

DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.019965

冠突散囊菌发酵对荔枝草茶主要成分及风味的影响

杨立娜^{1,2,3} 吴凯为^{1,2,3} 徐清莹^{1,2,3} 王如意^{1,2,3} 曲歌^{1,2,3} 吴昊桐^{1,2,3} 朱力杰^{1,2,3} 马涛^{1,2,3*}

1(渤海大学 食品科学与工程学院 辽宁 锦州 121013)

2(生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁 锦州 121013)

3(辽宁省食品安全重点实验室 辽宁 锦州 121013)

摘要 以荔枝草(*Salvia plebeia*)鲜叶为原料,冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)作为发酵剂进行发酵,研究荔枝草茶在不同发酵阶段主要品质成分含量的变化,并使用电子鼻和电子舌分析发酵前后的风味差异。结果表明,在发酵过程中,茶多酚、氨基酸和可溶性糖含量逐渐减少,分别降低了31.9%、36.3%、25.2%;茶黄素、茶红素和茶褐素逐渐增加,分别增长了3.02倍、1.73倍、1.29倍;发酵后的荔枝草茶和发酵前相比风味有明显差异,苦味和涩味都呈下降趋势。该研究首次将荔枝草和冠突散囊菌结合制备功能性发酵茶,为荔枝草茶的商品化奠定良好基础。

关键词 荔枝草;冠突散囊菌;发酵;品质成分;风味

荔枝草是一种来自民间的传统小型中草药,属于唇形科植物^[1]。广泛分布于亚洲和大洋洲,尤其是在中国和印度的湿地中^[2]。药理学研究表明,荔枝草具有抗炎活性、抗病毒、保肝等活性作用,其粉末具有很强的抗氧化活性^[3-6],这和荔枝草中含有的茶多酚、氨基酸、茶色素、茶多糖有密切的关系。荔枝草一直以来被用于治疗咳嗽、肝炎和腹泻等炎症疾病^[7],从荔枝草中可以分离出很多天然产品,包括黄酮类、木脂素类、二萜类化合物、倍半萜类化合物等,它们都具有广泛的生物活性^[8]。

冠突散囊菌是茯砖茶生产过程中产生的优势菌种,具有降脂、抗氧化和抗肿瘤等生理活性^[9-10]。在发酵过程中产生多种酶类,可以分解利用茶叶中的大分子物质,使活性成分发生复杂的变化,通过“发花”这道独特的工序改善茯砖茶原有品质^[11-12]。茶叶香气作为评价茶叶好坏的一个重要指标,直接影响着茶叶的品质以及消费者的认可程度,在发酵过程中,冠突散囊菌产生特有的香气物质,能有效地改善荔枝草发酵茶的感官品质^[13],研究中使用电子鼻和电子舌进行发酵前后荔枝草发酵茶的风味变化差异分析。本实验采用冠突散囊菌固态发酵荔枝草的方法,对荔枝草发酵过程中主要活性成分及风味的变化进行研

究,为进一步探讨荔枝草茶品质形成机理并改善其品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荔枝草原叶采购于市场;冠突散囊菌分离于大红袍茶,经多代单菌落纯化培养并测序鉴定,保藏在4℃冰箱待用。

Na₂CO₃、NaHCO₃、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、草酸、葡萄糖,国药集团化学试剂有限公司;甲醇、醋酸乙酯、95%乙醇、正丁醇、茚三酮、氯化亚锡、谷氨酸、蒽酮,天津市福晨化学试剂有限公司;福林酚、没食子酸,北京索莱宝科技有限公司;浓H₂SO₄,天津市科密欧化学试剂有限公司,以上试剂均为分析纯。

改良查氏液体培养基^[14]: NaNO₃ 3 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, NaCl 50 g/L, 蔗糖 40 g/L, 用蒸馏水充分搅拌使各成分溶解,加水定容至1 L, 121℃高温灭菌20 min,待用。以上各试剂均为分析纯,购自天津市风船化学科技试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

THZ-D 型台式恒温振荡器,太仓市实验设备厂;LRH-150 型生化培养箱、DHG-9055A 型电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;SW-CJ-2FD 型紫外洁净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;LDZF-50KB 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;AR124CN 型电子天平,沈阳杰龙仪器有限公司;DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅,北京市永光明

第一作者:博士,讲师(马涛教授为通讯作者,E-mail: matao-09@163.com)。

基金项目:辽宁省重点研发计划指导计划项目(2018205001);辽宁省自然科学基金项目(20170540022)

收稿日期:2019-01-15 改回日期:2019-03-28

医疗仪器有限公司; TDL-5-A 型低速台式大型离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; UV-2550 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; PEN3 型便携式电子鼻, 德国 Airsense 公司; SA402B 型电子舌, 日本 IN-SENT 公司。

1.3 方法

1.3.1 冠突散囊菌孢子悬液的制备

将实验室保藏的冠突散囊菌菌种复苏, 复壮, 用接种环将菌刮下, 在灭菌后的 250 mL 液体培养基中振荡培养 7 d, 制备成浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 孢子悬液。

1.3.2 发酵茶的制备工艺

将处理好的荔枝草茶叶 15 g 置于 250 mL 锥形瓶中, 121 °C 灭菌 20 min^[15], 放置 20 min 晾至室温。加入一定量的冠突散囊菌孢子悬液, 使茶叶充分湿润, 并在 28 °C 的环境中进行固态发酵, 发酵 7 d 后取出, 在 80 °C 烘箱内干燥 2 h, 制得成茶。具体技术流程如下:

鲜叶采摘 → 蒸煮杀青 → 揉捻 → 烘干 → 复水 → 灭菌 → 接种发酵 → 烘干 → 成茶

1.3.3 主要成分的测定

茶多酚的测定: 参考 GB/T 8313—2008 茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法; 氨基酸的测定: 参考 GB/T 8314—2013 茶游离氨基酸总量的测定; 茶色素的测定: 系统分析法^[16]; 可溶性糖的测定: 蒽酮-硫酸法^[17]。

1.3.4 荔枝草茶发酵前后气味的电子鼻检测

荔枝草茶样品前处理方法: 准确称取 5.0 g (精确到 0.01 g) 茶叶样品于 150 mL 锥形瓶中, 倒入 100 mL 事先煮沸的蒸馏水进行冲泡, 使用封口膜将瓶口密封浸泡 10 min 后, 取漏斗快速过滤得到澄清茶液, 取 10 mL 澄清茶液于 20 mL 顶空瓶中, 加入 3.0 g NaCl, 水浴锅中 70 °C 预热 25 min, 每个茶样做 5 个平行^[18]。

电子鼻分析条件: 测定时间为 120 s, 清洗时间 110 s, 样品间隔 1 s, 传感器室流量 350 mL/min, 测量样品流量 350 mL/min。PEN3 型便携式电子鼻传感器性能描述见表 1^[19]。

1.3.5 荔枝草茶发酵前后气味的电子舌检测

荔枝草茶样品前处理方法: 准确称取 5.0 g (精确到 0.01 g) 茶叶样品于 250 mL 锥形瓶中, 倒入 250 mL 事先煮沸的蒸馏水进行冲泡, 使用封口膜将瓶口密封浸泡 10 min, 8 层纱布过滤, 滤液装瓶密封, 冷却至

表 1 PEN3 型便捷式电子鼻传感器性能描述

Table 1 Properties of sensor on PEN3 electronic nose

传感器	性能描述	备注
R(1)	对芳香成分灵敏	C ₇ H ₈ (10 mL/m ³)
R(2)	灵敏度大, 对氮氧化物很灵敏	NO ₂ (1 mL/m ³)
R(3)	氨水, 对芳香成分灵敏	C ₆ H ₆ (10 mL/m ³)
R(4)	主要对氢气有选择性	H ₂ (100 mL/m ³)
R(5)	烷烃, 芳香成分	C ₃ H ₈ (1 mL/m ³)
R(6)	对甲烷灵敏	CH ₄ (100 mL/m ³)
R(7)	对无机硫化物灵敏	H ₂ S (1 mL/m ³)
R(8)	对乙醇灵敏	CO (100 mL/m ³)
R(9)	芳香成分, 对有机硫化物灵敏	H ₂ S (1 mL/m ³)
R(10)	对烷烃灵敏	CH ₄ (10 mL/m ³)

室温待测用^[20]。电子舌分析条件: 清洗时间 5.5 min, 传感器自检时间 30 s, 样品测试时间 30 s, 测量回味 30 s。SA402B 型便捷式电子舌传感器性能描述见表 2。

表 2 SA402B 型便捷式电子舌传感器性能描述

Table 2 Properties of sensor on SA402B electronic tongue

传感器	响应特性
CAO (S11)	对酸味灵敏
COO (S12)	对苦味灵敏
AEI (S13)	对涩味灵敏
AAE (S14)	对鲜味灵敏
CTO (S15)	对咸味灵敏

1.4 数据处理

通过软件 SPSS19.0 进行相关数据处理, 每组试验进行 3 次重复取平均值, 数据以平均值 ± 标准差表示, 作图利用 OriginPro8.6 与 Excel2010 进行处理, 电子鼻的数据分析采用主成分分析和 Loading 分析。

2 结果与分析

2.1 不同发酵阶段茶多酚含量的变化

由图 1 可以看出, 发酵前和发酵第 2 天茶多酚含量变化不显著, 随后茶多酚含量呈下降趋势且变化显著, 在发酵过程中, 茶多酚含量由发酵前 32.69% 下降至 22.27%, 降幅为 31.88%。有研究表明, 茶叶的加工方式对茶叶中茶多酚含量有较大的影响, 含量大小依次为: 未发酵茶 > 微发酵茶 > 半发酵茶 > 全发酵茶^[21], 因此荔枝草发酵茶中由于冠突散囊菌代谢旺盛, 使得发酵后的荔枝草茶茶多酚含量明显降低, 此外, 在发酵过程中冠突散囊菌产生多种胞外酶, 在多酚氧化酶的作用下, 茶叶中的多酚类物质被氧化成醌类^[22], 使茶多酚含量下降, 由此减少了荔枝草发酵茶的苦涩味。

2.2 不同发酵阶段氨基酸含量的变化

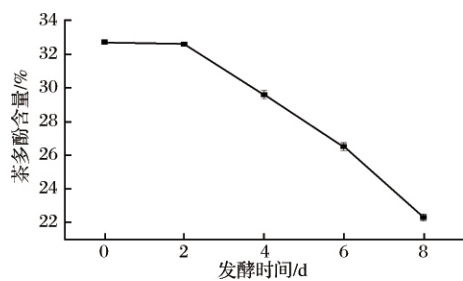


图1 不同发酵时间荔枝草茶中茶多酚含量变化

Fig. 1 Variations of tea polyphenols in *Salvia plebeia* tea during the different fermentation time

由图2可以看出,氨基酸含量呈显著下降趋势,发酵前期下降趋势不明显,随发酵时间的增长,氨基酸含量逐渐降低,由发酵前的4.79%下降至3.05%,降幅为36.3%。

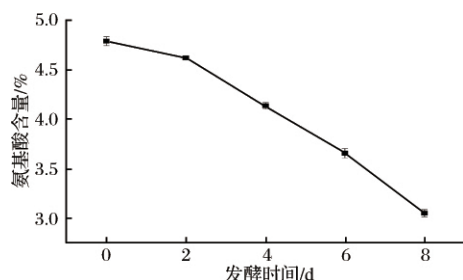


图2 不同发酵时间荔枝草茶中氨基酸含量变化

Fig. 2 Variations of amino acid in *Salvia plebeia* tea during the different fermentation time

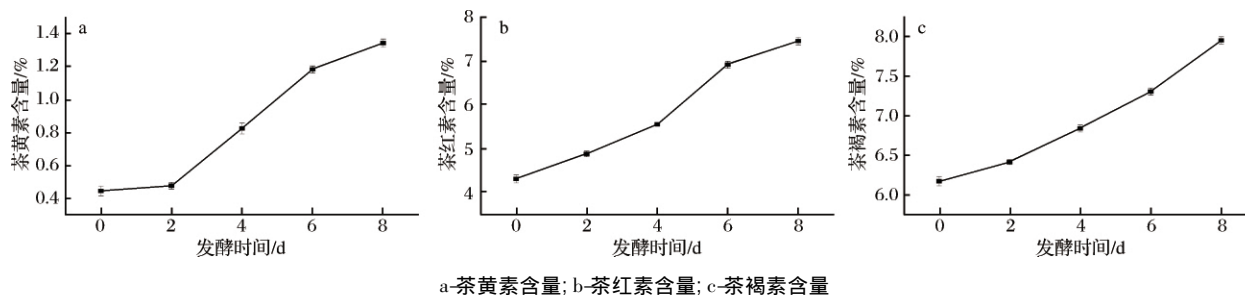


图3 不同发酵时间荔枝草茶中茶色素含量变化

Fig. 3 Variations of tea pigments contents in *Salvia plebeia* tea during the different fermentation time

2.4 不同发酵阶段可溶性糖含量的变化

由图4可以看出,在发酵过程中可溶性糖含量呈减少的趋势,尤其在发酵前2d,降幅最为明显,此后下降趋势减缓,发酵结束时,茶叶中可溶性糖含量由1.47%下降至1.1%,降幅达到25.17%。在发酵过程中冠突散囊菌产生多种胞外酶,包括纤维素酶和果胶酶,这些胞外酶将茶叶中的多糖分解为单糖,促进可溶性糖的溶出,为微生物的生长提供所需碳源^[26]。

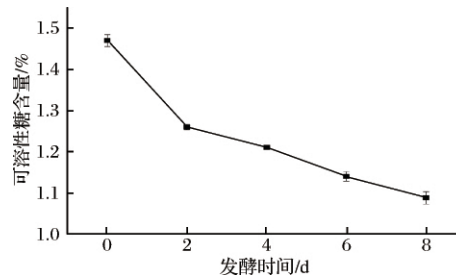


图4 不同发酵时间荔枝草茶中可溶性糖含量变化

Fig. 4 Variations of soluble sugar in *Salvia plebeia* tea during the different fermentation time

发酵过程中,氨基酸含量持续下降可能是因为,在发酵过程中,氨基酸为微生物提供生长所需的碳源或氮源被部分消耗,并且随着荔枝草茶的发酵,氨基酸进一步发生脱羧和氧化脱氨生成醛类物质以及水解、缩合等反应,形成荔枝草发酵茶的香气物质^[23],由此证明冠突散囊菌发酵荔枝草茶可以改善荔枝草茶本身的涩味,进一步提高其感官品质。

2.3 不同发酵阶段茶色素含量的变化

由图3-a和图3-b可以看出,在发酵过程中茶黄素和茶红素有着较为接近的变化趋势,即在发酵第6天前,色素累计含量逐渐升高且增长越来越迅速,在发酵结束时,增长趋势开始减缓,这是因为在发酵过程中,冠突散囊菌发酵产生的多酚氧化酶将茶多酚主要物质儿茶素氧化为醌类,再进一步缩聚形成茶黄素和茶红素,因此发酵前期这2种色素增长较快^[24]。由图3-c可以看出,茶褐素的变化随着发酵时间的增长不断增加,且有加快的趋势,这是因为发酵过程中茶黄素和茶红素发生氧化聚合反应生成茶褐素,使得茶褐素的含量不断增多,与此同时茶黄素和茶红素的增长速度减缓^[25]。在整个发酵过程中,3种茶色素含量有不同程度的提高,茶黄素增长3.02倍,茶红素增长1.73倍,茶褐素增长1.29倍,这种变化也有效地改善了荔枝草发酵茶茶汤的感官品质。

2.5 电子鼻分析荔枝草茶发酵前后风味的差异

图5为未发酵、冠突散囊菌发酵荔枝草茶的主成分分析,对同一样品进行多次取样判断检测稳定性。其主成分1(PC1 90.64%)和主成分2(PC2 5.95%)的总贡献率为96.59%,>90%,说明PC1和PC2包含很大的信息量,能够反应所有性状指标所提供的信息。从图5可以看出,未发酵和发酵的荔枝草茶分布于不同的区域,说明电子鼻能良好地区分2种样品。

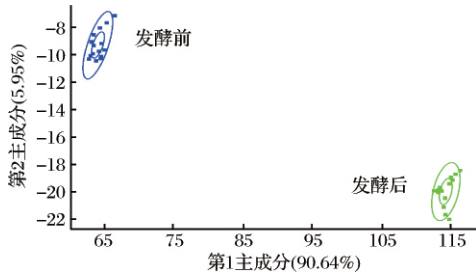


图5 荔枝草茶发酵前后的PCA分析

Fig. 5 PCA analysis of *Salvia plebeia* tea before and after fermentation

图6为电子鼻10个传感器分别对样品的PCA主成分分析的贡献率。R(2)传感器对第1主成分区分贡献率最大,是第1主成分的特征信号;R(9)传感器对第2主成分区分贡献率最大。根据各传感器对不同物质的特异敏感度,说明氮氧化物在荔枝草发酵茶中的贡献率最大,而有机硫化物在茶叶香气成分第2主成分中贡献率最大。

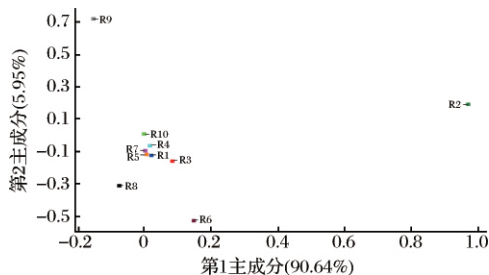


图6 荔枝草茶发酵前后Loading分析

Fig. 6 Loading analysis of *Salvia plebeia* tea before and after fermentation

2.6 电子舌分析荔枝草茶发酵前后风味的差异

本实验使用的电子舌设备含有5个检测探头,分别为酸味(CAO)、苦味(COO)、涩味(AEI)、鲜味(AAE)、咸味(CTO),通过检测后得到酸味、苦味、涩味、鲜味、咸味、苦味回味、涩味回味、丰富度8组滋味指标^[37]。由图7可以看出,5个滋味传感器对发酵前后2种茶叶均有响应,但敏感度略有差异,苦味、涩

味、咸味传感器响应值较为明显,鲜味和酸味传感器响应值较低。发酵后代表茶叶感官的苦味和涩味响应值降低,这表明通过冠突散囊菌的发酵改善了荔枝草发酵茶的感官品质。

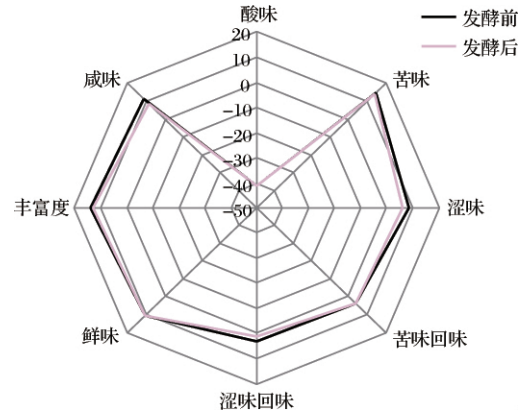


图7 荔枝草茶发酵前后茶汤滋味雷达图

Fig. 7 Radar plot of *Salvia plebeia* tea flavor before and after fermentation

3 结论

对冠突散囊菌发酵的荔枝草发酵茶不同阶段的主要成分及风味变化进行研究,结果表明,在荔枝草发酵过程中,茶多酚、氨基酸和可溶性糖含量变化规律相似,呈现随发酵时间的增长逐渐降低的趋势;茶黄素和茶红素的变化规律相似,增长速率先增加后减缓,而茶褐素含量随发酵时间的增长逐渐升高;在风味检测中,发现发酵后苦味、涩味明显降低,本实验表明冠突散囊菌的生长使得茶叶中主要理化成分及风味物质发生了显著地变化,有效地改善了荔枝草发酵茶的品质,为今后荔枝草发酵茶的进一步生产提供了理论依据。

参考文献

- [1] 钱俊,曹苗苗,朱荫,等. 荔枝草咀嚼片配方工艺研究[J]. 中药材 2018, 41(8): 1942-1947.
- [2] JANG H J, LEE S Y, LEE S J, et al. Anti-inflammatory activity of eudesmane-type sesquiterpenoids from *Salvia plebeia* [J]. Journal of Natural Products, 2017, 80: 2666-2676.
- [3] JANG H H, CHO S Y, KIM M J, et al. Anti-inflammatory effects of *Salvia plebeia* R. Br extract *in vitro* and in ovalbumin-induced mouse model [J]. Biological Research, 2016, 49(1): 41.
- [4] BANG S, QUY H, KIM T, et al. Antiviral activities of compounds from aerial parts of *Salvia plebeia* R. Br [J]. Ethnopharmacol, 2016, 192: 398-405.

- [5] QU Xianjun, XIA Xue, WANG Yuanshu, et al. Protective effects of *Salvia plebeia* compound homoplantaginins on hepatocyte injury [J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2009, 47(7): 1710–1715.
- [6] WENG X C, WANG W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia* [J]. *Food Chemistry*, 2000, 71(4): 489–493.
- [7] MA Liefeng, XU Hong, WANG Jidong, et al. Three new eudesmane sesquiterpenoids and a new dimer from the aerial part of *Salvia plebeia*, R. Br [J]. *Phytochemistry Letters*, 2018, 25: 122–125.
- [8] ZOU Yihong, ZHAO Liang, XU Youkai, et al. Anti-inflammatory sesquiterpenoids from the traditional Chinese medicine *Salvia plebeia*: Regulates pro-inflammatory mediators through inhibition of NF- κ B and Erk1/2 signaling pathways in LPS-induced Raw264.7 cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 210: 95.
- [9] JIANG Chenkai, ZENG Zhen, HUANG Yahui, et al. Chemical compositions of Pu'er tea fermented by *Eurotium cristatum* and their lipid-lowering activity [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 98: 204–211.
- [10] YAOYani, WU Mengyao, HUANG Yingjie, et al. Appropriately raising fermentation temperature beneficial to the increase of antioxidant activity and gallic acid content in *Eurotium cristatum*-fermented loose tea [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 82: 248–254.
- [11] 邓放明, 龚淑莉, 杨伟丽. 冠突散囊菌胞外多糖生物活性高通量筛选试验 [J]. *食品与机械*, 2007, 23(6): 48–51.
- [12] 黄秋桂, 张灵枝, 龚雪梅, 等. 黑茶优势菌对绿茶浸提液发酵过程多酚类化合物的影响 [J]. *食品科学*, 2014, 35(11): 164–167.
- [13] 李适, 龚雪, 刘仲华, 等. 冠突散囊菌对茶叶品质成分的影响研究 [J]. *菌物学报*, 2014, 33(3): 713–718.
- [14] KELLER A C, WEIR T L, RYAN E P. Antibacterial activity and phytochemical profile of fermented *Camellia sinensis* (fuzhuan tea) [J]. *Food Research International*, 2013(53): 945–949.
- [15] 杨金梅, 黄婧, 杨民和. 金花菌发酵对茶叶主要化学成分的影响 [J]. *广东农业科学*, 2015, 42(19): 20–26.
- [16] 刘刚, 杨妍, 胡婷婷, 等. 青刺尖“金花菌”发酵茶的降血脂效果 [J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(3): 323–328.
- [17] 秦俊哲, 刘凯利, 黄亚亚, 等. 茯砖茶人工接种发酵过程主要功效成分的变化 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(12): 90–93.
- [18] 乔阳. 基于GC-MS及电子鼻的云南红茶香气成分的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- [19] 朱力杰, 石月, 刘秀英, 等. 固相微萃取-气质联用分析玉米煎饼的挥发性风味物质 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 102–105.
- [20] 胡婷婷, 刘刚, 邓钱江, 等. 基于电子鼻、电子舌技术评价金花菌固态发酵对青刺尖茶感官品质的影响 [J]. *现代食品科技*, 2017(6): 285–292.
- [21] 高海荣, 黄振旭, 李华敏. 16种中国茶叶中茶多酚含量对比研究 [J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(7): 33–36.
- [22] 罗冰. 茯砖茶发酵菌生物学特性及其发酵剂制备研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
- [23] 李永福, 周杰, 陈琴芳, 等. 外源酶改善明日叶发酵茶品质的研究 [J]. *食品工业*, 2015, 36(9): 65–69.
- [24] 郝瑞雪, 杜丽平, 徐瑞雪, 等. 普洱茶发酵过程中酶活性与主要品质成分关系初探 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(11): 59–62.
- [25] 白晓丽, 闫星, 李长文. 普洱茶发酵过程中主要成分变化及相关性研究 [J]. *食品工业*, 2014, 35(12): 165–167.
- [26] 薛长风, 裴志胜, 文攀. 基于电子舌的茶叶滋味与特征成分相关性分析 [J]. *食品科技*, 2018, 43(7): 316–321.

Effects of *Eurotium cristatum* fermentation on main quality components and flavor of *Salvia plebeia* tea

YANG Lina^{1 2 3}, WU Kaiwei^{1 2 3}, XU Qingying^{1 2 3}, WANG Ruyi^{1 2 3},
QU Ge^{1 2 3}, WU Haotong^{1 2 3}, ZHU Lijie^{1 2 3}, MA Tao^{1 2 3*}

1(College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

2(National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, China)

3(Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

ABSTRACT *Eurotium cristatum* was used as the starter culture to ferment *Salvia plebeia*, the variations of main components in *Salvia plebeia* tea at different fermentation times were determined. Besides, the flavors of *Salvia plebeia* tea before and after fermentation were analyzed by electronic nose and electronic tongue. The results showed that tea polyphenols, amino acids and soluble sugar decreased by 31.9%, 36.3%, and 25.2%, respectively. In comparison, theaflavins, thearubigins and theabrownin increased 3.02, 1.73, and 1.29 times, respectively, during fermentation process. Moreover, the flavor of *Salvia plebeia* tea showed clear differences before and after fermentation, as the bitter and astringent tastes of the tea decreased. For the first time, this study produced functional fermented tea from *Salvia plebeia* by *E. cristatum* fermentation, which lays a good foundation for *Salvia plebeia* tea commercialization.

Key words *Salvia plebeia*; *Eurotium cristatum*; fermentation; quality components; flavor