

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2021.05.026

董彩文, 王明雷, 白少怡, 等. 蜂蜜酒发酵工艺条件的优化研究[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(5): 191-196.

DONG C W, WANG M L, BAI S Y, et al. Research on the optimization of mead fermentation technology[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(5): 191-196.

蜂蜜酒发酵工艺条件的优化研究

董彩文^{1,2}, 王明雷¹, 白少怡¹, 胡晓龙^{1,2}, 王悦¹, 黄天琪¹

(1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 河南省食品生产与安全协同创新中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 以蜂蜜、麦曲、酵母为原材料, 以酒精度为指标, 通过单因素实验分别考察了发酵温度、发酵时间、磷酸氢二铵添加量和发酵液糖度对酵母发酵蜂蜜过程中酒精度的影响。根据响应面优化结果进行验证实验, 最终的优化条件如下: 当麦曲添加量 4.0%, 酵母添加量 0.2%, 磷酸氢二铵添加量 600 mg/L, 发酵液糖度为 32.0%, pH 值为 4.5, 发酵温度为 32.0 °C, 培养时间为 6 d 时, 能得到酒精度的最高值 13.6%。

关键词: 蜂蜜; 麦曲; 酵母; 发酵; 响应面分析

中图分类号: TS 261.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2021)05-0191-06

Research on the Optimization of Mead Fermentation Technology

DONG Cai-wen^{1,2}, WANG Ming-lei¹, BAI Shao-yi¹, HU Xiao-long^{1,2}, WANG Yue¹, HUANG Tian-qi¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou, Henan 450002, China; 2. Henan Provincial Collaborative Innovation Center of Food Production and Safety, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: In this research, honey, wheat koji, and yeast are taken as raw materials and alcohol content is taken as the indicator to study the effects of fermentation temperature, fermentation time, the addition of ammonium dihydrogen-phosphate, and sugar content of fermentation broth through single-factor experiments. These factors are inspected on the alcohol production during honey fermentation. According to the response surface optimization results, verification experiment showed the optimal condition for alcohol content is follows: the fermentation broth have sugar content of 32.0% and is set to the pH of 4.5. 4.0% wheat koji is added with 0.2% yeast. Diammonium phosphate is added in 600.0 mg/L and the temperature is 32.0 °C with the culture time of 6 days. Under such a condition, the alcohol content is 13.6%.

Key words: honey; wheat koji; yeast; fermentation; response surface analysis

蜂蜜是工蜂采集开花植物的花蜜或蜜露以及

自身的分泌物, 在蜂巢中经过充分酿造加工得到的纯天然物质^[1]。蜂蜜酒拥有长久的酿造历史, 既保留了天然蜂蜜的营养成分, 同时使重要活性物质如氨基酸、维生素和矿物质的含量增加, 因此具有良好的营养功能^[2-4]。

麦曲广泛用于黄酒的酿造过程, 并对黄酒的酿造和风味起着重要的作用^[5-10]。在蜂蜜酒的酿

收稿日期: 2021-03-11

基金项目: 河南省重大项目子课题 (181100211400); 郑州轻工业大学校企合作项目 (24100000270)

Supported by: Subproject of Major Projects of Henan Province (No. 181100211400); Zhengzhou Light Industry University School-Enterprise Cooperation Project (No. 24100000270)

作者简介: 董彩文, 男, 1970 年出生, 教授, 研究方向为食品生物技术。Email: biodcw@126.com.

造过程中,大部分情况下用酵母进行发酵^[11-14],很少使用酒曲,导致蜂蜜酒的风味不足。在蜂蜜酒的发酵过程中使用酒曲和酵母,可以增加蜂蜜酒的风味^[15-16]。本实验把麦曲和酵母一起用于蜂蜜酒的发酵,经过单因素考察了不同因素对酒精生成的影响,然后经过响应面分析得到酒精最高生成值,并进行验证试验,进而达到优化发酵工艺的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

枣花蜜:河南省长葛市;麦曲:苏-16,江苏省地方特产专营店;酵母:高活性干酵母,安琪酵母股份有限公司;磷酸氢二铵(食品级):江苏科伦多食品配料有限公司。

1.2 仪器与设备

FE20 特勒-托利多实验室 pH 计:梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;HH-S₂ 数显恒温水浴锅:江苏省金坛市医疗机械厂;SW-CJ-1D 型单人净化工作台:苏州净化设备有限公司;TG16-WS 台式高速离心机:湘仪离心机仪器有限公司;LX-C35L 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器:合肥华泰医疗设备有限公司;电热恒温培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;UV9100 全自动紫外可见分光光度计:美国 Lab Tech 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酒精度的测量

参照标准方法^[17],发酵结束后离心,取上清进行酒精度的测定,并换算成 20 °C 时的酒精度。

1.3.2 发酵温度对酒精度的影响

取适量蜂蜜和蒸馏水配制糖度为 16.0% 的蜂蜜液,80.0 °C 水浴 20 min,冷却。在超净工作台将蜂蜜液依次倒入十个锥形瓶中,每瓶 250 mL。然后依次加入麦曲 10.0 g,酵母 0.5 g,摇匀。分别在 24.0、26.0、28.0、30.0、32.0 °C 条件下培养 3 d。按照 1.3.1 的方法进行酒精度的测定。

1.3.3 发酵时间对酒精度的影响

取适量蜂蜜和蒸馏水配制糖度为 22.0% 的蜂蜜液,80.0 °C 水浴 20 min,取出冷却。在超净工作台将蜂蜜液依次倒入 10 个锥形瓶中,每瓶

250 mL。然后依次加入麦曲 10.0 g,酵母 0.5 g,30.0 °C 培养箱中培养。培养时间分别为 3、4、5、6、7 d。按照 1.2.1 的方法进行酒精度的测定。

1.3.4 磷酸氢二铵添加量对酒精度的影响

取适量蜂蜜和蒸馏水配制糖度为 22.0% 的蜂蜜液,80.0 °C 水浴 20 min,冷却。在超净工作台将蜂蜜液依次倒入 10 个锥形瓶中,每瓶 250 mL。然后依次分别加入磷酸氢二铵 300、600、900、1 200、1 500 mg/L,麦曲 10.0 g,酵母 0.5 g,30.0 °C 培养箱中培养 5 d。按照 1.2.1 的方法进行酒精度的测定。

1.3.5 发酵液糖度对酒精度的影响

取适量蜂蜜和蒸馏水配制糖度为 16.0%、20.0%、24.0%、28.0%、32.0% 的蜂蜜液,80.0 °C 水浴 20 min,取出冷却。在超净工作台将蜂蜜液依次倒入 10 个锥形瓶中,每瓶 250 mL。然后依次加入磷酸氢二铵 225 mg,麦曲 10.0 g,酵母 0.5 g,30.0 °C 培养箱中培养 5 d。按照 1.3.1 的方法进行酒精度的测定。

1.3.6 响应面优化

在分别确定了单因素对蜂蜜发酵过程中酒精度生成的影响后,根据响应面试验设计原理,选取三个对酒精度生成影响较大的因素,然后在每个因素方向选取三个数值进行响应面分析试验,如下表。

表 1 实验因素及水平
Table 1 Experimental factors and levels

编码	因素	水平		
		-1	0	1
A	糖度/%	28.0	30.0	32.0
B	温度/°C	30.0	32.0	34.0
C	时间/d	4	5	6

1.4 数据分析

单因素实验结果用 Microsoft Office Excel 2016 对其进行分析,利用 Design Expert 10 软件对工艺参数的组合进行优化,利用响应面分析法(RSM)得到回归模型和工艺参数。试验数据均采用平行试验的平均值,并利用 SPSS 软件对数据进行组间方差分析,在 95% 的置信区间内各组之间是否显著,用相同字母表示不显著,用不同字母表示显著。

2 结果与分析

2.1 发酵温度对酒精生成的影响结果

温度是发酵过程中酵母参与反应的重要因素之一, 发酵温度对酵母发酵过程中产生的酒精有一定影响^[14]。由图 1 看出, 当温度从 24 °C 上升到 26 °C 时, 酒精度随温度的升高而明显上升, 并达到最大值, 随后出现波动。方差分析结果表明, 24 °C 和 26 °C 两个实验组在 95% 水平下差异显著, 26、28、30、32 °C 四个试验组在 95% 水平下无显著性差异。所以初步选定发酵温度为 30 °C。

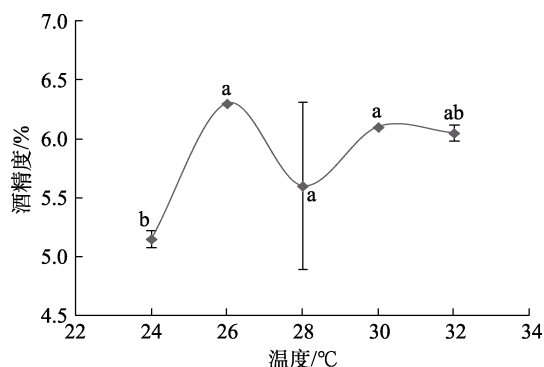


图 1 发酵温度对酒精度的影响

Fig.1 Effect of fermentation temperature on alcohol content

2.2 发酵时间对酒精生成的影响结果

发酵时间对酵母发酵过程中产生的酒精也有一定影响^[18], 前发酵期发酵作用不强, 主发酵期主要进行酒精发酵作用, 糖分迅速下降, 酒精逐渐增多。后发酵期由于大部分糖分被消耗, 产生酒精较少。

图 2 表明, 在发酵时间从 4~5 d 时, 酒精度上升明显, 之后随发酵时间延长变化不大。方差分析结果显示, 发酵时间 3、4 d 两个实验组和发酵时间 5、6、7 d 三个实验组在 95% 水平下差异

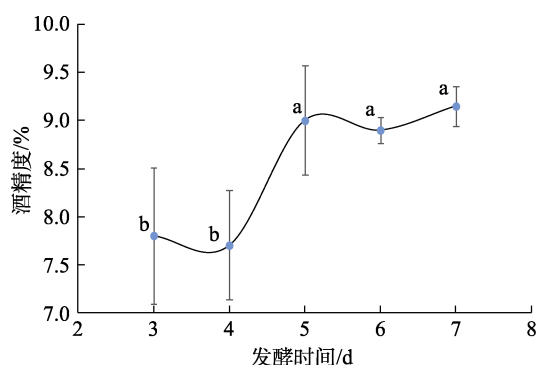


图 2 发酵时间对酒精度的影响

Fig.2 Effect of fermentation time on alcohol content

显著。发酵时间初步选为 5 d。

2.3 磷酸氢二铵添加量对酒精生成的影响结果

发酵液中氮源过多会造成酵母菌生长过快, 反而不利于产物的积累。氮源不足又会使菌体生长缓慢, 在稳定期引起菌体自溶。因此合理控制氮源的添加量能促进菌体稳定生长以及产物的积累^[19]。

图 3 表明, 磷酸氢二铵浓度的变化对酒精度影响不明显。方差分析结果显示, 五个实验组无显著性差异。说明在这个范围内磷酸氢二铵的浓度对蜂蜜发酵液酒精度影响不大。所以磷酸氢二铵浓度初步选为 900 mg/L。

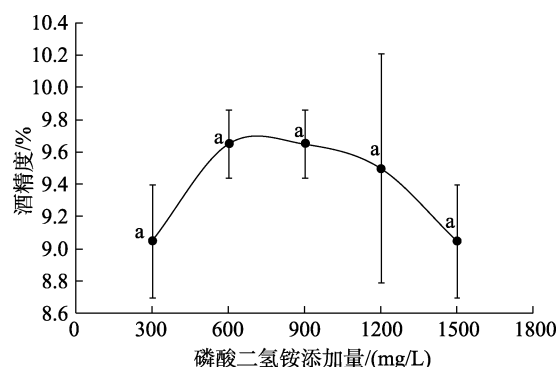


图 3 磷酸氢二铵添加量对酒精度的影响

Fig.3 Effect of diammonium phosphate on alcohol content

2.4 发酵液糖度对酒精生成的影响的结果

当发酵液中糖度过高时, 不仅会抑制乙醇产生途径中乙醇脱氢酶的活性而影响发酵, 而且也不利于酒精产物的积累, 同时会造成高渗透压环境而抑制酵母的生长。发酵液糖度过低又会减缓酵母生长, 并且糖分几乎全为酵母生长所用, 导致发酵不能正常进行^[20]。

图 4 表明, 酒精度随着发酵液糖度升高而上升, 当发酵液糖度从 20.0%~28.0% 时, 酒精度上

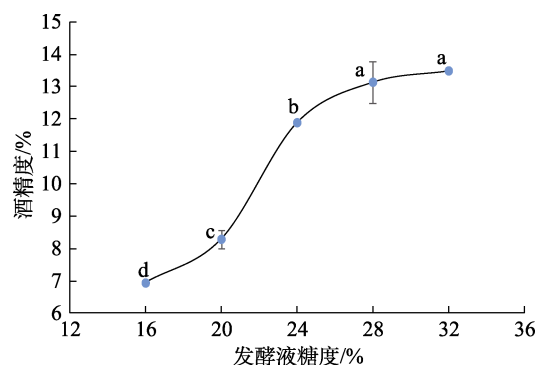


图 4 发酵液糖度对酒精度的影响

Fig.4 Effect of fermentation liquid sugar on alcohol content

升的趋势明显。通过方差分析得知, 糖度 16.0%、20.0%、24.0%、28.0% 四个实验组在 95% 水平下差异显著, 糖度 28.0% 和 32.0% 两个实验组无显著性差异。初步选定发酵液糖度为 28.0%。

2.5 响应面优化的结果

2.5.1 酒精度回归模型的建立和显著性检验

由响应面分析得到 17 组实验条件, 每组做次平行实验后得到实验结果如下表。

经响应面软件对数据进行拟合, 得到回归方程:

$$\begin{aligned} \text{酒精度} = & +13.02 - 0.062 * A + 0.31 * B + 1.28 * C \\ & + 0.58 * A * C - 0.63 * B * C - 0.54 * A^2 - \\ & 0.89 * B^2 - 0.61 * C^2. \end{aligned}$$

由表 3 知, 模型的 P 值 < 0.001 , 说明了模型的极显著性。回归方程相关系数 $R^2 = 0.976 > 0.9$, 表明约有 97.6% 的酒精度变化可由此模型解释。对糖度、温度、时间分别进行分析, 发现温度 $P < 0.05$, 时间 $P < 0.001$, 说明温度和时间对酒精度的影响分别是显著和极显著的。而糖度 P 值为 $0.5587 > 0.05$, 说明糖度对酒精度影响不显著。在二次项中, 糖度 $P < 0.01$ 、温度 $P < 0.01$ 、时间 $P < 0.01$, 说明提取糖度、温度和时间对酒精度的影响都是

高度显著的。交互项中 $AC < 0.01$, $BC < 0.01$, 差异高度显著。综上所述, 回归方程给酒精度提供了一个合适的模型。

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface experimental design and results

实验编号	A (糖度)	B (温度)	C (时间)	酒精度 (%, V/V)
1	1	1	0	11.7±0.63
2	0	-1	1	13.1±0.49
3	1	-1	0	11.3±1.20
4	-1	-1	0	11.5±0.42
5	0	0	0	13.0±0
6	0	0	0	12.7±0
7	0	-1	-1	9.1±0.63
8	-1	0	-1	11.3±0.14
9	0	0	0	13.1±0.14
10	1	0	-1	10.1±0.35
11	0	0	0	13.5±0.07
12	-1	0	1	12.5±0.35
13	-1	1	0	11.9±0.21
14	0	0	0	12.8±0.63
15	0	1	-1	11.2±0
16	0	1	1	12.7±0
17	1	0	1	13.6±0

表 3 回归方程方差分析结果

Table 3 Analysis results of regression equation variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	23.44	9	2.60	31.40	<0.001	***
A-糖度	0.031	1	0.031	0.38	0.5587	
B-温度	0.78	1	0.78	9.42	0.0181	*
C-时间	13.00	1	13.00	156.82	<0.001	***
AB	-3.553E-015	1	-3.553E-015	-4.284E-014	1.0000	
AC	1.32	1	1.32	15.95	0.0052	**
BC	1.56	1	1.56	18.84	0.0034	**
A ²	1.21	1	1.21	14.53	0.0066	**
B ²	3.30	1	3.30	39.77	0.0004	**
C ²	1.57	1	1.57	18.89	0.0034	**
残差	0.58	7	0.083			
失拟项	0.19	3	0.064	0.66	0.6176	
净误差	0.39	4	0.097			
总离差	24.02	16				
$R^2 = 0.9758$ $R^2_{Adj} = 0.9448$						

注: *** 为差异极显著 ($P < 0.001$); ** 为差异高度显著 ($P < 0.01$); * 为差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: *** Very significant difference ($P < 0.001$); ** high significant difference ($P < 0.01$); * significant difference ($P < 0.05$).

2.5.2 响应面分析结果

响应面的曲面形状可作为其影响因素显著水

平的依据, 曲面的陡峭程度用以表明其显著性, 曲面越陡说明越显著。由图 5 可看出, 相对于温

度和糖度, 发酵时间对酒精度影响较为显著。

响应面优化分析结果显示, 当发酵液初始糖

度为 31.0%, 发酵温度为 31.6 °C, 培养时间为 6 d 的时候能够得到酒精度的理论最大值为 13.8%。

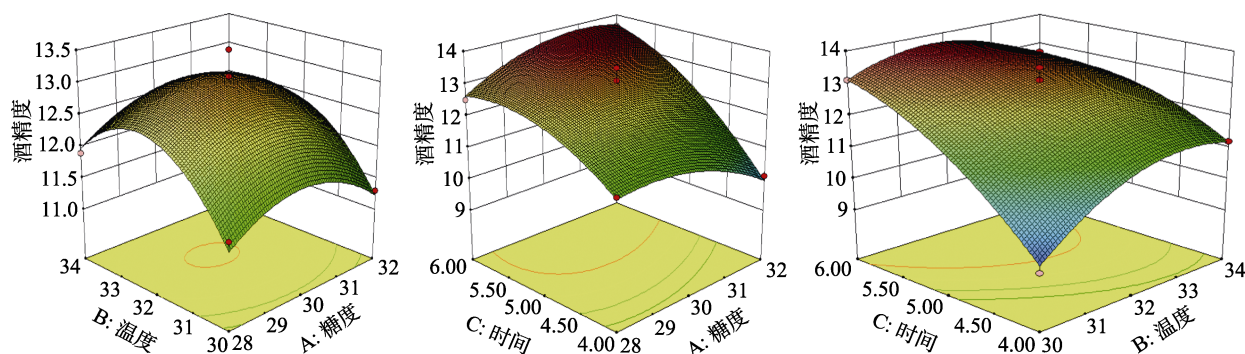


图5 发酵时间、温度、糖度及交互作用对蜂蜜酒发酵酒精度影响的响应面
 Fig.5 Response surface of fermentation time, temperature, sugar content and interaction on the fermentation alcohol degree of honey wine

2.5.3 验证实验

为了验证该模型给出的方案是否与实际情况相符合, 进行两次平行验证实验。出于实际情况的考虑, 将理论最优条件圆整为发酵液初始糖度为 31.0%, 发酵温度为 32.0 °C, 培养时间为 6 d。由此得到发酵液酒精度为 13.2%, 实际测定值与预测值的相对误差为 4.3%, 说明响应面模型能较好的反应实际情况。在响应面分析实验第 17 组中, 当发酵液糖度为 32.0%, 发酵温度为 32.0 °C, 培养时间为 6 d 时, 得到的发酵液酒精度为 13.6%, 大于验证实验结果。所以, 该条件作为最佳条件。该结果与理论的优化结果存在一定的差距, 可能是实验的条件控制等方面的误差所导致。

3 结论

本研究通过单因素实验, 考察了发酵温度、发酵时间、磷酸氢二铵添加量、发酵液糖度等因素对酒精度的影响。通过响应面优化得出酒精度的优化结果为: 当麦曲添加量 10.0 g, 酵母添加量 0.5 g, 磷酸氢二铵添加量 150 mg, 发酵液糖度为 32.0%, pH 值为 4.5, 发酵温度为 32.0 °C, 培养时间为 6 d 时, 能得到酒精度的最高值为 13.6%。同时, 经过初步感官评价, 麦曲和酵母共同发酵的蜂蜜酒的风味明显优于单独用酵母发酵的蜂蜜酒。

参考文献:

[1] 唐大恒, 王艳逊. 蜂蜜[M]. 北京: 科学技术出版社, 2005.

TANG D H, WANG Y X. Honey[M]. Beijing: Science and Technology Press, 2005.

[2] 傅国城. 蜂蜜酒酿造工艺技术的研究与应用[J]. 酿酒, 2014, 41(4): 90-93.

FU G C. Research and application of mead brewing technology [J]. Brewing, 2014, 41(4): 90-93.

[3] 曾志将. 养蜂学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.

ZENG Z J. Bee keeping[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2009.

[4] 张丽珍, 曾志将, 颜伟玉, 等. 山乌柏蜂蜜酒的酿造工艺研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(9): 180-182.

ZHENG L Z, ZENG Z J, YAN W Y, et al. Brewing technology of sapium discolor honey wine[J]. Brewing in China, 2010, 29(9): 180-182.

[5] 张晶, 刘双平, 周志磊, 等. 麦曲添加量对黄酒酿造及其风味的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 56-61.

ZHANG J, LIU S P, ZHOU Z L, et al. Effect of addition of wheat koji on brewing and flavor of yellow rice wine [J]. Food and Machinery, 2020, 36(4): 56-61.

[6] 罗涛. 清爽型黄酒香气特征及麦曲对其香气的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2008, 36-38.

LUO T. Aroma characteristics of light yellow rice wine and the effect of wheat koji on its aroma [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008, 36-38.

[7] 刘芸雅, 毛健, 孟祥勇. 绍兴黄酒麦曲及发酵过程中细菌群落结构分析[J]. 中国食品学报, 2017, 17(1): 201-206.

LIU Y Y, MAO J, MENG X Y. Exploring bacterial community in wheat qu and their changes during shaoxing rice wine fermentation[J]. China Food Journal, 2017, 17(1): 201-206.

[8] 毛青钟, 俞关松. 三种生麦曲的性能和应用研究[J]. 酿酒, 2016, 43(6): 66-73.

MAO Q Z, YU G S. Three kinds of raw wheat qu performance and experimental research[J]. Brewing, 2016, 43(6): 66-73.

[9] 毛青钟. 各地黄酒麦曲的特点[J]. 酿酒, 2013, 40(4): 18-22.

MAO Q Z. Around the yellow rice wine wheat koji characteristics

- of wine making, 2013, 40(4): 18-22.
- [10] 寿泉洪, 杨国军, 陈细丹, 等. 黄酒生麦曲与熟麦曲的性能比较[J]. 酿酒科技, 2008, (4): 92-95.
SHOU Q H, YANG G J, CHEN X D, et al. Properties comparison between uncooked wheat starter and cooked wheat starter for yellow rice wine[J]. *Brewing Technology*, 2008, (4): 92-95.
- [11] 李从军, 谢爱娣. 发酵型桂花蜂蜜酒的酿造工艺研究[J]. 2017, 36(7): 187-192.
LI C J, XIE A D. Brewing technology of fermented *Osmanthus fragrans* and honey wine [J]. *Brewing in China*, 2017, 36(7): 187-192.
- [12] 邹璐. 发酵型红枣蜂蜜酒的酿造工艺研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(2): 166-168.
ZOU L. Brewing technology of fermented jujube honey wine [J]. *Brewing in China*, 2016, 35 (2): 166-168.
- [13] 杜刚, 詹梦涛, 马坚司毅, 等. 蜂蜜中酵母菌的分离鉴定及蜂蜜酒的研制[J]. 中国酿造, 2020, 39(7): 78-82.
DU G, ZHAN M T, MA J S Y, et al. Isolation and identification of yeasts in honey and development of mead [J]. *Brewing in China*, 2020, 39(7): 78-82.
- [14] 彭涛, 马文锦, 王贵春, 等. 响应面法优化蜂蜜酒发酵工艺[J]. 中国酿造, 2015, 34(7): 104-107.
PENG T, MA W J, WZNG G C, et al. Optimization of honey wine fermentation process by response surface methodology [J]. *Brewing in China*, 2015, 34(7): 104-107.
- [15] 牛小明. 红曲蜂蜜酒生产工艺研究[J]. 中国酿造, 2011, (3): 165-167.
NIU X M. Production technology of honey red kojic rice wine[J]. *Brewing in China*, 2011, (3): 165-167.
- [16] 董彩文, 王浩瑾, 骆怡萍, 等. 不同条件对蜂蜜发酵过程中高级醇生成的影响[J]. 食品工业, 2021, 42(1): 112-115.
DONG C W, WANG H J, LUO Y P, et al. Effects of different conditions on the formation of higher alcohol in honey fermentation by yeast [J]. *Food Industry*, 2021, 42(1): 112-115.
- [17] 葡萄酒、果酒通用分析方法国家标准: GB/T 15038—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
National standard for general analysis method of wine and fruit wine: GB/T 15038—2006[S]. Beijing: China Standard Press, 2006.
- [18] 马荣山, 郭丹. 流加法发酵生产较高酒精度蜂蜜酒[J]. 中国酿造, 2008, 27(21): 56-59.
MA R S, GUO D. Honey wine with high alcohol content produced by fed-batch fermentation[J]. *Brewing in China*, 2008, 27(21): 56-59.
- [19] 刘光鹏, 焦守凤, 法涛, 等. 蜂蜜酒酿造工艺研究[J]. 中国果菜, 2014, 34(10): 26-28.
LIU G P, JIAO S F, HE F T, et al. Study on brewing technology of honey wine[J]. *China Fruit & Vegetable*, 2014, 34(10): 26-28.
- [20] 闫春明. 降低新酿黄酒中高级醇含量研究[D]. 合肥工业大学, 2017.
YAN C M. Study on reducing the content of higher alcohols in semi-dry yellow wine[D]. Hefei University of Technology, 2017. 完
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。