

冠突散囊菌黑茶发酵液对消化酶活性影响的研究

黄 群* 陈林杰 李彦坡 车 科

(吉首大学 食品科学研究所 吉首 416000)

摘要 在模拟人体胃肠环境中研究不同发酵时期的冠突散囊菌黑茶发酵液对淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶活性的影响。结果表明冠突散囊菌黑茶发酵液能显著提高 α -淀粉酶、蛋白酶活力,并有效抑制脂肪酶活力。冠突散囊菌发酵液利于淀粉、蛋白质消化吸收,抑制脂肪分解吸收,为解释茯砖茶的保健功能提供了理论依据。

关键词 冠突散囊菌 黑茶发酵液 淀粉酶 蛋白酶 脂肪酶 酶活

中图分类号:TS201.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0917-04

Study on the Effect of Dark Tea Fermentation Liquid with *Eurotium cristatum* on the Activity of Digestive Enzyme

HUANG Qun* CHEN Lin-Jie LI Yan-Po CHE Ke

(Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000)

Abstract The effect of dark tea fermentation liquid with *Eurotium Cristatum* on the activity of digestive enzyme was researched, as following amylase, protease, lipase. The results showed that dark tea fermentation liquid with *Eurotium Cristatum* may increase remarkably the activity of α -amylase and protease, but decrease efficiently the activity of lipase. The fermentation liquid improves the digestion and absorption of starch and protein, but inhibits the decomposition and absorption of fat, so it can explain the mechanism of Fu-brick tea's health functions.

Key words *Eurotium Cristatum*, Dark tea fermentation liquid, Amylase, Protease, Lipase, Enzyme activity

茯砖茶属紧压黑茶,主销西北少数民族地区,能“消腥肉之腻,解青稞之热”,并补充人体维生素^[1,2]。茯砖茶加工的“发花”过程是其形成独特品质的关键工艺,实质是通过控制外界条件促进优势菌——冠突散囊菌的生长繁殖,产生金黄色闭囊壳,俗称“金花”^[3~5],消费者历来根据“金花”的质量和数量判断茯砖茶品质的优劣,有“茶好金花开,花多茶质好”之说。

目前对冠突散囊菌的研究主要集中在菌种鉴定、固体培养等方面,而有关冠突散囊菌在茯砖茶促消化功能中所起作用及机理却鲜见报道。本实验在模拟人体胃肠环境中,研究不同发酵时期的冠突散囊菌黑茶发酵液对淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶活性的影响,为进一步研究茯砖茶调节人体消化功能机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与原料 冠突散囊菌,实验室保存;黑毛茶、茯砖茶、绿茶等市售。

1.1.2 酶制剂 淀粉酶(Diastase, 2000U/g),胰蛋白酶(Trypsin, 2500U/mg),胃蛋白酶(Pepsin, 1000U/mg),脂肪酶(Lipase, 3000U/g)等购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

1.1.3 主要试剂 氢氧化钠、盐酸、磷酸氢二钠、钨酸钠、钼酸钠、磷酸、碳酸钠、三氯乙酸、磷酸二氢钠、乳酸、乳酸钠等均为分析纯;二甲基甲酰胺、甲醇、冰醋酸等为色谱纯。

1.2 主要仪器与设备

722-S 型分光光度计, ZD-2 型自动电位滴定仪, SHA-C 型水浴恒温振荡器, YXQ. SG46.280 型高压蒸汽灭菌器, GZX-9146MBE 型电热恒温鼓风干燥箱,

* 通讯作者 Tel: 0743-2123573, E-mail: huangqunlaoshi@126.com

收稿日期: 2006-12-22, 修回日期: 2007-03-19

BIOF-2000 型机械搅拌发酵罐。

1.3 方法

1.3.1 酶液制备与稀释 :胰蛋白酶酶液 :用蒸馏水稀释至 500 倍 ;胃蛋白酶酶液 :用蒸馏水稀释至 250 倍。

1.3.2 模拟胃液配制^[6] :10.0% 的盐酸 16.4mL ,加水稀释至 pH 值为 1 , 1×10^5 Pa 灭菌 30min ,冷却至 40℃ 以下 ,每 100mL 加入 1mL 胃蛋白酶酶液、0.5g 脂肪酶 ,混匀后备用。

1.3.3 模拟肠液配制^[6] :磷酸二氢钾 6.8g ,加水 500mL 溶解 ,用 0.4% 氢氧化钠溶液调 pH 值至 6.8 ,加水稀释至 1000mL , 1×10^5 Pa 灭菌 30min ,冷却至 50℃ 以下 ,每 100mL 加入 1mL 胰蛋白酶酶液、0.5g 脂肪酶、0.5g 淀粉酶 ,混匀后备用。

1.3.4 冠突散囊菌黑茶发酵液制备 :称取 80g 黑毛茶(茶梗 16%)磨碎试样于铝锅中 ,加沸蒸馏水 8L ,立即移到电炉上保持沸腾 ,浸提 45min(每 10min 搅拌 1 次) ,立即减压过滤 ,残渣用少量蒸馏水洗 2~3 次 ,合并滤液加蒸馏水定容至 8L。将液体培养基倒入 10L 发酵罐中 ,通入蒸汽加热 , 1×10^5 Pa 灭菌 30min ,并使液体培养基液面达 10L 刻度处 ,循环水冷却至 37℃ ,接入冠突散囊菌孢子悬液 ($5.0 \sim 6.0 \times 10^8$ 个/mL)100mL ,30℃、100r/min 培养 108h 后终止发酵 ,取不同发酵时间液体过滤即得发酵液。

1.3.5 茶汁与茶多酚复合物制备 :茶汁制备 :分别称取 4.000g 黑毛茶(茶梗占 16%)、绿茶、茯砖茶磨碎试样于 500mL 三角瓶中 ,加入沸蒸馏水 450mL ,立即移入沸水浴 ,浸提 45min(每 10min 摇动 1 次) ,减压过滤 ,残渣用少量蒸馏水洗 2~3 次 ,合并滤液于 500mL 容量瓶 ,冷却后用蒸馏水定容至刻度。

茶多酚复合物制备 :茶多酚复合物 A :按茯砖茶茶多酚含量配制 ,即含茶多酚复合物 48.73 mg/100mL ;茶多酚复合物 B :按茯砖茶茶多酚含量的 2 倍配制 ,即含茶多酚复合物 97.46 mg/100mL。

1.3.6 对消化酶活性影响 :取 10mL 模拟胃液或模拟肠液置于 25mL 容量瓶中 ,分别加 5mL 冠突散囊菌黑茶发酵液和各种茶汁 ,37℃ 水浴保温 30min 后测定 α -淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶活力。

1.3.7 测定方法

α -淀粉酶活力测定 :参考文献 [7] ;蛋白酶活力测定 :参考文献 [8] ;脂肪酶活力测定 :参考文献 [9] ;

氨基酸测定 :茚三酮比色法^[10] ;茶多酚测定 :酒石酸铁比色法^[11] ;茶色素测定 :分光光度计法^[12]。

儿茶素测定 :高效液相色谱法^[11] ,色谱柱 Inertsie Φ ODS-3 ($5\mu\text{m}$, $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$) ,检测器 UV280nm ,样品采用梯度洗脱 ,洗脱液由 A、B 两相组成 ,A 为水相 ,B 为二甲基甲酰胺 :甲醇 :冰醋酸 = 40:2:1 (V/V/V) ,流速 1.0mL/min ,柱温 35℃ ,进样量 20 μL 。

2 结果与分析

2.1 发酵液与茶样主要成分比较

黑茶发酵液及各种茶样的主要理化成分测定结果如表 1 所示。由表分析可知 ,绿茶中茶多酚、儿茶素和氨基酸含量最高 ,茶黄素含量也较高 ,而茶褐素含量最低 ;黑毛茶中茶多酚、儿茶素和氨基酸含量较高 ,仅次于绿茶 ;与绿茶和黑毛茶相比较 ,茯砖茶和发酵液中茶多酚、儿茶素和氨基酸含量低得多 ,而茶红素、茶褐素含量相对较高 ,茯砖茶中茶黄素含量也较高 ,发酵液中茶黄素相对较低 ;发酵液中茶多酚、儿茶素、茶黄素和茶红素等随发酵时间延长均呈下降趋势 ,茶褐素含量则随发酵时间延长而增加。

表 1 冠突散囊菌黑茶发酵液和各种茶的主要成分

样品	含量(mg/100mL)					
	茶多酚	氨基酸	茶黄素	茶红素	茶褐素	儿茶素
绿茶汁	261.55	20.26	2.04	15.95	9.82	162.42
黑毛茶汁	123.72	8.34	1.52	16.08	37.63	61.90
茯砖茶汁	48.73	1.95	2.34	22.35	34.29	28.40
发酵液 A(36h)	81.54	5.54	1.79	23.34	39.14	34.51
发酵液 B(72h)	64.86	1.87	0.87	23.34	41.35	24.36
发酵液 C(108h)	52.57	2.485	*	21.45	48.79	19.95

注 : * 含量极少或没有 ,不能检出。

2.2 对 α -淀粉酶活性影响

在模拟肠液中 ,冠突散囊菌黑茶发酵液和各种茶样对 α -淀粉酶活力影响见表 2。结果表明 ,黑茶发酵液和各种茶汁均能提高 α -淀粉酶活力 ,激活效果为 :发酵液 C > 发酵液 B > 茯砖茶汁 > 发酵液 A > 绿茶汁 > 茶多酚复合物 B > 黑毛茶汁 > 茶多酚复合物 A > 对照。

茶多酚复合物也能提高 α -淀粉酶活力 ,并随浓度增大有所升高 ,这是由于茶多酚为大分子物质 ,

在一定条件下其羟基能与 α -淀粉酶的酶蛋白络合 , 使 α -淀粉酶的活性中心暴露 , 易与底物结合 , 加快了酶促反应的速度。与茶多酚复合物相比 , 发酵液和茯砖茶样对 α -淀粉酶的激活效果更显著 , 可能与发酵液和茯砖茶的茶色素和有机酸有关 , 在茯砖茶“发花”及黑茶液发酵过程中 , 茶多酚类物质在冠突散囊菌的作用下氧化聚合 , 转化为更具酶催化活性的聚合物 , 对 α -淀粉酶而言茶色素比茶多酚更具生物活性 , 具体机理有待进步研究。此外 , 有研究表明有机酸也能提高 α -淀粉酶活性。

表 2 冠突散囊菌黑茶发酵液及各种茶对 α -淀粉酶活力的影响

试验组合	α -淀粉酶活力 (U/mL)	与对照的 倍数关系
模拟肠液(未加茶汁的对照)	2.927	1.00
模拟肠液 + 绿茶汁	3.923	1.34
模拟肠液 + 黑毛茶汁	3.585	1.22
模拟肠液 + 茯砖茶汁	4.279	1.46
模拟肠液 + 发酵液 A(36h)	4.128	1.41
模拟肠液 + 发酵液 B(72h)	4.664	1.59
模拟肠液 + 发酵液 C(108h)	4.684	1.60
模拟肠液 + 茶多酚复合物 A	3.308	1.13
模拟肠液 + 茶多酚复合物 B	3.629	1.24

2.3 对蛋白酶活性影响

在模拟胃液和模拟肠液中 , 冠突散囊菌黑茶发酵液和各种茶样对蛋白酶活力影响见表 3。模拟胃液中激活效果为 : 发酵液 B > 发酵液 C > 茯砖茶汁 > 发酵液 A > 黑毛茶汁 > 绿茶汁 > 茶多酚复合物 B > 茶多酚复合物 A > 对照 , 模拟肠液中激活效果为 : 发酵液 C > 发酵液 B > 茯砖茶汁 > 发酵液 A > 黑毛茶汁 > 茶多酚复合物 B > 绿茶汁 > 茶多酚复合物 A > 对照。发酵液和茯砖茶汁在模拟胃液和模拟肠液中均能显著提高蛋白酶活力 , 机理与促淀粉酶活力相似。此外 , 发酵液在模拟胃液中要比在模拟肠液中促蛋白酶效果更显著 , 这与两种模拟液 pH 值相差较大有关 , 在酸性环境中更利于蛋白酶活性提高。

2.4 对脂肪酶活性影响

在模拟胃液和模拟肠液中 , 冠突散囊菌黑茶发酵液和各种茶样对脂肪酶活力影响见表 4。分析可知 , 发酵液和各种茶样对脂肪酶活性均有不同程度

表 3 冠突散囊菌黑茶发酵液及各种茶对蛋白酶活力的影响

试验组合	蛋白酶活力 (U/mL)	与对照的倍数 关系
模拟胃液(未加茶汁的对照)	23.35	1.00
模拟胃液 + 绿茶汁	58.61	2.51
模拟胃液 + 黑毛茶汁	67.95	2.91
模拟胃液 + 茯砖茶汁	87.80	3.76
模拟胃液 + 发酵液 A(36h)	82.66	3.54
模拟胃液 + 发酵液 B(72h)	92.93	3.98
模拟胃液 + 发酵液 C(108h)	89.66	3.84
模拟胃液 + 茶多酚复合物 A	35.96	1.54
模拟胃液 + 茶多酚复合物 B	46.00	1.97
模拟肠液(未加茶汁的对照)	13.08	1.00
模拟肠液 + 绿茶汁	19.88	1.52
模拟肠液 + 黑毛茶汁	25.90	1.98
模拟肠液 + 茯砖茶汁	37.54	2.87
模拟肠液 + 发酵液 A(36h)	33.62	2.57
模拟肠液 + 发酵液 B(72h)	45.13	3.45
模拟肠液 + 发酵液 C(108h)	47.22	3.61
模拟肠液 + 茶多酚复合物 A	15.83	1.21
模拟肠液 + 茶多酚复合物 B	31.21	1.57

表 4 冠突散囊菌黑茶发酵液及各种茶对脂肪酶活力的影响

试验组合	脂肪酶活力 (U/mL)	与对照的倍数 关系
模拟胃液(未加茶汁的对照)	4.95	1.00
模拟胃液 + 绿茶汁	4.37	0.88
模拟胃液 + 黑毛茶汁	3.96	0.80
模拟胃液 + 茯砖茶汁	3.01	0.63
模拟胃液 + 发酵液 A(36h)	4.16	0.84
模拟胃液 + 发酵液 B(72h)	2.68	0.54
模拟胃液 + 发酵液 C(108h)	2.21	0.45
模拟肠液(未加茶汁的对照)	24.85	1.00
模拟肠液 + 绿茶汁	22.55	0.91
模拟肠液 + 黑毛茶汁	17.82	0.77
模拟肠液 + 茯砖茶汁	21.48	0.87
模拟肠液 + 发酵液 A(36h)	23.17	0.93
模拟肠液 + 发酵液 B(72h)	21.39	0.86
模拟肠液 + 发酵液 C(108h)	25.64	1.03

的抑制作用。模拟胃液中抑制效果为 : 发酵液 C >

发酵液 B > 茯砖茶汁 > 黑毛茶汁 > 发酵液 A > 绿茶汁 > 对照; 模拟肠液中抑制效果为: 黑毛茶汁 > 发酵液 B > 茯砖茶汁 > 绿茶汁 > 发酵液 A > 对照 > 发酵液 C。此外, 发酵液在模拟胃液中抑制脂肪酶活性的效果要比模拟肠液中更显著, 这是因为两种模拟液 pH 值相差较大, 在酸性环境中更利于抑制脂肪酶活性, 该效应是否与酶分子的结构有关, 尚待进一步研究。

3 结论

在模拟肠液中, 发酵液、茶汁和茶多酚复合物均能提高 α -淀粉酶活力, 但发酵液的激活效果更明显。在模拟胃液和模拟肠液中, 发酵液和茯砖茶汁均能显著提高蛋白酶活力, 且促酶效果远大于黑毛茶汁、绿茶汁等对照样。冠突散囊菌发酵液可促进 α -淀粉酶对淀粉的酶解、胃蛋白酶和胰蛋白酶对蛋白质的酶解, 有利于淀粉、蛋白质消化吸收, 改善人体肠道功能。在模拟胃液中, 冠突散囊菌发酵液抑制脂肪酶活力的效果明显优于黑毛茶汁、绿茶汁等对照样, 而在模拟肠液中抑脂肪酶活力效果为: 黑毛茶汁 > 发酵液 B > 茯砖茶汁 > 发酵液 A > 发酵液

C > 绿茶汁。冠突散囊菌发酵液能抑制脂肪在消化系统中的降解、吸收, 为茯砖茶降脂减肥功能提供了理论依据。冠突散囊菌黑茶发酵液对消化酶活性影响的机理、动力学过程尚不清楚, 有待进一步研究探索。

参考文献

- [1] 陈晓阳. 茶叶通讯, 1997, 1: 41 ~ 42.
- [2] 杨抚林. 茶叶科学技术, 2005, 1(186): 4 ~ 7.
- [3] 王志刚, 董哲, 程苏云, 等. 食品科学, 1992, 5: 29 ~ 33.
- [4] 刘作易. 贵州农业科学, 1992, 1: 36 ~ 40.
- [5] 齐祖同, 孙曾美. 真菌学报, 1990, 9(3): 176 ~ 179.
- [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(第二部). 北京: 化学工业出版社, 附录XA72 ~ 74.
- [7] 中华人民共和国行业标准. QB1805.1-93 α -淀粉酶制剂.
- [8] 中华人民共和国行业标准. QB1805.3-93 蛋白酶活力的试验方法.
- [9] 中华人民共和国行业标准. QB1805.4-93 脂肪酶活力的试验方法.
- [10] 周传云. 微生物实验技术. 长沙: 湖南农业大学, 2002.
- [11] 黄意欢. 茶学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [12] 中华人民共和国国家标准. GB8313-87 茶多酚测定.