

张莉,段浩云,田洪涛,等. 葡萄酒苹果酸-乳酸发酵高耐受性优良植物乳杆菌直投式发酵剂的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):167-171.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.047

葡萄酒苹果酸-乳酸发酵高耐受性优良植物乳杆菌直投式发酵剂的优化

张莉,段浩云,田洪涛,檀建新,程书梅

(河北农业大学食品科技学院,河北保定 071000)

摘要:从葡萄酒二次发酵液中筛选的优良植物乳杆菌 L42 为研究对象,对菌株 L42 的高效直投式发酵剂进行研制。利用单因素试验和正交试验对菌株 L42 最佳增殖培养基、离心条件、冻干保护剂进行优化,得到植物乳杆菌 L42 最佳廉价培养基为番茄汁基础培养基、0.2% K_2HPO_4 、0.5% 胰蛋白胨、1.5% 蛋白胨、2.5% 葡萄糖,培养后活菌数可达到 57.8 亿 CFU/mL,与番茄汁基础培养基相比提高了 8.41 倍;最佳离心条件为 6 000 r/min、10 min,离心后活菌数收得率可达 99.37%;最佳冻干保护剂的配方为 10% 脱脂乳、10% 海藻糖、1.5% 谷氨酸钠、1% 吐温 80、0.5% 酵母浸粉,冻干存活率为 89.01%;冻干后的植物乳杆菌 L42 在 11% 乙醇度、130 mg/L SO_2 、pH 值 3.0 的环境下能够正常增殖,将获得的直投式发酵剂于 4 °C 下保存 11 个月后活菌数仍可达到 10 亿 CFU/mL。

关键词:葡萄酒;植物乳杆菌;离心浓缩;冻干保护剂;直投式发酵剂

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0167-04

苹果酸-乳酸发酵 (MLF) 是乳酸菌以双羧基 L-苹果酸为反应底物,在苹果酸-乳酸酶的作用下,转变成单羧基的 L-乳酸和二氧化碳的过程^[1-2]。经 MLF 作用后,果酒中的苹果酸被分解为乳酸而达到降低酸度作用;同时乳酸菌代谢活动还可以改变果酒中的酯类、醛类、氨基酸、有机酸和维生素等微量成分的含量以及呈香物质的浓度,有利于形成酒体风味复杂性^[3-4]。当葡萄酒酸度较高时,酿造出的葡萄酒口感较酸涩,须要进行 MLF 改善其风味^[5]。

直投式发酵剂 (directed vet set starters, DVS Starters) 是高度浓缩和标准化的冷冻干燥发酵微生物菌种,因使用时不须要活化和扩培处理而受到发酵行业的广泛欢迎。目前,直投式发酵剂在欧美等发达国家得到了广泛应用^[6-7],在葡萄酒生产中得到普遍应用,而国内该领域的相关研究和应用均较少。笔者已经从自然发酵的葡萄酒中筛选得到对乙醇度、 SO_2 浓度、pH 值具有高耐受性的植物乳杆菌 L42,本研究旨在通过单因素和正交试验对植物乳杆菌 L42 的复合增殖培养基、最适离心条件及冻干保护剂进行优化,确定适合葡萄酒二次发酵的优良植物乳杆菌高效直投式发酵剂研制参数。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株来源 菌种为植物乳杆菌 L42,由笔者所在实验室从自然发酵的葡萄酒中分离筛选所得。

1.1.2 培养基 (1) 复原脱脂乳培养基的制备。脱脂奶粉

加蒸馏水制成 14% 复原脱脂乳液,调节 pH 值为 6.5, 0.07 MPa 灭菌 10 min 冷却后备用。

(2) MRS 培养基。牛肉膏 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、葡萄糖 20 g/L、乙酸钠 5 g/L、柠檬酸二胺 2 g/L、硫酸镁 0.58 g/L、硫酸锰 0.25 g/L、吐温 80 1 mL/L、磷酸氢二钾 2 g/L 配制固体培养基时另添加 1.8% 琼脂,培养基均在 115 °C 下灭菌 20 min。

(3) 番茄汁培养基。番茄汁制备工艺为:新鲜番茄、清洗、热烫 (90 ~ 95 °C, 3 ~ 5 min)、榨汁→过滤 (100 目滤布)、调 pH 值至 6.0, 0.07 MPa 灭菌 30 min 备用。

(4) 白菜汁培养基。白菜汁制备工艺为:选取无破损、无霉烂、无虫蛀的新鲜白菜清水洗净、沥干→捣碎、打浆→过滤 (100 目滤布)、调 pH 值至 6.0, 0.07 MPa 灭菌 30 min 备用。

(5) 胡萝卜汁培养基。胡萝卜汁制备工艺为胡萝卜、洗净、去皮及根梢、称质量、切片→煮沸 (料:水 = 1 g : 4 mL, 100 °C, 5 min)→榨汁→过滤 (100 目滤布)→定容 (1 kg 胡萝卜生产 5 L 汁定义为 100% 胡萝卜汁)、调 pH 值至 6.0, 0.07 MPa 灭菌 30 min 备用。

1.1.3 仪器与设备 酸度计, PHS-3C, 上海理达仪器厂; SW-CJ-1FD 型洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; SPX-150B-Z 型生化培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器, 上海三申医疗器械有限公司; JA5002 型电子天平, 上海精天电子仪器有限公司; BCD-210C 华意冰箱, 中国华意电冰箱制造厂; 离心机、冻干机。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 菌种分别经 140 g/L 复原脱脂乳液培养基、液体 MRS 培养基活化, 备用。

1.2.2 廉价增殖培养基的优化

1.2.2.1 基础培养基的确定 将活化菌株按 1% 接菌量分

收稿日期:2015-12-07

作者简介:张莉 (1990—), 女, 河北邢台人, 硕士, 主要从事益生菌研究与开发。E-mail:15200095602@163.com。

通信作者:程书梅, 博士, 副教授, 主要从事微生物、发酵工程研究。E-mail:516089669@qq.com。

别接种于番茄汁、胡萝卜汁、白菜汁基础培养基中,37℃培养24 h,每2 h取样,测定 $D_{600\text{nm}}$ 值,确定最佳收获期,37℃恒温培养至最佳收获期,采用平皿菌落计数法确定最佳基础培养基。

1.2.2.2 增殖因子的筛选 在所选的基础培养基中添加0.2%磷酸氢二钾的基础上分别添加1%大豆蛋白胨、1%胰蛋白胨、1%蛋白胨、1%牛肉膏、0.5%酵母膏、2%乳糖、2%葡萄糖、2%蔗糖、0.5%玉米浆,制成不同增殖培养基,通过活菌数及结果差异显著性比较确定较优营养因子。

1.2.2.3 增殖复合培养基的确定 在单因素试验基础上采用正交试验设计,以活菌数为评价指标,以 $L_9(3^4)$ 正交表(表1)进行试验设计,筛选出增殖复合培养基。

表1 植物乳杆菌L42增殖培养基正交试验因素水平

水平	因素		
	A:胰蛋白胨浓度(%)	B:蛋白胨浓度(%)	C:葡萄糖浓度(%)
1	0.5	0.5	1.0
2	1.0	1.0	2.0
3	1.5	1.5	2.5

1.2.3 乳酸菌浓缩分离技术 植物乳杆菌L42经液体MRS培养基活化,分别以1% (活菌数约0.01亿CFU/mL)接种于番茄汁复合增殖培养基中,37℃恒温培养至对数生长末期,分别采用不同离心力、离心时间浓缩分离菌体细胞,检测不同离心条件下离心前初始活菌数和离心后上清液活菌数、沉淀的活菌数,计算离心损失率、离心存活率、离心收得率,以寻求获得最高菌体收得率的离心条件。离心损失率、离心存活率、离心收得率计算公式如下。

离心损失率 = 上清液活菌数(CFU/mL)/初始活菌数(CFU/mL) × 100% ;

离心存活率 = 沉降细胞活菌数(CFU/mL)/[初始活菌数(CFU/mL) - 上清液活菌数(CFU/mL)] × 100% ;

离心收得率 = 沉降细胞活菌数(CFU/mL)/初始活菌数(CFU/mL) × 100% 。

1.2.4 高效冻干保护剂 脱脂奶粉可作为乳酸菌的冷冻保护剂,糖类也是菌体在冻干时应用较为广泛的保护剂^[8-9],常用作糖类保护剂的主要有葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖。它们共同点是有大量自由基,具有还原性,抗干燥保护能力较强,同时还可抑制菌表面自由基的产生^[10-14];Fuchigami等认为,海藻糖能使菌体内的水形成细小和钝圆的小冰晶,减弱了冷冻时冰晶的机械损伤作用,能稳定细胞膜和蛋白质结构,抗逆保鲜作用较强^[15]。

小分子保护剂,一般具有很强的亲水性,分子结构含有3个以上氢键,在冷冻或干燥过程中,可与菌体细胞膜磷脂中的磷酸基团或菌体蛋白质极性基团形成氢键,保护细胞膜和蛋白质结构与功能的完整性。而大分子保护剂通过包裹形式保护菌体,同时,促进低分子保护剂发挥作用。

1.2.4.1 单因素保护剂的筛选 将活化后的植物乳杆菌L42,以1% (活菌数约0.1亿CFU/mL)接种于番茄汁复合增殖培养基中,37℃恒温培养至对数生长末期,离心收获菌体,以10%脱脂乳为基础保护剂,分别添加单糖类、多糖类、蛋白质类等物质在-20~18℃冷冻12 h,进行真空冷冻干

燥,测定其活菌数计算冷冻存活率及冻干存活率。

1.2.4.2 复合保护剂的筛选 在单因素试验基础上采用正交试验设计,以活菌数为评价指标,以 $L_9(3^4)$ 正交表(表2)进行试验设计,筛选出以10%脱脂乳为基础保护剂的复合保护剂。冷冻存活率、冻干存活率计算公式如下:

冷冻存活率 = 冷冻后细胞活菌数(CFU/mL)/初始活菌数(CFU/mL) × 100% ;

冻干存活率 = 冷冻干燥后细胞活菌数(CFU/mL)/初始活菌数(CFU/mL) × 100% 。

表2 植物乳杆菌L42保护剂筛选正交试验因素水平

水平	因素			
	A:海藻糖浓度(%)	B:谷氨酸钠浓度(%)	C:吐温80浓度(%)	D:酵母浸粉浓度(%)
1	2.5	1.5	0.5	0.5
2	5.0	3.0	1.0	1.0
3	10.0	5.0	1.5	1.5

1.2.5 菌株L42直投式发酵剂耐受性验证 将冻干后的菌株L42直投式发酵剂无菌条件下加入等量4%葡萄糖溶液复溶,以0.1亿CFU/mL的初始菌量,分别接种于不同乙醇度、乙醇度分别为9%、11%、13%; SO_2 浓度分别为70、100、130 mg/L;pH值分别为4.0、3.5、3.0的MRS液体培养基中,30℃恒温培养24 h,采用平板计数法测定不同处理的活菌数。

1.2.6 菌株冻干保护剂贮藏稳定性 将保存于4℃的菌株冻干发酵剂,每隔2个月测定活菌数,观察菌株在保藏期内的活菌量变化,为今后确定其保质期提供依据。

2 结果与分析

2.1 廉价增殖培养基的筛选

2.1.1 基础培养基的确定

2.1.1.1 植物乳杆菌L42的生长曲线 从图1可以看出,在37℃条件下,植物乳杆菌L42在3种基础培养基中培养6 h后细胞生物量开始快速增加,在6~16 h期间,菌体生物量呈对数增长, D 值增长迅速,但胡萝卜汁的增长速度较番茄汁、白菜汁增长缓慢。16 h后菌株L42在3种培养基中均进入生长稳定期,此时 D 值达到最大,并且保持稳定状态。通常细菌在对数增长期的后期,菌体细胞的活性较强,存活率较高,因此,在适宜条件下培养13~16 h是植物乳杆菌L42细胞收获的最佳时期。

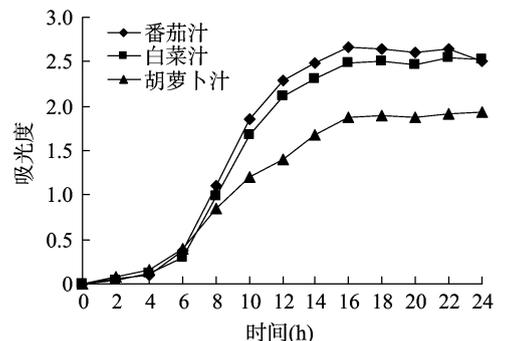


图1 菌株L42在基础培养基中的生长曲线

2.1.1.2 基础培养基的确定 从表3可以看出,植物乳杆菌

L42在3种基础培养基中均能生长,但由于3种基础培养基的营养物质不丰富,其细胞生长量不如MRS培养基,且在3种基础培养基中,菌株在番茄汁基础培养基中的长势最好,说明3种基础培养基中番茄汁最适合菌株的生长,且与其他培养基差异极显著,所以选择番茄汁作为增殖基础培养基。

表3 植物乳杆菌 L42 在不同基础培养基中的生长结果

培养基	活菌数 (亿 CFU/mL)
MRS	29.6Aa
番茄汁	6.94Bb
胡萝卜汁	0.49Dd
白菜汁	2.1Cc

注:同列数据后不同小写、大写字母分别表示差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。表4、表6、表7同。

2.1.2 基础培养基增殖因子的筛选 试验以番茄汁为基础培养基,磷酸氢二钾作为一种缓冲剂添加到番茄汁基础培养基中,再添加不同的增殖因子,以期获得高活菌数,从表4可以看出,添加的不同增殖因子对植物乳杆菌 L42 均有不同的增殖效果,其中1%胰蛋白胨、1%蛋白胨、2%葡萄糖为最佳增殖因子,为植物乳杆菌 L42 提供丰富的氮源和碳源。

表4 番茄汁基础培养基中添加不同的营养物质对植物乳杆菌 L42 细胞生长量的影响

营养物质	pH 值		16 h 活菌数 (亿 CFU/mL)
	0 h	16 h	
MRS	6.50	4.62	61.00Aa
番茄汁	6.00	4.12	6.87Kk
番茄汁+1%大豆蛋白胨	5.78	4.10	19.70Ee
番茄汁+1%胰蛋白胨	5.81	3.91	32.60Bb
番茄汁+1%蛋白胨	5.68	4.11	28.40Cc
番茄汁+1%牛肉膏	5.58	3.98	10.10Ji
番茄汁+0.5%酵母膏	5.67	3.78	11.10Ii
番茄汁+2%乳糖	5.56	3.98	14.20Ff
番茄汁+2%葡萄糖	5.49	3.97	27.70Dd
番茄汁+2%蔗糖	5.61	4.08	11.20Hh
番茄汁+0.5%玉米浆	5.68	3.84	13.30Gg

2.1.3 正交试验筛选植物乳杆菌 L42 番茄汁增殖复合培养基 根据单因素试验结果,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交设计试验,植物乳杆菌 L42 以胰蛋白胨、葡萄糖、酵母膏作为3个因素,参考正交表配制不同的复合培养基,从中优化筛选出植

表6 离心条件对菌体的影响

离心力 (g)	转速 (r/min)	时间 (min)	离心前初始活菌数 (亿 CFU/mL)	离心后上清活菌数 (万 CFU/mL)	离心后沉降活菌数 (亿 CFU/mL)	离心损失率 (%)	离心存活率 (%)	离心收得率 (%)
1 632	4 000	10	31.5	780	27.8	0.248baA	88.47Aa	88.25aA
1 632	4 000	20	31.5	480	28.5	0.152cB	90.61Bb	90.48bB
2 550	5 000	10	31.5	330	30.6	0.105cC	97.24Cc	97.14cC
2 550	5 000	20	31.5	121	31.1	0.038fF	98.76Dd	98.70dD
3 672	6 000	10	31.5	180	31.3	0.057eE	99.42Ee	99.37eE
3 672	6 000	20	31.5	296	27.0	0.094dD	85.79Ff	85.71fF
5 940	8 000	5	31.5	105	28.3	0.033gG	89.87Gg	89.84gG
5 940	8 000	10	31.5	73	28.0	0.023hH	88.91Hh	88.89hH

2.3 冻干保护剂的研究

2.3.1 单因素冻干保护剂的筛选 从表7可以看出,加不同

物乳杆菌 L42 的最佳番茄汁复合培养基。以1%接种量分别接入正交试验所设计的9种复合培养基中,37℃条件下培养16h,进行活菌计数。

从表5可以看出,植物乳杆菌 L42 的3个因素中,最佳培养基配比为 $A_1B_3C_2$ 。即在含有0.2% K_2HPO_4 的番茄汁基础培养基中添加0.5%胰蛋白胨、1.5%蛋白胨、2.5%葡萄糖,植物乳杆菌 L42 经活化后按1%的接菌量接入该复合培养基中于37℃条件下培养16h,活菌数可达到57.8亿CFU/mL,与番茄汁基础培养基相比提高了7.41倍,活菌数也提高了一个数量级。

表5 植物乳杆菌 L42 的复合增殖培养基的确定

试验号	因素			菌数 (亿 CFU/mL)
	A:胰蛋白胨	B:蛋白胨	C:葡萄糖	
1	1	1	1	23.0
2	1	2	2	24.0
3	1	3	3	57.8
4	2	1	2	11.0
5	2	2	3	17.6
6	2	3	1	42.8
7	3	1	3	17.1
8	3	2	1	18.0
9	3	3	2	30.8
k_1	34.933	17.033	27.933	
k_2	23.800	19.867	21.933	
k_3	21.967	43.800	30.833	
R	12.966	26.767	8.900	
较优水平	A_1	B_3	C_3	

2.2 乳酸菌浓缩分离技术

离心浓缩分离细胞是收获菌体的简便方法,多被采用。通过离心试验,可尽量减少残留在上清液中的细胞,也可改善离心力机械作用所造成的伤害,避免细胞死亡,寻求获得活细胞最高收得率的最佳离心条件。从表6可以看出,菌株 L42 离心损失率最高为4 000 r/min、10 min;其次是4 000、20 min,5 000、10 min,6 000、20 min,6 000、10 min,5 000、20 min,8 000、5 min,8 000、10 min,且差异极显著($P < 0.01$)。

菌株 L42 离心收得率由低到为6 000、20 min,4 000、10 min,8 000、10 min,8 000、5 min,4 000、20 min,5 000、10 min,5 000、20 min,6 000、10 min。植物乳杆菌的最佳复合冻干保护剂为6 000 r/min、10 min,离心收得率可达99.37%。

保护剂的冷冻存活率和冻干后存活率差异极显著,因而从大分子糖类中选择海藻糖为最佳冻干保护剂,小分子冻干剂以

谷氨酸钠、吐温 80、酵母浸粉较高,具有抗冷冻作用,为较优冻干保护剂。

表 7 单因素冻干保护剂的筛选

类型	营养基质	存活率(%)	
		冷冻	冻干
大分子	10% 脱脂乳 + 5% 海藻糖	99.41Aa	86.99Aa
	10% 脱脂乳 + 5% 乳糖	97.50Ff	77.19Dd
	10% 脱脂乳 + 5% 葡萄糖	99.08Cc	85.59Bb
	10% 脱脂乳 + 5% 蔗糖	93.68Hh	55.17Gg
小分子	10% 脱脂乳 + 3% 谷氨酸钠	98.59Dd	78.10Cc
	10% 脱脂乳 + 1% 甘油	99.18Bb	46.79Hh
	10% 脱脂乳 + 1% 吐温 80	94.09Gg	61.50Ff
	10% 脱脂乳 + 1% 酵母粉	98.10Ee	75.23Ee

2.3.2 正交试验筛选植物乳杆菌 L42 的最佳复合冻干保护剂 根据单因素试验结果,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交设计试验,以 10% 脱脂乳为基础保护剂,以海藻糖、谷氨酸钠、吐温 80、酵母浸粉为 4 个因素,参考正交表设计不同的复合保护剂,进行真空冷冻干燥试验,结果(表 8)表明,较优复合冻干保护剂为 $A_3B_1C_2D_1$,即 10% 脱脂乳、10% 海藻糖、1.5% 谷氨酸钠、1% 吐温 80、0.5% 酵母浸粉为最佳复合冻干保护剂,冻干存活率为 89.01%。

表 8 冻干保护剂正交试验的结果

试验号	保护剂浓度编码值				冻干存活率 (%)
	A:海藻糖	B:谷氨酸钠	C:吐温 80	D:酵母浸粉	
1	1	1	1	1	83.67
2	1	2	2	2	63.40
3	1	3	3	3	64.08
4	2	1	2	3	71.53
5	2	2	3	1	65.54
6	2	3	1	2	66.44
7	3	1	3	2	69.36
8	3	2	1	3	65.83
9	3	3	2	1	84.11
k_1	70.383	74.853	71.980	77.773	
k_2	67.837	64.923	73.013	66.400	
k_3	73.100	71.543	66.327	67.147	
R	5.263	9.930	6.686	11.373	
较优水平	A_3	B_1	C_2	D_1	

2.4 菌株 L42 直投式发酵剂的耐受性

植物乳杆菌 L42 经冷冻干燥后获得的直投式发酵剂对乙醇、 SO_2 、pH 值仍具有一定的耐受性,在 11% 乙醇、130 mg/L SO_2 、pH 值 3.0 的环境下能够正常增殖且与原始菌株耐受性在同一数量级上(表 9 至表 11)。

2.5 植物乳杆菌 L42 直投式发酵剂保藏期的验证

菌株 L42 冻干发酵剂在 4 °C, 11 个月内活菌数呈下降趋势,但在 11 个月后活菌数依然可以达到 10 亿 CFU/mL,表明选择的发酵剂可以满足直投式发酵剂的活菌数要求,在保证乳酸菌的活菌数方面具有一定的优势,并具有一定的稳定性(图 2)。

3 结论

确定植物乳杆菌 L42 的最佳廉价培养基为番茄汁基础培

表 9 菌株 L42 对乙醇的耐受性

乙醇度 (%)	菌株 L42 直投式发酵剂 (亿 CFU/mL)	原始菌株 L42 (亿 CFU/mL)
9	1.800	2.100
11	0.430	0.052
13	0.037	0.063

表 10 菌株 L42 对 SO_2 的耐受性

SO_2 浓度 (mg/L)	菌株 L42 直投式发酵剂 (亿 CFU/mL)	原始菌株 L42 (亿 CFU/mL)
70	38.0	82.0
100	10.2	61.0
130	5.4	9.8

表 11 菌株 L42 对 pH 值的耐受性

pH 值	菌株 L42 直投式发酵剂 (亿 CFU/mL)	原始菌株 L42 (亿 CFU/mL)
4.0	29.0	53.0
3.5	26.0	34.0
3.0	6.3	8.8

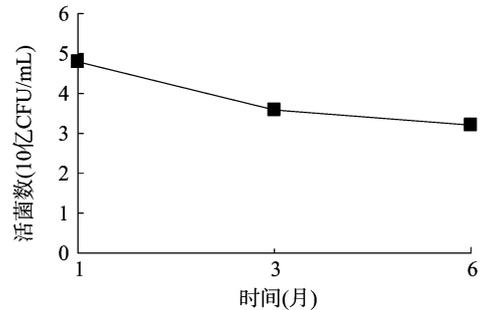


图 2 菌株 L42 冻干发酵剂保藏期的验证

培养基、0.2% K_2HPO_4 、0.5% 胰蛋白胍、1.5% 蛋白胍、2.5% 葡萄糖;最佳离心条件为 6 000 r/min, 10 min;最佳冻干保护剂的配方为 10% 脱脂乳、10% 海藻糖、1.5% 谷氨酸钠、1% 吐温 80、0.5% 酵母浸粉。在此条件下获得的植物乳杆菌 L42 直投式发酵剂进行稳定性研究,结果表明,该菌株直投式发酵剂在 4 °C 条件下保藏 11 个月后活菌数仍可保持在 10 亿 CFU/mL。经冷冻干燥后获得的植物乳杆菌对乙醇、 SO_2 、pH 值仍具有一定的耐受性,在 11% 乙醇、130 mg/L SO_2 、pH 值 3.0 环境下能够正常增殖。

目前,我国大多数葡萄酒厂进行葡萄酒 MLF 依靠进口直投式活性乳酸菌或自然发酵,致使生产成本极大增加、葡萄酒质量很难保证。本研究对葡萄酒二次发酵优良植物乳杆菌 L42 进行高密度培养和直投式发酵剂的制备,为葡萄酒优良乳酸菌 L42 的大规模培养提供依据,对葡萄酒工业生产具有深远意义。

参考文献:

- [1] 李 华. 现代葡萄酒工艺学[M]. 西安:陕西人民出版社,1995: 109-118.
- [2] Davis C R, Wibowo D, Eschenbruch R, et al. Practical implications of malolactic fermentation; a review[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1985, 36(4): 290-301.

林文秋,杨为海,邹明宏,等. 澳洲坚果果皮不同溶剂提取物的含量和抗氧化活性[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):171-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.048

澳洲坚果果皮不同溶剂提取物的含量 和抗氧化活性

林文秋, 杨为海, 邹明宏, 曾 辉, 万继锋, 陆超忠

(中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/农业部热带果树生物学重点实验室, 广东湛江 524091)

摘要:以成熟的澳洲坚果为试验材料,分别选用水和体积分数70%甲醇、70%乙醇与70%丙酮4种溶剂对澳洲坚果的新鲜果皮进行浸提,测定各溶剂提取物的总酚、总黄酮与单宁含量及其抗氧化活性。结果表明,不同溶剂对澳洲坚果果皮中总酚、总黄酮与单宁含量以及 DPPH、ABTS 自由基清除能力与总抗氧化能力方面存在明显差异,以体积分数70%丙酮提取物的总酚、总黄酮与单宁含量最高,分别为(6.63 ± 0.15) mg/g(FW)、(8.65 ± 0.32) mg/g(FW)、(8.80 ± 0.31) mg/g(FW)。其次是70%甲醇、70%乙醇;水提取物的含量最低。相关性分析表明,提取物中的总酚含量与其抗氧化能力显著相关。可见,提取剂的性质明显影响其提取物的酚类物质含量与抗氧化活性。

关键词:澳洲坚果果皮;溶剂提取物;多酚;黄酮;抗氧化活性

中图分类号: S667.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0171-04

澳洲坚果(*Macadamia* spp.)别称夏威夷果,原产于澳洲,属于山龙眼科(Proteaceae)澳洲坚果属(*Macadamia* F. Mull)常绿乔木果树,被誉为世界“干果之王”,以富含多种不饱和脂肪酸为主要特点,还含有蛋白质、矿质元素和维生素等,具有较高的营养价值和保健功效。作为一种新兴的高档坚果类果品,澳洲坚果在国际市场上供不应求,具有广阔的市场前

景。近年来,中国澳洲坚果产业得到迅猛发展,目前种植规模已达652 km²,年产带壳果约9 700 t^[1]。

澳洲坚果果实主要由果皮、种壳和果仁组成,其初加工的主要副产物为约占果实鲜质量的1/2的果皮和约占带壳果质量的2/3种壳。当前国内外对澳洲坚果果仁的营养成分^[2-5]与保健价值^[6-7]、种壳的功能性组分^[8-10]及开发利用^[11-13]等方面的研究报道较多,但对果皮内含物的研究仅见于不同种质果皮的粗蛋白、可溶性糖、单宁及矿质元素含量的测定与分析^[14-15],至今尚未见有果皮酚类物质及其抗氧化活性研究的报道。本试验采用水和体积分数70%甲醇、70%乙醇与70%丙酮4种溶剂浸提澳洲坚果果皮,研究不同溶剂提取物的总酚和总黄酮含量及其抗氧化活性的差异,旨在探讨适宜获得澳洲坚果果皮中天然抗氧化物质的提取溶剂,为开发和利用澳洲坚果果皮这一副产物资源提供理论依据。

收稿日期:2015-11-25

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务专项(编号:1630062014012、1630062014001);广东省云浮市星火科技计划(编号:201402-8)。

作者简介:林文秋(1989—),女,硕士,主要从事果树栽培与生理研究。E-mail:linwenqiu1989@163.com。

通信作者:杨为海,男,博士,副研究员,主要从事果树栽培与生理研究。E-mail:seayang2004@126.com。

[3]朱宝镛. 葡萄酒科学与工艺[M]. 北京:中国轻工业出版社,1992:17-18.

[4]张春晖,王 华,李 华. 苹果酸-乳酸发酵对干红葡萄酒品质的影响[J]. 西北农业大学学报,1999,27(6):74-78.

[5]朱宝镛. 葡萄酒工业手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995:170-172.

[6]Vinderola C, Mocchiutti P, Reinheimer J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products [J]. Journal of Dairy Science,2002,85(4):721-729.

[7]Crittenden R, Bird A, Gopal P, et al. Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia - Pacific region [J]. Current Pharmaceutical Design,2005,11(1):37-53.

[8]吴雁军,刘松玲,郭慧媛,等. 直投式乳酸菌发酵剂活性影响因素的研究进展[J]. 中国乳业,2011,113(5):52-55.

[9]Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals[J]. International Journal of Pharmaceutics,2000,203(1/2):

1-60.

[10]徐致远,刘 荣,郭本恒,等. 保护剂在乳酸菌冻干过程中的应用[J]. 乳业科学与技术,2006,29(4):155-157,165.

[11]万红兵. 高效浓缩型酸奶冻干发酵剂制备关键技术研究[D]. 保定:河北农业大学,2006.

[12]翟硕莉. 新鲜软质干酪发酵剂及发酵工艺研究[D]. 保定:河北农业大学,2007.

[13]Bynum D G, Barbano D M. Whole milk reverse osmosis Retentates for cheddar cheese manufacture; Chemical changes during aging[J]. Journal of Dairy Science,1985,68(1):1-10.

[14]于修维. 乳酸菌高密度培养及浓缩型发酵剂研究[D]. 南京:南京工业大学,2004.

[15]Fuchigami M, Ogawa N, Teramoto A. Trehalose and hydrostatic pressure effects on the structure and sensory properties of frozen tofu(soybean curd) [J]. Innovation Food Science&Emerging Technologies,2002,3(2):139-147.