

晒青毛茶液态发酵茶褐素特征及其对 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用

谢燕霞^{1,2,3}, 朱圆敏^{1,2,3*}, 杨子玺^{1,2,3}, 陈雪敏^{1,2,3}, 余龙江^{1,2,3*}

(1. 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074; 2. 分子生物物理教育部重点实验室, 武汉 430074;
3. 湖北省食药两用资源工程技术研究中心, 武汉 430074)

摘要: **目的** 研究由茶泛菌(*Pantoea camelliae*, CCTCC AB 2021544^T)液态发酵晒青毛茶所得茶褐素的组成结构与功能活性。**方法** 以固态发酵茶褐素(solild-state fermented theabrownins, S-TBs)为对照, 通过紫外可见光谱法(ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis)、傅里叶红外光谱法(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、居里点热裂解气相色谱-质谱法(Curie point pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry, CP-Py-GC-MS)、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、Zeta 电位测定仪等手段对液态发酵茶褐素(liquid-state fermented theabrownins, L-TBs)进行表征。同时, 检测了不同浓度 L-TBs 对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用。**结果** 与 S-TBs 相比, L-TBs 颗粒较小、分散度及稳定性较好, 但二者都含有丰富的羟基和羧基, pH 呈弱酸性, 总蛋白、总糖含量较高, 且没有显著差异; L-TBs 和 S-TBs 热裂解产物主要是酚类物质, 含量分别为 43.88%和 35.69%; 进一步研究发现, L-TBs 对 α -葡萄糖苷酶活性具有一定的抑制作用, 并在一定范围内呈剂量关系。**结论** 茶泛菌 L-TBs 在组成结构方面与 S-TBs 较一致, 具有很好的开发和应用价值。

关键词: 茶褐素; 液态发酵; 结构特征; α -葡萄糖苷酶

Characterization and inhibition of α -glucosidase activity of theabrownins from liquid-state fermentation with sun-dried green tea

XIE Yan-Xia^{1,2,3}, ZHU Yuan-Min^{1,2,3*}, YANG Zi-Xi^{1,2,3}, CHEN Xue-Min^{1,2,3}, YU Long-Jiang^{1,2,3*}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;
2. Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Wuhan 430074, China; 3. Hubei Engineering Research Center for Both Edible and Medicinal Resources, Wuhan 430074, China)

ABSTRACT: Objective To explore the composition, structure, and functional activity of the theabrownins obtained from the liquid-state fermentation with sun-dried green tea by *Pantoea camelliae* (CCTCC AB 2021544^T).

基金项目: 中央高校基本科研经费项目(2019kfyXKJC049、2020kfyXJJS120)、湖北省食药两用资源工程技术研究中心项目(2018BEC463)、华中科技大学创新研究院技术创新基金项目(2022JYCXJJ032)

Fund: Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2019kfyXKJC049, 2020kfyXJJS120), the Hubei Engineering Research Center for Both Edible and Medicinal Resources (2018BEC463), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, Huazhong University of Science and Technology (2022JYCXJJ032)

***通信作者:** 朱圆敏, 博士, 讲师, 主要研究方向为微生物技术与发酵工程。E-mail: zhuyuanmin@hust.edu.cn

余龙江, 博士, 教授, 主要研究方向为资源生物学与生物技术。E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn

***Corresponding author:** ZHU Yuan-Min, Ph.D, Lecturer, Huazhong University of Science and Technology, No.1037 Luoyu Road, Wuhan 430074, China. E-mail: zhuyuanmin@hust.edu.cn

YU Long-Jiang, Ph.D, Professor, Huazhong University of Science and Technology, No.1037 Luoyu Road, Wuhan 430074, China. E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn

Methods With the solid-state fermented theabrownins (S-TBs) as a control, the liquid-state fermented theabrownins (L-TBs) was characterized by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Curie point pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry (CP-Py-GC-MS), scanning electron microscopy (SEM), and Zeta potential determination. Meanwhile, the inhibitory effects of L-TBs with different concentrations on α -glucosidase activities were examined. **Results** Compared with S-TBs, L-TBs had smaller particles, better dispersion, and stability, but all contained abundant hydroxyl and carboxyl groups, weakly acidic pH, and higher total protein and total sugar content without significant differences. The pyrolysis products of L-TBs and S-TBs were mainly phenolics with content of 43.88% and 35.69%, respectively. It also revealed that L-TBs had a specific inhibitory effect on α -glucosidase activity with a dose relationship in a particular range. **Conclusion** The L-TBs by *Pantoea camelliae* are more consistent with S-TBs in terms of composition structure, which has good value for developing and applying theabrownins products.

KEY WORDS: theabrownins; liquid-state fermentation; structural characteristics; α -glucosidase

0 引言

茶褐素(theabrownins, TBs)是普洱熟茶的主要水溶性色素^[1],是一类易溶于水,不溶于有机溶剂的天然大分子物质,它不仅对普洱熟茶的颜色和滋味有重要影响^[2],也是主要活性物质^[3],具有抗氧化^[4]、抗癌^[5]和降脂^[6]等多种生理活性,其中,降脂减肥功能尤为显著。目前,茶褐素主要来源于固态发酵生产的普洱熟茶,即通过微生物、酶及湿热环境的共同作用合成,然后经过水提、有机溶剂萃取、醇沉获得,由于固态发酵周期较长(30~60 d),且普洱熟茶中的茶褐素含量有限,导致其收率和提取率较低。寻找并建立茶褐素高效生产方式,对于扩大茶褐素的市场应用具有重要的意义。随着对普洱熟茶发酵相关微生物作用研究的深入,液态发酵引起了广泛关注,即将单一微生物加入大叶种晒青毛茶原料水提物中进行发酵,然后通过萃取、醇沉获得茶褐素。目前,关于真菌和酵母在晒青毛茶液态发酵中的作用研究较多,包括常见的黑曲霉、塔宾曲霉、毕赤酵母等,转化效率高,茶褐素产量高。WANG等^[7]以低档绿茶为原料,利用黑曲霉液态发酵6 d后得到茶褐素的含量为140.92 g/kg。另一研究^[8]则在5 L发酵罐中,接种曲霉进行液态发酵,仅72 h,茶褐素含量即为固态发酵含量的4倍。除了酵母菌和真菌,细菌在普洱茶的发酵过程中也起到重要作用,特别是在发酵后期,此外,细菌还具有生长周期短、易培养的优点。XUE等^[9]发现,在普洱熟茶发酵中,拟杆菌门(Bacteroidetes),芽单胞菌门(Gemmatimonadetes),螺旋菌门(Spirochaetae),厚壁菌门(Firmicutes)和一些未分类的细菌与物质合成密切相关。然而,目前还鲜有关于单独用细菌进行液态发酵生产茶褐素的报道。前期,本课题组在不同的茶叶样品中筛选获得几十种微生物,评估发现一株能够高效转化合成茶褐素的细菌,并命名为茶泛菌(*Pantoea Camelliae*, CCTCC AB 2021544^T),利用该菌进行液态发酵,仅需24 h,茶褐

素含量即可达到184.69 g/kg。

茶褐素作为一类大分子物质,不同的发酵方式和微生物类型都可能会影响物质的组成结构。李桃等^[10]发现,与固态发酵茶褐素相比,液态发酵茶褐素在380 nm下多出一个吸收峰,且羧基和酚羟基的含量更高。杜金杰等^[4]检测了不同发酵时期茶褐素的组成及其抗氧化活性,结果发现,茶褐素中的总酚含量与空间结构的差异造成其抗氧化能力的不同。因此,对某一特定茶褐素的物质组成进行表征分析,有助于研究其功能活性。针对已报道茶褐素的功能,减肥降脂最显著,而 α -葡萄糖苷酶是外源糖脂分解代谢的关键酶,若能抑制该酶的活性,则可有效减少机体内糖脂的消化吸收和糖脂摄入量,从而显著降低血脂和血糖水平,达到减肥效果。已有研究发现,茶色素对 α -葡萄糖苷酶具有较好的抑制作用^[11],而茶褐素作为一种主要的茶色素,在减肥降脂功能上具有极大的开发利用价值。

本研究以固态发酵茶褐素为对照,对茶泛菌液态发酵高效生产所得茶褐素的组成和结构特征进行全面分析,并进一步探究该茶褐素的降糖降脂功能,指导茶褐素类健康产品的开发和生产。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

普洱熟茶生产于云南省临沧市蚂蚁堆茶厂,发酵原料为云南大叶种晒青毛茶(含水量9.92%);茶泛菌来源于本实验室。

无水碳酸钠、无水乙醇、浓硫酸、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);福林酚(生物纯)、没食子酸(色谱纯)、 α -葡萄糖苷酶(23.5 U/mg)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(纯度 $\geq 99\%$)(上海源叶生物有限公司);考马斯亮蓝G250(分析纯,北京沃凯生物科技有限公司);牛血清白蛋

白(色谱纯, 武汉赛维尔生物技术有限公司); 磷酸(分析纯)、D-(+)-葡萄糖(纯度 $\geq 99.5\%$)、苯酚(分析纯)、阿卡波糖水合物(纯度 $\geq 98\%$)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

YRE-201C 型旋转蒸发器、HH-S4/ZK4 恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司); Smart-T 超纯水机(上海和泰仪器有限公司); K6600-B 全波长酶标仪(北京凯奥科技发展有限公司); Nicolet iS50R 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); FE20-FiveEasy Plus pH 计、ME204E 电子天平(精度 0.0001 mg, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪、J&W DB-5 石英毛细柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m)(美国安捷伦科技有限公司); Nova NanoSEM 450 场发射扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(美国 FEI 公司); Nano-ZS90 纳米粒度电位仪(英国马尔文仪器有限公司); UV-1600 紫外可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司); LGJ-10S 真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 茶褐素制备

参考田燕华^[12]的实验方法, 稍作修改。

液态发酵茶褐素(liquid-state fermented theabrownins, L-TBs)的制备: 大叶种晒青毛茶 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min $\rightarrow$ 按照 1:40 (*m*:*V*, 下同)在茶叶中加入无菌水 $\rightarrow$ 接入茶泛菌, 转速 100 r/min, 温度 30 $^{\circ}$ C, 发酵 24 h $\rightarrow$ 将发酵液于 60 $^{\circ}$ C 旋蒸浓缩为原体积的 1/10 $\rightarrow$ 浓缩液依次用二氯甲烷、乙酸乙酯及正丁醇萃取, 最终保留水层 $\rightarrow$ 按照 80%乙醇静置醇沉 $\rightarrow$ 8000 r/min 离心 10 min, 获得沉淀 $\rightarrow$ 真空冷冻干燥得到 L-TBs。

固态发酵茶褐素(solid-state fermented theabrownins, S-TBs)的制备: 按照茶水比 1:20 用蒸馏水浸提普洱熟茶 3 次 $\rightarrow$ 过滤, 合并滤液 $\rightarrow$ 滤液 60 $^{\circ}$ C 旋蒸浓缩为原体积的 1/10 $\rightarrow$ 浓缩液依次用二氯甲烷、乙酸乙酯及正丁醇萃取, 最终保留水层 $\rightarrow$ 按照 80%乙醇静置醇沉 $\rightarrow$ 8000 r/min 离心 10 min, 获得沉淀 $\rightarrow$ 真空冷冻干燥得到 S-TBs。

1.3.2 主要组成测定

参考田燕华^[12]的实验方法。将不同茶褐素粉末配制为 0.2 mg/mL 样品, 用 pH 计测定其 pH。茶褐素中总酚含量测定参照 GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》中的福林酚法; 总蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法; 总糖含量测定采用苯酚-硫酸法。

1.3.3 Zeta 电位分析

参考文献[13]报道的方法, 将 L-TBs 和 S-TBs 溶解在超纯水中, 使得溶液质量浓度为 1 mg/mL, 采用 Nano-ZS90 马尔文粒度分析和电位分析仪测定茶褐素的 Zeta 电位。

1.3.4 茶褐素类光谱学性质分析

将不同茶褐素粉末配制为 0.2 mg/mL 样品, 通过酶标仪在 200~800 nm 间进行全波长扫描。

以 1:100 质量比例将不同茶褐素粉末与 KBr 混匀压片, 通过傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析, 扫描波数范围 400~4000 cm^{-1} , 分辨率 8 cm^{-1} , 扫描次数 16 次。

1.3.5 茶褐素类物质居里点热裂解分析

分析条件参考文献[14]的居里点热裂解气相色谱-质谱法(Curie point pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry, CP-Py-GC-MS), 稍作修改。分别称取不同茶褐素样品 0.05 mg 于铁磁体的热箔片中。热裂解时间为 10 s, 热裂解室温度为 600 $^{\circ}$ C, 进样针温度为 380 $^{\circ}$ C。采用 J&W DB-5 石英毛细柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m), 在温度 45 $^{\circ}$ C 保持 4 min, 以 3 $^{\circ}$ C/min 速率升至 280 $^{\circ}$ C, 保持 15 min, 以 5 $^{\circ}$ C/min 速率升至 380 $^{\circ}$ C, 保持 2 min; 载气为氦气; 流量为 1.0 mL/min。质谱条件为离子源温度 230 $^{\circ}$ C; 传输线温度 270 $^{\circ}$ 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 15~500 u。MS 光谱通过 NIST14s 数据库进行匹配, 筛选匹配度达 90%以上物质进行定性比较。

1.3.6 茶褐素类物质形貌分析

L-TBs 和 S-TBs 经过溶解后, 将样品溶液滴定于载玻片上, 置于烘箱中 50 $^{\circ}$ C 烘干, 使用 NovaNanoSEM 450 扫描电镜观察前, 使用离子溅射仪对样品喷金处理, 处理后的茶褐素样品采用扫描电镜观察。

1.3.7 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用测定

参考文献[15]报道的方法, 稍作修改。将磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、茶褐素样品溶液或阳性对照(阿卡波糖)和 α -葡萄糖苷酶溶液(20 μ L, 1.0 U/mL)在 96 孔板上混合并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 10 min; 再加入硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷溶液(20 μ L, 2.5 mmol/L)在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 15 min; 最后加入 Na_2CO_3 (80 μ L, 0.2 mmol/L)混匀后, 于 405 nm 处测定吸光度。抑制活性的计算如公式(1):

$$\text{抑制率}/\% = \frac{[A - (A_1 - A_0)]}{A} \times 100\% \quad (1)$$

其中, A 为不添加待测样品的吸光度, A_1 为加入待测样品的吸光度, A_0 为 A_1 的阴性对照(不加酶)。

1.4 数据处理

每组实验重复 3 次, 数据取平均值。采用 Origin 2022 绘制图形, IBM SPSS Statistics 26.0 对数据进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)检验分析。

2 结果与分析

2.1 L-TBs 主要组分分析

大叶种晒青毛茶中的多酚类物质, 主要为儿茶素, 在微生物和湿热的作用下被氧化成茶黄素和茶红素, 并进一

步氧化聚合, 与糖类、蛋白质化合物结合, 最终形成大量的茶褐素^[16]。对茶泛菌 L-TBs 和 S-TBs 的总酚、总糖、总蛋白检测分析, 如表 1 所示, 二者的总糖和总蛋白含量较高且接近, 总酚含量差异较显著($P<0.05$)。吴恩凯等^[17]利用塔宾曲霉液态发酵获得茶褐素, 并与对照 S-TBs 比较发现, 二者总酚、总糖、总蛋白含量差异显著, 说明在单菌发酵时, 不同微生物对茶褐素的物质组成影响较大。

表 1 固态和液态发酵方式茶褐素主要组分比较
Table 1 Comparison of the main components of theabrownins between the solid and liquid fermentation

主要指标	茶褐素样品	
	L-TBs	S-TBs
总酚/%	20.65±0.25 ^b	24.35±0.29 ^a
总糖/%	18.03±0.49 ^a	17.09±0.62 ^a
总蛋白/%	20.03±0.17 ^a	19.31±0.42 ^a
pH	6.45±0.26 ^a	6.03±0.10 ^a
Zeta 电位	28.70±0.54 ^a	11.01±0.43 ^b

注: 同行不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

对 L-TBs 和 S-TBs 两者的性质进行分析, pH 都呈现一定的弱酸性, 与现有报道一致^[8]。李晨晨等^[18]研究发现, 在传统普洱茶固态发酵过程中, 茶叶样品的 pH 呈现先下降后上升的趋势, 推测 pH 高低与茶褐素的形成直接相关。对 Zeta 电位值进行分析, L-TBs 溶液远高于 S-TBs 溶液, 差异显著($P<0.05$)。Zeta 电位是表征胶体溶液稳定性的重要指标^[19]。Zeta 电位绝对值越高, 则表明溶液体系稳定性越好^[20]。由此可以说明, L-TBs 的稳定性较 S-TBs 更好。此外, 有研究表明, Zeta 电位会随着茶褐素溶液 pH 的升高不断增大^[5], 这与本研究一致。

2.2 L-TBs 光谱学性质分析

紫外可见光谱可用于鉴定含有 σ 键、 π 键、孤对电子、

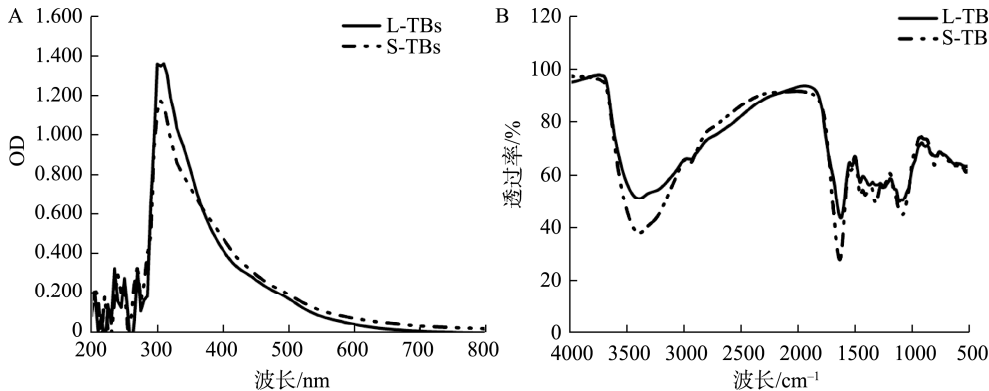
发色基团和芳环的化合物^[21]。如图 1A 所示, L-TBs 与 S-TBs 相比, 呈现出相似的紫外可见吸收峰, 在 300 nm 波长左右达到最高峰。由于取代的苯或多酚的 π - π 转换发生在波长区域, 因此, 茶褐素中的芳香族 C=C 含量丰富, 与现有报道一致^[22]。

FT-IR 光谱显示, 两种茶褐素的主要吸收峰基本一致, 表明其存在相似的官能团(图 1B)。两种茶褐素的 FT-IR 吸收峰约为 3396、2934、1628、1516、1440、1307、1064 和 801 cm^{-1} 。在 3396 cm^{-1} 的强宽吸收峰, 是 O-H 基团的伸缩振动峰^[23], 表明茶褐素是一类多羟基化合物; 峰值在 2934 cm^{-1} 的窄峰, 则与 C-H 伸缩振动有关; 1628 cm^{-1} 处的强吸收峰, 是由于 C=O 的伸缩振动形成; 1307 cm^{-1} 观察到的强吸收峰为 C-O 的伸缩振动峰; 1064 cm^{-1} 处为 C-O-C 糖苷键的伸缩振动峰^[24]; 而在 801 cm^{-1} 处的吸收峰可能为苯环取代基。上述数据表明, 茶褐素是一类聚合酚类化合物, 其富含羟基和羧基, 并且可能含有糖苷键。

2.3 L-TBs 的 CP-Py-GC-MS 分析

L-TBs 在 600°C 热裂解条件下, 共得到产物 161 种, 如表 2 所示, 其中匹配度达到 90 及以上的物质共 49 种。共鉴定出胺类(1.73%)、吡啶(4.52%)、吡咯(5.92%)、醇类(4.25%)、酚类(43.88%)、呋喃(1.78%)、醛类(0.87%)、酸类(14.07%)、烃类(16.23%)、酮类(5.81%)、酯类(1.54%)。主要包括邻苯二酚(10.39%)、4-甲基-1,2-苯二酚(9.28%)、乙酸(9.28%)、苯酚(9.20%)、甲苯(5.38%)等物质。

S-TBs 在 600°C 热裂解条件下, 共得到产物 141 种, 如表 3 所示, 其中匹配度达到 90 及以上的物质共 42 种, 数量少于 L-TBs。鉴定出吡啶(4.13%)、吡咯(9.10%)、醇类(0.32%)、酚类(35.69%)、呋喃(2.06%)、酸类(13.19%)、烃类(17.12%)、酮类(10.54%)、酯类(0.62%), 未检出胺类和醛类物质, 但检出呋喃(6.09%)和其他类物质(1.13%)。主要包括乙酸(13.19%)、苯酚(9.41%)、4-甲基苯酚(6.86%)、



注: A: 紫外可见光谱图; B: 傅里叶红外光谱图。

图 1 L-TBs 和 S-TBs 结构表征

Fig.1 Structural characterization of liquid-state fermented theabrownins and solid-state fermented theabrownins

表 2 L-TBs 样品热裂解产物(600℃, 匹配度≥90%)

Table 2 Pyrolysis products of theabrownins extracted from L-TBs samples (600℃, probability≥90%)

化合物种类	物质名称	保留时间/min	CAS 号	匹配度/%	相对含量/%	
胺类(1.73%)	油酸酰胺	31.44	000301-02-0	94	1.17	
	苯胺	6.95	000062-53-3	93	0.56	
	2-甲基吡啶	4.06	000109-06-8	97	0.74	
吡啶(4.52%)	3-甲基吡啶	4.79	000108-99-6	96	1.01	
	吡啶	3.05	000110-86-1	94	0.87	
	3,5-二甲基吡啶	6.06	000591-22-0	92	0.61	
	4-羟基吡啶	9.85	000626-64-2	90	1.30	
	N-甲基吡咯	2.96	000096-54-8	91	0.58	
吡咯(5.92%)	N-乙基吡咯	3.95	000617-92-5	91	1.48	
	3-甲基吡咯	4.56	000616-43-3	91	0.65	
	吡咯	3.15	000109-97-7	90	3.21	
醇类(4.25%)	糠醇	4.66	000098-00-0	97	4.25	
	邻甲酚	8.43	000095-48-7	97	2.46	
酚类(43.88%)	4-甲基苯酚	8.84	000106-44-5	97	4.83	
	2,4-二甲基苯酚	10.19	000105-67-9	96	1.97	
	邻苯二酚	11.21	000120-80-9	96	10.39	
	4-甲基-1,2-苯二酚	12.80	000452-86-8	96	9.28	
	苯酚	7.05	000108-95-2	94	9.20	
	愈创木酚	9.07	000090-05-1	94	1.75	
	4-乙基苯酚	10.53	000123-07-9	94	0.88	
	1,4-苯二酚	12.60	000123-31-9	94	2.17	
呋喃(1.78%)	3-乙基苯酚	10.57	000620-17-7	91	0.96	
	2,5-二甲基呋喃	2.589	000625-86-5	94	1.18	
醛类(0.87%)	E-15-十七碳烯醛	24.49	1000130-97-9	99	0.87	
酸类(14.07%)	肉豆蔻酸	19.79	000544-63-8	99	1.27	
	9-十六碳烯酸	22.22	002091-29-4	99	0.95	
	棕榈酸	22.55	000057-10-3	99	1.87	
	硬脂酸	25.57	000057-11-4	98	0.29	
	月桂酸	17.02	000143-07-7	97	0.41	
	乙酸	1.99	000064-19-7	91	9.28	
	环十六烷	21.32	000295-65-8	99	1.28	
烃类(16.23%)	1-二十碳烯	26.02	003452-07-1	98	0.87	
	反式角鲨烯	31.84	000111-02-4	98	3.17	
	环辛四烯	5.27	000629-20-9	96	0.67	
	甲苯	3.30	000108-88-3	95	5.38	
	十六烷	19.89	000544-76-3	95	0.46	
	十八烷	20.26	000593-45-3	95	0.18	
	间二甲苯	5.31	000108-38-3	94	0.36	
	茚	8.19	000095-13-6	93	0.54	
	对二甲苯	4.89	000106-42-3	91	3.06	
	环十四烷	20.33	000295-17-0	90	0.26	
	3-甲基--2-环戊烯-1-酮	6.67	002758-18-1	95	2.10	
	甲基环戊烯醇酮	7.90	000080-71-7	94	1.19	
	酮类(5.81%)	苯乙酮	8.64	000098-86-2	94	0.62
		2,3-二甲基-2-环戊烯酮	8.11	001121-05-7	93	0.82
	酯类(1.54%)	甲基环戊烯醇酮	5.56	001120-73-6	91	1.09
辛酸-十二烷酯		25.73	020292-09-5	96	0.16	
邻苯二甲酸二丁酯		22.61	000084-74-2	94	1.25	
对甲氧基肉桂酸辛酯		27.43	005466-77-3	91	0.13	

表 3 S-TBs 样品热裂解产物(600℃, 匹配度 $\geq 90\%$)
Table 3 Pyrolysis products of theabrownins extracted from S-TBs samples (600℃, probability $\geq 90\%$)

化合物种类	物质名称	保留时间/min	CAS 号	匹配度/%	相对含量/%
吡啶(4.13%)	吡啶	3.05	000110-86-1	91	1.54
	2-甲基吡啶	4.03	000109-06-8	96	1.37
	3,4-二甲基吡啶	6.03	000583-58-4	95	1.21
吡咯(9.10%)	吡咯	3.15	000109-97-7	90	5.16
	3-甲基吡咯	4.40	000616-43-3	90	3.95
醇类(0.32%)	糠醇	4.70	000098-00-0	97	0.32
	苯酚	7.03	000108-95-2	94	9.41
	邻甲酚	8.43	000095-48-7	97	3.71
酚类(35.69%)	4-甲基苯酚	8.83	000106-44-5	97	6.86
	愈创木酚	9.07	000090-05-1	95	2.42
	2,6-二甲基苯酚	9.41	000576-26-1	97	1.10
	2-乙基苯酚	10.00	000090-00-6	94	1.91
	2,4-二甲基苯酚	10.18	000105-67-9	96	3.34
	4-乙基苯酚	10.53	000123-07-9	94	1.52
	3-乙基苯酚	10.57	000620-17-7	91	1.57
	2,3-二甲基苯酚	10.73	000526-75-0	93	0.81
	3,4-二甲基苯酚	11.02	000095-65-8	93	1.60
	4-乙基-3-甲基苯酚	11.80	001123-94-0	93	0.78
	4,4'-亚乙基双苯酚	25.17	002081-08-5	93	0.65
呋喃(2.06%)	2,5-二甲基呋喃	2.59	000625-86-5	93	1.36
	7-甲基-苯并呋喃	13.66	017059-52-8	93	0.70
酸类(13.19%)	乙酸	1.97	000064-19-7	91	13.19
	甲苯	3.30	000108-88-3	95	5.87
	间二甲苯	4.75	000108-38-3	91	2.17
烃类(17.12%)	邻二甲苯	4.89	000095-47-6	95	4.03
	苯乙烯	5.27	000100-42-5	96	0.97
	对二甲苯	5.31	000106-42-3	95	0.82
	烯丙苯	7.83	000300-57-2	90	0.35
	蒾	8.19	000095-13-6	94	0.57
	1-甲基蒾	10.29	000767-59-9	93	1.21
	1,1-二甲基-1H-蒾	12.09	018636-55-0	95	0.67
	六甲苯	16.23	000087-85-4	93	0.45
	甲基环戊烯醇酮	5.05	001120-73-6	93	2.18
	3-甲基-2-环戊烯-1-酮	6.66	002758-18-1	95	3.75
酮类(10.54%)	3-甲基环戊烷-1,2-二酮	7.89	000765-70-8	94	1.35
	2,3-二甲基-2-环戊烯酮	8.10	001121-05-7	93	1.74
	苯乙酮	8.64	000098-86-2	91	0.89
	邻甲基苯乙酮	10.64	000577-16-2	94	0.63
酯类(0.62%)	戊二酸-二(2-乙基己基)酯	27.10	1000358-24-7	90	0.62
吡啶(6.09%)	吡啶	12.81	000120-72-9	96	4.86
	7-甲基吡啶	14.36	000933-67-5	92	1.23
其他(1.13%)	2-甲基苯并噻唑	9.56	000095-21-6	95	1.13

甲苯(5.87%)、吡咯(5.16%)。由以上数据可以发现, 酚类化合物是热解产物中最丰富的, 尤其是 L-TBs, 表明 TB 是一种聚合的酚类化合物, 与现有报道一致^[22]。

进一步对两种茶褐素热裂解的共有物质以及差异物质进行分析(如图 2 所示), L-TBs 特有热裂解产物 28 种, S-TBs 特有热裂解产物 21 种。同时, 鉴定出二者共有热裂解共有产物 21 种, 包括苯酚、吡咯、吡啶等。由此说明, 虽然发酵原料、发酵方式、发酵微生物的不同, 可能导致最终形成的茶褐素物质组成有所差异, 但茶褐素部分基本物质组成相似, 不受外界因素的影响, 这有利于研究茶褐素的结构组成。此外, 结构影响活性, 因此, 阐明 L-TBs 的基本组成结构, 是进一步研究其生理功能的基础。

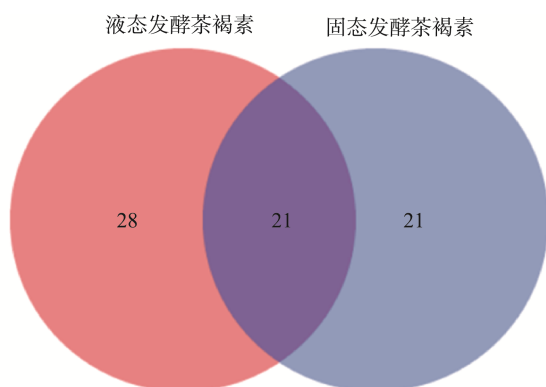


图 2 L-TBs 和 S-TBs 热裂解产物韦恩图

Fig.2 Venn diagram of the thermal pyrolysis products of liquid-state fermented theabrownins and solid-state fermented theabrownins

2.4 L-TBs 形貌分析

对液体发酵和固体发酵两种茶褐素溶液进行扫描电镜分析,如图 3 所示,二者在溶液中的形貌差异较大,L-TBs 颗粒更加分散,呈规则饱满原点状。而固体发酵所得茶褐素颗粒体积更大,且呈无规则形状。这在一定程度上说明,发酵方式对茶褐素,尤其是在溶解状态下的形貌有较大影响。推测由于液体发酵始终在溶液体系下进行,造成茶褐素颗粒之间分散更加均匀,而固体发酵主要发生于固体基质上,且长期保持静置状态,使得茶褐素之间接触不充分,更容易形成块状。

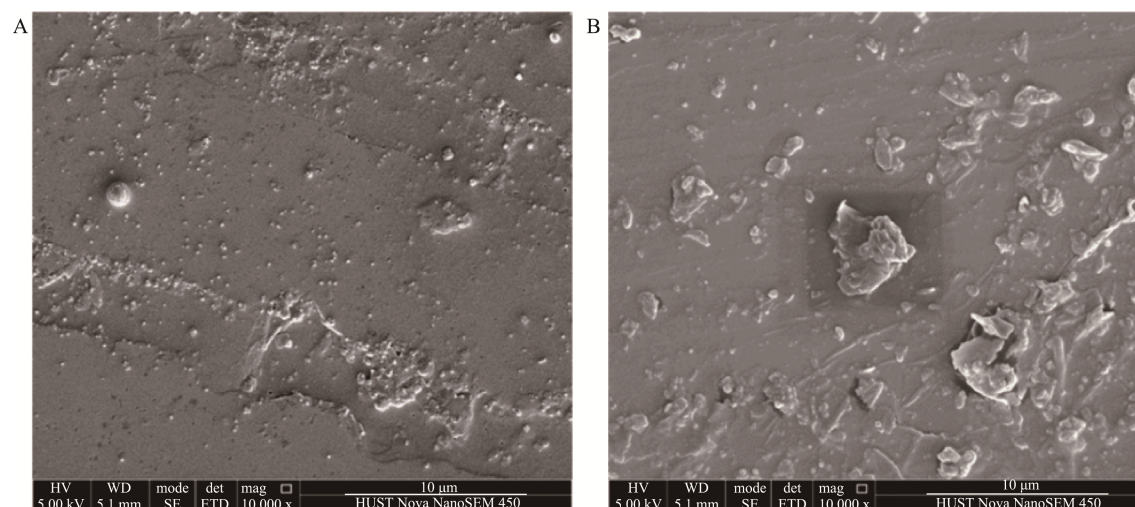
2.5 L-TBs 对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

利用茶泛菌液态发酵生产的茶褐素与传统固态发酵的茶褐素组成结构较类似,贺国文等^[25]发现 S-TBs 对 α -葡萄糖苷酶活性有抑制作用,且 25~50 kDa 级分对 α -葡萄

糖苷酶的抑制率为阿卡波糖的 1.9 倍。抑制 α -葡萄糖苷酶活性可以调节糖代谢并刺激胰岛素的产生,有助于降低餐后血糖水平,减少糖尿病的发生^[26]。该菌株的 L-TBs 是否具有类似的生理功能,本研究探究了其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,结果表明阿卡波糖的抑制曲线为 $Y=23.049\ln(X)+142.83$, $r^2=0.9938$,半抑制浓度为 0.02 $\mu\text{g/mL}$; L-TBs 的抑制曲线为 $Y=9.227\ln(X)+21.991$, $r^2=0.9901$,半抑制浓度为 20.81 $\mu\text{g/m}$ 。L-TBs 对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用,其半抑制浓度虽然远高于阿卡波糖的半抑制浓度,但与报道的普洱茶提取的生物活性物质(包括总黄酮、总酚等)的半抑制浓度(47.30 $\mu\text{g/mL}$)相比^[27],其抑制效果明显更好。结合图 4,可以发现较低浓度范围内, α -葡萄糖苷酶液的抑制作用随 L-TBs 浓度的增加而上升,但随后抑制效果则有所减弱。因此,在未来产品开发时,可以此作为剂量考虑依据。

3 讨论与结论

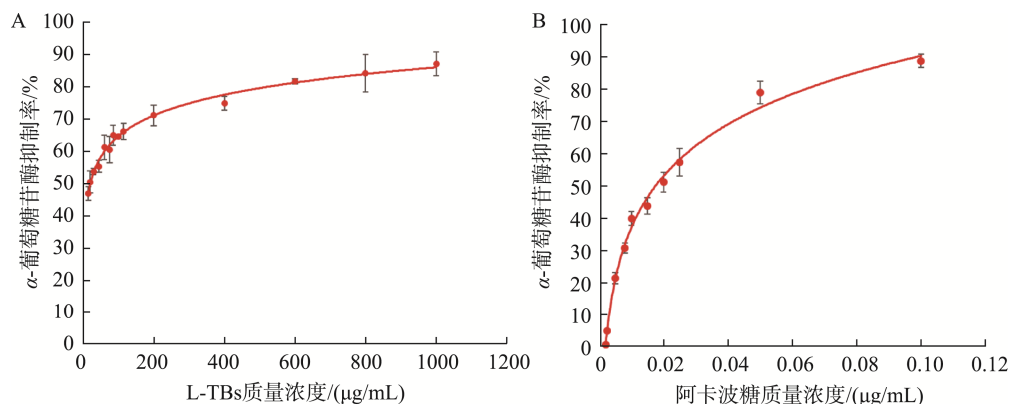
液态发酵生产茶褐素在近年来已成为研究重点,常用的发酵微生物为黑曲霉^[28]、塔宾曲霉^[8]等真菌。本研究则通过茶泛菌液态发酵获得茶褐素,效率高且产量高。通过与 S-TBs 组成结构进行比较分析,发现二者的总蛋白、总糖、pH 及光谱学性质上没有较大差异。进一步在 600 $^{\circ}\text{C}$ 下进行热裂解发现,两种茶褐素均含有大量酚类片段,可再次说明,茶褐素主要以多酚类物质作为底物,在微生物等作用下逐步氧化聚合^[29]。但 L-TBs 热裂解产物数量远高于 S-TBs,这与吴恩凯等^[18]的研究结果并不一致,说明不同茶褐素之间存在较大差异,推测茶泛菌可在体系中促进更多物质聚合,从而使得热裂解产物更加丰富。本研究还



注: A: L-TBs; B: S-TBs。

图 3 两种茶褐素溶液的扫描电镜图

Fig.3 Scanning electron microscope images of 2 kinds of theophyllin solutions

图4 L-TBs (A)及阿卡波糖(B)对 α -葡萄糖苷酶活性抑制强度Fig.4 Inhibition intensity of α -glucosidase activity by L-TBs (A) and acarbose (B)

发现在溶液状态下, L-TBs 和 S-TBs 的形貌存在较大差异。其中, L-TBs 在溶液中颗粒更小, 分散更加均匀, 这与其测得的 Zeta 电位更高相吻合, 即体系更加稳定。在功能上, 通过茶泛菌液态发酵获得的茶褐素对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用, 且在一定范围内呈剂量关系。 α -葡萄糖苷酶的活性与物质之间存在构效关系, 尤其是与物质的多糖组成、分子量、高级结构等有关^[30]。而在本研究中, 液态茶褐素含有较高含量糖, 且羟基、羧基、糖苷键丰富, 整体结构复杂, 可提供更多的酶结合位点, 从而获得较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

综上, 本研究通过茶泛菌液态发酵生产茶褐素具有可行性, 在工业应用上可实现大规模生产, 成本低且效率高。下一步将对茶褐素的高效合成机理以及组成结构进行深入解析, 从而为茶褐素类产品的开发提供更好的参考依据。

参考文献

- [1] WANG SN, QIU Y, GAN RY, *et al.* Chemical constituents and biological properties of Pu-erh tea [J]. Food Res Int, 2022, 154: 110899.
- [2] XIAO Y, LI MY, LIU Y, *et al.* The effect of *Eurotium cristatum* (MF800948) fermentation on the quality of autumn green tea [J]. Food Chem, 2021, 358: 129848.
- [3] 吴易霖, 陈勇. 茶褐素液生物学活性研究进展[J]. 农业开发与装备, 2021, (7): 153-154.
WU YL, CHEN Y. Advances in the biological activity of theabrownins liquid [J]. Agric Dev Eq, 2021, (7): 153-154.
- [4] 杜金杰, 吴新惠, 代雨晴, 等. 渥堆过程六堡茶品质成分分析及茶褐素抗氧化功能研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 50-55.
DU JJ, WU XH, DAI YQ, *et al.* Quality component analysis and antioxidant function of theabrownins from Liupao tea during fermentation process [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(6): 50-55.
- [5] CHEN XQ, HU YX, WANG BJ, *et al.* Characterization of theabrownins prepared from tea polyphenols by enzymatic and chemical oxidation and their inhibitory effect on colon cancer cells [J]. Front Nutr, 2022, 9: 849728.
- [6] XIAO Y, ZHONG K, BAI JR, *et al.* The biochemical characteristics of a novel fermented loose tea by *Eurotium cristatum* (MF800948) and its hypolipidemic activity in a zebrafish model [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 117: 108629.
- [7] WANG YW, ZHANG MY, ZHANG ZZ, *et al.* Multiple responses optimization of instant dark tea production by submerged fermentation using response surface methodology [J]. J Sci Food Agric, 2018, 55(7): 2579-2586.
- [8] WANG QP, 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 Sci Technol, 2018, 90: 598-605.
- [9] XUE J, YANG L, YANG Y, *et al.* Contrasting microbiomes of raw and ripened Pu-erh tea associated with distinct chemical profiles [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 124: 109147.
- [10] 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.
LI T, DU LP, XIAO DG, *et al.* Comparative study on theabrownins in Pu-erh tea and its powder fermented in liquid state [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, 30(11): 93-97.
- [11] 郝文幸, 王森, 吕梦娴. 宜兴红茶茶色素对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 中国科技论文在线, 2015, 26(5): 33-38.
HAO WX, WANG M, LV MX. Study on the inhibitory effect of Yixing black tea tea pigments on α -glucosidase [J]. China Sci Essays Online, 2015, 26(5): 33-38.
- [12] 田燕华. 液态发酵生产茶褐素及其生物活性研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
TIAN YH. Study on the production of theabrownins by submerged fermentation and its biological activity [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2019.
- [13] YUAN Y, BAI YY, ZHANG YJ, *et al.* Physicochemical and colon cancer cell inhibitory properties of theabrownins prepared by weak alkali oxidation of tea polyphenols [J]. Plant Food Hum Nutr, 2022, 77(3): 405-411.
- [14] PENG CX, LIU J, LIU HR, *et al.* Influence of different fermentation raw materials on pyrolyzates of Pu-erh tea theabrownin by Curie-point pyrolysis-gas chromatography-mass spectroscopy [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 54: 197-203.
- [15] XU H, ZHAO CF, LI YT, *et al.* The ameliorative effect of the *Pyracantha*

- fortuneana* (Maxim.) H. L. Li extract on intestinal barrier dysfunction through modulating glycolipid digestion and gut microbiota in high fat diet-fed rats [J]. *Food Funct*, 2019, 10(10): 6517–6532.
- [16] LIU JY, HE D, XING YF, *et al.* Effects of bioactive components of Pu-erh tea on gut microbiomes and health: A review [J]. *Food Chem*, 2021, 353: 129439.
- [17] 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 ENK, WANG QP, GONG JS, *et al.* Effect of fermentation methods on theabrownin composition of Pu-erh tea [J]. *Food Sci*, 2019, 40(4): 215–221.
- [18] 李晨晨, 吕杰, 杨瑞娟, 等. 普洱茶渥堆发酵过程中嗜热细菌的分离和鉴定[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2012, 39(2): 74–78.
- LI CC, LV J, YANG RJ, *et al.* Isolation and identification of thermophilic bacteria in the fermentation process of Pu-erh tea [J]. *J Beijing Univ Chem Technol (Nat Sci Ed)*, 2012, 39(2): 74–78.
- [19] FERREYRA MAPV, ESPECHE JC, MATURANA P, *et al.* Zeta potential beyond materials science: Applications to bacterial systems and to the development of novel antimicrobials [J]. *BBA-Biomemb*, 2021, 1863(6): 183597.
- [20] HAN Y, CHENG Z, ZHANG YT, *et al.* Effect of metal ions and pH on the emulsifying properties of polysaccharide conjugates prepared from low-grade green tea [J]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 102: 105624.
- [21] XIAO Y, LI MY, WU YP, *et al.* Structural characteristics and hypolipidemic activity of theabrownins from dark tea fermented by single species *Eurotium cristatum* PW-1 [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 204.
- [22] XIAO Y, HUANG YN, LONG FW, *et al.* Insight into structural characteristics of theabrownin from Pingwu Fuzhuan brick tea and its hypolipidemic activity based on the *in vivo* zebrafish and *in vitro* lipid digestion and absorption models [J]. *Food Chem*, 2022: 134382.
- [23] CHEN J, GU BH, LEBOEUF EJ, *et al.* Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions [J]. *Chemosphere (Oxford)*, 2002, 48(1): 59–68.
- [24] YANG XH, HUANG MJ, QIN CQ, *et al.* Structural characterization and evaluation of the antioxidant activities of polysaccharides extracted from Qingzhuang brick tea [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 101: 768–775.
- [25] 贺国文, 钟桐生, 彭晓赞, 等. 茯砖茶褐素组分特征及对 α -葡萄糖苷酶活性抑制研究[J]. *茶叶科学*, 2016, 36(1): 102–110.
- HE GW, ZHONG TS, PENG XY, *et al.* Comparative study on component characteristics and inhibitory activities on α -glucosidase of theabrownin from fuzhuan brick tea [J]. *J Tea Sci*, 2016, 36(1): 102–110.
- [26] WANH L, CHEN C, ZHANG B, *et al.* Structural characterization of a novel acidic polysaccharide from *Rosa roxburghii* Tratt fruit and its α -glucosidase inhibitory activity [J]. *Food Funct*, 2018, 9(7): 3974–3985.
- [27] ARMSTRONG L, ARAÚJO VDCM, WU Y, *et al.* Optimizing the extraction of bioactive compounds from pu-erh tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) and evaluation of antioxidant, cytotoxic, antimicrobial, antihemolytic, and inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities [J]. *Food Res Int*, 2020, 137: 109430.
- [28] 罗春燕. 碎末茶生产茶褐素发酵工艺研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2021.
- LUO CY. Study on the fermentation technology of theabrownin produced by crushed tea [D]. Guizhou: Guizhou University, 2021.
- [29] HU SM, LI XL, GAO CC, *et al.* Detection of composition of functional component theabrownins in Pu-erh tea by degradation method [J]. *Food Sci Hum Well*, 2022, 11(3): 643–647.
- [30] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 355–363.
- YANG YJ, LIU JY, TAN Y, *et al.* Progress in understanding the structure-activity relationship and hypoglycemic mechanism of polysaccharides [J]. *Food Sci*, 2021, 42(23): 355–363.

(责任编辑: 韩晓红 郑 丽)

作者简介



谢燕霞, 在读博士研究生, 主要研究方向为微生物发酵。

E-mail: yanxia_xie@hust.edu.cn



朱圆敏, 博士, 讲师, 主要研究方向为微生物技术与发酵工程。

E-mail: zhuyuanmin@hust.edu.cn



余龙江, 博士, 教授, 主要研究方向为资源生物学与生物技术。

E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn