

# 淡色啤酒类黑精的分离及抗氧化活性评价

郑金德<sup>1</sup>, 孙美侠<sup>2</sup>, 姚记威<sup>1</sup>, 赵海锋<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州中储粮粮油质监中心, 广东广州 510800)

**摘要:** 本文采用超滤结合大孔吸附树脂分离啤酒中的类黑精, 并采用 ABTS 自由基阳离子清除活性和还原力评价其抗氧化活性。研究表明: 大分子超滤组分 (>10 ku) 得率和类黑精含量低, 抗氧化活性弱, 而小分子超滤组分 (<10 ku) 呈现出分子量越小, 得率、类黑精含量和抗氧化活性越高的趋势, 其中分子量<3 ku 的 UF4 组分得率、类黑精含量和抗氧化活性均最高。UF4 组分经大孔吸附树脂富集后洗脱为三个不同极性组分 (D1>D2>D3), 其中 D1 组分得率最高, 约占 UF4 的 94%, 虽然 D3 组分得率不足 1%, 但其类黑精相对含量最高。D2 组分 ABTS 清除活性和还原能力均最高, 而 D1 组分抗氧化活性极弱。因此, 啤酒中抗氧化活性最高的类黑精主要集中在分子量小于 3 ku 的组分中, 经大孔树脂层析后, 20%乙醇洗脱部分具有最强的抗氧化活性。

**关键词:** 啤酒; 类黑精; 分离; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2017)10-127-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.019

## Separation and Antioxidant Activity Evaluation of Melanoidins from Lager Beer

ZHENG Jin-de<sup>1</sup>, SUN Mei-xia<sup>2</sup>, YAO Ji-wei<sup>1</sup>, ZHAO Hai-feng<sup>1</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Sinograin Quality Supervision Center, Guangzhou 510800, China)

**Abstract:** The antioxidant activity of melanoidins isolated from beer by ultrafiltration and macroporous resin chromatography was evaluated by measuring their 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity and reducing power. The results showed that fraction with high molecular weight (>10 ku) exhibited low yield and melanoidins content as well as weak antioxidant activity, while the lower molecular weight of fractions possessed the higher yield, melanoidins content and antioxidant activity. The UF4 fraction (<3 ku) had the highest yield, melanoidins content and antioxidant activity. The UF4 fraction was separated into 3 fractions with different polarity (D1>D2>D3) by macroporous resin chromatography. The D1 fraction which had the highest yield accounted for almost 94% of the UF4, while the D3 fraction represented less than 1% but showed the highest melanoidins content. The D2 fraction had the strongest ABTS radical scavenging activity and reducing power, whereas D1 showed very weak antioxidant activity. Therefore, the present results indicated that melanoidins with the strongest antioxidant activity existed in UF4 fraction (<3 ku), and could be isolated from beer by macroporous resin chromatography with 20% ethanol elution.

**Key words:** beer; melanoidins; isolation; antioxidant activity

美拉德反应产物是一类由还原糖和氨基酸反应缩合而成的结构极其复杂的化合物。在其最终产物中包含一类棕褐色的含氮物质: 类黑精<sup>[1]</sup>。在模拟体系中, 人们对于类黑精的结构已经给出各种不同的陈述<sup>[2-4]</sup>。然而类黑精的结构取决于反应物的种类、浓度和反应条件, 因此, 食品体系中的类黑精要比模拟体系中更

收稿日期: 2017-04-06

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A010105003); 国家自然科学基金项目 (31571821); 广东省自然科学基金项目 (2014A030313227)

作者简介: 郑金德 (1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 啤酒风味稳定性  
通讯作者: 赵海锋 (1977-), 男, 副研究员, 主要从事食品生物技术方面研究

加复杂, 种类更加繁多, 不同结构类黑精可能共同存在同一食品中<sup>[5]</sup>。近来有研究表明酚类物质可以以非共价键形式连接到类黑精中<sup>[6,7]</sup>, 但目前普遍认为类黑精是一类具有相似荷质比, 结构非常接近的复杂混合物<sup>[8]</sup>。

类黑精的抗氧化作用目前备受关注。研究主要集中在不同模型体系中的类黑精以及各种食品中分离出的类黑精, 比如咖啡和烘焙大麦等。这些研究表明, 各个反应条件下发生的美拉德反应, 其生成的棕色产物分别表现出各种不同的功能活性和生物特性, 如抗菌、抗癌、解毒活性以及体外抗氧化保护作用等<sup>[9]</sup>。

在啤酒生产过程中, 包括麦芽焙焦阶段, 糖化和

煮沸阶段都会发生美拉德反应,生成一系列美拉德反应产物<sup>[10]</sup>。啤酒中类黑精具有较强的抗氧化活性和清除自由基能力,其对于啤酒的风味和色泽也具有重要作用<sup>[11]</sup>。目前,对于淡色啤酒中类黑精的研究较少,吴洪斌等<sup>[12]</sup>研究了类黑精含量与色度的关系,刘晓璠<sup>[13]</sup>和孙桂芳<sup>[11]</sup>在研究啤酒的抗氧化性时,初步研究了类黑精总含量与抗氧化性间的关系。然而这些研究都没有深入挖掘类黑精的性质与抗氧化活性间的关系。由于啤酒类黑精结构复杂,对于其具体分子结构、性质及其功能机理尚知之甚少。因此,阐明啤酒类黑精的结构和抗氧化活性,探讨其对啤酒稳定性的作用具有重要意义。本文采用超滤结合大孔吸附树脂分离啤酒中的类黑精,并评价不同组分的抗氧化活性,以期揭示类黑精调控啤酒风味稳定性的作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

三种国产淡色啤酒(原麦汁浓度 8~10 °P,酒精度 2.5~3.6%,原料:麦芽、大米、糖浆和酒花)购自广州某超市;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、水溶性维生素 E (Trolox),美国 Sigma 公司;大孔树脂 D101 及其他试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器设备

UV-2100 紫外可见分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;超滤设备,Millipore 有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 超滤分离

量取 900 mL 啤酒,依次使用截留分子量为 10 ku、5 ku 和 3 ku 的超滤膜进行超滤分级,每个膜重复回流 5 次,依次得到 4 个组分:UF1>10 ku、5 ku<UF2<10 ku、3 ku<UF3<5 ku 和 UF4<3 ku。对各组分以及 100 mL 原啤酒 UF0 冻干称重,计算收得率,干燥保存。

#### 1.3.2 大孔树脂层析色谱分离

将大孔树脂 D101 按照填料使用说明进行预处理,并装填于 2.6×60 cm 层析柱中。取 20.0 g 冻干样品 UF4 溶于 30 mL 蒸馏水中,湿法上样。配置浓度梯度为 0、20% 和 40% 的乙醇溶液进行梯度洗脱,流速为 2.5 mL/min,在 420 nm 波长下检测吸光值。分别收集各梯度洗脱液并冻干称重,得到 3 个组分: D1、D2 和

D3,冻干称重,计算收得率,干燥保存。

#### 1.3.3 色度分析<sup>[10]</sup>

将冻干的啤酒及其各分离组分配成 0.02 g/mL 的水溶液,稀释适当的倍数,于 420 nm 处测其吸光值,结果用 EBC 值表示:  $EBC = A_{420} \times 25 \times \text{稀释倍数}$ 。

#### 1.3.4 类黑精含量<sup>[14]</sup>

样品中类黑精含量通过葡萄糖和甘氨酸模式反应所得类黑精标准品测得。类黑精标准品的制备:取 0.05 mol 葡萄糖和甘氨酸溶于 100 mL 水中,溶液冻干至恒重,将冻干的混合物放在烘箱中 125 °C 烘烤 2 h,然后在干燥皿中冷却至常温。把所得棕色物质研磨粉碎,取 5 g 粉末于 200 mL 水中,4 °C 搅拌 1 h 后过滤,滤液冻干,干燥保存。配置 0~10 mg/L 浓度梯度的上述标准品,测其 345 nm 处吸光值,制成标准曲线。测量适当浓度样品在 345 nm 处吸光值,通过标准曲线算得样品中类黑精含量。

#### 1.3.5 ABTS 阳离子自由基清除活性<sup>[15,16]</sup>

将浓度为 14 mmol/L 的 ABTS 溶液与浓度为 4.9 mmol/L 的过硫酸钾溶液等体积混合,室温下放置 12 h 后得 ABTS 自由基阳离子储备液,将其在 734 nm 波长下稀释至吸光值为 0.7±0.02,取 2.9 mL 稀释液与 0.1 mL 适当浓度样品混合,于 30 °C 反应 20 min,之后于 734 nm 测其吸光值,根据公式计算清除率,依据标准曲线计算 Trolox 值,结果用 mmol Trolox 值/L (mmol TE/L) 表示。

$$\text{清除率} = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

$A_0$ : 空白组吸光值, A: 样品吸光值。

#### 1.3.6 还原力<sup>[15,17]</sup>

取 1 mL 适当浓度样品与 2.5 mL、0.2 mol/L 的 pH 6.6 的磷酸盐缓冲溶液和 2.5 mL、1% 铁氰化钾溶液混合,于 50 °C 条件下反应 20 min 后,加入 2.5 mL、10% 三氯乙酸溶液,混匀。之后取 2.5 mL 反应液,加入 0.5 mL、0.1% 三氯化铁溶液与 2.5 mL 蒸馏水,室温下反应 20 min 后,于 700 nm 波长下比色,结果依据标准曲线用 mmol 抗坏血酸值/L (mmol AAE/L) 表示。

#### 1.3.7 统计分析方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 超滤分离啤酒中的类黑精及抗氧化活性评价

#### 2.1.1 超滤各组分得率及类黑精含量

表1 超滤所得组分质量得率

Table 1 Mass yield of different fraction by ultrafiltration

得率/%	>10 ku (UF1)	5~10 ku (UF2)	3~5 ku (UF3)	<3 ku (UF4)	总含量
样1	14.69	5.44	32.39	45.77	98.29
样2	25.28	6.04	23.77	43.75	98.85
样3	19.70	5.79	39.66	30.18	95.34

将啤酒分为大于 10 ku 的大分子化合物和小于 10 ku 的小分子化合物分别来讨论<sup>[18,19]</sup>, 超滤后各组分得率见表 1。由表 1 可知, 3 种啤酒样品均以小于 10 ku 的低分子化合物为主, 约占总重量的 80%。低分子量部分中, UF2 得率最低, 只有 5%左右。UF4 部分得率最高, 是啤酒中含量最多的组分。大分子化合物 UF1 组分约占啤酒总量的 20%, 说明啤酒固形物主要是以小分子化合物形式存在。

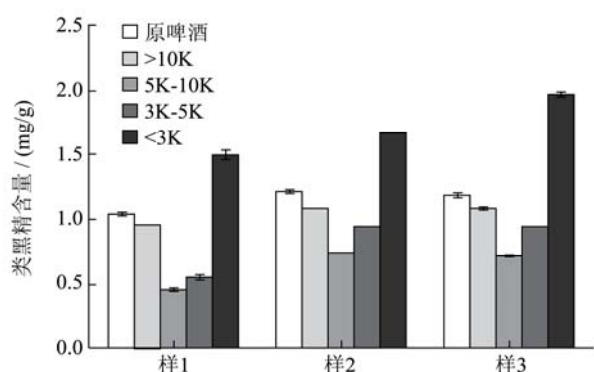


图1 原啤酒及超滤分离组分类黑精含量

Fig.1 The melanoidin content of beer and fractions by ultrafiltration

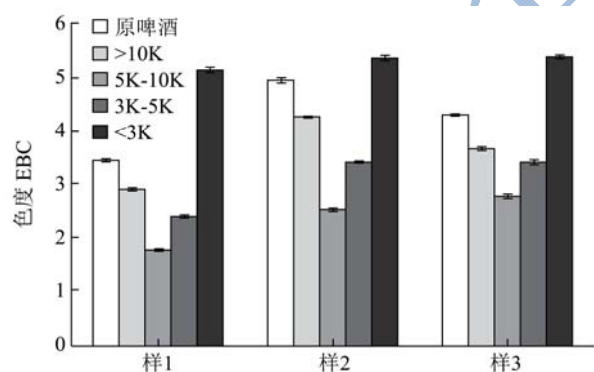


图2 原啤酒及超滤组分的色度

Fig.2 The color of beer and fractions by ultrafiltration

超滤各组分黑精含量如图 1 所示, UF1 组分类黑精含量相对较低, 且低于原啤酒中类黑精含量。在小于 10 ku 的低分子量组分中, 呈现出分子量越小, 类黑精含量越高的规律, 其中 UF4 类黑精含量最高, 也高于原啤酒 (UF0) 中类黑精含量。类黑精是在美拉德反应的最终阶段形成的聚合物, 在高温条件下, 小分子的有色基团大量聚合形成大分子类黑精<sup>[14,20,21]</sup>。淡色啤酒生产中所使用的麦芽焙焦温度较低,

导致类黑精的聚合程度低, 所以大分子类黑精含量较低, 而小分子类黑精含量较高。啤酒或麦汁的色度主要来源于焦糖化反应。从各组分的色度 (见图 2) 可以看出, 色度与类黑精含量呈现相似规律, 表现为 UF4 色度最高, 其次是原啤酒、UF1、UF3 和 UF2 色度最低, 说明 420 nm 吸光值与类黑精含量之间成显著的正相关性<sup>[22]</sup>。

### 2.1.2 不同分子量类黑精的抗氧化活性

原啤酒及超滤分级各组分的 ABTS 自由基清除活性和还原力分别见图 3 和图 4。

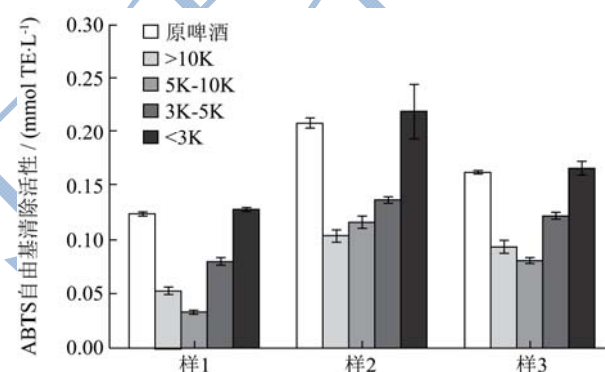


图3 原啤酒及超滤组分 ABTS 自由基清除活性 (0.01 g/mL)

Fig.3 The ABTS radical scavenging activity of beer and fractions by ultrafiltration (0.01 g/mL)

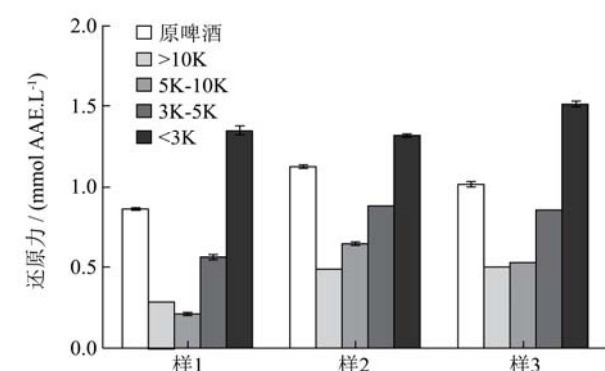


图4 原啤酒及超滤组分还原力 (0.01 g/mL)

Fig.4 The reducing power of beer and fractions by ultrafiltration (0.01 g/mL)

由图 3 和 4 可知, 啤酒超滤各组分均具有抗氧化活性, 大分子 UF1 抗氧化活性较低, ABTS 自由基清除活性及还原力均比 UF3 和 UF4 低。据文献报道<sup>[23]</sup>, 在烘焙程度高的焦香麦芽提取液中, 大分子的类黑精具有很强的自由基清除活性。而 Piggott 等<sup>[24]</sup>证明黑麦



芽的 DPPH 和 FRAP 自由基清除活性主要是大分子类黑精的作用，而在烘焙程度低的淡色麦芽中，起主要抗氧化作用的则是小分子类黑精。本研究所用啤酒均是淡色啤酒，啤酒大麦在制麦过程中焙焦程度低，导致类黑精聚合程度低，形成的大分子类黑精含量少，故其总体抗氧化活性低。

在小分子部分中，各组分 ABTS 自由基清除活性和还原力的大小顺序均为：UF2<UF3<UF4。呈现分子量越小抗氧化活性越高的规律。在所有组分中，UF4 的抗氧化活性最高。在咖啡中也有低分子物质具有很强的抗氧化性的报道<sup>[25]</sup>。

## 2.2 大孔树脂分离啤酒中的类黑精及抗氧化活性评价

### 2.2.1 不同极性组分的得率

表 2 不同极性组分质量得率

Table 2 Mass yield of the fractions with different polarity

得率/%	样 1	样 2	样 3
水系 (D1)	94.34	95.11	94.24
20%乙醇 (D2)	4.76	3.96	4.94
40%乙醇 (D3)	0.91	0.93	0.81

### 2.2.2 不同极性组分中类黑精含量

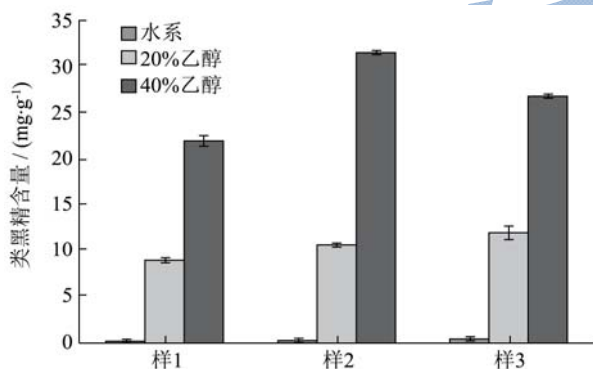


图 5 不同极性组分类黑精含量

Fig.5 The melanoidin content of the fractions with different polarity

选择低分子量中抗氧化活性最强的 UF4 组分采用大孔树脂进一步分离，分别使用水、20%和 40%乙醇溶液洗脱得 D1、D2 和 D3 三个组分，质量得率见表 2。由表 2 可知，由水洗脱的组分 D1 含量最高，占 94%左右。这是因为麦芽经糖化，酵母发酵后，产生了大量的低分子糖、蛋白水解物和发酵代谢产物，而这些大多是亲水性较高的极性化合物，所以很容易被水洗脱出来。20%乙醇洗脱液得到的组分 D2 占 4~5%左右，D3 含量不足 1%。说明啤酒中的固形物主要是由亲水性极强的物质组成，疏水性物质含量低。

由图 5 可知，D1 组分中的类黑精含量极少，几乎为零，说明啤酒中强极性的类黑精含量极少，水洗脱液主要以糖类居多。D2 组分中类黑精含量较高，大约为 10 mg/g。在所得三个组分中，D3 中类黑精含量最高，是 D2 的 2~3 倍。结合各组分的得率与类黑精含量可知，D2 中总的类黑精在 UF4 中含量最高，即 UF4 中的类黑精主要集中在 D2 组分中。啤酒低分子组分中，类黑精成分主要表现为非极性，而非类黑精成分主要表现为强极性，这一观点与咖啡低分子类黑精性质中观点一致<sup>[16]</sup>。

### 2.2.3 不同极性组分色度

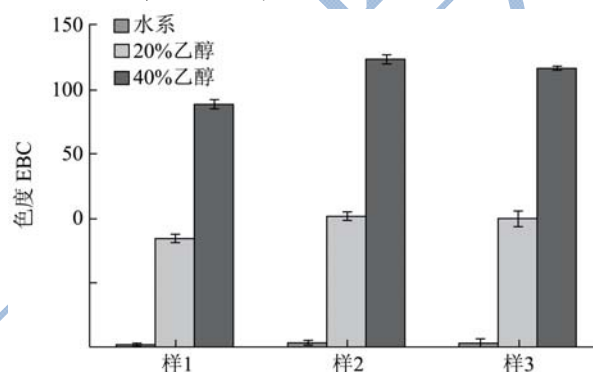


图 6 不同极性组分色度

Fig.6 The color of the fractions with different polarity

由图 6 可知，3 个组分的色度与类黑精含量极其相似，D1 组分色度最低，几乎为 0，D2 组分色度较高，D3 色度大约是 D2 的 2 倍，说明啤酒色度主要是由类黑精含量决定的。

### 2.2.4 不同极性组分抗氧化活性

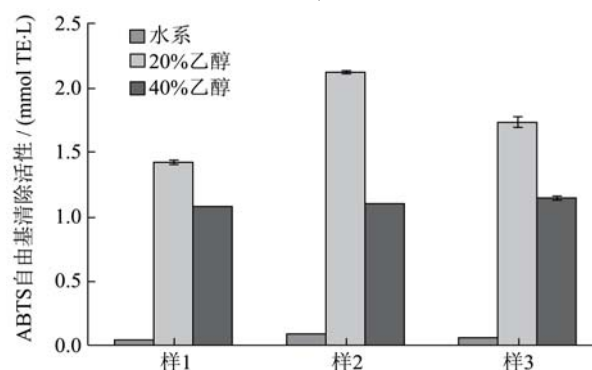


图 7 不同极性组分 ABTS 自由基清除活性 (0.01 g/mL)

Fig.7 The ABTS radical scavenging activity of the fractions with different polarity (0.01 g/mL)

由图 7 可知，啤酒中 D1 组分 ABTS 自由基清除活性最低，近乎为 0，而 D2 组分清除活性最高。由图 8 可知，各组分还原力与其 ABTS 自由基清除活性趋势一致，D1 组分还原力最低，D2 组分还原力最高，D3 组分还原力较 D2 组分要低，但比 D1 组分高 4~5 倍。尽管 D3 组分的类黑精含量比 D2 组分高，但抗氧

化性却比 D2 组分低,因此, D2 组分的活性最高,这也说明类黑精的抗氧化活性不仅取决于其含量,与其分子结构也具有重要关系。

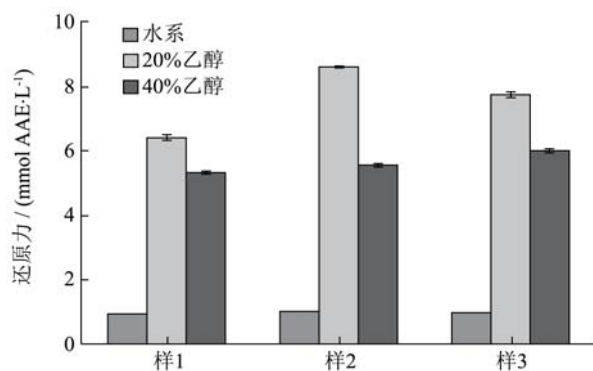


图 8 不同极性组分还原力 (0.01 g/mL)

Fig.8 The reducing power of the fractions with different polarity (0.01 g/mL)

### 3 结论

3.1 对 3 种淡色啤酒进行超滤分级,其中大分子组分 (>10 ku) 得率、类黑精含量和抗氧化活性均较低;小分子组分 (<3 ku) 得率、黑精含量和抗氧化活性均最高。

3.2 将活性最强的分子量<3 ku 组分进行大孔树脂层析色谱分离,得到极性由强到弱 3 个组分,其中水洗脱物得率最高,而 20%乙醇洗脱部分抗氧化活性最高。

3.3 类黑精是啤酒中重要的内源性抗氧化物质,通过超滤结合大孔树脂吸附可以高效分离啤酒中高抗氧化活性类黑精。

### 参考文献

- [1] 龚平, 阚建全. 美拉德反应产物性质的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 141-146  
GONG Ping, KAN Jian-quan. Study on properties of Maillard reaction products [J]. Food and Fermentation Industry, 2009, 35(4): 141-146
- [2] Tressl R, Wondrak G T, Garbe L A. Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(5): 1765-1776
- [3] Hofmann T. Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde. Chemical characterization of a red colored domain [J]. European Food Research and Technology, 1998, 206(4): 251-258
- [4] Cämmerer B, Walentina Jalyschko A, Kroh L W. Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(7): 2083-7
- [5] Adams A, Rosa C B, Vincenzo Fogliano A, et al. Thermal degradation studies of food melanoidins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10): 4136-42
- [6] Delgado-Andrade C, Morales F J. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1403-1407
- [7] D'agostina A, Boschin G, Bacchini F, et al. Investigations on the high molecular weight foaming fractions of espresso coffee [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(23): 7118-25
- [8] Wang H, Qian H, Yao W. Melanoidins produced by the Maillard reaction: structure and biological activity [J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 573-584
- [9] Langner E, Rzeski W. Biological properties of melanoidins: a review [J]. International Journal of Food Properties, 2014, 17(2): 344-353
- [10] Hellwig M, Witte S, Henle T. Free and protein-bound maillard reaction products in beer: method development and a survey of different beer types [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(38): 7234-7243
- [11] 孙桂芳. 啤酒抗氧化力和风味稳定性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014  
SUN Gui-fang. The study of antioxidant activity and flavor stability of beer [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014
- [12] 吴洪斌, 负建民, 李赟, 等. 不同干燥条件下麦芽色度与类黑精的关系研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(1): 130-133  
WU Hong-bin, YUN Jian-min, LI Bin, et al. Study on the relationship between malt color and melanoidins in different drying conditions [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2010, 45(1): 130-133
- [13] 刘晓璠. 啤酒的抗氧化活性研究[D]. 太原: 山西大学, 2012  
LIU Xiao-pan. Study on antioxidant activity of beer [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012
- [14] Carvalho D O, Correia E, Lopes L, et al. Further insights into the role of melanoidins on the antioxidant potential of barley malt [J]. Food Chemistry, 2014, 160(11): 127-133
- [15] 赵海锋. 啤酒抗氧化力与风味稳定性的研究-提高内源性抗氧化力及抑制反-2-壬烯醛形成的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008  
ZHAO Hai-feng. Study on antioxidant capacity and flavor stability of beer -improving endogenous antioxidant capacity

- and inhibiting the formation of anti -2- nonenal [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008
- [16] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [17] Oktay M, Gülçin İ, Küfrevioğlu Ö İ. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2003, 36(2): 263-271
- [18] Bekedam E K, Schols H A, van Boekel M A J S, et al. High molecular weight melanoidins from coffee brew [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7658-7666
- [19] Bekedam E K, Roos E, Schols H A, et al. Low molecular weight melanoidins in coffee brew [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(11): 4060-4067
- [20] Bekedam E K, Loots M J, Schols H A, et al. Roasting effects on formation mechanisms of coffee brew melanoidins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(16): 7138-7145
- [21] Coghe S, Adriaenssens B, Leonard S, et al. Fractionation of colored Maillard reaction products from dark specialty malts [J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2004, 62(2): 79-86
- [22] Brands C M J, Wedzicha B L, Van Boekel M A J S. Quantification of melanoidin concentration in sugar-casein systems [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(5): 1178-1183
- [23] Jehle D, Lund M N, Øgden L H, et al. Characterisation of a stable radical from dark roasted malt in wort and beer [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(2): 380-387
- [24] Piggott C O, Connolly A, FitzGerald R J. Application of ultrafiltration in the study of phenolic isolates and melanoidins from pale and black brewers' spent grain [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(10): 2252-2259
- [25] Nakamura-Takada Y, Shata H, Mino M, et al. Isolation of a zinc-chelating compound from instant coffee by the tetramethyl murexide method [J]. *LWT-food Science and Technology*, 1994, 27(2): 115-118