

万 丽, 蹇华丽, 胡 叶, 等. 模拟荔枝酒体系中儿茶素非酶褐变的研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 100-105.

模拟荔枝酒体系中儿茶素非酶褐变的研究

万 丽[†], 蹇华丽[†], 胡 叶, 杨幼慧
(华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究 4 种有机酸、pH、SO₂ 以及金属离子 Cu、Fe 对荔枝酒贮藏期间非酶氧化褐变的影响。【方法】在模拟荔枝酒体系加速褐变条件下, 研究酚类物质儿茶素的变化。【结果和结论】在模拟荔枝酒体系中, 酒石酸和金属离子能够加剧非酶褐变的反应过程, 其中 Fe³⁺ 与模拟酒的褐变呈极显著的正相关, $Y = 0.179X - 0.009X^2$, $R^2 = 0.990$ 。SO₂ 添加量在 40 mg/L 以上时能在一定程度上延缓非酶褐变的发生, 而当 pH 在 3.2~4.0 时, 调整 pH 对抑制或延缓褐变效果不明显。

关键词:模拟荔枝酒; 非酶褐变; 儿茶素
中图分类号:TS262.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)01-0100-06

A study of non-enzymatic browning of (+)-catechin in a simulated litchi wine

WAN Li, JIAN Huali, HU Ye, YANG Youhui
(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】In order to determine the influence of organic acid, pH, SO₂, copper and ferrous ion on non-enzymatic browning of litchi wine during the storage, the browning problem was studied in this paper. 【Method】(+)-Catechin was investigated as representative substance in a simulated litchi wine in accelerating browning test. 【Result and conclusion】It could be observed that tartaric acid, copper and ferrous iron increased the browning, in which the correlation between Fe³⁺ and browning of simulated litchi wine was significant: $Y = 0.179X - 0.009X^2$, $R^2 = 0.990$. The content of SO₂ above 40 mg/L can delay the oxidation to some extent, while the pH adjusted between 3.2 and 4.0 has no obvious influence.

Key words:simulated litchi wine; non-enzymatic browning; (+)-catechin

荔枝酒在贮藏过程中极易发生褐变,严重影响色泽和风味,使其感官品质变劣. 荔枝酒中的酚类物质是引起荔枝酒褐变的主要底物,包括酶促褐变和非酶褐变. 由于荔枝酒酿造期间添加 SO₂ 及采用低温发酵,抑制了氧化酶的活性,因而主要表现为非酶褐变^[1]. 近年来研究表明,含有邻羟基结构的酚类物质在非酶氧化过程中特别重要,其中黄烷醇类,特别是黄烷-3-醇类被认为是非酶褐变中最有效的底物,且褐变主要由其聚合反应引起^[2-3]. 李学伟^[4]和丁娟^[5]的研究表明,黄烷-3-醇类,例如(-)-表儿茶素、原花青素 B₂ 等,是引起荔枝酒非酶褐变的重要酚类物质,引起褐变的最主要原因之一可能是黄烷-3-醇类的氧化聚合反应. 由于荔枝酒中氧化褐变的反应过程及褐变产物组分复杂,直接研究各

收稿日期:2013-04-07 优先出版时间:2013-11-07
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20131107.1500.004.html>
作者简介:万 丽(1989—),女,硕士研究生,E-mail:wanni7715@163.com;蹇华丽(1977—),女,讲师,博士,E-mail:hualij@163.com;† 对本文贡献相同;通信作者:杨幼慧(1956—),女,教授,硕士,E-mail:yhyang@scau.edu.cn
基金项目:科技部农业科技成果转化资金项目(2012E0002005);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-33 荔枝龙眼产业技术体系)

类因素对其褐变的影响及褐变机理难度较大^[1,4].为探明不同因素对荔枝酒褐变的影响,本试验以引起荔枝酒褐变的主要酚类物质黄烷-3-醇类的代表物质儿茶素为研究对象,采用模拟荔枝酒体系,研究有机酸、SO₂、金属离子等因素对其非酶氧化褐变的影响,为控制荔枝酒的褐变提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 仪器

UVmini-1240 型分光光度计, HPLC-1525-2414-2487(美国 Waters 公司),水浴锅,PB-10 酸度计等.

1.2 试剂

(+)-儿茶素(质量分数为 98%),美国 Sigma 公司;乙腈(色谱纯),安徽时联;甲酸(色谱纯),天津科密欧;其余试剂均为分析纯试剂,广州化学试剂厂.

1.3 试验方法

1.3.1 模拟酒溶液的配制及加速褐变处理 用于配制模拟酒的玻璃瓶及试管等用体积分数为 10% 的硝酸浸泡 16 h,再用去离子水冲洗干净后备用.用去离子水配制乙醇水溶液(体积分数为 13%),分别加入 SO₂、有机酸及金属盐、适量的儿茶素(100 mg/L),用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 3.8.将配制好的模拟酒按 50% 体积密封于螺口试管中,放于(55 ± 0.2) °C 水浴锅中避光加热^[6].试验周期为 8 d,每隔 48 h 取样,置于 4 °C 条件下冷藏,供后续分析,所有试验均做 3 组平行.

1.3.2 褐变指数($D_{420\text{ nm}}$)的测定 采用分光光度计法:用 1 cm 比色皿,以蒸馏水为参比,在 420 nm 波长下,使用分光光度计测定其光密度($D_{420\text{ nm}}$).用光密度的大小直接表示非酶褐变的褐变指数^[7].

1.3.3 平均聚合度(mDP)的测定 儿茶素作为原花青素类物质的单体之一,褐变后主要以聚合产物的形式存在,其平均聚合度可利用测定出的质量和物质量浓度求出^[8],计算公式如下:

$$\text{mDP} = \frac{\rho_B}{c_B \times M},$$

其中: M 为儿茶素的摩尔质量(g/mol); ρ_B 为原花青素的质量浓度; c_B 为原花青素的物质量浓度.质量浓度的测定参考魏冠红^[9]的盐酸-香草醛乙醇法,物质量浓度的测定参考 Butler 等^[8]的硫酸-香草醛乙酸法.

1.3.4 HPLC 色谱条件 参考钟慧臻等^[10]的方法略

作调整.色谱柱:Purospher STAR LP RP18,4.6 mm × 250 mm, 5μm;检测波长:280 nm,440 nm;柱温:35 °C;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;流动相:流动相 A 为体积分数为 100% 的乙腈,流动相 B 为体积分数为 0.4% 的甲酸水溶液;梯度洗脱程序:0 ~ 40 min,5% ~ 25% A;40 ~ 45 min,25% ~ 35% A;45 ~ 50 min,35% ~ 50% A.

2 结果与分析

2.1 不同有机酸对模拟酒体系非酶褐变的影响

2.1.1 单一有机酸对模拟酒体系非酶褐变的影响

荔枝果肉中主要含有苹果酸、酒石酸、柠檬酸和琥珀酸等,其中苹果酸含量最高^[11-14].在荔枝酒酿造过程中,为保证发酵安全,需对荔枝汁进行调酸,同时酵母的代谢也影响着有机酸的含量.为了研究上述 4 种有机酸对模拟酒褐变的影响,本研究在各模拟酒溶液中分别添加苹果酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸 5 g/L,SO₂ 80 mg/L,Fe²⁺ 5 mg/L(以 FeSO₄ 形式添加),经加速褐变处理,各模拟酒样的褐变指数($D_{420\text{ nm}}$)和 mDP 变化情况见图 1.

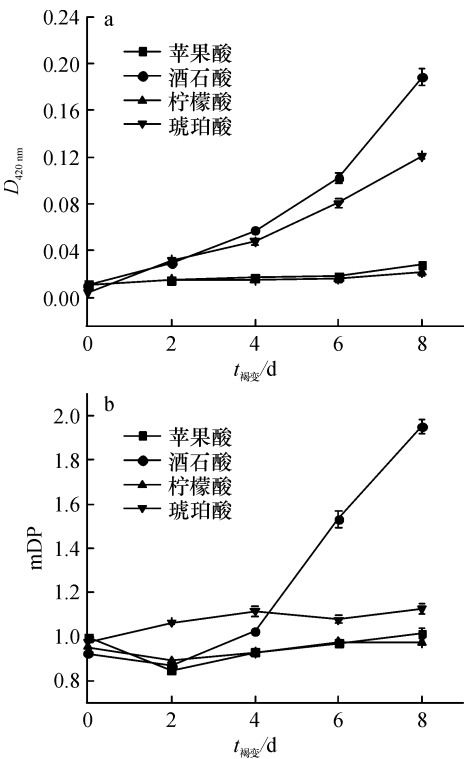


图1 不同有机酸对模拟酒体系 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 的影响
Fig.1 Effects of organic acids on $D_{420\text{ nm}}$ and mDP of simulated litchi wine

由图 1a 可以看出,随着加速褐变时间的延长,添加酒石酸和琥珀酸的模拟酒的 $D_{420\text{ nm}}$ 增加较快,而

添加苹果酸和柠檬酸的模拟酒的 $D_{420\text{ nm}}$ 变化不明显,在加速褐变第 8 天,添加酒石酸、琥珀酸模拟酒的 $D_{420\text{ nm}}$ 与添加苹果酸、柠檬酸的 $D_{420\text{ nm}}$ 差异达极显著 ($P < 0.01$);图 1b 表明:添加酒石酸的模拟酒的 mDP 显著增大,与其余组差异达显著水平 ($P < 0.05$),剩余几组的 mDP 在加速褐变试验过程中变化较小.

2.1.2 不同酒石酸与柠檬酸比例对模拟酒体系非酶褐变的影响 分别配制含酒石酸(5 g/L)、柠檬酸(5 g/L)的模拟酒溶液,按 1:0、0:1、1:1、1:2、2:1、1:3、3:1 的体积比混合,经加速褐变处理后,其 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 变化情况见图 2.

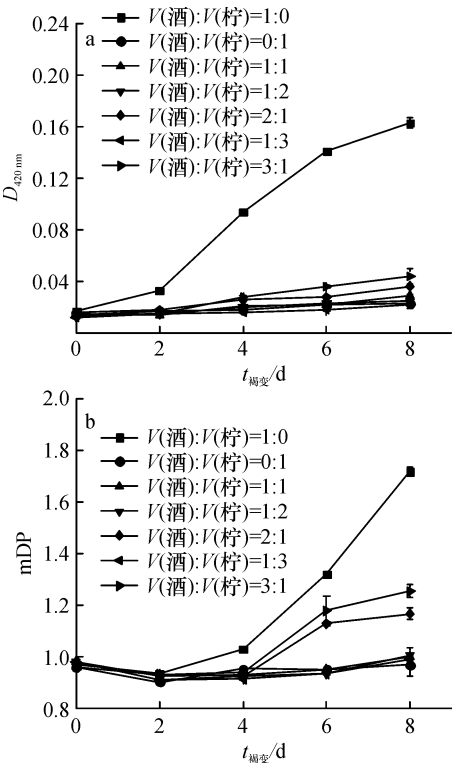


图 2 酒石酸与柠檬酸的比例对模拟酒体系 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 的影响
Fig.2 Effects of different proportions of tartaric acid and citric acid on $D_{420\text{ nm}}$ and mDP of simulated litchi wine

由图 2 可知,随着加速褐变时间的延长,不同酒石酸与柠檬酸配比的模拟酒其 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 差异明显.在加速褐变第 8 天,只添加酒石酸的组别与其余组 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 差异极显著 ($P < 0.01$),而随着酒石酸含量降低, $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 的增幅也趋缓.这表明酒石酸的含量对儿茶素的氧化褐变有较大的影响,在一定范围内,酒石酸含量越高,褐变程度越严重.

2.2 不同 pH 对模拟酒体系非酶褐变的影响 考虑到荔枝酒生产过程中涉及的 pH 区间范围,模拟酒添加酒石酸 5 g/L、 SO_2 80 mg/L、 Fe^{2+} 3 mg/L 后,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 分别至 3.2、3.5、3.8 和 4.0,经加速褐变处理,其 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 变化情况见图 3.

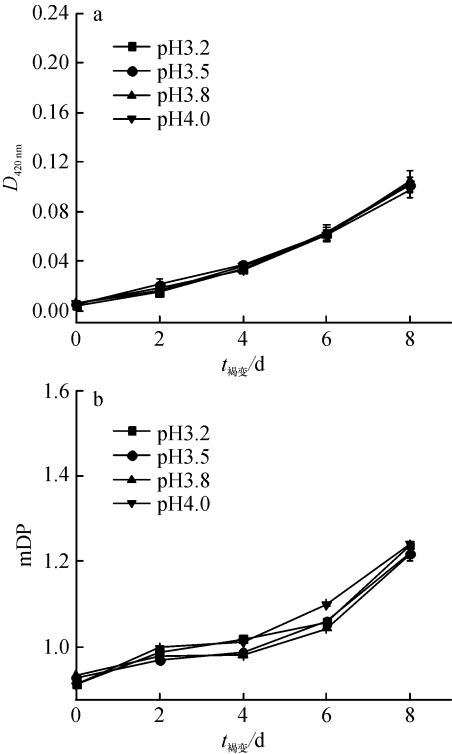


图 3 不同 pH 对模拟酒体系 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 的影响
Fig.3 Effects of pH on $D_{420\text{ nm}}$ and mDP of simulated litchi wine

随着加速褐变时间的延长,不同 pH 的模拟酒 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 虽不断增加(图 3),但不同水平间差异不显著 ($P > 0.05$),说明在 pH 3.2 ~ 4.0 间,通过调整 pH 并不能达到抑制或延缓褐变的目的.

2.3 不同 SO_2 添加量对模拟酒体系非酶褐变的影响

在各模拟酒溶液中添加酒石酸 5 g/L、 Fe^{2+} 3 mg/L,再分别添加 SO_2 40、80、120 mg/L,以未添加 SO_2 为对照(CK),经加速褐变处理,其 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 变化情况见图 4.

由图 4 可知,在加速褐变的前期,未添加 SO_2 的对照组其 $D_{420\text{ nm}}$ 显著高于其余组 ($P < 0.05$);随着加速褐变的时间延长,到褐变的第 8 天添加 SO_2 80 和 120 mg/L 的模拟酒 $D_{420\text{ nm}}$ 显著高于 40 mg/L 和对照组 ($P < 0.05$),且 80 mg/L 添加量的 $D_{420\text{ nm}}$ 最高;mDP 的变化虽不如 $D_{420\text{ nm}}$ 明显,但也有类似变化趋势.说明在褐变前期 SO_2 能有效地抑制褐变反应,而在后

期可能与 SO_2 在褐变过程中参与的氧化还原反应相关:在 SO_2 含量极低的时候,从 Fe^{2+} 到 Fe^{3+} 的氧化可能不够充分,从而限制了酚类物质的金属催化氧化的过程; SO_2 适量时一方面氧化金属离子,另一方面会提高酒中酚类对氧的消耗,加剧酚类的氧化褐变^[15];而当 SO_2 足够多时,可部分抑制酚类物质的氧化^[16].

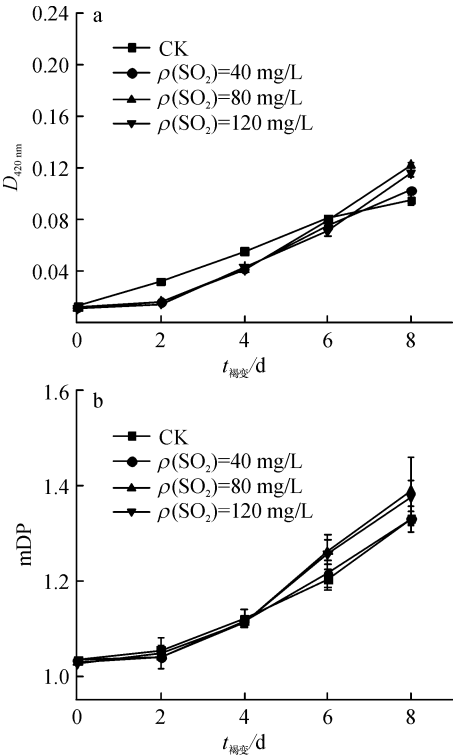


图4 不同 SO_2 添加量对模拟酒体系 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 的影响
Fig.4 Effects of SO_2 on $D_{420\text{ nm}}$ and mDP of simulated litchi wine

2.4 金属离子对模拟酒体系非酶褐变的影响

2.4.1 不同金属离子对模拟酒体系非酶褐变的影响 在各模拟酒溶液中添加酒石酸 5 g/L、 SO_2 80 mg/L,再分别添加 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 3 mg/L (以 FeSO_4 、 FeCl_3 、 CuSO_4 形式添加),以未添加金属离子为对照(CK),经加速褐变处理其 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 变化情况见图 5.

如图 5 所示,所有添加了金属离子的试验组的褐变情况均显著高于对照组 ($P < 0.05$);其中 Fe^{3+} 对褐变的影响最为突出,达极显著水平 ($P < 0.01$),而添加 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 模拟酒的褐变较添加 Fe^{3+} 的轻微,两者之间无显著差异 ($P > 0.05$). 说明金属离子的催化对于酚类的褐变起到了至关重要的作用,其中 Fe^{3+} 催化效率最高.

2.4.2 不同 Fe^{3+} 质量浓度对模拟酒体系非酶褐变的影响 为进一步探讨 Fe^{3+} 的影响,在各模拟酒溶

液中分别添加 Fe^{3+} 0、0.2、1.0、3.0、5.0、10.0 mg/L,经加速褐变处理 8 d 后其 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 变化情况见图 6.

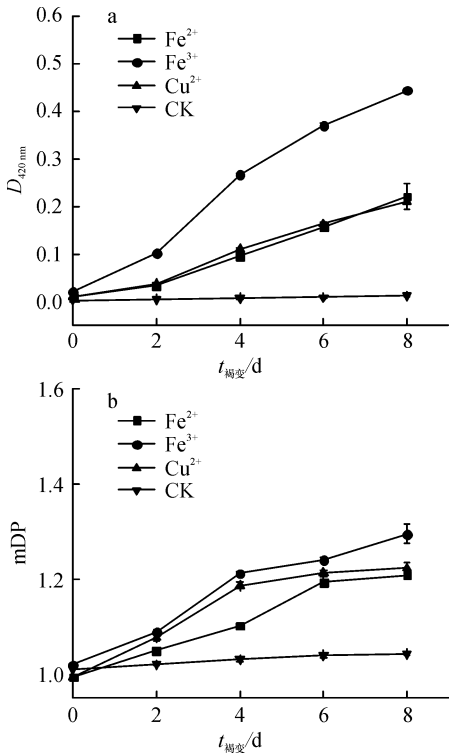


图5 不同金属离子对模拟酒体系 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 的影响
Fig.5 Effects of different metal ions on $D_{420\text{ nm}}$ and mDP of simulated litchi wine

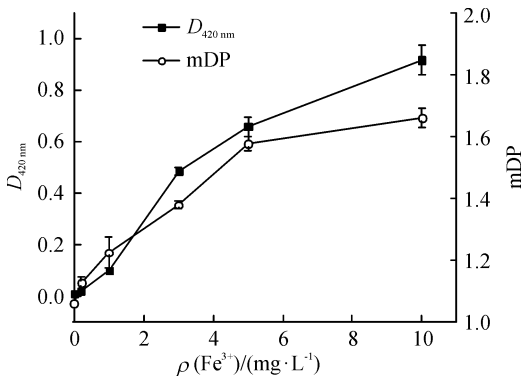


图6 不同 Fe^{3+} 质量浓度对模拟酒体系 $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 的影响
Fig.6 Effects of Fe^{3+} on $D_{420\text{ nm}}$ and mDP of simulated litchi wine

随着模拟酒中 Fe^{3+} 质量浓度的增加, $D_{420\text{ nm}}$ 和 mDP 迅速增大(图 6), Fe^{3+} 质量浓度与 $D_{420\text{ nm}}$ 呈极显著的正相关 ($P < 0.01$);以模拟酒 $D_{420\text{ nm}}$ 作为 Y 值, Fe^{3+} 质量浓度为 X 值,经 SPSS 17.0 对二者进行线性回归分析,两者间线性关系如下: $Y = 0.179X - 0.009X^2$, $R^2 = 0.990$.

2.5 模拟酒体系加速褐变处理后 HPLC 色谱分析

经过紫外可见分光光度计对加速褐变处理前后的模拟酒进行吸收光谱扫描分析,发现经加速褐变的模拟酒吸收波长除在 280 nm 外,在 440 nm 处也有较大吸收(图 7),而未褐变的模拟酒在此处几乎没有吸收;同时,进行 HPLC 色谱分析发现模拟酒褐变后在 440 nm 的 HPLC 色谱峰比未褐变的模拟酒增加了一些未知峰(图 8),其中 a~e 几个峰形与相关文献中研究结果类似,这些最大吸收波长在 440 nm 的物质经质谱分析发现为咕吨鎓盐(Xanthylum salts)阳离子类物质^[17],该类物质为原花青素单体形成的二聚物,说明该条件下模拟酒体系的褐变主要由儿茶素的氧化聚

合反应造成;而其余未知峰因未进行进一步质谱分析难以判定其构成.

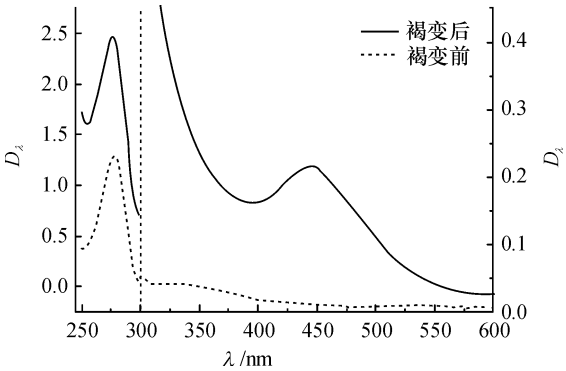
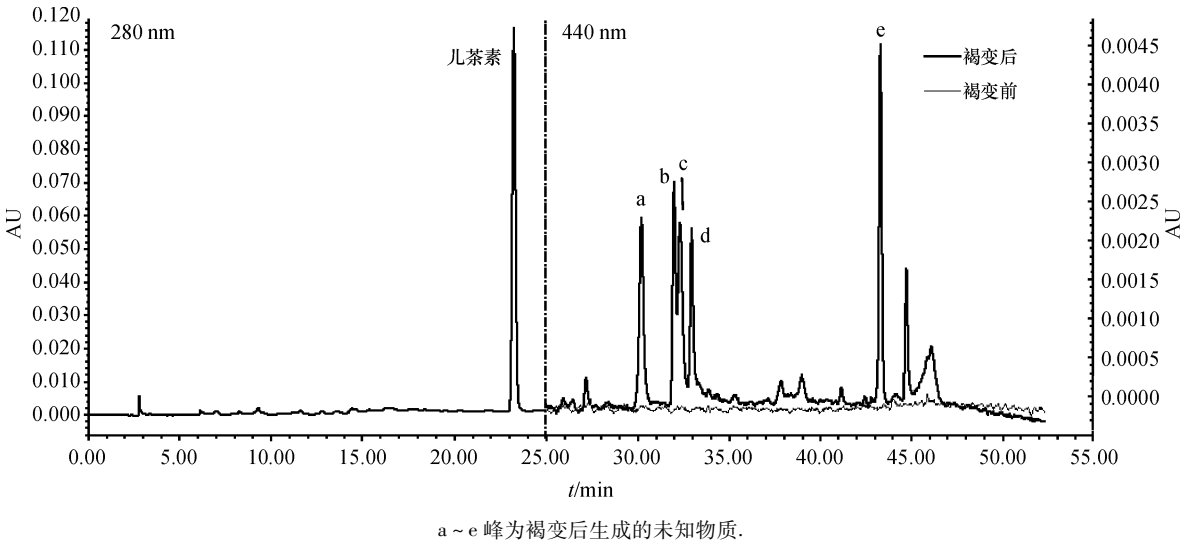


图 7 模拟酒褐变前后吸收光谱比较
Fig. 7 Changes in the absorbance spectra of simulated litchi wine



a~e 峰为褐变后生成的未知物质.
图 8 模拟酒加速褐变前后 HPLC 色谱图
Fig. 8 The HPLC chromatogram of controlled and browned simulated litchi wine

3 讨论与结论

不同有机酸对模拟荔枝酒中儿茶素非酶褐变的影响有较大的差异,其中酒石酸对酚类的氧化褐变有较大的影响; SO_2 与酚类的氧化褐变存在先抑制后促进的关系; Fe 、 Cu 等金属离子对非酶褐变有催化作用,其中 Fe^{3+} 离子的催化作用最强,且催化褐变的程度与其含量呈显著的正相关. Merida 等^[18] 研究认为,引起这一现象的原因可能是酒石酸在金属离子的催化作用下分解为乙醛酸,而乙醛酸在酚类聚合反应的过程中可作为黄烷-3-醇类物质之间的桥接,加剧聚合反应的进程. 相关研究证实, Fe^{3+} 可催化酚类物质氧化生成醌类和 H_2O_2 , 而 H_2O_2 可进一步催化低价态金属离子转化为高价态,并产生羟基

<http://xuebao.scau.edu.cn>

自由基,其作为强氧化剂可进一步加剧整个体系中的氧化褐变反应^[19-20]. 经 HPLC 色谱分析褐变后物质也初步推断,该条件下模拟酒体系的褐变主要由儿茶素的氧化聚合反应造成.

在荔枝酒生产中,可从选择酒石酸含量低的荔枝、控制荔枝酒中 SO_2 添加量及金属离子几方面考虑工艺措施,以减少荔枝酒贮藏过程中非酶褐变的发生.

参考文献:

[1] 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.
[2] FERNANDEZ-ZURBANO P, FERREIRA V, ESCUDERO

- A, et al. Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(12): 4937-4944.
- [3] OLIVEIRA C M, FERREIRA A C S, DE FREITAS V, et al. Oxidation mechanisms occurring in wines [J]. Food Res Int, 2011, 44(5): 1115-1126.
- [4] 李学伟. 酚类物质对荔枝酒非酶褐变影响研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2010.
- [5] 丁娟. 荔枝酒瓶贮期间褐变的控制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- [6] SIOUMIS N, KALLITHRAKA S, MAKRIS D P, et al. Kinetics of browning onset in white wines: Influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity[J]. Food Chem, 2006, 94(1): 98-104.
- [7] SINGLETON V L, KRAMLINGA T E. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity[J]. Am J Enol Vitic, 1976, 27(4): 157-160.
- [8] BUTLER L G, PRICE M L, BROTHERTON J E. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization[J]. J Agric Food Chem, 1982, 30(6): 1087-1089.
- [9] 魏冠红. 高聚原花青素的水解工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [10] 钟慧臻, 徐玉娟, 李春美, 等. 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法测定荔枝果肉中酚类物质[J]. 广东农业科学, 2010, 37(4): 11-14.
- [11] ALVES J A, DE OLIVEIRA L L C, NUNES C A, et al. Chemical, physical-chemical, and sensory characteristics of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) wines[J]. J Food Sci, 2011, 76(5): S330-S336.
- [12] 贾敏, 黄丽, 韦保耀, 等. 荔枝汁产品中有机酸、糖类和游离氨基酸的对比分析[J]. 食品科技, 2010, 35(10): 95-99.
- [13] 黄桂颖, 白卫东, 杨幼慧, 等. 反相高效液相色谱法测定荔枝肉中10种有机酸[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 568-570.
- [14] 刘晓艳, 白卫东, 蒋爱民, 等. 荔枝果酒加工过程中有机酸的变化研究[J]. 中国酿造, 2011, 236(11): 65-69.
- [15] MANZOCCO L, MASTROCOLA D, NICOLI M C. Chain-breaking and oxygen scavenging properties of wine as affected by some technological procedures [J]. Food Res Int, 1998, 31(9): 673-678.
- [16] GALUSKA S, MAKRIS D P, KEFALAS P. Browning development in wine-like liquid model matrices: Dependence on phenolic, Fe(III) and SO₂ concentrations[J]. J Food Proc Eng, 2010, 33(5): 934-945.
- [17] ES-SAFI N, CHEYNIER V, MOUTOUNET M. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system[J]. Int J Food Sci Technol, 2003, 38(2): 153-163.
- [18] MERIDA J, LOPEZ-TOLEDANO A, MEDINA M. Influence of aerobic and anaerobic conditions and yeasts on the reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid[J]. Eur Food Res Technol, 2006, 222(3/4): 451-457.
- [19] LI Hua, GUO Anque, WANG Hua. Mechanisms of oxidative browning of wine[J]. Food Chem, 2008, 108(1): 1-13.
- [20] DANILEWICZ J C, WALLBRIDGE P J. Further studies on the mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfite in wine[J]. Am J Enol Vitic, 2010, 61(2): 166-175.

【责任编辑 李晓卉】