

刁体伟,陈晓姣,赖晓琴,等.壳聚糖及其衍生物在果酒中应用的研究进展[J].食品工业科技,2022,43(6):467-473. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050115

DIAO Tiwei, CHEN Xiaojiao, LAI Xiaoqin, et al. Research Progress on Application of Chitosan and Its Derivatives in Fruit Wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 467-473. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050115

· 专题综述 ·

壳聚糖及其衍生物在果酒中应用的研究进展

刁体伟,陈晓姣,赖晓琴,魏 鑫,冷银江,马 懿*
(四川轻化工大学生物工程学院,四川宜宾 644000)

摘 要:壳聚糖是一种天然、无毒的高分子聚合物,研究显示其在果酒酿造中具有抑菌、金属整合、澄清和抗氧化等作用。但壳聚糖在酿酒过程中的上述活性强度及作用机理还未完全阐明。本文主要总结在果酒酿造中,壳聚糖及其衍生物的抗菌、抗氧化、澄清作用机理及应用现状,分析其目前存在的发展瓶颈问题,同时对潜在应用价值进行讨论,以期促进壳聚糖及其衍生物在果酒中进一步研究和开发利用,助推果酒产业链发展。

关键词:壳聚糖,果酒,抗菌性,抗氧化性,澄清剂

中图分类号:TS261.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2022)06-0467-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050115

本文网刊:



Research Progress on Application of Chitosan and Its Derivatives in Fruit Wine

DIAO Tiwei, CHEN Xiaojiao, LAI Xiaoqin, WEI Xin, LENG Yinjiang, MA Yi*

(College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin 644000, China)

Abstract: Chitosan, a natural and safe polymer, has antibacterial, metal chelating, clarifying and antioxidant effects in the fruit wine making industries. However, the activity strength and action mechanism of chitosan in the brewing process is still unclear. In this review, the action mode of chitosan and its derivatives as antibacterial, antioxidant and clarifying agent, their application status in fruit wine brewing are summarized, the development bottleneck problems are analyzed, as well as their potential application value is discussed, attempting to promote the further research, development and utilization of chitosan and its derivatives in fruit wine and boost the development of fruit wine industry.

Key words: chitosan; fruit wine; antimicrobial; antioxidation; clarifying agent

壳聚糖(Chitosan, CS)由甲壳素(Chitin)经脱乙酰作用而制得,又称为聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基- β -D 葡萄糖^[1]。因其具有良好的生物相容性、可降解性和无毒等特征,被广泛应用于果蔬加工与保鲜领域,以提高食品质量、保质期和安全性^[2]。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)证实壳聚糖具有广泛安全性(Generally Recognized as Safe, GRAS),允许在果酒酿造中使用(OIV-OENO 336A-2009)。壳聚糖可在酿造中发挥防腐、抗氧化和澄清等重要作用,因而受到果酒研究者的广泛关注^[3]。2010 年欧盟也同意其应用于果酒,发挥去除

铜和铁等金属离子的作用^[4]。研究者发现壳聚糖可与许多配体发生反应,其羧基化反应、酰化反应、季铵化反应、醚化反应、接枝共聚反应等产物将进一步增强其潜在应用价值,壳聚糖的改性是提高其活性的重要方法^[5]。目前壳聚糖在果酒中的主要功能有四大类(图 1): a.能螯合果酒中的部分金属离子,并去除多酚氧化酶和农药,起到澄清作用; b.作用微生物后使细胞膜通透性改变,细胞破碎,重要物质泄露导致细胞死亡,达到灭菌抑菌的效果; c.与自由基形成稳定化合物,清除自由基,使果酒具有良好抗氧化性; d.由其制作而成的保鲜复合膜能防腐保鲜,保证口感

收稿日期: 2021-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801458);四川轻化工大学人才引进项目(2017RCL24)。

作者简介: 刁体伟(1996-),男,硕士研究生,研究方向:发酵工程,E-mail: 997945862@qq.com。

* 通信作者: 马懿(1983-),男,博士,副教授,研究方向:食品科学与工程,E-mail: 191066789@qq.com。

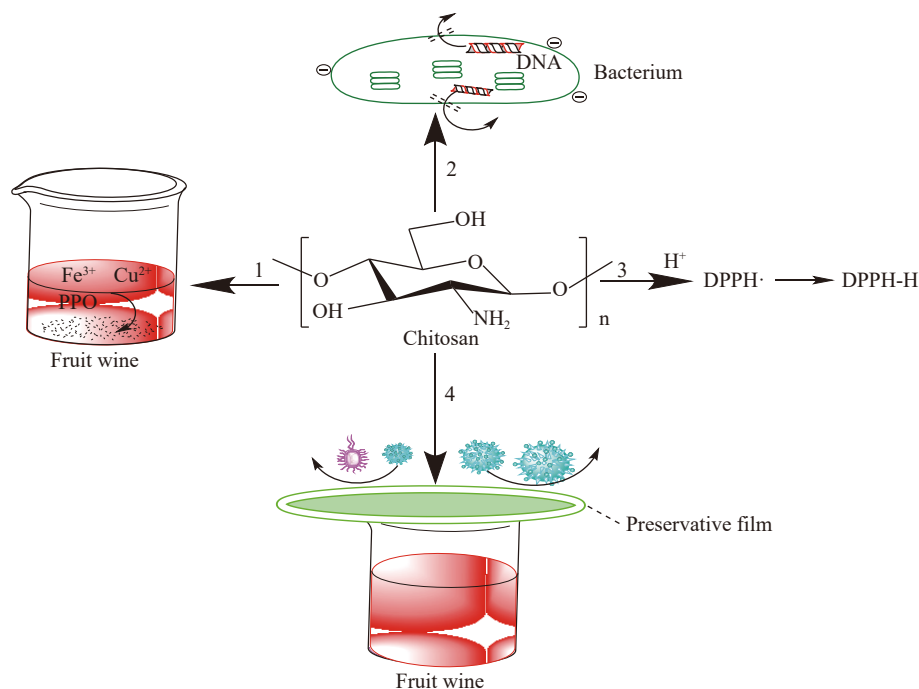


图 1 壳聚糖在酿酒中的主要应用

Fig.1 Main applications of chitosan in wine making

(可用于陈酿期或开瓶后)。因此,将壳聚糖及其衍生物作为抗氧化剂、抑菌剂、澄清剂等应用于果酒酿造,可实现增香调色、提高果酒品质安全的目的,同时对降低或取代 SO_2 的使用起到积极作用^[6]。

然而,壳聚糖及其衍生物的实际使用范围及作用机理还未完全阐明,其作用效果有待进一步提高。为全面深入总结壳聚糖及其衍生物的作用机理及其在果酒中的潜在应用价值,本文对壳聚糖及其衍生物在果酒中应用研究进展进行综述,以期壳聚糖在果酒酿造中的进一步应用,提高果酒品质安全提供参考依据与思路。

1 壳聚糖及其衍生物抗氧化活性与影响因素

目前研究提出的壳聚糖及其衍生物抗氧化途径主要有三种,包括阻断自由基链反应、金属离子螯合作用以及减少乙醛的产生。壳聚糖及其衍生物中含有大量高活性氨基、乙酰基、羟基,可通过阻断自由基链反应来抑制酒体氧化损伤,一是可提供氢原子($\text{H}\cdot$)形成稳定的 $\text{DPPH}\cdot\text{H}$ 和大分子化合物,因而具有较强的抗氧化性;二是抑制葡萄酒中乙醇氧化产物 1-羟乙基自由基的形成,促进葡萄酒中的酚类物

质形成聚合色素,增强葡萄酒颜色的稳定性,葡萄酒抗氧化活性会随着聚合度的增加而提高^[7]。由于对果酒中金属离子(Fe^{3+} 、 Pb^{2+})的螯合作用形成铁-酒石酸-壳聚糖络合物后抑制果酒的氧化反应,去除果酒中的多酚氧化酶,从而能减少或者缓解多酚物质被氧化。果酒中乙醛和乙醛酸是引起葡萄酒氧化腐败的关键活性醛,而壳聚糖能有效减少两者的生成从而减少果酒的褐变。此外,壳聚糖还能提高酿酒原材料的抗氧化性,在作用果实树藤后,能增加葡萄、草莓、无花果在生长过程中所含芳香化合物的含量,强化水果的抗氧化性^[8]。

1.1 壳聚糖抗氧化性

壳聚糖在果酒酿造中的抗氧化活性贯穿整个酿造过程(表 1),并且其绿色、无毒性使得生产低硫高质果酒具有一定的可行性。在果酒生产中将壳聚糖替代 SO_2 作为抗氧化剂的使用不仅在口感上无差异,而且安全性更占上风。但是因壳聚糖来源于甲壳素不易并且溶解度不高,将壳聚糖作为抗氧化剂添加必定会增加酿造成本,因而提高产量、降低成本与溶解度是目前研究者需要解决的问题。

表 1 壳聚糖在果酒酿造中的抗氧化效果

Table 1 Antioxidant effect of chitosan in fruit wine brewing

试验对象	应用剂量(mg/L)	效果
红葡萄酒 ^[9]	100	壳聚糖与 SO_2 都能较好保护葡萄酒中部分芳香多酚物挥发和氧化,总体上口感无异味、果香持久以及卫生安全性等方面较好。
白葡萄酒 ^[10]	400	壳聚糖能有效去除葡萄酒中多酚物质,对多酚具有较高的亲和力,并对酒质有一定的稳定能力。
模型红葡萄酒 ^[11]	—	壳聚糖薄膜被赋予抗氧化性,最大限度地减少了氧化反应,此外葡萄酒感官特性与使用二氧化硫酿造相当。
模型白葡萄酒 ^[12-13]	200~2000	壳聚糖能有效控制暴露于空气的模型白葡萄酒中儿茶素氧化衰退,有效保护硫醇不被氧化;能有效减少二氧化硫和亚硫酸盐的使用量。

1.2 壳聚糖衍生物抗氧化性

壳聚糖因分子结构聚合度高而不溶于水,因而需要通过改性成为衍生物来解决溶解度问题。破坏分子链的整体完整性并从侧链引入亲水基团能使得部分壳聚糖衍生物比原壳聚糖和其他抗氧化剂具有更优的抗氧化活性和溶解度,Zhao 等^[14]制备了 N-呋喃酰壳聚糖(N-Furanyl Chitosan, NF-CS)和 N-呋喃酰壳寡糖(N-Furanyl Chitosan Oligosaccharide, NF-COS)并研究他们体外抗氧化活性,结果显示两种壳聚糖衍生物比壳聚糖具有更高的抗氧化活性,在 50%(IC₅₀)条件下,NF-CS 和 NF-COS 对 DPPH 的清除作用分别为 1.3 和 0.76 mg/mL,并且清除率与壳聚糖浓度和剂量密切相关。朱广楠^[15]探究不同分子量壳聚糖尿素衍生物对于超氧阴离子、羟基自由基和 DPPH 自由基的清除效果,结果表明壳聚糖尿素衍生物都具有比 V_C 和原壳聚糖更好的抗氧化活性,高分子和低分子量壳聚糖对于羟基(·OH)和 DPPH 的清除效果有所差异,主要原因是由于衍生物溶解度和活性基团数量不同所导致。将酚类化合物通过接枝和偶联反应与壳聚糖结合,从而提高抗氧化性是目前常见的改性方法^[16]。Xie 等^[17]以壳聚糖(CS)为原料在水溶液中成功接枝没食子酸(Gallic acid, GA),并研究其抗氧化活性,高接枝率共聚物(GA-g-CS)兼有 CS 和 GA 的强抗氧化活性、可调流变性能等优点,并且抗氧化活性和溶解性都高于普通 CS 和 GA。Eom 等^[18]把 8 种酚酸与不同的共轭低聚糖采用酰胺偶联反应制备酚酸偶联壳寡糖;制备壳寡糖均有抗氧化性,其中咖啡酸-c-COS 自由基清除能力最好。然而在果酒酿造中,对壳聚糖衍生物抗氧化功能的研究较为空缺,这跟其活性易变难控以及果酒成分复杂有很大关系,部分衍生物羟基数量和剂量的增加虽然会让其性能增强,但也体现出不同衍生物之间性能差异性较大。分子质量和脱乙酰度的不同导致衍生物化学性能难以稳定和统一是改性壳聚糖应用于果酒产品的难题之一。

1.3 分子质量对抗氧化性的影响

目前研究表明低分子质量壳聚糖(分子量低于 50 kDa)及其衍生物的氨基和羟基基团活性较高,对自由基的清除作用更强,抗氧化能力越高^[19]。其原因可能是低分子质量会提高其溶解度从而促进活性基团与自由基的反应。此外,高分子质量的壳聚糖及其衍生物分子内氢键结合更为紧密,导致活性基团与果酒中自由基接触面积降低;小分子质量结构更为疏散,因而在果酒中呈现更优的抗氧化性。郝振铭等^[20]测评了小分子壳寡糖在葡萄酒样中的抗氧化性和对葡萄酒风味的影响,结果显示添加了壳寡糖后对 DPPH 清除效果增加了 3.96%,对羟自由基的清除率增加了 4.48%,葡萄酒的风味口感没有发生明显变化。Chinnici 等^[12]首次在葡萄酒的模型环境中,研究低分子量壳聚糖对儿茶素氧化以及对硫醇氧化

降解的保护作用,结果表明壳聚糖聚电解质行为降低了硫醇的氧化,能很好保持葡萄酒芳香,是一种潜在替代亚硫酸盐酿酒的添加剂。

1.4 脱乙酰度对抗氧化性的影响

在一定范围内,壳聚糖及其衍生物作用在葡萄酒中还还原效率会随着用量和脱乙酰度的增加而增强,这表明高脱乙酰度的壳聚糖及衍生物抗氧化活性更好,其原因是由于脱乙酰度增加使得活性基团氨基和羟基数量变多且活性增强,从而更易更快形成稳定的壳聚糖-NH₃⁺大分子化合物。Marin 等^[13]通过电子顺磁共振研究了 70%~85% 脱乙酰度壳聚糖对葡萄酒氧化降解影响,结果显示高脱乙酰度壳聚糖拥有高密度高活性的羟基和氨基,有显著的金属螯合能力,能直接清除氧化物,表现出较好的抗氧化能力。此外,对两种不同乙酰化的 N-乙酰基壳聚糖(N-Acetyl chitosan, NA-CS)和 N, N-二乙酰基(N, N-Diacetyl Group chitosan, NNDG-CS)壳聚糖清除羟基自由基和超氧自由基的活性进行探究,NNDG-CS 和 NA-CS 清除羟基自由基的 IC₅₀ 值分别为 1.43 和 1.93 mg/mL, NNDG-CS 因乙酰化程度高而抗氧化能力越突出^[21]。

目前在果酒研究中把壳聚糖及其衍生物单独作为抗氧化剂使用鲜有报道。主要原因有:在果酒中含有大量酚类和其他易氧化物质,壳聚糖加入后所引起反应顺序错综复杂;壳聚糖及其衍生物因制备难度较大,而其抗氧化活性会受到溶解度、去乙酰度、分子质量、聚合度和反应条件(温度、pH)等因素的影响而具有不稳定性,并且同一种衍生物对不同自由基清除效果也具有差异性;加入后须保证最终果酒口感和风味不变,难度较大,缺乏专属于酿酒的壳聚糖衍生物抗氧化剂。

2 壳聚糖及其衍生物抑菌活性与影响因素

壳聚糖及其衍生物作为一种阳离子抗菌剂,能吸附带负电的细菌并与细菌表面酸性聚合物反应形成壳聚糖聚电解质复合物阻碍营养物质的运输,改变微生物细胞膜通透性,破坏壁膜结构,导致重要物质被泄露出细胞外,因而具有良好的抑菌活性^[22]。此外,壳聚糖及其衍生物因具有金属离子螯合作用,可将微生物必需微量元素进行螯合吸附,从而抑制杂菌的正常生长。研究显示多数壳聚糖及其衍生物对枯草杆菌、芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、布氏酵母菌等常见果酒致腐菌均有较好的抑制效果^[23]。酒精发酵阶段,酿酒酵母对壳聚糖的抑菌作用表现出一定的耐受性,酵母活性与发酵性能并未受到显著影响;在苹果酸-乳酸发酵中,因乳酸菌(酒球菌)生长会被壳聚糖抑制从而会影响果酒二次发酵效果,此抑菌性能与 SO₂ 较为相似^[24]。此外,壳聚糖及其衍生物抑菌活性同样受到分子量、脱乙酰度、溶解度等因素的影响^[25]。

2.1 壳聚糖抑菌性

在果酒抑菌实验中,郝振铭等^[20]把壳寡糖作为抑菌剂替代 SO_2 加入到葡萄酒中,发现 500 mg/L 的壳寡糖对葡萄酒中腐败菌都具有很好的抑制效果,其抑菌效果优于胶体银和 SO_2 (50 mg/L)。此外,由壳聚糖和梔子中梔子苷的苷元衍生物(Genipin)制备的复合保鲜薄 CS-Genipin 可以用于葡萄酒的保鲜防腐,薄膜具有良好的抗自由基活性和机械性能,葡萄酒不会造成过敏反应,在葡萄酒储存一年期间并未发现有新增细菌的出现,能保证葡萄酒的感官质量^[11]。因此壳聚糖在果酒酿造中可作为抑菌剂使用(表 2),但对不同腐败菌的抑制效果会具有差异性,壳聚糖抑菌时酒体环境对其用量和作用是不可忽略的因素。

2.2 壳聚糖衍生物抑菌性

壳聚糖衍生物因其溶解度和生物活性明显高于壳聚糖而使得抑菌范围更为广泛,部分衍生物还具有双抑菌功能团和大量的正电荷,可以有效地预防和抑制果酒的微生物,避免因微生物的二次污染和繁殖造成果酒出现异杂味。此外,壳聚糖衍生物在果酒中的抑菌效果突出,主要是因为其在酸性环境下溶解度更高并具有较强的质子化氨基,因而可考虑在果酒发酵期间不影响酿酒酵母生长的情况下降低 pH,使得其具有更好的抑菌性能。

于沛沛等^[31]通过酯化反应合成苯甲酸壳聚糖酯并研究其对酵母和黑曲霉菌的抑制效果,结果显示在酸性条件下苯甲酸壳聚糖酯有很好的抑菌作用,抑菌活性远高于壳聚糖。Papineau 等^[32]探究了壳聚糖乳酸盐和壳聚糖水谷氨酸盐两者对金黄色葡萄球菌和酿酒酵母的灭活作用,结果显示两者的抑菌活性较为明显,低浓度壳聚糖乳酸盐能使酿酒酵母直接失去活性,壳聚糖谷氨酸盐也能抑制酵母菌的繁衍。N-膦基壳聚糖^[33]和 O-胺功能化壳聚糖^[34]两者具有比壳聚糖更好的抑菌活性,能较好抑制金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌生长,是一种新型高分子抑菌剂。壳聚糖衍生物对不同生长阶段和变异的菌种的抑菌效果有着差异性,但季铵盐衍生物、羧甲基壳聚糖和酰化壳聚糖抗菌活性更为突出^[23]。原因可能是季铵化、羧甲基化和酰化能增加衍生物的水溶性或形成更多

抑菌功能团。

2.3 分子量和脱乙酰度对抑菌活性的影响

壳聚糖及其衍生物抑菌活性不仅与果酒中微生物种类相关,还会因分子量、脱乙酰度不同而出现差异性,低乙酰度和低分子量的壳聚糖抑菌活性总体相对较好^[35]。可能是因为壳聚糖及其衍生物可以作为基因载体,而低分子量的壳聚糖更易穿过细胞壁进入细胞内部,与 DNA 结合从而阻止转录过程的发生。Simel 等^[24]探究了不同基质下脱乙酰 75%~85% 低分子量壳聚糖对七种葡萄酒相关微生物的抑菌效果,结果显示,在实验室培养基上或葡萄酒中,壳聚糖对腐坏菌(*Brettanomyces bruxellensis*、*Hanseniaspora uvarum*、*Zygosaccharomyces bailii*)都具有抑制作用,但在葡萄酒环境中由于壳聚糖会与其他成分发生复杂反应而导致抑制效果会减弱。Taillandier 等^[36]同样也发现在酿酒条件下,壳聚糖能破坏 *B. bruxellensis* 细胞膜使 ATP 外泄,导致菌种数量和生物活性都下降。在酿造中壳聚糖相比部分抑菌剂优势突出, Vitalini 等^[37]比较分子量 76 kDa 壳聚糖和抑菌剂苯并噻唑对葡萄酒芳香度和感官的影响,结果显示,壳聚糖葡萄酒的抑菌活性较好,总体接受度更高(酯醇提高),能更好的降低葡萄酒的酸度和危害,具备良好的香味持久性和化学性。

3 壳聚糖及其衍生物澄清作用

壳聚糖及其衍生物作为绿色阳离子澄清剂,其良好的絮凝性能吸附果酒中的胶体微粒(蛋白质、果胶、单宁)并选择性螯合部分金属离子(Fe^{3+} 、 Pb^{2+}),降低微生物代谢毒素并保证果酒安全,有效提高果酒的澄清度并提升果酒口感^[38]。除了壳聚糖自身物理性质外,其澄清效果突出还依赖于可以与果酒中的微粒发生静电作用、分解作用和沉降作用。表 3 对比了壳聚糖、果胶酶、明胶、硅藻土等多种澄清剂在果酒酿造中的澄清效果,通过透光率及感官评价进行综合比较,得出壳聚糖澄清效果较为突出。此外,含有壳聚糖的复合澄清剂对果酒澄清效果更佳,澄清效果远高于单一壳聚糖,复合澄清剂壳聚糖-聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl Pyrrolidone, PVPP)在甘蔗果酒中澄清效果比硅藻土-PVPP 的澄清效果要好,透光率最

表 2 壳聚糖在果酒酿造中的抑菌效果

Table 2 Antibacterial effect of chitosan in fruit wine brewing

抑菌类别	应用剂量(mg/L)	果酒种类	抑菌效果
<i>Brettanomyces</i> spp.	150~1500	丹魄红酒 ^[26]	壳聚糖(酒精发酵后)能使部分酵母菌、乳酸菌和醋酸菌数目降低。
<i>Brettanomyces</i> ; <i>Broxellensis</i>	40~100	橡木桶中的红酒 ^[27]	壳聚糖制剂能极大地减少红酒中的 <i>B. bruxellensis</i> 的数量。
<i>H. uvarum</i> ; <i>Z. baili</i> ; <i>Brettanomyces-bruxellensis</i>	100~400	土耳其白葡萄酒 ^[24]	壳聚糖对植物乳杆菌、酵母菌、布氏乳杆菌、紫花汉生孢子和贝氏酵母等与葡萄酒有关的微生物有较强的抑菌作用。
<i>S.cerevisiae</i> ; <i>B.bruxellensis</i>	0.12~250	红酒 ^[28]	壳聚糖可用于葡萄酒酿造以阻止杂菌生长,杀灭率可达50%,并且抑菌活性与正电荷密度在一定范围内成正相关。
<i>S.cerevisiae</i> 3085; <i>Saccharomycodes-ludwigii</i>	50~1000	变质苹果酒 ^[29]	壳聚糖能抑制部分腐败酵母菌的生长,其温和解聚可能会略微增强其抗菌作用。
Acetic acid bacteria: <i>A. malorum</i> and <i>A. pasteurianus</i>	200	葡萄酒 ^[30]	经壳聚糖处理后的葡萄酒中有高浓度的受损细胞,壳聚糖能使醋酸菌菌群的活力降低。

表 3 壳聚糖在多种果酒中澄清效果
Table 3 Clarification effect of chitosan in fruit wine

试验对象	澄清剂	澄清效果比较(透光率)	添加量与澄清效果
桑葚果酒 ^[40]	壳聚糖、明胶、交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、皂土	壳聚糖(83.5%)>PVPP(82.6%)>皂土(79.8%)>明胶(73.8%)	壳聚糖最佳添加量为0.8 g/L, 澄清后具有大量沉淀, 酒体呈现浅紫红色有光泽
蓝莓果酒 ^[41]	壳聚糖、皂土、明胶、硅藻土	皂土和壳聚糖(95%)>壳聚糖(81.96%)>皂土(79.85%)>硅藻土(64.20%)>明胶果胶酶(62.90%)	壳聚糖最佳添加量为2 g/L, 果酒澄清速度快, 产生沉淀量大, 色泽变为浅紫红色且澄清透明; 1 g/L皂土与0.5 g/L壳聚糖混合处理时透光率达95%
柚子果酒 ^[42]	壳聚糖、硅藻土、木瓜蛋白酶、明胶、PVPP、皂土	皂土和壳聚糖(91.7%)>皂土(84.8%)>壳聚糖(82.2%)>PVPP(73.6%)>硅藻土(71.6%)>木瓜蛋白酶(61.7%)	壳聚糖最佳添加量为0.7 g/L; 皂土和壳聚糖复合澄清剂0.75:1时, 透光率最佳91.7%
猕猴桃果酒 ^[43]	壳聚糖、0.22 μm滤膜	壳聚糖和微滤膜过滤法(97%)>微滤膜过滤法(88%)>壳聚糖(71%)	壳聚糖加入后稳定性较高, 有少量沉淀, 能使澄清度达到71%
甘蔗果酒 ^[39]	壳聚糖、蛋清液、明胶、果胶酶、珞藻土、琼脂、PVPP	壳聚糖(89.19%)>硅藻土(86.01%)>PVPP(84.51%)>琼脂(83.87%)>蛋清液(83.32%)>果胶酶(82.34%)>明胶(81.70%)	壳聚糖最佳添加量为1.6 mL/100 mL
大枣果酒 ^[44]	壳聚糖、果胶酶、硅藻土、皂土、琼脂	壳聚糖(94.6%)>皂土(87.47%)>果胶酶(85.4%)>硅藻土(84.7%)>琼脂(83.9%)	壳聚糖能最佳添加量为0.6 g/L, 能引起果酒混浊的颗粒絮凝沉淀下来; 35 ℃下处理3 h, 澄清度可达94.6%
草莓果酒 ^[45]	壳聚糖、明胶、皂土、果胶酶、复配澄清剂	酪蛋白质(96%)>壳聚糖(95.5%)>蛋清粉(94%)>PVPP(92.1%)>皂土(91.5%)	壳聚糖最佳添加量为0.2 g/L, 稳定性好; 对酒体色度和花青素浓度影响较大
石榴果酒 ^[46]	壳聚糖、明胶、皂土、果胶酶、复配澄清剂	皂土和壳聚糖(98.7%)>壳聚糖(94.6%)>皂土(94.2%)>复配酶制剂(92.8%)>果胶酶(90.2%)>明胶(65.7%)	壳聚糖最佳添加量为0.7 g/L; 皂土 1.1 g/L和壳聚糖0.7 g/L透光率达最佳98.7%

高可达到 89.77%, 澄清后总多酚含量明显降低, 果酒的风味和主成分无明显变化^[39]。

与物理澄清法比较, 壳聚糖的使用具有一定的优势, 体现在能较好的保持果香和酒质。唐玲^[47]在研究无花果果酒发酵中, 比较静置、冷冻、离心和添加壳聚糖等方法对无花果果酒的澄清效果, 结果显示添加壳聚糖组澄清效果最好, 透光率能达到 93.77%, 多糖、黄酮等营养物质得到较好保留。在草莓果酒研究中, 李亚辉等^[45]同样比较了冷冻、过滤、添加澄清剂对果酒的澄清效果, 当壳聚糖浓度低于 200 mg/L 具有较好的澄清效果, 澄清度最高能达到 95.5%, 但对草莓果酒色度影响较大。此外, 壳聚糖作为澄清剂具有混凝和絮凝性能, Venkatachalapathy 等^[48]研究了壳聚糖对葡萄汁中农药的去除效率, 结果显示壳聚糖(0.05%)能够去除葡萄汁中 86%~96% 的农药, 是一种有效的农药清除剂。壳聚糖衍生物同样具有澄清作用, 在黑莓果酒研究中, 壳聚糖季铵盐(0.3 g/L)与皂土(0.1 g/L)组成的复合澄清剂澄清效果最佳, 澄清后对果酒总糖、乙醇无明显影响^[49]。

综上所述, 壳聚糖在多数酒体中的澄清效果都优于明胶、皂土、果胶酶等澄清剂, 并且在不同酒体中澄清效果稳定, 是一种简便、易操作的理想澄清剂。未来果酒研究趋向于纯果汁或浓缩果汁发酵, 在澄清方面难度增大, 可考虑使用复合澄清剂或与物理澄清法联用, 以致于优化澄清效果并加快澄清时间, 缩短果酒酿造周期。

4 总结与展望

壳聚糖及其衍生物具有良好的抗氧化性、抑菌性和澄清功能, 是一种无毒无害的绿色添加剂。目前我国对壳聚糖的使用仅作为澄清剂被应用于果酒(汁)中(GB2760), 国际葡萄与葡萄酒组织已经开始

将其作为抑菌防腐剂添加使用, 对壳聚糖的抗氧化性应用探究目前还基于模型葡萄酒中(表 1), 但其作用是显著可见的。总体而言, 在果酒中低分子量、高脱乙酰度的壳聚糖及衍生物抗氧化性能更佳, 部分低分子量、低脱乙酰度的抑菌活性效果较好; 作为澄清剂使用时澄清效果较为稳定, 受分子质量和脱乙酰度的影响不大。基于此, 在果酒领域应用研究时可考虑壳聚糖及衍生物单一功能或兼顾多个性能, 通过调节脱乙酰度来进行设计研究, 可趋向于低分子量、中等脱乙酰度且水溶性好的衍生物来替代或者减少 SO₂ 在果酒中的使用。相比于二氧化硫的加入, 壳聚糖及其衍生物还可作为膳食补充品或抗生素替代品, 能增加酒体的附加风味或功能。

此外, 除了与其他添加剂复配或者增大用量可强化性能外, 也可将壳聚糖及其衍生物的改性与配体反应范围扩大, 如壳聚糖与葡萄糖两者美拉德反应的衍生物就保留了壳聚糖自身的抑菌性^[50]。尽管壳聚糖及其衍生物具有多样化的应用特点, 从实验室研究层面应用到果酒工业中或想完全替代 SO₂ 仍旧存在许多问题。主要表现在以下几个方面: a. 脱乙酰度和平均分子量等因素较为难控, 壳聚糖改性和衍生化的不易; b. 壳聚糖衍生物的最优性能单一, 需配合其他添加剂才能提高其功能性从而保证果酒的口感, 缺乏高活性多功能专属酿酒壳聚糖衍生物; c. 酿造果酒种类和工艺多样繁琐, 发酵、陈酿期间可能会与其他物质发生交叉连锁反应从而影响壳聚糖作用效果, 并且添加的时间位点也是不可忽视的因素。

参考文献

[1] LOGITHKUMAR R, KESHAVNARAYAN A, DHIVYA S, et al. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 151: 172–188.

- [2] NAVEED M, PHIL L, SOHAIL M, et al. Chitosan oligosaccharide(cos): An overview[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 827–843.
- [3] CASTRO-MARÍN A, BUGLIA A G, RIPONI C, et al. Volatile and fixed composition of sulphite-free white wines obtained after fermentation in the presence of chitosan[J]. *LWT*, 2018, 93: 174–180.
- [4] SHARMA R K, LALITA, SINGH A P. Sorption of pb(ii), cu(ii), fe(ii) and cr(vi) metal ions onto cross-linked graft copolymers of chitosan with binary vinyl monomer mixtures[J]. *Reactive and Functional Polymers*, 2017, 121: 32–44.
- [5] BRASSELET C, PIERRE G, DUBESSAY P, et al. Modification of chitosan for the generation of functional derivatives[J]. *Applied Sciences*, 2019, 9(7): 1321–1354.
- [6] PICARIELLO L, RINALDI A, BLAIOTTA G, et al. Effectiveness of chitosan as an alternative to sulfites in red wine production[J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246(9): 1795–1804.
- [7] MARCHANTE L, MÁRQUEZ K, CONTRERAS D, et al. Impact of oenological antioxidant substances on the formation of 1-hydroxyethyl radical and phenolic composition in so₂ free red wines[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(8): 3401–3407.
- [8] SINGH, SOARES B, GOUFO P, et al. Chitosan upregulates the genes of the ros pathway and enhances the antioxidant potential of grape (*Vitis vinifera* L. ‘Touriga Franca’ and ‘Tinto Cão’) tissues[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(11): 525.
- [9] FERRER GALLEGU R, PUXEU M, NART E, et al. Evaluation of tempranillo and albariño SO₂-free wines produced by different chemical alternatives and winemaking procedures[J]. *Food Research International*, 2017, 102: 647–657.
- [10] SPAGNA G, BARBAGALLO R N, PIFFERI P G. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(10): 4619–4627.
- [11] NUNES C, MARICATO É, CUNHA Â, et al. Chitosan-gelatin film, a sustainable methodology for wine preservation[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(19): 5331–5341.
- [12] CHINNICI F, NATALI N, RIPONI C. Efficacy of chitosan in inhibiting the oxidation of (+)-catechin in white wine model solutions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(40): 9868–9875.
- [13] MARIN A C, CULCASI M, CASSIEN M, et al. Chitosan as an antioxidant alternative to sulphites in oenology: EPR investigation of inhibitory mechanisms[J]. *Food Chemistry*, 2019, 285(1): 67–76.
- [14] ZHAO D, WANG J, TAN L, et al. Synthesis of N-furoyl chitosan and chito-oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity *in vitro*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 59(1): 391–395.
- [15] 朱广楠. 新型壳聚糖尿素衍生物的制备及其抗氧化活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019: 26–32. [ZHU G N. Preparation and antioxidant activity of new chitosan urea derivatives[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019: 26–32.]
- [16] LIU J, PU H, LIU S, et al. Synthesis, characterization, bio-activity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 174: 999–1017.
- [17] XIE M, HU B, WANG Y, et al. Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(37): 9128–9136.
- [18] EOM T K, SENEVIRATHNE M, KIM S K. Synthesis of phenolic acid conjugated chito-oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, 34(2): 519–527.
- [19] YANG Y M, SHU R G, SHAO J, et al. Radical scavenging activity of chito-oligosaccharide with different molecular weights[J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 222(1-2): 36–40.
- [20] 郝振铭, 孙珍. 壳寡糖对葡萄酒的抗氧化和抑菌作用[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(12): 216–224, 260. [HAO Z M, SUN Z. Antioxidant and bacteriostatic effects of chito-oligosaccharides on wine[J]. *Modern Food Technology*, 2019, 35(12): 216–224, 260.]
- [21] LI K, LIU S, XING R, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of two partially n-acetylated chitotrioses[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2): 1730–1736.
- [22] RAAFAT D, SAHL H G. Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey[J]. *Microbial Biotechnology*, 2009, 2(2): 186–201.
- [23] GRAISUWAN W, WIARACHAI O, ANANTHANAWAT C, et al. Multilayer film assembled from charged derivatives of chitosan: Physical characteristics and biological responses[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 376(1): 177–188.
- [24] SIMEL, BAĞDER, ELMAC, et al. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 107(3): 675–686.
- [25] YOUNES I, SELLIMI S, RINAUDO M, et al. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185: 57–63.
- [26] FERRER GALLEGU R, PUXEU M, MARTÍN L, et al. Microbiological, physical, and chemical procedures to elaborate high-quality SO₂-free wines[M]. *Grapes and Wines—Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*, 2018: 172–193.
- [27] PETROVA B, CARTWRIGHT Z M, EDWARDS C G. Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines[J]. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*, 2016, 50(1): 49–56.
- [28] PORTUGAL C, SÁENZ Y, ROJO BEZARES B, et al. *Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agents used in winemaking: *In vitro* and practical approaches[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(4): 641–652.
- [29] RHOADES J, ROLLER S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 80–86.

- [30] VALERA M J, SAINZ F, MAS A, et al. Effect of chitosan and SO₂ on viability of acetobacter strains in wine[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 246: 1-4.
- [31] 于沛沛, 夏文水. 苯甲酸壳聚糖酯的合成及抑菌性能研究[J]. *食品与机械*, 2011, 27(5): 115-119. [YU P P, XIA W S. Synthesis and antimicrobial activity of benzoate chitosan esters[J]. *Food and Machinery*, 2011, 27(5): 115-119.]
- [32] PAPINEAU A M, HOOVER D G, KNORR D, et al. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure[J]. *Food Biotechnology*, 1991, 5(1): 45-57.
- [33] GUO A, WANG F, LIN W, et al. Evaluation of antibacterial activity of n-phosphonium chitosan as a novel polymeric antibacterial agent[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 67: 163-171.
- [34] TAMER T M, HASSAN M A, OMER A M, et al. Antibacterial and antioxidative activity of o-amine functionalized chitosan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 169: 441-450.
- [35] MELLEGARD H, STRAND S P, CHRISTENSEN B E, et al. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 148(1): 48-54.
- [36] TAILLANDIER P, JOANNIS CASSAN C, JENTZER J B, et al. Effect of a fungal chitosan preparation on *brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(1): 123-131.
- [37] VITALINI S, RUGGIERO A, RAPPARINI F, et al. The application of chitosan and benzothiadiazole in vineyard(*Vitis vinifera* L. cv groppello gentile) changes the aromatic profile and sensory attributes of wine[J]. *Food Chemistry*, 2014, 162: 192-205.
- [38] BORNET A, TEISSEDE P L. Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 226(4): 681-689.
- [39] 杨继伟. 甘蔗果酒发酵过程褐变机理及其控制研究[D]. 南宁: 广西大学, 2017: 37-41. [YANG J W. Study on browning mechanism and its control during sugarcane fruit wine fermentation[D]. Nanning: Guangxi university, 2017: 37-41.]
- [40] 胡永正. 桑葚酒发酵工艺优化及动力学研究[D]. 成都: 西华大学, 2018: 42-45. [HU Y Z. Study on fermentation process optimization and kinetics of mulberry wine[D]. Chengdu: Xihua University, 2018: 42-45.]
- [41] 王芳, 邓启, 段伟丽, 等. 响应面法优化复合澄清剂对蓝莓果酒的澄清效果[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(8): 149-158. [WANG F, DENG Q, DUAN W L, et al. Response surface methodology was used to optimize the clarifying effect of compound clarifiers on blueberry wine[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2016, 16(8): 149-158.]
- [42] 赵玲燕, 谭晓辉, 龙运忠, 等. 复合澄清剂处理柚子发酵酒的澄清效果研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(3): 115-119. [ZHAO L Y, TAN X H, LY Z, et al. Study on clarifying effect of compound clarifier on grapefruit fermented wine[J]. *China Brewing*, 2020, 39(3): 115-119.]
- [43] 胡亚康, 何永艳, 王发明. 探讨不同工艺条件对猕猴桃果酒感官评价的影响[J]. *酿酒科技*, 2019(1): 65-70. [HU Y K, HE Y Y, WANG F M. To investigate the effects of different technological conditions on the sensory evaluation of kiwi fruit wine[J]. *China Brewing*, 2019(1): 65-70.]
- [44] 韩希凤, 金晓辉, 郭志鹏, 等. 澄清方法对发酵型大枣果酒澄清效果的比较分析[J]. *食品工业*, 2018, 39(4): 141-144. [HAN X F, JIN X H, GUO Z P, et al. Comparative analysis of clarifying effect of fermentation jujube wine by clarifying method[J]. *Food Industry*, 2018, 39(4): 141-144.]
- [45] 李亚辉, 马艳弘, 张宏志, 等. 草莓发酵酒澄清稳定处理技术[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(8): 864-870. [LI Y H, MA Y H, ZHANG Z Z, et al. Clarification and stabilization of strawberry fermented wine[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2016, 35(8): 864-870.]
- [46] 刘亚萍, 楚杰, 何秋霞, 等. 发酵石榴酒澄清剂的筛选及澄清条件优化[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(3): 175-179, 185. [LIU Y P, CHU J, QIU X H, et al. Study on the selection and optimization of clarificants of pomegranate wine[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(3): 175-179, 185.]
- [47] 唐玲. 无花果果酒发酵工艺及其品质研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018: 36-38. [TANG L. Study on fermentation technology and quality of FIG fruit wine[D]. Chongqing: Southwest University, 2018: 36-38.]
- [48] VENKATACHALAPATHY R, PACKIRISAMY A S B, INDIRA RAMACHANDRAN A C, et al. Assessing the effect of chitosan on pesticide removal in grape juice during clarification by gas chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94: 305-312.
- [49] 黄自芬, 周剑忠, 李亚辉, 等. 壳聚糖季铵盐和皂土在黑莓果酒澄清中的应用[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(17): 210-213. [HUANG Z S, ZHOU J Z, LI Y H, et al. Application of chitosan quaternary ammonium salt and bentonite in the clarification of blackberry wine[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(17): 210-213.]
- [50] KANATT S R, CHANDER R, SHARMA A. Chitosan glucose complex—a novel food preservative[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 521-528.