

单宁酶处理提高茶梗儿茶素含量及茶梗提取液生物活性

黄玉凤¹, 肖安风^{1,2,3,4*}, 倪辉^{1,2,3,4}, 蔡慧农^{1,2,3,4}

(1. 集美大学生物工程学院, 厦门 361021; 2. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 厦门 361021;
3. 福建省高校食品微生物与酶工程技术研究中心, 厦门 361021;
4. 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 厦门 361021)

摘要: 为综合利用茶叶加工副产物茶叶梗, 试验设计利用固态发酵得到的单宁酶处理茶梗, 比较不同处理条件下的茶梗提取液中儿茶素组成的差异及还原力、DPPH 和 OH 自由基清除率、胰 α -淀粉酶和胰脂肪酶抑制活性变化, 探讨单宁酶处理提高茶梗提取物中儿茶素含量和生物活性可行性。研究发现: 在 50℃ 条件下, 利用 2 U/mL 单宁酶溶液作用于茶梗粉末 60 min, 茶梗提取液中酯型儿茶素 (EGCG、ECG、GCG) 基本被水解生成非酯型儿茶素 (EGC、EC、GC) 和没食子酸 (GA), 从而减少单宁-蛋白质聚合物和茶乳的形成量; 此外, 经单宁酶处理的茶梗提取液抗氧化活性与对照比较明显增强, 表现为 OH 和 DPPH 自由基清除率 IC₅₀ 分别降低了 74% 和 26%; 酶解茶梗提取液质量浓度为 5 000 mg/L 时, 胰 α -淀粉酶和胰脂肪酶抑制率分别提高了 89% 和 107%。研究结果表明单宁酶可高效水解茶梗提取液中酯型儿茶素, 提高茶梗提取液的抗氧化活性以及体外抑制胰 α -淀粉酶和胰脂肪酶活性。

关键词: 酶, 提取, 生物活性, 茶梗, 儿茶素, 转化

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2013.13.035

中图分类号: Q814.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2013)-13-0277-09

黄玉凤, 肖安风, 倪辉, 等. 单宁酶处理提高茶梗儿茶素含量及茶梗提取液生物活性[J]. 农业工程学报, 2013, 29(13): 277-285.

Huang Yufeng, Xiao Anfeng, Ni Hui, et al. Tannase treatment improves contents of catechins and bioactivity of tea stalk infusion[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(13): 277-285. (in Chinese with English abstract)

0 引言

茶在中国的历史悠久, 但长期以来, 人们只重视茶树芽叶的生产加工, 而对茶末、茶梗等副产品的关注颇少。在茶生产加工过程中茶梗通常作为夹杂物被挑拣出来, 年产量约占茶叶总量的 20%, 仅福建安溪一带就达 5 万 t。目前, 大量茶梗还没有得到合理利用, 大多用于茶园肥料或茶枕制作或置于屋内去除异味等, 这造成资源很大浪费。其实茶梗与茶叶一样, 含有许多对人体有益的成分, 茶多酚^[1]、儿茶素^[2]、生物碱^[3-4]、茶多糖^[5]等。目前, 市场上出现多种多样的茶饮料和保健茶, 很多是从粗老茶、茶末、茶梗等副产品中提取营养保健成分, 配入特殊药理功效的中草药、代用茶、特定的维生素和人体所需的微

量元素等, 再经特殊工艺处理制成的。因此, 从茶梗原料中提取茶活性物质生产保健食品, 是提高产品附加值, 促进茶产业发展的有效途径。

目前, 茶叶有效成分提取方法主要有水浸提法和有机溶剂浸提法^[6]。在水浸提过程中, 添加外源酶辅助浸提有利于物料中有效成分的快速高效提取, 从而提高生产效率^[6]。单宁酶能切断没食子单宁中的酯键和缩酚键^[7], 使具有苦涩味的酯型儿茶素被水解^[8], 释放出的游离没食子酸又能与咖啡碱形成相对较小的水溶物^[9], 这样不仅可减少或消除液态茶冷浑浊现象^[10], 同时具有改善茶汤滋味的作用^[11], 也可减轻茶叶浓缩液过滤时膜的污染和堵塞^[12], 因此, 单宁酶在有关茶饮料和茶产品开发中具有广泛的应用^[13], 但利用单宁酶溶液辅助提取茶梗活性物质并分析单宁酶在改善茶梗提取液品质方面的研究还未见报道。本试验以福建安溪铁观音茶梗为原料, 利用茶梗发酵得到的单宁酶溶液再次作用于茶梗, 研究单宁酶对茶梗提取液儿茶素和生物活性的影响, 为单宁酶在茶饮料行业中的应用和以茶梗作为提取原料的饮料行业提供理论依据。

收稿日期: 2013-03-13 修订日期: 2013-04-25

基金项目: 福建省产学研重大专项项目 (2010N5009); 集美大学科研创新团队基金项目 (No.2010A006); 李尚大基金项目 (ZC2011014)。

作者简介: 黄玉凤 (1985-), 女, 福建漳州人, 研究方向: 食品生物技术。厦门 集美大学生物工程学院, 361021。

*通信作者: 肖安风 (1973-), 男, 江西吉安人, 集美大学生物工程学院副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事食品生物技术。厦门 集美大学生物工程学院, 361021。Email: xxaaffeng@jmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

茶梗：铁观音茶梗，购于福建省泉州市安溪茶园。

单宁酶溶液：由黑曲霉 JMU-TS528 固态发酵茶叶梗所得，培养基成分和发酵条件如下：每个 250 mL 锥形瓶装 5 g 茶梗粉末，额外添加 NH_4Cl 和 α -乳糖的量均为 5%（质量分数），初始盐溶液 pH 值为 6.0，固水比为 1:2 (g/mL)，搅拌均匀后，121℃ 灭菌 20 min，冷却后接种 4.35 mL 孢子悬液 (1×10^8 个孢子/mL)，28℃ 条件下发酵 118 h 后，每瓶加入 100 mL 柠檬酸/柠檬酸三钠缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 5.0)，于 28℃ 下 180 r/min 振荡浸提 1 h 后过滤，即得粗酶液。提取得到的粗酶液经 1% 活性炭脱色 1 h 后过滤，依次经过 0.8、0.45 和 0.22 μm 孔径的水相膜抽滤除菌。除菌后的酶液边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 40% 饱和度，低温静置 3 h，4℃，12 000 r/min 离心 20 min，收集上清液继续添加硫酸铵至 90% 饱和度，低温静置 3 h，4℃，12 000 r/min 离心 20 min，收集沉淀，用少量体积的柠檬酸/柠檬酸三钠缓冲液 (0.01 mol/L, pH 值 5.0) 对沉淀进行溶解后，4℃ 下透析 24 h。取透析后的酶液 4℃，12 000 r/min 离心 20 min，弃去不溶物，即得单宁酶溶液，测得酶活力为 2 U/mL，并分别用柠檬酸缓冲液稀释至所需浓度。酶活单位定义：30℃ 条件下每分钟产生 1 μmol 没食子酸所需的酶量定义为一个酶活单位。

胰 α -淀粉酶：2 800 U/mg，购于上海国药集团有限公司。酶活力单位定义：37℃，pH 值 7.0 条件下每分钟产生 1 μg 麦芽糖所需的酶量定义为一个酶活单位。

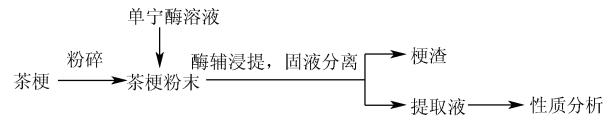
胰脂肪酶：100~400 U/mg，购于美国 Sigma 公司。酶活力单位定义：37℃，pH 值 7.7 条件下水解甘油三酯每分钟生成 1 μmol 脂肪酸所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.2 试验仪器

国家标准检验筛 (80 目，浙江上虞市金鼎标准筛具厂)；高速药物粉碎机 (山东青州精诚机械有限公司)；Centrifuge 5415D 小型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)；HH-6 数显恒温水浴锅 (厦门精艺兴业科技有限公司)；AvantiTMJ-25 冷冻离心机 (美国 Beckman 公司)；UV-2600A 型紫外可见分光光度计 (上海尤尼柯仪器有限公司)；Waters 2695/2489 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)；Symmetry C₁₈ 反相色谱柱 (3.0×250 mm, 5 μm , 美国 Waters 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程



将茶叶梗粉碎，过 80 目的筛。按茶梗质量 (g) 与单宁酶溶液 (mL)，即料液比为 1:20 g/mL 的比例，称取茶梗粉末 1 g 添加 2 U/mL 的单宁酶溶液 20 mL (pH 值 5.0)，50℃ 振荡浸提 60 min 后，置于沸水浴 5 min 终止反应，趁热减压^[14]过滤，并洗涤滤渣，定容至 50 mL，即单宁酶辅助浸提 (酶辅助浸提) 的茶梗提取液 (tea stalks infusion, TSI)，相同条件下以去离子水浸提得到的 TSI 为对照。

1.3.2 儿茶素检测方法

取处理后的 TSI 1 mL，10 000 r/min 离心 10 min，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后，备 HPLC 分析。液相色谱条件：symmetry C₁₈ (3.0×250 mm, 5 μm) 色谱柱；流动相为 0.5% 乙酸水溶液 (A) 和甲醇 (B)，线性洗脱梯度为 88%A (0 min) -88%A (5 min) -81%A (16 min) -76%A (28 min) -70%A (32 min) -88%A (40 min) -88%A (45 min)；流速 0.5 mL/min；柱温 30℃；检测波长 278 nm。

1.3.3 单宁-蛋白质聚合物分析

取 1 mL TSI 和 4 mL 染色 BSA 溶液混合，室温振荡 5 min，使完全混合。4 000 r/min 离心 20 min，弃上清，用 3.5 mL 十二烷基硫酸钠 (SDS)-三乙醇胺-异丙醇溶液 (1 g:5 mL:20 mL/100 mL)^[15] 溶解沉淀，摇匀使沉淀完全溶解，590 nm 处以水为空白调零，测量各样品的吸光值。

1.3.4 茶乳含量测定

采用烘干法^[15]测定。茶乳质量浓度 (g/100 mL) 以每 100 mL 提取液中沉淀的质量表示。

1.3.5 还原力测定

采用还原 Fe^{3+} 的方法测定 TSI 的还原力^[16]。

1.3.6 OH 自由基清除率的测定

采用水杨酸法测定 TSI 清除羟自由基能力^[17]。

1.3.7 DPPH 自由基清除能力测定

利用比色法测定 TSI 清除 DPPH 自由基能力^[18]。

1.3.8 对胰 α -淀粉酶的抑制作用

参考张永军建立的方法^[19]加以修改。取 0.25 mL 胰 α -淀粉酶溶液 (0.05 mg/mL) 于试管中 (对照管加已失活的胰 α -淀粉酶)，加入 0.25 mL TSI, 37℃ 保温 10 min，加入 0.5 mL 质量分数为 0.5% 淀粉溶液。反应 30 min 后立即加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 溶液，沸水浴 8 min，冷却后加水定容至 10 mL，以水为空白调零，540 nm 处测吸

光度 A 。根据麦芽糖标准曲线, 由测试管和对照管吸光值的变化计算麦芽糖生成量: $\Delta A_{540} = A_{\text{测试管}} - A_{\text{对照管}}$, 从而求出胰 α -淀粉酶活力 (T_2 , U)。以磷酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH 值 7.0) 代替茶梗提取液, 测定不加抑制剂 (茶梗提取液) 情况下的胰 α -淀粉酶活力 (T_1 , U)。根据加入抑制剂前 (T_1) 后 (T_2) 酶活力的变化求出抑制率, 绘制抑制率-TSI 浓度曲线。抑制率 E (%) = $(T_1 - T_2) / T_1 \times 100$ 。

1.3.9 对胰脂肪酶的抑制作用

参考张永军建立的方法^[19]加以修改。取 1 mL TSI 与 1 mL 胰脂肪酶溶液 (2 mg/mL) 混合, 对照加已失活的胰脂肪酶, 37°C 预热 5 min, 加入已预热至同样温度的底物 (0.05 mol/L, pH 值 7.7 的磷酸缓冲液 4 mL 加 2 mL 橄榄油), 37°C 下, 搅拌 30 min, 立即加入 10 mL 二甲苯, 继续搅拌 5 min, 终止反应, 同时萃取脂肪酸。转移至离心试管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上层有机相 4 mL 于小锥形瓶中, 加入 1 mL 显色剂 (质量分数 5% 醋酸铜溶液, 用吡啶调节 pH 值=6.1), 振荡 5 min, 4 000 r/min 离心 10 min 后取上层有机相于 710 nm 处测吸光值。另取 1 mL 缓冲溶液替代茶梗提取液, 测定不加抑制剂条件下胰脂肪酶活力。对照脂肪酸

标准曲线求出胰脂肪酶活力, 酶活计算及抑制率计算公式同胰 α -淀粉酶测定。

1.3.10 统计方法

试验结果均以 4 次平行测定的均值表示, 数据使用 SPSS 17.0 进行方差分析, 差异性分析采用邓肯多范围检测法, 相同字母表示差异不显著, 不同字母表明差异显著 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 酶添加量对茶梗儿茶素的影响

茶梗固态发酵制备的酶液, 经适当纯化后单宁酶活力为 2 U/mL, 稀释至不同浓度后用于辅助提取茶梗活性物质, 制得的茶梗提取液 (tea stalk infusion, TSI) 中儿茶素总量及其组成均有所改变 (表 1)。

由表 1 可知, 随着单宁酶添加量的增加, 儿茶素总量总体呈现逐渐减少的趋势, 酯型儿茶素 (EGCG、GCG、ECG) 大幅减少, 其中, 由于 EGCG 的含量大, 减少的幅度也最大, 非酯型儿茶素 (EGC、GC、EC) 增加明显, 同时没食子酸 (GA) 含量显著增加, 说明在单宁酶的作用下酯型儿茶素分解转化为非酯型儿茶素, 同时释放出 GA。

表 1 不同单宁酶浓度对茶梗儿茶素的影响

Table 1 Effects of tannase concentrations on catechins in TSI

单宁酶浓度 Concentration of Tannase/ (U·mL ⁻¹)	没食子酸 GA/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	儿茶素类质量浓度 Contents of catechins/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
		没食子儿 茶素 GC	表没食子 儿茶素 EGC	表没食子 儿茶素没 食子酸酯 EGCG	表儿茶素 EC	没食子儿茶素 没食子酸酯 GCG	表儿茶素 没食子酸 酯 ECG	非酯型儿茶素 Nonestern catechins	酯型儿茶素 Estern catechins	儿茶素总量 Total catechins
0	35.88 ^d	4.39 ^b	157.55 ^c	329.82 ^a	48.23 ^c	6.71 ^a	85.13 ^a	210.16 ^c	421.66 ^a	631.83 ^{ab}
0.4	244.07 ^c	4.67 ^a	374.99 ^b	106.44 ^b	96.00 ^b	0.00 ^b	61.37 ^b	475.66 ^b	167.81 ^b	643.47 ^a
0.8	305.20 ^b	3.64 ^c	413.42 ^a	34.51 ^c	103.87 ^{ab}	0.00 ^b	49.06 ^c	520.93 ^a	83.57 ^c	604.50 ^{abc}
1.2	337.21 ^a	3.34 ^d	431.97 ^a	14.74 ^d	108.56 ^a	0.00 ^b	43.69 ^c	543.88 ^a	58.43 ^d	602.31 ^{bc}
1.6	340.73 ^a	3.41 ^{cd}	429.56 ^a	11.54 ^d	109.50 ^a	0.00 ^b	43.44 ^c	542.47 ^a	54.98 ^d	597.45 ^{bc}
2	351.44 ^a	3.59 ^c	434.44 ^a	0.00 ^e	112.54 ^a	0.00 ^b	37.82 ^d	550.57 ^a	37.82 ^c	588.39 ^c

注: 同一列不同字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)。料液比为 1:20 g/mL, 酶作用温度为 50°C, 酶作用时间为 60 min。非酯型儿茶素含量=GC+EGC+EC; 酯型儿茶素含量=EGCG+GCG+ECG。

Note: The different letters in the same column indicates significant difference ($P < 0.05$). The ratio of tea stalk to enzyme: 1:20 g/mL, temperature: 50°C, time: 60 min. Content of nonestern catechins = GC+EGC+EC; Content of estern catechins = EGCG+GCG+ECG.

2.2 酶作用温度对茶梗儿茶素的影响

试验考察了不同温度对单宁酶作用于茶梗儿茶素的影响, 结果如表 2 所示。从表 2 可以看出, 在相对低温 (30°~50°C) 条件下, 儿茶素总量、非酯型儿茶素和 GA 含量明显增加, 酯型儿茶素含量也显著增加, 推测原因是在该条件下酯型儿茶素的溶出速率小于酶解速率。随着温度 (40°~60°C) 的升高, 酯型儿茶素的含量显著减少, 非酯型儿茶素和 GA 含量持续增加, 说明适当提高温度有利于物质的溶出和酶解作用的增强, 该现象以 EGCG 含量的变化最为明显。

2.3 酶作用时间对茶梗儿茶素的影响

提取液中儿茶素的含量随酶作用时间的变化规律如表 3 所示。同样地, 随着酶作用时间的延长, 酯型儿茶素的分解程度增大, 其总量持续减少, 非酯型儿茶素和 GA 的含量增加。在反应初始时, 茶梗一接触酶液立即过滤仍然有少量儿茶素的存在, 推测原因是一些易溶于水的物质一接触酶液就立即释放出来的缘故。随着时间的延长, 物质溶出速率小于酶解速率, 酯型儿茶素逐渐减少, 非酯型儿茶素不断增加。75 min 时, 大部分酯型儿茶素已基本被水解, 单宁酶酶解反应速率逐渐降低。

表 2 不同酶作用温度对茶梗儿茶素的影响
Table 2 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on catechins in TSI

温度 Temperature /°C	没食子酸 GA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	儿茶素类质量浓度 Contents of catechins($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
		没食子儿 茶素 GC	表没食子 儿茶素 EGC	表没食子 儿茶素没 食子酸酯 EGCG	表儿茶素 EC	没食子儿茶 素没食子酸 酯 GCG	表儿茶素没 食子酸 酯 ECG	非酯型儿茶素 Nonestern catechins	酯型儿茶素 Estern catechins	儿茶素总量 Total catechins
30	230.35 ^d	3.50 ^c	374.40 ^a	0.00 ^d	78.16 ^b	4.49 ^a	17.17 ^d	456.06 ^b	21.65 ^c	477.71 ^b
40	254.21 ^c	3.87 ^c	383.60 ^a	37.80 ^a	96.22 ^a	4.51 ^a	28.88 ^c	483.68 ^{ab}	71.19 ^a	554.87 ^a
50	303.42 ^b	5.12 ^a	420.16 ^a	25.71 ^b	107.84 ^a	3.78 ^c	41.06 ^a	533.12 ^a	70.55 ^a	603.67 ^a
60	326.61 ^a	4.48 ^b	414.92 ^a	5.89 ^c	102.61 ^a	4.18 ^b	35.30 ^b	522.01 ^a	45.37 ^b	567.38 ^a

注：同一列不同字母表示差异性显著 ($P<0.05$)。料液比为 1:20 g/mL，酶添加浓度为 2 U/mL，酶作用时间为 60 min。非酯型儿茶素含量=GC+EGC+EC；酯型儿茶素含量=EGCG+GCG+ECG。
Note: The different letters in the same column indicates significant difference ($P<0.05$). The ratio of tea stalk to enzyme: 1:20 g/mL, tannase concentration: 2 U/mL, time: 60 min. Content of nonestern catechins = GC+EGC+EC; Content of estern catechins = EGCG+GCG+ECG.

表 3 不同酶作用时间对茶梗儿茶素的影响
Table 3 Effects of enzymatic hydrolysis time on catechins in TSI

时间 Time/min	没食子酸 GA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	儿茶素类质量浓度 Contents of catechins($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
		没食子儿 茶素 GC	表没食子 儿茶素 EGC	表没食子 儿茶素没 食子酸酯 EGCG	表儿茶素 EC	没食子儿茶 素没食子酸 酯 GCG	表儿茶素没 食子酸 酯 ECG	非酯型儿茶素 Nonestern catechins	酯型儿茶素 Estern catechins	儿茶素总量 Total catechins
0	107.59 ^f	1.68 ^d	281.01 ^d	0.00 ^d	39.31 ^e	0.00 ^d	3.83 ^c	321.99 ^d	3.83 ^c	325.82 ^d
15	169.85 ^e	8.01 ^a	310.46 ^{cd}	206.51 ^a	83.15 ^d	5.29 ^a	63.62 ^a	401.61 ^c	275.42 ^a	677.03 ^a
30	211.53 ^d	6.84 ^b	326.39 ^c	146.09 ^b	86.38 ^{cd}	4.52 ^{bc}	58.04 ^b	419.61 ^c	208.65 ^b	628.25 ^{ab}
45	262.09 ^c	6.82 ^b	374.44 ^b	103.31 ^c	94.71 ^{bc}	4.21 ^c	42.75 ^c	475.96 ^b	150.27 ^c	626.23 ^{ab}
60	337.74 ^b	3.78 ^c	398.69 ^b	6.93 ^d	101.53 ^b	4.55 ^b	31.68 ^d	504.00 ^b	43.16 ^d	547.16 ^c
75	377.08 ^a	4.09 ^c	453.28 ^a	0.00 ^d	117.82 ^a	4.28 ^{bc}	3.37 ^e	575.20 ^a	7.65 ^e	582.85 ^{bc}
90	374.39 ^a	4.28 ^c	445.36 ^a	0.00 ^d	114.10 ^a	4.25 ^{bc}	2.76 ^e	563.74 ^a	7.01 ^e	570.76 ^{bc}

注：同一列不同字母表示差异性显著 ($P<0.05$)。料液比为 1:20 g/mL，酶添加浓度为 2 U/mL，酶作用温度为 50°C。非酯型儿茶素含量=GC+EGC+EC；酯型儿茶素含量=EGCG+GCG+ECG。
Note: The different letters in the same column indicates significant difference ($P<0.05$). The ratio of tea stalks to enzyme: 1:20 g/mL, tannase concentration: 2 U/mL, temperature: 50°C. Content of nonestern catechins = GC+EGC+EC; Content of estern catechins = EGCG+GCG+ECG.

2.4 单宁酶对茶梗儿茶素的作用试验

对传统沸水提取和单宁酶处理条件下制得的 TSI 中儿茶素组成进行比较 (表 4)。从表 4 可以看出，单宁酶辅助提取的 TSI 儿茶素总量较传统沸水提取方法增加了 11.5%，儿茶素组成变化极显著，

其中，酯型儿茶素总量减少了 94%，非酯型儿茶素增加了 156%，同时 GA 的含量增加了 684%，说明单宁酶可高效水解复杂儿茶素形成简单儿茶素，同时释放出 GA。

表 4 沸水提取与单宁酶处理条件下儿茶素的质量浓度
Table 4 Contents of catechins under the conditions of boiling water and tannase-treated

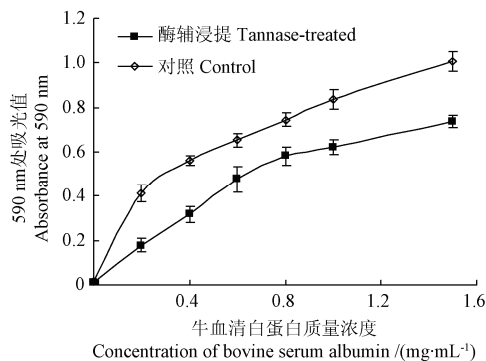
处理方法 Treatment	没食子酸 GA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	儿茶素类质量浓度 Contents of catechins($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
		没食子儿 茶素 GC	表没食子 儿茶素 EGC	表没食子 儿茶素没 食子酸酯 EGCG	表儿茶素 EC	没食子儿茶 素没食子酸 酯 GCG	表儿茶素没 食子酸 酯 ECG	非酯型儿茶素 Nonestern catechins	酯型儿茶素 Estern catechins	儿茶素总量 Total catechins
沸水提取 Boiling water extracted	44.07 ^b	4.89 ^b	142.82 ^b	211.35 ^a	55.09 ^b	46.59 ^a	19.88 ^a	202.81 ^b	277.82 ^a	480.63 ^b
单宁酶处理 Tannase treated	345.55 ^a	6.38 ^a	413.66 ^a	12.41 ^b	99.45 ^a	4.17 ^b	0.00 ^b	519.49 ^a	16.58 ^b	536.07 ^a

注：同一列不同字母表示差异性显著 ($P<0.05$)。沸水提取：沸水浴浸提 30 min；酶解条件：酶浓度 2 U/mL，酶作用温度 50°C，酶作用时间 60 min，下同。非酯型儿茶素含量=GC+EGC+EC；酯型儿茶素含量=EGCG+GCG+ECG。
Note: The different letters in the same column indicates significant difference ($P<0.05$). Boiling water extracted: tea stalks were extracted in boiling water for 30 min; Tannase treated: tannase concentration: 2 U/mL, temperature: 50°C, time: 60 min, the same as below. Content of nonestern catechins = GC+EGC+EC; Content of estern catechins = EGCG+GCG+ECG.

2.5 单宁-蛋白质聚合物分析

单宁是多酚类物质，也是食品、饮料中常见的呈味剂，单宁含量的多少对很多食品如酒、茶等的风味及质量影响较大，过量的单宁往往会对食品风味造成不良影响，单宁能与口腔黏膜或唾液蛋白结合并生成沉淀，引起粗糙褶皱的收敛感和干燥感，即涩味^[20]。因此，测定单宁含量对含单宁的食品生产具有较重要意义。单宁能使蛋白质产生絮凝沉淀，因此可利用单宁能定量沉淀蛋白质^[21]的特性达到间接测定单宁的目的。

试验考察了单宁酶处理对 TSI 中单宁沉淀牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 的影响 (图 1)。从图 1 可以看出，在 BSA-单宁沉淀体系中，随着 BSA 质量浓度的增大，单宁沉淀蛋白质的量随之增加，而且，在同一 BSA 质量浓度下，经单宁酶酶解作用的 TSI 沉淀蛋白质的量明显低于对照组，这可能是由于经单宁酶处理的 TSI 中儿茶素主要以简单儿茶素的形式存在，酯型儿茶素基本已被降解，有研究发现单宁与蛋白质结合的方式是，单宁酚中的羟基氢与蛋白质肽链上的羰基氧形成氢键^[22]，而酯型儿茶素能提供更多的羟基^[23]。这与 Kawamoto^[24]等研究水解单宁与 BSA 共沉淀的试验结果相符，该研究表明单宁的没食子酰基数与蛋白质聚集程度呈正相关关系。



注：酶辅浸提条件：料液比 1:20，酶浓度 2 U/mL，酶作用温度 50℃，酶作用时间 60 min；对照：相同条件下以去离子水为提取剂，下同。
 Note: Conditions of tannase treatment: The ratio of tea stalks to enzyme: 1:20, tannase concentration: 2 U/mL, temperature: 50℃, time: 60 min; Control: under the same conditions, using deionized water as extraction agent, the same below.

图 1 单宁酶处理对 TSI 单宁-BSA 聚合物的影响

Fig. 1 Effect of enzymatic treatment of TSI on precipitation of BSA with tannic

2.6 茶乳含量测定

图 2 显示的是室温 (25℃) 和低温 (4℃) 储存条件下单宁酶酶解对 TSI 茶乳形成量的影响。由图可知，室温条件下未经单宁酶处理的 TSI 茶乳形成量增加迅猛，而经单宁酶酶解的增加比较缓慢；4℃储存 30 d 过程中，经单宁酶处理的 TSI 茶乳含

量物无显著差异 (P>0.05)，而未经酶解的茶乳形成量呈现增加趋势，这说明单宁酶的添加有利于减缓 TSI 茶乳形成和提高 TSI 的稳定性。

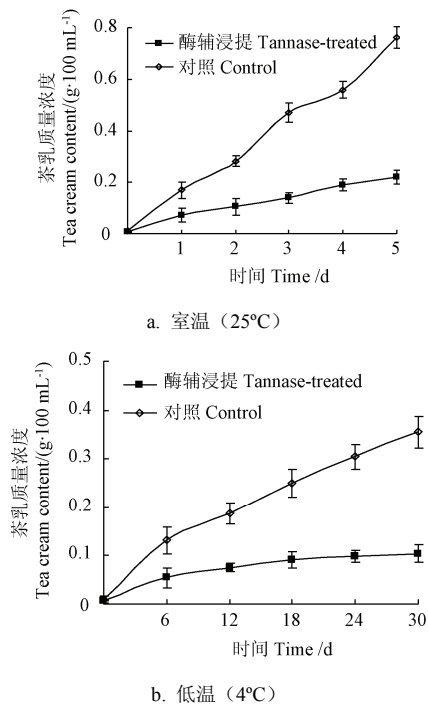


图 2 室温和低温储存过程单宁酶酶解对 TSI 茶乳形成量的影响

Fig. 2 Effect of enzymatic treatment on formation of tea cream for TSI during storage under room temperature and low temperature

2.7 单宁酶对茶梗提取液生物活性的影响

2.7.1 对还原力的影响

一般来说，物质的抗氧化能力与还原能力有正相关关系。在本试验中，样品的吸光值 A 越大，说明其还原能力越强，抗氧化能力也就越强。由图 3 可看出，随 TSI 浓度的增大吸光值逐渐增大，且经单宁酶处理的 TSI 吸光值增大趋势大于对照组，由此可见茶梗提取液经单宁酶处理后还原能力增强，且具有明显的剂量依赖性，表现为 0~800 mg/L 的质量浓度范围内吸光值几乎呈线性增大。

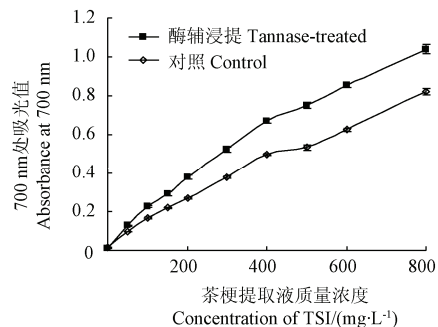


图 3 TSI 酶解前后的还原能力

Fig. 3 Reducing capacity of TSI with or without tannase treatment

2.7.2 对OH自由基清除率的影响

羟自由基是细胞新陈代谢过程中产生的一种毒性很强的自由基,存在人体内的时间很短,但具有很高的活性,与人体的病变、衰老有重要关系。不同浓度 TSI 对 OH 自由基的清除效果如图 4 所示。研究表明,酶解前后的 TSI 对 OH 自由基均具有清除作用。随着提取液质量浓度的增加,未经单宁酶作用的 TSI 清除率逐渐上升,而经单宁酶处理的清除率在低浓度下迅速上升,当浓度大于 3000 mg/L 时,OH 自由基的清除率趋于饱和并呈现稳定状态。

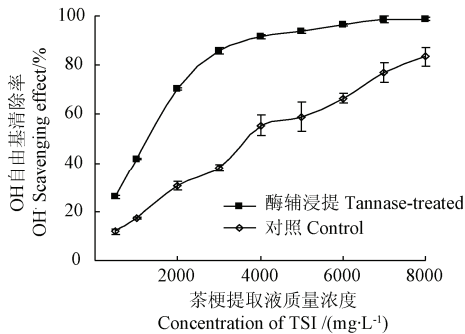


图 4 TSI 酶解前后对 OH 自由基的清除效果

Fig. 4 OH scavenging effect of TSI with or without tannase treatment

$IC_{50}^{[18]}$ 常用于评价样品的抗氧化能力和自由基清除能力,它指的是当清除率为 50%时样品的质量浓度,其值越小,自由基清除能力越强,即样品的抗氧化活性越强。在本试验中,根据数据拟合曲线方程计算得到:经单宁酶处理的 TSI 清除 OH 自由基的 IC_{50} 为 1 085 mg/L,而未经单宁酶处理的 IC_{50} 为 4 192 mg/L,酶解后的半清除浓度较对照组降低了 74%,这表明,TSI 经单宁酶水解后,其清除 OH 自由基的能力显著提高了。

2.7.3 对 DPPH 自由基清除率的影响

DPPH 是一种稳定反磁性分子的自由基,它能够很好地捕获电子和氢质子,常作为评价抗氧化剂清除自由基能力的底物^[25]。试验考察了 TSI 对 DPPH 自由基的清除效果(图 5)。

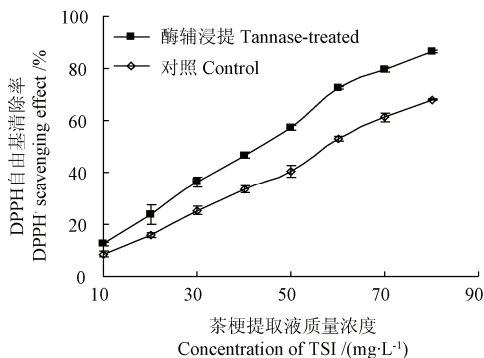


图 5 TSI 酶解前后对 DPPH 自由基的清除效果

Fig. 5 DPPH scavenging effect of TSI with or without tannase treatment

从图 5 可以看出,在 10~80 mg/L 范围内,TSI 对 DPPH 自由基的清除能力有较好的量效关系,随着提取液质量浓度的增大,其清除能力逐步增强,且经单宁酶处理的 TSI 清除率显著高于对照组。同时,根据数据拟合曲线方程计算得到:试验组清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 43 mg/L 较对照组(58 mg/L)降低了 26%,这说明,经单宁酶水解后,TSI 表现出较强的清除 DPPH 自由基能力。

2.7.4 对胰 α -淀粉酶抑制作用的影响

α -淀粉酶抑制剂可以有效地抑制唾液及肠道内胰 α -淀粉酶的活性,阻碍食物中碳水化合物的水解和消化,在不影响其他营养物质吸收和代谢的同时,减少糖分的吸收,降低血糖和血脂的水平,从而胰岛素分泌减少及脂肪合成降低,临床上常用于防治高血糖、高血脂、糖尿病、肥胖症等疾病^[26],因此研究 α -淀粉酶抑制剂具有重要的现实意义。由图 6,TSI 对胰 α -淀粉酶的抑制率曲线可知,不同浓度的 TSI 对胰 α -淀粉酶均具有抑制作用,且两者呈正相关关系。在低浓度(约 2 000 mg/L)下,经单宁酶处理的 TSI 抑制率略小于对照组,随着浓度的增大,前者的抑制效果显著增强,且明显大于对照组,这可能是因为随着酶解反应的进行,茶多酚的主体物质儿茶素类含量有所增加的原因。在 5 000 mg/L 的 TSI 质量浓度下,酶解前后 TSI 对胰 α -淀粉酶抑制率分别为 19%、36%,相比提高了 89%。

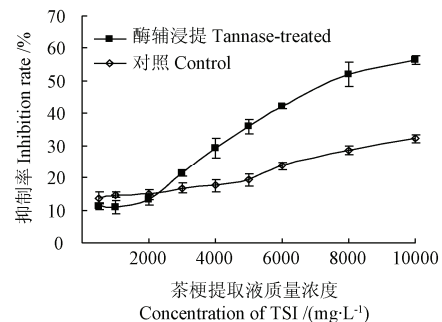


图 6 TSI 酶解前后对 α -淀粉酶的抑制作用

Fig. 6 Effect of TSI with or without tannase treatment on inhibition rate of pancreatic α -amylase activity

2.7.5 对胰脂肪酶的抑制作用

食物中的脂肪被胰脂肪酶降解为单酰甘油和游离脂肪酸后,在肠道被吸收,然后在体内重新合成脂肪,造成脂肪堆积,最终可导致肥胖。近年来,治疗肥胖症的各种方法中有许多是通过抑制胰脂肪酶的活性,从而达到减少脂肪的吸收、控制和治疗肥胖的目的^[27]。从图 7 可知,无论是经单宁酶处理还是未经单宁酶处理的 TSI 对胰脂肪酶均具有抑

制作用, 但经单宁酶水解的 TSI 抑制作用明显强于对照。在一定质量浓度下, TSI 对脂肪酶的抑制率呈上升趋势, 经单宁酶水解的提取液抑制率曲线在初期上升幅度大后趋于平缓, 对照组抑制率一直处于缓慢上升的状态。当 TSI 质量浓度为 5 000 mg/L 时, 经单宁酶处理的 TSI 对胰脂肪酶抑制率为 60%, 比未经单宁酶处理的 (29%) 提高了 107%。

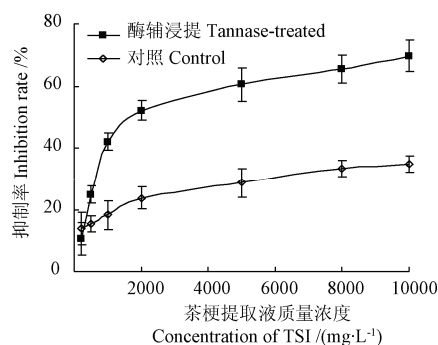


图 7 TSI 酶解前后对胰脂肪酶的抑制作用

Fig.7 Effect of TSI with or without tannase treatment on inhibition rate of pancreatic lipase activity

3 结 论

单宁酶可高效水解茶梗提取液中酯型儿茶素, 生成非酯型儿茶素和没食子酸。相比传统沸水提取方法, 2 U/mL 单宁酶溶液 50℃ 下辅助浸提茶梗粉末 60 min, 所得的茶梗提取液中儿茶素组分变化极显著, 儿茶素总量增加 11.5%, 酯型儿茶素减少了 94%, 而简单儿茶素和没食子酸分别增加了 156% 和 684%。同时, 酶解的茶梗提取液单宁-蛋白质聚合物和茶乳的形成量明显减少。此外, 与水提的茶梗提取液相比, 单宁辅助提取的茶梗提取液抗氧化活性和体外抑制胰 α -淀粉酶和胰脂肪酶活性明显增强, 其中 OH 和 DPPH 自由基清除率 IC₅₀ 分别降低了 74% 和 26%; 当茶梗提取液质量浓度为 5 000 mg/L 时, 酶解茶梗提取液对胰 α -淀粉酶和胰脂肪酶抑制率分别提高了 89% 和 107%。

[参 考 文 献]

[1] 汪兴平, 周志, 莫开菊, 等. 茶叶有效成分复合分离提取技术研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(6): 131—136.
Wang Xingping, Zhou Zhi, Mo Kaiju, et al. Comprehensive extraction technologies of active constituents of tea[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2002, 18(6): 131—136. (in Chinese with English abstract)

[2] Dong Junjie, Ye Jianhui, Lu Jianliang, et al. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination[J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(1): 62—66.

[3] İçen H, Gürü M. Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2009, 50(3): 225—228.

[4] Gürü M, İçen H. Obtaining of caffeine from Turkish tea fiber and stalk wastes[J]. Bioresource Technology, 2004, 94(1): 17—19.

[5] 吴颖, 张婉婷, 丁兆堂, 等. 茶梗多糖的提取与纯化研究[J]. 中国茶叶, 2010(1): 24—27.
Wu Yin, Zhang Wanting, Ding Zhaotang, et al. Study on extraction and purification of tea polysaccharides in tea stalk[J]. China tea, 2010(1): 24—27. (in Chinese with English abstract)

[6] 武永福. 酶在速溶绿茶浸提中的应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2009.
Wu Yongfu. Application of enzymes on extraction of the instant green tea[D]. Chongqing: Southwest University, 2009. (in Chinese with English abstract)

[7] Aguilar C N, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, et al. Microbial tannases: advances and perspectives[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(1): 47—59.

[8] Selwal M K, Yadav A, Selwal K K, et al. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(1): 374—387.

[9] 程琦, 程启坤, 李名君. 单宁酶的固定化及其酯型儿茶素水解反应中的应用[J]. 生物化学杂志, 1996, 12(4): 423—426.
Cheng Qi, Cheng Qikun, Li Mingjun. Immobilization of tannase and its application on hydrolysis of estern-catechines[J]. Chinese Biochemical Journal, 1996, 12(4): 423—426. (in Chinese with English abstract)

[10] Xu Yongquan, Chen Suqin, Yuan Haibo, et al. Analysis of cream formation in green tea concentrates with different solid concentrations[J]. Journal of Food Science and Technology, 2012, 49(3): 362—367.

[11] 苏祝成, 钱利生, 冯云, 等. 利用单宁酶改善绿茶滋味品质的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 305—307.
Su Zhucheng, Qian Lisheng, Feng Yun, et al. Improvement Effects of tannase on flavor quality of green tea[J]. Food Science, 2008, 29(12): 305—307. (in Chinese with English abstract)

[12] 童鑫, 谭月萍, 李志刚. 外源单宁酶对绿茶液微滤过程的影响[J]. 茶叶通讯, 2006, 33(1): 11—13.

- Tong Xin, Tan Yueping, Li Zhigang. Effect of external tannase on micro-filtration process of green tea liquor[J]. Tea Communication, 2006, 33(1): 11—13. (in Chinese with English abstract)
- [13] Chávez-González M, Rodríguez-Durán L V, Balagurusamy N, et al. Biotechnological advances and challenges of tannase: an overview[J]. Food Bioprocess Technology, 2012, 5(2): 445—459.
- [14] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [15] Lu Minjer, Chu Shengche, Yan Lipyng, et al. Effect of tannase treatment on protein-tannin aggregation and sensory attributes of green tea infusion[J]. LWT- Food Science and Technology, 2009, 42(1): 338—342.
- [16] 刘志刚, 孟庆莉. 儿茶素类化合物的体外抗氧化作用研究[J]. 海峡药学, 2012, 24(8): 238—240.
Liu Zhigang, Meng Qingli. Studies on the antioxidant activity of tea catechin in vitro[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2012, 24(8): 238—240. (in Chinese with English abstract)
- [17] 吴兰兰. 龙眼核多酚的分离纯化及其结构和抗氧化活性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2010.
Wu Lanlan. Isolation, purification and structure, anti-oxidation of polyphenol from Longan seed[D]. Xiamen: Jimei University, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [18] 陈亚琪, 康海权, 陈秋平, 等. 油茶蒲提取物的抗氧化活性[J]. 林业科学, 2011, 47(3): 20—24.
Chen Yaqi, Kang Haiquan, Chen Qiuping, et al. Antioxidant activity of extracts from the fruit shell of *Camellia oleifera*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2011, 47(3): 20—24. (in Chinese with English abstract)
- [19] 张永军. 茶叶浸提物对功能性酶活性和二级结构的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
Zhang Yongjun. Studies of tea extracts on the activity and secondary structure of functional enzymes[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [20] 李海鹏. 单宁酸与胰蛋白酶和牛血清白蛋白相互作用的研究[D]. 太原: 山西大学, 2006.
Li Haipeng. Study on the interaction of tannic acid with trypsin and BSA[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2006. (in Chinese with English abstract)
- [21] Makkar H P S, Dawra R K, Singh B. Protein precipitation assay for quantitation of tannins: determination of protein in tannin-protein complex[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 435—439.
- [22] Mole S, Waterman P G. Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation[J]. Phytochemistry, 1987, 26(1): 99—102.
- [23] Gong Jiashun, Liu Peiyong, Liu Qinjin. Study on stabilizing mechanism of konjac glucomannan in tea infusions[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(9): 358—363.
- [24] Kawamoto H, Nakatsubo F, Murakami K. Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation[J]. Phytochemistry, 1996, 41(5): 1427—1431.
- [25] Soare J R, Dinis T C P, Cunha A P, et al. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*[J]. Free Radical Research, 1997, 26(5): 469—478.
- [26] 王文蒙, 李楠, 王玲玲, 等. 小麦麸皮中 α -淀粉酶抑制剂分离、纯化及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(11): 28—31.
Wang Wenmeng, Li Nan, Wang Lingling, et al. Isolation and purification of α -amylase inhibitor from wheat bran and its characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(11): 28—31. (in Chinese with English abstract)
- [27] Chiesi M, Huppertz C, Hofbauer K G. Pharmacotherapy of obesity: targets and perspectives[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2001, 22(5): 247—254.

Tannase treatment improves contents of catechins and bioactivity of tea stalk infusion

Huang Yufeng¹, Xiao Anfeng^{1,2,3,4*}, Ni Hui^{1,2,3,4}, Cai Huinong^{1,2,3,4}

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering of Fujian Province, Xiamen 361021, China;

3. Research Center of Food Microbiology and Enzyme Engineering Technology of Fujian Province, Xiamen 361021, China;

4. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China)

Abstract: Tea stalk, also known as tea stem, a residue obtained from the process of initial tea selection, is a very abundant and low-cost agricultural byproduct which is plentifully available in southern China, and its use has not been exploited and standardized. In this study, in order to use the agricultural byproduct, tea stalk, thoroughly, tea stalk infusion was prepared with the help of tannase preparation from *Aspergillus niger* JMU-TS528 by the solid

state fermentation of tea stalks. Then, the property and effectiveness of a tannase-aided treatment on the contents of catechins and bioactivity changes in tea stalk infusion were illustrated, including their antioxidant activity and inhibitory potential against pancreatic α -amylase and lipase *in vitro*. Results showed that, with the help of tannase (2 U/mL) treatment at 50°C for 60 min, the contents of catechins in enzymatic hydrolysis tea stalk infusion changed a lot, much ester catechins (EGCG, GCG and ECG) were hydrolyzed into non-ester ones (EGC, GC and EC, respectively), accompanied by the production of gallic acid. Compared to untreated tea stalk infusion which was extracted by boiling water, the total catechin in a tannase-treated analog increased by 11.5%, and ester catechins decreased by 94%, along with the increases of non-ester catechins and gallic acid (156% and 684%, respectively). Meanwhile, the tannase-treated infusion had a relatively lower binding ability with protein and less tea cream formation, which were effective in improving the clarity and stability of tea stalk infusion. Furthermore, after being treated with tannase, the antioxidant activity of tea stalk infusion had a significant increase, as the tannase-treated tea stalk infusion had a greater OH \cdot and DPPH \cdot scavenging effects with their IC₅₀ decreased by 74.1% and 25.9%, respectively. In addition, assays of pancreatic α -amylase and lipase activities were used to evaluate the effects of tannase treatment on pancreatic enzymes inhibitory activities of tea stalk infusion. And whether it was extracted with tannase solution or water, tea stalk had some inhibition rate on pancreatic α -amylase and lipase activities. However, the tannase-treated tea stalk infusion had a significantly higher inhibition rate of pancreatic α -amylase and lipase activities than the untreated analog (89% and 107%, respectively) at a concentration of 5000 mg/L. Results from this study demonstrate that tea stalk infusion with tannase treatment can obtain better quality attributes, which is promising for the economic utilization and value addition of some important agro residues.

Key words: enzymes, extraction, bioactivity, tea stalk, catechins, transformation

(责任编辑: 郭海枫)