

‘红茶菌’发酵饮料生产工艺及其功能特性研究

谭培科¹, 陈志周^{1,2*}, 逯笑萌¹, 牟建楼¹, 刘冰²

(1. 河北农业大学食品科技学院, 保定 071000; 2. 河北农业大学机电工程学院, 保定 071001)

摘要: **目的** 优化纯菌混合发酵制备‘红茶菌’发酵饮料的生产工艺, 并对优化后的‘红茶菌’发酵饮料的功能特性进行考查。**方法** 以糖茶水为基底, 通过单因素试验考察接种量、葡萄糖添加量以及茶叶添加量对‘红茶菌’发酵饮料总糖利用率和感官评分的影响, 并采用响应面分析法得出最佳工艺。采用优化工艺条件对‘红茶菌’发酵至第6 d, 采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)自由基清除能力、2,2'-联氮-双-3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]阳离子自由基清除能力评价抗氧化能力, 96孔板法进行抑菌能力分析, 采用DNS法进行抑制 α -淀粉酶能力分析。**结果** 最佳工艺为接种量为8.0%、葡萄糖添加量14.5%、茶叶添加量1.2%。优化后‘红茶菌’发酵液pH下降至3.2左右, 总酸浓度为1.632 g/L, 总酚最高可至332.7 mg/mL。优化后发酵液DPPH自由基以及ABTS⁺自由基的清除率分别达到了81.32%和82.92%, 金黄色葡萄糖菌、大肠杆菌和单增李斯特菌的最小抑菌浓度分别为128、16和16 mg/mL, 对 α -淀粉酶的抑制作用达87.53%。**结论** 优化工艺可明显提高‘红茶菌’发酵饮料的抗氧化能力, 对金黄色葡萄糖球菌、大肠杆菌、单增李斯特菌具有明显的抑制作用, 对于 α 淀粉酶的抑制作用也有较大提升。

关键词: ‘红茶菌’; 纯菌混合发酵; 响应面法; 抗氧化性; 抑菌作用; α -淀粉酶

Study on production process and functional activity of the 'Kombucha' fermented beverage

TAN Pei-Ke¹, CHEN Zhi-Zhou^{1,2}, LU Xiao-Meng¹, MU Jian-Lou¹, LIU Bing²

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Hebei 071000, China;
2. College of Mechatronical and Electrical, Hebei Agricultural University, Hebei 071001, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the production technology of 'Kombucha' fermented beverage prepared by mixed fermentation of pure bacteria, and study the functional characteristics of optimized 'Kombucha' fermented beverage. **Methods** The effects of inoculum concentration, glucose addition amount, tea additive amount on the total sugar utilization rate and sensory score of 'Kombucha' fermented beverage were studied by single factor experiment, and the optimum process was obtained by response surface analysis. 'Kombucha' was fermented to the 6th day, the antioxidant capacity was evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2019104)、河北省省级研究生示范课程立项建设项目(KCJSX2020039)、河北农业大学食品加工学科群经费资助项目(2021-03)

Fund: Supported by the Science and Technology Research Project of Higher Education Institutions of Hebei Province (ZD2019104), the Hebei Provincial Graduate Demonstration Course Project (KCJSX2020039), and the Food Processing Discipline Group of Agricultural University of Hebei (2021-03)

*通信作者: 陈志周, 博士, 教授, 主要研究方向为食品包装材料与技术。E-mail: chenzhizhou2003@126.com

*Corresponding author: CHEN Zhi-Zhou, Ph.D, Professor, College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Hebei 071001, China. E-mail: chenzhizhou2003@126.com

2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) cation radical scavenging ability. The 96-well plate method was used for antibacterial ability analysis and DNS method was used for inhibition α -amylase capacity analysis. **Results** The best process was: 8.0% inoculation, 14.5% glucose added and 1.2% tea added. After optimization. pH decreased to around 3.2, which corresponded to an increase in total titration acidity up to 1.632 g/L, and the content of phenolic was up to 332.7 mg/mL. The removal rate of 'Kombucha' fermented beverage for DPPH and ABTS⁺ reached 81.32% and 82.92%, and the minimum antibacterial concentrations of the *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Monosaccharide listeria* were 128, 16, 16 mg/mL respectively, and the inhibition effect of α -amylase reached 87.53%. **Conclusion** The antioxidant ability of 'Kombucha' fermented beverage is significantly improved compared with non-optimization, and there is obvious inhibition for the three pathogenic bacteria, and the inhibition effect of α -amylase is also greatly improved.

KEY WORDS: 'Kombucha'; mixed fermentation of pure bacteria; response surface methodology; antioxidant; antimicrobial activity; α -amylase

0 引言

‘红茶菌’又称海宝、茶菌，在我国已经有 150 多年的历史，主要以红茶(也可以用其他原料代替，如果汁^[1]、牛奶^[2]以及树叶^[3])、葡萄糖作为基底，经由醋酸菌和酵母菌等多种微生物发酵 1~3 周制得^[4]。近年来，国内外研究表明，‘红茶菌’有调节血压、改善睡眠、预防治疗糖尿病和高血压等多种保健效果^[5-6]。但现阶段对于‘红茶菌’的研究主要集中在试验阶段，培养方式简单，难以满足‘红茶菌’生产的标准化和工业化^[7]，且用于发酵的菌种、茶叶种类众多且难以统一，不利于‘红茶菌’发酵稳定性的实现^[8]，而且存在菌种缺乏科学管理引起变异甚至死亡的问题^[9]，发酵过程中任何操作不当所导致的菌种污染都会对饮用者造成危害。发酵条件的不同对最终产品品质的影响较大，糖类、茶叶添加量和接种量对微生物代谢有着显著影响，进而改变产品风味。陈雪娇等^[10]使用纯菌发酵方法所得的‘红茶菌’的抗氧化能力、产酸能力、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力以及氨基酸合成能力都明显高于传统的‘红茶菌’菌膜发酵。WATAWANA 等^[11]利用‘红茶菌’发酵椰子水，发酵后葡萄糖酸、乙酸和多酚含量上升，得到了一种营养价值较高的新型饮料。所以，对‘红茶菌’发酵条件进行优化，保证产品的稳定和安全，提高产品的营养价值势在必行。

本研究将王洁琛等^[12]从野生‘红茶菌’中分离出的 3 株酵母菌(*Brettanomyces bruxellensis*、*Zygosaccharomyces bisporus*、*Metschnikowia fructicola*，以下分别简称为 Y1、Y2、Y3)和 1 株醋酸菌(*Komagataeibacter intermedius*，以下简称为 C1)复配进行纯菌混合发酵，通过单因素试验和响应面法对影响发酵过程的葡萄糖、茶叶添加量以及接种量进行优化，并对优化后产品的抗氧化性、抗菌性以及抑制 α -淀粉酶能力进行测定，期望能够得到清爽可口、功能

多样的‘红茶菌’饮料，发掘和拓展‘红茶菌’饮料的应用价值，为‘红茶菌’饮料的工业化生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及来源

Brettanomyces bruxellensis (KM236197.1)、*Zygosaccharomyces bisporus* (JX458135.1)、*Metschnikowia fructicola* (HM191666.1)、*Komagataeibacter rintermedius* (MH424833.1) 均为试验室自行分离。

1.2 材料与试剂

酵母浸粉、蛋白胨(分析纯，北京奥博星生物技术有限责任公司)；麦芽汁琼脂培养基(北京三药科技开发公司)；葡萄糖、十二水合磷酸氢二钠、酒石酸钾钠(分析纯，天津天大化工试验厂)；2,2'-联氮-双-3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼[纯度 98%，阿拉丁试剂(上海)有限公司]；庆大霉素(纯度 99%，上海远慕生物科技有限公司)； α -淀粉酶(食品级，南京绿意生物科技有限公司)；阿卡波糖(纯度 99%，天大市天大化工试验厂)；维生素 C (vitamin C, VC)(纯度 99%，广州市鼎盛药业有限公司)。

HS (Hestrin-Schramm)培养基配方：葡萄糖 2%，蛋白胨 0.5%，酵母浸粉 0.5%，十二水合磷酸氢二钠 0.68%。

酵母浸出粉葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose, YPD)配方：葡萄糖 2%，蛋白胨 2%，酵母浸粉 1%。

1.3 仪器与设备

F-1 型反压高温蒸煮锅(北京发恩科贸有限公司)；SW-CJ-2D 型超净工作台(北京永光明医疗仪器有限公司)；DH-360 型电热恒温培养箱(北京中兴伟业有限公司)；TU-1810 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)

1.4 试验方法

1.4.1 ‘红茶菌’饮料制作流程

制作工艺流程图见图 1。所制成品为‘红茶菌’发酵原液。



图 1 ‘红茶菌’饮料制作工艺流程图

Fig.1 Production process flow chart of kombucha fungus beverage

1.4.2 单因素试验

(1) 复配菌种组合对发酵的影响

在接种量 5% (文中百分比均为以糖水质量为基准的质量比)、茶叶添加量 1%、葡萄糖添加量 15% 条件下, 分别在 C1、Y3、C1、Y1、C1、Y2、C1、Y3、Y2、C1、Y1、Y2、C1、Y3、Y1、C1、Y1、Y2、Y3 7 种菌种组合下发酵 6 d。

(2) 接种量对发酵的影响

在菌种组合为 C1、Y1、Y2、Y3、茶叶添加量 1%、葡萄糖添加量 15% 条件下, 分别在 1%、3%、5%、7%、9% 接种量下发酵。

(3) 茶叶添加量对发酵的影响

在菌种组合为 C1、Y1、Y2、Y3、接种量 1%、葡萄糖添加量 15% 条件下, 分别在 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4% 茶叶添加量下发酵。

(4) 葡萄糖添加量对发酵的影响

在菌种组合为 C1、Y1、Y2、Y3、接种量 1%、茶叶添加量 1% 条件下, 分别在 9%、11%、13%、15%、17% 葡萄糖添加量下发酵。

采用感官评价法和总糖利用率 2 个指标对‘红茶菌’发酵产品进行评价, 总糖利用率代表菌体消耗糖类生产其他营养物质的效率, 总糖利用率按照公式(1)计算:

$$\text{总糖利用率(\%)} = \frac{\text{葡萄糖总量} - \text{残糖量}}{\text{葡萄糖总量}} \times 100 \quad (1)$$

式中, 葡萄糖总量和残糖量的单位为 mg; 总糖利用率越高, 说明菌体代谢旺盛, 能够快速高效的合成其他活性物质。

1.4.3 响应面优化试验

在单因素试验的基础上, 将接种量(B)、葡萄糖添加量(C)以及茶叶添加量(D)作为自变量, 以总糖利用率和感官评分为响应值, 进行 3 因素 3 水平响应面试验设计, 每个因素和水平试验均重复 3 次。Box-Behnken 试验因素和水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验因素和水平
Table 1 Box-Behnken test factors and levels

因子	水平		
B 接种量/%	6	7	8
C 葡萄糖添加量/%	14	15	16
D 茶叶添加量/%	1.1	1.2	1.3

菌种混合液制备: 将 1.1 的 1 种醋酸菌和 3 种酵母菌分别培养在 HS 培养基和 YPD 培养基中, 恒温 37 °C 培养 2 d。按照菌种数量(CFU/mL) 3:10:10:10 将 4 种菌种混合。

1.4.4 感官评定方法

(1) 建立感官判断评价模型

根据李志弟^[13]的方法并稍加修改建立‘红茶菌’的感官评定标准。选择 10 名食品专业人员根据表 2 对‘红茶菌’饮料各个指标进行评分^[14]。

1.4.5 pH 和总酸含量测定

采用 pH 计和酸碱滴定法测定发酵液的 pH 和总酸含量。

1.4.6 还原糖含量测定

参照 SENGUPTA 等^[15]的 3,5-二硝基水杨酸比色法对还原糖含量进行测定。

1.4.7 总酚含量测定

参照张恒等^[16]的方法并稍加修改, 采用 Folin 酚比色法对总酚含量进行测定。

1.4.8 功能特性研究

分别取 1、2、4、8、12、16、20 mg 维生素 C、阿卡波糖以及‘红茶菌’发酵原液溶于 10 mL 乙醇中制成 0.5、1、2、4、6、8、10 mg/mL 的维生素 C、阿卡波糖溶液和发酵液供试验使用。

按照菌种数量(CFU/mL) 3:10:10:10 的比例对醋酸菌与 3 种酵母菌进行复配, 在未优化条件下, 即接种量 5%、茶叶添加量 1%、葡萄糖添加量 15% 时发酵 6 d 所得为未优化‘红茶菌’发酵原液, 按照上述方式配制不同质量浓度的未优化‘红茶菌’发酵液供试验使用。

(1) 抗氧化能力测定

参照丁艳如^[17]的方法进行 DPPH 自由基清除试验, 参照唐思颀等^[18]的方法进行 ABTS⁺自由基清除能力试验。

(2) 抑菌试验

参照董飞等^[19]的方法进行稍加修改, 将 0.1 mL 不同浓度的待测溶液分别加入 96 孔板中, 11 孔和 12 孔分别为庆大霉素阳性对照以及无菌生理盐水的阴性对照。再将菌液加入到各个孔中, 37 °C 培养 18~24 h, 观察肉汤浑浊度, 浑浊则说明有微生物生长。

(3) α-淀粉酶抑制试验

参照邵元元^[20]的方法, 对优化前后的产品进行 α-淀粉酶抑制能力的测定。

1.4.9 数据分析

采用 Origin 8.5 进行绘图, 采用 SPSS 20.0 软件对数据

进行显著性分析, $P>0.05$ 表示没有显著性差异, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 复配菌种组合对发酵的影响

不同地区‘红茶菌’中菌种组成不同, 合理的菌种组合能够产生更好的发酵效果^[21]。按照菌种数量(CFU/mL) 3:10:10:10 的比例对醋酸菌与 3 种酵母菌进行复配。表 3 为不同菌种组合对发酵效果的影响。C1、Y1、Y2、Y3 组合的总糖利用率最高, 为 19.28%, 其对应的感官评分也是

最高, 且发酵状况保持了‘红茶菌’饮料的风味和特点, 所以选择 C1、Y1、Y2、Y3 作为发酵菌种组合。

2.2 接种量对发酵的影响

接种量对‘红茶菌’发酵的影响见图 2。由图 2 可知, 当接种量从 1% 增加至 9% 时, 饮料中的菌体总数不断增加, 菌体代谢旺盛, 总糖利用率显著上升至 51.82% ($P<0.05$), 但较大的接种量会导致发酵过度, 产生较重的酒精味, 影响感官评分, 当接种量在 7% 时, 感官评分达到最大值, 随后便显著下降($P<0.05$)。综上, 选择 6%、7%、8% 接种量进行响应面试验。

表 2 ‘红茶菌’饮料的感官评定标准
Table 2 Sensory evaluation standard of ‘Kombucha’ fermented beverage

评分	口感	外观	气味	色泽
8~10	酸甜比例均匀, 口感细腻, 茶香味浓郁	液体清亮澄清, 瓶底无沉淀, 只有生物膜漂浮	微酸, 有香甜味, 柔和	颜色均匀, 呈浅红色
6~8	酸甜比例较差, 只有淡淡的茶香味	液体较澄清, 只有少许杂质	酸味较大, 气味较协调	颜色较均匀, 呈浅黄色
4~6	过酸或过甜, 并且有较重的油脂味	液体浑浊, 瓶底沉淀较多, 液面只有纤维状细丝	酸味中掺杂醇味, 有刺鼻味道	颜色深浅不一, 整体感觉较差
0~4	醋酸味过重, 难以下咽	无生物膜形成, 瓶底大量沉淀	气味刺鼻, 醇味较重	颜色较深, 整体感觉差

表 3 复配菌种组合对‘红茶菌’发酵的影响
Table 3 Effects of species combinations on ‘Kombucha’ fermentation

复配菌种组合	发酵状况评价	总糖利用率/%	感官评分
C1、Y3	无菌膜, 偏甜无酸味, 茶涩味较重,	2.26±0.18 ^c	82±3.6 ^{ab}
C1、Y2	无菌膜, 腐败气味较大, 没有正常食品气味	5.11±0.47 ^d	70±9.1 ^c
C1、Y3、Y2	菌膜较薄, 味道酸甜, 醇味较大, 茶涩味重	8.93±0.10 ^c	78±2.6 ^{bc}
C1、Y1	无菌膜, 甜味较浓, 茶涩味较重	9.60±0.59 ^c	80±4.4 ^{ab}
C1、Y1、Y2	无菌膜, 酸味较大, 气味刺激, 茶香味较弱	16.99±0.15 ^b	80±1.7 ^{ab}
C1、Y3、Y1	有菌膜, 酸甜味比较协调, 有茶香味但涩味较重	17.41±0.44 ^b	86±1.7 ^{ab}
C1、Y1、Y2、Y3	有菌膜, 酸味较大, 涩味较弱, 茶香味浓郁	19.28±0.28 ^a	88±5.2 ^a

注: a~e: 不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。下同。

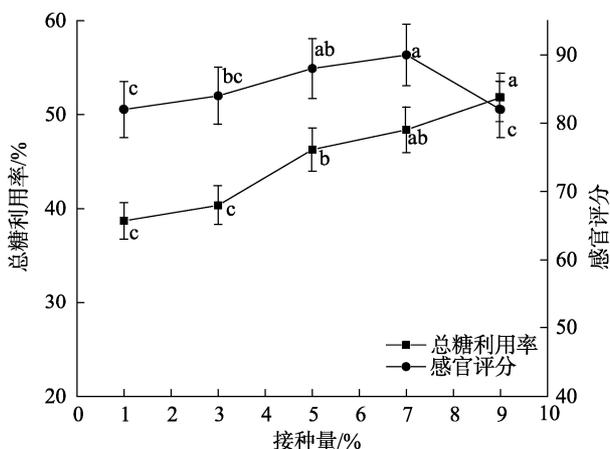


图 2 接种量对‘红茶菌’发酵的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of inoculation amount on ‘Kombucha’ fermentation ($n=3$)

2.3 茶叶添加量对发酵的影响

茶叶含有糖类、氨基酸、维生素及矿物质等丰富的营养物质, 对‘红茶菌’的生长繁殖影响较大^[23]。茶叶添加量对‘红茶菌’发酵的影响见图 3。由图 3 可知, 当茶叶添加量从 0.6% 增加至 1.4% 时, 总糖利用率显著上升至 38.54% ($P<0.05$), 但当茶叶添加量超过 1.2% 时, 饮料中的茶涩味、酸味较重, 感官评分下降, 但不具统计学差异($P>0.05$)。综上所述, 选择 1.1%、1.2%、1.3% 茶叶添加量进行响应面试验。

2.4 葡萄糖添加量对发酵的影响

糖类是微生物生长所需的重要营养来源, 合适的添加有助于发酵过程的进行^[22]。不同葡萄糖添加量对‘红茶菌’发酵的影响结果见图 4。当葡萄糖添加量从 9% 增加至

13%时, 总糖利用率显著下降至 15.3% ($P<0.05$), 这是因为‘红茶菌’在发酵第一阶段主要是酵母菌分解糖类产生乙醇, 葡萄糖添加过量造成乙醇生成量较高, 造成高渗透压环境, 致使酵母菌破裂, 影响了酵母菌的继续分解葡萄糖^[24]。随后过多的乙醇被发酵第二阶段的醋酸菌利用^[7], 乙醇的减少刺激酵母菌继续分解葡萄糖^[22], 所以在 15%添加量时显著上升至 39.35% ($P<0.05$), 总糖利用率达到最高, 另外由于糖度的提高, ‘红茶菌’饮料的口感也逐渐改善, 感官评分也显著提高($P<0.05$), 随后葡萄糖添加量继续增大, 总糖利用率显著下降($P<0.05$), 感官评分虽有降低, 但不具统计学差异($P>0.05$)。综上所述, 选择 14%、15%、16%茶叶添加量进行响应面试验。

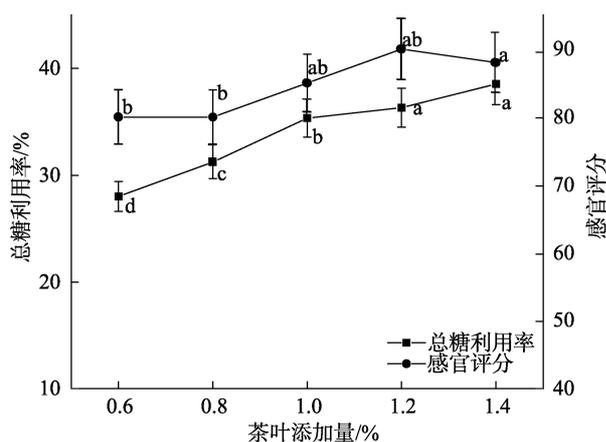


图 3 茶叶添加量对‘红茶菌’发酵的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of the addition amount of tea on ‘Kombucha’ fermentation ($n=3$)

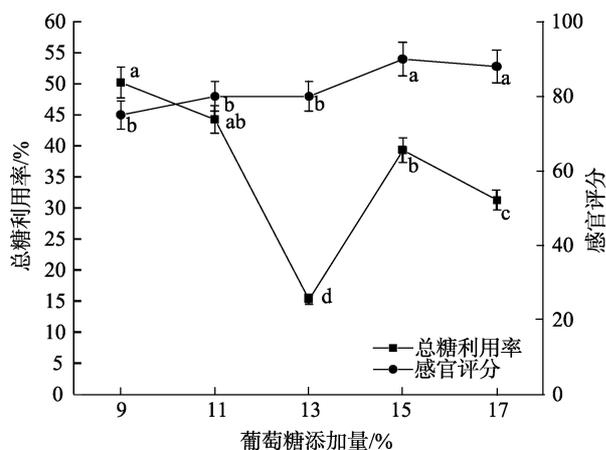


图 4 葡萄糖添加量对‘红茶菌’发酵的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of the addition amount of glucose on ‘Kombucha’ fermentation ($n=3$)

2.5 响应面法优化试验结果

响应面法优化试验结果如表 4 所示。分别以感官评价 (Y_1)和总糖利用率(Y_2)为响应值对表 4 试验结果进行多项式

回归分析, 拟合得到 2 个多元二次回归模型为:

$$Y_1=80.20+3.62\times B+2.13\times C-2.25\times D-5.57\times BD-2.25\times CD+1.15\times B^2-1.35\times C^2-4.10\times D^2;$$

$$Y_2=41.15+1.08\times B-2.15\times C+3.26\times D-0.75\times BC+3.45\times BD-0.46\times CD-7.76\times B^2-2.81\times C^2-5.61\times D^2$$

对以上 2 个模型进行方差分析, 分析结果见表 5。由表 5 可知, 两个模型“Prob>F”值均小于 0.05, 表明模型高度显著, 且失拟项 P 值相对于绝对误差均不显著, 说明两个模型有较好的拟合度。感官评分和总糖利用率的决定系数分别为 0.9467、0.9909, 表明变量之间的多元回归关系显著。

表 4 Box-Behnken 试验设计和结果
Table 4 Box-Behnken test design and results

序号	因素			响应值	
	B	C	D	感官评分	总糖利用率/%
1	0	0	0	80	40.79
2	0	1	-1	82	28.23
3	0	0	0	78	40.36
4	0	0	0	80	41.25
5	1	0	-1	89	21.34
6	1	0	1	80	35.49
7	-1	0	-1	72	26.98
8	0	-1	-1	72	31.47
9	0	-1	1	74	38.16
10	-1	1	0	76	27.60
11	-1	0	1	77	27.33
12	0	1	1	75	33.08
13	-1	-1	0	75	30.53
14	0	0	0	80	42.61
15	1	-1	0	84	35.08
16	0	0	0	82	40.57
17	1	1	0	85	29.14

回归系数显著性检验表明, B (接种量)、 C (葡萄糖添加量)因素对感官评分影响显著, BD 、 CD 交互作用显著; B (接种量)、 C (葡萄糖添加量)、 D (茶叶添加量)因素对总糖利用率影响显著, BD 交互作用显著。响应面陡峭程度和等高线密集程度反映了因素之间交互作用的强弱。图 4 为 B (接种量)、 C (葡萄糖添加量)、 D (茶叶添加量)对感官评分的交互作用。 BD 响应面较 CD 陡峭, 影响更显著, 这与方差分析结果相一致; 图 5 为 B (接种量)和 D (茶叶添加量)对总糖利用率的交互作用, 响应面陡峭, 且等高线密集, 说明交互作用十分显著, 亦与方差分析结果相一致。

表5 感官评价回归模型方差分析

Table 5 Sensory evaluation regression models analysis of variance

方差来源	P 值(Prob>F)	
	感官评分	总糖利用率
B	<0.0001	0.0126
C	0.0262	0.0003
D	0.0930	<0.0001
BC	1.0000	0.1440
BD	0.0037	0.0001
CD	0.0285	0.3482
B ²	0.0510	<0.0001
C ²	0.0510	0.0004
D ²	0.0206	<0.0001
模型	0.0011	<0.0001
失拟项	0.2880	0.429
R ²	0.9467	0.9909

2.5.3 发酵条件的确定和验证

利用 Design Expert 8.0 软件得出预测最佳生产工艺为:

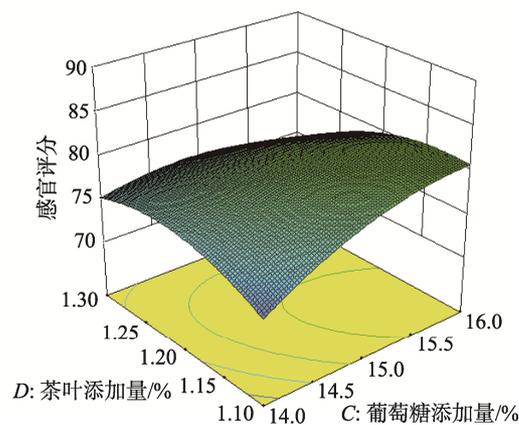
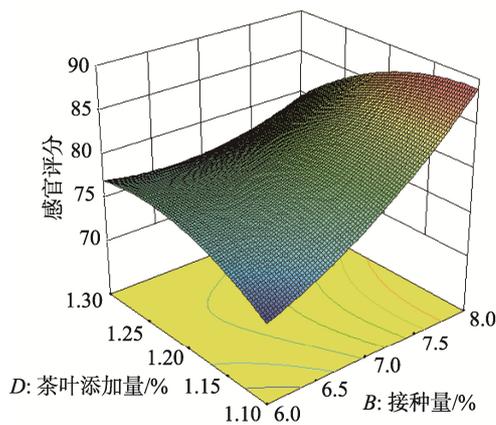


图5 接种量、葡萄糖添加量和茶叶添加量的交互作用对感官评分的影响

Fig.5 Interaction effects of inoculum concentration, glucose additive amount and tea additive amount on sensory scores

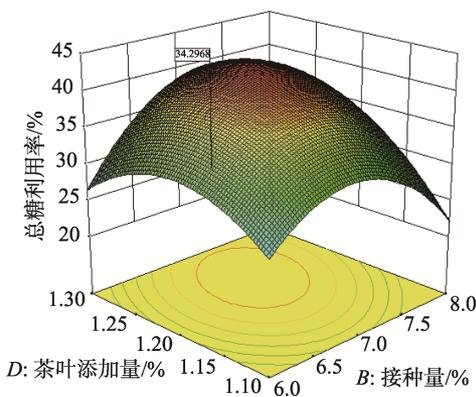


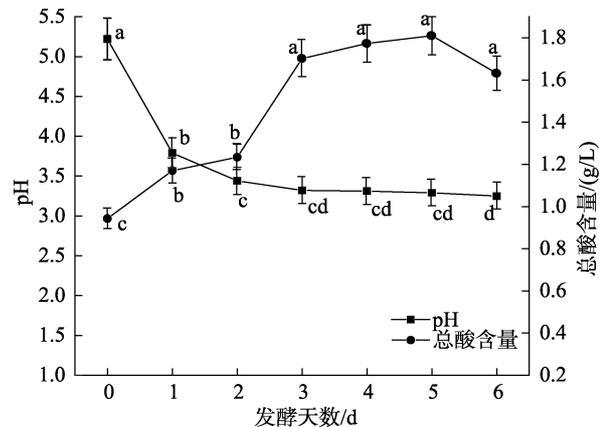
图6 茶叶添加量与接种量的交互作用对总糖利用率的影响

Fig.6 Interaction effects of tea additive amount and inoculum concentration on total sugar utilization

葡萄糖添加量 14.545%, 接种量 7.922%、茶叶添加量 1.196%, 在此条件下感官评分能够达到 91.96, 总糖利用率可以达到 43.00%。在验证试验中将工艺条件修正为葡萄糖添加量 14.5%, 接种量 8.0%、茶叶添加量 1.2%, 得出感官评分平均值为 92.25 ± 2.68 , 总糖利用率平均值为 $(45.54 \pm 6.21)\%$, 与预测值误差均小于 6%, 证明响应面分析法得到的‘红茶菌’饮料发酵工艺是真实可靠的。

2.6 发酵过程中总酸和 pH 的变化

在最佳条件下进行发酵, 总酸和 pH 变化见图 7, 总酸含量随着 pH 的下降而不断提高, 发酵第 1~3 d, pH 下降明显 ($P < 0.05$), 从 5.22 下降至 3.32, 随后便稳定在 3.2 左右, 这主要是因为发酵产生的二氧化碳溶于水产生的 HCO_3^- , 对溶液中有机酸起到了缓冲作用^[25]。总酸变化趋势与 pH 变化相反, 总酸含量一直增加到第 5 d, 其中第 2~5 d 有显著增幅 ($P < 0.05$), 从 1.234 g/L 增加到 1.810 g/L, 发酵结束时, 降至 1.632 g/L。‘红茶菌’中的有机酸主要是乙酸, 是醋酸菌利用酵母菌产生的乙醇发酵而来, 是造成 pH 降低、总酸含量增加的主要原因^[26]。

图7 ‘红茶菌’发酵过程中 pH 和总酸浓度的变化($n=3$)Fig.7 Changes in pH and titratable acidities during ‘Kombucha’ fermentation ($n=3$)

2.7 发酵过程中总酚含量的变化

总酚含量在发酵 1~4 d, 呈直线上升趋势, 含量从 117.06 mg/mL 显著增加至 229.8 mg/mL ($P < 0.05$), 在第 4~5 d 出现较大增幅 ($P < 0.05$), 增加 75 mg/mL, 达到了 332.7 mg/mL, 随后略有降低, 推测为‘红茶菌’中的微生物酶的作用以及环境的变化将不可溶的多酚类物质释放出来, 使得总酚含量的增加, 发酵后期在较低 pH 下, 微生物的氧化作用可能导致多酚出现氧化, 造成含量下降^[27]。

2.8 ‘红茶菌’的功能特性研究

2.8.1 抗氧化性

如图 8 所示, 优化前后‘红茶菌’发酵液对于 DPPH 自由基都有一定的清除能力。相比之下, 优化后的‘红茶菌’发酵液对于 DPPH 清除能力有较明显的上升。未经优化的‘红茶菌’在质量浓度 0.5~10 mg/mL 时, DPPH 清除率从 8.65% 提升 65.93%, 而发酵后, DPPH 清除率则从 10.97% 提高到了 81.32%。说明优化后的发酵条件能够明显提高‘红茶菌’的 DPPH 自由基清除能力。与此类似, JAYABALAN 等^[25]分别以红茶、绿茶以及茶叶废料为基底, 醋酸菌与酵母菌的共生菌种进行‘红茶菌’发酵, 发现 3 者发酵后总酚及总黄酮含量增加, 在发酵过程中对于 DPPH 自由基清除能力逐步提高, 这也从侧面表明酚类化合物质量浓度与 DPPH 自由基清除能力有关。综上, 优化过程能够提高‘红茶菌’发酵液对于 DPPH 自由基清除能力, 其中酚类化合物可能起到重要作用。

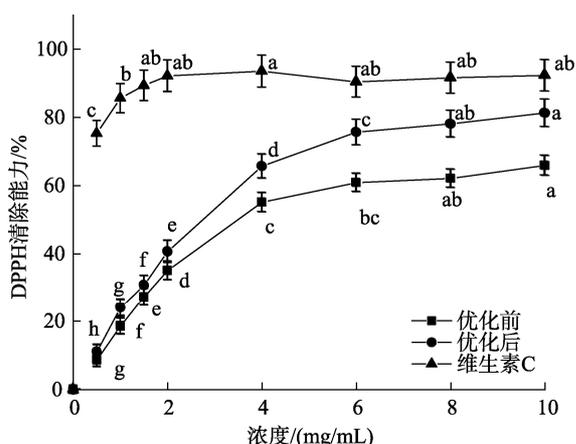


图 8 发酵前后 DPPH 自由基清除率(n=3)

Fig.8 DPPH scavenging abilities before and after fermentation (n=3)

如图 9 所示, 优化后‘红茶菌’对于 ABTS⁺的清除率较优化前有一定提高, 在质量浓度 0.5~4 mg/mL 时, 优化后的‘红茶菌’发酵液对 ABTS⁺的清除率从 33.21% 提高至 73.07%, 超过 4 mg/mL 时, 其清除率保持在 80% 左右, ‘红茶菌’发酵液为 10 mg/mL 时, ABTS⁺的清除率可达 82.92%, 与未优化的清除率相差 20% 左右, ‘红茶菌’发酵液与维生素 C 的清除率差距随着浓度增大逐渐减小, 从 52.25% 缩小到 12.14%。随着发酵时间的延长, ‘红茶菌’中多酚类化合

物的组成和浓度发生变化。这可能是由于微生物酶的作用, 导致复杂的多酚降解为更简单的分子, 优化过程能够进一步增加糖类转化为多酚类物质的效率, 这可能是造成优化后‘红茶菌’对 ABTS⁺清除率高于未优化‘红茶菌’的原因^[28]。

2.8.2 抑菌能力

抑菌试验结果见表 6, 未发酵的糖茶水在各个浓度孔中都有都变浑浊, 说明其对于金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及单增李斯特菌都没有抑制作用, 优化后‘红茶菌’发酵液对 3 种菌都有明显的抑制作用。金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和单增李斯特菌的最小抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)分别为 128、16 和 16 mg/mL。发酵后抑菌作用增加可能与发酵过程中产生的有机酸和抑菌蛋白等物质产生的抑菌作用有关^[29]。事实上, ‘红茶菌’不仅对一般食源性致病菌有抑制作用, 对霉菌也有一定的分解能力, BEN 等^[30]采用‘红茶菌’进行黄曲霉素的分解试验, 发现发酵 7 d 的‘红茶菌’能够分解 97% 的黄曲霉素。

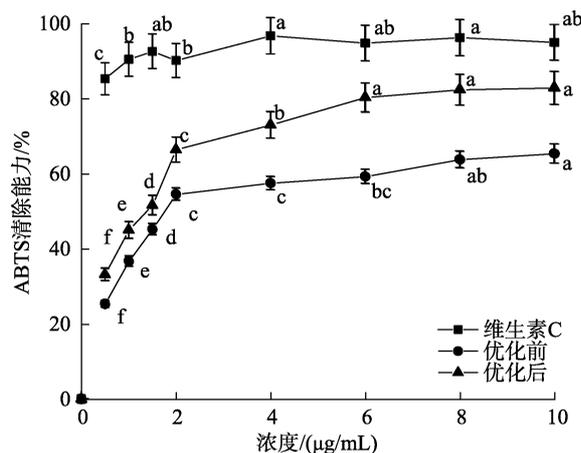


图 9 发酵前后 ABTS⁺自由基清除率(n=3)

Fig.9 ABTS⁺ scavenging abilities before and after fermentation (n=3)

表 6 ‘红茶菌’发酵液对 3 种致病菌的最小抑菌浓度
Table 6 Minimum inhibitory concentrations of ‘Kombucha’ to 3 kinds of pathogenic bacteria

‘红茶菌’发酵液浓度/(mg/mL)	菌种		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	单增李斯特菌
512	-	-	-
256	-	-	-
128	+	-	-
64	+	-	-
32	+	-	-
16	+	+	+
8	+	+	+
4	+	+	+
2	+	+	+
1			

注: -表示无菌生长, +表示有菌生长。

2.8.3 对 α -淀粉酶的抑制能力

天然无毒的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制剂是当前治疗糖尿病及其并发症的重要物质。‘红茶菌’优化前后对 α -淀粉酶的抑制率结果见图10,在0.5~6.0 mg/mL的区间内,‘红茶菌’发酵条件优化后对于 α -淀粉酶的抑制率有显著提升($P<0.05$),优化后抑制率从28.87%提高至77.67%,‘红茶菌’发酵液为10 mg/mL时,抑制率达到了87.53%。随着质量浓度的增大,‘红茶菌’发酵液对 α -淀粉酶的抑制率与阳性对照阿卡波糖的差距不断减小,在6 mg/mL抑制率差值达到最小为3.85%。相比来说,虽然未优化的‘红茶菌’发酵液的 α -淀粉酶抑制率一直在增长,但总体水平较低,最高抑制率为60.91%,综上,优化过程对于 α -淀粉酶抑制作用有较大提高。

3 结果与讨论

本研究以自行分离的3种酵母菌、1种醋酸菌为菌种,以糖水为基底进行纯菌混合发酵,当接种量8.0%、葡萄糖添加量14.5%、茶叶添加量1.2%时,感官评分能够达到 92.25 ± 2.68 ,总糖利用率为 $(45.54\pm 6.21)\%$,经发酵6 d后的‘红茶菌’总酚浓度达到了332.7 mg/mL,发酵液对于DPPH自由基以及ABTS⁺自由基的清除率分别达到了81.32%和82.92%,金黄色葡萄糖菌、大肠杆菌和单增李斯特菌的最小抑菌浓度分别为128、16、16 mg/mL,对于 α -淀粉酶的抑制作用达到了87.53%,抗氧化能力、抑菌能力以及对于 α -淀粉酶的抑制能力都有明显提高,故最终得到了具有酸甜口味、功能多样的发酵饮料。

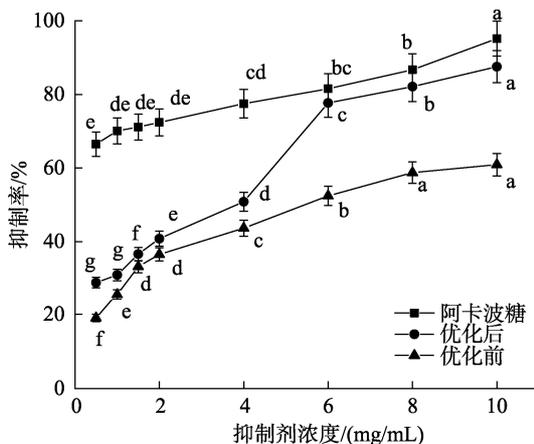


图10 发酵前后对 α -淀粉酶活性抑制比较

Fig.10 Comparison of activity inhibition effects from unfermented and fermented on α -amylase

本研究与先前研究相比,除了证明‘红茶菌’发酵液的抗氧化和抑菌性之外,对‘红茶菌’发酵液对于 α -淀粉酶的抑制能力也进行了研究,此方面在国内研究中涉及较少,发掘‘红茶菌’饮料能够作为天然无毒的 α -淀粉酶的潜力,

对糖尿病的治疗有广泛的应用前景。但是,本研究只以传统的红茶为主进行了探索,可以进一步探索不同发酵基底的发酵特性,如果汁、奶制品以及肉制品等。

参考文献

- ZUBAIDAH E, IFADAHR A, KALSUM U, *et al.* Anti-diabetes activity of Kombucha prepared from different snake fruit cultivars [J]. *Nutr Food Sci*, 2019, 49(2): 333–343.
- ELKHTAB E, EL-ALFY M, SHENANA M, *et al.* New potentially antihypertensive peptides liberated in milk during fermentation with selected lactic acid bacteria and Kombucha cultures [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(12): 9508–9520.
- LIANG Z, MENG JM, LI YL, *et al.* Stability of tea polyphenols solution with different pH at different temperatures[J]. *Int J Food Prop*, 2017, 20(1): 1–18.
- JONAS DR, LUC DV. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.08.007
- EMILJANOWICZ KE, MALINOWSKAP E. Kombucha from alternative raw materials-The review [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2019, 60(19): 3185–3194.
- 檀馨悦, 黎琪, 王晴, 等. 红茶菌中风味物质相关功能微生物的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(11): 327–335.
- TAN XY, LI Q, WANG Q, *et al.* Progresses in functional microorganisms associated with flavor compounds in Kombucha tea [J]. *Food Sci*, 2020, 41(11): 327–335.
- 李如意, 尹军峰, 邹纯. 红茶菌的国内外研究现状[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(12): 2291–2302.
- LI RY, YIN JF, ZHOU C. Research status of Kombucha in the world [J]. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2020, 32(12): 2291–2302.
- 赵平, 郭莹莹, 杨光, 等. 红茶菌研究现状[J]. *现代食品*, 2020, (21): 1–4.
- ZHAO P, GUO YY, YANG G, *et al.* Research status of Kombucha [J]. *Mod Food*, 2020, (21): 1–4.
- 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 J, YE XY, CAO ZL, *et al.* Isolation of microbes from Kombucha and Kombucha fermentation with pure culture combinations [J]. *J Chin Ins Food Sci Technol*, 2015, 15(2): 39–48.
- 陈雪娇, 曲冬梅, 单胜艳, 等. 不同发酵工艺对红茶菌有效成分的影响[J]. *饮料工业*, 2019, 22(1): 21–25.
- CHEN XJ, QU DM, SHAN SY, *et al.* Effects of different fermentation processes on effective components of Kombucha [J]. *Beverage Ind*, 2019, 22(1): 21–25.
- WATAWANA MI, JAYAWARDENA N, GUNAWARDHANA CB, *et al.* Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with ‘Kombucha’ ‘tea fungus’ [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2016, 51(2): 490–498
- 王洁琛, 陈志周, 王颖, 等. 红茶菌中醋酸菌和酵母菌的分离鉴定及其相互作用[J]. *中国酿造*, 2020, 39(3): 126–130.
- WANG JC, CHEN ZZ, WANG Y, *et al.* Isolation, identification and intercation of acetic and yeast in Kombucha [J]. *China Brew*, 2020, 39(3):

- 126–130.
- [13] 李志弟. 玫瑰酵素发酵工艺及生物活性研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2019.
LI ZD. Study on fermentation technology and biological activity of rose enzyme [D]. Shanghai: Shanghai Universities of Applied Sciences, 2019.
- [14] 王鸿志, 顾霞萍. 多菌群发酵红茶菌饮料的研制[J]. 饮料工业, 2019, 2: 38–40.
WANG HZ, GU XP. Study on Kombucha beverage by mixed bacteria fermentation [J]. Beverage Ind, 2019, 2: 38–40.
- [15] SENGUPTA S, JANA ML, SENGUPTA D, *et al.* A note on the estimation of microbial glycosidase activities by dinitrosalicylic acid reagent [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 6: 732–735.
- [16] 张恒, 郑俏然, 何靖柳, 等. 速溶藏茶制备工艺优化、功能性成分及抗氧化性分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 147–155.
ZHANG H, ZHENG QR, HE JL, *et al.* Optimization of preparation technology of instant Tibetan tea and analysis of its functional components and antioxidant activity [J]. Food Ind Sci Technol, 2021, 42(11): 147–155.
- [17] 丁艳如. 红茶菌发酵液的活性成分分析及活性研究[D]. 郑州: 河南大学, 2016.
DING YR. Study on active components quality of Kombucha fermentation liquid and its activity [D]. Zhengzhou: Henan University, 2016.
- [18] 唐思颖, 涂传海, 胡文秀, 等. 红茶菌发酵黄浆水的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 1–6.
TANG SX, TU CH, HU WX, *et al.* Antioxidant activity of fermented soy whey with Kombucha consortium [J]. Food Sci, 2019, 40(17): 1–6.
- [19] 董飞, 郭晓农. 藜麦种子总黄酮的提取及体外抑菌作用[J]. 甘肃农业科技, 2018, (4): 14–18.
DONG F, GUO XN. Extraction and antibacterial activity of total flavonoids from chenopodium quinoa seeds [J]. Gansu Agric Sci Technol, 2018, (4): 14–18.
- [20] 邵元元. 五倍子没食子酸高效制备及其对 α -淀粉酶的抑制作用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
SHAO YY. High performance preparation of gallic acid from gallinensis and its inhibitory function on α -amylase [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014.
- [21] 任二芳, 牛德宝, 郭海蓉, 等. 固定化共生发酵红茶菌饮料工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(12): 193–196, 210.
REN ERF, NIU DB, GUO HR, *et al.* Study on the preparation process of Kombucha beverage of symbiosis fermentation by immobilized cell technology [J]. Food Ind Sci Technol, 2015, 36(12): 193–196, 210.
- [22] 袁磊, 张国华, 何国庆, 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.
YUAN L, ZHAN GH, HE GQ, *et al.* Effects of fermentation conditions on quality and flavor of Kombucha [J]. Food Sci, 2017, 38(2): 92–97.
- [23] LINA K, VÉRONIQUE D, MOKTAR H, *et al.* Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion [J]. Food Res Int, 2012, 1: 226–232.
- [24] 张强. 高浓度酒精发酵技术研究进展[J]. 酿酒科技, 2019, (3): 102–106.
ZHANG Q. Research process in high-gravity ethanol fermentation technology [J]. Liquor-Making Sci Technol, 2019, (3): 102–106.
- [25] JAYABALAN R, SUBATHRADEVI P, MARIMUTHU S, *et al.* Changes in free-radical scavenging ability of Kombucha during fermentation [J]. Food Chem, 2007, 109(1): 227–234.
- [26] KATARZYNA NS, 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-J Food, 2017, 4: 601–607.
- [27] 乔宏萍, 燕平梅, 武晓英, 等. 红茶菌发酵条件的优化研究[J]. 生物技术世界, 2016, (1): 54–55.
QIAO HP, YAN PM, WU XY, *et al.* Study on optimization of fermentation conditions of Kombucha [J]. Biotechnol World, 2016, (1): 54–55.
- [28] RASU J, RADOMIR V, MALBASA SL, *et al.* A Review on Kombucha tea microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2014, 4: 538–550.
- [29] 王国增, 林娟, 叶秀云, 等. “茶菌”抑菌作用及抗氧化性[J]. 中国食品学报, 2015, 15(9): 173–179.
WANG GZ, LIN J, YE XY, *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of Kombucha [J]. J Chin Ins Food Sci Technol, 2015, 15(9): 173–179.
- [30] BEN T, BEN T, MANSOUR C, *et al.* Aflatoxin B-1 degradation by microorganisms isolated from Kombucha culture [J]. Toxicon, 2020, 179: 76–83.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



谭培科, 硕士研究生, 主要研究方向为食品微生物。
E-mail: 314052236@qq.com



陈志周, 博士, 教授, 主要研究方向为食品包装材料与技术。
E-mail: chenzhizhou2003@126.com