

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.016

陈洁梅, 缪冰旋, 张灿辉, 等. 野生葡萄及葡萄酒抗氧化活性和抗菌性研究[J]. 广西植物, 2014, 34(4): 510–514

Chen JM, Miao BX, Zhang CH, et al. Antioxidant activity and antibacterial property of wild grape and grape wine[J]. *Guihaia*, 2014, 34(4): 510–514

野生葡萄及葡萄酒抗氧化活性和抗菌性研究

陈洁梅¹, 缪冰旋¹, 张灿辉¹, 王琳欢², 艾田¹(1. 暨南大学 生物工程学系, 广州 510632; 2. 北京师范大学 香港浸会大学
联合国际学院 食品科学与工程系, 广东 珠海 519085)

摘要: 选取广西、湖南等地野生葡萄, 与经典酿酒葡萄比较, 研究抗氧化活性和活性物质, 同时监测葡萄酒发酵过程中各指标的动态变化, 并对不同品种葡萄酒的抗菌性进行研究。结果表明: 赤霞珠的酚类含量和抗氧化活性高于野生葡萄和玫瑰香葡萄, 但野生葡萄酒的抗菌性能显著优于赤霞珠和玫瑰香葡萄酒。葡萄酒在发酵过程中其抗氧化活性和酚类物质含量均随发酵过程的进行而升高; 总抗氧化活性与总酚含量、氧自由基清除能力与原花青素含量成显著正相关, 相关系数均大于 0.989; 总花色苷含量在发酵初期上升, 后期下降, 葡萄酒颜色变浅。

关键词: 葡萄酒; 野生葡萄; 多酚; 抗氧化活性; 抗菌性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)04-0510-06

Antioxidant activity and antibacterial property of wild grape and grape wine

CHEN Jie-Mei¹, MIAO Bing-Xuan¹, ZHANG Can-Hui¹,WANG Lin-Huan², AI Tian¹(1. *College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China*; 2. *Department of Food Science and Technology, United International College, Zhuhai 519035, China*)

Abstract: Comparing with the classic wine grapes, the wild grapes from Guangxi and Hunan were selected to analyze their antioxidant activity and active substances. The dynamic change of each indicator in the fermentation process was monitored and the antibacterial property of different grape wines was studied. The results showed that the total phenol content and antioxidant activity of cabernet sauvignon were higher than the wild grapes and muscat grape. But the antibacterial activity of wild grape wines were superior to that of cabernet sauvignon and muscat grape wine. During the fermentation process of wines, their antioxidant activity and total phenol content increased. The total antioxidant activity and total phenol content had a significant positive correlation, as well as the oxygen radical scavenging capacity and procyanidins content. The correlation coefficients were greater than 0.989. The total anthocyanin content rose in the initial fermentation and fell in the late. The wine color became shallow with it.

Key words: wine; wild grape; polyphenols; antioxidant activity; antibacterial property

葡萄中含有丰富的酚类物质, 主要来源于葡萄的果皮和籽, 在浸渍发酵期间通过浸提作用到葡萄酒中(Rebello *et al.*, 2013)。它作为葡萄及葡萄酒中

的重要成分, 不仅影响葡萄和葡萄酒的色泽、香气、风味、口感, 同时也具有较强的抗氧化能力、抗癌、抗炎症、抗心血管疾病和动脉粥样硬化等保健功效(唐

收稿日期: 2014-01-06 修回日期: 2014-02-27

基金项目: 国家自然科学基金(61078040); 广东省教育部产学研结合项目(2010B090400379)。

作者简介: 陈洁梅(1965-), 女, 广西玉林人, 博士, 副教授, 主要从事发酵与应用微生物研究, (E-mail) tchjm@jnu.edu.cn。

传核,2003)。它的保健作用已引起国内外的高度重视。此外,葡萄多酚对多种病原微生物生长有抑制作用(Rodriguez,2007),具有较强的抗菌性,从而调节人体肠道微生物菌落(李建慧,2008)。

多酚类物质的含量、组分及种类与葡萄酒的抗氧化活性、抗菌性相关性很高(王雪飞,2012)。不同葡萄品种之间多酚物质含量及类型相差很大,同品种及其酿制葡萄酒中多酚物质受到产地、年份、气候、光照等自然因素以及栽培、收获和酿造工艺等多因素影响(Katherine,2013)。本研究选取广西、湖南等地有代表性的野生葡萄并自酿葡萄酒,通过测定总抗氧化活性、羟自由基清除率、DPPH 自由基清除率以及总花色苷含量、原花色素含量、总酚含量来综合评价不同品种葡萄酒的抗氧化活性和活性物质及发酵过程动态变化,同时对于不同品种葡萄酒的抗菌性进行研究。可以很好地评价不同葡萄和葡萄酒的品质,为消费者提供参考,同时为葡萄酒酿制工艺改进提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

葡萄品种:食用水果葡萄(玫瑰香葡萄);野生葡萄(广西桂林野生葡萄、湖南乌龙山野生葡萄);经典酿酒葡萄(赤霞珠、蛇龙珠)。主要试剂:没食子酸,原花青素标样(上海金穗生物科技有限公司);T-AOC 试剂盒(南京建成生物工程研究所)等。菌种:酿酒酵母、大肠杆菌、枯草杆菌、四联球菌、金黄色葡萄球菌,均为暨南大学生物工程学系微生物实验室保存菌种。牛津杯:外直径 8 mm,内直径 6 mm,高度 10 mm 的不锈钢制品。

1.2 方法

1.2.1 不同品种葡萄抗氧化活性的比较 选取玫瑰香葡萄、湖南乌龙山野生葡萄、广西桂林野生葡萄、蛇龙珠、赤霞珠五种葡萄。各品种葡萄均取 50 g,洗净晾干,打碎榨汁后 3 000 r 离心 10 min,取上清汁液进行总抗氧化活性测定和总酚含量测定。

1.2.2 葡萄酒酿造方法 葡萄洗净晾干,去梗、挑除坏果,用果汁机打碎,加糖(白糖或其他糖),置于广口磨口玻璃瓶发酵(装量一般为总容量的 70%),自然发酵或添加酿酒酵母发酵。加糖量根据果汁含糖量不同而调整。根据糖浓度和酒精度的转化率计算,本研究把发酵起始糖浓度调到 Brix% 25。糖可

以一次加入,也可分 2~3 次加入。发酵第一周不盖紧瓶盖,每天摇动混匀两次,第 2 周开始密封。1 个月发酵结束,除渣,澄清,密封储存。

1.2.3 发酵过程糖度的变化 选用广西桂林野生葡萄进行发酵试验(表 1)。定期取样用手持糖度计 WS108 测定其白利度(Brix%),监控糖度变化。最后用 DNS 法测定 1 个月成酒的总糖含量,并根据国家标准 GB/T 15038-2006 测定其酒精度。

表 1 葡萄样品加糖发酵试验

Table 1 Grape samples added different kinds of sugar test

组别 Group	葡萄品种 Grape variety	另加糖的种类 Added sugar kinds	酿酒酵母 Yeast	发酵起始糖度 (Brix %) Begin sugar degree
1	桂林野生	蜂蜜	+	25
2	桂林野生	蜂蜜	-	25
3	桂林野生	冰糖	+	25
4	桂林野生	冰糖	-	25
5	桂林野生	50%白糖+ 50%蜂蜜	+	25
6	桂林野生	50%白糖+ 50%蜂蜜	-	25

1.2.4 葡萄酒发酵过程抗氧化活性及活性物质含量变化 选取赤霞珠葡萄和湖南乌龙山野生葡萄进行自然发酵,起始糖度均用白糖调至 Brix% 25。根据之前对于葡萄酒主发酵期的监控,选择取样时间间隔为 0、3、5、7、14、21、30 d。每次取样后测定其总抗氧化活性,总酚、总花色苷、原花青素含量,超氧阴离子、DPPH、羟自由基清除率。每个样品做 3 个平行试验。

总抗氧化能力测定:将样品用蒸馏水稀释 5 倍,用 T-AOC 试剂盒测定。总酚含量测定:将样品用蒸馏水稀释 5 倍,使用福林-肖卡法测定。结果以没食子酸(GAE)等价表示。没食子酸标准溶液浓度为 0、50、100、150、250 和 500 mg · L⁻¹。总花色苷含量测定:采用孙婧超(2011)的 pH 示差法,样品以蒸馏水稀释 100 倍。原花青素含量测定:采用李华(2007)的铁盐催化比色法,配制 5 mg/mL 的原花青素标样,分别吸取标样溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mL 制作标准曲线。超氧阴离子自由基清除能力:采用邻苯三酚自氧化的方法测定(许雅娟,2006)。DPPH 自由基清除能力测定:按照 Brand *et al.*(1995)的方法测定 DPPH 自由基清除活性。羟自由基清除能力:参照 Smirnoff *et al.*(1989)的水杨酸法进行。

1.2.5 葡萄酒抗菌性研究 选用市售锦绣庄园赤霞

珠干红葡萄酒(昌黎锦绣红葡萄酒有限公司生产)、设拉子红葡萄酒(Shiraz cabernet of RAWSON'S RETREAT from Australia)、广西马山野生葡萄酒、广西贺州野生葡萄酒以及自酿玫瑰香葡萄酒(1月)、广西桂林野生葡萄酒(1月)、赤霞珠葡萄酒(1月)、蛇龙珠葡萄酒(1月)进行抗菌性研究。采用牛津杯法,以12% vol已灭菌酒精为空白对照,每个牛津杯中加样100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。每个样品做3个平行试验。

1.2.6 细菌总数检测 检测方法根据国家标准 GB 4789.2-2010。

2 结果与分析

2.1 不同品种葡萄抗氧化活性及总酚含量比较

由图1可知,五种葡萄总抗氧化活性及总酚含量由高至低依次为赤霞珠、广西桂林野生、蛇龙珠、湖南乌龙山野生、玫瑰香。广西桂林野生葡萄的总抗氧化活性和总酚含量与赤霞珠的相近,说明广西桂林野生葡萄有很好的开发潜力。总酚含量和抗氧化活性间有较好的相关性,二者相关性系数达到0.989($P < 0.01$)。可见,葡萄中具有抗氧化活性的物质主要为葡萄多酚类物质。

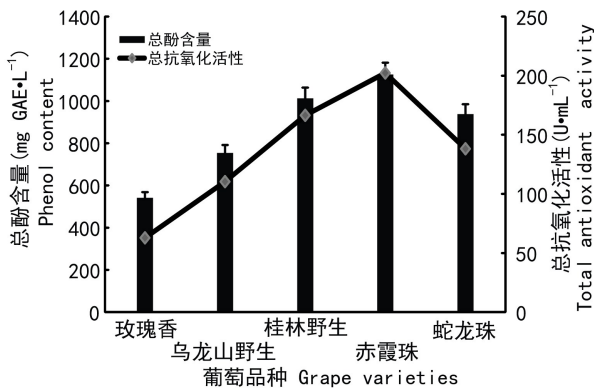


图1 不同品种葡萄原汁总酚含量与总抗氧化活性比较
Fig. 1 Comparing of total antioxidant activity and total phenol content of different kinds of grape

2.2 发酵过程糖度的变化

由图2可知,添加酵母菌的1、3、5号发酵速度较快,从第2天开始即达到发酵高峰期,未添加酵母菌的2、4、6号发酵速度较慢,但发酵趋势较一致,糖度在第3~5天之间降低较快。两者1周左右都完成主发酵过程,此后趋于平稳。1个月成酒时各样

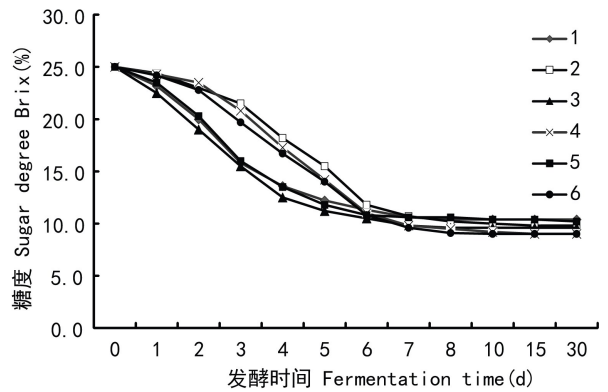


图2 葡萄酒发酵过程糖度变化

Fig. 2 Change of sugar in the winefermentation processes

品的糖度在Brix% 9.0~Brix% 10.4之间(用DNS法测定的糖度在12.0~16.6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间),其酒精度分别为14.8、15.3、14.8、15.5、15.0、15.3(单位为% vol)。可见,葡萄酒酵母发酵的主发酵期为第1周,此期间主要是酵母发酵糖成酒精,后期则主要是酒精对于葡萄中酚类物质的浸提作用。

2.3 葡萄酒发酵过程抗氧化活性及活性物质含量变化

2.3.1 发酵过程总抗氧化活性和总酚含量变化 从图3看出,二者均随发酵过程的进行而升高,在主发酵期第3~7天内上升最快。发酵1个月成酒时赤霞珠和乌龙山野生的总抗氧化活性提高了1.7倍,总酚含量分别提高1.5和1.9倍。说明浸提过程对多酚物质的溶出非常重要。

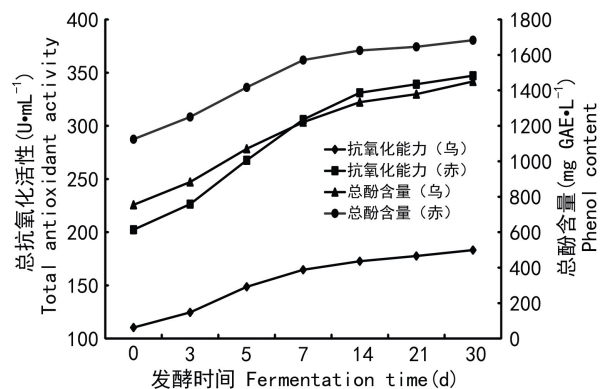


图3 发酵过程中总抗氧化活性和总酚含量变化
Fig. 3 Change of total antioxidant activity and total phenol content in the fermentation processes

2.3.2 发酵过程总花色苷含量的变化 从图4看出,总花色苷含量发酵前3 d上升最快,在主发酵期结束的第7天达到峰值后开始下降。这是因为前期的浸提作用,葡萄皮中花色苷逐渐溶出,与糖类结合形

成花色苷。后期陈酿过程中花色苷类聚合,而且发酵后期葡萄酒酸度下降影响花色苷的溶解,因此后期花色苷含量有所下降。发酵1个月成酒时,乌龙山野生的总花色苷含量为赤霞珠的3.7倍,说明其总酚中花色苷类所占比例显著高于赤霞珠。

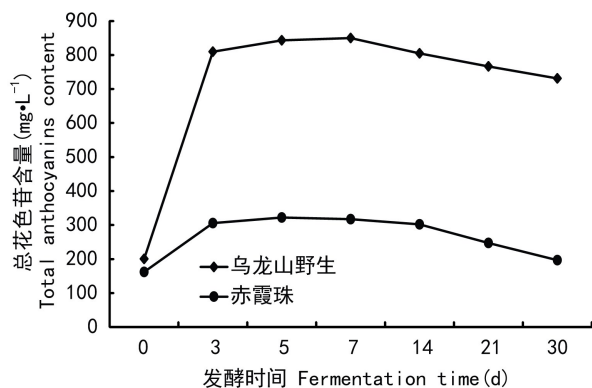


图4 发酵过程中总花色苷含量变化

Fig. 4 Change of total anthocyanins content in the fermentation processes

从表2看出,乌龙山野生葡萄中花色苷类占其酚类物质的比例较重,其总酚含量虽较高,但抗氧化能力并不显著。说明花色苷类的抗氧化活性较低,其主要作用是决定葡萄酒颜色。

表2 乌龙山野生葡萄酒与广西桂林野生葡萄酒的比较

Table 2 Comparison of Wulongshan wild grape wine and Guilin wild grape wine

样品 Wine	总酚含量 Total phenol content (mg GAE · L ⁻¹)	总花色苷含量 Total anthocyanins content (mg · L ⁻¹)	总抗氧化活性 Total antioxidant activity (U · mL ⁻¹)
乌龙山野生葡萄酒(1月)	1450	731	183.15
桂林野生葡萄酒(1月)	1358	299	235.57

2.3.3 发酵过程原花青素含量与超氧自由基清除率的变化 从图5看出,原花青素含量在发酵前3d上升较快,第3~7天有所波动,2周后继续上升,1个月成酒时赤霞珠和乌龙山野生葡萄酒的原花青素含量分别比原来提高2.3和2.9倍。这是因为发酵前期单体酚类溶出缩合成原花色苷类而升高较快;中期发酵较旺盛,酚类物质不稳定,从而导致波动;后期对葡萄籽和皮长时间浸提作用及一些酚类物质进一步向稳定性更强的原花青素类聚合,从而再升高。同时赤霞珠的超氧阴离子自由基清除率显著高于乌龙山野生葡萄,并且与原花青素含量具有

显著相关性,相关系数分别为0.993($P < 0.01$)、0.997($P < 0.01$)。说明葡萄多酚中与超氧阴离子自由基清除相关的主要是原花青素类物质。

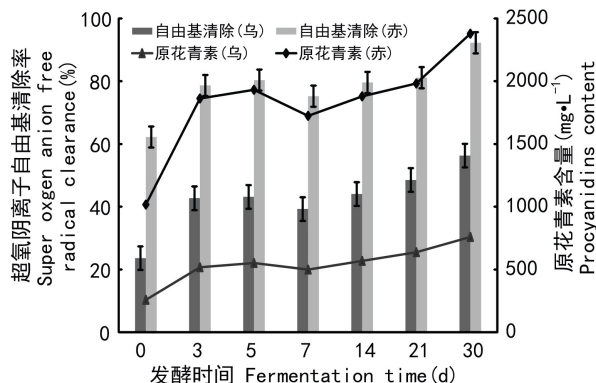


图5 发酵过程中原花青素含量变化和氧自由基清除率变化
Fig. 5 Change of procyanidins content and super oxygen anion free radical clearance in the fermentation processes

2.3.4 发酵过程DPPH自由基清除率和羟自由基清除率的变化 如图6所示,DPPH和羟自由基清除能力均随发酵过程进行而升高。赤霞珠和乌龙山野生都有较强的羟自由基清除活性,但品种差异和过程变化并不显著;而DPPH自由基清除能力,赤霞珠要显著高于乌龙山野生。发酵1个月成酒时赤霞珠和乌龙山野生的DPPH自由基清除率均提高1.4倍左右。同时,DPPH自由基清除能力和羟自由基清除能力与其总酚含量均呈现较高相关性,相关系数均在0.956($P < 0.01$)以上。

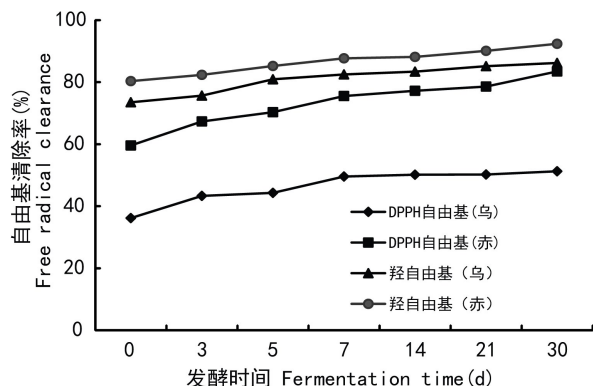


图6 发酵过程DPPH清除率和羟自由基清除率变化
Fig. 6 Change of DPPH and hydroxyl free radical free radical clearance in the fermentation processes

2.4 葡萄酒的抗菌性

各种葡萄酒对不同菌种的抗性研究结果见表3和图7。通过对革兰氏阴性模式菌大肠杆菌和革兰

表 3 不同葡萄酒对不同菌种抗菌能力
(以抑菌圈大小 mm 表示)

Table 3 Resistance to different strains of different grape wines

酒样 Wine	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	四联球菌 <i>Tetracoccus</i>	大肠杆菌 <i>E-coli</i>	空白对照 <i>Blank control</i>
① 锦绣庄园	11.5	9.5	14	8	8
② 设拉子	12.0	15	10.0	8	8
③ 自酿玫瑰香	9.0	8	14.7	8	8
④ 自酿赤霞珠	10.0	12.0	13.5	8	8
⑤ 自酿蛇龙珠	9.0	9.0	15.0	8	8
⑥ 自酿广西桂林野生	16.0	13.0	19.0	8	8
⑦ 自酿湖南乌龙山野生	12.0	12.0	15.0	8	8
⑧ 自酿广西贺州野生	15.0	14.5	31.5	9	8
⑨ 自酿广西马山野生	15.5	14.5	17.5	8	8

氏阳性模式菌金黄色葡萄球菌的抗性研究发现,葡萄酒对大肠杆菌抗性较弱,除广西贺州野生葡萄酒对其表现出微弱抗性外,其余对大肠杆菌均未表现出明显抗性,而对金黄色葡萄球菌抗性明显。说明葡萄酒对于革兰氏阳性菌的抗性显著大于革兰氏阴性菌。葡萄酒对于四联球菌、枯草杆菌等革兰氏阳性菌都表现出较强抗性也说明了这一点。研究结果

表明自酿葡萄酒抗菌性能普遍要强于市售葡萄酒。在自酿葡萄酒中,各野生葡萄酒抗菌性能要明显优于水果葡萄玫瑰香以及经典酿酒葡萄赤霞珠、蛇龙珠酿造的葡萄酒。野生葡萄酒中广西桂林野生葡萄酒和广西贺州野生葡萄酒的抗菌性能非常突出。说明野生葡萄中有抗菌性能非常突出的物质,其价值有待进一步开发利用。

2.5 自酿葡萄酒细菌总数的检测

细菌总数检测结果如表 4 所示。根据国家规定的葡萄酒菌落总数标准为 $<50 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表明所有自酿葡萄酒成酒时在细菌总数方面均符合国家标准(GB 4789.2-2010)。

表 4 自酿葡萄酒细菌总数检测结果

Table 4 The total number of bacteria of Brewed wine

发酵酒样 Fermentation wine	3 周菌落数 3 weeks colony count ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1 月菌落数 1 month colony count ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	45 d 菌落数 45 day scology count ($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)
玫瑰香葡萄酒	20	8	1
赤霞珠葡萄酒	21	5	—
广西桂林野生葡萄酒	19	2	1
湖南乌龙山野生葡萄酒	32	11	1

注:“—”代表未检出。Note:“—”representative no detected.

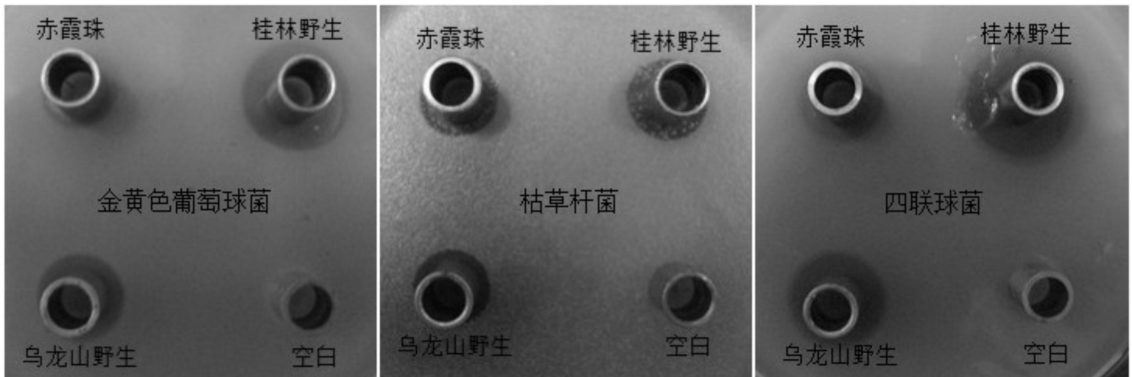


图 7 葡萄酒的抗菌性实验

Fig. 7 Antibacterial experiments of grape wines

3 讨论与结论

(1) 赤霞珠作为经典酿酒葡萄,具较高抗氧化活性和总酚含量;各种野生葡萄在这两个指标上也有良好表现,可用于酿造葡萄酒。(2) 葡萄酒发酵在 1 周左右完成主发酵过程。发酵及陈酿过程中,其总酚含量、原花青素含量,一直随着过程的进行而升

高。(3) 总花色苷含量在前 3 d 升高较快,主发酵期结束时达到峰值,此后由于花色苷聚合及花色苷溶解减少而逐渐下降,葡萄酒颜色变浅。花色苷类与抗氧化活性相关度不大,而主要影响葡萄酒的颜色。(4) 总抗氧化活性、DPPH 自由基清除率、氧自由基清除率、羟自由基清除率均随着发酵过程的进行而升高,且均与总酚含量相关(相关系数均大于 0.956)。(下转第 499 页 Continue on page 499)