

浓香型白酒窖池窖泥腐植酸波谱特征 与窖龄相关性的研究

彭昱雯¹, 牛美灿¹, 王平¹, 张宿义^{3,4}, 易斌^{3,4}, 钱志伟³, 吴重德¹, 黄钧¹, 周荣清^{1,2,4}

(1.四川大学轻纺与食品学院,四川成都610065;2.四川大学制革清洁技术国家工程实验室,四川成都610065;
3.泸州老窖股份有限公司,四川泸州646000;4.国家固态酿造工程技术研究中心,四川泸州646000)

摘要: 分析了浓香型白酒酿酒窖池窖泥腐植酸(HA)与土壤、淤泥及泥炭的HA在E4/E6及FTIR图谱之间的主要区别,比较了不同窖龄及窖池底、窖池壁E4/E6与FTIR图谱的异同。结果表明,HA的结构与来源有关,窖池窖龄越高,窖泥HA的腐植化程度越高,相对分子量越大,芳香基团和分子缩合程度越高。不同窖龄池壁与池底泥样品HA的区别主要发生在醛基C-H的伸缩振动的蓝移或甲基对称变形振动、O-H自由羟基的伸缩振动,以及-CH₂的消失。随窖龄增长,有机质的腐植质化程度趋于相同,E4/E6降低,腐植质化程度提高。

关键词: 窖泥; 腐植酸; E4/E6; 红外光谱; 特征基团

中图分类号:TS262.31;TS261.4;Q89 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)08-0021-04

Study on the Correlations between Pit Age and Spectral Characteristics of HA in Pit Mud for Luzhou-flavor Liquor

PENG Yuwen¹, NIU Meican¹, WANG Ping¹, ZHANG Suyi^{3,4}, YI Bin^{3,4}, QIAN Zhiwei³,
WU Chongde¹, HUANG Jun¹ and ZHOU Rongqing^{1,2,4}

(1.College of Light Industry, Textile & Food Engineering, Sichuan University, Chengdu,Sichuan 610065; 2.National Engineering Lab for
Clean Technology of Leather Manufacture, Chengdu,Sichuan 610065; 3.Luzhou Laojiao Co.Ltd., Luzhou,Sichuan 646000;
4.National Engineering Research Center of Solid State Brewing, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: In this study, the main difference in E4/E6 and FTIR of HA between in pit mud of Luzhou-flavour liquor and in soil, sludge and peat were investigated, and E4/E6 and FTIR of HA from pit mud of different pit age or at different pit location were also compared. The results showed that HA structure was related to its sources, its relative molecular weight and its condensation level of aromatic groups increased with the increase of pit age, and the major difference of HA from different location in pits of different pit age manifested in the blue shift in C-H telescopic vibration, CH₃- symmetric deformation vibration, expansion vibration of O-H freedom of hydroxyl, and -CH₂ disappearance. With the increase of pit age, E4/E6 of HA decreased and the humification tended to be the same.

Key words: pit mud; HA; E4/E6; FTIR; functional group

浓香型白酒酿造微生物栖息环境窖池,其窖泥的理化性质,如有机质、全氮、磷、钾等对其微生物群落的繁衍与变迁有重要影响。因其不间断的生产过程和部分回糟利用,所以窖泥具有高酸度、高乙醇、微氧和高水分的特性,其酿酒原料富含碳水化合物、蛋白质、脂肪等,腐植酸(HA)作为窖泥重要有机成分,常用于判断窖泥优劣的指标之一^[1]。作为腐殖质的主要成分,源于各种有机物的生物降解途径,其结构、分子和官能团等与来源和时间有

关,已被用以追溯土壤^[2-3]、垃圾填埋场^[4]的岁月信息。

本研究以泸州老窖不同窖龄窖泥为研究对象,参考文献^[5]所述方法提取获得HA,探讨了E4/E6的比值和傅立叶变换红外光谱(FTIR)图与窖龄及窖池壁、窖底相对位置酸度的关系。

1 材料与方法

1.1 样品

基金项目 国家自然科学基金(31171742)资助,四川省重大攻关项目(09ZC0735)资助。

收稿日期:2012-05-22

作者简介:彭昱雯(1988-),女,河南信阳人,硕士研究生。

通讯作者:周荣清(1960-),男,教授,研究方向:现代发酵技术及酶应用技术,E-mail:rqqzhou@163.com。

优先数字出版时间:2012-06-27;地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120627.1612.002.html。

窖泥样品采自泸州老窖股份公司300年(077号、079号和089号窖池)、100年(1939号、1960号和1962号)及50年(2130号、2131号和2132号)窖池、试验窖(2108号、2121号)。窖壁样品的采样方法:窖池的4个池壁分别划对角线,分别在每个窖壁的对角线的4个顶点及交叉点各取20g,混合均匀取100g窖泥。窖底泥样品的取样方法类似窖壁,划对角线,取在5个点的窖泥各20g,混合均匀取100g窖池。装入无菌PET袋封口后置于-20℃保存备用(不超过7d)。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:二氯甲烷,甲醇,均为国产分析纯。HA标品(No. 53680, Fluka)。

仪器:冷冻干燥机:FD-1A-50(博医康,北京);紫外分光光度计:Lambda 25 UV-vis, (Perkin Elmer, 美国);红外光谱仪:Nicolet iS10 (THERMO, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 HA的提取

按参考文献^[5]所述方法,稍有改进,具体步骤:准确称取不同类型窖泥25g,每种窖泥取3个平行样,加入脂肪萃取液250mL(二氯甲烷:甲醇=2:1),静置混合均匀24h后,以6000r/min(4℃)离心10min,丢弃上清液,使沉淀溶解于250mL脂肪萃取液(二氯甲烷:甲醇=2:1)中。静置混合均匀24h后,6000r/min(4℃)下离心10min,丢弃上清液,得到大约20g离心沉淀物。使之溶解于NaOH-Na₄P₂O₇(0.1mol/L, 1:1 v/v),使固液比为1:5,使之在氮气效果下振荡12h。将三角瓶中的样品分别转移至离心管中,4℃下10000r/min离心10min,取离心上清液,并将离心沉淀物用蒸馏水洗涤至pH7.0,收集洗涤液。合并离心上清液和洗涤液,使之透过石英过滤器过滤,取滤液。浓盐酸酸化处理至pH1.0,4℃下10000r/min离心10min,得沉淀物,使沉淀溶解于HCl(0.1mol/L)/HF(0.3mol/L)的混合液(固液比为1:50)中,振荡48h后离心取沉淀,溶解于无离子水中透析5d,冻干待检测。

1.3.2 HA含量及聚合分散度的分析

HA标品(No.53680, Fluka)溶于0.05mol/L NaHCO₃溶液中,用0.1mol/L NaOH溶液将其pH值调整至8.5后定容,并将其稀释为0.1~100ng/mL的工作液,测定其340nm的吸光度^[6],建立不同浓度工作液与吸光度的线性回归方程。准确称取不同类型窖泥样品各4份,每份25g,其中1份于105℃加热至恒重,测定其水分;其余3份分别用1.3.1所述方法获取HA萃取液,定容至25mL,测定其在340nm的吸光率,通过回归方程计算其腐植酸含量。不同样品调整相同HA浓度,测定其

465nm和665nm的吸光度,由465nm和665nm的吸光度比值确定窖泥的E4/E6比值,评估其极性组分的多寡。

1.3.3 窖泥HA的FTIR测定

精确称取不同类型窖泥的HA冻干物1mg,与100mg KBr混匀后压片。采用检测其FT-IR图谱(吸收波长:4000~400cm⁻¹光谱分辨率2cm⁻²),每个样品设置3个子样品,每个子样品扫描32次。

2 结果与讨论

2.1 不同类型窖泥HA含量及聚合度的比较

对不同类型窖泥的HA含量及E4/E6值进行比较分析,结果见表1。由表1可知,所测不同类型窖泥样品HA含量的范围是0.3~3mg/g,同龄窖池的窖壁和窖底泥呈相同规律,不同窖龄的窖壁与窖底泥间的HA含量则因窖龄而异。300年的窖(77号、79号和89号窖池),窖壁泥的HA含量明显高于窖底泥HA含量,100年(1939号、1960号和1962号)和50年(2130号、2131号和2132号)的窖底泥的HA含量则高于窖壁泥。试验窖的(2108号和2121号窖池)窖底泥和窖壁泥的HA含量无明显差异。同样,不同窖龄窖泥的E4/E6比值呈现不同规律。

表1 不同类型窖泥的HA含量及E4/E6值的比较

窖泥编号	HA含量*(mg/g)	E4/E6
77 壁泥	1.322±0.162	2.350
77 底泥	0.956±0.190	2.250
79 壁泥	1.482±0.261	2.362
79 底泥	0.269±0.157	2.416
89 壁泥	1.759±0.131	2.177
89 底泥	0.762±0.162	2.195
1939 壁泥	1.080±0.174	2.144
1939 底泥	2.907±0.261	2.472
1960 壁泥	0.784±0.225	2.263
1960 底泥	1.630±0.232	2.390
1962 壁泥	0.607±0.129	2.092
1962 底泥	0.985±0.234	2.780
2130 壁泥	0.869±0.053	2.628
2130 底泥	2.768±0.102	2.174
2131 壁泥	0.323±0.005	3.891
2131 底泥	0.387±0.016	4.189
2132 壁泥	0.584±0.139	3.733
2132 底泥	0.644±0.112	3.584
2108 壁泥	1.532±0.234	3.733
2108 底泥	2.267±0.287	4.696
2121 壁泥	1.581±0.301	4.003
2121 底泥	0.551±0.071	4.415

注:“*”表示平均值±标准偏差。

窖泥中的微生物经过长时间的生物、化学和物理作用,形成复杂的HA结构,外来有机质经窖泥微生物作用后重新形成多种有机化合物^[7]。窖泥因年份不同,HA结构与含量也会出现不同的分布。长期处于窖泥高酸度、高

乙醇和微氧的极端环境中,渐渐形成了窖泥所特有的HA结构。窖底泥与窖壁泥所处的位置不同,微生物群落不同,HA也形成各自特有的结构。在新窖中,窖底泥与窖壁泥HA含量无明显差异,而经过窖泥的老熟阶段,在50年和100年的窖池中,相同年份不同发酵工艺的窖池窖底泥HA含量均明显高于窖壁泥。300年窖池中,窖泥HA结构进一步发生变化,在含量上便表现为窖壁泥的HA含量高于窖底泥。在300年和100年窖中,除1962号窖池外,窖壁和窖底的E4/E6值无显著区别,小于3。50年窖的有波动,而试验窖的有较大差异。

HA的颜色取决于其发色基团,一般认为HA的形成是颜色逐渐变深的过程,颜色深则表明腐植化程度高,分子趋向于成熟和复杂^[8]。通过窖泥HA在465 nm与665 nm下的特征吸收峰,得到其E4/E6的比值。该值与腐殖酸分子的大小或缩合度有直接关系而与腐殖酸分子的数量无关,通常随腐殖酸分子量的增加或缩合度增大而减小^[9],可用于表征有机质的腐植化程度,E4/E6的比值越高,表明样品中有机质的腐植化程度越弱^[10]。Andreind^[11]等在森林土壤的研究中测得不同深度的土壤HAE4/E6的比值均处于4.9~11之间,Piccolo A^[12]等在粪肥与淤泥中提取HA测得该比值在3.04~9.60之间。由表1所示,在窖泥HA中,E4/E6的比值均处于2.0~4.7之间,偏小于土壤与淤泥的E4/E6比值,表明窖泥有机质的腐植化程度较强,相对分子量高,且芳香基团和分子缩合程度都较高^[13]。300年、100年与50年部分窖池(2130号窖池)的窖底泥与窖壁泥的E4/E6比值都相对稳定,50年窖池与试验窖池的E4/E6比值较高,有机质的腐植化程度相对较低,相对分子量偏低,芳香基团和分子缩合程度较百年以上老窖的低。HA是窖泥的微生物繁衍所需碳源、氮源及其他营养元素的来源之一,且其具有缓冲和富集重金属离子的能力,为其极端环境中微生物群落的繁衍和变迁提供了良好的环境条件。

2.2 不同窖龄窖泥HA的FTIR的比较

对不同窖泥腐植酸的红外图谱进行分析,结果见图1。

如图1所示,由上至下分别为新窖窖泥、50年窖泥、100年窖泥、300年窖泥。这些HA的FTIR类似于泥炭HA标品FTIR^[4],但在官能团区的3000~2800 cm⁻¹出现蓝移,且吸收峰变弱,在指纹区的1680~1620 cm⁻¹出现了红移,1220~1020 cm⁻¹、850 cm⁻¹的吸收峰变强。相对标品HA FTIR,窖泥的HA在官能团区和指纹图谱区分别增加了一些新的吸收峰(表2),其差异可能是腐植质化的环境不同,胡敏酸和富里酸的比值不同所致^[8]。在官能团区结构的吸收峰位置与相关文献报道^[11-12]的土壤、

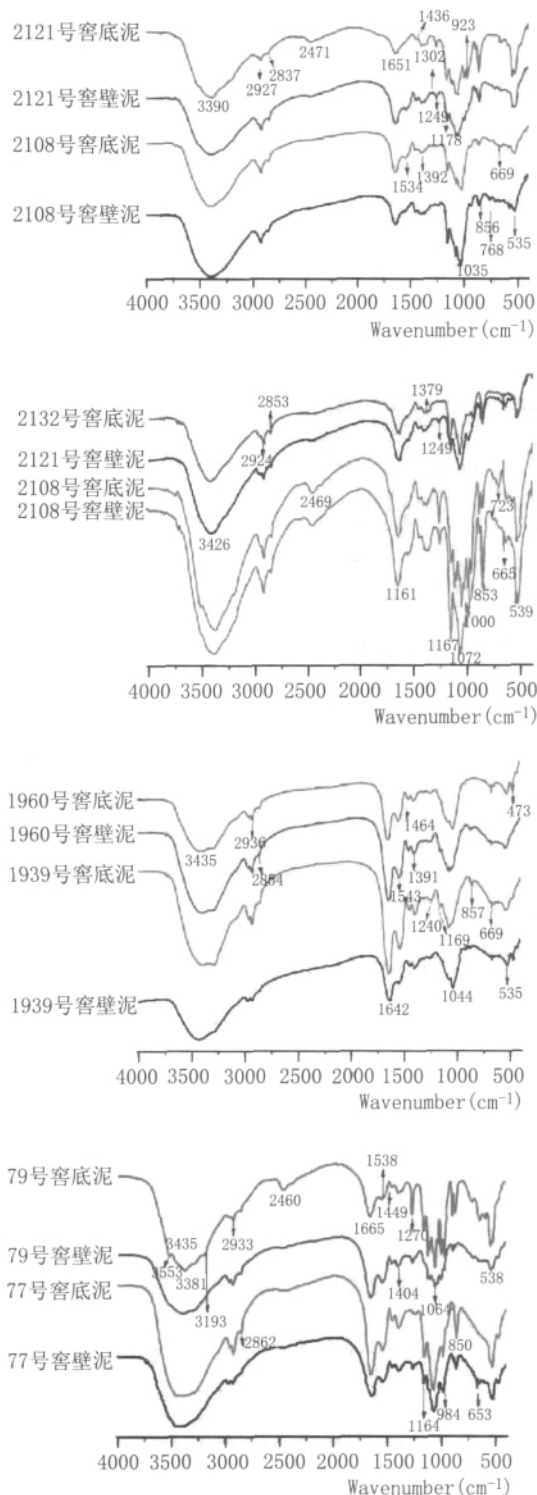


图1 不同窖泥腐植酸的红外图谱
淤泥和粪肥等的HA的FTIR类似。

比较窖龄HA的FTIR谱图,结果表明,随着窖龄的增长,相同部位窖泥HA的FTIR指纹图谱区的吸收峰的差异详见图2和表3。试验窖泥与50年窖泥的HA的1500 cm⁻¹(O-H的面内弯曲振动)的吸收峰消失,而100年与300年窖泥HA该波长吸收峰与HA标品相似。窖龄较长样品的HA在2850~2815 cm⁻¹和

表2 窖泥HA的特征FTIR谱

波长(cm^{-1})	振动类型
3300~2500	羧酸二聚体的O-H伸缩振动
2850~2815	甲氧基
1560	-NO ₂ 的对称伸缩振动峰
1375, 1370	-CH ₃ 的伸缩振动, -NO ₂ 的反对称伸缩振动峰
1460	-CH ₂ 的变形振动和甲基的反对称变形振动
1450~1440	环丙烷的-CH ₂ 的特征吸收峰
1400	羧酸盐离子(-CO ₂ ⁻)的对称伸缩振动
1275~1060	开链醚的C-O-C反对称伸缩振动强吸收, 伯醇C-O伸缩振动
650	O-H的面外弯曲振动

1680~1620 cm^{-1} 的吸收峰, 因分子的对称性逐渐降低^[15] 而逐步增强。相同窖池的窖壁和窖底样品HA的FTIR不同, 不同区域位置微生物及有机反应的细微差异大致体现在其指纹区的吸收峰的多寡、强弱及蓝移或红移(见图1), 尤其是试验窖和50年窖的差异更为显著。

3 结论

不同窖龄及窖壁和窖底HA的E4/E6及FTIR图谱的研究结果表明, 窖泥的HA官能团区类似于土壤及淤泥的HA结构, 聚合分散度值有较大差异。因腐植化的环境不同, 与泥炭HA标品FTIR比较, 在官能团区的3000~2800 cm^{-1} 出现了蓝移, 吸收峰变弱; 在指纹区的1680~1620 cm^{-1} 出现了红移, 1220~1020 cm^{-1} , 850 cm^{-1} 的吸收峰变强, 并在官能区和指纹区增加了吸收峰。不同窖龄的E4/E6的差异揭示窖池窖龄越长, 相对分子质量越大, 芳香基团和分子缩合程度越高, 窖泥腐植化程度越高。随着窖龄的增长, 池底部和壁部样品HA的FTIR在官能区和指纹区吸收峰上的差异揭示了时间和窖池部位的影响。研究结果有益揭示百年老窖是优质酒生产的科学内

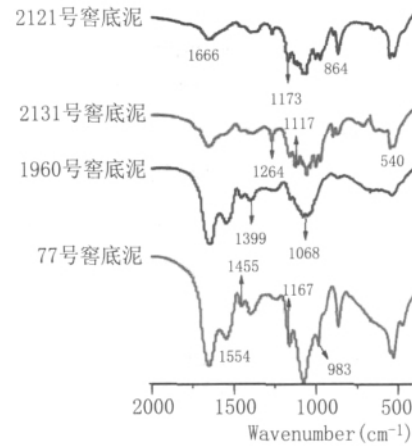


图2 不同窖底泥的指纹区红外图谱

涵。

参考文献:

- [1] 廖超, 吴生文, 黄小晖, 等. 特香型酒功能窖泥和普通窖泥理化指标对比分析[J]. 酿酒科技, 2010(2): 86-91.
- [2] Tikhova VD, Shakirov MM, Fadeeva VP, et al. Elemental content and functional group analysis of humic acids in fossilized soils of different ages[J]. Russian Journal of Applied Chemistry, 2001, 74(8): 1380-1384.
- [3] Calderoni Gilberto, Schnitzer Morris. Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids and fulvic acids [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1984, 10(48): 2045-2051.
- [4] Ki-Hoon Kang, Hyun Sang Shin, Heekyung Park. Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications[J]. Water Research, 2002, 36(16): 4023-4032.
- [5] Barot NS, Bagla HK. Extraction of humic acid from biological matrix-dry cow dung powder. Green Chemistry Letters and Reviews, 2009, 4(2): 217-221.

表3 窖泥腐植酸的特征FTIR吸收峰

特征吸收峰	窖池号
2600~2400 cm^{-1} (-COOH中的-OH), 1062 cm^{-1} (伯醇C-O)	仅在2121号窖池出现
669 cm^{-1} (烯烃C-H面外弯曲振动)	2108号窖池窖泥在该处的吸收峰较2121号窖池窖泥发生蓝移
3507 cm^{-1} (N-H伸缩振动), 2600~2400 cm^{-1} (-COOH中的-OH), 1249 cm^{-1} (-C-O-, -C-N-, O-H)	仅出现于2121号和2108号窖池的窖底泥中
1080 cm^{-1} (C-O伸缩振动)	仅出现于2131号窖池窖泥中
723 cm^{-1} (O-H面外弯曲)	2131号窖池窖泥相比于2132号窖池窖泥发生蓝移
3333 cm^{-1} (分子间氢键O-H伸缩振动)	仅出现于2131号与2132号窖池窖底泥中
3013 cm^{-1} (-COOH)	1960号窖池窖壁泥相比于1960号窖池窖底泥发生蓝移
1058 cm^{-1} (芳香族-NH-)	仅出现于1960号窖池窖底泥中
2960 cm^{-1} (O-H伸缩吸收), 857 cm^{-1} (芳烃C-H面外弯曲振动)	1960号窖池窖壁泥相比于1960号窖池窖底泥发生蓝移
3100 cm^{-1} (烯烃和芳烃的C-H伸缩振动), 3193 cm^{-1} (N-H伸缩振动吸收)	仅出现于1939号窖池壁泥中
1064 cm^{-1} (C-O伸缩振动)	仅出现于79号窖池窖底泥中
984 cm^{-1} (烯烃C-H面外弯曲振动)	77号窖池窖泥相比于79号窖池窖泥发生红移
850 cm^{-1} (芳烃C-H面外弯曲振动)	77号窖池窖泥相比于79号窖池窖泥的吸收峰更明显
	仅出现于79号窖池与79号窖池的窖底泥中

(下转第28页)

3 结论

3.1 酶学性质研究表明,黑曲霉与绿色木霉混合发酵粗酶液中 CMC 酶活在 pH4.0~6.0 的范围内,可保持初始酶活的 70%~80%,最适酶反应 pH 值为 5.5;温度为 30~50℃时,酶活较高,超过 60℃,酶活开始迅速下降,最适酶反应温度为 50℃。

3.2 粗酶液经硫酸铵盐析, Sephadex G-100 及 DEAE FF 阴离子交换层析柱分离纯化后,内切葡聚糖酶的比活力提高了 5.89 倍,回收率为 22%。在 SDS-PAGE 电泳上显示所分离的内切葡聚糖酶分子质量为 61.5 KD。

参考文献:

[1] 杜文娟,王家东,侯红萍.纤维素酶的制备及其应用研究[J].酿

酒,2007(3):27-28.

[2] 杨盛,侯红萍.高效降解纤维素混合菌的筛选及其产酶条件的研究[J].中国酿造,2008(11):20-22.

[3] 江华,于兆海.里氏木霉纤维素酶的分离纯化与酶学性质研究[J].南京林业大学学报,2007(6):48-52.

[4] 李毅然,马亢.纤维素酶生产菌的筛选鉴定及其产酶影响因素研究[J].楚雄师范学院学报,2011,26(9):75-80.

[5] 潘锋,杨树林,史小丽,等.黑曲霉纤维素酶的纯化及酶学性质的研究[J].生物技术,2001,3(6):8-10.

[6] 郑金华,郁建平.镰刀菌发酵培养液中纤维素酶的分离纯化[J].化学与生物工程,2010,27(12):65-68.

[7] 朱年青,夏文静,勇强.里氏木霉纤维素酶的分离纯化及酶学性质[J].生物加工过程,2010(3):9-12.

(上接第 24 页)

[6] Howeler M, Ghiorse WC., Walker, LPA. quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 54:37-45.

[7] 王承江.浅谈酿酒窖泥中的腐殖质及其检测[J].中国酿造,2006,163(10):51-53.

[8] 贺婧,颜丽,杨凯,等.不同来源腐殖质的组成和性质的研究[J].土壤通报,2003,34(4):343-345.

[9] Stevenson F J 著.夏荣基译.腐殖质化学[M].北京:北京农业大学出版社,1994:198.

[10] 顾华杰,李玉祥,赵明文,等.几种水稻田土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J].江苏大学学报:医学版,2005,15(4):300-305.

[11] Andreina Traversa, Daniel Said-Pullicino, Valeria D'Orazio, et

al. Properties of humic acids in Mediterranean forest soils (Southern Italy): influence of different plant covering. European Journal of Forest Research [J], 2011, 130: 1045-1054.

[12] Piccolo A, Zaccaro P, Genevini PG. Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils[J]. Bioresource Technology, 1992, 40:275-282.

[13] Chen Y, Senesi N, Schnitzer M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios[J]. Soil Science Society of America Journal, 1977, 41:352-358.

[14] 徐栋,冯科,吴峰,等.天然水体底质中腐植酸的光谱表征[J].分析科学学报,2003,19(6):499-502.

[15] 邓芹英,刘岚,邓慧敏.波谱分析教程[M].北京:科学出版社,2007:49.

贵州湄窖全国白酒专家鉴评会在遵义举行

本刊讯 2012年7月25日,贵州湄窖全国白酒专家鉴评会在贵州省遵义市大世界酒店隆重举行。本次会议由贵州省轻工业科学研究所及贵州湄窖酒业有限公司主办,会议由贵州省轻工业科学研究所所长、贵州省白酒专家黄平主持。应邀出席会议的有贵州省各级领导,全国著名白酒资深专家沈怡方、高景炎、高月明、于桥、庄名扬、徐岩,贵州省白酒专家黄平、方长仲、贾翹彦、李其书、吕相芬、徐道贵、谌永前、黄永光、田志强与黑龙江省白酒专家高军,以及各大相关新闻媒体代表。

会议上,贵州湄窖酒业有限公司董事长陈长文致词,贵州湄窖酒业有限公司总经理黄树强就公司的简况、新品特点及下一步发展做了介绍。此次品鉴会上,与会专家主要是对贵州湄窖酒业有限公司出品的三款系列白酒——春阳刚“铁匠”(酱香型)、百年湄窖“幽兰”(浓香型)、“菩提子”(茶香型)作了认真细致的品评,专家组从酒质、企业发展等方面提出了宝贵意见。最后,专家组组长沈怡方先生对此次品鉴会作了总结性发言,秘书方长仲先生公布此次品鉴结果。如下:

百年湄窖“幽兰”(浓香型)无色透明,窖香浓郁,绵甜爽净,酒体丰满,余味悠长。浓香型风格典型。

春阳岗铁匠酒(酱香型)微黄透明,酱香突出,幽雅细腻,酒体醇厚,回味悠长,空杯留香持久,酱香风格典型。

菩提子(茶香酒)清亮透明、茶香突出、清雅舒适、诸味协调、醇和爽净。具有茶香酒独特风格。

此次品鉴会上最大的亮点是茶香型白酒,据了解,此款酒是由贵州省轻工业科学研究所与贵州湄窖酒业有限公司联合开发,具有预防糖尿病,高血压及降低尿酸等功能,已申请国家专利。

随后举行了贵州湄窖全国白酒专家鉴评发布会,省有关领导在会上作了重要讲话。

本次品鉴会顺利完成各项议程,圆满结束。(莹子、晓文)



鉴评会场