



费永涛,刘东杰,罗子淳,等. 植物乳杆菌 R-1 对发酵柠檬果汁风味和营养物质的影响[J]. 轻工学报, 2024,39(3):29-37,53.  
FEI Y T, LIU D J, LUO Z C, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* R-1 on flavor and nutrient substances of fermented lemon juice[J]. Journal of Light Industry, 2024,39(3):29-37,53. DOI:10.12187/2024.03.004

# 植物乳杆菌 R-1 对发酵柠檬果汁风味和营养物质的影响

费永涛<sup>1,2</sup>, 刘东杰<sup>1,2</sup>, 罗子淳<sup>1</sup>, 杨晨<sup>1</sup>, 张智坤<sup>1</sup>, 马路凯<sup>1,2</sup>, 刘功良<sup>1,2</sup>, 肖更生<sup>1,2</sup>

- 仲恺农业工程学院 轻工食品学院, 广东 广州 510225;
- 仲恺农业工程学院 农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室/  
广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东 广州 510225

**摘要:**以植物乳杆菌 R-1 为发酵菌种发酵柠檬果汁,测定发酵过程中柠檬果汁的活菌数、营养物质含量、抗氧化能力和挥发性风味物质含量,探究植物乳杆菌 R-1 对发酵柠檬果汁风味和营养物质的影响。结果表明:植物乳杆菌 R-1 在柠檬果汁中具有较好的发酵特性,在发酵 36 h 后活菌数达到最高值( $4 \times 10^8$  CFU/mL),此后趋于稳定;在发酵过程中,植物乳杆菌 R-1 能降低柠檬果汁中的总糖和有机酸含量,提高总酚含量,在发酵 48 h 时,总酚含量从最初的 47.4 GAE mg/mL 显著增加到 174.3 GAE mg/mL,同时,发酵柠檬果汁的抗氧化能力(对 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除能力)显著提高( $P < 0.05$ );植物乳杆菌 R-1 还能改变柠檬果汁中挥发性风味物质的种类和含量,尤其是 D-柠檬烯、 $\gamma$ -松油烯等柠檬精油中的特征萜烯类风味物质,其相对含量在发酵 24 h 时达到最大值,感官评价结果也显示,此时发酵柠檬果汁在香味和口感方面均优于其他发酵时间点的样品。因此,植物乳杆菌 R-1 能很好地利用柠檬果汁中的营养物质进行生长代谢,并改善柠檬果汁的风味,提高其总酚及抗氧化功能物质的含量。

**关键词:**植物乳杆菌;发酵柠檬果汁;挥发性风味物质;营养物质;抗氧化能力

**中图分类号:**TS255.44 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2024)03-0029-10

## 0 引言

柠檬是兼具营养价值与药用价值的水果,富含柠檬酸、维生素 C、黄酮类、挥发油、橙皮苷、微量元素等<sup>[1]</sup>,具有杀菌、降低胆固醇、预防坏血病和心血

管动脉硬化等功效<sup>[2]</sup>。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)对果蔬汁具有较好的适应性,被广泛应用于发酵苹果汁<sup>[3-4]</sup>、泡菜<sup>[5]</sup>、葡萄酒<sup>[6]</sup>等发酵果蔬制品的生产。植物乳杆菌在代谢过程中能分泌多种酶,一方面可水解释放酚类物质,另一方面可将酚类

收稿日期:2023-09-15;修回日期:2023-11-09;出版日期:2024-06-15

基金项目:“十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2024KJ15);广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室项目(2021B1212040013);2021年仲恺农业工程学院大学生创新基金项目(S202111347048);广东省驻镇帮镇扶村科技特派员项目(粤科涵农字[2021]1056号)

作者简介:费永涛(1990—),男,山东省济南市人,仲恺农业工程学院讲师,博士,主要研究方向为食品生物技术。E-mail:chsyt@126.com

通信作者:刘东杰(1987—),女,辽宁省鞍山市人,仲恺农业工程学院副教授,博士,主要研究方向为果蔬加工。E-mail:djliu412@163.com

前体物质转化为具有高生物活性的多酚物质<sup>[6]</sup>。具体来说,植物乳杆菌可利用单宁酶水解果蔬中的单宁酸,从而释放没食子酸<sup>[7]</sup>,其所产生的阿魏酰酯酶可将与果蔬细胞壁结合的肉桂酸类物质(阿魏酸、咖啡酸等)从结合态中释放出来,以供肠道细胞吸收<sup>[8-9]</sup>。此外,植物乳杆菌所产生的酚酸脱羧酶、还原酶等可将 *p*-香豆酸、阿魏酸、咖啡酸等酚酸转化成 4-乙基苯酚、4-乙基愈创木酚等风味物质,从而影响发酵果蔬制品的风味特征<sup>[10]</sup>。没食子酸、咖啡酸等酚酸在植物乳杆菌的代谢作用下,可转化为具有强抗氧化活性的焦枞酸、二氢咖啡酸等,有助于提高发酵果蔬制品的营养功能<sup>[11]</sup>。

近年来,研究者论证了将水果汁作为益生菌培养基的可行性和适用性<sup>[12]</sup>,且水果汁的摄入不受年龄、地域的限制,这使其成为理想的非乳制益生菌培养基。柑橘类果汁深受消费者青睐,是发酵益生菌饮料的绝佳原料。目前,利用乳酸菌发酵柠檬果汁的研究主要集中在提高柠檬果汁抗氧化活性、抑菌性、多酚含量等方面<sup>[12-13]</sup>,对柠檬果汁风味和营养物质的影响研究却鲜见报道。基于此,本文拟以植物乳杆菌 R-1 为发酵菌种发酵柠檬果汁,探究发酵过程中果汁活菌数、营养物质含量、抗氧化能力和挥发性风味物质含量的变化规律,以期对柠檬发酵饮料的开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

植物乳杆菌 R-1 (*L. plantarum* R-1, CCTCCM 2015545),由仲恺农业工程学院果蔬加工实验室分离筛选得到,保藏于广东省菌种保藏中心;浓缩柠檬汁,广东中兴绿丰农业科技发展有限公司;乳酸、蔗糖、抗坏血酸、1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS),阿拉丁生化科技股份有限公司;琼脂粉、MRS 培养基、营养琼脂,广东环凯微生物科技有限公司。其余试剂为常用分析纯或生化试剂。

### 1.2 主要仪器与设备

DHP-9602 型恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;KQ5200V 型超声波清洗器,昆山市超声

仪器有限公司;1260 型高校液相色谱(HPLC)仪,5977 型气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,安捷伦科技有限公司;LDZX-30FBS 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 发酵柠檬果汁制备** 将-80℃冰箱保存的植物乳杆菌 R-1 菌株接种于 MRS 培养基中,在 37℃ 条件下静置培养 36~48 h 进行活化,再将体积分数为 5% 的活化菌液接种于 200 mL MRS 培养基中,培养 24~36 h 至对数生长后期,在 6000 r/min 条件下离心 5 min,收集菌体,倾倒入清液,用无菌水清洗菌体两次,并将最终菌液的  $OD_{600}$  调整为 1.0 (活菌数约为  $10^9$  CFU/mL),作为柠檬果汁的发酵剂。

将浓缩柠檬汁用无菌水稀释 5 倍后,加入质量分数为 10% 的蔗糖,调整初始 pH 值为 5.0;在 300 mL 新调配的柠檬汁(活菌数约为  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL)中接种质量分数为 5% 的发酵剂,于 37℃ 条件下静置发酵 48 h,每 12 h 取样一次(取样时间点分别为 0 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h),并对样品中的活菌数、营养物质含量、抗氧化活性和挥发性风味物质含量进行测定。

**1.3.2 活菌数测定** 使用灭菌超纯水制备发酵柠檬果汁系列稀释液,吸取 0.1 mL 稀释液( $10^{-7} \sim 10^{-4}$ )滴加到灭菌平板上,采用倾注法,将 46℃ 左右的 MRS 固体培养基(pH 值为  $6.2 \pm 0.2$ )倾倒在加样后的平板上,混匀后,在 37℃ 条件下培养 36 h,进行活菌计数。

**1.3.3 总酸和有机酸含量测定** 1) 总酸含量测定。参考《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》(GB 12456—2021)<sup>[14]</sup>的方法,先标定 0.1 mol/L NaOH 标准滴定溶液,再对发酵柠檬果汁样品进行总酸含量的测定。具体步骤为:称取 25.0 mL 发酵柠檬果汁样品于 250 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 去离子水和 2 滴 1% 酚酞指示剂,用 0.1 mol/L NaOH 标准滴定溶液滴定至微红色,且 30 s 不变色,记录消耗的 NaOH 标准滴定溶液体积( $V_1$ )。用去离子水代替发酵柠檬果汁样品,按上述步骤进行空白试验,记录消耗的 NaOH 标准滴定溶液体积( $V_2$ )。发

酵柠檬果汁中总酸含量以克每升(g/L)表示。

2)有机酸(主要为乳酸和柠檬酸)含量的测定。参考《食品安全国家标准 食品中有机酸的测定》(GB 5009.157—2016)<sup>[15]</sup>的方法,准确吸取不同取样时间点的发酵柠檬果汁样品 5 mL,在 8000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,用 0.45 μm 滤膜过滤,并保存于-80 ℃的冰箱中,供后续 HPLC 分析使用。

HPLC 条件如下:色谱柱为 Luna C18(2)100A 柱(4.6 mm×250 mm×5 μm);流动相为体积分数 95% 的 10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 值为 2.5)和体积分数 5% 的甲醇;检测器为 VWD 3100 紫外检测器,检测波长为 210 nm;进样体积为 20 μL;流速为 0.5 mL/min;分析时间为 20 min。

**1.3.4 总糖含量测定** 采用苯酚硫酸法测定发酵柠檬果汁中的总糖含量<sup>[16]</sup>。准确称取标准葡聚糖(或葡萄糖)20 mg 于 500 mL 容量瓶中,加水至刻度线,分别吸取 0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.4 mL、1.6 mL 和 1.8 mL 溶液后以蒸馏水补至 2.0 mL,加入体积分数为 6% 的苯酚 1.0 mL 和 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 mL,摇匀后冷却,室温放置 20 min,测定吸光度 OD<sub>490</sub>。同样显色操作,以 2.0 mL 去离子水为空白对照,绘制标准曲线。同样显色操作,吸取 2.0 mL 发酵柠檬果汁样品,通过标准曲线计算其总糖含量。

**1.3.5 维生素 C 和总酚含量测定** 1)维生素 C 含量测定。采用 HPLC 法<sup>[17]</sup>,样品前处理方式同有机酸含量测定,色谱条件如下:色谱柱为 Luna C18(2)100A 柱(4.6 mm×250 mm×5 μm);流动相为体积分数 95% 的磷酸溶液(体积分数为 0.1%)和体积分数 5% 的甲醇;检测器为 VWD 3100 紫外检测器,检测波长为 242 nm;进样体积为 0.8 μL;流速为 0.8 mL/min。

2)总酚含量测定。采用福林酚法<sup>[18]</sup>,首先制备福林酚储备液,使用前加等量的水并摇匀,制得福林酚工作液;配制质量浓度为 1000 mg/L 的没食子酸溶液,分别吸取 0 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL 和 5 mL 于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容后,得到质量浓度分别为 0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、

40 mg/L、50 mg/L 的标准溶液;准确移取 1 mL 标准溶液于试管中,分别加入 5 mL 蒸馏水、1 mL 福林酚工作液和 3 mL 质量分数为 7.5% 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液,于黑暗中显色反应 2 h 后,于 765 nm 波长处测定吸光度,绘制标准曲线  $Y = 0.00597X + 0.1087$ ,  $R^2 = 0.9985$ ( $Y$  为没食子酸质量浓度, $X$  为吸光度)。将发酵柠檬果汁样品稀释 10 倍,按照上述方法,结合标准曲线计算总酚含量。

**1.3.6 抗氧化能力测定** 1)清除 DPPH 自由基能力测定。参考文献[19],将 2 mL 发酵柠檬果汁样品加入 2 mL 0.15 mmol/L 的 DPPH 溶液(用体积分数为 95% 的乙醇溶解),在黑暗、室温条件下反应 30 min,于 8000 r/min 条件下离心 10 min,注意避光,取上清液,在 517 nm 波长处测定吸光度。以生育酚(Trolox)作为标准品,绘制标准曲线  $Y = -0.0135X + 1.2314$ ,  $R^2 = 0.9996$ ( $Y$  为吸光度, $X$  为 Trolox 浓度),以 μmol Trolox/mL 表示发酵柠檬果汁清除 DPPH 自由基的能力。

2)清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基能力测定。参考文献[19-20],将 5 mL 7 mmol/L 的 ABTS<sup>+</sup> 溶液和 88 μL 140 mmol/L 的过二硫酸钾溶液混合,在黑暗、室温条件下,静置过夜(12~16 h),制得 ABTS<sup>+</sup> 储备液;利用无水乙醇将储备液稀释 90 倍,制得 ABTS<sup>+</sup> 工作液( $OD_{734} = 0.700 \pm 0.02$ );在 3 mL ABTS<sup>+</sup> 工作液中加入 30 μL 发酵柠檬果汁样品,混匀,反应 6 min,在 734 nm 波长处测定吸光度。以 Trolox 作为标准品,绘制标准曲线  $Y = -0.2670X + 0.5561$ ,  $R^2 = 0.9998$ ,以 μmol Trolox/mL 发酵柠檬果汁清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基的能力。

**1.3.7 感官评价方法** 发酵柠檬果汁感官评价标准见表 1<sup>[21]</sup>。感官评价小组由 12 位感官正常的食品专业人员构成,在评价时,每个样品需按不同顺序重复进行 3 次感官评价,每评价一个样品后,需间隔 10 min 再评价下一个样品。取 3 次感官评分的平均值作为评价结果。

**1.3.8 挥发性风味物质测定** 参考文献[22],在 250 ℃ 条件下,对萃取针(50/30 μm)进行活化备用;吸取 7 mL 发酵柠檬果汁样品于 25 mL 样品瓶中,加入 1.4 g NaCl,混匀,将样品混合液在 45 ℃ 条

件下磁力搅拌 5 min, 插入活化的萃取针, 吸附萃取 50 min, 再将萃取针插入 GC-MS 仪进样口。GC 条件如下: 采用 DB-WAX UI 色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样口温度为 250 ℃, 载气为 He, 不分流; 升温程序为起始温度 30 ℃, 保持 6 min, 以 2 ℃/min 的速度升温到 40 ℃, 保持 2 min, 再以 5 ℃/min 的速度升温到 100 ℃, 保持 10 min, 最后以 10 ℃/min 的速度升温到 200 ℃, 保持 10 min。MS 条件如下: EI 电离源, 离子源温度为 230 ℃, 电子能量为 70 eV, 采用全扫描采集模式, 质量扫描范围为 50~550 amu。

#### 1.4 数据处理与分析

基于 Duncan 法多重比较检验, 采用 SPSS 17.0 和 Origin 8.0 软件对实验数据进行分析并绘图,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物乳杆菌 R-1 在柠檬果汁中的发酵特性分析

柠檬果汁中富含的葡萄糖、果糖、维生素 C 等营养成分可为植物乳杆菌 R-1 的生长代谢提

表 1 发酵柠檬果汁感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criteria for fermented lemon juice

项目	分值/分	评分标准
气味 (20分)	16~20	柠檬香味浓郁, 无异味
	11~15	柠檬香味浓郁, 略有异味
	6~10	柠檬香味较淡, 异味较重
	0~5	几乎无柠檬香味, 异味严重
口感 (30分)	24~30	柠檬味浓郁、酸甜适中、 口感细腻、无苦涩味
	16~23	柠檬味明显、酸甜适中、 口感较细腻、略有苦涩味
	8~15	柠檬味明显、偏酸或偏甜、 口感不细腻、苦涩味较重
	0~7	柠檬味较淡、过酸或过甜、 口感粗糙、苦涩味严重
组织状态 (30分)	24~30	质地均匀、不分层、透明无杂质
	16~23	质地均匀、不分层、澄清透明、稍有浑浊
	8~15	质地不均、较为浑浊、稍有分层
	0~7	质地不均、浑浊、不透明、分层明显
色泽 (20分)	16~20	淡黄色、均匀一致、无杂色
	11~15	色泽偏深或偏淡、均匀、无杂色
	6~10	色泽较深或较淡、不均匀、有杂色
	0~5	色泽非淡黄色、不均匀、杂色明显

供物质基础。柠檬果汁发酵过程中植物乳杆菌 R-1 的活菌数变化如图 1 所示, 其中不同小写字母代表组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。由图 1 可知, 由于初始活菌数较高 (约为  $10^6$  CFU/mL), 因此在柠檬果汁发酵前 12 h 未观察到明显的延滞期阶段, 活菌数不断增加, 并在发酵 36 h 后达到最高值  $4 \times 10^8$  CFU/mL, 随后进入稳定期。植物乳杆菌 R-1 在柠檬果汁中的生长曲线与 S. Hashemi 等<sup>[23]</sup> 所报道的植物乳杆菌 LS5 在甜柠檬 (*Citrus limetta*) 中的生长曲线较为相似, 该发酵过程的菌落总数最高可达  $10^8$  CFU/mL。此外, 有研究<sup>[12,22]</sup> 比较了不同益生菌在酸石榴果汁 (初始 pH 值为 3.1) 中的生长特性, 发现植物乳杆菌和德氏乳杆菌均具有较高的生长速率。因此, 植物乳杆菌能较好地适应酸性植物性原料的发酵环境。

柠檬果汁发酵过程中酸度值、有机酸含量和总糖含量的变化如图 2 所示, 图 2a) 中折线图代表酸度值, 柱状图代表有机酸含量, 不同大写字母代表乳酸的组间差异显著, 不同小写字母代表柠檬酸的组间差异显著。由图 2a) 可知, 随着发酵时间的延长, 发酵柠檬果汁的酸度值和有机酸含量变化均不显著, 且二者变化趋势较一致, 但在发酵过程的前 12 h, 乳酸和柠檬酸含量变化较显著, 柠檬酸含量从 11.2 g/L 减少到 6.02 g/L, 乳酸含量从 0.2 g/L 增加到 4.3 g/L。这主要是由于植物乳杆菌 R-1 是兼性厌氧菌, 在前期有氧生长过程中会利用三羧酸循环 (TCA) 进行代谢产能, 而柠檬酸作为 TCA 的重要中间物质会被植物乳杆菌 R-1 转运到胞内进行代谢

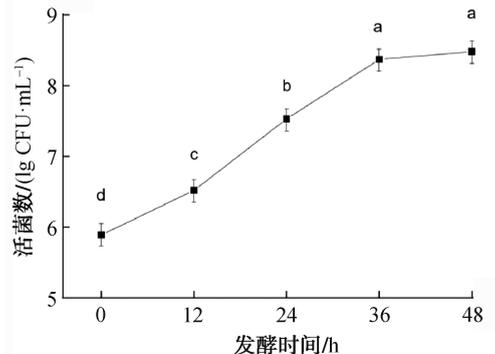


图 1 柠檬果汁发酵过程中植物乳杆菌 R-1 的活菌数变化

Fig. 1 Changes in the number of *L. plantarum* R-1 during lemon juice fermentation

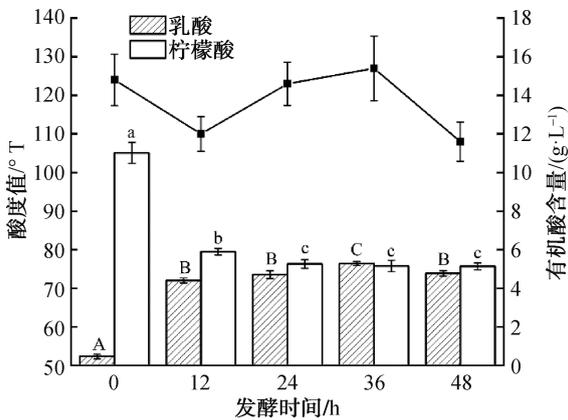
产能,其含量会显著下降;同时,柠檬果汁中含有较多的葡萄糖、果糖<sup>[21]</sup>及人为添加的蔗糖,植物乳杆菌 R-1 会通过糖酵解途径(EMP)将这些糖类物质转化为丙酮酸,在乳酸脱氢酶的作用下进一步转化为乳酸,因此乳酸含量在发酵过程的前 12 h 显著增加,而总糖含量(见图 2b)在发酵前期(0~24 h)显著下降( $P < 0.05$ ),从 0 h 的 24.1 g/L 下降到 24 h 的 13.2 g/L,而发酵 24 h 后,其变化不显著。有研究<sup>[24-26]</sup>发现,植物乳杆菌能够利用多种植物性原料(泡菜、果汁、豆腐酸浆水)中的小分子糖类(葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖、水苏糖等)代谢分泌乳酸,快速降低 pH 值,进而提升发酵食品的口感和风味。

## 2.2 植物乳杆菌 R-1 对发酵柠檬果汁营养物质及抗氧化活性的影响分析

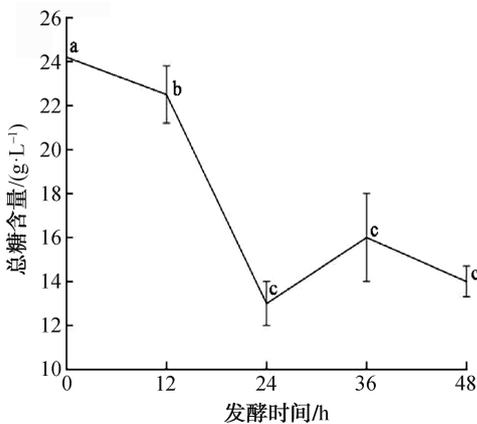
柠檬果汁发酵过程中维生素 C 含量和多酚含量的变化如图 3 所示。由图 3a)可知,在发酵过程

中,维生素 C 的含量未发生显著变化( $P > 0.05$ ),说明植物乳杆菌 R-1 的生长代谢及空气氧化并未导致维生素 C 的含量减少,与张业芳等<sup>[27]</sup>的研究结果较一致。这一方面是由于柠檬果汁本身的 pH 值偏酸性,另一方面,植物乳杆菌 R-1 的生长代谢会分泌大量乳酸,进一步降低发酵体系的 pH 值,而维生素 C 在酸性环境下较稳定,不易被氧化。由图 3b)可知,在发酵过程的前 12 h,总酚含量未发生显著变化( $P > 0.05$ );在发酵 24 h 后,总酚含量从 47.4 GAE mg/mL 显著增加到 80.3 GAE mg/mL ( $P < 0.05$ );当发酵 48 h 时,总酚含量显著增加到 174.3 GAE mg/mL。研究<sup>[27]</sup>发现,植物乳杆菌发酵能够显著提高橄榄、海带等植物性原料中的多酚含量,这可能是由植物细胞壁被植物乳杆菌分泌的 $\beta$ -葡萄糖苷酶、鞣酸酶等酶类水解所致。

乳酸菌发酵果蔬饮料的抗氧化能力主要受该发



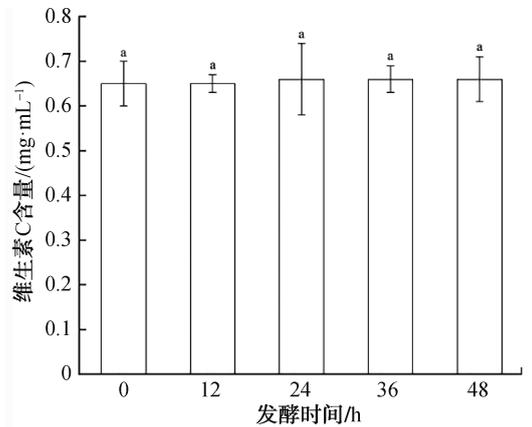
a) 酸度值和有机酸含量变化



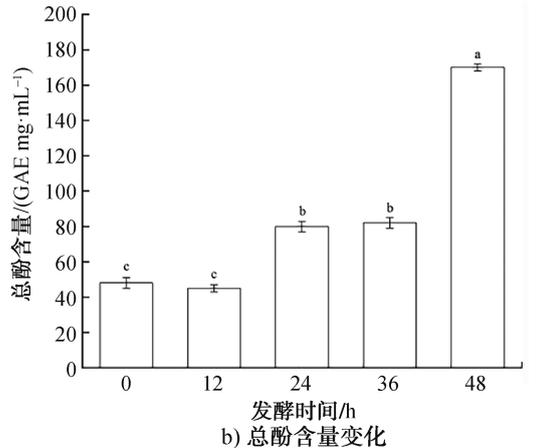
b) 总糖含量变化

图 2 柠檬果汁发酵过程中酸度值、有机酸含量和总糖含量的变化

Fig. 2 Changes of acidity values, organic acids, and total sugar content during fermentation of lemon juice



a) 维生素C含量变化



b) 总酚含量变化

图 3 柠檬果汁发酵过程中维生素 C 和总酚含量变化

Fig. 3 Changes of vitamin C and total phenol content during fermentation of lemon juice

醇体系的维生素 C 含量、多酚类物质含量、植物乳杆菌分泌的过氧化氢酶等因素的影响<sup>[27,29]</sup>。有研究<sup>[30]</sup>发现,利用植物乳杆菌和干酪乳杆菌组合发酵樱桃,能够显著提高其抗氧化能力,但也有研究<sup>[31]</sup>发现,乳酸菌发酵能降低果蔬汁对自由基的清除能力。因此,不同乳酸菌发酵的果蔬饮料的抗氧化能力存在显著区别,抗氧化能力变化的规律性也不够清晰。植物乳杆菌 R-1 发酵柠檬果汁的抗氧化能力见表 2。由表 2 可知,发酵 12 h 后,发酵柠檬果汁清除 DPPH 自由基的能力显著提高( $P<0.05$ ),在发酵 48 h 后达到 29.21  $\mu\text{mol Trolox/mL}$ ,同时,发酵柠檬果汁清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基的能力也随着发酵时间的延长呈显著上升的趋势( $P<0.05$ ),且发酵柠檬果汁的抗氧化能力与多酚含量成正比。这表明,植物乳杆菌 R-1 发酵可维持柠檬果汁中维生素 C 的稳定性,还可提高柠檬果汁的总酚含量并增强其抗氧化能力,进而提高发酵柠檬果汁的营养功能价值。

### 2.3 植物乳杆菌 R-1 对发酵柠檬果汁风味的影响分析

发酵柠檬果汁的挥发性风味物质及其相对含量见表 3。由表 3 可知,在未发酵的柠檬果汁中共检测出 38 种挥发性风味物质,其中,以萜烯类物质为主(19 种),相对含量为 87.26%,高于文献[32]报道的萜烯类物质相对含量(77%);醇类物质有 10 种,相对含量为 11.08%;醛类物质有 5 种,相对含量为 0.61%;其他挥发性风味物质有 4 种,相对含量为 0.83%,与文献[32-33]报道的结果较接近。在发酵 24 h 后,萜烯类物质增加到 21 种,相对含量达 98.26%;醇类物质减少到 7 种,相对含量减少到 1.13%;醛类物质减少到 4 种,相对含量减少到

0.06%。因此,植物乳杆菌 R-1 发酵能改变柠檬果汁挥发性风味物质的种类和相对含量。

柠檬果汁发酵过程中主要挥发性风味物质的相对含量(>0.20%)和感官评分如图 4 所示。由图 4 可知,如 D-柠檬烯、 $\gamma$ -松油烯、 $\beta$ -蒎烯等柠檬精油中的特征风味物质<sup>[34]</sup>都能被检测到,其中 D-柠檬烯的相对含量最高,且由 0 h 的 45.98% 增加到 24 h 的 52.06%,说明植物乳杆菌 R-1 发酵能明显提升 D-柠檬烯的相对含量,但发酵超过 48 h 后逐步降低到 44.23%。D-柠檬烯主要来源于柠檬,具有愉快、新鲜的橙子香气,能赋予柠檬果汁良好的风味<sup>[34]</sup>。 $\gamma$ -松油烯具有微甜的柑桔风味和芳香的松木气味<sup>[35]</sup>,其相对含量也较高,发酵 0 h 为 22.41%,发酵 24 h 后,达到最大值 25.29%。在发酵柠檬果汁中也检测到了  $\gamma$ -蒎品烯,虽然在发酵过程中的相对含量为 10.00%~11.00%,变化较小,但也是发酵柠檬果汁风味的重要组成部分。

由图 4b) 可知,不同发酵时间柠檬果汁的香味、口感和组织状态均有明显的差异。在香味方面,发酵 12 h 和 24 h 的果汁其柠檬香味要优于发酵 36 h 和 48 h 的样品。在口感方面,乳酸滋味会随着发酵时间的延长而增加,尤其是发酵 24 h 后增加较明显,这主要是由于乳酸菌在发酵过程中会不断分泌乳酸;同时,柠檬酸会因乳酸菌代谢而含量减少,相较于未发酵样品,发酵 12~48 h 的柠檬酸所产生苦涩味会有所缓解;另外,发酵柠檬果汁的酸甜度在发酵 12 h 后达到适中状态,并保持稳定。在组织状态方面,前 36 h 的发酵柠檬果汁质地均匀,分层不明显,评分为 14.50~16.08 分,而 48 h 后的发酵柠檬果汁出现明显的分层现象,评分降低。

### 3 结论

本文研究了植物乳杆菌 R-1 的生长代谢对发酵柠檬果汁的活菌数、营养物质含量、抗氧化能力和挥发性风味物质含量的影响,得到以下结论:在发酵过程中,植物乳杆菌 R-1 能够较好地利用柠檬果汁中的营养物质进行生长代谢,并增加发酵柠檬果汁的总酚含量,提升其抗氧化能力,但对维生素 C 的含量影响较小;植物乳杆菌 R-1 还能改变柠檬果汁

表 2 植物乳杆菌 R-1 发酵柠檬果汁的抗氧化能力

Table 2 Antioxidant capacity of lemon juice fermented by *L. plantarum* R-1  $\mu\text{mol Trolox/mL}$

发酵时间/h	清除 DPPH 自由基的能力	清除 ABTS <sup>+</sup> 自由基的能力
0	13.63±0.44 <sup>D</sup>	36.54±0.67 <sup>D</sup>
12	14.88±0.58 <sup>D</sup>	42.90±0.80 <sup>C</sup>
24	19.11±0.64 <sup>C</sup>	48.24±0.59 <sup>B</sup>
36	23.21±0.76 <sup>B</sup>	49.61±1.20 <sup>B</sup>
48	29.21±0.43 <sup>A</sup>	55.61±1.30 <sup>A</sup>

注:上标大写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

表3 发酵柠檬果汁的挥发性风味物质及其相对含量

Table 3 Volatile flavor compounds and their relative content in fermented lemon juice

种类	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%			
			0 h	12 h	24 h	48 h
萜烯类 (22种)	5.83	2-甲基-环己酮-1,3-二烯	—	—	0.02	0.03
	6.76	$\alpha$ -萜品烯	—	—	0.01	0.02
	9.02	$\alpha$ -侧柏酮	1.23	1.25	1.42	1.38
	10.38	7,7-二甲基-2-氧代-二环 [2.2.1]庚烷-1-甲酸	0.08	0.08	0.08	0.08
	10.79	茨烯	0.42	0.42	0.44	0.43
	13.22	$\gamma$ -松油烯	22.41	22.98	25.29	24.47
	14.15	$\beta$ -水芹烯	0.04	0.04	0.06	0.05
	16.71	$\alpha$ -水芹烯	0.24	0.25	0.27	0.27
	17.16	左旋-beta-蒎烯	2.40	2.46	2.71	2.70
	17.49	(+)-4-萜烯	1.23	1.30	1.39	1.37
	17.76	紫菌红素乙	0.01	0.01	0.01	0.01
	18.78	D-柠檬烯	45.98	47.97	52.06	44.23
	18.89	$\beta$ -水芹烯	1.01	1.08	1.10	1.10
	20.36	$\beta$ -罗勒烯	0.14	0.15	0.15	0.15
	20.56	$\gamma$ -萜品烯	10.14	10.45	11.34	10.99
	20.88	3-萜烯	0.30	0.31	0.33	0.32
	21.36	间异丙基甲苯	0.28	0.29	0.30	0.30
	21.84	(+)-4-萜烯	1.12	1.21	1.21	1.21
	26.49	薄荷-1,5,8-三烯	0.02	0.02	0.02	0.02
	34.62	香柑油烯	0.05	0.05	0.04	0.04
	39.91	四甲基二环二烯	—	—	0.01	0.01
	醇类 (12种)	32.78	芳樟醇	0.04	0.04	0.04
30.15		3-乙酰氧基-7,8-环氧羊毛甾烷-11-醇	0.01	0.01	0.01	0.01
34.89		小茴香醇	0.15	0.15	0.13	0.14
35.93		松油醇	0.41	0.40	0.40	0.40
38.48		1-壬醇	—	—	0.10	0.02
39.32		L- $\alpha$ -松油醇	0.27	0.34	0.40	0.45
46.38		正丁醇	0.16	0.04	—	—
46.89		四甘醇	1.76	1.02	—	—
48.59		3,6,9,12-四氧十四烷-1-醇	4.77	2.10	—	—
48.90		环氧乙烷乙醇	3.01	1.08	—	—
53.63		脱氢皮质醇	—	—	0.02	0.04
54.19		八乙二醇	0.50	0.06	—	—
醛类 (5种)	22.18	辛醛	0.03	0.03	0.01	0.01
	25.56	壬醛	0.05	0.05	0.02	0.01
	29.69	硬脂烷醛	0.01	0.01	—	—
	38.76	橙花醛	0.01	0.01	0.02	0.03
	40.94	1-环己烯-1-羧基醛	0.01	0.01	0.01	0.01
其他 (10种)	39.37	呋喃	—	—	0.03	0.03
	39.99	(Z)-3,7-二甲基-2,6- 辛二烯-1-醇乙酸酯	—	—	0.05	0.05
	40.82	丁烯酸	—	—	0.01	0.01
	41.08	p-薄荷-1,5-二亚乙基三胺	0.01	0.01	0.01	0.02
	43.11	乙胺	0.42	0.06	—	—
	43.60	二苯并 21-冠-7	0.06	0.04	0.03	0.03
	44.88	穿心莲内酯	—	—	0.02	0.02
	44.97	凤仙萜四醇苷 B	—	—	0.04	0.04
	47.42	月桂基聚氧乙烯醚	—	—	0.04	0.04
	53.47	六乙二醇单甲醚	0.34	0.26	0.02	0.01

注:—表示未检出。

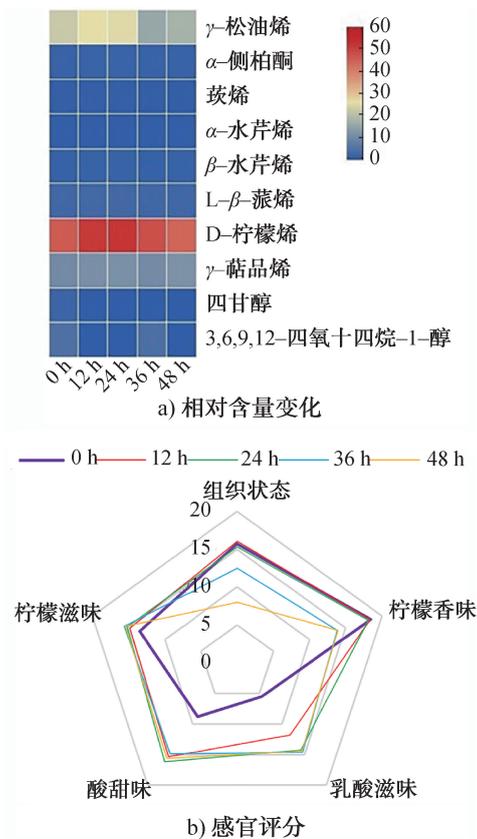


图4 柠檬果汁发酵过程中主要挥发性风味物质的相对含量(>0.20%)和感官评分

Fig. 4 Changes of relative contents of main volatile flavor compounds (>0.20%) and sensory scores in lemon juice during fermentation

挥发性风味物质的种类和相对含量,其中D-柠檬烯、γ-松油烯等的相对含量在发酵24 h后达到最大值,且发酵24 h的柠檬果汁在香味、口感和组织状态方面均较优。未来将进一步优化柠檬果汁的发酵工艺,提升发酵柠檬果汁的口感和稳定性,为其工业化生产提供理论依据。

## 参考文献:

[1] 农仲文,于立梅,曾晓房,等. 柠檬营养成分及其综合利用研究进展[J]. 农产品加工,2018(10):73-76.

[2] AI-QUDAH T S, UMBER Z, RAFIA R, et al. Lemon as a source of functional and medicinal ingredient: A review [J]. International Journal of Chemical and Biochemical Sciences, 2018, 14:55-61.

[3] PENG W Y, MENG D Q, YUE T L, et al. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*,

and *Lactobacillus fermentum* [J]. Food Chemistry, 2021, 340:127922.

[4] 崔树茂,徐长悦,毛丙永,等. 植物乳杆菌发酵苹果汁及菌体活性保持[J]. 食品与发酵工业,2019,45(12):7-15.

[5] SON S H, JEON H L, JEON E B, et al. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of β-galactosidase and antioxidant activities [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 85:181-186.

[6] WANG S Y, LI S Y, ZHAO H F, et al. Acetaldehyde released by *Lactobacillus plantarum* enhances accumulation of pyranoanthocyanins in wine during malolactic fermentation [J]. Food Research International, 2018, 108:254-263.

[7] WU C Y, LI T L, QI J, et al. Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 122:109064.

[8] DONG X B, QI J, XU K, et al. Effect of lactic acid fermentation and *in vitro* digestion on the bioactive compounds in Chinese wolfberry (*Lycium barbarum*) pulp [J]. Food Bioscience, 2023, 53:102558.

[9] BAEZA G, BACHMAIR E M, WOOD S, et al. The colonic metabolites dihydrocaffeic acid and dihydroferulic acid are more effective inhibitors of *in vitro* platelet activation than their phenolic precursors [J]. Food & Function, 2017, 8(3):1333-1342.

[10] ZHANG H W, WEN B T, LIU Y S, et al. A reverse catalytic triad Asp containing loop shaping a wide substrate binding pocket of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184:92-100.

[11] 张丽华,查蒙蒙,李顺峰,等. 益生菌发酵果蔬汁研究进展[J]. 轻工学报,2021,36(4):29-36.

[12] OKCU G, AYHAN K, GUNES ALTUNTAS E, et al. Determination of phenolic acid decarboxylase produced by lactic acid bacteria isolated from shalgam (salgam) juice using green analytical chemistry method [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 66:615-621.

[13] 费永涛,黄一鹤,黄星源,等. 一种覆盆子发酵乳酸菌及富含多酚覆盆子发酵饮料的制备:114058537B[P]. 2023-10-13.

[14] 国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中总酸的测定:GB 12456—2021[S]. 北京:中国标准出版社,2021.

[15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中有机酸的测定:GB 5009.157—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2017.

[16] 王迎香,唐子惟,彭腾,等. 苯酚-硫酸法测定酒蒸多花黄精多糖含量的优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18):308-316.

- [17] 刘成浩,张蓉,邹国庆,等. HPLC 法测定保健食品中抗坏血酸的组成及稳定性[J]. 食品研究与开发,2018,39(18):172-176.
- [18] HSIEH C Y, HSIEH S L, CIOU J Y, et al. Lemon juice bioactivity *in vitro* increased with lactic acid fermentation [J]. International Journal of Food Properties, 2021, 24(1):28-40.
- [19] 赵甜甜,张国治,王赵改,等. 两种市售香椿茶主要活性成分、抗氧化活性及挥发性成分的对比较分析[J]. 轻工学报,2023,38(3):35-45.
- [20] FEI Y, LIU L, LIU D, et al. Investigation on the safety of *Lactobacillus amylolyticus* L6 and its fermentation properties of tofu whey[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84(6):314-322.
- [21] 刘娟娟,田密. 一种刺梨樱桃复合果汁饮料的研制及稳定性[J]. 食品工业,2022,43(6):84-88.
- [22] WU S L, YANG J, DONG H, et al. Key aroma compounds of Chinese dry-cured Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) and their potential metabolic mechanisms[J]. Food Chemistry, 2021, 342:128381.
- [23] HASHEMI S, KHANEGHAH A M, BARBA F J, et al. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 38(6):409-414.
- [24] SZTOWSKA J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(3):357-372.
- [25] 叶青,许云贺,张莉力. 豆腐酸浆中干酪乳杆菌的分离、鉴定及作为豆腐凝固剂的应用[J]. 食品工业科技,2017,38(18):94-98,104.
- [26] 王红梅,蒋思睿,陶阳,等. 超声辅助植物乳杆菌发酵苹果汁及草莓汁过程中菌体生长及酚类等物质代谢[J]. 食品科学,2020,41(14):72-81.
- [27] 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.
- [28] SANTAMARÍA L, REVERÓN I, DE FELIPE F L, et al. Ethylphenol formation by *Lactobacillus plantarum*: Identification of the enzyme involved in the reduction of vinylphenols [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(17):e01064-e01018.
- [29] 刘佳奇,彭珍,熊涛. 乳酸菌发酵对红茶饮料营养成分、香气成分及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学,2017,38(24):130-136.
- [30] LIZARDO R C M, CHO H D, WON Y S, et al. Fermentation with mono- and mixed cultures of *Lactobacillus plantarum* and *L. casei* enhances the phytochemical content and biological activities of cherry silverberry (*Elaeagnus multiflora* Thunb.) fruit [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(9):3687-3696.
- [31] KAPRASOB R, KERDCHOECHUEN O, LAOHAKUNJIT N, et al. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria [J]. Process Biochemistry, 2017, 59:141-149.
- [32] 梅明鑫. 巴氏灭菌前后沃尔卡姆柠檬汁挥发性成分的分析比较[J]. 中国酿造,2020,39(10):176-182.
- [33] 吴小禾,邹爱国,唐林新,等. 天然提取物 D-柠檬烯作为食品添加剂成分的研究进展[J]. 轻工科技,2017,33(3):1-2,28.
- [34] LIU T, GAO Z P, ZHONG W M, et al. Preparation, characterization, and antioxidant activity of nanoemulsions incorporating lemon essential oil [J]. Antioxidants, 2022, 11(4):650.
- [35] 刘营营,范莹莹,石佳宁,等. 香辛料对莲藕泡菜挥发性风味成分和理化性质的影响[J]. 轻工学报,2021,36(5):34-41.

## Effects of *Lactobacillus plantarum* R-1 on flavor and nutrient substances of fermented lemon juice

FEI Yongtao<sup>1,2</sup>, LIU Dongjie<sup>1,2</sup>, LUO Zichun<sup>1</sup>, YANG Chen<sup>1</sup>, ZHANG Zhikun<sup>1</sup>,  
MA Lukai<sup>1,2</sup>, LIU Gongliang<sup>1,2</sup>, XIAO Gengsheng<sup>1,2</sup>

1. College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology/Key Laboratory of Green Processing and Intelligent Manufacturing of Lingnan Specialty Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

**Abstract:** To study the effects of *Lactobacillus plantarum* R-1 on the quality of fermented lemon juice beverage, the contents of nutrient substance, the antioxidant capacity and volatile flavor compounds in lemon juice at different fermentation stages were determined. The results showed that *L. plantarum* R-1 had good fermentation properties in

(下转第 53 页)

- [22] MURNANE S S, LEHOCKY A H, OWENS P D. Odor thresholds for chemicals with established health standards [M]. 2nd edition. Virginia: AIHA, 2013.
- [23] BUTTERY R G, TAKEOKA G R. Cooked carrot volatiles. AEDA and odor activity comparisons. Identification of linden ether as an important aroma component[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61 ( 38 ): 9063 - 9066.
- [24] 安会敏, 欧行畅, 熊一帆, 等. 茉莉花茶特征香气成分研究[J]. 茶叶科学, 2020, 40(2): 225-237.
- [25] 谢剑平. 烟草香原料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.

## Preparation of fermented *Flos sophorae* spice by *Cordyceps sinensis* strain and its application in cigarette flavoring

ZHANG Qianying<sup>1</sup>, YANG Shuanghong<sup>1</sup>, CAI Wen<sup>1</sup>, GENG Zongze<sup>1</sup>, LI Dongliang<sup>1</sup>, DING Zhongyang<sup>2</sup>

1. Center of Technology Innovation for Cigar, China Tobacco Sichuan Industrial Co., Ltd., Chengdu 610066, China;

2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** To develop a new natural spice of *Flos sophorae*, we used *Cordyceps sinensis* strain SCT-1 to ferment *Flos sophorae*. The fermentation medium formula was optimized through factor screening experiments. The spice obtained under the optimal conditions was evaluated for odor and cigarette flavoring sensory evaluation, and the volatile aroma components were analyzed. The results showed that the optimal fermentation medium was *Flos sophorae* powder 100 g/L, corn flour 2 g/L, bran 2 g/L and sucrose 2 g/L. The optimal spice obtained exhibited a predominant nutty aroma, supplemented by milk aroma and green aroma. By adding the spice, the cigarette had an increased nutty aroma, sweetness, and a more delicate smoke, while reducing its irritancy. The volatile aroma components, as styrene, (2Z)-2-octen-1-ol, naphthalene, benzothiazole, and methyleugenol, contributed to the aroma of the spice. (E)-2-heptanal, benzaldehyde, linalool, terpine-4-ol and  $\alpha$ -terpineol had a significant contribution to the aroma of this spice.

**Key words:** *Cordyceps sinensis*; fermented *Flos sophorae* spice; cigarette flavoring; volatile aroma component

[责任编辑:吴晓亭]

(上接第 37 页)

lemon juice, and the number of viable bacteria reached a maximum value of  $4 \times 10^8$  CFU/mL after 36 h of fermentation, and then tended to be stable afterwarded. *L. plantarum* R-1 could decrease the contents of total sugar and organic acids, but significantly increase the content of total phenols in lemon juice from 47.4 GAE mg/mL to 174.3 GAE mg/mL after 48 h fermentation, enhancing the antioxidant capacities (ability to scavenge DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals) of fermented lemon juice ( $P < 0.05$ ), *L. plantarum* R-1 could change the varieties and proportions of volatile flavor components in lemon juice, especially the terpene flavor compounds such as D-limonene and  $\gamma$ -terpinene in lemon oil. The relative content of terpene flavor compounds reached the maximum at 24 h of fermentation. The results of sensory evaluation also indicated that the flavor and taste of sample at 24 h was superior to that of other fermentation time point of the samples. *L. plantarum* R-1 could make good use of nutrients in lemon juice for growth and metabolism, which could improve the flavor of lemon juice and increase the content of total phenols and antioxidant substances. This study provides fundamental basis for the development of fermented lemon juice products.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum*; fermented lemon juice; volatile flavor compound; nutrition substance; antioxidant capacity

[责任编辑:杨晓娟]