

# 肇实发酵酒酿造工艺优化

## Brewing process optimization of gordon euryale seed wine

李妍<sup>1</sup> 林美英<sup>1</sup> 李云松<sup>2</sup>

LI Yan<sup>1</sup> LIN Mei-ying<sup>1</sup> LI Yun-song<sup>2</sup>

(1. 肇庆学院化学化工学院, 广东 肇庆 526061; 2. 中山出入境检验检疫局, 广东 中山 528403)

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China;

2. Zhongshan Entry-Exit Inspection and Quarantine, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

**摘要:**采用酶水解法制备肇实淀粉糖浆,并加入酿酒酵母进行发酵制成肇实发酵酒。通过单因素试验和正交试验对肇实发酵酒的液化、糖化及发酵工艺参数进行优化。结果表明:最佳肇实制浆料液比 1:10(m:m);最佳液化条件为 $\alpha$ -淀粉酶 0.4%,温度 70℃,时间 60 min;最佳糖化条件为糖化酶 0.5%,温度 60℃,时间 1 h,该条件下肇实糖化液的糖度为 10.5%;最佳发酵条件为酵母添加量 0.2%,温度 27℃,时间 5 d,该条件下肇实发酵酒酒精度为 12.3% Vol。

**关键词:** 芡实;酶解;发酵;糖度;酒精度

**Abstract:** The gordon euryale seed starch was hydrolyzed by  $\alpha$ -amylase and glucoamylase to prepare starch syrup, and then the saccharomyces cerevisiae was added to prepare the health wine. The technology parameters were optimized by single factor and orthogonal experiments. And the optimal fermentation conditions were gotten. With the ratio of mass to water of 1:10, the optimum liquefaction conditions were: addition of  $\alpha$ -amylase of 0.4%, liquefaction temperature 70℃, and liquefaction time 60 min. The optimum saccharifying conditions were: addition of glucoamylase 0.5%, saccharifying temperature 60℃, and saccharifying time of 1 h. Under the saccharifying conditions, the sugar content of the hydrolysate was 10.5%. The optimal fermentation conditions were: yeast dosage of 0.2%, fermentation temperature of 27℃, fermentation time of 5 d. Under the fermentation conditions, the alcoholicity of the health wine was 12.3% Vol.

**Keywords:** gordon euryale seed; enzymolysis; fermentation; sugar content; alcoholicity

肇实是广东肇庆地区的特产,又名芡实,为睡莲科芡属一年生大型水生植物的果实<sup>[1]</sup>。肇实中含有丰富的碳水化合物(73.88%),其中淀粉为 69.77%,粗蛋白质为 10.89%<sup>[2]</sup>,具有益肾固精、祛湿止带、补脾止泻的药效,常用于炖肉、煲粥和煮汤<sup>[3]</sup>。对于肇实的研究主要集中在成分测定<sup>[2,4]</sup>、淀粉提取与性质研究<sup>[5-6]</sup>、肇实壳提取<sup>[1,7]</sup>、肇实酸奶

研制<sup>[8]</sup>等方面,李湘利等<sup>[9]</sup>应用山东产芡实混合其他原料经糖化并添加白砂糖后发酵制备芡实酒,制备工序较多,且产品具有混合风味。为了适当简化制备工艺,开发风味纯正的肇实酒,本研究探索性地采用肇实作为唯一酿造原料,首先通过酶水解法将肇实水解糖化,然后将糖化液在酿酒酵母的作用下,以酒精度、感官评分为指标进行肇实发酵酒酿造工艺优化,力求充分利用肇实的营养,并为肇实的开发利用提供新途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

肇实:肇庆市鼎湖区威龙经济发展有限公司;

白砂糖:太古糖业(中国)有限公司;

$\alpha$ -淀粉酶:食品级,2 000 U/g,南宁庞博生物工程有限公司;

糖化酶:食品级,10 万 U/g,南宁庞博生物工程有限公司;

葡萄酒用高活性干酵母:安琪酵母股份有限公司;

碘、浓盐酸:分析纯,广州化学试剂厂。

### 1.2 主要仪器

数显电热恒温干燥箱:DHG-9070B 型,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;

恒温水浴锅:HH-6 型,苏州金坛市荣华仪器制造有限公司;

手提式高压蒸汽灭菌锅:SG46-280S 型,上海三申医疗器械有限公司;

生化培养箱:LRH-150 型,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;

电子分析天平:BS210S 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

多功能粉碎机:XS-10B 型,东莞布隆鑫机电公司;

手持糖量计:WY080ST 型,西安明克斯检测设备有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 工艺流程

肇实→清洗→烘干(90℃,2 h)→粉碎(过 40 目筛)→加水制浆→糊化(煮沸糊化 15 min<sup>[6]</sup>)→冷却→液化→调 pH、

**基金项目:**广东省高等学校优秀青年教师培养计划资助项目(编号:Yq2013164)

**作者简介:**李妍(1978—),女,肇庆学院副教授,博士。

E-mail:abcd2130@163.com

**收稿日期:**2015-07-03

糖化→灭酶→过滤→接种酵母→发酵→成品

1.3.2 肇实制浆料液比的确定 称取 20 g 肇实粉,按照料液比分别为 1:5,1:8,1:10,1:15,1:20(*m:m*)配成肇实浆液。将 5 种肇实浆液分别糊化后通过感官评价其状态,冷却后加入 α-淀粉酶 0.4%,采用自然 pH 于 70 °C 液化 10 min,观察浆液的状态变化,对比后得到适宜的料液比。

1.3.3 肇实粉的液化 糊化冷却后的肇实浆液加入 α-淀粉酶进行液化,采用自然 pH 进行酶解,温度为 70 °C,酶用量为肇实粉的 0.4%,液化期间要不断地搅拌以保证酶和淀粉充分接触,每隔 5 min 取浆液滴于碘板上,记录不同时间内颜色变化,以红棕色为终点<sup>[10]</sup>,确定液化时间。

1.3.4 肇实粉的糖化 将液化后的肇实浆液冷却至 60 °C,加稀盐酸调 pH 至 4.5 左右,分别加入肇实粉质量 0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,1.0%的糖化酶,搅拌均匀,分别保温糖化 0.5,1.0,1.5,2.0,3.0 h。测定各样品糖化液的糖度,确定适宜的糖化条件。

1.3.5 酵母的复水活化 本试验所用酵母为安琪葡萄酒用高活性干酵母,使用前需进行活化,使用 5%的蔗糖溶液,室温(28 °C)复水活化 30 min。

1.3.6 肇实发酵酒发酵条件的确定

(1) 酵母添加量:以成品酒精度和感官评分为指标,首先选择酵母添加量分别为肇实粉的 0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,活化后接种至灭菌肇实糖化液中,于 27 °C 恒温发酵 7 d,对比得到适宜的酵母添加量。

(2) 发酵时间:在酵母添加量为肇实粉的 0.3%的条件下,于 27 °C 恒温分别发酵 1,3,5,7,9 d,对比得到适宜的发酵时间。

(3) 发酵温度:在酵母添加量为肇实粉的 0.3%的条件下,分别于 20,25,27,30,35 °C 进行恒温发酵 7 d,对比得到适宜发酵温度。

(4) 正交试验:在单因素试验基础上,选用各因素的 3 个适宜水平,做三因素三水平的正交试验<sup>[11]</sup>,以成品酒精度和感官评分为指标,优化发酵条件,得出最佳方案。

1.3.7 测定项目及方法

(1) 可溶性固形物:采用手持糖量计测定。

(2) 酒精度:采用酒精计测定。

(3) 感官评价:酒的色泽、澄清度、香味、滋味等指标是衡量酒类品质的重要指标<sup>[12]</sup>。本试验通过对成品进行感官评价,来综合确定发酵的参数和发酵程度,使成品更符合消费者的需求,根据文献[9]、[13]和成品状态制定感官评分标准,见表 1。

表 1 肇实发酵酒感官评分标准

Table 1 Sensory score standard of the health wine

指标状态	分数
色泽浅黄,澄清透明,无沉淀和悬浮物,有肇实味道,酒香浓郁	9~10 分
色泽微黄,澄清透明,光泽略差,有肇实味道,酒香纯正,但不够浓厚	6~8 分
色泽微黄,轻微沉淀和悬浮物,光泽差,肇实味道和酒香较淡,酒味不足	3~5 分
无色,大量沉淀和悬浮物,无光泽,酒香不足,带苦涩味	3 分以下

## 2 结果与讨论

### 2.1 肇实制浆料液比的确定

根据实际操作,太粘稠和太稀的肇实浆液不利于后续的糊化、液化和糖化工序。由表 2 可知,当料液比 1:10(*m:m*)时,其糊化、液化效果较好。因此,选择料液比 1:10(*m:m*)进行后续试验。

表 2 制浆料液比对肇实发酵酒酿造工艺的影响

Table 2 Screening of the ratio of gordon euryale seed to water

料液比( <i>m:m</i> )	现象
1:5	太稠,糊化过程中搅拌难度大,造成糊底、部分发生变色,液化效果不明显
1:8	过稠,糊化过程中有轻微糊底,加入 α-淀粉酶后液化效果明显
1:10	浓度适中,糊化过程中不糊底,可成糊状物质,加入 α-淀粉酶后液化效果明显
1:15	过稀,糊化后不成糊状物质,加入 α-淀粉酶后无明显变化
1:20	太稀,糊化后呈水状物质,加入 α-淀粉酶后无明显变化

### 2.2 液化时间的确定

按照 1.3.3 的方法进行液化试验,得到不同时间的颜色变化见表 3。由表 3 可知,随着液化时间的延长,肇实浆液遇碘呈现的颜色依次从蓝色→紫色→淡紫色→红棕色,最终得到液化时间为 60 min。

表 3 不同液化时间肇实浆液遇碘呈现的颜色

Table 3 The color reaction of gordon euryale seed paste with iodine at different liquefaction time

时间/min	颜色	时间/min	颜色
5	蓝色	35	紫色
10	蓝色	40	紫色
15	蓝色	45	紫红色
20	蓝紫色	50	淡紫色
25	蓝紫色	55	淡紫色
30	蓝紫色	60	红棕色

### 2.3 糖化参数的确定

本试验所选用的糖化酶适合于 pH 为 4.5~5.0,温度为 55~60 °C 的条件。故将液化后的样液 pH 调至 4.5,于 60 °C 水浴中进行糖化。由表 4 可知,糖化后可得到的最大糖度为 10.5%。当糖化酶用量低于 0.5%时,达到最大糖度所需的糖化时间为 2~3 h,当糖化酶用量在 0.5%以上时,所需糖化时间仅为 1 h。对比糖化 0.5 h 的样品糖度,发现在 0.5%的酶用量时,糖度由 5.2%提高至 9.0%,之后变化趋缓,说明进一步增加酶用量也难以提高糖化效果。因此肇实糖化的适宜参数为 60 °C,0.5%糖化酶,糖化时间 1 h。

表 4 糖化时间和糖化酶用量对糖度的影响

Table 4 Effect of saccharifying parameters on the sugar content of the hydrolyzate %

糖化酶用量/%	糖化时间/h				
	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
0.1	3.0	4.5	6.0	7.8	9.4
0.2	4.1	5.4	7.1	8.9	10.3
0.3	4.8	6.5	9.0	10.1	10.5
0.4	5.2	7.9	9.9	10.5	10.5
0.5	9.0	10.5	10.5	10.5	10.5
1.0	10.0	10.5	10.5	10.5	10.5

2.4 肇实发酵酒发酵条件的确定

2.4.1 酵母添加量的确定 由图 1 可知, 当酵母添加量为 0.3% 时, 酒精度最高为 12.7% Vol, 感官评分最高为 9.0。当酵母添加量小于 0.3% 时, 酒精度和感官评分随着酵母添加量的增大而升高; 酵母添加量大于 0.3% 时, 感官评分随着酵母添加量的增大而降低, 酒精度基本不变, 综合考虑感官评分和酒精度, 酵母添加量选择 0.3% 为宜。

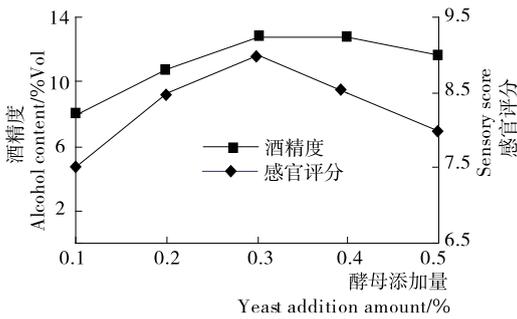


图 1 酵母添加量对发酵酒品质的影响

Figure 1 Effect of yeast addition amount on the wine quality

2.4.2 发酵时间的确定 由图 2 可知, 当发酵时间为 5 d 时, 酒精度和感官评分达到最大值, 发酵前 5 d 酒精度逐渐升高, 感官评分也随之增高, 5 d 后, 酒精度不变, 感官评分降低, 由此可知, 发酵时间选 5 d 为宜。

2.4.3 发酵温度的确定 由图 3 可知, 当发酵温度为 27 °C 时, 酒精度和感官评分最高。

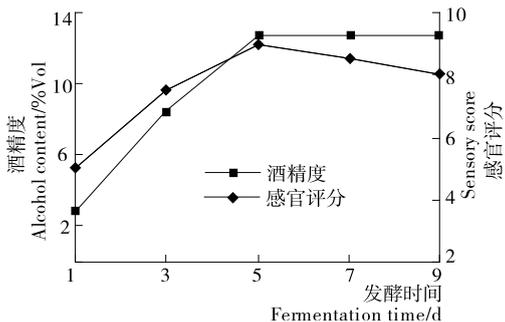


图 2 发酵时间对发酵酒品质的影响

Figure 2 Effect of fermentation time on the wine quality

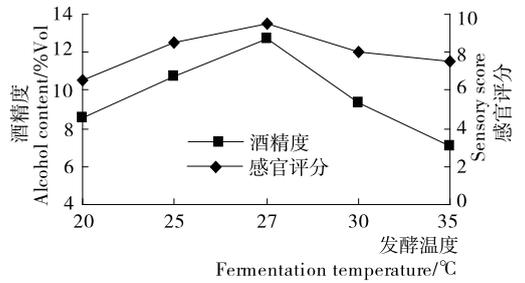


图 3 发酵温度对发酵酒品质的影响

Figure 3 Effect of fermentation temperature on the wine quality

时, 酒精度和感官评分最高。当温度低于 27 °C 时, 酒精度和感官评分都随着温度的升高而升高, 高于 27 °C 时, 酒精度和感官评分都随之降低, 由此可知, 发酵温度应选 27 °C 为宜。

2.4.4 正交试验结果 在单因素试验的基础上, 选择酵母添加量、发酵时间、发酵温度三因素进行正交试验, 采用  $L_9(3^1)$  正交表进行试验设计, 以酒精度和感官评分为指标进行发酵条件的优化。试验因素水平见表 5, 正交试验结果与方差分析见表 6~8。

表 5 正交试验因素水平表

Table 5 The experimental factors and levels

水平	A 酵母添加量/%	B 发酵时间/d	C 发酵温度/°C
1	0.2	3	25
2	0.3	5	27
3	0.4	7	30

表 6 正交试验结果

Table 6 The results of orthogonal experiments

试验号	A	B	C	空列	酒精度/%Vol	感官评分
1	1	1	1	1	8.9	7.8
2	1	2	2	2	12.3	8.5
3	1	3	3	3	10.9	9.1
4	2	1	2	3	10.5	7.3
5	2	2	3	1	12.1	8.4
6	2	3	1	2	11.4	8.1
7	3	1	3	2	9.7	7.5
8	3	2	1	3	10.7	8.6
9	3	3	2	1	11.9	7.9
<hr/>						
酒精度	$k_1$	10.7	9.7	10.3	11.0	
	$k_2$	11.3	11.7	11.6	11.1	
	$k_3$	10.7	11.4	10.9	10.7	
	R	0.6	2.0	1.3	0.4	
感官评分	$k_1$	8.4	7.5	8.2	8.0	
	$k_2$	7.9	8.5	7.9	8.0	
	$k_3$	8.0	8.3	8.3	8.3	
	R	0.5	1.0	0.4	0.3	

表7 以酒精度为指标的方差分析

Table 7 Analysis of variance with alcoholicity as indicator

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F比	显著性
酵母添加量	0.727	2	0.363	2.535	0.283
发酵时间	6.980	2	3.490	24.349	0.039
发酵温度	2.287	2	1.143	7.977	0.111
误差	0.287	2	0.143		

表8 以感官评分为指标的方差分析

Table 8 Analysis of variance with sensory score as indicator

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F比	显著性
酵母添加量	0.507	2	0.253	2.815	0.262
发酵时间	1.647	2	0.823	9.148	0.099
发酵温度	0.287	2	0.143	1.593	0.386
误差	0.180	2	0.090		

由表6可知,以酒精度为指标时,优方案为 $B_2C_2A_2$ ;以感官评分为指标时,优方案为 $B_2A_1C_3$ 。两个方案中, $B_2$ 均是最佳。表7、8方差分析表明,因素B对酒精度有显著性影响( $P < 0.05$ ),对感官评分无显著性影响( $P > 0.05$ ),因此确定 $B_2$ 为B因素最优水平;因素A和C对酒精度和感官评分均无显著性影响( $P > 0.05$ ),从节约成本上考虑,两因素均选择较低水平作为优方案,即确定 $A_1$ 为A因素最优水平, $C_2$ 为C因素最优水平,则最终优方案为 $A_1B_2C_2$ 。即最佳发酵条件为酵母添加量0.2%,发酵时间5d,发酵温度27℃。按此条件进行验证实验制备得到的成品发酵酒酒精度为12.3%Vol,感官评分为8.5。

### 2.5 产品指标

2.5.1 感官指标 肇实发酵酒成品色泽浅黄,澄清透明,无沉淀和悬浮物,具有肇实味道和酒香。

2.5.2 理化指标 酒精度12.3%Vol,糖度1.0%。

2.5.3 微生物指标 细菌总数 $\leq 50$ CFU/mL,大肠菌群 $\leq 3$ MPN/100mL,致病菌不得检出。

## 3 结论

本研究结果表明:最佳肇实制浆料液比为1:10( $m:m$ );最佳液化条件为 $\alpha$ -淀粉酶0.4%,温度70℃,时间60min;最佳糖化条件为糖化酶0.5%,温度60℃,时间1h,该条件下得到的肇实糖化液糖度为10.5%。肇实发酵酒的最佳发酵条件为酵母添加量0.2%,温度27℃,时间5d,该条件下肇实发酵酒酒精度为12.3%Vol。成品色泽浅黄,澄清透明,无沉淀和悬浮物,具有肇实味道和酒香。

本试验将肇实先酶解后发酵研制成发酵酒,测定酒中的糖度、酒精度等,对肇实特产肇实的深加工具有一定的参考价值,但试验中并未对酒中的其他成分进行定量研究,今后

可对此发酵酒中的成分进行更深入研究,也可扩展研究其保健功效。

### 参考文献

- 刘永,罗碧欣,黄志明. 肇实壳提取物与海藻酸钠涂膜保鲜鱼肉的研究[J]. 食品工业, 2013, 34(11): 16~19.
- 张素斌,许瑞兰. 肇实营养成分分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33): 18 780~18 781.
- 张彩山.《本草纲目》中药养生速查全书[M]. 天津:天津科学技术出版社, 2013: 414.
- 朱海燕. 微波消解原子吸收测定肇实中的微量元素[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(11): 1 341~1 342.
- 王晶,张然,王立梅,等. 芡实淀粉理化性质的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(4): 561~565.
- 刘永,植中强,黄志明. 肇实淀粉糊特性的研究[J]. 食品工业, 2006(5): 17~20.
- 李红缨,李菲菲,夏风华. 肇实壳黄酮类物质的提取及对花生油抗氧化性研究[J]. 农业机械, 2012(1): 53~55.
- 张素斌,梁舟. 肇实酸奶发酵工艺的优化[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(17): 3 827~3 829.
- 李湘利,刘静,张春慧,等. 芡实酒发酵条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(9): 84~89.
- 谢主兰,吴雪辉. 板栗深加工中淀粉的酶水解研究[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 62~66.
- 彭海文,周文美. 液态发酵法酿造荞麦酒发酵工艺研究[J]. 酿酒科技, 2012(8): 97~100.
- 蔡敏,郑惠. 枸杞酒的加工工艺及感官评定[J]. 农产品加工(学刊), 2011(7): 92~94.
- 郭克娜,阚健全,王颖,等. 响应面法优化薏米酒发酵工艺条件[J]. 食品科学, 2013, 34(21): 269~273.

(上接第94页)

- Martin G J, Koziat J, Rossmann A, et al. Site-specific natural isotope fractionation in fruit juices determined by deuterium NMR: An European inter-laboratory comparison study[J]. Analytica Chimica Acta, 1996, 321(2~3): 371~467
- Koziat J, Rossmann A, Martin G J, et al. Determination of the oxygen-18 and deuterium content of fruit and vegetable juice water [J]. An European Inter-laboratory Comparison Study, 1995, 302(94): 29~37.
- Guilloua C, Koziat J, Rossmann A, et al. Determination of the 13 C contents of organic acids and sugars in fruit juice: an inter-comparison study[J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 388: 137~143.
- 张晓敏,朱丽敏,张捷,等. 采用电子鼻评价肉制品中的香精质量[J]. 农业工程学报, 2008, 24(9): 175~178.
- 陈晓明,马明辉,李景明,等. 电子鼻在天然苹果香精检测中的应用[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 261~265.