酱香型白酒发酵过程中异戊醇的控制研究

孙金旭
（衡水学院生命科学系，河北衡水 053000）

摘要：在单因素试验研究基础，对影响酱香型白酒发酵主要杂油醇成分异戊醇的酵母添加量、糖化酶添加量、蛋白酶添加量、曲粮比例进行了优化研究，结果组合 $A_2B_1C_2D_2$ 条件下（即酵母添用量加量 2%，糖化酶用量 2×10^3 U/g，蛋白酶添加量 20 U/g，曲粮比例 1:1。），异戊醇的产量为 0.36×10^{-1} g/L，相对于未添加酵母降低 89.80%，表明此优化条件对降低酱香型白酒发酵异戊醇含量效果明显，几个影响因素中，酵母添加量影响显著。

关键词：异戊醇；杂油醇；气相色谱

文章篇号：1673-9078(2012)11-1541-1544

Methods for Isoamyl Alcohol Control in Wine

SUN Jin-xu
(Department of Biology, Hengshui College, Hengshui 053000, China)

Abstract: On the base of single factors experiments, the orthogonal test design was applied to study the effects of yeast, saccharifying enzyme, protease and the ratio for Daqu and grain on isoamyl alcohol of main hybrid oleyl alcohol in wine. The result of optimal conditions was found as follows: yeast dosage 2%, saccharifying enzyme dosage 2×10^3 U/g, protease dosage 20 U/g, and the ratio of Daqu to grain 1:1. Under these conditions, the content of isoamyl alcohol under the condition was 0.36×10^{-1} g/L and the content of isoamyl alcohol reduced 89.80%. The result indicated that the optimal conditions was effective to reduce the content of isoamyl alcohol in wine and adding yeast had significant effect comparing with others.

Key words: isoamyl alcohol; hybrid oleyl alcohol; GC

中国白酒因其酒色晶莹剔透、香气浓郁、历史悠久而闻名于世，中国白酒根据其口味分为酱香型、浓香型、清香型、米香型和其它香型等，而白酒发酵中，杂油醇为其主要的呈香物质之一，在白酒中必不可少，但当杂油醇含量较高时，不仅会导致低度白酒浑浊/沉淀影响白酒的质量，而且还会导致人体的中毒，因此控制白酒发酵中杂油醇含量势在必行，异戊醇为主要的杂油醇成分，白酒发酵中，控制了异戊醇含量，对控制杂油醇总量意义重大[1~3]。

本文研究了酱香型白酒发酵过程中，酵母添加量、糖化酶添加量、蛋白酶添加量、曲粮比例对异戊醇产生量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

异戊醇（分析纯；购于国家标准物质网）

1.2 仪器

气相色谱仪（Aglient HP6890N 安捷伦公司）；N_2(永腾气体 天津销售有限公司)；氢气发生器（SHC-3 北京华盛普信仪器有限责任公司）；H_2 发生器(北京汇佳精仪工贸有限公司)；气相色谱柱（FFAP 安捷伦公司）。

1.3 方法

1.3.1 异戊醇标准液配制[4]

1.3.1.1 定性分析

分别称取一定量的异戊醇标准品，用 60%乙醇溶解，待溶解后用微孔过滤器过滤处理，气相色谱法定性测定异戊醇及内标物。

1.3.1.2 定量分析

称取一定量的异戊醇标准品，同放入 100 mL 容量瓶中，60%乙醇定容，用移液枪分别移取以上混标样 1、2、4、8、10 mL 于 10 mL 容量瓶中，60%乙醇定容，得到异戊醇各浓度样品，经处理后的不同浓度的异戊醇样品，添加内标物后，分别利用 GC 法测定，测定后以异戊醇标品峰面积和内标物峰面积之比为纵坐标，以各异戊醇含量和内标物含量之比为横坐标，经绘制标准曲线后分别得到异戊醇标品的回归方程及相关系数 R 值，结果如图 1 所示。

1.3.1.3 内标溶液的配置

收稿日期：2012-05-23

作者简介：孙金旭（1975-），男，博士，副教授，主要从事发酵工程、功能性食品的研究

称取一定量的叔戊醇标准品，用 60%乙醇溶解后置于 100 mL 容量瓶中，定容至刻度，测定时，量取内标物 100 μL 添加入待测样品中，使样品中的内标物的浓度达到 17.58×10^{-2} g/L。

1.3.2 气相色谱测定条件

测定条件和升温程序参考文献[5]。

1.3.3 各种酶活力、大曲活力及酵母发酵力的测定

酶活力、大曲活力及酵母发酵力的测定见文献[7]。

表 1 各种酶活力、大曲活力及酵母发酵力的测定

Table 1 The determining for activity of enzyme, the power of yeast fermenting and Daqu

	大曲			干酵母	酶制剂	
项目	发酵力/(U/g)	糖化力/(U/g)	蛋白分解力/(U/g)	发酵力/(U/g)	糖化酶活力/(U/mL)	蛋白酶活力/(U/g)
结果	0.75	103.50	215.28	90.52	1×10^5	4.5×10^4

1.3.4 白酒样品发酵生产工艺[5]

1.3.5 影响异戊醇生成单因素试验

1.3.5.1 酵母添加量单因素试验

曲粮比例 0.1:1，酵母添加量分别为 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3%（酵母与高粱质量比），发酵温度 30 ℃，时间 28 d。结束后，蒸馏后，气相色谱测定异戊醇含量。

1.3.5.2 糖化酶添加量单因素试验

曲粮比例 0.1:1，酵母添加量 2%，糖化酶添加量分别为 0、1、2、3、4、5、6×10^3 U/g，发酵温度 30 ℃，时间 28 d。结束后，蒸馏后，气相色谱测定异戊醇含量。

1.3.5.3 蛋白酶添加量单因素试验

曲粮比例 0.1:1，酵母添加量 2%，糖化酶添加量 3×10^3 U/g，蛋白酶添加量分别为 0、10、20、30、40、50、60 U/g，发酵温度 30 ℃，时间 28 d。结束后，蒸馏后，气相色谱测定异戊醇含量。

1.3.5.4 曲粮比例单因素试验[5]

酵母添加量 2%，糖化酶添加量 3×10^3 U/g，蛋白酶添加量 20 U/g，曲粮比例分别为 0.1:1、0.2:1、0.4:1、0.6:1、0.8:1、1:1、1.2:1，发酵温度 30 ℃，时间 28 d。结束后，蒸馏后，气相色谱测定异戊醇含量。

2 结果与讨论

2.1 酵母添加量对异戊醇产生量的影响

理论上讲，酵母合成细胞蛋白质的副产物为杂油醇，因此，杂油醇的生成量随酵母菌增殖倍数的增大而增大，当酵母添加量少时，酵母菌增殖倍数较大，杂油醇的生成量较大，异戊醇为酱香型白酒中杂油醇的最主要的成分，其含量的变化决定着杂油醇总量的变化。

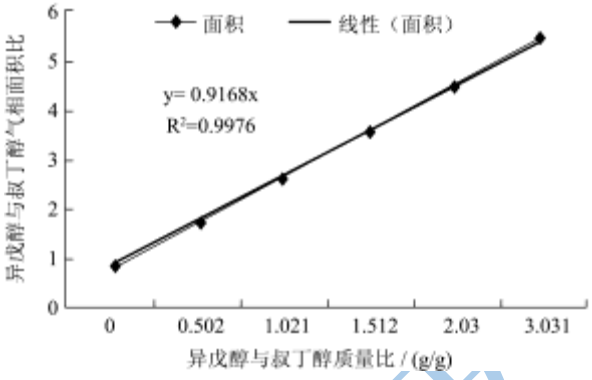


图 1 异戊醇标准曲线

Fig.1 The standard curve of Isoamyl alcohol

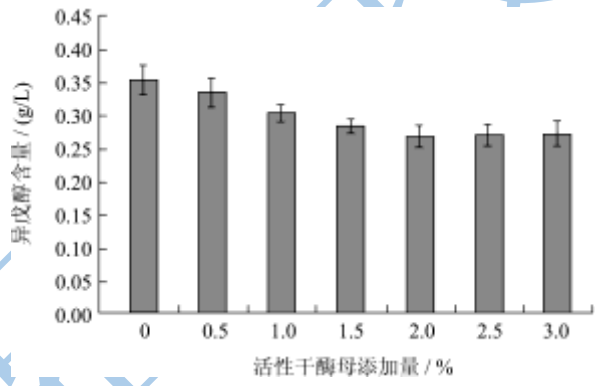


图 2 酵母添加量对异戊醇产生量的影响

Fig.2 Effect of yeast dosage on isoamyl alcohol in wine

如图 2 所示，酱香型白酒发酵过程中，异戊醇的变化趋势为当酵母菌添加量为 0~2%时，异戊醇的生成量随酵母菌添加量的增加而降低，2%的酵母菌添加量时降至最低，产量为 0.27 g/L，和未添加酵母菌相比相对降低 24.66%，之后异戊醇产量随酵母菌添加量的增加而增加，但增幅不大。

2.2 糖化酶添加量对异戊醇产生量的影响

有研究证明，一定添加量范围内，杂油醇的生成量与糖化酶的添加量呈反比，异戊醇为酱香型白酒中杂油醇的最主要物质，其变化趋势如图 3 所示。

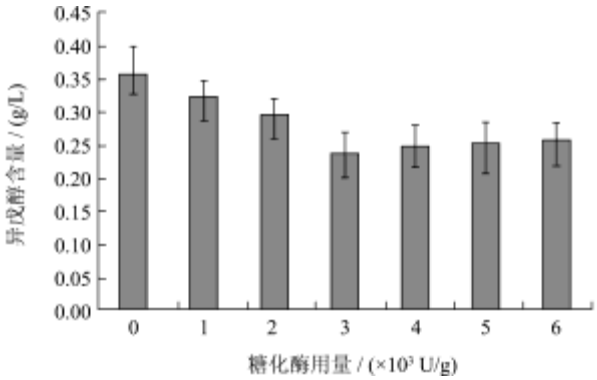


图 3 糖化酶添加量对异戊醇产生量的影响

Fig.3 Effect of saccharifying enzyme dosage on isoamyl alcohol in wine

由图 3 可知，糖化酶添加量在 0~3×10³ U/g 范围内，异戊醇产量随糖化酶添加量的增加而降低，当糖化酶添加量为 3×10³ U/g 时，异戊醇产量最低，和未添加糖化酶相比，相对降低 33.52%，之后随糖化酶添加量的增加，异戊醇含量有逐渐增加的趋势，但增幅不大。

2.3 蛋白酶添加量对异戊醇产生量的影响

酱香型白酒发酵过程中，蛋白酶分解蛋白质为氨基酸，根据杂油醇的生成机制，酒醅中的氨基酸含量高于酵母菌适应值时，有利于杂油醇的生成，蛋白酶添加量较低时，酒醅中氨基酸含量和酵母菌需求量相适应，没有多余的氨基酸参与到杂油醇的生成过程，杂油醇的生成量较低，当酒醅中蛋白酶添加量增加时，分解得到的氨基酸超过酵母菌的需求量，多余的氨基酸参与杂油醇的生成，杂油醇生成量增加。作为酱香型白酒发酵中杂油醇的主要成分异戊醇，其随蛋白酶的变化趋势如图 4 所示。

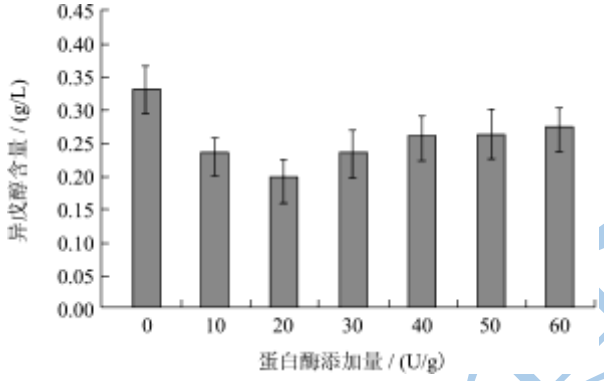


图 4 蛋白酶添加量对异戊醇产生量的影响

Fig.4 Effect of protease dosage on isoamyl alcohol in wine

由图 4 可知，在 0~20 U/g 蛋白酶的范围内，随蛋白酶添加量的增加，异戊醇生成量的增加而降低，当蛋白酶添加量为 20 U/g 时，异戊醇生成量降至最低，相对于未添加蛋白酶降低 40.23%，之后随蛋白酶添加量的增加，异戊醇生成量逐渐增加。

2.4 不通曲粮比例对异戊醇产生量的影响

白酒发酵过程中，杂油醇生成研究机理表明，杂油醇的生成是酵母菌增殖对氨基酸降解或糖合成途径，白酒发酵中，物料中酵母菌、糖含量、氨基酸含量对杂油醇的影响较大，加大白酒发酵中的曲粮比例，发酵力、蛋白酶分解力、糖化力增加，发酵速度增加，曲粮比例增加，相对增加了曲量，用曲量的增加，同时加大了酵母的含量，酵母的增殖倍数减少，糖化力的增加，使得酵母迅速消耗充足的糖分，减少对氨基酸的作用，因此减少了发酵过程中的副产物杂醇油的生成。曲粮比例对酱香型白酒发酵中异戊醇的生成影响如图 5 所示。

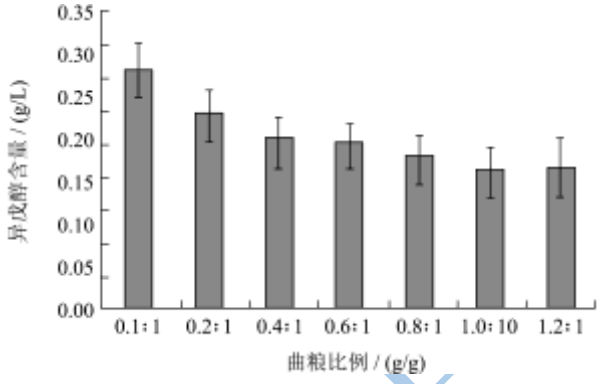


图 5 不同曲粮比例对异戊醇产生量的影响

Fig.5 Effect of Daqu-grain ratio on isoamyl alcohol in wine

由图 5 可知，在 0.1:1 至 1:1 的范围内，异戊醇产生量随用曲量的增加而降低，当曲粮比例为 1:1 时，降至最低，和曲粮比例 0.1:1 相比，相对降低 41.58%，之后随曲粮比例的增加，异戊醇含量有所增加，但增幅不大。

2.5 不同因素对异戊醇产生量的影响优化研究

对降低酱香型白酒发酵中异戊醇含量条件优化正交试验因素水平表、结果与分析如表 2、3、4 所示。

表 2 正交试验设计因素水平表

Table 2 The factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A (酵母添加量/%)	B [糖化酶添加量(10^3U/g)]	C [蛋白酶添加量(U/g)]	D [曲粮比例(g/g)]
1	1.50	2	10	0.8:1
2	2.00	3	20	1:1
3	2.50	4	30	1:1.2

表 3 条件优化正交试验结果与分析

Table 3 The results and analysis of orthogonal test

实验	因素				异戊醇
	A	B	C	D	含量/(g/L)
1	1	1	1	1	0.36
2	1	2	2	2	0.27
3	1	3	3	3	0.28
4	2	1	2	3	0.06
5	2	2	3	1	0.04
6	2	3	1	2	0.07
7	3	1	3	2	0.11
8	3	2	1	3	0.35
9	3	3	2	1	0.33
K_1	0.30	0.18	0.26	0.24	
K_2	0.06	0.22	0.22	0.15	
K_3	0.27	0.23	0.14	0.23	
R	0.24	0.050	0.18	0.09	

表 4 降低异戊醇条件正交试验各因素显著性分析

Table 4 The significant analysis on orthogonal test factors

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
酵母添加量	0.101	2	25.25	19.00	*
糖化酶添加量	0.004	2	1.00	19.00	
蛋白酶添加量	0.021	2	5.25	19.00	
曲粮比例	0.015	2	3.75	19.00	
误差	0.00	2			

由表 2、3、4 可知，影响酱香型白酒发酵中异戊醇生成的影响因素，酵母添加量>蛋白酶添加量>曲量比例>糖化酶添加量，其中酵母添加量对降低酱香型白酒发酵中异戊醇含量影响显著，根据 K 值得出几者的最佳组合为：$A_2B_1C_2D_2$，即酵母添用量加量 2%，糖化酶用量 2×10^3 U/g，蛋白酶添加量 20 U/g，曲粮比例 1:1。

2.6 不同最佳配比对比研究

由正交试验实验组的较好的配比组和经正交试验分析得出最佳配比组和经试验对比，结果如表 5 所示。

表 5 最佳条件对比研究

Table 5 The comparative studies for optimization condition

组合	异戊醇含量/(g/L)
$A_2B_2C_3D_1$	$(0.43\pm0.03)\times10^{-1}$
$A_2B_1C_2D_2$	$(0.36\pm0.03)\times10^{-1}$

由表 5 可知，经正交试验得出的优化组合 $A_2B_1C_2D_2$ 条件下，异戊醇的产量为 0.36×10^{-1} g/L，明显低于 $A_2B_2C_3D_1$ 的 0.43×10^{-1} g/L，表明优化组合条件 $A_2B_1C_2D_2$ 对降低酱香型发酵中异戊醇含量效果明显。

3 结论

异戊醇为酱香型白酒发酵过程中最主要的杂油醇成分，控制异戊醇产生量对控制酱香型白酒发酵中杂油醇含量意义重大，分别对影响异戊醇产生量有影响的单因素酵母添加量、糖化酶添加量、蛋白酶添加量、曲量比例进行了研究，在单因素试验研究的基础上，利用 $L_9(3^4)$正交试验设计对降低酱香型白酒发酵中异戊醇含量条件进行了优化研究，结果，组合 $A_2B_1C_2D_2$ 条件下（即酵母添用量加量 2%，糖化酶用量 2×10^3 U/g，蛋白酶添加量 20 U/g，曲粮比例 1:1。），异戊醇的产量为 0.36×10^{-1} g/L，相对于未添加酵母添加量降低 89.80%，表明此优化条件对降低酱香型白酒发酵异戊醇含量效果明显。

参考文献

[1] 凌东辉,钟春霞,陈若虹,等.白酒中甲醇及杂醇油的毛细管气相色谱测定法[J].职业与健康,2011,21(23):2487-2489

[2] 詹汉林.新型米香型白酒曲种的研制和应用[J].现代食品科技,2009,25(7):813-815

[3] 王传荣,沈洪涛.HACCP 在浓香型白酒酿造中的应用探讨[J].现代食品科技,2009,26(6):639-640

[4] 孙金旭,朱会霞,杨晓红,等.酵母添加量对酱香型白酒中杂油醇影响[J].食品研究与开发,2010,31(12):67-69

[5] 孙金旭,朱会霞.蛋白酶对酱香型白酒中杂油醇含量的影响研究[J].现代食品科技,2012,28(9):1146-1148

[6] 张邦建,李长文,梁慧珍.应用SAS 软件优化分析影响固态发酵白酒杂醇油的生成因素[J].酿酒科技,2011,23(5):46-48

[7] 孙金旭,王立召,李长文.不同加曲量对酱香型白酒中杂油醇影响探讨[J].中国酿造,2009,203(11):105-107