



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 121718457 A

(43) 申请公布日 2026. 03. 24

(21) 申请号 202610231614.3

A23F 5/02 (2006.01)

(22) 申请日 2026.02.27

A23F 5/46 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A23F 5/10 (2006.01)

CGMCC NO. 34748 2025.06.03

C12R 1/225 (2006.01)

CGMCC NO. 30564 2024.05.09

(71) 申请人 云南农业大学

地址 650201 云南省昆明市盘龙区金黑路
落索坡132号云南农业大学

(72) 发明人 胡永金 杨澜 陈慧敏 李宏

王琪 周永秀 倪婕 汤回花

(74) 专利代理机构 昆明今威专利商标代理有限公司 53115

专利代理师 孙敏

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2026.01)

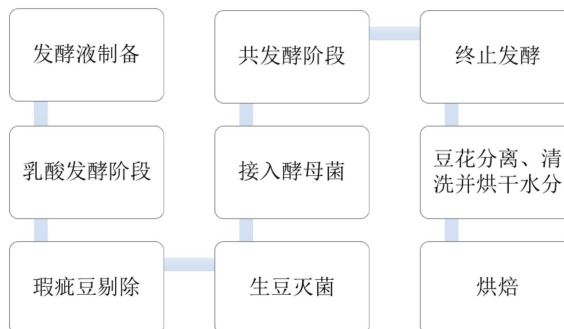
权利要求书1页 说明书13页 附图6页

(54) 发明名称

一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法及咖啡豆

(57) 摘要

本发明公开了一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法。所述发酵菌株包括罗伊氏乳杆菌 A V-47 (CGMCC No. 34748) 与马克斯克鲁维酵母 CI-06 (CGMCC No. 30564), 通过顺序接入的方式用于协同发酵生产桂花风味咖啡豆, 该方法具体通先向无菌水中接入罗伊氏乳杆菌悬液 (9logCFU/ml, 0.5ml/1kg生豆) 与桂花花粉 (生豆质量3%), 28℃共发酵24小时制得发酵液后再向其中添加咖啡生豆和接入马克斯克鲁维酵母菌悬液 (9logCFU/ml, 0.5ml/1kg生豆), 继续28℃共发酵24小时完成发酵后清洗烘焙制成具有明显柔和桂花风味、口感适宜、无分离感的风味咖啡。



1. 一株罗伊氏乳杆菌, 其特征在于, 所述罗伊氏乳杆菌 (*Limosilactobacillus reuteri*) AV-47 菌株于2025年6月3日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为: CGMCC No. 34748, 保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

2. 一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

S1, 无菌水制备: 向发酵罐中加入与待处理咖啡豆等质量水在121℃, 20min条件下灭菌制成无菌水;

S2, 预处理: 将收集到的桂花清洗干净后晾干并灭菌备用;

S3, 制备发酵液: 待S1中制备的无菌水冷却至室温后接入权利要求1所述的罗伊氏乳杆菌悬液和桂花花粉, 于 28℃恒温共发酵24小时;

S4, 生豆挑选, 剔除瑕疵豆: 选择已完成水洗处理且水分含量为10-12%、无损伤的卡蒂姆咖啡绿豆, 分选挑除有破损、虫眼的瑕疵豆子;

S5, 生豆灭菌: 将挑选好的咖啡生豆在高温线进行灭菌, 待其冷却后在无菌环境中将其加入到S3制备的发酵液中;

S6, 接菌: 将马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 菌CI-06菌株悬液接入发酵液中, 继续在28℃环境中共发酵24小时完成发酵; 所述马克斯克鲁维酵母CI-06菌株, 于2024年5月9日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为: CGMCC No. 30564, 保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号;

S7, 烘焙: 发酵结束后通过流水清洗咖啡豆, 使豆花分离, 清洗至无浑浊液体后将咖啡豆置于烘干机内45-50度, 12小时将其烘干至水分含量为11%, 烘焙至浅烘或中烘程度, 最终得到卡蒂姆咖啡粉。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述S3中接入的罗伊氏乳杆菌悬液与S6接入的马克斯克鲁维酵母菌悬液的浓度比为 (2-1) : (1-2)。

4. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述S3中接入的罗伊氏乳杆菌悬液与S6接入的马克斯克鲁维酵母菌悬液的浓度比为1:2。

5. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述S3中接入的罗伊氏乳杆菌悬液浓度为9logCFU/ml, 按照生豆质量0.5ml/1kg的量接入罗伊氏乳杆菌悬液。

6. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述S3中桂花花粉的添加量为生豆质量的3%。

7. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述S6中按照1ml/1kg的量接入浓度为9logCFU/ml的马克斯克鲁维酵母菌悬液。

8. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述S3的接菌时间与S6的接菌时间间隔为24h。

9. 根据权利要求6所述的方法, 其特征在于, 所述桂花花粉为产自广西的金桂。

一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法及咖啡豆

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物发酵和食品深加工技术领域,更具体地,涉及一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法及咖啡豆,尤其是一种利用罗伊氏乳杆菌和马克思克鲁维酵母混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法及咖啡豆。

背景技术

[0002] 为减轻咖啡商品豆库存压力,提升商品豆原有风味扩大咖啡消费市场,将外源菌种同风味物对商品豆进行控制发酵是一种新兴的处理方法。在中国发明专利CN116369408A中公开了一种金桔风味咖啡豆的制备工艺,该工艺将咖啡豆加入榨好的金桔牛奶汁中浸泡,使咖啡豆充分吸收果汁与牛奶的独特风味。既保留了金桔特有的香气,又充分利用了金桔的营养价值,具有开胃、生津、润喉等作用。本发明所述的金桔风味咖啡豆制作方法简单,设备要求不高,有利于进行工业化生产,扩大对金桔与咖啡豆的开发利用,有助于推动地方经济的发展。在这种制备工艺中,添加物是纯牛奶以及新鲜金桔,选用具有季节的新鲜水果在一定程度上限制产品的制作。此外,该方法未进行微生物处理,既没有杀灭咖啡豆上原有菌株,也没有外接特定菌株使得实验过程具有一定的不可重复性。基于此,中国专利CN115868566A公开了一种定向风味发酵咖啡及其制备方法,该方法采用GC-TOF-MS技术测定咖啡烘焙豆挥发性组分,获得与感官相关的化学组分,选择含有所述化学组分材料作为风味底物,将咖啡生豆与风味底物共同发酵,赋予咖啡豆特定的风味物质,此过程接入乳酸乳球菌至发酵到PH值降至5.0~5.5时,接种酿酒酵母继续发酵得到发酵咖啡豆。其解决了现有咖啡采用的咖啡鲜果不易保藏、咖啡鲜果季节性对发酵产品的产业化形成制约,同时后添加的花果风味调味剂与咖啡风味不融合,导致消费者体验感差的技术问题;以咖啡生豆为原材料,制成特定风味(玫瑰、桂花、茉莉花、陈皮风味等)的咖啡饮品。但是上述发酵方法获得的风味咖啡豆的特定风味与咖啡豆的融合存在分离感,随着保存时间的增长,其风味容易挥发,因此,亟需探索一种新的发酵方法,以获取一种无分离感融合风味,降低苦味和涩味,风味平衡,口感柔和的咖啡豆。

发明内容

[0003] 为实现上述目的,本发明提供了一种具有稳定发酵方法且定向赋予咖啡生豆桂花风味的制备方法,从而制得具有明显柔和桂花风味、口感适宜的风味咖啡,该风味,具体技术方案如下:

[0004] 本发明的第一个目的是提供一株罗伊氏乳杆菌,所述罗伊氏乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)AV-47于2025年6月3日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为:CGMCC No. 34748,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0005] 该菌株获取方法如下:

[0006] a. 选取咖啡果胶发酵液样品:选取中国云南省保山市成熟的卡蒂姆咖啡鲜果果

胶,采集至灭菌样品袋后迅速转移至低温盒中保存,低温储存运送至实验室;

[0007] b.卡蒂姆咖啡鲜果果胶样品分离:称取适量的卡蒂姆咖啡鲜果果胶发酵样品,置于90mL无菌生理盐水中,并通过振荡混匀,使卡蒂姆咖啡鲜果果胶发酵样品中的微生物细胞分散;

[0008] c.卡蒂姆咖啡鲜果果胶发酵样品梯度稀释:用无菌生理盐水对卡蒂姆咖啡鲜果果胶发酵混合液体进行梯度稀释;

[0009] d.涂布与培养:取200 μ L稀释液涂布于乳酸MRS琼脂固体板,在36 $^{\circ}$ C下培养乳酸菌;

[0010] e.观察菌落形态:通过观察菌落的形态、大小、颜色、光泽、质地、表面和边缘情况特征,挑选出优势菌株;

[0011] f.分离纯化并获取单菌落:通过交叉划线法进一步纯化菌株,获得单菌落;

[0012] g.冷冻保存优势菌株(分离株):其中具有一致形态的分离株经鉴定为罗伊氏乳杆菌。

[0013] 本发明的第二个目的是提供一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法,具体步骤如图1所示,包括以下步骤:

[0014] S1,无菌水制备:向发酵罐中加入与待处理咖啡豆等质量水在121 $^{\circ}$ C,20min条件下灭菌制成无菌水;

[0015] S2,预处理:将收集到的桂花清洗干净后晾干并灭菌备用;

[0016] S3,制备发酵液:待S1中制备的无菌水冷却至室温后接入罗伊氏乳杆菌悬液和桂花花粉,于28 $^{\circ}$ C恒温共发酵24小时;

[0017] S4,生豆挑选:剔除瑕疵豆:选择已完成水洗处理且水分含量为10-12%、无损伤的卡蒂姆咖啡绿豆,分选挑除有破损、虫眼的瑕疵豆子;

[0018] S5,生豆灭菌:将挑选好的咖啡生豆在高温线进行灭菌,待其冷却后在无菌环境中将其加入到S3制备的发酵液中;

[0019] S6,接菌:将马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)菌CI-06菌株悬液接入发酵液中,继续在28 $^{\circ}$ C环境中共发酵24小时完成发酵;所述马克斯克鲁维酵母CI-06菌株,于2024年5月9日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为:CGMCC No. 30564,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号;

[0020] S7,烘焙:发酵结束后通过流水清洗咖啡豆,使豆花分离,清洗至无浑浊液体后将咖啡豆置于烘干机内45-50度,12小时将其烘干至水分含量为11%,烘焙至浅烘或中烘程度,最终得到卡蒂姆咖啡粉。

[0021] 进一步地,所述S3中接入的罗伊氏乳杆菌悬液与S6接入的马克斯克鲁维酵母菌悬液的浓度比为(2-1):(1-2)。

[0022] 进一步地,所述S3中接入的罗伊氏乳杆菌悬液与S6接入的马克斯克鲁维酵母菌悬液的浓度比为1:2。

[0023] 进一步地,所述S3中接入的罗伊氏乳杆菌悬液浓度为 $9 \log \text{CFU/ml}$,按照生豆质量0.5ml/1kg的量接入罗伊氏乳杆菌悬液。

[0024] 进一步地,所述S3中桂花花粉的添加量为生豆质量的3%。

[0025] 进一步地,所述S6中按照生豆质量1ml/1kg的量接入浓度为 $9 \log \text{CFU/ml}$ 的马克斯

克鲁维酵母菌悬液。

[0026] 进一步地,所述桂花为广西金桂。

[0027] 发酵工艺的优化降低了咖啡生豆与水的接触时间,接种时间影响不同菌株在整个发酵过程中的种群数量,进而影响代谢产物的产生,在一定程度上降低了咖啡生豆中可溶性物质的流失,同时优先发酵风味发酵液的方法使得烘焙豆呈现出更柔和的桂花香气特征,在杯测评分上优化后发酵处理的烘焙豆表现出更高的醇厚评分、跟更干净的干净度评分。传统咖啡发酵多依赖自然微生物群落或单一菌种接种,而混合菌种的协同作用常因竞争抑制难以发挥最佳效果。优化后的发酵工艺采用的顺序接种技术通过分阶段控制微生物接种,先接种罗伊氏乳杆菌,24小时后再接种马克斯克鲁维酵母,可避免微生物间的负面作用,同时利用两者代谢互补性提升发酵效率。

[0028] 工作原理:选用卡蒂姆豆种并经过水洗处理后保持其水分含量为11%的绿咖啡豆为基豆,在其基础上进一步进行发酵,通过分阶段控制微生物接种,先接种罗伊氏乳杆菌与桂花发酵获得具有理想感官特性的最终产品的决定参数。在接种间隔期内,罗伊氏乳杆菌发酵的作用可以为后续酵母发酵充分发育创造有利的环境。采用顺序接种发酵咖啡时首先接入罗伊氏乳杆菌可使发酵环境的pH降低,为后续酵母发酵提供其适应的酸性环境,同时较低pH的发酵环境也抑制了杂菌的生长,此外乳酸菌发酵可以改变总糖、酒石酸、苹果酸、柠檬酸和氨基酸的含量进一步将其转化为风味前体物,24小时后再接种马克思克鲁维酵母,可避免微生物间的负面作用,同时利用两者代谢互补性提升发酵效率,二者发酵代谢产物进一步发生化合为咖啡带来丰富的风味前提物质,并且还降低了咖啡生豆与水的接触时间,降低咖啡生豆中可溶性物质的流失,优先发酵风味发酵液的方法使得烘焙豆呈现出更柔和的桂花香气特征可以改变咖啡感官特性的化合物的出现,例如负责水果和焦糖香味的挥发性化合物的增加。

[0029] 与现有技术相比,本发明的有益效果:经过酵母发酵工艺的优化降低了咖啡生豆与水的接触时间,在一定程度上降低了咖啡生豆中可溶性物质的流失,同时优先发酵风味发酵液的方法使得烘焙豆呈现出更柔和的桂花香气特征,在杯测评分上优化后发酵处理的烘焙豆表现出更高的醇厚评分、跟更干净的干净度评分。

附图说明

[0030] 图1为本发明的桂花风味咖啡豆的制备流程图;

[0031] 图2为生豆剔除瑕疵豆示意图;

[0032] 图3为本发明的罗伊氏乳杆菌平板图;

[0033] 图4为本发明的马克思克鲁维酵母的平板图;

[0034] 图5为本发明的罗伊氏乳杆菌和马克思克鲁维酵母的拮抗作用结果图;

[0035] 图6为与处理后的桂花示意图;

[0036] 图7为桂花风味的发酵示意图(a)和生豆状态图(b);

[0037] 图8为不同浓度配比的咖啡豆示意图;

[0038] 图9为不同组别的感官评价雷达图。

具体实施方式

[0039] 下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0040] 实施例1

[0041] 从云南发酵酸肉、牟定腐乳、富源酸菜、大理宾川葡萄和澜沧咖啡中筛选优势酵母菌和乳酸菌,准确称取25g样品,置于225mL生理盐水(0.85%NaCl)中,进行系列梯度稀释(10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6}),取各系列梯度稀释液0.2mL,分别涂布至YPD固体培养基和MRS培养基上,每个梯度进行3组平行实验,根据菌落的形态、颜色、大小、边缘、光滑度和湿润度等特征,采用灭菌的接种针挑取单菌落点接至YPD固体培养基和MRS培养基上,分别于 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 和 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养2d,进行3~5次分离纯化,得到YPD培养基上酵母菌编号为CI-06、CI-03和LI-08,MRS培养基上乳酸菌编号为AV 43、AV 47,挑取单菌落进行YPD液体和MRS肉汤培养基于 $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 或 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养箱进行培养,直至试管底部长出菌泥,甘油保藏于 -80°C 冰箱,甘油和菌悬液比例为0.5:1~0.8:1;所用生理盐水、试管、培养基,平板均需 121°C 灭菌20min。

[0042] 所述YPD液体培养基由酵母浸粉10.0g/L,蛋白胨20.0g/L,葡萄糖20.0g/L,pH 6.2 ± 2 组成;制YPD固体培养基则胨10.0g/L,葡萄糖20.0g/L酵母浸粉5.0g/L,琼脂14.0g/L,pH 6.2 ± 2 。

[0043] MRS培养基由蛋白胨10.0g/L,牛肉粉5.0g/L,酵母粉4.0g/L,葡萄糖20.0g/L,吐温-80 1.0mL, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g/L,醋酸钠 $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5.0g,柠檬酸三铵2.0g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2g,硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.05g,琼脂15.0g,最终pH 6.2 ± 2 ;MRS肉汤由酪蛋白酶消化物10.0g/L,牛肉膏粉10.0g/L,酵母膏粉4.0g/L,柠檬酸三铵2.0g/L,乙酸钠5.0g/L,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2g/L,硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.05g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g/L,葡萄糖20.0g/L,吐温-80 1.08g/L,最终pH 5.7 ± 2 。

[0044] 实施例2:菌株的筛选条件

[0045] (1) 乳酸菌菌株的筛选

[0046] 一株罗伊氏乳杆菌,所述罗伊氏乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri*)AV-47,该菌株取自中国云南省保山市成熟的卡蒂姆咖啡鲜果脱落的咖啡果胶自然发酵后的样品,采集至灭菌样品袋后迅速转移至低温盒中保存,低温储存运送至实验室;准确称取10g样品,置于200mL生理盐水(0.85%NaCl)中,并通过振荡混匀,使卡蒂姆咖啡鲜果果胶发酵样品中的微生物细胞分散后用无菌生理盐水对卡蒂姆咖啡鲜果果胶发酵混合液体进行系列梯度稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4});将稀释后的稀释液取0.2mL,涂布于乳酸MRS琼脂固体板上,每个梯度进行3组平行实验,于 32°C 培养24h;根据菌落的形态、颜色、大小、边缘、光滑度和湿润度等特征,采用灭菌的接种针挑取生长特征明显、重复率较高的单菌落点接MRS培养基上,于 32°C 培养24h挑选出优势菌株进行分离纯化并获得单菌落(如图3),分离所得两种菌株分别编号为AV 43、AV 47。

[0047] 乳酸菌株的筛选

[0048] 菌株活化:

[0049] 乳酸菌产酸性能:经产酸实验比较发现,分离所得的两株乳酸菌中,AV 47表现出良好的产酸性能,故选用其作为后续实验菌株公司鉴定该菌株为罗伊氏乳杆菌。

[0050] 并于2025年6月3日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏

编号为:CGMCC No .34748,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0051] (2)酵母菌株的筛选

[0052] 菌株活化:取酵母编号为CI-06、CI-03和LI-08的菌株进行活化,每株取YPD液体培养基或MRS肉汤培养基活化两管,每管10mL,灭菌冷却后加入-80℃冰箱取出至室温的甘油保藏菌液10-50微升,在 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 或 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养,长出菌泥,混匀后,即得到活化菌株和得到该菌株的培养。

[0053] 产果胶酶菌株的初筛

[0054] 将纯化后的菌株点种到初筛培养基上,进行3组平行实验, $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置培养48 h,用10 g/L刚果红染色液染色30 min,再用1mol/L NaCl溶液静置洗脱色30 min,挑选出产透明圈的菌株,使用游标卡尺测量透明圈直径与菌落直径,比较透明圈直径(R)/菌落直径(r),选R/r值较大的菌株进行复筛。

[0055] 所述初筛培养基为:果胶2.0 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L、 K_2HPO_4 1.0 g/L、 MgSO_4 0.5 g/L、 NaNO_3 3.0 g/L、琼脂粉20.0 g/L,蒸馏水定容至1 L,pH值6.0,121℃灭菌 20 min。果胶液体培养基在初筛培养基基础上没有加入琼脂粉。

[0056] 产果胶酶菌株的复筛(测定菌株酶活)

[0057] 将初筛得到R/r值较大的菌株活化后,于 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$,160 r/min培养24 h,再将活化24 h的培养物按体积分数为4%的接种量接到发酵培养基(50/250mL)中,于 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$,160 r/min发酵48 h,采用DNS法测各菌株的酶活力,透明圈直径与菌落直径比(R/r)的比值与生产的果胶酶的酶活力大小成正相关的关系,一般来说,随着(R/r)比值的增大,果胶酶的酶活力逐渐增大,具体步骤见以下序号。

[0058] 挑选出最大酶活力的菌株,用甘油管保存于-80℃冰箱。

[0059] ①菌株活化

[0060] 将以上编号菌株在YPD和MRS 固体培养基平板上进行活化, $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 和 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养,待菌株长出孢子。

[0061] ②种子液的制备

[0062] 在无菌环境下,将活化的菌株孢子接种到50mL的果胶液体培养基中, $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,160rpm培养。

[0063] ③发酵培养

[0064] 在无菌环境下,吸取1mL的种子液接种到 50mLYPD和MRS 液体发酵培养基中, $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,160rpm培养。

[0065] ④粗酶液的制备:

[0066] 菌株发酵培养的发酶液经冷冻离心后(4°C ,10000r/min离心5min)取得的上清液为粗酶液。

[0067] 溶液的配制

[0068] (1)柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液的配置(pH5.0)

[0069] 甲液的配置:准确称取柠檬酸5.25g,用容量瓶加水定溶至250mL。乙液的配置:准确称取柠檬酸钠7.75g,用容量瓶加水定溶至250mL。应用液的配置:用量筒称取甲液41mL,乙液59mL,然后把二者混合均匀,再用pH计矫正,最终至应用液的pH为 5.0 ± 0.05 低温冷藏备用。

[0070] (2) 3,5-二硝基水杨酸试剂的配置(DNS)

[0071] 准确称取3,5-二硝基水杨酸1.575g,溶于65.5mL2mol·L⁻¹的NaOH溶液中,加入到125mL45.5g酒石酸钾钠的热水溶液中,再加入1.25 g苯酚和1.25g亚硫酸钠,定容至250mL,倒入棕色试剂瓶,放置一周后使用。

[0072] (3) 1%(W/V) 果胶溶液的配制

[0073] 准确称取果胶粉1g,加入适量柠檬酸缓冲液,加热溶解,冷却,再将柠檬酸缓冲液定容至100mL,放置到4℃冰箱备用,有效期不超过5天。

[0074] (4) 1mg·mL⁻¹ 半乳糖醛酸标准储备液

[0075] 准确称取半乳糖醛酸0.020g加水溶解,并定溶于20mL容量瓶中,置于4℃冰箱内备用,有效期不超过三天。

[0076] 半乳糖醛酸标品曲线绘制

[0077] 分别吸取体积为0mL、0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1.0mL,质量浓度为1 mg·mL⁻¹的 D-半乳糖醛酸溶液到离心管中,添加去离子水到1mL,之后加入1mL的DNS试剂,充分混匀后,煮沸5min左右,室温下冷却,用10mL的容量瓶定容,使用分光光度计,在波长为540nm条件下测定吸光度。纵坐标为测定的吸光度,横坐标则为半乳糖醛酸的量,然后绘制半乳糖醛酸的标准曲线,D-半乳糖醛酸标准曲线,依据曲线计算果胶酶酶活。

[0078] ⑤菌株果胶酶活力的测定

[0079] 吸取0.8mL果胶溶液加入50mL的比色管中,50℃水浴加热5min,加入0.2mL的粗酶液,50℃水浴30min,加入3mL的DNS 试剂,沸水浴10 min,流水冷却,用纯水定容至25mL,混合均匀,10000r/min离心5min,用酶标仪在540nm处测溶液的 OD 值。对照组为灭活的粗酶液。根据半乳糖醛酸标准曲线测定果胶酶酶活力。

[0080] 酶活力的计算公式为: $S \times D \times 1000 / (0.2 \times 10)$

[0081] 在该式中,

[0082] S代表测的光的吸收在数值在标曲上的半乳糖醛酸量;

[0083] D 代表酶液的稀释的系数;

[0084] 1000代表换算因子:mg换算成μg;

[0085] 0.2 代表参与反应的酶液的量,单位为mL;10代表酶反应的时间单位为min。

[0086] 1个酶活力的单位(U)定义:1mL粗酶液在1min的单位时间内水解果胶,产生1μg的还原糖所消耗的酶量。

[0087] 筛选出的菌株进行果胶酶活的测定结果如下:

[0088] 表1 实验室筛选出的现有菌株的酶活统计

	菌株编号	R/r	菌株酶活
[0089]	CI-03	0.92	322.6
	LI-08	0.68	298.1
	CI-06	1.2	412.9

[0090] 果胶酶能裂解果胶大分子中的长链糖苷键使其还原端基不断暴露。因此,可通过

检测果胶酶降解长链糖苷键产生的还原端基的量评价果胶酶酶活性的高低。选用CI-06菌株进行后续实验,并进行甘油保藏。

[0091] 根据筛选条件,选菌株CI-06做后续实验,因此对CI-06菌株进行鉴定:用氢氧化钠溶液处理CI-06分离菌株后,从中提取16S rRNA进行扩增,扩增体系如下:

[0092] 进一步地,进行PCR产物测序:PCR产物检测合格后,切割目的条带进行纯化回收,用回收后的产物进行Sanger测序。

[0093] (1) DNA提取:使用TSINGKE植物DNA提取试剂盒(通用型,货号:TSP101)。

[0094] S1.研磨管中加入200 μ L Buffer ATL和20 μ L蛋白酶K,加入半勺3mm铅珠/一颗5mm钢珠(根据菌板状态,细菌加铅珠即可,真菌菌丝和厌氧型细菌需加入钢珠),取菌板中一株单一菌落到研磨管中,放在自动研磨仪上60hz研磨2min;

[0095] S2.瞬时离心,加入200 μ L Buffer AL,充分混匀;

[0096] S3.70℃水浴15min,期间振荡混匀2次,裂解完成后12000 rpm离心3min,取400 μ L上清转至新的深孔板,向深孔板中加入300 μ L Buffer BD和20 μ L磁珠,放入提取仪工位2;

[0097] S4.取新的提取板每孔分装300 μ L Buffer BW1放置在提取仪工位3、分装两板500 μ L孔的75%乙醇分别放在工位4、工位5,洗脱板每孔分装100 μ L/80 μ L/60 μ L(根据样品状态分装对应体积)洗脱液放置在工位6;

[0098] 注:Buffer BD和Buffer BW1使用前需加入指定量无水乙醇进行稀释;

[0099] S5.选择对应的程序,检查仪器状态和提取板信息后运行;

[0100] S6.运行完成之后,将洗脱板取出进行DNA浓度和电泳胶检测,放入4℃保存。

[0101] (2) PCR扩增:用菌种鉴定通用引物进行扩增,扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物条带是否与目的大小相符,是否单一,有无拖带。

[0102] 表2菌种鉴定通用引物

[0103]	所属类别	名称	序列	扩增序列	PCR 长度 /bp
	细菌	27F	AGTTTGATCMTGGCTCAG	16S rDNA	1500
	细菌	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	16S rDNA	1500

[0104] (3) PCR产物测序:PCR产物检测合格后,切割目的条带进行纯化回收,用回收后的产物进行Sanger测序。结果如表3所示,PCR产物测序结果比对分析,Sanger测序结果用软件ContigExpress进行拼接,并去除两端不准的部分。进一步地,批量对拼接序列进行blastn(最新版本v2.13)比对核酸数据库。其中,核酸数据库选择最新版本的nt库,通过与nt库进行blastn比对,即可得到同源序列的Accession Number号及物种鉴定和注释。

[0105] 表3 鉴定结果

[0106]

GeneID	Accession	Species	Identity	Score	Evalue	Annotation
C I -06	MN242725.1	Kluyveromyces marxianus	718/718(100.00)	1327	0.0	Kuyveromyces marxianus strain ICMP 340 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1.5.8S ribosomal RNA gene,and internal transcribed spacer2,complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
A V -47	CP162645.1	Limosilactobacillus reuteri	100%	1319	0.0	无

[0107] 对平板上培养的分离物进行形态观察,结果如图3-4:A V -47圆形、凸起、白色边缘较透明、表面较光滑边缘整齐;CI-06圆形、白色、凸起、透明、表面光滑、边缘整齐。

[0108] 最终,综合分子生物学与形态学结果,A V -47鉴定为罗伊氏乳杆菌,命名为罗伊氏乳杆菌*Limosilactobacillus reuteri*,并于2025年6月3日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为:CGMCC No .34748,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0109] CI-06鉴定为马克斯克鲁维酵母,命名为马克斯克鲁维酵母*Kluyveromyces marxianus*,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为GDMCC No.30564,保藏日期为2024年5月9日,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0110] 实施例3:利用本发明一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法,生产制备800g桂花风味咖啡豆,具体步骤如下:

[0111] S1,无菌水制备:向发酵罐中加入与800mL水,在121℃,20min条件下灭菌制成无菌水;

[0112] S2,预处理,将收集到的桂花清洗干净后晾干并粉碎后灭菌备用;

[0113] S3,制备发酵液:待S1中制备的无菌水冷却至室温后,于无菌环境中向发酵罐内按照生豆质量0.5ml/1kg的量接入0.4ml浓度为9logCFU/ml的罗伊氏乳杆菌悬液,并投入24g预处理后的桂花,于 28℃恒温共发酵24小时获得发酵液;

[0114] S4,生豆挑选,剔除瑕疵豆:选择已完成水洗处理且水分含量为10-12%、无损伤的卡蒂姆咖啡绿豆,分选挑除有破损、虫眼的瑕疵豆子,称取无瑕疵的卡蒂姆咖啡绿豆800g;

[0115] S5,生豆灭菌:将挑选好的800g咖啡生豆在高温线进行灭菌,待其冷却后在无菌环境中将其加入到S3制备的发酵液中;

[0116] S6,接菌:生豆加入发酵液后立即接入生豆质量1ml/1kg的浓度为9logCFU/ml的马克斯克鲁维酵母菌悬液,继续在28℃环境中共发酵24小时完成发酵;

[0117] S7,烘焙,发酵结束后通过流水清洗咖啡豆,使豆花分离,清洗至无浑浊液体后将咖啡豆置于烘干机内45-50度,12小时将其烘干至水分含量为11%,烘焙至浅烘或中烘程度,最终得到卡蒂姆咖啡粉。

[0118] 表4 原有发酵工艺(YF)与优化工艺(BF)加工后生豆的咖啡因以及杯测评分含量对比

[0119]	发酵工艺	咖啡因含量	杯测评分
	YF	5.86	82
	BF	7.33	85.75

[0120] 实施例4:一种混菌发酵桂花风味咖啡豆的方法中的发酵工艺的优化

[0121] (1)拮抗实验:点植法接种,使用无菌接种环分别挑取适量的罗伊氏乳杆菌和马克思克鲁维酵母,在已凝固的 MRS - YPD 混合培养基平板上,以十字交叉的方式进行点植接种。点与点之间保持一定的距离(如 1-2cm),避免菌苔相互重叠影响观察,将接种好的平板放入恒温培养箱中,根据两种菌的生长特性,设置合适的培养条件,一般可设置为 30℃,培养24-48小时。

[0122] 培养结束后,观察平板上两种菌的生长情况。重点观察在两种菌的交叉区域以及各自生长区域是否存在抑菌圈结果如图5所示:其上没有明显的抑菌圈,且两种菌在交叉区域都能正常生长,说明未表现出明显的拮抗作用。

[0123] 综上可知,罗伊氏乳杆菌和马克思克鲁维酵母作用于混菌发酵咖啡豆是可行的,实验发现罗伊氏乳杆菌和马克思克鲁维酵母未表现出明显的拮抗作用,这意味着在混菌发酵过程中,两种菌不会因为相互抑制而影响发酵效果。可利用这两种菌的协同作用来产生独特的风味物质或改善产品品质,那么它们可以在同一发酵体系中共同生长和代谢,不会因为拮抗作用而导致其中一种菌生长受抑制,从而保证了混菌发酵工艺的顺利进行。并且还使得发酵过程中的微生物群落结构相对稳定,不会因为菌种间的拮抗而导致群落结构失衡,从而保证发酵过程的可重复性和发酵产品质量的稳定性。

[0124] (2)酵母菌和乳酸菌接入浓度对杯测评分的影响

[0125] 实验对比了酵母菌:乳酸菌在浓度比为2:1、1:1、1:2下对混菌发酵桂花风味咖啡的影响,不同浓度配比发酵的咖啡豆见图8。

[0126] 表5 不同接菌浓度配比的杯测评分表

[0127]	接菌浓度比(酵母菌:乳酸菌)	2:1	1:1	1:2	未接菌
	杯测评分	85.75	81.25	79.75	80.25

[0128] 从杯测评分数值上看,杯测评分在随着乳酸菌浓度比升高而逐渐下降。未接菌发酵的咖啡杯测评分为80.25分。这表明无外源菌株参与发酵而单纯依靠桂花发酵液浸渍,菌株数量较少,发酵过程较为缓慢且发酵不足,由于发酵不完全,咖啡豆中的风味物质生成不足,咖啡的风味单一简单,口感较为平淡。而随着乳酸菌接菌浓度比的上升杯测评分下降为79.75,这表明高乳酸接菌浓度下,乳酸菌株数量过多,导致了较酸的发酵环境,接入酵母后发酵过程过快或过度,导致不利的代谢产物积累,过度发酵产生过多的酸味与乳酸菌产生的酸性物质或其他不良风味,导致咖啡口感失衡,风味过于尖锐或复杂,影响整体的感官体验进而降低了其杯测评分。接入相同浓度比的乳酸菌与酵母菌则表现出较为普通的杯测评分81.25,随着酵母接菌浓度比的升高其杯测评分能提高至85.75分,即最佳的接菌浓度。这

表明当马克思克鲁维酵母菌:罗伊氏乳杆菌接菌浓度比为2:1时,为桂花风味咖啡提供了充足且适量的活性菌株,二者的共同作用使得发酵过程达到最佳状态,风味物质充分生成,在此接菌浓度比发酵下的咖啡的风味表现最为丰富均衡,酸度适中,花香余韵悠长,可以更好体现出咖啡的最佳口感。

[0129] (3)混菌发酵对咖啡因、杯测评分的影响

[0130] 通过以上实验探究了桂花风味咖啡的最佳发酵工艺(先接种罗伊氏乳杆菌,24小时后再接种马克斯克鲁维酵母)、混菌浓度(酵母:乳酸=2:1,且接菌量按照1ml/1kg生豆的酵母菌、0.5ml/1kg生豆的乳酸菌量接入浓度为 $9\log\text{CFU/ml}$),该工艺生产的桂花风味咖啡的咖啡因含量为7.33,杯测评分为85.75,但是其中混菌发酵对咖啡的影响尚不明确,因此实验对比了灭菌后无菌株、单一菌株发酵以及混菌发酵对咖啡豆中咖啡因、总黄酮、单宁以及杯测评分的影响。

[0131] ①咖啡因含量测定

[0132] 1)标准曲线制定:称取0.0005g咖啡因标准品,溶于5mL甲醇,浓度为0.1mg/mL。过滤膜 $0.45\mu\text{m}$,取1ml用于高效液相色谱仪分析。

[0133] 2)咖啡提取物的制备:称取1g粉碎均匀的咖啡样品250mL锥形瓶中,加入约200mL超纯水,沸水浴中加热30min,不时振摇,取出冷却加入5g氧化镁,振摇,再放入沸水浴中加热20min,取出锥形瓶,冷却至室温,转移至250mL容量瓶中,加水定容至刻度线,摇匀,静置30min,取上清液经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤于进样瓶中,供高效液相色谱仪分析。结果如下表6所示:

[0134] 表6 不同组别的咖啡因含量及杯测评分

[0135]	发酵类型	咖啡因含量	杯测评分
	未发酵	7.07	79.85
	酵母发酵	6.55	83.15
	乳酸发酵	6.03	80.75
	混菌(同时)	5.54	82.25
	混菌发酵(本发明)	5.86	85.75

[0136] 从发酵后咖啡因含量上分析,无菌发酵后的咖啡因为7.07mg/g;单一菌株发酵后的咖啡因含量变化差异不显著,其中酵母发酵后咖啡因含量为6.55mg/g,而乳酸菌发酵后其含量为6.03mg/g;混菌发酵后的咖啡因含量降低至5.86mg/g。已知未经灭菌咖啡生豆的咖啡因含量约为10.67mg/g,分析以上数据可得知,生豆复水灭菌后无论发酵与否,其咖啡应含量都呈现出降低趋势,说明该加工方法能显著降低咖啡中咖啡因含量。单一菌株发酵后其咖啡因含量呈现相似的变化,推测可能是发酵过程中微生物进行正常生命活动导致咖啡因的部分降解或转化。然而,混菌发酵时其咖啡因含量较低,推测二者协同作用加速了咖啡因的降解与转化。

[0137] 从发酵后烘焙豆杯测评分上分析,无菌发酵后的杯测评分为80.25;单一菌株发酵后的杯测评分差异显著,其中酵母发酵后杯测评分为82.00,而乳酸菌发酵后其杯测评分为79.75;混菌发酵后的杯测评分可提高至85.75。结合咖啡因含量变化分析,咖啡因含量在咖

啡感官评测中表现为苦味因此咖啡因的降低也与混菌发酵样品杯测表现出较低的苦味相符合。乳酸发酵则致使咖啡表现出更不干净的酸涩感,与酵母协同发酵则提高了其醇厚度与甜感,故单一乳酸发酵表现出较低的杯测评分而协同发酵则表现出较高甚至接近与精品咖啡的杯测评分。

[0138] ②总黄酮

[0139] 黄酮总量测定分析

[0140] 1) 标准曲线制定:采用硝酸铝法测定总黄酮含量。制备标准品母液(1mg/mL):向标准品 EP 管里面加入1mL的60%乙醇提取液。把母液用60%乙醇稀释成五个浓度梯度的标准品:0,0.2,0.4,0.6,0.8,1 mg/mL,根据结果即可制作标准曲线。

[0141] 2) 咖啡试样的测定:准确称取1.00g 咖啡生豆粉末置于烧杯中,用20mL热水进行提取30min后定容至25mL,过滤后备用;取 2.0mL咖啡提取物,分别置于25mL比色管中,补水至10mL,加50g/L NaNO_3 溶液1mL混匀,放置 6min;再加入100g/L $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液1 mL混匀,放置6 min;最后加200g/LNaOH溶液4mL,纯水定容,混匀,放置15min。其中一份不加 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,为样品空白;在510nm 处测定吸光度。

[0142] 表7 不同组别的黄酮含量

[0143]

组别	总黄酮含量(mg/g)
无菌发酵	19.26
乳酸菌发酵	12.66
酵母菌发酵	16.28
混菌发酵	16.14

[0144] 从黄酮含量上分析,无菌发酵的黄酮含量为19.26 mg/g;单一菌株发酵后的黄酮含量与菌株种类有关,其中酵母发酵后总黄酮含量较高为16.28 mg/g,而乳酸菌发酵后其含量为12.66 mg/g;混菌发酵后的黄酮含量增加至16.14mg/g。未经灭菌咖啡生豆的黄酮含量约为22 mg/g,分析以上数据可得知,灭菌后黄酮含量降低说明该加工方法能降低咖啡中黄酮含量,单独发酵后黄酮含量显著下降,是发酵过程中微生物进行正常生命活动导致黄酮的部分降解或转化。然而,乳酸菌发酵与酵母菌发酵表现出黄酮含量变化的显著不同,混菌发酵时,黄酮含量较乳酸菌发酵显著增加,说明乳酸菌发酵对黄酮的利用转化率较大,而混菌发酵能更好的均衡这一点。

[0145] ③单宁测定

[0146] 1) 标准曲线的绘制:准确吸取单宁酸标准使用液(200mg/L) 0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1mL,分别置盛有6mL水的10mL比色管中,加福林酚0.5mL,加7.5%碳酸钠溶液1mL,蒸馏水定容至刻度线,摇匀,静置30min显色后,以试剂空白同操作为空白对照,在波长760nm处测定标准溶液的吸光度,以单宁酸浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

[0147] 2) 咖啡试样的测定:精密量取0.2mL咖啡粉提取物,置盛有6mL水的10mL比色管中,加福林酚0.5mL,加7.5%碳酸钠溶液1mL,蒸馏水定容至刻度线,摇匀。静置30min显色后,以试剂空白同操作为空白对照,在760nm波长处测定。试样溶液的吸光度,根据标准曲线求出试液中单宁酸的浓度。

[0148] 表8 不同组别的单宁含量

[0149]

组别	单宁含量(mg/g)
----	------------

无菌发酵	9.82
乳酸菌发酵	10.27
酵母菌发酵	10.25
混菌发酵	10.99

[0150] 从单宁含量上分析,无菌发酵的单宁含量为9.82 mg/g;单一菌株发酵后的单宁含量有所升高,其中酵母发酵后单宁含量为10.25mg/g,而乳酸菌发酵后其含量为10.27 mg/g;混菌发酵后的单宁含量升高至10.99 mg/g。使用菌株以及混菌发酵过程增加了单宁含量,尤其是在混菌发酵的情况下单宁含量显著增加。这可能是由于发酵过程和不同菌株的代谢产物不同而这些成分共同作用,促进了单宁的生成或释放。

[0151] ④感官评价

[0152] 将组别灭菌不发酵、灭菌+桂花不发酵、灭菌+桂花,罗伊氏乳杆菌发酵、灭菌+桂花,马克斯克鲁维酵母菌发酵、灭菌+桂花,混菌发酵分别命名为C、NF、FL、FM、FL&M,按以下表9所示的感官评价表要求开展品评,结果如表10和图9的雷达图。

[0153] 表9 感官评价标准

项目	评价标准	评价范围
花香 (9 分)	咖啡液具有丰富花香, 并伴随其他令人愉悦的香气	7-9
	咖啡液具有花香, 无异味	4-6
	咖啡液无花香, 并伴随令人不适的异味	1-3
酸度 (9 分)	咖啡液具有适宜的酸度, 并与整体风味融合	7-9
	咖啡液具有适宜的酸度	4-6
	咖啡液具有不适的酸度, 并与整体氛围不融合	1-3
甜度 (9 分)	咖啡液具有适宜的甜度, 并与整体风味融合	7-9
	咖啡液具有适宜的甜度	4-6
	咖啡液不具有甜度, 并与整体氛围不融合	1-3
醇厚感 (9 分)	咖啡液具有强烈的压舌感, 整体较浓厚	7-9
	咖啡液具有适宜的压舌感	4-6
	咖啡液不具有压舌感, 整体较寡淡	1-3
余韵 (9 分)	品尝结束后口腔仍留存浓烈咖啡香气	7-9
	品尝结束后口腔仍留存咖啡香气	4-6
	品尝结束后口腔未留存咖啡香气	1-3

[0155] 表10 感官评价结果

组别	花香 (9 分)	酸度 (9 分)	甜度 (9 分)	醇厚感 (9 分)	余韵 (9 分)
C	3	4	3	2	3
NF	4	4	5	3	5
FL	6	5	4	6	6
FM	7	5	4	6	5
FL&M	9	7	5	8	8

[0157] 表11 不同发酵方式的咖啡豆

[0158]	发酵类型	咖啡因含量	总黄酮	单宁	杯测评分
	灭菌不发酵	—	—	—	—
	灭菌+桂花不发酵	7.07	19.26	9.82	80.25
	灭菌+桂花, 马克斯克鲁维酵母	6.55	16.28	10.25	83.15
	灭菌+桂花, 罗伊氏乳杆菌发酵	6.03	12.66	10.27	80.75
	灭菌+桂花混菌发酵(同时添加)	5.54	—	—	82.25
	灭菌+桂花混菌发酵(顺序添加)	5.86	16.14	10.99	85.75

[0159] 分析:以上发酵对比可明显发现,经过酵母发酵工艺的优化降低了咖啡生豆与水的接触时间,在一定程度上降低了咖啡生豆中可溶性物质的流失,同时优先发酵风味发酵液的方法使得烘焙豆呈现出更柔和的桂花香气特征,在杯测评分上优化后发酵处理的烘焙豆表现出更高的醇厚评分以及更干净的干净度评分,因此本发明所述的顺序发酵方式能够获得一种相较于市场现有发酵方式更具优势的发酵方法,通过该方法生产的桂花风味咖啡豆其桂花风味融合更彻底其不易挥发。

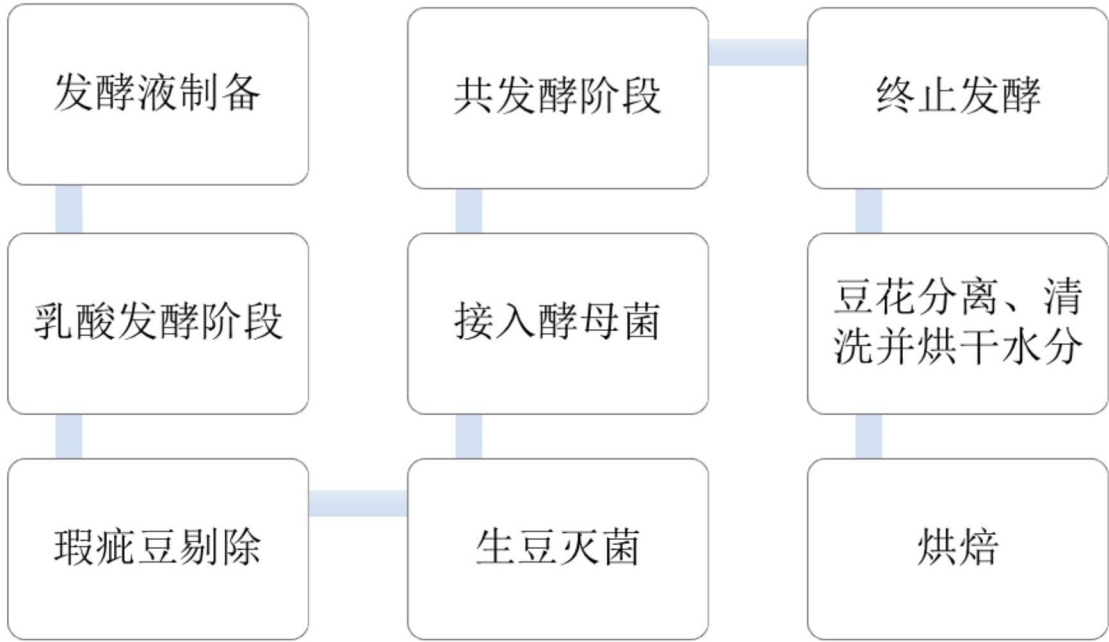


图1

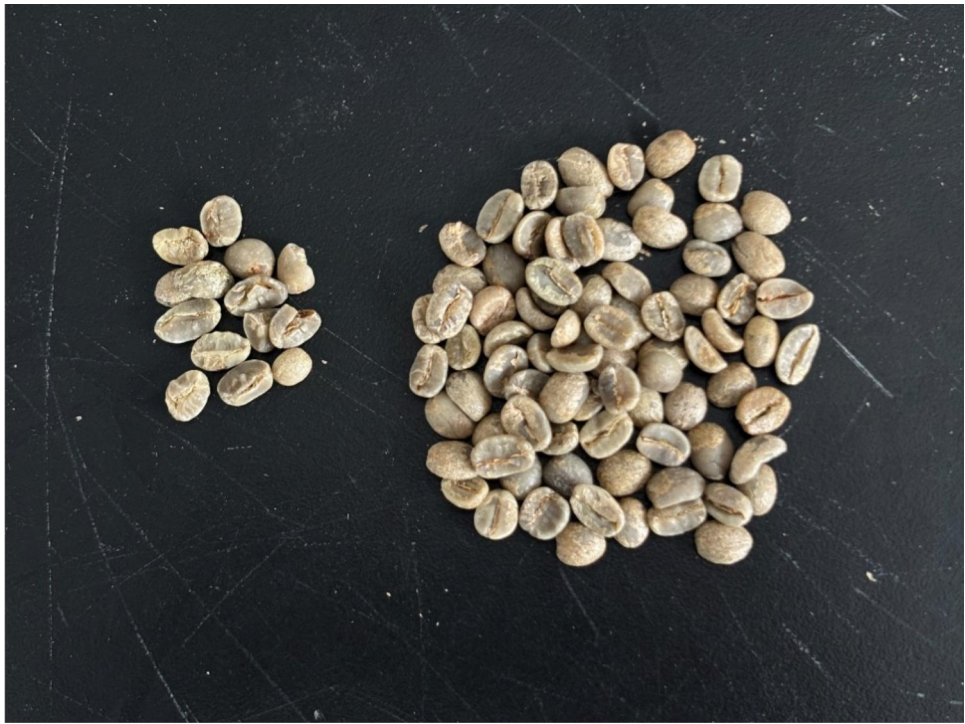


图2



图3



图4



图5



图6

**a****b**

图7

A
2:1



B
1:1



C
1:2



图8

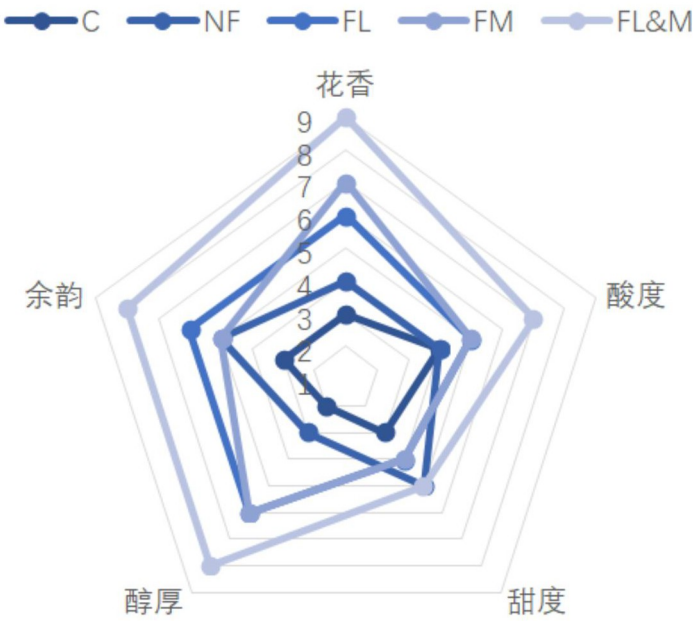


图9