

红枣汁酒精发酵工艺参数的优化

化志秀¹, 鲁周民^{2,*}, 芦艳², 李新岗²

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

2.西北农林科技大学林学院 陕西省红枣工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘要:为研究红枣汁酒精发酵规律,以清涧木枣为原料,采用响应面法对影响红枣汁酒精发酵中的初始可溶性固形物含量、酵母接种量、发酵温度和发酵时间进行优化。结果表明:原汁初始可溶性固形物含量、发酵温度、发酵时间对酒精度的影响极显著($P<0.01$),接种量影响不显著($P>0.05$);各因素对酒精度影响的主次顺序为:发酵时间>发酵温度>初始可溶性固形物含量>接种量。优化出枣醋酒精发酵的最佳工艺参数为:初始可溶性固形物含量17%、发酵温度31℃、酵母菌接种量0.8%、发酵时间43h,此条件下酒精度为9.6%以上。通过验证实验可知,建立的数学模型可用于指导实际生产。

关键词:红枣;酒精发酵;酒精度;工艺参数;响应面法

Optimization of Process Parameters for Alcoholic Fermentation of Jujube Juice

HUA Zhi-xiu¹, LU Zhou-min^{2,*}, LU Yan², LI Xin-gang²

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Shaanxi Center of Chinese Jujube Engineering and Technology, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Process parameters for the alcoholic fermentation of jujube juice prepared from Mu jujubes collected from Qingjian county such as initial solid content, yeast inoculum size, temperature and fermentation time were optimized using response surface methodology. Alcohol production was extremely significantly influenced by initial solid content, temperature and fermentation time ($P<0.01$) and no significantly influenced by inoculum size ($P>0.05$). Four process parameters were in descending order of their effects on alcohol production: fermentation time > temperature > initial solid content > inoculum size. Their optimum conditions were determined to be 43 h, 31 °C, 17% and 0.8%, respectively. Under these conditions, the alcohol concentration in fermented jujube juice was over 9.6%. The results of validation experiments demonstrated that the developed mathematical prediction model is applicable for practical production.

Key words: jujube; alcoholic fermentation; alcohol concentration; process parameters; response surface methodology
中图分类号: TS201.1 文献标志码: A 文章编号: 1002-6630(2013)01-0175-05

枣(*Zizyphus jujuba* Mill.)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Zizyphus* Mill.)植物^[1],是中国特有的经济果品,现在全国栽培面积已达100多公顷,年产量400多万吨^[2]。枣果不仅味道鲜美、且富含多种营养成分,其主要营养物质有多糖、有机酸、蛋白质、VB₁、VB₂、VC、VA及钙、磷、铁等^[3],在鲜枣中VC含量约为250mg/100g,个别品种含量高达800~900mg/100g^[4]。枣中含糖量相当高,一般含糖量超过30%,其中还原糖质量分数占总糖质量分数的70%以上^[5],有利于微生物发酵生产枣醋。

目前红枣主要是以干枣销售,枣果的深加工产品较少,随着科技发展以及人们生活水平的提高,果醋在世界范围内越来越受到欢迎。用红枣通过发酵生产枣醋是

红枣加工利用的重要途径,且枣醋具有很高的营养保健价值^[6]。红枣同苹果、橘、橙、柿子等相比,其维生素、糖类、氨基酸、矿物质含量更为丰富^[7],红枣多糖还具有免疫学活性和清除自由基的功能^[8]。

在发酵生产枣醋的过程中首先要经过酒精发酵,酒精发酵是枣醋发酵一个非常重要的阶段。目前对红枣醋酸发酵阶段的研究较多^[3,9-10],而对酒精发酵阶段的研究较少。本实验在保留全果肉成分条件下对红枣果浆进行液态发酵,采用响应面分析法^[11-16]对影响枣醋酒精发酵阶段的工艺参数进行优化,旨在建立枣醋生产中酒精发酵阶段的数学模型,为实际生产提供理论参考。

收稿日期: 2011-12-26

基金项目: 财政部以大学为依托的农业科技推广体系建设项目(XTG2010-15)

作者简介: 化志秀(1987—),女,硕士研究生,主要从事食品贮藏与加工研究。E-mail: 602998087@qq.com

*通信作者: 鲁周民(1966—),男,研究员,硕士,主要从事经济林产品保鲜贮藏与加工利用研究。E-mail: lzm@nwsuaf.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

红枣: 采自陕西省清涧县的木枣, 2011年10月中旬采摘(已失水软化), 运回实验室放于冰箱(2 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 中备用。原料含水率为59.18%、总糖含量33.7%、总酸含量0.57%。

酵母菌 广东丹宝利酵母有限公司; 果胶酶(酶活力大于20000U/g) 上海蓝季科技发展有限公司; 纤维素酶(酶活力1320U/g) 陕西省微生物研究所。

1.2 仪器与设备

UV-1700紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; HPS-250生化培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; R200D型-A200S型电子分析天平 德国Sartorius公司; Centrifuge 5804高速离心机 德国Eppendorf公司; WYT-4型手持糖量计 上海精密仪器仪表有限公司; HH-S4型电热恒温水浴锅 北京科伟永兴仪器有限公司; 酒精计(值为 0.1°) 河北武强县同辉仪表厂; BCD-215DC型冰箱 中国海尔集团; 发酵罐, 自制, 约200mL的罐头瓶, 瓶盖用针头扎5个针头大小的小孔, 以便发酵产生的 CO_2 出来。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程及操作要点

工艺流程: 红枣选择 \rightarrow 清洗 \rightarrow 去核 \rightarrow 打浆 \rightarrow 酶解 \rightarrow 灭菌 \rightarrow 调节可溶性固形物含量 \rightarrow 接种 \rightarrow 酒精发酵

实验时选择完好无损的枣果, 去核, 加入枣果质量2.5倍的凉开水打浆, 用由果胶酶和纤维素酶按质量比1:2组成的混合酶, 在温度 40°C 、酶用量2400mg/L条件下酶解4h^[17]。在 80°C 条件下灭菌10min, 冷却至 30°C 。调节可溶性固形物含量, 分装于自制的发酵罐中(每个样装3罐, 即重复3次), 按实验方案进行发酵, 定时用蒸馏法测酒精度。

1.3.2 红枣汁酒精发酵的单因素试验

1.3.2.1 发酵时间对红枣汁酒精发酵的影响

调整红枣汁初始可溶性固形物含量为16%, 量取5份红枣汁, 每份450mL, 按0.5%接入酵母菌, 分装于自制的发酵罐中, 在 30°C 条件下分别发酵12、24、36、48、60h, 检测其酒精度。3次重复, 取其平均值。

1.3.2.2 初始可溶性固形物含量对红枣汁酒精发酵的影响

量取红枣汁5份, 每份450mL, 分别调整可溶性固形物含量为10%、13%、16%、18%、21%, 接入0.5%的酵母菌, 装于自制的发酵罐中, 均于 30°C 发酵36h, 检测其酒精度。3次重复, 取其平均值。

1.3.2.3 酵母菌接种量对红枣汁酒精发酵的影响

量取已调整可溶性固形物含量为16%的红枣汁5份, 每份450mL, 分别按0.25%、0.5%、0.75%、1%、1.25%接入酵母菌, 装于自制的发酵罐中, 在 30°C 发酵36h, 检测其酒精度。3次重复, 取其平均值。

1.3.2.4 发酵温度对红枣汁酒精发酵的影响

量取已调整可溶性固形物含量为16%的红枣汁5份, 每份450mL, 按0.75%接入酵母菌, 装于自制的发酵罐中, 分别在26、28、30、32、 34°C 条件下发酵36h, 检测其酒精度。3次重复, 取其平均值。

1.3.3 红枣汁酒精发酵的响应面设计

在单因素试验的基础上, 采用Box-Behnken模型选取初始可溶性固形物含量、接种量、发酵温度、发酵时间作为响应面法考察因素。以酒精度(Y)作为响应值, 用统计软件Design-Expert 7.0设计四因素三水平29个试验点的响应面分析试验。各因素的编码水平和取值见表1。

表1 试验因素水平与编码表
Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

编码水平	因素			
	X_1 初始可溶性固形物含量/%	X_2 接种量/%	X_3 发酵温度/ $^{\circ}\text{C}$	X_4 发酵时间/h
-1	14	0.50	28	24
0	16	0.75	30	36
1	18	1.00	32	48

1.3.4 指标测定

可溶性固形物(SSC)测定: 用手持糖量计测定; 酒精度(% , V/V, 20°C)的测定: 酒精蒸馏法^[18]; 总糖含量、还原糖含量测定: 3,5-二硝基水杨酸比色法^[19]。

2 结果与分析

2.1 红枣汁酒精发酵的单因素试验结果

2.1.1 发酵时间对红枣汁酒精发酵的影响

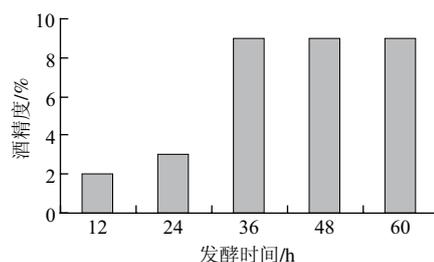


图1 发酵时间对红枣汁酒精发酵的影响
Fig.1 Effect of fermentation time on alcohol concentration

由图1可知, 在初始可溶性固形物含量一定的条件下, 一定时间内, 酒精度随发酵时间的延长而增大, 到36h时, 酒精度达到最大。之后, 随着发酵时间的延长酒精度基本保持不变。

2.1.2 初始可溶性固形物含量对红枣汁酒精发酵的影响

初始可溶性固形物含量在酒精发酵过程中直接影响着酒精发酵的程度。由图2可知, 当发酵时间确定为36h时, 在一定范围内酒精度随可溶性固形物含量的增大而

增大。当初始可溶性固形物含量太高时,可能对酵母菌的发酵有一定的抑制作用,因此,可溶性固形物含量超过16%时,酒精度又随红枣汁可溶性固形物含量的增大而降低。

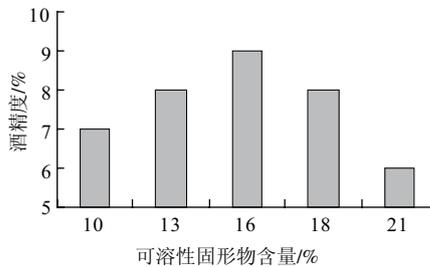


图2 初始可溶性固形物含量对红枣汁酒精发酵的影响
Fig.2 Effect of soluble solid content on alcohol concentration

2.1.3 酵母菌接种量对红枣汁酒精发酵的影响

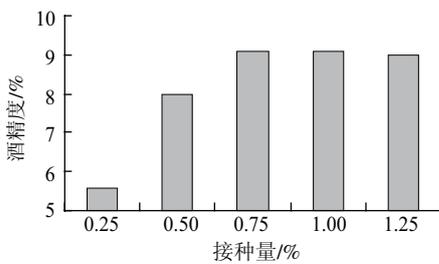


图3 接种量对红枣汁酒精发酵的影响
Fig.3 Effect of yeast inoculum size on alcohol concentration

由图3可知,在可溶性固形物含量和发酵时间一定时,随着酵母菌接种量的增加,酒精度也随之升高,当接种量为0.75%时酒精度达到最大为9.0%,之后随着接种量的增大,酒精度不再升高。

2.1.4 发酵温度对红枣汁酒精发酵的影响

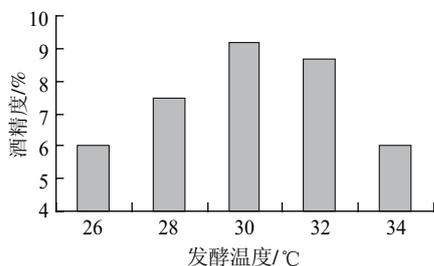


图4 发酵温度对红枣汁酒精发酵的影响
Fig.4 Effect of fermentation temperature on alcohol concentration

由图4可知,在温度较低时,酵母菌发酵缓慢,随着温度不断的升高,酵母菌的活动加强,酒精度也随之升高,当在30℃发酵时,酒精度达到最高;之后随着温度的升高,又会对酵母菌的活动有一定的抑制作用,酒精度又随之降低。

2.2 响应面试验结果

按照响应面设计方案,安排了29组处理组合,发酵结束时分别测定其酒精度,结果见表2。

表2 响应面试验设计及结果
Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X ₁ 初始可溶性固形物含量/%	X ₂ 接种量/%	X ₃ 发酵温度/°C	X ₄ 发酵时间/h	Y酒精度/%
1	14	0.50	30	36	7.4
2	18	0.50	30	36	8.2
3	14	1.00	30	36	7.8
4	18	1.00	30	36	8.5
5	16	0.75	28	24	2.2
6	16	0.75	32	24	3.0
7	16	0.75	28	48	8.0
8	16	0.75	32	48	8.5
9	14	0.75	30	24	3.6
10	18	0.75	30	24	2.1
11	14	0.75	30	48	7.3
12	18	0.75	30	48	9.2
13	16	0.50	28	36	7.5
14	16	1.00	28	36	7.7
15	16	0.50	32	36	8.0
16	16	1.00	32	36	8.7
17	14	0.75	28	36	6.5
18	18	0.75	28	36	7.0
19	14	0.75	32	36	7.8
20	18	0.75	32	36	8.3
21	16	0.50	30	24	3.0
22	16	1.00	30	24	3.1
23	16	0.50	30	48	9.0
24	16	1.00	30	48	8.9
25	16	0.75	30	36	8.8
26	16	0.75	30	36	8.9
27	16	0.75	30	36	9.1
28	16	0.75	30	36	9.1
29	16	0.75	30	36	8.9

2.3 回归模型的建立

通过统计软件Design-Expert 7.0以酒精度为响应值,对表2进行多元回归拟合,得到红枣汁酒精发酵工艺参数初步回归模型:

$$Y=8.96+0.24X_1+0.13X_2+0.45X_3+2.83X_4-0.025X_1X_2+0.85X_1X_4+0.12X_2X_3-0.05X_2X_4-0.075X_3X_4-0.74X_1^2-0.23X_2^2-0.8X_3^2-2.71X_4^2 \quad (1)$$

由表3可知, $P_{模型} < 0.0001$ 表明回归模型方程(1)极显著;失拟项 $P=0.1126 > 0.05$,表明不显著,模型的校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.9905$,表明回归模型与实测值能较好地拟合。变异系数(CV)表示试验的精确度,其值越大,试验结果的可靠性越低,试验 $CV=3.2\%$,在可接受范围内,说明试验结果可靠,可以用此模型对红枣汁酒精发酵阶段的酒精度进行分析和预测。

由回归方程各变量的系数显著性检验可知,模型(1)的一次项 X_1 、 X_3 、 X_4 影响极显著($P < 0.01$), X_2 影

响不显著($P>0.05$)；二次项 X_1^2 、 X_3^2 、 X_4 影响均极显著 $^2(P<0.01)$ ， X_2^2 影响显著($P<0.05$)；交互项 X_1X_4 达到极显著($P<0.01$)， X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 影响不显著($P>0.05$)。依据方程各变量系数的大小可知，各因素对响应值酒精浓度影响的主次顺序为：发酵时间>发酵温度>初始可溶性固形物含量>接种量。

表3 酒精度回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model for alcohol production

变异来源	自由度	平方和	均方和	F	P	显著性
总模型	14	151.532	10.82375	208.6745	<0.0001	**
X_1	1	0.70083	0.700833	13.51159	0.0025	**
X_2	1	0.21333	0.213333	4.112922	0.0620	
X_3	1	2.43	2.43	46.84875	<0.0001	**
X_4	1	95.7675	95.7675	1846.332	<0.0001	**
X_1X_2	1	0.0025	0.0025	0.048198	0.8294	
X_1X_3	1	0	0	0	1.0000	
X_1X_4	1	2.89	2.89	55.71724	<0.0001	**
X_2X_3	1	0.0625	0.0625	1.204958	0.2909	
X_2X_4	1	0.01	0.01	0.192793	0.6673	
X_3X_4	1	0.0225	0.0225	0.433785	0.5208	
X_1^2	1	3.53601	3.536018	68.17203	<0.0001	**
X_2^2	1	0.33081	0.330815	6.377895	0.0242	*
X_3^2	1	4.16000	4.160005	80.20206	<0.0001	**
X_4^2	1	47.7546	47.75467	920.6775	<0.0001	**
残差	14	0.72616	0.051869			
失拟项	10	0.65416	0.065417	3.634259	0.1126	
纯误差	4	0.072	0.018			
总误差	28	152.258				
		$R^2=0.9952$	$R_{adj}^2=0.9905$	CV=3.2%		

注：*：差异显著($P<0.05$)；**：差异极显著($P<0.01$)。

剔除不显著项，经优化后回归模型为：

$$Y=8.96+0.24X_1+0.45X_3+2.83X_4+0.85X_1X_4-0.74X_1^2-0.23X_2^2-0.80X_3^2-2.71X_4^2 \quad (2)$$

2.4 响应曲面分析

由于在交互项中只有原汁可溶性固形物含量(X_1)和发酵时间(X_4)的交互作用对酒精度的影响极显著，为了直观表达其影响，因此，令其他因素水平值为零，只考虑初始可溶性固形物含量(X_1)和发酵时间(X_4)2个因素对酒精度的影响，进行降维分析^[20]，绘出相应的响应面图和等高线图(图5)。

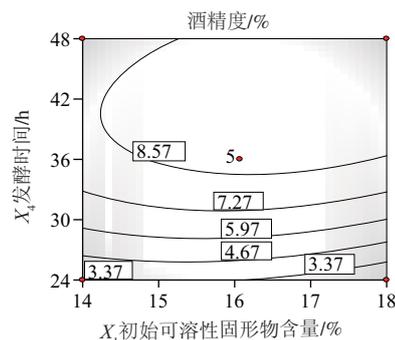
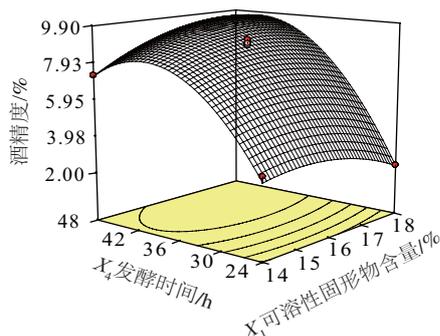


图5 发酵时间和初始可溶性固形物含量的交互作用对酒精度影响的响应面和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of fermentation time and initial solid content on alcohol concentration

图5显示了初始可溶性固形物和发酵时间及其交互作用对酒精度的影响，可以看出随着发酵时间的延长、初始可溶性固形物含量的增大，酒精度呈抛物线状态，在可溶性固形物含量为17%、发酵时间为40h达到最大。影响酒精度的最主要的因素是发酵时间，与前面由回归方程得出的结论相吻合。由等高线图可以看出它们的交互作用对酒精度也有很大的影响。

2.5 酒精发酵工艺的优化及验证

在试验结果分析及模型拟合的基础上，利用Design-Expert 7.0对试验参数进一步优化，即在获得最大酒精度的情况下对各工艺参数取值进行优化。由软件分析得最优工艺参数为初始可溶性固形物含量17%、酵母菌接种量0.82%、发酵温度30.55℃、发酵时间43.10h，按此工艺参数条件，酒精度预测值为9.94%。考虑到实际生产操作的方便性，把各参数取值规整，即初始可溶性固形物含量取17%、发酵温度31℃、酵母菌接种量0.8%、发酵时间43h，作为最佳生产技术参数。

参照理论上的最佳发酵工艺条件：对初始可溶性固形物含量17%、酵母菌接种量0.8%、发酵温度31℃、发酵时间43h进行3次重复验证实验，所得酒精度为9.7%、9.6%、9.6%，平均值为9.63%，和预测值的相对误差为3.1%，实际值与理论值极为接近。故响应面法优化得到的发酵工艺参数具有实际应用价值，可用于指导生产。

3 结论

3.1 通过响应面分析建立了以酒精度为目标值，发酵时间、初始可溶性固形物含量、发酵温度、接种量为因变量的数学模型为： $Y=8.96+0.24X_1+0.45X_3+2.83X_4+0.85X_1X_4-0.74X_1^2-0.23X_2^2-0.80X_3^2-2.71X_4^2$ 。模型中各因素与发酵中酒精度目标值高度显著，可用于生产预测。

3.2 红枣液态酒精发酵中,各影响因子的主效应主次顺序为发酵时间>发酵温度>初始可溶性固形物含量>接种量。

3.3 红枣液态酒精发酵的最佳工艺参数为原汁初始可溶性固形物含量17%、发酵温度31℃、酵母菌接种量0.8%、发酵时间43h。采用该工艺参数进行生产实验,酒精度达9.6%以上。

参考文献:

- [1] 梁洪. 中国红枣及红枣产业的发展现状、存在问题和对策的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.
- [2] 闫忠心, 鲁周民, 刘坤, 等. 我国红枣资源加工利用研究现状与展望[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(6): 102-108.
- [3] 傅力, 胡丽红, 古丽娜孜, 等. 红枣醋生产中醋酸发酵阶段最佳工艺条件的研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(8): 72-75.
- [4] 鲁周民, 刘坤, 闫忠心, 等. 枣果实营养成分及保健作用研究进展[J]. 园艺学报, 2010, 37(12): 2017-2024.
- [5] LI J W, FAN L P, DING S D, et al. Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube[J]. Food Chemistry, 2007, 103(2): 454-460.
- [6] 胡青霞, 陈延惠, 秦丽娜, 等. 发酵枣醋保健饮料最佳配方的研究[J]. 河南农业大学学报, 2008, 42(4): 443-445.
- [7] 徐清萍. 食醋生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 83-84; 163-184.
- [8] ZHAO Zhihui, LIU Mengjun, TU Pengfei. Characterization of water soluble polysaccharides from organs of Chinese jujube(*Ziziphus jujube* Mill.cv.Dong zao)[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 226: 985-989.
- [9] 郑战伟, 王静, 陈菁, 等. 枣醋醋酸发酵工艺优化[J]. 中国调味品, 2010, 36(7): 61-64.
- [10] 牟建楼, 王颀, 郭雪霞, 等. 金丝枣醋醋酸发酵工艺研究[J]. 中国调味品, 2010, 35(1): 60-63.
- [11] MONTGOMERY D C. Design and analysis of experiments[M]. New York: John Wiley and Sons, 2001: 427-450.
- [12] 周瑶, 徐怀德, 米林峰, 等. 响应面法优化黄芪酒发酵工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 293-296.
- [13] CHOWDARY G V, HARI KRISHNA S, HANUMANTHA RAO G. Optimization of enzymatic hydrolysis of mango kernel starch by response surface methodology[J]. Bioprocess Engineering, 2000, 23: 681-685.
- [14] 刘月梅, 白卫东, 鲁周民, 等. 柿果醋醋酸发酵工艺参数优化研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 257-260.
- [15] 李升升, 徐怀德, 李钰金, 等. 响应面法对洋葱酒发酵工艺的优化[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 135-138.
- [16] LEE W C, YUSOF S, HAMID N S A, et al. Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology(RSM)[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 75(4): 473-479.
- [17] 鲁周民, 张丽, 尹蓉, 等. 酶解条件对红枣汁主要成分的影响[J]. 农业工程学报, 2009, 24(1): 300-302.
- [18] GB/T 15038—2006葡萄酒, 果酒通用分析法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [19] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001.
- [20] 苏东林, 单杨, 李高阳, 等. 酶法辅助提取柑桔皮总黄酮的工艺优化研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(4): 240-245.