

菠萝酒中 SO₂ 天然替代物的筛选及其抗氧化机理的分析

张大为, 张洁, 闫佳, 田永航, 裴志胜

(海南热带海洋学院生命科学与生态学院, 海南省海洋食品工程技术研究中心, 海南三亚 572022)

摘要: 选取具有潜在抗菌及抗氧化潜力的 27 种中草药为研究对象, 分别通过抗菌实验和抗氧化实验来确定能够替代 SO₂ 中药的抗菌性和抗氧化性, 并对加入被确定具有较强抗氧化和抗菌性中药后的菠萝酒进行氧化还原电位和多元聚合度测定, 结果表明: 在被测试所有中药中, 酸枣仁的抗菌和抗氧化能力最强, 具有替代菠萝酒中 SO₂ 的潜力, 其中在菠萝酒中最适宜添加量为 2.5 mL/100 mL。与 SO₂ 相比, 酸枣仁对菠萝酒酿造菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 的影响较小, 适合于菠萝酒的酿造。酸枣仁加入到菠萝酒中以后, 菠萝酒的氧化还原电位与对照组相比, 在发酵 1~5 d 内呈逐渐降低的趋势, 从而减少酒体氧化; 菠萝酒加入酸枣仁以后, 使得菠萝酒中的多酚聚合度相对于对照组来说是降低, 进而延缓了氧化速度。

关键词: 菠萝酒; 二氧化硫; 替代物; 抗菌性; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2018)06-157-161

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.021

Screening of Natural SO₂ Substitutes in Pineapple Wine and Preliminary Study on Its Antioxidant Mechanism

ZHANG Da-wei, ZHANG Jie, YAN Jia, TIAN Yong-hang, PEI Zhi-sheng

(Hainan Tropical Ocean University, College of Life Science and Ecology, Hainan Engineering Research Center of Seafood, Sanya 572022, China)

Abstract: 27 kinds of Chinese herbal medicine with the potential ability of antibacterial and antioxidant were selected as the research objects. The Chinese herbal medicine with the ability of replacing the antibacterial and antioxidant of SO₂ were determined through the antibacterial and antioxidant experiments. The oxidation-reduction potential and polyphenol polymerization of the pineapple wine were investigated after adding strong antioxidant and antibacterial Chinese herbal medicine in the study. The results showed that *Semen zizyphi spinosae* had the best antibacterial and antioxidant properties in the pineapple wine, which was selected as the substitute of SO₂ through the antibacterial and antioxidant experiments with the suitable addition amount of 2.5 mL/100 mL. The effect of *Semen zizyphi spinosae* on the brewing strain *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 was lesser than SO₂. Compared with the control group, the oxidation-reduction potential of pineapple wine showed a gradual decrease in fermentation 1~5 d. Thereby the oxidation degree of pineapple wine was reduced. Besides, the polyphenol polymerization in the pineapple wine was decreased after adding *Semen zizyphi spinosae*, and the oxidation rate was slowed down accordingly.

Key words: pineapple wine; SO₂; substitute; antibacterial; antioxidant

果酒酿造过程中, SO₂ 作为添加剂一直沿用至今, 主要在酿造、存储等环节中起到抗菌和抗氧化两个作用^[1-3]。在果酒中 SO₂ 主要抑制酪氨酸酶、过氧化物酶、多酚氧化酶等引起的酶促褐变及非酶促褐变, 保护了果酒中多酚等还原性物质, 进而减少酒体的氧化程度^[4-7]。另一个方面 SO₂ 能够抑制果酒中腐败菌(包括野

生酵母、有害乳酸菌和醋酸菌)的生长, 主要通过与其腐败菌结构蛋白中的酶、辅酶、核酸等物质发生反应来起到防腐杀菌的作用^[8]。

尽管 SO₂ 在果酒中能够起到抗菌和抗氧化作用, 但据报道它也会给人类的健康造成影响。大量研究结果表明, SO₂ 能引起诸多包括皮炎、荨麻疹、血管性水肿、腹泻、腹痛、支气管狭窄和过敏反应等能使动物出现胃部发生病变、硫胺素缺乏及生长缓慢等健康问题。人体尤其是敏感人群对过量 SO₂ 会出现过敏反应, 超过 1 mg 的计量时, 就会出现哮喘等问题, 大

收稿日期: 2018-02-03

基金项目: 海南热带海洋学院 2017 年科研项目 (RHDXB201709)

作者简介: 张大为 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 应用微生物

通讯作者: 张洁 (1980-), 女, 讲师, 研究方向: 食品科学

约占总过敏人群的4~10%。鉴于此,国际葡萄与葡萄酒组织(OIV)建立了包括葡萄酒在内的果酒中二氧化硫含量的最高限量,当超过10 mg/L的计量时就要表明具体含量,总残留量不能超过50 mg/L,我国对此也有明确的限制,酿造过程中最大使用量不能超过250 mg/L。故找到能够替代SO₂的替代品和方法已成为果酒生产者和研究者的当务之急,已成为生产安全绿色果酒的关键问题之所在^[9-13]。

找到能够替代SO₂抗菌和抗氧化作用的物质将是行之有效的办法。中草药是中华民族的瑰宝,众多中草药都含有丰富的抗菌成分及抗氧化成分,所以以中草药为筛选源,从中找到在果酒中既起抗菌作用又起抗氧化作用中草药在理论上是可行的,从而使减少果酒加工和存储过程中SO₂的用量。本研究选取多种中草药作为筛选源,以菠萝酒为例,考察其在酒中的抗菌和抗氧化作用,希望找到能够减少菠萝酒中SO₂用量的抗菌剂和抗氧化剂,并对其抗氧化机理进行初步研究,为生产出不加SO₂的天然果酒奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要设备

菠萝汁:购买市售新鲜的香水菠萝,制备梨汁,调整糖度为15 Brix,备用;中草药:购于中药店或采于野外;酿造菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02:保存于实验室。

主要试剂:福林酚试剂,上海荔达生物科技有限公司; DPPH (2,2-Diphenyl-1-hydrazyl), Sigma 公司; Tris (三羟甲基氨基甲烷, Tris-hydroxymethyl aminomethane), 上海山浦化工有限公司; 邻苯三酚(焦性没食子酸, Pyrogallol), 贵州遵义佳宏化工有限责任公司; 亚硫酸等其他试剂均为分析纯,由华星试剂公司代购。

主要设备: SP-752 (PC) 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司; ZDJ-4A 型自动电位滴定仪,上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂。

1.2 试验方法及内容

1.2.1 中草药的选择

根据文献资料及前期研究工作,选择具有潜在高效抗氧化性能、抗菌性能的27种中草药为研究对象,作为筛选源。

1.2.2 中草药提取物的制备

每种样品称量2 g加入100 mL三角瓶中,加水20 mL,隔水蒸15 min,过滤分装,冷却,保存至4℃

的冰箱,备用。

1.2.3 菠萝酒酿造工艺

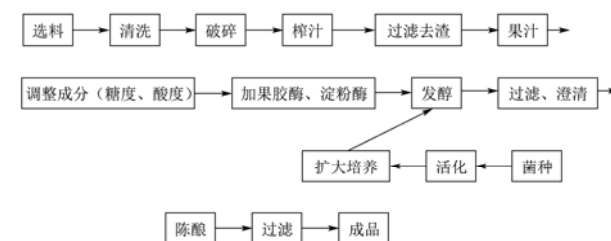


图1 菠萝酒酿造工艺流程图

Fig.1 Process flow chart of pineapple wine brewing

1.2.4 菠萝酒发酵

取100 mL菠萝汁至于150 mL发酵瓶中,加入定量中草药提取物,其中对照组加入3 mL亚硫酸。于27℃培养箱中发酵,前酵时间为8 d。

1.2.5 抗菌实验

采用紫外可见分光光度计 SP-752 (PC) 在波长为570 nm 条件下,定期测定各组菠萝酒的吸光度值,以添加SO₂的样品为标准对照(即每次测定吸光度以添加SO₂的样品作为零点)^[7]。

1.2.6 中药提取物定量实验

选取抗菌效果最好的中药发酵到第5 d时,来确定提取物的最佳添加量。

1.2.7 菠萝酒中总酚含量的测定

采用福林酚法测定菠萝酒中总酚含量。具体操作如下:用移液管精确量取菠萝酒样品0.5 mL于50 mL容量瓶中,加入30 mL蒸馏水,摇匀,再加入2.5 mL福林酚试剂和7.5 mL 20%的Na₂CO₃溶液,用蒸馏水定容并混匀,75℃水浴反应10 min,冷却后于波长760 nm处测吸光度。以添加SO₂的样品作为对照。建立标准曲线,具体操作为:准确称取0.1 mg/mL的没食子酸0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL于50 mL容量瓶中,各加30 mL水,后续按上述方法操作^[14]。

1.2.8 酿造菌株对SO₂替代物的适应性

通过上述筛选,将具有高效抗氧化和抗菌性能的中草药提取物加入到菠萝酒中,考察酿造菌株对其适应性,从而找到最适合菠萝酒发酵的SO₂替代物。

1.2.9 SO₂替代物抗氧化机理的初步探讨

1.2.9.1 菠萝酒氧化还原电位的测定

采用ZDJ-4A型自动电位滴定仪配合恒温搅拌器测定^[15]。

1.2.9.2 多酚相对聚合度的测定

(1) FD值的测定:FD试剂的配制:在150 mL蒸馏水中,加入20 g钨酸钠、4 g磷酸、10 mL磷酸,回流2 h,冷却,稀释至200 mL。于100 mL容量瓶中依次加入2 mL样品、2 mL FD试剂和4 mL 20%

的碳酸钠溶液，混匀后定容，于室温下放置 1 h 后于 760 nm 处测定吸光度值。(2) V 值的测定：于 10 mL 容量瓶中依次加入 2 mL 样品、3 mL 1%香草醛乙醇溶液和 4 mL 浓盐酸，混匀后定容，于室温下放置 30 min 后于 500 nm 处测定吸光度值^[6]。

相对聚合度 (FD/V) = FD 值/V 值

1.3 数据统计分析

所有数据均采用平均值 (Mean) ± 标准差 (SD) 表示。采用 Excel 2010 对数据进行画图。

2 结果与分析

2.1 中草药抗菌实验结果

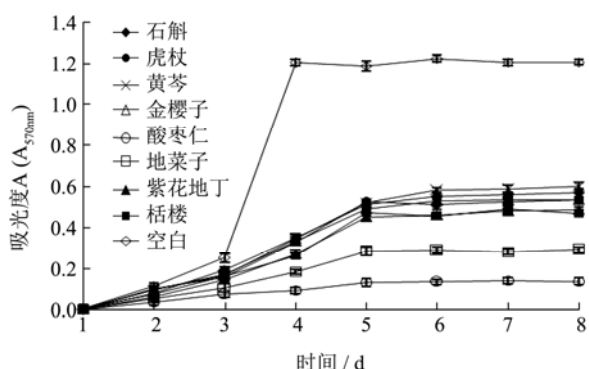


图2 中草药抗菌结果

Fig.2 Antibacterial results of Chinese herbal medicine

27 种中药经过测试发现，有 7 种在菠萝酒中具有良好的抗菌特性，如图 2 所示。从空白曲线可以看出，酒中微生物生长曲线符合单细胞生长规律，这与果酒中腐败菌主要是野生酵母、乳酸菌、醋酸菌的结论是一致的。图中 7 种中药与空白组相比，都具有抗菌的作用，从第 1 d 到第 3 d 的延滞期内菌量缓慢上升，第 3 d 到第 4 d 的对数生长期中呈缓慢上升的趋势，但是与空白组相比，上述速度显著降低。第 5 d 以后进入稳定期，较对空白组来说，进入稳定期延长 1 d。说明这 7 种中药均具有较显著抑制杂菌的作用。从图 2 可以看出，添加酸枣仁之后，菠萝酒在整个发酵过程中的吸光度 $A_{570\text{nm}}$ 均在 0.001~0.141 之间，与添加 SO_2 的菠萝酒最为接近，故酸枣仁的抗菌效果最好，地菜子次之，具有潜在替代菠萝酒中 SO_2 抗菌作用的能力。

表 1 没食子酸含量及对应吸光度值

Table 1 Gallic acid content and the corresponding absorbance values

没食子酸含量/($\mu\text{g/mL}$)	0	1	2	3	4	5	6
$A_{760\text{nm}}$	0.009±0.002	0.104±0.004	0.203±0.004	0.277±0.003	0.441±0.004	0.506±0.003	0.551±0.002

2.2 中草药提取物定量实验结果

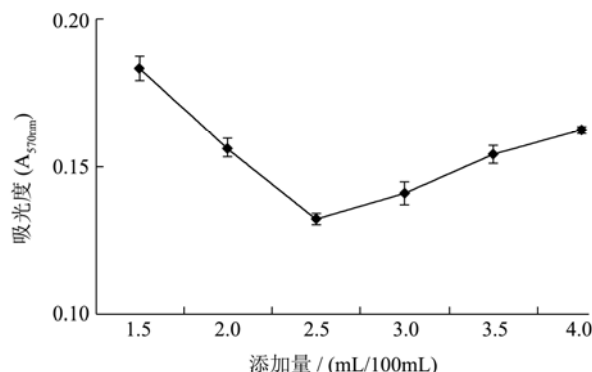


图3 酸枣仁加量对抗菌结果的影响

Fig.3 Effect of the amount of semen zizyphi spinosae on antibacterial results

在菠萝汁中加入抗菌效果最好的酸枣仁，在发酵第 5 d 后检测其抗菌性能。如图 3 所示，添加量从 1.5 mL/100 mL~4 mL/100 mL，发酵酒液在 570 nm 波长下的吸光度呈先下降后上升的趋势。中药提取物在 2.5 mL/100 mL 的加量时，吸光度最低，即含菌量最低，抗菌效果最好。

2.3 福林酚法测定菠萝酒中总酚含量的结果

2.3.1 标准曲线的建立

所得标准曲线如图 4 所示，由上数据可得到标准曲线所对应的方程如下：

$$x = \frac{y - 0.129}{0.0953}$$

式中：y-吸光度值；x-总酚含量 ($\mu\text{g/mL}$)。

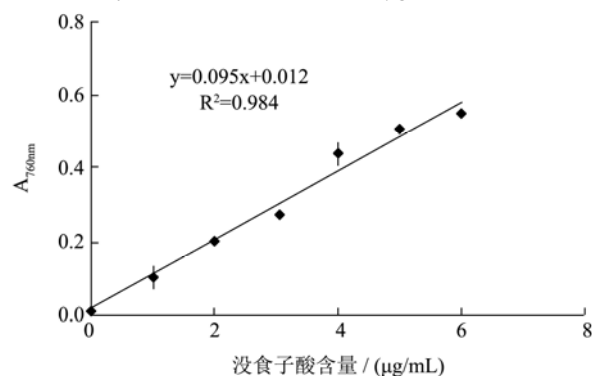


图4 总酚含量测定的标准曲线

Fig.4 Standard curve of total polyphenol content determination

2.3.2 以中草药作为抗氧化剂的菠萝酒中总酚含量的测定结果

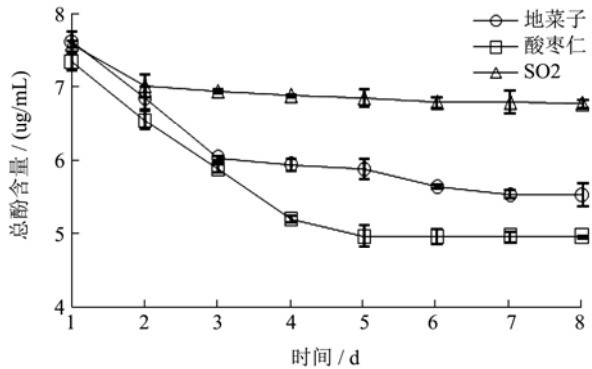


图5 菠萝酒中总多酚含量的变化曲线

Fig.5 Change curve of the whole polyphenol content in the pineapple wine

从图5可以看出,菠萝酒在添加SO₂、地菜子和酸枣仁之后,总多酚含量在发酵前3d之内下降比较明显,其中地菜子在第4d之前下降比较明显。随着发酵的进行,多酚含量趋于稳定。从图可以看出,菠萝酒在添加酸枣仁和地菜子后的多酚含量都与添加SO₂的相接近,均具有替代SO₂抗氧化作用的潜力。酸枣仁在菠萝酒中的抗氧化作用要强于地菜子,故本实验可以确定酸枣仁的抗氧化作用最强。

2.4 SO₂ 替代物对酿造用菌种 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 的影响

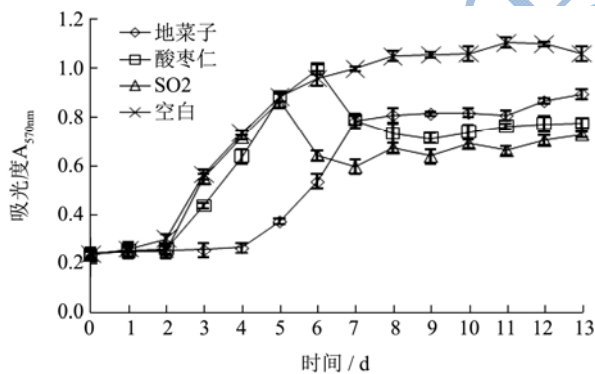


图6 SO₂替代物对酿造菌种 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 的影响

Fig.6 Effect of SO₂ substitution on *Saccharomyces cerevisiae* DJ02

菠萝汁经过121℃、15min灭菌冷却后分别加入地菜子和酸枣仁提取物,本实验为了确定地菜子和酸枣仁提取物对酿造用菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 的影响,以此来确定适合于菠萝酒酿造的替代物。以SO₂和不加任何添加物来酒样作为对照组。如图6所示,酒样中添加SO₂、酸枣仁和地菜子后,均

对 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 的生长具有抑制作用。空白组中第2d酿造菌株开始生长,标志延滞期结束并开始进入对数生长期,从第7d开始进入稳定期。与对照组相比添加SO₂、酸枣仁和地菜子的三种酒样中,酿造菌株均在第2d到第3d之间开始生长,比空白组稍晚,随后生长进入对数生长期。在第6d之前加入SO₂和酸枣仁的酒样中的酿造菌株生长与空白组相比没有被明显抑制,但其在加入地菜子中受到较明显的抑制作用。如图6所示,在发酵第7d以后,菌株生长到达稳定期,与空白组相比,其生长均不同程度地受到SO₂、酸枣仁和地菜子的影响,酸枣仁和地菜子对 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 生长的影响比SO₂都小,说明两者均适合于菠萝酒的发酵。但是,从整个发酵过程来看,地菜子的添加相对于酸枣仁来说延长了酿造菌株的延滞期,表明在发酵前期地菜子抑制作用比较明显。综合来看,酸枣仁更适合于菠萝酒的酿造过程。

2.5 酸枣仁在菠萝酒中的抗氧化机理分析

2.5.1 菠萝酒中氧化还原电位测定结果

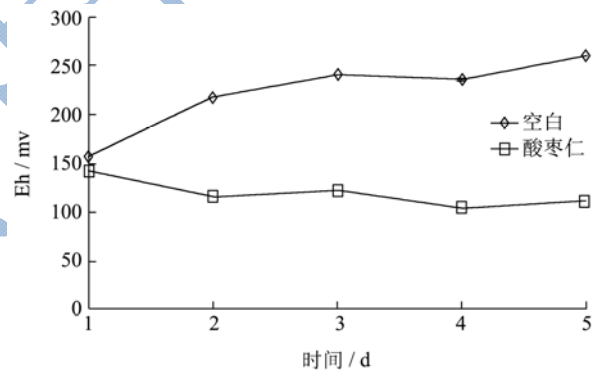


图7 菠萝酒中氧化还原电位的测定结果

Fig.7 Determination results of the oxidation-reduction potential (Eh) in pineapple wine

氧化还原电位可以间接地反应菠萝酒的氧化程度,氧化还原电位低,说明还原性较强,氧化性较弱。从图7可以看出,未加酸枣仁的空白组酒样,其氧化还原电位随着时间的延长呈上升的趋势,而菠萝酒中的多酚含量却呈逐渐降低的趋势,说明其氧化程度在加深。在添加了酸枣仁提取物以后,菠萝酒的氧化还原电位逐渐减低,说明其被氧化的程度较低。综上所述,酸枣仁提取物的添加可以降低菠萝酒的氧化还原电位,延缓多酚类物质的氧化。

2.5.2 菠萝酒中多酚聚合度的测定结果

果酒被氧化主要是非酶褐变,非酶褐变主要分为两步。第一步是酚类物质的氧化,尤其是具有邻羟基结构的多酚最容易被氧化。在氧气和铜铁等金属离子

的参与下,邻羟基酚被氧化生成邻醌或半醌自由基,同时氧被还原为过氧化氢。这一步中生成的醌类物质很不稳定,它能够自发地与菠萝酒中的亲和物质相结合,生成二聚体或多聚体。醌二聚体通过分子结构重排,可以产生新的二酚二聚体,新生成的二酚二聚体或多聚体比之前未聚合的多酚更容易发生氧化反应,从而更容易引起酚类物质的氧化聚合,生成更多的过氧化氢。过氧化氢在金属离子的作用下,发生Fenton反应,生成羟自由基。羟自由基具有极强的氧化性,但由于它存在的时间极短、作用半径也比较小,故最容易与菠萝酒中浓度较高的乙醇发生反应,将其氧化为乙醛。乙醛可以与黄烷醇类化合物反应,生成黄烷醇二聚体或三聚体,进而生成更加复杂的多聚体,从而使菠萝酒的氧化程度加深。

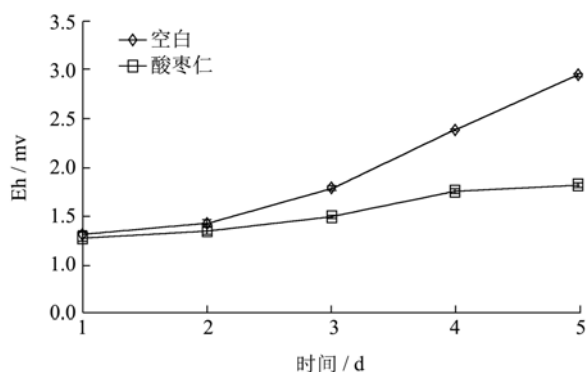


图8 菠萝酒中多酚相对聚合度的测定结果

Fig.8 Determination results of the relative polymerization of polyphenols in pineapple wine

从图8中可以发现,与未添加酸枣仁的菠萝酒相比,加入了酸枣仁提取物后,菠萝酒中多酚的相对聚合度有明显的降低,从而减少羟自由基的产生,进而抑制菠萝酒中多酚的氧化。

3 结论

酸枣仁和地菜子在菠萝酒发酵中具有较好的抗菌和抗氧化性能,其中酸枣仁的抗菌和抗氧化性能较强,具有替代 SO_2 的潜力。酸枣仁的最佳添加量为 2.5 mL/100 mL。酸枣仁应用于菠萝酒发酵中,其对酿造菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DJ02 的影响相对于地菜子和 SO_2 较小。酸枣仁加入到菠萝酒中以后,菠萝酒的氧化还原电位降低,从而减少酒体氧化;菠萝酒加入酸枣仁以后,使得菠萝酒中的多酚聚合度降低,进而延缓了氧化速度。

参考文献

[1] Maria-Ioanna Salaha, Stamatina Kallithraka, Ioannis Marmaras, et al. A natural alternative to sulphur dioxide for

red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and thocyanin content [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21: 660-666

- [2] Carrete R, Teresa Vidal, A Bordons, et al. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(2): 155-159
- [3] R Van Leeuw, C Kevers, J Pincemail, et al. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Piont Noir [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2014, 36: 40-50
- [4] A García-Ruiz, J Crespo, JM López-De-Luzuriaga, et al. Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines [J]. Food Control, 2015, 50: 613-619
- [5] Lucia Rizzotti, Nir Levav, F Fracchetti, et al. Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods [J]. Food Control, 2015, 47: 407-412
- [6] Wilson K, Boreham, G Moran, et al. Applications of radiation within the wine industry [J]. Canadian Undergraduate Physics Journal, 2003, 11: 17-19
- [7] Almudena Garcia-Ruiz, M Victoria, PJ Martín-Álvarez, et al. Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(2-3): 426-431
- [8] Brajkovich M, Tibbits, G Peron, et al. Effect of screwcap and cork closures on SO_2 levels and aromas in a Sauvignon Blanc wine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(26): 10006-10011
- [9] Olga Makhotkina, Paul A, Kilmartin. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 668(2): 155-165
- [10] Pyrzyńska K. Analytical methods for the determination of trace metals in wine [J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2004, 34(2): 69-83
- [11] E Gómez-Plaza, M Cano-López. A review of micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry [J]. Food Chemistry, 2011, 125(4): 1131-1140
- [12] Kenneth J Olejar, Bruno Fedrizzi, Paul A Kilmartin. Enhancement of Chardonnay antioxidant activity and sensory perception through maceration technique [J]. LWT-Food

- Science and Technology, 2016, 65: 152-157
- [13] Maria Nikolantonaki, Igor Chichuc, Pierre-Louis Teissedre, Philippe Darriet. Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 660: 102-109
- [14] 徐辉艳,孙晓东,张佩君,等. 红枣汁中总酚含量的福林法测定[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(3): 126-128
- XU Hui-yan, SUN Xiao-dong, ZHANG Pei-jun, et al. Determination of total polyphenols of chinese jujube juice by Folin-Clocaileu method [J]. *Food Research and Development*, 2009, 30(3): 126-128
- [15] 陈坚生,杨幼慧,蹇华丽,等. 荔枝酒贮藏过程中非酶褐变的因子解析[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(6): 20-25
- CHEN Jian-sheng, YANG You-hui, JIAN Hua-li, et al. Factors analyse on non-enzymatic browning of litchi wine during storage [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(6): 20-25
- [16] 刘伟伟,赵光鳌,徐岩,等. 苹果酒中模拟体系下非酶氧化与酶促氧化对聚合度影响的研究[J]. *酿酒科技*, 2006, 3: 42-44
- LIU Wei-wei, ZHAO Guang-ao, XU Yan, et al. Investigation on the effect of non-enzymatic oxidation & enzymatic oxidation on the polymerization degree of cider under simulation system [J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2006, 3: 42-44