

红曲霉与植物乳杆菌发酵普洱茶的抗氧化活性比较

黄媛, 于娟, 江小丽, 任玲, 董蕊, 鲁倩, 王建飞, 李亚莉, 周红杰*

(云南农业大学茶学院, 云南昆明 650201)

摘要: 该文探究添加红曲霉和植物乳杆菌发酵对普洱茶生化成分和抗氧化活性的影响。采用相关系数法分析主要生化成分和抗氧化指标的相关性。实验表明, 六个发酵茶样的水浸出物、黄酮、茶多酚含量范围分别是 50.64%~52.50%、0.77~0.95 mg/g、13.21%~11.07%, 单接植物乳杆菌 R 的茶多酚含量最高为 13.21%。不同处理的茶样体外抗氧化能力存在显著差异 ($P<0.05$), R 的总抗氧化能力、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率最高 (10.36 $\mu\text{g Trolox/mL}$ 、91.59%、29.43%)。相关性显示, 茶红素、茶褐素与抗氧化能力呈负相关, 但不显著; 咖啡碱、茶多酚、茶黄素、总黄酮指标与抗氧化能力都有一定的显著相关性, 其中茶多酚与总抗氧化能力、DPPH 自由基清除率呈极显著相关 ($P<0.01$), 相关系数为 0.74、0.95。添加菌种发酵的普洱茶具有较强抗氧化能力, 且单菌种发酵普洱茶的抗氧化能力比混合发酵普洱茶的抗氧化能力更强, 其中 R 的抗氧化能力最好。

关键词: 红曲霉; 植物乳杆菌; 发酵; 普洱茶; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2024)01-54-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.0070

Comparison of the Antioxidant Activities of Fermented Pu-erh Teas with *Monascus* and/or *Lactobacillus plantarum*

HUANG Yuan, YU Juan, JIANG Xiaoli, REN Ling, DONG Rui, LU Qian, WANG Jianfei,
LI Yali, ZHOU Hongjie*

(College of Tea Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The effects of the fermentation with *Monascus* and/or *Lactobacillus plantarum* on the biochemical components and antioxidant activities of Pu-erh teas were investigated. The correlation coefficient method was used to analyze the correlation between the main biochemical components and antioxidant indexes. The experiments showed that the contents of water extract, flavonoids and tea polyphenols of the six fermented tea samples were in the range of 50.64%~52.50%, 0.77~0.95 mg/g and 13.21%~11.07%, respectively, with the tea fermented with *L.plantarum* alone (R) having the highest tea polyphenol content (13.21%). There were significant differences ($P<0.05$) in the *in vitro* antioxidant capacity of the tea samples subjected to different treatments. R had the highest total antioxidant capacity, DPPH scavenging rate and hydroxyl radical scavenging rate (10.36 $\mu\text{g Trolox/mL}$, 91.59%, 29.43%, respectively). The correlation analysis showed that theophyllin and theaflavin were negatively correlated with antioxidant capacity (though not significantly);

引文格式:

黄媛,于娟,江小丽,等.红曲霉与植物乳杆菌发酵普洱茶的抗氧化活性比较[J].现代食品科技,2024,40(1):54-60.

HUANG Yuan, YU Juan, JIANG Xiaoli, et al. Comparison of the antioxidant activities of fermented pu-erh teas with *Monascus* and/or *Lactobacillus plantarum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1): 54-60.

收稿日期: 2023-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460215, K1400247000); 云岭产业技术领军人才 (发改委 [2014]1782, K2400102000); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2022Y228)

作者简介: 黄媛 (1998-), 女, 硕士生, 研究方向: 茶叶加工与质检, E-mail: 3169630193@qq.com

通讯作者: 周红杰 (1962-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 茶叶加工与品质鉴定, E-mail: 1051195348@qq.com

caffeine, tea polyphenols, theaflavin and total flavonoid indexes were significantly correlated with antioxidant capacity, among which tea polyphenols were highly significantly correlated with total antioxidant capacity and DPPH radical scavenging rate ($P < 0.01$) with the correlation coefficients being 0.74 and 0.95, respectively. The Pu-erh teas fermented with added strains had a relatively strong antioxidant capacity, and the antioxidant capacity of the fermented Pu-erh tea with a single strain was stronger than that with mixed strains, with the R having the highest antioxidant capacity.

Key words: *Monascus*; *Lactobacillus plantarum*; fermentation; pu-erh tea; antioxidative activity

普洱茶(熟茶)是以云南特有的大叶种晒青毛茶为原料,经适度潮水和一定时间的微生物发酵制成的茶叶^[1]。大量研究证实普洱熟茶具有降脂^[2]、降血糖^[3]、减肥^[4]、抗氧化等^[5]诸多保健功效,这与普洱茶丰富的内含物质有关。颜学行等^[6]研究认为将不同有益微生物应用于普洱茶的发酵中,可以提高普洱茶的品质。例如,用紫色红曲霉(*Monascus purpureus*) Mp-21 次级代谢产物进行分离纯化,发现该菌种具有开发成抗氧化、降血糖等功能性食品潜力^[7];乳酸菌发酵红酸汤可以明显减少亚硝酸盐的含量并缩短发酵时间^[8];阿曲霉 A1 (*Aspergillus amstelodami* A1) 发酵可改变茶叶的特征成分,提高普洱茶的感官品质^[9]。可见利用微生物发酵对茶叶功效和品质有一定的提升作用,通过工艺的改善有利于茶叶的发酵并提高其附加值。

红曲霉(*Monascus*)是腐生真菌,生长的最适 pH 值为 3.5~5,生长温度为 26~42 °C,最适温度为 32~35 °C^[10],可以代谢分泌多种功能性产物,包括酶、脂肪酸、有机酸、油脂、色素、洛伐他丁、麦角固醇、 γ -氨基丁酸等物质^[11,12]。红曲霉代谢物丰富,应用广泛,徐文流等^[13]用红曲霉发酵金银花,发现发酵后的红曲金银花具有较强的自由基清除能力,其中 ABTS⁺ 自由基清除能力提高了 61.39%, DPPH 自由基清除能力提高了 59.28%。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)是最广为人知的乳杆菌种之一,是一种公认的益生菌^[14,15],该菌属于短杆菌(*Brevibacterium*),厌氧或兼性厌氧,不产芽孢,最适生长温度为 30~35 °C,最适 pH 值为 6.5 左右,属于同型发酵乳酸菌^[16,17]。在许多食品发酵中有应用,成堃等^[18]以金银花、枸杞、全脂奶粉为原料,接种乳杆菌等微生物进行发酵,制作了具有独特中药风味的金银花枸杞酸奶。王姣琳等^[19]以藜麦为原料,利用红曲霉与乳酸菌混合发酵制备降压肽,得到的该抑制肽能保持良好的活性。暂未见关于两个菌种混合发酵普洱茶的探究,且外源菌种发酵普洱茶的抗氧化活性研究较少。因此,本文以晒青毛茶为原料,利用外源添加红曲霉和植物乳杆菌发酵普洱茶,探讨两个菌种对发酵普洱茶的生化成分影响,

并进一步探究其生物活性的差异,为普洱茶的深加工开发提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

材料:红曲霉来源于实验室保存的专利菌株 MPT13,专利号:201010182965.9;植物乳杆菌菌种 L34 购于宁波明舟生物科技有限公司,编号为:BMZ144978;晒青毛茶茶样购于云南临沧。

试剂:琼脂(分析纯),广州硕谱生物科技有限公司;DPPH 试剂、福林酚(分析纯),上海源叶生物科技有限公司;香兰素、碱式醋酸铅(均为分析纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;三氯化铝、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、碳酸氢钠、氯化亚锡(分析纯),天津市风船化学试剂科技有限公司;水合茚三酮、葡萄糖(分析纯),广东光华科技股份有限公司;蒽酮(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;95%乙醇、正丁醇、乙酸乙酯、甲醇(均为分析纯),天津市富宇精细化工有限公司;浓硫酸、浓盐酸(均为分析纯),重庆市川东化工(集团)有限公司;羟自由基清除能力、ABTS⁺ 自由基清除能力及总抗氧化能力(FRAP 法)测定试剂盒,苏州格锐思生物科技有限公司。

设备: DY04-13-38-00 BL-75G 灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SW-CJ-2D 超净台,苏州净化设备有限公司; HPX-250B 恒温恒湿培养箱,金坛市杰瑞尔电器有限公司; SKY-210Z 摇床,苏坤实业有限公司; UV-5100H 外可见分光光度计,海元析仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 红曲霉、植物乳杆菌的孢子悬浮液制备

将红曲霉以三点法点涂到 PDA 培养基中,于温度 28 °C,湿度 70% 的恒温恒湿培养箱培养,在平板中培养 6~8 d 后,将菌丝刮入 50 mL 的无菌水中,制备成孢子悬浮液;将植物乳杆菌以划线法培养于 MRS 培养基中,于温度 28 °C,湿度 70% 的恒温恒湿培养箱培养,在平板中培养 2~3 d 后,将菌丝刮

入 50 mL 的无菌水中，制备孢子悬浮液。

1.2.2 普洱茶固态发酵实验

实验室进行发酵试验，称取 50 g 晒青毛茶装于玻璃罐中，进行潮水使茶叶中含水量达 35%，在 121 °C、20 min 条件下高温高压灭菌，灭菌后接入等量的红曲霉、植物乳杆菌的孢子悬浮液 10 mL，控制温度 35±5 °C、湿度在 70%~80%，于恒温恒湿箱发酵 6 周，发酵过程中每周都接入相应等量的 10 mL 孢子悬浮液并定期翻堆、潮水；不接种菌种发酵的茶样为对照组（CK）。此外，实验设置了接种红曲霉的基础上在不同周期再添加植物乳杆菌发酵，以不接种菌株为对照。发酵茶样处理及编号见表 1。

表 1 发酵茶样处理

茶样编号	发酵 1 周	发酵 2 周	发酵 3 周	发酵 4 周	发酵 5 周	发酵 6 周
CK	水	水	水	水	水	出堆
R	植物乳杆菌	植物乳杆菌	植物乳杆菌	植物乳杆菌	植物乳杆菌	出堆
H	红曲霉	红曲霉	红曲霉	红曲霉	红曲霉	出堆
A	红曲霉	植物乳杆菌	红曲霉	红曲霉	红曲霉	出堆
B	红曲霉	红曲霉	红曲霉	植物乳杆菌	红曲霉	出堆
C	红曲霉	植物乳杆菌	红曲霉	植物乳杆菌	红曲霉	出堆

注：“水”表示进行潮水；“植物乳杆菌”表示接植物乳杆菌发酵；“红曲霉”表示接红曲霉发酵；“取样、出堆”表示对样品进行干燥并保存。

1.2.3 生化成分测定

水浸出物测定按照 GB/T 8305-2013《茶水浸

出物测定》规定方法测定；氨基酸测定按照 GB/T 8314-2013《茶 游离氨基酸总量的测定》规定方法测定；咖啡碱测定按照 GB/T 8312-2013《茶 咖啡碱测定》规定方法测定；茶多酚测定按照 GB/T 8313-2018《茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法》规定方法测定；茶红素、茶黄素、茶褐素采用萃取分离分光光度法^[20]测定；可溶性总糖测定按照蒽酮—硫酸比色法测定；黄酮测定按照三氯化铝比色法测定；儿茶素测定按照香荚兰素比色法测定。

1.2.4 抗氧化活性测定

茶样水提物的制备：准确称取磨碎试样 3 g；加 450 mL 沸水，在沸水浴中浸提 45 min，每一个样品设立 3 个平行，每隔 10 min 摇瓶一次，过滤。洗涤残渣，滤液合并于 500 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀，备用。

DPPH 自由基清除能力：DPPH 的清除能力测定参照文献^[21]，稍作修改。

羟自由基清除能力：按照羟自由基清除能力试剂盒加样表严格加样。

ABTS⁺ 自由基清除能力：按照 ABTS⁺ 自由基清除能力试剂盒加样表严格加样。

总抗氧化能力（FRAP 法）：按照总抗氧化能力（FRAP 法）试剂盒加样表严格加样。

1.3 数据处理

采用 Excel 2010 进行图表制作，数据处理；SPSS 64.0 软件进行显著性分析，相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 不同菌种发酵普洱茶的主要生化成分分析

表 2 茶样主要生化成分含量

	原料	CK	R	H	A	B	C
水浸出物/%	50.97 ± 1.36 ^{ab}	51.35 ± 0.66 ^{ab}	52.50 ± 0.29 ^a	50.64 ± 0.86 ^b	50.67 ± 0.58 ^{ab}	51.46 ± 0.89 ^{ab}	50.90 ± 0.26 ^{ab}
氨基酸/%	3.53 ± 0.17 ^{bc}	4.17 ± 0.05 ^a	4.09 ± 0.05 ^a	3.33 ± 0.16 ^c	3.95 ± 0.58 ^{ab}	3.30 ± 0.03 ^c	3.65 ± 0.02 ^{abc}
咖啡碱/%	3.93 ± 0.90 ^{bc}	3.78 ± 0.09 ^c	4.66 ± 0.21 ^{ab}	3.65 ± 0.33 ^c	5.14 ± 0.14 ^a	3.54 ± 0.13 ^c	4.82 ± 0.04 ^a
可溶性糖/%	4.24 ± 0.15 ^d	5.13 ± 0.37 ^a	5.12 ± 0.08 ^a	4.41 ± 0.05 ^{cb}	4.65 ± 0.16 ^{bc}	4.28 ± 0.13 ^d	4.82 ± 0.14 ^{ab}
茶多酚/%	11.56 ± 0.08 ^{bc}	10.65 ± 0.03 ^c	13.21 ± 1.15 ^a	11.07 ± 0.67 ^{bc}	11.61 ± 3.22 ^d	11.70 ± 0.24 ^{bc}	12.23 ± 0.85 ^b
总黄酮/(mg/g)	1.03 ± 0.18 ^{ab}	0.77 ± 0.1 ^b	0.81 ± 0.02 ^{ab}	0.82 ± 0.09 ^{ab}	0.92 ± 0.05 ^{ab}	0.86 ± 0.06 ^{ab}	0.95 ± 0.21 ^a
儿茶素/(mg/g)	0.75 ± 0.04 ^c	3.34 ± 0.10 ^a	3.26 ± 0.08 ^b	2.88 ± 0.18 ^c	3.04 ± 0.21 ^c	3.37 ± 0.07 ^b	2.39 ± 0.19 ^d
茶黄素/%	0.14 ± 0.01 ^c	0.23 ± 0.02 ^{cd}	0.28 ± 0.01 ^{ab}	0.24 ± 0.01 ^c	0.28 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.01 ^d	0.31 ± 0.01 ^a
茶红素/%	5.52 ± 0.23 ^a	4.55 ± 0.63 ^{bc}	4.72 ± 0.17 ^{bc}	5.95 ± 0.56 ^a	3.14 ± 0.12 ^d	5.22 ± 0.18 ^{ab}	4.11 ± 0.18 ^c
茶褐素/%	1.90 ± 0.07 ^d	2.60 ± 0.16 ^c	2.45 ± 0.04 ^c	6.39 ± 0.26 ^a	5.45 ± 0.11 ^b	6.06 ± 0.16 ^a	5.31 ± 0.27 ^b

注：同一行中标有不同字母，表示在 0.05 水平上差异显著（ $P < 0.05$ ）。

如表 2 所示, 不同处理的茶样之间生化成分存在一定差异。茶样的水浸出物在 50.64%~52.50% 之间, 高于国家标准中对普洱茶(散茶)规定的标准要求($\geq 28\%$)^[1]。7 个茶样之间 R 和 H 存在显著差异($P < 0.05$), 其余茶样之间无显著差异。其中 R 水浸出物含量最高为 52.50%, 其次是 B 为 51.46%, 这与茶样发酵方式有关系, 因添加菌种的不同会影响茶叶的水浸出物含量^[22]。R 水浸出物含量最高为 52.50%, 其次是 B 为 51.46%, 有研究表明, 植物乳杆菌会抑制多酚类和蛋白质结合^[23], 使结合态的多酚类物质释放变成游离态, 同时植物乳杆菌会保持发酵过程中多酚物质的活性^[24]。可能是植物乳杆菌的双重作用下, 促进茶多酚的释放, 同时增加蛋白质的水解, 使氨基酸含量增加, 从而提高了 R 的水浸出物含量。与原料相比, A(50.67%)、B(51.46%)、C(50.90%) 的水浸出物含量有变化, 但无显著差异, 可能与植物乳杆菌和红曲霉之间的拮抗作用有关, 发酵过程中的具体作用机制有待研究。

氨基酸的含量范围是 3.30%~4.17%, CK 的氨基酸含量最高为 4.17%, 其次是 R(4.09%), 与原料含量存在显著差异($P < 0.05$), 且都比原料(3.53%)的含量高, 赵苗苗等^[22]研究红紫芽发酵熟茶发现, 氨基酸随着翻堆次数的增加呈递减的趋势, 发酵后的茶叶氨基酸含量比晒青原料高, 与本文结果不一致, 可能与本文的发酵方式有关, 无菌条件下发酵产生的菌种单一减少了氮源的消耗; 植物乳杆菌在发酵过程中大量繁殖并分泌大量酸类物质^[15], 也会导致氨基酸含量的增加。咖啡碱的氨基酸含量范围为 3.54%~5.14%, 含量最高的是 R。原料(4.24%)与 CK(5.13%)、R(5.12%)、H(4.41%)、A(4.65%)、C(4.82%) 的可溶性糖之间存在显著差异($P < 0.05$), 其中对照组可溶性糖最高的是 CK, 发酵过程中双糖和多糖在淀粉酶、果胶酶等物质的作用下水解成分子量较小的单糖。微生物的生长需要一定的营养物质, 碳水化合物是其生长的主要营养物质, 红曲霉以糖类为碳源^[12], 添加红曲霉发酵的 H、A、B、C 可溶性糖都较低, 最低的是 B(4.28%), 其次是 H(4.41%), 可能是接种的红曲霉利用了茶叶中的糖类物质为生长基质, 导致发酵后茶叶的可溶性糖含量降低。

茶黄素是多酚类物质的氧化产物, 与原料相比, CK、R、H、A、B、C 都具有显著性差异; CK 和 R、

A、C 之间具有显著性差异($P < 0.05$), 与 H、B 之间不存在显著性差异; 茶褐素含量在普洱茶中高于茶黄素和茶红素^[22]。CK 和 H、A、B、C 相比具有显著性差异, R 与 H、A、B、C 的茶褐素含量之间具有显著性差异($P < 0.05$), 可能与红曲霉生长过程中会产生大量红曲色素转化有关^[12]。在普洱茶传统加工过程中发现茶多酚、黄酮类、茶红素的含量大幅度减少, 其中茶多酚的主要成分在多酚氧化酶作用下, 发生氧化成邻醌等物质而减少^[25], 实验发现, CK 与原料相比茶多酚含量减少, 原料与 R、A 之间存在显著差异($P < 0.05$), 与赵苗苗等^[22]的研究结果一致。R 和 C 的茶多酚含量有明显增加且存在显著差异($P < 0.05$), 其中 R 的含量最高为 13.21%, 植物乳杆菌在发酵过程中可产生相关酶, 通过分解酚环上的羟基产生酚酸来增加总酚含量^[26], 接种植物乳杆菌有利于茶多酚的转化。黄酮类化合物具有抗氧化^[27]、降血糖等^[28]多种药理作用, 测得样品的黄酮含量为 0.77~1.03 mg/g。其中原料的含量最高为 1.03 mg/g, CK 含量最低为 0.77 mg/g, R、H、A、B、C 黄酮含量比 CK 的含量高, 红曲霉能够代谢分泌的 β - 葡糖苷酶, 可以将其黄酮糖苷转化为黄酮苷元, 从而使得黄酮类化合物的含量增加^[29], 植物乳杆菌对植物中的黄酮化合物代谢能力较低^[30], 但两个菌种在茶叶中的转换机制有待进一步探究。

2.2 不同菌种发酵普洱茶的抗氧化活性分析

2.2.1 普洱茶的清除率分析

对 6 个不同处理发酵的普洱茶检测发现, 红曲霉和植物乳杆菌发酵普洱茶都具有抗氧化能力, 不同处理的茶样之间抗氧化活性不同。单一的抗氧化方法实验不能反映茶样的自由基清除率, 实验选用了 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基、羟自由基清除率三种方法进行测定, 发现接种外源菌种发酵的普洱茶抗氧化活性都有所提高。如图 1 所示 6 个茶样对 DPPH 自由基的清除能力差异显著, 清除率都在 75% 以上, DPPH 自由基清除率最强的是 R, 达到 91.59%, 这可能与植物乳杆菌具有较强的清除自由基的能力有关^[31], 该菌种的添加进一步促进茶叶抗氧化能力的提升; CK 的清除率最低为 76.45%, R 和 C 清除率在 88% 以上, 两者存在显著差异($P > 0.05$), H 和 CK 两者也存在明显差异($P > 0.05$)。DPPH 自由基的清除率 $R > C > A > B > H > CK$ 。

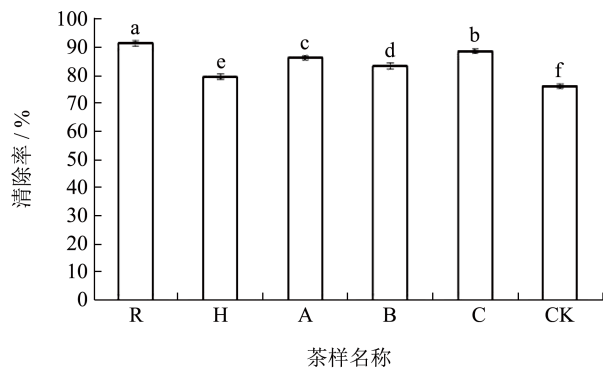


图1 不同茶样的DPPH 自由基清除率

Fig.1 DPPH free radical scavenging rate of different tea samples

注: 图中不同字母表示在0.05水平上差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

如图2所示, 茶样对 $ABTS^+$ 自由基的清除能力普遍较好, 清除率在 66.34%~78.98% 之间, A 的清除能力最强, 清除率为 78.98%, B 的清除能力最弱, 清除率为 66.34%, R 和 H 的 $ABTS^+$ 自由基清除能力没有显著差异 ($P > 0.05$), R、B、C、CK 之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 检测结果显示, $ABTS^+$ 自由基的清除能力 $A > R > H > C > CK > B$ 。

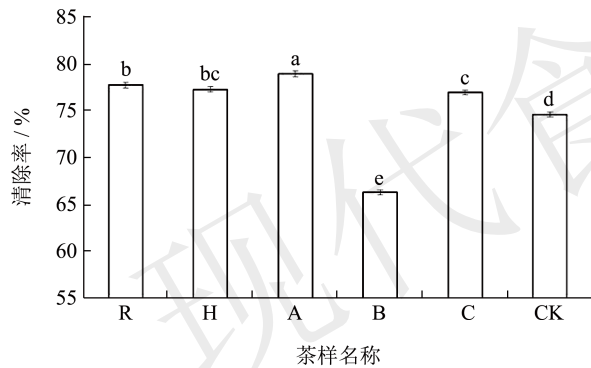


图2 不同茶样的 $ABTS^+$ 自由基清除率

Fig.2 $ABTS^+$ free radical scavenging rate of different tea samples

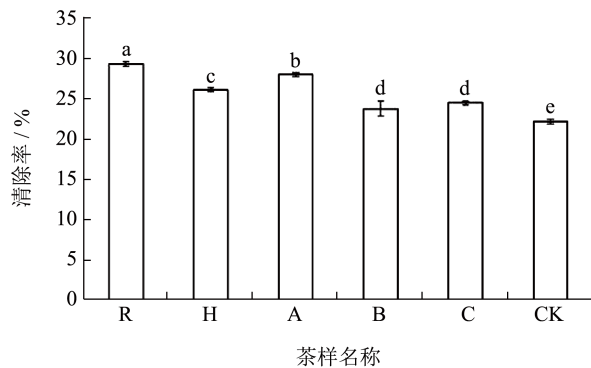


图3 不同茶样的羟自由基清除率

Fig.3 Hydroxyl radical scavenging rate of different tea samples

如图3所示, 6种茶样的羟自由基清除率都相对较低, 检测值范围在 22.29%~29.43%, R、H、A 和 CK 的羟自由基清除率互相存在显著差异 ($P < 0.05$), B 和 C 互相不存在显著差异 ($P > 0.05$), 羟自由基清除率 $R > A > H > C > B > CK$ 。红曲霉发酵茶叶提高其抗氧化活性, 与红曲霉发酵金银花的抗氧化结果一致^[13]。付依依等^[30]发现植物乳杆菌可以增加沙棘原浆风味挥发物质并提高其抗氧化能力, 与本文植物乳杆菌发酵普洱茶结果一致。但植物乳杆菌与红曲霉混合发酵的普洱茶其抗氧化活性欠佳, 具体原因还需进一步研究说明。

2.2.2 普洱茶的清除能力分析

不同的检测方法测定茶样的抗氧化能力, 茶样间的抗氧化能力不同, 如图4所示, 对6个普洱茶样品检测发现, 不同样品间存在一定差异性。茶样对 $ABTS^+$ 自由基清除能力较高, 其中最高的是 A 为 $3172.09 \mu\text{g Trolox/mL}$, B 最低为 $2666.70 \mu\text{g Trolox/mL}$, R、A、B、C、CK 之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。 $ABTS^+$ 自由基的清除率与清除能力结果一致。FRAP 法测定茶样的抗氧化能力都较低, R 与 H、A、B、C、CK 之间存在显著差异 ($P < 0.05$), R 的抗氧化能力最强, 为 $10.36 \mu\text{g Trolox/mL}$, 这可能与植物乳杆菌具有较强的还原铁离子的能力有关^[31], CK 的抗氧化能力最低, 为 $8.64 \mu\text{g Trolox/mL}$, 总抗氧化能力 $R > A > H > C > B > CK$ 。抗氧化结果显示, 添加外源菌种发酵有利于普洱茶抗氧化能力的提升, 但混合发酵的普洱茶效果都不如单接两个菌种发酵的好, 这可能与植物乳杆菌和红曲霉之间存在一定的拮抗作用有关。

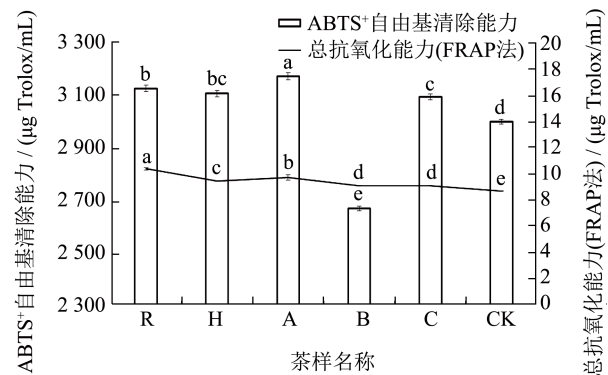


图4 不同茶样的抗氧化能力

Fig.4 Antioxidant capacity of different tea samples

2.3 生化成分与抗氧化活性的相关性分析

从表3可知, 茶样的抗氧化活性与氨基酸、咖

啡碱、可溶性糖、茶多酚、总黄酮、茶黄素含量呈正相关,水浸出物中含有多酚类、咖啡碱、可溶性糖等物质,影响茶叶抗氧化性的水溶性成分较复杂^[32],其中氨基酸、可溶性糖等物质具有一定的抗氧化活性,但是相比于茶多酚、维生素类强抗氧化剂,抗氧化活性相对较小相关性偏低;茶红素、茶褐素与抗氧化能力都呈负相关,这两种物质的转化不利于抗氧化能力的提升;儿茶素总量与ABTS⁺自由基清除能力、羟自由基清除率和DPPH自由基清除率呈负相关,相关系数分别为-0.47、-0.04、-0.29,因茶叶水提物成分复杂,多酚类物质除儿茶素之外,还有槲皮素、山柰酚等,并且水提物中还有茶多糖、茶氨酸等物质,影响其抗氧化能力^[33]。不同方法测定下其物质的抗氧化效果不同,其中咖啡碱与DPPH自由基清除率有极显著相关性($P<0.01$),相关系数为0.74,与ABTS⁺自由基清除能力、羟自由基清除率有显著相关性($P<0.05$),相关系数为0.67、0.61;总黄酮与DPPH自由基清除率有显著相关性($P<0.05$),相关系数为0.54;茶黄素与ABTS⁺自由基清除能力有极显著相关性($P<0.01$),相关系数为0.78,与DPPH自由基清除率有显著相关性($P<0.05$),相关系数为0.69;茶多酚抗氧化能力呈正相关^[33],其中与总抗氧化能力和DPPH自由基清除率有极显著相关性($P<0.01$),相关系数为0.74、0.95,与羟自由基清除率有显著相关性($P<0.05$),相关系数为0.66,茶多酚是普洱茶发挥抗氧化能力的重要成分,R的茶多酚含量最高,抗氧化效果最好。杨雪梅等^[32]对不同年份普洱生茶抗氧化活性研究发现,茶叶中茶多酚具有良好的抗氧化性能,与本文研究结果一致。

表3 体外抗氧化活性与生化成分的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of antioxidant activity and biochemical components in vitro

生化成分	总抗氧化能力	ABTS ⁺ 自由基清除率	羟自由基清除率	DPPH自由基清除率
水浸出物/%	0.46	0.17	0.27	0.41
氨基酸/%	0.21	0.49	0.20	0.14
咖啡碱/%	0.51	0.67*	0.61*	0.74**
可溶性糖/%	0.15	0.48	0.09	0.17
茶多酚/%	0.74**	0.18	0.66*	0.95**
总黄酮/(mg/g)	0.03	0.15	0.16	0.54*
儿茶素/(mg/g)	0.08	-0.47	-0.04	-0.29
茶黄素/%	0.41	0.78**	0.50	0.69*
茶红素/%	-0.12	-0.47	-0.26	-0.38
茶褐素/%	-0.18	-0.23	-0.07	-0.09

注: *在0.05级别(双尾),相关性显著; **在0.01级别(双尾),相关性显著。

3 结论

本实验测得不同菌种处理的普洱茶主要化学成分含量存在差异,混合菌种发酵普洱茶的总黄酮含量整体偏高,最高的是C,含量为0.95 mg/g;R的水浸出物和茶黄素的含量最高,分别为52.50%、0.28%;H的茶红素、茶褐素最高为5.95%、6.39%;R的茶多酚含量最高为13.21%,与原料、H、A、B、C、CK存在显著差异($P<0.05$)。通过抗氧化能力的测定发现,普洱茶都有较强的抗氧化能力,与CK相比,添加植物乳杆菌、红曲霉发酵普洱茶有利于茶叶抗氧化能力的提升,R的总抗氧化能力、DPPH自由基清除率和羟自由基清除率最高,分别是10.36 $\mu\text{g Trolox/mL}$ 、91.59%、29.43%。相关性显示,咖啡碱、茶多酚、茶黄素、总黄酮指标与抗氧化能力都有一定的显著相关性,其中茶多酚对抗氧化活性的影响最大,茶多酚含量与总抗氧化能力、DPPH自由基清除率呈极显著相关性,相关系数为0.74、0.95。外源菌种对发酵普洱茶的生化成分和抗氧化活性有较大影响,与R、H相比,A、B、C的抗氧化能力较弱,利用红曲霉和植物乳杆菌发酵开发不同风味和作用的普洱茶有一定意义,为普洱茶的深加工产品提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] 全国茶叶标准化技术委员会.GB/T 22111-2008地理标志产品 普洱茶[S].
- [2] MA W, SHI Y, YANG G, et al. Hypolipidaemic and antioxidant effects of various Chinese dark tea extracts obtained from the same raw material and their main chemical components [J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131877.
- [3] DU W H, PENG S M, LIU Z H, et al. Hypoglycemic effect of the water extract of Pu-erh tea [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(40): 10126-10132.
- [4] YE J, ZHAO Y, CHEN X, et al. Pu-erh tea ameliorates obesity and modulates gut microbiota in high fat diet fed mice [J]. Food Research International, 2021, 144: 110360.
- [5] YANG C Y, HUNG K C, YEN Y Y, et al. Anti-oxidative effect of Pu-erh tea in animals trails: a systematic review and meta-analysis [J]. Foods, 2022, 11(9): 1333.
- [6] 颜学行,赵媛,满红平,等.不同有益微生物协同发酵对普洱茶芳香物质的影响[J].食品科学,2023,44(10):188-194.
- [7] 丁允章,孔黎春,张奕嘉,等.紫色红曲霉Mp-21次级代谢产物抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J].微生物学报,2022,62(1):103-118.
- [8] 吴姝,李金玲,龙丽丽,等.自然与乳酸菌强化发酵过程中

- 红酸汤品质变化[J].中国酿造,2020,39(10):75-78.
- [9] 刘琨毅,王利妍,安江珊,等.阿曲霉接菌发酵普洱茶的研究[J].轻工学报,2022,37(4):1-9.
- [10] 张敏星,周游,许玫,等.不同材料中红曲霉的分离及对比研究[J].农产品加工,2022,5:58-62.
- [11] LOUHASAKUL Y, WADO H, LATEH R, et al. Solid-state fermentation of Saba banana peel for pigment production by *Monascus purpureus* [J]. Braz J Microbiol, 2023, 54: 93-102.
- [12] 李沅达,邓秀娟,吴婷,等.红曲霉发酵食品研究现状与分析[J].食品安全质量检测学报,2022,13(3):688-696.
- [13] 徐文流,贝琦,梁诗雅,等.红曲霉发酵提高金银花的抗氧化活性[J].现代食品科技,2020,36(9):47-53,163.
- [14] DIEZ-GUTIÉRREZ LUCÍA, VICENTE LEIRE SAN, SÁENZ JESSICA, et al. Biosynthesis of gamma-aminobutyric acid by *Lactiplantibacillus plantarum* K16 as an alternative to revalue agri-food by-products.[J].Sci Rep, 2022, 12: 18904.
- [15] 武万强,王琳琳,赵建新,等.植物乳杆菌生理特性及益生功能研究进展[J].食品与发酵工业,2019,45(1):1-13.
- [16] 李宏伟,孟祥信,杨晓洁,等.益生菌用途及其工艺化研究进展[J].微生物学杂志,2020,40(2):93-100.
- [17] NORAPHAT HWANHLEM A B, TEODORA IVANOVA C, VANESSA BISCOLA D, et al. Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties[J]. Food Control, 2017, 78: 187-195.
- [18] 成莹,袁雪娇,高星,等.响应面法优化金银花枸杞风味酸奶的发酵工艺[J].中国酿造,2020,39(2):206-210.
- [19] 王姣琳,岳田利,袁亚宏.红曲霉与乳酸菌混合发酵藜麦制备降压肽[J].食品与发酵工业,2021,47(21):217-224.
- [20] 张正竹.茶叶生物化学实验教程[M].北京:中国农业出版社,2009.
- [21] 李楠,杨欣,孙元琳,等.20种花茶黄酮、总酚及抗氧化活性分析[J].食品研究与开发,2021,42(18):34-39.
- [22] 赵苗苗,严亮,张文杰,等.红紫芽熟茶适制性及渥堆发酵过程品质变化研究[J].食品安全质量检测学报,2022, 13(19):6212-6220.
- [23] TAEKO H, SHUHEI U, HIROKI T. Complexing of green tea catechins with food constituents and degradation of the complexes by *Lactobacillus plantarum* [J]. Bioscience of Microbiota, Food and Health Vol, 2012, 31(2): 27-36.
- [24] MANTZOURANI IOANNA, KAZAKOS STAVROS, TERPOU ANTONIA, et al. *Lactobacillus Plantarum* potential of the probiotic ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice[J].Foods, 2018, 8(1): 4.
- [25] 吕海鹏,王梦琪,张悦,等.普洱茶后发酵过程中多酚类成分生物转化的研究进展[J].食品科学,2018,39(23):306-312.
- [26] MUTABARUKA R, HAIRIAH K, CADISCH G. Microbial degradation of hydrolysable and condensed tannin polyphenol-protein complexes in soils from different land-use histories [J]. Soil Biol Biochem, 2007, 39(7): 1479-1492.
- [27] XIA G H, LI X H, ZHANG Z, et al. Effects of fermentation treatments on *Polygonatum odoratum* flavones' antioxidant activities [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(9): 5011-5016.
- [28] LUO D, MU T, SUN H. Profiling of phenolic acids and flavonoids in sweet potato *Ipomoea batatas* L leaves and evaluation of their anti-oxidant and hypoglycemic activities [J]. Food Bioscience, 2020, 39(44): 100801.
- [29] MEN Y, ZHU P, ZHU Y M, et al. The development of low-calorie sugar and functional jujube food using biological transformation and fermentation coupling technology [J]. Food Sci Nutr, 2019, 7(4): 1302-1310.
- [30] 付依依,王永霞,张笑莹,等.植物乳杆菌发酵对沙棘原浆主要成分、抗氧化性及挥发性物质的影响[J].中国酿造,2022,41(2):125-131.
- [31] 赵吉春.植物乳杆菌抗氧化评价及抗氧化机制研究[D].无锡:江南大学,2018.
- [32] 杨雪梅,赵建锐,刘莹亮,等.不同年份普洱生茶体外抗氧化活性与生化成分相关性分析[J].食品研究与开发, 2021,42(5):32-37.
- [33] 马慧,茹鑫,王津,等.4种茶叶水提物及茶多酚的体外抗氧化性能研究[J].食品研究与开发,2019,40(8):65-70.