

葡萄和葡萄酒中聚合色素的测定

盛 慧,彭 军,李 运

(烟台张裕集团有限公司技术中心,山东 烟台 264000)

摘 要: 采用蛋白质沉淀和传统二氧化硫脱色分析方法测定聚合色素中单分子花色素。葡萄和葡萄酒中两种聚合色素:小分子色素(SPP)与蛋白质不产生沉淀,而大分子色素(LPP)则产生沉淀。分析成熟期和采摘期赤霞珠、西拉葡萄浆果内的聚合物色素成分,其果粒中含有的聚合色素比相应的葡萄酒少。在葡萄酒中找到的多数大分子聚合色素是在葡萄酒酿造过程中产生的。通过对照,葡萄酒和其果粒中小分子色素含量相比较是不稳定的、变化的,西拉中 SPP 降低,赤霞珠 SPP 增加,黑比诺 SPP 变化很小。蛋白质沉淀和二氧化硫漂白分析研究得出,葡萄汁和葡萄酒中的单宁酸和聚合色素有相同的结论。

关键词: 葡萄酒; 聚合色素; 花青素; 单宁酸; 原花青素; 蛋白质沉淀

中图分类号: TS262.6 ;TS261.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2005)03-0083-04

Measurement of Polymeric Pigments in Grape and in Grape Wine

SHENG Hui, PENG Jun and LI Yun

(Technical Center of Changyu Group Co. Ltd., Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: Protein precipitate analysis method and traditional sulfur dioxide bleaching analysis method were applied together to determine monomeric anthocyanins in polymeric pigments. There are two kinds of polymeric pigments in grapes and in grape wines: small molecular polymeric pigments (SPP) (not produce precipitate with protein) and large molecular polymeric pigments (LPP) (produce precipitate). During mature stage and harvest stage, the compositions of polymeric pigment in Cabernet Sauvignon and Syrah berries are less than that in the corresponding wines. Most of LPP in grape wines is formed during wine brewing. On the other hand, SPP in grape wines is unstable and changing status (compared with SPP in Sauvignon (increasing) and SPP in Syrah (decreasing) and SPP in Pinot noir (little change)). Tannic acid in grape juice and in grape wine (also analyzed by protein precipitate analysis method and traditional sulfur dioxide bleaching analysis method) had almost the same rules as polymeric pigments did.

Key words: grape wine; polymeric pigments; anthocyanin; tannic acid; procyanidin; protein precipitate

葡萄籽和皮中的单宁酸是黄烷-3-醇聚合物,它包含儿茶酸、表儿茶酸、表儿茶酸、或多数连接在黄烷醇 C₄-C₈ 键的表儿茶酸没食子酸。缩合单宁是来自于葡萄果粒的一种丰富的酚类物质,也是红葡萄酒中重要的收敛性成分。而花色素葡糖苷(花青素)是来自于葡萄中的多酚物质经酰化形成花色素的糖苷。葡萄皮和籽中的单宁酸在葡萄酒酿造和熟化过程中与葡萄皮中的花青素形成聚合色素。聚合色素和单分子花青素区别在于不同 pH 值下的基本特性成分和对二氧化硫漂白的灵敏度,当 pH 值在 1~5 时,花青素水溶液在 520 nm 处吸光率

衰减迅速,而相同条件下聚合色素的吸光率是稳定的;在 520 nm 处亚硫酸盐溶液中聚合色素明显的吸光度,红色单分子花青素被亚硫酸盐离子漂白,这一特性是聚合色素区别单分子花青素的简便方法。

通过对不同酒龄酒的分析,新酿制的葡萄酒含有明显的单分子花青素和少量的聚合色素。16 年酒龄的葡萄酒中几乎所有的颜色都来源于聚合色素。同时也说明花青素和单宁酸直接反应形成聚合色素的事实。

1995 年普里斯(Price)等人使用反相高效液相色谱法测定葡萄酒和葡萄汁中聚合色素^[1]。把萨莫斯

收稿日期 2004-12-23

作者简介 盛慧(1967-),女,江苏人,学士研究生,从事葡萄酒分析工作,发表论文数篇。

(Somers)和埃文斯(Evans)的二氧化硫漂白法和反相高效液相色谱法相互联系起来所得出的这种测定方法不受对位-香豆酰-葡萄糖苷花色素的干扰^[2]。

在本分析中发现,葡萄皮中蛋白质单宁酸沉淀再溶解后,在 510 nm 处吸光度值很小,这表明收获期的葡萄果粒中聚合色素含量低。红葡萄酒中的单宁酸和蛋白质产生沉淀再溶解后进行单宁酸分析,其溶液在 510 nm 处有较大的吸光度,这表明在红葡萄酒的蛋白单宁酸沉淀中存在聚合色素。红葡萄酒中被蛋白质沉淀转移的色素少于聚合色素的一半。因此,我们得出葡萄和葡萄酒中有两种类型的聚合色素:小分子聚合色素(SPP)与蛋白质不产生沉淀,大分子聚合色素(LPP)则相反。

1 材料与方法

1.1 材料

牛血清蛋白(BSA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、三乙醇胺(TEA)、六水合三氯化铁、焦亚硫酸钾、(+)-儿茶素(Sigma)。

1.2 样品收集和果浆提取

所有浆果样品为 2000~2001 年葡萄成熟季节采摘,生长 8 年的赤霞珠葡萄浆果,6 年的黑比诺浆果,5 年的西拉浆果。

前期收集样品的处理过程 3 种不同的葡萄果粒,取 20 粒浆果为一个样品单位,进行称重、去皮分离。把浆果切成两瓣,将果皮、籽分离,将 20 粒浆果样品的皮放进盛有 20 mL 70 % (v/v) 丙酮水溶液的 125 mL 锥形烧瓶中,锥形瓶口用橡胶盖密封,以 100 r/min 轻摇萃取。

萃取液经过充分萃取后进行分液,在 38 °C 条件下使用旋转蒸发仪将丙酮蒸发去除,残留物用去离子水定容到 10 mL,在 -20 °C 下冷冻供分析使用。

1.3 聚合色素分析

采用 Hagerman 和 Butler(1997)的单宁酸分析方法^[3],按比例减少测量葡萄酒或葡萄皮提取物,经过稀释和体积校准后测定吸光度。葡萄酒和葡萄皮提取物用含有 5 g/L 酒石酸氢钾的 12 % (v/v) 乙醇溶液稀释,用 HCl 调节其溶液 pH 值为 3.3。测量总吸光度、单宁酸沉淀和聚合物色素都是在 pH 值为 4.9(用 NaOH 调节)的含有 200 mM 乙酸和 170 mM NaCl 的缓冲液中进行的。因单宁酸沉淀,缓冲液中加入 BSA 的最终浓度为 1 mg/mL。

分析葡萄酒或葡萄汁中的聚合色素和单宁酸,每个样品需要两个 1.5 mL 的离心管。第一个管中先加入 1 mL 乙酸-NaCl 的缓冲液,然后加入 500 μ L 已稀释的葡萄皮提取物或葡萄酒并充分混合。取 1 mL 混合液在 520 nm 处测量吸光度(A) 继续加入 0.36 M 焦亚硫酸钾

80 μ L 混合均匀,稳定 10 min 重新测定在 520 nm 处的吸光度(B)。

在第二个 1.5 mL 的离心管中加入含有 BSA (1 mg/mL)的 1 mL 乙酸-NaCl 缓冲液,然后加入 500 μ L 已稀释的葡萄皮提取物或葡萄酒。将混合均匀后的样品在室温条件下缓慢搅拌 15 min。稳定后,样品以 27000 r/min 的转速离心,使蛋白质单宁酸沉淀形成颗粒状,取 1 mL 上清液放入透明小玻璃管中,再加入 0.36 M 焦亚硫酸钾 80 μ L,摇匀稳定 10 min 后,在 520 nm 处测定吸光度(C)。吸光度取决于 MP,SPP,LPP。LPP 分别由(A-B)、C 和(B-C)给出。

1.4 聚合色素和单宁酸分析

测量蛋白质单宁酸沉淀溶解后在 510 nm 处测吸光度,将第二管中取出的颗粒状蛋白质单宁酸用 250 μ L 乙酸/NaCl 缓冲液洗涤,转移剩余的单分子花色素,样品以 13500 r/min 重新离心,倒掉洗涤液,然后加入 875 μ L 含有 5 % SDS(w/v)和 5 % TEA(v/v)的缓冲液,待其蛋白质单宁沉淀后,溶解液放置于室温下 10 min,在 510 nm 处测定吸光度。吸光度描绘出蛋白质沉淀物中聚合物色素的数量,这和 Harberton 法测定单宁酸吸光度结果相同^[4]。

1.5 聚合色素总量测定

取 12 个不同品牌的红葡萄酒,进行相关性比较研究。酒样分别使用 Somers 和 Evans 方法和蛋白质单宁酸沉淀法测定聚合物色素。这 12 个葡萄酒包括 9 个赤霞珠、2 个梅鹿辄、1 个黑比诺。

2 结果与讨论

将所测定的 12 个不同品牌的红葡萄酒的蛋白质沉淀单宁酸吸光度分析结果和 Somers 和 Evans 方法测定聚合色素得出的吸光度值进行比较(图 1 为使用 Somers 和 Evans 方法所得到的结果),结果显示两种方法之间吸光度测定值没有相关性,因此与 BSA 产生沉淀的聚合色素不是葡萄酒中所有的聚合色素。用焦亚硫酸钾漂白单分子花色素,在蛋白质沉淀上清液中有大量的剩余吸光度,这些便是没有和 BSA 产生沉淀的聚合色素,由于带有 3 种以上儿茶酸或表儿茶酸的原花青素能够缔合和交联 BSA 蛋白,小分子聚合物色素(SPP)不与蛋白质产生沉淀。由此可知,与 BSA 产生聚合物色素沉淀的为 大分子聚合色素(LPP)。

通过蛋白质沉淀和二氧化硫漂白,测定出葡萄酒中一定数量的 SPP 和 LPP (见图 1)。SPP+LPP 总数与用 Somers 和 Evans 法测定的总聚合色素结果相比较,得出好的相关性(见图 2)。

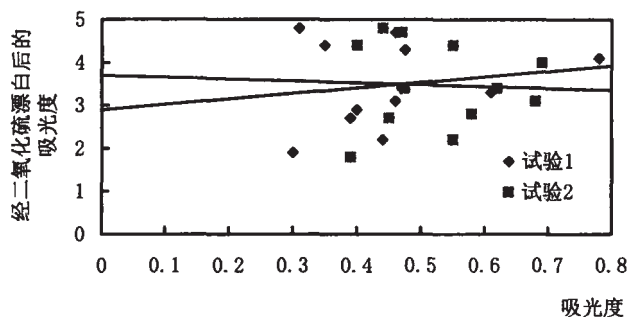


图1 Somers 和 Evans(1997)二氧化硫漂白方法测定聚合色素分析结果和使用 BSA 单宁酸分析吸光度,吸光度体现 BSA 沉淀的聚合色素

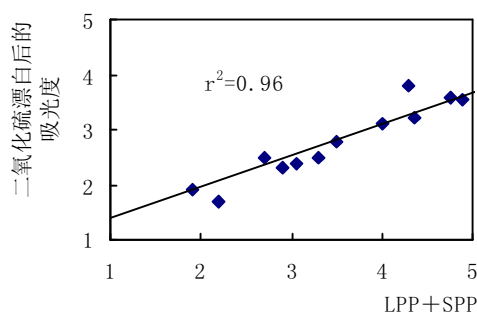


图2 蛋白质沉淀 SPP+LPP 与用 Somers 和 Evans 法测定的总聚合色素结果的相关性

葡萄籽单宁酸溶液中加入单分子花色素,与蛋白质作用生成沉淀,在 520 nm 处测定重新溶解的蛋白质单宁酸沉淀的吸光度,其值非常低,说明 LPP 的吸光度不单单归结于单分子花色素对蛋白质沉淀的缔合作用。为进一步的证实,我们在葡萄酒中加入不同数量的单宁酸,得到大量的蛋白质单宁酸沉淀,然后定量分析葡萄酒中的单宁酸的数量和 LPP 的数量,将两者数值加在一起。赤霞珠葡萄酒的吸光度(520 nm)取决于 LPP,SPP 和总聚合色素(LPP+SPP)(见表 1)。同时使用图 2 的分析方法测定单宁酸。表 1 表明 LPP 吸光度测定结果改变非常小。

表 1 赤霞珠葡萄酒的吸光度(520 nm)

项 目	LPP ^a	SPP ^a	LPP+SPP	Tannin ^b
葡萄酒	1.47	1.03	2.50	1107±7
葡萄酒+400 μg 单宁酸	1.58	1.00	2.58	1515±0.6
葡萄酒+800 μg 单宁酸	1.62	1.01	2.63	1900±21

注: a—吸光度(520 nm)取决于 LPP 或 SPP 对未稀释葡萄酒的计算。LPP, SPP 和 (LPP+SPP) 测量的标准偏差小于 0.01。
b—mg/L 儿茶酸类似物。

在测定的葡萄酒中,LPP 的吸光度和葡萄酒中的聚合色素数量之间没有相关性(见图 1),而使用 Somers 和 Evans 法测定聚合色素的结果和 LPP+SPP 的总和具有好的相关性。

在一些葡萄酒中,我们发现两种不同的聚合色素其比率有相当大的变化(见表 2)。测定成熟期和采摘期葡萄浆果中存在的色素含量。在成熟期,赤霞珠和西拉果皮中 LPP 和 SPP 的含量见图 3。图 3 表明葡萄皮中含有的 LPP 数量较 SPP 非常少。图 4 中 A,B 分别在 pH=4.9 时,采摘期的西拉浆果中的 LPP,SPP 和单分子花色素相互作用的色度百分数,与其相应的连续两年的葡萄酒中色度的比较。图 4 显示,果粒中相互作用的单分子花色素在总色度中的百分含量比葡萄酒低。这是因为在 pH 值等于 4.9 时,在 520 nm 处单分子花色素的吸光值很小。图 3 和图 4 显示,多数 LPP 是在发酵过程中形成的。在西拉成品葡萄酒和浆果中的 SPP 色度百分含量几乎相同(见图 3)。

表 2 12 个不同品牌红葡萄酒的 LPP 与 SPP 比值

葡萄酒名称	LPP/SPP	葡萄酒名称	LPP/SPP
梅鹿辄	1.30	赤霞珠	0.78
梅鹿辄	1.13	黑比诺	0.73
赤霞珠	1.05	赤霞珠	0.66
赤霞珠	0.90	赤霞珠	0.51
赤霞珠	0.79	赤霞珠	0.44
赤霞珠	0.78	赤霞珠	0.33

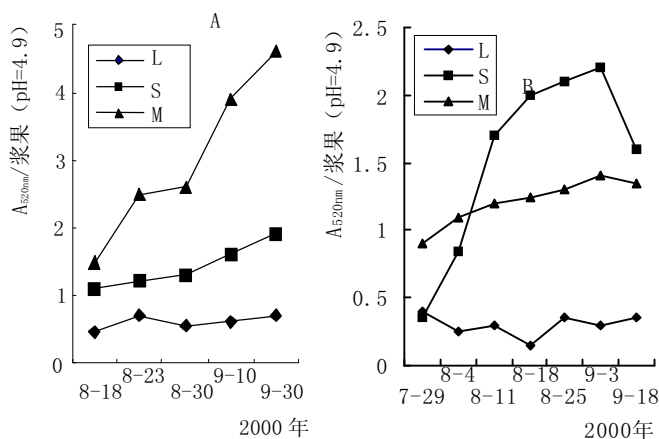


图3 成熟期间色素分析结果,pH=4.9。赤霞珠浆果(A)和西拉浆果(B) LPP:大分子聚合色素;SPP:小分子聚合色素;MP: pH=4.9 单分子色素(二氧化硫漂白后)

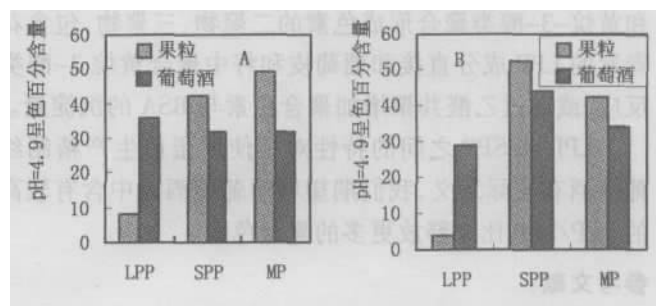


图4 收获期西拉果实与相应的葡萄酒中的 LPP,SPP 和 MP 在总色度中的百分含量,2000 年(A),2001 年(B)

采摘期赤霞珠和黑比诺果实中 LPP,SPP 和单分子

色素的百分含量与葡萄酒比较结果见图 5。赤霞珠和黑比诺在葡萄酒中的 LPP 百分数含量高于采摘期果实。黑比诺在酿造过程中 LPP 和 SPP 增加很小。

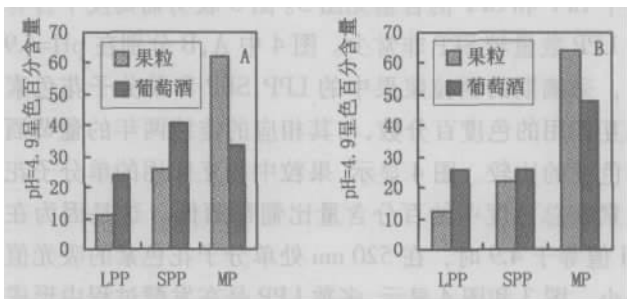


图 5 收获期果实与相应的葡萄酒中的 LPP,SPP 和 MP 与总色度百分含量 赤霞珠果粒和相应的葡萄酒(A),黑比诺葡萄果粒和相应的葡萄酒(B)

形成红葡萄酒中稳定颜色的聚合色素,多数是由于聚合色素和少量的单分子花色素的存在^[5]。使用 HPLC 测定 2 年酒龄的红葡萄酒中的聚合色素数量占酒中色度的 50 %,4 年酒龄为 75 %,10 年酒龄为 95 %。

在蛋白质沉淀定量分析单宁酸中,510 nm 处红葡萄酒的蛋白质单宁酸沉淀有相当大的吸光率。当醋酸盐缓冲液的 pH=4.9 时,BSA 的等电点(Pi)为 4.9^[6],该条件下单宁酸的蛋白质沉淀量最大,此时单分子花色素吸光率最小。

测定收获期赤霞珠的汁和西拉果皮发现,LPP 含量少于 SPP。收获期果皮中 LPP 和 SPP 的百分含量和酒中测定结果比较,得出酒中聚合色素 LPP 含量高于葡萄果实,LPP 优先于 SPP 提取似乎不太可能,我们认为 LPP 量比 SPP 多是在酒的酿造过程中形成的(见表 1)(取不同的葡萄收获期的同一品种的 140 个葡萄酒样品测定,得出比率值的范围为 0.14~2.2)。

澳洲葡萄品系中没有色素成分沉淀和二氧化硫的漂白(SPP),这些酒是低分子量,对二氧化硫的漂白作用有抵抗力^[7]。我们认为 SPP 成分内包含儿茶酸-锦葵色素-3-葡萄糖苷聚合物,和其他色素一样,乙醛使花色素和黄烷-3-醇类聚合形成色素的二聚物、三聚物,包含花青素的 LPP 成分直接和葡萄皮和籽中聚合黄烷 3-醇类反应,或通过乙醛共聚增加聚合色素与 BSA 的沉淀量。

LPP 和 SPP 之间的特性对于使用蛋白生产精制红葡萄酒有实际意义,我们期望精制葡萄酒酒中含有较高的 LPP/SPP 比来释放更多的聚合色素。

参考文献：

[1] Price,S.F.,P.J .Breen ,M .VaLLadao ,and B .T .Watson. Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot Noir Grapes and Wine[J].Am.J.Enol.Vitic,1995,46:187-194.
[2] Somers,T.C.,and M.E. Evans.Spectral Evaluation of

Young Red Wines:Anthocyanin Equilibria,TotaL Phenolics, Free and MolecuLar SO₂,"Chemical age"[J]. J. Sci. Food Agric,1997,28:279-287.
[3] Hagerman, A.E.,and ButLer, L.G. Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1978, 26,
[4] Harbertson,JF.,J.A.Kennedy,and D.O.Adams.Tannin in Skins and Seeds of Carbernet Sauvignon,Syrah,and Pinot noir Berries during Ripening[J]. Am.J.Enol.Vitic.2002, 53:54-59.
[5] CharLes A. Sims and J.R. Morris.Color and Color Stability of Red Wine from Noble (Vitis rotundifolia Michx.) and Cabernet Sauvignon (Vitis vinifera L.)at Various pH[J]. 1984,105: 90-96.
[6] Roger B. Boulton Vernon L. SingLeton Linda F.Bisson RaLph E. Kunkee,赵光整,等译.葡萄酒酿造学原理及应用[M].北京 中国轻工业出版社,
[7] 秦含章.葡萄酒分析化学[M].北京 中国轻工业出版社,1991.

酿酒科技杂志社 邮购书刊

书刊名	邮购价
《酿酒科技精选（1980～1985）》	20 元/册
《酿酒科技》1998 年合订本	58 元/册
《酿酒科技》1999 年合订本	60 元/册
《酿酒科技》2000 年合订本	65 元/册
《酿酒科技》2001 年合订本	70 元/册
《酿酒科技》2002 年合订本	75 元/册
《酿酒科技》2003 年合订本	80 元/册
《酿酒科技》2004 年合订本	80 元/册
《酿酒科技》2005 年（月刊）	96 元/年
《酿酒活性干酵母的应用与生产技术》	12 元/册
《世界蒸馏酒的风味》	6 元/册
《中国酒曲》	35 元/册
《生料酿酒技术》	42 元/册
《酿酒技术》世纪光盘（1980～2000 年）	380 元/套

需订阅以上书刊者，请直接汇款到本刊社邮购。地址：贵州省沙冲中路 58 号（550002）；电话：（0851）5796163；传真：（0851）5776394；联系人：吴萍