

枇杷醋生产中酒精发酵工艺优化及酸味特征分析

Optimization of alcohol fermentation and acid characteristics analysis in loquat vinegar production

段珍珍¹ 周才琼^{1,2} 袁敏¹ 常荣¹

DUAN Zhen-zhen¹ ZHOU Cai-qiong^{1,2} YUAN Min¹ CHANG Rong¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆市特色食品工程技术研究中心, 重庆 400715)

(1. Food Science College, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Engineering & Technology Research Centre of Characteristic Food, Chongqing 400715, China)

摘要:采用金华1号红肉枇杷为试验材料,对枇杷醋生产工艺中酒精发酵工艺参数进行优化,并分析醋基的酸味特征。研究酵母种类及接种量、发酵pH、发酵温度和初始糖度对枇杷醋醋基品质的影响,并以酒精度为响应值确定最优的发酵条件。结果表明,酵母菌种Yb为枇杷醋醋基酒精发酵优势酵母菌种,最优工艺参数为发酵温度25℃,酵母接种量0.05%,pH 3.5,该条件下枇杷醋醋基酒精度8.50% Vol,有机酸含量12.228 g/L。枇杷醋醋基酸味特征主要由苹果酸、乳酸、乙酸和琥珀酸构成,占总有机酸的95.4%,构成枇杷醋醋基酸味感的94.7%。高含量酒精和适当含量的有机酸是后续醋酸发酵后醋酸含量的保证以及构成枇杷醋果酸味和一定功能作用的重要成分。

关键词:红肉枇杷;果醋;酒精发酵;酸味特征

Abstract: Red flesh loquat named Jinhua No.1 was used as experimental material to optimize alcohol fermentation process and analyze the acidity characteristics of loquat vinegar in this study. The effects of yeast species and inoculation amount, pH, fermentation temperature and initial sugar content on the quality of loquat vinegar were studied, and the optimal fermentation conditions were determined by the alcoholic degree as the response value. The results showed that the yeast strain Yb was the dominant yeast strain of loquat vinegar, the optimal process parameters were that the yeast inoculation amount 0.05% was fermented at 25℃ and pH 3.5. Under the optimum process conditions, the loquat vinegar base possessed 8.5% Vol alcohol, 12.228 g/L organic acid. Malic acid, lactic acid, acetic acid and succinic acid were the main organic acids that made up the taste

of loquat vinegar, accounting for 95.4% of total organic acids, which constituted 94.7% of the vinegar sour taste of loquat vinegar. High content alcohol and suitable organic acid were the guarantee of acetic acid content after acetic acid fermentation and the important components that the acid taste and function of the loquat vinegar.

Keywords: red flesh loquat; loquat vinegar; alcohol fermentation; acidity characteristics

枇杷[Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl]为蔷薇科(Rosaceae)苹果亚科枇杷属(Eriobotrya Lindl.)植物,果肉富含苹果酸、酒石酸、柠檬酸、富马酸及草酰乙酸等^[1],含不同种类的胡萝卜素、三萜类和多酚类等成分^[2]。枇杷含水量高,不耐贮藏,鲜果货架期短,因此其深加工备受关注。枇杷深加工主要集中在枇杷饮料^[3-4]和枇杷果酒^[5-6]的研发。

果醋主要以水果或果品加工下脚料为原料,经酒精发酵和醋酸发酵酿制而成。果醋有很多种类,有用于烹饪调味,也有用于饮用保健,其中应用于烹饪的酸度最高达5%,饮料果醋的酸度较低(为1%)^[7]。现有报道集中于果醋的工艺研究,大多在酿造出果醋原醋基础上,调配大量果汁、蜂蜜、添加剂等兑制而成酸甜可口的果醋饮品^[8-9]。有少量报道了研制有明确用途的果醋,如调味型苹果醋、葡萄醋^[10-11]和保健型沙棘果醋^[12]。果醋进一步的研究包括雪利醋功能作用^[13]、柿果醋发酵过程中香气成分和有机酸的动态变化^[14]及果醋陈化后熟等^[15]。这些研究极少涉及果醋醋酸发酵最重要的基础——醋基的研究,枇杷果醋更少见报道。作为后续醋酸发酵的醋基,其有机酸含量及组成极大程度影响果醋的风味品质。因此酒精发酵工艺的选择是优良品质的保证,作为醋基的枇杷酒中的有机酸主要来自枇杷果实、工艺需求的外源添加酸和酒精发酵过程中酵母代谢产物,是枇杷醋风味品质构成基础。为此,本研究采用红肉枇杷为试验材料,以有机酸组成和含量、枇杷醋酒精发酵相关特征为依据,研

基金项目:重庆市特色食品工程技术研究中心能力提升项目(编号: cstc2014pt-gc8001)

作者简介:段珍珍,女,西南大学在读硕士研究生。

通信作者:周才琼(1964—),女,西南大学教授,博士。

E-mail: zhoucaiqiong@swu.edu.cn

收稿日期:2017-11-28

究酵母种类及接种量、发酵 pH、发酵温度和加糖量等对枇杷醋酯基酒精含量和有机酸的影响,通过单因素和响应面试验探究枇杷醋酯基的最佳酿造工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

红肉枇杷:金华 1 号,西南大学农业综合开发研究室科研基地;

白砂糖:重庆市北碚区天生街永辉超市;

安琪酿酒干酵母:分别为 Ya、Yb 和 Yc,安琪酵母股份有限公司;

帝伯仕酿酒干酵母:Yd,烟台帝伯仕自酿机有限公司。

1.1.2 主要试剂

果胶酶:酶活力 ≥ 50 U/g,成都科龙化工试剂厂;

柠檬酸、柠檬酸钾、邻苯二甲酸氢钾等:分析纯,成都科龙化工试剂厂;

磷酸二氢钾:优级纯,成都科龙化工试剂厂;

异抗坏血酸:纯度 99%,瑞士阿达玛斯试剂;

甲醇:色谱纯,天津四友精细化学品有限公司;

柠檬酸标准品(纯度 $\geq 97.0\%$)、草酸标准品(纯度 $\geq 99.5\%$):中国食品药品检定研究院;

L-苹果酸标准品、L-酒石酸标准品:纯度 HPLC $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司;

琥珀酸标准品(纯度 $\geq 99.5\%$)、乳酸标准品(纯度 $\geq 91.2\%$):德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司;

乙酸标准品:纯度 $\geq 99.8\%$,美国 Sigma-aldrich 公司。

1.2 主要设备

pH 计:PHS-3C 型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

折射仪:WZS 手持式,上海仪电物理光学仪器有限公司;

电热恒温培养箱:HH.B11.500-BS-II 型,上海跃进医疗器械厂;

恒温培养振荡器:ZWY-2102C 型,上海智诚分析仪器制造有限公司;

电子天平:FA2004A 型,上海精天电子仪器有限公司;

高效液相色谱仪:LC-2010AD 型,日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵基本工艺过程及操作要点

(1) 护色:成熟枇杷果实洗净、去核及果蒂,0.05%亚硫酸氢钠溶液在 (25 ± 3) °C 浸泡 30 min 护色,沥水备用。

(2) 打浆:护色后枇杷果加入 0.05%亚硫酸氢钠和 0.01% 异抗坏血酸进行打浆。

(3) 酶解:将枇杷果打浆后加入果胶酶 0.18 g/kg,调 pH 至 3.5,于 35 °C 酶解 8 h(出汁率 90%),85 °C 灭菌 15 min,用保鲜膜将灭菌后的枇杷果汁封口并迅速冷却至室温,得枇杷果汁(可溶性固形物 8.2%,总酸 0.3%)。

(4) 酵母活化及筛选:用 5%的糖水溶解酵母,38 °C 水

浴活化,30 min 后有细腻泡沫出现为活化成功。然后选用 1.1.1 所列 4 种酵母分别接种,控制糖度在 20%,pH 3.5,25 °C 恒温发酵 7 d 后,测定各指标,选择适合枇杷醋酒精发酵(醋基)的菌种。

(5) 发酵:调整枇杷果汁 pH 和初始糖度,将酵母活化后接种,在一定温度下发酵 7 d 检测分析。

1.3.2 枇杷醋酒精发酵工艺单因素试验

(1) 发酵 pH 对枇杷醋酒精发酵的影响:固定反应条件为枇杷果汁糖度 20%、酵母接种量 0.10%、发酵温度 25 °C、发酵时间 7 d,考察发酵 pH(3.0,3.5,4.0,4.5,5.0)对枇杷醋酒精发酵的影响。

(2) 酵母菌接种量对枇杷醋酒精发酵的影响:固定反应条件为枇杷果汁糖度 20%、发酵 pH 3.5、发酵温度 25 °C、发酵时间 7 d,考察酵母接种量(0.05%,0.1.0%,0.40%,0.70%,1.00%)对枇杷醋酒精发酵的影响。

(3) 发酵温度对枇杷醋酒精发酵的影响:固定反应条件为枇杷果汁糖度 20%、发酵 pH 3.5、酵母接种量 0.10%、发酵时间 7 d,考察发酵温度(20,24,28,32 °C)对枇杷醋酒精发酵的影响。

(4) 初始糖度对枇杷醋酒精发酵的影响:固定反应条件为发酵 pH 3.5、酵母接种量 0.10%、发酵温度 25 °C、发酵时间 7 d,考察初始糖度(12%,16%,20%,24%)对枇杷醋酒精发酵的影响。

1.3.3 响应面法优化枇杷醋醋基发酵条件 在单因素试验基础上,固定初始糖度 16%,研究发酵温度、酵母接种量和初始 pH 对枇杷醋醋基发酵的影响,以发酵酒精度和总有机酸含量为响应值,采用 Box-Behnken 响应面设计,优化发酵最佳工艺。

1.3.4 有机酸组成分析 根据文献[16],修改如下:

(1) 标准溶液制备:准确配制各有机酸标准母液,分别称取苹果酸标准品 91.7×10^{-3} g,酒石酸标准品 63.6×10^{-3} g,草酸标准品 105.7×10^{-3} g,柠檬酸标准品 130.2×10^{-3} g,乳酸标准品 99.8×10^{-3} g,乙酸标准品 0.5 mL,分别定容至 5 mL,称取琥珀酸标准品 257.3×10^{-3} g,定容至 10 mL。根据样品中有机酸含量将有机酸标准母液稀释成不同浓度混合有机酸标准工作液,用 $0.45 \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤后进样,确定各有机酸出峰时间。将稀释成不同浓度的混合有机酸标准工作液进样分析,有机酸标准曲线横坐标为浓度,纵坐标为峰面积,进行线性回归分析。

(2) 样品溶液制备:取样品于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液稀释 5 倍,用 $0.45 \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤,进样分析,计算各有机酸含量。

(3) HPLC 分析:Hypersil ODS(C_{18})色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm);柱温 28 °C;检测波长 210 nm;流速 0.6 mL/min;进样量 15 μL ;流动相为 99%的用磷酸调节 pH 为 2.50 的 0.06 mol/L 磷酸二氢钾缓冲溶液和 1%的甲醇溶液。

1.3.5 其他指标

(1) 酒精度:按 GB/T 15038—2006 的酒精计法执行。

(2) 可溶性固形物(TSS):按 GB/T 15038—2006 的糖度计直接测定执行。

(3) pH:按 GB/T 15038—2006 的 pH 计法执行。

(4) 失重:按式(1)计算。

$$m=m_1-m_2,$$
(1)

式中:

m ——失重,g;

m_1 ——开始发酵时发酵液及发酵装置的总重量,g;

m_2 ——发酵结束后发酵液及发酵装置的总重量,g。

1.3.6 数据处理 试验平行 3 次,结果以平均数±标准偏差表示;采用 SPSS 22.0 和 Excel 进行数据处理与统计分析,Duncan 法做多重比较,分析数据间的差异;用 Design-expert 8.0.6 设计响应面试验方案及数据分析。

2 结果与分析

2.1 枇杷鲜果有机酸组成分析

酶解前枇杷果浆有机酸含量组成分析见表 1,显示其主要由苹果酸组成,占总有机酸含量的 83.81%,与文献[17]报道苹果酸是枇杷主要的有机酸相符,其次是琥珀酸和酒石酸,有少量乙酸、柠檬酸和草酸。

2.2 枇杷醋酒精发酵酵母的筛选

由表 2 可知,各处理样品酒精度、TSS 及 pH 值比较接近,各酵母发酵后酒精度在 11.4%~12.2% Vol,均远高于后续醋酸发酵时所需酒精量,但采用高糖发酵可更好地观察酵母菌对糖的利用情况,有一定参考价值。有机酸组成分析见表 3,与枇杷鲜果有机酸组成含量相比(表 1),苹果酸快速下降,含量仅为鲜果的 47.4%~53.2%,其他各处理有机酸含量急剧上升,乳酸和乙酸占比较高,表明酵母发酵显著改变

了有机酸组成及酸味特点。试验各组苹果酸、乳酸、酒石酸和草酸有显著差异($P<0.05$)。乳酸、乙酸、苹果酸和柠檬酸分别占总有机酸含量的 24.96%~29.33%,22.89%~25.05%,15.14%~16.51%,12.15%~14.02%,乳酸和乙酸占比较高,Yb 和 Yd 总有机酸含量显著高于 Ya 和 Yc,Yb 中乙酸、柠檬酸和琥珀酸含量最高,Yd 中乳酸、苹果酸和酒石酸最高,但 Yb 酸味感更柔和圆润。综合考虑,选用 Yb 作为枇杷醋酒精发酵最优发酵菌种。

表 1 枇杷鲜果有机酸组成分析

Table 1 Analysis of organic acid composition of fresh loquat

有机酸	含量/(g·L ⁻¹)	占总有机酸比/%
草酸	0.115±0.003	1.75
酒石酸	0.282±0.005	4.30
苹果酸	5.502±0.012	83.81
乳酸	0.000±0.000	0.00
乙酸	0.234±0.330	3.56
柠檬酸	0.131±0.035	2.00
琥珀酸	0.300±0.003	4.57
合计	6.565±0.273	100.00

表 2 不同酿酒酵母对发酵的影响

Table 2 Effects of different yeast with fermentation

酵母	酒精度/% Vol	TSS/%	pH
Ya	11.40±0.12	7.13±0.12	3.71±0.03
Yb	12.20±0.00	7.00±0.06	3.68±0.02
Yc	12.10±0.08	7.10±0.00	3.70±0.04
Yd	11.60±0.05	7.13±0.06	3.55±0.02

表 3 不同酵母接种发酵对有机酸含量的影响[†]

Table 3 Effects of different yeast on organic acids content

酵母	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	合计
Ya	0.275±0.007 ^{ab}	0.863±0.023 ^{bc}	2.606±0.057 ^b	4.526±0.524 ^{ab}	3.781±1.151 ^a	2.181±1.001 ^a	1.929±0.286 ^a	16.160±0.702 ^b
Yb	0.280±0.008 ^a	0.909±0.025 ^{ab}	2.763±0.021 ^{ab}	4.555±0.100 ^{ab}	4.571±2.013 ^a	2.559±0.974 ^a	2.612±0.409 ^a	18.249±1.389 ^a
Yc	0.261±0.009 ^b	0.844±0.022 ^c	2.634±0.082 ^b	4.071±0.574 ^b	3.875±1.052 ^a	1.965±0.680 ^a	2.309±0.797 ^a	15.961±0.726 ^b
Yd	0.287±0.013 ^a	0.952±0.035 ^a	2.929±0.205 ^a	5.440±0.537 ^a	4.245±1.624 ^a	2.253±0.895 ^a	2.439±0.499 ^a	18.544±1.326 ^a

[†] 同列不同小写字母表示不同发酵菌种的均值差异显著($P<0.05$)。

2.3 枇杷醋酒精发酵单因素试验

2.3.1 温度对枇杷醋酒精发酵的影响 由表 4 可知,24, 28℃ 下发酵时酒精度较高,失重较多,发酵较完全;发酵后的残糖随温度上升而增加。有机酸组成分析见表 5,与枇杷鲜果有机酸组成(表 1)相比,苹果酸略有下降,其他各有机酸均不同程度增加。低温发酵利于柠檬酸积累,高温发酵利于乳酸积累($P<0.05$)。柠檬酸有愉快清新的酸感,酸味爽快,后苦时间短^[18]。苹果酸保持稳定,与 Kandylis 等^[19]报道温度会影响苹果酸的分解不符,可能与枇杷果汁中苹果酸的存在形式有关。感官品评显示在较低温度下发酵的枇杷醋醋基酸味感

更均衡柔和,综合考虑选取 24℃ 为最适发酵温度。

表 4 发酵温度对发酵的影响

Table 4 Effects of different fermentation temperatures with fermentation

发酵温度/℃	酒精度/% Vol	TSS/%	失重/g
20	10.9±0.3	6.60±0.00	12.33±0.58
24	11.2±0.3	6.87±0.12	15.67±3.51
28	11.2±0.2	6.93±0.12	14.67±0.58
32	10.7±0.2	7.20±0.00	13.33±1.15

表 5 发酵温度对有机酸含量的影响[†]
Table 5 Effects of different fermentation temperatures with organic acids contents g/L

温度/℃	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	合计
20	0.193±0.004 ^a	0.687±0.075 ^a	4.271 0±0.191 ^a	2.446±0.139 ^c	2.097±0.076 ^a	2.547±0.158 ^a	1.219±0.219 ^a	13.461±0.503 ^a
24	0.213±0.032 ^a	0.730±0.115 ^a	4.115 7±0.250 ^a	3.421±0.359 ^b	2.050±0.331 ^a	2.584±0.083 ^a	1.257±0.082 ^a	14.370±0.972 ^a
28	0.207±0.012 ^a	0.808±0.101 ^a	4.295 0±0.053 ^a	4.829±0.118 ^a	2.349±0.304 ^a	1.387±0.016 ^b	1.161±0.042 ^a	15.036±0.565 ^a
32	0.211±0.110 ^a	0.783±0.110 ^a	4.010 0±0.330 ^a	4.323±0.563 ^a	2.371±0.372 ^a	1.377±0.065 ^b	1.371±0.042 ^a	14.447±1.522 ^a

† 同列不同小写字母表示不同发酵温度的均值差异显著(P<0.05)。

2.3.2 酵母接种量对枇杷醋酒精发酵的影响 由表 6 可知,随酵母接种量的增加酒精度呈先增后降趋势。0.05%和0.10%处理酒精度和失重相对较高,且0.10%发酵残糖比0.05%低。有机酸组成分析见表 7,与枇杷鲜果有机酸组成(表 1)相比,苹果酸下降,乳酸、柠檬酸、琥珀酸和乙酸均增加较多。试验各处理总酸含量没有差异,较低接种量有利于乳酸和苹果酸积累(P<0.05)。综合考虑以0.10%为最适酵母接种量。

2.3.3 初始 pH 对枇杷醋酒精发酵的影响 由表 8 可知,随

表 6 酵母接种量对发酵的影响
Table 6 Effects of different yeast inoculation with fermentation

接种量/%	酒精度/%Vol	TSS/%	失重/g
0.05	11.4±0.1	7.27±0.12	14.67±0.58
0.1	11.6±0.6	7.07±0.12	14.33±1.15
0.4	11.0±0.2	7.20±0.00	12.33±0.58
0.7	10.9±0.3	7.13±0.12	13.33±1.53
1	10.4±0.4	7.00±0.00	13.00±1.00

表 7 酵母接种量对有机酸含量的影响[†]
Table 7 Effects of different yeast inoculation with organic acids contents g/L

接种量/%	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	合计
0.05	0.191±0.003 ^a	0.490±0.073 ^a	3.327±0.121 ^a	4.111±0.413 ^a	2.146±0.332 ^{ab}	2.885±1.923 ^a	2.039±0.465 ^a	15.190±2.639 ^a
0.10	0.162±0.041 ^a	0.438±0.049 ^a	3.167±0.137 ^{ab}	3.219±0.576 ^b	1.957±0.209 ^b	4.120±0.675 ^a	1.982±0.892 ^a	15.043±2.206 ^a
0.40	0.141±0.037 ^a	0.580±0.221 ^a	3.156±0.089 ^{ab}	3.314±0.329 ^b	2.520±0.182 ^a	4.227±0.138 ^a	2.847±0.511 ^a	16.784±0.535 ^a
0.70	0.137±0.040 ^a	0.448±0.046 ^a	3.013±0.020 ^{bc}	2.719±0.143 ^{bc}	2.313±0.195 ^{ab}	4.999±0.778 ^a	2.524±0.299 ^a	16.153±0.839 ^a
1.00	0.163±0.039 ^a	0.451±0.055 ^a	2.905±0.073 ^c	2.120±0.336 ^c	2.505±0.244 ^a	3.182±2.655 ^a	2.438±0.441 ^a	13.763±2.964 ^a

† 同列不同小写字母表示不同发酵菌种的均值差异显著(P<0.05)。

pH 升高酒精度先升后降,pH 3.5 时,酒精度最高且残糖最低。有机酸组成分析见表 9,与枇杷鲜果有机酸组成(表 1)相比,苹果酸有所下降,乙酸和乳酸增加较多。随发酵 pH 升高,苹果酸和乳酸显著增加(P<0.05)。乳酸是酒精发酵产物,由丙酮酸还原或苹果酸转化而成,有报道^[20]果汁 pH 在 4.0~6.0 时可提高乳酸含量。pH 3.5 时柠檬酸最低,这与 pH 调节有关,其他处理均添加了外源柠檬酸或柠檬酸钾。pH 3.5 处理酸味感更均衡柔和,为最适发酵 pH 值。

表 8 初始 pH 对发酵的影响
Table 8 Effects of different pH with fermentation

pH	酒精度/%Vol	TSS/%	失重/g
3.0	10.8±0.1	7.50±0.14	13.00±1.41
3.5	11.1±0.2	7.13±0.12	12.33±0.58
4.0	10.8±0.2	7.37±0.06	12.67±1.15
4.5	10.7±0.3	7.73±0.12	13.00±1.00
5.0	10.2±0.1	8.13±0.12	12.00±1.00

表 9 发酵 pH 对有机酸含量的影响[†]
Table 9 Effects of different pH with organic acids contents g/L

pH	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	合计
3.0	0.168±0.045 ^b	0.651±0.154 ^a	3.721±0.105 ^c	1.652±0.342 ^c	3.906±0.993 ^a	11.310±0.949 ^b	1.153±0.289 ^b	22.562±1.301 ^b
3.5	0.198±0.013 ^b	0.539±0.044 ^b	3.850±0.308 ^{bc}	2.460±0.530 ^b	3.975±1.119 ^a	3.899±0.335 ^d	1.926±0.616 ^a	16.847±1.039 ^d
4.0	0.196±0.021 ^b	0.500±0.059 ^b	4.122±0.370 ^{ab}	3.303±0.429 ^a	4.943±2.586 ^a	5.306±0.911 ^d	2.037±0.413 ^a	19.306±2.275 ^c
4.5	0.209±0.018 ^b	0.490±0.068 ^b	4.355±0.400 ^a	3.332±0.221 ^a	5.672±2.150 ^a	7.786±2.740 ^c	2.101±0.644 ^a	22.832±3.172 ^b
5.0	0.271±0.062 ^a	0.447±0.069 ^b	4.376±0.278 ^a	3.505±0.243 ^a	5.474±1.845 ^a	15.514±0.809 ^a	1.548±0.452 ^{ab}	29.967±1.326 ^a

† 同列不同小写字母表示不同发酵 pH 的均值差异显著(P<0.05)。

2.3.4 初始糖度对枇杷醋酒精发酵的影响 由表 10 可知,随初始糖度升高,酒精度、失重和残糖量增高。有机酸分析见表 11,与枇杷鲜果有机酸组成(表 1)相比,苹果酸快速下降,柠檬酸增加较多,其他有机酸均不同程度增加。乳酸和乙酸含量随初始糖度升高显著增加(P<0.05)。糖度越高,苹果酸含量越低,乳酸含量越高,推测苹果酸转化成了乳酸,同时参与了苹果酸-酒精发酵,酿酒酵母能分解10%~30%

表 10 初始糖度对发酵的影响
Table 10 Effects of different initial sugar with fermentation

初始糖度/%	酒精度/%Vol	TSS/%	失重/g
12	5.6±0.1	4.73±0.23	6.67±0.58
16	8.8±0.4	6.13±0.12	9.67±0.58
20	10.4±0.6	7.20±0.00	12.33±1.15
24	12.4±1.6	8.33±0.12	15.67±0.58

表 11 初始糖度对有机酸含量的影响[†]

Table 11 Effects of different initial sugar with organic acids contents

g/L

初始糖度/%	草酸	酒石酸	苹果酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	合计
12	0.233±0.011 ^b	1.505±0.001 ^a	3.097±0.048 ^a	1.144±0.047 ^d	0.633±0.037 ^d	4.688±0.157 ^a	1.323±0.049 ^a	12.622±0.033 ^b
16	0.271±0.010 ^{ab}	1.454±0.205 ^a	2.885±0.205 ^a	2.385±0.403 ^c	1.374±0.364 ^c	4.074±0.010 ^{ab}	1.277±0.176 ^a	13.721±0.896 ^b
20	0.287±0.025 ^{ab}	0.709±0.361 ^b	2.917±0.012 ^a	2.957±0.582 ^{bc}	1.714±0.008 ^c	3.571±0.336 ^b	1.257±0.037 ^a	13.413±0.848 ^b
24	0.327±0.039 ^a	1.279±0.001 ^a	2.830±0.070 ^a	3.505±0.007 ^{ab}	3.457±0.125 ^a	3.771±0.313 ^b	1.715±0.200 ^a	16.885±0.655 ^a

[†] 同列不同小写字母表示不同发酵初始糖度的均值差异显著(P<0.05)。

的苹果酸来生成酒精^[21],从而造成苹果酸的消耗。随初始糖度升高,总有机酸含量升高。但糖度是影响酒精度最重要的因素,考虑后续醋酸发酵中醋酸耐酒精度在 8% Vol 左右,因此选择 16% 的糖度作为枇杷醋酒精发酵糖度。

2.4 响应面优化枇杷醋醋基发酵工艺

2.4.1 试验设计及结果 根据单因素试验结果设计了响应面优化因素和水平,见表 12。以发酵后枇杷醋醋基酒精度和总有机酸含量为响应值,结果见表 13。

表 12 响应面优化试验因素水平表

Table 12 Factors and levels of response surface optimization test

水平	A 发酵温度/℃	B 酵母菌接种量/%	C 发酵 pH
1	20	0.05	3.5
0	24	0.20	4.0
-1	28	0.35	4.5

表 13 响应面优化试验设计及结果

Table 13 The design and results of response surface optimization test

处理号	A	B	C	Y ₁ 酒精度/ % Vol	Y ₂ 总有机酸/ (g·L ⁻¹)
1	-1	-1	0	8.0	15.921
2	0	0	0	8.0	18.077
3	0	1	1	8.1	18.163
4	1	-1	0	7.9	16.299
5	-1	1	0	7.7	15.348
6	1	0	-1	8.3	13.245
7	0	-1	1	8.1	24.144
8	1	1	0	7.9	15.752
9	0	1	-1	7.9	16.794
10	1	0	1	7.7	18.918
11	-1	0	1	7.9	20.479
12	0	0	0	7.9	19.524
13	0	0	0	7.8	17.631
14	0	-1	-1	8.6	13.764
15	0	0	0	8.1	17.457
16	-1	0	-1	8.0	13.008
17	0	0	0	8.0	17.508

2.4.2 以酒精度为响应值分析结果 对表 13 酒精度进行二次线性回归拟合,得回归方程:

$$Y_1 = 7.96 + 0.025A - 0.12B - 0.13C + 0.075AB - 0.13AC + 0.17BC - 0.14A^2 + 0.057B^2 + 0.16C^2。$$

(2)

对此模型进行方差分析结果见表 14,模型 $F=5.56$,达显著水平(P<0.05)。回归方程的失拟性检验不显著(P=0.470 3),回归模型负相关系数 $R^2=0.877\ 2$,表明超过 87.72% 的试验数据能被预测,模型相关性较好;校正决定系数 $R^2_{\text{adj}}=0.719\ 4$,说明该模型能解释 71.94% 的变化,拟合程度较好。因此可用该模型对枇杷醋酒精发酵工艺进行分析和预测。比较各因素 F 值,得出各因素酒精发酵影响顺序是:接种量>pH>温度。接种量、pH 及其交互项、温度和 pH 的二次项对酒精度影响显著(P<0.05)。

2.4.3 以有机酸含量为响应值的分析 对表 13 有机酸含量进行二次线性回归拟合,得回归方程为:

$$Y_2 = 18.04 - 0.068A - 0.51B + 3.11C + 6.775E - 003AB - 0.45AC - 2.25BC - 2.01A^2 - 0.20B^2 + 0.38C^2。$$

(3)

对此回归模型进行方差分析结果见表 15,模型 $F=21.86$,达极显著水平(P=0.000 3),回归方程失拟性检验不

表 14 酒精度回归模型方差分析[†]

Table 14 Analysis of variance of alcohol regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.66	9	0.073	5.56	0.017 0	*
A	5.00E-003	1	5.00E-003	0.38	0.556 9	
B	0.13	1	0.13	9.51	0.017 7	*
C	0.12	1	0.12	9.51	0.017 7	*
AB	0.022	1	0.022	1.71	0.232 1	
AC	0.062	1	0.062	4.76	0.065 6	
BC	0.12	1	0.12	9.32	0.018 5	*
A ²	0.085	1	0.085	6.51	0.038 1	*
B ²	0.014	1	0.014	1.06	0.337 6	
C ²	0.10	1	0.10	7.95	0.025 8	*
残差	0.092	7	0.013			
失拟项	0.04	3	0.013	1.03	0.470 3	
纯误差	0.052	4	0.013			
总和	0.75	16				

[†] * * 为差异极显著(P<0.01); * 为差异显著(0.01<P<0.05); $R^2=0.877\ 2$; $R^2_{\text{adj}}=0.719\ 4$ 。

表 15 有机酸回归模型方差分析[†]
Table 15 Analysis of variance of organic acid regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	118.31	9	13.15	21.86	0.000 3	* *
A	0.037	1	0.037	0.061	0.811 9	
B	2.07	1	2.07	3.44	0.105 8	
C	77.46	1	77.46	128.78	<0.000 1	* *
AB	1.84E-004	1	1.84E-004	3.05E-004	0.986 5	
AC	0.81	1	0.81	1.34	0.284 4	
BC	20.30	1	20.30	33.75	0.000 7	* *
A ²	16.95	1	16.95	28.18	0.001 1	* *
B ²	0.17	1	0.17	0.29	0.608 0	
C ²	0.61	1	0.61	1.01	0.348 7	
残差	4.21	7	0.60			
失拟项	1.22	3	0.41	0.54	0.678 9	
纯误差	2.99	4	0.75			
总和	122.52	16				

[†] * * 为差异极显著($P<0.01$); * 为差异显著($0.01<P<0.05$); $R^2=0.965\ 6$; $R^2_{\text{adj}}=0.921\ 5$ 。

显著($P=0.678\ 9$)。回归模型负相关系数 $R^2=0.965\ 6$,说明超过 96.56%的试验数据能被预测,模型相关性较好;校正决定系数 $R^2_{\text{adj}}=0.921\ 5$,说明该模型能解释 92.15%的变化,拟合程度较好。因此可用该模型对枇杷醋醋基酒精发酵工艺进行分析和预测。比较各因素 F 值,可得出各因素对有机酸含量的影响顺序是:pH>接种量>温度。pH、pH 和接种量的交互项、温度的二次项对有机酸影响极显著($P<0.01$)。

2.5 枇杷醋酒精发酵最佳工艺优化及验证

响应面优化结果显示酒精含量的影响顺序是接种量=pH>温度,有机酸含量的影响顺序是 pH>接种量>温度;考虑较高的酒精含量是后续醋酸发酵制备枇杷醋的基础,有机酸含量主要受 pH 的影响,以及在单因素试验中已经综合考虑了有机酸组成。因此,最终以酒精含量为依据,采用 Design-expert 8.0.6 对枇杷醋酒精发酵工艺进行优化,得到优化条件:发酵温度 25.06 ℃,酵母接种量 0.05%,初始 pH 3.5,模型预测的酒精度为 8.61% Vol,总有机酸含量为 13.319 g/L。根据实际条件,将发酵温度设为 25 ℃,其他条件同优化结果,经 3 次平行验证实验,实际测得酒精度平均为 8.50% Vol,与预测值相对误差 1.28%,总有机酸含量平均为 12.228 g/L,与预测值相对误差 8.19%。说明该数学回归模型可靠,能很好地预测试验结果。

经与酶解后枇杷果汁有机酸组成进行比较分析,结果见表 16,枇杷果汁主要酸味特征成分是苹果酸,占总味觉强度的 73.0%,经酒精发酵后有机酸含量及组成发生了巨大变化,苹果酸占总味觉强度比为 33.1%,柠檬酸和草酸含量下降,合计味觉强度从枇杷果汁的 13.3 降至 4.6;乳酸、乙酸和琥珀酸均增加,合计味觉强度从枇杷果汁的 59.4 升至 377.0;酒石酸略有下降。这可能与有机酸在发酵过程中参与 TCA 循环、乙醛酸循环、苹果酸-乳酸、苹果酸-乙醇和苹果酸-琥珀酸等代谢反应有关^[22-23]。

表 16 枇杷醋醋基中有机酸形成及味觉强度[†]

Table 16 The content of organic acids and its taste intensity index with base wine of loquat vinegar

有机酸	枇杷果汁(酶解后)		枇杷醋醋基	
	含量/(g · L ⁻¹)	味觉强度	含量/(g · L ⁻¹)	味觉强度
苹果酸	8.181±0.037	303.0	5.460±0.119	202.2
乳酸	0.408±0.184	22.7	3.186±0.242	177.0
乙酸	0.312±0.049	26.0	1.774±0.075	147.9
琥珀酸	0.257±0.064	10.7	1.250±0.234	52.1
酒石酸	0.588±0.001	39.2	0.417±0.016	27.8
柠檬酸	0.201±0.010	10.6	0.075±0.011	4.0
草酸	0.310±0.009	2.7	0.065±0.004	0.6
合计	10.257±0.129	414.9	12.228±0.421	611.6

[†] 味觉强度=有机酸浓度/有机酸味觉阈值^[24-25]。

枇杷果汁和酒精发酵后的醋基苹果酸、乳酸、乙酸和琥珀酸合计占总酸比分别为 89.3%和 95.4%,味觉强度合计占比分别为 87.5%和 94.7%,是枇杷醋醋基的重要酸味成分。苹果酸味爽快稍苦,乳酸稍有涩感而尖利,醋酸带刺激性,琥珀酸味感既苦又咸并带一丝鲜味,可使滋味浓厚,加上柠檬酸等共同构成了枇杷醋醋基酸味特征,为后续醋酸发酵后的枇杷醋成品酸味感提供基础。

3 结论

枇杷醋酒精发酵优化工艺条件为:发酵温度 25 ℃、酵母接种量 0.05%、pH 3.5,在此条件下得到枇杷醋醋基酒精度 8.50% Vol,有机酸含量 12.228 g/L。经对枇杷果汁和枇杷醋醋基有机酸组成及含量变化进行比较显示,苹果酸是枇杷果汁主要的有机酸。枇杷醋醋基特征性有机酸为苹果酸、乳

酸、乙酸和琥珀酸,合计占总有机酸的 95.4%,构成枇杷醋醋酸酸味味觉强度的 94.7%,它们是后续醋酸发酵后构成枇杷醋果酸味的重要品质成分。

有关果醋酒精发酵工艺优化中的有机酸及菌种筛选方面未见相关报道,因此对于果醋的酒精发酵工艺有关菌种筛选条件、醋基风味品质与最终果醋风味形成等还需要更多的研究支持。

参考文献

- [1] 陈发兴,刘星辉,陈立松. 枇杷果肉有机酸组分及有机酸在果实内的分布[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(3): 236-243.
- [2] 严燕. 枇杷膏加工工艺及其抗氧化特性的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012: 38-47.
- [3] 陈贤爽,王锦涛,鲁周民,等. 枇杷果汁加工过程中产品品质的变化[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 79-84.
- [4] 麻成金,黄群,欧阳玉祝,等. 枇杷果醋及其饮料的研制[J]. 中国酿造, 2006(6): 71-74.
- [5] 李维新,魏巍,何志刚,等. 酿酒酵母 JP2 发酵枇杷汁的有机酸代谢及其产香特征分析[J]. 中国食品学报, 2016, 16(2): 251-257.
- [6] 袁敏,王巧碧,赵欠,等. 催陈方法对白肉枇杷果酒品质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 108-114.
- [7] 牛蕾,杨幼慧. 健康食品——果醋[J]. 中国酿造, 2004, 23(2): 9-11.
- [8] 马荣山,郭丹. 蜂蜜果醋发酵工艺研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(6): 54-55.
- [9] 张海涛,刘新利. 苹果醋饮研制及氨基酸分析[J]. 齐鲁工业大学学报, 2010, 24(1): 41-44.
- [10] 肖舒元. 寒富苹果食醋的酿造工艺研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 54-60.
- [11] 洪文艳. 发酵型葡萄果醋的产品试制及风味成分研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015: 59-60.
- [12] 李秋,陶文沂. 沙棘果醋的工艺研究及其成分分析[J]. 中国调味品, 2009, 34(1): 27-31.
- [13] ALONSO A M, CASTRO R, RODRIGUEZ M C, et al. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols[J]. Food Research International, 2004, 37(7): 715-721.
- [14] 包蓉. 柿果醋加工过程中香气品质和主要有机酸变化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012: 48-50.
- [15] 鲁周民,郑皓,刘月梅,等. 陈化温度对柿果醋香气成分的影响[J]. 农业工程学报, 2008(S1): 208-212.
- [16] 郭根和,潘葳,苏德森,等. 反相高效液相色谱法同时测定枇杷中的某些有机酸[J]. 福建农业学报, 2005, 20(3): 198-201.
- [17] 何志刚,李维新,林晓姿,等. 枇杷果实成熟和贮藏过程中有机酸的代谢[J]. 果树学报, 2005, 22(1): 23-26.
- [18] 侍崇娟,吕钰凤,杜晶,等. 杨梅酒发酵工艺及其风味变化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(6): 166-170.
- [19] KANDYLIS P, MANTZARI A, KOUTINAS A A, et al. Modelling of low temperature wine-making, using immobilized cells[J]. Food Chemistry, 2012, 133(4): 1 341-1 348.
- [20] WHING G C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages—a review[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1976, 82(2): 84-92.
- [21] 张泓. 苹果酒酵母营养与有机酸代谢的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006: 39-40.
- [22] VERSAR A, PARPINELLO G P, CATTANEO M. Leuconostoc oenos and malolactic fermentation in wine: a review[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 23(6): 447-455.
- [23] VOLSCHENK H, VUUREN H M V, VILJOENBLOOM M. Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification[J]. South African Journal for Enology & Viticulture, 2006, 27(27): 123-136.
- [24] 曹雁平. 食品调味技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 50.
- [25] AMERINE M A, PANGBORN R M, ROESSLER E B, et al. The Sense of Taste-Principles of Sensory Evaluation of Food-CHAPTER 2[J]. Theoretical & Mathematical Physics, 1991, 86(3): 252-257.
- (上接第 179 页)
- [13] DUAN Xiao-juan, ZHANG Wei-wei, LI Xiao-ming, et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions Obtained from a red alga, Polysiphonia urceolata[J]. Food Chemistry, 2006, 95(1): 37-43.
- [14] 冯艳萍,张全,王萃. 马拉氧磷和异马拉硫磷对乙酰胆碱酯酶联合抑制作用[J]. 浙江工业大学学报, 2011, 39(2): 131-135.
- [15] BASSAM Amro, TALAL Aburjai, SAMIR Al-Khalil. Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract[J]. Fitoterapia, 2002, 73(6): 456-461.
- [16] MAO Zhu-xin, MASAO Hattori, MOHSEN Daneshtalab, et al. Chlorogenic acid derivatives with alkyl chains of different lengths and orientations: potent α -glucosidase inhibitors[J]. J Med Chem, 2008, 51(19): 6 188-6 194.
- [17] 程知庆,沈和定,姚理想,等. 干燥方法对瘤背石磺多糖抗氧化性和还原力的影响[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 169-172.
- [18] 季涛,宿树兰,郭盛等. 基于 α -葡萄糖苷酶抑制活性评价桑叶多组分药效相互作用研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 1 999-2 006.
- [19] 邹宇晓,廖森泰,刘学铭,等. 桑叶资源治疗糖尿病研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 265-268.
- [20] PATEL S S. Cerebrovascular complications of diabetes: α -glucosidase inhibitor as potential therapy[J]. Horm Metab Res, 2015, 48(2): 83-91.
- [21] HAMADA Y, NAGASAKI H, FUCHIGAMI M, et al. The α -glucosidase inhibitor miglitrol affects bile acid metabolism and ameliorates obesity and insulin resistance in diabetic mice[J]. Metabolism, 2013, 62(5): 734-742.
- [22] KAZUHISA Yatsunami, MASATOSHI Ichida, SATOSHI Onodera. The relationship between 1-deoxynojirimycin content and α -glucosidase inhibitory activity in leaves of 276 mulberry cultivars (Morus spp.) in Kyoto, Japan[J]. Journal of Natural Medicines, 2008, 62(1): 63-66.