

果醋发酵液残留乙醇含量的快速检测

刘志鹏, 杨海麟, 夏小乐, 张玲, 王武*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:在康维皿比色法的基础上,建立了一种快速测定果醋发酵液残留乙醇的新方法。结果表明:采用康维皿作为反应容器,乙醇反应体系在580nm处具有最大吸收峰。果醋中的乙醇浓度在0.5%~10%(v/v)之间呈良好线性,回归方程为 $Y=0.07389X-0.00886$,相关系数 $R^2=0.9995$ 。该方法具有取样量少、快速、准确、无需复杂仪器等优点,不仅适于测定果酒或果醋终产品的乙醇含量,也便于跟踪果酒或果醋生产过程的乙醇含量动态变化,具有较好的应用推广价值。

关键词:康维皿,快速检测,残留乙醇,果醋

Rapid assay of residue alcohol in the fermentation liquid of fruit vinegar

LIU Zhi-peng, YANG Hai-lin, XIA Xiao-le, ZHANG Ling, WANG Wu*

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A rapid method was developed for detecting residue alcohol in fruit vinegar according to KangWei-Utensil colorimetric method principle. The result showed that, the maximum absorbance wavelength of alcohol was 580nm using KangWei-Utensil as reaction container. There was a good linear relationship with $R^2=0.9995$ within the range from 0.5%~10% (v/v), regression equation was $Y=0.07389X-0.00886$. Due to the advantages of rapid, convenient, and complex equipment non-required, the method was not only suitable for detecting the alcohol content in fruit vinegar, but also tracking the change of alcohol during fermentation process. The method might be applied on other bioprocesses which involving with detection of ethanol residue or final ethanol concentration.

Key words: KangWei-Utensil; rapid detection; residue alcohol; fruit vinegar

中图分类号: TS255.47

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)12-0079-04

发酵型果醋具有软化血管、解酒保肝、调节体液循环和抗癌养生等功效,被誉为继碳酸饮料、饮用水、果汁和茶饮料之后的“第四代”饮料,发展空间和市场潜力巨大^[1-2]。发酵型果醋经两阶段发酵而成,先经酵母菌发酵为果酒,后由醋酸菌发酵成果醋。果醋发酵液含有果汁中残留的糖类物质和酵母菌、醋酸菌代谢生成的各类醇类、酚类和有机酸等物质,增加了果醋残留乙醇含量的检测难度^[3-5]。果醋发酵液中的乙醇含量是果醋酿造过程中的重要监测指标,是醋酸发酵终止点的重要判断依据,直接关系到发酵产品的质量及相关发酵参数的计算,美国液态食醋标准(AOAC)规定果醋中残留乙醇含量需小于0.5%(v/v)^[6]。传统的乙醇测定方法主要有三种:气相色谱法、密度瓶法和乙醇计法。气相色谱法精度高,用样少,速度快,但气相色谱仪比较昂贵,对操作者的要求以及仪器维护费用都较高,不适用于中小企业应用;密度瓶法和乙醇计法为避免溶液内其他物质对检测结果的干扰需先将发酵液经过蒸馏等处理后再测定,步骤繁琐,并且所用样品量多且花

费时间较长,精密度和准确度较差^[7-9],上述方法主要运用在乙醇发酵检测中,在果醋生产过程中仍欠缺一种快速灵敏的检测方法。康维皿比色法测乙醇原理基于加热的乙醇在康维皿封闭环境下从饱和 K_2CO_3 环境中逸出与 $K_2Cr_2O_7$ 在酸性条件下反应生成绿色的 $Cr_2(SO_4)_3$,色泽在一定范围内与乙醇浓度成正比,通过测定吸光度可确定发酵液中的乙醇含量。该方法操作快捷简便,样品纯度要求低,检测成本低廉,能够快速测定果醋发酵两个阶段的乙醇含量,但该方法目前没有系统的使用规范,相关涉及文献很少,并且在检测液的配制和检测过程上仍存在一定问题,如缺少精确的显色液配比,没有固定的检测限,缺乏实际果醋发酵检验等^[10-11]。本工作针对以上问题在原有康维皿法的基础上进行了改进,通过精确计算确定了重铬酸钾和浓硫酸的添加量,按比例配制重铬酸钾-硫酸溶液,保证了显色液内反应物质的浓度,同时通过对果醋发酵全过程乙醇浓度的检测验证了该方法的准确度和对果醋发酵过程的适应性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

安琪果酒活性干酵母 安琪公司;沪酿 1.01 醋酸杆菌(*Acetobacter pasteurianus*) 本实验室保藏;浓缩苹果汁 无锡市橙汁源果汁厂;标准溶液 1

收稿日期:2011-09-30 *通讯联系人

作者简介:刘志鹏(1986-),男,在读硕士研究生,研究方向:生物工程。

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JUSRP111A25)。

10% (v/v) 乙醇溶液; 标准溶液 2 0.5% ~ 10% (v/v) 乙醇溶液; 饱和 K_2CO_3 溶液 无水 K_2CO_3 115g 溶于 100mL 水中, 用时取上清液; 醋酸菌固体培养基 葡萄糖 10g/L、酵母粉 5g/L、琼脂粉 20g/L、 $CaCO_3$ 20g/L、pH6.5, 121℃ 灭菌 20min 冷却至 70℃ 加入无水乙醇 4%, 摇匀后分装试管摆斜面; 醋酸菌种子培养基 葡萄糖 5g/L、酵母粉 5g/L、磷酸二氢钾 0.5g/L、磷酸二氢钠 0.5g/L、硫酸镁 0.5g/L、调 pH6.5, 121℃ 灭菌 20min; 果醋发酵培养基 果酒发酵出乙醇含量为 6% (v/v) 左右的果酒; 其他试剂 均为分析纯, 市售。

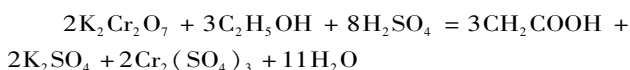
塑料康维皿 外径 90mm, 广东环凯微生物科技有限公司; LDZX-40 II 型立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; 9162MBE 型恒温培养箱 上海博讯实业有限公司; HYL-A 型全温摇床柜 太仓市强乐实验设备厂; V-1100D 型可见分光光度计 上海美谱达有限公司; DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥器 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵方法^[12] 果酒发酵: 浓缩苹果汁稀释至含糖量 120g/L 左右; 活化后的酵母菌以 4% (v/v) 接种量加入果酒发酵培养基中, 于 25℃ 恒温培养 3~4d 至含糖量降至 5g/L 时终止发酵。

果醋发酵: 醋酸菌经斜面 and 种子培养基活化后以 10% (v/v) 接种量加入发酵好的果酒中, 于 30℃, 转速 170r/min 恒温摇床振荡培养 2~3d 至乙醇浓度降至 0.5g/L 为发酵终点。

1.2.2 显色液配比的推导及测定方法 液配比的推导: 设浓度为 1% (v/v) 的乙醇在康维皿中完全挥发并反应完全, 所需 $K_2Cr_2O_7$ 和浓 H_2SO_4 量分别为 X 和 Y, 则根据配平后反应式可算出反应液中两物质的添加量, 保证反应过程中乙醇充分氧化。



$$\begin{array}{ccc} 3 & 3 & 8 \\ \frac{X}{294.18} & \frac{1 \times 0.8}{46.07} & \frac{Y \times 1.84}{98.08} \end{array}$$

$$X = 3.41g/100mL$$

$$Y = 2.47mL/100mL$$

测定方法: a. 配制反应液: 取 $K_2Cr_2O_7$ 3.4g, 加水 80mL, 充分溶解后缓慢加入浓 H_2SO_4 2.5mL, 冷却后定容至 100mL; b. 取康维皿 2 个, 外圈上边缘均匀涂抹一层甘油, 尽量使涂抹的厚度一致; c. 外圈的一侧加入 K_2CO_3 饱和溶液, 另一侧分别加入蒸馏水和待测液, 内圈中加入 2mL $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 溶液, 立即盖好皿盖后轻轻转动康维皿, 使乙醇溶液与饱和 K_2CO_3 溶液充分混合; d. 在 80℃ 恒温箱中准确保温 30min 后, 内圈反应液稀释 4 倍, 以加入蒸馏水的内圈对照液作为空白对照, 在最佳吸收波长下扫描, 见图 1。

1.2.3 吸收波长的扫描选择 将标准溶液 1 作为待测液, 其他方法步骤同 1.2.2, 在波长 530~640nm 范围内进行扫描, 以检测波长为横坐标, 吸光度为纵坐标做图, 取曲线最高点处的波长为检测波长。

1.2.4 绘制乙醇浓度标准曲线 取 8 个康维皿涂抹好甘油后, 各取不同浓度标准溶液 2 加入康维皿外

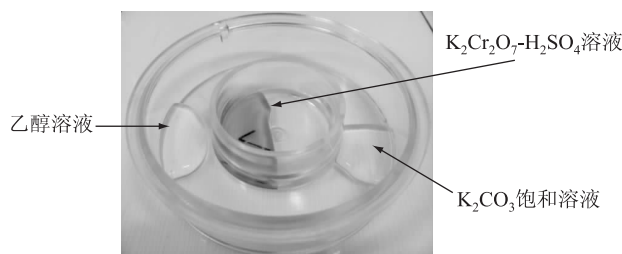


图1 康维皿比色法示例图

Fig.1 Example diagram of KangWei-Utensil

圈, 其他操作方法同 1.2.2, 在波长 580nm 处测定各内圈溶液吸光度, 以吸光度为纵坐标, 乙醇浓度为横坐标绘制标准曲线。

1.2.5 样品乙醇含量测定方法 无需离心、除菌或蒸馏等操作, 直接量取发酵液 0.2mL, 其他方法步骤同 1.2.2, 测定各内圈溶液吸光度, 将读出的吸光度值代入标准曲线, 即得出发酵液中的乙醇含量。

1.2.6 其他分析方法 糖浓度检测: DNS 比色法; 醋酸浓度检测: 酸碱滴定法^[13]。

2 结果与分析

2.1 乙醇反应液最大吸收波长的确定

样品溶液 1 经反应后的内圈溶液置于不同的波长下检测其吸光度, 选取最大吸收峰处波长作为样品检测波长, 实验结果见图 2。

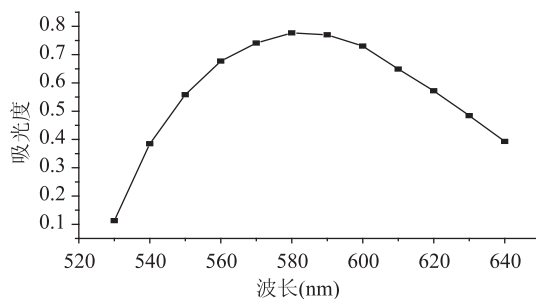


图2 标准样品液 1 的吸收光谱图

Fig.2 The absorption spectrum of sample 1

由图 2 可知, 标准溶液 1 的吸光度 A 在 $\lambda = 580nm$ 处达到最大值, 此时波长偏差对应的吸光度偏差最小, 被测组分的灵敏度最高, 能有效减小实验误差, 故选取该波长作为康维皿法测定乙醇浓度的测量波长。

2.2 乙醇测定标准曲线的绘制

根据配制的乙醇标准溶液 2 检测值拟合出乙醇和 $\lambda = 580nm$ 处吸光度值的标准曲线回归方程, 结果见图 3。

由图 3 可知, 乙醇- OD_{580nm} 标准曲线的回归方程在 0.5% ~ 1% (v/v) 之间呈良好线性, 对曲线作回归分析得相关系数 $R^2 = 0.9995$, 回归方程式 $Y = 0.07389X - 0.00886$, 其中 Y 表示吸光度, X 表示乙醇浓度, 0.00886 表示补偿参数。

2.3 密度及抗其他组分干扰的结果

果醋内含有大量的挥发酸醋酸和少量的糖类、醇类和有机酸等物质, 为确保测定数据的准确性, 设计精密度和干扰实验。在果醋发酵过程前期和后期

表1 康维皿比色法和气相色谱法检测结果

Table 1 Result of KangWei-Utensil and GC

方法	改进康维皿比色法		气相色谱法		原康维皿比色法	
样品	果醋样品 1	果醋样品 2	果醋样品 1	果醋样品 2	果醋样品 1	果醋样品 2
平均乙醇浓度 (% ,v/v)	3.57	1.55	3.57	1.54	3.49	1.69
相对标准偏差 RSD (%)	0.4248	0.7356	0.4603	0.5455	0.7752	0.8927
前处理时间	0				过滤、脱气等操作:10~20min	
检测耗时 (min)	30		40		30	

表2 抗干扰度实验结果

Table 2 Result of anti-interference degrees

干扰项	空白	醋酸	葡萄糖	蔗糖	正丁醇	异丁醇	苹果酸
添加量 (% ,w/w)	-	10	1	1	1	1	1
OD _{580nm}	0.743	0.741	0.744	0.742	0.742	0.744	0.743
乙醇浓度 (% ,v/v)	10.15	10.22	10.23	10.18	10.19	10.24	10.18

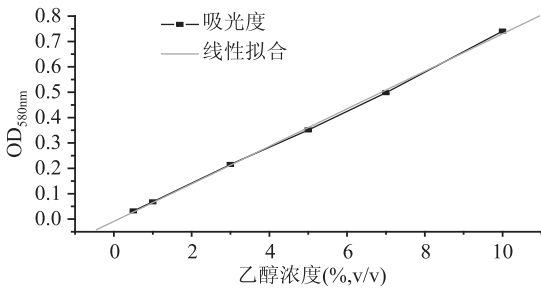


图3 乙醇浓度标准曲线

Fig.3 Standard curve of alcohol

换算关系为 1% (v/v) = 0.8g/dL。

表3 回收率实验结果

Table 3 Result of recovery test

组别	加入标准量 (% ,v/v)	样品乙醇含量 (% ,v/v)	测定值 (% ,v/v)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	5	3.5	8.42	99	100
2	5	3.5	8.53	101	
3	5	3.5	8.45	99	
4	5	3.5	8.48	99	
5	5	3.5	8.51	101	

各取 5 个样,同时采用气相色谱法测定乙醇含量,并将结果与原康维皿比色法检测结果进行分析比对,结果见表 1;在标准溶液 1 中分别加入各类糖、醇类物质,并检测乙醇浓度,将测定结果与空白对照进行对比,结果见表 2。

从表 1 结果可知,原康维皿比色法由于缺少精确的显色液配比和固定的检测限,造成检测结果与实际值偏差较大;改进康维皿比色法测定结果标准偏差较小,对不同发酵样品测定数据可靠。从检测成本角度考虑,康维皿可重复多次使用,并且对样品前处理和仪器要求小,可以短时间大批量检测。

由表 2 结果可知,额外添加醋酸等干扰物质并不影响乙醇含量的测定,与空白对照相比,检测结果波动均在误差范围之内,使用康维皿能够有效避免发酵液中各类糖类、醇类物质对检测结果的影响。

2.4 回收率实验

准确量取无水乙醇 5mL,用果醋样品溶液定容至 100mL,进行回收实验,平行五次,测得结果计算回收率,一般回收率在 95% ~ 105% 之间,结果见表 3。

2.5 果酒及果醋发酵过程乙醇含量的快速检测

通过上述研究,初步建立了一种乙醇快速检测方法,将其应用于果醋检测中,分别对果醋发酵两阶段乙醇含量进行在线即时检测,并同时分别测定糖浓度和产酸强度,以计算生产强度和转化率,从而验证该检测方法对果醋生产适用性。果酒发酵及乙醇生成速率见图 4、图 5,果醋发酵及乙醇消耗速率见图 6、图 7。为便于表示,乙醇浓度均以质量分数表示,

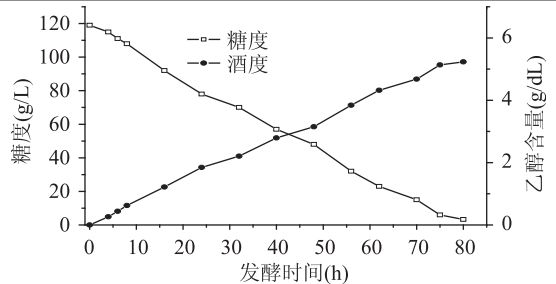


图4 果酒发酵过程

Fig.4 Fermentation process of cider

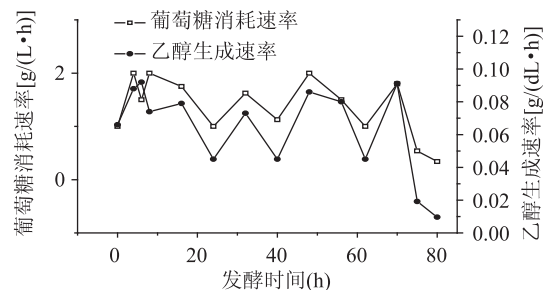


图5 糖消耗率及乙醇生产速率

Fig.5 Spending rate of sugar and production rate of alcohol

由图 4 结果可知,在果酒发酵阶段除发酵前期和后期由于菌体活力不足造成产醇速率较慢,糖度的下降与乙醇浓度的上升趋势相同,发酵 80h 后糖浓度下降至 5g/L 时,接近发酵终点时,生成的乙醇浓度为 5.3g/dL。由图 5 可知,在发酵过程中,单位时间糖的消耗量与乙醇生成量基本相同,转化率维持

在46%左右,终转化率为45.6%。康维皿检测法能够准确反映出果酒发酵过程中的乙醇生成情况,检测结果不受果酒发酵液复杂体系中糖类、醇类物质变化的影响,从而能够有效的指导生产。

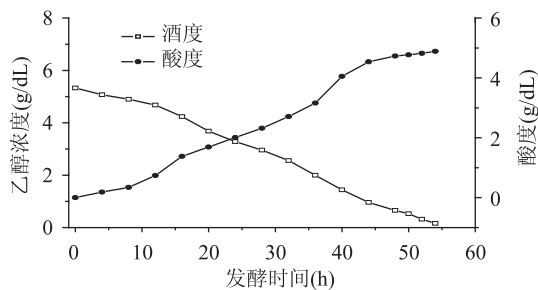


图6 果醋发酵过程

Fig.6 Fermentation process of vinegar

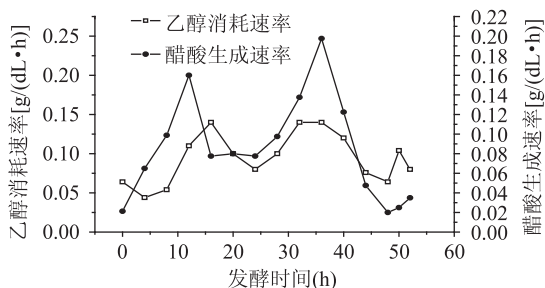


图7 乙醇消耗速率及醋酸生产速率

Fig.7 Spending rate of alcohol and production rate of acetic acid

由图6、图7结果可知,果醋发酵时,每消耗1g/dL乙醇生成的醋酸量约为1g/dL,发酵52h时乙醇浓度降至0.5g/dL以下,此时酸度为4.92g/dL,转化率为98.4%,生产过程中乙醇-醋酸转化率约为98%,与实验值基本相同。此步发酵过程中的乙醇含量亦采用康维皿比色法测定,在更为复杂的果醋发酵液中,数据同样准确可靠,有效地提高了检测效率,能够对果醋发酵整个过程进行即时监测,通过测定发酵过程中残留乙醇含量了解发酵情况,在发生发酵异常等情况时进行合理调整。

3 结论

果醋酿造以乙醇为底物,生产过程中需要跟踪分析醇酸的消长关系,以便优化工艺过程。终产品乙醇含量需要准确测定,是判断发酵是否完全的首要条件。随着国内果醋市场的逐步开发以及果醋饮料标准的出台,专门针对果醋相关发酵参数的检测显得尤为重要,因此建立快速准确的检测方法势在必行^[14-15]。

果醋发酵液是由酸类、醇类、醛类、酯类和酚类物质组成的复杂体系^[16],传统检测方法易受成分波动而造成测定不准。本文对康维皿比色法测定乙醇进行了一定改进,固定了反应液的配制浓度,通过精密度和抗干扰度等实验保证了检测结果精确度。实

验结果表明:采用康维皿作为反应容器,在580nm处测定,乙醇浓度在0.5%~10%(v/v)之间呈良好线性,测定精密度RSD为0.4248%,平均回收率为100%,重现性良好。并通过果酒发酵和果醋发酵实验证明该检测方法的时效性。整个检测过程不需要精密的检测仪器,与传统乙醇检测方法相比,不仅取样量少,减少了检测的工作量,而且不需要过滤蒸馏等前处理操作,受环境影响小,能准确反映出果酒酿造以及醋酸酿造两阶段乙醇含量变化情况,有利于对整个果醋生产过程的监控,为快速测定果醋发酵液残留乙醇含量提供了一种较为方便、准确的方法,随着果醋产业的不断发展,该检测方法将得到更为广泛的应用。

参考文献

- [1]王春霞.新一代健康饮品-果醋[J].食品工业科技,2004(4):78-79.
- [2]Kocher G S, Singh R M, Kalra K L. Preparation of value added vinegar using apple juice [J]. Food Sci Technol, 2007, 44: 226-227.
- [3]郭新光,马佩选.GB/T 15038-2006,葡萄酒果酒通用分析方法[S].中国轻工业联合会:中国标准出版社,2008.
- [4]Lisa Solieri, Paolo Giudici. Vinegars of the world [M]. Italia: Department of Agricultural and Food Sciences, 2009: 198-205.
- [5]陈义伦,裘立群,陈伟,等.原汁苹果醋中的有机酸[J].食品与发酵工业,2004,30(8):92-95.
- [6]Lea A G H. Cider vinegar [J]. Processed Apple Products, 1988(10):279-301.
- [7]牟建楼,张伟.乙醇的测定方法综述[J].酿酒,2006,33(2):46-47.
- [8]柴政强.气相色谱分析法测定丢糟中残留乙醇分[J].酿酒科技,2000(6):102.
- [9]姜燕萍,付海波.快速氧化法测定米醋生产中乙醇含量的研究[J].中国酿造,2009(1):151-152.
- [10]马美范,张印贞.化学氧化法测定白酒中乙醇含量的研究[J].酿酒科技,2007(2):93-94.
- [11]天津轻工业学院.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1992:3-15.
- [12]Jeong Y J, Seo J H, Lee G D, et al. The quality comparison of apple vinegar by two stages fermentation with commercial apple vinegar [J]. Korean Soc Food Sci Nutr, 1999, 28: 353-358.
- [13]上海酿造科学研究所编著.发酵调味品生产技术[M].北京:中国轻工业出版社,1992.
- [14]梁旭华.首个苹果醋饮料国标落地[EB/OL]. 2011-02-23. http://www.ce.cn/life/msty/sszy/201102/23/t20110223_22239083.shtml.
- [15]陈潇博.果醋饮料的规范化生产及市场前景展望[J].中国科技博览,2010(6):177.
- [16]符楨,陈华勇,王永华.菠萝果醋风味成分的GC-MS分析[J].中国酿造,2009(12):118-119.