

山楂酒酿造工艺研究及山楂酒中有机酸的 HPLC 测定

梁国伟 徐 亮 张宝荣 李 艳

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018)

摘 要: 山楂是我国的特色果品, 具有悠久的栽培历史。其果实中果肉营养丰富而全面, 是一种具有很高营养和药用价值的果品。以山楂为原料开发研制的发酵型山楂果酒, 不仅解决了鲜山楂贮藏问题, 而且提高了山楂的附加值, 同时山楂酒又具有营养保健功能。对发酵型山楂酒的酿造工艺进行了报道, 应用 HPLC 测定了山楂酒中有机酸的含量。结果显示: 山楂酒中柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、乳酸含量分别为 3366.34 mg/L、1791.172 mg/L、646.736 mg/L、0.276 mg/L。

关键词: 山楂酒; 有机酸; 酿造工艺; HPLC

中图分类号: TS261.7; TS262.7; TS261.4

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2009)07-0106-03

Study on the Production Techniques of Hawthorn Fruit Wine & Measurement of Organic Acids in Hawthorn Fruit Wine by HPLC

LIANG Guo-wei, XU Liang, ZHANG Bao-rong and LI Yan

(College of Bioscience & Bioengineering of Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: Hawthorn, as a characteristic fruit in China, has a long cultivating history. Its pulp contains rich nutrients, so it is a fruit of high nutritional and medicinal value. Hawthorn fruit wine is developed with hawthorn as the main raw materials, which could not only settle the problem of difficult storage of hawthorn fruits but also enhance the added value of hawthorn. In addition, the wine also has healthcare functions. In this paper, the production techniques of hawthorn fruit wine were reported. Besides, HPLC was used to measure organic acids content in hawthorn fruit wine and the results were as follows: the contents of citric acid, succinic acid, malic acid and lactic acid were 3366.34 mg/L, 1791.172 mg/L, 646.736 mg/L and 0.276 mg/L respectively.

Key words: hawthorn fruit wine; organic acids; brewing; HPLC

山楂是我国的特色果品, 具有悠久的栽培历史。山楂中含有柠檬酸、苹果酸、琥珀酸等多种有机酸和黄酮类化合物, 还含多种矿物质和维生素。山楂能够增加胃蛋白酶的分泌, 因而具有消食化滞、助消化、增进食欲之功效。并有加强和调节心肌、增强心室、心房运动和冠心血流量的作用, 可用于治疗冠心病、心绞痛等疾病^[1~2]。山楂在我国种植面积广, 但山楂口感太酸, 鲜食量并不大, 传统的山楂加工食品结构比较单一, 远不能满足人们对山楂食品的需求和山楂种植业发展的要求^[3]。以山楂为原料, 生产山楂酒, 既能解决山楂的供需矛盾, 又开拓营养保健型食品的生产原料。

本文在研究山楂酒酿造工艺的同时, 建立了对于山楂酒中有机酸的快速 HPLC 的检测方法。同时测定了山

楂酒中柠檬酸、苹果酸、乳酸等多种有机酸的含量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山东产山楂: 果粒大小均匀, 无霉粒, 无杂质, 果皮鲜红或紫红色, 采购于河北省石家庄市嘉农贸市场。

果胶酶、酵母菌、白砂糖(市售)、食用酒精等。

1.2 仪器与设备

SQ2119A 多功能食品加工机、岛津高效液相色谱仪(HPLC)LC20A、spectrum 紫外分光光度计 756P、DELTA 320 pH 计、AR1140 型电子分析天平、微孔过滤器等。

1.3 药品

磷酸二氢钾、磷酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸均

基金项目: 河北科技大学 2007 年大学生科技创新基金资助课题(校团委[2008]第 8 号)。

收稿日期: 2009-03-31

作者简介: 梁国伟(1983-), 男, 在读硕士研究生。

通讯作者: 李艳(1958-), 女, 教授, 研究方向: 饮料酒酿造。

为分析纯,超纯水,甲醇为色谱纯。

1.4 色谱条件

色谱柱:Platisil(铂金) ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm×5 μm); 流动相:0.05 mol/L 磷酸二氢钾水溶液磷酸调 pH2.5;检测波长:214 nm;流速 1 mL/min;柱温:25 °C;进样量:20 μL^[4~7]。

1.5 山楂酒酿造工艺流程^[8]

山楂→分选→洗涤→破碎→山楂汁的制备→添加果胶酶→加糖、酵母→发酵→分离→后发酵→补加 SO₂→贮存→下胶→过滤→冷冻→过滤→装瓶→成品

2 结果与分析

山楂的果实含水量低,对于发酵型山楂酒的酿制,山楂汁的制备在整个工艺流程中占有相当重要的地位^[9]。山楂汁的制备要求有效物质(主要为有机酸和固形物)尽可能高。浸提速率受浸取介质、料水比、浸提温度、浸取时间、果胶酶添加量等因素的影响。

2.1 山楂汁的制备

2.1.1 浸提温度与时间对山楂汁质量的影响

在山楂汁制取过程中,浸提温度对有效物质的浸出有很大影响,温度过高或过低都不利于有效成分的溶出,图 1 为浸提时间与浸提温度与山楂汁色度的关系。

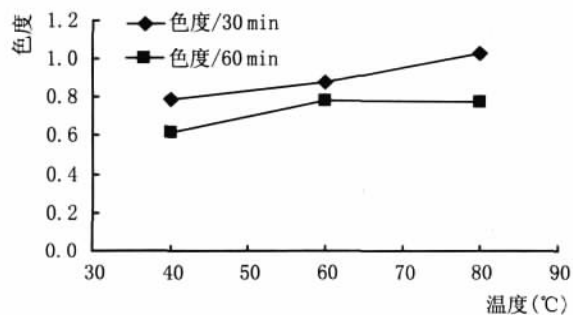


图1 温度和时间对山楂汁热浸提的影响

由图1可知,当浸提时间为30 min时,样品色度值随着温度上升而逐渐上升。当浸提时间延长到60 min时,样品的色度值随着温度的上升出现了最高点,即在40~60 °C之间呈上升趋势,大于60 °C后呈下降趋势。这是由于浸提温度的升高,抑制了氧化酶的活性,从而有效地防止了山楂汁的棕色破败和氧化口感的形成。在一定的温度范围内加热,促进了果皮上色素的浸提。但是,当温度过高时也会使一些对色素浸提有利的酶失活或使色素物质降解。因此,制备山楂汁较适宜的浸提条件为浸提温度60 °C、浸提时间30 min。

2.1.2 果胶酶添加量与作用温度的研究

山楂中果胶质含量丰富,需在山楂汁发酵前进行部分的分解,否则,大量的果胶质经酵母菌的发酵作用易生成过量的甲醇而影响山楂酒的品质。一般果胶质的分解

是在山楂制汁过程中,利用添加果胶酶进行分解。果胶酶的添加量和作用条件也影响山楂汁的质量,实验结果见图2~图5。

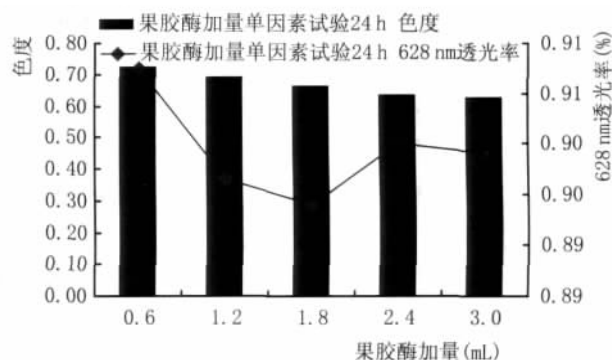


图2 果胶酶加量对色度和透光度的影响(24 h)

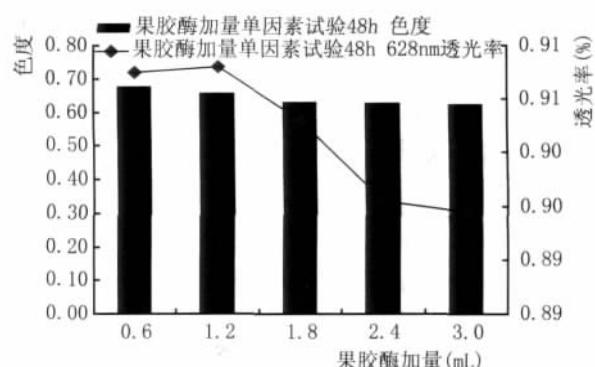


图3 果胶酶加量单因素实验(48 h)

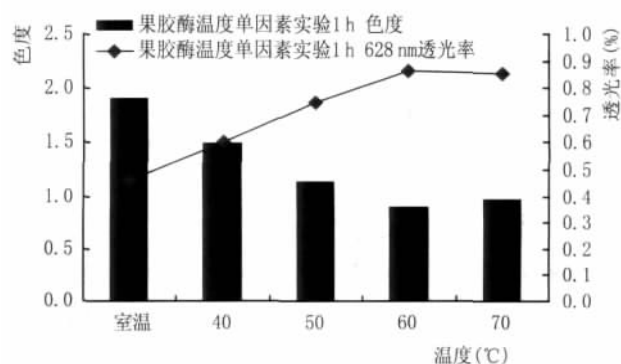


图4 不同温度对色度和透光度的影响(1 h)

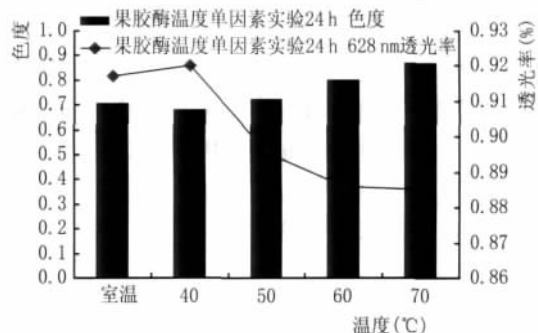


图5 不同温度对色度和透光度的影响(24 h)

图2为液体果胶酶处理24 h,样品的色度和透光度变化。结果显示,加酶量为0.6 mL/kg时,样品的色度最

高,为 0.724,透光度最好为 0.907。

图 3 为液体果胶酶处理 48 h,样品的色度和透光度的变化。结果显示,加酶量为 0.6~1.2 mL/kg 时,样品的色度和透光度明显比其他加量的处理效果好。加酶量大于 1.2 mL/kg 时,随果胶酶加量的增加其透光度明显下降。说明在酶反应的初始阶段果胶质分解速率较快,但当酶量达到一定程度后,一方面酶蛋白可能与山楂汁中的多酚类物质结合影响透光度,另一方面果胶质的分解产物对果胶酶的降解作用产生反馈抑制作用。由图 2 和图 3 可知,随样品酶处理时间的延长,其固形物含量及 pH 值变化不大。

图 4、图 5 分别为液体果胶酶在不同温度下作用 1 h 和 24 h 时,样品的色度和透光度变化。室温下果胶酶处理 1 h 时,样品色度值较高,但透光度不高。温度为 60~70 °C 时透光度较高。当果胶酶在不同温度下处理 24 h 后,由于经过了絮凝沉降,前 3 组样品的透光率大大提高,但其色度值明显降低。

综合考虑果胶酶处理时间、温度和加量对色度和透光度的影响认为:液体果胶酶加量为 0.6 mL/kg、60 °C 分解 24 h 样品的色度值和透光率均较好。

2.2 山楂酒酿造工艺关键点

发酵型山楂酒酿造工艺过程中除山楂汁的制备直接影响山楂酒的品质外,其他步骤如操作不当,同样对酒的质量有一定影响。

2.2.1 山楂分选、洗涤、破碎

山楂要求果粒大小均匀、无霉粒、无杂质,果皮鲜红或紫红色。将挑选好的山楂洗净晾干后钝压破碎,料水比为 1:1,于 60 °C 水浴浸取 30 min,重复操作 3 次。

2.2.2 酵母菌选择及发酵条件

酵母菌种为 BM₄₅,接种量 5.5×10^6 个/mL,控制发酵温度 28~30 °C,发酵过程中视发酵进展情况补加白砂糖至所需糖度。

2.2.3 山楂酒贮存及后处理

山楂酒在储酒罐中满存,控制总 SO₂ 的浓度为 100 mg/L。用明胶(明胶加冷水浸泡 24 h,再加 10~12 倍 55 °C 的热水溶解,溶解后的明胶加入山楂酒中,搅拌使之均匀)进行下胶处理,用量为 100~150 mg/L,温度控制在 15~18 °C,一周之后过滤分离。-4 °C 冷冻处理 15 d 后过滤,过滤采用膜深层过滤。

2.2.4 山楂酒成品指标

山楂酒成品理化指标参照葡萄酒国家标准 GB15037-2006 执行。酒体呈宝石红色,有光泽。酒质清澈透明、无悬浮物、无沉淀、无杂质。具有怡人的山楂果香和醇厚的酒香,口味纯正,酸甜适口,有愉快的涩敏感,醇

厚和谐,余味悠长,具有山楂发酵果酒的典型风格。

2.3 山楂酒中有机酸的测定

2.3.1 样品处理

山楂酒样品 25 mL,用超纯水定容至 100 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,待测。

2.3.2 有机酸测定色谱图及结果

对山楂酒样的有机酸进行测定,其色谱图及结果见图 6 和图 7。

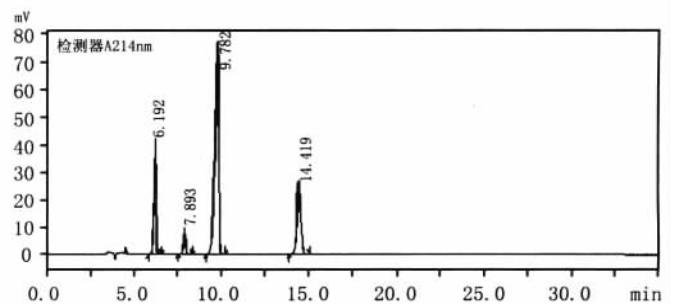


图 6 有机酸标准品色谱图(1 苹果酸、2 乳酸、3 柠檬酸、4 琥珀酸)

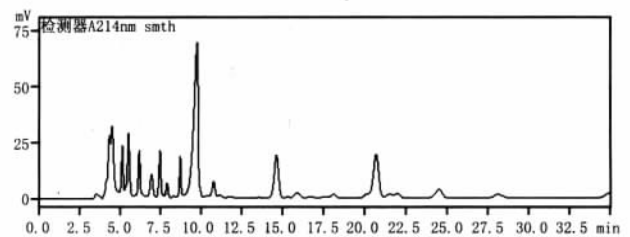


图 7 山楂酒样品色谱图

通过有机酸标品和样品的色谱图对比可知,酒样中分离的各种有机酸色谱峰与标准品匹配度较高,而且单峰的分离度和对称性也较好。结果显示,山楂酒以柠檬酸为主体酸,其含量达到 3366.34 mg/L。其次为琥珀酸和苹果酸。乳酸的含量最低为 0.276 mg/L。对于山楂酒中有机酸的检测,酒样的浓度不能过高,必须经过适当稀释或者减少进样量才能达到较好的分离效果。因为浓度较高会造成柠檬酸的进样量过大,从而使得柠檬酸的出峰受到前一物质的影响,导致分离不出柠檬酸的单峰和峰型出现严重的前拖尾。山楂酒中各有机酸含量测定线性回归方程、线性相关系数、相对标准偏差和含量结果见表 1。

表 1 山楂酒中有机酸含量测定结果

名称	含量 (mg/L)	回归方程	R ²	RSD (%)
苹果酸	646.736	Y=17.908X-28.88439	0.9990169	2.61
乳酸	0.276	Y=-1.6972X+17.28184	0.9991074	1.29
柠檬酸	3366.34	Y=12.380X-6.919385	0.9993131	0.77
琥珀酸	1791.172	Y=0.3147X+5.027619	0.9991795	0.84

(下转第 113 页)

利用微生物的不同生化和生理特性,可对微生物进行鉴定。气相色谱和高效液相色谱是常用的分析方法,其中以气相色谱应用较多,该法简单、快速。其原理是将微生物细胞经过水解、甲醇分解、提取以及硅烷化、甲基化等衍生化处理后,使之分离尽可能多的化学组分供气相色谱仪进行分析。主要是依据不同微生物的化学组成或所产生的代谢产物各异,利用上述色谱检查可直接分析各种微生物代谢产物、细胞中的脂肪酸、蛋白、氨基酸、多肽、多糖等,以确定微生物的特异性化学标志成分。不同的微生物所得到的色谱图中,通常大多数的峰是共性的,只有少数的峰具有特征性,可被用来进行微生物鉴定,大量分析检测各种常见细菌、酵母菌、霉菌等。如梳状菌属污染啤酒后可产生大量的丙酸和硫化氢,而啤酒巨球形菌则产生过量的丁酸、戊酸和己酸,因此,通过对代谢产物的分析可以很方便地检测出啤酒酿造过程中的有害菌。

10 小结

传统的微生物培养法虽然耗时较长、效率较低,但它仍广泛应用于实际生产中。与之相比,各种快速检测技术以其快速、灵敏、特异性强,而引起人们的广泛关注。但是一些快速检测技术仍需要依靠微生物的培养技术,也就是说只有当微生物的数量达到一定的值后才能进行检测。因此,当选用快速检测技术时,必须牢记,所谓快速仅仅是相对而言。微生物的培养条件、初始微生物的数量、微生物的倍增时间等因素,都会影响到检测时间的长短。即使如此,同传统的微生物培养法相比,快速检测技术仍显示出强大的生命力。

参考文献:

- [1] Foster,A.[J].Journal of the American Society of Brewing Chemists,1996,54,76.
- [2] Deak,T. and Beuchat,L.R.[J].Food Microbiology, 1995,(12): 165.
- [3] Vanne,L.,Karwoski,M.,Karppinen,S. and Sjoberg,A.M. [J].Food Control,1996,(7):263.
- [4] Gunasekera,T.Attfield,P.V. and Veal,D.A.[J]. Applied and Environmental Microbiology., 2000,66: 1228.
- [5] Boyd,A.,Attfield,P.V.,Veal,D.A. and Vincent,S.[J].Journal of the Institute of Brewing, 2000,106:319.
- [6] Fung,D.Y.C.[J]. Irish Journal of Agricultural and Food Reseach, 2000,39:301.
- [7] Tortorello,M.L.,Stewart,D.S. and Cray,W.C.Jr. [J].Veterinary Microbiology, 1996,51:343.
- [8] Daniel,Y.C.Fung.[M]. Comprehensive review of Food Science and Foodsafety.2002.
- [9] Tetsuji Yasui,Tomoyuki Okamoto,Hiroshi Tayachi.Can.J.[J]. Microbiol., 1997,43:157-163.
- [10] Manabu Samin,Yamashita H.Kadokura H.J.[J].Am.Soc.Brew. Chem.,1997,55(4):137-140.
- [11] Robert J Slewail,Terrance M Cowhanick.J.[J].Am.Soc.Brew. Chem., 1996,54(2):78-84.
- [12] Braune A. and Eidtmann A. 29th EBC Congr.[M].Dublin: Nurnberg,Fachverlag Hans Carl[CD-ROM],2003, 112:1128-1135.
- [13] Wold K, Bleken A and Hage T 30th EBC Congr.[M].Dublin: Nurnberg,Fachverlag Hans Carl[CD-ROM],2005,129: 1085-1087.

(上接第 108 页)

3 结论

3.1 对于山楂汁的制备,试验得出的最优工艺条件为:料水比 1:3,浸取时间 0.5 h,温度 60℃;液体果胶酶处理,加酶量 0.6 mL/kg,温度 60℃,作用时间 24 h,过滤待用。

3.2 对山楂酒中主要的有机酸进行了快速 HPLC 检测,其含量分别为:柠檬酸 3.366 g/L,琥珀酸 1.791 g/L,苹果酸 646.736 mg/L,乳酸 0.276 mg/L。对方法的可靠性做了详细的实验研究,经验证本方法快速、准确、可靠。

3.3 本方法对于果酒中有机酸的检测有着重要的参考价值。

参考文献:

- [1] 孔瑾,刘红,王鹏.山楂发酵果酒工艺技术研究[J].食品工业, 2006,(4):16-17.

- [2] 赵玉平,杜连祥.新型山楂汁饮料的研制[J].食品与发酵工业, 2003,29(9):98-100.
- [3] 蔡志朋.山楂酒的研制[J].酿酒科技,2003,(6):1-5.
- [4] 张庆合.高效液相色谱使用手册[M].北京:化学工业出版社, 2008.222-223.
- [5] 杨滨,李化,汤树良,等.高效液相色谱法测定山楂中枸橼酸的含量[J].中国药学杂志,2004,39(9):697-699.
- [6] 邹盛勤.高效液相色谱法同时测定山楂中乌索酸和齐墩果酸的含量[J].食品与机械,2006,22(2):87-98.
- [7] 袁光耀,郭振福,贾艳霞.高效液相色谱法(HPLC)测定山楂片中的熊果酸和齐墩果酸[J].食品研究与开发,2007,28(8): 137-139.
- [8] 顾国贤.酿造酒工艺学(第2版)[M].北京:中国轻工出版社, 1996.408-412.
- [9] 盛太伟,李兆刚,周建.山楂酒的研制与开发[J].山东食品发酵, 2002,(1):33-37.