

桑葚酒发酵期间花色苷及抗氧化活性变化

刘书晶, 吴彩娥*, 范龚健, 李婷婷, 应瑞峰

(南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 为研究桑葚酒发酵期间花色苷及其抗氧化活性的变化,通过测定发酵期间总酚、总花色苷和花色苷单体质量浓度,游离、聚合和辅色花色苷的比例以及抗氧化活性等指标,并采用主成分分析对其进行综合评价,探讨桑葚酒发酵过程中花色苷和抗氧化活性的变化规律。结果表明,在桑葚酒自然发酵过程中,总酚和总花色苷质量浓度呈先升高后降低的趋势,发酵结束时分别为峰值的 87.88%和 67.13%;游离花色苷和辅色花色苷比例显著下降($p<0.05$),聚合花色苷比例显著上升($p<0.05$);桑葚酒中的主要花色苷单体矢车菊-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-芸香糖苷质量浓度下降显著。相关性分析表明,桑葚酒总酚质量浓度与清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基能力呈显著正相关($p<0.01$),桑葚酒花色苷单体质量浓度与色度呈极显著正相关($p<0.01$),而与色调呈极显著负相关($p<0.01$)。对 11 项指标进行主成分分析,提取了两个主成分反映原变量 84.58%的信息,研究结果揭示了桑葚酒发酵期间花色苷和抗氧化活性的变化规律。

关键词: 桑葚酒;自然发酵;花色苷;抗氧化;主成分分析

中图分类号: TS 262.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)06—0624—08

Research on Changes of Anthocyanin and Antioxidant Activity of Mulberry Wine during Fermentation

LIU Shujing, WUCAI*, FAN Gongjian, LI Tingting, YING Ruifeng

(College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: To investigate the changes of anthocyanin and antioxidant activity of mulberry wine during spontaneous fermentation, total phenol content, total anthocyanin content, monomeric anthocyanins content, the content of monomeric anthocyanins, polymeric anthocyanins and copigmented anthocyanins, and antioxidant activity of mulberry wine were determined and analyzed by correlation analysis and principal component analysis (PCA). The results showed that total phenol and total anthocyanin content raised first then decreased, and the ending content were only 87.88% and 67.13% of the maximum, respectively; the monomeric anthocyanins and copigmented anthocyanins content decreased significantly ($p<0.05$), but the polymeric anthocyanin content

收稿日期: 2016-01-20

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD); 南京林业大学青年科技创新基金项目(163105762)。

* 通信作者: 吴彩娥(1962—), 女, 山西平陆人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事功能食品方面的研究。

E-mail: wucaie@njfu.edu.cn

引用本文: 刘书晶, 吴彩娥, 范龚健, 等. 桑葚酒发酵期间花色苷及抗氧化活性变化[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(06): 624-631.

increased significantly ($p < 0.05$); Cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside were the major monomeric anthocyanins in the mulberry wine, which decreased significantly. Correlation analysis showed that total phenol content and DPPH radical revealed a significant positive correlation ($p < 0.05$). The monomeric anthocyanin content showed a highly significant positive correlation ($p < 0.01$) with color intensity, while a highly significant negative correlation with color tone ($p < 0.01$). These eleven indexes were analyzed by principal component analysis. Two principal components were extracted to reflect the 84.58% information of the original variables. These results revealed the changes of anthocyanin and antioxidant activity in the spontaneous fermentation mulberry wine.

Keywords: mulberry wine, spontaneous fermentation, anthocyanin, antioxidant, principal component analysis

桑葚,俗称桑果、乌葚和桑泡儿等,是桑科桑属多年生木本植物桑树的果实。我国桑葚资源丰富,已被国家卫生部列为“既是食品又是药品”的食品原料之一。桑葚不耐储存,采收后极易变质、失水,目前多被加工成桑葚果汁、桑葚酒和桑葚果酱等。桑葚酒是一种新兴的果酒,营养价值高,富含花色苷、黄酮、白藜芦醇等生物活性物质而被广泛研究^[1]。目前已有关于桑葚酒发酵工艺优化^[2]和香气成分分析^[3]及发酵期间总花色苷的变化^[4]的报道,但是还未见桑葚酒发酵期间花色苷种类和含量的变化规律研究。

随着花色苷的抗氧化^[5]、抗肿瘤^[6]和预防糖尿病^[7]等生理活性被相继报道,花色苷越来越受到人们的关注。花色苷作为桑葚中的主要活性成分,对其加工产品的质量表征具有重要意义。目前桑葚酒主要采用葡萄酒酿制中常用的活性酿酒酵母进行发酵,但不同原料的成分差别较大,采用葡萄酒专用酿酒酵母不能更好地突出桑葚自身的特色^[8]。自然发酵在红葡萄酒^[9]和青梅酒^[10]酿造中取得较好的效果。目前还未见桑葚酒自然发酵的研究报道。

为探明桑葚酒发酵期间花色苷和抗氧化活性的变化规律,作者通过测定发酵期间总酚、总花色苷和花色苷单体质量浓度,游离、聚合和辅色花色苷的质量浓度以及抗氧化活性等指标,并采用主成分分析对其进行综合评价,有助于促进桑葚酒优质化发展。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑葚:产自山东省潍坊市;1,1-二苯基-2-三硝

基苯肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS)、矢车菊-3-葡萄糖苷标准品(纯度 $\geq 95\%$),矢车菊-3-芸香糖苷标准品(纯度 $\geq 98.0\%$):美国Sigma公司;三氟乙酸、乙腈(色谱纯):美国Tedia公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UVmini-1240型紫外分光光度计:日本岛津公司;LHS-150HC-11型恒温恒湿培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;TG16-WS型台式高速离心机:长沙湘仪离心仪器有限公司;Waters2695液相色谱:美国Waters公司。

1.3 桑葚酒自然发酵

参照葡萄酒酿造工艺^[11]制定了桑葚酒自然发酵的基本工艺。选择成熟度高、无腐烂的新鲜桑葚,破碎、打浆,放入2.5 L发酵瓶中,每瓶装2.0 kg桑葚(约2 L),调整 SO_2 质量浓度至70 mg/L,加蔗糖调整成分至可溶性固形物含量为20°Brix,在18℃恒温箱中培养。主发酵期间每天对其进行“打帽”处理,并取样测定相关指标;主发酵结束后,过滤酒液,进入后发酵,每隔3天测定相关指标。

1.4 测定指标

1.4.1 总酚 参照Fan等^[12]的方法略有改动,总酚质量浓度以没食子酸为标准品,依据福林-肖卡法测定总酚。精确吸取离心后的桑葚酒200 μL ,置于离心管中,加入已经稀释10倍的1.5 mL福林试剂,摇匀,加入1.5 mL质量浓度为75 g/L的 Na_2CO_3 溶液,充分混匀,暗处静置2 h,在紫外-可见分光光度计下,用10 mm比色皿,在725 nm波长下测定吸光

值。结果以每毫升桑葚酒中含有相当于没食子酸的毫克数表示。

1.4.2 抗氧化活性 采用 DPPH 和 ABTS 两种体系测定桑葚酒自然发酵期间抗氧化活性的变化,参照杨道强等^[13]的方法稍加改动。取 200 μL 稀释后的样品置于 10 mL 比色管中,加 3 mL DPPH 溶液,混匀静置 30 min,利用紫外-可见分光光度计,在 517 nm 测定吸光值。取 200 μL 稀释后的样品,加 3 mL ABTS 溶液,在暗室反应 30 min,利用紫外-可见分光光度计,在 734 nm 下测定吸光值。

以水溶性维生素 E(Trolox)为参照物,结果以每毫升桑葚酒清除自由基能力相当于 Trolox 清除同等自由基的毫克数。

1.4.3 总花色苷 取离心后的桑葚酒 200 μL ,加 5 mL 酸化乙醇,避光静置 30 min,测定其 530 nm 处吸光度值,结果以矢车菊素-3-葡萄糖苷计^[14]。

$$\text{花色苷质量浓度 (mg/L)} = \frac{A \times M_w \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

式中, M_w 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量 (449.2); ϵ 为摩尔消光系数 ($\epsilon=26\ 900$);DF 为稀释倍数。

1.4.4 游离、辅色和聚合花色苷 参考 Bimplias 等^[15]的方法略有改动,通过模拟酒(12%乙醇,5 g/L 酒石酸,0.2 mol/L 的 NaCl,调整 pH 值至 3.6)溶液将酒样稀释 20 倍,在 520 nm 处测定吸光值 A_{wine} 。将 20%乙醛 40 μL 加到 4 mL 的酒样中,静置 45 min,在 520 nm 处测定待测液的吸光值 A 。将 5%SO₂ 320 μL 加到 4 mL 的酒样中,在 520 nm 处测定待测液的吸光值 A_{SO_2} 。

$$\text{辅色花色苷质量分数 (\%)} = \frac{A - A_{\text{wine}}}{A} \times 100\%$$

$$\text{游离花色苷质量分数 (\%)} = \frac{A_{\text{wine}} - A_{\text{SO}_2}}{A} \times 100\%$$

$$\text{聚合花色苷质量分数 (\%)} = \frac{A_{\text{SO}_2}}{A} \times 100\%$$

1.4.5 色泽评价 参考 Bimplias 等^[15]的方法并加以改进,未稀释的桑葚酒样品用 1 mm 比色皿分别在 420、520、620 nm 处测定吸光值。

$$\text{色度} = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$\text{色调} = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

1.4.6 花色苷单体 桑葚酒过 0.45 μm 的滤膜,采用 XBridge-C18 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm,3.5 μm),28 $^{\circ}\text{C}$

进行 HPLC 分离,紫外检测器(Waters 2489)。进液量为 20 μL ,洗脱液为体积分数 0.1%三氟乙酸(A)和乙腈(B),流速为 0.8 mL/min,梯度洗脱。检测波长为 520 nm,洗脱顺序见表 1。以矢车菊-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-芸香糖苷为标准品,精确称取花色苷单体标准品并配置成不同质量浓度的花色苷单体标准溶液,在 520 nm 处检测吸光度,并绘制标准曲线,计算花色苷单体质量浓度。

表 1 桑葚酒花色苷洗脱顺序

Table 1 Elution order of mulberrywine anthocyanins

时间/min	洗脱剂 A/%	洗脱剂 B/%
0	90	10
30	75	25
35	90	10
40	90	10

1.5 数据分析

文中数据重复 3 次,结果以 Mean $\pm$ SD 表示;用 SPSS20.0 进行显著性和主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 桑葚酒发酵期间总酚质量浓度的变化

如表 2 所示,桑葚酒发酵期间总酚质量浓度变化差异显著($P<0.05$),这与赵红宇等^[5]在桑葚全渣发酵过程中的结果一致,可能的原因是主发酵期间采用“打帽”方式,桑葚中的酚类物质不断溶出,导致桑葚酒总酚质量浓度升高。发酵第 10 天后,总酚质量浓度逐渐降低,至发酵终点变化趋于平缓,总酚质量浓度变化差异不显著($P>0.05$)。这可能是单宁类等物质聚合、酚类物质氧化作用、微生物产生的酶促使多酚类物质发生降解,多酚类物质的水溶性下降^[16],使桑葚酒中总酚的质量浓度呈下降趋势。此外,花色苷作为桑葚酒中主要的酚类物质,其质量浓度变化对桑葚酒总酚质量浓度也有较大的影响。

2.2 桑葚酒发酵期间抗氧化活性的变化

桑葚酒发酵期间清除 DPPH 自由基能力呈先升高后降低的趋势。桑葚酒在发酵第 3 天和第 4 天时清除 DPPH 自由基能力最大,比发酵起点和终点分别高 0.79 mg/mL 和 0.54 mg/mL。桑葚酒发酵过程中,随着乙醇体积分数的增加,酒液中酚类物质溶出加快,其清除 DPPH 自由基能力提高。发酵后期桑葚酒清除 DPPH 自由基能力下降,这可能是由于桑葚酒中酚类物质受温度和 pH 值的影响而发生聚

合和氧化反应^[17]。此外,张晓松等^[16]研究发现,植物细胞壁在微生物酶的作用下释放出蛋白质、多糖等成分,在一定程度上也会影响 DPPH 的清除能力。桑葚酒发酵期间清除 ABTS 自由基能力变化不规律。ABTS 法反映的清除 ABTS 自由基的能力可与任何羟基化的芳香族化合物反应^[18],这就与 DPPH 法测定的抗氧化能力存在明显差异^[19]。

表 2 桑葚酒自然发酵期间总酚质量浓度及抗氧化活性变化

Table 2 Changes of total phenolic content and antioxidant activity of mulberry wine during spontaneous fermentation

天数/d	总酚质量浓度/ (mg/mL)	清除 DPPH 能力/ (mg/mL)	清除 ABTS 能力/ (mg/mL)
0	1.33±0.07 ^{gh}	0.54±0.04 ^{fg}	3.93±0.08 ^a
1	1.58±0.04 ^{abc}	0.69±0.02 ^f	2.47±0.02 ⁱ
2	1.32±0.01 ^h	0.86±0.03 ^{de}	2.79±0.04 ^b
3	1.61±0.02 ^{ab}	1.33±0.14 ^a	3.13±0.06 ^{defg}
4	1.63±0.11 ^a	1.32±0.03 ^a	2.86±0.01 ^{gh}
5	1.65±0.01 ^a	1.04±0.02 ^{bc}	2.97±0.10 ^{fgh}
6	1.52±0.04 ^{bcd}	1.08±0.06 ^b	2.84±0.10 ^h
7	1.50±0.01 ^{cdef}	1.06±0.07 ^{bc}	3.23±0.37 ^{cdef}
8	1.57±0.03 ^{abc}	0.96±0.03 ^{cd}	3.05±0.10 ^{efgh}
9	1.54±0.01 ^{abcd}	0.92±0.06 ^d	3.37±0.14 ^{bcd}
10	1.63±0.02 ^{ab}	0.87±0.01 ^{de}	3.32±0.02 ^{bcd}
14	1.43±0.05 ^{efg}	0.79±0.01 ^e	3.44±0.09 ^{bc}
17	1.40±0.07 ^{fgh}	0.77±0.02 ^{ef}	3.24±0.04 ^{cdef}
20	1.45±0.02 ^{def}	0.79±0.01 ^{ef}	3.55±0.03 ^b

注:总酚质量浓度以 mg 没食子酸/mL 计;清除 ABTS 和 DPPH 能力以 mg Trolox/mL 计。同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 桑葚酒发酵期间总花色苷含量的变化

桑葚酒发酵期间总花色苷含量呈先升高后降低的趋势,见表 3。发酵第 2 天达到最高值 (530.29 mg/L),这是可能由于发酵过程中乙醇浸提作用造成的。发酵结束时,桑葚酒总花色苷质量浓度仅为最高点的 32.87%。有研究表明,酵母在酒精发酵期间能产生 β -葡萄糖苷酶能水解花色苷的糖苷键,这

是导致总花色苷质量浓度下降的主要原因^[14]。此外,酒精发酵过程中产生的丙酮酸和乙醛等小分子物质能与花色苷发生聚合生成吡喃花色苷^[6],这也有可能导致桑葚酒总花色苷质量浓度下降。

2.4 游离、辅色和聚合花色苷质量浓度的变化

桑葚酒发酵期间游离花色苷、辅色花色苷和聚合花色苷的比例变化显著。游离花色苷比例由 87.53% 下降到 70.64%,辅色花色苷比例由 9.70% 下降到 1.73%,聚合花色苷比例由 3.63% 增加到 27.66%。韩富亮等^[20]在对红葡萄酒的研究中发现,葡萄中的聚合花色苷虽然很少,但在发酵期间可促进聚合花色苷的形成,利于葡萄酒颜色的形成。桑葚酒发酵期间游离、辅色和聚合花色苷质量浓度的变化也体现了这一变化规律。

2.5 桑葚酒发酵期间色泽的变化

如表 3 所示,在整个发酵期间色度呈下降趋势,在发酵第 14 天达到最低值,为 0.47,后发酵期间,色度趋于稳定。这表明桑葚酒发酵前期,显色物质的总量在减少,而发酵后期显色物质趋于稳定,这与发酵酒液中花色苷等呈色物质的消长规律有关^[21]。一般花色苷质量浓度越高,酒颜色越深,色度越高^[22]。色调的变化趋势与色度相反。色调反映各颜色之间的变化、转移情况。发酵过程中,色度的变化会对色调产生影响^[21]。桑葚酒发酵过程中色调不断增加,说明酒液中显现黄色物质增加 (A_{420}) 而显现红色物质减少 (A_{520}),这与李甜等^[23]对紫薯酒发酵过程颜色变化规律的研究结果类似。

2.6 桑葚酒发酵期间花色苷单体比例的变化

经 HPLC 检测发现,桑葚酒中主要存在两种花色苷单体,见图 1,其出峰时间与标准品矢车菊-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-芸香糖苷一致。陈亮等^[24]也证实了桑葚花色苷主要为矢车菊-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-芸香糖苷。桑葚酒发酵过程中,矢车菊-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-芸香糖苷质量浓度呈下降趋势,比初始发酵液 (第 0 天) 分别下降了 86.84% 和 72.17%。何英霞等^[11]研究认为,酵母在生长繁殖过程中会产生 β -葡萄糖苷酶,该酶能将花色苷水解为花青素,而花青素在水溶液中稳定性差,易降解。此外,两种花色苷单体在发酵过程中降解速率存在较大差异,这是由于矢车菊-3-芸香糖苷的结构比矢车菊-3-葡萄糖苷复杂,极性小,不易受到水分子的攻击导致^[6]。

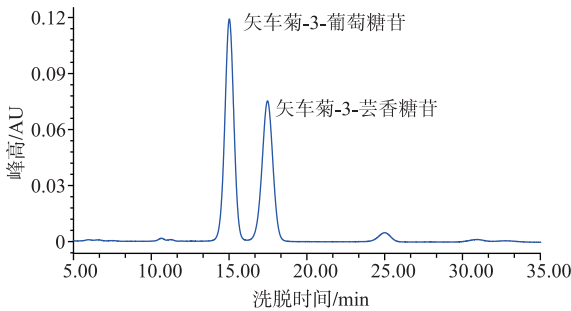


图 1 桑葚酒花色苷液相图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of anthocyanins in mulberry wine

2.7 相关性分析

对桑葚酒自然发酵期间的 11 项指标进行相关性分析和显著性检验,见表 4)。总花色苷质量浓度与游离花色苷比例、色度、矢车菊-3-葡萄糖苷、矢车菊-3-芸香糖苷质量浓度呈极显著正相关关系 ($P<0.01$),与聚合花色苷比例、色调呈极显著负相关关系 ($P<0.01$),聚合花色苷的比例与桑葚酒的色调有极显著的正相关性 ($P<0.01$),与色度有显著的负相关性 ($P<0.05$),说明花色苷的质量浓度和种类决定了桑葚酒的颜色性质;桑葚酒清除 DPPH 自由基能力与总酚质量浓度呈显著正相关 ($P<0.05$),说明酚类物质是桑葚酒中的主要抗氧化成分。

表 3 桑葚酒自然发酵期间花色苷及色泽变化

Table 3 Changes of anthocyanins and color of mulberry wine during spontaneous fermentation								
天数/ d	总花色苷质量 浓度/(mg/L)	游离花色苷 比例/%	辅色花色苷 比例/%	聚合花色苷 比例/%	色度	色调	矢车菊-3-葡萄 糖苷质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	矢车菊-3-芸香 糖苷质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)
0	451.71 $\pm$ 13.43 ^{cd}	87.53 $\pm$ 0.79 ^{ab}	9.70 $\pm$ 0.11 ^a	3.63 $\pm$ 0.09 ⁱ	1.00 $\pm$ 0.05 ^b	0.53 $\pm$ 0.03 ^d	153.41 $\pm$ 1.19 ^a	136.31 $\pm$ 0.90 ^a
1	518.06 $\pm$ 13.74 ^{ab}	88.08 $\pm$ 0.89 ^{ab}	7.22 $\pm$ 0.10 ^b	5.18 $\pm$ 0.02 ^h	1.10 $\pm$ 0.04 ^a	0.56 $\pm$ 0.03 ^d	96.82 $\pm$ 0.97 ^b	95.90 $\pm$ 0.82 ^b
2	530.29 $\pm$ 10.87 ^a	90.93 $\pm$ 0.82 ^{ab}	2.80 $\pm$ 0.09 ^d	6.35 $\pm$ 0.08 ^{gh}	0.93 $\pm$ 0.00 ^c	0.54 $\pm$ 0.02 ^d	92.22 $\pm$ 1.72 ^c	96.35 $\pm$ 0.87 ^b
3	507.30 $\pm$ 12.52 ^b	90.30 $\pm$ 0.65 ^a	3.04 $\pm$ 0.08 ^c	6.75 $\pm$ 0.08 ^g	0.94 $\pm$ 0.02 ^c	0.55 $\pm$ 0.03 ^d	88.39 $\pm$ 1.75 ^d	90.34 $\pm$ 0.76 ^c
4	471.81 $\pm$ 5.94 ^c	91.67 $\pm$ 0.84 ^a	2.54 $\pm$ 0.07 ^c	5.86 $\pm$ 0.07 ^{gh}	0.81 $\pm$ 0.01 ^d	0.54 $\pm$ 0.02 ^d	80.36 $\pm$ 0.94 ^e	85.30 $\pm$ 0.80 ^d
5	470.67 $\pm$ 4.01 ^c	87.24 $\pm$ 0.78 ^{bc}	2.33 $\pm$ 0.09 ^c	10.48 $\pm$ 0.80 ^f	0.77 $\pm$ 0.04 ^{de}	0.53 $\pm$ 0.03 ^d	70.21 $\pm$ 1.64 ^f	83.62 $\pm$ 0.80 ^{de}
6	448.53 $\pm$ 20.54 ^d	85.55 $\pm$ 0.99 ^{cd}	1.69 $\pm$ 0.07 ^e	12.80 $\pm$ 0.66 ^e	0.72 $\pm$ 0.03 ^{de}	0.57 $\pm$ 0.04 ^{cd}	65.95 $\pm$ 2.20 ^g	84.75 $\pm$ 0.90 ^d
7	441.15 $\pm$ 5.52 ^d	82.93 $\pm$ 1.34 ^{de}	3.02 $\pm$ 0.10 ^c	14.13 $\pm$ 1.27 ^e	0.68 $\pm$ 0.04 ^f	0.55 $\pm$ 0.03 ^d	59.61 $\pm$ 0.51 ^h	82.11 $\pm$ 0.78 ^e
8	446.54 $\pm$ 1.61 ^d	80.92 $\pm$ 1.18 ^e	2.06 $\pm$ 0.10 ^f	17.05 $\pm$ 1.08 ^d	0.58 $\pm$ 0.08 ^g	0.59 $\pm$ 0.07 ^{cd}	47.39 $\pm$ 1.72 ⁱ	72.88 $\pm$ 0.86 ^b
9	443.71 $\pm$ 4.56 ^d	76.39 $\pm$ 0.65 ^f	2.01 $\pm$ 0.10 ^f	21.64 $\pm$ 0.89 ^c	0.56 $\pm$ 0.05 ^{gh}	0.65 $\pm$ 0.04 ^c	44.07 $\pm$ 0.83 ^j	78.66 $\pm$ 0.82 ^f
10	462.16 $\pm$ 5.13 ^{cd}	77.17 $\pm$ 0.78 ^f	1.85 $\pm$ 0.08 ^g	21.01 $\pm$ 0.72 ^c	0.58 $\pm$ 0.04 ^g	0.76 $\pm$ 0.06 ^b	46.37 $\pm$ 0.89 ^j	75.68 $\pm$ 0.89 ^g
14	392.61 $\pm$ 9.74 ^e	71.19 $\pm$ 0.96 ^g	0.43 $\pm$ 0.02 ^h	28.39 $\pm$ 0.67 ^{ab}	0.47 $\pm$ 0.02 ^h	0.84 $\pm$ 0.04 ^a	27.21 $\pm$ 0.83 ^k	47.38 $\pm$ 0.82 ⁱ
17	363.08 $\pm$ 4.63 ^f	70.38 $\pm$ 0.68 ^g	0.35 $\pm$ 0.03 ^h	29.27 $\pm$ 0.75 ^a	0.52 $\pm$ 0.02 ^{gh}	0.87 $\pm$ 0.04 ^a	25.19 $\pm$ 0.53 ^k	46.70 $\pm$ 0.86 ⁱ
20	355.99 $\pm$ 1.20 ^f	70.64 $\pm$ 0.89 ^g	1.73 $\pm$ 0.09 ^g	27.66 $\pm$ 0.60 ^b	0.50 $\pm$ 0.02 ^{gh}	0.84 $\pm$ 0.04 ^a	20.42 $\pm$ 0.42 ^l	37.93 $\pm$ 0.86 ^j

注:总酚质量浓度以 mg 没食子酸/mL 计;清除 ABTS 和 DPPH 能力以 mg Trolox/mL 计。同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

表 4 桑葚酒自然发酵期间各指标相关性分析

Table 4 Correlation analysis of each index of mulberry wine during spontaneous fermentation										
	总花色苷	辅色花色苷	游离花色苷	聚合花色苷	色度	色调	DPPH	ABTS	矢车菊-3-葡萄 糖苷	矢车菊-3-芸 香糖苷
总酚	0.289	-0.187	0.223	-0.145	0.005	-0.238	0.626*	-0.420	-0.151	-0.059
总花色苷		0.437	0.873**	-0.850**	0.803**	-0.805**	0.294	-0.591*	0.666**	0.716**
辅色花色苷			0.523	-0.691**	0.785**	-0.542*	-0.412	0.106	0.877**	0.825**
游离花色苷				-0.978**	0.866**	-0.931**	0.414	-0.502	0.804**	0.797**
聚合花色苷					-0.928**	0.924**	-0.251	0.401	-0.898**	-0.879**
色度						-0.762**	0.020	-0.391	0.900**	0.827**
色调							-0.374	0.411	-0.761**	-0.821**
DPPH								-0.393	-0.096	-0.453
ABTS									-0.049	-0.052
矢车菊-3-葡萄 糖苷										0.959**

** 在 0.01 水平上显著相关;* 在 0.05 水平上显著相关。

2.8 主成分分析

主成分分析是利用降维思想,通过描述性统计、差异性检验以及发酵过程的得分图、载荷图,把多个指标转化成少数几个相互独立且包含原来指标大部分信息的综合指标,通过研究指标体系的内在结构关系,使结果更具有客观性和准确性^[25]。本研究第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)分别包含了原来信息量的 61.77%和 22.81%,为了以尽可能少的指标反映尽量多的信息,选取前两个因子作主成分,代表桑葚酒自然发酵主要的指标,见图 2。

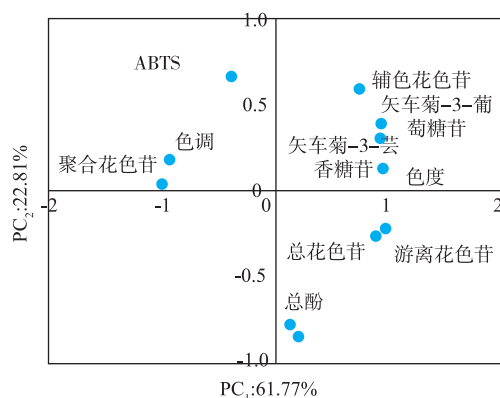


图 2 不同成分因子载荷散点图

Fig. 2 Loadings plot of principal component analysis of different constituents

PC1 主要综合了总花色苷、辅色花色苷、聚合花色苷、游离花色苷、色度、色调、矢车菊-3-葡萄糖苷、矢车菊-3-芸香糖苷的信息,其中聚合花色苷、色调在 PC1 上呈负向分布,其他呈正向分布,即在 PC1 坐标正向,PC1 越大,聚合花色苷、色调取值则越小。PC2 主要综合了总酚、DPPH、ABTS 的信息,其中总酚、DPPH 在第二主成分上呈负向分布,ABTS 呈正向分布。变量与原点的距离反映其因子载荷,位于坐标轴原点远端的变量具有较大的因子载荷,位于原点近端的变量具有较小的因子载荷^[25]。结合载荷散点图看,发酵第 0 天具有最大的因子载荷,含有较高的生物活性物质,清除 DPPH、ABTS 自

由基的能力也显著,抗氧化活性高。发酵第 8~10 天聚为一类,生物活性物质含量低,抗氧化活性低。发酵第 14~20 天含有较高的总酚、清除 DPPH、ABTS 自由基的能力显著,见图 3。利用主成分分析基本上反映了发酵期间桑葚酒花色苷质量浓度、色泽和抗氧化活性的贡献率,有效地揭示桑葚酒发酵期间花色苷、色泽和抗氧化活性的内在关系。

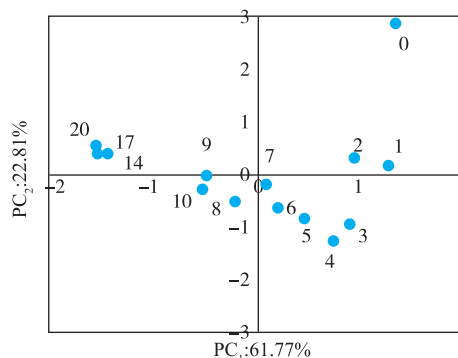


图 3 桑葚酒公因子得分图

Fig. 3 Common scores scatter plot of mulberry wine

3 结 语

作者研究了桑葚酒自然发酵期间花色苷、色泽及抗氧化活性变化,并对结果进行了相关性和主成分分析,获得以下主要结论:桑葚酒发酵期间花色苷、色泽以及抗氧化活性等指标变化显著;酚类物质是桑葚酒中主要抗氧化成分,桑葚酒的色泽与花色苷的种类和质量浓度密切相关;对桑葚酒发酵期间的各指标进行主成分分析,提取得到两个主成分,其中 PC1 主要综合了桑葚酒的色泽以及花色苷组成与质量浓度相关信息,反映了桑葚酒发酵期间花色苷与色泽之间的变化规律;PC2 主要综合了总酚质量浓度及抗氧化活性的相关信息,反映了桑葚酒发酵期间酚类物质抗氧化活性的变化规律。利用主成分分析有效地揭示桑葚酒发酵期间花色苷、色泽及抗氧化活性的变化规律,为进一步开发高品质的桑葚酒提供了可行途径。

参考文献:

- [1] LI Chenchen, LU Xiaotengjia, TONG Huarong. Analysis of phenolic compounds in mulberry by high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2015, 36(2): 101-104. (in Chinese)
- [2] XI Liang. Study on brewing technology and clarification technique of compound wine of mulberry and pomegranate[J]. *Food Industry*, 2013, 34(11): 9-12. (in Chinese)

- [3] ZENG Xia, LU Yan, CAO Jianping, et al. Optimization of the fermentation process of mulberry wine and analysis of its main flavoring components[J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2016, 1: 120-124. (in Chinese)
- [4] LIU Wei, CHEN Liang, WU Zhiming, et al. Analysis of aromatic composition of mulberry wine fermented with different yeast strains[J]. **Food Research and Development**, 2013, 34(24): 212-217. (in Chinese)
- [5] BAI Weibin, ZHU Cuijuan, HU Yunfeng, et al. Advance in molecular mechanism of nutrition interventions of anthocyanins for chronic disease[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(10): 1109-1119. (in Chinese)
- [6] YU X L, ZHONG H Y, SHAN S J, et al. Protective effect and mechanism of action of mulberry marc anthocyanins on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. **Journal of Functional Foods**, 2016, 24: 595-601.
- [7] ADISAKWATTANA S, YIBCHOK-ANUN S, CHAROENLERTKUL P, et al. Cyanidin-3-rutinoside alleviates postprandial hyperglycemia and its synergism with acarbose by inhibition of intestinal α -glucosidase[J]. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 2011, 49(1): 36-41.
- [8] WANG Ying, ZHOU Jianzhong, ZHU Jiana, et al. Screening and identification of superior yeasts from natural fermented blueberry wine[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2013, 13(4): 202-206. (in Chinese)
- [9] FRANCESCA N, GAGLIO R, ALFONZO A, et al. The Wine: typicality or mere diversity? The effect of spontaneous fermentations and biotic factors on the characteristics of wine[J]. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, 2016, 8: 769-773.
- [10] SATORA P, KOSTRZ M, SROKA P, et al. Chemical profile of spirits obtained by spontaneous fermentation of different varieties of plum fruits[J]. **European Food Research and Technology**, 2016, 243(3): 1-11.
- [11] HE Yingxia, LI Jixin, MI Lan, et al. Effects of pH, temperature and SO₂ on pyranoanthocyanins (Vitisins) in red wine by response surface methodology[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2016, 42(8): 115-120. (in Chinese)
- [12] FAN G J, NDLOLO V U, KATUNDU M, et al. Comparison of phytochemicals and antioxidant capacity in three bean varieties grown in central malawi[J]. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2016, 71(2): 204-210.
- [13] YANG Daoqiang, LU Shengmin, XIA Qile, et al. Changes of the main functional components and antioxidant capacity of ganoderma lucidum wine during the extraction with ethanol solution [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(2): 205-210. (in Chinese)
- [14] FAN Gongjian, GONG Xiaofeng, YANG Zhendong, et al. Color changes and anthocyanins component of purple corn vinegar during acetic fermentation[J]. **Journal of Nanjing Agricultural University**, 2009, 32(4): 176-179. (in Chinese)
- [15] BIMPLIAS A, PANAGOPOULOU M, TSIMOGIANNIS D, et al. Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors[J]. **Food Chemistry**, 2016, 197(8): 39-46.
- [16] ZHANG Xiaosong, SUN Yanmei, HU Zhensheng, et al. Changes of anthocyanin and total phenolics content and antioxidant activities during wine processing of *Vaccinium uliginosum* L. [J]. **Journal of Northeast Agricultural University**, 2010, 41(3): 120-124. (in Chinese)
- [17] ZHAO Hongyu, CHEN Dunhong, DENG Liang, et al. Influence of alcoholic solid-state fermentation process on bioactive constituents and antioxidant activity from mulberries (*Morus nigra* L.) [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2015, 36(23): 182-185. (in Chinese)
- [18] WANG Hui, ZHOU Yan. The method of ABTS assay for screening and evaluating antioxidant[J]. **Guangzhou Chemical Industry**, 2012, 40(22): 41-43. (in Chinese)
- [19] LIN Lianzhu, ZHAO Mouming. Effect of reaction time on DPPH and ABTS+ radical scavenging assays for antioxidant capacity evaluation[J]. **Food Science**, 2010, 32(5): 63-67. (in Chinese)
- [20] HAN Fuliang, LI Yang, LI Jiming, et al. Relation between anthocyanin structures and color in red wine: a review[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(3): 328-336. (in Chinese)
- [21] HUANG Xiaojie, LIU Yujia, TIAN Xueying, et al. Change of qualities and antioxidant substances in mulberry wines from different fermentation stages[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2014, 35(21): 119-122. (in Chinese)
- [22] SARI P, WIJAYA C H, SAJUTHI D, et al. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins[J]. **Food Chemistry**, 2012, 132(4): 1908-1914.

- [23] LI Tian,WANG Yue,AN Jiayan. Research on color change rules and color features of purple sweet potato wine during fermentation[J]. **Food and Fermentation Industries**,2016,42(1):48-52.(in Chinese)
- [24] CHEN Liang,XIN Xiulan,YUAN Qipeng. Analysis of compositions of anthocyanins in wild mulberry[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2012,33(15):307-310.(in Chinese)
- [25] CHEN Wanchao,YANG Yan,LI Wen,et al. Analysis of volatile components in Lentinula edodes by SPME-GC-MS and establishment of fingerprint[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(10):1074-1080.(in Chinese)

科技信息

欧盟评估吡啶、吡咯和喹啉衍生物组中调味物质安全性

2018年4月25日,欧洲食品安全局(EFSA)发布 10.2903 / j.efsa.2018.5226 文件,发布调味品评估报告(修订版3)。

根据欧盟委员会条例(EC)第 1565/2000 号所规定,评估涉及吡啶、吡咯和喹啉衍生物(第 63 次会议)的 22 种调味品,对于全部 22 种物质,小组同意粮农组织/世界卫生组织食品添加剂专家委员会(JECFA)“作为调味物质无安全性问题”的结论;同时对 1-糠基吡咯等 15 种调味品物质进行评估,并提交正常使用量和最大使用量建议表。

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 欧盟评估吡啶、吡咯和喹啉衍生物组中调味物质安全性

[EB/OL]. (2018-4-26). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/show.asp?id=57051>

我国学者在酵母 DNA 复制与姐妹染色单体黏连取得新进展

在国家自然科学基金项目(项目编号:31630005,31770084,31628011,31771382)等资助下,中国农业大学生物学院微生物学与免疫学系楼慧强教授课题组在酿酒酵母 DNA 复制与姐妹染色单体黏连研究中连续取得新进展,相关成果以“Dbf4 Recruitment by Forkhead Transcription Factors Defines an Upstream Rate-limiting Step in Determining Origin Firing Timing”(Fkh 家族转录因子直接招募 Dbf4 是决定基因组 DNA 复制起始时序的上游限速步骤)为题,于 2018 年 1 月 12 日发表在 *Genes & Development*(《基因与发育》),论文链接:<http://genesdev.cshlp.org/content/31/23-24/2405.long>。

所有生命的生长繁衍离不开细胞分裂,而细胞分裂增殖的核心事件是染色体复制和分配。真核生物基因组有几千个到几万个复制原点。有趣的是,这些复制起点并不同时开始复制,而是按照一定的时空程序启动。此前研究表明,不同原点的先后复制是由于细胞中部分必需的复制起始因子的分子数量少于原点的数量。这一模型即所谓的“早起的鸟儿有虫吃”的“限量起始因子模型”。但这些限量因子是如何优先被早期复制起点利用的却并不清楚。本研究在体内体外实验中均证明 Fkh 与 Dbf4 通过直接的物理互作将 Dbf4 优先募集到早期复制起点,改变了过去 Dbf4 能直接结合原点 DNA 或依赖 ORC 复合物的观点。更重要的是,证明了 Fkh 的 DNA 复制功能完全独立于其转录功能。审稿人认为,“此前发现一些转录因子或表观遗传因子都是通过影响已知复制蛋白的表达或活性间接调节 DNA 复制。这是首例转录因子不依赖其转录功能直接调节 DNA 复制起始的例子”。

该课题组还证明 Dbf4 存在独立于 DDK 激酶(Db4-Cdc7)的额外功能,并与英国 John Diffley 实验室互相独立报道 DDK 通过磷酸化 Mcm2-7 进一步介导 Sld3 的结合,阐明 DDK 激酶在激活 Mcm2-7 解旋酶活性从而启动 DNA 复制。

该课题组于 2017 年 8 月 1 日发现泛素连接酶 Rtt101-Mms1 与 DNA 复制叉结合,能够招募黏连因子 Smc3 的乙酰化酶 Eco1,将姐妹染色单体之间黏连的建立与 DNA 复制进程相偶联,相关成果以“Rtt101-Mms1-Mms22 Coordinates Replication-coupled Sister Chromatid Cohesion and Nucleosome Assembly”(Rtt101-Mms1-Mms22 协调 DNA 复制相偶联的两个事件:姐妹染色单体黏连和核小体组装)为题,在 *EMBO Reports*(EMBO 报告)发表封面文章,论文链接:<http://embor.embopress.org/content/18/8/1294.long>。

这些工作有助于了解真核生物如何保证染色质复制和分配的保真性,即遗传信息的准确传递。

[信息来源]国家自然科学基金委员会. 我国学者在酵母 DNA 复制与姐妹染色单体黏连取得新进展 [EB/OL]. (2018-3-7). <http://www.nsf.gov.cn/publish/portal0/tab448/info73038.htm>