [7] Pakhomova ON, Pakhomov AG, Akyel Y. Effect of millimeter waves on UV-induced recombination and mutagenesis in yeast [J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1997, 43(2): 227-232.
- [8] 肖冬光,刘青,李静,等.酿酒酵母单倍体制备方法的优化[J].酿酒科技,2004,(4): 21-22.
- [9] 丁友方,陈宁.普通微生物遗传学[M].天津:南开大学出版社,1990.
- [10] 王梅,张澎湃,帅桂兰,等. TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J].酿酒,2001,28(5): 62-64.
- [11] 钟娟,周金燕,谭红.抗真菌多肽——捷安肽素高产菌的选育[J].应用与环境生物学报,2004,10(1): 104-107.
- [12] 张伟,朱会霞,李英军,等.Co60 诱变原生质体选育高产酒精酵母[J].酿酒科技,2006,(1): 23-26.
- [13] 张丽萍,程辉彩,田连生,等.植酸酶高产菌株的紫外线-空气等离子体复合诱变选育[J].中国饲料,2006,(9): 13-15.
- [14] 李永泉.微波诱变选育木聚糖酶高产菌[J].微波学报,2001,17(1): 40-43.