近红外光谱在酒精发酵过程检测中的应用

杨维旭 孔令新 操 野 李立平

(吉林燃料乙醇有限责任公司,吉林 吉林 132101)

摘要: 论述了近红外光谱 DA7200 在酒精发酵过程检测中的应用,对液化、糖化、发酵工序的过程产物、低聚糖及有机酸的检测,探讨了改善进样装置及 HPLC 双检测器系统对定标模型的改进效果,并进行了准确性和重复性验证。结果表明,近红外光谱法可以满足低聚糖及有机酸的检测要求,为发酵工业提供了过程产物控制的参考方法。

关键词: 发酵; 醪液; 近红外光谱; 化学计量学

中图分类号:TS262.2;TS261.4;O657.33 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2011)09-0084-05

Application of Near-infrared Spectroscopy in the Fermentation Process of Alcohol

YANG Weixu, KONG Lingxin, CHAO Ye and LI Liping

(Jilin Fuel Alcohol Co.Ltd., Jilin, Jilin 132101, China)

Abstract: The application of near-infrared spectroscopy DA7200 to determine the processing products, oligosaccharides, and organic acids in the liquefying process, saccharifying process, and fermenting process of alcohol was elaborated. The improvement of sampling apparatus and the improvement effects of calibration model by HPLC double detector system were discussed and their accuracy and repeatability verification were carried out. The results suggested that NIR could be used for the determination of oligosaccharides and organic acids and could provide useful reference for the control of processing products in fermenting industry.

Key words: fermentation; wort; near-infrared spectroscopy; chemometrics

液化、糖化、发酵在发酵工业生产中是极为重要的工序。过程产物低聚糖及有机酸的监测,对掌握生产条件运行状态、确定合理工艺参数、避免罐内物料染菌、提高转化率起指导性作用。目前,较为先进的检测手段是对过程产物进行高效液相色谱(HPLC)分析,但样品处理过程较复杂,且液相柱压较高,色谱柱更换频繁,造成分析成本过高。 瑞典 Perten 北美公司与美国 Renew Energy 公司合作,率先应用 DA7200 对过程产物的低聚糖及有机酸进行检测,显著提高了分析效率;与 HPLC 法相比,检测时间从 30 min 缩短至 60 s;且能对多种物料全项检测。

本课题组在借鉴瑞典 Perten 北美公司试验方法的基础上,改善仪器进样系统,选用镀金石英喷砂的漫反射方式,克服了物料水分过高造成的光谱散射;采用双检测器分析,解决了示差折光检测器对有机酸响应不灵敏的缺陷;经过多次的验证调整,取得了较为理想的效果,真正实现了工艺参数的动态过程控制,拓展了近红外光谱的应用领域。

近红外光谱(NIR)属分子振动光谱,是基频分子振动的倍频和组合频;波长范围为700~2500 nm,主要反

映含氢基团 $X-H(C \setminus S \setminus O \setminus N)$ 的特征信息。

1 材料与方法

1.1 方法

近红外分析技术是近红外光谱仪、化学计量软件和 应用模型三者的有机结合。近红外技术是依照样品中化 学成分产生的光谱在吸收峰位置和强度的特性而进行的 定量测定。

1.2 仪器

1.2.1 仪器

Perten DA7200; 波长范围 950~1650 nm; 波长精 度≤0.3 nm;波长稳定性≤0.2 nm/年。

1.2.2 光学系统

采用固定光栅及全封闭光学腔体,光源灯为卤钨灯, 参比灯为汞灯。

1.2.3 软件系统

Simplicity ver 4.0.2.23 用来采集光谱、处理及存储; Grams32 化学计量软件。

1.2.4 液体进样装置

收稿日期:2011-05-11

由恒温系统、固化架托、镀金喷砂石英流通池组成。

在参照瑞典 Perten 北美公司进样样品盒的基础上 (见图 1),对进样装置重新进行了设计,设计后的进样装置(见图 2)具有如下特点。

- ①使用环形样品回收槽设计以防止多余样品外溢引起污染,同时,对于表面张力较大的醪液,可采取直接刮平的方式。
- ②发酵醪液水分含量过高,导致由于水的强吸收无法实现漫反射检测,为提高建模精度,需要采用漫反射和透射相结合的检测方式,且为适应其他浑浊介质的需要,设计了从 $0.5\sim10~\mathrm{mm}$ 光程长的系列检测池。
- ③为达到较强的漫反射和透反射效果,底部喷涂漫 反射涂料。为达到防腐蚀和长期使用无损坏,在喷涂后, 采取近红外区反射效果最好的镀金工艺处理底面。





图 1 Renew Energy 公司进样装置



图 2 吉林燃料乙醇公司进样装置

1.3 数据建模

1.3.1 数据建模组分的确认

- ①控制指标"DP 分布"是掌握在生产过程中淀粉水解程度和水解物特性的必备手段: DP(聚合度)分布是液化、糖化液中低聚糖组分葡萄糖(DP₁)、麦芽糖(DP₂)、麦芽三糖(DP₃)、DP₄+(四糖以上,十糖以下低聚糖)、果糖在物料中的组分含量。
- ②控制指标"乳酸、醋酸、丙三醇、乙醇"是发酵过程中预发、主发、酵母醪工艺运行过程关键指标,对掌握不同发酵途径,染菌情况,酵母成长、作用、衰退及转化酒精的收率至关重要。
- ③还原糖、酒分、挥发酸、锤度、pH 值是过程产物的常规控制指标。

1.3.2 数据建模种类的划分

液化醪(102V1251)数据模型:还原糖、锤度。

糖化醪(102V1311)数据模型:还原糖、锤度、挥发酸。 发酵醪(103U1051 103U1101 103U1701)数据模型: 还原糖、酒分、挥发酸、pH;葡萄糖(DP₁)、麦芽糖(DP₂)、麦

还原糖、酒分、挥发酸、pH;葡萄糖(DP_1)、麦芽糖(DP_2)、麦芽三糖(DP_3)、 DP_4 ⁺(四糖以上,十糖以下低聚糖)、果糖、阿拉伯糖;丁二酸、乳酸、醋酸、丙三醇、甲醇、乙醇。

1.4 样品

1.4.1 样品来源

吉林燃料乙醇有限责任公司乙醇厂提供,在样品成分含量覆盖范围和适用梯度上,选择具有工艺代表性的控制点 102V1251 (高温液化醪)、102V1311 (糖化醪)、103U1051(预发酵罐)、103U1101(主发酵罐)、103U1701(发酵成熟罐)的罐样。

1.4.2 样品成分含量参考值测定

①还原糖的测定(g/100 mL): 斐林氏甲、乙液法; 锤度 $(^{\circ}BX)$ 的测定: 阿贝折射仪法; 挥发酸度的测定: 挥发酸的主要成分是醋酸, 另外包括少量的甲酸、丁酸、戊酸等脂肪酸,以 10 mL 试样中含酸的毫克当量数表示。

②低聚糖及有机酸的测定(双检测器法)

高效液相色谱(HPLC): 岛津 LC-20A 系统;LC-20AB 泵;RID-10A 示差折光检测器;SPD-20A UV/VIS 检测器;CTO-10AVP 柱温箱;Sil-10ADvp 自动进样器;CLASS-VP6.14 软件系统;流动相:0.0025 mol/L H_2SO_4 ;进样量:5 μ L;色谱柱:SHIMADZU SCR-101H,300×7.8 mm;预柱:SHIMADZU SCR-G101H,50×7.8 mm;柱温:65 °C;流量:0.8 mL/min。

检测:由串联的双检测器系统进行检测,样品经流动相洗脱,先经过示差折光检测器检测其中的低聚糖,再流经 UV/VIS 检测器(210 nm)检测样品中的有机酸,使低聚糖及有机酸均能在对其有较高灵敏度的检测器中得到更好的响应。针对有机酸的分析,双检测器法较单一的示差折光检测法,具有更好的重复性及回收率,从而提高了建立近红外光谱数据模型的准确性。色谱数据处理:采用双通道方法,记录两个检测器的色谱图,通过调整积分的时间,同时得到低聚糖在示差折光检测器、有机酸在UV/VIS 检测器上的定量结果。

③样品成分含量信息

样品的常规控制指标分析结果见表 1、表 2。

2 样品分析与结果

2.1 定标建模

2.1.1 定标样品的收集与处理

定标样品是小的群体(几十个样品),代表被测群体 (几百以至几千样品)的计量过程。其中,待测组分含量范 围要覆盖被测样品中该组分的含量范围,且要求此范围 内定标样品的分布尽量均匀。

2.1.2 标准样品处理

2.1.2.1 过程醪液样品

醪液样品混匀后分为 2 份,一份进行实验室指标的 分析(化分及 HPLC),另一份 DA7200NIR 光谱扫描。

2.1.2.2 光谱采集及数据录入

将样品置于液体进样系统(固定式测量),近红外光谱扫描。每个样品重复测量6次,并将光谱均值化处理。将经化分法及 HPLC 法分析得出低聚糖、有机酸等数据录入软件系统。

2.2 化学计量学校正方法

在 Grams32 软件系统的化学计量方法中,选用偏最小二乘法分别对经过不同预处理的光谱进行分析。光谱预处理方式是将乘积分散校正法(MSC)、标准正态变量转换法(SNV)、标准化处理(Normalization)与一阶、二阶(sg1.2)导数处理相结合对光谱进行预处理,并以交互验证的标准偏差(SECV)和所建模型的相关系数(R²)为衡量曲线预测效果的主要参数,根据主因素分析图及光谱残差图及浓度残差图等分析结果剔除特异样品。最后,分别选择不同的波段,比较各波段的预测效果,从而确定定标模型。在两个定标模型预测效果接近状态时,则需根据其对验证样品的分析结果进行最终取舍。

在近红外光谱分析使用化学计量学建立模型的方法中,光谱预处理和波长优选的方法是基础,定性和定量分析都是在此基础上进行的。因此,光谱预处理和波长优选的方法对建立预测能力强、稳健性好的分析模型至关重要,甚至起到决定性作用。醪液光谱吸收结果见图 3~图7 和表 3、表 4。

在 DA7200 进行醪液分析过程中, 因物料水分含量较高(70%~80%),且水分对近红外光谱有着非常强烈的吸收,会导致其待测组分特征波长的偏移,是近红外分

表 1 样品成分含量信息(常规控制指标)

组分			罐号		
组刀	102V1251	102V1311	03U1051	03U1101	03U1701
рН		$4.10\sim4.60$	$2.84 \sim 4.86$	$3.50 \sim 3.90$	$3.70\sim4.00$
还原糖(g/100 mL)	$1.00{\sim}4.50$	$9.89{\sim}16.00$	$1.05 \sim 12.15$	$0.88{\sim}12.00$	$0.13 \sim 0.30$
锤度(°BX)	$7\sim25$	19.1 \sim 26.8	$5.60{\sim}18.90$	$7.80 \sim 15.0$	$7.2 \sim 9.0$
挥发酸(度)		$0.05 \sim 0.25$	$0.03 \sim 0.36$	$0.04 \sim 0.31$	$0.10 \sim 0.40$
酒分(%vol)			0.10~8.30	0.80~11.3	9.5 \sim 14.3

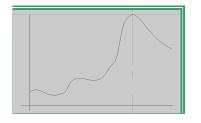


图 3 醪液光谱吸收 1460 nm



图 4 醪液光谱吸收 1185 nm

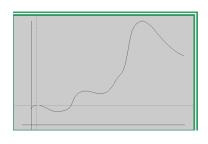


图 5 醪液光谱吸收 975 nm

析中最重要的干扰组分。以图 $5\sim$ 图 7 为例,分析计算可知,仅有 1 %的光得到了漫反射,其余 99 %的光都被吸收了;同样,在水分的特征吸收区域,噪声响应强烈,而对于噪声较高的光谱,常规的光谱预处理方式,反而降低模型的预测效果。

多元散射校正(MSC)主要是消除颗粒分布不均及颗粒大小产生的散射影响;MSC 在固体漫反射和浆状物质(透)反射光谱分析时得到了广泛的应用。因 MSC 校正假定散射与波长及样品浓度无关及醪液组分性质变化

较宽,MSC 处理效果受到一定的影响。同时,因在 1386~nm 后,水峰的噪声表现更为突出,严重影响漫反射效果,故建议仅选用 $986\sim1386~\text{nm}$ 波段。

2.3 与美国 Renew Energy 公司数学 模型的比较

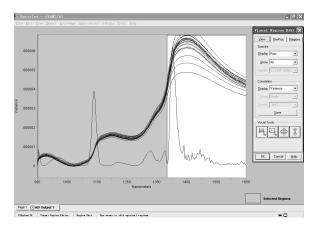
	表 2 样品成分含量信息(低聚糖及有机酸的 HPLC 分析)											(g/L)	
分布	组分	$\mathrm{DP_4}^+$	麦芽三糖	麦芽糖	葡萄糖	果糖	阿拉伯糖	丁二酸	乳酸	醋酸	丙三醇	甲醇	乙醇
MAX	103U1051	71.74	0.87	18. 26	73.70	0.65	0.45	0.83	1.37	0.76	5.86	5.88	67.44
MIN	预发酵罐	44. 43	0.10	12.82	3.88	0.13	0.06	0. 27	0.68	0.10	3.60	3.78	37.76
MAX	103U1101	46. 40	0.18	13.41	63.14	0. 23	0.24	0.77	1.17	0.80	5.40	5.27	65.95
MIN	主发酵罐	33.77	0.07	7.24	35.25	0.09	0.06	0.26	0.74	0.18	4.58	4.85	58. 10
MAX	103U1701	3.37	0.62	4. 48	6.05	1.45	0.85	0.80	1.49	1.20	7.54	7.53	109.86
MIN	发酵成熟罐	2. 82	0. 29	3.85	1. 51	0. 52	0. 13	0.35	0.46	0.30	6.14	6.66	105.58

表 3 醪液光谱吸收值

	- N	, •	HOTIK / LIGHT / CATION IN INC.
•	波长(nm)		OD(光密度)值
	1460		2. 03
	1185		0. 59
	975		0. 34

表 4 光谱预处理和波长优选对数学模型预测 效果的影响(以还原糖为例)

前处理方法及波长优选	模型评价指标							
刑处珪万法及彼长忧选	R^2	SECV	Press	T	F			
986~1386 nm MC+None+SG1st.5	0. 943	0. 423	5	1.27	0.86			
$950\sim1650\mathrm{nm}$ MC+None+SG1st.5	0.807	0.654	15	0.89	0.65			
$986{\sim}1386\mathrm{nm}$ MC+MSC+SG1st.5	0.932	0.458	6	1.28	0.78			
$950{\sim}1650\mathrm{nm}$ MC+MSC+SG1st.5	0.901	0.504	17	1.01	0.65			
$1400{\sim}1650 \text{ nm MC+None+SG1st.} 5$	0.723	0.654	16	1.00	0.67			
$1400\sim1650 \text{ nm MC+MSC+SG1st.} 5$	0.812	0.578	16	0.895	0.89			
$986\sim1386\mathrm{nm}\mathrm{MC} + \mathrm{None} + \mathrm{SG2st.}5$	0.897	0.489	12	0.965	0.78			
$986{\sim}1386\mathrm{nm}$ MC+MSC+SG2st.5	0.873	0.587	14	0. 987	0.76			
$986{\sim}1386\mathrm{nm}$ MC+None	0.882	0.562	13	0.875	0.68			
986∼1386 nm MC+MSC	0.879	0. 543	12	0.765	0.65			



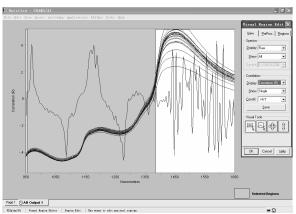
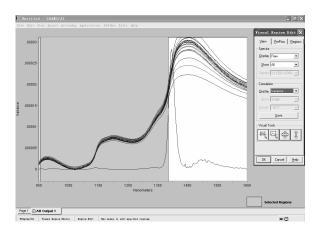


图 6 结合 Variance 及 Correlation(R)优选波段光谱 预处理为 MC+MSC+SG1st.5 的作用效果

针对美国 Renew Energy 公司提供的数据,对本课题组所建立的数据模型进行了对照,其中 SEP 是对 20 个未知样品进行检测得出的标准分析误差。两个数学模型对照结果见表 5。

①各工序的范围, 因美国 Renew Energy 公司采用



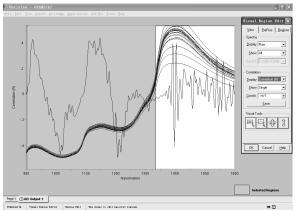


图 7 结合 Variance 及 Correlation(R)优选波段光谱 预处理为 MC+None+SG1st.5 的作用效果

生醪发酵工艺同我公司的连续发酵工艺有所不同,且酶制剂的效能有所差别,故范围值也是不同的。

②通过两种化学计量学数学模型对照,吉林燃料乙醇的各项数据已接近美国 Renew Energy 公司水平,但体现在交互验证标准差 SECV 及标准分析误差 SEP 值上,还是存在一定的差距的,可能是由于样品性质、样本数量集的差异(表 6)造成的。

3 讨论

- 3.1 近红外光谱 DA7200 应用于发酵过程分析检测,以 其高效、多成分分析、无损和低成本的特点,及时出具过 程产品的分析数据,为生产装置平稳运行和优化提供了 准确数据信息,并为近红外光谱分析的应用开发确立了 新的模式。
- 3.2 在化学计量学模型建立的过程中,光谱预处理和波长优选法对建立预测能力强、稳健性好的分析模型至关重要,甚至起到决定性作用。样品的水分含量过高,是噪声及引起光谱散射的主要原因,也是光谱预处理和波长优选重点考虑的因素。
- 3.3 受样品物性及样本集数量的影响,有效改进液体进 样装置,提高漫反射光作用效果;扩大样品数量集,是建

表 5	两种化学计量学数学模型对照表	
-----	----------------	--

		Fermentation	表 5 两科 预发酵罐	化字计重字数字的 Beerwell	主发酵罐	Yeast Prop	发酵成熟罐
项目		(USA)	(吉林乙醇)	(USA)	(吉林乙醇)	(USA)	(吉林乙醇)
-	Range	9. 00~26. 00	5.6~18.9	9.6~10.5	12. 1~14. 8	12.6~20.2	7.8~9.2
Brix	R^2	0. 995	0. 990	0. 466	0. 977	0.876	0. 849
(糖度)	SECV	0. 433	0. 331	0. 172	0.441	0.611	0. 589
	SEP	0.640	0. 57	0. 22	0. 57	0.790	0.86
	Range	$0.76 \sim 15.76$	$44.43 \sim 71.74$	$0.80{\sim}1.80$	$33.77 \sim 46.40$	$4.68 \sim 13.53$	$2.82\sim 3.37$
nn +	R^2	0. 993	0. 979	0.158	0. 982	0.344	0.795
$\mathrm{DP_4}^+$	SECV	0.375	0.894	0.079	1.075	1.48	0. 635
	SEP	0. 625	0.667	0.06	0.852	1. 191	0.58
	Range	$0.70 \sim 1.82$	$0.1 \sim 0.87$	$0.077 \sim 0.110$	$0.07 \sim 0.18$	$0.51\sim 2.15$	$0.29 \sim 0.62$
	R^2	0.889	0. 902	0.429	0.894	0.64	0.76
DP_3	SECV	0. 144	0.03	0.0065	0.008	0. 259	0.11
	SEP	0. 205	0. 124	0.02	0.125	0.477	0.33
	Range	$0.37 \sim 5.17$	12.82 \sim 18.26	$0.48 \sim 0.73$	$7.24 \sim 13.41$	$2.13\sim 3.92$	$3.85{\sim}4.48$
Maltose	R^2	0.952	0. 883	0.743	0.822	0.467	0.863
(麦芽糖)	SECV	0.367	0. 536	0.03	0.649	0. 269	0.33
	SEP	0.363	0. 52	0.06	0.73	0. 198	0. 22
	Range	$0.06{\sim}10.58$	$3.88 \sim 73.70$	$0.06 \sim 0.57$	$35.25\sim63.14$	$0.14 \sim 7.90$	$1.51 \sim 6.05$
Glucose	\mathbb{R}^2	0.99	0. 988	0.753	0.946	0.918	0.906
(葡萄糖)	SECV	0.325	1.043	0.07	0.896	0.680	0. 423
	SEP	0.343	0.96	0.24	1.02	0.924	1.01
	Range	$0.03 \sim 0.21$	$0.68 \sim 1.37$	$0.069 \sim 0.205$	$0.74 \sim 1.17$	$0.014 \sim 0.10$	$0.46 \sim 1.49$
LacticAcid	\mathbb{R}^2	0.598	0. 439	0.904	0.338	0.536	0.527
(乳酸)	SECV	0.018	0. 15	0.0097	0.19	0.015	0.14
	SEP	0.017	0.43	0.02	0.68	0.009	0.35
	Range	$0.35 \sim 1.45$	$3.60\sim5.86$	$1.07 \sim 1.39$	$4.58 \sim 5.40$	$0.27 \sim 0.89$	$6.14 \sim 7.54$
Glycerol	R^2	0.958	0. 966	0.754	0.973	0.965	0.958
(丙三醇)	SECV	0.063	0. 231	0.044	0.208	0.0338	0. 211
	SEP	0.060	0. 12	0.05	0.20	0.039	0.17
	Range	$0.007 \sim 0.07$	$0.10 \sim 0.76$	$0.023 \sim 0.07$	$0.18 \sim 0.80$	$0.008 \sim 0.039$	$0.30 \sim 1.20$
AceticAcid	R^2	0.567	0. 638	0.584	0.701	0.188	0.801
(醋酸)	SECV	0.0089	0.088	0.008	0.079	0.0072	0. 092
	SEP	0.0100	0. 45	0.01	0.51	0.0100	0.62
	Range	$0.663{\sim}13.58$	$37.76\sim67.44$	$11.48 \sim 13.27$	$58.10{\sim}65.95$	$0.107{\sim}4.00$	$105.58{\sim}109.86$
Ethanol	\mathbb{R}^2	0.997	0. 997	0.853	0. 923	0. 988	0.960
(乙醇)	SECV	0. 255	0.86	0. 172	0.58	0. 129	0.35
	SEP	0. 189	0. 56	0.29	0.63	0. 236	0.78

± ^	两公司样品性质及样本集对照结果	
7. 6	网络司科马尔西格利 电对路经虫	

						1.5 4 1 1 5 14.						
•	项目	BX	DX	$\mathrm{DP_4}^+$	DP₃	麦芽糖	葡萄糖	果糖	乳酸	丙三醇	醋酸	酒精
	Renew Energy	玉米采月	用多级破	碎,多级	筛分后,	物料接近	粉碎完全,	均匀;	进入生	廖发酵环节	5,物料;	匀匀、无
样品性质	吉林燃料乙醇	玉米采月			,物料粉	交少 }碎不完全, 光谱作用效					糖化、发	酵环节,
样本集(个)	Renew Energy 吉林燃料乙醇	934 186	507 263	916 163	1085 158	1453 172	$1565 \\ 152$	28 102	$1547 \\ 147$	$1562 \\ 157$	1273 143	1384 265

立稳定、准确数据模型的关键外部条件,也是接近或达到 美国 Renew Energy 公司应用效果的基础,并将是本课题 组下一步努力的方向。

参考文献:

[1] Marie-Farance Laporte, Paul Paqin. Near-Infrared Analysis of Fat, Protein and Casein in Cow's Milk[J]. Agric. Food Chem,

1999,47(7):2600-2605.

- [2] 籍保平.近红外光谱在农产品加工中的应用[J].粮油加工与食品机械,2000(6):31-33.
- [3] 王惠文.偏最小二乘回归方法及其应用[M].北京:国防工业出版社,2000.
- [4] Workman J,Mel Koch Jr,et al.Process Analytical Chemistry[J]. Anal Chem,2002,75:2859–2876.