

# 壳寡糖对葡萄酒的抗氧化和抑菌作用

郝振铭, 孙珍

(大连工业大学生物工程学院, 辽宁大连 116034)

**摘要:** 本文旨在研究壳寡糖对葡萄酒抗氧化和抑菌作用的影响。采用 DPPH、羟自由基清除率和抑菌率的方法评估了壳寡糖作为葡萄酒的抗氧化剂和抑菌剂的性能影响。结果表明, 壳寡糖具有良好的抗氧化性和抑菌性。在抗氧化性测评方面, 添加壳寡糖的葡萄酒样的原花青素、还原力、DPPH 和羟自由基清除率分别增强了 107.97%、14.23%、3.96% 与 4.48%。在抑菌性测评方面, 菌种活性与壳寡糖浓度呈负相关, 当壳寡糖浓度超过 500 mg/L 时, 所有腐败菌均可以被抑制。本文还检测了壳寡糖对葡萄酒风味的影响, 采用高效液相色谱和气相色谱检测的方法, 检测了葡萄酒中有机酸、风味物质和生物胺的变化。结果显示与新鲜葡萄酒相比老化处理后的葡萄酒中酒石酸、酮戊二酸、苹果酸、琥珀酸含量升高了 0.01~1.52 mg/mL, 乙酸乙酯、正丙醇、异丁醇、乙酸异戊酯、异戊醇的含量降低了 0.13~1.44 mg/mL, 组胺含量升高了 7.35 mg/L, 而添加壳寡糖的老化葡萄酒中有机酸、风味物质和生物胺含量与新鲜葡萄酒相比没有显著性变化。对于壳寡糖在葡萄酒中抗氧化性和抑菌性的研究, 可以对壳寡糖是否能取代 SO<sub>2</sub> 从而成为一种新型葡萄酒防腐剂具有重要作用。

**关键词:** 葡萄酒; 壳寡糖; 二氧化硫; 抑菌; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2019)12-216-224

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.028

## Antioxidant and Antibacterial Effects of Wine Added with Chitooligosaccharide

HAO Zhen-ming, SUN Zhen

(Dalian Polytechnic University, School of Biological Engineering, Dalian 116034, China)

**Abstract:** The effects of chitooligosaccharides on the antioxidant and bacteriostatic effects of wine were investigated. The effects of chitooligosaccharide as antioxidant and bacteriostatic agent in wine were evaluated by DPPH, hydroxyl radical scavenging rate and bacteriostatic rate. The results showed that chitooligosaccharide had good antioxidant and bacteriostatic properties. For antioxidant evaluation, the proanthocyanidins reducing power, DPPH and hydroxyl radical scavenging rate of the wine samples added with chitooligosaccharide increased by 107.97%, 14.23%, 3.96% and 4.48%, respectively. For bacteriostasis, the colony count of the strain was negatively correlated with the concentration of chitooligosaccharide. When the concentration of chitooligosaccharide exceeded 500 mg/L, all types of spoilage bacteria could be inhibited. The effects of chitosan oligosaccharide on wine flavor were also examined. The changes of organic acids, flavor substances and biogenic amines in wine were tested by high performance liquid chromatography and gas chromatography. The results showed that the contents of tartaric acid, ketoglutaric acid, malic acid and succinic acid in the aged wine were increased by 0.01~1.52 mg/mL compared with fresh wine, the content of ethyl acetate, propanol, isobutanol, isoamyl acetate, isoamyl alcohol decreased by 0.13~1.44 mg/mL, histamine content increased by 7.35 mg/L, the content of organic acids, flavor substances and biogenic amines in aged wines with chitosan oligosaccharides was not significantly different from that of fresh wines. Our studies on the antioxidant and bacteriostatic properties of chitooligosaccharide in wine suggest that chitooligosaccharide could be a new preservative used in wine that may be a replacement to SO<sub>2</sub>.

**Key words:** wine; chitooligosaccharide; sulfur dioxide; bacteriostatic; antioxidant

随着我国生活水平的不断提高和传统饮酒习惯的改变, 葡萄酒作为一种营养丰富的饮品逐渐被我国人

收稿日期: 2019-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601458); 辽宁省博士科研启动基金(201601272); 大连市青年科技之星项目(2017RQ054)

作者简介: 郝振铭(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 葡萄酒分析

通讯作者: 孙珍(1986-), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 葡萄酒分析

民所接受。氧化和微生物危害是影响葡萄酒质量和风味的主要因素。氧化会导致葡萄酒出现过氧化味, 颜色浑浊等问题, 从而降低葡萄酒的营养品质<sup>[1]</sup>。引起葡萄酒变质的主要微生物有酵母、醋酸菌和乳酸菌<sup>[2]</sup>, 会使酒味变淡产生令人难以忍受的酸涩味和刺激感<sup>[3]</sup>。二氧化硫(SO<sub>2</sub>)作为一种抗氧化剂和抑菌剂, 在葡萄酒中作为防腐剂已经被使用了好几个世纪。它通

常在葡萄酒发酵前加入,并在装瓶前再次添加来作为葡萄酒防腐剂<sup>[4]</sup>,来防止有害微生物的富集。尽管如此,但是人们越来越关注它作为食品添加剂的安全性<sup>[5]</sup>。葡萄酒中的二氧化硫主要以亚硫酸盐的形式添加,这可能导致人们产生过敏反应,可能会使人出现一系列症状,包括头痛、恶心、胃刺激和呼吸困难<sup>[6]</sup>。此外,过量 SO<sub>2</sub> 的使用会对葡萄酒的质量产生负面影响,可能会导致葡萄酒的感官发生变化,产生奇怪的味道,甚至导致葡萄酒特有味道缺陷<sup>[7]</sup>。并且长时间过量食用亚硫酸盐会对人体呼吸系统、循环系统、神经系统等造成一定损害<sup>[8,9]</sup>。因此减少甚至取消二氧化硫的使用,寻找一种新的健康绿色的替代品,对葡萄酒防腐具有重要的作用。

壳聚糖是甲壳素去乙酰化后产生的生物聚合物,甲壳素是虾、龙虾、螃蟹等甲壳类动物和许多无脊椎动物外骨骼的主要成分<sup>[10]</sup>。壳聚糖在食品中的应用有很多<sup>[11]</sup>,并被研究证明具有很好的抗氧化性和抑菌性<sup>[12]</sup>。但是由于壳聚糖粘度很高且只溶解在酸性溶剂中<sup>[13]</sup>所以实用性不高。而壳寡糖(COS)由壳聚糖降解产生<sup>[14]</sup>,具有水溶性和低分子量的特性。并且壳寡糖还具有多种生物活性,包括抗细菌,抗真菌,抗病毒,抗肿瘤和抗氧化等<sup>[15]</sup>。由于壳寡糖的抗氧化性和抑菌性,壳寡糖被作为食品防腐剂的应用于啤酒果蔬保鲜<sup>[16]</sup>等。壳寡糖在各种食品中的应用,不仅可以保持食品的质量,延长货架期,而且可以作为功能性食品和食品配料<sup>[17]</sup>。

本研究中将壳寡糖代替二氧化硫作为葡萄酒防腐剂,并通过与不添加壳寡糖葡萄酒作为对比,研究壳寡糖在葡萄酒中的抗氧化性和微生物抗性。到目前为止,这是首次报道壳寡糖作为二氧化硫的替代品在葡萄酒防腐剂的应用。结果表明,壳寡糖有可能替代二氧化硫用于葡萄酒防腐。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与仪器

#### 1.1.1 菌种

*Enterococcus*、*Bacillus cereus*、*Paenibacillus*、*Alkaliphilus*、*Pantoea sp.*、*Lactococcus*、*Aspergillus flavus*、*Aureobasidium pullulans*、*Penicillium* 存放在大连工业大学微生物资源与生物催化实验室。

#### 1.1.2 材料与试剂

壳寡糖购自大连中科格莱克生物科技有限公司(食品级);当西蒙阿依伦白葡萄酒购自沃尔玛;巨峰葡萄购自当地市场;牛肉膏、蛋白胨、酵母浸粉、琼

脂购自北京奥博星生物技术有限公司(BR);葡萄糖、蔗糖、氯化钠、硝酸钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氢氧化钠、硫酸镁、硫酸亚铁、氯化钾、浓硫酸、95%乙醇、亚硫酸钠、柠檬酸、氯化钠购自天津科密欧化学试剂有限公司(AR);苯酚、甲醛购自天津天河化学试剂厂(AR);链霉素购自大连罗美大药厂(100万单位/瓶);酒石酸钾钠购自烟台三和化学试剂有限公司(AR);3,5-二硝基水杨酸购自国药集团化学试剂有限公司(AR);酒石酸、草酰乙酸、L-苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸、乙醛、甲酸乙酯、乙酸乙酯、正丙醇、异丁醇、2,3-丁二醇、正丁醇、异戊醇和 2-苯乙醇(色谱纯)、生物胺、酪胺、腐胺、组胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、精胺购自天津科密欧公司。

#### 1.1.3 主要仪器

Agilent-1260 液相色谱仪,美国安捷伦公司;6850N 顶空气相色谱仪,美国安捷伦公司;Millipore 超纯水处理系统,美国 Millipore 公司;可见分光光度计 722s,上海精密科学仪器有限公司;TGL-16 高速台式冷冻离心机,日本日立公司;高速冷冻离心机 5840R,德国 Eppendorf 公司;MD200-1 氮吹仪。

#### 1.1.4 培养基

细菌培养基(/L):5g 蛋白胨、30g 牛肉膏、5g 氯化钠(固体培养基添加 2%琼脂);

真菌培养基(/L):30g 蔗糖、3g 硝酸钠、1g 磷酸氢二钾、0.5g 硫酸镁、0.5g 氯化钾、0.01g 硫酸亚铁(固体培养基添加 2%琼脂)。

## 1.2 葡萄酒中二氧化硫的测定

按国标 GB 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析法》中的滴定法测定样品中游离二氧化硫和总二氧化硫含量。

## 1.3 强制老化葡萄酒样品的制备

在葡萄酒添加壳寡糖后进行强制老化,称取 0.505g 壳寡糖,在紫外灭菌灯下灭菌 30 min,用 10 mL 无菌水溶解后即得到 5.05%的不同分子量壳寡糖溶液,过 0.22  $\mu$ m 的水系膜待用。

在无菌条件下,向干净灭菌的离心管中分别加入 50 mL 的刚开瓶新鲜葡萄酒,然后分别加入 0.5 mL 5.05%的壳寡糖溶液。使葡萄酒中壳寡糖的终浓度为 5.05%,即得到含有 5.05%壳寡糖的葡萄酒样品,以 0.5 mL 的无菌水代替壳寡糖来制备老化和新鲜对照组的葡萄酒样品。将添加壳寡糖的葡萄酒样品和老化对照组的葡萄酒样品放入 37  $^{\circ}$ C 恒温箱中静置培养 10

天,将新鲜对照组的葡萄酒样品放入4℃恒温培养箱中静置培养10d,10d之后将样品取出,待测。

#### 1.4 葡萄酒中 DPPH 自由基清除率的测定方法

参照 Kmi<sup>[18]</sup>等人的方法,并稍作修改。将不同浓度的待测样品加入含有 DPPH (10<sup>-4</sup> mol/L) 的甲醇溶液中,得到 3 mL 的反应体系。振荡混匀,在 25℃ 下避光放置 30 min,于波长 517 nm 下测定其吸光度。

$$\text{清除率}/\%=[1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{对照}})/A_{\text{空白}}]\times 100\%$$

注: A<sub>样品</sub>为加入 0.1 mL 样品溶液与 2.9 mL DPPH-甲醇溶液; A<sub>对照</sub>为加入 0.1 mL 样品溶液与 2.9 mL 甲醇溶液; A<sub>空白</sub>为加入 0.1 mL 去离子水与 2.9 mL DPPH-甲醇溶液。

#### 1.5 葡萄酒中羟自由基清除率的测定方法

参照 Liu<sup>[19]</sup>等人的方法,并稍作修改。将不同浓度的待测样品与 FeSO<sub>4</sub> (6 mmol/L) 溶液和水杨酸 (6 mmol/L) 溶液混合,在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液) 溶液,得到 6 mL 的反应体系。振荡混匀,在 37℃ 下水浴 1 h,于波长 510 nm 下测定其吸光度。

$$\text{清除率}(\%)=[1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{对照}})/A_{\text{空白}}]\times 100\%$$

注: A<sub>样品</sub>为加入 0.5 mL FeSO<sub>4</sub> 溶液、0.5 mL 水杨酸溶液、0.2 mL 样品、4.3 mL 去离子水和 0.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液; A<sub>对照</sub>为加入 0.5 mL FeSO<sub>4</sub> 溶液、0.5 mL 水杨酸溶液、0.2 mL 样品和 4.8 mL 去离子水; A<sub>空白</sub>为加入 0.5 mL FeSO<sub>4</sub> 溶液、0.5 mL 水杨酸溶液、4.5 mL 去离子水和 0.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液。

#### 1.6 葡萄酒中还原力的测定方法

取 1 mL 经稀释 4 倍的试样溶液与 2.5 mol/L pH 6.6 的磷酸缓冲液 2.5 mL 10%三氯乙酸溶液和 2.5 mL 1%铁氯化钾溶液混合,50℃ 反应 20 min,然后 3000 rpm 离心 10 min。取 2.5 mL 上清液与 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1%氯化铁溶液混合,700 nm 波长下测吸光值,以抗坏血酸作为标准品制作标曲,根据标准曲线表示 mmol 抗坏血酸值/L(mmolAAE/L)。

#### 1.7 原花青素的测量

加入 1 mL 样品、6 mL 盐酸正丁醇溶液、0.2 mL 硫酸铁铵溶液、1 mL 试样溶液于 10 mL 棕色容量瓶中,混匀,用聚四氟乙烯带把瓶口缠严,置沸水浴中,精确加热 40 min 后,立即置冰水浴中冷却 15 min,然后于 546 nm 波长处测吸光度,以原花青素作为标准品制作标曲,由标准曲线计算试样中原花青素含量。

#### 1.8 抑菌性的测定方法

##### 1.8.1 菌种的筛选

将新鲜葡萄至于空气中放置 48 h,取刚开始腐坏的葡萄进行搅拌破碎,将取得的葡萄渣和葡萄汁放入发酵瓶中,将发酵瓶放入 30℃ 恒温箱进行发酵(发酵共进行 7 d)。

取发酵稀释适当的倍数,将稀释液分别涂布在细菌培养基(加 0.0125%制霉菌素)、真菌培养基(加 400000 U/L 链霉素)每组做三个平行,放入 30℃ 恒温箱培养 24 h。取平板中单菌落,划线培养纯化三代,菌种保藏,送吉林省库美生物科技有限公司进行测序。

##### 1.8.2 菌落计数分析

在细菌(真菌)液体培养基(pH 3.5)中分别加入 0.01%、0.05%、0.1%的壳寡糖(紫外灭菌 30 min,过 0.22 水系膜)作为实验组,将等量的无菌水加入细菌液体培养基作为空白组。向实验组和对照组的培养基分别接入 0.2%的筛选出来细菌(真菌),然后将实验组、空白组放入摇床(160 r/min, 30℃, 24 h)。制备适当稀释倍数梯度的细菌悬浮液,将每种悬浮液以 100 μL 用无菌涂布器均匀涂布在经过过夜干燥的细菌(真菌)培养基的平板上。在 30℃ 恒温箱中,经过 24 h 的培养后,计数所有菌落,通过抑菌率=(空白-对照)/空白的公式计算抑菌率。

#### 1.9 葡萄酒中有机酸的测定方法

准确称取 7 种有机酸(酒石酸,草酰乙酸, L 苹果酸, α-酮戊二酸,乳酸,柠檬酸和琥珀酸),分别用超纯水定容至 10 mL,终浓度为 1 g/L。称取 7 种有机酸各 10 mg,定容至 10 mL,再逐级稀释 6 个梯度,用 0.22 μm 水系过滤器过滤,放置于 4℃ 冰箱保存,以便进行高效液相色谱分析。

色谱柱为依利特 C18 (250 mm×4.6 mm×4 μm),紫外检测波长为 215 nm,进样量 10 μL,柱温为 30℃,流速 0.8 mL/min,流动相 A 为 0.01 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲溶液(pH 2.5),流动相 B 为乙腈,洗脱程序 0~3 min 100% B 相; 10~20 min 96% B 相; 30~35 min 100% B 相。实验重复三次。

#### 1.10 葡萄酒中风味物质的测定方法

准确称取 10 种风味物质标准品(乙醛,甲酸乙酯,乙酸乙酯,正丙醇,异丁醇,乙酸异戊酯,正丁醇,异戊醇,2,3-丁二醇和 2-苯乙醇)10 mg,分别用 30% 的乙醇溶液定容至 10 mL,浓度为 1 g/L。逐级稀释到

6个梯度,放置于4℃冰箱保存,以便进行气相色谱分析。

色谱柱为AgilentDB-FFAP(30 m×0.250 mm×0.25 μm),进样口温度为250℃,检测器温度为250℃,分流比为2:1,升温程序:初始温度50℃保持2 min,以5℃/min升至190℃,在190℃保持1 min,以10℃/min升至230℃,在230℃保持10 min。采取静态顶空进样的方式,实验重复三次。

### 1.11 葡萄酒中生物胺的测定方法

样品和对照中的生物胺测定方法参照杨超等<sup>[20]</sup>方法,进行提取及衍生,得到样品后置于4℃冰箱保存,以便进行液相分析。

色谱柱为Agilent C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm×5 μm),紫外检测波长为254 nm,进样量50 μL,柱温为35℃,流速1.0 mL/min,流动相A为超纯水,B为甲醇,洗脱程序0~10 min 35% A相;15 min 25% A相;20 min 20% A相;27 min 15% A相;30 min 10% A相;35 min 5% A相;40~45 min 35% A相。用相同条件下标准品(酪胺、腐胺、组胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、精胺)进行定性鉴定,用内标法进行定量测定。

### 1.12 分析方法

所有测定均做三组平行,得出平均值与标准差。使用SPSS 17.0进行单向方差分析(ANOVA)以分析统计学显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 葡萄酒中二氧化硫的检测

表1 葡萄酒中SO<sub>2</sub>的测定

Table 1 Determination of SO<sub>2</sub> in wine

添加 SO <sub>2</sub> /(mg/L)	游离 SO <sub>2</sub> /(mg/L)	总 SO <sub>2</sub> /(mg/L)
40	5.12±0.32	23.04±0.72
60	12.8±0.74	31.12±0.12
80	24.32±1.72	55.62±1.23
100	30.97±0.98	79.67±2.11
葡萄酒	8.23±0.67	26.95±1.29

SO<sub>2</sub>作为葡萄酒中常用的抑菌剂,在葡萄酒中以游离SO<sub>2</sub>、亚硫酸氢根离子和亚硫酸根离子存在<sup>[21]</sup>。本文在常温(25℃)的葡萄汁(pH 3.5)中以偏重亚硫酸钾的形式添加SO<sub>2</sub>来模拟葡萄酒中SO<sub>2</sub>含量。如表1所示,游离的SO<sub>2</sub>含量很低,测试所用的葡萄酒中,游离的SO<sub>2</sub>含量为8.23 mg/L,总SO<sub>2</sub>含量为26.95 mg/L,相当于添加了50 mg/L左右的SO<sub>2</sub>。但游离SO<sub>2</sub>

具有抑菌性,而结合的SO<sub>2</sub>抑菌性很低<sup>[21,22]</sup>。因此实际抑菌的SO<sub>2</sub>很低,而为了达到抑菌要求,则需要添加更多的SO<sub>2</sub>。但添加过量的SO<sub>2</sub>会导致葡萄酒中亚硫酸盐的含量过高,这可能导致人们产生过敏反应,可能会使人出现一系列症状,包括头痛、恶心、胃刺激和呼吸困难。所以减少SO<sub>2</sub>的使用,寻找新的替代品,在葡萄酒工业中尤为重要。

### 2.2 壳寡糖在葡萄酒中抗氧化性的测定

葡萄酒的健康价值主要来源于其所含酚类物质与它所贡献的抗氧化能力<sup>[23]</sup>,但开瓶后的葡萄酒,随着时间的变化,酒中的酚类物质和抗氧化活性急剧降低<sup>[24]</sup>。而据报道壳寡糖具有良好的抗氧化性<sup>[25,26]</sup>,因此本文探究了壳寡糖对葡萄酒中抗氧化性的影响。在葡萄酒保存过程中,添加一定量的壳寡糖,测定了葡萄酒中的抗氧化性。DPPH自由基和羟自由基分析都是最常用的自由基<sup>[24,25]</sup>,用以测评各种酒样中抗氧化性的能力。因此,通过将添加壳寡糖与不添加壳寡糖的葡萄酒样中的自由基清除率进行对比,从而来评估抗氧化能力的改善。表2显示在老化过程中添加壳寡糖的葡萄酒中的自由基清除活性有所增强。与老化的葡萄酒样相比,添加壳寡糖的葡萄酒样的DPPH和羟自由基清除率分别增强了3.96%与4.48%。这可能是由于壳寡糖本身具有抗氧化性,并且壳寡糖可以提高抗氧化酶的酶活性,降低氧化酶的酶活性<sup>[27]</sup>所导致的。

FRAP可以反应抗氧化的活性<sup>[26]</sup>。因此,取葡萄酒样将Fe<sup>3+</sup>还原为Fe<sup>2+</sup>用于评价其还原能力。表2显示在葡萄酒老化过程中添加壳寡糖显著提高了葡萄酒的还原能力。与老化的酒样相比,添加壳寡糖的葡萄酒还原力提高了14.23%。

原花青素(Proanthocyanidins, PC)是植物中广泛存在的一大类多酚化合物的总称,具有强抗氧化、消除自由基的作用<sup>[28]</sup>。葡萄酒中含有大量的原花青素,它主要来源于葡萄籽的类黄酮类化合物,具有体内活性,是目前国际上公认清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂<sup>[29]</sup>。但在葡萄酒开瓶后,葡萄酒中的原花青素随着时间的增长而逐渐降低<sup>[23]</sup>。而壳寡糖可以有效的防止酚类化合物的降低<sup>[30]</sup>。表2中显示在葡萄酒老化过程中添加壳寡糖显著提高了葡萄酒的原花青素含量。与老化的酒样相比,添加壳寡糖的葡萄酒原花青素含量提高了107.97%,接近于新鲜的葡萄酒。

这表明了在葡萄酒中添加壳寡糖可以大大的提高葡萄酒中的抗氧化能力,这对于葡萄酒中抗氧化剂研究具有重要的影响。

表2 葡萄酒中 DPPH、羟自由基清除率、还原力和原花青素的测定

Table 2 Determination of DPPH, hydroxyl radical scavenging rate, reducing power and Proanthocyanidins in wine

项目	DPPH 清除率	羟自由基清除率	还原力 (10 <sup>-6</sup> mol 抗坏血酸值/g 样品)	原花青素/(mg/100 mL)
新鲜葡萄酒	49.96±2.33%	48.84±0.44%	2.25±0.04	295.49±23.89
老化葡萄酒	44.88±1.33%	44.87±3.01%	1.85±0.03	138.37±24.03
加壳寡糖的葡萄酒	48.82±1.68%	49.34±0.22%	2.11±0.03	287.77±11.13

表3 葡萄酒中腐败菌的抑菌率测定

Table 3 Determination of antibacterial rate of spoilage bacteria in wine

菌种	抑菌率/%		
	100 mg/L COS	500 mg/L COS	1000 mg/L COS
<i>Enterococcus</i>	21.23±0.95 <sup>b</sup>	99.98±0.01 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	73.01±1.90 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Paenibacillus</i>	63.98±0.30 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Alkaliphilus</i>	76.83±2.32 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Pantoea sp</i>	95.00±3.01 <sup>b</sup>	99.91±0.01 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Lactococcus</i>	12.43±4.23 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus flavus</i>	88.01±2.75 <sup>b</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	72.01±3.20 <sup>b</sup>	99.69±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>
<i>Penicillium</i>	44.01±5.78 <sup>b</sup>	99.54±0.00 <sup>a</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>

注: 不同字母代表具有显著性差异 (p<0.05)。

## 2.3 壳寡糖在葡萄酒中抑菌性的测定

### 2.3.1 添加壳寡糖的葡萄酒中腐败菌的抑菌率测定

到目前为止, 许多报道已经描述了壳寡糖对多种细菌和真菌的抗菌和抗真菌活性<sup>[29-33]</sup>。壳寡糖可以改变细胞膜的通透性, 保护细胞成分, 控制物质的进出。带正电的壳寡糖可以结合并吸收到微生物的细胞壁中, 导致 DNA 的渗透和 RNA 转录的阻断。从而杀死微生物细胞<sup>[32]</sup>。但壳寡糖的抑菌活性受聚合程度、微生物种类等因素的影响而发生变化<sup>[33]</sup>。因此, 为了在葡萄酒中更有效地发挥壳寡糖的抑菌活性, 本研究评估了在不同浓度下壳寡糖对葡萄酒腐败菌的抑菌活性。本文选取了六种细菌 (*Enterococcus*、*Bacillus cereus*、*Paenibacillus*、*Alkaliphilus*、*Pantoea sp*、*Lactococcus*) 和三种真菌 (*Aspergillus flavus*、*Aureobasidium pullulans*、*Penicillium*) 作为测试腐败菌。如表 3 所示, 添加不同浓度的壳寡糖对葡萄酒腐败菌抑制作用具有不同的效果, 壳寡糖对所有腐败菌的抑菌活性与壳寡糖的浓度呈负相关 (在 100~1000 mg/L 范围内), 说明壳寡糖具有较好的抑菌效果。如表 3 所示, 当在葡萄酒中添加 100 mg/L 壳寡糖时, 可以看出除对个别腐败菌显著抑制外, 大部分葡萄酒腐败菌均未受到明显抑制。仅对 *Pantoea sp* 有 95.00% 的抑制作用, 对 *Aspergillus flavus* 有 88% 的抑制作用。

当壳寡糖浓度增加到 500 mg/L 时, 对细菌或真菌的抑制率几乎可以达到 100%。当壳寡糖浓度增加到 1000 mg/L 时, 抑制率没有明显变化。从经济效益和抑菌效果来看, 以 500 mg/L 壳寡糖为最佳浓度。抑菌结果表明, 壳寡糖对筛选得到的 *Enterococcus*、*Bacillus cereus* 等腐败菌, 包括细菌和真菌都具有很好的抑制作用, 因此添加壳寡糖可以有效的延长葡萄酒的货架期。

### 2.3.2 添加壳寡糖与 SO<sub>2</sub> 的葡萄酒中腐败菌的抑菌率对比

表4 壳寡糖和 SO<sub>2</sub> 作为添加剂对葡萄酒中腐败菌混合物的抑菌效果

Table 4 Antibacterial effect of chitosan oligosaccharide and SO<sub>2</sub> as additives on wine spoilage mixture

菌种	抑菌率/%	
	500 mg/L COS	50 mg/L SO <sub>2</sub>
混合菌种	99.99±0.00	81.24±0.52

表 1 中显示成品酒中的 SO<sub>2</sub> 含量约在 50 mg/L 左右, 因此选用 50 mg/L SO<sub>2</sub> 作为测试浓度。将上述所有的腐败菌混合接入葡萄汁 (pH 3.5) 中, 利用菌落计数分析的方法。比较分析了 500 mg/L COS 和 50 mg/L SO<sub>2</sub> 作为添加剂对葡萄酒中腐败菌混合物的抑菌效果。如表 4 中所示, 添加 500 mg/L COS 的抑菌率为 99.99%, 比添加 50 mg/L SO<sub>2</sub> 的抑菌率高出了 18.75%。结果显示 500 mg/L COS 具有更好的抑菌效果。

据报道胶体银复合物 (colloidal silver complex)<sup>[34]</sup>、二甲基二碳酸盐 (dimethyl dicarbonate)<sup>[35]</sup>和葡萄酒多酚 (wine polyphenols)<sup>[36]</sup>在葡萄酒中具有很好的抑菌效果。在抑菌方面, 添加胶体银复合物, 在发酵第三天时腐败菌菌浓 (cfu) 为  $7.0\sim 4.4\times 10^3$ , 发酵结束后腐败菌菌浓 (cfu) 下降到  $5.0\sim 4.3\times 10^2$ , 抑菌率在 28.47%~99.82%; 在瓶装葡萄酒之前加入的二甲基二碳酸盐, 可以有效的抑制腐败菌生长, 抑菌率为 88.23%~100.00%; 葡萄酒多酚中黄酮醇和二苯乙烯对腐败菌显示出最大抑菌性效果, 添加黄酮醇和二苯乙烯后  $IC_{50}$  在 0.16~0.84 之间; 而添加的壳寡糖的抑菌率在 99.54%~100.00%。在抗氧化方面, 胶体银复合物和二甲基二碳酸盐没有抗氧化活性; 葡萄酒多酚具有显著抗氧化活性, DPPH 清除率在 85.02%~95.78%<sup>[37]</sup>; 而添加的壳寡糖的葡萄酒样的 DPPH 分别增强了 3.96%。与胶体银复合物、二甲基二碳酸盐和葡萄酒多酚相对比, 壳寡糖的抑菌性与二甲基二碳酸盐和葡萄酒多酚相当, 优于胶体银复合物; 壳寡糖的抗氧化性低于葡萄酒多酚, 优于胶体银复合物和二甲基二碳酸盐, 这可能是由于胶体银复合物和二甲基二碳酸盐没有还原能力所导致的。并且壳寡糖具有调节肠道微生态、改善肠道组织形态和增强免疫功能的效果<sup>[38]</sup>, 而过量使用胶体银复合物可能会引起重金属中毒等危害。

## 2.4 壳寡糖对葡萄酒风味的影响

### 2.4.1 葡萄酒中有机酸的测定

在上文中我们已经证实添加壳寡糖可以有效提高葡萄酒的抗氧化性, 同时也可以抑制细菌和真菌等腐败菌, 然而葡萄酒特殊的口感和香气决定了葡萄酒的风味, 壳寡糖作为添加剂添加到葡萄酒中是否会对葡萄酒的风味产生影响呢? 因此在这里, 我们考察了新鲜葡萄酒, 老化葡萄酒以及添加壳寡糖的老化葡萄酒中风味组分的变化, 来确定壳寡糖是否会对葡萄酒的风味产生影响。

葡萄酒中主要有有机酸有酒石酸、苹果酸、琥珀酸、乳酸、柠檬酸等, 有机酸的含量和种类是影响葡萄酒口感和风味的重要因素<sup>[39]</sup>。如表 5 所示与新鲜葡萄酒相对比经过老化处理后的葡萄酒中酒石酸、酮戊二酸、苹果酸、琥珀酸含量升高了  $0.01\sim 1.52\text{ mg/mL}$ , 而添加壳寡糖后老化处理的葡萄酒中酒石酸、草酰乙酸、酮戊二酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸含量与新鲜的葡萄酒相比没有显著性变化, 所以添加壳寡糖不会影响葡萄酒中有机酸的变化。其中酒石酸和苹果酸作为葡萄酒中主要的有机酸, 老化后的葡萄酒中酒石酸

和苹果酸含量增加  $0.36\text{ mg/mL}$  和  $1.23\text{ mg/mL}$ 。酒石酸既影响了葡萄酒 pH 的高低<sup>[40]</sup>又影响了葡萄酒的口感和稳定性, 而苹果酸酸度较大有特殊香味稍带苦涩味<sup>[41]</sup>, 也是影响葡萄酒口感的重要因素之一。当葡萄酒中酒石酸和苹果酸含量过大时, 会导致葡萄酒的口感粗硬并伴有涩感, 使酒体粗糙度、色度等降低<sup>[42,43]</sup>。新鲜葡萄酒中总酸含量为  $11.88\text{ mg/mL}$ , 老化葡萄酒中总酸含量为  $13.73\text{ mg/mL}$ , 比新鲜葡萄酒提高了 15.57%, 添加壳寡糖后老化处理的葡萄酒中总酸与新鲜相比没有显著性变化。李华<sup>[44]</sup>认为酿酒葡萄的适宜酸度应保持在  $6\sim 10\text{ mg/mL}$  之间, 否则酿成的葡萄酒易出现乏味、少筋、平淡、酸涩和粗硬的感官特征。老化后的葡萄酒中酸度超过了适宜酸度范围高出 3.73%, 而新鲜葡萄酒和添加壳寡糖的葡萄酒酸度含量仅高出 1.88%和 2.59%, 低于老化葡萄酒。

表 5 葡萄酒中有机酸的测定

Table 5 Determination of organic acids in wine

有机酸 (mg/mL)	新鲜葡萄酒	老化葡萄酒	添加壳寡糖 的葡萄酒
酒石酸	2.38±0.17 <sup>a</sup>	2.74±0.18 <sup>b</sup>	2.49±0.02 <sup>a</sup>
草酰乙酸	0.06±0.01 <sup>a</sup>	0.06±0.01 <sup>a</sup>	0.06±0.01 <sup>a</sup>
酮戊二酸	0.04±0.00 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>b</sup>	0.05±0.00 <sup>ab</sup>
苹果酸	5.20±0.26 <sup>a</sup>	6.43±0.20 <sup>b</sup>	5.68±0.21 <sup>a</sup>
乳酸	3.82±0.31 <sup>a</sup>	3.74±0.19 <sup>a</sup>	3.71±0.19 <sup>a</sup>
柠檬酸	0.34±0.03 <sup>a</sup>	0.29±0.03 <sup>a</sup>	0.33±0.04 <sup>a</sup>
琥珀酸	0.36±0.02 <sup>a</sup>	0.42±0.00 <sup>b</sup>	0.37±0.02 <sup>a</sup>
总酸	11.88±0.80 <sup>a</sup>	13.73±0.52 <sup>b</sup>	12.59±0.49 <sup>a</sup>

注: 不同字母代表具有显著性差异 ( $p<0.05$ )。

### 2.4.2 葡萄酒中风味物质的测定

表 6 葡萄酒中风味物质的测定

Table 6 Determination of flavor substances in wine

风味物质 (mg/mL)	新鲜葡萄酒	老化葡萄酒	添加壳寡糖 的葡萄酒
甲酸乙酯	0.27±0.04 <sup>a</sup>	0.26±0.10 <sup>a</sup>	0.31±0.05 <sup>a</sup>
乙酸乙酯	1.68±0.29 <sup>a</sup>	0.24±0.12 <sup>b</sup>	1.72±0.28 <sup>a</sup>
正丙醇	0.16±0.02 <sup>a</sup>	0.09±0.00 <sup>b</sup>	0.16±0.01 <sup>a</sup>
异丁醇	0.19±0.03 <sup>b</sup>	0.06±0.00 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>b</sup>
乙酸异戊酯	0.32±0.06 <sup>c</sup>	0.01±0.00 <sup>a</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>
正丁醇	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
异戊醇	1.79±0.27 <sup>b</sup>	0.76±0.08 <sup>a</sup>	1.75±0.20 <sup>b</sup>
2-苯乙醇	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.04±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>

注: 不同字母代表具有显著性差异 ( $p<0.05$ )。

鉴别葡萄酒品质重要的方法途径之一是测定葡萄酒中的香气成分<sup>[45]</sup>, 而气相色谱法是目前检验葡萄酒香气成分的主要检测方法之一<sup>[46]</sup>。表 6 中显示与新鲜

葡萄酒相比经过老化处理后的葡萄酒中乙酸乙酯、正丙醇、异丁醇、乙酸异戊酯、异戊醇的含量降低了 0.13~1.44 mg/mL, 而添加壳寡糖处理后老化的葡萄酒中除乙酸异戊酯外的风味物质与新鲜葡萄酒相比没有显著变化。这可能是由于老化处理过程中温度较高, 导致乙酸异戊酯挥发。所以添加壳寡糖不会影响葡萄酒中风味物质的变化。葡萄酒中高级醇主要包括正丙醇、正戊醇、异戊醇、正丁醇、异丁醇等, 主要由葡萄汁中的糖发酵而成, 是挥发性的香味物质, 可增加葡萄酒的风味<sup>[47]</sup>。老化后的葡萄酒中高级醇的总含量降低 1.54 mg/mL, 可能会使葡萄酒的香气降低。而添加壳寡糖的葡萄酒中高级醇的含量与新鲜的葡萄酒中的含量没有明显的变化。另外, 乙酸乙酯也是葡萄酒的重要香气成分<sup>[48]</sup>, 表 6 中显示老化后的乙酸乙酯损失严重, 乙酸乙酯降低了 1.44 mg/mL, 但添加壳寡糖的葡萄酒保存良好。

### 2.4.3 葡萄酒中生物胺的测定

表 7 葡萄酒中生物胺的测定

Table 7 Determination of biogenic amines in wine

生物胺 (mg/L)	新鲜葡萄酒	老化葡萄酒	添加壳寡糖 的葡萄酒
苯乙胺	2.49±0.05 <sup>b</sup>	1.41±0.75 <sup>a</sup>	2.14±0.02 <sup>b</sup>
腐胺	4.57±0.00 <sup>a</sup>	4.57±0.00 <sup>a</sup>	4.57±0.00 <sup>a</sup>
尸胺	0.64±0.01 <sup>a</sup>	0.65±0.01 <sup>a</sup>	0.62±0.00 <sup>a</sup>
组胺	7.58±0.02 <sup>a</sup>	14.93±2.43 <sup>b</sup>	7.69±0.00 <sup>a</sup>
酪胺	1.83±0.02 <sup>a</sup>	1.86±0.06 <sup>a</sup>	1.80±0.02 <sup>a</sup>
亚精胺	1.47±0.00 <sup>a</sup>	1.50±0.01 <sup>a</sup>	1.48±0.00 <sup>a</sup>
精胺	1.10±0.00 <sup>a</sup>	1.10±0.00 <sup>a</sup>	1.10±0.00 <sup>a</sup>

注: 不同字母代表具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

葡萄酒中富含多种生物胺<sup>[49]</sup>, 葡萄酒中生物胺主要是乳酸菌将氨基酸脱羧产生的<sup>[50]</sup>, 在葡萄酒中, 有多种氨基酸能够被乳酸菌脱羧, 生成组胺、酪胺、腐胺、尸胺及苯乙胺等, 前 3 种胺类是葡萄酒中最主要的生物胺<sup>[50]</sup>。因此本文对处理后的葡萄酒进行了生物胺的检测。如表 7 所示, 老化后的葡萄酒中腐胺、尸胺、酪胺、亚精胺、精胺含量与新鲜葡萄酒相对比没有显著变化, 添加壳寡糖处理后老化的葡萄酒中生物胺的含量与新鲜葡萄酒相比没有显著性变化, 但老化后的葡萄酒中组胺含量急剧升高, 比新鲜葡萄酒中升高了 7.35 mg/L, 含量提高了 96.97%。这可能是由于葡萄酒中乳酸菌生长所导致的<sup>[50]</sup>, 而生物胺都具有一定的毒性作用, 各种胺类毒性大小不同, 其中组胺对人体健康的影响最大<sup>[51]</sup>。并且组胺除了自身毒性较大外, 其他生物胺也会加强组胺的毒性<sup>[52]</sup>。目前, 许多国家对葡萄酒中组胺作出了限量规定。澳大利亚、

匈牙利和瑞士不得高于 10 mg/L, 法国不得高于 8 mg/L<sup>[53]</sup>。而老化后的葡萄酒中组胺含量严重超标, 相当于澳大利亚、匈牙利和瑞士标准 1.49 倍, 法国标准的 1.87 倍。但如此相对比添加壳寡糖后的葡萄酒中, 组胺含量比新鲜葡萄酒没有明显的变化, 在各个国家组胺限量标准之内。

从有机酸、风味物质和生物胺的检测中可以看出, 添加壳寡糖的葡萄酒不会对葡萄酒性能造成改变, 并且可以延长葡萄酒的口感和香气。而老化后的葡萄酒中酒石酸、苹果酸和组胺的增加以及高级醇和乙酸乙酯的减少可能有由于葡萄酒被强氧化或者腐败菌的生长所导致的。

## 3 结论

添加壳寡糖有利于维持葡萄酒的抗氧化性, 并且对 *Enterococcus*、*Bacillus cereus* 等腐败菌显示出抑菌活性。在抗氧化性测试中, 添加壳寡糖的葡萄酒与老化处理的葡萄酒相比, 添加壳寡糖的葡萄酒样中原花青素含量、还原能力、DPPH 清除率和羟自由基清除率分别增强了 107.97%、14.23%、3.96% 与 4.48%, 结果显示壳寡糖具有显著的抗氧化性。在抑菌测试中, 菌种活性与壳寡糖浓度呈负相关, 当壳寡糖浓度超过 500 mg/L 时, 所有腐败菌均可以被抑制, 因此选用 500 mg/L 作为壳寡糖在葡萄酒中的添加量。因此, 壳寡糖可以作为可食用的抗氧化抑菌材料潜在地应用于葡萄酒中。

## 参考文献

- [1] 李坚. 葡萄酒的氧化程度对酒质的影响及其判别模型的构建[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017  
LI Jian. The influence of oxidation degree on wine quality and the construction of discriminant model [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2017
- [2] 翁鸿珍, 成宇峰. 葡萄酒微生物病害[J]. 酿酒科技, 2011, 8: 132-133  
WENG Hong-zhen, CHENG Yu-feng. Study on microbial disease of grape wine [J]. Liquor-making Science & Technology, 2011, 8: 132-133
- [3] 丁正国. 葡萄酒醋酸菌病害的产生与防治[J]. 中国酿造, 1995, 4: 15-16  
DING Zheng-guo. Production and control of acetic acid bacteria in wine [J]. China Brewing, 1995, 4: 15-16
- [4] Sydney C. Morgan, Mansak Tantikachornkiat, Chrystal M. Scholl, et al. The effect of sulfur dioxide addition at crush on the fungal and bacterial communities and the sensory

- attributes of Pinot gris wines [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 290: 1-14
- [5] Guido L F. Sulfites in beer: reviewing regulation, analysis and role [J]. *Scientia Agricola*, 2016, 73(2): 189-197
- [6] Vally H, Misso N L A, Madan V. Clinical effects of sulphite additives [J]. *Clinical & Experimental Allergy Journal of the British Society for Allergy & Clinical Immunology*, 2009, 39(11): 1643-1651
- [7] RibéreauGayon, P, Dubourdiou D, Donèche, B, et al. *Handbook of Enology: Volume 1. The microbiology of Wine and Vinifications* [M]. 2006
- [8] 李雪莲,杨丽,陈鸿平,等. 食品中亚硫酸盐研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(3): 34-37  
LI Xue-lian, YANG Li, CHEN Hong-ping, et al. Progress in the research of sulfites in the food [J]. *Asia-pacific Traditional Medicine*, 2015, 11(3): 34-37
- [9] 孟紫强,秦国华,张波,等. 吸入二氧化硫对小鼠脑细胞 DNA 的损伤作用[J]. *中华预防医学杂志*, 2002, 6: 11-14  
MENG Zi-qiang, QIN Guo-hua, ZHANG Bo, et al. Damage effects of sulfur dioxide inhalation on DNA of brain cells in mice [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2002, 6: 11-14
- [10] Xia W, Liu P, Zhang J, et al. Biological activities of chitosan and chito oligosaccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2): 170-179
- [11] Shahidi F, Arachchi J K V, Jeon Y J. Food applications of chitin and chitosans [J]. *Trends in Food Sci Technol*, 1999, 10(2): 37-51
- [12] Agnihotri S A, Mallikarjuna N N, Aminabhavi T M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery [J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 100(1): 5-28
- [13] Seo S, King J M, Prinyawiwatkul W. Simultaneous depolymerization and decolorization of chitosan by ozone treatment [J]. *Journal of Food Science*, 2007, 72(9): 522-526
- [14] 原旭冰,刘洪涛,杜昱光. 壳寡糖的制备及其在医学和农业生产中的应用[J]. *生物技术进展*, 2018, 8(6): 7-14, 99  
YUAN Xu-bing, LIU Hong-tao, DU Yu-guang. Preparation of chitosan oligosaccharide and its application in medicine and agricultural production [J]. *Current Biotechnology*, 2018, 8(6): 7-14, 99
- [15] Kim S K, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62(4): 357-368
- [16] Mengfbar, Marian, Mateos-Aparicio I, Miralles B, et al. Influence of the physico-chemical characteristics of chito-oligosaccharides (COS) on antioxidant activity [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 97(2): 776-782
- [17] 王鲁霞,吴延立,马文平. 壳寡糖的制备方法及其在食品中的应用现状[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(32): 11485-11487  
WANG Lu-xia, WU Yan-li, MA Wen-ping. The preparation method and application status of chito oligosaccharide in food [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(32): 11485-11487
- [18] Kim H J, Chen F, Wu C, et al. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(10): 2849-2854
- [19] Liu Q, Cao X, Zhuang X, et al. Rice bran polysaccharides and oligosaccharides modified by *Grifola frondosa* fermentation: Antioxidant activities and effects on the production of NO [J]. *Food Chemistry*, 2017, 223(Complete): 49-53
- [20] 杨超,韩晓雪,黄雨濛,等. 利用色谱法快速检测分析啤酒腐败菌的新方法[J]. *工业微生物*, 2016, 46(2): 36-40  
YANG Chao, HAN Xiao-xue, HUANG Yu-meng, et al. A new method for rapid detection of beer spoilage bacteria by using chromatography [J]. *Industrial Microbiology*, 2016, 46(2): 36-40
- [21] Fugelsang K C, Edwards C G. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures* [M]. New York: Springer Verlag, 2007
- [22] Rose A H, Pillington B J. *Sulphite in Mechanisms of Action of Food Preservation* [M]. London: Elsevier Applied Science, 1989, 201-223
- [23] 孙翔宇,杜国荣,马婷婷,等. 陕西省售国产葡萄酒中多酚类物质的特征与抗氧化能力分析[J]. *现代食品科技*, 2014, 8: 242-250  
SUN Xiang-yu, DU Guo-rong, MA Ting-ting, et al. Polyphenol composition and antioxidant activity of domestic wines from shaanxi province [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 8: 242-250
- [24] 张宇,闫秋洁. 干红葡萄酒在室温条件下随时间变化的抗氧化性[J]. *绵阳师范学院学报*, 2016, 35(11): 49-54  
ZHANG Yu, YAN Qiu-jie. Antioxidant properties of dry red wine at room temperature over time [J]. *Journal of Mianyang Teachers' College*, 2016, 35(11): 49-54
- [25] 臧珉,陈斌. 壳寡糖抑菌及抗氧化性的研究[J]. *中国野生植物资源*, 2016, 6: 27-30  
ZANG Min, CHEN Bin. Study on the antibacterial activity

- and antioxidant activity of chitosan oligosaccharide [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2016, 6: 27-30
- [26] Kim H J, Chen F, Wu C, et al. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2849-2854
- [27] Xiaoyu G, Zhimin Y, Meihui Z, et al. Enhancing the production of phenolic compounds during barley germination by using chitoooligosaccharides to improve the antioxidant capacity of malt [J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(9-10): 1335-1341
- [28] 孟祥红.壳寡糖防止苹果果汁褐变的机理[J].食品科学, 2012,33(19):102-106  
MENG Xiang-hong. Analysis of the mechanism by which oligochitosans prevent apple juice browning [J]. Food Science, 2012, 33(19): 102-106
- [29] 白鸿.保健食品功效成分检测方法[M].中国中医药出版社,2011  
BAI Hong. Test Method for Functional Ingredients of Health Food [M]. China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011
- [30] Fujita A, Soma N, Goto Yamamoto N, et al. Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry [J]. Japan Soc Hort Sci, 2007, 76(2): 112-119
- [31] Fernandes J C, Tavoria F K, José C. Soares, et al. Antimicrobial effects of chitosans and chitoooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems [J]. Food Microbiology, 2008, 25(7): 922-928
- [32] Fernandes, João C, Tavoria F K, Fonseca S C, et al. *In vitro* screening for antimicrobial activity of chitosans and chitoooligosaccharides, aiming at potential uses in functional textiles [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 20(2): 311-318
- [33] Mei Y X, Dai X Y, Yang W, et al. Antifungal activity of chitoooligosaccharides against the dermatophyte *Trichophyton rubrum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 77: 330-335
- [34] Izquierdo-Ca As P M, Esteban Garcia-Romero, Belén Huertas-Nebreda, et al. Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking [J]. Food Control, 2012, 23(1): 73-81
- [35] Costa A, Barata A, Malfeito-Ferreira M, et al. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms [J]. Food Microbiology, 2008, 25(2): 422-427
- [36] Almudena García-Ruiz, Moreno-Arribas M V, Pedro J. 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
- [37] 李淳,李双石,岳明星,等.酶法提取葡萄酒渣多酚的含量与抗氧化性分析[J].酿酒科技,2017,12:37-42  
LI Bo, LI Shuang-shi, YUE Ming-xing, et al. Total polyphenol content and antioxidant activities of the extract from grape skin residues by enzyme method [J]. Liquor-making Science & Technology, 2017, 12: 37-42
- [38] 熊宇龙,匡欣薇,陈卫国,等.壳寡糖的免疫调节效应及其机制研究进展[J].现代生物医学进展,2009,9(9):1787-1789  
XIONG Yu-long, KUANG Xin-wei, CHEN Wei-guo, et al. Research advances on immunomodulatory effects and mechanism of chitoooligosaccharides [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(9): 1787-1789
- [39] Rahman M H, Hjeljord L G, Aam B B, et al. Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization [J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 141(1): 147-158
- [40] 庞敏,蔡松铃,刘茜.葡萄酒中有机酸及其分析方法的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2019,6:1588-1593  
PANG Min, CAI Song-ling, LIU Xi. Research progress on the analysis methods of organic acids in wine [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 6: 1588-1593
- [41] 杨春霞,苟春林,单巧玲.葡萄酒酿造过程中有机酸变化规律研究[J].中国酿造,2017,36(4):83-86  
YANG Chun-xia, GOU Chun-lin, SHAN Qiao-ling. Organic acids variation in wine brewing process [J]. China brewing, 2017, 36(4): 83-86
- [42] 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,2011,11:65-69  
LIU Xiao-yan, BAI Wei-dong, JIANG Ai-min, et al. Changes of organic acids content during the production of litchi wine [J]. China Brewing, 2011, 11: 65-69
- [43] 高年发.葡萄酒生产技术[M].北京:化学工业出版社,2012: 71-72  
GAO Nian-fa. Wine Production Technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012: 71-72
- [44] 李华.葡萄酒酿造与质量控制[M].西安:陕西人民出版社,1995  
LI Hua. Winemaking and Quality Control [M]. Xian: Shanxi People's Publishing House, 1995