

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.01.029

# 葡萄酒发酵过程主要参数近红外光谱分析\*

张树明<sup>1</sup> 杨阳<sup>1</sup> 梁学军<sup>2</sup> 李景明<sup>1</sup> 倪元颖<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 怀来龙徽庄园葡萄酒有限公司, 北京 100143)

**摘要:** 用近红外光谱结合化学计量学方法对葡萄酒酒精发酵中葡萄糖、果糖、乙醇和甘油4个指标进行了定量分析, 化学指标的测定采用高效液相色谱法。通过对近红外数据进行筛选、变量标准化等预处理, 比较了主成分回归和偏最小二乘回归定量分析的模型质量, 以决定系数、校正均方根误差、预测均方根误差为模型质量的评价指标。通过比较发现, 对于葡萄糖和果糖, 主成分回归与偏最小二乘回归的预测精度相当; 对于乙醇, 主成分回归预测结果较优; 对于甘油, 偏最小二乘回归的预测结果要优于主成分回归。主成分回归所采用的成分数要多于偏最小二乘回归, 但二者都可以用于上述4种成分的定量分析, 其预测精度也相近。

**关键词:** 葡萄酒 发酵参数 无损检测 近红外光谱 偏最小二乘回归

中图分类号: O657.33; TS261.4<sup>+</sup>3 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2013)01-0152-05

## NIR Spectroscopy Analysis of Main Parameters in Red Wine Fermentation

Zhang Shuming<sup>1</sup> Yang Yang<sup>1</sup> Liang Xuejun<sup>2</sup> Li Jingming<sup>1</sup> Ni Yuanying<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Huailai Chateau Dragon Seal Wines Co., Ltd., Beijing 100143, China)

**Abstract:** The glucose, fructose, ethanol and glycerol were predicted by using NIR spectroscopy and multivariate calibration methods. And the reference values were analyzed by HPLC to evaluate four components above. The principle component analysis regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR) were compared. The correlation coefficient of calibration ( $R^2$ ), the root mean square error of calibration (RMSEC) and the root mean square error of prediction (RMSEP) were used to evaluate the models. Results from the application of PCR and PLSR were presented, showing there were no significant differences between PCR and PLSR to predict glucose, fructose and ethanol. While for the glycerol, it was better to use the PLSR. PLSR almost always required fewer latent variables than PCR, but this did not appear to influence predictive ability.

**Key words:** Red wine Fermentation parameters Non-destructive detection NIR spectroscopy Partial least squares regression

### 引言

在现代工业生产中, 过程质量控制分析是保证产品质量, 调节生产参数的关键, 在工厂的化验分析中占有很大比重。但是, 目前由于大多数工厂依然采用传统分析手段, 而传统分析大多费时、操作繁琐, 不能解决生产上要求快速及时的要求, 成为工厂

提高生产效率的制约。

发酵是一个复杂的过程, 在此过程中原料转化为高价值的产品(比如葡萄汁转化为酒)。在酒精发酵过程中, 发酵底物和产物的含量是非常重要的检测指标(比如糖、乙醇)<sup>[1]</sup>。在酵母的作用下, 酒精发酵得以顺利地进行并且生成了绝大部分的香气物质: 酸类化合物、醇和酯类<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2011-12-20 修回日期: 2012-01-04

\* 国家自然科学基金资助项目(30971979)和农业部“948”引进项目(2004-Z33)

作者简介: 张树明, 博士生, 主要从事农产品无损检测研究, E-mail: sumin\_cheung@yahoo.cn

通讯作者: 倪元颖, 教授, 博士生导师, 主要从事果蔬加工、天然产物提取和功能食品开发研究, E-mail: niyuanyang@163.com

葡萄酒发酵过程中,糖类(葡萄糖和果糖)和醇类(乙醇和甘油)是需要不断检测的指标,许多工艺步骤需要根据这些物质的变化而进行调整。如果用常规的方法对这些指标进行检测,提供的信息往往滞后于生产。随着酿造技术的发展和质量控制要求的提高,对其进行快速、准确的测定对降低生产成本、提高生产效率等都具有重要意义。

由于近红外光谱具有快速、无损、绿色等优点,它已被广泛应用于许多行业。在食品科学领域也越来越多地用于定量和定性分析。近红外光谱应用于葡萄酒的品质检测方面,国外在最近十几年进行了大量的研究,也取得了很大进展<sup>[3-4]</sup>,但是在发酵监控方面,国内外报道很少。

本文利用近红外光谱技术结合化学计量学方法,对葡萄酒酒精发酵过程进行监控分析,期望为葡萄酒发酵的在线检测、监测提供一套高效、准确、快速的分析方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品制备

选取 6 个不锈钢发酵罐(30 000 L),葡萄品种为美乐,发酵温度 25℃,酵母为干酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。每个发酵罐取样从榨汁到酒精发酵结束,共计 54 个样品。样品经 0.45 μm 膜过滤,过滤后样品进行化学指标的测量和光谱分析。

### 1.2 化学值测定

葡萄糖、果糖、乙醇和甘油 4 种成分化学值的测定采用高效液相色谱法。仪器采用德国诺尔 K-1001 型高效液相色谱仪系统并配有梯度洗脱泵以及德国诺尔 K-2301 型示差折光检测器。

色谱条件:Waters Sugar-Park-I 钙型阳离子交换柱(6.5 mm × 300 mm, 5 μm),Waters Sugar-Pak-I Guard-Pak\* 保护柱;流动相为 0.05 g/L EDTA 钙钠水溶液,流速为 0.5 mL/min;柱温 90℃;进样量 20 μL。

样品用去离子水稀释一定倍数后,经 0.45 μm 膜过滤,然后进样,每个样品重复 3 次。标准曲线用色谱纯的标准物,采用峰面积定量。

### 1.3 光谱采集

仪器采用德国布鲁克光学仪器公司生产的傅里叶变换近红外光谱仪。光谱采集选用透射模式,光谱扫描波数为 125 000 ~ 3 600 cm<sup>-1</sup>,以空气为参比,光程为 1 mm,分辨率为 8 cm<sup>-1</sup>,扫描速率为 10 kHz,背景扫描 32 次,样品扫描 32 次。

### 1.4 数据处理与分析

利用 OPUS software v. 6.0 软件,选用偏最小二

乘法作为建立定标模型的化学计量方法,选择软件自动推荐的光谱范围,逐步筛选最佳的光谱预处理方法。偏最小二乘回归所提取的成分,能在很好地概括自变量系统的同时,最好地解释因变量,并排除系统中的噪声干扰<sup>[5]</sup>。模型质量的评价指标采用模型决定系数( $R^2$ )、校正均方根误差(RMSEC)和验证均方根误差(RMSEP)。 $R^2$  越大, RMSEC 和 RMSEP 越小,模型的质量就越好<sup>[6]</sup>,并且 RMSEC 和 RMSEP 的值越接近越好。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄糖、果糖、乙醇和甘油的含量(质量浓度)

Waters Sugar-Park-I 钙型阳离子交换柱(6.5 mm × 300 mm, 5 μm)是专门用于分析果酒中糖和乙醇的分析柱。按照上述条件可以一次性实现葡萄酒中葡萄糖、果糖、乙醇和甘油的分离,而且流动相比较简单。图 1 为液相的混标图,从左到右依次为蔗糖、葡萄糖、果糖、甘油和乙醇。各个组分的回归系数都在 0.99 以上。

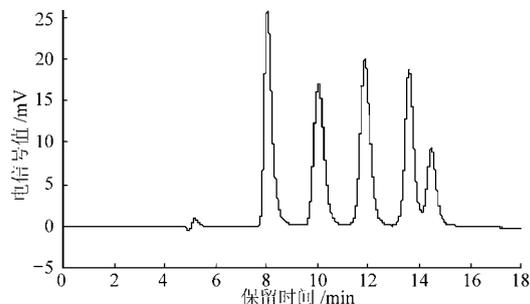


图 1 标准样品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standards

表 1 为葡萄酒发酵液葡萄糖、果糖、乙醇和甘油化学实测值的分析结果。表中列出了校正集和验证集中葡萄糖、果糖、乙醇和甘油的最大值、最小值和平均值,其中葡萄糖的含量分别为 0 ~ 113.65 g/L,果糖分别为 0.76 ~ 89.14 g/L。酒精发酵是还原糖在酵母和酶的作用下转化为乙醇,乙醇含量的范围分别为 0 ~ 127.48 g/L,甘油的含量范围分别为 0 ~ 2.04 g/L。

图 2 是其中一个发酵罐在发酵过程中葡萄糖、

表 1 葡萄糖、果糖、乙醇和甘油含量

Tab. 1 Chemical analysis of glucose, fructose, ethanol and glycerol g/L

成分	校正集(36 个)			验证集(18 个)		
	平均值	最大值	最小值	平均值	最大值	最小值
葡萄糖	51.69	113.65	0	54.53	107.80	0
果糖	47.38	89.14	0.76	49.39	87.66	1.03
乙醇	53.67	127.48	0	44.23	124.00	0
甘油	1.080	2.04	0	0.80	1.60	0

果糖、乙醇和甘油随着时间的变化图,其余发酵罐与此相似。从图中可以看出,随着发酵的进行,葡萄糖和果糖在发酵前40 h内,变化不大,乙醇和甘油的生成量也不是很大;40~160 h内迅速减少,说明此时间段为葡萄酒酒精发酵的主要阶段,同时乙醇和甘油的量迅速增加,由于相对于乙醇来说甘油的含量本身就很低,因此其曲线在图中看上去并不明显。180 h以后,发酵基本停止,此时葡萄糖和果糖基本消耗完毕,乙醇和甘油的生成量达到最大。

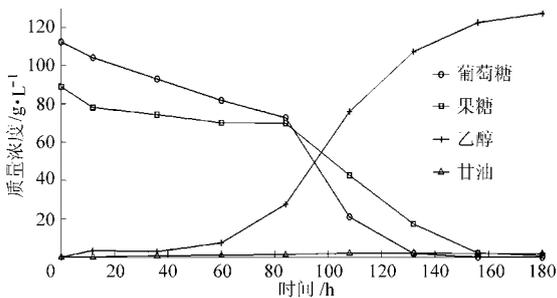


图2 其中一个发酵罐酒精发酵阶段主要发酵参数随着时间的变化曲线

Fig. 2 Change of fermentation parameters vs time

## 2.2 光谱分析

图3为葡萄酒酒精发酵阶段所有样品的近红外原始光谱图,在6870、5589、5155、4512、4410和4339  $\text{cm}^{-1}$ 有明显的特征峰。主要的吸收峰在6870和5155  $\text{cm}^{-1}$ 处,其中6870  $\text{cm}^{-1}$ 处与水的O—H键伸缩振动的一级倍频有关,而5155  $\text{cm}^{-1}$ 处是水和乙醇的O—H键伸缩振动与变形振动的合频吸收带。发酵过程变化最大的光谱区域出现在原始光谱4500~4300  $\text{cm}^{-1}$ 处,这可能与发酵过程乙醇含量的增加与糖含量的减少有关。原始光谱4410  $\text{cm}^{-1}$ 处与乙醇分子中 $\text{CH}_3$ 基团C—H键的伸缩和变形振动的合频吸收有关,这个吸收带上乙醇含量随着发酵的进行而增加。另外,原始光谱在4339  $\text{cm}^{-1}$ 处的吸收带可能与乙醇分子中 $\text{CH}_2$ 基团有关<sup>[7-8]</sup>。原始4500~4300  $\text{cm}^{-1}$ 段与碳水化合物C—H键的伸缩振动和C=O键伸缩振动的合频吸收有关<sup>[9-10]</sup>,由于葡萄酒发酵液中主要糖类是葡萄糖和果糖,因

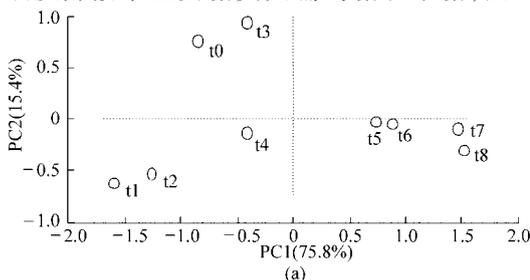


图4 其中一个发酵罐酒精发酵阶段近红外光谱的主成分分析结果

Fig. 4 Principal component analysis on NIR spectra of one fermentation trial

(a) 前两个主成分的得分图 (b) 载荷图

此这个区域与这两种糖的信息有关。

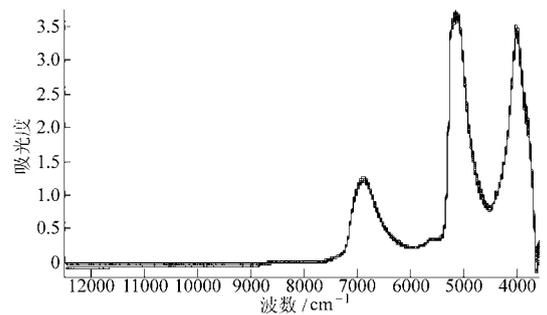


图3 酒精发酵阶段所有样品的近红外原始光谱图

Fig. 3 NIR spectra of all samples collected at different times during alcoholic fermentation

图4是其中一个发酵罐从榨汁到酒精发酵结束阶段的近红外光谱的主成分分析结果:前两个主成分的得分图中 $t_0$ 为加酵母前的葡萄汁, $t_1 \sim t_{18}$ 分别为酒精发酵不同时间的样品,而且从左到右依次分布。因此,随着发酵的进行,发酵液发生了显著变化,这是由于酒精发酵消耗了葡萄汁中的糖类,产生了新的醇类和酯类等其他物质。前两个主成分在4500~4300  $\text{cm}^{-1}$ 处的载荷最大,这也与图3中样品发生最大变化的光谱区域相一致。

## 2.3 近红外定量分析

表2和表3分别是偏最小二乘回归和主成分回归对葡萄糖、果糖、乙醇和甘油含量建模的结果分析,表中分别列出了4种成分的建模波长范围、数据处理方法、偏最小二乘回归的最佳主因子数、主成分回归最佳主成分数、模型决定系数、校正均方误差和验证均方误差。通过比较发现,偏最小二乘回归中4种成分的模型决定系数 $R^2$ 都大于0.90;而主成分回归中除了甘油的 $R^2$ 值为0.894外,其余3种成分均大于0.90。葡萄糖和果糖的模型质量则是偏最小二乘和主成分回归相当,但偏最小二乘回归的主因子数均小于主成分回归的主成分数,这是因为偏最小二乘回归考虑了兼顾自变量和因变量两方面的信息,而主成分回归只考虑了因变量的信息。对于乙醇,主成分回归要优于偏最小二乘回归,采用的主成分数为3,并且RMSEP值低于偏最小二乘回归。

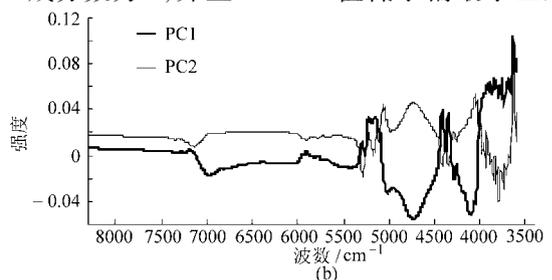


表 2 葡萄糖、果糖、乙醇和甘油含量的偏最小二乘回归建模结果

Tab. 2 PLSR calibration results of glucose, fructose, ethanol and glycerol

成分	波长范围/cm <sup>-1</sup>	数据处理方法	主因子数	校正集		验证集
				R <sup>2</sup>	RMSEC/g·L <sup>-1</sup>	RMSEP/g·L <sup>-1</sup>
葡萄糖	4 381.48 ~ 4 018.92	MSC + d1 + Norris 11.5	7	0.997	3.28	5.07
	4 315.91 ~ 4 030.50					
果糖	5 874.11 ~ 5 338.00	SNV	4	0.993	3.73	6.06
	4 412.33 ~ 4 234.91					
乙醇	4 412.33 ~ 4 234.91	SNV	4	0.999	2.26	2.80
甘油	4 728.60 ~ 4 385.33	SNV + d1	5	0.953	0.22	0.27
	6 012.96 ~ 5 291.71					

注: MSC 为多元散射校正; d1 为一阶导数; SNV 为变量标准化; Norris 11.5 为 Norris 11 点 5 次平滑。

表 3 葡萄糖、果糖、乙醇和甘油含量的主成分回归建模结果

Tab. 3 PCR calibration results of glucose, fructose, ethanol and glycerol

成分	波长范围/cm <sup>-1</sup>	数据处理方法	主因子数	校正集		验证集
				R <sup>2</sup>	RMSEC/g·L <sup>-1</sup>	RMSEP/g·L <sup>-1</sup>
葡萄糖	4 381.48 ~ 4 018.92	SNV + d1 + Norris 11.5	10	0.997	3.44	5.06
	4 315.91 ~ 4 030.50					
果糖	5 874.11 ~ 5 338.00	SNV	10	0.994	3.41	5.75
	4 412.33 ~ 4 234.91					
乙醇	4 412.33 ~ 4 234.91	SNV + d1	3	0.999	2.35	2.68
甘油	4 728.60 ~ 4 385.33	SNV + d1	6	0.894	0.32	0.36
	6 012.96 ~ 5 291.71					

甘油则是偏最小二乘回归的结果较好, R<sup>2</sup>、RMSEC 和 RMSEP 均高于主成分回归。总体来讲, 两种方法都可以用于生产中 4 种成分的定量分析, 其预测精度也没有差别<sup>[11-12]</sup>。

图 5 为偏最小二乘回归葡萄糖、果糖、乙醇和甘油校正集和验证集的实测值和预测值相关性关系

图, 将验证集葡萄糖、果糖、乙醇和甘油的化学值和近红外预测值经过 *t* 检验, 在 0.05 的显著性水平下, 两种方法不存在显著差异, 表明近红外方法与高效液相色谱法检测得到的 4 个参数化学值和近红外预测值差异不显著。

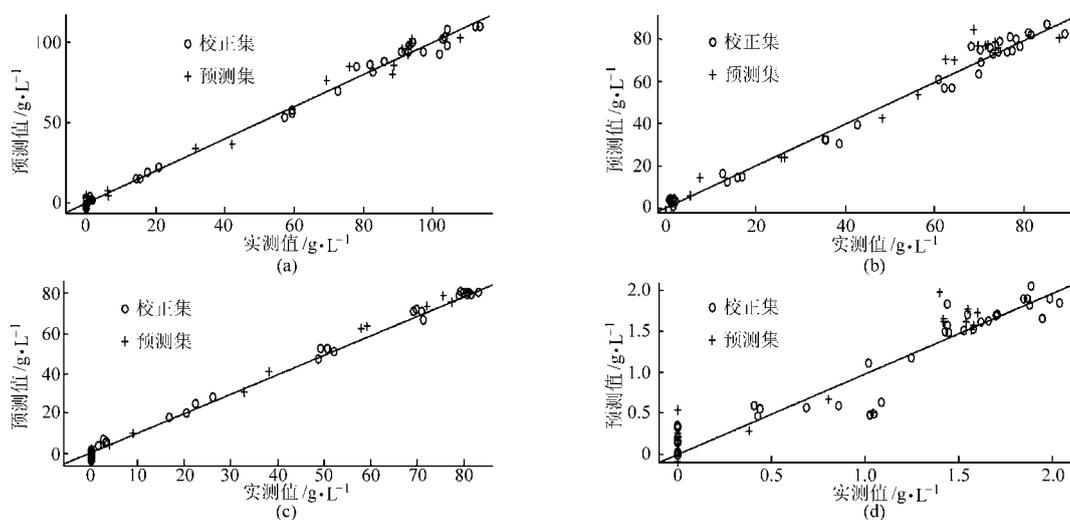


图 5 实测值和近红外预测值的相关关系图

Fig. 5 Correlation between reference and predicted values

(a) 葡萄糖 (b) 果糖 (c) 乙醇 (d) 甘油

### 3 结论

(1) 用 Waters Sugar - Park - I 钙型阳离子交换柱建立了分析葡萄酒发酵液中葡萄糖、果糖、乙醇和甘油 4 种成分的高效液相色谱分析方法, 方法简单、

易操作、精度高。

(2) 分析比较了主成分回归和偏最小二乘回归对葡萄糖、果糖、乙醇和甘油 4 种成分的定量分析模型质量。结果表明, 对葡萄糖和果糖, 两种方法模型质量相当; 对于乙醇, 主成分回归则优于偏最小二乘

回归;对于甘油,则是偏最小二乘回归模型性能较好。总体来讲,主成分回归和偏最小二乘回归都可

## 参 考 文 献

- 1 Di Egidio V, Sinelli N, Giovanelli G, et al. NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 230(6): 947 ~ 955.
- 2 Piñeiro Z, Natera R, Castro R, et al. Characterisation of volatile fraction of monovarietal wines; influence of winemaking practices [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 563(1 ~ 2): 165 ~ 172.
- 3 Urbancr Cuadrado M, Luque de Castro M D, Pérez Juan P M, et al. Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology: determination or screening of fifteen parameters in different types of wines[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 527(1): 81 ~ 88.
- 4 Urbancr Cuadrado M, Luque de Castro M D, Pérez Juan P M, et al. Comparison and joint use of near infrared spectroscopy and Fourier transform mid infrared spectroscopy for the determination of wine parameters[J]. *Talanta*, 2005, 66(1): 214 ~ 228.
- 5 王惠文. 偏最小二乘回归方法及其应用[M]. 北京: 国防工业出版社, 1999.
- 6 彭帮柱, 岳田利, 袁亚宏, 等. 苹果酒发酵过程中糖度近红外光谱检测模型的建立[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(3): 652 ~ 655.  
Peng Bangzhu, Yue Tianli, Yuan Yahong, et al. Modeling of sugar content based on NIRS during cider-making fermentation[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, 29(3): 652 ~ 655. (in Chinese)
- 7 Cozzolino D, Kwiatkowski M J, Parker M, et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by near infrared spectroscopy[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 513(1): 73 ~ 80.
- 8 Damberg R G, Kambouris A, Francis I L, et al. Rapid analysis of methanol in grape derived distillation products using near infrared transmission spectroscopy[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(11): 3 079 ~ 3 084.
- 9 严衍祿, 赵龙莲, 韩东海, 等. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- 10 陆婉珍, 袁洪福, 徐广通, 等. 现代近红外光谱分析技术[M]. 北京: 中国石油化工出版社, 2000.
- 11 Wentzell P D, Vega Montoto L. Comparison of principal components regression and partial least squares regression through generic simulations of complex mixtures[J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2003, 65(2): 257 ~ 279.
- 12 Hemmateenejad B, Akhond M, Samari F. A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline, and phenol: effect of wavelength selection[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2007, 67(3 ~ 4): 958 ~ 965.

(上接第 161 页)

- 19 陈活虎, 何晶晶, 邵立明, 等. 生物质分类表征蔬菜废物高温好氧降解特征及其动力学描述[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(3): 802 ~ 806.  
Chen Huohu, He Pinjing, Shao Liming, et al. Characteristics and kinetics of aerobic thermophilic decomposing for various biomass compositions of vegetable waste[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(3): 802 ~ 806. (in Chinese)
- 20 李坚斌, 李琳, 郭祀远, 等. 超声辐照马铃薯淀粉糊降解动力学的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 84 ~ 87.  
Li Jianbin, Li Lin, Guo Siyuan, et al. Degradation kinetics of potato starch paste under ultrasonic irradiation[J]. *Food Science*, 2007, 28(2): 84 ~ 87. (in Chinese)
- 21 赵叶君, 张巧巧, 杨超光, 等. 河流湿地土壤芘的降解和生物有效性模型与酶活性动态变化[J]. *生态毒理学报*, 2010, 5(5): 647 ~ 656.  
Zhao Yejun, Zhang Qiaoqiao, Yang Chaoguang, et al. Model of pyrene degradation and bioavailability and dynamic changes of enzymatic activities in the riverine wetland soil[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(5): 647 ~ 656. (in Chinese)