

红葡萄酒中花色苷辅色化反应研究进展

张 波, 祝 霞, 盛文军, 马腾臻, 韩舜愈*

(甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃省葡萄与葡萄酒工程学重点实验室, 兰州 730070)

摘 要:花色苷类化合物是红葡萄酒中主要的颜色物质,其种类、状态和含量决定了酒体的色泽特征和陈酿潜能。但花色苷化学性质不稳定,易受外界环境影响而降解,使得红葡萄酒出现色度变浅、颜色稳定性不佳等问题。通过花色苷与辅色素类物质的相互作用(即辅色化作用),可以达到增强葡萄酒色泽、提高颜色稳定性的效果,是一种天然有效提升红葡萄酒色泽的方法。系统介绍了红葡萄酒中花色苷辅色化反应的作用类型、辅色化反应机制、辅色化现象的测定和表征、红葡萄酒中主要的辅色素因子以及辅色化反应的影响因素等问题,并对未来可能的发展方向进行了展望,以期为进一步开展花色苷结构稳定性研究及其在葡萄酒生产中的应用提供有益参考。

关键词:红葡萄酒;花色苷;辅色化反应;反应类型;形成机制;辅色素因子

doi:10.13304/j.nykjdb.2016.640

中图分类号:TS262.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0864(2017)08-0092-13

Studious on Copigmentation of Anthocyanins in Red Wines

ZHANG Bo, ZHU Xia, SHENG Wenjun, MA Tengzhen, HAN Shunyu*

(Gansu Key Laboratory of Viticulture and Enology, College of Food Science and Engineering,
Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract:Anthocyanins are the main pigments directly responsible for the color of red wine, and their varieties, statuses, contents and can determine the wine chromatic characteristics and aging potential. However, anthocyanins are highly chemically unstable and vulnerable to the external environment. For this reason, the red wines are characterized by light color and poor chroma stability. It has been reported that the interaction between anthocyanins and copigments (namely copigmentation) can enhance the color properties and lead to increase of anthocyanins stability, being regarded as a natural way to improve the color and lustre of red wine. Therefore, this paper summarized the copigmentation reaction types, the copigmentation reaction mechanism, determination of copigmentation phenomenon and characterization, main copigments of red wine, and influence factors of copigmentation, etc. issues. The paper also prospected the future development direction, hoping to provide beneficial references for further studies on chromatic stability of anthocyanins, and their application in vinification process.

Key words:red wine; anthocyanins; copigmentation; reaction type; formation mechanism; copigment

色泽是构成干红葡萄酒感官质量的重要指标之一,直接影响人们对其品质的评价及其产品的选择,挑选具有浓郁色调的葡萄酒便成为消费者购买的依据。同时,这也对葡萄酒的生产提出了更高的要求。但是,红葡萄酒中主要呈色物质花色苷对外界环境十分敏感,易受媒介 pH、温度等

因素的影响,使得其色泽易发生改变甚至失色,进而影响葡萄酒的质量。近年来,关于如何加深红葡萄酒颜色以及提高颜色稳定性的研究持续增加,其中利用辅色作用增强花色苷的色泽强度已成为该领域关注的焦点。

辅色反应通过花色苷与辅色素间的相互作用

收稿日期:2016-10-19; 接受日期:2016-11-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31560451)资助。

作者简介:张 波,讲师,博士,研究方向为葡萄酒化学与酿造。E-mail: zb692002@ 163.com。* 通信作者:韩舜愈,教授,博士,研究方向为果蔬加工及葡萄酒风味化学。E-mail: gsnhdhsy@ 163.com

形成一种“三明治”结构复合体,进而达到增强葡萄酒色泽、提高颜色稳定性的效果。特别是在新鲜红葡萄酒中辅色作用可以贡献 30%~50% 颜色总量,而在陈酿葡萄酒中辅色作用也有 8%~30% 的颜色贡献^[1]。研究认为辅色作用还可能是形成聚合色素的第一步,对陈酿红葡萄酒的颜色稳定起着重要的作用^[2]。因此,对葡萄酒中花色苷辅色作用的研究已成为近 20 年关注的热点。特别是国际葡萄与葡萄酒组织(International Organization of Vine and Wine, OIV)授权以后,一些橡木制品在欧洲已成为葡萄酒生产过程中合法的添加辅料,使得其在葡萄酒生产中的使用量与日俱增。研究发现,橡木中的酚类物质可作为辅色素对红葡萄酒颜色进行保护,如单宁可参与酒体成熟色泽的形成^[3],最终使红酒的颜色更加稳定。而 Darias-Martín 等^[4]通过向发酵液添加儿茶素和咖啡酸等辅色素物质可以明显地提高黑丽诗丹(Listan Negro)和黑摩尔(Negramoll)在 520 nm 处的吸光值(13%和 60%)。利用芦丁、咖啡酸和对香豆酸等酚类辅色素对赤霞珠(Cabernet Sauvignon)和丹魄(Tempranillo)进行处理, Schwarz 等^[5]发现芦丁在 520 nm 处也产生较为明显的增色效果。Aleixandre-Tudó 等^[6]与 Gordillo 等^[7]分别在干红葡萄酒酿造过程中添加酚类辅色素,发现所酿造的干红葡萄酒颜色稳定性大幅提高,而且由于酚类物质的加入,使得红酒体系中花色苷等其他类型的多酚浸出率也得到加强。此外,在红葡萄酒酿造过程中添加葡萄梗以及葡萄

籽也会增强酒的辅色化程度,提高红葡萄酒的色度并对酒的颜色稳定性、感官质量及提高保健功能产生影响^[8]。

鉴于花色苷辅色反应对红葡萄酒颜色的重要性,本文综述了红葡萄酒中花色苷辅色化反应的作用类型、辅色化反应机制、辅色化现象的测定和表征、红葡萄酒中主要的辅色素因子以及辅色化反应的影响因素等方面的研究现状,并对未来可能的发展方向进行了展望,以期为相关的科研工作提供参考和帮助。

1 辅色化反应类型

通过对花色苷辅色反应过程的研究发现,花色苷分子同其他无色的有机分子或是金属离子利用分子间堆积、氢键连接以及络合等作用后形成复合体,使色素分子性质发生改变,增加花色苷的稳定性,导致花色苷在可见光区的光吸收增强(增色效应,hyperchromic effect)和(或)最大吸收波长增大,产生所谓红移效应(bathochromic effect)的现象叫做辅色作用(copigmentation)^[9]。其中同花色苷作用的成分被称为辅色素(copigment),广泛存在于植物的花和果实中^[3]。此外,橡木中的酚类物质^[7]、酵母的代谢产物^[9,10]等也可与花色苷发生辅色化反应。同时,根据其作用的特点可将其反应类型划分为分子间辅色、自聚合辅色、分子内辅色和金属络合作用 4 种(图 1)。

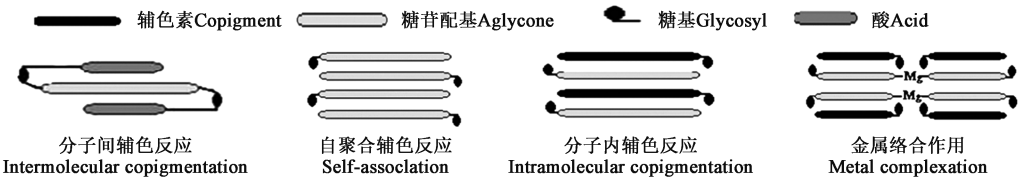


图 1 辅色化反应类型^[1]

Fig.1 Copigmentations types^[1].

1.1 分子间辅色化反应

分子间辅色化反应(intermolecular copigmentation)(图 1,表 1)主要是花色苷分子与辅色素以氢键或非共价键结合,形成水平或垂直层叠的花色苷-辅色素复合物,使花色苷的显色效果加强。关于花色苷和辅色素分子间反应的研究可以追溯到 20 世纪 30 年代,Robinson 等^[28]在

对植物材料的研究中发现,尽管自然界中花色苷结构类型有限,但是却赋予水果和鲜花多样的色彩。此外,在像红葡萄酒等含有花色苷色素的溶液中,也有类似的现象发生。于是推测可能是由于某种物质同花色苷结合后,形成了稳定其结构的状态,并使原有的花色苷表现出更加丰富的颜色特征。研究者将参与反应的分子统称为辅色素

因子,同时将由辅色素因子参与的反应称为分子间的辅色反应。随后的研究显示,分子间辅色除可维持溶液的色泽外,还可降低加工操作过程(受热或是高静水压)对花色苷的破坏,延长花色苷降解的半衰期^[11],并且辅色素与花色苷的摩尔比越大,或是分子中甲基化和糖基化的程度越高,辅色作用的效果就越显著^[12,13]。

许多物质可作为辅色因子参与分子间的辅色化过程,主要包括酚类化合物、生物碱、氨基酸以及有机酸等^[9]。其中由于酚类物质具有富电子的 π 系统,使得其更容易与缺少电子的花色苷烔盐离子结合,促进辅色反应的发生。目前研究较

多的酚类辅色素有黄酮醇类、黄烷醇类、羟基苯甲酸类和羟基肉桂酸类等。Gómez-Míguez 等^[29] 比较了模拟红酒体系在陈酿过程中 7 种酚类物质参与下的辅色反应后发现,黄酮醇类物质(杨梅酮和槲皮苷)的辅色效果最好,酚酸类物质(咖啡酸和香豆酸)次之,而 3 种黄烷醇类物质(儿茶素、表儿茶素和原花青素 B2) 的效果相对较差。Lambert 等^[30] 通过比较多种酚类物质的热力学参数后,发现黄酮醇类具有较高的辅色效应。此外,羟基苯甲酸类^[12],羟基肉桂酸类^[13] 和一些酚醛类物质^[14] 也被证实可显著提高花色苷的色度,同时产生较大的红移变化。

表 1 各类型辅色化反应的试验结果

Table 1 Experimental results of different kinds of copigmentation reaction.

反应类型 Reaction type	花色苷来源 Source of anthocyanins	反应现象或结果 Reaction phenomenons or results	参考文献 Reference
分子间辅色反应 Intermolecular copigmentation	圆叶葡萄汁 Muscadine juice	迷迭香和百里香的多酚萃取物可显著提高样品中花色苷抗高静水压的能力,稳定其颜色。 Polyphenol extracts of <i>Rosemary</i> and <i>Thyme</i> could significantly improve the ability of anti-hydrostatic pressure and color stability of anthocyanins.	[11]
	红葡萄酒模拟溶液 Red wine simulated solution	羟基苯甲酸类化合物可使花色苷表现出红移和增色效应。 Hydroxy benzoic acid compounds could make anthocyanins to exhibit hyperchromic and bathochromic effects.	[12]
	红葡萄酒模拟溶液 Red wine simulated solution	羟基肉桂酸类化合物处理的溶液在 pH 3.6 的环境下表现出明显的红移和增色效果。 The solution of hydroxycinnamic acids treatment showed obvious hyperchromic effect and bathochromic shift in the pH 3.6 medium.	[13]
	红葡萄酒模拟溶液 Red wine simulated solution	酚醛类物质具有辅色化效应,但效果要低于其对应的酚酸化合物。 Phenolic aldehyde compounds had copigmentation effect, but the effect was lower than their corresponding phenolic acid counterparts.	[14]
	美乐红葡萄酒 Merlot wine	羟基肉桂酸类化合物处理的红酒在贮藏阶段,其辅色化比率较对照增加了 15%~50%。 The copigmentation ratio of red wine treated with hydroxycinnamic acids was increased by 15%~50%.	[15]
	赤霞珠葡萄酒 Cabernet Sauvignon wine	发酵前添加没食子酸可提高酒样中辅色花色苷比率。 The addition of gallic acid before fermentation could increase the ratio of copigmentation.	[16]
自聚合反应 Self-association	甲基花青素、甲基花翠素和二 甲花翠素-3-O-葡萄糖苷溶液 Peonidin, delphinidin and malvidin 3-O- glucoside solutions	花色苷 B 环的甲基化程度与其自聚程度成正相关性。 The degree of methylation of anthocyanin B ring was positively correlated with self-association.	[17]
	刺葡萄色素粗提液 Extraction of <i>Vitis davidii</i> foex	刺葡萄花色苷适宜的自聚合条件为 pH 3.0,时间 60 min,温度 20℃,浓度大于 0.24 mmol/L。 The optimum self-association conditions of <i>Vitis davidii</i> foex anthocyanins were pH 3.0, 60 min, 20℃, and concentration of more than 0.24 mmol/L.	[18]
	二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷 及其香豆酰化花色苷溶液 Malvidin-3-O-glucoside and its acylated anthocyanin solutions	利用 NMR 分析发现酰化结构的花色苷可显著提高自聚合能力。 NMR analysis found that the acylated anthocyanins could significantly improve the ability of self-association.	[19]

续表

反应类型 Reaction type	花色苷来源 Source of anthocyanins	反应现象或结果 Reaction phenomenons or results	参考文献 Reference
分子内辅色反应 Intramolecular copigmentation	酰化花色苷 Acylated anthocyanin	分子内辅色作用由于阻止了花色苷的水化反应,因此可明显提高其稳定性和颜色强度。 Self-association could inhibit hydration reaction of anthocyanins and improve the stability and intensity of color.	[20]
	咖啡酰、阿魏酰和香豆酰化的花色苷 Caffeoylated, feruloylated, and maroylated anthocyanins	三种酰化花色苷的分子内辅色效果依次为:咖啡酰>阿魏酰>对香豆酰花色苷。 Three kinds of acylated anthocyanins in copigmentation as follows: caffeoylated anthocyanin > feruloylated anthocyanin > maroylated anthocyanin.	[21]
	芳香酰基,脂肪族酰化花色苷 Aromatic acyled and aliphatic acyled anthocyanins	两类酰化花色苷的稳定性依次为:芳香酰化花色苷>脂肪族酰化花色苷。 The stability of two kinds of acylated anthocyanins are: aromatic acylated anthocyanins> aliphatic acylated anthocyanins.	[22]
	双酰化花色苷 Diacylated anthocyanins	双酰化花色苷通过空间位阻效应保护其花色苷母核不受外界因素影响。 The effect of steric hindrance on the protection of diacylated anthocyanins from the anthocyanin nucleus was not affected by external factors.	[23]
	酰化花色苷 Acylated anthocyanins	酰化花色苷中的糖基位点可影响辅色反应的发生。 The glycosylation site of acylated anthocyanins could influence the occurrence of copigmentation.	[24]
金属络合作用 Metal complexation	红葡萄酒 Red wine	当 K^+ 浓度在 0.5 g/L 时对红葡萄酒颜色的提升最为显著。 The color of red wine was the most significant at the 0.5 g/L of K^+ .	[25]
	二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷溶液 Malvidin-3-O-glucoside solutions	Fe^{2+} 可促进花色苷-鞣花酸复合体的形成。 Fe^{2+} could promote the formation of anthocyanin-ellagic acid complex.	[26]
	红葡萄酒模拟溶液 Red wine simulated solution	咖啡酸对 Fe^{2+}/Fe^{3+} 的辅色作用有破坏作用。 Caffeic acid has a destructive effect on copigmentation of Fe^{2+}/Fe^{3+} .	[27]

1.2 自聚合反应

分子间的自聚合反应(self-association) (图 1,表 1)是一种特殊的分子间辅色现象。当溶液中花色苷浓度增加时,其吸光值发生明显的正向偏移,导致可见光谱范围内的吸光值增加,以及最大吸收波长蓝移(hypsochromic shift),表明花色苷自身之间发生了相互反应。目前,这一现象已被圆二色光谱(CD)^[31]和核磁共振氢谱(¹H NMR)^[32]加以证明。同时研究发现,相互作用的自聚合花色苷分子依靠疏水作用力相互垂直层叠在一起,有时还能形成一定的空间螺旋结构(图 2)。例如花色苷 10 聚体通过叠加环绕形成具有内部疏水,而骨架外侧是亲水葡萄糖基的左手螺旋构象,并通过分子间的氢键加强上述的结构^[33],而 González-Manzano 等^[17]发现,自聚合作用还会随花色苷甲氧基化程度的增加而增强。

研究发现,在 pH 近中性的溶液中,自聚合反应趋于同型自聚合(AA)和异型自聚合(AA⁻)相

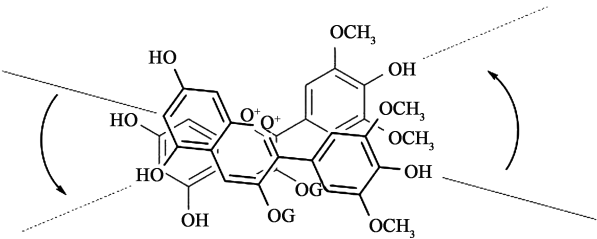


图 2 二甲花翠素葡萄糖苷二聚体可能的叠加模式^[32]
Fig.2 A proposed structure of the stacked dimer of malvidin-3-O-glucoside^[32].

平衡的状态。增加花色苷浓度将增大花色苷自聚合的作用,同时盐离子的添加,例如 NaCl 可以促进花色苷之间的聚合,增强稳定性^[31]。而在酸性 pH 条件下,自聚合反应还有可能在花色苷分子和顺式-查尔酮分子之间发生,不过由于其含量在红酒溶液中相对较低,这一现象并不常见。Somers 等^[34]认为自聚合反应可能是红酒中非朗伯-比尔化(non-Beer-Lambert Law)的主要原因。

通过对模拟红葡萄酒体系进行花色苷自聚合反应的研究发现,当花色苷浓度在 50~600 mg/L 的范围时,产生的自聚合效应能贡献 8%~60% 的增色效应,同时反应的效果还受到花色苷类型的影响^[17]。但是 Boulton^[1]在借助圆二色光谱的分析后认为,红葡萄酒中的颜色变化可能与其中的花色苷自聚合反应相关性不大,引起红酒颜色效应的主要因素还是花色苷和酚类物质的分子间反应。

1.3 分子内辅色化反应

分子内的辅色反应 (intramolecular copigmentation) (图 1,表 1)通常是指参与辅色的因子来自花色苷自身的一种辅色反应现象。因此,这类反应对花色苷结构有一定要求。花色苷结构中的糖基必须具有空间延展性,使得所连接的酚酸酰基在空间中折叠成一定的角度,便于其芳香结构和花色苷烔离子结构平面中的发色团 (chromophore) 形成所谓的“ π - π ”堆叠状态,从而起到保护花色苷、防止其与水分子发生亲核加成的作用^[1]。目前,酰化基团和花色苷发色基团之间存在的长距离的奥弗豪塞尔核效应 (nuclear overhauser effect, NOE) 和 ¹H NMR 的化学移动转向较高场的证据可以证明分子内辅色反应的存在。而对于一些单酰化的花色苷分子,如果酰化基团在空间中结构大小适中,在被其自身酰化基团辅色后,花色苷发色团的另一面还会和其他的辅色素分子结合,这样就会出现分子内和分子间辅色共存的现象^[1]。

分子内的辅色反应现象最初由 Brouillard^[35]在研究吊竹梅 (*Zebrina pendula*) 色素时发现,这种花色苷分子具有 4 个酰化基团,即便是在降低环境中游离酸度的条件下,也不会引起色素分子向无色结构的转变。因此,研究者认为可能是由于吊竹梅色素中的酰化基团起到了保护作用,在 4 个酰化基团中最少有 2 个酰化基团参与了上述保护反应,并且这种保护机制要比相应的分子间保护作用效果显著。随后,研究还发现,酰化结构中的酰基基团具有自适应的特性,可以通过改变其在空间中的折叠角度,以达到最大限度与花色苷发色团相匹配的效果。此外,酰化花色苷中参与酰基的酚酸分子结构和酰化的连接位点对分子内辅色的效果也起重要作用。B 环酰化的花色苷分子相比于 A 环酰化的分子更能有效保护花色

苷,而且酰基基团是肉桂酸类的花色苷分子要比苯甲酸类的分子稳定^[1]。同时,顺式 (*cis*-) 结构的肉桂酸分子要比其反式 (*trans*-) 结构更具有空间的灵活性,辅色效果更优^[36]。

随着研究的进行,分子内的辅色反应不仅只局限于在酰化花色苷中出现。在红葡萄酒的陈酿过程中形成的一些花色苷衍生物也具有类似的特征,其中 He 等^[36]发现,寡聚的原花色苷-黄烷醇类物质 (oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments) 可能是赋予陈酿红葡萄酒颜色稳定性的一类色素,这种色素由于具有较高的摩尔消光系数,在红酒中性质十分稳定。另外,由橡木单宁和花色苷形成的 1-脱氧栎木鞣花素-(1 β →8)-二甲花翠素 [1-deoxyvescalagin-(1 β →8)-oenin] 也被发现可形成类似的分子内“ π - π ”堆叠状态。

1.4 金属络合作用

对于 B 环上含有邻位羟基的部分花色苷分子,能与金属离子结合形成花色苷金属络合物 (metal complexation) (图 1,表 1),对颜色起到稳定作用。常见参与反应的金属离子有 Al³⁺、Fe³⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Sn²⁺ 和 K⁺ 等。但是考虑到有些金属离子在增色的同时也会形成金属-单宁复合物,使得红葡萄酒褪色。因此,关于其对改善红酒溶液颜色的应用仍需做进一步的研究。

2 辅色化反应机制研究

近年来,多酚辅助呈色已成为葡萄酒色泽的研究热点。从利用光学手段测定物质的红移和增色效应,到研究反应体系平衡常数 (*K*) 的移动;从使用热力学参数评价反应过程中自由能 (ΔG)、熵 (ΔS)、焓 (ΔH) 变化,到分析推断辅色复合物化学键类型等。此外,应用傅里叶变换 (Fourier transform) 的方法,进一步验证了辅色化合物与花色苷的作用是“ π - π ”堆积的结果。而通过对红外光谱 (IR) 中振动谱的判断,科研人员明确了辅色复合体中氢键的存在,并且还根据核磁共振中抗磁位移的变化,分析了在辅色反应过程中花色苷与辅因子之间质子的转移情况。

同时,限于参与辅色反应化学物质结构的微小性,科研人员正开始利用先进的量子化学手段,通过计算机的模拟,从微观角度了解花色苷同酚类辅色物质分子间的相互作用过程,分析其结合

时电子的转移和能量变化情况等。Teixeira 等^[37]利用分子动力学模拟的方法计算了辅色作用时结合常数以及花色苷与辅色素作用的平均距离,结果显示原花青素 B2 因具有与花色苷形成更多非共价键的平面反应结构,因而形成的复合物结合常数最大,且分子间作用平均距离最小,是所测定物质中结合最稳定、热力学最优的辅色素。而 Zhang 等^[12]通过量子化学计算表明,二甲花色素-3-O-葡萄糖苷与多酚物质间的辅色反应是 π - π 和 OH- π 连接的结果,同时在整个反应过程中热力学参数的变化是形成稳定辅色复合体的主要原因^[13,14]。

但是,到目前为止,有关辅色化过程中辅色分子和花色苷的结合机制还未阐明。比较成熟的解释是花色苷分子同辅色素形成 π - π 相互作用,或是通过分子中的 OH- π 作用进行结合,从而弱化由于分子间相互靠近时产生的库伦斥力。另外,在辅色系统中,花色苷烔离子通常带有 1 个单位的正电荷,是电子转移复合物(含富电子底物)的良好电子受体,而参与反应的辅色素因子则大都是很强的电子供体,这样分子间电子的转移(从辅色素因子传向花色苷分子),就促使辅色素和花色苷配对结合,这被视为形成辅色结构的另一种作用方式^[38]。通过这些作用,花色苷分子结构中的 C₂ 结合位点被有效地保护起来,使其不能同水分子结合形成无色的半醛类型花色苷或是查尔酮结构,稳定花色苷的结构,并使得花色苷分子的结构平衡向有色的分子状态(烔盐离子和醌型碱)移动,增加了其相应的比例。同时,电子的转移促进花色苷分子从其反应基态向激发态的转变^[38],产生所谓的红移和增色现象,并最终导致花色苷溶液显示出比其相应的 pH 溶液更深的颜色状态。

3 辅色化现象的测定和表征

Boulton^[1]利用测定稀释前后色素溶液在 520 nm 处吸光值来计算辅色作用的强弱。具体操作如下:首先测定未稀释前的花色苷溶液吸光值(A),之后在此溶液中加入稀释剂进行稀释,从而破坏花色苷分子同辅色素分子之间的作用,以及花色苷分子自身的辅色化作用,并测定其 520 nm 处的吸光值(A_d)。利用公式(1)便可表示溶液辅

色作用的强弱。

$$\frac{(A - A_d)}{A_d} \times 100\% \quad (1)$$

当然,利用在添加辅色素前后的吸光值变化,也能评估辅色作用的大小。例如,在未加入辅色素分子前测定花色苷溶液在 520 nm 处的吸光值(A_0),之后在此溶液中添加一定浓度的辅色素溶液,促进辅色反应的发生,并测定此时 520 nm 处的吸光值(A),最后使用公式(2)计算,便可评价辅色作用的效果^[29]。

$$\frac{(A - A_0)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

但是,比较上述两者的区别,第一种方法可更为全面地评价辅色效应(分子内、分子间和分子的自聚合反应),而后者则只能单一地评价所添加辅色素因子引起的分子间辅色效应。

而针对红葡萄酒溶液,Boulton^[1]还设计出更为具体的实验方法来计算样品中花色苷的辅色化(CA%)、游离化(FA%)及聚合化(PA%)比率。其具体步骤如下:首先调节被测酒样 pH 至 3.6,取 2 mL 样品加入 20 μ L 10% 乙醛溶液,反应 45 min 后测定其 520 nm 下吸光值(A^{acet}),再利用模拟干红葡萄酒溶液稀释试样 20 倍后测定 520 nm 下吸光值(A^{20}),之后另取 2 mL 供试酒样,加入 160 μ L 5% SO₂,反应后测定其 520 nm 下吸光度(A^{SO_2}),最后利用下列公式便可计算出样品中 CA%、FA%和 PA%的具体数值:

$$CA\% = \left(\frac{A^{acet} - A^{20}}{A^{acet}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

$$FA\% = \left(\frac{A^{20} - A^{SO_2}}{A^{acet}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

$$PA\% = \left(\frac{A^{SO_2}}{A^{acet}} \right) \times 100\% \quad (5)$$

科研人员发现,利用此公式对于年轻的新鲜红干葡萄酒来说,其颜色的 30%~50%来自于辅色化作用^[1]。Gutiérrez 等^[39]研究了新酿自于西班牙的丹魄(Tempranillo)、赤霞珠(Cabernet Sauvignon)和西拉(Syrah)葡萄酒后发现,在酒精发酵结束时由辅色作用贡献的颜色百分比在 32%~45%之间。而对于利用发酵前添加辅色素(没食子酸)生产的红葡萄酒来说,其在整个发酵

阶段可明显提高处理样品的辅色化程度,并在后期的短暂贮藏过程中一直维持较高的水平^[26]。同时,研究还发现,辅色程度的高低与辅色因子浓度、结构,以及红酒中酒精度、乙醛和金属离子等的含量和种类有关,而上述这些物质较花色苷含量更易影响辅色反应的发生^[1]。

在红酒的陈酿过程中,花色苷和辅色素的含量将逐渐下降,因而辅色效应也会逐渐的减弱。对于贮藏 3 个月后的丹魄(Tempranillo)、赤霞珠(Cabernet Sauvignon)和西拉(Syrah)葡萄酒来说,其辅色化程度为 20%~34%,而陈酿 9 个月后,辅色化程度基本消失(0%~5%)^[39]。可是在研究 Canary 岛生产的干红葡萄酒时,Darias-Martin 等^[40]发现黑丽诗丹(Listan Negro)和黑摩尔(Negramoll)葡萄酒的辅色化程度在陈酿 1~2 年后仍有 22% 和 19%。而这一现象同 Cándida 等^[41]的研究结果类似,研究发现在橡木桶中陈酿 9 个月的红酒,其辅色化程度仍有 18% 左右。对于新鲜的红葡萄酒而言,Vesari 等^[42]发现有 8%~30% 的辅色化结果。分析这一差别,主要可能是由于酿酒葡萄自身和生产工艺的差别造成的,因为上述的因素将直接影响酒中花色苷和辅色素的含量和类型,进而影响辅色化过程。此外,对于陈酿的控制以及栽培的管理,也将影响红酒中辅色化的程度。

当然,Boulton 的方法也存在一定的局限性。因为这种计算只能测量在可见光程范围内,花色苷溶液的最大吸收波长的变化,但对于这种变化造成的颜色质变和量变缺乏评价的手段。因此,在这个问题上,科研工作者做出了不断的努力。Gonnet^[43]利用 CIELAB 方法对辅色反应前后颜色变化的整体效果进行了评价。此外,研究人员还利用这种方法对颜色变化过程中的亮度、色度和色调进行了定量的分析,从而可以通过在数量上的比较,来更加直观地反映辅色前后的颜色变化。试验发现,由辅色化作用造成的增色效应与溶液的亮度加深有着直接的量变关系。同时,科研人员还利用 CIELAB 中的亮度(L^*)、红/绿色值(a^*)、黄/蓝色值(b^*)参数,对于造成辅色前后的颜色差异(ΔE_{ab}^*)进行了数量化的计算[公式(6)],通过比较 ΔE_{ab}^* 的数值是否大于 3.0,来判定辅色效应能否造成人眼可辨识的差异。

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (6)$$

4 红葡萄酒中的辅色素因子

辅色化溶液的色调和色度千变万化,这取决于溶液中的花色苷和辅色素因子的结构状态和浓度含量。研究发现,许多物质都可以作为辅色素因子参与相应的化学反应,例如有机酸、氨基酸、核苷酸、金属离子、生物碱以及多酚化合物等^[1]。这些物质广泛存在于红葡萄酒体系中,不过在随后的研究中发现,有些物质并不具有较强的辅色特性。例如几种单糖物质(果糖和葡萄糖),即便在较高的含量(50%)下也很难产生有效的辅色化效应。类似的结果还在添加有果胶和甘露糖蛋白的多糖溶液中观测到。Guadalupe 等^[10]在研究甘露糖蛋白对红酒颜色影响的过程中发现,添加有商用甘露糖蛋白或是在接种有高产甘露糖蛋白酵母的红酒中,并没有产生期望的较强辅色化效果,这一结果的产生使得科研人员对多糖参与保护红酒颜色这一结论产生了质疑。

来自于葡萄自身、橡木制品及花色苷降解产生的羟基苯甲酸类(hydroxybenzoic acids)分子(包括没食子酸、原儿茶酸等)可以作为一类潜在的辅色素因子,起到保护花色苷的作用^[12]。但是同一些可溶性单宁类(hydrolysable tannins)物质相比,苯甲酸类分子的辅色化效果相对较弱。研究发现,红葡萄酒中可溶性单宁的含量和种类受桶储用橡木类型和贮藏时间等影响,例如,使用新制法国木桶陈酿的红酒,检测到的橡木单宁含量要高于美国橡木制造的酒桶。

对于红葡萄酒而言,黄酮醇类(flavonols)化合物可以作为较为理想的辅色素因子。通过在体外与其他类型的酚类物质比较,黄酮醇类化合物的辅色效果最好。通常而言,红葡萄酒中的黄酮醇类化合物主要是以糖苷结合形式存在,例如槲皮素-3-O-葡萄糖苷,杨梅酮-3-O-葡萄糖苷等,在发酵浸渍阶段进入到酒体中,并通过水解作用释放出相应的黄酮醇类物质。研究发现,黄酮醇类中的芦丁和槲皮素是较有效的辅色素因子,在 pH 3.5 的条件下,上述两种物质可与花色苷形成稳定性较高的色素复合体,并分别产生 30 nm 和 28 nm 的红移变化^[44]。但是,红葡萄酒中的黄酮醇

含量较低,并受葡萄品种和酿造工艺的影响。同时,随着陈酿过程的进行,其含量还会因聚合沉淀或是氧化等因素而不断下降。有研究发现,在贮藏 9 个月后,红葡萄酒中的黄酮醇含量会减少 50%~80%^[39],这在一定程度上限制了黄酮醇的作用。

相比黄酮醇类化合物,酒中的羟基肉桂酸类(hydroxycinnamic acids)化合物,也被证实有良好的辅色特性,但其性能相对黄酮醇类物质有所降低。酒中的羟基肉桂酸分子主要来自于葡萄酒中酒石肉桂酸酯类物质的水解。此外,通过与木桶或是其他的橡木制品接触,以及酰化花色苷的分解,也会得到一定的羟基肉桂酸分子。因此,不同于黄酮醇,羟基肉桂酸类分子的含量可能在陈酿过程中有所提高。咖啡酸是红葡萄酒中主要的羟基肉桂酸类化合物,可占到总含量的 50% 左右。此外,对香豆酸和阿魏酸也是红酒中常见的羟基肉桂酸类物质类型。

黄烷醇(flavanols)的含量在葡萄酒中相对较高,主要以单体和聚合体的形式存在。黄烷醇中的儿茶素分子,因为其空间结构易造成位阻效应,妨碍了其与花色苷发色团平面的配合^[29],而影响了辅色反应的发生。但是,黄烷醇中的表儿茶素分子,由于其结构中的异构化,相比儿茶素分子,表儿茶素分子可以较好地与花色苷分子形成“ π - π ”堆叠结构^[30],具有良好的辅色化效果。另外,二聚化的黄烷醇分子也被证实有一定的辅色能力,并且通过试验发现,分子结构中以 C₄-C₆ 相连的聚合体辅色效果要优于 C₄-C₈ 成键的分子,这主要可能是由于前者具有更加灵活、开放的空间构象的结果^[45]。同时,研究发现在儿茶素分子的 C₃ 位置进行没食子酸化加成,形成 Dimer B2-3"-3-O-gallate(B2G) 分子,可显著提高儿茶素分子的辅色化性能,通过模拟加成物在空间中的结构发现,加成后的化合物与原花色苷 B2 有相似的空间构象,不过前者可以形成类似“口袋”的空间结构,从而使得花色苷分子能“嵌入”到其中,便于与花色苷更好地结合(图 3)^[46]。

但是,多聚的黄烷醇结构由于分子体积较大,在空间上易形成一定的位阻效应,从而会影响辅色的效果。研究发现,其辅色能力随聚合度的增加而逐渐降低^[45]。但是也有研究认为,多聚黄烷醇可以通过诱发形成化学性质稳定的咕吨鎓

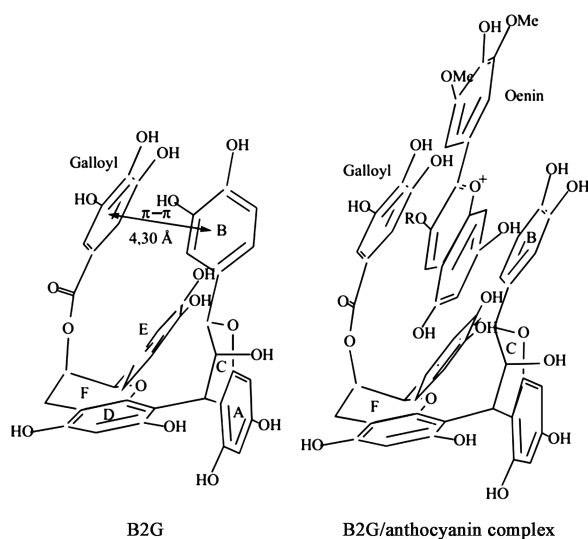


图 3 B2G 及 B2G 花色苷复合体结构^[46]

Fig.3 Structures of B2G and B2G/anthocyanin complex^[46].

(xanthylum), 达到对红葡萄酒颜色的保护。另外,黄烷醇分子的聚合物对陈酿红酒的颜色贡献要远高于单体物质。例如,在模拟反应体系中,花色苷和黄烷醇可直接缩合形成新的橙黄色色素。同时,在乙醛介导的条件下,二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷和表儿茶素可形成稳定的紫红色色素等。正是这些色素使红葡萄酒的色度增加,色素聚合物的稳定性提高^[45]。不过,有关黄烷醇聚合体的辅色效果还需做进一步的研究。但是,考虑到黄烷醇类化合物在葡萄酒中的含量较高,即便其辅色能力有限,但在数量上占有优势,因此黄烷醇类物质仍是红葡萄酒中较为理想的辅色素因子。

此外,在对橡木制品中酚类化合物的研究中发现,有些酚醛类物质(香草醛、丁香醛和松柏醛)不仅可以改善红葡萄酒的风味,而且由于其结构特点,这类物质也具有较为理想的辅色作用效果^[14]。通过将香草醛、丁香醛和松柏醛添加于红葡萄酒的模拟体系中反应,可以看到较为明显的辅色现象,同时利用分子模拟手段,可对其在空间中与花色苷的“叠合”情况作进一步的了解。

5 辅色化反应的影响因素

研究发现,反应体系中的水分子控制着花色苷和辅色素因子间的缔合,形成类似于四面体的

氢键网络,反应体系中形成的四面体水分子网络越多,辅色作用效果就越强,因此辅色现象被证实只在有水的环境下发生^[47]。在此作用下,花色苷分子和辅色素相互靠近,形成类似疏水作用的结合状态。一些外界的作用,例如温度的升高,其他物质的加入,离子强度的增高等,均会弱化分子之间的作用,破坏反应的效果。甲醇、乙醇以及丙酮,或是二甲基甲酰胺、酒石酸氢钾等,均会引起维持结构的氢键断裂,导致辅色作用的降低。

在 Isidro^[48]的研究中,溶液乙醇含量的增加和辅色作用效果的降低呈明显的二次方作用关系。当乙醇含量在 12%~14% 之间时,红酒中的辅色化效果较无醇的溶液降低了 25% 左右;而当乙醇含量达到 20%~22% 时,只有较为微弱的红移现象发生。Somers 等^[34]在模拟环境下也观察到类似的结果,当溶液中乙醇浓度在 10%~15% 时,辅色复合体很容易被存在的乙醇破坏,进而导致色度的降低。但 Kunsági-Máté 等^[49]在研究二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷和 5 种多酚时发现,咖啡酸、鞣花酸和芦丁与花色苷作用时,分子大小和结构稳定性随乙醇含量的升高而增大;而花色苷和原花青素和表儿茶素作用时,尽管其稳定性会随着乙醇的升高而升高,但是分子结构的大小却会在酒精含量超高 8% 时显著减小。因此,研究者在这个基础上认为,红酒中的辅色反应会伴随着发酵过程的进行而逐渐加强,特别是当酒精度超过临界状态(8%)后。但是也有研究表示,乙醇也有可能作为辅色因子参与反应,提高溶液的色泽。例如,对比溶剂为水和 10% 乙醇的色素溶液色度后发现,添加乙醇的样品吸光值增加了 18%,而水溶液的样品吸光值只增加了 5%^[1]。而对具有紫色色调的新鲜波尔图加强型红葡萄酒进行颜色分析,结果表明,呈现较深颜色特征的原因可能是辅色化反应与乙醇共同作用的结果^[50]。同时有观点认为,由于乙醇相比水具有更高的溶解度,可以溶解更多的物质进入系统参与辅色反应。因此,溶液的辅色作用也相应表现更加强烈^[48],但有关这一内容还需做进一步的研究。

花色苷和辅色素的浓度也是影响辅色效果的重要因素。试验发现,一般要产生辅色化效应,花色苷浓度必须在 3.5×10^{-5} mol/L 以上^[1]。而对辅色素来说,色素和辅色素的摩尔比在 1:2.5 甚至 1:0.5 时,辅助效果就会有所显现,当辅色素浓度

对花色苷的比值越高时,辅色作用的效果就会越明显^[12]。

pH 也能影响辅色化作用。通常在酸性条件下,辅色素因子可更好地与花色苷形成辅色复合体,而增强花色苷溶液的颜色和稳定性。这主要是因为,在 pH<1.0 时,花色苷的主要存在形式是烺盐离子,这种状态已达到最大红移量,因此并不能提高花色苷的颜色强度;而当 pH>2.0 时,花色苷分子是烺盐离子、醌型碱和甲醇假碱等共存的状态,此时辅色素的存在就能使最大吸收红移,以及提高花色苷颜色强度。Malaj 等^[51]通过测定热力学参数比较二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷与对香豆酸、香草酸及丁香酸在不同 pH 条件下的辅色效果,结果发现在较高的 pH 条件下(pH 3.65 vs. pH 2.50)更利于辅色反应的进行。

同时,研究发现,提高反应体系的温度将破坏辅色复合体之间的非共价键,使得辅色现象变弱,出现所谓的减色效应(hypochromic effect)和蓝移变换(hypsochromic shift)。但当环境温度下降时,被破坏的辅色复合体又将重新建立连接,辅色效应将再次恢复^[52]。

通过向辅色反应体系添加多糖类物质,Fernandes 等^[53]发现,加入的多糖将阻碍二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷与儿茶素间的连接,限制辅色反应的发生。另外,在有咖啡酸存在的情况下,铁离子(Fe^{2+} 和 Fe^{3+})参与的辅色作用可忽略^[27]。但是,利用 β -环糊精构建起的特殊运载体系,却可在空间结构上防止花色苷直接与水分子接触而水化,起到保护和促进辅色的效果^[54]。

当然,对于花色苷而言,其结构特点也影响自身的稳定性,并间接影响辅色反应的发生。花色苷糖基化后,易于与水分子形成氢键,从而改善其水溶性,表现出良好的稳定性特征,并且花色苷随结构中糖分子数量的增加,稳定性也逐渐加强。Brouillard 等^[55]认为,花色苷中糖基化的程度越高,辅色作用的效果就越显著。而 González-Manzano 等^[17]通过对模式溶液中花色苷的进一步研究还发现,当花色苷 B 环中甲氧基化的程度提高时,其自聚合作用的能力也相应的增强。此外,不同酰化基团也影响花色苷的稳定。有试验结果表明,分子中含有芳香酰基的花色苷要比带有脂肪族酰基的花色苷稳定^[22],而多酰基花色苷较单酰基花色苷更易形成分子内的辅色结构^[20]。

另外,在葡萄酒的生产阶段,通过和其他葡萄品种进行共发酵,发酵前冷浸渍,以及添加果胶酶等工艺措施,或是利用超声、微波以及脉冲电场等处理方法,也被证明是提高酒中辅色素因子含量,稳定红酒色泽的方法措施。表 2 列出了常见的一些因素对辅色反应的影响。

表 2 不同因素对辅色化反应的影响
Table 2 Influence of different factors on the copigmentation reaction.

影响因素 Influence factor	反应结果或现象 Reaction phenomenons or results	参考文献 Reference
辅色素浓度 Concentration of copigment	辅色效应随辅色物浓度的提高而逐渐加强。 The copigmentation effect gradually strengthened with the increase of the concentration of the copigment.	[12]
花色苷甲基化数 Methylation number of anthocyanin	花色苷 B 环中甲氧基化程度越高,其自聚合作用就越强。 Copigmentation effect improved with the increase of methylation number of anthocyanin.	[17]
咖啡酸 Caffeic acid	咖啡酸可弱化铁离子(Fe^{2+} 和 Fe^{3+})参与的辅色作用。 Caffeic acid could weaken the copigmentation effect of Fe^{2+} and Fe^{3+} .	[27]
乙醇 Alcohol	加入乙醇溶剂将破坏辅色反应体系,弱化辅色效果。 The addition of ethanol could destroy the copigmentation system and weaken the effect of copigmentation.	[48]
	红酒中的辅色反应会伴随着发酵过程的进行而逐渐加强,特别是当酒精度超过临界状态(8%)后。 The copigmentation in red wine was gradually enhanced with the fermentation process, especially when the alcohol was over the 8%.	[49]
pH	环境 pH 条件在 3.65 时(<i>vs.</i> 2.50)更利于对香豆酸,香草酸及丁香酸参与的辅色反应的发生。 The condition of pH 3.65 (<i>vs.</i> 2.50) was more favorable for the occurrence of copigmentation reaction in the presence of <i>p</i> -coumaric, vanillic and syringic acids.	[51]
温度 Temperature	提高反应体系的温度将破坏辅色复合体结合键,使辅色现象变弱,但是温度下降时,辅色效应将重新恢复。 To improve the temperature of the reaction system would destroy the structure of copigmentation complex and weaken copigmentation effect, but when the temperature dropped, the copigmentation complex would be restored.	[52]
多糖 Polysaccharide	加入的多糖将阻碍二甲花翠素-3-O-葡萄糖苷与儿茶素间的连接,限制辅色反应的发生。 The addition of polysaccharides could block the connection between malvidin-3-O-glucoside and catechin and prevent copigmentation.	[53]
β -环糊精 β -cyclodextrin	β -环糊精可防止花色苷直接与水分子接触而水化,起到保护和促进辅色的效果。 β -cyclodextrin could prevent the anthocyanins from hydration and promote the effect of copigmentation.	[54]
花色苷糖基化数 Glycosylation number of anthocyanin	花色苷中糖基化的程度越高,辅色作用的效果就越显著。 Copigmentation effect improved with the increase of glycosylation number of anthocyanin.	[55]
超声处理 Ultrasonic treatment	利用 37 kHz 的处理频率,运行 15 min 可提高酒中花色苷和非花色苷酚含量。 Using 37 kHz treatment frequency and operation of 15 min could increase the content of anthocyanins and non-anthocyanins in wine.	[56]
微波处理 Microwave treatment	利用 400 W 功率处理 7 min,可降低红酒生产过程中 SO_2 的用量,促进后期辅色反应的发生。 Using 400 W power and operation of 7 min could reduce the amount of SO_2 and promote the copigmentation reaction.	[57]
脉冲电场处理 Pulsed electric field treatment	31 kV/cm 的电场强度,可提高酒中花色苷含量,提升红酒颜色强度。 The red wine color could be improved by 31 kV/cm electric field intensity treatment.	[58]

6 辅色化反应在红葡萄酒增色中的应用研究

通过向模拟红葡萄酒体系中加入黄酮醇和酚酸进行处理,与不加酚类物质的对照相比,添加处理的试验组样品能够使花色苷的色泽强度提高 46%,稳定性提高 41%^[30]。利用阿魏酸和单宁酸处理也可有效提高溶液体系中花色苷稳定性^[6]。

通过在发酵前添加辅色素作为提高红酒颜色的一种工艺措施,已经在生产上有所尝试。Liu 等^[16]通过向发酵醪液添加没食子酸(300 mg/L)可以明显地提高赤霞珠(Cabernet Sauvignon)葡萄酒的辅色化比率和 520 nm 处的吸光值。Bloomfield 等^[59]在黑必诺(Pinot Noir)和赤霞珠(Cabernet Sauvignon)发酵前添加咖啡酸和对香豆酸也发现类似的效果。但是通过比较两者的红移数据,试验结果表明,对香豆酸的作用效果要强于咖啡酸。这可能是由于前者不仅可以产生辅色效应促进红酒色泽的变化,而且对香豆酸更易与花色苷形成新的色素(吡喃型花色苷),影响红酒的颜色表达。并且由于酚类物质的加入,红酒体系中花色苷等其他类型的多酚浸出率也得到加强^[6]。

同时,研究还利用葡萄籽作为辅色素因子在生产上予以应用。试验结果表明,通过添加葡萄籽可以明显地提高歌海娜(Garnacha)、威尔娜(Vranac)和丹魄(Tempranillo)葡萄酒中总酚和总花色苷的含量,并可长时间地提高其色调和色泽稳定性^[8]。但是研究也发现,对于葡萄籽的添加不是越多越好,当其含量超过一定的范围时,则会产生相反的作用效果(120 mg/L)^[8]。

7 展望

辅色化作用可以达到增强葡萄酒色泽、提高颜色稳定性的效果,是一种天然有效提升红葡萄酒色泽的方法。纵观过去几十年来红葡萄酒辅色化的研究进展,科学家已在辅色反应类型的确定、辅色因子类型和辅色反应机制等方面取得了一系列突破性的成果,而在辅色化应用领域方面,由于辅色作用对于花色苷的保护和稳定作用,使其作为国内外公认的天然而又安全的增色方法,在食

品加工和葡萄酒生产等领域已得到了直接的应用,展示出巨大的发展前景。但是,在研究的过程中仍然存在着一些问题:①在分析不同辅色素对红葡萄酒颜色的影响时,现在报道最多的是儿茶素、表儿茶素、咖啡酸等酚类辅色因子,对红葡萄酒中其他类型的辅色素研究,现有的报道数量依然有限,要想完全了解辅色素对红葡萄酒颜色的影响,还有大量的工作需要;②在研究辅色反应机制方面,目前的方法多是利用二甲基花翠素-3-O-葡萄糖苷这种花色苷来构建模拟反应体系,然而红酒中花色苷也存在其他类型,因此在理论研究中还应考虑不同花色苷对于辅色作用的影响;③在辅色作用对于生产实践的应用时,通常只着重于其对颜色的影响,而忽略了从整体品质方面对辅色素及其参与的辅色反应进行评价;④有研究认为辅色化反应可能是红葡萄酒中聚合色素形成的初步反应或是前期反应,而聚合色素由于其稳定的化学性质,对于葡萄酒的颜色有着重要的影响,因此研究辅色化过程与聚合色素的形成将对花色苷在葡萄酒陈酿期间的转变起到帮助。

此外,研究还通过改良葡萄栽培架势、调控植株种植树势、优化果穗修剪方式、制造适度的水分亏缺,以及葡萄植株田间生草和根域限制处理等栽培调控手段促进葡萄中酚类物质积累,并通过发酵前浸渍工艺优化、调整发酵原料种类及比例、酵母菌种选择、添加护色物质,以及改善陈酿条件等酿造工艺手段提高花色苷和其他酚类物质在葡萄酒中的含量,以此形成栽培调控和工艺优化并举的方式,开展辅色作用对葡萄酒颜色的应用与研究,以期在人类生产、生活等方面取得更大突破。

参 考 文 献

- [1] Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review [J]. *Am. J. Enol. Viticult.*, 2001, 52(2): 67-87.
- [2] Brouillard R, Dangles O. Anthocyanin molecular interactions: The first step in the formation of new pigments during wine aging [J]? *Food Chem.*, 1994, 51(4): 365-371.
- [3] Figueiredo-González M, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J, et al.. The phenolic chemistry and spectrochemistry of red sweet wine-making and oak-aging [J]. *Food Chem.*, 2014, 152(2): 522-530.
- [4] Darias-Martín J, Carrillo M, Díaz E, et al.. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments [J]. *Food Chem.*, 2001, 73(2): 217-220.

- [5] Schwarz M, Picazo-Bacete J J, Winterhalter P, *et al.*. Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53(21): 8372–8381.
- [6] Alexandre-Tudó J L, Alvarez I, Lizama V, *et al.*. Impact of caffeic acid addition on phenolic composition of Tempranillo wines from different winemaking techniques [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(49): 11900–11912.
- [7] Gordillo B, Cejudo-Bastante M J, Rodríguez-Pulido F J, *et al.*. Application of the differential colorimetry and polyphenolic profile to the evaluation of the chromatic quality of Tempranillo red wines elaborated in warm climate. Influence of the presence of oak wood chips during fermentation [J]. *Food Chem.*, 2013, 141(3): 2184–2190.
- [8] Kovac V, Alonso E, Revilla E. The effect of adding supplementary quantities of seeds during fermentation on the phenolic composition of wines [J]. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1995, 46(3): 363–367.
- [9] Escribano-Bailon T M, Santos-Buelga C. Anthocyanin copigmentation-evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines [J]. *Curr. Organic Chem.*, 2012, 16(6): 715–723.
- [10] Guadalupe Z, Palacios A, Ayestaran B. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55(12): 4854–4862.
- [11] Del Pozo-Insfran D, Del Follo-Martínez A, Talcott S T, *et al.*. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure [J]. *J. Food Sci.*, 2007, 72(4): S247–S253.
- [12] Zhang B, Liu R, He F, *et al.*. Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations [J]. *Food Chem.*, 2015, 170: 226–233.
- [13] Zhang B, He F, Zhou P P, *et al.*. Copigmentation between malvidin-3-O-glucoside and hydroxycinnamic acids in red wine model solutions: Investigations with experimental and theoretical methods [J]. *Food Res. Int.*, 2015, 78: 313–320.
- [14] Zhang B, He F, Zhou P P, *et al.*. The color expression of copigmentation between malvidin-3-O-glucoside and three phenolic aldehydes in model solutions: The effects of pH and molar ratio [J]. *Food Chem.*, 2016, 199: 220–228.
- [15] Bimpilas A, Panagopoulou M, Tsimogiannis D, *et al.*. Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors [J]. *Food Chem.*, 2016, 197(8): 39–46.
- [16] Liu Y, Zhang B, He F, *et al.*. The influence of prefermentative addition of gallic acid on the phenolic composition and chromatic characteristics of Cabernet Sauvignon wines [J]. *J. Food Sci.*, 2016, 81(7): C1669–C1678.
- [17] González-Manzano S, Santos-Buelga C, Dueñas M, *et al.*. Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins [J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, 226(3): 483–490.
- [18] 邓洁红, 位佳静, 刘永红, 等. 刺葡萄花色苷自聚合条件及水合动力学特性的研究 [J]. *现代食品科技*, 2015, 31(3): 144–150.
- Deng J H, Wei J J, Liu Y H, *et al.*. Self-association conditions and hydration kinetics of spine grape anthocyanins [J]. *Modern Food Sci. Technol.*, 2015, 31(3): 144–150.
- [19] Fernandes A, Brás N F, Mateus N, *et al.*. A study of anthocyanin self-association by NMR spectroscopy [J]. *New J. Chem.*, 2015, 39(4): 2602–2611.
- [20] Saito N, Nakamura M, Shinoda K, *et al.*. Covalent anthocyanin-flavonol complexes from the violet-blue flowers of *Allium 'Blue Perfume'* [J]. *Phytochemistry*, 2012, 80: 99–108.
- [21] Matsufuji H, Kido H, Misawa H, *et al.*. Stability to light, heat, and hydrogen peroxide at different pH values and DPPH radical scavenging activity of acylated anthocyanins from red radish extract [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55(55): 3692–3701.
- [22] Bakowskabarczak A. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants—A review [J]. *Polish J. Food Nutr. Sci.*, 2005, 11(3): 201–247.
- [23] Tatsuzawa F, Saito N, Shinoda K, *et al.*. Acylated cyanidin 3-sambubioside-5-glucosides in three garden plants of the *Cruciferae* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(12): 1287–1295.
- [24] Giusti M M, Wrolstad R E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems [J]. *Biochem. Engin. J.*, 2003, 14(3): 217–225.
- [25] Czibulya Z, Horváth I, Kollár L, *et al.*. Unexpected effect of potassium ions on the copigmentation in red wines [J]. *Food Res. Int.*, 2012, 45(1): 272–276.
- [26] Kunsági-Máté S, Ortmann E, Kollár L, *et al.*. Effect of ferrous and ferric ions on copigmentation in model solutions [J]. *J. Mol. Structure*, 2008, 891(1–3): 471–474.
- [27] Kunsági-Máté S, Stampel E, Kollár L, *et al.*. The effect of the oxidation state of iron ions on the competitive complexation of malvidin by caffeic or ellagic acid [J]. *Food Res. Int.*, 2008, 41(7): 693–696.
- [28] Robinson G M, Robinson R. A survey of anthocyanins. II [J]. *Biochem. J.*, 1932, 26(5): 1647–1664.
- [29] Gómez-Míguez M, Manzano S G, Escribano T, *et al.*. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54(15): 5422–5429.
- [30] Lambert S G, Asenstorfer R E, Williamson N M, *et al.*. Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine [J]. *Food Chem.*, 2011, 125(1): 106–115.
- [31] Hoshino T, Matsumoto U, Goto T. Evidences of the self-association of anthocyanins I. Circular dichroism of cyanin anhydrobase [J]. *Tetrahedron Lett.*, 1980, 21(18): 1751–1754.
- [32] Hoshino T. Self-association of flavylium cations of anthocyanidin 3,5-diglucosides studied by circular dichroism and ^1H NMR [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(2): 647–653.
- [33] Hoshino T. An approximate estimate of self-association

- constants and the self-stacking conformation of Malvin quinonoidal bases studied by ^1H NMR [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(6): 2049–2055.
- [34] Somers T C, Evans M E. Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification [J]. *J. Sci. Food Agric.*, 1979, 30(6): 623–633.
- [35] Brouillard R. Origin of the exceptional colour stability of the *Zebrina* anthocyanin [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(1): 143–145.
- [36] He J R, Carvalho A R F, Mateus N, *et al.*. Spectral features and stability of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments isolated from red wines [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58(16): 9249–9258.
- [37] Teixeira N R, Cruz L, Brás N R F, *et al.*. Structural features of copigmentation of oenin with different polyphenol copigments [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61(28): 6942–6948.
- [38] Palmira F D S, Lima J O C, Freitas A A, *et al.*. Charge-transfer complexation as a general phenomenon in the copigmentation of anthocyanins [J]. *J. Physical Chem. A*, 2005, 109(32): 7329–7338.
- [39] Gutiérrez I H N, Lorenzo S P, Espinosa A V. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah [J]. *Food Chem.*, 2005, 92(2): 269–283.
- [40] Darias-Martín J, Carrillo-López M, Echavarri-Granado J F, *et al.*. The magnitude of copigmentation in the colour of aged red wines made in the Canary Islands [J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2007, 224: 643–648.
- [41] Cándida L, Francisco P, Amaya Z, *et al.*. Effect of red grapes co-winemaking in polyphenols and color of wines [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53(19): 7609–7616.
- [42] Versari A, Boulton R B, Parpinello G P. A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines [J]. *Food Chem.*, 2008, 106(1): 397–402.
- [43] Gonnet J F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale [J]. *Food Chem.*, 1998, 63(3): 409–415.
- [44] Chen L J, Hrazdina G. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(2): 297–303.
- [45] Bénédict B, Victor D F. A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins [J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2007, 87(2): 260–265.
- [46] Berké B, Freitas V A P D. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin [J]. *Food Chem.*, 2005, 90(3): 453–460.
- [47] Brouillard R, Mazza G, Saad Z, *et al.*. The co-pigmentation reaction of anthocyanins: A microprobe for the structural study of aqueous solutions [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 111(7): 2604–2610.
- [48] Isidro H G. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51(14): 134–136.
- [49] Kunsági-Máté S, Ortmann E, Kollár L, *et al.*. Entropy-driven complex formation of malvidin-3-O-glucoside with common polyphenols in ethanol-water binary solutions [J]. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2008, 70(4): 860–865.
- [50] Mirabel M, Saucier C, Guerra C, *et al.*. Copigmentation in model wine solutions: Occurrence and relation to wine aging [J]. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1999, 50(2): 211–218.
- [51] Malaj N, De Simone B C, Quartarolo A D, *et al.*. Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids [J]. *Food Chem.*, 2013, 141(4): 3614–3620.
- [52] Bakowska A, Kucharska A Z, Oszmianski J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex [J]. *Food Chem.*, 2003, 81(3): 349–355.
- [53] Fernandes A, Bras N F, Oliveira J, *et al.*. Impact of a pectic polysaccharide on oenin copigmentation mechanism [J]. *Food Chem.*, 2016, 209: 17–26.
- [54] Aguilera Y, Mojica L, Rebollo-Hernanz M, *et al.*. Black bean coats: New source of anthocyanins stabilized by β -cyclodextrin copigmentation in a sport beverage [J]. *Food Chem.*, 2016, 212: 561–570.
- [55] Brouillard R, Chassaing S, Fougerousse A. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long [J]? *Phytochemistry*, 2003, 64(7): 1179–1186.
- [56] Coletta A, Trani A, Faccia M, *et al.*. Influence of viticultural practices and winemaking technologies on phenolic composition and sensory characteristics of Negroamaro red wines [J]. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, 48(11): 2215–2227.
- [57] Carew A L, Sparrow A M, Curtin C D, *et al.*. Microwave maceration of pinot noir grape must: Sanitation and extraction effects and wine phenolics outcomes [J]. *Food Bioproc. Technol.*, 2014, 7(4): 954–963.
- [58] Abca E E, Evrendilek G A. Processing of red wine by pulsed electric fields with respect to quality parameters [J]. *J. Food Proc. Preserv.*, 2015, 39(6): 758–767.
- [59] Bloomfield D G, Heatherbell D A, Nikfardjam M S P. Effect of p-coumaric acid on the color in red wine [J]. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 2003, 53: 195–198.

(责任编辑:陈凌云)