

黑茶优势菌对绿茶浸提液发酵过程多酚类化合物的影响

黄秋桂, 张灵枝*, 龚雪梅, 杨伟琼, 曾淑婷
(华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 利用从普洱茶中分离出的黑曲霉、根霉和从茯砖茶中分离出的冠突散囊菌接种云南大叶种晒青毛茶茶汤, 进行单一菌株发酵, 对发酵过程茶多酚类化合物的含量变化进行分析。结果表明: 随着发酵时间的延长, 茶多酚含量显著降低, 黄酮类化合物总量在黑曲霉、冠突散囊菌作用下分别减少72%、31.76%, 在根霉作用下增加了94.92%; 儿茶素各组分的含量变化较大, 其中表没食子儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯均呈现显著的下降趋势, 而儿茶素、没食子酸在不同菌株作用下表现出不同的变化规律; 茶黄素在黑曲霉、根霉作用下先增加后减少, 冠突散囊菌则相反; 茶红素总体呈下降趋向, 茶褐素在根霉、冠突散囊菌作用下显著增加。

关键词: 黑曲霉; 根霉; 冠突散囊菌; 液态发酵; 多酚类化合物

Effect of Fermentation with Preponderant Fungi from Dark Tea on Tea Polyphenols of Green Tea Extracts

HUANG Qiu-gui, ZHANG Ling-zhi*, GONG Xue-mei, YANG Wei-qiong, ZENG Shu-ting
(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, *Aspergillus niger* and *Rhizopus* isolated from Pu-erh tea and *Eurotium cristatum* isolated from Fuzhuan tea were used for the fermentation of aqueous infusions of the sun-dried green tea as the raw material for Pu-erh tea, respectively. Results showed that the content of tea polyphenols was significantly decreased with increasing fermentation time. *Aspergillus niger* and *Eurotium cristatum* reduced the total flavonoid content by 72% and 31.76%, respectively. On the contrary, *Rhizopus* increased the total flavonoid content by 94.92%. The contents of epigallocatechin (EGC), epigallocatechingllte (EGCG), epicatechin (EC), epicatechingllte (ECG) were significantly lowered, while catechin (C) and gallic acid (GA) showed different variation patterns under the influence of different microbes. Theaflavins increased firstly and then decreased by *Aspergillus niger* and *Rhizopus*, while *Eurotium cristatum* had the opposite effect. Thearubigins content increased during the fermentation process. Theabrownins were increased significantly by *Aspergillus niger* and *Eurotium cristatum*.

Key words: *Aspergillus niger*; *Rhizopus*; *Eurotium cristatum*; liquid-state fermentation; polyphenols

中图分类号: TS272.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 11-0164-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411033

普洱茶为代表的黑茶具有“醇、厚、甘、甜、滑”的独特品质, 同时微生物代谢作用赋予其抗氧化、降血脂、减肥等特殊生理功效^[1-2]。目前国内外为了揭示黑茶品质和保健功能形成机理, 进行了大量的相关研究, 其中比较深入的研究主要包括以下四方面: 一是后发酵过程微生物类群, 对微生物进行分离、鉴定^[3-4]; 二是微生物对后发酵茶品质的影响, 包括品质成分分析和感官品质评定^[5-6]; 三是后发酵过程微生物分泌的胞外酶变化规

律及对品质的影响^[4,7]; 四是后发酵茶的保健功能^[8]。但对后发酵工序中微生物参与转化的机理和转化产物的研究还很有限。

普洱茶渥堆发酵过程中主要的微生物有黑曲霉、根霉属等^[9], 冠突散囊菌则是茯砖茶加工发花过程中的优势菌, 其数量和质量被作为判断茯砖茶品质优劣的标准^[10]。这些黑茶优势菌的生长代谢产生酶, 促使茶叶内质成分发生复杂的变化, 对其品质的形成起着重要的作用。

收稿日期: 2013-05-24

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (5300-E12237)

作者简介: 黄秋桂 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为茶叶生物化学与茶叶深加工综合利用。E-mail: hqg19892012@163.com

*通信作者: 张灵枝 (1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为茶叶深加工与综合利用。E-mail: lingzhi@scau.edu.cn

本研究利用从普洱茶中分离得到的黑曲霉、根霉和从茯砖茶中分离得到的冠突散囊菌接种云南大叶种晒青毛茶茶汤,进行单一菌株发酵,摆脱多种微生物的混合作用,对发酵过程中茶多酚类化合物的变化规律进行分析,为探明黑茶后发酵过程微生物转化产物的分子结构、活性及其转化形成机理提供参考依据,进而构建黑茶优势菌对多酚类化合物的生物转化体系。

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

云南大叶种晒青毛茶,购自广州芳村茶叶市场。

黑曲霉、根霉、冠突散囊菌从普洱茶和茯砖茶中分离得到,实验室保存。

1.2 仪器与设备

THA-82A台式恒温振荡器 上海一恒科学仪器有限公司;7200型可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;Agilent 1200LC高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种的活化培养

将4℃保存的黑曲霉、根霉、冠突散囊菌菌种取出,25℃条件下培养24h,用接种环挑取菌种菌丝在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)平板上划线,28℃条件下培养4d。

1.3.2 孢子悬液的制备

取2cm²活化后的黑曲霉、根霉、冠突散囊菌菌片,分别接种于茶水比(m/V)为1:30、1:30、1:60的茶汤培养基中,黑曲霉、根霉25℃、130 r/min培养2d,冠突散囊菌28℃、120 r/min培养6d,备用^[11-12]。

1.3.3 茶汤培养基制备

将茶叶用粉碎机粉碎后,过40目筛,分别按茶水比为1:30和1:60的比例称取茶叶,在100℃蒸馏水中浸提20min,过滤,分装于250mL的三角瓶中,每瓶装100mL,于120℃条件下灭菌20min,冷却,备用。

1.3.4 液体发酵培养

将制备好的黑曲霉、根霉、冠突散囊菌孢子悬浮液各取1.0mL分别接种到已灭菌的1:30、1:30、1:60的茶汤培养基中,黑曲霉、根霉于25℃、130 r/min的条件下发酵4d,每1d取一次样,冠突散囊菌于28℃、120 r/min的条件下发酵8d,每2d取一次样^[11-12]。设黑曲霉、根霉以茶水比1:30的自然发酵茶汤为对照CK1,冠突散囊菌以茶水比1:60的自然发酵茶汤为对照CK2。

1.3.5 样品处理

过滤各阶段发酵液,以相同茶水比的自然发酵液为对照样,测定多酚类总量、儿茶素各组分含量、没食子

酸、黄酮苷、茶黄素、茶红素、茶褐素含量,以上各项指标的测定均重复3次。

1.3.6 指标测定

茶多酚总量:GB/T 8313—1987《茶 茶多酚测定》中的酒石酸铁比色法测定。

黄酮类化合物总量:三氯化铝比色法测定。

茶色素:分光光度计法^[13]测定。

儿茶素(ctechin, C)组分、没食子酸(gallic acid, GA):高效液相色谱法,色谱分析条件:色谱柱:Agilent TC-C₁₈(4.6mm×250mm, 5μm);检测器:紫外检测器278nm;样品采用梯度洗脱,洗脱液由A、B两相组成,A相:甲醇,B相:0.05%三氟乙酸水溶液,流速:0.8mL/min,柱温:35℃,进样量:20μL;采用外标法测定。

1.4 数据统计与作图

采用Excel 2003和SPSS 13.0软件进行处理,用SigmaPlot 10.0软件作图,并对实验数据进行显著性差异。

2 结果与分析

2.1 发酵过程茶汤多酚类总量变化动态

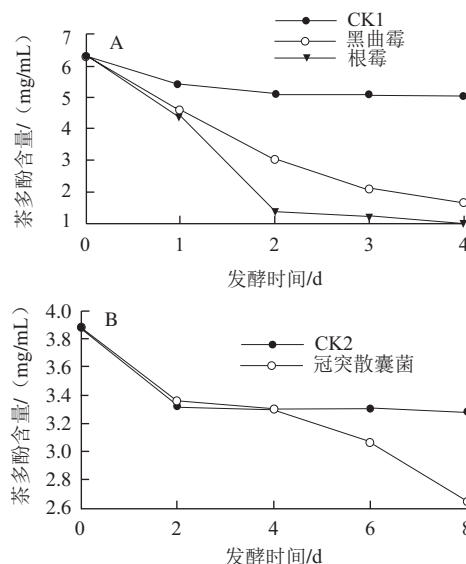


图1 茶汤发酵过程中茶多酚的含量变化

Fig.1 Change in the content of tea polyphenols in tea infusion during fermentation

由图1A可知,黑曲霉、根霉液态发酵过程中,茶多酚含量随着发酵时间的延长而显著降低($P<0.05$)。与发酵初期相比,黑曲霉发酵液中茶多酚含量降低了74.42%,根霉发酵液降低了83.77%。说明黑曲霉、根霉发酵过程中多酚类物质发生明显转化,且根霉的转化能力强于黑曲霉,这是由于两者产生的多酚氧化酶活性不同造成的。

由图1B可知,发酵前4 d,冠突散囊菌发酵液中的茶多酚含量变化趋势与自然发酵茶汤相比,无显著差异($P>0.05$),这是由于发酵初期冠突散囊菌生长速度较为缓慢;发酵后4 d差异显著($P<0.05$),在冠突散囊菌的作用下,茶多酚含量减少了31.73%,较自然发酵茶汤降低了19.46%,与冠突散囊菌发酵过程中分泌胞外酶,催化茶多酚氧化、缩合以及产物之间的聚合等系列反应有关^[14]。此外,根据文献[12]报道,菌丝体在生长过程能吸收茶汤中部分茶多酚。实验过程中发现,发酵4 d后冠突散囊菌生物量明显增加,对茶多酚的吸收也因此增加,这可能是发酵后期茶汤中多酚含量显著下降的另一个原因。

2.2 发酵过程中茶汤黄酮类化合物总量的变化动态

黄酮类化合物是一类重要的生物学活性物质,具有改善血液循环、提高免疫力等多种保健功效,其含量的高低与茶汤的滋味色泽密切相关^[15],可作为评判普洱茶品质的指标之一。

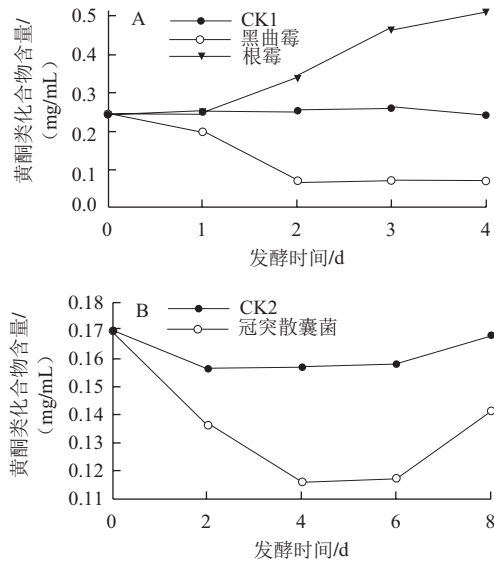


图2 茶汤发酵过程中黄酮类化合物的含量变化

Fig.2 Change in the content of flavonoids in tea infusion during fermentation

如图2A、B所示,不同微生物在液态发酵过程中对黄酮类化合物总量的影响规律不同。黑曲霉发酵液中黄酮类总量在发酵前期(0~2 d)显著下降,下降幅度为72%,发酵后期(2~4 d)无明显变化。冠突散囊菌发酵前期(0~4 d)黄酮类总量降低了31.76%,达到显著差异水平($P<0.05$)。说明黑曲霉、冠突散囊菌生长繁殖过程中分泌胞外酶以及有机酸^[9,16],促使黄酮类物质发生酶促氧化和酸水解等一系列生化反应,同时,黄酮类氧化产物还可与咖啡碱形成络合物^[17]。黄酮类物质的减少有助于茶汤滋味的醇化和改善茶汤汤色,随着发酵时间的延长,黑曲霉发酵液、冠突散囊菌发酵液汤色逐渐变得“橙黄明亮”,说明黄酮类物质含量的降低,有利于改善茶汤汤色。而根霉发酵液中黄酮类物质总量随着发酵时间的延长呈显著上升趋势($P<0.05$),与发酵前相比增加了94.92%。这是由于茶叶中黄酮类物质大

部分是以糖苷形式存在,在高温高湿的灭菌环境下迅速水解^[17],含量降低。而根霉的淀粉酶活性很高^[18],茶汤发酵过程中淀粉迅速降解,促使黄酮类与糖重新结合,从而含量增加。此外,冠突散囊菌容易分泌淀粉酶^[19],其发酵后期黄酮类总量的增加可能由于黄酮类与糖结合的速率高于其氧化水解速率。

2.3 发酵过程中茶汤儿茶素组分含量的变化动态

儿茶素是茶叶中的重要活性物质,没食子酸是普洱茶的特征成分之一,具有清除人体自由基、降脂、降糖等功效^[20-21]。在渥堆工艺中,微生物能够分泌多酚氧化酶、单宁酶等,共同促使茶多酚,尤其是儿茶素发生转化,进而产生茶色素等一系列氧化产物。

表1 不同发酵时间茶汤儿茶素组分含量

Table 1 Catechin contents in tea infusion at different fermentation times

菌种	发酵时间/d	GA含量/(mg/100 mL)	C含量/(mg/100 mL)	EGC含量/(mg/100 mL)	EGCG含量/(mg/100 mL)	EC含量/(mg/100 mL)	ECG含量/(mg/100 mL)
CK1	0	205.20±0.56 ^a	53.00±0.05 ^a	44.10±0.10 ^a	89.50±0.41 ^a	56.20±0.13 ^a	97.20±0.12 ^a
	1	140.19±1.05 ^b	42.10±0.64 ^b	35.40±0.18 ^b	27.20±0.12 ^b	14.00±0.07 ^b	96.10±0.11 ^a
	2	135.71±0.98 ^b	41.70±0.37 ^b	34.10±0.11 ^b	32.40±0.22 ^b	13.70±0.11 ^b	98.80±0.25 ^a
	3	203.49±1.28 ^a	39.50±0.55 ^b	14.60±0.17 ^d	75.80±0.20 ^b	57.60±0.31 ^a	95.60±0.13 ^a
	4	138.60±0.56 ^b	43.40±0.97 ^b	31.60±0.22 ^c	28.10±0.03 ^d	15.90±0.18 ^b	98.90±0.28 ^a
黑曲霉	0	205.20±0.12 ^a	53.00±0.17 ^a	44.10±0.23 ^d	89.50±0.12 ^a	56.20±0.25 ^a	97.20±0.31 ^a
	1	404.05±0.23 ^a	69.20±0.12 ^a	61.40±0.15 ^a	50.67±0.03 ^b	15.70±0.18 ^b	9.74±0.05 ^b
	2	203.34±0.07 ^b	62.82±0.06 ^b	60.06±0.35 ^b	25.51±0.23 ^c	3.05±0.05 ^c	1.90±0.09 ^c
	3	7.86±0.15 ^c	68.42±0.26 ^c	55.47±0.32 ^c	16.63±0.17 ^d	3.52±0.09 ^c	1.65±0.04 ^c
	4	5.82±0.12 ^c	59.43±0.29 ^b	6.01±0.38 ^c	5.30±0.15 ^c	4.28±0.07 ^c	1.90±0.05 ^c
根霉	0	205.20±0.12 ^a	53.00±0.17 ^b	44.10±0.23 ^a	89.50±0.12 ^a	56.20±0.19 ^b	97.20±0.21 ^a
	1	100.80±0.23 ^b	60.54±0.07 ^a	39.47±0.03 ^b	12.38±0.12 ^b	77.41±0.32 ^a	5.25±0.07 ^b
	2	7.84±0.03 ^c	17.27±0.03 ^c	15.09±0.40 ^c	8.54±0.12 ^c	25.15±0.15 ^c	2.860±0.01 ^c
	3	8.41±0.12 ^c	17.10±0.35 ^c	8.67±0.06 ^d	3.74±0.03 ^d	24.80±0.22 ^c	1.65±0.22 ^c
	4	5.73±0.03 ^c	4.60±0.12 ^d	2.72±0.03 ^c	4.16±0.12 ^d	7.38±0.14 ^d	1.14±0.14 ^c
CK2	0	144.60±1.04 ^a	40.60±0.02 ^a	15.40±0.23 ^a	55.60±0.31 ^a	34.90±0.12 ^a	62.30±0.88 ^a
	2	122.24±2.00 ^b	26.43±0.25 ^b	15.40±0.11 ^a	35.31±0.33 ^b	20.05±0.11 ^c	58.59±0.61 ^b
	4	113.39±1.08 ^c	25.68±0.21 ^b	9.44±0.04 ^b	29.79±0.14 ^c	21.05±0.13 ^c	54.17±0.42 ^c
	6	115.01±0.99 ^c	22.61±0.11 ^c	9.49±0.12 ^b	33.08±0.13 ^c	22.49±0.15 ^c	60.66±0.35 ^c
	8	125.11±0.79 ^b	24.01±0.27 ^b	8.34±0.13 ^c	37.46±0.21 ^b	30.76±0.22 ^b	58.61±0.22 ^b
冠突散囊菌	0	144.60±0.12 ^a	40.60±0.06 ^d	15.40±0.06 ^d	55.60±0.04 ^d	34.90±0.08 ^a	62.30±0.26 ^c
	2	105.52±0.17 ^c	49.49±0.20 ^a	10.31±0.17 ^c	29.47±0.09 ^b	11.04±0.11 ^b	4.76±0.11 ^b
	4	112.51±0.03 ^b	48.76±0.17 ^b	11.44±0.17 ^b	27.06±0.11 ^c	7.74±0.05 ^c	2.10±0.02 ^c
	6	100.43±0.17 ^d	49.76±0.42 ^a	11.05±0.15 ^b	30.25±0.30 ^b	3.98±0.05 ^d	2.10±0.08 ^c
	8	100.39±0.04 ^d	43.08±0.03 ^c	8.39±0.23 ^d	24.45±0.22 ^d	4.66±0.10 ^d	2.24±0.12 ^c

注:字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

由表1可知,在黑曲霉、根霉、冠突散囊菌的作用下,表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechingllte, EGCG)、表儿茶素(epicatechin, EC)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechingllte, ECG)随着发酵时间的延长均呈现显著的下降趋势($P<0.05$),其中根霉发酵液中儿茶素含量下降尤为显著($P<0.05$),EGC、EGCG、EC、ECG含量与发酵前相比,分别下降了93.83%、95.35%、86.87%、98.83%。这可能是因为微生物分泌的胞外酶作用下,酯型儿茶素降解形成简单儿茶素,简单儿茶素进一步发生氧化生成茶色素类物质。此外,菌丝体生长过程中分泌有机酸以及对儿茶素的吸收,均导致发酵液中儿茶素含量的降低^[22]。黑曲霉、冠突散

囊菌发酵液中C含量先增加后减少,而根霉发酵液中C的含量呈下降趋势,与自然发酵茶汤相比存在显著差异($P<0.05$)。说明发酵初期,黑曲霉、冠突散囊菌对酯型儿茶素的降解能力高于对儿茶素的氧化能力,因此C含量呈上升趋势;而根霉在整个发酵过程中均表现出很强的氧化能力,进而产生茶色素等一系列氧化产物。根霉发酵液中没食子酸(gallic acid, GA)含量显著下降($P<0.05$),与发酵前相比降低了97.21%,而黑曲霉发酵中GA含量先增加后减少,而冠突散囊菌作用下GA含量则表现为先减少后增加,这也是由于不同微生物对GA的生成转化速率不同而引起的。

2.4 发酵过程茶汤茶色素的变化动态

茶黄素(theaflavin, TF)、茶红素(thearubigin, TR)、茶褐素(theabrownin, TB)均为茶多酚不同程度的氧化产物,是普洱茶的主要色素物质。随着发酵时间的增加,茶多酚氧化程度逐渐加深,茶黄素与茶红素的积累进一步转化为茶褐素^[23]。

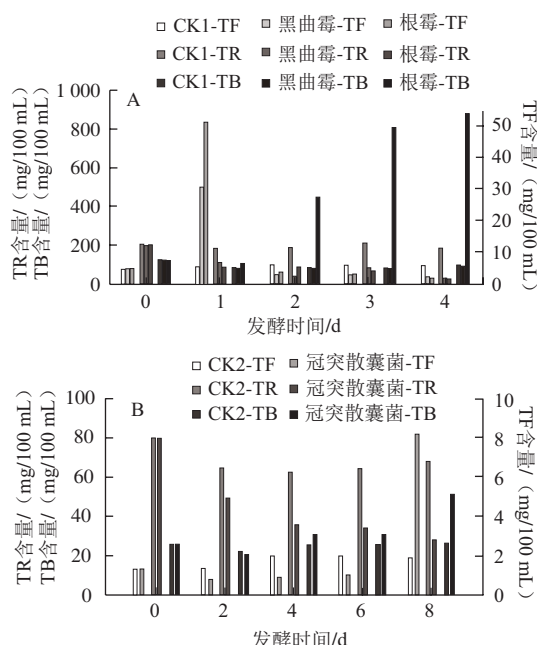


图3 茶汤发酵过程中花色素含量变化

Fig.3 Change in the content of tea pigments in tea infusion during fermentation

由图3A、B分析可知,黑曲霉、根霉发酵过程中,茶黄素含量先增加后减少,这是由于发酵初期(0~1 d)儿茶素氧化聚合形成茶黄素的速率远远大于茶黄素进一步氧化的速率,发酵后期则相反;而冠突散囊菌发酵液中的茶黄素含量先减少后增加,说明发酵前期(0~4 d)多酚类总量无明显变化,发酵后期茶多酚大量转化为茶色素,与上述冠突散囊菌发酵液中茶多酚含量变化情况相符。黑曲霉、根霉、冠突散囊菌发酵液中,茶红素含量在整个发酵过程中呈总体下降趋向,达显著差异水平($P<0.05$)。黑曲霉发酵第3天,茶红素含量的略微上升与茶红素作为聚合过程的中间产物有关,一方面通过TF的氧化聚合而增加,另一方面TR进一步氧化聚合而减

少。根霉、冠突散囊菌发酵液中茶褐素含量显著增加,增加速率根霉高于冠突散囊菌。与发酵前相比,根霉、冠突散囊菌发酵液茶褐色含量分别增加了6.4、1倍,具显著差异性($P<0.05$)。说明一定数量根霉的存在,有利于形成普洱茶醇厚品质。黑曲霉发酵液与自然发酵茶汤相比,茶褐素含量变化趋势无显著差异($P>0.05$)。

3 结论

随着发酵过程的进行,茶多酚含量显著降低,黄酮类化合物总量在黑曲霉、冠突散囊菌作用下分别减少72%、31.76%,在根霉作用下增加了94.92%;儿茶素各组分的含量变化较大,其中表型儿茶素EGC、EGCG、EC、ECG均呈现显著的下降趋势,而C、GA则在不同菌株作用下表现出不同的变化规律;茶黄素在黑曲霉、根霉作用下先增加后减少,冠突散囊菌则相反;茶红素呈总体下降趋向,茶褐素在根霉、冠突散囊菌作用下显著增加。研究结果对进一步探明转化产物分子结构、活性及其转化形成的机理具有一定参考价值。

参考文献:

- [1] 薛水英,张勇.普洱茶的主要化学成分及其保健作用的研究[J].农业与技术,2008,28(5):71-73.
- [2] 方祥,李斌,陈栋,等.普洱茶功效成分及其品质形成机理研究进展[J].食品工业科技,2008,29(6):314-315.
- [3] 温琼英,刘素纯.黑茶渥堆(堆积发酵)过程中微生物种群的变化[J].茶叶科学,1991(增刊1):15-17.
- [4] 刘仲华,黄建安,施兆鹏.黑茶初制中主要酶类的变化[J].茶叶科学,1991(增刊1):8-12.
- [5] 张大春,王登良,郭勤.普洱茶渥堆作用研究进展[J].中国茶叶,2002,24(5):6-8.
- [6] 王增盛,施兆鹏,刘仲华.论黑茶品质及风味形成机理[J].茶叶科学,1991(增刊1):20-23.
- [7] 张灵枝,程楚镇,李焯.普洱茶渥堆过程主要酶系活性变化研究[J].食品科学,2010,31(11):1-4.
- [8] 张灵枝,王登良,陈维信.发酵程度对普洱茶活体抗氧化作用的影响[J].茶叶科学,2010,30(3):208-212.
- [9] 周红杰,李家华,赵龙飞,等.渥堆过程中主要微生物对于云南普洱茶品质形成的研究[J].茶叶科学,2004,24(3):212-218.
- [10] 杨抚林,邓放明,赵玲艳,等.茯砖茶花过程中优势菌的研究进展[J].茶叶科学技术,2005(1):4-7.
- [11] 刘文瑶,陈忠正,李斌,等.绿茶茶汤混菌发酵过程中内质成分的变化[J].茶叶科学,2011,31(3):225-229.
- [12] 徐瑞瑞,李立祥,倪媛,等.绿茶液冠突散囊菌发酵期间品质变化的研究[J].安徽农业大学学报,2010,37(3):478-482.
- [13] 黄意欢.茶学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1997:126-127.
- [14] 黄怀生,郑红发,栗本文,等.茯砖茶中冠突散囊菌的代谢产物研究[J].茶叶通讯,2010,37(2):15-17.
- [15] 吴平.微生物种群在形成六堡茶品质中的作用研究[J].广东茶业,2007(3):15-18.
- [16] 金冬双,龚淑英.黑茶的微生物作用研究进展[J].茶叶,2007,33(4):203-207.
- [17] 傅冬和,刘仲华,黄建安,等.茯砖茶加工过程中主要化学成分的变化[J].食品科学,2008,29(2):64-67.
- [18] 曹冠华,王文光,孔楠,等.普洱茶中主要微生物与品质的关系及发酵方法优化的探讨[J].茶叶科学技术,2011(4):1-5.
- [19] 齐祖同,孙曾美.茯砖茶中优势菌种的鉴定[J].菌物学报,1990(3):176-179.
- [20] 吕海鹏,林智,谷记平,等.普洱茶中的没食子酸研究[J].茶叶科学,2007,27(2):104-110.
- [21] 张冬英,邵宛芳,刘仲华,等.普洱茶功能成分单体降糖降脂作用研究[J].茶叶科学,2009,29(1):41-46.
- [22] 陈喧,屠幼英,童启庆,等.绿茶活性成分在酵母发酵过程中的代谢动力学研究[J].茶叶科学,2002,22(1):66-69.
- [23] 宛晓春.茶叶生物化学[M].北京:中国农业出版社,2003:277.