

红阳猕猴桃酵素发酵工艺优化及其体外抗氧化活性

陈林, 苏珊, 吴应梅, 徐凤莲, 程扬清

(重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆市渝东北特色生物资源开发利用工程技术研究中心, 重庆 404000)

摘要: 本实验以红阳猕猴桃为原料, 羟基自由基清除率(50%)和感官评价(50%)为综合指标, 采用双正交试验优化红阳猕猴桃酵素发酵工艺。首先在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、乳酸菌(*Lactobacillus bulgaricus*和*Streptococcus thermophilus*)、果胶酶和纤维素酶单因素实验基础上通过正交试验优化添加量, 并确定酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶添加量分别为2.0%、2.0%、0.5%和2.0%。然后在此基础上进行初始糖添加量、料液比、发酵温度、发酵时间单因素实验并通过正交试验确定红阳猕猴桃酵素最优发酵工艺条件分别为: 初始糖添加量20%, 料液比1:1.3, 36℃持续发酵35d。最后, 在最优发酵条件下制备红阳猕猴桃发酵产品并测定羟基自由基清除率、感官最佳和综合指标分别为94.33%, 76.33和85.33。试验表明通过正交试验可以优化红阳猕猴桃酵素发酵工艺以及提高产品品质。抗氧化测定发现优化的红阳猕猴桃发酵产品抗氧化活性明显高于自然发酵($p<0.05$), 其羟基自由基清除率、DPPH·和ABTS·⁺自由基清除率分别增加了8.69%、11.89%和36.57%。本研究为推动本地特色红阳猕猴桃深加工产品提供新方法。

关键词: 红阳猕猴桃酵素; 发酵; 正交试验; 羟基自由基清除率; 感官评价

文章编号: 1673-9078(2021)04-224-233

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0840

Optimization of Fermentation Process for Hongyang Kiwifruit Jiaosu and Antioxidant Activity *in Vitro*

CHEN Lin, SU San, WU Ying-mei, XU Feng-lian, CHENG Yang-qing

(Engineering Technology Research Center of Characteristic Biological Resources in Northeast of Chongqing, College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China)

Abstract: The fermentation process of Hongyang kiwi jiaosu produced in Chongqing was optimized by biorthogonal experiment with hydroxyl radical scavenging rate (50%) and sensory evaluation (50%) as comprehensive indexes. Firstly, the addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), lactobacillus (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), pectinase and cellulase were chosen as the independent variables and optimized through the first orthogonal experiments on the basis of single-factor experiments. The addition amounts of yeast, *Lactobacillus*, pectinase and cellulase were determined to be 2.0%, 2.0%, 0.5% and 2.0%, respectively. Then on this basis, the initial amount of sugar, fermentation temperature, fermentation time and solid-liquid ratio were investigated through the second orthogonal test as another part of the independent variables. The optimal technological parameters were as follows: 20% of initial amount of sugar, 1:1.3 of solid-liquid ratio, and fermentation at 36℃ for 35 d, under these conditions the hydroxyl free radical clearance rate, sensory evaluation and comprehensive indexes were 94.33%, 76.33 and 85.33, separately. The results showed that the fermentation process of Hongyang kiwifruit jiaosu could be optimized by the orthogonal experiment. In addition, it was found that the antioxidant activity of the fermentation product was significantly higher than that of the natural fermentation group ($p<0.05$), and the hydroxyl free radical clearance rate, DPPH·, ABTS·⁺ were increased by 8.69%, 11.89% and 36.57%, separately. This study provides a new way to promote the deep processing of Hongyang kiwifruit with local characteristics.

Key words: Hongyang kiwi fruit jiaosu; fermentation; orthogonal test; hydroxyl radical clarity rate; sensory evaluation

引文格式:

陈林,苏珊,吴应梅,等.红阳猕猴桃酵素发酵工艺优化及其体外抗氧化活性[J].现代食品科技,2021,37(4):224-233

CHEN Lin, SU San, WU Ying-mei, et al. Optimization of fermentation process for Hongyang kiwifruit Jiaosu and antioxidant Activity *in vitro* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 224-233

收稿日期: 2020-09-05

基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目(KJQN201901237); 重庆市基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0770); 重庆市人文社会科学重点研究基地三峡库区可持续发展研究中心科学研究项目(2019sxxyjd09)

作者简介: 陈林(1986-), 女, 实验师, 研究方向: 食品开发

猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 原产于中国, 既是一种观赏性和食用性兼具的特殊经济作物, 也是药食同源水果^[1]。猕猴桃含有丰富的糖分和碳水化合物, 维生素 C 含量高 (161.3 mg/g), 并且含有钾、磷、钙、镁等微量元素^[2]。相关研究认为摄入一定量猕猴桃能促进消化、增强免疫力和提高代谢^[3,4]。猕猴桃在中国主要有中华猕猴桃和美味猕猴桃两种系列, 其中红阳、Hort16A、金艳、软枣是中华猕猴桃系列的优质品种^[5-7]。红阳猕猴桃又称红心猕猴桃、红心奇异果, 是由中国四川自然资源研究所对野生猕猴桃单株选育而成的一种稀有优良品种。目前红阳猕猴桃品种仅四川、重庆、贵州、陕西及浙江部分地区种植。与绿肉猕猴桃相比, 红阳猕猴桃果肉香气浓郁、口感香甜, 其后代具有稳定的遗传特征, 抗逆性强、果实大、耐贮藏性好^[8]。

发酵是一个复杂的过程, 微生物将植物中的糖分转化为乙醇、二氧化碳和其他副产物并发挥了积极作用^[9]。发酵不仅能够提高食品的风味和延长货架期, 而且能提高生物功能性, 如促进新陈代谢、调节酸碱平衡、调节肠胃功能、提高免疫力和营养成分利用率等^[10,11]。发酵一方面通过增加植物性食品中酚类化合物和黄酮类化合物含量来提高其抗氧化活性^[12], 另一方面发酵导致植物细胞壁被破坏, 释放抗氧化物质^[13,14]。目前关于猕猴桃发酵相关研究主要集中在纯猕猴桃汁或猕猴桃酒^[15,16], 对于猕猴桃果渣发酵工艺及抗氧化活性和感官分析研究较少。植物性发酵食品在国际市场有广泛的发展空间, 相应的产品也逐渐商业化^[17], 随着发酵产品的快速发展, 发酵产品逐步从饲料扩展到化妆品、药品和食品等行业^[18]。重庆万州地理条件及气候环境适合红阳猕猴桃生长, 本地种植面积和产量处于逐年增长趋势。由于猕猴桃鲜果保质期短且不耐储藏, 本地需要提高猕猴桃深加工产品开发以期提升猕猴桃经济价值和品牌效应。虽然已有不少关于猕猴桃发酵工艺研究报道, 但是不同猕猴桃品种和地域对于发酵有很大影响, 且双正交方法深入探索红阳猕猴桃全果发酵优化工艺尚未有系统报道。因此本研究以新鲜红阳猕猴桃为原料, 以酵母和乳酸菌为复合发酵菌种制备猕猴桃酵素。试验通过双正交方法对其发酵工艺参数进行优化, 并在最优发酵工艺条件下研究酵素产品抗氧化能力和感官评价, 目的获得具有高品质的红阳猕猴桃酵素产品并推动当地特色农产品深加工产品开发。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

红阳猕猴桃采自重庆市万州区走马镇, 经重庆市渝东北特色生物资源开发利用工程技术研究中心鉴定为红阳猕猴桃。鲜果自采摘后 1 h 内被运送到实验室, 常温冷却 2 h 后气调贮藏 (3%~5% O₂+3%~4% CO₂)。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 法国 Sofralab the Oenological 公司; 果胶酶, 南宁庞博生物工程有限公司; 纤维素酶, 宁夏和氏璧生物技术公司; 乳酸菌 (*Lactobacillus bulgaricus* & *Streptococcus thermophilus*), 北京川秀技术公司; 食品级柠檬酸, 河南万邦实业有限公司; 去离子水, 东莞市仟净环保设备有限公司; DPPH、ABTS 等购自北京 Solarbio 科技公司; K₃[Fe(CN)₆], 氨基水杨酸, 无水乙醇等试剂 (分析纯) 购自重庆川东化工集团有限公司。

LRH-300 生化培养箱, 上海百典仪器设备有限公司; A5176024 立式自动压力蒸汽灭菌器, 致微厦门有限公司; FA2004 电子天平, 上海精平科学仪器有限公司; SP-756 紫外可见分光光度计, 上海雅程仪器设备有限公司; PAL-BX 手持糖度仪, 日本 Atago 公司; PH-100A 笔式酸度计, 邦西仪器科技(上海)有限公司。

1.2 实验方法

参考相关文献^[19,20]设计单因素试验, 确定酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶水平范围并进行第一次正交试验, 在其基础上根据相关文献^[21,22]设计初始糖添加量、发酵温度、时间和料液比单因素试验, 接着进行第二次正交试验。根据两次正交试验结果确定红阳猕猴桃酵素发酵工艺优化条件。

1.2.1 酵母添加量

猕猴桃清洗干净后晾干, 连皮混合打碎后分成 5 份, 每份 75 g。猕猴桃果泥分别放入 5 个灭菌的 250 mL 碘量瓶中后每瓶加入 85 mL 蒸馏水。接着每组分别加入 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5% 的酵母。然后每组加入 1.5% 乳酸菌, 0.5% 果胶酶和 1.0% 纤维素酶。所有样品在 36 °C 发酵 21 d, 按照“1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算 (综合指标: 羟基自由基清除率 50%+感官评价 50%), 每组实验重复 3 次。

1.2.2 乳酸菌添加量

样品按照 1.2.1 处理后, 每组分别加入 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5% 的乳酸菌。然后每组加入 1.5% 酵母, 0.5% 果胶酶和 1.0% 纤维素酶。所有样品在 36 °C 发酵 21 d, 按照“1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算, 每组实验重复 3 次。

1.2.3 果胶酶添加量

样品按照 1.2.1 处理后, 每组分别加入 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%和 0.7%的果胶酶。然后每组加入 1.5%酵母, 1.5%乳酸菌和 1.0%纤维素酶。所有样品在 36 °C发酵 21 d, 按照“1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算, 每组实验重复 3 次。

1.2.4 纤维素酶添加量

样品按照 1.2.1 处理后, 每组分别加入 0.3%、0.5%、1.0%、1.5%和 2.0%的纤维素酶。然后每组加入 1.5%酵母, 1.5%乳酸菌和 0.5%果胶酶。所有样品在 36 °C发酵 21 d, 按照“1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算, 每组实验重复 3 次。

1.2.5 初始糖添加量

猕猴桃清洗干净后晾干, 连皮混合打碎后分成 5 份, 每份 75 g。猕猴桃果泥分别放入 5 个灭菌的 250 mL 碘量瓶中每组加入 2.0%酵母, 2.0%乳酸菌、0.5%果胶酶、2.0%纤维素酶后, 每瓶加入 150 g 蒸馏水。分别按照 10%、15%、20%、25%、30%浓度添加蔗糖, 所有样品 36 °C发酵 21 d, 按照“1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算, 每组实验重复 3 次。

1.2.6 发酵温度

猕猴桃按照 1.2.5 处理后, 调节初始 20%糖度。接着分别在 0、12、24、36、48 °C下进行 21 d 发酵, 按照“1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算, 每组实验重复 3 次。

1.2.7 发酵时间

猕猴桃按照 1.2.5 处理后, 调节初始 20%糖度。接着分别在 36 °C下发酵 7、14、21、28、35 d, “1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算, 每组实验重复 3 次。

1.2.8 料液比

猕猴桃洗净、晾干、打碎后, 分别称取 45、60、75、90、105 g 按照 1.2.5 处理后, 调节初始 20%糖度, 分别按照料液比 1:4.5、1:3.1、1:2.3、1:1.7、1:1.3 g/mL 添加蒸馏水。接着 36 °C 下进行 21d 发酵, “1.2.11”“1.2.12”和“1.2.13”方法测定和计算, 每组实验重复 3 次。

1.2.9 发酵菌种和酶添加量正交试验

采用 $L_9(3^4)$ 正交试验^[23], 在单因素试验基础上, 以羟基自由基清除率 (50%) 和感官评价 (50%) 为综合指标, 确定最佳发酵菌种和酶添加量 (表 1)。

表 1 酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶添加量因素水平表 $L_9(3^4)$

水平	酵母/%	乳酸菌/%	果胶酶/%	纤维素酶/%
1	1.0	1.0	0.4	1.0
2	1.5	1.5	0.5	1.5
3	2.0	2.0	0.6	2.0

1.2.10 发酵条件正交试验

表 2 初始糖添加量、发酵温度、时间和料液比的因素水平表 $L_9(3^4)$

水平	初始糖添加量/%	发酵温度/°C	时间/d	料液比/(g/mL)
1	15	24	21	1:2.3
2	20	36	28	1:1.7
3	25	48	35	1:1.3

表 3 猕猴桃酵素液感官评定标准

Table 3 Criteria of sensory evaluation of fermented kiwifruit jiaosu

项目	评价标准	得分 (满分 100 分)
口感 (30)	酸甜爽口、丰满柔和且有回味	20~30
	酸甜适宜, 清淡且无异杂味	10~20
	无酸甜味, 刺激感且有异味	<10
色泽 (25)	色泽均匀, 呈现明亮的绿黄色	15~25
	色泽一致, 呈现黄绿色	10~15
	浑浊且为深黄色	<10
气味 (25)	果香浓郁, 香甜中略有酒味, 无异味	15~25
	略有果香味, 酒味重, 无异味	10~15
	无果香味, 酒精味重且刺激并有异味	<10
形态 (20)	清亮有光泽、稠度适宜	15~20
	清透无光泽, 有明显的浑浊出现	10~15
	出现分成或底部有大量沉淀	<10

采用 L9 (3⁴) 正交试验, 在单因素试验基础上, 以羟基自由基清除率 (50%) 和感官评价 (50%) 为综合指标, 确定最佳发酵工艺条件 (表 2)。

1.2.11 猕猴桃酵素感官评价方法

猕猴桃发酵后通过 120 目纱网过滤后获得猕猴桃酵素液并于 4 °C 保存, 用于感官评价^[21]。感官评定由 20 名 (男女各半) 经过专业培训的成员组成, 对猕猴桃发酵液色泽、形态、香气、口感进行评分 (表 3)。

1.2.12 猕猴桃酵素提取方法

称取 30 g 猕猴桃酵素, 用甲醇-水 (80:20, V/V) 稀释, 接着在 20 °C, 150 r/min 摇匀过夜。最后样品在 4 °C 条件下, 3000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 获得猕猴桃酵素 (后称提取液) 用于抗氧化分析, 选取 0.1 mg/mL Vc 溶液做阳性对照。

1.2.13 羟基自由基清除率测定

羟基自由基测定按照修改过的水杨酸测定方法^[24,25]。取 1 mL 提取液与 1 mL 9 mmol/L FeSO₄ 和 1 mL 8.8 mmol/L H₂O₂ 均匀混合, 放置 10 min 后加入 1 mL 9 mmol/L 水杨酸溶液, 于 37 °C 赋予 30 min, 测 510 nm 吸光度 (A₁)。方法同前, 用蒸馏水替代 1 mL 8.8 mmol/L H₂O₂ 测定溶液吸光度 A₂。蒸馏水代替提取液, 测定吸光度 A₃。提取液羟基自由基清除率计算公式:

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\%$$

1.2.14 DPPH 自由基清除率测定

DPPH 自由基清除率测定方法采用 Kim 方法并稍加修改^[14]。准备三支洁净刻度试管编号, 1 号试管加入 1.6 mL 去离子水, 2 号和 3 号试管均加入 0.5 mL 提取液和 1.1 mL 去离子水。接着 1 号和 2 号试管分别添加 2.1 mL 0.1 mol/L DPPH-乙醇溶液, 3 号试管用 2.1 mL 无水乙醇代替。三支试管在室温避光反应 60 min 后, 517 nm 处测定吸光度, 试管编号对应吸光度。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_1 - A_3}{A_2}\right) \times 100\%$$

1.2.15 ABTS⁺·自由基清除率测定

ABTS⁺·自由基清除率测定方法采用 Re 方法并稍加修改^[22]。首先将 5 mL 7.0 mmol/L ABTS 溶液与 88 μL 2.6 mmol/L K₂S₂O₈ 混合, 避光反应 12~16 h 制备成 ABTS 工作液。然后用 5 mM 磷酸缓冲溶液稀释成在 734 nm 处吸光度为 0.70±0.02。取 0.2 mL ABTS⁺·稀释液与 10 μL 提取液混合, 避光反应 6 min, 在 734 nm 处测定吸光度 A₁, 不含样品测定 ABTS⁺·稀释液吸光度 A₂。ABTS⁺·自由基清除率公式如下:

$$\text{ABTS}^+ \cdot \text{自由基清除率}/\% = \frac{A_2 - A_1}{A_2} \times 100\%$$

1.2.16 数据分析

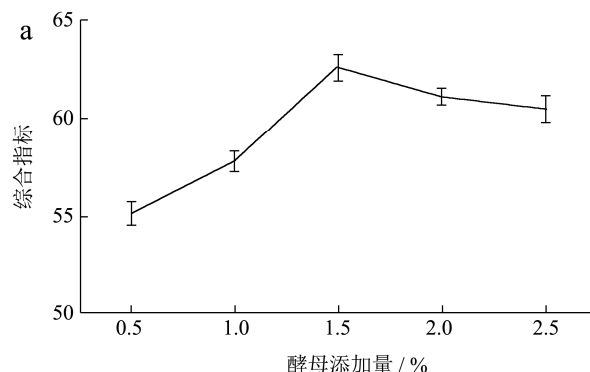
数据首先采用 Microsoft Excel 软件进行统计, 方差分析和显著性分析采用 SPSS version 16.0 统计。每项实验至少进行 3 次, 结果以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 发酵菌种和酶的添加量单因素试验结果

羟基自由基是最具有活性的自由基, 对邻近生物分子具有诱导作用并造成重要损害^[26]。感官评价能对发酵产品所表现出的感官元素做出直观评价。因此猕猴桃酵素的综合指标由羟基自由基清除率 (50%) 和感官评价 (50%) 两个方面组成。

合适的菌种和酶能够有效促进猕猴桃发酵, 张晶等^[27]发现复合菌发酵能提高野生猕猴桃酒风味, 增加醇类、酯类化合物。彭宁等^[22]在猕猴桃酵素工艺条件研究中发现菌种接种量对猕猴桃发酵质量影响最大, 因此本实验首先确定发酵菌种和酶添加量, 通过单因素实验酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶对猕猴桃综合指标的影响。本实验在添加酿酒酵母同时添加乳酸菌共同发酵, 一方面酵母为乳酸菌提高可溶性氮化合物, 另一方面乳酸菌为酵母生长提供适宜的酸环境。纤维素酶和果胶酶能提高植物中大分子物质的分解, 提高发酵效率。已有研究证实猕猴桃的膳食纤维, 尤其是非淀粉多糖几乎全部来自植物细胞壁。同样, 果胶广泛存在于水果细胞壁, 分子量且不容易水影响发酵效率。通过果胶酶和纤维素酶处理的猕猴桃比非酶处理一方面提高大分子物质释放和分解, 另一方面能促进发酵微生物生长活力。图 1 反映了酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶不同添加量对提取液综合指标的影响。发酵初期, 随着菌种和酶添加增加, 综合指标均出现上升趋势, 当酵母添加量为 1.5%, 乳酸菌添加量 1.5%, 果胶酶添加量 0.5% 和纤维素酶添加量 1.5% 时, 综合指标达到最高。



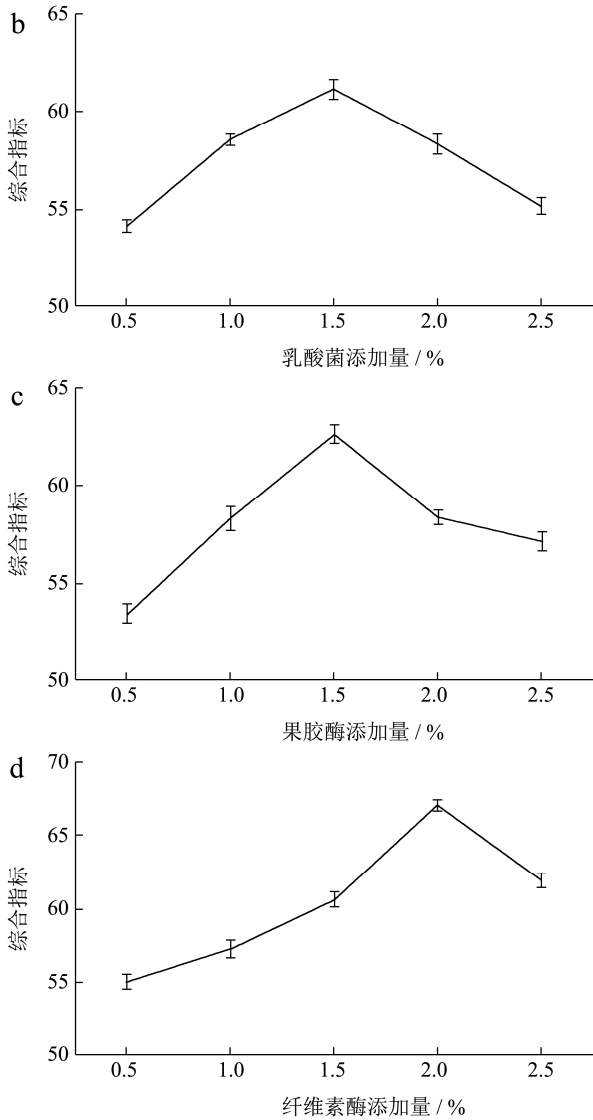


图1 不同发酵菌种和酶添加量下对发酵提取液综合指标的影响

Fig.1 Effect of different fermentation strains and enzyme additions on the aggregate indicator of fermented

2.2 发酵条件单因素试验结果

初始糖添加量为猕猴桃发酵提供必要的碳源, 从图 2a 看到, 随着初始糖添加量的增加, 评价指标逐渐升高, 当初始糖度添加量超过 20%, 菌种生长活性受到限制, 综合指标开始下降。同样, 在发酵环境中, 适宜的温度能促进微生物生长以及各种酶类酶解活性, 有效的释放和合成活性物质, 如黄酮、多酚等。从图 2b 看到, 发酵温度超过 36 °C, 酶活性和微生物生长受到影响。发酵时间是影响发酵物质的重要因素, 从图 2c 看到猕猴桃发酵液综合指标随着发酵时间的变化关系, 发酵第 28 d 指标最高, 因此发酵时间选择范围为 21~35 d。料液比是影响发酵的关键因素之一, 料液比过低抗氧化活性弱, 反之发酵成本增高。

从图 2d 看到, 料液比达到 1:1.7 发酵液综合指标达到最高。

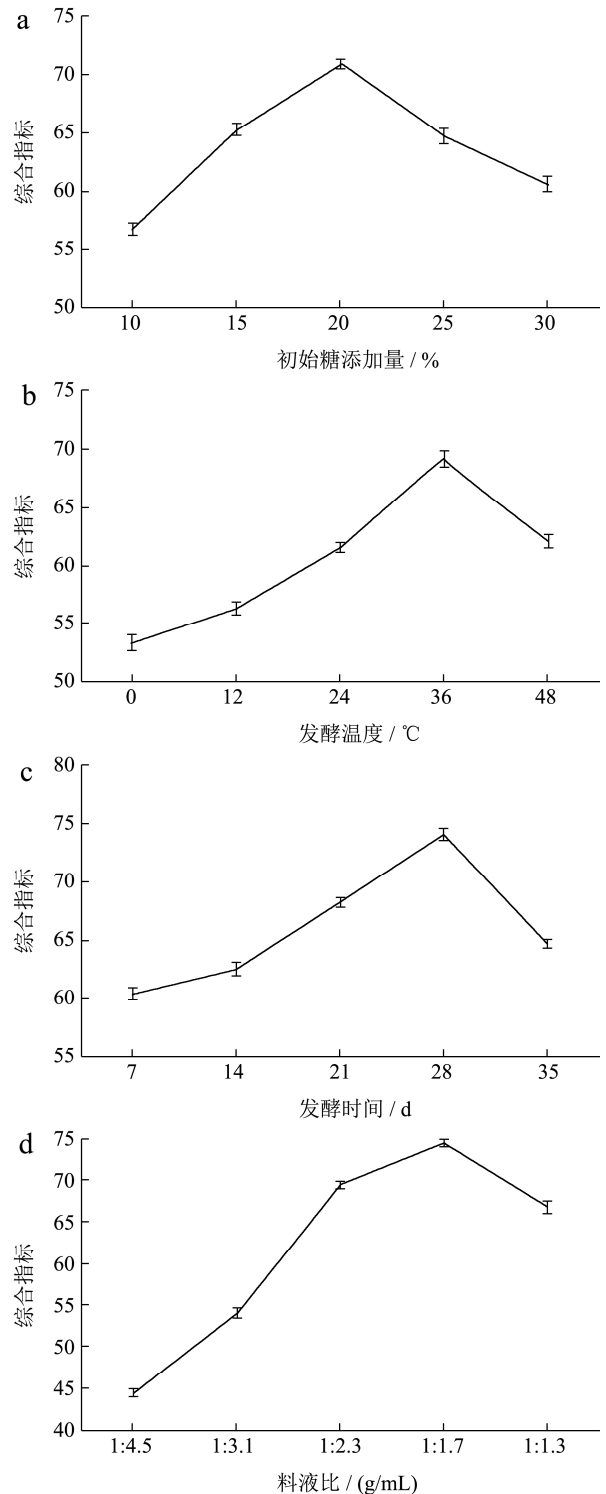


图2 不同发酵条件下发酵提取液的综合指标

Fig.2 Effect of different fermentation condition on the aggregate indicator of fermented

2.3 发酵菌种和酶添加量正交试验结果

根据酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶添加量因素水平表 L₉ (3⁴) (表 1), 以综合指标为评价标准,

进行发酵菌种和酶添加量进行正交试验并对结果进行方差分析, 确定最佳添加量 (表 4、5)。由表 4 可知, 影响羟基自由基清除率的因素, 从主到次为酵母>乳酸菌>果胶酶>纤维素酶; 感官方面影响因素为酵母>果胶酶>纤维素酶>乳酸菌。分别以极值最小的因素为误差项进行方差分析 (表 5), 影响羟基自由基清

除率因素, 酵母与乳酸菌添加量有显著影响; 影响感官评价因素, 酵母有显著影响。对于综合指标, 影响因素为酵母>乳酸菌>纤维素酶>果胶酶, 以极值最小果胶酶为误差项, 酵母和乳酸菌有显著影响, 故确定优化添加量为: 酵母、乳酸菌和纤维素酶各 2.0%, 果胶酶 0.5%。

表 4 猕猴桃酵素发酵菌种和酶添加量正交试验结果

Table 4 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test of addition of strains and enzyme of fermented kiwi fruit

序号	酵母/%	果胶酶/%	乳酸菌/%	纤维素酶/%	羟基自由基清除率/%	感官评价	综合指标
1	1 (1.0)	1 (0.4)	1 (1.0)	1 (1.0)	46.61	53	49.81
2	1	2 (0.5)	2 (1.5)	2 (1.5)	43.85	55	49.43
3	1	3 (0.6)	3 (2.0)	3 (2.0)	48.15	58	53.08
4	2 (1.5)	1	3	2	43.36	60	51.68
5	2	2	1	3	38.74	64	51.37
6	2	3	2	1	36.77	64	50.39
7	3 (2.0)	1	2	3	38.37	69	53.69
8	3	2	3	1	43.95	68	55.98
9	3	3	1	2	36.58	67	51.79
羟基自由基清除率	k1	46.203	42.780	40.643	42.443		
	k2	39.623	42.180	39.663	41.263		
	k3	39.633	40.500	45.153	41.753		
	R	6.570	2.280	5.490	1.180		
感官评价	k1	55.333	60.667	61.333	61.667		
	k2	62.667	62.333	62.667	60.667		
	k3	68.000	63.000	62.000	63.667		
	R	12.667	2.333	1.334	2.000		
综合指标	k1	50.773	51.727	50.990	52.060		
	k2	51.147	52.260	51.170	50.967		
	k3	53.820	51.753	53.580	52.713		
	R	3.047	0.533	2.590	1.746		

表 5 猕猴桃酵素发酵菌种和酶添加量正交试验结果方差分析

Table 5 Variance analysis and parameter estimation of addition of strains and enzyme of fermented kiwi fruit

项目	方差来源	SS	f	MS	F 值	P 值
羟基自由基清除率	酵母	86.461	2	43.231	41.004	<0.05
	果胶酶	8.381	2	4.19	3.975	>0.05
	乳酸菌	51.441	2	25.72	24.296	<0.05
	纤维素酶 (误差)	2.109	2	1.054		
感官评价	酵母	242.667	2	121.333	91	<0.05
	果胶酶	8.667	2	4.333	3.25	>0.05
	乳酸菌 (误差)	2.667	2	1.333		
	纤维素酶	14	2	7	5.25	>0.05
综合指标	酵母	16.568	2	8.284	30.576	<0.05
	果胶酶 (误差)	0.542	2	0.271		
	乳酸菌	12.549	2	6.274	23.158	<0.05
	纤维素酶	4.673	2	2.337	8.624	>0.05

表 6 猕猴桃酵素发酵条件正交试验结果

Table 6 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test of fermentation condition of fermented kiwi fruit

序号	初始糖添加量/%	发酵温度/°C	时间/d	料液比/(g/mL)	羟基自由基清除率/%	感官评价	综合指标
1	1 (15)	1 (24)	1 (21)	1 (1:2.3)	54.95	62	58.48
2	1	2 (36)	2 (28)	2 (1:1.7)	58.88	66	62.44
3	1	3 (48)	3 (35)	3 (1:1.3)	66.35	68	67.18
4	2 (20)	1	3	2	72.64	79	75.82
5	2	2	1	3	73.63	77	75.32
6	2	3	2	1	61.53	75	68.27
7	3 (25)	1	2	3	63.8	74	68.90
8	3	2	3	1	60.78	71	65.89
9	3	3	1	2	63.33	70	66.67

羟基自由基清除率	k1	60.060	63.797	63.970	59.087		
	k2	69.267	64.430	61.403	64.950		
	k3	62.637	63.737	66.590	67.927		
	R	9.207	0.693	5.187	8.840		

感官评价	k1	65.333	71.667	69.667	69.333		
	k2	77.000	71.333	71.667	71.667		
	k3	71.667	71.000	72.667	73.000		
	R	11.667	0.667	3.000	3.667		

综合指标	k1	62.700	67.733	66.823	64.213		
	k2	73.137	67.883	66.537	68.310		
	k3	67.153	67.373	69.630	70.467		
	R	10.437	0.510	3.093	6.254		

表 7 猕猴桃酵素发酵条件正交试验结果方差分析

Table 7 Variance analysis and parameter estimation of fermentation condition of fermented kiwi fruit

项目	方差来源	SS	f	MS	F 值	P 值
羟基自由基清除率	初始糖添加量	135.359	2	67.6795	152.875	<0.05
	发酵温度(误差)	0.885	2	0.4425		
	发酵时间	40.354	2	20.177	45.576	<0.05
	料液比	121.385	2	60.693	137.093	<0.05

感官评价	初始糖添加量	204.667	2	102.3335	307	<0.05
	发酵温度(误差)	0.667	2	0.3335		
	发酵时间	14	2	7	21	<0.05
	料液比	20.667	2	10.333	31	<0.05

综合指标	初始糖添加量	164.556	2	82.278	399.215	<0.05
	发酵温度(误差)	0.412	2	0.206		
	发酵时间	17.528	2	8.764	42.524	<0.05
	料液比	60.538	2	30.269	146.866	<0.05

2.4 发酵条件正交试验结果

在菌种和酶添加量实验结果基础上, 根据发酵条件单因素试验结果, 选取猕猴桃酵素对羟基自由基清除率影响各因素进行正交试验(表 2), 并对结果进行方差分析, 确定最佳发酵条件(表 6、7)。由表 6 可

知, 影响羟基自由基清除率的因素和感官方面影响因素, 从主到次为初始糖度>料液比>发酵时间>发酵温度。分别以极值最小的因素为误差项进行方差分析(表 7), 影响羟基自由基清除率因素和影响感官评价因素, 初始糖添加量、发酵时间和料液比均有显著影响。对于综合指标, 影响因素和显著影响结果与各指标一致,

即初始糖度>料液比>发酵时间>发酵温度,故确定优化发酵条件为20%初始糖添加量,料液比为1:1.3,36℃发酵35d。

2.5 最优发酵工艺验证试验

按照双正交试验结果最佳发酵条件和工艺进行3次验证实验结果表明(表8),优化后猕猴桃酵素的羟基自由基清除率、感官评价以及综合指标分别为94.33%、76.33和85.33,实验结果均高于正交实验测得的结果,表明正交实验获得的红阳猕猴桃酵素在羟基自由基清除率和感官评价方面均得到优化。

表8 猕猴桃发酵工艺验证试验结果

Table 8 Verification test results of fermented Hongyang kiwifruit

试验号	羟基自由基清除率/%	感官评价	综合指标
1	94.92	78	86.46
2	94.86	76	85.43
3	93.2	75	84.1
总计	94.33±0.80	76.33±1.25	85.33±0.97

2.6 猕猴桃酵素抗氧化效果比较

根据最佳发酵工艺制备猕猴桃发酵工艺优化组,以未添加酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶的猕猴桃为对照组。两组猕猴桃均在20%初始糖添加量和料液1:1.3情况下发酵,且工艺优化组发酵温度为36℃,对照组为室温发酵。发酵35d后考察两组羟基自由基清除率、DPPH·和ABTS⁺清除自由基情况。

由于猕猴桃皮渣和籽中含有大量色素、多酚及单宁等物质,对于发酵果汁或酒类的感官有影响,因此关于猕猴桃发酵研究大多围绕猕猴桃汁液,全果发酵工艺相对较少。近年来水果皮渣发酵相关研究逐渐成为热点,其原因为带皮发酵可以提高乙酸、总黄酮、总酚等功效成分含量并且赋予发酵物饱满丰富的香味特征^[28]。另外,有研究发现尽管带渣发酵中总花色苷含量低于清汁发酵,但带渣发酵能促进皮渣中黄酮等物质溶出,显著提高发酵产品总酚含量和抗氧化活性^[29]。从图3看到,经过优化后的猕猴桃酵素羟基自由基清除率、DPPH·和ABTS⁺清除率均增强。与对照组相比,优化发酵后羟基自由基清除率、DPPH·和ABTS⁺自由基清除率分别增加了8.69%、11.89%和36.57%,说明酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶能够有效的提高猕猴桃发酵效率和活力,且全果发酵能够提高发酵物多酚及单宁含量进而增强抗氧化活性^[30]。另外适宜的发酵温度对猕猴桃酵素抗氧化效果起到积极作用。

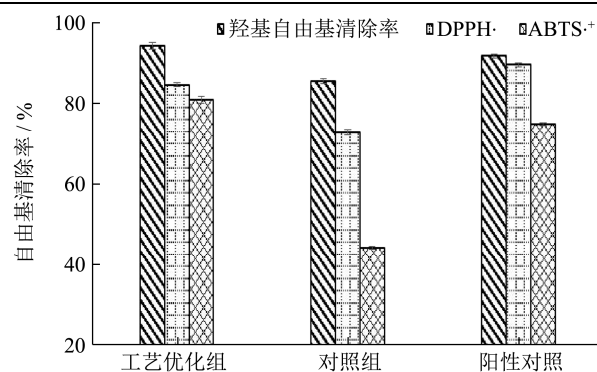


图3 经过工艺优化的猕猴桃酵素抗氧化效果比较

Table 3 Comparison of antioxidant effects of fermentation of Kiwifruit after technological optimization

3 结论

3.1 本试验以羟基自由基清除率(50%)和感官评价(50%)为综合指标,采用双正交实验方法进行猕猴桃发酵工艺优化。本实验首先确定发酵菌种和酶添加量,通过单因素实验酵母、乳酸菌、果胶酶和纤维素酶对猕猴桃综合指标的影响。在此基础上进行正交实验,实验结果表明酵母和乳酸菌为最主要因素,且具有显著性。发酵菌种和酶添加量分别为:2%酵母,2%乳酸菌,0.5%果胶酶和2%纤维素酶。然后在进一步考察发酵最佳条件,通过单因素实验分析初始糖添加量、发酵温度、发酵时间和料液比对猕猴桃综合指标的影响。正交实验结果表明初始糖添加量、发酵时间和料液比为主要因素,且达到显著程度。最佳发酵工艺为20%初始糖添加量,料液比1:1.3(g/mL),36℃发酵35d。优化后猕猴桃酵素的羟基自由基清除率、感官评价以及综合指标分别为94.33%、76.33和85.33,实验结果均高于正交实验测得的结果。优化发酵后测得红阳猕猴桃酵素抗氧化活性发现,羟基自由基清除率、DPPH·和ABTS⁺清除率分别增加了8.69%、11.89%和36.57%,优于自然发酵猕猴桃。

3.2 本试验以猕猴桃全果进行发酵,通过微生物代谢获得具有营养价值和保健功能的猕猴桃酵素产品,可以进一步提升猕猴桃开发利用价值,对重庆特色水果精深加工和当地猕猴桃产业经济效益具有重要意义。另外,红阳猕猴桃发酵过程中各阶段不同成分和活性变化还需要进一步研究和分析。

参考文献

- [1] 齐秀娟,郭丹丹,王然,等.我国猕猴桃产业发展现状及对策建议[J].果树学报,2020,37(5):754-763
QI Xiu-juan, GUO Dan-dan, WANG Ran, et al. Development status and suggestions on Chinese kiwifruit industry [J].

- Journal of Fruit Science, 2020, 37(5): 754-763
- [2] Richardson D P, Ansell J, Drummond L N. The nutritional and health attributes of kiwifruit: a review [J]. European Journal of Nutrition, 2018, 57(8): 2659-2676
- [3] Chandani S R, Lokhande K B, Swamy K V, et al. Data on docking of phytoconstituents of *Actinidia deliciosa* on dengue viral targets [J]. Data in Brief, 2019, 25: 103996
- [4] Wojdyło A, Nowicka P, Oszmiański J, et al. Phytochemical compounds and biological effects of *Actinidia* fruits [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 194-202
- [5] 李小艳,杨红,谢谭秋,等.“金艳”猕猴桃果实生长规律及不同采收期对其品质的影响[J].中国南方果树,2020,49(4):116-121
- LI Xiao-yan, YANG Hong, XIE Tan-qiu, et al. The growth rule of "Jin Yan" kiwi fruit and the influence of different harvest period on its quality [J]. Fruit Trees of South China, 2020, 49(4): 116-121
- [6] 姜存良,贾雯雯,李丹,等.猕猴桃品种'Hort-16A'实生苗果实表型变异研究[J].北方园艺,2020,13:25-32
- JIANG Cun-liang, JIA Wen-wen, LI Dan, et al. Study on fruit phenotype variation of kiwifruit variety 'Hort-16A' [J]. Northern Horticulture, 2020, 13: 25-32
- [7] 程建军,吴晓云,左利娟,等.软枣猕猴桃绿枝扦插技术研究[J].安徽农业科学,2020,13(48):49-50
- CHENG Jian-jun, WU Xiao-yun, ZUO Li-juan, et al. Study on cutting technique of soft Jujube kiwifruit green branch [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2020, 13(48): 49-50
- [8] 王宇,唐冬梅,仲伟敏,等.“红阳”猕猴桃全基因组SSR标记与基因密码子偏性分析[J].西南农业学报,2020,33(5):920-927
- WANG Yu, TANG Dong-mei, ZHONG Wei-min, et al. Genome-wide analysis of SSR markers and codon bias of *Actinidia chinensis* cv. Hongyang [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(5): 920-927
- [9] 陈倩,李永杰,扈莹莹,等.传统发酵食品中微生物多样性与风味形成之间关系及机制的研究进展[J].食品工业科技: 1-10[2021-01-22].<https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070365>.
- CHEN Qian, LI Yong-jie, HU Ying-ying, et al. Relationship and mechanism between microbial diversity and flavor development in traditional fermented foods: a review [J]. Science and Technology of Food Industry: 1-10[2021-01-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070365>.
- [10] Axelle S, Fabienne R, Patrick P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: changes in bioactive compounds during lactic fermentation [J]. Food Research International, 2018, 104: 86-99
- [11] Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation [J]. Food Microbiology, 2013, 33(1): 1-10
- [12] Hur S, Lee S, Kim Y, et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods [J]. Food Chemistry, 2014, 160: 346-356
- [13] Ji D, Udenigwe C C, Agyei D. Antioxidant peptides encrypted in flaxseed proteome: an in silico assessment [J]. Food Science and Human Wellness, 2019, 8(3): 306-314
- [14] Kim A, Kim H, Chun J, et al. Degradation kinetics ofolic content and antioxidant activity of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) puree at different storage temperatures [J]. LWT, 2018, 89: 535-541
- [15] 赵宁,魏新元,樊明涛,等.SPME-GC-MS结合电子鼻技术不同品种猕猴桃酒香气物质[J].食品科学,2019,40(22): 249-255
- ZHAO Ning, WEI Xin-yuan, FAN Ming-tao, et al. Analysis of volatile components of kiwifruit wines made from different cultivars using solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry combined with electronic nose [J]. Food Science, 2019, 40(22): 249-255
- [16] 罗心欣,成雨阳,王周利,等.益生菌发酵猕猴桃汁工艺优化及香气成分动态解析[J].食品科学,2019,40(12):168-175
- LUO Xin-xin, CHENG Yu-yang, WANG Zhou-li, et al. Process optimization the development of fermented kiwifruit juice with probiotics and dynamic analysis of aroma composition [J]. Food Science, 2019, 40(12): 168-175
- [17] Choi J, Han S, Kim H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(7): 1443-1454
- [18] 丁楠,何美珊,戈子龙,等.果蔬发酵制品的功效及应用研究进展[J].食品工业科技,2019,40(7):332-336
- DING Nan, HE Mei-shan, GE Zi-long, et al. Functions and applications of the fermented products of fruits and vegetables [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(7): 332-336
- [19] 张业芳,唐诗,周艳,等.植物乳杆菌发酵对猕猴桃抗氧化物质含量及抗氧化活性的影响[J].中国酿造,2018,37(12):154-159
- ZHANG Ye-fang, TANG Shi, ZHOU Yan, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* fermentation on the antioxidants content and antioxidant activities of kiwifruit [J]. China Brewing, 2018, 37(12): 154-159
- [20] 张宝香,秦红艳,刘迎雪,等.软枣猕猴桃全浆发酵酒工艺优化及成分分析[J].酿酒科技,2017,7:65-69

- ZHANG Bao-xiang, QIN Hong-yan, LIU Ying-xue, et al. Optimization of the production technology of whole-pulp hardy kiwi wine and analysis of its components [J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2017, 7: 65-69
- [21] 左丽丽,任婷婷,勾文哲,等.狗枣猕猴桃果汁加工工艺的优化[J].*粮食与油脂*,2019,32(5):30-33
- ZUO Li-li, REN Ting-ting, GOU Wen-zhe, et al. Optimization of processing technology of *Actinidia kolomikta* juice [J]. *Grain and Oil*, 2019, 32(5): 30-33
- [22] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [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
- ZHANG Jin, ZUO Yong, XIE Guang-jie, et al. Influence of fermentation conditionson the yield of polyphenols in kiwi fruit wine [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(9): 160-163, 167
- [24] Su X, Wang Z, Liu J. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds [J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(4): 681-686
- [25] Zhang K, Deng K, Luo H, et al. Antioxidant properties and phenolic profiles of four Chinese Za wines produced from hull-less barley or maize [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2013, 119(3): 182-190
- [26] 张晶,左勇,谢光杰,等.复合菌发酵对野生猕猴桃果酒风味物质的影响[J].*食品工业科技*,2017,38(19):213-217
- ZHANG Jin, ZUO Yong, XIE Guang-jie, et al. Influence of fermentation conditions on the yield of polyphenols in kiwi fruit wine [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(19): 213-217
- [27] 王静,徐俊南,常婷婷,等.猕猴桃酒发酵过程中营养成分变化及发酵方式对成品酒品质的影响[J].*中国酿造*,2018,37(7): 55-60
- WANG Jing, XU Jun-nan, CHANG Ting-ting, et al. Changes of nutritional composition during kiwi wine fermentation and effects of fermentation methods on the quality of kiwi wines [J]. *China Brewing*, 2018, 37(7): 55-60
- [28] 赵宁,魏新元,樊明涛,等.发酵方法及品种对猕猴桃酒多酚和抗氧化性的影响[J].*食品科学*,2017,38(21):86-92
- ZHAO Ning, WEI Xin-yuan, FAN Ming-tao, et al. Effect of fermentation methods and cultivars on polyphenols and antioxidant activity of kiwi wines [J]. *Food Science*, 2017, 38(21): 86-92
- [29] 彭宁,杨永峰,鲁云凤.猕猴桃酵素生产工艺条件优化[J].*南阳师范学院学报*,2019,18(1):32-37
- PENG Ning, YANG Yong-feng, LU Yun-feng. Optimizing the production conditions of kiwifruit enzyme [J]. *Journal of Nanyang Normal University*, 2019, 18(1): 32-37
- [30] 钟武,王腾腾,张娜威,等.带皮发酵对"金艳"猕猴桃果醋品质的影响[J].*食品科学*,2020,41(22):74-81
- ZHONG Wu, WANG Teng-teng, ZHANG Na-wei, et al. Effect of fermentation with peel on the quality of "Jinyan" kiwifruit vinegar [J]. *Food Science*, 2020, 41(22): 74-81

(上接第 268 页)

- [25] 程津津,吴瑕,高健,等.鹿茸对去卵巢小鼠子宫和阴道增重及雌二醇的影响[J].*实验动物科学*,2012,29(2):8-10
- CHENG Jin-jin, WU Xia, GAO Jian, et al. The influence of pilose antler on sexual organ growth and serum estradiol in ovariectomized female mice [J]. *Journal of Experimental Animal Science*, 2012, 29(2): 8-10
- [26] 臧彬如,周改莲,单国顺,等.超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法测定梅花鹿茸中总游离氨基酸与游离氨基酸含量[J].*医药导报*,2020,39(11):1520-1527
- ZANG Bin-ru, ZHOU Gao-lian, SHAN Guo-shun, et al. Determination of total free amino acids and free amino acids in Sika deer velvet antler by UPLC-QqQ-MS/MS [J]. *Medical Bulletin*, 2020, 39(11): 1520-1527