

己酸菌培养液中己酸含量的测定方法

钟 雨¹, 谢宜辉²

(江苏双沟酒业股份有限公司, 江苏 泗洪 223911)

摘 要: 介绍了己酸菌液中己酸含量的 4 种测定方法, 即硫酸铜快速测定法、比色法、纸上层析法和直接进样毛细管柱气相色谱法, 比较了它们的优缺点, 直接进样毛细管柱气相色谱法快速、准确, 但关键是要处理好样品。

关键词: 己酸菌液; 己酸含量; 测定方法; 硫酸铜法; 比色法; 纸上层析法; 毛细管柱气相色谱法

中图分类号: TS262.3; TS261.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286(2004)04-0091-02

Determination Methods of Caproic Acid Content in Caproate Bacteria Culture Fluid

ZHONG Yu¹ and XIE Yi-hui²

(Jiangsu Shuanggou Liquor Industry Co. Ltd., Sihong, Jiangsu 223911, China)

Abstract: Four methods including copper sulfate rapid determination, colorimetry, paper chromatographic method and direct sample injection capillary column gas chromatographic method to determine caproic acid content in caproate bacteria culture fluid were introduced in this paper and their advantages and disadvantages were contrasted. The results indicated that the application of direct sample injection capillary column gas chromatographic method could rapidly and accurately finish the determination. The key operation of this method was the proper preparation of the samples. (Tran. by YUE Yang)

Key words: caproate bacteria culture fluid; caproic acid content; determination methods; copper sulfate rapid determination; colorimetry; paper chromatographic method; capillary column gas chromatographic method

己酸是生成浓香型白酒主体香己酸乙酯的前体物质, 也是重要的呈味物质之一。我国在 20 世纪 60 年代末就开展了对己酸菌的研究^[1]。现在己酸菌液和固体己酸菌已有专业化生产企业, 但许多浓香型白酒厂仍根据自身资源, 分离、纯化己酸菌来培养己酸菌液, 将其应用于白酒生产中。主要有培养人工窖泥, 保养发酵池, 喷洒底醅等方法来增加香醅中己酸含量, 以达到提高己酸乙酯含量的目的。为保证己酸菌质量, 己酸含量的测定尤为重要。现根据实际生产情况总结一文, 供同行参考。

1 发酵液中己酸含量的测定方法

1.1 硫酸铜快速测定法

吸取己酸发酵液 10 ml 于带塞试管中, 加入 2 % 硫酸铜溶液 0.5 ml, 乙醚 1 ml, 摇匀后静置, 观察醚层。如有蓝色, 说明含有己酸。己酸含量高者, 蓝色较深。

1.2 比色法^[2]

利用发酵液中己酸与醋酸铜显色反应 (pH6.8), 取乙醚层溶液, 用分光光度计在波长 660 nm 下, 测定 O.D. 值, 绘制标准曲线, 对样品定量分析。

1.3 纸上层析法^[3]

发酵液过滤, 取 2~3 ml 滤液, 加 1 滴 0.5 % 酚酞溶液, 用 0.1 N 氢氧化钠溶液滴定至微红色。将层析滤纸裁成宽×长=10 cm×22 cm, 在距裁好的滤纸底边 2 cm 处用铅笔画一条原线, 线中间标一

原点, 在此原点两侧 2 cm 处各标一个原点。用微量注射器将标准己酸 5 μl, 标准丁酸 1 μl, 发酵液 10 μl 分别点在编号为 1, 2, 3 的 3 个原点上。点样时, 每完一次用电吹风吹干, 再在原点上重新点样, 直至点完规定量的样品 (点样的直径控制在 0.3~0.5 cm)。

将点好样的层析纸垂直放入盛有展开剂的层析缸内, 密封层析缸, 与展开剂平衡 1.5 h。平衡结束后, 用上行法将滤纸底边浸入展开剂 1 cm, 保持温度 20 ℃, 密封层析缸, 静止至前沿达到滤纸顶端约 1 cm 处时, 取出滤纸, 在溶剂前沿作一直线, 吹干至无正丁醇为止。

展开后的滤纸用 0.04 % 甲基红乙醇溶液 (使用前用 0.1 N 氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.5 左右, 此时溶液呈桔黄色) 喷雾, 黄色的纸上出现红色的斑点。干后立即用铅笔将斑点圈出, 以免褪色。

测出标准己酸、标准丁酸和发酵液中各斑点的 R_f 值, 根据他们的 R_f 值来确定发酵液中有无己酸与丁酸。分别将斑点剪下称重, 计算出发酵液中己酸含量。计算 R_f 值公式,

$$R_f = \frac{\text{物质斑点移动的距离}}{\text{溶剂前沿移动的距离}}$$

1.4 直接进样毛细管柱气相色谱法

由于平常分析白酒用的是混合内标测定 (2 % 叔戊醇, 2 % 醋酸正戊醇, 2 % 2-乙基正丁酸), 为此, 我们直接利用混合内标中内标 3 (2-乙基正丁酸) 来测定己酸菌液中有有机酸。

收稿日期 2003-12-04

作者简介: 钟雨 (1965-), 男, 江苏泗洪人, 本科, 在读 MBA, 高级工程师, 现任江苏双沟酒业股份有限公司生产技术部部长, 发表论文数十篇, 主持和参加研究课题多项, 其中有 4 项科研成果分别获部、省、市科技进步奖。

仪器及条件:岛津 GC-14,FID 检测器,CDMC 色谱工作站。色谱柱为毛细管柱 FFAP(BP-21)长 50 m,内径 32 mm。检测器温度 220 ℃,汽化温度 180 ℃。程序升温:起始温度 50 ℃,恒温 2 min 后以 3.5 ℃/min 速率升至 200 ℃,继续恒温 10 min。分流比 40:1。

样品处理:取样品 50 ml 加活性炭吸附,静置,过滤,取清滤液 20 ml 加盐酸酸化至 pH2,用无水乙醇稀释至 40 ml,摇匀;于 10 ml 具塞试管中准确移入 10 ml 处理后的样品,加入 0.1 %三内标混合液,摇匀,进样量为 1 μ l。

例如某 F₂ 发酵液稀释 1 倍进样分析色谱图见图 1,主要有机酸分析结果见表 1。

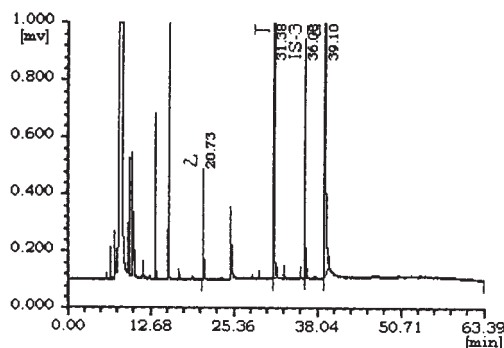


图 1 F₂ 发酵液稀释 1 倍色谱图

表 1 F₂ 发酵液稀释 1 倍分析结果

组分名称	保留时间 (min)	峰高 (微伏)	峰面积 (微伏·秒)	校正因子	含量 (mg/100 ml)
乙酸	20.73	388	1911.5	2.30	19.2
丁酸	31.38	2529	14717.3	1.47	94.8
内标 3	36.00	839	4240.0	1.00	18.57
己酸	39.10	11504	74242.5	1.34	435.7

还有其他处理己酸发酵液样品方法来进行气相色谱分析,如,借用测定白酒中有机酸方法如苯酯化衍生法、有机重氮甲烷法^[4]等。但制备重氮甲烷试剂及重氮甲烷本身有剧毒、易爆,而苯基溴也是催泪毒气,要求在通风橱中进行操作。

2 分析讨论

2.1 己酸菌培养要求定期抽样镜检菌体健壮程度、活动情况、菌体数量等,还要经常纯化菌种,优化培养基,严格控制好发酵参数,提高其产己酸能力。

2.2 以上几种方法测定同一己酸发酵液,结果对比见表 2。

硫酸铜快速测定法定性发酵中己酸快速、简便,仅能从颜色深

(上接第 86 页)

表 1 鹿血酒氨基酸含量

氨基酸名称	含量	氨基酸名称	含量
ASP 天门冬氨酸	2.42	THR 苏氨酸	1.14
SER 丝氨酸	1.08	GLU 谷氨酸	3.58
GLY 甘氨酸	1.04	ALA 丙氨酸	1.57
VAL 缬氨酸	3.53	MET 蛋氨酸	0.46
ILE 异亮氨酸	0.56	LEU 亮氨酸	1.95
TYR 酪氨酸	0.64	PHE 苯丙氨酸	1.59
LYS 赖氨酸	1.37	HIS 组氨酸	0.87
ARG 精氨酸	1.21	PRO 脯氨酸	0.99
CYS 胱氨酸	0.32	TRP 色氨酸	0.29
氨基酸总量	24.59		

3.4 3 种酶的添加量只能低于上述要求,如果过高会给产品的口感带来邪杂味。

3.5 鹿血的有效成分大多属水溶性物质,因此最终产品的酒度越

表 2 4 种测定法结果对比 (mg/100 ml)

酸类	硫酸铜法	比色法	层析法	色谱法
己酸	++++	930	840	871
丁酸	—	—	155	190
乙酸	—	—	—	38

浅粗略判断发酵液中己酸的高低。如果发酵液没有乙酸盐或 pH 值过低,则乙醚层不显色,这一点应引起注意。

比色法测定己酸简单易操作,同样 pH 值及其他有机酸对己酸显色有干扰,因此要予以重视,否则容易产生较大误差。

纸上层析法在发酵工业应用广泛,如我公司和中国药科大学开发新产品植物激素-脱落酸(Absciscic acid)也可以用纸上层析或薄层层析定性分析甚至可以定量分析,它有设备简单、样品量少和灵敏度高优点,但展开时间较长是其缺点,所配部分试剂也不能放置时间过长。

直接进样毛细管柱气相色谱法,该方法快速、准确且多种组分可分析出。但关键要处理好样品,发酵液滴加盐酸酸化一般 pH2~3,可添加适量活性炭吸附蛋白质等有机大分子,滤液要求无固形物,过滤可采用多次过滤,亦可考虑高速离心机处理样品,总之,稀释后的样品须达到色谱进样要求。若通过蒸馏己酸发酵液来测定己酸,可能误差较大。我们取某发酵液(直接进样色谱法测定己酸 562 mg/100 ml,丁酸 38 mg/100 ml)100 ml 蒸馏,蒸出 90 ml,加无水乙醇稀释至 100 ml,气相色谱法检测;而将残留液加蒸馏水、无水乙醇洗脱,溶解,酸化,稀释至 100 ml,活性炭吸附,过滤,取滤液色谱检测。分析结果见表 3。

表 3 蒸馏液及残液分析结果 (mg/100 ml)

酸类	蒸馏液	残液	合计
己酸	166	351	517
丁酸	—	39	39

可见残液中己酸含量占很大部分,可能因为己酸等有机酸一般沸点都比较高,不容易蒸馏出,且发酵液中有有机酸很大一部分以盐的形式存在,无法蒸出,因此酸化处理发酵液是必要的。

参考文献:

- [1] 梁家砦,等.产己酸细菌研究(I)[J].酿酒科技,1994,(4):67.
- [2] 吴根福,陈佩华.比色法定量测定己酸含量的初步研究[J].酿酒科技,1995,(6):35-36.
- [3] 天津轻工业学院,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [4] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.

低越好,但是鹿血的有效成分不能经过高温灭菌,因此产品还要在一定的酒精浓度范围内。

我们经过多次试验后,最后将鹿血酒定为 28 度,这样不仅满足了有效成分的含量,同时在鹿血酒的卫生要求上达到标准。

3.6 由于酶活性的灭失有很多种方法,为了不使鹿血中有效成分的损失过多,故采用一定浓度的酒精和低温灭酶法,效果良好。

参考文献:

- [1] 无锡轻工大学.微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [2] 曹庆文,李昌康.强化工艺管理,确保粮食酒安全度夏[J].酿酒科技,1998,(4):39.
- [3] 沈同等.生物化学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1991.
- [4] 贾士儒.生物反应工程原理[M].天津:南开大学出版社,1990.