

mass spectrometry Publication: European Food Research and Technology (Zeitschrift Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung Authors.

- [20] Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography[J]. Source Journal of Agri-

cultural & Food Chemistry.2001,49(1): 26-31.

- [21] Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Source Journal of Agricultural & Food Chemistry,2000,48(9):3990-3996.

HPLC 法检测红茶菌中葡萄糖代谢曲线 及培养基的优化研究

田文礼, 籍保平*, 李 博, 张 泓

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 本实验室从红茶菌中分离出可以产生高含量的功能因子—葡萄糖二酸 1,4 内酯的菌株——葡萄糖醋酸杆菌 (*Gluconacetobacter sp.* A22)。本文利用高效液相色谱法检测葡萄糖, 通过对葡萄糖代谢曲线的测定, 确定了发酵时间为 126h(30℃, 160r/min 振荡培养)。发酵结束时, 残糖量与初始葡萄糖浓度呈线性关系: $y=40.254x-35.862$ ($R^2=0.9999$)。对 A22 培养基的优化进行了研究, 结果表明, 葡萄糖浓度 5% (w/v)、茶叶浓度 0.5% (w/v) 时最适合 A22 发酵生产功能性饮料。

关键词: 红茶菌; 葡萄糖醋酸杆菌; HPLC; 培养基优化; 葡萄糖代谢曲线

Determination of the Curve of Glucose Consumption of Kombucha by HPLC and Optimization of Culture Medium

TIAN Wen-li, JI Bao-ping*, LI Bo, ZHANG Hong

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: *Gluconacetobacter sp.* A22 was isolated from the symbiotic culture of Kombucha made in the lab. It could produce plenty of d-Saccharic acid 1,4 lactone. Glucose was determined with HPLC. The fermentation period was confirmed for 126h by the curve of glucose consumption (The flasks were incubated at 30℃ and agitated at 160r/min). At the end of fermentation, the concentration of residual glucose was linear with initial concentration of glucose: $y=40.254x-35.862$ ($R^2=0.9999$). The optimal medium was glucose 5% (w/v) and black tea 0.5% (w/v) for functional beverage.

Key words: kombucha; *Gluconacetobacter sp.*; HPLC; optimization of culture medium; the curve of glucose consumption

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)02-0161-03

红茶菌酸性饮料是以糖茶水为原料, 经多种微生物 (主要是酵母菌和醋酸菌) 共同发酵而成^[1]。菌液中含有一部分茶叶浸出物、活的微生物以及其代谢产物, 这些物质主要包括葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、葡萄糖二酸 1,4 内酯、醋酸、葡萄糖、果糖、蛋白质、氨基酸、维

生素、微量元素、茶多酚、咖啡因、乙醇、甘油和 CO₂ 等^[2-4]。红茶菌的这些物质成分决定了它是一种对人体健康有益无害的酸性饮料。近年来, 国内外分别展开了对红茶菌菌种分离鉴定、发酵工艺条件、细菌纤维素、抗菌性等方面的研究^{[3][5-8]}。

收稿时间: 2004-01-05

* 通讯联系人

作者简介: 田文礼(1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。

本实验室从红茶菌中分离出可以产生高含量的功能因子—葡萄糖二酸 1,4 内酯的菌株——葡萄糖醋酸杆菌 (*Gluconacetobacter* sp. A22)^[9]。葡萄糖二酸 1,4 内酯可使肝素、透明质酸、硫酸粘多糖以及葡萄糖醛酸的破坏大大减少,帮助身体更有效地排出毒素,防癌抗癌,并缓解关节炎、痛风、气喘和相关组织功能下降所引起的其它不适。在 Kim 等人(1994)的研究中,0.03~0.15 mg/ml 的葡萄糖二酸 1,4 内酯能显著抑制正常人和结肠癌患者的肠道细菌产生的、粪便中存在的葡萄糖苷酸酶的活性^[10]。本文对 A22 的葡萄糖代谢曲线及培养基的优化进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 *Gluconacetobacter* sp. A22(本实验室保藏),保存在斜面培养基(葡萄糖 100g,酵母浸出物 10g,碳酸钙 20g,琼脂 15g,蒸馏水 1000ml, pH6.8)。

红茶 由超市购进的云南红碎茶。

1.2 仪器

岛津 LC-10AT 型液相色谱仪;

岛津 RID-10A 型示差折光检测器;

CLASS-10AVP(6.10)化学工作站;

色谱柱:Kromasil KR100-5NH₂(150×6mm, 5μm);

PHS-25 型 pH 计;上海雷磁仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 最适葡萄糖浓度的确定和葡萄糖代谢曲线的测定

种子液制备 用接种环分别从斜面接 1 环至两只装有 10ml 的液体培养基(葡萄糖 100g,酵母浸出物 10g,碳酸钙 20g,蒸馏水 1000ml, pH6.8)的试管中,于 30℃ 振荡培养 24h,然后经过两次连续扩大培养,培养基为 1.5%(w/v)茶叶+10%(w/v)葡萄糖,接种量为 20%,30℃ 振荡培养,培养时间为 24h。

培养基制备 取 60.00g 红茶,用刚沸腾过的蒸馏水浸泡 3 次,每次 10min,配成 1.5% 的红茶水 4000ml;用上述红茶浸提液分别溶解 37.50g、75.00g、112.50g、150.00g、187.50g 葡萄糖,定容至 750ml,配成葡萄糖 5%、10%、15%、20%、25% 的糖茶水。再把每份按每瓶 150ml 分装至 5 个 250ml 的三角瓶中,棉塞封口后 121℃ 灭菌 15min。

将活化好的 A22 种子液接入上述各三角瓶中,接种量为 10%,置于 30℃ 的摇床中振荡培养。在 0h、6h、18h、30h、42h、54h、66h、78h、90h、102h、114h、126h、138h 取样稀释适宜的倍数经微孔滤膜过滤至 1ml 离心管中,经高效液相色谱检测葡萄糖含量,并于 126h 检测总酸含量。

1.3.2 最适茶叶浓度的确定

在上述试验的基础上确定葡萄糖最适浓度为 5%,因此在做种子液时将扩大培养培养基调整为:1.5%(w/v)茶叶+5%(w/v)葡萄糖。

培养基制备 分别取 3.00g、5.00g、10.00g、15.00g、

20.00g 红茶,用刚沸腾过的蒸馏水浸泡 3 次,每次 10min,配成 0.3%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的红茶水各 1000ml;用上述红茶浸提液分别溶解 50.00g 葡萄糖,定容至 1000ml,配成茶叶浓度为 0.3%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%,葡萄糖浓度为 5% 的糖茶水。再把每份按每瓶 300ml 分装至 3 个 500ml 的三角瓶中,封口后 121℃ 灭菌 15min。

将活化好的 A22 种子液接入上述各三角瓶中,接种量为 10%,置于 30℃ 的摇床中振荡培养。第 0h、第 24h、第 48h、第 72h、第 96h、第 126h 时检测总酸含量。

每一个试验做三个平行样,结果取平均值。

1.4 检测方法

1.4.1 葡萄糖的测定

检测葡萄糖所采用的色谱条件如下:

(1) 流动相 乙腈(色谱纯,迪马公司):水(v:v=77.5:22.5);流速:1.0ml/min;

(2) 柱温 38℃;

(3) 检测池温度 40℃;

(4) 进样量 20μl。

1.4.2 总酸的测定 电位滴定法,GB/T15038-94,总酸以葡萄糖酸计(A22 发酵产物中葡萄糖酸为主体酸)。

2 结果与分析

2.1 最适葡萄糖浓度的确定

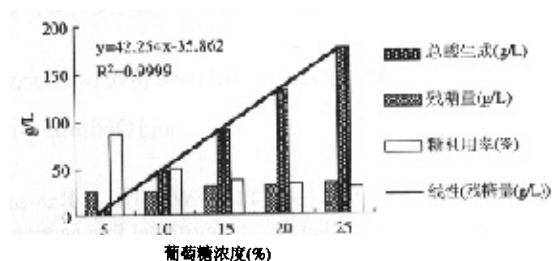


图1 初始葡萄糖浓度对总酸生成、残糖、糖利用率的影响

初始葡萄糖浓度对总酸生成、残糖量、糖利用率的影响见图 1。在初始葡萄糖浓度不同时, A22 对葡萄糖的利用、产酸情况也各不相同。残糖随初始葡萄糖浓度的增大而增大,在葡萄糖浓度 5% 时,残糖最低为 6.64g/L,葡萄糖浓度 25% 时,残糖最高,高达 176.08g/L,并且残糖量与初始葡萄糖浓度呈线性关系: $y = 40.254x - 35.862$ ($R^2 = 0.9999$), x : 初始葡萄糖浓度(g/L), y : 残糖量(g/L); 随初始葡萄糖浓度的增加,糖利用率降低,从 86.7%(5% 葡萄糖)降低至 29.6%(25% 葡萄糖);同时考虑总酸的生成,可以看出随初始葡萄糖浓度的提高,总酸的量增长幅度不大,仅从 26.6g/L 升至 36.0g/L。

在考虑最适合 A22 发酵的葡萄糖浓度时,应该综合考虑耗糖量、糖利用率和总酸的生成情况。在初始

葡萄糖浓度不同时, A22 对糖的利用率有较大的差异, 其耗糖值的增加远小于初始葡萄糖的添加量; 而产酸能力也没有随糖浓度提高而相应提高。高糖浓度又造成资源浪费, 故选择初始葡萄糖浓度 5%, 既提高糖利用率, 又降低残糖量。

2.2 葡萄糖代谢曲线的测定

1. 葡萄糖检测色谱图

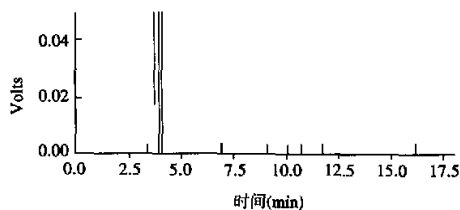


图2 样品高效液相检测色谱图

依上述条件测定的葡萄糖保留时间为 13.6445 min(如图 2)。

2. 葡萄糖的代谢曲线

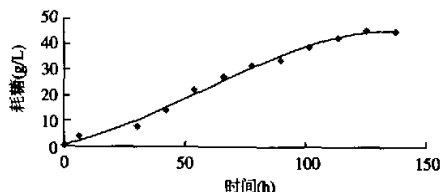


图3 5% 葡萄糖的代谢曲线

初始浓度为 5% 的葡萄糖代谢曲线见图 3。耗糖量与发酵时间呈现以下关系: $y = -2E - 5x^3 + 0.0039x^2 + 0.2154x + 0.7024$ ($R^2 = 0.9917$), 在发酵前 126h 内, 随培养时间的延长耗糖量增加, 在培养 126h 后, 耗糖量出现平缓趋势。从 A22 对葡萄糖的代谢曲线来看, 在 30℃ 下振荡培养以 126h 为宜。

2.3 最适茶叶浓度的确定

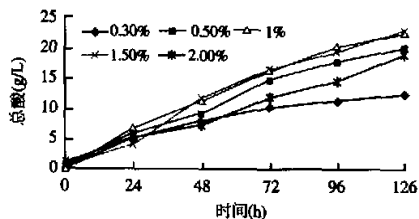


图4 不同茶叶浓度在发酵过程中总酸的变化

不同茶叶浓度在发酵过程中总酸的变化见图 4。由图 4 可见, 不同茶叶浓度的处理其初始总酸为 0.2~1.3g/L, 但随着发酵进行, 不同茶叶浓度的总酸含量呈现不同程度的增长。发酵第 126h, 总酸生成量在茶叶浓度为 0.3%~1.5% 时随茶叶浓度增大而增大, 继续提高茶叶浓度至 2.0% 时, 总酸生成量反而下降。0.5%、1%、1.5% 的

茶叶浓度其最终总酸含量差不多, 在 2% 的茶叶浓度下生成总酸反而略微降低, 这可能由于高浓度的茶叶含有较多的咖啡因和单宁, 从而抑制 A22 代谢葡萄糖产酸。而低浓度的茶叶则有可能因为所提供的氮源不足而不利于菌体生长。0.5% 茶叶的总酸为 20.1g/L 略低于 1% 茶叶(22.8g/L), 同时由于茶叶浓度高, 发酵液颜色呈深褐色, 沉淀较多, 影响后续处理, 并浪费茶叶, 增加产品成本, 因此选择茶叶添加量少、总酸生成相对较多的 0.5% 茶叶最合适。

3 结 论

通过对葡萄糖代谢曲线的测定, 确定发酵时间为 126h(30℃, 振荡培养)。残糖量与初始葡萄糖浓度呈线性关系: $y = 40.254x - 35.862$ ($R^2 = 0.9999$), x : 初始葡萄糖浓度(g/L), y : 残糖量(g/L)。通过对 A22 的培养基进行优化, 得出: 30℃, 160r/min 振荡培养, 以葡萄糖为碳源, 5%(w/v) 的葡萄糖以及 0.5%(w/v) 的茶叶最适合 A22 发酵生产功能性饮料, 此时 A22 利用葡萄糖发酵产酸能力较强, 且发酵结束的残糖量较低, 茶叶沉淀少, 颜色清亮, 涩味不明显。

参考文献:

- [1] C J GREENWALT, K H STEINKRAUS, R A LEDFORD. Kombucha, the fermented tea: microbiology, Composition, and claimed health effects[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(7):976-981.
- [2] Blanc P J. Characterization of the tea fungus metabolites[J]. Biotechnology Letters, 1996, 18:139-142.
- [3] C H Liu, W H Lee, et al. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation[J]. Food Microbiology, 1996, 13:407-415.
- [4] 段葆兰. 健康之友红茶菌[M]. 科学普及出版社, 1982.
- [5] Fumihiro Yoshinaga & etc. Research progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Application as a New Industrial Material[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 61(2):219-224.
- [6] Mi Ae Choi, et al. Effects of saccharides and incubation temperature on pH and total acidity of fermented black tea with tea fungus[J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 28(3):405-410.
- [7] Guttapadu Sreeramulu. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity[J]. J Agric Chem, 2000, 48:2589-2594.
- [8] C J Greenwalt. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha[J]. Lebensm Wiss u Technol, 1998, 31:291-296.
- [9] 吴薇. 功能性茶菌饮料的菌种分离鉴定及糖代谢的研究[D]. 中国农业大学硕士论文, 2002.
- [10] Kim-DH, et al. Purification and characterization of beta-glucuronidase from Escherichia coli HGU-3, a human intestinal bacterium[J]. Biol-Pharm Bull, 1995, 18(9):1184-1188.