

乳清酒中高级醇的检测与控制

赵仁国, 肖冬光*, 王维君

(天津科技大学生物工程学院, 天津工业微生物重点实验室, 天津 300222)

摘要: 乳清酒中的醇类主要有甲醇、乙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇和异戊醇, 正丁醇含量 (97.40 mg/L) 超过淡色啤酒的风味阈值 (50 mg/L)。种子培养基、碳源补加、蛋白质处理和混合菌种发酵对总高级醇和正丁醇的生成有较大的影响, 初始 pH、温度和装液量的影响相对较小。优化发酵条件可降低正丁醇含量 86%, 降低甲醇含量 79%, 使其他高级醇含量趋于协调, 乳清酒更加清澈, 口味更协调。(孙悟)

关键词: 乳清酒; 高级醇; 气相色谱; 发酵工艺优化

中图分类号: TS262.5; TS261.4 Q657.71 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286 (2005) 12-0083-04

Determination and Control of Higher Alcohols in Milone

ZHAO Ren-guo, XIAO Dong-guang and WANG Wei-jun

Bioengineering College of Tianji University of Science and Technology,
Tianji Industrial Microbiology Key-lab, Tianjin 300222, China)

Abstract: The alcohols in milone mainly covered methanol, ethanol, normal propyl alcohol, isobutyl alcohol, n-butyl alcohol and isoamyl alcohol. The content of n-butyl alcohol was 97.40 mg/L, higher above the flavor threshold value of light beer (50 mg/L). Besides, seed culture medium, the addition of carbon sources, protein treatment and mixed microbial fermentation would influence greatly the formation of total higher alcohol and n-butyl alcohol. And the effects of initial pH value, temperature and liquid filling quantity were comparatively small. The optimization of fermentation conditions could reduce 86% n-butyl alcohol and 79% methanol and advance the harmony between other higher alcohols contents. Besides, milone could become clean with better taste. (Tran. by YUE Yang)

Key words: milone; higher alcohols; gas chromatography; optimization of fermentation techniques

乳清是生产干酪或干酪素的副产品, 营养丰富, 相当于除去酪蛋白的脱脂乳的营养^[1]。目前国外乳清资源化研究较多的是利用乳清生产乳清蛋白、乳清粉、乳糖、酒精等产品^[2,3], 而国内的研究主要集中在利用乳清作为基料生产调配型果汁乳清饮料、发酵型乳酸饮料或发酵型含醇饮料^[4]等。乳清酒是乳酒的一种, 是以乳清为发酵基质, 以酵母菌为主要发酵剂发酵生产的一种富含营养的饮品。国内在乳清酒的发酵工艺^[5,6]、发酵特性研究^[7]以及发酵动态研究^[8]等方面都有较多报道, 但由于原料、口感等方面的原因, 乳清酒尚未在国内取得工业化发展。有关乳清酒的质量检测、质量评价等方面的工作未见报道。

高级醇是构成啤酒酒体的重要物质, 含量超过一定

的限度就会产生杂醇油味, 饮用后易“上头”。乳清酒中也有不同程度的高级醇生成, 本文主要研究用气相色谱法检测乳清酒中的高级醇, 并结合酿造酒中高级醇的阈值要求, 通过发酵工艺的优化, 降低高级醇的含量, 使之成为适合饮用的健康绿色饮用酒。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脱盐乳清粉

海河乳业提供的法国红鸟牌 D-70; 主要成分 (w/w): 蛋白质 11%, 乳糖 79.5%, 脂肪 1%, 灰分 2.5%, 水分 3%, 其他 3%。

1.1.2 酵母菌

收稿日期: 2005-08-15

作者简介: 赵仁国 (1981-), 男, 山东人, 硕士生在读。

* 责任作者: 肖冬光 (1956-), 男, 湖南人, 硕士, 天津科技大学教授、博士生导师, 长期从事生物工程方面的教学与科研工作, 在生物反应器、活性干酵母和现代酿造技术的研究与应用方面有精深研究。

TY-3, TY-1, AY-5 均为本实验室保藏。

1.1.3 仪器

GC7890F 型气相色谱仪,上海天美科学仪器有限公司;毛细管色谱柱,中国科学院兰州化学物理研究所色谱技术研究开发中心,SPB-3 全自动空气源,北京中惠普分析技术研究所;SPH-300A 氢气发生器,北京中惠普分析技术研究所。

1.1.4 色谱条件

柱温:70℃,进样室温度:120℃,检测器温度:135℃;氢气:36 mL/min,氮气:28 mL/min,空气:132 mL/min;色谱柱:1993-3SC AF 酒柱 20 m×0.53 mm,尾吹:30 mL/min,进样方式:不分流。

1.2 实验方法

1.2.1 乳清酒样的预处理

取 100 mL 澄清酒样于蒸馏器中,加入 100 mL 蒸馏水,蒸馏至 95 mL 左右时,停止蒸馏并加入 1 mL 内标标准溶液,用蒸馏水定容至 100 mL,混匀后待测。

1.2.2 气相色谱法分析乳清酒中的高级醇

分别进样甲醇、正丙醇、异丁醇、异戊醇、正丁醇和乙酸异戊酯标准物质溶液 1 μL,测得各物质保留时间。再进酒样 1 μL,根据各物质的保留时间初步定性各物质。根据各组峰面积用内标法定量计算各组分含量。

1.2.3 发酵条件的析因实验

利用 SAS 统计分析软件,以是否混合菌种发酵、发酵液初始 pH、主发酵温度、种子培养基是否处理、是否脱蛋白质、是否补加碳源和装液量为因素,进行实验,分析影响高级醇生成的因素。因素水平见表 1。

表1 发酵条件析因实验因素水平

RUNS	pH	发酵温度 (℃)	培养基 处理	碳源	脱蛋 白	发酵 菌种	装液量 (mL)
1	6.0	30	0	1	1	1	150
2	7.0	30	0	0	0	1	250
3	6.0	33	0	0	1	0	250
4	7.0	33	0	1	0	0	150
5	6.0	30	1	1	0	0	250
6	7.0	30	1	0	1	0	150
7	6.0	33	1	0	0	1	150
8	7.0	33	1	1	1	1	250

注:培养基处理是指 YEPD 种子培养基处理与否,“0”表示不处理,“2”表示无菌水洗滌一次;碳源“0”表示不补加碳源,“1”表示补加 5%蔗糖;脱蛋白“0”表示乳清发酵也不做脱蛋白处理,“1”表示加热除蛋白;发酵菌种“0”表示单菌种发酵,“1”表示混合菌种发酵(TY-3, TY-1 和 AY-5)。

1.2.4 初始 pH 对高级醇的生成影响

分别调节发酵液初始 pH 为 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 发酵一定时间后取样分析乳清酒中的高级醇含量。

1.2.5 主发酵温度对高级醇的生成影响

分别调节主发酵温度在 27℃, 30℃, 33℃, 发酵一定时间后取样分析乳清酒中的高级醇含量。

1.2.6 接种量对高级醇的生成影响

混合酵母菌接种总量分别调节为 6%, 8%, 10%, 12%, 发酵一定时间后取样分析乳清酒中的高级醇含量。

2 结果与分析

2.1 乳清酒中主要醇类物质分析

以 6% (v/v) 乳清复原液为发酵基质,接种单株酵母 TY-3 于 30℃ 静置发酵 96 h 后分析检测其中的醇类物质。首先运用保留时间法和内加法相结合定性分析乳清酒中的主要醇类物质,然后用内标法定量分析其含量。

保留时间法定性是气相色谱定性分析中最方便、最可靠的方法。该方法是基于在一定的操作条件下,各组分的保留时间一定的原理而进行的。根据各标准物质的色谱图(图 1)和乳清酒样色谱图(图 2)所显示的各物质保留时间(表 2),可以初步定性乳清酒样中的主要醇类物质有甲醇、乙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇和异戊醇。用内标法定量计算乳清酒中各高级醇的含量(表 3)。

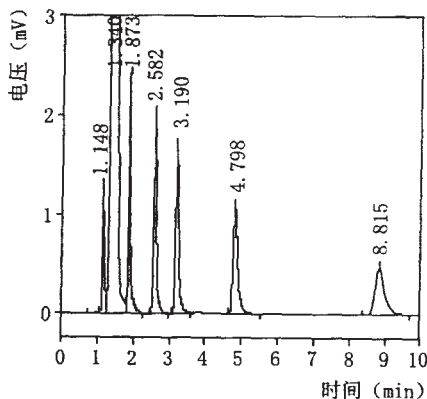


图 1 物质色谱图

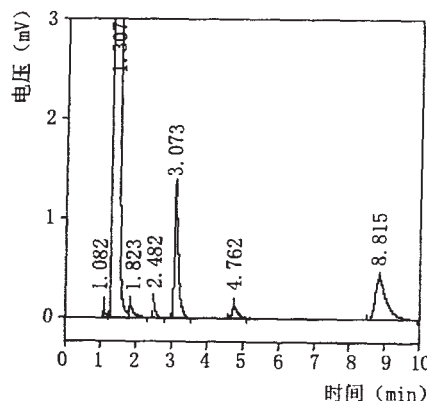


图 2 乳清酒样色谱图

通过对乳清酒样定量分析可知,乳清酒样中正丙醇、异丁醇和异戊醇的含量较低(总量 30.86 mg/L);与淡色啤酒相比正丙醇和异戊醇含量稍低,异丁醇含量与淡色啤酒的相当;而正丁醇含量相对较高(97.40 mg/L),高于淡色啤酒中正丁醇的阈值(50 mg/L)^[10];甲醇含量 7.53 mg/L(优级食用酒精中甲醇最高含量为 50 mg/L),

表2 各物质的保留时间

项目	保留时间(min)	项目	保留时间(min)
甲醇	1.1	正丁醇	3.1
乙醇	1.3	异戊醇	4.7
正丙醇	1.8	内标	8.8
异丁醇	2.4		

表3 内标法测定乳清酒样中的主要醇类物质* (mg/L)

项目	含量	淡色啤酒	阈值***
甲醇	7.53	-	50****
乙醇**	22896.72	-	-
正丙醇	4.53	6~10	5~25
异丁醇	6.79	5~9	10~20
正丁醇	97.40	12	50
异戊醇	19.54	40~70	50

注: *所得数据为3次平行样的均值; **乙醇含量为乳清酒中乙醇与加内标物质时引入的0.55%(v/v)乙醇的总和; ***酿造酒中高级醇阈值; ****优级食用酒精中甲醇的最高含量标准(mg/L)^[9]。

乙醇浓度约为2.4%(v/v)。因此,乳清酒中其他高级醇(包括正丙醇、异丁醇和异戊醇)的含量与淡色啤酒的相差不大,正丁醇的含量明显较高,是乳清酒中高级醇的控制重点。

2.2 乳清酒中高级醇的生成规律

在酿造酒生产过程中,高级醇的形成主要集中在发酵前期,与酵母菌合成细胞蛋白质有关,对酿造酒风味具有重大的影响^[10]。超过一定含量,具有明显的杂醇味,饮用过量会导致人体不适。乳清酒在发酵过程中,高级醇有两个快速形成期(见图3),一个是在发酵前8h,主要是正丙醇、异丁醇和异戊醇的大量生成引起的,其原因主要是由于发酵前期酵母菌的大量繁殖,与文献报道相符。

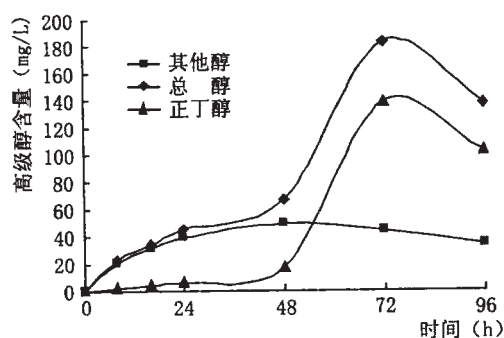


图3 高级醇的生成规律

另一个是在发酵48~72h,主要是正丁醇的大量生成引起的,其原因尚未明确,可能与乳糖代谢有关。

2.3 高级醇生成的析因实验

高级醇的生成与酵母菌的繁殖代谢有很大的相关性。在乳清酒酿造过程中,多种因素会影响到酵母菌的繁殖代谢。鉴于影响因素的多样性,本文利用SAS统计软件进行析因分析,考察了多种因素对发酵过程中

高级醇生成的影响,结果见图4。

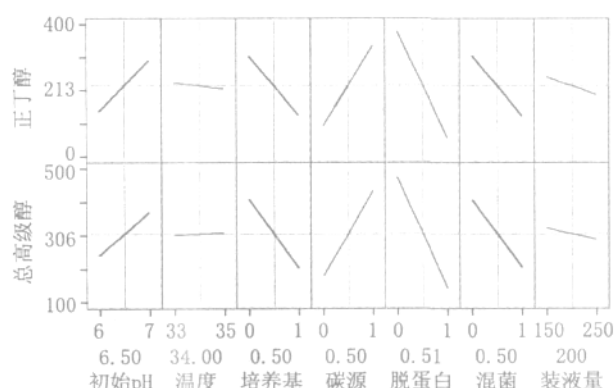


图4 发酵条件的析因实验

种子培养基、碳源补加、蛋白质处理和混合菌种发酵对总高级醇和正丁醇的生成有较大的影响;而初始pH、温度和装液量的影响相对较小(见图4)。种子培养基的处理,发酵液的蛋白处理以及混合菌种发酵均会使高级醇大量降低,其中发酵液的蛋白处理影响最大,所以在发酵过程中采用与发酵液成分相近的种子培养基,采取一定的措施改变发酵液的蛋白含量但又尽量保留其营养成分,进行混合菌种发酵。补加一定量的碳源会使高级醇含量增加,因此在保证预期酒度要求的前提下尽可能少地添加碳源。初始pH、温度和装液量的影响相对较小,进一步进行单因素实验考察其对总高级醇,尤其是正丁醇的生成量的影响。

2.4 初始pH对高级醇的生成影响

发酵液的初始pH对醇类生成有一定的影响(见图5),乳清复原液的初始pH为6.0时,受正丁醇的影响,总高级醇生成量最低,且此时其他高级醇的生成量也较低。原因可能是初始pH影响了发酵初期酵母菌的代谢途径。发酵过程中,乳清复原液的初始pH调节为6.0。

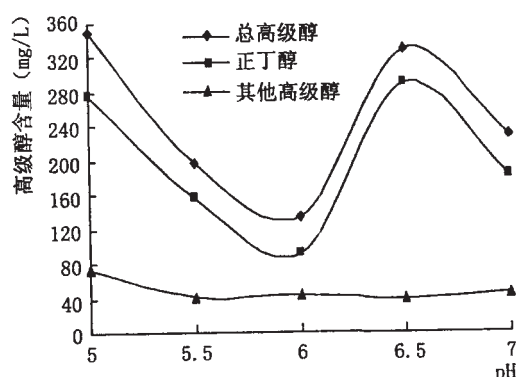


图5 初始pH对高级醇生成的影响

2.5 发酵温度对高级醇生成的影响

发酵温度影响了酵母菌的繁殖速度,进而影响了高级醇的生成量。图6所示,随着温度的改变,在发酵温度为30℃时正丁醇有最高值,也因此导致了总高级醇最

高值的出现；而其他高级醇随着温度的升高略有增加。发酵温度过低会影响到乳糖消耗速度，使发酵周期变长，选择温度 27℃为发酵温度。

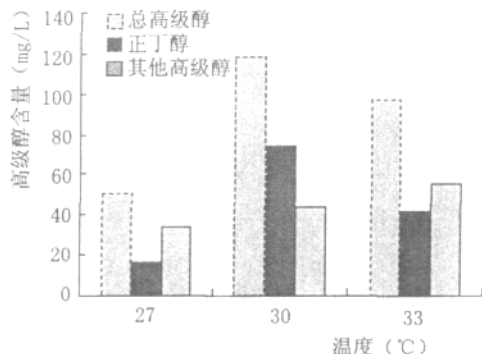
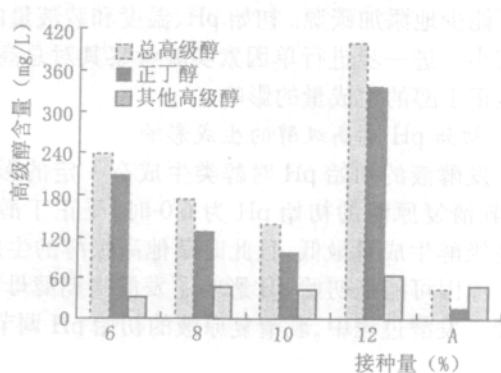


图 6 发酵温度对高级醇生成的影响

2.6 接种量对高级醇生成的影响

种子液接入量的多少影响了酵母菌初期的繁殖代数，从而影响了总高级醇的生成。图 7 所示，随着接种量的增加，总高级醇含量减少；但是接种量过大（12%，v/v），总高级醇生成量会有明显增加，这主要由发酵液氮源不足引起，而在添加了一定的氮源后（图 7 所示 A），总高级醇的含量明显降低。但是在添加一定量的氮源后，发酵原酒气味欠佳，所以接种量采用 10%（v/v）。



A 表示接种量 12% 补充 0.5% 氮源

图 7 接种量对高级醇的生成影响

2.7 优化前后主要醇类物质的比较

根据国内诸多文献的报道，乳清酒的发酵工艺中，通常先对乳清原料进行脱蛋白处理^[1]，或者对乳清蛋白进行酶解处理^[2]。前者使乳清酒的营养价值大打折扣；而後者的处理费用相对较高，不适合工业化生产。本文采用了生物法处理蛋白，即首先接入蛋白分解力强的乳酸菌发酵一定时间后再接入混合酵母菌发酵，可以起到蛋白处理的效果，并可以使乳清原酒中的高级醇有较明显的降低。此外，通过调节诸多影响因素，在工艺水平上控制高级醇的含量，取得了较明显的效果（见表 4）。

由表 4 可知，优化后比优化前乳清酒中甲醇和正丁醇的含量有明显降低，而乙醇、正丙醇、异丁醇和异戊醇有不同程度的增加；其中正丁醇已经降低到淡色啤酒的

表 4 内标法测定乳清酒样中的主要醇类物质* (mg/L)	项目	甲醇	乙醇**	正丙醇	异丁醇	正丁醇	异戊醇
优化前		7.53	22896.72	4.53	6.79	97.40	19.54
优化后		1.57	25313.77	4.85	7.60	13.46	20.14

注：*所得数据为 3 次平行样的均值；**乙醇含量为乳清酒中乙醇与加内标物质时引入的 0.55%（v/v）乙醇的总和。

风味阈值（见表 3）以下，甲醇含量降低到特级食用酒精的国家标准（2 mg/L）以下。乳清酒酒体更加清澈，口味更协调。

3 结论

3.1 用气相色谱法测得乳清酒中的醇类主要有甲醇、乙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇和异戊醇。其中正丁醇含量（97.40 mg/L）较高，超过淡色啤酒的风味阈值（50 mg/L），是控制的重点。

3.2 运用 SAS 统计分析软件分析了影响乳清酒中高级醇含量的各种因素。结果显示，种子培养基、碳源补加、蛋白质处理和混合菌种发酵对总高级醇和正丁醇的生成有较大的影响；而初始 pH、温度和装液量的影响相对较小。

3.3 发酵条件优化后比优化前正丁醇降低了 86%，甲醇降低了 79%，其他高级醇含量趋于协调，乳清酒更加清澈，口味更协调。

参考文献：

[1] 马俪珍,张秀红,等.乳清的营养价值及乳清饮料的研究现状[J].中国乳品工业,1999,27(5):47-50.

[2] M. I. Gonzalez Siso. THE BIOTECHNOLOGICAL UTILIZATION OF CHEESE WHEY: A REVIEW [J]. Bioresource Technology, 1996, 57(1): 1-11.

[3] Lucilia Domingues et al. Alcohol Production from Cheese Whey Permeate Using Genetically Modified Flocculent Yeast Cells [J]. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2001, 72(5): 507-514.

[4] 金世琳,等.乳清饮料[J].饮料工业,2001,4(5):22-24.

[5] 包怡红.乳清酿酒工艺条件的研究[J].酿酒,2002,11,29(6):23-26.

[6] 蒋福虎,等.低度乳清酒的研制[J].山西农业大学学报,1998,18(1):54-57.

[7] 樊爱斌,耿丹.乳清发酵特性研究[J].山西农业科学,2001,29(3):86-89.

[8] 谢继志,等.乳清酒发酵条件及发酵动态的研究[J].中国乳品工业,1999,27(1):3-6.

[9] GB10343-2002,食用酒精标准[S].

[10] 管敦仪.啤酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998.

[11] 谢达忠,等.乳清酿酒的研究[J].食品与发酵工业,1993,19(1):60-63.

[12] 包怡红,张兰威.多肽乳清酒的研究[J].中国乳品工业,2002,30(5):85-88.