

# 红茶菌中优势微生物发酵儿茶素的变化研究

蒋立文<sup>1,2</sup>, 刘德华<sup>1,\*</sup>, 易 灿<sup>2</sup>, 唐道方<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学园艺园林学院茶叶研究所, 湖南 长沙 410128)

2. 湖南农业大学食品科学技术学院食品微生物研究所, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 以 10% 蔗糖、0.7% 绿茶为主要原料制成的糖茶水为培养基质, 传统的红茶菌菌膜分离得到的优势微生物裂殖酵母菌、产膜醋酸菌、乳酸菌 A、乳酸菌 P 为试验菌种, 在 28℃ 恒温静止进行单一和混合培养 12 d, 每 4 d 取样分析。结果表明: 不同菌种单一和混合培养不同时间, 其培养液中的各儿茶素及总量存在明显差异, 产膜醋酸菌混合培养有促进 EGCG、ECG 降解的作用。酵母菌、醋酸菌和乳酸菌 A、P 混合培养, 其培养液中酯型儿茶素含量远远高于酵母菌、醋酸菌混合培养液, 乳酸菌 A、P 有抑制酯型儿茶素降解的作用。

**关键词:** 红茶菌; 优势微生物; 儿茶素

Study on Tea Catechins Changes of Dominant Microbe in Tea Fungus during Fermentation

JIANG Li-wen<sup>1,2</sup>, LIU De-hua<sup>1,\*</sup>, YI Can<sup>2</sup>, TANG Dao-fang<sup>1</sup>

(1. Institute of Tea, College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

2. Institute of Food Microbiology, College of Food Science and Technology, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In this paper, it was checked using dominant microbe, isolated from traditional tea fungus inoculated in pasteurized tea broth with 10% sucrose and 0.7% green tea, controlling 28℃ invariably and fermented 12 days stillness with single or mixed dominant microbe, fermentation guidelines were measured every 4 days. The results showed as following: The total tea catechins and epicatechin isomers (EGC, EC, EGCG, GCG, including GCG, DL-C) are demonstrated varying during sucrose-green-tea both fermentation with difference microbes and difference culturing times. Mixed-culturing fermentation including *Acetobacter* enhances degrading EGCG and ECG. The total ester catechins, with mixed yeast, *Acetobacter*, *Lactobacillus* A and *Lactobacillus* P fermentation are higher than that of mixed Yeast and *Acetobacter* fermentation. Degrading of ester catechins are inhibited by *Lactobacillus* A and *Lactobacillus* P fermentation.

**Key words** tea fungus; dominant microbe; tea catechins

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0257-04

茶叶中儿茶素(catechins)占干重的 12%~24%, 是茶叶中多酚类物质的主体成分。儿茶素具有抗氧化、防癌抗癌、抗突变、抗菌及杀菌等作用, EGCG 是起这些作用的主要物质<sup>[1]</sup>。红茶菌发酵液是一种传统的饮料, 对多种慢性疾病, 如高血压、冠心病、糖尿病等具有一定疗效, 并具有多种保健作用<sup>[2-4]</sup>。近年来, 国内外研究发现, 不同来源的红茶菌, 其菌种存在差异。红茶菌有两种共生体, 即由醋酸菌、酵母菌、乳酸菌组成的共生体和由醋酸菌、酵母菌组成的共生体, 而对红茶菌培养液中的儿茶素含量的变化, 还未见报道。

本研究以红茶菌共生体中的优势菌种为发酵培养对象, 茶糖水为培养液, 探讨在培养过程中培养液中儿茶素变化, 以期红茶菌发酵液工业化生产及保健作用

提供一些理论依据及参数。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源及扩大培养

以不同来源的红茶菌菌膜中分离得到的优势微生物裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces* sp.)、产膜醋酸菌(*Acetobacter* sp.)、乳酸菌 A(*Lactobacillus* sp. a)和乳酸菌 P(*Lactobacillus* sp. p)作为试验菌种。

裂殖酵母菌培养采用 PDA 培养基, 其组成及制作方法是: 洗净去皮马铃薯 200 g, 加水 1 L, 煮沸 1 h, 双层纱布过滤, 滤液加入蔗糖 2% 和琼脂 2%, 煮沸溶解补加蒸发水分后, 分装于具棉塞试管中, 牛皮纸包扎, 于 0.1 MPa 灭菌 30 min, 摆斜面。培养基经无菌检查后

收稿日期: 2007-05-22

\*通讯作者

基金项目: 湖南农业大学创新团队基金项目(60266: 660401)

作者简介: 蒋立文(1968-), 男, 博士研究生, 主要从事食品微生物发酵技术的研究。

接种, 于25~28℃温度下培养24~48h后, 置冰箱中冷藏备用。扩大培养采用液体培养基(上述培养基不加琼脂), 25~28℃温度下, 培养24~48h, 酵母菌数量在 $10^8$ 个/ml以上。

产膜醋酸菌采用醋酸菌培养基培养, 其组成为: 酵母膏1%、葡萄糖10%、碳酸钙2%、琼脂2%, pH6.8。划线接种, 于温度28~30℃下培养48~72h, 置冰箱中冷藏备用。扩大培养采用液体培养基(上述培养基不加琼脂), 添加3%(V/V)的乙醇, 其培养菌液的酸度在1.0%~1.5%, 置冰箱中冷藏备用。

乳酸菌采用TJA液体培养基, 其组成为: 番茄汁50ml、酵母抽提液5g/L、牛肉膏10g/L、乳糖20g/L、葡萄糖2g/L、磷酸氢二钾2g/L、吐温1g/L、乙酸钠1g/L; pH6.8±0.2。分装后121℃的高压锅内灭菌30min。扩大培养后测定培养液的光密度(600nm波长的OD值)的增加值为0.4以上, 冰箱保存备用。

## 1.2 发酵培养液的制备及发酵培养

实验设计如下6种处理进行发酵实验: ①为裂殖酵母菌; ②为产膜醋酸菌; ③为乳酸菌A; ④为乳酸菌P; ⑤为①+②+③+④(简称四混); ⑥为①+②(简称二混)。以扩大培养后各菌种的菌液作为接种菌种, 接种量以最终培养液体积的5%(V/V)接入(表1)。

表1 培养液的配制  
Table 1 Making of cultivating medium

处理	培养液体积(ml)	发酵培养液量(ml)	蒸馏水(ml)	菌液量(ml)
①	200	160	30	10
②	200	160	30	10
③	400	320	60	20
④	400	320	60	20
⑤	200	160	0	40
⑥	200	160	20	20

发酵培养液配制方法是: 将沸水冷却至85~90℃时, 按绿茶:蔗糖:水=7:100:1000配制培养液母液。首先加入绿茶, 保温20min, 滤去茶渣, 然后加入蔗糖混匀。按如表1所示分装和加蒸馏水于300、500ml三角瓶中, 加棉塞, 牛皮纸包扎后, 进行巴氏灭菌, 冷却至室温备用。菌液接入培养液中后, 摇匀, 四层纱

布封口, 28℃静止培养。

## 1.3 儿茶素的变化分析

发酵培养时间共12d。以接种前的糖茶水培养液作对照, 各菌种接种后, 每隔4d取样一次, 测定发酵过程中儿茶素的变化。儿茶素采用HPLC法测定, 色谱柱为Shim-pack ODS C<sub>18</sub>, 4.6mm×150mm, 5mm, 波长278nm; 流动相: A为水; B为甲酰胺: 甲醇: 冰醋酸=40:2:1.5; 流速1.0ml/min; 进样量10μl。

## 2 结果与分析

### 2.1 裂殖酵母菌、产膜醋酸菌及二混培养过程中儿茶素的变化

由表2~4可以看出, 裂殖酵母菌、产膜醋酸菌及其二者混合培养过程中, 培养液中的儿茶素变化总量呈下降趋势。培养液中的GCG、DL-C、EGCG、ECG含量减少, EGC、EC含量大幅度增加。裂殖酵母培养液中的儿茶素的变化主要在培养后的前4d。产膜醋酸菌培养液中的EGCG在培养后的8d基本不变, 但在第8d后大幅度下降; GCG、ECG随着培养时间的延长, 其含量逐渐下降, EC、EGC的含量逐渐增加。裂殖酵母和产膜醋酸菌混合培养液, 随着培养时间的延长, 酯型儿茶素含量逐渐下降, EC、EGC逐渐增加。

从总体看, 裂殖酵母和产膜醋酸菌单独培养的培养液, 在第4d至第8d各表型儿茶素的含量差异较小, 有一个相对稳定期。而裂殖酵母和产膜醋酸菌混合培养液处于连续变化中。

### 2.2 乳酸菌A、P的发酵过程中的儿茶素变化

乳酸菌A、乳酸菌P在培养后的0~4d, 儿茶素的变化大致相同(表5、6), 除GCG、DL-C的含量大幅度增加外, 其他儿茶素都急剧下降。第4~12d变化较平稳, 除乳酸菌P培养液中的DL-C、EC的含量呈缓慢增加外, 其他都呈下降趋势。

### 2.3 四混培养儿茶素的变化

从表7可以看出, 培养至第12d, 酯型儿茶素的含量呈下降趋势, 但下降幅度不大。而简单儿茶素略有增加。

表2 裂殖酵母菌在发酵过程中培养液的儿茶素变化  
Table 2 Changes of tea catechins with yeast fermentation

发酵时间(d)	不同发酵时间各儿茶素异构体的变化(mg/100ml)						儿茶素总量(mg/100ml)
	EGC	DL-C	EC	EGCG	GCG	ECG	
0	8.382	3.318	2.880	41.66	14.088	8.928	53.798
4	15.221	1.650	4.091	35.231	2.882	6.580	45.706
8	15.094	1.452	4.188	34.349	2.938	6.417	44.478
12	16.379	1.858	4.461	35.285	2.786	6.488	47.33
比率(%)	195.4	56.0	154.9	84.7	19.8	72.7	87.98

注: 比率为发酵12d后该儿茶素的含量与0d该儿茶素的含量的百分比, 下同。

表3 产膜醋酸菌发酵过程中培养液的儿茶素变化  
Table 3 Changes of tea catechins with *Acetobacter* fermentation

发酵时间(d)	不同发酵时间各儿茶素异构体的变化(mg/100ml)						儿茶素总量(mg/100ml)
	EGC	DL-C	EC	EGCG	GCG	ECG	
0	8.382	3.318	2.880	41.66	14.088	8.928	53.798
4	12.592	1.503	3.542	41.971	3.703	8.253	47.029
8	13.636	1.735	3.764	41.082	3.631	7.902	49.245
12	18.902	2.286	4.571	30.619	2.518	5.669	47.787
比率(%)	225.5	68.9	158.7	73.5	17.9	63.5	88.83

表4 酵母菌+醋酸菌发酵过程中培养液的儿茶素变化  
Table 4 Changes of tea catechins with yeast and *Acetobacter* fermentation

发酵时间(d)	不同发酵时间各儿茶素异构体的变化(mg/100ml)						儿茶素总量(mg/100ml)
	EGC	DL-C	EC	EGCG	GCG	ECG	
0	8.382	3.318	2.880	41.66	14.088	8.928	53.798
4	11.171	1.550	3.144	33.442	3.691	6.524	40.567
8	13.775	1.773	3.967	30.040	3.361	5.446	42.776
12	19.455	2.359	5.319	23.957	2.516	3.881	44.518
比率(%)	232.0	71.1	184.7	57.5	17.9	43.5	82.75

表5 乳酸菌A发酵过程中儿茶素变化  
Table 5 Changes of tea catechins with *Lactobacillus* A fermentation

发酵时间(d)	不同发酵时间各儿茶素异构体的变化(mg/100ml)						儿茶素总量(mg/100ml)
	EGC	DL-C	EC	EGCG	GCG	ECG	
0	8.382	3.318	2.880	41.66	14.088	8.928	53.798
4	4.272	6.272	1.242	23.542	20.284	4.615	36.268
8	4.396	6.262	1.152	24.093	19.804	4.570	35.881
12	4.417	5.971	1.217	23.275	19.207	4.284	35.322
比率(%)	52.7	180.0	42.3	55.9	136.3	48.0	65.66

表6 乳酸菌P发酵过程中儿茶素的变化  
Table 6 Changes of tea catechins with *Lactobacillus* P fermentation process

发酵时间(d)	不同发酵时间各儿茶素异构体的变化(mg/100ml)						儿茶素总量(mg/100ml)
	EGC	DL-C	EC	EGCG	GCG	ECG	
0	8.382	3.318	2.880	41.66	14.088	8.928	53.798
4	3.636	6.762	1.302	22.749	19.759	4.856	35.625
8	3.704	6.925	1.389	21.924	18.783	4.225	33.658
12	3.608	7.535	1.456	20.916	17.595	4.041	32.941
比率(%)	43.0	227.1	50.6	50.2	124.9	45.3	61.23

表7 混合发酵前后各种儿茶素的变化  
Table 7 Changes of tea catechins in fermenting fluid after mixed-fermentation process

发酵时间(d)	不同发酵时间各儿茶素异构体的变化(mg/100ml)						儿茶素总量(mg/100ml)
	EGC	DL-C	EC	EGCG	GCG	ECG	
0	8.382	3.318	2.880	41.66	14.088	8.928	53.304
12	8.506	4.123	3.356	35.294	13.094	7.935	51.359
比率(%)	102.14	124.26	116.53	84.72	92.94	88.89	96.35

### 3 结论与讨论

#### 3.1 不同菌种对不同儿茶素的作用存在差异

裂殖酵母菌、产膜醋酸菌、乳酸菌、二混及四混培养至第12d,培养液中的EGCG、ECG的含量下降,菌种不同,开始下降的时间及速率存在差异。在培养

0~4d内,裂殖酵母菌、乳酸菌培养液中的EGCG、ECG含量急剧下降,乳酸菌培养液中的含量低于裂殖酵母菌,第5~12d的含量处于较稳定的状态。产膜醋酸菌在培养0~8d内,培养液中的EGCG、ECG含量变化很少,与产膜醋酸菌接种后迅速生长和酸度增加基本吻合。醋酸菌属于好氧性微生物,酵母菌是兼性好氧菌,

乳酸菌对氧的要求不是很严格。可能培养液中的 EGCG、ECG 含量的变化与培养液中的氧消耗及 pH 值变化有关。

裂殖酵母菌、产膜醋酸菌在培养至第 4 d, GCG、DL-C 含量下降幅度较大, 可能此二种菌利用或分泌物分解 GCG、DL-C 有关。裂殖酵母菌培养液中的 EGCG、ECG 含量下降, 而 EGC、EC 含量上升, 可以说 EGC、EC 增加的部分是 EGCG、ECG 降解的产物, 裂殖酵母菌或分泌物有降解表型酯型儿茶素的能力。产膜醋酸菌在 0~4 d 内, 培养液中的 EGCG 的含量稳定, EGC 含量有较大幅度上升, ECG 含量下降, 在 4~12 d, EGCG、ECG 含量才逐渐下降, EGC、EC 含量逐渐上升, 可以推测, 醋酸菌在培养前期能分解 ECG, 转化成 EC; 并具有降解 GCG、改变其空间结构的能力, 将 GCG 转化为 EGC。其机理有待进一步研究。

乳酸菌 A、P 在培养液中培养至第 12 d, 培养液中各种表型儿茶素均降低 50% 左右, 而 GCG、DL-C 都有较大幅度的增加, 说明 GCG、DL-C 由 EGCG、ECG 和 EC 分解、转化而来。乳酸菌 A、P 或其发酵液具有较强的变构能力。

### 3.2 不同菌种混合培养的复合作用

红茶菌是一种共生菌, 各菌共同组成一个微生态系

统, 相互存在促进和抑制作用。裂殖酵母、产膜醋酸菌混合培养的培养液中的酯型儿茶素含量都呈下降趋势, EGCG、ECG 下降幅度比单独培养的培养液大, 二者混合培养有促进 EGCG、ECG 降解的作用。酵母菌、醋酸菌和乳酸菌 A、P 混合培养 12 d, 其培养液中的简单儿茶素含量略有增加, 酯型儿茶素下降幅度均在 15% 以下, 其培养液中酯型儿茶素含量远远高于酵母菌、醋酸菌混合培养液, 其培养液中各种儿茶素的含量均保持 84% 以上, 似乎乳酸菌 A、P 有抑制酯型儿茶素降解的作用。因此在制作红茶菌发酵饮料时, 以采用含乳酸菌的菌种较好。

### 参考文献:

- [1] 苑晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 329.
- [2] 顾学华. 健康长寿饮料——红茶菌[M]. 福州: 福建科技出版社, 1981.
- [3] 谢俊杰, 余世望. 培养条件对红茶菌生长及抗菌作用的影响[J]. 食品工业科技, 2000, 21(3): 21-23.
- [4] 陈暄, 屠幼英. 茶叶和红茶菌中有效成分对肠道微生态平衡的作用[J]. 中国茶叶加工, 2001(2): 31-33.
- [5] TU Y Y, XIA H L, WATANABE N. Changes in catechins during the fermentation of green tea[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2005, 41(6): 574-577.



## 日本发明用植物净化水质新方法

日本三得利公司日前宣布开发出一种利用植物净化水质的新方法, 这一办法就是改造蓝翅蝴蝶草(俗名蓝猪耳)基因, 使其能够大量地吸收水中的磷。

湖泊和人一样, “营养过剩”会引发一系列“健康”问题。如果富含磷、氮等化学物质的工农业污水排入湖泊, 就会导致湖水“营养过剩”, 水中微生物过度繁殖, 水质下降。

据日本《东京新闻》网站报道说, 日本研究人员从十字花科植物拟南芥中选取一些和吸收、蓄积磷密切相关的基因, 将其“移植”到蓝翅蝴蝶草中, 这种转基因蓝翅蝴蝶草吸收磷的能力提高到原来的 3 倍到 6 倍。

报道称, 三得利公司开发的这种水质净化法成本较低, 不仅可以用于净化水质, 吸收大量磷的蓝翅蝴蝶草还可以用作很好的农田肥料。

Öâ'óÀû¿ÆÑÐ-çlÖl÷:ªÊÁÆα¿ÉÖÆx÷  
»·±£ËÜÁï'ü

最近, 意大利生物化学分子研究所的科研人员研究发现, 废弃的西红柿皮可用来制作无污染的可降解塑料袋。

该研究所的研究人员称, 西红柿废料尤其是西红柿皮可提取复合糖化物, 经过提炼和净化, 可转化成为一系列可降解的环保塑料制品, 包括人们购物经常使用的塑料袋以及在农田使用的塑料薄膜等。目前, 这一研究成果已经成为开发项目, 并得到了意大利政府的资金支持, 正在南部城市那不勒斯市的一些企业中生产。

西红柿废料的再利用将成为一种潜力巨大的经济资源。另据报道, 西红柿废料迄今已被成功地用于制造树脂、人造血浆产品及一些医疗用品等。