分类号：　　密　　级：5年
学　号：20152211007　　单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文

新疆马奶酒挥发性物质解析与制备技术优化

学位申请人　王泽盛
指导教师　田洪磊教授
申请学位类别　农业硕士
专业名称　食品加工与安全
研究领域　食品风味化学
所在学院　食品学院

中国·新疆·石河子
2019年3月

Analysis of Volatile Substances and Optimization of preparation technology in Xinjiang koumiss

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Food processing and security

By

Wang Zesheng

（Food flavor and chemistry）

Dissertation Supervisor:Prof. Tian Honglei

Mar, 2019

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：王泽强　　时间：2019 年 5 月 21 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅。有权将学位论文的内容编入有关数据进行检索。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：王泽强　　时间：2019 年 5 月 21 日

导师签名：　　时间：2019 年 5 月 30

摘　要

本论文以新疆阿勒泰地区马奶为原料，并以该地区牧民自行酿制的马奶酒为对照，首先采用气质联用技术分离鉴定了新疆不同地区马奶酒样品中挥发性物质组成以及不同加工条件下马奶酒风味物质的变化，其次，结合感官评价与相关性模型的构建确定了马奶酒的关键挥发性成分；并对照传统马奶酒制备工艺，明确了马奶酒在加工条件改变的过程中风味物质变化规律。

具体方法为采用顶空固相微物萃取技术结合不同极性的萃取头与色谱柱，确定了马奶酒中极性与非极性的挥发性成分的具体组成，同时结合前人的研究，通过改变马奶酒中发酵参数，并有规律的调节马奶酒的加工参数和实时进行感官评价，最终结合模糊数学法确定了不同属性的权重系数与参数及关键挥发性成分，构建了马奶酒发酵工艺参数与马奶酒特征性挥发性物质的相关性模型，建立了一套可以监督马奶酒发酵工艺的风味评价体系。最终确定的具体研究结果如下：

（1）采用顶空固相微物萃取技术结合气质联用技术对新疆传统工艺马奶酒的挥发性风味物质成分进行分析，共检测出 31 种挥发性成分，主要为酯类与酸类，占马奶酒整体挥发性成分含量的 86%-97%。

（2）采用顶空固相微物萃取技术结合气质联用技术对来自新疆八个地区的不同品质及加工工艺的传统马奶酒的挥发性成分进行分离与鉴定，通过比较所有马奶酒，共检测出 31 种成分，其中总的酯类占挥发性物质总量的比例的 67.75%、总的酸类含量占 25.23%、总醛类含量占 3.19%、总醇类含量占 2.86%、总烃类含量占 0.57%、总酮类含量占 0.33%。在八个地区的传统马奶酒中共测得 7 种共有挥发性物质，它们分别为异戊醇、己酸乙酯、壬醛、辛酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸、癸酸。

（3）通过定向改变发酵工艺参数，最大差异化马奶酒的风味属性结合气质联用技术与感官评价，建立了感官属性与挥发性成分及工艺参数的相关性模型，并探究了马奶酒在发酵过程中各个参数与马奶酒最终风味属性形成的变化规律，最终得出发酵温度与发酵时间能够直接影响乙酸乙酯与辛酸乙酯的含量，发酵时间的改变会直接导致马奶酒中醇香味与发酵香两种感官属性发生改变的结论。

（4）在明确了马奶酒的主要感官属性分别为发酵香，奶香，醇香，浓厚感后，采用模糊性感官评价法结合响应面分析法对新疆传统马奶酒加工工艺进行优化，最终得出新疆马奶酒最优加工工艺，方法为：发酵温度 32℃，发酵时间 70 h，酵母添加量为 8 % ，马奶酒发酵效果及感官评分可达最佳。

关键词：新疆地区；传统马奶酒；挥发性成分；响应面法；感官评价；相关性模型

Abstract

In this paper，we took milk of mare that comes from Altay, Xinjiang as raw material, taking koumiss that brewed by local nomads as a contrast. Firstly, using GC-MS identified composition of volatile compounds of different regions of koumiss and change of flavor compounds of koumiss under different processing conditions.

Using sensory evaluation equipped with correlation model confirmed key volatile components of koumiss. Compared with traditional manufacturing process, we determined the change rules of flavor compounds of koumiss when condition of processing changed. The specific method is that using headspace solid phase micro extraction technology equipped with different polar extraction head and column to determine the specific composition of polar and non-polar volatile components in koumiss. Meanwhile, combined with previous studies confirmed that through changing the fermentation parameters of koumiss, regularly adjusting processing parameters of Koumiss with simultaneous sensory evaluation, and finally combining the fuzzy mathematics method to determine the weight parameters and key coefficients of different attribution. In this way, a correlation model of fermentation parameters and characteristics volatile substances of koumiss was established, and a set of evaluation system can supervise the flavor Koumiss fermentation processing was confirmed. The final results are as follows:

(1) Using headspace solid phase micro extraction technology with the GC-MS technology on the detected 31 kinds of volatile components in traditional koumiss of Xinjiang, such as esters and acids, the average total content of volatile constituents of Koumiss 86%-97%.

(2) Using headspace solid phase micro extraction technique combined with GC-MS technology identified volatile components of traditional koumiss of different quality and processing technology from eight regions of Xinjiang. By comparing total 31 components of horse milk, concentration of esters was accounted for 67.75% of total compounds, the concentration of acids was accounted for 25.23%, the concentration of aldehydes accounted for 3.19% and alcohols was accounted for 2.86%, accounted for 3.19% of the total, hydrocarbons was accounted for 3.19% and ketones accounted for 0.33%. 7 kind of volatile compounds were measured in traditional koumiss in eight regions, they were isoamyl alcohol, ethyl caproate, nonanal, octanoic acid ethyl ester, ethyl decanoate, octanoic acid, decanoic acid.

(3) By changing the orientation of fermentation process parameters, differentiating t koumiss with an utmost extent, and using GC-MS combined with sensory evaluation techniques, a correlation model of sensory attributes of volatile components and parameters of processing was established, and we explored the rules on parameters in the fermenting processing and final formation of flavor attributes of koumiss. We finally found the fermenting temperature and the fermenting time can directly affect the content of ethyl acetate and ethyl caprylate, the change in fermenting time will directly lead to the concentration of fermented flavor and fermentation fragrant changed.

(4) The main sensory attributes of Koumiss were fermented flavor, milk flavor, and mellow, strong

sense. Utilizing method of response surface analysis with fuzzy sensory evaluation method optimize processing of Xinjiang traditional Koumiss. Finally we obtained the optimal processing of Xinjiang koumiss was as following: the fermentation temperature was 32℃, the fermenting time is 70 h, the amount of yeast was 8%, respectively.

Key words: Xinjiang area; traditional koumiss; volatile components; response surface method; sensory evaluation; correlation model

缩略词表

Abbreviation

缩写	英文全称	中文全称
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry	气质联用技术
HS-SPME	Headspace solid phase micro extraction	顶空固相微物萃取
CA	Cluster analysis	聚类分析
RI	Retention index	保留指数

目录

摘　要.....II
Abstract.....IV
缩略词表.....VI
第一章　绪论.....1
1.1 马奶酒的研究现状.....1
1.1.1 马奶酒的研究目的及意义.....1
1.1.2 马奶酒研究现状.....4
1.1.3 马奶酒的营养价值.....5
1.1.4 马奶酒的功能性及保健性.....5
1.2 常见传统马奶酒发酵方法.....6
1.3 马奶酒研究重点及难点.....7
1.4 本课题研究的主要内容.....7
第二章 新疆地区传统马奶酒关键挥发性成分筛选.....9
2.1 试验材料与仪器.....9
2.2 试验内容.....10
2.3 结果与讨论.....11
2.4 本章小结.....19
第三章 基于响应面法对马奶酒发酵工艺研究与参数优化.....20
3.1 试验材料与仪器.....20
3.2 试验内容.....20
3.2.1 试验方法.....20
3.2.2 不同发酵条件对马奶酒风味品质影响的单因素试验.....22
3.2.3 马奶酒感官属性与发酵工艺相关性分析.....22
3.2.4 马奶酒发酵工艺对其感官评分影响的响应面分析.....23
3.2.5 数据分析.....23
3.3 试验结果与分析.....23
3.3.1 不同酒曲接入量对马奶酒风味品质的影响.....23
3.3.2 不同发酵时间对马奶酒风味品质的影响.....24
3.3.3 不同发酵温度对马奶酒风味品质的影响.....25
3.3.4 响应面分析法优化提取试验结果与分析.....25
3.3.5 最优条件的确定及验证.....29
3.3.6 响应面法分析结果.....30
3.3.7 各因素对各感官属性影响.....30
3.4 本章小结.....32
第四章 基于 PCA 模型的马奶酒发酵参数与风味品质解析.....33
4.1 材料和方法.....33
4.1.1 试验材料和试剂.....33
4.1.2 试验仪器.....33
4.1.3 马奶酒发酵工艺流程.....33
4.1.4 具体试验流程.....33
4.2 试验结果与分析.....34
4.2.1 挥发性成分分离与鉴定.....34

4.2.1.2 不同试验组挥发成分变化.....35
4.3 本章小结.....38
第五章 结论总结与展望.....39
5.1 全文总结.....39
5.2 创新点.....39
5.3 展望.....39
参考文献.....41
致谢.....45
作者简介.....46

第一章　绪论

1.1 马奶酒的研究现状

1.1.1 马奶酒的研究目的及意义

奶酒是游牧民族生活中不可缺少的发酵乳制品，主要以鲜奶为原料通过乳酸菌和酵母菌发酵制作而成。我国食品行业标准中定义奶酒是“以动物乳、乳清或乳清粉等为主要原料，经发酵等工艺酿制而成的饮料酒”。所谓的马奶酒其实是酸马奶，蒙语叫策格（其格，有些地方也称为叫艾日克），马奶酒自古就是“塞北八珍”之一。在《蒙古秘史》之中记载”额速格“一词，指的就是策格；而我们现在对马奶酒的称呼在新疆为“艾日格”，在内蒙古为“策格”；其意思都是”紫玉浆、元玉浆“，是少数民族牧民在生活中的聚会和宴会中的必须饮品。马奶分为生熟两种，生马奶即鲜马奶，熟马奶即酸马奶。鲜马奶、酸马奶不仅是草原上牧民的营养品而且在传统医学中应用于临床医疗和保健作用。民间还有喝策格比赛等很多传统文化娱乐活动，内蒙古阿巴嘎旗已被命名为“内蒙古策格文化之乡”[1]。我国新疆地区马奶酒风味独特、营养丰富，具有明显的区域传统食品标志性及民族代表性，是我国新疆少数民族地区极具有特色的食品资源。马奶酒的历史可以追溯至汉代，其加工工艺及原理基本延续至今，随着时间的推移，马奶酒的品质已经逐渐提高。奶酒加工的工艺得到明显的优化，并且种类也形成了丰富多样、各具特色，如在我国北方常见的奶酒有蒸馏型奶酒、发酵型奶酒、勾兑型奶酒、起泡型奶酒和加气起泡型奶酒等[2]。在我国新疆、内蒙古和西藏等牧区传统饮用的奶酒常为发酵型奶酒和蒸馏型奶酒。由于饮用人群少，传统奶酒的研究在国内外仅限于发酵型奶酒和蒸馏型奶酒，而且研究的主要地域都集中在我国的新疆、内蒙古和西藏牧区以及蒙古国、西亚和东欧的一些国家。随着社会的发展，人们对健康的追求，发酵型奶酒作为具有民族地域特色的新一代健康饮品已经逐渐走向全国，成为了大家公认的继白酒、啤酒、黄酒、果酒、露酒之后的第六大酒种。

随着社会经济的发展，人们的生活节奏加快，健康问题已经成为热点话题，因此乳制品作为天然的保健饮料也应运而生；而且人们现在也更容易接收发酵型饮料，尤其是乳品发酵，因此发酵型奶酒行业将在以后的有一个蓬勃的发展期。而我国现在已经生产发酵型奶酒的企业多达数百家，主要集中在我国北方的内蒙古、黑龙江，有一定品牌的如一代天骄、草原狼、腾格尔、恩格尔、元朝、乳香飘和牧马人等。这些酒都属于内蒙古或黑龙江等地生产，而新疆在这十大奶酒中没有一款，目前的加工生产都仅限于小作坊、小工厂进行加工销售，销售范围也只限于新疆本地和一些游客，但其口感和口味还是各有特色，良莠不齐。目前新疆马奶酒所遇到关键壁垒问题是奶源的品质不同及添加配方的差异，致使不同地域甚至是不同加工者的最终产品都有明显的差异，各具特色的马奶酒具有独特的魅力，虽然能给品尝者带来新鲜感[3]，但是鉴于马奶酒多以手工作坊的产品形式存在，没有规范的具有一定规模的生产厂家进行生产，所以市面上产品的多样化及品质不均一化也为马奶酒产品带来了一些负面影响[4]。其次马奶酒属于发酵型系

列，酒精度数比较低，保存时间没有其他酒时间长，造成口感口味容易发生改变；二是现在新疆的奶酒生产多为小、微型企业，在制作标准上不统一，制作工艺还是停留在传统的基础上；三是缺乏市场监督，对于发酵菌种的选择和马奶酒的保健功能还需更好的研究。因此要推广新疆传统马奶酒，就必须建立马奶酒标准化品质，以及规范其风味品质的标准。因此本课题在对马奶酒的风味物质解析以及发酵条件优化方面做出研究是为了能够推广新疆地区马奶酒以及新疆马奶酒文化，为少数民族创收增收。

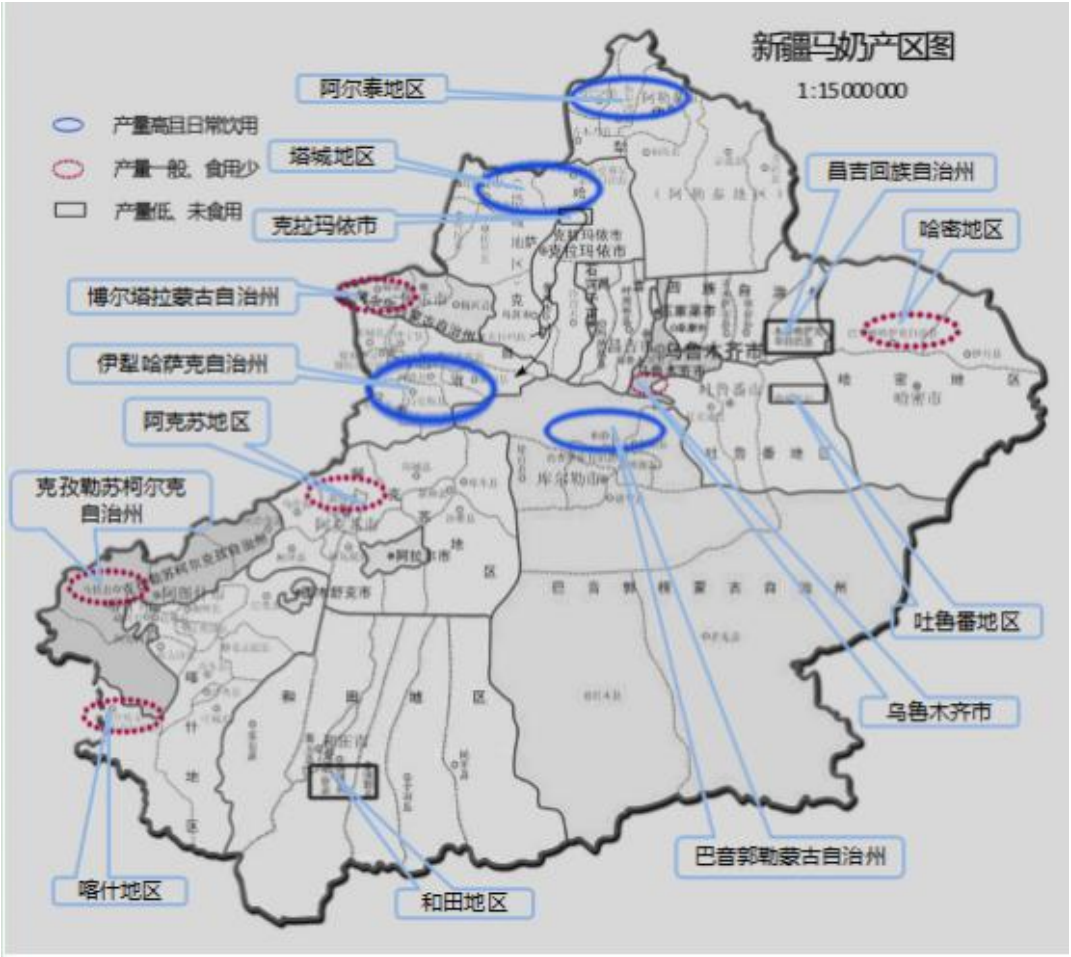


图 1-1 新疆马奶酒产区汇总

Fig.1-1 Summary of Xinjiang koumiss producing areas

表 1-1 新疆不同地区马奶酒制作现状

Table 1-1 Current situation of koumiss production in different areas of Xinjiang

新疆2017年马匹饲养地域分析				
地域	马匹数量（万匹）	比例（%）	奶马数量（万匹）	制作马奶酒
伊犁哈萨克自治州	36.83	43.2	11.049	***
阿尔泰地区	10.29	12.1	3.087	***
塔城地区	8.92	10.5	2.676	***
阿克苏地区	5.58	6.5	1.674	**
昌吉回族自治州	4.92	5.8	1.476	*

续表 1-1

喀什地区	3.87	4.5	1.161	**
巴音郭勒蒙古自治州	3.8	4.5	1.14	***
克孜勒苏柯尔克自治州	2.39	2.8	0.717	**
乌鲁木齐市	1.77	2.1	0.531	**
博尔塔拉蒙古自治州	1.5	1.8	0.45	**
和田地区	1.39	1.6	0.417	*
哈密地区	1.25	1.5	0.375	**
吐鲁番地区	0.31	0.4	0.093	*
克拉玛依市	0.07	0.1	0.021	*
合计	82.89	100	24.867	

注：本资料来源于《新疆统计年鉴（2017）》相关数据;***代表经常制作，**代表偶尔制作，*没有制作习惯

新疆在 2017 年统计共有马匹数量是 82.89 万匹，其中奶马的数量是 24.867 万匹，主要集中在伊犁、阿尔泰和塔城地区，占到了总数的 62%。而且也显示出经常制作马奶酒的地州是伊犁、塔城、阿尔泰和巴音郭勒蒙古自治州，主要原因是在这里生活着新疆游牧民族哈萨克族、柯尔克孜族、蒙古族中的图瓦人；通过调查我们得知在巴音郭勒蒙古自治州马匹少的原因是牧场主要集中在和静县与和硕县，其他地区的牧场放牧马比较少，但和静县与和硕县居住的蒙古族自古就属于游牧民族，因此喜食马奶酒；而阿克苏地区和喀什地区虽然马匹数量众多，但因居住的主要是维吾尔族居民，不喜食用马奶，因而也就没有制作马奶酒；同样昌吉回族自治州因居住的主要是回族，由于民族的习惯也不喜食马奶；乌鲁木齐市、博尔塔拉蒙古自治州和哈密地区食用马奶酒的主要是蒙古族和哈萨克族。

本项目通过对马奶酒的不同发酵方式下风味物质差异性的研究，结合如响应面试验、均匀设计等优化方法等，在解决品质问题的基础上优化生产工艺，基于传统工艺结合现代化的生产技术及科学化品控模式，将传统马奶酒的特色保留并进一步优化整体品质，在符合我国的企业或行业标准的前提下，将产品质量严格把控，提高发酵及加工效率，获得出产率高，风味品质优良，具有地方特色，同时符合国内外市场需求的优质产品。在马奶酒的生产过程中如何安全、无污染地、最大限度地保持马奶发酵后原有独特奶香风味和增加马奶酒独特的酒香风味，成为了提高马奶酒产品质量、增加产品市场接受度的重点。新疆是我国马奶类食品的主要消费地区[5]，近几年来伴随消费者的保健意识增强、旅游业的发展，马奶酒的营养保健作用逐渐被发现且进行推广，然而马奶酒风味特色使其受众面具有严重局限性，相关领域研究人员将研究重点放在对传统马奶酒生产方法的改良，从而提高产量及风味品质，增加马奶酒在消费市场占比。鉴于目前马奶酒的生产工艺具有瓶颈，本研究课题将风味品质作为评价指标，通过对马奶酒发酵工艺的优化及特征性挥发成分监测，以传统加工工艺为基础，结合实际生产情况完善出一套

成体系的商业化生产技术，以期能够推动新疆地区丰富的马奶资源合理有效的利用，及将马奶酒产业作为新疆特色资源发展并进行推广，提高市场认可度，增加附加值为当地养殖户增收创收。

1.1.2 马奶酒研究现状

马奶酒（koumiss），又称为马酪、马酒等，是一种自汉朝起就有记载的中国传统发酵型乳酒[6]。最早起源于欧亚大陆的游牧民族，主要流行在蒙古族、哈萨克族、鄂温克族及柯尔克孜族等少数民族，现今在我国的新疆、内蒙古、西藏和宁夏等少数民族聚居区还存在饮用马奶酒的生活习惯。我国少数民族利用发酵原理制作马奶酒的历史可追溯到我国西汉时期，远嫁到伊犁的细君公主在《悲愁歌》中写到“吾家嫁我兮天一方，远托异国兮乌孙王。穹庐为室兮旃为墙，以肉为食兮酪为浆。居常土思兮心内伤，愿为黄鹄兮归故乡。”乌孙是汉代时西域国名，在现在新疆温宿以北、伊宁以南一带，而“酪”这里就指发酵型的奶酒。另据《汉书•西域传下》记载，刘细君出嫁时，汉武帝“赐乘舆服御物，为备官属侍御数百人，赠送其盛”。一到乌孙，细君公主就将陪嫁物品分给百姓，备受爱戴。因为细君公主皮肤非常白嫩，乌孙百姓爱称她为“柯木孜公主”，意思是说她的皮肤像马奶酒一样雪白。而在《史记•匈奴列传》中也写到当时西汉政权赐予匈奴的珍馐佳肴全被匈奴人所嫌弃，当时匈奴人认为这些珍馐佳肴“不如湩酪之便美也”，这里所提到的“湩酪”指的就是当时传统的发酵型马奶酒。另据《汉书》记载，在武帝时期就设有“桐马令”这一主管乳马的官职，汉代如淳的注释说:“桐马”为“ 主乳马“，“以韦革为夹兜， 受数斗，盛马乳，桐取其上肥，因名曰桐马。”因此我们可以推断出，由于民族文化不断的交流交融中，当时的汉朝由于受到西域的乌孙人和匈奴人的饮食影响，马奶酒已经成为皇宫贵族的餐桌上的饮品之一[7]。而北魏贾思勰所著的《齐民要术》中就明确记载了马酪的制作方法是用马奶制作而成。在《隋书•突厥传》中也有“饮马酪取醉，歌呼相对，敬鬼神”的记载；说明三国两晋和隋唐时期的突厥人也喜食马奶酒，并且成为他们供奉祖神的上品。唐代《酉阳杂俎》一书中也有记载，唐玄宗在给安禄山的赏赐物品里有一物为马酪。意大利著名的旅行家和商人马可波罗在我国元朝时期游历我国大江南北，所著的《马可波罗游记》中也提到“鞑靼人饮马乳，其色类白葡萄酒，而其味佳，其名库米斯(Koumiss) ”。在《新元史• 兵志》书中记载：“黑马乳以奉王食，谓之细乳，诸王以下亦供马乳，谓之粗乳，自始祖以下诸陵寝各有酝都，取马乳以供祭祀，号金陵挤”。 因此在元朝时期马奶酒已经成为人们的日常饮品之一。诗人许有壬形容马奶酒：“味似融甘露，香疑酿醴泉。“清代肖雄说它“其性温补，久饮不间，能返少颜。”

马奶酒一直延续至今，随着时代的发展，我国北方少数民族依然保留着饮用马奶酒的习惯，而且马奶酒也成为蒙古族、哈萨克族、柯尔克孜族等少数民族待客的最高礼节。我国传统马奶酒是新鲜马奶中加入发酵剂发酵数日后，形成的一种具有马奶独特香味及浓郁酒香的乳白色发酵型饮料，后经过蒸馏成为透明清亮的酒类饮料。目前我国马奶酒的主要产地为新疆及内蒙古，消费群体主要是当地少数民族，如柯尔克孜族、哈萨克族、

图瓦人、蒙古族等。马奶酒中富含钙、铁、维生素 C、维生素 B_5、叶酸等，长期饮用马奶酒可以有效的防止血栓、血管硬化、高血压等现代常见慢性病，同时马奶酒的酒精含量低，口感独特，使马奶酒成为新一代的发酵型健康饮品[8]。

近年来，国内外研究学者将研究重点集中在对益生菌群分析，发酵工艺优化及安全性评估等方面，王立平[9]等对酸马奶酒中乳酸菌群进行了分离与鉴定；李少英[10]等对马奶酒中乳酸菌的生物学特性进行了深入研究；王璐[11]等采用响应面法对马奶酒发酵条件进行了优化。然而采用气质联用（gas chromatography-mass spectrometry）技术对马奶酒中挥发性物质的鉴定及新疆不同地区马奶酒的挥发性物质差异对比现鲜有报道。本课题采用顶空固相微物萃取技术（headspace solid phase micro-extraction）结合 GC-MS 分析能够高效、全面的对马奶酒中的醇类、酯类、有机酸类等挥发性物质进行分离鉴定[12]。同时采用相关性分析方法对新疆不同地区马奶酒中的挥发性物质进行分析，找出不同地区马奶酒中共有的挥发性物质，以期能够寻找出马奶酒中关键的“香气”物质[13]。

目前在马奶酒中常用的发酵菌种是乳酸杆菌、乳链球菌、酒精发酵的酵母。马荣山等人从脱脂牛奶酒中的分离出了乳酸杆菌，并以此进行了牛奶酒的发酵剂制备[14]。传统的马奶酒在不同温度下发酵其理化指标具有显著的差异，如在 40℃左右发酵后酸度为 2900T，而在 25℃发酵一定时间后，酸度控制在 2900T-3100T 之间，发酵后的乳制品将不含酒精[15]；相关研究人员从马奶酒中分离出一株乳酸杆菌，对其菌落形态及生化指标进行分析与鉴定，并将该乳酸菌命名为 *Laktobaktyerum bulgarisum MON*-75[16]；1982 至 1988 年期间，微生物学家 Korolyeva[17]和 Stojanova[18]从马奶酒中分离出一株新的乳酸菌，通过比对研究，最终确定此类乳酸菌为乳链球菌属；酒精发酵酵母菌是马奶酒中用于生产酒精的重要微生物，Koroleva[19]再次对酸马奶酒中微生物的组成进行了研究，明晰马奶酒中主要的酵母菌种类以及发现该菌种对结核杆菌有特异性抑制效果。

1.1.3 马奶酒的营养价值

马奶酒与牛奶酒等其它发酵型奶酒的基本成分是相似的。酸马奶中蛋白质原料约为 1.8% - 2.2%，密度大于牛奶酒，易被人体消化系统吸收。两种可溶性蛋白、酸马奶酒中清蛋白和球蛋白占 40%，其中α-白蛋白、β球蛋白分别占总蛋白含量的 47.6%与 31.4%。半固态球蛋白的含量能够决定马奶酒的最终整体品质，同时发酵过程中微生物及酶促作用将蛋白质转化为更易被吸收短链肽及多种功能性化合物 [20]。马奶酒中另一重要组成物质是氨基酸，马奶中氨基酸组成接近母乳，其中色氨酸的含量为 1.40%，显著高于牛奶中的含量，色氨酸的生物学活性作用在人体新陈代谢过程中起至关重要的作用，与生成维生素、胆汁酸和固醇类代谢过程密切相关。同时马奶酒中含有多种人体必需氨基酸，其中多种是不能通过人体代谢途径合成的氨基酸[21]。马奶中含有约 2.0 %的脂肪，通常肉眼可见漂浮在马奶上层，能够提供充足的能量并且不会影响人体的健康[22]，因此马奶酒成为了最佳酒类饮品选择。

1.1.4 马奶酒的功能性及保健性

马奶酒具有丰富的营养价值以及保健功能，同时兼具有独特的风味，深受新疆牧民

喜爱，被视为最好的日常饮品，加工工艺也代代相传至今。古时马奶酒用于一些伤口的辅助治疗，并将该方法延续至今，如被蚊虫叮咬，狗咬伤后将马奶酒涂抹于伤口，对防止感染及伤口愈合效果明显。在古代蒙古酸马奶和奶制品功效就有详细记录。相关历史文献记载对马奶酒的功效有，对胃部具有显著保护作用、能够有助于消化、促进新陈代谢提升体内排毒能力，并能活化血管促进血液循环、能够优化睡眠、对肤质也能起到保养的作用[23]； 临床结果证明长期饮用马奶酒能提高人体免疫力，增强人体对常见疾病的抵抗力，同时针对一些疾病也具有辅助治疗的作用；马奶酒对人体消化系统有显著的改善作用，如对便秘、腹泻等均具有显著的疗效。相关领域研究人员基于马奶酒功能性特点，通过运用“酸马奶疗法”在心血管疾病、肺结核和神经系统等多种疾病治疗方面均具有良好的疗效[24]。

马奶酒中含有蛋白质，脂肪，碳水化合物，以及微量元素如钙，磷，钾，钠等，同时含有丰富的 B 族维生素以及肌醇等多种功能性因子。在马奶酒发酵过程中产生的产物与维生素及其他营养成分均具有显著的生理活性及生物学性质。由益生菌如乳酸菌和酵母菌生产马奶酒的过程中能够促进多种新的活性物质代谢产生使马奶酒的生物活性增强[25]；同时，马奶酒的相关报道中对比发现不同品种的酵母菌在发酵过程中发酵能力具有显著的差异，且不同酵母菌在发酵过程中起到的作用也具有差异性，酵母菌的种类和含量的差异对马奶酒独特的风味形成及保健功能均有显著影响[26]。

除了在马奶酒发酵过程中占有重要地位酵母菌，其它多种益生菌如保加利亚乳杆菌乳酸菌，德国的嗜酸乳杆菌、肠球菌等也是马奶酒的活性物质形成的关键[27]。乳酸菌与酵母菌在不同比例下发酵，所得马奶酒的风味特征及理化指标也会产生差异性。决定马奶酒风味品质优劣的一个重要因素是微生物乳酸菌的含量，乳酸链球菌能产生风味物质，使得马奶酒的风味自然且独特。马奶酒发酵过程中，乳酸菌的主要功能是能产生多种有机酸，同时酸性环境增强了酵母菌的生存能力提高了发酵效率[28]。目前，由于益生菌和乳酸菌产品的宣传力度提高了其市场的认知度，越来越多的消费者倾向于购买发酵后的乳制品，认为发酵后的乳制品营养价值更为丰富，同时这类产品的营养价值高，易于消化吸收，长期食用可减少高血压、高血脂等慢性病的风险，同时可以提高人体的免疫力[29]；此外，发酵后的奶制品能够起到保护及协助正常的胃肠道菌群，促进胃肠蠕动，防止便秘的作用。马奶酒作为一种极具特色的发酵乳制品，除以上功能还拥有其它特色，如马奶酒具有丰富的营养，经过益生菌如酵母菌和乳酸菌协同发酵，在保证风味品质独特的同时也具有优良的保健功能，具有很高营养价值同时也满足了消费者对酒类产品的需求[30]。

1.2 常见传统马奶酒发酵方法

不同的发酵工艺参数对马奶酒中香气物质的特征性表达具有差异性，传统的马奶酒发酵工艺采用环境中的微生物进行自然发酵[31]或者在发酵过程中加入适量的酒曲进行发酵[21]等两种发酵方式。两种发酵工艺所带来的风味具有一定差异性[6]，目前国内外对两种加工工艺的区别及每种加工工艺的优化都鲜有研究。因此探究不同加工工艺下马奶

酒的风味品质的区别或是对同种加工工艺下进行优化，将新疆马奶酒传统加工工艺标准化是很有研究价值的。

1.3 马奶酒研究重点及难点

为了能够全面且精确的研究出马奶酒的主要挥发性成分构成及关键性物质的产香机理与产香机制，因此马奶的原材料规范化选取及长期统一的固定采集是重中之重，然而针对新疆这种特殊的地理环境，人文环境这样做是不现实也是不可取的。由于马奶奶源难以追溯，养殖监管不规范，使得新疆地区的马奶酒风味差异化显著且品质不均一。这对于后期研究工作的开展有很大的困扰，为了能够降低这些系统外因素的干扰，减少人为因素的影响，新疆地区马奶酒的选择将不能局限于对某一地区或是特定的某种马奶酒进行研究，而是应针对新疆的特色，广泛的采集样品，对马奶酒中挥发性物质的组成分离与鉴定。同时，科学的筛选感官属性结合理化指标，系统的对马奶酒进行品质监测，所构建的相关性模型可进行挥发性成分与加工工艺间相关性分析以及发酵过程中主要关键风味品质差异化信息的筛选。

目前我国的马奶酒相关研究中对发酵品质的评判标准仅仅局限于对理化参数的分析或是采用模糊性感官评价，而感官属性的差异以及理化参数往往不能有效的指导马奶酒生产工艺的改进，同时对风味品质的评价也缺乏严谨性。本研究希望能够建立出一套以新疆地区马奶为原料对加工工艺及产品品质进行预测的模型，能够对马奶酒的生产过程及最终产品品质进行检测且进行科学合理的评价。具体步骤为：首先选取新疆不同地区不同加工手段生产的多种马奶酒，结合气质分析技术对马奶酒芳香物质进行分离与鉴定，确定马奶酒特征香气成分；其次，通过多种化学计量法相结合的分析方法，明晰马奶酒香味物质成分及其构效关系。通过对马奶酒中关键发酵参数的优化结合气质分析监测关键挥发性物质含量的变化，以马奶酒整体风味的丰富度作为评价指标并以感官评价作为评判依据，最终确定马奶酒的最优发酵工艺，生产出具有新疆特色的传统马奶酒。然而目前关于马奶酒风味方面的研究较少，因此马奶酒中关键性挥发性物质组成需要多种分析方法及检测手段结合，采样范围全面等因素。马奶酒的发酵方式有多种，不同的发酵方式差异性明显，同时马奶酒具有民族差异性，不同的人群所偏好的马奶酒发酵工艺不尽相同，因此发酵手段选择的差异性决定了最终马奶酒的整体风味品质优劣。

1.4 本课题研究的主要内容

为了探究马奶酒中风味物质的形成规律与形成机理，为马奶酒的发酵工艺，提供理论依据。本研究首先对新疆不同地区传统马奶酒挥发性物质鉴定，选取新疆不同地区不同加工手段生产的多种马奶酒，结合气质分析技术对马奶酒芳香物质萃取物进行分离与鉴定，确定马奶酒特征香气成分；其次通过多种化学计量法分析相结合的方法，明晰马奶酒香味物质成分及其构效关系。确定最优马奶酒发酵工艺，通过对马奶酒发酵中关键发酵参数的优化，结合气质分析监测关键挥发性物质含量的变化，以马奶酒整体风味的丰富度作为评价指标结合感官评价作为评判依据，最终确定马奶酒的最优发酵工艺生产

出具有新疆特色的传统马奶酒。本课题主要目的以能够开发出具有新疆地域特色的传统马奶酒，提升马奶酒产业化加工程度为目的。研究过程中使用的主要手段为：（1）结合 GC-MS 技术及相关性分析法，确定马奶酒中主要呈香成分与风味品质构效关系；（2）通过对发酵过程中关键参数的优化，形成一套较为完整的马奶酒发酵工艺理论及风味控制技术体系。虽然目前有关马奶酒风味方面研究较少，但是确定马奶酒中关键性挥发性物质需要多种分析方法及检测手段结合，可以借鉴近几年来相关领域的研究人员的工作成果，根据大数据分析及相关信息收集的规则，合理的采样范围全面等因素共同决定马奶酒中关键性挥发物质；然而为了避免由于马奶酒的发酵方式有多种，不同的发酵方式所造成的差异性明显的问题，以及马奶酒具有民族差异性，不同的人群所偏好的马奶酒发酵工艺不尽相同等因素，开展本课题前首先确定马奶酒的生产地域，同时对所采特征性样品的挥发性成分进行详尽的分析，结合相关性分析的方法，确定挥发性成分与各影响因素间的相关性，以期明晰导致马奶酒发酵过程中风味差异化的关键影响因素，同时揭示挥发性成分及感官属性与发酵参数间内在联系。在明确各因素间相关性的基础上，基于模糊性感官评价针对性的对马奶酒发酵工艺进行优化，以期优化出一套完整的高品质马奶酒的发酵工艺。

第二章 新疆地区传统马奶酒关键挥发性成分筛选

初步筛选出不同地区马奶酒所共有的关键性挥发性成分，即在一定程度上代表了马奶酒的整体风味属性，通过比较所采集的马奶酒样本对比在挥发物含量的共有特征及差异点，最终得出能够表征马奶酒最根本的一种或几种物质。本研究最终确定采用顶空固相微萃取法（HS-SPME）作为提取方法，结合气相色谱-质谱法（GC-MS）作为分离鉴定手段[32-34]，收集了目前所能购买到的 8 个品种的马奶酒，以上样品均来自新疆不同地区。最终结果为在新疆不同地区的传统马奶酒样品共检出 31 种挥发性化合物，其中酯、酸、醛、醇、烃、酮占总挥发性物质的比例分别为 67.75%、25.23%、3.19%、2.86%、0.57%、0.33%，其中已经剔除了外源性误差挥发性成分，如萃取头或色谱柱的固有材料等[35]。其中七种挥发性化合物的所有样品中共有挥发性成分，也被认定为关键性挥发成分，能够在一定程度上代表马奶酒的特征挥发性成分，包括异戊醇、己酸乙酯、壬醛、辛酸乙酯、辛酸和癸酸。本研究采用聚类分析用来区分不同地区马奶酒的整体构型差异。聚类分析结果表明，马奶酒虽然取自 8 个不同地区，然而建立的聚类树状图表明可以分成两大类[36]，图形构建根据不同的挥发性成分的含量与种类作为数据源。具体试验过程如下。

2.1 试验材料与仪器

表 2-1 新疆不同地区马奶酒采集详细信息

Table 2-1 Information about the 8 koumiss from different areas from Xinjiang

样品编号	采集地区	具体地点
1	新疆阿尔泰地区布尔津县窝依莫克乡喀纳斯村	图瓦人牧民家中采集
2	新疆塔城地区额敏县额玛勒郭楞蒙古民族乡	哈萨克牧民家中采集
3	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县种马场	当地集市购买
4	新疆伊犁哈萨克自治州新源县那拉提镇	农贸市场购买
5	新疆巴音郭楞蒙古自治州和静县巴音布鲁克镇	集市购买
6	新疆克孜勒苏柯尔克孜州乌恰县	集市购买
7	新疆哈密市巴里坤县	农贸市场购买
8	新疆喀什地区塔什库尔干塔吉克自治县	农贸市场购买

表 2-2 试验药品与仪器

Table2-2 experiment medicine and instruments

仪器名称	规格/型号	生产厂家
2-辛醇	100ppm 色谱纯	美国 Sigma 公司
SPME 萃取装置	75μm CAR/PDMS/DVB	美国 Sigma 公司
气质联用仪	5977 A-7890B	美国安捷伦公司
电子分析天平	WSC-S	上海精密科学仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-200VDE	昆山市超声仪器有限公司

2.2 试验内容

2.2.1 试验方法

2.2.1.1 马奶酒的收集与整理

马奶酒的产地多为新疆少数民族聚集地，地处偏远，且没有产业化商品化的公司。因此购买马奶酒应当尽可能的多采集样本数量的前提下，再尽量选取具有地方特色的马奶酒。本研究组历时 1 个多月，分别从新疆阿尔泰布尔津县的图瓦人牧民家中采集，新疆塔城额敏县哈萨克牧民家中采集，新疆伊犁昭苏县种马场当地集市购买，新疆伊犁新源县那拉提镇农贸市场购买，新疆巴音郭楞蒙古自治州和静县巴音布鲁克镇集市购买，新疆克孜勒苏柯尔克孜自治州乌恰县的贸易市场以及新疆哈密市巴里坤县与新疆喀什地区塔什库尔干塔吉克自治县当地集市购买，多地点多渠道地采购马奶酒作为关键性挥发成分筛选试验的基础样品，编号依次为 1-8 号（详见表 2-1）

2.2.1.2 马奶酒样品预处理

经过调查发现，所有的采集样品马奶酒均是原奶自然发酵，因此其保质期很短，风味品质一直处于逐渐的变化过程，整体变化趋势与其发酵菌群有一定关系，整个加工过程没有相对统一的加工环境，因此为确保不同样品马奶酒中挥发性物质的稳定性与初始性，将采购回的马奶酒立即冷藏于 4℃待用，只在检测前将马奶酒放置于室温环境内，待其温度恢复至室温（约 25℃），立即进行挥发性成分提取与检测。

2.2.1.3 HS-SPME 萃取[37]

萃取头老化：将萃取纤维头(75μm CAR/PDMS/DVB)在 GC-MS 进样口于 250℃老化 30 min。取 5g 马奶酒样品于 15 mL 顶空瓶内，加入 10 μL 2-辛醇作为内标物，混合均匀，顶空瓶置于顶空固相微物萃取器水浴平台上，将萃取针插入顶空瓶，在 45℃下吸附 30 min。等待马奶酒挥发性成分吸附完成后，取出萃取头，迅速插入气质联用仪的 250 ℃进样口热解析 7 min，同时启动气相色谱-质谱仪采集数据。

2.2.1.4 GC-MS 测定条件[38]

气相色谱条件：色谱柱为 HP-INNOWAX 毛细管柱（30 m ×250 μm，0.25 μm）；升温程序：初始温度为 40 ℃，保持 5 min，以 7 ℃/min 的速率升温至 150 ℃，保持 5 min，

后以 7 ℃/min 的速率升温至 230 ℃，保持 5 min，进样口温度为 250 ℃。载气为氦气，流速为 1 mL/min，不分流进样，接口温度为 250 ℃。

质谱条件：EI 电离源；电子能量为 70 eV；灯丝电流为 80 μA；离子源温度为 230 ℃；四级杆 150 ℃。溶剂延迟 2 min，scan 标准扫描范围（35-750m/z）。

2.2.1.5 数据处理

定量分析：为准确定量，选取 2-辛醇为内标(10 μL，内标浓度)，根据检出峰面积大小与其质量大小等比例得出每种待检测物质的含量，从而得出相应物质的质量浓度[39]。计算公式为：

$$M2 = \frac{M1 \times R2}{R1}$$

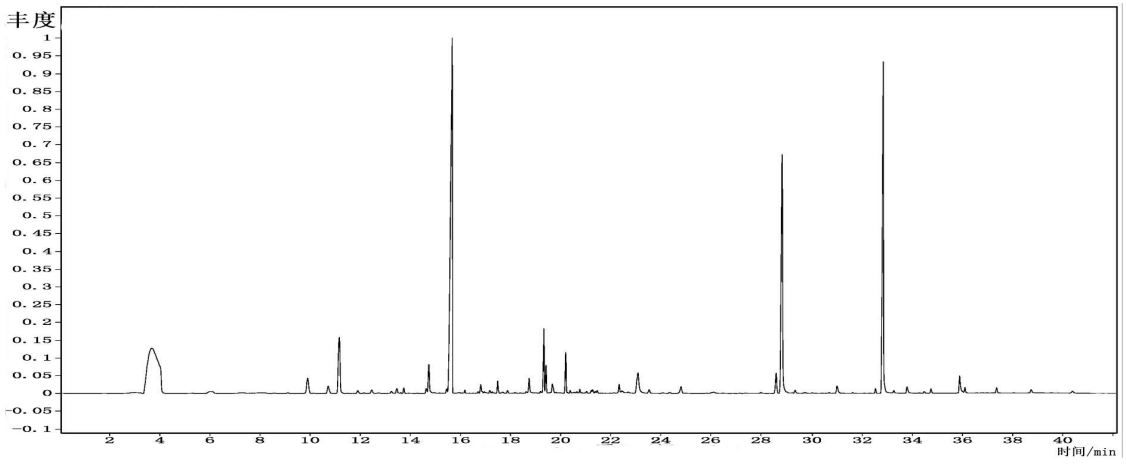
式中：M1 为内标的含量(μg/mL)，M2 为目标物的含量（μg/mL)，R1、R2 分别为内标与目标物的峰面积。

定性分析：分离出的未知物与 NIST 14 library 相匹配（仅选取匹配度大于 80 的鉴定结果）。

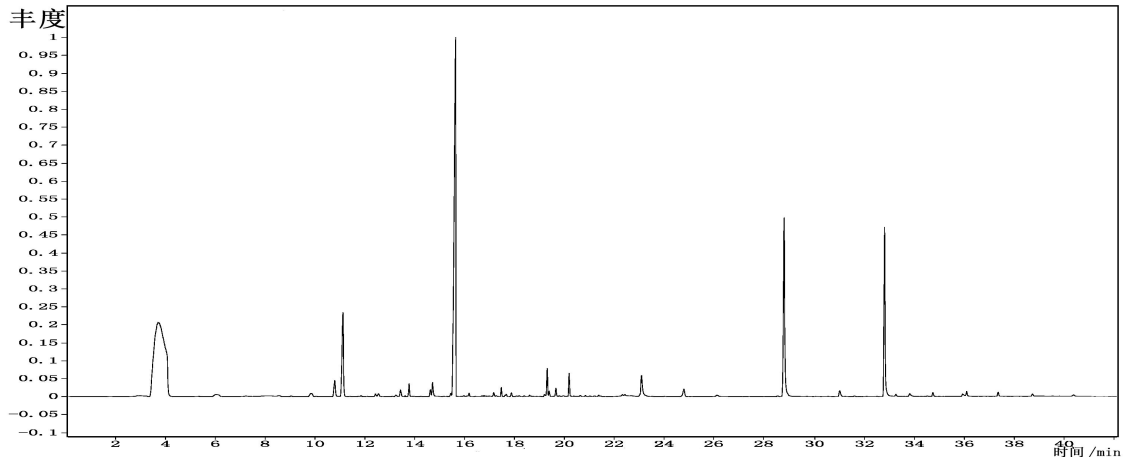
2.3 结果与讨论

2.3.1 马奶酒挥发性物质分析

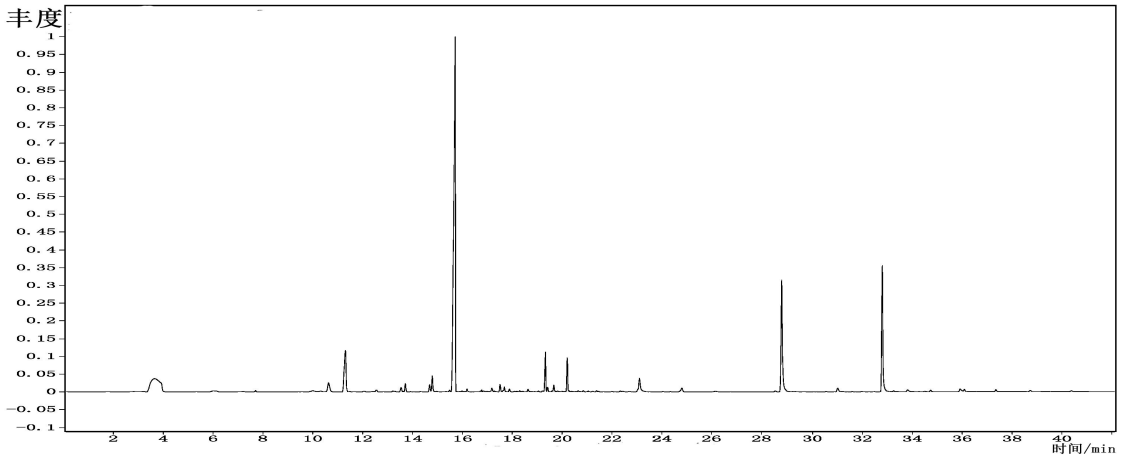
根据气质联用的原理，在相同标度下色谱图中峰值的高低能够作为参照物对各个挥发性成分含量大小进行对比，同时其中峰的突出与否代表了物质的种类丰富程度，本研究对新疆不同地区传统马奶酒中的挥发性物质进行分离鉴定，最终得到的在同一标度下质谱总离子流色谱图如图 2-1 所示。



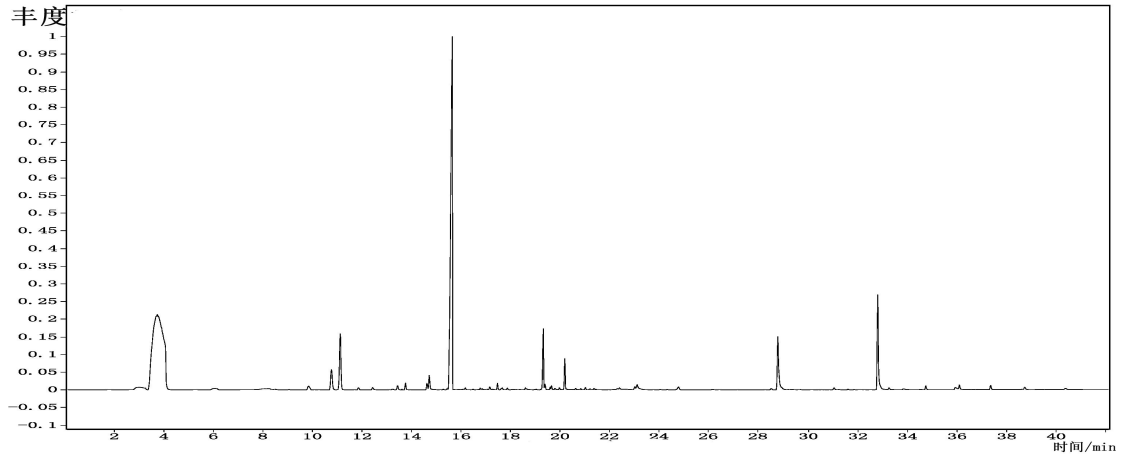
1 号（新疆阿尔泰地区布尔津县窝依莫克乡喀纳斯村）



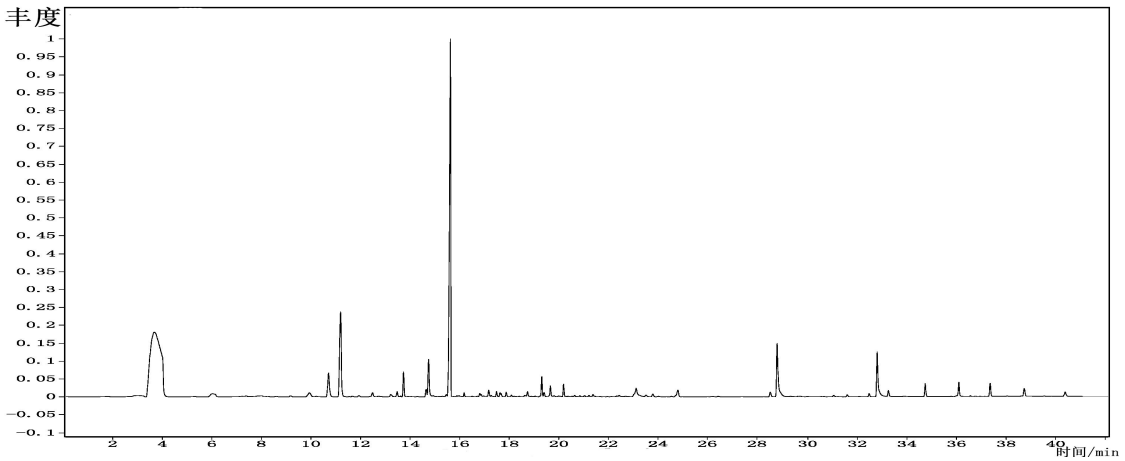
2 号（新疆塔城地区额敏县额玛勒郭楞蒙古民族乡）



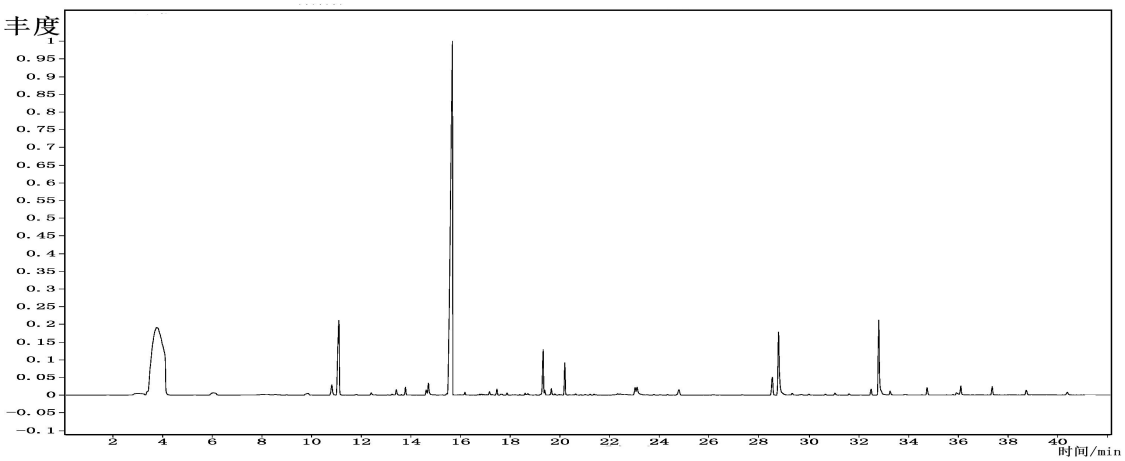
3 号（新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县种马场）



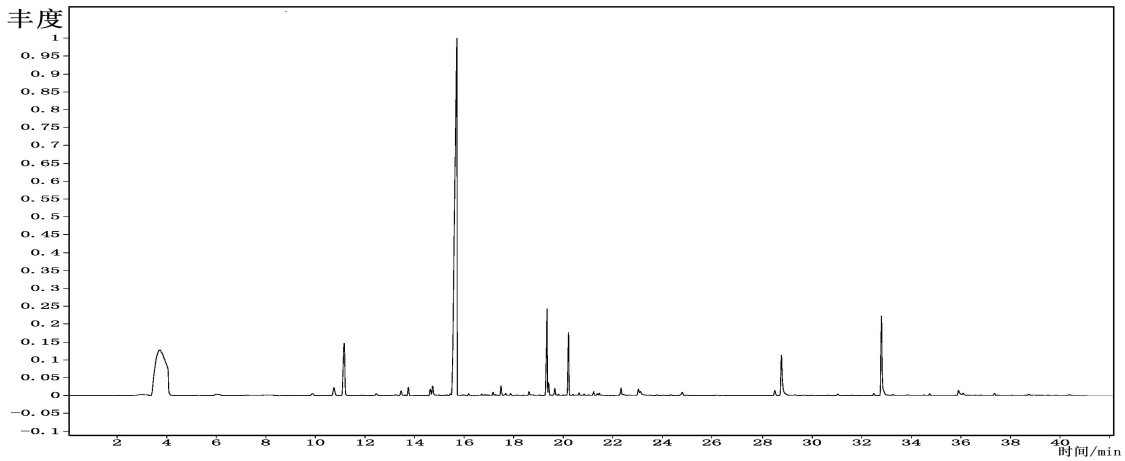
4 号（新疆伊犁哈萨克自治州新源县那拉提镇）



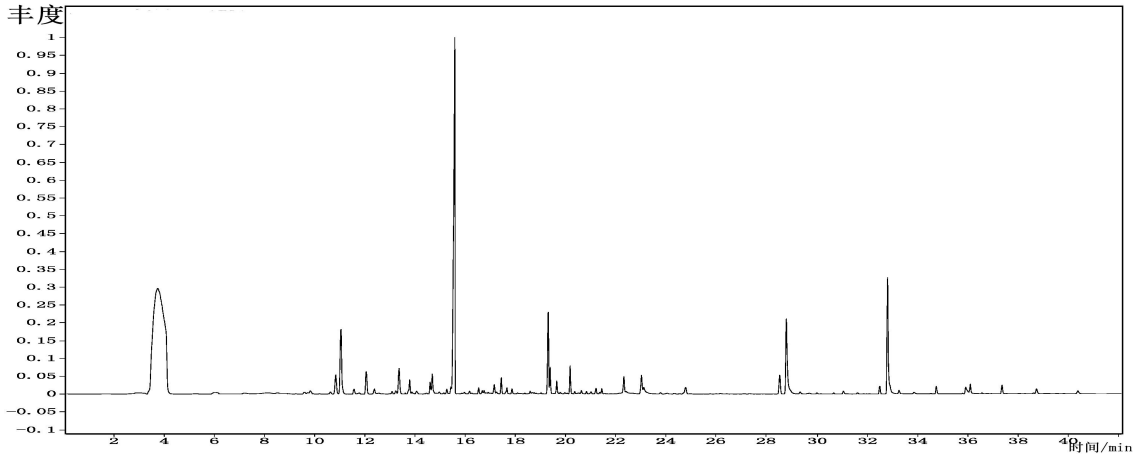
5 号（新疆巴音郭楞蒙古自治州和静县巴音布鲁克镇）



6 号（新疆克孜勒苏柯尔克孜州乌恰县）



7 号（新疆哈密市巴里坤县）



8 号（喀什地区塔什库尔干塔吉克自治县）

图 2-1 新疆 8 种马奶酒挥发性物质分析总离子流图

Fig.2-1 Total ion current chromatograms of volatile compounds in 8 koumiss form Xinjiang

采用 HS-SPME-GC-MS 技术，对新疆地区 8 种传统马奶酒进行全物质成分分析，得出的分析结果与 NIST 14 谱库进行比对，仅选取匹配分大于 80 分的结果，最终检测出马奶酒样品中挥发性物质共有 38 种，在去除各个由试验设备所造成的挥发性成分后，一共确定了 31 种挥发性成分。基于色谱图中峰值的高低能够在相同标度下对各个挥发性成分含量大小进行对比，以及所得色谱图中峰的突出数量多少，稀疏程度均可以代表了物质的种类丰富程度这一原则，由图 2-1 可以看出，色谱图基线平稳且没有过多波动，证明该条件符合马奶酒的萃取及分离鉴定条件。显而易见的是不同地区样品马奶酒样品的色谱峰峰型在同一丰度下挥发性物质数量较为丰富，同时整体的峰型结构与数量具有一定的相似性，侧面证明了虽然马奶酒产自不同地区，所采集马奶酒样品在加工工艺上存在着较为明显的差异，但是这些马奶酒在人拿到手的一瞬间，闻起来都能够一下辨识出是马奶酒。这是由于原料相同都为马奶，这就使得最终发酵而成的马奶酒在香气属性上相似。其次，发酵菌的种类主要就是乳酸菌和酵母菌[40]，虽然在菌种上存在差异，但最终代谢产物主体就是乳酸和酒精，因此存在一定的相似性。与此同时在明确不同地区样品马奶酒具有相似性的情况下，可以通过挥发性物质对比，去除差异性成分，得出共有物质从而确定马奶酒中关键挥发性物质组成。

2.3.2 马奶酒中挥发性成分鉴定结果

本研究采用内标法定量，谱库定性，将质谱定性结果按出峰时间由低至高排列，最终得出 8 个不同地区的传统马奶酒中挥发性物质的 GC-MS 鉴定结果见表 2-3。

表 2-3 不同样品中挥发性物质的 GC-MS 鉴定结果

Table 2-3 Analytical results for GC-MS identification of volatiles in different samples

名称	保留时间/min	分子式	样品名称（相对质量%）(“-”表示未检出)							
			1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号
乙酸乙酯	2.941	$C_4H_8O_2$	-	-	-	1.94	0.81	1.18	0.67	-
丁酸乙酯	5.995	$C_6H_{12}O_2$	0.54	0.82	-	-	1.58	0.98	-	-
β-松油醇	9.834	$C_{10}H_{18}O$	-	0.69	-	0.81	1.27	-	-	-
柠檬烯	9.882	$C_{10}H_{16}$	1.68	-	-	-	-	-	-	-
异戊醇	10.708	$C_5H_{12}O$	0.75	1.88	1.79	3.28	4.23	1.33	1.10	2.56
己酸乙酯	11.149	$C_8H_{16}O_2$	5.34	10.01	7.12	8.32	15.09	9.95	6.80	8.82
庚酸乙酯	13.441	$C_9H_{18}O_2$	0.38	0.63	-	-	-	-	-	-
乳酸乙酯	13.754	$C_5H_{10}O_3$	-	0.93	0.79	-	2.45	0.64	-	1.52
2-壬酮	14.667	$C_9H_{18}O$	-	-	0.74	-	0.89	-	-	1.01
壬醛	14.716	$C_9H_{18}O$	1.92	1.28	1.61	1.66	4.65	1.27	0.92	2.10
辛酸乙酯	15.653	$C_{10}H_{20}O_2$	35.49	44.13	53.88	58.80	46.45	61.74	67.45	41.19
癸醛	16.792	$C_{10}H_{20}O$	0.56	-	-	-	-	-	-	-
壬酸乙酯	17.449	$C_{11}H_{22}O_2$	-	0.62	0.62	-	-	-	0.77	-
反式-2-壬烯醛	17.465	$C_9H_{16}O$	0.66	-	-	-	-	-	-	1.24
十一醛	18.723	$C_{11}H_{22}O$	0.98	-	-	-	-	-	-	-
癸酸乙酯	19.308	$C_{12}H_{24}O_2$	3.03	1.90	3.17	5.36	1.83	3.61	6.40	7.26
反式-2-癸烯醛	19.397	$C_{10}H_{18}O$	1.37	-	-	-	-	-	0.94	2.09
壬醇	19.637	$C_9H_{20}O$	-	0.67	0.62	-	0.80	-	-	1.15
壬烯	19.645	C_9H_{18}	0.73	-	-	-	-	-	-	-
反式-2,4-癸二烯醛	22.314	$C_{10}H_{16}O$	0.53	-	-	-	-	-	-	1.69
己酸	23.008	$C_6H_{12}O_2$	-	2.79	2.36	1.05	-	1.24	0.70	1.15
月桂酸乙酯	23.068	$C_{14}H_{28}O_2$	2.46	-	-	-	-	0.76	0.72	2.12
庚酸	23.105	$C_7H_{14}O_2$	-	-	-	-	2.36	-	-	-
十四酸乙酯	28.59	$C_{16}H_{32}O_2$	1.49	-	-	-	-	1.95	-	2.13
辛酸	28.823	$C_8H_{16}O_2$	18.19	19.24	14.09	7.83	8.92	7.97	5.19	10.38
壬酸	31.011	$C_9H_{18}O_2$	0.62	-	-	-	-	-	-	-
癸酸	32.862	$C_{10}H_{20}O_2$	21.46	14.40	13.21	10.94	6.56	7.39	7.60	12.44
二十三烷	33.279	$C_{23}H_{48}$	-	-	-	-	0.72	-	-	-
9-癸烯酸	33.8	$C_{10}H_{18}O_2$	0.50	-	-	-	-	-	-	-
二十四烷	34.762	$C_{24}H_{50}$	-	-	-	-	1.41	-	-	-
月桂酸	35.908	$C_{12}H_{24}O_2$	1.32	-	-	-	-	-	0.74	1.15

由表 2-3 可知，选自八个地区新疆传统马奶酒样品中共分离鉴定出来 31 中挥发性成分，具体的是包括了酯类 10 种，酸类 7 种，醛类 6 种，烃类 4 种，醇类 3 种，1 种酮类（表 2-3）。在这 31 中挥发性成分中，种类虽然繁多，含量在不同地区样品马奶酒中差异也十分明显，但是仍旧能够在其中找到 7 种物质是新疆不同八个地区传统马奶酒样品中所共有的，这些物质是异戊醇、己酸乙酯、壬醛、辛酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸和癸酸。然而，种类上的相似不能够作为马奶酒差异性分析的标准，因为尽管不同地区样品马奶酒挥发性物质种类组成相似，但是风味物质的细微差异就会导致马奶酒的整体香气成分发生巨大的改变，关键性呈味物质的变化与差异会直接造成最终马奶酒的差异，上面的表中每种挥发性物质的相对组成含量能够看出具有明显的差异。与此同时在通过内标法（详见 2.2.1.5）计算出每种挥发性物质含量，为了更加直观的对比含量上的差异，在浓度统一的情况下分别计算每种挥发性成分的相对含量，这样就能够直观的观察出各个挥发性成分的含量在其所有挥发性物质构成中所占比例。八个不同地区样品的马奶酒的挥发性物质种类差异巨大，但是数量差异不大，从 10-20 种不等，也就是说马奶酒中风味成分复杂程度不高，种类最多的为 1 号阿尔泰布尔津县的图瓦人马场自酿的马奶酒，种类含量最少的为 4 号伊犁新源县市场采购的农家自酿马奶酒。马奶酒所含挥发性物质种类不同直观的体现为：1 号的整体酒味更加丰富，而 4 号的奶酒香味略显单一整体香味不够浓郁。根据表 2-3 得出具体参数，采用单因素方差分析结合了 Duncan 多重比较得出不同地区样品马奶酒中按物质大类的各物质成分总含量[41]，详见表 2-4。

2.3.3 新疆不同地区马奶酒样品挥发性物质的总含量

表 2-4 新疆不同地区马奶酒样品挥发性物质的总含量

Table.2-4 The total contents of different groups of volatile compounds identified from koumiss samples from different areas in Xinjiang

样品	酯类（%）	酸类（%）	醛类（%）	醇类（%）	烃类（%）	酮类（%）
1	48.72^{d}	42.09^{a}	6.03^{a}	0.75^{d}	2.41^{d}	0^{c}
2	59.05^{b}	36.44^{a}	1.28^{a}	3.23^{c}	0^{c}	0^{b}
3	64.96^{c}	29.66^{a}	1.61^{a}	2.41^{b}	0^{a}	0.74^{a}
4	74.42^{a}	19.83^{a}	1.66^{a}	4.09^{a}	0^{a}	0^{a}
5	68.21^{a}	17.83^{a}	4.65^{a}	6.29^{b}	2.12^{b}	0.89^{a}
6	80.80^{a}	16.60^{a}	1.27^{a}	1.33^{a}	0^{a}	0^{a}
7	82.81^{a}	14.23^{b}	1.86^{b}	1.10^{a}	0^{a}	0^{a}
8	63.04^{a}	25.13^{c}	7.12^{c}	3.71^{a}	0^{a}	1.01^{a}
平均值	67.75	25.23	3.19	2.86	0.57	0.33

注：不同样品间主要挥发性物质类别上角标“abc”为 ANOVA 方差结果分析，表明组间差异性。

由表 2-4 可以看出，八个不同地区样品的新疆传统马奶酒样品中挥发性物质主要是由酯类和酸类构成，在相同的马奶酒浓度下，这两大类挥发性成分相对含量基本占到了

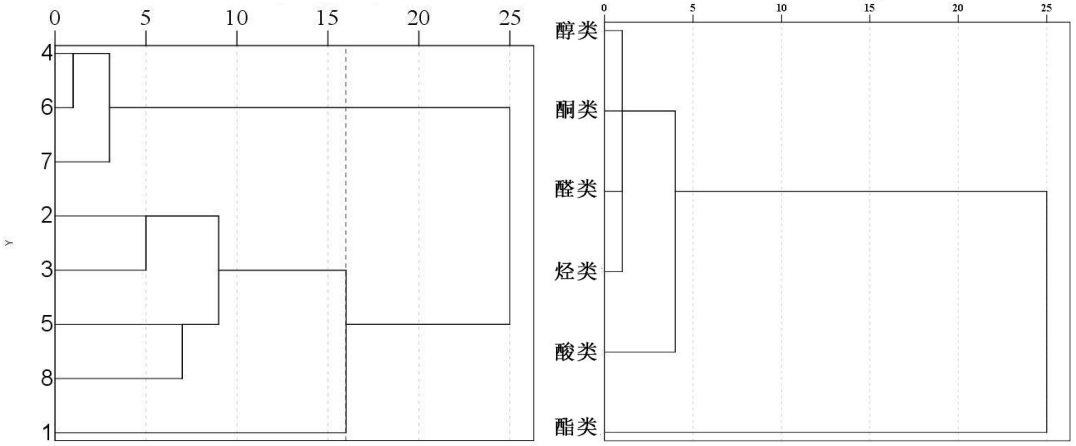
整体挥发性含量的 80%以上，具体的是酯类和酸类分别占新疆不同采集区马奶酒挥发性成分整体的 86.04%-97.40%，所得的平均含量占总体挥发性物质含量百分比为 90.98%。由此可见，马奶酒中酯类、酸类是最主要的两大类挥发性物质。酯类，具体占每组样品中挥发性物质总量的 48.72%-82.81%， 其平均含量占平均百分数含量为 67.75%。相关研究表明，食品中的酯类通常具有香甜的气味，或是奶香的风味 [42]，整体上大部分酯类具有舒适宜人的香气，酯类物质在水果的挥发性物质构成中占有绝对主体地位，同时在各类酒中具有重要风味构成作用，是酒类的重要的芳香物质之一。结合表 2-3 不难看出，马奶酒中以乙酸乙酯、己酸乙酯、丁酸乙酯等 酯类物质居多，同时这些乙酯类物质中又多以碳个数低于或等于 10 的碳链为主碳链，综合这些因素，能够推断出酯类成分的含量巨大一定程度上是由于传统发酵马奶酒中，经过酵母菌发酵产生了大量的乙醇，在乙酰转移酶等酶类的协同酶解反应下产生了酯化反应，这就使得乙酯类含量相对较高[43]。在酯类物质含量相对较高的为己酸乙酯和辛酸乙酯，含量平均高达 8.93%和 51.15%。

在马奶酒中酸类物质的含量仅次于酯类物质的相对含量，酸类物质占总挥发性物质含量的 14.23%-42.09%，平均含量达到 25.23%。在这些酸类物质中出现频率较高的酸类有己酸、辛酸与癸酸。根据马奶酒发酵工艺原理推断，马奶酒中挥发性酸类物质较高的原因是由于马奶在发酵的过程中乳酸菌中会产生大量的酸类物质，这与采集到的马奶酒样品的感官体验上呈现酸味十分明显相吻合。同时，酸类物质易挥发、易被萃取的特点也是最终导致马奶酒中挥发性物质检测含量较高一个重要原因[44]。通过差异性分析对比新疆地区的八种马奶酒中酸类物质，能够得出 1-6 号的样品差异性不显著侧面说明这些样品具有一定相似性，证明了大部分新疆地区的马奶酒，在酸类的种类与含量上是具有相似性的。这也符合马奶酒样品感官体现的结果。

醛类物质在马奶酒挥发性物质构成中也占有重要地位，醛类物质占总挥发性物质总量的 1.27%-7.12%，平均含量为 3.19%，位列所有挥发性成分含量中第三位。更为重要的是壬醛为 8 组不同地区样品马奶酒挥发性物质中的共有物质之一，占总含量的 0.92%-4.65%，平均含量为 1.93%。虽然醛类物质的总含量相对于酯类与酸类来说相对较低，但是醛类物质通常情况下具有较低的感官阈值，因此醛类物质含量的细微改变亦可对食品风味产生显著的影响。酮类物质在马奶酒中含量较低，仅检测出 2-壬酮一种酮类物质，分别占马奶酒种挥发性成分的 0%-1.01%。

2.3.4 不同地区 8 种马奶酒样品挥发性物质的聚类分析

图 2-2 为在同一度量标准下，基于欧式平方距离映射后 8 种不同地区马奶酒样品及其主要类型挥发性成分聚类分析结果。



a　　b

a 不同样本间，b 不同挥发性物质间.

图 2-2 不同地区马奶酒样品的聚类分析图

Fig. 2-2 Cluster pedigree diagram of volatiles among 8 kinds of koumiss

由图 2-2 a 可知，通过聚类分析可以明显的将八种新疆不同地区的马奶酒样品进行分类。欧氏距离的分类原则是根据各组样本间相似程度大小，如果说两样本相似性越大，那么就会在越小的欧氏距离下归为一类[45-49]。因此在同一度量标准下进行聚类分析，将各个地区马奶酒样品中，所有挥发性成分的含量作为聚类的数据源，可以由图 2-2 直观的得出所收集的不同地区的马奶酒样品，明显分成 2 个类群；第一大类在欧式距离为 3 的时候 4、6、7 号样品可以归为一类，证明这三款传统马奶酒的挥发性物质种类与含量的相似性较高；当欧氏距离达到 9 时，一共为 4 个样品 2、3、5、8 形成第二大类群。结合表 2-3 也可以得出这 4 个地区的马奶酒在差异性分析上也显示的为不显著，侧面证明具有相似性；当欧氏距离达到 16 时所有地区新疆马奶酒最终可归为一类，16 的距离与 25 这一极限相距较远，因此证明了虽然这些马奶酒样品有一定差异性，但由于原材料的相近，使得整体挥发性物质构成上也具有一定相似性。

然而到底是什么原因造成这些马奶酒产生差异，根据前期研究结果及相关研究成果发现导致这些差异的原因包括新鲜马奶原料的选择、马奶酒发酵剂的差异、发酵过程中加工方式的不同，这些因素导致马奶酒挥发性成分的差距进而形成了各自独特的风味特征。为更进一步的分析，从第一类群（4、6、7 号）的挥发性物质构成入手，发现这几种马奶酒的风味物质构成比例相近，最为明显的是酯类物质的比例均高达 74%以上，相对于酯类，其它类物质的含量相对较低。反观第二类群的 1、2、3、5、8 号马奶酒，最为明显的是酯类物质的含量均低于 68%，与此同时其它挥发性物质如酸、醛、醇类挥发性化合物种类丰富，由于挥发性成分的复杂性会带来更多的风味感受与体验，这就能够

使得越是风味成分多的马奶酒，它的整体风味就越是醇厚浓郁。第二大类的样品多采购于牧民家中或是牧场周边，而第一类群的马奶酒采购于市场中，市场商品化加工售卖质量可能相较于当地牧民自家酿造自给自足的马奶酒略微不足。此外牧民自酿的马奶酒多采用更为原始，更为传统的自然发酵，发酵过程采用的多是陈年器物，如同白酒的窖泥一般，具有了自己独特的特色，而且自酿马奶酒可以做到不外加菌种，或是直接使用数月前就预留好的“酵头”直接发酵，而市场购买的马奶酒会采用外加商业酒曲的方式进行发酵[50 52]，不可忽视的是新鲜马奶奶源的品质也直接导致了最终马奶酒的风味品质。

挥发性物质组成的差异不仅体现在各单一物质的含量差异，大类物质的整体改变也会对马奶酒的风味构成产生影响，通过对所收集的马奶酒样品中的酯类、酸类、醇类、醛类、酮类、烃类进行聚类分析，能够更为直观的得出导致不同地区马奶酒样品风味差异的关键物质种类。由图 2-2b 可知，在标度为 4 时所有挥发性物质可归为两大类，当距离达到 25 时所有挥发性物质归为一类，酯类物质在同一度量标准下与其它大类物质间的欧式距离差最大，这就证明了酯类物质所产生造成的差异对马奶酒品质的影响较其它几类物质更为显著。由于奶源的品质的不同或是菌种含量及种类的不同，可能是导致最终发酵后酒精含量存在差异，导致酯化反应效率不同，最终使得酯类物质产生较为明显的差异。同时，香气之间具有交互作用，如果马奶原本的香气浓郁度，那么最终马奶酒的整体香味也会有明显的提升。综上所述，新疆马奶酒产业需要标准化整个生产过程，从最初的奶源选择，到菌种的筛选以及发酵工艺的优化等过程相结合从而做到马奶酒产业规范化。

2.4 本章小结

（1）新疆 8 个不同地区传统马奶酒样品共检测出 31 种挥发性物质，马奶酒中挥发性成分主要包含酯类、酸类、醛类、醇类、烃类、酮类，其中酯类与酸类物质含量种类最多，其次为醛类和醇类物质。所有挥发性成分中共有 7 种为 8 个地区马奶酒共有挥发性成分，分别为异戊醇、己酸乙酯、壬醛、辛酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸、癸酸。

（2）聚类分析可以看出 8 个不同地区的马奶酒样品挥发性物质存在显著差异，通过聚类可以分为 2 个类群，能够客观真实的反映了样品信息的真实性。

（3）通过对不同大类物质的聚类分析得出造成不同地区马奶酒样品差异性的关键物质为酯类物质，如己酸乙酯和辛酸乙酯等可能是造成马奶酒样品不同风味的主要因素。

第三章 基于响应面法对马奶酒发酵工艺研究与参数优化

传统马奶酒的风味品质由于加工工艺的局限存在明显的差异性，这是不可避免的。由于其采用的发酵手段有使用外加带酵母产物的水果如葡萄干或是采用带有酵母或乳酸菌的器物，如多次使用的马皮桶等，这就使得经过传统发酵工艺所得马奶酒具有很多的不可控制因素，这些因素的产生最大原因是菌群的复杂性，以及发酵条件的多样性。为了能够科学有效的探究马奶酒发酵工艺中关键工艺对马奶酒风味品质的影响，首先需要减少因素的复杂性，以及建立出一套科学有效的感官评价属性及评分标准。这样才能够确定出具体的马奶酒发酵过程是由于那种因素导致。

为明确马奶酒发酵过程中马奶酒具体挥发性成分发生了何种变化，以及确定马奶酒的发酵过程中各项参数对马奶酒最终风味品质的影响。在发酵过程中，　　限定了其它影响因素大小为 0，仅仅探究所需要明确的因素。因此基于响应面法对马奶酒中关键的 3 个因素进行的优化与分析。分别对酒曲（酵母菌：乳酸菌为 2：1）添加量，发酵时间，发酵温度进行优化。

3.1 试验材料与仪器

表 3-1 试验试剂

Table3-1 experiment reagents

试剂名称	纯度级别	生产厂家
安琪酵母	99%	郑州谦顺化工产品有限公司
保加利亚乳杆菌	100 亿-1000 亿/克	青州市向日葵生物有限公司
新鲜马奶		图瓦人牧民家中购买

表 2-2 试验仪器

Table3-2 experiment instruments

仪器名称	型号	生产厂家
恒温水浴锅	HSQ-3	上海智域分析仪器制造公司
电磁炉	C-16F	青岛澳柯玛科技电器有限公司
磁力搅拌器	85-2	江苏金壇医疗仪器厂
电子分析天平	WSC-S	上海精密科学仪器有限公司
全自动新型生化培养箱	ZXSD-1160	上海智城分析仪器制造有限公司
超声波清洗器	KQ-200VDE	昆山市超声仪器有限公司

3.2 试验内容

3.2.1 试验方法

3.2.1.1 马奶酒发酵工艺流程

为了明确马奶酒发酵工艺对最终风味品质影响，将传统马奶酒的发酵方法与试验室马奶酒发酵工艺相结合，同时为了明确马奶酒发酵的关键影响因素，需要对马奶酒发酵工艺进行优化以及精炼，最终确定其工艺流程为[11]：新鲜马奶的收集及筛选→盛装马奶酒容器消毒→新鲜马奶的预处理→新鲜马奶的灭菌→冷却至室温→接种混合菌液→培养箱酒精发酵→灌装至储存容器→成品马奶酒

3.2.1.2 新鲜马奶的预处理

由于新疆地区产马奶的养殖区都为山区，路途相对较远，马奶的采集环境相对较为复杂。周围的泥土，微生物，环境温度，植被等等都会对马奶的最初品质产生一定的影响。因此为了避免周围的环境对新鲜马奶造成系统或是人为误差，需要对所采集的所有马奶原料样品进行预处理，从而达到减少其中动物毛发及周围环境如泥土灰尘等的影响的目的。由于采集的马奶均是当天提前预定好现挤奶，所以不需要添加任何的防腐剂或其它添加剂，原始的新鲜马奶最优。提前预备好一个洗净的桶，桶面包裹 3-4 层洗净的纱布，将挤奶桶中的马奶缓缓的倒入桶中。直到肉眼无法看见明显的杂质为止。随后将马奶放入锅内煮至微微沸腾（95℃），持续 3-5 min，迅速倒入事先准备的瓶装容器中，冷却至室温，留待试验用。

3.2.1.3 马奶酒的感官评价评分标准的建立

本研究的主要目的是对马奶酒发酵工艺与发酵后马奶酒风味品质间的相关性进行探究，从而能够明确马奶酒的关键发酵因素。因此仅仅以传统的酒精度或是酸度等理化指标作为评价马奶酒的发酵优劣的唯一标准，是过于片面的及背离本研究核心的。因此，在符合我国对奶酒发酵各个参数要求的国家标准（GB/T 23546-2009）[53]的前提下，构建出标准的感官评价指标，以及建立出详细的感官评分标准是重中之重。对于感官评价指标，主要研究的是嗅觉上的差异，口感与视觉上主要为辅助因素。

为了降低由感官评定人员、评定重复次数间的差异对样品评定结果的影响，样品风味的感官评定采用描述性感官分析进行评定[54]。具体操作如下[55-56]：感官评价组构成为 4 名男性，2 名女性，共 6 人组成感官测试小组。为保证感官评定结果科学有效，能够用于后期指导工艺优化，在对样品进行评价前先进行感官培训。第一步评价小组组长制定出产物中可能出现的香气或者是不良风味属性，并就相关感官属性与小组成员进行讨论，当意见达成一致时，对已选择的 5 个感官属性（马奶香、发酵香、醇香、浓厚感和异味）评分标准进行进一步的统一，最后对样品进行评估。总分均为 10 分（浓厚感属性除外），以 5 分为心理承受标准线，对不良属性异味以负分记录。对于浓厚感，单独用 5 分（0 完全无味，1 有淡淡气味，2 有一定浓香感但不明显，3 有较浓烈的香气，4 有十分明显的浓厚感，5 有非常明显的浓厚感且嗅闻过后 就能够感觉），评价完成后, 记录评价结果，每个样品记录 3 次，取平均值，对于偏差过大的多进行一次试验验证原因。

3.2.1.4 马奶酒发酵液的制备

参照使用说明书将购买的市售发酵菌种分别放置于 37℃活化半小时，后按照酵母菌与乳酸菌为 2:1 的比例进行配制，最终形成马奶酒酒曲。根据近几年相关的研究表明，马奶酒的酒曲接种量范围在 6%-10%之间。

3.2.2 不同发酵条件对马奶酒风味品质影响的单因素试验

3.2.2.1 不同酒曲接入量对马奶酒风味品质的影响

确定了发酵时间为 72h，发酵温度为 30℃，酒曲接入量分别为 6%、7%、8%、9%、10%，将已精确称量的 15 组 150g 新鲜马奶样品分成 5 组每组 3 个样品，分别接入以上含量的酒曲摇匀，在恒温培养箱按照指定的温度，培养至规定时间后，取出，放置室温进行感官评价，感官评价方法如 3.2.1.3 所示。在此过程中需要注意的是必须将马奶酒样品摇匀且平均封装至小杯中，因为在预试验过程中发现，未摇匀的马奶酒上清液不具有明显的马奶酒风味，且酒精的醇香味过浓，还带有淡淡的臭味。其次新的容器小样分装十分重要，恒温箱中长期处于一种潮湿恒温恒湿环境，因此具有一定异味，如果依旧以该锥形瓶为评价的容器，会严重降低感官评分。

3.2.2.2 不同发酵时间对马奶酒风味品质的影响

确定了酒曲的接入量为 8%，发酵温度为 30℃，发酵时间以一天为间隔，分别为 1 天，2 天，3 天，4 天，5 天，将已精确称量的 15 组 150g 新鲜马奶样品分成 5 组每组 3 个样品，分别接入 8%已配置好的酒曲，在恒温培养箱按照指定的温度，培养至规定时间后，取出发酵后马奶酒，放置于室温后进行感官评价，感官评价方法如 3.2.1.3 所示。在此过程中需要注意的是必须将马奶酒样品进行摇匀且打乱顺序的平均封装至小杯中进行感官评价。

3.2.2.3 不同发酵温度对马奶酒风味品质的影响

确定了酒曲的接入量为 8%，发酵时间为 72 小时，发酵温度分别为 25℃，28℃，31℃，34℃，37℃，将已精确称量的 15 组 150g 新鲜马奶样品分成 5 组每组 3 个样品，分别接入 8%已配置好的酒曲，在恒温培养箱按照指定的温度，培养至规定时间后，取出发酵后的马奶酒，放置于室温后进行感官评价，感官评价方法如 3.2.1.3 所示。在此过程中需要注意的是必须将马奶酒样品进行摇匀且打乱顺序的平均封装至小杯中进行感官评价。

在单因素的设定上并没有引入不同产地的马奶，也没有引入发酵过程中经常加入糖源物质，因为在传统马奶酒发酵的过程中，并没有加糖的过程，这也使得最终马奶酒发酵工艺探究的过程与传统马奶酒的工艺相切合，同时如果此时将糖当作是一个影响因素将会引入许多系统差异变量，这会使得前期在确定马奶酒的特征风味品质及关键挥发性成分时失去参考价值，所以本章内容对于马奶酒的奶源不作为关键影响因素考虑。

3.2.3 马奶酒感官属性与发酵工艺相关性分析

为了能够直观的看出马奶酒在不同发酵条件下发酵效果对各个风味品质的影响，在每种单因素指标条件下，以感官评分为数据源构建马奶酒风味雷达图，从各个感官属性

上对马奶酒发酵工艺的优劣变化进行预测。

3.2.4 马奶酒发酵工艺对其感官评分影响的响应面分析

采用 Design-Expert 8.0 软件应用响应面分析法，根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理，结合前期单因素试验，以感官评价得分为响应值，对单因素试验结果进行响应面试验，采用模糊性感官评价方法确定最终感官评分，研究发酵工艺对最终发酵马奶酒的风味品质影响，确定最佳工艺路线。

3.2.5 数据分析

采用 Origin 8.5 进行绘图，SPSS 19.0 软件进行进行 ANOVA 方法分析，Design-Expert 8.0.5 软件应用响应面分析。

3.3 试验结果与分析

3.3.1 不同酒曲接入量对马奶酒风味品质的影响

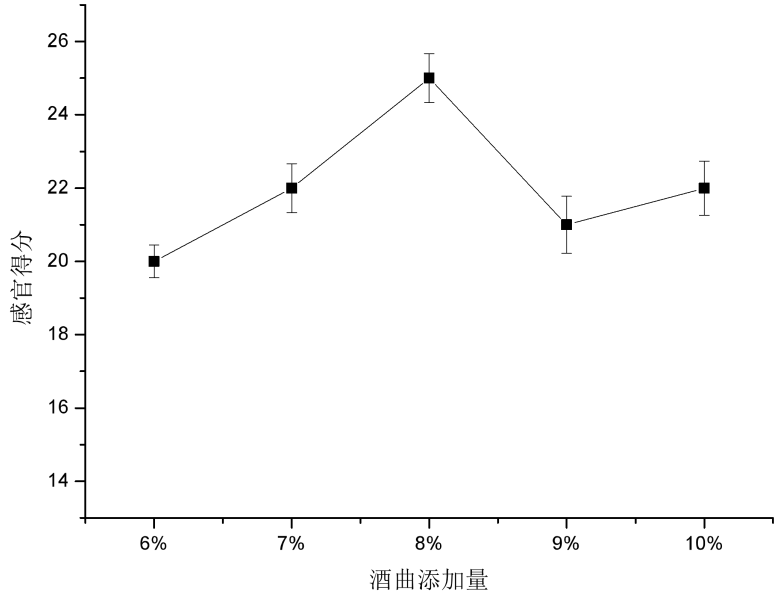


图 3-1 酒曲添加量对马奶酒风味品质的影响

Figure 3-1 Effect of addition of yeast on flavor quality of kumiss

如图 3-1 所示，酒曲的添加量对马奶酒的风味品质具有明显的影响，这是由于马奶酒发酵过程涉及两个代谢过程[61-62]。其中酵母菌的酒精产生量与乳酸菌的乳酸产生配比如果恰到好处的话，则感官评分就会很高，如果其配比不合适则最终即使酒精含量合适，酸度合适，可最终感官得分会很低。如图能够看出在添加量为 6%和 7%时，酒曲的含量相对于 8%时略低，因为这几个参数都是目前奶酒生产的酒曲添加大致范围[11]，所以产出的马奶酒评分都不是很低，但是由于酵母菌的含量与酒精发酵产量在合适的范围内成正比，同样乳酸菌发酵与乳酸的产量在一定范围内也是成正比关系。乳酸菌能够将马奶中蛋白质转换成乳酸和其他带有香味的有机物，因此如果酵母含量相对较高，乳酸菌含量相对较低则最终产生的风味物质有限，会使得发酵出的马奶酒仅仅具有酒的浓烈感，而不具有奶酒的奶香或是发酵香。而酵母菌由于是兼性厌氧菌所以具有前期发酵优势，

但是如果乳酸菌含量相对较高，则会使得其优势期过短，最终导致发酵所得的马奶酒酒香评分很低，还有酸度过高产生酸败味，让人难以品尝，这也就是为什么随着酒曲含量增加至 9%，10%时感官评分会稍微降低，因此需要选择合适的酒曲添加量 8%，作为最佳添加量。

3.3.2 不同发酵时间对马奶酒风味品质的影响

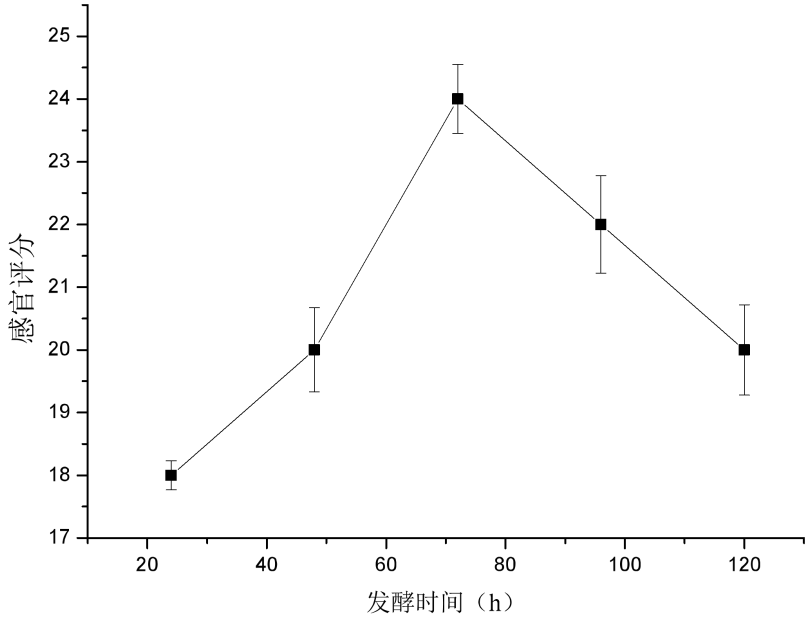


图 3-2 发酵时间对马奶酒风味品质的影响

Figure 3-2 Effect of fermentation time on the quality of Koumiss

如图 3-2 所示，当发酵时间由短至长升高时，马奶酒的感官评分呈现先上升后下降的趋势。发酵的时间影响的是酵母菌和乳酸菌产代谢产物的量，并不是时间越长发酵效果越佳。如图在发酵时间为 24h 时马奶酒的感官评分很低，这主要是由于发酵的时间过短，酵母菌的产酒精过程并没有结束，氧气仍存在，所以乳酸菌还没有进行发酵，因此风味物质的含量会很低，随着时间增长，乳酸菌逐渐的开始发酵产香，这就使得马奶酒的风味构成逐渐的从酒香加马奶原本的香气，逐渐变为酒香加马奶香加上发酵后的酵香。然而并不是马奶酒的发酵时间越长就越能够得到好的产物。因为无论是酵母菌还是乳酸菌发酵都是一个消耗有机物及马奶中的蛋白质以及糖的一个过程，过长时间的发酵会使得酸味过浓直到变为酸败味，如过期的牛奶一样，会极大的掩盖掉马奶原本该有的奶香气，这也就使得如图在 96h 和 120h 时整个感官评分下降明显。因此选择 72h 作为发酵最佳时间。

3.3.3 不同发酵温度对马奶酒风味品质的影响

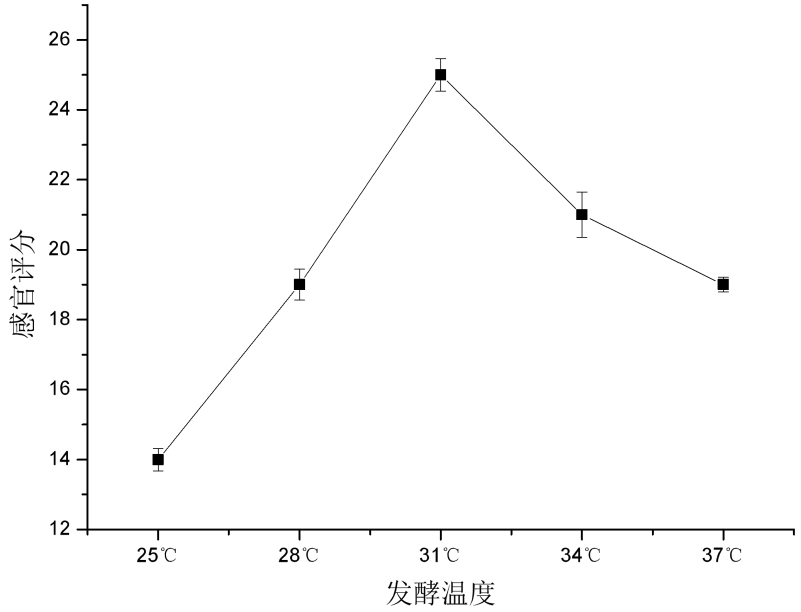


图 3-3 发酵温度对马奶酒风味品质的影响

Figure 3-3 Effects of fermentation temperature on flavor quality of Koumiss

微生物的生长除了与生长环境中的能量来源有关，还与温度有关，温度是影响其繁殖速度以及代谢速度的一个重要因素。如图 3-3 所示，从 25℃到 37℃随着温度逐渐的升高马奶酒的感官评分整体呈现先明显升高后缓慢降低，最后又略微升高的趋势。这主要是由于发酵的温度发生改变会促进或是抑制微生物的生长。具体变化如下，在 25℃时酵母菌并没有达到发酵的最佳温度，其繁殖速度与发酵速度都很低，这就使得马奶酒几乎没有产出香气物质与酒精，当达到 28℃时，马奶酒的发酵温度略微升高，促进了酵母菌的发酵效果，使得醇香这一属性提高明显。当达到 31℃时，马奶酒中的酵母菌与乳酸菌均是达到了合适的发酵温度，使得整体的感官评分最高，当温度在升高超过 31℃时，对酵母菌的繁殖速度产生了抑制作用，这就是导致其最终产物减少，感官评分降低的原因，当发酵温度达到 37℃时感官评分又略微上升了一些，这可能是有两种原因，其一是评价人员的误差使得评分趋势略微改变，第二种原因可能是，虽然 31℃以上影响的酵母菌的繁殖，但是在 37℃时对乳酸菌的繁殖或代谢有一定促进作用，这样一来乳酸菌代谢的增加会使得发酵香和浓厚感的评分相对提高，但同时带来的异味也会增加，所以整体的感官评分会略微升高，但是最终整体的趋势并没有发生明显的改变，因此，选择 31℃为最佳发酵温度。

3.3.4 响应面分析法优化提取试验结果与分析

3.3.4.1 回归模型的建立及方差分析

基于前期的单因素试验，初步了解了各个因素的大致最优点及相对最优的范围，在此基础上探讨优化马奶酒的发酵效果的各个因素(酒曲添加量、发酵时间、发酵温度)进行三因素三水平的响应面试验。响应面试验设计和结果分别见表 3-3 和表 3-4

表 3-3 响应面试验的因素水平表

Table3-3 response surface experimental factor level table

编码	因素	水平		
		-1	0	+1
A	酒曲添加量%	7%	8%	9%
B	发酵温度℃	28	31	34
C	发酵时间 h	48	72	96

表 3-4 响应面分析及结果

Table **3-4 Response surface analysis and results**

序号	A：酒曲添加量%	B：发酵温度℃	C：发酵时间 h	感官得分
1	0	-1	1	17
2	0	0	0	20
3	0	0	0	21
4	0	0	0	20
5	-1	0	1	17
6	1	0	1	17
7	-1	1	0	18
8	-1	-1	0	16
9	-1	0	-1	17
10	0	-1	-1	18
11	1	1	0	18
12	1	-1	0	17
13	0	0	0	20
14	0	1	-1	19
15	0	1	1	19
16	1	0	-1	18
17	0	0	0	20

试验数据使用 Design—Expert 软件进行分析处理，得到回归方程，如下：

感官评分= +20.20+0.25A+0.75B－0.25C－0.25AB－0.25AC+0.25BC－1.98A^2－0.98B^2－0.97C^2

表 3-5 回归统计分析

Table 3-5 regression analysis

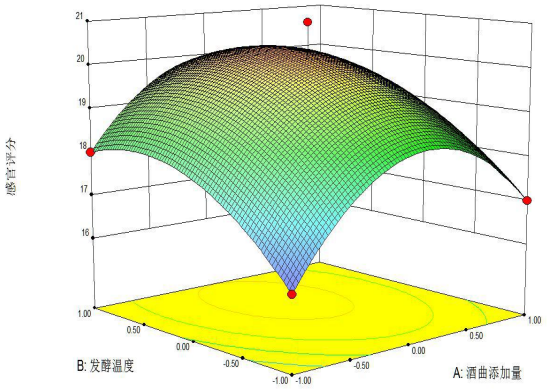
方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	Pr > F	显著性
模型	33.08	1	3.68	32.16	< 0.0001	**
A-酒曲添加量	0.50	1	0.50	4.38	0.0748	**
B-发酵温度	4.50	1	4.50	39.38	0.0004	**
C-发酵时间	0.50	1	0.50	4.38	0.0748	**
AB	0.25	1	0.25	2.19	0.1827	
AC	0.25	1	0.25	2.19	0.1827	
BC	0.25	1	0.25	2.19	0.1827	
A^2	16.42	1	16.42	143.71	< 0.0001	**
B^2	4.00	1	4.00	35.02	0.0006	
C^2	4.00	1	4.00	35.02	0.0006	***
残差	0.80	7	0.11			
失拟项	0.000	3	3.3	0.23	1.0000	
纯误差	0.80	4	0.20			
总误差	33.88	16				

注：*为显著(p＜0.05)，**为极显著(p<0.01)

从表 3-5 可以看出，感官评分模型的 P 值为 0.0001，小于 0.05 因此该模型具有显著性。模型失拟项 P 表征预测值与实际值不拟合的概率。结果中 P 值为 1.000，大于 0.05，证明模型失拟项不显著且模型中不必再引入更高次数的项，该模型可用于分析优化；表中的回归决定系数 R^2 值为 0.9764，大于 0.9，说明模型拟合程度很好。变异系数(CV)表征所得模型置信度[63-65]，且 CV 值与模型的置信度大小呈负相关，本试验的 CV 值为 1.84，证明模型的置信度高。综上结论采用用该响应面模型能够对发酵条件与发酵最终感官评分的相关性试验进行分析和预测。从水解度方差分析可知，A、B、C 的 P 值分别为 0.0001、0.0006、0.0006，均小于 0.05，表明三个因素对于最终发酵马奶酒的风味感官评价都呈显著影响。通过直接比较方程中一次项系数绝对值大小来判断因素影响的主次性，对感官评分的影响效果由大至小依次是发酵温度＞发酵时间=酒曲添加量。

3.3.4.2 响应面分析法分析各因素间的相互作用

利用响应面分析发酵温度，发酵时间，酒曲添加量各因素之间的相互作用结果如图3-5 至 3-10 所示。



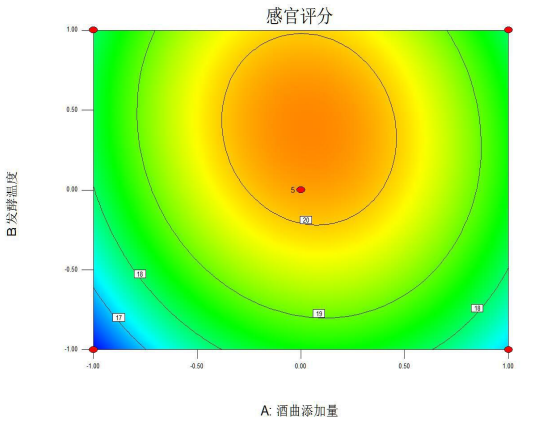
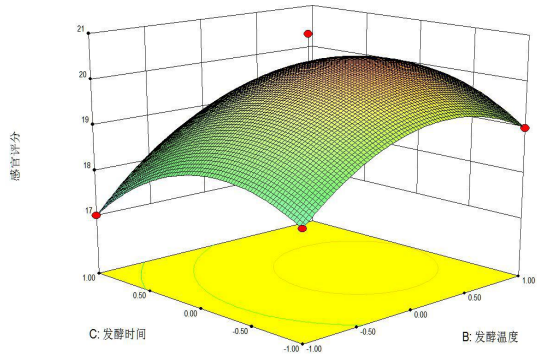


图 3-5 酒曲添加量与发酵温度交互影响水解度的曲面图　图 3-6 酒曲添加量与发酵温度对感官评分的影响



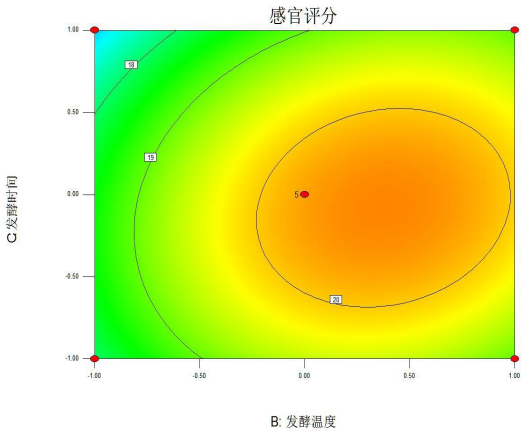
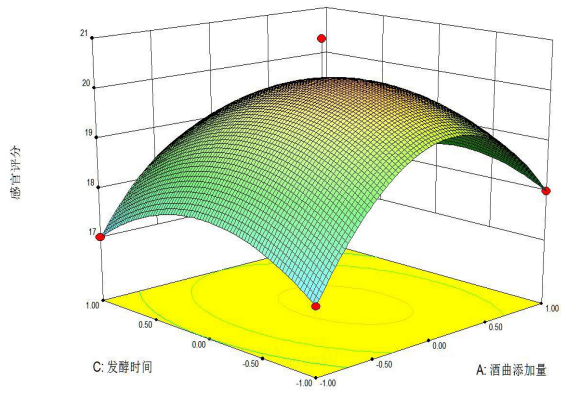


图 3-7 发酵温度与发酵时间交互影响水解度的曲面图　图 3-8 发酵温度与发酵时间对感官评分的影响



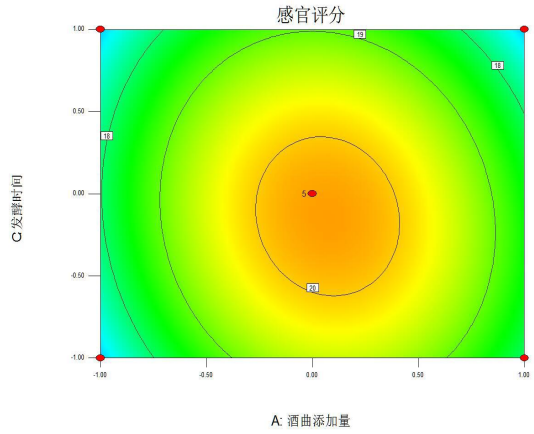


图 3-9 酒曲添加量与发酵时间交互影响水解度的曲面图　图 3-10 酒曲添加量与发酵时间对感官评分的影响

通过响应面分析得出的曲面图与平面等高线图能够直观的得出各个因素间的交互作用，以及各个因素与感官评分间的相关性。由等高线图的基本原理可知，当中心点与

椭圆的圆心越近的时候则表明这两个因素对感官评分影响越大，也表明这两个因素间相互作用显著。由图 3-6、3-8、3-10 可以看出酒曲添加量与发酵时间之间的相关性显著，且在这两个交互因素的作用下对感官评分作用明显，其次是发酵温度与酒曲添加量之间的相关性且对感官评分影响显著。为了更加详细直观的看出各个因素间的相关性的交互关系，观察响应面各因素间 3D 曲面图进行分析。

由曲面图的基本原理可知，当曲度越大则表示该因素对感官评分影响越大，弧顶的曲度越大则表明这两个因素间的相关性越大，基于前期数学模型的结论，这三个因素间均具有明显的相关性，且能够显著的影响感官评分指标。通过酒曲添加量与发酵温度的曲面图（图 3-5），可以看出二者均能够显著二次影响感官评分这一指标，随着二者数值的增大，感官评分均呈现先增大后减小的规律，即在一定范围内这两个因素与感官评分呈现正相关或负相关。同时，发酵温度相对于酒曲添加量的曲率更大，因此发酵温度对感官评分的高低影响更大，相关性更加显著。

通过发酵时间与发酵温度的曲面图（图 3-7），可以看出二者均能够显著二次影响感官评分这一指标，随着二者数值的增大，感官评分均呈现先增大后减小的规律，即在一定范围内这两个因素与感官评分呈现正相关或负相关。与此同时，发酵温度相对于发酵时间的曲面坡度陡，说明发酵温度对最终的感官评分影响要明显大于发酵时间对感官评分的影响，也从侧面验证了模型得出的结论，同时也与试验前期单因素趋势相吻合。

通过酒曲添加量与发酵时间的 3D 曲面图（图 3-9），可以明显的看出该图的顶弧弧度要明显大于前两个图，说明这两个因素间的相关性及其显著，同时也能够明显看出随着二者数值的增大，感官评分均呈现先增大后减小的规律，即在一定范围内这两个因素与感官评分呈现正相关或负相关。通过曲面弧度分析，可以看出酒曲添加量的弧度更为明显，说明在考虑到发酵时间与酒曲添加量时，若要对感官评分产生影响则不需要明显的改变酒曲的添加量，而只需要略微改变发酵时间，这也是由于前期单因素试验范围已经选取到了相对合适的区间，因此在该区间内进行优化最终得出的结论必然是酒曲添加量的影响变化数值不如发酵时间明显，也对感官评分的影响相对影响较低。

3.3.5 最优条件的确定及验证

利用响应面软件对感官评分模型进行进一步分析，以获得最优的提取条件[66]。经分析得最佳的发酵条件是：当发酵温度在 32.01℃，发酵时间 69.89 h，酵母添加量为 8.05%时，预测马奶酒发酵效果及感官评分可达最佳，理论感官评得分为 20.3544。考虑到操作的方便性，将发酵工艺参数修正为发酵温度在 32℃，发酵时间 70 h，酵母添加量为 8 %时马奶酒发酵效果及感官评分可达最佳。在此条件下感官评分达到 22 分，重复三次试验，与理论值相差低于 1%，响应面分析的的优化结果与实际值较吻合，说明该响应面相关性预测模型建立科学合理，能够作为指导模型。

3.3.6 响应面法分析结果

通过所得回归模型对马奶酒发酵工艺最优组合进行筛选，表明当发酵温度在32.01℃，发酵时间 69.89 h，酵母添加量为 8.05%时，马奶酒发酵效果及感官评分可达最佳。

考虑到实际操作可行性，将最佳条件修订为：发酵温度在 32℃，发酵时间 70 h，酵母添加量为 8 %时，马奶酒发酵效果及感官评分可达最佳。通过验证试验，表明实际测量值接近预测值，说明 Box-Behnken 试验设计方法对该试验条件的优化，具有可行性。

3.3.7 各因素对各感官属性影响

单因素试验以及响应面优化能够直接地优化出最优的感官评分所需要的发酵条件，但是总的感官评分是由各个感官属性汇总而来。因此为了能够更加清晰的得出具体的工艺对每个属性的影响大小，以及初步判断各个关键发酵因素对各属性的影响趋势，通过模糊性感官评价与各个单因素指标变化，构建各因素与各感官属性间的风味雷达图[67-70]，此处为了能够明显的区分各个属性的趋势，所有属性的评分均取成绝对值。

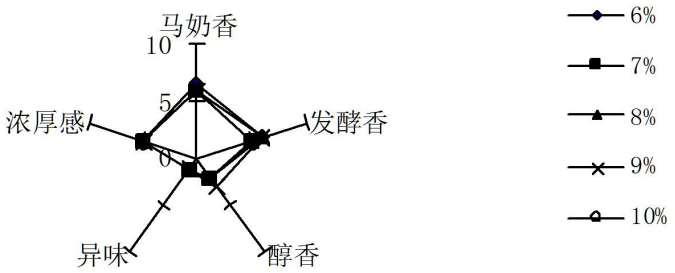


图 3-11 酒曲添加量对各感官属性的影响

Fig. 3-11 Effect of addition of yeast on flavor quality of kumiss

如上图所示，酒曲的添加量改变，在一定程度上影响了发酵香与醇香的含量，而发酵香主要就是由乳酸菌分解有机物所产生的具有香气的物质，同时随着酒曲的添加量增加，酵母菌的含量也随之增加，因此酒精含量也随之升高，这就导致了醇香这一感官属性评分的增高，但是对于浓厚感及马奶香的影响并没有十分明显，这可能是选取的酒曲添加范围均处于已有相关奶酒研究建议的合适范围，因此在该范围中酒曲产生的差异性不会十分明显，无论是优化参数还是改变马奶酒整体香气作用能力有限，同时根据相应面优化可知，所选取的单因素发酵时间与发酵温度接近最优值，因此，在这个范围内马奶酒的整体变化仅仅限于菌落数量改变所能导致的感官属性。

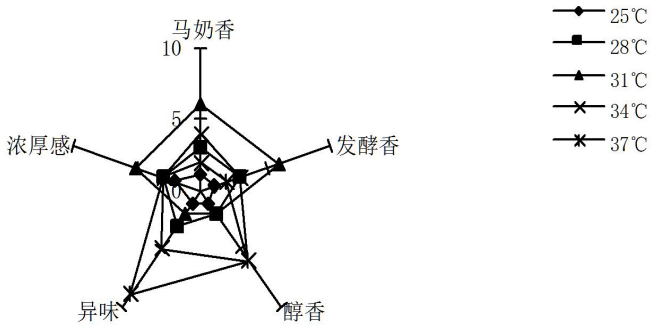


图 3-12 发酵温度对各感官属性的影响

Fig. 3-12 Effects of fermentation temperature on flavor quality of Koumiss

由图 3-12 能够看出发酵温度单因素的改变对于马奶酒各个风味感官属性改变趋势，随着温度的升高，马奶香、发酵香浓厚感均呈现先上升后下降的趋势，在温度相对较高的 37℃异味达到了最大值，其中酸败味和乳臭味较为明显，让人闻之难以入口，同时随着温度的升高马奶香降低明显这说明发酵温度能够明显影响微生物发酵的速度，使得马奶中主体香气发生改变，从而掩盖住了马奶香以及浓厚感，因此发酵温度如果控制不到位，将会使得异味增加过于明显从而降低整体的感官评分。

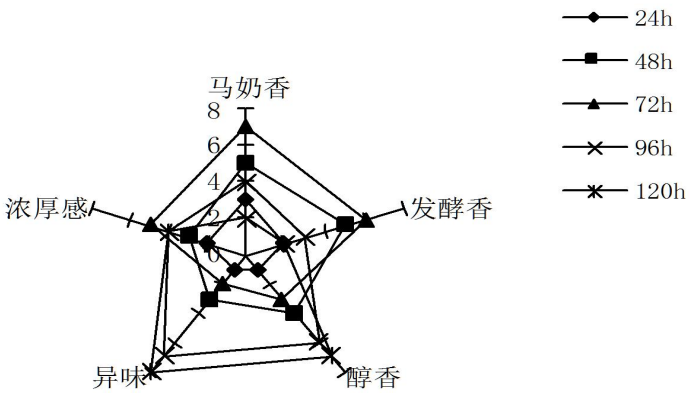


图 3-13 发酵时间对各感官属性的影响

Fig. 3-13 Effect of fermentation time on the quality of Koumiss

上图结论能够得出马奶酒中异味产生的一个来源是发酵温度过高，使得酸败味明显，同样可以从图 3-13 发现，当发酵时间逐渐增加，能够从另一个渠道是发酵的过程被延长，这也就从侧面增加了发酵中乳酸发酵剂酒精发酵过量的趋势，因此，这里能够看出发酵时间的增加所导致的马奶酒各个感官属性变化风味雷达图与前面发酵温度的较为类似。不同点为，在合理的发酵温度下，适当的延长发酵时间能够明显提高发酵香和浓厚感，这也从另一方面验证了发酵条件的改变能够明显的影响马奶酒的整体香气。

因此单从马奶酒的感官评价总分变化去探究发酵工艺对发酵结果的影响是不够全面的，如何能够建立出一个挥发性成分与香气属性及发酵工艺间的相关性模型是十分迫切的课题，因此以前两章内容作为研究基础，逐级构建出马奶酒发酵工艺与风味品质间的相关性模。

3.4 本章小结

(1)根据响应面模型得出，各个发酵工艺关键因素对感官评分总分的影响效果由大至小依次是发酵温度＞发酵时间＞酒曲添加量。发酵工艺参数修正为发酵温度在 32℃，发酵时间 70 h，酵母添加量为 8 %时马奶酒发酵效果及感官评分可达最佳。

(2)通过各个单因素变化与感官属性所构建的风味雷达图，初步确定酒曲的添加量主要影响马奶酒中醇香和发酵香两个属性；而发酵温度则与马奶酒中异味这一属性呈显著相关；特别是发酵时间对五种感官评价属性的影响均十分显著。

第四章 基于 PCA 模型的马奶酒发酵参数与风味品质解析

目前国内外均有研究学者发表过对马奶酒的文化、工艺、发酵参数优化、商业化转型的研究报道。然而大多数研究内容仅局限于基于理化参数对发酵工艺进行了优化，往往忽视了挥发性成分组成的差异造成风味品质异变。因此，前几章研究内容中初步明确了马奶酒发酵参数与其风味品质的变化呈显著相关性，分离与鉴定了马奶酒酒中的特征性挥发性成分，并基于感官评分体现优化出马奶酒的最优发酵参数，以及初步探讨了各发酵参数与马奶酒中风味属性间的联系。然而仅仅采用直观分析的方法，无法明晰发酵参数与风味属性以及关键性挥发性成分间的内在联系，以及构建马奶酒发酵参数与风味品质间的相关性模型。而主成分分析（PCA）作为一种无监督识别方法，可以在不具备任何背景的情况下对样品进行类别归属的判别，揭示样品与参数之间的内在联系。[71]

因此本研究将基于前期的单因素试验结果，采用顶空固相微物萃取法（HS-SPME）作为提取方法，结合气相色谱-质谱法（GC-MS）作为分离鉴定手段监测马奶酒中各个风味物质成分的变化，采用 PCA 主成分分析法构建马奶酒各参数的相关性模型[72-73]，最终明确马奶酒中各个风味品质属性与发酵工艺间的内在联系。以期能够为后期马奶酒的发酵工艺的研究提供理论基础。

4.1 材料和方法

4.1.1 试验材料和试剂

新鲜马奶于牧民家中购买，酒曲配置详见表 3-1，2-辛醇（100ppm）色谱纯，购买于美国 Sigma 公司。

4.1.2 试验仪器

表 4-1 试验仪器

Table4-1 experiment instruments

仪器名称	型号	生产厂家
电子分析天平	WSC-S	上海精密科学仪器有限公司
SPME 萃取装置	75μm CAR/PDMS/DVB	美国 Sigma 公司
全自动新型生化培养箱	ZXSD-1160	上海智城分析仪器制造有限公司
磁力搅拌器	85-2	江苏金壇医疗仪器厂
气质联用仪	5977 A-7890B	美国安捷伦公司
恒温水浴锅	HSQ-3	上海智域分析仪器制造公司
电磁炉	C-16F	青岛澳柯玛科技电器有限公司
超声波清洗器	KQ-200VDE	昆山市超声仪器有限公司

4.1.3 马奶酒发酵工艺流程

详见 3.2.1.1 的具体流程。

4.1.4 具体试验流程

4.1.4.1 新鲜马奶的预处理

详见 3.2.1.2 的操作方法及注意要点。

4.1.4.2 马奶酒成品的感官评价体系建立

详见 3.2.1.3 具体确定感官属性，以及如何构建马奶酒的感官评分标准。

4.1.4.3 马奶酒发酵液的制备

详见 3.2.1.4 中如何配制马奶酒发酵酒曲，以及如何活化菌液。

4.1.4.4 马奶酒发酵单因素试验

详见 3.2.2 的具体操作方法及注意事项。同时采用响应面分析所优化出的最优发酵参数进行发酵试验，得出最优组。

4.1.4.5 马奶酒挥发性成分提取

将按照单因素试验后的马奶酒按照 3.2.1.3 中感官评价的方法打分，选取其中得分差异最大组，同时根据响应面分析优化所得最优参数进行马奶酒发酵的最优组共计 6 组，按照 2.2.1.3 与 2.2.1.4 的挥发性成分提取及分析的方法经行检测。

4.1.4.6 数据分析

挥发性成分的定量分析具体见 2.2.1.5 的公式，模型构建根据所需要构建的模型，选用 SPSS 软件进行 PCA 相关性模型构建及主成分分析。

4.2 试验结果与分析

4.2.1 挥发性成分分离与鉴定

4.2.1.1 发酵工艺参数与关键性挥发性成分解析

为了能够找出发酵参数与关键性挥发性成分间的关键相关性作用，将前期单因素试验中各个试验组差异最大的两组选出，以期通过其中较为明显的差异性更为直观的得出具体的关键呈味物质与发酵参数，以及感官属性得分间的效应关系。

表 4-2 不同样品的试验条件及编号

Table 4-2 Experimental conditions and numbering of different samples

编号	酒曲添加量	发酵温度	发酵时间	马奶香	发酵香	醇香	异味	浓厚感
1	8%	28℃	48h	5	1	3	1	2
2	8%	32℃	72h	6	6	8	2	5
3	8%	32℃	48h	6	6	5	3	5
4	10%	28℃	72h	4	5	7	3	2
5	8%	32℃	24h	6	2	2	2	2
6	8%	32℃	72h	6	7	8	3	3

由表 4-2 可以看出，编号 1-5 为单因素试验组所得的感官属性，试验编号 6 为根据响应面所得的最优发酵参数进行发酵，由于感官得分为 10 分制，为在感官属性上具有显著的差异性，因此将差异不显著的试验组不进行感官评价对比，最终选取 6 个试验组所得结果如上表所示。

感官评分的过程中，前期的感官试验是以此作为评分指标，所需要的是客观评价，因此为了能够保证后期感官数据分析的准确性，可用于后期工艺优化指导，感官评分小组的成员对异味这一属性进行定义，最终认定异味是一种令人产生不愉快的气味，包括马奶的原始奶味，动物特有体味，发酵过程中产生的过量酒精刺激气味，酸败味等。在此基础上重新更为明确的定义了浓厚感的含义，最终含义为马奶酒发酵后风味的复杂程度，及超出这几种感官属性之外的风味复杂程度。风味复杂程度越高，给感官评价人员的嗅觉反馈就更加丰富且浓郁，最直观的感受便是马奶酒不仅仅是马奶加酒精加酸味的简单组合，而是由多种复杂的香气互相作用、相互影响的结果。

从表 4-2 可以直观的发现，马奶酒的发酵条件中各因素的明显改变，会显著影响其各种风味属性的表现。其中当时间从 24h 变为 72h 会明显影响发酵香和醇香感，而发酵香便是如同酸奶乳酪般酸香的气味，该感官属性是乳酸菌发酵提供的，同时醇香气的增加是酵母菌发酵的产物，因此可以看出随着马奶酒发酵时间的增加初步可以推断出会影响马奶酒中发酵的代谢产物的含量，从而影响马奶酒的香气属性。与此同时，马奶酒的香气属性改变也随着温度的变化而发生明显变化，这主要体现在当超过了微生物适合生长的温度时，能够侧面降低马奶酒中代谢产物的含量，这与发酵时间的长短改变有相同的作用。而酒曲的添加量的改变，则主要影响马奶酒中醇香的变化，这主要是由于酵母菌是产酒精需要氧气，因此先发酵的酵母菌一旦含量增加过多，则会过快的消耗氧气，从而跳过了马奶酒产酒精这一阶段，直接进入产乳酸的阶段。

4.2.1.2 不同试验组挥发成分变化

在第二章的研究中已经详细的分析了马奶酒中挥发性成分的构成及主要挥发性成分的种类，同时采用聚类分析的方法探究了关键性的挥发性成分。在本章内容中主要针对马奶酒特征性挥发性成分，监测在 1-6 组发酵条件下产生的变化，同时对马奶酒发酵后挥发性成分总量的差异性进行了对比分析，具体详见表 4-3。

表 4-3 关键挥发性成分含量变化

Table 4-3 Changes in the content of key volatile components

名称	保留时间/min	分子式	样品名称（相对质量%）					
			1	2	3	4	5	6
异戊醇	2.941	$C_5H_{12}O$	0.7^{c}	1.9^{b}	1.8^{b}	3.2^{a}	4.2^{a}	1.3^{c}
己酸乙酯	5.995	$C_8H_{16}O_2$	5.3^{d}	9.9^{b}	7.0^{c}	8.2^{c}	14.9^{a}	9.8^{b}
壬醛	9.834	$C_9H_{18}O$	1.9^{b}	1.3^{c}	1.6^{b}	1.6^{b}	4.6^{a}	1.3^{c}
辛酸乙酯	9.882	$C_{10}H_{20}O_2$	35.1^{c}	43.6^{b}	53.2^{a}	58.1^{a}	45.9^{b}	61.0^{a}
癸酸乙酯	10.708	$C_{12}H_{24}O_2$	3.0^{b}	1.9^{c}	3.1^{b}	5.3^{a}	1.8^{c}	3.6^{b}
辛酸	11.149	$C_8H_{16}O_2$	18.0^{a}	19.0^{a}	13.9^{b}	7.7^{c}	8.8^{c}	7.9^{c}
癸酸	13.441	$C_{10}H_{20}O_2$	21.2^{a}	14.2^{b}	13.1^{b}	10.8^{b}	6.5^{c}	7.3^{c}

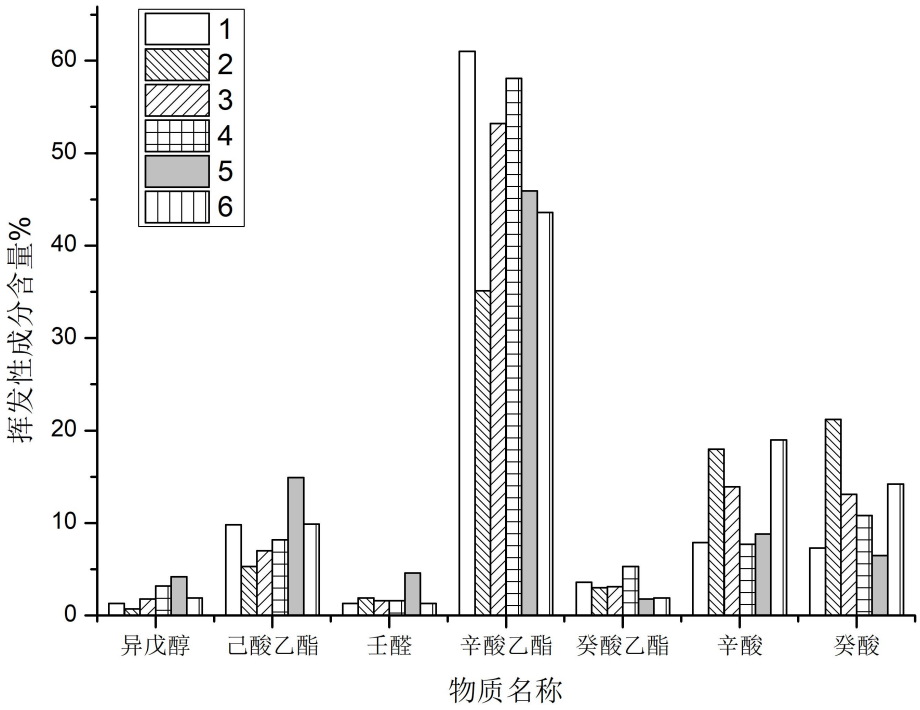


图 4-1 关键挥发性成分含量变化

Fig. 4-1 Changes in the content of key volatile components

由图 4-1 与表 4-3 可以看出随着发酵条件的改变，所有关键性挥发性物质均发生了显著的变化，其中辛酸与辛酸乙酯以及癸酸的变化最为显著。通过表 4-2 的具体参数变化可以得出，最优组中挥发性成分组成较为合理，所以说整体的感官评价效果最优，那么可以看出，并不是所有的关键性挥发性成分含量高，所代表的整体风味品质越高。这就可以认为是关键性挥发性成分含量的高低与最终感官属性的优劣并不是完全的正比关系。其次如最优组的异戊醇，壬醛[74]等虽然含量上相较于其他组并不是最高，但是在与其它挥发性成分合理的组合后所得的整体风味构成则具有明显的优势。

从表 4-3 的单因素方差分析（Anova）可以看出，条件的改变对各个挥发性成分的影响是呈无规律性趋势改变[75]，并不是单纯的正相关或是负相关。其中具体的规律需要从数学模型的构建中分析得出。

4.2.1.3 PCA 构建发酵工艺与风味属性相关性模型

试验采用主成分分析分析建立感官属性与关键挥发性成分及发酵参数间相关性模型，评价结果如图 4-2 所示。

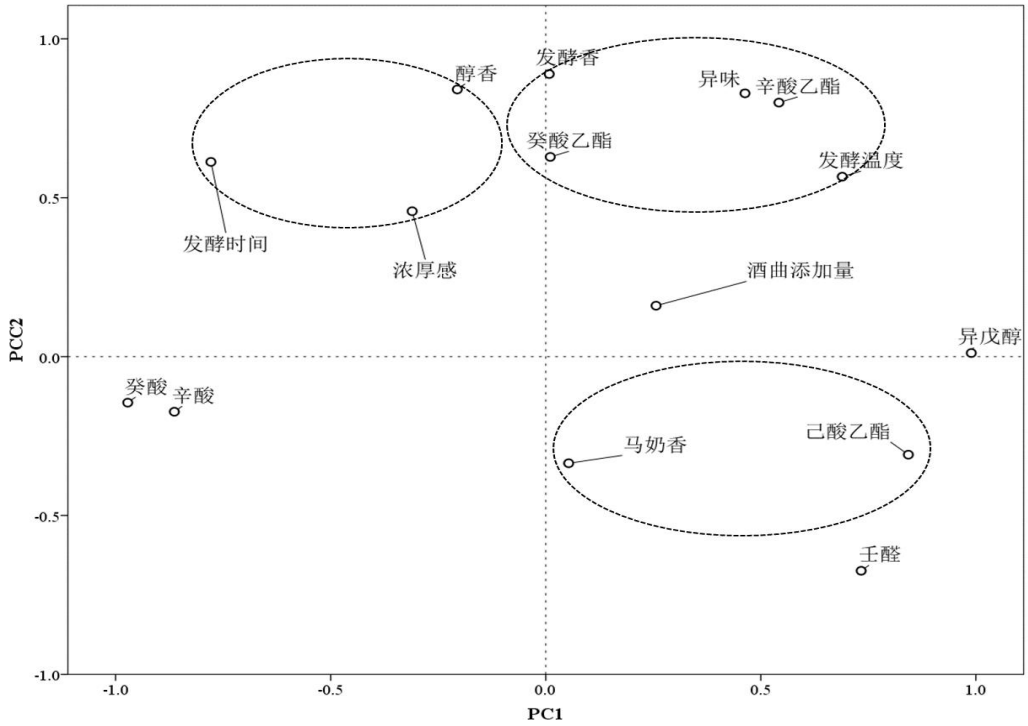


图 4-2 发酵工艺与风味属性 PCA 模型

Fig. 4-2 Fermentation technology and flavor property PCA model

采用无监督的判别方法 PCA 作为模型构建手段[71]，以感官属性评分，关键性挥发性成分的含量以及工艺参数数值，作为数据源进行分析及模型构建。最终得出如上图 4-2 所示。其中坐标轴中虚线部分将整个平面分成了 4 个象限，聚集在同一个象限的参数表明其具有一定的相关性，这个相关性可以为正也可以为负相关。其中 PC1 与 PC2 能够解释 70.506%的结果[76]，因此选取 PC1 与 PC2 作为主成分轴构建二维的主成分图。

如图所示，发酵时间与发酵温度和酒曲添加量位于整个图形的上半区域，其中发酵温度与酒曲的添加量处于同一象限说明，酒曲添加量与发酵的温度大小具有显著的相互影响作用，而发酵时间与二者相对距离较远，说明发酵时间的影响程度与这二者间的影响程度大小相比，发酵温度与酒曲添加量影响更为显著。

在关键性挥发性成分中，癸酸与辛酸位于第三象限，且二者距离很近，这可能是由于二者都是酸类物质，且对整个马奶酒的风味影响接近因此，具有极大的相关性。同时，马奶香与己酸乙酯的距离十分接近且与壬醛位于同一象限，这说明己酸乙酯在一定程度上决定了马奶酒的马奶香气，而己酸乙酯也是马奶中的固有挥发性物质。观察第一象限，剩余所有的的特征性物质聚集在了第一象限，其中癸酸乙酯与辛酸乙酯距离异味及发酵香较近，首先这两种酯类物质可能是发酵香的主要影响因素，其次发酵香与异味距离接近的原因可能是对发酵香这一感官属性与异味界限模糊，在发酵过程产出的酸乳酪的香

气，但酸乳酪的香气过量，会转变为一种酸败的气味[11]，如同牛奶过期一样。那么发酵香与异味其实是具有相关性的，异味的一个主要供给源就有发酵香，同时发酵香与异味同时与发酵温度在同一象限内，且距离较近。这与第三章内容中发酵温度是主要影响因素，主要影响马奶酒中微生物生长代谢的结论相互印证，即马奶酒中发酵温度能够明显影响发酵香气以及异味的感官属性评分，同时，能够显著的影响癸酸乙酯与辛酸乙酯的含量。最后，还剩余的两个感官属性，浓厚感与醇香和发酵时间这一个工艺参数相关性密切，这与前期的风味感官单因素试验的结果相符合，发酵的时间越久则产生的马奶酒香气成分更为复杂也越浓厚，其次发酵时间的增长会使得酵母菌的产酒精时间增长，因此醇香感会随之增加。

综上所述，马奶酒发酵工艺中，发酵时间主要与醇香和浓厚感呈现显著正相关，同时发酵温度与发酵液酒曲的添加量对发酵香和异味的影响较大具有显著相关性。马奶酒中的马奶香味这一感官属性可能是由于己酸乙酯所贡献的，且壬醛也起到一定的相关影响。

4.3 本章小结

(1)随着马奶酒发酵时间延长发酵香和醇香感两个感官属性得分会呈显著上升趋势也说明，同时发酵过程中辛酸与辛酸乙酯及癸酸的变化在所有挥发性成分中最为显著。

(2)基于主成分分析模型发现在马奶酒发酵过程中，发酵时间主要与醇香与浓厚感呈显著相关，同时发酵温度与发酵液酒曲的添加量对发酵香和异味具有显著的相关性。马奶酒中的马奶奶香味这一感官属性与己酸乙酯与壬醛具有显著相关性，感官属性中发酵香与异味已发生转化，同时癸酸乙酯与辛酸乙酯两种酯类与发酵香感官属性呈显著正相关。

（3）相关性模型得出马奶酒发酵工艺中，发酵时间主要是与醇香和浓厚感呈现显著正相关，同时发酵温度与发酵液酒曲的添加量对发酵香和异味的影响较大具有显著相关性。

第五章　结论总结与展望

5.1 全文总结

(1) 新疆 8 个不同地区传统马奶酒样品共检测出 31 种挥发性物质，其中 7 种为 8 个地区马奶酒共有挥发性成分，分别为异戊醇、己酸乙酯、壬醛、辛酸乙酯、癸酸乙酯、辛酸、癸酸。马奶酒中挥发性成分主要包含酯类、酸类、醛类、醇类、烃类、酮类，其中酯类与酸类物质含量种类最多，其次为醛类和醇类物质。

(2) 聚类分析可以看出 8 个不同地区的马奶酒样品挥发性物质存在显著差异，通过聚类可以分为 2 个类群，能够客观真实的反映了样品信息的真实性。

(3) 通过对不同大类物质的聚类分析得出造成不同地区马奶酒样品差异性的关键物质为酯类物质，可能是造成马奶酒样品不同风味的主要因素。

(4) 发酵工艺参数修正为发酵温度 32℃，发酵时间 70 h，酵母添加量为 8 %时马奶酒发酵效果及感官评分可达最佳。在此条件下感官评分达到 22 分。根据响应面模型得出，各个发酵工艺关键因素对感官评分总分的影响效果由大至小依次是发酵温度＞发酵时间＞酒曲添加量。

(5) 通过各个单因素变化与感官属性所构建的风味雷达图，最终初步推导出酒曲的添加量主要影响马奶酒中醇香和发酵香两个属性；发酵温度主要影响马奶酒中异味这一属性；发酵时间对各个感官评价属性的影响均十分明显，其中异味和醇香最为显著。

(6) 马奶酒发酵工艺的改变不是成正比的影响马奶酒中挥发性成分的构成，且最优马奶酒的挥发性成分构成并不是每种挥发性成分都是最高值。需要进行合理的配比协同才能达到最优马奶酒风味品质。

(7) 马奶酒发酵工艺中，发酵时间主要是对醇香与浓厚感有积极的相关性，同时发酵温度与发酵液酒曲的添加量对发酵香和异味的影响较大，具有显著的相关性。马奶酒中的马奶奶香味这一感官属性可能是由于己酸乙酯所贡献的，且壬醛也起到一定的相关影响。

5.2 创新点

（1）本研究分离鉴定出新疆传统马奶酒的挥发性成分特征，同时对比了新疆不同地区传统马奶酒样品的挥发性成分构成。

（2）成功构建了马奶酒发酵工艺与马奶酒的各个感官属性及特征挥发性成分间的相关性模型，得出了发酵工艺的改变影响马奶酒中具体属性的变化趋势。

5.3 展望

风味品质的高低是决定一个产品好坏第一要素，所以新疆马奶酒的研究内容不能够仅仅局限于一些理化参数的改变，因此在后期对新疆马奶酒发酵工艺的优化方面，采用理化参数与风味感官属性相结合的方法更加能够科学合理的开发马奶酒相关产品。所有的传统食品产业化进程中都会或多或少的遇到品质劣变的现象，马奶酒也不会例外，因

此如何能够更加完善的优化出一套能够实施产业化的参数，需要后期更多更大量的试验去验证。同时，在整个研究过程中，我深刻的认识到，风味的好坏不能够仅仅依靠仪器测定的数值来判断，人的感官体验才是其中最关键的要素。然而人工评价也受限于主观性，多次人工评价试验均发现，若感官小组成员的状态发生改变时，同一样品感官得分会出现较为显著的差异，因此我们在研究马奶酒发酵工艺的道路上还有很多事情去做：

（1）如何能够高效率的对马奶酒进行感官评价，如何让感官评价人员能够保持客观去进行打分。

（2）关键挥发性成分如何去精确到具体是哪个物质影响哪种属性，是由哪些参数导致的。

（3）马奶酒需要奶源为新鲜的高品质马奶，而马奶的产量与产期与牛奶相比不具有优势，如何在产业化的道路上从奶源开始产业化养殖供奶马，以及规范化养殖是关键问题。其次高品质的马奶酒研发过程中能否将传统工艺与现代化工业生产相结合，而不是一直进行改良。

参考文献

[1] 黄适远 . 千里飘香图瓦人奶酒[N]. 中国民族报，2010-12-03.

[2] 张和平, 那日苏.蒙古族的马奶酒[J]. 中国乳品工业, 1993(4):165-168.

[3] 程适良 .新疆阿尔泰山区的图瓦人[J]. 中央民族大学学报，1994(5):39-42.

[4] 朱兆龙. 禾木乡的奶酒[J]. 食 品 与 生 活，2005(6):13.

[5] 王萍. 我国图瓦人生活方式研究 [J]. 新疆社科论坛，2007(6):89-91.

[6] 秦立虎, 张和平. 我国少数民族的马奶酒初探[J]. 酿酒科技, 1996, 17(6):1-5.

[7] 任志敏, 陈忠军, 孙子羽, et al. 传统发酵奶酒的研究进展[J]. 中国酿造, 2018(7):17-21.

[8] 刘洪元, 高昆. 马奶及酸马奶(马奶酒)的营养价值和医疗作用[J]. 中国食物与营养, 2003(4):45-46.

[9] 王立平. 内蒙古传统酸马奶酒中乳杆菌潜在益生特性的研究[硕士学位论文]. 内蒙古农业大学, 2005.

[10] 贺银凤, 李少英, 母智深,等. 酸马奶酒中微生物的分离鉴定及抗菌特性的研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(2):91-95.

[11] 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.

[12] 汪立平, 徐岩, 赵光鳌, 等. 顶空固相微萃取法快速测定苹果酒中的香味物质[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1): 1-6.

[13] 余宁华, 陆震鸣, 许伟, 等. 基于主成分分析的中国发酵食醋有机酸含量差异性分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 144-148.

[14] 马荣山, 黄晶. 营养型牛奶酒发酵工艺的研究[J]. 中国酿造, 2008, 27(19):96-99.

[15] 韩磊. 马奶酒抑菌活性与发酵条件相关性研究[硕士学位论文]. 内蒙古农业大学, 2015.

[16] 钢照日格. 蒙古国酸马奶中酵母菌的分离及主要生物学特性研究[D]. 内蒙古农业大学, 2015.

[17] Koroleva N S .Technology of Kefir and Koumiss[J].Bullet in of Te International Dairy Federation,1988,227: 96-100.

[18] Stojanova L G, Ponomarjowa O J, Spiridonowa W A. Antibiotic Properties of Koumiss[J].XXI Int.Dairy Congress M oscow,1982,1(1):308-309.

[19] Koroleva N S.Starters for Fermented Milks. Kefir and Koumiss Starters[J]. Bulletin of TeInternational Dairy Federation,1988,227:35-40.

[20] 王立平,徐杰,云月英等.蒙古国传统发酵酸马奶(Koumiss)中乳杆菌潜在益生特性的研究[J].中国乳品工业,2005,33(4):4-10.

[21] 王泽盛. 新疆图瓦人的马奶酒[J]. 现代食品, 2016, 9(18):71-73.

[22] 刘洪元, 高昆. 马奶及酸马奶(马奶酒)的营养价值和医疗作用[J]. 中国食物与营养, 2003(4):45-46.

[23] 扎木苏. 酸马奶降脂及抗凝作用 50 例临床观察[J].民族医药,1994,5(2):87-88.

[24] 查哈达.酸马奶治疗肺结核 56 例临床观察[J].中国民族医药杂志,1999,36(4):13-14.

[25] 乌. 扎木苏.酸马奶疗法[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社,1986.218.

[26] 徐杰,邵亚东,孟和毕力格,等.蒙古族传统酸马奶中嗜酸乳杆菌发酵特性研究[J]. 乳业科学与技术,2005,(5):202- 206.

[27] 李平兰,张篪,郑海涛.乳酸菌及其生物工程研究新进展[J].中国乳品工业,2000,28 (4):50-53.

[28] 李凤林，王盛运. 新型低醇奶酒生产工艺的研究[J]. 试验报告与理论研究，2009(1):32-34

[29] 贾士芳, 郭兴华.活菌制剂的现状和未来[J].生物工程进展,1999,16(2):17-20.

[30] Fedechko I M,Hrytsko R Iu,Herasun B A.Te anti-immunodepressive action of kumiss made from cow's milk[J].Lik Sprava,1995,(9):104-107.

[31] NAMNANSUREN GAN-OD. 马奶酒发酵工艺的研究[硕士学位论文]. 东北农业大学，黑龙江省哈尔滨市, 2015.1-2

[32] 李华, 王华, 刘拉平, 等.爱格丽白葡萄酒香气成分的 GC-MS 分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1250-1254.

[33] 郎召伟, 陆震鸣, 龚劲松, 等. 泸型酒蒸馏前后酒醅中挥发性物质的差异性分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7):34-37.

[34] 王培璇, 毛健, 李晓钟, 等. 不同地区黄酒挥发性物质差异性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(6):83-89.

[35] 王鹏, 田洪磊, 张海轮,等. 基于 GC-MS 结合化学计量学方法的蟠桃鲜果指纹图谱的构建及应用[J]. 现代食品科技, 2016(5):258-263.

[36] 詹萍, 张晓鸣, 田洪磊. 羊骨蛋白酶解物热反应制备羊肉香精的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 286-289.

[37] 康明丽, 潘思轶, 范刚, 等. HS-SPME-GC-MS 法测定不同成熟度蜜柑果汁挥发性成分[J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 326-330.

[38] 李华, 王华, 刘拉平, 等.爱格丽白葡萄酒香气成分的 GC-MS 分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1250-1254.

[39] 胡国栋,张晓磊. 顶空固相微萃取-气相色谱/质谱分析啤酒微量香味组分的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,(02):1-5.

[40] Danova S, Petrov K, Pavlov P, et al. Isolation and characterization of Lactobacillus, strains involved in koumiss fermentation[J]. International Journal of Dairy Technology, 2005, 58(2):100–105.

[41] 杨帅, 杨文文, 吕青涛等. GC-MS 结合保留指数分析半枝莲挥发性成分[J]. 现代仪器, 2012, 18(3): 47-50.

[42] Zhu X, Gao Y, Chen Z, et al. Development of a Chromatographic Fingerprint of Tobacco Flavor by Use of GC and GC-MS[J]. Chromatographia, 2009, 69(7-8): 735-742.

[43] ERTEN H, TANGULER H, CAKIROZ H. The effect of pitching rateon fermentation and flavor compounds in high gravity brewing [J].Journal of the Institute of Brewing, 2007, 113(1): 182-189.

[44] 杨敏, 周围, 魏玉梅. 桃品种间香气成分的固相微萃取-气质联用分析[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 389-392.

[45] 刘罗曼, 张颖南. 因子分析和聚类分析的一个简单应用[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学

版),2005,(02):130-132.

[46] Zhu X, Gao Y, Chen Z, et al. Development of a Chromatographic Fingerprint of Tobacco Flavor by Use of GC and GC-MS[J]. Chromatographia, 2009, 69(7-8): 735-742.

[47] 梁倩. 金银花、丹参花的 GC 和 HPLC 指纹图谱构建[D]. 西北农林科技大学, 2008.

[48] Song SQ, Zhang XM, Hayat K, et al. Coordinating Fingerprint Determination of Solid Phase Micro Extraction Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Chemometric Methods for Quality Control of Oxidized Tallow [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1278: 145-152.

[49] FAN W, QIAN M C. Characterization of aroma compounds of Chinese“Wuliangye”and“Jiannanchun”liquors by aroma extract dilution analysis [J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54(7):2 695-2(704).

[50] 李星科, 李开雄, 邹圣东. 酸马奶酒[J]. 中国乳业,2006,(07):58-60.

[51] Graciela L.Garrote, Analia Q.Inhibitory power of kifer.Terole of organic acid[J].food protection, 2000,163 (3):364-369.

[52] Montanari G, Zambonelli C, Grazia L. Saccharomyces nisporus as Te principal alcoholic fermentation microorganism of traditional koumiss[J]. Journal of Dairy Research,2007,63(2):327.

[53] CN-GB.奶酒[S]2009.谢建春, 孙宝国, 马洪亮, 等. 氧化猪脂-热反应制备猪肉香精研究[J]. 中国调味品,2006 (12): 49-53.

[54] 孙宝国, 马洪亮, 等. 氧化猪脂-热反应制备猪肉香精研究[J]. 中国调味品,2006 (12): 49-53.

[55] 龚钢明, 肖作兵, 荣绍丰, 等. 氧化牛油 Maillard 反应制备牛肉香精研究[J]. 中国调味品, 2008 (6): 79-83.

[56] Kim J S, Lee Y S. Study of Maillard reaction products derived from aqueous model systems with different peptide chain lengths[J]. Food chemistry, 2009, 116(4):846-853.

[57] 马荣山, 王清, 邢艳芳. 响应面法优化蒸馏型牛奶酒发酵工艺[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(1):171-175.

[58] 韩磊, 殷文政, 岳智慧. 响应面法优化马奶酒对沙门氏菌抑菌效果发酵条件的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23).

[59] 韩磊. 马奶酒抑菌活性与发酵条件相关性研究[硕士学位论文]. 内蒙古农业大学, 2015.

[60] 殷文政, 刘立一, 马玉玲,等. 马奶酒抑菌活性的研究[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(7):15-17.

[61] 李少英, 乌尼. 马奶酒中乳酸菌的分离及其生物学特性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2002, 23(4):59-66.

[62] Urbisinov Z K,Servetnik-Chalaya G K,Ospanova M S.Amino acid composition and biological value of a koumiss starter[J].Voprosy Pitaniya,1985,(6): 68.

[63] 郭兴凤.响应面分析法在菜仁蛋白酶水解研究中的应用[J].郑州工程学院学报.2002(4):19-21

[64] 黄艳青,龚洋洋,陆建学.鳕鱼下颌肉水解蛋白制备工艺优化[J].渔业信息与战略,2013(3):210-214.

[65] 李向平. 发酵液中γ-氨基丁酸提取工艺的研究[硕士学位论文]. 浙江大学, 2006.

[66] 姜莉，陈金海，徐怀德.胰蛋白酶对核桃蛋白水解条件的优化研究[J].西北农林科技大学学

报.2008(36):201-207

[67] 王百姓, 冯积社. 模糊综合评价在干红葡萄酒感官品评中的应用[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(8):33-37.

[68] 黄六斌, 丁雪梅, 穆洪霞,等. 模糊数学法在柑桔酒感官品评中的应用[J]. 酿酒科技, 2014(9):65-68.

[69] 曹志军, 刘晓军, 刘敏,等. 咖啡牛奶酒工艺优化及其稳定性的研究[J]. 食品工业, 2014(8):145-148.

[70] 姜培武, 侯明轶, 吴臣. 食品质量感官品评数据的合理处理[J]. 长春工业大学学报, 1990(2):58-60.

[71] 李新蕊. 主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用[J]. 山东教育学院学报, 2008, 22(6): 23-26.

[72] Zhu X, Gao Y, Chen Z, et al. Development of a Chromatographic Fingerprint of Tobacco Flavor by Use of GC and GC-MS [J]. Chromatographia, 2009, 69(7-8): 735-742.

[73] 李新蕊. 主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用[J]. 山东教育学院学报,2007,(06):23-26.

[74] 孙倩茹. 柚子汁, 柠檬汁在加工关键单元操作及贮藏过程中香气物质变化的研究[D]. 华中农业大学, 2011.

[75] Shaw R G, Mitchellolds T. Anova for Unbalanced Data: An Overview [J]. Ecology, 1993, 74(6):1638-1645.

[76] 杨婧, 雷良波, 胡光源,等. 基于主成分分析的不同香型白酒识别方法[J]. 酿酒科技, 2015(8):33-35

致　　谢

本试验的进行和论文的撰写都是在导师田洪磊教授的精心指导下完成的，从论文的选题、试验设计、方案的论证、确定和实施的整个过程都得到了田老师的精心指导和大力支持。感谢恩师两年来给我提供了宝贵的学习机会和良好的学习环境，导师的谆谆教导以及广博的知识、严谨治学态度和平易近人的师德师风令我受益非浅，终生难忘。在此，特别感谢田洪磊老师给予的大量的帮助和支持，使我的论文得以顺利完成。

在硕士课题研究过程中，得到了本人工作单位新疆应用职业技术学院大力支持，无论是试验过程中给予的帮助还是同科室老师的协助。另外，对所有给予试验建议和指导的老师一并表示感谢。

感谢我的同事和学生协助我完成了大部分的试验，同时，感谢牧民朋友们的热心帮助与指导，使我的试验得以顺利进行。

在此论文完成之际，特别感谢我的家人在生活上和学习上给予的帮助与支持！

我要特别感谢我的家人及亲友在我入学以来在精神关心和支持，这是我不断进取的保证。

最后，借此机会，衷心地向在百忙中抽出宝贵时间对本文进行评阅和评议的各位专家、教授表示感谢！

王泽盛

2019 年 5 月

作 者 简 介

王泽盛，男，生于 1982 年 9 月 26 日，籍贯甘肃。2005 年毕业于四川烹饪高等专科学校面点工艺专业，2009 年毕业于中央广播电视大学工商管理专业。2015 年 9 月起至今在石河子大学食品学院食品加工与安全专业在职硕士，主要研究方向为食品风味化学。

在学期间主要参与的研究项目

2017 年 10 月申请立项主持校企合作横向课题“新疆马奶酒研究与开发”

在学期间发表文章

《食品研究与开发》刊物上发表了“新疆不同地区传统马奶酒挥发性物质差异性分析”2018 年第 8 期

《当代旅游》刊物上发表了“酒文化是中华饮食文明的独特存在”2018 年 9 月号

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	王泽盛	学制	3年
专业	食品加工与安全	研究方向	食品风味化学

学术评语：

该论文以新疆具有区域特色的传统饮品马奶酒为研究方向，选题来源于实际，能熟练地综合运用所学理论和专业知识。以新疆地区马奶为原料采用传统加工工艺生酿造成马奶酒，运用气质联用技术分离与鉴定了新疆不同地区马奶酒的挥发性物质组成以及不同加工条件下马奶酒风味物质变化，最终在结合感官评价与相关性模型构建确定了马奶酒的关键挥发性成分，并明确了马奶酒在加工条件改变的过程中风味物质变化规律；建立了一套可以监督马奶酒发酵工艺的风味评价体系。对于推动新疆地区丰富的马奶资源合理有效地利用，以及将马奶酒产业作为新疆特色资源发展并进行推广，提高市场认可度、增加附加值，为新疆当地养殖户增收创收起到重大的意义。

论文历经2年的时间，通过对新疆的八个地区马奶酒采样找出共性的挥发性物质，随后又对新疆阿尔泰地区马奶酒制作工艺进行优化、分析得出影响马奶酒风味物质的主要物质。该生系统地查阅了一定量的有关文献，掌握了该领域国内外的研究现状和发展方向。论文的实践操作性强，成功构建了马奶酒发酵工艺与马奶酒的各个感官属性及特征挥发性成分间的相关性模型，能够预测发酵工艺的改变影响马奶酒中具体属性的变化趋势。有一定的实用价值，对于解决实际问题有一定的指导作用。

论文实验设计合理，材料真实，数据可靠，结论合理，写作规范，语言通顺，反应了作者对国内外研究动态及科研领域的前沿知识有较为深刻的了解，具有独立进行科研工作的能力。

指导教师签字：

2019年5月30日