

茶树修剪老叶成分分析及利用塔宾曲霉制备茶褐素的条件优化

白 健, 龚加顺, 艾桃屹, 王秋萍*

(云南农业大学食品科学技术学院 昆明 650201)

摘要 以大叶晒青茶(正常和粗老)为对照,分析冬季茶树修剪老叶的理化性质,并以修剪老叶水提物为原料,接种塔宾曲霉,纯菌株液态发酵制备茶褐素。结果表明,正常和粗老大叶晒青茶的营养成分差异小,冬季茶树修剪老叶的水溶性多糖、氨基酸、蛋白质、总多酚、总黄酮、儿茶素、茶黄素、茶红素和茶褐素含量均显著低于正常和粗老大叶晒青茶($P<0.05$),而水溶性总糖显著高于正常和粗老茶($P<0.05$)。塔宾曲霉发酵茶树修剪老叶水提物合成茶褐素的最优条件为:水提物质量浓度 10 g/L,发酵温度 40 ℃,摇床转速 150 r/min。在最优条件下,茶褐素的含量为 5.78 g/L,生成速率 0.026 g/L·h,底物转化率 3.922 g/g。本研究为提升冬季茶树修剪老叶的综合利用,降低茶褐素的生产成本提供依据。

关键词 茶树修剪老叶;理化性质;塔宾曲霉;液态发酵;茶褐素

文章编号 1009-7848(2023)07-0250-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.026

大叶晒青茶是选用云南大叶种茶叶(*Camellia sinensis* Var. *assamica*),经过摊放、杀青、揉捻后,在日光下干燥的茶叶,是普洱生茶和熟茶的原料^[1],其中含有丰富的多酚类物质如黄酮、儿茶素和生物碱,如咖啡因等营养成分。多酚类化合物是其分子结构中有若干个酚性羟基的植物成分的总称^[2]。研究较多的是儿茶素类中的表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)单体,具有多种生物学功能,早在 1987 年就有 EGCG 抑制人体癌细胞作用的报道^[3]。多酚类物质具有抗氧化,抗突变,降压,降血脂,降血糖^[4-6],抑制黑色素的合成^[7],保护肾脏、肝脏^[8]等功能。

茶褐素是一类易溶于水,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合化合物^[9]。茶褐素是以茶叶中的多酚类物质为主要原料,在儿茶酚氧化酶、漆酶、过氧化物酶等酶类的作用下,经过氧化形成邻醌类物质,邻醌进一步氧化聚合形成茶黄素、茶红素,再进一步与其它物质偶联氧化聚合形成茶褐素^[10-14]。

茶园通常在每年的十月到来年二月,剪去茶

树顶端不整齐的枝叶,使蓬面平整形成水平或弧形,降低冬季茶树叶的营养消耗,有利于提高来年春茶的品质。冬季修剪茶叶是提高茶叶品质的重要手段,同时修剪下的茶树老叶中也含有大量的多糖、多酚等营养物质。

目前茶褐素的制备方法有从固态发酵的普洱熟茶或黑茶中提取,采用化学或酶促法合成茶褐素等^[15]。从普洱熟茶或黑茶中提取存在诸如发酵周期较长,分离纯化比较困难,发酵过程难控制等问题^[16-17],而化学法^[18-19]或酶促转化^[20-21]等方法存在化学试剂易污染环境,酶促反应的酶制剂成本较高等问题。鉴于此,本文采用冬季茶园茶树修剪老叶的水提物为原料,以固态发酵中分离纯化的塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)CGMCC.10022 为发酵菌种,进行液态发酵制备茶褐素,以期实现对茶园冬季修剪茶树老叶的废物利用,降低茶褐素的生产成本。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

正常大叶晒青茶、粗老大叶晒青茶和冬季茶树修剪老叶均由普洱澜沧古茶股份有限公司提供,其中正常大叶晒青茶、粗老大叶晒青茶所用鲜叶分别为 3 级(一芽二、三叶占 50%以上,同等嫩度其它芽叶占 50%以下)和 4 级(一芽三、四叶占 70%以上,同等嫩度其它芽叶占 30%以下)^[1];所用

收稿日期: 2022-07-16

基金项目: 云南省基础研究计划项目(2019FB051);云南省重大科技专项计划项目(202102AE090027, 202102AE090027-1)

第一作者: 白健,男,硕士生

通信作者: 王秋萍 E-mail: soffiywang@163.com

化学试剂均为分析纯级。

塔宾曲霉 (*Aspergillus tubingensis*)CGMCC.10022 从普洱茶固态发酵中分离纯化的优势菌种,保藏于中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 仪器与设备

BS210S 电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;RE-52A 旋转蒸发器,上海亚荣仪器厂;FD5-3 真空冷冻干燥机,金西蒙;ELX808 酶标仪,美国博腾公司;HS153 卤素水分活性测定仪,瑞士 BD Biosciences;CM-5 分光色差仪,日本 Konica Minolta 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 理化性质测定 水分采用卤素水分仪测定;pH 值用 pH 计测定;色差用分光色差仪测定;茶黄素、茶红素和茶褐素的含量用萃取比色法测定^[22];水溶性氨基酸用茚三酮比色法测定^[23];水溶性蛋白质用考马斯亮蓝法测定^[24];儿茶素的含量用香兰素比色法测定^[25];总多酚和总黄酮的含量用福林酚比色法测定^[26-27];水溶性总糖和多糖的含量用蒽酮比色法测定^[22]。

1.3.2 发酵条件优化

1.3.2.1 茶树修剪老叶水提物制备 茶叶按照 1:15(g/mL)的质量浓度在沸水中浸提 15 min,冷却后纱布过滤,再经滤纸过滤,滤渣复提 1 次,合并 2 次滤液,在 65 °C 下减压浓缩,浓缩液经真空冷冻干燥后得到茶树修剪老叶水提物。

1.3.2.2 发酵条件单因素实验 以水提物质量浓度 (5,10,20,40 g/L)、孢子接种量 ($10^3, 10^5, 10^7$ CFU/mL)、摇床转速 (0,100,200,300 r/min) 和发酵温度 (30,37,42,45 °C) 4 个因素进行单因素实验,所有发酵重复 2 次。发酵过程每天取样 4 mL,测定总多酚和茶褐素含量,所有测定重复 3 次,以茶褐素的生成速率 (Q_m) 和底物转化率 ($Y_{m/m}$) 为评价指标选出最佳条件。

1) 修剪老叶水提物浓度 将 1 mL, 10^7 CFU/mL 孢子悬浮液,分别接种至 5,10,20,40 g/L 已巴士杀菌的水提物中,在 37 °C,200 r/min 下培养至茶褐素含量稳定。

2) 孢子接种量 将制备好的孢子悬浮液稀释到合适的倍数,用血球计数板计数,分别将原孢子悬浮液稀释至 $10^3, 10^5, 10^7$ CFU/mL,分别吸取 1

mL 孢子悬浮液,接种至 10 g/L 已巴士杀菌的水提物中,在 37 °C,200 r/min 下培养至茶褐素含量稳定。

3) 发酵温度 在 10 g/L 已巴士杀菌的水提物中接种 1 mL, 10^7 CFU/mL 孢子悬浮液,分别在 30,37,42,45 °C 发酵,转速为 200 r/min 下培养至茶褐素含量稳定。

4) 转速 在 10 g/L 已巴士杀菌的水提物中接种 1 mL, 10^7 CFU/mL 孢子悬浮液,分别在 0,100,200,300 r/min 发酵,发酵温度为 37 °C,直至茶褐素含量稳定。

1.3.2.3 发酵条件正交试验 根据单因素实验结果,选取水提物浓度(A)、培养温度(B)、摇床转速(C)三因素三水平即 $L_9(3^3)$ 进行正交试验,以茶褐素含量稳定为发酵终点,以底物转化率作为评价指标,筛选出最优发酵条件。

1.4 发酵参数计算及数据处理方法

发酵动力学参数根据 Sirisansaneeyakul 等^[28]的方法计算。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 不同嫩度茶叶理化性质比较

由表 1 可知,不同嫩度茶叶的茶汤 pH 均呈酸性,无显著性差异 ($P > 0.05$)。茶树修剪老叶的 L^* 和 b^* 值显著高于嫩度更高的大叶晒青茶,而 a^* 值则显著降低 ($P < 0.05$),表明茶树修剪老叶的茶汤亮度高,偏黄绿色。

正常和粗老茶叶之间成分差异小,除氨基酸、茶红素和水分外,其余成分均无显著性差异 ($P > 0.05$)。茶树修剪老叶的 3 种茶色素含量均显著小于正常和粗老茶叶 ($P < 0.05$)。正常茶叶和粗老茶叶中茶色素含量最高的均为茶红素,而茶树修剪老叶则为茶褐素。茶树修剪老叶的多糖、氨基酸、蛋白质、总多酚、总黄酮、儿茶素、茶黄素、茶红素和茶褐素含量均显著低于正常茶叶和粗老茶叶 ($P < 0.05$); 而修剪老叶的水溶性总糖显著高于正常茶叶和粗老茶叶 ($P < 0.05$)。可能是由于冬季修剪老叶较其它茶叶生长时间更长,积累了更多的

糖分,且主要为还原糖等糖类。总之,茶树修剪老叶含有丰富的水溶性物质,如碳水化合物、氨基酸、蛋白质等,可作为塔宾曲霉生长所需的碳源和

氮源,同时含有一定的总多酚(13.59%),可作为塔宾曲霉发酵合成茶褐素所需的底物。

表 1 不同嫩度茶叶理化性质比较

Table 1 Physicochemical comparison of tea leaves varied with tenderness

指标	正常晒青茶	粗老晒青茶	茶树修剪老叶
pH 值	5.74 ± 0.03 ^A	5.76 ± 0.02 ^A	5.96 ± 0.01 ^A
<i>L</i> *	86.53 ± 0.01 ^B	83.94 ± 0.00 ^A	88.71 ± 0.00 ^C
<i>a</i> *	-2.45 ± 0.00 ^B	0.66 ± 0.00 ^C	-5.87 ± 0.00 ^A
<i>b</i> *	30.75 ± 0.01 ^A	38.75 ± 0.01 ^B	44.84 ± 0.00 ^C
水分/%	6.38 ± 0.13 ^A	7.71 ± 0.26 ^B	7.90 ± 0.04 ^B
水溶性总糖/g·kg ⁻¹	119.77 ± 4.57 ^A	123.25 ± 5.65 ^A	204.38 ± 4.45 ^B
水溶性多糖/g·kg ⁻¹	0.74 ± 0.05 ^B	0.70 ± 0.05 ^B	0.22 ± 0.06 ^A
氨基酸/g·kg ⁻¹	5.86 ± 0.37 ^B	7.54 ± 0.27 ^C	3.09 ± 0.16 ^A
水溶性蛋白质/g·kg ⁻¹	15.40 ± 0.66 ^B	15.85 ± 0.47 ^B	12.97 ± 1.13 ^A
总多酚/g·kg ⁻¹	274.54 ± 23.67 ^B	259.51 ± 51.36 ^B	135.94 ± 10.47 ^A
总黄酮/g·kg ⁻¹	257.70 ± 24.92 ^B	242.94 ± 49.33 ^B	83.79 ± 10.33 ^A
儿茶素/g·kg ⁻¹	165.02 ± 7.93 ^B	183.91 ± 17.49 ^B	123.55 ± 21.42 ^A
茶黄素/g·kg ⁻¹	0.40 ± 0.02 ^B	0.36 ± 0.06 ^B	0.16 ± 0.04 ^A
茶红素/g·kg ⁻¹	46.37 ± 1.80 ^B	53.11 ± 3.93 ^C	3.88 ± 1.06 ^A
茶褐素/g·kg ⁻¹	16.76 ± 1.06 ^B	19.55 ± 1.16 ^B	5.11 ± 0.79 ^A

注:表中同行间大写字母不同者表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 塔宾曲霉发酵茶树修剪老叶水提物合成茶褐素的条件优化

不同单因素发酵条件下总多酚和茶褐素含量变化如图 1 所示,发酵过程中多酚作为合成茶褐素的底物呈下降趋势,而产物茶褐素则呈上升趋势。在发酵的 1~2 d,部分组别的总多酚含量有所提高(图 a,c,e),这可能是与多酚的测定方法有关,本文采用的是福林酚法,该法以没食子酸作为校正标准定量茶多酚。而已有研究表明普洱茶固态发酵过程中,酯型儿茶素如 EGCG 和 ECG,会在微生物产生的酯酶等作用下水解产生没食子酸,因此发酵初期没食子酸呈上升趋势^[29],从而导致所测总多酚亦呈上升趋势。

2.2.1 不同浓度修剪老叶水提物对塔宾曲霉合成茶褐素的影响 从图 1b 可知水提物质量浓度为 5, 10, 20 g/L 时,茶褐素含量都在发酵第 9 天时达到最大,分别为 2.92, 5.25, 8.88 g/L,分别是发酵初始的 3.07, 2.88, 2.62 倍,随后保持稳定。由表 2 可知,茶树修剪老叶水提物质量浓度为 10 g/L 和 20

g/L 时,茶褐素生产速率(Q_{TB})较高,且在 10 g/L 水提物质量浓度时底物转化率最高,故选择 10 g/L 的水提物质量浓度作为发酵培养基。

2.2.2 不同孢子接种量对塔宾曲霉合成茶褐素的影响 由图 1d 可看出孢子接种量为 $10^3, 10^5, 10^7$ CFU/mL,发酵 14~15 d 后,茶褐素含量均达到最大值,分别为 4.94, 5.16, 5.32 g/L。由表 2 可知,接种量为 $10^5, 10^7$ CFU/mL 时,茶褐素的生成速率和底物转化率均显著高于 10^3 CFU/mL ($P < 0.05$)。接种量为 $10^5, 10^7$ CFU/mL 时,茶褐素的生成速率和底物转化率均无显著差异 ($P > 0.05$),而接种量为 10^7 CFU/mL 时,底物转化率略高于 10^5 CFU/mL,故选用 10^7 CFU/mL 作为后续孢子接种量。

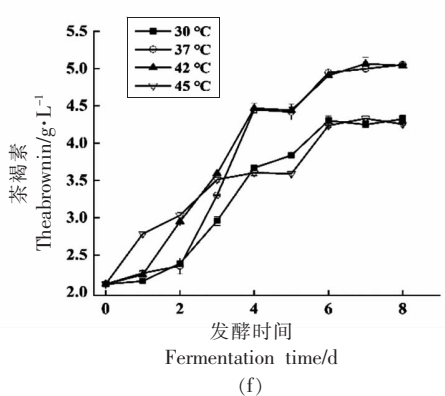
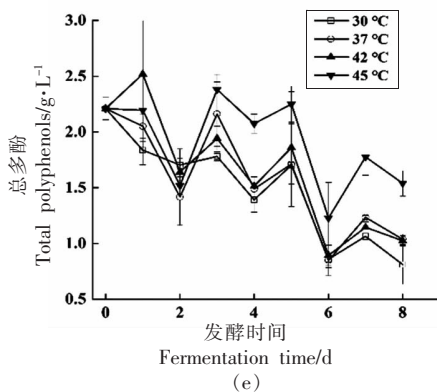
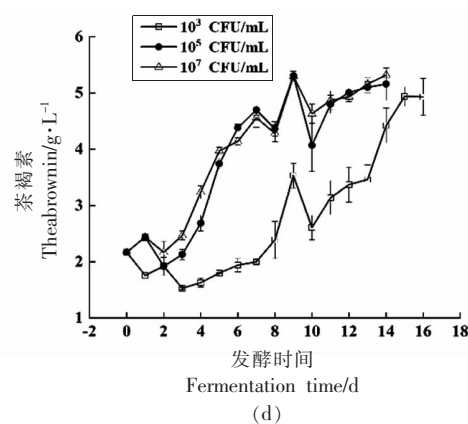
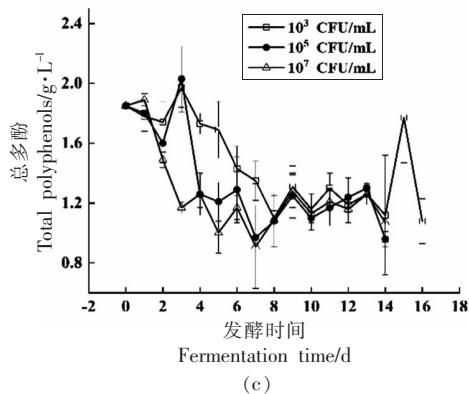
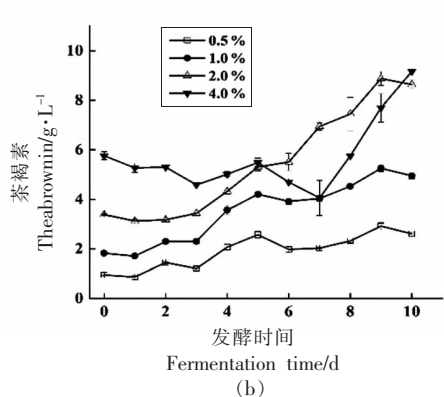
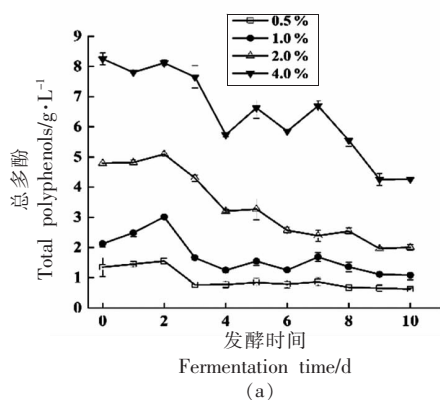
2.2.3 不同温度对塔宾曲霉合成茶褐素的影响 如图 1f 所示,发酵温度为 37 °C 和 42 °C 时,茶褐素的生成快于 30 °C 和 45 °C,发酵 6 d 时,30, 37, 42, 45 °C 下,茶褐素的含量分别为 4.30, 4.95, 4.91, 4.24 g/L,表明温度过低或过高均不利于塔宾曲霉的生长及其胞外酶的分泌,以及胞外酶氧化多酚

合成茶褐素的酶催化作用。发酵温度为 37 °C 和 42 °C 时, 茶褐素的生成速率显著高于 30 °C 和 45 °C ($P < 0.05$), 而两者的底物转化率无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2), 从节能角度出发, 后续试验选用 37 °C 作为发酵温度。

2.2.4 不同转速对塔宾曲霉合成茶褐素的影响

由图 1h 可知, 静置和 100 r/min 下, 氧气供应不足, 茶褐素的生成较少, 发酵 2 d 时, 茶褐素含量

分别为 2.18 g/L 和 2.39 g/L, 仅为发酵初始的 1.65 倍左右, 随后保持稳定。而 200 r/min 和 300 r/min 下, 茶褐素含量最高可达 5.00 g/L, 约为发酵初始的 3.75 倍。表明塔宾曲霉的生长及茶褐素的合成均需氧气参与。由表 2 发酵参数可知, 转速为 200 r/min 和 300 r/min 时, 底物转化率显著高于静置和 100 r/min ($P < 0.05$), 且 200 r/min 底物转化率最高, 因此后续试验选用 200 r/min。



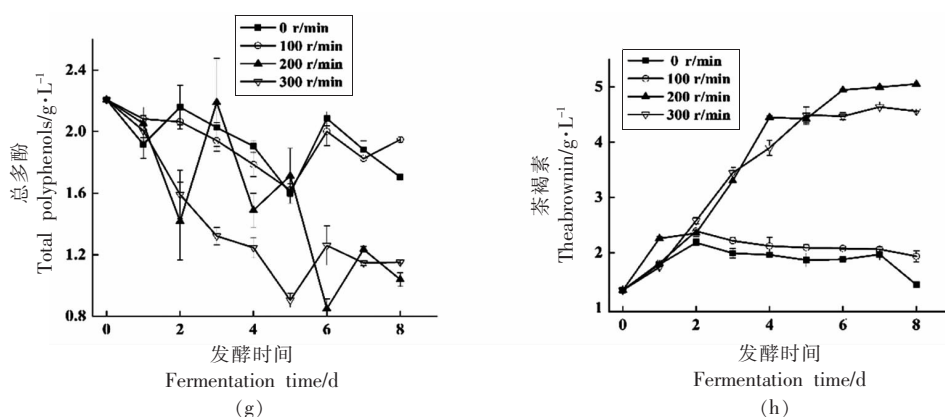


图1 不同单因素发酵条件下茶多酚和茶褐素含量的变化

Fig.1 Changes of tea polyphenols and theabrownin under different single factor fermentation conditions

根据上述单因素实验结果得到塔宾曲霉利用茶树修剪老叶合成茶褐素的较佳条件为茶树修剪老叶水提物质量浓度 10 g/L, 温度 37 ℃, 孢子接种量 10^7 CFU/mL, 摇床转速 200 r/min。正交试验选取老叶水提物质量浓度(A)、培养温度(B)、摇床转速(C)三因素三水平即 $L_9(3^3)$, 以茶褐素含量稳定为发酵终点, 以底物转化率作为评价指标, 结果如图 2 和表 3 所示。

如图 2 所示, 采用不同质量浓度水提物时, 发酵过程中总多酚和茶褐素的含量变化趋势相同, 总多酚均在 0~3 d 时大量下降, 随后逐渐稳定。水提物质量浓度为 5 g/L 和 15 g/L 时, 茶褐素含量在第 6 天时稳定, 水提物质量浓度为 10 g/L 时, 茶褐素含量在第 7 天稳定。在水提物质量浓度为

10 g/L, 发酵温度 40 ℃, 摇床转速 150 r/min 时, 茶褐素的含量变化介于水提物质量浓度为 10 g/L, 发酵温度 37 ℃, 摇床转速 250 r/min 和水提物质量浓度为 15 g/L, 发酵温度 34 ℃, 摇床转速 250 r/min 之间, 茶褐素最终含量可达到 5.78 g/L。

通过比较表 3 中 $Y_{TB/TP}$ 的极差 r 可知, 各因素关系为 $B>C>A$, 即影响塔宾曲霉利用茶树修剪老叶水提物合成茶褐素的因素依次为发酵温度>摇床转速>水提物质量浓度; 最佳因素水平组合为 $A_2B_3C_1$, 即最佳的发酵条件为茶树修剪老叶水提物质量浓度为 10 g/L, 发酵温度为 40 ℃, 摇床转速为 150 r/min。在最优条件下, 茶褐素含量为 5.78 g/L, 茶褐素的生成速率为 $0.026 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 底物转化率为 3.922 g/g。

表 2 不同单因素发酵条件下塔宾曲霉合成茶褐素的发酵参数

Table 2 Fermentation parameters of theabrownin production by *Aspergillus tubingensis* under different single factor fermentation conditions

单因素	发酵时间/h	$C_{TP,0}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$C_{TB,t}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$Q_{TP}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$Q_{TB}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$Y_{TB/TP}/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
水提物质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$						
5	0~216	1.35 ± 0.05	2.22 ± 0.07	0.004 ± 0.001^A	0.006 ± 0.000^A	1.529 ± 0.339^B
10	0~216	2.13 ± 0.13	3.99 ± 0.11	0.006 ± 0.001^B	0.010 ± 0.001^{AB}	1.689 ± 0.062^B
20	0~216	4.80 ± 0.00	6.75 ± 0.27	0.015 ± 0.000^C	0.016 ± 0.001^B	1.018 ± 0.069^B
40	0~240	8.25 ± 0.04	6.72 ± 0.75	0.021 ± 0.000^D	0.004 ± 0.004^A	0.189 ± 0.174^A
接种量/CFU·mL ⁻¹						
103	0~360	1.85 ± 0.12	2.96 ± 0.13	0.002 ± 0.000^A	0.002 ± 0.000^A	1.001 ± 0.041^A
105	0~216	1.85 ± 0.12	4.03 ± 0.05	0.004 ± 0.000^B	0.009 ± 0.000^B	2.060 ± 0.005^B
107	0~216	1.85 ± 0.12	4.03 ± 0.03	0.004 ± 0.000^B	0.009 ± 0.000^B	2.120 ± 0.174^B
温度/℃						
30	0~144	2.21 ± 0.00	3.40 ± 0.06	0.011 ± 0.001^B	0.009 ± 0.000^A	0.832 ± 0.101^A

(续表 2)

单因素	发酵时间/h	$C_{TP,0}/g \cdot L^{-1}$	$C_{TB,t}/g \cdot L^{-1}$	$Q_{TP}/g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	$Q_{TB}/g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	$Y_{TB/TP}/g \cdot g^{-1}$
37	0~168	2.21 ± 0.00	3.98 ± 0.05	0.008 ± 0.000^A	0.011 ± 0.000^B	1.345 ± 0.011^B
42	0~168	2.21 ± 0.00	3.96 ± 0.04	0.008 ± 0.000^A	0.011 ± 0.000^B	1.327 ± 0.020^B
45	0~144	2.21 ± 0.00	3.35 ± 0.01	0.007 ± 0.001^A	0.009 ± 0.000^A	1.254 ± 0.178^B
转速/ $r \cdot min^{-1}$						
0	0~48	2.21 ± 0.00	1.12 ± 0.00	0.018 ± 0.000^C	0.016 ± 0.002^A	0.860 ± 0.099^A
100	0~48	2.21 ± 0.00	1.52 ± 0.08	0.014 ± 0.000^B	0.020 ± 0.001^A	1.397 ± 0.041^B
200	0~168	2.21 ± 0.00	3.98 ± 0.05	0.010 ± 0.000^A	0.020 ± 0.000^A	2.041 ± 0.011^C
300	0~120	2.21 ± 0.00	3.59 ± 0.00	0.011 ± 0.000^A	0.021 ± 0.000^A	1.978 ± 0.001^C

注:表中同一单因素条件下,同列不同大写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

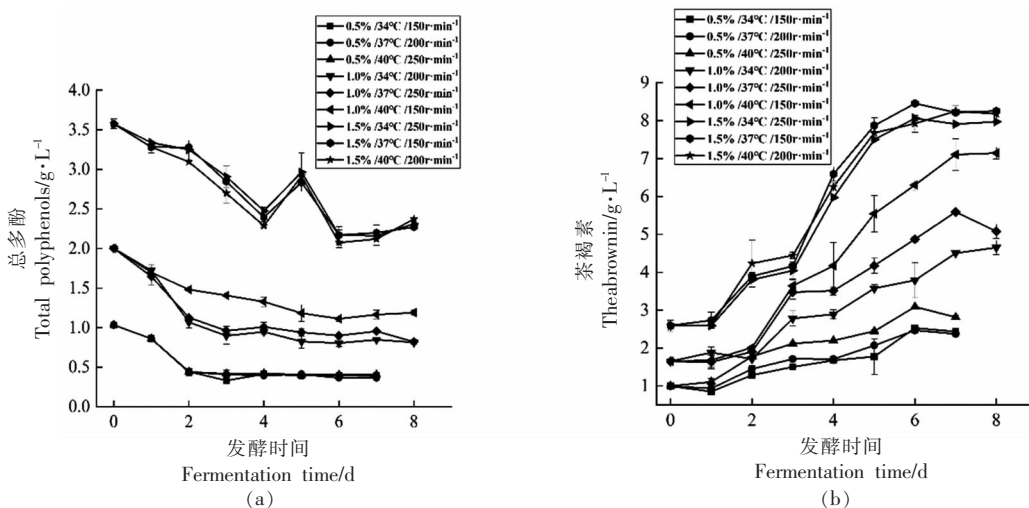


图 2 正交试验优化下总多酚和茶褐素的变化

Fig.2 Changes of total polyphenols and theabrownin optimized by orthogonal design

表 3 正交试验优化下塔宾曲霉合成茶褐素的发酵参数

Table 3 Fermentation parameters for theabrownin production by *Aspergillus tubingensis* optimized by orthogonal test

组别	因素			$C_{TP,0}/g \cdot L^{-1}$	$C_{TB,t}/g \cdot L^{-1}$	$Q_{TB}/g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	$Y_{TB/TP}/g \cdot g^{-1}$
	A/%	B/ $^{\circ}C$	C/ $r \cdot min^{-1}$				
1	0.5	34	150	1.03 ± 0.00	2.19 ± 0.02	1.714 ± 0.065	0.008 ± 0.000
2	0.5	37	200	1.03 ± 0.00	2.14 ± 0.07	1.576 ± 0.023	0.008 ± 0.000
3	0.5	40	250	1.03 ± 0.00	2.68 ± 0.01	2.426 ± 0.048	0.012 ± 0.000
4	1.0	34	200	2.00 ± 0.01	3.66 ± 0.01	1.532 ± 0.015	0.010 ± 0.000
5	1.0	37	250	2.00 ± 0.01	4.55 ± 0.05	2.359 ± 0.013	0.015 ± 0.000
6	1.0	40	150	2.00 ± 0.01	5.78 ± 0.34	3.922 ± 0.522	0.021 ± 0.000
7	1.5	34	250	3.57 ± 0.06	6.71 ± 0.11	2.175 ± 0.135	0.024 ± 0.002
8	1.5	37	150	3.57 ± 0.06	6.77 ± 0.07	2.325 ± 0.054	0.028 ± 0.001
9	1.5	40	200	3.57 ± 0.06	7.10 ± 0.03	2.503 ± 0.021	0.030 ± 0.001
K_1	5.716	5.421	7.961				
K_2	7.813	6.260	5.611				
K_3	7.003	8.851	6.960				
k_1	1.905	1.807	2.654				

(续表 3)

组别	因素			$C_{TP,0}/g \cdot L^{-1}$	$C_{TB,t}/g \cdot L^{-1}$	$Q_{TB}/g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	$Y_{TB/TP}/g \cdot g^{-1}$
	$A/\%$	$B/^\circ C$	$C/r \cdot min^{-1}$				
k_2	2.604	2.087	1.870				
k_3	2.334	2.950	2.320				
r	0.699	1.143	0.783				
较优水平	A_2	B_3	C_1				
主次因素	$B>C>A$						

3 结论

正常和粗老大叶晒青茶的成分差异较小,而冬季茶树修剪老叶除总糖高于正常和粗老大叶晒青茶外,其余均低于二者。冬季茶树修剪老叶含有丰富的水溶性物质,可作为塔宾曲霉生长所需的碳源和氮源。以冬季茶树修剪老叶水提物为培养基,接种塔宾曲霉进行发酵,合成茶褐素的最优条件为修剪老叶水提物质量浓度为 10 g/L,发酵温度为 40 °C,摇床转速为 150 r/min。在最优条件下,茶褐素含量为 5.78 g/L,生成速率为 0.026 g/L·h,底物转化率为 3.922 g/g。

参 考 文 献

- [1] 中国国家标准化管理委员会. 地理标志产品 普洱茶: GB/T 22111-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 2.
Standardization Administration of China. Product of geographical indication-Puer Tea: GB/T 22111-2008 [S]. Beijing: China Standard Press, 2008: 2.
- [2] 凌关庭. 有“第七类营养素”之称的多酚类物质[J]. 中国食品添加剂, 2000(1): 28-37.
LING G T. Polyphenols are called as ‘seventh nutrients’[J]. China Food Additives, 2000(1): 28-37.
- [3] FUJIKI H, SUGANUMA M, IMAI K, et al. Green tea: Cancer preventive beverage and/or drug[J]. Cancer Letters, 2002, 188(1/2): 9-13.
- [4] 袁静, 余新欣, 章复清, 等. 茶多酚调脂及抗脂质过氧化作用的实验研究[J]. 陕西中医学院学报, 2000, 23(3): 37.
YUNA J, YU X X, ZHANG F Q, et al. Experimental study on lipid-regulating and anti-lipid peroxidation effects of tea polyphenols [J]. Journal of Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, 2000, 23(3): 37.
- [5] 刘波静. 茶多酚对动物血清血脂和载脂蛋白水平的影响和抗氧化作用[J]. 茶叶科学, 2000, 20(1): 67-70.
LIU B J. Effects of tea polyphenols on serum-lipid and carry-lipoprotein level and antioxidation in animal[J]. Journal of Tea Science, 2000, 20(1): 67-70.
- [6] 赵秀兰, 宫爱华, 李建华, 等. 茶多酚对家兔实验性动脉粥样硬化的抑制作用[J]. 中华老年医学杂志, 2003(8): 477-480.
ZHAO X L, GONG A L, LI J H, et al. Study on the inhibition of experimental atherosclerosis in rabbits by tea polyphenols[J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2003(8): 477-480.
- [7] 官兴丽. 儿茶素对黑色素形成抑制效果初探[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
GUAN X L. Inhibitory effect of catechins on the formation of melanin[D]. Chongqing: Southwest University, 2011.
- [8] 林春兰, 蒋建伟, 严玉霞, 等. 茶多酚对酒精诱导的小鼠肝脂质过氧化和血清 ALT 活性变化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(1): 110-112.
LIN C L, JIANG J W, YAN Y X, et al. Effect of tea polyphenols on liver MDA lever and serum ALT activity in alcohol-treated mice[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2003, 19(1): 110-112.
- [9] 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.
- [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(2): 27-34.
GONG J S, CHEN Y J, PENG C X, et al. Effect of different additives on the theabrownin and its formation mechanism during Pu-erh tea fermentation[J].

- Journal of Tea Science, 2010(2): 27-34.
- [11] DIX M A, FAIRLEY C J, MILLIN D J, et al. Fermentation of tea in aqueous suspension. Influence of tea peroxidase[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1981, 32(9): 920-932.
- [12] 吴桢. 普洱茶渥堆发酵过程中主要生化成分的变化[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- WU Z. The variation of chemical component during the fermentation procedure of Pu'er tea [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [13] 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]. 茶叶科学, 2012(1): 91-98.
- WANG Q P, GONG J S. Effect of theabrownin extracted from 'Zijuan' Pu-erh tea on growth of rats with hyperlipidemia food[J]. Tea Science, 2012(1): 91-98.
- [14] 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, 2016, 96(11): 3708-3716.
- [15] 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.
- WU E K, WANG Q P, GONG J S, et al. Effect of fermentation methods on theabrownin composition of Pu-erh tea[J]. Food Science, 2019, 40(4): 215-221.
- [16] 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): 316-322.
- [17] 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.
- [18] 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 and Agriculture, 2010, 63(4): 455-464.
- [19] WAN X C, 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 and Agriculture, 1997, 74(3): 401-408.
- [20] 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 and Agriculture, 2014, 95(13): 2686-2692.
- [21] WANG Q P, SIRISANSANEYAKUL S, CHISTI Y, et al. Production of theabrownins using a crude fungal enzyme concentrate[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 231: 250-259.
- [22] 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.
- [23] FRIEDMAN M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(3): 385-406.
- [24] 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.
- [25] 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.
- ZHANG X F, GONG J S, ZHOU H J, et al. Study on relationship between polyphenols and quality of Yunan Pu-erh tea[J]. Food Science, 2007, 28(1): 230-233.
- [26] 中国国家标准化管理委员会. 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法: GB/T 8313-2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 4-5.
- Standardization Administration of China. Determination of total polyphenols and catechins content in tea: GB/T 8313-2018[S]. Beijing: China Standards Press, 2018: 4-5.
- [27] KOMES D, HORZIC D, BELSCAK A, et al. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds[J]. Food Research International, 2010, 43(1): 167-176.
- [28] SIRISANSANEYAKUL S, WANNAWILAI S, CHISTI Y, et al. Repeated fed-batch production of xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663 [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2012, 88(6): 1121-1129.

[29] MA Y, LING T J, SU X Q, et al. Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii* and

Aspergillus fumigatus [J]. Food Chemistry, 2020, 334: 127560.

Composition Analysis of Trimmed Old Leaves from Tea Trees and Its Application in Theabrownin Production by *Aspergillus tubingensis*

Bai Jian, Gong Jiashun, Ai Guangyi, Wang Qiuping*

(College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract Physicochemical properties of trimmed old leaves from tea trees were analyzed in comparison with normal and older large-leaf sun-dried tea (*Camellia sinensis* Var. *assamica*). Moreover, water extract was prepared from trimmed old tea leaves, which was then inoculated with *Aspergillus tubingensis* for theabrownin (TB) production via submerged fermentation. Results showed that there was little difference in nutritional components between normal and older large-leaf sun-dried tea. However, contents of water-soluble polysaccharides, amino acids, protein, total polyphenols, total flavonoids, catechins, theaflavins, thearubigins and TB of trimmed old tea leaves were significantly lower than those of normal and older large-leaf sun-dried tea ($P<0.05$). In contrast, its total water-soluble carbohydrates were significantly higher than that of normal and older large-leaf sun-dried tea. The optimum condition for TB production from water extract of trimmed old tea leaves by *A. tubingensis* was as follows: mass concentration of water extract 10 g/L, temperature 40 °C, shaking speed 150 r/min. Under this condition, TB concentration reached 5.78 g/L, production rate 0.026 g/L·h, and yield 3.922 g/g. This study can provide basis for comprehensive utilization of trimmed old tea leaves and reducing production cost of TB.

Keywords trimmed old leaves from tea trees; physicochemical properties; *Aspergillus tubingensis*; submerged fermentation; theabrownin