

# 己酸菌微胶囊的制备及其在浓香型白酒中的应用

汪江波<sup>1</sup>, 朱嘉璐<sup>1</sup>, 荣光玉<sup>1</sup>, 金维君<sup>1</sup>, 何超<sup>2</sup>, 张瑞景<sup>1</sup>, 蔡凤娇<sup>1</sup>, 徐健<sup>1\*</sup>

(1. 湖北工业大学生物工程与食品学院, 工业发酵省部共建协同创新中心, 发酵工程教育部重点实验室, 工业微生物湖北省重点实验室, 武汉 430000; 2. 湖北毕圣泉酒业有限公司, 黄冈 438700)

**摘要:** **目的** 探究己酸菌微胶囊化及其在无窖泥发酵生产浓香型白酒中的应用。**方法** 采用锐孔-凝固浴法制备己酸菌微胶囊, 通过单因素筛选、Box-Behnkn 实验设计和神经网络结合遗传算法优化得到最佳的己酸菌微胶囊制备工艺参数。**结果** 制备己酸菌微胶囊的最佳工艺条件为: 海藻酸钠浓度 1.71%、氯化钙浓度 2.85%、固化时间 37 min, 此时活菌数达到最高, 为  $2.17 \times 10^8$  个/g。对制备好的己酸菌微胶囊进行浓香型白酒无窖泥发酵验证实验, 结果表明, 微胶囊组酒样中的己酸乙酯含量为 4.20 mg/100 mL, 比空白组酒样(0.20 mg/100 mL)提高了 20 倍。**结论** 本研究酿造的白酒无色透明, 酒体谐调, 具有窖香风味, 浓香风格明显。

**关键词:** 己酸菌; 微胶囊; 活菌数; 工艺优化; 神经网络

## Preparation of *Caproic acid bacteria* microcapsules and its application in Nongxiangxing Baijiu

WANG Jiang-Bo<sup>1</sup>, ZHU Jia-Lu<sup>1</sup>, RONG Guang-Yu<sup>1</sup>, JIN Wei-Jun<sup>1</sup>, HE Chao<sup>2</sup>,  
ZHANG Rui-Jing<sup>1</sup>, CAI Feng-Jiao<sup>1</sup>, XU Jian<sup>1\*</sup>

(1. Collaborative Innovation Center of Industrial Fermentation, Key Laboratory of Fermentation Engineering of Ministry of Education, Key Laboratory of Industrial Microbiology of Hubei Province, College of Bioengineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430000, China; 2. Hubei Bishengquan Wine Industry Co., Ltd., Huanggang 438700, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the microencapsulation of *Caproic acid bacteria* and its application in the production of Nongxiangxing Baijiu without cellar mud fermentation. **Methods** The *Caproic acid bacteria* microcapsules were prepared by sharp hole-coagulation bath method. The optimum preparation parameters of *Caproic acid bacteria* microcapsules were optimized by single factor screening, Box-Behnkn experimental design and neural network combined with genetic algorithm. **Results** The optimum conditions for the preparation of *Caproic acid bacteria* microcapsules were as follows: Sodium alginate concentration of 1.71%, calcium chloride concentration of 2.85%, and curing time of 37 minutes, at which time the number of viable bacteria reached a maximum of  $2.17 \times 10^8$  individuals/g. The prepared *Caproic acid bacteria* microcapsules were used to verify the fermentation of Nongxiangxing Baijiu without cellar mud. The results showed that the content of ethyl caproate in the microcapsule group was 4.20 mg/100 mL, which was 20 times higher than that in the blank group (0.20 mg/100 mL). **Conclusion** The Baijiu brewed in this study is colorless and transparent, with a harmonic body, cellar flavor, and

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2021BGD016)、湖北省知识产权局项目(ZXKY2022498)

**Fund:** Supported by the Key Research and Development Plant of Hubei Province (2021BGD016), and the Intellectual Property Office of Hubei Province (ZXKY2022498)

\*通信作者: 徐健, 博士, 副教授, 主要研究方向为发酵工业废弃物的资源化处理和综合利用。E-mail: xujian0218@126.com

\*Corresponding author: XU Jian, Ph.D, Associate Professor, College of Bioengineering and Food, Hubei University of Technology, No.28 Nanli Road, Hongshan District, Wuhan 430000, China. E-mail: xujian0218@126.com

obvious strong aroma style.

**KEY WORDS:** *Caproic acid bacteria*; microcapsule; viable count; process optimization; neural network

## 0 引言

浓香型白酒是我国 4 种主要香型白酒之一,以其特殊的发酵工艺和典型的口味特点而闻名<sup>[1]</sup>,酒体香气浓郁、口感绵甜,很受市场欢迎<sup>[2]</sup>。通过研究表明,浓香型白酒中最主要的气味特征是水果味、甜味和花香味,这些香味主要是由酯类物质产生的,包括己酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯和乙酸乙酯等<sup>[3-4]</sup>。其中,由窖泥中己酸菌产生的己酸和乙醇进行缩合形成的己酸乙酯是浓香型白酒的典型风味成分<sup>[5]</sup>,也是 GB/T 10781.1—2021《白酒质量要求 第 1 部分:浓香型白酒》中的一项重要质量指标<sup>[6-7]</sup>。但由于窖泥的存在,使得料醅在出入窖池的过程中主要依靠人力操作,工作强度较大,卫生环境较差,对于实现浓香型白酒的机械自动化生产有一定的难度和挑战<sup>[8]</sup>,还会给酒体带来一些窖泥中的味道,比如泥臭和土腥味<sup>[9-10]</sup>,必须进行再处理,这在一定程度上增加了净化成本<sup>[11-12]</sup>。因此,实现浓香型白酒的无窖泥化生产,是浓香型白酒机械化突破的关键点。目前用于无窖泥生产浓香型白酒的方式主要是将己酸菌进行单独培养制成发酵液,再将发酵液倒入料醅中进行混合发酵<sup>[8]</sup>,但直接使用发酵液容易造成己酸菌过早死亡,对发酵产生影响。

近年来,微胶囊化被证明是一种很有前途的活性物质保护方法<sup>[13]</sup>,它是将目标物料通过一定的技术手段使其包埋封装并制作成一种固体微小颗粒的技术,不仅可以保护活性物质免受有害环境的伤害,保持其生存能力,而且可以在目标位置实现控制释放<sup>[14-15]</sup>。通过这种包埋和控制释放的过程,对目标物料起到一个保护的作用,也可以通过控制释放因素(时间、速度、量和方式等)来使物料充分发挥其功效<sup>[16]</sup>。目前制备微胶囊的主要方法有锐孔法、乳剂法、冷冻喷雾干燥法和静电结合法等<sup>[17-18]</sup>。通过锐孔法进行包埋的主要优点是,在球体形成期间,活性物质被快速包埋在壁材中,整个形成过程中应用条件温和,有助于维持活性物质的高存活率<sup>[19-20]</sup>。海藻酸钠是一种常与锐孔法结合用来制备微胶囊的材料,它来源于褐藻类的海带或马尾藻的离子多糖,通常与钙离子结合作为交联剂用于制备含有活性物质的微胶囊<sup>[21]</sup>,其具有成本低、生物相容性高和对活性物质无毒性等优点<sup>[22]</sup>。目前关于无窖泥发酵浓香型白酒的研究较少,将己酸菌微胶囊化放入料醅中共同发酵生产浓香型白酒的研究更是鲜见。

为了实现无窖泥发酵生产浓香型白酒,本研究选择海藻酸钠为壁材,采用锐孔法使己酸菌微胶囊化,以微胶囊内的活菌数为指标,通过单因素实验、Box-Behnkn 实验

设计和神经网络结合遗传算法优化进一步确定制备己酸菌微胶囊的最佳工艺参数,并将其应用在无窖泥发酵生产浓香型白酒中,初步进行工艺验证,以期为己酸菌微胶囊在无窖泥发酵生产浓香型白酒中的开发和利用提供一定的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

高粱(市售高粱);浓香型大曲(湖北武汉某酒业有限公司)。

己酸菌复合菌液(水原拉梅尔芽孢杆菌属,湖北工业大学酿酒中试基地);海藻酸钠(分析纯,青岛海之林生物科技有限公司);乙酸钠、酵母膏、无水硫酸镁、磷酸氢二钾、硫酸铵、氯化钙、柠檬酸、磷酸氢二钠、碳酸钙、无水乙醇、液体石蜡(分析纯,上海国药集团有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

YXQ-LS-75 立式高温蒸汽灭菌锅(上海楚柏实验设备有限公司);MJP-250 恒温培养箱(上海精宏实验仪器有限公司);DK-8D 恒温水浴锅(常州诺基仪器设备有限公司);HNYC-203T 智能恒温振荡器(天津欧诺仪器股份有限公司);DM1000-LED 生物显微镜(徕卡显微系统上海贸易有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验仪器有限公司);5 mL 一次性使用无菌注射器(广州金塔医用材料有限公司);85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器设备有限公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰技术有限公司);AL104 万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器广州有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌种活化培养

在无菌条件下,将己酸菌复合菌液以 3% 的浓度接种于己酸菌液体培养基中(液体培养基的配方:乙酸钠、酵母膏、无水硫酸镁、磷酸氢二钾、硫酸铵、碳酸钙和无水乙醇),于 36°C 恒温厌氧培养 6 d,连续活化传代 2~3 次,然后将发酵液在 8000 r/min 的条件下离心 5 min,收集菌体沉淀,并用无菌水洗涤 2~3 次,再次离心(8000 r/min, 5 min)沉淀,用高速混匀振荡器使菌体和无菌水充分混合均匀,再次离心(8000 r/min, 5 min),前后重复 3 次,最后用 50 mL 无菌水悬浮菌泥,即为菌悬液,重悬后的菌悬液用于后续的包埋实验,置于 4°C 冷藏柜备用<sup>[23]</sup>。

#### 1.3.2 己酸菌微胶囊的制备

称取海藻酸钠溶于无菌水中,75°C 下水浴加热至海藻

酸钠完全溶解, 制得海藻酸钠溶液, 冷却至室温备用。称取氯化钙溶于蒸馏水中, 灭菌后冷却备用。将制备好的菌悬液以 1:4 (V:V) 的比例与海藻酸钠溶液混合, 搅拌均匀后静置 10 min, 使用一次性无菌注射器吸取混合液, 以距离液面 15 cm 左右的高度缓慢逐滴滴入到氯化钙固化剂中, 形成微囊, 在磁力搅拌器的外力作用下使其均匀固化, 用蒸馏水冲洗 3 次, 洗去固定化微胶囊表面剩余的氯化钙和菌体, 即得湿胶囊, 于 4℃ 冰箱中贮存备用<sup>[24-25]</sup>。

### 1.3.3 己酸菌微胶囊活菌数测定

准确称取微胶囊 1 g, 加入到 9 mL 磷酸盐缓冲溶液中 (pH 7.4), 37℃、230 r/min 的条件下在摇床中进行裂解, 取样, 采用血球计数板进行活菌计数。

### 1.3.4 己酸菌微胶囊的外形与样貌观察

使用数字化扫描电子显微学技术 (scanning electron microscope, SEM) 观测己酸菌微胶囊冷冻干燥后的表面构造, 操作时先在试样台上贴一层导电黏合剂, 再将微胶囊轻轻的粘贴在面上, 并将多余的粉末刮除, 之后再对试样进行表面喷金处理, 随后放入扫描电镜中对微胶囊的外形构造加以观测。

### 1.3.5 酒样理化指标测定

参考 GB/T 10345—2022《白酒分析方法》测定酒样的酒精度、己酸乙酯、总酸、总酯、酸酯总量等理化指标。

### 1.3.6 己酸菌微胶囊制备工艺优化的单因素实验设计

#### (1) 海藻酸钠浓度对微胶囊活菌数的影响

在氯化钙浓度为 2%, 固化时间为 10 min, 海藻酸钠浓度为 0.8%、1.2%、1.5%、1.8%、2.2% 的条件下, 参照 1.3.2 的实验方法制备微胶囊, 以微胶囊内的活菌数为指标, 探究海藻酸钠浓度对己酸菌微胶囊活菌数的影响, 确定海藻酸钠的最佳添加量。

#### (2) 氯化钙浓度对微胶囊活菌数的影响

在海藻酸钠浓度为 1.2%, 固化时间为 10 min, 氯化钙浓度为 1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5% 的条件下, 参照 1.3.2 的实验方法制备微胶囊, 以微胶囊内的活菌数为指标, 探究氯化钙浓度对己酸菌微胶囊活菌数的影响, 确定氯化钙的最佳添加量。

#### (3) 固化时间对微胶囊活菌数的影响

在海藻酸钠浓度为 1.2%, 氯化钙浓度为 2%, 固化时间为 10、20、30、40、50 min 的条件下, 参照 1.3.2 的实验方法制备微胶囊, 以微胶囊内的活菌数为指标, 探究固化时间对己酸菌微胶囊活菌数的影响, 确定最佳的固化时间。

### 1.3.7 工艺优化 Box-Behnkn 实验设计

根据单因素实验, 在其分析结果的基础上选择海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、固化时间为自变量, 微胶囊活菌数为响应值, 进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnkn 实验设计, 对制备己酸菌微胶囊的工艺条件进行优化。实验因素水平如表 1 所示。

表 1 工艺优化 Box-Behnkn 实验设计因素与水平  
Table 1 Factors and levels of Box-Behnkn test design for process optimization

水平	因素		
	海藻酸钠/%	氯化钙/%	固化时间/min
-1	1.2	2.0	20
0	1.5	2.5	30
1	1.8	3.0	40

### 1.3.8 神经网络结合遗传算法优化

为得到更贴合实验结果的拟合效果, 使用 Matlab 2017a 软件对单因素实验和 Box-Behnkn 实验结果进行人工神经网络 (artificial neural network, ANN) 分析。所创建的神经网络包含 1 个输入层、输出层和隐藏层, 其中三者分别有 3、1 和 11 个神经元, 最大迭代次数为 10000, 误差为  $10^{-3}$ 。神经网络构建完成后, 输入数据迭代至最终误差小于设置误差, 此时神经网络已学习完成, 所构建神经网络模型可较好预测实际结果<sup>[26]</sup>。将单因素实验和 Box-Behnkn 实验结果分为 27 个训练组和 5 个实验组, 进行神经网络训练分析实验, 直到预测值与实际输出结果之间的均方误差小于  $10^{-3}$ , 最后运用遗传算法对神经网络分析得到的模型进行最优值求解<sup>[27]</sup>。

### 1.3.9 白酒发酵验证实验

采用优化后的最佳工艺条件制备己酸菌微胶囊, 进行白酒发酵验证实验。以高粱为发酵原料, 经过浸泡、初蒸、复水、复蒸 4 个步骤, 得到开口率达到 80% 以上、内部没有生心的熟粮, 将蒸熟后的高粱置于平地摊开冷却至室温备用; 称取质量为高粱干重 20% 的浓香型大曲, 与摊凉后的高粱充分混匀, 再将制备好的己酸菌微胶囊与大曲高粱混合物搅拌均匀, 己酸菌微胶囊的添加量为粮醅干重的 12%, 入坛发酵 30 d; 将发酵结束后的物料与清蒸后的稻壳进行混匀操作, 蒸馏得到酒样, 对酒样进行进一步的分析测定。以未添加己酸菌微胶囊的粮醅发酵后蒸馏得到的酒样为空白组。

## 1.4 数据处理

利用 Excel 2016、Origin 2021b、Design-Expert 13.0 和 Matlab 2017a 等统计分析软件对实验数据进行处理和作图分析, 所有数据均为 3 次独立平行重复实验的结果, 采用平均值±标准偏差表示, 以  $P < 0.05$  表示具有显著差异性为标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 己酸菌微胶囊的外观样貌分析

图 1 为己酸菌微胶囊的外观图, 其外观形态呈白色小球形, 大小形状均匀, 通过测量得出平均粒径为 0.3 mm 左右, 表面光滑且富有弹性, 基本无拖尾现象, 符合预期实

验结果。通过扫描电镜进一步观察己酸菌微胶囊的表面形态及其样貌,如图 2 所示,冷冻干燥后的己酸菌微胶囊表面凹陷有褶皱,形态不规则,呈蜂窝状,但仍维持完整的球形外观结构,无裂纹和破碎等现象。要经纬等<sup>[28]</sup>通过扫描电镜观察冷冻干燥后的植物乳杆菌微胶囊形态,认为冻干后微胶囊形态保持的较好,与本研究结果相符。上述结果证明本研究所制备的己酸菌微胶囊形态完整,能够较好地保持己酸菌的活性,从而使己酸菌微胶囊在无窖泥发酵浓香型白酒中得到良好应用。



图 1 己酸菌微胶囊外观图

Fig.1 Appearance of *Caproic acid bacteria* microcapsules

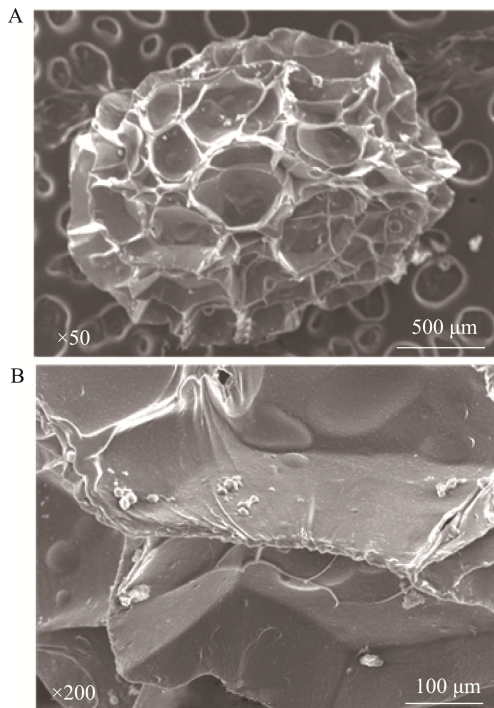


图 2 己酸菌微胶囊的扫描电子显微镜图

Fig.2 Scanning electron microscopy of *Caproic acid bacteria* microcapsules

## 2.2 单因素实验结果分析

### 2.2.1 海藻酸钠浓度对己酸菌微胶囊活菌数的影响

图 3 为不同浓度的海藻酸钠对己酸菌微胶囊活菌数的影响,结果显示,添加不同浓度的海藻酸钠制备微胶囊对己酸菌活菌数有明显影响。可以发现己酸菌的活菌数随着海藻酸钠浓度的增加呈先上升后下降趋势;当海藻酸钠浓度小于 1.5%时,己酸菌活菌数呈上升趋势,这可能是由于低浓度的海藻酸钠黏度较小,不能形成很致密的网络结构,导致其不能有效包埋菌体<sup>[29]</sup>;随着海藻酸钠浓度的提高,对己酸菌的包埋效果增强,当海藻酸钠浓度为 1.5%时,微胶囊活菌数达到最大,与其他实验组有明显差异;随着海藻酸钠的浓度继续增大,微胶囊活菌数反而降低,这可能是因为二者的黏度过高从而使己酸菌菌液混合不均匀。刘月静等<sup>[30]</sup>在制备鼠李糖乳杆菌微胶囊时发现,当海藻酸钠的浓度为 2.0%时效果最好,而本研究中海藻酸钠的浓度为 1.5%时效果最好,可能是制备方法的不同造成结果不同。综上所述,最终选择 1.5%浓度的海藻酸钠来进行后续实验。

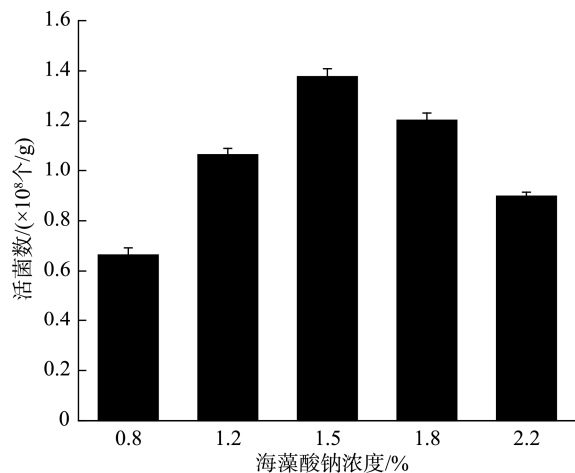


图 3 海藻酸钠浓度对微胶囊活菌数的影响

Fig.3 Effects of sodium alginate concentration on microcapsule viable count

### 2.2.2 氯化钙浓度对己酸菌微胶囊活菌数的影响

图 4 为不同氯化钙浓度对己酸菌微胶囊活菌数的影响,结果显示,微胶囊活菌数随着氯化钙浓度的增加呈先上升后下降趋势。当氯化钙浓度小于 2.5%时,随着氯化钙浓度的提高,己酸菌活菌数呈上升趋势;在氯化钙浓度为 2.5%时,活菌数达到最大;之后再增加氯化钙的浓度,微胶囊活菌数反而降低,原因可能是氯化钙浓度增高,使  $\text{Ca}^{2+}$  含量升高,体系中无法提供给  $\text{Ca}^{2+}$  更多的结合位点,浓度过高导致其溶液密度和表面张力增加,挤出的液滴部分浮于表面不易成形,使得微胶囊活菌数下降<sup>[31]</sup>。杨剖舟等<sup>[32]</sup>在制备长双歧杆菌微胶囊时选择的氯化钙浓度为 2%,

而费国琴等<sup>[33]</sup>在制备溶菌酶微胶囊时选择的氯化钙浓度为3.0%,综上所述,本研究选择以氯化钙浓度为2.5%作为己酸菌微胶囊的最佳制备条件。

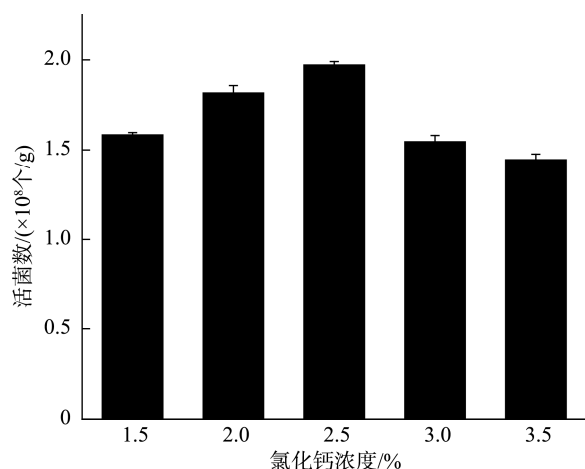


图4 氯化钙浓度对微胶囊活菌数的影响

Fig.4 Effects of  $\text{CaCl}_2$  concentration on microcapsule viable count

### 2.2.3 固化时间对己酸菌微胶囊活菌数的影响

图5为不同固化时间对己酸菌微胶囊活菌数的影响,结果显示,己酸菌活菌数随着固化时间的增加呈先上升后下降的趋势。当固化时间小于30 min时,活菌数呈上升趋势,可能是磁力搅拌过程中,力的作用促进了菌壁分散,增大了菌液与壁材的接触面,从而促进壁材对己酸菌的包埋;当固化时间为30 min时,活菌数达到最大,此时海藻酸钠与己酸菌液充分结合,固化更完全;当固化时间大于30 min时,活菌数反而降低,这可能是由于固化时间的延长,导致微胶囊的脆性增大,使得己酸菌菌液泄露到氯化钙溶液中,从而导致微胶囊中活菌数下降<sup>[34]</sup>。郭宇星等<sup>[35]</sup>认为,海藻酸钠中的钠离子与氯化钙中的钙离子生成海藻

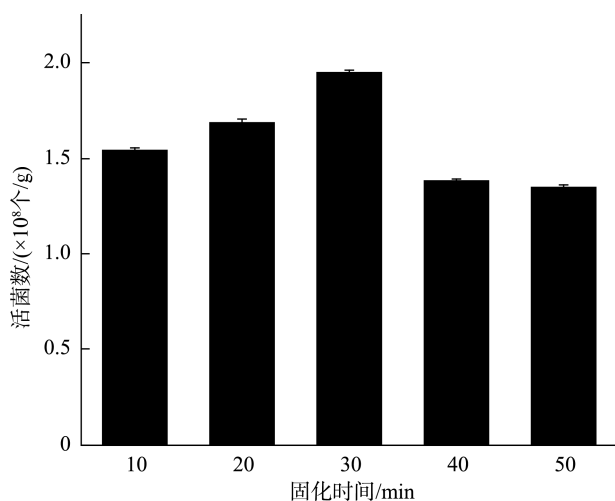


图5 固化时间对微胶囊活菌数的影响

Fig.5 Effects of curing time on microcapsule viable count

酸钙凝胶需要一定的反应时间,但随着反应时间的增加,交联程度会过高,凝胶结构过于紧密,影响细胞的存活率。综上所述,选择30 min作为己酸菌微胶囊的最佳固化时间。

### 2.3 Box-Behnkn 实验设计结果

表2为以海藻酸钠浓度、氯化钙浓度和固化时间3个因素及其对己酸菌微胶囊活菌数的不同影响水平,进行Box-Behnkn实验所得的结果。

表2 工艺优化 Box-Behnkn 实验结果  
Table 2 Process optimization Box-Behnkn experiment results

实验编号	海藻酸钠浓度/%	氯化钙浓度/%	固化时间/min	微胶囊活菌数/( $\times 10^8$ 个/g)
1	0	0	0	1.52
2	0	0	0	1.51
3	0	0	0	1.52
4	1	0	1	1.24
5	0	1	-1	1.82
6	-1	0	-1	1.71
7	1	0	-1	1.57
8	-1	-1	0	1.74
9	0	1	1	1.71
10	0	-1	-1	1.42
11	0	0	0	1.53
12	-1	1	0	1.77
13	-1	0	1	1.47
14	1	-1	0	1.30
15	1	1	0	1.89
16	0	0	0	1.61
17	0	-1	1	1.48

### 2.4 神经网络结合遗传算法优化工艺结果

通过 Matlab 设计神经网络对结果进行优化,ANN能够普遍逼近所有阶的非线性函数,与传统的正交阵列设计和响应面方法相比,神经网络的优越性和准确性更高<sup>[36]</sup>。

如图6A所示,以单因素实验和Box-Behnkn实验结果的前27组数据作为训练组,后5组数据作为测试组,采用“3-11-1”的拓扑结构进行神经网络训练,训练过程进行92次,直到预测值与实际输出结果之间的均方误差小于 $10^{-3}$ 。由图6B可知,此时样本点集中分布在 $Y=X$ 直线附近, $R=0.99875$ ,说明训练值与预测值接近,且具有较好的线性关系,神经网络训练结果良好,可用于预测<sup>[37]</sup>。通过对神经网络训练模型进行优化,再结合遗传算法,最终得到一个己酸菌微胶囊的最佳工艺参数:海藻酸钠浓度1.7097%、氯化钙浓度2.8495%、固化时间36.9897 min,该条件下得到己酸菌微胶囊活菌数的预测含量为 $2.1925 \times 10^8$ 个/g。

为验证神经网络模型结合遗传算法优化己酸菌微胶囊工艺的可行性,采用预测的最佳工艺条件进行己酸菌微胶囊的制备,结合实际工艺情况以海藻酸钠浓度 1.71%、氯化钙浓度 2.85%、固化时间 37 min 为工艺条件进行 3 次平行实验,得到的己酸菌微胶囊的平均活菌数为  $2.17 \times 10^8$  个/g,实验符合值为 98.97%。

## 2.5 白酒发酵验证结果

以优化后的最佳工艺条件制备己酸菌微胶囊,并将己酸菌微胶囊放入待发酵的料醅中共同发酵,蒸馏后得到实

验组酒样。将未添加己酸菌微胶囊的料醅发酵后进行蒸馏,得到空白组酒样。表 3 为两组酒样的理化指标,可以发现,在同等酒精度的条件下,实验组酒样的总酸、总酯、酸酯总量、己酸乙酯含量均明显高于空白组酒样。其中实验组和空白组酒样的己酸乙酯含量分别为 4.20 mg/100 mL 和 0.20 mg/100 mL,实验组酒样比空白组酒样提高了 20 倍,证明己酸菌微胶囊用于无窖泥发酵生产浓香型白酒的方法在技术上可行。此外,对实验组酒样进行了感官品评,酒体无色透明、有窖香风味、入口醇厚绵甜,具有一定的浓香风格。

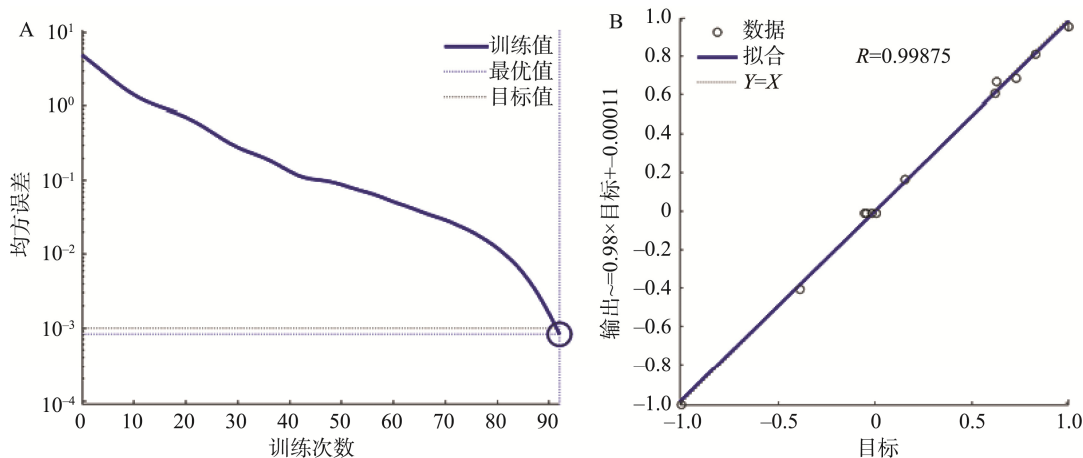


图 6 神经网络训练结果中预测值与实际值的均方误差随训练次数的变化情况(A)及预测值与实际值的相关性(B)

Fig.6 Mean square error of the predicted value and the actual value changes with the number of training sessions (A) and correlation between the predicted value and the actual value (B) in neural network training results

表 3 酒样理化指标  
Table 3 Physical and chemical indexes of wine samples

	酒精度/%vol	总酸/(g/L)	总酯/(g/L)	酸酯总量/(mmol/L)	己酸乙酯/(mg/100 mL)
空白组	60.0	0.19	0.63	10.54	0.20
实验组	60.0	0.48	1.43	24.26	4.20

## 3 结论

本研究以微胶囊活菌数为指标,通过单因素、Box-Behnkn 实验设计和神经网络结合遗传算法优化确定了制备己酸菌微胶囊的最佳工艺条件为:海藻酸钠浓度 1.71%、氯化钙浓度 2.85%、固化时间 37 min,在此条件下得到的己酸菌微胶囊活菌数为  $2.17 \times 10^8$  个/g。将制备好的己酸菌微胶囊放入大曲高粱混合物料中共同发酵并进行蒸馏,微胶囊组酒样中的己酸乙酯含量为 4.20 mg/100 mL,比空白组酒样提高了 20 倍,说明己酸菌微胶囊化用以实现无窖泥发酵浓香型白酒的方法可行,为己酸菌微胶囊的后续开发利用提供了参考,为促进无窖泥发酵浓香型白酒的生产提供了有益尝试,具有广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] HU X, TIAN R, WANG K, *et al.* The prokaryotic community, physicochemical properties and flavors dynamics and their correlations in fermented grains for Chinese strong-flavor Baijiu production [J]. *Food Res Int*, 2021, 148(10): 110626.
- [2] LIU H, SUN B. Effect of fermentation processing on the flavor of Baijiu [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(22): 5425–5432.
- [3] FANG C, DU H, JIA W, *et al.* Compositional differences and similarities between typical Chinese Baijiu and western liquor as revealed by mass spectrometry-based metabolomics [J]. *Metabolites*, 2019, 9(1): 1–18.
- [4] GAO J, LIU G, LI A, *et al.* Domination of pit mud microbes in the formation of diverse flavour compounds during Chinese strong aroma-type Baijiu fermentation [J]. *LWT*, 2021, 137: 110442.
- [5] QIAN W, LU Z, CHAI L, *et al.* Cooperation within the microbial

- consortia of fermented grains and pit mud drives organic acid synthesis in strong-flavor Baijiu production [J]. *Food Res Int*, 2021, 147(9): 110449.
- [6] CHAI L, LU Z, ZHANG X, *et al.* Zooming in on butyrate-producing clostridial consortia in the fermented grains of Baijiu via gene sequence-guided microbial isolation [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 01379.
- [7] WANG X, DU H, XU Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor [J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, 244: 27–35.
- [8] 任雪, 魏晓庆, 韩雨辰, 等. 无窖泥发酵生产浓香型白酒[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(7): 105–109.
- REN X, WEI XQ, HAN YC, *et al.* Production of Nongxiangxing Baijiu by fermentation without cellar mud [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(7): 105–109.
- [9] DU H, LIU B, WANG X, *et al.* Exploring the microbial origins of p-cresol and its co-occurrence pattern in the Chinese liquor-making process [J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, 260: 27–35.
- [10] 刘欣欣, 武亚帅, 黄河, 等. 基于风味交互作用的浓香型白酒关键风味物质探究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(12): 23–34.
- LIU XX, WU YS, HUANG H, *et al.* Research on key flavor substances of Nongxiangxing Baijiu based on flavor interaction [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(12): 23–34.
- [11] 陈思恒, 宁欣强, 唐棠, 等. 添加不同生物炭对人工窖泥培养微生物群落影响研究[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(23): 96–104.
- CHEN SH, NING XQ, TANG T, *et al.* Research on the effect of adding different biochar on the microbial community structure of artificial pit mud culture process [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(23): 96–104.
- [12] 王邦坤, 刘民万, 史庆立, 等. 人工窖泥培养技术对浓香型白酒品质影响的研究[J]. *酿酒科技*, 2021, (10): 61–64.
- WANG BK, LIU MW, SHI QL, *et al.* Effect of culture techniques of artificial pit mud on the quality of Nongxiangxing Baijiu [J]. *Liquor-Mak Sci Technol*, 2021, (10): 61–64.
- [13] COGHETTO CC, BRINQUES GB, AYUB MAZ. Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2016, 67(8): 929–943.
- [14] LIU Z, CHEN X, GUO H. Preparation and properties of a novel sodium alginate microcapsule [J]. *J Phys*, 2021, 1893: 012005.
- [15] FENG K, ZHAI M, ZHANG Y, *et al.* Improved viability and thermal stability of the probiotics encapsulated in a novel electrospun fiber mat [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(41): 10890–10897.
- [16] NALE Z, TONTUL I, AŞÇI ARSLANA, *et al.* Microbial viability, physicochemical and sensory properties of kefir microcapsules prepared using maltodextrin/Arabic gum mixes [J]. *Int J Dairy Technol*, 2018, 71: 61–72.
- [17] MANDAL S, HATI S. Microencapsulation of bacterial cells by emulsion technique for probiotic application [J]. *Method Mol Biol*, 2017, 1479: 273–279.
- [18] SILVA MP, TULINI FL, RIBAS MM, *et al.* Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes [J]. *Food Res Int*, 2016, 89: 582–590.
- [19] SETH D, MISHRA HN, DEKA SC. Effect of microencapsulation using extrusion technique on viability of bacterial cells during spray drying of sweetened yoghurt [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 103: 802–807.
- [20] 吴玲玲, 张慧, 刘亚萍. 锐孔法制备谷氨酸钠微胶囊及其缓释性的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(8): 104–111.
- WU LL, ZHANG M, LIU YP. Microencapsulation of monosodium glutamate by piercing method and their sustained release in boiling water [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2019, 38(8): 104–111.
- [21] DIMITRELLOU D, KANDYLIS P, LEVIĆ S, *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in alginate capsules for probiotic fermented milk production [J]. *LWT*, 2019, 116: 108501.
- [22] LAI K, HOW Y, PUI L. Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG with flaxseed mucilage using co-extrusion technique [J]. *J Microencapsul*, 2020, 38(2): 134–148.
- [23] 周莉, 王晓瑞, 谭静, 等. 海藻酸钠-乳清蛋白复合益生菌微胶囊的构建及性能评价[J]. *中国食品添加剂*, 2020, 31(4): 108–113.
- ZHOU L, WANG XR, TAN J, *et al.* Construction and performance evaluation of sodium alginate whey protein composite probiotics microcapsules [J]. *China Food Addit*, 2020, 31(4): 108–113.
- [24] 葛得龙, 张鸿飞, 刘娇, 等. 海藻酸钠/羧甲基微胶囊对副干酪乳杆菌生存率影响的研究[J]. *中国饲料*, 2021, (21): 53–59.
- GE DL, ZHANG HF, LIU J, *et al.* Effect of sodium alginate/carboxymethyl microcapsule on the survival rate of *Lactobacillus paracasei* [J]. *China Feed*, 2021, (21): 53–59.
- [25] 王道滇, 马月星, 魏光强, 等. 海藻酸钠-乳铁蛋白复合益生菌微胶囊的制备及性能研究[J]. *中国奶牛*, 2023, (2): 43–51.
- WANG DD, MA YX, WEI GQ, *et al.* Preparation and performance study of sodium alginate-lactoferrin composite probiotic microcapsules [J]. *China Dairy Cattle*, 2023, (2): 43–51.
- [26] 邹立飞, 郑鹏. 人工神经网络和响应面法优化薏苡仁酒发酵条件[J]. *中国酿造*, 2021, 40(1): 142–147.
- ZOU LF, ZHENG P. Optimization of fermentation conditions of coix seed wine by artificial neural network and response surface method [J]. *China Brew*, 2021, 40(1): 142–147.
- [27] 毛炳强, 孙铁良, 孙凌祎, 等. 基于双神经网络结构的新型人工神经网络训练算法[J]. *化工自动化及仪表*, 2021, 48(5): 446–449, 456.
- MAO BQ, SUN TL, SUN LY, *et al.* A novel ANN training method based on dual neural network architecture [J]. *Control Instrum Chem Ind*, 2021, 48(5): 446–449, 456.
- [28] 要经纬, 朱含芳, 黄学成, 等. 植物乳杆菌微胶囊的制备工艺优化及特性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(22): 54–59.
- YAO JW, ZHU HF, HUANG XC, *et al.* Optimization of production process of *Lactobacillus plantarum* microcapsules and its properties [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(22): 54–59.
- [29] 周莉, 王晓瑞, 平洋, 等. 保加利亚乳杆菌微胶囊的制备及特性研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 188–193.
- ZHOU L, WANG XR, PING Y, *et al.* Preparation and characterization of

- microcapsule *Lactobacillus bulgaricus* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(11): 188–193.
- [30] 刘月静, 闫杨, 王帅珂, 等. 鼠李糖乳杆菌肠溶性微胶囊的制备研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2019, 32(4): 34–40.
- LIU YJ, YAN Y, WANG SK, *et al.* Preparation of enteric microcapsulated of *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *J Liaocheng Univ (Nat Sci Ed)*, 2019, 32(4): 34–40.
- [31] 王伟洁, 秦翠丽, 王大红, 等. 响应面法优化保加利亚乳杆菌微胶囊制备工艺[J]. 中国酿造, 2018, 37(9): 105–109.
- WANG WJ, QIN CL, WANG DH, *et al.* Optimization of *Lactobacillus bulgaricus* microencapsulation preparation process by response surface methodology [J]. *China Brew*, 2018, 37(9): 105–109.
- [32] 杨凯舟, 刘云, 杨立芳, 等. 长双歧杆菌 BBMN68 微胶囊的制备及其应用性评价[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 71–77.
- YANG KZ, LIU Y, YANG LF, *et al.* Preparation and application of *Bifidobacterium longum* BBMN68 microcapsules [J]. *Food Sci*, 2015, 36(9): 71–77.
- [33] 费国琴, 宁喜斌, 李晓晖, 等. 响应面分析法优化微生物溶菌酶微胶囊制备工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 11–15.
- FEI GQ, NING XB, LI XH, *et al.* Optimization of preparation conditions for microbial lysozyme microcapsule by response surface methodology [J]. *Food Sci*, 2014, 35(4): 11–15.
- [34] 石月. 复合乳杆菌微胶囊的研制及质量评价[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2015.
- SHI Y. Development and quality evaluation of *Lactobacillus* complex microcapsules [D]. Harbin: Heilongjiang University, 2015.
- [35] 郭宇星, 潘道东, 刘洋, 等. 海藻酸钠固定瑞士乳杆菌条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 188–192.
- GUO YX, PAN DD, LIU Y, *et al.* Optimization of conditions for immobilization of *Lactobacillus helveticus* using sodium alginate [J]. *Food Sci*, 2012, 33(5): 188–192.
- [36] HAMAD K, ALI KHALIL M, SHANABLEH A. Modeling roadway traffic noise in a hot climate using artificial neural networks [J]. *Transport Res D-Tr E*, 2017, 53: 161–177.
- [37] 张丽, 田密, 李凯. 遗传算法结合反向传播神经网络优化党参多糖的提取工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9563–9567.
- ZHANG L, TIAN M, LI K. Genetic algorithm combined with back propagation neural network to optimize the extraction process of *Codonopsis pilosula* polysaccharide [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9563–9567.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

## 作者简介

汪江波, 教授, 主要研究方向为传统发酵过程的现代化改造。

E-mail: wangjb117@163.com

徐健, 博士, 副教授, 主要研究方向为发酵工业废弃物的资源化处理和综合利用。

E-mail: xujian0218@126.com