

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.03.024

普洱茶中丙烯酰胺含量检测与生成机理研究^{*}

李 蕾¹ 张 涛² 孙志健¹ 陈 芳¹ 胡小松¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

【摘要】 对 50 份普洱茶样进行了检测,表明普洱茶样中丙烯酰胺(AA)含量总体较低(2.05 ~ 91.95 ng/g)。通过对渥堆茶样中 AA 生成量与蔗糖、葡萄糖、果糖含量进行相关性分析,得出蔗糖含量与 AA 生成量相关系数最大($R^2 = 0.5776$),果糖次之($R^2 = 0.4977$),葡萄糖相关性最小($R^2 = 0.2567$)。渥堆普洱茶样中天冬酰胺含量低于检测限,无法检出。同时结合文献推测认为普洱茶渥堆发酵过程中 AA 主要是通过丙烯醛途径生成,天冬酰胺途径贡献很小。

关键词: 普洱茶 丙烯酰胺 生成机理 渥堆发酵

中图分类号: S571.1; TS201.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)03-0123-07

Survey of Acrylamide Contents in Pu-erh Tea and Study on Its Formation Mechanism

Li Lei¹ Zhang Tao² Sun Zhijian¹ Chen Fang¹ Hu Xiaosong¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract

Fifty Pu-erh tea samples were investigated for acrylamide (AA) contents. The results showed that the AA contents in tea samples were generally low, 2.05 ~ 91.95 ng/g. Based on the correlation analysis between sugar contents and the amount of AA, it was found there was the highest correlation coefficient between the sucrose content and AA ($R^2 = 0.5776$), followed by fructose ($R^2 = 0.4977$), glucose was the least ($R^2 = 0.2567$). The asparagine contents of wet-stored Pu-erh tea samples could not detected. In combination with literature records, it could be concluded that AA mainly generated through acrolein way during the fermentation of Pu-erh tea. There was a very small contribution of asparagine way.

Key words Pu-erh tea, Acrylamide, Formation mechanism, Wet-stored fermentation

引言

丙烯酰胺(acrylamide,简称AA)之所以受到关注是因为它的毒性。目前食品中AA数据主要来源于欧洲、北美洲、南美洲,亚洲地区相关数据较少^[1]。我国对AA的研究起步较晚,对中式传统食品中AA含量状况了解较少,茶叶中AA含量数据尚处于空白状态。目前国际上茶叶中AA含量检测相关文章仅有5篇^[2~6],我国学者^[2]在多个茶样中

检出AA,其中普洱茶检出率最高。因此有必要对不同种类的普洱茶叶中AA含量进行系统调查。渥堆发酵是普洱茶加工过程中核心工序,在微生物分泌的胞外酶的酶促作用、微生物呼吸代谢产生的热量和茶叶水分湿热协同作用下,发生了一系列氧化、聚合、缩合、分解等复杂的化学变化,从而形成了普洱茶的特征品质^[7~8]。本文对不同种类普洱茶及渥堆发酵过程中不同发酵阶段的普洱茶AA含量进行检测,揭示AA的变化规律,研究其生成机理。

收稿日期:2011-05-11 修回日期:2011-05-24

^{*} 云南省科技计划项目(20050019002)

作者简介: 李蕾,博士生,主要从事食品安全与质量控制研究,E-mail: lileisea@126.com

通讯作者: 陈芳,副教授,博士生导师,主要从事食品安全与质量控制研究,E-mail: chenfangch@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

在云南省当地市场和普洱茶生产厂采购普洱茶样品,共计 50 份,涉及 8 个产区、10 个普洱茶生产厂,所选样品具有代表性。选用的普洱茶样品包括晒青毛茶、普洱生茶、普洱熟茶 3 个种类,样品份数分别为 7、10 和 33。普洱茶渥堆茶样由云南某普洱茶生产厂提供(2009 年 12 月~2010 年 2 月),渥堆发酵期间,每 7 d 翻堆一次,同时进行科学取样,取得样品共计 8 个,发酵时间分别为 0、7、14、21、28、35、42、49 d。

试剂有:AA、21 种氨基酸、蔗糖、葡萄糖(Glc)、果糖(Fru)标准品和异硫氰酸苯酯(PITC)衍生剂(纯度大于 99.8%,美国 Sigma 公司); $^{13}\text{C}_3$ -AA 标准品(Cambridge Isotope Laboratories, USA);甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Honeywell 公司);甲酸(纯度 98% 以上,德国 Sigma-Aldrich 公司);氩气(纯度 99.9% 以上,北京市华元气体化工有限公司);液氮(纯度 99.9% 以上,北京诚为信气体销售中心)。

1.2 主要设备与仪器

实验仪器包括:Waters-2695 型 HPLC-MS/MS 系统(美国 Waters 公司);三重四极杆串联质谱仪 Quattro Micro(英国 Micromass 公司);氮吹仪(上海安谱科学仪器公司);SPE 固相萃取柱 Cleanert PCX (60 mg, 美国 Agela 公司);HPLC 系统(德国 KNAUER 系列);示差折光检测器(德国 KNAUER 系列)。

1.3 实验方法

1.3.1 茶叶样品中 AA 的测定

茶样前处理^[2]:将 1 份散茶茶样品均匀混合,采用四分法获得足够量的样品;或将 1 份紧压茶茶样敲碎,采用四分法获得足够量样品。准确称取 1.0 g 茶粉,放入 50 mL 离心管中,加入 1 mL 质量浓度为 900 ng/mL 的 $^{13}\text{C}_3$ -AA 标准溶液和 9 mL 超纯水,剧烈振荡混匀,25℃ 振荡浸提 20 min。振荡浸提之后分别加入 10 mL 乙腈溶剂、4 g 无水硫酸镁和 0.5 g 氯化钠,迅速将离心管闭合,振荡 1 min。冷冻离心 10 min,温度 4℃,转速 5 000 r/min。将 9 mL 的乙腈层转移至试管中,50℃ 水浴条件下氮气吹干。取 0.5 mL 超纯水溶解试管壁上的残余物,水抽提物过 0.45 μm 水系微孔滤膜,之后进行固相萃取(SPE)处理。

SPE 处理^[2]:将 PCX 柱用 2 mL 甲醇和 2 mL 水活化,之后加 0.5 mL 水复溶物过柱,收集流出物,再加 0.5 mL 超纯水淋洗残留于 PCX 柱上的 AA,合并

得 1 mL 提取液,做 0.22 μm 水系微孔滤膜,待 HPLC-MS/MS 检测。

色谱条件:采用 Venusil ASB-C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),柱温为 30℃;流动相为 90% 的 0.1% 甲酸水溶液和 10% 乙腈,采用等度洗脱程序;流速为 0.4 mL/min;进样量为 20 μL 。

质谱条件:采用 waters HPLC-MS/MS 系统,电喷雾(ESI)离子源,正离子模式。定量采用 MRM 模式,AA 离子通道为 m/z 72 > 55, $^{13}\text{C}_3$ -AA 离子通道为 m/z 75 > 58。毛细管电压 1 kV,锥孔电压 20 V,源温度 110℃。氮气作为脱溶剂气,脱溶剂气温度 400℃,脱溶剂气流速 600 L/h,锥孔气流 50 L/h。氩气作为碰撞气,碰撞气压力为 200 MPa,碰撞气能量 13 eV。MRM 模式采集数据的驻留时间为 0.4 s,每次扫描时间为 0.1 s。

1.3.2 茶叶样品中氨基酸的测定

茶样前处理:将渥堆茶样冷冻干燥至含水率 2%,研磨制粉,过 40 目筛。准确称茶粉 0.500 0 g,加入 25 mL 蒸馏水,80℃ 水浴 30 min,每隔 10 min 摇匀一次,之后将浸提液置于冰水浴中迅速冷却至室温,补足 25 mL。上清液过 0.22 μm 水系微孔滤膜,得氨基酸提取液。

氨基酸衍生:准确量取氨基酸标准溶液或茶样氨基酸提取液 200 μL ,分别置于 1 mL 离心管中,准确加入 20 μL 正亮氨酸溶液(1 mg/mL),之后加入三乙胺乙腈溶液 100 μL ,PITC 乙腈溶液 100 μL ,振荡混匀,室温避光放置 1 h,然后加入正己烷 400 μL ,振荡之后避光放置 10 min,取下层溶液,过 0.45 μm 水系微孔滤膜,待测。

流动相配制:流动相 A,称取 15.2 g 无水醋酸钠,加水 1 850 mL,溶解后用冰醋酸调 pH 值至 6.5,然后加乙腈 140 mL,混匀,用 0.45 μm 水系滤膜过滤;流动相 B,80% 乙腈水溶液。

HPLC-PDA 检测方法:色谱柱为 Venusil AA 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),柱温 42℃,进样量 2 μL ,检测波长为 254 nm。洗脱程序采用了时间、流动相、流速三维梯度变化,见表 1。

1.3.3 茶叶样品中糖的测定

茶样前处理同 1.3.1 节。

HPLC 测定方法:Water Sugar-Park-I 糖柱(6.5 mm $\times$ 300 mm, 5 μm),糖保护柱 Sugar-Pak 1,柱套 Guard-Pak,进样量 20 μL ,流动相为 50 mg/L EDTA 钙钠盐,流速为 0.5 mL/min,柱温为 90℃。

1.3.4 数据处理

所有实验均重复 3 次。采用 SAS 软件对实验结果进行方差分析、回归分析和 Duncan 多重比较。

采用 Microcal Origin 8.0 软件(Microcal Software, Inc., Northampton, USA)进行图形绘制和曲线拟合。

表 1 分离氨基酸衍生物的洗脱程序

Tab.1 Gradient program employed for the separation of amino acids derivatives			
时间 /min	流动相 A 体积分数/%	流动相 B 体积分数/%	流速 /mL·min ⁻¹
0	93	7	1
5	93	7	0.35
14.00			0.35
14.01			0.8
30	62	38	
40	0	100	1
45	93	7	1
55	93	7	1

注:洗脱程序在 5~30 min,流动相 A 从 93% 匀速降至 62%,而流动相 B 则从 7% 匀速升至 38%。洗脱程序在 14.01~40 min,流速从 0.8 mL/min 匀速升至 1 mL/min。

2 结果与分析

2.1 普洱茶样品中 AA 含量

表 2 显示了普洱茶样品中 AA 检测结果,在所有检测的 50 份云南普洱茶样品中,共有 7 份样品未检出 AA,占到样品总数的 14%。其余样品中 AA 质量比为 2.05~91.95 ng/g,共有 26 份样品 AA 检测低于 10 ng/g,占检出样品总数的 60.47%。33 份普洱熟茶样品中,共有 2 份样品未检出 AA,在普洱熟茶样品中占到 6.06%;10 份普洱生茶样品中,有 3 份未检出,占普洱生茶样品的 30%;7 份晒青毛茶中,未检出样品共有 2 份,占晒青毛茶样品的 28.57%,与普洱生茶相当。未检出率从大到小依次为普洱生茶、晒青毛茶、普洱熟茶。

检测结果说明普洱茶中 AA 含量相对较低,与我国学者研究结果类似^[2]。Yoshida 等^[6]在对日本加工食品调查中发现绿茶中 AA 含量低于“Houjicha”茶和炒制大麦茶,其中绿茶 AA 质量比为 20~100 ng/g,“Houjicha”茶作为炒制绿茶的一类其 AA 质量比为 190~570 ng/g,大麦茶 AA 质量比为 180~320 ng/g,而 Ono 对大麦茶的检测结果则更高(200~600 ng/g)^[3],与咖啡粉中 AA 相当^[9]。Mizukami 等^[4]对茶叶样品检测发现,“Houjicha”茶中 AA 含量要远高于绿茶、黑茶、乌龙茶,其质量比为 247~1 880 ng/g。可以看出,不同种类茶中 AA 含量差异较大,可能是茶叶加工工艺不同所致。日本茶叶^[4]中“Houjicha”茶的杀青温度在 170~200℃

表 2 普洱茶样品中 AA 含量

Tab.2 AA concentration in Pu-erh tea samples			
品名	产地	类别	丙烯酰胺质量比/ng·g ⁻¹
普洱熟茶	下关	熟散	6.10±0.28
普洱熟茶	下关	熟散	4.17±0.12
普洱熟茶	下关	熟散	2.97±0.95
普洱熟茶	下关	熟沱	7.37±0.98
普洱熟茶	临沧	熟砖	4.60±1.12
普洱熟茶	双江	熟散	3.37±0.76
普洱熟茶	双江	熟散	5.00±0.90
普洱熟茶	双江	熟散	4.53±0.37
普洱熟茶	双江	熟饼	5.10±1.61
普洱熟茶	勐海	熟散	6.60±0.83
普洱熟茶	勐海	熟散	26.83±2.45
普洱熟茶	勐海	熟散	13.20±1.27
普洱熟茶	勐海	熟饼	13.57±0.84
普洱熟茶	勐海	熟散	3.40±0.93
普洱熟茶	勐海	熟散	6.10±0.35
普洱熟茶	勐海	熟散	5.87±1.38
普洱熟茶	勐海	熟饼	8.97±2.31
普洱熟茶	昆明	熟散	15.27±0.99
普洱熟茶	昆明	熟散	18.27±2.10
普洱熟茶	昆明	熟饼	18.20±3.06
普洱熟茶	宁洱	熟散	11.60±2.79
普洱熟茶	宁洱	熟散	3.53±0.97
普洱熟茶	宁洱	熟散	4.40±1.20
普洱熟茶	宁洱	熟饼	2.70±0.16
普洱熟茶	澜沧	熟散	—
普洱熟茶	澜沧	熟散	44.97±3.87
普洱熟茶	澜沧	熟茶	63.93±3.93
普洱熟茶	澜沧	熟饼	—
普洱熟茶	潞西	熟散	64.00±2.62
普洱熟茶	潞西	熟饼	2.05±0.77
普洱熟茶	勐海	熟饼	42.33±2.59
普洱熟茶	潞西	熟散	70.43±1.60
普洱熟茶	潞西	熟饼	86.57±3.62
晒青毛茶	下关		—
晒青毛茶	双江		6.10±1.71
晒青毛茶	勐海		7.40±2.54
晒青毛茶	勐海		9.73±0.83
晒青毛茶	宁洱		5.83±1.76
晒青毛茶	澜沧		—
晒青毛茶	勐海		3.35±0.29
普洱生茶	下关	生沱	91.95±2.85
普洱生茶	临沧	生饼	78.60±2.41
普洱生茶	双江	生饼	8.30±1.39
普洱生茶	勐海	生饼	—
普洱生茶	勐海	生饼	9.10±0.98
普洱生茶	昆明	生饼	—
普洱生茶	宁洱	生饼	7.03±0.62
普洱生茶	澜沧	生饼	—
普洱生茶	潞西	生饼	20.00±3.10
普洱生茶	潞西	生饼	55.40±5.63

之间,绿茶的杀青温度在 120 ~ 140℃ 之间,我国普洱茶的杀青温度为 130 ~ 150℃^[10],与日本绿茶相近,而且茶制品中 AA 含量水平相当。同时同种类茶叶中的 AA 含量也有很大不同,原因可能是加工产地不同和所采用的加工原料不同。晒青毛茶、普洱生茶和普洱熟茶的主要区别在于普洱熟茶的加工过程中有一个渥堆发酵环节,而晒青毛茶和普洱生茶无此发酵环节,其品质特征更接近于传统绿茶。

2.2 渥堆发酵过程中氨基酸含量变化

2002 年,Mottram^[11]和 Stadler^[12]曾指出热加工食品中 AA 是由氨基酸和羰基化合物在高温条件下通过美拉德反应最终生成。因此研究普洱茶中 AA 生成机理就有必要监测发酵期间普洱茶样品中氨基酸和糖含量的变化,以明确氨基酸、糖与 AA 生成量之间的相关性。

通过对渥堆茶样进行氨基酸分析检测,结果发现渥堆茶样中天冬酰胺(Asn)含量低于检测限,无法检出。发酵工序对不同氨基酸(图 1 ~ 3)具有不同的影响作用,并且呈现出规律性的变化。

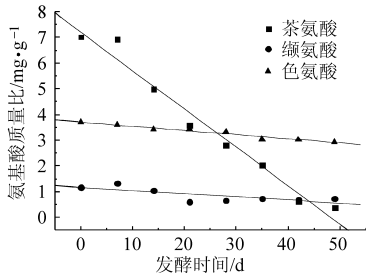


图 1 渥堆发酵期间茶氨酸、缬氨酸和色氨酸含量变化趋势

Fig. 1 Dependence of the contents of theanine, valine and tryptophan on fermentation time of wet-stored Pu-erh tea samples

图 1 显示了茶氨酸(Thea)、缬氨酸(Val)和色氨酸(Trp)在渥堆发酵过程中的变化趋势,随着发酵程度的加深,3 种氨基酸都呈现逐渐下降的趋势。通过 Origin 8.0 软件线性拟合得到,Thea 含量相对于发酵时间的拟合公式为 $Y = 7.188 - 0.149x$, $R^2 = 0.9734$; Trp 拟合公式为 $Y = 3.702 - 0.016x$, $R^2 = 0.9609$; Val 拟合公式为 $Y = 1.166 - 0.012x$, $R^2 = 0.766$ 。在发酵过程中,3 种氨基酸含量都逐渐减少,可能是因为参与了发酵过程中的其他反应,如美拉德反应,或者作为氮源营养被发酵微生物所利用^[13]。

图 2 显示了渥堆发酵过程中丙氨酸(Ala)、异亮氨酸(Ile)含量变化趋势。可以看出,随着渥堆发酵程度的加深,Ala 和 Ile 含量都呈现逐渐升高的趋势,在发酵结束后 Ala 含量增加了 57.74%,而 Ile 增

加了 33.32%。采用 Origin 8.0 软件的指数衰减模型拟合得到了相关性较高的拟合模型,Ala 含量对于发酵时间的拟合公式为 $Y = 8.227 - 3.541e^{-x/17.231}$, $R^2 = 0.9283$; Ile 的拟合公式为 $Y = 3.025 - 0.838e^{-x/18.835}$, $R^2 = 0.9398$ 。

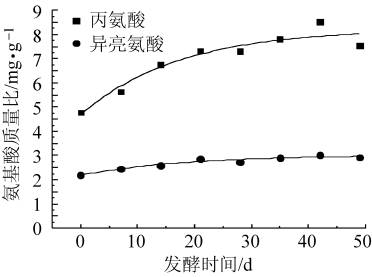


图 2 渥堆发酵期间丙氨酸、异亮氨酸含量变化趋势

Fig. 2 Dependence of the contents of alanine and isoleucine on fermentation time of wet-stored Pu-erh tea samples

图 3 显示了渥堆发酵过程中精氨酸(Arg)的变化趋势,随着渥堆发酵时间的延长精氨酸含量呈现抛物线式的变化趋势。通过 Origin 8.0 软件多项式回归模型拟合,Arg 含量对于发酵时间的拟合公式为 $Y = 5.388 + 0.627x - 0.012x^2$, $R^2 = 0.8843$ 。

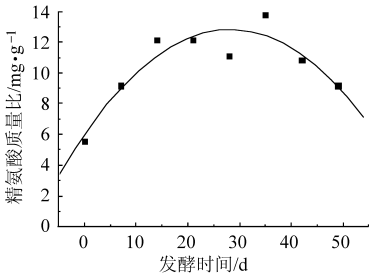


图 3 渥堆发酵期间精氨酸含量变化趋势

Fig. 3 Dependence of the contents of arginine on fermentation time of wet-stored Pu-erh tea samples

渥堆发酵对天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、酪氨酸(Tyr)和甲硫氨酸(Met)含量变化影响见表 3。可以看出在渥堆发酵过程中以上 4 种氨基酸含量较为稳定,没有发生显著变化($p < 0.05$)。

2.3 渥堆发酵过程中糖含量变化

渥堆发酵过程中蔗糖、葡萄糖(Glc)和果糖(Fru)变化如图 4 所示。3 种糖在普洱茶原料中含量不同,蔗糖和葡萄糖含量接近,而果糖最低;之后的渥堆发酵过程中,蔗糖在发酵初始含量突然增高,含量超过葡萄糖,在发酵第 7 天时达到最高点,之后则呈现逐渐降低的趋势,发酵结束时降幅达到 37.71%;葡萄糖和果糖含量变化类似,都呈现逐渐降低的趋势,发酵结束时葡萄糖降幅达 25.52%,果糖降幅达 10.16%;渥堆发酵结束时,普洱茶中葡萄糖含量最高,蔗糖次之,果糖含量最少。可以看出,

表 3 渥堆发酵过程中天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸和甲硫氨酸含量

Tab.3 Quantification of Asp, Glu, Tyr and Met contents in wet-stored Pu-erh tea samples					mg/g
样品编号	天冬氨酸 (Asp)	谷氨酸 (Glu)	酪氨酸 (Tyr)	甲硫氨酸 (Met)	
翻堆-0	12.22 ± 4.95 ^{ab}	20.98 ± 7.82 ^b	3.21 ± 0.79 ^b	0.84 ± 0.15 ^{ab}	
翻堆-1	11.65 ± 2.30 ^b	28.67 ± 13.45 ^{ab}	5.22 ± 2.91 ^{ab}	1.21 ± 0.7 ^{ab}	
翻堆-2	14.13 ± 3.51 ^{ab}	43.30 ± 26.21 ^a	6.88 ± 0.59 ^a	1.43 ± 0.39 ^a	
翻堆-3	12.72 ± 0.84 ^{ab}	17.72 ± 0.73 ^b	5.69 ± 2.14 ^{ab}	0.80 ± 0.33 ^{ab}	
翻堆-4	15.80 ± 3.87 ^{ab}	19.70 ± 6.40 ^b	5.35 ± 1.19 ^{ab}	0.94 ± 0.54 ^{ab}	
翻堆-5	17.02 ± 0.86 ^a	20.61 ± 2.70 ^b	4.61 ± 0.15 ^{ab}	0.69 ± 0.13 ^b	
翻堆-6	14.02 ± 0.35 ^{ab}	21.76 ± 0.73 ^b	4.77 ± 0.10 ^{ab}	1.04 ± 0.04 ^{ab}	
翻堆-7	11.71 ± 0.35 ^b	17.24 ± 2.31 ^b	3.94 ± 1.56 ^b	1.01 ± 0.07 ^{ab}	

注:同列中不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平存在显著性差异

3 种糖含量在渥堆发酵过程中有波动,但总趋势是减少的。原因在于微生物大量繁殖,小分子糖作为碳源营养被消耗,同时在发酵的过程中还参与美拉德反应,因此,在渥堆发酵后期,小分子糖含量逐渐减少^[13]。

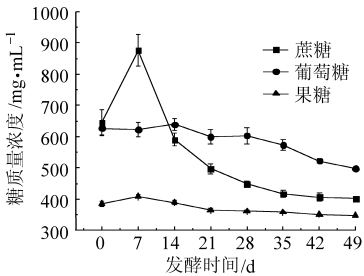


图 4 渥堆发酵期间蔗糖、葡萄糖、果糖的变化趋势
Fig.4 Trends of sucrose, glucose and fructose contents during wet-stored fermentation of Pu-erh tea

2.4 渥堆发酵过程中 AA 含量与糖含量相关性

在渥堆发酵期间 AA 含量变化趋势见图 5。从图中可以看出,未发酵茶叶原料中 AA 含量很少,发酵初始 AA 含量迅速攀升,第 7 天时达到最大值。之后随着发酵时间的延长,AA 含量有波动,但总体呈现降低的趋势。结果表明,渥堆发酵对于 AA 的生成有抑制或降低的作用。发酵初始 AA 含量迅速富集,目前尚未清楚其形成原因,但可以观察到此现象与蔗糖在渥堆发酵过程中变化趋势类似。因此,

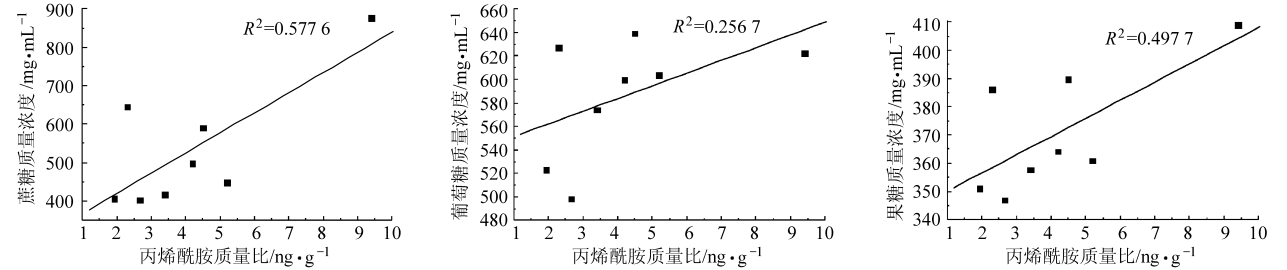


图 6 渥堆发酵期间蔗糖、葡萄糖、果糖含量与 AA 生成量相关性的散点图
Fig.6 Scatter plots of relationship between sucrose, glucose, fructose contents and AA content during wet-stored fermentation of Pu-erh tea

对蔗糖、葡萄糖、果糖含量变化与 AA 生成变化进行了相关性分析。

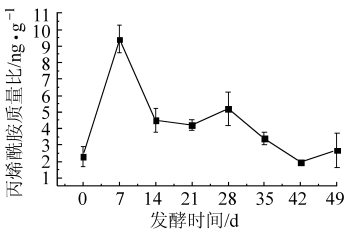


图 5 渥堆发酵期间 AA 含量变化趋势
Fig.5 Trends of AA contents during wet-stored fermentation of Pu-erh tea

蔗糖、葡萄糖、果糖含量与 AA 含量相关性分析结果见图 6。从图中可以看出蔗糖含量与 AA 生成量相关系数最大,果糖次之,葡萄糖相关性最小,即渥堆发酵期间普洱茶中蔗糖的含量影响 AA 生成作用最大,果糖影响作用次之,而葡萄糖的影响作用最小。前期实验结果表明,渥堆茶样中未检测出天冬酰胺,因此天冬酰胺途径对渥堆茶样中 AA 的生成没有贡献,这也是导致普洱茶中 AA 含量低的主要原因,由此可以认为天冬酰胺是普洱茶中 AA 生成的限制性因素。单糖可以降解转化生成丙烯醛,可以与在渥堆发酵过程中产生的 NH_3 ^[13~15] 结合通过丙烯醛途径最终生成 AA,由此可以解释蔗糖和果糖对 AA 生成有影响作用的原因。由于丙烯醛还可

以由茶多糖、寡糖、脂类^[9, 16]等降解转化生成,这也是最终导致蔗糖和果糖与 AA 生成的相关性不高的原因。

以上结论可以概括为,普洱茶渥堆发酵过程中 AA 主要是通过丙烯醛途径生成,天冬酰胺途径贡献很小,这也是普洱茶样品中 AA 生成量较低的主要原因。蔗糖、果糖通过降解转化生成丙烯醛来影响 AA 的生成,因此与 AA 生成有一定的相关性,但由于还有其他途径可以生成丙烯醛,由此就解释了与 AA 相关性并不是很高的原因。由于,天冬酰胺在渥堆茶样中含量很少,因此可以认为天冬酰胺是渥堆普洱茶样中 AA 生成的限制性因素,这与文献[4]观点一致。

以上所得出的结论可以部分解释渥堆发酵过程中是由于糖含量降低而导致 AA 生成量降低。渥堆发酵过程是一个复杂的化学变化过程,其中茶多酚和没食子酸的变化是显著而主要的^[8, 17]。这类多酚类物质都具有较强的抗氧化性,虽然目前对于抗氧化性物质对 AA 抑制作用尚无定论,但也有一些研究表明某些抗氧化剂对 AA 具有抑制作用,由此推测茶样中的多酚类物质在渥堆发酵过程中也可能对 AA 的生成发挥了抑制效果。

3 结束语

对 50 份普洱茶样进行了 AA 含量检测,结果显示,普洱茶样中 AA 总体较低(2.05 ~ 91.95 ng/g)。3 种普洱茶的未检出率存有较大差异,普洱生茶与晒青毛茶接近,而远高于普洱熟茶。

渥堆发酵工序对茶氨酸、缬氨酸、色氨酸、丙氨酸、异亮氨酸和精氨酸具有不同的影响作用,并且呈现出规律性的变化,通过软件拟合得到了相应的拟合模型。

渥堆发酵过程中,蔗糖、葡萄糖和果糖含量有波动变化,但总体上呈下降趋势。通过对 3 种糖含量与 AA 生成量相关性分析,并结合氨基酸测定结果得出,普洱茶渥堆发酵过程中 AA 主要是通过丙烯醛途径生成,天冬酰胺途径贡献很小,这也是普洱茶样品中 AA 生成量较低的主要原因。蔗糖、果糖通过降解转化生成丙烯醛来影响 AA 的生成,因此与 AA 生成有一定的相关性,但由于还有其他途径可以生成丙烯醛,由此就解释了与 AA 相关性并不高的原因。由于天冬酰胺在渥堆茶样中含量很少,因此可以认为天冬酰胺是普洱茶渥堆发酵过程中 AA 生成的限制性因素。

参 考 文 献

- 1 JECFA/64/SC. Summary and conclusions of the 64th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives[R]. JECFA, 2005.
- 2 Liu J, Zhao G, Yuan Y, et al. Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 760 ~ 767.
- 3 Ono H, Chuda Y, Ohnishi-Kameyama M, et al. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods [J]. Food Additives and Contaminants, 2003, 20(3): 215 ~ 220.
- 4 Mizukami Y, Kohata K, Yamaguchi Y, et al. Analysis of acrylamide in green tea by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7 370 ~ 7 377.
- 5 Mizukami Y, Sawai Y, Yamaguchi Y. Changes in the concentrations of acrylamide, selected odorants, and catechins caused by roasting of green tea [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(6): 2 154 ~ 2 159.
- 6 Yoshida M, Ono H, Chuda Y, et al. Acrylamide in Japanese processed foods and factors affecting acrylamide level in potato chips and tea [M]//Mendel Friedman, Don Mottram. Chemistry and safety of acrylamide in food: advances in experimental medicine and biology. Heldelbeng: Springer, 2005, 561: 405 ~ 413.
- 7 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, 2008, 29(4): 230 ~ 233. Zhang Xinfu, Gong Jiashun, Zhou Hongjie, et al. Study on relationship between polyphenols and quality of Yunnan Pu-erh tea [J]. Food Science, 2008, 29(4): 230 ~ 233. (in Chinese)
- 8 周斌星, 孔令波, 李发志. 普洱茶(熟茶)发酵过程中不同堆层主要生化成分的变化[J]. 江西农业学报, 2010, 22(7): 63 ~ 68. Zhou Binxin, Kong Lingbo, Li Fazhi. Changes in major biochemical compositions of Puer tea during fermentation process [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2010, 22(7): 63 ~ 68. (in Chinese)
- 9 Umamo K, Shibamoto T. Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(6): 909 ~ 912.
- 10 李连喜. 不同制法普洱茶茶褐素及其在贮存中变化的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2005. Li Lianxi. Study on tea browning in different processing Pu-er tea and its change along with preservation [D]. Chongqing:

Southwestern University, 2005. (in Chinese)

11 Mottram D S, Bronislaw L, Wedzicha A T D. Acrylamide is formed in the Maillard reaction [J]. Nature, 2002, 419(6906): 448.

12 Stadler R H, Blank I, Varga N, et al. Acrylamide from Maillard reaction products [J]. Nature, 2002, 419(6906): 449 ~ 450.

13 罗龙新, 吴小崇, 邓余良, 等. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J]. 茶叶科学, 1998, 18(1): 53 ~ 60.

Luo Longxin, Wu Xiaochong, Deng Yuliang, et al. Variations of main biochemical components and their relations to quality formation during pile-fermentation process of Yunnan Puer tea[J]. Journal of Tea Science, 1998, 18(1): 53 ~ 60. (in Chinese)

14 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学:上册[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 9 ~ 15.

15 Vatter D A, Shetty K. Acrylamide in food: model for mechanism of formation and its reduction [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2003, 4 (3): 331 ~ 338.

16 Gertz C, Klostermann S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products [J]. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2002, 104(11): 762 ~ 771.

17 折改梅, 张香兰, 陈可可, 等. 茶氨酸和没食子酸在普洱茶中的含量变化[J]. 云南植物研究, 2005, 27(5): 572 ~ 576.

She Gaimei, Zhang Xianglan, Chen Keke, et al. Content variation of theanine and gallic acid in Pu-er tea [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2005, 27(5): 572 ~ 576. (in Chinese)

(上接第 122 页)

8 Mukerjee R, Slocum G, Robyt J F. Determination of the maximum water solubility of eight native starches and the solubility of their acidic-methanol and-ethanol modified analogues [J]. Carbohydrate Research, 2007, 342(1): 103 ~ 110.

9 王淑杰, 周亚军, 苏丹, 等. 鹿肉盐溶蛋白热诱导凝胶特性影响因素试验[J]. 农业机械学报, 2010, 41(9): 122 ~ 127.

Wang Shujie, Zhou Yajun, Su Dan, et al. Properties of venison protein gelatin and mathematical model[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(9): 122 ~ 127. (in Chinese)

10 Bayarri S, Chuliá I, Costell E. Comparing λ -carrageenan and an inulin blend as fat replacers in carboxymethyl cellulose dairy desserts. Rheological and sensory aspects [J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(6 ~ 7): 578 ~ 587.

11 Kim Y, Faqih M N, Wang S S. Factors affection gel formation of inulin[J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 46(2): 135 ~ 145.

12 Koca N, Metin M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers [J]. International Dairy Journal, 2004, 14(4): 365 ~ 373.

13 Villegas B, Costell E. Flow behavior of inulin-milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content [J]. International Dairy Journal, 2007, 17(7): 776 ~ 781.