

桃醋液态发酵过程中主要成分及有机酸的变化

向进乐, 杜琳, 刘志静, 李鑫玲, 罗磊, 朱文学

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471023)

摘要: 以成熟桃为原料, 采用液态发酵法酿造原浆桃醋, 对“两步法”酿造桃醋过程中主要成分的动态变化进行分析。桃打浆后接种 0.05% 的果酒酵母带皮渣酒精发酵, 在 20 °C 恒温发酵 80 h, 发酵液酒度为 6.07%。醋酸发酵使用自吸式液态深层发酵罐, 接种 10% 活化的醋酸菌菌种, 发酵温度 34 °C, 经 60 h 醋酸发酵, 桃醋酸度为 3.54%。桃醋发酵液中检出 9 种有机酸, 包括草酸、甲酸、苹果酸、 α -酮戊二酸、乳酸、醋酸、柠檬酸、富马酸和琥珀酸, 9 种有机酸在酒精发酵和醋酸发酵阶段均发生显著变化, 对发酵液的酸度和品质产生显著影响。酒精发酵阶段, 乳酸大量积累; 苹果酸、柠檬酸被消耗显著降低。醋酸发酵阶段酒精大量转化醋酸, 醋酸含量显著上升; 而其它大部分, 如乳酸、苹果酸等有机酸显著降低。试验确定的发酵方法适用于桃醋生产。

关键词: 桃; 液态发酵; 果醋; 有机酸

文章编号: 1673-9078(2015)5-193-198

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.031

Changes in Biochemical Parameters and Organic Acid Content during Liquid Fermentation of Peach Vinegar

XIANG Jin-le, DU Lin, LIU Zhi-jing, LI Xin-ling, LUO Lei, ZHU Wen-xue

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: Pear vinegar was produced from ripe peaches by liquid-state fermentation and changes in biochemical parameters were monitored during the “two-step” fermentation process. “Skin-on” fermentation was carried out after pulping and inoculation with 0.05% wine yeast. Fermentation lasted for 80 h at a constant temperature of 20 °C, with an alcoholic content of 6.07% (V/V). Acetic fermentation was carried out in a self-priming, submerged fermentation tank after inoculation with 10% acetic acid bacteria. Acetification lasted for 60 h at 34 °C with titratable acidity of 3.54% (m/V). Nine organic acids were found in the peach wine fermentation liquor, including oxalic acid, formic acid, malic acid, α -ketoglutaric acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid, and succinic acid. The organic acid content was constantly changing during fermentation, which significantly contributed to the acidity and quality of the fermentation liquor. During alcoholic fermentation, lactic acid was produced and accumulated, while the concentration of malic acid and citric acid decreased significantly. Acetic acid bacteria transformed alcohol to acetic acid, the concentration of which increased significantly, while the concentration of the majority of the remaining organic acids, such as lactic acid and malic acid, decreased during acetification. Thus, the “two-step” fermentation method used in this study is suitable for the production of peach vinegar.

Key words: peach; liquid fermentation; fruit vinegar; organic acids

桃 (*Amygdalus persica* Linn) 为蔷薇科 (rosaceae) 李属 (prunus) 植物的果实, 原产于我国。桃被认为是零钠、零脂肪、零胆固醇, 并且富含柠檬酸、苹果酸、琥珀酸等多种有机酸, 维生素和矿物质的夏季水果。桃的加工产品主要有桃汁、桃罐头、干制品、糖制品 (桃脯、桃酱和蜜饯) 等^[1], 也有采用生物发酵技术酿造桃酒^[2]和桃醋^[3]的报道。桃成熟后, 果实汁多

收稿日期: 2014-09-18

基金项目: 河南科技大学大学生研究训练计划 (SRTP) 项目 (2014110); 河南科技大学博士科研基金资助项目 (13480034)

作者简介: 向进乐 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬发酵食品及其功能性

皮薄, 容易软烂, 不耐贮运。桃产区在盛果期往往有相当数量的桃不能及时销售软化而被废弃。但是, 充分成熟后的软桃, 可溶性固形物较高, 是良好的发酵原料。李自强^[3]以成熟水蜜桃为原料, 采用固态发酵法对桃醋的酿造工艺进行研究, 得到了风味、色泽良好的桃醋。

发酵果醋中含有种类丰富的有机酸, 有机酸也是果醋的最重要营养、风味和特征成分之一。果醋酿造过程中, 酵母菌和醋酸菌进行旺盛的发酵代谢, 一部分有机酸作为微生物代谢底物, 如苹果酸、柠檬酸等, 有些有机酸由于微生物代谢产生, 如乳酸、醋酸和琥珀酸等^[4-5]。果醋的发酵方法^[6]和工艺条件^[7]都会直接

影响最终产品有机酸的种类和含量。桃醋的液态发酵工艺,有机酸种类和含量以及所含各种有机酸在发酵过程中的动态变化过程均未见报道。本试验以成熟桃为原料,采用“两步法”发酵法酿造桃醋,分析桃醋中主要有机酸及其在发酵过程中的动态变化,以期为桃醋加工和品质控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桃,洛阳市银杏山庄;酒用高活性干酵母,湖北安琪酵母股份有限公司;醋酸菌,上海中科伍佰豪生物有限公司;有机酸标准品(草酸、乙酸、甲酸、苹果酸、乳酸、琥珀酸、富马酸、 α -酮戊二酸、酒石酸、柠檬酸,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);3,5-二硝基水杨酸(DNS)、葡萄糖、NaOH、 KH_2PO_4 、 H_3PO_4 等,均为国产分析纯试剂。

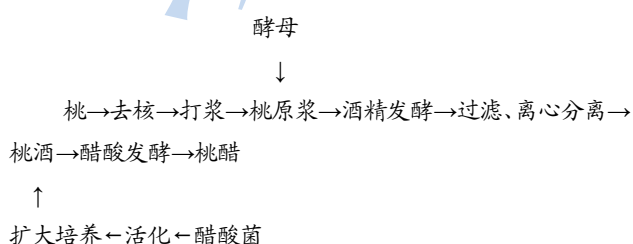
1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计(UVmini 1240型),日本岛津公司;打浆机(HR2838型),珠海经济特区飞利浦家用电器有限公司;手持糖量计(WYT-4型),福建省泉州光学仪器厂;台式离心机(TD5A),湖南凯达科学仪器有限公司;高速冷冻离心机,北京时代北利离心机有限公司;pH计(THS-3C),上海雷磁仪器厂;移液器,上海大龙医疗设备有限公司;小型自吸式液态发酵罐(5L),实验室自制;Shimadzu LC-15C 高效液相色谱仪(配有LC-15C泵,SIL-10AF自动进样器,CTO-15C柱温箱,SPD-15C双波长紫外检测器以及Shimadzu数据处理系统),日本岛津公司;Wondasil C18 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),日本岛津公司;水相针式过滤器(0.22 μm),上海楚定分析仪器有限公司;超纯水发生器,净环环保设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 桃醋发酵工艺

1.3.1.1 工艺流程:



1.3.1.2 技术要点:

(1) 挑选干净、成熟的桃,去核,直接打浆得桃

原浆

(2) 按桃浆重量添加0.05%的酒用活性干酵母,20℃恒温酒精发酵,酒精度不再升高后过滤,离心分离得桃酒

(3) 在桃酒酪中接种10%活化的醋酸菌菌种,34℃恒温通气发酵得桃醋

1.3.2 发酵液可溶性固形物、酒精度以及 pH 值测定

样品可溶性固形物以手持糖度计测定;发酵液酒精度以酒精计法测定,取100 mL的发酵液,将样品中酒精蒸馏,收集蒸馏液定容至100 mL,以酒精计测其酒度,同时测定温度,查表、换算得发酵液酒精含量;pH值直接取样用pH计测定。

1.3.3 总酸和还原糖测定

样品中总酸采用酸碱滴定法测定。取样1.0 mL,用0.1 mol/L NaOH溶液滴定至pH 8.1,结果以醋酸计。

还原糖以3,5-二硝基水杨酸比色法测定^[8]。分别量取2 mg/mL葡萄糖标准溶液0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL,加蒸馏水至总体积为1.0 mL,然后各加DNS 2.0 mL混匀,沸水浴2 min,冷却后加9.0 mL蒸馏水混匀,于540 nm处测定吸光值,绘制标准曲线得回归方程为: $y=0.4427x-0.0163$ ($R^2=0.9981$)。取1.0 mL样液按标准曲线方法测定,计算发酵液还原糖含量。

1.3.4 有机酸含量测定

发酵过程中桃发酵液有机酸含量参考前期优化的方法进行^[4]。

色谱条件:色谱柱,Wondasil C18 色谱柱(4.6 \times 250 mm ID, 5 μm);流动相,0.01 mol/L KH_2PO_4 - H_3PO_4 ,缓冲溶液(pH 2.8)过0.45 μm 水系滤膜;流速0.7 mL/min;检测波长210 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL 。

样品处理:取一定量的桃发酵液样品迅速高速冷冻离心(10000 r/min, 10 min),使蛋白质、果胶等干扰物质沉淀分离,上清液用流动相稀释10倍,过0.22 μm 孔径滤膜,滤液上机分析(进样10 μL),外标法定量。

1.3.5 统计分析

采用DPS 6.55数据处理软件对实验结果进行处理(实验重复三次),结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性差异以不同字母表示($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 酒精发酵过程基本参数变化

桃浆酒精发酵过程中发酵液可溶性固形物、还原

糖、酒精度以及 pH 值变化如图 1 所示。由图可以看出, 酒精发酵大致可以分为三个阶段。在初始阶段 (0~16 h), 由于桃浆皮渣中部分可溶性糖溶出以及酵母将蔗糖转化为葡萄糖和果糖^[9], 而使发酵液还原糖含量略有升高。在这一阶段, 酵母剧烈活动产生大量 CO₂, 将皮渣悬浮, 逐渐形成酒帽。这一阶段只产生微量酒精, pH 值变化不明显。中间发酵阶段 (16~64 h), 发酵液可溶性固形物含量由于可溶性糖不断被消耗而显著下降。这一阶段, 酵母将糖转化为酒精, 酒度达到 5.83%(V/V), 而还原糖几乎耗尽, pH 值也不断下降直至最低点。最后发酵阶段 (64~80 h), 由于还原糖耗竭, 酵母的活动逐渐减弱, 酒度缓缓升高至最大值 6.07%(V/V), 酒精发酵结束。由图 1 可以看出, 桃浆在 20 °C 发酵 80 h, 酒精发酵即可完成。

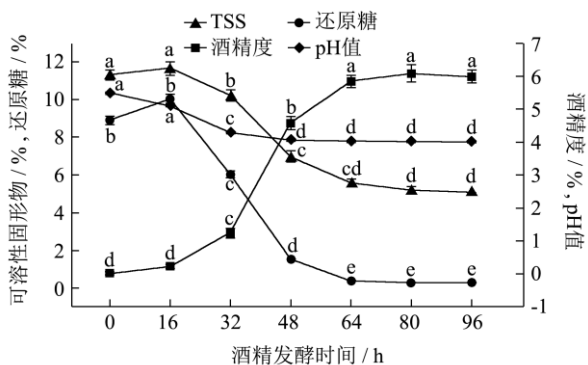


图 1 酒精发酵过程中总可溶性固形物含量、还原糖、酒精度以及 pH 变化

Fig.1 Time course of alcoholic fermentation to produce peach vinegar (n = 3)

注: 不同时间点差异显著性以不同字母 a、b、c、d、e 表示 (p<0.05)。

2.2 醋酸发酵过程基本参数变化

传统醋酸发酵周期长, 往往需要 4~5 周才能完成一批发酵, 而连续和半连续发酵往往可以使醋化效率显著提高^[10]。本试验使用实验室自制的半连续自吸式醋酸发酵罐进行发酵。

醋酸发酵过程中总酸、酒度以及 pH 值变化如图 2。由图 2 可以看出, 醋酸发酵大致可分为两个阶段。第一阶段 (0~12 h): 醋酸菌首先不断增殖至足够高的菌体浓度, 这一阶段发酵液总酸度小幅升高, 说明醋酸菌在桃酒液中生长繁殖良好。第二阶段 (12~60 h): 酒度急剧下降至 0.71%(V/V), 总酸含量显著升高至 3.53%(m/V), pH 值也显著下降至最低点 3.37。这一阶段是发酵产酸的主要时期。由于醋酸菌活动剧烈, 发酵液温度很容易升高, 需要维持相对稳定的发酵温度

(34 °C 左右), 才能保证醋酸发酵的正常进行。发酵的最后 12 h, 由于发酵液酒精基本耗尽, 总酸度基本维持最大值 3.54%(m/V)。由图 2 可以看出, 桃酒在 34 °C 恒温通气醋化 60 h 即可完成醋酸发酵。

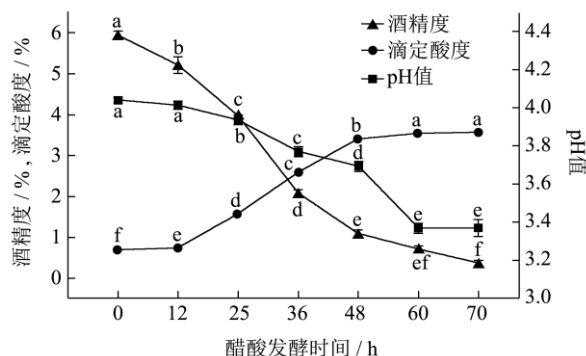


图 2 醋酸发酵酒精度、总酸含量以及 pH 变化

Fig.2 Time course of acetic fermentation to produce peach vinegar (n = 3)

注: 不同时间点差异显著性以不同字母 a、b、c、d、e、f 表示 (p<0.05)。

2.3 桃发酵液中有有机酸及在酿醋过程中的变化

有机酸标样 RP-HPLC 色谱图如图 3 所示, 各种有机酸分离良好。

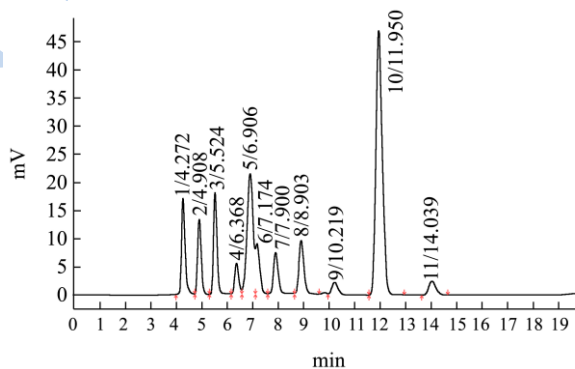


图 3 11 种有机酸标样色谱图

Fig.3 Chromatogram of a standard mixture containing 11 organic acids

注: (1)草酸; (2)酒石酸; (3)甲酸; (4)苹果酸; (5) α -酮戊二酸; (6)未知; (7)乳酸; (8)醋酸; (9)柠檬酸; (10)富马酸; (11)琥珀酸。

桃酒和桃醋有机酸色谱图如图 4 和图 5 所示。桃发酵液中共检出 9 种有机酸, 分别对应为标样色谱图中的峰(1)草酸、(3)甲酸、(4)苹果酸、(5) α -酮戊二酸、(7)乳酸、(8)醋酸、(9)柠檬酸、(10)富马酸、(11)琥珀酸。

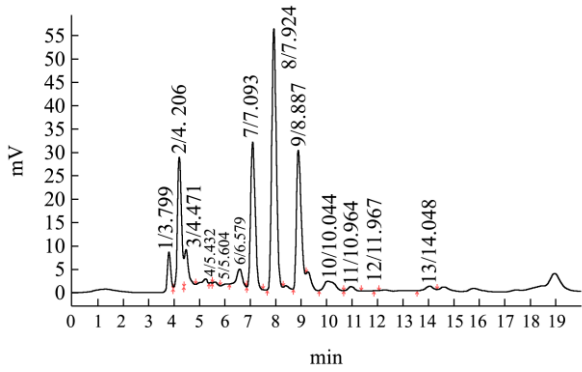


图4 桃酒有机酸色谱图

Fig.4 Chromatogram of peach wine containing 13 organic acids

注：(1)未知；(2)草酸；(3)未知；(4)未知；(5)甲酸；(6)苹果酸；(7) α -酮戊二酸；(8)乳酸；(9)醋酸；(10)柠檬酸；(11)未知；(12)富马酸；(13)琥珀酸。

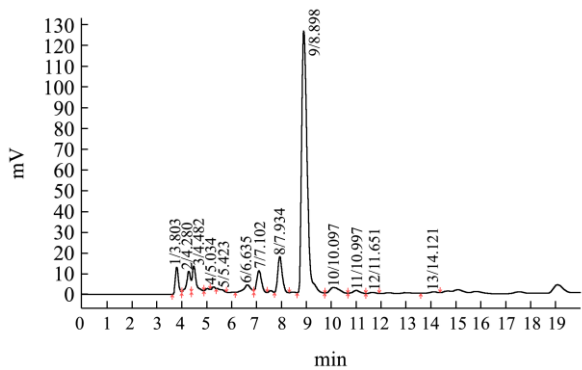


图5 桃醋有机酸色谱图

Fig.5 Chromatogram of peach vinegar containing 13 organic acids

注：(1)未知；(2)草酸；(3)未知；(4)甲酸；(5)未知；(6)苹果酸；(7) α -酮戊二酸；(8)乳酸；(9)醋酸；(10)柠檬酸；(11)未知；(12)富马酸；(13)琥珀酸。

桃酒中的主要有机酸有草酸、苹果酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、乳酸和醋酸，桃浆酒精发酵过程中有机酸的变化如图6所示。

酒精发酵中最显著的特点是乳酸大量积累，而桃果实中固有的苹果酸和柠檬酸含量降低。酒精发酵初始阶段，由于苹果酸和柠檬酸从桃的皮渣中不断溶出，二者含量显著升高。但是，在酒精发酵32h时，苹果酸含量显著下降至858.88 mg/L。因为，在酒精发酵中，通常伴随着著名的苹果-乳酸发酵(MLF)或者苹果酸-酒精发酵(MEF)^[11-12]。在MLF过程中，乳酸菌比如酒球菌(Oenococcus oeni)能将苹果酸转化成乳酸和CO₂。因此，在发酵的16-32h之间，苹果酸急剧减少；同时，乳酸含量显著升高。但，由于酵母菌通常不能有效将苹果酸完全转化，而且在酒精发酵中通常还会出现MLF停滞现象^[11]。所以，苹果酸被大量代谢之后的发酵阶段，变化不显著；乳酸含量的变化也趋于

稳定。

草酸也是桃果实中的一种有机酸，在桃浆酒精发酵中的变化如图6(a)所示。发酵初期，桃浆发酵液草酸含量为560.56 mg/L，随着发酵的进行草酸含量显著降低。由于草酸与发酵液中的金属离子结合易形成沉淀，64h时草酸含量下降至365.17 mg/L，而发酵后期草酸含量降低不显著。 α -酮戊二酸是由微生物发酵产生的一种微量有机酸^[13]， α -酮戊二酸含量先显著增加至837.54 mg/L，然后下降至425.42 mg/L。

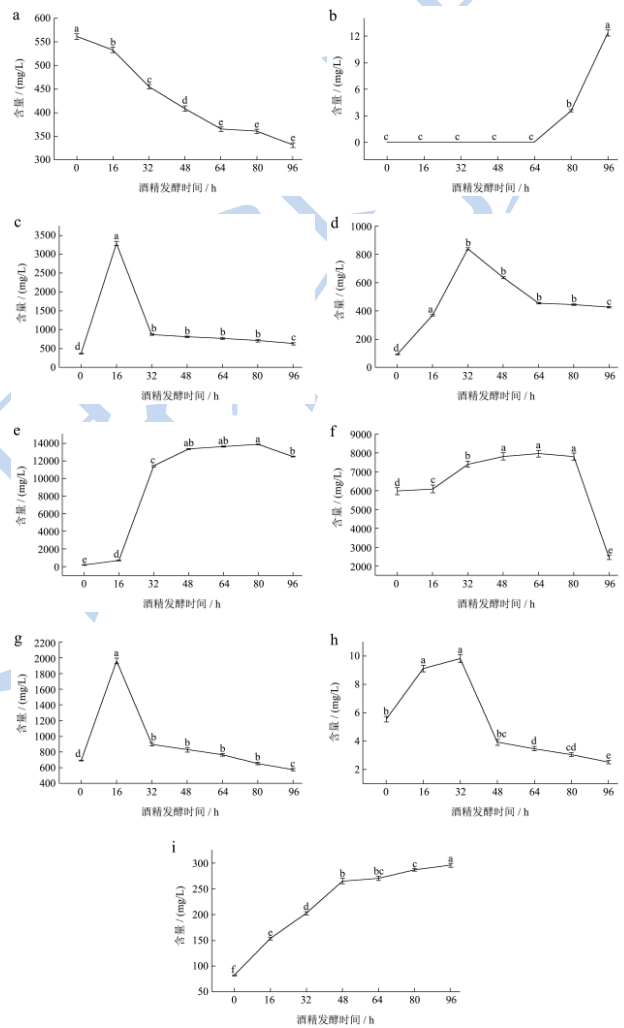


图6 酒精发酵过程中9种有机酸变化

Fig.6 Changes in organic acid content during alcoholic fermentation (n = 3)

注：a草酸，b：甲酸，c：苹果酸，d： α -酮戊二酸，e：乳酸，f：醋酸，g：柠檬酸，h：富马酸，i：琥珀酸；不同时间点差异显著性以不同字母a、b、c、d、e、f表示(p<0.05)。

酿酒酵母在厌氧条件下将糖转化为酒精的过程中通常伴随着一定量的副产物的产生，最常见的副产物是醋酸、甘油和生物量^[13]。酒精发酵中，醋酸含量的变化如图6(f)。醋酸在酒精发酵过程中不断合成和积累，在60h时达到最大值7.96 g/L。酒精发酵过程中

糖含量高时, 醋酸含量显著升高^[13]。另外, 酵母细胞在酒精发酵的初始阶段代谢产生少量乙醛, 而乳酸菌能将乙醛转化为酒精或者醋酸^[14]。因此, 在酒精发酵的前半程, 醋酸含量显著升高。而发酵后期由于醋酸作为营养物质被酵母代谢利用产生少量酒精, 而使醋酸含量在酒精发酵的最后阶段显著下降^[5, 13]。

桃醋中的主要有机酸有醋酸、乳酸和 α -酮戊二酸, 醋酸发酵过程中有机酸变化如图7所示。醋酸发酵阶段的特点是醋酸含量显著上升, 而其它大部分有机酸含量降低。

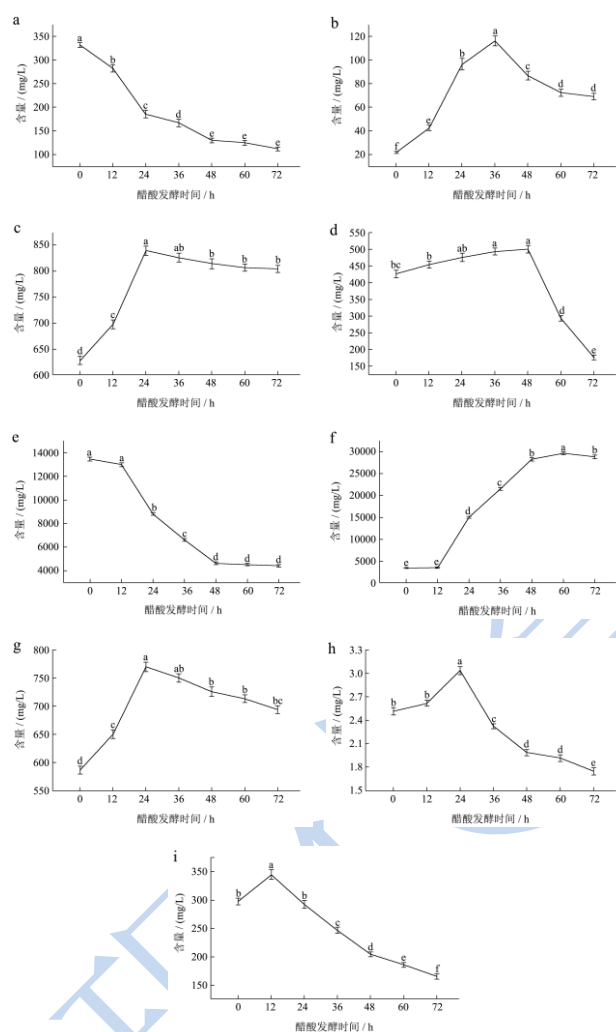


图7 醋酸发酵过程中9种有机酸变化

Fig.7 Changes in organic acid content during acetic fermentation (n = 3)

注: a:草酸, b: 甲酸, c: 苹果酸, d: α -酮戊二酸, e: 乳酸, f: 醋酸, g: 柠檬酸, h: 富马酸, i: 琥珀酸; 不同时间点差异显著性以不同字母a、b、c、d、e、f表示 (p<0.05)。

醋酸菌将酒精转化为醋酸, 醋酸含量显著升高。醋酸的变化趋势如图7(f), 变化趋势与图2中总酸度的变化趋势一致, 醋酸的大量生成是桃醋总酸度增加的直接原因。醋酸发酵的最后12h, 醋酸可能由于被

过度氧化分解为CO₂和水以及挥发损失。醋酸含量在发酵60h达到最大值29.60g/L, 说明此时可以终止发酵。因此, 直接测定醋酸含量可以更加精确地判断醋酸发酵终点, 防止发酵过度。

苹果酸在醋酸发酵中的变化如图7(c), 苹果酸含量先显著升高(p<0.05), 然后一直缓慢下降至发酵结束。这可能因为在醋酸发酵后期苹果酸作为营养物质被醋酸菌代谢和利用。 α -酮戊二酸的变化如图7(d), α -酮戊二酸含量先显著升高至499.97mg/L, 最终下降至175.33mg/L。 α -酮戊二酸浓度在发酵过程中波动可能主要是由微生物的代谢积累以及被消耗利用引起。草酸、乳酸、富马酸和琥珀酸含量显著下降, 也可能是因为被醋酸菌代谢利用或者在发酵的强氧化条件下被氧化降解引起。

3 结论

3.1 “两步法”液态发酵酿造桃醋方法简单、可行。成熟桃直接打浆后接种0.05%的果酒酵母, 在20℃恒温酒精发酵80h, 发酵液酒精度为6.07%。醋酸发酵时接种10%活化的醋酸菌菌种, 在34℃经60h通气醋化, 桃醋酸度为3.54%。

3.2 桃醋酿造过程中, 各种有机酸在发酵过程中不断积累、代谢与转化。酒精发酵阶段最显著的特点是由于苹果-乳酸发酵而使乳酸大量积累, 苹果酸、柠檬酸被消耗而降低; 草酸由于形成草酸盐沉淀, 显著降低; 其它有机酸如 α -酮戊二酸、琥珀酸由于微生物的代谢积累, 含量显著升高。

3.3 醋酸发酵阶段的特点是由于醋酸菌转化酒精生成醋酸, 醋酸含量显著上升; 而其它大部分有机酸由于在醋酸发酵中作为醋酸的营养物质被代谢, 比如乳酸、苹果酸等; 或者在发酵的强氧化条件下被氧化降解而导致含量下降, 比如琥珀酸, 富马酸等。

参考文献

[1] 吕健, 毕金峰, 赵晓燕, 等. 国内外桃加工技术研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 268-270
LV Jian, BI Jin-feng, ZHAO Xiao-yan, et al. Research progress on peach processing technology [J]. Food and Machinery, 2012, 28(1): 268-270

[2] 康孟利, 林旭东, 凌建刚, 等. 干白水蜜桃酒发酵关键工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 98-100
KANG Meng-li, LIN Xu-dong, LING Jian-gang, et al. Dry white wine fermentation of the key technology of peach [J]. Food Research and Development, 2010, 31(10): 98-100

[3] 李自强. 桃果醋酿造工艺研究[J]. 中国酿造, 2007, 3: 70-72

- LI Zi-qiang. Brewing technology of peach vinegar [J]. China Brewing, 2007,3: 70-72
- [4] 向进乐,杜琳,郭香凤,等.离子抑制反相高效液相色谱法测定菠萝果酒中10种有机酸[J].中国食品学报,2014, 14(6): 229-234
- XIANG Jin-le, DU Lin, GUO Xiang-feng, et al. Determination of ten organic acids in pineapple wine by ion suppression reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(6): 229-234
- [5] Vasserot Y, F Mornet, P Jeandet. Acetic acid removal by *saccharomyces cerevisiae* during fermentation in oenological conditions. metabolic consequences [J]. Food Chemistry, 2010, 119: 1220-1223
- [6] 赵松,王颀,刘亚琼.不同发酵方法对枣醋主要有机酸含量的影响[J].中国食品学报,2014,3:135-139
- ZHAO Song, WANG Jie, LIU Ya-qiong. Effects of different fermentation processes on contents of main organic acids of jujube vinegar [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, (03): 135-139
- [7] 鲁周民,刘月梅,赵文红,等.工艺条件对柿果醋中主要有机酸含量的影响[J].农业工程学报,2009,(S1):213-216
- LU Zhou-min, LIU Yue-mei, ZHAO Wen-hong, et al. Effects of technological conditions on contents of main organic acids of persimmon vinegar [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, (S1): 213-216
- [8] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428
- [9] Jayabalan R, S Marimuthu, K Swaminathan. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation [J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 392-398
- [10] Kaur P, G S Kocher, R P Phutela. Production of tea vinegar by batch and semicontinuous fermentation [J]. Journal of Food Science and Technology, 2010, 48(6): 755-758
- [11] Volschenk H, H J J v Vuuren, M Viljoen-Bloom. Malic acid in wine: Origin, function and metabolism during vinification [J]. South African Journal for Enology & Viticulture, 2006, 27(2): 123-135.
- [12] Versari A G, Parpinello M, Cattaneo. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 23: 447-455
- [13] Taherzadeh M J, C Niklasson, G Liden. Acetic acid-fermenter in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *saccharomyces cerevisiae*? [J] Chemical Engineering Science, 1997, 52(15): 2653-2659
- [14] Osborne J P, A Dube Morneau, R Mira de Orduna. Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(2): 474-479