

冠突散囊菌液态发酵过程中黑茶活性成分变化研究

黄 群, 李彦坡, 陈林杰, 车 科
(吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 实验研究了冠突散囊菌液态深层发酵过程中黑茶活性成分变化及其与冠突散囊菌生长的关系。结果表明, 发酵液颜色逐渐加深, 后期菌丝自溶而导致浑浊; 发酵液 pH 值先降后升; 茶多酚、儿茶素、氨基酸、蔗糖逐渐减少; 茶黄素、茶红素、茶褐素在不同发酵时期含量呈动态变化。

关键词: 冠突散囊菌; 黑茶浸提液; 液态发酵; 活性成分; 变化动态

Study on Changes of Active Components in Dark Tea during Liquid Fermentation by *Eurotium cristatum*

HUANG Qun, LI Yan-po, CHEN Lin-jie, CHE Ke
(Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: In this study, the changes of active components in dark tea related to the growth of *Eurotium cristatum* during the liquid fermentation were studied. The results showed that the color of fermenting liquor deepens gradually, and it becomes muddy because of mycelium autolysis in the later stage. The contents of tea polyphenol, catechin, amino acid and sugar all decrease gradually. The tea pigments, such as theaflavin (TF), thearubigin (TR), theabrownin (TB), vary dynamically in different fermentation stages.

Key words *Eurotium cristatum*; dark tea slurry fluid; liquid fermentation; active component; variance trend

中图分类号: TS201.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0231-04

茯砖茶属紧压黑茶, 主销北方少数民族地区, 在蒙、藏、维吾尔族等牧民中流传着“宁可一日无粮, 不可一日无茶, 一日无茶则滞, 二日无茶则病”之说, 因为茯砖茶能“消腥肉之腻, 解青稞之热”, 并能补充人体维生素^[1-2]。茯砖茶加工的“发花”过程是茯砖茶独特品质形成的关键工艺, 其实质是通过控制外界条件促使优势菌—冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)的生长繁殖, 产生金黄色闭囊壳, 俗称“金花”^[3-5]。茯砖茶中闭囊壳与其品质密切相关, 消费者历来根据“金花”的质量和数量判断茯砖茶品质的优劣, 有“茶好金花开, 花多茶质好”之说。

以前对冠突散囊菌的研究主要集中于固体培养, 对液态培养及培养过程中基质成分变化动态的研究未见报道。为进一步研究冠突散囊菌在茯砖茶生产过程中所起到的作用, 本实验通过对冠突散囊菌黑茶液发酵过程中活性物质变化动态的研究, 为揭示冠突散囊菌与茯砖茶品质、功能之间关系奠定理论基础, 为提高茯砖茶品质和改进工艺提供可行途径。

1 材料与方法

1.1 原料与菌种

黑毛茶 市售 冠突散囊菌 实验室保存。

1.2 试剂

磷酸氢二钠, 磷酸二氢钾, 茶氨酸, 硫酸亚铁, 酒石酸钾钠, 茶多酚, 醋酸乙酯, 正丁醇, 95%乙醇, 碳酸氢钠, 草酸等为分析纯。二甲基甲酰胺, 冰醋酸, 甲醇, 乙腈等为色谱纯。

1.3 仪器与设备

Prostar210高效液相色谱仪 美国瓦里安公司; 722-S型分光光度计 上海棱光技术有限公司; HWS-250恒温恒湿培养箱、ZD-2型自动电位滴定仪 上海精密科学仪器有限公司; 机械搅拌发酵罐 镇江东方生物工程设备技术公司; 无损糖度计 成都市青羊联合光学仪器有限公司。

1.4 黑茶浸提液制备

参照 GB8305—87^[6]。

收稿日期: 2006-11-28

作者简介: 黄群(1977-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品生物技术及食物资源开发与利用。

1.5 孢子悬液制备

取一支已培养4d长满冠突散囊菌的斜面试管,于无菌条件下倒入无菌水10ml,用接种环将黄色闭囊壳刮下,悬浮于无菌水中,再将悬浮液倒入盛有100ml无菌水并带有玻璃珠的三角瓶内,振摇20min,制得均匀孢子悬液,测得孢子浓度为 $5.0 \times 10^8 \sim 6.0 \times 10^8$ 个/ml。

1.6 培养基

固体培养基: PDA培养基, 自然pH值。液体培养基: 称取600g蔗糖, 加入黑茶浸提液中, 混匀, 得0.8%黑茶汁、6%蔗糖液态培养基。

1.7 液态深层发酵

将液态培养基倒入容量为10L的发酵罐中, 通入蒸汽, 121℃灭菌30min, 并使液态培养基液面达10L刻度处, 循环水冷却至37℃, 接种冠突散囊菌孢子悬液100ml, 在30℃、转速为100r/min的条件下培养。

1.8 实验方法

分别取培养12、24、36、48、60、72、84、96、108、120h后的发酵液200ml, 测定发酵液pH值; 或过滤后于4℃保存, 测定滤液茶多酚总量、儿茶素、茶色素、氨基酸总量、蔗糖, 研究冠突散囊菌液态发酵不同时期发酵液中物质代谢情况。

1.9 测定方法

蔗糖含量: 折光计; 氨基酸总量: 茚三酮比色法^[7]; 茶多酚总量: 酒石酸铁比色法^[8]; 茶色素: 分光光度计法^[9]; 各儿茶素单体含量: 高效液相色谱法^[10], 色谱分析条件: 色谱柱为Inertsie Φ ODS-3(5μm, 4.6×250mm), 紫外检测器: UV280nm, 样品采用梯度洗脱, 洗脱液由A、B两相组成, A为水相, B为二甲基甲酰胺: 甲醇: 冰醋酸=40:2:1(体积比), 流速: 1.0ml/min, 柱温: 35℃, 进样量: 20μl。

2 结果与分析

2.1 菌落特征变化

冠突散囊菌液态发酵过程中菌落特征变化见表1, 随发酵时间延长, 茶汁颜色逐渐加深, 主要由于茶多酚逐步被氧化, 生成茶黄素、茶红素、茶褐素等氧化

聚合物, 以及发酵后期冠突散囊菌分泌褐色素; 发酵中菌落不断增大, 后期出现部分衰老自溶, 导致茶汁混浊。

2.2 pH值变化动态

取不同培养时间的发酵液200ml测pH值, 探索冠突散囊菌液态发酵过程中发酵液pH值的变化规律, 结果见图1。由图可知, 发酵液pH值先下降, 然后上升。0~36h pH值从5.51缓慢下降至4.76; 36~48h pH值从4.76快速下降至最低值4.05; 随后开始缓慢回升, 48~96h pH值从4.05回升至5.04; 96~120h pH值趋于稳定, 为5.00左右。这可能由于发酵前期冠突散囊菌产生有机酸并分泌到细胞外, 从而引起发酵液pH值下降; 但冠突散囊菌进入快速生长期后, 有机酸作为碳源被利用, pH值又回升; 此外, 可可碱和茶碱含量提高也可能是后期发酵液pH值上升的原因。

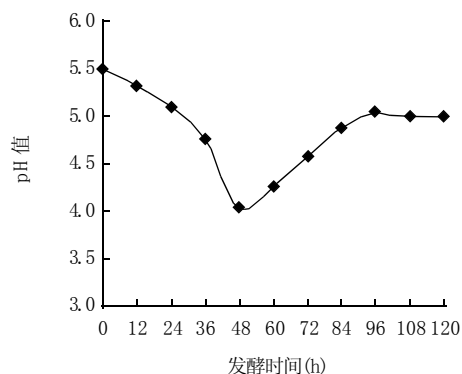


图1 pH值随发酵时间的变化
Fig.1 Changes of pH value during fermentation

2.3 茶多酚变化动态

取不同培养时间的发酵液200ml, 过滤, 测定滤液茶多酚总量, 探索冠突散囊菌液态发酵过程中茶多酚总量的变化规律, 结果见图2。结果表明, 发酵液中茶多酚总量随发酵时间的延长而逐渐减少, 从发酵初期的123.726mg/100ml降低到48.935mg/100ml。发酵前期(0~

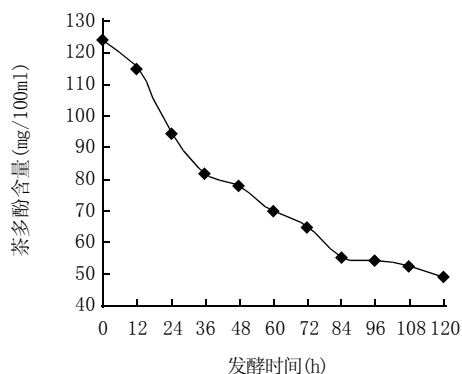


图2 发酵过程中茶多酚含量的变化
Fig.2 Changes of tea polyphenols contents during fermentation

表1 液态培养中菌落特征变化

Table 1 Changes of *Eurotium cristatum* colony during liquid fermentation

发酵时间(h)	茶汁颜色 ^[11]	菌落特征
0	橙黄、明亮	无
24	橙红、明亮	出现白色细小颗粒状菌球
48	橙红、深亮	球形或近球形, 直径约2mm
72	深红、深亮	球形或近球形, 直径约4mm
96	红褐、深亮	球形或近球形, 直径约5mm
120	棕褐、出现少许混浊	球形或近球形, 直径约5mm, 出现自溶

36h) 发酵液中茶多酚含量较高, 大量被氧化而导致含量迅速下降。此后随着发酵时间延长, 底物浓度降低, 氧化速度相对变缓, 同时茶多酚能逐步沉淀酶蛋白, 引起酶蛋白变性失活, 以及发酵过程中有机酸增加, 使多酚氧化酶失去最适 pH 条件而活性下降, 也使茶多酚氧化速度降低, 茶多酚含量下降速度也随之变缓。

2.4 儿茶素变化动态

取不同培养时间的发酵液 200ml, 过滤, 测定滤液儿茶素含量, 探索冠突散囊菌液态发酵过程中儿茶素含量的变化规律, 结果见图 3。分析可知, 由于儿茶素氧化聚合成茶黄素, 其含量逐渐减少。发酵前期儿茶素在多酚氧化酶或过氧化酶的作用下, 很快被氧化成初级氧化产物邻醌, 邻醌极不稳定, 还原成黄烷醇类, 或氧化生成次级氧化产物茶黄素, 茶黄素继续氧化聚合成茶红素和茶褐素等; 发酵后期底物浓度降低, 儿茶素氧化速度也减慢。儿茶素氧化聚合过程复杂, 各单体能相互转化, 故儿茶素各单体含量变化曲线呈不规则波动, 但儿茶素总量呈下降趋势。

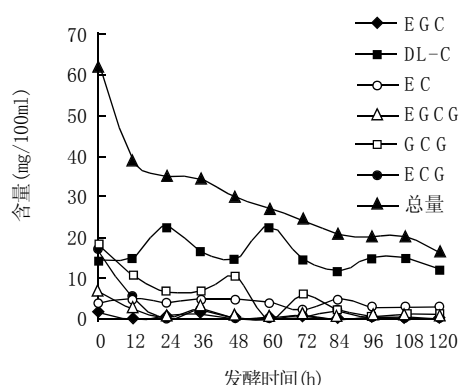


图3 发酵过程中各儿茶素含量的变化
Fig.3 Changes of catechins contents during fermentation

2.5 茶色素变化动态

取不同培养时间的发酵液 200ml, 过滤, 测定滤液茶色素含量, 探索冠突散囊菌液态发酵过程中茶色素含量的变化规律, 结果见图 4、5。

茶黄素(TF)、茶红素(TR)、茶褐素(TB)均为茶多酚不同程度的氧化产物。由图 5 分析可知, 发酵液 TF 总量很少, 发酵前 24h 有微量增加, 随后逐渐下降, 96h 后不能检出, 这可能由于发酵前期儿茶素氧化、聚合形成茶黄素使 TF 增加, 而发酵一定时间后, TF 在氧的参与下迅速转化为茶红素, 含量逐步减少直至为零。发酵前 84h, 发酵液 TR 含量持续增加, 且前 24h 增加幅度较大, 随后增加缓慢, 这可能与 TR 作为聚合过程的中间产物有关, 一方面通过 TF 的氧化聚合而增加, 而另一方面 TR 继续氧化聚合而减少, 发酵 96h 后 TR 含量开始下降。发酵液 TB 含量在发酵中一直呈增加趋

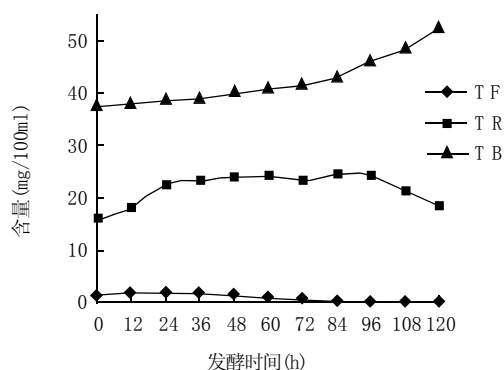


图4 发酵过程中茶色素含量的变化
Fig.4 Changes of tea pigments contents during fermentation

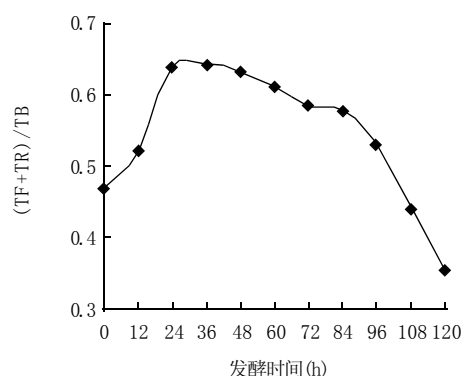


图5 发酵过程中(TF+TR)/TB 值的变化
Fig.5 Changes of (TF+TR)/TB value during fermentation

势, 前期增加缓慢, 72h 后增加较快, TB 为儿茶素类物质氧化、聚合的最终产物, 故发酵后期 TF、TR 大量下降, 而茶褐素大幅度增加, 引起发酵液色泽逐渐变深。由图 5 可知, (TF+TR)/TB 呈先升后降趋势, 说明发酵前期茶多酚氧化生成 TF 和 TR 较多, 而在后期 TF、TR 减少, 茶多酚氧化逐渐加深及 TB 大量增加。

2.6 氨基酸变化动态

取不同培养时间的发酵液 200ml, 过滤, 测定滤液氨基酸总量, 探索冠突散囊菌液态发酵过程中氨基酸总量的变化规律, 结果见图 6。由图可知, 84h 内随发酵

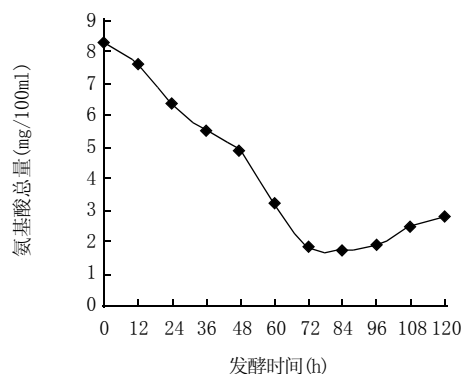


图6 发酵时间中氨基酸总量的变化
Fig.6 Changes of amino acid contents during fermentation

时间延长,氨基酸总量逐渐减少,从最初8.340mg/100ml下降至1.756mg/100ml,下降了78.9%。究其原因,一方面可能是在发酵中,氨基酸作为氮源被冠突散囊菌吸收利用;另一方面可能是茶氨酸与茶多酚氧化产物结合生成暗色聚合物,或茶氨酸发生氧化、降解和转化。84h后发酵液氨基酸总量有所回升,可能是此时冠突散囊菌生长缓慢,氨基酸利用减少,部分菌丝体发生自溶而释放氨基酸到发酵液中。

2.7 蔗糖变化动态

取不同培养时间的发酵液200ml,过滤,测定发酵液蔗糖含量,探索冠突散囊菌液态发酵过程中蔗糖含量的变化规律,结果见图7。由图可知,发酵液蔗糖含量随发酵时间延长而逐渐减少,从最初5.95%降低至2.57%。24h至96h降低幅度最大,而此阶段为冠突散囊菌生长最快的时期,说明该菌对蔗糖有较高利用率,另一方面,糖类物质在微生物发酵作用下,与儿茶素生成糖苷化儿茶素。

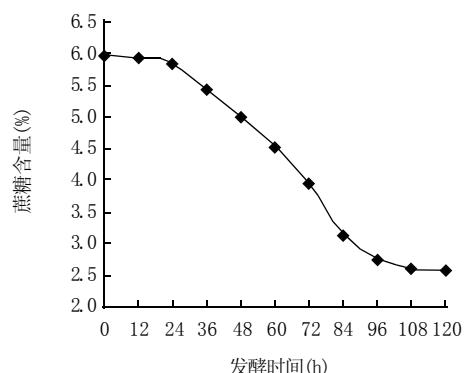


图7 发酵过程中蔗糖含量的变化

Fig.7 Changes of sugar contents during fermentation

3 结论

黑茶汁于冠突散囊菌发酵过程中,发酵液颜色逐渐加深,最初为橙黄色,发酵终止为棕褐色,后期衰老自溶导致发酵液混浊。发酵液pH值先降后升,0~48h间pH值从5.51下降到4.05;48h时达到最低值4.05,然后开始回升,96~120h间pH值趋于稳定,为5.00左右。茶多酚总量从发酵初期123.726mg/100ml降至发酵终止48.935mg/100ml,减少60.45%;儿茶素总量从发酵初期61.902mg/100ml降至发酵终止16.293mg/100ml,降低73.7%。茶黄素、茶红素、茶褐素在不同发酵时期的含量呈动态变化,(TF+TR)/TB呈先升后降变化。氨基酸含量84h时降至1.756mg/100ml,下降78.9%,84h后有所回升,120h时达到2.796mg/100ml。蔗糖含量逐渐减少,从发酵初期5.95%降至终止时2.57%。

参考文献:

- [1] 陈晓阳. 茯砖茶的生产与传播[J]. 茶叶通讯, 1997(1): 41-42.
- [2] 杨抚林. 茯砖茶发花过程中优势菌的研究进展[J]. 茶叶科学技术, 2005, 186(1): 4-7.
- [3] 王志刚, 童哲, 程苏云, 等. 茯砖茶中霉菌含量和散囊菌鉴定及利弊分析[J]. 食品科学, 1992(5): 29-33.
- [4] 刘作易. 茯砖茶“金花”菌对营养成分的利用[J]. 贵州农业科学, 1992(1): 36-40.
- [5] 齐祖同, 孙曾美. 茯砖茶中优势菌群的鉴定[J]. 真菌学报, 1990, 9(3): 176-179.
- [6] GB8305-87 茶水浸出物测定[S].
- [7] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 129-131.
- [8] GB8313-87 茶多酚测定[S].
- [9] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 126-127.
- [10] 戴军, 王洪新, 陈尚卫, 等. 茶叶及茶多酚中儿茶素的高效液相色谱分析方法研究[J]. 色谱, 2001(9): 398-402.
- [11] 陆松候, 施兆鹏. 茶叶审评与检验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 208-209.
- [12] 陈暄, 屠幼英, 童启庆, 等. 绿茶活性成分在酵母发酵过程中的代谢动力学研究[J]. 茶叶科学, 2002, 22(1): 66-69.



美科学家培育出抗旱植物

美国科学家公布的最新研究说,他们已经培育出能够在极端干旱条件下存活并生长的转基因植物。科学家希望,面对全球干旱土地面积不断扩张的趋势,这一成果在未来可能有助于减少因干旱天气遭受的粮食产量损失。

科学家借助转基因工程技术对烟草属植物展开研究,并将研究结果发表在即将于12月4日出版的美国《国家科学院学报》上。

作者之一、来自美国加利福尼亚大学的科学家罗莎·里韦罗说,在干旱季节,植物的叶子往往会因为缺少水分而枯萎,而只要延缓这一枯萎过程,植物抵御干旱的能力将得到加强。

“我们的假设是,枯萎过程是因一种细胞死亡程序而发生。干旱季节,这一程序会在不同植物中得到不同程度的激发,”里韦罗说,“解决这一障碍,植物对环境的适应能力将得到显著加强。一旦抗旱能力增强,其产量自然就不会下降。”

里韦罗相信,如果这一技术最终被应用到粮食种植方面,那么它将有助于最大限度减少干旱对作物产量的负面影响。