

## 不同原浓啤酒中有机酸的含量分析

朱婷婷<sup>1</sup> 吴 帅<sup>1,3</sup> 邵洪涛<sup>2</sup> 张开利<sup>2</sup> 杜金华<sup>1</sup>

1(山东农业大学食品科学与工程学院,泰安,271018) 2(泰山啤酒有限公司,泰安,271000) 3(天津科技大学生物工程学院,天津,300222)

**摘 要** 以相同原料配比,用下面发酵法酿造 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 与 10.0°P 啤酒。样品总酸随原浓上升而提高,原浓低于 7.5°P 时,啤酒酸味明显。用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法在啤酒中检测出了 10 种有机酸:草酸、酒石酸、丙酮酸、苹果酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、富马酸与琥珀酸,总量为 738.17~799.50 mg/L,各样品间有机酸含量差异明显。琥珀酸含量最高;其次是柠檬酸、苹果酸、丙酮酸、乳酸与草酸。草酸、丙酮酸随着原浓的增加而升高。7.0、7.5、8.0、10.0°P 啤酒中乳酸含量相近,6.0、6.5°P 啤酒中乳酸含量急剧上升。研究结果表明,啤酒酵母产酸受原浓与发酵度的影响。

**关键词** 啤酒,反相高效液相色谱,有机酸,原浓,发酵度

啤酒中的有机酸主要来源于原料、添加剂与发酵过程。有机酸是麦汁和啤酒酸度的主要来源,对啤酒酿造与成品酒的风味具有重要意义。糖化过程中,有机酸有利于维持糖化醪和麦芽汁的 pH 值,使麦汁制备过程中的各种反应过程能够顺利进行。发酵过程中有机酸的生成,逐步降低了发酵液的 pH 值,有助于蛋白质凝固物的析出;在酸性环境和酶的催化下,与发酵液中的醇类反应形成酯,使啤酒口味逐步成熟;造成的酸性环境可抑制部分杂菌的生长繁殖;有机酸本身具有风味,除影响啤酒的 pH 值外,还影响啤酒的风味和口感<sup>[1]</sup>。

本实验室在前期研究中发现,酿造低浓度啤酒时,过高的发酵度会引起啤酒口味淡薄,酸味加重;6.0°P 啤酒发酵度为 50%,6.5、7.0、7.5°P 啤酒发酵度为 60%,8.0°P 啤酒发酵度为 65%时,啤酒具有良好的风味特征,但低浓度啤酒酸味仍较明显。文中采用下面发酵法酿造了 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、10.0°P 啤酒,分析了成品啤酒的理化指标、感官特征和主要有机酸的种类与含量。以确定不同原浓度啤酒中的有机酸组成,为改善低浓度啤酒的风味,特别是酸味提供线索。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

原料:麦芽,大米,焦香麦芽,啤酒花。各样品间的原辅料配比相同。

菌种:啤酒酵母(*S. uvarum*):本实验室保存。

主要仪器:pHS-3C 型数字式酸度计;电磁力搅拌器 IKAMAG RET-GS;全自动啤酒分析仪;酒精蒸馏装置;双乙酰蒸馏装置;美国 Waters 高效液相色谱仪:包括 510 型高压泵,U6K 进样器,M-490 型 UV 检测器。

主要试剂:NaOH、邻苯二胺、HCl、草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{H}_3\text{PO}_4$  等,均为分析纯,丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸为生化试剂。

### 1.2 生产工艺

#### 1.2.1 麦汁制备流程

糊化锅  $\rightarrow 75^\circ\text{C} \rightarrow 95^\circ\text{C} \rightarrow 100^\circ\text{C}$   
 $\downarrow$   
 糖化锅  $\rightarrow 50^\circ\text{C}$  蛋白质休止  $\rightarrow 62\sim 70^\circ\text{C}$  糖化  $\rightarrow$  过滤  
 $\downarrow$   
 100°C 煮沸  
 $\downarrow$   
 冷却  $\rightarrow$  定型麦汁

按麦汁制备流程制备 6.0~10°P 定型麦汁。

#### 1.2.2 发酵工艺

接种量 1%,接种温度 8°C,主酵温度 9°C。满罐 2 d 后封罐升压,主酵压力 0.12 MPa,降糖至适宜浓度时自然升温至 12°C,还原双乙酰。双乙酰降至 0.06 mg/L 时降温。后贮压力 0.12~0.13 MPa,后贮温度 -1~-1.5°C。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 理化指标分析<sup>[2]</sup>

浓度与酒精体积分数:全自动啤酒分析仪。

酸度:电位滴定法。

双乙酰:比色法。

第一作者:硕士研究生(杜金华为通讯作者)。

收稿日期:2005-01-25

### 1.3.2 有机酸

反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。色谱柱:Diamonsil C<sub>18</sub>柱(250×4.6 mm, 10 μm), PT-C<sub>18</sub>预处理柱;检测器波长:215 nm;流动相:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液,以磷酸调节pH值;流速:0.5~1.0 mL/min;柱温:30℃;色谱数据处理:N2000 双通道色谱工作站。

## 2 结果与分析

### 2.1 啤酒的理化指标与感官特征

成品啤酒理化指标分析结果(表1)表明,各个啤酒样品的理化指标均符合GB4927—2001啤酒标准要求,总酸随原浓度降低而下降。虽然在酿造过程中对7.5°P以下啤酒控制了较低的发醇度,但感官品尝显示,原浓度低于7.5°P时,随原浓的降低,啤酒酸味加重,且7.0°P啤酒的酸味最重。因此在相同的原料配比与工艺下,啤酒的酸味受原浓与发酵度(可发酵性糖总量)的影响,啤酒中主要有机酸间的含量差别可能是导致啤酒酸味差别的主要原因之一。

表1 啤酒的理化分析结果

理化指标	6.0°P	6.5°P	7.0°P	7.5°P	8.0°P	10.0°P
酒精体积分数/%	2.2	2.6	2.8	3.0	3.8	4.8
原浓/°P	6.0	6.4	7.0	7.6	8.1	10.1
发醇度/%	58	61	61	61	74	73
双乙酰/mg·L <sup>-1</sup>	0.03	0.05	0.05	0.04	0.02	0.02
苦味质/BU	8.0	8.5	8.5	8.0	8.1	8.2
色度/EBC	3.5	3.5	3.5	3.5	4.0	5.0
总酸/mL·L <sup>-1</sup>	12	12	13	13	15	17
CO <sub>2</sub> 质量分数/%	0.60	0.64	0.63	0.62	0.54	0.54
泡久/s	271	290	295	301	313	316

### 2.2 啤酒中有机酸分析

#### 2.2.1 标准溶液的配制

根据啤酒中有机酸浓度范围<sup>[3]</sup>,准确称取草酸0.20 g,酒石酸0.02 g,丙酮酸0.20 g,苹果酸0.30 g,α-酮戊二酸0.10 g,乳酸0.50 g,乙酸0.10 g,柠檬酸0.50 g,富马酸0.10 g,琥珀酸0.50 g,用二次去离子水溶解后,全部加入到100 mL容量瓶中定容至刻度,作为储备液。

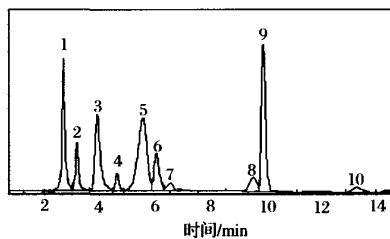
#### 2.2.2 分离条件的确定

流动相的pH值是分离样品有机酸的关键,酸性流动相可有效地抑制有机酸的电离,由于10种有机酸的解离平衡常数不同,流动相pH值对分离效果会有明显的影响。根据相关研究<sup>[4]</sup>,选择流动相pH在2.5~3.0的范围内。柠檬酸和富马酸较难分离,适宜的pH值是分离柠檬酸和富马酸的关键,结果表明

pH值在2.8~2.95之间,2种酸的分离效果较好。由于流动相pH值越低对机器损伤程度越大,经反复比较,发现以pH2.93的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲溶液为流动相能较好地将10种有机酸分离;洗脱液浓度在0.05~0.25 mol/L对分离效果影响不大,考虑到过高的盐浓度会对色谱柱有不良影响,选择洗脱液浓度在0.1 mol/L以下,由于所分析的样品中有机酸量较少,0.08 mol/L的洗脱液足以达到使有机酸稳定的缓冲容量;分别选择流动相流速0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL/min,0.5~0.8 mL/min范围内分离效果相差不大。流速越低,分析时间就越长,柱效也会越差,因此,确定流速为0.8 mL/min;根据以上分离条件进行色谱分析,得到峰面积与浓度的标准曲线的回归方程如下:

草酸:	$Y = 0.4872X + 0.2047$	$R^2 = 0.9953$
酒石酸:	$Y = 0.5240X + 0.2145$	$R^2 = 0.9942$
丙酮酸:	$Y = 0.3490X + 0.2246$	$R^2 = 0.9968$
苹果酸:	$Y = 0.1925X + 0.3011$	$R^2 = 0.9951$
α-酮戊二酸:	$Y = 0.2756X + 0.3409$	$R^2 = 0.9949$
乙酸:	$Y = 1.0087X + 0.3130$	$R^2 = 0.9966$
柠檬酸:	$Y = 0.1753X + 0.2864$	$R^2 = 0.9984$
富马酸:	$Y = 0.2755X + 0.3861$	$R^2 = 0.9957$
乳酸:	$Y = 0.4267X + 0.2639$	$R^2 = 0.9993$
琥珀酸:	$Y = 0.2704X + 0.4819$	$R^2 = 0.9937$

各种有机酸在样品的浓度范围内的线性关系良好,外标法定量的准确度可以得到保证。根据确定的分离条件,10种有机酸混合标准溶液的HPLC图谱如图1所示。



1—草酸,2—酒石酸,3—丙酮酸,4—苹果酸,5—α-酮戊二酸  
6—乳酸,7—乙酸,8—柠檬酸,9—富马酸,10—琥珀酸

图1 有机酸标准溶液的RP-HPLC有机酸分析图谱

#### 2.2.3 啤酒有机酸RP-HPLC分析图谱

啤酒样品中某些有机酸的含量较低,不易检出。为便于分析及减少误差,确定进样量20 μL。各啤酒样品的有机酸RP-HPLC分析图谱如图2~7所示。在本实验条件下,每种样品中均检出10种有机酸。



啤酒样品中有机酸总量在 738.17~799.50 mg/L(表 2),单一有机酸间的含量差异明显。草酸主要来自于麦芽,含量 66.18~80.29 mg/L,随样品中麦芽使用量提高而增加。丙酮酸是啤酒酵母正常发酵副产物,随样品中原浓的提高、发酵度的增加而升高。7.0、7.5、8.0、10.0 $^{\circ}$ P 为啤酒中乳酸含量相近;6.0、6.5 $^{\circ}$ P 啤酒样品中乳酸含量急剧上升,分别为 163.64 mg/L 与 117.69 mg/L。另外,两样品中对应的乙酸含量也较高,分别为 36.42 mg/L 与 31.91 mg/L,但丙酮酸含量不高。这可能是由于两样品中可发酵糖的总量少,啤酒酵母接入麦汁后,经生长繁殖迅速进入发酵后期,酵母利用发酵液中丙酮酸进行歧化反应形成乙酸和乳酸。对照表 2 中结果,6.5、7.0 $^{\circ}$ P 样品中可发酵性糖的总量相差不多(发酵度均为 61%),但乳酸含量相差近 1 倍,这可能是由于当麦汁中可发酵性糖的总量或浓度低于某一界限值时,发酵液中乳酸大量生成。各样品中琥珀酸含量最高,测定浓度为 183.53~240.28 mg/L。琥珀酸是酵母正常副产物,发酵葡萄酒时,其含量约为酒精含量的 1%,但在本研究中,未发现有此规律。

柠檬酸与苹果酸也是啤酒中含量较高的有机酸(表 2),柠檬酸在 7.0 $^{\circ}$ P 样品中含量最高,为 185.21 mg/L;苹果酸在 6.5、7.0 $^{\circ}$ P 样品中含量较高,分别为 127.45 mg/L 与 118.73 mg/L。对照 2.1 中的感官分析结果,7.0 $^{\circ}$ P 样品酸味最重可能是酒中高量柠檬酸(三元酸且产生酸感快)与苹果酸(尖酸,呈味时间长)的缘故。柠檬酸与苹果酸都是 TCA 环中的中间产物,柠檬酸在 7.0 $^{\circ}$ P 样品中含量最高、苹果酸在 6.5 $^{\circ}$ P 样品中含量最高,其中原因尚待于进一步研究。

对照表 1 与表 2 中结果,随着样品中原浓与发酵度的降低,啤酒中所测有机酸的总量升高,即随着样品中原浓的降低,单位可发酵性糖产酸量升高。可见麦汁浓度及发酵度对酵母的产酸作用有一定影响。这可能是由于麦汁中可发酵性糖总量低,接入麦汁的酵母转入发酵后,迅速将发酵液中的可发酵性糖用完,酵母的发酵作用停止,许多中间产物无法转为乙醇或其他风味物质而以有机酸的形式存在,从而导致低浓啤酒中有机酸含量相对高,啤酒酸味重。

其他几种酸如酒石酸、 $\alpha$ -酮戊二酸与富马酸在啤

酒中含量较少。

### 3 结 论

从 6 个啤酒样品中分别分离出 10 种有机酸。琥珀酸含量最高,其次柠檬酸、乳酸、苹果酸、丙酮酸与草酸等。10 种有机酸含量的总和在 738.17~799.50 mg/L 之间,随着啤酒样品中可发酵性糖总量的降低,啤酒中有机酸总量升高。不同种类有机酸的含量有十分明显的差别,其中,柠檬酸、苹果酸、丙酮酸含量差别较大。啤酒酵母产酸受麦汁中可发酵性糖总量(原浓、发酵度)的影响。

### 参 考 文 献

- 董霞,李崎,顾国贤. 啤酒有机酸类物质研究进展[J]. 酿酒, 2003(6):63~66
- GB/T44928—2001《啤酒分析方法》
- Chris Boulton, David Quain. *Brewing Yeast & Fermentation* [M]. Oxford [England]: Blackwell Science. Bodmin, 2001.116~117
- 张军,韩英素,高年发等. HPLC 法测定葡萄酒中有机酸的色谱条件研究[J]. 酿酒科技, 2004(2):91~93
- 管敦仪编. 啤酒工业手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998
- Cahill G, Murray D M, Walsh P K. Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance [J]. J Am Coc Brew Chen, 2000,58:14~20
- Younis O S, Stewart G G. Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of the Institute of Brewing, 1998,104:255~264
- Patkvva J, Smogrovicova D, and Bafrncova P et al. Change in the yeast metabolism at very high-gravity wort fermentation [J]. Folia Microbiol, 2000,45(4):335~338
- Aho K and Pietila K. The effect of wort composition on fermentation and beer flavor [J]. Mallasja Olut, 1993(1):4~13
- Younis O S and Stewart G G. Effect of malt-very high gravity malt, and very high gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of American Society of Brewing Chemists, 1999(2):39~45
- 丁耐克编. 食品风味化学[M]. 中国轻工业出版社, 1996. 64~70

## Study on Organic Acids in Different Original Gravity Beers

Zhu Tingting<sup>1</sup> Wu Shuai<sup>1,3</sup> Shao Hongtao<sup>2</sup> Zhang Kaili<sup>2</sup> Du Jinhua<sup>1</sup>

1(College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, 271018, China)

2(Taishan Beer Ltd. Co., Taian, 271000, China)

3(College of Biology and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300222, China)

**ABSTRACT** With the same ratio of raw materials, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, and 10.0°P beers were brewed by bottom fermentation. The total acidities of the samples increased with the increase of the original gravity. The 10 organic acids, oxalic, tartaric, pyruvic, malic, ketoglutaric, lactic, acetic, citric, fumaric, and succinic acids were detected in each of the samples by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). And the total content of these acids ranged from 738.17 to 799.50 mg/L. Significant differences in acid were found among individual samples. Succinic acid had the highest content followed by citric, lactic, malic, pyruvic and oxalic acid, in descending order. The content of pyruvic and oxalic acid increased with the increase of the original gravity of the samples. The content of lactic acid in the 7.0, 7.5, 8.0, and the 10.0°P samples were similar. However, it increased sharply in the 6.0 and 6.5°P samples. It is indicated that the metabolization of beer yeast was affected by original gravity and attenuation of beer.

**Key words** beer, reverse phase high performance liquid chromatography (RE-HPLC), organic acids, original gravity, attenuation

## 行业动态

## 2004年白酒工业的总体情况

全国白酒总产量微弱增长,产销衔接良好,白酒主产区和部分骨干企业产量有所下降。2004年全国规模以上白酒企业986家,吸纳从业人员32.37万人,共生产白酒311.68万千升,同比增长1.98%。2004年白酒市场销售势头良好,白酒销售量多于生产量,共计销售白酒 $314.20 \times 10^4$ kL,年末库存比年初减少12.90%。白酒行业产品销售率达到102.20%,产销基本平衡。全国白酒产量仍然集中在主要产区和骨干企业,白酒产量前5个省区的生产量为 $173.44 \times 10^4$ kL,占全行业比重55.65%;其中山东 $58.40 \times 10^4$ kL,占全国比重18.74%;四川 $50.64 \times 10^4$ kL,占全国比重16.25%;江苏 $21.98 \times 10^4$ kL,占全国比重7.05%;河南 $21.71 \times 10^4$ kL,占全国比重6.97%;安徽 $20.71 \times 10^4$ kL,占全国比重6.64%。

销售收入平稳增加,利润增长大于税收增长,白酒行业税收贡献和盈利能力处于较低水平。2004年全国规模以上白酒生产企业,累计完成工业总产值659.30亿元,同比增长19.21%。完成销售收入613.00亿元,同比增长15.17%。白酒销售额前5个省、区共计实现产品销售收入418.62亿元,占全行业比重68.29%。其中四川232.44亿元,占全国比重37.92%;山东72.60亿元,占全国比重11.84%;安徽44.37亿元,占全国比重7.24%;贵州38.47亿元,占全国比重6.28%;江苏30.74亿元,占全国比重5.01%。2004年白酒行业实现利税158.75亿元,同比增长19.05%。实现利税前5个省区的利税总额为115.61亿元,占全行业比重为72.54%。其中四川63.40亿元,占全国比重39.94%;贵州25.13亿元,占全国比重15.83%;山东12.85亿元,占全国比重8.09%;安徽8.02亿元,占全国比重5.05%;江苏5.76亿元,占全国比重3.63%。2004年白酒产量、销售收入和利税集中度继续提高,白酒行业经济效益进一步向优势企业集中,特别是2004年白酒百强企业拥有占全行业76%的资产;完成了全行业61%的产量;占有全行业77%的销售额和创造了全行业86%的利税。

白酒行业的产量、销售额、利润和税金增长比例失调,产业结构性矛盾突出。2004年规模以上企业白酒产量 $311.68 \times 10^4$ kL,同比增长1.98%;销售收入613.00亿元,同比增长15.17%;实现利润58.66亿元,同比增长38.79%;完成税收100.08亿元,同比增长7.95%。白酒行业销售收入、实现利税的增幅,同产量增长之间的矛盾极其突出,1.98%的产量增长,使销售收入增长了15%以上,使利润增幅近39%,实现税收增长幅度仅8%。2004年白酒行业产量和利税增长失调的原因是,为规避从价和从量复合计征的白酒消费税,白酒企业纷纷缩减中低价白酒产量,白酒骨干企业五粮液公司、泸州老窖公司、北京红星股份、杏花村汾酒、山东兰陵股份、泰山、中轩、卫河酒业、安徽古井贡酒、金种子集团、河南仰韶集团等近30家大型骨干企业产量均同比下降,最高降幅达43%以上,个别大型企业低价位酒减产万吨以上。由于税收负担过重,使生产中低档产品微利或亏损,为平衡税收增加对产品成本的影响,企业减少生产产品,主推高价位产品,白酒企业在效益增长的同时,造成产品结构失衡,一些骨干企业生产经营多年,具有广大市场需求,质量稳定的知名中低档产品总量锐减,市场萎缩,一些靠偷漏税生存的小酒厂又死灰复燃,与大企业争夺中低价产品市场。