

# 响应面分析红曲酒酿造工艺研究

宋泽玉, 徐伟, 牟建迪 (聊城大学生命科学学院, 山东聊城 252000)

**摘要** [目的]研究红曲酒发酵的工艺参数,对红曲酒的生产给予指导。[方法]选取温度、红曲量、酵母量3个对红曲酒的发酵酒精度影响较大的因素进行单因素试验,考察它们对红曲酒发酵酒精度的影响。在此基础上,设计3因素3水平的响应面分析对红曲酒发酵工艺进行优化。[结果]试验表明,红曲酒的最佳发酵条件为发酵温度29.16℃,红曲量34.94g,酵母量8.07g,该工艺发酵所得红曲酒酒精的体积分数最高可达15.130%。[结论]研究可为红曲酒的工业化生产提供参考依据。

**关键词** 红曲;酵母菌;温度;响应面分析

中图分类号 TS261.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)25-076-03

## Research on Brewing Technology of Red Koji Wine by Using Response Surface Analysis

SONG Ze-yu, XU Wei, MOU Jian-di (College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000)

**Abstract** [Objective] To research the technology parameter of red koji wine fermentation, and to give the guidance for the process of red koji wine. [Method] Temperature, red koji quantity and yeast quantity were selected as the factors for single factor test which had relatively great impacts on fermented alcohol content of red koji wine. Effects of these factors on the fermented alcohol content were researched. Based on these, response surface analysis with three factors and three levels were designed to optimize the fermentation technology of red koji wine. [Result] Test showed that the optimal fermentation technology of red koji wine was as follows: 29.16℃ fermentation temperature, 34.94 g red koji quantity and 8.07 g yeast quantity. Under this technology, the alcoholic content of red koji wine reached 15.130%. [Conclusion] This research provides references for the industrialization production of red koji wine.

**Key words** Red koji; Yeast; Temperature; Response surface analysis

红曲起源于我国,古时称为丹曲<sup>[1]</sup>,早在汉朝时期,红曲就被用于酿酒<sup>[2]</sup>。红曲是以大米为原料,经红曲霉繁殖而成的一种紫红色米曲<sup>[3]</sup>。红曲中的主要菌是红曲霉<sup>[4]</sup>,红曲霉是一种耐高温、液化糖化力强又具有药食同源性的菌种<sup>[5]</sup>。酿酒行业俗称的红曲酶是红曲霉的代谢产物,用它酿造的红曲酒不仅味道醇厚,还具有医疗保健的作用。近年来,随着人们对食品功能的要求越来越高,红曲霉在酿造酒中的应用越来越广泛。

红曲酒主要以糯米为原料,加入酵母菌及红曲米对其进行发酵。目前,已有许多关于红曲酒的研究,但采用响应面分析优化红曲酒发酵条件的研究较少。响应面法可同时对影响生物产量的各因子水平及其交互作用进行优化与评价<sup>[6-7]</sup>。响应面法能快速有效地确定多因子系统的最佳条件,并且该法已经广泛应用于各类培养基以及发酵条件的优化<sup>[8-9]</sup>。针对以上现状,为充分利用红曲的糖化力,减少在红曲酒生产过程中原料的浪费,提高红曲酒生产的经济效益,笔者采用糯米为原料,利用响应面法优化红曲酒发酵的工艺参数,为红曲酒的生产提供参数。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 红曲米,福建省古田县屏湖红酒曲有限公司;酵母菌,安琪酵母股份有限公司;糯米;蔗糖等。主要仪器设备:立式压力蒸汽灭菌锅(BXM-30R)、振荡培养箱(SPX-150B-D),上海博迅实业有限公司医疗设备厂;超净工作台(SW-CJ-1D型),苏州净化设备有限公司;电热恒温培养箱(DNP-9082),上海精宏实验设备有限公司;生化培养箱(SPX-150),北京市永光明医疗仪器厂。

## 1.2 方 法

**1.2.1 红曲酒酿造的主要工艺流程。**锥形瓶(500 mL)内加蔗糖(8.00 g)→加蒸馏水(400 mL)→搅拌均匀→封口→115℃灭菌20 min→冷却→加入酵母菌→活化1 h→加入红曲米→加入等量蒸熟的糯米(糯米浸泡24 h后蒸熟,每瓶200 g)→发酵10 d。

**1.2.2 红曲酒酿造的单因素试验。**将糯米与无菌水调成适当的比例进行发酵,pH自然,发酵时间为10 d。分别以发酵温度(22、26、30、34、38℃)、红曲米用量(12、24、36、48、60 g)、酵母菌用量(4、8、12、16、20 g)3个因素为考察对象,发酵酒精度为指标,研究各因素对酒精度的影响。

**1.2.3 红曲酒酿造工艺的响应面优化。**根据 Box-Behnken 中心组合设计原理<sup>[10]</sup>,在单因素酒精发酵的基础上,以影响酒精度的3个因素:发酵温度(A)、红曲量(B)及酵母量(C)为研究对象,采用3因素3水平的响应面分析,确定最佳参数值<sup>[11]</sup>。利用响应面分析软件 Design-Expert 6.0.5,以发酵终止后发酵液中含有的酒精度为响应值,采用响应面法进行分析讨论<sup>[12]</sup>。该试验进行3次重复,最终的试验结果取3次试验的平均值。试验的因素和水平见表1。

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平 Level	因素 Factor		
	温度(A) Temperature/℃	红曲量(B) Red koji quantity/g	酵母量(C) Yeast quantity/g
-1	25	20	8
0	30	40	16
1	35	60	24

**1.2.4 分析测定方法。**酒精度测定采用蒸馏-密度法。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果分析

**2.1.1 发酵温度对酒精度的影响。**从图 1 可以看出,发酵温度在 22 ~ 30 °C,红曲酒的酒精度随发酵温度的升高而增加;在 30 ~ 38 °C,红曲酒的酒精度随温度的升高而减少。可知发酵温度对菌体生长及代谢有很大的影响,只有在适当的温度下菌体才能进行高效率发酵。在一定温度范围内,菌体的生长代谢速度随温度的升高而增加,酒精积累量也随之增加。在温度超过一定值时,菌体的生长及代谢能力下降,酒精的积累也随之减少。因此,红曲酒发酵的较适温度在 30 °C 左右。

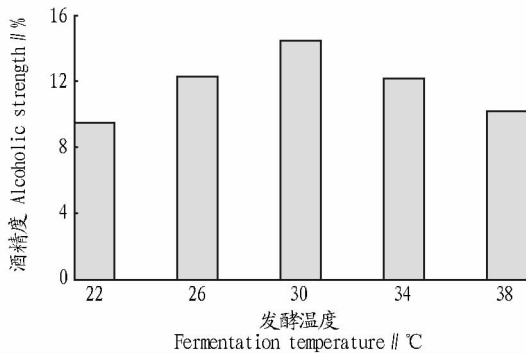


图 1 发酵温度对酒精度的影响

Fig. 1 Effects of fermentation temperature on alcoholic strength

**2.1.2 红曲量对酒精度的影响。**由图 2 可以看出,红曲量在 12.0 ~ 36.0 g 时,酒精度随红曲量的增加而增加;红曲量在 36.0 ~ 48.0 g 时,酒精度随红曲量的增加而减少。可以看出红曲量对酒精度有影响,随红曲量的增加酒精度有先上升后下降的趋势。当红曲达到一定量时,酒精度达到最大值,红曲量继续增加,酒精度逐渐下降。可能是红曲过量时红曲的生长消耗了较多的营养物质,糖分被大量消耗,导致酒精度下降。因此,红曲量的较适量在 36.0 g 左右。

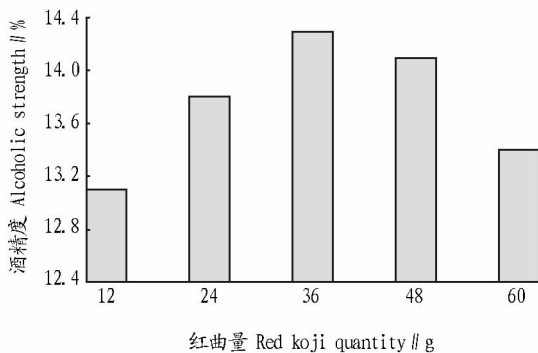


图 2 红曲量对酒精度的影响

Fig. 2 Effects of red koji quantity on alcoholic strength

**2.1.3 酵母菌量对酒精度的影响。**从图 3 可以看出,酵母量在 4.0 ~ 8.0 g 时,酒精度随酵母量的增加而增加;在 8.0 ~ 12.0 g 时,酒精度基本没有变化;在 12.0 ~ 20.0 g 时,酒精度随酵母量的增加而减小。酵母量对酒精度的影响较小,随着酵母量的增加酒精度呈先上升后下降的趋势。原因是由于酵母菌接种量较小时,发酵液中酵母浓度低,发酵效率低,产

酒精量小;酵母菌接种量较大时,发酵液中的新生酵母细胞比例较小,老细胞比例较大,整体发酵活力低,导致酒精的积累量少。因此,酵母接种量在 8.0 ~ 12.0 g 时产酒精量较多。

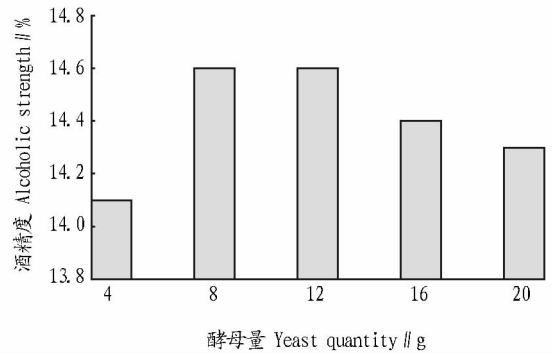


图 3 酵母量对酒精度的影响

Fig. 3 Effect of yeast quantity on alcoholic strength

**2.2 红曲酒发酵响应面优化分析** 综合单因素试验结果,采用 Box-Behnken Design 响应面分析法对试验影响因素进行优化。响应面试验设计及结果见表 2。

对表 2 中的试验数据进行多元回归方程拟合,建立红曲酒酒精度(Y)对发酵温度(A)、红曲量(B)、酵母量(C)的拟合方程:  $Y = -97.12000 + 7.53150A + 0.079500B + 0.097188C + 1.25000E - 003AB - 0.010000AC + 7.81250E - 004BC - 0.12740A^2 - 1.65000E - 003B^2 + 4.14062E - 003C^2$ ;  $R^2 = 93.58\%$ ,  $Adj. R^2 = 85.33\%$ 。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and result of response surface methodology

试验号 Test No.	因素 Factor			酒精度试验值(Y) Tested value of alcoholic strength//%	酒精度预测值 Forecasted value of alcoholic strength // %
	A	B	C		
1	0	0	0	14.80	14.52
2	-1	1	0	11.70	11.61
3	1	-1	0	9.40	9.49
4	-1	0	1	13.50	12.80
5	0	0	0	14.50	14.52
6	0	-1	-1	15.40	14.66
7	1	0	1	10.20	9.78
8	0	-1	1	13.40	13.74
9	0	1	-1	14.60	14.26
10	0	0	0	13.80	14.52
11	0	1	1	13.10	13.89
12	1	1	0	10.00	9.64
13	1	0	-1	10.50	11.20
14	-1	0	-1	12.20	12.62
15	0	0	0	14.50	14.52
16	-1	-1	0	11.60	11.96
17	0	0	0	15.00	14.52

回归方程中各变量对响应值影响的显著性,由  $F$  检验来判断,概率  $P$  的值越小,则相应变量的显著性程度越高。方差分析显示:  $F_{模型} = 11.34, P_{模型} = 0.0021^{**}$ ;  $F_A = 17.70, P_A = 0.0040^{**}$ ;  $F_B = 0.036, P_B = 0.8554$ ;  $F_C = 1.40, P_C = 0.2759$ ;  $F_{AB} = 0.11, P_{AB} = 0.7480$ ;  $F_{AC} = 1.14, P_{AC} = 0.3203$ ;  $F_{BC} = 0.11, P_{BC} = 0.7480$ ;  $F_{A^2} = 76.36, P_{A^2} = <0.0001^{***}$ ;  $F_{B^2} = 3.28, P_{B^2} = 0.1131$ ;  $F_{C^2} = 0.53, P_{C^2} = 0.4908$ ;  $F_{失拟} = 4.97$ ,

$P_{失拟} = 0.0777$ 。由此看出,当模型  $F = 11.34$  时,  $P = 0.0021 < 0.01$ ,说明模型是极显著的;当失拟项  $F = 4.97$  时,  $P = 0.0777 > 0.05$ ,说明模型失拟项不显著。

通过对立体曲面图分析及偏导数计算得出:  $A \approx -0.20$ ,  $B \approx -0.0064$ ,  $C \approx -0.98$ ,即发酵温度约为  $29.16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,红曲量约为  $34.94\text{ g}$ ,酵母量约为  $8.07\text{ g}$ ,响应值  $Y$  达到最大,即红曲酒的酒精体积分数达到  $15.13\%$ 。

**2.3 响应面图与等高线图分析** 利用 Design-Expert 6.0.5 软件对回归方程进行分析,做出交互项的三维响应面图及等高线图,能比较直观地解释各个变量和变量之间对响应值的影响<sup>[13]</sup>。等高线的形状可以反映出交互作用的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反<sup>[14]</sup>。

由图4可以看出,酒精度随温度变化的幅度比较大,曲线坡度比较大,酒精度随红曲量的变化较小,曲线较平滑。由图5可以看出,在温度较低时,酒精度随酵母量的升高有缓慢升高的趋势,在温度较高时,酒精度随酵母量的升高而下降。随酵母量的升高,低温对酒精度的影响逐渐减小,而高温对酒精度的影响逐渐增大。由图6可以看出,红曲量与酵母菌对酒精度的影响有交互作用,随红曲量的增加,酒精度呈先上升后下降的趋势,随酵母量的增加酒精度呈先下降后轻微上升的趋势。在酵母量低时,酒精度普遍高于酵母量高时的酒精度。

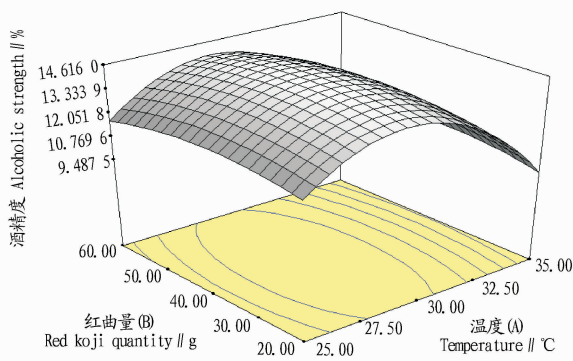


图4 温度和红曲量对酒精度的影响

Fig. 4 Effects of fermentation temperature and red koji quantity on alcoholic strength

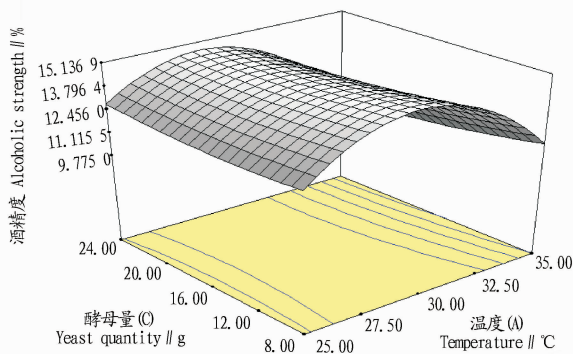


图5 温度和酵母量对酒精度的影响

Fig. 5 Effects of fermentation temperature and yeast quantity on alcoholic strength

**2.4 红曲酒发酵优化条件的验证试验** 由软件自动分析可

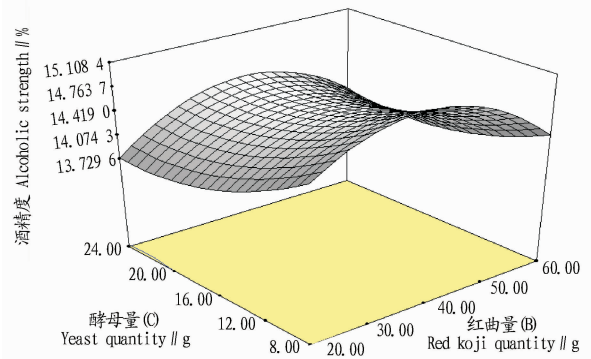


图6 红曲量和酵母量对酒精度的影响

Fig. 6 Effects of red koji quantity and yeast quantity on alcoholic strength

得红曲酒最佳发酵条件为:发酵温度  $29.16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、红曲量  $34.94\text{ g}$ 、酵母量  $8.07\text{ g}$ ,所得红曲酒的酒精体积分数预测值为  $15.1300\%$ 。考虑实际情况,取发酵温度  $29.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、红曲量  $35.00\text{ g}$ 、酵母量  $8.00\text{ g}$ ,进行3次平行试验,最终酿得红曲酒的酒精体积分数分别为  $14.8000\%$ 、 $14.7000\%$ 、 $15.1000\%$ ,平均为  $14.8667\%$ ,与模型预测值基本一致,该模型的建立对红曲酒酒精度的预测比较准确。

**2.5 红曲酒的质量指标** 该试验制得的红曲酒的感官指标见表3,理化指标见表4。由表3、4可知,所得红曲酒感官质量达到标准,理化指标符合要求。

表3 红曲酒的感官指标

Table 3 Sensory index of red koji wine

项目 Item	红曲酒 Red koji wine	标准 Standard
色泽 Color	紫红色,酒体澄清	紫红色,酒体澄清
香气 Aroma	有醇香,气味芳香愉悦	有醇香,气味芳香愉悦
口感 Taste	酒味浓厚,酸甜可口,口感柔和	酒味较浓厚,酸甜可口,口感柔和

### 3 结论

红曲酒是一种以糯米为原料的具有优良保健功能的饮料酒,发酵温度、红曲量、酵母量是对红曲酒的酒精度有较大影响的3个因素。该研究在单因试验的基础上,利用响应面分析法,以酒精度为响应值进行响应面分析设计,建立了发酵温度、红曲量、酵母量3个因素与响应值酒精度之间的数学模型:  $Y = -97.12000 + 7.53150A + 0.079500B + 0.097188C + 1.25000E - 0.03AB - 0.010000AC + 7.81250E - 0.04BC - 0.12740A^2 - 1.65000E - 0.03B^2 + 4.14062E - 0.03C^2$ ,  $F$  检验模型极显著。对试验因素进行了优化,得到红曲酒的最佳发酵条件为:发酵温度  $29.16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,红曲量  $34.94\text{ g}$ ,酵母量  $8.07\text{ g}$ ,红曲酒的酒精体积分数预测值为  $15.1300\%$ 。红曲酒发酵优化条件的验证试验得到红曲酒酒精体积分数平均值为  $14.8667\%$ ,与模型预测值基本一致。经检验,红曲酒的感官指标、理化指标和微生物指标符合标准。可以较好地地为红曲酒生产提供指导。

(下转第145页)

minet 等<sup>[10]</sup> 分别将来源于牛、猪组织的胶原蛋白肽作用于鼠的成骨细胞,发现成骨细胞数量增加,碱性磷酸酶的活性提高。从该研究结果来看,将浓度分别为 150、300、600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的狭鳕鱼皮胶原蛋白肽作用于成骨细胞后,细胞的增殖率上升, SOD 含量上升,MDA 含量下降。表明胶原肽能够降低成骨细胞中氧化物的含量,提高抗氧化物的含量。因此,胶原肽可能通过抗氧化应激作用,从而在一定程度上保护成骨细胞免受  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤。

表 2 胶原蛋白肽对成骨细胞中 Sirt1、Foxo3a 相对表达量的影响 ( $n=3$ )

Table 2 The influence of collagen peptide on the relative expression of Foxo3a and Sirt1 in osteoblast cell

组别 Groups	Foxo3a/GAPDH	Sirt1/GAPDH
正常对照组 Normal control group	0.82 $\pm$ 0.01	1.04 $\pm$ 0.06
模型对照组 Model control group	1.07 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	0.59 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup>
胶原肽低浓度组 Collagen peptide low concentration group	0.98 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>	0.93 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>
胶原肽中浓度组 Collagen peptide middle concentration group	0.96 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	0.96 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>
胶原肽高浓度组 Collagen peptide high concentration group	0.91 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	1.01 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>

注:##、##分别表示与正常组相比差异显著( $P < 0.05$ )、极显著( $P < 0.01$ );\*、\*\*分别表示与模型组相比差异显著( $P < 0.05$ )、极显著( $P < 0.01$ )。

Note: #, ## stands for significant difference ( $P < 0.05$ ) and extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) compared with normal group. \*, \*\* stands for significant difference ( $P < 0.05$ ) and extremely significant difference ( $P < 0.01$ ) compared with model group.

该试验结果中,与  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组相比,胶原肽降低 Foxo3a mRNA 和蛋白表达水平,提高 Sirt1 蛋白表达水平,并具有剂量依赖性。说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  能够激活 Foxo3a,而胶原肽能够抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 Foxo3a 的激活。Tseng 等<sup>[11]</sup> 研究发现 Sirt1

与 Foxo3a 的 C-末端结构域结合,促进 Sirt1/Foxo3a 复合物的形成。因此,狭鳕鱼皮胶原蛋白肽抑制  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的成骨细胞氧化应激可能是通过上调 Sirt1 的表达水平、下调 Foxo3a 的表达水平导致的。然而,Sirt1/Foxo3a 通路是否参与了此过程,还需要进一步的研究。

### 参考文献

- [1] MUTHUKUMAR T, PRABU P, GHOSH K, et al. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible woundburn dressing material[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 113(1):207-212.
- [2] MURAKAMI M, TONOUCHI H, TAKAHASHI R, et al. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide( $\beta$ -lactosin B) isolated from a commercial whey product[J]. Journal of dairy science, 2004, 87(7):1967-1974.
- [3] ZHANG Y, DUAN X, ZHUANG Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin[J]. Peptides, 2012, 38(1):13-21.
- [4] LEAN J M, DAVIES J T, FULLER K, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss[J]. Clin Invest, 2003, 112(6):915-923.
- [5] RACHED M T, KODE A, XU L. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts[J]. Cell Metab, 2010, 11(2):147-160.
- [6] HAIGIS M C, SINCLAR D A. Mammalian Sirtuins: Biological insights and disease relevance[J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5:253-295.
- [7] BAUR J A, UNGVARI Z, MINOR R K, et al. Are Sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(6):443-461.
- [8] LEE H W, SUH J H, KIM A Y, et al. Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(10):2432-2443.
- [9] WEITZMANN M N, PACIFICI R. Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale[J]. Clin Invest, 2006, 116(5):1186-1194.
- [10] GUILLERMINET F, BEAUPIED H, FABIEN-SOULE V, et al. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an in vitro and in vivo study[J]. Bone, 2010, 46(3):827-834.
- [11] TSENG P C, HOU S M, CHEN R J, et al. Rensvertrol promotes osteogenesis of human mesenchymal cells by upregulating RUNX2 gene via the SIRT1/FOXO3A axis[J]. Bone Miner Res, 2011, 26(10):2552-2563.

(上接第 78 页)

表 4 红曲酒的理化指标

Table 4 Physical and chemical indicators of red koji wine

项目 Item	红曲酒 Red koji wine	标准 Standard
每 100 mL 中糖分(以葡萄糖计)的含量 Content of sugar in every 100 mL (calculated by glucose)	0.70 g	不得高于 1 g
每 100 mL 中总酸(以琥珀酸计)的含量 Content of total acid in every 100 mL (calculated by succinic acid)	0.35 g	不得高于 0.55 g
酒精度 Alcoholic strength	14.86%	不低于 13.50%

### 参考文献

- [1] 岳振宇,王亚琴,许喜林,等.红曲霉的特点及应用研究[J].食品工业科技,2006(12):186-188.
- [2] 赵树欣,李凤美.酿酒红曲、色素红曲、功能红曲的对比及抑菌性研究[J].中国食品添加剂,2007(1):96-99.
- [3] 张晓敏,杨明.红曲及其生物活性物质的介绍[J].肉类工业,2009(12):32-36.
- [4] 方跃进.红曲霉在我国白酒生产中的作用[J].中国酿造,2013,32(4):133-135.
- [5] 路振华,王琛,马荣山.红曲营养保健酒的研制[J].酿酒,2006,33(4):73-74.
- [6] MUSSATTO S I, DRAGONE G, ROCHAG J J M, et al. Optimum operating conditions for brewer's spent grain soda pulping[J]. Carbohydrate polymers, 2002, 64:22-28.
- [7] 韩建春,冯镇,张宏伟.产葡萄糖氧化酶菌株的筛选及发酵培养基的优化[J].食品科学,2011,32(1):149-153.
- [8] VOHRA A, SATYANARAYANA T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*[J]. Process biochemistry, 2002, 37:999-1004.
- [9] SHIH I L, KOU C Y, HSIEH F C, et al. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation[J]. Journal of the Chinese institute of chemical engineers, 2008, 39:635-643.
- [10] 邓红梅,马超,李大云.响应面分析葡萄皮渣酿造葡萄醋工艺研究[J].中国调味品,2015,40(12):42-47.
- [11] 聂永华,刘福玲,徐桂花,等.响应面分析法优化枸杞酒发酵醪的浸渍工艺[J].中国酿造,2013,32(9):91-95.
- [12] 张婧,杨馨.响应面法优化柚皮精油的超临界  $\text{CO}_2$  萃取工艺[J].食品研究与开发,2015,36(20):96-99.
- [13] 王璐,李小溪,古丽娜孜,等.响应面法优化马奶酒发酵条件的研究[J].中国酿造,2014,33(2):66-70.
- [14] 刘春梅,张守义,代亨燕,等.响应面分析法确定刺梨醋的加工工艺[J].中国调味品,2011,36(1):40-44.