

申光辉,冯 孟,张志清,等. 生香酵母发酵桑葚低糖复合果酱工艺优化及风味、抗氧化活性变化分析[J].江苏农业学报,2018, 34(3):669-678.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.028

生香酵母发酵桑葚低糖复合果酱工艺优化及风味、抗氧化活性变化分析

申光辉, 冯 孟, 张志清, 陈安均, 黎杉珊, 刘兴艳

(四川农业大学食品学院,四川 雅安 625014)

摘要: 为改善低糖桑葚复合果酱风味,以异常威克汉姆酵母为发酵菌株,在单因素试验基础上,以模糊数学感官综合得分结合苯乙醇含量指标,采用正交试验优化复合果浆发酵条件,采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法结合 ROAV 法分析发酵果酱加工过程中挥发性风味成分变化,并比较发酵果酱与非发酵果酱基本指标、有机酸、抗氧化成分及体外抗氧化活性。结果表明:生香酵母发酵复合果浆最佳条件为:接种量 1×10^5 CFU/ml、发酵温度 28 ℃、发酵时间 20 h、蔗糖添加量 4%,所制备的发酵果酱糖度 36.02%,可溶性固形物 40.15%,pH3.32,感官综合评分 86.82,苯乙醇含量为 2.83 $\mu\text{g/g}$ 。挥发性物质分析结果表明,真空浓缩导致风味物质成分损失,通过生香酵母发酵使复合果浆原料增加了苯乙烯、芳樟醇、苯乙醇和辛酸乙酯等香气化合物,最终发酵果酱保留了萜品烯、苯乙醇和辛酸乙酯等 7 种酯类香气成分,赋予果酱更加浓郁的果香和花香气味。生香酵母发酵提高了乳酸、甲酸、乙酸含量,增加了酸度,口感较非发酵果酱更加醇厚协调,改善了复合果酱风味。生香酵母发酵对样品总酚、总黄酮和 V_c 等抗氧化成分含量及 DPPH·清除能力和总还原力均无显著影响,能够保留更多花青素,并提高了果酱·OH自由基清除率。

关键词: 桑葚果酱; 异常威克汉姆酵母; 苯乙醇; 风味成分; 有机酸; 抗氧化活性

中图分类号: TS255.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)03-0669-10

Optimization of fermentation conditions and analysis of volatile components and antioxidant activity of low-sugar complex mulberry jam fermented by *Wickerhamomyces anomalus* Z133

SHEN Guang-hui, FENG Meng, ZHANG Zhi-qing, CHEN An-jun, LI Shan-shan, LIU Xing-yan

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In order to improve the flavor quality of the low-sugar mulberry jam mixed with tomato and carrot, orthogonal experiments based on single-factor test combined with fuzzy mathematics sensory evaluation were applied to optimize the fermentation conditions of complex purple by aroma-producing yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* Z133. Headspace solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry (HP-SPME-GC-MS) and relative odor activity value (ROAV) method were used to detect and analyze the changes of volatile compounds of fermented jam at different processing stage. The basic quality, organic acid, antioxidant substances and antioxidant activity *in vitro* were also compared between fermented jam and unfermented jam. The results showed that the optimal fermentation conditions were inoculation amount 1×10^5 CFU/ml, fermentation temperature 28 ℃, fermentation time 20 h, sugar added with 4%. The sugar content in fermented jam product was 36.02%, total soluble solid 40.15%, pH3.32, sensory score 86.82, phenylethanol content 2.83 $\mu\text{g/g}$. Although

收稿日期:2017-10-09

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303073)

作者简介:申光辉(1985-),男,陕西渭南人,博士,讲师,主要从事农产品贮藏与加工研究。(Tel) 0835-2882281; (E-mail) shenghuishen@163.com

通讯作者:张志清, (E-mail) zqzhang721@163.com

sous vide process decreased the volatile flavor component, the fermentation by *W. anomalous* Z133 produced more aroma compounds for complex purple such as ethenyl benzene, linalool, phenylethanol, octanoic acid ethyl ester. Terpinene in mulberry, phenylethanol, octanoic acid ethyl ester and other seven esters compounds produced from fermentation were detected in jam. These aroma compounds newly produced by *W. anomalous* Z133 enriched the fruity and flower odour of jam. The contents of lactic acid, formic acid and acetic acid were increased after the fermentation, but there were no significant changes in the contents of total phenolics, total flavonoids and V_C , the DPPH · scavenging activity and total reducing power. In addition, the anthocyanin was better maintained and ·OH scavenging activity was enhanced in fermented jam.

Key words: mulberry jam; *Wickerhamomyces anomalous*; phenylethanol; volatile flavor components; organic acid; antioxidant activity

桑葚(*Fructus Mori*)是中国南北方广泛栽培的一种重要的小浆果,口感酸甜,富含多酚、黄酮、花青素、胡萝卜素等生物活性成分^[1],具有良好的抗氧化功能^[2],被誉为“第三代水果”。中国桑葚资源丰富,但因桑葚皮薄,含水含糖量高,成熟期较为集中,贮藏难度大,多以鲜食为主,精深加工利用技术相对滞后。果酱是桑葚等耐贮性差浆果的重要加工方式,对于增加产业链价值具有重要意义。目前国内桑葚果酱产品主要采用传统果酱加工方式,产品种类单一,风味淡薄,含糖量高($\geq 60\%$)^[3],缺乏产品风味特色。

生香酵母是一类能够产生酯类、醇类等多种挥发性香气化合物的酵母菌,广泛存在于白酒酒曲^[4]、馒头发酵剂^[5]、泡菜、酱料^[6]等传统发酵食品中。利用生香酵母发酵可增加香气成分种类与含量,是改善现代加工食品风味,提高产品品质的有效方式。除应用于酱油^[7]、食醋^[8]、馒头^[9]等传统发酵食品,生香酵母越来越多的以强化发酵或混合发酵方式用于面包^[10]、果汁果酒饮料^[11-12]等现代加工食品风味品质的改善。王益妹等^[10]利用异常威克汉姆酵母发酵面团提高了面包中异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异戊酯、苯乙醇、乙酸苯乙酯等风味物质的含量。目前国内外利用生香酵母发酵桑葚果酱的研究鲜见报道。异常威克汉姆酵母 Z133 是分离自酱香型白酒酒曲的 1 株产香酵母,能够代谢产生苯乙醇等香气物质^[13]。为改善传统桑葚果酱风味品质,本研究以桑葚为原材料,以富含 V_C 、矿物质等多种营养成分的番茄和胡萝卜为辅料,以生香酵母 Z133 为菌株,优化其发酵低糖桑葚复合果酱的工艺条件,采用顶空固相微萃取-气相色谱-串联质谱法(SPME-GC-MS)分析发酵工艺过程中挥发性成分的变化,并分析发酵对果酱基本理化指标、有机酸组成、抗氧化成分及其体外抗氧化活性的影响,为利用生香酵母加工发酵型桑葚果酱提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大十果桑采自四川省凉山州德昌县,番茄、胡萝卜购自本地农贸市场。

蔗糖购自本地超市,柠檬酸、黄原胶、低甲氧基果胶(LMP)、氯化钙(食品级)均购自河南千志商贸有限公司。

生香酵母:异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalous* Z133),分离自酱香酒曲^[13]。

1.2 主要试剂与仪器

苯乙醇(分析纯 $\geq 99.0\%$),上海瑞永生物科技有限公司产品;色谱甲醇,Oceanpak 公司产品。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、水杨酸、葡萄糖、抗坏血酸(V_C)、芦丁(芸香苷)等均为国产分析纯。

100 型胶体磨,郑州玉祥公司产品;WZS-1 型阿贝折光仪,上海光学仪器厂产品;pHS-320 型酸度计,成都世纪方舟公司产品;ZWY-2102C 型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器公司产品;LC-6A 型高效液相色谱仪(配 SPD-10A 紫外检测器),日本岛津公司产品;RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂产品;7890A-5975C 型气相色谱-质谱联用仪,美国 Agilent 公司产品;ICS-1100 型离子色谱仪(配 RFC-30 型淋洗液自动发生装置),美国 Thermo 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 发酵果酱制备工艺流程与要点 生香酵母活化→梯度驯化→原料打浆→复合果浆→杀菌→接种发酵→发酵果浆→调配浓缩→成品。

1.3.1.1 复合果浆制备 将符合原料要求的新鲜桑葚、番茄、胡萝卜分别蒸汽漂烫软化后打浆,其中桑葚漂烫 3 min 后打浆,番茄十字形切 4 块漂烫 4 min 后打浆,胡萝卜切 0.5 cm 厚片漂烫 8 min,按 0.5 ml/g 加水打浆。根据混料试验结果,将各原料果浆

按质量比桑葚:番茄:胡萝卜=73:10:17(质量比)混匀,100℃沸水浴杀菌20 min,冷却备用。

1.3.1.2 生香酵母菌梯度驯化培养 将活化酵母菌依次接种于复合果浆含量为25%、50%、75%和100%的驯化培养基,每梯度于28℃140 r/min振荡培养20 h,使菌株逐步适应复合果浆营养条件,活菌数大于 1.0×10^8 CFU/ml。

1.3.1.3 生香酵母菌发酵 将梯度驯化的发酵种子液接种于150 ml复合果浆中,添加蔗糖静置发酵。

1.3.1.4 果浆调配与酱体浓缩 向发酵后的150 ml果浆中添加28 g蔗糖,柠檬酸调整pH值至3.6,50℃真空预浓缩至100 ml左右(接近浓缩终点),再依次添加0.04 g氯化钙,0.5 g低甲氧基果胶和0.5 g黄原胶,浓缩至100 g即为果酱产品。

1.3.2 复合果浆发酵条件优化 采用单因素试验考察生香酵母菌接种量、发酵温度、发酵时间和蔗糖添加量4个因素对发酵果浆感官综合评分和苯乙醇含量的影响。其中接种量设 10^3 CFU/ml、 10^4 CFU/ml、 10^5 CFU/ml、 10^6 CFU/ml、 10^7 CFU/ml,发酵温度设24℃、26℃、28℃、30℃、32℃,发酵时间设12 h、16 h、20 h、24 h、28 h,蔗糖添加量设2%、4%、6%、8%、10%。各因素固定水平分别为接种量 10^5 CFU/ml,发酵温度28℃,发酵时间20 h,蔗糖添加量6%。

在单因素试验结果基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,以最终制备的果酱感官模糊数学综合评分为指标,同时结合果酱苯乙醇含量,对影响发酵的3个主

要因素(接种量、发酵时间、蔗糖添加量)进行优化,试验水平见表1。

表1 生香酵母发酵复合果浆 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平
Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment of fruit pulp in the process of fermentation

水平	接种量 (CFU/ml)	发酵时间 (h)	蔗糖添加量 (%)	误差项
1	10^4	16	4	1
2	10^5	20	6	2
3	10^6	24	8	3

1.3.3 果酱感官模糊数学综合评判 由经过专业学习培训的10名食品专业研究生组成感官评定小组,采用3级标度法,选择香气、色泽、口感、组织状态、涂抹性5个评定指标对生香酵母发酵后的发酵果浆进行感官评定(表2)。分别计算不同等级得票率,构建模糊评判矩阵A。采用模糊合成算子中的 $M(\cdot,+)$ 建立模糊综合评价模型^[14],对发酵果浆感官品质进行综合评判,因素集 $U=\{\text{香气 } u_1, \text{色泽 } u_2, \text{口感 } u_3, \text{组织状态 } u_4, \text{涂抹性 } u_5\}$ 、评价集 $V=\{\text{I级 } v_1, \text{II级 } v_2, \text{III级 } v_3\}$ 、权重集 $K=\{0.30 k_1, 0.15 k_2, 0.30 k_3, 0.15 k_4, 0.10 k_5\}$ 。模糊关系综合评判集 $R=K\times A$,K为权重集,A为模糊评判矩阵,即样品不同评定指标的不同质量等级得票率。进一步采用改进算法计算综合分数 $H=\sum_{j=1}^n jR_j$ ^[15]。评分方法:I级赋90分,II级赋75分,III级赋60分。

表2 生香酵母发酵果酱感官评定等级标准

Table 2 Sensory evaluation criteria of fruit jam fermented by aroma-producing yeast

指标	I级 优秀 (90分)	II级 一般 (75分)	III级 较差 (60分)
香气	具有明显桑葚果香味和协调的发酵香味	桑葚果香较淡,同时具有较淡的发酵香味	无桑葚果香,有异味
色泽	自然明亮,光泽度好,呈深紫色或紫色	色泽较明亮,光泽度较差,淡紫色或紫红色	色泽灰暗,光泽度差
口感	酸甜适中,果味浓郁	略偏酸或偏甜,果味较淡	酸甜比例不协调有异味
组织状态	凝胶良好,无流散,无分层析水现象	基本形成凝胶,流散轻微,分层析水较少	凝胶状态差,流散缓慢,分层析水明显
涂抹性	易涂抹,涂层均匀光滑	较易涂抹,涂层均匀但不光滑	涂抹性差,涂层不均匀,不连贯

1.3.4 发酵果酱苯乙醇含量测定 采用反相高效液相色谱法^[16]。取2.00 g果酱样品加水稀释定容至50 ml,8 000 r/min离心10 min,上清液用0.45 μm微孔滤膜过滤。Phenomenex Luna-C18(2)色谱柱(4.6 mm×150.0 mm,5 μm),流动相比比例甲醇:水(体积比)=50:50,柱温30℃,检测波长215 nm,进样量

10 μl,流速1.0 ml/min。峰面积外标法进行定量。
1.3.5 发酵果酱制备过程中挥发性成分分析 采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定原料果浆、发酵果浆、发酵果酱和非发酵果酱样品的挥发性成分^[17]。顶空固相微萃取条件:取5.00 g果酱于15 ml采样瓶中,按质量浓度0.1 g/ml加入NaCl,超

声 10 min, 插入装有固相微萃取头 (50/30 μm DVB/CAR/PDMS) 的手动进样器, 60 $^{\circ}\text{C}$ 萃取 30 min, 快速移出并插入进样口, 250 $^{\circ}\text{C}$ 热解析 3 min, 不分流进样。色谱条件: HP-5MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) 色谱柱, 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 高纯 He 流量 1 ml/min。升温程序: 初始温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 190 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。质谱条件: EI 电离源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 质量扫描范围 33~550 amu, 接口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。对采集到的质谱图利用 NIST 11.L 谱图库进行检索, 根据匹配度来确定未知化合物, 当 $SI>80\%$ 时定性, 并结合保留指数法予以确认, 剔除萃取头及色谱柱流失成分, 采用峰面积归一化法计算各成分相对百分含量。

通过计算相对气味活度 ($ROAV$) 比较不同果酱样品的挥发性风味成分对果酱风味贡献的大小。所有组分 $0\leq ROAV\leq 100$, $ROAV$ 越大的组分对样品总体风味的贡献就越大, 其中 $ROAV\geq 1$ 的组分对样品总体风味起特征性决定作用, 视为关键风味化合物, 而 $0.1\leq ROAV<1.0$ 的组分对样品总体风味具有重要的修饰作用, 认为其对风味具有重要贡献^[18]。

1.3.6 有机酸含量测定 采用离子色谱法^[19], 按峰面积外标法定量。IonPac AS18 (4 mm \times 250 mm) 阴离子交换分析柱, AG18 保护柱 (4 mm \times 50 mm); KOH 梯度洗脱条件: 0~13 min 2 mmol/L, 13~30 min 2~45 mmol/L, 30~45 min 45 mmol/L, 45~50 min 45~2 mmol/L; 流速 1.0 ml/min; 进样体积 25 μl , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 色谱池温度 35 $^{\circ}\text{C}$, 抑制电流 112.5 mA。样品用超纯水稀释 100 倍, 依次过 SPE-RP 柱和 SPE-Ag 柱, 弃初始 3 ml 后经 0.22 μm 滤膜过滤, 上机分析。

1.3.7 果酱基本指标测定 可溶性固形物采用阿贝折光仪测定, 以 20 $^{\circ}\text{C}$ 样品折光率计; 总糖采用硫酸-蒽酮比色法^[20]测定; 总酸测定参照 GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》^[21]; pH 值采用酸度计测定。

1.3.8 抗氧化成分含量及体外抗氧化活性测定 总黄酮含量采用 $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3$ 比色法^[22]测定, 总酚含量采用 Folin-Ciocalteu 法^[23]测定, V_C 含量采用 2, 6-二氯酚酚滴定法^[20]测定, 花青素含量采用 pH 示差法^[24]测定。

DPPH·清除能力的测定参考 Sharma 等^[25]的方法, $\cdot\text{OH}$ 清除能力测定参考晁正等^[26]的方法, 总还原力采用铁离子还原能力^[27]测定。

2 结果与分析

2.1 复合果浆发酵单因素试验结果

生香酵母发酵能够赋予发酵原料特殊香气, 改善产品风味^[13]。异常威克汉姆酵母 Z133 具有产生多种醇、酯类香气成分的能力, 特别是玫瑰花香气的苯乙醇。本试验考察生香酵母接种量、发酵温度、发酵时间和蔗糖添加量 4 个单因素对果酱感官品质和苯乙醇含量的影响。

2.1.1 接种量 由图 1 可见, 不同接种量对生香酵母发酵果酱感官综合评分和苯乙醇含量具有明显影响。接种量过低, 发酵产香效应尚未表现出来, 感官综合评分较低, 当接种量过高, 发酵速度快, 特别是当接种量超过 1×10^5 CFU/ml, 发酵产生较浓厚的花香气味和酸味, 掩盖柔美的果香气味, 导致感官综合评价明显降低, 接种量 1×10^5 CFU/ml 时, 感官品质最好。生香酵母发酵产生玫瑰花香味的苯乙醇含量随着接种量增加而不断提高。

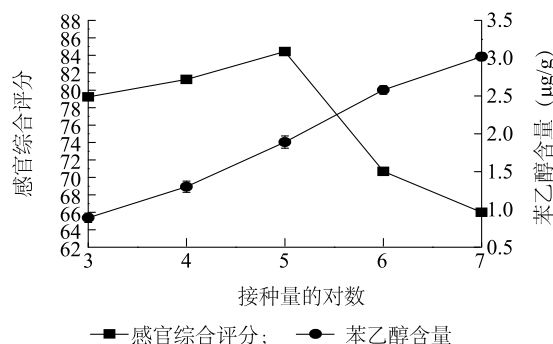


图 1 接种量对发酵果酱感官综合评分与苯乙醇含量的影响

Fig.1 Effects of inoculation amount on sensory scores and phenylethanol content of fermented jam

2.1.2 发酵温度 由图 2 可以看出, 发酵温度对果酱感官综合评分具有一定的影响, 但对苯乙醇含量影响并不显著。发酵温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 时, 感官综合评分最高, 为 85 分, 而发酵温度过低, 香气成分产生速度较慢, 发酵温度过高, 利于酒精发酵, 均导致感官综合评分降低。

2.1.3 发酵时间 发酵时间对生香酵母代谢产生各类风味物质具有重要影响。由图 3 可见, 发酵时间对果酱感官风味和苯乙醇均有明显影响。当发酵时间为 20 h 时, 复合果酱感官综合评分最高为 88.3 分, 随着发酵时间的延长, 产生更多的乙醇, 掩盖了原料本身的风味, 感官综合评分急剧降低。苯乙醇含量随着发酵时间延长不断升高。

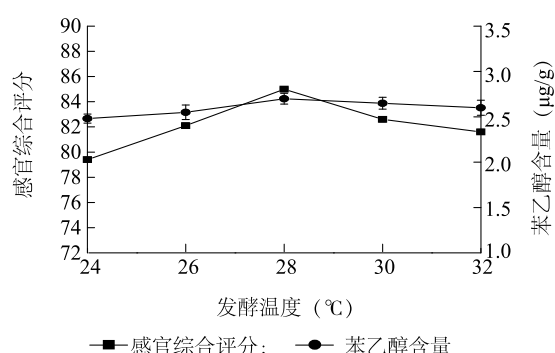


图2 发酵温度对发酵果酱感官综合评分与苯乙醇含量的影响
Fig.2 Effects of fermentation temperature on sensory scores and phenylethanol content of fermented jam

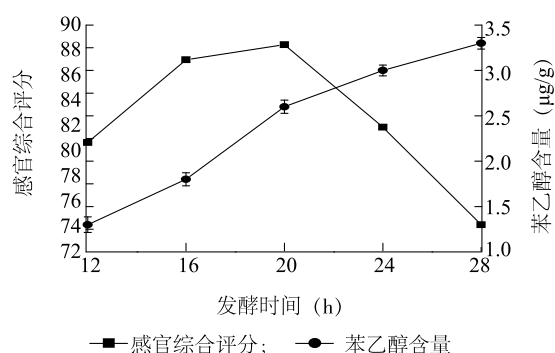


图3 发酵时间对发酵果酱感官综合评分与苯乙醇含量的影响
Fig.3 Effects of fermentation time on sensory scores and phenylethanol content of fermented jam

2.1.4 蔗糖添加量 添加外源蔗糖作为生香酵母碳源,可促进酵母生长代谢。由图4可见,添加6%蔗糖进行发酵所得果酱感官综合评分最高,蔗糖添加过量,导致生香酵母发酵过度,掩盖果浆原来的风味。但苯乙醇含量随着蔗糖添加量增加不断提高,表明蔗糖利于苯乙醇的积累。

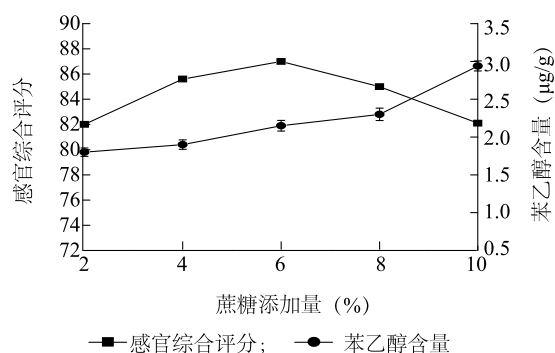


图4 蔗糖添加量对发酵果酱感官综合评分与苯乙醇含量的影响
Fig.4 Effects of the amount of sugar on sensory scores and phenylethanol content of fermented jam

2.2 复合果浆发酵正交试验结果

在单因素试验结果基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,以不同发酵条件制备的果酱感官综合评分 (Y_1) 及苯乙醇含量 (Y_2) 为指标,选取对感官综合评分和苯乙醇含量具有显著影响的接种量、发酵时间、蔗糖添加量,确定最佳发酵条件。由表3极差分析结果可知,各影响因素对发酵果酱感官综合评分及苯乙醇含量的影响主次顺序均为:接种量>发酵时间>蔗糖添加量。由表4结果可知,发酵时间和接种量对果酱感官综合评分及苯乙醇含量的影响均达到显著水平 ($P<0.05$),而蔗糖添加量对其影响均不显著 ($P>0.05$);由表3可知,正交试验结果显示,以果酱感官综合评分为指标的最佳工艺条件为试验组5:接种量 1×10^5 CFU/ml、发酵时间 20 h、蔗糖添加量 8%,感官综合评分为 86.50。苯乙醇含量最高为试验组9:接种量 1×10^6 CFU/ml、发酵时间 24 h、蔗糖添加量 6%,苯乙醇含量为 $3.05 \mu\text{g/g}$ 。果酱风味是多种挥发性化合物的综合体现,因此,苯乙醇含量仅可作为发酵工艺优化的参考指标。基于原料成本角度结合感官综合评分结果,确定复合果浆的最佳发酵条件为接种量 1×10^5 CFU/ml、发酵时间 20 h、蔗糖添加量 4%。在此条件下进行验证试验,所得发酵果酱感官综合评分为 86.82,苯乙醇含量为 $2.83 \mu\text{g/g}$,均接近于试验组最佳组合发酵果酱样品值。

2.3 发酵果浆加工过程中挥发性物质变化分析

果酱风味与其中的烯类、醇类、醛类、酸类、芳香族化合物密切相关。果酱热加工过程中部分小分子香气成分会逸散或降解损失而导致风味变化^[28]。本试验通过 HP-SPME-GC-MS 方法对原料复合果浆、发酵果浆、发酵果酱及非发酵工艺制备的果酱各类挥发性物质种类和相对含量进行检测分析。由表5可见,复合果浆原料中检测出 15 种挥发性成分,以烯类和酯类为主,其中烯类 6 种,酯类 8 种,醛类 1 种,醇酮类等成分未检出,原料中烯类以角鲨烯 (3.559%)、柠檬烯 (0.822%)、 γ -萜品烯 (0.399%) 的相对含量较高,酯类以反式油酸甲酯 (37.674%)、硬脂酸甲酯 (4.862%) 和花生酸甲酯 (3.640%) 等脂肪酸酯类化合物相对含量较高。复合果浆检出挥发性物质种类较少,可能与原料漂烫、打浆处理过程中热处理破坏损失有关。

表 3 复合果浆生香酵母发酵 $L_9(3^4)$ 正交试验结果表

Table 3 Orthogonal experiment design and results of fruit pulp fermentation by yeast

试验号	接种量 (CFU/ml)	发酵时间 (h)	蔗糖添加量 (%)	误差项	感官综合评分	苯乙醇含量 ($\mu\text{g/g}$)
1	10^4	16	4	1	70.63	1.52
2	10^4	20	6	2	80.13	1.94
3	10^4	24	8	3	71.65	2.48
4	10^5	16	6	3	80.93	1.78
5	10^5	20	8	1	86.50	2.84
6	10^5	24	4	2	80.13	2.98
7	10^6	16	8	2	73.50	2.72
8	10^6	20	4	3	83.18	2.89
9	10^6	24	6	1	74.65	3.05
K_{11}	74.14	75.02	77.98	77.98		
K_{12}	82.52	83.27	78.57	77.92		
K_{13}	77.11	75.48	77.22	78.59		
R_{1j}	8.38	8.25	1.35	0.67		
K_{21}	1.98	2.01	2.46	2.46		
K_{22}	2.53	2.56	2.26	2.55		
K_{23}	2.89	2.84	2.68	2.38		
R_{2j}	0.91	0.83	0.42	0.16		

R_{1j} 、 R_{2j} 分别表示感官综合评分、苯乙醇含量的极差值。

表 4 正交试验方差分析结果

Table 4 Analysis of variance of orthogonal experiment results

变异来源	感官综合评分				苯乙醇含量			
	平方和	均方	F 值	P 值	平方和	均方	F 值	P 值
接种量	108.389	54.195	41.06	0.024	1.253	0.627	31.27	0.031
发酵时间	129.007	64.504	48.86	0.020	1.070	0.535	26.70	0.036
蔗糖添加量	2.762	1.381	1.05	0.489	0.269	0.134	6.71	0.130
误差	2.640	1.320			0.040	0.020		

复合果浆经过生香酵母发酵转化,挥发性物质种类和含量产生了明显变化,通过生香酵母发酵新增加了具有果香味的苯乙烯、芳樟醇 2 种烯类化合物和具有玫瑰花香的苯乙醇,此外还生成了细辛脂素;同时通过生香酵母代谢利用,使复合果浆中的 α -蒎烯、柠檬烯、 α -石竹烯和 γ -萜品烯相对含量降低。此外,生香酵母发酵新生成了辛酸乙酯等 9 种酯类化合物,而原料中有 3 种酯类化合物可能通过酶反应被代谢,而在发酵果浆中未被检出。

浓缩工艺是制备果酱的关键环节,真空浓缩可有效降低浓缩物料温度,避免高温对果蔬类产品挥发性成分及营养成分的破坏。由表 5 可见,采用生香酵母发酵果浆浓缩而成的果酱与非发酵果酱产品挥发性成分种类组成差异明显。浓缩导

致发酵果酱和非发酵果酱中烯类物质种类数均明显减少,采用真空浓缩在提高果蔬汁固形物含量的同时,仍无法避免果蔬汁风味物质种类及含量的变化^[29-30]。浓缩对 2 种不同工艺果酱酯类化合物种类影响不同,其中发酵果酱浓缩后 3 种原有酯类物质被破坏,同时新生成了 6 种酯类化合物,总体增加了 3 种,而非发酵果酱中原有 4 种酯类化合物未被检出,同时新增了 2 种,总体上减少了 2 种。发酵果酱浓缩反应能够新生成更多的酯类化合物,可能与生香酵母发酵提供更多的酯类前体物质有关。除苯乙醇和棕榈酸外,发酵果酱较非发酵果酱多 11 种酯类化合物。因此,生香酵母发酵可赋予桑葚复合果浆更多的醇、酯类香气成分,对产品风味起到一定改善作用。

表5 生香酵母发酵低糖桑葚复合果酱加工过程挥发性成分变化

Table 5 Volatile components and relative percentage in fermented jam by aroma-producing yeast at different processing period

种类	保留时间 (min)	化合物名称	CAS 号	化学式	相对含量 (%)			
					复合果浆	发酵果浆	发酵果酱	非发酵果酱
烯类	9.598	苯乙烯	100-42-5	C ₈ H ₈	—	0.809	—	—
	11.045	α-蒎烯	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆	0.223	0.042	—	—
	12.526	β-侧柏烯	28634-89-1	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	0.662
	13.217	左旋-β-蒎烯	18172-67-3	C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	0.845
	14.439	柠檬烯	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	0.822	0.227	1.478	3.163
	15.460	γ-蒎品烯	99-85-4	C ₁₀ H ₁₆	0.399	0.107	0.091	—
	16.417	2-蒎烯	554-61-0	C ₁₀ H ₁₆	0.082	—	—	—
	16.913	芳樟醇	78-70-6	C ₁₀ H ₁₈ O	—	0.193	—	—
	28.985	α-石竹烯	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄	0.065	0.036	—	—
	44.906	角鲨烯	111-02-4	C ₃₀ H ₅₀	3.559	—	—	—
酯类	19.805	辛酸乙酯	106-32-1	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	—	0.108	0.136	—
	26.364	9-氧代壬酸甲酯	1931-63-1	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	—	0.613	—	—
	30.850	8-(2-呋喃基)-辛酸甲酯	38199-50-7	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	—	0.145	0.247	—
	33.040	肉豆蔻酸甲酯	124-10-7	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	—	0.112	0.029	—
	37.019	(Z)-十六烯酸甲酯	1120-25-8	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ SNa	—	0.113	0.096	—
	37.550	14-甲基十五烷酸甲酯	5129-60-2	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	—	—	5.974	6.566
	37.556	棕榈酸甲酯	112-39-0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	8.600	9.049	4.003	6.005
	39.097	5-Hexyltetrahydrofuran-2-octanoic acid methyl ester	34724-76-0	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	—	0.035	—	—
	39.516	十七酸甲酯	1731-92-6	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	0.083	0.067	0.244	—
	39.522	14-甲基十六烷酸甲酯	2490-49-5	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	—	—	0.190	0.081
	40.602	9-顺,11-反-共轭亚油酸甲酯	13058-52-1	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	—	—	3.1983	—
	40.614	亚油酸甲酯	112-63-0	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	—	11.815	7.236	—
	40.685	反式油酸甲酯	2462-84-2	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	37.674	13.410	18.688	20.530
	41.045	硬脂酸甲酯	112-61-8	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	4.862	2.829	3.640	3.064
	41.311	10-反,12-顺-十八碳二烯酸甲酯	21870-97-3	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.851	—	1.251	—
	41.417	8-(5-己基-2-呋喃基)-辛酸甲酯	10038-16-1	C ₁₉ H ₃₂ O ₃	—	—	1.792	—
	41.872	6,9-十八碳二烯酸甲酯	56599-55-4	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.572	—	—	—
	42.928	顺-9,10-环氧硬脂酸甲酯	2566-91-8	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	—	1.661	—	—
	43.147	11-二十碳烯酸甲酯	3946-08-5	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	1.499	—	—	—
	43.424	18-甲基十九碳烯酸甲酯	65301-91-9	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	—	—	2.108	—
	43.430	花生酸甲酯	1120-28-1	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	3.640	2.007	3.717	1.995
	46.069	山嵛酸甲酯	929-77-1	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	—	1.180	1.440	—
醇类	17.497	苯乙醇	60-12-8	C ₈ H ₁₀ O	—	1.457	0.500	—
醛类	16.977	壬醛	124-19-6	C ₉ H ₁₈ O	0.401	0.202	0.140	0.293
酸类	38.601	棕榈酸	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	—	—	0.762	—
其他	8.855	邻二甲苯	95-47-6	C ₈ H ₁₀	—	—	—	2.811
	9.699	间二甲苯	108-38-3	C ₈ H ₁₀	—	—	0.625	1.293
	41.966	细辛脂素	133-03-9	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	—	13.252	—	—

“—”表示未检测出。

食品特征风味不仅受挥发性风味成分相对含量影响,同时与关键风味物质感觉阈值有关。由表 6 可知,4 种不同样品的关键风味物质的种类、数量差异较大。其中柠檬烯和壬醛阈值较低(分别为 0.210 0 mg/kg 和 0.015 0 mg/kg),是原料果浆及 2 种果酱成品的关键特征性风味物质。复合果浆中壬醛、柠檬烯、 α -石竹烯 *ROAV* 均大于 1,是原料中的关键特征性风味化合物。复合果浆经生香酵母发酵后的发酵果浆重要风味物质种类数大大增加,其中芳

樟醇对总体风味贡献最大(*ROAV* = 100),此外发酵产生的苯乙烯 *ROAV* 为 13.27,表明发酵产生甜香气味的苯乙烯对原料风味特征具有重要影响。经过浓缩后的 2 种果酱样品中重要风味物质种类数均有所减少,特别是生香酵母发酵产生的苯乙烯、芳樟醇并未得到较好的保留,但发酵果酱中的 γ -萜品烯、辛酸乙酯和苯乙醇对果酱风味产生了重要修饰作用(*ROAV* 均大于 0.1),表明生香酵母发酵能够有效改善桑葚复合果酱的风味。

表 6 不同样品关键风味物质气味阈值、气味特征及 *ROAV*

Table 6 Sensory threshold, odor description and relative odor activity value (*ROAV*) of key aroma compounds in fermented and unfermented jam

化合物	气味特征描述	感觉阈值 ^[31] (mg/kg)	相对气味活度值			
			复合果浆	发酵果浆	发酵果酱	非发酵果酱
苯乙烯	特殊香味、甜香	0.120 0	—	13.27	—	—
α -蒎烯	果香味	1.010 0	0.83	0.08	—	—
柠檬烯	水果香	0.210 0	14.64	2.13	75.41	77.11
γ -萜品烯	果香	2.140 0	0.70	0.10	0.46	—
芳樟醇	玉兰花香、玫瑰花香	0.003 8	—	100.00	—	—
α -石竹烯	木香、柑橘香、丁香	0.160 0	1.52	0.44	—	—
辛酸乙酯	花香、果香、甜味	5.000 0	—	0.04	0.29	—
棕榈酸甲酯		4 000.000 0	0.01	0.00	0.01	0.01
9-顺,11-反-共轭亚油酸甲酯		8 800.000 0	—	—	<0.001	—
反式油酸甲酯		3 400.000 0	0.04	0.01	0.06	0.03
苯乙醇	玫瑰香、紫罗兰香	41.400 0	—	0.07	0.13	—
壬醛	蜡香、甜桔香、脂肪香	0.015 0	100.00	26.51	100.00	100.00

“—”表示未检测出。

2.4 发酵果酱与非发酵果酱品质比较

为比较生香酵母发酵制备的复合果酱与非发酵果酱的相关品质及抗氧化能力的差异,试验以未经发酵直接以相同工艺条件调配浓缩制备的非发酵果酱为对照,分析相关指标的异同。

由表 7 可知,生香酵母发酵工艺制备的果酱和非发酵果酱基本指标差异显著。生香酵母发酵将糖类物质转化成有机酸,而使发酵果酱糖度和可溶性固形物含量显著低于非发酵果酱($P < 0.05$),酸度显著高于非发酵果酱($P < 0.05$)。发酵果酱乳酸、乙酸、甲酸和草酸含量均显著高于非发酵果酱,而琥珀酸含量显著低于非发酵果酱($P < 0.05$)。柠檬酸主要通过预浓缩阶段添加,生香酵母发酵的果浆酸度更高,因此用于调整 pH 的柠檬酸添加量略少,而导

致最终发酵果酱中柠檬酸含量较低。不同有机酸具有不同的风味特征,乳酸可增强浓厚感,苹果酸酸味圆润,呈味缓慢持久,乙酸和草酸酸味强度高,感官刺激性强,而琥珀酸呈辣味^[32]。因此经过生香酵母发酵改变果酱有机酸含量,使其口感更醇厚协调。

酚类、黄酮和花青素是桑葚、胡萝卜等原料重要的抗氧化活性成分。酵母发酵对原料抗氧化成分及其活性具有重要影响^[33-34]。由表 7 可知,与非发酵果酱相比,发酵果酱中总黄酮和总酚无显著性变化($P > 0.05$), V_c 含量略有降低,但差异并不显著($P > 0.05$),而花青素含量显著高于非发酵果酱($P < 0.05$)。体外抗氧化活性结果表明,发酵果酱 DPPH·清除率和总还原能力与非发酵果酱无显著性差异($P > 0.05$),但发酵果酱·OH清除率显著高

于非发酵果酱($P<0.05$)。因此,生香酵母发酵可一定程度上提升果酱抗氧化功能。

表7 发酵与非发酵果酱基本指标、有机酸、抗氧化成分及体外抗氧化活性差异

Table 7 Comparison of physical-chemical properties, organic acids, antioxidant substance and *in vitro* antioxidant activity of aroma-producing yeast fermented and non-fermented mulberry jam

指标	发酵果酱	未发酵果酱
糖度(%)	36.02±1.03b	40.50±2.38a
可溶性固形物(%)	40.15±0.63b	43.23±0.8 a
酸度(g/kg)	2.63±0.04a	2.38±0.03b
pH 值	3.32±0.12b	3.63±0.16a
乳酸(mg/g)	0.606±0.020a	0.083±0.002b
乙酸(mg/g)	0.135±0.034a	0.014±0.001b
甲酸(mg/g)	0.175±0.047a	0.029±0.002b
琥珀酸(mg/g)	1.954±0.103b	3.165±0.018a
苹果酸(mg/g)	0.730±0.046a	0.704±0.008a
草酸(mg/g)	0.203±0.004a	0.088±0.003b
柠檬酸(mg/g)	11.326±0.344b	13.109±0.312a
总黄酮(mg/g)	6.83±0.48a	7.11±0.43a
总酚(mg/g)	6.75±0.09a	6.61±0.22a
花青素(mg/g)	2.573 2±0.015 6a	2.515 1±0.020 9b
V _C (mg/g)	0.088 0±0.010 5a	0.104 3±0.012 0a
DPPH·清除率(%)	78.08±2.78a	79.86±2.00a
·OH清除率(%)	65.72±1.13a	59.24±0.96b
总还原力(A ₇₀₀)	0.281±0.020a	0.303±0.011a

同一行数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 结论

本研究利用异常威克汉姆酵母 Z133 发酵,真空浓缩制备发酵型桑葚低糖复合果酱。通过优化试验获得了酵母发酵桑葚复合果浆的最佳条件:接种量 1×10^5 CFU/ml、发酵时间 20 h、蔗糖添加量 4%。所制备果酱糖度 36.02%,可溶性固形物 40.15%,pH3.32,风味协调,醇酯香味浓郁,感官综合评分 86.82,苯乙醇含量为 2.83 $\mu\text{g/g}$ 。检测结果表明,通过生香酵母发酵可使复合果浆原料新增苯乙炔、芳樟醇、苯乙醇和辛酸乙酯等 7 种酯类香气物质,最终发酵果酱中较非发酵果酱增加了 γ 萜品烯、辛酸乙酯和苯乙醇,提高了乳酸、乙酸、甲酸和草酸含量,改

善了桑葚复合果酱的风味品质,同时保留了更多花青素,提高了·OH清除能力。

参考文献:

- [1] KOCA I, USTUN N S, KOCA A F, et al. Chemical composition, antioxidant activity and anthocyanin profiles of purple mulberry (*Morus rubra*) fruits[J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2008, 6(2): 39-42.
- [2] WU X Y, LIANG L H, ZOU Y, et al. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 443-453.
- [3] 邹宇晓,吴娉明,施英,等.低糖桑椹红枣营养果酱的研制[J].现代食品科技,2008,24(11):1130-1132.
- [4] 罗小叶,邱树毅,陆安谋,等.酱香大曲产香酵母的分离及鉴定[J].食品与发酵工业,2016,42(12):26-31.
- [5] LI Z, LI H, BIAN K. Microbiological characterization of traditional dough fermentation starter (Jiaozi) for steamed bread making by culture-dependent and culture-independent methods.[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 234:9-14.
- [6] 王刚,邢家溧,印伯星,等.泡菜、豆酱中产香酵母菌的筛选及其在面包制作中的应用[J].食品科学,2014,35(23):155-160.
- [7] 李学伟,陈强,朱新贵.添加生香酵母改善酱油风味研究[J].中国酿造,2014,33(3):121-124.
- [8] 李玉斌,邓静,吴华昌,等.3株功能菌在四川保宁醋强化发酵中的应用[J].食品科学,2017,38(12):75-82.
- [9] ZHANG G, WU T, SADIQ F A, et al. A study revealing the key aroma compounds of steamed bread made by Chinese traditional sourdough[J]. Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol), 2016, 17(10): 787-797.
- [10] 王益妹,钱超,黄卫宁,等.梅兰春酒醅中生香酵母的分离鉴定及其发酵面包香气成分分析[J].食品与发酵工业,2016,42(9):45-51.
- [11] 叶荫祺,袁亚宏,岳田利,等.产香酵母分离鉴定与苹果酒发酵中的应用[J].农业机械学报,2013,44(12):187-192.
- [12] BLASZCZYK U, SROKA P, SATORA P, et al. Effect of *Wickerhamomyces anomalus* and *Pichia membranifaciens* killer toxins on fermentation and chemical composition of apple wines produced from high-sugar juices[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2017, 56(2): 189-199.
- [13] 申光辉,黎梅,王玥,等.发酵低醇西瓜果酒产香酵母的分离筛选及香气成分分析[J].食品与发酵工业,2016,42(8):103-108.
- [14] 刘春风,郑飞云,李永仙,等.啤酒口感品评的模糊综合评价法[J].食品科学,2008,29(4):138-142.
- [15] 熊德国,鲜学福.模糊综合评价方法的改进[J].重庆大学学报(自然科学版),2003,26(6):93-95.
- [16] 王成涛,梁婧如,尹胜,等.溶氧量对酿酒酵母及其工程菌的

- β -苯乙醇合成代谢的影响及调控效应[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 78-86.
- [17] BUTKHUP L, JEENPHAKDEE M, JORJONG S, et al. HS-SPME-GCMS analysis of volatile aromatic compounds in alcohol related beverages made with mulberry fruits[J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(4): 1021-1032.
- [18] 刘登勇,周光宏,徐幸莲. 确定食品关键风味化合物的一种新方法:“ROAV”法[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 370-374.
- [19] 成 霏,刘 佳,顾慧莹,等. 离子色谱法测定果酒中的有机酸[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(8): 175-177.
- [20] 曹建康,姜微波. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2007: 57-59.
- [21] 国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会. 食品中总酸的测定 GB/T 12456-2008[S]. 北京:中国标准出版社, 2008: 1-2.
- [22] 金 波,蔡茜彤,冯叙桥,等. 桑葚、蓝莓、黑加仑中多酚类物质的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(2): 157-162.
- [23] BASTOLA K P, GURAGAIN Y N, BHADRIRAJU V, et al. Evaluation of standards and interfering compounds in the determination of phenolics by folin-ciocalteu assay method for effective bioprocessing of biomass[J]. American Journal of Analytical Chemistry, 2017, 8(6): 416-431.
- [24] 林耀盛,刘学铭,杨荣玲,等. 桑椹片中多酚及花青素含量的测定[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 890-893.
- [25] SHARMA V, VIJAY K H, JAGAN M R L. Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea[J]. Food Research International, 2008, 41(2): 124-129.
- [26] 晁 正,冉玉梅,杨 霞,等. 麦麸中低聚木糖的制备及抗氧化活性研究[J]. 核农学报, 2014, 28(4): 655-661.
- [27] GARZÓN G A, NARVÁEZ-CUENCA C E, KOPEC R E, et al. Determination of carotenoids, total phenolic content, and antioxidant activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian fruit.[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18): 4709-4717.
- [28] 鲍 杰,李莹灿,刘雅冉,等. 笃斯越橘果酱特征香气成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(6): 255-262.
- [29] 余 炼,滕建文. 真空浓缩对芒果汁香气成分影响的分析[J]. 现代食品科技, 2010, 26(9): 1020-1022.
- [30] 陈学红,马利华,宋 慧,等. 真空浓缩对绿芦笋汁营养品质和风味的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 205-209.
- [31] 里奥·范海默特. 化合物香味阈值汇编[M]. 北京:科学出版社, 2015.
- [32] 汪建国,冯德明. 嘉兴玫瑰米醋中有机酸风味特征的分析探讨[J]. 江苏调味副食品, 2011, 28(1): 27-29.
- [33] 王 行,张海宁,马永昆,等. 蓝莓酒发酵过程中酚类物质动态变化及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(1): 90-95.
- [34] 赵红宇,陈敦洪,邓 良,等. 桑葚果酒全渣发酵过程中生物活性物质及其抗氧化活性变化的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(23): 182-185, 189.

(责任编辑:陈海霞)