

发酵方法对普洱茶茶褐素样品组成的影响

吴恩凯, 王秋萍*, 龚加顺*, 张婷婷
(云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 采用水提醇沉法从塔宾曲霉液态发酵普洱茶粉和传统固态发酵工艺所产普洱熟茶中提取茶褐素。应用居里点热裂解气相色谱-质谱联用技术及比色法研究液态发酵茶褐素样品和固态发酵茶褐素样品的化学组分。结果显示, 液态发酵样品中的茶褐素、总多酚、总黄酮、总儿茶素和氨基酸显著高于固态发酵样品 ($P < 0.05$); 液态发酵样品中的总糖、多糖、茶黄素显著低于固态发酵样品 ($P < 0.05$); 液态发酵样品与固态发酵样品的蛋白质含量差异不显著 ($P > 0.05$)。在不同居里点热裂解温度下, 固态发酵样品与液态发酵样品的裂解产物分别有12种 (380 °C) 和9种共同成分 (600 °C), 两者在不同温度下的裂解产物中, 酚类种类最多, 含量最高的化合物是咖啡因。

关键词: 普洱茶; 塔宾曲霉; 茶褐素; 液态发酵; 固态发酵; 化学成分; 居里点热裂解气相色谱-质谱联用

Effect of Fermentation Methods on Theabrownin Composition of Pu-erh Tea

WU Enkai, WANG Qiuping*, GONG Jiashun*, ZHANG Tingting
(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Theabrownins (TB) were extracted from instant Pu-erh tea made by submerged fermentation using *Aspergillus tubingensis* and from ripened Pu-erh made by conventional solid-state fermentation. Curie point pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry (CP-Py-GC-MS) and colorimetry were used to analyze the TB composition of Pu-erh tea. Results showed that the contents of theabrownins, total polyphenols, total flavonoids, total catechins and amino acids in instant Pu-erh tea were significantly higher than those in ripened Pu-erh ($P < 0.05$), while the contents of total carbohydrate, polysaccharides and theaflavins were significantly lower in instant Pu-erh tea ($P < 0.05$). On the other hand, no significant difference in protein content between the two teas was observed ($P > 0.05$). At different Curie point pyrolysis temperatures (380 and 600 °C), 12 and 9 compounds were found to be common to the pyrolysis products of TB from both tea samples. The majority of these pyrolysis products were phenolic compounds with caffeine being the most predominant.

Keywords: Pu-erh tea; *Aspergillus tubingensis*; theabrownins; submerged fermentation; solid-state fermentation; chemical composition; Curie point pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry (CP-Py-GC-MS)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171201-006

中图分类号: TS272

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 04-0215-07

引文格式:

吴恩凯, 王秋萍, 龚加顺, 等. 发酵方法对普洱茶茶褐素样品组成的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 215-221.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171201-006. <http://www.spkx.net.cn>

WU Enkai, WANG Qiuping, GONG Jiashun, et al. Effect of fermentation methods on theabrownin composition of Pu-erh tea[J]. Food Science, 2019, 40(4): 215-221. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171201-006. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-12-01

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31560456); 云南省农业基础研究联合专项资助项目 (2017FG001-089)

第一作者简介: 吴恩凯 (1991—) (ORCID: 0000-0002-0689-053X), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与功能。

E-mail: wuenkai0318@163.com

*通信作者简介: 王秋萍 (1987—) (ORCID: 0000-0002-5932-8479), 女, 讲师, 博士, 研究方向为植物多酚功能及其微生物转化。E-mail: qpwang@ynau.edu.cn

龚加顺 (1971—) (ORCID: 0000-0003-0920-0466), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学与茶叶化学。

E-mail: gong199@163.com

茶褐素是指茶叶中以儿茶素为主的多酚类化合物氧化聚合而成的大分子水溶性色素,是一类易溶于水,但不溶于乙醇、甲醇、乙酸乙酯、正丁醇、三氯甲烷等有机溶剂的高聚物质^[1]。茶褐素具有减肥、调节血脂、抗动脉粥样硬化、抗氧化等作用,是普洱茶的主要活性物质,在普洱熟茶中茶褐素平均质量分数为12%^[1-8]。

由于茶褐素具有多种生物活性,快速高效获得茶褐素是当前茶叶科学研究的热点之一。目前茶褐素的获取主要有3种途径:一是采用水提醇沉法从各类黑茶尤其是普洱茶中提取茶褐素^[6,8],然而黑茶存在生产周期长(30 d以上)、茶褐素含量高低不均、生产过程易污染杂菌、生产过程可控性和自动化差的技术问题;二是以茶多酚、没食子酸、新鲜茶叶或茶水提物等为原料,采用化学^[9-10]或酶促法^[11-12]合成茶褐素,然而化学合成法中使用的化学氧化剂如铁氰化钾,不仅影响所得茶褐素的食用安全性,同时也会对环境造成一定的污染,酶促合成法制备茶褐素,快速便捷,所得茶褐素安全性高,然而此方法使用的酶制剂成本通常较高;三是采用微生物液态发酵法快速合成茶褐素^[13-14],此法通常是将普洱茶固态发酵中的优势微生物,如黑曲霉(*Aspergillus niger*)、塔宾曲霉(*A. tubingensis*)、米曲霉(*A. oryzae*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等,用于液态发酵绿茶水提物或绿茶水提物和茶叶混合物制备茶色素。此法效率高、成本低,其生产条件及环境容易控制,易实现自动化。在前期研究中,从普洱茶固态发酵过程中分离得到优势菌种塔宾曲霉,可直接在绿茶水提物中生长繁殖,无需额外添加任何碳氮源,并能快速地将绿茶水提物中的多酚类物质转化为大分子水溶性茶褐素。塔宾曲霉液态发酵绿茶茶汤合成茶褐素速率是固态发酵的11倍^[14]。李桃等^[15]曾报道,液态自然发酵的茶褐素与固态发酵茶褐素均含有羧基和酚羟基,且液态茶褐素中的两种官能团均比固态茶褐素多,两种茶褐素总还原力均具有剂量依赖性,活性相似。塔宾曲霉为普洱茶固态发酵中的优势菌种^[14,16],采用塔宾曲霉纯种液态发酵方法得到的茶褐素化学组成与从传统固态发酵普洱茶中所提取茶褐素的差别尚鲜见报道。

本实验主要比较塔宾曲霉液态发酵茶褐素和传统固态发酵茶褐素化学成分的区别,旨在探讨液态发酵茶褐素与传统固态发酵茶褐素组分的差异,从而证明新工艺液态发酵法制备茶褐素的可行性,为快速高效获得茶褐素提供理论依据,为推动普洱茶产业多元化、健康可持续发展提供动力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

普洱茶熟茶(GB/T 14456.2—2008《绿茶 第二部分:大叶种绿茶》,生产许可证QS53351401 1057)云南春茗茶业有限公司;大叶晒青绿茶 云南昆明雄达茶城;塔宾曲霉TISTR3647(GenBank序列号:KJ948640, KJ948650, KJ948652)从普洱茶固态发酵中分离所得。

茛三酮(生物纯) 上海斯信生物科技有限公司;
牛血清白蛋白(生物纯) 上海源叶生物科技有限公司;
其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Jan-80离心机 常州市华普达教学仪器有限公司;
A360紫外-可见分光光度计 翱艺仪器(上海)有限公司;
RE-52A旋转蒸发器 上海亚荣仪器厂; BILON-12真空冷冻干燥机 郑州比朗仪器有限公司; JHP-5居里点热裂解(Curie point pyrolysis, CP-Py)仪 日本分析工业株式会社; 7890A-5975C气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用仪 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 固态发酵茶褐素样品的制备^[6,8,17]

普洱茶熟茶茶样→10倍蒸馏水浸提2次→过滤→合并滤液→减压浓缩(65℃, 0.07 MPa)→乙醇醇沉(滤液-无水乙醇1:4, V/V), 静置6 h→4 000 r/min离心10 min→沉淀→蒸馏水溶解→真空冷冻干燥→固态发酵茶褐素样品

1.3.2 液态发酵茶褐素样品的制备

大叶晒青绿茶→沸水浸提(茶水比1:30(g/mL))→过滤→茶汤→巴氏杀菌(80℃, 30 min)→冷却至室温→接种塔宾曲霉TISTR3647→37℃, 搅拌速率250 r/min, 通气量0.5 vvm, 发酵72 h→发酵液→过滤→55℃减压浓缩→巴氏杀菌(80℃, 30 min)→冷冻干燥→液态发酵普洱茶粉→蒸馏水溶解→乙醇醇沉(茶汤-无水乙醇1:4, V/V), 静置6 h→4 000 r/min离心10 min→沉淀→蒸馏水溶解→真空冷冻干燥→液态发酵茶褐素样品

1.3.3 组分的测定

将0.025 g茶褐素溶于10 mL水中,用pH计测其pH值。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法^[18],标准曲线方程为 $y=1.1083x$, $R^2=0.9952$ (x 为牛血清白蛋白质量浓度/(mg/mL), y 为595 nm波长处吸光度)。氨基酸测定采用茛三酮比色法^[19],标准曲线方程为 $y=0.5057x$, $R^2=0.9998$ (x 为谷氨酸质量浓度/(mg/mL), y 为570 nm波长处吸光度)。

总糖、多糖测定采用苯酚-硫酸法^[20-21], 标准曲线方程为 $y=14.638x$, $R^2=0.9989$ (x 为葡萄糖质量浓度/(mg/mL), y 为490 nm波长处吸光度)。测定多糖含量时, 样品制样方法: 将0.025 g茶褐素溶于1 mL水中, 加入4 mL无水乙醇醇沉6 h后4 000 r/min离心10 min, 所得沉淀溶于蒸馏水后即得多糖待测液。总多酚、总黄酮采用福林-酚比色法^[22], 标准曲线方程为 $y=9.061x$, $R^2=0.9922$ (x 为没食子酸质量浓度/(mg/mL), y 为765 nm波长处吸光度)。测定总黄酮时, 样品制样方法: 于2 mL EP管中加入1 mL所测总多酚的样品、0.5 mL HCl溶液(浓盐酸-水1:4, V/V)、0.5 mL 35%甲醛溶液, 暗处放置24 h后4 000 r/min离心5 min, 沉淀为黄酮样品^[23]。总儿茶素采用香兰素比色法^[24], 标准曲线方程为 $y=7.5209x$, $R^2=0.9997$ (x 为表儿茶素质量浓度/(mg/mL), y 为500 nm波长处吸光度)。茶色素的测定采用Roberts萃取比色法^[25-26]。

1.3.4 CP-Py-GC-MS分析条件

CP-Py条件: 热裂解时间10 s, 热裂解室温度分别为380、600 °C; 进样针温度为380 °C^[21]。

GC条件: J&W DB-5石英毛细柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 分析采用程序升温: 初始温度60 °C, 保持5 min, 以10 °C/min速率升至270 °C, 保持8 min, 以5 °C/min速率升至380 °C, 保持2 min; 载气为氦气; 流量为5.0 mL/min。

MS条件: 离子源温度220 °C; 传输线温度270 °C; 电子电离源; 电子能量70 eV; 扫描时间0.2 s; 质量扫描范围50~400 u。

称取试样0.5 mg, 包裹于铁磁体的热箔片中, 分别在380 °C和600 °C条件下裂解, 进样分析。主要裂解产物含量的确定采用面积归一化法^[27], 测定各类裂解物质的相对含量。

1.4 数据和图像处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据先进行Grubbs检验, 以排除过失误差; 经 G 检验合格的数据, 采用SPSS 19.0, 用邓肯氏法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同发酵方法普洱茶茶褐素样品化学组分比较

由表1可知, 液态发酵茶褐素样品的pH值高于固态发酵茶褐素样品($P<0.05$), 均属于弱酸性物质。液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品的蛋白质含量差异不显著($P>0.05$); 液态发酵样品中的总糖、多糖、茶黄素显著低于固态发酵($P<0.05$); 液态发酵茶褐素样品中的氨基酸、总多酚、总黄酮、总儿茶素和茶褐素则显著高于固态发酵($P<0.05$); 茶红素未检出。儿茶素和茶褐素是普洱茶的主要活性物质, 而液态发酵茶褐素样品的总儿茶素含量和茶褐素含量均为固态发酵茶褐素

样品的2.3倍。值得注意的是, 本研究测得液态发酵茶样品的茶褐素相对含量高于100%, 这是由于茶褐素的定量分析采用的是传统Roberts萃取比色法, 此法自1963年发表以来, 被广泛用于测定各类茶中的茶褐素含量, 然而在测定茶粉等新式产品中茶褐素含量时, 易出现此现象。杨妍等^[28]基于茶褐素在270 nm波长下有特征性吸收峰, 曾建立一种茶褐素紫外光谱定量测定法, 然而由于现无市售的茶褐素标准品, 此法难以得到普及。

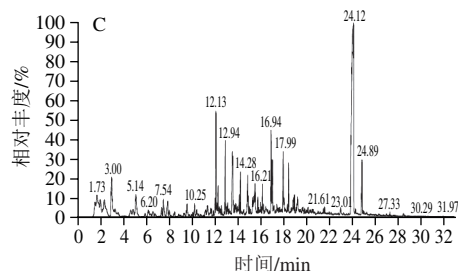
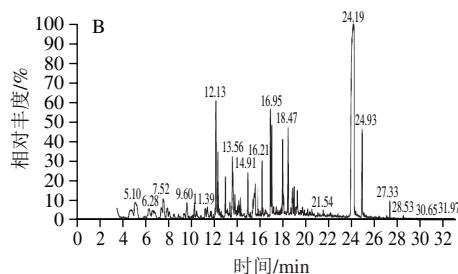
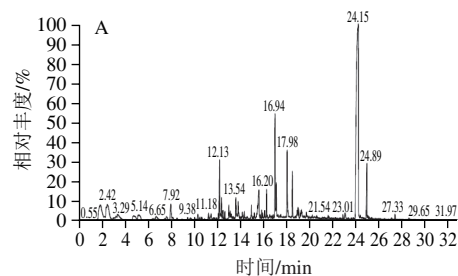
表1 固态发酵茶褐素与液态发酵茶褐素样品组分比较

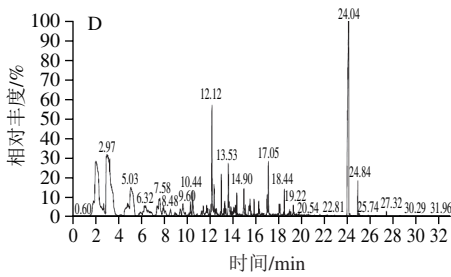
Table 1 Theabrownin compositions of instant and ripened Pu-erh tea

检测指标	茶褐素样品	
	液态发酵	固态发酵
pH	6.91±0.02 ^B	6.21±0.02 ^A
蛋白质/(g/kg)	400.67±9.44 ^A	324.33±23.94 ^A
氨基酸/(g/kg)	56.82±4.22 ^B	44.81±3.67 ^A
总糖/(g/kg)	145.31±7.32 ^A	192.97±18.60 ^B
多糖/(g/kg)	142.62±12.68 ^A	181.48±13.79 ^B
总多酚/(g/kg)	321.76±13.46 ^B	278.07±10.74 ^A
总黄酮/(g/kg)	314.83±5.16 ^B	267.76±10.64 ^A
总儿茶素/(g/kg)	55.15±2.15 ^B	23.76±0.44 ^A
茶黄素/(g/kg)	0.79±0.21 ^A	1.87±0.70 ^B
茶红素/(g/kg)	ND	ND
茶褐素/(g/kg)	1 749.52±117.39 ^B	752.99±17.31 ^A

注: 同行不同大写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。ND.未检测到。

2.2 不同发酵茶褐素样品CP-Py-GC-MS分析





A.固态发酵 (380 ℃) ; B.液态发酵 (380 ℃) ;
C.固态发酵 (600 ℃) ; D.液态发酵 (600 ℃) 。

图1 固态发酵茶褐素与液态发酵茶褐素样品在不同居里点热裂解温度下的GC-MS图

Fig.1 GC-MS profiles of theabrownins extracted from instant and ripened Pu-erh tea at varying Curie-point pyrolysis temperatures

从图1A和表2可以看出, 固态发酵茶褐素样品在380 ℃热裂解条件下得到的裂解产物共有123种, 经鉴定的29种, 占总产物的70.49%。其中包括酚类6种(14.38%)、酮类3种(1.71%)、吡咯2种(2.23%)、胺类2种(1.12%)、酯类2种(0.39%)、酸类2种(0.07%)、吡啶1种(2.73%)、嘌呤2种(0.23%)、醛类1种(0.18%)、呋喃1种(0.16%)、嘧啶1种(0.44%)、咖啡因(42.26%)、可可碱(3.06%)、茶碱(0.06%)和其他物质(1.47%)。

从图1B和表3可以看出, 液态发酵茶褐素样品在380 ℃热裂解条件下得到的裂解产物共有142种, 经鉴定的21种, 占总产物的60.27%。其中包括酚类4种(12.61%)、酮类2种(1.10%)、吡咯2种(4.12%)、胺类1种(0.40%)、酯类1种(0.39%)、嘌呤2种(0.24%)、吡啶1种(2.47%)、呋喃1种(0.13%)、咖啡因(34.66%)、可可碱(3.57%)、茶碱(0.06%)和其他物质(0.52%)。

在380 ℃热裂解条件下(匹配度≥60%), 液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品得到的裂解产物共有12种共同成分, 包括色素酚类(苯酚、邻苯二酚、4-甲基儿茶酚、1,3-苯二酚)、吡咯类(*N*-乙基吡咯、吡咯)、嘌呤类(1,3,7,8-四甲基黄嘌呤、1,7-二甲基黄嘌呤)、2-甲基苯并噻唑、咖啡因、可可碱、茶碱。液态发酵茶褐素与固态发酵茶褐素样品裂解产物中, 化合物数量最多的是酚类, 其次是吡咯类和嘌呤类。其中两者裂解产物中含量最高的化合物是咖啡因, 其次是酚类。

从图1C和表4可以看出, 固态发酵茶褐素样品在600 ℃热裂解条件下得到的裂解产物共有153种, 经鉴定的26种, 占总产物的45.39%。其中包括酚类3种

(5.07%)、酮类2种(0.94%)、吡咯2种(2.13%)、呋喃类2种(2.81%)、酸类1种(0.61%)、醇类1种(0.32%)、吡啶2种(1.70%)、嘧啶2种(0.45%)、嘌呤2种(0.24%)、酯类1种(0.09%)、咖啡因(27.56%)、可可碱(2.14%)、茶碱(0.04%)和其他物质(1.29%)。

从图1D和表5可以看出, 液态发酵茶褐素样品在600 ℃热裂解条件下得到的裂解产物共有124种, 经鉴定的21种, 占总产物的36.85%。其中包括酚类3种(6.84%)、酮类3种(1.19%)、吡咯5种(4.69%)、胺类1种(0.45%)、酸类1种(0.46%)、酯类1种(0.16%)、嘌呤1种(0.10%)、吡啶1种(1.87%)、咖啡因(18.78%)、可可碱(1.29%)和其他物质(1.02%)。

表2 固态发酵茶褐素样品热裂解产物(380 ℃, 匹配度≥60%)

Table 2 Pyrolysis products of theabrownins extracted from instant Pu-erh tea (380 ℃, probability ≥ 60%)

化合物种类	物质名称	保留时间/min	匹配度/%	相对峰面积/%
酚类	苯酚 phenol	12.13	64.04	2.89
	3-甲氧基苯酚 3-methoxyphenol	16.39	80.17	0.03
	邻苯二酚 1,2-benzenediol	16.94	90.36	5.69
	4-甲基儿茶酚 4-methylcatechol	17.98	69.40	3.34
	1,4-苯二酚 1,4-benzenediol	18.45	65.72	1.85
酮类	1,3-苯二酚 1,3-benzenediol	18.85	73.41	0.58
	2-(5H)-呋喃酮 2(5H)-furanone	10.60	67.13	0.16
	2-甲基-3-羟基-4-吡喃酮 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone	13.07	78.32	0.41
	3,4-二甲基-1,5-二氢-2H-吡咯-2-酮 3,4-dimethyl-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one	13.75	69.71	1.14
	<i>N</i> -乙基吡咯 <i>N</i> -ethylpyrrole	4.69	63.44	1.11
吡咯	吡咯 pyrrole	5.14	69.77	1.12
	丁二酰亚胺 succinic acid imide	15.43	64.03	1.06
胺类	油酰胺 oleamide	28.53	71.74	0.06
	乙酸甘油酯 glycerola-monoacetate	14.51	68.26	0.20
酯类	己二酸二乙基己基酯 bis(2-ethylhexyl) adipate	27.33	66.59	0.19
	棕榈酸 palmitic acid	23.70	65.05	0.03
酸类	12-二甲氨基-10-氧癸酸 12-dimethylamino-10-oxodecanoic acid	25.31	73.99	0.04
	3-羟基吡啶 3-hydroxypyridine	15.55	75.73	2.73
吡啶	1,3,7,8-四甲基黄嘌呤 1,3,7,8-tetramethylxanthine	24.99	66.52	0.15
	1,7-二甲基黄嘌呤 1,7-dimethylxanthine	25.09	95.19	0.08
嘌呤	5-甲基呋喃醛 5-methyl furfural	9.97	93.71	0.18
	2-乙酰基呋喃 2-acetyl furan	8.45	74.91	0.16
呋喃	5-甲基嘧啶 5-methyluracil	23.01	72.97	0.44
	咖啡因 caffeine	24.15	98.46	42.26
嘧啶	可可碱 theobromine	24.89	79.94	3.06
	茶碱 tetrahydropurine	27.03	94.17	0.06
碱类	2-甲基苯并噻唑 2-methylbenzoxazole	12.04	79.87	0.23
	甘氨酸- <i>D</i> -苏氨酸二水 <i>D</i> -threonine, <i>N</i> -glycyl-, dihydrate (9CI)	12.45	61.79	0.60
	propanoic acid, 2-methyl-, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	18.94	75.10	0.64

表3 液态发酵茶褐素样品热裂解产物 (380 ℃, 匹配度≥60%)
Table 3 Pyrolysis products of theabrownins extracted from ripened Pu-erh tea (380 ℃, probability ≥ 60%)

化合物种类	物质名称	保留时间/min	匹配度/%	相对峰面积/%
酚类	苯酚 phenol	12.13	65.38	4.96
	邻苯二酚 pyrocatechol	16.95	82.99	3.95
	4-甲基儿茶酚 4-methylcatechol	17.99	71.23	2.50
	1,3-苯二酚 1,3-benzenediol	18.86	64.69	1.20
酮类	3-甲基-2-环戊烯-1-酮 3-methyl-2-cyclopenten-1-one	10.24	65.50	0.79
	1-甲基-2-吡咯烷酮 1-methyl-2-pyrrolidinone	12.43	72.14	0.31
吡咯	吡咯 pyrrole	5.10	66.14	2.36
	3-甲基吡咯 pyrrole,3-methyl-	7.52	77.37	1.76
胺类	N-乙基琥珀酰亚胺 2,5-pyrrolidinedione,1-ethyl-	14.12	89.00	0.40
酯类	己二酸二(2-乙基己)酯 adipic acid bis (2-ethylhexyl) ester	27.33	66.53	0.39
嘌呤	1,3,7,8-四甲基黄嘌呤 1,3,7,8-tetramethylxanthine	25.02	68.92	0.16
	1,7-二甲基黄嘌呤 1,7-dimethylxanthine	25.11	92.13	0.08
吲哚	吲哚 indole	17.06	64.38	2.47
呋喃	2,2'-bifuran	17.84	60.84	0.13
碱类	咖啡因 caffeine	24.14	98.45	27.90
	咖啡因 caffeine	24.19	98.46	6.76
	可可碱 theobromine	24.93	81.45	3.57
	茶碱 theophylline	27.04	94.80	0.06
其他	2-甲基苯并噁唑 2-methylbenzoxazole	12.04	83.67	0.27
	吡咯-2-甲腈 1H-pyrrole-2-carbonitrile	16.28	76.07	0.20
	3-甲基吡啶氧化物 3-methylpyridine-N-oxide	18.14	76.61	0.05

表4 固态发酵茶褐素样品热裂解产物 (600 ℃, 匹配度≥60%)
Table 4 Pyrolysis products of theabrownins extracted from instant Pu-erh tea (600 ℃, probability ≥ 60%)

化合物种类	物质名称	保留时间/min	匹配度/%	相对峰面积/%
酚类	邻苯二酚 pyrocatechol	16.94	86.88	3.55
	1,4-苯二酚 1,4-benzenediol	18.46	64.04	1.37
	2-甲基间苯二酚 2-methylresorcinol	18.72	65.23	0.15
酮类	2-甲基-2-环戊烯-1-酮 2-methyl-2-cyclopenten-1-one	8.05	75.01	0.33
	3-甲基-2-环戊烯-1-酮 3-methyl-2-cyclopenten-1-one	10.25	60.13	0.61
吡咯	3-甲基吡咯 3-methylpyrrole	7.54	79.37	1.71
	2-乙基-4-甲基-1H-吡咯 2-ethyl-4-methyl-1H-pyrrole	11.23	74.05	0.42
呋喃	2-甲基呋喃 2-methylfuran	1.73	64.19	2.69
	2-乙酰基呋喃 2-acetyl furan	8.45	70.34	0.12
酸类	对羟基苯甲酸 4-hydroxybenzoic acid	10.46	61.42	0.61
醇类	麦芽醇 maltol	13.07	60.09	0.32
吲哚	吲哚 indole	17.06	65.61	1.66
	9H-吡啶 (3,4-b) 吲哚 9H-pyrido[3,4-b]indole	26.37	63.86	0.04
嘧啶	1,3-二甲基嘧啶 1,3-dimethyluracil	21.83	70.54	0.05
	5-甲基嘧啶 5-methyluracil	23.01	74.13	0.40
嘌呤	1,3,7,8-四甲基黄嘌呤 1,3,7,8-tetramethylxanthine	24.99	66.81	0.14
	1,7-二甲基黄嘌呤 1,7-dimethylxanthine	25.09	92.69	0.10
酯类	己二酸二(2-乙基己)酯 bis (2-ethylhexyl) adipate	27.33	61.28	0.09
碱类	咖啡因 caffeine	24.12	98.37	27.56
	可可碱 theobromine	24.89	81.64	2.14
	茶碱 theophylline	27.03	94.33	0.04
	乙苯 ethylbenzene phenylethane	4.88	68.81	0.48
其他	异己腈 4-methylpentanenitrile	6.80	62.82	0.20
	2-甲基苯并噁唑 2-methylbenzoxazole	12.04	85.90	0.46
	cyclo (leucylprolyl)	25.23	61.48	0.05
	二酚基丙烷 2,2-bis-4-hydroxyphenylpropane	28.52	62.07	0.10

表5 液态发酵茶褐素样品热裂解产物 (600 ℃, 匹配度≥60%)
Table 5 Pyrolysis products of theabrownins extracted from ripened Pu-erh tea (600 ℃, probability ≥ 60%)

化合物种类	物质名称	保留时间/min	匹配度/%	相对峰面积/%
酚类	苯酚 phenol	12.12	68.73	5.29
	邻苯二酚 pyrocatechol	16.93	88.20	0.77
	1,4-苯二酚 hydroquinone	18.44	71.80	0.78
酮类	3-甲基-2-环戊烯-1-酮 3-methyl-2-cyclopenten-1-one	10.23	70.35	0.89
	N-甲基吡咯烷酮 N-methyl-2-pyrrolidinone	12.43	73.22	0.27
	6H-purin-6-one,1,7-dihydro-1,7-dimethyl-	25.74	80.23	0.03
吡咯	3-甲基吡咯 3-methylpyrrole	7.49	70.00	0.95
	2-甲基吡咯 1H-pyrrole, 2-methyl-	7.58	71.72	1.45
	2-乙基-4-甲基-1H-吡咯 2-ethyl-4-methyl-1H-pyrrole	11.22	76.02	0.40
	3-甲基吡啶 3-picoline	6.32	60.40	0.91
胺类	3-羟基吡啶 3-hydroxypyridine	15.44	64.89	0.98
	N-乙基琥珀酰亚胺 N-ethylsuccinimide	14.11	83.64	0.45
酸类	乙烷过氧酸 1cyano1 (2-methylphenyl) ethyl ester	19.22	82.86	0.46
酯类	己二酸二(2-乙基己)酯 bis (2-ethylhexyl) adipate	27.32	68.48	0.16
嘌呤	1,3,7,8-四甲基黄嘌呤 1,3,7,8-tetramethylxanthine	24.96	63.9	0.10
吲哚	吲哚 indole	17.05	66.04	1.87
碱类	咖啡因 caffeine	24.04	98.40	18.78
	可可碱 theobromine	24.84	80.88	1.29
其他	2-甲基苯并噁唑 2-methylbenzoxazole	12.04	88.66	0.40
	(2,4-cyclopentadiene-1-ylidenemethyl) benzene	16.26	77.39	0.18
	3,4-二羟基甲苯 3,4-dihydroxytoluene	17.97	72.25	0.44

在600 ℃热裂解条件下(匹配度≥60%)，液态发酵茶褐素与固态发酵茶褐素的裂解产物共有9种共同成分，包括色素酚类(邻苯二酚、1,4-苯二酚)、3-甲基-2-环戊烯-1-酮、3-甲基吡咯、1,3,7,8-四甲基黄嘌呤、己二酸二(2-乙基己)酯、2-甲基苯并噁唑、咖啡因、可可碱。液态发酵茶褐素与固态发酵茶褐素样品的裂解产物中，化合物数量最多的分别是酚类和吡咯，含量最高的化合物是咖啡因，其次是酚类。

通过分析液态发酵茶褐素与固态发酵茶褐素样品在不同热裂解温度下得到的裂解产物发现，不管是在380 ℃还是600 ℃热裂解条件下(匹配度≥60%)，两者裂解产物中相对含量最高的化合物均为咖啡因，其次是酚类。在380 ℃时，液态发酵茶褐素与固态发酵茶褐素样品裂解产物中咖啡因相对含量分别为34.66%和42.26%；在600 ℃时，液态发酵茶褐素与固态发酵茶褐素样品裂解产物中咖啡因相对含量分别为18.78%和27.56%。表明由于居里点热裂解温度的不同，裂解产物中的咖啡因相对含量亦发生变化，但液态发酵茶褐素样品裂解产物中的咖啡因含量低于固态发酵茶褐素样品。在前期研究中^[26]，发现塔宾曲霉液态发酵法制备的速溶普洱茶粉咖啡因相对含量为13.52%，而市售的速溶普洱茶粉(提取自传统固态发酵普洱茶)的咖啡因相对含量为9.65%。本研究中，液态茶褐素的制备是在速溶普洱茶粉的基础上采用醇沉法进一步纯化，因而其裂解产物中咖啡因相对含量亦发生变化。

通过分析比较不同发酵方法对普洱茶茶褐素组成的影响,发现液态发酵茶褐素样品中的氨基酸、总多酚、总黄酮、总儿茶素和茶褐素相对含量显著高于固态发酵茶褐素样品 ($P<0.05$)。其中液态发酵茶褐素样品的总儿茶素和茶褐素相对含量均是固态发酵茶褐素的2.3倍,说明采用塔宾曲霉液态发酵法制备茶褐素可提高茶褐素粗提物中总儿茶素和茶褐素的相对含量。在380℃热裂解的条件下(匹配度 $\geq 60\%$),液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品的裂解产物共有12种共同成分;在600℃热裂解条件下(匹配度 $\geq 60\%$),液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品裂解产物共有9种共同成分。液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品的组分及含量存在一定的差异,可能是由于液态发酵法中,茶褐素的生物合成只有塔宾曲霉参与;而传统的固态发酵是自然发酵,体系中的微生物组成极其复杂,除塔宾曲霉外还有其他霉菌、酵母及细菌参与了茶褐素的生物合成^[14,29-30]。

3 结论

液态发酵茶褐素样品中的茶褐素、总多酚、总黄酮、总儿茶素和氨基酸含量显著高于固态发酵茶褐素样品 ($P<0.05$),其中液态发酵茶褐素样品的总儿茶素和茶褐素含量均是固态发酵茶褐素样品的2.3倍;液态发酵茶褐素样品中的总糖、多糖、茶黄素含量显著低于固态发酵样品 ($P<0.05$);液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品蛋白质含量差异不显著 ($P>0.05$)。在380℃热裂解条件下(匹配度 $\geq 60\%$),液态发酵样品与固态发酵样品的裂解产物共有12种共同成分;在600℃热裂解条件下(匹配度 $\geq 60\%$),液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品的裂解产物共有9种共同成分。液态发酵茶褐素样品与固态发酵茶褐素样品在不同温度下的裂解产物中相对含量最高的均为咖啡因,其次是酚类。本研究证明新工艺塔宾曲霉液态发酵法制备茶褐素具有可行性。

参考文献:

- [1] GONG J S, PENG C X, CHEN T, et al. Effects of theabrownin from Pu-erh tea on the metabolism of serum lipids in rats: mechanism of action[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): H182-H189. DOI:10.1111/j.1750-3841.2010.01675.x.
- [2] WANG Q P, PENG C X, GAO B, et al. Influence of large molecular polymeric pigments isolated from fermented Zijuan tea on the activity of key enzymes involved in lipid metabolism in rat[J]. Experimental Gerontology, 2012, 47(9): 672-679. DOI:10.1016/j.exger.2012.06.002.
- [3] WANG Q P, PENG C X, GONG J S, et al. Effects of enzymatic action on the formation of theabrownin during solid state fermentation of Pu-erh tea[J]. Journal of The Science of Food & Agriculture, 2011, 91(13): 2412-2418. DOI:10.1002/jsfa.4480.
- [4] WANG Q P, PENG C X, GONG J S, et al. Antioxidative effect of large molecular polymeric pigments extracted from Zijuan Pu-erh tea *in vitro* and *in vivo*[J]. Kasetsart Journal, 2013, 47: 739-747.
- [5] 薛志强, 李亚莉, 秘鸣, 等. 普洱茶保健功效研究进展[J]. 中国保健营养, 2012, 22(8): 2449-2451. DOI:10.3969/j.issn.1004-7484(x).2012.08.052.
- [6] 王秋萍, 龚加顺. “紫娟”普洱茶茶褐素对高脂饮食大鼠生长发育的影响[J]. 茶业科学, 2012, 32(1): 87-94. DOI:10.13305/j.cnki.jts.2012.01.010.
- [7] PENG C X, WANG Q P, LIU H R, et al. Effects of Zijuan pu-erh tea theabrownin on metabolites in hyperlipidemic rat feces by Py-GC/MS[J]. Journal of Analytical & Applied Pyrolysis, 2013, 104(10): 226-233. DOI:10.1016/j.jaap.2013.07.011.
- [8] LIU J, PENG C X, GAO B, et al. Serum metabolomics analysis of rat after intragastric infusion of Pu-erh theabrownin[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 96(11): 3708-3716. DOI:10.1002/jsfa.7556.
- [9] BAILEY R G, NURSTEN H E, MCDOWELL I. The chemical oxidation of catechins and other phenolics: a study of the formation of black tea pigments[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 63(4): 455-464. DOI:10.1002/jsfa.2740630413.
- [10] WAN X, NURSTEN H E, CAI Y, et al. A new type of tea pigment from the chemical oxidation of epicatechin gallate and isolated from tea[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 74(3): 401-408. DOI:10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3<401::AID-JSFA816>3.0.CO;2-J.
- [11] LEE Y, LIN Z, DU G, et al. The fungal laccase-catalyzed oxidation of EGCG and the characterization of its products[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 95(13): 2686-2692. DOI:10.1002/jsfa.7003.
- [12] WANG Q, GONG J, CHISTI Y, et al. Production of theabrownins using a crude fungal enzyme concentrate[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 231: 250-259. DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.06.010.
- [13] WANG Q, GONG J, CHISTI Y, et al. Bioconversion of tea polyphenols to bioactive theabrownins by *Aspergillus fumigatus*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(12): 2515-2522. DOI:10.1007/s10529-014-1632-0.
- [14] WANG Q P, GONG J S, CHISTI Y, et al. Fungal isolates from a Pu-erh type tea fermentation and their ability to convert tea polyphenols to theabrownins[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(4): M809-M817. DOI:10.1111/1750-3841.12831.
- [15] 李桃, 杜丽平, 肖冬光, 等. 普洱茶与液态发酵普洱茶粉中茶褐素的比较研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(11): 93-97. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.018.
- [16] 杨瑞娟, 吕杰, 严亮, 等. 普洱茶渥堆发酵中嗜热真菌的分离和鉴定[J]. 茶叶科学, 2011, 31(4): 371-378. DOI:10.13305/j.cnki.jts.2011.04.007.
- [17] 范艺凡, 彭春秀, 冯励, 等. 不同分子质量茶褐素对高脂饮食大鼠脂代谢关键酶的影响[J]. 中国食品学报, 2017, 17(11): 9-19. DOI:10.16429/j.1009-7848.2017.11.002.
- [18] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [19] FRIEDMAN M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides and proteins to agricultural and biomedical sciences[J]. Journal of Agriculture & Food Chemistry, 2004, 52(3): 385-406. DOI:10.1021/jf030490p.

- [20] DUBOIS M, GILLES K A, HANILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356. DOI:10.1021/ac60111a017.
- [21] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 125-127.
- [22] 杭州茶叶研究院. 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法: GB/T 8313—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [23] KOMES D, DUNJA H, BELŠČAK A, et al. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds[J]. Food Research International, 2010, 43(1): 167-176. DOI:10.1016/j.foodres.2009.09.022.
- [24] 张新富, 龚加顺, 周红杰, 等. 云南普洱茶中多酚类物质与品质的关系研究[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 230-233. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.04.048.
- [25] ROBERTS E, SMITH R. The phenolic substances of manufactured tea. IX. the spectrophotometric evaluation of tealiquors[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1963, 14(10): 689-700. DOI:10.1002/jsfa.2740141002.
- [26] WANG Q, BELŠČAK-CVITANOVIĆ A, DURGO K, et al. Physicochemical properties and biological activities of a high-theabrownins instant Pu-erh tea produced using *Aspergillus tubingensis*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 598-605. DOI:10.1016/j.lwt.2018.01.021.
- [27] PENG C X, LIU J, LIU H R, et al. Influence of different fermentation raw materials on pyrolyzates of Pu-erh tea theabrownin by curie-point pyrolysis-gas chromatography-mass spectroscopy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 54(1): 197-203. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2012.12.021.
- [28] 杨妍, 彭春秀, 刘华戎, 等. 普洱茶中茶褐素含量的紫外光谱法测定[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(7): 1850-1856. DOI:10.3964/j.isn.1000-0593(2013)07-1850-07.
- [29] HAAS D, PFEIFER B, REITERICH C, et al. Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(2): 316. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.024.
- [30] ZHANG Y, IDA S, MICHAEL S, et al. The microbiome and metabolites in fermented Pu-erh tea as revealed by high-throughput sequencing and quantitative multiplex metabolite analysis[J]. PLoS ONE, 2016, 11(6): e0157847. DOI:10.1371/journal.pone.0157847.