

蓝莓酒发酵过程中酚类物质动态变化及其抗氧化活性研究

王行¹, 张海宁¹, 马永昆^{1,2}, 叶华¹, 张龙², 李俊芳¹, 于怀龙¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 镇江市果圣源食品科技有限公司, 江苏镇江 212013)

摘要: 以兔眼蓝莓为对象, 研究其发酵过程中酚类物质和抗氧化活性的变化。结果表明: 蓝莓酒发酵过程中, 总酚、总黄酮和花色苷含量以及铁还原力、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率呈先增加后减少的趋势; 颜色分析显示 L* 值先增加后减少, 后酵阶段波动上升, a* 值逐渐上升, 后酵期间波动下降, a* 值变化正相关于花色苷含量的变化, b* 值变化正相关于总酚、总黄酮含量的变化; 蓝莓酒发酵过程中 p-羟基苯甲酸未检出, 香草酸含量显著上升 ($p < 0.05$), 而没食子酸、原儿茶酸、龙胆酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸、p-香豆酸、阿魏酸、芥子酸等 9 种酚酸含量主发酵期间均显著上升 ($p < 0.05$), 发酵结束时含量均显著下降 ($p < 0.05$), 但显著高于各自初始含量 ($p < 0.05$), 对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸和总酚酸含量均呈先增加后减少的趋势。

关键词: 蓝莓酒; 发酵; 酚类物质; 抗氧化; 动态变化

文章编号: 1673-9078(2015)1-90-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.017

Dynamic Changes in Phenolics and Their Antioxidant Activities during the Fermentation of Blueberry Wine

WANG Xing¹, ZHANG Hai-ning¹, MA Yong-kun^{1,2}, YE Hua¹, ZHANG Long², LI Jun-fang¹, YU Huai-long¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2. Zhenjiang Guoshengyuan food co., LTD, JiangSuScience and Technology, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The Rabbiteye blueberry was used as raw material to study changes in phenolic contents and their antioxidant activities during its fermentation. The results showed that during the fermentation of blueberry wine, the trend of increased first and then decreased was observed in the contents of total flavonoids, total polyphenols and anthocyanins, as well as the iron-reducing ability, the DPPH free radical scavenging rate and hydroxyl free radical scavenging rate. Color analysis showed that the L* value increased before decreasing, and it fluctuated and increased in the later stage of fermentation; the a* value increased gradually, and then fluctuated and decreased in the later stage of fermentation. There were positive correlations between the a* value and anthocyanin content and between the b* value and total polyphenol and total flavonoid contents. No p-hydroxybenzoic acid was detected during the fermentation of blueberry wine, while vanillic acid content increased significantly ($p < 0.05$). The contents of nine phenolic acids, namely, gallic acid, protocatechuic acid, gentisic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, p-cumaric acid, ferulic acid, and sinapic acid, significantly increased ($p < 0.05$) during primary fermentation, and significantly decreased ($p < 0.05$) at the end of fermentation, but were still significantly higher ($p < 0.05$) than the contents of those acids in the initial stage of fermentation. Contents of hydroxybenzoic phenolic acids, hydroxy cinnamic phenolic acids, and total phenolic acids increased before decreasing.

Key words: blueberry wine; fermentation; phenolics; antioxidant; dynamic change

蓝莓果实含有丰富的糖、氨基酸、有机酸、维生素等, 此外富含的原花青素、花色苷等多酚类生理活性成分使其具有很强的抗氧化性。以蓝莓为原料酿造

收稿日期: 2014-06-05

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 王行 (1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向超高压食品加工及食品发酵

通讯作者: 马永昆 (1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向超高压食品加工及食品发酵

出的蓝莓酒可充分保留蓝莓果实营养价值及其保健功能, 将逐渐成为蓝莓深加工中的主导产品^[1]。酚类物质作为蓝莓酒中一类重要化合物, 与酒的感官特征 (如颜色、风味等) 密切相关^[2], 同时酚类物质中的类黄酮 (黄酮、异黄酮、花色苷、黄烷醇等) 和酚酸类赋予蓝莓酒极强的抗氧化能力, 能清除人体自由基, 是蓝莓酒保健功能的重要载体^[3]。Rupasinghe 等^[4]研究显示蓝莓酒的总抗氧化能力和总酚含量处于较高水平。刘玉田等^[5]研究发现蓝莓干红总酚含量远高于其它干

红。随着蓝莓酒酚类物质及其抗氧化性能的深入人心,其生产和加工引起生产者和消费者的广泛关注,研究蓝莓酒发酵过程中酚类物质及其抗氧化活性的变化对优化发酵工艺、指导生产实际有着积极的推动作用。此外由于园蓝的可溶性固形物、花色苷和超氧化物歧化酶(SOD)含量等较高,且园蓝果实风味极佳,为此本文以兔眼蓝莓中园蓝为对象,通过采用 RP-HPLC 法分析测定其发酵过程中酚酸含量,对总酚、总黄酮、花色苷的含量及抗氧化活性的变化进行检测分析,同时对发酵过程中与酚类物质有着直接或间接联系的色泽、pH 值的变化实时监控,以期探讨蓝莓酒发酵过程中抗氧化物质的变化规律,科学评价蓝莓酒的抗氧化活性等,为深入开发利用蓝莓资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

兔眼蓝莓,园蓝,江苏省溧水县,-20℃冻藏保存储备用;PC-3型果胶酶,天津利华酶制剂技术有限公司;偏重亚硫酸钾,天津万橡酒业有限公司;活性干酵母,LaLvin-71B;蔗糖,江苏大学恺源超市;没食子酸、原儿茶酸、龙胆酸、P-羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、绿原酸、咖啡酸、P-香豆酸、芥子酸,Sigma-ALdrich公司;儿茶素,Sigma-ALdrich公司;福林酚试剂,上海荔达生物科技有限公司;甲醇,美国Tedia公司;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司;其余试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

BS-224-S电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;HR2826型飞利浦打浆机,珠海飞利浦家用电器有限公司;PHS-3TC型数显酸度计,上海天达仪器有限公司;Avanti Centrifuge J-25型冷冻离心机,Beckman公司;HH-6恒温水浴锅,国华电器有限公司;UV-1600紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;DC-P3全自动测色色差计,北京兴光测色仪器公司;0.45 μm混合纤维树脂微孔滤膜,上海市新亚净化器件厂;LC-20A高效液相色谱仪,日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蓝莓酒样品

冷冻蓝莓▽常温自然解冻▽打浆(SO₂添加量为60 mg/L)▽酶解(0.35%,40℃,1.5h)▽成分调整(酵母接种量0.10%,糖度22.9%)▽主发酵(23℃,7d)▽分离酒液▽后酵(18℃,

18d)▽下胶澄清▽灭菌▽灌装

按上述工艺参数发酵蓝莓酒,于发酵过程中取样,发酵液经10000 r/min离心10 min后,取上清液得蓝莓酒样直接测定其色泽、酚类物质含量及抗氧化活性;另取离心后上清液经0.45 μm有机滤膜过滤后直接进样测定酚酸含量。

1.3.2 颜色分析

采用L*、a*、b*表色系统^[6],样品颜色由L*(光泽度),a*(红色/绿色)和b*(黄色/蓝色)三坐标空间定义,a*>0表示样品颜色偏红,a*<0表示样品颜色偏绿;b*>0表示样品颜色偏黄,b*<0表示样品颜色偏蓝。以标准白板(X=94.83,Y=100,Z=107.381,X、Y、Z为样品的三刺激值,分别为红原色刺激量,绿原色为刺激量,蓝原色为刺激量)为对照,测定样品的L*、a*、b*值。

1.3.3 蓝莓酒酚类物质的测定

1.3.3.1 花色苷含量的测定

采用pH示差法^[7]。取两个10 mL容量瓶,各加入1 mL的蓝莓酒样,分别用pH 1.0的缓冲液(0.2 mol/L KCl:0.2 mol/L HCl=25:67 (V/V))和pH 4.5的缓冲液(1 mol/L NaAc:1 mol/L HCl:H₂O=100:60:90 (V/V/V))定容后混匀,在冰箱中(4℃)静置2 h,分别测定pH 1.0和pH 4.5缓冲液中样品在510 nm和700 nm波长下的吸光度,按式(1)计算花色苷含量:

$$\text{花色苷含量 (mg/L)} = \frac{A \times M_w \times D_f \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (1)$$

注:A=(A₅₁₀-A₇₀₀)_{pH1.0}-(A₅₁₀-A₇₀₀)_{pH4.5},D_f为稀释倍数,ε为摩尔吸光度(26900 L/mol cm),L为比色皿的光程长度(1.0 cm),M_w为分子量(以矢车菊-3-葡萄糖苷计算,M_w=449.2 g/mol)

1.3.3.2 总酚含量的测定

参考李巨秀等^[8]的方法,并做适当改进。取0.1 g焦性没食子酸稀释至1000 mL,分别取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL该焦性没食子酸溶液于七个10 mL具塞试管中,加入2 mL LFC试剂(10%),30 s后加入4 mL 12% (m/V) Na₂CO₃溶液,混匀后加水定容摇匀,25℃下避光反应2 h,蒸馏水为参比溶液,在760 nm波长下比色,测定吸光度,结果用焦性没食子酸当量表示。焦性没食子酸标准曲线y=0.2016x+0.0254 (R²=0.9935),蓝莓酒中总酚含量按照以下公式计算:

$$\text{吸光度值} A = 0.2016 \times \text{总酚含量} + 0.0254$$

1.3.3.3 总黄酮含量的测定

参考Wolfe等^[9]的方法,并做适当改进。分别取浓度为25、50、75、100、125、150 mg/mL的儿茶素

1 mL, 加入 5 mL 双蒸水, 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液, 混匀静置反应 5 min, 加入 0.6 mL 10% AlCl₃ 溶液, 混匀反应 6 min 后, 加入 2 mL 1 M NaOH 溶液, 1 mL 去离子水, 混匀后 510 nm 处比色, 结果用儿茶素等价值(CE)表示。儿茶素标准曲线 $y = 0.0044x + 0.0034$ ($R^2 = 0.9994$), 蓝莓酒中总黄酮含量按照以下公式计算:

$$\text{吸光度值} A = 0.0044 \times \text{总黄酮含量} + 0.0034$$

1.3.3.4 酚酸含量的测定

色谱分析条件^[10]

色谱柱: AgiLent 20RBAX-SB C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 紫外检测波长在 11~15 min 为 320 nm, 其余时间为 280 nm; 柱温 30 °C; 进样体积 20 μL; 采用峰面积外标法定量。

梯度洗脱: 流动相 A: 甲醇+乙酸+水 (10:2:88); 流动相 B: 甲醇+乙酸+水 (90:2:8), 流速为 1 mL/min。

洗脱顺序: 0~25 min, B 为 0%~15%; 25~45 min, B 为 15%~50%; 45~53 min, B 为 50%~0%。

标准工作曲线的建立

准确配制 1 mg/mL 的 11 种酚酸混合标准溶液, 按要求配制 5 个浓度水平, 每个水平重复 3 次, 按上述色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 计算标准曲线。

1.3.4 蓝莓酒抗氧化活性测定

铁还原力的测定参考时磊等^[11]的方法; DPPH 自由基清除率测定参考 Brand-Williams 等^[12]的方法, 羟自由基清除率测定参考 Sroka 等^[13]的方法, 并做适当改进。

1.4 数据分析

试验结果数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 试验重复三次, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 蓝莓酒发酵过程中色泽的变化

由图 1 可知, 主发酵期间 L* 值先增后减, 发酵 7 d 时达最大值; 后发酵阶段 L* 值波动上升, 可能是由于蓝莓酒后发酵过程体系不稳定及花色苷严重损失引起的。

蓝莓酒 a* 值主发酵前期 (0~2 d) 无显著差异 ($p > 0.05$), 4~7 d 显著增大 ($p < 0.05$), 可能由于花色苷类物质逐渐被浸提出来; 后发酵期间 a* 值波动下降。

蓝莓酒发酵过程中 b* 值与总酚、总黄酮含量的变化趋势一致, 主发酵期间随发酵时间的延长显著上升

($p < 0.05$), 这是由于总酚、总黄酮等酚类物质是产生酒液黄色色调的来源, 在主发酵期间含量增加; 发酵 10~22 d 时, b* 值显著降低 ($p < 0.05$), 可能是由于酚类物质的聚合, 发酵 22 d 与 25 d 的 b* 值无显著差异 ($p > 0.05$), 说明后发酵后期 b* 值变化不大; 针对整个发酵过程而言, 蓝莓酒发酵结束时 b* 值无显著差异 ($p > 0.05$)。

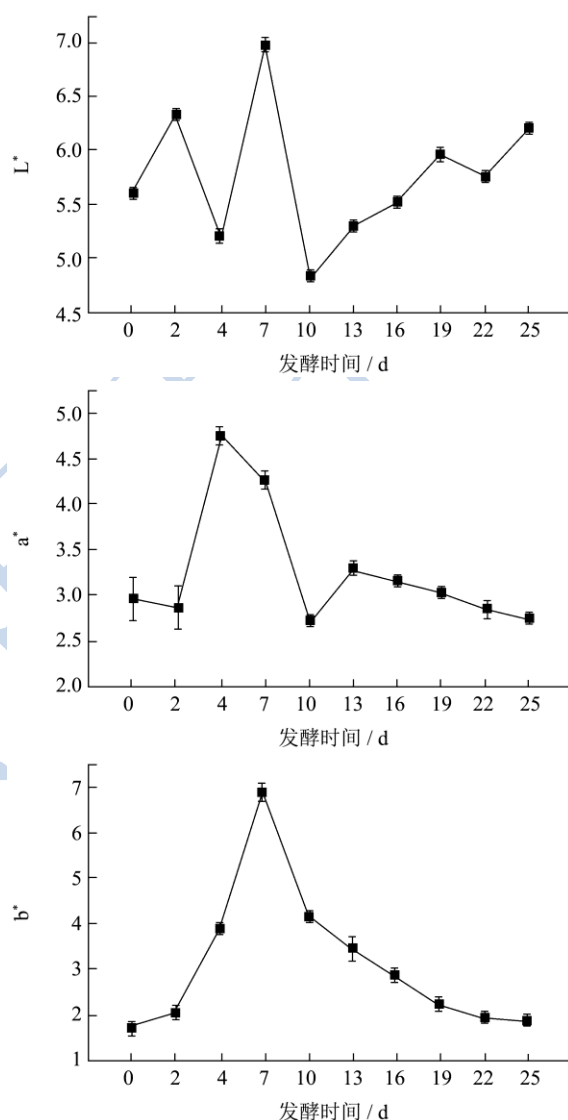


图 1 蓝莓酒发酵过程中 L*, a*, b* 的变化

Fig.1 Changes in L*, a*, and b* during the fermentation of blueberry wine

2.2 蓝莓酒发酵过程中花色苷含量的变化

由图 2 可知, 主发酵初期, 由于花色苷的积累及酒精的浸提作用, 花色苷含量在发酵 2 d 时出现峰值, 达 369.05 mg/L, 后随发酵时间延长, 发酵液中花色苷含量呈下降趋势, 至发酵 7 d 时花色苷含量为初始含量的 70.94%, 可见主发酵期间花色苷降解较快。发酵 7 d 到 16 d 花色苷含量下降趋势减缓, 为初始含量的

60.34%，该时间段下降了 10.65%，可见发酵液中糖浓度降低时，花色苷下降速度变慢。后发酵后期（16~25 d）下降趋势增快，但下降幅度远小于主发酵期间的 2~7 d。蓝莓酒发酵过程中花色苷含量的下降，前期可能主要是受酵母对色素的吸附、微生物产生的酶促作用的影响，后期则可能主要是单宁类物质和花色苷的聚合的影响^[14~16]。

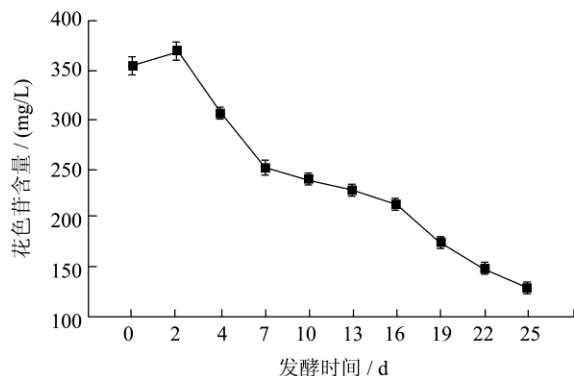


图 2 蓝莓酒发酵过程中花色苷含量的变化

Fig.2 Change in anthocyanin content during the fermentation of blueberry wine

2.3 蓝莓酒发酵过程中总酚和总黄酮含量的变化

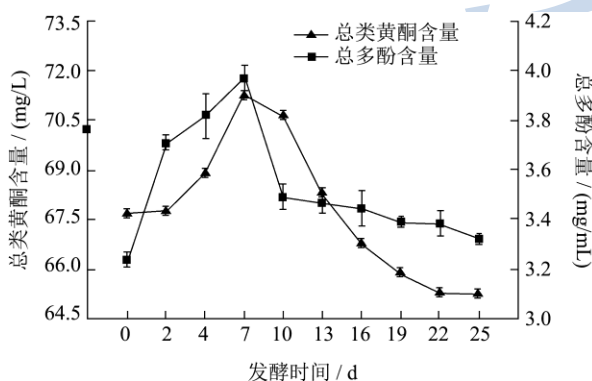


图 3 蓝莓酒发酵过程中总酚和总黄酮含量的变化

Fig.3 Changes in total polyphenol and total flavonoid contents during the fermentation of blueberry wine

由图 3 可知，总酚和总黄酮含量在蓝莓酒整个发酵过程中变化趋势相同。主发酵期间，总酚和总黄酮逐渐被浸提出来，含量均逐渐增加，从时间上看总酚和总黄酮含量增加滞后于花色苷物质。在发酵 7 d 时分别达到峰值 3.97 mg/mL、71.25 mg/L，发酵 7 d 后，含量均逐渐降低，至发酵终止变化平缓，两者含量基本保持稳定，可能是单宁类等物质聚合、酚类物质氧化作用的结果^[17]。

2.4 蓝莓酒发酵过程中抗氧化活性的变化

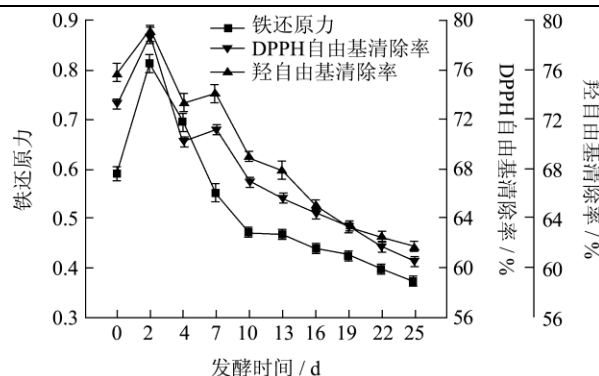


图 4 蓝莓酒发酵过程中抗氧化能力的变化

Fig.4 Changes in antioxidant abilities during the fermentation of blueberry wine

由图 4 可知，铁还原力、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率三者较为一致地描述了发酵过程中抗氧化活性的变化规律。铁还原力、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率均在主发酵 2 d 时达到峰值，这与发酵初期花色苷不断被浸提出来有关，而后由于花色苷降解均呈下降趋势；发酵 7 d 时，DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率均略有增加，这可能与总酚、总黄酮含量发酵 7 d 时达到峰值有关。

2.5 蓝莓酒发酵过程中酚酸含量的变化

将 11 种酚酸标品调至合适浓度，在上述色谱条件下分别进样，同时采用增高法定性，确定各自保留时间。由图 5 可知，11 种酚酸在 53 min 内得到了很好的分离，且各酚酸标准品溶液浓度与相应的响应值呈良好的线性关系，满足定量要求。

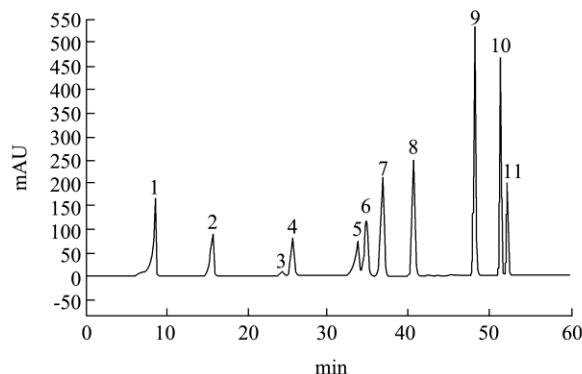


图 5 11 种酚酸标准品色谱图

Fig.5 Chromatography of 11 phenolic acid standards

注：1.没食子酸，2.原儿茶酸，3.龙胆酸，4.p-羟基苯甲酸，5.绿原酸，6.香草酸，7.咖啡酸，8.丁香酸，9.p-香豆酸，10.阿魏酸，11.芥子酸。

由图 6 可知，蓝莓酒 11 种酚酸的检测中，p-羟基苯甲酸未检出。发酵 0 d 时绿原酸含量最高，达 475.17 mg/L，其次是阿魏酸与芥子酸。蓝莓酒发酵过程中，香草酸含量显著上升 ($p < 0.05$)；没食子酸、原儿茶酸、

龙胆酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸、p-香豆酸、阿魏酸、芥子酸等 9 种酚酸主发酵期间含量均显著上升 ($p<0.05$), 至发酵 25 d 时, 以上 9 种酚酸含量均显著下降 ($p<0.05$), 但显著高于各自发酵 0 d 时的初始含量。

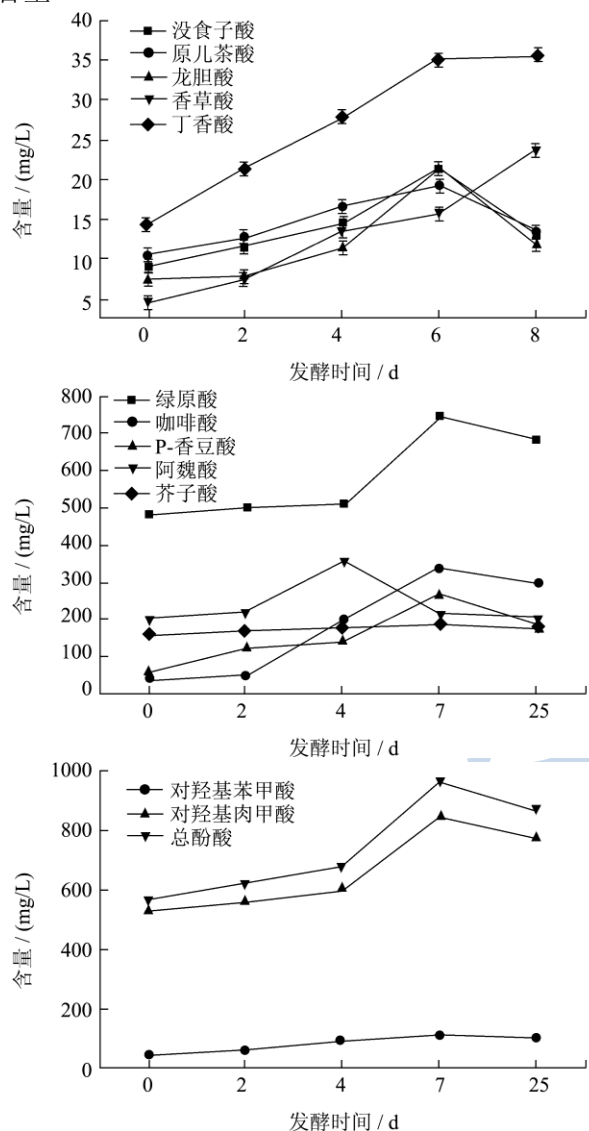


图 6 蓝莓酒发酵过程中酚酸含量的变化

Fig.6 Changes in phenolic acid contents during blueberry wine fermentation

对羟基苯甲酸类、对羟基肉桂酸类和总酚酸含量主发酵期间均显著增加 ($p<0.05$), 呈上升趋势, 在发酵 7 d 时达最大值, 此时三者含量分别为各自发酵 0 d 时初始含量的 2.60 倍、1.89 倍、7.76 倍; 此后对羟基苯甲酸类、对羟基肉桂酸类和总酚酸含量均显著下降 ($p<0.05$), 发酵 25 d 时三者含量显著高于发酵 0 d 时各自含量。对羟基苯甲酸类、对羟基肉桂酸类和总酚酸含量与总多酚, 总类黄酮含量的变化趋势基本一致。

3 结论

3.1 蓝莓酒发酵过程中, 颜色分析显示光泽度 L^* 值先增加后减少, 后酵阶段波动上升; a^* 值逐渐上升, 后酵期间波动下降, a^* 值正相关于花色苷含量的变化, b^* 值变化正相关于总多酚、总类黄酮含量的变化。

3.2 蓝莓酒发酵过程中, 总多酚、总类黄酮和花色苷含量以及铁还原力、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率呈先增加后减少的趋势; p-羟基苯甲酸未检出, 香草酸含量显著上升 ($p<0.05$), 没食子酸、原儿茶酸、龙胆酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸、p-香豆酸、阿魏酸、芥子酸等 9 种酚酸含量主发酵期间均显著上升 ($p<0.05$), 发酵结束时含量均显著下降 ($p<0.05$), 但显著高于各自初始含量 ($p<0.05$), 对羟基苯甲酸、对羟基肉桂酸和总酚酸含量均呈先增加后减少的趋势。

3.3 蓝莓酒发酵过程中酚类物质含量的变化正相关于抗氧化活性的变化。

参考文献

- [1] 梁晨,张倩雯,盛启明,等.不同品种蓝莓酒抗氧化能力及其多酚含量分析[J].中国酿造,2013,8:46-49
LIANG Chen, ZHANG Qian-wen, SHENG Qi-ming, et al. Different varieties of blueberry wine antioxidant capacity and polyphenols content analysis [J]. China Brewing, 2013, 8: 46-49
- [2] Lee C A J. Phenolic compounds in white grapes in New York [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1987, 38: 277-281
- [3] Patricia Benteza, Remedios Castroa, Jose Antonio Sanchez Pazob, et al. Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning [J]. Food Research International, 2002, 35: 785-791
- [4] Rupasinghe H P V, Clegg S. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20(2): 133-137.and Wine, 2001, 2: 48-50
- [5] 刘玉田,赵玉平,邹琴.蓝莓干红的抗氧化能力分析[J].酿酒,2008,1:98-100
LIU Yu-tian, ZHAO Yu-ping, ZOU Qin. Blueberry dry red antioxidant capacity analysis [J]. Journal of Wine, 2008, 1: 98-100
- [6] Nollet L M. Handbook of Food Analysis: Physical characterization and nutrient analysis [M]. CRC Press, 2004
- [7] Lee J, Durst R W, Wrolstad R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices,

- beverages, natural colorants, and wines by the ph differential method: collaborative study [J]. *Journal of AOAC International*, 2005, 88(5): 1269-1278
- [8] 李巨秀,王柏玉.福林-酚比色法测定桑椹中总多酚[J].*食品科学*,2009,18:292-295
LI Ju-xiu, WANG Bai-yu. The folin-phenol colorimetric method determination of total polyphenols in mulberry [J]. *Food Science*, 2009, 18: 292-295
- [9] Wolfe K, Wu X, Liu R H. Antioxidant activity of apple peels [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(3): 609-614
- [10] 陈建业.葡萄酒中酚酸及葡萄果实苯丙烷类代谢途径研究[D].中国农业大学,2005
CHEN Jian-Ye. Study on the phenolic acids in wines and phenylpropanoid metabolism in grape berries [D]. Agricultural University of China, 2005
- [11] 时磊.总抗氧化能力、总酚测定方法的优化及在蓝莓葡萄干红酒酿造中的应用研究[D].烟台大学,2010
SHI Lei. Total antioxidant capacity, total phenol determination method of optimization and its application in blueberries GanHongJiu brewing grape research [D]. YanTai University, 2010
- [12] Brand-Williams, W Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28: 25-30
- [13] Sroka Z C W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids [J]. *Food Chemistry and Toxicology*, 2003, 41: 753-758
- [14] Bal k J. Dynamics of changes in total anthocyanins during the fermentative maceration of grapes [J]. *Horticultural Science-UZPI (Czech Republic)*, 2006
- [15] Morata A, Gómez-Cordov é M, Colomo B, et al. Cell wall anthocyanin adsorption by different saccharomyces strains during the fermentation of vitis vinifera l. cv graciano grapes [J]. *European Food Research and Technology*, 2005, 220(3-4): 341-346
- [16] Romero-Cascales I, Fernández-Fernández J I, López-Roca J M, et al. The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine [J]. *European Food Research and Technology*, 2005, 221(1-2): 163-167
- [17] 黄晓杰,柴哲,杨钟燕,等.蓝莓酒发酵过程中抗氧化物质变化规律研究[J].*食品工业科技*,2013,17:103-105,109
HUANG Xiao-Jie, CHAI Zhe, YANG Zhong-Yan, et al. Research of the change rules of antioxi-dant substances of blueberry wines during fermentation [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2013, 17: 103-105, 109