响应面法优化莲子黄酒的发酵工艺条件

吴灿，夏延斌，唐鑫

（湖南农业大学食品科技学院，国家蔬菜加工技术研发分中心，湖南长沙 410128）

摘要：以大米和莲子为原料，采用响应面试验设计优化莲子黄酒的发酵条件，探索其发酵规律。在单因素试验基础上确定以发酵时间、接种量、发酵温度为影响因素，以酒精体积分数为响应值，根据 Box-Behnken 中心组合方法采用三因素三水平响应值试验设计优化。结果表明，莲子黄酒最佳发酵工艺条件为：发酵时间 14 d、接种量 1.0%、发酵温度 30 ℃，酒精体积分数 14.2%，与预测值 14.54%基本一致。说明该模型能较好地预测莲子黄酒发酵过程中的酒精体积分数。

关键词：莲子；黄酒；发酵工艺；响应面分析

文章篇号：1673-9078(2013)7-1675-1679

Optimization of Fermentation Process for Lotus Rice-Wine Production by Response Surface Methodology

WU Can, XIA Yan-bin, TANG Xin

(College of Food Science Technology, Hunan Agricultural University, National R&D Center For Vegetable Processing, Changsha 410128, China)

Abstract: Response surface methodology was applied to optimize fermentation parameters for lotus rice-wine production. On the basis of single factor experiments, the fermentation time, wheat koji inoculums size, and temperature on the yield of alcohol were selected as main factors for further test. A regression model for the yield of alcohol was established using a Box-Behnken design involving the above three factors at three levels. Results showed that the optimal fermentation parameters were as follows: fermentation time 14days, inoculums size 1.0%, and temperature 30℃. Under these conditions, the alcohol yield reached14.2%, closing to predicted yield of 14.54%. This reliable model could predict the contents of alcohol in the lotus rice-wine fermentation conditions.

Key words: lotus seed; rice wine; fermentation process; response surface methodology

莲子又名水芝丹，是我国水生蔬菜栽培中的特种挺水宿根经济植物，属睡莲科莲属（Nymphaeaceae Nelumbo Adans）[1]，自古以来因其具有丰富的营养性及特殊的滋补和疗效作用一直受到人们的青睐，是我国以及东南亚地区人民最为喜欢的保健食品原料之一。莲子营养丰富，除了含有氨基酸，多肽和蛋白质外，还含有酚类、皂苷生物碱和类黄酮等营养保健成分[2]。黄酒是中国文化的国粹，具有悠久的历史，是世界上著名的酿造酒之一。黄酒含有 21 种氨基酸，其中人体不能自身合成而必需的氨基酸种类最全，居各种酿造酒之首。它还含有多种维生素、糖类、有机酸、蛋白质、肽、无机盐等成分，具有很高的营养价值[3~4]。另外黄酒还可以药用，具有烹饪调味等功能，被誉为“中华第一味”、“东方名酒之冠”[5]。现今人们对莲子各方面的研究与加工开发均有所报道，但将莲子与糯（大）米混合发酵酿制黄酒技术未有研究，由于大米缺乏赖氨酸而莲子中赖氨酸含量较高，将大米与莲子混合发酵，既能提高黄酒中赖氨酸的含量，又能使莲子中其他功能性成分溶于黄酒中，提高了黄酒的营养价值和保健功能，为更加有效地开发利用莲子以及黄酒类新产品，增加各自的附加价值提供了理论基础。

收稿日期：2013-02-14

作者简介：吴灿（1987-），男，硕士研究生，研究方向：食品化学与营养

通讯作者：夏延斌，博士生导师

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

莲子由湖南宏兴隆食品有限公司提供，粉碎机打碎过 60 目筛备用；大米购于校内某超市；绍兴酒曲市场购买。

1.2 仪器与设备

MLS-3750 型全自动立式高压灭菌锅，日本三洋电器集团；SPX-250B-Z 型生化培养箱，上海博迅实业有限公司医疗设备厂；FW177 中药粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司；CP214 型电子天平，奥豪斯（上海）仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

湘红莲→去莲子心→粉碎→过 60 目筛

↓

大米→浸泡 10~12 h →沥干水分→加入莲子粉拌匀上甑→蒸饭至大量冒气→摊冷→发酵→压榨→灭菌→澄清→过滤→陈酿→成品

↑

拌曲（糖化、水）

1.3.2 操作要点

原料的制备：将未磨皮莲子粉碎过 60 目筛。常温饮用水浸泡大米 10~12 h，按照莲子占发酵原料的 15%将莲子粉和大米混合，于常压下蒸煮 20~30 min，蒸煮过程中隔十分钟喷洒一次水，每次用量占发酵物料的 0.5~1.0%，便于大米和莲子充分吸水膨胀，然后，置于室温通风摊冷至 30~40 ℃。

主发酵：向已蒸煮好并冷却的原料中添加一定量的绍兴黄酒麦曲，混匀，加入与原料比例为 1:1 的优质纯净水（口感良好，理化指标，微生物指标达标），将米饭中央搭成 V 形或 U 形的凹状圆窝，表面洒少量麦曲粉，发酵罐封 5 层纱布先于一定温度下有氧发酵 1 d，再密封发酵罐分别在生化培养箱中控制温度进行酒精发酵若干天，抽虑出酒液，按时测定酒精体积分数。

1.3.3 影响莲子黄酒发酵的单因素试验

1.3.3.1 黄酒麦曲接种量的影响

发酵温度为 30 ℃，发酵时间为 10 d，莲子粉添加量为 15%，分别加入原料体积分数为 0.1%、0.4%、0.8%、1.0%、1.2%、1.6%的黄酒麦曲，于恒温箱内保湿发酵，探讨麦曲接种量对莲子黄酒发酵的影响。

1.3.3.2 发酵温度的影响

麦曲接种量为 0.8%，发酵时间为 10 d，莲子粉添加量为 15%，分别于 20、25、30、35、40 ℃温度下保湿发酵，考察发酵温度对莲子黄酒发酵的影响。

1.3.3.3 发酵时间的影响

麦曲接种量为 0.8%，发酵温度为 30 ℃，莲子粉添加量为 15%，分别于恒温箱内保湿发酵 4、8、12、16、20 d，探讨发酵时间对莲子黄酒发酵效果的影响。

1.3.4 莲子粉添加量的选择

通过预试验可知，莲子黄酒的酒精体积分数随着莲子添加量的变化而浮动不大，因此考虑莲子价格，成品酒的色泽和人员操作成本等因素，采用添加 15%的莲子粉与大米一起发酵。

1.4 指标测定

酒精度、总糖、总酸、非糖固形物：采用 GB/T 13662-2008《黄酒》中分析方法；甲醇：参照国标 GB/T5009.48-2003[6]和文献[7]中方法测定。

1.5 莲子黄酒感官评价

莲子黄酒的感官品评参照 GB/T 13662-2008《黄酒》中的评价方法。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 黄酒麦曲接种量的影响

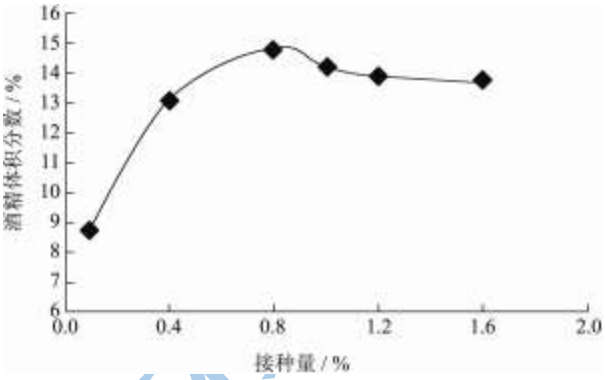


图 1 接种量对酒精体积分数的影响

Fig.1 Effects of wheat koji inoculums size on alcohol content in lotus rice-wine

图 1 表明：酒精体积分数随着接种量的增加呈现上升的趋势，但在接种量超过 0.8%后下降并开始趋于稳定，说明在接种量很低时，酒曲中的微生物生长代谢缓慢，原料利用效率低，而接种量过多，会使微生物繁殖旺盛，菌丝生长过快，发酵体系的营养和溶氧量不足，酵母菌无氧呼吸受到抑制，因此选择最适宜发酵接种量为 0.8%[8]。

2.1.2 发酵温度的影响

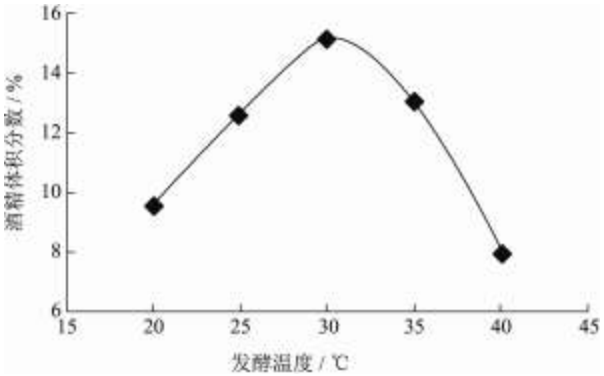


图 2 发酵温度对酒精体积分数的影响

Fig.2 Effects of fermentation temperature on alcohol content in lotus rice-wine

图 2 表明，酒精体积分数随时间递增而增加，当发酵温度达到 30 ℃时，酒精体积分数达到最大，继续升高温度，酒精度明显下降。由于酒曲中的微生物体系有最佳活力温度范围，在这个温度范围内，温度升高能促进体系微生物糖化和发酵能力，但超过一定

温度后或者温度过低时，微生物生长变缓慢，酶的活力也受到抑制，发酵时间延长，并且会产生不良的发酵气味，影响口感和品质[9~11]，因此选择 30 ℃为最佳发酵温度。

2.1.3 发酵时间的影响

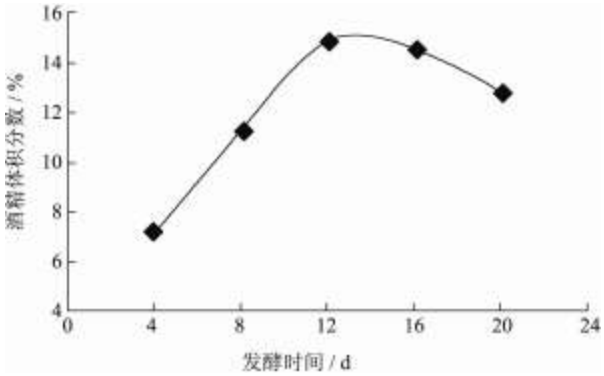


图 3 发酵时间对酒精体积分数的影响

Fig.3 Effects of fermentation time on alcohol content in lotus rice-wine

图 3 表明，发酵时间短，微生物生长和无氧发酵不完全，导致酒精产生量减少，随着时间延长，发酵完全，酒精含量增加，当发酵时间过长时，酒精抑制了酵母菌的生长和呼吸作用，菌体自溶，同时细菌将一部分乙醇转化为有机酸，导致酒精体积分数下降，因此选择 12 d 为最佳发酵时间。

2.2 响应曲面试验设计及结果[12~17]

在单因素试验的基础上，综合各因素对莲子黄酒发酵的影响，确定三个主要因素，并采用统计软件 Design Expert8.0.5 中的 Box-Behnken 设计，以终止发酵时黄酒中酒精体积分数为响应值，采用发酵时间/d（X_1）、接种量/%（X_2）、发酵温度/℃（X_3）为三因素三水平的中心组合试验设计，因素与水平编码见表 1。

表 1 Box−Behnken 中心组合因素水平编码表（三因素三水平）

Table 1 Independent variables and coded levels in Box-Behnken experimental design

水平	因素		
	X_1 (发酵时间/d)	X_2 (接种量/%)	X_3 (发酵温度/℃)
-1	8	0.4	25
0	12	0.8	30
1	16	1.2	35

Box-Behnken 试验设计及结果见表 2，利用 Design-Expert8.0.5 对表中数据进行多元回归拟合并对模型进行方差分析，结果见表 3。各因素经二次多项回归拟合后，得到莲子黄酒酒精体积分数对发酵温度、接种量、发酵时间 3 个因素的二次多项回归方程：

$Y=14.24+0.76X_1+0.51X_2+0.30X_3+0.05X_1X_2+0.38X_1X_3+0.025X_2X_3-1.00X_1^2-0.69X_2^2-0.92X_3^2$。

表 2 响应曲面试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and surface analysis

试验号	因素			Y 酒精体积分数/%
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	11.4
2	0	-1	1	12.3
3	0	0	0	14.0
4	1	0	1	13.8
5	0	-1	-1	11.8
6	1	-1	0	12.8
7	0	0	0	14.2
8	1	0	-1	12.4
9	0	1	-1	12.9
10	0	1	1	13.5
11	0	0	0	14.2
12	1	1	0	13.8
13	-1	0	1	11.5
14	0	0	0	14.6
15	0	0	0	14.2
16	-1	0	-1	11.6
17	-1	1	0	12.2

表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for the established regression model

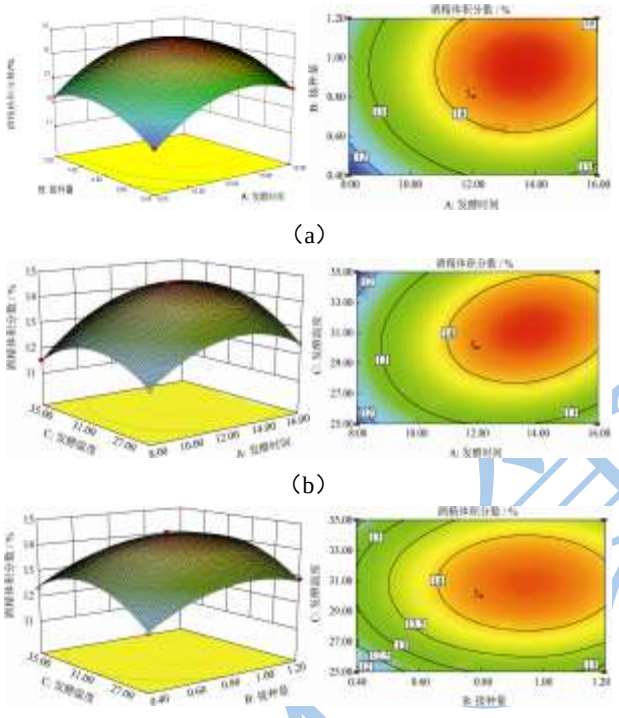
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值 (Pro>F)	显著性
模型	18.93	9	2.10	64.15	<0.0001	**
X_1	4.65	1	4.65	141.87	<0.0001	**
X_2	2.1	1	2.1	64.09	<0.0001	**
X_3	0.72	1	0.72	21.96	0.0022	**
X_1X_2	0.010	1	0.010	0.31	0.5979	
X_1X_3	0.56	1	0.56	17.16	0.0043	**
X_2X_3	2.50×10^{-3}	1	2.50×10^{-3}	0.076	0.7904	
X_{12}	4.17	1	4.17	127.14	<0.0001	**
X_{22}	2.03	1	2.03	62.03	0.0001	**
X_{32}	3.56	1	3.56	108.70	<0.0001	**
残差	0.23	7	0.033			
失拟	0.038	3	0.013	0.26	0.8511	不显著
纯误差	0.19	4	0.048			
总和	19.16	16				
R_2=0.9880		R_2A_{dj}=0.9726				

注：*差异显著，P<0.05；**差异极显著，P<0.01。

由表 3 回归分析结果可知，模型的 F 值为 64.15，P<0.0001，说明该模型是极显著的，一次项 X_1、X_2、

X_3 偏回归系数均极显著，说明发酵时间、接种量和发酵温度对酒精体积分数具有显著性影响，交互项 X_1X_3 以及二次项 X_1^2、X_2^2、X_3^2 的偏回归系数达到极显著水平。失拟项在 0.05 水平上不显著(P=0.8511)，说明残差均由随机误差引起。模型校正决定系数 R^2_{Adj}=0.9726，说明模型能解释 97.26%响应值的变化，仅有总变异的 2.8%不能用此模型解释；模型的复相关系数为 R^2=0.9880，说明该模型与实际拟合较好，各具体试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系，因此可用于莲子黄酒发酵中的酒精体积分数的理论预测[18~19]。对酒精体积分数的影响顺序为发酵时间>接种量>发酵温度。

2.3 响应面及等高线分析结果



（a）

（b）

（c）

图 4 各两因素交互作用对莲子黄酒酒精体积分数影响的响应曲面及等高线图

Fig.4 Response surface and contour plots for the effects of three process parameters on alcohol content of lotus rice-wine

注：a：X_1 发酵时间和 X_2 接种量，b：X_1 发酵时间和 X_3 发酵温度，c：X_2 接种量和 X_3 发酵温度；固定水平：发酵时间：12 d，接种量：0.8%，发酵温度：30 ℃。

对二次回归方程优化的响应面曲面及等高线图见图 4，曲面图的形状可反应出单因素对总黄酮得率的影响，曲面越陡峭，影响越显著，拟合的响应面和等高线图比较直观地反映了各因素间的交互作用[20~21]。由图 4a 可以看出，随着接种量和发酵时间的增加酒精体积分数呈上升趋势，当发酵时间约为 13.56 d，接种量约为 0.97%时，酒精体积分数达最大，由等高线图可知，沿发酵时间轴向等高线相对密集，表明发酵时间对酒精含量的影响比接种量大，等高线呈圆形，说明两因素交互作用不强。图 4b 表明，酒精体积分数随发酵时间和发酵温度的增加先增大后减小，在发酵时间为 13.64 d，发酵温度为 31.26 附近可以达到响应值最高点。等高线呈椭圆形，表明两因素有明显的交互作用，且发酵时间对酒精含量的影响大于发酵温度因素。图 4c 表明，酒精体积分数随着接种量和发酵温度的增加而上升，等高线表明，接种量对酒精含量的影响比发酵温度影响显著，表现为曲线较陡，沿接种量轴向等高线相对密集，等高线呈椭圆形，两因素交互作用较强，影响显著[22~23]。

2.4 莲子黄酒发酵条件优化与验证试验

为进一步确定发酵参数最佳点，用 Design- Expert 8.0.5 软件进行数值优化分析，以获得最优的发酵条件。经分析，莲子黄酒最适发酵条件为：在莲子粉添加量为 15%下，发酵时间为 13.77 d、接种量为 0.96%、发酵时间为 31.29 d，酒精体积分数理论值为 14.54%。考虑到实际操作的便利，将发酵条件修正为发酵时间 14 d、接种量 1.0%、发酵温度 30 ℃。采用修正后的条件参数进行 3 次平行验证实验，结果测得酒精度为 14.2%，与理论值较吻合。

2.5 微生物、理化指标

测定 2.4 中 3 次验证实验所得莲子黄酒样品的微生物、理化指标，取平均值得：酒精度：14.23%；总糖（以还原糖计）：5.8 g/L；非糖固形物：18.8 g/L；总酸（以乳酸计）：8.7 g/L。甲醇含量：0.025 mg/mL。细菌总数≤21 cfu/mL；大肠杆菌：未检出；其他致病菌：未检出。

2.6 感官指标

色泽：产品呈微红色光泽、清亮透明、瓶底有微量聚集物。口感：柔和爽口，无异味，回味深长。香气：有黄酒特有的浓郁醇香和莲子的清香，香气协调。说明莲子大米复合酿制黄酒具有营养好、酒色好、口感好，综合品质强于普通大米黄酒等特点。

3 结论

本研究在单因素试验基础上，通过响应面分析法对莲子黄酒发酵条件优化，并得到回归方程。回归分析结果表明，发酵时间（X_1）、接种量（X_2）和发酵温度（X_3）对响应值均有极显著影响，且与响应值之间不是简单的线性关系。各因素对莲子黄酒酒精体积分数影响程度依次为发酵时间、接种量和发酵温度。其中发酵时间与发酵温度交互效应为极显著。经回归分析并结合实际操作便利性，确定莲子黄酒发酵工艺

条件为发酵时间 14 d、麦曲接种量 1.0%、发酵温度 30 ℃，此条件下的平均酒精体积分数为 14.2%，与理论值 14.54%接近，说明该模型可靠性较高，能很好地预测试验结果，故本研究为莲子黄酒发酵工艺提供了一定参考。发酵所得莲子黄酒，产品质量优良，各项检测指标合格，营养丰富，具有一定的保健作用，有广阔的市场开发前景。

参考文献

[1] 郑宝东,郑金贵,曾绍校.我国主要莲子品种中三种功效成分的研究[J].营养学报,2004,26(2):158-160

[2] 陈轩,周坚.莲子皮化学成分的初步分析[J].农业机械,2011,10:139-141

[3] 周家骥.黄酒生产工艺[M].北京:轻工业出版社,1996

[4] 范怀德,乔自林.黄酒营养价值的研究[J]. 西北民族学院学报(自然科学版),2000,21(2):47-49

[5] 李家寿.黄酒色、香、味成分来源浅析[J].酿酒科技,2001,3:48-50

[6] 中华人民共和国卫生部.GB/T5009.48-2003 蒸馏酒和配制酒卫生标准分析方法[S].北京:中国标准出版社,2003

[7] 黄鸣,刘江勋,黎锡流.顶空气相色谱法测深色酒中微量甲醇[J].食品科学,2002,23(2):106-108

[8] 王世宽,高明燕,潘明,等.响应面法优化杨梅米酒的工艺[J].食品研究与开发,2012,33(2):91-95

[9] 张靖媛,王成荣,杨绍兰,等.响应面法优化南瓜酒发酵工艺条件[J].食品科学,2012,33(5):213-217

[10] 范兆军,牛广财,朱丹,等.响应面法优化沙棘果酒发酵条件的研究[J].食品与机械,2009,25(1):41-45

[11] 郭晓明,温海祥,吕顺,等.响应面法优化香蕉酒的制作工艺[J].现代食品科技,2011,27(11):1382-1386

[12] 李娜,董明,张国庆,等.响应面法优化榴莲皮中总黄酮的提取工艺[J].食品工业科技,2011,32(9):325-332

[13] KHAJEH M. Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design [J]. Journal of Food Composition and analysis, 2009, 22(4): 343-346

[14] SILA E M, ROGEZ H, LARONDELLE Y. Optimization of extraction of phenolics from lnga edulis leaves using response surface methodology [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 55(3): 381-387

[15] 吕萍,李茜,薛波,等.超声波辅助提取燕竹笋壳中多酚的工艺优化[J].现代食品科技,2012,28(12):1734-1759

[16] 孙美,黄艳菲,赵小燕,等.响应面法优化荞麦总黄酮的提取工艺[J].现代食品科技,2012,28(12):1714-1718

[17] Khajeh M. Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(4): 343-346

[18] 李帅,赵岩岩,陈晓平.响应面优化微波辅助乙醇提取蜂胶黄酮工艺优化[J].食品科学,2012,33(18):127-132

[19] 杨海燕,于蒙,刘姗姗.冷冻干燥法制备甜杏仁油微胶囊[J].食品科学,2012,33(18):36-40

[20] 郭雷,陈宇.响应面法优化超声辅助提取浒苔多糖工艺[J]食品科学,2010,31(16):117-121

[21] 陈耀华,陈健.响应面法优化鸡枞菌多糖的提取工艺[J].现代食品科技,2012,28(5):541-563

[22] 夏海涛,刘玉芬,董超男,等.响应面法优化野生马兰头总黄酮的提取工艺[J].食品科学,2011,32(24):191-195

[23] 张玉香,屈慧鸽,杨润亚,等.响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺[J].食品科学,2010,31(16):33-37

欢迎订阅 EI 收录期刊、中文核心期刊

《现代食品科技》

邮发代号：46-349　　刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620

每期定价 15 元，全年 12 期仅 180 元。欢迎食品及相关行业的机构和科学工作者到各地邮局订阅，并踊跃投稿或建立广告宣传和产学研合作关系。

地址：广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508，邮编：510640

电话：020-87112373，87113352，87112532

E-mail：xdspkj@vip.sohu.com