

# 采用 HPLC 分析检测发酵醪

张小希<sup>1</sup>, 张显友<sup>1</sup>, 董秀玲<sup>2</sup>, 刘志富<sup>2</sup>

(吉林燃料乙醇有限责任公司, 吉林 130000)

**摘要:** 通过对发酵醪的高效液相色谱 (HPLC)<sup>[1]</sup> 分析研究和比对试验, 建立了发酵醪的液相分析方法。实践证明, 通过液相图谱, 不仅可直观地了解发酵状况, 还能测定发酵醪中剩余糖 (或还原糖) 含量和酒精、琥珀酸、乳酸、丙三醇、醋酸、甲醇等组分的含量。HPLC 法具有快速、准确、直观、省人力的优点。

**关键词:** HPLC 法; 发酵醪; 分析检测; 酒精; 还原糖

中图分类号: O652.63; O657.72; TS262.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286 (2005) 10-0086-04

## Determination of Fermenting Mash by HPLC

ZHANG Xiao-xi<sup>1</sup>, ZHANG Xian-you<sup>1</sup>, DONG Xiu-lin<sup>2</sup> and LIU Zhi-fu<sup>2</sup>

(Jilin Fuel Alcohol Co.Ltd., Jilin 130000, China)

**Abstract:** Through the analysis and contrast experiments of fermenting mash by high performance liquid chromatography (HPLC), the liquid phase analytic method of fermenting mash was established. And the practice indicated that liquid phase chromatography analysis could not only display fermentation status directly but also could be used in the measurement of residual sugar content and the contents of alcohol, lactic acid and methanol in fermenting mash. HPLC had the advantages of saving manpower and rapid and accurate measurement. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** HPLC; fermenting mash; analysis and determination; alcohol; reducing sugar

淀粉质原料经过液化和糖化等物理、生物和化学过程, 淀粉已充分糊化和液化, 其中相当一部分已转化成可发酵性糖。将这种糖化醪送入发酵罐, 接入酵母菌后, 在酵母的作用下, 醪液中的糖被发酵成酒精和 CO<sub>2</sub>; 而保存下来的糖化酶不断地将残存的淀粉转化成可发酵性糖, 就这样酵母的酒精发酵和后糖化作用互相配合, 最终将醪液中绝大部分淀粉及糖转化成酒精和 CO<sub>2</sub><sup>[2]</sup>。

酒精生产, 要求尽可能提高酒精生产率, 并应尽量减少发酵损失。所以, 传统的发酵过程控制分析不能完全满足现代的需求, 通过对发酵醪的高效液相色谱 (HPLC) 分析研究和比对实验, 取得了很好的效果, 建立了发酵醪的液相分析方法, 为进一步推广和实施奠定了坚实的基础。初步实践证明, 通过液相图谱, 不仅可直观地了解 and 掌握发酵的进展情况, 并且能测定出发酵醪中剩余糖 (或还原糖) 的含量和酒精、琥珀酸、乳酸、丙三醇、醋酸、甲醇等组分的含量。此法具有快速、准确、直观、稳定、省人力等优点。

### 1 实验

#### 1.1 条件

色谱柱 Shim-pack SCR-101H, 300×7.9 φmm; 预柱 Shim-pack SCR (H) 50×4.0 φmm; 流动相 0.0025 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L; 流速 0.4 mL/min; 柱温 50 °C; 检测器: 示差折光; 进样量 20 mL。

#### 1.2 洗提液的制备

吸取 10 mL 0.5M 硫酸于 2000 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度。用前进行微膜 (0.22 μm) 过滤, 并进行超声脱气。

#### 1.3 外标液的制备

试剂 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.5 g/L, 麦芽三糖 1.5 g/L, 麦芽糖 3.0 g/L, 葡萄糖 D(+) 7.0 g/L, 果糖 3.5 g/L, 阿拉伯糖 2.0 g/L, 琥珀酸 2.5 g/L, 乳酸锂 3.0 g/L, 丙三醇 (甘油) 3.0 g/L, 醋酸钠 (Na-Acetate) 2.5 g/L, 乙醇 50 g/L。以上试剂均为分析纯或色谱纯。

上面提及的数字总称重量可变化 ±5%, 但每个试剂的重量必须准确至 1.0 mg。把所有试剂全量转移至 100 mL 容量瓶中, 用大约 95 mL 的蒸馏水溶解, 置于 20 °C

收稿日期: 2005-06-06

作者简介: 张小希 (1965-), 女, 吉林省吉林市人, 大学, 高级工程师, 发表论文数篇。

水浴中恒温,然后定容至刻度。摇动使溶液充分混匀。

#### 1.4 试验样品

吉林燃料乙醇有限责任公司生产线上的实际发酵醪。

#### 1.5 样品制备

考虑到发酵醪中的酵母活动情况,采用离心清液进行检测分析。样品经过离心后,稀释 1 倍,吸取滤液样品进入连有微膜过滤器 (Millipore; Millex-GS; 0.22 μm) 的注射器,然后将样品注入自动进样系统的样品瓶中。或者在注射器与针之间连接微膜过滤器直接注入 HPLC 的进样部分。

#### 1.6 仪器校准

样品的分析是采用外标法对系统进行校准的。每天通过注射两次外标液来检查系统校准情况。依照积分仪手册或 HPLC 工作站手册采用外标法对仪器进行校准,结果用 g/L 表示。

#### 1.7 备注

有一个流动比常数、恒定的柱温和细致准备洗提液是重要的。启动 HPLC 时需要用洗提液运行几个小时来冲洗柱子并且得到一个稳定的检测器信号。为了消除每天启动的长周期, HPLC 可用低流速 (如 0.1 mL/min) 运行整夜或几天。

#### 1.8 HPLC 图谱 (见图 1~图 4)

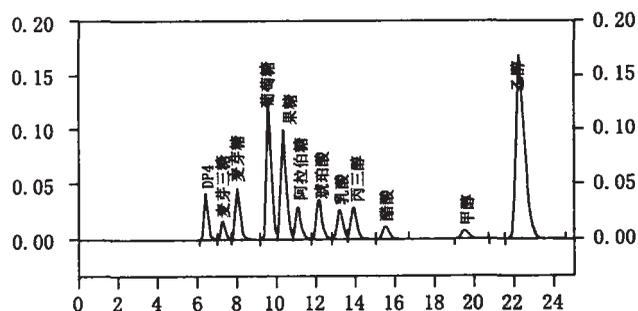


图 1 标准样品的 HPLC 图谱

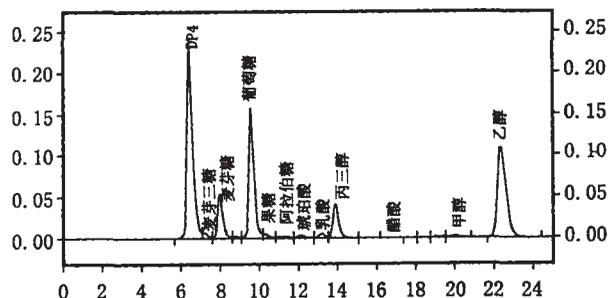


图 2 发酵 1101 罐的 HPLC 图谱

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 还原糖测定

还原糖的化学法测定采用的是 0.1 N 硫代硫酸钠标

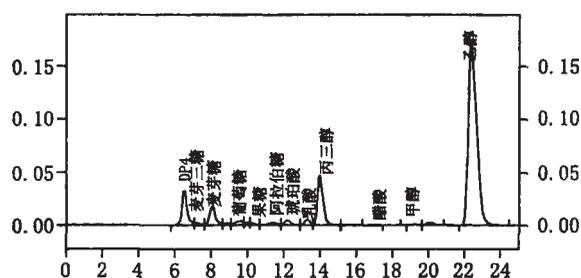


图 3 发酵 1401 罐的 HPLC 图谱

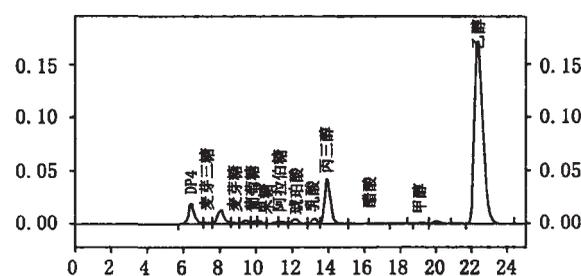


图 4 发酵 1801 罐的 HPLC 图谱

准溶液滴定<sup>[1]</sup>。此法为引进奥地利奥高布殊公司采用的还原糖测定法。即移取 25 mL 测试溶液于 300 mL 具塞锥形瓶中,加入费林试剂甲、乙液各 10 mL,置于加热板或电炉上加热 1 min(±15 s)内至沸,保持沸腾至 2 min。立即用冷水冷却至室温(不能摇动),加入 10 mL 30% 的碘化钾溶液和 10 mL 26% 的硫酸,立即用 0.1 N 硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色。加入 2 mL 淀粉指示剂滴定至蓝色消失,蓝色至少在 1 min 内不能重现。再用葡萄糖标准溶液 (5 mL 标准葡萄糖加 20 mL 水)作标准实验。同时用 25 mL 水作空白实验。

$$\begin{aligned} \text{还原糖 (g/L)} &= \frac{5 \times 0.01 \times (B-A) \times F}{(B-C) \times V} \times 1000 \\ &= \frac{50 \times (B-A) \times F}{(B-C) \times V} \end{aligned}$$

式中:A——样品消耗 0.1N 硫代硫酸钠的 mL 数;

B——空白消耗 0.1N 硫代硫酸钠的 mL 数;

C——葡萄糖标准溶液消耗 0.1N 硫代硫酸钠的 mL 数;

F——稀释因子 =  $\frac{\text{准备测试溶液的 mL 数}}{\text{测试时用试液的 mL 数}}$ ;

V——准备测试溶液的原始样品体积。

注:如果 A<6 mL,则应减少测试液用量,并用蒸馏水补充至 25 mL,重复测定。

发酵罐还原糖的测定数据结果见表 1~表 3。

由表 1~表 3 中的实验数据对比可知,用 HPLC 法与葡萄糖标准溶液滴定法测定的还原糖结果接近,比奥高布殊公司的硫代硫酸钠标准溶液测定的结果要高。

### 2.2 HPLC 法测定总糖

在 HPLC 的图谱中,四糖以上直至糊精淀粉集中在一个峰上,以糊精来代表,用硫酸钠来定量。化学法试验测定了生产线上 22 个糖化液样品,其平均总糖为

表 1 发酵 1101 罐还原糖数据 (g/100mL)

日期	时间	奥法数据	HPLC 数据	生产数据
	9:00	3.92	4.30	
4.14	13:00	3.85	4.12	
	15:00	3.81	4.09	
	8:00	3.77	3.98	生产实际数据 (标准葡萄糖测定法)
	10:00	4.02	4.30	
4.18	11:00	4.11	4.37	
	13:00	4.18	4.45	
	14:00	4.18	4.44	
	15:00	4.05	4.27	
	平均值	3.99	4.26	4.22

表 2 发酵 1401 罐还原糖数据 (g/100mL)

日期	时间	奥法数据	HPLC 数据	生产数据
	8:00	0.21	0.36	
	10:00	0.22	0.37	
4.19	11:00	0.22	0.37	
	13:00	0.22	0.37	
	14:00	0.22	0.37	
	15:00	0.22	0.37	
4.21	8:00	0.23	0.37	生产不测定
	10:00	0.25	0.37	
	13:00	0.24	0.36	
	8:00	0.23	0.36	
	10:00	0.20	0.38	
4.22	11:00	0.19	0.37	
	13:00	0.23	0.42	
	14:00	0.23	0.37	
	平均值	0.22	0.37	

表 3 发酵 1801 罐还原糖数据 (g/100mL)

日期	时间	奥法数据	HPLC 数据	生产数据
	9:00	0.16	0.29	
	10:00	0.15	0.29	
4.25	13:00	0.16	0.29	
	14:00	0.16	0.29	
	15:00	0.14	0.29	生产实际数据 (标准葡萄糖测定法)
	9:00	0.14	0.29	
	11:00	0.16	0.29	
4.26	13:00	0.20	0.30	
	14:00	0.18	0.30	
	15:00	0.13	0.29	
	平均值	0.16	0.29	0.32

202.73 g/L ;用 HPLC 对应测定 22 个糖化液 ,平均含量 :硫酸钠 83.85 g/L,麦芽三糖 3.23 g/L,麦芽糖 14.03 g/L,葡萄糖 118.37 g/L ;总糖=硫酸钠×f+麦芽三糖+麦芽糖+葡萄糖 f=0.8。

### 2.3 HPLC 法测定还原糖和总糖

化学法试验测定了生产线上 22 个糖化液样品 ,其平均还原糖为 133.75 g/L ;用 HPLC 对应测定了 21 个糖化液样品 ,平均含量 :糊精 68.75 g/L,麦芽三糖 3.23 g/L,麦芽糖 14.03 g/L,葡萄糖 118.37 g/L ;还原糖=糊精×F+

麦芽三糖×0.441+麦芽糖×0.608+葡萄糖<sup>[1]</sup>,F=0.079。所以,得出 HPLC 测得的还原糖=0.079 糊精+0.441 麦芽三糖+0.608 麦芽糖+葡萄糖+0.92 果糖。总糖=糊精+麦芽三糖+麦芽糖+葡萄糖+果糖+阿拉伯糖。

### 2.4 发酵醪酒分的测定对比

采用两种方法测定发酵醪的酒精度 结果见表 4。

表 4 两种方法测定发酵醪酒精度的对比

日期	时间	罐号	蒸馏酒精计法		HPLC 法	
			酒度 (%, v/v)	乙醇 (g/L)	酒度 (%, v/v)	乙醇 (g/L)
	9:00		8.0	64.02	8.0	
4.14	13:00		8.2	65.11	8.2	
	15:00		8.2	64.50	8.1	
	8:00	1101	8.6	67.73	8.5	
	10:00		8.6	68.78	8.6	
4.18	11:00		8.6	69.14	8.7	
	13:00		8.6	67.84	8.5	
	14:00		8.5	68.62	8.6	
	15:00		8.4	68.64	8.6	
	平均		8.41	67.15	8.43	
	8:00	1401	12.1	96.41	12.1	
	10:00		11.9	97.66	12.3	
4.19	11:00		11.9	98.74	12.4	
	13:00		12.3	97.16	12.2	
	14:00		12.3	97.81	12.3	
	15:00		12.2	98.10	12.3	
4.21	8:00		11.8	94.81	11.9	
	10:00		12.0	94.32	11.8	
	13:00		12.0	94.42	11.8	
	8:00	1801	11.8	93.40	11.7	
	10:00		12.2	95.42	12.0	
4.22	11:00		12.0	94.86	11.9	
	13:00		12.0	94.71	11.9	
	14:00		12.0	94.83	11.9	
	平均		12.04	95.90	12.03	
	9:00		11.6	93.91	11.8	
	10:00		11.6	94.07	11.8	
4.25	13:00		11.7	93.64	11.7	
	14:00		11.4	91.74	11.5	
	15:00		12.1	95.32	12.0	
	9:00		11.7	95.45	12.0	
	11:00		11.7	93.05	11.7	
4.26	13:00		11.9	95.09	11.9	
	14:00		11.8	94.62	11.9	
	15:00		11.9	94.28	11.8	
	平均		11.74	94.12	11.81	

酒精含量的测定对比方法采用的是蒸馏酒精计法。从表 4 结果看出 ,与 HPLC 方法几乎没有差异。相比较而言 ,HPLC 测得的结果更准确、更稳定些 20℃和 23℃时测定并没有差别 ,且结果用 g/L 表示 ,完全满足工艺控制需要。对比时折算成体积比 HPLC 测定时将发酵醪稀释 1 倍后测定 ,此时酒分在 4%~6% (v/v) 之间 ,密度

取 0.99,因此,折算公式为:折算酒分(v/v)=(HPLC 测值/7.89)×0.99。

## 2.5 挥发酸的测定对比

同样采用两种方法测定发酵醪的挥发酸(见表 5)。

表 5 两种方法测定发酵醪挥发酸的对比

日期	时间	罐号	蒸馏滴定法	HPLC 法
			挥发酸(度)	醋酸(g/L)
4.14	9:00	1101	0.08	0.14
	13:00		0.09	0.14
	15:00		0.09	0.13
4.18	8:00	1101	0.11	0.19
	10:00		0.11	0.20
	11:00		0.10	0.21
	13:00		0.12	0.20
	14:00		0.10	0.19
	15:00		0.11	0.21
平均值			0.10	0.18
4.19	8:00	1401	0.13	0.25
	10:00		0.13	0.26
	11:00		0.12	0.26
	13:00		0.16	0.26
	14:00		0.16	0.26
4.21	15:00	1401	0.16	0.27
	8:00		0.15	0.28
	10:00		0.13	0.28
	13:00		0.13	0.28
4.22	8:00	1801	0.14	0.26
	10:00		0.15	0.30
	11:00		0.15	0.25
	13:00		0.17	0.29
4.25	14:00	1801	0.17	0.28
	15:00		0.15	0.28
	9:00		0.14	0.27
	11:00		0.13	0.24
	13:00		0.13	0.26
4.26	14:00	1801	0.13	0.29
	15:00		0.13	0.25
	平均值		0.14	0.27

化学法测定的挥发酸度<sup>[5]</sup>是指原发酵液加水蒸馏出原体积,其中 10 mL 蒸馏液所消耗 0.1 N 氢氧化钠的 mL 数,结果受分析操作过程和环境因素影响较大。而 HPLC 法是直接测定样品的醋酸含量,以 g/L 表示。因为醋酸是挥发酸的主体,所以通过两种方法的对照,建立了挥发酸度与醋酸含量的关系式:挥发酸度=0.5416×醋酸含量(g/L)。挥发酸度是考察发酵过程染菌程度的重要指标,醋酸含量的高低也同样反映出发酵的染菌程度。

所以,建议生产或工艺管理用醋酸含量来判断发酵的染菌程度,HPLC 测定的醋酸含量更准确些。

## 2.6 发酵醪的总残糖

发酵醪中各种糖和总残糖的测定结果见表 6。

表 6 1801 罐发酵醪中各糖及总糖测定结果 (g/L)

日期	时间	糊精	麦芽三糖	麦芽糖	葡萄糖	果糖	阿拉伯糖	总糖
4.25	9:00	4.14	0.11	2.45	0.70	0.37	0.40	8.16
	10:00	4.16	0.10	2.43	0.67	0.36	0.38	8.10
	13:00	4.19	0.11	2.45	0.70	0.37	0.39	8.21
4.26	14:00	3.99	0.25	2.35	0.67	0.36	0.37	7.99
	15:00	4.19	0.10	2.45	0.71	0.36	0.37	8.17
	9:00	4.07	0.25	2.40	0.65	0.36	0.37	8.10
4.26	10:00	4.06	0.25	2.38	0.65	0.36	0.38	8.07
	11:00	5.01	0.25	2.37	0.67	0.38	0.37	9.05
	13:00	4.01	0.25	2.43	0.68	0.37	0.37	8.10
	14:00	4.16	0.28	2.51	0.67	0.37	0.37	8.35
	15:00	4.06	0.25	2.40	0.64	0.35	0.36	8.05

淀粉质原料经过液化和糖化等物理、生物及化学过程,淀粉已充分糊化和液化,可以用 HPLC 测定出发酵液的残余总糖。从表 6 可看出,HPLC 测定得的结果为 0.82 g/100 mL。而生产采用酸水解<sup>[5]</sup>实际测定的残余总糖为 1.64 g/100 mL。由于酸水解时,纤维素和半纤维素水解生成糖,故测定结果偏高。所以,HPLC 测定的结果更准确,更接近实际。建议采用 HPLC 测出的残余总糖考核发酵情况。

## 3 结论

上述实验是采用对比的方法对不同阶段的发酵醪进行分析。通过对数据的整理、比对和分析,HPLC 法完全能够满足生产过程控制的需求。建立 HPLC 方法以后,操作过程简单,且重现性和稳定性好,引入的误差相对较少。同时节省了大量的人力。

HPLC 的分析不仅能满足对还原糖、残余总糖、酒分和挥发酸的分析需要,同时还可以测定淀粉糊精、麦芽三糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、琥珀酸、乳酸、丙三醇、醋酸和乙醇等的含量。HPLC 的图谱及各组分的含量是生产、工艺管理者及操作者理想的控制资料和数据,具有重要的指导价值和现实意义。

## 参考文献:

- [1] 夏玉宇.化验员实用手册[M].北京:化学工业出版社,1999.
- [2] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [3] 姜锡瑞,段钢.酶制剂实用技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,2002.
- [4] 奥地利奥高布殊公司.分析方法手册[M].2002.
- [5] 蔡定域.酿造工业分析手册[M].北京:轻工业出版社,1988.