DOI:10.3969/j.issn. 1673–1689.2017.07.014

利用渥堆发酵制备银杏叶茶的研究

袁丹丹[1]， 陈晓燕[1]， 侯丽君[*2]， 蒋秋燕[2]， 刘 飞[1]， 朱希强[1]

（1. 山东省药学科学院 / 山东省生物药物重点实验室 / 山东省多糖类药物工程实验室，山东 济南 250101；2. 山东商业职业技术学院 食品药品学院，山东 济南 250103）

摘要： 制备发酵型银杏叶茶，并探究银杏叶在发酵过程中不同时期总黄酮和银杏酸质量分数变化。利用渥堆的方式制备发酵型银杏叶，在渥堆过程中定期取样，紫外分光光度法测定银杏叶中总黄酮的含量，高效液相色谱法测定银杏叶中银杏酸的质量分数。渥堆后银杏叶颜色变为棕褐色，苦涩感降低，滋味微甘醇和，总黄酮与银杏酸质量分数均有所下降，黄酮质量分数下降了6.86%，银杏酸质量分数下降了 29.08%。此结果为合理开发银杏叶提供了参考。

关键词： 银杏叶茶；渥堆发酵；总黄酮；银杏酸

中图分类号：TS 27　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1673—1689(2017)07—0750—06

Study on Production of *Ginkgo biloba* Tea with Pile–Fermentation

YUAN Dandan[1]， *CHEN Xiaoyan*[1]， *HOU Lijun*[*2]， *JIANG Qiuyan*[2]， *LIU Fei*[1]， *ZHU Xiqiang*[1]

（1. Polysaccharide Drugs Engineering Laboratory of Shandong Province / Shandong Key Laboratory of Biological Drugs / Shandong Academy of Pharmaceutical Science，Jinan 250101，China；2. Food and Drug Department，Shandong Institute of Commerce and Technology，Jinan 250103，China）

Abstract： To produce *Ginkgo biloba* tea and research the changes of total flavonoids and ginkgolic acids during the process of *Ginkgo biloba* leaves with pile-fermentation. Pile-fermentation was used to produce *Ginkgo biloba* leaves.The contents of total flavonoids and ginkgolic acids in different times of fermentation were determined by UV spectrophotometry and HPLC respectively. After pile-fermentation，the colour of *Ginkgo biloba* leaves was brown.Soup was decreasing bitterness，slightly sweet and mellow taste.During the fermentation，the content of total flavonoids and ginkgolic acids showed a downward trend，total flavonoids dropped 6.86%，ginkgolic acids dropped 29.08%. These results provide reference for reasonable development of *Ginkgo biloba* leaves.

Keywords： *Ginkgo biloba* tea，pile-fermentation，total flavonoids，ginkgolic acids

银杏是现今地球上最古老的树种之一，其全身是宝，集食用、药用、观赏于一身，具有重要的研究价值，被称为植物界的“活化石”[1]。银杏叶中的成分主要包括银杏黄酮、内酯类、萜类、酚酸类、聚异戊二烯等化合物。以银杏叶为原料制成的银杏叶提取物(EGb)是目前国内外最畅销的药品和食品添加剂

收稿日期： 2015–06–17

基金项目： 山东省教育厅科技计划课题(J06K59)；山东省重点研发计划(2015GSF121003)。

* **通信作者：** 侯丽君(1961—)，女，山东烟台人，教授，主要从事医药教育与研究。E–mail：lfshwu@163.com

引用本文： 袁丹丹，陈晓燕，侯丽君，等. 利用渥堆发酵制备银杏叶茶的研究[J]. 食品与生物技术学报，2017，36(07)：750–755.

之一,EGb 对心肌梗塞、防治冠心病、老年性痴呆等具有良好的药效,另外,银杏叶还是一种重要的保健品资源,银杏叶茶则是深受人们欢迎的绿色保健品[2]。

银杏黄酮是银杏叶的主要有效成分之一,具有捕获游离基、清除活性氧、促进血液循环、抗肿瘤活性及脑代谢等功能[3]。银杏酸具有潜在的致敏、致突变作用和细胞毒性[4-7],随着国际贸易的推进,一些企业生产的 EGb 常常在外销过程中遭遇退货,究其原因基本都是由于银杏酸质量分数高,质量检测不符合要求。德国卫生部规定 EGb 制剂中的银杏酸质量分数须小于 5 mg/kg[8],《中国药典》2010 年版也限定 EGb 中银杏酸应在 10 mg/kg 以下[1],但对银杏叶茶中银杏酸的限量还没有统一的标准,2010 年国家质监局将银杏叶茶确定为保健食品,因此建立降低银杏叶茶中银杏酸含量的方法具有重要意义。

目前市售的银杏叶茶均是经过杀青、揉捻、干燥等基本步骤制备,味道苦涩,口感较差。渥堆可以促使粗老的鲜叶通过一定程度的发酵,形成优良的品质特征,作者研究了银杏叶的渥堆发酵工艺对银杏叶口感的影响,并分别利用分光光度法及高效液相色谱法测定渥堆发酵过程中的总黄酮、银杏酸的质量分数,为银杏叶的开发利用提供实践及理论基础。在渥堆过程中,银杏叶中的黄酮类、酚酸类等物质在湿热、微生物的作用下发生了酶促及非酶促氧化,可以形成银杏叶的特殊色香味,减少苦涩感,降低银杏酸质量分数,制备的发酵型银杏叶可直接饮用,或制成银杏叶提取物供药用或食用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

银杏叶:采集于山东商业职业技术学院叶用银杏林教学科研实验基地;芦丁:北京百灵威科技有限公司产品;白果新酸:森贝伽生物科技公司产品;银杏酸 A($C_{15:0}$,$C_{17:1}$)、银杏酸 B($C_{13:0}$,$C_{15:1}$,$C_{17:2}$):编号 111594-201304,中国食品药品检定研究院提供。

1.2 仪器与设备

立式压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂产品;FA1004 型分析天平:上海良平仪器仪表有限公司产品;TES1310 快速电子测温仪:苏州特安斯电子有限公司产品;UV-2100 型紫外可见分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品;DHG-9000 型电热鼓风干燥箱:上海高致精密仪器有限公司产品;1200 型高效液相色谱仪:美国安捷伦公司产品。

1.3 银杏叶的渥堆发酵

1.3.1 渥堆发酵 称取银杏鲜叶 55 kg,经清洗、晾晒处理,使其水分质量分数维持在 45 %,将银杏叶置于灭菌锅内,升温至 100 ℃,汽蒸杀青 10 min,趁热将银杏叶堆积在渥堆室中,整堆,茶堆内部要松紧适当,边缘筑紧,茶堆尺寸长宽高为 70 cm×70 cm×55 cm,上面加盖湿布,利于保温保湿,随时监测堆内温度及空气温、湿度变化,并取样测定银杏叶的含水量。堆内温度升至 50~60 ℃时,保温一段时间,翻堆。根据银杏叶的色香味等来评判发酵进程,最后将渥堆结束的银杏叶置于灭菌锅内,100 ℃汽蒸 10 min,室外晒干。

1.3.2 温、湿度及含水量的测定 堆内温度:将电子测温仪探针插入茶堆内部 30 cm 处,测 3 处不同位置,取平均值,并记录数据;空气温、湿度:利用加热器及加湿器控制渥堆室温湿度,并用温湿度计监测温湿度的变化;银杏叶含水量:用镊子取茶堆内部 25~35 cm 处的银杏叶,每 4 h 取样一次,银杏叶含水量按 GB/T8304-2002 第二法测定,并将银杏叶做样品保存。

1.3.3 银杏叶的感官审评 聘请有银杏叶茶品评经验的 8 位品尝员参照 GB/T23776-2009 对银杏叶样品进行感官审评,记录审评结果。

1.4 银杏叶中黄酮质量分数的测定

1.4.1 供试品溶液的制备 将渥堆样品粉碎至 40 目,分别精密称取 5 g,用体积分数 50%乙醇,按固液质量体积比 1 g:8 mL,放入索氏提取器中回流提取 4 h,抽滤得提取液。

1.4.2 标准曲线的绘制 参照文献[9],称取芦丁 10 mg,50 %的乙醇溶解定容于 50 mL 容量瓶中。吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 加入 10 mL 容量瓶中,50%的乙醇补充至 5 mL,加入 0.3 mL 质量分数 5%的 $NaNO_2$,摇匀,放置 5 min 后加入 0.3 mL $Al(NO_3)_3$,6 min 后加入 2 mL 1 mol/L 的 NaOH,混匀,用体积分数 50%的乙醇稀释至刻度,10 min 后于波长 510 nm 处进行比色测定。以 0 为对照,以浓度 C 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $A=11.1C+0.033$,$r=0.998\ 8$,质量浓度在 0.001 2~0.04 g/L 范围内有良好的线性关系。

1.4.3 银杏叶中黄酮质量分数的测定 取银杏叶

提取液适量,加入 10 ml 容量瓶中,按 2.2.2 中的方法操作,测定银杏叶中黄酮的质量分数。

1.5 银杏叶中银杏酸的测定

1.5.1 供试品溶液的制备 将渥堆样品粉碎至 40 目,称取 1 g 于 100 mL 三角瓶中,加入 20 mL 甲醇,超声辅助提取 50 min(超声频率 40 kHz),冷却后称取质量,并用甲醇补足损失的质量,5 000 r/min 离心 10 min,滤液用微孔滤膜过滤,得供试品溶液。

1.5.2 对照品溶液的制备 银杏酸 A、银杏酸 B 以 1:2 的质量比加入到 10 mL 容量瓶中,甲醇定容,得总银杏酸定位用溶液。精密称取 9.9 mg 白果新酸,用甲醇定容至 10 mL,作为对照品溶液。

1.5.3 HPLC 检测条件 色谱柱,安捷伦 ZORBAX,4.6 mm×250 mm,5 μm;流动相,*V*(甲醇):*V*(体积分数 1%冰醋酸)=90:10;流量,1.0 mL/min;柱温,40 ℃;紫外检测波长,310 nm;进样量,20 μL。

1.5.4 总银杏酸含量的测定 精密吸取供试品溶液、定位用溶液、对照品溶液,注入液相色谱仪,计算供试品溶液中与总银杏酸定位用溶液色谱峰的总面积,以白果新酸对照品,外标法计算总银杏酸含量。

2 结果与讨论

2.1 银杏叶茶的制备

渥堆技术最早应用在黑茶(如湖南黑茶、云南普洱茶、四川边茶、广西六堡茶等)中,是形成黑茶品质的关键工序,可以促使鲜叶通过一定程度的发酵,形成叶色黑润、香气纯正、滋味醇和、汤色明亮的品质特征,并可通过微生物、湿热作用的转化形成黑茶的功效成分[10]。为了减少银杏叶的苦涩感,并提高其品质,作者即采用渥堆技术处理银杏叶,经过数天的发酵,当银杏叶由黄色变为棕褐色,青涩气消除,叶坯出现黏汁,发出醇香,即为渥堆适度,渥堆发酵时间为 8 d,最后进行晾晒处理后,得发酵型银杏叶。渥堆前后的银杏叶如图 1 所示。如图 1(a)、(b)所示,渥堆后,银杏叶的色泽发生了明显的变化,从亮黄色变为棕褐色,形成了具有独特色泽的银杏叶茶。

2.2 银杏叶的渥堆发酵进程

银杏叶茶品质的好坏与环境条件有较大的关系,要保持适宜的环境温、湿度,温、湿度过高或过低都不利于渥堆发酵的进行。渥堆过程中最为关键性的因素是银杏叶的含水量以及堆内温度。控制适宜的含水量,含水量太高,容易滋生腐败菌,银杏叶易酸馊而软烂;含水量太低,微生物生长缓慢,且不利于湿热作用的进行。随着氧化的进行及微生物的生长代谢,堆内温度不断升高,堆内温度较高时进行翻堆处理,否则容易"烧芯";温度低于 40 ℃时,注意保温处理,否则容易滋生大量黑曲霉和青霉。渥堆进程曲线如图 2 所示。



(a)渥堆前银杏叶



(b)渥堆后银杏叶

图 1 银杏叶渥堆前后的对比图

Fig. 1 Comparison of *Ginkgo biloba* leaves before and after pile-fermentation

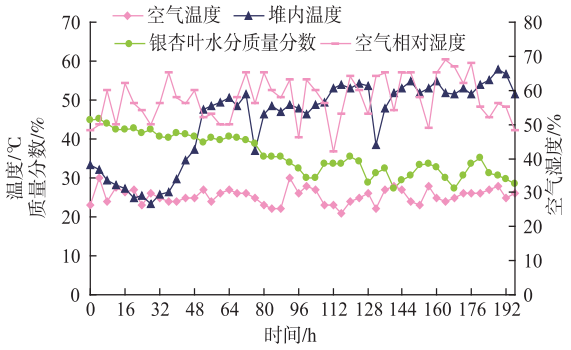


图 2 渥堆发酵进程曲线

Fig. 2 Pile-fermentation course curve of Ginkgo biloba leaves

渥堆发酵进程曲线如图 2 所示,室内温度维持在 23~30 ℃,空气相对湿度维持在 50%~70%,空气温、湿度条件基本满足渥堆过程中微生物的生长需

求。渥堆初始,堆内温度较高,为汽蒸余热,稍后有小幅度下降。在 40 h 时堆内温度开始快速上升,观察发现,此时堆表有霉菌生长,但茶堆内部没有霉菌生长,由于内部温度较高,抑制了霉菌的生长。温度上升后,保持一定时间开始翻堆,整个过程翻堆两次,翻堆时打散茶坯,将边上茶坯翻入中心。翻堆时间在 76、132 h, 翻堆后堆内温度有较大下降,但在很短的时间温度上升,温度最高可达到 58 ℃。银杏叶的初始含水量为 45%, 在渥堆开始的 72 h,银杏叶含水量变化缓慢,只有小幅度下降,翻堆后含水量有所降低,此时做洒水处理,使水分质量分数保持在 30%~35%。整个过程中严格控制各参数,以保证渥堆发酵的顺利进行。

2.3 渥堆过程中堆样感官审评

在渥堆过程中,由含水量、叶温、微生物等的共同作用,银杏叶的色香味发生着不同的变化。从审评结果看(表 1),随着渥堆的进行,叶色由黄色变为棕褐色,条索变得更加紧结,汤色橙红明亮,香气由原来的略带青草气变为醇香中略带淡淡草药香,滋味由单一苦涩转为醇和,叶底由黄色较整变为棕褐明亮。由此可见,经过渥堆发酵,银杏叶的感官品质发生了一定的变化,口感尚佳,适于饮用。

表 1 不同发酵时间银杏叶的感官审评结果

Table 1 Results of sensory evaluation of *Ginkgo biloba* leaves at different times during fermentation

渥堆时间/d	外形	汤色	香气	滋味	叶底
0	疏松,黄色	浅黄	略带青草气	单一苦涩	黄色,较整
2	欠紧结,暗黄	浅黄	略带青草气	淡稍涩	黄色
4	尚匀整,黄褐	橙黄欠亮	清苦,略带醇香	微苦	黄褐
6	紧结,棕褐	橙黄明亮	醇香,略带草药香	微涩醇和	棕褐,欠明亮
8	紧结,棕褐油润	橙红明亮	醇香,淡淡草药香	醇和	棕褐明亮

2.4 渥堆过程中黄酮含量的变化

渥堆过程中复杂的物质转化,主要来自于茶叶中的微生物,微生物类群包括黑曲霉、青霉、根霉、酵母菌、细菌等,多数研究认为黑曲霉是优势菌群,发挥主要作用,酵母菌其次[11]。在银杏叶茶的渥堆中发现黑曲霉亦最多。黑曲霉能产生多种酶,果胶酶、葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶等,可以分解多糖、蛋白质、果胶和水不溶性化合物等有机物,形成其它化合物[12]。银杏叶在微生物的作用下,其内含成分—黄酮发生了一定的变化,变化趋势如图 3 所示。

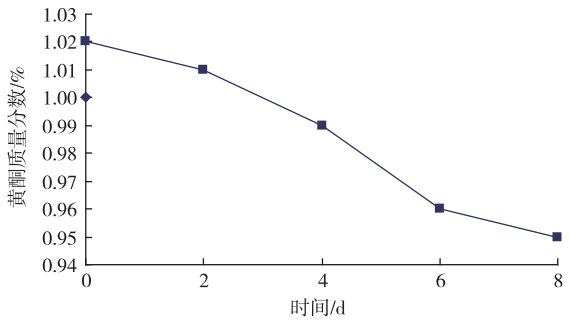


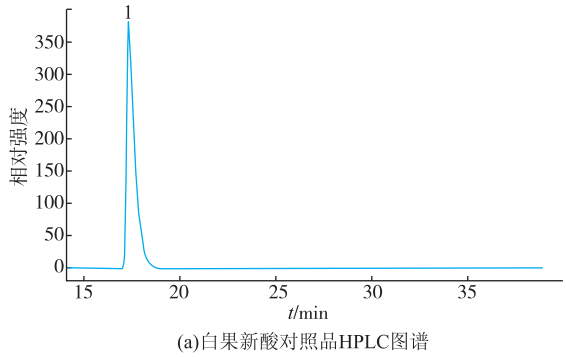
图 3 渥堆发酵过程中总黄酮质量分数的变化曲线

Fig. 3 Change curve of total flavonoids in the process of pile-fermentation

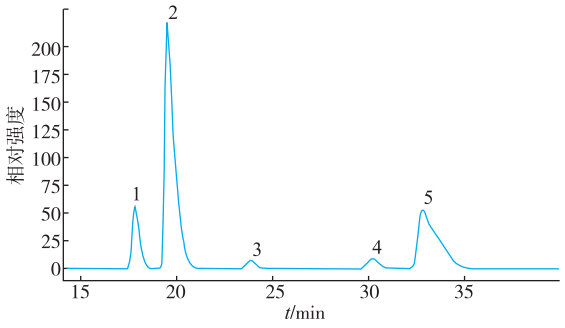
由图 3 可见,渥堆开始时,银杏叶中总黄酮的质量分数为 1.02%,随着渥堆的进行,总黄酮的质量分数呈现下降的趋势,在第 4~6 d,下降速度最快,此时也是微生物数量最多、代谢活动最剧烈的时期。至发酵结束时,总黄酮的下降率为 6.86%。银杏黄酮是银杏叶中的生理活性物质,虽然质量分数有所降低,但是,在微生物胞外酶的作用下,使黄酮发生了转化、降解等反应,可能生成了更具活性的物质,机理需进一步的研究探讨。

2.5 渥堆发酵过程中总银杏酸质量分数的变化

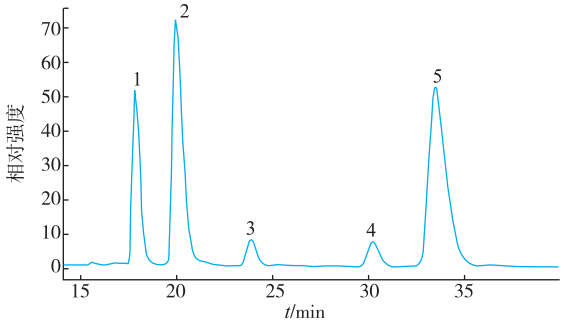
按 2.3 中的方法测定, 以总银杏酸作为定位用对照品,以白果新酸为对照品外标法测总银杏酸的含量。色谱图见图 4。



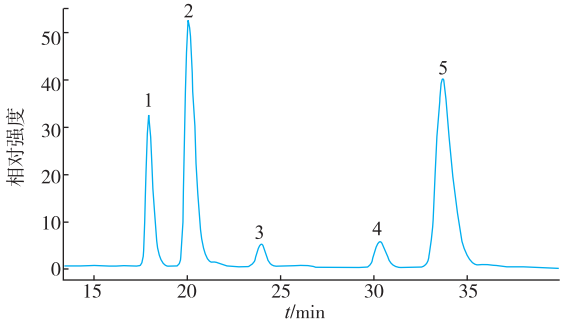
(a)白果新酸对照品HPLC图谱



(b)银杏酸定位用溶液HPLC图谱



(c)渥堆前银杏叶样品HPLC图谱



(d)渥堆后银杏叶(8 d)样品HPLC图谱

1.白果新酸;2~5.其它 4 种银杏酸

图 4　银杏叶提取物的高效液相色谱图

Fig. 4　HPLC Chromatograms of *Ginkgo biloba* extract

从高效液相色谱图 4(c、d)两图可以看出,渥堆后银杏叶中的总银杏酸明显减少。根据标准品 HPLC 图谱 4(a、b),计算出银杏叶渥堆各时期总银杏酸的质量分数，总银杏酸的质量分数变化如图 5 所示,随着渥堆发酵的进行,总银杏酸的质量分数逐渐降低,0~6 d 银杏酸的质量分数变化较小,6~8 d 银杏酸迅速下降,最终下降率达到 29.08%。在渥堆中后期银杏酸的质量分数才开始减少,显然这些变化都与微生物的变化有关系的,可能是微生物在生长过程中利用代谢银杏酸,将这种有毒物质分解掉。因此,渥堆发酵达到了降低总银杏酸质量分数的目的。

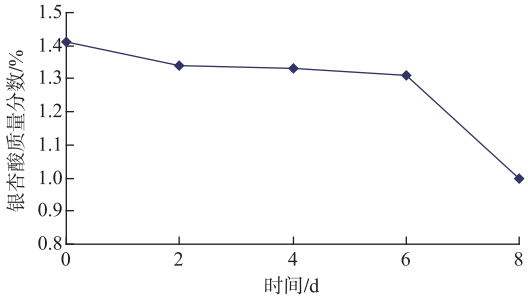


图 5　渥堆发酵过程中银杏酸的质量分数变化曲线

Fig. 5　Change curve of *Ginkgolic acids* in the process of pile-fermentation

3 结　语

渥堆发酵宜采用较粗老原料,不易渥烂。作者采集 11 月下旬的银杏叶，此时银杏叶黄色，较粗老,利于渥堆发酵的进行。渥堆后,口感发生了明显的改善,苦涩感消失,滋味醇和,色香味等各方面均优于普通市售银杏茶,更符合大众口味,说明渥堆处理方式可作为以后银杏叶大规模开发利用的方法。利用紫外分光光度法测定,银杏黄酮含量从最初的 1.02%下降到 0.95%,下降率为 6.86%,但从整个发酵 8d 的时间来看,下降率较小。HPLC 法测定银杏酸含量，从 1.41%下降到 1.0%，下降率达 29.08%,因此增加了发酵型银杏叶的质量品质。另外，由于发酵型银杏叶中银杏酸含量有较大的下降,其后续经过分离提取制备的 EGb 中银杏酸的含量势必减少,提高了银杏叶制剂的安全性。

参考文献:

[1] 王新雯. 银杏叶黄酮类化合物的提取、分离纯化及其生物活性研究[D]. 桂林:桂林理工大学,2010.

[2] WU Xiangyang,YANG Liuqing,CHEN Jun. Determination of the contents of gingolic acids in leaves of *Ginkgo biloba* collected within different vegetative periods[J]. **Food Sicence**,2002,23(12):94-97.(in Chinese)

[3] DENG Guichun,WANG Xin,ZHAO Liyan,et al. Spectrophotometric determination of total flavonoids in *Ginkgo leaves* [J]. **Journal of Liaoning University**,2005,32(2):101-104.(in Chinese)

[4] KOCH E，JAGGY H，CHATTERJEE S S. Evidence for immunotoxic effects of crude *Ginkgo biloba* L.1eaf extracts using the popliteal lymph node assay in the mouse[J]. **Int J Immunopharmacol**，2000，22：229-236.

[5] JAGGY H，KOCH E. Chemistry and biology of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L.[J]. **Pharmazie**，1997，52(10)：735-738.

[6] BARON R G，LUEPKE N P. Evidence for toxic effects of alkyl phenols from *Ginkgo biloha* in the hen′ s egg test (HET)[J]. **Phytomedicine**，2001，8(2)：133-138.

[7] HECKER H，JOHANNISSON R，KOCH E，et al. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkyl phenols from *Ginkgo bilobs* L.[J]. **Toxicology**，2002，177(2-3)：167-177.

[8] YANG Liuqing，WU Xiangyang，CHEN Jun. HPLC determination of Ginkgolic acids in fruits of *Ginkgo biloba* [J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**，2004，24(6)：636-639.(in Chinese)

[9] ZENG Fanjun，CHEN Songbo，ZENG Li，et al. Study on an improved ultraviolet spectrophotometry for determining genaral flavone of *Gingo biloba* L.[J]. **Food Science**，2003，24(11)：102-104.(in Chinese)

[10] ZHANG Dachun，WANG Dengliang，GUO Qin. Research progress on pile-fermentation of dark tea[J]. **China Tea**，2002，24(5)：6-8.(in Chinese)

[11] YANG Fulin，DENG Fangming，ZHAO Lingyan，et al. Development of black tea microbiology [J]. **Journal of Microbiology**，2006，26(1)：81-84.(in Chinese)

[12] WEN Jieyu，LI Zongjun，WANG Yuanliang，et al. Fermentation microorganisms and their healthcare function in black tea[J]. **Food Science**，2010，31(9)：329-332.(in Chinese)

科　技　信　息

欧盟发布蛋白质健康声明的评估意见

2017 年 6 月 13 日，欧盟发布在限制摄取能量和减少体重的情况下蛋白质比例≤1.8 的健康声明的评估意见。根据 Marks 和 Spencer PLC 的申请，经由英国主管机关提交的依照(EC)第 1924/2006 号条例第 13(5)条授予卫生要求的食品，EFSA 营养产品，营养和过敏要求(NDA)在限制饮食能量和体重的背景下就能量基础上的 CHO：P 比值≤1.8 的健康声明的科学证据发表意见。

根据所提交的数据，得出结论：(一)在能量限制饮食背景下消耗的能量基础上的固定 CHO：P 比≤1.8 是充分表征的。(二)申请人提出的要求赔偿的效果是“在能量受限条件下减少总体重”。在能量限制饮食的背景下减轻体重是有益的生理效应。(三)在能量限制饮食背景下消耗的能量基础的 CHO：P 比值≤1.8 与体重减轻之间的因果关系尚未确定。

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 欧盟发布蛋白质健康声明的评估意见 [EB/OL]. (2017-6-21). http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=54670