

柑橘红茶菌饮料发酵工艺的优化

徐家豪, 林静嫦, 张舒宁, 董思远, 钟先峰, 陈文胜, 陈礼培*

(佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东省传统发酵食品工程技术研究中心, 广东省食品流通安全控制工程技术研究中心, 佛山市酿造工程技术研究中心, 佛山市农业生物制造工程技术研究中心, 广东佛山 528231)

摘要: 为了确定柑橘红茶菌饮料的最佳发酵工艺参数。该研究以新会柑橘、英德红茶为主要原料, 通过接种红茶菌发酵生产柑橘红茶菌饮料, 在单因素实验的基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法设计试验, 运用 4 因素 3 水平, 以 pH 值为响应指标, 探究乳酸菌粉添加量、蔗糖添加量、发酵时间和发酵温度四种因素对柑橘红茶饮料品质的影响, 并确定柑橘红茶菌饮料发酵的最佳工艺条件参数。结果表明, 柑橘红茶菌饮料发酵的最佳工艺条件参数为: 乳酸菌添加量 0.40%、蔗糖添加量 15%、发酵温度 32 °C、发酵时间为 4 d。在此条件下, 此时 pH 值为 3.14, 感官评价分值为 93.1 分, 可溶性固形物消耗量为 12.30%, 与 3 次验证试验的结果接近, 说明回归模型拟合程度高, 因此响应面法优化柑橘红茶菌饮料的发酵工艺具有可靠性, 可为柑橘红茶菌饮料研发提供一定的科学依据。

关键词: 新会柑橘; 英德红茶; 饮料; 配方优化; 响应面试验

文章编号: 1673-9078(2022)04-106-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0724

Optimization of Fermentation Technology of Citrus Black Tea Beverage

XU Jiahao, LIN Jingchang, ZHANG Shuning, DONG Siyuan, ZHONG Xianfeng, CHEN Wensheng, CHEN Lippei*

(School of Food Science and Engineering, Research on Traditional Fermented Food Engineering Technology in Guangdong Province, Guangdong Food Safety Control Engineering Technology Research Center, Foshan Brewing Engineering Technology Research Center, Foshan Agricultural Biological Manufacturing Engineering Technology Research Center, Foshan University, Foshan 528231, China)

Abstract: In order to determine the best fermentation parameters of citrus tea fungus beverage, in this experiment, Xinhui citrus and Yingde black tea were used as main raw materials to produce citrus black tea beverage by inoculation of black tea fungus. Based on the single factor experiment, Box-Behnken response surface method was used to design the experiment, using four factors and three levels, taking pH value as the response index, to explore the influence of four factors on the quality of citrus black tea beverage, such as the amount of lactic acid bacteria powder, the amount of sucrose, the fermentation time and the fermentation temperature, and to determine the best technological parameters of citrus black tea beverage fermentation. The results showed that the optimum fermentation conditions of citrus tea fungus beverage were as follows: lactic acid bacteria 0.40%, sucrose 15%, fermentation temperature 32 °C and fermentation time 4 days. Under these conditions, the pH value is 3.14, the sensory evaluation score is 93.1 points, and the consumption of soluble solids is 12.30%, which is close to the results of three verification tests, indicating that the regression model fits well. Therefore, the response surface method to optimize the fermentation process of citrus black tea beverage is reliable and can provide a scientific basis for the research and development of citrus black tea beverage.

Key words: Xinhui citrus; Yingde black tea; beverage; formula optimization; response surface

引文格式:

徐家豪, 林静嫦, 张舒宁, 等. 柑橘红茶菌饮料发酵工艺的优化[J]. 现代食品科技, 2022, 38(4): 106-113, +274

XU Jiahao, LIN Jingchang, ZHANG Shuning, et al. Optimization of fermentation technology of citrus black tea beverage [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 106-113, +274

收稿日期: 2021-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072198; 31501476; 31660459); 广东省自然科学基金项目 (2020A1515011444); 广东省教育厅重点领域专项 (2020ZDZX1029; 2020ZDZX104); 佛山市科技奖培育入库项目 (2020001003715)

作者简介: 徐家豪 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2508437225@qq.com

通讯作者: 陈礼培 (1967-), 男, 硕士, 农艺师, 研究方向: 农业, E-mail: 731540108@qq.com

新会柑橘, 又称茶枝柑, 产自广东新会, 是中国地理标志产品, 新会柑橘有丰富的苹果酸、维生素C、糖类、类黄酮、柚皮苷等营养物质^[1], 具有抗氧化、抗突变、抗癌等多种生物活性, 对心脑血管系统疾病的发生具有一定预防作用^[2]。新会柑橘果皮常被制作成陈皮, 而其果肉则因味酸而较少被利用, 当作废料处理, 这种“留皮弃肉”的处理方式, 造成了资源浪费, 同时也造成了一定的环境污染^[3]。

红茶是产量最多且消费最广的茶, 占据了全球茶销量的80%^[4]。由于其独特的香气、味道、颜色及有益健康的特性, 红茶已成为最令人愉悦和受欢迎的饮品之一^[5]。英德红茶是广东著名红茶, 中国地理标志产品, 以其汤色红亮、香气浓郁而闻名^[6], 受到国内外消费者的广泛青睐, 其含有多酚类物质、茶黄素等活性成分^[7], 具有抗氧化^[8], 抑菌^[9], 解毒抗癌^[10]等功效。近年来, 以红茶为原料研发的红茶菌饮料不断进入消费市场^[11]。红茶菌饮料是一种起源于中国的传统发酵饮料^[12,13], 以红茶糖水为原料, 由醋酸菌、酵母菌和乳酸菌^[14]组成共生菌群混合发酵而成^[15], 不但保留了红茶本身的饮用价值, 同时兼具独特的发酵风味和保健作用^[16]。本研究以广东特产-新会柑橘和英德红茶为原料, 利用红茶菌, 通过添加柑橘汁混合发酵生产柑橘红茶菌饮料, 并对柑橘红茶菌饮料发酵工艺进行探究。首先通过单因素试验, 探究乳酸菌添加量、糖添加量、发酵温度和发酵时间对红茶菌饮料的影响, 再通过响应面法优化柑橘红茶菌饮料发酵工艺, 最终得到制备柑橘红茶菌饮料最优发酵工艺, 以期为实现广东特色产品融合开发, 提高新会柑橘和英德红茶附加值, 拓宽其应用领域提供理论依据, 也为柑橘红茶菌饮料研发提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

新会柑橘; 红茶叶, 购自茶里集团有限公司; 蔗糖, 福正东海食品有限公司; 乳酸菌, 本实验室筛选鉴定保藏的食品源乳酸菌菌株, 制成菌粉备用; 葡萄酒果酒酵母菌, 购自安琪酵母有限公司; 醋酸菌, 适用于醋酸发酵, 购自济宁玉园生物科技有限公司; 福林酚、没食子酸、柠檬酸、碳酸钠、无水乙醇、无水碳酸钠, 购自广州化学试剂公司; 果胶酶(食品级), 购自康达生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

7200型可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有

限公司; LRH-150型生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; JYL-C93T型榨汁机, 九阳股份有限公司; WAY-2WAJ型阿贝折光仪, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; GR60DA型全自动灭菌锅, 致微仪器有限公司; FE28-Standard型pH计、ME104型电子天平(万分之一), 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 柑橘红茶菌饮料流程

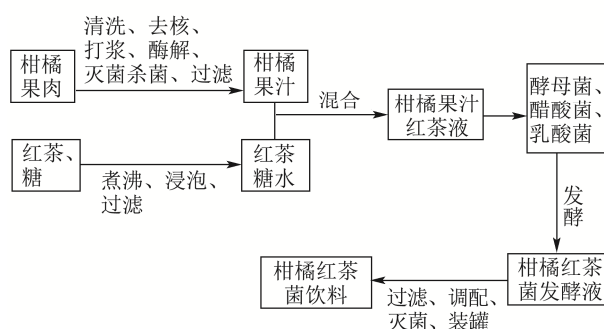


图1 柑橘红茶菌饮料工艺流程图

Fig.1 Technological flow chart of citrus black tea beverage

1.3.2 操作要点

1.3.2.1 柑橘汁制备流程

根据娄明等^[17]的制备方法制备柑橘汁。

1.3.2.2 糖茶水制备流程

根据茶里红茶品牌推荐的浸泡方法, 取2包红茶包于500 mL沸水中浸泡3 min, 浸泡完毕后, 取出茶包, 加入蔗糖(80 g/L), 再次煮沸10 min, 进行灭菌处理^[18]。

1.3.2.3 混合、调配

将柑橘汁和糖茶水按照1:1的比例混合, 根据实验探究加入蔗糖调配初始糖量, 得到柑橘果汁红茶液。

1.3.2.4 接种、发酵

在柑橘果汁红茶液中加入一定量的酵母菌粉、乳酸菌粉、醋酸菌粉, 搅匀, 置于32 °C培养箱发酵, 糖度和pH趋于稳定时发酵停止。

1.3.2.5 过滤、灭菌、装罐

发酵完后, 取发酵液上清液, 用8层纱布过滤, 得澄清液体, 调配糖度和酸度后, 进行高温灭菌(100 °C, 10 min), 冷却后, 装罐, 于4 °C冷藏保存。

1.4 指标测定

1.4.1 pH测定

便携式/台式酸度计测量pH, 参照GB/T 11165-2005的测定方法。

1.4.2 可溶性固形物测定

可溶性固形物测定, 参照 GB/T 12143-2008 饮料通用分析方法。

1.4.3 柑橘红茶菌饮料感官评价

通过感官评价探究饮料的工艺条件。感官评价由 10 名经过感官评价训练、有经验的评定员, 进行评定。根据分级测试评价的要求, 从色泽、口感、风味、组织状态等 4 个方面对柑橘红茶菌饮料的品质进行评分, 满分 100 分。柑橘红茶菌饮料的评定标准见表 1。

表 1 柑橘红茶菌饮料感官评价评分表

Table 1 Sensory evaluation scale of citrus kombucha beverage

评分项目	评分标准	分值/分
色泽 (20分)	颜色淡黄透亮颜色均匀一致无杂色	10~20
	颜色偏暗黄或偏淡黄颜色较均匀	6~10
	颜色深黄色或浅黄色	0~5
状态 (20分)	清澈透明, 允许有少量沉淀	11~20
	较清澈透明, 有明显沉淀杂质	6~10
	混浊沉淀物较多	0~5
口感 (30分)	甜度适中, 口味纯口感细腻润滑	21~30
	酸甜比例差略带杂味, 口感较细腻	11~20
	偏酸或偏甜杂味明显口感粗糙	0~10
风味 (30分)	有柑橘和茶的醇香混合, 气味协调柔和	21~30
	柑橘稍淡且茶味过浓或较淡	11~20
	柑橘味且无茶味, 气味不协调	0~10
总分		100

1.5 发酵工艺的确定

1.5.1 单因素试验

经文献调研可知, 影响柑橘红茶菌发酵的主要因素有: 发酵菌(酵母菌、醋酸菌、乳酸菌)比例^[19]、蔗糖添加量^[20,21]、发酵时间^[22]和发酵温度^[23]。这些因素能够影响微生物的生长及最终代谢产物, 从而影响最终产品品质。pH 反映了有机酸产生情况, 同时影响着饮料风味^[24], 感官评定能反映饮料的品质及风味; 消耗的可溶性固形物水平反映了微生物的生长过程^[19], 故本研究以 pH、感官评定、可溶性固形物消耗量为响应值, 通过单因素试验, 确定单因素水平范围, 然后利用 Box-Behnken 响应面优化方法探究各因素对柑橘红茶菌饮料的综合影响, 以确定柑橘红茶菌饮料发酵的最优发酵工艺。

1.5.1.1 乳酸菌粉添加量

红茶菌主要由酵母菌、醋酸菌、乳酸菌组成。而乳酸菌可发酵糖类物质产生乳酸等多种有机酸, 且具有促进营养物质吸收、增加人体有益菌群、抗氧化等

多种益生功能。研究表明^[22], 红茶菌中的乳酸菌不仅可以改善红茶菌饮料风味, 且可以提高醋酸菌的存活率和产有机酸能力。鉴此, 发酵菌比例选择, 以乳酸菌添加量变化为主导, 在自然 pH 值下, 固定酵母菌、醋酸菌添加量分别为 0.10%, 固定初始糖量为 15%, 于 28 °C 恒温生化培养箱发酵 5 d。在乳酸菌粉添加量为 0.20%、0.40%、0.60%、0.80%、1.00% 的情况下, 探究乳酸菌粉添加量对柑橘红茶菌饮料品质的影响。

1.5.1.2 蔗糖添加量

在自然 pH 值下, 乳酸菌粉添加量为 0.40%, 于 28 °C 恒温生化培养箱发酵 5 d。分别加入蔗糖 1.80、5.50、8.80、12.50、16.70 g 于 100 mL 的柑橘果汁红茶菌发酵液中, 调配成糖量分别为 5%、10%、15%、20%、25% 的样品, 探究蔗糖添加量对柑橘红茶菌饮料品质的影响。

1.5.1.3 发酵温度

在自然 pH 值下, 乳酸菌粉添加量为 0.40%, 初始糖量固定为 15%, 于恒温生化培养箱发酵 5 d。柑橘果汁红茶菌发酵液分别放置于温度为 24、28、32、36、40 °C。探究发酵温度对柑橘红茶菌饮料品质的影响。

1.5.1.4 发酵时间

在自然 pH 值下, 乳酸菌粉添加量为 0.40%, 初始糖量固定为 15%。柑橘果汁红茶菌发酵液分别发酵 1、2、3、4、5、6 d, 探究发酵时间对柑橘红茶菌饮料品质的影响。

1.5.2 响应面试验设计

表 2 响应面试验水平及因素

Table 2 Response surface test level and factors

水平	因素			
	A 乳酸菌粉添加量/%	B 蔗糖添加量/%	C 发酵温度/°C	D 发酵时间/d
-1	0.20	10	28	3
0	0.40	15	32	4
1	0.60	20	36	5

研究表明, 在红茶菌饮料发酵过程中, pH 反映了有机酸产生情况, 同时也反映了红茶菌菌群活性, 且对饮料风味影响较大^[25], 鉴此, 本研究在单因素试验结果基础上, 使用 Box-Behnken 试验设计, 以柑橘红茶菌饮料 pH 值为响应值, 探究乳酸菌粉添加量 (A)、蔗糖添加量 (B)、发酵温度 (C)、发酵时间 (D), 4 个因素对柑橘红茶菌饮料发酵的影响, 采用 Box-Behnken 模型进行四因素三水平试验设计, 试验因素与水平如表 2 所示。

1.5.3 数据分析

实验数据采用 Microsoft Excel 2019 和 Design-Expert 8.0.6 软件作数据分析, 采用 OriginPro 2018 作图, 每个试验重复 3 次及以上, 结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 乳酸菌粉添加量对柑橘红茶菌饮料发酵的影响

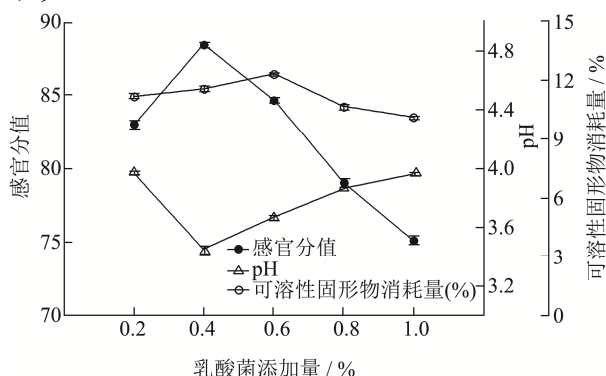


图2 乳酸菌粉添加量对柑橘红茶菌发酵的影响

Fig.2 Effect of lactic acid bacteria addition on fermentation of citrus black tea bacteria

红茶菌饮料的特点之一是有机酸含量丰富, 而有机酸含量与 pH 值呈一定正相关性^[26]。Coelho 等^[14]研究认为, 红茶菌饮料的 pH 最佳范围是 2.5~4.2。在此范围内, pH 越低, 有机酸越丰富, 并对人体不会造成危害。红茶菌主要由醋酸菌、酵母、乳酸菌组成^[27]。乳酸菌作为益生菌, 具有抗氧化、改善肠道菌群等益生特性, 它可利用糖类产生乳酸^[28], 且能提高醋酸菌存活率和产有机酸能力^[29]。在传统红茶菌饮料(醋酸菌和酵母发酵)的基础上添加乳酸菌, 能影响菌群对碳水化合物的利用和菌体的生长, 同时使得发酵过程中的代谢途径发生变化, 导致代谢产物及其产量也有所不同。添加了乳酸菌的红茶菌饮料, 能产生更多的健康有机酸, 改善饮料风味, 气味更加柔和, 降低刺激酸味^[30], 同时提高饮料益生功效。本研究结果如图 2 所示。随着乳酸菌粉添加量的增加, 感官评价得分的趋势是先增加后下降, 乳酸菌粉添加量为 0.40% 时, 感官评价得分最高, 为 88.47 分, 此时的柑橘红茶菌饮料香气协调, 茶味、果香味及酸味巧妙结合, 滋味酸甜可口, 色泽为橘黄色, 澄清透明; 乳酸菌粉添加量为 0.40% 时, 红茶菌饮料 pH 最低, 为 3.44。乳酸菌添加量为 0.40% 和 0.60% 时, 可溶性固形物的消耗值没有显著性差异 ($p > 0.05$)。结合成本问题考虑, 选择最佳乳酸菌添加量为 0.40%。

2.1.2 蔗糖添加量对柑橘红茶菌饮料发酵的影响

蔗糖不仅可以作为红茶菌饮料发酵的碳源, 还可以作为甜味剂来调节饮料口感的酸甜比。由图 3 可以看出, 在一定范围内, 感官评分会随着蔗糖添加量的增加而升高。但蔗糖添加量过大时, 糖未完全消耗完, 液体浑浊, 香气带有略微的酒香和甜腻, 滋味较涩, 导致感官评分下降; 而蔗糖添加量过少时使得饮料香气和滋味带有着茶涩味; 蔗糖添加量在 15% 时, 柑橘红茶菌饮料清澈透明, 呈现橘黄色, 香气酸甜, 无酒味和涩味, 此时感官评分最高, 为 86.7 分; 而随着蔗糖添加量的增加, pH 值呈先下降后上升的趋势, 可溶性固形物消耗量呈先上升后下降的趋势, 当蔗糖添加量为 15% 时, pH 值最低, 为 3.71; 可溶性固形物消耗量最高, 为 11.77%, 说明此时红茶菌代谢活力较强。因此, 本研究蔗糖的最佳添加量选为 15%。在发酵过程中, 蔗糖是主要的碳源和能源, 红茶菌利用蔗糖代谢原理是酵母通过转化酶将蔗糖水解成葡萄糖和果糖, 并通过糖酵解产生乙醇^[31], 代谢产物作为醋酸菌和乳酸菌代谢产生有机酸的底物被利用, 同时酵母也会合成易挥发的酸性酯类, 和对发展康普茶香气非常重要的果味芳香化合物^[32], 为柑橘红茶菌饮料提供风味, 提升品质。因为醋酸菌不能直接利用蔗糖, 而醋酸菌将酵母代谢产生的葡萄糖和乙醇转化为乙酸及其他有机酸^[28]。

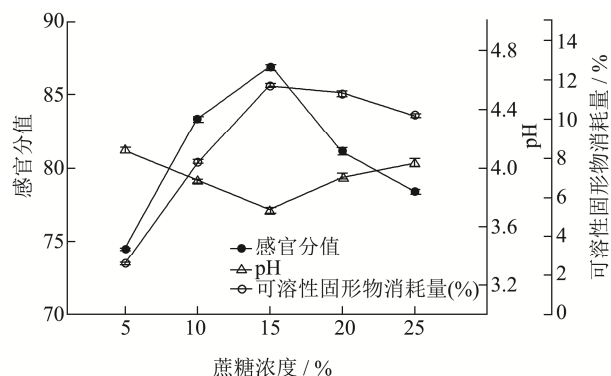


图3 蔗糖浓度对柑橘红茶菌发酵的影响

Fig.3 Effect of sucrose concentration on fermentation of citrus black tea fungus

2.1.3 发酵时间对柑橘红茶菌饮料发酵的影响

柑橘红茶菌饮料发酵是三种菌混合发酵的相对复杂的体系, 无法完全根据某一种菌的生长特性而设定对应的发酵时间。添加了乳酸菌的红茶菌饮料, 发酵所需的时间会比传统红茶菌饮料的发酵所需的时间要短, 促进了酵母和醋酸菌的代谢作用, 也加快了对碳水化合物的利用^[22]。通过初步测定发酵 1 d 到 6 d 的饮料指标变化, 以找到合适的发酵时间。结果如图 4 所示, 发酵时间在 1 d 时, 液体较为浑浊, 且颜色偏

暗橘黄色，气味较不协调，有很淡的酒香味。而发酵在第 5 d 以上，液体较为澄清呈橘黄色，具有浓郁的茶涩味，酸甜味适宜但带有杂味。而发酵第 4 d 时，感官评价分值达到最大，为 87.63 分，此时柑橘红茶菌饮料呈澄清亮橘黄色溶液，酸甜味适宜，滋味和气味协调，同时饮料的 pH 最低，可溶性固形物消耗量最大。在发酵前期，有较充足的物质供微生物生长繁殖，其可充分利用蔗糖转化成有机酸^[33]，致使发酵液 pH 下降。发酵 4 d 后 pH 值稍有上升，推测有机酸进行了转化或者与某些物质发生了反应^[34]，致使有机酸含量略有降低，pH 值稍有上升。由以上结果可知，柑橘红茶菌饮料发酵 4 d 时，pH 为 3.65，可溶性固形物的消耗值达 12.23%，其品质较好。

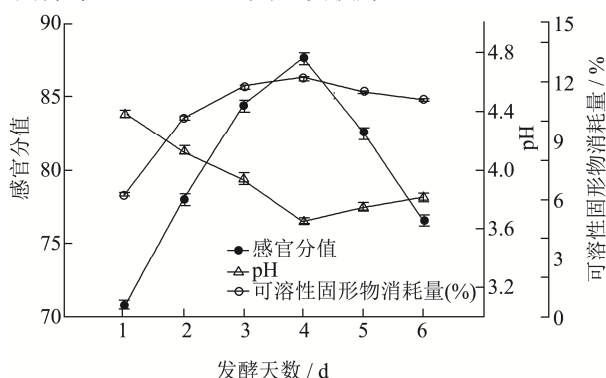


图 4 发酵天数对柑橘红茶菌饮料发酵的影响

Fig.4 Effect of fermentation days on fermentation of citrus black tea beverage

2.1.4 发酵温度对柑橘红茶菌饮料发酵的影响

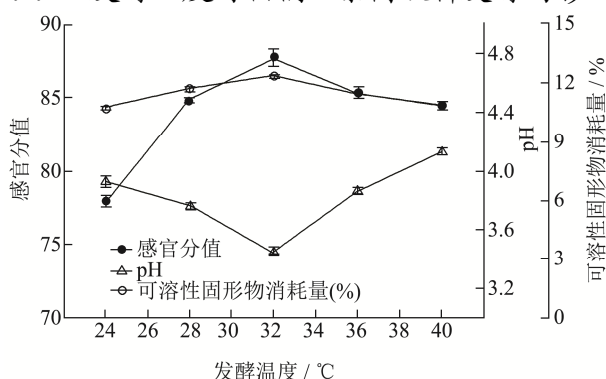


图 5 发酵温度对柑橘红茶菌饮料发酵的影响

Fig.5 Effect of fermentation temperature on fermentation of citrus black tea beverage

如图 5 所示，当发酵温度较低时，饮料风味带有微微酒味，香味比较淡同时滋味较涩，而发酵温度较高时，饮料的颜色呈暗黄色，液体中较为浑浊，口味较甜。发酵温度为 32 °C 时，柑橘红茶菌饮料的感官评价分值最高，为 87.80 分，此时柑橘红茶菌饮料色泽呈橘黄色且清澈透明，酸甜适中，口感细腻润滑，气味协调柔和。发酵温度对菌种生长、产酸能力有一

定影响。发酵温度在 32 °C 时，可溶性固形物消耗最大，pH 值最低。说明在发酵温度 32 °C 时，红茶菌处于一个活力较好的状态，能够充分利用糖类产生有机酸。这也基本在酵母菌（26~30 °C）、醋酸菌（28~35 °C）和乳酸菌（30~37 °C）的最适生长温度内^[35]。温度过低或过高时，不利于菌种生长繁殖，同时也降低了产酸能力^[36]。根据 Nguyen 等^[19]的研究，红茶菌饮料发酵工艺的正确选择是能够生产出健康有机酸含量较高的饮料，pH 能反映有机酸含量。因此，从有机酸含量生成的角度，柑橘红茶菌饮料最佳发酵温度选为 32 °C。

表 3 配方优化响应面试验结果与分析

Table 3 Results and analysis of formula optimization by response surface method

序号	A 乳酸菌粉添加量/%	B 蔗糖添加量/%	C 发酵温度/°C	D 发酵时间/d	pH 值
1	0.40	20	28	4	4.28
2	0.40	15	36	3	3.77
3	0.40	20	36	4	4.54
4	0.40	15	32	4	3.12
5	0.40	20	32	3	4.27
6	0.20	15	32	5	4.44
7	0.20	15	36	4	4.67
8	0.40	15	32	4	3.21
9	0.20	15	32	3	4.31
10	0.60	15	32	5	4.34
11	0.40	10	28	4	4.53
12	0.40	10	36	4	4.29
13	0.40	15	32	4	3.15
14	0.60	15	28	4	4.50
15	0.40	15	36	5	3.86
16	0.40	15	32	4	3.10
17	0.40	10	32	3	4.26
18	0.40	15	28	5	3.72
19	0.40	15	32	4	3.10
20	0.60	20	32	4	4.75
21	0.20	10	32	4	4.84
22	0.20	15	28	4	4.47
23	0.40	10	32	5	4.25
24	0.40	20	32	5	4.18
25	0.60	15	32	3	4.48
26	0.20	20	32	4	4.76
27	0.40	15	28	3	4.03
28	0.60	15	36	4	4.65
29	0.60	10	32	4	4.70

表4 拟合回归方程的方差分析结果

Table 4 Analysis of variance of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	8.35	14	0.6	80.68	<0.0001	**
A-乳酸菌粉添加量/%	4.08E-04	1	4.08E-04	0.055	0.8176	
B-蔗糖添加量/%	6.75E-04	1	6.75E-04	0.091	0.767	
C-发酵温度/°C	5.21E-03	1	5.21E-03	0.7	0.4155	
D-发酵时间/d	9.08E-03	1	9.08E-03	1.23	0.2866	
AB	4.23E-03	1	4.23E-03	0.57	0.4623	
AC	6.25E-04	1	6.25E-04	0.085	0.7755	
AD	0.018	1	0.018	2.46	0.1388	
BC	0.063	1	0.063	8.45	0.0115	*
BD	1.60E-03	1	1.60E-03	0.22	0.649	
CD	0.04	1	0.04	5.41	0.0356	*
A ²	5.55	1	5.55	751	<0.0001	**
B ²	3.82	1	3.82	517.1	<0.0001	**
C ²	1.47	1	1.47	198.17	<0.0001	**
D ²	0.59	1	0.59	79.11	<0.0001	**
残差	0.1	14	7.40E-03			
失拟项	0.095	10	9.50E-03	4.46	0.0813	
纯误差	8.52E-03	4	2.13E-03			
总和	8.46	28				

注: R²=0.9878; Adj R²=0.9755; Pred R²=0.9337; **表示极显著 (p<0.01), *表示显著 (p<0.05)。

2.2 响应面法优化设计与结果

根据单因素结果可知,柑橘红茶菌饮料发酵过程中, pH 值与可溶性固形物消耗量的变化趋势相反,但基本保持了同步。研究表明,有机酸是红茶菌饮料独特风味的主要影响因素,而 pH 大小可以比较直观的反映有机酸含量^[37]。结合成本考虑,本研究最终以 pH 值为响应指标,乳酸菌粉添加量、蔗糖浓度、发酵温度、发酵时间 4 个因素设计响应面试验,得到二次多项回归方程: $Y=3.14-0.005833A-0.0075B+0.021C-0.027D+0.032AB-0.012AC-0.068AD+0.13BC-0.02BD+0.1CD+0.93A^2+0.77B^2+0.48C^2+0.3D^2$

2.2.1 方差分析

对回归方程结果进行方差分析(表4)发现:响应面回归模型中 F=80.68 且 p<0.0001,说明试验中所采用的二次模型极为显著;失拟项 F=4.46, p=0.0813>0.05,则说明模型与纯误差之间的关联不显著,该模型具有较高可靠性;模型的决定系数 R²为 0.9878,说明模型具有较高显著性;同时调整决定系数 AdjR²=0.9755,能够解释实验有 97.55%符合模型,且预测相关系数 Pred R²=0.9337,说明此实验模型与真实数据拟合程度良好,具有实践指导意义,由

此可以用该模型分析和预测红茶菌制备的最优工艺条件。交互项 BC、CD 对 pH 值的影响显著 (p<0.05),二次项 A²、B²、C²、D² 对 pH 值的影响极显著 (p<0.01)。根据表中各个因素的 F 值,说明各变量对 pH 值影响大小顺序为: D (发酵时间)>C (发酵温度)>B (蔗糖添加量)>A (乳酸菌粉添加量)。

2.2.2 响应面交互作用分析

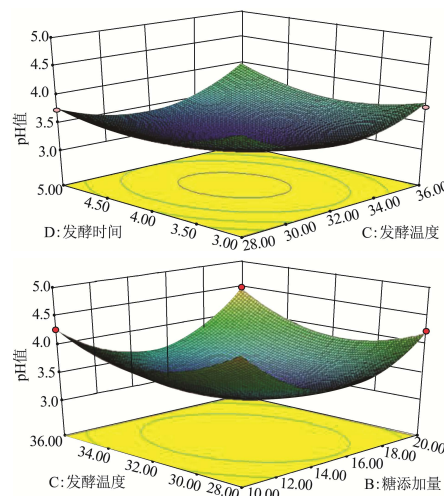


图6 各因素交互作用对 pH 值影响的响应面图

Fig.6 Response surface diagram of the interaction of various factors on pH value

响应面图中, 等高线越密集, 响应面越陡峭, 则说明该因素对结果的影响越显著^[38,39]。由图 6 可知, BC 和 CD 项的响应面比较陡峭, 影响显著($p<0.05$); 且从等高线可以看出, BC 和 CD 的等高线接近于椭圆形, 说明两因素之间交互作用显著 ($p<0.05$), 即蔗糖添加量和发酵温度之间、发酵温度和发酵时间之间的影响显著; 而其他的因素等高线接近圆形, 则说明交互作用不显著。回归方程模型的方差分析结果与响应面图反映的各因素之间的交互作用结果一致。

以上结果可知, 以 pH 值为响应指标, 在乳酸菌粉添加量、蔗糖添加量、发酵温度、发酵时间等因素共同作用下, 柑橘红茶菌饮料最优发酵工艺为: 乳酸菌粉添加量 0.40%、蔗糖添加量 15.04%、发酵温度 31.89 °C、发酵时间 4.05 d, 在此条件下模型预测的 pH 值为 3.14。

2.3 最优工艺条件试验验证

结合生产所能实现的实际条件, 取乳酸菌粉添加量 0.40%、蔗糖添加量 15%、发酵温度 32 °C、发酵时间 4 d, 进行柑橘红茶菌饮料发酵, 三次重复, 以验证响应面优化的预测结果。最后得柑橘红茶菌饮料 pH 值为 3.14, 感官评价分值为 93.1 分, 可溶性固形物消耗量为 12.30%, 红茶菌饮料液体澄清, 色泽呈浅亮的橘黄色, 酸甜中带着柑橘发酵的果香和微微的茶香。该值与模型预测结果基本一致, 表明基于该响应面模型分析优化柑橘红茶菌饮料发酵工艺的方法可行。

3 结论

本研究以新会柑橘和英德红茶作为主要原料, 以乳酸菌、醋酸菌和酵母菌为发酵剂, 对柑橘红茶菌饮料发酵工艺进行了优化探究。通过单因素确定了乳酸菌粉添加量、蔗糖添加量、发酵温度及发酵时间, 利用 Box-Behnken 响应面法对发酵工艺进行了优化, 优化后的最佳发酵工艺条件为: 乳酸菌粉添加量 0.40%、蔗糖添加量 15%、发酵温度 32 °C、发酵时间 4 d, 在此工艺条件下, 得出柑橘红茶菌发酵液 pH 值为 3.14、感官评价分值为 93.1 分、可溶性固形物消耗量为 12.30%。本研究结果为提高英德红茶和新会柑橘的资源利用率及柑橘红茶菌饮料开发提供了理论依据及技术支持。

参考文献

[1] 杨秀娟, 巢颖欣, 蔡轶, 等. 新会陈皮化学成分的综合分析测定研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(4): 348-352
YANG Xiujuan, CHAO Yingxin, CAI Yi, et al. Comprehensive analysis and determination of chemical

components in Xinhui Chenpi [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2019, 39(4): 348-352

[2] 白卫东, 赵文红, 钱敏, 等. 新会柑果汁饮料工艺的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(10): 56-58
BAI Weidong, ZHAO Wenhong, QIAN Min, et al. Study on fruit juice beverage of Xinhui citrus [J]. Food Science and Technology, 2009, 34(10): 56-58

[3] 杨秀娟. 新会柑种子化学成分分析及抑制肝癌 HepG2 细胞生长的作用研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2020
YANG Xiujuan. Analysis of chemical components in Xinhui citrus seeds and the inhibition effect on the growth of hepatocellular carcinoma HepG2 cells [D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2020

[4] Liu H, Xu Y, Wen J, et al. A comparative study of aromatic characterization of Yingde black tea infusions in different steeping temperatures [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 143: 110860

[5] Wang Z, Han B, Jing W, et al. Effects of different steeping temperatures on the leaching of aroma components in black tea by SPME-GC-MS coupled with chemometric method [J]. Journal of AOAC International, 2019, 6: 6

[6] 桑嘉琪, 温靖, 刘昊澄, 等. 不同品种英德红茶的品质比较分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 157-162
SANG Jiaqi, WEN Jing, LIU Haocheng, et al. Comparison of the quality of different varieties of Yingde black tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 157-162

[7] Zhou H, Li H, Du Y, et al. C-geranylated flavanones from YingDe black tea and their antioxidant and α -glucosidase inhibition activities [J]. Food Chemistry, 2017, 235(15): 227-233

[8] Sharpe E, Hua F, Schuckers S, et al. Effects of brewing conditions on the antioxidant capacity of twenty-four commercial green tea varieties [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 380

[9] Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra M, et al. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens [J]. Current Microbiology, 2016, 73(6): 885-896

[10] Hirota H, Sueoka E, Watanabe T, et al. Synergistic enhancement of anticancer effects on numerous human cancer cell lines treated with the combination of EGCG, other green tea catechins, and anticancer compounds [J]. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, 2015, 141: 1511-1522

[11] 杨清, 徐立, 王俊, 等. 桑红茶发酵工艺条件优化及活性成分含量的动力学研究[J]. 蚕业科学, 2010, 36(2): 221-228

- YANG Qing, XU Li, WANG Jun, et al. Optimization of technological conditions for mulberry-black-tea fermentation and kinetic analysis of the active ingredients [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2010, 36(2): 221-228
- [12] Tanticharakunsiri W, Mangmool S, Wongsariya K, et al. Characteristics and upregulation of antioxidant enzymes of kitchen mint and oolong tea kombucha beverages [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 45(1): e13574
- [13] Jayabalan R, Malbaša R, Lončar E, et al. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(4): 538-550
- [14] Coelho R, Almeida A, Amaral R, et al. Kombucha: review [J]. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2020, 22: 100272
- [15] Özcan Sinir G, Ece Tamer C, Suna S. Kombucha tea: a promising fermented functional beverage - science direct [J]. *Fermented Beverages*, 2019, 5: 401-432
- [16] 刘晓辉,万晶琼,吴函殷,等.益生菌固态发酵红茶风味品质的分析[J].*饮料工业*,2021,24(1):29-35
LIU Xiaohui, WAN Jingqiong, WU Hanyin, et al. Analysis on flavor and taste quality of solid-state fermentation for probiotic black tea [J]. *Beverage Industry*, 2021, 24(1): 29-35
- [17] 娄明,麻成金,黄群,等.蜂蜜柑橘果醋饮料生产工艺研究[J].*食品与发酵科技*,2009,45(4):67-70,73
LOU Ming, MA Chengjin, HUANG Qun, et al. Study on processing technology of honey-orange fruit vinegar drink [J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2009, 45(4): 67-70, 73
- [18] 高妍妍.红茶菌优势菌株分离鉴定及水果红茶菌饮料活性成分分析[D].郑州:河南大学,2018
GANG Yanyan. Isolation and identification of the predominant strains in kombucha and the active components analysis of fruits kombucha [D]. Zhengzhou: Henan University, 2018
- [19] Nguyen N, Nguyen P, Nguyen H, et al. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 64(2): 1149-1155
- [20] Luo Y, Tang H, Wang X, et al. Antioxidant properties and involved antioxidant compounds of strawberry fruit at different maturity stages [J]. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2011, 9(1): 166-170
- [21] Watawana M, Jayawardena N, Ranasinghe S, et al. Evaluation of the effect of different sweetening agents on the polyphenol contents and antioxidant and starch hydrolase inhibitory properties of kombucha [J]. *Journal of Food Processing & Preservation*, 2017, 41(1): e12752.1-e12752.10
- [22] Laureys D, Britton S, Clippeleer J. Kombucha tea fermentation: areview [J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2020, 78(3): 165-174
- [23] Cardoso R, Neto R, D'Almeida C, et al. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities [J]. *Food Research International*, 2019, 128: 108782
- [24] Sengun I Y, Kirmizigul A. Probiotic potential of kombucha [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 76: 104284
- [25] Malbaša R, Lončar E, Djurić M. Comparison of the products of kombucha fermentation on sucrose and molasses [J]. *Food Chemistry*, 2007, 106(3): 1039-1045
- [26] Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, et al. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 220: 63-72
- [27] Filippis F, Troise A, Vitaglione P, et al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation [J]. *Food Microbiology*, 2018: 11-16
- [28] Cvetković D, Ranitović A, Savić D, et al. Survival of wild strains of *Lactobacilli* during kombucha fermentation and their contribution to functional characteristics of beverage [J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2019, 69(4): 407-415
- [29] Nguyen N, Dong N, Nguyen H, et al. Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha [J]. *Springerplus*, 2015, 4(1): 91
- [30] 林娟,叶秀云,曹泽丽,等."红茶菌"中微生物的分离及纯菌混合发酵生产[J].*中国食品学报*,2015,15(2):39-48
LIN Juan, YE Xiuyun, CAO Zeli, et al. Isolation of microbes from kombucha and kombucha fermentation with pure culture combinations [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(2): 39-48
- [31] Reiss J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 1994, 198(3): 258-261