

文章编号:2095-6002(2013)03-0034-05

引用格式:林晓姿,梁璋成,魏巍,等.葡萄全汁乳酸发酵菌株筛选及其风味分析.食品科学技术学报,2013,31(3):34-38.
LIN Xiao-zi, LIANG Zhang-cheng, WEI Wei, et al. Selection of strains for lactic acid fermented grape juice and flavor analysis. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(3):34-38.

葡萄全汁乳酸发酵菌株筛选及其风味分析

林晓姿^{1,2}, 梁璋成^{1,2}, 魏巍^{1,2}, 李维新^{1,2}, 任香芸^{1,2}, 何志刚^{1,2,*}

(1. 福建省农科院 农业工程技术研究所,福建 福州 350003;

2. 福建省农科院 农产品加工研究中心,福建 福州 350013)

摘要:为葡萄全汁乳酸发酵饮料研制提供优良菌株资源.以“桂葡1号”葡萄果汁为原料,以耐酸性及风味评价为指标,筛选葡萄果汁乳酸发酵的优良菌株,研究优选菌的单菌及复配发酵对果汁风味物质的影响.植物乳杆菌 R23 及副干酪乳杆菌 R37 能耐受 pH 值 3.0 高酸,其发酵香与葡萄果香协调;两菌复配生长是共生型,其发酵风味比单菌更饱满丰富;乳酸发酵增加了葡萄果汁酸、酮、酯类物质的相对含量,增加了酚类和有机酸的成分数量.植物乳杆菌 R23 及副干酪乳杆菌 R37 是葡萄果汁乳酸发酵优良菌株,其复配发酵能赋予葡萄果汁更丰富的发酵风味.

关键词:葡萄果汁;乳酸菌;发酵;风味物质

中图分类号: TS255.4

文献标志码: A

乳酸菌发酵果蔬汁在日美等发达国家已有部分产品研发成功^[1],但国内仅有以花甘蓝、胡萝卜、甜菜、南瓜、番茄等果蔬为原料的实验室研究报道^[2-4],未见葡萄汁乳酸发酵的研究,也鲜见乳酸发酵果汁挥发性风味物质的国内外相关报道.要在较高酸度的全果汁中实现乳酸发酵,就要求所用乳酸菌能适应酸性环境并快速增殖,发酵产生的滋味与风味能与果汁物性协调.现有研究多直接应用乳制品发酵常用菌种,往往需在原料或扩大培养基中添加一定量乳粉来启动乳酸发酵^[4-5],或者仅限于中性或弱酸性发酵基质,产生的滋味与果汁清爽淡雅风格不协调,无法提升果汁饮料风味及营养功能.“桂葡1号”葡萄是适宜南方栽培的优良加工品种^[6],但其果汁酸度较高,可达 0.5%~1.2%,本实验室在针对枇杷果汁乳酸发酵菌株筛选等前期研究基础上^[7-8],筛选适宜葡萄果汁乳酸发酵的优良菌

株,研究优选菌的单菌及复配发酵对果汁风味物质的影响,旨在为南方特色果品的精深加工提供新领域及技术支撑,为饮料市场提供具有功能因子的新型益生菌发酵产品.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 葡萄果汁

“桂葡1号”葡萄,福建省福安产,果实经去梗、破碎、护色、取汁,分装在玻璃发酵瓶中加硅胶塞于沸水浴杀菌 10 min,冷却备用.果汁总酸(以酒石酸计)0.60%,pH 值 3.32,可溶性总糖(以葡萄糖计)19.93%.

1.1.2 乳酸菌

干酪乳杆菌 20986、嗜热链球菌 20379,购自中

收稿日期:2013-01-08

基金项目:福建省科技计划项目(2011R1017-4;2012J01103);福建省财政专项(福建省农业科学院科技创新团队建设基金)(STIFY05).

作者简介:林晓姿,女,副研究员,主要从事农产品贮藏与加工方面的研究;

*何志刚,男,研究员,主要从事农产品贮藏与加工方面的研究.通讯作者.

国工业微生物菌种保藏中心;植物乳杆菌 R23 (*Lactobacillus plantarum* R23)、干酪乳杆菌 R35 (*Lactobacillus casei* R35)^[7]、副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37 (*Lactobacillus paracasei* R37),本实验室选育并保藏。各菌株的培养及发酵温度均为 28 ± 1 °C。

1.1.3 LH16 培养基^[8]

用于乳酸菌的液体保藏。TJA 培养基:番茄汁 50 mL,酵母抽提液 5 g,牛肉膏 10 g,乳糖 20 g,葡萄糖 2 g,磷酸氢二钾 2 g,吐温 80 1g,乙酸钠 5 g,加蒸馏水至 1 L, pH 值为 6.8 ± 0.2 , 121 °C 下灭菌 20 min,用于活菌的平板计数。

1.2 实验方法

1.2.1 种子液制备

供试乳酸菌经活化后,分别接种于液体培养基 LH16,培养 24 h 后至菌量达 10^9 CFU/mL,采用 3 000 r/min 4 °C 离心 10 min,取菌泥加适量预处理葡萄汁振荡悬浮,菌密度达到 10^9 CFU/mL 以上,待用。

1.2.2 乳酸菌的耐酸性实验

将 1.2.1 收集的乳酸菌菌泥用无菌生理盐水洗涤 2 次,并以原体积的十分之一制成悬浮菌,以 1% 的接种量分别接种于 pH 值为 2.5,3.0,3.5 的 LH18 培养基中, 28 ± 1 °C 控温培养 4 h,每 2 h 取样进行活菌计数,平行 3 次取平均值。

1.2.3 葡萄全汁乳酸发酵风味评价方法

将 1.2.1 制备的种子液,分别以 10^7 CFU/mL 的生物量接入葡萄果汁中, 28 °C 控温培养,感官评判发酵风味变化。

1.2.4 目标菌株共生发酵

将植物乳杆菌 R23、副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37 按 1.2.1 制备种子液,分别将 2 株单菌株,以及 2 菌株按接种体积比 1:1 复配菌,按 10^7 CFU/mL 的生物量接入葡萄全汁中, 28 ± 1 °C 控温培养,每 12 h 检测发酵果汁菌体生物量。

1.2.5 目标菌株发酵风味评判与组分测定

将 1.2.1 制备的种子液,分别以 10^7 CFU/mL 的生物量接入葡萄汁中, 28 ± 1 °C 控温培养,以未发酵葡萄果汁为对照,选取发酵风味最佳时期进行感官评判,并定性检测挥发性风味物质。

1.3 检测方法

1.3.1 风味评判^[7,9]

从果香、发酵香、滋味和典型性四个角度来考察,分别赋予 20 分,40 分,20 分,20 分的权重,最后以各项的总和加权计算。请 12 个经培训过的专业

人士进行独立打分,取平均值统计分析。发酵样品按其得分分为 5 级。一级为 90 ~ 100 分,特点为有葡萄果香,发酵香浓郁,滋味好,风格独特,优雅无缺;二级为 80 ~ 89 分,特点为有葡萄果香,发酵香较浓郁,滋味好,典型明确,风格良好;三级为 70 ~ 79 分,特点为有葡萄果香,发酵香一般,滋味较好,有典型性,不够怡雅;四级为 60 ~ 69 分,特点为葡萄果香淡,发酵香不明显;五级分值小于 60 分,特点为香气及滋味均不愉快。

1.3.2 菌落总数测定

参照 GB/T 4789.35—2003[食品卫生微生物学检验—乳酸菌饮料中乳酸菌检验],平板菌落计数法。

1.3.3 挥发性风味物质测定

参考文献[10]方法改进。

1) 样品前处理。取 200 mL 样品,分别用 100, 50, 30 mL 的重蒸 2 遍的二氯甲烷萃取 3 次,合并有机相,用无水硫酸钠脱水干燥,浓缩至 5 mL,旋转蒸发仪浓缩至 1 mL, -40 °C 保存。

2) 检测条件。采用 Agilent 7980A/5975C 型气质联用系统,色谱柱 HP-FFAP (改性聚乙二醇柱,极性) 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 mm。色谱条件:载气 He 气,进样口温度 250 °C,柱温采用程序升温,60 °C 保留 5 min,以 5 °C/min 升至 240 °C,保留 10 min 恒流 (1 mL/min),不分流进样。质谱条件:离子源温度为 230 °C,四级杆温度为 150 °C,电离方式为 EI 源。

1.4 数据处理

各实验重复 3 次,数据采用 DPS 软件处理,表 1 是 3 次实验的平均值,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;图 1 至图 4 及表 2 是其中一次典型实验的测定和评价值,样品中各未知挥发性成分经 NIST08 谱库检索定性,定量分析采用面积归一法。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的耐酸能力比较

各菌株耐酸能力见表 1。植物乳杆菌 R23、副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37 和干酪乳杆菌 R35 均能在 pH 值 3.0 的环境下维持生长,其中 R23 和 R37 在 pH 值 2.5 的环境下培养 4 h 的生物量仍高于 10^5 CFU/mL,显著高于其他各菌 ($P < 0.01$)。干酪乳杆菌 20986 在 pH 值为 2.5 的环境下培养 4 h 后生长受限,而嗜热链球菌 20379 则全部死亡。结果表明,植物乳杆菌 R23 和副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37

对高酸环境的耐受能力最强,适用于较高酸度果蔬汁的乳酸发酵。

表 1 菌株耐酸能力对比

Tab. 1 Comparison of acid tolerance capacity among strains

		lgCFU/mL		
菌株	t/h	pH		
		3.5	3.0	2.5
R23	0	8.891±0.021	8.891±0.021	8.891±0.021
	2	8.767±0.011	8.556±0.012	6.106±0.009
	4	8.853±0.002	8.512±0.013	6.204±0.055
R37	0	8.605±0.011	8.605±0.011	8.605±0.011
	2	8.505±0.013	8.603±0.018	7.504±0.033
	4	8.750±0.017	8.690±0.033	5.606±0.005
R35	0	8.806±0.007	8.806±0.007	8.806±0.007
	2	8.754±0.013	8.597±0.017	3.000±0.005
	4	8.831±0.011	8.547±0.015	ND
20986	0	8.412±0.012	8.412±0.012	8.412±0.012
	2	8.483±0.033	7.283±0.014	6.223±0.022
	4	8.824±0.016	6.512±0.015	3.205±0.005
20379	0	8.304±0.017	8.304±0.017	8.304±0.017
	2	8.183±0.024	3.442±0.045	ND
	4	8.317±0.011	ND	ND

注:表中数据是 3 次实验的平均值,数据以 $x \pm s$ 表示;“ND”表示未检测到

2.2 乳酸菌发酵风味的比较

葡萄果汁接种不同乳酸菌控温培养过程的发酵风味变化见图 1。不同发酵菌株均能赋予发酵基质典型性的发酵香气,参考陶永胜等^[11]对葡萄酒香气特征描述,感官评价认为植物乳杆菌 R23 含有淡雅绵长的白脱香,副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37 赋予典型性突出的树脂香,均与葡萄果香协调,分别在发酵 2 d 和 3 d 获得最佳发酵风味,风味值可达 93~94 分。嗜热链球菌 20379 可能是因为对 pH 值为 3.32

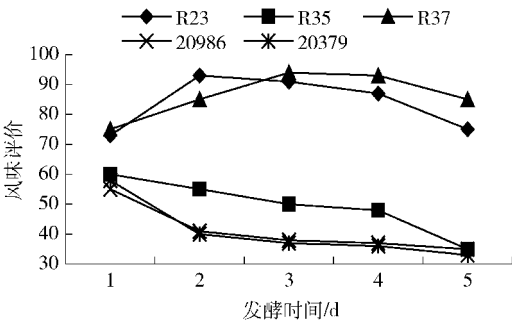


图 1 葡萄全汁乳酸发酵风味评判
Fig. 1 Evaluation of flavor of lactic acid fermented grape juice

葡萄全汁的高酸抗逆性较差,生长受到抑制,无法产生良好发酵风味,干酪乳杆菌 R35、干酪乳杆菌 20986 则产生了奶臭味或腐土味等与葡萄果香不协调的风味。

耐酸实验(表 1)和风味评价(图 1)结果表明,植物乳杆菌 R23 和副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37 应用于葡萄果汁发酵,可生产与葡萄果香协调的愉快发酵香,是葡萄果汁乳酸发酵的优良菌株。

2.3 优选菌株复配发酵生长模型

植物乳杆菌 R23、副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37 的单菌株及其复配菌在葡萄果汁中的生长曲线见图 2。两菌株及复配菌在葡萄果汁中均能快速进入对数增长期,生长稳定期可维持 120 h 以上,生长曲线均符合 Gauss 模型。实验结果表明:两菌株复配在葡萄汁中可共生发酵,其菌量对数值 Y 与发酵时间 X 的回归方程为: $Y = 8.9482 \times (1 - 0.205279 \times \text{EXP}(-0.003087 \times X^2))$ ($F = 193.2086, P < 0.01$)。

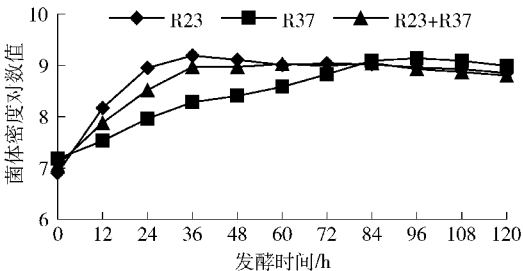


图 2 优选菌株的生长曲线
Fig. 2 Growth curve of capable strains

2.4 优选菌株风味评价

植物乳杆菌 R23、副干酪乳杆菌副干酪亚种 R37 的单菌株及其复配菌的发酵风味评分见图 3,最佳风味收获期的风味值达 93~96 分,复合菌发酵糅合了两单菌特点而更显愉快饱满,且与果香协调。实验结果表明:复配菌在葡萄汁中的发酵风味集合了两菌株各自特点而更具优势,具有理想应用前景。

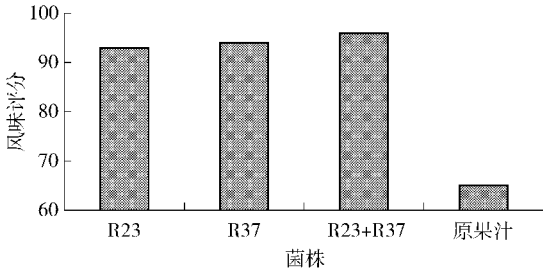


图 3 优选菌株及其配伍菌的发酵风味
Fig. 3 Fermentation flavor of capable strains and their symbiosis

2.5 发酵菌株对挥发性风味物质的影响

采用 GC-MS 法定性检测发酵及未发酵葡萄果汁挥发性风味物质的总离子流色谱图见图 4, 结果见表 2. 葡萄果汁以酯类和芳香族物质为主, 乳酸发酵主要增加了酸、酮、酯类物质的相对含量比例, 酚

和酸有新增的组分. 植物乳杆菌 R23 发酵产生的风味物质数量最多, 各单株发酵及其复合菌发酵所产生的挥发性风味物质组成不同, 形成各具特色的发酵风味, 其主要特征风味物质的定性定量分析鉴定待另文发表.

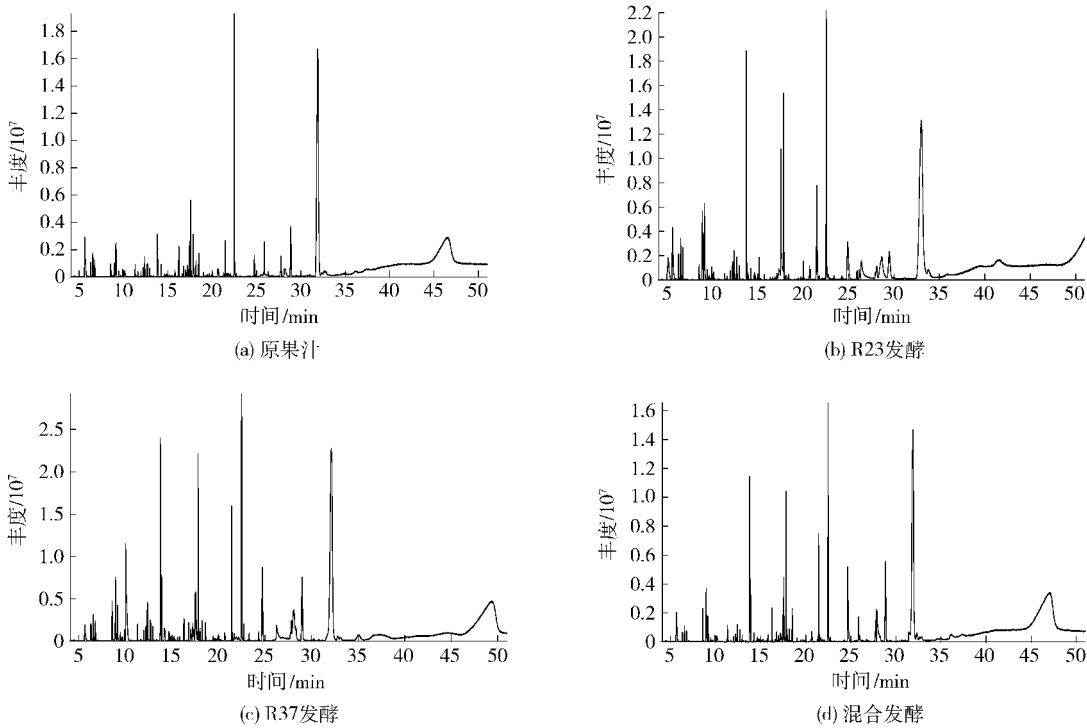


图4 葡萄乳酸发酵果汁 GC-MS 总离子流色谱

Fig. 4 Total ion contents of volatile components emitted from lactic acid fermented grape juice by GC-MS

表 2 葡萄乳酸发酵果汁中的主要挥发性成分含量

Tab. 2 Relative contents of volatile components emitted from lactic acid fermented grape juice

挥发性风味物质		CK	R23	R37	R23 + R37	挥发性风味物质		CK	R23	R37	R23 + R37
酮	相对含量/%	8.92	15.6	9.1	11.63	酚	相对含量/%	8.36	5.55	6.96	4.79
	数量/个	4	5	4	4		数量/个	3	5	4	5
酯	相对含量/%	39.2	41.3	42.5	44.42	烷烃	相对含量/%	8.06	8.75	9.87	6.44
	数量/个	5	5	5	5		数量/个	12	12	12	10
醇	相对含量/%	2.84	3.48	2.37	2.15	酸	相对含量/%	0.84	2.41	5.21	6.13
	数量/个	6	5	4	5		数量/个	2	3	3	3

3 结论与讨论

大部分水果的物性都偏酸,尤其是南方特色果品枇杷、葡萄等果汁的 pH 值往往低于 4.0,有机酸丰富,而乳糖等碳源缺乏. 现有研究多直接应用酸奶发酵菌,添加乳粉或者人为降低果汁酸度,以启动乳酸发酵,但破坏了果汁的自然风味与滋味. 本实验室自选的植物乳杆菌 R23 与副干酪乳杆菌副干

酪亚种 R37 均是 MLF 乳酸菌,具有耐酸能力好,可利用天然有机酸为碳源,发酵香与原果香协调,增殖能力强^[12]等优点,可获得树脂香型或淡雅白脱香的自然清爽乳酸发酵果汁,均是葡萄果汁乳酸发酵适宜菌株.

不同乳酸菌发酵果汁产生的发酵风味和滋味存在差异,能形成与原果香协调的发酵香的乳酸菌才是适宜发酵菌株. 植物乳杆菌 R23 与副干酪乳杆菌

R37 能改变葡萄果汁的风味物质组成,促进果汁风味复杂性的形成,两菌株复配发酵是友好共生型,风味与单菌发酵各有特色,可通过优化复配比例得到更理想的发酵风味。

乳酸发酵改变了果汁所含酸、酮、酯类等物质组成及其成分数量^[9],形成了复杂多样的风味和滋味体系^[13],可通过定性定量鉴定其特征代谢产物建立相应的指纹图谱,为乳酸发酵果汁新产品提供真、假、伪、劣的鉴定依据。

参考文献:

- [1] Beverini M, Lacorre C, Francois A, et al. Probiotic enriched and low organic acid food products; United States, 13224716[P]; 2008.
- [2] Champagne C P, Savard T, Barrette J. Production of lactic acid bacteria on spent cabbage juice[J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2009, 7(2): 82 - 87.
- [3] Yoon K Y, Woodams E E, Yong D H. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria[J]. Lwt-food Science and Technology, 2005, 38(1): 73 - 75.
- [4] 孟宪军,朱继英. 乳酸发酵复合蔬菜浆的工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(1):87 - 89.
- [5] 李湘利,刘静. 乳酸菌发酵法生产金丝枣饮料的研究[J]. 中国酿造,2006,165(12):71 - 73.
- [6] 魏巍,李维新,何志刚,等. 闽引葡萄“桂葡1号”酿造特性研究[J]. 福建农业学报,2011,26(2):265 - 268.
- [7] 林晓姿,梁璋成,何志刚,等. 枇杷汁乳酸发酵优良菌株筛选及其发酵特性研究[J]. 热带作物学报,2011,32(3):550 - 553.
- [8] 林晓姿,梁璋成,何志刚,等. 植物乳杆菌 R23 酵解枇杷汁有机酸的动态分析[J]. 中国食品学报,2011,11(3):187 - 191.
- [9] 高晗. 红枣乳酸发酵饮料加工工艺研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [10] 孟祥敏,刘乐全,徐怀德,等. 不同木瓜果实香气成分的 GC-MS 分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(8):125 - 130.
- [11] 陶永胜,孙汉文,彭传涛. 我国几个产区不同年份干红葡萄酒香气特征的差异[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2012,30(6):31 - 39.
- [12] 张菊华. 乳酸菌发酵番茄 胡萝卜复合蔬菜汁工艺研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2005.
- [13] 范利华,杨洁彬,张境,等. 乳酸发酵番茄汁、胡萝卜汁风味物质的研究[J]. 食品与发酵工业,1993(2):18 - 24.

Selection of Strains for Lactic Acid Fermented Grape Juice and Flavor Analysis

LIN Xiao-zi^{1,2}, LIANG Zhang-cheng^{1,2}, WEI Wei^{1,2}, LI Wei-xin^{1,2}, REN Xiang-yun^{1,2}, HE Zhi-gang^{1,2,*}

(1. Institute of Agricultural Engineering and Technology, Fujian Academy of

Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Agricultural Product Processing Research Centre, Fujian Academy of

Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: This study was conducted to provide high quality resources of lactic acid bacteria for lactic acid fermented grape juice. With "Guipu No. 1" grape juice used as raw material and acid tolerance capacity and flavor evaluation used as indexes, several strains of lactic acid bacteria were screened. The effects of capable strains and their symbiosis on flavor components of fermented juice were also investigated. It was shown that *Lactobacillus plantarum* R23 and *Lactobacillus paracasei* R37 could tolerate acid up to pH3.0, generating fermented aroma which harmonized with fruit aroma. The combination of *Lactobacillus plantarum* R23 and *Lactobacillus paracasei* R37 was symbiotic style, producing more abundant flavor than that of each strain. Lactic acid fermentation increased the relative contents of acids, ketones and esters in grape juice, in which some phenols and acids were produced as well. *Lactobacillus plantarum* R23 and *Lactobacillus paracasei* R37 were capable strains for lactic acid fermented grape juice, which were endowed with richer fermented flavor by their symbiotic fermentation.

Key words: grape juice; lactic acid bacteria; fermentation; flavor components

(责任编辑:叶红波)