

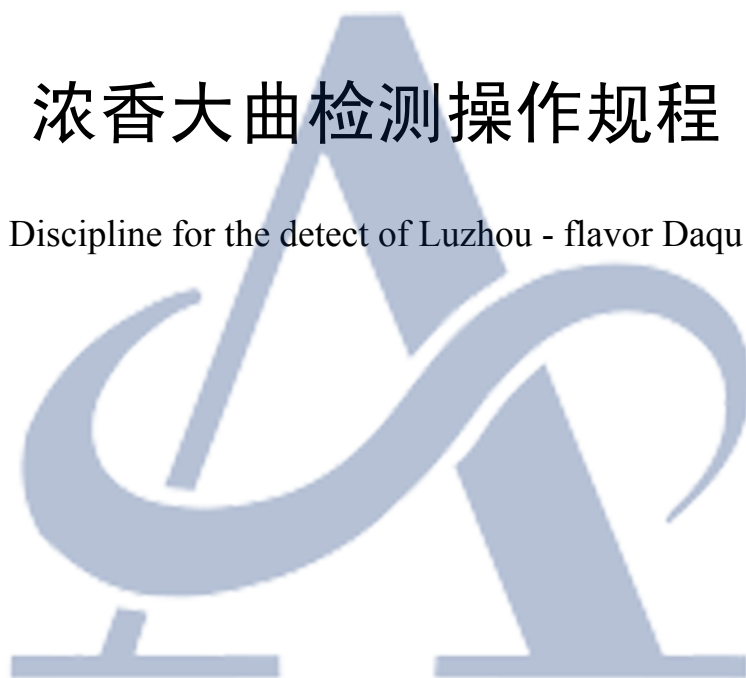
DB34

安 徽 省 地 方 标 准

DB 34/T 3085—2018

浓香大曲检测操作规程

Discipline for the detect of Luzhou - flavor Daqu



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

2018 - 04 - 16 发布

2018 - 05 - 16 实施

安徽省质量技术监督局 发布



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由安徽白酒标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：安徽文王酿酒股份有限公司、安徽国科检验检测有限公司、安徽瑞思威尔科技有限公司、国家农副加工食品质量监督检验中心、天津科技大学。

本标准主要起草人：崔磊、邵栋梁、张居舟、董思文、蒋超、芮友涛、杨恩贺、肖冬光、郭学武、席鲜会、马珂珂、吴再节、冯志成、崔战友、李清晨、常强、高亚利、杨昆鹏。



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

浓香大曲检测操作规程

1 范围

本标准规定了浓香大曲的术语和定义、试剂与仪器、抽样、感官、制样与理化分析操作规程。
本标准适用于浓香大曲产品检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

QB/T 4257 酿酒大曲通用分析方法

QB/T 4259 浓香大曲

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

发酵力单位 liquerying power unit

在 30℃，1 g 曲利用可发酵糖产生二氧化碳的克数，符号为 U，以 (g/g) 表示。

3.2

蛋白酶活力单位 protease activity unit

1 g 干曲，在 40℃，一定 pH 条件下，1 min 水解酪蛋白生成酪氨酸的微克数为 1 个酶活力单位 (U)，以微克每克·分钟 (ug/g·min) 表示。

4 抽样

4.1 抽样方式

以裸露在外的五个点随机抽取。

4.2 抽样数量

抽样数量参照标准 QB/T 4259 浓香大曲中规定执行。

5 感官检验

5.1 外观

在适宜光线(非直射阳光)下,从大曲 6 个面立体观察曲坯表面菌丝的颜色、挂衣、裂缝及光洁度等外表特征,并进行记录。

5.2 断面

将曲块断开,观察界面上菌丝形态、颜色、菌斑、泡气等情况,以及有无青霉、黄曲霉和窝水情况等并进行特征记录。

5.3 曲皮厚

对曲块表层未发酵的生淀粉及菌丝不密集部分的厚度(并非水圈以外的部分)进行观测和记录。

5.4 曲香

嗅闻大曲断面散发出来的香气,分辨是否纯正、有无复合曲香,检查有无氨味、霉味等异杂味等,并进行记录。

6 试剂与仪器

6.1 实验用水

本标准中所用水,在未注明其他要求时,均指符合 GB/T 6682 中三级及以上要求。

6.2 试剂

本标准中所用试剂,在未注明特殊要求时,均指分析纯(AR)。

6.3 分析天平

感量为 0.0001 g。

6.4 电热干燥箱

精度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

6.5 电炉

1000-2000 瓦可调电炉

6.6 分光光度计

756 紫外可见分光光度计

6.7 水浴锅

精度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$

7 理化分析

7.1 制样

将抽取的大曲样品用粉碎机粉碎，过 40 目筛后充分搅拌均匀，置于干燥处备用。

7.2 水分

7.2.1 恒重法

参照 QB/T 4257 的规定执行。

7.2.2 定时恒温烘干法

称取粉碎均匀的大曲试样置于 $130 \pm 2^\circ\text{C}$ 下烘干 40 分钟，根据烘干前后质量之差，计算出所失去的质量分数，即为水分含量。

取洁净称量瓶置于 $135 \pm 2^\circ\text{C}$ 电热干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，加热 30 分钟，取出盖好，置干燥器内冷却 20 min，称量。用烘干的称量瓶称取大曲试样 4 g~5 g，精确至 0.0001 g，置于 $135 \pm 2^\circ\text{C}$ 电热干燥箱中，然后将烘箱温度调至 130°C 烘 40 分钟(烘干时打开瓶盖，侧立于该瓶边)。取出，迅速移入干燥器内(盖上瓶盖)冷却 20 min，称量。

7.2.3 结果计算

水分含量测定见公式 (1)。

$$X_1 = (m_1 - m_2) / (m_1 - m) \times 100 \% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_1 ——试样的水分含量，单位为克每百克 (g/100g)；

m_1 ——烘干前，称量瓶加试样的质量，单位为克 (g)；

m_2 ——烘干后，称量瓶加试样的质量，单位为克 (g)；

m ——恒重称量瓶的质量，单位为克 (g)。

注：计算结果保留至小数点后一位。

7.2.4 精密度

在重复性条件下，获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%。

7.2.5 注意事项

水分应在专用电热干燥箱中烘干，不宜采用电热丝或电热灯进行烘干，以免影响实验准确度。

7.3 酸度

7.3.1 方法摘要

采用酸碱中和，酚酞在碱性环境下显红色，测定大曲试样的酸度。

7.3.2 试剂与仪器

——0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液：按 GB/T 601 配制与标定；

——酸度计：精度 ± 0.02 ；

——烧杯：500 ml、100 ml；

——碱式滴定管：10 ml。

7.3.3 分析步骤

7.3.3.1 样液的制备

称取以绝干计大曲试样 10 g, 精确至 0.01 g, 放入 500 mL 烧杯中, 加无二氧化碳水 200 mL, 用玻璃棒搅拌 0.5 min, 浸泡 30 min(每隔 5 min 搅拌一次)后, 用滤布过滤, 收集滤液, 备用。

7.3.3.2 电位滴定法

参照 QB/T 4257-2012 中 5.3 的规定执行。

7.3.3.3 指示剂法

吸取样液 2.0 mL 于 250 mL 三角烧瓶中, 加无二氧化碳水 50 mL, 摇匀, 以酚酞为指示剂, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定至终点。

记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积 V_1 , 以水作空白, 同样操作进行空白试验, 记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积 V_0 。

7.3.3.4 结果计算

酸度测定见公式 (2)。

$$X = \frac{c \times (V_1 - V_0) \times 200}{2} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X —— 试样的酸度 (以绝干计) 即每 10 克曲消耗 0.1 mol/L 氢氧化钠毫摩尔数, 单位毫摩尔每 10 克 (mmol/10g),

c —— 氢氧化钠标准溶液的浓度, 单位为摩尔每升 (mol/L);

V_1 —— 滴定试样时, 消耗氢氧化钠标准溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_0 —— 空白试验时, 消耗氢氧化钠标准溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

20 —— 取样液进行滴定的体积, 单位为毫升 (mL);

2 —— 取样液进行滴定的体积, 单位为毫升 (mL);

注: 计算结果保留至小数点后一位。

7.3.4 精密度

在重复性条件下, 获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%。

7.4 淀粉含量

7.4.1 方法摘要

淀粉分子在盐酸作用下, 被水解生成还原糖。

利用斐林溶液与还原糖共沸, 生成氧化亚铜沉淀, 用次甲基蓝作指示剂, 以水解后的样液滴定费林溶液, 达到终点时, 稍微过量的还原糖使次甲基蓝的蓝色消失, 以示终点。根据生成的还原糖量折算出淀粉含量。

7.4.2 方法一

按照 QB/T 4257 的规定执行。

7.4.3 方法二

7.4.3.1 试剂与仪器

如下：

- a) 盐酸溶液：量取 200 mL 盐酸，与 800 mL 水混合。
- b) 氢氧化钠溶液：称取 200 g 氢氧化钠，加适量水溶解，待冷却后定容至 1000 mL。
- c) 1 g/L 葡萄糖标准溶液：准确称取预先在 $105\pm 1^\circ\text{C}$ 烘干的无水葡萄糖 1 g（准确 0.0002 g），溶解于水，加 5 mL 浓盐酸，用水定容至 1 L。
- d) 碘液
 - 1) 原碘液：称取碘 11 g、碘化钾 22 g，用少量水研磨溶解，用水定容至 500 mL，贮于棕色瓶中。
 - 2) 稀碘液：吸取 2 mL 原碘液，加碘化钾 20 g，用水定容至 500 mL，贮于棕色瓶中。
- e) 斐林溶液
 - 1) 配制
 - 甲液：称取 15 g 硫酸铜（ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）、0.05 g 亚甲基蓝，溶解于水并稀释至 1 L。
 - 乙液：称取 50 g 酒石酸钾钠、54 g 氢氧化钠、4 g 亚铁氰化钾，溶于水并稀释至 1 L。
 - 2) 标定
 - 预备试验：吸取斐林甲、乙液各 5 mL 于 150 mL 锥形瓶中，加 10 mL 水，摇匀，在电炉上加热至沸腾，在沸腾状态下用制备好的葡萄糖标准溶液滴定，当溶液的蓝色将消失，部分溶液变黄时，判定为终点，记录消耗葡萄糖标准溶液的体积。
 - 正式试验：吸取斐林甲、乙液各 5 mL 于 150 mL 锥形瓶中，加 10 mL 水和比预备试验少 1 mL 的葡萄糖标准溶液，摇匀，在电炉上加热至沸腾，在沸腾状态下于 1 min 内以 2 s 一滴的速度用葡萄糖标准溶液滴定至终点，记录消耗葡萄糖标准溶液的总积 V_0 。
- f) 酸碱滴定管：量程 50 mL，精确度 0.01 mL。

7.4.3.2 试样溶液的制备

曲粉原滤液：称取曲粉 2 g，精确至 0.001 g，放 250 mL 锥形瓶中，加入 100 mL 盐酸溶液，装上回流冷凝管，加热煮沸 2 h，取下立即冷却，用稀碘液检查水解是否完全，若未完全水解，则延长反应时间直至完全水解，完全水解后，用氢氧化钠溶液中和至微酸性，将全部滤液和残渣用水过滤并定容至 1000 mL。

7.4.3.3 滴定

如下：

- a) 预备试验：吸取斐林甲、乙液各 5 mL 于 150 mL 锥形瓶中，摇匀，加 10 mL 水，用滴定管加入样液 5 mL，摇匀后，置于电炉上加热至沸腾，用葡萄糖滴定直至溶液出现黄色为终点，记录消耗试样溶液的体积。
- b) 正式试验：吸取斐林甲、乙液各 5.0 mL 于 150 mL 锥形瓶中，摇匀，加 10 mL 水以及 5 mL 样液，再用滴定管加入比预备试验少 1 mL 的葡萄糖，摇匀，在沸腾状态下于 1 min 内以 2 s 一滴的速度继续用葡萄糖滴定，直至黄色出现为终点，记录消耗样液的总体积 V 。

7.4.3.4 结果计算

淀粉含量测定见公式（3）。

<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

$$X = (V_0 - V) \times c \times \frac{1}{5} \times 1000 \times \frac{1}{m} \times 0.9 \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中：
X —— 试样的淀粉含量，单位为克每百克（g/100g）
V₀ —— 标定斐林液消耗葡萄糖标准溶液的体积，单位为毫升（mL）；
V —— 加试样正式滴定时斐林液消耗葡萄糖标准溶液的体积，单位为毫升（mL）；
c —— 葡萄糖标准溶液浓度，单位为克每毫升（g/mL）；
5 —— 滴定时加入稀释试样体积，单位为毫升（mL）；
1000 —— 稀释试样总体积，单位为毫升（mL）；
0.9 —— 还原糖换算成淀粉的系数；
m —— 大曲质量，单位为克（g）。

7.4.3.5 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

7.4.3.6 注意事项

氢氧化钠溶液中和盐酸溶液时，溶液 pH 尽量维持在 7.0 左右。
实验要有平行组，以保障结果准确性。

7.5 液化力

按 QB/T 4257 的规定执行。

7.6 发酵力测定

7.6.1 方法摘要

大曲是糖化发酵剂。
其中的酵母能使酒醅中还原糖发酵，生成酒精和二氧化碳，所以可使用在一定条件下制备的糖化液为培养基，测定发酵过程中生成的二氧化碳的量，来衡量大曲的发酵力。

7.6.2 方法一

按照 QB/T 4257 的规定执行。

7.6.3 方法二

7.6.3.1 试剂与仪器

如下：
——发酵瓶：250 mL 三角瓶，带发酵栓；
——培养箱：精度 ±1℃；
——2.5 mol/L 硫酸溶液：取 28 mL 浓硫酸，边搅拌边缓慢加入 100 mL 水中，最后用水稀释至 200 mL。

7.6.3.2 糖化液的制备

称取高粱 200 g，加水 1000 mL，混匀加液化酶（5 u/g 原料），90℃水浴锅中水浴 1 h，再在灭菌锅中 121℃ 15 min 蒸煮，取出后冷却至 60℃，加糖化酶（50 u/g 原料），糖化 3~4 h，用稀碘液试之不显蓝色，过滤后加水至糖度为 7°Bé。

将上述糖化液分别取 150 mL 于 250 mL 发酵瓶中，塞上棉塞并包上牛皮纸，记录液面高度。同时用牛皮纸包好发酵栓，一起放入灭菌锅中灭菌 15 min。

7.6.3.3 发酵力的测定

灭菌后的糖液冷却到 28℃左右，在无菌条件下，加入曲粉 1 g，空白实验不加入曲粉。发酵栓中加入 10 mL 2.5 mol/L 硫酸溶液，用凡士林密封发酵瓶，擦干瓶外壁，在感量为 0.0001 的分析天平上称重，然后放入 30℃保温箱中发酵。期间每隔 24 h 取出摇晃排出气体，称重，直至发酵瓶恒重发酵结束。

发酵力为每 1 克曲发酵完全后产生二氧化碳的克数(gCO₂/g 曲)。

7.6.3.4 结果计算

液化力测定见公式（4）。

发酵力 $X = (m_1 - m_2) - (m_3 - m_4) \dots\dots\dots (4)$

- 式中：
- X —— 发酵力，单位为克每克（g/g）；
 - m₂ —— 试验组发酵前发酵瓶总质量，单位为克（g）；
 - m₁ —— 试验组发酵后发酵瓶总质量，单位为克（g）；
 - m₄ —— 空白组发酵前发酵瓶总质量，单位为克（g）；
 - m₃ —— 空白组发酵后发酵瓶总质量，单位为克（g）。

7.6.3.5 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

7.6.3.6 注意事项

- 如下：
- a) 糖化液浓度要严格控制为 7°Bé；
 - b) 发酵温度、时间要准确；
 - c) 准备实验的环境温度与发酵温度的温差不宜过大，以免造成硫酸溶液倒吸现象，影响发酵；
 - d) 因使用大曲量较少，尽量使用粉末状大曲。

7.7 糖化力

7.7.1 方法摘要

大曲中的糖化型淀粉酶能将淀粉水解生成葡萄糖。
试样在规定条件下从淀粉的非还原性末端开始依次水解 α-1, 4糖苷键产生葡萄糖，用费林法测定所生成的葡萄糖量，以此来表示糖化力。

7.7.2 方法一

糖化力小于 800 的按照 QB/T 4257 的规定执行。

7.7.3 方法二

7.7.3.1 试剂与仪器

如下:

- a) 恒温水浴锅: 精度 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。
- b) 甲液: 称取 69.28 g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 用水溶解并稀释至 1000 mL;
- c) 乙液: 称取 346 g 酒石酸钾钠, 100 g 氢氧化钠, 用水溶解并稀释至 1000 mL, 摇匀, 过滤备用。
- d) 乙酸-乙酸钠缓冲溶液($\text{pH}=4.6$): 称取 164 g 无水乙酸钠(CH_3COONa), 溶解于水, 加 114 mL 冰乙酸, 用水稀释至 1000 mL。缓冲溶液的 pH 应以酸度计校正。
- e) 可溶性淀粉溶液(30 g/L): 称取 $100^{\circ}\text{C} \sim 105^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h 的可溶性淀粉 3.0 g, 精确至 0.001 g, 用水调成糊状, 不断搅拌注入 70 mL 沸水, 搅拌煮沸 2 min 直至完全透明, 冷却至室温, 完全转移至 100 mL 容量瓶中并定容。此溶液现配现用。
- f) 葡萄糖标准溶液(2.5 g/L): 称取经 $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重的无水葡萄糖 2.5 g, 精确至 0.0001 g, 用水溶解, 再加 2 mL 浓盐酸, 定容至 1000 mL。
- g) 氢氧化钠溶液(质量分数为 20%)。

7.7.3.2 大曲样液的制备

根据测得大曲试样的水分, 称取相当于绝干试样量 5 g, 精确至 0.001 g, 放入 250 mL 烧杯中, 加 20 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液, 再加水 $(180-5 \times \text{水分})$ mL, 用玻璃棒搅拌均匀。

将上述烧杯置于 35°C 恒温水浴中保温浸渍 1 h, 过滤, 收集滤液, 备用。

7.7.3.3 测定

空白: 于试管内加入 25.0 mL 可溶性淀粉溶液, 再加 5.0 mL 大曲样液, 摇匀, 加入 20%NaOH 溶液 1 mL 后, 吸取 5.0 mL 作为空白溶液, 用葡萄糖标准溶液滴定, 记录其消耗体积 V_1 。

预备试验: 于另一试管内加入 25.0 mL 可溶性淀粉溶液, 再加 5.0 mL 大曲样液, 摇匀, 置于 35°C 恒温水浴中, 准确计时, 糖化 1 h, 加入 20%NaOH 溶液 1 mL 后, 吸取糖化液 5.0 mL 于盛有费林溶液甲、乙液各 5.0 mL 的锥形瓶中, 加水 10 mL, 用葡萄糖标准溶液滴定, 记录消耗体积。

正式滴定: 吸取费林甲、乙液各 5.0 mL 于 150 mL 锥形瓶中, 摇匀, 加 10 mL 水, 糖化液 5 mL, 再用滴定管加入比预备试验少 1 mL 的葡萄糖, 摇匀, 在沸腾状态下于 1 min 内以 2 s 一滴的速度继续用葡萄糖滴定, 直终点, 记录消耗样液的总体积 V_2 。

7.7.3.4 结果计算

糖化力测定见公式 (5)。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times 2.5 \times 30}{0.125 \times 5} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

- X —— 试样的糖化力, 单位为毫克每克·小时 ($\text{mg/g} \cdot \text{h}$);
- V_1 —— 滴定空白时, 消耗葡萄糖标准溶液的体积, 单位为毫升 (mL);
- V_2 —— 滴定试样时, 消耗葡萄糖标准溶液的体积, 单位为毫升 (mL);
- 2.5 —— 每毫升葡萄糖标准溶液中含有葡萄糖的质量, 单位为毫克 (mg);
- 30 —— 糖化混合液(可溶性淀粉溶液加大曲样液)的总体积, 单位为毫升 (mL);

0.125 —— 5 mL 大曲样液相当大曲的质量, 单位为克(g);

5 —— 滴定时吸取的糖化液体积, 单位为毫升(mL)。

注1: 计算结果保留至整数。

注2: 若样品糖化力过高, 则适当提高淀粉浓度, 同时降低大曲浸泡液浓度。

7.7.3.5 精密度

在重复性条件下, 获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

7.8 酯化力

7.8.1 方法摘要

酯化酶是脂肪酶和酯酶的统称, 它与短碳链香脂的生物合成有关。

白酒香味是以酯香为主的复合体, 白酒酿造过程中酯化酶的作用是使一个酸元和一个醇元结合、脱水而生成酯。

酯化是可逆反应, 酯酶既能产酯, 也能使酯分解。特别在不适宜的酯化条件下(如温度、pH、空气量等), 会将已生成的酯迅速分解。因而要选育产酯能力强, 酯分解能力相对较弱的菌株, 才能使白酒中留存较多的酯类。

酯化力是以 1 g 干曲在 35℃反应 100 h 所产生的己酸乙酯的毫克(mg)数表示。

7.8.2 仪器与试剂

如下:

- a) 微量滴定管;
- b) 玻璃蒸馏器: 1000 mL;
- c) 安捷伦气相色谱仪。
- d) 己酸(分析纯)。
- e) 无水乙醇。
- f) 乙醇溶液(体积分数为 30%): 量取 300 mL 无水乙醇于 1000 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。
- g) 氢氧化钠标准溶液(0.1 mol/L): 按 GB/T 601 配制与标定。
- h) 硫酸标准滴定溶液 $[c(\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4)=0.1\text{mol/L}]$: 按 GB/T 601 配制与标定。

7.8.3 测定步骤

7.8.3.1 酯化样品的制备

吸取 1 mL 己酸于 250 mL 锥形瓶中, 加 25 mL 无水乙醇, 稍微振荡后, 加入 75 mL 蒸馏水, 充分混匀。再称取相当于绝干试样量 15 g, 精确至 0.01 g, 加到锥形瓶中, 摇匀后, 塞上塞子, 35℃恒温箱内保温酯化 7 d, 同时做空白试验。

7.8.3.2 蒸馏

将酯化 7 d 后的试样溶液全部移入 250 mL 蒸馏瓶中, 量取 50 mL 乙醇溶液分数次充分洗涤锥形瓶, 洗液也一并倒入蒸馏烧瓶中, 用 50 mL 容量瓶接收馏出液(外用冰水浴), 缓缓加热蒸馏, 当收集馏出液接近刻线时, 取下容量瓶, 调液温 20℃, 用水定容, 混匀, 备用。

7.8.3.3 皂化、滴定

<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用, 请勿传播或其他用途

将上述馏出液倒入 250 mL 具塞锥形瓶中，加两滴酚酞，以氢氧化钠标准溶液中和(切勿过量)，记录消耗氢氧化钠标准溶液的体积。再准确加入 25.0 mL 氢氧化钠标准溶液，摇匀，装上冷凝管，于沸水浴上回流 0.5 h，取下，冷却至室温。然后，用硫酸标准溶液进行反滴定，微红色刚好消失为其终点，记录消耗硫酸标准溶液的体积 V_1 。

注：滴定后，可将酒样过滤处理后，经气相色谱仪分析。滴定总酸总酯，结合气相的单项酯和酸分析，使实验结果更加准确。

7.8.4 结果计算

a) 试样总酯含量(以己酸乙酯计)计，见公式(7)。

$$A_1 = \frac{(c \times 25 - c_1 \times V_1)}{50} \times 0.144 \times 1000 \dots\dots\dots (6)$$

式中：

$$A = A_1 - A_0 \dots\dots\dots (7)$$

式中：

- A_1 —— 测定总酯含量(以己酸乙酯计)，单位为克每升(g/L)；
- c —— 氢氧化钠标准溶液的浓度，单位为摩尔每升(mol/L)；
- 25.0 —— 皂化时，加入 0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液的体积，单位为毫升(mL)；
- c_1 —— 硫酸标准滴定溶液的浓度，单位为摩尔每升(mol/L)；
- V_1 —— 滴定时，消耗 0.1 mol / L 硫酸标准溶液的体积，单位为毫升(mL)；
- 0.144 —— 与 1 mL 氢氧化钠标准溶液 [$c(\text{NaOH})=1.000 \text{ mol/L}$] 相当的以克表示的己酸乙酯的质量；
- 25 —— 样品体积，单位为毫升(mL)；
- A —— 试样总酯含量(以己酸乙酯计)，单位为克每升(g/L)；
- A_1 —— 未扣除空白试样所测总酯含量(以己酸乙酯计)，单位为克每升(g/L)；
- A_0 —— 空白试验所测总酯含量(以己酸乙酯计)，单位为克每升(g/L)。

b) 试样的酯化力按公式(8)计算。

$$X = A \times 50 \times \frac{10}{3} \dots\dots\dots (8)$$

式中：

- X —— 试样的酯化力(以己酸乙酯计)，单位为 U；
- A —— 馏出液的总酯，单位为克每升(g/L)；
- 50 —— 取样体积，单位为毫升(mL)；
- $\frac{10}{3}$ —— 大曲重量转化系数。

注：计算结果保留至整数。

7.8.5 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

7.8.6 注意事项

如下:

- a) 酯化温度与时间对结果影响较大,应严格控制。
- b) 酯化液倒入蒸馏瓶时,应避免抛洒,三角瓶应用 30%乙醇充分洗涤。
- c) 蒸馏时,尽量不用旋蒸仪等仪器,以免造成酒中易挥发物质的损失。
- d) 蒸馏时出现焦糊现象,可加入适量蒸馏水。

7.9 容重

按照 QB/T 4257 的规定执行。

7.10 酸性蛋白酶活力

7.10.1 方法摘要

在测定蛋白酶活力时,以酪蛋白为底物,蛋白酶将酪蛋白水解,生成含酚基的酪氨酸,在酸性条件下使福林-酚试剂还原产生蓝色(钼蓝和钨蓝的混合物),用分光光度计测定即 1 g 干曲,在 40℃,一定 pH 条件下,1 min 水解酪蛋白生成酪氨酸的微克数单位(U/g)。

7.10.2 试剂与仪器

如下:

- a) 标准比色管: 25 mL, ± 0.2 mL
- b) 分光光度计: 可见光分光光度计
- c) 水浴锅: $\pm 2^\circ\text{C}$
- d) 福林-酚试剂
- e) 0.4 mol/L 碳酸钠溶液: 取 42.4 g 碳酸钠,溶于水并稀释至 1 L。
- f) 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液: 取 65.5 g 三氯乙酸,溶于水并稀释至 1 L。
- g) 10 g/L 酪蛋白溶液: 取 1 g 酪蛋白(准确至 0.001 g)于 100 mL 容量瓶中,先加入约 0.5 mL 乳酸再加入 pH=3.0 的乳酸缓冲液,沸水浴中加热溶解,冷却后,用 0.1 mol/L 的盐酸溶液或 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液调至 pH=3.0,最后用乳酸缓冲液稀释定容至 100 mL,储存于冰箱中备用,有效期 3 d。
- h) 标准 L-酪氨酸溶液: 准确称取 105℃干燥过的 L-酪氨酸 0.1000 g,加 60 mL 1 mol/L 盐酸溶液,在水浴中加热溶解,用水定容至 100 mL,浓度为 1 mg/mL。再用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释 10 倍,即为 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液。
- i) 乳酸-乳酸钠溶液 (pH=3.0)
 - 1) a 液: 取 80%~90%的乳酸 10.6 g,用水稀释至 1 L;
 - 2) b 液: 取纯度为 70%的乳酸钠 16 g,用水溶解,并稀释至 1 L。

吸取上述 a 液 8 mL, b 液 1 mL,混匀并用水稀释 1 倍,即为 0.05 mol/L 乳酸-乳酸钠溶液。

注: 缓冲液配置好后,均用 pH 计校正。

7.10.3 测定步骤

如下:

- a) 标准曲线的绘制: 取 8 支 25 mL 试管,分别吸取 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准酪氨酸溶液 0、1、2、3、4、5、6、7 mL,分别补水至 10 mL。
- 吸取稀释后的标准液各 1 mL,分别放在另外 8 支试管中,加入 5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液和 1 mL 福林-酚试剂。在 40℃水浴中加热 20 min 显色,在 680 nm 波长下,1 cm 比色皿,以

不含酪氨酸的“0”试管为空白，测定吸光度，绘制浓度为吸光度的标准曲线。在曲线上查的吸光度为 1 时对应酪氨酸的微克数，即为吸光常数 k 值，该 k 值应为 95~100 范围内，可作为常数用于试样计算。但若更换仪器或新配置显色剂，则应重测 k 值。

- b) 5%酶浸出液（酸性酶）取相当于绝干曲 10 g 的试样（准确至 0.01 g），加 200 mL pH=3.0 的乳酸缓冲液，在 40℃水浴中浸出 30 min。根据酶活力高低，必要时可再用缓冲液稀释一定倍数，使吸光度的测定值在 0.2~0.4 范围内。用干滤纸过滤，得到酶浸出液。

试样测定

——吸取酶浸出液 1 mL，注入 10 mL 离心管中（一式三份），在 40℃水浴中预热 5 min，准确加入 10 g/L 酪蛋白溶液 1 mL，计时，准确保温 10 min，立刻加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液，以沉淀多余蛋白质，终止酶解反应。15 min 后离心分离，吸取上层清液 1 mL 注入试管中，加入 5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液和 1 mL 福林-酚试剂，摇匀，在 40℃水浴中加热显色 20 min。

空白试验

——与试样测定同时进行，离心管中先后注入酶浸出液 1 mL，三氯乙酸 2 mL，10 g/L 酪蛋白 1 mL。15 min 后离心分离或过滤，以下的操作均与试样测定相同。

以空白液为对照，在 680 nm 波长下，1 cm 比色皿测定式样的吸光度。

7.10.4 结果计算

蛋白酶活力计算见公式（9）。

$$X = K \times A \times 4 \times 200 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{m} \dots\dots\dots (9)$$

式中：

X —— 蛋白酶活力，单位为微克每分钟（ug/min）

K —— 吸光度为1时相当于酪氨酸微克数（吸光常数）；

A —— 式样吸光度；

m —— 干曲质量，单位为克（g）；

200 —— 酶浸出液总体积，单位为毫升（mL）；

4 —— 酶反应液总体积，单位为毫升（mL）；

10 —— 反应时间，单位为分钟（min）。

7.10.5 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

7.10.6 注意事项

如下：

- a) 标准曲线线性关系 R^2 应 ≥ 0.99 ，否则应重新制作。缓冲液重新配置使用以及更换分光光度计时，需重新制作标曲。
- b) 各步骤所加溶液应严格控制在规定时间内，且溶液添加量也要准确。