

普洱茶与液态发酵普洱茶粉中茶褐素的比较研究

李桃¹, 杜丽平¹, 肖冬光¹, 李长文², 徐咏全²

(1. 工业微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

(2. 云南天士力帝泊洱生物茶集团有限公司, 云南普洱 665000)

摘要: 采用有机溶剂萃取法提取液态自然发酵普洱茶粉和固态发酵工艺生产普洱熟茶“7572”的茶褐素, 对两种茶褐素的光谱学性质及理化性质进行比较分析。紫外-可见光谱(UV-Vis)表明, 液态茶褐素在380nm左右比固态茶褐素多一个吸收峰; 红外光谱(IR)分析结果显示, 两种茶褐素所含官能团相似, 均为多羟基的酚类化合物, 还可能有蛋白质和多糖与其结合; 对茶褐素酸性官能团定量分析表明, 两种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; 膜法分离分级茶褐素结果显示, 低聚(M<10 ku)部分在固、液态茶褐素中含量分别为26.74%和18.84%; 高聚(M>100 ku)部分在固态茶褐素中含量56.98%、在液态茶褐素中含量为70.72%; 两种茶褐素总还原力均具有剂量依赖性, 活性相似; 对膜分级后各组分还原力测定表明, 两种茶褐素的中聚部分(10 ku<M<100 ku)、高聚部分的总还原力均明显高于低聚茶褐素。

关键词: 普洱茶; 茶褐素; 光谱学性质; 总还原力

文章编号: 1673-9078(2014)11-93-97

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.018

Comparative Study on Theabrownins in Pu-erh Tea and Its Powder Fermented in Liquid State

LI Tao¹, DU Li-ping¹, XIAO Dong-guang¹, LI Chang-wen², XU Yong-quan²

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education; Tianjin Industrial Microbiology Key Lab, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Yunnan Tasly Deepure Biological Tea Group Co., Ltd, Puer 665000, China)

Abstract: To study the spectroscopic and physicochemical properties of theabrownins in ripened Pu-erh tea “7572” produced by solid-state fermentation and the Pu-erh powder produced by natural liquid-state fermentation, two types of theabrownins were extracted with an organic solvent. The UV-visible results showed that liquid theabrownin had an additional absorption peak at ~380 nm compared to solid theabrownin. The IR results indicated that the two theabrownins had similar functional groups. Both of them were composed of phenolic and carboxylic compounds, along with proteins and polysaccharides. The quantitative analysis of the acidic functional groups in theabrownins showed that both types of theabrownins contained carboxyl and phenolic hydroxyl groups, and the number of the two functional groups in liquid theabrownin was more than that in solid theabrownin. Theabrownins were isolated and graded based on membranes. The results showed that the contents of the oligomer fraction (M < 10 ku) in solid and liquid theabrownins were 26.74% and 18.84%, respectively. The contents of the high-polymer fraction (M > 100 ku) in solid and liquid theabrownins were 56.98% and 70.72%, respectively. The reducing powers of two theabrownins were dose-dependent and had similar activities. The measurement of the reducing power of each fraction after the grading by membranes indicated that the reducing powers of the middle- (10 ku < M < 100 ku) and high- (M > 100 ku) polymer fractions in both the theabrownins were significantly higher than that of the oligomeric fraction.

Key words: pu-erh tea; theabrownin; spectroscopic properties; reducing power

普洱茶是以云南大叶种茶 [*Camellia sinensis*

收稿日期: 2014-04-21

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目 (IRT1166)

作者简介: 李桃 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为现代酿造技术及生物分离

通讯作者: 杜丽平 (1967-), 女, 博士, 副教授, 主要从事发酵工艺及分离工程研究

(Linn.) var. *assamica* (Masters) Kitamura] 的鲜叶为原料, 经杀青、揉捻、日晒等工序制成晒青毛茶, 然后采用特殊的“渥堆”工艺后发酵形成滋味醇厚、汤色红褐、陈香显著、叶底红褐的独特品质, 具有消食去腻、生津止渴、解乏除烦、减肥降脂^[1]、抗衰老^[2]、抗突变^[3]和抑菌^[4]、抗病毒^[5]等多种保健功效, 受到越来越多的人喜爱, 也是目前普洱茶消费的主流产品^[6]。

渥堆发酵是普洱茶品质形成的关键,其实质是茶叶内的化学物质在微生物参与的酶促与湿热的综合作用下,发生一系列转化、异构、降解、聚合、偶联等复杂的化学反应而形成普洱茶独特的品质。罗龙新^[1]、龚加顺^[2]、梁名志^[3]等先后对普洱茶渥堆发酵过程中主要生化成分的变化规律进行了研究,结果表明,在渥堆过程中茶多酚、儿茶素、茶红素、氨基酸、可溶性糖含量下降,茶褐素类物质成倍增加,说明茶褐素可能对普洱茶感官品质和功能品质具有重要的影响。龚家顺^[4]研究表明,在普洱茶发酵过程中微生物对茶褐素的形成起主导作用,添加外源物也对茶褐素的形成有一定影响。近年来,为满足人们对茶叶产品多样性的需求,普洱茶产业开始了由单一的茶初加工产品向多元化的深加工产品的转变。主要产品有茶膏、速溶茶粉、液态茶饮料等茶饮品。其中普洱茶粉生产要经过“渥堆”发酵、提取、浓缩、干燥等多个步骤,工艺繁琐、生产周期长。本实验室以云南大叶种晒青毛茶为原料,开发了液态自然发酵生产普洱茶粉新工艺^[11]。

本文对新工艺发酵普洱茶粉与普洱熟茶典型代表“7572”中茶褐素的基本理化性质及其活性进行比较,旨在探讨新工艺发酵普洱茶粉与普洱熟茶茶褐素在组成和活性方面的差异,为进一步优化液态发酵工艺条件,提高产品质量提供理论依据,为推动普洱茶产业多元化、健康可持续发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

云南大叶种晒青毛茶由云南天士力帝泊洱生物茶集团有限公司提供;大益牌普洱熟茶(唛号7572)由云南西双版纳勐海茶厂生产。

无水乙醇,二氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇,溴化钾,氢氧化钠,浓盐酸,邻苯二甲酸氢钾,氯化钡,醋酸钙,铁氰化钾,三氯乙酸,三氯化铁,L-抗坏血酸均为国产分析纯;实验室用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

岛津 UV-1800 紫外可见分光光度计,布鲁克 VECTOR 22 傅立叶变换红外光谱仪,东京理化 N-100 旋转蒸发仪, SIM FD5-2.5 冷冻干燥机,密理博 LabScale 切向流系统。

1.3 实验方法

1.3.1 茶褐素的制备

液态发酵普洱茶粉茶褐素(液态茶褐素)的制备:以云南大叶种晒青毛茶为原料,采用普洱茶液态自然发酵工艺^[11]发酵,发酵液离心除菌后浓缩、干燥得到茶粉;为方便操作本实验直接采用发酵浓缩液,依次经二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取得水层溶液,水层冷冻干燥得到液态茶褐素样品。

普洱熟茶“7572”茶褐素(固态茶褐素)的制备:取大益普洱熟茶,粉碎,加 80% 乙醇水溶液浸泡过夜,茶渣按一定比例沸水浸提 100 min,过滤浓缩。浓缩液依次经二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取得水层溶液,水层冷冻干燥得到固态茶褐素样品。

1.3.2 茶褐素紫外可见光谱分析

取一定量的茶褐素样品,加超纯水溶解定容,配制成浓度为 0.50 mg/mL 的溶液,超纯水为空白对照,用紫外可见光扫描,扫描范围 190 nm~1100 nm。

1.3.3 茶褐素红外光谱分析

茶褐素样品经 KBr 压片后,于傅里叶红外光谱仪扫描,扫描波数范围 400~4000 cm^{-1} ,分变率 4 cm^{-1} ,扫描次数 16。

1.3.4 茶褐素酸性基测定

采用 BaCl_2 和 $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ 沉淀法^[12]对普洱茶茶褐素官能团进行定量分析。

1.3.5 茶褐素的分级

取一定量的茶褐素样品,加水溶解,利用切向流系统使溶液先通过 100 ku 的膜,将溶液分为大于 100 ku 的浓缩液和小于 100 ku 透过液;再将透过液通过 10 ku 的膜,将溶液分为大于 10 ku 的浓缩液与小于 10 ku 透过液。将膜分离后的溶液浓缩冷冻干燥,称各部分的质量,计算各部分所占的百分含量。

1.3.6 茶褐素总还原力的测定

采用铁氰化钾法^[13]对茶褐素样品的总还原力进行测定。取梯度浓度的茶褐素溶液 1.0 mL,加入 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.6) 2.5 mL 和 1% 的铁氰化钾溶液 2.5 mL,混合物于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 20 min,然后加入 2.5 mL 10% (m/V) 三氯乙酸溶液,混合溶液 3 000 r/m 离心 10 min,精密吸取上清液 2.5 mL,加入 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液,在 700 nm 处测吸光度。以超纯水为空白对照。将实验重复三次,求平均值。

1.3.7 数据分析

采用 Origin 8.0 软件进行数据统计分析和作图。

2 结果与讨论

2.1 固态与液态茶褐素的光谱学分析

2.1.1 固态与液态茶褐素的紫外可见光谱分析

将两种茶褐素配制成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液进行紫外可见光谱扫描, 结果如图 1 所示。

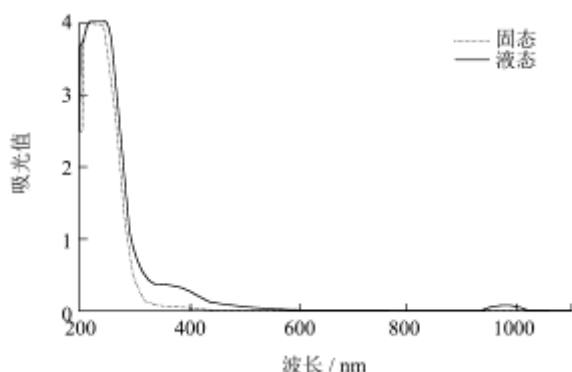


图 1 固态与液态茶褐素的紫外可见扫描图谱

Fig.1 UV-visible spectra of solid and liquid theabrownins

由图 1 的光谱图可知, 在波长为 250 nm 附近两种茶褐素的吸收峰均达到最高, 在 380 nm 左右, 液态茶褐素比固态茶褐素多了一个吸收峰。可能是由于液态茶褐素分子的聚合程度较大, 导致吸收的红移。

2.1.2 固态与液态茶褐素的红外光谱差异分析

固态与液态茶褐素的红外光谱分析结果如图 2 所示。

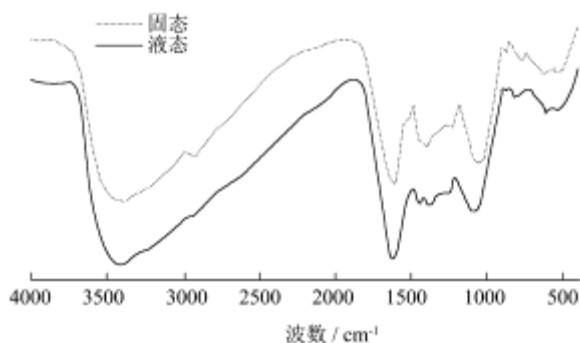


图 2 固态与液态茶褐素的红外扫描图谱

Fig.2 IR spectra of solid and liquid theabrownins

由图 2 可知, 两种茶褐素的红外光谱大致相同。茶褐素混合物在 3475 cm^{-1} 处的强宽吸收峰为 O-H 伸缩振动峰, 存在分子间和分子内的氢键, 在 3600~3000 cm^{-1} 出现的宽峰还可能包含 N-H 伸缩振动; 2850 cm^{-1} 处为亚甲基的 C-H 伸缩振动峰; 1634 cm^{-1} 处为 C=O 的伸缩振动峰, 结合 1531 cm^{-1} 处的吸收峰可以判断该处可能还包含芳环骨架振动引起吸收; 1354 cm^{-1} 处为 COO- 的对称伸缩振动峰; 1313 cm^{-1} 处应为芳香族的 C-N 伸缩振动峰, 1242 cm^{-1} 处为酚的 C-O 伸缩振动峰; 1098、1050 cm^{-1} 两处为 C-O-C 的伸缩振动峰, 应该是糖苷的特征吸收峰; 787、701 cm^{-1} 两处为苯环的 C-H 面外弯曲振动。红外光谱分析表明, 固、液态茶褐素结构中均含有羟基与羧基基团, 并且还有蛋白质和多

糖与酚类物质结合^[14]。

2.2 固态与液态茶褐素活性官能团分析

采用 BaCl_2 和 $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 沉淀法对固态与液态茶褐素酸性官能团进行定量分析, 结果表 1 所示。

表 1 固态与液态茶褐素酸性官能团分析 (mmol/g)

Table 1 Quantitative analysis of functional groups of solid and

liquid theabrownins			
	总酸性基	羧基	酚羟基
液态	28.34±0.11	8.10±0.04	20.24±0.11
固态	8.39±0.05	1.70±0.02	6.69±0.04

由表 1 可知, 在两种茶褐素中, 酚羟基的含量均高于羧基, 表明酚羟基是普洱茶茶褐素中主要的酸性官能团, 与文献报道的普洱熟沱茶褐素中的结果一致^[12]; 无论是总酸性基团、羧基还是酚羟基, 液态茶褐素中的含量均高于固态茶褐素。

2.3 固态与液态茶褐素总还原力分析

梯度浓度的两种茶褐素溶液, 采用铁氰化钾法测定茶褐素总还原力, 并以 Vc 作为对照, 探讨两种工艺发酵所得的茶褐素总还原力, 实验结果如图 3、图 4。

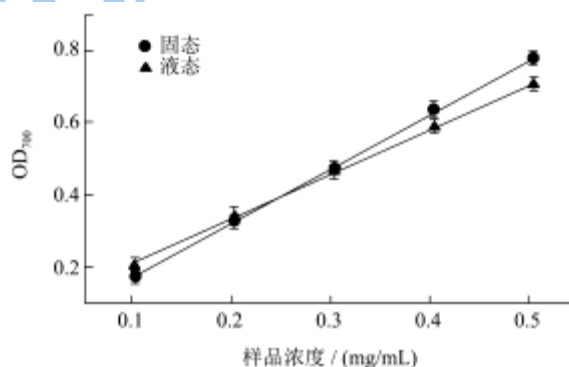


图 3 茶褐素总还原力的测定

Fig.3 Measurement of the reducing power of theabrownins

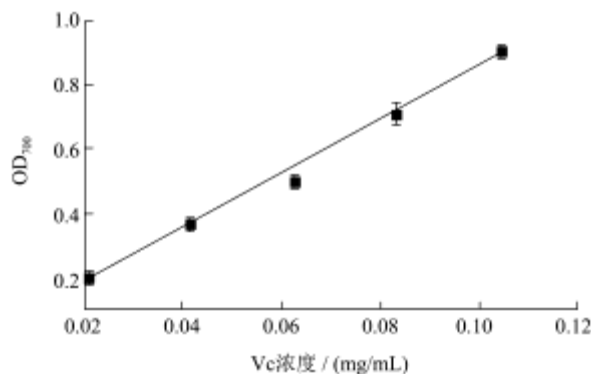


图 4 Vc 总还原力的测定

Fig.4 Measurement of the reducing power of Vc

具有还原力的物质, 在一定的条件下能够将铁氰化钾还原为亚铁氰化钾, 加入含有三价铁的物质, 三

价铁与亚铁氰化钾络合,形成普鲁兰,该物质在 700 nm 处有最大吸收,物质的总还原力与其抗氧化活性有关。由图 3、4 可以看出,在浓度为 0.1~0.5 mg/mL 的范围内,两种茶褐素还原力均具有剂量依赖性,总还原力差别不大;与相同浓度的 Vc 相比还原力小。

2.4 固态与液态茶褐素分子量分布及各级分总还原力差异分析

2.4.1 固态与液态茶褐素分子量分布分析

将大叶种晒青毛茶的水提物灭菌后,按照晒青毛茶液态自然发酵工艺进行发酵,并对发酵液中的茶褐素进行提取,以此作为空白对照(CK)。将该茶褐素和另外两种茶褐素膜分离,计算膜分离后各级分的百分含量,结果如图 2~4 所示。

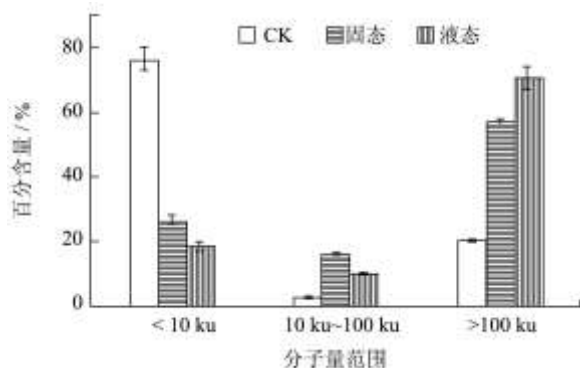


图 5 各级分茶褐素含量

Fig.5 Percent composition of different fractions in theabrownins

由图 5 可知,液态茶褐素中,低聚部分(M<10 ku)占总量的 18.84%,中聚部分(10 ku<M<100 ku)占总量的 10.44%,高聚部分(M>100 ku)占总量的 70.72%;固态发酵茶褐素中,低聚部分为 26.74%,中聚部分为 16.28%,高聚部分为 56.98%;对照 CK 中低聚部分、中聚部分、高聚部分分别占 76.47%、2.91%、20.61%。由于 CK 中没有微生物,多酚氧化需要的各种酶均来自植物,因此低聚茶褐素含量较高,高聚茶褐素含量较低。而在液态茶褐素中高聚部分比固态发酵茶褐素含量高,中聚和低聚部分则低于固态发酵茶褐素,这可能与微生物所产生的酶在液态基质中比在固态基质中更易传递有关,有关机理还需进一步深入研究。

2.4.2 各级分茶褐素总还原力的测定

采用膜分离的方法对两种茶褐素按照分子量进行分级,依次分为低聚(M<10 ku)、中聚(M>10 ku 且 M<100 ku)、高聚(M>100 ku)茶褐素。采用铁氰化钾法对各级分茶褐素的总还原力测定。

采用铁氰化钾法测定固态与液态茶褐素膜分离后

各级分的总还原力,以 OD₇₀₀ 表征样品的总还原力的大小。由图 6、7 可知,在浓度 0.1~0.5 mg/mL 的范围内,两种茶褐素各级分的总还原力与样品浓度呈良好的线性关系,相关系数 R² 均大于 0.99。两种茶褐素中,中、高聚部分的总还原力明显高于低聚部分,普洱茶茶褐素的活性可能与茶褐素聚合度有关;在固态茶褐素中中聚部分的总还原力高于高聚茶褐素,而在液态茶褐素中高聚部分的总还原力差距不大,相关机理还需进一步深入研究。

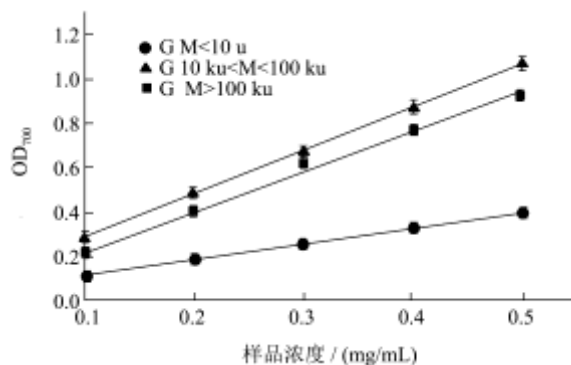


图 6 固态茶褐素各分级总还原力测定

Fig.6 Measurement of the reducing powers of different fractions of solid theabrownins

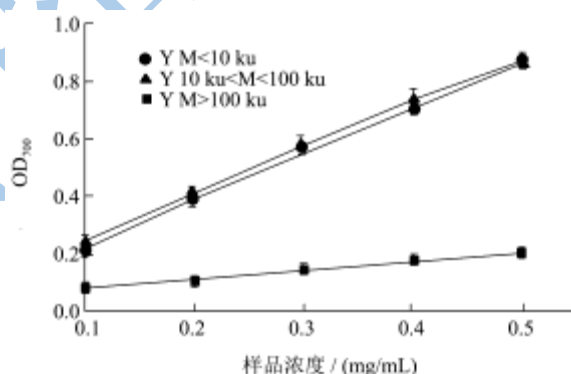


图 7 固态与液态茶褐素各分级总还原力测定

Fig.7 Measurement of the reducing powers of different fractions of liquid theabrownins

3 结论

- 3.1 结构分析表明:两种茶褐素所含官能团相似,均为多羟基的酚类化合物,并有蛋白质和多糖与其结合;
- 3.2 对茶褐素酸性官能团定量分析,两种茶褐素均含有羧基和酚羟基,并以后者为主,液态茶褐素中的两种官能团均比固态普洱茶茶褐素中多;
- 3.3 膜分离分级结果表明:液态茶褐素中,高聚部分比固态茶褐素中含量高,中聚和低聚部分含量则低于固态发酵茶褐素;
- 3.4 两种茶褐素的总还原力均具有剂量依赖性,活性接近,活性均低于 Vc;在两种茶褐素中,同级分茶褐

素还原力差别不大,但不同级分茶褐素的还原力差别较大,中聚、高聚茶褐素的总还原力明显高于低聚茶褐素。

参考文献

- [1] zhen-hui cao, da-hai gu, qiu-ye lin, et al. Effect of pu-erh tea on body fat and lipid profiles in rats with diet-induced obesity [J]. *Phytotherapy Research*, 2011, 25(2): 234-238
- [2] pin-der duh, gow-chin yen, wen-jye yen, et al. Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(26): 8169-8176
- [3] she-ching wu, gow-chin yen, bor-sen wang, et al. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea [J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2007, 40(3): 506-512
- [4] 胡永金,韩小溪,薛桥丽,等.普洱茶不同提取物体外抑菌活性研究[J].*现代食品科技*,2013,29(8):1770-1773
HU Yong-jin, HAN Xiao-xi, XUE Qiao-li, et al. Antibacterial activity of pu'er tea extracts in vitro [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(8): 1770-1773
- [5] ning huang, liu-meng yang, xiao-li li, et al. anti-hiv activities of extracts from pu-erh tea [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2012, 10(5): 347-352
- [6] yuh-shuen chen, bing-lan liu, yaw-nan chang. Bioactivities and sensory evaluation of pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(6): 557-563
- [7] 罗龙新,吴小崇,邓余良,等.云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J].*茶叶科学*,1998,18(1): 53-60
LUO Long-xin, WU Xiao-chong, DENG Yu-liang, et al. Variations of main biochemical components and their relations to quality formation during pile-fermentation process of yunan puer tea [J]. *Journal of Tea Science*, 1998, 18(1): 53-60
- [8] 龚加顺,周红杰,张新富,等.云南晒青绿毛茶的微生物固态发酵及成分变化研究[J].*茶叶科学*,2005,25(4):300-306
GONG Jia-shun, ZHOU Hong-jie, ZHANG Xin-fu, et al. Changes of chemical components in pu'er tea produced by solid state fermentation of sundried green tea [J]. *Journal of Tea Science*, 2005, 25(4): 300-306
- [9] 梁名志,夏丽飞,陈林波,等.普洱茶渥堆发酵过程中理化指标的变化研究[J].*中国农学通报*,2006,22(10):321-325
Liang Ming-zhi, Xia Li-fei, Chen Lin-bo, et al. Study on variation of physics and chemistry index during pile-fermentation of puerh-tea [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(10): 321-325
- [10] 龚加顺,陈一江,彭春秀,等.普洱茶发酵过程中不同添加物对茶褐素及其形成机制的影响[J].*茶叶科学*,2010,30(2): 101-108
GONG Jia-shun, CHEN Yi-jiang, PENG Chun-xiu, et al. Effect of different additives on the theabrownin and its formentation mechanism during pu-erh tea fermentation [J]. *Journal of Tea Science*, 2010, 30(2): 101-108
- [11] 徐瑞雪,杜丽平,郝瑞雪,等.普洱茶液态自然发酵的工艺研究[J].*食品工业科技*,2012,11:243-246
XU Rui-xue, DU Li-ping, HAO Rui-xue, et al. Study on technology of liquid natural fermentation of pu'er tea [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 11: 243-246
- [12] 秦谊,龚加顺,张惠芬,等. $BaCl_2$ 和 $Ca(CH_3COO)_2$ 沉淀法定量分析普洱茶茶褐素官能团[J].*林产化学与工业*,2010,6: 107-112
QIN Yi, GONG Jia-shun, ZHANG Hui-fen, et al. Quantitative determination of functional groups in theabrownine from pu-erh tea based on $bacl_2$ and $ca(ch_3coo)_2$ precipitation methods [J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2010, 6: 107-112
- [13] Dina Atmani, Nassima Chaher, Meriem Berboucha, et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected algerian medicinal plants [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(2): 303-309
- [14] Jia-shun Gong, Qin Zhang, Chun-xiu Peng, et al. Curie-point pyrolysis-gas chromatography-mass spectroscopic analysis of theabrownins from fermented zijuan tea [J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2012, 97: 171-180