

响应面法优化低高级醇高氨基氮的黄酒酿造工艺

曹 钰^{1,2}, 潘慧青^{1,2}, 陆 健^{1,3}, 谢广发⁴

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 4. 中国绍兴黄酒集团有限公司 国家黄酒工程技术研究中心, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 高级醇含量和氨基酸态氮含量都是成品黄酒中的重要理化指标,且酒中高级醇的形成与氨基酸态氮代谢密切相关,酿造工艺条件对两者的影响复杂而且可能存在交互作用。在前期单因素实验的基础上,选取前酵温度、酵母接种量及后酵温度进行 Box-Behnken 响应面实验,通过响应面回归分析,确定了低高级醇、高氨基酸态氮的最优酿造工艺条件为:前酵温度 30 ℃,酵母接种体积分数为 3%,后酵温度为 13 ℃。在此条件下酿造的黄酒中高级醇质量浓度为 355.43 mg/L,氨基酸态氮质量浓度 0.98 g/L,与优化前相比高级醇降低了 12.30%,氨基酸态氮提高了 8.90%,有助于提高黄酒的品质。

关键词: 黄酒;高级醇;氨基态氮;响应面分析法

中图分类号: TS 261.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)05—0535—07

Optimization of Fermentation Process for Chinese Rice Wine with Low Higher Alcohols Content and High Amino Nitrogen Level by Response Surface Methodology

CAO Yu^{1,2}, PAN Huiqing^{1,2}, LU Jian^{1,3}, XIE Guangfa⁴

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. National Engineering Research Center for Chinese Rice Wine, China Shaoxing Rice Wine Group Co., Ltd. Shaoxing 312000, China)

Abstract: Both higher alcohols and amino nitrogen are important physical and chemical indexes of Chinese rice wine, and furthermore formation of the former is closely related to metabolism of the latter during wine brewing. There are multiple process conditions affect both two indexes content complexly, which may be interactions between factors. In this paper, on the basis of the previous single factor experiment results, three factors were selected as variables, which include

收稿日期: 2015-08-01

基金项目: 国家“973”计划项目(2012CB720802); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介: 曹 钰(1971—), 女, 江苏泰兴人, 工学硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事传统酿造的机理及相关微生物和酶类研究。

E-mail: tsaoy5@jiangnan.edu.cn

引用本文: 曹钰, 潘慧青, 陆健, 等. 响应面法优化低高级醇高氨基氮的黄酒酿造工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(05): 535-541.

primary-fermentation temperature, yeast inoculation size, post-fermentation temperature. The Box-Behnken design and response surface analysis were used to determine the optimal levels of the main factors. As a result the optimal conditions for Chinese rice wine with low higher alcohols content and high amino nitrogen level were primary-fermentation temperature 30 °C, yeast inoculation 3%, post-fermentation temperature 13 °C. The content of higher alcohols decreased 12.30% and amino nitrogen improved 8.90% in the optimal conditions.

Keywords: Chinese rice wine, higher alcohols, amino nitrogen, response surface methodology

黄酒是我国的特有酒种,以谷物(通常是糯米/粳米)为主要原料,利用酒药和麦曲或米曲所含的丰富的微生物和酶为糖化发酵剂,经双边浓醪发酵酿造而成的发酵原酒^[1]。

高级醇是各类酒的主要香味和口味物质之一。适量的高级醇能使酒体丰富,口味协调,给人以醇厚的感觉。若高级醇含量过高,则对人体有毒害作用^[2]。相比于其他发酵酒类而言,各种黄酒中高级醇的含量较多,也是导致黄酒容易“上头”的主要原因之一^[3]。在黄酒发酵过程中影响高级醇生成的因素有很多,主要包括:酵母菌种^[4-5]、酿酒原辅料^[5-6]、麦曲^[7]、发酵工艺^[8](温度、营养物质主要是氮源含量的控制、接种量及增殖倍数)。但从本质上来说,高级醇的形成不外乎2种途径^[1]:第一,若氨基酸缺失,酵母菌通过Harris途径自身合成必需氨基酸,同时形成的 α -酮酸中间体,被还原形成相应的高级醇;第二,若氨基酸含量过多,酵母菌通过Ehlich降解途径分解氨基酸,生成原氨基酸少一个碳的高级醇。由此可见高级醇的形成与发酵过程中的氨基酸代谢密切相关^[9],吴春在研究黄酒风味物质的形成及变化过程中证实发酵醪液中高级醇含量增加阶段与氨基酸的含量大量增加期有明显的一致性^[10]。张兴亚研究发现黄酒酿造中,随着麦曲量的增加、后酵温度的升高,高级醇与氨基酸态氮的变化趋势相同,都呈升高趋势^[8]。

氨基酸在黄酒酿造过程中既为微生物提供了丰富的营养物质,也是很多风味物质的前体物质,并能赋予酒体丰富的味觉层次。在整个黄酒酿造过程中氨基酸的含量是一个动态过程,一方面酵母菌等微生物的自身生长繁殖需要消耗一部分氨基酸,另一方面蛋白质在多种蛋白酶肽酶的作用下不断水解为氨基酸和小肽。黄酒行业采用氨基酸态氮来反映氨基酸及小肽的总体水平,氨基酸态氮含量是

评价黄酒质量等级重要指标^[11],国标对不同类型、不同等级黄酒中的氨基酸态氮含量有明确的要求。而黄酒的氨基酸态氮的形成同样也受到原辅料、麦曲中的酶系、发酵工艺条件等复杂影响^[12],且影响因素之间可能存在着交互作用。

随着人们对黄酒品质和饮用健康性要求的不断提高,降低黄酒中的高级醇含量并同时保留高等级标准氨基氮的优质黄酒受到极大的关注。作者前期已经进行黄酒酿造工艺,包括接种量、前酵温度、后酵温度、后酵时间^[13]等单因素对氨基酸态氮的影响研究。在综合文献资料和前期单因素实验结果的基础上,选取对高级醇和氨基酸态氮影响较大的3个因素:前酵温度、酵母接种体积分数及后酵温度进行Box-Behnken实验设计,探讨降低高级醇质量浓度并提高氨基酸态氮质量浓度的最优酿造工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Saccharomyces cerevisiae N85,由浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司提供;糯米,购于无锡市华润万家超市;生、熟麦曲,均由浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司提供;乙腈,赛默飞世尔科技有限公司产品;甲醇,北京白灵威科技有限公司产品,色谱纯,其他试剂均为分析纯。

UV-2100 紫外分光光度计,Unic公司产品;凯氏定氮仪 K2300,瑞典 FOSS 分析仪器有限公司产品;固相微萃取头、手动进样手柄,美国 Supelco 公司产品;Agilent GC7890A 型气相色谱仪,安捷伦科技有限公司产品。

1.2 常规黄酒酿造

采用3L的三角瓶发酵600g糯米,酿造工艺流程如图1。

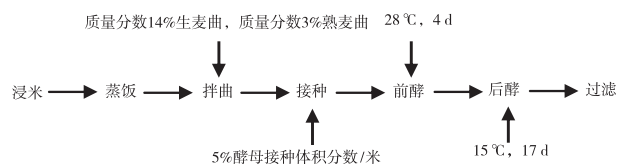


图1 黄酒酿造工艺流程

Fig. 1 Diagram of Chinese rice wine brewing

1.3 响应面优化实验

实验采用自然浸米,发酵时间为21 d,选取前酵温度、酵母接种体积分数和后酵温度3个工艺条件作为影响因素进行Box-Behnken响应面分析和优化,因素水平设计见表1,响应面实验为同一批次进行,所用麦曲经四分法取样测得酸性蛋白酶活在112~118 U/g之间。

表1 响应面因素设计水平表

Table 1 Factors and 3 level value of response surface methodology

水平	因素		
	A 前酵温度/°C	B 酵母接种体积分数/%	C 后酵温度/°C
-1	26	3	13
0	28	5	15
1	30	7	17

* 酵母接种量以米质量计算。

1.4 常规指标的测定

酒精度、总糖、总酸、氨基酸态氮及非糖固形物的测定方法按照GB/T 13662-2008《黄酒》中规定方法执行^[1]。总氮的测定采用凯氏定氮法,参照凯氏定氮仪说明书。高级醇质量浓度的测定参考李童^[12]等人。

2 结果与分析

2.1 Box-Behnken实验结果及方差分析

根据黄酒酿造工艺对氨基酸态氮和高级醇质量浓度影响的单因素实验结果^[13],前酵温度、后酵温度及酵母接种量3个因素的影响相对较大。选取前酵温度26、28、30 °C,酵母接种体积分数3%、5%、7%,后酵温度13、15、17 °C为影响因子水平,以高级醇含量和氨基酸态氮质量浓度为实验指标,进行Box-Behnken响应面分析,实验设计结果见表2。

利用软件Design-Expert8.0.6对表2进行多元回归拟合,分别获得高级醇质量浓度 Y_1 对自变量前酵温度(A),酵母接种量(B)和后酵温度(C)的三元多次回归方程和氨基酸态氮质量浓度 Y_2 对自变量的二元多次回归方程如下。

$$Y_1 (\text{高级醇}) = 410.33 + 33.05A + 25.86B + 21.64C - 1.00AB + 5.08AC + 6.64BC - 10.56A^2 - 29.28B^2 - 20.19C^2 - 7.62A^2B - 3.09A^2C - 5.79AB^2, R^2 = 0.99。$$

$$Y_2 (\text{氨基酸态氮}) = 0.92 + 0.08A - 6.250 \times 10^{-3}B + 0.046C - 0.017AB - 0.022AC + 2.500 \times 10^{-3}A^2 - 0.035B^2 - 0.025C^2, R^2 = 0.99;$$

回归诊断显示, Y_1 和 Y_2 回归方程的决定系数(R^2)均为0.99,信噪比(Adequate Precision)分别为81.76和22.88,且二元多次回归方程式的失拟值方差分析不显著($P=0.28>0.05$),这些都表明方程的拟合度与可信度很高,误差极小,能够用模型分别对高级醇质量浓度和氨基酸态氮质量浓度进行预测和分析。

表2 Box-Behnken实验设计结果

Table 2 Experiment design and results of Box-Behnken

实验号	A	B	C	指标	
				高级醇 质量浓度/ (mg/L)	氨基酸态氮 质量浓度/ (g/L)
1	-1	-1	0	324.00	0.78
2	1	-1	0	380.52	1.01
3	-1	1	0	362.47	0.80
4	1	1	0	415.00	0.96
5	-1	0	-1	333.06	0.75
6	1	0	-1	389.00	0.95
7	-1	0	1	360.00	0.89
8	1	0	1	436.27	1.00
9	0	-1	-1	320.00	0.82
10	0	1	-1	358.44	0.81
11	0	-1	1	350.01	0.91
12	0	1	1	415.03	0.90
13	0	0	0	412.00	0.93
14	0	0	0	410.00	0.92
15	0	0	0	409.00	0.91

由表3高级醇回归模型方差分析可知,对高级醇的质量浓度所建立的回归模型极显著($P=0.0014<0.01$),因素A、B、C、 A^2 、 B^2 和 C^2 对高级醇质量浓度的影响极为显著($P<0.01$);AC、BC、 A^2B 及 AB^2 对高级醇质量浓度的影响为显著($P<0.05$);因素AB和 A^2C 对高级醇质量浓度的影响不显著($P>0.05$)。

表 3 高级醇的方差分析表

Table 3 Variance analysis of Box-Behnken design about higher alcohols

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	19 426.378 0	12	1 618.864 8	693.799 2	0.001 4
A	4 369.871 0	1	4 369.871 0	1 872.801 9	0.000 5
B	2 674.441 2	1	2 674.441 2	1 146.189 1	0.000 9
C	1 873.591 2	1	1 873.591 2	802.967 7	0.001 2
AB	3.980 0	1	3.980 0	1.705 7	0.321 5
AC	103.327 2	1	103.327 2	44.283 1	0.021 8
BC	176.225 6	1	176.225 6	75.525 3	0.013 0
A ²	411.580 1	1	411.580 1	176.391 5	0.005 6
B ²	3 165.032 9	1	3 165.032 9	1 356.442 7	0.000 7
C ²	1 505.552 8	1	1 505.552 8	645.236 9	0.001 5
A ² B	116.128 8	1	116.128 8	49.769 5	0.019 5
A ² C	19.096 2	1	19.096 2	8.184 1	0.103 6
AB ²	67.048 2	1	67.048 2	28.734 9	0.033 1
残差	4.670 0	2	2.330 0		
总变异	19 431.04	14			

注: $R^2=0.99$, Adjusted $R^2=0.99$, Adequate Precision=81.76。

表 4 氨基酸态氮的方差分析表

Table 4 Variance analysis of Box-Behnken design about amino nitrogen

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.088	9	9.83×10^{-3}	47.95	0.000 3
A	0.061	1	0.061	298.78	<0.000 1
B	3.13×10^{-4}	1	3.13×10^{-4}	1.52	0.271 8
C	0.017	1	0.017	83.48	0.000 3
AB	1.23×10^{-3}	1	1.23×10^{-3}	5.98	0.058 3
AC	2.03×10^{-3}	1	2.03×10^{-3}	9.88	0.025 6
BC	0	1	0	0	1
A ²	2.31×10^{-5}	1	2.31×10^{-5}	0.11	0.750 9
B ²	4.52×10^{-5}	1	4.52×10^{-5}	22.06	0.005 4
C ²	2.31×10^{-3}	1	2.31×10^{-3}	11.26	0.020 2
残差	1.03×10^{-3}	5	2.05×10^{-4}		
总变异	0.089	14			

注: $R^2=0.99$, Adjusted $R^2=0.97$, Adequate Precision=22.88。

氨基酸态氮回归模型方差分析见表 4, 对氨基酸态氮的质量浓度所建立的回归模型极显著 ($P=0.000\ 3<0.01$), 因素 A 对氨基酸态氮的影响最为显著, 其次因素 C 的影响极为显著 ($P<0.01$); AC, C² 对氨基酸态氮质量浓度的影响为显著 ($P<0.05$); 因素 B、AB、BC 和 A² 对氨基酸态氮质量浓度的影响不显著 ($P>0.05$)。

2.2 因素交互作用的响应面分析

2.2.1 前酵温度、酵母接种量、后酵温度的交互作用对高级醇的影响 前酵温度和酵母接种量对高级醇的交互作用不显著, 如图 2 所示。当前酵温度不变时, 随着酵母接种体积分数的增大, 高级醇的质量浓度基本没有发生较大改变。同样, 当酵母接种体积分数恒定时随着前酵温度的增加使得高级

醇质量浓度也未发生显著变化。

前酵温度与后酵温度对高级醇的交互作用明显。当前酵温度不变时,随着后酵温度的增大使得高级醇质量浓度增加;同样,当后酵温度保持不变时随着前酵温度的增大也使得高级醇质量浓度增加。

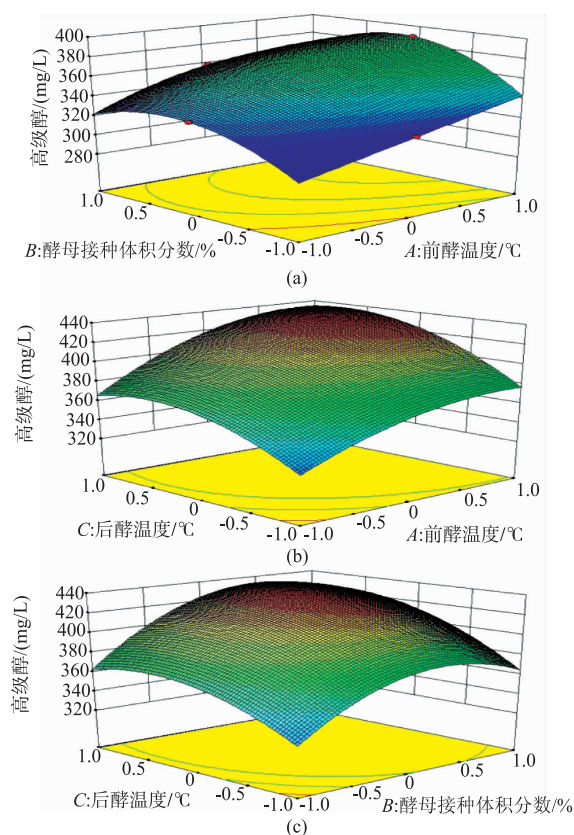


图2 前酵温度、酵母接种体积分数与后酵温度交互作用对高级醇的影响

Fig. 2 Response surface plots of effect of interaction between primary fermentation temperature and yeast inoculation size and post-fermentation temperature on higher alcohols in Chinese rice wine

酵母接种体积分数和后酵温度对高级醇的交互作用显著。当酵母接种体积分数不变时,随着后酵温度的不断增大,高级醇质量浓度呈现先增多后稍微降低的趋势;同样,当后酵温度保持不变时,随着酵母接种体积分数的增大而高级醇质量浓度呈现先增多后降低的趋势。因此,该条件下2因素的交互作用对高级醇质量浓度影响较为显著。

2.2.2 前酵温度、酵母接种体积分数、后酵温度的交互作用对氨基酸态氮的影响 前酵温度和酵母接种体积分数对氨基酸态氮的交互不显著,见图3。

当前酵温度不变时,随着酵母接种体积分数的增大,氨基酸态氮的质量浓度基本没有发生改变;仅当酵母接种体积分数恒定时随着前酵温度的升高使得氨基酸态氮质量浓度增多,此时前酵温度起到主要影响作用。

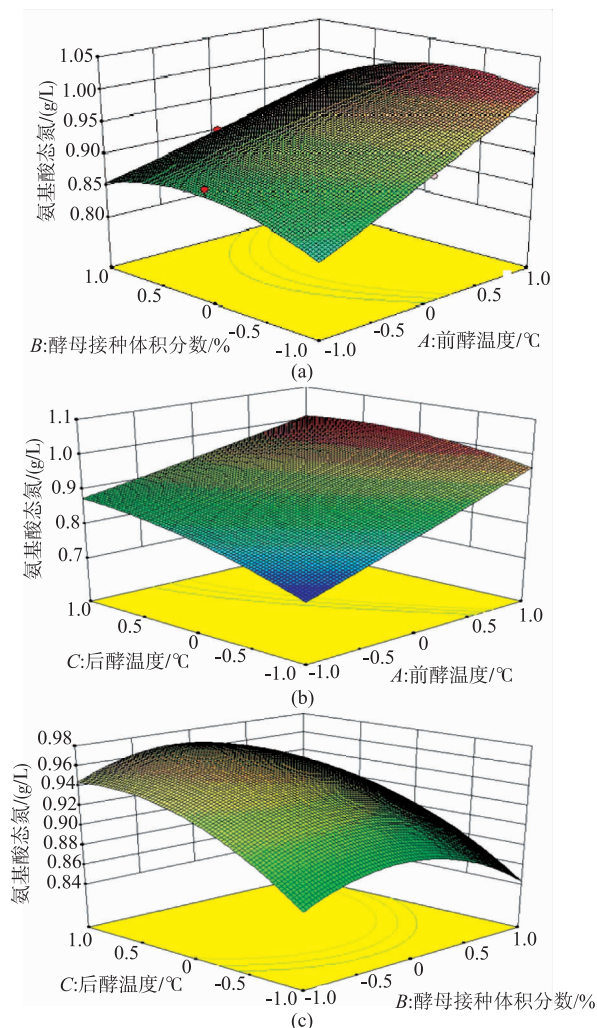


图3 前酵温度、酵母接种体积分数与后酵温度的交互作用对氨基酸态氮的影响

Fig. 3 Response surface plots of effect of interaction between primary-fermentation temperature and yeast inoculation size and post-fermentation temperature on amino nitrogen in Chinese rice wine

前酵温度与后酵温度对氨基酸态氮的交互作用明显。当前酵温度不变时,随着后酵温度的增大使得氨基酸态氮质量浓度增加;同样,当后酵温度保持不变时随着前酵温度的增大也使得氨基酸态氮质量浓度增加。

酵母接种体积分数和后酵温度对氨基酸态氮的交互作用不显著。当酵母接种体积分数不变时,随着后酵温度的不断增大,氨基酸态氮质量浓度呈现先增多后稍微降低的趋势;但当后酵温度保持不变时,随着酵母接种体积分数的增大而氨基酸态氮质量浓度几乎未发生变化。因此,该条件下因素后酵温度对氨基酸态氮质量浓度影响较为显著。

2.3 验证性实验

用软件 Design-Expert 8.0.6 中的“Optimization”选项进行分析得出优化结果,即同时获得较低的高级醇质量浓度及较高的氨基酸态氮质量浓度的发

酵条件为:前酵温度 30 ℃,酵母接种体积分数 3% 和后酵温度 13 ℃,高级醇质量浓度和氨基酸态氮质量浓度的计算预测值分别为 343.33 mg/L 和 0.95 g/L。

采用优化的工艺条件(前酵温度 30 ℃、酵母接种体积分数 3% 和后酵温度 13 ℃)进行发酵实验,同时采用优化前发酵条件(前酵温度 28 ℃、酵母接种体积分数 5%、后酵温度 15 ℃)作为对比酿造实验,以进一步验证该方法的可靠性。分别做 3 个平行实验,结果见表 5。

优化酿造的黄酒中高级醇质量浓度平均值为

表 5 实验设计的结果验证

Table 5 Validation of the experimental design results

	酒精度/%	总糖/(g/L)	总酸/(g/L)	酵母数/(亿/mL)	氨基酸态氮/(g/L)	高级醇/(mg/L)	非糖固形物/(g/L)
优化前	16.0±0.2	14.25±0.85	4.87±0.27	0.65±0.03	0.90±0.03	405.26±10.28	40.76±1.20
优化后	16.0±0.2	12.58±0.53	5.04±0.30	0.60±0.01	0.98±0.02	355.43±8.74	42.18±0.81

355.43 mg/L,氨基酸态氮的平均值为 0.98 g/L,验证实验的结果与理论预测值误差小于 3.50%,与优化前相比高级醇降低了 12.30%,氨基酸态氮提高了 8.90%,其他黄酒理化指标均在正常范围之内。因此,采用响应面方法优化得到的最优工艺条件具有实际意义与实用价值,既能有效降低黄酒的高级醇质量浓度,又可以提高氨基酸态氮质量浓度,确保黄酒的饮用安全和品质等级。

3 结 语

在黄酒发酵过程中高级醇的形成与氨基酸态氮代谢密切相关,两者是成品酒中的重要理化指标。高级醇和氨基酸态氮的生成受到多种酿造工艺条件影响,且因素之间可能存在交互作用。在前期单因素实验的基础上,选取前酵温度、酵母接种体积分数及后酵温度进行 Box-Behnken 响应面实验,用 Design expert 8.0.6 对实验数据处理分析,并进行

响应面分析,探讨这 3 个因素的交互作用对高级醇和氨基酸态氮的影响。

结果表明前酵温度、后酵温度以及前酵温度和后酵温度的交互作用对高级醇和氨基酸态氮的影响都是极显著;酵母接种体积分数对高级醇的影响极显著,但对氨基酸态氮的影响不显著;酵母接种体积分数与后酵温度的交互作用对高级醇影响显著,但对氨基酸态氮影响不显著;前酵温度和酵母接种体积分数交互作用对两者都不显著。通过响应面回归分析,确定了降低高级醇质量浓度同时提高氨基酸态氮的最优工艺条件为:前酵温度 30 ℃,酵母接种体积分数为 3%,后酵温度为 13 ℃。经过验证实验,在此条件下酿造的黄酒中高级醇质量浓度为 355.43 mg/L,氨基酸态氮质量浓度 0.98 g/L,与优化前相比高级醇降低了 12.30%,氨基酸态氮提高了 8.90%,有助于提高黄酒的品质。

参考文献:

- [1] 谢广发. 黄酒酿造技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010:18-20.
- [2] STRUBELT O, DETERS M, PENTZ R, et al. The toxic and metabolic effects of 23 aliphatic alcohols in the isolated perfused rat liver[J]. *Toxicol Sci*, 1999, 49(1): 133-142.
- [3] XIA Xiaole, ZHU Xiaoming, ZHANG Bin, et al. Quantitative analysis of fusel alcohol in Chinese rice wine and its explanation of formation mechanism[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(12): 125-129. (in Chinese)

- [4] CHEN S,XU Y. The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine[J]. **Journal of the Institute of Brewing**,2010,116(2):190-196.
- [5] CHEN Shuang,LUO Tao,XU Yan,et al. Effects of yeast strains and raw materias on β -phenylethanol production in Chinese rice [J]. **China Brewing**,2009,28(4):23-26.(in Chinese)
- [6] RONG Zhixin,ZHOU Jiandi,QIAN Bin,et al. Effect of the polishing degree office on higher alcohols content during the main fermentation of Chinese rice wine[J]. **China Brewing**,2013,32(1):28-32.(in Chinese)
- [7] ZHANG Xingya,GAO Mengsha,JIANG Yujian. Effect of saccharifying and fermenting agent on higher alcohols contents in Chinese rice wine[J]. **China Brewing**,2012,31(1):130-133.(in Chinese)
- [8] 张兴亚. 黄酒中高级醇含量控制的工艺研究[D]. 杭州:浙江工商大学,2012.
- [9] HAN Tao,XIAO Dongguang,LI Jiabiao. Effect of α -amino nitrogen fusel alcohols production in beer fermentation[J]. **Liquor Making**,2003,30(6):55-57.(in Chinese)
- [10] 吴春. 古越龙山黄酒的特征风味物质及其成因的初步研究[D]. 无锡:江南大学,2009.
- [11] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 13662-2008. 黄酒[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [12] CHEN Jingxian. Factors influencing amino acid nitrogen of Chinese rice wine[J]. **Food and Fermentation Industries**,1992,18(2):83-88.(in Chinese)
- [13] 潘慧青. 黄酒中氨基酸态氮的来源及酿造工艺的影响[D]. 无锡:江南大学,2015.
- [14] LI Tong,SUN Junyong,WU Dianhui,et al. Effect of YDL080C and LEU2 gene knockout on isoamyl alcohol production in industrial yellow rice wine yeast[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2015,36(15):189-193.(in Chinese)

科 技 信 息

欧盟授权将昆布褐藻多酚作为新食品成分投放欧盟市场

2018年3月21日,欧盟委员会发布(EU)2017/460号法规,根据欧洲议会和理事会(EC)第2015/2283号法规,授权昆布褐藻多酚(Ecklonia cava phlorotannins)作为新型食品成分投放于欧盟市场,并修订欧盟委员会实施细则(EU)2017/2470。内容包括:

一是按法规(EU)2015/2283第8条的规定列入欧盟授权新食品清单;
二是对规定了可以使用新食品的条件为2002/46/EC指令中定义的食品补充剂(适用于普通人群,包括12岁以下的儿童),其中对于12至14岁的青少年为163mg/天、14岁以上青少年为230mg/天、成人263mg/天;三是规定了标签要求。

本法规在欧盟官方公报公布后20天生效。

[信息来源]厦门WTO工作站. 欧盟授权将昆布褐藻多酚作为新食品成分投放欧盟市场

[EB/OL]. (2018-3-26). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/show.asp?id=56805>