

响应面法优化蜡质芽孢杆菌 低产正丙醇发酵工艺

唐浪,舒梨,赵兴秀,赵长青*

(四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000)

摘要:为优化从浓香型白酒酿酒大曲和糟醅中分离出的低产正丙醇蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)发酵工艺,本文通过单因素试验考察该菌发酵时间、接种量、发酵温度以及发酵液初始 pH 四个主要因素对发酵液中正丙醇含量的影响。然后以正丙醇含量为响应值,进行响应面分析和优化,建立了*B.cereus* 发酵工艺的回归模型。结果表明,最佳发酵工艺为发酵时间 33 h,接种量 4.9%,发酵温度 32 ℃,发酵液初始 pH7.0。在此条件下,发酵液中正丙醇含量为 (0.70 ± 0.0012) mg/100 mL,和模型的预测值相吻合。

关键词:蜡质芽孢杆菌,正丙醇,发酵工艺,响应面法

Optimization of Low Yield Positive N-propyl Alcohol Fermentation Process of *Bacillus cereus* by Response Surface Methodology

TANG Lang, SHU Li, ZHAO Xing-xiu, ZHAO Chang-qing*

(College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: In order to optimize the separation of Luzhou flavor liquor Daqu and fermented grains in the low yield of n-propyl alcohol fermentation process of *Bacillus cereus*, single factor experiments were conducted to investigate the effects of four main factors, including fermentation time, inoculation amount of *Bacillus cereus*, fermentation temperature and initial pH of fermentation broth, on the content of n-propyl alcohol in fermentation broth. Then the response surface analysis and optimization were carried out with the response value of normal as the response value to establish a regression model for the fermentation process of *Bacillus cereus*. The results showed that the optimum fermentation time was 33 h, the inoculation amount of *Bacillus cereus* was 4.9%, the fermentation temperature was 32 ℃, and the initial pH of fermentation broth was pH7.0. Under the condition, the content of n-propyl alcohol in the fermentation broth was (0.70 ± 0.0012) mg/100 mL, which had accordance with the predicted value of the model.

Key words: *Bacillus cereus*; n-propyl alcohol; fermentation process; response surface method

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2018)18-0170-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.18.030

引文格式:唐浪,舒梨,赵兴秀,等.响应面法优化蜡质芽孢杆菌低产正丙醇发酵工艺[J].食品工业科技,2018,39(18):170-175,180.

正丙醇作为白酒发酵过程中的高沸点副产物,是白酒中的一种香气物质^[1],也是白酒中苦味的主要来源之一^[2],其含量过高不但影响白酒的品质,还会影响人体神经系统^[3]。我国国标 GB/T 10343-2002《食用酒精》中对其在食用酒精中的含量做了规定(≤ 100 mg/L)^[4]。如何降低食用酒精中正丙醇的含量,提高食用酒精质量,是制酒行业不可避免的问题,极具研究意义。

傅其军等^[5]研究了食用酒精的酒度和生产过程

中精馏塔底温与正丙醇含量的关系,并在生产中做出了相应优化。谢文华^[6]研究了正丙醇的性质和来源,并通过调整发酵液组成、优化提取工艺等方法降低食用酒精中正丙醇的含量,提高了食用酒精质量。罗惠波等^[7]采用模拟固态发酵的方法,通过减少水用量、加糠量以及投粮量,增大加曲量,可降低白酒中正丙醇含量。张翠英等^[8]把低产正丙醇优势酿酒酵母工程菌应用在小曲酒的酿造中,达到了降低小曲酒中正丙醇含量的目的。可见,目前相关领域研究

收稿日期:2018-01-02

作者简介:唐浪(1995-),男,本科,研究方向:食品微生物,E-mail:tanglang20100304@163.com。

*通讯作者:赵长青(1981-),女,博士,教授,研究方向:食品微生物,E-mail:zhaocq2010@163.com。

基金项目:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2015-11);四川理工学院“泸州老窖科研奖学金”项目(15ljzk09);四川省大学生创新创业训练计划项目(201510622054)。

主要体现在白酒生产设备改进、发酵工艺优化以及优选酿酒酵母等方面。而将优势功能芽孢杆菌应用至白酒发酵以降低白酒中正丙醇含量的研究,则鲜有报道。

针对这一领域研究的不足,本课题组在之前的试验中从浓香型白酒酿酒大曲和糟醅中分离出了低产正丙醇的功能芽孢杆菌—蜡质芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[9]。在这一基础上,本研究通过单因素实验和响应面法对该*B.cereus*发酵工艺参数进行优化,以期进一步降低*B.cereus*发酵过程中产生的正丙醇含量,为将*B.cereus*应用至浓香型白酒传统酿造工艺提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蜡质芽孢杆菌(*B.cereus*)本实验室分离和保存,用于苏氨酸液体发酵;乙酸丁酯、正丙醇 色谱纯,天津市光复精细化工所;无水乙醇 优级纯,成都市科隆化学品有限公司;蛋白胨酵母膏、琼脂、巴豆酸 分析纯,成都市科隆化学品有限公司。

Agilent 7890A 型气相色谱仪 美国 Agilent 公司;DPH-9272 型电热恒温培养箱 上海慧泰仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制 LB(Luria-Bertani)固体培养基^[10]:蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,氯化钠 10 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL,pH7.0,121 ℃灭菌 20 min;

种子培养基:LB 液体培养基:蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水 1000 mL,pH7.0,121 ℃灭菌 20 min;

苏氨酸液体发酵培养基^[11]:葡萄糖 30 g,酵母膏 1 g,氯化钠 6 g,巴豆酸 2 g,苏氨酸 2.5 g,蒸馏水 1000 mL,115 ℃灭菌 30 min。

1.2.2 种子液的制备 将保存于斜面培养基中的*B.cereus*取出,接种于 LB 固体培养基上进行平板划线,置于 37 ℃培养箱中倒置培养 24 h,以此操作纯化 3 次,并接种斜面于 4 ℃保存。将菌株从斜面上取一环至 100 mL 已灭菌的种子培养基中,置于 37 ℃、150 r/min 摇床中培养,后将其菌落数稀释为 10⁷ CFU/mL,作为种子液备用。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 发酵时间对发酵液中正丙醇含量的影响 将苏氨酸液体发酵培养基的初始 pH 调为 8.0,按 5% 接种量接入种子液,150 r/min 摇床培养,于 37 ℃下分别发酵 24、36、48、60、72 h。发酵结束后,测定发酵液中正丙醇含量。

1.2.3.2 接种量对发酵液中正丙醇含量的影响 将苏氨酸液体发酵培养基的初始 pH 调为 8.0,分别按 1%、2.5%、5%、7.5%、10% 接种量接入种子液,150 r/min 摇床培养,于 37 ℃下发酵 36 h。发酵结束后,测定发酵液中正丙醇含量。

1.2.3.3 发酵温度对发酵液中正丙醇含量的影响 将苏氨酸液体发酵培养基的初始 pH 调为 8.0,按 5% 接种量接入种子液,150 r/min 摇床培养,分别

于 22、27、32、37、42 ℃下发酵 36 h。发酵结束后,测定发酵液中正丙醇含量。

1.2.3.4 发酵液初始 pH 对发酵液中正丙醇含量的影响 将苏氨酸液体发酵培养基的初始 pH 分别调为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,按 5% 接种量接入种子液,150 r/min 摇床培养,于 32 ℃下发酵 36 h。发酵结束后,测定发酵液中正丙醇含量。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素实验的基础上,选取发酵时间(A)、接种量(B)、发酵温度(C)和发酵液初始 pH(D)作为响应变量,以正丙醇含量为响应值,采用 Box-Behnken 试验设计方法,试验因素水平设计见表 1^[12-14]。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface test

因素	水平		
	-1	0	1
A 发酵时间(h)	24	36	48
B 接种量(%)	2.5	5	7.5
C 发酵温度(℃)	27	32	37
D 发酵液初始 pH	6.0	7.0	8.0

1.2.5 正丙醇的测定方法 色谱条件:色谱柱为 DB-WAX(60.0 m×0.25 mm×0.25 μm)毛细管色谱柱,进样口温度 210 ℃,检测器温度 230 ℃;柱箱升温程序:起始 40 ℃,保持 1 min,6 ℃/min 升至 180 ℃保持 2 min,10 ℃/min 升至 220 ℃,保持 5 min,运行时间 35 min;载气: N₂, N₂: H₂ = 80: 20,载气流量: 5 mL/min,载气压力:0.08 MPa,进样量 1 μL。

标准溶液的配制:分别准确吸取乙酸丁酯、正丙醇色谱纯标准试剂 2 mL 于 100 mL 容量瓶中,用体积分数为 50% 的乙醇(超纯水稀释无水乙醇得到)定容至 100 mL,体积分数为 2%。准确吸取体积分数为 2% 的各标准溶液各 3 mL 于 25 mL 容量瓶,用 50% 乙醇溶液定容至刻度,用于建立系统模板和计算校正因子。

模板建立和校正因子的计算:根据各种物质在同一色谱柱和相同仪器条件下有确定不变的保留值,因此可以定性混合标准液中各种成分,确定其出峰顺序。取混合标准液 1 μL 进样色谱分析,进样 2 次,确定出峰顺序,定性混合标准液中各种成分。出峰顺序依次为正丙醇、乙酸丁酯(内标)。校正因子 = 内标物峰面积 × 标准物质浓度 / 内标物浓度 / 标准物质峰面积。

发酵液测定:发酵液放入高速离心机中,6000 r/min 离心 6 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜后备用。取离心后的发酵液 1.5 mL,加入体积分数为 2% 的标准内标物(乙酸丁酯)0.15 mL,内标物浓度为 146.109 mg/100 mL。混匀后,再与 f 值相同条件下测定。正丙醇浓度 = 校正因子 × 正丙醇峰面积 × 内标物质量浓度 / 内标物峰面积。

1.3 数据处理

单因素实验数据处理采用美国 Microsoft Corporation 公司的 Microsoft Excel 2010 软件进行数

据分析并制成柱状图;响应面试验数据处理采用美国 Stat Ease 公司的 Design-Expert 8.0.6 软件,统计差异比较采用软件中的方程显著性检验操作,通过方差分析检验($p < 0.05$)模型及因素的显著性。所有实验重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 校正因子

如表 2 所示,混合标准样品(正丙醇、乙酸丁酯)中两种成分相对标准偏差(RSD) $< 5\%$,校正因子可靠,适用于香气成分定量分析^[15-17]。

表 2 混合标准液的校正因子

Table 2 Correction factors for the mixed standard solution

实验号	成分	质量浓度 (mg/100 mL)	平均校正 因子 f	相对标准 偏差(%)
1	乙酸丁酯	211.800	1.0000	0.00
2	正丙醇	192.864	1.3705	3.32

2.2 色谱分析

图 1 是混合标准样品(正丙醇、乙酸丁酯)的气相色谱离子流色谱图。由图 1 可知,两种混合标准样品的溶液离子流色谱出峰清楚,因此是可信的。

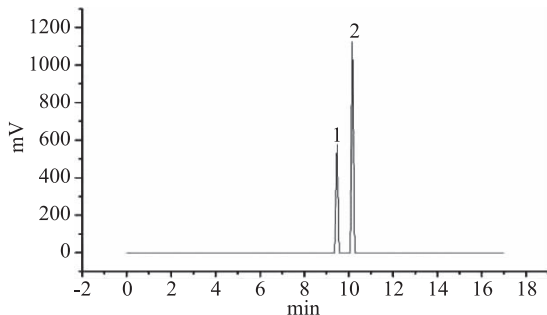


图 1 混合标准溶液离子流色谱图

Fig.1 Total ion current chromatogram of mixed standard solution

注:1:正丙醇;2:乙酸丁酯。

2.3 单因素实验

2.3.1 发酵时间对发酵液中正丙醇含量的影响 由图 2 可知,随着发酵时间的延长,发酵液中正丙醇含量先降低后升高。这是因为 24 h 之前,发酵处于起始阶段,*B.cereus* 在生长和增殖过程中产生了一定的正丙醇,导致正丙醇较多。24~48 h 时,发酵液糖分及其它营养物质充足,*B.cereus* 代谢良好,相应正丙醇的产生受到抑制,之前产生的正丙醇又被利用分解,正丙醇含量较低^[18]。48 h 之后细菌老化,营养物质缺乏,正丙醇逐渐积累。故选择发酵时间 24、36 和 48 h 作为响应面试验的优化水平。

2.3.2 接种量对发酵液中正丙醇含量的影响 由图 3 可知,随着接种量的增加,发酵液中正丙醇含量逐渐降低。这是因为接种量的增加使得 *B.cereus* 繁殖加快,发酵液的糖分消耗加快,加速了发酵的完成,从而避免了正丙醇的积累,所以接种量的增大有利于低产正丙醇。但是考虑到实际运用到白酒发酵时,过多接种 *B.cereus* 会严重影响白酒的口感,是不

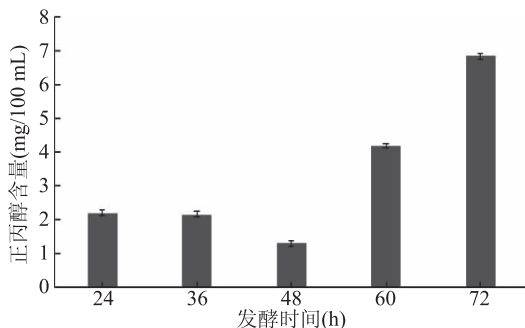


图 2 发酵时间对发酵液中正丙醇含量影响

Fig.2 Effect of fermentation time on the content of n-propyl alcohol in the fermentation broth

可取的^[19]。故选择接种量 2.5%、5% 和 7.5% 作为响应面试验的优化水平。

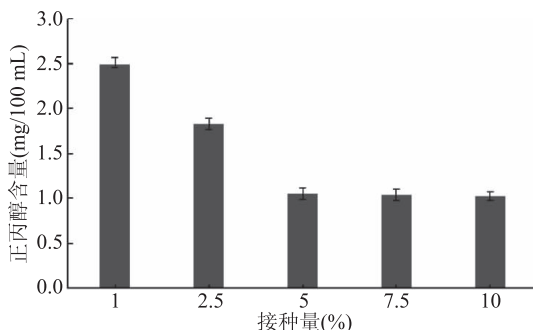


图 3 接种量对发酵液中正丙醇含量的影响

Fig.3 Effect of inoculation amount of *B.cereus*

on the content of n-propyl alcohol in the fermentation broth

2.3.3 发酵温度对发酵液中正丙醇含量的影响 由图 4 可知,随着发酵温度的升高,发酵液中正丙醇含量逐渐升高。这是因为发酵温度升高会加强蛋白质分解和促进正丙醇的生成。但是过低的发酵温度会导致 *B.cereus* 活性不足,不利于它的正常繁殖和代谢。当实际运用到白酒发酵时就会延长白酒发酵的主发酵期,还会抑制其它香味物质的产生,进而影响白酒的品质^[20]。故选择发酵温度为 27、32、37 °C 作为响应面试验的优化水平。

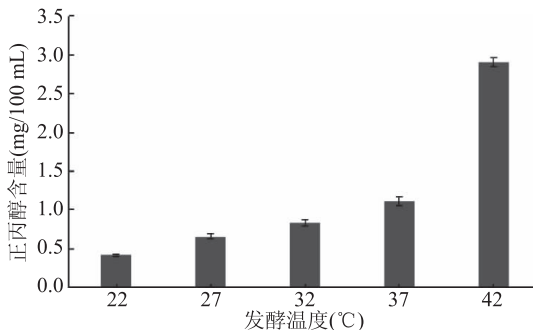


图 4 发酵温度对发酵液中正丙醇含量的影响

Fig.4 Effect of fermentation temperature on the content of n-propyl alcohol in the fermentation broth

2.3.4 发酵液初始 pH 对发酵液中正丙醇含量的影响 由图 5 可知,随着发酵液初始 pH 的升高,发酵液中正丙醇含量先降低后升高。这是因为酸性和碱性条件下 *B.cereus* 的正常代谢受到抑制,但是细菌体

内产正丙醇的相关酶却还具有相当的活性,它们促进了正丙醇的产生,导致发酵液中正丙醇的积累^[21]。中性条件下代谢正常,正丙醇的产生也受到抑制,发酵液中正丙醇含量较低。故选择 pH 为 6.0、7.0 和 8.0 作为响应面试验优化水平。

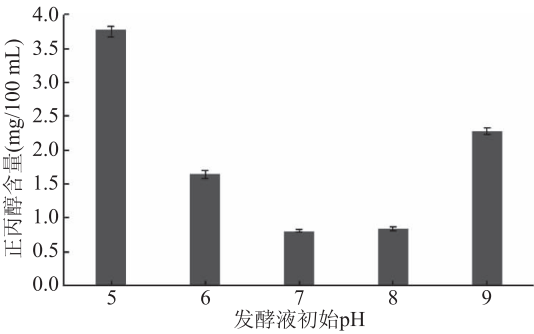


图5 发酵液初始 pH 对发酵液中正丙醇浓度影响

Fig.5 Effect of initial pH of fermentation broth on the content of n-propyl alcohol in the fermentation broth

2.4 响应面优化

响应面试验设计及结果见表 3。

将试验数据用 Design-Expert 软件进行多元拟合,得到了以正丙醇含量为目标函数的回归方程: Y (正丙醇含量) = $0.88 - 0.10A + 0.009B - 0.018C - 0.021D + 0.25AB + 0.005AC - 0.18AD - 0.033BC + 0.15BD - 0.22CD + 0.76A^2 + 0.52B^2 + 0.46C^2 + 0.61D^2$

响应面回归模型的方差分析见表 4。由表 4 可以看出,模型 $p < 0.001$ (极显著),失拟项 $p = 0.0939 > 0.05$ (不显著),说明该模型对于本试验拟合性较好,试验误差小。确定系数 $R^2 = 0.9709$,模型修正系数 $R^2_{Adj} = 0.9418$,说明该模型能解释 94.18% 的响应值变化,也表明了该模型拟合程度较好。变异系数 $CV = 6.58\%$ 说明模型的重现性好,该模型可用于优化 *B.cereus* 低产正丙醇发酵工艺。

此外,显著性检验表明,对正丙醇含量的影响次序为:A(发酵时间) > D(发酵液初始 pH) > C(发酵温度) > B(接种量)。另外,A 发酵时间和 B 接种量的交互项、A 发酵时间的二次项、B 接种量的二次项、C 发酵温度的二次项、D 发酵液初始 pH 的二次项对正丙醇含量的影响极显著($p < 0.001$);A 发酵时间和 D 发酵液初始 pH 的交互项、C 发酵温度和 D 发酵液

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface test

标准序号	运行序号	A 发酵时间	B 接种量	C 发酵温度	D 发酵液初始 pH	正丙醇含量(mg/100 mL)
1	15	-1	-1	0	0	2.60
2	18	1	-1	0	0	1.82
3	10	-1	1	0	0	2.08
4	6	1	1	0	0	2.32
5	1	0	0	-1	-1	1.64
6	12	0	0	1	-1	2.25
7	3	0	0	-1	1	2.16
8	25	0	0	1	1	1.91
9	21	-1	0	0	-1	2.13
10	4	1	0	0	-1	2.25
11	2	-1	0	0	1	2.54
12	7	1	0	0	1	1.93
13	22	0	-1	-1	0	1.89
14	5	0	1	-1	0	1.93
15	29	0	-1	1	0	1.79
16	13	0	1	1	0	1.70
17	11	-1	0	-1	0	2.22
18	9	1	0	-1	0	2.10
19	8	-1	0	1	0	2.09
20	28	1	0	1	0	1.99
21	19	0	-1	0	-1	2.24
22	20	0	1	0	-1	2.04
23	23	0	-1	0	1	1.69
24	24	0	1	0	1	2.07
25	17	0	0	0	0	0.90
26	26	0	0	0	0	0.99
27	27	0	0	0	0	0.84
28	14	0	0	0	0	0.85
29	16	0	0	0	0	0.82

表4 正丙醇含量响应面回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of the response surface regression model of the concentration of n-propyl alcohol

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	6.95	14	0.50	33.38	<0.0001	***
A	0.13	1	0.13	8.76	0.0104	*
B	0.0010	1	0.0010	0.068	0.7984	
C	0.0036	1	0.0036	0.25	0.6268	
D	0.0052	1	0.0052	0.35	0.5634	
AB	0.26	1	0.26	17.49	0.0009	***
AC	0.0004	1	0.0004	0.0067	0.9358	
AD	0.13	1	0.13	8.96	0.0097	**
BC	0.0042	1	0.0042	0.28	0.6024	
BD	0.0840	1	0.084	5.66	0.0322	*
CD	0.18	1	0.18	12.43	0.0034	**
A ²	3.76	1	3.76	252.76	<0.0001	***
B ²	1.78	1	1.78	119.65	<0.0001	***
C ²	1.38	1	1.38	92.80	<0.0001	***
D ²	2.40	1	2.40	161.63	<0.0001	***
残差	0.21	14	0.015			
失拟项	0.19	10	0.019	4.08	0.0939	
纯误差	1.019	4	0.0046			
总和	7.16	28				
R ²	0.9709					
R _{Adj} ²	0.9418					
CV(%)	6.58					

注: $p < 0.05$:差异显著; $p < 0.01$:差异高度显著; $p < 0.001$:差异极显著。

初始 pH 的交互项对正丙醇含量影响高度显著($p < 0.01$);A 发酵时间、B 接种量和 D 发酵液初始 pH 的交互项对正丙醇含量影响显著($p < 0.05$);其它因素对正丙醇含量的影响不显著($p > 0.05$)。

根据回归方程得到不同因子对正丙醇含量的响应面结果见图 6。图 6 直观地给出了各个因子交互作用的响应面 3D 图和等高线分析图。响应面 3D 图曲面坡度陡峭程度越大对应两因素对发酵液中正丙醇含量的影响就越大^[22]。此外,等高线形状也反映了因素之间交互作用的强弱,椭圆程度越高表示两因素交互作用越显著,反之表示交互作用不明显^[23]。通过响应面陡峭程度分析发现,A(发酵时间)对正丙醇含量的影响最大,其次是 D(发酵液初始 pH)和 C(发酵温度),B(接种量)对正丙醇含量的影响最小。通过等高线分析发现 AB、AD、BD、CD 交互作用对应等高线均为椭圆形,说明各因素交互作用均显著($p < 0.05$),进一步分析其椭圆程度,得到各因素交互对发酵液中正丙醇含量的影响程度为:AB > CD > AD > BD。与表 4 方差分析结果一致。

2.5 验证实验

依据建立的响应面模型,以正丙醇含量最低为优化条件,得到最优的发酵工艺条件为:发酵时间 32.96 h,接种量 4.92%,发酵温度 32.15℃,发酵液初始 pH7.04,得到正丙醇含量的预测值为 0.69 mg/100 mL,考虑到实际操作的便捷性,将该工艺条件简化为发酵时间 33 h,接种量 4.9%,发酵温度 32℃,发酵液初

始 pH7.0。按照该简化条件进行 3 次重复试验,所得发酵液中正丙醇含量为 (0.70 ± 0.0012) mg/100 mL,吻合度达到 98.6%,说明该模型很好地预测了 *B. cereus* 低产正丙醇发酵工艺条件。

3 结论与讨论

依据建立的响应面模型,以正丙醇含量最低为优化条件,结合实际情况,得到最优的发酵工艺条件为:发酵时间 33 h,接种量 4.9%,发酵温度 32℃,发酵液初始 pH7.0,此时,发酵液中正丙醇含量为 (0.70 ± 0.0012) mg/100 mL,吻合度达到预测值的 98.6%,说明该模型很好地预测了 *B. cereus* 低产正丙醇发酵工艺条件。

白酒酿造过程中功能菌影响着窖泥微生物生态功能及酒糟发酵生态,从而决定着白酒的质量和风格^[24]。在浓香型白酒的酿造中,酿酒微生物群中的蜡质芽孢杆菌作为一种重要的功能菌而存在,它影响着正丙醇在内的多种香味物质的产生^[25]。因此本文基于从浓香型白酒酿酒大曲中筛选出的低产正丙醇 *B. cereus*,通过单因素实验,运用响应面法优化得到了最优发酵工艺。该发酵工艺条件下发酵液中正丙醇含量符合中国国标优级酒要求^[26]。如果将该 *B. cereus* 及发酵工艺条件应用至浓香型白酒传统酿造工艺,将有利于提高浓香型白酒品质。

参考文献

- [1] 宋波.白酒中各种成分对酒质的影响[J].酿酒科技,2011,210(10):65-67.

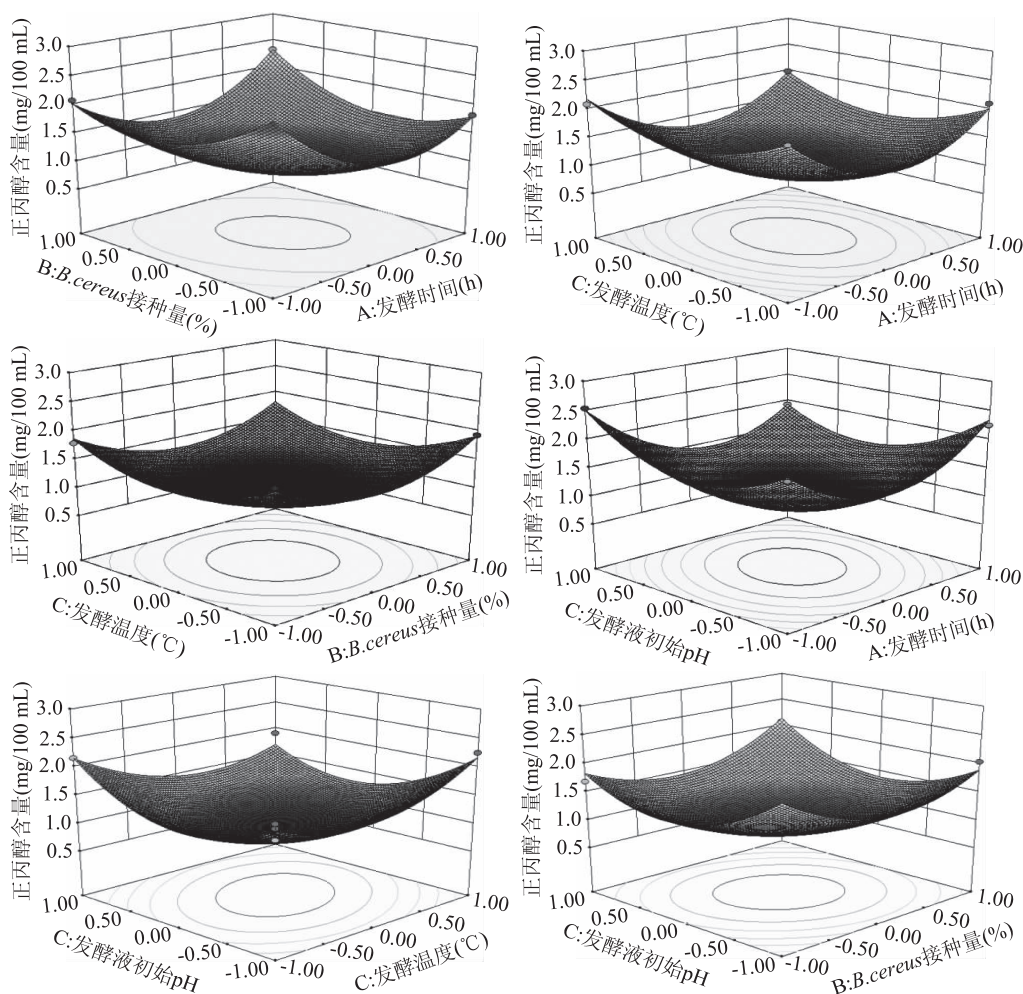


图6 各因素互交对发酵液中正丙醇含量的影响

Fig.6 Effect of the intercross of various factors on the content of n-propyl alcohol in the fermentation broth

[2] Genovese A, Piombino P, Gambuti A, et al. Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations[J]. Food Chemistry, 2009, 114(1): 100-107.

[3] 严锦, 方尚玲, 蒋威, 等. 降低小曲酒中杂醇油含量的研究进展[J]. 酿酒, 2011, 39(6): 32-35.

[4] 曾文生. 降低食用酒精产品正丙醇含量的探讨[J]. 企业科技与发展, 2012(13): 48-49.

[5] 傅其军, 韦文昌. 浅谈如何降低食用酒精中的正丙醇浓度[J]. 轻工科技, 2003(6): 20-21.

[6] 谢文华. 去除正丙醇提高糖蜜酒精质量[J]. 酿酒科技, 2004(3): 49-50.

[7] 罗惠波, 苟云凌, 叶光斌, 等. 影响白酒中高级醇生成的工艺条件研究[J]. 中国酿造, 2011, 30(8): 87-90.

[8] 张翠英, 张艳英. 低产高级醇酿酒酵母工程菌株在小曲酒酿造中的应用[J]. 酿酒科技, 2013(7): 62-64.

[9] 赵长青, 徐莎, 杨阳, 等. 浓香型白酒酿造大曲及糟醅中功能芽孢杆菌的筛选[J]. 食品工业科技, 2017, 38(7): 151-155.

[10] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验(第4版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 32-34.

[11] Rajendra Singh, Ralph E Kunkee. Alcohol dehydrogenase activities of wine yeasts in relation to higher alcohol formation[J]. Applied And Environmental Microbiology, 1976, 32(5):

666-670.

[12] 陈湘宁, 李宗华, 丁轲, 等. 响应面法优化超声波辅助提取柿子多糖工艺研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(7): 105-111.

[13] 王玉莹, 戴洪义. 响应面法优化苹果醋发酵工艺[J]. 中国酿造, 2012, 31(8): 19-23.

[14] 周瑶, 徐怀德, 米林峰, 等. 响应面法优化黄芪酒发酵工艺[J]. 食品科学, 2011(4): 293-296.

[15] 仲海洁, 胡军华, 王晓姣, 等. 气相色谱法测定六味地黄苷糖原料药中的7种残留溶剂[J]. 中国药房, 2016(6): 797-800.

[16] 吴迪, 潘达凡, 王欣, 等. 气相色谱法分析冬虫夏草中的脂肪酸[J]. 郑州轻工业学院学报, 2009, 24(5): 5-7.

[17] 解润芳, 李慧方杰, 刘清, 等. 直接进样气相色谱法测定全血中乙醇的含量[J]. 中国法医学杂志, 2014, 29(6): 553-555.

[18] 王宏, 锁然, 赵然, 等. 发酵条件对红枣白兰地原料酒杂醇油的影响[J]. 酿酒科技, 2016(8): 33-35.

[19] 侯小歌, 王俊英, 李学思, 等. 浓香型白酒糟醅及窖泥产香功能菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1257-1265.

[20] 蒲岚, 李璐, 邱树毅, 等. 发酵温度调控对浓香型白酒主

(下转第180页)

组合已在正交试验中进行了3次测定,测得玛咖中总生物碱提取得率为 $10.01\% \pm 0.78\%$ 。

3 结论

玛咖的种植中有黄、紫、黑3种色型,本实验利用酸水提取法对3种色型的玛咖本的总生物碱提取得率进行优化发现,黄、紫、黑3种色型玛咖最佳提取单因素存在一定的差异。通过单因素试验和正交试验的优化,确定酸水提取3种色型玛咖中总生物碱的最佳条件如下:黄色玛咖的最佳提取工艺条件为料液比1:30(g/mL),提取温度75℃,提取时间5.5 h,在此条件下获得的玛咖总生物碱提取得率为 $9.89\% \pm 0.38\%$;紫色玛咖的最佳提取工艺条件为料液比为1:25(g/mL),提取温度90℃,提取时间5.5 h,在此条件下获得的玛咖总生物碱提取率为 $10.36\% \pm 0.58\%$;黑色玛咖的最佳提取工艺条件为料液比为1:20(g/mL),提取温度85℃,提取时间6 h,在此条件下获得的玛咖总生物碱提取得率为 $10.01\% \pm 0.78\%$ 。研究表明,不同色型玛咖中总生物碱的最佳提取条件有一定差异,或与其各色型玛咖生物碱组成成分的差异相关,这可为玛咖生物碱研究者提供一定参考。

参考文献

- [1] Quiros C F, Epperson A, Hu J, et al. Physiological studies and determination of chromosome number in Maca, *Lepidium meyenii* (Brassicaceae) [J]. Economic Botany, 1996, 50(2): 216-223.
- [2] Gonzales GF, Nieto J, Rubio J, et al. Effect of black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats [J]. Andrologia, 2006, 38(5): 166-172.
- [3] Gonzales GF, Vasquez V, Rodriguez D, et al. Effect of two different extracts of red maca in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia [J]. Asian Journal Andrology, 2007, 9(2): 245-251.
- [4] Choi E H, Kang J I, Cho J Y, et al. Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats [J]. Journal of Function Foods, 2012, 4: 568-573.
- [5] 张永忠, 余龙江, 万军梅, 等. 玛咖醇提物对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 274-276.
- [6] Brooks NA, Wilcox G, Walker KZ, et al. Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures (上接第175页)
- 要香味成分生产影响 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(7): 126-129.
- [21] 刘乃侨, 孙丽华. 改善啤酒酿造过程酶活力方法的研究 [J]. 微生物学杂志, 2011, 31(5): 73-75.
- [22] Doblado-Maldonado A F, Janssen F, Comand S V, et al. A response surface analysis of the aqueous leaching of amylase from maize starch [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 265-272.
- [23] Derrien M, Badr A, Gosselin A, et al. Optimization of a green

of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content [J]. Menopause, 2008, 15(6): 1157-1166.

[7] Clément C, Witschi U, Kreuzer V. The potential influence of plant-based feed supplements on sperm quantity and quality in livestock: A review [J]. Animal Reproduction Science, 2012, 132: 1-10.

[8] Ganzera M, Zhao J P, Muhammad I, et al. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(7): 988-991.

[9] Ilias Muhammad, JianPing Zhao, D Chuck Dunbar, et al. Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca' [J]. Phytochemistry, 2002, 59(1): 105-110.

[10] S Piacente, V Carbone, A Plaza, et al. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(20): 5621-5625.

[11] A Dini, G Migliuolo, L Rastrelli, et al. Chemical composition of *Lepidium meyenii* [J]. Food Chemistry, 1994, 49(4): 347-349.

[12] Obregón L. Maca, Planta Medicinal Y Nutritivo del Pera [M]. Lima: Instituto de Fitoterapia Americana, 1998.

[13] Zheng B L, He K, Kim C H, et al. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats [J]. Urology, 2000, 55(4): 598-602.

[14] Chacón G. Estudio fitoquímico de *Lepidium meyenii* Walp [D]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1962.

[16] 周雪晴, 冯玉红, 张冲, 等. 超临界 CO₂ 萃取结合柱色谱分离罗芙木生物碱 [J]. 精细化工, 2007, 24(2): 154-155, 161.

[16] 胡志国. 卵叶娃儿藤生物碱的提取及其活性功能研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2007.

[17] 浦跃武, 王金全. 超声波提取玛咖多糖的工艺研究 [J]. 食品科技, 2010, 35(3): 174-177.

[18] 杜广香, 浦跃武. 超声波提取玛咖生物碱的工艺研究 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(3): 74-76.

[19] 周雪晴, 冯玉红, 张冲, 等. 超临界 CO₂ 萃取结合柱色谱分离罗芙木生物碱 [J]. 精细化工, 2007, 24(2): 154-155, 162.

[20] 刘树兴, 郭瑞霞, 赵芳. 超声波法提取荷叶生物碱的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(16): 52-55.

[21] 甘瑾, 玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp.) 抗氧化活性及活性物质基础的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.

process for the extraction of lutein and chlorophyll (RSM) [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 79: 170-177.

[24] 涂向勇, 姚继承. 窖泥与基酒成分关系比较研究 [J]. 酿酒科技, 2009, 185(11): 90-93.

[25] 杨春霞, 廖永红, 刘俊雄, 等. 芽孢杆菌分离鉴定及发酵风味分析 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 70-74.

[26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB10343-2008 食用酒精 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.