

植物乳杆菌对猕猴桃果酒品质影响的评价

葛东颖¹, 李华佳², 刘雪婷¹, 杨成聪¹, 陈欣蕾¹, 郭壮^{1,*}

(1. 湖北文理学院 食品科学技术学院 鄂西北传统发酵食品研究所, 湖北 襄阳 441053;

2. 四川省农业科学院 农产品加工研究所, 四川 成都 610066)

摘要:使用酿酒酵母与 39 株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)分别发酵进行猕猴桃果酒制备,并结合电子舌、电子鼻和高效液相色谱技术对其品质进行评价。经电子舌检测发现,添加 *L. plantarum* 发酵后部分猕猴桃果酒较之对照组酸味、苦味、涩味、咸味和后味 A 呈明显下降趋势,而部分猕猴桃果酒的丰度呈现相反趋势。经电子鼻检测发现,传感器 W1C、W6S、W1S、W1W 和 W3S 对添加 *L. plantarum* 发酵猕猴桃果酒的响应值明显偏低,而传感器 W5S 和 W5C 呈现出相反的趋势。经高效液相色谱检测发现,品质较好的猕猴桃果酒中奎尼酸和柠檬酸的含量显著偏低($P<0.05$)。*L. plantarum* HBUAS52016 和 *L. plantarum* HBUAS52017 在后续猕猴桃酒产品开发中具有一定的应用潜力。

关键词:猕猴桃果酒;电子鼻;电子舌;植物乳杆菌;品质评价

Effect of *Lactobacillus plantarum* on the Product Quality of Kiwifruit Wine

GE Dong-ying¹, LI Hua-jia², LIU Xue-ting¹, YANG Cheng-cong¹, CHEN Xin-lei¹, GUO Zhuang^{1,*}

(1. Northwest Hubei Research Institute of Traditional Fermented Food, College of Chemical Engineering and Food Science, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China; 2. Institute of Agro-products Processing, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, Sichuan, China)

Abstract: The quality evaluation of kiwifruit wine samples, which fermented by *Saccharomyces cerevisiae* and 39 strains of *Lactobacillus plantarum* respectively, were evaluated by electronic tongue, electronic nose, and high-performance liquid chromatography (HPLC). The testing of electronic tongue indicated that sourness, bitterness, astringency, saltiness, and aftertaste A were significantly more abundant in the kiwifruit wine fermented by *L. plantarum*, whereas richness showed the opposite tendency. The testing of electronic nose indicated that the response value of sensor W1C, W6S, W1S, W1W, W3S, and W5C were higher in the kiwifruit wine fermented by *L. plantarum*, whereas sensor W5S and W5C showed the opposite tendency. The testing of HPLC indicated that the content of quinic acid and citric acid were lower in kiwifruit wine with better flavor quality ($P<0.05$). Meanwhile, *L. plantarum* HBUAS52016 and *L. plantarum* HBUAS52017 had certain potential to be used in the fermented of kiwifruit wine.

Key words: kiwifruit wines; electronic tongue; electronic nose; *Lactobacillus plantarum*; quality evaluation

基金项目:成都市产业集群协同创新项目(2015-cp030031-nc);湖北省荆楚卓越工程师协同育人计划(201657)

作者简介:葛东颖(1999—),女(汉),本科,研究方向:食品生物技术。

* 通信作者:郭壮(1984—),男,副教授,博士,研究方向:食品生物技术。

- 与食品机械,2001,19(5): 12-16
- [17] 周昆,钱海峰,周惠明,等.超声-微波协同水解玉米淀粉生成乙酰丙酸的工艺研究[J].食品工业科技,2008,29(2): 243-246
- [18] 丁文平,王月慧,丁霄霖.大米淀粉胶凝和回生机理的研究[J].粮食与饲料工业,2003(3): 11-13,16

- [19] 彭松,王红娟,彭峰.温和条件下微波超声协同作用对纤维素酸解的研究[J].化工新型材料,2009,37(5): 64-68
- [20] 沈丹.挤压膨化对鹰嘴豆淀粉理化特性及其品质的影响[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2015

收稿日期:2019-02-12

引文格式:

葛东颖,李华佳,刘雪婷,等.植物乳杆菌对猕猴桃果酒品质影响的评价[J].食品研究与开发,2019,40(11):71-75

GE Dongying, LI Huajia, LIU Xueting, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on the Product Quality of Kiwifruit Wine[J].

Food Research and Development, 2019, 40(11): 71-75

作为呼吸跃变型水果,猕猴桃采摘后不易保藏和运输,长时间贮藏易变软和腐败变质,因此对其进行深加工则显得尤为重要^[1]。猕猴桃果酒作为猕猴桃深加工的产品,不仅具有浓郁醇厚的酒香,其V_C的含量也相对较高,具有较好的保健作用^[2]。但目前猕猴桃果酒的市场接受度却并不高,究其原因在于猕猴桃果酒的酸度过高,消费者难以接受^[3]。多年来,国内外的众多研究者都致力于借助苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)来降低果酒中的酸度^[4]。

在MLF发酵过程中,酒类酒球菌(*Oenococcus oeni*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)可以把口感尖锐的苹果酸转化为口感圆润的乳酸,从而实现了果酒酸度的降低^[5]。然而目前商业化的*O. oeni*生长缓慢且对于环境及营养的要求较高,生长周期较长,延缓了工业化生产周期,增加了污染的潜在可能性^[6],*L. plantarum*对环境的适应能力较强、生产速度快,使猕猴桃果酒的产业化生产成为了可能^[7]。电子舌和电子鼻技术在食品品质的评价方面具有广泛的应用,不仅可以快速的对食品滋味和风味品质进行分析,而且具有不受主观因素影响的优点^[8],两种技术相结合目前在红酒^[9-10]、橄榄油^[11]、樱桃番茄汁^[12]和鱼肉^[13]的品质评价中有着广泛的应用。

本研究以鄂西北传统发酵食品菌种资源库中39株*L. plantarum*(植物乳杆菌)为依托,将其与酵母菌混合发酵进行猕猴桃果酒制备,并使用电子舌和电子鼻相结合的手段对猕猴桃果酒的品质进行评价,同时结合高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)技术对果酒中有机酸构成进行了分析,以期从中筛选出发酵性能优良的菌株用于后续猕猴桃果酒的生产。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

徐香猕猴桃:市售;39株*L. plantarum*(植物乳杆菌):由湖北文理学院鄂西北传统发酵食品菌种资源库提供,其中1号~5号菌株编号为HBUAS52005、HBUAS52006、HBUAS52007、HBUAS52008和HBUAS52010,6~10号菌株编号为HBUAS52015、HBUAS-

52016、HBUAS52017、HBUAS52018和HBUAS52019,11号~15号菌株编号为HBUAS52020、HBUAS52154、HBUAS52168、HBUAS52173和HBUAS52175,16号~20号菌株编号为HBUAS52151、HBUAS52153、HBUAS52155、HBUAS52166和HBUAS52158,21号~25号菌株编号为HBUAS52340、HBUAS52336、HBUAS52337、HBUAS52343和HBUAS52345,26号~30号菌株编号为HBUAS52346、HBUAS52350、HBUAS52333、HBUAS52321和HBUAS52323,31号~35号菌株编号为HBUAS52324、HBUAS52328、HBUAS52352、HBUAS52339和HBUAS52322,36号~39号菌株编号为HBUAS52325、HBUAS52327、HBUAS52354和HBUAS52356;RW葡萄酒·果酒专用酵母:安琪酵母股份有限公司;甲醇(色谱纯)、异丙醇(色谱纯)、磷酸二氢钾(优级纯)、奎宁酸(优级纯)、苹果酸(优级纯)、乳酸(优级纯)、柠檬酸(优级纯):国药集团化学试剂有限公司;氯化钠:分析纯,天津市化学试剂研究所有限公司;国药集团化学试剂有限公司;果胶酶(5万U/g)、偏重亚硫酸钾:食品级,烟台帝伯仕自酿机有限公司;参比溶液、阳离子溶液、预处理溶液、阴离子溶液、内部溶液:日本INSENT公司。

SA 402B电子舌(配备2个参比电极和5个味觉传感器):日本Insent公司;PEN3电子鼻(配备10个金属传感器):德国Airsense公司;LC-20ADXR高效液相色谱仪、InertSustainSwift C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、SPD-M20A二极管阵列检测器:日本岛津公司;CR21N高速离心机:日本日立公司;250B数显生化培养箱:金坛市荣华仪器制造有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 猕猴桃果酒的制作

选择相同成熟度且无变质的猕猴桃去皮后破碎入罐,按添加0.10 mg/L偏重亚硫酸钾和0.06%的果胶酶,搅拌均匀后使用白砂糖调节糖度至22°Brix,接种酵母6 h后分装为40罐,按照10⁶ CFU/mL猕猴桃酒添加量分别接入39株*L. plantarum*于22℃发酵7 d后18℃后发酵20 d,样品5 000 r/min离心10 min取上清液待用^[14]。设置不添加*L. plantarum*的样品为对照组。

1.2.2 基于电子舌猕猴桃果酒的滋味品质评价

参考王玉荣等^[15]和郭壮等^[16]对米酒滋味品质测定

的条件并做适当优化。取 40 mL 果酒样品和 80 mL 蒸馏水混合均匀后 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液抽滤待用。每个样品重复测定 4 次, 取后 3 次数据为试验数据。

1.2.3 基于电子鼻猕猴桃果酒的风味品质评价

参考张振等^[17]和徐晚秀等^[18]对黄酒和白酒风味品质测定的条件并做适当优化。取 10 mL 果酒样品于电子鼻样品瓶中, 50 ℃保温 30 min, 室温静置 10 min 后插入电子鼻探头进行测定, 平行测定 3 次。响应曲线在 60 s 后达到稳定, 选取 69、70 s 和 71 s 的响应值, 并计算其平均值为测试值。

1.2.4 基于 HPLC 猕猴桃果酒中有机酸测定

参考王刚等^[19]和杨成聪等^[20]对猕猴桃果酒和米酒有机酸测定的条件并做适当优化, 对猕猴桃果酒中奎宁酸、乳酸、苹果酸和柠檬酸的含量进行测定。准确吸取 2 mL 果酒样品于 10 mL 容量瓶中, 加入 0.2 mL 的 0.1 mol/L 的磷酸溶液后用流动相定容, 过 0.22 μm 针孔滤膜待用。参数设置: 流动相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (pH 2.50), 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL/min, 检测器为二极管阵列紫外-可见光检测器, 检测波长 215 nm。采用保留时间对果酒中 4 种有机酸进行定性, 采用峰面积和外标法对 4 种有机酸进行定量计算。

1.2.5 统计学分析

使用主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 和多元方差分析 (multivariate analysis of variance, MANOVA) 对猕猴桃果酒品质进行分析, 采用 Mann-Whitney 检验对不同分组猕猴桃果酒各指标的差异性进行分析。采用 PAST 3 软件做 PCA, 其他分析均使用 MATLAB 2016b 软件; 使用 Origin 2017 绘图。

2 结果与分析

2.1 猕猴桃果酒滋味和风味品质评价

本研究首先使用电子舌技术对猕猴桃果酒 8 个滋

味品质指标进行了测定, 结果如图 1 所示。

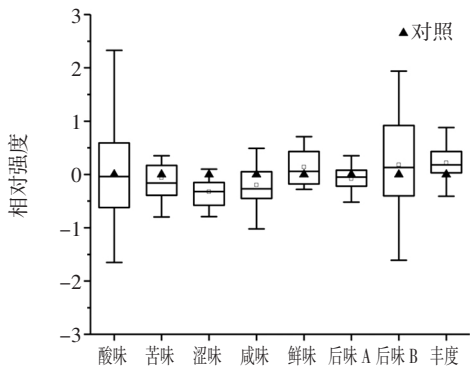


图 1 猕猴桃果酒各滋味指标的箱形图 (n=40)
Fig.1 Box diagram of the taste indicators of kiwi fruit wine (n=40)

由图 1 可知, 纳入研究的 40 个猕猴桃果酒在酸味和后味 B (苦的回味) 上具有较大的组间差异, 极差值分别为 5.05 和 3.55, 其次为苦味、咸味、丰度 (鲜味的回味) 和后味 A (涩味的回味), 极差值分别为 2.69、2.22、1.63 和 1.06, 而在鲜味和涩味上的差异值较小, 分别为 0.99 和 0.89。当不同样品在某一滋味指标上的差值大于 1.0 时, 其差异可以通过感官鉴评的方法予以区分出^[21], 由此可见, 猕猴桃果酒的鲜味和涩味不会影响消费者对产品的喜好程度。

由图 1 亦可知, 添加 *L. plantarum* 发酵后部分猕猴桃果酒较之对照组其酸味、苦味、涩味、咸味和后味 A (涩味的回味) 呈明显下降趋势, 而部分猕猴桃果酒的丰度 (鲜味的回味) 呈现上升趋势。由此可见, 添加 *L. plantarum* 可明显改善猕猴桃果酒的滋味品质, 然而这与菌株自身的发酵特性有关, 不同菌株之间差异较大, 因而进行猕猴桃果酒用优良 MLF 植物乳杆菌的筛选则显得尤为重要。本研究进一步采用电子鼻技术对不同处理猕猴桃果酒中典型物质类型进行了测定, 结果如表 1 所示。

表 1 猕猴桃果酒中风味指标的差异性分析 (n=40)

Table 1 Difference analysis of flavor indicators in kiwi fruit wine (n=40)

金属电极	性能描述	对照组	添加乳杆菌
W1C	对芳香类物质灵敏	0.017	0.019(0.019, 0.016~0.024)
W5S	对氢氧化物灵敏	162.588	126.446(123.352, 107.681~158.618)
W3C	对氨气、芳香类物质灵敏	0.080	0.079(0.080, 0.068~0.087)
W6S	对氢气有选择性	3.027	3.167(3.103, 2.6~4.044)
W5C	对芳香类物质灵敏	0.083	0.071(0.070, 0.061~0.081)
W1S	对甲烷类灵敏	218.850	240.539(237.529, 217.915~276.874)
W1W	对有机硫化物、萜类物质灵敏	75.614	76.492(75.657, 71.307~85.179)
W2S	对乙醇灵敏	118.096	99.999(97.383, 83.605~133.562)
W2W	对有机硫化物灵敏	42.380	41.397(41.361, 38.865~45.49)
W3S	对烷烃类物质灵敏	4.246	4.358(4.257, 3.984~5.044)

由表 1 可知,传感器 W1C、W6S、W1S、W1W 和 W3S 对添加 *L. plantarum* 发酵猕猴桃果酒的响应值明显偏低,而传感器 W5S 和 W5C 呈现出相反的趋势。由此可见,添加 *L. plantarum* 可明显提升猕猴桃果酒的香气成分,同时对部分不良气味具有明显的降低作用。

2.2 基于 PCA 猕猴桃果酒的差异性分析

以滋味和气味为评价指标,在构建 18 行×40 列矩阵的基础上,本研究使用 PCA 对猕猴桃果酒品质的区分度进行了评价,PCA 的方差贡献率如表 2 所示。

表 2 主成分的方差贡献率

Table 2 Variance contribution rate of principal components

主成分	特征值	方差贡献率/%	累计贡献率/%
PC1	1.75	41.93	41.93
PC2	0.99	23.81	65.75
PC3	0.55	13.27	79.01
PC4	0.20	4.77	83.78
PC5	0.17	4.11	87.89
PC6	0.15	3.65	91.54
PC7	0.10	2.42	93.96
PC8	0.07	1.73	95.70
PC9	0.06	1.53	97.23
PC10	0.04	1.06	98.29

由表 2 可知,仅 PC1 的特征值大于 1,前 5 个主成分的累计方差贡献率为 87.89%,分别为 41.93%、23.81%、13.27%、4.77%和 4.11%。由此可知,18 个评价指标降为了 5 个不相关的综合变量,说明了这 5 个综合变量代表了绝大部分的变量信息,达到了降维的目的。基于 PCA 猕猴桃果酒因子载荷图如图 2 所示。

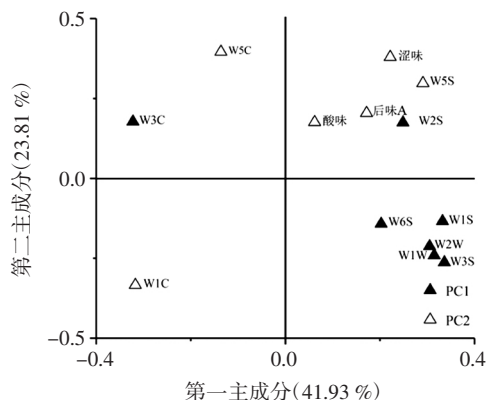


图 2 基于 PCA 猕猴桃果酒品质的因子载荷图

Fig.2 Factor load map based on PCA kiwi fruit wine quality

由图 2 可知,第一主成分(PC1)主要是由 W3C、W2S、W1S、W2W、W1W 和 W3S 6 个指标构成,PC1 中载荷量较高的正影响品质评价指标是 W3S、W1S、W1W、W2W、W2S 和 W6S,其中 W3S 的载荷量最高为

0.34,载荷量较高的负影响品质评价指标是 W3C,其载荷量为 0.32,即 PC1 的差异性主要集中在烷烃类物质和芳香类物质上;第二主成分主要是由 W5C、涩味、W5S、后味 A(涩味的回味)、酸味和 W1C 构成并占全部权重的 23.81%,PC2 中载荷量较高的正影响品质评价指标是 W5C、涩味、后味 A(涩味的回味)和酸味,其中 W5C 的载荷量最高为 0.40,载荷量较高的负影响品质评价指标为 W1C,其载荷量为 0.33,即 PC2 的的差异性主要集中在涩味和芳香类物质上。基于 PCA 分析猕猴桃果酒的因子得分图如图 3 所示。

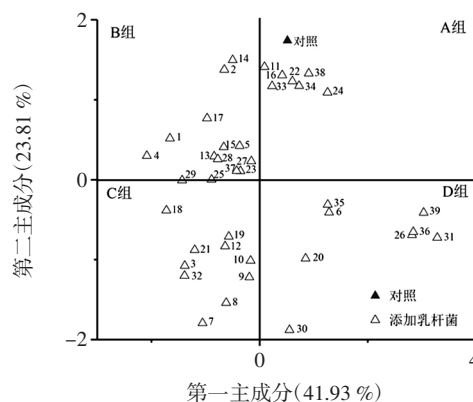


图 3 基于 PCA 猕猴桃果酒品质的因子得分图

Fig.3 Factor score map based on PCA kiwi fruit wine quality

由图 3 可知,40 个猕猴桃果酒样品在 4 个象限均有分布,其中分布于第一、二、三和四象限的样品数分别为 8、14、10 个和 8 个。结合因子载荷图可知,偏向 X 轴正方向的猕猴桃果酒样品在烷烃类、甲烷类、有机硫化物和乙醇的相对含量较高,偏向 X 轴负方向的猕猴桃果酒样品在芳香类物质含量较高;而偏向 Y 轴正方向的猕猴桃果酒样品在涩味、酸味、后味 A(涩味的回味)和氢氧化物等强度较大,偏向 Y 轴负方向的猕猴桃果酒样品的芳香类物质含量较高。由此可知,位于第三象限的猕猴桃果酒品质最好,其次为第二、第四和第一象限,因而第三象限的 10 株菌株,尤其是 7 号(菌种资源库中编号为 HBUAS52016)和 8 号 *L. plantarum*(菌种资源库中编号为 HBUAS52017)可以作为猕猴桃果酒用优良 MLF 植物乳杆菌的潜在菌株进行后续筛选。

2.3 猕猴桃果酒有机酸的分析

本研究以 PCA 结果为分组依据,将 40 个猕猴桃果酒样品分为 A、B、C 组和 D 组,同时结合 HPLC 对猕猴桃果酒中的 4 种有机酸进行分析,从而对造成不同品质猕猴桃果酒间差异的关键物质进行甄别,进而为后续猕猴桃果酒用 *L. plantarum* 的筛选提供指导。不同分组猕猴桃果酒中有机酸含量的比较分析结果如

表3所示。

表3 猕猴桃果酒中4种有机酸的差异性分析
Table 3 Difference analysis of four organic acids in kiwi fruit wine

有机酸	奎尼酸/ (mg/mL)	柠檬酸/ (mg/mL)	苹果酸/ (mg/mL)	乳酸/ (mg/mL)
A组	9.24±0.22 ^a	7.73±0.24 ^a	0.50±0.57 ^a	1.88±0.50 ^a
B组	9.12±0.43 ^a	7.79±0.28 ^a	0.71±0.43 ^a	1.98±0.66 ^a
C组	7.9±1.13 ^b	6.71±0.67 ^b	0.56±0.49 ^a	1.65±0.80 ^a
D组	9.09±0.78 ^a	7.56±0.25 ^a	0.79±0.34 ^a	1.84±0.37 ^a

注:同列字母不同,表示差异显著($P<0.05$)。

由表3可知,猕猴桃果酒中奎尼酸的含量最高、其次是柠檬酸、乳酸和苹果酸。经Mann-Whitney检验发现,C组猕猴桃果酒中奎尼酸和柠檬酸的含量显著低于其他组($P<0.05$),而苹果酸和乳酸的含量与其他组显著均无差异($P>0.05$)。由此可见,品质较佳的猕猴桃果酒其有机酸含量偏低,且添加*L. plantarum*可明显降低猕猴桃果酒中的有机酸含量。

3 结论

以鄂西北传统发酵食品菌种资源库中39株*L. plantarum*为依托,将其与酵母菌混合发酵进行猕猴桃果酒制备,并使用电子舌和电子鼻相结合的手段对猕猴桃果酒的品质进行了评价,结果发现部分*L. plantarum*通过降低猕猴桃果酒的酸味、苦味和涩味及提升香气成分从而改善了猕猴桃果酒的品质,且*L. plantarum* HBUAS52016和*L. plantarum* HBUAS52017可作为猕猴桃果酒用优良MLF植物乳杆菌的潜在菌株进行后续筛选。

参考文献:

[1] 张美芳,何玲,张美丽,等.猕猴桃鲜果贮藏保鲜研究进展[J].食品科学,2014,35(11):343-347

[2] 冯尚坤.营养型猕猴桃酒发酵工艺优化[J].中国酿造,2015,34(2):172-175

[3] 张方艳,蒲彪,刘兴艳.猕猴桃果酒的降酸研究[J].食品工业科技,2014,35(18):207-210

[4] Bauer R, Dicks L M T. Control of malolactic fermentation in wine: a review[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2017, 25(2): 74-88

[5] Betteridge A, Grbin P, Jiranek V. Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(9): 547-553

[6] Bastard A, Coelho C, Briandet R, et al. Effect of biofilm formation by *Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(4): 613

[7] 李静,樊明涛,孙慧烨.植物乳杆菌对猕猴桃酒降酸效果的研究[J].食品工业科技,2016,37(1):165-169

[8] 巴特尔达赖,王锡昌,吴娜,等.电子舌技术在真假伊力老陈酒鉴别中的应用[J].食品工业科技,2017,38(9):290-293

[9] Buratti S, Benedetti S, Scampicchio M, et al. Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 525(1): 133-139

[10] Rodriguez-Mendez M L, Apetrei C, Gay M, et al. Evaluation of oxygen exposure levels and polyphenolic content of red wines using an electronic panel formed by an electronic nose and an electronic tongue[J]. Food Chemistry, 2014, 155(7): 91-97

[11] Haddi Z, Alami H, El Bari N, et al. Electronic nose and tongue combination for improved classification of Moroccan virgin olive oil profiles[J]. Food Research International, 2013, 54(2): 1488-1498

[12] Hong X, Wang J. Detection of adulteration in cherry tomato juices based on electronic nose and tongue: comparison of different data fusion approaches[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 126(4): 89-97

[13] Han F, Huang X, Teye E, et al. Nondestructive detection of fish freshness during its preservation by combining electronic nose and electronic tongue techniques in conjunction with chemometric analysis[J]. Analytical Methods, 2014, 6(2): 529-536

[14] 袁琳,宋育阳,鲁燕汶,等.两种酵母菌对猕猴桃原酒品质的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2017,37(2):130-133

[15] 王玉荣,张俊英,胡欣洁,等.湖北孝感和四川成都地区来源的酒曲对米酒滋味品质影响的评价[J].食品科学,2015,36(16):207-210

[16] 郭壮,汤尚文,王玉荣,等.基于电子舌技术的襄阳市售米酒滋味品质评价[J].食品工业科技,2015,36(15):289-293

[17] 张振,李臻峰,宋飞虎,等.电子鼻结合化学计量法用于检测黄酒酒龄[J].食品与机械,2015,31(3):57-61

[18] 徐晚秀,李臻峰,张振,等.基于电子鼻的中国白酒酒龄检测[J].食品与发酵工业,2016,42(2):144-149

[19] 王刚,王涛,潘德林,等.不同品种猕猴桃果实有机酸组分及含量分析[J].农学学报,2017,7(12):81-84

[20] 杨成聪,沈馨,马雪伟,等.高效液相色谱法测定米酒中有机酸的含量[J].食品研究与开发,2018,39(10):116-123

[21] Kobayashi Y, Habara M, Ikezaki H, et al. Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores[J]. Sensors, 2010, 10(4): 3411-3443

收稿日期:2018-09-30