

纯生黄酒的酿造 ——超滤去酶技术的应用

朱一松¹ 赵光鳌¹ 帅桂兰¹ 魏运平¹ 邹慧君² 谢广发²

1(江南大学生物工程学院 沙多利斯过滤实验室 无锡,214036)

2(中国绍兴黄酒集团公司 绍兴,312000)

摘要 对纯生黄酒的研制进行了探讨。通过模拟实验验证了超滤去酶的效果,并且用截留分子量为30000和10000的超滤膜对生黄酒进行过滤,分析了超滤处理前后的黄酒样品。结果表明,这2种规格的超滤膜对淀粉酶、糖化酶、蛋白酶都能达到去除的要求,超滤处理后的黄酒各理化指标均符合GB/T13662—2000的指标要求,蛋白质和氨基酸均有所减少,酒样颜色变浅,黄酒有新的香味感觉,具有淡爽感,呈现一种黄酒新品种的风味。

关键词 纯生黄酒 超滤 超滤去酶 黄酒酿造

黄酒是世界3大古酒种之一^[1~3],深受广大消费者喜爱^[4]。新产品的开发,是当前各黄酒生产企业面临的主要问题。而纯生黄酒,即不经过任何加热酿造的黄酒,则是顺应市场需求而研发的一种新产品。

笔者改变了传统黄酒酿造中的煎酒灭酶工艺,以超滤法去酶,获得满意效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

生黄酒(刚压榨出来的黄酒):由某黄酒厂提供;实验黄酒(煎酒装瓶后未经巴氏杀菌的黄酒):由某黄酒厂提供;中温淀粉酶、糖化酶、中性蛋白酶:由本实验室提供;干酪素(化学纯):中国医药(集团)上海化学试剂公司生产;L-酪氨酸(生化试剂):中国医药(集团)上海化学试剂公司生产。其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

VIVASCIENCE过滤装置:某国外公司品牌;消化仪2006 Digester Foss Tecator;自动凯氏定氮仪:2300 kjeltec analyzer unit, Foss Tecator;LD4-2A型低速离心机:北京医用离心机厂制造;UV-754分光光度计:上海

精密科学仪器有限公司制造;TGL-16C台式离心机:上海安亨科学仪器厂制造;Agilent1100型氨基酸分析仪:美国安捷伦公司制造;HWS24型电热恒温水浴锅:上海益恒实验仪器有限公司制造;FA/JA型电子天平:上海精密科学仪器有限公司制造;PHS-3C精密pH计:上海雷磁仪器厂制造。

1.3 纯生黄酒生产工艺流程

生黄酒→硅藻土过滤→微滤→超滤→微滤→无菌灌装→成品酒。

1.4 分析方法

1.4.1 总糖、还原糖、酒精度、总酸、氨基酸态氮、非糖固形物的测定

按GB/T13662—2000测定^[5]。

1.4.2 糊精的测定

铁氰化钾滴定法^[6]。

1.4.3 蛋白质的测定

改良的凯氏定氮法^[7,8]。

1.4.4 蛋白质隆丁区分的测定

单宁沉淀法和磷钼酸沉淀法^[7,8]。

1.4.5 工业酶制剂活力的测定

淀粉酶活力的测定:分光光度计法;糖化酶活力的测定:硫代硫酸钠滴定法;蛋白酶活力的测定:福林法^[9]。

以酪氨酸浓度作横坐标,吸光值 A 为纵坐标作酪氨酸浓度-吸光度标准曲线图,如图 1 所示。

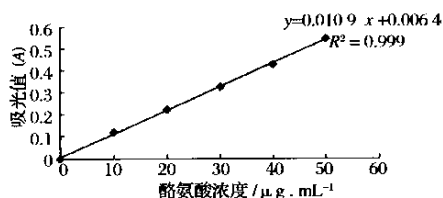


图 1 酪氨酸浓度-吸光度标准曲线

1.4.6 生黄酒中酶活力的测定

淀粉酶活力的测定:分光光度计法;糖化酶活力的测定:硫代硫酸钠滴定法;蛋白酶活力的测定:福林法^[6]。

1.4.7 氨基酸分析

取 2 mL 黄酒样品,用超纯水定容至 10 mL,经 10000 r/min 的离心机离心 10 min,再用 0.45 μm 的微滤膜过滤后进样分析。

1.4.8 黄酒色度的测定

在 UV-754 分光光度计上,选定 420 nm 作为测定波长,以去离子水为参比,测定酒样的吸光值。

1.4.9 黄酒风味的评定

感官评定法^[5]。

2 结果与讨论

2.1 黄酒色度测定的波长的确定

实验黄酒(煎酒装瓶后未经巴氏杀菌的黄酒)经 9000~10000 r/min 离心,再以去离子水为参比进行 400~860 nm 波长扫描,其吸收曲线如图 2 所示。

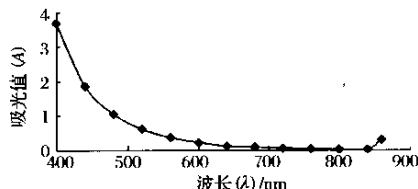


图 2 澄清黄酒 400~860 nm 波段吸收曲线

从图 2 可以看出,吸光值随着波长的增加而逐渐减少。但是,测定色度时的波长应是吸光值最大时的波长,考虑到仪器的灵敏度及吸光值的合理性,并结合葡萄酒色度测定时的波长(420 nm)^[11],选择 420 nm 作为色度测定时的波长。

2.2 超滤去酶实验的研究

2.2.1 单独酶系的模拟实验

为了验证超滤去酶的效果,首先采用工业用的淀粉酶、蛋白酶和糖化酶进行单独酶系去酶的模拟试验。将各种酶分别配成一定单位的酶液后^[9],分别用截留分子量为 30 000 和 10 000 的超滤膜过滤,测定过滤前后的酶活力,实验结果如表 1 所示。

从表 1 可以看出,截留分子量为 30 000 的超滤膜对糖化酶的去除效果并不十分理想(去除率仅为 64.32%),这是因为该糖化酶

表 1 单独酶系超滤前后酶活力的变化

酶 类	酶液 A ¹⁾	酶液 B ²⁾	经 10000 的超滤膜过滤后的酶液(酶液 C) ³⁾	相对去除率 I (B 相对于 A) %	相对去除率 II (C 相对于 A) %
淀粉酶活力/u·mL ⁻¹	1866	0	0	100	100
糖化酶活力/u·mL ⁻¹	95256	33986	720	64.32	99.24
蛋白酶活力/u·mL ⁻¹	9408	146	0	98.45	100

1) 酶液 A 超滤前的原酶 2) 酶液 B 经 30 000 的超滤膜过滤后的酶液 3) 酶液 C 经 10000 的超滤膜过滤后的酶液(表 2 与此相同)。

的分子量在 30 000 左右,超滤时糖化酶的稳定因子随着超滤液一起滤出^[12],从而导致滤液中存在着一一定的酶活。由于淀粉酶的分子量在 50 000 左右,蛋白酶的分子量为 30 000~40 000^[12],因此,该超滤膜对淀粉酶和蛋白酶都能达到去除的要求,去除率分别为

100%和 98.45%。同时可以发现,截留分子量为 10000 的超滤膜对这 3 种酶都能达到去除的要求,与实际生产相符合。

2.2.2 混合酶系的模拟实验

由于生黄酒中淀粉酶、糖化酶和蛋白酶同时存在,为了研究超滤技术对生黄酒中这

3 种酶的去情况 ,用这 3 种酶进行混合酶系的模拟实验。考虑到黄酒的 pH 值 ,选择

乙酸-乙酸钠作为缓冲溶液(pH4.6) ,实验结果如表 2 所示。

表 2 混合酶系超滤前后酶活力的变化

混合酶系	酶液 A	酶液 B	酶液 C	相对去除率 I (B 相对于 A) %	相对去除率 II (C 相对于 A) %
淀粉酶活力/ $u \cdot mL^{-1}$	1 836	0	0	100	100
糖化酶活力/ $u \cdot mL^{-1}$	121 468	5 472	577	95.49	99.52
蛋白酶活力/ $u \cdot mL^{-1}$	10 779	73	0	99.32	100

从表 2 可以看出 ,截留分子量分别为 30 000 和 10 000 的超滤膜对混合酶系中的 3 种酶均能起到较好的去除效果(去除率均在 95 % 以上) ,这与前面的实验结果相一致 ,因为这 3 种酶混合后 ,彼此之间发生络合作用 ,分子量变大。这为后面用超滤技术去除生黄

酒中的酶提供了依据。

2.2.3 生黄酒的去酶实验

文中分别用截留分子量为 30 000 和 10 000 的超滤膜过滤生黄酒 ,通过测定各种酶在过滤前后的活力 ,验证超滤去酶的效果 ,实验结果如表 3 所示。

表 3 生黄酒超滤前后酶活力变化

生黄酒中的酶类	滤前 酒样 A ¹⁾	酒样 B ²⁾	酒样 C ³⁾	相对去除率 I (B 相对于 A) %	相对去除率 II (C 相对于 A) %
淀粉酶活力/ $u \cdot mL^{-1}$	0.760	0.0432	0	94.32	100
糖化酶活力/ $u \cdot mL^{-1}$	46.152	4.400	0	90.47	100
蛋白酶活力/ $u \cdot mL^{-1}$	0.912	0	0	100	100

1 酒样 A 超滤前的生黄酒 2 酒样 B 经 30000 的超滤膜过滤后的酒样 3 酒样 C 经 10000 的超滤膜过滤后的酒样(表 4、表 5、表 6 和表 7 与此相同)。

从表 3 可以看出 ,生黄酒经超滤膜过滤后 ,酒样中淀粉酶、糖化酶和蛋白酶的去率均在 90 % 以上 ,说明这 2 种规格的超滤膜对生黄酒中的酶均能达到去除的要求 ,从而为纯生黄酒的生产奠定了基础。

2.3 生黄酒超滤处理前后理化指标的分析

使用超滤膜(截留分子量分别为 30 000 和 10 000)对生黄酒进行过滤 ,并对所得的 3 种酒样进行了理化指标的分析 ,实验结果如表 4 所示。

表 4 生黄酒超滤前后理化指标的分析

理化指标	酒样 A	酒样 B	酒样 C
酒精体积分数/ %	19.0	18.4	17.7
总糖/ $g \cdot L^{-1}$	14.2	11.2	9.90
还原糖/ $g \cdot L^{-1}$	13.5	10.5	9.34
总酸/ $g \cdot L^{-1}$	4.2	3.9	3.8
氨基酸态氮/ $g \cdot L^{-1}$	0.77	0.73	0.70
非糖固形物/ $g \cdot L^{-1}$	32.5	30.5	29.8
糊精/ $g \cdot L^{-1}$	1.40	1.26	1.07

从表 4 可以看出 ,生黄酒经超滤膜过滤后各理化指标都呈减小的趋势 ,但均符合

GB/T13662—2000 的指标要求 ,说明超滤处理对黄酒的内在品质无明显不良的影响 ,处理后的酒样仍具有黄酒的特性。

2.4 生黄酒超滤处理前后蛋白质及其隆丁区分的测定

蛋白质是影响黄酒稳定性的重要因素之一 ,它可以与多酚类物质、铁离子等结合 ,从而引起浑浊 ,因此 ,对经超滤处理后的生黄酒进行了蛋白质及其隆丁区分的分析 ,实验结果如表 5、图 3 和图 4 所示。

表 5 生黄酒超滤前后蛋白质的分析

蛋白质	酒样 A	酒样 B	酒样 C
总蛋白质/ $g \cdot L^{-1}$	1.243	1.069	1.005
高分子蛋白质/ $g \cdot L^{-1}$	0.147 1	0.085 33	0.060 78
中分子蛋白质/ $g \cdot L^{-1}$	0.185 8	0.151 2	0.122 3
低分子蛋白质/ $g \cdot L^{-1}$	0.909 9	0.832 4	0.821 6

从表 5 和图 3 可以看出 ,生黄酒经超滤膜过滤后 ,总蛋白质含量以及高、中、低分子蛋白质的含量均减少 ,总蛋白质的去除率分别为 13.99 % 和 19.16 % ,经截留分子量为

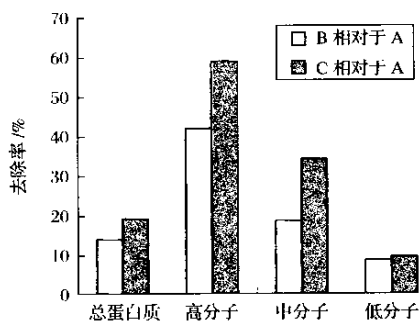


图3 超滤前后蛋白质的去除率

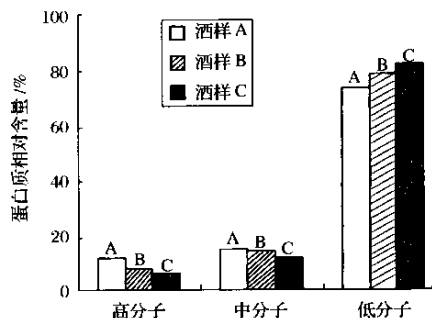


图4 超滤前后蛋白质隆丁区分

30 000 的超滤膜过滤后的酒样中,高、中、低分子蛋白质的去除率分别为 42.00%、18.63%和 8.51%;经截留分子量为 10 000 的超滤膜过滤后的酒样中高、中、低分子蛋白质的去除率分别为 58.69%、34.17%和 9.70%,可以看出,这 2 种规格的超滤膜对蛋白质的去除有较为明显的效果,尤其是对高分子蛋白质说明超滤技术可以提高黄酒的稳定性。而且截留分子量愈小的超滤膜,蛋白质的去除效果越好。同时,从图 4 中可以看出,超滤处理后高分子蛋白质和中分子蛋白质的相对含量均有所减少,由原来的 11.84% 和 14.95% 分别减少为 7.98%、14.15%和 6.05%、12.18%,而低分子蛋白质的相对含量有所增加,由 73.21% 分别增加为 77.87%和 81.77%。

2.5 生黄酒超滤处理前后氨基酸的分析

黄酒中氨基酸的含量非常丰富,它是黄酒中的营养物质,同时也是黄酒中一种重要

的风味物质,因此对超滤前后生黄酒中的氨基酸进行了测定分析,其结果如表 6 所示。

表 6 生黄酒超滤前后氨基酸的测定 mg/L

氨基酸	酒样 A	酒样 B	酒样 C
Asp	306.546	226.274	222.011
Glu	459.925	426.092	412.360
Asn	59.6160	89.2989	89.4514
Ser	214.553	178.986	173.482
Gln	562.166	430.403	410.696
His	120.259	94.8152	96.3458
Gly	260.198	235.852	226.592
Thr	106.151	82.4206	81.3696
Ala	523.084	500.591	472.377
Arg	582.233	526.408	499.307
Tyr	312.975	260.802	219.030
Cys	70.8079	83.6487	—
Val	205.063	174.811	169.887
Met	110.668	92.0120	89.1008
Phe	280.732	235.880	230.052
Ile	155.476	130.946	127.338
Leu	366.652	323.003	312.969
Lys	197.462	174.667	168.610
Pro	478.270	422.975	399.398
Σ	5 372.84	4 689.89	4 400.38

从表 6 可以看出,生黄酒经超滤膜过滤后,酒样中氨基酸的总量均呈减小的趋势,由原来的 5 372.84 mg/L 分别减小为 4 689.89 mg/L和4 400.38 mg/L,而经 2 种规格的超滤膜处理后的酒样,其氨基酸含量变化不大。

2.6 生黄酒超滤处理前后颜色和口味的变化

色泽是黄酒的感官指标之一,影响色泽的主要因素有:原料本身存在的色素,麦曲中添加的焦糖色,黄酒在贮存过程中,糖分与氨基酸相结合,产生类黑精物质(美拉德反应),引起酒色褐变;另外还有其他类似的化学反应(如蛋白质与糖、醛、酮之间的反应)也是引起黄酒增色的因素^[4]。超滤技术可以去除黄酒中的一些物质(如蛋白质、糖色等),从而对黄酒的颜色和口味产生一定的影响,实验结果如表 7 所示。

从表 7 可以看出,经截留分子量为 30 000和10 000的超滤膜处理后的酒样颜色变浅,色度变化率分别为 43.36% 和

45.80%。而且通过品尝实验发现,超滤处理后,黄酒的香味有新的感觉,具有淡爽感,呈现一种黄酒新品种的风味。

表7 生黄酒超滤前后颜色和口味的变化

指 标	酒样 A	酒样 B	酒样 C
口味	黄酒香味浓郁,醇厚感较好	黄酒香味淡雅,有淡爽感	黄酒香味较淡雅,有淡爽感
色度(吸光值)	0.286	0.162	0.155

3 结 论

(1)经超滤处理后,生黄酒中的酶均能达到去除的要求,其去除率均在90%以上,从而为纯生黄酒的生产奠定了基础。

(2)超滤后的酒样中各理化指标均符合GB/T13662—2000,说明超滤处理后的酒样仍具有黄酒的特性。蛋白质和氨基酸含量在超滤处理后都有所下降,总蛋白质的去除率分别达到13.99%和19.16%,特别是高分子蛋白质的去除效果更明显,去除率分别为42.00%和58.69%,从而在一定程度上有助于黄酒稳定性的提高。而且截留分子量越小的膜对蛋白质的去除效果越好。氨基酸的总量由原来的5 372.84 mg/L分别减小为4 689.89 mg/L和4 400.38 mg/L,差别不大,而且经品尝实验发现,超滤处理后的黄酒虽然颜色变浅,但香味有新的感觉,具有淡爽感,呈现一种黄酒新品种的风味。

参 考 文 献

- 1 周家骥. 黄酒生产工艺. 北京:中国轻工业出版社,1996
- 2 顾国贤. 酿造酒工艺学. 北京:中国轻工业出版社,1996
- 3 康明宫. 黄酒生产问答. 北京:中国轻工业出版社,1987
- 4 李家寿. 酿酒科技,2001(3):48~50
- 5 中华人民共和国黄酒国家标准. 国家质量技术监督局,2001
- 6 赵光鳌,金岭南. 黄酒生产分析检验. 北京:轻工业出版社,1987
- 7 管敦仪. 啤酒工业手册(中册). 北京:轻工业出版社,1985
- 8 蔡定域. 酿酒工业分析手册. 北京:轻工业出版社,1988
- 9 姜锡瑞. 酶制剂应用手册. 北京:中国轻工业出版社,1999
- 10 钱俊青等. 中国酿造,1997(1):25~29
- 11 梁冬梅,李记明,林玉华. 中外葡萄与葡萄酒,2002(3):9~10
- 12 陈生,胡学智. 酶制剂生产技术. 北京:化学工业出版社,1994

Application of Removing Enzymes by Ultrafiltration in Draft Rice Wine Making

Zhu Yisong¹ Zhao Guangao¹ Shuai Guilan¹ Wei Yunping¹
Zou Huijun² Xie Guangfa²

1(The Sartorius Filtration Laboratory of School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036)
2(Shaoxing Yellow Wine Group Co. Ltd., Shaoxing, 312000)

ABSTRACT This article presents the study on the making of draft rice wine. Simulation experiments were carried out in order to verify the effect of removing enzymes by ultrafiltration. Raw rice wine was filtrated through ultrafiltration membranes that with molecular weight cut-off (MWCO) of 30 000 and 10 000, respectively. Three kinds of samples were analyzed and the results indicated that the ultrafiltration membranes could remove over 90% of amylase, saccharogenic amylase and proteinase. The filtrated rice wine contains less protein and amino acids and the physical and chemical indexes conformed to the national standard GB/T 13662—2000. It was seen that the filtrated rice wine was pale in color, crisp in taste and with aroma.

Key words draft rice wine, ultrafiltration, removing enzymes by ultrafiltration, rice wine making