

响应面法优化桑葚酒低产高级醇发酵条件的研究

罗惠波^{1,2}, 卫春会^{1,2}, 宗绪岩^{1,2}, 江文涛¹, 徐升东³

(1.四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2.酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000; 3.四川省阆州圣果酒业有限公司, 四川 阆中 637400)

摘要: 以桑葚为主要原料,通过单因素试验和响应面试验,调控桑葚酒中高级醇的生成量。结果表明,在初始 pH3.8,发酵温度为 24℃,接种量为 8.0×10^6 cell/mL 的最佳工艺条件下,高级醇的生成量为 357.06 mg/L,与常规发酵相比,高级醇的生成量降低了 13.07%。

关键词: 桑葚酒; 高级醇; 响应面

中图分类号: TS262.7; TS261.4; TS261.7

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2013)01-0085-04

Optimization of the Fermenting Conditions of Mulberry Wine by Response Surface Method for Low-yield of Higher Alcohols

LUO Huibo^{1,2}, WEI Chunhui^{1,2}, ZONG Xuyan^{1,2}, JIANG Wentao¹ and XU Shengdong³

(1.School of Biological Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000; 2. Liquor-making Bio-Technology & Application of Key Lab of Sichuan Province, Zigong, Sichuan 643000; 3. Sichuan Langzhong Enlightenment Wine Industry Co.Ltd., Langzhong, Sichuan 637400, China)

Abstract: The regulation and the control of higher alcohols yield in mulberry wine was carried out by single factor test and response surface method. As initial pH value was 3.8, fermenting temperature was at 24℃, and the inoculating quantity was 8×10^6 cell/mL, the yield of higher alcohols was 357.06 mg/L, decreasing by 13.07% compared with conventional fermentation.

Key words: mulberry wine; higher alcohols; response surface method

高级醇是指碳原子数超过 2 的一价醇类,包括正丙醇、异丁醇、异戊醇、活性戊醇、 β -苯乙醇等^[1]。高级醇是酒中重要的香味物质,通常占酒中总香味物的 50%^[2]。适量的高级醇可赋予果酒以醇厚、丰满的口感,增加酒的协调性,使其典型性突出。高级醇含量过少会使果酒的风味淡薄;含量过多会给人以辛辣、腐臭感和不愉快的苦涩味。高级醇在人体内的分解速度较缓慢,大量饮酒后易引起“上头”^[3]。故高级醇的含量必须控制在一定的范围内。

我国 GB 2757 中规定 60%vol 蒸馏酒中高级醇(杂醇油)含量不得高于 0.2 g/100 mL。Rapp 和 Mandery 发现葡萄酒中高级醇含量达 300.00 mg/L 时便可产生令人愉快的风味,但当浓度超过 400.00 mg/L 时,会使葡萄酒产生不愉快的风味,并有刺激的口感^[4];甄会英研究表明,葡萄酒中高级醇含量超过 368.64 mg/L 后,酒体风味不协调,易使人上头^[5];C. Y. Lee 和 H. J. Cooley 测得红葡萄酒中总高级醇平均值为 339.00 mg/L^[6]。

本研究通过单因素试验和响应面试验,调控桑葚酒

中高级醇的生成量。解决桑葚酒饮后“上头”和口感粗糙的问题,提高桑葚酒的品质。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器设备

菌种: 从桑果园中分离筛选得到的 1 株低产高级醇桑葚酒酿酒酵母。

样品: 桑葚,四川阆州圣果酒业有限公司提供。

试剂: 正丙醇、异丁醇、异戊醇、 β -苯乙醇、乙醇均为色谱纯。

仪器设备: Agilent 6890N-5975B 气相色谱质谱联用仪,美国 Agilent 公司;毛细管色谱柱 J&W 122-7062 DB-WAX 60.0 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m,美国 Agilent 公司;LRH-250 生化培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司;200 μ L、1 mL 可调式移液器,上海雷勃分析仪器有限公司等。

1.2 实验方法

基金项目 2011 年度四川省重点技术创新项目(2011NCLZ433)。

收稿日期:2012-09-04

作者简介:罗惠波(1969-),男,教授,硕士生导师,长期从事酒类发酵工程专业的教学和科研工作。

优先数字出版时间 2012-11-21;地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121121.1450.007.html>。

1.2.1 桑葚酒发酵工艺流程

桑葚→分选→清洗→压榨→调整成分(调整糖度、pH 值、添加 SO₂)→摇匀、静置 1 h→接种→前发酵→后发酵→过滤→陈酿→澄清处理

1.2.2 高级醇的测定

用容量瓶准确量取 100 mL 桑葚酒于 500 mL 蒸馏瓶中,用 50 mL 蒸馏水分 3 次冲洗容量瓶,洗液全部并入蒸馏瓶中,再加入几颗玻璃珠,连接冷凝器,用洁净、干燥的 100 mL 容量瓶接收馏出液(冰浴)。开启冷凝水,缓慢加热蒸馏。收集馏出液 95 mL,取下容量瓶,盖塞。于 20 ℃ 水浴保温 30 min,用蒸馏水定容,混匀,4 ℃ 保存备用^[7]。

1.2.3 色谱分析条件

毛细管柱 J&W 122-7062 DB-WAX 60.0 m×0.25 mm×0.25 μm;进样口温度 250 ℃,起始温度 60 ℃,保留 1 min,以 6 ℃/min 升至 150 ℃,不保留,以 10 ℃/min 升至 200 ℃,保留 2 min,以 15 ℃/min 升至 230 ℃,保留 2 min;载气 He,检测器温度 250 ℃,恒流 1.0 mL/min;进样量:2 μL。

1.2.4 试验设计

根据酵母菌种生长特性和发酵条件,进行单因素试验。通过单因素试验结果分析,选出影响高级醇生成量的 3 个主要因素(pH 值、温度、接种量),进行三元二次回归正交试验设计,因素水平编码见表 1。

表 1 因素水平编码表

水平	因素		
	X ₁ : pH 值	X ₂ : 温度(℃)	X ₃ : 接种量 (×10 ⁶ cell/mL)
上星号臂(1.215)	4.5	30	10
上水平1	4.4	29	9.3
零水平0	3.8	25	6
下水平-1	3.1	21	2.7
下星号臂(-1.215)	3	20	2
变化间距(Δj)	0.6	4	3.3

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 初始 pH 值对高级醇生成量的影响

发酵前将桑葚汁的初始 pH 值分别调到 3.0、3.5、4.0、4.5,发酵结束后测定高级醇含量,结果见图 1。

不同初始 pH 值对高级醇生成量的影响试验结果表明,桑葚汁初始 pH 值对高级醇生成量影响显著,随桑葚汁初始 pH 值的升高,高级醇的生成量显著增加。初始 pH 值达 4.0 以上时,高级醇的生成量增加明显;pH 值在 3.5 以下时,酵母的代谢活动受到抑制,其增殖量受到控制,高级醇合成过程中酶的活性受到影响,因而高级醇的

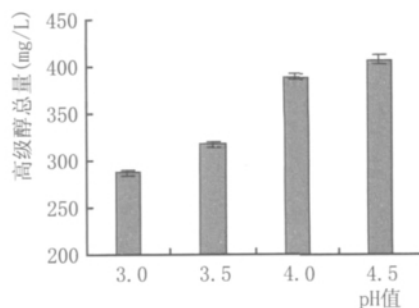


图 1 pH 值对高级醇生成量的影响

生成量明显降低。因此,适当降低果汁初始 pH 值,有利于降低高级醇的生成量。

2.1.2 发酵温度对高级醇生成量的影响

采用控温发酵方式,将发酵温度分别调至 15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃,恒温发酵。不同发酵温度条件下桑葚酒中高级醇生成量见图 2。

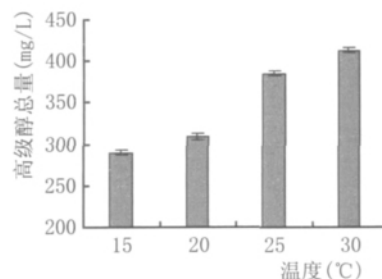


图 2 发酵温度对高级醇生成量的影响

试验结果表明,温度对高级醇的生成量影响显著,随发酵温度的升高,高级醇的生成量明显增加。20 ℃ 以下时高级醇的生成量较低,当温度达 25 ℃ 以上时高级醇的生成量显著增加。这是由于发酵温度的升高,酵母的生长及代谢活动增强,高级醇生成相关转化酶活力提高,因而由分解代谢及合成代谢途径所产生的高级醇含量就会增加。若发酵温度过低,酵母的代谢活动相对较弱,发酵变得缓慢,发酵周期延长,不利于发酵。因此,适当降低发酵温度有利于调控高级醇的生成。

2.1.3 接种量对高级醇生成量的影响

不同接种量条件下,桑葚酒中高级醇生成量见图 3。

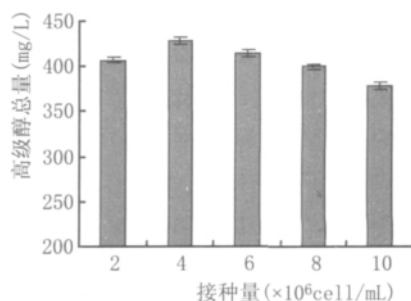


图 3 接种量对高级醇生成量的影响

由图 3 可知,不同酵母接种量条件下高级醇的生成

量有明显差异。随着酵母接种量的增加,高级醇生成量增加,当接种量达 4.0×10^6 cell/mL 时,高级醇含量最高,然后随酵母接种量的增加高级醇生成量降低。因此,适当增加酵母的接种量,可降低酵母的增殖倍数,从而合成细胞蛋白质的副产物高级醇也会相应降低,使桑葚酒中高级醇的生成量降低。

2.2 采用响应面分析法调控高级醇的生成量^[8]

2.2.1 回归模型方程的建立及其显著性检验

三元二次回归正交组合设计编码表及试验结果见表 2。 Z_1' 、 Z_2' 、 Z_3' 分别由二次项(Z_1^2 、 Z_2^2 、 Z_3^2)中心化^[8]后得到。

表 2 中心组合设计表及试验结果

试验号	Z_1	Z_2	Z_3	高级醇总量(Y) (mg/L)
1	1	1	1	396.18
2	1	1	-1	360.36
3	1	-1	1	285.26
4	1	-1	-1	279.03
5	-1	1	1	330.27
6	-1	1	-1	328.40
7	-1	-1	1	253.30
8	-1	-1	-1	264.72
9	1.215	0	0	413.38
10	-1.215	0	0	302.23
11	0	1.215	0	385.29
12	0	-1.215	0	275.94
13	0	0	1.215	348.91
14	0	0	-1.215	358.38
15	0	0	0	366.69

运用 SPSS 对试验数据进行回归拟合,建立高级醇生成量(Y)与规范变量之间的函数关系式,得到回归方程如下:

$$Y = 329.897 + 25.491 \times Z_1 + 42.526 \times Z_2 + 1.917 \times Z_3 + 6.450 \times Z_1 Z_2 + 6.450 \times Z_1 Z_3 + 5.360 \times Z_2 Z_3 - 13.545 \times Z_1' - 31.952 \times Z_2' - 16.361 \times Z_3'$$

通过对上述回归方程进行方差分析,验证回归模型及各参数的显著度,结果见表 3。

表 3 各因素显著性比较结果

方差来源	回归系数	标准误差	t Stat	P-value
常量	329.897	5.133	64.274	0.000
Z_1	25.491	6.007	4.244	0.008
Z_2	42.526	6.007	7.080	0.001
Z_3	1.917	6.007	0.319	0.763
$Z_1 Z_2$	6.450	7.028	0.918	0.401
$Z_1 Z_3$	6.450	7.028	0.918	0.401
$Z_2 Z_3$	5.360	7.028	0.763	0.480
Z_1'	-13.545	9.516	-1.423	0.214
Z_2'	-31.952	9.516	-3.358	0.020
Z_3'	-16.361	9.516	-1.719	0.146

由表 3 可知,对于显著性水平 $\alpha=0.05$, Z_1 、 Z_2 对应的偏回归系数的 P-value < 0.01 , Z_2' 对应的偏回归系数的

$0.01 < P\text{-value} < 0.05$,因此,初始 pH、发酵温度对高级醇生成量的影响非常显著;由 F 值(F 值等于“t Stat”的平方)的大小,可以得到各因素和交互作用的主次顺序为: $X_2 > X_1 > X_2 X_2 > X_3 X_3 > X_1 X_1 > X_1 X_2 > X_1 X_3 > X_2 X_3 > X_3$;影响因素的主次顺序为:温度 $>$ pH 值 $>$ 接种量。将对试验结果无显著影响的因素和交互作用从回归方程中排除,将 Z_3 、 $Z_1 Z_2$ 、 $Z_1 Z_3$ 、 $Z_2 Z_3$ 、 Z_1' 、 Z_3' 的平方和及自由度并入残差项,再进行方差分析,分析结果见表 4。

表 4 回归模型方差分析表

项目	df	SS	MS	F	Significance F
回归分析	3	34283.754	3809.306	9.638	0.011
残差	11	1976.228	395.245		
总计	14	36259.982			

由表 4 可知, $F=9.640 > F_{0.05}(9,5)=4.77$,因此,建立的线性回归方程显著;复相关系数 $R=0.972$,所以建立的回归方程与试验数据拟合较好。

2.2.2 响应面分析与优化

利用 OriginPro 软件对数据进行处理,得到三维图,见图 4~图 6,综合反映各变量与响应值之间,变量与变量之间的关系。

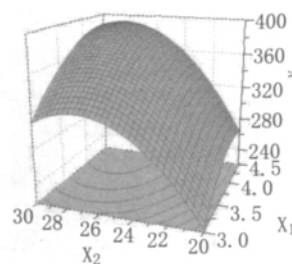


图 4 $Y=(X_1, X_2)$ pH 值和温度对高级醇生成量影响的响应面和等高线图

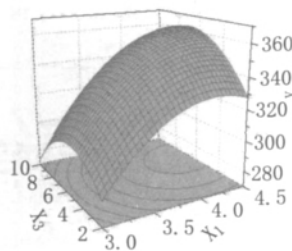


图 5 $Y=(X_1, X_3)$ pH 值和接种量对高级醇生成量影响的响应面和等高线图

根据曲面响应图,可以确定高级醇生成量随各因素的变化情况。图 4 显示 pH 值和温度对高级醇生成量的影响。当发酵温度低于 21°C 时,随 pH 值的变化,高级醇的生成量始终低于 300 mg/L 。图 5 显示 pH 值和接种量对高级醇生成量的影响。当 pH 值低于 3.0 时,随接种量的变化,高级醇的生成量始终低于 300 mg/L 。图 6 显示

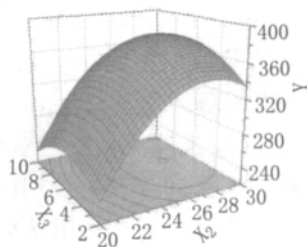


图 6 $Y=(X_2, X_3)$ 温度和接种量对高级醇生成量影响的响应面和等高线图

温度和接种量对高级醇生成量的影响。当发酵温度低于 21 °C 时, 随 pH 值的变化, 高级醇的生成量始终低于 300 mg/L。

结合响应面试验结果, 进行规划求解。当初始 pH 3.8, 发酵温度 24 °C, 接种量为 8.0×10^6 cell/mL 时, 高级醇的生成量为 357.06 mg/L, $300 \text{ mg/L} < 357.06 \text{ mg/L} < 368.64 \text{ mg/L} < 400 \text{ mg/L}$ 。

2.2.3 模型的验证

为了检验响应面法的可靠性, 根据以上试验结果进行验证试验, 选取初始 pH 为 3.8, 发酵温度为 24 °C, 接种量为 8.0×10^6 cell/mL, 在此条件下重复 3 次试验。实际测得高级醇生成量分别为 363.28 mg/L、359.61 mg/L、367.32 mg/L, 平均值为 363.40 mg/L, 与理论预测值相差 1.78 %。因此, 采用响应面法优化调控高级醇生成量的工艺条件准确可靠, 具有使用价值。

3 结论

本研究是以桑葚为主要原料, 采用从桑果园中分离筛选得到的 1 株桑葚酒优良酿酒酵母进行酒精发酵。通过单因素试验和响应面试验, 调控桑葚酒中高级醇的生成量。结果表明, 在初始 pH 值为 3.8, 发酵温度为 24 °C,

接种量为 8.0×10^6 cell/mL 的最佳工艺条件下, 高级醇的生成量为 357.06 mg/L, 与常规发酵相比, 高级醇的生成量降低了 13.07 %。

为了检验响应面法的可靠性, 采用上述最优条件进行发酵试验, 重复 3 次。实际测得高级醇生成量分别为 363.28 mg/L、359.61 mg/L、367.32 mg/L, 平均值为 363.40 mg/L, 与理论预测值相差 1.78 %。因此, 采用响应面法优化调控高级醇的生成量的工艺条件准确可靠, 具有使用价值。

参考文献:

- [1] 秦含章. 国产白酒的工艺技术和试验方法[M]. 北京: 学苑出版社, 2000.
- [2] Dirk W. Lachenmeier, Simone Haupt, Katja Schulz. Defining maximum levels of higher alcohols in alcoholic beverages and surrogate alcohol products[J]. Regulatory Toxicology & Pharmacology: RTP, 2008, 50(3): 313-321.
- [3] 罗惠波, 苟云凌, 饶家权, 等. 酶制剂对浓香型白酒发酵过程中高级醇生成的影响[J]. 四川理工学院学报, 2011, 24(2): 186-189.
- [4] RaPP A, Mandery H. New progress in wine and wine research [J]. Experientia, 1987 (42): 873-884.
- [5] 甄会英. 葡萄酒中高级醇的测定方法与调控技术研究[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2005.
- [6] C. Y. Lee, H. J. Cooley. Higher-alcohol contents in New York wines[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1981, 32 (3): 244-246.
- [7] 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, 2006.
- [8] 陈浩, 谭忠元, 冯昆达, 等. 响应面法优化康宁木霉产纤维素酶的发酵培养基[J]. 酿酒科技, 2011 (11): 45-48.
- [9] 李云雁, 胡传荣. 实验设计与数据处理[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2008.

江西省天贻酒业招聘启事

因业务发展需要, 诚邀营销总监(可承包)、大区经理、营销专员若干名加盟。

因生产需要, 高薪诚邀酱香型白酒酿造师、白酒勾调师、动力工程师、烤酒工等专业人士加盟。

本公司是新转制企业, 目标高机会大, 待遇优厚, 为优秀人才提供良好的发展空间!

地址 江西省瑞金市红都广场

电话 0797-7112299

手机 18679793888

网址 www.jxytyjy.com

邮箱 929031346@qq.com