

响应面法优化番茄酱发酵工艺

牟 琴¹, 徐 俐^{1,2,*}, 鲁青松¹, 王 梅³, 钟定江⁴

(1. 贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州贵阳 550025;

2. 茅台学院, 贵州仁怀 564500;

3. 贵州省农业科学院生物技术研究所以, 贵州贵阳 550025;

4. 麻江明洋食品有限公司, 贵州凯里 556000)

摘 要:为了丰富番茄加工品种, 获得品质、口感较佳的发酵番茄酱, 采用番茄为原料, 在单因素实验的基础上, 以色差值、总酸、有机酸含量为考察指标, 以总酸含量为响应值, 通过响应面法对番茄发酵工艺条件进行优化。结果表明, 植物乳杆菌:嗜酸乳杆菌:凝结芽孢杆菌比例为 1:2:1 发酵时, 发酵番茄酱产酸最高, 确定最优发酵条件分别为发酵温度 28 ℃、发酵时间 30 d、接种量 1.8%、异 V_C-Na 添加量 0.5%, 在此优化条件下所发酵的番茄酱总酸含量为 25.16 g/kg, 有机酸含量高于自然发酵, 成品色泽新鲜, 香气浓郁, 回味醇厚。

关键词:发酵番茄酱, 乳酸杆菌, 有机酸, 响应面优化

Optimization of Tomato Sauce Fermentation Process by Response Surface Method

MOU Qin¹, XU Li^{1,2,*}, LU Qing-song¹, WANG Mei³, ZHONG Ding-jiang⁴

(1. School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Moutai University, Renhuai 564500, China;

3. Biological Technology Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025, China;

4. Majiang Mingyang Food Co., Ltd., Carey 556000, China)

Abstract: In order to enrich tomato varieties and obtain fermented tomato sauce with better taste and quality, tomato was used as raw material. On the basis of single factor experiment, color difference, total acid and organic acid content were used as the test indexes. Using total acid content as response value, the fermentation conditions of tomato were optimized by response surface method. The results showed that when the ratio of *Lactobacillus botanica*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bacillus coagulans* was 1:2:1, the acid production of tomato sauce was the highest, and the optimum fermentation conditions were as follows: Fermentation temperature was 28 ℃, fermentation time was 30 d, the inoculum size was 1.8% and the content of V_C-Na was 0.5%. The total acid content of fermented tomato sauce was 25.16 g/kg, the organic acid content was higher than that of natural fermentation. The finished product was fresh in color, rich in aroma and mellow aftertaste.

Key words: fermented tomato sauce; lactobacillus; organic acid; response surface optimization

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)23-0111-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.019

引文格式: 牟琴, 徐俐, 鲁青松, 等. 响应面法优化番茄酱发酵工艺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 111-118.

番茄(*Solanum lycopersicum*), 属于我国大宗蔬菜之一, 含丰富营养物质^[1], 在我国大部分地区均有种植, 每年番茄制品产量位居世界前茅, 其中 90% 以上用于出口, 我国 2016 年加工番茄在 600 万吨以上^[2]。我国番茄酱出口以大包装为主, 缺乏深加工, 国内外关于发酵番茄酱制品的研究微乎其微, 研究发现番茄经过发酵后不仅能改善其风味, 还能提高有机酸、V_C、氨基酸等营养物质^[3-7], 具有缓解乳糖不耐症、免疫调节及抗肿瘤的作用^[8-9]。

乳酸菌(Lactic acid bacteria)是一类可发酵糖类产生乳酸的无芽孢、革兰氏染色阳性的细菌总称, 具有耐酸、接触酶阴性及兼性厌氧等特性, 果蔬发酵领域对乳酸菌的营养颇多^[10-12]。植物乳杆菌、凝结芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌属于食品中常用的乳酸菌, 日本大制药公司曾利用植物乳杆菌发酵开发出一种具有独特风味且营养丰富的蔬菜饮品——“蔬菜的战士”, 颇受市场欢迎^[13], 植物乳杆菌还能产生酯酶, 水

收稿日期: 2019-02-27

作者简介: 牟琴(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品贮藏与加工, E-mail: 1435559248@qq.com。

* 通讯作者: 徐俐(1963-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 食品贮藏与加工, E-mail: 954008524@qq.com。

基金项目: 贵州省科技成果转化引导基金计划项目([2015]5022B 号)。

解复杂的多酚类物质转化为结构更加简单的酚类物质^[14],小分子物质可以使产品获得更好风味。嗜酸乳杆菌在酸胁迫时能通过激活谷氨酸脱酸酶的活性来提高其耐酸的能力^[15-16]。凝结芽孢杆菌具有乳酸菌产乳酸且产量高的性能,又具有芽孢杆菌丰富的酶系统及抗逆性强、耐高温高压的储存特性,其产酸所需营养要求低,对木糖利用高,代谢产物中具有广谱抗菌效果的多肽类细菌素物质,通过 MTT 实验证明没有明显毒性,且能够被蛋白酶水解^[17]。研究发现乳酸菌菌株的混合发酵具有协同作用^[18],可以克服单一菌株发酵单一的缺陷,如共同降低亚硝胺的产生^[19]等。所以本实验通过探究植物乳杆菌、凝结芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌发酵番茄酱的最佳复配比例,并对发酵番茄酱的工艺进行响应面优化,力求获得色香味俱全、有机酸含量高且种类丰富的发酵番茄酱,为发酵番茄酱的生产提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

发酵原料 选取无虫害、成熟度高、颜色鲜红、外观完整、色泽均一的贵州主栽番茄作为发酵的原料;食盐、食糖 市售;老酸汤 凯里市玉梦红酸汤有限公司;嗜酸乳杆菌 1.1878 中国微生物菌种保藏中心;凝结芽孢杆菌 1.420、植物乳杆菌 6233 广州微生物菌种保藏中心;乳酸细菌(MRS)培养基 上海博微生物科技有限公司;草酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸(均为色谱纯) 北京索莱宝科技有限公司;磷酸二氢铵 为优级纯;氢氧化钠 为分析纯,成都金山化学试剂有限公司。

SPE-150B-Z 型生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;LS-B75L-I 型立式压力蒸汽灭菌锅 江阴滨江医疗设备有限公司;NH310 便携式电脑色差仪 深圳市三恩时科技有限公司;Agilent 1260 高效液相色谱配有可变波长紫外检测器 美国安捷伦公司;WondaSil C₁₈ Superb (5 μ m 4.6 mm $\times$ 150 mm) 岛津技迹(上海)商贸有限公司;HH 恒温水浴锅 金坛市中大仪器厂;LRH-250-GS 人工气候箱 广东省医疗器械;TG 16-WS 离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司;SHZ-D(III)循环水式多用真空泵 河南省予华仪器有限公司;PHS-3C 酸度计 上海佑科仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程

鲜番茄→清洗→漂烫→去皮、去籽→打浆→过滤→
活化菌株
↓
浓缩→调配→装罐密封→发酵→成品
↑
食盐4%、食糖6%

1.2.2 菌液制备、活化 在无菌操作台中分别取三种菌粉(植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、凝结芽孢杆菌)少许于 100 mL 无菌 MRS 液体培养基中,摇匀,于(37 $\pm$ 0.5)℃恒温培养箱中培养 36 h,再分别吸取 2 mL 活化菌悬液于 100 mL 无菌 MRS 液体培养基中,摇匀,置于(37 $\pm$ 0.5)℃恒温培养箱中培养 36 h,备用。

1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 乳酸菌复配 将三种乳酸菌菌株(植物乳杆菌 6233、嗜酸乳杆菌 1.1878、凝结芽孢杆菌 1.420)进行组合,以番茄酱体积计(mL)按表 1 接种 3% 混合乳酸杆菌到番茄酱中置于 28℃恒温发酵 20 d,以有机酸和总酸含量为考核指标,筛选出产酸能力较强的菌株组合,以自然发酵番茄酱为对照,发酵方法参照 1.2.1。

表 1 有机酸回归方程

Table 1 Organic acid regression equation

序号	菌株悬液体积比例
A	6233:1.1878:1.420(1:1:1)
B	6233:1.1878:1.420(2:1:1)
C	6233:1.1878:1.420(1:1:2)
D	6233:1.1878:1.420(1:2:1)

1.2.3.2 发酵温度 将乳酸菌组合按照比例接种 3% 到番茄酱中,置于 25、28、31、34、37℃条件下恒温发酵 30 d,色差值、总酸和有机酸含量为考核指标,确定最佳的发酵温度。

1.2.3.3 发酵时间 将乳酸菌按照比例接种 3% 到番茄酱中,置于 28℃下恒温发酵,分别在第 10、20、30、40、50 d 进行取样,以色差值、总酸和有机酸含量为考核指标,确定最佳的发酵时间。

1.2.3.4 接种量 将筛选出的乳酸菌组合分别按照 1%、3%、5%、7%、9% 的比例接种到番茄酱中,置于 28℃恒温发酵 30 d,以色差值、总酸和有机酸含量为考核指标,确定最佳的乳酸菌接种量。

1.2.3.5 异 V_C-Na 添加量 将乳酸菌按照比例接种 3% 到番茄酱中,分别添加异 V_C-Na 为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5% 后置于 28℃温度下恒温发酵 30 d,以色差值、总酸和有机酸含量为考核指标,确定最佳的发酵时间。

1.2.4 番茄酱发酵工艺优化响应面试验设计 在单因素实验的基础上,采用 Design Expert 8.0.6 根据 Box-Behnken 试验设计原理,以发酵时间(A)、发酵温度(B)、接种量(C)、异 V_C-Na(D)添加量为 4 个影响因素,以总酸含量(Y)为响应值,采用响应面法进行中心组合设计试验,因素水平见表 2。

表 2 发酵番茄酱工艺响应面因素水平表

Table 2 Factors and levels of response surface experiment for fermentation of tomato sauce

水平	因素			
	A 发酵温度 (℃)	B 发酵时间 (d)	C 接种量 (%)	D 异 V _C -Na (%)
-1	25	20	1	0.5
0	28	30	3	1
1	31	40	5	1.5

1.2.5 指标测定

1.2.5.1 色差值测定 用便携式色差仪测定,依次读取 L*、b* 值。其中 L* 值表示亮度, L* 值越大说明颜色越亮越接近白色; a*、b* 值反映产品的色度,若 a*

值越大产品越红;若 b^* 值越大产品越黄。

1.2.5.2 有机酸含量测定 有机酸标准储备液的配制:准确称取乳酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、草酸、琥珀酸 0.0200 g, 分别用纯净水定容至 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 配制成浓度为 2 mg/mL 的有机酸标准储备液。

有机酸混合标准曲线的制作:分别吸取各有机酸储备液 0.025、0.05、0.1、0.5 mL 定容至 10 mL 容量瓶中(使各有机酸质量浓度依次为 0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 mg/mL)摇匀, 进样 20 μ L, 采集数据。根据峰面积与浓度的关系建立线性回归方程, 见图 1 及表 3。

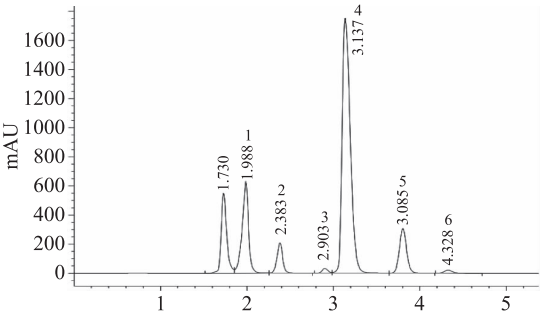


图1 有机酸混合标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of mixed organic acids

注:1:草酸;2:酒石酸;3:苹果酸;4:乳酸;5:柠檬酸;6:琥珀酸。

表3 有机酸回归方程

Table 3 Organic acid regression equation

序号	名称	回归方程	决定系数
1	草酸	$y = 60.383x + 180.11$	$R^2 = 0.9992$
2	酒石酸	$y = 16.185x + 41.253$	$R^2 = 0.9993$
3	苹果酸	$y = 11.097x - 23.835$	$R^2 = 0.9994$
4	乳酸	$y = 3.0822x + 6.6586$	$R^2 = 0.9998$
5	柠檬酸	$y = 5.175x + 24.007$	$R^2 = 0.9991$
6	琥珀酸	$y = 3.0604x + 12.506$	$R^2 = 0.9998$

样品前处理:取发酵完成的样品 5.000 g, 加入 0.2 g 活性炭, 用蒸馏水定容至 50 mL 容量瓶中, 于 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤, 待进样。

液相色谱条件:柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 210 nm; 流动相:甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢铵溶液 (pH = 2.6) (98:2); 流速:1.0 mL/min; 进样量:20 μ L。

表4 发酵番茄酱感官评价标准

Table 4 Sensory evaluation criteria for fermented tomato sauce

项目	评价标准		
滋气味 (35 分)	具有浓郁的发酵番茄酱应有的滋气味, 咸淡适中, 无异味 (35 ~ 25 分)	具有微量发酵番茄酱应有的滋气味, 偏咸或淡 (24~15 分)	无具有对应的滋气味, 甚至有异味 (苦涩味、焦糊味、滑腻油脂味) (14 ~0 分)
色泽 (25 分)	深红色, 带有光泽 (25~15 分)	红色, 表面有少量褪色 (14~5 分)	褐色严重 (4~0 分)
状态 (20 分)	酱体均匀, 组织细腻, 黏度适中, 无流散和汁液分离现象 (20~15 分)	酱体组织有分层现象, 汁液分离不是很明显 (14~10 分)	酱体分层严重 (9~0 分)
杂质 (20 分)	酱体无粗大皮渣和籽实, 无黑斑出现 (20~15 分)	酱体有极少粗大皮渣及籽实, 少量黑斑 (14~10 分)	组织有较大皮渣、籽实、黑斑 (9~0 分)

1.2.5.3 总酸测定 酸碱中和测定法, 参考曹建康改编的《果蔬采后生理生化实验指导》进行测定^[20]。

1.2.5.4 发酵番茄酱的感官评定 组织 10 人小组对发酵番茄酱进行感官评定评分 (见表 4), 用平均值表示不同品种发酵番茄酱所得感官评定总分。

1.2.6 模型的验证 利用响应面模型优化的最佳条件进行发酵实验, 比较模型预测值与实验值, 验证模型的有效性。

1.3 数据处理

各指标重复测定 3 次, 色差值重复测定 6 次, 取平均值。使用 Origin 8 进行数据记录、初步处理和绘制图表; 采用 SPSS 17 软件进行单因素方差分析与显著差异分析, Design Expert 8.0.6 进行 Box-bnheken 实验设计。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 乳酸菌不同比例对发酵有机酸、乳酸、总酸影响 如表 5 所示, 将三株菌种分别进行组合接种到番茄酱中, 由于混合乳酸菌生长代谢占优势, 与自然发酵对比, 总酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸含量明显增加, A、B、C、D 组乳酸比自然发酵组分别增加 24.45%、30.45%、27.64%、58.17%, 苹果酸分别增加 79.68%、50%、67.96%、128.91%。其中 D 组乳酸占总酸含量最高为 83.257%, 乳酸酸味柔和, 较高的柠檬酸、苹果酸能使番茄酱具有爽快温和酸味, 对改善番茄酱酸味具有积极的作用, 综合总酸、苹果酸以及柠檬酸含量考虑, 选择 D 组 (植物乳杆菌:嗜酸乳杆菌:凝结芽孢杆菌 = 1:2:1) 作为发酵番茄酱的发酵剂。

2.1.2 温度对发酵过程中色差、总酸、有机酸影响 如表 6 所示, 随着温度的升高, 色差值逐渐减少, 番茄酱黄度、红度降低, L^* 值减小。由图 2 可知, 温度对乳酸菌产酸速度和产酸量均有所影响, 发酵温度对有机酸、总酸含量具有明显影响, 当发酵温度在 25~28 $^{\circ}$ C 之间时, 草酸、酒石酸、苹果酸增加, 乳酸菌产乳酸量可达 15.9 g/kg, 乳酸占总酸含量在 73%~79% 之间, 当温度从 31 $^{\circ}$ C 上升至 37 $^{\circ}$ C 时, 乳酸菌代谢受阻, 乳酸减少, 37 $^{\circ}$ C 时乳酸含量减少到 10.59 g/kg, 柠檬酸逐渐增加, 可能原因是, 乳酸减少, 柠檬酸作为产乳酸的底物受到阻碍而富集^[21]。综合考虑, 选择 28 $^{\circ}$ C 作为最佳发酵温度。

表 5 菌株复配接种番茄酱发酵产酸结果

Table 5 Results of acid production by mixed inoculation with tomato sauce

组别	乳酸菌 复配比例	草酸 (g/kg)	酒石酸 (g/kg)	苹果酸 (g/kg)	乳酸 (g/kg)	柠檬酸 (g/kg)	琥珀酸 (g/kg)	总酸 (g/kg)	乳酸/总酸 (%)
A	1:1:1	0.065	0.181	0.230	15.534	2.841	0.049	21.859	71.062
B	2:1:1	0.067	0.176	0.192	16.284	2.757	0.060	21.468	75.852
C	1:1:2	0.071	0.177	0.215	15.932	2.957	0.024	21.706	73.401
D	1:2:1	0.072	0.181	0.293	19.740	2.800	0.053	23.710	83.257
E	自然发酵	0.047	0.099	0.128	12.482	1.465	0.045	16.658	74.930

表 6 温度对发酵番茄酱色差的影响

Table 6 Effect of temperature on color difference of fermented tomato sauce

发酵温度 (℃)	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]	<i>L</i> [*]
25	20.42 ± 1.21 ^b	19.13 ± 1.23 ^d	39.59 ± 1.43 ^d
28	21.91 ± 0.94 ^d	18.25 ± 0.12 ^e	38.97 ± 0.21 ^e
31	19.78 ± 1.92 ^b	17.86 ± 0.75 ^{bc}	37.59 ± 1.09 ^b
34	21.27 ± 0.89 ^{cd}	17.26 ± 2.02 ^b	37.07 ± 2.10 ^a
37	17.61 ± 0.94 ^a	12.81 ± 1.02 ^a	37.00 ± 1.83 ^a

注: $\bar{X} \pm SD$, $n = 6$, 同列不同字母表示具有显著差异性 ($P < 0.05$); 表 7~表 9 同。

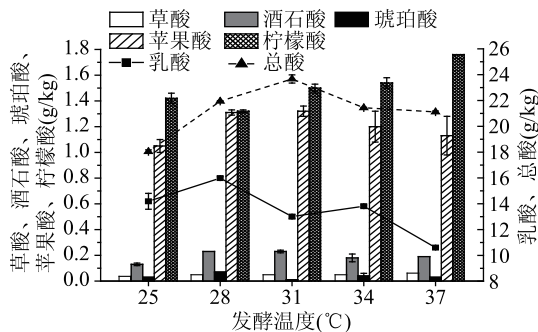


图 2 温度对发酵番茄酱产酸的影响

Fig.2 Effect of temperature on acid production of fermented tomato sauce

2.1.3 发酵时间对发酵过程中色差、总酸、有机酸影响 如表 7 所示,发酵时间对番茄酱色差有明显影响,发酵时间越长,酶促褐变产生色素越多,发酵前 30 d,色差值缓慢下降,黄度、红度降低,发酵 30 d 以后 L^* 值显著下降 ($P < 0.05$)。由图 3 可知,发酵番茄酱中的有机酸含量随着时间的变化明显的变化,当发酵 10~30 d 时,发酵液中乳酸菌代谢最为旺盛,各种有机酸含量均明显增大,发酵第 30 d 时,乳酸含量增加到 12.69 g/kg,占总酸含量最高为 71.02%,当发酵 30 d 以后,番茄酱发酵液中底物被乳酸菌逐渐消耗殆尽,苹果酸、柠檬酸逐渐被消耗,因此,为最大化保留番茄酱中的有机酸含量,选择最佳发酵时间为 30 d。

2.1.4 接种量的影响 接种量对番茄浆的影响明显,接种量少,番茄酱总酸增长缓慢,接种量多,有机酸生成速率及产酸量提高,不仅成本增加,还可能会严重抑制其它微生物的生长而影响番茄酱的整体风味。如表 7 所示,接种量小于 5% 时,色差值变化缓慢,接种量大于 5% 以后, L^* 值开始下降。由图 4 可

表 7 发酵时间对发酵番茄酱色差的影响

Table 7 Effect of fermentation time on color difference of fermented tomato paste

发酵时间 (d)	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]	<i>L</i> [*]
10	14.58 ± 0.21 ^b	6.42 ± 0.91 ^b	49.41 ± 0.94 ^d
20	12.21 ± 1.23 ^a	3.24 ± 1.43 ^a	41.74 ± 1.48 ^d
30	19.42 ± 0.97 ^e	14.71 ± 0.94 ^e	36.97 ± 1.92 ^e
40	20.13 ± 1.57 ^d	17.21 ± 1.43 ^d	35.30 ± 0.73 ^b
50	20.93 ± 1.73 ^d	17.73 ± 2.1 ^d	34.31 ± 1.69 ^a

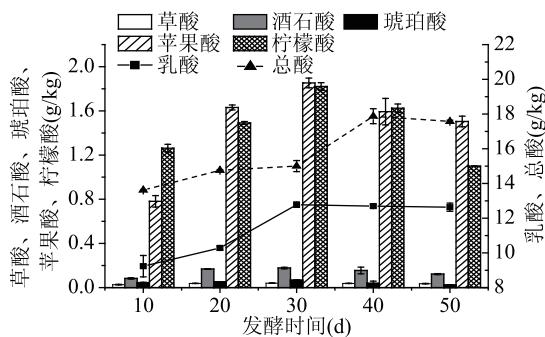


图 3 发酵时间对发酵番茄酱产酸的影响

Fig.3 Effect of fermentation time on acid production of fermented tomato sauce

知,当接种量在 1%~3% 之间时,苹果酸、乳酸、柠檬酸及总酸含量均呈现增加的趋势,乳酸占总酸含量最高为 56.6%;接种量为 5% 以后,乳酸菌消耗营养物质加快,导致营养物质消耗殆尽,可能乳酸菌部分开始提早消亡^[22],有机酸和总酸开始缓慢减少,综上所述,选择最佳接种量为 3%。

表 8 接种量对发酵番茄酱色差的影响

Table 8 Effect of inoculation amount on color aberration of fermented tomato sauce

接种量 (%)	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]	<i>L</i> [*]
1	18.93 ± 1.34 ^a	14.82 ± 0.05 ^a	35.39 ± 1.74 ^b
3	19.65 ± 1.93 ^b	14.29 ± 1.95 ^a	37.71 ± 0.96 ^e
5	21.15 ± 0.99 ^c	17.26 ± 1.39 ^b	37.09 ± 1.89 ^e
7	19.13 ± 1.54 ^b	17.67 ± 1.97 ^b	38.24 ± 1.27 ^d
9	18.14 ± 1.89 ^a	14.39 ± 0.83 ^a	34.77 ± 0.45 ^a

2.1.5 异 V_c -Na 添加量的影响 番茄酱颜色在发酵过程中不仅受到乳酸菌代谢产物的影响,还与本身褐变有关,添加异 V_c -Na 不仅可以克服番茄酱变

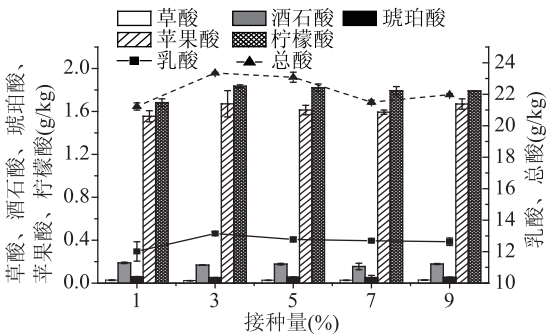


图4 接种量对发酵番茄酱产酸的影响

Fig.4 Effect of inoculation on acid production in fermented tomato sauce

色、异味和混浊等现象,还可以抑制发酵番茄酱中亚硝酸盐的量^[23]。如表9所示,不同异V_C-Na的添加量对发酵番茄酱的色差值具有明显的影响,当添加量小于1.5%时,色差减少缓慢,红度高,亮度大;异V_C-Na能够抑制微生物繁殖速率^[24],由图5可以看出,随着异V_C-Na添加量增大,乳酸菌产酸的速率逐渐缓慢,有机酸含量变化不明显,综合异V_C-Na成本及有机酸含量考虑,选择添加1%异V_C-Na较合适。

表9 异V_C-Na添加量对发酵番茄酱色差的影响

Table 9 Effect of addition of different V_C-Na on color difference of fermented tomato sauce

异V _C -Na量 (%)	a*	b*	L*
0.5	18.6 ± 1.83 ^a	14.7 ± 1.63 ^a	35.0 ± 1.23 ^a
1	19.3 ± 1.09 ^b	15.7 ± 1.89 ^c	36.3 ± 1.62 ^b
1.5	21.4 ± 2.01 ^d	17.1 ± 1.21 ^d	37.7 ± 1.75 ^c
2	20.7 ± 0.93 ^c	17.3 ± 1.53 ^d	37.0 ± 1.43 ^c
2.5	19.3 ± 1.63 ^b	15.4 ± 1.93 ^b	35.4 ± 1.95 ^a

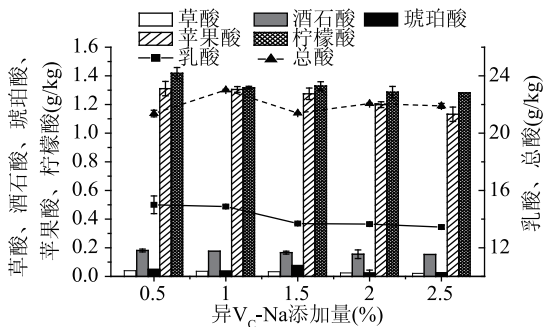


图5 异V_C-Na添加量对发酵番茄酱产酸的影响

Fig.5 Effect of V_C-Na addition

on acid production in fermented tomato sauce

2.2 响应面优化试验结果

在单因素实验结果的基础上,以发酵温度(A)、发酵时间(B)、接种量(C)、异V_C-Na(D)添加量为4个影响因素,以总酸(Y)为响应值,根据Box-bnhenken试验设计原理进行优化实验,试验因素设计与结果见表10,利用Design-Expert 8.0.6软件对表9中数据进行二次多项式回归拟合,得到二次多项式回归方程:

总酸含量(Y) = 24.73 - 0.93A - 0.74B - 0.73C - 0.49D - 0.96AB + 0.30AC - 0.92AD - 1.39BC + 0.015BD + 0.74CD - 4.82A² - 3B² - 1.28C² - 0.39D²

表10 Box-behnken 试验设计结果

Table 10 Box-behnken experimental design results

试验号	A	B	C	D	总酸含量 (g/kg)
1	0	0	0	0	24.92
2	-1	1	0	0	17.09
3	0	0	-1	1	22.9
4	0	0	0	0	24.35
5	0	1	0	1	20.1
6	-1	0	-1	0	21.3
7	0	0	1	1	22.39
8	1	-1	0	0	18.01
9	0	1	1	0	21.7
10	-1	0	1	0	19.02
11	1	0	-1	0	18.1
12	-1	0	0	-1	20.02
13	-1	0	0	1	20.95
14	0	0	0	0	25.32
15	0	1	0	-1	21.92
16	0	0	-1	-1	24.56
17	1	1	0	0	13.97
18	0	0	0	0	25.02
19	1	0	1	0	17.03
20	0	-1	0	-1	23.06
21	-1	-1	0	0	17.29
22	1	0	0	1	17.34
23	0	0	0	0	24.02
24	0	-1	-1	0	20.12
25	0	1	1	0	18.17
26	0	-1	0	1	21.18
27	0	-1	1	0	22.15
28	1	0	0	-1	20.08
29	0	0	1	-1	21.1

运用Box-behenken 响应面分析法对实验结果拟合的模型进行方差分析,模型中各系数显著性检验结果见表11。回归方程中变量对总酸含量影响的显著性由F检验判断,P值越小,其所对应变量的显著性程度越高。该模型的F值为36.64,大于0.01水平上的F值,且P<0.0001,说明该模型极显著,该模型的决定系数R² = 0.9734,说明该模型的拟合度良好,能够预测响应值。在统计学上有意义,失拟项F = 1.84,P = 0.293 > 0.05,不显著,说明该模型回归方程不失拟,能充分反映实际情况,可以用回归方程代替试验真实点对实验结果进行分析。复相关系数越大,表明变量之间的线性关系程度越密切,该模型的调整复相关系数(R²_{Adj} = 0.9469)接近于1,说明变量间的线性相关程度密切。各因素中一次项A、B、C、D,二次项A²、B²、C²,交互项BC对发酵番茄酱的总酸含量影响极显著(P<0.01),AB、AD、CD项对发酵

表 11 响应面方差分析结果
Table 11 Response surface ANOVA results

变异来源	均方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	228.68	14	16.33	36.64	<0.0001	**
A	10.34	1	10.34	23.2	0.0003	**
B	6.54	1	6.54	14.67	0.0018	**
C	6.48	1	6.48	14.54	0.0019	**
D	2.88	1	2.88	6.46	0.0235	**
AB	3.69	1	3.69	8.27	0.0122	*
AC	0.37	1	0.37	0.82	0.3802	
AD	3.37	1	3.37	7.55	0.0157	*
BC	7.73	1	7.73	17.34	0.001	**
BD	9.00 × 10 ⁻⁴	1	9.00 × 10 ⁻⁴	2.02 × 10 ⁻³	0.9648	
CD	2.18	1	2.18	4.88	0.0443	*
A ²	150.65	1	150.65	337.91	<0.0001	**
B ²	58.35	1	58.35	130.88	<0.0001	**
C ²	10.57	1	10.57	23.72	0.0002	**
D ²	1.01	1	1.01	2.26	0.1548	
残差	6.24	14	0.45			
失拟项	5.12	10	0.51	1.84	0.293	
纯误差	1.12	4	0.28			
综合	234.92	28				
R ²	0.9734					
R ² _{Adj}	0.9469					

注：* 表示显著(P<0.05)，** 表示极显著(P<0.01)。

表 12 最优组合发酵和自然发酵的番茄酱有机酸含量及感官评价结果
Table 12 The organic acid content and sensory evaluation results of tomato sauces
by optimal combination fermentation and natural fermentation

项目	乳酸 (g/kg)	酒石酸 (g/kg)	草酸 (g/kg)	苹果酸 (g/kg)	柠檬酸 (g/kg)	琥珀酸 (g/kg)	感官评价	得分 (分)
最优发酵	18.211	0.143	0.032	1.854	1.932	0.054	深红色、酸爽适口、酸味浓、 无异味、酱体均匀	87
自然发酵	12.482	0.099	0.047	1.28	1.465	0.045	红色、酸味偏淡、 酸味不足、轻微分层现象	77

番茄酱的总酸含量影响显著(P<0.05)，各因素对发酵番茄酱总酸影响程度依次为：发酵温度>发酵时间>接种量>异V_c-Na添加量。

两两交互作用的响应面图见图6。

由图6的三维空间图可知，该试验在所选范围内存在极值，既是三维曲面的最高点，又是等高线椭圆的中心点。与B方向比较，A方向的响应面曲线较陡，A等高线的密度显著高于沿B方向的密度，说明发酵温度(A)对发酵番茄酱总酸含量的影响显著高于发酵时间(B)，等高线呈椭圆形，表明发酵温度(A)与发酵时间(B)交互作用显著；与D方向比较，A方向的响应面曲线较陡，A等高线的密度显著高于沿D方向的密度，说明发酵温度(A)对发酵番茄酱总酸含量的影响显著高于异V_c-Na添加量(D)，等高线呈椭圆形，表明发酵温度(A)与异V_c-Na添加量(D)交互作用显著；与C方向比较，B方向的响应面曲线较陡，B等高线的密度显著高于沿C方向的密度，说明发酵时间(B)对发酵番茄酱总酸含量的影

响显著高于接种量(C)，等高线呈椭圆形，表明发酵时间(B)与接种量(C)交互作用极显著；与D方向比较，C方向的响应面曲线较陡，C等高线的密度显著高于沿D方向的密度，说明接种量(C)对发酵番茄酱总酸含量的影响显著高于异V_c-Na添加量(D)，等高线呈椭圆形，表明接种量(C)与异V_c-Na添加量(D)交互作用显著。

2.3 验证实验

由回归方程可解出4个因素的最佳条件，分别为发酵温度27.93℃、发酵时间30.14d、接种量1.83%、异V_c-Na添加量0.5%，在此条件下发酵番茄酱的总酸含量预测值为25.25g/kg。考虑到实际操作的便利性与可行性，将模型条件修正为发酵温度28℃、发酵时间30d、接种量为1.8%，异V_c-Na添加量0.5%，在此条件下进行3次重复验证性试验，得到发酵番茄酱总酸含量均值为25.16g/kg，与预测值接近，表明该模型拟合程度较好，具有实用价值，在此条件下发酵的番茄酱有机酸含量如表12所示，

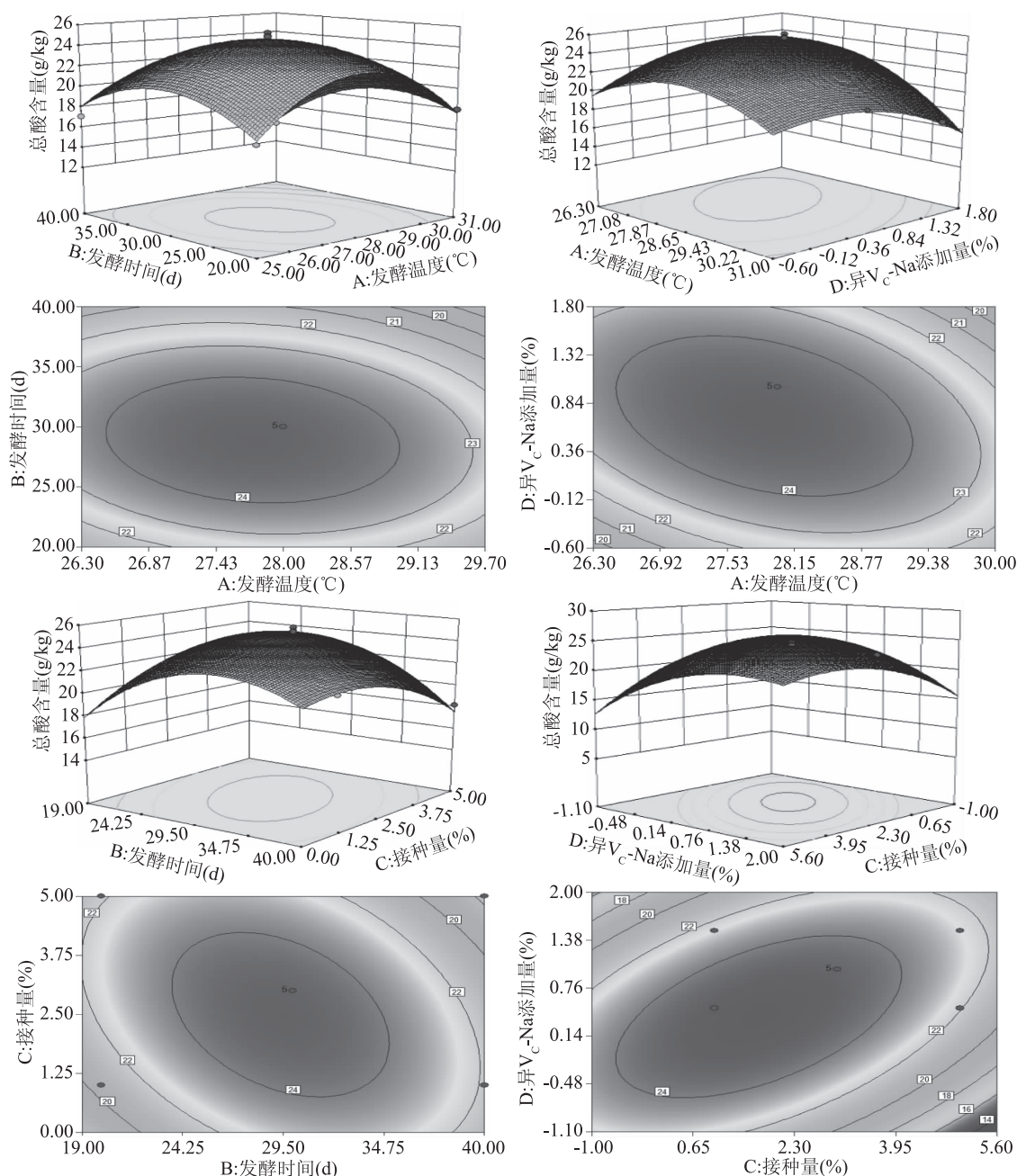


图6 发酵温度、发酵时间、乳酸菌接种量、异 V_c -Na添加量交互的响应面及等高线

Fig.6 The interactive response surface and contour of fermentation temperature, fermentation time, inoculation amount of lactic acid bacteria, addition of V_c -Na

苹果酸、柠檬酸分别高出自然发酵 44.84%、46.7%，草酸比自然发酵少 31.9%。少量的草酸可减少产品刺激味道^[21]，酒石酸酸感强^[25]，乳酸使番茄酱酸味柔和，较高的柠檬酸、苹果酸能使番茄酱具有爽快温和酸味，单一的有机酸口味比较平淡，多种有机酸可赋予产品更加可口的风味^[26]，对改善番茄酱酸味具有积极的作用，通过感官评析可知最佳发酵组合的番茄酱酸爽适口、酸味浓，自然发酵酸味偏淡、酸味不足，所以通过响应面优化得出的最佳发酵方式比自然发酵口感佳，符合大众消费者口味。

3 结论

通过单因素实验和响应面优化试验，得到最佳的乳酸菌配比为植物乳杆菌：嗜酸乳杆菌：凝结芽孢

杆菌 = 1 : 2 : 1，确定了影响因素对发酵番茄酱总酸含量的影响大小为：发酵温度 > 发酵时间 > 乳酸菌接种量 > 异 V_c -Na添加量；通过二次多元回归方程，确定最优发酵条件分别为发酵温度 28℃、发酵时间 30 d、接种量 1.8%、异 V_c -Na添加量 0.5%，在此条件下进行 3 次重复验证性试验，得到色泽、口感较佳且有机酸含量比自然发酵高的发酵番茄酱，得到发酵番茄酱总酸含量均值为 25.16 g/kg，与预测值接近，证明该数据模型合理可靠，在此条件下发酵的番茄酱色泽鲜艳，风味浓郁，口感极佳。

参考文献

[1] 敬思群, 杨文菊. 番茄渣、皮成分分析及在食品加工中的

应用[J].新疆大学学报:自然科学版,2006,23(2):197-200.

[2] 马兆红.从生产市场需求谈我国番茄品种的变化趋势[J].中国蔬菜,2017(3):1-5.

[3] 张菊华.乳酸菌发酵番茄、胡萝卜复合蔬菜汁工艺研究[D].长沙:湖南农业大学,2005.

[4] 赵美佳.番茄乳酸饮料发酵工艺及抗氧化能力变化分析[J].农产品加工,2015(6):37-40.

[5] 吴文惠,包斌,吴太平.活性乳酸菌饮料的研究[J].内蒙古农牧学院学报,1995(1):54-60.

[6] Sun Qing-shen, Zhou Li-nan. Advances in studies on probiotic health foods [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 36(2): 21-26, 34.

[7] 尹曼,董哲,王憬,等.复合果蔬发酵汁对小鼠脾淋巴细胞的作用研究[J].中国食品学报,2019,19(3):127-133.

[8] 孙帅楠.甘蔗汁饮料混菌发酵工艺的研究[D].南京:广西大学,2017.

[9] Wee Y J, Kim J N. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications food technol [J]. Food Technology & Biotechnology, 2006, 44(2): 163-172.

[10] Klaenhammer T, Altermann. Discovering lactic acid bacteria by genomics [J]. Antonie Van Leeuw-enhoek, 2002, 82(1-4): 29-58.

[11] Zhu Qi-qi, Pu Bo, Wang Zhou. Screening and identification of a strain of lactobacillus with cholesterol-reducing ability and its application in pickles [J]. China Condiment, 2016, 41(5): 16-22.

[12] 森地敏树.日本乳酸菌的研究现状和发展趋势[J].中国供销商情(乳业导刊),2004(4):41-43.

[13] 杨琳琳.益生菌发酵玫瑰花饮料的研究[D].济南:山东师范大学,2018.

[14] 袁峥.嗜酸乳杆菌耐酸机理研究[D].新乡:河南科技学院,2013.

(上接第110页)

[13] 高娟,郭伟杰,刘娜,等.硫酸酸化-气相色谱-质谱法测定植物提取物中的4种多环芳烃[J].理化检验-化学分册,2017(6):684-688.

[14] 王雅琴,左谦,焦杏春,等.北京大学及周边地区非取暖期植物叶片中的多环芳烃[J].环境科学,2004,25(4):23-27.

[15] 龙明华,龙彪,梁勇生,等.南宁市蔬菜基地土壤多环芳烃含量及来源分析[J].中国蔬菜,2017,1(3):52-57.

[16] 龙彪.南宁市菜地土壤及蔬菜中多环芳烃的含量及来源分析[D].南宁:广西大学,2017.

[17] 吴敏敏,夏忠欢,张倩倩,等.南京市蔬菜中多环芳烃污染特征及健康风险分析[J].地球与环境,2017,45(4):447-454.

[18] 万开,江明,杨国义,等.珠江三角洲典型城市蔬菜中多环芳烃分布特征[J].土壤,2009,41(4):583-587.

[19] 葛蔚,程琪琪,柴超,等.青岛市城郊蔬菜中多环芳烃污染特征和健康风险评估[J].环境科学学报,2017(12):327-333.

[20] 刘玉兰,温运启,许利丽,等.不同植物油制取工艺对毛油中多环芳烃含量的影响[J].中国油脂,2018,43(2):41-45.

[21] Cai Q Y, Mo C H, Li Y H, et al. Occurrence and assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from vegetable fields of the Pearl River Delta, South China [J]. Chemosphere, 2007, 68

[15] Majeed M, Majeed S. Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(4): 894-901.

[16] Abdhula K, Ganesha M, et al. Bacteriocinogenic potential of a probiotic strain *Bacillus coagulans* [BDU3] from Ngari [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 800-806.

[17] 孟庆玉,王建舫.凝结芽孢杆菌发酵液中有有机酸成分反相高效液相色谱法建立及其测定[J].北京农学院学报,2017,32(4):80-84,112.

[18] Kim S H, Kang K H, Kim S H, et al. Lactic acid bacteria directly degrade N-nitrosodimethylamine and increase the nitrite-scavenging ability in kimchi [J]. Food Control, 2017, 71: 101-109.

[19] 肖仔君,钟瑞敏,陈蕙音,等.植物乳杆菌的生理功能与应用[J].中国食品添加剂,2005(2):87-89.

[20] 曹建康.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2016.

[21] 张东亚,徐俐,鲁青松,等.菌群强化凯里红酸汤“番茄浆”及发酵工艺的优化[J].食品科技,2018,43(5):313-318.

[22] 何嘉敏,于新,刘学云.响应面优化益生菌发酵复合果蔬汁的加工工艺[J].现代食品科技,2019,35(5):206-213.

[23] 黄海,吴天瑞,黄育英,等.D-异抗坏血酸钠抑制酸菜腌制中亚硝酸盐产生研究[J].中国食品添加剂,2008(6):106-107,105.

[24] 张铁华,李奎.冷鲜牛肉微生物菌相变化及抑菌剂保鲜效果初探[J].农产品加工(学刊),2012(11):19-23.

[25] 郝媛,白洪吉,郭昊翔,等.自然发酵对山荆子果有机酸含量的影响[J].食品工业,2019,40(1):14-17.

[26] 王芮东,卫博慧,李楠.不同发酵方式下甘蓝泡菜中有机酸的 HPLC 分析[J].中国酿造,2018,37(9):175-180.

(1):159-168.

[22] 平立凤,李振,赵华,等.土壤样品中多环芳烃分析方法研究进展[J].土壤通报,2007,38(1):179-184.

[23] 武中庸,热孜万古力·赛买提,车敏娜,等.响应面法优化紫色马铃薯花青素超声波提取工艺[J].江苏农业学报,2017(6):1378-1385.

[24] 毕鸿亮,张浩原,孙翠香,等.蔬菜中多环芳烃的 GC-MS 分析[J].分析测试学报,2007,26(4):530-532.

[25] 廖丹,黄华斌,庄峙厦,等.多环芳烃(PAHs)污染对滨海湿地入侵植物互花米草的影响[J].应用与环境生物学报,2018,24(4):894-900.

[26] 平立凤,李振,赵华,等.土壤样品中多环芳烃分析方法研究进展[J].土壤通报,2007,38(1):179-184.

[27] 张茜,刘满威,罗铭,等.快速溶剂(ASE)提取、凝胶渗透色谱(GPC)联合固相萃取(SPE)净化、高效液相色谱法测定土壤中的多环芳烃[J].环境化学,2011(4):771-777.

[28] 张东东.炒香型油脂生产中多环芳烃的控制[D].郑州:河南工业大学,2016.

[29] 张虹.加标回收率的测定和结果判断[J].石油与天然气化工,2000,29(1):50-52.