



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113508839 A

(43) 申请公布日 2021.10.19

(21) 申请号 202110790145.6

(22) 申请日 2021.07.13

(71) 申请人 长春医学高等专科学校

地址 130000 吉林省长春市吉林大路6177号

(72) 发明人 臧学丽 黄志远 王佳宇 路芳

李新 张滴 郑海箜 吕佳

(74) 专利代理机构 北京中政联科专利代理事务

所(普通合伙) 11489

代理人 何磊

(51) Int. Cl.

A23C 9/13 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

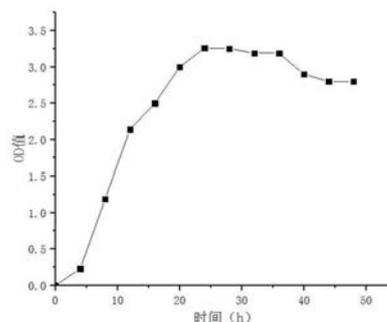
权利要求书2页 说明书12页 附图12页

(54) 发明名称

一种复方中药降脂发酵饮品及其最佳配比的研究方法

(57) 摘要

本发明公开了一种复方中药降脂发酵饮品及其最佳配比的研究方法,该复方中药降脂发酵饮品配方组分按重量计包括,中药提取液30-100份、葡萄糖3-5份和脱脂乳粉1-3份,该复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,包括确定原料配比的发酵最佳量和确定最佳发酵工艺。本发明中,对原料用量和发酵工艺进行优化,获得最佳的原料配比和发酵工艺,有助于保证饮品成品的口感和生产质量。



1. 一种复方中药降脂发酵饮品,其特征在于,其配方组分按重量计包括,中药提取液30-100份、葡萄糖3-5份和脱脂乳粉1-3份。

2. 根据权利要求2所述的一种复方中药降脂发酵饮品,其特征在于:中药提取液制备方法为,称量荷叶6-8g、山药20-30g、菊花6-10g、金银花9-11g、陈皮4-6g、决明子18-22g、茯苓23-27g和薏苡仁13-17g,加入适量水和其它辅助剂,熬制汁液,即得中药提取液。

3. 一种复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,其特征在于:具体包括以下步骤:

S1、确定原料配比的发酵最佳量;

S2、确定最佳发酵工艺。

4. 根据权利要求3所述的一种复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,其特征在于:所述步骤S1中,确定原料配比的发酵最佳量的具体步骤为:

S11、确定pH值、总酸量和感官检测项目:取待测中药饮品样品,用pH计直接测定pH值;准确量取2.0mL待测样品溶液,置于150mL锥形瓶中,向其中加入40-60mL蒸馏水,并滴加1-2滴酚酞指示剂,用0.2mol/LNaOH滴定液缓慢滴定待测样品溶液,观察溶液颜色变红后停止滴定,等待30s,溶液颜色不再发生改变,标志着滴定结束,记录消耗NaOH标准液体积,然后根据NaOH标准液体积推算出总酸量;按照预设的规则对样品的感官进行评定;

S12、提取液pH值调整:选择稀NaOH溶液,将提取液pH值调整至6.4-6.6;

S13、菌种活化:配置MRS液体培养基,将植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于液体培养基中,放置于37℃培养箱中静置培养24小时后取出,采用10倍梯度稀释法,选择适宜的稀释度,将菌液分别均匀涂布于制备好的MRS平板上,倒置于37℃培养箱中培养36h,观察菌种生长情况,选择平板上生长速度较快且菌落较大的菌株;

S14、确定最合适菌种复配比例:将中药提取液分为5组,第1组只接种植物乳杆菌,第2组只接种鼠李糖乳杆菌,第3-5组分别按照植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1、1:1.5、1.5:1的比例接种复配菌种,固定接种量均为4%,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,确定最合适的菌种复配比例;

S15、确定最合适菌种生长的碳源:选择葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖4种碳源,并以2%的添加量将其分别添加到中药提取液中,杀菌后冷却至40℃,接种4%的混合菌种,混合菌种中菌种比例为,植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,筛选出有利于菌种生长的碳源;

S16、确定最合适菌种生长的氮源:选择大豆分离蛋白、蛋白胨、脱脂乳粉3种氮源,并以1%的添加量将其分别添加到中药提取液中,杀菌后冷却至40℃,接种4%的混合菌种,混合菌种中菌种比例为,植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,筛选出有利于菌种生长的氮源;

S17、通过单因素试验获得最佳中药提取液浓度、最佳葡萄糖添加量和最佳脱脂乳粉添加量;

S18、在步骤S17的基础上,对原料配比进行三因素三水平的正交实验。

5. 根据权利要求4所述的一种复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,其特征在于:所述步骤S17中,确定最佳中药提取液浓度、最佳葡萄糖添加量和最佳脱脂乳粉添加量

的具体步骤为:

确定最佳中药提取液浓度:中药提取液浓度分别选用30%、40%、50%、60%和70%,葡萄糖添加量为8%,脱脂乳粉添加量为3%,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的中药液浓度;

确定最佳葡萄糖添加量:在中药提取液中加入3%的脱脂乳粉,并将葡萄糖分别以0%、4%、6%、8%和10%的添加量加入其中,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的葡萄糖添加量;

确定最佳脱脂乳粉添加量:在提取液中加入8%的葡萄糖,并将脱脂乳粉分别按0%、1%、2%、3%和4%的添加量加入其中,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的脱脂乳粉添加量。

6.根据权利要求5所述的一种复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,其特征在于:所述步骤S18中,三因素三水平的正交实验中,中药提取液浓度分别选用30%、40%和50%;葡萄糖的添加量分别选用6%、8%和10%;脱脂乳粉的添加量分别选用1%、2%和3%。

7.根据权利要求3所述的一种复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,其特征在于:所述步骤2中,确定最佳发酵工艺的具体步骤为:

S21、确定最佳乳酸菌接种量:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1的配比,调整总接种量为1%、2%、3%、4%、5%接种于提取液中,在37℃发酵48h,并测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳乳酸菌接种量;

S22、确定最佳发酵温度:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,接种量4%接种于提取液中,分别在32℃、34℃、36℃、38℃、40℃条件下发酵48h,测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳发酵温度;

S23、确定最佳发酵时间:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1的配比,总接种量为4%接种于提取液中,在37℃条件下调整发酵时间,每隔4h测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳发酵时间;

S24、优化工艺参数:依据单因素实验结果中心组合设计原理,确定接种量A、发酵温度B、发酵时间C三因素三水平共17个实验点,进行响应面实验与分析,优化饮料的发酵工艺参数。

## 一种复方中药降脂发酵饮品及其最佳配比的研究方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及发酵饮品技术领域,特别涉及一种复方中药降脂发酵饮品及其最佳配比的研究方法。

### 背景技术

[0002] 中药饮片是中药材经过按中医药理论、中药炮制方法,经过加工炮制后的,可直接用于中医临床的中药。中药材、中药饮片并没有绝对的界限,中药饮片包括了部分经产地加工的中药切片,原形药材饮片以及经过切制、炮炙的饮片。随着技术的发展,中药发酵饮品,作为中药饮品的一种,具有独特的风味,而得到较快速度的发展,且随着现有肥胖人数的增加,降脂发酵饮品越来越得到受众的喜爱。

[0003] 发酵作为饮品生产的重要步骤,对中药饮品的口感起到至关重要的作用,目前,一般是按照经验获得发酵过程中,乳酸菌的使用量进行判断,难以对中药提取液浓度、葡萄糖添加量和脱脂乳粉添加量进行优化,影响最后的口感。

### 发明内容

[0004] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案

[0005] 一方面,本发明提供了一种复方中药降脂发酵饮品,其配方组分按重量计包括,中药提取液30-100份、葡萄糖3-5份和脱脂乳粉1-3份。

[0006] 作为本发明的一种优选技术方案,中药提取液制备方法为,称量荷叶6-8g、山药20-30g、菊花6-10g、金银花9-11g、陈皮4-6g、决明子18-22g、茯苓23-27g和薏苡仁13-17g,加入适量水和其它辅助剂,熬制汁液,即得中药提取液。

[0007] 第二方面,本发明另提供一种复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,具体包括以下步骤:S1、确定原料配比的发酵最佳量;S2、确定最佳发酵工艺。

[0008] 作为本发明的一种优选技术方案,所述步骤S1中,确定原料配比的发酵最佳量的具体步骤为:S11、确定pH值、总酸量和感官检测项目:取待测中药饮品样品,用pH计直接测定pH值;准确量取2.0mL待测样品溶液,置于150mL锥形瓶中,向其中加入40-60mL蒸馏水,并滴加1-2滴酚酞指示剂,用0.2mol/LNaOH滴定液缓慢滴定待测样品溶液,观察溶液颜色变红后停止滴定,等待30s,溶液颜色不再发生改变,标志着滴定结束,记录消耗NaOH标准液体积,然后根据NaOH标准液体积推算出总酸量;按照预设的规则对样品的感官进行评定;S12、提取液pH值调整:选择稀NaOH溶液,将提取液pH值调整至6.4-6.6;S13、菌种活化:配置MRS液体培养基,将植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于液体培养基中,放置于37℃培养箱中静置培养24小时后取出,采用10倍梯度稀释法,选择适宜的稀释度,将菌液分别均匀涂布于制备好的MRS平板上,倒置于37℃培养箱中培养36h,观察菌种生长情况,选择平板上生长速度较快且菌落较大的菌株;S14、确定最合适菌种复配比例:将中药提取液分为5组,第1组只接种植物乳杆菌,第2组只接种鼠李糖乳杆菌,第3-5组分别按照植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1、1:1.5、1.5:1的比例接种复配菌种,固定接种量均为4%,放置于37℃条件下发酵

48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,确定最合适的菌种复配比例;S15、确定最合适菌种生长的碳源:选择葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖4种碳源,并以2%的添加量将其分别添加到中药提取液中,杀菌后冷却至40℃,接种4%的混合菌种,混合菌种中菌种比例为,植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,筛选出有利于菌种生长的碳源;S16、确定最合适菌种生长的氮源:选择大豆分离蛋白、蛋白胨、脱脂乳粉3种氮源,并以1%的添加量将其分别添加到中药提取液中,杀菌后冷却至40℃,接种4%的混合菌种,混合菌种中菌种比例为,植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,筛选出有利于菌种生长的氮源;S17、通过单因素试验获得最佳中药提取液浓度、最佳葡萄糖添加量和最佳脱脂乳粉添加量;S18、在步骤S17的基础上,对原料配比进行三因素三水平的正交实验。

[0009] 作为本发明的一种优选技术方案,所述步骤S17中,确定最佳中药提取液浓度、最佳葡萄糖添加量和最佳脱脂乳粉添加量的具体步骤为:确定最佳中药提取液浓度:中药提取液浓度分别选用30%、40%、50%、60%和70%,葡萄糖添加量为8%,脱脂乳粉添加量为3%,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的中药液浓度;确定最佳葡萄糖添加量:在中药提取液中加入3%的脱脂乳粉,并将葡萄糖分别以0%、4%、6%、8%和10%的添加量加入其中,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的葡萄糖添加量;确定最佳脱脂乳粉添加量:在提取液中加入8%的葡萄糖,并将脱脂乳粉分别按0%、1%、2%、3%和4%的添加量加入其中,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的脱脂乳粉添加量。

[0010] 作为本发明的一种优选技术方案,所述步骤S18中,三因素三水平的正交实验中,中药提取液浓度分别选用30%、40%和50%;葡萄糖的添加量分别选用6%、8%和10%;脱脂乳粉的添加量分别选用1%、2%和3%。

[0011] 作为本发明的一种优选技术方案,所述步骤2中,确定最佳发酵工艺的具体步骤为:S21、确定最佳乳酸菌接种量:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1的配比,调整总接种量为1%、2%、3%、4%、5%接种于提取液中,在37℃发酵48h,并测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳乳酸菌接种量;S22、确定最佳发酵温度:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,接种量4%接种于提取液中,分别在32℃、34℃、36℃、38℃、40℃条件下发酵48h,测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳发酵温度;S23、确定最佳发酵时间:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1的配比,总接种量为4%接种于提取液中,在37℃条件下调整发酵时间,每隔4h测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳发酵时间;S24、优化工艺参数:依据单因素实验结果中心组合设计原理,确定接种量A、发酵温度B、发酵时间C三因素三水平共17个实验点,进行响应面实验与分析,优化饮料的发酵工艺参数。

[0012] (三)有益效果

[0013] 1.本发明提供的复方中药降脂发酵饮品,配方组分按重量计包括,中药提取液30-100份、葡萄糖3-5份和脱脂乳粉1-3份,且中药提取液制备方法为,称量荷叶6-8g、山药20-30g、菊花6-10g、金银花9-11g、陈皮4-6g、决明子18-22g、茯苓23-27g和薏苡仁13-17g,加入适量水和其它辅助剂,熬制汁液,即得中药提取液,具有良好的口感和减肥效果;

[0014] 2. 本发明提供的复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,通过确定原料的配比,确定了饮料的最佳发酵菌种为植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,确定最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为脱脂乳粉;

[0015] 3. 本发明提供的复方中药降脂发酵饮品的最佳配比的研究方法,确定最佳发酵工艺,乳酸菌接种量4.5%、发酵温度37℃、发酵时间50h,通过确定最佳配比和最佳工艺,保证饮品的口感。

### 附图说明

- [0016] 图1是本发明的植物乳杆菌生长曲线示意图;
- [0017] 图2是本发明的鼠李糖乳杆菌生长曲线示意图;
- [0018] 图3是本发明的菌种复配比例对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0019] 图4是本发明的菌种复配比例对发酵饮料pH值的影响示意图;
- [0020] 图5是本发明的碳源种类对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0021] 图6是本发明的碳源种类对发酵饮料pH值的影响示意图;
- [0022] 图7是本发明的氮源种类对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0023] 图8是本发明的氮源种类对发酵饮料pH值的影响示意图;
- [0024] 图9是本发明的中药液浓度对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0025] 图10是本发明的中药液浓度对感官评价分数的影响示意图;
- [0026] 图11是本发明的葡萄糖添加量对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0027] 图12是本发明的葡萄糖添加量对感官评价分数的影响示意图;
- [0028] 图13是本发明的脱脂乳粉添加量对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0029] 图14是本发明的脱脂乳粉添加量对感官评价分数的影响示意图;
- [0030] 图15是本发明的接种量对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0031] 图16是本发明的接种量对发酵饮料pH值的影响示意图;
- [0032] 图17是本发明的发酵温度对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0033] 图18是本发明的发酵温度对发酵饮料pH值的影响示意图;
- [0034] 图19是本发明的发酵时间对发酵饮料乳酸含量的影响示意图;
- [0035] 图20是本发明的发酵时间对发酵饮料pH值的影响示意图;
- [0036] 图21是本发明的发酵温度和接种量对乳酸含量影响的等高线图;
- [0037] 图22是本发明的发酵温度和接种量对乳酸含量影响的响应面图;
- [0038] 图23是本发明的接种量和发酵时间对乳酸含量影响的等高线图;
- [0039] 图24是本发明的接种量和发酵时间对乳酸含量影响的应面图。

### 具体实施方式

[0040] 为使本发明实施方式的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施方式中的附图,对本发明实施方式中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施方式是本发明一部分实施方式,而不是全部的实施方式。基于本发明中的实施方式,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施方式,都属于本发明保护的范围。

[0041] 一种复方中药降脂发酵饮品,其配方组分按重量计包括,中药提取液30-100份、葡萄糖3-5份和脱脂乳粉1-3份。

[0042] 在本实施例中,中药提取液制备方法为,称量荷叶6-8g、山药20-30g、菊花6-10g、金银花9-11g、陈皮4-6g、决明子18-22g、茯苓23-27g和薏苡仁13-17g,加入适量水和其它辅助剂,熬制汁液,即得中药提取液。

[0043] 如图1至图24所示,第二方面,本发明另提供一种复方中药降脂发酵饮品最佳配比的研究方法,具体包括以下步骤:

[0044] S1、确定原料配比的发酵最佳量;S2、确定最佳发酵工艺。

[0045] 在本实施例中,所述步骤S1中,确定原料配比的发酵最佳量的具体步骤为:

[0046] S11、确定pH值、总酸量和感官检测项目:取待测中药饮品样品,用pH计直接测定pH值;准确量取2.0mL待测样品溶液,置于150mL锥形瓶中,向其中加入40-60mL蒸馏水,并滴加1-2滴酚酞指示剂,用0.2mol/LNaOH滴定液缓慢滴定待测样品溶液,观察溶液颜色变红后停止滴定,等待30s,溶液颜色不再发生改变,标志着滴定结束,记录消耗NaOH标准液体积,然后根据NaOH标准液体积推算出总酸量;按照预设的规则对样品的感官进行评定;需要说明的是,感官评价的内容包括色泽、滋味、气味(30分)、组织形态作为评价指标,具体内容见下表1:

[0047]

评定项目	评分标准	感官评分
色泽	色泽呈乳白色且略带黄色	15-20
	色泽或浅或深,不均匀一致	10-14
	其他特殊颜色	0-9
滋味	口感柔软细腻,酸甜适中	20-30
	口感略酸或略甜	10-19
	过酸过甜或苦涩味较重	0-9
气味	中药香气和发酵气味浓郁	20-30
	香味略清淡,无异味	10-19
	无香味且具有特殊异味	0-9
组织形态	质地均匀,无气泡和沉淀,流动性好	15-20
	质地比较均匀,有少量气泡或沉淀,较粘稠	10-14
	分层现象较明显	0-9

[0048] 表1感官评价标准

[0049] S12、提取液pH值调整:选择稀NaOH溶液,将提取液pH值调整至6.4-6.6;

[0050] S13、菌种活化:配置MRS液体培养基,将植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌分别接种于液体培养基中,放置于37℃培养箱中静置培养24小时后取出,采用10倍梯度稀释法,选择适宜的稀释度,将菌液分别均匀涂布于制备好的MRS平板上,倒置于37℃培养箱中培养36h,观察菌种生长情况,选择平板上生长速度较快且菌落较大的菌株;

[0051] 需要说明的是,在具体试验时,如图1所示,0h-4h为该株植物乳杆菌的延缓期,4h

开始进入对数生长期,到24h开始趋于稳定,稳定期在36h结束,随后进入衰亡期,对数生长期的菌种繁殖速度最快,进入稳定期后,培养基内菌体总数最多,所以选取处于对数生长期的菌种进行接种,因此植物乳杆菌的种子液培养时间应该控制在4h-24h。如图2所示,0h-4h为鼠李糖乳杆菌生长的延缓期,4h开始进入对数生长期,直到20h开始趋于稳定,稳定期在32h结束,随后进入衰亡期,采用对数期的菌种进行接种,因此鼠李糖乳杆菌的种子液培养时间应该控制在4h-20h。因为两株菌对数生长期的开始和结束的时间不完全相同,所以,若两株菌同时进行种子液的培养,考虑到实验的可行性,可以将种子液培养时间确定为8h。

[0052] S14、确定最合适菌种复配比例:将中药提取液分为5组,第1组只接种植物乳杆菌,第2组只接种鼠李糖乳杆菌,第3-5组分别按照植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1、1:1.5、1.5:1的比例接种复配菌种,固定接种量均为4%,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,确定最合适的菌种复配比例;

[0053] 需要说明的是,在具体实验时,如图3所示,不论是单一菌种发酵还是两株菌混合发酵,发酵液中的乳酸含量在48h内都呈现出不同程度的上升趋势,鼠李糖乳杆菌单独发酵产乳酸量高于植物乳杆菌单独发酵产乳酸量,由于乳酸含量可以衡量乳酸菌的产酸能力,所以鼠李糖乳杆菌的产乳酸能力明显优于植物乳杆菌。两株菌混合发酵时,植物乳杆菌与鼠李糖乳杆菌的复配比例为1:1、1:1.5、1.5:1时产乳酸量均明显高于植物乳杆菌发酵产酸量,且稍高于鼠李糖乳杆菌发酵产酸量,比例为1:1产乳酸量最多,其次是比例为1.5:1时,而1:1.5时产乳酸量最少。故最佳菌种配比比例为1:1,该组合菌种在发酵48h乳酸含量变化了5.67g/kg,只有植物乳杆菌、只有鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌与鼠李糖乳杆菌的复配比例为1:1.5、植物乳杆菌与鼠李糖乳杆菌的复配比例为1.5:1的组发酵48h乳酸含量分别变化了1.495g/kg、4.67g/kg、5.505g/kg、5.395g/kg。

[0054] 如图4所示,pH值随着发酵时间的延长不断下降,这主要是因为产生的乳酸不断累积造成的,但不同配比比例的菌种在48h内pH值呈现不同程度的下降趋势,发酵初期,菌种较活跃,产生大量乳酸,使得发酵液pH值迅速降低,随着pH值的不断下降,乳酸菌生长开始受到酸性环境的抑制作用,因此发酵24h后,pH值下降缓慢。发酵48h后,只有植物乳杆菌、只有鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌与鼠李糖乳杆菌的复配比例为1:1.5、植物乳杆菌与鼠李糖乳杆菌的复配比例为1.5:1的组pH值分别降至4.75、3.88、3.78、3.82、3.8,即1:1的pH值降低最快,植物乳杆菌pH值下降最慢,鼠李糖乳杆菌发酵后口感较刺激,而植物乳杆菌发酵口感细腻柔和并具有明显的芳香气味产生,所以两种乳酸菌复合发酵产品品质更优。

[0055] S15、确定最合适菌种生长的碳源:选择葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖4种碳源,并以2%的添加量将其分别添加到中药提取液中,杀菌后冷却至40℃,接种4%的混合菌种,混合菌种中菌种比例为,植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,筛选出有利于菌种生长的碳源;需要说明的是,在具体试验时,得出碳源种类对发酵饮料乳酸含量的影响和碳源种类对发酵饮料pH值的影响,具体内容如下:乳酸菌可以利用糖类发酵产酸,但利用糖类的能力却有所不同。如图5可知,随着发酵时间的延长,乳酸菌利用四种糖类发酵最终产酸量不同,对糖的使用消耗能力由强到弱顺序依次为葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖。葡萄糖和果糖利用效果好于蔗糖和乳糖,主要是因为葡萄糖和果糖都为结构最简单的单糖,可以直接被利

用;而蔗糖和乳糖都归属为两个分子单糖构成的二糖,而二糖需要先水解为单糖才会被利用,不能直接被乳酸菌利用。发酵48h后,葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖实验组的乳酸含量分别为6.275g/kg、5.54g/kg、2.485g/kg、1.885g/kg,空白组为1.65g/kg。由此可知,发酵过程中,葡萄糖利用效果最好,产乳酸量最高,所以,葡萄糖为适宜的碳源。如图6所示,乳酸菌利用糖类发酵产乳酸,随着乳酸含量增加,饮料的pH值不断降低,发酵48h后,葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖实验组的pH值分别下降了3.20、2.92、2.39、2.03,空白组下降了1.73。葡萄糖作为碳源时产酸量最多,pH变化最大。所以,选择葡萄糖作为碳源。

[0056] S16、确定最合适菌种生长的氮源:选择大豆分离蛋白、蛋白胨、脱脂乳粉3种氮源,并以1%的添加量将其分别添加到中药提取液中,杀菌后冷却至40℃,接种4%的混合菌种,混合菌种中菌种比例为,植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,放置于37℃条件下发酵48h,每间隔4h测定发酵液的pH值和其中的乳酸含量,根据这两项指标的变化情况,筛选出有利于菌种生长的氮源;需要说明的是,在具体实验时,得出氮源种类对发酵饮料乳酸含量的影响、氮源种类对发酵饮料pH值的影响,具体内容如下:

[0057] 乳酸菌无法自身合成蛋白质,但其对营养物质要求又较严格,所以为了满足自身生长需要,乳酸菌需要水解环境中的蛋白质为寡肽供自身利用。在饮料中添加蛋白质不仅可以增加香气改善口味,还可以促进乳酸菌生长,提高饮料的品质。如图7所示,乳酸菌对氮源利用能力的排序由强到弱依次为蛋白胨、脱脂乳粉、大豆分离蛋白,发酵48h,产酸变化量依次为7.290g/kg、5.727g/kg、1.59g/kg,空白组为0.92g/kg。乳酸菌利用蛋白胨产酸量最多,但是发酵饮料的气味较能差,且口味也较差,所以氮源的选择排除蛋白胨。乳酸菌对脱脂乳粉的利用效果好于大豆分离蛋白,这可能与蛋白质的分子大小有关,牛乳蛋白质分子大小为80-120纳米,而大豆蛋白质分子大小为5000-8000纳米,所以脱脂乳粉更易于被利用。且以脱脂乳粉作为氮源,发酵后的饮料具有一定香气。所以,脱脂乳粉为适宜的氮源。如图8所示,在加入初始加入三种氮源时,饮料的pH由些许升高,这可能是由于蛋白质的缓冲作用,发酵48h后,蛋白胨、脱脂乳粉、大豆分离蛋白实验组的pH分别降低了2.48、3.27、3.13,空白组降低了3.02。考虑到食品营养及品质,最终,选用脱脂乳粉作为氮源。

[0058] S17、通过单因素试验获得最佳中药提取液浓度、最佳葡萄糖添加量和最佳脱脂乳粉添加量;

[0059] S18、在步骤S17的基础上,对原料配比进行三因素三水平的正交实验。在本实施例中,所述步骤S17中,确定最佳中药提取液浓度、最佳葡萄糖添加量和最佳脱脂乳粉添加量的具体步骤为:确定最佳中药提取液浓度:中药提取液浓度分别选用30%、40%、50%、60%和70%,葡萄糖添加量为8%,脱脂乳粉添加量为3%,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的中药液浓度;需要说明的是,在具体实验时,如图9所示,30%-70%浓度的中药液实验组,发酵48h后,乳酸含量分别变化了8.35g/kg、8.52g/kg、8.56g/kg、8.41g/kg、8.33g/kg。中药液浓度对乳酸含量影响较小,可能是因为中药液中可供乳酸菌利用的营养物质较少,饮料中乳酸的产生主要是因为乳酸菌利用了碳源和氮源提供的糖类以及蛋白质。当中药液浓度达到40%时,乳酸含量几乎不再变化,且中药液浓度继续升高,乳酸含量稍有降低,可能是由于中药液中有有机酸等抑制乳酸菌生长物质增多,环境不利于乳酸菌生长,从而乳酸含量降低。

[0060] 中药提取液与水混合的比例不同,发酵后饮料的气味、口味、色泽也会有所不同。

由图10可知,随着中药液浓度的增加,饮料的感官评分先升高后降低,30%的中药液浓度发酵而成的饮料口感较稀、色泽较浅且缺少中药和发酵香气,60%、70%的中药液浓度发酵而成的饮料口感较酸涩且发酵香气较淡,生产成本也相应提高。因此,中药液浓度较优水平为30%-50%。

[0061] 确定最佳葡萄糖添加量:在中药提取液中加入3%的脱脂乳粉,并将葡萄糖分别以0%、4%、6%、8%和10%的添加量加入其中,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的葡萄糖添加量;需要说明的是,在具体实验时,由图11可知,乳酸含量随着葡萄糖添加量的增加而增加,发酵48h后,4%-10%实验组的乳酸含量分别为7.4g/kg、8.0g/kg、8.7g/kg、8.9g/kg。由此可见低浓度的葡萄糖就可以促进乳酸菌的生长,当添加10%葡萄糖时,乳酸含量较葡萄糖添加量为8%的组别乳酸含量仅增加了0.22g/kg,可能是因为较高浓度的葡萄糖,会改变乳酸菌细胞的渗透压。由图12可以看出,葡萄糖添加量对饮料感官评价影响较大,葡萄糖可以改善中药液苦涩的口感,也可以促进乳酸菌产乳酸,只有饮料的糖酸比协调时,饮料口感才最佳,当葡萄糖添加量小于8%时,发酵饮料口感偏酸;当葡萄糖添加量为8%时,发酵饮料酸甜适中;当继续增加葡萄糖添加量,发酵饮料中葡萄糖利用不完全,大量葡萄糖堆积会造成口感偏甜。所以,葡萄糖添加量的较优水平为6%-10%。

[0062] 确定最佳脱脂乳粉添加量:在提取液中加入8%的葡萄糖,并将脱脂乳粉分别按0%、1%、2%、3%和4%的添加量加入其中,接种4%的复配菌种,37℃发酵48h,根据乳酸含量和感官评分确定最佳的脱脂乳粉添加量。需要说明的是,在具体试验时,如图13,脱脂乳粉的添加量对乳酸含量的影响较大,发酵48h后,添加1%-4%脱脂乳粉实验组的乳酸含量分别为6.3g/kg、7.2g/kg、8.51g/kg、8.782g/kg。由此可见,乳酸含量随着脱脂乳粉添加量的增加而增加。由图14可知,当脱脂乳粉添加量为1%时,可供乳酸菌利用的蛋白质较少,发酵不完全,产乳酸量较少,发酵饮料的酸味不足;当脱脂乳粉添加量为2%或3%时,发酵饮料甜酸比协调,口感适中;当脱脂乳粉添加量为4%时,产酸量较多,发酵饮料口感偏酸,且失去光泽,品质变差。所以,脱脂乳粉添加量的较优水平为1%-3%。

[0063] 在本实施例中,所述步骤S18中,三因素三水平的正交实验中,中药提取液浓度分别选用30%、40%和50%;葡萄糖的添加量分别选用6%、8%和10%;脱脂乳粉的添加量分别选用1%、2%和3%。需要说明的是,对原料配比进行三因素三水平的正交实验,由表2可以看出,在乳酸含量方面,各因素对乳酸含量的影响大小排序为:C(脱脂乳粉添加量)>B(葡萄糖添加量)>A(中药液浓度),最优组合为A3B3C3;在感官评分方面,各因素对感官评分的影响大小排序为:A(中药液浓度)>B(葡萄糖添加量)>C(脱脂乳粉添加量),最优组合为A2B2C3。为了在保证口味的同时节约成本,综合考虑,选择A2B2C3组合方案。因此选择40%的中药液浓度、8%的葡萄糖添加量、3%的脱脂乳粉添加量,此时发酵饮料的乳酸含量为8.62g/kg,感官评分为96分。

[0064]

试验号	因素			指标	
	A 中药液浓度 (%)	B 葡萄糖添加量 (%)	C 脱脂乳粉添加量 (%)	R <sub>1</sub> 乳酸含量 (g/kg)	R <sub>2</sub> 感官评分 (分)
1	1	1	1	5.56	72
2	1	2	2	7.42	82
3	1	3	3	8.72	74
4	2	1	2	6.75	88
5	2	2	3	8.52	96
6	2	3	1	6.67	80
7	3	1	3	8.2	78
8	3	2	1	6.4	79
9	3	3	2	7.8	77
乳酸含量 (R <sub>1</sub> )					
K1	7.23	6.83	6.21		
K2	7.31	7.45	7.32		
K3	7.46	7.73	8.48		
R	0.23	0.9	2.27		
主次因素					
最优组合					
感官评分 (R <sub>2</sub> )					
K1	76	79.33	77		
K2	88	85.67	82.33		
K3	78	77	82.67		
主次因素	A>B>C				
最优组合	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>				

[0065] 表2原料配比正交实验结果表

[0066] 由表3可知,葡萄糖添加量(B)对乳酸含量具有显著影响( $P<0.05$ ),脱脂乳粉添加量(C)对乳酸含量具有极显著影响( $P<0.01$ ),中药液浓度和葡萄糖添加量对感官评分均具有显著性影响( $P<0.05$ )。

[0067]

因变量: 乳酸含量 (R <sub>1</sub> )					
源	III类平方和	自由度	均方	F	P (显著性)
修正模型	9.065 <sup>a</sup>	6	1.511	78.918	.013*
截距	484.587	1	484.587	25312.139	.000**
A	.084	2	.042	2.203	.312--

	B	1.250	2	.0625	32.658	.030*
	C	7.730	2	3.865	201.894	.005**
	误差	.038	2	.019		
	总计	493.690	9			
	R <sup>2</sup> =0.996					
因变量: 感官评分 (R <sub>2</sub> )						
	源	III类平方和	自由度	均方	F	P (显著性)
[0068]	修正模型	429.333 <sup>a</sup>	6	71.556	30.667	.032*
	截距	58564.000	1	58564.000	25098.857	.000**
	A	248.000	2	124.000	53.143	.018*
	B	120.667	2	60.333	25.857	.037*
	C	60.667	2	30.333	13.000	.071--
	误差	4.667	2	2.333		
	总计	58998.000	9			
	R <sup>2</sup> =0.989					

[0069] 表3方差分析结果表

[0070] 表3中,\*\*为差异性极显著 (P<0.01);\*为差异性显著 (P<0.05);--为差异性不显著 (P>0.05)。

[0071] 综上,通过单因素实验和正交实验分析,对饮料的原料配比进行了优化,最终确定最佳原料配比为:中药液浓度40%、葡萄糖添加量8%、脱脂乳粉添加量3%。

[0072] 在本实施例中,所述步骤2中,确定最佳发酵工艺的具体步骤为:

[0073] S21、确定最佳乳酸菌接种量:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1的配比,调整总接种量为1%、2%、3%、4%、5%接种于提取液中,在37℃发酵48h,并测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳乳酸菌接种量;需要说明的是,在具体实验时,如图15和图16可知,发酵48h后,1%-5%接种量实验组的乳酸含量分别为8.485g/kg、8.775g/kg、9.1g/kg、8.97g/kg;pH值为3.62、3.6、3.58、3.55、3.57。接种量4%的实验组乳酸含量较接种量3%的实验组乳酸含量增加了0.325g/kg,而接种量5%的实验组乳酸含量较接种量4%的实验组乳酸含量减少了0.12g/kg。因此,选定3%-5%的接种量作为响应面实验的水平。

[0074] S22、确定最佳发酵温度:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1,接种量4%接种于提取液中,分别在32℃、34℃、36℃、38℃、40℃条件下发酵48h,测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳发酵温度;需要说明的是,在本实验中,在饮料整个发酵过程中,温度对乳酸菌的生长代谢起到很重要的作用,并且影响发酵饮料的品质。由图17和图18可知,发酵48h后,32℃-40℃发酵温度实验组的乳酸含量分别为8.15g/kg、8.33g/kg、9.02g/kg、8.98g/kg、8.65g/kg;pH值为3.66、3.58、3.52、3.53、3.56。由此可看出,发酵温度过低,菌种起始活化时间较长且后续繁殖速度较慢,使得产算量较低;发酵温度过高,起始菌种生长迅速,pH值随着乳酸的产生而迅速下降,但较快进入酸性环境会抑制乳酸菌的活性,使其很快进入衰

亡期。温度过低过高都不利于乳酸菌生长,影响发酵饮料的品质。因此,选定35℃-39℃的发酵温度作为响应面实验的水平。

[0075] S23、确定最佳发酵时间:按植物乳杆菌:鼠李糖乳杆菌=1:1的配比,总接种量为4%接种于提取液中,在37℃条件下调整发酵时间,每隔4h测定发酵液的pH值、乳酸含量,确定最佳发酵时间;

[0076] 需要说明的是,在试验过程中,发酵时间对发酵饮料乳酸含量和pH值的影响如图19和图20,乳酸含量随着发酵时间的延长而增加,pH随着发酵时间的延长而降低,整个过程,乳酸含量增加和pH值降低的速率都是先快后慢,发酵时间达到48h,乳酸含量和pH值的变化曲线趋于平缓,发酵48h时的乳酸含量较44h时增加了0.21,pH值降低了0.04;52h时乳酸含量较48h时仅增加0.08,pH值仅降低了0.01,基本再无变化。因此,选定44h-48h的发酵时间作为响应面实验的水平。

[0077] S24、优化工艺参数:依据单因素实验结果中心组合设计原理,确定接种量A、发酵温度B、发酵时间C三因素三水平共17个实验点,进行响应面实验与分析,优化饮料的发酵工艺参数。需要说明的是,在试验过程中,依据单因素实验结果和Box-Behnken的中心组合设计原理,确定因素水平表,并进行响应面实验,结果见表4和表5所示:

水平	因素		
	A 接种量 (%)	B 发酵温度 (°C)	C 发酵时间 (h)
-1	3	35	44
0	4	37	48
1	5	39	52

[0079] 表4响应面实验因素水平表

实验号	A 接种量 (%)	B 发酵温度 (°C)	C 发酵时间 (h)	R <sub>1</sub> 乳酸含量 (mg/g)
1	0	-1	-1	8.19
2	-1	0	1	8.45
3	0	0	0	9.12
4	1	1	0	8.85
5	0	1	1	8.62
6	-1	1	0	8.15
7	-1	-1	0	8.17
8	0	-1	1	8.35
9	0	0	0	9.00
10	0	0	0	9.07
11	0	0	0	9.08
12	1	0	-1	8.4
13	0	1	-1	8.55
14	-1	0	-1	8.6
15	1	0	1	8.96
16	1	-1	0	8.25
17	0	0	0	9.03

[0082] 表5响应面实验结果表

[0083] 将表5中所得到的数据利用Design-Expert8.0.6软件进行回归拟合,得到了乳酸含量(R1)对接种量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)的多元二次方程为:

$$[0084] \quad Y=9.06+0.14A+0.15B+0.08C+0.15AB+0.18AC-0.023BC-0.27A^2-0.44B^2-0.19C^2$$

[0085] 观察表6可以看出,交互项AB和AC的交互作用对乳酸含量有极显著影响( $P < 0.01$ );交互项BC的交互作用对乳酸含量影响不显著( $P > 0.05$ ),表明所选因素与响应值间非简单线性关系。回归模型的 $P < 0.0001$ ,说明回归模型具有高度的显著性;同时失拟误差项的 $P = 0.0780 > 0.05$ ,说明该模拟具有较高的可靠性。回归模型决定系数 $R^2 = 0.9958$ ,校正决定系数 $Radj^2 = 0.9831$ ,说明了响应值(R1乳酸含量)的变化有98.31%来源于该模型,表明该模型拟合度较好。

[0086] 观察表6中F值项可以看出,A、B、C三个因素对乳酸含量的影响大小顺序为:发酵温度(B) > 接种量(A) > 发酵时间(C)。

[0087]

方差来源	平方和	自由	均方	F值	P值	显著性
		度				
模型	2.00	9	0.22	38.34	<0.0001	**
A	0.15	1	0.15	25.62	0.0015	**
B	0.18	1	0.18	31.57	0.0008	**
C	0.051	1	0.051	8.83	0.0207	*
AB	0.096	1	0.096	16.58	0.0047	**
AC	0.13	1	0.13	21.74	0.0023	**
BC	2.025E-003	1	2.025E-003	0.35	0.5731	--
A <sup>2</sup>	0.30	1	0.30	51.01	0.0002	**
B <sup>2</sup>	0.82	1	0.82	140.63	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.16	1	0.16	26.92	0.0013	**
残差	0.041	7	5.796E-003			
失拟项	0.032	3	0.011	4.96	0.0780	
净误差	8.600E-003	4	2.150E-003			
总离差	2.04	16				
R <sup>2</sup> = 0.9958	Radj <sup>2</sup> = 0.9831					

[0088]

[0089] 表6回归方程方差分析表

[0090] 根据表6的结果,利用Design-Expert8.0.6软件绘制等高线图和响应面3D图,可以观察到各因素对乳酸含量的影响,见图21-图24。

[0091] 观察图21-图24可发现,发酵温度(B)与接种量(A)之间和接种量(A)与发酵时间(C)之间的等高线图均呈椭圆形,说明两组交互作用均显著,其中,发酵温度的响应面图变化曲面较接种量的变化曲面陡峭,说明乳酸含量对于发酵温度的改变更敏感;接种量的响

应面图变化曲面较发酵时间的变化曲面陡峭,说明乳酸含量对于接种量的改变更敏感,这与方差分析结果一致。

[0092] 通过Desgin-Expert8.0.6软件分析后得到发酵饮料最佳发酵工艺为:接种量4.47%、发酵温度37.49℃、发酵时间49.63h,由此条件乳酸含量可达到9.12638g/kg。为了实验的可操作性,将工艺调整为接种量4.5%、发酵温度37℃、发酵时间50h。同时为进一步确定响应面法的准确性,对工艺进行验证试验,如表7所示,当接种量4.5%、发酵温度37℃、发酵时间50h,由此条件乳酸含量可达到9.09g/kg。实际测量值接近软件预测值,证明用响应面法可有效的优化饮料发酵工艺参数。

	接种量 (%)	发酵温度 (°C)	发酵时间 (h)	乳酸含量 (g/kg)
[0093] 数据值	4.47	37.49	49.63	9.12638
实际值	4.5	37	50	9.09

[0094] 表7最佳发酵工艺的乳酸含量比较表

[0095] 综上,对饮料的发酵工艺条件进行了优化,在单因素实验基础上进行响应面设计,得到最佳发酵工艺参数为:接种量4.5%、发酵温度37℃、发酵时间50h。在此条件下,乳酸含量可达到9.09g/kg。

[0096] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

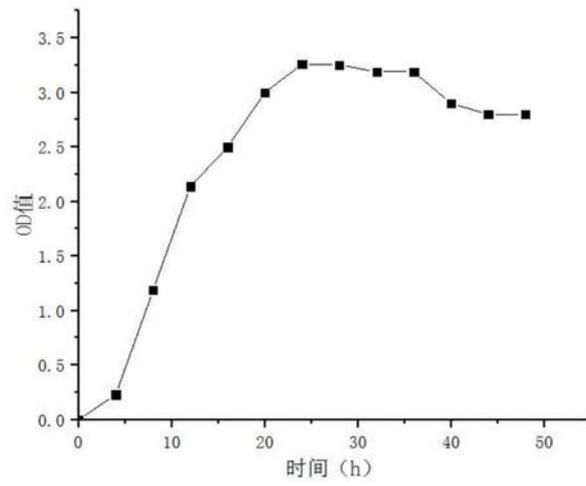


图1

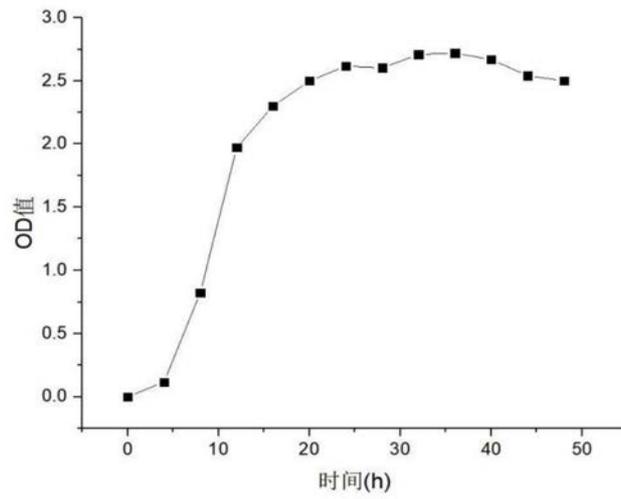


图2

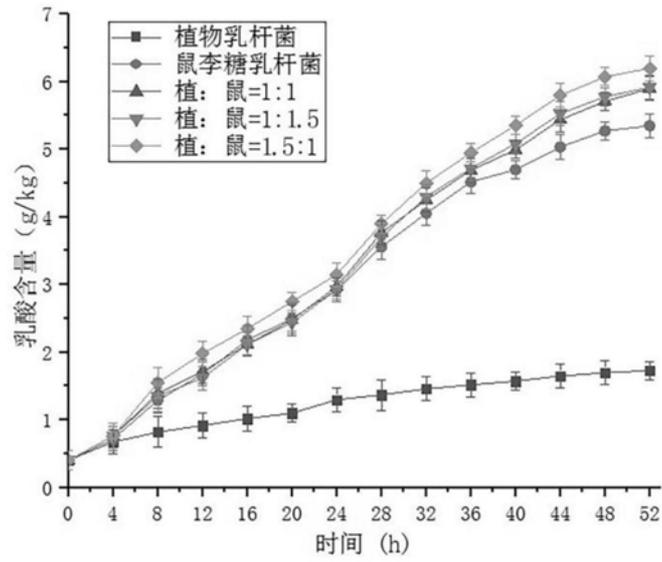


图3

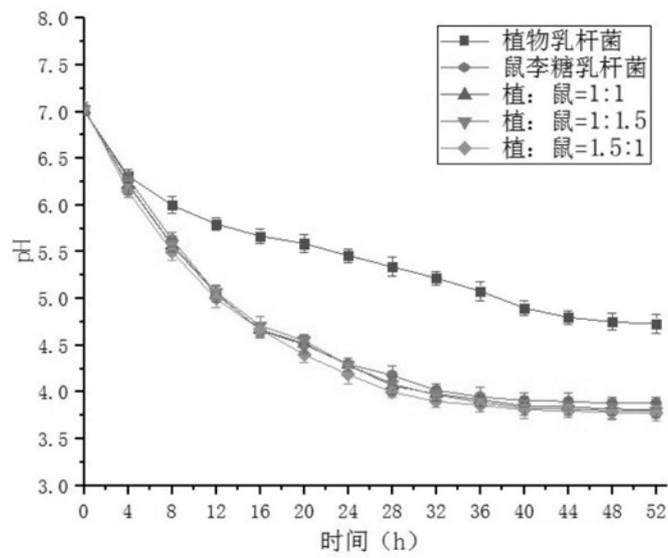


图4

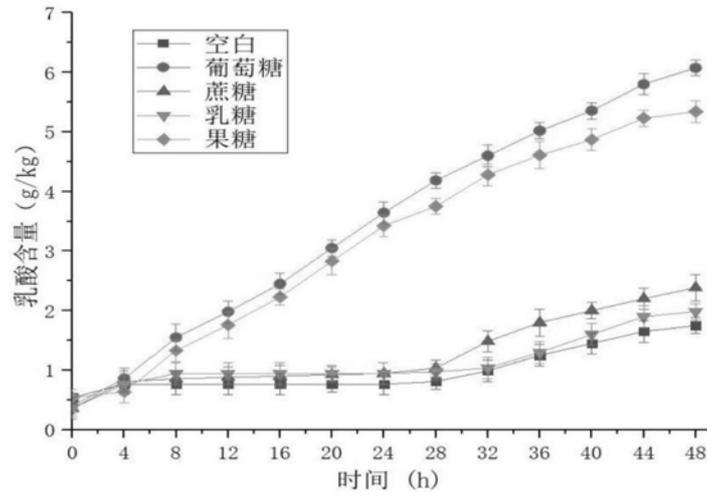


图5

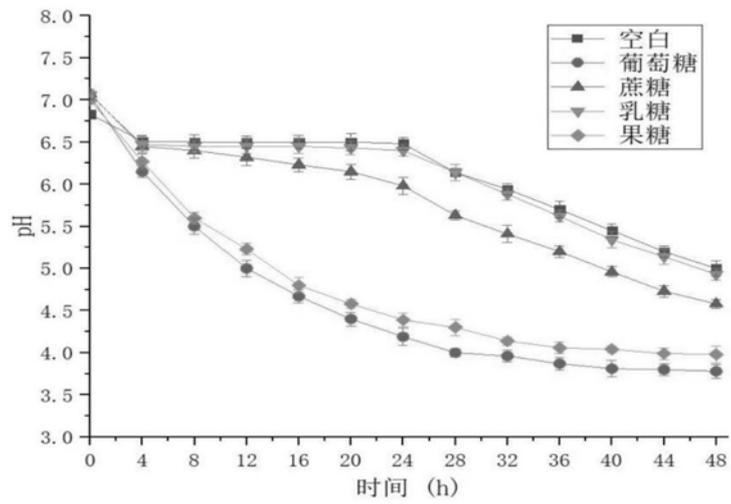


图6

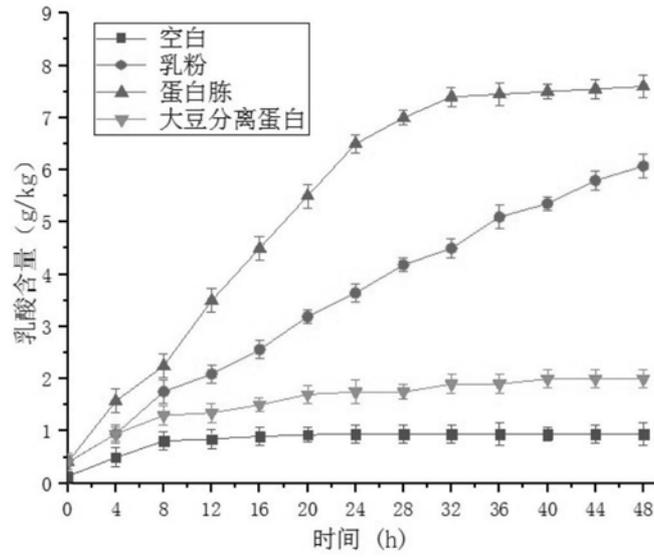


图7

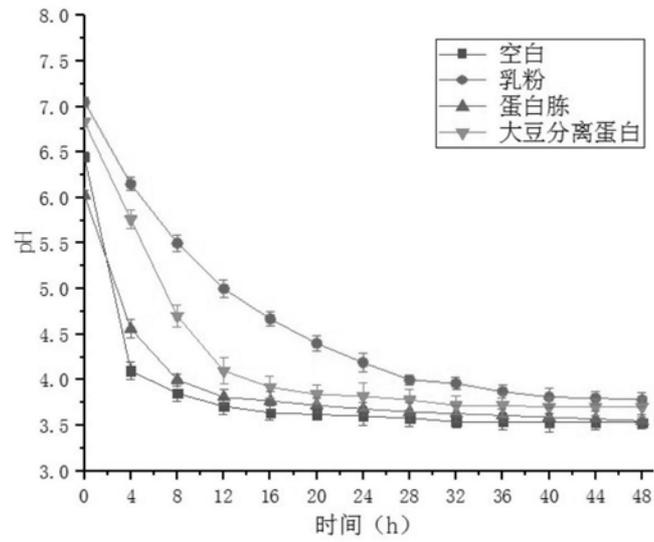


图8

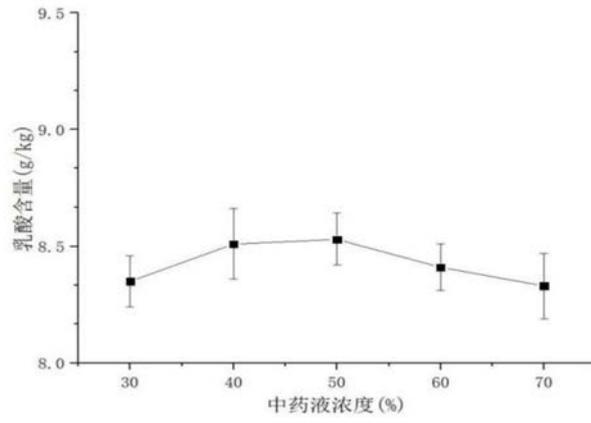


图9

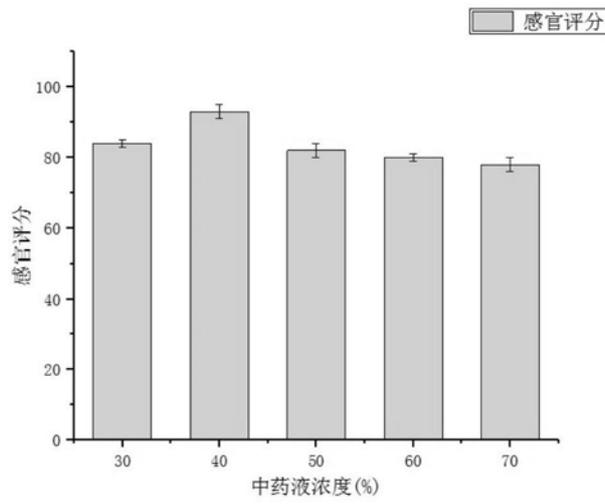


图10

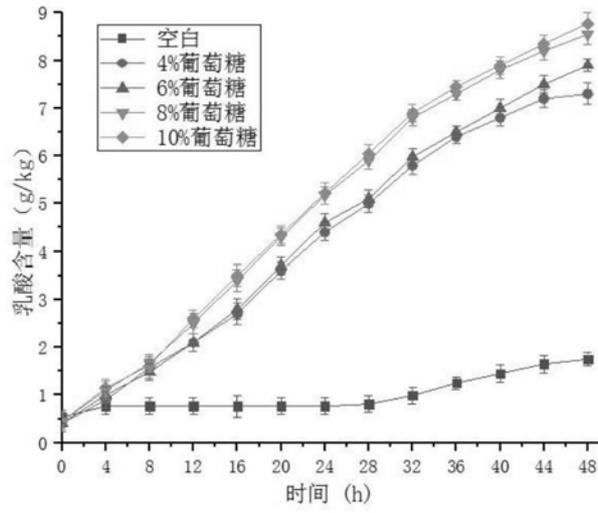


图11

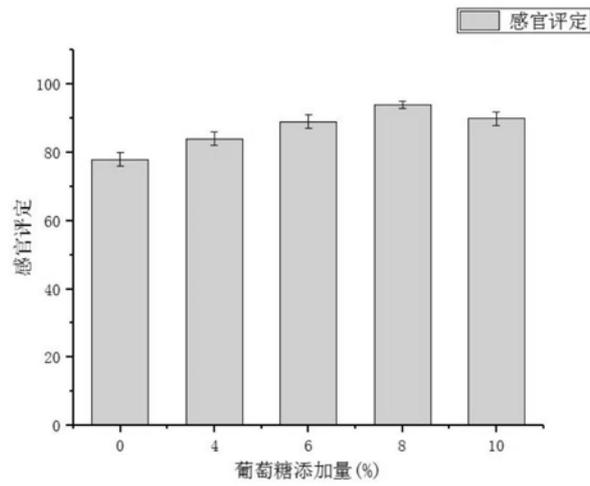


图12

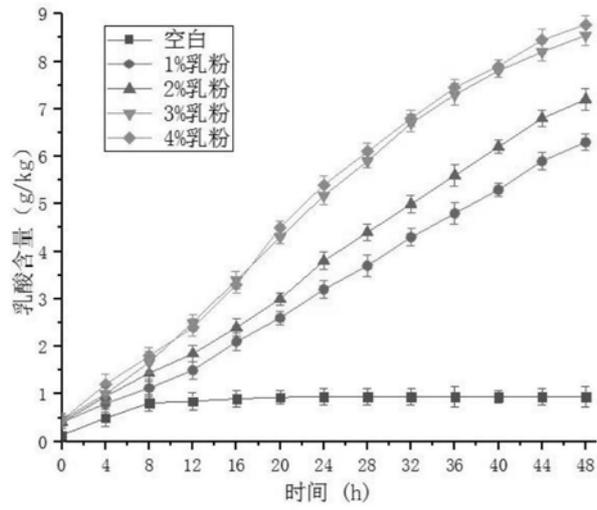


图13

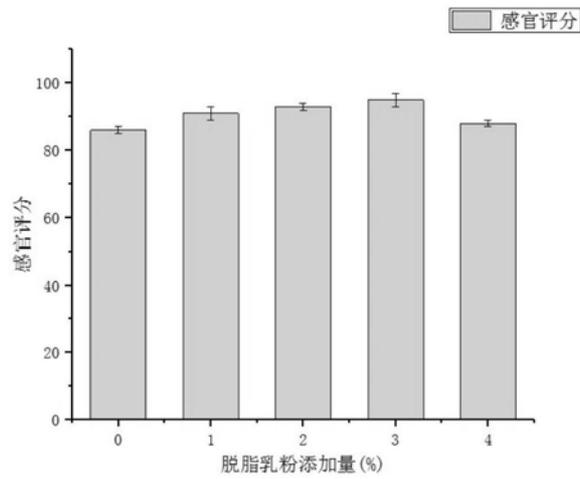


图14

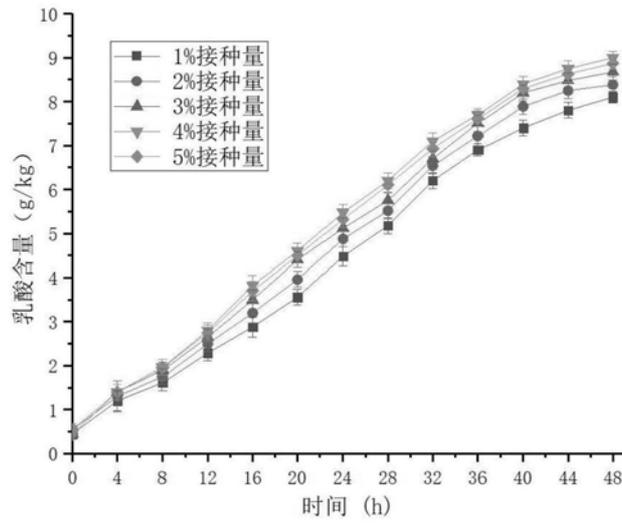


图15

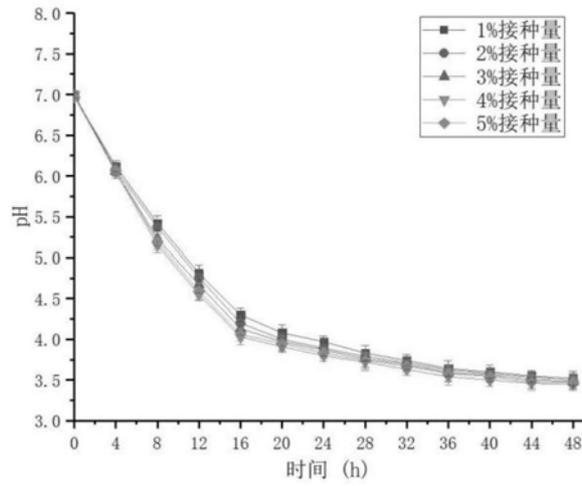


图16

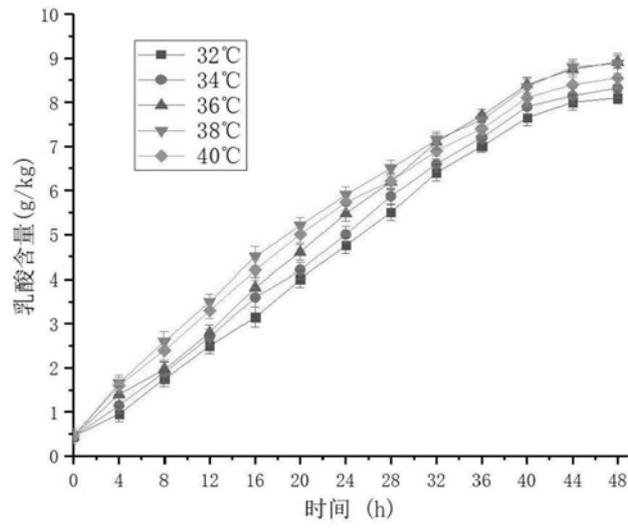


图17

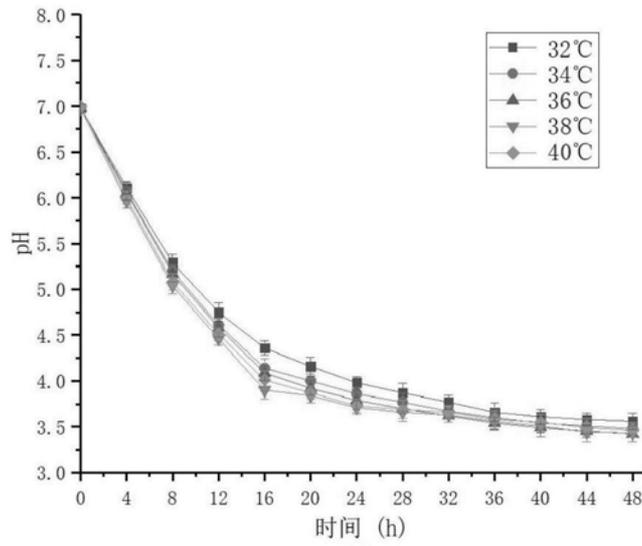


图18

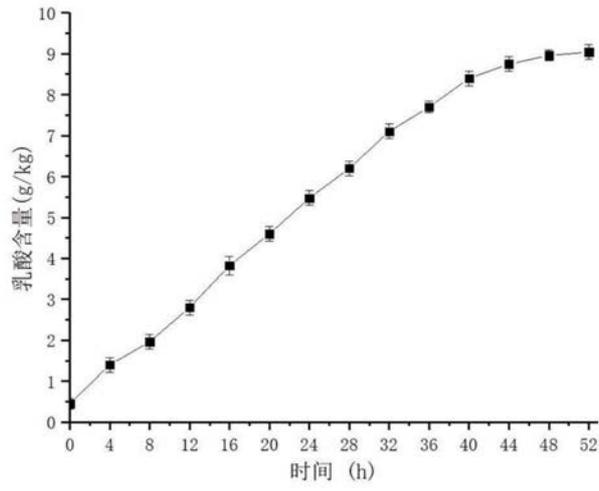


图19

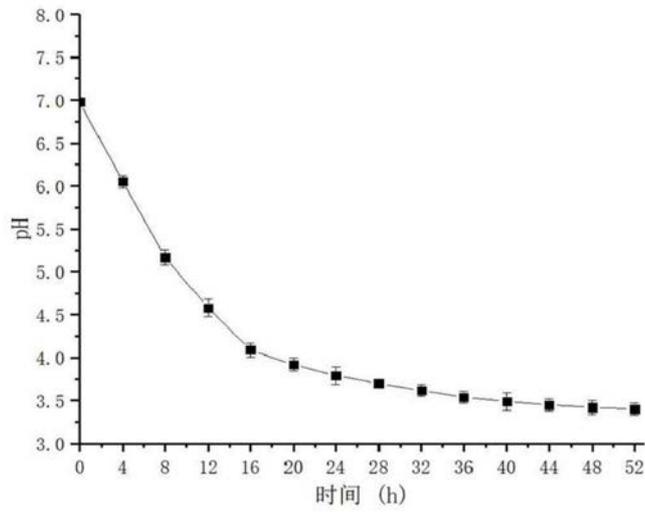


图20

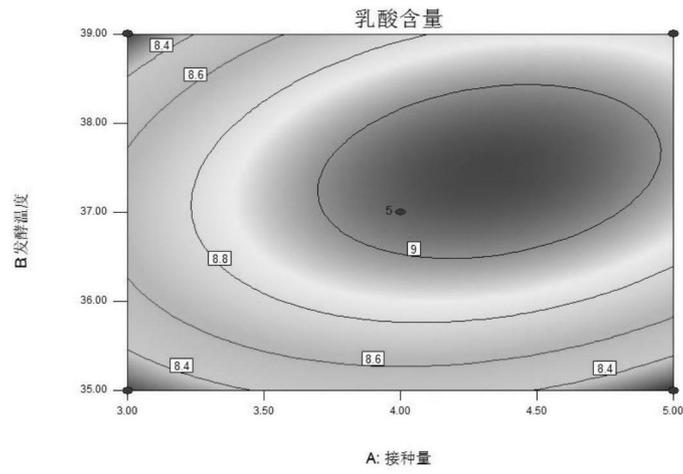


图21

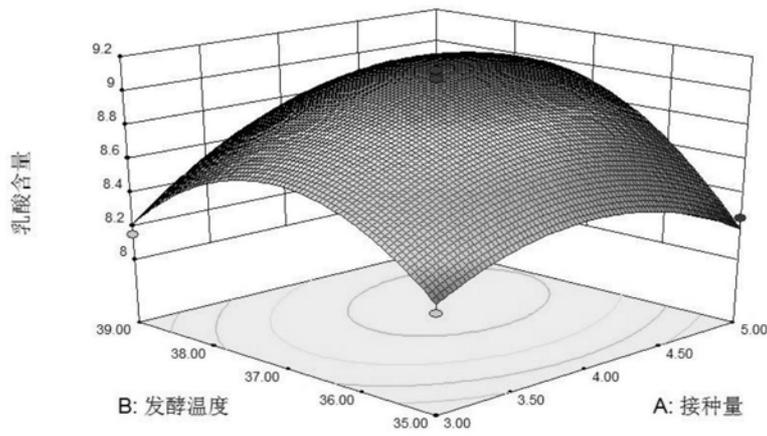


图22

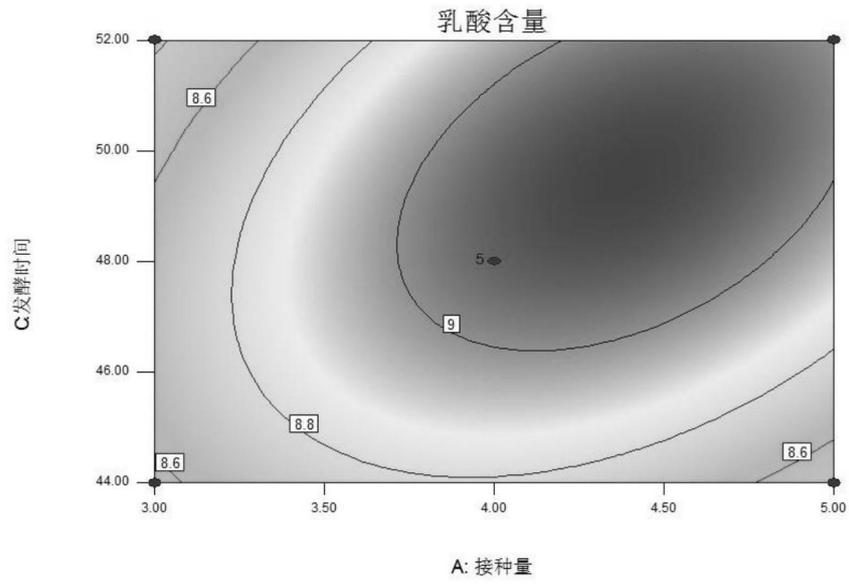


图23

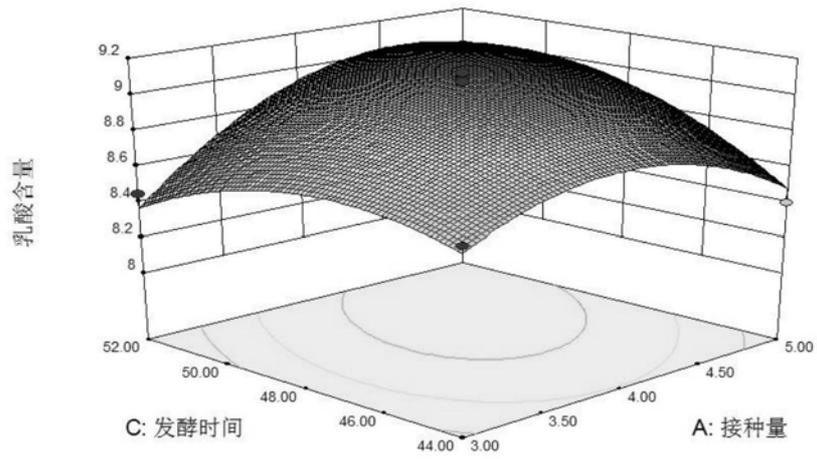


图24