

窖面酒、醇甜酒与窖底酒中香气物质差异性分析

梁 焯¹ 孟天毅² 李 灏¹ 吕 杰^{1*}

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 贵州国台酒业有限公司, 贵州 仁怀 564500)

摘 要: 应用顶空固相微萃取(HS-SPME)结合气相色谱质谱技术(GC-MS)获得窖底酒、醇甜酒与窖面酒中的微量香气物质信息,然后应用多元统计分析方法如主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLS-DA)等研究3组酒的差异性香气物质,并利用聚类分析(HCA)验证了差异性分析结果的正确性。结果表明:窖面酒、醇甜酒与窖底酒之间的差异性香气物质共有15种,其中准确定性9种,包括戊酸乙酯、己酸乙酯、庚酸乙酯、辛酸乙酯、十二酸乙酯、糠醛、苯甲醛、戊酸、庚酸。这些差异性香气物质的变化提供了醇甜酒与窖底酒不同的风格与口感特征。

关键词: 酱香型酒; 香气物质; 顶空固相微萃取; 气相色谱与质谱联用; 多元统计分析方法

中图分类号: TS262.3; TS207.3

引 言

白酒的风格口感特征取决于酒中的一种微量物质或多种微量物质的复合。这些微量物质包括酸类、醇类、酯类、醛类、吡嗪类等。窖面酒、醇甜酒、窖底酒由发酵池中不同深度的酒糟蒸馏而得。窖面酒酱香突出、略涩、后味绵长;醇甜酒酱香突出,具有醇甜味,后味爽净;窖底酒具有部分浓香型酒风格,酱香明显,浓厚丰满。造成这些酒体风格口感差异的微量物质尚不清楚,有研究报告推测苯甲醛为影响酱香酒风格的重要香味物质^[1]。

目前,人们主要利用直接进样、顶空进样方法等分析酒中香气物质,或利用液液萃取、顶空固相微萃取(HS-SPME)等方法对酒中香气物质进行浓缩萃取后进行气质联用分析(GC-MS)^[2]。如吴兆征等^[3]使用FFAP毛细管柱联合气相色谱质谱的直接进样法分析浓香型古贝春酒微量成分;郭志刚等^[4]利用液液萃取法对干红葡萄酒进行混合萃取,并对所萃取微量成分利用GC-MS进行了分析;Margarita等^[5]用动态顶空进样法分析了西班牙40个葡萄酒样品中的挥发性成分。与上述方法相比,HS-SPME简便快捷并且不需要溶剂。Cheng等^[6]利用顶空固相微萃取联合气相色谱质谱法检测131种白酒中的

挥发性香气成分,并用多元统计分析方法结果预测酒的生产地域。HS-SPME结合GC-MS为检测分析酒中的微量香气物质提供了有效便捷的方法。

本文应用HS-SPME结合GC-MS获得窖面酒、醇甜酒与窖底酒中微量香气物质的指纹图谱,并利用多元统计分析方法如主成分分析(PCA)观察三组酒样整体分离趋势,应用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)与变量重要性分析(VIP)等找到影响3种酒体风格特点与口感差异的微量香气物质。

1 实验部分

1.1 材料

1.1.1 酒样

酒样来自贵州国台酒业有限公司2008年生产的第5次发酵循环的窖面、醇甜、窖底酒,乙醇体积分数52%。

1.1.2 试剂

NaCl, 2-辛醇, 分析纯, 国药化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器

7890A-5975C型气相色谱-质谱联用仪, PC-WAX毛细管柱, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm, 美国Agilent Technologies公司; JHH-S型磁力搅拌水浴锅, 科杰仪器厂; 手动萃取手柄, 30/50 μm PDMS/CAR/DVB萃取头, 20 mL样品瓶, 美国Supelco公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酒样香气物质的分析

将酒样的酒精度用去离子水稀释为17% (体积分数), 取10 mL稀释后酒样加入20 mL样品瓶

收稿日期: 2014-05-12

第一作者: 女, 1987年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: lvjie@mail.buct.edu.cn

中,加入磁力转子,再加入 2.5 g NaCl 使溶液饱和,迅速拧紧样品瓶盖。酒样中的微量香气物质用萃取头萃取,稀释及制备后的酒样放入 60 ℃ 磁力搅拌水浴锅中平衡 10 min,磁力搅拌速度为 200 r/min。再将萃取头顶空插入样品瓶萃取挥发性香气成分 10 min。萃取完成后,将萃取头插入气相色谱 250 ℃ 进样口解析 5 min。

气相色谱分析所用色谱柱为 PC-WAX,氮气的流速为 2 mL/min,未分流进样,采用程序升温,初温 50 ℃,稳定 2 min 后以 4 ℃/min 的速度升到 230 ℃,保持 5 min。检测器的温度为 250 ℃。质谱分析中采用 EI 离子源,电离电压 70 eV,离子源与接口温度均为 250 ℃,四级杆温度为 150 ℃,采用全扫描,扫描范围为 m/z 300 ~ 500。

1.2.2 数据分析

窖面、醇甜、窖底 3 组酒样的 GC-MS 数据通过 AMDIS 软件导出。其中窖面包括 3 个生物重复,醇甜与窖底包括 6 个生物重复,生物重复的个数即为在酒罐中重复取样的次数。各个酒样 GC-MS 总离子流图中出峰物质的相对峰强度为出峰物质的峰面积比上内标物 2-辛醇的出峰面积。将一组包含样品名、保留时间与相对峰强度三维矩阵表对齐并导入 SIMCA-P 10.0 软件(美国 Umetrics 公司)进行多元统计分析,即 PCA 与 PLS-DA 分析。PCA 用于观察窖面酒、醇甜酒与窖底酒的总体分离趋势,PLS-DA 用于查找造成组间差异的微量香气物质。

为了考察随着窖池发酵深度的变化,窖面酒、醇甜酒、窖底酒 3 组酒样中香气物质的差异,选择醇甜酒为对照组,分别于窖面组与窖底组建立 PLS-DA 模型,观察组间分离情况,并查找差异物质。除此之外,PLS-DA 模型导出的 VIP 图也用于寻找组间重要的差异物质,VIP 大于 1 表明该物质是组间重要差异物。将 PLS-DA 载荷图与 VIP 分析查找的差异性微量物质求并集,得到汇总的包括样品名、保留时间、相对峰强度的差异微量物质表。

应用 SPSS 17.0 软件对上述汇总的差异物质进行独立性 t 检验,并利用 P 值考察各出峰物质是否具有显著差异性。将具有显著差异与极显著差异的微量香气物质汇总,并在 NIST08 质谱库(<http://chemsw.farhawk.com/NIST08/>)中查找质谱信息,鉴定差异物质^[7]。

利用 R 语言编程对上述经鉴定的差异性微量物质进行聚类分析(HCA),采用欧氏距离法聚类,

验证 PCA 与 PLS-DA 结果。

2 结果与讨论

2.1 窖面、醇甜、窖底 3 组酒的总体差异

窖面、醇甜、窖底 3 组酒的 GC-MS 总离子流色谱图如图 1 所示。导出 3 组酒样的 GC-MS 数据并对齐后,共 97 个出峰物质。从总离子流色谱图可以看出,随着发酵深度的变化,窖面、醇甜、窖底的香气物质组成发生变化。窖面醇甜的总离子流色谱图较为相似,醇甜与窖底的总离子流色谱图差异较大。3 组酒样之间总离子流色谱图的差异鉴别需要借助多元统计分析,找到对组间差异起贡献的出峰物质。

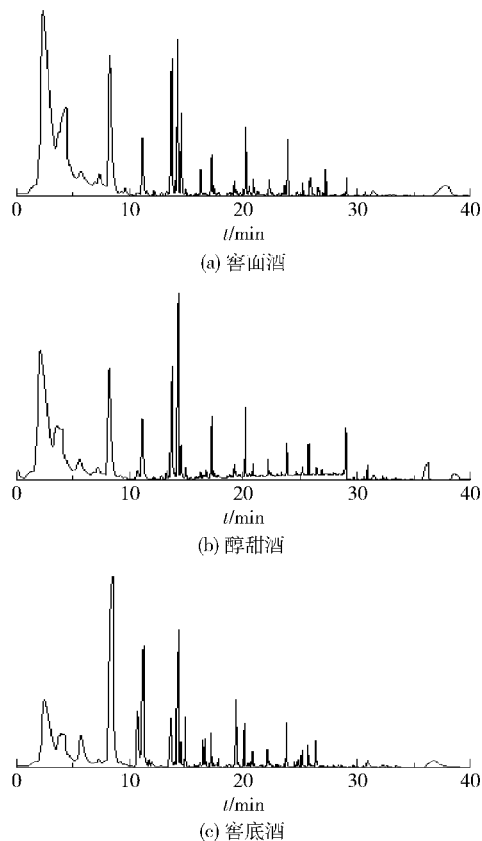


图 1 窖面酒、醇甜酒、窖底酒的 GC-MS 总离子流色谱图
Fig. 1 Typical TICs of GC-MS of Jiaomian liquor, Chuntian liquor and Jiaodi liquor

如图 2(a) 所示,非监督 PCA 得分图($R^2 X_{cum} = 0.96$, $Q^2_{cum} = 0.705$), $R^2 X_{cum}$ 与 Q^2_{cum} 越高,模型解释率与预测率越高。非监督 PCA 得分图被用于观察窖面、醇甜、窖底酒的香气物质组成总体差异,该图揭示了窖面、醇甜、窖底 3 组酒样 96% 的差异性由酱香酒发酵深度的变化造成。PCA 得分图显示了 3 组酒样之间的分离趋势,从图中看出,窖面与醇甜分

离趋势不大,而醇甜与窖底分离趋势较大。表明醇甜和窖底之间香气物质组成差异较大。这些差异性香气造成了醇甜酒与窖底酒不同的风格与口感。

为了进一步确认 3 组酒样总体分离趋势,应用 3 组酒样的 GC-MS 数据建立 PLS-DA 模型,得分图如图 2(b) 所示,PLS-DA 结果与 PCA 结果吻合,窖面与醇甜之间的香气物质差异性较小,然而醇甜与窖底之间香气物质差异性较大。

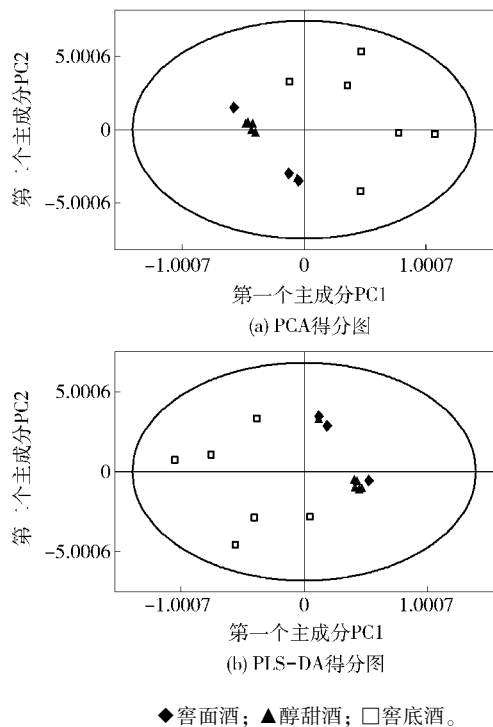


图 2 窖面组、醇甜组、窖底组的 PCA 与 PLS-DA 得分图
Fig. 2 Score plot of PCA and PLS-DA for Jiaomian liquor group, Chuntian liquor group and Jiaodi liquor group

2.2 醇甜酒与窖面酒的差异性分析

为了进一步考察随着窖池发酵深度的变化,窖面酒、醇甜酒、窖底酒 3 组酒样中香气物质的差异,选择醇甜酒为对照组,分别于窖面组与窖底组建立 PLS-DA 模型,观察组间分离情况,并查找差异物质。窖面与醇甜的总 PCA 得分图如图 2(a) 所示,两组酒样分离度较小,无法建立 PLS-DA 模型,因此本研究建立窖底组与醇甜组的 PLS-DA 模型,分析两组酒样香气物质差异。

PLS-DA 模型 R^2 值与 Q^2 值越大,表明 PLS-DA 模型的预测能力越准确与真实,本研究中,醇甜组与窖底组建立 PLS-DA 模型的 $R^2 X_{cum}$ 与 Q^2_{cum} 分别为 0.996 与 0.900,表明此 PLS-DA 模型能真实反应醇甜组与窖底组之间的分离情况。

图 3(a) 中,醇甜组处于得分图中正半轴,窖底处于得分图中的负半轴。在得分图中,醇甜组与窖底组能很好的分开。醇甜组与窖底组在得分图中的分离现象是由两组间的差异性香气物质造成,通过 PLS-DA 模型的载荷图查找这些差异性香气物质。图 3(b) 为醇甜组与窖底组的载荷图,正半轴向上的突出峰代表醇甜酒中对两组酒样得分图中观察到的分离起贡献的差异性香气物质,负半轴向下的突出峰代表窖底酒中对两组酒样得分图中观察到的分离起贡献的差异性香气物质。将载荷图中正负半轴突出峰的保留时间列出,得到差异性香气物质。

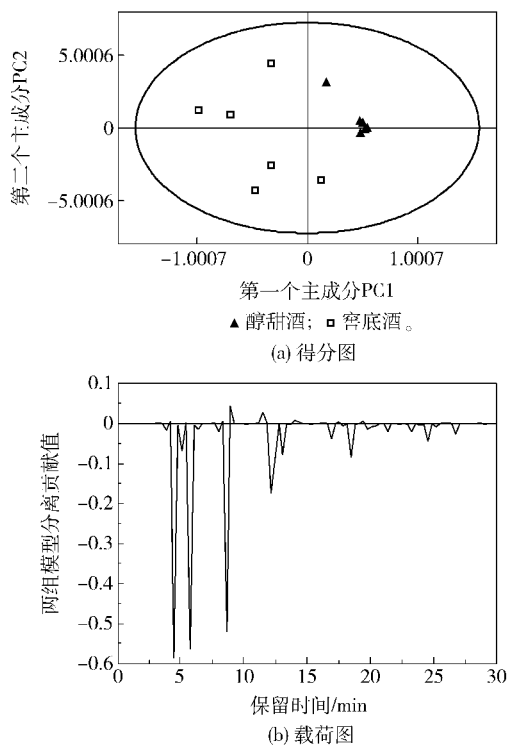


图 3 醇甜组与窖底组 PLS-DA 得分图与载荷图
Fig. 3 PLS-DA model plots for the Chuntian liquor group versus the Jiaodi liquor group

香气物质的 VIP 值若大于 1,则该香气物质对 PLS-DA 模型的分离有重要贡献。如图 4 所示,醇甜组与窖底组对比, VIP 值大于 1 的香气物质有 4 个,这 4 个香气物质对于醇甜与窖底的 PLS-DA 模型分离有重要贡献。

将根据载荷图与 VIP 值找到的差异性香气物质求并集并应用独立性 t 检验判定其差异的显著性。最后得到 15 个具有显著差异的香气物质如表 1 所示。表 1 列出了显著性差异物质的名称、保留时间以及在窖面、醇甜、窖底中的相对峰强度。

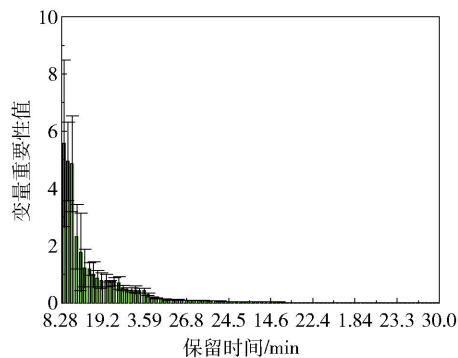


图4 醇甜与窖底中香气物质的VIP图

Fig. 4 Variable importance of the projection plots

表1 醇甜与窖底的显著性差异物质总表

Table 1 The significant differential aroma compounds between Chuntian group and Jiaodi group

化合物	保留时间/ min	相对峰强度		
		醇甜	窖面	窖底
戊酸乙酯	5.83	0.91	0.01 *	3.56
己酸乙酯	8.28	4.45	2.37	103.10 **
庚酸乙酯	11.1	2.26	2.34	97.20 **
未知	12	0.04	0.13	2.41 *
未知	13.5	0.18	0.11	3.63 **
辛酸乙酯	14.2	54.76	93.52	142.39 *
糠醛	14.5	16.93	13.26	9.28 **
未知	15.9	0.54	0.19 *	0 **
苯甲醛	16.2	8.23	5.33	3.52 **
未知	16.5	0	0	29.14 *
戊酸	19.2	1.92	8.39	8.35 **
未知	20.7	0.12	0.41	2.31 *
未知	22.1	0	0	3.47 **
十二酸乙酯	25.7	6.99	8.82	14.36 *
庚酸	27.9	0.33	9.36	4.57 *

* 显著性差异; ** 极显著性差异。

2.3 差异性香气物质的聚类分析

图5为15个差异性香气物质的聚类分析图,从图中看出这些差异性物质的聚类结果与PCA及PLS-DA结果相同,即窖面与醇甜不能分开,而醇甜与窖底能很好的分开。这表明窖底酒的香气物质组成与窖面酒醇甜酒的香气物质组成有较大的差异,这与3种香型酒的品评结果一致,窖面酒与醇甜酒酱香突出,而窖底酒的风格偏向于浓香型酒。聚类分析结果表明这15个显著差异性香气物质造成了窖底酒与醇甜酒之间风格口感的差异。同时聚类分析结

果验证了PCA模型与PLS-DA模型的真实性与准确性。

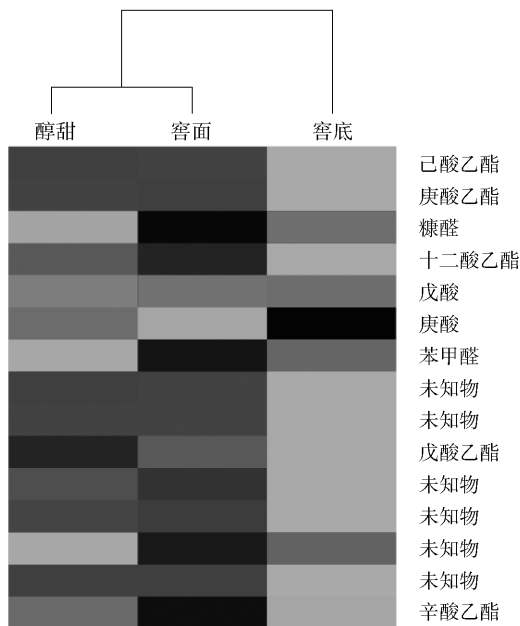


图5 差异性香气物质聚类分析图

Fig. 5 Hierarchical cluster analysis of the identified differential aroma compounds

2.4 差异性香气物质的变化

通过多样性分析,发现醇甜酒与窖底酒的差异性香气成分共有15个,如表1所示。其中准确定性的香气物质有9个,未能定性的香气物质有6个。已知的差异性香气物质分别是戊酸乙酯、己酸乙酯、庚酸乙酯、辛酸乙酯、十二酸乙酯、糠醛、苯甲醛、戊酸、庚酸。这些差异香气物质共同造成了醇甜与窖底风格与口感特点的差异。

2.4.1 酯类物质的变化

酱香酒中含量最丰富的香气物质为酯类,它是酱香酒乃至中国白酒中极为重要的呈香物质,已有研究表明己酸乙酯是浓香型白酒中的主体香成分,而乙酸乙酯是清香型酒中的主体香成分^[1]。酱香型酒中的主体香成分尚不清楚,推测酱香型的典型酱香风格可能为一种香气物质引起或由多种香气物质以一定比例复合而成^[1]。

窖面、窖底与醇甜在同一条件下蒸馏取酒,因此窖面窖底与醇甜中香气物质的变化也侧面反应了随着窖池深度的变化,窖池酒糟中香气物质的变化。随着窖池发酵深度的增加,戊酸乙酯、己酸乙酯、庚酸乙酯、辛酸乙酯以及十二酸乙酯的变化较大。其中戊酸乙酯与己酸乙酯的含量随着窖池深度的增加

而增加。庚酸乙酯与辛酸乙酯在窖池表层和中层变化不大,在窖池底层中的酒糟中含量增加较多。十二酸乙酯在窖池中层的酒糟中含量最低,在窖面层中含量有所增加,在窖底的含量最高。

在发酵过程中,醇类物质与酸类物质的官能团在酶的催化作用下发生酯化作用生成酯类物质^[8]。酯含量的变化是由窖池发酵条件决定,如温度、含氧量、pH、菌群结构等^[9]。研究发现酱香型酒窖池的中层酒糟温度较高,底层温度其次,表层温度最低,窖池表层含好氧菌最多,酵母菌的含量随窖池深度的增加而减少^[10]。然而随着窖池深度的增加,酵母菌多进行无氧发酵,在缺氧条件下氧化葡萄糖生产酒精与二氧化碳,有利于酯类的形成。除此以外,高温引起酯类物质的水解,因此低温环境有利于酯类物质的形成^[9]。从酯类物质随发酵池深度的变化可以看出,窖底的酯类含量居高,推测窖池底部含氧量低、低温以高活性的兼性厌氧菌等发酵条件为酯类的合成提供了有力环境。同时与醇甜酒相比,窖底酒中的己酸乙酯含量有极大的增加,这也是醇甜酒与窖底酒相比的标志性极显著性差异香气物质。己酸乙酯的极大增加使得窖底的香型与口感偏向于浓香型酒,这与文献报告的浓香型酒的特征香气物质为己酸乙酯相一致^[1]。

2.4.2 酸类物质的变化

酸类物质在酱香型酒中主要起到助香作用,具有酸味与甜味^[9]。随着窖池中发酵深度的增加,戊酸与庚酸在酒糟上、中、下层变化较大。窖面中含量最高,窖底其次,中层醇甜含量最低。醇甜酒是3种典型体当中口感最协调细腻的酒体,推测这与醇甜酒中含量较低的酸类物质有关。窖池中层的酸类物质含量最低,推测中层的发酵条件如高温等不利于产酸细菌的生长,而窖面温度低并且氧气充足,有利于产酸细菌的生长和繁殖。

2.4.3 醛类物质的变化

醛类物质是酱香酒中一类重要的呈香化合物,有研究表明苯甲醛与糠醛在酱香酒中含量很高,分别为5.6 mg/L与2.6 g/L,推测这两种物质可能为酱香型酒的特征香气物质^[1]。本研究中,糠醛与苯甲醛的含量在醇甜中最高,窖面其次,窖底最低。糠醛具有甜味与杏仁味,而苯甲醛具有水果香^[11]。苯甲醛与糠醛为醇甜与窖底之间的显著性差异香气物质,这种显著差异性造成了醇甜酒与窖底酒不同的风格与口感特点。

3 结论

本研究应用HS-SPME结合GC-MS法分析窖面酒、醇甜酒、窖底酒中的香气物质,并将多元统计分析方法如PCA、PLS-DA与HCA应用于3种典型酒体的差异性香气物质分析,成功找到15种差异性香气物质,其中准确定性9种香气物质,分别为戊酸乙酯、己酸乙酯、庚酸乙酯、辛酸乙酯、十二酸乙酯、糠醛、苯甲醛、戊酸、庚酸。这些差异性香气物质共同造成了醇甜酒与窖底酒的风格差异,它们以一定比例复合,构成了醇甜酒与窖底酒不同的风格与口感特征。

参考文献:

- [1] 吴三多. 五大香型白酒的相互关系与微量成分浅析[J]. 酿酒科技, 2001(4): 82-85.
Wu S D. Research on correlations and trace components of five flavour types of liquor[J]. Liquor Making Science and Technology, 2001(4): 82-85. (in Chinese)
- [2] 范文来, 徐岩. 应用浸入式固相微萃取(DI-SPME)方法检测中国白酒的香味成分[J]. 酿酒, 2007, 34(1): 18-21.
Fan W L, Xu Y. Determination of aromatic components in China white liquor by using immersion solid-phase microextraction[J]. Liquor Making, 2007, 34(1): 18-21. (in Chinese)
- [3] 吴兆征, 范志勇, 左国营, 等. GC-MS直接进样定性定量分析白酒的探讨[J]. 酿酒, 2009, 36(6): 88-90.
Wu Z Z, Fan Z Y, Zuo G Y, et al. GC-MS direct analysis of qualitative and quantitative sampling of liquor[J]. Liquor Making, 2009, 36(6): 88-90. (in Chinese)
- [4] 郭志刚, 刘天明, 赵长增, 等. 不同产区葡萄及葡萄酒香气成分比较研究[J]. 中国酿造, 2008(16): 15-18.
Guo Z G, Liu T M, Zhao C Z, et al. Comparison of aroma components of the grape and wine from different area[J]. China Brewing, 2008(16): 15-18. (in Chinese)
- [5] Margarita A, Teresa A. Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap-gas-chromatography-mass spectrometry: Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1165: 151-157.
- [6] Cheng P, Fan W, Xu Y. Determination of Chinese liquor from different geographic origins by combination of mass spectrometry and chemometric technique[J]. Food Con-

- trol, 2014, 35: 153–158.
- [7] Li H, Ma M L, Luo S, et al. Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(7): 1087–1096.
- [8] Sumbly K M, Grbin P R, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 1–16.
- [9] Fan W, Qian M C. Identification of aroma compounds in Chinese ‘Yanghe Daqu’ liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography olfactometry[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, 21(2): 333–342.
- [10] 唐玉明, 姚万春, 任道群, 等. 酱香型白酒窖内发酵过程中糟醅的微生物分析[J]. *酿酒科技*, 2007(12): 50–53.
- Tang Y M, Yao W C, Ren D Q, et al. Analysis of microbes in fermented grains of Maotai-flavor liquor during the fermentation in pits[J]. *Liquor Making Science and Technology*, 2007(12): 50–53. (in Chinese)
- [11] Fan W, Qian M C. Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” liquors by aroma extract dilution analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(7): 2695–2704.

Differential analysis of aroma compounds in Jiaomian liquor, Chuntian liquor and Jiaodi liquor

LIANG Ye¹ MENG TianYi² LI Hao¹ LU Jie¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. GuiZhou Guotai Liquor Co. Ltd., Renhuai Guizhou 564500, China)

Abstract: In this study, headspace – solid phase microextraction (HS – SPME) and gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS) have been to analyze the aroma components in Jiaomian liquor, Chuntian liquor and Jiaodi liquor. Multivariate analysis, involving principal component analysis (PCA) and partial least-squares-discriminant analysis (PLS – DA), was used to investigate the different aroma components. Finally, the multivariate analysis results were verified by hierarchical cluster analysis. A total of 15 different aroma components were found, and nine of them were identified, namely ethyl pentanoate, ethyl hexanoate, ethyl heptanoate, ethyl caprylate, ethyl dodecanoate, furfural, benzaldehyde, valeric acid and heptanoic acid. It is the combination of all these different aroma components that provide the special flavor and unique taste of Chuntian liquor and Jiaodi liquor.

Key words: soy sauce type liquor; aroma components; headspace – solid phase microextraction (HS – SPME); gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS); multivariate analysis