

富黄酮洋葱酒发酵工艺研究

Researches on fermentation conditions of flavonoid-rich wine of onions

孙彩霞 王成荣 吴昊 杨绍兰

SUN Cai-xia WANG Cheng-rong WU Hao YANG Shao-lan

(青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109)

(College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

摘要:以新鲜紫皮洋葱为原料,采用超声复合酶法提取洋葱中黄酮类物质,制备富黄酮提取液,并以其为发酵液进行富黄酮洋葱酒发酵。在单因素试验基础上,采用 Plackett-Burman 试验方法,优选对富黄酮洋葱酒黄酮增长率及酒精度影响显著的因素,进一步采用双值响应面法优化其发酵工艺。结果表明:每 100 mL 富黄酮发酵液中添加 2.5 g 洋葱粉,调 pH 4.0,糖度 19 °Brix,发酵时间 7 d,装液量 80%,接种量 0.1%,该条件下黄酮增长率为 48.76%,富黄酮洋葱酒中黄酮含量可达 (1.24 ± 0.06) g/kg,酒精度为 11.1% (V/V)。所得富黄酮洋葱酒色泽微黄、清澈透明、口感醇正。

关键词:洋葱;酒;黄酮;发酵

Abstract: Fresh purple onions were used as material, ultrasound-assisted complex enzymatic method was used to extract total flavonoids from it. Then, the crude extracts were used as fermentation materials to ferment for flavonoid-rich onion wine. The growth rate of flavonoids and alcoholic content were used as indicators to evaluate the quality of onion wine. This experiment explored the impact of following factors on quality of onion wine, which includes the amount of onion powder, fermentation time, sugar content, fluid loading volume, pH of broth, inoculum volume, etc. Plackett-Burman design was used to choose the important factors of influencing onion wine fermentation. Response surface methodology (RSM) was employed to maximize the growth rate of flavonoids (Y_1) and alcoholic content (Y_2) on a central composite design in involving 3 factors (fermentation time, sugar content, fluid loading volume) at 3 levels. The optimal technological conditions could be concluded as follows: sugar was 19 °Brix, fermentation time was 7 d, loaded liquid was 80%. Eventually, the optimum fermentation conditions was: adding 5 g onion powder in flavonoid-rich broth, adjusted pH to 4.0, sugar was 19 °Brix, the solution volume with onion powder was 20 mL, fer-

mentation time was 7 d, loaded liquid was 80%. In the validation test of the response surface method, the growth rate of flavonoids reached to 48.76%, flavonoids content achieved to (1.24 ± 0.06) g/100 mL in onion wine. The alcoholic content can be achieved at 11.1% (V/V), which can meet the requirements of the plant liqueur.

Keywords: onions; wine; flavonoids; fermentation

洋葱 (*Allium cepa* L.) 属百合科葱属两年生草本植物,是世界上消费量最大的蔬菜之一^[1]。洋葱中含有丰富的黄酮类化合物及花青素^[2],具有抗炎、抗氧化、降血压、降血脂、抑制肿瘤等生理作用^[1,3]。洋葱不仅作为一种调味品,更是膳食中营养和功能成分的重要来源^[4]。目前为止,洋葱的消费方式主要为烹饪、生食、脱水制品等初级产品,已有深加工产品主要有洋葱黄酮、洋葱多糖、洋葱粉、洋葱酱和洋葱酒等^[5-7],其中洋葱酒的制作均采用新鲜洋葱浆或汁直接发酵的传统工艺^[8-9],残存于浆渣或汁渣中的黄酮被废弃,致使原料中的有效功能成分黄酮不能被充分利用。

本研究拟以超声复合酶法提取洋葱中黄酮类物质,以此为发酵液制备洋葱酒,通过探究不同条件对发酵过程中黄酮增长率和酒精度的影响,优选影响显著的因素并进行优化,最终确定其最佳工艺,旨在增加洋葱酒中功能成分黄酮的含量,为洋葱酒的产业化提供创新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 试验材料

洋葱:市售新鲜紫皮洋葱。选取无损伤、无病虫害、无异味、成熟度适中的样品。

1.1.2 试剂

纤维素酶:4 万 U/g,沂源康源生物科技有限公司;

果胶酶:10 万 U/g,河南双丰食品有限公司;

木瓜蛋白酶:10 万 U/g,南宁东恒华道生物科技有限责任公司;

基金项目:山东省现代农业技术体系(编号:SDAIT-02-022-12)

作者简介:孙彩霞,女,青岛农业大学在读硕士研究生。

通讯作者:王成荣(1958-),男,青岛农业大学教授,硕士。

E-mail: qauwcr@126.com

收稿日期:2015-09-25

芦丁标准品:99%,中国药品生物制品检定所;
葡萄酒高活性干酵母:安琪酵母股份有限公司;
其余均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

紫外—可见分光光度计:754型,上海光谱仪器有限公司;
打浆机:ZA-70B型,天津市达康电器有限公司;
原汁机:HU-100型,HUROM LS. CO. LTD;
电子分析天平:AR2140型,奥豪斯国际商贸(上海)有限公司;
电热恒温水浴锅:DK-S82型,上海精宏实验设备有限公司;
多用途恒温超声提取仪:SY-1000E型,北京弘祥隆生物技术开发有限公司;
阿贝折光仪:WAY-2S型,上海精密科学仪器有限公司;
生化培养箱:SPX250B-Z型,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;
立式高压灭菌锅:SANYO型,日本三洋电器集团;
电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9016A型,太仓精宏仪器设备有限公司;
气引式粉碎机:FDV型,北京兴时利和科技发展有限公司。

1.3 黄酮含量的测定

(1) 标准曲线的绘制:精确配置0.1 mg/mL的芦丁标准液,分别取不同体积的该标准溶液于10 mL容量瓶中,分别加亚硝酸钠、硝酸铝和氢氧化钠溶液,放置15 min,于510 nm条件下测定吸光度。以芦丁浓度 c (mg/mL)为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线,进行回归分析。得标准曲线回归方程为: $A = 1.2226c + 0.0079, R^2 = 0.9989$ 。

(2) 黄酮含量的测定:采用亚硝酸钠—硝酸铝比色法^[10]。洋葱中黄酮含量按式(1)计算:

$$Y = \frac{c \times v}{m} \quad (1)$$

式中:

Y ——黄酮含量,mg/g;

c ——由标准曲线所得黄酮的浓度,mg/mL;

v ——黄酮提取液总体积,mL;

m ——提取所用洋葱的质量,g。

1.4 工艺流程

1.4.1 富黄酮提取液制备

洋葱→清洗→切分→打浆→酶解、超声(添加纤维素酶1.0%(m/m)+果胶酶0.2%(m/m)+木瓜蛋白酶0.2%(m/m),在550 W、53℃、水料比9:1(V:m)条件下超声处理30 min)→富黄酮提取液

1.4.2 富黄酮洋葱酒发酵工艺流程

活性干酵母→活化



富黄酮提取液→成分调整→杀菌→接种→发酵→离心→富黄酮洋葱酒

1.5 黄酮增长率的计算

总黄酮增长率按式(2)计算:

$$R = \frac{M_2 - M_1}{M_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R ——总黄酮增长率,%;

M_1 ——发酵前发酵液中黄酮含量,mg/g;

M_2 ——发酵得富黄酮洋葱酒中黄酮含量,mg/g。

1.6 酒精度的测定

采用酒精计法^[11]。

1.7 洋葱酒发酵单因素试验

1.7.1 发酵时间对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响 发酵过程中,发酵液装液量80%,添加2.50 g洋葱粉,调节糖度19°Brix,pH 4.0,接种1.0%的酵母,探究发酵时间(3,4,5,6,7 d)对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响。

1.7.2 洋葱粉添加量对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响 发酵过程中,发酵液装液量80%,调节糖度19°Brix,pH 4.0,接种1.0%的酵母,发酵6 d,探究洋葱粉添加量(1.25,2.50,3.75,5.00,6.25 g)对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响。

1.7.3 糖度对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响 发酵过程中,发酵液装液量80%,添加2.50 g洋葱粉,pH 4.0,接种1.0%的酵母,发酵6 d,探究糖度(13,15,17,19,21°Brix)对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响。

1.7.4 接种量对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响 发酵过程中,发酵液装液量80%,添加2.50 g洋葱粉,调节糖度19°Brix,pH 4.0,发酵6 d,探究接种量(0.06%,0.08%,0.10%,0.12%,0.14%)对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响。

1.7.5 pH值对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响 发酵过程中,发酵液装液量80%,添加2.50 g洋葱粉,调节糖度19°Brix,接种1.0%的酵母,发酵6 d,探究pH(3.0,3.5,4.0,4.5,5.0)对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响。

1.7.6 装液量对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响 发酵过程中,添加2.50 g洋葱粉,调节糖度19°Brix,pH 4.0,接种1.0%的酵母,发酵6 d,探究装液量(60%,70%,80%,90%,100%)对洋葱酒黄酮增长率及酒精度的影响。

1.8 PB设计

采用Plackett-Burman方法,根据单因素试验结果,采用软件Minitab16.0设计6因素2水平12次试验,对各单因素进行筛选,确定对洋葱酒发酵过程中黄酮增长率及酒精度影响显著的因素,进行后续优化。

1.9 响应面优化

对PB试验优选的因素用Design-Expert软件进行BBD试验设计进行优化试验。

1.10 数据分析

采用SPSS17.0进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

通过单因素试验,得最适发酵时间为 5~7 d,洋葱粉的添加量为 2.5~5.0 g/100 mL,最适糖度为 17~21 °Brix,接种量为 0.08%~0.12%,最适发酵 pH 为 3.5~4.5,最佳装液量为 70%~90%。

2.2 PB 试验结果与分析

在单因素试验基础上,采用 Minitab16 软件进行 Plackett-Burman 试验因素水平设计(表 1),所得结果见表 2,回归分析见表 3。由表 3 可知,对洋葱酒发酵过程中黄酮增长率影响显著的因素为洋葱粉添加量、糖度、发酵时间、装液量,对酒精度影响较大的因素为糖度,因此应选取以上 4 个因素进行后续优化试验。但由于洋葱粉制备过程中能耗大,经济成本较高,在保证富黄酮洋葱酒品质的基础上,尽可能减少粉的添加量以减少生产成本。试验过程中发现,当洋葱粉添加量为 2.5 g/100 mL 富黄酮发酵液时,洋葱酒中黄酮含量较高,且此时酒的风味和色泽较其他条件优。因此此项不再优化,仅选取糖度、发酵时间、装液量 3 个因素进行后续优化试验。

2.3 响应面试验设计及结果

2.3.1 BBD 试验设计及结果 根据上述优化结果,每 100 mL

表 1 Plackett-Burman 试验设计的因素及水平

Table 1 Factors and levels in Plackett-Burman design

编码水平	A 洋葱粉添加量/ (10 ⁻² g·mL ⁻¹)	B 发酵时 间/d	C pH	D 糖度/ °Brix	E 接种 量/%	F 装液 量/%
-1	2.5	5	3.5	17	0.08	70
1	5.0	7	4.5	21	0.12	90

表 2 Plackett-Burman 试验设计结果

Table 2 Results of Plackett-Burman design on growth rate of flavonoids and alcoholic content in flavonoid-rich wine of onion

序号	A	B	C	D	E	F	黄酮增长 率/%	酒精度/ %(V/V)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	29.43	10.20
2	1	1	-1	1	-1	-1	41.02	12.10
3	-1	-1	1	1	1	-1	36.70	12.50
4	-1	1	-1	-1	-1	1	24.81	10.20
5	-1	1	1	1	-1	1	28.62	11.88
6	-1	1	1	-1	1	-1	24.65	10.50
7	1	1	-1	1	1	-1	41.10	12.00
8	1	-1	-1	-1	1	1	37.32	10.10
9	1	-1	1	1	-1	1	42.92	12.70
10	1	1	1	-1	1	1	34.91	10.30
11	1	-1	1	-1	-1	-1	40.03	10.40
12	-1	-1	-1	1	1	1	32.96	12.00

富黄酮发酵液中添加 2.5 g 洋葱粉,调整发酵液 pH 为 4.0,接种 0.10% 的酵母,根据 BBD 方案试验进行发酵。采用 Design-Expert 8.0.5 软件进行分析,以糖度、发酵时间、装液量为自变量(表 4),以洋葱酒中黄酮增长率及酒精度为因变量,进行双值响应面分析,结果见表 5。对所得结果进行拟合,分

表 3 Plackett-Burman 试验的因素效应值

Table 3 Plackett-Burman experimental factor level and effect value of growth rate of alcoholic content

变量	黄酮增长率/%		酒精度/%(V/V)	
	F 值	P 值	F 值	P 值
A	229.84	0.000	0.14	0.723
B	37.38	0.002	1.16	0.330
C	0.09	0.779	3.88	0.106
D	65.81	0.000	181.03	0.000
E	0.04	0.847	0.01	0.929
F	8.23	0.035	0.37	0.569

表 4 3³ BBD 设计因素及水平

Table 4 Factors and levels in Box-Behnken design

编码水平	X ₁ 糖度/°Brix	X ₂ 发酵时间/d	X ₃ 装液量/%
-1	17	5	70
0	19	6	80
1	21	7	90

表 5 3³ BBD 设计方案及响应值

Table 5 3³ Box-Behnken design and experimental data for the responses

序号	X ₁	X ₂	X ₃	黄酮增长率/%	酒精度/%(V/V)
1	0	-1	-1	41.50	10.4
2	1	0	1	48.05	10.6
3	1	1	0	47.56	10.9
4	0	1	1	47.15	10.4
5	0	0	0	48.46	11.1
6	-1	-1	0	41.47	9.0
7	0	1	-1	47.07	11.0
8	0	0	0	48.19	11.2
9	0	0	0	48.34	11.2
10	-1	1	0	46.50	9.9
11	0	0	0	48.16	11.2
12	-1	0	-1	41.51	9.7
13	-1	0	1	43.36	9.1
14	0	-1	1	46.85	10.2
15	-1	0	-1	43.96	10.7
16	0	0	0	48.06	11.2
17	-1	-1	0	46.05	10.6

别得黄酮增长率(Y_1)、酒精度(Y_2)与糖度、发酵时间、装液量的二次多项回归方程为:

$$Y_1 = 48.24 + 1.6X_1 + 1.55X_2 + 1.42X_3 - 0.88X_1X_2 + 0.56X_1X_3 - 1.32X_2X_3 - 2.14X_1^2 - 0.71X_2^2 - 1.89X_3^2 \quad (3)$$

$$Y_2 = 11.18 + 0.64X_1 + 0.25X_2 - 0.19X_3 - 0.15X_1X_2 + 0.13X_1X_3 - 0.1X_2X_3 - 0.78X_1^2 - 0.3X_2^2 - 0.38X_3^2 \quad (4)$$

对所得试验数据进行方差分析,得黄酮增长率及酒精度

拟合模型的 R^2 分别为 0.995 6 和 0.996 2,表明所建模型与实际拟合良好。由表 6 可知,各试验因素对响应值均有显著或极显著影响,且失拟项差异不显著,方程拟合良好。根据 F 值大小,可推断在试验范围内各因素对响应值影响程度。表 6 表明,对黄酮增长率和酒精度影响大小顺序均为:糖度>发酵时间>装液量。该结果进一步证明,黄酮增长率与发酵液中酒精含量联系密切。

表 6 BBD 试验中黄酮增长率及酒精度二次回归方差分析结果[†]

Table 6 Analysis of variance for quadric regression model on growth rate of flavonoids and alcoholic content in of Box-Behnken design

差异源	自由度	黄酮增长率/%			酒精度/(V/V)		
		平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值
模型	9	106.90	176.55	< 0.000 1	8.08	206.02	< 0.000 1
A	1	20.39	303.10	< 0.000 1	3.25	746.19	< 0.000 1
B	1	19.24	285.93	< 0.000 1	0.50	114.75	< 0.000 1
C	1	16.21	240.93	< 0.000 1	0.28	64.55	< 0.000 1
AB	1	3.11	46.18	0.000 3	0.09	20.66	0.002 7
AC	1	1.25	18.56	0.003 5	0.063	14.34	0.006 8
BC	1	6.93	102.98	< 0.000 1	0.040	9.18	0.019 1
A ²	1	19.20	285.45	< 0.000 1	2.55	584.16	< 0.000 1
B ²	1	2.14	31.76	0.000 8	0.39	88.43	< 0.000 1
C ²	1	14.98	222.71	< 0.000 1	0.60	137.71	< 0.000 1
残差	7	0.47			0.031		
失拟项	3	0.37	5.09	0.074 9	0.023	3.75	0.117 1
净误差	4	0.098			8.00E-03		
校正项	16	107.37			8.11		

† P<0.000 1 差异性极显著;0.000 1<P<0.05 差异性显著;P>0.05 差异性不显著。

2.3.2 交互项对黄酮增长率影响的响应面 在 3 个因素中,任意固定某一因素,其余两因素的交互作用可通过三维响应面图直观表现,从而确定最佳工艺范围,图 1 为洋葱酒发酵过程中黄酮增长率及酒精度拟合模型的三维响应图。由图 1 可知,在所选范围内,等高线较为密集,并存在极值,说明所选因素交互作用对两响应值影响较大^[12-13],且随着各因素变化,响应值呈现先上升后下降趋势。

由图 1 可知,当糖度为 18.53~21.12 °Brix,装液量为 77.64%~90.00%时,黄酮增长率可达 48%以上;发酵时间为 5.67~7.00 d,糖度为 17.75~20.90 °Brix,黄酮增长率大于等于 48%;所选发酵时间为 5.63~7.00 d,装液量为 71.06%~88.61%,黄酮增长率高于 48%。综上所述,所选糖度为 18.53~20.90 °Brix,发酵时间为 5.67~7.00 d,装液量为 77.64%~88.61%,存在洋葱酒发酵过程中黄酮增长率最大值。同理,当糖度为 18.53~21.00 °Brix,发酵时间为 5.52~7.00 d,装液量为 70.00%~85.25%,所得发酵洋葱酒酒精度≥11%(V/V),可得最大值。

2.3.3 最优条件及验证 分析得富黄酮洋葱酒发酵最优条件为:糖度 19 °Brix,发酵时间 7 d,装液量 81%,此条件下黄

酮增长率为 49.15%,酒精度为 11.2%(V/V)。根据实际条件对各参数稍加调整进行验证试验,调整为糖度 19 °Brix,发酵时间 7 d,装液量 80%,在此条件下,所得洋葱酒中,黄酮增长率为 48.76%,酒精度为 11.1%(V/V),相对误差在 1%以内,实际值与预测值拟合良好,模型具有实用参考价值。

3 结论

本研究探讨了糖度、发酵时间、装液量、接种量、pH、洋葱粉添加量 6 个因素对富黄酮洋葱酒发酵过程中黄酮增长率及酒精度的影响,采用 PB 试验法优选出影响显著的因素为洋葱粉添加量、糖度、发酵时间、装液量,综合产品酒品质并考虑经济成本,最终选取糖度、发酵时间、装液量等进行富黄酮洋葱酒发酵最佳优化工艺。

响应面法优化富黄酮洋葱酒发酵最佳工艺条件为:每 100 mL 富黄酮发酵液中添加 2.5 g 洋葱粉,调 pH 4.0、糖度 19 °Brix、发酵时间 7 d、装液量 80%、酵母接种量 0.1%,最终富黄酮洋葱酒酒精度为 11.1%(V/V),黄酮增长率为 48.76%,成品酒中黄酮含量为(1.24±0.06) g/kg。所得洋葱酒产品中黄酮含量较高,色泽微黄、清澈透明、口感醇正。

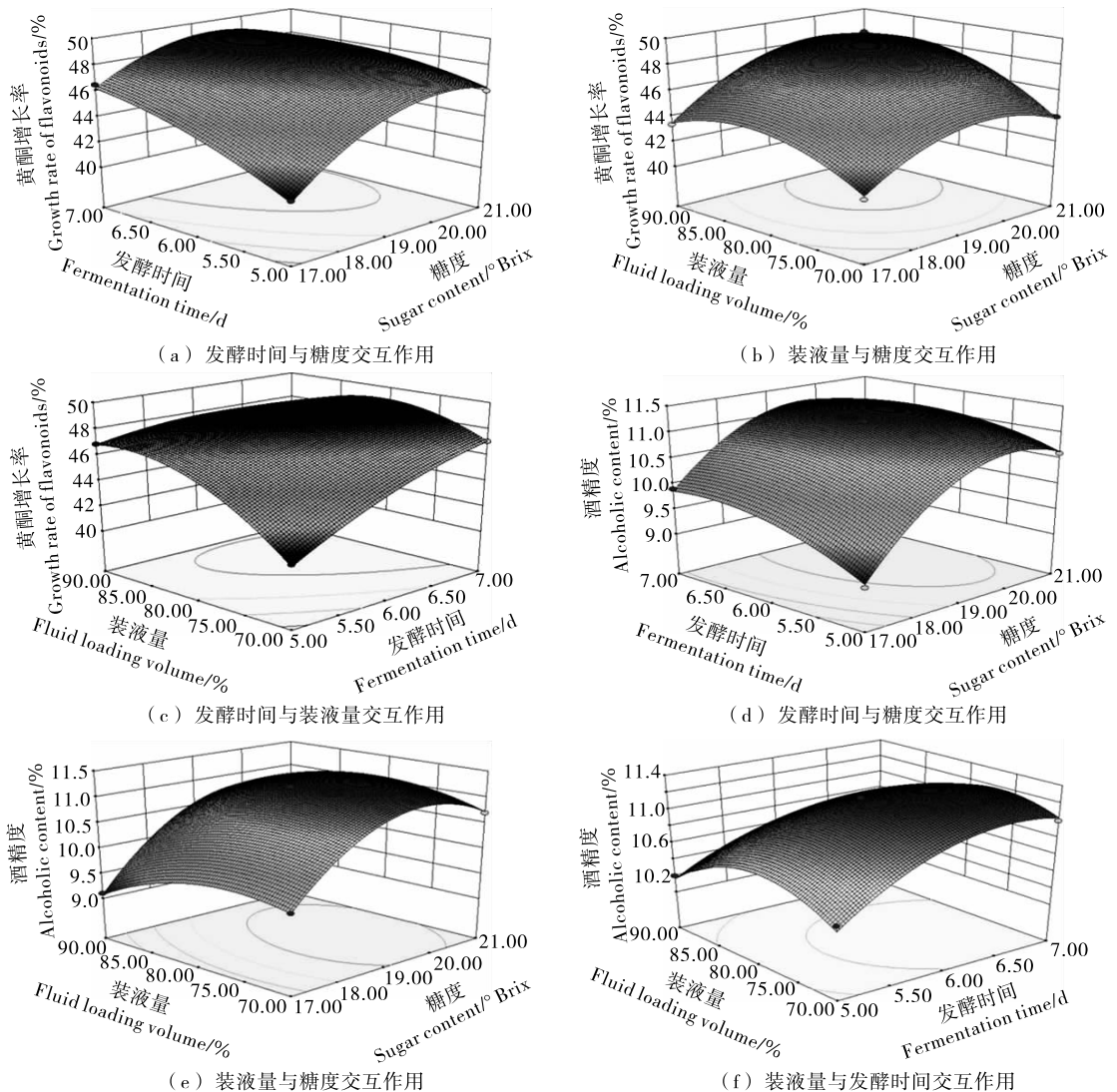


图 1 交互作用对富黄酮洋葱酒中黄酮增长率及酒精度的影响

Figure 1 Response surface graph showing the interaction effects on growth rate of flavonoids and alcoholic content in flavonoid-rich wine of onion

参考文献

- [1] Griffiths G, Trueman L, Crowther T, et al. Onions—a global benefit to health[J]. *Phytotherapy Research*, 2002, 16(7): 603-615.
- [2] Pérez-Gregorio M R, Regueiro J, González-Barreiro C, et al. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage[J]. *Food Control*, 2011, 22(7): 1108-1113.
- [3] Xue You-lin, Ahiko T, Miyakawa T, et al. Isolation and Caenorhabditis elegans lifespan assay of flavonoids from onion[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(11): 5927-5934.
- [4] Lu Xiao-nan, Ross C F, Powers J R, et al. Determination of quercetins in onion (*Allium cepa*) using infrared spectroscopy[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(12): 6376-6382.
- [5] 王文亮, 王世清, 李晓玲, 等. 洋葱的活性成分药理功效及产品开发综述[J]. *中国食物与营养*, 2013, 19(11): 37-39.
- [6] 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.
- [7] Horiuchi J I, Yamauchi N, Osugi M, et al. Onion alcohol production by repeated batch process using a flocculating yeast[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 75(2): 153-156.
- [8] 江洁, 江成英, 蒋继丰, 等. 洋葱汁的酶法制备及其酒精发酵特性研究[J]. *食品研究与开发*, 2007(6): 34-37.
- [9] 李升升. 基于微波处理的洋葱酒, 醋加工技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011: 4-5.
- [10] 张仁堂, 秦静, 孙欣, 等. 洋葱皮中黄酮类物质的提取及分离纯化研究[J]. *中国食物与营养*, 2012, 18(8): 50-54.
- [11] 中国轻工业联合会. GB/T 15038—2006 葡萄酒 果酒通用分析方法[S]. 北京: 中华人民共和国质量检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2008.
- [12] 朱俊向, 吴昊, 杨绍兰, 等. 超声辅助提取冻干番茄粉番茄红素的工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2013, 29(18): 284-291.
- [13] 赖红芳, 黄秀香, 陆俊宇. 超声波辅助提取山豆根中的黄酮和多糖工艺优化[J]. *食品与机械*, 2014, 30(1): 196-198.