

Lactobacillus Fermentum 发酵降酸对三华李汁品质的影响

袁星星^{1,2}, 余元善², 吴继军², 肖更生², 徐玉娟², 邹波²

(1. 江西农业大学食品科学与工程学院, 江西南昌 330045) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 本文分析了三华李汁发酵乳杆菌发酵降酸期间乳酸菌活菌数、糖组分、有机酸、pH、可滴定酸、总酚、抗氧化活性、花色苷、色泽的变化规律。结果表明, 在 30 °C 的条件下, 发酵乳杆菌缓慢生长, 发酵 6 d 后, 菌种数量趋于稳定; 发酵期间, 菌株对糖的利用较缓慢, 仅利用少量的葡萄糖维持代谢生长, 而对苹果酸的消耗较快。随着苹果酸的大量消耗以及少量乳酸的生成, 三华李汁的 pH 值快速上升, 可滴定酸含量迅速下降; 发酵 8 d 后, 菌种数量由初始的 7.01 log CFU/mL 增加到 7.91 log CFU/mL, 苹果酸被完全消耗, 葡萄糖保留 73.82%, 果糖保留 97.7%, pH 值上升了 0.38, 可滴定含量下降了 43.7%, 总酚保留 82.23%, 抗氧化活性 (ORAC 值) 升高了 14.90%, 花色苷保留 50% 以上, 三华李汁的色泽变化不显著 ($p>0.05$)。因此, 利用乳酸菌发酵三华李汁, 不仅能够降低三华李汁酸度, 而且很好地保留了三华李本身的营养成分。

关键词: 三华李汁; 乳酸菌; 降酸; 发酵; 品质

文章编号: 1673-9078(2016)11-134-138

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.021

Effect of Deacidification by Fermentation with *Lactobacillus fermentum* on the Qualities of Plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sanhua) Juice

YUAN Xing-xing^{1,2}, YU Yuan-shan², WU Ji-jun², XIAO Geng-sheng², XU Yu-juan², ZHOU Bo²

(1. College of Food Science & Food Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China) (2. Sericultural & Agri-Food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou, 510610, China)

Abstract: The changes in the viable count of *Lactobacillus fermentum*, sugar component, organic acids content, pH value, titratable acid content, total phenolic content, antioxidant capacity, anthocyanin content, and color of the Sanhua plum juice during the deacidification by fermentation with *L. fermentum* were investigated in this paper. The results showed that the *L. fermentum* grew slowly in the plum juice at 30 °C, and its population appeared to be stable after six days of fermentation. During the fermentation, *L. fermentum* consumed the sugar in the plum juice slowly, using only a small amount of glucose to maintain its metabolism and growth, while consuming malic acid rapidly. With the depletion of malic acid and production of a small amount of lactic acid, the pH of the plum juice increased quickly with a rapid reduction in the total titratable acid content. After eight days of fermentation, the population of *L. fermentum* in the plum juice increased from 7.01 log CFU/mL to 7.91 log CFU/mL, the malic acid was completely consumed, while 73.82% of the glucose and 97.7% of the fructose remained. The pH value increased by 0.38, titratable acid content reduced by 43.7%, while 82.23% of the total phenolics remained. The antioxidant activity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value) increased by 14.90%, 50% of anthocyanin remained, and no significant changes ($p>0.05$) were observed in the color of the juice sample. Hence, the use of *L. fermentum* for the fermentation of Sanhua plum juice can not only reduce the acidity of the plum juice, but also retain the nutrient content of plum juice well.

Key words: Sanhua plum juice; lactic acid bacteria; deacidification; fermentation; quality

收稿日期: 2015-12-15

基金项目: 广东省自然科学基金研究团队项目 (2015BAD31B03); 广东省特支计划科技创新拔尖青年人才项目 (2014TQ01N120); 广州市科技计划项目 (2014Y2-00099)

作者简介: 袁星星 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 徐玉娟 (1974-), 女, 研究员, 研究方向: 农产品深加工

三华李 (*Prunus salicina* Lindl cv. Sanhua) 为蔷薇科李属植物, 因最早栽种于广东韶关翁源县三华乡而得名, 是广东十大优稀水果之一^[1]。据中医理论认为, 李味甘酸, 性凉, 具有清肝涤热、生津液和利小便之功效, 特别适合于治疗胃阴不足、口渴咽干、大腹水肿与小便不利等症状。三华李肉中含有花色苷使其呈紫红色, 肉厚核小, 肉质爽脆, 是优良的制汁和制酒材料, 目前三华李在国内主要是鲜食及加工成李干、李脯、蜜饯与糖水罐头等传统食品, 对加工成原果汁和浓缩汁的研究较少, 国内仅见李升峰等分析了三华李原汁的生产工艺及营养成分^[2], 刘永吉等研究了高花色苷含量的三华李浓缩果汁加工条件^[3]。

三华李中含有丰富的有机酸, 主要是苹果酸。苹果酸对口感的酸性刺激比柠檬酸强, 因此, 三华李原汁直接饮用时口感欠佳, 往往需要进行调配处理。一些研究表明, 很多乳酸菌能利用苹果酸—乳酸发酵 (malolactic fermentation, MLF) 途径将苹果酸 (二元酸) 转变为乳酸 (一元酸), 达到降酸的效果, 且乳酸相比苹果酸更加柔和、圆润, 能够带给饮料更美好的风味, 同时增加果汁的益生功能^[4]。

项目组前期从青梅果中筛选出一株能高效降解柠檬酸的乳酸菌, 经生理生化和 16S rDNA 法鉴定为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*), 该菌株能在不消耗 (或仅微弱消耗) 果汁中可转化糖的情况下优先代谢果汁中的柠檬酸和苹果酸来维持生长代谢^[5]。Yu 等 (2015) 报道了茶枝柑果汁经该菌株轻微发酵后其果汁的糖酸比显著提高, 并且其营养品质也得到很好的保留^[6]。目前, 仍未见有关于通过乳酸菌发酵降酸的方式来提高三华李汁营养和感官风味的相关研究。因此, 本文分析了三华李汁经发酵乳酸菌发酵期间其乳酸菌活菌数、糖组分、有机酸、pH、可滴定酸、总酚、抗氧化活性、花色苷与色泽等品质的变化规律, 以期在三华李汁乳酸发酵饮料的研发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三华李, 产地为广东清远; 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*), 本实验室保藏; MRS 肉汤, 广东环凯微生物科技有限公司; 技术琼脂粉, 广东环凯微生物科技有限公司; 焦性没食子酸, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

LLJ-206J 型多功能料理机, 江门市贝尔斯顿电器

有限公司; UV 1800 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; PB-10 型 pH 计, Sartorius 公司; UltraScan VIS 型全自动色差仪, 美国 HunterLab 公司; Infinite M200PRO 型酶标仪, 瑞士 TECAN 公司; Agilent 1200 series 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; PX-250B-Z 型生化培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; YXQ-LS-50S 型立式蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌活化复壮

在灭菌后的 MRS 肉汤中接入发酵乳酸菌的保藏培养物, 30 °C 下静置培养 18 h。

1.3.2 三华李汁的乳酸菌发酵

三华李经洗净、捅核、打浆 (不加水) 和热杀菌 (85 °C, 30 s) 冷却后, 在无菌条件下接种乳酸菌 (接种量约为 7.01 log CFU/mL), 置于 30 °C 的培养箱中静置培养, 每隔 2 d 取样用于微生物和其它理化品质参数的分析。

1.3.3 乳酸菌活菌数的测定

采用稀释倒平板法, 具体原理和步骤参考 GB 4789-2010 中乳酸菌菌落总数的测定方法^[7]。

1.3.4 糖组分的测定

糖的测定采用 HPLC 法测定^[6]。色谱柱: Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm×250 mm) 色谱柱; 柱温: 30 °C; 检测器: 蒸发光 (ELSD) 检测器; 流动相: 乙腈:H₂O (V/V)=3:1; 流速: 1.0 mL/min。进样量为 10 μL, 并采用外标 (葡萄糖、果糖和蔗糖为标准品) 法定量。

1.3.5 有机酸的测定

有机酸的测定采用 HPLC 法测定^[6]。色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6×250 mm) 色谱柱; 柱温: 30 °C; 检测器: 二极管阵列检测器; 流动相: 0.1 mol/L (NH₄)₂HPO₄ (pH=2.70); 流速: 1.0 mL/min; 吸收波长: 210 nm。进样量为 10 μL, 并采用外标 (苹果酸、乙酸、乳酸和柠檬酸为标准品) 法定量。

1.3.6 pH 和可滴定酸的测定

pH 值用 pH 计直接测定。可滴定酸按照 GB/T 15038-2006 《葡萄酒、果酒通用分析方法》^[8], 采用直接滴定法测定, 总酸度以柠檬酸计。

1.3.7 总酚含量的测定

采用福林酚法测定^[9], 结果以没食子酸当量表示。

1.3.8 抗氧化能力的测定

抗氧化能力的测定采用氧自由基吸收能力 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) 法测

定^[10], 结果以 Trolox 当量(TE)表示。

1.3.9 花色苷的测定

果汁样品(1.5 mL)与 8.5 mL 的甲醇(含 1% HCl, V/V) 混合、超声提取 15 min 后离心取上清液用于花色苷含量的测定, 按照参考文献中的 HPLC 分析条件测定样品中的花色苷含量^[9], 并采用外标(矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-芸香苷为标准品)法定量。

1.3.10 色差的测定

采用全自动色差仪测定^[10], 色差值以 L^* 、 a^* 、 b^* 和 ΔE^* 表示。

1.4 统计分析

所有的不同处理均重复三次, 数据结果采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差分析(Duncan's multiple range tests), 数值以平均值±SD 表示, 并用 Origin 8.5.1 软件制图。

2 结果与讨论

2.1 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中乳酸菌

活菌数的变化

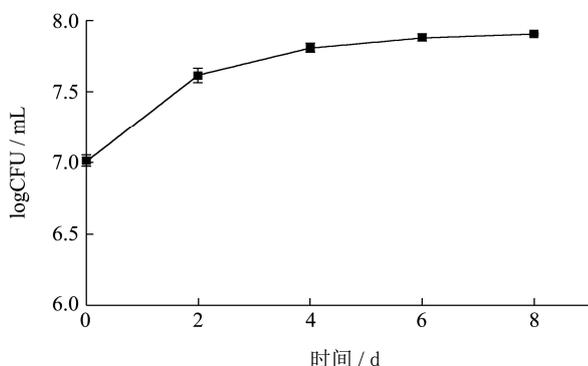


图 1 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中乳酸菌活菌数的变化
Fig.1 Changes in the viable counts of *L. fermentum* in Sanhua plum juice during fermentation with *L. fermentum*

图 1 表示发酵期间三华李汁中乳酸菌的生长情况。由图可知, 发酵乳杆菌在三华李汁中缓慢生长, 发酵 6 d 后, 菌种数量趋于稳定, 此时菌种数量由初始的 7.01 log CFU/mL 增加到 7.91 log CFU/mL。一些研究表明, 在果汁的乳酸菌发酵中, 果汁的种类对乳酸菌的生长速率有显著的影响, 很多乳酸菌在荔枝汁^[10]、龙眼汁^[11]和柑橘汁^[6]中生长较好, 而在桑果、蓝莓和石榴汁等花色苷含量高的果汁中生长较缓慢, 接种后的延滞期较长, 可能原因是水果中含有的花色苷或其它酚酸类物质对乳酸菌的生长产生抑制作用^[9,12]。前期研究也发现, 很多乳酸菌在三华李(含花

色苷) 汁中生长也较缓慢, 因此本研究中发酵乳杆菌的接种量较高, 以此来缩短接种后的延滞期。

2.2 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中糖、有机

酸、pH 和可滴定酸含量的变化

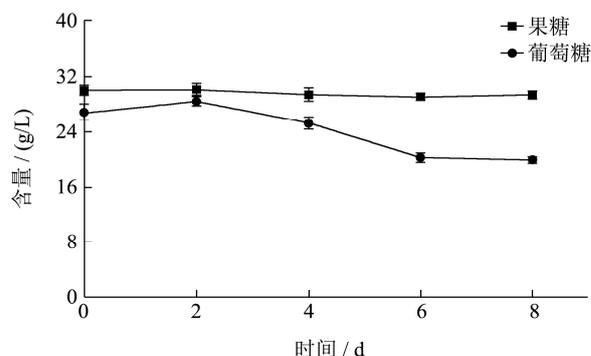


图 2 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中糖含量的变化
Fig.2 Changes in the sugar content of Sanhua plum juice during fermentation with *L. fermentum*

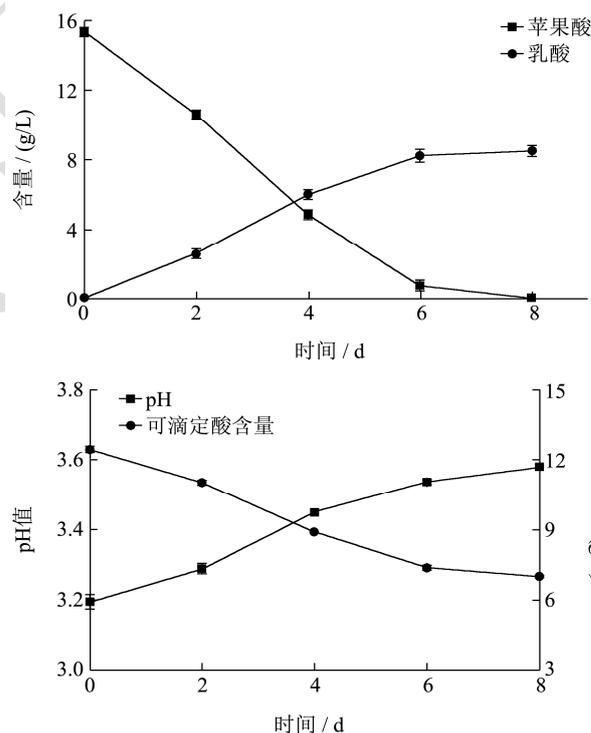


图 3 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中有机酸、pH 和可滴定酸含量的变化
Fig.3 Changes in organic acid content, pH, and titratable acid content of Sanhua plum juice during fermentation with *L. fermentum*

图 2 和图 3 分别表示发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中糖和有机酸含量的变化。由图可知, 果糖和葡萄糖是三华李汁中的主要糖组分, 分别为 30.01 g/L 和 26.86 g/L; 苹果酸是其主要有有机酸组分, 含量高达

15.33 g/L。发酵前 2 d, 三华李汁中糖组分的含量基本保持不变, 而苹果酸的含量呈现直线下降, 并伴随有乳酸的生成, 说明该菌能在不消化三花李汁中糖的情况下直接利用苹果酸维持缓慢的代谢生长。随着苹果酸含量的下降, 该菌开始利用少量葡萄糖来进行生长代谢; 发酵 6 d 时, 苹果酸已经接近消耗完, 由图 1 可知, 发酵乳杆菌开始进入稳定期, 所需要的能源和碳源较少, 因此葡萄糖含量开始出现轻微下降。发酵 8 d 后, 苹果酸全部消耗完毕, 而果糖和葡萄糖仅分别消耗了 2.33% 和 26.13%。根据苹果酸-乳酸发酵和糖-乳酸发酵代谢的化学平衡原理^[4], 三华李汁中的苹果酸如果全部通过 MLF 途径代谢, 代谢完后应该至少有 10.29 g/L 的乳酸生成, 而发酵 8 d 后仅有 8.47 g/L 的乳酸生成, 上述研究结果进一步表明该菌株能将三华李中的苹果酸部分转化为碳源用于菌体的生长, 同时发酵糖生成乳酸的代谢能力较弱。

发酵 8 d 后, 虽然有乳酸生成, 但苹果酸的消耗量明显高于乳酸的生成量, 导致三华李汁的 pH 值由起始的 3.20 升至 3.58, 可滴定酸含量由起始的 12.44 g/L 降至 7.02 g/L。上述结果表明, 三华李汁经过发酵乳杆菌发酵后, 能达到很好的降酸效果。目前, 电渗析和钙盐沉淀是对于高酸水果降酸的普遍方法^[13]。在果酒发酵过程中, 乳酸菌的苹果酸-乳酸发酵和裂殖酵母的乙醇发酵也是降酸和提高 pH 的常用方法^[14]。本研究中, 发酵乳杆菌显示出很大的将苹果酸作为碳源和能源的能力, 因此该菌株在高酸食品中具有很大的降酸潜力。

2.3 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁的总酚和抗氧化活性变化

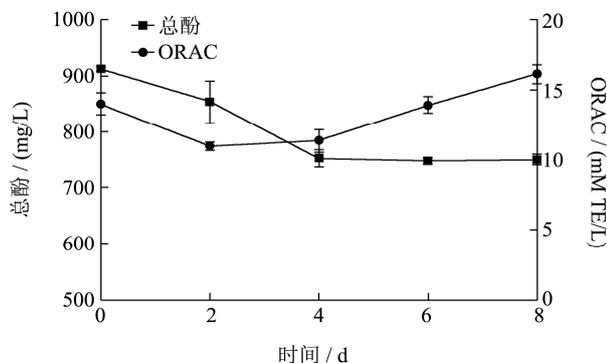


图 4 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中总酚和抗氧化活性的变化

Fig.4 Changes in total phenolic content and antioxidant capacity of Sanhua plum juice during fermentation with *L. fermentum*

图 4 表示发酵乳杆菌发酵期间三华李汁总酚和抗氧化活性的变化。由图 5 可知, 发酵前 4 d, 总酚含量快速下降, 而发酵后 4 d 则基本趋于稳定。发酵前期总酚的快速下降可能与果汁的多酚类物质被残留的氧气氧化有关^[9,10]。一些研究表明, 果汁中多酚类物质是抗氧化活性的主要物质, 多酚类物质的变化与抗氧化活性呈现明显的正相关性。在本研究中, 发酵的前 2 d, 抗氧化活性也随着多酚含量的下降而呈明显的下降趋势, 而发酵 2 d 后, 抗氧化活性则呈现缓慢的上升趋势, 可能与发酵后期部分乳酸菌细胞衰亡胞外一些抗氧化物质的释放有关^[5,12]。

2.4 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁的花色苷变化

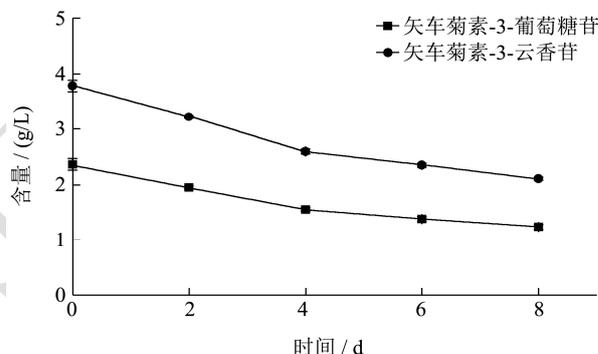


图 5 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁中花色苷的变化

Fig.5 Changes in the anthocyanin content of plum juice during fermentation with *L. fermentum*

图 5 表示乳酸菌发酵期间三华李汁花色苷含量的变化。由图 5 可知, 三华李中花色苷主要为矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-云香苷, 随着发酵的进行, 矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-云香苷含量均出现缓慢减少, 且两者减少的趋势基本保持一致, 发酵前 4 d 降低较快, 后 4 d 较为迟缓, 发酵 8 d 后, 矢车菊素-3-葡萄糖苷含量保留 52.88%, 矢车菊素-3-云香苷含量保留 55.87%。研究表明, 花色苷易受温度、pH、氧化作用、糖类等因素影响而失去活性^[3], 但矢车菊素类花色苷在 pH 值为 3~4 时变化不大, 由图 3 可知, 三华李汁发酵过程中 pH 值由 3.20 变化至 3.58, 且发酵温度恒定, 所以发酵前 4 d 花色苷下降较快的原因可能是由于花色苷易被氧化, 发酵前期三华李汁中残留的氧气较多, 导致花色苷氧化较快, 随着氧气被乳酸菌消耗, 三华李汁中的氧气减少, 使得花色苷氧化速率降低。

2.5 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁的色差分

析

表 1 发酵乳杆菌发酵期间三华李汁的色差值变化

Table 1 Change in color value of *Prunus salicina* juice during fermentation with *L. fermentum*

发酵时间/d	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	33.55±0.08 ^d	8.40±0.10 ^a	7.83±0.06 ^d	-
2	33.91±0.01 ^c	8.43±0.16 ^a	8.76±0.06 ^c	1.0±0.01 ^a
4	34.34±0.04 ^b	7.96±0.09 ^b	8.59±0.13 ^c	0.81±0.43 ^a
6	34.34±0.10 ^b	7.92±0.01 ^b	9.21±0.06 ^a	1.06±0.78 ^a
8	34.64±0.20 ^a	7.57±0.10 ^c	8.99±0.03 ^b	1.09±0.83 ^a

注: a、b、c 和 d 表示同一竖行数值之间的显著性差异 ($p < 0.05$)。

表 1 表示发酵乳杆菌发酵期间三华李汁的色差值变化。由表 1 可知,随着发酵时间的延长,三华李汁的 L^* 、 b^* 呈逐渐变大的趋势, a^* 逐渐减小。说明三华李汁亮度逐渐增加,色泽偏向黄色和蓝色。研究表明,大量的单宁类物质的颜色能随着 pH 的变化而变化^[10], 本研究中, pH 值越来越大,某些单宁类物质的颜色可能也发生相应的变化,也有可能是因为果汁中溶入的氧气导致果汁中易氧化的物质发生氧化褐变。整个发酵过程中, ΔE^* 变化不显著,且均小于 1.10,一般认为 ΔE^* 小于 3 时,肉眼难以分辨出样品颜色的变化^[15]。因此,三华李汁发酵前后,没有观察到其颜色发生明显的变化。

3 结论

3.1 三华李汁发酵乳杆菌发酵期间,菌体生长较缓慢,苹果酸首先被消耗产生乳酸,而后利用少量葡萄糖维持生长代谢。发酵结束后,菌种数量由初始的 7.01 log CFU/mL 增加到 7.91 log CFU/mL。

3.2 三华李汁发酵乳杆菌发酵期间,随着葡萄糖、苹果酸的消耗和乳酸的生成,三华李汁的 pH 值快速上升,可滴定酸含量直线下降,能达到较好的降酸效果。发酵 8 d 后,苹果酸完全降解,葡萄糖消耗了 26.14%,可滴定酸含量下降了 43.65%,pH 值上升了 0.38。

3.3 发酵乳杆菌发酵三华李汁 8 d 后,果汁的总酚含量下降 17.76%,而抗氧化活性则增加了 14.9%,果汁中两种花色苷(矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-芸香苷)均保留了 50%以上,且果汁的色差值没有发生明显的变化。

参考文献

- [1] 段翰英,王超,戴雄杰,等.不同巴氏杀菌条件对三华李果汁主要抗氧化成分的影响[J].食品科学,2013,34(21):69-74
DUAN Han-ying, WANG Chao, DAI Xiong-jie, et al. Effect of pasteurization on major antioxidant compounds of sanhua plum juice [J]. Food Science, 2013, 34(21): 69-74
- [2] 李升锋,刘学铭,叶尚,等.三华李原汁的生产工艺及其营养成分分析[J].中国果菜,2005,2:38
LI Sheng-feng, LIU Xue-ming, YE Shang, et al. Analysis of production process and nourishment composition of sanhua plum juice [J]. Cnina Fruit & Vegetable, 2005, 2: 38
- [3] 刘永吉,郭红辉,钟瑞敏,等.高花色苷含量的三华李浓缩果汁加工条件研究[J].食品研究与开发,2013,34(24):139-142
LIU Yong-ji, GUO Hong-hui, ZHONG Rui-min, et al. Study on processing conditions of concentrated sanhua-plum juice rich in anthocyanin [J]. Food Research and Development, 2013, 34(24): 139-142
- [4] Reuss R M, Stratton J E, Smith D A, et al. Malolactic fermentation as a technique for the deacidification of hard apple cider [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(1): C74-C78
- [5] Yu Y, Xiao G, Xu Y, et al. Changes of quality in the fruits of *Prunus mume* during deacidification by fermentation with *Lactobacillus Fermentum* [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(2), M405-M410
- [6] Yu Y, Xiao G, Xu Y, et al. Slight fermentation with *Lactobacillus fermentum* improves the taste (sugar: Acid ratio) of citrus (*Citrus reticulata* cv. chachiensis) juice [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(11): M2543-M2547
- [7] GB 4789.35-2010,中华人民共和国国家标准[S]
GB 4789.35-2010, The national standard of the people's republic of China [S]
- [8] GB/T 15038-2006,中国国家标准化管理委员会[S]
GB/T 15038-2006, Standardization administration of the people's republic of china [S]
- [9] Yu Y, Xu Y, Wu J, et al. Effect of ultra-high pressure homogenisation processing on phenolic compounds, antioxidant capacity and anti-glucosidase of mulberry juice [J]. Food Chemistry, 2014, 153(12): 114-120
- [10] 龚小洁,余元善,徐玉娟,等.乳酸菌发酵对荔枝果渣理化指标的影响[J].现代食品科技,2015,10:257-262
GONG Xiao-jie, YU Yuan-shan, XU Yu-juan, et al. Effect of fermentation with lactic acid bacteria on the quality of litchi pulp pomace [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 10: 257-262
- [11] 龚小洁,余元善,徐玉娟,等.鲜龙眼果肉的干酪乳杆菌发酵

- 特性的研究[J].食品科技,2015,40(6):6-10
- GONG Xiao-jie, YU Yuan-shan, XU Yu-juan, et al. Fermentation characteristic of *Lactobacillus casei* in fresh longan pulp [J]. Food Science and Technology, 2015, 40(6): 6-10
- [12] X Zheng, Y Yu, G Xiao, et al. Changes of anti-glucosidase content and some other characteristics in mulberry juice during fermentation with *Leuconostoc mesenteroides* [J]. Acta Alimentaria, 2014, 43(4), 668-675
- [13] Vera E, Sandeaux J, Persin F, et al. Deacidification of passion fruit juice by electrodialysis with bipolar membrane after different pretreatments [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 90(1): 67-73
- [14] Garcia-Ruiz A, Cueva C, Gonzalez-Rompinelli E M, et al. Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation [J]. Food Control, 2012, 28(2): 212-19
- [15] Cao X, Bi X, Huang, W, et al. Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2012, 16(39): 181-190