

蔡亚洁, 乌日娜, 李煜, 等. 发酵桑叶茶工艺条件优化及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(15): 187–194. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080151

CAI Yajie, WU Rina, LI Yu, et al. Optimization of Process Conditions for Fermented Mulberry Leaf Tea and Analysis of Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(15): 187–194. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080151

· 工艺技术 ·

发酵桑叶茶工艺条件优化及其抗氧化活性分析

蔡亚洁¹, 乌日娜¹, 李煜¹, 穆德伦¹, 丁瑞雪¹, 王军^{2,3,*}, 武俊瑞^{1,*}

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866;

2.辽宁省沈阳市浑南区农业农村局, 辽宁沈阳 110170;

3.彰武绿阳苗木工程有限公司, 辽宁阜新 123200)

摘要: 为了对发酵桑叶茶工艺条件进行优化并探究桑叶茶经发酵后抗氧化活性的变化, 该试验通过响应面分析法确定发酵桑叶茶在发酵温度、发酵时间和黑曲霉接种量 3 种变量条件下的最佳工艺条件, 并测定发酵桑叶茶生物活性物质含量及其抗氧化性。结果表明, 最佳工艺条件为发酵时间 5 d 16 h, 发酵温度 30 ℃, 接种量 16.55%, 此条件下所制发酵桑叶茶感官评分高达 90 分, 且其总黄酮、总多糖、多酚、游离氨基酸、芦丁、槲皮素含量比桑叶绿茶分别升高了 14.39%、12.67%、2.90%、3.46%、81.13%、19.35%, 还检测到了含量 $7.55\pm 0.37\%$ 的茶褐素。此外, 1/1000 (g/mL) 浓度下发酵桑叶茶对羟基自由基、DPPH 自由基、超氧自由基的清除率和对二价铁离子的螯合率分别是桑叶绿茶的 1.16 倍、1.07 倍、1.06 倍和 0.82 倍, 该研究结果为今后桑叶的进一步开发与应用提供理论基础和参考。

关键词: 发酵, 桑叶茶, 生物活性物质, 工艺优化, 抗氧化性

中图分类号: TS205.5

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)15-0187-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080151

本文网刊:



Optimization of Process Conditions for Fermented Mulberry Leaf Tea and Analysis of Its Antioxidant Activity

CAI Yajie¹, WU Rina¹, LI Yu¹, MU Delun¹, DING Ruixue¹, WANG Jun^{2,3,*}, WU Junrui^{1,*}

(1.College of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2.Bureau of Agriculture and Rural Development, Hunnan District, Shenyang 110170, China;

3.Zhangwu Lüyang Seedling Engineering Co., Ltd., Fuxin 123200, China)

Abstract: In order to optimize the fermentation process conditions of mulberry leaf tea and explore the changes in antioxidant activity of mulberry leaf tea after fermentation. This experiment used response surface analysis to determine the optimal process conditions for fermenting mulberry leaf tea under three variable conditions: Fermentation temperature, fermentation time, and inoculation amount of *Aspergillus niger*. The content of bioactive substances and antioxidant properties in fermented mulberry leaf tea were determined. The findings indicated that 5 days and 16 hours of fermentation duration, 30 ℃ of fermentation temperature, and 16.55% of inoculation amount were the ideal process parameters, and that the fermented mulberry leaf tea scored as high as 90 on the sensory scale under these conditions. In addition, the content of total flavonoids, total polysaccharides, polyphenols, free amino acids, rutin, and quercetin in fermented mulberry leaf tea increased by 14.39%, 12.67%, 2.90%, 3.46%, 81.13%, and 19.35%, respectively, compared to

收稿日期: 2023-08-16

基金项目: 辽宁省科技攻关计划 (21-103-0-14); 沈阳市星火计划 (21-104-0-28)。

作者简介: 蔡亚洁 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: cyj234578@163.com。

* 通信作者: 王军 (1986-), 男, 硕士, 农艺师, 研究方向: 桑叶加工与利用, E-mail: 717798576@qq.com。

武俊瑞 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: junruiwu@126.com。

mulberry leaf green tea. Tea brown pigment with a content of $7.55\% \pm 0.37\%$ was also detected in fermented mulberry leaf tea. In addition, the scavenging rate of hydroxyl radicals, DPPH radicals, superoxide radicals and the chelating rate of divalent iron ions of fermented mulberry leaf tea at the concentration of 1/1000 (g/mL) were 1.16, 1.07, 1.06 and 0.82 times higher than that of mulberry leaf green tea, respectively. The results of this study provide theoretical basis and references for further development and application of mulberry leaf in the future.

Key words: ferment; mulberry leaf tea; bioactive substances; process optimization; antioxidant properties

桑叶(*Morus alba* L.)是一种常见的药食两用植物,《本草纲目》记载了:“桑为治消渴之圣药”;“桑椹以叶煮汁服,止渴润燥”;“桑为去湿之圣药”等说法^[1]。现代医学研究发现,桑叶中含有多种生物活性物质,如黄酮类、桑叶多糖、 γ -氨基丁酸、1-脱氧野尻霉素(DNJ)、芦丁、槲皮素等,尤其是黄酮类物质具有较强的抗氧化活性^[2]。冯拓等^[3]指出桑叶是天然的抗氧化剂来源,随着人们越来越崇尚健康生活和功能食品,因而,具有抗氧化性等功效的桑叶也越来越受到人们关注。目前桑叶的主要加工方式为制茶,所制桑叶茶会有特殊的香气,不仅可以给食品增加香味,还能提高食品营养价值。市场上常见的桑叶茶是未经过发酵的桑叶绿茶,陈永丽等^[4]研究表明桑叶绿茶口感微涩,且不能产生独有的降解酶和风味酶。Mas 等^[5]研究发现发酵这一过程可以把桑叶中部分蛋白质水解成氨基酸,纤维素水解成可溶性糖,这些分解物发生非酶褐变反应,能够改善桑叶的青草味道,增加其耐泡性,同时可以提升茶的品质^[6]。此外,部分酚类物质经发酵可被氧化成茶褐素,所以发酵桑叶茶的茶汤颜色呈棕褐色^[2],同时,发酵可增加桑叶茶中黄酮类、桑叶多糖、 γ -氨基丁酸等生物活性物质含量,其营养价值和口感均得到提升。

近年来国内外有关桑叶茶抗氧化活性的研究对象均是桑叶绿茶,发酵桑叶茶抗氧化活性的报道较少,且发酵桑叶茶的生产工艺受发酵时间、发酵菌种和发酵温度等多因素影响,发酵工艺参数不好控制,因此探究发酵桑叶茶的最佳提取工艺及其抗氧化活性,对进一步开发桑叶的利用价值,促进其在健康食品和保健领域的应用具有一定的研究意义。本研究拟通过单因素-响应面试验确定发酵桑叶茶最佳工艺条件,并通过测定其对羟自由基、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基和超氧自由基的清除能力及对二价铁离子螯合能力,分析比较新鲜桑叶、桑叶绿茶和发酵桑叶茶的抗氧化能力。优化发酵桑叶茶工艺条件并研究其抗氧化活性,对于提高桑叶的利用价值、开发新型茶饮品以及对人体健康的保健作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

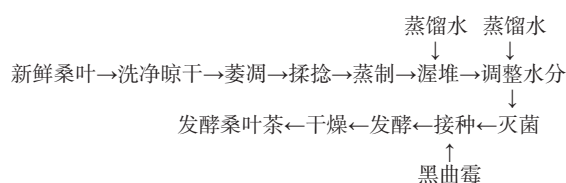
新鲜桑叶、桑叶绿茶 于 2022 年 9 月 20 日购买自辽宁省阜新市彰武县五峰镇高山台村航天科技园桑树圃,新鲜桑叶为成熟期长势茂盛且无病虫害的白桑(*Morus alba*)树叶,桑叶绿茶是由上述桑叶经清

洗、切条、炒制、杀青、揉制和干燥而得到;黑曲霉 中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC2039); Tris(三羟甲基氨基甲烷) 淮安和元化工有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 上海蓝季科技发展有限公司; 盐酸、芦丁标准品、槲皮素标准品、氯甲酸-9-芴基甲酯(FMOC-Cl) 北京索莱宝科技有限公司; 三氯化铁、铁氰化钾、水杨酸、抗坏血酸、氢氧化钠、氯化亚铁 国药集团化学试剂有限公司; Ferro zine(菲洛嗪)、EDTA(乙二胺四乙酸) 石家庄杰克化工有限公司; 柠檬酸钠、三氯乙酸、磷酸氢二钠 上海化学试剂有限公司; 以上试剂均为分析纯。

Lbe Tash IU-200 型紫外分光光度计 北京莱伯泰科仪器有限公司; SCA-J 型恒温水浴锅 中国仪成医疗器械有限公司; SHZ-C(Ⅲ)型循环水式真空泵 五和华正仪器厂有限公司; EHX-6604B 型电热干燥箱 上海菁华科技仪器有限公司; SS-1022 型粉碎机 恒煜商贸有限公司; BSA124S 型分析天平 德国赛多利斯公司; XFH-40MA 型全自动压力蒸汽灭菌器 浙江新丰医疗器械有限公司; PHS-25 型台式计 pH 计 上海力辰邦西仪器科技有限公司; XRT-XG 型微波灭菌器 青岛新锐特自动化有限公司; SHA-BA 型恒温水浴振荡器 常州金南仪器制造有限公司; MJ-701 型电热恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵桑叶茶生产工艺路线



1.2.2 发酵桑叶茶制备步骤 实验前将新鲜桑叶和桑叶绿茶密封,置于 4℃ 冰箱保鲜。参照贾冬英等^[7]的方法并稍作改进,挑选新鲜、无病虫害的桑叶,洗净晾干后进行萎凋和揉捻,于常压下蒸 15~20 min,冷却至室温,得到预处理桑叶;将其放入无菌锥形瓶于 60℃ 渥堆 4 h,再将桑叶水分含量调整至 40%,灭菌,冷却后在无菌条件下接种黑曲霉进行发酵,得到湿发酵桑叶茶;将湿发酵桑叶茶置于 110℃ 条件下进行干燥,使其水分含量达到 5%~8%,即得发酵桑叶茶^[5]。

1.2.3 发酵桑叶茶单因素实验 孢子悬浮液的制备:

将 4 ℃ 储藏黑曲霉置于 225 mL 无菌水的锥形瓶中, 超声振荡 60 min, 至黑曲霉孢子分散均匀, 得到 6×10^6 CFU/mL 的悬浮液。在 400 W, 60 s 微波灭菌条件下, 对加水量 5% 的 1.2.2 所得接种前的桑叶进行灭菌处理。取 5 只烧杯, 分别编号 1、2、3、4、5, 倒入 100 g 上述灭菌后的桑叶, 在发酵温度 32 ℃、接种量 15% 条件下, 设置发酵时间 3、5、7、9、11 d 进行水平实验; 同样地, 在发酵时间 5 d、接种量 15% 条件下, 设置发酵温度 28、30、32、34、36 ℃ 进行水平实验; 在发酵时间 5 d、发酵温度 32 ℃ 条件下, 设置接种量 5%、10%、15%、20%、25% 进行水平实验^[6]。

1.2.4 发酵桑叶茶响应面分析 结合单因素实验得到的结果, 基于 Design-Expert 13 软件进行 Box-Behnken 试验设计, 以得出最好工艺参数。以感官评分(Y 值)为考察指标, 选取发酵时间(A)、发酵温度(B)、接种量(C)3 个因素为自变量, 每个自变量的低、中、高试验水平分别以-1、0、1 进行编码。试验因素水平设计见表 1。

表 1 试验因素水平 Table 1 Experimental factors and levels			
因素	水平		
	-1	0	1
A 发酵时间(d)	5	7	9
B 发酵温度(℃)	30	32	34
C 接种量(%)	10	15	20

1.2.5 发酵桑叶茶感官评分 参照卢丽等^[8]的方法, 并稍作修改。试验结束后, 分别称取发酵桑叶茶 5 g, 加入 250 mL 沸水, 冲泡 5 min, 由 20 位专业感官评审员(年龄在 20~30 岁和 30~40 岁之间的评审员各 10 人, 男女各 10 人)打分评定。采用评分法, 按照表 2 所示细则打分, 取 20 位感官评审员平均分, 即为感官评分。

1.2.6 样品液的制备 将新鲜桑叶和桑叶绿茶以及 1.2.2 所得发酵桑叶茶在 110 ℃ 条件下干燥至恒重后用粉碎机粉碎备用。参照冯拓等^[3]的方法并稍作修改, 准确称取 1 g 上述粉碎的样品, 分别按照质量体积比(g/mL)1:2500、1:2000、1:1500、1:1000 和 1:500 沸水浸提 45 min, 每 15 min 振动均匀, 趁热抽滤, 备用, 得到不同浓度待测样品液, 用于后续三种桑叶产品对羟自由基、DPPH 自由基和超氧自由基清除率以及对亚铁离子螯合率的测定。

1.2.7 生物活性物质含量分析 参照郑升海等^[1]的方法测总黄酮; 国家标准 GB/T 8313-2018 测多酚和槲皮素^[9]; 国家标准 GB/T 40632-2021 测总多糖^[10]; 胡海洋等^[11]的方法测芦丁; 胡圆圆等^[12]的方法测茶褐素; 国家标准 GB/T 30987-2020 测游离氨基酸^[13]; 国家标准 GB/T 40642-2021 测 1-脱氧野尻霉素^[14]; 国家标准 GB/T8305-2013 测水浸出物^[15]。

表 2 感官评定标准 Table 2 Sensory evaluation standards		
指标	评分标准	得分
叶底(15分)	叶底黄褐、明亮, 叶质较柔软, 紧捏成团	9~15
	叶底黄绿欠匀, 叶质较硬, 手捏少许碎断	5~8
	叶底暗绿, 叶质硬实, 紧捏易碎	1~4
	澄清、透亮、光泽度较好、色泽诱人	28~30
汤色(30分)	澄清、透亮、具有产品应有色泽	24~27
	澄清、无夹杂物、色泽诱人	20~23
	微浑、无光泽、色泽一般	15~19
	浑浊、无光泽、色泽差	<15
香气(15分)	茶香浓郁, 呈现出特有的菌香、甜香和混合香, 回甘悠长、丰满	9~15
	香味略平淡, 同时略带青草气	5~8
	茶香体现不明显且带严重青草气和豆腥味	1~4
	风味协调、口感醇正、独特茶香	38~40
滋味(40分)	茶体饱满、茶香柔和、酸涩适中	34~37
	不酸、不涩、回甘且纯正	30~33
	偏酸、微涩、带苦味、欠浓郁	25~29
	很酸、很涩、很苦、口感平淡、有青草异味	<25

1.2.8 抗氧化活性分析

1.2.8.1 羟自由基清除率的测定 参照 Dondurmacioglu 等^[16]的方法, 取 2 mL 1.2.6 所得不同浓度样品液, 分别加入 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 FeSO₄ 和 H₂O₂ 溶液, 摇匀, 反应 10 min, 再加入等浓度等量的水杨酸, 混匀, 待 30 min 后, 在波长 510 nm 处, 测 OD 值, 以维生素 C 为阳性对照, 蒸馏水为空白对照, 测定各种桑叶产品羟自由基清除能力。计算公式如下:

清除率(%) = $\frac{[A'_0 - (A'_i - A'_j)]}{A'_0} \times 100$

式中: A_i: 样品吸光值; A₀: 没有样品参加反应时的吸光值; A_j: 没有水杨酸参加反应时的吸光值。

1.2.8.2 DPPH 自由基清除率的测定 参照东方等^[17]的方法, 取 0.3 mL 1.2.6 所得待测液, 在离心管中加入 DPPH 乙醇溶液 2.7 mL, 作为测试样, 用等体积的乙醇代替待测样作对照, 3 mL 的乙醇溶液作为空白组, 避光且在 25 ℃ 下水浴 30 min, 在波长 517 nm 处测吸光度, 以维生素 C 为阳性对照, 测定各种桑叶产品 DPPH 自由基清除能力。计算公式如下:

清除率(%) = $\frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100$

式中: A₀: 对照吸光值; A_x: 样品溶液吸光值。

1.2.8.3 超氧自由基清除率的测定 参照玄红专等^[18]的方法, 取 4.5 mL 浓度为 0.05 mol/L Tris-HCl pH8.2 缓冲液和 0.1 mL 的蒸馏水混匀, 在 37 ℃ 水浴锅里(同时把邻苯三酚放在水浴锅里)预热, 等待 20 min, 马上和邻苯三酚(0.5 mL 3 mmol/L)混匀, 在波长 325 nm 处测吸光值, 上述操作确保在 3 min 之内做完, 再加入 0.1 mL 1.2.6 所得的各样品液, 重复上述步骤, 以维生素 C 为阳性对照, 10 mmol/L HCl 溶液

为空白对照,测定各种桑叶产品超氧自由基清除能力。计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_a - A_b}{A_a} \times 100$$

式中: A_a : 没有样品参加反应时的吸光值; A_b : 样品溶液吸光值。

1.2.8.4 对 Fe^{2+} 螯合能力的测定 参照王昌禄等^[19]的方法,用 EDTA 对 Fe^{2+} 的螯合能力作为衡量标准,分别取 1 mL 1.2.6 所得样品液,依次加入 3.5 mL 蒸馏水和 0.1 mL FeCl_2 溶液,反应 10 min 后,最后加入 0.2 mL Ferro zine,在波长为 562 nm 处测吸光值,以蒸馏水为空白对照,分别计算并比较各种桑叶产品对 Fe^{2+} 的螯合率。计算公式如下:

$$\text{螯合率}(\%) = \left(1 - \frac{A''}{A'_0}\right) \times 100$$

式中: A'' : 样品溶液吸光值; A'_0 : 没有样品参加反应时的吸光值。

1.3 数据处理

样品测定采用 3 次重复,用 SPSS 26.0 软件对数据结果进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA), Design-Expert 13 软件进行响应面设计及分析, Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 发酵桑叶茶单因素实验

本试验选择发酵时间(d)、发酵温度($^{\circ}\text{C}$)和接种量(%)3个因素,进行单因素实验,结果如图1所示。

从发酵时间来看,发酵桑叶茶感官评分随着发酵时间增加而不断提高,发酵第7d时,得到最高感官评分88分,但在发酵第7d以后,感官评分急剧下降。推测发酵第7d之前,由于发酵时间越久,黑曲霉的生长越旺盛,利用叶片中的营养物质更均衡,于是产生的代谢产物变多,增加发酵茶的风味物质^[20],发酵第7d之后,可能是因为过多的黑曲霉使发酵底物腐败变质,极大影响了感官评分^[21]。从发酵温度来看,伴随温度的不断上升,感官评分呈先上升再下降的趋势,感官评分在32 $^{\circ}\text{C}$ 达到最高为87分。说明在32 $^{\circ}\text{C}$ 发酵桑叶茶能较好地保持微生物的湿热作用,帮助微生物生长发育,高温可能会导致一些有机物质的分解或者不利的化学反应发生,从而影响茶叶的口感和香气,温度升高也可能影响茶叶中的挥发性化合物的挥发速率,进而影响茶叶的香气和口感,导致感官评分降低^[22]。从接种量(浓度为 6×10^6 CFU/mL 的黑曲霉菌液)来看,接种量15%时作为一个分界点,接种量小于15%时,感官评分随接种量的增加而增大,当接种量超过15%,感官评分反而下降。可能是因为接种量小于15%时,发酵桑叶茶的底物暂时不会达到饱和状态,黑曲霉在桑叶叶片上生长趋势较好,感官评分不断提高^[23],接种量超过15%时,此

时发酵桑叶茶的底物已经饱和,黑曲霉接种量的增加反而破坏了发酵桑叶茶的品质。综上,接种量选择15%,发酵时间选择7d,发酵温度选择32 $^{\circ}\text{C}$ 。

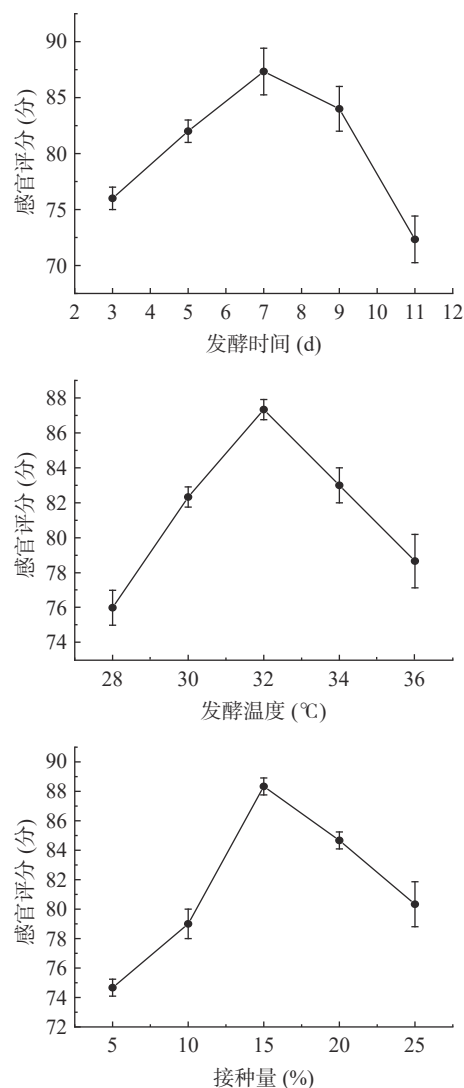


图1 发酵时间、发酵温度以及接种量对发酵桑叶茶的影响
Fig.1 Effect of fermentation time, fermentation temperature and inoculation amount on fermented mulberry leaf tea

2.2 发酵桑叶茶响应面分析

通过单因素实验结果,现选择A发酵时间(d)、B发酵温度($^{\circ}\text{C}$)、C接种量(%)作为3个因素,以感官评分(Y)作为响应值,利用3因素3水平的响应面试验方法,研究各个因素对发酵桑叶茶加工工艺的影响,试验设计与结果见表3。

通过 Design Expert 13 软件,将表3中17组响应值进行二元回归拟合分析,建立A发酵时间(d)、B发酵温度($^{\circ}\text{C}$)、C接种量(%)3个因素与感官评分(Y)之间的二次多项式模型,得到如下方程: $Y = 87.80 + 2.25A + 1.25B + 4.25C + 2.25AB - 1.25AC + 0.25BC - 4.52A^2 - 3.02B^2 - 5.53C^2$,从表4可以看出:方程回归项的模型 $P < 0.05$,具有差异显著性,但失拟项 ($P = 0.3287 > 0.05$) 差异不显著。还可以看出,B、AB影响显著 ($P < 0.05$),A、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 影响极显著

表 3 Box-Behnken 试验方案与结果
Table 3 Scheme and results of Box-Behnken test

试验号	A 发酵时间	B 发酵温度	C 接种量	Y 感官评分(分)
1	0	0	0	87
2	-1	0	-1	69
3	1	-1	0	78
4	0	0	0	89
5	1	0	-1	78
6	1	1	0	85
7	1	0	1	84
8	0	-1	-1	74
9	-1	0	1	80
10	-1	1	0	78
11	0	-1	1	82
12	0	0	0	88
13	0	1	1	85
14	0	0	0	86
15	-1	-1	0	80
16	0	1	-1	76
17	0	0	0	89

($P<0.01$)。从 F 值大小得出, 3 个因素对感官评分 Y 值的影响大小排列顺序为: 接种量>发酵时间>发酵温度。

表 4 响应面试验结果方差分析
Table 4 Analysis of variance of response surface test results

方差来源	平方和	自由度	均方差	F	P	显著性
模型	505.08	9	56.12	26.54	0.0001	显著
A 发酵时间	40.50	1	40.50	19.16	0.0032	**
B 发酵温度	12.50	1	12.50	5.91	0.0453	*
C 接种量	144.50	1	144.50	68.34	<0.0001	**
AB	20.25	1	20.25	9.58	0.0174	*
AC	6.25	1	6.25	2.96	0.1292	
BC	0.2500	1	0.2500	0.1182	0.7410	
A ²	86.21	1	86.21	40.78	0.0004	**
B ²	38.53	1	38.53	18.22	0.0037	**
C ²	128.53	1	128.53	60.79	0.0001	**
残差	14.80	7	2.11			
失拟项	8.00	3	2.67	1.57	0.3287	不显著
纯误差	6.80	4	1.70			
总离差	519.88	16				

注: F 表示 F 检验所得值, P 表示置信度; ** 表示差异极显著 ($P<0.01$), * 表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 发酵桑叶茶感官评分三维响应曲面分析

利用 Design-Expert 13 软件对表 3 的 17 组数据进行分析, 结果如图 2 所示, 发酵温度、发酵时间和接种量对发酵桑叶茶感官评分存在一定的交互作用, 坡度越陡表示响应值对于因素的敏感性越高, 因素间的交互作用越显著^[18]。由图 2 和表 4 可知, 发酵时间与发酵温度间的交互作用较强, 对感官评分影响显著 ($P<0.05$), 发酵时间与接种量、发酵温度与接种量的交互作用略弱, 对感官评分的影响不显著。

2.4 最优工艺条件验证

Design-Expert 软件给出的最优发酵桑叶茶工艺条件为: 发酵时间 5.68 d, 发酵温度 30.08 ℃, 接种量 16.55%, 此条件下发酵桑叶茶感官评分为 87 分。

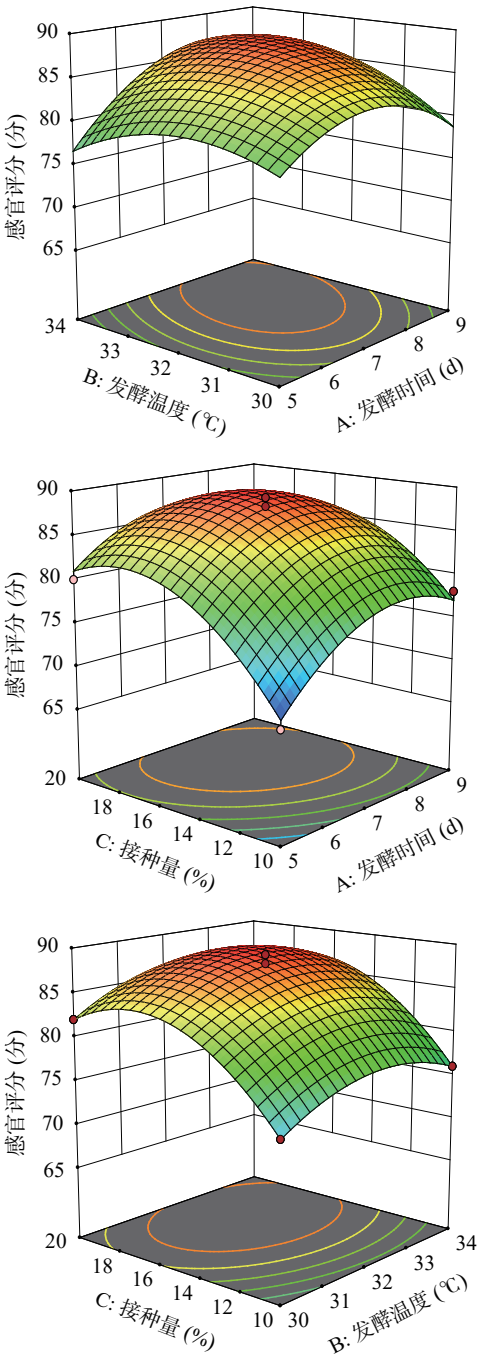


图 2 发酵桑叶茶响应面优化 3D 曲面
Fig.2 Optimized 3D response surface for fermented mulberry leaf tea

考虑到生产实际, 调整工艺条件为发酵时间 5 d 16 h, 发酵温度 30 ℃, 接种量 16.55%。为验证实验可靠性, 在此条件下不断实验, 该条件下发酵桑叶茶感官评分高达 90 分, 说明该优化条件可信。

2.5 生物活性物质含量分析

按照 1.2.7 所述对发酵桑叶茶中生物活性物质进行检测, 结果如表 5 所示。经过发酵的桑叶茶其总黄酮、总多糖、多酚、游离氨基酸、芦丁、槲皮素含量与桑叶绿茶相比, 分别增加了 14.39%、12.67%、2.90%、3.46%、81.13%、19.35%, 发酵桑叶茶中的芦丁含量上升最为明显, 而 1-脱氧野尻霉素(Deoxy-nojirimycin, DNJ) 含量对比桑叶绿茶显著下降

表 5 生物活性物质含量
Table 5 Bioactive substances content

有效成分	总黄酮 (mg/g)	总多糖 (mg/g)	多酚 (mg/g)	游离氨基酸 (mg/g)	芦丁 (mg/g)	槲皮素 (mg/g)	1-脱氧野尻霉素 (mg/g)	水浸出物 (%)	茶褐素 (%)
新鲜桑叶	13.84±0.26 ^a	21.56±0.37 ^a	2.08±0.28 ^a	13.40±0.14 ^a	0.50±0.22 ^a	0.010±0.001 ^a	2.10±0.31 ^a	46.56±1.97 ^a	0
桑叶绿茶	12.86±0.18 ^a	22.34±0.21 ^b	2.07±0.31 ^a	15.90±0.09 ^{ab}	0.53±0.30 ^a	0.031±0.004 ^b	2.62±0.42 ^b	46.94±2.04 ^a	0
发酵桑叶茶	14.71±0.21 ^b	25.17±0.30 ^c	2.13±0.22 ^b	16.45±0.26 ^{ab}	0.96±0.25 ^b	0.037±0.002 ^b	2.19±0.36 ^a	47.30±1.89 ^b	7.55±0.37

注: 同列肩标小写字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)。

($P<0.05$), 可能在发酵桑叶茶工艺过程中, 高温破坏了 DNJ 的结构, 微生物作用将部分 DNJ 转变成其他物质, 造成了 DNJ 含量流失^[24], 但具体原因需进一步验证; 其次, 发酵桑叶茶的水浸出物最多, 说明茶叶中可溶性物质充分溶解, 茶汤的滋味会更加纯正, 营养价值更高^[25]; 最后, 只在发酵桑叶茶里发现有茶褐素, 更加说明本试验工艺优化较为成功, 在改善了桑叶绿茶滋味的基础上, 又促使发酵桑叶茶中原有的生物活性物质含量增加, 还产生了新鲜桑叶和桑叶绿茶没有的茶褐素^[26]。黑曲霉能分泌酸性蛋白酶, 糖苷酶、葡萄糖淀粉酶和乳酸酶等丰富的胞外酶类, 使茶叶内含物质更易渗出, 从而实现大分子物质小分子化, 促使发酵桑叶茶汤色由绿黄明亮转变为红褐, 茶汤的收敛性和苦涩味降低, 使发酵桑叶茶产生茶褐素^[20]。郑升海等^[1]通过冠突散囊菌发酵桑叶茶来探究品质变化的研究表明, 发酵桑叶茶多糖、总黄酮、多酚含量均与桑叶绿茶相比分别下降了 76.10%、12.14% 和 7.10%, 而 DNJ 含量和水浸出率是桑叶绿茶的 3 倍, 可能是发酵菌种不同导致结果产生差异。

2.6 发酵桑叶茶抗氧化活性

2.6.1 羟自由基清除率 按照 1.2.8.1 所述测定新鲜桑叶、桑叶绿茶、发酵桑叶茶及维生素 C 对羟自由基的清除能力, 结果如图 3 所示。1/1000(g/mL) 浓度时新鲜桑叶、桑叶绿茶、发酵桑叶茶对羟自由基的清除率分别是维生素 C 的 0.67 倍、0.58 倍和 0.65 倍, 随着样品浓度升高, 三者对羟自由基的清除能力波动不大, 新鲜桑叶对羟自由基清除率最高, 可能是桑叶绿茶和发酵桑叶茶在制作工程中, 揉捻和高温等操作破坏了桑叶中的某些抗氧化物质, 使得桑叶绿茶和发酵桑叶茶对羟自由基清除率降低。发酵桑叶茶

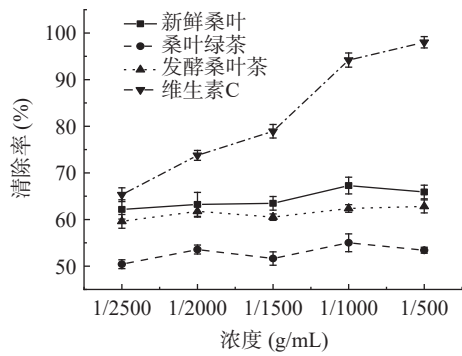


图 3 维生素 C 和桑叶产品对羟自由基的清除作用

Fig.3 Scavenging effect of vitamin C and mulberry leaf products on hydroxyl radicals

对羟自由基的清除率稳定在 60% 左右, 高于桑叶绿茶, 可能是桑叶茶经发酵后总多糖等生物活性物质含量提高, 导致发酵桑叶茶抗氧化活性大于桑叶绿茶^[27]。这与 Unban 等^[28]研究结果一致, 茶叶经发酵后总多酚、总多糖、总黄酮、总单宁和总儿茶素含量升高, 导致发酵阿萨姆(Assam)茶对羟自由基清除率比未发酵茶升高 12.96%。

2.6.2 DPPH 自由基清除率 按照 1.2.8.2 所述测定维生素 C、新鲜桑叶、桑叶绿茶及发酵桑叶茶对 DPPH 自由基的清除能力, 结果如图 4 所示。随着样品浓度的升高, 三者对 DPPH 自由基的清除能力一直在升高, 清除率和浓度呈现正相关线性关系, 而维生素 C 对 DPPH 自由基的清除能力基本保持在 97% 以上。新鲜桑叶清除 DPPH 自由基的能力要大于桑叶绿茶和发酵桑叶茶, 1/1000(g/mL) 浓度时, 新鲜桑叶、桑叶绿茶、发酵桑叶茶对 DPPH 自由基的清除率分别为维生素 C 的 0.92 倍、0.33 倍和 0.40 倍, 推测原因可能是具有抗氧化能力的生物活性物质, 其中一部分因发酵氧化成了有色物质, 一些原有的抗氧化物质在制茶过程中可能会被降解或转化为其他化合物。发酵桑叶茶对 DPPH 自由基的清除率要略高于桑叶绿茶, 1/500(g/mL) 浓度时发酵桑叶茶对 DPPH 自由基的清除率达到 59%, 故推测在发酵中黑曲霉的参与有利于桑叶茶产品的抗氧化性物质的形成和提高。冯拓等^[3]研究了 16 种不同茶叶的抗氧化活性, 结果显示大部分茶叶对 DPPH 自由基的清除率在 38.30%~77.59% 之间, 与本研究结果基本一致。

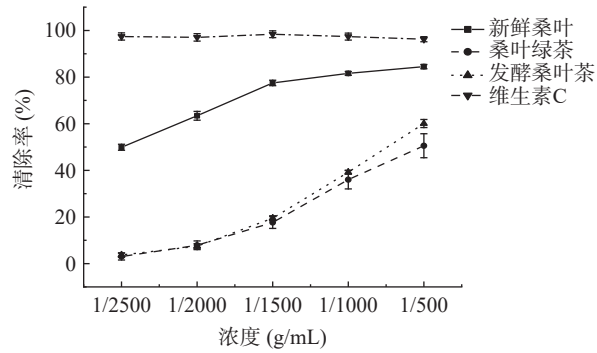


图 4 维生素 C 和桑叶产品对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.4 Scavenging effect of vitamin C and mulberry leaf products on DPPH radicals

2.6.3 超氧自由基清除率 按照 1.2.8.3 所述测定维生素 C、新鲜桑叶、桑叶绿茶及发酵桑叶茶对超氧自

由基的清除能力,结果如图 5 所示。清除率和浓度呈现正相关线性关系,1/1000(g/mL)浓度下,新鲜桑叶、桑叶绿茶、发酵桑叶茶对超氧自由基的清除率分别是维生素 C 的 0.41 倍、0.62 倍和 0.69 倍,桑叶绿茶和发酵桑叶茶对超氧自由基的清除率相近,发酵桑叶茶在 1/500 浓度时清除率达到 42%,推测是发酵桑叶茶在渥堆和发酵的过程中,某些生物活性成分被高温分解或者转化生成原来没有的抗氧化物质,这些物质可能具有清除超氧自由基的能力,也有可能是微生物和酶的作用,使多糖类物质暴露出很多活性基团,这些活性基团有助于对超氧自由基进行清除^[29]。这与 Chan 等^[30]的研究结果基本一致,与桑叶绿茶相比,发酵桑叶茶对超氧自由基的清除能力和总抗氧化活性分别升高 48.64% 和 34.59%。总体来说,桑叶产品清除超氧自由基的能力都较强,三者对清除超氧自由基的能力大小依次为:发酵桑叶茶>桑叶绿茶>新鲜桑叶。

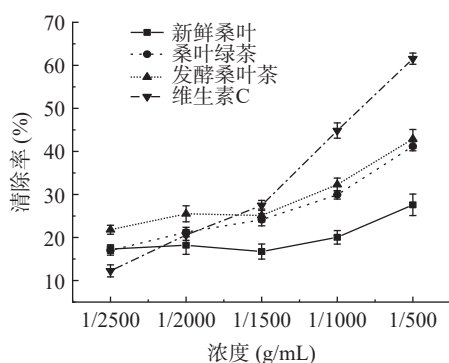


图 5 维生素 C 和桑叶产品对超氧自由基的清除作用
Fig.5 Scavenging effect of vitamin C and mulberry leaf products on superoxide radicals

2.6.4 对 Fe^{2+} 螯合能力 按照 1.2.8.4 所述测定新鲜桑叶、桑叶绿茶及发酵桑叶茶对 Fe^{2+} 的螯合能力,结果如图 6 所示。总体来说,三种样品对 Fe^{2+} 的螯合能力都很弱,发酵桑叶茶对 Fe^{2+} 的螯合能力最弱。新鲜桑叶中含有一些天然的鞣酸等活性成分,这些活性成分具有良好的螯合能力,可以与 Fe^{2+} 形成稳定的络合物,然而,当桑叶经过发酵处理时,鞣酸往往会被氧化、分解或降解,从而减少了发酵桑叶茶对 Fe^{2+} 的螯合能力;其次,微生物产生的代谢产物可能与桑叶中

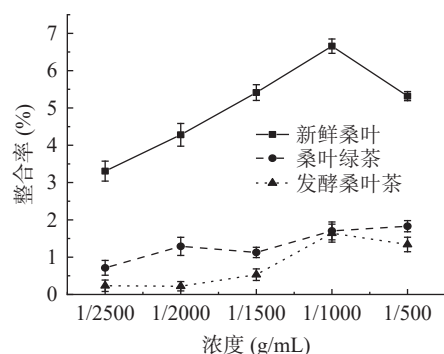


图 6 桑叶产品对 Fe^{2+} 的螯合能力
Fig.6 Chelating ability of mulberry leaf products on Fe^{2+}

的活性成分竞争结合 Fe^{2+} ,降低了发酵桑叶茶对 Fe^{2+} 的螯合效率^[17]。三种样品在浓度为 1/1000 (g/mL) 时对 Fe^{2+} 的螯合率分别为 6.51%、1.53% 和 1.51%,这个浓度可以作为日后生产功能性桑叶茶饮料的一个参考^[31],目前有关茶叶对 Fe^{2+} 螯合能力的报道较少,后续需要进一步对其探究。

3 结论

本研究通过单因素-响应面试验确定了发酵桑叶茶的最佳工艺条件是:发酵时间 5 d 16 h,发酵温度 30 °C,黑曲霉接种量 16.55%。通过对发酵桑叶茶生物活性物质检测发现,总黄酮、总多糖、多酚、游离氨基酸、芦丁、槲皮素含量比桑叶绿茶分别升高了 14.39%、12.67%、2.90%、3.46%、81.13%、19.35%,并生成了新鲜桑叶和桑叶绿茶中没有的茶褐素,本研究为茶褐素的来源提供了一条新途径。进一步通过抗氧化实验反映了本研所得发酵桑叶茶与桑叶绿茶相比具有较好的抗氧化能力,1/1000(g/mL)浓度下发酵桑叶茶对羟自由基、DPPH 自由基和超氧自由基的清除能力分别是维生素 C 的 0.65 倍、0.40 倍和 0.69 倍,对 Fe^{2+} 螯合率为 1.51%。综合来看,与桑叶绿茶相比,发酵桑叶茶抗氧化活性升高,此外,发酵桑叶茶在黑曲霉作用下,其总黄酮、总多糖、多酚类、游离氨基酸、芦丁、槲皮素含量均上升,这一结果为今后开发具有抗氧化性发酵桑叶茶产品提供了一定的理论依据和指导。但是,本研究仅以辽宁阜新地区白桑树叶为原料进行研究,未考虑其他因素对其抗氧化活性影响,因此,后续需要进行更多关于不同地区和不同品种桑叶抗氧化活性差异性研究。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 郑升海,黄丹,罗惠波,等.冠突散囊菌发酵桑叶茶品质研究[J].食品科技,2021,46(3):44-48. [ZHENG S H, HUANG D, LUO H B, et al. Study on the quality of mulberry leaf tea fermented by *Clostridium coronarium* [J]. Food Technology, 2021, 46(3): 44-48.]
- [2] YAO J M, LIU H F, MA C Y, et al. A review on the extraction, bioactivity, and application of tea polysaccharides[J]. Molecules, 2022, 27(15): 12-17.
- [3] 冯拓,单培,张展开,等.16 种市售茶叶抗氧化活性及抗氧化物质分析[J].中国食品学报,2022,22(10):352-362. [FENG T, SHAN P, ZHANG Z K, et al. Analysis of antioxidant activity and antioxidant substances of 16 commercially available tea leaves[J]. Chinese Journal of Food, 2022, 22(10): 352-362.]
- [4] 陈永丽,高畅,洛桑卓玛,等.米曲霉发酵桑叶茶的工艺优化[J].食品科技,2020,45(1):114-121. [CHEN Y L, GAO C, LUO S Z M, et al. Optimization of fermentation process for mulberry leaf tea by *Aspergillus oryzae* [J]. Food Technology, 2020, 45(1): 114-121.]
- [5] MAS S S. Examination of significance of measurement of free amino acid in the blood in pregnancy and diabetes[J]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2011, 241(1): 13-19.
- [6] KHO K, SIM Y Y, NYAM K L. Antioxidant activities of tea

- prepared from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L. KR9) leaves at different maturity stages[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2019, 13(3): 2009–2016.
- [7] 贾冬英, 高畅, 金野, 等. 一种发酵桑叶茶及其制备方法[P]. 四川: CN107897455B, 2021-01-05. [JIA D Y, GAO C, JIN Y, et al. A fermented mulberry leaf tea and its preparation method[P]. Sichuan: CN107897455B, 2021-01-05.]
- [8] 卢丽, 周承哲, 徐凯, 等. 基于感官评价和代谢组学的叶用枸杞茶分析[J]. *食品科学*, 2023, 20(5): 1–17. [LU L, ZHOU C Z, XU K, et al. Analysis of leaf use goji berry tea based on sensory evaluation and metabolomics[J]. *Food Science*, 2023, 20(5): 1–17.]
- [9] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 8313-2018 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018. [Standardization Administration of China. GB/T 8313-2018. Detection method for tea polyphenols and catechins in tea[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2018.]
- [10] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 40632-2021 竹叶中多糖的检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. [Standardization Administration of China. GB/T 40632-2021. Detection methods for polysaccharides in bamboo leaves[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2021.]
- [11] 胡海洋, 陈红艳. 电化学法对苦荞茶中芦丁含量的测定[J]. *食品科学*, 2015, 36(8): 115–119. [HU H Y, CHEN H Y. Determination of rutin content in tartary buckwheat tea by electrochemical method[J]. *Food Science*, 2015, 36(8): 115–119.]
- [12] 胡圆圆, 杨云忠, 王萍, 等. 普洱茶及茶粉中茶褐素含量测定的研究[J]. *食品安全导刊*, 2021, 25(30): 46–58. [HU Y Y, YANG Y Z, WANG P, et al. Study on the determination of tea brown content in Pu'er tea and tea powder[J]. *Introduction to Food Safety*, 2021, 25(30): 46–58.]
- [13] 全国生化检测标准化技术委员会. GB/T 30987-2020 植物中游离氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020. [National Technical Committee for Standardization of Biochemical Testing. GB/T 30987-2020. Determination of free amino acids in plants[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2020.]
- [14] 全国林化产品标准化技术委员会. GB/T 40642-2021 桑叶提取物中 1-脱氧野尻霉素的检测高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. [National Technical Committee for Standardization of Forestry Products. GB/T 40642-2021. High performance liquid chromatography for the detection of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaf extract[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2021.]
- [15] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 8305-2013 茶水浸出物测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013. [China National Standardization Administration. GB/T 8305-2013. Determination of tea water extracts[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2013.]
- [16] DONDURMACIOGLU F, AVAN A N, APAK R. Simultaneous detection of superoxide anion radicals and determination of the superoxide scavenging activity of antioxidants using a N,N-dimethyl-p-phenylene diamine/Nafion colorimetric sensor[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(43): 6202–6212.
- [17] 东方, 揭国良, 何普明. 不同发酵程度茶叶的体内与体外抗氧化功能比较[J]. *中国茶叶加工*, 2015(4): 40–45. [DONG F, JIE G L, HE P M. Comparison of *in vivo* and *in vitro* antioxidant functions of tea leaves with different degrees of fermentation[J]. *China Tea Processing*, 2015(4): 40–45.]
- [18] 玄红专, 桑青, 麻建军. 邻苯三酚自氧化法测定不同蜂产品抗氧化活性的研究[J]. *食品科技*, 2008(4): 137–139. [XUAN H Z, SANG Q, MA J J. Study on the determination of antioxidant activity of different bee products using pyrogallol autooxidation method[J]. *Food Technology*, 2008(4): 137–139.]
- [19] 王昌禄, 任璐, 陈志强, 等. 香椿老叶总多酚抗氧化活性的研究[J]. *林产化学与工业*, 2008, 10(5): 89–92. [WANG C L, REN L, CHEN Z Q, et al. Study on the antioxidant activity of total polyphenols from the old leaves of *Toona sinensis*[J]. *Forestry Chemistry and Industry*, 2008, 10(5): 89–92.]
- [20] 何建新, 胡艳玲, 何汶珊, 等. 响应面-主成分分析法优化大曲发酵桑叶茶工艺[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(17): 113–119. [HE J X, HU Y L, HE W S, et al. Optimization of Daqu fermentation technology for mulberry leaf tea by response surface methodology principal component analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(17): 113–119.]
- [21] BAI H, YAN R, WANG F, et al. Comparing the effects of three processing methods on the efficacy of mulberry leaf tea: Analysis of bioactive compounds, bioavailability and bioactivity[J]. *Food Chemistry*, 2023, 405(PB): 139–147.
- [22] 梅玉立. 桑叶发酵条件优化及混合活性成分对小鼠脂代谢异常的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2022. [MEI Y L. Optimization of mulberry leaf fermentation conditions and the effect of mixed active ingredients on abnormal lipid metabolism in mice[D]. Chongqing: Southwest University, 2022.]
- [23] 黄磊磊, 刘佳怡, 王天怡, 等. 纤维素酶辅助超声提取丁香叶黄酮工艺优化及抗氧化性分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 16(8): 1–19. [HUANG L L, LIU J Y, WANG T Y, et al. Optimization of cellulase assisted ultrasound extraction process and analysis of antioxidant activity of flavonoids from clove leaves[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 16(8): 1–19.]
- [24] GANZON J G, CHEN L G, WANG C C. 4-O-Caffeoylquinic acid as an antioxidant marker for mulberry leaves rich in phenolic compounds[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, 26(3): 985–993.
- [25] WANYO P, SIRIAMORNPNUN S, MEESO N. Improvement of quality and antioxidant properties of dried mulberry leaves with combined far-infrared radiation and air convection in Thai tea process[J]. *Food Bioprod Process*, 2011, 89(C1): 22–30.
- [26] 雷诗涵, 屈廷彪, 胡艳玲, 等. 盐渍-醋蒸-发酵法制备功能性桑叶茶及其性质研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 177–180. [LEI S H, QU T Q, HU Y L, et al. Preparation and properties of functional mulberry leaf tea by salting vinegar steaming fermentation method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(11): 177–180.]
- [27] JEON Y H, CHOI S. Evaluation of phytochemical constituents and organoleptic properties of mulberry leaf tea obtained by different processing methods[J]. *Korean Journal of Food Preservation*, 2019, 26(1): 59–67.
- [28] UNBAN K, KHATTHONGNGAM N, SHETTY K, et al. Nutritional biotransformation in traditional fermented tea (Miang) from north Thailand and its impact on antioxidant and antimicrobial activities[J]. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2019, 56(5): 2687–2699.
- [29] HE Q, YANG K L, WU X Y, et al. Phenolic compounds, antioxidant activity and sensory evaluation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf tea[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(3): 1212–1222.
- [30] CHAN E W C, LYE P Y, TAN L N, et al. Effects of drying method and particle size on the antioxidant properties of leaves and teas of *Morus alba*, *Lagerstroemia speciosa* and *Thunbergia laurifolia*[J]. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 2012, 18(3): 465–472.
- [31] YASUMOTO K, HOSHIKO H, SEKIGUCHI N, et al. Safety evaluation of a beverage containing mulberry leaf extract[J]. *Bio-science Biotechnology and Biochemistry*, 2022, 86(4): 519–527.