

海红果酒酵母筛选及其发酵工艺的响应面法优化

杨 辉¹, 黄丽梅¹, 罗建华²

(1. 陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西西安 710021;

2. 怀来县贵族庄园葡萄酒业有限公司, 河北怀来 075400)

摘要:选取 8 种活性干酵母对海红果酒进行了发酵实验, 以残糖和酒精度为考量参数, 筛选出适于海红果酒酿造的最优菌株。在单因素实验的基础上, 选取发酵温度、接种量、发酵时间为影响因子, 以残糖为响应值, 应用中心组合 Box-Behnken 实验设计构建二次回归方程的数学模型, 进行了响应面分析。结果表明, Z2 酵母是海红果酒酿造的最优菌株, 优化后的海红果酒发酵工艺条件为: 发酵温度为 23℃; 接种量为 0.25g/L; 发酵时间为 35d, 在此条件下, 发酵所得的海红果酒残糖量为 5g/L, 且果香浓郁, 酒体丰满。

关键词:海红果酒, 酵母筛选, 酿造, 工艺优化, Box-Behnken 设计

Selection and optimization of fermentation by box-behnken design of yeast for haihong wine brewing

YANG Hui¹, HUANG Li-mei¹, LUO Jian-hua²

(1. College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China;

2. Huailai County Aristocratic Manor Wine Co., Ltd., Huailai 075400, China)

Abstract: Through comparing fermentation of 8 active dry yeast in brewing of haihong wine, the optimal strain was selected with the index of the residual sugar and acidity. Based on single factor experiment, the inoculum of yeast, fermentation temperature, fermentation time were chosen as main factors, and the alcoholicity was used as response value and the mathematical model was established by Box-Behnken central composite design. The results showed that the optimal strain for haihong wine brewing was Z2, and the optional fermentation conditions were as follows: the fermentation temperature was 23℃, the inoculation of 0.25g/L and the fermentation time of 35d. Under these conditions, the resultant wine contained the residual sugar of 5g/L and had a good quality.

Key words: haihong wine; yeast selection; brewing; technical optimization; Box-Behnken

中图分类号: TS262.7

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)09-0221-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.09.040

海红果属稀有水果, 蔷薇科苹果属, 形似山楂, 主产于陕西府谷县及周边地区^[1]。海红果营养丰富, 含有 16 种氨基酸, 多种维生素, 钙磷含量居水果之首, 有“钙王”之美誉, 且对人体有益的黄酮类物质含量丰富, 营养价值高于苹果属其他水果^[2]。经常食用有消食健胃, 解除疲劳, 降低血脂及延缓动脉硬化等功效。

面对海红果加工水平低下的情况, 以海红果为原料酿造海红果酒可提高其附加值。李莉莉^[3]等采用海红干果进行其酿造工艺研究, 李龙柱^[4]等考察了影响海红果酒酿造的初始糖度和温度, 但均未对海

红果酒酿造酵母筛选进行相关研究。在果酒的生产中, 酵母是发酵的原动力, 直接影响果酒的质量和产量, 基于此, 本课题以海红果浓缩汁为原料, 进行海红果酒的发酵, 研究不同酵母菌株的发酵特征和产酒精能力, 通过感官指标评定筛选适合海红果酒酿造的优良菌株, 并通过响应面分析方法, 分析影响该菌株的各个因素, 优化其发酵工艺, 为海红果酒生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

海红果汁 陕西府谷县聚金邦农产品开发公司提供, 果汁的主要成分见表 1。

表 1 海红果汁主要成分

Table 1 Main components in haihong wine

pH	酸度(g/L)	总糖(g/L)
2.89	9.65	128.61

收稿日期: 2013-09-04

作者简介: 杨辉(1960-), 男, 博士, 教授, 主要从事生物材料和发酵工程方面的研究。

基金项目: 陕西省科技厅重大科技创新项目(2011ZKC11-2); 科技部成果转化项目(2013GB2G000473)。

酵母 Z1、Z2、ZF15 由陕西府谷县聚金邦农产品开发公司提供;BM45、BV818、RV171、RV002、RV100 酵母 安琪酵母有限公司生产;蔗糖 市售一级;亚硫酸 食品级,天津市天力化学试剂有限公司;氢氧化钠 AR,天津市恒星化学试剂制造有限公司;硫酸铜 AR,天津市百世化工有限公司;酒石酸钾钠 AR,天津市天力化学试剂有限公司;邻苯二甲酸氢钾 天津市博迪化工有限公司。

PHS-4C⁺ 酸度计 成都市方舟科技有限公司;SK-S22 型电热恒温水浴锅 上海精密实验仪器有限公司;HYC-DA 全温培养箱 太仓市豪城实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 活性干酵母的活化 将酵母溶解于 10 倍 37℃ 热水中,搅拌均匀,当有大量泡沫产生时表明活化完成。

1.2.2 发酵菌株筛选 以酿造 12% (vol) 的海红果酒计算补加蔗糖的含量为 76g/L,按 60mg/L 加 SO₂ 于果汁中,进行发酵。分别以上述 8 种菌株作为发酵菌株,酵母的接种量为 0.25g/L,于 20℃ 下发酵,观察发酵动态,比较各菌株产酒精能力及感官评定,确定海红果酒酿造的最佳菌株。

1.2.3 单因素实验设计

1.2.3.1 接种量对发酵的影响 在温度为 20℃、SO₂ 用量为 60mg/L、装液体积为 85%、发酵时间为 34d 的条件下,选取酵母接种量分别为 0.15、0.2、0.25、0.3g/L 考察接种量对海红果酒发酵的影响。

1.2.3.2 温度对发酵的影响 在酵母接种量为 0.25g/L、SO₂ 用量为 60mg/L、装液体积为 85%、发酵时间为 34d 的条件下,选取 15、20、25、28℃ 进行海红果酒发酵,考察温度的影响。

1.2.3.3 发酵时间对发酵的影响 在酵母的接种量为 0.25g/L、发酵温度为 20℃、SO₂ 用量为 60mg/L、装液体积为 85% 的条件下,选取为 25、30、35、40d 进行发酵,考察发酵时间的影响。

1.2.4 响应面分析 根据 Box-Behnken 的设计原理,在单因素实验的基础上,设计三因素三水平,共计 15 次实验的响应面分析。因素与水平设计见表 2,其中用“-1”、“0”和“1”分别代表各因素的低、中心点、高三个不同水平。

表 2 响应面分析因素与水平
Table 2 Factors and levels for RSA

因素	水平		
	-1	0	1
A 发酵温度(℃)	17	20	23
B 接种量(g/L)	0.22	0.25	0.28
C 发酵时间(d)	32	35	38

1.2.5 分析方法 酒精度:酒精计法^[5];pH:pH 计法;总酸:酸碱滴定法^[5];还原糖:斐林试剂法^[5];甲醇:比色法^[5];挥发酸测定:参照 GB/T 15038-2006。

感官分析方法:由 20 名专业人员组成感官评价

小组对海红果酒进行感官品评,参照 GB/T 15038-2006^[5] 制定评分标准,并根据该标准进行感官评分,取其平均值作为评分结果,满分为 100 分。感官评分标准见表 3。

表 3 海红果酒干酒感官评定标准
Table 3 The evaluation standards for haihong wine

项目	项目	完美	很好	好	一般	不好
外观分析	澄清度	5	4	3	2	1
	色调	10	8	6	4	2
	纯正度	6	5	4	3	2
香气分析	浓度	8	7	6	4	2
	质量	16	14	12	10	8
	纯正度	6	5	4	3	2
口感分析	浓度	8	7	6	4	2
	持久性	8	7	6	5	4
	质量	22	18	16	13	10
整体评价		11	10	9	8	7

评价标准:完美,85~100;很好,80~85;好,70~80;一般,50~70;不好,<50。

2 结果与分析

2.1 不同菌株的发酵特性

2.1.1 不同菌株发酵过程中总糖变化 海红果酒中残糖和还原糖的含量直接影响最终酒精度的高低、酒的口感和风味,是酿酒的重要工艺参数^[6]。在一定范围内,糖分增加可提高酒精度,但糖分过高,在提高酒精度的同时,也提高了某些高级醇、琥珀酸等副产物的生成量,导致果酒口味苦涩刺喉^[7]。不同菌株发酵海红果酒的总糖变化见图 1。由图看出,发酵过程中 8 株菌株的总糖含量变化趋势相同,但起酵时间、蔗糖的利用率,发酵周期不尽相同。其中酵母 Z2 起酵时间快,糖分利用率最高,发酵结束时,残糖仅有 7.8g/L。

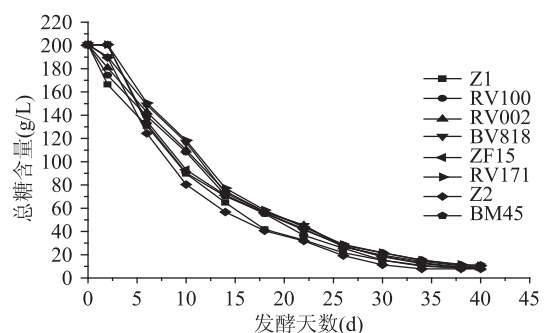


图 1 发酵过程中总糖含量变化趋势

Fig.1 Changes of total sugar in fermentation

2.1.2 不同菌株发酵过程中酒精度的变化 在发酵过程中,酒精度的不断提高会破坏酵母菌体内的蛋白质,甚至杀死酵母菌,从微生物代谢角度分析,随着酒度的提高,终产物反馈抑制作用渐渐加强,酵母产酒精能力减退^[7]。不同菌株发酵过程中酒精体积分数的变化如图 2 所示。结果表明 8 株菌株的产酒精能力差异不大,菌株 Z2 稍高于其它菌株,酒精度可达 11.4%,除酵母 RV171、F15、BM45 发酵启动速

表4 不同菌株发酵性能比较

Table 4 Comparison of fermentation properties of different strains

菌株	发酵时间 (d)	总酸 (g/L)	残糖 (g/L)	酒精度 (%)	感官品评分数	评语
Z1	36	10.84	8.4	11.3	83	色泽橙红、澄清、具有典型品种香气、爽口
Z2	34	10.75	7.8	11.4	87	色泽橙红、澄清透明、果香浓郁、口感圆润、厚味绵长
BM45	38	12.06	11.1	10.8	82	色泽橙红、澄清、酸度高、平衡性一般、厚味短
RV002	40	10.64	8.8	11.2	79	色泽橙红、澄清、具有明显果香、适口
RV100	36	10.94	8.6	11.3	75	色泽暗红、澄清、偏酸、果香一般、有骨架感
ZF15	38	11.37	9.3	11	73	色泽暗红、澄清、有苦味、果香寡淡
BV818	38	11.08	9.2	11.1	72	色泽暗红、澄清、口感粗糙、结构感差、厚味短
RV171	40	11.42	10.4	10.9	80	色泽橙红、澄清、果香明显、酒体丰满

度慢之外,其它5株菌株启发速率相近。

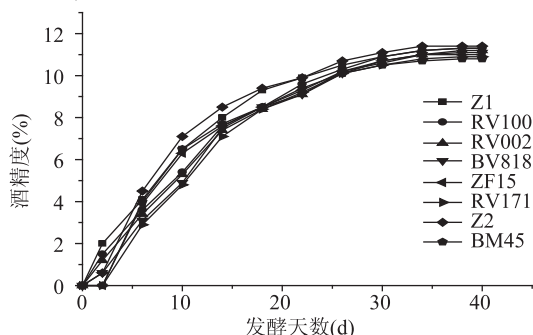


图2 发酵过程中酒精体积分数变化趋势

Fig.2 Changes of alcohol concentration in fermentation

2.1.3 不同菌株对滴定酸变化的影响 适量的有机酸能使酒醇厚且爽口,平衡酒中的苦味,还能抑制细菌活动^[8]。发酵过程中,不同菌株的总酸变化如图3所示。由图3看出,不同菌株对发酵过程中可滴定酸先升高再降低,然后再略微升高,降低,最终趋于平缓。原因是,发酵前期,酵母大量繁殖,发酵旺盛,产生大量的CO₂溶于酒中,使果酒中可滴定酸的含量迅速升高,然而随着CO₂的释放,可滴定酸含量逐渐下降,与此同时,有机酸随酵母细胞的生长、繁殖、发酵而产生、分泌,所以果酒中有机酸的含量呈现稍微上升的趋势,发酵后期,由于某些有机酸被吸收代谢而导致酸度略微下降。

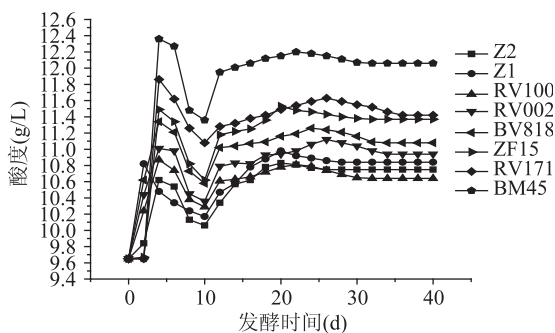


图3 发酵过程中滴定酸的变化

Fig.3 Changes of acidity in fermentation

2.1.4 不同菌株发酵性能综合比较 8株活性干酵母在20℃发酵40d,各菌株的综合指标、感官评定如表4所示。结果表明,Z2发酵时间最短,仅为

34d,且总酸和残糖含量最低,其他酵母菌的产酒精能力相差不多,感官品评发现,采用Z2酵母酿造的海红果酒口感圆润、果香浓郁,挥发酸含量为0.205g/L,甲醇含量为63.76mg/L,符合标准。综合考虑,Z2酵母菌株发酵性能优良,发酵周期短,风味较好,故选取该菌株作为海红果酒酿造的最优菌株。

2.2 影响Z2酵母发酵工艺的因素分析

2.2.1 Z2酵母的接种量对残糖和总酸的影响 由图4和图5可知,发酵过程中,随着酵母添加量的增加,发酵旺盛,对果汁糖分的分解转化就越充分,酒度也就越高。但过高的接种量会使发酵过于猛烈,导致酒味变苦^[9],同时接种量大,酵母自身生长繁殖消耗的果汁糖分高,使最终的酒精含量低。发酵结束后,酸度提升1~2个单位(见图3),酸度过高,易造成酒体粗糙,难以入口。因此,初步确定酵母的接种量为0.25g/L左右为宜。

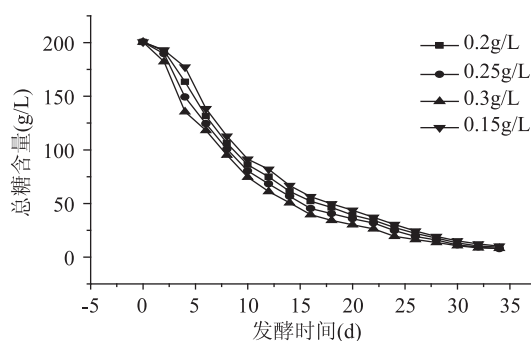


图4 发酵过程中总糖含量变化

Fig.4 Changes of total sugar in fermentation

2.2.2 发酵温度对残糖和总酸的影响 如图6所示,发酵过程中,随着温度升高,发酵启发快且旺盛,但是,高温造成酒体粗糙,香气损失较大,高温还导致发酵液的颜色加深,酵母早衰,严重时甚至不能完成发酵^[10-12],且残糖含量高。温度太低,发酵迟缓,整体生产不利。因此,主发酵温度控制在20℃左右为最佳。

2.2.3 发酵时间对残糖和总酸的影响 由图7可知,当发酵时间为30d时,残糖含量为11.3g/L,当发酵时间达32d时,残糖含量已达9.4g/L(数据未列出),表明发酵过程由此转入发酵较为缓慢的阶段,发酵时

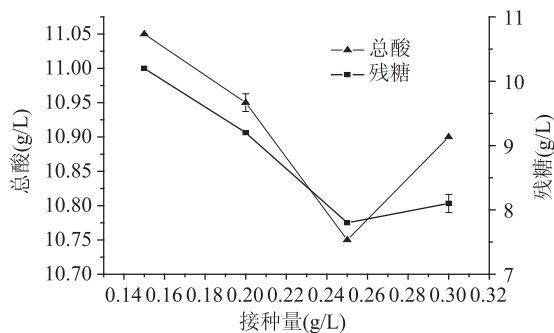


图5 接种量对残糖和总酸的影响

Fig.5 Effect of yeast inoculum amount on residual sugar and acidity

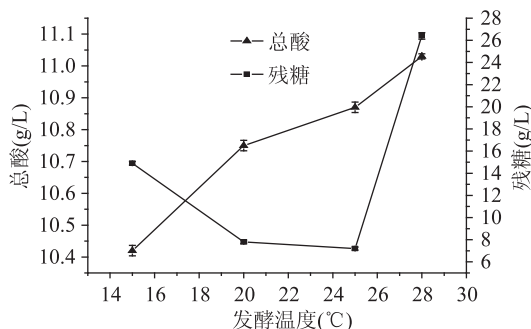


图6 温度对残糖和总酸的影响

Fig.6 Effect of fermentation temperature on residual sugar and acidity

间达到 35d 后,残糖更低,发酵基本完成。因此,发酵时间以 35d 左右为宜。

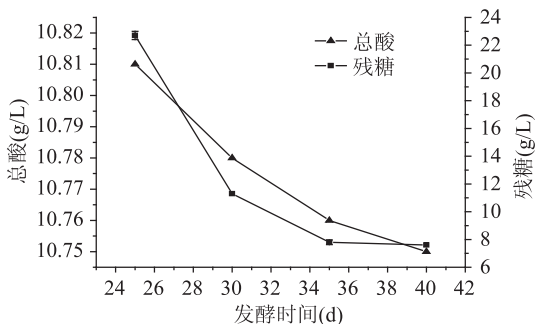


图7 发酵时间对残糖和总酸的影响

Fig.7 Effect of fermentation time on residual sugar and acidity

2.3 响应面设计与分析

2.3.1 模型的建立与显著性检验 根据 Box-Behnken 的实验设计原理,综合分析单因素实验结果,选取影响海红果酒发酵的三个因素,设计了三因素三水平的响应面分析实验,实验方案及结果见表 5。

根据表 5 中实验结果,利用 SAS9.1 软件对结果进行二次回归分析,获得的回归方程为: $Y = 6.27 - 1.015A - 0.9125B - 0.1525C - 0.34A^2 + 0.685AB + 1.305AC + 1.665B^2 + 0.5BC + 3.975C^2$ 。对该模型进行方差分析,结果见表 6,模型系数显著性检验见表 7。

表5 Box-Behnken 实验设计与结果

Table 5 Experimental design and results for Box-Behnken

实验号	A	B	C	残糖(g/L)
1	-1	-1	0	10.22
2	-1	1	0	6.8
3	1	-1	0	7
4	1	1	0	6.62
5	0	-1	-1	12.8
6	0	-1	1	12.6
7	0	1	-1	10.2
8	0	1	1	12
9	-1	0	-1	13.02
10	1	0	1	8.2
11	-1	0	1	9
12	1	0	1	9.4
13	0	0	0	5.65
14	0	0	0	6.18
15	0	0	0	5.9

表6 回归方程的方差分析

Table 6 ANOVA of regression model

方差来源	自由度	总方差	均方差	F 值	p 值
模型	9	95.55613	10.61735	19.19006	0.0023204
残差	5	2.766367	0.553273		
失拟项	3	2.6171	0.872367	11.6887	0.079835
纯误差	2	0.149267	0.074633		
总和	14	98.32249			

表7 回归方程中回归系数的 T 值检验

Table 7 Test of significance for regression coefficient

参数	参数估计	标准误差	t	p
A	-0.9775	0.262981	-3.71699	0.013755
B	-0.875	0.262981	-3.72723	0.020842
C	-0.1525	0.262981	-0.57989	0.587138
A ²	-0.15583	0.387098	-0.40257	0.7039
A × B	0.76	0.371912	2.043496	0.096438
A × C	1.305	0.371912	3.508897	0.017121
B ²	1.839167	0.387098	4.751166	0.005099
B × C	0.5	0.371912	1.344405	0.236586
C ²	4.084167	0.387098	10.55073	0.000132

从表 6 可以看出,模型的 $F_{模型} = 19.19006 > F_{0.01}(9,5) = 7.50136$, $p = 0.0023204 < 0.01$,表明模型方程极显著;失拟项 $p = 0.079835 > 0.05$,不显著;模型的调整复相关系数 $R_{adj}^2 = 0.9212$,说明该模型拟合程度较好,因此,可以用回归方程对海红果酒发酵后的残糖进行预测和分析。

回归方程的回归系数显著性检验表明:模型一次项 A 和 B 显著,C 不显著;二次项 B²、C² 极显著 ($p < 0.01$),说明其对响应值影响大;交互项 A × C 对响应值有显著的影响,应用该模型时需考虑其交互作用的影响。

2.3.2 响应面分析 利用软件 SAS9.1 根据回归方

程,对交互作用显著的因素进行响应面分析,绘制响应面分析图及其等高线图,结果见图8,从其等高线图可以直观看出两因素的交互作用显著,为确定最佳点,利用 SAS9.1 软件得出优化条件为:发酵温度为 23℃,接种量为 0.25g/L,发酵时间为 35d,此时残糖 4.84g/L。

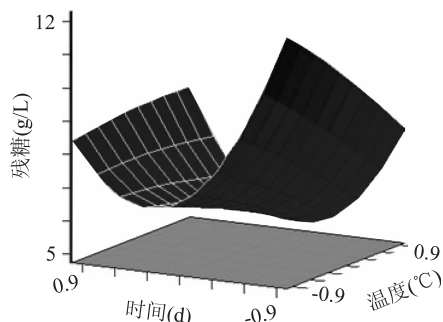


图8 发酵温度与发酵时间对残糖影响的响应曲面图

Fig.8 Effect of fermentation temperature and time on residual sugar of response surface

2.3.3 验证实验 在优化条件下,产品残糖的理论预测值为 4.84g/L。为检验实验结果的可靠性,采用上述优化发酵工艺条件酿造海红果酒,实验结果见表8,残糖平均值为 5g/L,与理论预测值仅相差 0.16%,说明该方程与实际情况拟合良好,响应面分析所得到的优化模型是可靠的,具有实用价值。同时,对该三款酒样进行总酸、甲醇、挥发酸含量的测定以及感官评定(见表8)。结果表明:在该条件下进行海红果酒酿造,其甲醇及挥发酸含量符合标准,果香浓郁,酒体丰满,厚味绵长,感官评定得分为 90.3 分。

3 结论

3.1 Z2 酵母适于海红果酒的酿造,发酵周期短,残糖低,产酸少,口感好。

3.2 Z2 酵母在 23℃,接种量 0.25g/L,经 35d 发酵所得的海红果酒果香浓郁,酒体丰满,是一种营养丰富

的保健型果酒。

表8 各项指标含量测定

Table 8 Determination of the indicators

序号	残糖 (g/L)	甲醇 (mg/L)	挥发酸 (g/L)	感官评定
1	4.96	66.48	0.213	88
2	4.92	72.34	0.246	92
3	5.12	69.26	0.235	91
平均值	5.00	69.36	0.213	90.3

参考文献

[1] 韩燕,温仲清,刘英.一种优良园林观赏树种-海红子[J].陕西林业科技,2005,33(1):63-68.
 [2] 赵亮,李青山.海红果[J].食品与药品,2007,7(9):71-72.
 [3] 李莉莉.海红果酒制备与分析[D].太原:山西大学,2008.
 [4] 李龙柱,张富新,贾润芳,等.海红果酒发酵工艺研究[J].农产品加工,2013,12(1):16-19.
 [5] GBT15038-2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
 [6] 白雪莲,岳田利,袁亚红.优良苹果酵母的筛选研究[J].食品研究与开发,2006,27(3):86-88.
 [7] 高兆建.低醇菠萝果酒酿造工艺的研究[J].中国酿造,2005,24(11):16-19.
 [8] 康孟利,凌建刚,林旭东.果酒降酸方法的应用研究进展[J].现代农业科技,2008,37(24):25-26.
 [9] 李加兴,陈双平,梁先长,等.猕猴桃干型果酒发酵工艺优化[J].食品科学,2010,31(22):504-507.
 [10] 吕英杰,张慧文,吕淑霞,等.红树莓干酒酿造菌种筛选及工艺优化[J].酿酒,2008,35(2):80-83.
 [11] 刘绍军,刘畅,张艳霞,等.特色玫瑰香葡萄酒发酵工艺优化[J].河北科技师范学院学报,2012,26(1):1-4.
 [12] 张大为,董文宾,张洁,等.梨酒专用酵母发酵工艺优化[J].农业机械学报,2010,41(10):159-163.

上海成立食药监管“重案组”

上海市食品药品监督管理局执法总队正式宣布成立。新组建的执法总队将在全面履行对食品、药品、保健品、化妆品、医疗器械监督执法职能的基础上,瞄准打击跨区域、涉案金额高、社会影响力大的大案要案,堪称食品药品监管“重案组”。

据市食安委副主任、市食药监局局长阎祖强介绍,作为市食药监局直属行政执法机构,此次新组建的执法总队由原上海市食品药品监督所、上海市食品生产监督所、上海市食品药品监督管理局稽查大队3支执法力量整合。

目前,市食药监局执法总队由130名熟悉食品药品监管法律法规、业务素质优良的执法人员组成。根据职能,他们被编入食品、餐饮、药品化妆品、医疗器械、应急机动等7个支队,配备有一流的执法装备、快检设备和快检车辆,能够对80余个项目实施现场快速检测。市食药监局执法总队首次集中执法检查启动,围绕食品、药品、保健品、化妆品、医疗器械“四品一械”展开。

来源:慧聪食品工业网