

发酵酱油色素的提取及性质研究

郭彩华¹, 陈昭华¹, 孙莉萍², 卢珍华¹, 杨秋明¹

(1.集美大学生物工程学院,福建厦门 361021;
2.厦门夏商淘化大同调味品有限公司,福建厦门 361000)

摘要:用有机溶剂从生抽酱油中提取酱油色素,研究其理化性质。结果表明:酱油色素的得率为17.8g/100mL,其为棕褐色带有浓郁酱香味的固体物。紫外和红外光谱扫描结果显示酱油色素是美拉德反应和酶促褐变的产物。酱油色素容易被H₂O₂氧化,而亚硫酸钠、蔗糖、苯甲酸钠和山梨酸钾对色素的影响很小,说明酱油色素稳定性良好。色素对DPPH自由基的清除能力可达88%,对羟基自由基的清除能力达80%,抑制亚硝胺合成的抑制率可达80%。

关键词:生抽酱油,色素,DPPH自由基,亚硝胺

Research of extraction and property of melanin from fermented soy sauce

GUO Cai-hua¹, CHEN Zhao-hua¹, SUN Li-ping², LU Zhen-hua¹, YANG Qiu-ming¹

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. Xiamen Seashine Kusu Condiment Co., Ltd., Xiamen 361000, China)

Abstract: The melanin was extracted from light fermented soy sauce by organic solvent, and its physical and chemical properties were studied. Results showed that 17.8g soy sauce melanin could be obtained from 100mL uncooked soy sauce, and it was a chocolate brown solid with a rich sauce flavor. UV-Vis and infrared spectra revealed that the soy sauce melanin was products of the Maillard reaction and enzymatic browning. The melanin could be oxidized easily by H₂O₂. But Na₂SO₃, sucrose, sodium benzoate and potassium sorbate had little effect on it, soy sauce melanin had a good stability. Scavenging effect of the melanin on DPPH free radicals and on hydroxyl free radicals were 88% and 80%, respectively. Blocking action on synthesis of nitrosamine was up to 80%.

Key words: light fermented soy sauce; melanin; DPPH free radical; nitrosamine

中图分类号:TS264.2⁺¹

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)10-0157-05

酱油的功效物质主要有蛋白类黑素、呋喃酮、黄酮类物质、无盐固体物等。Kataoka等在研究日本酱油时发现,其含有多种呋喃酮及蛋白类黑素物质,这些成分具有很好的自由基清除活性及抗癌活性^[1]。张水华等报道了酿造酱油在模拟胃液pH及温度条件下具有消除过氧化基的能力,对H₂O₂消除量的相关程度依次为:无盐固体物>总酸>氨基态氮>总氮,无盐固体物含量与H₂O₂消除量之间的相关值最大^[2]。Moon等人在分析29种不同的酱油样品之后,认为酱油的褐色度与抗氧化能力之间存在相关性,类黑精等色深物质是酱油抗氧化的重要成分^[3]。李莹等在分析了41个酱油样品后,认为自由基清除能力与色深物质含量之间有明显的相关性,色深物质含量与自由基清除效率成较强的线性关系,说明色深物质是酱油清除DPPH自由基的主要的成分^[4]。从现有的资料看,酱油的功效物质主要是色深物质,或称为色素的物质,但是到目前为止国内对酱油色

素的提取分离,将其作为功能性成分并得到应用的报道极少。本研究以生抽酱油为原料,有机溶剂沉淀法提取色素并对其性质进行研究,进而为酱油色素的应用提供可参考的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

生抽酱油 厦门夏商淘化大同调味品有限公司,按SB/T10312-1999高盐稀态发酵酱油酿造工艺流程酿造:简言之,以大豆、面粉、麸皮为主要原料,经过蒸料、制曲、发酵(3个月)、淋罐、出油等工序得到的生酱油;二苯基苦基苯阱(DPPH) Sigma公司;邻二氮菲、 α -萘胺、对氨基苯磺酸、二甲胺、亚硫酸钠等均为国产分析纯。

FT/IR-400/600型傅立叶变换红外光谱仪 JASCO日本分光公司;CARY50型紫外可见分光光度计 美国瓦里安(Varian)公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酱油色素的沉淀提取工艺 生抽酱油→加入无水乙醇→得到下层深棕色粘稠状固体→加入丙酮→沉淀物→无水乙醇和丙酮轮流洗涤三次,挥发溶剂→固体物→干燥→酱油色素。

提取工艺的关键点是无水乙醇沉淀,具体操作

收稿日期:2011-08-29

作者简介:郭彩华(1963-),女,硕士,副教授,主要从事食品生物化学方面的研究。

基金项目:福建省教育厅科技项目(JA09155)。

为:常温下将酱油和无水乙醇以1:1.75(V:V)比例混匀,静置24h。下层深棕色粘稠状固体和丙酮以1:1(W:V)处理。

1.2.2 酱油和色素基本成分的测定 总氮的测定:凯氏定氮法^[5];总糖含量的测定:直接滴定法^[5];氯化钠含量测定:采用GB/T 5009.39-2003酱油卫生标准的分析方法(食盐含量的测定)。

1.2.3 酱油色素的理化性质研究

1.2.3.1 色素的光谱性质 将酱油色素配制成不同质量浓度的水溶液,用CARY50紫外可见分光光度计,在室温下以纯水做基线校正,于200~1000nm波长范围内进行光谱扫描。酱油色素3mg用300mg KBr压片后做红外光谱扫描,范围为4000~400cm⁻¹。

1.2.3.2 色素的稳定性实验 根据文献[6]和[7]的报道,黑色素的含量与400nm处的光密度值成线性关系,因此,色素稳定性实验中以400nm下测得的光密度变化值表示其变化程度。

分别吸取10mL 10g/L酱油色素溶液置于多个50mL容量瓶中,用不同质量分数的过氧化氢(氧化剂)溶液,或是不同质量浓度的亚硫酸钠(还原剂)溶液,或是不同质量浓度的蔗糖溶液、苯甲酸钠溶液和山梨酸钾溶液,稀释至刻度,充分混匀。另吸取10mL纯水置于50mL容量瓶中,用相应溶液稀释至刻度作为参比溶液。除过氧化氢实验在室温避光放置1、2、3h外,其它的实验在室温避光放置1、2、3、4d,测定400nm光密度值。

1.2.3.3 色素对DPPH自由基清除活性的研究 色素对DPPH自由基清除活性按文献[8]介绍的方法做一定的修改后进行。精确移取2.00mL待测的酱油色素溶液置于10mL试管中,加入2.00mL 0.16mmol/L DPPH 95%乙醇溶液,使总体积为4.00mL,摇匀,室温放置30min后,记录517nm光密度值为A_i。根据公式得样品清除率。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

式中,A_i-2mL DPPH溶液和2mL酱油色素溶液的光密度值;A_j-2mL酱油色素溶液和2mL 95%乙醇的光密度值;A₀-是2mL DPPH溶液和2mL水的光密度值。

1.2.3.4 色素清除羟自由基能力实验 采用亚铁离子催化过氧化氢产生羟自由基(Fenton反应)方法^[9-10]。取0.75mmol/L邻二氮菲溶液1mL,0.2mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)2mL和纯水1mL,充分混匀后,加0.75mmol/L硫酸亚铁1mL,立刻混匀,加入质量分数0.01%的过氧化氢1mL,于37℃保持60min,于536nm处测光密度值,其值为A_p。用质量分数30%乙醇1mL代替1mL过氧化氢,测得光密度值A_s。取不同质量浓度的酱油色素溶液1mL代替1mL纯水,测得其光密度值为A_s。(以1mL纯水代替1mL硫酸亚铁作为参比)。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_s - A_p}{A_s - A_p} \times 100\%$$

1.2.3.5 色素抑制亚硝胺合成实验 取14个25mL容量瓶,分为两组(每组7个),吸取不同量的酱油色

素溶液,加入pH=3.0的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液10mL,其中一组加入1mmol/L的NaNO₂溶液1.0mL和1mmol/L的二甲胺溶液1.0mL,另一组不加作为参比溶液,用纯水稀释至刻度,在37℃下恒温1h。然后按文献[11]所描述的紫外光解法操作,在525nm处测光密度值A_x。同时以纯水替代酱油色素溶液做空白实验测A₀。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 酱油色素的提取结果

100mL生抽酱油经乙醇、丙酮沉淀后,可得(17.8±1.05)g酱油色素,其为棕褐色带有浓郁酱香味的固形物。酱油及色素的基本营养成分比较见表1。

表1 酱油及酱油色素的基本营养成分比较(n=3)

Table 1 The comparison of basic nutritional content of soy sauce and melanin (n=3)

样品	全氮(g)	总糖(g)	氯化钠(g)
酱油(100mL)	2.21 ± 0.01	15.55 ± 0.03	21.65 ± 0.01
酱油色素(100g)	3.98 ± 0.02	18.74 ± 0.07	26.17 ± 1.05

2.2 酱油色素的光谱特征

酱油色素紫外可见吸收光谱结果如图1所示,说明色素在紫外波长下有吸收,最大吸收峰在215nm处。根据图1(B)中的多个吸收峰,可以推测酱油色素含有美拉德反应高级阶段产生的大量活性小分子物质,如酮类和醛类衍生物^[12]。

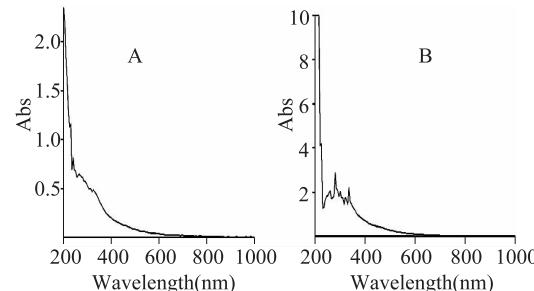


图1 酱油色素在200~1000nm的吸收光谱

Fig.1 UV-Vis spectrum of melanin from 200nm to 1000nm

注:A:p(酱油色素)0.5 g·L⁻¹;B:p(酱油色素)1.2 g·L⁻¹。

酱油色素的红外光谱图见图2,可获得的结构信息:3412.42cm⁻¹宽而强的吸收峰是由分子间多聚缔合的O-H和N-H伸缩振动产生的;在2925cm⁻¹附近的弱吸收峰是C-H伸缩振动产生的;1624cm⁻¹是由C=O变形振动伯酰胺、C=C共轭伸缩振动、芳环上C=C骨架伸缩振动等产生;1384cm⁻¹是由脂肪族和脂环族中CH₃对称变形振动产生;1079cm⁻¹是由C-O伸缩振动、脂肪C-O-C不对称伸缩振动等产生。3400cm⁻¹和1630cm⁻¹附近强吸收是吲哚基团^[13]。酱油色素的红外光谱图与天然黑色素^[14]的很相似,天然黑色素主要来自酶促褐变,是酪氨酸酶催化酪氨酸成多巴,多巴再被氧化成多巴醌,再经过一系列聚合反应而形成。酱油色素的紫外和红外光谱特征说明了发酵酱油中的色素来自生产过程中的美拉德反应和酶促褐变。

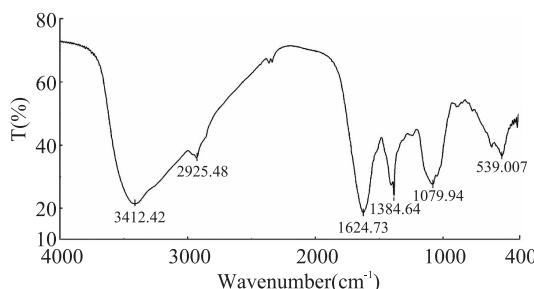


图2 酱油色素的红外吸收光图谱

Fig.2 Infrared spectroscopy of soy sauce melanin

2.3 酱油色素的稳定性

2.3.1 对氧化剂的稳定性 由图3可知,随着过氧化氢质量分数的增大以及反应时间的延长,光密度值逐渐变小,且变化较明显,说明过氧化氢对酱油色素有漂白作用。导致这种现象的原因可能是过氧化氢会将酱油色素中作为辅色基团的酚羟基氧化,从而使溶液颜色减弱,甚至褪色。

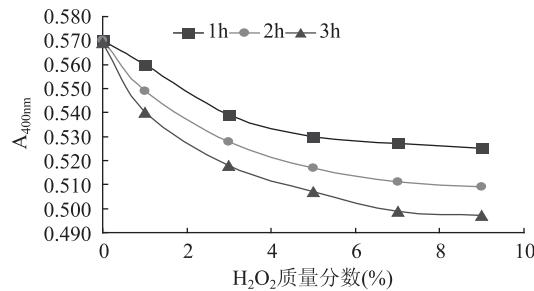


图3 过氧化氢对酱油色素稳定性的影响

Fig.3 Effect of H_2O_2 on stability of melanin

2.3.2 对还原剂的稳定性 由图4可知,随着亚硫酸钠质量浓度的增大,光密度值逐渐变大;随着反应时间的延长,光密度值有所减小。但是变化幅度很小,最大值为0.675,最小值为0.643,差值仅为0.032。因此可以认为,亚硫酸钠对酱油色素有一定的增色作用,但两者间并不发生化学反应。

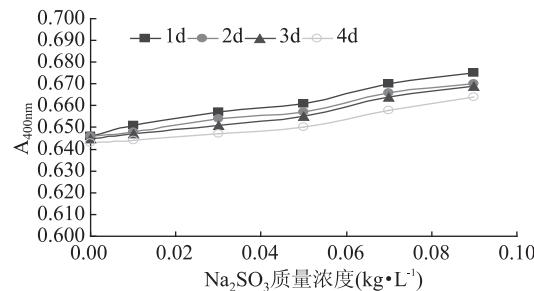


图4 亚硫酸钠对酱油色素稳定性的影响

Fig.4 Effect of Na_2SO_3 on stability of melanin

2.3.3 对蔗糖的稳定性 由图5可知,随着蔗糖质量浓度的增大以及反应时间的延长,光密度值逐渐减小,但是变化幅度很小,最大值为0.577,最小值为0.551,差值仅为0.026。因此可以认为,蔗糖对酱油色素没有影响。

2.3.4 对防腐剂的稳定性 由图6可知,随着苯甲酸钠质量浓度的增大以及反应时间的延长,光密度值变化非常小,最大值为0.693,最小值为0.687,差值仅

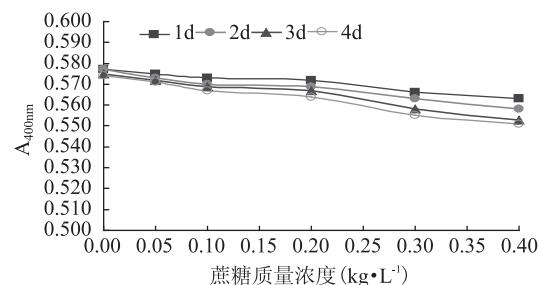


图5 蔗糖对酱油色素稳定性的影响

Fig.5 Effect of sucrose on stability of melanin

为0.006,说明苯甲酸钠对酱油色素没有影响。由图7可知,山梨酸钾对色素的影响稍大,但光密度的差值也只有0.02。

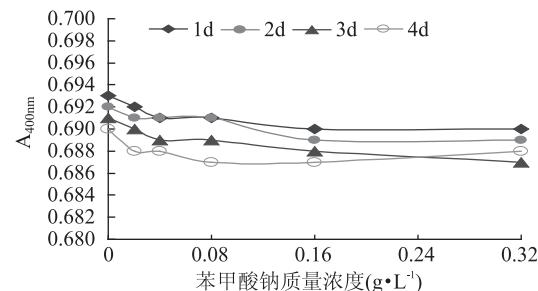


图6 苯甲酸钠对酱油色素稳定性的影响

Fig.6 Effect of sodium benzoate on stability of melanin

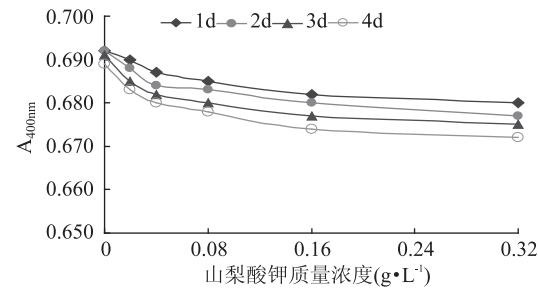


图7 山梨酸钾对酱油色素稳定性的影响

Fig.7 Effect of potassium sorbate on stability of melanin

2.4 酱油色素的功能

2.4.1 色素对DPPH自由基的清除能力 DPPH⁺在乙醇溶液中是一种稳定的自由基,被广泛用于检测各种样品的自由基清除能力。从图8可看出,随着色素浓度增加,对DPPH⁺的清除能力增强。当色素浓度到达一定值之后,清除率不再增加,清除率最高可达88%。目前普遍认为黑色素对DPPH自由基的清除作用可能是通过直接的还原作用把电子与质子传递给DPPH自由基氮原子上的单电子生成DPPH₂,或是直接捕获DPPH自由基所致,酱油色素来自生产过程中的美拉德反应和酶促褐变,其成分复杂,具备发生上述两种作用的结构基础。

2.4.2 色素清除羟自由基的能力 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系产生的·OH将邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} ,使邻二氮菲- Fe^{2+} 对536nm波长的最大吸收减弱,光密度值降低。当反应体系中存在·OH清除剂时,氧化过程受抑制,光密度值降低不明显,通过光密度值可以比较·OH清除剂的清除能力。

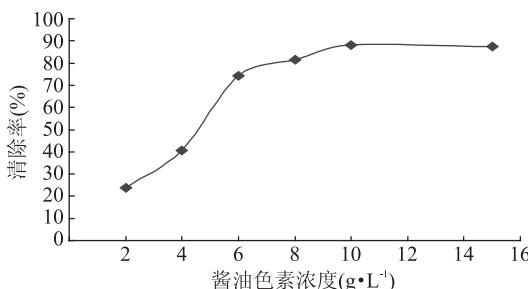


图8 色素对DPPH·自由基的清除作用

Fig.8 Scavenging effects of the melanin
on DPPH free radical

由图9可知,酱油色素对·OH自由基的清除能力随着色素浓度的增大而逐渐增大,在质量浓度为1.0~5.0g/L范围内,酱油色素质量浓度与清除率之间呈良好的线性相关关系, $y = 15.35x + 1.65$ ($R^2 = 0.9831$)。这种线性量效关系与文献报道的相一致^[4,15]。实验获得的清除率达81.8%。

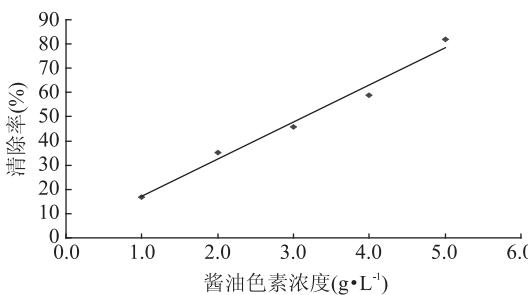


图9 酱油色素对羟基自由基的清除率

Fig.9 Scavenging activity of the melanin
on OH free radical

2.4.3 色素抑制亚硝胺合成的能力 亚硝胺可引起人和动物的胃、肝脏等多种器官的恶性慢性肿瘤,阻断或减少亚硝胺的生成是预防肿瘤发生的一个重要措施。二甲胺与NaNO₂在模拟人体胃液的条件下(pH 3.0, 37℃)下,可生成二甲基亚硝胺(NDMA)。实验中先加入酱油色素溶液,再依次加入亚硝酸钠与二甲胺时,色素溶液优先同亚硝酸钠作用,使得二甲胺不能与亚硝酸钠反应,以达到阻止亚硝胺生成的目的。

色素对NDMA合成的阻断作用结果见图10。由图10可知,色素加入量在2.8g/L之前,随着加入量的增加,色素对亚硝胺合成的抑制率逐渐增大,说明在模拟人体胃液的条件下,酱油色素可有效地阻断亚硝胺的合成。但当加入量超过2.8g/L时,其对亚硝胺合成的阻断率下降至80%,这可能是由于酱油类黑素中含有黄酮类物质^[4],而黄酮浓度过高时,容易发生自身氧化聚合,而导致活性降低。

3 结论

生抽酱油通过乙醇丙酮沉淀,挥发溶剂后的固体物为酱油色素,得率为17.8g/100mL。紫外和红外光谱扫描结果显示酱油色素是美拉德反应和酶促褐变的产物。酱油色素容易被H₂O₂氧化,而亚硫酸钠、蔗糖、苯甲酸钠和山梨酸钾对酱油色素的影响很小。酱油色素对DPPH自由基的清除能力可达88%,对羟基自由基的清除能力达80%,对亚硝胺合

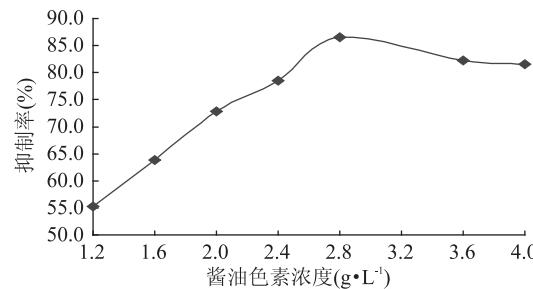


图10 酱油色素对亚硝胺合成的抑制作用

Fig.10 The inhibition of the melanin
on synthesis of nitrosamine

成的抑制率可达80%。

由此说明,酱油色素可以作为固体酱油、食用色素、自由基清除剂以及亚硝胺合成抑制剂等被广泛开发和利用。我国是酱油生产的发源地,有着丰富的酱油资源和进行酱油深加工的条件和基础,并且通过对酱油的深加工可以提高生产企业的经济效益。

参考文献

- [1] Kataoka S, Liu W, Albright K, et al. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia and reduction of H₂O₂ concentration in human polymorphonuclear leucocytes by flavour components of Japanese-style fermented soy sauce [J]. Food and Chemical Toxicology, 1997, 35(5):449-457.
- [2] 张水华,罗瑞山,陈艳,等.酱油对活性自由基的消除作用研究[J].中国调味品,1996(9):12-14.
- [3] Moon G, Lee M, Lee Y, et al. Main component of soy sauce representing antioxidative activity [J]. International Congress Series, 2002, 1245:509-510.
- [4] 李莹,刘敏,崔春,等.酱油抗氧化能力评价及聚类分析[J].食品与发酵工业,2008,34(1):14-19.
- [5] 杨月欣.实用食物营养成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,2007:41-42,63-64,45-48.
- [6] 郑晨娜,方柏山,罗菊香,等.链霉菌G-HD-4产黑色素的提取及理化性质[J].华侨大学学报:自然科学版,2009,30(3):292-296.
- [7] 曹志艳,董金皋,杨胜勇,等.玉米大斑病菌黑色素的一些理化性质和光谱吸收特征[J].植物病理学报,2007,37(4):410-417.
- [8] Wang BS, Li BS, Zeng QX, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater[J]. Food Chemistry, 2008, 107:1198-1204.
- [9] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等.邻二氮菲-Fe²⁺氧化法检测H₂O₂/Fe²⁺产生的羟自由基[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(6):553-555.
- [10] 谢贞建,赵超群,邹联柱,等.普洱茶多酚的提取及抗氧化作用研究[J].食品与机械,2009,25(1):64-67.
- [11] 袁毅骅,陈忻,陈纯馨,等.柚皮提取物对亚硝化反应抑制作用的研究[J].化学世界,2004(1):26-28.
- [12] Hodge J E. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1953, 1(15):928-943.
- [13] 朱淮武.有机分子结构波谱解析[M].北京:化学工业出

充氮处理对荔枝酒氧化褐变的影响研究

丁娟¹, 詹华丽¹, 李学伟^{1,2}, 胡嘉良¹, 林婉欣¹, 杨幼慧^{1,*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642;

2. 李锦记(新会)食品有限公司, 广东江门 529156)

摘要:为减少荔枝酒贮藏过程中的氧化褐变,本实验对荔枝酒采用充氮封瓶处理,通过测定相关指标,并结合HPLC分析,发现经充氮处理的荔枝酒褐变指数A₄₂₀和酚类物质相对聚合度分别较对照(未充氮)下降了46.3%和26.8%,而总酚损失减少,其中(-)-表儿茶素、原花青素B₂、绿原酸及芦丁的损失分别比对照(未充氮)减少了49.5%、31.1%、22.6%和23.2%,说明充氮处理通过减少荔枝酒中的溶解氧,减少了酚类物质的氧化聚合程度,从而在一定程度上延缓了荔枝酒的褐变。

关键词:荔枝酒, 氧化褐变, 氮气, 贮藏

Effect of nitrogen treatment on oxidative browning of litchi wine

DING Juan¹, JIAN Hua-li¹, LI Xue-wei^{1,2}, HU Jia-liang¹, LIN Wan-xin¹, YANG You-hui^{1,*}

(1. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2. Lee Kum Kee(Xinhui) Foods Co., Ltd., Jiangmen 529156, China)

Abstract: To reduce the oxidative browning in litchi wine during storage, the litchi wine was treated with nitrogen in this experiment, by measuring the relevant indicators and combining with HPLC analysis, it was found that the browning index A₄₂₀ and the relative degree of polymerization of phenols of litchi wine treated with nitrogen fell by 46.3% and 26.8% respectively compared with the control (without nitrogen), while the loss of total phenol content decreased, in which the loss of (-)-epicatechin, procyanidins B₂, chlorogenic acid and rutin declined by 49.5%, 31.1%, 22.6% and 23.2%, respectively. It showed that nitrogen treatment could reduce the degree of oxidation of phenolic compounds by reducing the dissolved oxygen in wine, thereby delayed the browning of litchi wine to a certain extent.

Key words: litchi wine; oxidative browning; nitrogen; storage

中图分类号: TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)10-0161-05

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)为我国南方特有水果,其果肉柔嫩多汁,含较高糖分、适量有机酸以及多种氨基酸,风味独特,誉为果中珍品^[1]。近年来,广东省荔枝加工业发展迅速,荔枝酒因其酒度低、酒色柔和、酒质温和、爽口和果香浓郁、营养价值高等特点,正受到越来越多国内外消费者的亲睐和喜爱,对于开发我国特色资源有非常广阔前景^[2]。但荔枝酒极易发生氧化褐变,保质期短,通常瓶贮一年后酒

收稿日期: 2011-08-22 * 通讯联系人

作者简介: 丁娟(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程。

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-33); 广东省科技计划项目(2008B021100019); 2005粤港关键领域重点突破项目(20054983); 广东省省级财政支持技术改造项目(GMTC044046-5)。

出版社, 2005: 38-54, 65-67, 245-254.

[14] 陆懋荪, 尹佩玉, 容蓉, 等. 黑芝麻黑色素的化学结构研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 91-94.

体色泽开始发暗,荔枝风味逐渐变淡,出现氧化苦味,对酒的感官品质产生严重影响,甚至丧失其商品价值,成为荔枝酒产业发展的瓶颈^[3]。果酒氧化褐变是影响果酒品质的突出问题^[4],因此,在果酒生产上,防止其氧化褐变显得尤为重要。防止果酒褐变的方法有很多种^[5],如减少氧化底物、降低溶解氧浓度、改变催化氧化的条件、添加合适的抗氧化剂;其中利用惰性气体(N₂)阻隔果汁和果酒与氧气的接触是多年来实践证明的一项有效方法^[6-7]。但是,目前对于荔枝酒褐变的研究主要集中在减少氧化底物和添加抗氧化剂方面,对添加惰性气体防止其褐变的研究未见报道,本文对荔枝酒进行充氮瓶贮处理,以探讨氮气对荔枝酒贮藏期间氧化褐变的影响,为减少荔枝酒褐变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

[15] 叶明, 许庆平, 陈晓, 等. LachnumYM-223产黑色素发酵及其黑色素抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 185-189.