

响应面法优化黄酒高温糖化酒母制作条件的研究

刘 杰 蒋启海 余凡涛

(宁波阿拉酿酒有限公司,浙江 宁波 315800)

摘 要: 以酿酒酵母 ALA01 为材料对大酒母制作时物料添加量进行优化研究。利用 Plackett-Burman 设计筛选出麦芽、纯种曲和米浆水添加量是影响酒母质量的显著性因素,采用响应面 Box-Behnken 试验设计建立 3 个因素的二次多项式回归方程模型。优化结果显示,酵母数最佳参数是麦芽 24.11 g/kg、纯种曲 25.00 g/kg、米浆水 324.70 g/kg,出芽率最佳参数是麦芽 23.68 g/kg、纯种曲 21.14 g/kg、米浆水 328.56 g/kg,在各自最佳参数下,实际酵母数和出芽率分别达到 2.35 亿/mL 和 24.8%。利用酵母数最佳参数扩大培养时,酵母数达到 2.37 亿/mL,出芽率达到 24.9%。

关键词: 黄酒; 高温糖化; 酒母; 制作; 响应面法

中图分类号:TS262.4;TS261.4;TS261.1;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2011)10-0072-05

Research on the Optimization of Production Conditions for High-temperature Saccharifying Yeast of Yellow Rice Wine by Response Surface Method

LIU Jie, JIANG Qihai and YU Fantao

(Ningbo Ala Yellow Rice Wine Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang 315800, China)

Abstract: The optimum addition level of raw materials for yeast production was studied by the use of *Saccharomyces cerevisiae* ALA01. The addition level of malt, pure species starter and seriflux, screened out by Plackett-Burman design, had significant influence on yeast quality. Two quadratic polynomial regression models of the above three influencing factors were established by response surface Box-Behnken design. The optimization results indicated that the optimum addition levels of malt, pure species starter and seriflux were 24.11 g/kg, 25.00 g/kg and 324.70 g/kg for yeast number, and 23.68 g/kg, 21.14 g/kg and 328.56 g/kg for budding rate, respectively. Under the optimum conditions, the actual yeast number and budding rate could reach 2.35×10^8 /mL and 24.8%, respectively. Amplified production was carried out under the optimum conditions, and yeast number and budding rate could reach 2.37×10^8 /mL and 24.9%, respectively.

Key words: yellow rice wine; high-temperature saccharification; yeast; production; response surface method

黄酒是世界三大酿造酒之一^[1],在中国特别是南方地区受到人们广泛的欢迎^[2]。黄酒的生产主要分为糖化和酒精发酵两个方面,其工艺流程依次为浸米、蒸饭、糖化、发酵、压榨、过滤、煎酒和勾兑,涉及的微生物主要有霉菌、酵母菌和细菌^[3]。其中,酒母(酵母菌)质量的优劣直接关系到黄酒发酵和风味的好坏^[4]。酒母按照不同的制作工艺可以分为淋饭酒母、速酿酒母、高温糖化酒母和干酵母^[5],其中高温糖化酒母具有培养时间短、制作不受季节限制、占用设备少、酵母菌纯度高、死亡率低、发起迅速等优点,适合于机械化黄酒生产^[6]。

麦芽汁是酵母菌生长的优良培养基,但是纯粹使用麦芽汁制作酒母时需要量大,导致原料成本大幅上升^[7];使用米粉糖化液(添加麦芽、纯种曲、酶制剂)作为酒母培养基,其营养成分与前发酵时类似,可以缩短酵母的适应

期;米浆水回用作为酒母氮源不但可以降低废物处理成本,还可以调节培养液的 pH 值^[8]。

种子级数少有利于简化工艺控制、减少工作量,而且可以减少多次移种带来的染菌风险。因此,本研究在黄酒高温糖化酒母制作过程中省略小酒母环节,在单因素试验的基础上利用 Plackett-Burmen 设计筛选出添加物料中影响酒母质量的显著性因素,然后采用 Box-Behnken 设计建立显著性因素的二次多项式回归方程模型,并得到酒母制作的最佳参数,以期为机械化黄酒高温糖化酒母的实际制作提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ALA01,宁波阿

收稿日期:2011-06-15

作者简介:刘杰(1985-),男,硕士,主要从事黄酒酿造技术的研究。

通讯作者:蒋启海(1981-),男,硕士,国家级黄酒评委,主要从事黄酒酿造技术的研究。

拉酿酒有限公司保存。

1.2 物料与仪器

糯米:宁波鄞州梁桥米业有限公司;纯种曲:宁波阿拉酿酒有限公司;麦芽:宁波麦芽有限公司;葡糖淀粉酶:苏州宏达制酶有限公司; α -淀粉酶:诺维信生物技术有限公司;537 酸性蛋白酶:上海花联生物科技有限公司。

AL204 分析天平:Mettler Toledo;SPX-300B-型生化培养箱,上海跃进医疗器械厂;HZ-9211K 型恒温振荡器,江苏太仓科技器材厂;Novel N-120 光学显微镜,宁波永新光学股份有限公司;XB-K-25 型血细胞计数板,上海求精生化试剂仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 麦芽汁制备

麦芽与 72 °C 的水按照 1:4(质量比)的比例混合后,55~65 °C 保温糖化 5 h,借助筛板及麦糟将浸出物与不溶性麦糟分开,用自来水调节糖度为 12.5°Brix,灭菌冷却后备用。

1.3.2 酵母二级种子

挑取斜面酵母菌种 1 环接入盛有 30 mL 麦芽汁的大试管中,振荡均匀后,置于 30 °C 静置培养 22 h;取混匀后的 3 mL 酵母培养液接入到盛有 250 mL 麦芽汁的三角瓶中,振荡均匀后于 30 °C 静置培养 22 h,得到酵母二级种子。

1.3.3 米粉糖化液

糯米粉 150 g、米浆水 300 g、自来水 550 g,加入 0.5

mL α -淀粉酶煮沸并保温 0.5 h。

1.3.4 米浆水

42 °C 自来水浸泡糯米(液位高于米面 20 cm),2 d 后得到米浆水。

1.3.5 酒母质量的表示

酒母液经纱布过滤后,用血球计数板统计酵母数量(亿/mL)和出芽率(%),出芽率为芽细胞数占总酵母细胞数的百分比。

1.3.6 试验设计和数据分析

利用 Design Expert 7.1.6 软件进行试验设计和数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

在 68 °C 的米粉糖化液 1000 g 中加入麦芽 15.00 g、纯种曲 17.50 g、 α -淀粉酶 0.5 mL、糖化酶 0.4 mL、蛋白酶 0.04 g 于 65 °C 保温糖化 3.5 h 后,90~100 °C 杀菌 20 min 并冷却至 30 °C 作为基础培养基,接种 5 mL 二级种子后置于恒温振荡器中 30 °C 静置培养,每隔 2 h 于 180 r/min 下振荡 0.5 h,16 h 后,摇匀测定每毫升酵母数。在以上参数基础上研究各物料添加量对酵母数的影响,结果见图 1。

由图 1 可知,酵母数随麦芽、纯种曲添加量的增加而增加,但是超过一定添加量后,酵母数增加幅度减小。在一定范围内,酵母数随着米浆水用量的增加而快速增加,

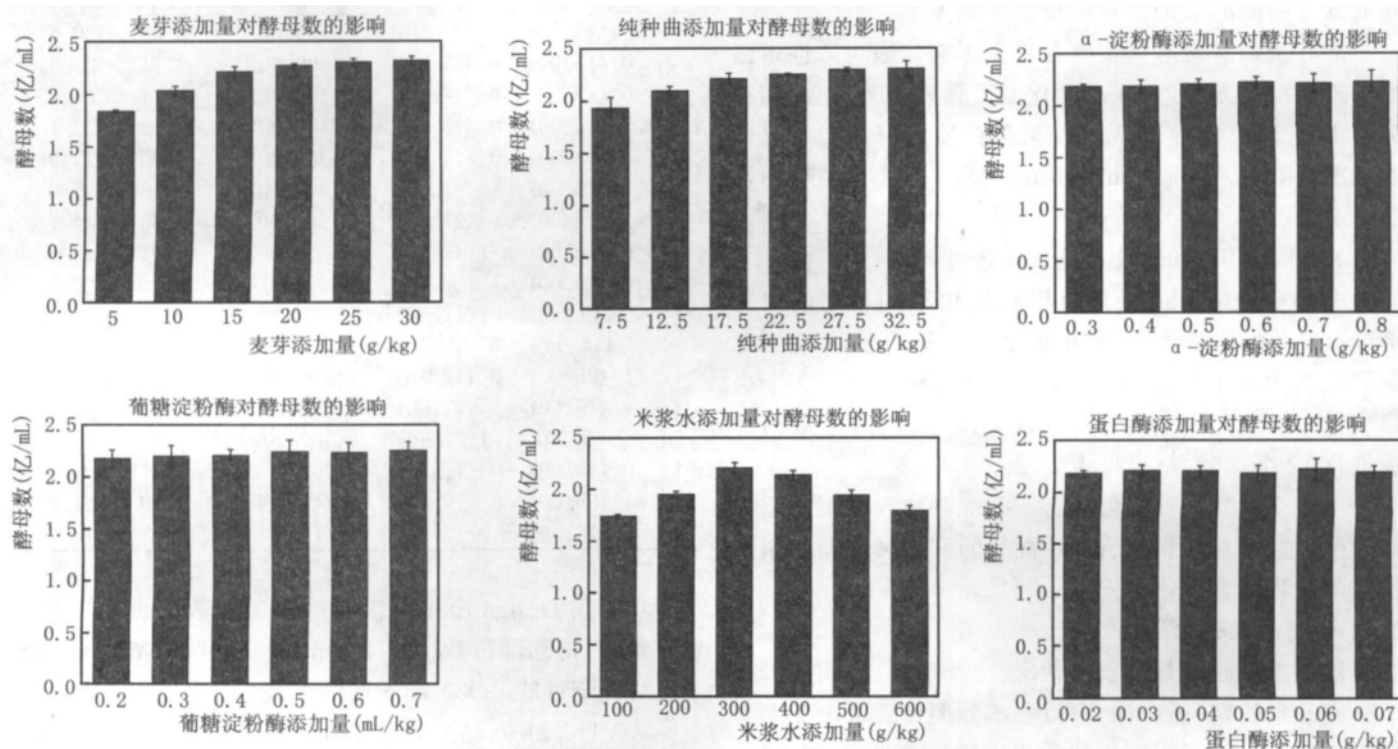


图1 物料添加量对酵母数的影响

但是超过一定量后反而会减小。

氮元素是微生物生长的必需元素,它既参与构成细胞的蛋白质和核酸,又与菌体的代谢活动密切相关^[9]。在实际制作酒母时发现,培养基中氨基氮含量低(未添加米浆水时,浓度为 0.09 g/L 左右)是制约酒母质量的重要因素,而培养基中较低的碳氮比有利于酵母菌体的获得,麦芽汁和米浆水中含有丰富的氨基氮供酵母生长和繁殖^[10-11],纯种曲本身也具有较高的氨基氮含量^[12],因此,麦芽、纯种曲和米浆水都可以提供酵母增殖时的氮源。当麦芽、纯种曲添加量超过一定量时,其所提供的营养已经能够满足酵母增殖的需要,继续增加对酵母增殖的影响减小,并且添加量过高时,所含的大量糖分会使渗透压升高^[13],造成酵母衰老甚至死亡,不利于酵母的增殖。

米浆水在提供氨基氮营养(基础培养基氨基氮浓度为 0.19 g/L 左右)的同时,也会降低糖化液的 pH 值,试验时测定基础培养基的 pH 值为 4.6,可直接接种酵母。随着米浆水用量的增加,糖化液的 pH 值继续降低,当低于酵母最适生长 pH 值范围时酵母生长就会受到抑制^[14]。考虑到米浆水既能作为酒母制作的氮源物质,又能在不引入新添加剂剂的情况下作为糖化液 pH 值的天然调节剂,因此本试验未单独调节 pH 值,直接综合米浆水的两个功效作为一个因素来研究其对酒母质量的影响。

米粉糖化液本身含有麦芽糖、葡萄糖等酵母可直接利用的碳源,而且纯种曲本身含有淀粉酶和糖化酶^[1],可以分解米粉中的多糖为单糖供酵母利用,因此 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶的添加量对酵母数影响不大。

酸性蛋白酶对酵母增殖几乎无影响,因为酸性蛋白酶添加温度是 68℃,保温糖化温度是 65℃,而此酶在 63℃ 以上严重失活^[15],无法降解蛋白质为酵母增殖提供氨基氮,因此,在 Plackett-Burman 试验设计时未考虑蛋白酶这一因素。

2.2 Plackett-Burman 设计筛选显著性因素

Plackett-Burman 设计可以在优化添加量之前快速筛选出显著性因素^[16-17]。在单因素试验基础上,每个因素取高低两个水平(分别以 -1 和 +1 表示),并设置 3 个虚拟变量(X6, X7, X8)用于估计试验误差,以酵母数为指标进行 12 组试验,结果见表 1、表 2。

由表 2 的方差分析可知,麦芽、纯种曲和米浆水添加量对酵母数有显著影响,而 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶添加量对酵母数无显著影响。

2.3 响应面试验结果

出芽率反映酵母的繁殖状况,出芽率高,表明酵母处于旺盛的生长期,适合作菌种用,成熟酒母要求出芽率为 15%~30%。为了更好地优化出高质量酒母,按照 Box-

表 1 Plackett-Burman 设计及其结果

试验号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	酵母数 (亿/mL)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.58
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1.96
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	2.02
4	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.98
5	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	2.11
6	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.94
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2.18
8	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1.91
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1.64
10	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2.23
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	2.21
12	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.72

表 2 Plackett-Burman 设计因素水平及方差分析结果

代码	因素	水平		F	Prob>F
		-1	+1		
X1	麦芽(g/kg)	10.00	20.00	14.30	0.0092
X2	纯种曲(g/kg)	12.50	22.50	10.58	0.0174
X3	α -淀粉酶(mL/kg)	0.40	0.60	0.57	0.4781
X4	葡萄糖淀粉酶(mL/kg)	0.20	0.60	1.29	0.2999
X5	米浆水(g/kg)	200.00	400.00	56.06	0.0003

Behnken 试验设计原理^[18-20],以酵母数和出芽率共同作为响应值进行响应面试验,结果见表 3,经美蓝染色后发现各试验组酵母死亡率均低于 1%。

表 3 Box-Behnken 响应面试验设计及结果

试验号	因素			响应	
	A: 麦芽 (g/kg)	B: 纯种曲 (g/kg)	C: 米浆水 (g/kg)	酵母数 (亿/mL)	出芽率 (%)
1	-1 (5.00)	1 (27.50)	0 (300.00)	2.03	20.4
2	0 (15.00)	0 (17.50)	0 (300.00)	2.21	23.3
3	0 (15.00)	0 (17.50)	0 (300.00)	2.24	24.4
4	0 (15.00)	0 (17.50)	0 (300.00)	2.12	23.1
5	0 (15.00)	0 (17.50)	0 (300.00)	2.20	23.9
6	1 (25.00)	-1 (7.50)	0 (300.00)	2.18	23.0
7	1 (25.00)	1 (27.50)	0 (300.00)	2.33	24.7
8	0 (15.00)	-1 (7.50)	1 (450.00)	1.91	19.5
9	0 (15.00)	1 (27.50)	1 (450.00)	2.16	22.7
10	-1 (5.00)	0 (17.50)	1 (450.00)	2.06	20.5
11	-1 (5.00)	0 (17.50)	-1 (150.00)	1.54	19.0
12	1 (25.00)	0 (17.50)	1 (450.00)	2.18	22.3
13	0 (15.00)	1 (27.50)	-1 (150.00)	2.01	20.2
14	-1 (5.00)	-1 (7.50)	0 (300.00)	1.76	17.8
15	0 (15.00)	0 (17.50)	0 (300.00)	2.27	24.2
16	1 (25.00)	0 (17.50)	-1 (150.00)	1.89	21.2
17	0 (15.00)	-1 (7.50)	-1 (150.00)	1.57	18.7

运用 Design Expert 软件对表 3 的数据进行二次回归分析,得到酵母数(Y1, 亿/mL)和出芽率(Y2, %)预测值对自变量的二次多项式回归方程:

$$Y1=2.21+0.15A+0.14B+0.16C-0.030AB-0.057AC-0.047BC-0.064A^2-0.069B^2-0.23C^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 23.78 + 1.69A + 1.13B + 0.74C - 0.23AB - 0.10AC + 0.42BC - 0.92A^2 - 1.39B^2 - 2.11C^2 \quad (2)$$

表 4 回归模型系数显著性检验结果

变异来源	酵母数		出芽率	
	F	(P) > F	F	(P) > F
模型	15.39	0.0008	10.88	0.0024
A	29.22	0.0010	31.08	0.0008
B	25.42	0.0015	13.81	0.0075
C	34.87	0.0006	5.94	0.0450
AB	0.59	0.4660	0.28	0.6154
AC	2.18	0.1831	0.055	0.8220
BC	1.49	0.2618	0.99	0.3539
A ²	2.85	0.1354	4.81	0.0644
B ²	3.31	0.1117	11.10	0.0126
C ²	35.66	0.0006	25.70	0.0014
失拟项	3.13	0.1499	4.06	0.1046
R ²	0.9519		0.9333	

由表 4 可知,3 因素对酵母数和出芽率均有显著性影响。回归方程模型(1)的 $P=0.0008 < 0.05$,表明该试验模型显著;失拟项 $P=0.1499 > 0.05$,说明方程对试验的拟合度较好;模型的决定系数 $R^2=0.9519$,说明 3 因素对酵母数影响中 95.19%的试验数据变异性可以用此模型解释;回归方程模型(2)的 $P=0.0024 < 0.05$,表明该试验模型显著;失拟项 $P=0.1046 > 0.05$,说明方程对试验的拟合度较好;模型的决定系数 $R^2=0.9333$,说明 3 因素对出芽率影响中 93.33%的试验数据变异性可以用此模型解

释。

图 2 和图 3 分别表示麦芽和纯种曲(米浆水平固定在 300.00 g/kg)、麦芽和米浆水(纯种曲水平固定在 17.50 g/kg)、纯种曲和米浆水(麦芽水平固定在 15.00 g/kg)对酵母数和出芽率影响的三维响应面图。

由图 2 和图 3 可以直观地看出,2 个回归方程模型存在最大值。软件分析得到酵母数最佳投料参数是麦芽 24.11 g/kg、纯种曲 25.00 g/kg、米浆水 324.70 g/kg, Y_1 的理论最大值为 2.34 亿/mL;出芽率最佳投料参数是麦芽 23.68 g/kg、纯种曲 21.14 g/kg、米浆水 328.56 g/kg, Y_2 的理论最大值为 24.8%。

2.4 模型验证

为检验模型预测的可靠性,在各自最佳参数条件下进行三角瓶试验,酵母数达到 2.35 亿/mL(相应出芽率为 24.7%),出芽率达到 24.8%(相应酵母数为 2.33 亿/mL),与理论预测值有良好的符合性,说明回归方程能较真实地模拟 3 因素对酒母质量的影响。利用酵母数最佳参数,按照物料比例由三角瓶换成大酒母罐(扩大 2000 倍)进行试验,酵母数达到 2.37 亿/mL,同时出芽率达到 24.9%。

3 结论

在单因素试验基础上,根据 Plackett-Burman 设计确定物料添加中影响酒母质量的显著性因素分别是麦芽、

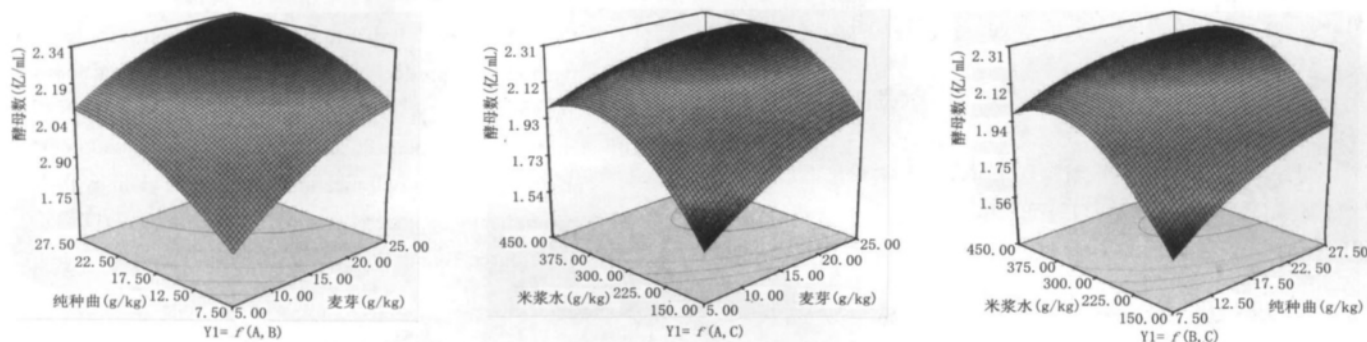


图 2 因素对酵母数影响的响应面图

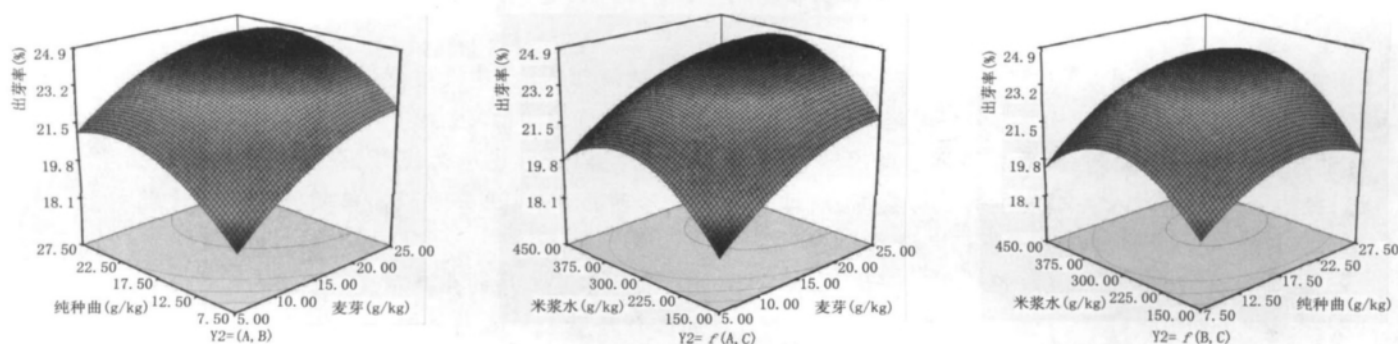


图 3 因素对出芽率影响的响应面图

纯种曲和米浆水;采用响应面 Box-Behnken 试验设计建立酵母数和出芽率对 3 个因素的二次多项式回归方程模型,优化结果显示,酵母数最佳投料参数是麦芽 24.11 g/kg、纯种曲 25.00 g/kg、米浆水 324.70 g/kg;出芽率最佳投料参数是麦芽 23.68 g/kg、纯种曲 21.14 g/kg、米浆水 328.56 g/kg。在各自最佳参数条件下三角瓶酒母的酵母数达到 2.35 亿 /mL,出芽率达到 24.8%。利用酵母数最佳参数的扩大制作取得了较好的结果,说明利用优化后的物料添加量机械化制作大酒母具有一定的可行性。

参考文献:

- [1] Luo T, Fan WL, Xu Y. Characterization of volatile and semi-volatile compounds in Chinese rice wines by headspace solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2008, 114(2): 172-179.
- [2] Zhu YB, Zhang JH, Shi ZP, et al. Optimization of operating conditions in rice heat blast process for Chinese rice wine production by combinational utilization of neural network and genetic algorithms[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2004, 110(2): 117-123.
- [3] 周家骥.黄酒生产工艺[M].2 版.北京:中国轻工业出版社, 1996.
- [4] 谢广发.新工艺酒母在传统工艺黄酒中的应用中试[J].食品工业科技,2001,22(1): 72-73.
- [5] 毛青钟,鲁瑞刚,陈宝良,等.黄酒酒母的不同制作特点[J].江苏食品与发酵,2006(2): 21-25.
- [6] 毛青钟,宣贤尧,吴炳圆.几种黄酒酒母的特性[J].酿酒科技, 2006(9): 65-67.
- [7] 刘月琴,赵爱丽,丰水平.辅料糊化特性对啤酒糖化工艺的影响研究[J].啤酒科技,2008(12): 30-36.
- [8] 毛青钟,鲁瑞刚,陈宝良,等.传统黄酒发酵醪的酸败及防止措施[J].酿酒科技,2006(7): 73-77.
- [9] 贾才华,邓泽元,范亚苇,等.响应面法优化粗壮脉纹孢菌降解啤酒糟粗纤维的培养基[J].食品科学,2009,30(21): 195-199.
- [10] 刘杰,陈智,李卫旗,等.基于麦汁培养基的富硒酵母培养条件优化[J].食品科学,2010,31(9): 206-210.
- [11] 胡健,张国华,张雨,等.米浆水回用技术对黄酒酿造的影响[J].酿酒科技,2010(8): 25-28.
- [12] 邵法都.用生麦曲改进乌衣红曲黄酒质量的探索[J].酿酒科技,2001(2): 59-60.
- [13] 夏艳秋,朱强,汪志君.黄酒醪液酸败的影响因素及控制[J].食品与发酵工业,2004,30(7): 33-37.
- [14] 牟建楼,王颖,张伟,等.毕赤酵母菌变异株发酵特性的研究[J].酿酒科技,2006(5): 33-35.
- [15] 关桂兰,董文彩,陈菊英,等.宇佐美曲霉酸性蛋白酶的研究——.537 酸性蛋白酶提纯及性质[J].微生物学报, 1985,25(3): 255-261.
- [16] Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments[J]. Biometrika, 1946, 33(4): 305-325.
- [17] Bajaj IB, Lele SS, Singhal RS. A statistical approach to optimization of fermentative production of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 826-832.
- [18] Feng YL, Li WQ, Wu XQ, et al. Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 49(1): 104-112.
- [19] Wang JL, Wan W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2009, 34(1): 235-244.
- [20] Ghosh D, Hallenbeck PC. Response surface methodology for process parameter optimization of hydrogen yield by the metabolically engineered strain *Escherichia coli* DJT135[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(6): 1820-1825.

白云边酒业制曲车间开展质量月活动

本刊讯:今年 9 月是全国第 22 个质量活动月,湖北白云边酒业围绕“建设质量强国,共创美好生活”活动主题,从 2011 年 9 月 1 日开始,在全公司范围内开展为期一个月的质量活动。9 月 1 日下午,该公司制曲车间召开质量月活动专题会议,会议再次强调了此次活动的重要性,坚持以科学发展为统领,引导全体员工增强质量意识,努力营造一个人人关心质量的良好氛围,通过此次质量活动的开展,进一步提高车间整体质量管理水平,以此来促进车间的成曲质量进一步稳定提高。

目前,该车间各生产班组正按要求严格执行工艺纪律,狠抓各道工序的生产质量,每个员工更是身体力行,从我做起,从细节做起,一丝不苟地操作,通过提高自身的工作质量来精心打造每一块酒曲,确保成曲质量的稳定和提高,为酿造车间的稳产优质提供有力的后勤保障。(屈万山)