

# 响应面法优化广东客家黄酒产 $\gamma$ -氨基丁酸的发酵工艺

黄敏欣<sup>1</sup>, 莫依灿<sup>1</sup>, 赵文红<sup>1,2\*</sup>, 王辉<sup>1,2</sup>, 钱敏<sup>1,2</sup>, 白卫东<sup>1,2</sup>

1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院(广州 510225); 2. 广东省岭南特色食品工程技术研究中心(广州 510225)

**摘要** 研究红曲添加量、主酵温度和主酵时间对广东客家黄酒产 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的影响,并用响应面法对客家黄酒产GABA的发酵工艺条件进行优化。结果表明,红曲添加量、主酵温度和主酵时间对客家黄酒中GABA含量有较大影响,响应面分析法优化红曲添加量、主酵温度和主酵时间3个因素得到模型方程: $y=298.36+40.84A+27.68B+5.02C-14.10AB+11.71AC+52.21BC-41.44A^2-26.54B^2-30.01C^2$ (其中,A为红曲添加量,B为主酵温度,C为主酵时间),确定了最佳发酵工艺条件为红曲添加量6.5%,主酵温度32℃,主酵时间6d,此条件下酿制的广东客家黄酒中GABA含量达到309.09 mg/L,高于市售客家黄酒,且电子舌分析得到工艺优化黄酒与市售黄龙客家甜黄酒在滋味上差异不大。

**关键词** 广东客家黄酒; GABA; 发酵工艺; 响应面法

## Optimization of Fermentation Process of GABA Production of Guangdong Hakka Rice Wine by Response Surface Methodology

Huang Min-xin<sup>1</sup>, Mo Yi-can<sup>1</sup>, Zhao Wen-hong<sup>1,2\*</sup>, Wang Hui<sup>1,2</sup>, Qian Min<sup>1,2</sup>, Bai Wei-dong<sup>1,2</sup>

1. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering (Guangzhou 510225);

2. Guangdong Engineering Technology Research Center for Lingnan Specialty Food (Guangzhou 510225)

**Abstract** Effect of red koji additive amount, temperature of main fermentation stage and time of main fermentation stage on GABA of Hakka rice wine was studied at this article, and fermentation process conditions were optimized by response surface methodology. The results showed that red koji additive amount, temperature of main fermentation stage and time of main fermentation stage had large effect on GABA of Hakka rice wine. The model equation  $y=298.36+40.84A+27.68B+5.02C-14.10AB+11.71AC+52.21BC-41.44A^2-26.54B^2-30.01C^2$  (A for red koji additive amount, B for temperature of main fermentation stage, and C for time of main fermentation stage) was get by optimizing red koji additive amount, temperature of main fermentation stage and time of main fermentation stage by response surface methodology. The optimum fermentation conditions were red koji additive amount for 6.5%, temperature of main fermentation stage for 32℃, time of main fermentation stage for 6 d, GABA content of Guangdong Hakka rice wine at those condition reached 309.09 mg/L more higher than commercial Hakka rice wine. Hakka rice wine brewed by above optimum fermentation conditions and commercial Hakka rice wine of Huanglong was similar in taste.

**Keywords** Guangdong Hakka rice wine; GABA; fermentation process; response surface methodology

广东客家黄酒是集营养、保健为一体的低度酿造酒<sup>[1]</sup>,主要分布在广东河源、梅州一带。客家黄酒的酿造是以红曲为主的多菌种混合发酵,其生产工艺十分独特。客家黄酒发酵的生物转化主要发生于主发酵阶段,此阶段边糖化边发酵,原料在红曲等酒曲微生物作用下发生糖化和酒精发酵<sup>[2]</sup>。客家黄酒的发酵工艺直接影响黄酒的营养物质和风味。 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)是客家黄酒中的一种功能性成分,具有提高记忆力、降血压、活化肝肾及防止动脉硬化等功能<sup>[3]</sup>。在客家黄酒发酵过程中,GABA主要由微生物生长代谢产生。研究发酵工艺条件对客家黄酒GABA的影响,有助于直观了解发酵过程中GABA的转化途径,并为研究客家黄酒发酵的影响因素提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验原料与试剂

红曲、麦曲、酒药:广东省紫金县某酒厂提供;糯米:山西丰园食品有限公司;米酒(29度):广东石湾酒厂有限公司;黄龙客家甜黄酒、龙乡贡客家甜黄酒:市售;GABA标准品:美国Sigma试剂公司;氨基酸混标、OPA衍生剂、磷酸盐缓冲液:美国Agilent科技有限公司;甲醇、乙腈:广州自力色谱科仪有限公司;以上试剂为色谱纯。氢氧化钠:天津富宇精细化工有限公司;磷酸二氢钠:广州化学试剂厂;磷酸:天津富宇精细化工有限公司;以上试剂为分析纯。

### 1.2 试验仪器

1100系列高效液相色谱仪：美国Agilent科技有限公司；LRH-250A生化培养箱：广东省医疗器械厂；LX-C35L自动电热压力蒸汽灭菌器：合肥华泰医疗设备有限公司；BS223S电子天平：北京赛多利斯仪器系统有限公司；Jq-1200电炉：上海司乐仪器有限公司；VAL1酒精计：上海一恒科技有限公司；TG16-W高速离心机：湖南湘立科学仪器有限公司；Smar Tongue电子舌：上海瑞玢国际贸易有限公司等。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 广东客家黄酒的酿造工艺流程

红曲、麦曲、酒药



浸米→蒸饭→摊凉→拌曲→前发酵→加米酒后发酵→压榨→煎酒→过滤→装坛→陈酿

#### 1.3.2 客家黄酒γ-氨基丁酸含量的测定

采用糯米，高效液相色谱检测酒液中GABA含量。色谱条件：采用紫外检测检测器，其检测波长为340 nm；色谱柱为4.6 × 150 mm Agilent氨基酸柱，柱温为40 ℃；流动相A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 为0.02 mol/L (pH为7.8)；流动相B (V(甲醇MeOH) : V(乙腈CAN) : V(水H<sub>2</sub>O)) 为45 : 45 : 10。依次吸取0 μL H<sub>2</sub>O→5 μL缓冲液→1 μL OPA衍生剂→0 μL H<sub>2</sub>O→10 μL酒样→0 μL H<sub>2</sub>O→进样(表1)。

表1 高效液相色谱梯度洗脱的程序

| 时间/min | A流动相A/% | B流动相B/% | 流速/<br>mL · min <sup>-1</sup> |
|--------|---------|---------|-------------------------------|
| 0      | 100     | 0       | 1                             |
| 1.9    | 100     | 0       | 1                             |
| 18.1   | 43      | 57      | 1                             |
| 20.6   | 0       | 100     | 1                             |
| 23.5   | 0       | 100     | 1                             |
| 24.2   | 100     | 0       | 1                             |
| 26     | 100     | 0       | 1                             |

#### 1.3.3 客家黄酒酒精度的测定

客家黄酒酒精度的测定：按GB/T 13662—2008黄酒国标<sup>[4]</sup>。

#### 1.3.4 红曲添加量对客家黄酒产γ-氨基丁酸的影响

红曲添加量为1%、3%、5%、7%和9%，麦曲和酒药都分别添加0.7%。30 ℃发酵到第7天后，加入45%白酒，进入后发酵。发酵到第30天后，煎酒，贮藏1个月，检测客家黄酒中GABA的含量，以考察红曲添加量对GABA含量的影响。

#### 1.3.5 主酵温度对客家黄酒产γ-氨基丁酸的影响

添加红曲、麦曲、酒药依次为5%，0.7%和0.7%，主酵温度分别为22 ℃，25 ℃，28 ℃，31 ℃，34 ℃和37 ℃。发酵到第7天时，加入45%白酒，进入后发酵。发酵到第30天后，煎酒，贮藏1个月，检测

客家黄酒中GABA的含量，以考察主酵温度对GABA含量的影响。

#### 1.3.6 主酵时间对客家黄酒产γ-氨基丁酸的影响

添加红曲、麦曲、酒药依次为5%，0.7%和0.7%，主酵温度为32 ℃，主酵时间分别为3，5，7，9和11 d，主酵结束后，加入45%白酒，进行后发酵。发酵到第30天后，煎酒，贮藏1个月，检测客家黄酒中GABA的含量，以考察主酵时间对GABA的影响。

#### 1.3.7 响应面优化客家黄酒产γ-氨基丁酸的发酵工艺条件

根据单因素试验的结果，选取红曲添加量、主酵温度和主酵时间的优化范围，加入45%白酒，进行后发酵。发酵到第30天后，煎酒，贮藏1个月，检测客家黄酒中GABA的含量，利用响应面分析软件优化客家黄酒产GABA的发酵工艺。

#### 1.3.8 电子舌分析客家黄酒的口感品质

采用电子舌检测工艺优化黄酒、黄龙客家甜黄酒和龙乡贡客家甜黄酒，并运用主成分分析法和判别函数分析法分析。清洗探头，设置电子舌参数。准确量取15 mL酒样，电子舌室温下检测，最高电压1 V，最低电压-1 V，脉冲间隔200 mV，灵敏度10<sup>4</sup>。平行测定3次。

#### 1.3.9 数据分析与处理

采用Sigma Plot 11.0软件对试验结果进行统计分析，各组试验数据用 $X \pm S$  (平均数 ± 标准偏差) 表示。Design Expert 8.0.6.1软件对条件参数进行优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 红曲添加量对γ-氨基丁酸含量的影响

广东客家黄酒发酵过程中其微生物来源主要是曲种，曲种包括红曲、麦曲和酒药。糯米糖化过程中的微生物群不一致，将导致GABA的生成量也有所差异。红曲是客家黄酒生产的糖化发酵剂之一，能产生糖化酶、液化酶、酸性蛋白酶和酯化酶等，对发酵具有重要的作用<sup>[5]</sup>。同时，红曲可以产生GABA等次级代谢产物。由图1看出，当红曲添加量为1%，3%，5%，7%和9%时，随着红曲添加量的增加，GABA含量呈增多的趋势，酒精度也增大。当红曲添加量为5%时，GABA含量较大，而后增大红曲添加量对GABA含量影响不大。这可能是随着红曲添加量的增加，为发酵提供了更多水解酶，使得淀粉水解更彻底，有利于红曲霉等微生物在生长代谢过程中产GABA，因此GABA含量增加。而当红曲添加量为5%时，酒精度最高，再增加红曲添加量，酒精度反而下降。这可能是由于红曲添加量过高，液化和糖化速度加快，产生大量的糖分，导致酒液渗透压过高，酵母的生长和代谢受到影响，各种微生物代谢也受到影

响,因此酒精度下降,GABA的生成也受到影响。因此选取红曲添加量约5%比较适宜。

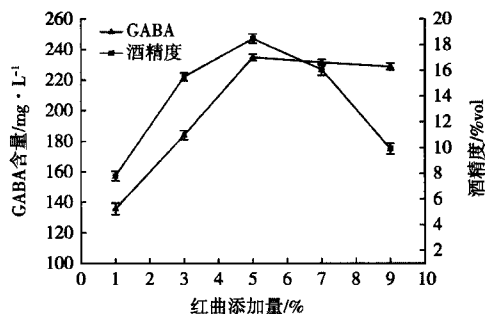


图1 红曲添加量对GABA含量的影响

## 2.2 主酵温度对 $\gamma$ -氨基丁酸含量的影响

发酵温度将影响微生物的代谢活动,适宜的主酵温度显得尤为重要。发酵温度能影响微生物生长和酶活性,最终会影响GABA的产生。所以,采取的主酵温度不能过高,且升温速度要求适中。从图2中看出,主酵温度从22℃,25℃,28℃,31℃,34℃和37℃逐渐升高时,GABA的含量逐渐提高,这主要是因为主酵温度逐渐升高,红曲霉等微生物生长繁殖和淀粉酶作用加快,代谢产生更多的GABA,酵母也逐渐产生酒精。当主酵温度为31℃,GABA的含量达到最大。但是主酵温度过高,GABA含量反而降低,酒精度变化不明显,这是因为发酵醪液本身的发热量大,再加上原料大米发酵时易浮于液面形成盖,流动性差,使发酵醪散热非常困难,若此时主酵温度又控制得过高,这将使得微生物的生命活动受到很大的影响,可能会导致高糖分和高渗透压局面的出现,微生物的代谢活动受阻。还有,微生物过早衰退、繁殖和代谢能力下降,甚至死亡,导致微生物的代谢受阻,最终影响GABA生成。所以在客家黄酒酿造过程中必须控制好发酵温度。选取主酵温度31℃左右较合适。

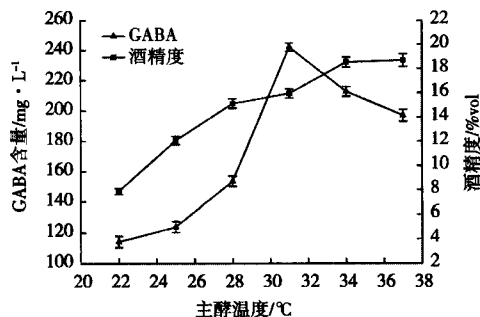


图2 主酵温度对GABA含量的影响

## 2.3 主酵时间对 $\gamma$ -氨基丁酸含量的影响

广东客家黄酒在进行主发酵一段时间后,需添加一定量白酒来抑制糖化发酵进程,添加白酒后就进入

后发酵进程,这是客家黄酒酿造过程的特色,也是客家黄酒与绍兴黄酒的区别之处。客家黄酒的发酵时间持续不够长,酒醪中有大量糖分发生积累,这独特的发酵工艺给予客家黄酒高糖、低酒精度的特点,而绍兴黄酒发酵长达一个月或以上,糖分能大部分转化为酒精。由从图3中可看出,主酵时间为3,5,7,9和11 d时,GABA的含量和酒精度随着主酵时间的延长呈增加后减小。这是因为,客家黄酒的酿造是典型的边糖化边发酵过程,主酵期间淀粉在淀粉酶的作用下分解为小分子的糖,当糖化发酵剂用量一定,延长主酵时间能使淀粉酶水解淀粉较充分,糖化菌等微生物可利用的营养物质充分,代谢产生GABA增多,同时酵母的生长代谢也受到促进,其除了能充分利用葡萄糖生成酒精外,也生成一部分GABA。当主酵时间为7 d时,GABA的含量和酒精度达到最大。但是随着主酵时间的延长,GABA的含量和酒精度下降,这是因主酵时间延长,虽然仍有少部分微生物及酶能进行缓慢反应,生成少部分GABA,但是长时间的高糖分和高渗透压影响了微生物的发酵环境,部分酵母衰亡,同时在一定程度上抑制了微生物及大部分酶的活力,特别是GAD酶活性,进而影响到它们的生长代谢,使得GABA和酒精的生成受阻。因此选取主酵时间约7 d为宜。

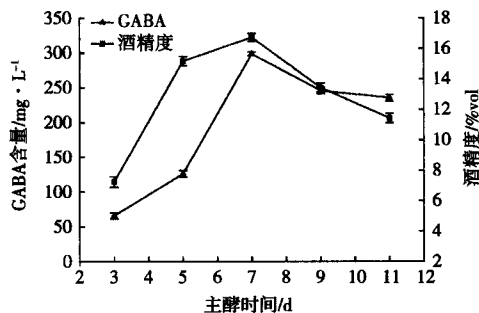


图3 主酵时间对GABA含量的影响

## 2.4 响应面优化客家黄酒的发酵工艺条件

以单因素试验为基础,选取红曲添加量为3%,5%和7%,主酵温度为28℃,31℃和34℃,主酵时间为5,7和9 d,用响应面分析法对客家黄酒产GABA的条件进行优化。因素水平和结果分别见表2和表3。

分析广东客家黄酒产GABA的条件可知,红曲添加量、主酵温度和主酵时间这三个因素都是显著因素。客家黄酒中GABA的二次回归拟合方程如下:

$$\text{GABA含量 (mg/L)} = 298.36 + 40.84A + 27.68B + 5.02C - 14.10AB + 11.71AC + 52.21BC - 41.44A^2 - 26.54B^2 - 30.01C^2$$

(其中,A为红曲添加量,B为主酵温度,C为主酵时间)

从表4可知,模型 $p < 0.0001$ ,但是失拟项 $p =$

0.733 5, 这说明了广东客家黄酒产GABA的模型和实际情况拟合度较好, 所以由此可预测客家黄酒产GABA的条件。

表2 响应面优化试验的因素与水平

| 水平 | 因素      |        |        |
|----|---------|--------|--------|
|    | 红曲添加量/% | 主酵温度/℃ | 主酵时间/d |
| -1 | 3       | 28     | 5      |
| 0  | 5       | 31     | 7      |
| 1  | 7       | 34     | 9      |

表3 广东客家黄酒产GABA的试验设计及结果

| 序号 | 红曲添加量/% | 主酵温度/℃ | 主酵时间/d | GABA含量/<br>mg · L <sup>-1</sup> |
|----|---------|--------|--------|---------------------------------|
| 1  | 3       | 28     | 5      | 176.74                          |
| 2  | 2.2     | 31     | 7      | 157.66                          |
| 3  | 5       | 31     | 7      | 298.42                          |
| 4  | 5       | 31     | 7      | 298.42                          |
| 5  | 5       | 31     | 7      | 298.42                          |
| 6  | 5       | 31     | 7      | 298.42                          |
| 7  | 5       | 27     | 7      | 206.06                          |
| 8  | 5       | 31     | 4      | 231.16                          |
| 9  | 7       | 28     | 9      | 192.24                          |
| 10 | 3       | 34     | 9      | 246.94                          |
| 11 | 5       | 31     | 7      | 297.31                          |
| 12 | 5       | 35     | 7      | 284.36                          |
| 13 | 7.8     | 31     | 7      | 273.16                          |
| 14 | 5       | 31     | 10     | 245.36                          |
| 15 | 7       | 34     | 5      | 185.94                          |

表4 回归方程方差

| 方差来源           | 自由度 | 平方和       | 均方        | F值        | Prob>F   | 显著性 |
|----------------|-----|-----------|-----------|-----------|----------|-----|
| Model          | 9   | 36 851.63 | 4 094.63  | 8 885.85  | <0.000 1 | 极显著 |
| A-红曲添加量        | 1   | 6 670.13  | 6 670.13  | 14 475.00 | <0.000 1 | 极显著 |
| B-主酵温度         | 1   | 3 065.44  | 3 065.44  | 6 652.40  | <0.000 1 | 极显著 |
| C-主酵时间         | 1   | 100.82    | 100.82    | 218.79    | <0.000 1 | 极显著 |
| AB             | 1   | 397.88    | 397.88    | 863.44    | <0.000 1 | 极显著 |
| AC             | 1   | 274.17    | 274.17    | 594.97    | <0.000 1 | 极显著 |
| BC             | 1   | 5 451.86  | 5 451.86  | 11 831.21 | <0.000 1 | 极显著 |
| A <sup>2</sup> | 1   | 13 244.93 | 13 244.93 | 28 743.16 | <0.000 1 | 极显著 |
| B <sup>2</sup> | 1   | 5 432.06  | 5 432.06  | 11 788.24 | <0.000 1 | 极显著 |
| C <sup>2</sup> | 1   | 6 947.92  | 6 947.92  | 15 077.84 | <0.000 1 | 极显著 |
| 残差             | 5   | 2.30      | 0.46      |           |          |     |
| 失拟项            | 1   | 0.074     | 0.074     | 0.13      | 0.733 5  | 不显著 |
| 纯误差            | 4   | 2.23      | 0.56      |           |          |     |
| 总差             | 14  | 36 853.93 |           |           |          |     |

注: “Prob>F” < 0.05, 代表研究的因素是显著因素

上述方差分析表明, AB, AC和BC的相互作用都显著, 曲面图如图4~图6所示。

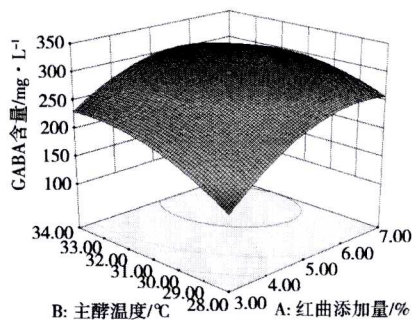


图4 红曲添加量和主酵温度相互作用对GABA含量的影响

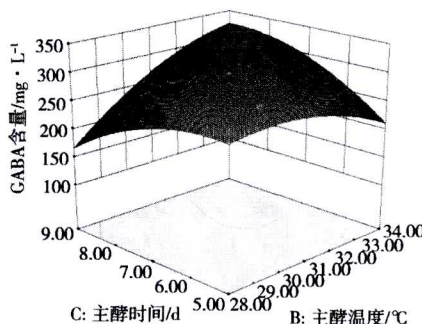


图5 红曲添加量和主酵时间相互作用对GABA含量的影响

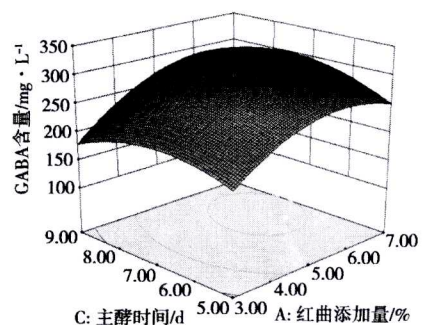


图6 主酵温度和主酵时间相互作用对GABA含量的影响

以上述的试验结果和回归方程各项的方差分析为基础, 用响应面分析法对客家黄酒产GABA的条件进行优化, 得到客家黄酒产GABA的最佳条件为红曲添加量6.5%, 主酵温度32℃, 主酵时间6 d, 此条件下GABA含量达到309.09 mg/L。

2.5 验证试验

依据设计表(表5)来进行验证试验, 以验证2.4得到的客家黄酒产GABA最佳工艺条件的可靠性。从表5看出, 试验4的GABA含量最高, 因此客家黄酒产GABA的最佳条件为红曲添加量6.5%, 主酵温度32℃, 主酵时间6 d, 此条件下GABA含量达到309.09

mg/L。

表5 验证试验设计表

| 序号 | 红曲添加量/% | 主酵温度/℃ | 主酵时间/d | GABA含量/<br>mg·L <sup>-1</sup> |
|----|---------|--------|--------|-------------------------------|
| 1  | 7.8     | 31     | 7      | 273.16                        |
| 2  | 5       | 35     | 7      | 284.36                        |
| 3  | 5       | 31     | 7      | 298.42                        |
| 4  | 6.5     | 32     | 6      | 309.09                        |

## 2.6 工艺优化黄酒与市售客家黄酒 $\gamma$ -氨基丁酸含量的比较

从表6可知,不同品牌之间的客家黄酒GABA含量有一定差异,这是因为不同品牌的客家黄酒酿造用的酒曲和发酵工艺条件有差异。与其他市售客家黄酒相比,采用优化工艺条件酿制的客家黄酒GABA含量较高,分别是HL客家黄酒的2.13倍、LXG客家黄酒的2.65倍,是富含GABA的黄酒。

表6 与市售客家黄酒GABA含量的比较

| 品牌       | GABA含量/mg·L <sup>-1</sup> |
|----------|---------------------------|
| HL       | 145.32                    |
| LXG      | 116.74                    |
| 优化后的客家黄酒 | 309.09                    |

## 2.7 工艺优化黄酒与市售客家黄酒的电子舌分析

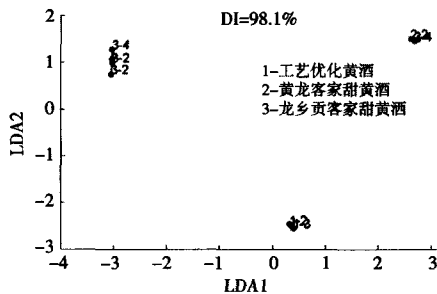


图7 黄酒的判别函数分析图

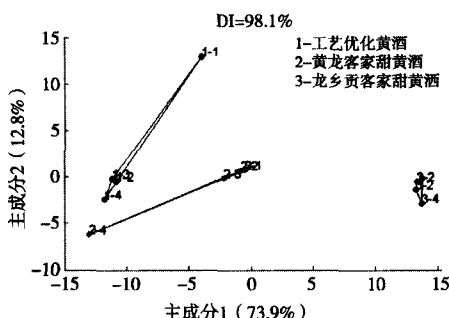


图8 黄酒的主成分分析图

由图7可以看出,工艺优化黄酒、黄龙客家甜黄酒、龙乡贡客家甜黄酒分布在图中的不同区域内,相互之间没有重叠,说明电子舌能将这3种黄酒很好地区分开。从图8可知,主成分1和主成分2的总贡献率

为86.7%,基本能够代表样品的整体信息。工艺优化黄酒和黄龙客家甜黄酒在图中距离接近,龙乡贡客家甜黄酒与工艺优化黄酒、黄龙客家甜黄酒在图中距离较远,这说明工艺优化黄酒与黄龙客家甜黄酒在滋味上差异不大,而龙乡贡客家甜黄酒与优化黄酒、黄龙客家甜黄酒在滋味上差异较大。客家黄酒的口感和风味是吸引消费者购买的主要因素之一,是一个非常重要的指标。总体来说,工艺优化客家黄酒的口感柔和清醇、滋味协调。

## 3 结论与讨论

红曲添加量、主酵温度和主酵时间对客家黄酒中GABA含量有较大影响,利用响应面分析法对红曲添加量、主酵温度和主酵时间3个因素进行优化,得到模型方程:  $GABA \text{ 含量 (mg/L)} = 298.36 + 40.84A + 27.68B + 5.02C - 14.10AB + 11.71AC + 52.21BC - 41.44A^2 - 26.54B^2 - 30.01C^2$  (其中, A为红曲添加量, B为主酵温度, C为主酵时间),确定了最佳发酵工艺条件为红曲添加量6.5%,主酵温度32℃,主酵时间6d,此条件下酿造的广东客家黄酒中GABA含量达到309.09 mg/L,高于市售客家黄酒,且电子舌分析得到工艺优化黄酒与市售黄龙客家甜黄酒在滋味上差异不大。

在后续的试验中,可考虑浸米时间、蒸饭温度和白酒添加量等因素对GABA的影响,并进一步优化客家黄酒生产工艺。还有,可进一步筛选酒曲微生物得到高产GABA的菌株,然后将筛选得到的高产GABA菌株与酿酒微生物混合制曲,再结合优化的发酵工艺条件,生产出富含GABA含量高且口感风味更优的客家黄酒。

### 参考文献:

- [1] 陈晓芸. 广东客家娘酒传统酿造工艺研究及主要酒曲微生物的分离和特性[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
- [2] 冯爱军. 广东客家娘酒中风味物质研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [3] 谢广发, 戴军, 赵光整, 等. 黄酒中的 $\gamma$ -氨基丁酸及其功能[J]. 中国酿造, 2005(3): 49-50.
- [4] 方晓弟, 白卫东, 赵文红, 等. 响应面法优化低聚异麦芽糖客家娘酒的发酵工艺[J]. 中国酿造, 2013, 32(2): 41-44.
- [5] 王晓丹, 胡宝东, 班世栋, 等. 酱香型大曲酶系与大曲中微生物产酶关系的研究[J]. 酿酒科技, 2015(9): 1-7.