

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.04.008

胡陆军, 陈晓蝶, 林曼, 等. 混菌发酵对菠萝苹果复合果酒品质改善的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(4): 70-81.

混菌发酵对菠萝苹果复合果酒品质改善的研究

胡陆军^{1,2}, 陈晓蝶^{1,2}, 林曼¹,
林锐¹, 徐腾^{1,2}, 赵志峰^{1,3}

1. 四川轻化工大学 生物工程学院, 四川 宜宾 644005;

2. 四川轻化工大学 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644005;

3. 四川大学 轻工科学与工程学院, 成都 610065

摘要: 研究表明发酵菌种是影响果酒品质的关键因素, 基于不同菌种的互补作用的混菌发酵方式是改善果酒品质的重要途径。本研究利用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)和植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)分别进行菠萝苹果复合果酒的单菌与混菌发酵, 并对发酵过程中的理化指标和抗氧化性进行分析, 同时对发酵产生的风味物质进行分析比较。相比于单菌发酵, 酿酒酵母、库德里阿兹威毕赤酵母与植物乳植杆菌混菌发酵(SKP 组)糖利用率最高, 还原糖质量浓度最低, 为 5.26 ± 0.26 g/L, 总酸质量浓度为 6.79 ± 0.20 g/L。相较于其他组, SKP 组抗氧化性最强, 总酚质量浓度最高, 为 261.20 ± 2.61 mg/L, 超氧阴离子浓度最低, 为 36.96 ± 0.74 μ mol/mL, 羟自由基清除率最高, 为 $83.73\% \pm 0.84\%$ 。研究发现乙酸和乳酸是菠萝苹果复合果酒发酵产生的主要有机酸, 且 SKP 组乳酸质量浓度最高。共检出 30 种挥发性化合物, 相比单菌发酵, 酿酒酵母和库德里阿兹威毕赤酵母两菌发酵组(SK 组)和三菌发酵组(SKP 组)都增加了酯类和高级醇的质量浓度, 增加了菠萝苹果复合果酒的香气复杂性。感官评价发现 SKP 组在口感、香气和色泽方面得分均最高, 总分为 87.37 ± 0.67 分, 口感酸甜适中, 颜色透亮, 改善了菠萝苹果复合果酒的口感和香气复杂度。因此, 混菌发酵有助于提升菠萝苹果复合果酒的品质。

关键词: 混菌发酵; 复合型果酒; 抗氧化性; 风味物质;

品质分析

中图分类号: TS262

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2024)04-0070-12

Research on Improving the Quality of Blended Pineapple and Apple Wine Based on the Mixed Microbial Fermentation

收稿日期: 2023-06-26

基金项目: 四川省科技计划项目(2022NSFSC1132); 四川轻化工大学人才引进项目(2019RC27)。

作者简介: 胡陆军, 博士, 讲师, 主要从事食品生物技术研究。

HU Lujun^{1,2}, CHEN Xiaodie^{1,2}, LIN Man¹,
LIN Rui¹, XU Teng^{1,2}, ZHAO Zhifeng^{1,3}

1. College of Biological Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin Sichuan 644005, China;

2. Liquor Brewing Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin Sichuan 644005, China;

3. College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: A large number of studies have shown that the microbial species are important factors affecting the quality of fruit wines. The mixed microbial fermentation based on the complementary effect between different species is an important method to improve the quality of the fruit wines. In this study, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* and *Lactiplantibacillus plantarum* were used in the single and mixed microbial fermentation of blended pineapple and apple wine. The physical and chemical indexes and antioxidant activity in the fermentation process were detected, and the flavor substances produced in the fermentation process were analyzed and compared. The results showed that the fermentations with mixed *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii* and *L. plantarum* (SKP group) had the highest sugar utilization rate and the obvious advantage of reducing the total acids, in which the reducing sugar content was 5.26 ± 0.26 g/L, and the total acid was 6.79 ± 0.20 g/L. In addition, compared with other fermentation groups, SKP group had the strongest antioxidant activity, in which the total phenol content was 261.20 ± 2.61 mg/L, the superoxide anion content was 36.96 ± 0.74 μ mol/mL, and the scavenging rate of hydroxyl radical was $83.73\% \pm 0.84\%$. The results also showed that lactic acid and acetic acid were the main organic acids produced during the fermentation processing. In particularly, the relative content of lactic acid in SKP group is the highest. What is more, a total of 30 volatile components were detected, particularly, compared with the single bacteria fermentation group, the mixed microbial fermentation group of *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii* (SK group) and SKP group had increased contents of esters, and higher alcohols, which increased the aroma complexity of blended pineapple and apple wine. Results of sensory evaluation revealed that SKP group scored the highest in taste, aroma, and color, with a total score of 87.37 ± 0.67 . SKP group had moderate sweet and sour, and bright colors, which indicated that mixed microbial fermentation was helpful to improve the taste and enrich the aroma complexity. So, mixed microbial fermentation enhanced the quality of blended pineapple and apple wine, which provided a theoretical basis for quality control and product development of blended pineapple and apple wine.

Key words: mixed microbial fermentation; complex fruit wine; oxidation resistance; flavor substances; quality analysis

苹果(*Malus pumila* Mill.)因口感丰富且含有大量多酚物质、维生素和微量元素而深受人们喜爱,同时它还具有抗肿瘤、预防心脑血管疾病等作用^[1]. 菠萝[*Ananas comosus* (Linn.) Merr.]除了含有大量生物活性物质、膳食纤维、矿物质等,还具有抗炎、改善神经系统等功能^[2]. 果酒是增加苹果、菠萝等水果附加值的重要加工方式,但目前用于果酒酿造的原料多是单一水果,且发酵菌种较为单一,导致果香味不足,典型性不明显. 复合果酒是目前提升果酒品质的常用方法之一,菠萝苹果复合果酒可以综合利用两种水果在果香、营养价值等方面的特点,进而酿造出色泽风味俱佳的复合果酒. 然而,目前还未见多菌种混合发酵菠萝苹果复合果酒的报道.

影响果酒品质的因素有很多,如工艺参数(pH、糖度、发酵温度等)和风味物质等,其中风味物质是影响发酵果酒品质的关键因素之一。发酵菌种是影响果酒风味物质产生的关键因素。Escribano 等^[3]研究发现非酿酒酵母在发酵过程中可以分泌果胶酶、 β -葡萄糖苷酶等多种胞外酶,有助于增加香气化合物的质量浓度,进而改善果酒品质,是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)发酵的重要补充。常见的非酵母属有毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、圆孢菌属(*Torulaspora*)等^[4-5]。何松等^[6]采用从水蜜桃自然发酵液筛选出来的菌株 *P. cephalocereana* hsm1-1 和菌株 *M. sinensis* hsm1-6 发酵水蜜桃,结果发现这两株菌株混合发酵能增加水蜜桃果酒的香气成分,有效改善水蜜桃果酒的品质。

植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)是一种常见的益生菌,在果酒发酵方面有巨大的应用潜力,它通过发酵赋予果酒更高的营养保健价值。越来越多的研究人员开始关注植物乳植杆菌对水果中植物化学物质的生物转化,以改善果酒的品质^[7]。植物乳植杆菌在果酒发酵中可以进行苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF),能将口味尖酸的苹果酸降解为更为柔和的乳酸,使果酒的口感更加圆润饱满^[8]。植物乳植杆菌所产生的有机酸还能提高果酒发酵环境中微生物的稳定性,其分泌的糖苷酶、酯酶、酚酸脱羧酶等酶类还有助于微生物与果汁相互作用产生更多风味物质^[9],改善果酒的感官价值。陈晓蝶等^[10]采用酿酒酵母、毛榛毕赤酵母(*Pichia manshurica*)和植物乳植杆菌混菌发酵沃柑果酒,发现混菌发酵增加了酯类和高级醇的种类和质量浓度,增加了沃柑果酒的香气复杂性,同时改善了沃柑果酒的口感。目前还未见利用酿酒酵母、非酿酒酵母和乳酸菌组合发酵菠萝苹果复合果酒的研究。

本研究以富士苹果、菠萝为原料,利用酿酒酵母、库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)和植物乳植杆菌混菌发酵菠萝苹果复合型果酒,以期改善菠萝苹果复合果酒的品质,提高其产品附加值,促进复合果酒产业的发展。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

菠萝和富士苹果:宜宾市;商业果酒酿酒酵母:安琪酵母股份有限公司;YPD(yeast extract-peptone-dextrose)和 MRS(Man-Rogosa-Sharpe)培养基:北京奥博星生物技术有限责任公司;酿酒酵母 SCFF227、库德里阿兹威毕赤酵母 SCFF207 和植物乳植杆菌 SCFF19:四川轻化工大学。

果胶酶(30 000 U/mL,食品级)和无水柠檬酸:日照金禾博源生化有限公司;焦亚硫酸钾(食品级):山东齐鲁生物科技有限公司;酚酞(分析纯):天津市致远化学试剂有限公司;亚硝酸钠(分析纯):天津市京东天正精细化学试剂厂;柠檬酸三铵和磷酸氢二钾(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;DNS 试剂(分析纯):厦门海标科技有限公司;芦丁(分析纯):北京索莱宝科技有限公司。

MITR-80ATC 酒精计和 MITR-50ATC 糖度计:长沙米琪仪器设备有限公司;UV-1900I 紫外可见分光光度计:苏州乌津仪器有限公司;PhS-10 酸度计:成都世纪方舟科技有限公司;TSQ 8000 气相色谱-质谱联用仪:赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific);LC1100 高效液相色谱仪:安捷伦科技(Agilent Technologies)有限公司;WJE-F6 榨汁机:宁波沃玛电器有限公司;PTX-JA510 分析天平:华志(福建)电子科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菠萝苹果复合型果酒制备工艺

菠萝苹果复合果酒发酵工艺流程如图 1 所示。挑选新鲜菠萝和苹果分别进行清洗、去皮并去核后榨汁。根据预实验结果,将菠萝果浆和苹果果浆以 3:2 的体积比混合,同时糖度调节至 20 °Brix,并加入 60 mg/L 果胶酶,80 mg/L 纤维素,40 °C 水浴酶解 20 min,再按果汁体积的 0.02%加入焦亚硫酸钾,果浆经纱布过

滤后冷藏备用. 预先将酵母菌在 YPD 培养基上涂布培养 24 h, 随后在恒温摇床(180 r/min)中利用液体培养基培养 24 h, 经 2 次活化后制成酵母种子液, 冷藏备用. 同时, 按相同方法将植物乳植杆菌接种于 MRS 培养基活化 2 次制成种子液备用. 将活化后的菌种接种于混合果浆中, 并在 20 ℃ 下进行发酵, 发酵期间每隔 48 h 取样检测菠萝苹果复合果酒的总酸、还原糖等理化指标. 以还原糖和酒精度为主要指标, 当二者连续测定 3 次没有明显变化时视为发酵结束. 发酵结束后将果酒过滤至经巴氏消毒的发酵罐中, 于 4 ℃ 条件下避光陈酿 3 个月.

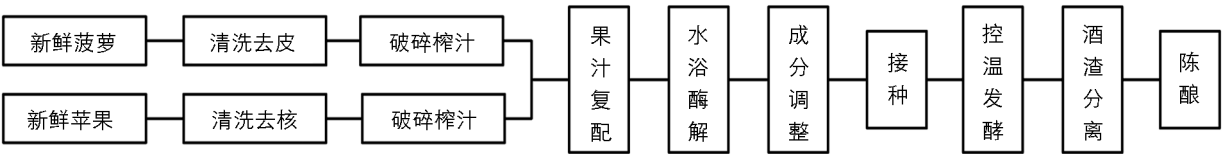


图 1 菠萝苹果复合果酒发酵工艺流程

1.2.2 实验设计

酿酒酵母与植物乳植杆菌的接种比例通过多次预实验调整为 2 : 1, 酿酒酵母与非酿酒酵母接种比例为 1 : 1, 活化后的菌种按复合果汁体积的 6 % 接入 1 L 复合果汁中, 使菌种浓度为 10⁷ CFU/mL. AQ 组采用安琪酿酒酵母单菌发酵; SC 组采用酿酒酵母 SCFF227 单菌发酵; KB 组采用库德里阿兹威毕赤酵母 SCFF207 单菌发酵; SK 组采用酿酒酵母 SCFF227 和库德里阿兹威毕赤酵母 SCFF207 组合发酵; SKP 组采用酿酒酵母 SCFF227、库德里阿兹威毕赤酵母 SCFF207 和植物乳植杆菌 SCFF19 组合发酵.

1.3 菠萝苹果复合型果酒理化指标的测定

1.3.1 常规理化指标测定

参照《葡萄酒、果酒通用分析方法》(GB/T 15038—2006)进行果酒糖度、酒精度、总酸、还原糖的测定, pH 值采用 pH 计测定, 每项指标重复测定 3 次.

1.3.2 总酚质量浓度测定

参照 Mohd 等^[11]的方法对样品中的总酚质量浓度进行测定, 分别吸取 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mL 质量浓度为 0.1 mg/mL 的没食子酸标准溶液, 加入 2.0 mL 福林酚试剂, 随后加入 8.0 mL 浓度为 60 g/L 碳酸钠溶液, 混匀, 定容至 25 mL, 25 ℃ 水浴 1.5 h, 在 760 nm 处测定其吸光度. 以没食子酸质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 求出回归方程及其相关系数 [$y = 12.699x + 0.082 (R^2 = 0.999\ 2)$]. 计算总酚质量浓度.

1.4 菠萝苹果复合型果酒抗氧化性能测定

1.4.1 羟自由基清除率

采用生工生物工程(上海)股份有限公司的羟自由基检测试剂盒(比色法)进行测定. 按照说明书处理菠萝苹果复合果酒样品, 以 H₂O 为对照, 取各样品上清液在 536 nm 处测定吸光度值. 羟自由基清除率计算公式为:

$$D = \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100$$

(1)

式中: D 表示羟自由基清除率(%); A_2 代表测定管吸光度; A_1 表示对照管吸光度; A_0 代表空白管吸光度.

1.4.2 超氧阴离子自由基清除率

采用生工生物工程(上海)股份有限公司的超氧阴离子浓度检测试剂盒(比色法)进行测定. 在 530 nm 下测得不同浓度标准品的吸光度值, 以标准溶液浓度为横坐标, 以标准溶液的吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线方程为:

$$Y = 6.2615X - 0.0101$$

$$R^2 = 0.999\ 7$$

按照比色法处理菠萝苹果复合果酒样品，在波长 530 nm 处测定吸光度值为 A 样品，以标准溶液替代样品作为标准管，测得吸光度值为 A 标准管；以提取样替代样品为空白管，测得吸光度值为 A 空白管，将 ΔA 样本带入标准方程得到 X ，超氧阴离子浓度的计算公式为：

$$\text{超氧阴离子浓度}(\mu\text{mol/mL})=2X$$

(2)

1.5 菠萝苹果复合型果酒风味物质测定

1.5.1 有机酸测定

有机酸参考 Ye 等^[12]的高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)进行测定. 吸取 1 mL 菠萝苹果复合果酒样品，经 0.22 μm 有机滤膜过滤后备用. HPLC 条件：Agilent ZORB-AX SB-Aq(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)色谱柱，VWD 检测器，检测波长：210 nm，流动相 A：磷酸二氢钾(pH=2.4)95%，流动相 B：甲醇 5%，进样量：15 μL ，流速：0.4 mL/min，柱温：25 $^{\circ}\text{C}$.

1.5.2 挥发性风味物质测定

挥发性风味物质参考程宏桢等^[13]的气相色谱-质谱联用法(Gas Chromatography-Mass Spectrometer, GC-MS)进行测定. GC 条件：采用 DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm)，采用不分流模式，进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ，载气为氦气，载气流速 1.5 mL/min，升温程序初始温度 35 $^{\circ}\text{C}$ ，保持时间 5 min 后，以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升至最终温度 250 $^{\circ}\text{C}$. MS 条件：采用全扫描模式，电离模式 EI，发射电流：10 μA ，电子能：70 eV，接口温度：280 $^{\circ}\text{C}$ ，离子源温度：200 $^{\circ}\text{C}$ ，四级杆温度：150 $^{\circ}\text{C}$ ，质量扫描范围：40 $\sim$ 600 amu.

1.6 感官评价

参考金海炎等^[14]的方法设计感官评价表，挑选 10 名食品专业的同学并进行相关培训后进行菠萝苹果复合果酒感官品评.

表 1 菠萝苹果复合型果酒感官评分标准

感官特性	评分标准	得分
色泽(10 分)	澄清透亮，协调悦目	$>9\sim10$
	较澄清、透明	$>8\sim9$
	澄清、色泽偏淡	$>6\sim8$
	微混、酒色暗淡	$>0\sim6$
香气(30 分)	酒香浓郁，酒香和果香丰富	$>28\sim30$
	酒香良好、苹果和菠萝的香气平淡	$>25\sim28$
	具有酒香，苹果和菠萝香气不足	$>21\sim25$
	香气不良	$>0\sim21$
口感(40 分)	酒体丰满、醇厚协调	$>36\sim40$
	酸甜合适，柔和爽口，回味绵延	$>31\sim36$
	酒体较为协调	$>26\sim31$
	滋味平淡	$>0\sim26$
典型性(20 分)	具有菠萝苹果酒典型性，风味突出	$>18\sim20$
	典型明确，风格良好	$>15\sim18$
	有典型性，不够突出	$>11\sim15$
	不具有菠萝苹果复合酒典型性	$>0\sim11$

1.7 数据分析

数据分析采用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件, 进行了单因素方差分析和 Duncan 多重比较差异分析. 当 $p<0.05$ 时, 差异有统计学意义. 采用 OriginPro 2021 绘图.

2 结果与分析

2.2 菠萝苹果复合果酒基本理化指标

2.2.1 pH 值和总酸

pH 值和总酸不仅是果酒的口感特征指标, 而且对发酵过程中的微生物的代谢程度也有一定的指示作用^[15]. 5 个发酵组总酸和 pH 值的变化如图 2 所示, 在前 2 d, 各发酵组的 pH 值呈下降趋势, 总酸呈显著上升趋势, 该变化不仅与果浆中的酸性成分有关, 还可能与高糖环境激发细胞代谢产酸的应激效应有关^[16]. 发酵 3 d 后, 各组 pH 值明显升高, 且后期各发酵组 pH 值在一定范围内波动, 可能是某些有机酸之间发生了合成与分解, 例如酒石酸等^[17]. 发酵第 6 d, 各发酵组的总酸质量浓度都有一定程度的增加, 可能与酵母等细胞生长代谢某些有机酸或自身代谢产酸有关^[18]. 发酵结束时, AQ 组总酸质量浓度最高, 为 9.32 ± 0.28 g/L. 与其他发酵组相比, SKP 组总酸质量浓度最低, 为 6.79 ± 0.20 g/L; pH 最高, 为 4.04 ± 0.02 , 这可能是植物乳杆菌在果酒发酵过程中参与了部分有机酸的代谢, 例如苹果酸、柠檬酸代谢等, 从而使果酒的酸度降低^[19].

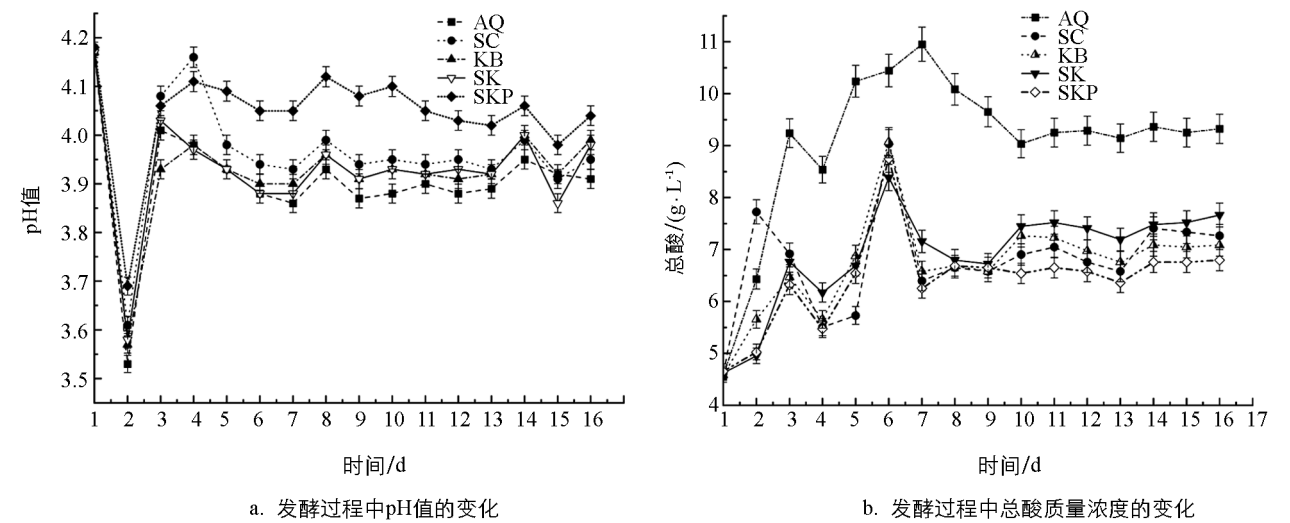


图 2 发酵过程中 pH 值和总酸的变化

2.2.2 糖度、还原糖和酒精度

糖的利用率是衡量酵母菌发酵性能的重要指标之一, 酵母菌通过代谢果酒中的糖类物质, 生成乙醇及其他次级代谢产物^[20]. 由图 3 可知, 不同菌种在单独发酵和混合发酵过程中, 前期糖度和还原糖质量浓度由于微生物的利用呈快速下降趋势, 后期因菌种参与的代谢途径有差异, 导致糖的利用程度有显著差异. 在发酵中后期, 相比其他发酵组, KB 组对糖的利用效率最低, 可能是库德里阿兹威毕赤酵母在发酵过程中对糖的利用能力低于酿酒酵母, 酒精发酵效率较低, 这与其他非酿酒酵母结果相似^[21], 导致该组发酵末期的还原糖质量浓度最高, 为 49.13 ± 0.21 g/L. 而相比于其他发酵组, 三菌混合发酵 SKP 组糖度值和还原糖质量浓度最低, 质量浓度为 5.26 ± 0.26 g/L, 表明 SKP 组有较高的糖利用率和发酵效率.

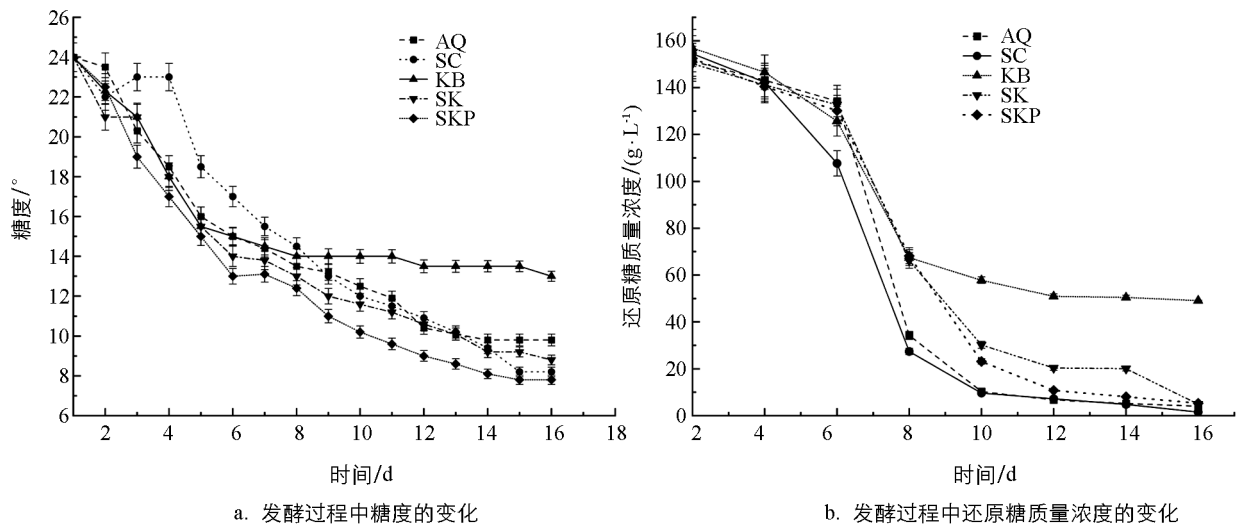


图 3 发酵过程中糖度和还原糖的变化

由图 3 和图 4 对比可知,糖的消耗程度与酒精度的高低成正比。如图 4 所示,混菌发酵 SKP 组对糖的利用率最高,其酒精度最高,为 $12.40\% \pm 0.49\%$; KB 组在发酵过程中对糖的利用率相对较低,无法完成糖的充分利用,因此产酒精能力也相对较弱,其酒精度最低,为 $6.90\% \pm 0.28\%$ 。这与在香梨百香果复合果酒中的研究结果类似^[22]。这说明混菌发酵 SK 组和 SKP 组利用糖的能力比单菌发酵 AQ 组、SC 组和 KB 组高,发酵能力更强。

2.3 菠萝苹果复合果酒抗氧化性分析

果酒中总酚的质量浓度能对果酒的质量产生重要影响,比如果酒的颜色和湿度。如图 5 所示,单菌发酵 AQ 组、SC 组和 KB 组总酚质量浓度明显低于混菌发酵组 SK 组和 SKP 组,混菌发酵 SKP 组总酚质量浓度最高,为 $261.20 \pm 2.61 \text{ mg/L}$,这可能是由于微生物代谢产生了一些次级代谢产物,与混合果汁中的小分子酚类物质不断进行结合与分解反应,从而导致发酵后期总酚质量浓度产生了明显变化^[23]。同时,各发酵组的超氧阴离子浓度和羟自由基清除能力也有较大差异,一种说法是果酒中的有机酸和酚类物质等抗氧化物质可以被微生物代谢或吸附,另一种说法是它们在酶的作用下可以被分解成蛋白质、糖苷类等物质^[24]。同时,SKP 组的抗氧化能力显著优于 SK 组 ($p < 0.05$),SKP 组的超氧阴离子浓度最低,为 $36.96 \pm 0.74 \text{ } \mu\text{mol/mL}$,羟自由基清除率最高,为 $83.73\% \pm 0.84\%$,可能是植物乳植杆菌参与了一部分抗氧化性物质的代谢通路,从而对果酒的抗氧化性提升有一定程度的帮助。

2.4 菠萝苹果复合果酒不同发酵组风味物质分析

2.4.1 有机酸比较

有机酸能影响果酒的酸度、颜色、化学稳定性和储存质量等,所以,有机酸与果酒的感官品质有直接的相关性。不同菌种参与的有机酸代谢途径不同,风味物质也会产生明显的变化,如某些酯类(乳酸乙酯、醋酸酯等),挥发性脂肪酸,醇类和萜类物质等。由图 6 可知,乳酸和乙酸是菠萝苹果复合果酒发酵产生的主要有机酸。酒石酸在所有发酵组中相对质量浓度较小,可能是生成了酒石酸氢钾沉淀,这也可能会导致果酒 pH 值发生变化^[25]。

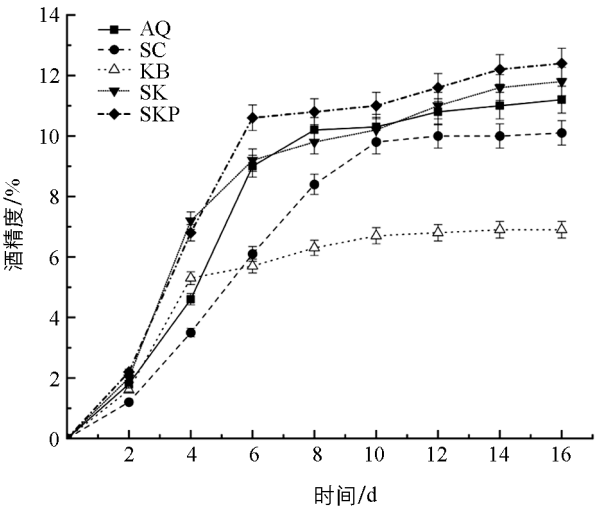
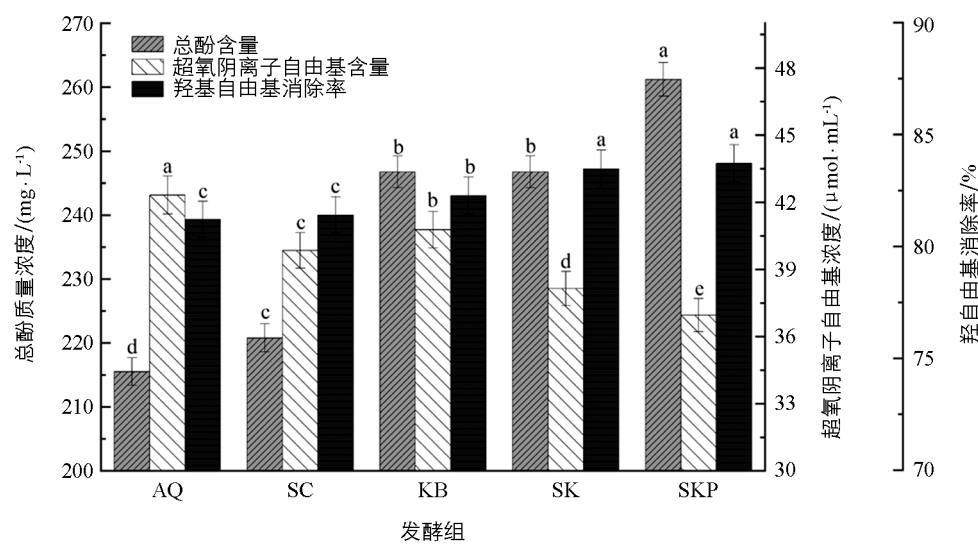


图 4 发酵过程中酒精度的变化



不同小写字母表示同一指标不同发酵组之间差异有统计学意义($p<0.05$), 下同。

图 5 不同发酵组总酚质量浓度、羟自由基清除率和超氧阴离子自由基浓度对比

柠檬酸被认为是三羧酸循环 (Tricarboxylic Acid Cycle) 中重要的中间体, 柠檬酸相对质量浓度的变化可能是由于微生物在发酵过程中通过柠檬酸代谢生成了乙酸、乳酸等物质^[26]。SKP 组的柠檬酸质量浓度最高, 为 1.06 ± 0.03 mg/mL, KB 组质量浓度最低, 为 0.43 ± 0.01 mg/mL。研究表明, 乙酸可以通过酵母菌的磷酸葡萄糖酸途径生成, 除此之外, 也可由乳酸菌分解柠檬酸产生^[27]。由图 6 可知, SK 组和 SKP 组的乙酸相对质量浓度较高分别为 1.29 ± 0.04 mg/mL 和 1.62 ± 0.05 mg/mL, 且加入库德里阿兹威毕赤酵母的发酵组乙酸质量浓度显著增加, 这与 Wei 等^[28]报道的结果相似, 但非酿酒酵母产乙酸的机制还有待深入研究。

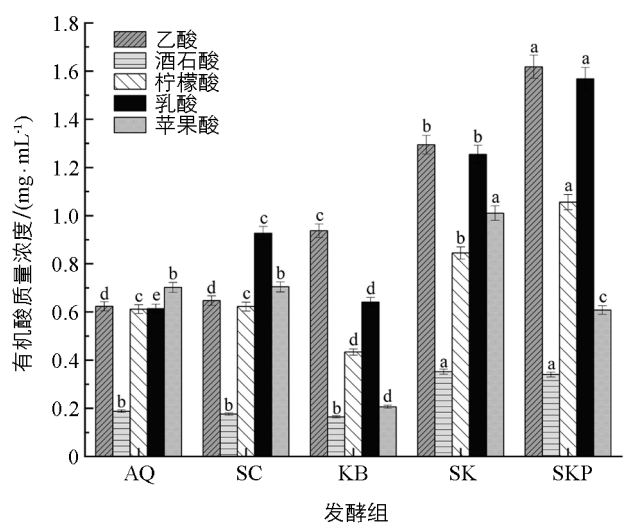


图 6 不同发酵组有机酸质量浓度对比

在发酵过程中, 乳酸是糖酵解的最终产物, 口感上比苹果酸更加柔和。由图 6 可知, 除 KB 组和 AQ 组, 其余发酵组乳酸的相对质量浓度都比较高。而 SKP 组的乳酸质量浓度最高, 为 1.57 ± 0.05 mg/mL, 说明在相同条件下, 在菠萝苹果复合果酒中加入植物乳植杆菌, 发生了苹果酸—乳酸发酵, 使菠萝苹果复合果酒整体的酸度降低, 口感更加柔和, 这与前文总酸质量浓度分析结果一致。

综上, 乳酸和乙酸是菠萝苹果复合果酒发酵产生的主要有机酸, 且加入植物乳植杆菌后有利于降低菠萝苹果复合果酒的酸度, 能有效提升菠萝苹果复合果酒的口感。

2.4.2 挥发性风味物质比较

发酵菌种是影响果酒挥发性风味物质形成和感官特征的重要因素之一。五组发酵体系中共检测出 30 种挥发性成分, 其中醇类 12 种、酯类 6 种、醛酮类 6 种、其他化合物(萜烯类和脂肪酸类)6 种。SC 组挥发物种类最多为 24 种, SK 组和 SKP 组次之, 均为 23 种。其中 SKP 组挥发物质量浓度最高, 为 80.35 ± 1.23 mg/mL。

醇类是果酒香气的重要组成之一, 如表 2 所示, 乙醇、苯乙醇、丙三醇和丁二醇等是菠萝苹果复合果

酒的主要醇类. 其中 SKP 组的乙醇和苯乙醇质量浓度较高, 这些物质赋予菠萝苹果复合果酒良好的玫瑰花香和酒香, 对果酒香气复杂性有一定贡献^[29]. 此外, 丙三醇在各组的质量浓度都较高, 一般认为其对果酒的口感具有积极贡献, 对香气没有显著影响^[29]. 在 KB 组中发现异戊醇质量浓度较高, 异戊醇被认为具有令人愉悦的玫瑰和蜂蜜香气, 通过苯丙氨酸的脱羧和还原脱氨基作用形成, 其生成主要受酵母菌株的影响^[31]. 其余醇类如丁二醇, 它的质量浓度在菠萝苹果复合果酒中相对较低, 但也可能会对复合果酒的感官产生积极影响.

酯类是果酒的主要呈香物质, 主要在发酵和陈酿期间通过醇类与脂肪酸的酯化作用形成^[32]. 如表 2 所示, 乙酸乙酯、正乙酸己酯和丁酸乙酯是菠萝苹果复合果酒的主要酯类, 酯类能够赋予菠萝苹果复合果酒愉悦的花香和果香. 乙酸乙酯和丁酸乙酯在混菌发酵 SK 组和 SKP 组中质量浓度较高, 因而能使菠萝苹果复合果酒具有浓郁的甜香和果香.

表 2 不同发酵组主要挥发性物质相对质量浓度 / (mg · mL⁻¹)

序号	物质名称	AQ	SC	KB	SK	SKP
醇类						
1	乙醇	26.72±1.29a	20.21±0.1b	10.93±0.42d	16.49±0.43c	25.86±0.89a
2	异丁醇	2.60±0.13a	1.33±0.06b	2.60±0.13a	1.60±0.07b	1.65±0.08b
3	桉叶油醇	0.01±0.00c	0.41±0.01ab	—	0.32±0.01b	0.52±0.07a
4	苯乙醇	3.07±0.05d	3.35±0.01cd	3.63±0.40c	4.36±0.07b	5.05±0.04a
5	丙三醇	22.79±0.60a	16.19±1.04b	22.4±2.10a	12.96±0.48c	15.03±0.24bc
6	异山梨醇	2.34±0.04a	2.49±0.07a	2.14±0.07a	0.70±0.03b	1.34±0.07b
7	丁二醇	4.49±0.03a	2.32±0.06c	1.47±0.04d	1.68±0.01d	3.71±0.05b
8	丙二醇	0.59±0.01a	—	0.65±0.01a	0.54±0.01a	—
9	糠醇	0.53±0.01a	—	—	—	—
10	3-甲硫基丙醇	0.19±0.01ab	—	0.25±0.09a	0.42±0.06a	—
11	异戊醇	6.59±0.05b	4.79±0.16c	7.09±0.11a	4.23±0.05d	4.76±0.03c
12	甲醇	2.15±0.04a	1.97±0.05b	1.63±0.03c	1.98±0.25b	1.06±0.27d
酯类						
12	乙酸乙酯	0.42±0.05c	1.49±0.01b	1.46±0.03b	2.78±0.01a	2.92±0.01a
13	正乙酸己酯	0.01±0.00d	2.25±0.09b	1.52±0.02c	1.8±0.04c	2.72±0.03a
14	丁酸乙酯	0.11±0.00c	0.43±0.01b	0.19±0.00c	0.34±0.01b	1.24±0.01a
15	甲氧基乙酸乙酯	—	0.18±0.01b	0.17±0.07b	1.31±0.1a	—
16	庚酸乙酯	—	0.06±0.00a	—	—	0.04±0.00ab
17	正乙酸乙酯	—	2.65±0.05a	—	1.3±0.05b	—
酮类						
18	3-羟基-2-丁酮	0.13±0.00a	0.21±0.00a	0.36±0.19a	0.32±0.03a	0.26±0.02a
19	丙酮	—	2.34±0.12b	—	1.05±0.07c	2.8±0.03a
20	羟基丙酮	2.22±0.03b	1.20±0.01d	2.44±0.05a	1.52±0.06c	0.76±0.07e
21	N-甲基吡咯烷酮	—	5.69±0.02a	—	3.36±0.02c	4.87±0.08b
22	1,3-二羟基丙酮二聚体	—	—	—	0.56±0.05a	—
其它						
23	乙酸	5.37±0.02a	2.70±0.02c	4.51±0.02b	—	2.73±0.05c
24	丁酸	—	0.58±0.02a	0.84±0.09a	—	0.7±0.01a

续表 2

序号	物质名称	AQ	SC	KB	SK	SKP
25	甲胍	—	—	—	—	0.61±0.02a
26	四氢呋喃	—	0.56±0.03a	—	0.24±0.07b	0.57±0.02a
27	1,3,6-三氧杂环辛烷	—	—	—	—	0.59±0.04a
28	二甲基亚砷-D6	—	1.31±0.03a	—	0.68±0.02c	1.07±0.02b
29	松三糖	—	0.16±0.01a	0.04±0.00b	—	—
30	乙醛	0.92±0.01a	0.55±0.12b	0.50±0.01b	0.61±0.01b	0.55±0.01b
Σ		79.10±1.10a	73.43±2.21b	63.19±1.01c	54.67±2.38d	80.35±1.23a

注：“—”表示未检出；不同小写字母表示不同发酵组之间差异有统计学意义($p<0.05$)。

此外，菠萝苹果复合果酒发酵过程中还产生了众多微量但对香气有贡献的化合物，如 3-羟基-2-丁酮、丙酮、羟基丙酮、乙醛和乙酸等，而且，发酵菌株不同，风味物质的质量浓度也有显著差异。综上，发酵菌种和多种风味物质在菠萝苹果复合果酒体系中相互作用，相辅相成，构成了风味独特的菠萝苹果复合果酒。

2.5 菠萝苹果复合果酒不同发酵组感官评价

菠萝苹果复合果酒的品质与其色泽、香气、口感等感官指标有关。感官评价发现，混菌发酵 SKP 组的果酒色泽、香气、口感持久性和整体可接受性都较好(表 3)。SK 组和 SKP 组菠萝苹果复合果酒的色泽和香气得分较高，可能是由于不同菌种的互补作用，减少了某些营养物质的损失，进而提高了菠萝苹果复合果酒的色泽，并增加了某些酯类、高级醇的积累。SKP 组被认为酸度最低，酒香、花香和奶油味较浓，与前文总酸、有机酸分析结果一致，而酒香、花香和奶油味较浓可能是与某些醇类、酯类物质及 3-羟基-2-丁酮有关。KB 组在色泽、口感和典型性方面得分较低，总分为 75.43±2.89 分，可能是因为库德里阿兹威毕赤酵母单发酵能力较弱，导致发酵进程缓慢，营养物质损失较多。综合来看，酿酒酵母、库德里阿兹威毕赤酵母和植物乳植杆菌混菌发酵的菠萝苹果复合果酒颜色鲜艳，香气丰满，口感独特，更受欢迎。

表 3 不同发酵组感官评价得分

感官特征	AQ	SC	KB	SK	SKP
色泽	7.4±0.26c	7.27±0.06c	7.77±0.67bc	8.3±0.1ab	8.47±0.06a
香气	22.57±0.9c	23.3±0.26bc	21.5±0.5d	24.33±0.72b	25.77±0.15a
口感	31.1±0.7bc	30.97±0.55bc	29.87±1.63c	32.83±0.81b	34.77±1.02a
典型性	18.23±0.15ab	17.6±0.2ab	16.3±0.44c	17.43±0.45b	18.37±0.68a
总分	79.3±1.51c	79.13±0.35c	75.43±2.89d	82.9±0.35b	87.37±0.67a

注：同一行不同小写字母代表不同发酵之间差异有统计学意义($p<0.05$)。

3 结论

本研究首次利用酿酒酵母、库德里阿兹威毕赤酵母和植物乳植杆菌发酵菠萝苹果复合果酒，对比了不同菌种组合发酵组的理化特性、抗氧化性与风味物质的差异。相比于单菌发酵，酿酒酵母、库德里阿兹威毕赤酵母与植物乳植杆菌混合发酵的 SKP 组改善了复合果酒的理化特性和抗氧化特性。研究还发现，乙酸和乳酸是菠萝苹果复合果酒发酵产生的主要有机酸，且乙酸乙酯、正乙酸己酯和丁酸乙酯等酯类物质丰富，这有助于提升菠萝苹果复合果酒的香气复杂性。此外，研究发现 SKP 组还含有丰富的苯乙醇、异丁醇和异戊醇等高级醇，它们能赋予菠萝苹果复合果酒以花香、酒香和果香等积极特征。感官评价显示 SKP 组

的果酒颜色清透、香气浓郁、口感酸甜适中。因此,混菌发酵有助于改善菠萝苹果复合果酒品质。后续还可以针对菠萝苹果复合果酒的发酵工艺进行优化,进一步探讨不同菌种接种量及接种顺序等因素对菠萝苹果复合果酒品质的影响。

参考文献:

- [1] ZHANG S Q, HU C, GUO Y R, et al. Polyphenols in Fermented Apple Juice: Beneficial Effects on Human Health [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 76: 104294.
- [2] DELLACASSA E, TRENCHS O, FARÍÑA L, et al. Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr.) Wine Production in Angola: Characterisation of Volatile Aroma Compounds and Yeast Native Flora [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 241: 161-167.
- [3] ESCRIBANO R, GONZÁLEZ-ARENZANA L, GARIJO P, et al. Screening of Enzymatic Activities within Different Enological Non-*Saccharomyces* Yeasts [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(6): 1555-1564.
- [4] RAHBAR SAADAT Y, YARI KHOSROUSHAHI A, MOVASSAGHPOUR A A, et al. Modulatory Role of Exopolysaccharides of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* as Probiotic Yeasts from Dairy Products in Human Colon Cancer Cells [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103675.
- [5] HU L L, WANG J, JI X A, et al. Selection of Non-*Saccharomyces* Yeasts for Orange Wine Fermentation Based on Their Enological Traits and Volatile Compounds Formation [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(10): 4001-4012.
- [6] 何松,任建军,牛东泽,等. 阳山水蜜桃非酿酒酵母的筛选、发酵特性及产香气性能的研究 [J]. 食品科技, 2021, 46(1): 1-7.
- [7] WANG Z N, FENG Y Z, YANG N N, et al. Fermentation of Kiwifruit Juice from Two Cultivars by Probiotic Bacteria: Bioactive Phenolics, Antioxidant Activities and Flavor Volatiles [J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131455.
- [8] WU C Y, LI T L, QI J, et al. Effects of Lactic Acid Fermentation-Based Biotransformation on Phenolic Profiles, Antioxidant Capacity and Flavor Volatiles of Apple Juice [J]. LWT, 2020, 122: 109064.
- [9] DEVI A, ANU-APPAIAH K A, LIN T F. Timing of Inoculation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* in Mixed Malo-Lactic Culture along with Compatible Native Yeast Influences the Polyphenolic, Volatile and Sensory Profile of the Shiraz Wines [J]. LWT, 2022, 158: 113130.
- [10] 陈晓蝶,胡陆军,曹雨澜,等. 混菌发酵对沃柑果酒品质改善作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 183-192.
- [11] MOHD ADZIM KHALILI R, NORHAYATI A H, ROKIAH M Y, et al. Hypocholesterolemic Effect of Red Pitaya (*Hylocereus* sp.) on Hypercholesterolemia Induced Rats [J]. International Food Research Journal, 2009, 16: 431-440.
- [12] YE M Q, YUE T L, YUAN Y H. Evolution of Polyphenols and Organic Acids during the Fermentation of Apple Cider [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(14): 2951-2957.
- [13] 程宏桢,蔡志鹏,王静,等. 基于 GC-MS、GC-O 和电子鼻技术评价百香果酒香气特征 [J]. 食品科学, 2021, 42(6): 256-264.
- [14] 金海炎,王丰园,鲁云凤,等. 混菌发酵猕猴桃果酒工艺条件优化及抗氧化性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(3): 177-185.
- [15] BAI X, HAN M Z, YUE T L, et al. Control of Post-Acidification and Shelf-Life Prediction of Apple Juice Fermented by *Lactobacillus* [J]. Food Control, 2022, 139: 109076.
- [16] BELY M, STOECKLE P, MASNEUF-POMARÈDE I, et al. Impact of Mixed *Torulaspora delbrueckii-saccharomyces cerevisiae* Culture on High-Sugar Fermentation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 122(3): 312-320.
- [17] LI H C, HUANG J T, WANG Y Q, et al. Study on the Nutritional Characteristics and Antioxidant Activity of Dealcoholized Sequentially Fermented Apple Juice with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* Fermentation [J]. Food Chem-

- istry, 2021, 363: 130351.
- [18] 任学梅,姚红红,严幻汝,等. 高产糖苷酶非酿酒酵母菌株筛选、鉴定及其发酵过程中酶活性变化 [J]. 食品科学, 2022, 43(20): 198-206.
- [19] 贾丽艳,张丽,李惠源,等. 果香风味导向的库德毕赤酵母 FJZ 的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 276-282.
- [20] BORTOLINI D G, BENVENUTTI L, DEMIATE I M, et al. A New Approach to the Use of Apple Pomace in Cider Making for the Recovery of Phenolic Compounds [J]. LWT, 2020, 126: 109316.
- [21] SHI W K, WANG J, CHEN F S, et al. Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on Wine Flavor and Quality through Simultaneous and Sequential Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* [J]. LWT, 2019, 116: 108477.
- [22] 胡陆军,胡晋伟,陈晓蝶,等. 混菌发酵对香梨百香果复合果酒品质影响的研究 [J]. 中国酿造, 2023, 42(3): 122-128.
- [23] 张晶,左勇,谢光杰,等. 发酵条件对猕猴桃果酒中多酚含量的影响 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 160-163, 167.
- [24] 谭敏华,张巧苑,于立梅,等. 柚子全果果酒发酵工艺优化及其抗氧化活性、挥发性成分分析 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(13): 149-155.
- [25] LI C X, ZHAO X H, ZUO W F, et al. The Effects of Simultaneous and Sequential Inoculation of Yeast and Autochthonous *Oenococcus oeni* on the Chemical Composition of Red-Fleshed Apple Cider [J]. LWT, 2020, 124: 109184.
- [26] BARTOWSKY E J, HENSCHKE P A. The ‘Buttery’ Attribute of Wine-Diacetyl-Desirability, Spoilage and beyond [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(3): 235-252.
- [27] LIMA M M M, CHOY Y Y, TRAN J, et al. Organic Acids Characterization: Wines of Pinot Noir and Juices of ‘Bordeaux Grape Varieties’ [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 114: 104745.
- [28] WEI J P, ZHANG Y X, WANG Y W, et al. Assessment of Chemical Composition and Sensorial Properties of Ciders Fermented with Different Non-*Saccharomyces* Yeasts in Pure and Mixed Fermentations [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 318: 108471.
- [29] WEI J P, ZHANG Y X, QIU Y, et al. Chemical Composition, Sensorial Properties, and Aroma-Active Compounds of Ciders Fermented with *Hanseniaspora osmophila* and *Torulaspora quercuum* in Co-and Sequential Fermentations [J]. Food Chemistry, 2020, 306: 125623.
- [30] SUKHVIR S, KOCHER G S. Development of Apple Wine from Golden Delicious Cultivar Using a Local Yeast Isolate [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 56(6): 2959-2969.
- [31] WANG K H, QI J, JIN Y, et al. Influence of Fruit Maturity and Lactic Fermentation on Physicochemical Properties, Phenolics, Volatiles, and Sensory of Mulberry Juice [J]. Food Bioscience, 2022, 48: 101782.
- [32] ZHANG S R, XING X, CHU Q, et al. Impact of Co-Culture of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* at Different Ratios on Malolactic Fermentation, Volatile and Sensory Characteristics of Mulberry Wine [J]. LWT, 2022, 169: 113995.

责任编辑 孙文静
崔玉洁