

酿酒酵母和异常汉逊酵母混合发酵黄酒工艺研究

郑超群¹, 陈晨¹, 蒋予箭¹, 张蕾¹, 谢广发^{2*}

¹浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018

²浙江树人学院生物与环境工程学院 浙江省污染暴露与健康干预重点实验室 杭州 310015)

摘要 以酿酒酵母和异常汉逊酵母为黄酒发酵菌种,分别考察 2 种酵母对 18 °Bx 糖化液的发酵特性,结果表明酿酒酵母产酒精(9.9% vol)能力强于异常汉逊酵母(6.8% vol),异常汉逊酵母产挥发酯(2.41 g/L)显著高于酿酒酵母(0.53 g/L)。比较混菌发酵途径,顺序混合发酵酒精度(8.1% vol)略低于同时混合发酵酒精度(8.7% vol),挥发酯含量(1.59 g/L)显著高于同时混合发酵(0.56 g/L)($P < 0.05$),结合发酵过程理化指标和感官评价结果,选择顺序混合发酵途径较为合适。通过单因素和 Box-Behnken 中心组合试验设计,选择主发酵温度、pH 值、酵母接种量 3 个因素对顺序混合发酵黄酒产品的挥发酯含量进行响应面优化,结果显示:顺序混合发酵黄酒的最佳参数为:发酵温度 31.5 °C,接种量 1.0×10^7 个/mL, pH 4.2。验证试验表明,在此条件下顺序混合发酵黄酒的挥发酯含量为 (1.66 ± 0.028) g/L,与预测值 1.70 g/L 相差不大,比酿酒酵母单独发酵提高 213%。本研究为非酿酒酵母在黄酒发酵上的应用奠定了基础。

关键词 异常汉逊酵母; 混合菌种; 黄酒; 发酵曲线; 工艺优化

文章编号 1009-7848(2024)01-0146-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.016

黄酒是中国最古老的酿造酒,与葡萄酒、啤酒共同享有世界三大古酒的美誉^[1]。黄酒是以稻米、黍米、小米等为主要原料,利用麦曲和部分酶制剂、酵母等糖化发酵剂酿造而成的发酵酒^[2-4]。黄酒的酒精度低,一般含量为 14% vol~20% vol,20 种氨基酸成分齐全,营养价值丰富,符合新时代消费者对食品安全、健康、营养的需求。然而,近年来黄酒的发展不尽如人意。据不完全统计,目前我国白酒的人均消费量为 9 L 左右,啤酒的人均消费量为 38 L 左右,而黄酒的人均消费量不足 2 L^[5],黄酒市场仍有增长的空间,黄酒生产工艺与装备的更新、新产品开发的工作还任重道远。

酿酒酵母(*S. cerevisiae*)是黄酒酿造过程中的优势菌种,其特点是发酵速度快,酒精转化率高,发酵过程易于控制,对其它杂菌的抑制作用强,然而存在香气成分不丰富等缺陷^[6]。异常汉逊酵母(*H. anomala*)是一类与酒精发酵相关的天然非酿酒酵母,其代谢能力差,产酒精能力较低,通常不能独立完成酒精发酵^[7]。研究发现,非酿酒酵母能够通过自身代谢活动生成醇或酯,或者通过

胞外酶的释放产生包括乙酯类、高级醇、甘油、挥发性酚类、芳香酮等一系列对黄酒质量有益的香气物质,增加酒类香气的复杂度和浓郁度^[8-10]。Rojas 等^[11]发现,有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora guilliermondii*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)与酿酒酵母的混合发酵获得的乙酸酯类化合物比单一酿酒酵母发酵产品有明显提高。Moreira 等^[12]提出,将葡萄汁有孢汉逊酵母与酿酒酵母进行混合模拟自然发酵,结果酯类含量增加,提高了香气复杂度。李婷^[13]从川南白酒窖池中分离出 1 株高产酯的非酿酒酵母,发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*)在 40 °C、pH 5 时,最大酶活力可达 12.68 U/g,在提前 0~96 h 接种处理的混菌发酵葡萄酒中检出 35 种香气物质,总含量达 70~194 mg/L。夏鸿川等^[14]通过酿酒酵母和非酿酒酵母混合发酵试验,发现混菌发酵处理提高了葡萄酒甘油产量 0.38~1.11 g/L,同时降低了酒精含量 0.33% vol~1.9% vol。Anfang 等^[15]发现,克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)与酿酒酵母按照 1:1 接种混合发酵时,葡萄酒中硫醇类香气物质的含量有所提高;按 9:1 进行混菌发酵时,葡萄酒中乙酸-3-巯基己醇的浓度增加。

本研究以酿酒酵母和异常汉逊酵母为发酵菌种,在比较 2 种酵母的发酵特性以及对黄酒品质

收稿日期: 2023-01-29

基金项目: 浙江省绍兴黄酒产业创新综合体科技创新项目

第一作者: 郑超群,男,硕士生

通信作者: 谢广发 E-mail: xiegf632@126.com

影响的基础上,进行混菌发酵试验。混菌发酵试验包括同时混合发酵(CH)和顺序混合发酵(SH)这两种发酵途径。在发酵过程中,测定酵母菌数、酒精度、还原糖、挥发酯等理化指标。在发酵结束后,对混菌发酵黄酒样品进行感官评定。对筛选出的混合发酵路线,采用响应面分析法进行试验设计与发酵工艺条件优化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糯米:北纯糯米;糖化酶(酶活力 1×10^5 U/g,食品级)、液化酶(酶活力 2×10^4 U/g,食品级),河南万邦实业有限公司;酿酒酵母,安琪黄酒专用活性干酵母;异常汉逊酵母 1298,中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC);麦曲,绍兴古越龙山黄酒工程技术研究中心有限公司。

葡萄糖、氢氧化钠、硫酸铜、亚铁氰化钾、酒石酸钾钠、亚甲基蓝、邻苯二甲酸氢钾、无水乙醇、酚酞、甲基红均为分析纯级;盐酸、硫酸、乳酸,国药集团化学试剂有限公司;酵母增殖培养基(YPD)、孟加拉红培养基,杭州微生物有限公司。

1.2 仪器与设备

HH-6 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;XSP-4C 显微镜,东莞市永先电子仪器有限公司;BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司;NSKY-200B 恒温培养振荡器,上海苏坤实业有限公司;3K30 台式高速冷冻离心机,SIGAM Laboratory Centrifuges;Milli-Q 超纯水处理系统,Millipore。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵试验流程 见图 1。

1.3.2 糖化液的制备 将糯米打碎成糯米粉,粉碎后过 60 目筛,备用,称取糯米粉 300 g,蒸馏水 750 g(料水比为 1:2.5)加入到 1 L 锥形瓶,混合均匀后,加入 2 g 液化酶,在 75 °C 水浴条件下,液化 1 h,调节 pH 4.5~4.8,加入 1.5 g 糖化酶和 30 g 麦曲(10%添加量),在 65 °C 水浴锅中糖化 3 h,纱布过滤后,取上清液,正常情况糖度能达到 $20^\circ\text{Bx} \sim 25^\circ\text{Bx}$,95 °C 灭菌 20 min,备用^[16-17]。

1.3.3 酵母的扩培与计数

1.3.3.1 酯香酵母制备 挑取异常汉逊酵母 1298

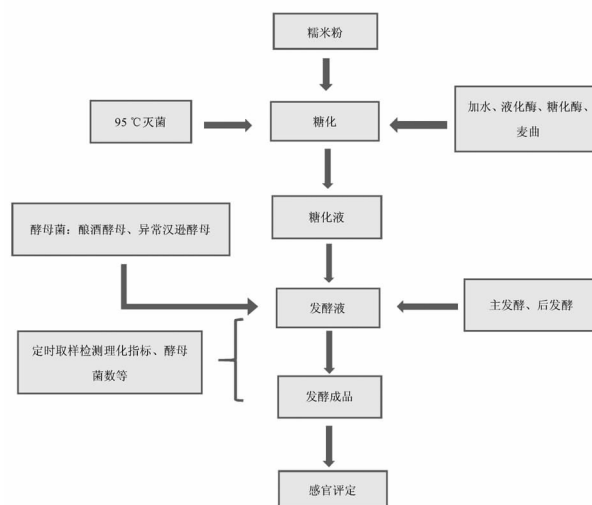


图 1 发酵试验流程图

Fig.1 Flow chart of fermentation experiment

斜面菌种,转入 YPD 液体培养基,于 28 °C,180 r/min 条件下培养 18~20 h 至对数生长期,保证酯香酵母的工作浓度达到 1×10^7 个/mL 以上,低温离心 10 min 后(4 °C,4 000 r/min)收集酵母菌体,经无菌水洗涤后,采用血球计数板进行酵母计数,在主发酵阶段前,按接种比例接入纯种酯香酵母发酵剂^[18]。

1.3.3.2 酿酒酵母制备 称取 10 g 干酵母,加入 150 mL 2%葡萄糖溶液,38 °C 水浴活化 20 min,低温离心(4 °C,4 000 r/min)10 min 后,收集菌体,经无菌水洗涤,采用血球计数板进行酵母计数,按比例接种到糖化液中^[19]。

发酵过程中采用平板计数法进行计数,培养基为孟加拉红培养基^[20-21]。

1.3.4 发酵条件 初始糖度 18°Bx , 温度 28 °C, 发酵 20 d (主发酵 5 d+后发酵 15 d), 发酵体量 150 mL, 其中酿酒酵母和异常汉逊酵母的的接种量都为 1×10^7 个/mL^[22-23]。

1.3.5 发酵试验设计 试验组: 接种酿酒酵母 *S. cere*; 接种异常汉逊酵母 *Han*; 同时接种混合发酵 CH; 顺序接种混合发酵(接种汉逊酵母 48 h 后接种酿酒酵母)SH^[24]。

其中,酿酒酵母和异常汉逊酵母的接种量都为 1×10^7 个/mL,同时接种是指同时接入酿酒酵母和异常汉逊酵母同时进行酒精发酵,顺序接种是指先接入异常汉逊酵母,48 h 后再接入酿酒酵母

进行酒精发酵。

1.3.6 黄酒取样检测 主发酵第1,2,4天,后发酵第7,12,16,20天,分别取样125 mL滤纸过滤,4℃冰箱保存,备用。测定还原糖、酒精度、总酸、挥发酯、酵母菌数等理化指标。

1.3.7 理化指标的测定 酒精度、总酸的测定参照 GB/T 13662-2018^[25];还原糖的测定参照 GB 5009.7-2016^[26]中的亚铁氰化钾滴定法;挥发酯的测定参考国家标准 GB/T 17946^[27]中的回流皂化法。酵母菌数的测定:血球计数法^[28]、平板计数法参考 GB/T 4789.2-2016^[29]。

1.4 工艺优化设计

1.4.1 单因素实验设计 按照工艺路线进行发酵试验,并对以下单因素进行相关参数替换。初始还原糖含量:250,220,190,160,130 g/L,可使用葡萄糖调节;初始 pH 值:3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,参考文献[30]使用柠檬酸、小苏打调节;主发酵温度:26,28,30,32,34℃;接种量(酯香酵母:酿酒酵母为1:1): 0.5×10^7 , 1.0×10^7 , 1.5×10^7 , 2.0×10^7 , 2.5×10^7 个/mL。每个发酵组做3次平行,取平均值。以发酵结束后的挥发酯、酒精度为评价指标。

1.4.2 响应面设计 在单因素实验的基础上,选择对黄酒顺序发酵挥发酯含量影响较大的3个因素(包括初始 pH、酵母接种量、主发酵温度)根据

表1 响应面分析因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
pH 值	3.5	4.2	4.9
接种量/个·mL ⁻¹	0.5	1.0	1.5
温度/℃	30	32	34

Box-Behnken 中心组合试验设计原理,采用3因素3水平1响应值响应面分析法进行设计。

选定初始 pH、酵母接种量、主发酵温度范围分别为 pH 3.5~4.9, $0.5 \sim 1.5 \times 10^7$ 个/mL,30~34℃,响应面的分析因素及水平设计如表1所示。

1.5 感官评定

9名感官评定人员先经过3轮品评专业培训。使用计分评价法对酒样进行感官评价,以筛选出感官品质最优的黄酒样品。本次感官评价参考黄酒国家标准(GB/T 13662-2018)^[25],制定发酵酒的感官评分表(见表2),满分是100分,其中色泽10分,香气25分,口味50分,风格15分。根据品评酒样的色泽、香气、味道、风格的优劣差异的评语情况,依规定项目的分数进行打分。

表2 黄酒感官评分表

Table 2 Yellow rice wine sensory score

因素	评判标准	评分
色泽(10分)	橙黄(符合本类型黄酒应有色泽),清凉透明,有光泽	10
	清凉透明,但光泽略差,或色泽过深、过浅者	8
	微混,或者失光者	6
	浑浊,或缺乏黄酒应有的色泽者	4
	有沉淀物、悬浮物、其它杂质者	2
香气(25分)	具有黄酒特有的香气,醇香浓郁,无其它异香、异气	25
	有黄酒应有的香气,有醇香,但不浓郁	20
	有黄酒应有的香气,但醇香不明显	15
	缺乏黄酒应有的香气,有异杂气者	10
	有黄酒不应有的香气、有严重臭气,或异杂怪气者	5
口味(50分)	醇厚(半干型以上黄酒),醇和(干型普通黄酒),鲜甜(甜型和半甜型黄酒),柔和爽口,无其它异杂味	50
	醇厚或醇和,但不够柔和	40
	尚醇厚、清爽,但酒味较淡薄	30
	酒味淡薄,有苦涩味,弱味	20
	淡而无味,酸败,异杂怪味者	10

(续表 2)

因素	评判标准	评分
风格(15分)	具有本类型黄酒的独特风格,酒体组分协调	15
	有本类型黄酒的风格,酒体组分较协调	12
	典型性不明显,酒体组分尚协调	9
	缺乏典型性,酒体组分不协调	6

1.6 数据处理

数据采用 Excel, Origin 9.0, Design Expert 8.0.6 软件处理、绘图。

2 结果与分析

2.1 两株酵母发酵特性比较

2.1.1 两株酵母单独发酵过程理化指标变化 酿酒酵母和异常汉逊酵母发酵过程中理化指标的变化如图 2~4 所示,对发酵结束后的理化指标进行统计,结果见表 3。

图 2 和图 3 分别为酿酒酵母和异常汉逊酵母

发酵过程中理化指标的变化,包括还原糖、酒精度、总酸、挥发酯,图 4 为酵母数的变化。由图 2 可以看出,酿酒酵母发酵的还原糖含量急剧下降,仅 2 d 下降至 7.0 g/L,同时酒精度含量达到 9.3% vol,第 7 天酒精度达到最高值 10.7% vol,之后缓慢下降。异常汉逊酵母的还原糖含量在整个发酵过程中呈逐步下降的趋势,发酵结束后,还原糖含量与酿酒酵母差异不大,说明异常汉逊酵母的还原糖代谢能力不低于酿酒酵母。同时,发酵过程中异常汉逊酵母的酒精度含量始终低于酿酒酵母,说明异常汉逊酵母的酒精转化能力较差。由图 3 可知,

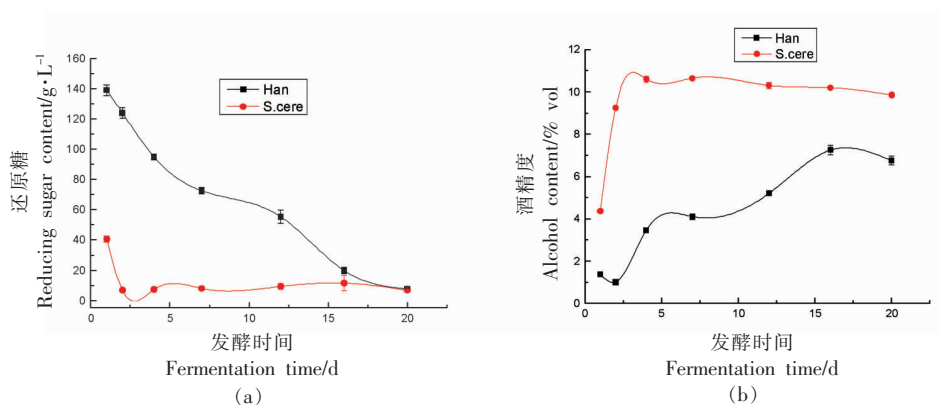


图 2 酵母单独发酵过程还原糖(a)和酒精度(b)的变化

Fig.2 Changes in reducing sugar (a) and alcohol content (b) during yeast fermentation alone

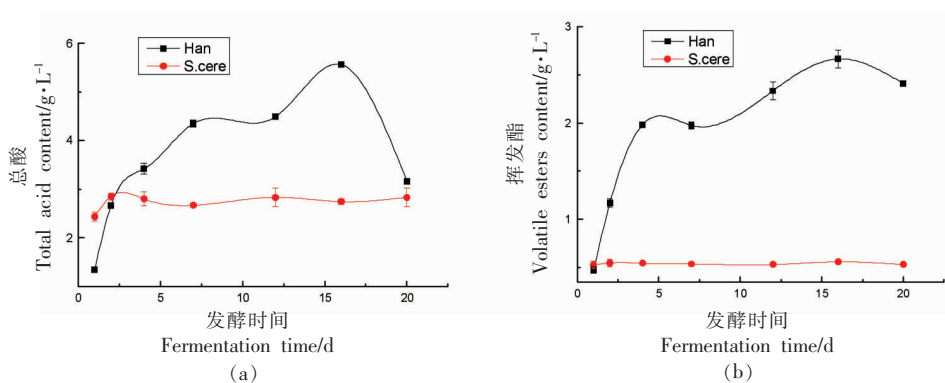


图 3 酵母单独发酵过程总酸(a)和挥发酯(b)的变化

Fig.3 Changes in total acid (a) and volatile esters (b) during yeast fermentation alone

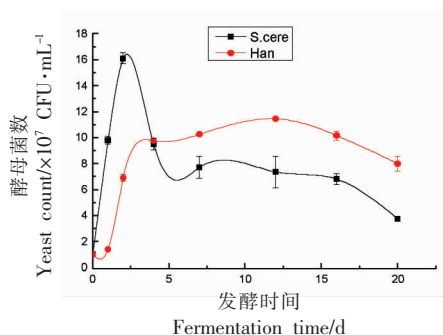


图4 酵母单独发酵过程酵母数的变化

Fig.4 Changes in the number of yeast during fermentation of yeast alone

在发酵过程中,异常汉逊酵母的产酸能力明显强于酿酒酵母,在发酵第16天达到最大值5.6 g/L,之后出现下降,推测发酵后期有机酸会与醇类物质发生酯化反应,生成乙酯类化合物,导致总酸含量下降,同时,可以看出异常汉逊酵母的挥发酯含量一直在增加,第16天达到最大值2.67 g/L,而酿

酒酵母的挥发酯含量增加缓慢,变化不大,发酵结束后,酿酒酵母和异常汉逊酵母的挥发酯含量分别为0.53 g/L和2.41 g/L,异常汉逊酵母的挥发酯含量是酿酒酵母的4.5倍。说明异常汉逊酵母的产酯能力明显强于酿酒酵母的产酯能力。由图4可以看出,酿酒酵母前期的增殖速度较快,第2天达到最大值 1.61×10^8 CFU/mL,之后呈下降趋势;异常汉逊酵母在发酵前4天增殖速度最快,在第12天达到最大值 1.15×10^8 CFU/mL时进入平衡期,后期糖类碳源物质逐渐消耗殆尽,酵母菌缺少营养物质,进入衰亡期。

从表3看出,发酵结束后,酿酒酵母与异常汉逊酵母发酵液中的还原糖含量都在10 g/L以下,说明两者糖代谢都比较彻底。发酵结束时酿酒酵母的酒精度高于异常汉逊酵母,挥发酯含量低于异常汉逊酵母,显然酿酒酵母产酒精能力较强,异常汉逊酵母产挥发酯能力较强。

表3 发酵结束后各理化指标

Table 3 Physical and chemical indicators after fermentation

发酵类型	还原糖/g \cdot L $^{-1}$	酒精度/% vol	总酸/g \cdot L $^{-1}$	挥发酯/g \cdot L $^{-1}$	酵母数/ $\times 10^7$ CFU \cdot mL $^{-1}$
S.cere	6.8	9.9	2.8	0.53	3.8
Han	7.6	6.8	3.2	2.41	8.0

2.1.2 酵母单独发酵黄酒感官评价结果 对不同发酵方式的黄酒进行感官品评,总分以各项分累

计而得,结果见表4。

表4 不同发酵方式黄酒感官评价结果

Table 4 Sensory evaluation results of yellow rice wine with different fermentation methods

样品	色泽	口味	香气	风格	感官描述	得分
S.cere	6.3 \pm 0.58	29.0 \pm 7.94	16.8 \pm 4.16	9.7 \pm 0.58	黄酒香气成分寡淡,有酒味	61.8
Han	8.4 \pm 0.58	29.3 \pm 3.79	21.9 \pm 4.36	10.6 \pm 1.53	酯香性成分明显,酒味较淡	70.2

发酵结束后,对两种酵母菌单独发酵的黄酒样品进行感官评价,从色泽、口味、香气、风格4个方面对黄酒样品进行打分,由表4可以看出,两种酵母单独发酵黄酒的差异主要体现在色泽和香气成分上,酿酒酵母发酵的黄酒样品颜色较淡,而异常汉逊酵母发酵的黄酒样品呈现出色泽较好的琥珀色。另外,异常汉逊酵母由于产挥发酯的特性,所以其发酵的黄酒样品香气成分浓郁,强烈。从口味上来说,酿酒酵母的酒味明显强于异常汉逊酵母。综合来看,异常汉逊酵母发酵的黄酒样品得分

高于酿酒酵母发酵的黄酒样品。

2.2 混合酵母发酵路线的筛选

2.2.1 混合酵母发酵过程变化

2.2.1.1 酵母混合方式对酵母生长量的影响 图5可知,酿酒酵母和异常汉逊酵母同时混合接种发酵,异常汉逊酵母处于劣势地位,4 d后,平板计数中检测不出异常汉逊酵母菌,说明酿酒酵母对异常汉逊酵母起到强烈的抑制作用^[31]。可以看出,在顺序混合发酵条件下,前期异常汉逊酵母具有先发优势,增殖速度较快,形成菌种优势,对酿酒

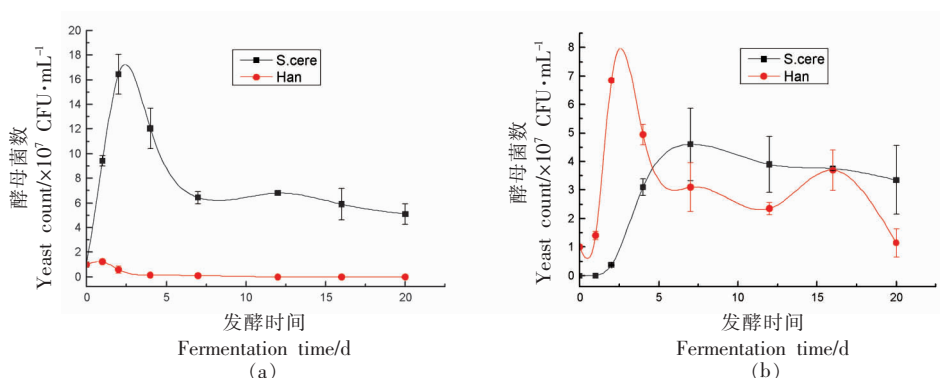


图 5 同时混合静置(a)和顺序混合静置(b)发酵期间酵母数变化

Fig.5 Changes in yeast number during fermentation with simultaneous mix-and-stand (a) and sequential mix-and-stand (b)

酵母的增殖起一定压制作用。4 d后,酿酒酵母逐渐适应发酵条件,增殖数大于异常汉逊酵母,异常汉逊酵母菌种优势下降,酿酒酵母占据发酵优势地位。

2.2.1.2 酵母混合方式对发酵过程理化指标及产挥发酯量的影响 从图 6 和图 7 可以看出,在发酵前 2 天,CH(同时混合发酵)消耗还原糖的速率远远大于SH(顺序混合发酵)还原糖的速率,这是因为前 2 天,酿酒酵母大量生长繁殖,还原糖等碳源营养物质被大量吸收利用,通过 EMP 代谢途径产生大量酒精。发酵结束后,SH 和 CH 的还原糖含量均低于 10 g/L,说明发酵代谢彻底,还原糖转化率高。发酵过程中 CH 的酒精度始终高于 SH 的酒精度,说明酿酒酵母的酒精度转化率高,SH 挥发酯含量显著高于 CH 的挥发酯含量,这是因为 CH

在发酵过程中,异常汉逊酵母竞争力太差,导致发酵中后期,以酿酒酵母为主体发酵菌种。结束后,SH 的酒精度(8.1%vol)略低于 CH 的酒精度(8.7%vol)。CH 和 SH 最终总酸含量分别为 3.1 g/L 和 4.7 g/L,挥发酯含量分别为 0.56 g/L 和 1.59 g/L,SH 挥发酯含量显著高于 CH 挥发酯含量。

2.2.2 酵母混合方式对黄酒发酵产品感官的影响

发酵结束后,对黄酒样品进行感官评定,从色泽、口味、香气、风格 4 个方面对黄酒样品进行打分,根据感官评价结果,由表 5 可知,SH 黄酒的综合感官得分高于 CH 黄酒。SH 具有浓郁的酒香味,口味醇和、爽口的特点。CH 黄酒具有酒味不醇厚,香气不明显的特点。因此,可以将 SH 路线作为黄酒新工艺研究方向,改善黄酒风味和口感。

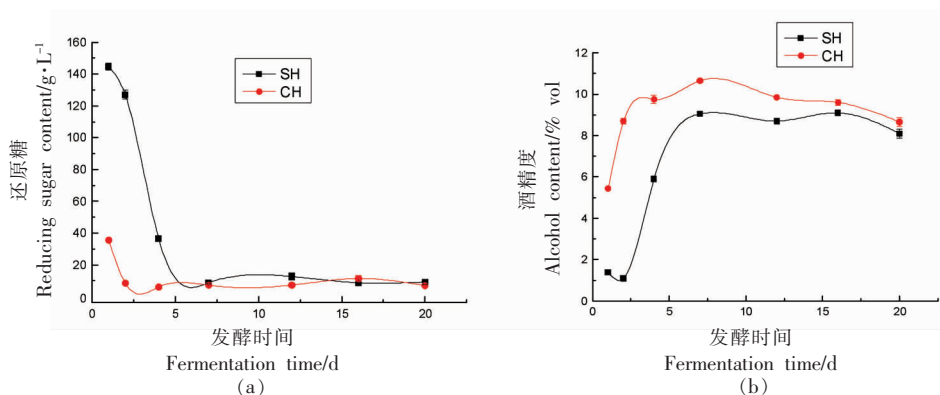


图 6 不同混合条件黄酒发酵期间还原糖(a)和酒精度(b)的变化

Fig.6 Changes in reducing sugar (a) and alcohol content (b) during fermentation of yellow rice wine with different mixing conditions

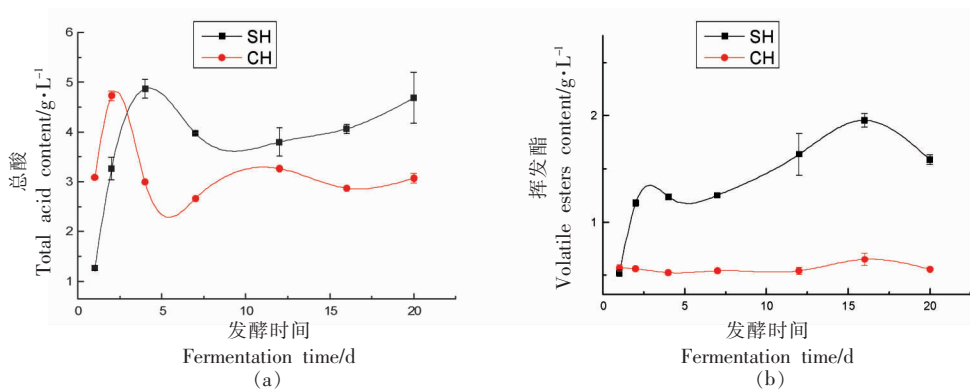


图7 不同混菌条件黄酒发酵期间总酸(a)和挥发酯(b)的变化

Fig.7 Changes of total acid (a) and volatile ester (b) during fermentation of rice yellow wine under different mixed conditions

表5 黄酒感官评价结果

Table 5 Sensory evaluation results of yellow rice wine

样品	色泽	口味	香气	风格	感官描述	得分
SH	7.0 ± 1.00	37.7 ± 10.50	21.2 ± 1.00	13.0 ± 1.05	有浓郁的酒香味,口味醇和、爽口	78.9
CH	4.6 ± 1.52	33.6 ± 11.01	17.0 ± 1.02	10.6 ± 2.08	酒味不醇厚,香气不浓郁	65.8

2.3 发酵工艺优化

2.3.1 单因素实验结果与分析 由图8可知,随着初始还原糖含量的增加,酒精度呈逐步上升的趋势,而挥发酯含量在逐步下降,当还原糖含量高于220 g/L时,挥发酯含量趋于稳定,说明还原糖含量偏高时,不利于酯类等物质的生成,使得发酵黄酒挥发酯含量偏低;而酒精度随还原糖含量的增加而增加,说明发酵彻底,酒精转化率高。由此,可以选择一个合适的含糖量(160 g/L),使发酵黄酒的酒精度含量不能过低,并且可以增加挥发酯的含量,增加香气成分。

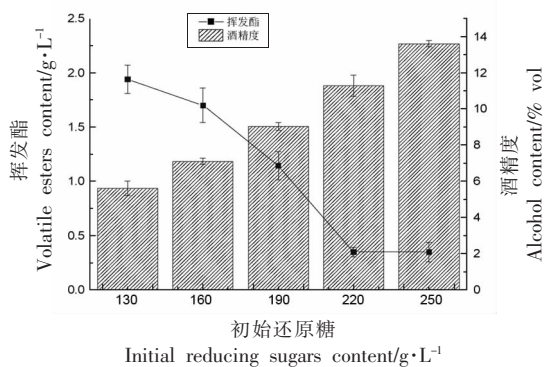


图8 初始还原糖浓度对发酵黄酒酒精度和挥发酯含量的影响

Fig.8 Effect of initial reducing sugar concentration on alcohol content and volatile ester content of fermented yellow rice wine

由图9可知,当发酵温度在26~34℃,温度对发酵黄酒最后的酒精度含量影响不显著,说明在这个温度范围内,酿酒酵母具有较强的发酵酒精能力。发酵温度在32℃时,挥发酯的含量达到最高值1.70 g/L。发酵温度过高或者过低都会影响最后挥发酯的含量。这可能是因为温度过高或者过低都不利于产酯酵母的生长繁殖,从而使得最终生成的挥发酯含量下降。另外,发酵温度过高也不利于香气成分等小分子物质保留,使得最终的挥发酯含量略低。综上考虑,发酵温度为32℃较为合适。

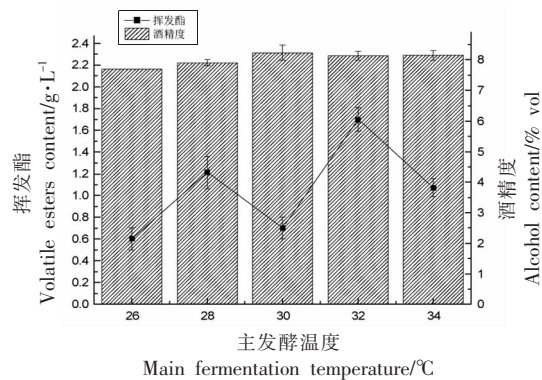


图9 主发酵温度对发酵黄酒酒精度和挥发酯含量的影响

Fig.9 The effect of main fermentation temperature on the alcohol content and volatile ester content of fermented yellow rice wine

由图 10 可知,当 pH 值为 4.5 时,酒精度含量最高达到 8.9% vol。pH 值为 4.0 时,挥发酯的含量最高,为 1.64 g/L。pH 值的高、低都会影响异常汉逊酵母的生长代谢,使得最后生成的挥发酯含量有所不同。当 pH 值含量为 4.0 时,酒精度的含量也大于 8.0% vol,达到低度黄酒国家标准的酒精度要求。综合考虑,选择初始发酵 pH 值为 4.0 比较合适。

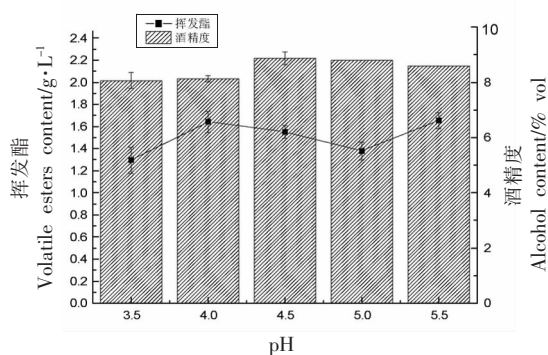


图 10 初始 pH 值对顺序发酵黄酒酒精度和挥发酯含量的影响

Fig.10 Effect of initial pH value on alcohol content and volatile ester content of sequentially fermented yellow rice wine

由图 11 可知,不同接种量条件对发酵黄酒最终酒精度含量的影响并不显著。挥发酯含量随着接种量的增加呈先增大后减小的趋势。接种量在 1.0×10^7 个/mL 时,挥发酯含量最高,达到 1.72 g/L。当初接种量过小时,影响发酵的启动速度,效率过低。接种量过高时,则由于糖类等初始营养物质消耗过快,不利于酯类物质的积累。综合考虑,选择接种量为 1.0×10^7 个/mL,比较适合黄酒发酵。

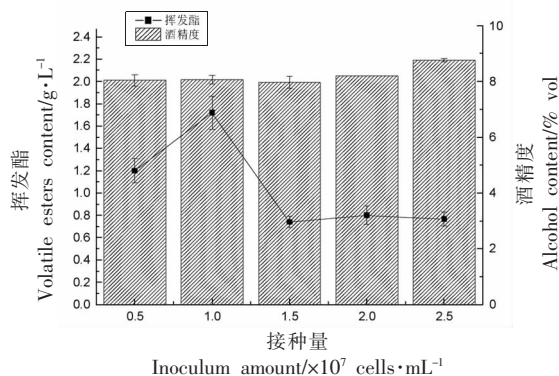


图 11 接种量对顺序发酵黄酒酒精度和挥发酯含量的影响

Fig.11 Effect of inoculum size on alcohol content and volatile ester content of sequentially fermented yellow rice wine

2.3.2 响应面试验结果与分析 在单因素实验结果的基础上,确定主发酵温度(A)、pH 值(B)、接种量(C)为考察自变量,以挥发酯含量为响应值,

用 Design-Expert V8.0.6 统计分析软件设计 BoxBehnken 响应面试验,共设计 3 因素 3 水平,共 17 个试验组别,试验结果见表 6。

表 6 响应面分析法试验方案及结果

Table 6 Experimental scheme and results of response surface methodology

编号	温度	pH 值	接种量	挥发酯/g·L ⁻¹	编号	温度	pH 值	接种量	挥发酯/g·L ⁻¹
1	-1	-1	0	1.52	10	0	1	-1	1.42
2	1	-1	0	1.46	11	0	-1	1	1.41
3	-1	1	0	1.49	12	0	1	1	1.44
4	1	1	0	1.41	13	0	0	0	1.66
5	-1	0	-1	1.52	14	0	0	0	1.70
6	1	0	-1	1.42	15	0	0	0	1.71
7	-1	0	1	1.51	16	0	0	0	1.68
8	1	0	1	1.33	17	0	0	0	1.69
9	0	-1	-1	1.58					

通过软件分析拟合,以挥发酯含量为响应值,得到顺序发酵黄酒挥发酯含量对主发酵温度(A)、pH 值(B)、接种量(C)的二次回归方程为:挥发

酯=1.69-0.053A-0.026B-0.031C-0.005AB-0.020AC+0.048BC-0.12A²-0.10B²-0.13C²。

表7 挥发酯回归方差模型分析

Table 7 Analysis of volatile ester regression variance model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.23	9	0.026	39.65	< 0.0001	**
A(温度)	0.022	1	0.022	33.89	0.0006	**
B(pH值)	5.512×10 ⁻³	1	5.512×10 ⁻³	8.47	0.0226	*
C(接种量)	7.812×10 ⁻³	1	7.812×10 ⁻³	12.01	0.0105	*
AB	1.000×10 ⁻⁴	1	1.000×10 ⁻⁴	0.15	0.7067	
AC	1.600×10 ⁻³	1	1.600×10 ⁻³	2.46	0.1609	
BC	9.025×10 ⁻³	1	9.025×10 ⁻³	13.87	0.0074	**
A ²	0.058	1	0.058	89.72	< 0.0001	**
B ²	0.042	1	0.042	65.03	< 0.0001	**
C ²	0.066	1	0.066	101.51	< 0.0001	**
残差	4.555×10 ⁻³	7	6.507×10 ⁻⁴			
失拟项	3.075×10 ⁻³	3	1.025×10 ⁻³	2.77	0.1750	不显著
净误差	1.480×10 ⁻³	4	3.700×10 ⁻⁴			
总误差	0.24	16				

注:*. 显著水平 $P<0.05$; **. 极显著水平 $P<0.01$; $P>0.05$. 不显著。

表8 模型可行性分析

Table 8 Model feasibility analysis

指标	数值
标准差	0.026
平均值	1.53
变异系数	1.67
预测残差平方和	0.052
决定系数	0.9808
校正拟合度	0.9560
预测拟合度	0.7825
信噪比	17.723

从表7和表8可以看出,模型的 P 值<0.0001,说明该回归模型达到极显著水平,失拟项的 P 值为0.1750>0.05,表明模型失拟项不显著;决定系数 $R=0.9808$,表明98.8%的数据可以用这个方程来解释;信噪比为17.723>4;变异系数为1.67%<15%;以上分析均说明该回归模型与试验拟合良好,可以用于对顺序发酵黄酒的挥发酯含量的预测分析。

本模型因素一次项 A ($P<0.01$)为极显著水平, B 和 C ($0.01<P<0.05$)为显著水平;二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 均为极显著水平($P<0.01$);交互项 BC 为极显著水平($P<0.01$), AB 和 AC 均不显著($P>0.05$),

从主发酵温度(A)、pH值(B)、接种量(C)3个影响因素的 F 值可知,各单因素对发酵黄酒挥发酯含量的影响大小依次为: $A(33.89)>C(12.01)>B(8.47)$ 。

2.3.2.1 模型讨论与分析 响应面是以响应值对各试验因子所构成的三维空间的曲面图^[32]。通过用Design expert 8.06软件分析,得出主发酵温度、pH值和酵母接种量交互作用对黄酒挥发酯含量影响的响应曲面和等高线,结果如图12所示。

响应面中的最高点是等高线最小椭圆的圆心,并且图形的曲面越陡峭,说明两因素之间的交互作用越明显。相反,图形的曲面越平缓,说明两因素的交互作用越小。等高线的形状可以表示因素之间的交互作用的显著程度,等高线的形状越接近椭圆形,表明两因素的交互作用显著;相反,形状越接近圆形,表面相互作用不显著^[33]。由图12可知,曲面图形开口均向下,存在极值。从图中可以看出,温度对于SH黄酒的挥发酯含量影响最大, A (发酵温度)和 B (pH值)的等高线趋于圆形,交互作用不显著;而 A (发酵温度)和 C (接种量)与 B (pH值)和 C (接种量)的曲面形状较为陡峭,等高线近于椭圆形,说明两因素间的交互作用显著。从图中也可看出,发酵温度对挥发酯含量的影响大于pH值、接种量;接种量对挥发酯含量的影

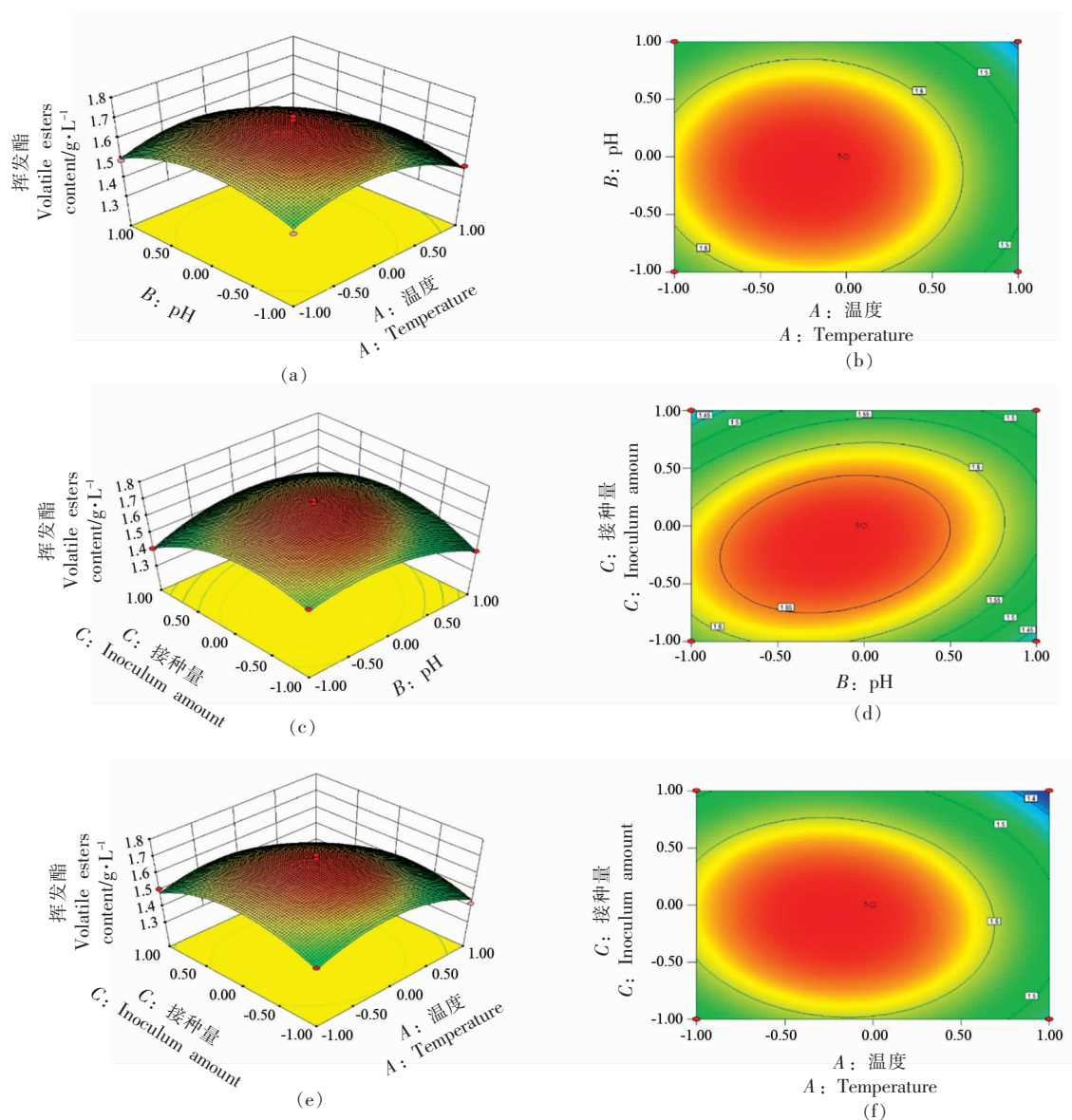


图 12 各因素间交互作用对黄酒挥发酯含量影响的响应面图和等高线图

Fig.12 Response surface and contour map of the interaction between factors on the content of volatile esters in yellow rice wine

响大于 pH 值。因此,各因素影响挥发酯含量的顺序依次为:发酵温度>接种量>pH 值,与方差结果分析一致,说明模型的可靠性较高。

2.3.2.2 验证试验 通过 Design-Expert 8.0.6 对方程求解,得到顺序发酵黄酒的最佳工艺:发酵温度为 31.58 ℃,接种量为 0.93×10^7 个/mL, pH 值为 4.18。在此条件下,挥发酯含量的理论值为 1.70 g/L。同时考虑到实际操作的可行性,修正最佳工艺

的条件为:温度 31.5 ℃,接种量为 1.0×10^7 个/mL, pH 值为 4.2。在此条件下进行平行试验 3 次,得到发酵黄酒结束后的挥发酯含量为 1.66 g/L,准偏差为 0.028,与理论值相差不大,说明试验模型可靠,试验结果理想。在此条件下,测得发酵结束后的理化指标,酒精度 8.0% vol,还原糖含量 9.32 g/L,总酸含量 4.32 g/L,综合感官评价得分为 82.6。

3 结论

本研究对2种酵母发酵过程中理化指标进行跟踪检测,并对发酵结束后的黄酒样品进行感官评价,发酵结束后,酿酒酵母和异常汉逊酵母的酒精度分别为9.9% vol和6.8% vol,挥发酯含量分别为0.53 g/L和2.41 g/L,异常汉逊酵母的挥发酯含量是酿酒酵母含量的4.5倍,含量显著高于酿酒酵母,且香气较为浓郁。对2种酵母进行混菌发酵途径筛选,显示顺序混合发酵路线能有效提高黄酒中挥发酯含量,选择顺序混合发酵路线较为合适。

通过使用软件Design-Expert 8.0.6对主发酵温度、pH值、接种量3个因素以挥发酯为响应值进行优化。结果显示,最佳发酵工艺为:发酵温度31.5℃,pH值4.2,接种量 1.0×10^7 个/mL。在此条件下进行3次平行试验,得到挥发酯含量为1.66 g/L。同时测得理化指标:酒精度8.0% vol,还原糖含量9.32 g/L,总酸含量4.32 g/L,符合黄酒国标GB/T 13662-2018中清爽型干黄酒理化要求,综合感官评价得分为82.6。在保证顺利发酵的情况下,增加了非酿酒酵母的优势,提高了黄酒中挥发酯含量,增加更多香气成分,改善了黄酒的品质和风味,具有一定的现实意义。

参 考 文 献

- [1] 汪江波,王浩,孔博,等.黄酒酿造技术研究进展[J].酿酒,2020,47(6):26-30.
WANG J B, WANG H, KONG B, et al. Research progress on rice wine brewing technology[J]. Liquor Making, 2020, 47(6): 26-30.
- [2] 张江宁,丁卫英,张玲,等.黄酒酿造技术的研究进展及发展态势[J].农产品加工,2019(18):61-62.
ZHANG J N, DING W Y, ZHANG L, et al. Research progress and development trend of rice wine brewing technology[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2019(18): 61-62.
- [3] 谢广发.黄酒的功能性成分与保健功能[J].酿酒,2008,35(5):14-16.
XIE G F. Functional ingredients and health care functions of rice wine[J]. Liquor Making, 2008, 35(5): 14-16.
- [4] 冯浩,毛健,黄桂东,等.黄酒发酵过程中乳酸菌的分离、鉴定及生物学特性研究[J].食品工业科技,2013,34(16):224-227,244.
FENG H, MAO J, HUANG G D, et al. Isolate, identify and study the biological characteristics of lactic acid bacteria during the fermentation process of rice wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(16): 224-227, 244.
- [5] 冯芃菲,冯庆义,栗竞帆,等.黄酒发展现状及营销策略[J].中国市场,2019(7):125-126.
FENG P F, FENG Q Y, LI J F, et al. Development status and marketing strategy of rice wine[J]. China Market, 2019(7): 125-126.
- [6] 卜光明,周化斌,周茂洪,等.酿造酒中非酿酒酵母的研究进展[J].食品工业科技,2019,40(14):346-352.
BU G M, ZHOU H B, ZHOU M H, et al. Research progress on non-*Saccharomyces cerevisiae* in brewed wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 346-352.
- [7] TUFARIELLO M, FRAGASSO M, PICO J, et al. Influence of non-*Saccharomyces* on wine chemistry: A focus on aromarelated compounds[J]. Molecules, 2021, 26(3): 644-666.
- [8] 战吉宸,曹梦竹,游义琳,等.非酿酒酵母在葡萄酒酿造中的应用[J].中国农业科学,2020,53(19):4057-4069.
ZHANG J C, CAO M Z, YOU Y L, et al. The application of non-*Saccharomyces cerevisiae* in winemaking [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 53(19): 4057-4069.
- [9] PADILLA B, GIL J, MANZANARES P. Past and future of non-*Saccharomyces yeasts*: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 411-441.
- [10] LIU P T, LU L, DUAN C Q, et al. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation[J]. LWT-Food Sci Technol, 2016, 71: 356-363.
- [11] ROJAS V, GIL J V, PIÑAGA F, et al. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 86(1): 181-188.
- [12] MOREIRA N, MENDES F, GUEDES D P P, et al. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and es-

- ters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(3): 231–238.
- [13] 李婷. 川南白酒窖池中产酯酵母的筛选及其葡萄酒增香酿造的潜力分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- LI T. Screening of ester-producing yeast in white wine cellar pond in southern Sichuan and analysis of its potential for wine flavoring[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
- [14] 夏鸿川, 张众, 孙丽君, 等. 混菌发酵对贺兰山东麓赤霞珠干红葡萄酒香气的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 165–175.
- XIA H C, ZHANG Z, SUN L J, et al. Effect of mixed fermentation on the aroma of Cabernet Sauvignon dry red wine at the eastern foot of Helan Mountain[J]. Food Science, 2022, 43(14): 165–175.
- [15] ANFANG N, BRAJKOVICH M, GODDARD M R. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Savignon Blanc[J]. Australian Journal of Grape & Wine Research, 2008, 15(1): 1–8.
- [16] 谭樞华, 周建弟, 刘杨露, 等. 利用固定化酵母进行黄酒主发酵的初步研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(1): 162–166.
- TAN L H, ZHOU J D, LIU Y L, et al. A preliminary study on the main fermentation of rice wine using immobilized yeast[J]. China Brewing, 2012, 31(1): 162–166.
- [17] 郑和龙. 黄酒酵母菌株对黄酒发酵微生物群落结构与风味物质的影响[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
- ZHENG H L. The impact of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on microbial diversity and wine quality in Chinese rice wine fermentations [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [18] 王晶晶, 谭樞华, 蒋予箭. 固定化条件下主发酵温度对黄酒中高级醇含量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(9): 79–82.
- WANG J J, TAN L H, JIANG Y J. Effect of main fermentation temperature on higher alcohol content in rice wine under immobilization condition [J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(9): 79–82.
- [19] 刘爱国. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒酿酒酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- LIU A G. Isolation and classification of *Saccharomyces cerevisiae* from grapes at the eastern foot of Helan Mountain, Ningxia [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2008.
- [20] 刘梦, 缪礼鸿, 刘蒲临, 等. 马克斯克鲁维酵母与酿酒酵母混合发酵对液态法黄酒风味的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 160–167.
- LIU M, MIAO L H, LIU P L, et al. Effect of mixed fermentation of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on the flavor of liquid rice wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 160–167.
- [21] 王婧, 高娉娉, 田秀, 等. 粟酒裂殖酵母与酿酒酵母顺序接种发酵对干红葡萄酒品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 84–90.
- WANG J, GAO P P, TIAN X, et al. Effect of sequential inoculation fermentation of *Schizosaccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* on the quality of dry red wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(9): 84–90.
- [22] 杨鲁君, 蒋予箭, 李余劲. 黄酒酵母优良抗逆菌株的筛选、鉴定及发酵特性研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(9): 71–77.
- YANG L J, JIANG Y J, LI Y D. Screening, identification and fermentation characteristics of excellent stress-resistant strains of *Saccharomyces sinensis* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(9): 71–77.
- [23] JIANG X H, LU Y Y, LIU S Q. Effects of pectinase treatment on the physicochemical and oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Torulopsis delbrueckii*[J]. LWT, 2020, 132: 109929.
- [24] DOMIZIO P, LIU Y, BISSON L F, et al. Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*: Quantification and characterization [J]. Food Microbiology, 2017, 61: 136–149.
- [25] 国家市场监督管理总局. 黄酒: GB/T 13662–2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1–22.
- State Administration for Market Regulation. Huangjiu: GB/T 13662–2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018: 1–22.
- [26] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中还原糖的测定: GB 5009.7–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1–19.

- National Health and Family Planning Commission. Determination of reducing sugars in food: GB 5009.7-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1-19.
- [27] 国家质量监督检验检疫总局. 地理标志产品绍兴酒: GB/T 17946-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-6.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Geographical Indication Products Shaoxing wine: GB/T 17946-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008: 1-6.
- [28] 郑超群. 基于酿酒酵母和异常汉逊酵母混合发酵技术的黄酒生产工艺及风味成分研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
- ZHENG C Q. Research on the production process and flavor components of rice wine based on the mixed fermentation technology of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomaliae* [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022.
- [29] 国家食品药品监督管理总局. 菌落总数测定: GB 4789.2-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-5.
- China Food and Drug Administration. Total colony count assay: GB 4789.2-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 1-5.
- [30] 孙佳平. 蓝莓果酒发酵菌株的筛选及固定化技术的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- SUN J P. Screening and immobilization technology of fermentation strains in blueberry fruit wine [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2009.
- [31] VICENTE J, CALDER N F, SANTOS A, et al. High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3): 1196-1208.
- [32] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 河南教育学院学报(自然科学版), 2011, 20(4): 34-37.
- ZHANG Z Z, HAN C L, LI C W. Application of response surface method in experimental design and optimization[J]. Journal of Henan Institute of Education (Natural Science Edition), 2011, 20(4): 34-37.
- [33] 林毅, 黄梅, 吴桂苹, 等. 响应面法优化熏干草果油树脂提取工艺及成分分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(1): 163-171.
- LIN Y, HUANG M, WU G P, et al. The response surface method was used to optimize the extraction process and composition analysis of oleoresin from smoked hay fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(1): 163-171.

Studies on Yellow Rice Wine Technology Using Mixed Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomala*

Zheng Chaoqun¹, Chen Chen¹, Jiang Yujian¹, Zhang Lei¹, Xie Guangfa^{2*}

(¹School of Food and Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018

²Key Laboratory of Pollution Exposure and Health Intervention of Zhejiang Province, College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015)

Abstract *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomaliae* as yellow rice wine fermentation strains, the fermentation characteristics of the two yeasts on the 18 °Bx saccharification solution were investigated respectively. It was found that the alcohol-producing capacity of *Saccharomyces cerevisiae* (9.9% vol) was stronger than that of *Hansenula anomala* (6.8% vol), and the volatile ester content (2.41 g/L) of *Hansenula anomaliae* was significantly higher than that of *Saccharomyces cerevisiae* (0.53 g/L). Further comparing the mixed fermentation pathways, the alcohol content of sequential mixed fermentation (8.1%vol) was slightly lower than that of simultaneous mixed fermentation alcohol (8.7% vol), and the volatile ester content (1.59 g/L) was significantly higher than that of simultaneous mixed fermentation (0.56 g/L) ($P<0.05$). Combined with the physical and chemical indicators of the fermentation process and sensory evaluation, it is more appropriate to choose a sequential mixed fermentation route. Through the combined experimental design of the single-factor and Box-Benhnken Center, the response surface of the volatile ester content of the sequentially mixed fermented rice wine products was optimized by selecting three factors: the main fermentation temperature, pH value and yeast inoculation amount.

The results showed that the optimal parameters for sequential mixing of standing fermented yellow rice wine were: fermentation temperature of 31.5 °C, inoculation amount of 1.0×10^7 cells/mL, and pH of 4.2. The verification experiments showed that the volatile ester content of sequentially mixed yellow rice wine under this condition was (1.66 ± 0.028) g/L, which was not much different from the predicted value of 1.70 g/L, which was 213% higher than the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* alone. In this study, the fermentation pathway and application effect were elucidated for the application of non-*Saccharomyces cerevisiae* in yellow rice wine fermentation.

Keywords *H. anomala*; mixed strains; yellow rice wine; fermentation curve; process optimization