

产多粮浓香型白酒风味物质微生物代谢成分的超临界 CO₂ 萃取研究

尹昌树, 刘波, 陈大理, 岳明生

(1.四川省申联生物科技有限责任公司, 四川 成都 611136; 2.四川省天府名优酒研究中心, 四川 成都 611136)

摘要: 以筛选出的5株对宜宾多粮浓香型白酒独特风格(粮香、糟香、窖香)起主要作用的微生物作为目标菌株, 研究其代谢风味物质, 确定多菌种混合发酵培养模式。结果表明, 发酵液超临界 CO₂ 萃取的最佳工艺为: 萃取压力 15 MPa, 萃取温度 45 °C, CO₂ 流量为 10 L/h, 分离压力为 7 MPa, 分离温度为 50 °C, 解析釜分离压力为 4.5~6.0 MPa, 温度为 55 °C, 萃取时间为 4 h。

关键词: 微生物; 多粮浓香型白酒; 风味物质

中图分类号: Q93-3; TS262.31; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2012)04-0061-04

Research on Supercritical CO₂ Extraction of Microbial Metabolites of Flavoring Substances of Multiple-grains Luzhou-flavor Liquor

YIN Changshu, LIU Bo, ZHANG Yizheng, CHEN Dali and YUE Mingsheng

(1.Sichuan Shenlian Biotech Co.Ltd., Chengdu, Sichuan 611136; 2. Research Center of Sichuan Tianfu Famous Liquor Products, Chengdu, Sichuan 611136; 3. Biotech Lab of Life Science College of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 611136, China)

Abstract: 5 microbial strains which played main roles in forming the special styles of multiple-grains Luzhou-flavor liquor (grains aroma, distiller's grains aroma and pits aroma) were screened out as object strains to study their metabolites and to determine the mixed fermentation pattern of multiple microbial species. The optimum technical conditions of supercritical CO₂ extraction were summed up as follows: the extraction pressure was 15 MPa, the extraction temperature was at 45 °C, CO₂ flow rate was 10 L/h, the separation pressure was 7 MPa, the separation temperature was at 50 °C, the resolve kettle separation pressure was 4.5~6.0 MPa and the temperature was at 55 °C, and the extraction time was 4 h.

Key words: microorganism; multiple-grains Luzhou-flavor liquor; flavoring substances

以五粮液为代表的宜宾多粮浓香型白酒的生产离不开当地独特的自然环境。作为中国酒都, 宜宾地处三江交汇处, 特殊的气候环境孕育出了独特的酿酒微生物生态区系; 一般认为, 在浓香型白酒生产过程中, 霉菌主要起糖化作用, 酵母发酵产生酒精, 细菌主要参与形成白酒复杂的风味和香气^[1]。本实验利用纯培养的方法对多粮浓香型白酒生产环节中优势细菌开展研究, 并筛选出5株对宜宾多粮浓香型白酒酒体独特风格起主要作用的微生物菌株。结合现代发酵技术及超临界萃取技术得到上述菌株的发酵产物, 以此对多粮浓香型白酒的特征风味物质进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2012-03-08

1.1.1 菌种

从四川某浓香型酒厂酿酒车间的窖泥、酒糟、曲药、黄水中筛选。分别编号: SL0015、SL0061、SL0098、SL0106、SL0158, 于 4 °C 保藏备用。

1.1.2 试剂

高纯二氧化碳, 食品级(99.99%)。

1.1.3 主要仪器和设备

Agilent CC 6890-5975 rnfKs, 美国安捷伦科技有限公司; Agilent C-C 6890-FID, 美国安捷伦科技有限公司; DD-6 低速大容量离心机, 济南福的机械有限公司; 超临界萃取设备, HA120-50-01A, 江苏南通华安超临界萃取有限公司; UF-20型实验型超滤装置, 华泰净化技术工程有限公司; 10 L 发酵罐, 50 L 发酵罐, 江苏镇江东方生物

工程设备技术有限责任公司。

1.1.4 培养基

种子液培养基:牛肉膏蛋白胨培养基^[2]、葡萄糖胰胨培养基^[3]。

发酵培养基(g/L):葡萄糖 20、小麦粉 10、酵母膏 1、(NH₄)₂SO₄ 为 0.5、MgSO₄·7H₂O 为 0.2、FeSO₄·7H₂O 为 0.1、K₂HPO₄·3H₂O 为 0.2、高粱粉 10、乙醇 20。

1.2 方法

1.2.1 种子液培养

将菌种接种于种子培养液中,其中 SL0015、SL0098、SL0106 以 42 ℃、150 r/min 培养 28 h;SL0061、SL0158 以 35 ℃,静置培养 3 d。

1.2.2 发酵培养

采取两种发酵形式:各菌种单独培养、全菌种混合培养。

1.2.3 感官评定

品评人员由国家评酒委员和从事白酒研究工作并经过闻香训练的人员组成;每个样品由 4 名品评人员分 3 次进行品评;在 20 ℃的品评环境下,品评发酵液的浓香,按很弱、弱、一般、强、很强 5 个等级分类。

1.2.4 发酵液中特征性风味化合物的分析

GC-MS 分析:样品通过 DB-Wax 毛细管柱进行分离,程序升温条件:初温 40 ℃,恒温 5 min,然后以 8 ℃/min 升至 230 ℃,保持 30 min;进样量:1 μL,不分流;载气:He;流速:2 mL/min;分离后的样品用 Agilent 5975MSD 鉴定。质谱条件 EI;电离源;电子能量:70 eV;离子源温度:230 ℃;扫描范围:30~550 amu。

物质定性分析:将未知物质谱图与 NIST 08a.L Database(Agilent Technologies Inc.)中标准谱图进行比对定性。

1.2.5 超临界 CO₂ 萃取

预处理:发酵液→粗滤→超滤→清液。

取 1 L 发酵清液投入萃取釜,将萃取釜温度升至设定值后开启 CO₂ 泵,萃取压力升至设定值后进行流动萃取,从解析釜出料口获得萃取物,将所得液体进行 GC-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 单独培养与混合培养比较

发酵结束后,取样进行感官评价,结果见表 1。

表 1 菌种单独培养与混合培养所产香气的比较

项目	菌株					混合培养
	SL0015	SL0061	SL0098	SL0106	SL0158	
香气	一般	弱	一般	一般	弱	强

从表 1 可以看出,筛选出的菌株进行单独培养时,产香均不强;而混合培养的香气浓。这与菌种间的协同作用有关,因为某种菌种的发酵代谢产物可能是另一种菌种发生作用的诱导物质,或是两种菌种的产物在酶的作用下进行一些反应,如酯化反应等。

2.2 混合培养条件的研究

2.2.1 培养基的选择

培养基 A(g/L):牛肉膏 10、蛋白胨 5、酵母膏 5、葡萄糖 40、(NH₄)₂SO₄ 为 0.5、MgSO₄·7H₂O 为 0.2、FeSO₄·7H₂O 为 0.1、K₂HPO₄·3H₂O 为 0.2、CaCl₂ 为 0.1。

培养基 B(g/L):葡萄糖 20、小麦粉 10、酵母膏 1、(NH₄)₂SO₄ 为 0.5、MgSO₄·7H₂O 为 0.2、FeSO₄·7H₂O 为 0.1、K₂HPO₄·3H₂O 为 0.2、高粱粉 10、乙醇 20。

培养基 C(g/L):小麦粉 10、高粱粉 10、玉米粉 8、大米粉 5、糯米粉 5。

利用上述培养基分别进行发酵,发酵结束后,取样进行感官品评,结果见表 2。

表 2 不同培养基生长情况及产香情况比较

项目	培养基 A	培养基 B	培养基 C
生长情况	快	较快	慢
产香情况	弱	强	强

从表 2 可知,培养基 A 营养丰富,菌种生长快,但产香弱;培养基 C 产香强,但生长太慢;而培养基 B 兼备 A、C 的优点,菌种生长较快、产香强。故选培养基 B 作为以下试验所用培养基。

2.2.2 培养温度的选择

以下列控温方式做试验:①35 ℃;②先 35 ℃后 42 ℃;③42 ℃。发酵结束后,取样进行感官评价,结果见表 3。

表 3 不同控温方式对产香的影响

项目	35 ℃	先 35 ℃后 42 ℃	42 ℃
产香情况	一般	强	弱

从表 3 可看出,控温方式以先 35 ℃后 42 ℃为最佳。

2.2.3 培养基 pH 值的选择

将培养基分别维持在 pH5、6、7、8 条件下进行发酵,发酵结束后,取样进行感官评价,结果见表 4。

表 4 不同 pH 值对产香的影响

项目	pH 值			
	5	6	7	8
产香情况	弱	强	一般	弱

从表 4 可以看出,pH 值在 6 时,产香最强。

2.2.4 接种量的选择

选择不同的接种量进行发酵,实验设计及其结果见表 5。

表5 不同接种量的产香情况 (%)

项目	菌株接种量					产香情况
	SL0015	SL0061	SL0098	SL0106	SL0158	
A	10	10	10	10	10	一般
B	5	5	5	5	5	弱
C	5	10	5	5	10	强

从表5可以看出,菌种 SL0015、SL0061、SL0098、SL0106、SL0158 按 5%、10%、5%、5%、10% 的接种量接种进行混合发酵,产香最强。

2.3 超临界 CO₂ 萃取条件的研究

2.3.1 萃取温度的确定

超临界 CO₂ 的临界点为 7.52 MPa、31.1 °C, 因此试验的温度、压力都不能低于这个条件。另外,由于超临界 CO₂ 所萃取的物质一般都为热敏性物质,萃取温度不能太高,所以对萃取温度的调节非常重要^[4]。通过 4 组单因素试验确定萃取温度,结果见表 6。

表6 萃取温度选取试验

样品编号	萃取条件			分离条件		萃取率 (%)	品评
	压力 (MPa)	温度 (°C)	CO ₂ 流量 (L/h)	压力 (MPa)	温度 (°C)		
1	10	35	10	8	50	4.78	弱
2	10	40	10	8	50	5.28	一般
3	10	45	10	8	50	5.16	强
4	10	50	10	8	50	4.99	一般

通过以上试验可以看出,3 号样虽然萃取率略低于 2 号样,但其风味更佳,所以萃取温度选用 45 °C。

2.3.2 萃取压力的确定

选取不同的萃取条件和分离条件进行试验,其结果见表 7。

表7 萃取压力选取试验

样品编号	萃取条件			分离条件		萃取率 (%)	品评
	压力 (MPa)	温度 (°C)	CO ₂ 流量 (L/h)	压力 (MPa)	温度 (°C)		
11	9	45	10	8	50	5.08	弱
12	12	45	10	8	50	5.26	一般
13	15	45	10	8	50	5.31	强

从表 7 可以看出,13 号样品萃取率高且风味好,因此,萃取压力确定为 15 MPa。

2.3.3 CO₂ 流量的确定

在萃取压力为 15 MPa、温度 45 °C、分离压力 8 MPa、分离温度 50 °C 条件下,选取不同的 CO₂ 流量进行试验,其结果见表 8。

从表 8 可以看出,不同 CO₂ 流量对所得萃取物的品质无影响,但在相同萃取时间下,流速越大,萃取得率越高。因此,确认 CO₂ 流量为 10 L/h。

表8 CO₂流量的选取试验

样品编号	萃取条件			分离条件		萃取率 (%)	品评
	压力 (MPa)	温度 (°C)	CO ₂ 流量 (L/h)	压力 (MPa)	温度 (°C)		
21	15	45	10	8	50	5.24	强
22	15	45	8	8	50	5.18	强
23	15	45	6	8	50	5.09	强
24	15	45	4	8	50	5.01	强

2.3.4 分离温度的确定

在萃取压力为 15 MPa、温度 45 °C、CO₂ 流量为 10 L/h、分离压力为 8 MPa 条件下进行试验,结果见表 9。

表9 分离温度的选取试验

样品编号	萃取条件			分离条件		萃取率 (%)	品评
	压力 (MPa)	温度 (°C)	CO ₂ 流量 (L/h)	压力 (MPa)	温度 (°C)		
31	15	45	10	8	30	5.34	弱
32	15	45	10	8	40	5.28	一般
33	15	45	10	8	50	5.19	强
34	15	45	10	8	60	5.01	强

从表 9 可以看出,分离温度越低,萃取率越高,但品质不好,所以分离温度选取 50 °C。

2.3.5 分离压力的确定

在萃取压力为 15 MPa、温度 45 °C、CO₂ 流量为 10 L/h、分离温度 50 °C 条件下进行试验,结果见表 10。

表10 分离压力的选取试验

样品编号	萃取条件			分离条件		萃取率 (%)	品评
	压力 (MPa)	温度 (°C)	CO ₂ 流量 (L/h)	压力 (MPa)	温度 (°C)		
41	15	45	10	6	50	5.24	一般
42	15	45	10	7	50	5.18	强
43	15	45	10	8	50	5.11	强

从表 10 可以看出,分离压力越大,萃取率越低,但品质更好,综合考虑,确定分离压力为 7 MPa。

2.3.6 解析釜压力、温度的确定^[4]

为确保在解析釜中萃取物质达到完全解析,解析压力越低越好,但考虑到 CO₂ 能重复利用,因此,解析压力与 CO₂ 储罐中压力相同,即在 4.5~6.0 MPa 之间,解析釜温度设定为 55 °C。

2.3.7 萃取时间的确定

萃取时间在 4 h 后,产品得率很小,因此将萃取时间定为 4 h^[4]。

2.4 萃取物的分析

以萃取压力 15 MPa、萃取温度 45 °C、CO₂ 流量为 10 L/h、柱分离压力为 7 MPa、分离温度为 50 °C、解析釜分离压力为 4.5~6.0 MPa、温度为 55 °C、萃取时间为 4 h 作为控制条件进行超临界 CO₂ 萃取,萃取得率为

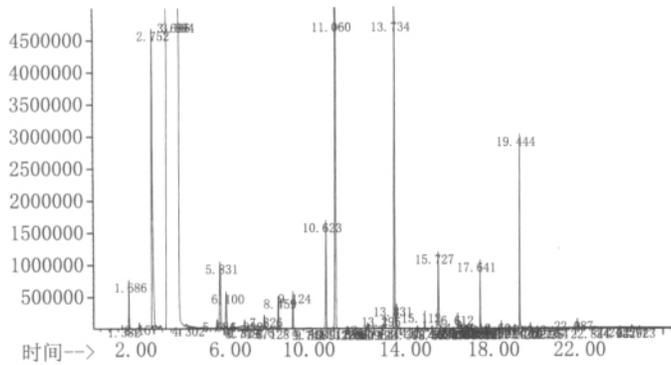


图1 萃取物的质谱图

5.48%。把萃取物进行GC-MS分析,结果见图1。

按以上条件进行萃取,所获得萃取物中主要成分如下:

醇类:乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、仲丁醇、正戊醇、2-戊醇、异戊醇、 β -苯乙醇、正己醇、2-庚醇、3-甲基苯甲醇、9,12,15-三烯十八醇;

多元醇:1,2-丙二醇、2,3-丁二醇、1,3-丁二醇、丙三醇;

酸类:乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸、己酸、庚酸、辛酸、癸酸、苯乙酸、十五酸、十六酸、十七酸、十八酸、油酸、亚油酸、7-烯十六酸;

酯类:乙酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯、十三酸乙酯、苯乙酸乙酯、甲酸-2-丁酯、乙酸异戊酯、十五酸乙酯、十六酸乙酯、棕榈酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯、十七酸乙酯、亚麻酸乙酯、油酸癸酯、油酸单甘油酯、乳酸乙酯、苯甲酸乙酯、月桂酸乙酯、苯丙酸乙酯、丁二酸单乙酯、甲氧基乙酸乙酯、11-十六烯酸乙酯、2-氯油酸乙酯、琥珀酸双乙酯、邻苯二甲酸二丁酯;

酚:对丁酸甲酯酚、对乙醇酚、对乙基酚、4-乙烯基愈创木酚;

胺:乙酰胺、3-甲基丁酰胺;

烷:辛烷、1,1-二氧基戊烷、1,1-二乙氧基异戊烷、2-乙氧基苯烷、2,3-二苯基丁烷;

酮:丙酮、5-甲基-2-己酮、6,10,14-三甲基-2-十四酮;

醛:乙醛、异丁醛、2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、苯甲醛、2,4-二烯癸醛;

杂环类:苯乙酰吡唑、2-苯基-4,5-二甲基-1,3-二氧五环、2-苯基-1,3-二氧六环、2-苯基-4-甲基-1,3-二氧五环、糠醇、2-甲酰吡咯、2-羟基-3,4,5-三氢咪喃、2-羟基吡咯、氮甲基-2,4-二烯-2-甲酰吡咯、三甲基吡嗪、2,5-二甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪、2,6-二乙基吡嗪、四甲基吡嗪、吡啶、3-羟基吡啶、糠醛、2-戊基咪喃。

3 结论

3.1 以筛选的微生物菌株进行多粮浓香型白酒的呈香呈味物质的生产,并确定了多菌种混合发酵的培养模式。

3.2 确定了发酵液进行超临界CO₂萃取的最佳工艺:萃取压力15 MPa,萃取温度45℃,CO₂流量10 L/h,柱分离压力7 MPa,分离温度50℃,解析釜分离压力4.5~6.0 MPa,温度55℃,萃取时间4 h。

3.3 所得萃取液经专家鉴定,具有典型的多粮浓香型白酒的风味;白酒固态发酵感强,粮香突出,糟香优雅,窖香柔和。多家酒厂试用后,均反响强烈。

参考文献:

- [1] 周瑞平,陈云宗,唐代云.宜宾多粮浓香型酒厂内细菌多样性及分布的初步研究[J].酿酒科技,2010(4):65-67.
- [2] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.
- [3] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [4] 王国春,等.利用超临界CO₂萃取技术从酿酒副产物中提取酒用呈香呈味物质的研究[J].酿酒科技,2008(1):38-41.

第六届国际葡萄酒挑战赛成功落幕

本刊讯 2012年3月24日,全国糖酒会第六届巅峰国际葡萄酒挑战赛在成都新国际会展中心举行颁奖典礼,为3月21日~22日盲品大赛胜出的11款高分酒颁发奖项。本届大赛设置的最佳新世界葡萄酒与最佳旧世界葡萄酒两项大奖分别由澳大利亚天鹄酿酒有限公司选送的灵魂种植者——缓酿与浙江拉托贸易有限公司选送的拉巴迪酒庄红葡萄酒摘得,荣获优秀干白葡萄酒的两个款分别是四川锦城颐和实业有限公司选送的陶思酒庄雷斯林干白和长沙代躬商务服务有限公司选送的马尔堡 OTU 长相思。本届大赛共评出了5款优秀干红葡萄酒,分别是获奖酒款:布克珀诺山干红(萨林那(上海)国际贸易有限公司送选)、金玫瑰庄园干红(广州蓝泉酒业有限公司送选)、天鹅庄总督之选赤霞珠西拉(澳大利亚天鹄酿酒有限公司送选)、拿帕1号(上海醉客国际贸易有限公司送选)、拉发佳酿酒庄内梅亚干红(北京荣锦佳福酒业送选);另外组委会特别设置最具竞争力葡萄酒奖项由嘉华(福建)酒业有限公司选送的纳瓦罗酒庄真飞度陈酿05与锦州渤海贸易有限责任公司选送巴肯典藏赤霞珠获得。

据了解,本届大赛由全国糖酒商品交易会办公室、新食品杂志社共同主办,于2012年3月21日~22日在成都花样年·隆堡酒店举办盲品比赛。本届大赛评委团由来自香港的WSET 4级、侍酒师协会认证侍酒师许铁松,台湾地区葡萄酒作家、讲师林殿理,国际侍酒师协会认证专业讲师,ISG美国国际侍酒师协会文凭获得者,WSET Level 3,澳大利亚葡萄酒与烈酒委员会专业认证讲师,逸香葡萄酒教育高级讲师开闻,青岛大学生物系葡萄酒室教授涂正顺,台湾《酒讯》杂志社社长吴志彦组成,共同为224款来自不同国家、不同产地的参赛酒款进行盲品打分。本届比赛的顾问为亚洲首位葡萄酒大师李志延女士。(小小荐)

来源:糖酒快讯-食品资讯 2012-03-31