

和田红葡萄汁熬煮过程中游离氨基酸检测与分析

乔通通¹, 薛菊兰¹, 何引¹, 朱丽霞^{1,2*}

(1. 塔里木大学生命科学学院, 阿拉尔 843300; 2. 新疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 阿拉尔 843300)

摘要: **目的** 研究和田红葡萄汁在熬煮过程中, 游离氨基酸含量随糖度升高的变化趋势。**方法** 利用 AccQ-Tag-高效液相色谱法对和田红葡萄熬煮汁中游离氨基酸进行定量检测。**结果** 脯氨酸和精氨酸在慕萨莱思中含量最多, 其次是赖氨酸、丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸, 甲硫氨酸含量最少, 半胱氨酸未检出。熬煮过程中多数氨基酸含量平稳上升, 天冬氨酸和甘氨酸含量略有下降; 当糖度达到 26 °Brix 之后, 丝氨酸、谷氨酸和甲硫氨酸含量有所下降。**结论** 氨基酸的变化明显受到美拉德反应的影响, 总氨基酸的浓缩为慕萨莱思自然发酵及其香味积累提供了前提条件。

关键词: AccQ-Tag 高效液相色谱法; 游离氨基酸; 熬煮; 慕萨莱思发酵液

Detection and analysis of free amino acids during the cooking process of Hetian red grape juice

QIAO Tong-Tong¹, XUE Ju-Lan¹, HE Yin¹, ZHU Li-Xia^{1,2*}

(1. College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China; 2. South Xinjiang Special Agricultural Products Deep Processing Corps Key Laboratory, Alar 843300, China)

ABSTRACT: Objective To study the change trend of free amino acid content with the increase of sugar content during the cooking process of Hetian red grape juice. **Methods** AccQ-Tag-high performance liquid chromatography was used to quantitatively detect free amino acids in Hetian red grape cooking juice. **Results** Proline and arginine were the most abundant in Musales, followed by lysine, serine, glutamic acid, alanine, and phenylalanine. The content of methionine was the least, and cysteine was not check out. During the cooking process, the content of most amino acids increased steadily, and the content of aspartic acid and glycine decreased slightly; when the sugar content reached 26 °Brix, the content of serine, glutamic acid, and methionine decreased. **Conclusion** The changes of amino acids are obviously affected by the Maillard reaction. The concentration of total amino acids provides a prerequisite for natural fermentation and accumulation of flavor in Musales.

KEY WORDS: AccQ-Tag-high performance liquid chromatography; free amino acid; boiling; fermentation broth of Musales

基金项目: 地区科学基金(31660460)

Fund: Supported by the Regional Science Foundation (31660460)

*通讯作者: 朱丽霞, 教授, 主要研究方向为食品加工及贮藏技术。E-mail: 120050068@taru.edu.cn

*Corresponding author: ZHU Li-Xia, Professor, College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China. E-mail: 120050068@taru.edu.cn

1 引言

据《阿克苏市志》记载:清光绪年间流传一种低醇度的葡萄酒,当地人们会遵循祖辈的经验,将葡萄手工取汁、浓缩、移入大缸后进行自然发酵,这种葡萄饮品即为慕萨莱思^[1,2]。

葡萄汁中含有多种含氮化合物,酵母可同化的 2 类主要含氮化合物是铵离子和氨基酸,氨基酸是形成蛋白质的原料,是一些杂醇油的前体,其含量与酒的芳香有关,此外,氨基酸也是人体的营养成分。氨基酸中氮素占总同化氮的 60%左右,是酵母菌重要的生长因子,可影响酵母的生长、发酵速率、发酵持续时间及糖代谢速率^[3-5]。葡萄汁中的可同化氮素不足会造成酒精发酵停滞,进而影响葡萄酒的香气成分和质量^[4,6-8]。慕萨莱思是由和田红葡萄皮渣熬煮汁与其原汁混合后,再经熬煮后得到的混合物,其氨基酸含量在熬煮过程中不断发生变化,熬煮过程中基于氨基酸与葡萄糖的美拉德反应是决定成品感官品质的重要反应^[9]。AccQ-Tag 方法是 Waters 公司专为柱前衍生高效液相分析氨基酸而开发的创新方法,其核心在于名为 AQC(6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)的专利衍生剂能与所有含氨基的化合物发生快速、定量反应^[10-12]。葡萄汁浓缩程度不同,产品品质也不相同,对此本研究采用 AccQ-Tag 高效液相色谱法对不同熬煮程度的和田红浓缩汁中游离氨基酸含量进行测定和分析,把握其变化规律,考察不同浓度下的葡萄汁中游离氨基酸的变化,为慕萨莱思产品在熬煮工序中浓缩度的选择提供理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

和田红葡萄:购买于新疆阿瓦提县。

磺基水杨酸(分析纯,北京凯瑞基生物科技有限公司);乙二胺四乙酸二钠(ethylene-diamine-tetra-acetate, EDTA)(分析纯,上海雅吉生物科技有限公司);盐酸(优级纯,上海国药公司);Waters AccQ-Fluor 试剂盒(包括硼酸缓冲液 I、衍生剂粉 2A、稀释液 2B);混合氨基酸标准液[含 17 种氨基酸,分别为天冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、半胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、甲硫氨酸(Me)、赖氨酸(Lys)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe),美国 Waters 公司];乙腈(色谱纯,美国 Honeywell B&J 公司);实验用高纯水(美国 MilliQ 公司)。

2.2 仪器与设备

Waters-2695 高效液相色谱仪(配有 2475 荧光检测器及色谱工作站,美国 Waters 公司);EYELA 真空旋转蒸发器(日本东京理化器械株式会社);CL-20M 高速冷冻离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);SK-1 型快速混匀器、HH-S 数显恒温水浴锅(江苏金坛医疗仪器厂);SK-2000LH 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);GZX-9140 MBE 电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

吸取 2 mL 葡萄汁于 10 mL 离心管,准确加入 50 g/L 磺基水杨酸 2 mL,混匀,放置 1 h,使蛋白质沉淀。准确加入 10 g/L EDTA 溶液 1 mL 和 0.06 mol/L 盐酸溶液 1 mL,混匀,离心 15 min,将上清液用微孔膜(0.45 μm)过滤。吸取滤液 1 mL 蒸干。用重蒸水定容至 5 mL,待衍生。

2.3.2 衍生处理

取样品滤液 20 μL 和硼酸缓冲液 70 μL ,加入衍生剂 10 μL (6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯),在混合器上充分混合,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 10 min,待测。

2.3.3 色谱条件

色谱柱:Waters AccQ-Tag 氨基酸分析柱 C_{18} (3.9 mm \times 150 mm, 4 μm);柱温:37 $^{\circ}\text{C}$;流速:1 mL/min;进样量 10 μL ;荧光检测:激发波长 250 nm,发射波长 395 nm;流动相 A:醋酸盐-磷酸盐缓冲液,使用时以 1:10($V:V$)用 MilliQ 高纯水稀释;流动相 B:乙腈;流动相 C:MilliQ 高纯水。流动相经超声脱气后使用。梯度洗脱程序如表 1。

2.3.4 氨基酸的定性和定量测定

根据氨基酸标准品的保留时间和荧光光谱对样品中的氨基酸定性,用 Waters 色谱工作站测定纯度后,据外标曲线计算氨基酸的含量(mg/L)。

3 结果与分析

3.1 氨基酸标准溶液的色谱分离

配制浓度分别为 0.0125、0.025、0.05、0.075、0.1 $\mu\text{mol/mL}$ 氨基酸混标溶液,每一标准液按上述方法进行衍生化处理后取 10 μL 进行测定。17 种氨基酸混合标准液 AQC 衍生物的色谱分离见图 1,所有衍生物均可获得较好的分离。

3.2 方法的回归方程及相关系数

以各氨基酸溶液浓度 $X(\text{mg/L})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制氨基酸的标准工作曲线,由表 2 可知,线性回归方程的相关系数 r 均大于 0.9994,呈良好的线性关系。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Conditions of gradient elution

	时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%	曲线
1	0.01	1.00	100.0	0.0	0.0	6
2	0.50	1.00	99.0	1.0	0.0	11
3	18.00	1.00	95.0	5.0	0.0	6
4	19.00	1.00	91.0	9.0	0.0	6
5	29.50	1.00	83.0	17.0	0.0	6
6	33.00	1.00	0.0	60.0	40.0	11
7	36.00	1.00	100.0	0.0	0.0	11
8	45.00	1.00	100.0	0.0	0.0	6

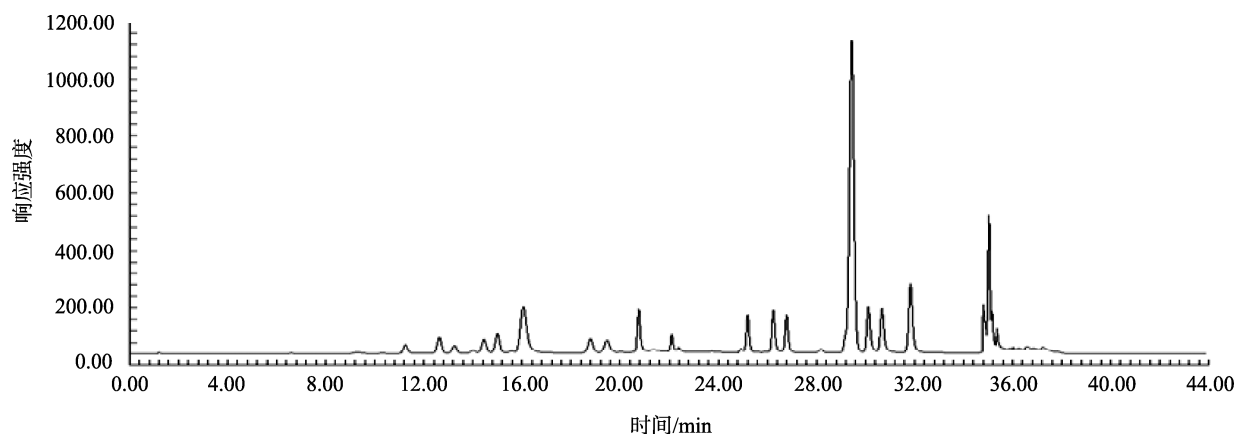


图 1 标准氨基酸衍生物的分离色谱图

Fig.1 Chromatograms of amino acids derivatives in standard by diode array detection

表 2 线性回归方程及相关系数
Table 2 Linear regression equation, correlation coefficient of amino acids derivatives

序号	氨基酸	保留时间/min	线性回归方程	相关系数 r
1	天冬氨酸 Asp	11.358	$Y=325.5X-4610.1$	0.9997
2	丝氨酸 Ser	12.730	$Y=808.5X-7642.0$	0.9998
3	谷氨酸 Glu	13.345	$Y=294X-3431.8$	0.9998
4	甘氨酸 Gly	14.540	$Y=1008X-23015$	0.9995
5	组氨酸 His	15.086	$Y=693X-39833$	0.9995
6	精氨酸 Arg	18.857	$Y=483X-18039$	0.9998
7	苏氨酸 Thr	19.523	$Y=703.5X-26550$	0.9998
8	丙氨酸 Ala	20.807	$Y=180.2X-30450$	0.9998
9	脯氨酸 Pro	24.147	$Y=420X+45951$	0.9999
10	半胱氨酸 Cys	24.967	$Y=90393X-1828.9$	0.9997
11	酪氨酸 Tyr	25.226	$Y=703.5X-31363$	1.0000
12	缬氨酸 Val	26.236	$Y=137.8X-25407$	1.0000
13	甲硫氨酸 Met	26.801	$Y=924X-1309$	0.9999
14	赖氨酸 Lys	29.438	$Y=117.7X-262.5$	0.9997
15	异亮氨酸 Ile	30.117	$Y=148.4X-22156$	0.9999
16	亮氨酸 Leu	30.666	$Y=159X-27839$	1.0000
17	苯丙氨酸 Phe	31.823	$Y=190.8X-59387$	0.9999

3.3 原汁及不同熬煮程度的和田红浓缩汁中 17 种游离氨基酸的含量

采用 AccQ-Tag 高效液相色谱法对和田红葡萄原汁及不同熬煮程度和田红浓缩汁中 17 种游离氨基酸含量进行测定, 结果如表 3 所示。

从表 3 可看出, 和田红浓缩汁与原汁中氨基酸种类较为丰富, 同时氨基酸的组成相同, 但其含量上具有一定差异。和田红浓缩汁中大部分氨基酸(丝氨酸、谷氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸)含量远高于原汁, 随酿造过程的进行, 氨基酸总量也逐渐增加。同时随着酿造的进行, 天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸的含量有所降低。原汁与熬煮过程均未检出半胱氨酸。在含量减少的氨基酸中, 甘氨酸的变化趋势极为明显, 原汁中甘氨酸的含量为 22.76 mg/L, 发酵液中(30 °Brix)为 6.83 mg/L, 由此可见, 在和田红浓缩汁发酵过程中, 其氨基酸为微生物发酵营养素来源之一。甲硫氨酸和半胱氨酸是含硫氨基酸, 在正常发酵过程中, 硫化氢的形成主要由含硫氨基酸经酵母代谢分解产生, 和田红浓缩汁中甲硫氨酸和半胱氨酸含量极低, 因此能在一定程度上降低硫化氢的合成, 提高酒的品质。

原汁与 11 °Brix 和田红浓缩汁的糖度相差不大, 但其

氨基酸含量相差较大。11 °Brix 和田红浓缩汁中除甘氨酸和酪氨酸含量在减少外, 其他氨基酸含量均比原汁高, 其中天冬氨酸、丝氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸及苯丙氨酸含量增加显著; 谷氨酸与甲硫氨酸含量略有增加。甘氨酸、酪氨酸含量降低的原因主要是皮渣熬煮过程中溶解或水解得到的甘氨酸和酪氨酸含量低, 使得原汁中氨基酸被稀释, 同时熬煮过程中甘氨酸和酪氨酸与糖发生了美拉德反应, 因此降低了其总体水平。天冬氨酸、丝氨酸、精氨酸、脯氨酸等含量显著增加的原因主要是皮渣在熬煮过程中游离氨基酸溶出, 部分蛋白质或小分子肽也水解得到的氨基酸, 此外, 熬煮过程中慕萨莱思发酵液糖度增加了 1 °Brix, 略有浓缩。在熬煮过程中, 和田红浓缩汁中组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的含量都保持较平稳上升, 这主要是熬煮过程中水分蒸发, 氨基酸浓缩所致; 天冬氨酸含量持续下降, 甘氨酸先保持相对稳定, 当糖度达到 26 °Brix 后含量开始下降, 这主要是受美拉德反应的影响, 因美拉德反应损失的量高于蒸发浓缩的量; 当糖度达到 26 °Brix 后, 丝氨酸、谷氨酸和甲硫氨酸含量有所下降, 这可能随着糖度的升高, 美拉德反应加剧, 消耗更多的氨基酸。在过去的研究中发现, 醇香与焦糖香为慕萨莱思特征香气^[13,14]。同时也有研

表 3 原汁及不同熬煮程度和田红浓缩汁中 17 种游离氨基酸的含量(mg/L)

Table 3 Content of 17 kinds of free amino acids in the original juice and different cooking degrees of Hetian red concentrated juice (mg/L)

氨基酸	原汁		和田红浓缩汁			
	10 °Brix	11 °Brix	21 °Brix	26 °Brix	30 °Brix	
天冬氨酸 Asp	8.86	14.63	12.85	11.96	8.28	
丝氨酸 Ser	17.57	30.15	35.82	38.66	35.95	
谷氨酸 Glu	29.01	30.79	44.48	51.33	46.67	
甘氨酸 Gly	22.76	11.00	11.09	11.01	6.83	
组氨酸 His	15.01	24.08	30.14	33.17	38.66	
精氨酸 Arg	138.86	269.00	389.16	449.25	652.27	
苏氨酸 Thr	14.06	22.53	28.42	31.37	41.03	
丙氨酸 Ala	34.40	37.90	39.83	40.80	43.28	
脯氨酸 Pro	284.68	435.10	649.67	756.98	996.83	
半胱氨酸 Cys	ND	ND	ND	ND	ND	
酪氨酸 Tyr	23.53	17.71	18.13	18.34	19.20	
缬氨酸 Val	12.34	21.05	23.89	25.30	29.72	
甲硫氨酸 Met	2.96	3.74	4.01	4.15	3.16	
赖氨酸 Lys	92.76	95.81	97.40	98.20	105.58	
异亮氨酸 Ile	9.50	14.57	17.13	18.41	21.17	
亮氨酸 Leu	14.87	23.84	28.97	31.54	39.40	
苯丙氨酸 Phe	15.88	27.47	38.99	44.75	60.47	
总量	737.05	1079.37	1469.98	1665.22	2148.50	

注: ND 表示未检出。

究证明, 甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸等氨基酸于 100 °C 和等量葡萄糖反应可产生焦糖香气, 这与本结果分析吻合^[15,16]。综上, 和田红葡萄汁在熬煮过程中随浓缩度的增长, 其氨基酸种类含量大部分随之增长, 且均比原汁中氨基酸含量要高。当达到 26 °Brix 时虽然总氨基酸含量低于 30 °Brix, 但避免了部分氨基酸受美拉德反应的影响造成损失。

4 结论与讨论

本研究采用 AccQ-Tag 高效液相色谱法测定和田红葡萄原汁和不同熬煮程度和田红葡萄汁中游离氨基酸的含量, 结果准确度高, 稳定性好, 共检出 16 种游离氨基酸, 脯氨酸和精氨酸是和田红原汁及浓缩汁中氨基酸的主体, 占游离氨基酸总量的 50% 以上。和田红葡萄汁熬煮过程中组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的含量均保持平稳上升, 天冬氨酸含量持续下降。本研究为慕萨莱思产品在熬煮工序中工艺控制及品质提升提供了科学参考。

参考文献

- [1] 李桢峰. 新中国成立前新疆酒史小考[J]. 新疆地方志, 2006, (1): 57-60.
Li ZF. The history of Xinjiang wine before the founding of new China [J]. Local Chronical Xinjiang, 2006, (1): 57-60.
- [2] 朱丽霞, 侯旭杰, 许倩. 新疆慕萨莱思葡萄酒的发展对策探讨[J]. 酿酒科技, 2008, (7): 111-113.
Zhu LX, Hou XJ, Xu Q. Discussion on development strategy of Xinjiang Musales wine [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2008, (7): 111-113.
- [3] Sablayrolles JM, Dubois C, Manginot C, *et al.* Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations [J]. J Ferment Bioeng, 1996, 82(4): 377-381.
- [4] Bell SJ, Henschke PA. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine [J]. Aus J Grape Wine Res, 2005, 11(3): 242-295.
- [5] Kemsawasd V, Viana T, Ardó Y, *et al.* Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(23): 10191-10207.
- [6] Vilanova M, Ugliano M, Varela C, *et al.* Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *saccharomyces cerevisiae* wine yeasts [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77(1): 145-157.
- [7] Carrau FM, Medina K, Farina L, *et al.* Production of fermentation aroma compounds by *saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains [J]. FEMS Yeast Res, 2008, 8(7): 1196-1207.
- [8] Tesnière C, Brice C, Blondin B. Responses of *saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(17): 7025-7034.
- [9] 王丽玲, 况风, 朱丽霞. 慕萨莱思加工中褐变机理及褐变模型的研究 [C]// 第九届葡萄与葡萄酒国际学术研讨会论文集. 镇江: 西北农林科技大学出版社, 2015.
Wang LL, Kuang F, Zhu LX. Research on browning mechanism and browning model in Musales processing [C]// Proceedings of the 9th International Symposium on Grape and Wine. Zhen J: Northwest A&F University Press, 2015.
- [10] Boogers I, Plugge W, Stokkermans YQ, *et al.* Ultra-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in protein hydrolysates using an automated pre-column derivatisation method [J]. J Chromatogr A, 2008, 1189(1): 406-409.
- [11] Armenta JM, Cortes DF, Pisciotta JM, *et al.* Sensitive and rapid method for amino acid quantitation in malaria biological samples using AccQ-Tag ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-MS/MS with multiple reaction monitoring [J]. Anal Chem, 2009, 82(2): 548-558.
- [12] Zeng F, Ou J, Huang Y, *et al.* Determination of 21 Free Amino Acids in Fruit Juices by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method [J]. Food Anal Method, 2015, 8(2): 428-437.
- [13] 朱丽霞, 甄文, 王丽玲. 新疆慕萨莱思感官特性定量描述分析[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 38-44.
Zhu LX, Zhen W, Wang LL. Quantitative description and analysis of sensory characteristics of Musalais in Xinjiang [J]. Food Sci, 2013, 34(1): 38-44.
- [14] 张昱. 采用电子鼻和 GC-MS 技术研究慕萨莱思葡萄酒中呈香物质的变化[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2017.
Zhang Y. Using electronic nose and GC-MS technology to study the changes of aroma substances in Musales wine [D]. Alar: Tarim University, 2017.
- [15] 朱新鹏, 姚敏, 李美. 美拉德反应制备蛋糕香精及成分分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 362-365.
Zhu XP, Yao M, Li M. Cake flavor and composition analysis by Maillard reaction [J]. Food Ind Technol, 2012, 33(2): 362-365.
- [16] 陈美花. 美拉德反应改良马氏珠母贝酶法提取物风味的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.
Chen MH. Study on the modification of enzyme extract flavor of pearl mother-of-pearl by Maillard reaction [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2010.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



乔通通, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工及贮藏技术。
E-mail: 1480901133@qq.com



朱丽霞, 教授, 主要研究方向为食品加工及贮藏技术。
E-mail: 120050068@taru.edu.cn