

黄酒蛋白质沉淀

林峰¹,白少勇¹,邹慧君²,谢广发²,周建弟²

(1.浙江大学化学系,浙江 杭州 310028 2.中国绍兴黄酒集团公司,浙江 绍兴 312000)

摘要: 高分子蛋白质是引起黄酒沉淀的主要因素,其与单宁聚合物引起黄酒冷浑浊、沉淀。绍兴黄酒蛋白质的含量为 0.80% ;酒脚中的蛋白质含量为 50.20%。黄酒蛋白质的沉淀机理主要是由蛋白质的变性团聚,产生分子量大于 10000 的蛋白质分子,分子量在 10000~5000 的蛋白质分子易使黄酒形成沉淀,酒体中的多酚(单宁)、金属离子(如铁)、乙醇也会引起蛋白质沉淀。(孙悟)

关键词: 黄酒; 蛋白质沉淀; 机理

中图分类号:TS262.4;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)09-0069-04

Protein Precipitate in Yellow Rice Wine

LIN Feng¹, BAI Shao-yong¹ and ZOU Hui-jun² et al.

(1.Chemistry Department of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310023; 2. Shaoxing Yellow Rice Wine Group Co., Shaoxing, Zhejiang 312000, China)

Abstract: Macromolecular proteins coupled with tannin polymer were the main factor to induce precipitate and turbidity in yellow rice wine. The contents of proteins were 0.8% in yellow rice wine and 50.20% in ending wine. The mechanism of protein precipitate was mainly described to the denature agglomeration of proteins which then developed macromolecular proteins with their molecular higher above 10,000 (proteins with molecular weight between 10,000~5,000 easily produced precipitates). Besides, the polyphenol such as tannin, metal ions such as Fe, and ethanol would also induce protein precipitate in yellow rice wine. (Tran. by YUE Yang)

Key words: yellow rice wine; protein precipitation; mechanism

自古以来,黄酒品质最突出的问题之一就是出现浑浊现象和产生沉淀物,一般可分为生物浑浊和非生物浑浊两种。生物浑浊是由于煎酒杀菌温度不到或储酒容器洗刷不净、灭菌不严而导致的。而非生物浑浊主要是蛋白质沉淀、氧化浑浊以及金属污染产生的浑浊等^[1]。对生物浑浊,大家已有认识,也容易解决;而非生物浑浊的情况比较复杂,影响的因素较多,一般认为主要是由于酒体中的蛋白质与多酚类物质(如单宁)相结合而引起^[2]。黄酒中主要营养成分为蛋白质,其含量居各酿造酒之首,但引起黄酒浑浊和产生沉淀的主要物质也正是蛋白质,这就是问题的矛盾所在。

为了解决这一问题,目前,在黄酒生产工艺中,一般采用和借鉴啤酒生产工艺的经验与方法,添加助剂或应用冷冻过滤、微滤等工艺技术等^[3],吸附除去部分蛋白质或使其凝固析出,尽可能地减少和控制黄酒的非生物浑浊。但由于对黄酒蛋白质沉淀的机理尚不清楚,同时对酒体中蛋白质的含量和分子量分布也缺少必要的检测

手段和方法,这些处理工艺和技术基本上是凭经验操作,因而,未能从根本上解决黄酒蛋白质的沉淀问题。

本文利用 TCDB-1 型蛋白质分离检测仪系统研究黄酒蛋白质的沉淀机理,测定和分析黄酒中蛋白质的含量和分子量与黄酒沉淀的相关关系;研究黄酒中共存物质(如多酚、多糖、溶解氧、H⁺和无机离子 Fe³⁺等)对黄酒沉淀的影响;从诸多影响沉淀的因素中,紧紧抓住蛋白质这一引起黄酒沉淀的主要因素,试图在分子层次上阐明黄酒蛋白质的沉淀机理。

1 材料与方法

1.1 试剂

单宁酸(C₇₆H₅₂O₄₆, FW=1701.25)、考马斯亮蓝 G-250 (Sigma Chemical Co.)、乙醇、蔗糖、硫酸铁、牛血清白蛋白(FW :67000)、卵白蛋白(FW :43000)、马血红蛋白(FW :12500)、牛胰岛素(FW :5733.5)。

1.2 仪器

收稿日期 2005-03-15

作者简介:林峰(1960-),男,浙江人,博士,副教授,从事生物无机化学研究,发表论文 40 余篇。

TCDB-1 蛋白质分离检测仪,杭州天辰仪器设备有限公司;MA110 电子分析天平,上海第二天平仪器厂;CS101-1EB 电热鼓风干燥箱,重庆四达实验仪器有限公司;722 可见分光光度计,上海第三分析仪器厂;CS501-3C 恒温水浴器,重庆四达实验仪器有限公司;pHs-3Tc 精密数显酸度计,上海天达仪器有限公司。

1.3 实验与分析方法

1.3.1 黄酒蛋白质含量与分子量的测定

应用 TCDB-1 蛋白质分离检测仪测定黄酒中的蛋白质含量与分子量分布,根据葡聚糖凝胶层析法的原理,并结合 Bradford 蛋白质测定法,创建了一种测定蛋白质的新方法——流动注射光度法^[4],可分离黄酒中的各类大小不同的蛋白质,并准确测定蛋白质的含量和分子量分布(见图 1,图 2,横坐标表示洗脱曲线上的保留时间(min),与蛋白质的分子量大小相对应,纵坐标表示蛋白质的含量(μg))。

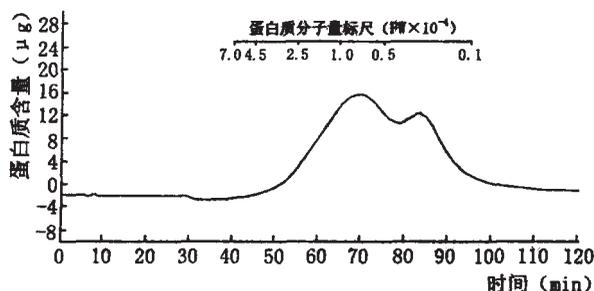


图 1 黄酒中蛋白质的含量和分子量分布

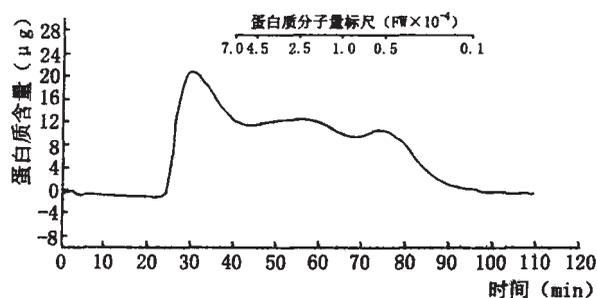


图 2 酒脚中蛋白质含量与分子量分布

1.3.2 单宁含量的测定

将酒样稀释 4 倍,采用磷钼酸-磷钨酸吸光光度法测定。

1.3.3 多糖的测定

采用费林氏容量法。

1.3.4 α -氨基氮的测定

采用茚三酮比色法测定,设定波长 570 nm。

1.3.5 铁含量测定

采用邻菲罗啉比色法测定,设定波长 510 nm。

1.3.6 黄酒浊度的测定

在可见分光光度计上,设定 800 nm 为测定波长,以

澄清未处理的同种酒样为参比,将待测酒样迅速摇匀测定透光率 T,以 $1-T$ 作为黄酒的浊度^[5]。

1.3.7 酒脚的收集及处理

取一定量的酒脚液于离心机中离心 30 min (3000 r/min),倾出上层清液,沉淀物 50℃ 干燥(3 d),室温冷却后称重,得干燥酒脚 0.1750 g。将其用 1 mol/L NaOH 溶解后,用 2 mol/L HCl 中和至溶液 pH=7.0,过滤后,移入 100 mL 容量瓶中定容待测。

2 结果与讨论

2.1 黄酒酒体和酒脚有关组成与蛋白质的含量与分子量分布

黄酒的沉淀与酒体中含有大量营养物质有关,尤其是蛋白质分子,分析和对比酒体与沉淀物(酒脚)中有关组成的含量,有助于对黄酒蛋白质沉淀机理的了解。

表 1 黄酒酒体和酒脚中有关成分的含量 (mg/L)

酒样	单宁	多糖(g/L)	α -氨基氮	铁
成 手工黄酒	820.4	22.16	589.2	3.36
品 机械黄酒	719.6	24.56	609.2	5.93
酒 平均值	770.0	23.36	599.2	4.65
酒脚(%)	1.912	19.78	0.390	0.071
酒脚/成品酒(倍)	24.8	8.47	6.51	152.7

表 2 酒体和酒脚中蛋白质的含量($\times 10^4$)与分子量分布 (%)

酒 样	成品酒			酒脚	
	手工黄酒	机械黄酒	平均值		
分子 量 分 布	4.5 以上	0.00	0.04	0.02	33.79
	4.5~2.5	2.19	3.90	3.04	16.02
	2.5~1.0	17.59	18.48	18.04	16.85
	1.0~0.5	27.68	24.85	26.27	14.01
	0.5 以下	52.55	52.74	52.65	19.32
蛋白质总含量	0.83	0.74	0.78	50.2	

从表 1,表 2 可知,酒脚中铁与单宁的含量分别比成品酒高出 152.7 和 24.8 倍,而蛋白质的含量达到了 50.2%,显然这 3 种物质是引起黄酒沉淀的主要因素。同时,从蛋白质的分子量分布情况看(见图 1,图 2),酒体中蛋白质分子量的分布主要为两部分:25000~5000 间的占 44.31%,<5000 的占 52.65%;而在酒脚中蛋白质分子量的分布为:>45000 的占 33.79%,45000~25000 间的占 16.02%,25000~10000 间的占 16.85%,10000~5000 间的占 14.01%,<5000 的占 19.32%。高分子量蛋白质的比例很高,这说明酒体中分子量大的蛋白质容易形成沉淀。

2.2 蛋白质含量与分子量分布与沉淀的关系

从酒脚中含有大量的蛋白质可知,酒体中蛋白质的含量与沉淀有关。为此,可通过向酒液添加蛋白质,配成不同浓度的酒样,进行单因素试验。根据黄酒中蛋白质

分子量的分布情况,选择1-牛血清白蛋白(FW:67000)、2-卵白蛋白(FW:43000)、3-马血红蛋白(FW:12500)和4-牛胰岛素(FW:5733.5)4种蛋白质进行试验,酒体的稳定性用浊度(1-T)表示。

试验方法:100 mL酒样中分别加入不同量的这4种标准蛋白质,室温下磁力搅拌10 min,测定酒体的浊度(1-T),实验数据见图3。

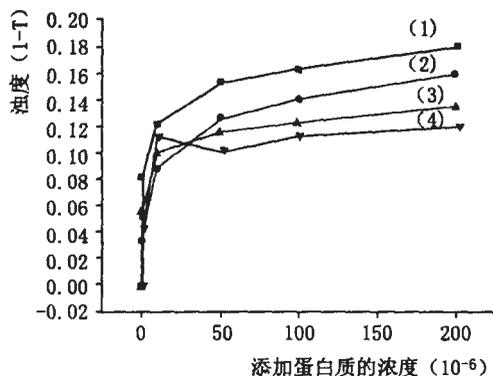


图3 蛋白质浓度与酒体稳定性的关系

图3中的数据表明,随着黄酒中添加蛋白质浓度的增加,酒体的浊度都一致增大,这说明黄酒中的蛋白质的确是形成沉淀的主要因素之一,添加蛋白质分子量的大小在低浓度时与黄酒沉淀之间似乎并不存在一一对应的关系,但随着浓度增大总的来说分子量大的蛋白质容易引起沉淀。

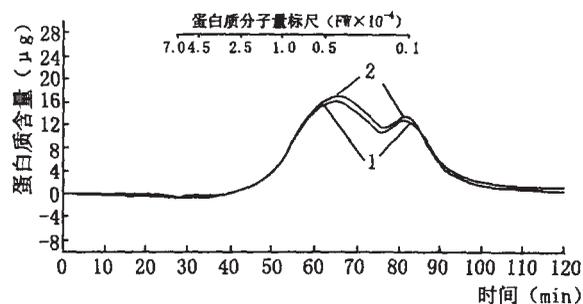
2.3 温度对蛋白质沉淀的作用

温度升高会使黄酒变得不稳定而产生热沉淀,而降低温度(如降至0℃)又会使酒体失光变浑形成冷浑浊,这是黄酒在存放过程中常见的现象,也是促使黄酒沉淀的主要因素之一。可通过加热和冷冻实验来研究黄酒蛋白质的热沉淀与冷浑浊,酒体中蛋白质的含量与分子量分布的变化情况见图4。

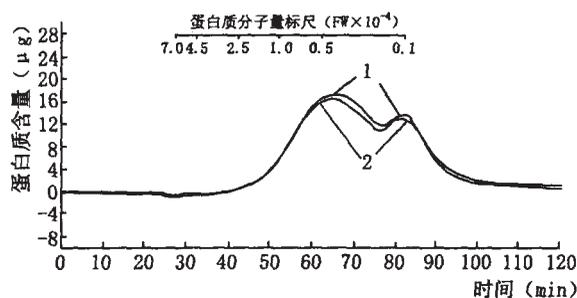
加热试验:酒样100 mL水浴90℃加热1 h,冷却至室温过滤,滤液待分析。

冷冻试验:酒样100 mL冰箱(0℃)放置24 h,趁冷过滤(放在冰箱内),滤液待分析。

从图4(a)中可知,加热后蛋白质变性聚合,所以,酒体中分子量大的蛋白质含量增多,而分子量较小的蛋白质含量略有减少,同时,酒体中蛋白质的总含量也有所降低,这说明黄酒的热沉淀主要是由于蛋白质的受热变性团聚所引起。冷冻试验表明,黄酒的冷浑浊是一个可逆的物理过程——酒体遇冷失光变浑,但升温到室温后放置时又会变得清澈透明。冷冻处理后酒液中蛋白质与单宁的含量都有所降低,表明蛋白质与单宁聚合物的确是引起黄酒冷浑浊的主要原因^[2],参与的主要是分子量在10000~5000间的蛋白质(见图4(b))。



a. 酒样加热处理



b. 酒样冷冻处理

图4 加热与冷冻处理前后酒样中蛋白质的含量与分子量分布

2.4 酒体中共存物对蛋白质沉淀的影响

黄酒中的其他共存物如乙醇、多酚、金属离子、多糖等对酒体的稳定性与蛋白质沉淀都有一定的影响,可以分别向酒体中添加这些物质进行单因素试验。

试验方法:在100 mL酒体中分别加入乙醇、单宁(多酚)、蔗糖(多糖)和Fe(III)等4种物质,在不同添加量的条件下,室温磁力搅拌10 min,测定酒体的浊度(1-T)及其蛋白质含量与分子量分布,实验数据见表3,表4,表5,表6。

表3 添加乙醇、单宁、蔗糖和Fe(III)等对酒体稳定性的影响 (mg/100 mL)

编号	1	2	3	4	5	6	
乙醇	添加量	0	10	20	30	40	50
	浊度	0	0	0	0.01	0.015	0.115
单宁	添加量	0	5	10	15	20	25
	浊度	0	0.213	0.357	0.431	0.568	0.632
Fe(III)	添加量	0	2	4	6	8	10
	浊度	0	0.131	0.312	0.503	0.658	0.772
蔗糖	添加量	0	5	10	15	20	25
	浊度	0	0	0	0	0	0

注:原酒样中:乙醇15.8%;单宁812.2 mg/L;多糖26.24 g/L;Fe(III)4.58 mg/L。

添加物中单宁和Fe(III)对酒体的稳定性与蛋白质沉淀影响最大,乙醇加到一定量时,略有影响,而多糖(蔗糖)对酒体的浊度与蛋白质沉淀基本不起作用。从蛋白质的含量与分子量分布来看,这些共存物都能促使蛋白质沉淀,但形成沉淀的主要是那些分子量较大的蛋白

表4 添加乙醇对酒体中蛋白质含量($\times 10^4$)和分子量分布的影响 (%)

添加量*	分子量分布					蛋白质总含量
	4.5以上	4.5~2.5	2.5~1.0	1.0~0.5	0.5以下	
0	0.04	3.80	18.58	26.85	50.73	0.83
10	0.03	3.76	19.53	25.67	51.01	0.83
20	0.05	3.46	18.52	27.84	50.13	0.82
30	0.02	3.36	17.89	28.67	50.06	0.82
40	0	3.12	18.23	29.45	49.20	0.80
50	0	2.58	17.26	29.78	50.38	0.78

* 添加量单位为 mg/100 mL, 表5, 表6同。

表5 添加单宁对酒体中蛋白质含量($\times 10^4$)和分子量分布的影响 (%)

添加量	分子量分布					蛋白质总含量
	4.5以上	4.5~2.5	2.5~1.0	1.0~0.5	0.5以下	
0	0.04	3.91	18.69	26.45	50.91	0.84
5	0.01	2.35	17.56	27.12	52.96	0.82
15	0	0.02	12.87	33.76	53.35	0.69
20	0	0	8.64	28.34	63.02	0.51
25	0	0	4.62	22.38	73.00	0.41

表6 添加铁(III)对酒体中蛋白质含量($\times 10^4$)和分子量分布的影响 (%)

添加量	分子量分布					蛋白质总含量
	4.5以上	4.5~2.5	2.5~1.0	1.0~0.5	0.5以下	
0.0	0.02	3.41	18.63	26.08	51.86	0.82
2	0.01	3.01	16.45	27.67	52.86	0.74
4	0	2.31	14.81	28.25	54.63	0.63
6	0	1.25	10.43	31.28	57.04	0.57
8	0	0	6.42	33.56	60.02	0.54
10	0	0	3.32	35.76	60.92	0.51

质, 这表明酒体中高分子蛋白质的确是引起蛋白质沉淀的主要因素。

2.5 成品酒蛋白质含量与分子量分布的质控指标

在研究黄酒浑浊现象与蛋白质沉淀机理的基础上, 我们试验并确定了成品黄酒的蛋白质质控指标。从蛋白质的总量来说, 黄酒中的蛋白质含量越少, 酒体的稳定性越高; 从蛋白质分子量的分布来看, 高分子蛋白质的含量越少, 酒体越稳定; 但蛋白质是黄酒的基本营养成分, 也不能完全除去。同时, 黄酒中蛋白质尽管含量丰富、种类繁多, 而且各类不同性质和分子量的蛋白质对黄酒沉淀的形成也有不同的影响, 但黄酒蛋白质作为胶体溶液的相对稳定性, 其各类蛋白质的含量及分子量分布应有一个合理的数值和分布曲线。以此为标准, 我们提出了成品黄酒的蛋白质标准, 建议作为企业的质控指标(见表7), 预测和控制黄酒酒体的蛋白质稳定性。

表7 成品黄酒蛋白质($\times 10^4$)的质控指标 (%)

组分	绍兴黄酒
4.5以上	≤ 0.1
4.5~2.5	≤ 4.0
2.5~1.0	25.0~15.0
1.0~0.5	≥ 25.0
0.5以下	≥ 45.0
蛋白质总含量	0.9~0.6

参考文献:

- [1] 顾国贤. 酿造酒工艺学(第2版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [2] Siebert K.J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze stabilization, and analysis[J]. J.Agric.Food.Chem. 1999 47(2): 353-362.
- [3] 高恩丽, 帅桂兰, 赵光鳌, 等. 黄酒中的冷混浊和氧化混浊[J]. 酿酒, 2001 28(2): 46-47.
- [4] 林峰, 韩滨, 方巍, 陈小伦. 一种测定啤酒蛋白质含量和分布的新技术[J]. 啤酒科技, 2002(8): 43-44.
- [5] 钱俊青, 蒋同隽, 徐国明, 陈金凤. 吸附法提高黄酒稳定性的研究[J]. 中国酿造, 1997(1): 25-29.

贵州茅台称雄两市

本刊讯: 据《证券时报》报道, 2005年8月17日, 贵州茅台(600519)公布了其2005年半年报, 近38%的净利润增长, 不负其绩优股的称号, 报告期内该公司净资产收益率为10.34%, 实现每股收益1.22元, 为目前深沪两市已公布半年报的企业中最高者。

2005年上半年, 贵州茅台生产茅台酒及系列产品12394.67吨; 实现主营业务收入16.861亿元, 较上年同期增长28.31%。其中, 高度茅台酒(含陈年茅台酒)实现销售收入13.918亿元, 同比增长32.43%, 毛利率为83.75%; 低度茅台酒销售2.294亿元, 同比增长16.16%, 毛利率为81.56%; 其他系列酒实现销售收入6494.68万元, 同比下降1.13%, 毛利率为60.55%, 同比下降5.32%。(小源)