草莓味黄大茶发酵饮料的开发及工艺优化

朱其顺， 李其琴， 汪乐飞， 段 方， 庞剑涛， 颜守保*
（淮南师范学院 生物工程学院，安徽 淮南 232038）

摘要： 从不同产地红茶菌中分离筛选优良乙酸菌和酵母菌为发酵菌株，以大别山区黄大茶为主要原料，加入草莓果汁液，开发草莓味黄大茶发酵饮料。通过发酵工艺优化和产品调配等手段，获得最佳工艺参数：发酵菌株为乙酸菌 DZ-001 和酵母菌 LN-001、接种体积比为 2∶1、总接种体积分数为 5%、起始 pH 值为 5.5、发酵温度为 30 ℃、发酵时间为 12 d、草莓果汁添加质量浓度为 4.66 g/L、结晶糖浆添加质量浓度为 5.08 g/L、柠檬酸和柠檬酸钠添加质量浓度为 0.20 g/L、VC 质量浓度为 0.02 g/L、*D*-异抗坏血酸钠质量浓度为 0.03 g/L、草莓香精添加质量分数为 0.1%。

关键词： 红茶菌；乙酸菌；酵母菌；发酵；工艺优化
中图分类号：TS 272.5　**文章编号：**1673-1689(2023)06-0067-11　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.009

Development and Process Optimization of Strawberry-Flavored Yellow Tea Fermented Beverage

ZHU Qishun, *LI Qiqin*, *WANG Lefei*, *DUAN Fang*, *PANG Jiantao*, *YAN Shoubao**
(School of Biological Engineering, Huainan Normal University, Huainan 232038, China)

Abstract: Excellent acetic acid bacteria and yeasts were separated and screened as fermentation strains from different producing areas of kombucha. The yellow big tea in Dabie Mountains was used as the main raw material, and strawberry juice was added to develop the strawberry-flavored yellow big tea fermented beverage. By optimizing the fermentation process and product formulation, the optimal process parameters were identified. This includes the use of two exceptional fermentation strains, acetic acid bacteria DZ-001 and yeast LN-001, with an inoculation ratio of 2∶1 and a total inoculation amount of 5%. The optimal initial pH value is 5.5, with a fermentation temperature of 30 ℃ for a duration of 12 days. The addition amount of strawberry juice is 4.66 g/L, while the addition amount of crystalline syrup is 5.08 g/L. The addition amount of citric acid and sodium citrate is 0.20 g/L, with the optimal addition amounts of VC and *D*-sodium erythorbate at 0.02 g/L and 0.03 g/L, respectively. Finally, the optimal addition amount of strawberry flavor is 0.1%.

Keywords: kombucha, acetic acid bacteria, yeast, fermentation, process optimization

收稿日期： 2021-10-17
基金项目： 安徽省高校自然科学研究重点项目（KJ2021A0960）；安徽省酿造工业微生物资源开发与应用工程研究中心开放基金项目（2023BIM08）。
作者简介： 朱其顺(1975—)，男，硕士，高级实验师，主要从事食品发酵方面的研究。E-mail：zhuqs75@163.com
* **通信作者：** 颜守保(1980—)，男，博士，教授，主要从事生物工程、食品加工方面的研究。E-mail：1176144756@qq.com

红茶菌(胃宝)是一种传统的民间发酵饮料,经乙酸菌、酵母菌等多种微生物共同发酵而成,俗称“海宝”[1-2],含有多种对人体有益的物质[3-4],有预防和治疗多种疾病以及增强机体免疫力等功效[5-7],是一种很有利用价值的天然微生物发酵产品[8]。目前,国内外对红茶菌发酵工艺和菌种分离的研究[9-16]取得了一定进展,但对红茶菌风味评价研究方面缺少系统的报道。黄大茶是皖西大别山区特色茶类之一,其叶大、梗长、汤色黄,具有典型的老火香,有提神、助消化、化痰止咳、降血糖等功效[17-18]。草莓含有大量维生素、多种矿物质、蛋白质、果胶、有机酸等,具有极高的营养价值,被称为“水果皇后”[19]。

目前国内已有红茶菌发酵茶饮料方面的研究[20-22],但市场上尚未见到果味黄大茶类发酵饮料。作者以不同产地红茶菌中分离筛选优良菌株,以皖西大别山区黄大茶为主要原料,加入草莓果汁液和其他辅料,通过发酵工艺优化和产品调配等手段开发出一种草莓味茶发酵特色饮料产品。

1 材料与方法

1.1 实验材料

不同产地红茶菌“胃宝”:网购;特级黄大茶:皖西大别山区;精选草莓大果:安徽长丰县草莓基地。

酵母菌斜面培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,酵母浸膏 5 g,琼脂粉 15~20 g,溶化后加蒸馏水定容至 1 L,121 ℃ 灭菌 25 min。

YEPD 培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 50 g,酵母浸膏 10 g,琼脂 15~20 g,蒸馏水 1 L,自然 pH。

乙酸菌分离培养基:酵母提取物 10 g,葡萄糖 50 g,碳酸钙 10 g,蛋白胨 5 g,琼脂 20 g,121 ℃灭菌 15 min,冷却到 50~60 ℃时,加入 100 μg/mL 的制霉菌素和体积分数 2%的无水乙醇。

乙酸菌增殖和产酸培养基:葡萄糖 10 g,酵母提取物 10 g,115 ℃灭菌 20 min,使用前加入体积分数 3%的无水乙醇。

1.2 种子培养

分别取数环斜面保藏的乙酸菌种和酵母菌种,接入装有 100 mL 增殖培养基的 250 mL 三角瓶,30 ℃、160 r/min 摇床培养 48 h,制得乙酸菌和酵母菌种子液。

1.3 优良菌株筛选

1.3.1 菌株筛选 取梯度稀释红茶菌液 1 μL,涂布于分离培养基平板上,30 ℃培养 48 h,经标记和多次平板划线获得纯菌株,4 ℃保藏。

1.3.2 优良菌株的获得

1)乙酸菌产酸能力测试 将 200 mL 产酸培养基加入 250 mL 三角瓶中,灭菌,在无菌条件下以体积分数 2%接种,30 ℃培养 7 d 后进行产酸量检测。

2)酵母菌发酵力分析 将 200 mL 的麦芽汁(250 g/L)加入 250 mL 三角瓶中,灭菌后在无菌条件下加入体积分数 5%的酵母菌种子液(1×10^7 CFU/mL),30 ℃培养 7 d,检测乙醇体积分数和残糖质量浓度。

3)发酵产物中可挥发性风味物质评价 将上述乙酸菌发酵液和酵母菌发酵液通过 GC-MS 分析可挥发性风味成分。

4)发酵产物感官评价 对乙酸菌发酵液和酵母菌发酵液进行风味感官评价。

5)目标菌株鉴定 乙酸菌 DNA 提取用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工),测定细菌 16SrDNA 序列用 PCR 扩增试剂盒(上海生工),引物为 Eu27F:AGAGTTTGATCATGGCTCAG 和 1492R:TACGGCTACCTTGTTACGACTT。酵母菌 DNA 提取用 Ezup 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工),测定酵母 ITS 序列用 PCR 扩增试剂盒(上海生工),引物为 ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCG 和 ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC。用 EZ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化后测序,结果提交 GenBank 进行 BLAST 分析。用 ClustalX1.8 对 GenBank 数据库中的菌株序列进行比对(Aligment),用 BioEdit 手工删除两端不齐序列,Mega 4.0 软件构建系统发育树,并进行 1 000 次 Bootstraps 检验计算支持率。

1.4 茶发酵饮料的制作方法

图 1 为产品酿制工艺流程,主要步骤包括种子培养、糖茶汁制备、发酵、草莓汁制备、调配、澄清、杀菌包装等。

1.4.1 种子培养 培养方法见 1.2。

1.4.2 糖茶汁制备 将 4 mg/L 的黄大茶煮沸 5 min 后用 4 层纱布过滤,加入 40 g/L 白砂糖液,冷却至室温后备用,每 500 mL 蓝口瓶中装 300 mL 糖茶汁并用八层纱布封口,113 ℃灭菌 15 min 备用。

1.4.3 发酵 将乙酸菌种子液和酵母菌种子液按照一定接种体积分数和接种比例接入糖茶汁液中,

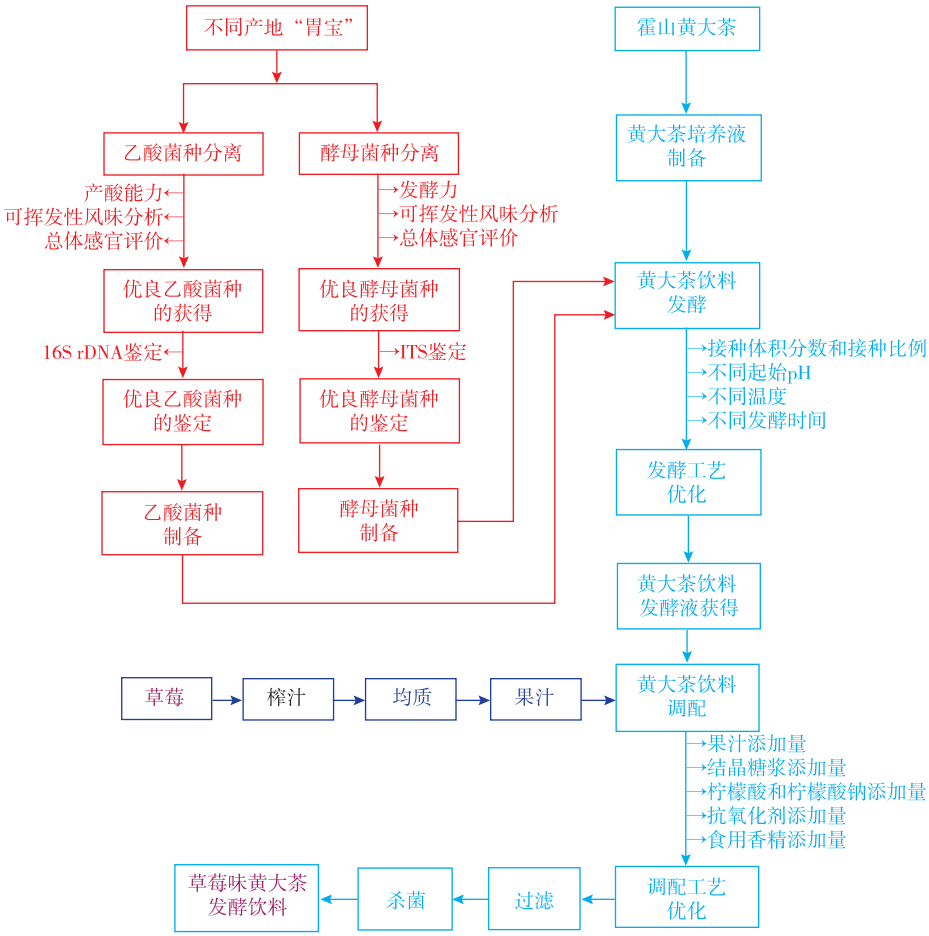


图 1　草莓味黄大茶发酵饮料酿制工艺流程图

Fig. 1　Process flow chart of brewing strawberry-flavored yellow tea fermented beverage

30 ℃静置培养 7 d。

1.4.4　草莓汁制备　草莓鲜果和水按质量比 1∶3 比例榨汁,均质后备用。

1.4.5　调配　将茶发酵液、草莓汁、水、蜂蜜、果葡糖浆、柠檬酸和柠檬酸钠、VC 和 *D*-异抗坏血酸钠、食用香精等辅料按照一定比例调配,获得初级产品。

1.4.6　澄清　将初级产品于 4 000 r/min 离心 15 min,保留上清液。

1.4.7　杀菌、包装　上清液于 113 ℃灭菌 5 min,冷却至常温,无菌灌装即为成品。

1.5　茶饮料发酵工艺参数优化

1.5.1　接种量和接种比例　将上述茶培养液中分别接入不同量和不同比例的乙酸菌株和酵母菌株,30 ℃发酵 7 d,测产酸量并进行评价。

1.5.2　初始 pH 值　在 1.5.1 的最佳条件下,将上述茶培养液 pH 分别调节至 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0;其他步骤同 1.5.1。

1.5.3　发酵温度　在 1.5.2 最佳条件下,将上述茶培养液中分别接入最佳量和最佳比例的混合菌种,分别于 20、25、30、32、34 ℃静置发酵 7 d,测产酸量并进行评价。

1.5.4　发酵时间　在最佳条件下静置发酵 15 d,第 3 天开始每天取样测定产酸量并进行评价。

1.6　调配工艺优化

将获得的发酵液调节 pH 至 3.0,用草莓汁调配,同时添加其他辅料,研究原料调配比例对茶发酵产品感官的影响,并获得最佳的配比。

1.6.1　辅料添加量优化

1) 单因素实验设计　以感官评分为指标,分别对草莓汁添加量(g/L)、结晶糖浆添加量(g/L)、柠檬酸和柠檬酸钠添加量(g/L)等 3 个因素各取 5 个梯度。草莓汁为:1、3、5、7、9 g/L,结晶糖浆为:1、3、5、7、9 g/L,柠檬酸和柠檬酸钠为:0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 g/L。

2）响应面试验设计　选取单因素试验中感官评分最高的 3 个水平进行响应面试验，试验因素水平见表 1。

表 1　草莓味发酵茶饮料试验因素与水平编码

Table 1　Experimental factors and level coding of strawberry-flavored fermented tea beverage

编码水平	*A* 草莓果汁添加量/(g/L)	*B* 结晶糖浆添加量/(g/L)	*C* 柠檬酸和柠檬酸钠添加量/(g/L)
−1	3	3	0.15
0	5	5	0.20
1	7	7	0.25

1.6.2　模糊数学评价方法

1）因素集的确立　感官评价指标的集合为 $W=(w_1,w_2,w_3,w_4)$，其中 w_1、w_2、w_3、w_4 分别代表香气、色泽、滋味、口感质地 4 个因素。

2）评语集的确立　评语集表示为 $\omega=(\omega_1,\omega_2,\omega_3,\omega_4)$，其中 ω_1、ω_2、ω_3、ω_4 分别表示优、良、中、差。

3）权重集的确立　根据层次分析法设定权重向量，记为 $X=(x_1,x_2,x_3,x_4)=(0.25,0.20,0.40,0.15)$，并且 $x_1+x_2+x_3+x_4=1$，x_1、x_2、x_3、x_4 分别表示香气、色泽、滋味和口感质地 4 个因素的质量权重。

借鉴邢慧雅等[23]的研究方法，由 10 名作者所在学院食品专业高年级学生(男、女生各 5 名)组成感官评价小组，采取密码审评法，从香气、色泽、滋味和口感质地等 4 个方面打分。

1.6.3　抗氧化剂添加量的确定

将茶发酵饮料分别添加不同比例和不同量的 VC 和 *D*-异抗坏血酸钠，25 ℃静置 3 个月，以未添加为对照组，540 nm 波长下测 OD 值，OD 值越小，抗氧化性越强。

1.6.4　食用香精添加量的确定

参照香精使用说明，添加多种香味香精。

1.7　分析方法

1.7.1　理化指标分析

残糖测定采用 DNS 法[24]；产酸量测定采用滴定法[25]，以乙酸计；乙醇体积分数测定采用蒸馏比重法[26]。

1.7.2　可挥发性风味物质分析

1）顶空固相微萃取(HS-SPME)条件　选取 50 μm/30 μm DVAB/CAR/PDMS 固相微萃取头。萃取条件：精确称取 3.0 g 样品放入顶空瓶中，密封，于 60 ℃水浴超声波振荡仪中平衡 15 min，60 ℃水浴顶空萃取 30 min，将萃取头取出解吸 4 min，进行 GC-MS 分析。

2）气相色谱-质谱(GC-MS)分析条件　气相色谱条件：DB-WAX 色谱柱（60 m×250 μm×0.25 μm)；手动不分流进样；40 ℃保持 1 min，以 5 ℃/min 升温到 180 ℃，保持 1 min，以 8 ℃/ min 升温到 230 ℃，保持 7 min；高纯度氦气，流量为 1 mL/min。

质谱条件：EI 电离源，电子能量 70 eV，离子源温度 230 ℃，接口温度 230 ℃。

GC-MS 分析：采用 50 μm/30 μm DVAB/CAR/PDMS 固相微萃取头，自动 SPME 进样器，15 mL 样品瓶，Agligent 7890N-5975B 气相色谱-质谱联用仪。

3)定性与定量分析　定性分析：检测质谱挥发性风味成分，与标准库的物质(NIST)匹配，匹配度超过 800 的判定结果保存。半定量分析：以 2-辛醇为内标，先将样品中的挥发性化合物的峰面积与 2-辛醇峰面积之比来初步判断，再根据 2-辛醇质量浓度计算质量浓度[27]。

4）数据处理方法　将样品香味成分质量浓度录入 SPSS22.0，计算出各主成分值，进行主成分分析。

1.8　整体风味感官评价

参照沈明浩[28]偏好度排序检验评分，由感官评价小组对试样的感官特性和整体特征进行评定。

2　结果与分析

2.1　优良发酵菌株的获得

2.1.1　优良乙酸菌株的筛选和鉴定

采用稀释涂平板法，经过多次分离纯化，获得 10 个乙酸菌纯菌株，编号分别为：1.乙酸菌 AH-001，2.乙酸菌 AH-002，3.乙酸菌 SX-001，4.乙酸菌 DZ-001，5.乙酸菌 ZJ-001，6.乙酸菌 BJ-001，7.乙酸菌 BJ-002，8.乙酸菌 LN-001，9.乙酸菌 WH-001，10.乙酸菌 QS-001。

将上述 10 种乙酸菌菌株以体积分数 2%分别接种到乙酸菌产酸培养基中，30 ℃静置培养 7 d 后检测其产酸量，可以看出，乙酸菌 DZ-001 产酸能力最大，为 3.18 g/L，见图 2。

按照 1.3.2 的方法，各菌株种子液按照体积分数 2%分别接种进行发酵实验，对发酵液进行整体感官风味评价，可以看出乙酸菌 DZ-001 发酵液评价分数最高，见图 3。

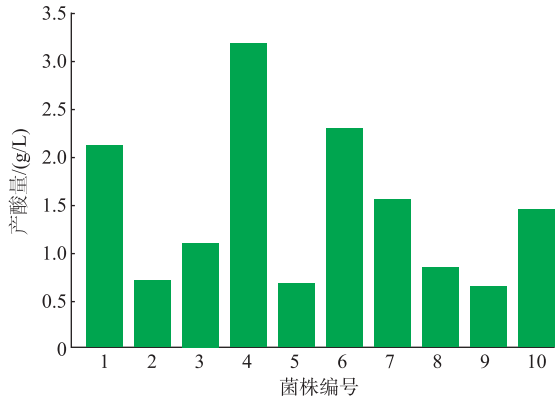


图 2　不同菌株产酸情况

Fig. 2　Acid production by different strains

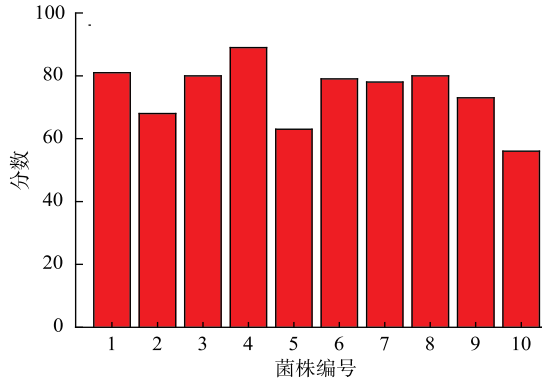


图 3　不同菌株酵素茶发酵液感官风味评价

Fig. 3　Sensory and flavor evaluation of the fermentation broth of fermented tea by different strains of bacteria

分别以上述 10 株乙酸菌为发酵菌株，按照 1.3.2 中的方法获得乙酸菌发酵液，通过 GC-MS 分析其中可挥发性风味物质,结果见表 2。

表 2 表明,10 株菌发酵产物中主要含有 17 种可挥发性风味物质，包括酸类（4 种）、烷烃类(4 种)、醛酮类(3 种)、醇类(2 种)、酯类(1 种)、醚类化合物(2 种)和噻唑类(1 种)。其中,乙酸菌 DZ-001 发酵液含有较高质量浓度的乙酸、硅氧烷类、苯乙醇、酯类化合物等,可赋予该菌种发酵液较好的复合香气。综合以上分析结果,选择乙酸菌 DZ-001 作为发酵菌株。

测定乙酸菌 DZ-001 的 16S rDNA 序列,提交到 NCBI-BLAST 上进行比对,见图 4。根据同源性最高(100%)，初步鉴定结果为液化葡萄糖酸杆菌(*Gluconacetobacter liquefaciens*)。

表 2　不同乙酸菌发酵液可挥发性风味成分

Table 2　Volatile flavor components in fermentation broth of different acetic acid bacteria　μg/dL

化合物	AH-001	AH-002	SX-001	DZ-001	ZJ-001	BJ-001	BJ-002	LN-001	WH-001	QS-001
正己烷	—	—	—	—	—	0.3	—	—	—	—
甲醚	—	—	—	—	—	8.7	—	—	—	—
八甲基环四硅氧烷	58.8	47.1	53.7	48.6	39.4	—	41.0	32.5	56.3	59.3
十甲基环五硅氧烷	32.4	45.4	15.0	40.6	44.3	—	44.4	13.8	39.5	42.2
十甲基环五硅氧烷 2-辛酮	1.63	—	—	2.8	—	—	—	14.0	12.3	0.8
正己酸乙酯	—	0.9	1.0	0.9	0.7	ND	0.8	0.8	0.8	—
2-辛酮	0.8	0.7	0.9	—	0.8	ND	0.7	0.8	0.8	—
乙酸	2.0	7.2	5.2	8.0	8.0	7.7	6.5	5.9	2.2	—
十二甲基环六硅氧烷	22.2	19.7	23.0	32.1	20.5	—	—	18.0	—	21.5
4-苯基噻唑-2-硫醇	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6	0.7
苯乙醇	—	—	—	0.3	—	—	—	0.5	4.3	0.2
18-冠-6-醚	4.9	—	1.4	1.5	1.5	—	—	—	—	0.8
异丁酸	—	—	2.2	1.8	—	9.6	2.1	0.8	—	—
3-甲基丁酸	—	—	1.8	1.5	—	13.9	1.4	0.8	—	1.0
L-缬氨醇	—	—	—	—	—	2.2	—	—	—	—
5-羟甲基糠醛	—	—	—	—	—	17.9	—	—	—	—
苯乙酸	—	—	—	—	—	19.9	0.7	—	—	—

注:—表示未检出。

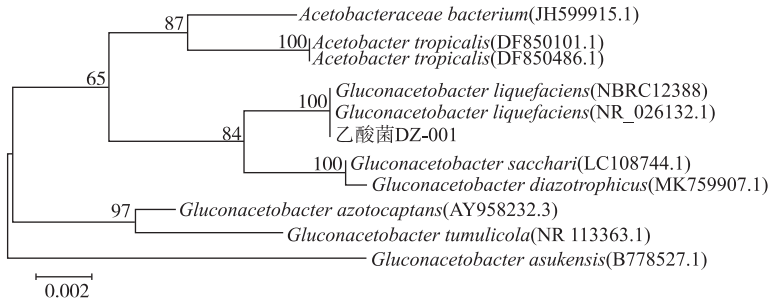


图 4　乙酸菌 DZ-001 菌株的分子发育树

Fig. 4　Molecular development tree of acetic acid bacteria DZ-001 strain

2.1.2　优良酵母菌的获得

1）目标菌株筛选　通过分离筛选初步获得10株菌落形态不同和闻香不同的酵母菌，编号分别为：酵母菌 AH-001、酵母菌 SX-001、酵母菌SX-002、酵母菌 DZ-001、酵母菌 ZJ-001、酵母菌 BJ-001、酵母菌 LN-001、酵母菌 LN-002、酵母菌 WH-001、酵母菌 QS-001。将 10 种酵母菌株以体积分数 10%接种到糖质量浓度为 250 g/L 的麦芽汁中，30 ℃发酵 7 d，每隔 1 d 观察发酵情况（观察气泡和镜检），7 d 后检测乙醇体积分数和残糖质量浓度，结果见表 3。

从表 3 可以看出，酵母菌 LN-001 发酵乙醇体积分数高、残糖质量浓度低，发酵能力最强。7 d 后该菌种发酵液中乙醇体积分数为 11.1%，残糖质量浓度 26.9 g/L。再分别以该 10 株菌为发酵菌株，按照 1.3.2 中的方法获得酵母菌发酵液，通过 GC-MS 分析可挥发性风味物质，结果见表 4。

表 4 表明，酵母菌发酵液中主要含有 11 种可挥发性风味物质，包括醇类（4 种）、酸类（3 种）、酯类（3 种）和硅氧烷化合物（1 种）。酵母菌 LN-001 发酵液中，质量浓度较高的丙三醇、2,3-丁二醇、苯乙醇对香气有促进作用，而影响口感的异戊醇质量浓度相对较低。

为了进一步分析优劣，分别对 10 种酵母菌发酵液进行感官风味评价，结果见表 5。感官风味评价结果表明，酵母菌 LN-001 发酵液的产酸量、香气、口感、风味均优于其他菌株，故选为发酵菌株。

2）菌株鉴定　测定酵母菌 LN-001 的 ITS 序列，提交到 NCBI-BLAST 上进行比对，初步鉴定该酵母菌是*Wickerhamomyces anomalus*，见图 5。

2.2　发酵工艺优化

2.2.1　接种体积分数和接种比例的确定　对乙酸菌 DZ-001 和酵母菌 LN-001 的不同接种比例和接种体积分数对混菌发酵茶饮料的影响见表 6。当乙酸菌DZ-001 和酵母菌 LN-001 接种体积比为 2∶1，总接种体积分数为 5%时，产酸量达到最大值。

表 3　不同酵母菌发酵能力测试结果

Table 3　Different yeast fermentation ability test results

菌株编号	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	乙醇体积分数/%	残糖质量浓度/(g/L)
AH-001	+	++	+++	+++	++	+	N	10.8	33.2
SX-001	+	++	+++	++	++	+	+	8.3	61.5
SX-002	+	++	+++	++	++	+	+	7.3	82.3
DZ-001	+	++	+++	+++	++	+	+	9.1	38.2
ZJ-001	++	++	+++	++	++	+	N	8.7	59.6
BJ-001	++	++	+++	+++	++	+	N	10.6	38.4
LN-001	++	+++	+++	+++	++	+	+	11.1	26.9
LN-002	+	++	+++	+++	++	+	+	9.0	40.2
WH-001	++	+++	+++	+++	++	+	+	10.3	50.7
QS-001	++	++	+++	+++	++	+	+	9.4	43.8

注：+越多表示发酵能力越强；N 表示不发酵。

表 4　不同酵母菌种发酵液可挥发性风味成分

Table 4　Volatile flavor components in fermentation broth of different yeast strains

μg/dL

化合物	AH-001	SX-001	SX-002	DZ-001	ZJ-001	BJ-001	LN-001	LN-002	WH-001	QS-001
丙三醇	76.8	—	36.5	543.9	26.5	—	518.5	—	—	—
异戊醇	21.5	868.6	326.8	235.9	125.6	263.9	16.8	78.8	85.2	528.1
2,3-丁二醇	106.2	138.1	45.2	36.6	25.7	65.5	119.6	20.4	86.7	89.5
苯乙醇	310.6	553.7	265.6	320.9	34.3	18.1	518.1	37.8	142.3	437.8
乙酸	—	240.7	31.7	99.9	—	225.5	304.8	78.1	126.4	—
丁酸	132.6	58.1	69.9	355.0	82.6	292.0	75.2	21.6	34.5	40.0
己酸	31.2	322.8	—	20.2	23.7	14.2	—	16.5	—	54.5
乙酸乙酯	—	—	—	—	—	13.5	85.6	11.5	10.4	—
乳酸乙酯	58.2	78.7	21.8	22.8	—	—	—	12.2	—	—
乙酸苯乙酯	—	—	—	—	—	—	18.4	10.3	8.6	—
十二甲基环六硅氧烷	39.4	57.4	21.7	28.8	34.6	78.7	428.5	45.9	67.6	22.0

注:—表示未检出。

表 5　不同酵母菌发酵液感官评价

Table 5　Volatile flavor components in fermentation broth of different yeast strains

菌株编号	固体平板特征描述	感官评价得分
AH-001	菌落浅白色、表面光滑、中间微凸起,无异杂味,略带少许香气	84
SX-001	菌落浅黄色,表面光滑、中间微凸起,有较纯正的奶酪香	83
SX-002	菌落椭圆、表面光滑、中间微凸起,颜色灰色,气味略有奶酪香气,略带有少许饭馊味	71
DZ-001	菌落浅黄色、椭圆、中间微凸起,表面光滑,气味纯正	75
ZJ-001	菌落椭圆、表面光滑、中间微凸起,颜色灰色,气味较佳	79
BJ-001	菌落浅黄色、表面粗糙,类似假丝落特征,有奶酪香气	82
LN-001	菌落椭圆、表面光滑、中间微凸起,颜色浅黄色,香气特别,有清新水果香	88
LN-002	菌落椭圆、表面粗糙、中间微凸起,香气较好	76
WH-001	菌落椭圆、表面光滑、中间微凸起,颜色浅灰色,气味略带水果香,但夹杂少许馊味	75
QS-001	菌落椭圆、表面粗糙、中间微凹陷,浅黄色,特征香气不明显	65

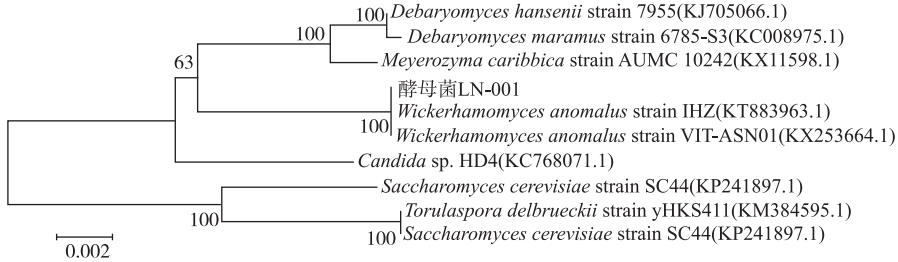


图 5　酵母菌 LN-001 菌株的分子发育树

Fig. 5　Molecular developmental tree of yeast LN-001 strain

2.2.2　*初始 pH 值的确定*　表 7 是不同初始 pH 值的实验结果。可以看出,当起始 pH 值为 5.5 时,产酸量最高,感官评价得分最高。

2.2.3　*发酵温度的确定*　从表 8 可知,在温度为 30 ℃时,产酸量较大,感官评价得分最高。

表 6　不同接种体积分数和接种比例对混菌发酵茶饮料的影响

Table 6　Effect of different inoculation amount and inoculation ratio on the fermented tea beverage by mixed bacteria

总接种体积分数/%	$V_{乙酸菌\ DZ-001}$:$V_{酵母菌\ LN-001}$	产酸量/(g/L)	感官评价得分
2.5	2:1	3.83±0.65	82
	1:1	3.28±0.84	70
	1:2	2.59±0.76	65
5.0	2:1	4.38±0.58	89
	1:1	3.07±0.45	80
	1:2	2.85±0.55	76
7.5	2:1	4.10±0.81	85
	1:1	3.87±0.34	79
	1:2	3.64±0.54	70
10.0	2:1	3.95±0.52	82
	1:1	3.61±0.54	68
	1:2	3.06±0.32	60

表 7　不同起始 pH 对混菌发酵茶饮料的影响

Table 7　Effect of different initial pH on the fermented tea beverage by mixed bacteria

pH	产酸量/(g/L)	感官评价得分
4.5	3.58±0.36	70
5	4.22±0.72	85
5.5	4.89±0.65	91
6	3.91±0.57	78
6.5	3.06±0.32	74

表 8　不同温度对混菌发酵茶饮料的影响

Table 8　Effect of different temperatures on the fermented tea beverages by mixed bacteria

温度/℃	产酸量/(g/L)	感官评价得分
20	3.62±0.63	73
25	4.65±0.37	90
30	4.91±0.62	91
32	4.96±0.64	87
34	3.06±0.32	80

2.2.4　*发酵时间的确定*　表 9 表明，随着发酵时间的延长，发酵液中产酸量不断增大，10 d 后趋于稳定。其中发酵时间为 12 d 时，感官评价得分最高，这与徐小倩[29]的研究结果一致。

2.3　辅料添加量的优化

2.3.1　*单因素试验*　图 6 表明，当草莓果汁添加质量浓度为 3 g/L、结晶糖浆添加质量浓度为 4 g/L、柠檬酸和柠檬酸钠添加质量浓度为 3 g/L 时，感官评分最高。

表 9　不同发酵时间对混菌发酵茶饮料的影响

Table 8　Effect of different fermentation time on the fermented tea beverage by mixed bacteria

时间/d	产酸量/(g/L)	感官评价得分
3	2.02±0.37	73
4	2.87±0.41	75
5	3.81±0.33	80
6	4.03±0.37	87
7	4.91±0.62	91
8	5.12±0.37	91
9	5.32±0.57	91
10	5.52±0.53	92
11	5.54±0.35	92
12	5.57±0.45	95
13	5.56±0.78	91
14	5.60±0.48	91
15	5.53±0.82	91

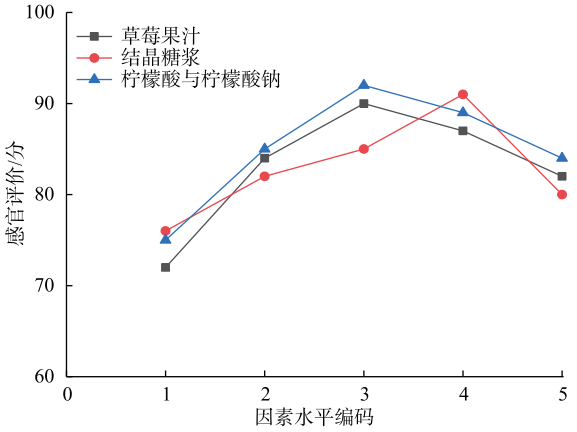


图 6　各因素对草莓味酵素茶感官评价的影响

Fig. 6　Effect of various factors on the sensory evaluation of strawberry-flavored fermented tea

2.3.2　*响应面试验模糊评判*

1)响应面模糊评判结果　以香气、色泽、滋味、口感质地 4 个因素为评价指标，对响应面试验 17 组不同样品进行感官评价，每组样品指标等级的得票数/总参评数(10 人)，得到模糊矩阵 D_1~D_{17}。

2)模糊变换及综合评价　根据模糊变换的原理 $G=X\cdot D$，则第 j 号样品评价结果表示为 $G_j=X\cdot D_j$(X 为权重，j 为 1~17 号)。将 G_j 乘以其相应的子集分数值，结果求和得到综合评定的分数，然后进行多元回归拟合，得到以感官分值为目标函数的模型：Y_1= 92.20 −0.88A_1 +0.75B_1 +0.62C_1 +1.50A_1B_1 +0.75A_1C_1 − 1.00B_1C_1−2.23A_1^2−4.97B_1^2−2.72C_1^2。对所得模型进行回归系数及显著性测验，结果见表 10。

由表 10 可知,$A_1>B_1>C_1$ 且 3 个因素都显著;交互项 A_1C_1 不显著,B_1C_1 显著,A_1B_1 极显著;二次项都为极显著。总模型的概率 $P<0.000\ 1$,为极显著。同时失拟项 $P=0.788\ 0$,表示模型拟合良好。相关系数 $R^2=0.982\ 6$,说明响应值的变化有 98.26%来源于所选变量。

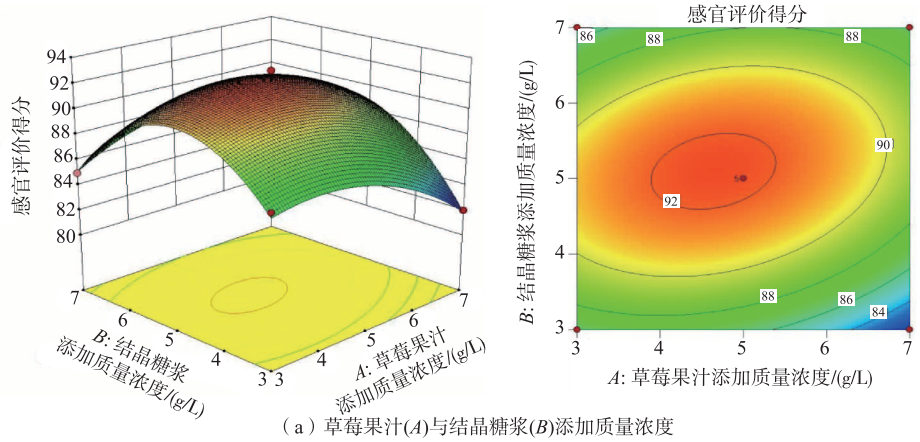
3)响应面分析及最优条件确定　模型的响应面和等高线图见图 7。可以看出,影响感官评价得分的分别是:$A_1>B_1>C_1$。比较 3 个等高线图,交互作用显著性程度为:$A_1B_1>B_1C_1>A_1C_1$。

表 10　回归系数及其显著性测验结果

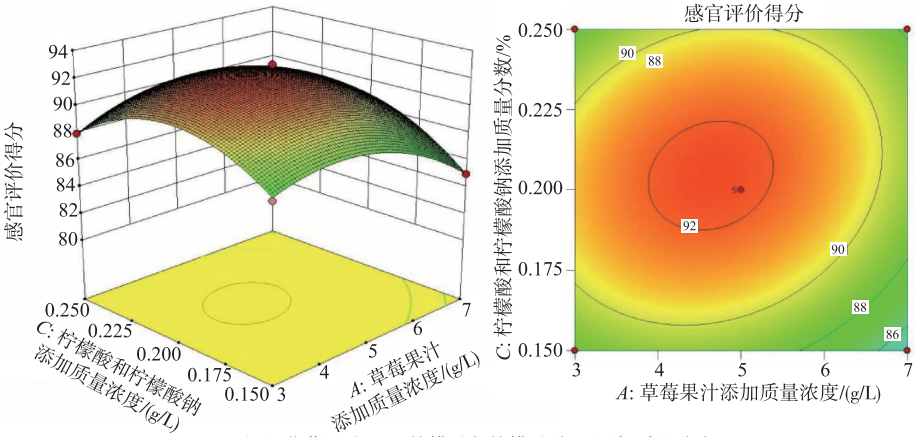
Table 10　Regression coefficient and its significance test results

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	200.69	9	22.30	43.97	< 0.000 1	极显著
A_1	6.12	1	6.12	12.08	0.010 3	显著
B_1	4.50	1	4.50	8.87	0.020 5	显著
C_1	3.12	1	3.12	6.16	0.042 1	显著
A_1B_1	9.00	1	9.00	17.75	0.004 0	极显著
A_1C_1	2.25	1	2.25	4.44	0.073 2	不显著
B_1C_1	4.00	1	4.00	7.89	0.026 2	显著
A_1^2	20.84	1	20.84	41.10	0.000 4	极显著
B_1^2	104.21	1	104.21	205.49	< 0.000 1	极显著
C_1^2	31.27	1	31.27	61.65	0.000 1	极显著
残差	3.55	7	0.51			
失拟误差	0.75	3	0.25	0.36	0.788 0	
纯误差	2.80	4	0.70			
总变异	204.24	16				

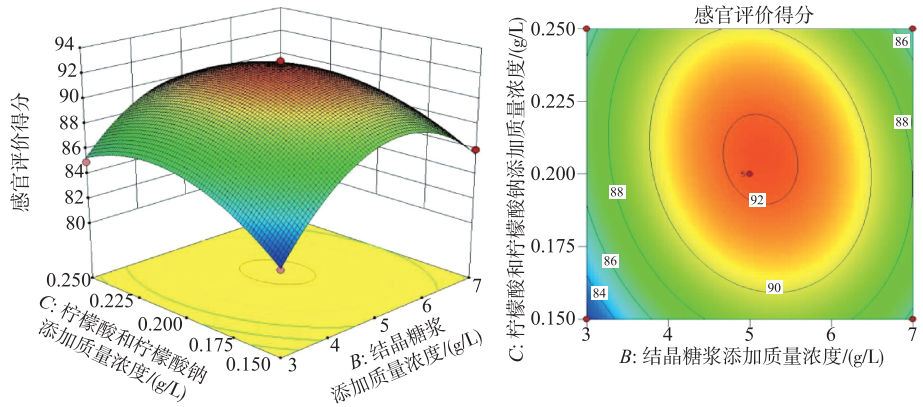
注:$R^2=0.982\ 6$;$R^2_{Adj}=0.960$



(a)草莓果汁(*A*)与结晶糖浆(*B*)添加质量浓度



(b)草莓果汁(*A*)和柠檬酸与柠檬酸钠(*C*)添加质量浓度



（c）结晶糖浆(*B*)和柠檬酸与柠檬酸钠(*C*)添加质量浓度

图 7　辅料添加量对感官评价的响应面和等高线图

Fig. 7　Response surface and contour plot of the additives amount to sensory evaluation

通过响应面分析法优化和平行验证试验，将酵素茶最佳调配工艺修正为：草莓果汁添加质量浓度 4.66 g/L、结晶糖浆添加质量浓度 5.08 g/L、柠檬酸和柠檬酸钠总添加质量浓度 0.20 g/L。实际感官评价总分为 92 分，与理论预测值相近，说明该模型与实际情况拟合良好。

2.4　抗氧化剂添加量的确定

由表 11 中 OD 值和感官得分情况综合评判，VC 和 *D*-异抗坏血酸钠的最佳添加量分别确定为 0.02、0.03 g/L。

2.5　食用香精添加量

草莓香精按照使用说明书上推荐的添加质量分数为 0.1%，效果良好。

表 11　不同抗氧化剂添加量对草莓味茶酵素特性影响

Table 11　Effects of different antioxidant amounts on the properties of strawberry-flavored fermented tea

总添加量/(g/L)	VC:*D*-异抗坏血酸钠	OD 值	感官评价得分
0.025	1.5:1.0	1.22±0.21	81
	1.0:1.0	1.28±0.23	84
	1.0:1.5	1.59±0.26	83
0.05	1.5:1.0	0.88±0.18	80
	1.0:1.0	0.87±0.15	83
	1.0:1.5	0.76±0.15	86
0.075	1.5:1.0	0.70±0.22	83
	1.0:1.0	0.77±0.24	79
	1.0:1.5	0.79±0.16	70
0.1	1.5:1.0	0.50±0.14	82
	1.0:1.0	0.61±0.17	78
	1.0:1.5	0.68±0.18	70

3　结　语

从不同产地红茶菌“胃宝”中分离筛选乙酸菌和酵母菌，通过发酵性能测试、发酵产物可挥发性风味物质分析、总体感官评价和分子生物学鉴定等方法，分别获得一株优良乙酸菌和酵母菌；再以大别山区黄大茶为主要原料，加入草莓汁，通过发酵工艺优化和产品调配优化等手段开发草莓味黄大茶发酵饮料，并获得最佳工艺参数。研究结果为黄大茶和草莓资源产业化利用、提升其附加值、带动地方经济发展提供依据。

参考文献：

[1] 梅瀚杰，胡文锋. 国内外红茶菌研究进展[J]. 食品工业科技，2018，39(17)：335-341，351.
[2] LAUREYS D，BRITTON SJ，CLIPPELEER J D. Kombucha tea fermentation：a review[J]. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**，2020，78(3)：165-174.
[3] 魏书蓉，张亚楠，吴春，等. 红茶菌的研究进展[J]. 亚太传统医药，2018，14(11)：97-99.
[4] FRANK G W. Kombucha:Health Beverage and Natural Remedy from the Far East[M]. Steyr：Wilhelm Ennsthaler,1991.
[5] 刘士清，张无敌. 民间红茶菌的医疗保健作用[J]. 中国民族民间医药杂志，1996(3)：19-21.
[6] DUTTA D，GACHHUI R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. Nov.，isolated from kombucha tea[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**，2007(57)：353-357.
[7] DUFRESNE C，FARNWORTH E. Tea，Kombucha，and health：a review[J]. **Food Research International**，2000，33(6)：409-421.
[8] MMWR. Unexplained severe illness possibly associated with consumption of Kombucha tea Niowa[J]. **The Journal of the American Medical Association**，1996，275(2)：96-98.
[9] 孙协军，宋立. 红茶菌发酵工艺优化及菌液主要成分变化分析[J]. 食品与发酵工业，2013，49(5)：87-90.
[10] 袁磊，张国华，FAIZANAS，等. 发酵条件对红茶菌发酵品质及风味的影响[J]. 食品科学，2017，38(2)：92-97.
[11] KATARZYNA N S，BARBARA S，IWONA S，et al. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical，microbiological and sensory properties[J]. **CYTA–Journal of Food**，2017，15(4)：601.
[12] NGUYEN N K，NGUYEN P B，NGUYEN H T，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.
[13] LONCAR E，KANURIC K，MALBASA R，et al. Kinetics of saccharose fermentation by Kombucha[J]. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**，2014，20(3)：345-352.
[14] 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]. 开封：河南大学，2018：1-71.
[15] 叶建斌，齐晓娜，张婷婷，等. 红茶菌发酵制备特色酸香型烟草浸膏[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(10)：104-111.
[16] 王桥美，杨瑞娟，严亮，等. 速溶普洱茶对红茶菌饮料发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(2)：197-204.
[17] 王丽. 黄大茶具有显著降血糖功效[J]. 海南医学，2016，27(20)：3438.
[18] 冯巩，朱晓凤，刘政权. 无糖黄大茶饮料的研制[J]. 饮料工业，2016，19(4)：41-44.
[19] 范晓勤. 生态水果长丰草莓产业发展对策[J]. 研究产业创新研究，2021，8(下)：37-38.
[20] 杜青平，袁保红. 红枣红茶菌复合保健饮料的研制[J]. 食品科技，2002(8)：43-44.
[21] 郭书贤，王冬梅，李娟，等. 红薯糖浆在红茶菌发酵饮料中的应用研究[J]. 中国酿造，2007(8)：33-37.
[22] 王冬梅，郭书贤，王庆洁，等. 芦荟红茶菌复合发酵饮料工艺研究[J]. 中国酿造，2008(1)：82-85.
[23] 邢慧雅，陈树俊，白宝清. 基于模糊数学法和响应面法优化藜麦发酵浓浆发酵工艺[J]. 食品安全质检测学报，2019，10(7)：1934-1943.
[24] 中华人民共和国农业部. 水果及制品可溶性糖的测定 3，5- 二硝基水杨酸比色法：NY/T 2742-2015[S]. 北京：中国标准出版社，2015.
[25] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品酸度的测定：GB/T5009.239—2016[S]. 北京：中国标准出版社，2016.
[26] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京：中国轻工业出版社，2007：1000.
[27] FAN W L，QIAN M C. Characterization of aroma compounds of Chinese "Wuliangye" and "Jiannanchun" liquors by aroma extract dilution analysis[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2006，54(7)：2695-2704.
[28] 沈明浩，谢主兰. 食品感官评定(第二版)[M]. 郑州：郑州大学出版社，2017：146-147.
[29] 徐小倩. 液态茶饮料的混菌发酵工艺研究[D]. 合肥：安徽农业大学，2016：23.