

# 红茶菌发酵普洱茶茶汤过程中主要成分变化

赵振军<sup>1</sup>, 周黎<sup>2</sup>, 刘勤晋<sup>2,\*</sup>

(1.西南大学园林园艺学院, 重庆 400716; 2.西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

**摘要:**以蔗糖(50g/L)、不同贮藏年份的普洱茶(8g/L)为主要原料制成的糖茶水,经微孔滤膜除菌后接种红茶菌母液发酵,于28℃恒温静置培养8d,研究微生物总数、pH值、茶多酚、总酸度、蛋白质含量、成膜生物量及发酵液中高沸点物质的动态变化规律。结果表明:采用普洱茶茶汤培养的红茶菌,发酵过程中各项基本指标(如微生物总数、pH值等)的变化规律与采用绿茶或红茶茶汤发酵没有多大差异,说明普洱茶茶汤是培养红茶菌的较好原料;发酵过程中采用GC-MS从发酵液中共鉴定到了35种非挥发性成分,其中主要是醇类(14种)和酸类(13种),发酵初期(0~4d)以产生醇类物质为主,之后则以酸类物质为主;柠檬酸、nonahexacontanoic acid、2,6-十六烷基-1(+)-抗坏血酸酯等物质出现在菌液成熟期(7d),可能是成熟的红茶菌菌液中起保健作用的关键成分。

**关键词:**红茶菌;普洱茶;化学成分

## Variations in Major Components of Pu-erh Tea Infusion during Fermentation by Kombucha Culture

ZHAO Zhen-jun<sup>1</sup>, ZHOU Li<sup>2</sup>, LIU Qin-jin<sup>2,\*</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Different storage-age Pu-erh tea (1, 5, 10 years) infusion (8 g/L) sweetened with sucrose 50 g/L was filtrated and inoculated with kombucha culture for 8-day fermentation at 28 °C. The fermentation broth was dynamically analyzed for microbial population, pH, tea polyphenols, total acidity, protein and biomass as well as high-boiling-point substances. Results showed that there were no obvious differences in microbial population, pH values, etc. between Pu-erh and green or black tea infusion fermented by kombucha culture. Therefore, Pu-erh tea infusion was an excellent matrix for kombucha fermentation. Added together, 35 non-volatile components (mainly including 14 alcohols and 13 acids) were identified by GC-MS in different storage-age Pu-erh tea infusion fermented by kombucha for 3, 4, 6, 7 days and 8 days. Alcohols were detected with the most frequencies at the initial fermentation stage (0–4 days), and acids were dominant later. Citric acid, nonahexacontanoic acid, 1-(+)-ascorbic acid, 2, 6-dihexadecanoate, etc. were detected in the maturation period (the 7<sup>th</sup> day), which may be the crucial constituents in favor of health in fermented Pu-erh tea infusion by kombucha.

**Key words:** kombucha; Pu-erh tea; chemical components

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)01-0079-05

普洱茶是起源于中国云南的一种独特的微生物发酵茶类,刘勤晋<sup>[1]</sup>和周红杰等<sup>[2]</sup>先后对普洱茶发酵过程中的真菌种群进行分离鉴定,研究发现,其中主要的微生物是曲霉和酵母。最初普洱茶是中国西南地区少数民族的一种传统饮料,而进入21世纪,普洱茶因其具有抑制脂肪酸合成酶基因表达<sup>[3]</sup>,清除自由基<sup>[4-5]</sup>,降低总的胆固醇<sup>[6]</sup>等保健功能而在香港、台湾、东南亚地区甚至

在西方国家都受到了广泛关注。

红茶菌菌液是由酵母和醋酸菌共同发酵添加有可溶性糖的茶汤,而形成的一种略带甜酸风味的茶饮料<sup>[7]</sup>。它起源于中国的东北地区,后来因其发酵液对人体多种慢性疾病,如胃病、关节疼痛、高血压等具有很好的辅助疗效而传播至俄罗斯、日本、美国乃至世界各地<sup>[8]</sup>。

发酵红茶菌的茶类主要是绿茶和红茶。蒋立文等<sup>[9]</sup>

收稿日期: 2009-04-23

基金项目: 云南省普洱茶关键技术研究项目(2007YNCXB-01-01)

作者简介: 赵振军(1976—),男,博士研究生,研究方向为茶饮料开发与食品安全。E-mail: zzjnau@126.com

\*通信作者: 刘勤晋(1939—),男,教授,研究方向为茶叶加工与综合利用。E-mail: liuqinjin@163.com

以绿茶为主要原料制成的糖水作发酵基质,研究了红茶菌发酵过程中主要化学成分变化, Jayabalan 等<sup>[10]</sup>分别以绿茶和红茶茶汤为原料,发酵红茶菌,深入研究了发酵液中有机酸和茶多酚组分的变化规律。迄今为止,鲜见有用普洱茶特别是熟普洱茶茶汤做发酵液培养红茶菌的报道,而且红茶菌代谢过程中产生的主要化学成分也未见系统报道。

本实验利用不同贮藏年份的普洱茶茶汤发酵红茶菌,对红茶菌在发酵过程中的基本指标(各菌种的增殖、pH 值、茶多酚、总酸度、蛋白质含量、成膜生物量)做比较分析,并应用 GC-MS 对红茶菌代谢过程中产生的非挥发性化学成分进行动态跟踪研究,以期对红茶菌发酵普洱茶机理提供化学依据,为揭示红茶菌保健价值提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

菌种为俄罗斯纯正红茶菌菌种,购自黑龙江红茶菌网;不同贮藏年份的普洱茶(1、5、10 年普洱茶)为西南大学茶叶研究所收藏。

牛血清白蛋白 上海伯奥生物科技有限公司;孟加拉红培养基 天津浩连科技发展有限公司;察氏培养基:硝酸钠 3g、磷酸氢二钾 1g、硫酸镁 0.5g、氯化钾 0.5g、硫酸亚铁 0.01g、蔗糖 30g、琼脂 20g、蒸馏水 1000mL。

### 1.2 仪器与设备

2010 气相色谱-质谱联用仪 岛津公司;超净工作台 苏州净化设备有限公司;pH 计 Auror 公司。

### 1.3 方法

培养方法:分别称取 8g 不同普洱茶样品,加 1L 沸水,浸提 15~20min,纱布过滤去除茶渣,滤液冷却至 60℃,加入 50g 蔗糖,冷却至室温后,用 0.45 μm 微孔滤膜抽滤除去细菌,将无菌茶汤分装至 250mL 三角瓶中(每瓶 150mL),然后在每个三角瓶中接种 20mL 红茶菌母液,盖上透气的封口薄膜,放入 28℃ 培养箱中培养。分别在 3、4、6、7、8d 时,每个茶样各取一瓶红茶菌培养液用于相关指标检测。

样品的 pH 值采用 pH 计测定。总酸度测定参考食品中总酸的测定方法(GB/T 12456—90),以氢氧化钠和酚酞做指示剂,采用滴定方法来测定。

红茶菌培养液中的酵母和细菌的计数应用平板稀释法,酵母计数利用孟加拉红培养基,细菌计数应用察氏培养基。经过稀释后的红茶菌培养液分别涂布在不同培养基上,放于培养箱中培养(细菌在 30℃ 培养 3d 后计数;酵母在 25℃ 培养 5d 后计数)。

红茶菌膜生物量测定:分别在 3、4、6、7、8d 时,取出在发酵菌液中漂浮的红茶菌菌膜,用蒸馏水漂洗后,置于 110℃ 恒温箱内烘至恒重称重。

茶多酚含量测定:采用酒石酸亚铁比色法测定(GBT83813—2002)。

发酵茶汤蛋白质含量测定:采用考马斯亮蓝测定法。以牛血清白蛋白作标准品对照。

非挥发性成分提取(参照文献[11]):取 1mL 茶汤,加入 0.4mL 50% 浓度的硫酸和 2mL 甲醇,混合均匀后于 60℃ 水浴处理 1h,酯化后加入 1mL 氯仿,振摇 40 次,然后于 4000r/min 离心 10min,取底部氯仿层用于 GC-MS 分析。

GC-MS 分析条件:进样口温度 260℃,不分流;氦气流速 1.0mL/min 色谱柱 Rtx-SMS,长度 30.0m,程序升温:起始温度 40℃ 保持 3min,10℃/min 升温,直到 260℃,保持 3min;MS:离子源温度 230℃,扫描范围 5~550amu;溶剂(三氯甲烷)延迟 3.0min。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵过程中发酵液微生物种群数量与膜生物量的变化

在红茶菌以不同贮藏年份的普洱茶茶汤为基质的发酵过程中,细菌和酵母菌的总数变化均呈现先增长后减少的趋势(表 1),但是与 5、10 年普洱茶茶汤发酵液相比,1 年普洱茶茶汤发酵液中细菌和酵母总数变化规律略有不同,5 年和 10 年普洱茶茶汤发酵液中细菌和酵母菌总数变化趋势几乎一致:发酵之初细菌和酵母菌立即大量繁殖,在发酵第 3 天时细菌和酵母总数达到最大值,此后大幅度减少;1 年的普洱茶茶汤发酵液中细菌和酵母开始时繁殖速度相对较慢,细菌总数在发酵第 4 天才达到最大值  $2.7 \times 10^9$  CFU/mL,酵母菌总数在发酵第 6 天达到最高值  $2.1 \times 10^8$  CFU/mL,此后逐渐减少。

总体来说,以不同贮藏年份的普洱茶茶汤为基质发酵,红茶菌菌膜生物量随着发酵进程(时间 3~8d),而逐渐增加(表 1),膜干重变化在 0.051~0.096g 之间。发酵第 2 天时,在液面即形成完整的菌膜,此后生物量增长随着茶样的不同而出现细微的变化,1、5 年的普洱茶茶汤发酵液中,菌膜干重先增加(分别在第 6、7 天干重达到最高值 0.088g 和 0.093g),后逐渐降低(1 年陈普洱茶茶汤中第 8 天干重最低降至为 0.044g),10 年的普洱茶茶汤发酵液中菌膜干质量基本上是逐渐增加,在第 7 天达到最高值 0.096g。相较而言,以不同贮藏年份的普洱茶茶汤为基质发酵,红茶菌菌膜生物量大小为 10 年普洱茶 > 5 年普洱茶 > 1 年普洱茶。

表1 不同贮藏年份普洱茶红茶菌发酵液中细菌、酵母总数和菌膜生物量的变化

Table 1 Total number of bacteria, yeast count and membrane biomass in different storage-age Pu-erh tea infusion fermented by kombucha for 3, 4, 6, 7 days and 8 days

| 普洱<br>茶样<br>品 | 3d                |                   |          | 4d                |                   |          | 6d                |                   |          | 7d                |                   |          | 8d                |                   |          |
|---------------|-------------------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|----------|-------------------|-------------------|----------|
|               | 细菌<br>总数          | 酵母<br>总数          | 膜生<br>物量 | 细菌<br>总数          | 酵母<br>总数          | 膜生<br>物量 | 细菌<br>总数          | 酵母<br>总数          | 膜生<br>物量 | 细菌<br>总数          | 酵母<br>总数          | 膜生<br>物量 | 细菌<br>总数          | 酵母<br>总数          | 膜生<br>物量 |
| 1年            | $1.1 \times 10^9$ | $2.3 \times 10^4$ | 0.049    | $2.7 \times 10^9$ | $2.5 \times 10^5$ | 0.052    | $1.8 \times 10^7$ | $2.1 \times 10^6$ | 0.088    | $2.8 \times 10^6$ | $1.6 \times 10^6$ | 0.081    | $4.1 \times 10^6$ | $1.9 \times 10^6$ | 0.082    |
| 5年            | $6.9 \times 10^9$ | $4.3 \times 10^7$ | 0.050    | $1.0 \times 10^9$ | $5.3 \times 10^6$ | 0.055    | $7.3 \times 10^5$ | $2.7 \times 10^6$ | 0.064    | $4.1 \times 10^4$ | $3.9 \times 10^5$ | 0.094    | $2.0 \times 10^4$ | $7.3 \times 10^5$ | 0.092    |
| 10年           | $7.3 \times 10^9$ | $3.1 \times 10^7$ | 0.051    | $3.7 \times 10^8$ | $2.3 \times 10^6$ | 0.072    | $3.0 \times 10^7$ | $6.0 \times 10^6$ | 0.085    | $8.9 \times 10^4$ | $6.5 \times 10^5$ | 0.096    | $1.4 \times 10^4$ | $7.4 \times 10^5$ | 0.095    |

注：细菌、酵母菌总数单位为CFU/mL，膜生物量单位为g。

### 2.2 发酵过程中总酸度与pH值的变化

不同贮藏年份的普洱茶茶汤初始pH值差异不大，在6.68~6.70之间，经过红茶菌发酵后，发酵液pH值和总酸度都会发生显著的变化，pH值和总酸度成负相关，即随着酸度的增加pH值逐渐降低(图1)。在发酵开始第3天，pH值快速降低(4.0左右)，3d之后pH值变化缓慢，至第7天降至最低(2.9~3.0)，7d之后开始缓慢回升，第8天pH值升至3.5~3.7之间，在发酵期间，酸度变化呈现与pH值变化相反的趋势，即先升高(第7天10年的普洱茶茶汤发酵液酸度达到最高点2.59)后降低。3种普洱茶茶汤发酵液在发酵第7天时，最大酸度之大小为10年普洱茶>5年普洱茶>1年普洱茶。

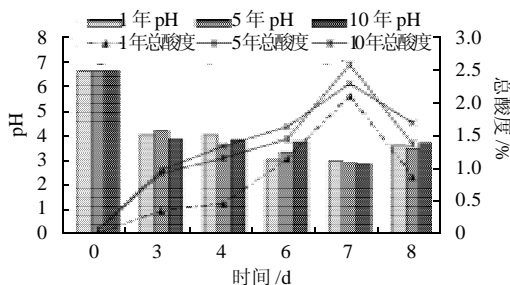


图1 发酵过程中总酸度和pH值的变化

Fig.1 Variations of total acidity and pH in different storage-age Pu-erh tea infusion during fermentation by kombucha

### 2.3 发酵过程中茶多酚和蛋白质含量的变化

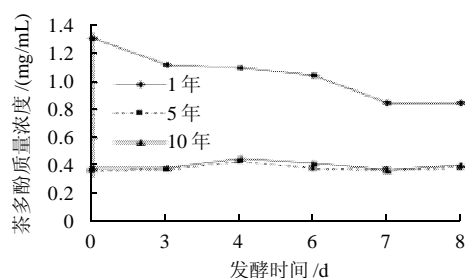


图2 发酵过程中茶多酚质量浓度的变化

Fig.2 Variations of tea polyphenols in different storage-age Pu-erh tea infusion during fermentation by kombucha

1年的普洱茶茶汤茶多酚总量明显高于5、10年的普洱茶茶汤(约是5、10年普洱茶茶多酚含量的3倍)，在红茶菌发酵过程中，5、10年的普洱茶茶汤发酵液中茶多酚含量几乎没有什么变化，而1年的普洱茶茶汤发酵液茶多酚总量会随着发酵进程缓慢降低(图2)。

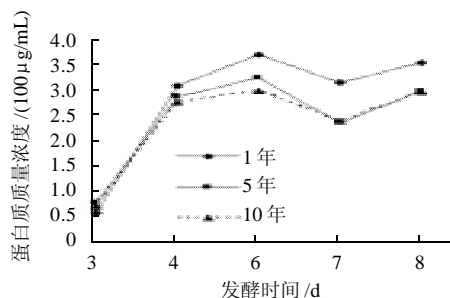


图3 发酵过程中的蛋白质含量变化

Fig.3 Variations of protein in different storage-age Pu-erh tea infusion during fermentation by kombucha

从图3可以看出，经红茶菌发酵过的不同贮藏年份的普洱茶茶汤中，蛋白质均有明显增长，且变化趋势基本一致：含量先增加，第6天达到最高值(0.30~0.37mg/mL)，第7天蛋白质含量有一个降低的过程，此后缓慢回升。

### 2.4 红茶菌发酵过程中非挥发性成分动态变化

利用GC-MS对红茶菌发酵液进行分析，鉴定一些非挥发性化学成分，并根据它们的变化规律做分类。这些成分大致可以分为两类：发酵液中固有成分(始终存在于整个发酵过程中)；发酵过程中产生的新兴成分(表2)。发酵液中的固有主要成分有：丁二酸、邻苯二甲酸、2,4-二叔丁基苯酚、咖啡碱、邻苯二甲酸二异丁酯、棕榈酸、邻苯二甲酸二丁酯、硬脂酸以及多种烷烃等20种物质，它们来源于普洱茶茶汤，稳定存在于红茶菌发酵液之中。

发酵过程中鉴定到的非挥发性成分有35种，隶属于5大类：醇类14种、酸类13种、酯类4种、醛类2种、其他(包括醚)2种。从表2可以看出这些物质出现的动态规律：发酵3~4d，物质种类以醇类为主，同

表2 红茶菌利用普洱茶茶汤发酵过程中出现的新化学成分动态变化

Table 2 Summary of non-volatile components in different storage-age Pu-erh tea infusion fermented by kombucha for 3, 4, 6, 7 days and 8 days

| 类别 | 化合物名称                  | 1年陈普洱茶 |    |    |    |    | 5年陈普洱茶 |    |    |    |    | 10年陈普洱茶 |    |    |    |    |   |   |
|----|------------------------|--------|----|----|----|----|--------|----|----|----|----|---------|----|----|----|----|---|---|
|    |                        | 3d     | 4d | 6d | 7d | 8d | 3d     | 4d | 6d | 7d | 8d | 3d      | 4d | 6d | 7d | 8d |   |   |
| 醇类 | 2,7-二甲基-4-辛烯-2,7-二醇    |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    | +  |   |   |
|    | 2-乙基-2-甲基-十三醇          |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    | + |   |
|    | 3,5-二甲基环己醇             |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    | +  | + |   |
|    | 5-甲基-2-哌嗪基甲醇           |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    | + |   |
|    | 苯乙醇                    |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇    | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
|    | 1-乙基-2-甲基环己醇           |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 3-甲基-2-异丙基环己醇          |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 2,6-二甲基-4-乙基-4-庚醇      | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
|    | 2,5-二甲基-4-己烯-3-醇       | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
| 醛类 | 2-异丙基-5-甲基-1-庚醇        | +      | +  | +  | +  |    | +      |    | +  | +  |    | +       |    | +  |    | +  | + |   |
|    | 2-甲基癸醇                 |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    | + |   |
|    | 2-己基-1-癸醇              | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    | + |   |
|    | 5-甲基-2-异丙基己醇           |        | +  | +  |    |    | +      | +  | +  |    | +  | +       | +  |    |    |    |   |   |
|    | Z-7-十六烯醛               | +      | +  |    |    |    | +      | +  |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
|    | 2,4-二甲基苯甲醛             |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    | + |   |
|    | 2-氧丙二酸                 |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    | + |   |
|    | 2-羟丙二酸                 |        |    |    | +  | +  |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 2-氧戊二酸                 |        |    |    | +  | +  | +      |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 2-甲基丁二酸                |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
| 酸类 | 2-氧戊酸                  |        |    |    |    |    | +      |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 4-氧戊酸                  |        |    |    |    |    | +      |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 柠檬酸                    |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 2-氧己酸                  |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 5-羟基-3,4,4-三甲基丙烯酸      | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
|    | 苯乙酸                    |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 2-羟-3-甲基丁酸             |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | nonahexacontanoic acid | +      | +  | +  |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 2-甲基-3-羟基戊酸            |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 3-甲基丙酸-2-丙烯酸酯          | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
| 酯类 | 甲氧基乙酸-4-十六烷酯           | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
|    | 邻苯二甲酸二异壬酯              |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
| 其他 | 2,6-十六烷基-1(+)-抗坏血酸酯    |        |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |
|    | 硫氰酸异龙脑                 | +      |    |    |    |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   |   |
|    | 癸醚                     | +      | +  | +  | +  |    |        |    |    |    |    |         |    |    |    |    |   | + |

注: +.GC-MS 鉴定到了该物质。

时有少量种类的酸产生, 发酵4~7d, 酸类物质大量出现, 只能检测到少数几种醇类物质, 发酵7d之后, 能检测到的酸类物质的种类也大幅减少, 此时几乎检测不到醇类物质的存在。醇类物质主要是在发酵的第3天和第4天检测到的, 酸类物质主要出现在发酵的6~7d, 其具体类别视不同陈年普洱茶茶汤而有较大差异, 醇类物质之中只有2-异丙基-5-甲基-1-庚醇、2-己基-1-癸醇、5-甲基-2-异丙基己醇等能在3种普洱茶茶汤发酵液中同时检测到, 而能同时从3种普洱茶茶汤发酵液中检测到的酸类物质较多, 如2-羟丙二酸、2-氧戊二酸、柠檬酸、nonahexacontanoic acid等。

红茶菌发酵液中检测到物质除了醇类和酸类之外, 还有属于醛类、酯类和醚类的几种物质。其中醚类(癸

醚)出现在整个发酵过程中, 而2,6-十六烷基-1(+)-抗坏血酸酯(酯类物质)是在红茶菌发酵7d(1年普洱茶茶汤发酵液是在7d时检测到的)之后检测到的, 它们都可能是红茶菌发酵液中最常见的成分。

### 3 讨论

过慈妹<sup>[12]</sup>曾研究过不同茶类茶汤对红茶菌生长及品质的影响, 认为黑茶茶汤培养红茶菌, 菌液浑浊, 产菌膜量少, 不适合培养红茶菌。本研究选择了同一厂家生产的3种不同贮藏年代的普洱茶(1、5、10年)来培养红茶菌, 在培养之前采用微孔滤膜抽滤方式去除普洱茶茶汤中的杂菌, 有效地避免了因为高温灭菌而使茶汤变黑与大量活性成分(如茶多酚、蔗糖等)遭到破坏。培

养结果显示,采用普洱茶茶汤来培养的红茶菌菌液汤色明亮,无混浊现象,发酵过程中的各种指标(如各菌种的增殖、pH值、茶多酚、总酸度、蛋白质含量、成膜生物量)变化规律与蒋立文等<sup>[9]</sup>采用绿茶或红茶茶汤发酵没有多大差异,而且在普洱茶茶汤发酵过程中的微生物(无论是醋酸菌还是酵母菌)总数要高于绿茶<sup>[8]</sup>和红茶<sup>[9]</sup>茶汤发酵液中的微生物总数,这说明普洱茶茶汤可以用来培养红茶菌,相比绿茶和红茶茶汤来说甚至更适合红茶菌的生长繁殖。

红茶菌中的主要微生物是酵母菌和醋酸菌<sup>[13]</sup>,吴薇等<sup>[14]</sup>从红茶菌中分离到了巴斯德酵母(*Saccharomyces pastorianus* Hansen)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe* Lindner)和醋化醋杆菌木质亚种(*Acetobacter xylinum*)等菌种。根据发酵液中酵母菌和醋酸菌种群数量的变化,可以把红茶菌发酵分为3个阶段:发酵初期,酵母菌和醋酸菌大量繁殖期(1~4d),这个时期,pH值迅速下降(第3天时就接近3左右),总酸度迅速增加,蛋白质含量和膜生物量也在增加,这与蒋立文<sup>[9]</sup>和 Sievers<sup>[15]</sup>等的研究结果一致;只是茶多酚含量变化和酵母菌和醋酸菌总数增长速度,因不同普洱茶茶汤而有差异,对5、10年普洱茶茶汤基质来说,细菌和酵母菌总数增长速度基本同步,都在发酵初期达到了最大值,茶多酚总量基本维持不变;而对于1年普洱茶茶汤发酵液来说,茶多酚含量成缓慢降低的趋势,细菌增长速度与5、10年普洱茶茶汤发酵液中大致相同,酵母菌增长速度要明显低于5、10年普洱茶茶汤发酵液(1年普洱茶发酵液在发酵第6天,酵母总数才达到最大值),这可能与1年普洱茶茶汤中茶多酚含量高于5、10年普洱茶茶汤有关,较高含量的茶多酚可能抑制了酵母菌的繁殖,5、10年普洱茶茶汤中低含量的茶多酚环境有利于酵母菌的生长。发酵中期(4~7d)、发酵后期(7d之后)这两个时期,3种不同茶样发酵液酵母菌和醋酸菌数量变化、酸度、pH值、茶多酚等参数变化缓慢且趋势基本相同。

发酵过程中,酵母菌和醋酸菌数量的变化与总酸度变化趋势一致,与pH值变化成负相关,说明酸度和pH值的变化是酵母菌和醋酸菌共同作用的结果,pH值和总酸度都可以作为衡量红茶菌发酵进程的重要指标<sup>[16]</sup>,本研究在发酵第7天pH值降至最低(2.9~3.0),酸度升至最高点(一定数量的二元酸的出现可能是pH值继续降低,酸度升高的主要原因),大量酸类物质的出现标志着红茶菌发酵进入了成熟期,就在这个时期,通过GC-MS,检测到了柠檬酸、nonahexacontanoic acid、2,6-十六烷基-1(+)-抗坏血酸酯等物质的存在,康杰芳等<sup>[17]</sup>发现2,6-十六烷基-1(+)-抗坏血酸酯是抗肿瘤药用植物小丛红景天中的主要成分(相对含量为6.27%),这些物质可能是成熟的红茶菌菌液中的关键成分,对这些成分的深入研究可

能会为揭示红茶菌保健机理提供新的思路。

Jayabalan等<sup>[10]</sup>研究了红茶菌在发酵期间醋酸、D-葡萄糖醛酸、乳酸和柠檬酸的动态变化,据此推测红茶菌发酵产酸的机理:酵母菌优先利用蔗糖转化酶把蔗糖水解为葡萄糖和果糖,然后产生乙醇;醋酸菌一方面利用葡萄糖产生葡萄糖酸,另一方面把酵母菌产生的乙醇转化成醋酸。本研究利用GC-MS,发现了发酵液中非挥发性成分的动态变化规律,据此推测:发酵初期酵母菌不仅能利用蔗糖,还能利用茶汤中的多种碳水化合物代谢产生多种醇类物质(本研究没有检测到乙醇,但检测到苯乙醇等14种醇类物质);然后醋酸菌将酵母菌代谢产生的多种醇类物质,实现醇-酸的转化(如苯乙醇向苯乙酸的转化)。此外,红茶菌发酵过程中不仅产生一元酸,还合成了一定数量的二元酸,二元酸的形成可能是红茶菌菌液酸度进一步增加(或pH值的降低)的关键因素,其代谢机理有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 刘勤晋,周才琼,许鸿亮,等.普洱茶的渥堆作用[J].茶叶科学,1986,6(2):55-56.
- [2] 周红杰,李家华,赵龙飞,等.渥堆过程中主要微生物对云南普洱茶品质形成的研究[J].茶叶科学,2004,24(3):212-218.
- [3] CHIANG C T, WENG M S, LIN S A, et al. Pu-erh tea supplementation suppresses fatty acid synthase expression in the rat liver through down regulating Akt and JNK signalings as demonstrated in human hepatoma HepG2 cells[J]. Oncology Research, 2006, 16(3): 119-128.
- [4] DUH P D, YEN G C, YEN W J, et al. Effects of Pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 8169-8176.
- [5] JIE G L, LIN Z, ZHANG L Z, et al. Free radical scavenging effect of Pu-erh tea extracts and their protective effect on oxidative damage in human broblast cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(21): 8058-8064.
- [6] KUO K L, WENG M S, CHIANG C T, et al. Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(2): 480-489.
- [7] AIDOO K E, NOUT M J R, SARKAR P K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(1): 30-39.
- [8] STEINKRAUS K H. Tea fungus/Kombucha[M]//STEINKRAUS K. Handbook of indigenous fermented food. New York: Marcel Dekker Inc, 1996: 493-496.
- [9] 蒋立文,刘德华,廖卢燕,等.红茶菌发酵过程中主要化学成分变化的研究[J].食品科学,2007,28(3):238-240.
- [10] JAYABALAN R, MARIMUTHU S, SWAMINATHAN K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation[J]. Food Chemistry, 2007, 102: 392-398.
- [11] 刘晓毅,许华,曹红,等.五株菌混合发酵及其五个单株菌发酵液的GC-MS酸性代谢产物分析[J].食品研究与开发,2008,29(2):133-136.
- [12] 过慈妹.红茶菌加工工艺研究[D].合肥:安徽农业大学,2007.
- [13] GREENWALT C J, LEDFORD R A, STEINKRAUS K H. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea Kombucha[J]. LWT Food Science and Technology, 1998, 31(3): 291-296.
- [14] 吴薇,盖宝川,籍保平.红茶菌混合菌种的分离与鉴定[J].食品科学,2004,25(4):55-58.
- [15] SIEVERS M, LANINI C, WEBER A. Microbiology and fermentation balance in a Kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1996, 18(4): 590-594.
- [16] MALBAS R, LONC E, DJURIC M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses[J]. Food Chemistry, 2008, 106: 1039-1045.
- [17] 康杰芳,王喆.小丛红景天挥发油化学成分的分析[J].第四军医大学学报,2006,27(22):2089-2091.