

# 响应面优化涉县无核黑枣果酒发酵工艺

咎立峰<sup>1,2</sup>, 杨香瑜<sup>1,2</sup>, 张策<sup>1</sup>, 李景旭<sup>1</sup>

(1. 邯郸学院 生命科学与工程学院, 河北 邯郸 056005; 2. 河北省高校冀南太行山区野生资源植物应用研发中心, 河北 邯郸 056005)

**摘要:**以河北涉县产无核黑枣为原料,采用响应面法优化黑枣果酒发酵工艺条件。用白砂糖将黑枣汁还原糖含量调整至 20%,在发酵菌种及其接种量、发酵初始 pH 值、发酵温度、发酵时间 4 个单因素试验基础上,选取发酵初始 pH 值、发酵温度、发酵时间为影响因子,以黑枣果酒的酒精度为响应值,应用 Box-behnken 试验设计建立回归模型,并进行响应面分析。结果表明,黑枣果酒发酵的最佳条件为:安琪黄酒高活性酵母添加量 0.2%、发酵初始 pH 3.5、发酵温度 27.0℃、发酵时间 9 d,在此优化条件下,黑枣果酒的酒精度为 15.37%vol。

**关键词:**黑枣;果酒;发酵条件;响应面分析;优化

## Optimization of Fermentation of Date Plum Fruit Wine by Response Surface Methodology

ZAN Li-feng<sup>1,2</sup>, YANG Xiang-yu<sup>1,2</sup>, ZHANG Ce<sup>1</sup>, LI Jing-xu<sup>1</sup>

(1.School of Life Science and Engineering, Handan College, Handan 056005, Hebei, China; 2.Wild Plant Resources Research Centre in Taihang Mountain of Southern Hebei Province, Handan 056005, Hebei, China)

**Abstract:** The stone-free date plum produced in Shexian of Hebei province was utilized as raw material to brew fruit wine in this study. Response surface methodology (RSM) was applied to optimize the fermentation conditions of date plum fruit wine. The sugar concentration of the fruit juice was adjusted to 20%, based on single factor experiments (fermentation strain and its inoculation amount, initial pH value, fermentation temperature and fermentation time), and the fermentation initial pH value, temperature and time were chosen as influencing factors, and the alcoholicity was selected as response value and the mathematical model was established by Box-behnken central composite design. The results showed that the optimal fermentation conditions were as follows: inoculating amount of Angel alcohol active dry yeast for yellow rice wine 0.2%, fermentation initial pH 3.5, fermentation temperature 27.0℃ and fermentation time 9 d. Under these optimal condition, the alcoholicity was 15.37%vol.

**Key words:** date plum; fruit wine; fermentation conditions; response surface methodology; optimization

引文格式:

咎立峰,杨香瑜,张策,等. 响应面优化涉县无核黑枣果酒发酵工艺[J].食品研究与开发,2019,40(8):139-144

ZAN Lifeng, YANG Xiangyu, ZHANG Ce, et al. Optimization of Fermentation of Date Plum Fruit Wine by Response Surface Methodology[J].Food Research and Development, 2019, 40(8): 139-144

黑枣,学名君迁子(*Diospyros lotus* L.),属于柿树科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros*),落叶乔木<sup>[1-2]</sup>。果实脱涩

基金项目:邯郸市科学技术研究项目(1627201048-1);邯郸学院校内项目(14101)

作者简介:咎立峰(1980—),男(汉),副教授,博士研究生,研究方向:天然产物资源开发利用。

后生食,或者酿酒制醋,广泛分布在中国北方地区,河北的涉县、赞皇,山西的平顺、左权,山东的邹平、淄博,湖南的洞口等地均有成片的栽培<sup>[3-4]</sup>。主要分为有核和无核两种,黑枣入脾胃经,能补中养气、养血、安神及明目,多用于补血和作为调理药物,对贫血、血小板减少、肝炎、乏力、失眠有一定的疗效<sup>[5-7]</sup>。

黑枣果实中含有丰富的营养成分,是研制多种食品、饮料、保健品以及果酒的理想原料,所含蛋白质包括人体自身不能合成的丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、赖氨酸、缬氨酸、组氨酸、精氨酸。维生素含量非常丰富,包括 $V_A$ 、 $V_C$ 、 $V_E$ 等,尤其 $V_C$ 含量极为丰富,每百克新鲜黑枣中含有 $V_C$  97.9 mg,是苹果、梨、桃、杏等水果的14~32倍<sup>[8-9]</sup>。同时黑枣中含有大量的多酚类化合物,包括没食子酸、没食子酸甲酯、倍酸甲酯、鞣花酸、单宁酸、山萘酚、槲皮素、杨梅素等,这些多酚化合物具有良好的抗氧化、抗肿瘤、镇静和抑制HIV-1病毒的作用<sup>[10-13]</sup>。

本试验以河北涉县产无核黑枣为原料,采用响应面法对发酵工艺进行优化,研发出一种口感协调,营养价值较高的保健型果酒,旨在为进一步精深加工黑枣奠定基础,实现资源的深度开发利用,推动产业结构升级和效益提升,带动涉县林产业和传统初加工工业的转型和综合协调发展。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

无核黑枣于2017年11月采自河北省涉县井店镇;安琪果酒酵母、安琪黄酒高活性酵母、安琪酿酒曲(绍酒风味):安琪酵母股份有限公司;果胶酶(酶活力10万U/g):河南臻玉实业有限公司;柠檬酸(食品级):潍坊英轩实业有限责任公司;白砂糖:北京康普汇维科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

BioFlo/CelliGen115发酵罐:New Brunswick Scientific公司;PHS-3E pH酸度计:上海仪电科学仪器股份有限公司;PAL-1数显折射仪、PAL-33S酒精浓度计:厦门森态仪器仪表有限公司;MKJ-J1-4型实验室微波炉:青岛迈威微波技术应用有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黑枣果酒发酵工艺流程

果实精选→清洗→切片→热水浸提→果胶酶处理→调糖→调酸→高温灭菌→接种发酵→后发酵→澄清过滤→灌装→检验→成品

#### 1.3.2 指标测定方法

糖度测定:数显折射仪进行测定;酒精度测定:酒精浓度计测定发酵液的蒸馏液中的酒精度;还原糖含量、大肠菌群和菌落总数按照NY/T 1508—2017《绿色食品 果酒》中的方法测定<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.3 无核黑枣果酒发酵的单因素试验

##### 1.3.3.1 发酵菌种筛选及其接种量的影响

将涉县无核黑枣切成1 mm~2 mm的薄片,称取

100 g于烧杯中加入纯水500 mL,置于微波炉中在功率为400 W条件下微波处理5 min,然后于85℃下浸提得到黑枣汁,用白砂糖将还原糖含量调到20%,柠檬酸调节pH 3.5,向250 mL锥形瓶中个加入100 mL黑枣汁,在黑枣汁中分别加入安琪果酒酵母、安琪黄酒高活性酵母、安琪酿酒曲(绍酒风味),接种量分别为0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%,在25℃条件下发酵9 d,分别测量酒精度。

##### 1.3.3.2 发酵初始pH值的影响

将浸提得到的黑枣汁还原糖含量调到20%,用柠檬酸调节pH值分别为2.5、3.0、3.5、4.0、4.5,在枣汁中加入0.2%的安琪黄酒高活性酵母,25℃条件下发酵9 d,分别测量酒精度。

##### 1.3.3.3 发酵温度的影响

将浸提得到的黑枣汁还原糖含量调到20%,用柠檬酸调节pH 3.5,在枣汁中加入0.2%的安琪黄酒高活性酵母,分别置于15、20、25、30、35℃的条件下发酵,9 d后测量酒精度。

##### 1.3.3.4 发酵时间的影响

将浸提得到的黑枣汁还原糖含量调到20%,用柠檬酸调节pH 3.5,在枣汁中加入0.2%的安琪黄酒高活性酵母,在25℃的条件下分别发酵6、7、8、9、10 d后分别测量酒精度。

#### 1.3.4 无核黑枣果酒发酵工艺优化

在单因素试验的基础上,根据Box-behnken的中心组合设计原理,选取发酵初始pH值(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)3个影响较大的因素为自变量,以黑枣果酒的酒精度为响应值,采用响应面分析法对涉县无核黑枣果酒的发酵工艺进行优化,并对响应面法得到的最佳工艺进行验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 影响无核黑枣果酒发酵的单因素试验

#### 2.1.1 发酵菌种及其接种量的影响

发酵菌种及其添加量对酒精度的影响见图1。

3种酿酒酵母发酵黑枣果酒酒精度随着接种量增加而增加,整体观察发现安琪黄酒高活性酵母为发酵菌种的酒精度最高,在接种量为0.2%时,酒精度为13.97%vol,而果酒酵母和安琪酿酒曲发酵的酒精度最高分别为12%vol和11%vol,因此选择安琪黄酒高活性酵母为发酵菌种。当黄酒高活性酵母菌种接种量较小时,代谢繁殖慢,且抗性较弱,导致原料代谢转化为酒精不彻底,酒精度低;而当黄酒高活性酵母接种量过高时,酒精度反而降低;当接种量为0.2%时,酒精度达到最高为13.97%vol,且酒体品质良好,因此以安琪黄

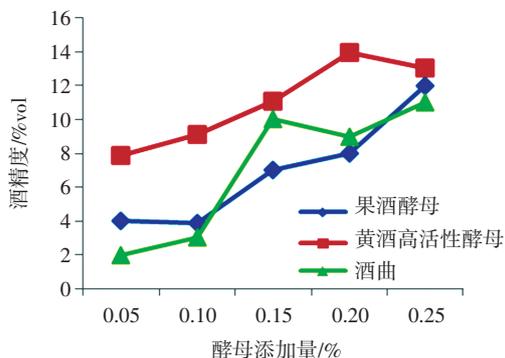


图1 发酵菌种及其添加量对酒精度的影响

Fig.1 Effects of fermentation strains and inoculating amount on alcoholicity

酒高活性酵母添加量为 0.2 % 比较合适。

### 2.1.2 发酵初始 pH 值的影响

发酵液中 pH 值对酵母细胞中酶的活性影响较大,从而影响酒精的产量,其对酒精度的影响见图 2。

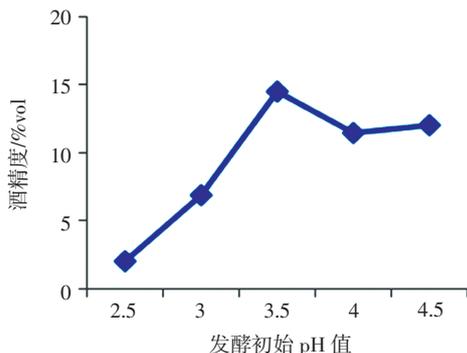


图2 发酵初始 pH 值对酒精度的影响

Fig.2 Effects of fermentation pH on alcoholicity

由图 2 可知,在其他条件相同的情况下,随着发酵液初始 pH 值的增加,酒精度逐渐增加,当初始 pH 值为 3.5 时,黑枣果酒的酒精度达到最高为 14.5 %vol,而当 pH 值高于 3.5 后,酿酒酵母生长和代谢酶系活性被抑制,酒精度逐渐降低,因此选择初始发酵液 pH 值为 3.5。

### 2.1.3 发酵温度的影响

温度对酵母菌的生长繁殖和次级代谢产物的形成都具有重要的影响,发酵温度对酒精度的影响见图 3。

黑枣果酒的酒精的体积分数在 15 °C~35 °C 区间呈现先增后减的趋势,而当温度为 25 °C~30 °C 时,黑枣果酒的酒精度为 15.2 %vol,而高于 30 °C 时,酒精度呈下降趋势,高温影响酵母菌活性和代谢途径中酶系活力,同时发酵温度过高会产生不良发酵味,影响果酒的口感<sup>[15-17]</sup>。因此选择发酵温度为 25 °C~30 °C 比较合适。

### 2.1.4 发酵时间的影响

发酵时间对酒精度的影响见图 4。

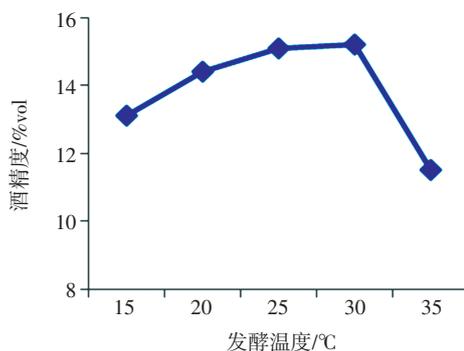


图3 发酵温度对酒精度的影响

Fig.3 Effects of fermentation temperature on alcoholicity

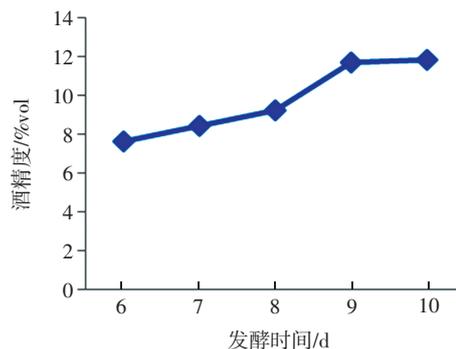


图4 发酵时间对酒精度的影响

Fig.4 Effects of fermentative time on alcoholicity

黑枣酒的酒精度与发酵时间呈正相关,在发酵前 9 d 时,酒精度增长较快,之后发酵速度趋于缓慢,原因为发酵液中的糖转化较完全,此时测定还原糖含量 2.3 % 左右,酒精发酵基本接近终点,为了保持果酒口感,选择发酵时间为 9 d 较为适宜。

## 2.2 响应面优化试验

### 2.2.1 响应面试验设计方案及试验结果

在单因素试验的基础上,按响应面设计方案,以黑枣果酒酒精度为响应值,设计三因素三水平,因素水平见表 1,试验结果见表 2。

表 1 响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

编码值	A pH 值	B 发酵温度/°C	C 发酵时间/d
+1	4.0	30	10
0	3.5	25	9
-1	3.0	20	8

### 2.2.2 回归模型的建立与方差分析

通过统计软件 Design-Expert.V8.06 对表 2 中的试验数据进行二次线性回归拟合分析,得到回归方程为:  

$$\ln(\text{酒精度}) = 14.76 + 0.20A + 1.35B + 0.20C - 0.75AB + 1.30AC + 2.20BC - 0.81A^2 - 1.81B^2 - 3.26C^2$$

对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

表2 响应面试验设计及结果

**Table 2 Design and results of response surface experiments**

试验号	因素			□酒精度/ %vol
	A pH值	B 发酵温度	C 发酵时间	%vol
1	0	1	-1	8.0
2	0	-1	1	7.0
3	1	0	-1	10.0
4	-1	-1	0	9.8
5	-1	0	1	8.8
6	0	0	0	14.0
7	-1	0	-1	13.0
8	0	-1	-1	9.0
9	1	0	1	11.0
10	0	0	0	14.0
11	-1	1	0	13.3
12	1	1	0	13.0
13	1	-1	0	12.5
14	0	1	1	14.8
15	0	0	0	16.0
16	0	0	0	15.0
17	0	0	0	14.8

模型  $P=0.0107 < 0.05$ , 表明回归模型方程显著, 拟合度较好; 失拟项  $P=0.0777 > 0.05$ , 不显著, 说明通过试验得到的二次回归方程能较好地预测结果<sup>[18-19]</sup>。其中一次项  $B$ 、 $BC$  交互项以及二次项  $B^2$ 、 $C^2$  均表现为显著, 由此可知这些一次、交互项、二次项对涉县无核黑枣果酒

表3 回归统计分析表

**Table 3 ANOVA for the regression response surface model**

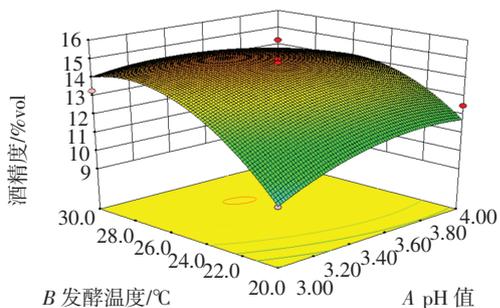
数据来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	109.69	9	12.19	6.56	0.0107	*
A pH值	0.32	1	0.32	0.17	0.6906	
B 温度	14.58	1	14.58	7.84	0.0265	*
C 时间	0.32	1	0.32	0.17	0.6906	
AB	2.25	1	2.25	1.21	0.3076	
AC	6.76	1	6.76	3.64	0.0982	
BC	19.36	1	19.36	10.42	0.0145	*
A <sup>2</sup>	2.73	1	2.73	1.47	0.2650	
B <sup>2</sup>	13.72	1	13.72	7.38	0.0299	*
C <sup>2</sup>	44.61	1	44.61	24.00	0.0018	**
残差	13.01	7	1.86			
失拟项	10.26	3	3.42	4.97	0.0777	不显著
净误差	2.75	4	0.69			
总离差	122.70	16				

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

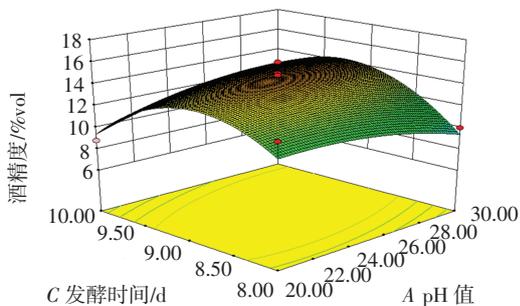
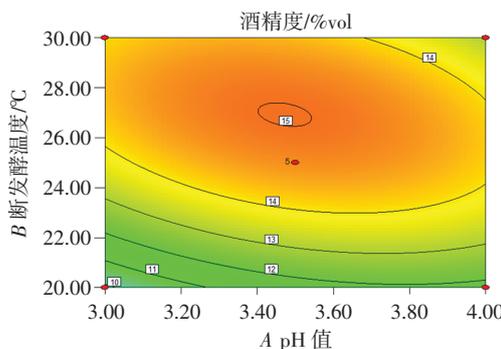
发酵的影响较为明显; 在模型交互项中,  $AB$ 、 $AC$  交互项的显著性较差, 说明发酵与单因素并不是简单的线性关系。方差分析可知, 试验所选因素对响应值影响的强弱次序依次为: 温度 > 时间 > pH 值。

2.2.3 交互项拟合响应值分析

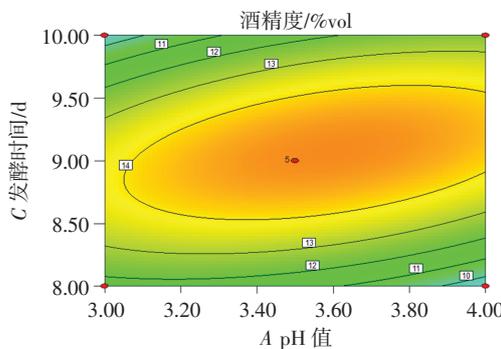
对各变量的交互项进行二元回归模型分析, 得到三维响应面分析图以及等高线<sup>[20]</sup>图见图5。由图可以直观看出各因素及其交互值对响应值的影响、变化趋势



(a) pH值和发酵温度



(b) pH值和发酵时间



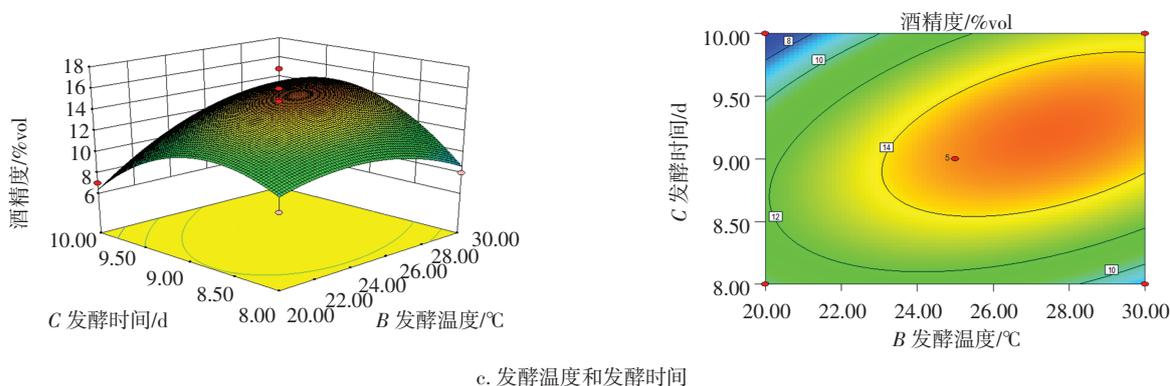


图5 各变量互相作用对酒精度影响的响应面和等高线

Fig.5 Response surface and contour plots showing the interactive effects on alcoholicity

以及各因素在所选范围内存在的极值。

图5中(a、b、c)响应面上标记的最高点即为最大值,说明在所选分析的因素水平范围内存在极值。等高线的形状均为近椭圆型,在一定程度上反映了交互项对黑枣果酒发酵酒精度的显著性,当发酵温度高于26℃时,等高线变化稀疏(图5a),说明对发酵酒精度影响减弱,这与单因素试验结果一致。从图5b等高线中发现pH值和发酵时间均对酒精度有一定的影响,而发酵时间为中间水平9d时,等高线变化稀疏。图5c中发现发酵温度比发酵时间对果酒酒精度的影响大。

为了确定最佳响应值的因子组合,计算得到的数学回归模型的一阶偏导数,得出的最佳条件为:发酵温度27.44℃、初始pH3.53、发酵时间9.21d,理论酒精度为15.12%vol。考虑实际因素以及操作条件,将涉县无核黑枣酒发酵工艺的最佳参数调整为:发酵温度27℃、初始pH3.5、发酵时间9d。在此工艺条件下3次试验取平均值,得到的涉县无核黑枣果酒的酒精度平均值为15.37%vol,与理论预测值相差0.25%vol,说明此次响应面分析法优化后所得到的黑枣酒的发酵条件较为准确可靠,具有一定的实际应用价值。

### 2.3 黑枣果酒质量指标

#### 2.3.1 感官指标

色泽:橙黄色至棕黄色,透明清亮,无沉淀物;香气:愉悦的酒香和黑枣果香,无异味;口味:清爽,柔顺;典型性:酒体协调、完整,典型性突出。

#### 2.3.2 理化指标

酒精度:15%vol~16%vol;还原糖含量 $\leq 4$ g/L。

#### 2.3.3 微生物指标

大肠菌群 $\leq 3.0$ MPN/mL;细菌总数 $\leq 50$ CFU/mL;致病菌:未检出。

## 3 结论

本文在单因素试验的基础上,以黑枣果酒的酒精

度为考查指标,通过Box-Behnken响应面设计优化,建立了黑枣果酒的发酵工艺条件,研发一种口感协调,果香浓郁以及营养价值较高的保健型果酒,对解决产量过剩和深加工问题,促进太行山资源开发利用具有重要的现实意义。最终得到黑枣果酒最佳发酵工艺条件参数为:安琪黄酒高活性酵母接种量0.2%、发酵pH值为3.5、发酵温度27℃、发酵天数9d,在此条件下的黑枣酒品质最佳,黑枣果酒的酒精度为15%vol左右。

### 参考文献:

- [1] Yang Y, Yang T T, Jing Z B, et al. Genetic diversity and taxonomic studies of date plum (*Diospyros lotus* L.) using morphological traits and SCoT markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 61: 253-259
- [2] Li, X H, Jiang Z Y, Shen Y Y, et al. In vitro regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *D. lotus* (*Diospyros lotus* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 236: 229-237
- [3] 钱海荣, 李建军, 王清江. 涉县柿子生产现状、存在问题及发展对策[J]. *河北林业科技*, 2009(2): 59-60
- [4] 杨良辰. 河北涉县无核黑枣低产园改造示范试验 [J]. *果树实用技术与信息*, 2012(1): 15-16
- [5] 滕宁宁, 王明, 吴一飞, 等. 君迁子药理学研究概况[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2010, 12(9): 81-82
- [6] Uddin G, Rauf A, Siddiqui BS, et al. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and sedative activities of the extracts and chemical constituents of *Diospyros lotus* L. [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(7): 954-959
- [7] Rauf A, Uddin G, Khan H, et al. Anti-tumour-promoting and thermal-induced protein denaturation inhibitory activities of  $\beta$ -sitosterol and lupeol isolated from *Diospyros lotus* L. [J]. *Natural Product Research*, 2016, 30(10): 105-1207
- [8] 畅凌冰, 王治军, 梁臣, 等. 黑枣的价值及繁育[J]. *绿色科技*, 2012, 10(10): 68-69
- [9] Zhang Z P, Ma J, He Y Y, et al. Antioxidant and hypoglycemic effects of *Diospyros lotus* fruit fermented with *Microbacterium flavum* and

# 再制干酪工艺条件的优化

霍建新<sup>1</sup>, 白彩艳<sup>1</sup>, 马晓丽<sup>1</sup>, 郭拥莉<sup>1</sup>, 薛洪<sup>1</sup>, 李明<sup>2,\*</sup>

(1. 晋中学院, 山西 晋中 030600; 2. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 研究乳化盐、稳定剂、乳清粉、乳化温度对再制干酪的生产工艺的影响。采用单因素简单分析、复合因素共同调节及响应面试验设计进行工艺条件优化。最佳工艺条件为乳化温度 70 ℃, 柠檬酸钠 1.5%、焦磷酸钠 0.5%, 黄原胶 1.0%、卡拉胶 1.5%、乳清粉 20% (均以原料天然干酪的质量计)。在此条件下, 验证试验得到再制干酪的感官综合评分为 23.4, 与模型预测值非常接近。

**关键词:** 再制干酪; 乳化盐; 融化性; 响应面法; 感官评价

## Optimization of the Manufacture Conditions for the Preparing Cheese

HUO Jian-xin<sup>1</sup>, BAI Cai-yan<sup>1</sup>, MA Xiao-li<sup>1</sup>, GUO Yong-li<sup>1</sup>, XUE Hong<sup>1</sup>, LI Ming<sup>2,\*</sup>

(1. Jinzhong University, Jinzhong 030600, Shanxi, China; 2. College of Food Engineering & Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The effects of emulsifying temperature, emulsifying salt, stabilizing agent and whey powder on the manufacture conditions of preparing cheese were studied. The conditions were optimized by using single-factor tests, compound factors modulation and response surface methodology. The optimal conditions were composed of 70 ℃ emulsifying temperature, 1.5 % sodium citrate, 0.5 % sodium pyrophosphate, 1.0 % xanthan, 1.5 % carrageenan, 20 % whey powder on the basis of the weight of natural cheese). Under the conditions, the overall sensory evaluation was 23.4, which was close to the predicted value.

**Key words:** preparing cheeses; emulsifying salt; melting texture; response surface methodology; sensory evaluation

作者简介: 霍建新(1972—),男(汉),教授,硕士研究生,研究方向:乳品科学与技术。

\* 通信作者

- Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(6): 682-687
- [10] Loizzo M R, Said A, Tundis R, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2009, 64(4): 264-270
- [11] Gao H, Cheng N, Zhou J, et al. Antioxidant activities and phenolic compounds of date plum persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruits[J]. Journal of Food Science & Technology, 2014, 51(5): 950-956
- [12] Rashed K, Zhang X J, Luo M T, et al. Anti-HIV-1 activity of phenolic compounds isolated from *Diospyros lotus* fruits[J]. Phytopharmacology, 2012, 3(2): 199-207
- [13] Rauf A, Uddin G, Siddiqui B S, et al. Bioassay-guided isolation of novel and selective urease inhibitors from *Diospyros lotus*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2017, 15(11): 865-870
- [14] 中华人民共和国农业部. 绿色食品 果酒:NY/T 1508—2017[S].北京: 中国农业出版社, 2017
- [15] 张翼, 胡靖, 张颖, 等. 黄肉猕猴桃果酒酿造工艺研究[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(5): 84-87
- [16] 邹燕羽, 陈文俊, 李祖祥, 等. 响应面法优化红阳猕猴桃果酒的发酵工艺研究[J]. 食品工业, 2017, 38(8): 113-116
- [17] 李秀萍, 王在谦, 郑平, 等. 响应面法优化甘蔗果酒发酵工艺[J]. 酿酒, 2014, 41(6): 97-102
- [18] 吴瑞红, 李慧杰, 孙金旭, 等. 响应面法优化覆盆子浆果果酒发酵工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(11): 102-104
- [19] 叶学林, 程水明, 温露文, 等. 响应面法优化桑葚果酒发酵工艺[J]. 中国酿造, 2017, 36(12): 105-109
- [20] 彭玲, 赵云, 布尼洪泽, 等. 响应面法优化绿茶雪梨果味茶饮料工艺[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(8): 70-75

收稿日期: 2018-08-16