

营养素对苹果酒中结合 SO₂ 影响的研究

方 强, 籍保平*, 李 博, 张 泓

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 研究 SO₂ 在果酒酿制中的变化规律以及如何降低果酒中的 SO₂ 使用量是果酒食品安全的重要课题。本文利用单因素试验和二次通用旋转组合设计研究了磷酸氢二铵、硫酸铵、硫胺素等外加营养素对苹果酒酒精发酵结束后结合 SO₂ 量的影响。结果表明, 磷酸氢二铵、硫酸铵、硫胺素的添加能够在不同程度上降低酒精发酵结束后结合 SO₂ 的量; 酒精发酵结束后结合 SO₂(Y₁) 的量与磷酸氢二铵(X₁)、硫酸铵(X₂) 的添加量关系显著, 回归方程为 $Y_1=67.22-3.075X_1^2+5.48X_1X_2-4.685X_1-3.676X_2^2$, 相关系数为 0.7543。

关键词: 苹果酒; 结合 SO₂; 磷酸氢二铵; 硫酸铵; 响应面分析法

The Effect of Nutrients on Binding Sulfur Dioxide after Cider Fermentation

FANG Qiang, JI Bao-ping*, LI Bo, ZHANG Hong

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: It is an important food safety subject with the study on change regularity of sulfur dioxide to decrease the amount of sulfur dioxide in cider. The paper studied the effect of ammonium monoacid phosphate and other nutrients on binding sulfur dioxide after cider fermentation by single element experiments and rotary unitized design. The results showed that the amounts of binding sulfur dioxide could be decreased by adding ammonium monoacid phosphate, ammonium sulfate, thiamine separately. The results showed the relation between binding sulfur dioxide with ammonium monoacid phosphate, ammonium sulfate is significant. The Regressive equation is $Y_1=67.21719-3.074819X_1^2+5.48X_1X_2-4.685243X_1-3.675864X_2^2$, R-square is 0.7543.

Key words: apple cider; binding sulfur dioxide; ammonium monoacid phosphate; ammonium sulfate; response surface analysis

中图分类号: TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0146-06

SO₂ 是苹果酒和葡萄酒酿造过程中常用的添加剂。它有抑菌、抗氧化、改善果酒风味、增酸等多种作用^[1]。但是, 它也会给人的身体健康带来问题。20 世纪初, 人们开始研究 SO₂ 的毒性。动物试验表明^[2], SO₂ 的急性毒性不强; 在 SO₂ 的慢性毒性研究方面, 用含 1.5g/kg SO₂ 饲料喂养动物并繁殖几代后, 出现三个问题: 一是硫胺素缺乏, 二是胃部发生组织病变, 三是动物生长缓慢; 1973 年, 试验证实了人体对亚硫酸盐的过敏性反应。

目前人们对食品安全问题日益重视, 各国对果酒中 SO₂ 添加制定了限量标准。美国 FDA 要求在美国出售的葡萄酒, 若其中总 SO₂ 含量超过 10mg/L 则需要在标签上注明^[2]。我国国家标准中规定葡萄酒中总 SO₂ 最大限量为 250mg/L, 游离 SO₂ 的最高限量为 50mg/L。长期以来

SO₂ 的安全问题在国内一直并未引起足够的重视, 到目前为止也尚未见到相关的报道。针对这种情况, 本文研究了苹果酒中的 SO₂ 问题, 试图为解决 SO₂ 的安全问题提供依据和途径。

以苹果浓缩汁稀释液进行酒精发酵常出现发酵迟滞甚至意外停止的现象, 研究表明添加合适的的营养素能够解决这一问题^[3]。外加的营养元素主要有无机氮源、生物素、泛酸、硫胺素、肌醇、烟酰胺等。这些营养元素的添加同时也会影响到酵母代谢中间产物乙醛、丙酮酸等的分泌^[4~6]。而乙醛、丙酮酸等物质又是和游离 SO₂ 结合的主要物质^[7], 所以有必要探讨营养素与发酵结束后结合 SO₂ 量的规律。

所以, 本文将利用单因素试验和二次通用旋转组合设计研究磷酸氢二铵、硫酸铵、硫胺素等营养素对苹

表1 20° Bx的浓缩苹果汁稀释液中的可同化氮源及维生素含量
Table 1 Concentration of assimilable nitrogen and vitamins in 20° Bx apple juice

营养素种类	可同化氮 (mg/L)	硫胺素 (mg/100ml)	VB ₂ (mg/100ml)	烟酰胺 (μg/100g)	吡哆醇 (μg/100g)	生物素 (mg/100g)	泛酸 (mg/100g)
含量	158.19	0.0517	0.0047	119.3	11.9	3.17	1.20

果酒酒精发酵结束后结合SO₂量的影响,并试图得到使结合SO₂量与营养素添加量之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

苹果汁:浓缩苹果汁,由汇源饮料食品有限公司提供,基本参数如下:可溶性固形物(73%),酸度(2.0%)。浓缩苹果汁稀释20° Bx后的可同化氮源及维生素含量见下表1。

酿酒酵母菌种:酵母900,由试验室保存。

1.2 仪器

SO₂氧化法检测装置:全自动杀菌釜MLS2420/2420U 日本SANYO公司;生化培养箱LRH-250 上海一恒科技有限公司;高速台式离心机TGL16C 上海安亭科学仪器厂;电热恒温水浴锅北京市长风仪器仪表公司;恒温密度瓶(25ml)安徽凤阳县玻璃厂。

1.3 方法

1.3.1 发酵种子液制备

固体斜面培养 $\xrightarrow{25^{\circ}\text{C}, 48\text{h}}$ 液体试管培养 $\xrightarrow[接种量(12.5\%)]{25^{\circ}\text{C}, 24\text{h}, 150\text{r/min}}$
三角瓶摇床培养 $\xrightarrow[接种量(5\%)]{25^{\circ}\text{C}, 48\text{h}, 150\text{r/min}}$ 发酵(18℃)

1.3.2 苹果酒发酵过程

将苹果浓缩汁稀释至20° Bx。取稀释后的苹果汁,分装入经过紫外杀菌的500ml的三角瓶中,每瓶装入400ml。称取偏重亚硫酸钾,用水溶解,配成30g/L溶液。用此溶液调各罐中SO₂浓度达120mg/L。静置24h之后,添加营养素,然后按5%接种量接入酵母菌种子液,在18℃下发酵18d。

取18d的酒体检测酒精度,将酒体离心后检测游离SO₂、结合SO₂。

1.3.3 试验设计

单因素试验:选用影响苹果酒发酵的营养素磷酸氢二铵、硫酸铵、硫胺素、肌醇、烟酰胺、吡哆醇、生物素、泛酸钙进行单因素试验。试验中各因素分别取五水平,分别检测酒精发酵后酒样的结合SO₂量。

二次通用旋转组合设计试验:在单因素试验的基础

上进行组合设计。该方法试验点由三部分构成,即要因点(1~8),它为各因素皆取二水平(+1, -1)的全面试验点,分布在坐标轴上的星号点(9~14),以及各因素均取零水平的中心点(15~20)。

本试验以磷酸氢二铵、硫酸铵、硫胺素为自变量(分别用X₁, X₂, X₃表示),酒精发酵结束后结合SO₂和酒精度的量(分别用Y₁, Y₂表示)为响应值设计了三因素五水平共20个试验点的响应面分析试验。每个自变量取五个水平,如表2所示:

试验中每个试验点取三个平行样。试验获取的结合

表2 试验因素水平编码表
Table 2 Coding of levels of the elements in experiment

变量(单位)	符号	代码				
		-1.68	-1	0	1	+1.68
磷酸氢二铵(mg/L)	X ₁	231.8	300	400	500	568.2
硫酸铵(mg/L)	X ₂	347.7	450	600	750	852
硫胺素(mg/L)	X ₃	0.648	0.75	0.90	1.05	1.152

SO₂和酒精度的响应值,用SASv8.0软件进行分析,并由此给出方差分析表及响应面分析图。

1.3.4 游离SO₂和结合SO₂的检测方法 氧化法 GB/T 15038/94。

1.3.5 酒精度的测定 密度瓶法 GB/T 15038/94。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果与分析

试验中选用添加的营养素对苹果酒酒精发酵结束后

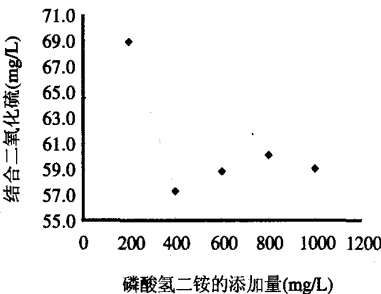


图1 磷酸氢二铵添加对结合二氧化硫的影响
Fig.1 Effect of ammonium monoacid phosphate on binding sulfur dioxide

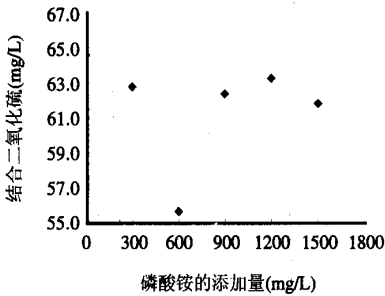


图2 硫酸铵添加对结合二氧化硫的影响

Fig.2 Effect of ammonium sulfate on binding sulfur dioxide

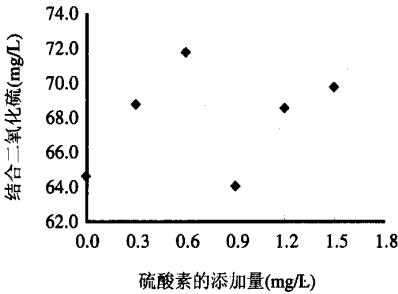


图3 硫胺素添加对二氧化硫的影响

Fig.3 Effect of thiamine on binding sulfur dioxide

结合 SO₂ 的影响结果如图 1~3 所示。从图中可以看出，与对照样相比，磷酸氢二铵、硫酸铵、硫胺素的添加能够在不同程度上降低酒精发酵结束后酒样的结合 SO₂ 的量。其中磷酸氢二铵添加量从 200mg/L 上升到 400mg/L 时，结合 SO₂ 的量从 68.91mg/L 下降到 57.36mg/L，而添加量大于 400mg/L 时，结合 SO₂ 的量变化很小；硫酸铵的添加对结合 SO₂ 的影响呈现出随着硫酸铵添加量的增加，结合 SO₂ 的量先减少后增加的规律，其中在硫酸铵添加量为 600mg/L 时，结合 SO₂ 的量达到最小量 55.68mg/L；当硫胺素的添加量为 0.90mg/L 时，结合 SO₂ 的量达到最小值 64.01mg/L；而其他五种营养素分别添加后，并没有达到降低结合 SO₂ 的目的，反而是在不同程度上增加了酒精发酵结束后结合 SO₂ 的量。

所以，在八种营养素中选用能够在不同程度上降低酒精发酵结束后结合 SO₂ 量的三种营养素磷酸氢二铵、硫酸铵、硫胺素来进行下一步的二次通用旋转组合设计，以期考察三种营养素对酒精发酵结束后结合 SO₂ 量的交互影响作用以及得到在选用的添加量范围内三种营养素对结合 SO₂ 量影响的回归方程。

2.2 二次通用旋转组合设计试验结果与分析

营养素对苹果酒酒精发酵结束后结合 SO₂ 影响的二次通用旋转组合设计试验的 20 个试验点的结果如表 3 所示。

表3 响应面试验设计安排及试验结果
Table 3 Design and results of response surface experiments

序号	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	300	450	0.75	71.97	11.27
2	300	450	1.05	68.51	11.67
3	300	750	0.75	55.36	11.47
4	300	750	1.05	53.56	11.57
5	500	450	0.75	42.63	11.43
6	500	450	1.05	50.37	11.60
7	500	750	0.75	47.47	10.97
8	500	750	1.05	57.81	11.37
9	231.8	600	0.9	66.58	11.30
10	568.2	600	0.9	58.93	11.50
11	400	347.7	0.9	59.87	11.63
12	400	852.3	0.9	62.24	11.47
13	400	600	0.648	65.78	11.63
14	400	600	1.152	68.57	11.47
15	400	600	0.9	62.88	11.37
16	400	600	0.9	68.66	11.30
17	400	600	0.9	67.88	11.27
18	400	600	0.9	68.10	11.30
19	400	600	0.9	63.84	11.27
20	400	600	0.9	70.49	11.13

用 SASv8.0 软件对 20 个试验点的结合 SO₂ 响应值进行回归分析，得到回归方程，以及回归方程方差分析表。

以酒精发酵完成后的结合 SO₂(Y₁)为响应值，经回归拟合后，得到回归方程：

$$Y_1=67.22-4.685X_1-1.120X_2+1.282X_3-3.075X_1^2+5.48X_1X_2+2.918X_1X_3-3.676X_2^2+0.533X_2X_3-1.512X_3^2$$

2.2.1 回归方程的失拟性检验和显著性检验

结合回归方程的方差分析(见表 4)中的失拟项均方和纯误差均方，对回归方程进行失拟性检验如下，F=49.98849/12.79583=3.91 < F_{0.05}(5,5)=5.05。结果表明其差异不显著，即回归方程对所有的试验点拟合的较好，所以可直接对回归方程进行进一步地显著性检验。

从回归方程的方差分析(见表 4)可以看出，用回归方程来描述结合 SO₂ 与全体自变量的关系时，其非线性关系显著：F=3.410371 > F_{0.05}(9,10)=3.02，线性相关系数 R² 是 0.7543，离回归标准差为 5.60287。这表明回归方程拟合程度较好。

2.2.2 回归系数的显著性检验

从回归系数的显著性检验(表 5)来看，回归系数 b₁, b₁₁, b₁₂, b₂₂ 在置信度 90% 以上显著，而其它系数的 t 值的置信度均在 90% 以下。所以回归方程为

表4 回归方程各项的方差分析表
Table 4 Variance analysis of items of regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	显著性
模型	9	963.5301	107.0589	3.410371	*
一次项	3	339.3719	113.124	3.603574	*
二次项	3	363.9272	121.3091	3.864311	*
交互项	3	310.6061	103.5354	3.298128	*
误差	10	313.9216	31.39216		
失拟项	5	294.9424	49.98849	3.906623	
纯误差	5	63.97915	12.79583		
RMSE	离回归标准差		5.60287		
R-square	相关系数		0.7543		

$F_{0.05(5,5)}=5.05$; $F_{0.01(5,5)}=11.0$; $F_{0.05(9,10)}=3.02$, $F_{0.01(9,10)}=4.94$ 。

表5 回归方程中回归系数的估计值
Table 5 Estimate values of coefficients in regression equation

变量	系数	标准误差	T 检验	大于 T 的概率
X_1	-4.68524	1.516126	-3.09027	0.011439
X_2	-1.11988	1.516126	-0.73865	0.477099
X_3	1.282305	1.516126	0.845777	0.417456
$X_1 \times X_1$	-3.07482	1.475909	-2.08334	0.063839
$X_1 \times X_2$	5.48	1.980914	2.7664	0.01991
$X_1 \times X_3$	2.9175	1.980914	1.472805	0.171567
$X_2 \times X_2$	-3.67586	1.475909	-2.49058	0.031959
$X_2 \times X_3$	0.5325	1.980914	0.268815	0.793536
$X_3 \times X_3$	-1.51212	1.475909	-1.02453	0.329729

$$Y_i=67.22-3.075X_1^2+5.48X_1X_2-4.685X_1-3.676X_2^2$$

2.2.3 等高线图和响应面图分析

从表4得知，回归方程的应变量即结合SO₂与全体自变量之间非线性关系明显。回归方程的一次项、二次项、交叉项的影响都是较显著的，这说明所选的因素(磷酸氢二钾、硫酸铵、硫胺素)之间的交互效应较大。

二次通用旋转组合设计试验结果通过SASv8.0统计软件处理后得到表示因素间交互作用的三维响应面图以及二维平面上的等高线图，见图4~6。从图4中可以看出，磷酸氢二铵、硫酸铵的添加都会降低酒精发酵结束后结合SO₂的量，并且两者有明显的降低结合SO₂的交互作用；从图5、图6中可以看出，硫胺素的添加对酒精发酵结束后结合SO₂的量影响很小。

由SASv8.0软件分析得到，当磷酸氢二钾、硫酸铵、硫胺素的添加量分别为568、347、0.648mg/L时，结合SO₂的量达最低值33.08mg/L。

2.3 讨论

二氧化硫作为抑菌剂已使用几百年，但是它的使用也存在缺陷，例如一些微生物如*Saccharomyces*

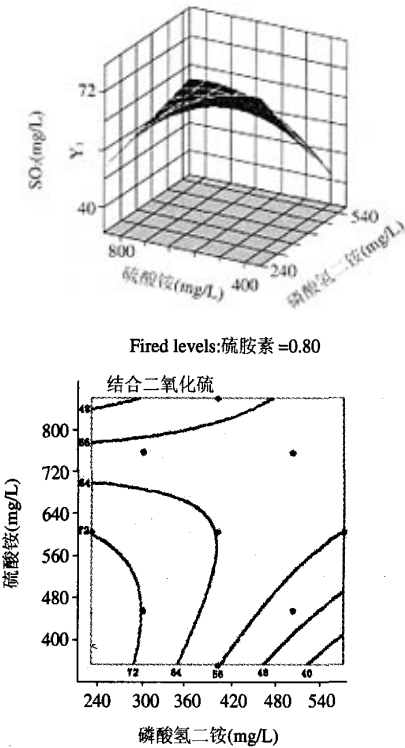
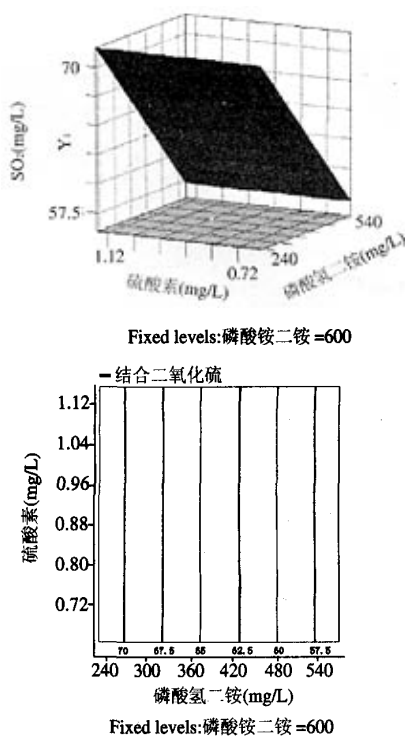
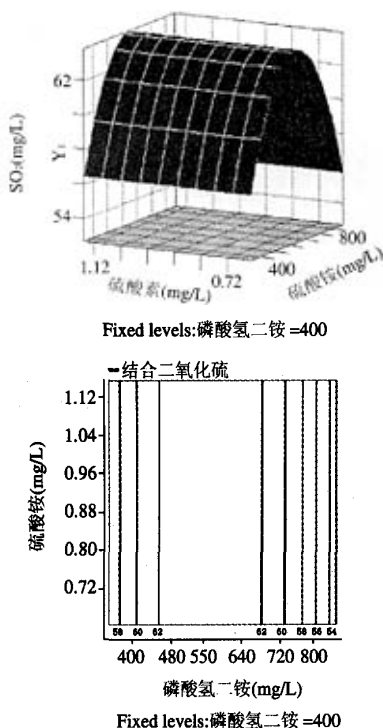


图4 $y=f(x_1, x_2)$ 响应面立体图和等高线图
Fig.4 $y=f(x_1, x_2)$ response surface solid figure and contour figure

cerevisiae and *bayanus*比其他菌要更能抵抗SO₂的抑制作用，它的功效受到pH的强烈影响，它会导致出现不良气味，以及可能产生过敏性的反应。所以，在果汁和葡萄酒的工业生产中试图寻找降低二氧化硫添加量或是替代品的途径。

本文选用的几种营养元素，特别是氮源如磷酸氢二铵、硫酸铵能够在不同程度上解决苹果浓缩汁酒精发酵迟滞的问题^[8]。而通过适当的配比来添加营养元素，同时又达到了在一定程度上降低结合酒精发酵结束后结合SO₂，使二氧化硫在酒精发酵过程中发挥最大限度作用

图5 $y=f(x_1, x_3)$ 响应面立体图和等高线图Fig.5 $y=f(x_1, x_3)$ response surface solid figure and contour figure图6 $y=f(x_2, x_3)$ 响应面立体图和等高线图Fig.6 $y=f(x_2, x_3)$ response surface solid figure and contour figure

的目的。Basil Jarvis 等人(2000)利用两株酵母菌考查了三种温度以及添加或不添加营养素(磷酸氢二铵、硫酸素、泛酸钙混合添加)对苹果酒发酵结束后亚硫酸盐的结合水平的影响。结果表明:在添加营养素的条件下,结合 SO_2 的量都比缺乏营养素的条件下要高^[7]。本文试验结果中也出现了添加一定配比的营养素而使其酒精发酵结束后结合 SO_2 比对照样结合 SO_2 量高的情况,与 Basil Jarvis 等人的试验结果有一致之处。

另外,过量的含氮化合物会影响酒的风味和微生物的稳定性,而且可能还会形成氨基-甲酸乙酯的前体物质,因此,各国对氮源添加量都有限定。美国规定在葡萄酒中添加磷酸氢二铵(一铵和二铵)量不超过 960mg/L^[9],澳大利亚的限量为 1885mg/L^[10],而欧共体的规定严格一些,它规定添加磷酸氢二铵或硫酸铵的用量不超过 300mg/L^[10]。本文中添加的氮源量未超过澳大利亚和美国对铵盐的限量要求。

3 结 论

3.1 选用磷酸氢二铵、硫酸铵、硫酸素、肌醇、烟酰胺、吡哆醇、生物素、泛酸钙等八种外加营养素进行的单因素试验结果表明,与不加营养素的对照组相比,磷酸氢二铵、硫酸铵、硫酸素的添加能够在不同程度上降低酒精发酵结束后结合 SO_2 的量,当磷酸氢二铵、硫酸铵、硫酸素的添加量分别为 400、600、0.9mg/L 时,结合 SO_2 的量分别为 57.36、55.68、64.01mg/L(对照组为 64.57mg/L);而其他营养素的添加反而会增加结合 SO_2 的量。

3.2 由单因素试验基础上进行二次通用旋转组合设计试验,结果表明酒精发酵结束后结合 SO_2 (Y_1) 的量与磷酸氢二铵(X_1)、硫酸铵(X_2)的添加量非线性关系显著,并得到了回归方程 $Y_1=67.22-3.075X_1^2+5.48X_1X_2-4.685X_1-3.676X_2^2$,相关系数为 0.7543,能够较好的拟合在自变量变化范围内的试验点。当磷酸氢二钾、硫酸铵、硫酸素的添加量分别为 568、347、0.648mg/L 时,结合 SO_2 的量达最低值 33.08mg/L。

参考文献:

- [1] 朱宝镛.葡萄酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [2] Ribéreau - Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B, et al. The microbiology of wine and vinification[M]. Translate by Brance J M New York: Wiley & Sons, 2000. 179-203.
- [3] Dukes B C, C E Butzke. Rapid determination of primary amino acids in must using an OPA/NAC Spectrophotometric assay[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1998, 49(2): 125-133.

三种澄清剂对枸杞酒澄清效果及其 对枸杞多糖含量影响的研究

刘锐萍, 籍保平*, 李 博

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 本文对皂土、壳聚糖、ZTC1+1 澄清剂对枸杞酒澄清效果及其对枸杞多糖等各种成分含量的影响进行研究, 结果表明皂土的澄清效果最好, 透光率能达到 95% 以上, 枸杞多糖的损失率在 25.7% 以下, 蛋白质和总酚去除率可分别达到 86.1% 和 44.6%。壳聚糖和 ZTC1+1 澄清剂的澄清速度快, 壳聚糖澄清枸杞酒最大透光率为 90.5%, 多糖、蛋白质和总酚的最大去除率分别为 15.1%、11.6%、8.8%。ZTC1+1 澄清剂澄清后枸杞酒的最大透光率为 91.45%, 总多糖、蛋白、总酚的最大损失率分别为: 30.3%、9.5%、16%。

关键词: 枸杞酒; 澄清; 枸杞多糖; 皂土; 壳聚糖; ZTC1+1 澄清剂

Study on the Clarification Effects of Three Clarification Agents and the Influence to The Lycium Barbarum Polysaccharide

LIU Rui-ping, JI Bao-ping*, LI Bo

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Bentonite, Chitosan and ZTC1+1 were used to clarify the lycium barbarum wine in this article. The influence to the lycium barbarum polysaccharide and other ingredients were studied. The results showed that among the three agents bentonite was the best, and its transperance was more than 95%, its lost of lycium barbarum polysaccharide was less than 25.7%, and the contents of protein and polyphenol dropped 86.1% and 44.6%. The clarifying speed of Chitosan and ZTC1+1 was higher. The most transperance of chitosan only was 90.5%, the polysaccharide, protein and polyphenol dropped 15.1%, 11.6 %and 8.8%. The most transperance of ZTC1+1 was 91.45%. The polysaccharide, protein and polyphenol dropped not more than 30.3, 9.5% and 16%.

Key words: lycium barbarum wine; clarify; lycium barbarum polysaccharide; bentonite; chitosan; ZTC1+1 agents

收稿日期: 2004-11-09 * 通讯作者

作者简介: 刘锐萍(1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事枸杞发酵酒方面的研究工作。

-
- [4] Coote N, Kirsop B H, Buckee G K. Journal of the Institute of Brewing, 1973, 79: 298.
 - [5] Stratford M, Morgan P, Rose A H. Sulphur dioxide resistance in Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces ludwigii[J]. Journal of General Microbiology, 1987, 133: 2173-2179.
 - [6] Weeks C. American Journal of Enology and Viticulture, 1969, 20: 32.
 - [7] Basil Jarvis, Andrew G H Lea. Sulphite binding in ciders[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2000, 35: 113-127.
 - [8] 王华. 苹果浓缩汁生产苹果酒中酵母营养与发酵性能的研究[D]. 中国农业大学硕士论文, 2001.
 - [9] Higgins S E. Revision and recodification of wine regulations[J]. 27 CRR part 4 et al. Federal Register, part III, 55(118) Department of the Treasury, Bureau of Alcohol, Tobacco, and Firearms, 1990, 24974-25034.
 - [10] Bruce C Dudes, Christian E. Butzke. Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric assay[J]. Am J Enol Vitic, 1998, 49(2).