一种低度芡实酒理化功能性质分析

张　佘，　蔡华珍，　陈志宏，　何晓伟
（滁州学院 生物与食品工程学院，安徽 滁州 239000）

摘要：为充分利用芡实这一地方特产资源，拓宽其应用领域，将一定比例的芡实与糯米混合发酵，制备一种低度芡实酒，对其主要营养组分、酚类物质含量及其体外抗氧化特性进行了分析。结果显示，所得芡实新酒和陈酿1年的成熟酒中均含有丰富的蛋白质、必需氨基酸和总酚，风味浓郁，相关指标达到了一级半干型黄酒国家标准。HPLC分析显示，芡实酒中含有较丰富的多酚类物质，如没食子酸、阿魏酸、槲皮素和芦丁等。在陈酿期间，芡实新酒中的芦丁几乎全部转化为槲皮素。此外，芡实酒显示出很强的体外抗氧化活性和亚硝酸盐清除能力，这与其中丰富的还原糖和多酚含量密切相关。研究表明，所得芡实酒营养丰富、具有较强体外抗氧化活性。

关键词：芡实酒；多酚物质；抗氧化特性
中图分类号：TS 251.1　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)01—0092—06

Physicochemical and Functional Characteristics of the *Euryale ferox* Wines Fermented with Glutinous Rice

ZHANG Cuan，　*CAI Huazhen*，　*CHEN Zhihong*，　*HE Xiaowei*
（School of Biology and Food Engineering，Chuzhou University，Chuzhou 239000，China）

Abstract：In this manuscript，a kind of low-alcohol-content EF wines was produced by co-fermented EF seed kernel and glutinous rice in a specific ratio was developed. The major nutrients，polyphenol components in the EF wines and the antioxidant activities were also investigated. The results showed that high contents of protein，essential amino acids and total phenols were found in the new and aging EF wines，the wines，especially aging EF wine，have good flavor and some quality characters have reached a semi-dry rice wine national standards. The HPLC analysis results showed that four kinds of polyphenol components were identified form EF wines，such as gallic acid，ferulic acid，quercetin and rutin. During aging，the rutin in new EF wine was completely transformed into quercetin in aging EF wine. The EF wines all exhibited strong antioxidant activities and nitrite-scavenging capacities，and these activities may be closely related to the high contents of reducing sugar and polyphenols constituents in the EF wines. The results indicated that the EF wine is

收稿日期：2013-07-14
基金项目：安徽省高等学校省级自然科学研究项目(KJ2012B128)；滁州学院项目(2012kj006Z)。
作者简介：张　佘(1970—)，女，陕西泾阳人，工学博士，副教授，主要从事食品化学与营养学、功能食品研究。
E-mail：zhangchuan2005@126.com

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

nutritious and has strong antioxidant activity in vitro.
Keywords: *Euryle ferox* (EF) wine, polyphenol compounds, antioxidant properties

芡实是属于睡莲(*Nymphaeaceae*)族的一种水生植物芡(*Euryle ferox*,EF)的成熟种仁。芡实俗称鸡头米,在中国、印度、俄罗斯和日本等国家均有分布,是一种传统滋补食材。在印度,将芡实种仁加工成一种称为"Makhanna"的休闲食品,很受消费者的欢迎[1-2]。据《本草纲目》记载:芡实"味甘、涩,性平,无毒"。具有"补中益气,提神强志,耳目聪明"等功效[3]。芡实的诸多保健功能和膳食疗效也得到了许多现代研究的证实[4],Lee 等[5]研究发现,芡实提取物具有很高的游离基清除活性和抗脂质过氧化能力。Das 等[6]报道,"Makhanna"提取物具有潜在的活性氧清除活性和心脏保护功能。但是,现有研究均不能明确芡实中真正发挥生理保健功效的物质组分有哪些。

在中国、印度、日本和韩国等国,芡实主要作为一种传统中药材和保健食品使用,是一种很好的药食兼用材料。芡实中含有很低的脂类 (质量分数 0.1%),淀粉含量丰富(质量分数 78%~83%),蛋白质含量与谷类接近(质量分数 9.7%),此外,还含有丰富的矿物质,如锌(42.9~66.0 mg/kg)和铁(1 994~2 236 mg/kg)[3],其组成非常适宜于作为酿酒原料。

目前,保健酒的生产一般有两种方式,一种是将一定的保健材料浸泡在白酒中,以溶解其中的保健组分;另一种是将各种淀粉基材料与一定比例保健食材配比后进行混合发酵,利用原料中原有功能组分及其发酵期间形成的功能组分的富集和生物转化,以期得到不同保健功效的产品,如蒲公英酒、灵芝酒[7-8]。目前,关于芡实深加工方面的文献报道很少,作者根据医药典籍和前期研究,采用一定比例的芡实和糯米(*Oryza sativa* L.),研制出一种低度芡实酒, 作者对新酿芡实酒和成熟芡实酒 (陈酿 1 年) 的理化性质和体外抗氧化活性进行了分析,拟通过分析,对该芡实酒的保健作用做初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜芡实种子:2010 年 10 月购自安徽滁州当地市场,芡种子脱壳后,取芡实仁,粗粉(过 20 目筛网),即得芡实粉;糯米,购自安徽滁州当地市场,为长粒型糯米;混合发酵剂:高活性酿酒曲和增香酿酒曲:购自湖北安琪酵母股份有限公司,按质量比 3:1 的比例混合加入发酵基质中, 总添加量为质量分数 1.0%。

1.2 化学试剂

福林酚试剂(Folin-Ciocalteu reagent),没食子酸、铁氰化钾、三氯乙酸、氯化铁、三羟甲基氨基甲烷(trihydroxymethyl aminomethane)、盐酸、焦性没食子酸、亚硝酸钠、盐酸萘乙二胺、对氨基苯磺酸、维生素 C(VC)、3,5-二硝基水杨酸(DNS)、氯化亚铁、乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na)等试剂:上海化学试剂集团公司产品;1,1-二苯基-2-苦肼基自由基(DPPH·,纯度>97.0%)和菲咯嗪(Ferrozine):Sigma-Aldrich 试剂公司。

没食子酸、儿茶素、绿原酸、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、槲皮素、咖啡酸、阿魏酸、芦丁等单体酚对照品:购自中国药品生物制品检定所。甲醇、乙酸等流动相试剂均为色谱纯。

1.3 芡实酒制备

将芡实粗粉与糯米以质量比 30:70 的比例混合,加入其质量 1.5 倍的水,混合,室温浸泡 1~2 h,放入笼屉中蒸 40 min。取出,室温冷却至 35~40 ℃,加入质量分数 1%的混合发酵剂,拌匀后,装入发酵容器内,于 28~30 ℃培养箱内发酵 30 d。发酵结束后,采用压滤方式分离液相,所得液体室温静置 30 d,待酒液澄清透明时,将上层酒液用虹吸法转移至干净容器内,此为芡实新酒。新酒于室温下避光贮藏 1 年,即得芡实成熟酒。

1.4 芡实酒理化性质

采用 GB/T13662-2008 黄酒的质量分析方法,分别对芡实酒中的感官特性、总糖、非糖固形物、酒精度、pH 值、总酸、氨基酸态氮含量进行了分析。

采用凯氏定氮法对酒样中的总蛋白质质量分数进行测定,氮换算系数取 6.25;采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法对酒样中的还原糖含量进行测定; 采用 L-8900 型氨基酸自动分析仪对酒样中的游离氨基酸组成进行分析;以没食子酸酸为总酚对

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

照品,采用福林酚试剂(Folin–Ciocalteau)法对酒样中的总酚含量进行了测定。

酚类物质组成分析:酒样中酚类物质组成采用美国 Waters 公司 2695 型高效液相色谱 (HPLC)仪进行测定,酒中酚类物质用 C18 反相色谱柱(X Bridge™ 柱,250 mm×4.6 mm, 固定相粒径 5 μm)进行分离,以紫外检测器进行检测。

HPLC 分析条件:参考文献[11–12]方法,经反复试验,确定为:以甲醇和体积分数 1%乙酸溶液为流动相,流量 1.0 mL/min,柱温 35 ℃,样液注入体积 5 μL,在 280 nm 处检测。以多酚对照品的保留时间定性,峰面积定量。

1.5 体外抗氧化能力分析

总还原力: 采用铁氰化钾比色法测定;DPPH·清除能力:采用比色法测定;亚硝酸根离子(NO_2^-)清除活性:采用比色法测定;亚油酸过氧化抑制能力:采用硫氰酸盐比色法测定。

1.6 数据分析

采用 Excel 和 DPSv7.55 数据处理软件对数据进行分析,采用多重比较法进行显著性分析(显著性水平 $p<0.05$)。试验数据均重复测定 3 次,取平均值,表示为平均值±标准差(Mean±SD)。

2 结果与分析

2.1 芡实酒主要营养组分

该芡实酒的制备工艺类似于黄酒,为避免热敏性组分损失,该酒未经任何加热处理。从外观看,芡实新酒呈浅黄色($A_{420\ nm}$=0.167),澄清透明,风味清香,微酸涩。经 1 年室温陈酿,芡实成熟酒的颜色逐渐变深($A_{420\ nm}$=0.446),呈深琥珀色,风味更加浓郁。

理化分析结果显示,与 GB/T13662–2008(黄酒)中的清爽型半甜黄酒质量指标相比,所得芡实酒达到半甜黄酒一级标准。芡实新酒和成熟酒在总糖、非糖固形物、总酸、氨基酸态氮、总蛋白质和还原糖等含量方面存在显著差别($p>0.01$),经 1 年陈酿后,上述指标均显著降低,但酒精度和总酚含量变化不大,陈酿 1 年后略有增加。因实验所用酒曲中同时含有糖化曲(以霉菌为主)和酿酒曲(以酿酒酵母为主),在芡实酒加工中未经任何热处理,仅在发酵结束后,直接进行固液分离,再进行室温静置陈酿,显微镜下的新酒中可以看到许多活的霉菌和酵母,因此,酒中残留微生物代谢也会导致上述营养组分的降低。此外,霉菌和酵母在代谢过程中产生的各种胞外酶,如淀粉酶、蛋白酶、单宁酶、乳糖酶、蔗糖酶、脂肪酶等在芡实酒陈酿前期仍有活性,致使成熟酒中的总糖、总蛋白和还原糖等组分含量显著降低。

芡实中含有丰富的酚类物质(0.93 mg/g),而普通糯米中的总酚含量很低(0.18 mg/g),因此,可以认为,该芡实酒中丰富的总酚含量(492.35 mg/L)主要来自于芡实。但与陈酿 1 年的绍兴黄酒相比,其总酚质量浓度不到黄酒(1 159 mg/L)的一半[20],这可能与黄酒较长的发酵期和相对丰富的原料组成有关。酚类物质作为一种膳食中具有多种生理保健作用的组分,其含量直接影响芡实酒的保健功效。此外,陈酿后芡实酒中总酚质量浓度的少量增加可能与酒中原有聚合酚物质的水解有关。

2.2 氨基酸组成

表 2 显示,原料中除甘氨酸外,芡实中的总氨基酸和必需氨基酸含量均显著高于糯米 ($p>0.01$)。经陈酿 1 年后,芡实新酒中几乎所有游离氨基酸均显著降低($p>0.01$),且远低于陈酿 1 年的黄酒(表 2)。陈酿芡实酒中,苦味、甜味、鲜味和涩味氨基酸分别降低了 38.06%、35.49%、26.80%和 47.12%,其中以涩味的酪氨酸降低最多,其次是苦味氨基酸,这说明经陈酿后,有利于降低芡实酒的苦涩味,改善其口感。陈酿后,氨基酸含量的显著降低主要缘于氨基酸与糖类间缓慢的美拉德反应。相比之下,传统黄酒中高含量的氨基酸可能与其原料组成和发酵时间较长有关。因此,为提高芡实酒中游离氨基酸含量,需在制作工艺和配方方面进一步改善。

2.3 芡实酒中酚类物质组成

采用 HPLC 法, 从两种芡实酒中鉴定出 5 种酚类物质,分别为没食子酸、表儿茶素没食子酸酯、阿魏酸、槲皮素和芦丁,还有 3~4 个吸收峰有待鉴定。已鉴定的 5 种酚类物质中,除芦丁外,其他 4 种多酚物质在成熟芡酒中的含量均高于新酒,尤其是成熟酒中的槲皮素质量浓度(113.51 mg/L)远高于新酒 (57.76 mg/L)。芡实新酒中, 芦丁质量浓度为 23.54 mg/L,经一年陈酿后,成熟酒中芦丁质量浓度几乎完全消失,但槲皮素质量浓度几乎增加了 1 倍(表 2 和图 1)。根据芦丁和槲皮素的分子结构式(图 2),不难推测:在贮存期间,芡实新酒中的芦丁组分经水解转变为槲皮素,该过程在酸性条件下一般是可以发生的。此外,成熟芡实酒的 HPLC 图谱峰数多

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 芡实酒及其原料中氨基酸的组成

Table 1 Amino acid contents of the EF wines and its materials

氨基酸		英文缩写	新酒/(mg/L)	成熟酒/(mg/L)	芡实/(mg/g)	糯米[20]/(mg/g)	黄酒[20]/(mg/L)
苦味氨基酸	组氨酸	His	65.251	53.871	3.05	1.37	73.67
	精氨酸	Arg	370.075	245.448	11.43	4.36	20.00
	缬氨酸	Val*	153.819	92.634	5.04	3.56	151.57
	异亮氨酸	Ile*	77.946	49.215	5.1	2.19	97.55
	亮氨酸	Leu*	232.011	126.499	8.07	5.68	212
	苯丙氨酸	Phe*	202.466	121.451	6.17	3.51	143.97
	赖氨酸	Lys*	189.496	110.631	2.89	2.03	200.26
		Σ	1 291.064	799.749			899.02
甜味氨基酸	甘氨酸	Gly	88.55	69.802	2.81	3.05	114.31
	丙氨酸	Ala	184.135	127.615	5.82	3.67	502.63
	脯氨酸	Pro	182.632	118.868	3.28	1.86	289.47
	丝氨酸	Ser	139.735	82.141	5.73	3.37	123.79
	苏氨酸	Thr*	119.685	67.659	3.61	2.17	77.22
	胱氨酸	Cys	26.478	28.358	0.34	0.28	55.86
	蛋氨酸	Met*	68.849	28.109	3.23	1.18	46.67
		Σ	810.064	522.552			1 209.95
鲜味氨基酸	天冬氨酸	Asp	163.667	124.638	7.16	6.09	316.58
	谷氨酸	Glu	283.909	202.973	16.58	13.62	865.46
		Σ	447.576	327.611			1 182.04
涩味氨基酸	酪氨酸	Tyr	144.193	76.244	3.27	1.97	159.46
	总氨基酸[a]		2 692.897	1 726.156	90.3	59.96	5 600.44
	必需氨基酸		1 188.465	672.442	40.43	23.66	985.10

注:表中 * 必需氨基酸。a 芡实新酒和成熟酒中的总氨基酸和必需氨基酸含量均为总游离氨基酸和游离必需氨基酸含量。

于新酒,在保留时间 8~10 min 间出现 3 个新的吸收峰,说明陈酿期间形成了一些新的物质,这些组分有待进一步分析鉴定。

2.4 芡实酒体外抗氧化活性

2.4.1 总还原性 芡实酒的总还原性排列顺序为:新酒>0.1 mg/mL VC 溶液>成熟酒>0.05 mg/mL VC 溶液>体积分数 15%乙醇溶液(图 3),且不同样品间差异显著(p>0.01)。结果表明,芡实酒具有很强的还原力,尤其是芡实新酒的还原力显著高于 0.1 mg/mL VC 溶液和成熟酒。而体积分数 15%乙醇溶液还原性极低,这说明芡实酒强的还原力主要源于其中丰富的还原糖和总酚(表 1)。

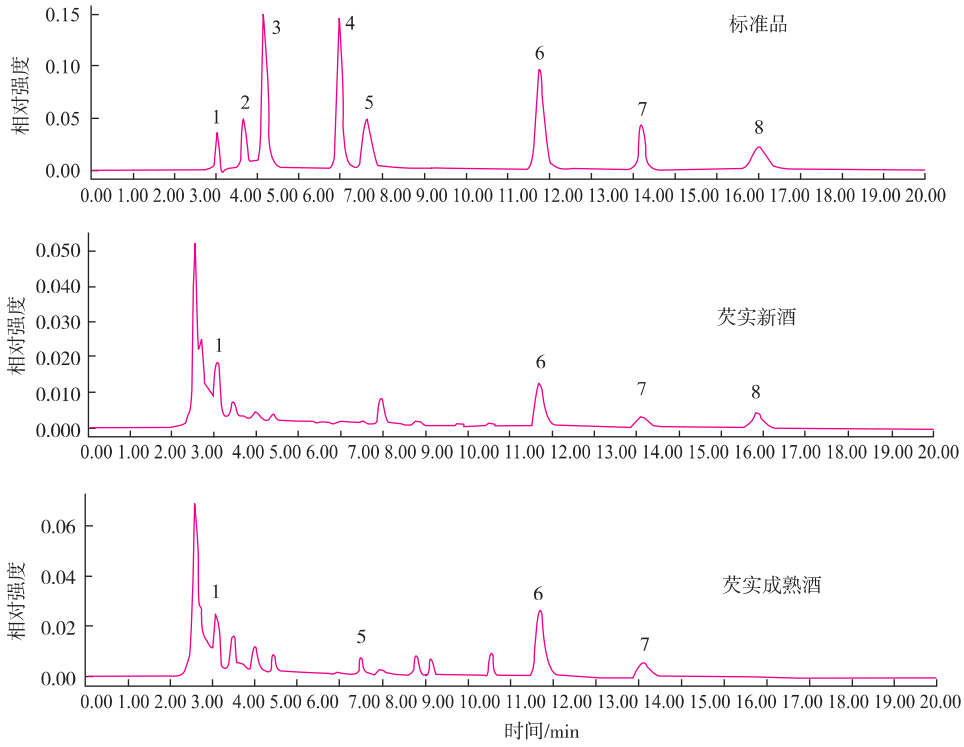
表 2 芡实酒中部分酚类物质质量浓度

Tablele 2 Concentrations of identified phenolic compo-nents in the EF wines (mg/L)

酚类物质	质量浓度/(mg/L)	
	芡实新酒	芡实成熟酒
没食子酸(Galicacid)	85.94±4.12	98.07±6.24
表儿茶素没食子酸酯(Epicatechingallate)	ND	2.54±0.14
阿魏酸(Ferulicacid)	10.13±0.34	22.50±0.58
槲皮素(Quercetin)	57.76±1.57	113.51±8.72
芦丁(Rutin)	23.54±0.84	ND

注:ND 指未检出。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



各峰:(1) 没食子酸,(2)表没食子酸儿茶素没食子酸酯,(3) 绿原酸,(4)咖啡酸,(5) 表儿茶素没食子酸酯,(6) 阿魏酸,(7) 槲皮素,(8) 芦丁

图 1　多酚标准物质和芡实酒样的 HPLC–UV 色谱图

Fig. 1　HPLC–UV chromatograms of polyphonic standards and the EF wines

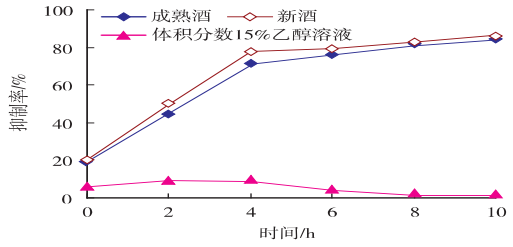
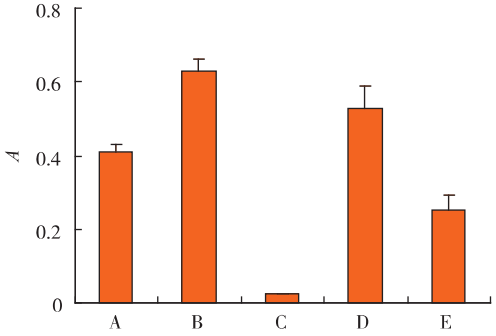


图 2　芦丁(1)和槲皮素(2)的分子结构式

Fig. 2　Molecular structures of (1) rutin and (2) quercetin



(A)芡实成熟酒,(B)芡实新酒,(C)体积分数 15%乙醇溶液,(D)0.1 mg/mL VC 溶液,(E)0.05 mg/mL VC 溶液

图 3　芡实酒和 VC 溶液的总还原力

Fig. 3　Total reducing power of wines

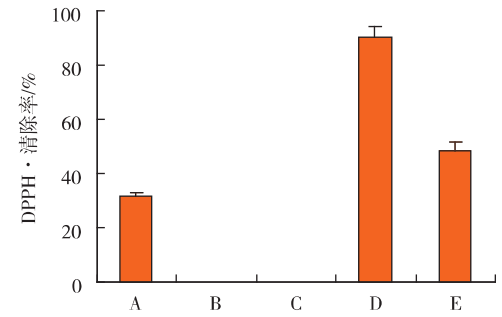
2.4.2　DPPH·清除活性　与还原力分析结果相似,0.10、0.05 mg/mL VC 溶液的 DPPH·清除活性远高于成熟芡酒,体积分数 15%乙醇水溶液几乎不显示任何 DPPH·清除活性(图 3)。然而,在评价新酒的 DPPH·清除活性时,随着新酒样品的加入,反应体系呈明显浑浊状态, 无法通过比色法进行分析,但仍能看到体系原有的紫红色在加入新酒后,发生明显褪色,说明新酒也具有较强的清除活性。有关芡实新酒使反应体系变浑浊的原因还有待分析。

2.4.3　NO_2^-清除能力　芡实酒和 VC 溶液的 NO_2^-清除能力随着用量的增加而显著增加($p<0.01$),其中,0.1 mg/mL 的 VC 溶液的 NO_2^-清除能力最高,其次是芡实新酒和成熟酒(图 4)。体积分数 15%的乙醇溶液的 NO_2^-清除能力最低。结果表明,芡实新酒和成熟酒均具有非常强的 NO_2^-清除活性。

2.4.4　亚油酸过氧化抑制活性　芡实新酒和成熟酒均具有很强的亚油酸过氧化抑制能力, 在 4 h 内其过氧化抑制率从 20%左右迅速增加至 80%左右,此后变化趋于平缓,10 h 后, 抑制率仍可保持在 80%左右, 且芡实新酒和成熟酒间无显著差别 ($p>$

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

0.05)(图 5)。



(A)成熟酒,(B) 新酒,(C) 体积分数 15%乙醇溶液,(D) 0.1 mg/mL VC 溶液,(E) 0.05 mg/mL VC 溶液

图 4 芡实酒和 VC 溶液的 DPPH·清除活性

Fig. 4 DPPH ·–scavenging activities of wines and VC solutions

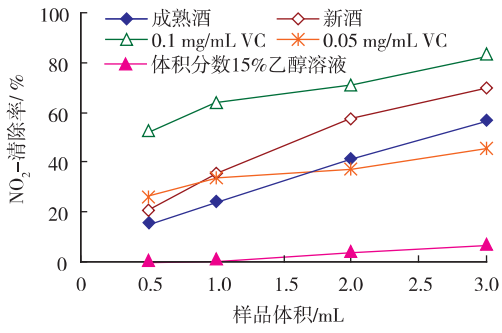


图 5 芡实酒和 VC 溶液的 NO_2^-清除能力

Fig. 5 NO_2^-–scavenging capacities of the wines and VC solutions

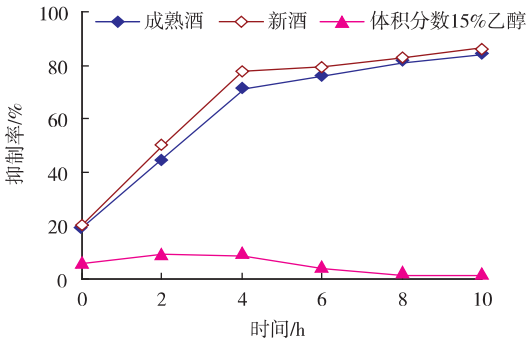


图 6 芡实酒和 VC 溶液的亚油酸过氧化抑制能力

Fig. 6 Linoleic acid peroxidation inhibition of the wines

以上 4 种不同体外抗氧化评价方法的结果均表明,芡实酒具有很强的体外抗氧化活性,部分抗氧化性能与黄酒接近[16]。芡实酒体外抗氧化活性与其中的乙醇无关,而与其中丰富的还原糖、多酚类物质及氨基酸可能具有密切关系。

3 结 语

研究表明,芡实酒营养丰富,富含各种必需氨基酸和总酚,芡实新酒和成熟酒均显示出很强的体外抗氧化活性和 NO_2^-清除能力。采用 HPLC 法对芡实酒中的部分多酚物质组分进行了定性和定量分析,它们包括:没食子酸、阿魏酸、槲皮素和芦丁,且成熟芡酒中含有更高含量的多酚物质。因此,芡实酒,尤其是经 1 年陈酿成熟酒,不仅含有更多的活性组分和更好的风味,而且具有很强的体外抗氧化活性,显示出很大的生理保健潜力。

参考文献:

[1] Jha S N,Prasad S. Determination of processing conditions for gorgon nut (*Euryale ferox*) [J]. **Journal of Agricultural Engineering Research**,1996,63:103–112.

[2] Jha S N. Physical and hygroscopic properties of makhana [J]. **Journal of Agricultural Engineering Research**,1999,72:145–150.

[3] (明)李时珍著. 倪泰一,李智谋等编译. 本草纲目(第三版)[M]. 重庆:重庆出版社,2006. (in Chinese)

[4] SHANKARr M,CHAUDHARY N,SINGH D. A review on gorgon nut[J]. **International Journal of Phamaceutical & Biological Archives**,2010,1:101–107.

[5] LEE S E,MI J E,HEE K J. Antioxidant activity of extracts from Euryale ferox seed[J]. **Experimental and Molecular Medicine**,2002,34:100–106.

[6] DAS S,DER P,RAYCHAUDURI U,et al. The effect of Euryale ferox (makhana),an herb of aquatic origin,on myocardial ischemic reperfusion injury[J]. **Molecular and Cellular Biochemistry**,2006,289:55–63.

[7] KIM J H,LEE S H,KIM N M,et al. Manufacture and physiological functionality of Korean traditional liquors by using dandelion (*Taraxacum platycarpum*)[J]. **Korean J Biotechnol Bioeng**,2000,28:367–371.

[8] KIM J H,LEE D H,LEE S H,et al. Effect of Ganoderma lucidum on the Quality and Functionality of Korean Traditional Rice Wine,Yakju[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2004,97:24–28.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net