

# 混菌发酵及曲面响应法优化苹果醋发酵工艺

张霁红<sup>1</sup>, 张永茂<sup>1</sup>, 韩舜愈<sup>2</sup>, 李新明<sup>1</sup>, 曾朝珍<sup>1</sup>

(1. 甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以酒精和总酯含量为考察指标, 筛选发酵性能较好的混合酵母菌组合。通过 Plackett-Burman(PB)设计对苹果汁酒精发酵相关影响因素的效应进行评价, 并筛选出有显著效应的3个主要因素, 用 Box-Behnken 设计及响应面分析方法确定主要影响因素的最佳条件为: 发酵温度 28.12 °C、接种量 8.20 %、种龄 14.45 h, 酒精含量可达 6.34 %。在此工艺基础上进行醋酸发酵, 醋酸含量为 54.9 g/L。

**关键词:** 混合酵母; Plackett-Burman 设计; 响应面; 苹果醋; 发酵工艺

**中图分类号:** TS261.1; TQ920; Q93-3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-9286(2011)06-0038-04

## Optimization of the Fermentation of Cider Vinegar by Mixed Yeast Fermentation and Response Surface Method

ZHANG Jihong<sup>1</sup>, ZHANG Yongmao<sup>1</sup>, HAN Shunyu<sup>1</sup>, LI Xinming<sup>1</sup> and Zeng Chaozhen<sup>1</sup>

(1. Agricultural Product Storage and Processing Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070;

2. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** Mixed yeasts combination with good fermentation performance was determined by using alcohol content and total esters content as examining indexes. Then a Plackett-Burman design was used to evaluate the related factors influencing the fermentation of cider and three main influencing factors were finally screened out. Then Box-Behnken design and response surface analysis were used to determine the optimum conditions of the three main influencing factors as follows: fermentation temperature was at 28.12 °C, inoculating quantity was 8.2 %, and inoculating seeds age was 14.45 h, as a result, alcohol content could reach 6.34 %. Based on the above conditions, acetic fermentation was carried out and acetic content could reach 54.9 g/L.

**Key words:** mixed yeast; Plackett-Burman design; response surface analysis; apple vinegar; fermentation technology

苹果醋是以苹果为主要原料, 经酒精发酵和醋酸发酵制成的具有酯香和果香的醋。优良的菌种和工艺是影响果醋品质的关键因素, 其中酒精发酵对果醋的品质及原料转化有着重要意义。目前, 苹果醋生产的菌种和工艺方面研究较多, 但菌种大都是单一的酿酒酵母和食醋菌种, 工艺也多见于正交实验研究。汪立平等研究了采用混菌发酵提高苹果酒的发酵效率和总酯含量<sup>[1]</sup>, 董书阁等人也做了醋酸菌的双菌共酵研究, 结果表明, 此法可提高苹果醋的风味和营养<sup>[2]</sup>。但是同时采用混菌发酵及曲面响应法优化发酵工艺的研究未见报道。本实验以苹果汁为原料, 在引进酿酒酵母的基础上, 采用单菌株及混合菌株发酵方法, 筛选出发酵性能较好的混合菌株, 并对影响酒精发酵条件的因素进行 Plackett-Burman 试验设计、Box-Behnken 设计及响应面法分析<sup>[3-4]</sup>, 在优化的工艺条

件下进行醋酸发酵, 旨在为苹果醋的生产提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

菌种: 酵母菌 1383、1023、1751; 醋酸菌 20064 购于工业微生物菌种保藏中心。

酵母菌种子培养基: 灭菌后的苹果汁; 发酵培养基: 调配后的苹果汁; 醋酸菌发酵培养基: 酒精含量 5.0 %~6.5 %的发酵苹果汁。

DH360AS 电热恒温培养箱: 北京科伟永兴仪器有限公司; YB280B 手提式不锈钢蒸汽消毒器: 上海三申医疗器械有限公司; YJ-875 超净工作台: 苏州净化设备厂; SHZ-B 水浴恒温振荡器; PHS-3CPH 酸度计: 上海雷磁仪器厂。

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项资金资助。

收稿日期: 2011-04-22

作者简介 张霁红(1977-), 女, 陕西周至人, 在读硕士研究生, 助理研究员, 主要从事果蔬加工研究工作。

通讯作者 张永茂。

优先数字出版时间 2011-05-24, 地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110524.1521.001.html?uid=>。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 酒精发酵

按6%的接种量移取种子培养液于发酵培养基中,通氧发酵48 h,然后密闭发酵7 d后,测酒精含量。

### 1.2.2 醋酸发酵

在前期酒精发酵的基础上接入10%的已活化的醋酸菌种子液于32℃、200 r/min,培养5 d,测总酸含量。

### 1.2.3 酵母菌发酵力测试

采用CO<sub>2</sub>失重法<sup>[5]</sup>。

取500 mL三角瓶,加入150 mL苹果汁(糖度13°Brix),按6%的接种量接入单菌株1383、1023、1751及混合菌株8323、2351、8351、238351共7个组合的酵母种子液,重复3次,在25℃下发酵,测失重量。

## 1.3 检测方法

酒精度测定:蒸馏瓶法;总酯测定:皂化法;总酸测定:酸碱滴定法<sup>[6]</sup>。

## 1.4 数理统计方法

### 1.4.1 Plackett-Burman(PB)设计<sup>[7]</sup>

对影响酒精发酵的7因素进行Plackett-Burman实验分析,从中快速有效地筛选出最为重要的因素。

### 1.4.2 Box-Behnken 实验设计<sup>[8]</sup>

采用中心组合设计(central composite design,CCD),对PB实验筛选到的关键因子进一步研究,以获得混菌发酵酒精的优化条件。

实验设计与结果分析统计软件应用 Design-Expert 7.1 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母菌株发酵力测定

以150 mL发酵苹果汁的CO<sub>2</sub>失重量为纵坐标,发酵时间为横坐标,绘制发酵速率曲线图,结果见图1。

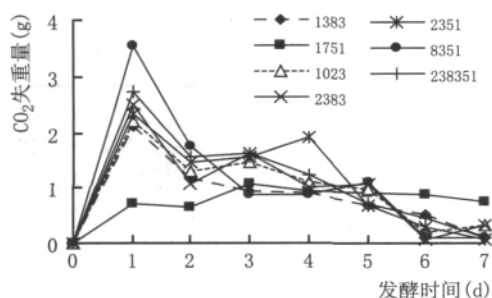


图1 不同酵母菌发酵速率曲线图

由图1可看出,3株酿酒酵母及其4个混菌发酵组合,发酵速率的趋势为:前24 h上升,随后逐渐下降,6 d后降至最低,之后变化不大。其中,8351的发酵力最强,明显高于其他菌株及组合,发酵过程也比较平稳,发酵峰

值高,发酵周期短,稳定期较长。

### 2.2 影响酒精发酵关键因子的确定

以8351为发酵菌株进行苹果醋酒精发酵工艺的优化,根据有关参考文献和单因素试验结果<sup>[9]</sup>,设计Plackett-Burman实验因素及水平(见表1)。Plackett-Burman实验设计矩阵见表2。每组实验设置平行3个,以酒精含量(%)的平均值为响应值Y,结果见表2。对表2进行统计分析,结果见表3。

表1 Plackett-Burman实验因素及水平

| 编号 | 因素                       | 水平  |     |
|----|--------------------------|-----|-----|
|    |                          | -1  | +1  |
| X1 | SO <sub>2</sub> 含量(mg/L) | 100 | 125 |
| X2 | pH                       | 3.5 | 5.5 |
| X3 | 温度(℃)                    | 24  | 30  |
| X4 | 虚拟条件                     |     |     |
| X5 | 接种量(%)                   | 6   | 12  |
| X6 | 种龄(h)                    | 10  | 15  |
| X7 | 发酵时间(d)                  | 5   | 8   |
| X8 | 通氧时间(h)                  | 10  | 48  |

表2 N=12的Plackett-Burman实验设计与结果

| 序号 | X1 | X2 | X3 | X4 | X5 | X6 | X7 | X8 | Y(%) |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 4.9  |
| 2  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 4.1  |
| 3  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 5.7  |
| 4  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | 4.7  |
| 5  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 4.1  |
| 6  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | 6.1  |
| 7  | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | -1 | 5.2  |
| 8  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | 1  | 1  | 5.4  |
| 9  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 5.1  |
| 10 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | -1 | 4.6  |
| 11 | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 4.7  |
| 12 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 4.1  |

表3 方差分析

| 参数 | F值     | Prob>F | 重要性顺序 |
|----|--------|--------|-------|
| X1 | 20.16  | 0.0206 |       |
| X2 | 8.44   | 0.0622 |       |
| X3 | 195.98 | 0.0008 | 1     |
| X4 | 虚拟条件   |        |       |
| X5 | 75.98  | 0.0032 | 2     |
| X6 | 30.77  | 0.0116 | 3     |
| X7 | 5.65   | 0.0979 |       |
| X8 | 25.19  | 0.0152 |       |
| 回归 | 47.23  | 0.0045 |       |

由表1、表2和表3结果可知,“Prob>F”小于0.05,表明因素是重要的。“Model Prob>F”等于0.0045,表明模型是重要的。因此,发酵温度、接种量和种龄对酒精发酵有重要的影响。

### 2.3 关键因子对酒精产量的影响

#### 2.3.1 酒精产量多元二次模型方程的建立

根据以上 PB 试验结果,对确定出的影响酒精发酵工艺的 3 个显著因素进行 Box-Behnken 试验设计(见表 4、表 5),应用 Design-Expert7.1 软件进行分析,建立二次响应面回归模型,并对模型进行方差分析。

表4 Box-Behnken设计实验因素水平及编码

| 因素  | 编码 | 未编码 | 水平 |    |    |
|-----|----|-----|----|----|----|
|     |    |     | -1 | 0  | +1 |
| 温度  | X1 | X3  | 26 | 28 | 30 |
| 接种量 | X2 | X5  | 6  | 8  | 10 |
| 种龄  | X3 | X6  | 10 | 15 | 20 |

表5 Box-Behnken试验设计及响应值

| 试验号 | X1 | X2 | X3 | 酒精度(%vol) |
|-----|----|----|----|-----------|
| 1   | -1 | 1  | 0  | 5.5       |
| 2   | -1 | 0  | -1 | 5.2       |
| 3   | 0  | -1 | -1 | 4.3       |
| 4   | 0  | 0  | 0  | 6.4       |
| 5   | 1  | 0  | -1 | 5.0       |
| 6   | 0  | 1  | -1 | 4.8       |
| 7   | -1 | 0  | 1  | 4.2       |
| 8   | 1  | 0  | 1  | 4.7       |
| 9   | 0  | 0  | 0  | 6.3       |
| 10  | 1  | -1 | 0  | 5.1       |
| 11  | 0  | 0  | 0  | 6.2       |
| 12  | -1 | -1 | 0  | 4.2       |
| 13  | 0  | -1 | 1  | 4.6       |
| 14  | 0  | 1  | 1  | 4.0       |
| 15  | 0  | 0  | 0  | 6.5       |
| 16  | 0  | 0  | 0  | 6.2       |
| 17  | 1  | 1  | 0  | 5.2       |

通过对表 5 进行二次多项回归拟合,获得回归方程为:

$$Y = 6.32 + 0.11X_1 + 0.16X_2 - 0.22X_3 - 0.30X_1X_2 + 0.18X_1X_3 - 0.27X_2X_3 - 0.49X_1^2 - 0.84X_2^2 - 1.06X_3^2$$

$R^2=0.9617$ ,表明方程的拟合性较好。回归方程方差分析见表 6,P 值等于 0.0004,说明该模型极显著,与实际情况拟合很好。因此,该模型可用于分析和预测发酵过程中酒精产量。

表6 酒精含量二次多项模型的方差分析表

| 变异来源 | 自由度 | 均方    | 平方和   | F值    | P值     |
|------|-----|-------|-------|-------|--------|
| 回归   | 9   | 11.60 | 1.23  | 19.53 | 0.0004 |
| 残差   | 7   | 0.44  | 0.063 |       |        |
| 总变异  | 16  | 11.50 |       |       |        |

### 2.3.2 酒精产量响应面分析与优化

通过多元回归方程进行响应曲面分析(见图 2~图 4)。再通过该组动态图对任何 2 因素交互影响酒精产量的效应进行分析与评价,并从中确定最佳因素水平范围。

从图 2~图 4 中可直观地看出,分析各因子对响应

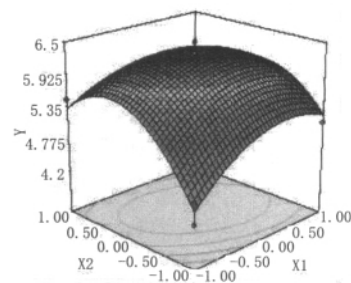


图2  $Y=f(X_1, X_2)$ 响应面立体图

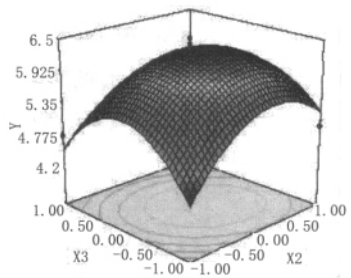


图3  $Y=f(X_2, X_3)$ 响应面立体图

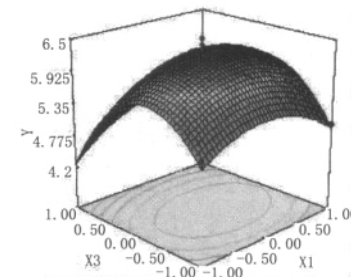


图4  $Y=f(X_1, X_3)$ 响应面立体图

值的影响变化趋势,回归模型确实存在最大值。利用设计软件进行岭脊分析,y 取最大值时各因素的优化水平见表 7。

表7 响应面的岭脊分析

| 自变量 | 编码值   | 取值    | Y值      |
|-----|-------|-------|---------|
| X1  | 0.06  | 28.12 | 6.84494 |
| X2  | 0.10  | 8.20  |         |
| X3  | -0.11 | 14.45 |         |

由表 7 可得,模型极值点坐标: $X_1=0.06$  (28.12 °C),  $X_2=0.10$ (8.20 %), $X_3=-0.11$ (14.45 h),此时模型预测的酒精含量最大值为 6.84 %。

### 2.4 醋酸发酵

在以上优化工艺基础上,接入 10 %已活化的醋酸菌种子液,于 32 °C、200 r/min,培养 5 d,总酸(以苹果酸计)含量均值达 54.9 g/L。

### 3 结论

通过混菌发酵和工艺优化发现,在苹果醋酒精发酵阶段,优良的菌种及其发酵条件对酒精的生成起着重要



作用。本文在优选菌株的基础上采用 Plackett-Burman 实验设计,对影响酒精产量的诸多相关因子进行了评价,成功地筛选出影响最显著的发酵温度、接种量和种龄三因素,并进一步进行响应面法分析,建立二次多项数学模型得到响应面立体图,通过分析得到酒精含量的最大预测值为 6.34%,优化后的发酵条件为 8351 混合菌株在发酵温度 28.12℃、接种量 8.20%、种龄 14.45 h 的条件下,酒精含量可达到最大预测值,在此工艺基础上进一步醋酸发酵得到的苹果醋醋酸含量达 54.9 g/L。

#### 参考文献:

- [1] 汪立平,徐岩.混菌发酵对苹果酒香气物质及发酵效率的影响[J].食品科学,2005(10):151-154.
- [2] 董书阁,徐国华,藏立华,等.果粮混酿双菌共酵生产苹果醋的研究[J].发酵科技通讯,2008,37(2):36-38.
- [3] 江英英,李海星,曹郁生.响应面法优化  $\gamma$ -氨基丁酸发酵培养基[J].食品科技,2007(5):44-49.
- [4] 邓丽红,张扬,马润宇,等.采用响应面法优化木糖醇发酵培养基[J].食品与发酵工业,2005,31(6):59-61.
- [5] 杨晓英,丁立孝,梁美霞,等.苹果酒优良酵母菌株的筛选[J].青岛农业大学学报:自然科学版,2008,25(1):28-33.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 15038—2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [7] 张健,高年发.利用响应面法优化丙酮酸发酵培养基[J].食品与发酵工业,2006(8):52-55.
- [8] 王永斌,王允祥.玉米黑粉菌培养条件响应面法优化研究[J].中国酿造,2006(5):56-60.
- [9] Lea A G H.Cider making.In Fermented Beverage Production[M].London:Blackie Academic and Professional Press,1995:66-67.
- [10] 彭帮柱,岳田利,袁亚宏,等.优良苹果酒酵母的选育[J].西北农林科技大学学报,2004,32(5):81-84.

## 贵州省酿酒工业协会 黑龙江省酒业协会 交流座谈会在筑召开

本刊讯 贵州省酿酒工业协会、黑龙江省酒业协会交流座谈会于 2011 年 5 月 27 日在筑举行。会议由贵州省酿酒工业协会副秘书长黄平主持,黑龙江省酒业协会会长栗永清,全国著名白酒专家高月明,黑龙江省酒业协会秘书长赵志昌、副秘书长栗岩,贵州省酿酒工业协会秘书高士敏,贵州省酿酒工业协会副秘书长徐道贵、黎阳、黄永光出席了会议,在黔参加黑龙江省白酒评委年会的全体代表,贵州省轻工科学研究所、酿酒科技杂志社、贵州龙黔威酒业有限公司的代表参加了会议。

贵州省酿酒工业协会秘书高士敏代表贵州省酿酒工业协会和副理事长、法人代表龙超亚向与会代表表达了欢迎黑龙江省酒业协会代表团一行来黔考察和传经送宝,并介绍了贵州酿酒工业的情况。黑龙江省酒业协会会长栗永清、全国著名白酒专家高月明、黑龙江省酒业协会秘书长赵志昌、及企业代表黑龙江北大仓集团的吕工等分别讲话发言。栗永清会长讲话表达了黑龙江省白酒评委年会在贵州召开取得成功,得到贵州省酿酒工业协会和贵州白酒企业的支持表示感谢,并希望两省协会加强交流,取长补短,共同促进白酒行业发展。两省传统友谊源远流长,从计划经济时期对企业的帮扶、老一辈著名白酒专家的合作、两个刊物互相携手共同发展,到新时期新一代酿酒人的合作,友谊不断加深,希望不断发展和提升,并对贵州省酿酒工业协会的工作提出了宝贵的建议。著名白酒专家高月明从亲身体会谈了如何做好协会工作,协会与行业的发展息息相关,基础是企业,领导是关键,协会应成为学习型的协会,才能把工作做好。

座谈会气氛融洽,发言热情,表达了促进两省协会加强交流、共同推进行业发展的愿望。(小雨)

## 白云边团委被授予“全国五四红旗团委”称号

本刊讯 近日,从共青团中央传来喜讯 湖北白云边酒业公司团委获得团组织最高荣誉,被授予 2010 年度“全国五四红旗团委”称号。

白云边自民营化以来,始终坚持以科学发展观为指导,积极贯彻以人为本、科学发展的企业宗旨,高度重视群团组织的发展。公司形成党委直接领导、行政大力支持、部门密切配合,党建带团建的工作机制,有效推动了公司共青团工作的创新和发展。

近年来,白云边团委在公司党委的领导下,紧紧围绕企业中心工作,坚持把服务生产经营和服务青年成长成才作为团组织工作的出发点和落脚点,按照“支部班子建设好、团员作用发挥好、团的活动开展好、基础工作做得好”的“四好”标准,扎实有效地开展了团建创新工程、青年人才工程、青年文化工程和青春建功行动。通过一系列特色鲜明的“青”字号品牌工程,切实做到围绕公司发展大局有新作为、服务青年有新成效、自身建设有新发展,受到公司党委和各级团组织的肯定。2010 年,白云边公司团委荣获“湖北省五四红旗团委”称号。

据悉,此次湖北省共有 13 家基层团组织获得表彰,白云边团委是湖北省酒类行业唯一获此殊荣的团组织。(刘华)