

# 棒状乳杆菌 FZU63 发酵对红茶汤风味品质改善的作用

李瑞丽<sup>1,2#</sup>, 刘宜锋<sup>3#</sup>, 骆伟博<sup>1</sup>, 黄慧琳<sup>1</sup>, 黄梅婷<sup>3</sup>, 陈驰<sup>4</sup>, 肖榕辉<sup>3</sup>, 韩金志<sup>1</sup>, 吕旭聪<sup>1</sup>

1 福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350108

2 福建农林大学 食品科学学院, 福建 福州 350002

3 福建省粮油科学技术研究所, 福建 福州 350025

4 福建农业职业技术学院 现代农业工程学院, 福建 福州 350303

李瑞丽, 刘宜锋, 骆伟博, 黄慧琳, 黄梅婷, 陈驰, 肖榕辉, 韩金志, 吕旭聪. 棒状乳杆菌 FZU63 发酵对红茶汤风味品质改善的作用. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4731-4743.

LI RL, LIU YF, LUO WB, HUANG HL, HUANG MT, CHEN C, XIAO RH, HAN JZ, LÜ XC. Effect of *Lactobacillus coryniformis* FZU63 on the flavor quality of black tea beverage. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4731-4743.

**摘要:** 乳酸菌发酵可赋予茶饮料独特的香气与滋味, 且可改变其物质组成, 产生益生因子等。目前, 针对乳酸菌在不同发酵阶段对茶汤中风味物质形成影响的研究较少。本研究以从中国传统泡菜中筛选获得的棒状乳杆菌 FZU63 为发酵菌株, 对不同发酵阶段红茶汤中的挥发性香气成分、还原糖、游离氨基酸、有机酸等含量的变化过程进行分析, 并对发酵红茶汤的感官品质进行评价。结果表明, 棒状乳杆菌 FZU63 以红茶汤中的葡萄糖、果糖、甘露糖和木糖作为发酵过程中的主要碳源物质。红茶汤经棒状乳杆菌 FZU63 发酵作用后, 香气成分丰度显著增加, 且主要香气组分结构发生改变, 发酵红茶汤在花香、坚果香的基础上增添了水果香; 此外, 部分苦味氨基酸含量下降, 甜味和鲜味氨基酸含量增加; 并且, 乳酸、苹果酸、柠檬酸等有机酸含量在发酵过程中呈现积累。同时, 感官评定结果表明棒状乳杆菌 FZU63 发酵可改善红茶汤的感官品质, 且在发酵 48 h 后达到较优。本文系统分析了经棒状乳杆菌发酵不同阶段对红茶汤风味的影响, 可为乳酸菌发酵茶饮料的品质控制与产业化应用提供理论参考。

**关键词:** 棒状乳杆菌 FZU63; 红茶汤; 发酵; 风味物质; 品质改善

**Received:** February 11, 2022; **Accepted:** July 15, 2022; **Published online:** August 2, 2022

**Supported by:** Special Fund Project for the Central Government to Guide Local Science and Technology Development (2022L3020069); Fujian Provincial Natural Science Foundation, China (2020J01492)

**Corresponding author:** LÜ Xucong. E-mail: t20038@fzu.edu.cn

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study

**基金项目:** 中央引导地方科技发展资金专项 (2022L3020069); 福建省自然科学基金 (2020J01492)

## Effect of *Lactobacillus coryniformis* FZU63 on the flavor quality of black tea beverage

LI Ruili<sup>1,2#</sup>, LIU Yifeng<sup>3#</sup>, LUO Weibo<sup>1</sup>, HUANG Huilin<sup>1</sup>, HUANG Meiting<sup>3</sup>, CHEN Chi<sup>4</sup>, XIAO Ronghui<sup>3</sup>, HAN Jinzhi<sup>1</sup>, LÜ Xucong<sup>1</sup>

1 College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China

2 College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 Fujian Research Institute of Cereal and Oil Science and Technology, Fuzhou 350025, Fujian, China

4 College of Modern Agricultural Engineering, Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou 350303, Fujian, China

**Abstract:** The tea beverages will be endowed with distinct aroma and taste, as well as various biologically active compounds including probiotic factors, when fermented with lactic acid bacteria (LAB). However, at present, few studies on the dynamics of flavors in tea soup at different fermentation stages were conducted. In this study, the composition of monosaccharides, aromatic components, free amino acids, and organic acids were measured, when the black tea beverages were fermented with *Lactobacillus coryniformis* FZU63 which was isolated from Chinese traditional kimchi. The results indicated that monosaccharides including glucose, fructose, mannose and xylose in black tea beverages are the main carbon sources for fermentation. In addition, the abundance of aromatic compounds in black tea soup are increased significantly at different fermentation stages, which endow the fermented black tea soup with fruit aroma on the basis of flowery and nutty aroma. Moreover, some bitter amino acids are reduced, whereas the content of sweet and tasty amino acids is elevated. Furthermore, the levels of lactic acid, malic acid, citric acid and other organic acids are accumulated during the fermentation. Additionally, sensory evaluation displays that black tea beverage is acquired with comprehensive high-quality after being fermented for 48 h. This study provides a theoretical basis to steer and control the flavor formation and quality of the fermented tea beverages during LAB fermentation.

**Keywords:** *Lactobacillus coryniformis* FZU63; black tea soup; fermentation; aromatic components; quality improvement

乳酸菌作为一类重要的食品级微生物, 已被广泛应用于肉品<sup>[1]</sup>、乳制品<sup>[2]</sup>、大豆产品<sup>[3]</sup>与果蔬<sup>[4]</sup>等食品的发酵过程。乳酸菌发酵可改善食品风味, 并可代谢产生功能性益生因子等。研究表明, 豆乳饮料经干酪乳酸菌、乳双歧杆菌、植物乳杆菌等混合菌株发酵产生主体风味物质 3-甲基丁醛和 2-壬烯-1-醇等物质, 与

此同时, 己醛、1-己醇和苯甲醛等豆腥味物质含量显著降低<sup>[5]</sup>。杨桃汁经瑞士乳杆菌、干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌发酵, 增添了具有花果香和甜香的酮类、醇类和脂肪酸类等香气成分<sup>[6]</sup>。同时, 乳酸菌发酵食品具有调节肠道菌群平衡、改善机体免疫力等益生功能<sup>[7]</sup>, 如: 发酵豆奶<sup>[8]</sup>、发酵果蔬菜汁<sup>[9]</sup>。此外, 乳酸菌

发酵植物基食品可为素食者和乳糖不耐受人群提供更多的选择<sup>[10]</sup>。

当前, 红茶约占全球茶叶消费总量的 80%<sup>[11]</sup>。在红茶加工过程中, 产生大量碎茶屑, 将这类副产物经乳酸菌发酵制备成发酵茶饮料是提高其经济附加值的优选策略之一。发酵茶饮料可将益生菌和茶饮料的双重益生功能相结合, 提高其营养价值, 并改善茶饮料的风味。茶汤中含有苦涩味的鞣酸与多酚类物质, 经乳酸菌发酵可降低茶多酚含量<sup>[12]</sup>; 同时, 经乳酸菌发酵可提高有机酸含量, 不仅能改善茶汤风味<sup>[13-14]</sup>, 还可降低被食源性致病菌污染的风险<sup>[15]</sup>。如乳酸菌发酵红茶饮料对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌效果较未发酵组更为有效<sup>[16]</sup>, 这可能是由于乳酸菌在发酵过程中产生多种有机酸和细菌素等物质所致<sup>[17-18]</sup>。

本研究以红茶加工过程产生的碎茶为原料, 利用产生细菌素的棒状乳杆菌 FZU63 对红茶汤进行发酵, 并对不同发酵阶段红茶汤中风味成分组成与含量变化进行分析, 旨在为乳酸菌发酵茶饮料的品质控制与产业化开发提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

红茶碎屑 (正山小种) 购自福建茶叶进出口有限公司; MRS 培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; 乙腈(色谱级)购自默克集团有限公司; 2-辛醇(纯度 99.8%) 购自 Dr. Ehrenstorfer 公司; 42 种游离氨基酸混合标准品购自曼默博尔公司; 8 种有机酸混合标准品购自北京北方伟业计量技术研究院。

### 1.2 仪器和设备

SPX-150BIII 恒温生化培养箱 (黄骅菲斯福实验仪器有限公司); LDZF-50L-III 立式高

压灭菌锅 (上海申安医疗器械厂); MP511 pH 计 (上海三信仪表厂); Fresco 17 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司); Dionex-5500 超高相离子交换色谱 (戴安公司); Carbo-Pac PA20 色谱柱(3 mm×150 mm) (戴安公司); 5977A 气相色谱质谱联用仪 (安捷伦科技有限公司); PDMS 固相微萃取头 (30 μm) (Supelco 公司); 57330-U SPME 手动进样柄 (Supelco 公司); 反相 C18 液相色谱柱 (4.6 mm×200 mm) (安捷伦科技有限公司); A300 氨基酸自动分析仪 (曼默博尔公司); LC-20A 高效液相色谱 (岛津)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 乳酸菌发酵红茶汤的制备

取 10 g 干燥红茶碎屑为原料加入 2 L 纯净水, 煮沸保持 5 min 后, 加入 10 g 葡萄糖, 溶解、过滤除渣, 取上清茶汤分装于丝口瓶中, 115 °C 条件下高压灭菌 20 min; 随之冷却降至室温, 按体积比 0.5% 接入棒状乳杆菌 FZU63 (GGMCC 19553) 生理盐水菌悬液 ( $OD_{600}$  为 0.5–0.6), 37 °C 条件下恒温静置发酵, 设置 3 个平行。同时, 以未接种发酵菌株的灭菌茶汤设置为空白对照组 (Ct)。

#### 1.3.2 发酵红茶汤中乳酸菌活菌数与 pH 的测定

分别在发酵 0、2、4、8、12、18、24、36、48、72、96 h 对红茶汤进行取样, 经生理盐水梯度稀释后, 涂布于 MRS 固体培养基上, 置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h 后进行菌落计数。同时, 分别对红茶汤发酵 0、24、48、72、96 h, 取样 5 mL, 10 000×g 离心 5 min, 取上清测定样品 pH。

#### 1.3.3 感官评定

感官评定方法参考 Malongane 等描述的方法<sup>[19]</sup>, 分别对红茶汤的颜色、香味、苦味、甜

味、酸味、透明度等感官指标进行评定。由 10 名实验室专业品评人员组成评价小组, 要求感官评定人员在评定前不喝酒、不吸烟, 不吃辛辣等刺激性食物, 评定一个样品后, 要以清水漱口后再感官评定下一个样品。各项指标的满分为 10 分, 各项指标处于最佳状态时为满分, 其他情况相应扣分。

### 1.3.4 还原糖含量的测定

依据 Shi 等<sup>[20]</sup>描述的方法检测发酵红茶汤中的还原糖含量。样品经 15 000×g 离心 10 min 后, 收集上清, 过 0.22 μm 滤膜; 取适量上清液经超纯水稀释 100 倍后, 采用超高效离子交换色谱系统, 并使用脉冲安培检测器进行分析; 以 0.02% (W/W) NaN<sub>3</sub> 为流动相, 采用 Carbo-Pac PA20 色谱柱(3 mm×150 mm), 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL, 且流动相流速为 0.5 mL/min。

### 1.3.5 挥发性香气成分的测定

根据 Xu 等<sup>[21]</sup>报道的方法测定样品中的风味物质。取 5 mL 样品置于 12 mL 顶空萃取瓶, 依次加入 1 g NaCl、10 μL 浓度为 10 mg/mL 2-辛醇 (内标)<sup>[22]</sup>混匀, 置于 40 °C 水浴磁力搅拌器上, 600 r/min 条件下温育 20 min 后插入固相微萃取针, 压出萃取纤维, 使其固定在距离液面 0.5–1.0 cm 处, 吸附萃取 30 min 后收回萃取纤维, 拔出萃取针并插入气相色谱质谱联用仪中进样分析。GC-MS 分析条件为<sup>[23–24]</sup>: 采用 DB-WAX 色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 进样口温度 250 °C; 柱温箱起始温度为 40 °C, 保留 8 min, 然后以 4 °C/min 升温至 150 °C, 再以 20 °C/min 升温至 250 °C, 保留 5 min; 载气为 99.999% 高纯度氦气, 流速 1 mL/min; 离子源温度为 230 °C, 电离方式为 EI, 电离能量为 70 eV, 接口温度为 250 °C, 四级杆温度 150 °C, 选择 SCAN 模式为扫描方式进行定性

分析, 离子碎片的扫描范围为 30–500 *m/z*, 溶剂延迟时间为 2.5 min。选择匹配度 ≥ 85, 按以下公式 (1) 计算挥发性气味物质含量。

$$\text{挥发性香气成分含量}(\mu\text{g/L}) = \frac{\text{各挥发性香气成分峰面积} \times 2 - \text{辛醇浓度}}{2 - \text{辛醇峰面积}} \quad (1)$$

### 1.3.6 游离氨基酸的测定

首先, 将 400 μL 经 0.45 μm 过滤处理的样品与 100 μL 10% 磺基水杨酸混合均匀, 置冰箱中 2–8 °C 冷藏静置过夜; 15 000×g 离心 15 min, 取上层清液再次以 15 000×g 离心 5 min。用样品稀释液按 1:2 稀释, 过 0.22 μm 滤膜后, 使用氨基酸自动分析仪对样品中游离氨基酸进行检测分析。

### 1.3.7 有机酸的测定

依据 Tu 等<sup>[25]</sup>描述的方法测定有机酸; 样品在 15 000×g 离心 5 min, 过 0.22 μm 滤膜, 使用高效液相色谱进行检测。色谱条件: 流动相为磷酸二氢钠溶液 (0.01 mol/L, pH 2.7) 过 0.45 μm 滤膜, 超声处理 20 min 后备用; 色谱柱为反相 C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm×200 mm, 5 μm, 安捷伦), 柱温 27 °C; 使用紫外检测器, 检测波长为 210 nm; 进样量为 20 μL, 流动相流速为 0.8 mL/min。

## 1.4 数据处理

数据通过 Excel 及 SPSS 16.0 进行分析; *P*<0.05 表示差异性显著。使用软件 Origin 2018、Heml 1.0.3.7-Illustrator 和 SIMCA 14.1 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵红茶汤 pH 与乳酸菌活菌数的变化

红茶汤经棒状乳杆菌发酵过程中, pH 与活菌数变化是判断发酵进程的重要指标。如图 1 所示, 红茶汤经发酵 0–24 h, 棒状乳杆菌活菌数量略有上升, 24–96 h 乳酸菌活菌数呈下

降趋势；可能是由于红茶汤中游离的可发酵糖与可转化氮源等营养素浓度较低，且含有多酚、生物碱等抑菌物质，可对乳酸菌生长繁殖产生逆境胁迫所致。同时，经棒状乳杆菌发酵 0–96 h，红茶汤 pH 由 4.73 逐步下降至 4.25。结果表明，棒状乳杆菌可有限耐受红茶汤中的生长环境，并能够代谢产酸。乳酸菌在发酵茶饮中的应用已有相关研究报道；如，由酸茶中筛选高产酸植物乳杆菌并用于生产发酵茶饮料<sup>[26]</sup>；此外，戊糖乳杆菌在酸茶厌氧发酵过程风味形成中发挥了重要作用<sup>[27]</sup>。

## 2.2 发酵红茶汤还原糖组成的变化分析

单糖是乳酸菌发酵过程用以提供物质与能量代谢的主要碳源物质，尤其为细胞生长与物质合成提供所需要的碳骨架与能量。由表 1 可见，在红茶汤发酵过程中总计检测出 6 种单糖，包括葡萄糖、果糖、甘露糖、木糖、半乳糖和鼠李糖。其中，葡萄糖、果糖和甘露糖伴随发酵进程而逐步被消耗，分别由 6.46 mg/mL、0.41 mg/mL 和 0.122 mg/mL 显著下降至 4.56 mg/mL、0.17 mg/mL 和 0.011 mg/mL；木糖含量在 24 h 后由 0.74 mg/mL 被完全消耗 0 mg/mL。此外，半乳糖含量较少，变化不显著；经发酵 48 h 至 96 h 时，棒状乳杆菌在红茶

汤中代谢产生了少量鼠李糖。可见，红茶汤中的葡萄糖、果糖、甘露糖和木糖为棒状乳杆菌发酵提供了主要碳源。有研究表明，乳糖是乳酸菌生物合成乳酸的最佳碳源，而果糖是更利于各种主要有机酸合成的碳源<sup>[28]</sup>；在本研究中，虽然红茶汤中的可发酵碳源以葡萄糖含量最多，但果糖和甘露糖的发酵消耗率最快，表明棒状乳杆菌在发酵过程中以果糖和甘露糖作为优选碳源，其次是葡萄糖等其他单糖。

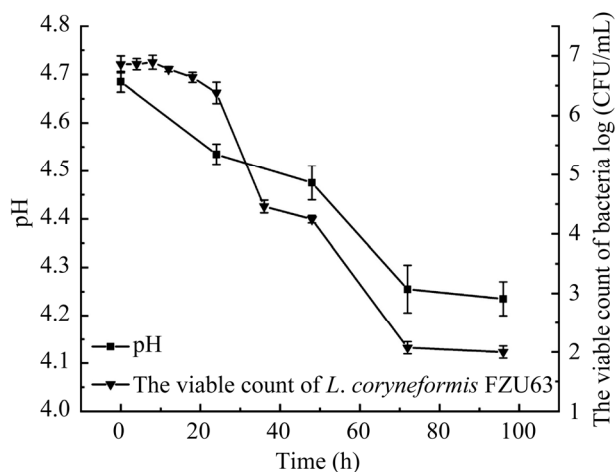


图 1 红茶汤 pH 及棒状乳杆菌活菌数变化情况  
Figure 1 The pH variation of black tea soup and the number of viable cells of *Lactobacillus coryneformis* during fermentation.

表 1 不同发酵阶段红茶汤中单糖含量的变化

Table 1 The variation of monosaccharides in black tea soup at different fermentation stages

No.	Items	Content of different monosaccharide (mg/mL)					
		Ct	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	Glucose	6.110±0.320	6.460±0.420	5.860±0.240	5.220±0.340*	4.270±0.140*	4.560±0.22*
2	Fructose	0.360±0.021	0.410±0.012	0.150±0.032*	0.160±0.022*	0.180±0.013*	0.170±0.014*
3	Mannose	0.152±0.040	0.122±0.001	0.008±0.001*	0.011±0.002*	0.011±0.005*	0.011±0.001*
4	Xylose	0.810±0.015	0.740±0.012	—	—	—	—
5	Galactose	0.020±0.001	0.010±0.004	0.007±0.001	0.002±0.004	0.006±0.002	0.007±0.002
6	Rhamnose	—	—	—	0.003±0.001	0.001±0.002	0.004±0.001

“\*” represents  $P \leq 0.05$ ; “—” means that content is below the detection limit.

### 2.3 棒状乳杆菌发酵红茶汤挥发性香气成分差异性分析

挥发性香气成分的丰度与结构组成是评价发酵红茶汤品质的关键指标之一。如图 2A 所示, 经 GC-MS 总离子流图可见, 棒状乳杆菌发酵红茶汤中的挥发性气味物质组成及含量在不同阶段存在差异, 且随发酵时间而处于动态变化过程。其中, 未发酵红茶汤中主要包括 25 种挥发性香气成分; 经棒状乳杆菌发酵 24、48、72、96 h 后, 红茶汤中分别检测出 34、36、32、34 种挥发性香气成分; 这些挥发性香气物质主要由醇类、醛类、酯类、酚类、烯炔类和酸类等构成。在不同发酵组, 这些物质各自所占比例存在差异; 其中, 在不同发酵阶段, 茶汤中酸类、醇类、酯类和酚类物质均有增加 (图 2B)。

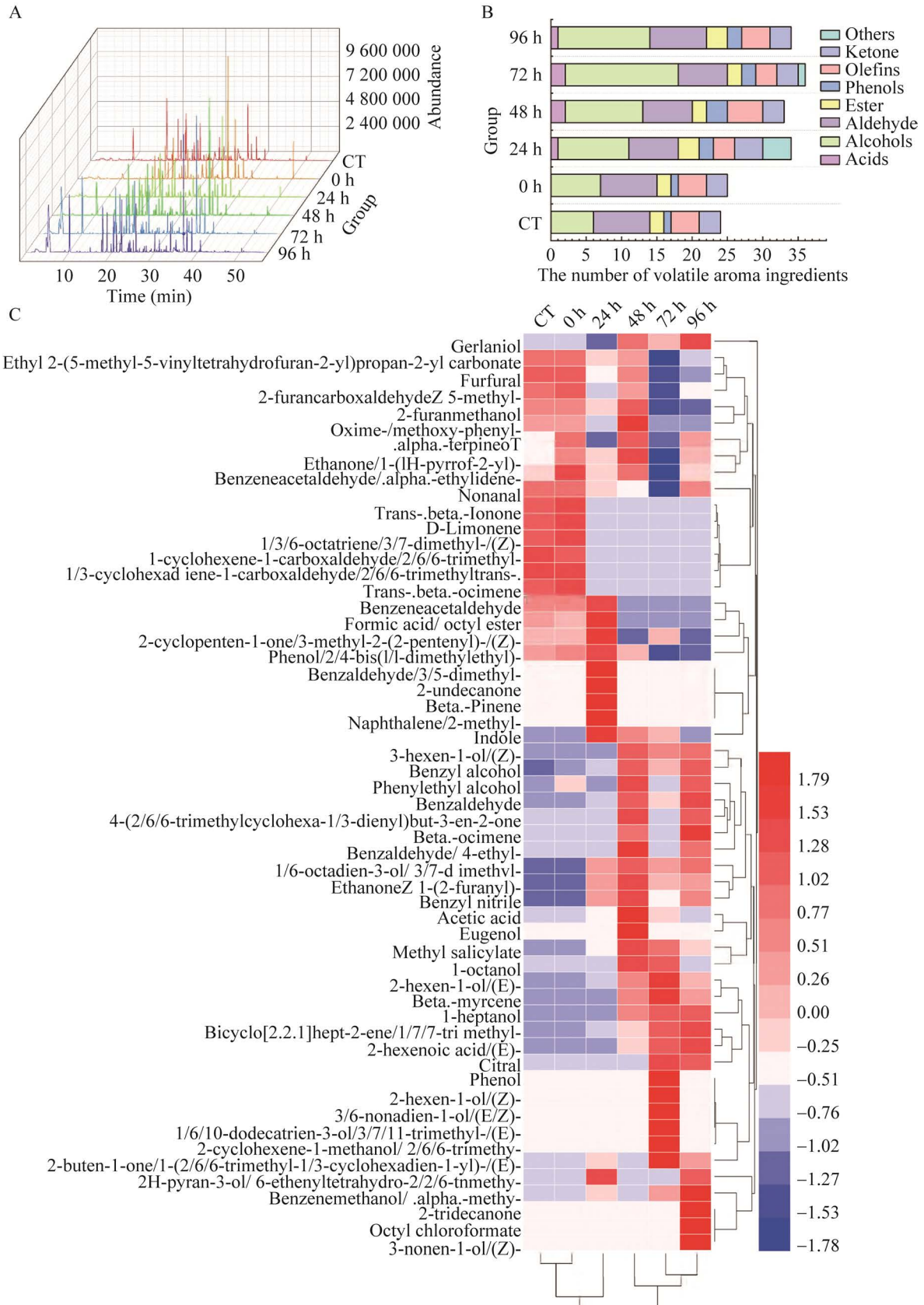
红茶汤在不同发酵阶段, 挥发性香气成分组成呈现出动态变化, 未发酵组茶汤中的主要挥发性香气成分为: 苯乙醇、香叶醇、3-己烯-1-醇、苯甲醇、糠醛、2-呋喃甲醛、 $\alpha$ -松油醇、紫罗兰酮等; 发酵 24 h 主要香气物质包括: 苯乙醇、香叶醇、3-己烯-1-醇、苯甲醇、苯乙醛、2-己烯-1-醇、柠檬烯、3,5-二甲基苯甲醛; 发酵 48 h 主要香气物质包括: 苯乙醇、香叶醇、3-己烯-1-醇、苯甲醇、 $\alpha$ -松油醇、苯甲醛、3,5-二甲基苯甲醛、5-甲基-2-呋喃甲醛、4-壬烯醛、4-异丙基苯甲醛、水杨酸甲酯等; 发酵 72 h 主要香气物质包括: 水杨酸甲酯、1-辛醇、1-庚醇、 $\beta$ -月桂烯、2-己烯酸、1-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基)-2-丁烯-1-酮等; 发酵 96 h 主要香气物质包括: 香叶醇、 $\alpha$ -松油醇、糠醛、壬醛、苯甲醇、4-乙基苯甲醛、4-壬烯醛、2-己烯酸等 (图 2C)。

为进一步研究不同发酵阶段挥发性香气成分的差异性, 对挥发性香气成分进行主成分及

聚类分析。由图 2D、2E 所示, 不同发酵阶段挥发性香气成分被分为 3 组。其中, Ct、0 h、24 h 为第 1 组, 其代表性特征香气成分主要为苯乙醇 (玫瑰香气)、香叶醇 (温和、甜的玫瑰花气息)、3-己烯-1-醇 (绿色嫩叶清香气味)、苯甲醇 (花香)、糠醛 (坚果香)、苯乙醛 (水果甜香气)、2-己烯-1-醇 (强烈未成熟果实气味)、柠檬烯 (柠檬香气) 等。72 h 为第 2 组, 主要代表性特征香气为具有水杨酸甲酯 (冬青油香气)、1-辛醇 (柠檬气味)、1-庚醇 (鲜青的果香)、 $\beta$ -月桂烯 (清淡的脂香气)、2-己烯酸 (似菠萝、山楂、草莓香气)。48 和 96 h 为第 3 组, 主要的代表性特征香气为苯甲醇、苯甲醛 (坚果香)、松油醇 (紫丁香花香)、香叶醇、4-壬烯醛 (黄瓜香、甜瓜香)、3-己烯-1-醇等。由此可见, 经棒状乳杆菌发酵不同阶段红茶汤中的香气成分丰度均显著增加, 且主要香气成分呈现差异性变化, 这些主要香气成分赋予了发酵红茶汤更加丰富的花香、甜香与水果香气。

### 2.4 有机酸含量变化及分析

有机酸是乳酸菌发酵过程中碳代谢的主要中间产物和终产物。由图 3A 所示, 在对照组和 5 个发酵阶段中均检测出酒石酸、甲酸、乳酸、柠檬酸、丁二酸等 8 种有机酸, 经棒状乳杆菌发酵红茶汤中的有机酸含量总体呈现逐步积累的趋势, 但有机酸组成及含量呈现动态变化。与对照组相比较, 经棒状乳杆菌发酵至 96 h, 红茶汤中的苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和丁二酸含量增加, 甲酸含量略有下降, 酒石酸和丙酸含量则变化差异较小。有机酸是乳酸菌发酵过程中的主要终产物, 对发酵红茶汤的风味和生理功能有重要的影响作用<sup>[15]</sup>。乳酸菌发酵过程中, 有机酸合成途径主要包括异型乳酸发酵途径和氨基酸代谢途径<sup>[29]</sup>。异型乳





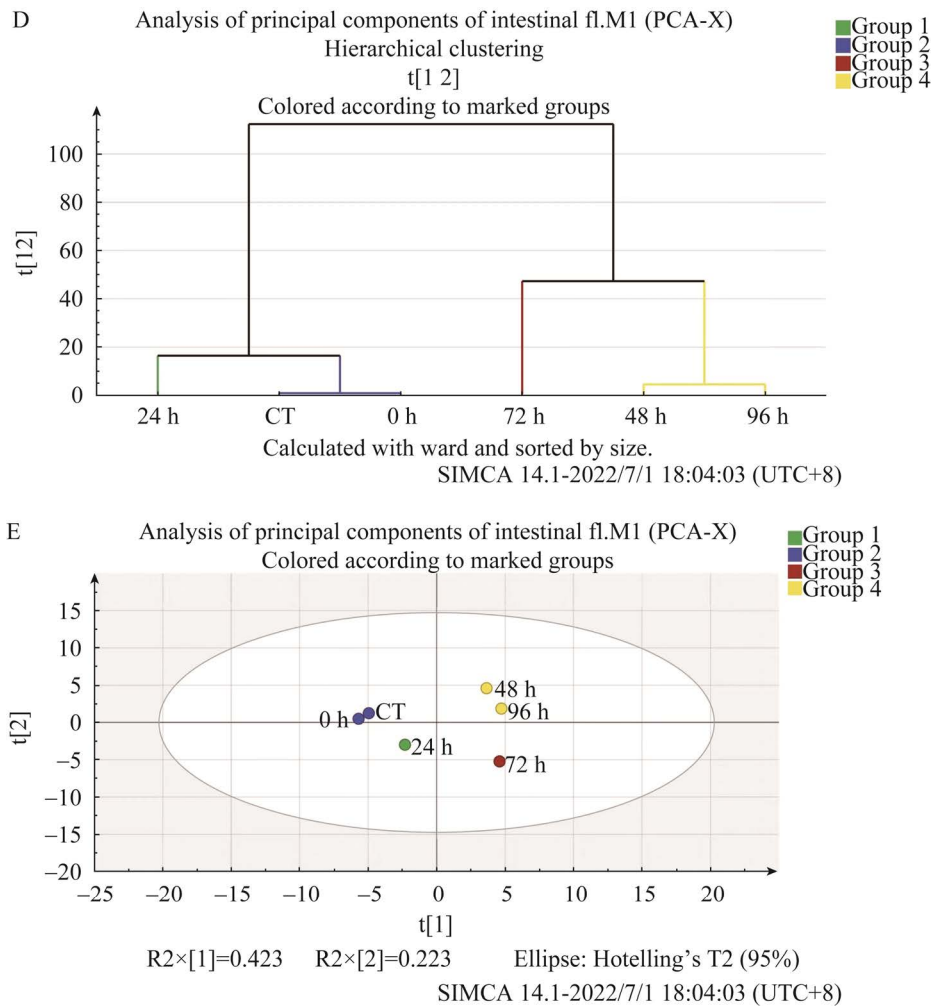


图 2 发酵红茶汤成分分析 A: 不同发酵阶段红茶汤中挥发性香气成分总离子流图; B: 发酵红茶汤中挥发性香气成分的分类图; C: 不同发酵阶段挥发性香气成分组成热图; D: 基于红茶汤中挥发性香气成分的不同发酵组系统聚类分析图与 (E) 主成分分析图

Figure 2 Analysis of the components in the fermented black tea soup. (A) Total ion current diagram of volatile aroma components in black tea soup at different fermentation stages. (B) The classification of the volatile compounds of fermented black tea beverages. (C) The heat map of aromatic components in different fermentation stages. (D) Hierarchical clustering plot and (E) PCA score plot of the fermented black tea beverages from different groups were drawn based on the relative abundance of volatile flavor profiles.

酸发酵除了被分解成乳酸之外, 丙酮酸还可以在一定的条件下被分解成乙酸、甲酸和乙醇<sup>[30]</sup>; 此外, 还可经三羧酸循环等代谢途径产生琥珀酸、丙酸和丁酸等有机酸<sup>[31]</sup>。不同有机酸对食品风味产生不同的贡献, 如乙酸具有强烈的刺激性酸味, 乳酸、苹果酸、琥珀酸、柠檬酸等

不挥发酸则酸味比较柔和; 其中, 苹果酸酸味圆润, 并具有涩味和生青味<sup>[32]</sup>, 柠檬酸口感清冽, 而琥珀酸具有鲜酸爽口与略带苦涩味的风味特征<sup>[33]</sup>; 棒状乳杆菌发酵红茶汤含有多种有机酸, 可赋予其丰满、持久和具有层次感的酸味特征。



## 2.5 游离氨基酸含量差异分析

红茶汤中游离氨基酸的组成与含量对其滋味具有重要调和和改善作用。由图 3B 所示,在红茶汤中总计检测出 15 种游离氨基酸,经棒状乳杆菌发酵后,总氨基酸含量呈现下降趋势。其中,在未发酵组以  $\beta$ -丙氨酸、肌氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、谷氨酸等为主;经发酵 24–96 h 红茶汤中肌氨酸、天冬氨酸、色氨酸、赖氨酸、羟脯氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、亮氨酸和精氨酸等游离氨基酸含量下降。其中,不同种类游离氨基酸呈现出酸、咸、苦、鲜等滋味<sup>[34]</sup>。

在本研究中,红茶汤经棒状乳杆菌发酵其中的苦味氨基酸如色氨酸、赖氨酸、亮氨酸和精氨酸含量减少。此外,一些氨基酸作为可转化氮源,也是丙酮酸和乳酸等有机酸合成的潜在底物,如 Ala、Ser、Thr 和 Trp 可以脱氨基作用产生氨和丙酮酸; Ile、Leu、Thr、Trp 等氨基酸可转化为乙酰辅酶 A; 然后,丙酮酸和乙酰辅酶 A 进入丙酮酸代谢途径或三羧酸循环,生成乳酸、丙酸、苹果酸、甲酸、乙酸和柠檬酸等有机酸; 同时, Asp 和 Glu 可通过转氨基作用与代谢作用转化为  $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸和富马酸。此外,氨基酸可作为前体物质转为多种醛类香气物

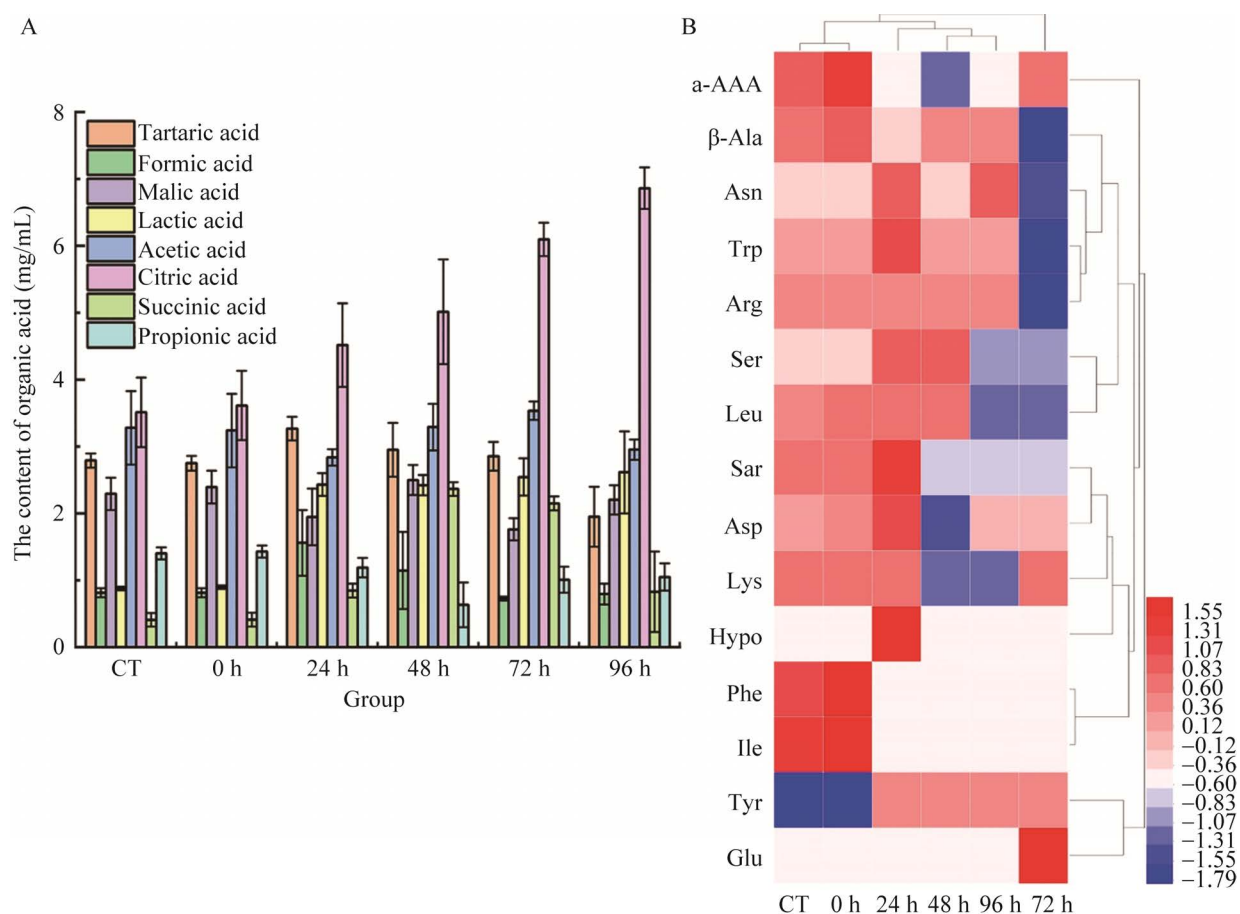


图 3 不同发酵阶段红茶汤中有机酸 (A) 和游离氨基酸 (B) 含量的变化

Figure 3 The variation of organic acids (A) and amino acids (B) of black tea soup at different fermentation stages.

质,尤其是支链氨基酸如苯丙氨酸和蛋氨酸可转化为苯乙醛和水杨酸甲酯等挥发性香气物质<sup>[35]</sup>。游离氨基酸与有机酸、挥发性香气成分之间的相互转化关系对改善红茶汤的滋味发挥着重要作用。

## 2.6 不同风味物质相关性分析

风味是评价发酵食品品质优劣的首要指标,本文将红茶加工副产物制备成的红茶汤经

棒状乳杆菌发酵,在不同发酵阶段产生了多种新的挥发性香气成分如: $\alpha$ -松油醇、2-呋喃甲醇、3,5-二甲基苯甲醇、苯乙醛、2-己烯-1-醇、柠檬烯、2-己烯酸、吡嗪等。在发酵过程中醇、醛、酮、酯等挥发性香气物质的合成均通过微生物以单糖、游离氨基酸等物质为底物通过自身代谢途径合成,这些物质转化之间存在着复杂的相关性。由图4所示,部分单糖、

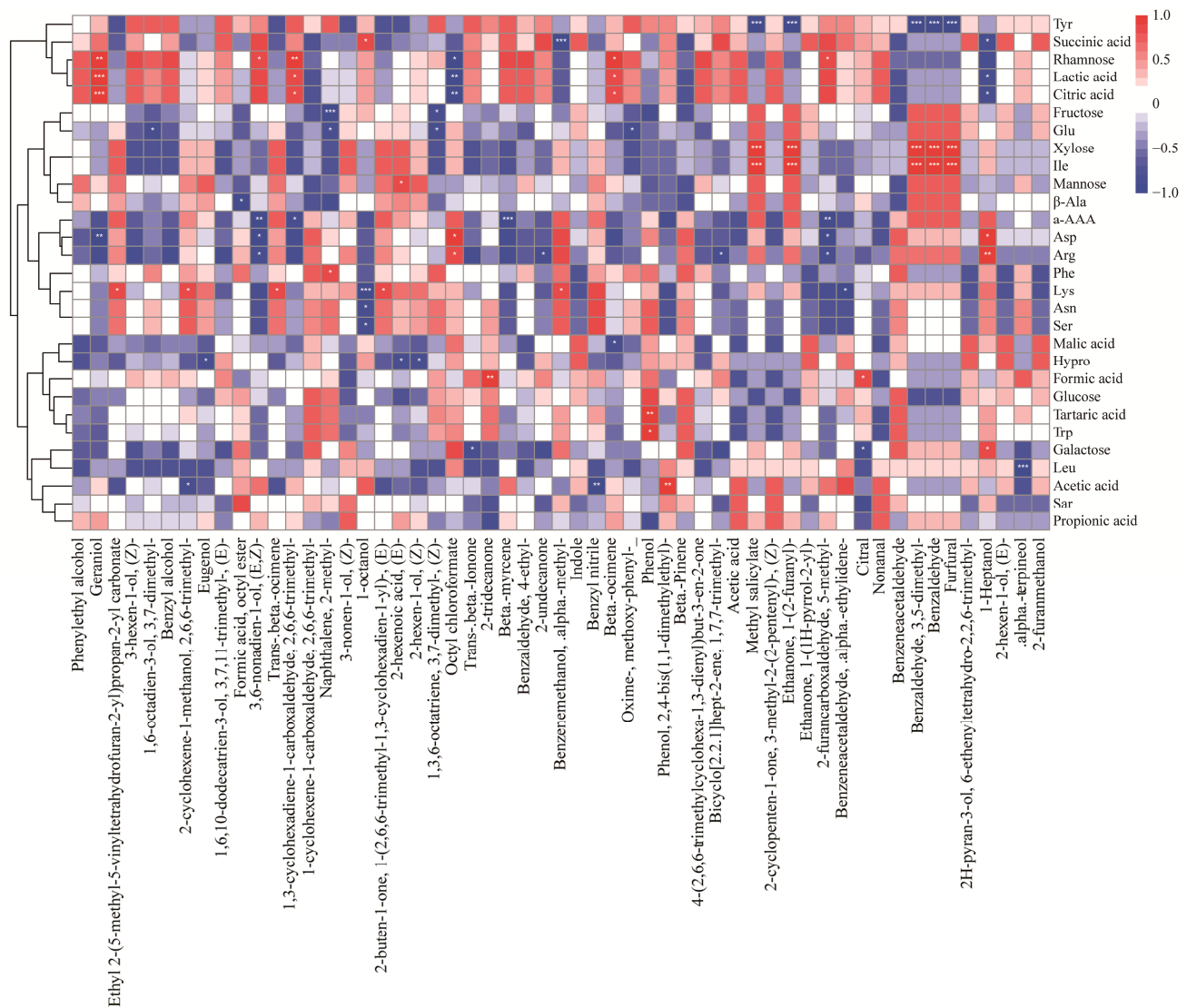


图4 单糖、游离氨基酸和有机酸与挥发性香气物质之间的相关性

Figure 4 Correlation analysis between monosaccharides, free amino acids, organic acids and volatile aroma compounds.

游离氨基酸和有机酸与挥发性香气物质之间存在正相关或负相关性。其中,鼠李糖、乳酸和柠檬酸与香叶醇呈现正相关性;酒石酸、色氨酸与吡啶亦呈现正相关性;苯丙氨酸与苯乙醛呈正相关;异亮氨酸、木糖与香气物质 $\beta$ -罗勒烯、D-柠檬烯、2-己烯酸等呈现正相关性,而酪氨酸则与以上这几种香气物质呈现负相关性。其中,2-己烯酸呈现出似菠萝、山楂、草莓香气,柠檬烯具有柠檬香气; $\alpha$ -松油醇具有类似丁香花的宜人风味,它可能是由糖苷类香气前体物质香叶基二磷酸水解产生<sup>[36]</sup>。同时,红茶汤中游离氨基酸与挥发性香气成分之间存在相互转化关系,可通过多种代谢途径转化成香气物质,如:色氨酸代谢和苯丙氨酸代谢等途径等。其中,色氨酸经微生物合成的色氨酸酶作用下转化为具有花果香气的吡啶<sup>[37]</sup>。苯丙氨酸在转氨酶的作用下转化为苯丙酮酸,之后经脱羧酶作用形成具有水果甜香气味的苯乙醛<sup>[38]</sup>。此外,苯甲醇、苯甲醛和苯乙醇也由苯丙氨酸转化而来<sup>[39]</sup>;这些经棒状乳杆菌发酵产生的香气物质使未发酵红茶汤在原始花香与坚果香气的基础上增添了水果香气。植物乳杆菌与布拉氏酵母菌协调发

酵绿茶饮料可提高水杨酸甲酯、香叶醇和 2-苯乙醇的含量,从而改善产品风味<sup>[40]</sup>。

## 2.7 发酵红茶汤的感官评定分析

由图 5A 所示,未发酵红茶汤相比较于发酵组呈现出更强烈的苦味和更高的透明度,以及较低的香气强度、酸味、颜色深度和甜味。而在发酵过程中,红茶汤中的酸味、香气强度、甜味、透明度等感官评分随发酵时间而提升;而苦味、透明度等感官评分则有所下降。其中,对照组未发酵茶饮料的感官评价总分与发酵 0、24 h 组相近;红茶汤经发酵 48、72 h 后的感官总得分呈上升趋势,而经发酵 96 h 后红茶汤的感官总评分则略有下降(图 5B)。根据感官评定结果综合分析可见,红茶汤经棒状乳杆菌发酵 48 h 后被赋予最优的感官品质。此时,香气物质主要以呈现坚果香、甜香、花香和水果香气的醛、醇等香气物质为主,并且以乳酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸等有机酸为主,且 pH 为 4.4 左右,酸度适中,且主要含有丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸等呈现鲜甜味的游离氨基酸。以上这些成分组成及含量可为此时发酵红茶汤呈现出较佳的感官的品质提供物质基础。

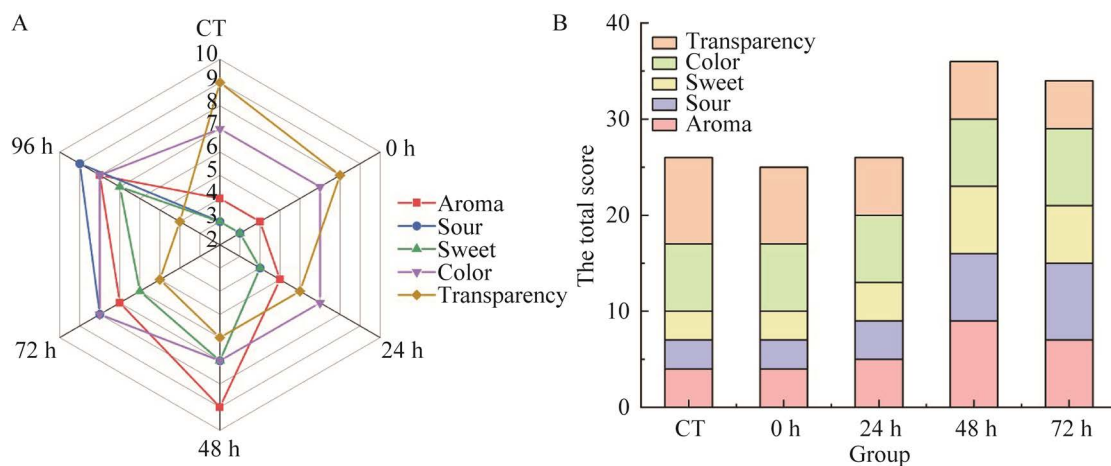


图 5 红茶汤各感官指标的雷达图 (A) 和总评分图 (B)

Figure 5 Quantitative description and the sensory indexes of black tea beverage using (A) radar chart and (B) total score chart.

### 3 结语

当前, 乳酸菌发酵食品因其独特的风味与显著的益生功能而备受关注。本研究以传统红茶加工过程中产生的碎茶等副产物为原料制成红茶汤, 探讨经棒状乳杆菌发酵作用后, 红茶汤中风味物质与活性物质的变化过程; 阐明了棒状乳杆菌发酵红茶汤在不同发酵阶段风味物质的变化过程, 可为乳酸菌发酵红茶饮料的工业化生产与品质控制提供理论参考。

### REFERENCES

- [1] Barbosa J, Ferreira V, Teixeira P. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol*, 2009, 26(5): 527-532.
- [2] Erten H, Ağırman B, Gündüz CPB, et al. Importance of Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Food Processing. *Food Engineering Series*. New York, NY: Springer New York, 2014: 351-378.
- [3] Zhang JH, Tatsumi E, Fan JF, et al. Chemical components of *Aspergillus*-type Douchi, a Chinese traditional fermented soybean product, change during the fermentation process. *Int J Food Sci Tech*, 2007, 42(3): 263-268.
- [4] M'hir S, Minervini F, Di Cagno R, et al. Technological, functional and safety aspects of enterococci in fermented vegetable products: a mini-review. *Ann Microbiol*, 2012, 62(2): 469-481.
- [5] Cheng MC, Tsai TY, Pan TM. Anti-obesity activity of the water extract of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 fermented soy milk products. *Food Funct*, 2015, 6(11): 3522-3530.
- [6] LU YY, TAN CW, CHEN D, et al. Potential of three probiotic lactobacilli in transforming star fruit juice into functional beverages. *Food Sci Nutri*, 2018, 6(8): 2141-2150.
- [7] Lu YY, Tan CW, Chen D, et al. Potential of three probiotic lactobacilli in transforming star fruit juice into functional beverages. *Food Sci Nutr*, 2018, 6(8): 2141-2150.
- [8] Chiang SS, Pan TM. Antiosteoporotic effects of *Lactobacillus*-fermented soy skim milk on bone mineral density and the microstructure of femoral bone in ovariectomized mice. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(14): 7734-7742.
- [9] 谢俊华, 聂少平, 丁翘, 等. 植物乳杆菌 NCU116 发酵胡萝卜浆对免疫抑制小鼠肠道黏膜免疫的影响. *食品科学*, 2015, 36(21): 201-206.
- [10] Xie JH, Nie SP, Ding Q, et al. Effect of carrot slurry fermented with *Lactobacillus plantarum* NCU116 on intestinal mucosal immunity in immunosuppressed mice. *Food Sci*, 2015, 36(21): 201-206 (in Chinese).
- [10] 关倩倩, 熊涛, 谢明勇. 植物基食品乳酸菌发酵技术研究进展. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(7): 1-11.
- [11] Guang QQ, Xiong T, Xie MY. Research progress in lactic acid bacteria fermentation technology of plant-based foods. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2022, 41(7): 1-11 (in Chinese).
- [11] 李丽华, 周玉璠. 世界红茶发展史略初探. *福建茶叶*, 2019, 41(4): 215-217.
- [12] Li LH, Zhou YF. A brief study on the history of black tea development in the world. *Tea in Fujian*, 2019, 41(4): 215-217 (in Chinese).
- [12] 冯雪娜, 李啸, 李建华, 等. 乳酸菌发酵红茶饮料主要营养成分变化. *中国酿造*, 2022, 41(2): 183-186.
- [13] Feng XN, Li X, Li JH, et al. Changes of main nutrients in black tea beverage fermented by lactic acid bacteria. *China Brewing*, 2022, 41(2): 183-186.
- [13] 韩之皓, 郭帅, 黄天, 等. 复合益生菌发酵不同基料乳酸菌饮料中挥发性代谢物差异分析. *中国食品学报*, 2021, 21(3): 300-314.
- [14] Han ZH, Guo S, Huang T, et al. Difference analysis of volatile flavor metabolite in *Lactobacillus* beverage fermented with complex probiotics. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21(3): 300-314 (in Chinese).
- [14] Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol*, 2013, 33(1): 1-10.
- [15] 康慎敏, 武瑞赟, 穆文强, 等. 乳酸菌拮抗食源性致病菌的研究及应用进展. *食品科学*, 2022, 43(01): 250-259.
- [16] Moroeanu VI, Vamanu E, Paun G, et al. Probiotic strains influence on infant microbiota in the in vitro colonic fermentation model GIS1. *Indian J Microbiol*, 2015, 55(4): 423-429.
- [17] Bhattacharya D, Ghosh D, Bhattacharya S, et al. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against *Vibrio cholerae*: targeting cell membrane. *Lett Appl Microbiol*, 2018, 66(2): 145-152.
- [18] Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra MM, et al. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against enteric bacterial pathogens. *Curr Microbiol*, 2016, 73(6): 885-896.
- [19] Malongane F, McGaw LJ, Debusho LK, et al. Sensory characteristics and volatile compounds of herbal teas and mixtures of bush tea with other selected herbal teas of south Africa. *Foods*, 2020, 9(4): 496.

- [20] Shi XD, Nie SP, Yin JY, et al. Polysaccharide from leaf skin of *Aloe barbadensis miller*: part I. Extraction, fractionation, physicochemical properties and structural characterization. *Food Hydrocoll*, 2017, 73: 176-183.
- [21] Xu X, Zhou SD, Julian McClements D, et al. Multistarter fermentation of glutinous rice with Fu brick tea: effects on microbial, chemical, and volatile compositions. *Food Chem*, 2020, 309: 125790.
- [22] Huang ZR, Guo WL, Zhou WB, et al. Microbial communities and volatile metabolites in different traditional fermentation starters used for Hong Qu glutinous rice wine. *Food Res Int*, 2019, 121: 593-603.
- [23] 韩金志, 潘雯丽, 沈昊, 等. 不同乳酸菌发酵豆浆挥发性气味物质的差异性分析. *中国食品学报*, 2021, 21(9): 296-305.  
Han JZ, Pan WL, Shen H, et al. Diversity analysis of volatile odors in soy milk fermented by different lactic acid bacteria. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2021, 21(9): 296-305 (in Chinese).
- [24] Luo T, Fan WL, Xu Y. Characterization of volatile and semi-volatile compounds in Chinese rice wines by headspace solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J Inst Brew*, 2008, 114(2): 172-179.
- [25] Tu CH, Tang SJ, Azi F, et al. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. *J Funct Foods*, 2019, 52: 81-89.
- [26] Tu CH, Hu WX, Tang SJ, et al. Isolation and identification of *Starmarella davenportii* strain Do18 and its application in black tea beverage fermentation. *Food Sci Hum Wellness*, 2020, 9(4): 355-362.
- [27] Xiao P, Huang YY, Yang WP, et al. Screening lactic acid bacteria with high yielding-acid capacity from pickled tea for their potential uses of inoculating to ferment tea products. *J Food Sci Technol*, 2015, 52(10): 6727-6734.
- [28] Nishioka H, Mizuno T, Iwahashi H, et al. Changes in lactic acid bacteria and components of Awa-bancha by anaerobic fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(9): 1921-1935.
- [29] 宫路路, 龚福明, 李晓然, 等. 豆豉中高产乳酸菌的筛选及其产酸条件的优化研究. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(5): 516-520.  
Gong LL, Gong FM, Li XR, et al. Screening of high-yield lactic acid bacteria from 'Douchi' and optimization of its lactic acid producing conditions. *Chin J Microecol*, 2013, 25(5): 516-520 (in Chinese).
- [30] Li SJ, Wang WL, Ma YC, et al. *Citrus* CitERF<sub>6</sub> contributes to citric acid degradation via upregulation of CitAclA1, encoding ATP-citrate lyase subunit A. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(37): 10081-10087.
- [31] Yun Z, Jin S, Ding YD, et al. Comparative transcriptomics and proteomics analysis of *Citrus* fruit, to improve understanding of the effect of low temperature on maintaining fruit quality during lengthy post-harvest storage. *J Exp Bot*, 2012, 63(8): 2873-2893.
- [32] Özcelik S, Kuley E, Özogul F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT*, 2016, 73: 536-542.
- [33] 李华, 王华, 袁春龙, 等. 葡萄酒化学. 北京: 科学出版社, 2005.  
Li H, Wang H, Yuan CL. *Wine Chemistry*. Beijing: Science Press, 2005 (in Chinese).
- [34] 索化夷, 赵欣, 骞宇, 等. 永川豆豉发酵过程中总糖和氨基酸变化与滋味的形成. *食品科学*, 2015, 36(21): 100-104.  
Suo HY, Zhao X, Qian Y, et al. Changes in total sugar and amino acids, and formation of taste compounds in Yongchuan Douchi during fermentation. *Food Sci*, 2015, 36(21): 100-104 (in Chinese).
- [35] Chen QC, Zhu Y, Liu YF, et al. Black tea aroma formation during the fermentation period. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131640.
- [36] Fang RS, Zhou WY, Chen QH. Ethyl carbamate regulation and genomic expression of *Saccharomyces cerevisiae* during mixed-culture yellow rice wine fermentation with *Lactobacillus* sp.. *Food Chemistry*, 2019, 292: 90-97.
- [37] 刘坚, 牟光庆. 奶酪风味物质形成机理的研究. *食品研究与开发*, 2007, (11): 158-161.  
Liu J, Mu GQ. Investigation of flavour forming mechanism in cheeses. *Food Research and Development*, 2007, (11): 158-161 (in Chinese).
- [38] 赵修报, 唐育岐, 刘天明.  $\beta$ -苯乙醇的研究进展. *中国酿造*, 2011(08): 1-4.  
Zhao XB, Tang YQ, Liu TM. Research progress of  $\beta$ -phenylethanol. *China Brewing*, 2011(8): 1-4 (in Chinese).
- [39] Yang ZY, Baldermann S, Watanabe N. Recent studies of the volatile compounds in tea. *Food Res Int*, 2013, 53(2): 585-599.
- [40] Wang R, Sun JC, Lassabliere B, et al. Green tea fermentation with *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299V. *LWT*, 2022, 157: 113081.

(本文责编 郝丽芳)