

泸型酒酿造过程中上层和下层酒醅的有机酸变化分析

徐勇¹, 郎召伟^{2a,2b}, 沈咪娜^{2a,2b}, 王松涛¹, 张晓娟^{2c}, 沈才洪¹, 陆震鸣^{2c}

(1. 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000; 2. 江南大学 a. 工业生物技术教育部重点实验室;

b. 生物工程学院; c. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:采用高效液相色谱技术(HPLC),对泸型酒上层和下层酒醅发酵过程中的7种有机酸(丙酮酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、乙酸和柠檬酸)的含量变化进行分析。结果表明,上层和下层酒醅发酵结束时,7种有机酸总量分别为 47.02 ± 0.83 mg/g干醅和 72.18 ± 0.11 mg/g干醅。上层酒醅有机酸含量在整个发酵过程中缓慢增长,而下层酒醅在前21天持续较快增长,随后波动增长。乳酸、乙酸、柠檬酸为3种主体有机酸,占7种有机酸总含量的94%以上。乙酸、柠檬酸在上层和下层酒醅中的变化趋势相似,乙酸在第15~18天快速上升,然后急剧下降,之后缓慢增长;柠檬酸在第18~21天出现大幅增长,随后保持缓慢增长。

关键词:泸型酒;酿造;酒醅;有机酸

中图分类号:TS26

文献标志码:A

引言

白酒的风味特点取决于含量仅占2%左右的微量挥发性香气成分,其含量、种类以及量比关系与白酒的香型和风格有关,能够对人的嗅觉、味觉引起丰富的感官刺激^[1]。在浓香型白酒中,有机酸的含量在微量成分中仅次于挥发性酯类,是形成白酒口味的主要成分,也是生成酯类的重要前体^[2,4]。这些有机酸可在酒醅蒸馏过程中进入基酒,具有除苦、减涩、压爆,斧正香气和口味,柔和酒体,延长和丰富白酒味感等作用,对提高白酒质量、丰富白酒香气具有重大意义^[5-8]。

已有大量研究对白酒中的风味物质变化及检测方

法进行过报道^[1,9-13],对白酒酿造酒醅中有机酸变化也有较多报道,如孙国炎等人^[14]采用气相色谱法对五粮液酒醅中有机酸组成规律进行了研究探讨,赵扬扬等人^[15]对泸州老窖发酵过程中不同窖帽高度酒醅中乙酸、丁酸、己酸的变化与微生物变化之间的关联进行了探讨,但对泸型酒酒窖不同位置的酒醅中有机酸含量差异和发酵变化规律尚缺少深入研究。基于此,本文采用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)对泸型酒上层和下层酒醅发酵过程中7种有机酸(丙酮酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、乙酸和柠檬酸)组成及其变化规律进行了分析,为解析泸型酒酿造机理奠定基础。

收稿日期:2018-08-15

基金项目:国家“863计划”(2012AA021301, 2013AA102106, 2014AA021501)

作者简介:徐勇(1974-),男,四川泸州人,酿酒工程师,高级品酒师,主要从事酿酒方面的研究,(E-mail) 38327702@qq.com

通信作者:陆震鸣(1981-),男,江苏无锡人,教授,博士,主要从事传统发酵食品酿造微生态方面的研究,(E-mail) zmlu@jiangnan.edu.cn

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

酒醅样品:自酒醅入窖后发酵开始,采用取样器对上层和下层酒醅分别进行取样,每层各取3个样品作为生物学重复,用冰袋迅速转移至实验室, -80 °C超低温冰箱中储存待用。每隔3天按照上述方法进行取样,持续至发酵结束(合计39天),共13组样品。

试剂:亚铁氰化钾、磷酸二氢钠和硫酸锌,均为分析纯,购于国药试剂有限公司;丙酮酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、乙酸和柠檬酸,均为色谱纯,购于Sigma - Aldrich公司。

仪器与设备:高效液相色谱仪(美国Waters公司)、Sep - Pak C18 预处理柱(美国Waters公司)、Milli - Q Biocel 超纯水系统(美国Millipore公司)、高速冷冻离心机(日本日立公司)、KQ - 50E型舒美超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、博讯GZX - 9070MBE电热鼓风干燥箱(上海图新电子科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品含水量检测

称取2g酒醅样品至已烘至恒重的称量瓶(40 mm × 25 mm)内,115 °C干燥箱中烘约3h至恒重,计算上层和下层酒醅中干醅的比例。每个样品设3个重复。

1.2.2 HPLC分析样品预处理

准确称取2g样品于50 mL离心管中,加入20 mL超纯水,浸泡1h,8000 rpm离心15 min后留上清液;吸取4 mL上清液加入106 g/L亚铁氰化钾和300 g/L硫酸锌各1 mL去蛋白,涡旋混匀器vortex充分涡旋混匀,8000 rpm离心3 min;上清液用0.22 μm滤膜过滤, Sep - Pak C18小柱除色素,然后用HPLC检测有机酸含量^[16]。

1.2.3 有机酸检测的液相色谱条件

色谱柱: Waters Atlantis dC₁₈ 5 μm, 4.6 mm × 150 mm;柱温:30 °C;流动相:20 mmol/L NaH₂PO₄,用磷酸调节其pH值为2.7。进样体积:10 μL。检测器波长:UV 210 nm^[17-18]。

1.2.4 有机酸定量方法

按以下浓度配制有机酸标准混合液:11 mg/L丙酮酸、10.5 mg/L草酸、66 mg/L酒石酸、190.5 mg/L琥珀酸、100.8 mg/L乳酸、70.8 mg/L乙酸和68.4 mg/L柠檬酸。将有机酸混合标准溶液用超纯水按1:0(标准溶液:超纯水)、1:1、1:3、1:5、1:7稀释成5个不同浓度梯度,稀释好的混合标准溶液按浓度从高到低顺序进行HPLC分析,绘制各有机酸的峰面积 - 浓度曲线,计算7种有机酸的回归方程和相关系数,并以3倍信噪比计算出各有机酸的最低检出限^[19]。回归方程及相关参数见表1。

表1 7种有机酸的线性回归方程参数

有机酸	保留时间/min	回归方程	相关系数	线性范围/(mg/mL)	检出限/(mg/L)
草酸	4.21	$y = 0.249x - 0.051$	0.9997	0.0020 ~ 0.0162	0.0030
酒石酸	4.93	$y = 4.125x - 0.248$	0.9995	0.0113 ~ 0.0900	0.0391
丙酮酸	6.05	$y = 0.562x - 0.031$	0.9999	0.0100 ~ 0.0798	0.0074
乳酸	8.68	$y = 15.693x - 5.844$	0.9999	0.8003 ~ 6.4024	0.2202
乙酸	9.51	$y = 12.923x - 0.069$	0.9995	0.0267 ~ 0.2136	0.1855
柠檬酸	13.13	$y = 6.288x - 0.817$	0.9999	0.1203 ~ 0.9622	0.0950
琥珀酸	17.41	$y = 10.721x + 0.028$	0.9997	0.0072 ~ 0.5760	0.2473

2 结果与分析

2.1 上层酒醅发酵过程中有机酸的变化

上层酒醅连续发酵过程中7种有机酸总含量的变化如图1所示。

从图1可知,在发酵的前6天,有机酸从 26.89 ± 0.41 mg/g干醅迅速增长到 41.01 ± 0.61 mg/g干醅,之后呈现波动、缓慢上升的趋势,直到发酵结束时增长到 47.02 ± 0.83 mg/g干醅。

乳酸、乙酸和柠檬酸的总量在上层酒醅发酵过程中

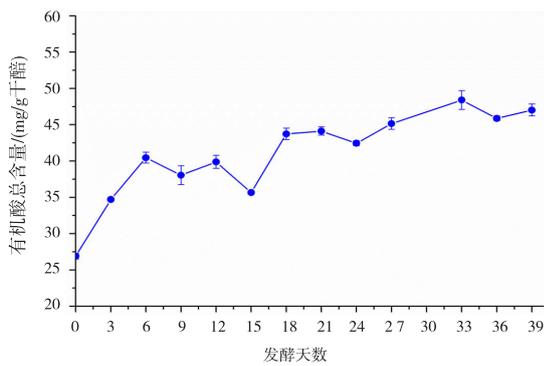


图 1 上层酒醅发酵过程中有机酸的总量变化

占 7 种有机酸总含量的 95% 以上,这三种有机酸含量的变化情况如图 2 所示。

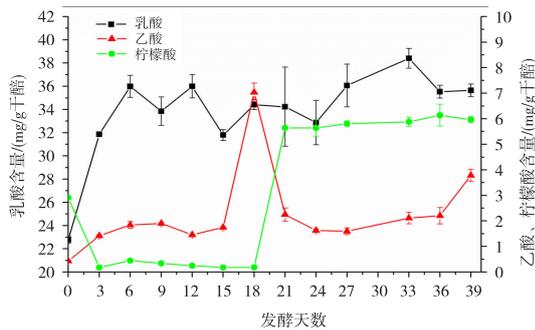


图 2 上层酒醅中乳酸、乙酸、柠檬酸含量的变化

从图 2 可知,泸型酒上层酒醅中乳酸含量在发酵前 6 天从 22.79 ± 0.31 mg/g 干醅快速增长到 35.97 ± 0.42 mg/g 干醅,之后缓慢上升,至发酵结束时达到 35.65 ± 0.54 mg/g 干醅。乳酸是白酒中非常重要的有机酸,可由酒醅中乳酸菌合成,可以增加白酒的厚重感,降低白酒的刺激感,是白酒中良好的呈味物质。乳酸在发酵过程中还能与乙醇发生酯化反应形成乳酸乙酯,能够使酒体呈现优雅的香气。乙酸含量在发酵前期增长缓慢,在第 15~18 天快速升高、达到 7.03 ± 0.37 mg/g 干醅,然后急剧下降至 2.25 ± 0.22 mg/g 干醅,随后又缓慢增长、至发酵结束达到 3.78 ± 0.23 mg/g 干醅。柠檬酸含量在发酵前 3 天从初始的 2.91 ± 0.07 mg/g 干醅逐渐下降至 0.18 ± 0.05 mg/g 干醅,直到第 18 天一直维持在较低的水平,在 18~21 天内急速上升至 5.64 mg/g 干醅、并维持至发酵结束。

上层酒醅中除了以上三种主体有机酸外,还有琥珀酸、酒石酸、草酸、丙酮酸,其相对含量较低,总含量在总有机酸中不到 5%。其中,琥珀酸在发酵前期不断增长,

第 9 天达到最高、为 0.89 ± 0.02 mg/g 干醅,随后逐渐下降,至发酵结束时为 0.65 ± 0.04 mg/g 干醅。丙酮酸在整个发酵过程中从 0.05 mg/g 干醅波动上升至 0.27 ± 0.05 mg/g 干醅。

2.2 下层酒醅发酵过程中有机酸的变化

下层酒醅发酵过程中有机酸含量的变化如图 3 所示。

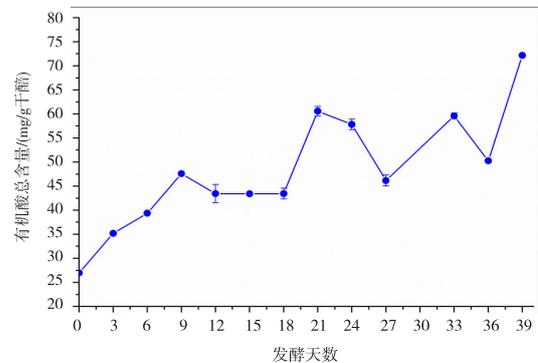


图 3 下层酒醅发酵过程中有机酸总量变化

从图 3 可知,下层酒醅发酵过程中有机酸含量总体呈不断增加的趋势,前 21 天从开始的 26.97 ± 0.44 mg/g 干醅不断增长至 60.02 ± 0.36 mg/g,随后波动上升,至发酵结束时为 72.18 ± 0.11 mg/g 干醅。与上层酒醅相比,下层酒醅有机酸含量增加了 25.16 mg/g 干醅。

与上层酒醅中相同的是,下层酒醅中乙酸、乳酸、柠檬酸是主体有机酸,三者含量占 7 种有机酸总含量的 94% 以上。下层酒醅中,乙酸、乳酸、柠檬酸在发酵过程中的变化规律如图 4 所示。

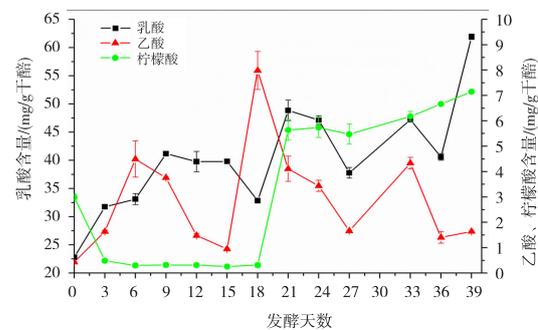


图 4 下层酒醅中乳酸、乙酸、柠檬酸含量变化

从图 4 可知,下层酒醅发酵过程中,乳酸含量总体呈现上升趋势,从开始的 22.79 ± 0.31 mg/g 干醅至发酵结束达到 61.90 ± 0.48 mg/g 干醅。乙酸含量在前 15 天先增加后减少,然后快速上升,在第 18 天达到最大,第

18~21天快速下降,之后波动下降,直到发酵结束为 1.69 ± 0.07 mg/g干醪,乙酸这一变化规律与在上层酒醪中相似。柠檬酸含量在前3天不断减少,之后维持在低水平,在18~21天快速上升,至发酵结束达到 7.15 ± 0.04 mg/g干醪,柠檬酸的变化规律也与在上层酒醪中相似。

下层酒醪中除了以上三种主要的有机酸以外,还有琥珀酸、酒石酸、草酸、丙酮酸,其相对含量较低,在总有机酸中不到5%。琥珀酸含量在前期不断增长,在第15天达到最高,为 1.05 ± 0.12 mg/g干醪,随后不断下降。

3 结论

(1) 泸型酒发酵过程中,上、下层酒醪的有机酸总量整体上均呈上升趋势,但在两层中的变化规律略有不同,在上层酒醪中基本上是稳定的增加,而在下层酒醪中,在发酵的前21天持续上升,随后波动上调,直至发酵结束。

(2) 对酒醪发酵过程中7种有机酸的监测结果发现,乳酸、乙酸、柠檬酸在上层、下层酒醪中均为主体有机酸,三者占这7种有机酸总含量的94%以上,且乳酸含量最高。在上层酒醪中,乳酸含量在第0~6天迅速上升,之后至发酵结束基本保持稳定,而下层酒醪中乳酸的变化趋势与总有机酸类似。乙酸和柠檬酸在上层和下层酒醪中变化趋势相似,分别第18天和第21天快速上升。

(3) 酒醪发酵结束时,上层和下层酒醪中有机酸含量不同,下层的总有机酸和乳酸含量均比上层中高,其中有机酸总含量相差 25.16 mg/g干醪。这可能是由于两层酒醪的理化性质有所不同,使得其微生物代谢活力和强度不同^[20],加上黄水从上层向下层渗透等各种因素,导致了有机酸含量在不同酒醪层之间的差异,但其具体机理还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 范文来,徐岩.中国白酒风味物质研究的现状与展望[J].酿酒,2007,34(4):31-37.
[2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.

[3] 王瑞明,来安贵,信春晖.白酒勾兑技术[M].北京:化学工业出版社,2015.
[4] ZHENG X W,HAN B Z.Baijiu,Chinese liquor:History, classification and manufacture[J].Journal of Ethnic Foods, 2016(3):19-25.
[5] 何育明.论白酒中的不挥发酸[J].酿酒科技,2007(6):56-58.
[6] 张宿义.泸型酒技艺大全[M].北京:中国轻工业出版社,2011,224-226.
[7] 贾智勇.中国白酒勾兑宝典[M].北京:化学工业出版社,2017.
[8] XIAO Z,YU D,NIU Y,et al.Characterization of aroma compounds of Chinese famous liquors by gas chromatography-mass spectrometry and flash GC electronic-nose[J].Journal of Chromatography B,2014,945-946:92-100.
[9] FAN W L,QIAN M C.Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese "YangheDaqu" liquors[J].J Agric Food Chem,2005,53(20):7931-7938.
[10] JING Y,MENG Q,QI P,et al.Electronic nose with a new feature reduction method and a multi-linear classifier for Chinese liquor classification[J].Review of Scientific Instruments,2014,85(5):11543-11549.
[11] 徐成勇,郭波,周莲等.白酒香味成分研究进展[J].酿酒科技,2002(3):38-40.
[12] CUI S,WANG J,YANG L,et al.Qualitative and quantitative analysis on aroma characteristics of ginseng at different ages using E-nose and GC-MS combined with chemometrics [J].Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis,2015,102:64-77.
[13] 廖永红,赵爽,张毅斌,等.LLE、SDE、SPME和GC-MS结合保留指数法分析二锅头酒中的风味物质[J].中国食品学报,2014,14(6):220-228.
[14] 孙国炎,郑勇,李阳华.窖内酒醪中有机酸分布规律的探讨[J].酿酒科技,1992(4):14-16.
[15] 赵扬扬.不同窖帽高度和不同封窖方式对浓香型白酒品质的影响研究[D].重庆:重庆大学,2015.

- [16] 余永建,邓晓阳,陆震鸣,等.固态发酵食醋有机酸组成分析中样品预处理方法的研究[J].食品工业科技,2013(4):198-200,211.
- [17] 余永建,邓晓阳,陆震鸣,等.高效液相色谱法定量分析固态发酵食醋中有机酸的方法优化[J].食品科学,2014,35(4):55-59.
- [18] 苏俊霞.镇江香醋醋醅中醋酸菌多样性及 *Gluconacetobacter intermedius* 特性的研究[D].无锡:江南大学,2014.
- [19] MARIA G, PAOLO G. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(30): 46-53.
- [20] 沈才萍,李喆,敖宗华,等.泸州酒生产中不同层糟醅微生物与白酒风味的关系[J].四川理工学院学报:自然科学版,2015,28(2):14-18.

Organic Acids Dynamics in the Upper and Bottom Layers During Luzhou-flavor Baijiu Fermentation

XU Yong¹, LANG Zhaowei^{2a,2b}, SHEN Mina^{2a,2b}, WANG Songtao¹, ZHANG Xiaojuan^{2c},
SHEN Caihong¹, LU Zhengming^{2c}

(1. National Engineering Research Center of Solid-state Brewing, Luzhou 646000, China; 2. a. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; b. School of Biotechnology; c. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyze the changes of seven organic acids in the upper layer of fermented grains through fermentation of Luzhou-flavor baijiu. The total content of 7 organic acids in the upper and bottom layers of the fermented grains at the end of fermentation was 47.02 ± 0.83 mg/g and 72.18 ± 0.11 mg/g, respectively. The dynamics of organic acids in the upper layer increased slowly, and those in the bottom layer increased rapidly in the first 21 days, then undulatedly increased. Lactic acid, acetic acid, and citric acid were the three most abundant organic acids in the upper and bottom layers, accounting for more than 94% of the total organic acids. The content of acetic acid increased from the upper layer to the bottom layer similarly with that of citric acid, and the acetic acid showed a tendency to be stable after a rapid rise from the 15th day to the 18th day, while the citric acid showed a rapid rise from the 18th day to the 21th day and then a slow rise.

Key words: Luzhou-flavor baijiu; brewing process; fermented grains; organic acids