

酯化发酵条件及其测定方法的研究

冯学愚

(宜宾学院生物工程系 四川 宜宾 644000)

摘要: 采用正交实验研究了 B 类酶促物质发酵生产高酯调味酒的最适酯化条件。结果表明, 最适宜的酯化条件为乙醇浓度 $A_2\%$, 己酸浓度 $B_4\%$, 发酵时间 C_3 d, 发酵温度 $D_2\text{ }^\circ\text{C}$, 黄水含量为 $E_1\%$, 此时己酸乙酯含量可高达 36.386 g/L。在测定己酸乙酯含量数值时, 总酯分析法可替代色谱分析方法, 具有分析仪器相对简单、成本相对较低、可操作性强等优势。(孙悟)

关键词: 酯化发酵条件; B 类酶促物质; 己酸乙酯; 检测方法

中图分类号: TQ920; TS262.31; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)12-0032-03

Investigation on Esterifying Fermentation Conditions and the Measurement Approaches

FENG Xue-yu

(Bioengineering Department of Yibin College Yibin, Sichuan 644000, China)

Abstract: The optimal esterifying condition for B kind enzyme substances to produce highest ester flavoring liquor were studied by orthogonal experiments. And the result indicated that the best esterifying conditions were the following $A_2\%$ ethanol concentration, $B_4\%$ caproic acid concentration, C_3 d fermentation time, $D_2\text{ }^\circ\text{C}$ fermentation temperature and $E_1\%$ yellow water content. The content of ethyl caproate could reach as high as 36.386 g/L. Total ester analytical method instead of chromatography in the measurement of ethyl caproate content had the advantages of comparatively simple analytic instruments, low analytic costs, convenient to operate, and suitable for the generalization in the industry etc. (Tran. by YUE Yang)

Key words: esterifying fermentation conditions; B kind enzyme substance; ethyl caproate; measurement approaches

浓香型白酒的主体香味物质是己酸乙酯。它源于糟醅体系中的酯化酶对窖泥功能菌的代谢产物己酸与糟醅体系中的乙醇发生酯化缩合而成。在相同等级的窖池中, 母糟操作工艺基本相同的条件下, 发酵周期与己酸乙酯含量成正相关性。传统泸型(浓香型)酒酿造体系中己酸乙酯生成缓慢, 发酵周期一般在 60~70 d, 有的厂家甚至长达 90 d。优质泸型酒的四大酯含量排序一般为己酸乙酯 > 乳酸乙酯 > 乙酸乙酯 > 丁酸乙酯, 因而在生产中通常研究如何采取“增己降乳”措施, 以保证酒体香和味的平衡、协调。

在窖外酯化生香过程中, 影响己酸乙酯含量的因素较多, 有底物乙醇、己酸浓度、B 类酶促物质用量、发酵温度、时间以及黄水用量等因素。B 类酶促物质源于自然发酵, 是高酯调味酒酿造体系中香醅发酵重要的微生物复合酶系和呈香呈味物质的来源和载体, 能很好地促

进己酸和乙醇合成己酸乙酯, 并在发酵过程中产生较丰富的复合香味物质。生产实践已证明这一技术具有提高泸型大曲酒优质品率, 缩短泸型大曲酒发酵周期的显著功效^[1]。为此, 本研究以容器填充装满 B 类酶促物质为基础, 保证 B 类酶促物质的超量供给, 不考虑 B 类酶促物质用量对己酸乙酯生成量的影响。从静态角度对主要影响因子乙醇浓度、己酸浓度、发酵时间、发酵温度、黄水用量等进行 5 因素 4 水平的正交实验研究分析, 以便有效提高高酯调味酒的己酸乙酯含量并降低其己酸残留量。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

己酸: 市售, 分析纯;

乙醇: 市售, 95% (v/v) 食用级;

收稿日期: 2005-08-24

作者简介: 冯学愚 (1964-), 男, 四川宜宾学院生物工程系, 副教授, 主要从事发酵工艺及抗菌材料研究。

B 类酶促物质 :泸州老窖股份公司提供 ;
黄水 :泸州老窖股份公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验条件

介于 B 类酶促物质不仅在香醅发酵过程中催化 (促进)己酸乙酯的生成积累,并可代谢融入其他的香味物质,也是己酸乙酯积累的载体和浓缩的场所,因此我们不再研究 B 类酶促物质的用量对己酸乙酯生成积累的影响。本试验只对乙醇浓度、己酸浓度、发酵时间、发酵温度及黄水含量等 5 大因子作 4 水平的正交试验,见表 1,表 2 (取两轮试验结果的平均值, K 值、R 值的计算按传统色谱分析法数值)。

表 1 实验因素及水平

因素水平	乙醇浓度 (%)	己酸浓度 (%)	发酵时间 (d)	发酵温度 (°C)	黄水含量 (%)
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	E ₁
2	A ₂	B ₂	C ₂	D ₂	E ₂
3	A ₃	B ₃	C ₃	D ₃	E ₃
4	A ₄	B ₄	C ₄	D ₄	E ₄

1.2.2 蒸馏液己酸乙酯含量的检测

己酸和乙醇在 B 类酶促物质酯化酶作用下合成己酸乙酯,是一个可逆反应,酯化发酵 7 d 后的酯化液中,

要么是己酸乙酯含量高,要么是己酸含量高。己酸乙酯和己酸都是醇溶性物质,将随蒸馏过程被提馏到前馏分中。采用色谱分析蒸馏液的己酸乙酯含量,蒸馏液中高含量的己酸乙酯或己酸都可能对色谱柱产生较严重的腐蚀,造成分析检测成本较高。

为解决这一问题,我们分析认为:酯化液中发生的生化反应主要是“己酸 + 乙醇 → 己酸乙酯”这一酶促可逆过程。因而,采取了利用皂化法测定蒸馏液中总酯这一检验方法来衡量蒸馏液中的己酸乙酯含量,但白酒总酯的传统检验方法是以乙酸乙酯作为衡量标准,而色谱分析则是以己酸乙酯为衡量标准,为达到两种方法的一致性,本研究采取统一以己酸乙酯作为计算的衡量标准,按文献^[2]测定己酸乙酯含量。

2 结果及分析

2.1 高酯调味酒酯化条件正交实验^[4]及己酸乙酯测定

高酯调味酒酯化条件及己酸乙酯测定,按正交实验因素设计进行,正交实验及酯化反应结果见表 2。

表 2 结果表明,①5 大影响因子的极差因子 (即 R 值)排序为 $R_{温} \geq R_{己} > R_{乙} \geq R_{时} > R_{黄}$,也就是说发酵温度和己酸浓度是影响己酸乙酯生成积累量的重要影响因素;②促进己酸乙酯生成积累量的 5 大相关因子的组

表 2 高酯调味酒酯化条件正交实验及己酸乙酯测定结果

样品编号	乙醇浓度 (%)	己酸浓度 (%)	发酵时间 (d)	发酵温度 (°C)	黄水含量 (%)	己酸乙酯含量 (g/L) (色谱法)	己酸乙酯含量 (g/L) (总酯法)
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	E ₁	3.458	3.731
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	E ₂	10.066	10.125
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	E ₃	14.382	14.132
4	A ₁	B ₄	C ₄	D ₄	E ₄	3.569	3.479
5	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	E ₄	5.154	5.145
6	A ₂	B ₂	C ₁	D ₄	E ₃	12.474	12.535
7	A ₂	B ₃	C ₄	D ₁	E ₂	16.290	16.311
8	A ₂	B ₄	C ₃	D ₂	E ₁	24.713	24.385
9	A ₃	B ₁	C ₃	D ₄	E ₂	6.402	6.328
10	A ₃	B ₂	C ₄	D ₃	E ₁	13.180	13.097
11	A ₃	B ₃	C ₁	D ₂	E ₄	5.800	5.732
12	A ₃	B ₄	C ₂	D ₁	E ₃	17.164	17.239
13	A ₄	B ₁	C ₄	D ₂	E ₃	4.732	4.823
14	A ₄	B ₂	C ₃	D ₁	E ₄	8.752	8.873
15	A ₄	B ₃	C ₂	D ₄	E ₁	14.392	14.298
16	A ₄	B ₄	C ₁	D ₃	E ₂	6.522	6.477
K ₁	31.475	19.746	28.254	55.743	45.664		
K ₂	58.631	44.472	46.776	39.280	45.311		
K ₃	42.546	50.864	54.249	48.752	30.068		
K ₄	34.398	51.968	37.771	23.275	36.837		
k ₁	7.88	4.94	7.06	13.94	11.42		
k ₂	14.66	11.12	13.46	9.82	11.33		
k ₃	10.64	12.72	13.56	12.19	7.52		
k ₄	8.60	12.99	9.44	5.82	9.21		
R	6.72	8.05	6.50	6.50	2.21		

合方式为 $A_2B_4C_3D_2E_1$, 即最适宜的酯化条件是乙醇浓度为 $A_2\%$, 己酸浓度为 $B_4\%$, 发酵时间为 C_3d , 发酵温度为 $D_2^\circ C$, 黄水含量为 $E_1\%$, 此时己酸乙酯含量可高达 $24.731 g/L$; 但通过对 R 值最大的发酵温度因子及己酸浓度因子作进一步单因素试验修正, 研究确定 5 大因子的最佳水平组合, 此时己酸乙酯含量高达 $36.386 g/L$ 。

按照酯化条件研究得到的组合量比, 进行高酯调味酒大生产试验, 发酵成熟的窖外发酵香醅, 首先进行渣汁分离, 汁液入底锅, 渣子拌熟谷壳上甑蒸馏, 采取泸型酒典型的截头去尾的摘酒工艺。大生产酿造的高酯调味酒, 其主体香己酸乙酯的含量达 $70 g/L$ 左右。经贮存 6 个月左右, 酒体变得柔和。

2.2 总酯和色谱分析法测定己酸乙酯含量的比较

表 2 所列数据还表明, 色谱法分析己酸乙酯数值 16 组数据平均值为 $10.441 g/L$, 理化皂化法分析己酸乙酯数值 16 组数据平均值为 $10.419 g/L$, 两者数值趋于一致。利用两种方法来测定同一酯化液蒸馏馏分样品的己酸乙酯含量, 皂化法测定总酯得到的己酸乙酯含量数值与色谱法测定己酸乙酯含量得到的数值趋于一致 (均以

己酸乙酯计)。

因此, 在酯化力检测的反应体系中, 其酯化反应的底物基本视为己酸和乙醇, 因而其反应生成产物就只有己酸乙酯。总酯测定方法, 首先是用碱中和蒸馏液中的残余己酸, 再用过量的碱进行皂化反应, 最后用酸中和剩余的碱, 测定的总酯含量应该是蒸馏液中的己酸乙酯含量 (色谱检测结果也是如此), 因而, 在测定己酸乙酯含量数值时, 总酯分析法可以替代色谱分析方法。总酯分析法测定己酸乙酯含量具有所需分析仪器相对简单、分析成本相对较低等优势, 更具有行业可操作性, 适宜行业推广。

参考文献:

- [1] 许德富, 沈才洪, 等. 应用微生物技术窖外发酵香醅的研究 (初报) [J]. 酿酒科技, 1995, (3): 11-14.
- [2] 黄晓东. 白酒中总酸、总酯和总醛含量的连续测定 [J]. 食品科学, 1999, (11): 52-54.
- [3] 马美范. 比色法测定白酒中总酯含量 [J]. 酿酒, 2001, (1): 64-64.
- [4] 王叔淳. 食品分析数理统计与质量控制 [M]. 1991.

“枝江杯”首届全国品酒技能决赛落下帷幕

本刊讯: 由中国酿酒工业协会、中国财贸轻纺烟草工会、中国就业培训技术指导中心、中国轻工业技能鉴定指导中心联合举办的“枝江杯”首届全国品酒师技能决赛于 2005 年 11 月 15 日至 17 日在湖北宜昌市三峡工程大酒店举行。开幕式由全国总工会中国财贸轻纺烟草工会轻工烟草工作部部长郝宜新主持, “枝江杯”首届全国品酒技能比赛组委会主任、中国酿酒工业协会理事长王延才、中国财贸轻纺烟草工会副主席查学明、中国轻工业技能鉴定指导中心处长孟琪、中国就业培训技术指导中心综合处处长楚小力、湖北省酒业协会会长程业涛、宜昌市副市长艾苍松等领导出席了开幕式并讲话。王延才理事长致开幕词, 指出了本届决赛的重要意义和对培养行业优秀人才的推动作用, 孟琪处长认为要发挥企业和行业的作用, 国家由制造大国向制造强国转变, 非常重视职业教育, 品酒技能大赛是一个重要举措。



中国财贸轻纺烟草工会郝宜新部长主持会议

经过半年多各省区品酒师技能初赛, 有 28 个省区 89 个企业的 101 名选手进入决赛。“枝江杯”首届全国品酒师技能比赛组委会副主任、中国酿酒工业协会秘书长王琦宣布决赛评审组成员名单, 评审组由王延才、王琦、赵建华、梁邦昌、栗永清、杨俊、姜祖模、何钊、程业涛 9 人组成, 王延才任组长, 王琦任副组长, 由著名白酒专家沈怡方、高月明、高景炎组成咨询组。决赛组织严密, 要求严格。贾智勇代表参赛选手宣誓: “我们将严格遵守本次技能大赛的各项安排, 服从大赛组委会的统一指挥, 严格遵守比赛规则和赛场纪律, 服从裁判, 尊重其他选手, 发扬顽强拼搏的精神, 赛出风格, 赛出水平, 为本次大赛的圆满成功尽自己的努力!” 栗永清代表评审组人员宣誓: “坚决服从评审组主任指挥, 严格遵守竞赛规则和评审组纪律, 尊重参赛选手, 文明评审, 严肃认真, 不徇私情, 秉公办事, 圆满完成各项评审工作”。经过两天的理论考试和实践考试角逐, 张锋国、李泽霞和刘建华荣获金奖; 王贤、宋书玉等 20 名选手获得银奖, 我省选手王莉和向祖祥分别荣获第六名和第十八名, 为贵州争了光。在前 23 名选手中, 山东 4 名, 河南 2 名, 江苏 5 名,

河北 2 名, 黑龙江 3 名, 吉林 1 名, 陕西 2 名, 贵州 2 名, 安徽 1 名, 湖北 1 名。

王延才理事长在总结中指出: 大赛首开先河, 众多企业开展了技术练兵、技术比武活动, 江苏等 7 个省市区纳入了技术比赛计划, 参加初赛的有 2600 多家企业, 选手近万名。大赛是对全国酿酒队伍的大检阅、大练兵, 起到了示范作用。本次大赛的特点:

参赛人员代表中坚力量, 有 28 个省市 89 个企业共 101 名代表参加决赛;

大赛组织严密, 要求严格, 评判科学;

考题较难, 考出了水平。1 轮理论考试, 9 轮实践考试, 收集全国酒样 100 多个;

评审细则严格, 工作职责明确, 评审组分工明确, 阅卷、校阅分别进行, 由统计组计分、复校, 保证了决赛成绩的准确性, 严格工作纪律。

大会圆满完成各项评审工作, 顺利落下帷幕。(小雨)



“枝江杯”决赛试卷当场开封