

镇江香醋抗氧化活性成分来源分析

徐清萍 陶文沂 敖宗华

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

摘要 文中研究了镇江香醋生产过程中抗氧化性成分酚类、黄酮类化合物含量及 DPPH 自由基清除活性的变化, 并分析了总酚、总黄酮与 DPPH 自由基清除活性的相关性。研究表明, 在醋酸发酵阶段, 镇江香醋总酚含量及总黄酮含量开始明显增加。露底封醋阶段和煎煮过程对镇江香醋 DPPH 自由基清除作用有较明显的影响。总酚含量与总黄酮含量与 DPPH 自由基清除活性有较高的相关性, 相关系数分别为 0.933 4 和 0.935 3。

关键词 食醋, 抗氧化性, DPPH 自由基清除活性, 总酚含量, 总黄酮含量

镇江恒顺香醋从 1850 年开始生产, 它以优质糯米为主要原料, 经酿酒、醋酸发酵、淋醋 3 大过程, 40 多道工序, 历时 60 多天酿制而成^[1], 具有“色、香、酸、醇、浓”5 大特色, 素有“酸而不涩, 香而微甜, 色浓味鲜, 愈存愈香”之特点。食醋具有多种生理调节功能, 对镇江香醋体外抗氧化性研究表明, 镇江香醋具有抗氧化作用^[2,3]。

文中主要对镇江香醋中的抗氧化活性成分进行了来源分析, 对镇江香醋酿造过程不同生产阶段总酚含量、总黄酮含量及 DPPH 自由基清除活性的变化进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

DPPH 自由基, Sigma 公司; 没食子酸, 芦丁标准品及各种试剂, AR 级, 均为国产。

1.2 实验仪器

721 分光光度计、电子天平, 均为国产。

1.3 实验样品

在食醋酿造生产过程中的不同生产线取样: 酒样、露底样 8 d、成熟下醋样、封醋 1 d 样、封醋 4 d 样、封醋 7 d 样、封醋 10 d 样、封醋 11 d 样、封醋 18 d 样、醋卤样、生醋样、煎醋样、陈醋(新)、香醋(2 年)、香醋(新), 各阶段取样均至少为 3 个平行样, 由镇江恒顺香醋厂提供。2% 的米色液: 0.2 g 米色液加水稀释至 10 mL。其中露底样及成熟封醋样均按 30 g: 40 mL 水量进行提取, 测定水提物中的总酚含量和总黄酮含量。

1.4 实验方法

1.4.1 总酚含量的测定^[4]

将样品醋适当稀释后, 取 25~50 μL , 依次加 1.0 mL Folin-Ciocalteu 试剂(稀释 10 倍后), 1.0 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液, 用蒸馏水定容至 5 mL, 室温下静置 30 min, 用 0.5 cm 光径比色杯于 765 nm 比色测定, 试剂空白为参比。总酚含量以没食子酸等价物(μg)表示, 根据标准曲线线性方程 $A = 0.0077C + 0.0105$, $R^2 = 0.9994$ 来计算总酚含量。其中 A 为吸光度, C 为没食子酸等价物(μg)。

1.4.2 总黄酮含量的测定

适当稀释醋样, 取 0.2 mL 样品溶液于 10 mL 比色管, 加入 30% 乙醇补充至 2.5 mL, 加入 140 μL NaNO_2 (5%) 摇匀, 放置 5 min; 再加入 140 μL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (10%), 放置 6 min 后加入 1 mL 5% NaOH 混匀, 用 30% 乙醇定容至 5 mL, 10 min 后于 500 nm 处(以不加样品为空白)比色测定, 总黄酮含量以芦丁等价物表示, 根据芦丁标准曲线线性方程 $A = 2.7585C + 0.0094$, $R^2 = 0.9994$ 来计算总黄酮含量, 其中 A 为吸光度, C 为芦丁等价物(mg)。

1.4.3 DPPH 自由基清除率的测定^[2,3]

将醋样适当稀释并定容至 1 mL, 与 1 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液混合, 置暗处反应 30 min, 测定 517 nm 处吸光度 A_i 。同时测定 0.2 mmol/L DPPH 溶液与等体积无水乙醇混合液的吸光度 A_c , 以及待测液与等体积无水乙醇混合液的吸光度 A_j 。根据下列公式计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\%$$

1.4.4 数据处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据采用 t 检验统计处理。

2 结果与讨论

2.1 酿酒阶段总酚含量、总黄酮含量及 DPPH 自由

第一作者: 博士研究生(陶文沂为通讯作者)。

收稿时间: 2004-10-09, 改回时间: 2004-12-16

基清除作用

取恒顺集团不同分厂生产的酒样,2条生产线上各取3个样,过滤后取25 μL检测总酚含量,取200 μL检测总黄酮含量,取12.5 μL、25 μL分别定容至1

表1 酿酒阶段总酚含量、总黄酮含量及 DPPH 自由基清除率(̄x ± s)

样品	总酚/mg·mL ⁻¹	总黄酮/mg·mL ⁻¹	12.5 μL 样品 DPPH 清除率/%	25 μL 样品 DPPH 清除率/%
酒样平均值	0.405 ± 0.011	0.081 ± 0.006	13.87 ± 3.06	24.86 ± 5.58

2.2 醋酸发酵过程及封醅陈酿阶段总酚含量、总黄酮含量及 DPPH 自由基清除作用

镇江香醋的标准生产工艺中醋酸发酵过程为有氧发酵,共需21 d。其中从麸皮和糠等原料投入酵池发酵开始直到发酵成熟,这一阶段被统称为露底过程,露底开始的几天,发酵池中水分都被麸皮吸收,并无液体析出。

在镇江香醋的后期生产工艺中,在醋酸发酵完成以后,淋醋以前要进行封醅陈放,该过程实际是无氧发酵过程,对醋的风味形成有很重要的影响。淋醋过程是用水浸泡成熟醋醅,配制过程是将不同生产线所得淋醋液统一调配,它们和澄清过程都不涉及化学变化,因此文中只考察了露底及封醅陈酿阶段的变化。

露底及封醅样液体析出很少,而最后的成品醋是成熟醋醅经过二次卤汁淋出的。所以对这2个阶段的样品用水(每30 g露底样或封醅样均用40 mL水浸提,然后过滤)浸提,测定浸提清液中总酚、总黄酮的变化即可反映此阶段的实际变化(表2)。取浸提液25 μL测定总酚含量,取200 μL样测定总黄酮含量,分别取12.5 μL、25 μL测定对DPPH自由基的清除率。

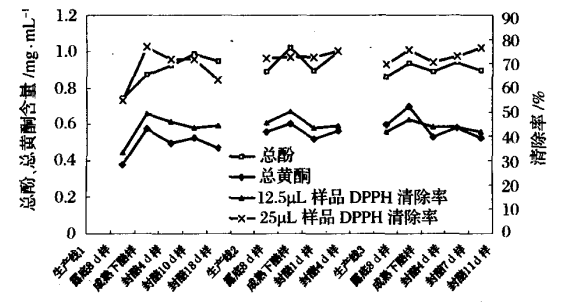


图1 露底、封醅阶段总酚含量、总黄酮含量、DPPH 自由基清除率变化

由图1可见,在露底初期总酚含量、总黄酮含量均相对较低,随着时间延长,到发酵成熟下醅时,总酚

mL测定DPPH自由基清除作用。对在不同生产线上取的酒样进行分析,结果显示,在此阶段酒样中的总酚含量及总黄酮含量均较低,来源可能为原料糯米中含有的酚类、黄酮类化合物在酿酒阶段的溶出(表1)。

含量及总黄酮含量均明显升高,DPPH自由基清除活性最强。封醅陈酿阶段,总酚含量、总黄酮含量与成熟下醅时比较略有下降,随着陈酿时间的延长,总酚及总黄酮含量有所波动,但变化并不显著,封醅陈酿时间对总酚、总黄酮及DPPH自由基清除活性影响应不是很大。

露底过程对总酚、总黄酮含量及DPPH自由基清除活性的影响较多。考虑到在酿酒阶段酒样中的总酚及总黄酮含量均较低,露底过程是从麸皮和糠等原料投入酵池发酵开始直到发酵成熟,此阶段对总酚、总黄酮的影响应主要来自2个方面:(1)原料麸皮和米糠中可能含有的抗氧化成分酚类和黄酮类化合物等。如麸皮中含有V_E、植酸^[5]等,米糠中含有阿魏酸、γ-谷维醇^[6]等,在淋醋时可能会有部分成分溶出;(2)是有部分成分在醋酸发酵过程中发生转化,生成具有较强抗氧化活性的成分。如据日本文献报道,从日本黑醋中分离出具有DPPH自由基清除活性的二氢阿魏酸和二氢芥子酸。他们认为阿魏酸在发酵过程中还原成了二氢阿魏酸,发酵过程在增强DPPH自由基清除活性方面起着决定性的作用^[7]。

2.3 后期加工过程中总酚含量、总黄酮含量的变化及 DPPH 自由基清除作用

2.3.1 外加米色液的影响

在镇江香醋的后期生产工艺中需要添加米色液(添加量约2%)、食盐和糖等物质用于调节产品的口味和颜色。其中食盐和糖不会对抗氧化性带来直接影响。米色液是由炒米而来,成分复杂,因此必须考查这一影响因素。将0.2 g米色液加水稀释至10 mL,直接测定2%的米色液总酚含量、总黄酮含量、DPPH自由基清除作用。与成品醋相比,米色液对总酚含量、总黄酮含量和DPPH自由基清除活性均有一定影响,但影响很小。酚含量仅占总酚含量的2%左右,对总黄酮含量的影响仅约为7%左右(表2)。

表2 米色液对总酚含量、总黄酮含量及 DPPH 自由基清除率

样品	总酚/mg·mL ⁻¹	总黄酮/mg·mL ⁻¹	12.5 μL 样品 DPPH 清除率/%	25 μL 样品 DPPH 清除率/%
2%米色液	0.081	0.137	10.78	16.80

2.3.2 煎煮过程影响

煎煮过程是将淋醋液常压加热的过程,应予考

查。取自各生产线的生醋样及熟醋样各 9 个。

表 3 所示是煎煮前和煎煮后醋样中总酚含量、

表 3 煎煮醋样总酚含量、总黄酮含量变化及 DPPH 自由基清除率变化($\bar{x} \pm s$)

样品	总酚含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	总黄酮含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.5 μL 样品 DPPH 自由基清除率/%	5 μL 样品 DPPH 自由基清除率/%
生醋	2.939 ± 0.294	1.649 ± 0.170	24.37 ± 3.46	47.70 ± 8.16
熟醋	2.927 ± 0.273	1.741 ± 0.234	$27.25 \pm 3.18^*$	51.66 ± 1.50

* $P < 0.05$ 熟醋与生醋相比。

总黄酮含量及自由基清除活性变化情况。由表 3 可见,总酚含量有所下降,总黄酮含量及 DPPH 自由基清除率有所上升。对 2 组数据采用 t 检验显著性,总酚含量及总黄酮含量变化均不显著。但在取样 2.5 μL 时对 DPPH 自由基清除率变化有显著性差异。

2.3.3 陈放的影响

表 4 陈放对镇江香醋总酚含量、总黄酮含量、DPPH 自由基清除活性影响($\bar{x} \pm s$)

样品	总酚含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	总黄酮含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.5 μL 样品 DPPH 自由基清除率/%	5 μL 样品 DPPH 自由基清除率/%
香醋(新)	4.393 ± 0.357	2.227 ± 0.367	40.04 ± 8.63	70.54 ± 1.90
香醋(2 年)	4.145 ± 0.233	2.266 ± 0.379	44.69 ± 5.71	72.82 ± 1.91

表 4 为新醋与陈放 2 年醋的比较,由表 4 可见,陈放 2 年醋与新醋相比,总酚含量测定值略有下降,总黄酮测定值及 DPPH 自由基清除活性略有上升,但变化均不显著。说明在温和条件下陈放,美拉德反应缓慢发生,可能生成一些具有抗氧化活性的成分,但是短期效果并不显著。

2.4 镇江香醋酿造 3 阶段中总酚含量、总黄酮含量、DPPH 自由基清除率变化趋势

镇江香醋为固态发酵,随着发酵时间增长,醋醅中逐渐析出液体(醋卤),对酒样、醋卤及成品醋总酚含量、总黄酮含量及 DPPH 自由基清除作用比较如图 2 所示。

镇江香醋的陈放有 2 个阶段。在醋酸发酵完成以后,淋醋以前要进行封醋陈放,该过程在前面已考察过。在成品出厂以前还要密封陈放,实际上直到用户打开密封包装食用以前都可以看作是这一阶段的延续。由于成品已经过高温煎煮杀菌,因此该阶段发生的物理化学变化并不以微生物的作用为主。

均取样 2.5 μL 、5 μL 测定,酒样为未稀释样品取样 12.5 μL 、25 μL 测定。由图 2 可见,酒样中总酚含量、总黄酮含量及对 DPPH 自由基的清除作用均较低。醋卤中总酚含量、总黄酮含量及对 DPPH 自由基的清除作用均最高。由此可见对镇江香醋抗氧化活性具有决定性影响的阶段为醋酸发酵阶段。

2.5 总酚含量、总黄酮含量与 DPPH 自由基清除活性的相关性

对镇江香醋不同阶段、不同浓度取样样品中的总酚含量、总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率作图,求总酚含量与 DPPH 自由基清除率的相关曲线如图 3,总黄酮含量与 DPPH 自由基清除率的相关曲线如图 4。

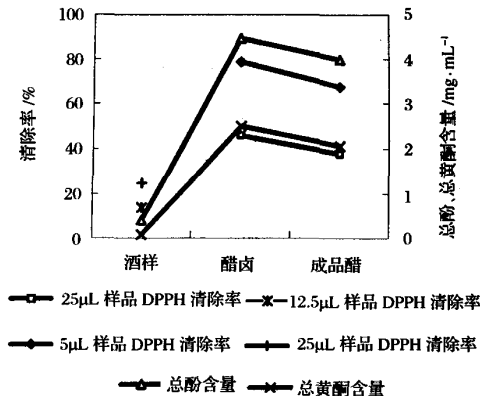


图 2 酿造生产过程总酚含量、总黄酮含量及 DPPH 自由基清除活性变化趋势

其中对 DPPH 自由基清除作用中醋卤和成品醋

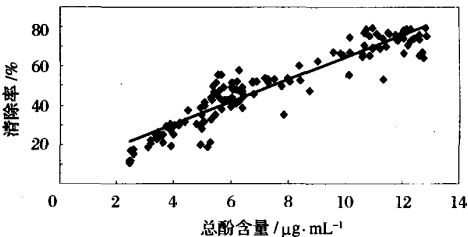


图 3 总酚含量与 DPPH 自由基清除活性关系

由图 3 可见,总酚含量与 DPPH 自由基清除率相关曲线线性回归方程:

$y_1 = 5.6748x_1 + 7.4463, R^2 = 0.8713$

其中: x_1 为总酚浓度($\mu\text{g/mL}$); y_1 为 DPPH 自由基清除率(%).总酚含量与 DPPH 自由基清除率

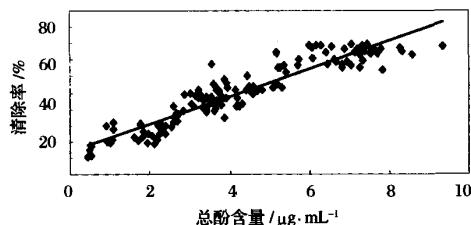


图4 总黄酮含量与DPPH自由基清除活性关系的相关系数为0.9334。

由图4可见,总黄酮含量与DPPH自由基清除率相关曲线线性回归方程:

$$y_2 = 8.4031x_2 + 14.078, R^2 = 0.8748$$

其中: x_2 为总黄酮浓度 ($\mu\text{g/mL}$); y_2 为DPPH自由基清除率(%). 总黄酮含量与DPPH自由基清除率的相关系数为0.9353。

由总酚含量、总黄酮含量与DPPH自由基清除活性的相关性曲线看镇江香醋的抗氧化活性(对自由基的清除作用)与醋中的总酚含量、总黄酮含量均有较高的相关性。

3 结 论

(1)镇江香醋生产中总酚含量、总黄酮含量及DPPH自由基清除作用在醋酸发酵阶段开始明显增加,成熟下醋时达到最高。

(2)镇江香醋生产后期加工阶段的煎煮过程对醋样品中的DPPH自由基清除作用有显著影响,对总酚含量及总黄酮含量没有显著影响,说明在此阶段

可能生成一些具有抗氧化活性的成分。

(3)镇江香醋抗氧化活性与其含有的酚类、黄酮类化合物具有较高的相关性。总酚含量与DPPH自由基清除率相关曲线线性回归方程 $y_1 = 5.6748x_1 + 7.4463, R^2 = 0.8713$ 。总黄酮含量与DPPH自由基清除率相关曲线线性回归方程 $y_2 = 8.4031x_2 + 14.078, R^2 = 0.8748$ 。

参 考 文 献

- 1 包启安. 镇江香醋传统生产工艺剖析[J]. 中国酿造, 2000(4):1~4
- 2 卫祥云. 我国复合调味料的生产技术与市场发展(上)[J]. 中国调味品, 2004(1):3~8
- 2 徐清萍, 敖宗华, 陶文沂. 恒顺香醋DPPH自由基清除活性成分研究[J]. 中国调味品, 2004(7):19~23
- 3 徐清萍, 敖宗华, 陶文沂. 恒顺香醋提取物抗氧化性的研究[J]. 中国酿造, 2004(7):16~18
- 4 Ock-sook Y, Anne S, Neyer Edwin N. Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin lipo some system[J]. JAOCS, 1997, 74(10):1301~1307
- 5 陈志敏, 赵仁勇. 小麦麸皮的开发利用[J]. 粮食流通技术, 1997, 3:18
- 6 龚院生, 姚惠源. 米糠中 γ -谷维醇抗脂质氧化作用[J]. 粮食与饲料工业, 2000, 11:40~41
- 7 Yumi Shimoji, Yoshitaka Tamura et al. Isolation and identification of DPPH radical scavenging compounds in kurosu (Japanese Unpolished Rice Vinegar) [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50:6 501~6 503

Analysis of the Source of Antioxidant Compounds in Zhenjiang Vinegar

Xu Qingping Tao Wenyi Ao Zonghua

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036, China)

ABSTRACT The bioregulatory functions of vinegar have recently been attracting a great deal of attention in these days. Zhenjiang vinegar has antioxidant activity in vitro. Changes of amount of total phenolic compounds, total flavones and percent of DPPH scavenging activity during vinegar production were studied in this paper. The relationship of total phenolic compounds, total flavones and DPPH radical scavenging activity were analyzed. Amount of total phenolic compounds and total flavones increased in acetic acid fermentation period. Dumping and decoction have stronger influence on DPPH scavenging activity. Amount of total phenolic compounds and total flavones have relationship with DPPH scavenging activity, correlative coefficients were 0.9334 and 0.9353 respectively.

Key words Vinegar, antioxidant activity, DPPH scavenging activity, total phenolic compounds, total flavones