

啤酒产生和清除自由基的双重性质

李 崎¹, 严 敏¹, 董建军², 单连菊², 顾国贤¹

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036;

2. 青岛啤酒股份有限公司科研开发中心, 山东 青岛 266101)

摘 要: 本文利用自旋捕集技术, 采用电子自旋共振(ESR)仪研究了啤酒经保温产生自由基以及啤酒自身清除二苯代苦味酰肼自由基(DPPH)的过程, 说明啤酒具有产生和清除自由基的双重性质。文章初步探讨了啤酒酿造及贮存过程中易于形成自由基和发生自由基链反应的工艺阶段, 以及清除自由基的物质种类及来源。

关键词: 啤酒; 电子自旋共振(ESR); 自由基; 二苯代苦味酰肼自由基(DPPH)

Dual Characters of Beer——Yielding and Scavenging Free Radicals

LI Qi¹, YAN Min¹, DONG Jian-jun², SHAN Lian-ju², GU Guo-xian¹

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;

2. Research and Development Center, Tsingtao Brewery Co. Ltd., Qingdao 266061, China)

Abstract: The processes of yielding free radicals (FR) by incubated beer and scavenging 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical by fresh beer are studied by electron spin resonance spectroscopy with spin-trapping technology, which implies that beer has the dual character of yielding and scavenging FR. The technical phases adapting to forming FR or arising chain reactions during brewing and storage and the substances and sources of scavenging FR as well are discussed.

Key words: beer; electron spin resonance (ESR); free radical; DPPH

中图分类号: TS262.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0067-04

啤酒是一个非常复杂的体系, 目前已知含有 800 多种有机和无机化合物。这个复杂体系中的一些物质形成了啤酒特有的主体风味, 而另一些物质又通过一系列物理化学反应来改变这种风味, 使得啤酒的风味处于不断的变化中, 并最终导致风味老化。尽管啤酒老化的机理尚未完全阐明, 但氧化反应应该是老化风味产生的最重要原因。风味稳定期可以认为是各种力量均衡的维持期, 当氧化反应占主导后风味即开始趋向于老化。近来的研究表明^[1-6], 氧自由基($O_2\cdot$ 、 $\cdot OH$ 、 1O_2 、 H_2O_2 、 $RO\cdot$ 、 $ROO\cdot$ 、 $ROOH$)参与了啤酒的氧化。

电子自旋共振法(electron spin resonance, 简称 ESR)是唯一可以定量测定自由基的方法, 但由于一般的自由基存在时间非常短, 所以直至自旋捕集技术的出现, 才开始应用于短寿命自由基, 如氧自由基的测定。其原理是利用自旋捕集剂与自由基反应, 生成相对稳定的加合物, 再对加合物进行测定。对氧自由基而言较常用的自旋捕集剂是 2-苯叔丁基硝酮(N-t-butyl-1-phenylnitron, 简称 PBN)。另一方面, 二苯代苦味酰肼自由基(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 简称 DPPH)是一种相对较稳定的自由基^[7-9], 当有自由基清除剂存在

收稿日期: 2005-10-12

作者简介: 李崎(1971-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为酿酒科学与微生物。

- [5] 魏新林, 夏文水. 甲壳低聚糖的生理活性研究进展[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(6): 614-617.
- [6] 夏文水. 壳聚糖的生理活性及其在保健食品中的应用[J]. 中国食品学报, 2003, 3(1): 77-81.
- [7] 覃彩芹, 池伟林, 舒海波. 壳聚糖的体内生物活性功能研究进展[J]. 孝感学院学报, 2004, 24(6): 5-9.
- [8] 吕朋, 李八方, 夏兰. 壳聚糖在医药保健中的应用[J]. 中国海洋药物, 2001, (5): 30-34.

- [9] 侯振江, 周秀艳. 微量元素与疾病[J]. 微量元素与健康研究, 2004, 21(6): 16-17.
- [10] 方敏, 曹朝晖, 方垂, 等. 甲壳低聚糖铁、硒配合物的制备及其表征[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(1): 37-39.
- [11] 何炳林, 黄文强. 离子交换与吸附树脂[M]. 上海科教出版社, 1995: 406.
- [12] 张秀军, 郎惠云, 魏永锋, 等. 壳聚糖亚铁螯合物的合成及吸附动力学[J]. 应用化学, 2003, 20(8): 749-753.

时, DPPH 的单电子被分配而使 ESR 信号减弱, 从而评价样品的抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

啤酒 市售商品啤酒; 麦汁、发酵液、清酒 某啤酒厂生产线即取; PBN(98%)、DPPH(90%) Sigma 公司; 无水乙醇、阿魏酸、香豆酸、儿茶素、花色素、偏重亚硫酸钾 均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器

电子自旋共振仪、UV 分光光度计(2100 型)。

1.3 自由基测定方法

ESR 测定条件: 中心磁场 3475.00G; 微波功率 4mW; 微波频率 9.7GHz; 调制频率 200kHz; 调制幅度 2.00G; 温度为室温; 扫描时间 3min。

1.4 方法

1.4.1 自由基捕集

将 0.5ml 除气啤酒装入离心管, 外覆铝箔避光, 加入 PBN 溶液(溶剂为 50% 乙醇-水)使其终浓度达到 0.02mol/L, 混匀; 置于 60℃ 水浴中, 促使自由基产生, 于 270min 时取样测定。

1.4.2 自由基清除

将 2.0ml 除气啤酒及 2ml DPPH 乙醇溶液置于具塞试管中, DPPH 乙醇溶液终浓度为 0.05mmol/L, 摇匀, 0℃ 静置 30min, 进行 ESR 测定。

1.4.3 分光法测定 DPPH 清除率

将 2ml 待测液及 2ml DPPH 溶液(浓度同上)置于一具塞试管中, 摇匀, 放置 30min, 以无水乙醇为空白于 517nm 测其吸光度 A_i , 并按下式计算清除率。

$$\text{清除率} = \left[1 - \frac{(A - A_i)}{A} \right] \times 100\%$$

式中, A_c 为 2 ml 无水乙醇加 2ml DPPH 溶液的吸光度; A_i 为 2ml 待测液加 2ml DPPH 溶液的吸光度; A_j 为 2ml 待测液加 2ml 无水乙醇的吸光度。

2 结果与分析

2.1 啤酒中的自由基

利用电子自旋共振仪可以直接测定自由基, 本研究采用 PBN 为自旋捕集剂捕集啤酒中的自由基, 自由基的含量多少表现在波谱上即为信号强弱, 或称峰高。为促进自由基的产生, 将样品置于 60℃ 加热。成品啤酒的 PBN 自旋加合物 ESR 波谱如图 1b 所示。

自由基信号(b)在磁场持续出现 40G, 超精细分裂常数(hfs) a_N 、 a_H 分别是 15.6G 和 3.0G, 结合特征性分岔

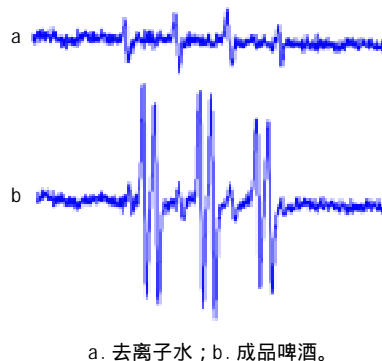
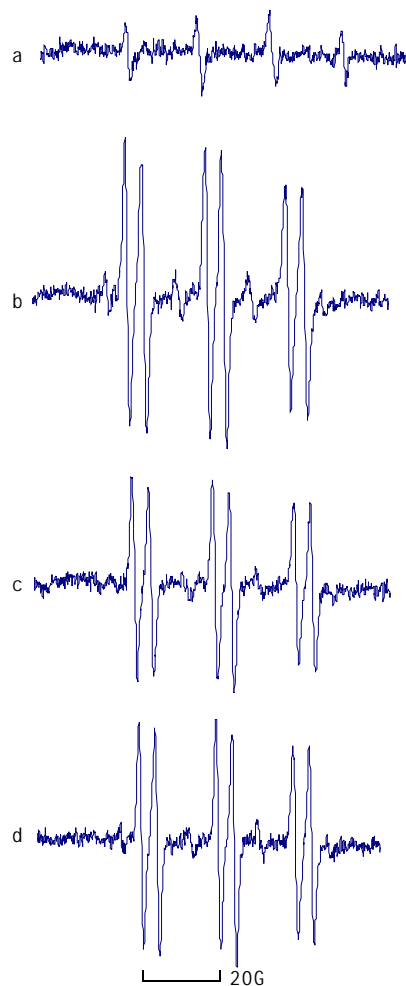


图1 PBN 自旋加合物的 ESR 谱

Fig.1 Electron spin resonance spectra of PBN adducts

谱线基本可以认为该自旋加合物是 PBN-OH, 这表明在啤酒氧化过程中产生了 $\cdot OH$ 自由基。将啤酒换成去离子水, 其它反应条件相同的情况下, 体系测不到明显自由基信号(a)。辐射、热和氧化还原反应是产生自由基的适宜条件, 啤酒酿造及贮存过程均涉及这些方面。本文分



a、b、c、d 分别取样自糖化麦汁、煮沸麦汁、发酵液、清酒。

图2 酿造过程自由基变化

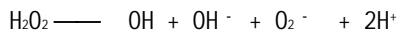
Fig.2 Typical patterns and contents of free radicals during brewing process

段研究了啤酒酿造过程自由基变化,结果如图2所示。

由图2a可知,糖化过程中的自由基变化并不像我们推测的那样,对比图2a、2b的波谱可以看出糖化时产生的自由基与煮沸时产生的不同,表现在数量和峰高上,糖化时并未产生羟基自由基,直至煮沸时才大量产生,说明高强度的加热使得自由基反应加剧;而糖化时产生的自由基目前尚无法断定其类别,暂命名为FR1。FR1贯穿整个啤酒酿造过程,但含量越来越少,同时未在成品啤酒中检出。糖化煮沸是继制麦后又一个温度较高的过程,高温引发自由基一方面能与基质反应生成老化(前驱)物质,另一方面能够破坏麦芽中酶类,如-葡聚糖酶。即使在糖化过程中低温以保持酶活,高浓度的自由基也能产生极大的危害。

图2c所示为发酵液的ESR谱,发酵过程中代谢非常旺盛,风味物质大量形成,由于前期的供氧,使得发酵液中存在超氧自由基,及后续的 $\cdot\text{OH}$,这些自由基活性很强,作为反应中介传递自由基,加速氧化还原链向下传递。但可能因为发酵时某些代谢产物具有清除自由基或抑制自由基产生的能力,使得发酵液的羟基自由基含量较煮沸麦汁(图2b)少。

清酒产生的自由基(图2d)较发酵阶段(图2c)产生的多,说明过滤对酒液自由基含量影响较大。主要原因是由硅藻土带入的铁离子作为催化剂催化了fenton反应。



一般熟啤采用高温瞬时20P.U.巴氏灭菌,这一措施会大大加快fenton反应,使酒液中出现大量氧自由基,并引发链式反应。

外界条件相对稳定,但酒液中仍有相当复杂的反应,使得啤酒的风味处于不断变化之中,这一阶段的主要反应有:不饱和脂肪酸的酶氧化及自由基氧化可以导致大量挥发性醛的形成;强烈的阳光和紫外线使不饱和脂肪酸、异葑草酮光氧化,啤酒中的核黄素及其衍生物、类黑色素均是光的活性体。以这些光活性体为中介,不饱和脂肪酸分解成为具有风味活性的羰基化合物;以类黑色素为中介的醇的氧化。

另外,麦芽作为啤酒最主要的原料,是啤酒风味物质及前体物质最主要的来源,制麦阶段随温度升高,超过50℃时美拉德反应被激活,产生类黑色素自由基,可作为中介使醇类氧化。

总之,啤酒酿造及贮存过程中伴随大量自由基生成和反应,同时促进了啤酒老化风味的形成。

2.2 啤酒清除自由基的能力

众所周知,啤酒中含有一定量的抗氧化物质,因而啤酒自身具有一定的抗氧化能力。作者分别测定在

DPPH溶液中添加啤酒前后的ESR图谱,结果见图3所示。DPPH自由基是目前最常用于评价抗氧化物质对自由基清除能力的自由基,通过计算抗氧化剂对DPPH自由基的清除率来表示该抗氧化剂的抗氧化能力。有研究认为^[8],DPPH自由基在被清除时的表现与氧自由基相近,可以代替氧自由基。

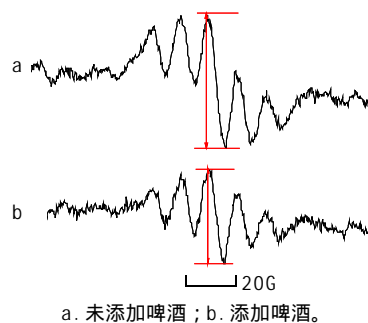


图3 DPPH溶液中添加啤酒前后的ESR谱

Fig.3 Electron spin resonance spectra of DPPH radical in beer

由图3可以看出,DPPH自由基的ESR谱是典型的五线谱,以中间谱线的峰高代表信号强弱。添加啤酒后,DPPH自由基信号明显减弱,说明啤酒对DPPH自由基有清除作用。

这种清除作用来源于啤酒中的内、外源抗氧化剂。啤酒中含有大量的抗氧化物质,包括多酚如(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、香草酸、阿魏酸、槲皮素,以及类黑精、含S化合物等,这些物质主要来源于原料和酵母代谢。表1列举了上述几种单酚(终浓度均为8mg/L)对DPPH自由基的清除效果,尽管单酚的清除效果各不相同,(+)-儿茶素和槲皮素的清除率较高,(-)-表儿茶素和阿魏酸次之,香草酸最低,总的来说都能清除DPPH自由基,即表明它们都有抗氧化能力,这是啤酒抗氧化力的主要组成部分。

表1 几种啤酒所含抗氧化物质对DPPH自由基的清除效果
Table 1 Scavenging capacity of some antioxidants in beer to DPPH radical

抗氧化物质	(+)-儿茶素	(-)-表儿茶素	香草酸	阿魏酸	槲皮素
DPPH清除率(%)	74.79	56.32	13.95	53.16	70.80

麦芽中有很多抗氧化物质,如大麦中的多酚、制麦和焙焦时产生的部分美拉德产物,经酿造过程存在于成品中。提高焙焦温度有利于麦芽多酚在糖化时的溶出;深色麦芽的抗氧化物质含量高于浅色麦芽。

酒花除赋予啤酒特殊的香气外,还带入多酚物质(主要是单体酚和单体多酚)。

发酵前期酵母暴露于氧气中会合成超氧化物歧化酶和过氧化氢酶,从而激发对自由基破坏的保护;同时代谢产生的含S化合物(主要是 SO_2)提高酒液的还原力,并

莎能奶山羊初乳化学组成成分的研究

杨晓宇¹, 丁辉煌¹, 杨 华², 陈锦屏¹, 张富新¹

(1. 陕西师范大学食品工程系 陕西 西安 710062; 2. 杨凌职业技术学院农学系 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 对不同泌乳期的莎能奶山羊初乳的化学组成成分进行了分析。结果表明, 莎能奶山羊初乳中总干物质、灰分、蛋白质、脂肪含量均随泌乳期延长呈下降趋势。分娩后第一次(3h)所挤初乳中各指标含量最高, 其中总干物质含量为21.32%, 灰分含量为1.57%, 蛋白质含量为10.24%, 脂肪含量为6.61%(12h), 之后下降趋势都趋于平缓。分娩后第一次(3h)所挤初乳中乳糖含量最低, 为1.93%, 之后随泌乳期延长乳糖含量呈上升趋势。

关键词: 莎能奶山羊初乳; 不同泌乳期; 化学组成; 分析

Research on Chemical Compositions of Shaneng Goat Colostrum

YANG Xiao-yu¹, DING Hui-huang¹, YANG Hua², CHEN Jin-ping¹, ZHANG Fu-xin¹

(1. Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University Xi'an 710062, China;

2. Department of Agronomy, Yangling Vocational Technical College, Yangling 712100, China)

Abstract: The chemical compositions of Shaneng goat colostrum were analysed. The results showed that: the contents of total solids, ash, protein and fat decrease with the prolong of lactation in Shaneng goat colostrum. The average contents of gross compositions are: 21.32% total solids, 1.57% ash, 10.24% protein, 6.61% fat (12h) and 1.93% lactose in colostrum at 3h post parturition. The contents of total solids, ash, protein and fat are the highest but the content of lactose is the lowest at 3h post parturition. The content of lactose increases with the prolong of lactation.

Key words: Shaneng goat colostrum milk; different lactation; chemical composition; analysis

收稿日期: 2005-10-20

作者简介: 杨晓宇(1974-), 男, 讲师, 博士, 主要从事食品加工与贮藏方面的研究。

有效遮盖老化醛的劣味。

多酚、类黑精、SO₂都具有两面性, 一方面有抗氧化的作用, 另一方面又会对啤酒造成负面影响。比如多酚易形成混浊, 类黑精加深啤酒色度, 过量SO₂会有硫臭味。

3 结 论

啤酒是一个复杂的溶液, 一些物质促进了自由基的形成, 另一些物质又有清除自由基的能力, 物质间不停的作用导致啤酒风味的动态变化。

自由基反应贯穿啤酒生产及贮存的整个过程, 对老化风味的形成有极大的推动作用, 减少生产及贮存过程中的自由基的量, 在不影响风味的前提下适当提高可清除自由基的物质的含量, 对提高啤酒风味稳定性非常有益。

参考文献:

[1] KANEDA H, KANO Y, KAMIMURA M. A study of beer staling using chemiluminescence analysis[J]. J Inst Brew, 1991, 97: 105-109.

- [2] KANEDA H, KANO Y. Free radical reactions in beer during pasteurization[J]. International Journal of Food Science and Technology, 1994, 29: 195-200.
- [3] UCHIDA M, SUGA S, ONO M. Improvement for oxidative flavor stability of beer - Rapid prediction method for beer flavor stability by electron spin resonance spectroscopy[J]. J Am Soc Brew Chem, 1996, 54: 205-211.
- [4] UCHIDA M, SUGA S, ONO M. Technological approach to improve beer flavor stability: analysis of the effect of brewing processes on beer flavor stability by the ESR method[J]. J Am Soc Brew Chem, 2000, 58: 8-13.
- [5] MOGENS L, ANDERSERN, OUTTRUP H, et al. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping[J]. Agricultural Food Chemistry, 2000, 48: 3106-3111.
- [6] NIKOLAI M, KOCHERGINSKY, KOSTETSKI Y Y, et al. Use of nitroxide spin probes and ESR for assessing reducing power of beer Role of SH group[J]. Journal Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(4): 1052-1057.
- [7] 许申鸿, 杭瑚. 一种筛选自由基清除剂的简便方法[J]. 中草药, 2000, 31(2): 96-97.
- [8] 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.
- [9] 彭长连, 陈少薇, 林植芳, 等. 用清除有机自由基DPPH法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 658-661.