

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2016.02.037

糖对葡萄酒中聚合色素与单宁 A－H 法测定的影响

袁春龙 周亚丽 韩富亮 苏鹏飞 王沙沙

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100)

摘要：聚合色素和单宁是葡萄和葡萄酒中非常重要的组成部分,葡萄与葡萄酒中的单宁和聚合色素通常采用蛋白质沉淀法(A－H法)测定,而糖是该测定方法的重要影响因素。在葡萄酒中加入不同浓度的葡萄糖、果糖和蔗糖,然后测定葡萄酒中单宁和聚合色素的含量,结果表明葡萄糖、果糖和蔗糖都能显著地影响葡萄酒中非蛋白质沉淀的小分子聚合色素(Small polymeric pigment, SPP)和总聚合色素(Total polymeric pigment, TPP)的含量。而且,蔗糖的影响比葡萄糖和果糖大。葡萄糖和蔗糖对酒中蛋白质沉淀的大分子聚合色素(Large polymeric pigment, LPP)的含量有一定的影响,但没有规律性,很多处理差异不显著,果糖对酒中 LPP 的含量没有影响。同时,葡萄糖、果糖和蔗糖也能显著地减少葡萄酒中单宁含量的测定结果。因此,在糖含量较高的葡萄酒中,应用 A－H 法测定葡萄酒中单宁、聚合色素时有一定的局限性。

关键词：葡萄酒；聚合色素；单宁；糖；A－H 法

中图分类号：TS262.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-1298(2016)02-0280-08

Effect on Determining Polymeric Pigments and Tannins in Wine with High Content of Sugars by A－H Method

Yuan Chunlong Zhou Yali Han Fuliang Su Pengfei Wang Shasha

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Polymeric pigments and tannins are essential components in grape and wine. A common method for measuring polymeric pigments and tannins in grape and wine is using protein precipitation assay(A－H). In order to investigate the impact of sugars on tannins and polymeric pigments determined by the A－H method, the concentrations of polymeric pigments and tannins in wine samples were tested after adding different amounts of sugars (glucose, fructose and sucrose). The experiment result showed that after all the treatments the contents of non-protein-precipitable small polymeric pigments (SPP) and total polymeric pigments (TPP) were affected significantly by sugars (glucose, fructose and sucrose) in wine, and the effect of sucrose was greater than those of glucose and fructose. However, difference was found in the amount of protein-precipitable large polymeric pigments (LPP). Some of treatments by sucrose and glucose had significant impact on the concentration of LPP, but the content of LPP was affected insignificantly by fructose in wine. One possible explanation for the different impacts of sugars on polymeric pigments and tannins was that sugars could have significant influence on the combination of protein with polymeric pigments. Meanwhile, the experiment result also indicated that sugars (glucose, fructose and sucrose) can significantly decrease the content of tannins in wine. Therefore, caution needs to be exerted when using the A－H method to determine polymeric pigments and tannins in wine with high content of sugars.

Key words: wine; polymeric pigment; tannin; sugar; A－H method

引言

单宁和色素类物质是葡萄酒基质的基本组成部分,葡萄酒许多重要的品质因素均与其有关,包括颜色、苦涩味、收敛性和抗氧化能力等。聚合色素可划分为 2 类,即不与蛋白质产生沉淀的小分子聚合色素 (Small polymeric pigment, SPP) 和与蛋白质产生沉淀的大分子聚合色素 (Large polymeric pigment, LPP)^[1]。Somers 等^[2]发现,硫酸氢盐离子能漂白红色的单分子花青素,而聚合色素在亚硫酸氢盐存在的情况下能继续吸收波长为 252 nm 的光,由此建立了检测葡萄酒聚合色素的基本方法^[2]。

Bate-Smith 首次对单宁进行了描述,指出单宁是分子量在 500 ~ 3 000 Da 之间的水溶性酚类化合物,并具有能沉淀生物碱、明胶和其他蛋白质能力的特殊性质^[3]; Haslam 指出,单宁的结构不仅与蛋白质和生物碱的结构一样复杂,而且与某些高分子量 (20 000 Da) 的多糖一样复杂^[4]。

Hagerman 等^[5]首次提出用蛋白质沉淀方法来分析单宁,经过 Adams 和 Harbertson 的研究完善了蛋白质沉淀法,后被简称为 A-H 法^[6],随后他们运用这种方法分别分析了葡萄皮、种子和酒中的单宁含量,然而单宁与蛋白质反应的程度以及反应所产生的沉淀是否会受到酒基质改变的影响仍不确定,比如酒中的含糖量、乙醇浓度的变化等。有关乙醇浓度的变化对于蛋白质沉淀影响的研究较多^[7-8],而很少有糖对蛋白质沉淀影响的研究^[9-10]。目前测定葡萄酒中色素和单宁的方法主要有蛋白质沉淀法 (A-H 法)^[11]、高效液相色谱法 (HPLC 法)^[12]、甲基纤维素法 (MCP 法)^[13] 和福林-丹尼斯法 (F-D 法)^[14]。但在我国葡萄酒庄和酒厂中测定酒中的单宁和色素类物质并没有一个统一的测定方法^[9]:一方面,单宁和色素类化合物结构复杂而且种类繁多,没有一种方法能够将其准确地测定出来;另一方面,大多数酒厂没有专业的人员,或设备太昂贵而无法普及。因此,对于酒庄和酒厂来说,选择一种简单、方便、快捷的测定葡萄酒中色素和单宁类物质的方法是非常重要的。

目前在分析葡萄酒中单宁和聚合色素含量时,蛋白质沉淀法 (A-H 法) 具备操作简单,使用方便、快捷的特点,因此受到了越来越多的葡萄酒行业或者葡萄与葡萄酒研究领域的认可^[9]。而糖、色素以及单宁类物质均含有较多的羟基,糖对 A-H 法测定葡萄酒中聚合色素和单宁的影响机制至今尚不清楚。故本文旨在探究应用 A-H 法测定葡萄酒中的聚合色素和单宁时,糖对测定结果的影响,以便完善

A-H 法,使其更好地服务于国内葡萄酒厂和酒庄的生产实践。

1 材料与方法

1.1 样品

贺兰山东麓赤霞珠干红葡萄酒 (Cabernet Sauvignon, 2012)。

1.2 主要试剂

牛血清蛋白 (BSA 冻干粉)、十二烷基硫酸钠 (SDS, 质量分数 95%) 和 (+)-儿茶素水合物 (质量分数 98%, 粉末), 均购于美国 Sigma 公司。蔗糖、D-葡萄糖、D-果糖、偏重亚硫酸钾、三乙醇胺 (TEA, 质量分数 98%)、氯化铁 (质量分数 98%), 购于西安化学试剂有限公司。试剂的制备^[1] 和存储分别参照 Harbertson 和 Rio 等的方法^[15]。

1.3 主要仪器

UV-2450 型紫外分光光度计 (日本岛津公司), 振荡器, 离心机。

1.4 试验方法

1.4.1 单宁的测定

单宁的测定参照 Harbertson 的方法^[1], 并进行了适当的修改。

标准曲线的制作: 配制 0.50 mg/mL 的儿茶素水合物酚母液 (现配现用)。分别吸取儿茶素水合物酚母液 0、50、100、150、200、250、300 μ L 于离心管中, 加入 Buffer C (50 g/L SDS 和体积分数 5% 的 TEA, 2 mol/L HCl 调 pH 值至 9.4) 定容至 875 μ L, 用 Buffer C 调零, 在 510 nm 下测定其吸光度, 即为单宁的背景值, 记为 A_1 ; 再加入 125 μ L $FeCl_3$ 溶液, 迅速混匀, 室温静置 10 min 后在 510 nm 下测定吸光度 A_2 , $A_2 - A_1$ 作为反应吸光度。绘制标准曲线, 并求得方程式

$$Y = 0.320\,2X + 0.061\,7 \quad (R^2 = 0.997\,4)$$

式中 Y——吸光度

X——儿茶素质量浓度, mg/mL

蛋白缓冲液是将 1.0 g 牛血清蛋白 (BSA) 溶于 1 L Buffer A (250 mL 蒸馏水、6 mL 冰醋酸和 4.93 g 氯化钠, 10% NaOH 溶液调 pH 值至 4.9) 中, 使蛋白的最终质量浓度为 1 mg/mL。

分别取 75、100、150 μ L 红葡萄酒, 加入到 1.5 mL 离心管中, 用 Buffer B (400 mL 蒸馏水、2.5 g 酒石酸氢钾和 60 mL 无水乙醇, 2 mol/L HCl 调 pH 值至 3.3) 稀释至 500 μ L, 然后加入 1 mL 的蛋白缓冲液, 室温下反应 15 min; 再离心 5 min (13 500 g), 倒掉上清液, 加入 875 μ L 的 Buffer C, 室温下再反应 10 min, 然后在振荡器上振荡使沉淀完全溶解。用

Buffer C 调零,在 510 nm 下测定其吸光度,即为单宁的背景值,记为 A_1 ;然后在比色皿中加入 125 μL 的显色剂 FeCl_3 溶液,在室温下反应 10 min,在 510 nm 下测定其吸光度,即为单宁的最终值,记为 A_2 ,单宁的吸光度 $A = A_2 - A_1$,将数值代入标准曲线即可得到单宁的含量。

1.4.2 聚合色素的测定

聚合色素的测定参照 Harbertson 的方法^[1],并进行了适当的修改。

分别取 2 组 1.5 mL 的离心管,第 1 组离心管记作“管 1”,第 2 组记作“管 2”,其中在管 1 中,分别取 75、100、150 μL 的红葡萄酒,然后加入 Buffer B 稀释至 500 μL ,接着加入 1 mL Buffer A 混合均匀,室温下反应 10 min 后,取 1 mL 反应液于光程 10 mm 的比色皿中,加入 80 μL 0.36 mol/L 的偏重亚硫酸钾(显色剂),室温下再反应 10 min,520 nm 下测吸光度,记为 B 。管 2 分别加入 75、100、150 μL 的红葡萄酒,用 Buffer B 稀释至 500 μL ,接着加入 1 mL 蛋白缓冲液,室温下反应 15 min,然后离心 5 min (13 500 g),小心移取上部的上清液 1 mL 于光程为 10 mm 的比色皿中,然后加入 80 μL 0.36 mol/L 的偏重亚硫酸钾(显色剂),室温下再反应 10 min,520 nm 下测吸光度,记为 C ;将离心管中剩余的上清液倒掉,加入 875 μL 的 Buffer C,振荡使沉淀溶解,用于单宁的测定。根据测定的吸光度,代入标准曲线计算聚合色素的含量。

大分子聚合色素 (Large polymeric pigment, LPP) 计算公式为

$$L_{pp} = 1.08n \times 4(B - C - b)/k$$

小分子聚合色素 (Small polymeric pigment, SPP) 计算公式为

$$S_{pp} = 1.08n \times (30/7)(C - b)/k$$

总聚合色素 (Total polymeric pigment, TPP) 计算公式为

$$T_{pp} = L_{pp} + S_{pp}$$

式中 L_{pp} ——大分子聚合色素的质量浓度,mg/L
 B ——管 1 中溶液在 520 nm 处吸光度
 S_{pp} ——小分子聚合色素的质量浓度,mg/L
 C ——管 2 中溶液在 520 nm 处吸光度
 T_{pp} ——总聚合色素的质量浓度,mg/L
 b ——标准曲线的截距,取 0.061 7
 k ——标准曲线的斜率,取 0.320 2
 n ——稀释倍数

1.4.3 糖对葡萄酒中单宁测定的影响

在对单宁进行分析时,酒样中加入不同浓度的糖(葡萄糖、果糖和蔗糖),用 A-H 法确定糖的浓度

对红酒中单宁的影响。用单宁稀释法来模拟在红酒发酵过程中可能出现的各种不同浓度的单宁。在试验过程中,将蔗糖、葡萄糖、果糖溶于水制成质量浓度 1 g/mL 的溶液备用。取 75 μL 的葡萄酒于 5 个比色皿中,分别加入 0、100、200、300、400 μL 的糖溶液,用 Buffer B 稀释至 500 μL ;同样,取 100、150 μL 葡萄酒时,操作方法与 75 μL 酒样相同(酒样 150 μL 时,添加糖溶液最高为 350 μL),接下来的测定方法同 1.4.1 节单宁的测定方法。

1.4.4 糖对葡萄酒中聚合色素测定的影响

在酒样中加入不同浓度的糖(葡萄糖、果糖和蔗糖),用 A-H 法确定糖的浓度对红酒中聚合色素的影响。在试验过程中,将蔗糖、葡萄糖和果糖溶于水制成质量浓度为 1 g/mL 的溶液备用,取 75 μL 的葡萄酒于 5 个比色皿中,分别加入 0、100、200、300、400 μL 的糖溶液,用 Buffer B 稀释至 500 μL ;同样,取 100、150 μL 葡萄酒时,操作方法与 75 μL 酒样相同(酒样 150 μL 时,添加糖溶液最高为 350 μL),接下来的测定方法同 1.4.2 节聚合色素的测定方法。

1.5 统计分析

每组试验重复 4 次,试验结果用平均值 $\pm$ 标准差表示。用 R3.1.2 软件作图、DPS7.55 进行统计分析。其中 DPS7.55 用于检测差异显著性,邓肯氏检验来判定处理之间的差异性是否达到统计学意义 ($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖

75、100、150 μL 的酒样试验结果分别如表 1~3 所示。

LPP 含量随加入葡萄糖量的增加而增加,但差异显著性没有规律。75 μL 酒样只有添加 300 μL 的葡萄糖溶液时,LPP 含量与对照达到显著差异 ($P < 0.05$),其余处理与对照没有差异显著性,且处理之间差异不显著(表 1);150 μL 酒样只有添加 100 μL 的葡萄糖溶液时,与对照达到极显著差异 ($P < 0.01$),其余同 75 μL 酒样一样(表 3);而 100 μL 的酒样,各处理与对照之间、各处理间的 LPP 含量没有显著性差异(表 2)。

SPP 的含量随着葡萄糖添加量的增加而显著增加,酒样取样量越多差异越大。75 μL 酒样添加 100 μL 的葡萄糖(表 1)、100 μL 酒样添加 100、200 μL 葡萄糖(表 2),SPP 含量与对照没有显著性差异,其他处理与对照均达到了显著差异,有些达到了极显著差异,而且糖浓度越高,差异显著性越大(表 1~3)。说明葡萄糖会影响色素和蛋白质之间的缔合,对

A-H 法测定葡萄酒中 SSP 含量有一定的影响。

表 1~3 结果显示,葡萄酒中单宁的含量均随葡萄糖添加量的增加而显著的降低。75 μL 和 150 μL 酒样中添加不低于 300 μL 葡萄糖、100 μL 酒样中添

加不低于 100 μL 葡萄糖时,单宁的含量与对照达到极显著差异。说明葡萄糖会影响单宁和蛋白质之间的缔合,对 A-H 法测定葡萄酒中单宁含量有显著的影响。

表 1 75 μL 酒样品中葡萄糖对葡萄酒聚合色素和单宁的影响

Tab.1 Effect of glucose on polymeric pigments and tannins of 75 μL wine sample			
葡萄糖添加量/μL	LPP 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	SPP 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	单宁质量浓度/(mg·L ⁻¹)
400	509.30 ± 174.32 ^{abA}	926.59 ± 54.37 ^{aA}	609.62 ± 16.62 ^{dC}
300	523.43 ± 35.97 ^{aA}	783.95 ± 24.41 ^{bAB}	651.19 ± 53.02 ^{cdBC}
200	418.82 ± 141.01 ^{abA}	776.23 ± 166.40 ^{bAB}	739.87 ± 100.49 ^{bcAB}
100	433.22 ± 33.53 ^{abA}	637.52 ± 17.19 ^{cB}	818.49 ± 60.47 ^{abA}
0(对照)	364.62 ± 50.90 ^{bA}	623.40 ± 20.55 ^{cB}	861.26 ± 35.54 ^{aA}

注:表内同列不同大、小写字母分别表示 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 下差异显著(DMRT法),下同。

表 2 100 μL 酒样品中葡萄糖对葡萄酒聚合色素和单宁的影响

Tab.2 Effect of glucose on polymeric pigments and tannins of 100 μL wine sample			
葡萄糖添加量/μL	LPP 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	SPP 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	单宁质量浓度/(mg·L ⁻¹)
400	557.83 ± 144.39 ^{aA}	902.24 ± 129.74 ^{aA}	781.27 ± 67.07 ^{cC}
300	607.45 ± 192.82 ^{aA}	761.53 ± 131.62 ^{bAB}	841.75 ± 35.67 ^{bcBC}
200	581.67 ± 14.62 ^{aA}	700.07 ± 11.06 ^{bcB}	905.33 ± 31.88 ^{bB}
100	514.63 ± 37.41 ^{aA}	642.32 ± 27.34 ^{bcB}	900.28 ± 71.34 ^{bB}
0(对照)	509.94 ± 58.34 ^{aA}	593.75 ± 19.53 ^{cB}	1035.94 ± 14.63 ^{aA}

表 3 150 μL 酒样品中葡萄糖对葡萄酒聚合色素和单宁的影响

Tab.3 Effect of glucose on polymeric pigments and tannins of 150 μL wine sample			
葡萄糖添加量/μL	LPP 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	SPP 质量浓度/(mg·L ⁻¹)	单宁质量浓度/(mg·L ⁻¹)
350	532.60 ± 27.68 ^{bAB}	607.68 ± 8.41 ^{aA}	1 041.70 ± 20.22 ^{dB}
300	541.70 ± 28.04 ^{bAB}	580.10 ± 10.96 ^{bA}	1 057.77 ± 15.69 ^{cdB}
200	536.40 ± 52.03 ^{bAB}	504.99 ± 28.52 ^{cB}	1 102.20 ± 40.39 ^{bcAB}
100	596.56 ± 14.89 ^{aA}	440.73 ± 15.07 ^{cC}	1 131.92 ± 36.65 ^{abA}
0(对照)	520.37 ± 15.18 ^{bB}	467.08 ± 5.15 ^{dC}	1 156.67 ± 30.52 ^{aA}

图 1a 显示,除 100 μL 酒样外,葡萄糖的添加量与单宁的下降率呈现极显著的正相关关系($P < 0.01$)。其回归方程分别为:

75 μL 酒样

$Y = 0.0008X - 0.025$ ($P = 0.0085 < 0.01$)

100 μL 酒样

$Y = 0.0004X + 0.07$ ($P = 0.0561 > 0.05$)

150 μL 酒样

$Y = 0.0003X - 0.0139$ ($P = 0.0027 < 0.01$)

图 1b 显示,除 150 μL 酒样外,酒中 TPP 的增加

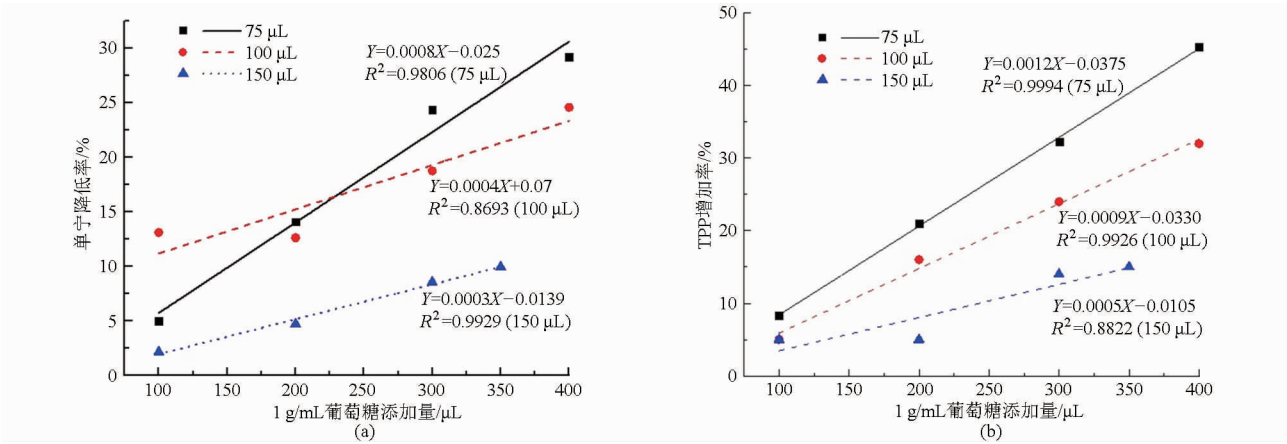


图 1 1 g/mL 葡萄糖的添加量与单宁的降低率和 TPP 增加率之间的关系

Fig.1 Relationship between additive amounts of 1 g/mL glucose solvent and decreasing or increasing percentages of tannin and TPP

率与加入的葡萄糖量呈极显著正相关关系 ($P < 0.01$)。其回归方程分别为:

75 μL 酒样
$$Y = 0.0012X - 0.0375 \quad (P = 0.0003 < 0.01)$$

100 μL 酒样
$$Y = 0.0009X - 0.0330 \quad (P = 0.0036 < 0.01)$$

150 μL 酒样
$$Y = 0.0005X - 0.0105 \quad (P = 0.0585 > 0.05)$$

2.2 果糖

图 2a 显示, LPP 的变化趋势与果糖添加量呈负相关的关系, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。其回归方程分别为:

75 μL 酒样
$$Y = -0.0005X + 0.3215 \quad (P = 0.3453 > 0.05)$$

100 μL 酒样
$$Y = -0.0005X + 0.1620 \quad (P = 0.6068 > 0.05)$$

150 μL 酒样
$$Y = -0.0003X + 0.0456 \quad (P = 0.1664 > 0.05)$$

从果糖的试验结果来看, 与葡萄糖的趋势相似 (表 1 ~ 3), 但对葡萄酒的 LPP 含量几乎没有影响。

由图 2b 可知, 除了 100 μL 酒样外, SPP 的增长率随加入果糖量的增加而显著的增大 ($P < 0.05$)。也就是说, 果糖能增加葡萄酒中 SPP 含量。其中一个原因可能是果糖影响聚合色素和蛋白质的缔合,

从而使 SPP 的含量随果糖的增加而增加。其回归方程分别为:

75 μL 酒样
$$Y = 0.001X - 0.1585 \quad (P = 0.0133 < 0.05)$$

100 μL 酒样
$$Y = 0.0009X - 0.1005 \quad (P = 0.1003 > 0.05)$$

150 μL 酒样
$$Y = 0.0005X - 0.0614 \quad (P = 0.0127 < 0.05)$$

从图 2c 可以看出, 总聚合色素 (TPP) 的增长率呈线性增长的趋势, 而且不论酒样如何稀释, 它们的线性回归方程几乎是平行的, 但只有 150 μL 酒样达到了显著性差异, 这表明聚合色素与蛋白质之间相互作用在一定程度上受到果糖的影响。其回归方程如下:

75 μL 酒样
$$Y = 0.000804X - 0.2375 \quad (P = 0.0882 > 0.05)$$

100 μL 酒样
$$Y = 0.000704X - 0.1285 \quad (P = 0.0733 > 0.05)$$

150 μL 酒样
$$Y = 0.000804X - 0.1056 \quad (P = 0.0160 < 0.05)$$

图 2d 显示, 在测定的反应体系中, 除 100 μL 酒样外, 单宁的含量随果糖含量的增加而极显著的下降 ($P < 0.01$)。说明葡萄酒中果糖含量的增加, 显著地影响到 A-H 法对酒中单宁的测定结果。其回

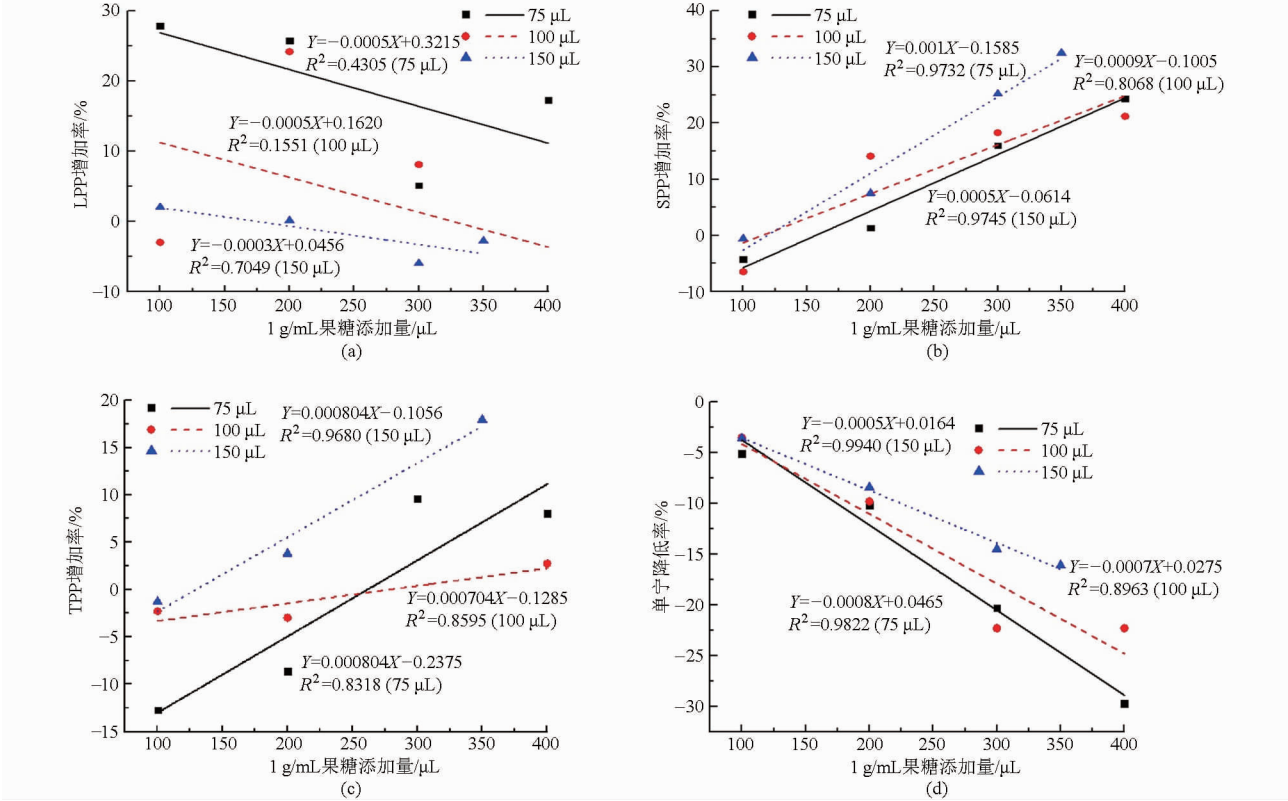


图 2 1 g/mL 果糖的添加量与 LPP、SPP、TPP 的增加率和单宁降低率之间的关系

Fig. 2 Relationship between additive amounts of 1 g/mL fructose solvent and decreasing or increasing percentages of tannin and LPP, SPP and TPP

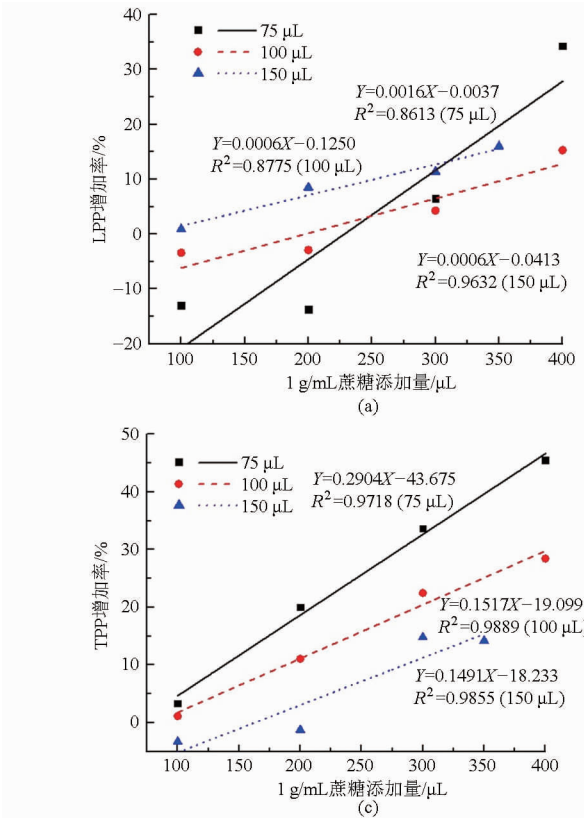
归方程如下：

75 μL 酒样

$$Y = -0.0008X + 0.0465 \quad (P = 0.0088 < 0.01)$$

100 μL 酒样

$$Y = -0.0007X + 0.0275 \quad (P = 0.0532 > 0.05)$$



150 μL 酒样

$$Y = -0.0005X + 0.0164 \quad (P = 0.0031 < 0.01)$$

2.3 蔗糖

蔗糖对葡萄酒聚合色素和单宁的影响结果如图 3 所示。

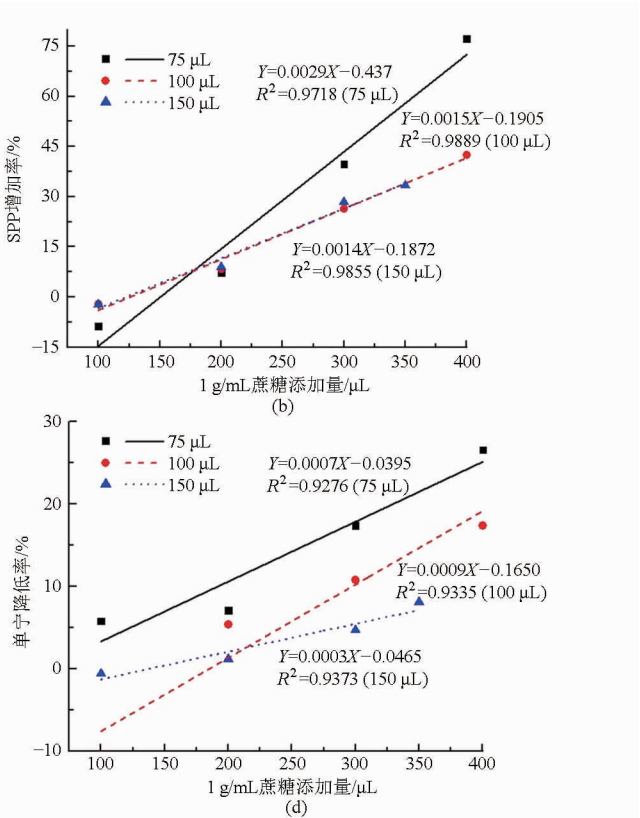


图 3 1 g/mL 蔗糖的添加量对 LPP、SPP、TPP 和单宁的影响
Fig. 3 Effects of additive amounts of 1 g/mL sucrose solvent on LPP, SPP, TPP and tannin

图 3a 显示,蔗糖能降低葡萄酒中 LPP 的含量,其降低幅度随蔗糖加入量的增加而增大,但只有 150 μL 的酒样达到了显著差异 ($P < 0.05$),其他差异不显著。其线性回归方程分别为:

75 μL 酒样品

$$Y = 0.0016X - 0.0037 \quad (P = 0.0720 > 0.05)$$

100 μL 酒样

$$Y = 0.0006X - 0.1250 \quad (P = 0.0633 > 0.05)$$

150 μL 酒样

$$Y = 0.0006X - 0.0413 \quad (P = 0.0178 < 0.05)$$

图 3b 显示,蔗糖显著地增加葡萄酒中 SPP 的含量,其增长率随蔗糖加入量的增加而显著的增大。100 μL 和 150 μL 酒样的线性回归曲线几乎是重叠的,达到了极显著差异。其线性回归方程分别如下:

75 μL 酒样

$$Y = 0.0029X - 0.437 \quad (P = 0.0143 < 0.05)$$

100 μL 酒样

$$Y = 0.0015X - 0.1905 \quad (P = 0.0055 < 0.01)$$

150 μL 酒样

$$Y = 0.0014X - 0.1872 \quad (P = 0.0074 < 0.01)$$

说明蔗糖对葡萄酒中 SPP 的含量影响显著。

蔗糖能极显著地增加葡萄酒中 TPP 的含量,与葡萄糖和果糖一样(图 1b、2c)。图 3c 显示了蔗糖的添加量与 TPP 增加率之间的关系,回归方程分别为:

75 μL 酒样

$$Y = 0.2904X - 43.675 \quad (P = 0.0031 < 0.01)$$

100 μL 酒样

$$Y = 0.1517X - 19.099 \quad (P = 0.0075 < 0.01)$$

150 μL 酒样

$$Y = 0.1491X - 18.223 \quad (P = 0.0065 < 0.01)$$

蔗糖对葡萄酒中的单宁的影响几乎与葡萄糖、果糖一致(图 1a、2d、3d),显著地降低酒中单宁的含量。图 3d 显示,其回归方程分别为:

75 μL 酒样

$$Y = 0.0007X - 0.0395 \quad (P = 0.0370 < 0.05)$$

100 μL 酒样

$$Y = 0.0009X - 0.1650 \quad (P = 0.0340 < 0.05)$$

150 μL 酒样

$Y = 0.0003X - 0.0465$ ($P = 0.0312 < 0.05$)
该公式可以推算出,75 μL 葡萄酒中,添加蔗糖每增加 1 个单位数量,酒中单宁数量下降约 7.28%,在 100 μL 和 150 μL 葡萄酒中,单宁含量分别下降约 8.93% 和 3.35%,进一步证明糖在一定程度上影响单宁的测定结果。

试验数据分析得出,TPP 随着糖含量增加而增加,这表明糖可能影响 A-H 法测定葡萄酒中的聚合色素和单宁。因为糖的存在,可能会与部分色素结合,使得这部分色素会出现耐亚硫酸氢盐漂白的现象^[16],并且随着葡萄糖、果糖浓度的增加,SPP 的含量显著增加,LPP 的含量影响不显著。蔗糖的影响与葡萄糖、果糖相似,但是有所不同,它可以显著地降低 LPP 的含量,显著地增加 SPP 的含量,明显地表现出蔗糖影响蛋白与色素之间的缔合,可能是蔗糖分子结构比单糖大,也可能是其他方面的原因,之前的研究分析了糖对花青素的影响,分析结果是蔗糖对花青素具有保护作用^[17]。虽然,糖对蛋白、单宁反应的沉淀物有一定的影响^[10],但糖对蛋白沉淀法测定葡萄酒中的聚合色素和单宁的影响的具体反应机理尚不清楚,有待进一步研究。

葡萄糖和果糖是在葡萄浆果中主要的单糖^[18],蔗糖在葡萄浆果中的含量以葡萄品种的不同而有差异,经酒精发酵后基本消失,因此,葡萄糖、果糖和蔗糖是葡萄酒酿造过程中主要的糖类物质,对葡萄酒的感官质量具有重要的影响。本试验以赤霞珠干红葡萄酒为研究对象,在其中添加不同种类、不同浓度的糖,然后测定其聚合色素和单宁的含量,试验结果说明高浓度的糖(质量浓度 66.7 ~ 266.7 g/L)对 A-H 法测定酒中单宁和聚合色素有影响,对葡萄汁、浓缩葡萄汁、高糖甜型葡萄酒不适用。

3 结束语

通过各试验分析,结果表明,葡萄糖能增加葡萄酒中 LPP 含量的测定结果,但各处理和对照之间的差异显著性没有规律,影响不大,但是,能显著增加葡萄酒中 SPP 和 TPP 的含量,说明葡萄糖能影响蛋白质与色素的结合。同时,可能由于葡萄糖影响到单宁与蛋白质之间的缔合,导致葡萄酒中单宁含量显著地降低;果糖和蔗糖对 LPP、SPP、TPP 和单宁测定结果的影响也类似于葡萄糖,而且,蔗糖的影响作用更显著。因此,葡萄酒中含糖量很高时,A-H 法测定单宁和聚合色素有一定的局限性。

参 考 文 献

1 Harbertson J F, Kennedy J A, Adams D O. Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2002, 53(1): 54-59.

2 Somers T C, Evans M E. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “chemical age” [J]. Journal of Science of Food and Agriculture, 1977, 28(3): 279-287.

3 Bate-Smith E C. Detection and identification of anthocyanins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues [J]. Biochemistry Journal, 1954, 58(1): 122-125.

4 Haslam E. Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. [M]. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998

5 Hagerman A E, Butler L G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(4): 809-812.

6 Harbertson J F, Picciotto E A, Adams D O. Measurements of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulphite bleaching[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2003, 54(4): 301-306.

7 Rowe J D, Harbertson J F, Osborne J P, et al. Systematic identification of yeast proteins extracted into model wine during aging on the yeast lees[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(4): 2337-2346.

8 Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(8): 3148-3151.

9 Harbertson J F, Spayd S. Measuring phenolics in the winery[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57(3): 280-288.

10 Harbertson J F, Yuan Chunlong, Mireles M S, et al. Glucose, fructose and sucrose increase the solubility of protein-tannin complexes and at high concentration, glucose and sucrose interfere with bisulphite bleaching of wine pigments [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 556-563.

11 胡立志,袁春龙,袁琳. 蛋白沉淀法测定葡萄籽中单宁含量[J]. 北方园艺, 2012(14): 23-26.
Hu Lizhi, Yuan Chunlong, Yuan Lin. The method of tannin-protein precipitate to determinate content of tannins in grape seed [J]. Northern Horticulture, 2012(14): 23-26. (in Chinese)

12 陈曦,周小平,韩舜愈,等. HPLC 测定葡萄和葡萄酒中花色苷[J]. 光谱实验室, 2013, 30(4): 1704-1709.
Chen Xi, Zhou Xiaoping, Han Shunyu, et al. Determination of anthocyanin in grape and wine by HPLC[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2013, 30(4): 1704-1709. (in Chinese)

13 张振文,宁鹏飞,张军贤,等,葡萄酒缩合单宁测定方法的比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(20): 233-237.
Zhang Zhenwen, Ning Pengfei, Zhang Junxian, et al. Comparison of two methods for the determination of condensed tannins in wine[J]. Food Science, 2012, 33(20): 233-237. (in Chinese)

14 李艳,崔彦志,随子华. 橡木桶陈酿干红葡萄酒过程中聚合色素的变化[J]. 酿酒科技, 2009(3): 48-50.
Li Yan, Cui Yanzhi, Sui Zihua. Changes of polymeric tannin during dry red grape wine aging in oak barrel[J]. Liquar-Making Science and Technology, 2009(3): 48-50. (in Chinese)

15 Rio J L P Del, Kennedy J A. Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57(2): 125-132.

16 李华,王华,袁春龙,等. 葡萄酒化学[M]. 北京: 科学出版社, 2005.

17 Wrolstad R E, Skrede G, Lea P, et al. Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries[J]. Journal of Food Science, 2006, 55(4): 1064-1065.

18 Boulton R B, Singleton V L, Bisson L F, et al. Principles and practices of winemaking[M]. New York: Chapman & Hall,1998.

~~~~~

(上接第 269 页)

14 张玉辉,史延桥,王戌晋,等. 乳酸菌和酵母菌联合培养初探[J]. 食品科技,2009,34(2):273-276.  
Zhang Yuhui, Shi Yanqiao, Wang Xujin, et al. Study on co-culture of lactobacillus and yeast[J]. Food Science and Technology, 2009,34(2):273-276. (in Chinese)

15 Kubota H, Senda S, Nomura N, et al. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008,106(4):381-386.

16 Kawai T, Furukawa S, Ogihara H, et al. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14):4673-4676.

17 Furukawa S, Yoshida K, Ogihara H, et al. Mixed-species biofilm formation by direct cell-cell contact between brewing yeasts and lactic acid bacteria[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010,74(11): 2316-2319.

18 Momose H, Iwano K, Tonoike R. Studies on the aggregation of yeast caused by *Lactobacilli* [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1969,15(1):19-26.

19 Furukawa S, Nojima N, Yoshida K, et al. The importance of inter-species cell-cell co-gaareation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011,75(8):1430-1434.

20 Gabriele Pretzer, Johannes Snel, Douwe Molenaar, et al. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Bacteriology,2005,187(17):6128-6136.

21 Marina Alejandra Golowczyc, Pablo Mobili, Graciela Liliana Garrote, et al. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains:evidence for lectin-like activity bacterial surface proteins[J]. Journal of Dairy Research, 2009,76(1):111-116.

22 Yoshio Katakura, Ryosuke Sano, Takashi Hashimoto, et al. Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010,86(1):319-326.

23 Tamime A Y, Marshall V M E. Microbiology and technology of fermented milks[M] //Law B A. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. London: Blackie Academic & Professional,1997.

24 Atsumu Abe, Soichi Furukawa, Shinya Watanabe, et al. Yeasts and lactic acid bacteria mixed-specie biofilm formation is a promising cell immobilization technology for ethanol fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2013, 171(1):72-79.