



引用格式:张文叶,吴庆伟,吴刚,等. 氨基酸种类与添加量对山楂酒中主要高级醇生成量的影响[J]. 轻工学报,2017,32(3):1-7.

中图分类号:TS261 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.3.001

文章编号:2096-1553(2017)03-0001-07

氨基酸种类与添加量对山楂酒中主要高级醇生成量的影响

Effects of amino acid variety and addition amount on the formation of main higher alcohols in hawthorn wine

张文叶,吴庆伟,吴刚,赵凡

ZHANG Wen-ye, WU Qing-wei, WU Gang, ZHAO Fan

郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001

College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

关键词:

氨基酸;山楂酒;高级醇;风味物质

Key words:

amino acid; hawthorn wine; higher alcohol; flavor compound

摘要:以辉县山楂为原料,通过向山楂发酵液中分别添加5种不同的氨基酸,研究氨基酸种类与添加量对山楂酒中主要风味物质高级醇生成量的影响.实验结果表明,除谷氨酸外,其他4种氨基酸均影响山楂酒中高级醇的生成.其中,甘氨酸作为合成异戊醇的前体物质,能使山楂酒中异戊醇含量升高;而缬氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸在山楂酒中进一步分解代谢,生成更多的异丁醇、苯乙醇和异戊醇.

收稿日期:2017-03-23

基金项目:河南省科技攻关项目(142102110061);郑州轻工业学院研究生科技创新基金项目(2015029);食品生产与安全河南省协同创新中心研究生科技创新基金项目;郑州轻工业学院大学生创新实验项目

作者简介:张文叶(1965—),女,河南省辉县市人,郑州轻工业学院教授,主要研究方向为食品生物技术.

Abstract: The study aimed to explore the effects of amino acid variety and addition amount on the formation of the main flavor compound higher alcohols in hawthorn wine by using Huixian hawthorn as raw material and adding five amino acids into fermentation broth of hawthorn. The results showed that the other four amino acids exerted obvious influences on the generation of higher alcohols in hawthorn wine except glutamate. In that, glycine, as the precursor for the synthesis of phenethyl, led to the increase of phenethyl content in hawthorn wine. Whereas, the addition of valine, phenylalanine and leucine promoted the increase of isobutanol, phenethyl and isopentanol alcohol in hawthorn wine, respectively.

0 引言

山楂又名山里果、山里红,为蔷薇科山楂属。山楂果实含有多种营养成分,是有名的药食同源水果。山楂酒是以山楂果为主要原料,经过发酵工艺酿造而成的,酒质温和爽口、果香浓郁,基本保持了山楂果实中的营养成分,是一种天然健康的生物饮品^[1-3]。

高级醇是包含3个以上碳的一元醇类物质的总称,能与酒中的其他物质一起构成酒体的主要风味物质^[4-6]。高级醇溶于酒精而不溶于水,低浓度时似油状,故又称为杂醇油,在酒精工业中被视为杂质^[7-8]。酒中含高级醇过量,能使人的神经系统充血,引发头疼等反应,并且其毒性随着含量的加大而加剧,因此高级醇的含量直接影响酒的品质^[9-12]。不同发酵条件对高级醇生成量的影响不同,研究发现,与不锈钢桶相比,橡木桶存储的果酒高级醇生成量增加550 $\mu\text{g/L}$,分析其原因可能是木桶中含有 α -氨基酸^[13-15]。宫振英^[16]发现,向苹果酒中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,随着其添加量的增加,高级醇的生成量出现了先减小后增大的趋势。张斌等^[17]研究发现,荔枝汁发酵时,向其中添加60 mg/L 谷氨酸或精氨酸,能明显提高发酵速率,促进酵母生长,提高酒精得率,但该研究未涉及氨基酸组成对高级醇生成量影响。鉴于此,本实验通过分别向山楂发酵液中添加甘氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和谷氨酸5种氨基酸,分析其对山楂酒中异丁醇、异戊醇和苯乙醇这3种主要高级醇生成量的影响,以期通过工艺优化调控

发酵酒中高级醇生成量的研究提供理论依据。

1 材料与方法

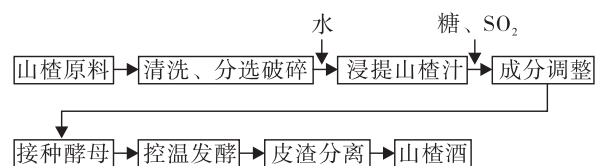
1.1 材料与仪器

材料:山楂,购自河南省辉县市上八里村;安琪酿酒耐高温活性干酵母,购自湖北省宜昌市安琪酵母股份有限公司;甘氨酸(AR)、缬氨酸(AR)、苯丙氨酸(AR)、亮氨酸(AR)、谷氨酸(AR)、异丁醇(AR)、异戊醇(AR)、苯乙醇(色谱纯)、无水乙醇(色谱纯)、二氯甲烷(色谱纯),购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

仪器:SHP-250智能生化培养箱,上海鸿都科技有限公司产;7820气相色谱仪,美国Agilent公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 山楂发酵工艺流程



工艺要点:按 $m(\text{原料}):m(\text{水})=1:4$ 配比,加热煮沸15 min,室温冷却3 h,糖分调整为170 g/L ,按接种量0.6 g/L 进行接种,保持在22~23 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行发酵。

1.2.2 气相色谱测定山楂酒中3种高级醇的方法 标准溶液的配制:分别称取0.5000 g异丁醇、异戊醇、苯乙醇于100 mL容量瓶中,用无水乙醇定容,得到高级醇标准储备液。再用无水乙醇稀释标准储备液,配制成浓度分别为0.020 mg/mL , 0.060 mg/mL , 0.100 mg/mL ,

0.140 mg/mL, 0.200 mg/mL, 0.400 mg/mL 的高级醇标准溶液。

气相色谱条件:选用 HP-INNOWAX 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)对异丁醇、异戊醇和苯乙醇标准品进行分离,色谱条件:进样口温度为 220 °C,检测器温度为 280 °C,分流比为 20 : 1,进样量为 1 μL,载气为 He(纯度 99.999%)。色谱柱升温程序:初始温度 45 °C,保持 2 min,以 3 °C/min 升至 80 °C,再以 10 °C/min 升至 220 °C,保持 5 min,然后升温至 240 °C,保持 5 min^[18]。

高级醇生成量计算:将不同浓度梯度的高级醇标准品上样分析,以峰面积/10⁷ 为横坐标,质量浓度为纵坐标作标准曲线。山楂酒样品经 0.45 μm 滤膜过滤后直接上样分析,计算出峰面积/10⁷,代入标准曲线方程即可得到样品中 3 种主要高级醇生成量。

1.2.3 氨基酸种类对山楂酒中 3 种高级醇生成量影响的分析方法 在 1.2.1 中成分调整阶段分别添加 0.15 g/L 亮氨酸、甘氨酸、缬氨酸、谷氨酸和苯丙氨酸于发酵液中,以不添加氨基酸为对照,发酵过程中每 4 d 测定 1 次高级醇生成量,选出对其有显著影响的氨基酸。

1.2.4 氨基酸添加量对山楂酒中 3 种高级醇生成量影响的分析方法 将对高级醇生成量有显著影响的氨基酸,按照 0 g/L, 0.1 g/L,

0.2 g/L, 0.3 g/L, 0.4 g/L, 0.5 g/L 的添加量加入山楂发酵液,就氨基酸添加量对山楂酒中主要高级醇生成量的影响进行定量分析。

1.3 统计方法

测定结果采用 Origin Pro 7.0 进行处理。

2 结果与分析

2.1 3 种高级醇标准品的气相色谱图线性分析结果

图 1 为 3 种高级醇标准品的气相色谱图。由图 1 可以看出,本实验应用的气相色谱方法对异丁醇、异戊醇、苯乙醇 3 种主要高级醇能够实现较好的分离。3 种高级醇标准品线性分析结果见表 1。由表 1 可知,异丁醇、异戊醇、苯乙醇之间的相关系数均在 0.994 以上,表明 3 种高级醇的质量浓度与相应的峰面积/10⁷ 呈良好的线性关系。因此,该方法能够应用于山楂酒样品中 3 种高级醇生成量的定量和定性检测。

2.2 氨基酸种类对山楂酒中 3 种高级醇生成量的影响

2.2.1 氨基酸种类对山楂酒中异丁醇生成量的影响 图 2 为氨基酸种类对山楂酒中异丁醇生成量的影响。由图 2 可知,在发酵前期(0 ~ 4 d)阶段,6 组发酵液中异丁醇含量均急剧上升,其原因是发酵前期酵母生长繁殖迅速,分解与合成代谢活动旺盛。随着发酵时间进一步延长(4 ~ 20 d),异丁醇生成速度逐渐减慢,由此可

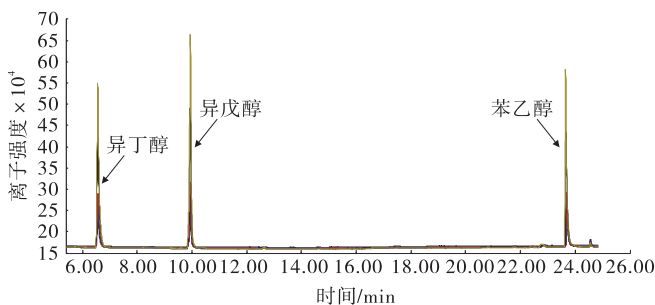


图 1 3 种高级醇标准品的气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograph map of three higher alcohols standards

知,异丁醇主要在发酵前期随着酵母的生长繁殖而生成^[19]. 添加甘氨酸和缬氨酸的实验组中,异丁醇含量与对照组相比,分别上升了32.28%和70.12%,而添加另外3种氨基酸的实验组中异丁醇生成量与对照组相比变化不大,主要是因为甘氨酸被酵母利用作为合成异丁醇的前体物质,而缬氨酸的添加则促进了其本身的分解代谢,经转氨脱羧生成异丁醇.

2.2.2 氨基酸种类对山楂酒中异戊醇生成量的影响 图3为氨基酸种类对山楂酒中异戊醇生成量的影响. 由图3可知,随发酵时间的延长,异戊醇含量不断上升,发酵结束时,添加甘氨酸和亮氨酸的实验组与对照组相比,异戊醇含量分别上升了37.17%和46.12%,而添加缬氨酸、苯丙氨酸和谷氨酸的实验组中异戊醇含量无明显变化. 由此可知,发酵液中添加甘氨酸和亮氨酸对异戊醇的生成有显著促进作用.

表1 3种高级醇标准线性分析结果

Table 1 Linear analysis results of three higher alcohols standards

成分	回归方程	相关系数 R^2	线性范围/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
异丁醇	$y = 0.009x + 0.020$	0.996	20 ~ 600
异戊醇	$y = 0.012x + 0.030$	0.994	20 ~ 600
苯乙醇	$y = 0.008x + 0.008$	0.999	20 ~ 600

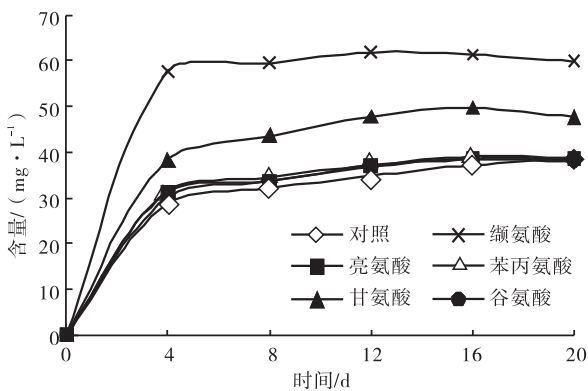


图2 氨基酸种类对山楂酒中异丁醇生成量的影响
Fig.2 Effects of different amino acids on the formation of isobutanol in hawthorn wine

2.2.3 氨基酸种类对山楂酒中苯乙醇生成量的影响 图4为氨基酸种类对山楂酒中苯乙醇生成量的影响. 由图4可知,在发酵前期(0~4 d)添加苯丙氨酸的实验组中苯乙醇生成量迅速上升,在之后的4~20 d发酵阶段,苯乙醇生成量的上升幅度趋于平缓. 而其他实验组和对照组中苯乙醇生成量在整个发酵阶段均上升缓慢,并且随发酵进行苯乙醇生成速率不断降低. 发酵结束时,添加苯丙氨酸的实验组中苯乙醇生成量是对照组的3.83倍,而添加亮氨酸、甘氨酸、缬氨酸和谷氨酸的实验组与对照相比,苯乙醇生成量无明显变化. 由此可知,发酵液中添加苯丙氨酸能明显提高山楂酒中苯乙醇生成量.

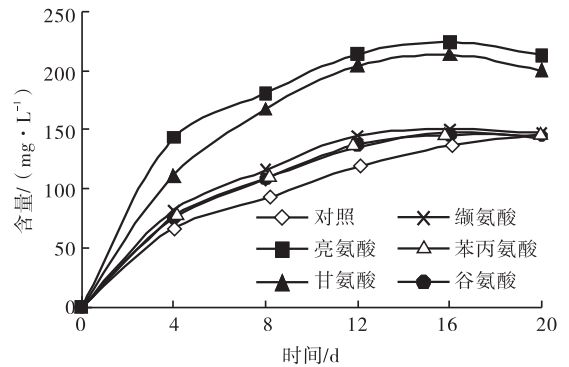


图3 氨基酸种类对山楂酒中异戊醇生成量的影响
Fig.3 Effects of different amino acids on the formation of isopentanol in hawthorn wine

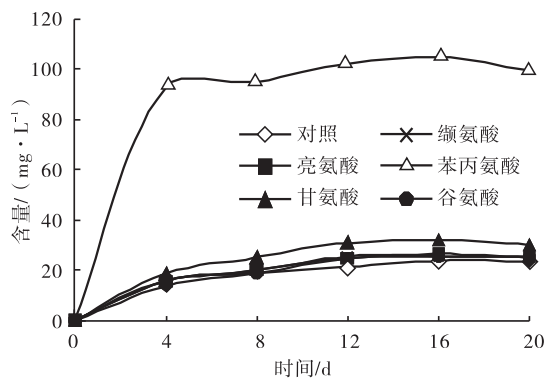


图4 氨基酸种类对山楂酒中苯乙醇生成量的影响
Fig.4 Effects of different amino acids on the formation of phenethyl alcohol in hawthorn wine

2.3 氨基酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

2.3.1 甘氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

图5为甘氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响.由图5可知,随着甘氨酸添加量的增加,异丁醇、异戊醇和苯乙醇含量均不断增加,但不同的甘氨酸添加量对异戊醇含量影响最为明显,而对异丁醇和苯乙醇含量的影响较小.其原因是甘氨酸作为合成异戊醇的前体物质,其添加促进了异戊醇含量升高.

2.3.2 缬氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

图6为缬氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响.由图6可知,随着

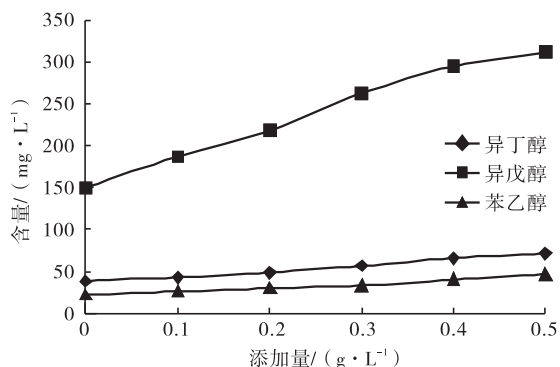


图5 甘氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

Fig.5 Effects of addition amount of glycine on the content of three higher alcohols in hawthorn wine

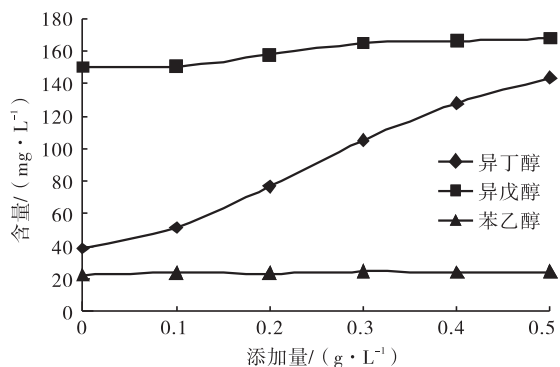


图6 缬氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

Fig.6 Effects of addition amount of valine on the content of three higher alcohols in hawthorn wine

缬氨酸添加量的增大,3种高级醇呈现不同的变化趋势:异丁醇含量不断增大,在添加0.5 g/L缬氨酸时,异丁醇含量可达143.67 mg/L;异戊醇含量整体略有增加,在添加0.3 g/L缬氨酸后有所上升,之后没有明显变化;缬氨酸添加量对苯乙醇含量没有明显的影响.综上可知,添加缬氨酸对山楂酒中3种高级醇生成量的影响主要表现在异丁醇上,这与甄会英^[20]的分析结果一致.其原因是缬氨酸添加量的不断增大促进了自身的分解代谢,从而使异丁醇含量不断增大.

2.3.3 苯丙氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

图7为苯丙氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响.由图7可知,苯丙氨酸添加量对苯乙醇含量的影响最显著,当苯丙氨酸添加量分别为0.1 g/L,0.2 g/L,0.3 g/L,0.4 g/L,0.5 g/L时,苯乙醇的含量分别为对照组的3.58倍、5.53倍、7.24倍、9.18倍、10.86倍.这表明,苯丙氨酸的添加促进了自身的分解代谢,添加量越大越能分解生成更多的苯乙醇.苯丙氨酸添加量对异丁醇、异戊醇含量的影响不明显.

2.3.4 亮氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

图8为亮氨酸添加量对山楂酒

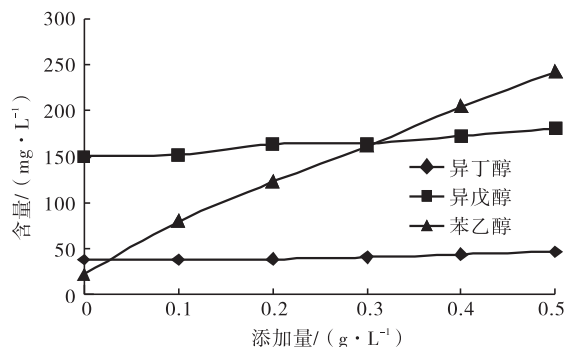


图7 苯丙氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

Fig.7 Effects of addition amount of phenylalanine on the content of three higher alcohols in hawthorn wine

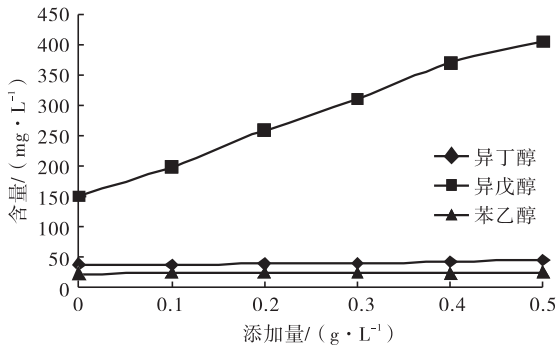


图8 亮氨酸添加量对山楂酒中3种高级醇生成量的影响

Fig.8 Effects of addition amount of leucine on the content of three higher alcohols in hawthorn wine

中3种高级醇生成量的影响。由图8可知,随着亮氨酸添加量的增大,异戊醇生成量迅速增加,在添加量为0.5 g/L时,异戊醇生成量是对照组的2.69倍。而异丁醇和苯乙醇生成量随亮氨酸添加量的增大变化不明显。因此,添加亮氨酸对异戊醇生成量变化影响最大,原因是随着亮氨酸浓度升高,会反馈抑制其在合成途径的酶活性,降低高级醇在合成途径的生成量,但使分解途径的异戊醇生成量显著增加。这与张丹等^[21]就亮氨酸对固态发酵枣酒中高级醇生成量的影响的研究结论一致。

3 结论

以辉县山楂为原料,通过向山楂发酵液中分别添加5种不同的氨基酸,研究了氨基酸种类和添加量对山楂酒中异丁醇、异戊醇、苯乙醇3种高级醇生成量的影响。实验结果表明,甘氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸的添加对3种高级醇生成量有显著影响:甘氨酸作为合成异戊醇的前体物质,其添加促进了异戊醇含量升高;缬氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸在山楂酒中进一步分解代谢,生成了更多的异丁醇、苯乙醇和异戊醇,从而使山楂酒中3种高级醇生成量增加。谷氨酸对这3种高级醇的含量无明显影响。本研

究为今后在果酒发酵过程中,通过选育氨基酸缺陷型酵母调控果酒中高级醇生成量,以期生产出更高品质的酒类提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 刘武. 山楂的营养化学成分及保健作用[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(5): 65.
- [2] 周广麟, 尹丽杰, 闫辞, 等. 山楂白兰地的酿造及检测[J]. 中国酿造, 2011, 30(8): 150.
- [3] 韩翠萍. 山楂的营养成分及其加工性能[J]. 农产品加工, 2010(4): 28.
- [4] 李先奇. 刺葡萄酒生产中高级醇的调控及其脱出技术的研究[D]. 武汉: 湖北农业大学, 2012.
- [5] 罗惠波, 苟云凌, 叶光斌, 等. 影响白酒中高级醇生成的工艺条件研究[J]. 中国酿造, 2011, 30(8): 87.
- [6] 曾曹珍, 张永茂, 康三江, 等. 发酵酒中高级醇的研究进展[J]. 中国酿造, 2015, 34(5): 11.
- [7] 秦伟帅. 影响葡萄酒酿造过程中高级醇形成的因素分析[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2010.
- [8] VIDAL E E, DE BILLERBECK G M, SIMOES D A, et al. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaca fermentation[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 701.
- [9] 武宝忠, 申华. 浅析啤酒发酵过程中高级醇的产生及控制措施[J]. 酿酒, 2003(5): 66.
- [10] 童永鑫, 李玲, 杨文字, 等. 气相色谱法测定石榴葡萄酒中的甲醇和杂醇油[J]. 2013, 32(3): 142.
- [11] 田小菊, 张宝善, 张百刚. 影响石榴酒中甲醇和杂醇油生成量的几个工艺因素[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(33): 16705.
- [12] 林玲, 王丽, 张兴亚, 等. 气相色谱法测定黄酒中的高级醇[J]. 中国酿造, 2011, 30(5): 170.
- [13] MARIATERESA L, SANDRA P, MATTEOALE-

- SANDRO D N, et al. Aroma quality improvement of Chardonnay white wine by fermentation and ageing in barrique on less [J]. Food Research International, 2010, 43(4):996.
- [14] TOEEEA D, FRAILE P, GARDE T, et al. Production of volatile compounds in the fermentation of Chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands [J]. Food Control, 2003, 14(8):565.
- [15] GONZALEZ-MARCO A, JIMENEZ-MORENO N, ANCIN-AZPILICUETA C. Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stain less steel tanks and oak barrels [J]. Food Chemistry, 2008, 108(1):213.
- [16] 官振英. 苹果酒酿造过程中高级醇的控制 [D]. 保定:河北农业大学, 2003.
- [17] 张斌, 曾新安, 陈勇, 等. 添加复合氨基酸对荔枝酒发酵进程的影响 [J]. 酿酒科技, 2008(3):23.
- [18] LEE P R, ONG Y L, YU B, et al. Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus* [J]. Food Microbiology, 2010, 27(7):853.
- [19] 孙金旭, 朱会霞, 杨晓红, 等. 酵母添加量对酱香型白酒中杂油醇的影响 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(12):67.
- [20] 甄会英. 葡萄酒中高级醇的测定方法与调控技术研究 [D]. 保定:河北农业大学, 2005.
- [21] 张丹, 锁然, 范立欣, 等. 可同化氮素对固态发酵枣酒高级醇的影响 [J]. 酿酒科技, 2013(11):15.