

氮源对低温发酵脐橙果酒挥发性成分的影响

邓山鸿, 陈 钢*

(南昌大学食品学院, 江西南昌 330047)

摘要:为解决低温发酵周期长的问题,并进一步分析其挥发性成分。通过考察不同氮源质量浓度对低温发酵脐橙果酒精度和发酵时间的影响,确定氮源添加量,并采用顶空-固相微萃取-气质联用法(HS-SPME-GC-MS)分析其挥发性成分。结果表明,与未添加氮源的空白组相比,添加DAP 0.4 g/L、硫酸铵 1.0 g/L、碳酸氢铵 1.5 g/L的脐橙果酒精度可提高4.6%~5.3%,缩短发酵时间22%~56%。四种低温发酵脐橙果酒共检测出挥发性成分32种,其中高级醇5种、萜烯类化合物10种、中链脂肪酸2种、高级醇乙酸酯3种、中链脂肪酸乙酯7种、醛酮类5种。添加三种氮源的果酒中,萜烯类和乙酸酯类挥发性成分总含量均大于空白组,中链脂肪酸和乙基酯类挥发性成分总含量均小于空白组。其中,添加磷酸氢二铵的果酒中乙酸酯类挥发性成分总含量最高(1.170 mg/L),添加硫酸铵的果酒中萜烯类挥发性成分总含量最高(11.378 mg/L);与另外两种氮源相比,添加磷酸氢二铵的果酒中乙酸-2-苯乙酯、庚酸乙酯等挥发性成分含量相对更高,添加硫酸铵的果酒中D-柠檬烯、乙酸乙酯、癸酸乙酯等挥发性成分含量相对更高,添加碳酸氢铵的果酒中 β -水芹烯、4-萜烯醇、辛酸乙酯等挥发性成分含量相对更高。实验证明了氮源对促进脐橙果酒低温发酵具有明显效果,并对挥发性香气成分含量具有一定的促进作用,为脐橙果酒低温发酵工艺的应用提供了理论依据。

关键词:脐橙果酒,低温发酵,氮源,挥发性成分

Effect of Nitrogen Sources on Volatile Components of Navel Orange Wine during Low Temperature Fermentation

DENG Shan-hong, CHEN Gang*

(School of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: To solve the problem of longer time during low temperature fermentation, and analyze its volatile aroma components. The concentrations of nitrogen sources was determined depending on the alcohol content and fermentation time of navel orange wine fermented at low temperature. The volatile components of orange wine samples were analyzed by HS-SPME-GC-MS. The alcohol content of orange wine samples with 0.4 g/L DAP, 1.0 g/L ammonium sulfate and 1.5 g/L ammonium bicarbonate added increased by 4.6%~5.3% compared with the no addition, and the fermentation time shortened by 22%~56%. The results of GC-MS showed that 32 aroma compounds were detected in four wine samples, including 5 higher alcohols, 10 terpene compounds, 2 medium-chain fatty acids, 3 higher alcohol acetates, 7 medium-chain fatty acid ethyl esters and 5 aldehydes or ketones. Compared with the no nitrogen source addition group, the three nitrogen sources group had higher content of terpenes and acetates, and lower content medium chain fatty acids and ethyl esters. The orange wine sample added with diammonium hydrogen phosphate had the highest content of acetate compounds (1.170 mg/L), while the orange wine added with ammonium sulfate had the highest content of terpene compounds (11.378 mg/L). Compared with the other two nitrogen sources, the content of 2-phenyl ethyl acetate and ethyl heptanoate in orange wine added with diammonium hydrogen phosphate was relatively higher, the content of D-limonene, ethyl acetate and ethyl decanoate in orange wine added with ammonium sulfate was relatively higher, and the content of β -phellandrene, 4-carvomenthenol and ethyl caprylate in orange wine added with ammonium bicarbonate was relatively higher. The result showed that nitrogen sources had significant effect on promoting the process of low temperature fermentation, and had effect on promoting the content of some volatile aroma components. This study provide a theoretical basis for the application of low temperature fermentation technology on orange wine.

Key words: navel orange wine; low temperature fermentation; nitrogen sources; volatile components

中图分类号: TS262.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)20-0092-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.015

收稿日期: 2020-01-06

作者简介: 邓山鸿(1994-),男,硕士研究生,研究方向:发酵工程, E-mail: 18772381972@163.com。

*通讯作者: 陈钢(1968-),男,博士,教授,研究方向:食品生物技术与功能食品开发, E-mail: nc_chengang_edu@163.com。

引文格式: 邓山鸿, 陈钢. 氮源对低温发酵脐橙果酒挥发性成分的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 92-98, 103.

低温发酵作为一种重要的发酵工艺, 被广泛应用于面包、酸奶等发酵食品中, 对食品风味具有积极作用^[1-2]。在发酵果酒中, 白葡萄酒主要采用低温发酵, 发酵温度为 10~12 ℃, 具有独特的风味口感。脐橙果酒是兼具脐橙营养物质和酒精的消费产品, 风味与口感尤为重要。研究表明, 采用低温发酵工艺酿制果酒, 可保持果酒中较高含量的萜烯类物质, 并促进酵母产生酯类物质, 改善果酒品质^[3]。低温发酵改善果酒品质的同时, 也有其天然缺陷, 即发酵周期长, 存在发酵延迟或停止的风险^[4]。

添加外氮源可强化菌种发酵能力, 缩短发酵周期, 使发酵过程更平稳。一些研究表明氮源对促进酵母发酵具有明显效果, 并会影响果酒香气物质种类和含量的差异性^[5-7]。低温发酵中也有少量应用氮源的文献。Perez 等^[8]的研究表明, 添加氮源可显著缩短白葡萄酒低温发酵时间。张斌等^[9]的研究表明, 添加氮源可促进荔枝酒低温高糖发酵, 提升乙醇和酯类物质的得率。目前, 低于 18 ℃ 的低温发酵果酒普遍存在着发酵周期长的问题, 而针对这一问题的研究还很少。对不同种类果酒而言, 选择不同的外氮源, 在促进酵母发酵的效果上不同, 同时也会对果酒的香气成分造成影响^[10]。因此, 选择脐橙果酒低温发酵的外氮源时, 既要保证果酒低温发酵效率, 也需考虑其对果酒香气物质的影响。

本文以低温发酵脐橙果酒为研究对象, 选取了磷酸氢二铵(diammonium phosphate, DAP)、硫酸铵和碳酸氢铵作为外氮源, 考察了不同氮源对低温发酵脐橙果酒酒精度、发酵时间的影响, 同时分析了其挥发性香气成分, 以期对脐橙果酒低温发酵工艺提供研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

脐橙原料 赣南信丰脐橙(可溶性固形物 11.54%, 总糖 45.61 g/L); 偏重亚硫酸钾(食品级) 河南华兴生物科技公司; 果胶酶(5 万 U/g) 南宁庞博生物工程有限公司; 磷酸氢二铵(分析纯)、硫酸铵(分析纯) 西陇科学股份有限公司; 碳酸氢铵(分析纯) 北京索莱宝科技有限公司; 酿酒酵母 中国工业微生物菌种保藏中心; 营养琼脂(WL)培养基 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 3-辛醇(色谱纯) 萨恩化学技术(上海)有限公司。

酒精计 上海精密科学仪器有限公司; WYT-J 型手持糖度计 成都光学厂; 石英毛细管色谱柱 HP-5MS(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 美国 Agilent 公司; 气相色谱质谱联用仪(Agilent 6890N-5975B) 美国 Agilent 公司; 50/30 μm 二乙基苯/碳分子筛/聚二甲硅氧烷(divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane, DVB/CAR/PDMS)萃取头、顶空 SPME 进样器 美国 Supelco 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脐橙果酒工艺流程 脐橙→分选、清洗、去皮、破

碎(加果胶酶)→压榨→果汁(加果胶酶、SO₂)→加热→静置→调整成分(接种酵母菌, 加白砂糖、SO₂)→控温发酵→倒罐→陈酿→脐橙酒。

关键操作点:

分选、清洗: 挑选果体偏黄色、色泽均匀、无明显色差、表皮光滑、果形端正的脐橙, 剔除霉烂果及杂质。用清水洗涤除去表面污物, 以减少原料的带菌量。

破碎榨汁: 将去皮后的脐橙全果切成小块置于打浆机中破壁。在破壁后的果浆中加入果胶酶 100 mg/kg, SO₂ 50 mg/kg(按偏重亚硫酸钾质量 50% 计, 下同), 均匀静置 2.5 h 后进行榨汁。果汁榨出后再加入果胶酶 15 mg/kg, 水浴加热至 45 ℃, 静置澄清 4 h, 使得果胶充分水解。

调整成分: 将澄清后的果汁分装至 250 mL 锥形瓶中, 调整糖度。根据预实验, 参考发酵所需达到的酒精度以及酵母对可溶性固形物的适应性^[11], 添加白砂糖使发酵初始可溶性固形物达 22%, 同时加入 30 mg/L SO₂。空白组不添加任何氮源, 氮源组分别添加一定量的 DAP、硫酸铵、碳酸氢铵。

酵母活化: 将保藏的菌种接种至酵母浸出粉陈葡萄糖液体培养基中活化, 于 28 ℃ 振荡培养 48 h 后, 放入 4 ℃ 冰箱备用。

接种: 按 3% (v/v) 接种酿酒酵母至含 180 mL 脐橙果汁的锥形瓶中。

主发酵: 控温 14 ℃ 发酵, 至可溶性固形物的含量稳定不变, 视为主发酵结束。发酵过程中定期排出发酵产生的 CO₂, 主发酵结束后倒罐, 转入陈酿阶段。

陈酿: 将主发酵完成后的酒样置于 12 ℃ 恒温箱陈酿 30 d。

1.2.2 单因素实验 选取 DAP 添加质量浓度为 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 (g/L), 硫酸铵添加质量浓度 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 (g/L), 碳酸氢铵添加量 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6 (g/L), 进行发酵实验, 至可溶性固形物含量不变时发酵结束, 记录发酵时间, 并测定脐橙酒酒精度。根据单因素实验结果, 确定 DAP、硫酸铵、碳酸氢铵三种氮源的添加量。

1.2.3 酵母计数 根据确定的氮源添加量, 在发酵过程中, 采用平板计数法测定不添加氮源与添加 DAP(0.4 g/L)、硫酸铵(1.0 g/L)、碳酸氢铵(1.5 g/L) 的低温发酵脐橙酒中的酵母总数。

1.2.4 基本理化指标检测 可溶性固形物: 糖度计; 酒精度: 酒精计; 总糖、总酸等其他基础理化指标的检测参照 GB/T 15038-2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》。

1.2.5 挥发性成分检测 顶空-固相微萃取(HS-SPME)^[12]: 取 8 mL 脐橙酒样品、10 μL 3-辛醇内标(400 μg/L)、3.0 g NaCl 于 20 mL 样品瓶中, 密封, 将样品瓶于 40 ℃ 搅拌平衡 15 min 后, 将老化的萃取头插入密封的样品瓶中, 顶空萃取 40 min, 然后在气

相色谱进样口 230 ℃ 解析 3 min, 采用 GC-MS 分析其挥发性成分。

GC 条件: 石英毛细管色谱柱 HP-5MS (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm); 起始温度 40 ℃, 保留时间 2 min, 以 5 ℃/min 升至 230 ℃, 保留时间 15 min; 不分流进样, 载气 He, 流速: 1.2 mL/min。

MS 条件: 电子电离源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 ℃, 进样口温度 250 ℃, 传输线温度 250 ℃, 质量范围 33~400 amu。

定性定量分析: 实验数据处理由 GC-MS 数据分析软件系统完成, 未知化合物经计算机检索, 同时与 Wiley 7.0/NIST05 检索数据库进行匹配, 对比, 并结合已有文献进行定性分析。根据已知浓度 3-辛醇内标物, 以各挥发性物质的相对于内标物含量进行半定量分析。

1.2.6 香气活性值 (odor activity value, OAV) 的计算

$$OAV = \frac{FC}{OT}$$

式中: FC (flavor compound) 为挥发性香气成分质量浓度; OT (odor threshold) 为该挥发性化合物的香气阈值。香味活度值反映出香味化合物对果酒感官贡献的多少, 通过数据对比, 能够体现不同组别的差异性。

1.2.7 感官评定 水果味、柑橘类味、橙味、青草味、薄荷味、花香味、香草味、酒精味、辛辣味共九种感官属性评定特征在对脐橙果酒的感官评价中具有一定的代表性^[13], 感官评定以此为基础。陈酿阶段完成后, 由 15 人组成的感官评定小组, 对提供标准品与样品的香气特征强度进行评估, 各香气特征强度采用 1~9 分制 (1: 香气特征强度非常弱, 3: 香气特征强度较弱, 5: 香气特征强度中等, 7: 香气特征强度较强, 9: 香气特征强度非常强), 取平均值为评分结果。

1.3 数据处理

数据为各组处理 3 次重复的平均值, 利用 Microsoft Excel 2016 统计分析, Spss 20 进行方差分析, 差异显著性分析和主成分分析, Origin 2018 作图。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

DAP 是葡萄酒中最普遍添加的氮源, 其不仅能促进酵母的发酵效率, 同时能一定程度增加果酒的香气物质^[5]。在脐橙酒的低温发酵中, DAP 仍然具有较强促进发酵的效果。随着添加量的增加, 脐橙酒酒精度先升高后降低。在添加量达到 0.4 g/L 时, 其酒精度最大, 发酵时间最短, 相对于未添加氮源组, 酒精度增加了 4.6%, 发酵时间缩短了 56%。研究表明, DPA 添加浓度过高反而不利于酵母对氮源的吸收^[14]。因此, 后续实验中选取 0.4 g/L 作为 DAP 组低温发酵脐橙果酒的添加量。

硫酸铵是发酵实验中最常添加的氮源, 具有一定的代表性。研究表明, 硫酸铵在荔枝酒的低温高糖发酵工艺中具有明显强化菌种发酵能力的效果,

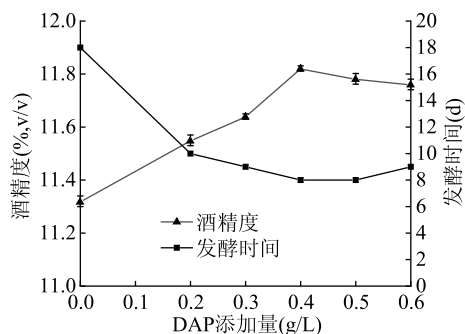


图1 不同质量浓度 DAP 对酒精度和发酵时间的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of

DAP addition on ethanol content and fermentation time

促进了发酵过程中对糖的转化效果, 提高了醇和酯的得率^[9]。由图 2 可知, 添加硫酸铵在低温发酵脐橙酒中对于提高酒精度具有良好效果。硫酸铵的添加量为 1.0 g/L 时, 其酒精度达到最大值, 发酵时间为最短, 相对于未添加氮源组, 酒精度增加了 5.3%, 发酵时间缩短了 44%。因此, 后续实验中选取 1.0 g/L 作为硫酸铵组低温发酵脐橙果酒的添加量。

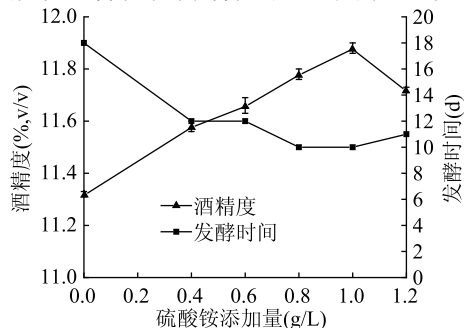


图2 不同质量浓度硫酸铵对酒精度和发酵时间的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of ammonium

bicarbonate on ethanol content and fermentation time

碳酸氢铵在果酒中有一定应用。在苹果啤酒发酵研究中发现, 碳酸氢铵可以提高酵母发酵力, 促进酯类合成^[15]。此外, 碳酸氢铵会影响到一些重要的代谢途径, 如在抑制杂醇油的合成代谢方面效果明显^[16]。由图 3 可知, 碳酸氢铵的添加为 1.5 g/L 时, 酒精度最高, 发酵时间最短, 相对于未添加氮源组, 酒精度增加了 5.2%, 发酵时间缩短了 22%。因此, 后续实验中选择 1.5 g/L 作为碳酸氢铵组低温发酵脐橙果酒的添加量。

根据单因素实验可知, 与未添加氮源的低温发酵脐橙酒相比, 添加 DAP、硫酸铵、碳酸氢铵三种氮源均能明显缩短发酵周期。其中添加 DAP 作为氮源的果酒, 发酵时间最短; 添加硫酸铵作为氮源的果酒, 能达到的酒精度最高。添加 DAP 0.4 g/L、硫酸铵 1.0 g/L、碳酸氢铵 1.5 g/L 的果酒, 分别缩短发酵时间 56%、44%、22%, 增加酒精度 4.6%、5.3%、5.2%。

2.2 添加不同氮源时低温发酵菌落总数的变化

酵母在未添加氮源的果酒中低温发酵时发酵启动缓慢、糖转化效率低^[17]。酵母发酵过程中菌落总数的变化如图 4 所示。四组果酒发酵至第 2 d 时菌落

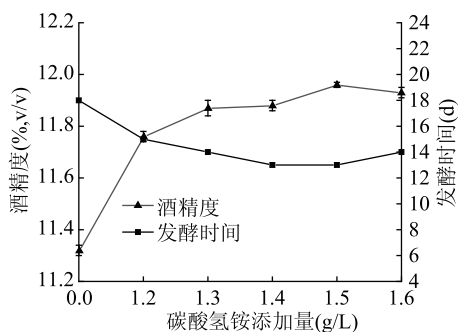


图3 不同碳酸氢铵添加量对酒精度和发酵时间的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of ammonium bicarbonate on ethanol content and fermentation time

总数达到最大值,随发酵过程进行,酵母总数慢慢下降。添加三种氮源果酒中酿酒酵母的最大值(6.61、6.60、6.62 lg CFU/mL)与空白组(6.71 lg CFU/mL)有一定差异性。添加三种氮源的低温发酵酒在第2 d时的酵母数较空白组小,可能是由于添加三种氮源的果酒中,酵母增殖的最大值点在此时间之前。在后续发酵过程中,除发酵末期外,添加三种氮源的果酒中酵母数量均高于空白组,说明三种氮源对于促进酵母发酵具有明显效果。

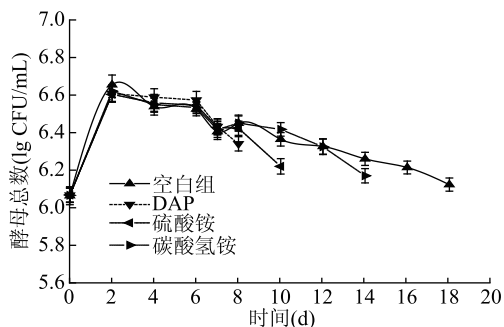


图4 不同种类氮源对发酵过程中酵母数量的影响

Fig.4 Effects of different nitrogen sources on the quantity of yeast during low temperature fermentation

为进一步探究三种氮源添加对低温发酵脐橙果酒的挥发性成分影响,进行了挥发性成分的定量分析。

2.3 添加不同氮源对低温发酵脐橙酒基本理化指标的影响

香气化合物检测前,测定脐橙酒的基本理化指标。如表1所示,添加DAP、硫酸铵、碳酸氢铵三种氮源均能提高脐橙果酒的酒精度,硫酸铵与碳酸氢铵组酒精度较高。相应的添加三种氮源的脐橙酒,残糖含量均低于空白组。由表1知,总酸含量最低

的是空白组。低温果酒的总酸含量较低,但氮源的添加导致果酒的总酸含量偏高^[18],其中,添加DAP的果酒中总酸含量最大。挥发性酸会影响到果酒的感官品质^[19],挥发性酸含量过高时使得酒体呈现不好的“醋香”。果酒中挥发性酸主要是乙酸,由于低温发酵果酒发酵周期长,挥发性酸一般较低,香气协调^[20]。氮源的添加会影响酵母的代谢途径,进而减少挥发性酸的积累^[21],由表1知,三种不同氮源果酒之间的挥发性酸含量差异性不显著。

2.4 添加不同氮源对低温发酵脐橙酒挥发性成分的影响

对添加不同氮源组的挥发性成分的GC-MS分析结果见表2,添加三种氮源的脐橙果酒与未添加氮源的仅在挥发性成分含量上有所差异,在挥发性成分的种类上没有差异。四种低温发酵酒检测出挥发性成分32种,其中高级醇类5种、萜烯类10种、中链脂肪酸类2种、乙酸酯类3种、乙酯类7种、醛酮类5种。

高级醇指挥发性成分中六个碳原子以上的一元醇,其含量对果酒感官品质具有重要影响。适宜含量的高级醇能促进果酒风味的形成,但高级醇含量过高反而会降低果酒品质。通过对四种低温发酵脐橙酒的挥发性成分分析发现,DAP组和硫酸铵组的高级醇总含量小于空白组,碳酸氢铵组的高级醇总含量最大,且高于空白组。与DAP组和碳酸氢铵组相比,碳酸氢铵组中的异戊醇和苯乙醇含量相较于空白组增加更明显。苑振宇等^[22]研究表明,碳酸氢铵对高级醇生成的影响显著,且与碳酸氢铵的添加量有关。

萜烯类挥发性成分是果酒香气中果香的主要来源^[23]。由表2可知,D-柠檬烯、 β -水芹烯、4-萜烯醇三种萜烯类化合物含量较高,明显大于其他萜烯类化合物含量。萜烯类挥发性成分在温度较高时很容易挥发,低温发酵有助于萜类挥发性成分更好的保留,此外,加入氮源能够影响酵母的代谢途径,从而有利于萜烯类挥发性成分的积累^[7]。由表2可知,三个氮源组中的萜烯类挥发性成分总含量均高于空白组,其中硫酸铵组的萜烯类挥发性成分总含量最高。D-柠檬烯是脐橙中的特征性挥发性成分,兼具增香和药用价值^[24],在萜烯类挥发性成分总量中的占比明显高于其他种类的化合物。其中,DAP组和硫酸铵组果酒中D-柠檬烯高于空白组,且硫酸铵组中更高,而碳酸氢铵组低于空白组。 β -水芹烯、4-萜烯醇两种挥发性成分的含量在添加氮源果酒中均高于空

表1 脐橙酒的理化指标

Table 1 Main chemical parameters of orange wine

组别	空白组	DAP组	硫酸铵组	碳酸氢铵组
酒精度(% v/v)	11.32 ± 0.02 ^b	11.84 ± 0.03 ^a	11.92 ± 0.03 ^a	11.91 ± 0.02 ^a
总糖(g/L)	6.42 ± 0.01 ^a	5.98 ± 0.01 ^b	5.83 ± 0.02 ^c	5.85 ± 0.01 ^c
总酸(g/L)	5.24 ± 0.02 ^d	5.68 ± 0.03 ^a	5.45 ± 0.01 ^c	5.52 ± 0.02 ^b
挥发性酸(g/L)	0.35 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.02 ^b	0.28 ± 0.01 ^b	0.25 ± 0.01 ^b

注:总酸以酒石酸计,挥发性酸以乙酸计;同行肩标不同小写字母表示差异显著(P < 0.05);表2同。

表2 不同氮源对低温发酵脐橙酒挥发性成分含量的影响
Table 2 Effects of different nitrogen sources on volatile components in orange wine

化合物名称	挥发性化合物质量浓度(mg/L)			
	空白组	DAP	硫酸铵	碳酸氢铵
高级醇类				
1-己醇	0.076 ± 0.005 ^a	0.042 ± 0.004 ^c	0.050 ± 0.006 ^b	0.037 ± 0.005 ^d
异戊醇	0.357 ± 0.016 ^b	0.324 ± 0.011 ^c	0.292 ± 0.010 ^d	0.564 ± 0.012 ^a
苯乙醇	0.327 ± 0.024 ^b	0.289 ± 0.014 ^c	0.268 ± 0.011 ^c	0.528 ± 0.019 ^a
庚醇	0.030 ± 0.004 ^b	0.035 ± 0.005 ^c	0.024 ± 0.005 ^d	0.036 ± 0.006 ^a
癸醇	0.076 ± 0.009 ^a	0.042 ± 0.006 ^c	0.050 ± 0.005 ^b	0.037 ± 0.004 ^d
总计	0.866	0.732	0.684	1.202
萜烯类				
β-水芹烯	1.532 ± 0.203 ^c	1.689 ± 0.116 ^b	1.674 ± 0.123 ^b	1.739 ± 0.142 ^a
3-葑烯	0.153 ± 0.013 ^c	0.162 ± 0.009 ^b	0.156 ± 0.010 ^c	0.172 ± 0.012 ^a
D-柠檬烯	7.353 ± 1.012 ^c	7.524 ± 1.123 ^b	7.893 ± 1.265 ^a	6.976 ± 0.913 ^d
α-蒎品烯	0.055 ± 0.003 ^c	0.066 ± 0.006 ^b	0.068 ± 0.006 ^b	0.075 ± 0.004 ^a
4-乙酰基-1-甲基环己烯	0.064 ± 0.003 ^a	0.050 ± 0.004 ^b	0.051 ± 0.004 ^b	0.054 ± 0.003 ^b
β-蛇麻烯	0.137 ± 0.012 ^c	0.156 ± 0.014 ^b	0.166 ± 0.010 ^b	0.171 ± 0.014 ^a
4-萜烯醇	1.003 ± 0.112 ^c	1.198 ± 0.104 ^b	1.176 ± 0.121 ^b	1.277 ± 0.116 ^a
D-香芹酮	0.055 ± 0.004 ^a	0.052 ± 0.006 ^a	0.042 ± 0.004 ^b	0.048 ± 0.004 ^b
橙花醇	0.092 ± 0.003 ^c	0.125 ± 0.010 ^b	0.121 ± 0.012 ^b	0.137 ± 0.008 ^a
罗勒烯	0.026 ± 0.001 ^b	0.032 ± 0.001 ^a	0.031 ± 0.001 ^a	0.030 ± 0.002 ^a
总计	10.470	11.054	11.378	10.679
中链脂肪酸类				
癸酸	0.140 ± 0.016 ^a	0.122 ± 0.012 ^b	0.114 ± 0.012 ^b	0.105 ± 0.014 ^b
辛酸	4.139 ± 0.413 ^a	3.462 ± 0.315 ^d	3.740 ± 0.306 ^c	4.010 ± 0.362 ^b
合计	4.279	3.584	3.854	4.115
乙酸酯类				
乙酸乙酯	0.510 ± 0.018 ^b	0.812 ± 0.016 ^a	0.822 ± 0.023 ^a	0.732 ± 0.018 ^a
乙酸-2-苯乙酯	0.130 ± 0.009 ^c	0.246 ± 0.012 ^a	0.231 ± 0.010 ^a	0.190 ± 0.010 ^b
乙酸癸酯	0.065 ± 0.005 ^d	0.112 ± 0.023 ^b	0.104 ± 0.018 ^c	0.122 ± 0.021 ^a
总计	0.705	1.170	1.157	1.044
乙基酯类				
庚酸乙酯	1.010 ± 0.053 ^a	0.922 ± 0.048 ^b	0.741 ± 0.046 ^d	0.848 ± 0.054 ^c
壬酸乙酯	0.059 ± 0.004 ^a	0.052 ± 0.002 ^b	0.051 ± 0.003 ^b	0.061 ± 0.002 ^a
癸酸乙酯	4.386 ± 0.132 ^a	2.154 ± 0.121 ^c	2.809 ± 0.133 ^b	1.413 ± 0.118 ^d
辛酸乙酯	5.839 ± 0.226 ^a	3.814 ± 0.211 ^b	3.681 ± 0.321 ^d	4.010 ± 0.244 ^b
丁酸乙酯	0.093 ± 0.005 ^a	0.071 ± 0.006 ^d	0.080 ± 0.003 ^c	0.083 ± 0.006 ^b
己酸-3-羟基-乙酯	0.064 ± 0.004 ^a	0.046 ± 0.004 ^c	0.051 ± 0.003 ^b	0.054 ± 0.003 ^b
十二烷酸乙酯	0.943 ± 0.022 ^b	0.875 ± 0.025 ^c	0.715 ± 0.033 ^d	1.081 ± 0.042 ^a
合计	12.301	7.863	8.048	7.467
醛酮类				
癸醛	0.137 ± 0.009 ^c	0.134 ± 0.005 ^c	0.156 ± 0.012 ^b	0.373 ± 0.013 ^a
壬醛	0.038 ± 0.003 ^a	0.034 ± 0.004 ^a	0.031 ± 0.008 ^a	0.032 ± 0.004 ^a
甲缩醛	0.203 ± 0.012 ^a	0.148 ± 0.014 ^c	0.144 ± 0.012 ^c	0.166 ± 0.013 ^b
2-戊酮	0.127 ± 0.013 ^b	0.132 ± 0.013 ^b	0.156 ± 0.013 ^a	0.022 ± 0.006 ^c
2-十一烷酮	0.038 ± 0.003 ^c	0.044 ± 0.005 ^b	0.038 ± 0.004 ^c	0.099 ± 0.006 ^a
合计	0.543	0.492	0.417	0.692

白组,且两种挥发性成分在碳酸氢铵组中与空白组相比增加最显著。

癸酸和辛酸酵母发酵过程中重要的代谢物质,在大多数类果酒发酵中均有发现。本实验中检测到

两种酸,且以辛酸为主。中链脂肪酸影响一些基因的表达,被认为是制约酵母生长的物质^[25]。辛酸的含量较大也是低温发酵的一个特征,是酵母在低温胁迫下物质代谢的结果^[26]。由表2可知,三个氮源

组中,碳酸氢铵组中的中链脂肪酸类挥发性成分总含量更高。

酯类挥发性成分分为乙酸酯和乙基酯两类,其中乙酸酯是由醇类物质与乙酰辅酶 A 经由醇乙酰基转移酶催化形成,乙基酯是由醇类物质和脂肪酸经由酰基转移酶催化形成^[27]。乙酸酯和乙基酯分别贡献了果酒的果香和花香,是脐橙果酒中第二大类的挥发性成分。由表 2 知,同组中乙基酯总含量明显大于乙酸酯总含量;其中添加三种氮源的脐橙酒乙酸酯总含量大于空白组,而乙基酯的含量少于空白组。与其他氮源组相比,乙酸酯含量最高的为 DAP 组,乙酸酯含量最高的为硫酸铵组。乙基酯类挥发性成分中仅有壬酸乙酯和十二烷酸乙酯在添加碳酸氢铵组中大于空白组。添加三种氮源的脐橙酒中,乙酸酯含量均大于空白组,这与其他研究一致^[28]。与另外两种氮源组相比,DAP 组中酯类挥发性成分含量相对更高的为乙酸-2-苯乙酯、庚酸乙酯;硫酸铵组中含量相对更高的为乙酸乙酯、癸酸乙酯;碳酸氢铵组中含量相对更高的为乙酸癸酯、壬酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、己酸-3-羟基-乙酯、十二烷酸乙酯。

由表 2 可知,添加碳酸氢铵的低温发酵酒中的醛酮类挥发性成分含量最高。醛酮类物质也具有相应的香气特征^[29],但因总含量较低,一般很难达到其香气阈值,故对果酒的感官品质影响较小。

2.5 不同氮源低温发酵脐橙酒主成分分析

对不同氮源组低温发酵脐橙果酒的香气成分各大类累积量进行主成分分析。由图 5 可知,主成分 1 和主成分 2 贡献率分别为 56.08%、41.20%,累计方差贡献率为 97.28%,能较好的反映数据的整体。由不同氮源组的载荷图知,空白组与主成分 2 有很高的正相关,DAP 组与主成分 2 有很高的负相关,硫酸铵组与主成分 1 有很高的负相关,碳酸氢铵与主成分 1 有很高的正相关。由各类挥发性成分载荷图知,高级醇、萜烯类、醛酮类与主成分 1 有很高的正相关性,说明这三类成分与碳酸氢铵的添加关系密切;乙酸酯类与主成分 2 有很高的负相关性,这说明此类成分与 DAP 添加关系密切;乙基酯类与中链脂肪酸与主成分 2 有很高的正相关性,说明这两类成分与不添加氮源关系密切。

2.6 不同氮源低温发酵脐橙酒 OAV

由表 3 知,在低温发酵脐橙果酒中,挥发性成分含量大于香气阈值的有癸醇、庚醇、辛酸、D-柠檬烯、4-萜烯醇、乙酸癸酯、丁酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯,说明这些物质对果酒的香气贡献较大。高级醇含量较低,而由于癸醇和庚醇的香气阈值也较低,故对香气感官有一定贡献。其中,庚醇在 DAP 和硫酸铵的影响下,OVA 值变小,而在碳酸氢铵的影响下变大。由表 3 可知,癸醇、辛酸、丁酸乙酯、癸酸乙酯的 OAV 降低,说明这些挥发性成分在氮源的影响下对果酒香气贡献变小,其中辛酸和丁酸乙酯在 DAP 组中相较于空白组的减小量更大,癸醇和癸酸乙酯在碳酸氢铵组中相较于空白组的减小量更大;D-柠檬

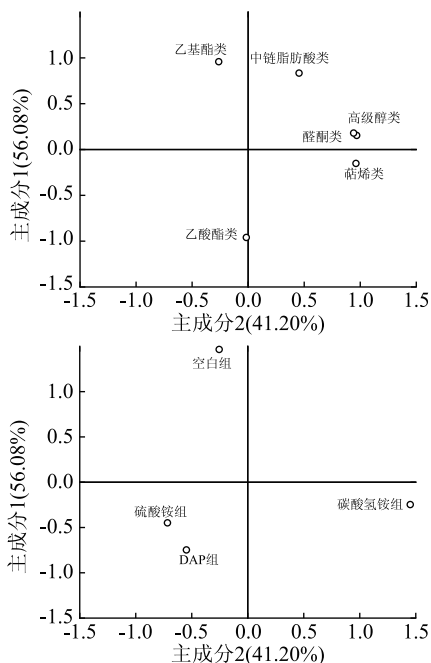


图 5 不同类化合物总量与不同组氮源主成分分析数据图
Fig.5 Principal component analysis data chart of total amount of different types of compounds and different groups of nitrogen sources

烯、4-萜烯醇、乙酸癸酯的 OAV 增加,说明这些挥发性成分在氮源的影响下对果酒香气贡献变大,其中 D-柠檬烯在 DAP 组中相较于空白组增加量更大,4-萜烯醇和乙酸癸酯在碳酸氢铵组中相较于空白组增加量更大。

2.7 不同氮源低温发酵脐橙酒感官评定

由图 6 可知,添加三种氮源的脐橙果酒在青草味、薄荷味、酒精味三种香气特征比较中无明显区别;在柑橘类味、橙味、辛辣味三种香气特征中得分高于未加氮源组,其中硫酸铵与其他组相比,在橘类味和橙味香气特征属性中得分最高;在水果味、花香味、香草味三种香气特征中低于未添加氮源组,且与其他氮源组相比,DAP 组中的水果味香气特征属性得分更高,硫酸铵组中的花香味和香草味得分更高。水果味、花香味是低温发酵的特征香味,添加氮源会削弱这些香气特征,且相较于 DAP 和硫酸铵而言,碳酸氢铵的两种香气特征削弱更明显。

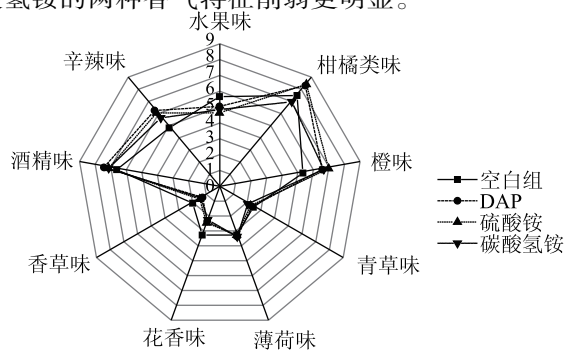


图 6 不同氮源低温发酵脐橙果酒的感官评定
Fig.6 Sensory evaluation of orange fruit wine fermented at low temperature with different nitrogen sources

表3 不同氮源低温发酵脐橙酒 OAV 值

Table 3 OAV of orange wine fermented at low temperature with different nitrogen sources

化合物	OAV				香气阈值 ^[30] (mg/L)
	空白组	DAP	硫酸铵	碳酸氢铵	
1-己醇	0.01	0.01	0.01	0.01	5.37
癸醇	3.30	1.83	2.17	1.61	0.023
庚醇	1.79	1.62	1.46	2.82	0.2
辛酸	8.28	6.92	7.48	8.02	0.5
D-柠檬烯	490.23	501.61	526.20	465.07	0.015
4-萜烯醇	5.02	5.99	5.88	6.39	0.2
乙酸乙酯	0.07	0.11	0.11	0.10	7.5
乙酸癸酯	1.63	2.80	2.60	3.05	0.04
丁酸乙酯	4.65	3.55	4.00	4.15	0.02
辛酸乙酯	10.03	6.55	6.32	6.89	0.582
乙酸-2-苯乙酯	0.52	0.98	0.92	0.76	0.25
壬酸乙酯	0.22	0.19	0.19	0.23	0.27
癸酸乙酯	21.93	10.77	14.05	7.07	0.2
壬醛	0.14	0.13	0.11	0.12	0.27
癸醛	0.08	0.04	0.05	0.04	1

3 结论与讨论

本研究通过对比添加三种氮源与空白组的发酵实验结果发现,磷酸氢二铵、硫酸铵和碳酸氢铵在缩短低温发酵时间与提高酒精含量上具有显著效果,酒精含量可提高 4.6%~5.3%,发酵时间可缩短 22%~56%。这对通过添加氮源的方式,克服低温发酵周期长的缺点,具有一定的参考价值。四种脐橙果酒在不同挥发性成分含量上具有不同特征,且在不同感官属性特征上具有一定的差异性。与其他氮源组相比,添加 DAP 的果酒中乙酸酯类挥发性成分的含量更高,添加硫酸铵的果酒中萜烯类和乙基酯类挥发性成分的含量更高,添加碳酸氢铵的果酒中高级醇类、高级脂肪酸类和醛酮类挥发性成分的含量更高。因此,在选择低温发酵氮源时,需综合考虑酵母的发酵效率和氮源对果酒挥发性成分的影响。

影响酵母发酵的营养物质众多,除本文选择的三种氮源外,还有众多营养素可作为研究对象。如果针对酵母低温发酵时易缺乏的营养素加以补充,则促进酵母发酵效率和缩短低温发酵时间的效果将更好,同时也将有利于果酒风味物质的积累。本文的不足之处在于确定不同氮源添加量时,以酒精度最高作为氮源添加量的参考标准。实际上,同一氮源在不同质量浓度下也会影响其挥发性成分含量和感官评定,需进一步的研究。

参考文献

- [1]程新,董英,苏萍,等.捺菜中低温发酵乳酸菌的筛选及其在茼蒿泡菜生产中的应用[J].中国食品学报,2018,18(4):148-155.
- [2]杨仁琴.低温发酵搅拌型酸乳发酵条件研究[D].扬州:扬州大学,2018.
- [3]原苗苗,赵新节,孙玉霞.低温对葡萄酒香气成分和酵母

代谢的影响[J].食品与发酵工业,2017,43(12):268-276.

- [4]Deed R C, Fedrizzi B, Gardner R C. Influence of fermentation temperature, yeast strain, and grape juice on the aroma chemistry and sensory profile of sauvignon blanc wines [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(40):8902-8912.
- [5]尹晓洁,陈钢,简素平,等.磷酸氢二铵对枣酒发酵性能和挥发性成分的影响[J].食品科学,2018,39(4):132-137.
- [6]Crépin L, Truong N M, Bloem A, et al. Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(5):e02617-16.
- [7]魏铭,赵莱昱,杨航宇,等.不同酵母和氮源对笃斯越橘果酒香气的影响[J].食品科学,2018,39(10):257-262.
- [8]Perez D, Assof M, Bolcato E, et al. Combined effect of temperature and ammonium addition on fermentation profile and volatile aroma composition of Torrontés Riojano wines [J]. Lwt - Food Science and Technology, 2018, 87:488-497.
- [9]张斌,李明阳.荔枝酒低温高糖发酵技术研究[J].酿酒科技,2017(11):51-56.
- [10]傅红雪.添加氮源和维生素对发酵蓝莓酒品质的影响[D].合肥:安徽农业大学,2015.
- [11]郑淑丹.脐橙全果酒的混合发酵及风味物质的研究[D].南昌:南昌大学,2019.
- [12]Hu L L, Wang J, Ji X Y, 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.
- [13]Selli S, Canbas A, Varlet V, et al. Characterization of the most odor-active volatiles of orange wine made from a turkish cv. kozan (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(1):227-234.
- [14]González-marco A, Jiménez-moreno N, Ancín-azpilicueta

(下转第 103 页)

pretreatment plus microbial fermentation and enzymatic hydrolysis on saccharification and lignocellulose degradation of corn straw [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 194: 165-171.

[8] 田朝光, 马延和. 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(10): 1333-1339.

[9] 杨娟, 王艳, 蔡云花, 等. 解淀粉芽胞杆菌对玉米秸秆的降解特性[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(3): 526-533.

[10] 任红梅, 刘左军, 袁惠君, 等. 低温纤维素降解菌的筛选及其产酶研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(19): 127-134.

[11] Ayyappa k S K, Qin W. Recent Developments in using advanced sequencing technologies for the genomic studies of lignin and cellulose degrading microorganisms [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016, 12(2): 156-171.

[12] Sun L, Liu T, Bettina M, et al. The microbial community structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of straw and cellulose in batch tests [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 128.

[13] 张悦, 季静, 关春峰, 等. 秸秆纤维素降解菌的筛选及其产酶特性研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2018, 26(4): 28-37.

[14] 臧晓琳, 张洪芹, 王鑫朝, 等. 放牧对冷蒿根际土壤微生物数量和群落功能多样性的影响[J]. *浙江农林大学学报*, 2017, 34(1): 86-95.

[15] Wei H, Wang L, Muhammad H, et al. Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 333-341.

(上接第98页)

C. Influence of nutrients addition to nonlimited-in-nitrogen must on wine volatile composition [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(4): S206-S211.

[15] 韩东, 李红, 景建洲, 等. 不同氮源与浓度对苹果啤酒发酵及风味的影响[J]. *酿酒科技*, 2015(10): 5-9.

[16] 杨生智, 沈永祥, 曹亚龙, 等. 添加氮源对降低小曲白酒中杂醇油含量的研究[J]. *酿酒*, 2018, 45(6): 64-66.

[17] Bell S, Henschke P A. Implications of nitrogen nutrition for grapes fermentation and wine [J]. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2008, 11(3): 242-295.

[18] Torrea D, Varela C, Ugliano M, et al. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1072-1083.

[19] 曾英杰, 钟秋平, 李从发, 等. 荔枝酒挥发酸控制技术的研究进展[J]. *中国酿造*, 2013(5): 6-9.

[20] Deed R C, Deed N K, Gardner R C. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature during wine fermentation [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 107(4): 1029-1048.

[21] Jiménez-martí E, Agustín A, Mendes-ferreira A, et al. The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds

[16] 萨如拉, 高聚林, 于晓芳, 等. 玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(19): 4082-4090.

[17] 郝哲, 唐叶衡, 耿荣庆, 等. 稻草秸秆饲料中微生物菌株的分离与鉴定[J]. *现代农业科技*, 2018(5): 229-230.

[18] 张建峰. 东北地区秸秆降解工程菌的选育及速腐菌剂的研制[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.

[19] 肖艳萍. 复合微生物秸秆腐熟菌剂的筛选及其对毒死蜱残留的影响[D]. 昆明: 云南农业大学, 2017.

[20] 芦光新. 高寒草地真菌纤维素降解酶系及其对油菜秸秆降解活性的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.

[21] 夏俊. 不同湿地土壤中真菌群落分析以及纤维素降解菌的筛选[J]. *生物化工*, 2018, 4(4): 37-43.

[22] 沈大春. 秸秆堆肥降解菌株分离及降解稻秆效果研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.

[23] 于慧娟, 郭夏丽. 秸秆降解菌的筛选及其纤维素降解性能的研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(2): 58-63.

[24] 李春艳, 于琦, 冯露, 等. 低温纤维素降解菌分离鉴定及产酶条件优化[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 4(10): 74-81.

[25] 袁铭章, 刘树堂, 陈延玲, 等. 16S rDNA 扩增子测序揭示长期定位秸秆还田对土壤细菌群落的影响[J]. *华北农学报*, 2016, 31(6): 157-163.

[26] Ali S, Kandasamy S, Saldias S, et al. Corn and its interactions with bacterial communities [M]. *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*, 2017: 145-163.

[27] 李娜, 韩永武, 金勋, 等. 一株低温秸秆纤维素降解菌的分离、鉴定及降解特性[J]. *玉米科学*, 2019, 27(1): 159-163.

[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007, 92(1): 61-75.

[22] 苑振宇, 王秉钦, 邹海晏. 中国清酒中降低高级醇含量的研究[J]. *酿酒*, 2013, 40(2): 78-79.

[23] Hosoglu M I. Aroma characterization of five microalgae species using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry [J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 1210-1218.

[24] 黄巧娟, 孙志高, 龙勇, 等. D-柠檬烯抗癌机制的研究进展[J]. *食品科学*, 2015, 36(7): 240-244.

[25] 邢建宇, 李春荣, 林挺花, 等. 脂肪酸对酿酒酵母乙醇耐受性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(6): 33-35.

[26] Tronchoni J, Rozès N, Querol A, et al. Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 155(3): 191-198.

[27] 刘峻溪, 王俊芳, 韩爱芹, 等. 葡萄酒中酯类物质的生物合成及其影响因素[J]. *酿酒科技*, 2016(9): 43-47.

[28] Rayne S. Comment on influence of serving temperature and wine type on perception of ethyl acetate and 4-ethyl phenol in wine [J]. *Journal of Wine Research*, 2009, 20(2): 159-166.

[29] Waterhouse A L, Sacks G L, Jeffery D W. Aldehydes, ketones, and related compounds [M]. *Wiley: Understanding Wine Chemistry*, 2016(2): 940-946.

[30] 里奥·范海默特化合物香味阈值汇编[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 1-22.