

UNIWERSYTET MORSKI W GDYNI

WYDZIAŁ ZARZĄDZANIA I NAUK O JAKOŚCI

KATEDRA ZARZĄDZANIA JAKOŚCIĄ



**INNOWACYJNE METODY OKREŚLANIA JAKOŚCI
I BADANIA AUTENTYCZNOŚCI HERBAT PU-ERH**

Kaja Katarzyna Karwowska

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Maria Śmiechowska

Promotor pomocniczy: Dr hab. inż. Przemysław Dmowski, prof. UMG

Gdynia 2021

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i pojęć	4
Wstęp.....	6
1. Definicja i rodzaje herbaty	9
2. Charakterystyka towaroznawcza herbaty Pu-erh	12
2.1. Pochodzenie	12
2.2. Kształtowanie jakości herbaty na etapie uprawy i zbioru	13
2.3. Surowiec wykorzystywany do produkcji herbaty Pu-erh.....	18
2.4. Obróbka technologiczna surowca i jej wpływ na jakość produktu końcowego	20
3. Jakość produktu i jego wpływ na zdrowie konsumenta.....	29
3.1. Związki bioaktywne i ich przemiany w trakcie produkcji herbaty Pu-erh.....	29
3.2. Wpływ spożywania herbaty Pu-erh na organizm człowieka.....	34
4. Autentyczność i potrzeba identyfikacji herbaty Pu-erh	41
4.1. Rynek herbaty Pu-erh	42
4.2. Regulacje prawne dotyczące herbaty Pu-erh.....	44
4.3. Autentyczność herbaty Pu-erh.....	46
4.4. Metody identyfikacji herbaty Pu-erh	49
5. Cel, założenia i hipotezy badawcze	60
6. Materiał i metody badań	62
6.1. Charakterystyka badanego materiału.....	62
6.2. Przygotowanie prób do analiz	70
6.3. Metody badawcze	70
6.3.1. Oznaczenie parametrów barwy badanych naparów	70
6.3.2. Pomiar zawartości związków polifenolowych.....	71
6.3.3. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej	72
6.3.4. Oznaczenie zawartości kofeiny, teobrominy, teofiliny, kwasu galusowego i teogaliny	72
6.3.5. Pomiar zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego	73
6.3.6. Oznaczenie ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu oraz w naparach	73
6.3.7. Pomiar widma fluorescencyjnego	75
6.4. Analiza statystyczna	76
7. Wyniki badań i dyskusja	77
7.1. Oznaczenie parametrów barwy naparów.....	77

7.2. Pomiar zawartości związków polifenolowych	83
7.3. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej	89
7.4. Oznaczenie zawartości kofeiny, teobrominy, teofiliny, kwasu galusowego i teogaliny	96
7.5. Pomiar zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego	109
7.6. Oznaczenie ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu oraz w naparach	114
7.7. Analiza skuteczności zastosowanych narzędzi badawczych.....	123
7.8. Pomiar widma fluorescencyjnego	125
8. Podsumowanie i wnioski	137
9. Bibliografia	141
Spis tabel	161
Spis rysunków	162
Streszczenie w języku polskim	164
Streszczenie w języku angielskim.....	166
Dokumentacja pracy.....	168

Wykaz stosowanych skrótów i pojęć

ABTS – sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)

A.U. – jednostki niemianowane

C – (+)-katechina

CAA – test mierzący komórkową aktywność przeciwutleniającą

CBA – metoda odbarwienia krocyny

CUPRAC – metoda oznaczania zdolności do redukowania jonów miedzi (II)

DMPD – dichlorowodorek dimetylo-p-fenylenodiaminy

DPPH – 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl

EC – (-)-epikatechina

ECG – galusan (-)-epikatechiny

EGC – (-)-epigalokatechina

EGCG – galusan (-)-epigalokatechiny

FCR – odczynnik Folin-Ciocalteu

FIC – metoda oznaczania zdolności do chelatowania jonów żelaza (II)

FRAP – metoda oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza (III)

GABA – kwas gamma-aminomasłowy

GC – (+)-galokatechina

GCG – galusan (-)-galokatechiny

Gong fu – chińska sztuka parzenia herbaty, pozwalająca uzyskać z jednej porcji herbaty wiele naparów (w przypadku Pu-erh – nawet kilkanaście)

IC₅₀ – stężenie próby wymagane do zneutralizowania 50% wolnych rodników

kDa – kilodalton, jednostka masy atomowej

KOF – kofeina

KW – kwas galusowy

LPIC – metoda oznaczania inhibicji utlenienia frakcji LDL

Maocha – suszone na słońcu liście *Camellia sinensis* var. *assamica*

Men-dui – etap fermentacji nieenzymatycznej, charakterystycznej dla herbat żółtych

ORAC – metoda oznaczania zdolności absorpcji rodników tlenowych

SARSA – metoda oznaczania zdolności wychwytywania anionów nadtlennokowych

SD – odchylenie standardowe

TB – teobromina

TEAC – ekwiwalent potencjału przeciwutleniającego troloksu w reakcji z odpowiednim rodnikiem

TF – teofilina

TG – teogalina

TOSC – metoda oznaczania całkowitej zdolności wychwytywania rodników tlenowych

TR – tearubigina

TRAP – metoda oznaczania całkowitej zdolności zmiatania wolnych rodników

Wstęp

Herbata jest po wodzie najczęściej spożywanym napojem na świecie. Uwzględniając obróbkę technologiczną surowca, można ją podzielić na sześć zasadniczych rodzajów: zielone, białe, żółte, szmaragdowe, czarne, ciemne. Ostatnią w tym podziale grupę stanowią herbaty produkowane w większości jedynie na rynek azjatycki i wyróżnia je etap fermentacji mikrobiologicznej. Najbardziej znanym przedstawicielem herbat ciemnych jest herbata Pu-erh, produkowana wyłącznie w niektórych regionach chińskiej prowincji Yunnan. Ze względu na swoje walory sensoryczne, prozdrowotne i czynniki społeczno-kulturowe Pu-erh zyskała dużą popularność nie tylko w Chinach, ale także w Europie.

Herbatę Pu-erh można podzielić na dwa rodzaje: surową (*Raw*, *Sheng*) i sztucznie postarzaną (*Ripe*, *Shu*). Surowa Pu-erh jest przetwarzana jak typowa zielona herbata, a podczas przechowywania poddawana jest naturalnemu procesowi leżakowania. Ripe Pu-erh różni się od surowej Pu-erh dodatkowym etapem tzw. sztucznego postarzenia, który został wprowadzony w celu skrócenia procesu produkcyjnego. Takie różnice w obróbce technologicznej surowca prowadzą do otrzymania produktów o różnych profilach chemicznych i sensorycznych. Tradycyjna herbata Pu-erh, to wersja Raw poddana procesowi wieloletniego dojrzewania – nazywana jej wówczas *Vintage Raw Pu-erh*. W przypadku tego produktu wraz z wydłużaniem okresu dojrzewania jego cena rośnie. Najlepsze egzemplarze tej herbaty nie są dostępne w sklepach a na specjalnych aukcjach, na których osiągają bardzo wysokie ceny (liczone w tysiącach dolarów). W związku z tym pojawia się duża sposobność do pomnażania środków finansowych w nielegalny sposób, czyli poprzez sprzedawanie produktów zafałszowanych.

Fałszowanie herbaty może polegać na: mieszaniu tańszego surowca z droższym i informowaniu jedynie o surowcu lepszej jakości, podawaniu nieprawdziwych informacji o pochodzeniu produktu, zawyżaniu wieku herbaty oraz podawaniu nieprawdziwych informacji o rodzaju herbaty.

Rozróżnienie Raw i Ripe Pu-erh nie jest trudne, jeśli wersja Raw jest stosunkowo młoda. Jednak w przypadku *Vintage Raw* oraz wysokiej jakości Ripe Pu-erh różnice nie są już tak oczywiste. Potwierdzenie pochodzenia danej herbaty, jej rocznika i typu należy do mistrzów herbaty. Możliwe jest, że gdy na rynku pojawi się wyjątkowy egzemplarz herbaty Pu-erh, to wiedza a przede wszystkim doświadczenie nowych specjalistów okaże się niewystarczające do potwierdzenia autentyczności prezentowanego produktu. Mimo iż osoby związane z aukcjami herbaty nie widzą takiej potrzeby, to naukowcy nadal poszukują niezawodnej metody służącej

do identyfikacji różnych rodzajów herbat, określania pochodzenia surowca czy szacowania wieku herbaty.

W związku z powyższym celem pracy była próba określenia parametrów, pozwalających na identyfikację rodzajów herbaty Pu-erh.

Dokonując przeglądu dostępnej literatury, zauważono, iż autorami większości artykułów dotyczących herbat Pu-erh byli naukowcy, pochodzący z azjatyckich ośrodków naukowych. Duża część tych prac została wydana jedynie w ojczystym języku autorów. Ze względu na specyfikę języka ich dostępność dla autorki niniejszej dysertacji była utrudniona. Nieliczne pozycje krajowe zawierały w głównej mierze zestawienia wyników badań dla różnych rodzajów herbat i herbatek i nie zawierały nawet ogólnych informacji o rodzajach Pu-erh, metodach ich produkcji czy tym bardziej surowcu pozyskiwanym do ich otrzymania. Poza tym w opracowaniach krajowych nadal przedstawiany jest niepełny podział rodzajów herbat, uwzględniający technologię obróbki surowca.

Zauważono również, że w pracach badawczych, w których materiał badany stanowiła herbata Pu-erh, ponad 60% prac nie posiadało informacji o rodzaju wykorzystanego Pu-erh czy jego roczniku – co ma bardzo istotny wpływ na skład biochemiczny produktu, a także jego właściwości. W takim przypadku część posiadanych publikacji nie mogła zostać wykorzystana do przygotowania niniejszej pracy, ponieważ nie można było jednoznacznie stwierdzić, jaki produkt został poddany analizie.

Na podstawie własnych obserwacji stwierdzono, że w ciągu ostatnich kilkunastu lat oferta herbat Pu-erh na trójmiejskim rynku nie uległa istotnej zmianie. Produkty dostępne w dyskontach oraz sklepach wielkopowierzchniowych zawierają na swoich opakowaniach niepełne informacje o produkcie lub są one tak sformułowane, że mogą wprowadzić konsumenta w błąd. Bardzo często jest to pierwsze i jedyne źródło takich informacji, co nie tylko skutkuje brakiem wiedzy konsumentów, ale również nie dostarcza konsumentowi pełnej wiedzy o produkcie, a zwłaszcza o różnych rodzajach herbaty Pu-erh.

Kolejnym powodem dla podjęcia niniejszej tematyki jest to, że herbaciarnie są sklepami specjalistycznymi i powinny (teoretycznie) dawać możliwość zapoznania się konsumentowi z różnymi rodzajami herbaty z różnych regionów świata. Niestety w herbaciarniach spora część sprzedawców nie potrafi powiedzieć jaki typ Pu-erh sprzedaje twierdząc, że jest to produkt najwyższej jakości. Jeśli takie sklepy nie posiadają w swojej ofercie wersji tradycyjnej tego produktu, to można przypuszczać, że zdecydowana większość konsumentów herbaty nie zna i nie miała możliwości nawet spróbować wersji Raw Pu-erh. Osoby interesujące się tym produktem mogły go zakupić w specjalistycznych sklepach internetowych.

Mając to na uwadze kolejnym celem pracy była ocena jakości herbaty Pu-erh dostępnej na polskim rynku w aspekcie jej autentyczności.

Niniejsza rozprawa ma charakter interdyscyplinarny i jest pierwszym, kompleksowym krajowym opracowaniem, które systematyzuje wiedzę na temat jakości i autentyczności herbat Pu-erh oraz zbiera najważniejsze informacje o wpływie regularnego spożywania jej naparów na zdrowie konsumenta. Opracowanie to wypełnia lukę empiryczną związaną z brakiem podstawowych badań w zakresie porównawczej oceny jakości naparów Raw i Ripe Pu-erh. Stanowi również próbę realizacji kierunku badań, na którym środowisko naukowe powinno się skupić, czyli na opracowaniu metod, służących do identyfikacji i potwierdzania autentyczności herbat Pu-erh. Mimo iż opracowano już wiele metod różnicujących herbatę Raw i Ripe Pu-erh, to wykazują one różną skuteczność i uznawane są za skomplikowane oraz kosztowne. Z informacji płynących z rynku aukcyjnego wynika, że oczekuje się prostych, szybkich i tanich metod identyfikujących poszczególne rodzaje herbaty Pu-erh dla potwierdzenia ich autentyczności.

1. Definicja i rodzaje herbaty

Pod pojęciem „herbata” należy rozumieć zarówno liście, pączki liściowe i delikatne łodyżki odmian gatunku botanicznego *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, wyprodukowane z zastosowaniem uznanych metod produkcji i służące do przygotowania herbaty jako napoju. Dodatkowo jako herbatę uznaje się napoje przygotowane poprzez zalanie gorącą wodą suszu herbacianego (International Food Information Service 2009; PN-ISO 6078:1996). Tak więc prawdziwa herbata jest otrzymywana tylko i wyłącznie z rośliny *Camellia sinensis*. W innym przypadku nie jest to herbata, a herbatka, którą stanowi napar z liści, korzeni, kory, nasion lub kwiatów innych roślin (np.: ziołowe, owocowe, rooibos, yerba mate).

Podstawę klasyfikacji herbat może stanowić kraj jej pochodzenia, termin zbioru surowca, klasa jakości, forma, jednak najważniejszy jest podział, uwzględniający ich proces produkcyjny. Biorąc pod uwagę stopień fermentacji, w większości państw obowiązuje klasyfikacja uproszczona, obejmująca herbaty: niefermentowane (zielona), częściowo fermentowane (oolong) oraz całkowicie sfermentowane (czarne) (Fung i in. 2009; Lee i in. 2011). W ten sposób herbaty żółte, oolong i Pu-erh tworzą jedną, dużą i bardzo zróżnicowaną grupę. O ile herbaty oolong charakteryzuje szeroki zakres stopnia utlenienia liści, tak herbaty Pu-erh przechodzą proces długiej fermentacji mikrobiologicznej, który nie występuje w żadnej innej herbacie¹. Podział ten jest bardzo ogólny i nie pokazuje pełnego zróżnicowania herbat. Jego zastosowanie było słuszne w czasach, gdy największą popularnością cieszyły się herbaty czarne i zielone, a pozostałe nie były jeszcze znane konsumentom europejskim. Obecnie świadomość konsumentów stale rośnie, dzięki czemu również inne rodzaje herbaty zostały zauważone. Stąd zaprezentowany podział można uznać jedynie za podstawę do bardziej szczegółowej klasyfikacji, która lepiej oddaje różnorodność herbat.

W 1979 roku Chen Chuan, przyjmując jako kryterium obróbkę liścia krzewu herbacianego, po raz pierwszy zaprezentował podział herbat na sześć, następujących rodzajów:

- zielone – w których proces utleniania polifenoli katechinowych jest na minimalnym poziomie, ponieważ zostaje zahamowany we wstępnym etapie obróbki;
- białe – w których dochodzi do lekkiego utlenienia na poziomie 10-15%;
- żółte – charakteryzujące się częściowym i dwuetapowym utlenianiem katechin;

¹ Tak naprawdę żadna z chińskich herbat nie jest poddawana procesowi fermentacji, a utleniania. Jednak przy herbacie Pu-erh używa się określenia „fermentowana” ze względu na przyjęte w technologii uproszczenie, że proces rozpadu substancji organicznych spowodowany działaniem enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy, zachodzący w warunkach tlenowych, również może być nazywany fermentacją.

- szmaragdowe – w których poziom utlenienia polifenoli katechinowych może wynosić od 15 do 80% - nazywane herbatami oolong;
- czerwone – w których poziom utlenienia katechin osiąga poziom powyżej 90%;
- czarne – (hei-cha) zwane również późno fermentowanymi lub dojrzewającymi, które przechodzą fermentację nieenzymatyczną (Chuan 1981).

Podział ten odnosi się do stopnia oksydacji składników obecnych w surowcu, prowadzącego do uzyskania wyjątkowych walorów sensorycznych końcowego produktu.

Herbaty zielone uznawane są za najmniej przetworzone, ponieważ naturalny proces oksydacji enzymatycznej jest kończony tak szybko, jak to możliwe. Kolejne trzy rodzaje (białe, żółte, oolong) zaliczane są do grupy herbat częściowo utlenionych, wśród których najprostszym, a zarazem najkrótszym procesem produkcyjnym charakteryzują się herbaty białe, gdzie surowiec jest poddawany jedynie suszeniu na słońcu. Ten rodzaj herbat wyróżnia dodatkowo wykorzystany do produkcji surowiec, który stanowią pąki liściowe oraz młode listki, dzięki czemu przygotowane z nich napary są bardzo delikatne. W trakcie wytwarzania herbat żółtych naturalny proces oksydacji jest kończony zaraz po zbiorze surowca, a liście poddawane są procesowi fermentacji nieenzymatycznej (*men-dui*), podczas którego zachodzi kontrolowana oksydacja. Etap ten polega na kilkukrotnym powtarzaniu procesów podgrzewania liści, studzenia ich oraz suszenia. Ostatnim rodzajem herbat częściowo utlenionych są herbaty oolong. Ta grupa jest najbardziej różnorodna, ponieważ występują w niej herbaty z oksydacją na poziomie 15% (jasne), a także takie, w których proces utlenienia wynosi niemal 80% (ciemne). Specyficznym etapem w procesie produkcyjnym jest podrzucanie liści w celu kruszenia ich krawędzi i uzyskania większej powierzchni do utleniania. W przypadku ciemnych herbat oolong końcowym etapem jest prażenie liści. Poprzez modyfikację czasu trwania tego etapu oraz wielokrotne jego powtarzanie, uzyskuje się pożądaną końcową głębię smaku (Mao 2013; Tomczyk 2009). Kolejną grupę herbat, charakteryzującą się największym stopniem utlenienia składników, stanowią herbaty określane w nomenklaturze europejskiej jako czarne, natomiast w Azji nazywane herbatami czerwonymi. Na rysunku 1.1 przedstawiono podział herbat z uwzględnieniem najważniejszych etapów ich procesu produkcyjnego. Ostatnią grupę stanowią herbaty nazywane „post-fermented” lub „dark”, wyróżniające się na tle pozostałych rodzajów procesem fermentacji mikrobiologicznej. Ich roczna produkcja jest stosunkowo niewielka, ponieważ stanowią produkty tradycyjne i regionalne, które do niedawna były przeznaczone wyłącznie na rynek azjatycki. Jedynym znanym w Europie ich przedstawicielem jest Pu-erh. Gwałtowny wzrost zapotrzebowania na ten produkt skutkowało skróceniem wieloletniego procesu produkcyjnego. W tych

okolicznościach została opracowana metoda *wo-duit*, dzięki której zaspokajane jest stale rosnące zapotrzebowanie rynku światowego na ten rodzaj herbaty. Jednak ze względu na zmianę parametrów produkcji, jakość tej herbaty jest odmienna od wzorca – czyli tradycyjnej jej wersji. Rodzaje Pu-erh oraz ich procesy produkcyjne opisano w rozdziale 2.4.



Rys. 1.1 Klasyfikacja herbat ze względu na proces produkcyjny

Źródło: opracowanie własne na podstawie <http://www.riyang-teayard.com/about-tea/>

2. Charakterystyka towaroznawcza herbaty Pu-erh

2.1. Pochodzenie

Historia herbaty Pu-erh nieodłącznie związana jest z historią prowincji Yunnan, politycznymi i militarnymi relacjami Chin z Tybetem i ekspansją tego rejonu przez Chiny. Płaskowyż Yunnan-Guizhou jest przedłużeniem Płaskowyżu Tybetańskiego, więc wymiana kulturowa między ośrodkami handlowymi Tybetu, Yunnanu i Sichuanu była naturalna, co niewątpliwie przyczyniło się do poznania herbaty przez Tybetańczyków. Historycy uważają, iż miało to miejsce w VII wieku, kiedy Królestwo Tybetańskie *Tubo* podbiło obecne prefektury Dali, Lijiang i inne części Yunnanu. Rozwój nowego Imperium Tybetańskiego wymusił na Chinach dialog i kontakt ze stolicą. Po wielu naciskach ze strony tybetańskiego władcy postanowiono zawrzeć sojusz polityczny, polegający na małżeństwie chińskiej księżniczki Wencheng z królem Tybetu – Songtsan Gampo. Istnieją doniesienia, że księżniczka przywiozła do Lhasy (stolicy Tybetu) herbatę jako część swojego posagu (Freeman i Ahmed 2015).

Tybetańczycy szybko odkryli prozdrowotne właściwości herbaty i zaczęła ona konkurować z naparami z roślin występującymi endemicznie w Tybecie. Herbata w tej części świata nie występowała natywnie, a ponieważ zapotrzebowanie na nią rosło, szukano sposobu zapewnienia ciągłości dostaw. W tym czasie Chiny borykały się z ciągłymi najazdami i potrzebowały koni, dzięki którym mogłyby skuteczniej chronić północne granice swojego państwa. To stanowiło impuls do intensywnej wymiany barterowej, którą kontynuowano aż do XX wieku, kiedy konie nie miały już tak dużego znaczenia militarnego. Od transakcji tego typu wywodzi się nazwa *The Ancient Tea Horse Road* (Freeman i Ahmed 2015).

Według relacji historycznych, w czasach dynastii Tang (618-907 r.), herbatę przeznaczoną na sprzedaż prasowano do formy cegiełek, gdyż taki kształt ułatwiał jej załadunek i transport. Ze względu na duże odległości (tysiące kilometrów), trudny teren (w większości górzysty) oraz trudne warunki pogodowe (śnieg w górach, pełne słońce na płaskowyżach), herbata trafiała do celu po kilku lub nawet kilkunastu miesiącach podróży – w zależności od tego, czy miała dotrzeć do stolicy na dwór cesarski, do Tybetu czy na południe. W trakcie tak długich podróży i zmiennych warunków klimatycznych herbata przechodziła procesy starzenia i fermentacji, w których mikroorganizmy powodowały zmiany biologiczne i enzymatyczne. Powstała w ten sposób herbata stała się bardzo pożądana – najpierw przez członków rodziny królewskiej i wysokich urzędników, a później przez koneserów herbaty. Zyskała uznanie nie tylko ze względu na swój wyjątkowy smak, ale także ze względu na swoje właściwości lecznicze (<https://banateacompany.com>).

Mimo iż produkcja i uznanie dla herbaty Pu-erh sięgają czasów dynastii Tang, zgodnie ze starożytnym dokumentem zatytułowanym „Księga o barbarzyńcach”, nie była ona wtedy tak nazywana. Choć jej nazwa pochodzi od miasta Pu'er, jednego z miast prowincji Yunnan, to nie jest ono miejscem jej pochodzenia. Według historii miasta, w dynastii Song (960-1279), miasto Pu'er było już znanym ośrodkiem handlu herbatą. Znajdował się w nim targ, na który zjeżdżali handlarze z całej południowej części prowincji. Stąd herbata ruszała w dalszą drogę na grzbietach koni lub plecach tragarzy drogami *The Ancient Tea Horse Road*. Z biegiem czasu miasto Pu'er stało się znanym centrum handlu herbatą. Z tego powodu ludzie zaczęli nazywać herbatę kupowaną i sprzedawaną w mieście Pu'er „herbatą Pu-erh”. Obecnie herbata Pu-erh i *The Ancient Tea Horse Road* stały się istotnym elementem w promowaniu turystyki w prowincji Yunnan, Sichuan oraz w Tybecie (Freeman i Ahmed 2015; Pong 2006).

2.2. Kształtowanie jakości herbaty na etapie uprawy i zbioru

Jakość herbaty zależy przede wszystkim od jakości surowca, który determinują: odmiana rośliny, warunki klimatyczne i glebowe, wysokość występowania upraw, a także stosowane praktyki agronomiczne.

Krzew herbaciany jest rośliną heterogenną, wykazującą wspólne cechy morfologiczne, biochemiczne i fizjologiczne. We współczesnej, międzynarodowej nomenklaturze botanicznej ((L) O. Kuntze) roślina ta należy do rodziny botanicznej *Theaceae* i rodzaju *Camellia*, który składa się z 82 gatunków, w tym ozdobnych kameliowatych (Kumar i in. 2013). W obrębie gatunku wyróżnia się 4 odmiany *Camellia sinensis*: *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Camellia sinensis* var. *assamica*, *Camellia sinensis* var. *dehungensis* oraz *Camellia sinensis* var. *pubilimba*. Surowiec wykorzystywany do produkcji herbaty pochodzi z dwóch pierwszych odmian. Na podstawie cech liści, tj. rozmiaru, pozycji oraz kierunku wzrostu, wyróżnia się trzy odmiany uprawne: *Camellia sinensis* var. *sinensis* (zwana chińską), *Camellia sinensis* var. *assamica* (zwana assamską) oraz *Camellia sinensis* var. *lasiocalyx* (zwana kambodżańską), będąca hybrydą dwóch pierwszych – do niedawna uznawana za podgatunek odmiany assamskiej (Ahmed i Stepp 2013a; Das i Ghosh 2016; Wachira i in. 2013a). Surowiec wykorzystywany do produkcji herbaty pochodzi przede wszystkim z dwóch odmian: drobnolistnej chińskiej oraz szerokolistnej assamskiej. Pierwsza z nich to niewielki, wolnorosnący krzew z drobnymi, ząbkowanymi i ciemnozielonymi liśćmi. Optymalne warunki do jego wzrostu to ciepłe i wilgotne rejony górskie. Ten surowiec uważany jest za bardziej szlachetny od wersji assamskiej, ponieważ nadaje herbacie lekkiego i słodkiego posmaku.

Z tego względu jest on wykorzystywany do produkcji herbaty białej i zielonej, a także delikatnej indyjskiej herbaty czarnej. Druga odmiana to szybko rosnąca roślina, występująca w postaci rozłożystego krzewu lub drzewa z dużymi, szerokimi i jasnozielonymi liśćmi, które zazwyczaj nie posiadają ząbkowanej krawędzi. Uprawiana jest w klimacie tropikalnym i subtropikalnym. Ten surowiec nadaje produktowi końcowemu wyrazisty i ciężki posmak. Surowiec ten wykorzystywany jest do produkcji herbat zielonych, czarnych oraz Pu-erh. Niektóre gatunki dzikorosnących krzewów z gatunku *Camellia sinensis* są wykorzystywane przez miejscową ludność do jedzenia, przygotowywania napojów oraz do celów medycznych. Nie są one wykorzystywane na skalę przemysłową (Ahmed i Stepp 2013a; Ahmed i Stepp 2013b).

Naturalną granicą występowania dwóch głównych odmian herbaty jest, występujący w południowo – zachodniej części Chin, płaskowyż Yunnan – Guizhou. Na północ od 25° szerokości geograficznej północnej rośnie odmiana drobnolistna, a na południe od tego równoleżnika odmiana szerokolistna (assamska). Natomiast w środkowej części tego obszaru rosną najczęściej hybrydy wspomnianych odmian. Pas południowo – zachodnich Chin (prowincje Yunnan, Sichuan, Guizhou i Guangxi), północnego Laosu, Wietnamu, Birmy północnej, Kambodży i północnych Indii to tereny naturalnie występujących roślin herbacianych. Niektóre odmiany występują również we wschodnich Chinach, Japonii, południowo – zachodniej Korei, Tajlandii i na Tajwanie. Jednak centrum różnorodności odmian *Camellia sinensis* zlokalizowane jest w prowincji Yunnan, na obszarze północnego Mekongu. Obecnie roślina ta jest uprawiana również na obszarach tropikalnych i subtropikalnych, tj. w Rosji, Turcji, Argentynie, centralnej Afryce, Indonezji oraz na Sri Lance. Dodatkowo można ją spotkać na terenach między równoleżnikami 42°N oraz 30°S na obszarach, spełniających agrotechniczne wymagania dla odpowiednich odmian tej rośliny (Ahmed i Stepp 2013b; Wachira i in. 2013a).

Uprawa herbaty wymaga ściśle określonych warunków klimatyczno-glebowych, różnych dla poszczególnych odmian tej rośliny. *Camellia sinensis* var. *sinensis* rośnie w chłodniejszych regionach wysokogórskich, natomiast *Camellia sinensis* var. *assamica* najlepiej rozwija się w klimacie tropikalnym. Uważa się, że optymalne warunki uprawy, to zapewnienie roślinie wysokiej wilgotności (opady roczne na poziomie 2500 – 3000 mm), temperatury w zakresie 18 – 20°C oraz usytuowania upraw na wysokościach do 2200 m.n.p.m. Gleba musi być sucha, przepuszczalna, przewiewna, z niskim odczynem pH (4,5-5) oraz z żyzną warstwą próchniczą. Obecnie uprawa herbaty coraz częściej prowadzona jest w warunkach kontrolowanych, które gwarantują uzyskanie surowca właściwej jakości. Niekorzystne warunki, takie jak podtopienia,

przymrozki czy upały, ograniczają wzrost rośliny, prowadzą do zmian w strukturze biochemicznej surowca, a w konsekwencji do obniżenia jego jakości, a także obniżenia ekonomicznej opłacalności produkcji (Ahmed i Stepp 2013a; Ahmed i Stepp 2013b; Kumar i in. 2013).

Metody uprawy i zbioru herbaty zmieniały się na przestrzeni wieków. Powstanie pierwszych systemów uprawnych datuje się na okres sprzed ponad 1700 lat. Dzięki zebranych dowodom naukowym opracowano standardowe wytyczne dla prowadzenia upraw roślin herbacianych, które są powszechnie stosowane na całym świecie – upraw plantacyjnych. O innych rodzajach upraw jest bardzo niewiele informacji, stąd w dalszej części pracy przedstawiono podział, uwzględniający sposoby zakładania oraz prowadzenia upraw, stosowane obecnie w Chinach (Karwowska 2017).

A) Uprawy plantacyjne

Powstały w celu pozyskiwania dużych ilości surowca z jednego miejsca. Wymaga to opracowania dla każdej monokultury indywidualnego sposobu nasadzenia roślin i ich pielęgnacji, dostosowanych do ukształtowania terenu, aby w każdym okresie zbiorów uzyskać maksymalną wydajność z plantacji. W przypadku krzewów herbacianych najlepsze efekty uzyskano dla długich rzędów z minimalnymi ścieżkami między nimi (w celach komunikacyjnych), ściśle określonym sposobem przycinania roślin, regularnie prowadzonymi zbiorami oraz stosowaniem właściwej ochrony roślin.

Do produkcji młodych krzewów mogą być wykorzystywane nasiona, które uzyskuje się z rośliny już po 3 latach uprawy. Staranna pielęgnacja młodych krzewów prowadzona jest w tak zwanych „żłobkach” przez okres maksymalnie jednego roku. Częściej jednak wykorzystuje się sadzonki (klony diaspor), charakteryzujące się wysoką odpornością na stres oraz wysokim potencjałem wydajności. Pierwszą partię materiału pozyskuje się z roślin dwu- trzyletnich. Automatyczny zbiór surowca jest procesem szybszym, jednak bardzo niedokładnym, ponieważ liście często bywają uszkodzone i zanieczyszczone nadmierną ilością łodyg. Z tego względu herbaty liściaste dobrej jakości wymagają zawsze zbioru ręcznego.

Rolnictwo plantacyjne charakteryzuje się stosowaniem dużej ilości nawozów oraz środków ochrony roślin. Ze względu na to, że krzew herbaciany jest rośliną wieloletnią, a ilość produkowanego przez nią surowca odpowiedniej jakości spada, niezbędne jest regularne uzupełnianie składników odżywczych w glebie. Ponieważ zapotrzebowanie roślin na te składniki jest zróżnicowane, należy uwzględnić to w procesie nawożenia. Usunięcie rodzimej roślinności oraz założenie monokultur stwarza korzystne warunki do namnażania się agrofagów. Rośliny herbaciane mają wielu naturalnie występujących szkodników, w tym

chrząszcza *Xyleborus fornicatus*, czerwonego pająka *Oligonychus coffeae*, różnego rodzaju larwy czy roztocza *Typhlodromus* i *Phytoseius*. W nielicznych przypadkach, porażenie roślin przez określoną grupę szkodników jest wręcz pożądane, ale w zdecydowanej większości tak nie jest. W celu uniknięcia strat finansowych, powstałych na skutek zniszczenia krzewów, rolnicy muszą korzystać ze środków ochrony roślin (Ahmed i Stepp 2013a; Ahmed i Stepp 2013b; Tea. An INFOCOMM Commodity Profile 2016). Częstość występowania i rozprzestrzenianie się szkodników, chorób i chwastów zostanie dodatkowo wzmocniona przez wzrost temperatury. Rolnicy są zmuszeni stosować coraz większe ilości pestycydów, co w konsekwencji wpływa na bezpieczeństwo żywności (FAO 2016). Już od kilku lat dostępne są raporty wskazujące obecność pozostałości pestycydów w produkcie końcowym (https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en). W zdecydowanej większości przypadków wykryte ilości nie przekraczają zalecanych norm i nie stwarzają bezpośredniego zagrożenia. Jednak w przypadku regularnego spożywania produktów zawierających nawet niewielkie ich ilości, mogą się one gromadzić w organizmie człowieka (substancje lipofilowe) i w konsekwencji prowadzić do rozwoju różnych rodzajów nowotworów (m.in. jelita grubego, trzustki czy białaczki), uszkodzeń systemu nerwowego (m.in. choroby Parkinsona, demencji i Alzheimer, stwardnienia zanikowego bocznego), systemu immunologicznego czy hormonalnego (Sabarwal, Kumar i Singh, 2018).

Zakładanie nowych plantacji rozpoczyna się zazwyczaj na terenach leśnych. Ogromne połacie lasów są wycinane, co powoduje utratę różnorodności biologicznej. Mimo iż plantacje herbaty kojarzą się z tradycyjnym obrazem Chin, to stanowią one „sztuczny twór”, stworzony w celu pokrycia zapotrzebowania rynku światowego na herbatę. Powstanie takich miejsc ożywiło lokalną gospodarkę, jednak ze względu na intensywną produkcję, już od kilku lat nie tylko władze kraju (zwłaszcza na szczeblu lokalnym), ale również mieszkańcy dostrzegają potrzebę zmian. Zmian w kierunku nowoczesności, kojarzonej z rozwiązaniami proekologicznymi.

B) Uprawy leśne

Krzewy herbaciane uzyskiwane z nasion oraz sadzonek, pochodzących z innych upraw tego typu lub okolicznych lasów, są wkomponowane w krajobraz leśny. Zostają specjalnie umieszczone w otoczeniu drzew owocujących lub zawierających silne olejki eteryczne, by nadać liściom delikatnie owocowe lub lekko żywiczne smaki. Najczęściej spotykane są naturalne aromaty: kamfory (*Cinnamomum camphora* Ness et Eberm.), głożyny pospolitej/jujuby pospolitej (*Ziziphus jujuba* Mill.) i jęczyczka strzelistego (*Ligularia stenocephala* Matsum. & Koidz). Uprawy leśne zakładane są na dwa sposoby: poprzez usunięcie z upraw

plantacyjnych 2/3 krzewów i umieszczenie w ich miejsce różnych rodzajów drzew i krzewów lub poprzez przerzedzenie obszarów leśnych i uzupełnienie ich krzewami *Camelli*. Taki sposób prowadzenia upraw uznaje się za przyjazny dla środowiska, ponieważ działalność człowieka ogranicza się jedynie do zbiorów surowca, niewielkiego przycinania rośliny co pomaga utworzyć kolejne rozgałęzienia oraz nawożenia kompostem. Roślinom herbacianym pozwala się na osiągnięcie formy drzewiastej (o wysokości 2-8 metrów), co urozmaica strukturę lasu. Dzięki temu system ten charakteryzuje się kilkupiętrową strukturą: wysokie korony drzew, drzewa średniej wysokości oraz najniższa zielona warstwa roślinności. Wykazano, że forma drzewiasta rośliny herbacianej wpływa na rozwój roślinności epifitycznej. Teren wygląda naturalnie, stanowi siedlisko lokalnych zwierząt oraz roślinności. Nie dochodzi na nim do erozji gleby. Rośliny mają dostęp do bogatej, odpowiednio odżywionej i napowietrzonej gleby. Dzięki otoczeniu innych roślin, zróżnicowanych pod względem wysokości, rośliny herbaciane są chronione przed intensywnymi zmianami klimatu, gdyż otaczająca je roślinność stanowi strefę buforową. To rozwiązanie było już pilotażowo stosowane w roku 2011 w okolicy Mangjing w prowincji Yunnan i stanowi nowy kierunek zmian propagowany przez lokalne władze. Dzięki wprowadzeniu tego typu działań dostrzeżono szansę na odtworzenie lokalnego ekosystemu (Ahmed i in. 2013; Ahmed i Stepp 2013b; Hung 2013; Wang i in. 2017b).

C) Mieszane pola uprawne

To ekologiczny i rodzimy system upraw herbaty dla prowincji Yunnan. Nie są tak popularne jak uprawy leśne, w których rośliny herbaciane są mieszane z rodzimą roślinnością lub innymi roślinami uprawnymi. W jednym gospodarstwie wyróżnia się kilka mniejszych polaci upraw danych roślin, które ze sobą sąsiadują. W tej wersji uprawy herbaty nie ma tak dużego zróżnicowania wysokości roślinności, ponieważ krzewy są stale przycinane i utrzymywane w formie krzewiastej (Ahmed i in. 2013; Ahmed i Stepp 2013b).

D) Stare drzewa:

Nazywane również „dzikimi” drzewami. Rosną pojedynczo w głębi dżungli w prowincji Yunnan, na wysokości ponad 2000 m.n.p.m. Niektórzy badacze uważają, że były one w tych miejscach uprawiane przed setkami lat, a inni sądzą, że zawsze rosły w stanie dzikim. Ingerencja człowieka sprowadza się jedynie do zbioru liści. Drzewa liczą sobie kilka stuleci, są smukłe i bardzo wysokie, ponieważ w tak gęstych lasach gór każda roślina „walczy” o dostęp do światła i musi piąć się ku górze. Liście pozyskane z tych roślin są bardzo zróżnicowane zarówno pod względem kształtu, jak i aromatu. Niektórzy eksperci twierdzą, iż takie liście nie nadają się do produkcji herbaty ([https://banateacompany.com](https://banateacompany.com;); <https://hojotea.com/indexe.html>).

Ahmed i in. (2013) przeprowadzili badania dotyczące wpływu sposobu uprawy herbaty na wybrane parametry jakościowe. Wykorzystując metodę wywiadu bezpośredniego dokonali również oszacowania ekonomicznej opłacalności poszczególnych form uprawy. Badania autorów dowiodły, że największą wydajność uzyskano z upraw tarasowych (64000 kg/ha), następnie z mieszanych pól uprawnych (18000 kg/ha) i upraw rolno – leśnych (13500 kg/ha). Najmniej wydajne były uprawy leśne (6000 kg/ha). Chiński rząd wprowadził limity wielkości zbioru liści z „dzikich” drzew, dlatego nie jest znana realna możliwość pozyskania tego rodzaju materiału. Uprawy plantacyjne pozwalają osiągnąć maksymalną wydajność upraw, co nie przekłada się na odpowiednio wysokie zyski. Taki rodzaj surowca uznawany jest za gorszy jakościowo (pod względem składu chemicznego), dlatego w roku 2010 za 1 kg takich liści płacono zaledwie 3-8 \$. Dla porównania w tym samym roku za surowiec z „dzikich” drzew płacono 12,10 \$, z mieszanych pól uprawnych 157,26 \$, a najwięcej, bo aż 219,65 \$ za 1 kg surowca z upraw leśnych. Największe zróżnicowanie genetyczne zauważono wśród roślin z mieszanych pól uprawnych, a najmniejsze – z upraw plantacyjnych. Sposób prowadzonych upraw oraz bioróżnorodność genetyczna miały wpływ na skład biochemiczny. Autorzy stwierdzili bowiem, że surowiec pochodzący z ogrodów herbacianych oraz ekologicznych upraw rolno – leśnych zawierał kilkukrotnie większe ilości katechin ogółem (EGCG, EGC, C, EC, ECG, GCG, GC) oraz kilkukrotnie większe ilości metyloksantyn ogółem (kofeina, teobromina, teofilina) w porównaniu z pozostałymi typami. Wachira i in. (2013b) potwierdzili, iż różne sposoby prowadzenia upraw pozwalają uzyskać surowiec o zróżnicowanej zawartości substancji bioaktywnych, co można w przyszłości wykorzystać do opracowania produktów herbacianych o większym potencjale antyoksydacyjnym.

2.3. Surowiec wykorzystywany do produkcji herbaty Pu-erh

Dokonując zakupu herbaty Pu-erh, należy brać pod uwagę następujące elementy:

- surowiec (pochodzenie, typ upraw),
- zastosowaną obróbkę technologiczną (tradycyjne wieloletnie dojrzewanie czy sztuczne postarzenie),
- czas i warunki dojrzewania („mokry”, „suchy” magazyn czy warunki mieszane).

Każdy z tych elementów w sposób znaczący wpływa na jakość końcową produktu, szczególnie w kontekście pożądanых przez konsumentów cech sensorycznych i zdrowotnych. Osoby, które nie mają dużego doświadczenia z herbatą Pu-erh będą w pierwszej kolejności kierować się zastosowaną obróbką technologiczną, a następnie czasem i warunkami

dojrzewania, które mogą złagodzić smak produktu. Jednak koneserzy tej herbaty w pierwszej kolejności zwracają uwagę na pochodzenie surowca, tradycję fabryki, w której produkt został wytworzony, ewentualnego mistrza herbaty nadzorującego proces produkcyjny oraz warunki i czas dojrzewania produktu (<https://hojotea.com/indexe.html>). Wykorzystanie odpowiedniego rodzaju surowca bardzo często decyduje o walorach produktu finalnego (Raw czy Ripe).

Tradycyjna wersja herbaty Pu-erh nie jest produkowana z surowca uzyskanego z upraw plantacyjnych, który jest uznawany za najgorszy jakościowo. Proces produkcji tradycyjnej, zielonej herbaty Pu-erh trwa kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt lat, a zmiany w surowcu zachodzą powoli, w sposób naturalny. Wyjątek stanowi „nowa” odmiana Pu-erh, gdzie czas produkcji trwa zaledwie kilka miesięcy a sam etap fermentacji to okres zaledwie kilku tygodni, w którym zachodzą bardzo gwałtowne zmiany w składzie oraz strukturze surowca. Dlatego z materiału z upraw plantacyjnych uzyskiwana jest tania i łatwo dostępna w sklepach na całym świecie wersja tej herbaty.

Oryginalna wersja Pu-erh uzyskiwana jest z surowca, pochodzącego z 4 źródeł:

1. Dzikich krzewów – to krzewy herbaciane, które są mniej zagospodarowane i zwykle znajdują się na wyższych wysokościach niż krzewy na plantacjach;
2. Małych drzew – są to drzewa uzyskane z nasion lub były to stare drzewa, które zostały przycięte. Drzewa te mogą mieć od kilku do pięćdziesięciu lat i są zwykle uprawiane w systemie upraw leśnych;
3. Dużych drzew – są to drzewa w wieku od 100 do 300 lat. Częściej nazywane są starymi ogrodami herbacianymi. Występują na dużych wysokościach. Stanowią pozostałości dawnych upraw, które zostały na jakiś czas pozostawione bez opieki i są aktualnie uprawiane bez nawożenia i bez stosowania pestycydów;
4. Starych drzew nazywanych „dzikimi” – drzewa te mają na ogół ponad 500 lat. Niektóre z nich zostały porzucone i odkryte w ostatnich latach. Najczęściej znajdują się w głębi dżungli (<https://banateacompany.com>).

Surowiec uzyskany z dzikich krzewów oraz młodych drzew jest uznawany za lepszy jakościowo i droższy aniżeli z upraw tarasowych, a same ich uprawy są przyjazne dla środowiska i wpisują się w nową, proekologiczną politykę władz prowincji. Materiał ze starych ogrodów herbaty uznawany jest obecnie za najbardziej pożądanym, ale jego ilość jest ograniczona. Dlatego też jest on dość kosztowny i wykorzystywany tylko do produkcji najlepszych herbat. Najmniej surowca pozyskuje się ze starych drzew, które zostały dodatkowo objęte rządowym limitem wielkości zbioru. Niektórzy producenci uważają, iż nie jest to

najlepszy surowiec. Jednak nadal jest on wykorzystywany do produkcji niektórych rodzajów herbaty Pu-erh w fabrykach o długiej tradycji.

Główne tereny produkcyjne herbaty Pu-erh znajdują się w chińskich prefekturach Xishuangbanna (Banzhang, Yiwu, Menghei, Yibang, Hekai, Mingsung, Pasha), Simao (Jingmai, Kunlu, Jinggu, góra Wulang) oraz Lingcang (Fengqing, Bingdao, Zhuang Jiang). Jednak nadal bardzo pożądane i cenione są egzemplarze uzyskane z surowca z drzew herbacianych, znajdujących się na obszarze tak zwanych *Six Famous Tea Mountains*, obejmujących góry: Youle, Gedeng, Yibang, Mangzhi, Manzhuan i Mansa, zlokalizowanych w Xishuangbanna. Za czasów dynastii *Qing* (1644-1912) herbata z tych gór uchodziła za produkt najwyższej jakości. Była składana cesarzowi w hołdzie lennym – stąd określenie „herbaty hołdowniczej”. Znane i cenione obecnie góry herbaciane takie jak Bulangshan i Jingmaishan są względnie nowe (debiutują) w chińskim przemyśle herbacianym o długiej tradycji. Słynna koncepcja gór herbacianych została zrewitalizowana po ustanowieniu Chińskiej Republiki Ludowej w 1949 r., kiedy wyznaczono nowy podział administracyjny kraju, uruchomiono fabryki herbaty i powołano instytuty badawcze. Mimo to „stare” herbaciarnie w Hong Kongu za oryginalną herbatę Pu-erh nadal uznają tę wytwarzaną z liści pozyskanych z *Six Famous Tea Mountains*, które po wielu latach starzenia oferują dobry smak (Freeman i Ahmed 2015; Pong 2006).

2.4. Obróbka technologiczna surowca i jej wpływ na jakość produktu końcowego

Herbata, stanowiąca podstawę do powstania herbaty znanej jako Pu-erh, nazywana jest obecnie *maocha* (chiński termin „surowiec”). Jest to herbata zielona, ponieważ świeże liście po zbiorze są zmiękczone, poddawane procesowi „killing the green”, a następnie zwijane i suszone na słońcu. Biorąc pod uwagę proces produkcyjny, herbatę Pu-erh dzieli się na dwa zasadnicze rodzaje:

- *Raw* (*Sheng cha*, niefermentowana): to sprasowana *maocha*, która dostępna jest jako młody surowy Pu-erh – czyli świeżo wyprodukowany lub mający zaledwie kilka lat (Young Raw Pu-erh) – oraz jako wersja tradycyjna, przechodząca powolny i długotrwały proces dojrzewania (Aged/Vintage Raw Pu-erh);

- *Ripe* (*Shou cha*, fermentowana): nowa wersja, otrzymywana za pomocą procesu *wo-duit* (sztucznego postarzenia), który pozwolił skrócić proces produkcyjny tradycyjnej wersji, a tym samym umożliwił produkcję tej herbaty na dużą skalę (<https://banateacompany.com>; Zhang 2014).

Na rycinie poniżej (Rys. 2.1) przedstawiono różnice oraz podobieństwa w procesach produkcyjnych Raw, Aged Raw oraz Ripe Pu-erh.






Rys. 2.1 Skrócony proces produkcyjny herbaty Pu-erh z uwzględnieniem różnych jej rodzajów

Źródło: opracowanie własne na podstawie

<https://teavivre.com/info/difference-between-raw-and-ripe-puerh-tea.html>

Wymienione rodzaje herbaty Pu-erh różnią się przebiegiem procesu produkcyjnego oraz czasem jego trwania, a to przekłada się na różnice w składzie chemicznym, walorach organoleptycznych, wielkości popytu, a także cenie produktów końcowych. W tabeli 2.1 przedstawiono różnice w wyglądzie suszu oraz naparów poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh.

Tab. 2.1 Wygląd suszu i naparów różnych rodzajów herbaty Pu-erh

Raw 2017	Vintage Raw 1999	Ripe 2018
		

Źródło: opracowanie własne na podstawie <https://banateacompany.com>

A) Otrzymywanie i charakterystyka herbaty Raw Pu-erh

Pierwszy zbiór liści ma miejsce w lutym lub marcu. Liście herbaty wyrastają nieprzerwanie przez całą wiosnę, lato i jesień, jednak za najlepszą uznaje się te ze zbiorów wiosennych. Herbata letnia jest uważana za gorszą, ponieważ obfitość deszczowych dni może skutkować brakiem wyraźnego aromatu oraz większą cierpkością produktu końcowego. W Chinach zbiera się zwykle jeden pączek oraz dwa liście z każdego kielka. W przypadku herbaty przeznaczonej do produkcji Pu-erh często zbiera się kolejne dwa lub nawet trzy liście. Zbiór prowadzony jest o świcie, a surowiec dostarczany jest od razu do fabryki, gdzie jest wstępnie sortowany. Następnym krokiem jest wędnięcie (dehydratacja), które ma na celu przygotować liście do następnego etapu. W zależności od wyposażenia fabryki oraz jej tradycji (np. tylko ręczna produkcja) zmiękczenie materiału może odbywać się na dwa sposoby – zmechanizowany i ręczny. Opcja niezmechanizowana obejmuje umieszczenie materiału na dużych bambusowych tacach i pozostawienie ich w pomieszczeniu na 3-6 godzin (ostateczny czas zależy od grubości rozłożonej warstwy materiału oraz temperatury otoczenia). W wersji zmechanizowanej liście umieszczane są na długich wentylowanych stołach. Poprawnie przeprowadzony proces zmiękczenia pozwala uniknąć w kolejnym etapie przypalenia liści na woku.

Następny etap nazywany „killing the green” ma na celu częściową inaktywację enzymów odpowiedzialnych za utlenianie surowca oraz pozbycie się znacznych ilości wody. W fabrykach niezmechanizowanych liście umieszcza się w dużych, suchych wokach ogrzewanych drewnem lub węglem drzewnym i ręcznie miesza przez około 12 do 20 minut do momentu zmiany ich koloru oraz konsystencji. Błędnie przeprowadzony proces może prowadzić do przypalenia liści. W wersji zmechanizowanej liście trafiają do ciepłego obrotowego cylindra na około 3 min. Temperatura procesu oraz czas prażenia mają duży wpływ na smak produktu końcowego.

Wysoka temperatura i krótszy czas prażenia są częściej wykorzystywane do produkcji zielonych Pu-erh, ponieważ takie warunki prowadzą do uzyskania herbaty wyrazistej z podkreślonymi roślinnymi nutami. Z kolei niższa temperatura i dłuższy czas prażenia prowadzą do uzyskania herbaty delikatniejszej, o pełniejszym smaku z podkreślonymi nutami owocowymi. Nieodpowiednio dobrana temperatura, może doprowadzić do powstania poważnych wad herbaty.

Po przestygnięciu liście są zwijane (rolowane). W produkcji przemysłowej wykorzystuje się specjalne maszyny, których spiralne obroty powodują zwijanie się liści. Etap ten trwa od 5 do 10 minut i ma kilka celów. Po pierwsze w jego trakcie dochodzi do rozerwania komórek na powierzchni liścia, co ułatwia w trakcie suszenia pozbycie się pozostałej wody. W połączeniu z wodą taniny przemieszczają się bliżej powierzchni liścia z głębszych warstw komórek i w momencie przygotowywania naparu, bardzo szybko do niego migrują. Dodatkowo materiał zyskuje nowy kształt, który ułatwia jego przechowywanie. Zmiękczenie pozwala również zachować odpowiednią kruchość i uniknąć pęknięcia czy rozrywania liści. Jeśli etap ten będzie trwał zbyt długo, to herbatę będzie można zaparzyć kilka razy, a każdy napar będzie bardzo intensywny².

Po tym etapie liście są wilgotne na skutek wydzielania soków, dlatego rozkładane są na bambusowych tacach i pozostawiane na noc w budynku do przeschnięcia. W procesie „killing the green” działanie enzymów nie zostaje do końca wygaszone, dlatego w dalszym ciągu zachodzi powolny i delikatny proces oksydacji. Następnie materiał jest rozkładany na dużych bambusowych matach, gdzie przechodzi proces ostatecznego suszenia. Przy dobrej pogodzie herbata jest suszona na słońcu przez jeden dzień. W przeciwnym wypadku suszenie prowadzone jest w pomieszczeniu i może trwać kilka dni. Grubość ułożonej warstwy surowca musi być odpowiednio dobrana do panującej w otoczeniu temperatury. Końcowa wilgotność suszu herbacianego może wahać się od 2 do nawet 10% – zależy to od miejsca produkcji, np. w Hong Kongu uzyskuje się herbaty z większą wilgotnością. Zazwyczaj surowiec bardziej wilgotny przeznaczany jest do produkcji Ripe Pu-erh, a mniej wilgotny – do Raw Pu-erh (<https://farmer-leaf.com>; <https://hojotea.com/indexe.html>; <https://teavivre.com>; Zhang 2014). Z 14 kilogramów świeżych liści, po suszeniu pozostaje około 3,5 kilograma suszu – ostateczna ilość zależy od końcowej zawartości wody. Waga surowca w trakcie procesu produkcyjnego herbaty Pu-erh zmienia się w następujący sposób: świeży surowiec: 14 kg > zmiękczenie:

² Chińska sztuka parzenia herbaty *Gong fu cha* pozwalająca uzyskać z jednej porcji herbaty Pu-erh kilkanaście naparów.

10,8 kg> „killing the green”: 7,6 kg> zwijanie: 7,5 kg (po nocy: 6,5 kg)>suszenie: 3,5 kg (<https://farmer-leaf.com>).

Wysuszony materiał to *maocha* – intensywna w smaku zielona herbata, stanowiąca surowiec do dalszej produkcji Pu-erh. Aby uzyskać Raw Pu-erh, należy sprasować *maochę* – najczęściej do postaci dysku, cegielki lub gniazda (Rys. 2.2). W tym celu liście dzielone są na odpowiednie wagowo porcje (w zależności od wielkości ciastka) i umieszczane w metalowych cylindrach z sitkiem na dnie. Na ich powierzchni układa się bilet z kodem handlowym, umożliwiającą identyfikację produktu. Materiał traktowany jest przez kilkanaście sekund parą wodną, która ma zmiękczyć liście i uniemożliwić ich kruszenie w trakcie prasowania. Zawartość naczynia przekładana jest do lnianych worków, gdzie prowadzi się wstępne formowanie ciastek. Ostateczne ich prasowanie może odbywać się na dwa sposoby: ręcznie – za pomocą bloków kamiennych, umieszczanych na workach i dociążanych przez pracowników; lub w wersji zmechanizowanej – za pomocą prasy. Po zakończeniu procesu kształtowania ciastka muszą przeschnąć, po czym są zawijane w papier z nadrukiem fabryki i umieszczane w magazynie (o określonej temperaturze oraz wilgotności), gdzie dojrzewają (leżakują). Czas składowania herbaty zależy od jej przeznaczenia. Jeśli ma być sprzedawana jako młoda (Young Raw), to spędzi w magazynie od kilku miesięcy do kilku lat. Jeśli ma to być tradycyjna wersja (Aged Raw), poddana długotrwałemu i powolnemu procesowi oksydacji, to będzie ona leżakować przez kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt lat. Zmiany zachodzące w liściach postępują bardzo powoli, dlatego materiał potrzebuje dużo czasu na uzyskanie pożądanych cech (<https://hojotea.com/indexe.html>; Pong 2006).



Rys. 2.2 Najczęściej spotykane formy po prasowaniu

Źródło: opracowanie własne na podstawie (Pong 2006)

Proces dojrzewania herbat Pu-erh jest kolejnym etapem, który nadaje jej unikatowe walory, zarówno sensoryczne, jak i ekonomiczne. Potrzeba szerokiej wiedzy oraz dużego

doświadczenia, aby poprawnie dobrać warunki do przeprowadzenia tego procesu, gdyż niewłaściwe postępowanie może prowadzić do obniżenia jakości produktu. Gdy herbata jest już sprasowana i zapakowana, umieszcza się ją w specjalnym magazynie – „suchym” lub „mokrym”. Przechowywanie na sucho odnosi się do środowiska przechowywania, w którym nie podwyższa się sztucznie wilgotności pomieszczeń magazynowych. W takich warunkach herbata starzeje się powoli, zachowując witalność i aromat specyficzny dla jej pochodzenia. Największą wadą tej metody jest czas, ponieważ tradycyjnie etap przechowywania Raw Pu-erh trwa od kilkunastu do nawet kilkudziesięciu lat. Z tego względu coraz częściej producenci decydują się na skrócenie czasu trwania tego etapu poprzez łączenie dwóch rozwiązań. W takim układzie herbata najpierw trafia do „mokrego” magazynu na krótki czas, a następnie jest umieszczana w „suchym”. Przechowywanie na mokro odnosi się do środowiska przechowywania, w którym wilgotność panująca w pomieszczeniu została podwyższona do wartości około 60–65%. Wilgotność przyspiesza fermentację, dzięki czemu produkt szybciej się starzeje. Mimo iż jest to powszechnie stosowana metoda sterowania stopniem dojrzałości herbaty, to zdarza się, że negatywnie wpływa na jakość produktu końcowego. Pleśń może bardzo łatwo rozwinąć się na dużej powierzchni produktu, a zbyt intensywny przyrost pleśni może powodować nieodwracalne uszkodzenie struktury liścia. Herbata, która po zakończonym procesie suszenia, zawiera większą niż powinna ilość wody, po przechowywaniu w „mokrym” magazynie będzie miała bardzo ostry zapach – nie zawsze akceptowalny przez konsumentów (<https://banateacompany.com>).

W początkowych etapach produkcji herbata Raw Pu-erh przypomina herbatę zieloną zarówno pod względem barwy liścia, jak i naparu. Wraz z postępującym procesem dojrzewania jej liście ciemnieją i stają się brązowe. Z kolei napary dojrzewającej Raw Pu-erh po kilku latach leżakowania mają barwę pomarańczową, a po kilkunastu – brązową (Rys. 2.3). Wrażenia smakowe dojrzewającej Raw Pu-erh są bogate i intensywne z wyróżniającymi się zazwyczaj kwiatowymi nutami oraz pozbawione tradycyjnej goryczki. Ten rodzaj Pu-erh jest dostępny tylko w specjalistycznych sklepach internetowych. Cena takiej herbaty zależy od rodzaju surowca, regionu zbioru liści oraz czasu dojrzewania i waha się w zakresie od kilku do nawet kilkuset dolarów za 100 gramów (<https://banateacompany.com>; <https://chawangshop.com>).



Rys. 2.3 Zmiany wyglądu naparu w zależności od okresu przechowywania
(od 1 roku do 30 lat)

Źródło: <https://banateacompany.com/pages/tea-mastery-pu-erh-teas.html>

Mianem Aged czy też częściej Vintage Raw Pu-erh określano niegdyś herbatę, której proces produkcyjny trwał ponad 20 lat. Obecnie takich herbat jest coraz mniej, ponieważ niewielu producentów lub inwestorów decyduje się na tak długi okres przechowywania. Mimo to wiele sklepów internetowych oferuje Pu-erh pod wspomnianą nazwą, mimo iż są młodsze. Coraz częściej sprzedawcy kierują się nową, nieoficjalną zasadą, pozwalającą wykorzystywać określenie „Aged” lub „Vintage” dla stosunkowo młodych herbat. Specjaliści uznali, iż określenia te można wykorzystywać już w momencie, gdy w produkcji zajdą pierwsze zmiany charakterystyczne dla wiekowych Pu-erh. Czyli gdy ostry smak świeżej zielonej herbaty zniknie na tyle, aby mogły pojawić się nuty owocowe lub kwiatowe – specyficzne dla pochodzenia surowca – a sam susz zacznie zmieniać swoją barwę. Nowe wersje Vintage osiągają ceny nawet do kilku tysięcy dolarów za 100 gramów. Natomiast tradycyjne, faktycznie wiekowe Vintage Raw Pu-erh z wyjątkowym pochodzeniem lub historią dostępne są jedynie na specjalnych aukcjach, gdzie mogą osiągać jeszcze wyższe ceny.

B) Otrzymywanie i charakterystyka herbaty Ripe Pu-erh

Wersja Ripe Pu-erh powstała w drugiej połowie XX wieku w fabryce w Kunming, gdzie opracowano metodę *wo-dui*. Jej celem było uzyskanie herbaty identycznej pod względem walorów sensorycznych jak tradycyjna Pu-erh, ale w zdecydowanie krótszym czasie (Tomczyk 2009). W tej metodzie *maocha* poddawana jest sztucznie wywołanej oraz intensywnej fermentacji grzybowo-bakteryjnej, dlatego do jej wytworzenia wykorzystuje się bardzo często surowiec gorszej jakości. W specjalnie do tego przeznaczonych hali materiał usypywany jest w duże stosy spłaszczane od góry. Następnie do każdego stosu dodawana jest określona ilość wody, a całość przykrywa się kocami, aby stworzyć idealne warunki dla rozwoju drobnoustrojów. Mogą one pochodzić z dwóch źródeł: z otoczenia (koców lub mat, którymi nakrywany jest surowiec oraz z pomieszczeń fermentacyjnych) oraz ze specjalnie

przygotowanych mieszanek, którymi zaszczepia się surowiec. W naturalnej fermentacji udział bierze wiele grzybów, w tym szczególnie te z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* czy *Eurotium*. Kilka gatunków z rodzaju *Aspergillus* uznawanych jest za gatunek dominujący. To one odgrywają kluczową rolę w tworzeniu końcowej jakości herbaty. Ich dodatek w początkowej fazie procesu fermentacji pozwala w krótkim czasie nadać produktowi podstawowe i specyficzne właściwości sensoryczne. Różne mikroorganizmy wywierają różny wpływ na skład chemiczny herbaty. Tak więc kompozycja stosowanych „szczepionek” jest ważnym zagadnieniem, pozwalającym na kreowanie końcowej jakości produktu – zarówno sensorycznej, jak i zdrowotnej (Ahmed i in. 2010; Haas i in. 2013; <https://hojotea.com/indexe.html>; Lv i in. 2013). Temperatura panująca wewnątrz stosu gwałtownie rośnie w początkowej fazie procesu fermentacji i utrzymuje się na poziomie ok. 50°C do 35 dnia. W następnych dniach powoli spada, osiągając około 50 dnia fermentacji temperaturę pokojową. Zawartość wody utrzymywana jest początkowo na poziomie ok. 30% w celu pobudzenia aktywności mikroorganizmów. Następnie powoli maleje i około 50 dnia osiąga wartość 16%. Odczyn pH ulega zmianom w trakcie fermentacji i oscyluje w granicach 4,6-5,9 (Mogensen i in. 2009). Na powierzchni nasypu rozwijają się „ciemne” grzyby, bliżej środka pojawia się warstwa z białym nalotem – grupa pleśni, natomiast najbliżej środka – tam, gdzie panuje najwyższa temperatura – większość drobnoustrojów stanowią bakterie. Materiał musi być regularnie mieszany (co kilka dni), aby w centralnej części nasypu nie doszło do zagrzenia materiału i aby w całej objętości utrzymywać podobne warunki. Cały proces trwa od kilku tygodni do około 2 miesięcy – w zależności od oczekiwanego stopnia dojrzałości. Aby zakończyć ten etap i zmniejszyć aktywność drobnoustrojów, należy obniżyć temperaturę oraz wilgotność materiału. Stos jest odkrywany, mieszany oraz stopniowo rozkładany na coraz większej powierzchni – zazwyczaj w innym pomieszczeniu, gdzie przez kilka dni powoli schnie. Następnie liście są przebierane i dzielone na określone klasy jakości. W tym momencie najczęściej prasuje się herbatę, choć dostępna jest ona również w formie luźnej. Procedura prasowania przebiega tak jak w przypadku herbaty Raw. Taka herbata nadaje się już do spożycia, ale będzie ona bardzo mocna, z wyrazistym ziemistym lub nawet pleśniowym aromatem. Z tego względu coraz częściej również Ripe Pu-erh poddaje się procesowi leżakowania w suchym magazynie. W ciągu 3-5 lat produkt staje się delikatniejszy, bardziej gładki i przyjemny (<https://farmer-leaf.com>; <https://www.teavivre.com>; Pong 2006).

Procesem sztucznego postarzenia można sterować za pomocą trzech parametrów: wilgotności, którą utrzymuje się dodając wodę do usypanego stosu herbaty, temperatury, która

nie może przekroczyć 65°C oraz częstotliwości mieszania usypanego stosu herbaty (<https://farmer-leaf.com>).

Ripe Pu-erh wyglądem przypomina herbatę czarną (wg europejskiej nomenklatury). Dobrej jakości herbata czarna ma ciemną brązową barwę z pojedynczymi pomarańczowymi i lekko zielonkawymi liśćmi. W herbacie Pu-erh barwa suszu jest bardziej jednorodna, ponieważ dominuje ciemny brąz oraz pomarańcz. Napary są ciemniejsze niż w przypadku herbat czarnych – biorąc pod uwagę taki sam sposób i czas parzenia. Dominują w nich barwa brązowa lub ciemnobrązowa, którym często towarzyszą rubinowe refleksy. Zapach i smak naparu nie przypominają innych herbat i są specyficzne dla tego rodzaju, ponieważ dobrej jakości Ripe Pu-erh powinna mieć aromat suszonych daktyli. Ziemisty, pleśniowy lub rybny zapach i smak uznawane są za wadę produktu, powstałą przez nieodpowiednio przeprowadzony proces fermentacji (<https://hojotea.com/indexe.html>; Śmiechowska, Dmowski i Karwowska 2015). *Shou cha* dostępna jest w zróżnicowanych cenach – od zaledwie kilku do kilkudziesięciu dolarów za 100 gramów produktu. Wraz z wydłużaniem okresu leżakowania, cena produktu będzie rosła. Jednak wzrost ceny nie będzie tak duży jak w przypadku Raw Pu-erh. Najbardziej cenione Ripe Pu-erh kosztują zazwyczaj około 100\$ za 100 gramów produktu.

Innowacja procesowa, polegająca na przyspieszonej fermentacji, pozwoliła na otrzymanie herbaty Ripe Pu-erh w dużo krótszym czasie oraz niższej cenie, ale jej cechy sensoryczne nie dorównują herbacie produkowanej tradycyjnie. Szybkie i diametralne zmiany w produkcji Pu-erh, pozwoliły na pokrycie zapotrzebowania światowego rynku na ten produkt. Wielkość produkcji herbaty Pu-erh nagle wzrosła i pozwoliła wzmocnić regionalną gospodarkę Chin. Jednak skutkiem wprowadzenia takich zmian jest duże zróżnicowanie jakości produktu. Z tego powodu przeciętny konsument nie ma możliwości poznać walorów smakowych pierwowzoru herbaty Pu-erh.

3. Jakość produktu i jego wpływ na zdrowie konsumenta

Herbaty Pu-erh niewątpliwie wyróżnia proces produkcyjny. Uczestniczą w nim drobnoustroje, które są odpowiedzialne za ostateczny skład produktu. W zależności od metody produkcji (tradycyjne dojrzewanie, sztuczne postarzanie bez zaszczepienia czy sztuczne postarzanie z zaszczepieniem) skład mikroflory obecnej w trakcie fermentacji może się różnić. Ze względu na różne opcje dojrzewania, różne warunki jej przeprowadzenia oraz obecność drobnoustrojów, skład Pu-erh oraz innych herbat z grupy „dark” lub „post-fermented” został jedynie częściowo określony. Wiadomo natomiast, że obecność drobnoustrojów prowadzi do powstania związków, które w innych herbatach nie występują.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat naukowcy dokładniej poznali mechanizmy zachodzące w składzie surowca podczas fermentacji mikrobiologicznej oraz zidentyfikowali kolejne związki obecne w herbatach tego typu. W tym rozdziale skoncentrowano się na aktualnie dostępnych w piśmiennictwie istotnych różnicach w składzie Pu-erh tradycyjnego oraz sztucznie postarzanego oraz zmianach, jakie zachodzą w trakcie naturalnego procesu dojrzewania i fermentacji.

3.1. Związki bioaktywne i ich przemiany w trakcie produkcji herbaty Pu-erh

Tradycyjna Pu-erh wytwarzana jest z liści *Camelli sinensis var. assamica* suszonych na słońcu, a następnie kompresowanych. Skład świeżej Raw Pu-erh jest bardzo podobny do składu świeżych liści herbaty, co potwierdzono licznymi metodami analitycznymi (wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIRS), spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)). Mimo iż ze świeżych liści *Camelli sinensis var. assamica* oraz surowej Pu-erh wyizolowano i zidentyfikowano wiele związków, to za główne uznano flawonoidy i hydrolizowane garbniki, charakteryzujące się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi (Lv i in. 2013).

- **Raw Pu-erh**

Z grupy flawan-3-oli i ich pochodnych, głównymi składnikami chemicznymi surowego Pu-erh – podobnie jak w przypadku zwykłej zielonej herbaty – są katechiny i ich pochodne, proantocyjanidyny i związki z grupy *theasinensin*. Głównymi katechinami zidentyfikowanymi w *maochy* są galusan epikatechiny (ECG), galusan epigalokatechiny (EGCG) i katechyna (C), z których najliczniej występuje ECG. Dla porównania EGCG jest katechiną dominującą w liściach *Camelli sinensis var. sinensis*.

Do grupy flawonów i ich pochodnych, występujących w herbacie Pu-erh, należą głównie kemferol, kwercetyna, mirycetyna i ich O-glikozylowane flawony oraz acylowane i glikozylowane flawony. Jednak w Raw Pu-erh nie wykryto apigeniny. Tak jak w innych rodzajach herbaty, tak i w surowej Pu-erh dominują związki z grupy flawonów w glikozylowanej postaci.

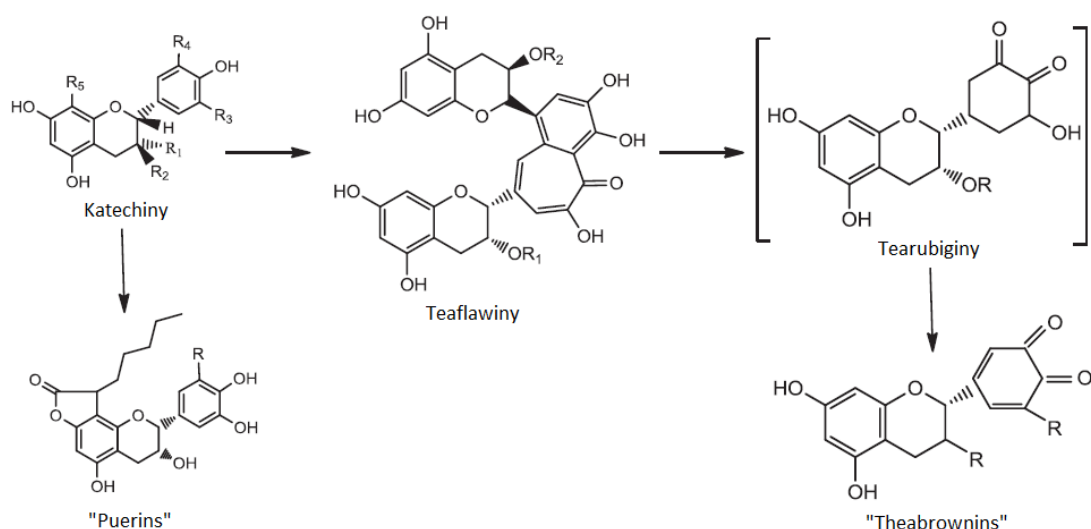
Spośród pozostałych związków fenolowych zawartość hydrolizowalnych tanin w surowej herbacie Pu-erh jest znacznie wyższa niż w zwykłej zielonej herbacie czy sztucznie postarzonej Pu-erh. Ponadto *maocha* bogata jest w teogallinę tak jak czarna herbata produkowana w Indiach i czarna herbata cejlońska. Najprawdopodobniej teogallina jest charakterystycznym składnikiem samego surowca, czyli liści *Camelli sinensis var. assamica*. W Raw Pu-erh zidentyfikowano również koniferynę (Lv i in. 2013; Zhao i in. 2011b).

Skład dojrzewającej Raw Pu-erh jest bardziej zróżnicowany w porównaniu z klasyczną zieloną herbata. Zawiera wiele związków chemicznych, które mogą ulegać przemianom w trakcie naturalnego procesu starzenia oraz fermentacji, prowadząc do uzyskania produktów końcowych o odmiennym składzie chemicznym – część tych związków zaprezentowano w części poświęconej Ripe Pu-erh. Dzięki temu opracowano już metody, pozwalające klasyfikować i rozróżniać zwykłe herbaty zielone oraz surowe Pu-erh (Zhao i in. 2011b).

- **Vintage Raw Pu-erh**

W trakcie naturalnego procesu starzenia skład chemiczny herbat Pu-erh ulega powolnym zmianom. Ripe Pu-erh, dojrzewająca przez rok, oraz Raw Pu-erh, dojrzewająca 6 lat, wykazują w analizie spektrofotometrycznej w podczerwieni bardzo podobne przebiegi oraz maksima absorpcji w postaci pików. Świadczy to o zbliżonej zawartości związków chemicznych wchodzących w skład obu produktów (Lv i in. 2013). Na właściwości antyoksydacyjne herbat Pu-erh znaczący wpływ ma okres ich przechowywania. Herbaty dłużej leżakujące charakteryzują się mniejszą zdolnością redukcji wolnych rodników. W przypadku surowej herbaty Pu-erh zaobserwowano znaczące korelacje pomiędzy EGCG, rytyniną i kwasem galusowym a długością okresu późniejszej fermentacji. Ilości tych związków zmieniały się w sposób zależny od wieku herbaty. Xie i in. (2009) udowodnili, że roczna i 3-letnia próba Pu-erh różniły się od siebie stężeniami niektórych składników chemicznych (TF, TR, TB) i obie znacząco różniły się od próbek 5-, 8- i 10-letnich. Wykazali również, że powyżej piątego roku różnice pomiędzy zawartością badanych związków nie różniły się istotnie statystycznie, co wskazuje na to, że po pewnym czasie dojrzewania, tempo zachodzących zmian się stabilizuje. Naturalne leżakowanie i starzenie się herbaty to etapy niezbędne do uzyskania

odpowiedniej jakości herbaty Pu-erh. Im dłuższy jest czas przechowywania, tym lepiej. W jego trakcie zmianie ulegają zawartości teaflawin, tearubigin i *theabrownin*. Przemiany tych związków przedstawiono na rysunku 3.1. Przez okres pół roku ich ilości wzrastają odpowiednio o 54,7%, 12,6% i 25,5%, tworząc pomarańczową i jasną barwę naparu. Wraz z wydłużeniem czasu przechowywania teaflawiny i tearubiginy ulegają degradacji przez samoutlenianie lub stopniowej konwersji do *theabrownin* przez interakcję z białkiem i aminokwasami. Po roku leżakowania ilości teaflawin i tearubigin znacznie się zmniejszają, podczas gdy *theabrownin* znacznie wzrastają, zmieniając barwę naparu na ciemną. Jest to również główny powód, dla którego smak herbaty staje się lekki, a zapach postarzany (Zhiguo i in. 2019).



Rys. 3.1 Przemiany z udziałem teaflawin, tearubigin i *theabrownin*

Źródło: opracowanie własne na podstawie (Lv i in. 2013; Wang i in. 2017a)

- **Ripe Pu-erh**

W metodzie wo-dui, zmiany zachodzące podczas fermentacji następują szybciej i gwałtowniej niż w wyniku naturalnego dojrzewania. Jednak efekt końcowy – w porównaniu z Vintage Raw Pu-erh – jest bardzo podobny. W wyniku zastosowanego procesu zmniejszeniu ulega zawartość polifenoli, katechin, teaflawin, tearubigin, aminokwasów i rozpuszczalnych cukrów (Tab. 3.1). Wzrasta natomiast zawartość teobrominy i nierozpuszczalnych polifenoli. Równocześnie całkowita zawartość substancji ekstrahowanych wodą zmienia się w nieznacznym stopniu. Oznacza to, że w trakcie reakcji utleniania, degradacji i kondensacji, zachodzących na etapie fermentacji, powstają nowe związki tworzące szczególny kolor, smak oraz aromat herbat Pu-erh – znaczący udział mają związki typu *theabrownin*. Dodatkowo wzrasta poziom polisacharydów oraz α -tokoferolu. Z kolei poziom zawartości kwasu

askorbinowego nie ulega zmianie. Lu i Chen (2008) wykazali, że zielona herbata potraktowana tanazą³ (w różnych ilościach) ma wyższą zdolność przeciwutleniającą niż bez modyfikacji.

Tab. 3.1 Porównanie zawartości wybranych związków w Raw i Ripe Pu-erh

Związek/grupa związków	Świeża Raw Pu-erh	Ripe-Pu-erh
Nierozpuszczalne polifenole	3,52%	6,38%
Polifenole ogółem	29,73%	9,40%
Katechiny ogółem	18,31%	3,62%
C (katechina)	0,49%	0,33%
EC (epikatechina)	1,19%	0,36%
ECG (galusan epikatechiny)	11,31%	-
EGC (epigalokatechina)	2,15%	-
EGCG (galusan epigalokatechiny)	4,04%	-
GC (galokatechina)		0,47%
GCG (galusan galokatechiny)	1,19%	-
Kwas galusowy	0,10%	1,77%
Kwas askorbinowy	0,30 mg/100 g	0,32 mg/100 g
Teogalina	3,26%	-
Teofilina	0,14%	0,03%
Teorubigina	4,35%	0,20%
Teobromina	2,90%	7,85%
Aminokwasy	1,80%	0,66%
Teanina	0,40%	0,08%
GABA	13,00 mg/100 g	3,00 mg/100 g
α - tokoferol	9,12 mg/100 g	15,98 mg/100 g
Cukry rozpuszczalne	5,13%	3,86%
Polisacharydy	0,35%	2,40%
Substancje ekstrahowane	45,00%	41,00%
Kofeina	4,19%	5,17%
Flawonoidy	0,89%	0,96%
Kempferol	1,26 mg/g	0,48 mg/g
Kwercytyna	4,37 mg/g	1,31 mg/g
Mirycetyna	0,63 mg/g	0,33 mg/g
Glikozydy flawonolowe	15,71 mg/g	5,32 mg/g
Lowastyna	-	139,26 ng/g
Aktywność antyoksydacyjna (DPPH)	87,90%	80,94%
Aktywność antyoksydacyjna ($O_2^{\cdot-}$)	135,10%	45,90%
Składniki aromatu		
Alkohole	33,48%	21,38%
Aldehydy	3,39%	6,53%
Ketony	6,96%	11,10%
Estry i laktony	5,58%	9,49%
Węglowodory	31,15%	13,38%

³ Tanaza jest enzymem wytwarzanym przez niektóre grzyby strzępkowe. Ich obecność w procesie fermentacji zwiększa bioaktywność herbaty Pu-erh.

Kwasy	1,14%	0,62%
Związki metoksyfenolowe	8,42%	27,10%

Źródło: opracowanie własne na podstawie (Hou i in. 2009; Lv i in. 2013)

Podczas procesu fermentacji zwiększa się także zawartość kwasu galusowego, co prawdopodobnie jest związane z aktywnością drobnoustrojów powodujących hydrolizę tanin. Dodatkowo przy podwyższonej temperaturze oraz wilgotności, może on pochodzić z degradacji galusanów katechiny. Proces fermentacji wpływa również na zwiększenie zawartości kofeiny. Z kolei ilości mirycetyny, kwercetyny i kemferolu w produkcie fermentowanym są mniejsze w porównaniu z surową odmianą. Spada również zawartość glikozydów flawonowych, podczas gdy poziom flawonoidów wrasta (Lv i in. 2013). Jeng i in. (2007) wykazali, że wraz z wydłużaniem czasu trwania fermentacji (analiza obejmowała czas do 180 dni) za pomocą *Streptomyces bacillaris* lub *Streptomyces cinereus* zwiększa się w stopniu znaczącym zawartość polifenoli ogółem, GABA (kwas γ -aminomasłowy) i statyn, które w Raw Pu-erh są na granicy wykrywalności.

Opisane wyżej zmiany głównych składników chemicznych przyczyniają się do zmiany jakości produktu końcowego ze świeżego i wyrazistego smaku przypominającego herbatę zieloną na specjalny nieświeży, ale łagodny smak herbaty Pu-erh. Znaczące są też zmiany parametrów barwy naparu, który traci swoją barwę żółtozieloną na rzecz czerwono-brązowej (Lv i in. 2013).

Ostatecznie gotowa Ripe Pu-erh, w porównaniu z herbatą zieloną, oolong, białą czy nawet czarną, zawiera niewielką ilość monomerów katechin. Spośród pozostałych najliczniej występują galokatechina (GC) i epikatechina (EC) (w zielonej dominują EGCG i GC, a w czarnej GC i ECG). Wysoka zawartość GC w Ripe Pu-erh może być konsekwencją biotransformacji katechin z EGCG do EGC, a następnie do GC. Ponadto wykazano, iż główną katechiną w ekstrakcie tego rodzaju Pu-erh jest EC. Zawartość ECG, EGC i EGCG jest stosunkowo niska, często trudna do zidentyfikowania za pomocą HPLC (Lv i in. 2013).

Zhou i in. (2005) zidentyfikowali dwa flawan-3-ole z podstawieniami w pozycji 8-C. Związki te nazwano *Puerin A* (R=H) i *Puerin B* (R=OH). Kilka lat później Tao i in. (2014) odkryli kolejne 4 formy tego flawonu i nazwali je kolejno *Puerin C-F*.

Theabrownin (TB) jest jednym z głównych związków bioaktywnych w herbacie Pu-erh, który rozpuszcza się w wodzie, ale nie rozpuszcza się w octanie etylu, alkoholu n-butylovym ani innych rozpuszczalnikach organicznych. Jest uważany za determinantę koloru i smaku

herbaty Pu-erh, ale także za ważny parametr służący do oceny jakości herbaty Pu-erh (Lv i in. 2013).

Opisane w literaturze ilości kwercetyny, kemferolu i mirycetyny są zróżnicowane, co najprawdopodobniej spowodowane może być różnicami w analizowanych próbkach herbaty oraz nietrwałości analizowanych związków w trakcie przechowywania produktu (Ostadalova i in. 2014). Flawony w herbacie Pu-erh występują głównie jako glikozydy, głównie jako kwercetyno-3-O-glukozyd i kwercetyna-3-O-rutynozyd. Zawartość glikozydów flawonoidowych w omawianym rodzaju herbaty jest znacznie niższa w porównaniu z wersją Raw. Zidentyfikowano i potwierdzono również obecność luteoliny, wykazującej silną aktywność biologiczną (Lv i in. 2013).

Mechanizmy zmian, zachodzące w trakcie fermentacji nie są jeszcze dokładnie poznane, ponieważ należałoby przeanalizować wpływ poszczególnych rodzajów grzybów obecnych w tym procesie na wszystkie składniki herbaty, a następnie przeanalizować ich koegzystencję.

3.2. Wpływ spożywania herbaty Pu-erh na organizm człowieka

Pu-erh, podobnie jak inne herbaty, jest źródłem polifenoli, alkaloidów, białek, wolnych aminokwasów, węglowodanów, pigmentów, lipidów, minerałów, witamin i związków aromatycznych. Wybór odpowiedniego rodzaju Pu-erh oraz jego jakość determinują skład naparu. Dodatkowo sposób parzenia herbaty również wpływa na strukturę składników bioaktywnych obecnych w przygotowanym napoju.

Badania *in vitro* i na zwierzętach wykazały, że Raw (zielona), Vintage (dojrzała) i Ripe (sztucznie postarzana) Pu-erh mają szereg działań ochronnych dla zdrowia człowieka, w tym między innymi działanie przeciwdrobnoustrojowe (Chen, Liu i Chang 2010; Hu i in. 2010). W 2011 roku przedstawiono wyniki badań, które wskazywały na potencjalne właściwości lecznicze także w kontekście HBV (wirusowe zapalenie wątroby typu B) (Pei i in. 2011).

Podobnie jak pozostałe rodzaje herbaty, również Pu-erh wykazuje działanie przeciwutleniające. Herbata została poddana serii testów antyoksydacyjnych w różnych modelach eksperymentalnych. Za każdym razem naukowcy wykazywali, że jej ekstrakty mają silny wpływ ochronny na uszkodzenie oksydacyjne *in vitro*. Wykazano również, że główne związki przeciwutleniające, takie jak epikatechina, flawonoidy i kwas askorbinowy, występują w herbacie Pu-erh w zdecydowanie mniejszych ilościach aniżeli w innych herbatach. Uznano wtedy, że Pu-erh musi zawierać w swoim składzie inne składniki aktywne o silnych właściwościach przeciwutleniających (Duh i in. 2004; Roda i in. 2019; Zhang i in. 2013b).

Badania przeprowadzone na szczurach potwierdziły, że spożywanie herbaty Pu-erh chroni tkankę wątroby (hepatocyt) przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Duh i in. 2004; Duh i in. 2010).

Z kolei Zhang i in. (2012) wykazali, że podawanie myszom ekstraktu herbaty powoduje spowolnienie immunosenescencji, poprawiając odporność i zmniejszając poziom cytokin prozapalnych. Zatem jej długotrwałe picie może być korzystne dla osób starszych pod względem zwiększenia odporności organizmu na infekcje i niektóre rodzaje nowotworów.

Liczne badania potwierdzają również działanie antymutagenne (słabsze niż w herbacie zielonej, oolong i czarnej) i przeciwnowotworowe. Składniki aktywne nie tylko zapobiegają zmianom w materiale genetycznym, ale również hamują namnażanie komórek nowotworowych i zapobiegają ewentualnym przerzutom (Chen, Liu i Chang 2010; Wu i in. 2007; Zhao i in. 2011a; Zhao i in. 2014). Zhao i in. (2011a) przedstawili w swojej pracy mechanizm działania herbaty Pu-erh, który tłumaczy jej selektywność w hamowaniu komórek nowotworowych bez wpływu na komórki typu dzikiego⁴.

Yu i in. w 2014 roku stwierdzili, że spożywanie herbaty Pu-erh wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Wykazano, że składniki ekstraktu herbaty Pu-erh oddziałują z białkami z rodziny FET⁵ – odpowiedzialnymi za rozwój stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Ich ustalenia dowodzą, że Pu-erh może zapobiegać wystąpieniu tych białek oraz hamować ich agregację – opóźniając progres ALS. Następnie Li i in. (2017) przedstawili wyniki badań nad wpływem związków zawartych w herbacie Pu-erh na centralny układ nerwowy. Wykazali, że herbata ta znacznie hamuje aktywację mGluR⁶ (jego rozregulowanie wiąże się z wieloma zaburzeniami mózgu) w porównaniu do herbat czarnych i zielonych. Herbata Pu-erh chroni komórki nerwowe przed martwicą, wywołaną nadmiarem glutaminy⁷. Dodatkowo w badaniach na szczurach z padaczką zmniejszona została zawartość wtórnych przekazników. Wyniki te sugerują, że herbata Pu-erh jest potencjalnym środkiem neuroochronnym działającym poprzez regulację mGluR5.

Dodatkowo Liu i in. (2017) sugerują, że spożywanie herbaty Pu-erh znacznie łagodzi niedobór estradiolu (badanie przeprowadzono na szczurach OVX). Konsumpcja tej herbaty

⁴ Zdrowa forma, standard, punkt odniesienia.

⁵ Wiąże się z RNA i przyczyniają do kontroli transkrypcji, przekształcania RNA i reakcji informacyjnego RNA zachodzących w cytoplazmie wielokomórkowych organizmów zwierzęcych. Białka te mogą również wiązać DNA (Schwartz, Cech i Parker 2015).

⁶ Metabotropowy receptor glutaminianowy 5 (mGluR5) jest jednym z receptorów glutaminianowych i stanowi cel w badaniach nad potencjalnymi środkami neuroprotekcijnymi.

⁷ Glutaminian jest jednym z głównych pobudzających neuroprzekazników centralnego układu nerwowego i jest niezbędny dla wielu kluczowych funkcji neuronalnych. Jednak jego nadmiar powoduje śmierć neuronów i uszkodzenie mózgu z powodu patologicznego procesu ekscytotoksyczności.

wpływa na homeostazę wapnia i fosforu, poprawia parametry biochemiczne krwi oraz gęstość mineralną kości. Kolejne prace Liu doprowadziły do wyznaczenia składników odpowiedzialnych za właściwości przeciw osteoporotyczne. Za najważniejszy związek, wykazujący takie działanie, uznano *theabrownin* (Liu i in. 2018).

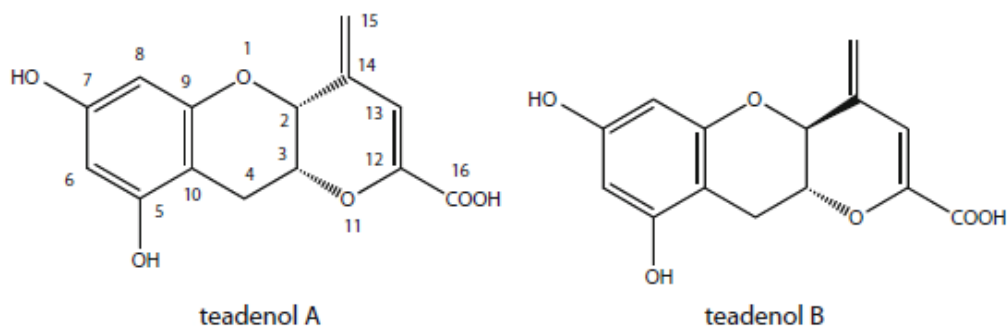
Jednak do najbardziej znanych właściwości prozdrowotnych herbaty Pu-erh należą te, związane bezpośrednio ze zmianami poziomu cukru oraz tłuszczów we krwi. Wyniki uzyskane przez Cai i in. (2016), Du i in. (2012) oraz Huang i in. (2013) sugerują, że wodne ekstrakty herbaty Pu-erh powodują wyraźną supresję hiperglikemii poposiłkowej w modelu *in vivo* oraz mają korzystny wpływ na homeostazę glukozy w cukrzycy typu 2 oraz poprawie insulinowrażliwości. Konsumpcja składników zawartych w herbacie Pu-erh obniża poziom lipidów, masę tkanki tłuszczowej, lipazy lipoproteinowej u szczurów, ale zwiększona przy tym zostaje aktywność lipolityczna indukowana adrenaliną – o czym doniesiono już w roku 1986. Sano i in. (1986) stwierdzili, że biologiczne działanie tej herbaty jest silniejsze niż zielonej, ponieważ wyraźnie obniżało poziom cholesterolu, triglicerydów i LDL-u, a zwiększało poziom HDL w surowicy i wątrobie. Od tego momentu pojawiło się wiele opracowań (Chiang i in. 2006; Hou i in. 2009; Kuo i in. 2005; Yang i Koo 1997) potwierdzających te właściwości oraz tłumaczących mechanizmy, jakie zachodzą w organizmie żywym po spożyciu naparu lub przyjęciu wyciągu wodnego – zarówno w modelu stosowania normalnej diety, jak i wysokotłuszczowej. Pojawiały się również pojedyncze opracowania niepotwierdzające działania hipocholesterolemicznego herbaty Pu-erh. Oi i in. (2012) wykazali, że zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej oraz poziomu triglicerydów zachodzi na skutek zmniejszenia aktywności lipazy trzustkowej. Z kolei Peng i in. (2013) przedstawili wyniki badań, w których za skuteczne regulowanie metabolizmu lipidów u zwierząt i obniżanie poziomu cholesterolu całkowitego, frakcji o niskiej gęstości i triglicerydów w surowicy odpowiadały *theabrownin*.

Naukowcy przez lata analizowali skład i właściwości herbaty Pu-erh. Wielokrotnie w wynikach swoich badań podkreślali, że herbata zawiera nieznanne im składniki. W tym miejscu należy wspomnieć jeszcze o 4 związkach charakterystycznych dla tego produktu – statynach, teadenolu, *theabrownin* oraz *strictinin*, które są odpowiedzialne za niektóre z opisanych powyżej korzystnych właściwości.

Ze względu na wykorzystanie w produkcji herbaty Pu-erh drobnoustrojów, głównie *Aspergillus cristatus* czy *Aspergillus niger*, oczekuje się, że herbata ta będzie zawierać bioaktywne metabolity tych mikroorganizmów. Hwang (2003) przeprowadził badania jakościowe, wykrywając lowastynę. Kilka lat później Yang i Hwang (2006) przeprowadzili dokładną analizę konwersji lowastyny, simwastatyny i prawastyny z form laktonowych do ich

odpowiednich hydroksykwasów oraz sprawdzili ich zawartości w herbacie Pu-erh. Wykazano, że ekstrakt wodny herbaty Pu-erh zawiera tylko lowastynę, ale za to w obydwu formach (forma laktonu – 21,12 ng/g suchej masy, forma hydroksykwasu – 40,42 ng/g suchej masy). Zawartość statyn w herbacie tego rodzaju zależy od dwóch czynników: składu obecnych w trakcie fermentacji drobnoustrojów oraz czasu trwania tego procesu (Jeng i in. 2007). Mimo iż ich ilość w naparze herbaty jest niewielka, to regularne ich przyjmowanie może wspomóc leczenie lub zmniejszyć ryzyko hiperlipidemii czy chorób układu sercowo-naczyniowego. Jest to jeden ze składników aktywnych herbaty Pu-erh, dzięki któremu synteza cholesterolu zostaje zmniejszona. Prowadzone są badania pokazujące, iż statyny wykazują szerszy zakres działania w chorobach neurologicznych, reumatologicznych czy alergologicznych. Szczególną uwagę zwraca się obecnie na ich działanie przeciwzapalne i immunomodulujące (Climent i in. 2017).

Wulandari i in. (2011) wyizolowali i dokładnie opisali strukturę dwóch nowych związków fenolowych, uzyskanych w wyniku fermentacji liści krzewu herbacianego z udziałem *Aspergillus* sp. Pierwszy z opisanych związków – teadenol A – jest metabolitem pochodzącym z EGCG. Drugi z nich – teadenol B – jest metabolitem pochodzącym z GCG (Rys. 3.2).



Rys 3.2 Struktura chemiczna teadenolu A i teadenolu B

Źródło: Wulandari i in. 2011

Teadenol pobudza wydzielanie adiponektyny i hamuje ekspresję białkowej fosfatazy tyrozynowej-1B (PTP1B). Adiponektyna, polipeptyd wysoce specyficzny dla tkanki tłuszczowej, ma właściwości przeciwzapalne oraz przeciwmiażdżycowe i korzystnie wpływa na metabolizm. Zmniejsza względne ryzyko cukrzycy typu 2 i jest odwrotnie skorelowana z trzewną tkanką tłuszczową. PTP1B jest ujemnym regulatorem transdukcji sygnału insuliny i leptyny oraz nowym celem terapeutycznym dla cukrzycy typu 2, otyłości i insulinowrażliwości (Su i in. 2016). Wulandari i in. (2011) nie wykryli teadenolu w komercyjnie występujących produktach. Z kolei Su i in. (2016) podjęli się oceny aktywności teadenolu w herbatach komercyjnych oraz analizowali jego zmiany w trakcie fermentacji.

W dostępnym materiale zidentyfikowali teadenol A w zróżnicowanych ilościach – od 0,17 mg/g do 8,15 mg/g. W roku 2017 Song, Miyazaki i Yoshida porównali zawartość teadenolu w dwóch komercyjnych herbatach Ripe Pu-erh (z surowca z Chin oraz z surowca z Japonii), w „Yabamuki-nadeshiko” oraz herbacie przygotowanej według własnej receptury. Niestety w próbach uzyskanych z chińskiego surowca nie wykryli analizowanych związków. Obie frakcje były za to obecne w pozostałych próbach. Najmniej teadenolu oznaczono w Ripe Pu-erh z japońskiego surowca (teadenol A – 0,20 µg/ml, teadeol B – 0,57 µg/ml), większe ilości były w „Yabamuki-nadeshiko” (odpowiednio 3,10 µg/ml i 9,51 µg/ml). Najwięcej było go w wersji opracowanej przez zespół (odpowiednio 3,22 mg/ml i 4,49 mg/ml) co pokazuje, że w wyniku tych badań rośnie wiedza o warunkach i mechanizmach powstawania tego związku, a także że jest jeszcze miejsce na poprawę wydajności procesów produkcji tych związków, wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, żywnościowym i paszowym.

Podczas procesu fermentacji herbaty, katechiny i ich galusowe pochodne są utleniane do fenolowych kompleksów barwnych, w tym teaflawin (TF) i tearubigin (TR). Teaflawiny ulegają dalszemu utlenianiu i tworzą bardziej spolimeryzowane tearubiginy, które są następnie kondensowane do *theabrownin* (Huang i in. 2019). Tak więc herbaty z największym stopniem utlenienia związków pierwotnych, będą charakteryzowały się mniejszą zawartością katechin, a większą związków wymienionych powyżej. *Theabrownin* po raz pierwszy został wyizolowany z herbaty czarnej w 1957 roku. Związek obecny w herbacie Pu-erh jest bardzo do niego podobny. Zarówno pod względem budowy, jak i właściwości. Z tego powodu został tak samo nazwany. Stanowi on brązowy pigment, który dobrze rozpuszcza się w wodzie, ale nie w rozpuszczalnikach organicznych. W herbacie czarnej jego zawartość wynosi około 9% masy. W herbacie Pu-erh jest go więcej, bo może przekraczać nawet 18% masy (Gong i in. 2010; Wu i in. 2019).

Theabrownin jest głównym barwnikiem herbaty Pu-erh i jednym z najważniejszych składników aktywnych. Potencjalny wpływ na zdrowie nadal jest przedmiotem badań, ponieważ związek ten nie został jeszcze do końca poznany. Potwierdzono, że *theabrownin* skutecznie obniża ciśnienie krwi i łagodzi objawy nadciśnienia (rozszerza naczynia krwionośne aorty) (Luo i in. 2019). Przyspiesza katabolizm lipidów u szczurów i może wpływać na metabolizm glukozy. Ma znaczące działanie obniżające stężenie lipidów we krwi: zmniejsza poziom triglicerydów w surowicy, cholesterolu całkowitego (TC) i lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), równocześnie podnosząc poziom lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Nie miał znaczącego wpływu na metabolizm lipidów we krwi u zdrowych szczurów. Regularne

przyjmowanie omawianego związku może skutecznie zapobiegać otyłości i insulinooporności (badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym). W połączeniu z lekkimi ćwiczeniami fizycznymi zapobiegał otyłości i łagodził zespół metaboliczny u szczurów (Gong i in. 2010; Liu i in. 2016; Wu i in. 2019). *Theabrownin* z herbaty Pu-erh osłabia hipercholesterolemię poprzez modulację mikroflory jelit i metabolizm kwasów żółciowych (Huang i in. 2019). Jak już wcześniej wspomniano, znacznie łagodzi niedobór estradiolu, wpływa na homeostazę wapnia i fosforu, poprawia parametry biochemiczne krwi oraz gęstość mineralną kości (Liu i in. 2017). Wykazuje również działanie antynowotworowe i antymutagenne. Dane *in vivo* potwierdziły wynik *in vitro*, że *theabrownin* może znacząco hamować wzrost raka płuc u myszy i indukować apoptozę guzów w sposób zależny od dawki. Obiecujące wyniki uzyskano w przypadku leczenia raka płuc, a także kostniakomięsaka. Badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że związek ten znacząco hamuje wzrost guza i wykazuje przy tym silniejsze działanie niż chemioterapia (Jin i in. 2018; Zhou i in. 2017).

Strictinin zidentyfikowano już w roku 1983 w zielonej herbacie. Związek ten należy do grupy elagotanin i jest taniną hydrolizującą. Występuje w różnych herbatach jako mniejszościowy związek fenolowy. Jednak w herbacie Raw Pu-erh, uzyskiwanej z liści i pąków z dzikich drzew, to *strictinin* a nie katechiny stanowią większościowy związek fenolowy. Już sam surowiec (z dzikich drzew) zawiera zdecydowanie większe jego ilości w porównaniu z tym pozyskanym z uprawianych krzewów (Chen i in. 2018; Hsieh i in. 2016). Zhou, Yang i Liu (2004) wykazali, że *strictinin* stosowany samodzielnie lub w połączeniu z α -tokoferolem jest skutecznym przeciwutleniaczem mogącym zapobiegać peroksydacji lipidów. Jego działanie jest jednak uzależnione od środowiska reakcji. Saha i in. (2010) opublikowali wyniki swoich badań, w których omawiany związek fenolowy wykazywał działanie przeciwwirusowe. Według autorów *strictinin* zapobiega replikacji wirusa grypy typu A u ludzi, kaczek i świń w badaniach *in vitro*. Wykazuje również działanie przeciwwirusowe na wirusa grypy typu B oraz wirusa grypy rzekomej typu 1. Wykazuje również właściwości przeciwbakteryjne (Hsieh i in. 2016). Potwierdzono tę właściwość w stosunku do *Propionibacterium acnes* i *Staphylococcus epidermidis*. Działanie to było skuteczniejsze niż 10 antybiotyków najczęściej stosowanych w zakażeniach bakteryjnych. Autorzy wykazali również, że regularne podawanie *strictinin* ma działanie przeczyszczające, ale nie związane z przyspieszonym opróżnianiem żołądka a z przyspieszeniem tranzytu jelitowego. W najnowszym opracowaniu Chen i in. (2018) wykazali, że *strictinin* ma działanie hamujące działanie lipazy trzustkowej *in vitro*. Ponadto w badaniu długoterminowym wykazano, że obniża ona poziom triglicerydów, cholesterolu i glukozy we krwi oraz akumulację tłuszczu u myszy karmionych dietą

wysokotłuszczową. To dzięki temu składnikowi herbata Pu-erh może wykazywać działanie wspomagające w leczeniu otyłości. Prawdopodobnie wynika to z zapobiegania wchłanianiu tłuszczu z diety przez hamowanie lipazy trzustkowej. Wydaje się więc, że *strictinin* może stanowić łagodny i naturalny zamiennik dla orlistatu (lek stosowany w leczeniu otyłości), który wykazuje wiele negatywnych efektów.

Analizując doniesienia naukowe o nowych składnikach herbaty lub ich właściwościach, należy pamiętać, że w samym naparze składniki aktywne występują w niewielkich ilościach. Aby uzyskać pozytywny wpływ na organizm, należy codziennie w dłuższej perspektywie czasu spożywać herbatę dobrej jakości i przygotowaną w odpowiedni sposób.

4. Autentyczność i potrzeba identyfikacji herbaty Pu-erh

Uważa się, że zmiana jakości herbaty Pu-erh z wiekiem jest cechą wyróżniającą ją na tle innych rodzajów herbat. Jednak nie jest to jedyna jej właściwość, dzięki której szybko zyskała uznanie i popularność.

Pierwszą niezwykłą jej cechą jest smak. Jedno z chińskich powiedzeń głosi, że „kiedy pokochasz Pu-erh, nie będziesz pił żadnej innej herbaty”. Jednak dla przeciętnych konsumentów pierwszy napar Pu-erh może okazać się nieprzyjemnym. Surowy Pu-erh, mimo iż jest zieloną herbatą, to jest bardzo mocny i wyrazisty w smaku, nieco zbliżony do japońskich herbat zielonych. Z kolei wersja sztucznie postarzana może posiadać nieakceptowalny przez większość osób smak „ziemisty”, „spleśniały” czy też „rybny”. Często wystarczy znaleźć odpowiedni dla siebie sposób parzenia oraz spróbować herbaty z różnych fabryk, różnych regionów, aby odnaleźć tą odpowiednią. Po czasie można się przyzwyczaić do specyficznych aromatów herbaty Pu-erh i odkryć inne walory smakowe. Można to porównać do degustowania wina lub mocniejszych alkoholi jak whisky. Chińskie słowo stosowane do opisanie idealnego smaku surowej herbaty Pu-erh to „huigan”, oznaczające utrzymującą się słodycz po początkowej goryczy lub cierpkości. Z kolei dobra sztucznie postarzana herbata Pu-erh popularnie opisywana jest jako „ciepła” lub „gładka”. W licznych opisach herbat oferowanych na sprzedaż pojawiają się kwiatowe, ziołowe, a nawet owocowe aromaty, jak na przykład: orchidei, kamfory, lotosu czy głożyny pospolitej.

Drugą niezwykłą cechą herbaty Pu-erh jest jej wartość zdrowotna – ceniona od tysięcy lat. W rozdziale 3.1 przedstawiono wyniki badań potwierdzające jej wpływ na utratę masy ciała, poprawę trawienia, obniżenie wysokiego ciśnienia krwi i ochronę przed różnymi chorobami.

Trzecią szeroko promowaną cechą herbaty Pu-erh jest jej wartość kulturowa. Szczególnie głośno podkreślane są dwa aspekty: powiązanie z *Ancient Tea Horse Road* oraz składanie jej w hołdzie cesarzowi. Na uwagę zasługuje również tradycja prasowania, pochodząca z czasów dynastii Tang i Song (od VII do XIII wieku). W okresie gwałtownie rosnącej popularności uważano, że picie herbaty Pu-erh stanowiło nową modę i styl życia.

Ostatnią i kluczową cechą herbaty Pu-erh była jej wartość finansowa. Herbatę Pu-erh zaczęto wykorzystywać jako pewne narzędzie inwestycyjne. Około 2003 roku handlarze herbaty zaczęli opierać funkcjonowanie swoich przedsiębiorstw na transakcjach z udziałem przede wszystkim herbaty Pu-erh, a rzadziej zielonej czy oolong. Herbata zielona lub oolong traci swoją wartość, jeśli nie zostanie sprzedana w odpowiednim czasie – bez względu na jej początkową wartość. Z herbatą Pu-erh jest wręcz odwrotnie – im starsza, tym bardziej zyskuje

na wartości. Niektóre egzemplarze na aukcjach uzyskiwały bardzo wysokie ceny. W rezultacie coraz więcej osób zaczęło zajmować się poszukiwaniem młodych egzemplarzy Pu-erh, a następnie jej przechowywaniem (Zhang 2014).

Z opisanych powyżej powodów herbata Pu-erh stała się niezwykle popularna w pierwszych latach XXI wieku. Wiceprezes Stowarzyszenia Herbaty prowincji Yunnan podał, że wielkość produkcji herbaty Pu-erh w latach 70. XX wieku wynosiła zaledwie jeden do dwóch tysięcy ton na rok. Według informacji przekazanych w lipcu 2007 roku produkcja omawianej herbaty osiągnęła w roku 2006 poziom 80 tys. ton, o 28 tys. więcej niż w roku poprzednim. W latach 2005-2006 wielkość produkcji herbaty Pu-erh wzrosła z 45% do 58% (w odniesieniu do łącznej produkcji herbat w prowincji Yunnan). Zmianie uległ wzór konsumpcji i produkcji herbaty w prowincji Yunnan, a także w innych, pobliskich jednostkach terytorialnych (Zhang 2014).

4.1. Rynek herbaty Pu-erh

Ze względu na różne odmiany herbaty Pu-erh jej rynek również jest podzielony. Chińczycy nie mają w zwyczaju spożywać wersji Ripe, która została stworzona na potrzeby krajów europejskich i amerykańskich. Dlatego niemal cała produkcja tej Pu-erh przeznaczona jest na eksport. Rynek rodzimy zdominowany jest przez Raw i Vintage Raw Pu-erh, ponieważ tradycyjnie spożywa się tam herbaty zielone oraz naturalnie dojrzewające.

Według danych zaprezentowanych w oparciu o europejską nomenklaturę, w Polsce oraz pozostałej części Europy najczęściej spożywa się herbatę czarną. Jednak od kilku lat jej udział w rynku maleje na rzecz innych rodzajów herbat – przede wszystkim herbaty zielonej. Statystyki, dotyczące spożycia herbaty obejmują zazwyczaj podział na trzy grupy: herbatę czarną, herbatę zieloną i inne. Do ostatniej z nich należą pozostałe 4 rodzaje herbat, w tym Pu-erh. Niestety w tej grupie często są uwzględniane również herbatki. Udział w rynku herbat z grupy „inne” jest niewielki w porównaniu z herbatą czarną i zieloną (CBI 2016; <http://portalspozywczy.pl/napoje/wiadomosci/rynek-kawy-w-polsce-wart-5-3-mld-zl-a-herbaty-2-mld-zl,140293.html>).

Mimo iż prognozy sugerują w najbliższych latach spadek wielkości spożycia herbaty czarnej na rzecz innych rodzajów herbaty, to jej produkcja w Chinach będzie stale rosła. Według Organizacji Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa wzrost ten będzie wynikać ze wzrostu produkcji herbat z grupy „dark”, w której największy udział ma herbata Pu-erh (FAO 2018).

W przypadku Pu-erh najwyższej jakości preferowaną metodą sprzedaży były oraz nadal są aukcje, na których niektóre egzemplarze tej herbaty osiągały niesamowicie wysokie ceny. Na początku XX wieku dochodziło do licznych działań, mających na celu sztuczne windowanie cen tej herbaty. Proceder ten rozwinął się na ogromną skalę. Jednym z jego efektów była sprzedaż w listopadzie 2002 r. na Międzynarodowych Targach w Guangzhou 100 gramów trzyletniej herbaty Pu-erh za 168 tys. juanów (94 tys. zł, CNY=0,56 zł). Następnie w roku 2004 podczas chińskiego Nowego Roku trzy gramy rzadkiego Pu-erh z dynastii Qing zostały sprzedane na aukcji za 12 tys. juanów (6 720 zł, CNY=0,56 zł). To 4 tys. juanów za gram, czyli trzydzieści dwa razy więcej niż cena złota w tym czasie. Na uwagę zasługuje również wynik, jaki uzyskano w maju 2007 r. na wystawie Shenzhen Tea. Wysokiej klasy ciastko świeżej Pu-erh „Jingxiu Chazu” (499 gramów) zostało sprzedane na aukcji za 400 tys. juanów (224 tys. zł, CNY=0,56 zł), co było jak dotąd najwyższym wynikiem aukcyjnym świeżej herbaty Pu-erh (<https://teasenz.com/chinese-tea/2007-pu-erh-tea-market-crash-boom-bust-crisis-recession.html>; Zhang 2014).

Niespotykana sytuacja rynkowa przyniosła wysokie zyski handlowcom. Wiele osób (również spoza Chin) postanowiło zainwestować w herbatę Pu-erh i wykorzystać ją jako instrument finansowy, służący do zabezpieczenia i pomnażania swojego majątku. W 2006 i na początku 2007 roku wielu indywidualnych inwestorów zainwestowało w rynek herbaty. Widząc rosnące zapotrzebowanie na Pu-erh, sukcesywnie przybywało osób, zajmujących się jej produkcją. Efekty najbardziej zauważalne były w 2007 roku, gdy na rynku zaczęły pojawiać się coraz większe ilości tej herbaty – nie zawsze dobrej jakości. W skupach oraz na aukcjach nie prowadzono kontroli jakości, pozwalającej na identyfikację pochodzenia oraz wieku oferowanych herbat. Dlatego zaistniała sytuacja była okazją do wprowadzania na rynek produktów o nazwie „herbata Pu-erh” o wątpliwym pochodzeniu. Przez pogorszenie jakości oferowanych produktów, ich ceny zaczęły powoli spadać, co wywołało panikę wśród inwestorów. Pojawiły się obawy, że sytuacja rynkowa może się zacząć zmieniać i aby uniknąć dużych strat, wielu inwestorów zaczęło pozbywać się swoich zasobów herbaty. Speculanci zdążyli sprzedać swoje zapasy, co dodatkowo spotęgowało spadek wartości Pu-erh. Gdy bańka spekulacyjna pękła, rynek się załamał, a wiele osób zbankrutowało. W kwietniu 2007 roku w dosłownie 3 dni ceny gwałtownie spadały (<https://hojotea.com/indexe.html>; <https://teasenz.com/chinese-tea/2007-pu-erh-tea-market-crash-boom-bust-crisis-recession.html>; Zhang 2014).

Sytuacja na rynku herbaty ustabilizowała się w roku 2010. Herbata Pu-erh nadal pozostaje popularną inwestycją, ale zjawisko to nie występuje już na tak olbrzymią skalę. W Azji nadal

funkcjonują aukcje herbat, na których zawsze największe zainteresowanie wzbudzają herbaty Pu-erh (<https://theedgemarkets.com/article/tea-alternative-investment-part-1>). Najwięcej aukcji odbywa się w Chinach, najczęściej mają one charakter cykliczny. Ważnym miejscem handlu herbatą Pu-erh jest Hong Kong, który miał duży udział w promowaniu tradycyjnego Pu-erh, wyprodukowanego z surowca z gór herbacianych.

Po ustabilizowaniu się rynku, licytacje herbaty Pu-erh ponownie przyciągają wielu uczestników. Jednak obecność mistrzów herbaty, którzy odpowiedzialni są za kontrolę wprowadzanych produktów, powoduje, że nie dochodzi już do sztucznego windowania cen. Szczególne zainteresowanie handlowcy kierują w stronę najlepiej rokujących młodych Raw Pu-erh, a także Vintage Raw Pu-erh, uzyskanych z surowca o wyjątkowym pochodzeniu, wytworzonych przez uznanych mistrzów herbaty oraz przechowywanych w stałych i pewnych warunkach. 26 listopada 2018 r. na aukcji w Hongkongu prasowaną Pu-erh (14 954 g) z późnych lat 80. sprzedano za kwotę pięciu milionów siedmiuset pięćdziesięciu tysięcy dolarów HK (2 875 000 zł, HKD=0,50 zł). Licytacja Pu-erh z Yang Pin Hao (318 g) zakończyła się 2 milionami osiemdziesięcioma ośmioma tysiącami dolarów HK (1 044 000 zł, HKD=0,50 zł) (<http://teasommelier.be/aged-puerh-reached-a-record-high-price-in-hong-kong-autumn-auction>). Z kolei stuletnią Nan Piao Shong Ping Pu-erh (ok. 2 491 g) sprzedano ostatecznie za 13 328 000 HK (6 664 000 zł, HKD=0,50 zł). Nowy rekord został ustanowiony 29 maja 2019 roku, gdy na aukcji Tokyo Chuo Hong Kong sprzedano najdroższą herbatę Pu-erh w historii – 1920 Zi Piao Fu Yuan Chang Hao (2236 g) – za cenę 26 320 000 HK (13 160 000 zł, HKD=0,50 zł) (<https://flavourful.co/blog/the-most-expensive-pu-erh-tea-in-history>).

4.2. Regulacje prawne dotyczące herbaty Pu-erh

Bardzo długo nie zdefiniowano pojęcia herbaty Pu-erh, co umożliwiło pojawienie się na rynku ogromnych ilości herbaty nazywanej Pu-erh o niepotwierdzonym pochodzeniu. Przed wzrostem popytu na herbatę Pu-erh istniały regulacje, dotyczące standardów jakości, a nie definicji. Pierwszy standard jakości został uchwalony przez rząd krajowy około 1955 roku, zaś drugi przez władze prowincji Yunnan w roku 1979.

Na początku XXI wieku do przetwórstwa w prowincji Yunnan trafiały duże ilości surowca z Syczuan, Guangxi i Guangdong. Wyprodukowana z tego surowca herbata nie odpowiadała ustanowionemu standardowi, gdyż otrzymano ją z małych liści. W pracach nad definicją herbaty Pu-erh wspomniano o dostępności surowca o dużych liściach z innych obszarów.

Jednak znawcy tej herbaty stwierdzili, że jakość tego rodzaju surowca jest kształtowana przez unikalne naturalne warunki panujące tylko i wyłącznie w prowincji Yunnan. Mistrzowie herbaty przyznali, że herbata z Laosu, Wietnamu czy Birmy ma wiele cech wspólnych z herbatą z Yunnan i że przy zastosowaniu prawidłowych technik produkcji można ją przekształcić w herbatę Pu-erh, którą trudno byłoby odróżnić od chińskiej. Jednak w tym miejscu odwołują się do wątku historycznego przypominając, że herbata ta wzięła swoją nazwę od prefektury Pu'er, zlokalizowanej w prowincji Yunnan (Zhang 2014).

26 stycznia 2003 roku wydano pierwszy lokalny standard dla herbaty Pu-erh DB53/103-2003, który wdrożono 1 marca 2003 roku. Został on zaproponowany przez Stowarzyszenie Herbaty Yunnan, pod jurysdykcją Biura Jakości i Nadzoru Technicznego Yunnan. Norma definiowała herbatę Pu-erh jako: wytwarzaną z dużych liści krzewu herbacianego, które zostały wysuszone na słońcu; z surowca pochodzącego z prowincji Yunnan; występującą w postaci sypkiej lub prasowanej; o brązowo-czerwonej barwie, z jasnym i ciemnoczerwonym naparem; o łagodnym smaku, z wyraźną słodyczą po nucie goryczy; smakiem zmieniającym się z biegiem czasu; liśćmi po zaparzeniu barwy brązowoczerwonej (<http://std.samr.gov.cn>; <https://www.puer.cn/puerchazs/peczs/125495.html>; Zhang 2014).

Następnie 16 kwietnia 2004 roku Ministerstwo Rolnictwa Chińskiej Republiki Ludowej ogłosiło wprowadzenie Normy Przemysłu Rolniczego (wdrożona 1 czerwca 2004 roku) NY/T779-2004, która do wcześniejszego standardu wprowadzała następujące pojęcia: herbata sypana Pu-erh, herbata prasowana Pu-erh, torebki herbaty Pu-erh oraz dojrzewanie, które uwzględniało proces naturalnego dojrzewania oraz sztucznego postarzenia (<http://std.samr.gov.cn>; <https://www.puer.cn/puerchazs/peczs/125495.html>).

W przeciwieństwie do naukowego trybu klasyfikacji, opartego na technice produkcji, rządowe regulacje skupiały się bardziej na pochodzeniu herbaty. Podejście to było wyraźniej zaznaczone w aktualizacji (DB53/103-2006), wydanej 1 lipca 2006 roku (wdrożonej 1 lipca 2007 roku) przez Biuro Jakości i Nadzoru Technicznego Prowincji Yunnan, w której herbata Pu-erh została określona jako: produkt z oznaczeniem geograficznym prowincji Yunnan; wytwarzana z dużych liści herbaty, które zostały wysuszone na słońcu; wytwarzana na pewnych terenach prowincji Yunann, które posiadają warunki odpowiednie dla produkcji tej herbaty; po przeprowadzeniu specjalnego procesu produkcyjnego, herbata rozwija swoje unikalne cechy; dzieli się na Pu-erh *Sheng cha* (surowa i dojrzała surowa) oraz Pu-erh *Shu cha* (sztucznie postarzana).

Według ekspertów akademickich zajmujących się herbatą definicja powinna opierać się na technice produkcji. Oznacza to, że rodzaj procesu produkcyjnego kształtuje rodzaj herbaty.

Zgodnie z tą zasadą produkt można nazwać herbatą Pu-erh, o ile jest uzyskiwana zgodnie ze schematem produkcyjnym herbaty Pu-erh, niezależnie od pochodzenia surowca (<http://std.samr.gov.cn>; Zhang 2014). Wytyczne ogłoszone w 2006 roku, zawierały wykaz 639 miast (zlokalizowanych w 11 prefekturach prowincji Yunnan), które po spełnieniu podstawowych wymagań, mogły swoje produkty nazywać herbatą Pu-erh. Zakazywały one również wprowadzania po 30 czerwca 2009 roku na rynek herbaty Pu-erh bez oznaczeń geograficznych. Prowincja Guangdong, drugi duży ówczesny producent tak zwanej herbaty Pu-erh, została pozbawiona w ten sposób prawa do produkcji i sprzedaży herbaty Pu-erh. Niektórzy naukowcy wstawili się za władzami prowincji Guangdong, uważając, że to właśnie na tych terenach jako pierwszych rozpoczęto produkcję herbaty Pu-erh. Poza tym w latach 50. prowadzono tam prace nad rozwojem technologii sztucznego postarzenia (http://chinadaily.com.cn/bizchina/2009-06/15/content_8286028.html; Lv i in. 2013).

Obecnie obowiązująca, wdrożona 21 grudnia 2008 roku, norma krajowa GB/T22111-2008 „Produkty z oznaczeniem geograficznym – Krajowe standardy herbaty Pu'er” na nowo definiuje herbatę Pu-erh jako produkt o unikalnym oznaczeniu geograficznym w prowincji Yunnan, w której jako surowiec wykorzystuje się suszoną na słońcu zieloną herbatę wielkolistną spełniającą warunki środowiskowe obszaru produkcji herbaty Pu'er, produkowaną zgodnie z określoną technologią przetwarzania. Jest to herbata o wyjątkowych cechach jakościowych, która dzieli się na dwa rodzaje: Raw Pu'er i Ripe Pu'er (<http://std.samr.gov.cn>; <http://www.puerteas.com/puerchazhishi/puerhajichu/1834.html>).

Do tej pory nie ma jednej, wspólnej nazwy dla ciemnej herbaty produkowanej w prowincji Guangdong. Produkty z tego regionu nazywane są od miast lub wsi, w których zostały wyprodukowane. Pozostałe prowincje ujednoliciły system nazewnictwa swoich produktów. Ciemna herbata z prowincji Hunan nazywana jest *Fu-zhuan*, z Hubei – *Qing-zhuan*, z Sichuan – *Bian-xiao*, a z Guangxi – *Liu-bao* (Lv i in. 2013).

4.3. Autentyczność herbaty Pu-erh

Produkt autentyczny to taki, który spełnia wymagania standardu i jest zgodny z oryginałem. Autentyczność rozumiana jako „tradycyjność” to zgodność produktu ze standardem zakodowanym w umyśle, np. zapamiętanym z dzieciństwa (Śmiechowska 2014). Każde odstępstwo od tego standardu powoduje, że produkt jest nieautentyczny. Jednym z elementów, powodujących że produkt nie może zostać uznany za autentyczny, jest jego zafałszowanie. Może ono polegać na modyfikacjach składu lub właściwości, o czym

konsument nie został poinformowany oraz na wszelkich działaniach, które mają na celu ukrycie rzeczywistego składu produktu i nadania mu wyglądu, świadczącego o odpowiedniej jakości. Brakiem autentyczności jest także zamieszczenie na opakowaniu nieprawdziwych danych (o składzie czy pochodzeniu produktu) oraz nieprawidłowe oznakowanie produktu. Szczególnym rodzajem fałszowania są produkty podrobione, czyli takie, które swoim wyglądem przypominają produkty oryginalne, ale pod względem składu, właściwości lub wykorzystania różnią się od nich. Rynek produktów podrabianych stale się rozwija. Przyczyną tego zjawiska jest chęć zwiększenia zysków poprzez obniżenie kosztów produkcji i zwiększenie atrakcyjności cenowej produktu. Rzadziej fałszowanie ma na celu ukrycie niskiej jakości produktu lub błędów w procesie produkcyjnym (Śmiechowska 2013).

Pojęcie autentycznej Pu-erh miało początkowo odniesienie do tradycyjnej wersji, znanej obecnie jako Vintage Raw. Po wprowadzeniu metody produkcji *wo-dui* przez niemal 30 lat wersja Ripe nie była uznawana przez Chińczyków za herbatę Pu-erh. Poza krajami azjatyckimi to właśnie sztucznie postarzana wersja była dostępna, przez co konsumenci na całym świecie znali tylko tę herbatę i ją chcieli nabywać. Potrzeby rynku miały znaczący wpływ na zmiany w regulacjach rządowych, przez co kolejne definicje i wymagania były tak konstruowane, aby również surowiec przetworzony za pomocą metody *wo-dui*, mógł być nazywany herbatą Pu-erh. Po uznaniu nowej wersji, gdy ceny herbaty Pu-erh wzrosły do nieoczekiwanych poziomów, liczne gospodarstwa nastawiły się na produkcję dużych ilości tej herbaty. Większość surowca była wykorzystywana do produkcji herbaty Pu-erh, powodując gwałtowny spadek produkcji herbaty czarnej (wg europejskiej nomenklatury) oraz niektórych rodzajów zielonej. Mimo iż liście herbaty z Fujian, Sichuan lub z sąsiedniego Wietnamu i Birmy nie są uznawane za odpowiednie do wytwarzania Pu-erh, były wykorzystywane do produkcji „herbaty Pu-erh”. Tak rozpoczął się konflikt między prowincjami o prawo do produkcji „oryginalnej” Pu-erh. W 2005 r. *Yunnan Tea Business Association* publicznie oskarżyło Guangdong o sprzedaż dużej ilości sfalszowanej herbaty Pu-erh (http://chinadaily.com.cn/bizchina/2009-06/15/content_8286028.html).

Zagadnienie autentyczności herbaty Pu-erh nie jest ostatecznie takie proste, mimo iż ustanowiono standardy, jakie musi spełniać produkt oraz ustanowiono jego definicję. Przegląd literatury przedmiotu prowadzi do jednoznacznego stwierdzenia, iż wersja Raw jest produktem tradycyjnym, tak samo jak Vintage Raw. Z kolei wersji Ripe nie można uznać za taki produkt, ponieważ jej proces produkcji jest niezgodny z przyjętym w prowincji Yunnan standardem. W takim przypadku można uznać, że wersje tradycyjne tego wyrobu są jedynymi

autentycznymi. Jednak z drugiej strony, uwzględniając obowiązującą definicję, każdy z przedstawionych rodzajów należałoby uznać za produkt zgodny z wymaganiami.

Informacje na opakowaniach powszechnie dostępnej na światowym rynku herbaty Pu-erh są zgodne z obowiązującą definicją oraz europejską nomenklaturą. Zawierają bowiem zwroty „herbata czerwona” oraz „herbata Pu-erh”. Niektórzy naukowcy oraz mistrzowie herbaty – zwłaszcza azjatyccy – nie zgadzają się z takimi zapisami uznając, iż oba te zwroty stanowią nadużycie oraz wprowadzają konsumenta w błąd. Przede wszystkim herbata ta jest produktem chińskim, tak więc powinno się używać chińskiego podziału, a nie europejskiego, który ogranicza się jedynie do 3 gatunków herbaty (czarna, czerwona, zielona). Dodatkowo używając sformułowania „herbata Pu-erh”, producenci powinni określić jej rodzaj: czy jest to wersja Raw czy Ripe. Wówczas konsument otrzymywałby rzetelne informacje o produkcie. Takie proste rozwiązanie mogłoby załagodzić spór w kwestii powstałej definicji.

Biorąc pod uwagę niejednoznaczności w badaniu autentyczności herbat Pu-erh oraz specyficzny, przede wszystkim długotrwały proces produkcji wersji oryginalnych, a tym samym ich wysokie ceny, na rynku pojawia się wiele produktów zafalszowanych, niezgodnie z prawem nazywanych herbatami Pu-erh. Do typowych sposobów fałszowania herbaty Pu-erh zalicza się:

- mieszanie tańszego surowca z droższym i informowanie jedynie o surowcu lepszej jakości,
- podawanie nieprawdziwych informacji o pochodzeniu produktu,
- zawyżanie wieku herbaty,
- podawanie nieprawdziwych informacji o rodzaju herbaty.

Producenci i dystrybutorzy, prowadzący nieetyczne działania oferują do sprzedaży produkt niskiej jakości lub nawet taki, który nie powinien być wprowadzony na rynek – ze względu na wady w nim występujące. Mimo to taki produkt trafia na rynek europejski, ponieważ konsumenci oraz sprzedawcy nie posiadają wiedzy o produkcie odpowiedniej jakości. Krajowe opracowania naukowe (Michalak-Majewska 2013a; Piskuła i Astel 2017), zawierające informacje o smaku czy zapachu herbaty Pu-erh, podają takie określenia jak: ziemisty czy pleśniowy. Dla znawców tego rodzaju herbaty są to oczywiste wady powstałe na skutek źle przeprowadzonego procesu fermentacji, suszenia lub w trakcie transportu. Takie przypadki spotykane są w stacjonarnych sklepach, gdzie herbata Pu-erh dostępna jest w torebkach lub w formie liściastej w bardzo niskiej cenie. Na opakowaniach produktów dostępnych w stacjonarnych sklepach, nie zamieszcza się informacji o rodzaju tego produktu, wieku, pochodzeniu surowca czy czasie leżakowania, przez co nie można go właściwie zidentyfikować. Brak informacji o pochodzeniu produktu jest klasycznym przykładem jego zafalszowania.

Herbaty w prasowanej formie pakowane są w bardzo cienki papier, na którym znajdują się podstawowe informacje o produkcie oraz oznaczenia fabryki. Więcej danych umieszczonych jest na bilecikach wprasowywanych w tzw. „ciastko”. Przykład wprasowanego bilecika zaprezentowano na rysunku 4.1. Bileciki zostały wprowadzone w 1976 roku do identyfikacji herbat z 3 największych wówczas fabryk (*Kunming, Menghai i Xiaguan Tea Factory*). Obecnie jest to już standard i każda prasowana Pu-erh musi posiadać taki bilecik wprasowany w tzw. „ciastko”. Na nim znajdują się informacje o miejscu produkcji, stosowanej recepturze i surowcu. Nie jest natomiast wymagana data produkcji (<https://www.teachat.com/viewtopic.php?f=20&t=12141>).



Rys. 4.1 Wygląd wprasowanego bilecika

Źródło: zdjęcie autorki pracy

Trudno jest znaleźć informacje o znanych przypadkach fałszowania herbaty Pu-erh w ostatnich latach. Nie oznacza to jednak, że nie mają one miejsca. Dane o takich incydentach sporadycznie pojawiają się w lokalnych mediach. Traktowane są jako brak honoru, za który wszyscy częściowo odpowiadają, dlatego organizatorzy aukcji nie chcą ujawniać dokładnych informacji o takich zdarzeniach. Jedno z większych oszustw na rynku herbaty Pu-erh, które miało miejsce po załamaniu się rynku, dotyczyło większej ilości herbaty rzekomo pochodzącej z czasów dynastii Qing (1644-1912). Nie udało się ustalić kiedy incydent miał miejsce i na czym dokładnie polegał. Wiadomo, że oszustów udało się po jakimś czasie zidentyfikować i osądzić, a poszkodowanymi byli mieszkańcy Chin oraz Stanów Zjednoczonych.

4.4. Metody identyfikacji herbaty Pu-erh

Wymienione powyżej metody fałszowania herbaty Pu-erh stosowane były bardzo często przed załamaniem się rynku. Aktualnie rynek jest już stabilny i nie cechuje go taka zmienność

jak przed 2007 rokiem. Przed aukcją każda herbata jest sprawdzana przez mistrza herbaty. Potwierdzenie informacji przekazywanych przez właściciela herbaty odbywa się na podstawie oceny opakowania, wyglądu samego ciastka, a następnie oceny sensorycznej przygotowanego naparu. Świeżą surową Pu-erh bardzo łatwo jest odróżnić wizualnie od wersji sztucznie postarzanej. Ta pierwsza ma zieloną barwę, a druga – ciemnobrązową. Różnice te stopniowo się zmniejszają, ponieważ wersja surowa z wiekiem się zmienia i ciemnieje. Jednak doświadczeni mistrzowie herbaty nadal bez pomocy testów czy laboratoriów potrafią odróżnić te dwa rodzaje produktu – nawet bardzo wiekowe. Znane są im proste testy, różnicujące omawiane rodzaje. Wersja sztucznie postarzana będzie mieć niższe pH niż wersja naturalnie dojrzewająca, której pH powinno wynosić od 5,5 do 6,0. Obraz pod mikroskopem również pokazuje różnice. Wersja Ripe ze względu na gwałtowną fermentację mikrobiologiczną będzie miała zniszczoną strukturę komórek (poszarpane krawędzie). Na dodatek będzie zawierać więcej kwasu galusowego niż wersja naturalnie dojrzewająca.

Mentalność Chińczyków powoduje, że starają się oni unikać nieetycznych i ryzykownych działań. Dlatego herbaty przeznaczone na aukcje nie podlegają szczegółowym badaniom laboratoryjnym. W krajach azjatyckich za wprowadzenie do sprzedaży niezafałszowanych herbat Pu-erh odpowiedzialni są mistrzowie herbaty, stąd wielu producentów, handlowców i kupców herbaty Pu-erh nie widzi potrzeby przeprowadzania czasochłonnych i często bardzo drogiej analiz laboratoryjnych. Ich zdaniem analiza sensoryczna wykonywana przez profesjonalistę jest wystarczająca, więc nie ma potrzeby poszukiwania nowych metod identyfikacji poszczególnych rodzajów. Problem pojawia się w przypadku herbaty bardzo wiekowej, gdy istotna jest dokładna data jej produkcji lub gdy kwestią sporną będzie pochodzenie surowca (np. określenie konkretnej góry herbacianej). Mistrzowie herbaty nie określają precyzyjnie wieku herbaty lub regionu upraw surowca. Na podstawie wieloletniego doświadczenia potrafią je jedynie oszacować i tym samym potwierdzić lub nie deklarację producenta/właściciela produktu. Określenie pochodzenia surowca i wieku herbaty stanowi wyzwanie dla naukowców, ponieważ – tak jak wspomniano we wcześniejszej części pracy – na końcową jakość herbaty Pu-erh składa się wiele czynników i nie ma jednego wzorca, do którego można by się odnieść.

W celu pozyskania lub potwierdzenia bardziej szczegółowych informacji o produkcji wykorzystuje się metabolomikę, która jest stosunkowo nową, ale prężnie rozwijającą się dziedziną nauki. Opiera się ona na analizie związków o małej masie cząsteczkowej (do 1,5 kDa) w badanym materiale. Analiza przeprowadzana jest z wykorzystaniem zaawansowanych narzędzi, służących do obserwacji jakościowych oraz ilościowych zmian

związków chemicznych. W podejściu metabolomicznym wyróżnia się analizę ukierunkowaną oraz profilową. Pierwsza z nich polega na identyfikacji konkretnych grup związków, świadczących o zajściu pewnych procesów w analizowanym materiale. Na końcu takiej analizy uzyskuje się jakościowy opis badanego materiału. Z kolei analiza profilowa ma na celu uzyskanie ogólnego profilu związków, obecnych w próbce, bez konieczności ich identyfikacji. Takie podejście pozwala na wytypowanie w analizowanym materiale o określonej jakości jego biomarkerów. Wszechstronność podejścia metabolomicznego polega na możliwości analizy metabolitów obecnych w komórkach ludzi, zwierząt, grzybów, bakterii i roślin. Dzięki czemu ma szerokie zastosowanie w badaniach medycznych oraz szeroko rozumianej jakości żywności (Słowikowska i in. 2016; Kopczyńska i in. 2019).

W analizie produktów rolnych i spożywczych metabolomika wykorzystywana jest przede wszystkim do badania bezpieczeństwa, jakości, określania wpływu procesów technologicznych na jakość wytwarzanej żywności oraz sprawdzania jej autentyczności (Jawień 2012). W tym celu określane są tak zwane „food fingerprints”, które można zdefiniować jako molekularne markery, które reprezentują charakterystyczny stan żywności lub warunek, umożliwiający skuteczniejszą dyskryminację produktu. Do badań tego typu najczęściej wykorzystywane są bardzo precyzyjne narzędzia jak: chromatografia sprzężona ze spektrometrią mas, jądrowy rezonans magnetyczny, spektroskopia Ramana, spektrofluorymetria, analiza izotopów stabilnych i DNA (Medina i in. 2019). Szczególne zainteresowanie naukowców dotyczy tych znaczników, które umożliwiają określenie kraju pochodzenia produktu, wieku produktu lub odmiany wykorzystanego surowca, co ma istotne znaczenie w przypadku takich produktów jak oliwa, wino, alkohole wysokoprocentowe, kawa, herbata, żywność genetycznie modyfikowana, ekologiczna czy z nadanymi oznaczeniami geograficznymi (np. produkty regionalne) (Kopczyńska i in. 2019).

Tak jak w przypadku innych produktów, również dla herbaty możliwe jest określenie pochodzenia surowca, jego odmiany, a nawet okresu zbioru. Zhao, Yu i Li (2017) przeanalizowali 3 rodzaje surowca, pochodzące z 3 lokalizacji w Chinach i zebranych w 3 porach zbiorów pod kątem zawartości składników mineralnych. Naukowcy wykazali, że zawartość magnezu, niklu, rubidu, strontu, kadmu, cezu, baru i ołowiu w liściach zależała od położenia geograficznego upraw. Zawartość miedzi, glinu i uranu była powiązana z odmianą surowca. Z kolei stężenie sodu, wanadu, arsenu, selenu i cyny informowało o okresie zbiorów surowca. Gal, Colquhoun i Defernez (2004) porównali 191 herbat zielonych zróżnicowanych pod kątem jakości oraz kraju pochodzenia. Do analizy widm uzyskanych za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wykorzystali analizę głównych

składowych oraz hierarchiczną analizę skupień. Niestety tak skonstruowane narzędzie nie było skuteczne w określeniu pochodzenia produktów oraz ich jakości. Uzyskano jedynie dane, pozwalające na rozróżnienie herbat z Chin i innych krajów oraz odróżnienie herbaty Longjing od innych rodzajów – za pomocą różnicy w zawartości kwasów tłuszczowych, sacharozy, teogaliny, teobrominy i mio-inozytolu. Natomiast Lin i in. (2013) wykorzystując metodę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w połączeniu z chromatografią gazową i spektrometrią mas lotnych związków, skutecznie rozróżnili 5 odmian herbat oolong. Analiza profili aromatycznych (18 związków) z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi chemometrycznych (analiza głównych składowych, analiza skupień, liniowa analiza dyskryminacyjna) pozwoliła skonstruować skuteczny model dyskryminacji różnorodności herbat oolong.

Przeprowadzono również liczne próby opracowania narzędzi, które skutecznie identyfikowałyby różne rodzaje herbaty oraz ich pochodzenie. Budinova i in. (1998) porównali 3 rodzaje herbaty (zielona, czarna i oolong) różnego pochodzenia z zastosowaniem spektroskopii w zakresie średniej podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Przeprowadzona liniowa analiza dyskryminacyjna uzyskanych wyników wykazała, że metoda ta stanowi skuteczne narzędzie do identyfikacji kraju pochodzenia produktu i to pomimo znacznej niejednorodności analizowanych prób. W tym miejscu należy zaznaczyć, iż analizie poddano zaledwie 12 prób, z czego tylko jedna pochodziła z Afryki (Kenia), a pozostałe z krajów Azjatyckich (Sri Lanka, Chiny, Indie, Japonia, Jawa, Tajwan). Z kolei Moreda-Pineiro, Fisher i Hill (2003) przeprowadzili analizę większej ilości tych samych rodzajów herbat (z krajów azjatyckich – 36 prób, z krajów afrykańskich – 18 prób), ale porównali je pod kątem zawartości kilkunastu wybranych metali śladowych. Analiza laboratoryjna obejmowała pomiary z wykorzystaniem spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie oraz atomowej spektrometrii emisyjnej z wzbudzeniem plazmowym. Mimo nadal ograniczonej ilości prób autorzy wykazali, że możliwe jest różnicowanie oraz klasyfikacja próbek z Azji i Afryki za pomocą profili metali z wykorzystaniem wielowymiarowych technik chemometrycznych (analiza głównych składowych, analiza skupień, liniowa analiza dyskryminacyjna). Możliwa jest również klasyfikacja herbat według krajów pochodzenia, jednak do potwierdzenia tej tezy potrzebne są dalsze badania na większej ilości prób. Mu i in. (2018) przedstawili zastosowanie mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej związków lotnych z enancjoselektywną chromatografią gazową ze spektrometrią mas. Analiza rozkładu enancjomerów chiralnych 15 składników lotnych surowca oraz 4 rodzajów herbaty (biała, zielona, oolong, czarna) z różnych regionów Chin była ściśle skorelowana z odmianą herbaty i jej pochodzeniem geograficznym.

Zaprezentowane powyżej wybrane metody stanowią skuteczne narzędzie w rozróżnianiu rodzajów herbaty oraz ich pochodzenia. Jednak każdy rodzaj herbaty ma swój charakterystyczny element w procesie wytwarzania, polegający na wykorzystaniu nieco odmiennego surowca lub wyjątkowym etapie produkcyjnym. Dodatkowo skład samego surowca różni się w zależności od jego pochodzenia. Dlatego wydaje się, że łatwiej jest skonstruować narzędzie różnicujące na przykład herbatę czarną, zieloną i oolong, niż identyfikować różne odmiany tego samego rodzaju herbaty. O ile w przypadku herbaty Pu-erh wersje Raw i Ripe zaraz po zakończeniu procesu produkcyjnego są zupełnie odmiennie i łatwo jest je rozróżnić, to już oszacowanie wieku Vintage Raw oraz odróżnienie Vintage Raw od dobrej jakości Ripe Pu-erh wydaje się trudniejszym zadaniem. Dodatkowo w przypadku produktu regionalnego, nie występuje tak duże zróżnicowanie w pochodzeniu surowca.

Pomimo tych trudności naukowcy opracowali już kilka narzędzi, które pozwalają na identyfikację herbat Pu-erh – z różną skutecznością. Cao i in. (2018) podjęli się porównania profili związków lotnych 6 ciemnych herbat (w tym Pu-erh). Oznaczenie i identyfikację związków przeprowadzono za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Zidentyfikowano łącznie 98 związków, w tym: aldehydy, alkohole, ketony, metoksyfenole, areny, kwasy, estry i alkeny. Analizy uzyskanych wyników dokonano z wykorzystaniem analizy głównych składowych, analizy dyskryminacyjnej metodą częściowych najmniejszych kwadratów oraz ortogonalnej analizy dyskryminacyjnej metodą częściowych najmniejszych kwadratów. Wieloczynnikowa analiza statystyczna wykazała, że herbaty z prowincji Yunnan i Guangxi można sklasyfikować jako jeden typ, a pozostałe 4 herbaty jako drugi. Osiem spośród oznaczonych związków najliczniej występowało w herbacie Pu-erh. Autorzy potwierdzili, że związki metoksyfenolowe stanowią markery tego rodzaju herbaty. Różnice w składzie związków lotnych są związane przede wszystkim z przebiegiem procesu produkcyjnego, a zwłaszcza składem grzybów (ze szczególnym uwzględnieniem grzybów dominujących), uczestniczących w etapie fermentacji. Przedmiotem badań Lv i in. (2014) było siedem prób „Dayi” Pu-erh, charakteryzujących się mieszanym surowcem, pozyskanych z różnych lokalizacji. Trzy ciemne herbaty z prowincji Sichuan stanowiły próby kontrolne. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej połączona z chromatografią ciecząową i detekcją mas składników aromatycznych wykazała, że analizowane herbaty wyróżniał znaczący udział związków metoksyfenolowych (ponad 20%) w grupie związków aromatycznych w porównaniu z próbą kontrolną. Największy udział miał 1,2,3- trimetoksybenzen (17,16%). Opracowany chromatograficzny „odcisk palca” (profil związków aromatycznych) w połączeniu z analizą chemometryczną może być wykorzystywany do identyfikacji i kontroli jakości „Dayi” Pu-erh.

Autorzy uważają, że opracowane przez nich narzędzie można z powodzeniem zastosować również dla innych rodzajów herbat. Nieco odmienną formą herbaty zajęli się Wang i in. (2016). Wykorzystali oni bowiem wysokosprawną chromatografię ciecząową do analizy zawartości wybranych 10 składników w herbacie instant Pu-erh wybranego producenta. Uzyskane wyniki poddali analizie statystycznej, obejmującej hierarchiczną analizę skupień, analizę głównych składowych oraz analizę dyskryminacyjną. Opracowany przez autorów model wykazuje potencjał w ocenie rodzaju tej herbaty i jej pochodzenia, a także w kontroli spójności jakości produktu w obrębie firmy. Lv i in. (2015) stosując mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej połączonej z chromatografią gazową, detekcją mas oraz statystyką wielowymiarową skonstruowali nowatorski model służący do identyfikacji i oceny jakości Raw Pu-erh. Analizie poddano 12 prób Pu-erh z różnych zakładów oraz 6 zielonych herbat, pochodzących z innych prowincji Chin. Przeprowadzona analiza skupień i analiza głównych składowych wykazały, że można wyraźnie odróżnić herbaty Raw Pu-erh od innych zielonych na podstawie ich składu. Tak skonstruowane narzędzie może być z powodzeniem stosowane do identyfikacji oraz oceny spójności zielonych Pu-erh. Autorzy uważali, że takie podejście może mieć również zastosowanie w przypadku innych zielonych herbat. Ku i in. (2010) podeszli bardziej kompleksowo do oczekiwań strony zainteresowanej badaniami tego typu, ponieważ wykorzystali metabolomikę do analizy rodzajów herbat Pu-erh oraz zmian w składzie produktu w zależności od czasu jego leżakowania. Analiza podstawowych składników wykazała dwa duże skupiska na wykresie punktowym analizy głównych składowych – Raw i Ripe Pu-erh. Surowe Pu-erh zawierały większe ilości związków o charakterze przeciwutleniającym i w rezultacie wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą (metoda TEAC, DPPH, FRAP) niż wersja sztucznie postarzana. Dodatkowo charakteryzowały się znacznie silniejszym działaniem hamującym produkcję tlenu azotu oraz działaniem ochronnym wobec komórek (pod wpływem działania H₂O₂). Autorzy wykazali istotną korelację między składem herbaty Raw Pu-erh a czasem jej leżakowania. Z każdym rokiem malała ilość galusanu epigalokatechiny, epigalokatechiny, galusanu epikatechiny i kwasu chinowego, a wzrastała – kwasu galusowego. Takiego związku nie odnotowano w przypadku wersji Ripe. Badania te wykazują, iż podejście metabolomiczne może być z powodzeniem wykorzystywane do analizy typu herbaty Pu-erh oraz jej wieku. Z kolei Wu i in. (2016) podjęli się problemu tak samo trudnego, jak istotnego dla znawców tego rodzaju herbaty, czyli precyzyjnego określenia pochodzenia produktu. Autorzy za cel postawili sobie opracowania narzędzi umożliwiających rozróżnienie pochodzenia surowych Pu-erh. Do analizy wykorzystali po 10 Raw Pu-erh, pochodzących z gór Jingmai i Wuliang (dystrykt Pu-erh).

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej połączona z chromatografią cieczową i detekcją pozwoliły na identyfikację 63 substancji lotnych, wśród których alkohole i węglowodory stanowiły główne składniki aromatu analizowanych herbat. Zawartości niektórych alkoholi terpenowych oraz ketonów wykazywały istotne różnice w zależności od pochodzenia produktu. Zarówno analiza głównych składowych, jak i analiza skupień pozwoliły na skuteczne rozróżnienie surowych Pu-erh pochodzących z różnych gór herbacianych. Ten rodzaj herbat będzie charakteryzować się składem chemicznym, niewiele różniącym się od samego surowca. Z tego względu metoda ta powinna również mieć zastosowanie w innych rodzajach herbat mało przetworzonych. Po fermentacji herbaty zmienia ulega skład frakcji lotnej. Jednak to Wang i in. (2018b) wykonali niezwykle istotne i trudne badania. Mimo iż cel ich badań pokrywał się z celem wielu zespołów naukowych – jakim jest identyfikacja rodzaju Pu-erh oraz jego pochodzenie – to wyróżnił ich materiał wykorzystany do badań. Zespół pozyskał surowe herbaty z Bingdao (okolice miasta Lincang) wytworzone z surowca z drzew w wieku 100-300 lat, przetworzone, sprasowane i przechowywane w naturalnych warunkach przez okres od 1 do 10 lat. Przedmiotem badań były zarówno Raw, jak i Ripe Pu-erh, pochodzące z innych zakładów. Próby były dodatkowo zróżnicowane miejscem pozyskania surowca (12 gór herbacianych). Do profilowania metabolitów rozpuszczalnych w wodzie autorzy wykorzystali spektrometrię mas o wysokiej rozdzielczości oraz spektrometrię bliskiej podczerwieni (NIR) w połączeniu z analizą chemometryczną (analiza głównych składowych, regresja cząstkowych najmniejszych kwadratów, hierarchiczna analiza skupień, dyskryminacyjna metoda częściowych najmniejszych kwadratów). Uzyskane dane posłużyły do opracowania modeli różnicujących rodzaje herbaty i prognozujących czas ich przechowywania. Zidentyfikowano 38 związków, dzięki którym można oszacować wiek herbaty oraz 19 związków, dzięki którym można odróżnić wersję surową od sztucznie postarzonej. Analiza skupień wykazała zależność składu chemicznego (31 związków) przygotowanych naparów od lokalizacji miejsca zbioru surowca. Taka konstrukcja doświadczenia pokazała, iż możliwe jest opracowanie narzędzi skutecznie rozróżniających rodzaje herbat Pu-erh, pochodzenie surowca (z dokładnością do gór herbacianych), a także pozwalających na szacowanie wieku produktu. Niestety model opracowany dla herbat z Bingdao może nie być skuteczny dla herbat z innych lokalizacji oraz starszych niż te analizowane. Dlatego dobrze by było sprawdzić jego skuteczność na innym materiale badanym – najlepiej tak samo zróżnicowanym, jak przeanalizowany przez wspomnianych autorów.

Prace nad odpowiednią metodą identyfikacji herbat Pu-erh nadal trwają, ponieważ żadna z powyżej zaprezentowanych nie uzyskała aprobaty producentów, sprzedawców oraz mistrzów herbaty. Żadna z nich nie nosi znamion prostej, szybkiej czy taniej.

Dokonując analizy literatury, wydaje się, że narzędziem spełniającym podane kryteria może być spektroskopia fluorescencyjna, która jest już z powodzeniem wykorzystywana w analizie jakości żywności. Dostępnych jest kilka opracowań naukowych, traktujących o możliwości wykorzystania tego rodzaju spektroskopii w analizie jakości herbaty, jednak zaledwie jedna dotyczy herbaty Pu-erh (Yamazaki i in. 2013).

- **Zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej**

Wykorzystanie spektrofluorymetrii do analizy jakości produktów spożywczych znacząco wzrosło w ciągu ostatnich kilkunastu lat. Stało się tak dzięki niewątpliwym zaletom tej metody, do których zalicza się: szybkość wykonania pomiaru, czułość układu, niskie koszty wykonania pomiaru oraz brak zmian w strukturze analizowanej próby. Dodatkowo unika się czasochłonnego przygotowania próbek, a do przeprowadzenia pomiaru nie stosuje się lub stosuje w niewielkich ilościach odczynniki chemiczne. W połączeniu z metodami chemometrycznymi spektroskopia fluorescencyjna stanowi skuteczne narzędzie do kontroli jakości produktów spożywczych, kontroli zmian zachodzących podczas przetwarzania i przechowywania żywności oraz badania jej autentyczności (Kim i Park, 2010; Dankowska 2016).

Spektrofluorymetria opiera się na zdolności emisji światła przez fluorofory, czyli związki, które pochłaniają energię w postaci światła o określonej długości fali i wypromieniowują energię w postaci emitowanego światła o większej długości fali. Żywność zawiera szeroką gamę naturalnie występujących związków fluorescencyjnych, do których należą między innymi: alkaloidy, aminokwasy aromatyczne, kumaryny, chlorofile, kolagen, flawonoidy, kwasy nukleinowe, porfiryny, mykotoksyny, witaminy i kofaktory. Produkty spożywcze zawierają zazwyczaj kilka związków fluoryzujących. Składają się one na charakterystyczny obraz, który zmienia się wraz ze zmianami zachodzącymi w produkcji. Stężenie fluoroforu zależy od pochodzenia botanicznego i geograficznego surowca/produktu, zastosowanego procesu technologicznego, warunków przechowywania, a także świeżości produktu (Dankowska 2016; Sikorska 2012).

Sygnal fluorescencyjny pochodzący od analizowanej próbki zależy od jej właściwości fizycznych i chemicznych. Tak więc wpływ na niego mają obecne związki fluoryzujące, ich stężenie, a także reakcje międzycząsteczkowe, które mogą konkurować z fluorescencją

i bezpośrednio wpływać na wydajność kwantową, czas życia i widmo emisji. Każdy fluorofor ma charakterystyczną długość fal emisji i wzbudzenia, przy których wykazuje maksymalną fluorescencję. Na sygnał fluorescencji, poza czynnikami związanymi z naturą próbki, będzie mieć wpływ również środowisko molekularne fluoroforów, w którym może dochodzić do rozproszenia lub wygaszania promieniowania. Dodatkowo fluorofory są wrażliwe na zmiany środowiska. Profil widmowy fluorescencji może się zmienić, w zależności od temperatury, ciśnienia, lepkości, polarności, pH czy potencjału jonowego. Z tego względu należy zapewnić stałe warunki podczas pomiaru. W związku z powyższym właściwości fluorescencyjne wybranego związku występującego w naturalnej matrycy mogą być inne od obserwowanych w układzie modelowym (Tomin 2010; Sikorska, 2012; Dankowska 2016; Kumar, Tarai i Mischra, 2017).

Do analizy produktów, zawierających kilka związków fluoryzujących, wykorzystuje się najczęściej następujące techniki:

- Spektroskopia fluorescencji macierzy wzbudzenia i emisji (EEMF): intensywność emisji jest przedstawiana jako funkcja dwóch zmiennych: długości fali promieniowania wzbudzającego i emitowanego. Wyniki pomiarów przedstawia się w trójwymiarowym układzie współrzędnych lub w postaci map konturowych;
- Synchroniczna spektroskopia fluorescencyjna (SFS): intensywność fluorescencji jest przedstawiana jako funkcja jednocześnie zmieniających się długości fal promieniowania wzbudzającego i emitowanego. Przy czym zmiany odbywają się najczęściej przy zachowaniu stałej różnicy między tymi długościami. W przypadku takiego sposobu pomiaru zmniejszeniu ulega szerokość spektralna pasma;
- Całkowita synchroniczna spektroskopia fluorescencyjna (TSFS): intensywność fluorescencji uzyskuje się przez połączenie funkcji długości fali wzbudzenia i różnicy między długością fali wzbudzenia i emisji. TSFS jest zasadniczo zbiorem SFS uzyskanych jako funkcja rosnącego przesunięcia długości fali (Kumar, Tarai i Mischra, 2017; Sikorska 2012).

Do oceny produktu jakim jest herbata, spektrofluorymetria była skutecznie wykorzystywana do analizy jakościowej i ilościowej składników oraz charakterystyki przemian, zachodzących między wybranymi związkami. Shan i in. (2017) oraz Shan i in. (2018) zastosowali pomiar synchronicznych widm fluorescencyjnych sprzężonych z metodami chemometrycznymi do opracowania optymalnego modelu pomiaru zawartości oraz właściwości flawonoidów w herbacie zielonej. Öksüz i in. (2019) wykorzystali metodę fluorymetryczną do szybkiego oznaczenia śladowych zawartości arsenu (III i V), a Gonzales

i in. (2020) zaproponowali nową metodę ilościowego oznaczania ochratoksyny A. Z kolei Tan, Li i Yang (2020) opracowali nową metodę wykrywania kwasu galusowego, opartą na uaktywnianiu światła fluorescencyjnego. Podjęto również próby wykorzystanie fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia (TXRF) do analizy herbat. Dalipi i in. (2018) zastosowali ją do analizy suszów oraz naparów herbat czarnych, zielonych i oolong pod kątem zawartości 13 pierwiastków (K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Ba, Pb) oraz skuteczności ich ekstrakcji do naparu. W połączeniu z analizą głównych składowych (PCA) stanowiła skuteczne narzędzie do oceny bezpieczeństwa i kontroli jakości analizowanych produktów. Natomiast Marguá i Voutchkov (2018) ocenili możliwości analityczne TXRF do wielopierwiastkowej analizy naparów herbat czarnych oraz herbatek zielonych, zróżnicowanych pod kątem czasu parzenia, temperatury oraz rodzaju wody, wykorzystanej do ich przygotowania. Coraz częściej do analizy jakościowo-ilościowej naukowcy wykorzystują chromatografię cieczową połączoną z bardzo czułym detektorem fluorescencyjnym. Dzięki takiemu połączeniu Zhang i in. (2013a) dokonali jednoczesnego wykrycia aminokwasów, zawierających selen i ich analogi siarkowe, Kazan i in. (2019) – 8 wybranych aminokwasów w różnych rodzajach herbaty, a Yu i in. (2018) w połączeniu z techniką ISD-D (degradacji-derywatywacji in situ) wykorzystali te narzędzia do jednoczesnego wykrywania siedmiu pestycydów zawierających tioestry fosforoorganiczne.

Fluorescencja posłużyła również do wyjaśnienia oddziaływań polifenoli herbacianych na albuminy w surowicy (Bose 2016) oraz do wyjaśnienia mechanizmu hamowania aktywności tyrozyny przez wybrane polifenole (Tang i in. 2018). Bilge i Özdemir (2020) wykorzystali synchroniczną spektroskopię fluorescencyjną połączoną z metodami chemometrycznymi do monitorowania zmian aktywności przeciwutleniającej i całkowitej zawartości związków fenolowych w różnych rodzajach herbaty w zależności od temperatury i czasu parzenia. Proces wygaszania fluorescencji posłużył do lepszego zrozumienia mechanizmów zachodzących między polifenolami herbaty a świńską amylazą trzustkową (Sun, Gidley i Warren, 2017).

Hu i Yin (2017) oraz Casale i in. (2018) wykorzystali spektroskopię fluorescencyjną macierzy wzbudzenia-emisji (EEM) w połączeniu z technikami chemometrycznymi (wieloliniowa analiza głównych składowych (M-PCA), *self-weighted alternating trilinear decomposition* (SWATLD), wieloliniowa analiza dyskryminacyjna metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (N-PLS-DA) oraz równoległa analiza czynnikowa PARAFAC) do skutecznego odróżnienia odmiany i gatunku analizowanych herbat zielonych oraz identyfikacji ich pochodzenia (Chiny, Japonia). Li i in. (2019) zaproponowali wykorzystanie obrazowania hiperspektralnego fluorescencji (FHSI) w celu identyfikacji klasy jakości herbaty *Tieguanyin*. W połączeniu z algorytmami *Variable Iterative Space Shrinkage Approach* (VISSA) i *Artificial*

Bee Colony (ABC) oraz maszyną wektorów nośnych (SVM) uzyskano najlepszą precyzję w klasyfikacji jakości tego produktu. Ze względu na liczne zalety metod fluorescencyjnych, podjęto również prace nad redukcją rozmiaru oraz kosztów układu pomiarowego. W tym celu jako światło wzbudzenia wykorzystywano diody elektroluminescencyjne (LED). Dong i in. (2014) do zbierania fluorescencji zastosowali światłowód wielomodowy, a analizę widm przeprowadzili z wykorzystaniem analizy głównych składowych (PCA), co umożliwiło klasyfikację 4 rodzajów herbat zielonych oraz 2 herbat czarnych. Z kolei Lin i in. (2019) sprzężyli wielokanałowy system fluorescencji indukowanej za pomocą diod z konwolucyjną siecią neuronową. Dzięki takim rozwiązaniom uzyskano małe, kompaktowe, bardziej ekonomiczne (w porównaniu z tradycyjnymi), a jednocześnie dokładne i szybkie systemy służące do klasyfikacji różnych rodzajów herbat.

Dankowska i Kowalewski (2019) sprawdzili potencjał wybranych metod spektroskopowych (UV-Vis, synchronicznej fluorescencji, NIR) do klasyfikacji herbat, zróżnicowanych pod kątem procesu produkcyjnego. W celu zmniejszenia wielowymiarowości danych zastosowano analizę głównych składowych. W celu klasyfikacji herbat wykorzystano liniową analizę dyskryminacyjną (LDA), kwadratową analizę dyskryminacyjną (QDA), regularyzowaną analizę dyskryminacyjną (RDA) oraz maszynę wektorów wsparcia (SVM). Poszczególne rodzaje herbat (czarna, zielona, biała, żółta, oolong, ciemna) charakteryzowały się różnymi widmami uzyskanymi dla poszczególnych metod, ale dopiero połączenie tych metod dało wyniki, pozwalające osiągnąć najmniejsze błędy w klasyfikacji herbat.

5. Cel, założenia i hipotezy badawcze

Herbata Pu-erh obecna jest na polskim rynku już od kilkudziesięciu lat, a mimo to wiedza o niej wśród krajowych konsumentów jest powierzchowna. Kupujący, dokonując wyboru produktu, kierują się przede wszystkim informacjami zamieszczonymi na etykiecie lub bezpośrednio na opakowaniu produktu. Te informacje nie zawsze są dokładne co wynika przede wszystkim z braku odpowiedniej wiedzy o herbacie Pu-erh. Jako przykład może posłużyć nazywanie tego produktu herbatą czerwoną. Ze względu na brak propagowania rzetelnych i aktualnych informacji o herbacie Pu-erh, polscy konsumenci nie mogą świadomie wybierać rodzaju herbaty Pu-erh oraz nie mogą wcielać się w rolę prosumentów, wpływających na jakość produktu importowanego do Polski.

Na rodzimym rynku asortyment herbat Pu-erh to przede wszystkim herbaty aromatyzowane. Wynika to głównie z braku akceptacji przez konsumentów specyficznego smaku herbaty Pu-erh, określanego jako „ziemisty” lub „rybny”. Dla koneserów tego rodzaju herbaty są to oczywiste wady produktu, wynikające z braku dbałości o przebieg procesu produkcyjnego. Jednak ze względu na potrzebę zaspokojenia światowego popytu na ten produkt, zmieniono wymagania produkcyjne (inny surowiec, nowa technologia produkcji, produkcja na masową skalę) a także samą definicję herbaty Pu-erh.

Chociaż istnieje wiele badań dotyczących składu chemicznego herbat zielonych i czarnych, to skład chemiczny herbaty Pu-erh nie został jeszcze do końca poznany. Liczne badania naukowe, dotyczące tego produktu, nie dały jednoznacznych odpowiedzi na wszystkie pytania naukowców. W związku z tym środowisko naukowe, zajmujące się herbatą Pu-erh, wyznaczyło kilka kierunków badań na najbliższe lata. Należą do nich: analiza związków bioaktywnych odpowiedzialnych za udowodnione właściwości prozdrowotne oraz mechanizmów powstawania tych związków, opracowanie zalecanych rozsądnych poziomów spożycia herbaty Pu-erh dla różnych grup konsumentów, charakterystyka zewnątrzkomórkowych enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy uczestniczące w procesie produkcji, standaryzacja i optymalizacja technologii przetwarzania herbaty Pu-erh oraz opracowanie metod, służących do identyfikacji i potwierdzania autentyczności herbat Pu-erh, przy użyciu nowoczesnej technologii.

Biorąc powyższe pod uwagę celem głównym pracy była ***była próba określenia parametrów, pozwalających na identyfikację rodzajów herbaty Pu-erh. Celem szczegółowym była ocena jakości herbaty Pu-erh dostępnej na trójmiejskim rynku w aspekcie jej autentyczności, za pomocą wybranych metod analitycznych.***

Zakres pracy obejmował:

1. Porównanie wybranych parametrów fizykochemicznych herbat Raw i Ripe Pu-erh.
2. Identyfikacja parametrów, stanowiących markery poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh.
3. Weryfikacja jakości i autentyczności herbat Pu-erh obecnych na lokalnym rynku.

W nawiązaniu do celu i zakresu pracy przyjęto następujące hipotezy badawcze:

1. Herbaty Pu-erh obecne na lokalnym rynku charakteryzują się niższą jakością – pod kątem zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawowego oraz ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu – w porównaniu z herbatami sprowadzonymi bezpośrednio z Chin.
2. Herbaty Pu-erh obecne na lokalnym rynku nie stanowią tradycyjnej wersji tej herbaty.
3. Sposób produkcji herbaty Pu-erh determinuje obecność substancji, stanowiących markery Raw i Ripe Pu-erh.
4. Metody fluorymetryczne mogą być skutecznie wykorzystywane do identyfikacji Raw i Ripe Pu-erh.

6. Materiał i metody badań

6.1. Charakterystyka badanego materiału

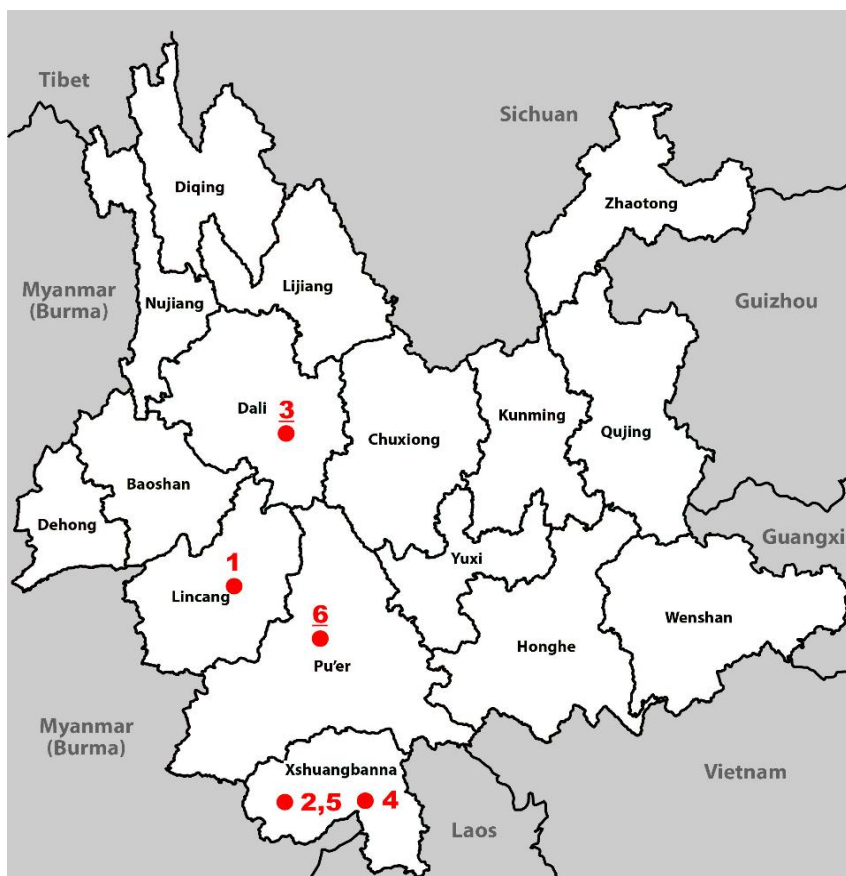
Przedmiotem badań były herbaty liściaste Pu-erh sprowadzone drogą lotniczą z Chin w styczniu 2016 roku oraz zakupione na terenie Trójmiasta. Herbaty zamówiono w sklepie Cha Wang Shop, mieszczącym się w prowincji Yunnan, w mieście Kunming. Ze względu na ograniczone możliwości wyboru w tamtym czasie wszystkich rodzajów Pu-erh, uzyskanych z tego samego surowca o odpowiednim wieku oraz potrzebę uzupełnienia materiału po czasie, wybrano ostatecznie 6 herbat. Reprezentują one każdy z 4 przedstawionych rodzajów Pu-erh: *maocha*, dwa egzemplarze wersji Raw, dwa egzemplarze wersji Ripe oraz jeden reprezentujący Vintage Raw. Szczegółową charakterystyką badanego materiału przedstawiono w tabeli 6.1 i na rysunku 6.1. Materiał sprowadzony bezpośrednio z Chin porównywano z materiałem zakupionym na terenie Trójmiasta (Tab. 6.8).

A. Herbaty sprowadzone z Chin z prowincji Yunnan

Tab. 6.1 Charakterystyka herbat sprowadzonych z Chin

Lp.	Nazwa	Rodzaj	Rok zakończenia produkcji	Deklarowane pochodzenie surowca	Cena za 100 g [€]
1.	2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha	Maocha	2014	Stare drzewa herbaciane	12,0
2.	2007 Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess	Raw	2007	Ogrody herbaty	15,0
3.	2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw	Raw	2003	Brak danych	25,0
4.	1998 CNNP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake	Raw	1998	Ogrody herbaty	38,5
5.	2010 Shuangli Jingmaishan Ripe	Ripe	2010	Las mieszany	10,0
6.	2005 Jinggu Bai Long TF A Grade “Zao Xiang” Ripe Puerh	Ripe	2005	Brak danych	15,2

Źródło: opracowanie własne



Rys. 6.1 Rejony zbioru surowca do poszczególnych herbat z tabeli 6.1
(w przypadku prób nr 3 i 6 zaznaczono miejsca ich produkcji)

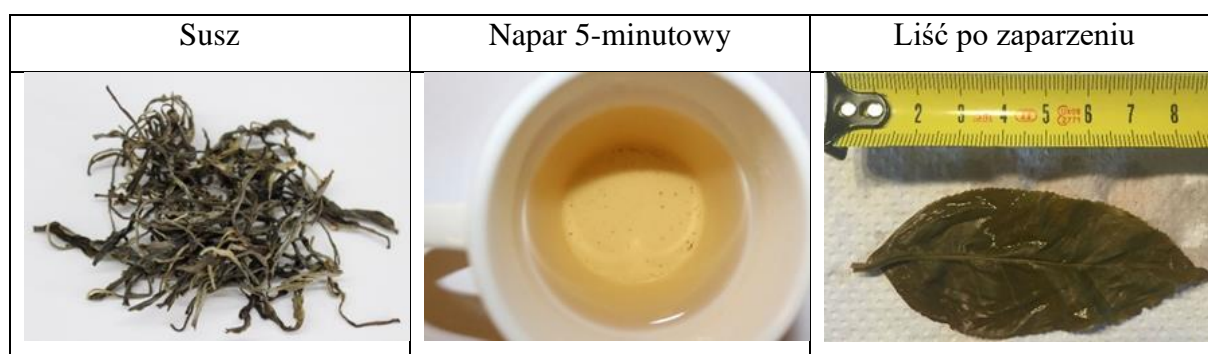
Źródło: opracowanie własne na podstawie

<http://wondersofyunnan.com/destinations/yunnan/maps>

➤ **2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha (Tab. 6.2)**

Zgodnie z deklaracją producenta herbata została wytworzona w sposób tradycyjny. Pochodzi z jesiennych zbiorów (koniec września 2014 r.) ze wsi Di Jie, w okolicy miasta Bingdao. Do jej produkcji wykorzystano tylko i wyłącznie liście starych drzew herbacianych. Charakteryzuje ją silny, bogaty oraz szybko zmieniający się i dający pełnię wrażeń smakowych aromat. Nie nadaje się do dojrzewania (<https://chawangshop.com>).

Tab. 6.2 *Maocha* 2014 r



Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **2007 Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess** (Tab. 6.3)

Zgodnie z deklaracją producenta herbata została wyprodukowana we wrześniu 2007 roku w Menghai Yong Chang Tea Factory. Do jej produkcji wykorzystano surowiec z ogrodów herbaty (Gushu Cha Yuan) z okolic miasta Menghai, głównie dużą ilość pączków oraz małych żółtych listków (Huang Pian). Po trzech latach naturalnej fermentacji, herbata ta charakteryzuje się dojrzałym smakiem, złotym naparem i przyjemnym smakiem (<https://chawangshop.com>).

Tab. 6.3 Raw Pu-erh 2007 r



Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw** (Tab. 6.4)

Zgodnie z deklaracją zawartą na opakowaniu surowiec zebrano w 2002 roku, a proces produkcyjny zakończono w marcu 2003 roku. Herbatę składowano w prowincji Guangdong do kwietnia 2011 roku. Napar charakteryzuje się czystym, głębokim żółtym odcieniem. Zastosowane na opakowaniu oznaczenie „FT” (For Taiwan) oznacza, iż produkt był specjalnym zamówieniem firmy „Fei Tai”. Firma ta jest największym dystrybutorem Pu-erh z Xiaguan i Menghai Tea Factory na Tajwanie. Uznaje się, że niestandardowe produkty firmy „Fei Tai”

osiągają wyższą jakość w Xiaguan Tea Factory. Ten Pu-erh stanowi podstawowy rodzaj touchy (Yi Ji), który produkuje się od 1993 roku (<https://chawangshop.com>).

Tab. 6.4 Raw Pu-erh 2003 r

Opakowanie	Gniazdo	Napar 5-minutowy
		




Zródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **1998 CNNP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake (Tab. 6.5)**

Produkt ten stanowi wersję Vintage (Aged) Pu-erh, ponieważ zaszły w nim zmiany charakterystyczne dla tego typu Pu-erh. Znany jako „Youle qiaomu” to produkt stworzony na zamówienie fabryki z Kunming. *Maocha* pochodzi z góry Youle (zwanej także Jinuoshan, góra Jinuo), która należy do sześciu słynnych gór herbacianych w Xishuangbanna. Herbata składa się z wczesnowiosennych liści pozyskanych z herbacianych ogrodów. *Maocha* wykorzystana do produkcji pochodzi z miejsca o długiej tradycji upraw i została przetworzona przez mniejszość Jinuo metodami tradycyjnymi. Początkowo była przechowywana w wilgotnym magazynie w Xishuangbanna, następnie została przeniesiona do magazynu suchego w Kunming.

Pierwsze napary mają głęboką pomarańczową barwę, a kolejne – złotą. Zapach charakteryzują nuty dojrzałych owoców i miodu, a wrażenia smakowe są intensywne i długo utrzymujące się. Liście po zaparzeniu charakteryzuje barwa ciemnozielonej miedzi (<https://chawangshop.com>).

Tab. 6.5 Raw Pu-erh 1998 r

Opakowanie	Dysk	Napar 5-minutowy
		

Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **2010 Shuangli Jingmaishan Ripe** (Tab. 6.6)

Zgodnie z deklaracją producenta proces produkcji tej herbaty został zakończony w marcu 2010 roku w Yezhuang Shuangli Tea Factory. Surowiec do produkcji tej herbaty Pu-erh stanowiła *maocha* z liści, pochodzących z upraw wysokogórskich z terenów Jingmaishan i Menghai, o charakterystycznym zapachu orchidei. Dodatkowo herbata ta posiada leśne luty, ponieważ drzewa, z których pozyskuje się surowiec, rosną w lesie mieszanym (<https://chawangshop.com>).

Tab. 6.6 Ripe Pu-erh 2010 r

Opakowanie	Dysk	Napar 5-minutowy
		

Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **2005 Jinggu Bai Long TF A Grade „Zao Xiang” Ripe Puerh** (Tab. 6.7)

Herbata ta dostępna jest w dwóch wersjach: „2005 Jinggu Bai Long TF Zao Xiang Ripe Puerh” oraz „2005 Jinggu Bai Long TF A Grade Zao Xiang Ripe Puerh”. Pierwsza wersja produkowana jest ze sfermentowanych żółtych starych liści i kawałków szypulek, przechowywanych w suchych pojemnikach przez 9 lat. Suche liście są błyszczące i czarne, ale szorstkie. W zapachu wyraźnie czuć nutę głożyny pospolitej (*Ziziphus jujuba*). Jej napar ma barwę intensywnie brązowo-czerwoną. Specyficzny jest tu czysty, lekko słodki smak

i orzeźwiający aromat dojrzałej herbaty. Wersja przeznaczona do badań jest określana jako wyższej jakości ze względu na lepszy gatunek liści oraz mniejszą ilość łądyg. Herbatę wyprodukowano w roku 2005 w fabryce Jinggu Bai Long Tea Factory, która jest jednym z tradycyjnych miejsc produkcji Ripe Pu-erh (<https://chawangshop.com>).

Tab. 6.7 Ripe Pu-erh 2005 r



Źródło: zdjęcia autorki pracy

B. Herbaty zakupione na trójmiejskim rynku

Tab. 6.8 Charakterystyka herbat Pu-erh zakupionych na rynku trójmiejskim

Lp.	Nazwa	Rodzaj	Rok zakończenia produkcji	Deklarowane pochodzenie surowca	Cena za 100g [zł]
1.	Herbaciarnia „Czas na Herbatę”	3-letni, superior	Brak danych	Brak danych	31,90
2.	Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”	6-letni, premium	Brak danych	Brak danych	22,90
3.	Astra	Herbata czerwona	Brak danych	Brak danych	5,58
4.	Haichao	Herbata czerwona	Brak danych	Brak danych	14,39
5.	Mayo	Herbata czerwona	Brak danych	Brak danych	5,13

Źródło: opracowanie własne na podstawie informacji na opakowaniach produktów

➤ Herbaciarnia „Czas na Herbatę” (Tab. 6.9)

Zgodnie z deklaracją dystrybutora, wykorzystana do badań herbata to Pu-erh o delikatnie ziemistym smaku. Na stronie internetowej sklepu nie ma informacji o jej rodzaju, roku zakończenia produkcji czy pochodzeniu surowca. Od sprzedawcy otrzymano informację, iż

liście pochodziły z krzewów z upraw plantacyjnych, a produkt leżakował przez 3 lata w nieznanych warunkach (https://czasnaherbate.net/herbaty-czerwone-c-2_6.html).

Tab. 6.9 Pu-erh Superior

Opakowanie	Susz	Napar 5-minutowy
		

Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”** (Tab. 6.10)

Na stronie internetowej herbaciarni zamieszczono informację, iż jest to doskonałej jakości Pu-erh z prowincji Yunnan. Opublikowano tam wzmiankę o procesie produkcyjnym tego rodzaju herbaty – odpowiednim dla wersji Ripe. Od sprzedającego uzyskano informację, iż liście pochodziły z krzewów z upraw plantacyjnych, a produkt był poddany procesowi leżakowania przez 6 lat w nieznanych warunkach (<http://herbata-kawa.pl/herbata-czerwona>).

Tab. 6.10 Pu-erh Premium

Opakowanie	Susz	Napar 5-minutowy
		

Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **Astra (Tab. 6.11)**

Na opakowaniu produktu umieszczono informację, iż jest to czerwona herbata liściasta, która od ponad 1700 lat wytwarzana jest w prowincji Yunnan. Produkt pochodzi z Azji. Nie podano informacji o rodzaju Pu-erh, roku zakończenia produkcji czy pochodzeniu surowca.

Tab. 6.11 Pu-erh firmy Astra

Opakowanie	Susz	Napar 5-minutowy
		

Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **Haichao (Tab. 6.12)**

Herbata czerwona prasowana w kostkach. Zgodnie z deklaracją importera produkt pozyskano z najlepszych gatunków krzewów herbacianych (*Camelli sinensis*) w prowincji Yunnan.

Tab. 6.12 Pu-erh firmy Haichao

Opakowanie	Kostka	Napar 5-minutowy
		

Źródło: zdjęcia autorki pracy

➤ **Mayo (Tab. 6.13)**

Na opakowaniu produktu umieszczono informację, iż jest to liściasta herbata czerwona, pochodząca z Chin. Wyjaśniono również pochodzenie jej nazwy. O samym przebiegu procesu produkcyjnego napisano jedynie, iż jest on wyjątkowy, co czyni ten rodzaj herbaty unikalnym w skali światowej.

Tab. 6.13 Pu-erh firmy Mayo

Opakowanie	Susz	Napar 5-minutowy
		

Źródło: zdjęcia autorki pracy

6.2. Przygotowanie prób do analiz

Ze względu na zróżnicowanie wielkości liści oraz każdorazowo indywidualny sposób przygotowania odpowiedniej naważki z całej porcji sprasowanej formy herbaty, postanowiono wyeliminować wpływ jej postaci na prędkość ekstrakcji składników z produktu do naparu. W tym celu herbaty rozdrabniano za pomocą młynka (model 980 Moulinex) przez 10 s – nie dotyczy oznaczenia ogólnej liczby grzybów. Następnie na wadze technicznej odważano po 2 g herbaty (z dokładnością do 0,0001 g) i zalewano 100 ml wody demineralizowanej o temperaturze $98^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Wszystkie herbaty parzono pod przykryciem przez 5 minut (w przypadku analizy chromatograficznej – 15 min). Na końcu napary przefiltrowano przez sączki 0,22 mm.

6.3. Metody badawcze

6.3.1. Oznaczenie parametrów barwy badanych naparów

Oznaczenia parametrów barwy badanych herbat wykonano w systemie CIE $L^*a^*b^*$ opartym na pomiarze trzech składowych trójkromatycznych:

- L^* wyraża jasność – intensywność koloru (jasne lub ciemne);

- a^* oznacza wartość między czerwonym a zielonym;
- b^* oznacza wartość między żółtym a niebieskim (CIE Draft Standard 014-4.3/E:2007).

Bezwzględna różnicę barwy wyznaczono na podstawie wzoru:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2}$$

gdzie:

$0 < \Delta E \leq 1$ – różnice barwy są nierozpoznawalne (odchylenie niewidoczne);

$1 < \Delta E \leq 2$ – niewielkie odchylenie, rozpoznawalne przez osobę doświadczoną w odróżnianiu niuansów barw;

$2 < \Delta E \leq 3,5$ – średnie odchylenie rozpoznawane nawet przez osobę postronną;

$3,5 < \Delta E \leq 5$ – wyraźne odchylenie;

$\Delta E > 5$ – duże odchylenie barwy.

Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem kolorymetru Konica Minolta CR-400. Kalibracji urządzenia dokonano z wykorzystaniem białej płytki kalibracyjnej CR-A43 nr 13933075. Napary schłodzone do temperatury otoczenia i umieszczono w naczynku pomiarowym o długości drogi optycznej wynoszącej 10 mm szklanej szalce pomiarowej. Oznaczenia wykonano trzykrotnie (Załącznik 1).

6.3.2. Pomiar zawartości związków polifenolowych

Całkowitą zawartość związków polifenolowych oznaczono metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu, zgodnie z wymaganiami normy ISO 14502-1:2005 „Determination of substances characteristic of green and black tea – Part 1: Content of total polyphenols in tea – Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent”.

Przygotowano próbki zawierające: 1 cm³ wody demineralizowanej (ślepa próba), 1 cm³ każdej badanej próbki oraz po 1 cm³ roztworów wzorcowych A, B, C, D i E. Do każdej z nich dodano 5 ml odczynnika Folina (Chempur) i po 5 minutach – 4 ml węgla sodu (Chempur). Następnie zawartość każdej próbki mieszano za pomocą Vortex'u i pozostawiono w ciemnym miejscu na okres 1 h. Po upływie tego czasu próbki zamieszano i wykonano pomiar przy użyciu spektrofotometru UV/VIS (Cecil Instruments Ltd., model CE 1011). Pomiaru dokonano przy długości fali 765 nm wobec próby zerowej. Pomiar wykonano w dwukrotnym powtórzeniu. Ogólną zawartość polifenoli wyznaczono na podstawie uzyskanego równania krzywej kalibracyjnej ($y=0,084x+0,0264$; $R^2=0,9995$) i przedstawiono jako zawartość kwasu galusowego w 100 ml naparu (mg/100 ml). Jako wynik końcowy przyjęto średnią arytmetyczną

z trzech równoległych pomiarów. Wyniki pomiarów zamieszczono w dokumentacji pracy (Załącznik 2).

6.3.3. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej

Aktywność przeciwutleniającą analizowanych naparów herbat oznaczono według procedury zaproponowanej przez Fik i Zawiślak, 2004. Odważono 0,0078 g (z dokładnością do 0,00001 g) odczynnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) (Sigma Aldrich), przeniesiono do kolby o pojemności 100 ml i uzupełniono metanolem.

Do próbek pobrano po 1 cm³ naparów herbaty i dodano po 2 cm³ roztworu DPPH. Następnie pozostawiono na okres 1 h bez dostępu światła. Pomiar wykonano przy długości fali 517 nm wobec próby kontrolnej, którą stanowił roztwór DPPH z wodą demineralizowaną. Pomiar wykonano w trzykrotnym powtórzeniu. Zdolność do wymiatania wolnych rodników przedstawiono jako % inhibicji wolnych rodników na podstawie wzoru:

$$CPA = \frac{(A_B - A_A)}{A_B} \cdot 100$$

gdzie:

CPA – całkowity potencjał antyoksydacyjny (%),

A_A – absorbancja badanej próbki,

A_B – absorbancja próby kontrolnej.

Wyniki pomiarów zamieszczono w dokumentacji pracy (Załącznik 3).

6.3.4. Oznaczenie zawartości kofeiny, teobrominy, teofiliny, kwasu galusowego i teogaliny

Oznaczenie zawartości wybranych metyloksantyn wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), z wykorzystaniem chromatografu Agilent 1200 series z detektorem UV-VIS typu DAD. Zadawalający rozdział chromatograficzny uzyskano przy zastosowaniu fazy ruchomej o składzie metanol/woda/kwas mrówkowy w proporcjach 19,9/79,8/0,3 % v/v w przebiegu izokratycznym przy prędkości przepływu 1 cm³/min. Analizę przeprowadzono na kolumnie Intersil ODS-3 5 μm (250 × 4,6 mm), a nastrzyk wynosił 20 μl. Wszystkie oznaczenia prowadzono w temperaturze 23°C, mierząc wielkość absorbancji promieniowania przy długości fali 273 nm. Całkowity czas analizy wynosił 28 minut.

Oprócz analizy HPLC-DAD metyloksantyn zidentyfikowano dodatkowo za pomocą połączenia techniki HPLC ze spektrometrem mas (MS typu potrójny kwadrupol, 6470 Agilent

Technologies USA) obecność kwasu galusowego oraz teogaliny w badanych próbkach. Widma mas jonów (m/z) uzyskano w trybie SCAN pracy MS.

Aby wykonać oznaczenia jakościowe i ilościowe składników próbki przygotowano roztwory wzorcowe analitów, których obecności można oczekiwać w próbkach herbat. Wzorce (Sigma Aldrich) przygotowano w dwóch stężeniach dla wyznaczenia krzywej tj.: teobromina ($c_1=10,88$ mg/l; $c_2=54,40$ mg/l), teofilina ($c_1=12,00$ mg/l; $c_2=60,00$ mg/l) i kofeina ($c_1=9,20$ mg/l; $c_2=46,00$ mg/l) (Załącznik 4).

Analizę chromatograficzną przeprowadzono przy współpracy z Katedrą Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Optymalizację metodyki HPLC-DAD/MS oraz oznaczenia zawartości analitów w próbkach herbat wykonała dr inż. Katarzyna Kozłowska-Tylingo.

6.3.5. Pomiar zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawowego

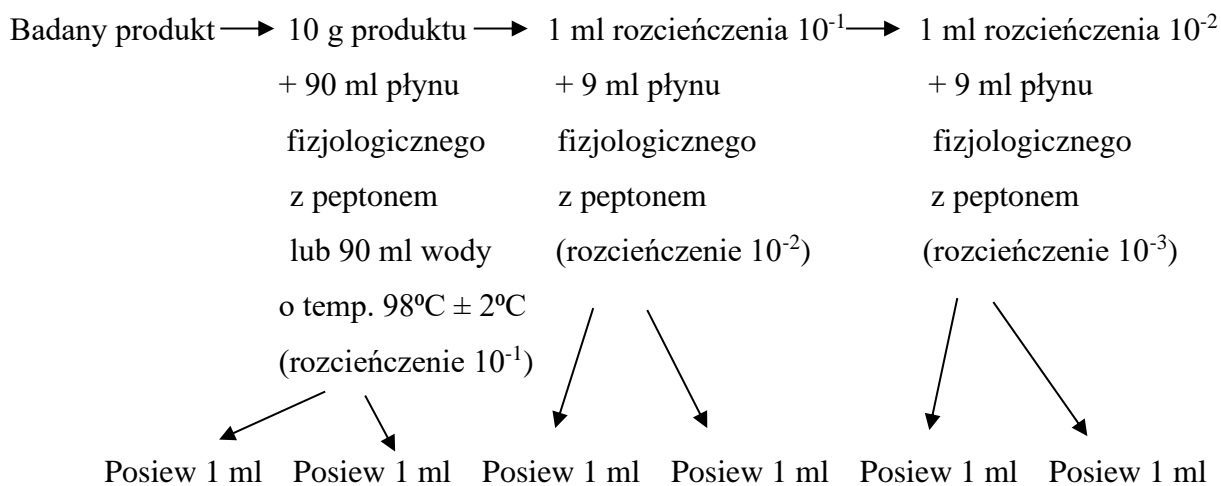
Do oznaczenia rozpuszczalnego kwasu szczawowego w badanych naparach herbat zastosowano metodę manganometryczną (Borawska i in. 2014) z modyfikacją, polegającą na pominięciu końcowego etapu ogrzewania. Z przygotowanych naparów pobrano po 10 cm^3 roztworu i przeniesiono do probówek wirówkowych. Do prób dodano po 5 cm^3 chlorku wapnia (Eurochem BGD Sp. z o.o.) i acetonu (POCH S.A.). Probówki wstawiono do lodówki na 30 minut. Powstały osad odwirowano i przeniesiono ilościowo do kolb stożkowych za pomocą 5 cm^3 kwasu siarkowego (VI) (POCH S.A.). Miareczkowanie odbywało się po całkowitym rozpuszczeniu osadu w łaźni wodnej. W przypadku herbat Pu-erh podczas ogrzewania w łaźni wytrącały się „kłaczkki”, które nawet przy dłuższym ogrzewaniu nie ulegały rozpuszczeniu. Ich ilość była na tyle duża, że zakłócały proces miareczkowania. Dlatego postanowiono zrezygnować z etapu ogrzewania. Zdecydowano się na taką zmianę, ponieważ dodanie kwasu siarkowego (VI) całkowicie rozpuszczało powstały osad, a uzyskane wyniki miały służyć jedynie do różnicowania herbat Pu-erh, a nie określenia rzeczywistej zawartości szczawianów rozpuszczalnych. Miareczkowanie wykonywano za pomocą roztworu $0,02\text{ N KMnO}_4$ (POCH S.A.) do momentu uzyskania barwy różowej, utrzymującej się przez 1 minutę. Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach (Załącznik 5).

6.3.6. Oznaczenie ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu oraz w naparach

Do oceny ogólnej ilości grzybów na powierzchni suszu odważono 10 g herbaty, zalano 90 ml płynu Ringera (Merck Sp. z o.o.) i wytrząsano przez 15 minut. Do oceny ogólnej ilości grzybów w naparach odważono 10 g herbaty, zalano 90 ml wody o temperaturze $98^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

i parzono przez 5 minut. Następnie roztwór zdekantowano i pozostawiono do wystygnięcia (PN-EN ISO 6887-4:2017-05).

Oznaczenie ogólnej liczby grzybów wykonano metodą płytkową posiewu zalewowego według wymagań normy PN-ISO 21527-2:2009. Na płytki Petriego posiano 1 cm³ kolejnych rozcieńczeń (Rys. 6.2), zalano agarem DG18 z chloramfenikolem (Merck Sp. z o.o.) jako pożywką i inkubowano w temperaturze 25°C przez 5 dni.



Rys. 6.2 Procedura przygotowania rozcieńczeń próbek do oznaczenia ogólnej liczby grzybów metodą posiewu zalewowego

Źródło: opracowanie własne

Następnie dla każdego rozcieńczenia określono liczbę jednostek tworzących kolonię (jtk) w przeliczeniu na 1 g produktu lub 1 cm³ naparu. Do obliczeń wybrano płytki, na których liczba wyrosłych kolonii była mniejsza niż 150. Ogólną liczbę drożdży i pleśni obliczono ze wzoru:

$$L = \frac{C}{(N_1 + 0,1N_2) \cdot d}$$

gdzie:

C – suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia,

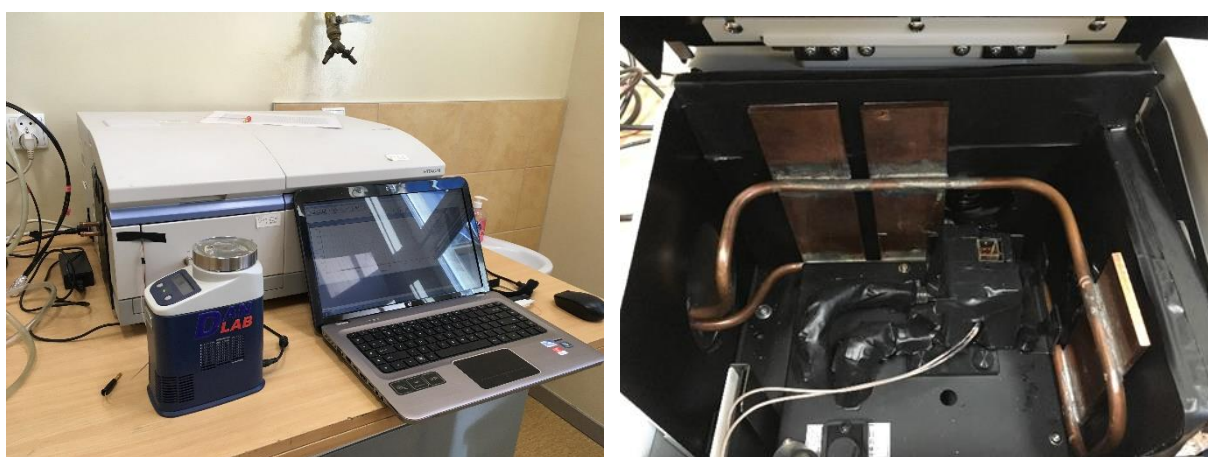
N₁ – liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia (mniejszego),

N₂ – liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia,

d – wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający najniższemu liczonemu rozcieńczeniu.

6.3.7. Pomiar widma fluorescencyjnego

Pomiary widm fluorescencyjnych (EEMF) wykonano za pomocą spektrofluorymetru Hitachi F-7000 z lampą ksenonową, jako źródłem wzbudzenia. Zakres długości fal wzbudzenia wynosił 220,0-550,0 nm, a zakres długości fal emisji 260,0-600,0 nm. Odpowiedni obraz uzyskano dla szczelin obydwu monochromatorów ustawionych na 10,0 nm i czasie integracji wynoszącej 0,5 sekundy. Pomiary wykonano w kuwetach kwarcowych Hellma o drodze optycznej 1cm. Do układu dołożono zewnętrzny termostat DANLAB, który zapewniał stałą temperaturę podczas pomiaru (18°C). Urządzenie połączono z zewnętrznym komputerem wyposażonym w oprogramowanie FL Solutions (Rys. 6.3).



Rys. 6.3 Wygląd zestawu pomiarowego i wnętrza komory pomiarowej

Źródło: zdjęcie autorki pracy

Napary przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 6.2, a następnie przygotowano ich rozcieńczenia: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 i 1:256. W kuwecie kwarcowej umieszczano kolejno: próbę zawierającą wodę demineralizowaną przegotowaną, próbę o największym rozcieńczeniu, kolejne próby z mniejszymi rozcieńczeniami aż do próby nierozcieńczonej. Po zakończeniu pomiarów, dla każdej herbaty otrzymano 9 macierzy danych, które poddano normalizacji i przedstawiono w postaci map konturowych (dokumentacja badań w załączeniu na nośniku danych). Aby uzyskać rzeczywiste wartości pomiaru widm wzbudzenia i emisji, uzyskane dane skorygowano o wyniki otrzymane dla przegotowanej wody wodociągowej.

Do identyfikacji związków odpowiedzialnych za aktywności w analizowanym obszarze wykorzystano związki zastosowane w analizie chromatograficznej (kofeina, teobromina, teofilina, teogalina, kwas galusowy). Przygotowane roztwory 1% w przypadku kofeiny

i teogaliny wymagały rozcieńczeń w celu uzyskania wyraźniejszych punktów maksymalnej intensywności fluorescencji. Widma fluorescencyjne roztworów wzorców skorygowano o rozpuszczalnik (woda:metanol, 1:1).

Pomiar widm fluorescencyjnych przeprowadzono przy współpracy z Katedrą Fizyki Uniwersytetu Morskiego w Gdyni.

6.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem programu Statistica 12.0 pakiet zaawansowany firmy StatSoft oraz PQStat firmy PQStat Software. Zmienne ilościowe zostały opisane za pomocą średniej, wartości minimalnej i maksymalnej. Ze względu na zbyt małą liczebność analizowanej grupy niemożliwe było określenie stopnia wzajemnych powiązań między poszczególnymi zmiennymi. Statystykę chi-kwadrat charakteryzowała zbyt niska moc testu (0,30). Istotność różnic pomiędzy dwoma grupami (niezależnymi) zbadano testem t-Studenta. W celu weryfikacji zaobserwowanych zależności w poszczególnych grupach herbat (rodzaje, rynek) przyjęto poziom istotności statystycznej $\alpha=0,05$. Dodatkowo w celu porównania wyników uzyskanych dla pojedynczych próbek wykonano wielowymiarową analizę skupień, a wyniki przedstawiono na poziomych, hierarchicznych wykresach drzewa. Skupienia wyznaczono używając odległości euklidesowej wobec skali podobieństw, wykorzystując metodę Warda do wyznaczenia zasad wiązania. Analizę skupień wykorzystano ze względu na przystępny sposób grupowania badanych herbat we względnie jednorodne klasy, uwzględniające podobieństwo między analizowanymi próbkami.

7. Wyniki badań i dyskusja







7.1. Oznaczenie parametrów barwy naparów

Podczas procesu fermentacji katechiny i ich galusowe pochodne są utleniane do fenolowych kompleksów barwnych, takich jak teaflawiny, które nadają różne odcienie koloru żółtego. Związki te ulegają dalszemu utlenianiu i tworzą bardziej spolimeryzowane tearubiginy, nadające naparom kolor czerwonobrunatny. Te z kolei są kondensowane do *theabrownin*, które nadają produktowi kolor brązowy (Huang i in. 2019). Zawartość związków barwnych w przeliczeniu na suchą masę w herbacie Ripe Pu-erh kształtuje się na poziomie 0,16% – 0,29% dla teaflawin, 0% – 0,99% dla tearubigin i 8,33% – 13,65% dla *theabrownin* (Lv i in. 2013). *Theabrownin*, nadając brązowej barwy naparowi, jest głównym barwnikiem herbaty Pu-erh i jednym z najważniejszych składników biologicznie aktywnych (Luo i in. 2019).

Dokonując wizualnej oceny barwy naparów herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin, zaobserwowano wyraźne różnice między wersją Raw a Ripe oraz poszczególnymi rocznikami (Tab. 7.1). Obserwacje te znalazły swoje potwierdzenie w wynikach kolorymetrycznego pomiaru wartości parametrów barwy $L^*a^*b^*$. Mimo iż *maocha* stanowi surowiec do produkcji obu rodzajów Pu-erh, to postanowiono ująć ją w analizie, aby móc porównać zmiany parametrów barwy.

Wygląd naparu przygotowanego z *maocha* wyraźnie różnił się od naparów pozostałych herbat, sprowadzonych bezpośrednio z Chin. Różnice między surowcem a Raw Pu-erh były mniejsze ($5,07 \leq \Delta E \leq 6,93$) niż między surowcem a Ripe Pu-erh ($9,13 \leq \Delta E \leq 10,46$). Napar Raw Pu-erh z 2007 roku różnił się od pozostałych dwóch Raw Pu-erh w stopniu rozpoznawalnym nawet przez osobę niedoświadczoną w tym zakresie, z tym że różnica z najstarszym Raw Pu-er z 1998 roku była największa ($\Delta E=3,67$). Z kolei napary Raw z 2003 roku oraz z 1998 roku były najbardziej do siebie zbliżone wizualnie, a różnice w barwie były nierozpoznawalne ($\Delta E=0,46$).

Tab. 7.1 Porównanie barwy 5-minutowych naparów herbat sprowadzonych z Chin

Surowiec	2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha		
			
Raw	2007 Dai Jia Gong Zhu: Dai princess	2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha	1998 CNNP Youle Qiaomu Pu-erh Cake
			
Ripe	2010 Shuangli Jingmaishan	2005 Jinggu Bai Long TF A Grade „Zao Xiang”	
			

Źródło: zdjęcia autorki pracy

Szczegółowa analiza parametrów barwy naparów wykazała, że napar przygotowany z *maocha* był najjaśniejszy ($L^*=41,67$). Ujemna wartość parametru a^* (-1,36) sugerowała, że w sporządzonym naparze dominowało zielone zabarwienie. Napary pozostałych herbat miały dodatnie wartości parametrów a^* i b^* , co świadczyło o większej intensywności barwy czerwono-żółtej niż w naparze przygotowanym z surowca (Tab. 7.2).

Tab. 7.2 Wartości parametrów barwy naparów sprowadzonych bezpośrednio z Chin oraz zakupionych na rynku lokalnym

Oznaczenie	Rodzaj	Rok produkcji	Parametry barwy (\bar{x} ; zakres)		
			L*	a*	b*
Herbaty sprowadzone z Chin					
2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha	Maocha	2014	41,67; 41,34 – 41,99	-1,36; -1,30 – -1,41	6,28; 6,10 – 6,46
2007 Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess	Raw	2007	40,13; 39,70 – 40,55	0,13; 0,10 – 0,16	10,88; 10,41 – 10,89
2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw	Raw	2003	37,74; 37,35 – 38,12	2,21; 2,00 – 2,41	10,30; 9,74 – 10,85
1998 CNNP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake	Raw	1998	37,50; 37,19 – 37,81	2,58; 2,44 – 2,71	10,16; 9,71 – 10,61
2010 Shuangli Jingmaishan Ripe	Ripe	2010	32,65; 32,56 – 32,73	3,14; 2,89 – 3,38	3,47; 3,32 – 3,62
2005 Jinggu Bai Long TF A Grade „Zao Xiang” Ripe Puerh	Ripe	2005	34,28; 34,18 – 34,38	4,00; 3,85 – 4,14	5,96; 5,78 – 6,14
Herbaty zakupione na lokalnym rynku					
Herbaciarnia „Czas na Herbatę”	b.d.	b.d.	27,23; 27,22 – 27,24	1,16; 1,09 – 1,22	2,11; 2,08 – 2,13
Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”	b.d.	b.d.	21,92; 21,90 – 21,93	6,25; 6,23 – 6,27	4,76; 4,74 – 4,77
Astra	b.d.	b.d.	20,95; 20,95 – 29,95	4,31; 4,21 – 4,40	3,97; 3,20 – 4,74
Haichao	b.d.	b.d.	22,08; 22,07 – 22,09	6,21; 6,14 – 6,27	4,72; 4,71 – 4,73
Mayo	b.d.	b.d.	27,75; 27,73 – 27,76	2,13; 2,07 – 2,18	3,30; 3,28 – 3,31

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

b.d – brak danych

Napary starszych herbat Raw były ciemniejsze, wartość parametru a* rosła, a parametru b* malała. Między herbatami z lat 2007 i 2003 wykazane różnice w barwie były większe niż między herbatami z lat 2003 i 1998, co może być związane ze spowolnieniem intensywności reakcji chemicznych (zmian) zachodzących w produkcji.






W przypadku wersji Ripe uzyskane dane wykazały, że starsza herbata (z 2005 roku) charakteryzowała się większym nasyceniem barwy, na co wskazują wartości parametrów L*, a* i b*. Całkowita różnica barwy między naparami przygotowanymi z Ripe Pu-erh była zauważalna nawet dla niedoświadczzonego obserwatora ($\Delta E=3,10$).

Z kolei całkowita różnica barwy dla naparów przygotowanych z Raw i Ripe Pu-erh była wyraźnie zauważalna ($\Delta E>5$), co może świadczyć o potencjalnej możliwości wykorzystania

oznaczenia parametrów barwy naparów do odróżniania wersji Raw od Ripe Pu-erh. Przynajmniej w pewnym zakresie.

W wyniku własnej oceny wizualnej barwy naparów herbat zakupionych na rynku lokalnym stwierdzono, że największe podobieństwo wykazywały napary herbat Haichao oraz produktu zakupionego w herbaciarni „Herbata-kawa.pl” ($\Delta E=0,17$) (Tab. 7.3). Różnice w wyglądzie ich naparów były niezauważalne nawet dla doświadczonego obserwatora.

Tab. 7.3 Porównanie barwy 5-minutowych naparów herbat zakupionych na rynku lokalnym

	Herbaciarnia „Czas na Herbatę”	Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”	
Rynek lokalny			
	Astra	Haichao	Mayo
			

Źródło: zdjęcia autorki pracy

Z kolei całkowita różnica w barwie produktu zakupionego w herbaciarni „Czas na Herbatę” była niewielka (zauważalna jedynie dla osoby doświadczonej w tym zakresie), ale tylko w przypadku porównania z naparem herbaty firmy Mayo. W odniesieniu do naparów pozostałych herbat różnice były znaczące ($7,27 \leq \Delta E \leq 7,82$).

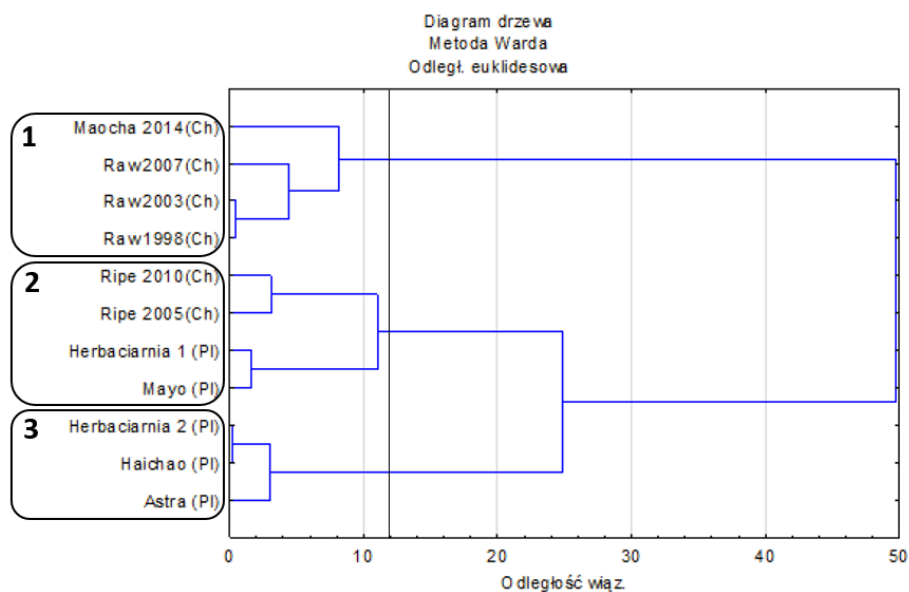
Szczegółowa analiza parametrów barwy naparów wykazała, że jasność tych naparów kształtowała się na poziomie od $L^*=20,95$ do $L^*=27,75$. Parametr a^* przyjmował wartości od 1,16 do 6,21, a parametr b^* od 2,11 do 4,76. Wśród herbat zakupionych w herbaciarni wraz ze wzrostem czasu leżakowania zmniejszała się wartość parametru L^* (napar stawał się ciemniejszy) oraz wzrastała wartość parametru a^* i b^* . Największym udziałem zarówno barwy żółtej, jak i czerwonej charakteryzowały się dwie próby: z herbaciarni „Herbata-kawa.pl” (dojrzewająca 6 lat) oraz Haichao.

W kolejnym etapie analizy parametrów barwy postanowiono porównać wyniki uzyskane dla herbat zakupionych na lokalnym rynku z wynikami uzyskanymi dla herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin. Porównanie przeprowadzono w celu weryfikacji jakości i autentyczności herbat Pu-erh obecnych na lokalnym rynku.

Wizualna ocena porównawcza sugerowała, że napary herbat zakupionych na lokalnym rynku były w większym stopniu podobne pod kątem barwy do naparów herbat Ripe Pu-erh, sprowadzonych bezpośrednio z Chin. Całkowite różnice w barwie (ΔE) między tymi dwiema grupami herbat wynosiły od 5,01 do 13,48. Z kolei w porównaniu z Raw Pu-erh różnice te były większe i przyjmowały wartości od 11,93 do 20,81.

Szczegółowa analiza parametrów barwy naparów wykazała, że herbaty zakupione w sklepach stacjonarnych charakteryzowały się ciemnymi naparami, ciemniejszymi niż Ripe Pu-erh sprowadzone bezpośrednio z Chin. Między parametrami a^* oraz b^* nie zaobserwowano żadnej zależności. Różnice w jasności między Ripe Pu-erh sprowadzonymi z Chin a herbatami zakupionymi na lokalnym rynku mogły wynikać z wieku samej herbaty. Jednak brak informacji o terminie zakończenia procesu produkcyjnego herbat zakupionych na rynku lokalnym uniemożliwił przeprowadzenie takiego porównania.

W celu sprawdzenia, czy herbaty zakupione na rynku lokalnym wykazują większe podobieństwo do Raw Pu-erh czy Ripe Pu-erh, wykorzystano aglomeracyjną metodę Warda, w której podstawą aglomeracji były odległości euklidesowe. Grupowanie przeprowadzono w oparciu o trzy parametry barwy: L^* , a^* i b^* . Skupienia wyznaczono na podstawie wykresu odległości wiązania względem etapów wiązania (odległość aglomeracyjna równa 12) (Rys. 7.1).



Rys. 7.1 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na ich barwę określoną przez parametry L^* , a^* , b^*
Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Przy wybranej odległości aglomeracyjnej wyodrębniono trzy skupienia. Pierwsze skupienie tworzyły *maocha* oraz Raw Pu-erh sprowadzone z Chin. Herbaty te charakteryzowały się większymi wartościami parametrów L^* i b^* od wersji Ripe oraz herbat zakupionych na lokalnym rynku. Najbardziej zbliżone do siebie parametry barwy naparów wykazywały dwie najstarsze próby Raw: z 2003 i 1998 roku (odległość euklidesowa=0,5). Może to wynikać ze spowolnieniem tempa zmian, jakie zachodzą w produkcie dojrzewającym. Kolejne skupienie było reprezentowane przez dwie Ripe Pu-erh sprowadzone z Chin oraz dwie próby zakupione na lokalnym rynku: z herbaciarni „Czas na Herbatę” oraz firmy Mayo. Z czego herbaty sprowadzone z Chin wykazywały największe podobieństwo względem siebie, a próby zakupione na rynku lokalnym – największe podobieństwo względem siebie. Tę grupę charakteryzowały wartości parametru L^* w przedziale 27,23-34,28. Trzecie skupienie tworzyły trzy próby zakupione na rynku lokalnym firm: z herbaciarni „Herbata-kawa.pl” oraz firm Haichao i Astra. Tę grupę charakteryzowały najniższe spośród oznaczonych wartości parametru L^* oraz największe z oznaczonych wartości parametru a^* . Największe podobieństwo pod kątem parametrów barwy naparów wykazywały herbata Haichao oraz zakupiona w herbaciarni (odległość euklidesowa=0,2).

Na podstawie przeprowadzonej oceny porównawczej oznaczonych parametrów barwy można uznać, iż herbaty zakupione na rynku lokalnym stanowią wersję Ripe Pu-erh. Jednak

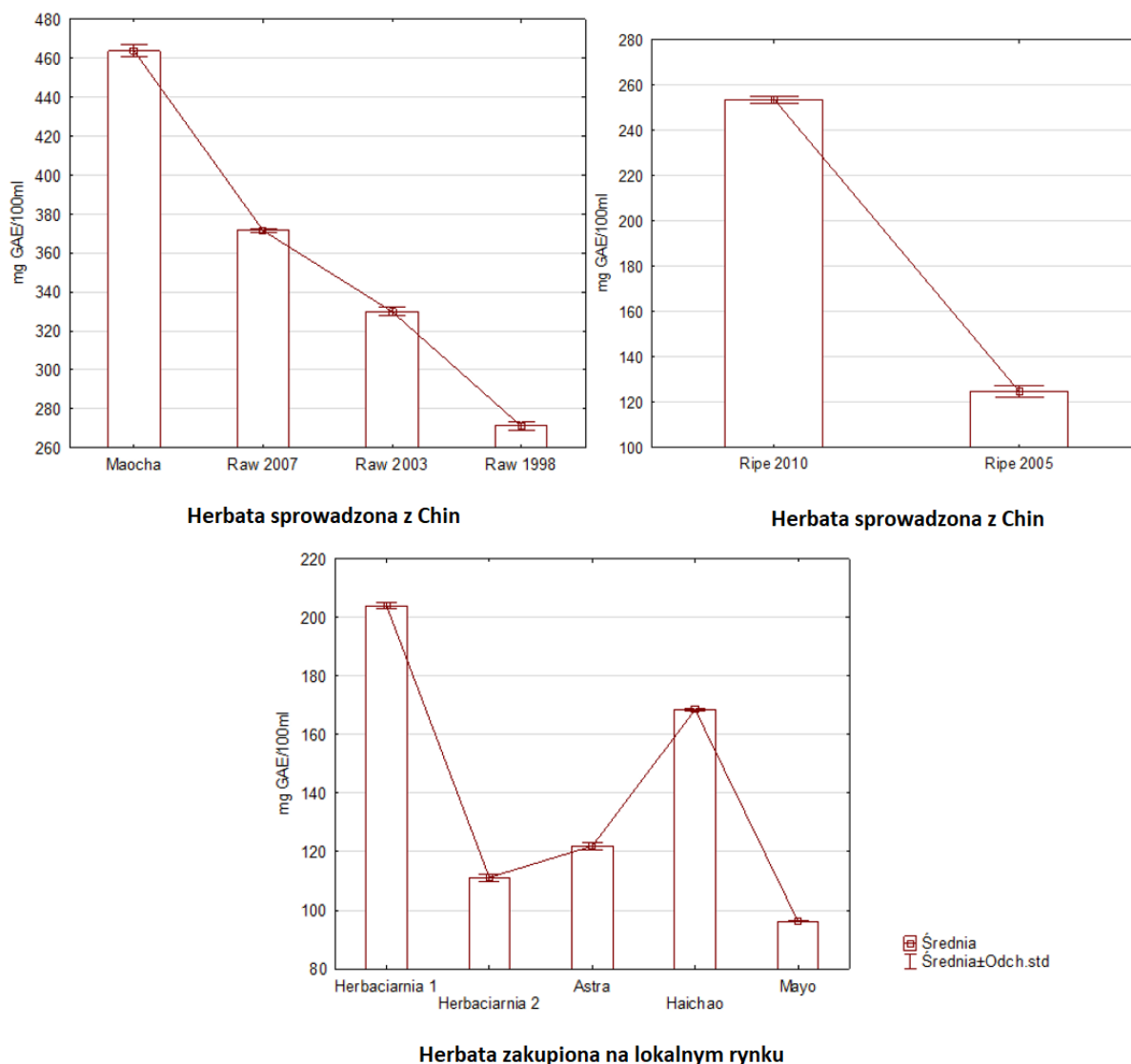
należy mieć na uwadze, że w wyniku długotrwałego procesu dojrzewania Raw Pu-erh różnice te mogą się zmniejszać i w pewnym momencie metoda ta może nie być skuteczna. Dodatkowo warunki panujące podczas magazynowania produktów, wpływają na końcową zawartość składników aktywnych – w tym związków barwnych. Zhou i in. (2020a) dokonali porównania składu dwóch 15. letnich prób Ripe Pu-erh przechowywanych w różnych warunkach. Naukowcy stwierdzili, że próba przechowywana we względnie suchym otoczeniu zawierała większe ilości teaflawin, tearubigin i *theabrownin* (odpowiednio 3,63 mg/g, 36,43 mg/g i 131,70 mg/g) w porównaniu z próbą przechowywaną we względnie wilgotnym otoczeniu (odpowiednio 4,37 mg/g, 44,13 mg/g i 107,10 mg/g).

W wyniku przechowywania zmienia się barwa wszystkich rodzajów herbat, choć w większości przypadków długotrwałe przechowywanie prowadzi do niepożądanych zmian. Jimenez-Zamora, Delgado-Andrade i Rufian-Henares (2016) przeanalizowali zmiany barwy naparów, popularnych w Hiszpani rodzajów herbat, w zależności od warunków oraz czasu przechowywania. Do badania wybrano herbatę białą, zieloną, czerwoną oraz czarną. Próby przechowywano w temperaturze pokojowej przez okres 3 i 6 miesięcy oraz w podwyższonej temperaturze (50°C) przez okres 3 i 6 miesięcy. Analiza wykazała, że różne warunki przechowywania (sterowanie temperaturą otoczenia) w różny sposób wpływają na poszczególne rodzaje herbaty i nie ma jednego wzorca, określającego kierunek zachodzących zmian.

7.2. Pomiar zawartości związków polifenolowych

Największe ilości związków polifenolowych występują w owocach (przede wszystkim jagodowych), niektórych warzywach, winie oraz herbacie (zwłaszcza zielonej). Mimo iż wiele produktów zawiera większe ilości polifenoli niż herbata, to bardzo często herbata jest głównym źródłem tych związków w codziennej diecie, ze względu na jej częstość spożycia.

Dokonując analizy uzyskanych wyników w grupie herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin stwierdzono, że odmiany Raw Pu-erh zawierają większe ilości związków polifenolowych w porównaniu z odmianą Ripe (Rysunek 7.2).



Rys. 7.2 Zawartość związków polifenolowych dla poszczególnych herbat z uwzględnieniem podziału na grupy: Raw z Chin, Ripe z Chin, herbaty z rynku lokalnego

Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Prace innych naukowców potwierdzają zaobserwowane zależności. Ahmed i in. (2010) oznaczyli większą zawartością katechin ogółem w Raw Pu-erh (ok. 14,5 mg/g), wykazując równocześnie duże zróżnicowanie wyników (od 5 do 30 mg/g). Świeża Ripe Pu-erh charakteryzowała się mniejszą zawartością analizowanych związków – około 1,75 mg/g, z równoczesnym mniejszym ich zróżnicowaniem. Również Roda i in. (2019) porównali Raw i Ripe Pu-erh pod kątem zawartości omawianych związków. Ekstrakty Raw Pu-erh charakteryzowały się dwukrotnie większą zawartością związków polifenolowych niż w wersji Ripe Pu-erh. Analiza jakościowa (LC-MS) wykazała, że głównymi składnikami

polifenolowymi w ekstraktach Pu-erh są flawonoidy, a w szczególności: katechiny, flawonole, proantocyjanidyny, kwas kawoilochinowy (chlorogenowy) i kumarylochinowy. Z kolei Xue i in. (2020) porównali 5 herbat Raw i 5 herbat Ripe z regionu Menghai w prowincji Yunnan. Raw Pu-erh zawierały większe ilości związków polifenolowych. Ich średnia zawartość wyniosła 268,6 mg/g (od 225 do 299 mg/g), podczas gdy w Ripe Pu-erh 159,0 mg/g (od 135 do 200 mg/g). W związku z tym można przyjąć, iż decydujący wpływ na ostateczną zawartość polifenoli w herbacie będzie mieć zastosowany proces produkcyjny.

W analizowanej grupie Raw Pu-erh sprowadzonych bezpośrednio z Chin zaobserwowano spadek zawartości związków polifenolowych wraz ze wzrostem wieku herbaty, ponieważ największą ilość analizowanych związków oznaczono w najmłodszej próbie (z 2007 roku) – 371,5 mg GAE/100ml, a najmniejszą w najstarszej (z 1998 roku) – 271,1 mg GAE/100ml. Zaobserwowaną zależność potwierdzają wyniki uzyskane przez Ahmed i in. (2010). Naukowcy porównali Raw i 10-letnie Aged Raw pod kątem zawartości wybranych związków. Raw Pu-erh charakteryzowały się większą zawartością katechin ogółem (ok. 14,5 mg/g), niż wersje 10-letnie (średnia ok. 6,75 mg/g). Tak więc w wyniku dojrzewania tego produktu zawartość katechin zmniejszyła się aż o połowę. Oba rodzaje herbaty charakteryzowało duże zróżnicowanie pojedynczych wyników: świeży Raw od 5 do 30 mg/g, Aged Raw od 0 do 20 mg/g. Dodatkowo w produkcie naturalnie dojrzewającym oznaczono ok. 2,5 mg/g kwasu galusowego, podczas gdy w świeżej zielonej Pu-erh zaledwie ok. 1 mg/g suchego produktu.

W analizowanej grupie Ripe Pu-erh sprowadzonych bezpośrednio z Chin zaobserwowano potencjalną zależność między zawartością związków polifenolowych a wiekiem herbaty. Jednak ilość zaledwie dwóch prób uniemożliwia potwierdzenie tego przypuszczenia. Większą ilością analizowanych związków charakteryzowała się młodsza herbata (z 2010 roku), w której oznaczono średnio 253,7 mg GAE/100ml naparu. W herbacie z 2005 roku oznaczono dwukrotnie mniejszą zawartość związków polifenolowych – średnio 124,7 mg GAE/100ml naparu.

Ze względu na krótszy okres obróbki technologicznej surowca przy wersji Ripe Pu-erh (w porównaniu z Raw Pu-erh) oraz większą sposobność do sterowania tym procesem, naukowcy chętniej analizują przebieg procesu *wo-dui* pod kątem wpływu na zawartość wybranych związków chemicznych. Abe i in. (2008) przeanalizowali przebieg procesu fermentacji Ripe Pu-erh (temperatura, pH, zawartość wody) i scharakteryzowali go pod kątem występujących populacji grzybów oraz zmian zawartości polifenoli. Początkowa zawartość związków polifenolowych (w surowcu) wynosiła 22%. W pierwszej fazie procesu fermentacji (do 6 dnia) zaobserwowano niewielką zmianę ich zawartości. Następnie, aż do 50. dnia

fermentacji, ilość polifenoli sukcesywnie malała, osiągając na samym końcu procesu poziom 10%. W tym samym okresie (od 10 do 50 dnia) autorzy zaobserwowali gwałtowny wzrost liczby grzybów, którym przypisali kluczowe znaczenie w kształtowaniu poziomu zawartości polifenoli – w trakcie procesu produkcyjnego. Enzymy wydzielane przez grzyby są odpowiedzialne za utlenianie oraz transformację związków polifenolowych. Li i in. (2018b) uzupełnili badania wykonane przez Abe i in. (2008) o obserwacje początkowego okresu procesu sztucznego postarzania. Pomiary rozpoczęli w czasie zero, a kolejne pomiary wykonywali po 3, 6, 9 i 12 godzinach. Dzięki temu stwierdzili, że pierwsze zmiany w zawartości polifenoli i flawonoidów ogółem zachodzą już po 3 godzinach trwania procesu (niewielki wzrost o ok. 5% i ok. 0,1%). Następnie, w przypadku polifenoli, następuje stały spadek ich zawartości aż do końca okresu pomiarowego (do poziomu ok. 15%). W przypadku flawonoidów od 3 do 9 godziny następuje spadek ich zawartości (do poziomu ok. 3,30%), ale po 9 godzinie ponownie następuje nieznaczny wzrost (do poziomu ok. 3,35%). Chen, Liu i Chang (2010) wykazali, iż proces sztucznego postarzania z udziałem pojedynczych szczepów bakterii (wykorzystano dwa gatunki: *Streptomyces* i *Actinoplanes*) nie prowadzi do zmniejszenia a do znaczącego zwiększenia ilości związków fenolowych w produkcie końcowym – nawet 7-krotnego po 180 dniach fermentacji. Dzięki temu możliwe jest projektowanie herbat Pu-erh z większą zawartością wybranych związków chemicznych.

Wyniki badań własnych, uzyskanych dla grupy herbat zakupionych na rynku lokalnym, wykazują ich duże zróżnicowanie. Najmniejszym poziomem związków polifenolowych charakteryzowała się herbata firmy Mayo (96,1 mgGAE/100ml naparu), podczas gdy w próbie z herbaciarni „Czas na Herbatę” oznaczono ich zawartość na poziomie 204,1 mgGAE/100ml naparu. W pozostałych próbach ilość tych związków mieściła się w przedziale od 111,2 do 168,5 mgGAE/100ml naparu. Wyniki uzyskane dla tej grupy herbat wykazują większe podobieństwo do wersji Ripe sprowadzonej z Chin. Dodatkowo herbata z herbaciarni poddana procesowi 6-letniego dojrzewania wykazywała mniejszą zawartość związków polifenolowych niż herbata dojrzewająca 3 lata.

Dostępne opracowania naukowe potwierdzają, że warunki leżakowania wpływają na zawartość składników aktywnych w produkcie końcowym. Jimenez-Zamora, Delgado-Andrade i Rufian-Henares (2016) przeanalizowali zmiany zawartości związków fenolowych w zależności od warunków oraz czasu ich przechowywania – pomiary wykonywano w czasie zero, po upływie 3 i następnie 6 miesięcy. W wyniku przechowywania herbaty czerwonej w temperaturze pokojowej odnotowano spadek zawartości analizowanych związków. Takie same obserwacje poczyniono w wyniku przechowywania tej samej herbaty

w podwyższonej temperaturze (50°C). Autorzy dokonywali pomiarów w krótkim okresie oraz nie podali dokładnego opisu analizowanej herbaty, dlatego autorowi niniejszej dysertacji trudno jest się odnieść do zaprezentowanych wyników w stosunku do konkretnego rodzaju herbaty Pu-erh. Z kolei Zhou i in. (2020a) uwzględnili dłuższy czas przechowywania produktu, ponieważ porównali 15-letnią herbatę Ripe Pu-erh przechowywaną we względnie suchym i względnie wilgotnym środowisku (warunki naturalne, niesterowane). Obie próby zostały przygotowane z tego samego surowca i sprasowane przed procesem leżakowania. Herbata przechowywana we względnie suchym otoczeniu zawierała większe ilości polifenoli (85,73 mg/g) niż herbata przechowywana we względnie wilgotnym otoczeniu (70,73 mg/g).

Ze względu na niepełne informacje w pochodzeniu surowca wykorzystanego do produkcji analizowanych herbat, nie można było w przeprowadzonych badaniach uwzględnić wpływu pochodzenia/rodzaju surowca na zawartości oznaczanych związków. Mimo iż zastosowany proces produkcyjny w istotny sposób wpływa na końcową zawartość związków polifenolowych, to również pochodzenie surowca nie pozostaje tutaj bez znaczenia. Jego rodzaj oraz jakość decydują bowiem o wyjściowej ilości tych związków, które następnie w odpowiednim stopniu ulegną dalszym przemianom.

Do produkcji niemal wszystkich rodzajów herbat wykorzystuje się młode, górne liście i nieotwarte pączki liściowe. Podczas gdy dojrzałe, starsze liście o barwie głębokiej zieleni uznawane są za nieodpowiednie do produkcji herbaty, ze względu na ich niepożądany smak (Liu i in. 2020). Do produkcji Pu-erh również wykorzystuje się młode liście, ale dodatkowo także kolejne 2-3 liście. W przypadku surowca ze starych „dzikich” drzew (trudnodostępnego ze względu na położenie w dżungli oraz wysokość samych drzew) większość pozyskiwanego materiału stanowią dojrzałe liście.

Młode liście zawierają na ogół większe ilości kofeiny, EGCG i ECG niż te dojrzałe. Jednak starsze liście są bogatsze w teaninę, EGC i EC. Z kolei rośliny dziko rosnące charakteryzują większe poziomy EGCG, EGC, ECG i katechin ogółem w porównaniu z odmianami uprawnymi (Chan, Lim i Chew 2007). Liu i in. (2020) porównali profil fenolowy młodych (maksymalnie dwutygodniowe) i starych (co najmniej trzymiesięcznych) liści *Camellia sinensis var. sinensis*. Uzyskane wyniki wykazały, że młode liście zawierają niemal dwa razy więcej związków fenolowych (18,82% suchej masy) niż liście starsze (9,52% suchej masy). Potwierdzili również, że młode liście zawierają więcej ECG i EGCG i mniej EC i EGC niż starszy materiał. Dodatkowo dojrzały materiał zawierał większe ilości rutyny (stary liść – 0,37% suchej masy, młody liść – 0,24% suchej masy). Podobną zależność, ale w liściach *Camellia sinensis var. assamica*, przedstawili Chan, Lim i Chew (2007). Dokonali oni analizy

porównawczej świeżych pędów (pączek i dwa najmłodsze liście), młodych liści (liście od 3 do 5) oraz dojrzałych liści (od 6 do 8). Największą zawartość związków fenolowych oznaczyli w świeżych pędach (7666 mg GAE/100 g), następnie w młodych liściach (7280 mg GAE/100 g), a najmniej w liściach dojrzałych (5836 mg GAE/100 g). Dodatkowo porównali materiał pozyskany z upraw zlokalizowanych na terenach nizinnych oraz terenach górskich. Nieznacznie większą ilością związków fenolowych charakteryzował się surowiec z upraw znajdujących się na większych wysokościach (7586 ± 1995 mg GAE/100 g), ale był też bardziej zróżnicowany pod tym kątem. Surowiec pozyskany z terenów nizinnych (7280 ± 126 mg GAE/100 g) wykazywał bardziej stabilną ilość związków fenolowych.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała zróżnicowanie uzyskanych wyników w zależności od miejsca zakupu analizowanych herbat. Mając na uwadze, że t Stat (Załącznik 6) dla związków polifenolowych jest większe od 0 (2,94) i $P(T \leq t)$ jednostronny wynosi 0,0082, a więc jest mniejsze od założonego $\alpha=0,05$ zakłada się, że średnia zawartość związków polifenolowych mierzona w mgGAE/100ml dla herbat, których próby pochodzą bezpośrednio z Chin, jest istotnie większa od średniej zawartości tych związków mierzonych w ten sam sposób dla herbat, zakupionych na rynku lokalnym. Może to wynikać z wielu czynników, jak: warunki przechowywania i transportu, forma i sposób przygotowania surowca (surowiec w postaci sypkiej lub prasowany).

Według wielu ośrodków naukowych herbaty Pu-erh wykazują niewielką zawartość związków polifenolowych w porównaniu z pozostałymi rodzajami herbaty. Almajano i in. (2008) największą zawartość analizowanych związków oznaczono w herbacie białej (2180 mg GAE/l naparu), niewiele mniejszą w herbacie zielonej (2083 mg GAE/l naparu), następnie w czarnej (1844 mg GAE/l naparu), a najmniej w czerwonej (825 mg GAE/l naparu). Z kolei Jimenez-Zamora, Delgado-Andrade i Rufian-Henares (2016) uzyskali inną kolejność dla tych samych rodzajów herbat: zielona (1387 mg GAE/l naparu), biała (613 mg GAE/l naparu), czerwona (318 mg GAE/l naparu), czarna (251 mg GAE/l naparu). Herbata żółta, oolong oraz inne ciemne herbaty, poza Pu-erh, są sporadycznie spożywane lub w ogóle nieznane. Dlatego bardzo często opracowania europejskich naukowców nie uwzględniają wszystkich 6 rodzajów herbat. Z tego względu ciekawsze wydają się opracowania autorów z Chin, którzy mają dostęp do wszystkich rodzajów herbat, w tym Raw i Ripe Pu-erh. Zhang i in. (2011) porównali zawartości katechin i kwasu galusowego we wszystkich rodzajach herbaty z uwzględnieniem Aged Raw i Ripe Pu-erh. Uzyskane wyniki pokazały, że największą zawartością katechin charakteryzowały się herbaty oolong (87,82 mg/g) – należy w tym miejscu zaznaczyć, że herbaty oolong wykazują największe zróżnicowanie pod względem

stopnia utlenienia składników (od 15 do 80%). Następne w kolejności były herbaty żółte (72,29 mg/g), a dopiero potem białe (70,73 mg/g) i zielone (66,38 mg/g). Wersja Aged Raw Pu-erh zawierała więcej katechin (38,69 mg/g) niż wersja sztucznie postarzana, ale niemal dwukrotnie mniej niż herbata zielona. Jedną z najniższych zawartości tych związków oznaczono w herbatach czarnych (7,79 mg/g) i Ripe Pu-erh (4,28 mg/g). Analiza zawartości kwasu galusowego wykazała, że większą jego ilość miały herbaty bardziej przetworzone – najwięcej Ripe Pu-erh (6,51 mg/g). Z kolei Tang i in. (2019) przeanalizowali wszystkie rodzaje herbat, z czego w grupie herbat ciemnych uwzględnili wszystkich przedstawicieli 5 prowincji, zajmujących się produkcją herbat tego rodzaju. W wyniku przeprowadzonej analizy zawartości związków polifenolowych otrzymali następujące wyniki: herbaty żółte (198,44 mg GAE/g suchej masy)> zielone (195,79 mg GAE/g suchej masy)> oolong (172,11 mg GAE/g suchej masy)> czarne (107,54 mg GAE/g suchej masy)> białe (84,39 mg GAE/g suchej masy)> ciemne (78,16 mg GAE/g suchej masy). Tang i in. (2019) podkreślili, iż rzadko przytaczanym czynnikiem, mającym wpływ na siłę antyoksydacyjną poszczególnych rodzajów herbat jest biodostępność związków fenolowych. Herbaty fermentowane cechuje wyższa biodostępność tych składników niż herbat niefermentowanych. Mimo iż herbaty czarne i ciemne zawierają mniej składników przeciwutleniających niż herbaty zielone, będą w badaniach *in vivo* wykazywać większą lub podobną skuteczność działania.

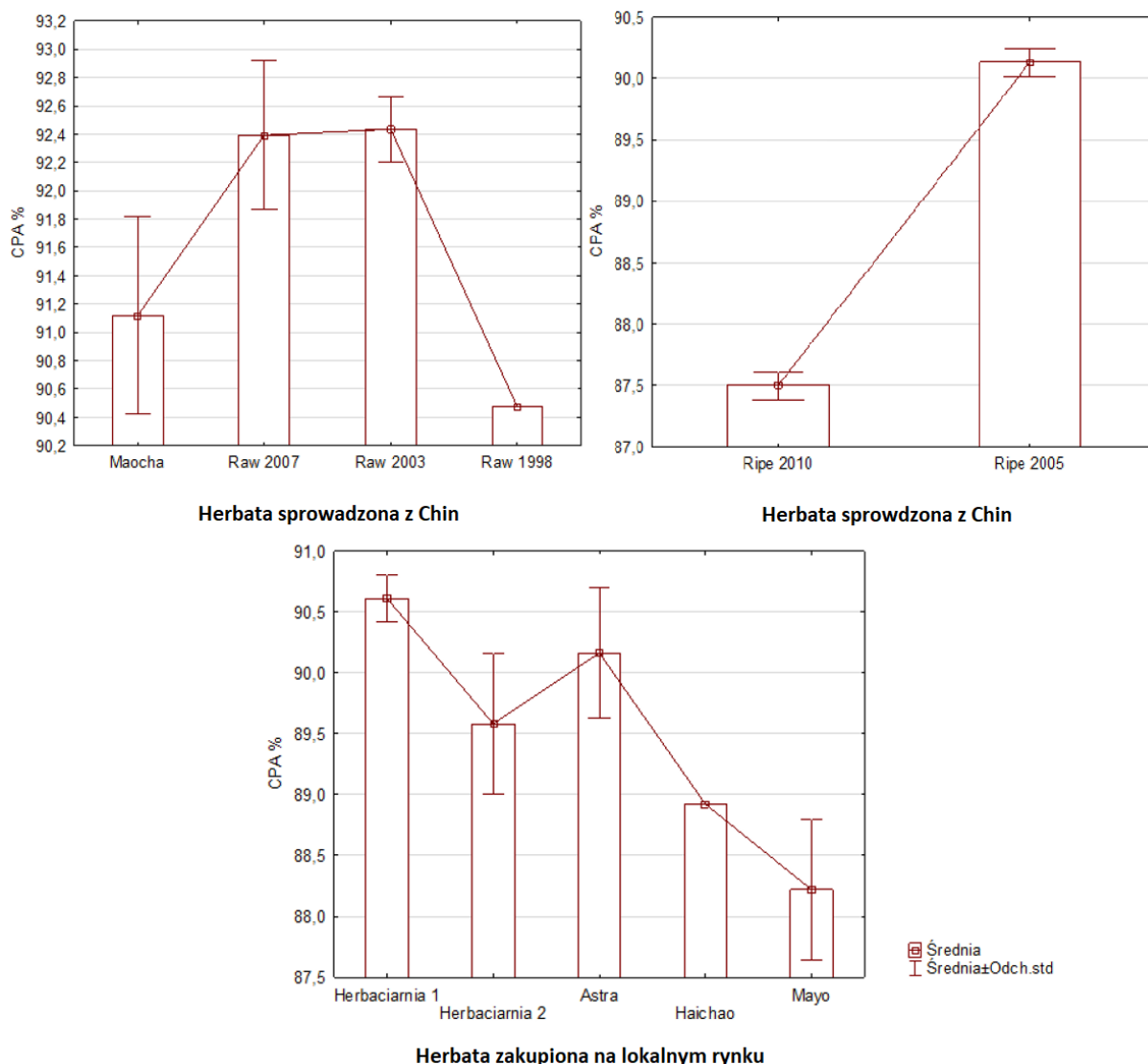
7.3. Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej

Żywność nieprzetworzona, a przede wszystkim owoce i warzywa, wykazują największą aktywność przeciwoksydacyjną i znajdują się u podstaw piramidy zdrowego żywienia. Herbata, choć nie zawiera tak znaczących ilości składników o charakterze przeciwutleniającym, to stanowi cenne uzupełnienie codziennej diety. W porównaniu z wodą i innymi napojami dostarcza różnorodnych i cennych związków, których struktura zależy od wybranego rodzaju herbaty. Polifenole stanowią w herbacie największą grupę związków o charakterze antyoksydacyjnym. Jednak również witaminy, kwasy organiczne i związki barwne, występujące w mniejszych ilościach, wpływają na końcową zdolność produktu do wymiatania wolnych rodników. Jak wykazano w części teoretycznej, herbata Pu-erh nie została jeszcze do końca poznana przez naukowców i nadal odkrywane i poznawane są jej nowe składniki, które również mogą wykazywać właściwości przeciwutleniające.

Opracowania porównujące aktywność przeciwutleniającą różnych rodzajów herbat wykazują, że herbaty Pu-erh wykazują najmniejszą lub jedną z mniejszych skuteczności na tym

polu. Wydaje się więc, że mimo bogatego składu chemicznego skuteczność tych związków do neutralizacji wolnych rodników jest niska. Almajano i in. (2008) porównali zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniającą (test TEAC) herbaty białej, zielonej, czerwonej i czarnej. Przy zastosowanym doborze prób najmniejszą skuteczność w wygaszaniu wolnych rodników ABTS wykazywała herbata czerwona (1215 mmol troloksu/l), a największą – herbata zielona (6344 3771 mmol troloksu/l). Herbata czarna, należąca również do herbat mocno przetworzonych, wykazywała w porównaniu z herbatą czerwoną ponad trzykrotnie lepszą skuteczność. Bardziej rozbudowaną analizę przeprowadzili Jimenez-Zamora, Delgado-Andrade i Rufian-Henares (2016), uzyskując nieco odmienne wyniki. Porównali oni zdolność do wygaszania wolnych rodników w herbacie białej, zielonej, czerwonej i czarnej. Autorzy zastosowali test TEAC względem odczynników ABTS, DPPH oraz FRAP. W każdym wykonanym teście największą skutecznością charakteryzowała się herbata zielona, następnie biała, czerwona i na końcu czarna. Wykorzystując odczynnik DPPH, różnica między herbatą czerwoną a czarną była najmniejsza (odpowiednio 5,45 i 5,13 mmol troloksu/l). Z kolei Tang i in. (2019) porównali zdolności antyoksydacyjne wszystkich 6 rodzajów herbat w odniesieniu do redukcji jonów żelaza (III) oraz za pomocą testu TEAC wobec rodników ABTS. Najlepszą skutecznością – ponad lub niemal 3-krotnie większą w porównaniu z herbatami czarnymi, ciemnymi i białymi – charakteryzowały się napary herbat zielonych (3621,75 $\mu\text{mol Fe (III)/g}$ suchej masy) i żółtych (3182,34 75 $\mu\text{mol Fe (III)/g}$ suchej masy). Również wobec rodników ABTS napary herbat żółtych i zielonych wykazywały kilkukrotnie większą skuteczność niż napary herbat czarnych, białych i ciemnych. W grupie herbat ciemnych w obu doświadczeniach najmniejszą skuteczność wykazywała herbata *Tibetan Tea* z prowincji Sichuan, a największą – *Fuzhuan Brick Tea* z prowincji Hubei. Herbata Pu-erh z prowincji Yunnan za każdym razem wykazywała skuteczność poniżej średniej dla całej grupy herbat ciemnych (FRAP: 803,46 $\mu\text{mol Fe (III)/g}$ suchej masy; TEAC: 406,02 $\mu\text{mol troloksu/g}$ suchej masy). Należy w tym miejscu zaznaczyć, że w grupie herbat ciemnych występowały herbaty poddane wymuszonemu procesowi fermentacji mikrobiologicznej.

Dokonując analizy uzyskanych wyników w grupie herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin stwierdzono, że proces naturalnej i powolnej fermentacji prowadzi do uzyskania herbat o lepszej zdolności do neutralizacji wolnych rodników w porównaniu z herbatą uzyskaną w wyniku sztucznego postarzenia (Rys. 7.3).



Rys. 7.3 Aktywność antyoksydacyjna wszystkich analizowanych naparów herbat względem odczynnika DPPH z uwzględnieniem podziału na grupy: Raw z Chin, Ripe z Chin, herbaty z rynku lokalnego

Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Herbaty Raw Pu-erh charakteryzowała aktywność antyoksydacyjna na poziomie 90,5% do 92,4%, natomiast Ripe Pu-erh na poziomie 87,5% do 90,1%. Taką zależność potwierdzili również Roda i in. (2019), którzy porównali herbaty Raw i Ripe Pu-erh pod kątem zdolności ich naparów do absorpcji rodników tlenowych (ORAC), zmiatania rodników nadtlenkowych (SARSA) oraz skuteczności względem odczynników DPPH, ABTS, FRAP. Wersja Raw w każdym teście wykazywała większą skuteczność niż wersja Ripe. Kilkukrotnie lepsze wyniki

odnotowano w doświadczeniu z odczynnikami DPPH, FRAP oraz metodzie ORAC, a właściwości antyoksydacyjne surowej Pu-erh rosły wraz z zawartością polifenoli.

W przypadku Pu-erh wytwarzanej w sposób tradycyjny jakość surowca oraz jego pochodzenie będą w znacznym stopniu wpływać na właściwości antyoksydacyjne produktu końcowego. Chan, Lim i Chew (2007) dokonali analizy porównawczej świeżych pędów (pączek i dwa najmłodsze liście), młodych liści (liście od 3 do 5) oraz dojrzałych liści (od 6 do 8) *Camellia sinensis var. assamica*, pochodzących z upraw prowadzonych na terenach nizinnych i górskich. Do oceny właściwości antyoksydacyjnych wykorzystali odczynnik DPPH, FRAP oraz ocenę zdolności do chelatowania jonów żelazowych (II) (FIC). W każdym teście najlepsze wyniki odnotowano dla młodych pędów, a następnie młodych liści. Różnica między tymi rodzajami surowca a dojrzałymi liśćmi była znacząca. Uzyskane wielkości były skorelowane z zawartością związków fenolowych. Interesujące jest zestawienie wyników uzyskanych dla surowców z upraw prowadzonych na różnych wysokościach. Mimo iż surowiec pozyskany z upraw prowadzonych na terenach nizinnych zawierał mniejsze ilości związków fenolowych, to wykazywał on większą skuteczność względem odczynników DPPH i FRAP. Autorzy sugerowali, że lokalizacja upraw krzewu herbacianego wpływa na powstawanie w surowcu innych związków (niż związki fenolowe) o charakterze przeciwutleniającym. W roku 2016 zespół Zeng i in. potwierdził, że lokalizacja upraw krzewu herbacianego wpływa na skład chemiczny pozyskiwanych liści.

W wyniku wykonanych badań własnych zauważono, że wraz z wiekiem herbaty zmienia się jej zdolność do zmiatania wolnych rodników DPPH. W wersji tradycyjnej najstarsza próba wykazywała pod tym kątem najmniejszą skuteczność. Można zatem przypuszczać, że wieloletni proces dojrzewania będzie mieć negatywny wpływ na aktywność antyoksydacyjną naparów analizowanych herbat. Taką zależność wykazali również Ahmed i in. (2010). Autorzy porównali zdolność do wychwytywania wolnych rodników DPPH 3 rodzajów Pu-erh: Raw, 10-letni Aged Raw i Ripe. Najlepszą aktywnością antyoksydacyjną (wyrażoną wartością IC₅₀) charakteryzowały się napary surowej Pu-erh (średnia wyniosła ok. 71 µg/ml). Nieco mniejszą skuteczność wykazywały Aged Raw (średnia wyniosła ok. 95 µg/ml). Z kolei najmniejszą – Ripe Pu-erh (średnia wyniosła ok. 101 µg/ml).

W analizowanej grupie herbat sztucznie postarżanych sprowadzonych bezpośrednio z Chin zaobserwowano potencjalną zależność między zdolnością naparów do redukcji wolnych rodników a wiekiem herbaty. Jednak ilość zaledwie dwóch prób uniemożliwia potwierdzenie tego przypuszczenia. Większą zdolnością antyoksydacyjną charakteryzowały się napary

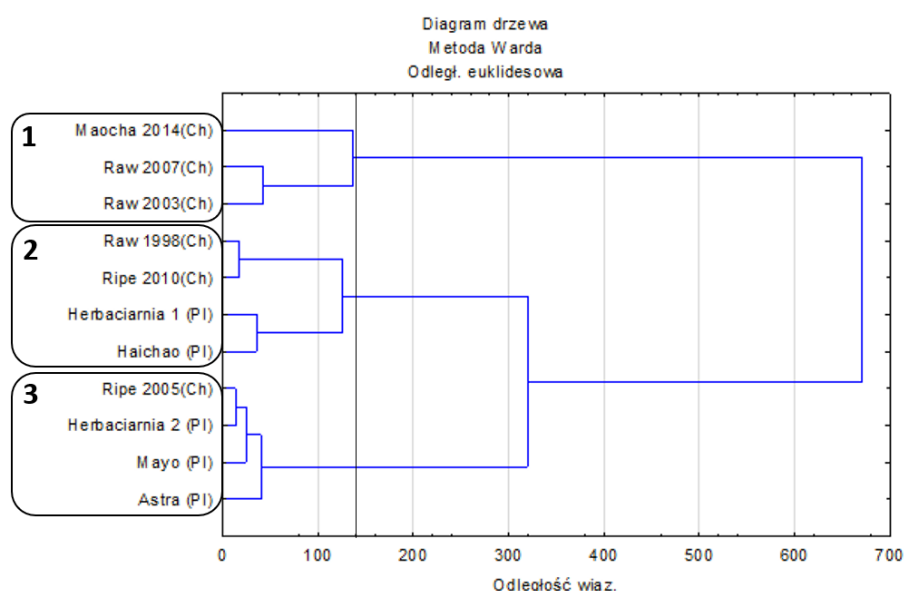
starszej herbaty (z 2005 roku) – średnio 90,1%. W herbacie z 2010 roku wykazana aktywność antyoksydacyjna wyniosła średnio 87,5%.

Przy produkcji Ripe Pu-erh, na skład produktu końcowego wpływ ma kompozycja drobnoustrojów wykorzystanych w procesie sztucznego postarzania. W przypadku zaszczerpienia surowca to technolog jest odpowiedzialny za dobór grzybów i bakterii. Chen, Liu i Chang (2010) wykazali, że sterowanie procesem sztucznego postarzania, może prowadzić do uzyskania herbat zawierających większe ilości związków aktywnych i wykazujących lepsze właściwości antyoksydacyjne. Naukowcy przeprowadzili proces sztucznego postarzania surowców różnego pochodzenia z zastosowaniem bakterii rodzaju *Streptomyces*. Zdolność do wymiatania wolnych rodników DPPH oraz rodników ponadtlenkowych sprawdzano w surowcu, a następnie po 10, 20, 30, 60, 90 i 180 dniach trwania procesu fermentacji. Najlepszymi właściwościami antyoksydacyjnymi w stosunku do rodników DPPH charakteryzował się surowiec przetworzony z zastosowaniem *S. bacillaris* i *S. cinereus*. Autorzy stwierdzili, że przeprowadzenie procesu fermentacji z wykorzystaniem *S. cinereus* prowadzi do powstania w produkcie końcowym kwasu galusowego, galokatechiny i galusanu epikatechiny oraz zwiększenia ilości epikatechiny, epigalokatechiny, kwasu kawowego i chlorogenowego, w porównaniu z herbatą uzyskaną bez udziału tych bakterii. W odniesieniu do rodników ponadtlenkowych również odnotowano pozytywny kierunek zmian. Jednak różnice między skutecznością wychwytywania rodników ponadtlenkowych między surowcem a produktem końcowym nie były tak duże, jak w odniesieniu do odczynnika DPPH. Autorzy uznali, że za wysoką początkową zdolność do neutralizowania rodników ponadtlenkowych odpowiedzialne są związki fenolowe. Natomiast w odniesieniu do warunków przechowywania produktu, to Jimenez-Zamora, Delgado-Andrade i Rufian-Henares (2016) zaobserwowali zależność między oznaczoną zawartością polifenoli oraz wartościami testu TEAC dla rodników ABTS oraz FRAP. W teście z odczynnikiem DPPH również zaobserwowano taką zależność, ale tylko podczas przechowywania herbaty w temperaturze pokojowej. Podczas jej przechowywania w podwyższonej temperaturze (50°C) po upływie 6 miesięcy zależność była odwrotna, to znaczy, że wraz ze spadkiem zawartości polifenoli zdolność naparu herbaty do neutralizowania wolnych rodników DPPH rosła. Zdaniem autorów mogło to być związane z modyfikacją matrycy roślinnej, która pozwoliła na większe uwalnianie materiału fenolowego podczas okresu infuzji.

Herbaty zakupione na rynku lokalnym charakteryzowało nieznaczne zróżnicowanie właściwości antyoksydacyjnych. Najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywały napary herbaty zakupionej w herbaciarni „Czas na Herbatę” (90,6%). Sprzedawca deklarował, iż

produkt ten poddany został procesowi 3-letniego dojrzewania. Napary herbaty z deklarowanym 6-letnim takim okresem (herbaciarnia „Herbata-Kawa.pl”) wykazywały podobną skuteczność – na poziomie 89,6%. Najmniejszą oznaczoną skuteczność w zmiataniu wolnych rodników DPPH w tej grupie wykazywały napary herbat firm Haichao (88,9%) oraz Mayo (88,2%).

W celu ustalenia, jaki rodzaj herbaty Pu-erh reprezentują próby zakupione na rynku lokalnym, przeprowadzono grupowanie z wykorzystaniem aglomeracyjnej metody Warda. Grupowanie przeprowadzono w oparciu o dwa parametry: zawartość związków polifenolowych oraz zdolność naparów analizowanych herbat do redukcji wolnych rodników DPPH. Zaprezentowane na rysunku 7.4 skupienia wyznaczone na podstawie odległości wiązania względem etapów wiązania, któremu odpowiadała odległość aglomeracyjna równa 140.



Rys. 7.4 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość polifenoli i aktywność antyoksydacyjną

Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Przy wybranej odległości aglomeracyjnej wyodrębniono trzy skupienia. Pierwsze skupienie tworzyły *maocha* oraz młodsze Raw Pu-erh sprowadzone z Chin (z 2007 i 2003 roku). Herbaty te charakteryzowała największa zawartość oznaczonych związków polifenolowych i równocześnie najlepsze właściwości antyoksydacyjne względem wolnych rodników DPPH. Najbardziej zbliżone wyniki analizowanych parametrów wykazywały

w pierwszej grupie obie wersje Raw (odległość euklidesowa=43). *Maocha* różniła się od nich zdecydowanie większą zawartością związków polifenolowych. Drugie skupienie tworzyły najstarszy Raw Pu-erh, Ripe Pu-erh z 2010 roku sprowadzony z Chin, a także próby zakupione na rynku lokalnym: z herbaciarni „Czas na Herbatę” oraz firmy Haichao. Z czego herbaty sprowadzone z Chin wykazywały największe podobieństwo względem siebie (odległość euklidesowa=18), a próby zakupione na rynku lokalnym – największe podobieństwo względem siebie (odległość euklidesowa=36). Analizowane skupienie charakteryzowała zawartość związków polifenolowych na poziomie 168,5-271,1 mg GAE/100 ml naparu oraz zdolność do redukcji wolnych rodników na poziomie 87,5-90,6%. Ostatnie skupienie tworzyły Ripe Pu-erh z 2005 roku oraz trzy próby zakupione na rynku lokalnym: z herbaciarni „Herbata-kawa.pl” oraz firm Mayo i Astra. Tę grupę charakteryzowała najmniejsza zawartość związków polifenolowych. Największe podobieństwo pod kątem ocenianych parametrów wykazywały herbata sprowadzona z Chin oraz herbata zakupiona na lokalnym rynku w herbaciarni „Herbata-kawa.pl” (odległość euklidesowa=13). W następnej kolejności (odległość euklidesowa=29) większe podobieństwo do tych dwóch prób wykazywała herbata firmy Mayo, a dopiero w dalszej kolejności firmy Astra.

Na podstawie przeprowadzonej oceny porównawczej zawartości związków polifenolowych w naparach oraz ich zdolności do redukcji wolnych rodników DPPH można uznać, iż herbaty zakupione na rynku lokalnym stanowią wersję Ripe Pu-erh.

Wyniki badań wskazują na niską aktywność przeciwutleniającą Ripe Pu-erh, jednak spożywanie jej naparów może się wiązać z osiąganiem większych korzyści zdrowotnych w porównaniu do spożywania naparów innych rodzajów herbat. Lv, Zhang, Shi i Lin (2017) porównali bowiem składy oraz właściwości przeciwutleniające trzech rodzajów herbat ciemnych: Pu-erh (Yunnan), Fuzhuan (Hunan) i Liubao (Guangxi). Najwięcej związków fenolowych oznaczyli w Pu-erh (10,59%), a najmniej w Fuzhuan (9,74%). Tak więc różnice w zawartości tych związków były niewielkie. W metodzie oznaczania zdolności wychwytywania wolnych rodników DPPH najlepszą skuteczność wykazywały napary herbat Pu-erh (87,83%). Zbliżony wynik uzyskano dla herbat Fuzhuan (87,60%). Natomiast najmniejszą skuteczność wykazywały napary herbat Liubao (82,31%). Z kolei w metodzie oznaczania zdolności neutralizowania rodników ABTS herbaty Pu-erh wykazywały najmniejszą skuteczność. Również w oznaczeniu zdolności naparów herbaty do redukcjonowania jonów żelaza (III), herbata Pu-erh uzyskała najniższy wynik. Co jednak ważniejsze w ostatnim teście, odzwierciedlającym wchłanianie, metabolizm i dystrybucję przeciwutleniaczy na poziomie komórkowym, herbata Pu-erh uzyskała najlepszy rezultat. Wyniki te sugerują, że

herbata Pu-erh ma silniejsze działanie przeciwutleniające na poziomie komórkowym w porównaniu z pozostałymi analizowanymi herbatami. Autorzy sugerują, że testy biologiczne takie jak CAA powinny być częściej wykonywane, ponieważ tylko one (poza testami na modelu zwierzęcym) uwzględniają przynajmniej częściowo środowisko panujące w żywym organizmie.

7.4. Oznaczenie zawartości kofeiny, teobrominy, teofiliny, kwasu galusowego i teogaliny

Mimo iż naukowcy opracowali już kilka skutecznych narzędzi do oceny jakości herbaty Pu-erh, to żadne z zaproponowanych rozwiązań nie zyskało aprobaty rynku aukcyjnego – ze względu na skomplikowane procedury oraz ich koszty. Dlatego poszukuje się ciągle nowych, niezawodnych, prostszych i tańszych metod badawczych do określania jakości i badania autentyczności (tożsamości) herbaty Pu-erh. Z tego powodu w niniejszej dysertacji podjęto próbę określenia zależności lub różnic, które w prosty sposób dałyby pewne wyniki.

Przedstawione w części teoretycznej (rozdział 4.4) narzędzia stosowane do oceny jakości herbat, opierają się na analizie profili składników mineralnych, substancji lotnych, wybranych grup związków lub pełnej analizie jakościowej produktu. W badaniach własnych postanowiono skupić się na analizie wybranych metyloksantyn obecnych w herbacie. Uzyskane wyniki (Tab 7.4) pokazują, że teofilina może być uważana za dobry biomarker herbaty Pu-erh, umożliwiając odróżnienie wersji Raw od Ripe. Zarówno surowiec, jak i wszystkie analizowane wersje tradycyjne, nie wykazały obecności tego związku. Z kolei w wersjach sztucznie postarzanych zawartość teofiliny wahała się od 1,2 do 31,2 mg na 100g produktu.

Tab. 7.4 Zawartość wybranych metyloksantyn w 100g produktu

Oznaczenie	Rodzaj	Rok produkcji	Ilość w 100g produktu (mg)		
			TB	TF	KOF
Herbaty sprowadzone z Chin					
Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha	Maocha	2014	152,1	n.w.	454,8
Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess	Raw	2007	251,1	n.w.	466,7
Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw	Raw	2003	171,7	n.w.	474,5
CNNP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake	Raw	1998	43,6	n.w.	511,0
Shuangli Jingmaishan Ripe	Ripe	2010	250,6	24,1	553,1
Jinggu Bai Long TF A Grade „Zao Xiang” Ripe Puerh	Ripe	2005	23,6	8,0	588,2

Herbaty zakupione na lokalnym rynku					
Herbaciarnia „Czas na Herbatę”	Ripe	b.d.	19,9	1,2	382,6
Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”	Ripe	b.d.	195,6	31,2	563,9
Astra	Ripe	b.d.	17,9	1,6	369,8
Haichao	Ripe	b.d.	51,8	6,6	1023,1
Mayo	Ripe	b.d.	21,6	13,4	451,9

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych.

TB – teobromina

TF – teofilina

KOF – kofeina

b.d – brak danych

n.w. – nie wykryto

Jednak opracowania innych naukowców nie potwierdzają istnienia takiej zależności. Lin i in. (1998) oznaczyli teofilinę w zaledwie 3 próbach (0,06-0,10 mg/100 mg suchych liści) na 7 analizowanych Ripe Pu-erh. Kłódka, Bońkowski i Telesiński (2008) nie wykryli tego związku w żadnym analizowanym naparze Pu-erh (dotyczy wersji Ripe). Z kolei Zhao i in. (2011) oznaczyli w zielonym Pu-erh teofilinę (w ilości mniejszej niż 0,2 mg/g), a Wang i in. (2018a) nie wykryli teofiliny w dwóch analizowanych próbach spośród 3 komercyjnych herbatach instant Ripe Pu-erh. W związku z tym teofilina nie może służyć do identyfikacji rodzaju herbaty Pu-erh, a zaobserwowaną zależność należy uznać za przypadek, wynikający z doboru materiału badanego. Zawartość analizowanego związku nie jest bowiem determinowana przez zastosowaną obróbkę technologiczną surowca.

Na zawartość teofiliny w produkcie końcowym wpływ ma przede wszystkim ilość tego związku w surowcu, która jest ściśle powiązana z zawartością kofeiny, oraz składem mikroorganizmów obecnych w trakcie procesu fermentacji. Yang i in. (2007) wykazali, że rośliny z rodzaju *Camellia* (*Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla*, *Camellia assamica* var. *kucha*) zawierają alkaloidy purynowe (kofeina, teobromina, teofilina, teakryna, adenina, ksantyna, hipoksantyna i paraksantyna) i niewielką ilość alkaloidów pirymidynowych. Głównym alkaloidem występującym w suchych liściach *Camellia sinensis* i *Camellia assamica* jest kofeina (ok. 2-5%). Jest ona produkowana głównie w młodych liściach, gdzie stale gromadzi się w trakcie ich dojrzewania, jednocześnie ulegając powolnej degradacji. Główny szlak biosyntezy kofeiny w krzewie herbacianym obejmuje konwersję ksantyny do kofeiny poprzez 7-metyloksantozynę, 7-metyloksantynę i teobrominę. Tempo biosyntezy kofeiny zależy od ilości i aktywności enzymów, dostępności substratów, etapu rozwoju danej tkanki, okresu wzrostu i warunków środowiskowych. W korzeniach kofeina powstaje w wyniku 3-etapowej metylacji ksantyny. Z kolei podczas katabolizmu kofeiny w krzewie herbacianym

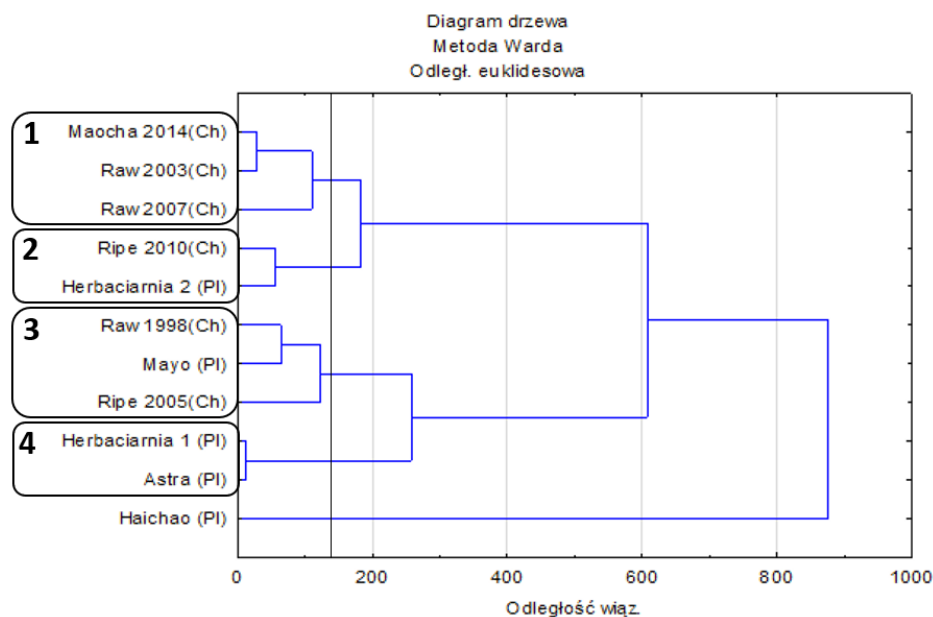
teofilina jest jedynie przemijającym metabolitem i pozostaje na bardzo niskim poziomie, ponieważ proces ten obejmuje rozpad kofeiny do ksantyny poprzez teofilinę i 3-metyloksantynę, które następnie ulegają dalszej degradacji przez konwencjonalną drogę katabolizmu puryny do CO₂, NH₃ i mocznika poprzez kwas moczowy, alantoinę i kwas alantoinowy (Mohanpuria i in. 2009; Mohanpuria, Kumar i Yadav, 2010; Zhou i in. 2019).

Specyficzny proces fermentacji, jaki przechodzą herbaty Pu-erh (w szczególności wersja sztucznie postarzana), odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu poziomu kofeiny oraz teofiliny w produkcie końcowym. Wiedza na temat wpływu poszczególnych mikroorganizmów na ilości tych i innych związków może posłużyć do wyprodukowania herbaty o konkretnym składzie. Wang i in. (2008) wykorzystali wybrane rodzaje pleśni oraz drożdży (*Aspergillus Niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor circinelloides*, *Candida albicans*, *Candida famata*) do fermentacji herbaty, w trakcie której wykonywano pomiar zawartości kofeiny, teobrominy i teofiliny. Wykazali, że fermentacja z wykorzystaniem pleśni spowodowała wzrost zawartości kofeiny, natomiast z wykorzystaniem drożdży – jej spadek. Szczep *Aspergillus niger* wykazywał najsilniejszy wpływ na zawartość kofeiny, której zawartość wzrosła z początkowych 3,47% do 9,63%. Zmiany zawartości kofeiny i teofiliny miały podobny trend. Naukowcy stwierdzili, że kofeina w produkcie fermentowanym pochodzi z metylacji teofiliny, zachodzącej w trakcie metabolizmu drobnoustrojów. Z kolei Zhou i in. (2018) wyizolowali z herbaty Pu-erh 11 szczepów grzybów i zbadali, w jaki sposób wpływają one na poziom kofeiny w trakcie procesu fermentacji. Wykazali, że głównie *Aspergillus niger* oraz *Aspergillus sydowii* były zdolne do degradacji kofeiny, a głównymi produktami jej rozkładu były teofilina oraz 3-metyloksantyna. Ich poziom istotnie wzrastał wraz z postępującą degradacją kofeiny. W kolejnych badaniach Zhou i in. (2019) wykazali, że podczas wtórnego metabolizmu mikroorganizmów dochodzi zarówno do demetylacji, jak i utleniania kofeiny – z czego demetylacja jest główną ścieżką. Podczas rozkładu kofeiny przez grzyby powstaje przede wszystkim teofilina. *Aspergillus niger*, *Aspergillus pallidofulvus*, *Aspergillus sesamicola* oraz *Penicillium mangini* znacząco zwiększyły zawartość kofeiny, jednak nie wpłynęły na zawartość teofiliny. Wykorzystanie *Aspergillus sydowii* w procesie fermentacji znacząco wpłynęło na spadek zawartości kofeiny (z początkowej ilości 34,39 mg/g do 5,54 mg/g 15 dnia procesu) i równoczesny wzrost zawartości teofiliny (z początkowego poziomu 0,43 mg/g do 25,03 mg/g 15 dnia procesu). Około 93% zdegradowanej kofeiny zostało przekształcone w teofilinę. W innych badaniach Zhou i in. (2020b) wyizolowali 7 grzybów, pochodzących z herbaty Pu-erh, które były odpowiedzialne za rozkład teofiliny. Zwłaszcza *Aspergillus ustus* oraz *Aspergillus tamari*

w znaczącym stopniu degradowały teofilinę do 3-metyloksantyny i ksantyny – poprzez N-demetylację i utlenianie.

Pozostałe oznaczenia ilościowe poczynione przez autorkę niniejszej pracy nie wskazują na istnienie żadnej zależności, którą można by wykorzystać do potwierdzania autentyczności herbat Pu-erh. W grupie Raw Pu-erh zaobserwowano, że herbaty młodsze zawierały większą ilość teobrominy niż jej młodsze odpowiedniki. Możliwe więc, że wraz z wydłużaniem czasu dojrzewania herbaty, zawartość obecnej w niej teofiliny będzie maleć, a z kolei zawartość kofeiny – rosnąć (zależność zawartości teofiliny i kofeiny determinują przemiany opisane wcześniej). Również w grupie Ripe Pu-erh, sprowadzonych bezpośrednio z Chin, próba z 2010 roku zawierająca większą ilość teofiliny niż próba z roku 2005, miała mniejszą zawartość kofeiny w porównaniu ze starszą próbą. W herbatach zakupionych na lokalnym rynku oznaczono teobrominę na poziomie porównywalnym do Ripe Pu-erh sprowadzonych bezpośrednio z Chin. Zarówno najmniejszą jak i największą zawartość teobrominy oznaczono w próbach z herbaciarni. Z tym że herbata krócej dojrzewająca zawierała mniejszą ilość teobrominy, a herbata dłużej dojrzewająca – większą. W przypadku oznaczenia zawartości kofeiny jedna herbata wyróżniała się na tle pozostałych. Produkt firmy Haichao zawierał bowiem największą ilość kofeiny wśród wszystkich analizowanych prób (1023,1 mg/100 g).

Wyniki uzyskane dla łącznej zawartości teobrominy, teofiliny oraz kofeiny nie wykazują istnienia zależności, możliwej do wykorzystania jako narzędzie do identyfikacji rodzaju herbaty Pu-erh. Postanowiono zatem sprawdzić, czy grupowanie uwzględniające 3 parametry w wielowymiarowej analizie skupień wykaże istnienie innych zależności między ocenianymi próbami. Na rysunku 7.5 zaprezentowano 4 skupienia wyznaczone na podstawie odległości wiązania względem etapów wiązania przy odległości aglomeracyjnej równej 140.



Rys. 7.5 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych.

Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość wybranych metyloksantyn

Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

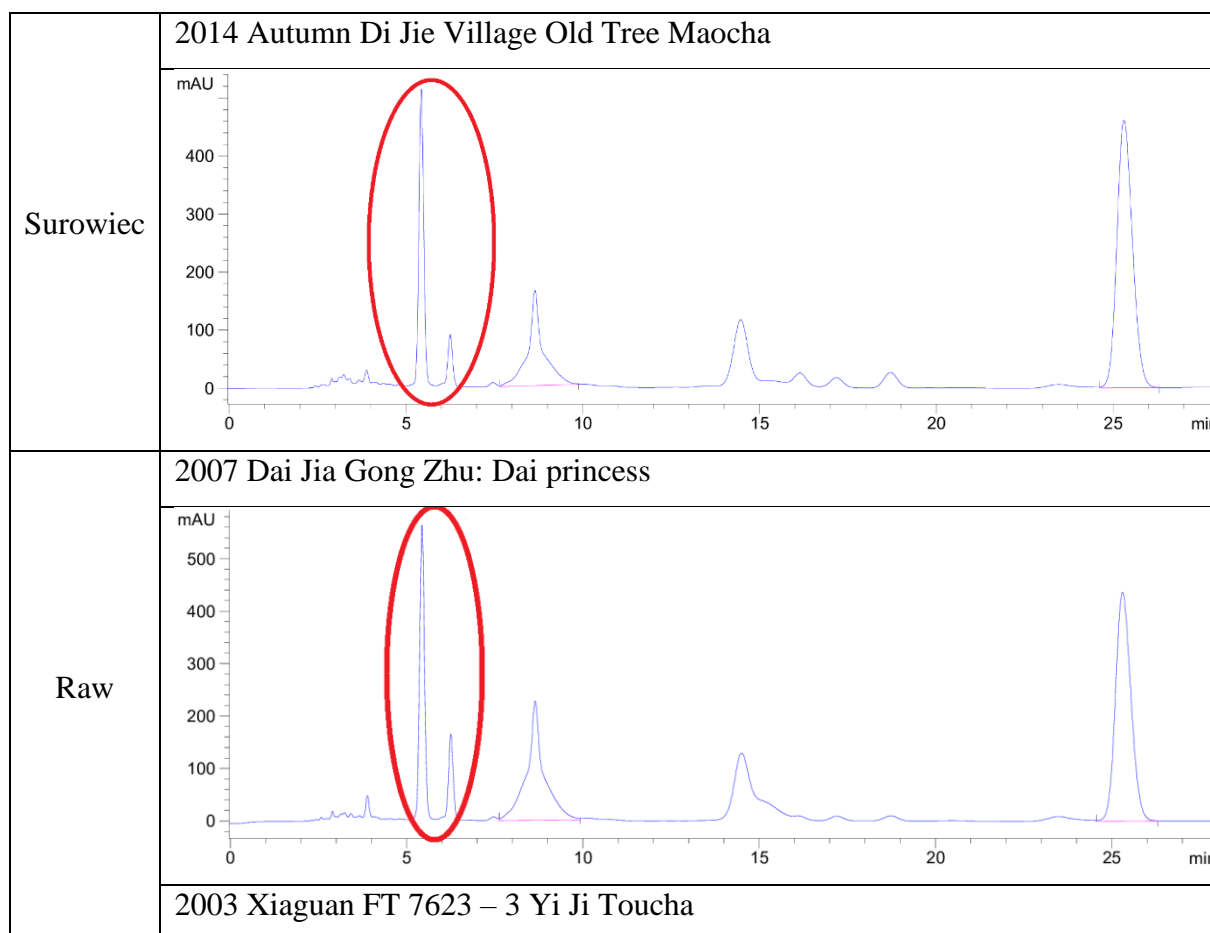
Przeprowadzona wielowymiarowa analiza skupień wykazała, że nie można dokonać skutecznego podziału herbat Pu-erh biorąc za kryterium tego podziału łączną zawartość kofeiny, teofiliny i teobrominy. Pierwsze skupienie tworzą *maocha* i Raw Pu-erh z 2003 roku (odległość euklidesowa=28), a także Raw Pu-erh z 2007 roku. Herbaty te charakteryzuje brak teofiliny, bardzo zbliżona zawartość kofeiny oraz jedne z największych zawartości teobrominy. Kolejne skupienie tworzą Ripe Pu-erh z 2010 roku sprowadzona bezpośrednio z Chin oraz próba zakupiona w herbaciarni „Herbata-kawa.pl” (odległość euklidesowa=56). Te dwie próby w całej grupie herbat Ripe Pu-erh zawierały największe ilości teobrominy i teofiliny oraz zawartość kofeiny na zbliżonym poziomie. W trzecim wyodrębnionym skupieniu znalazła się najstarsza próba Raw Pu-erh sprowadzona bezpośrednio z Chin (Raw 1998) oraz dwie próby Ripe Pu-erh (firmy Mayo oraz próba z roku 2005 sprowadzona bezpośrednio z Chin). W tym skupieniu herbaty wykazywały zróżnicowaną zawartość oznaczonych metyloksantyn: teobrominy – od 21,6 do 43,6 mg/100 g produktu, teofiliny – od „nie wykryto” do 13,4 mg/100 g produktu, kofeiny – od 451,9 do 588,2 mg/100 g produktu. Czwarte i ostatnie skupienie tworzyły dwie próby pozyskane z lokalnego rynku: firmy Astra oraz z herbaciarni „Czas na Herbatę” (odległość euklidesowa=13), ponieważ charakteryzowały się podobną zawartością wszystkich trzech analizowanych związków. Ze wszystkich analizowanych prób

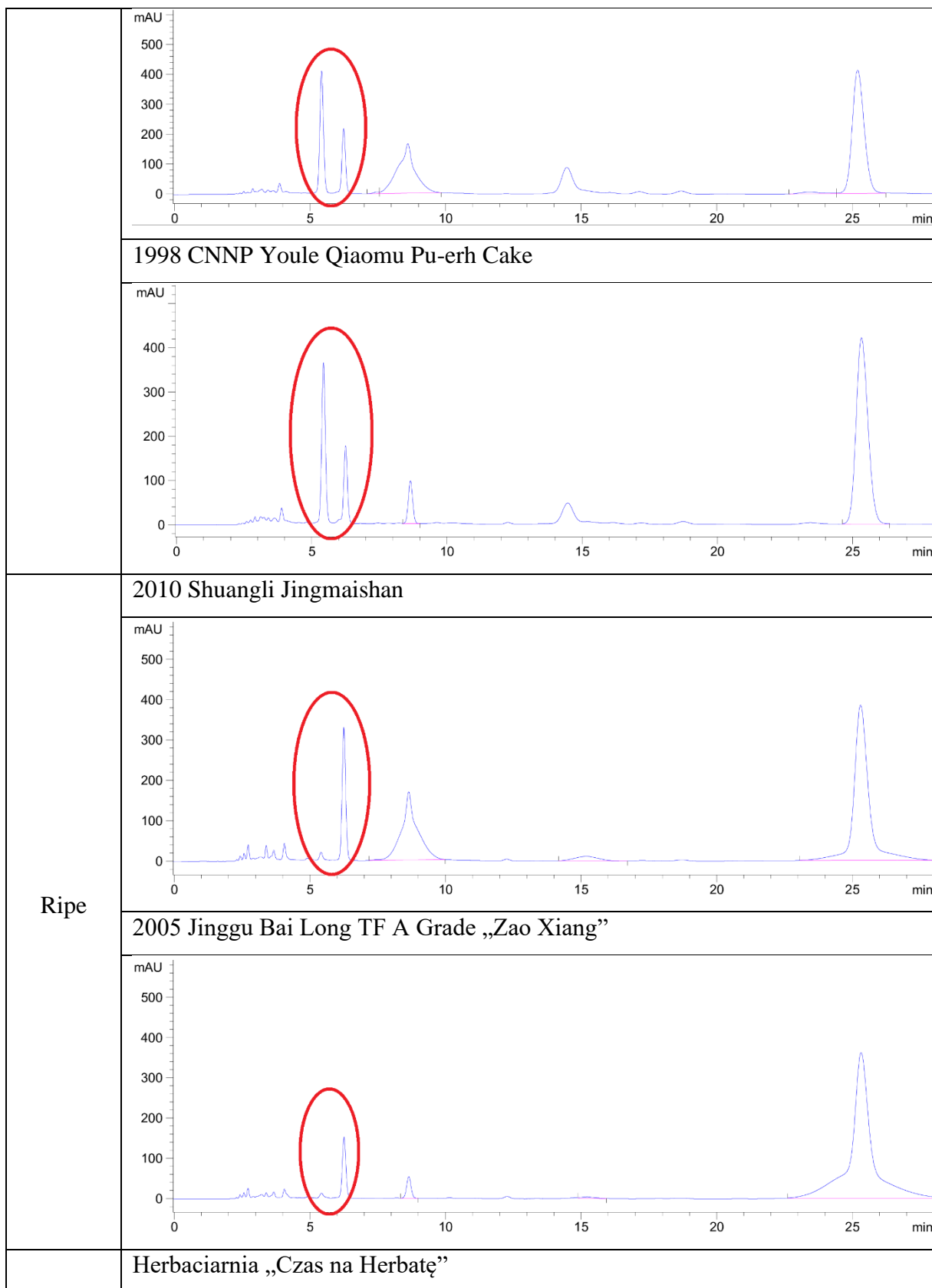
najbardziej wyróżniała się herbata firmy Haichao, ponieważ przy stosunkowo niewielkiej ilości teobrominy zawierała największą oznaczoną zawartość kofeiny.

Przedstawione grupowanie prezentuje duże zróżnicowanie analizowanego materiału pod względem zawartości wybranych metyloksantyn. Przez co analiza tych związków nie może być z powodzeniem wykorzystywana do identyfikacji rodzajów herbaty Pu-erh.

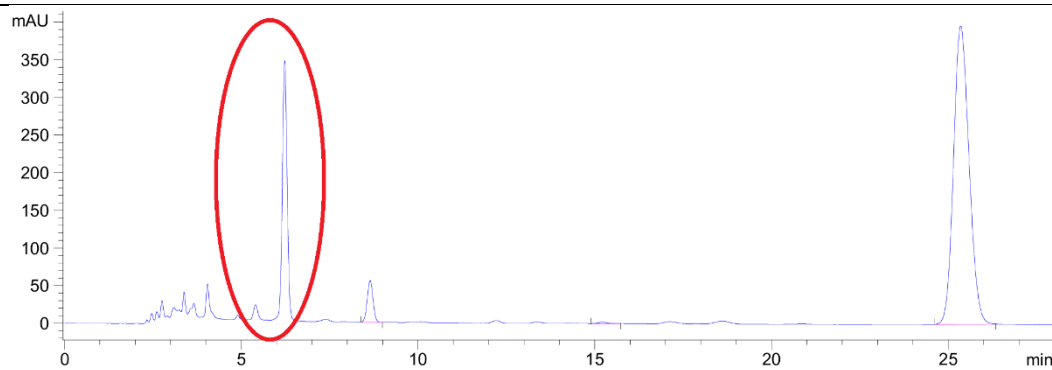
Dokonując wizualnej oceny uzyskanych chromatogramów, zauważono potencjalną zależność dla dwóch pików, występujących w czasie 5,4 oraz 6,2 minuty. W surowcu oraz tradycyjnej wersji Pu-erh oba piki były wyraźnie zaznaczone, a pierwszy z nich był wyższy od drugiego. Z kolei w wersji sztucznie postarzonej pierwszy pik był zdecydowanie niższy od drugiego (Tab. 7.5).

Tab. 7.5 Zależność między pikami w czasie 5,4 oraz 6,2 minuty w poszczególnych grupach badanego materiału

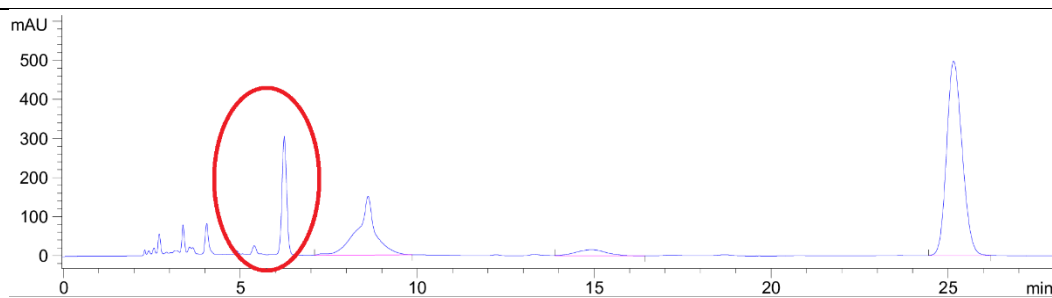




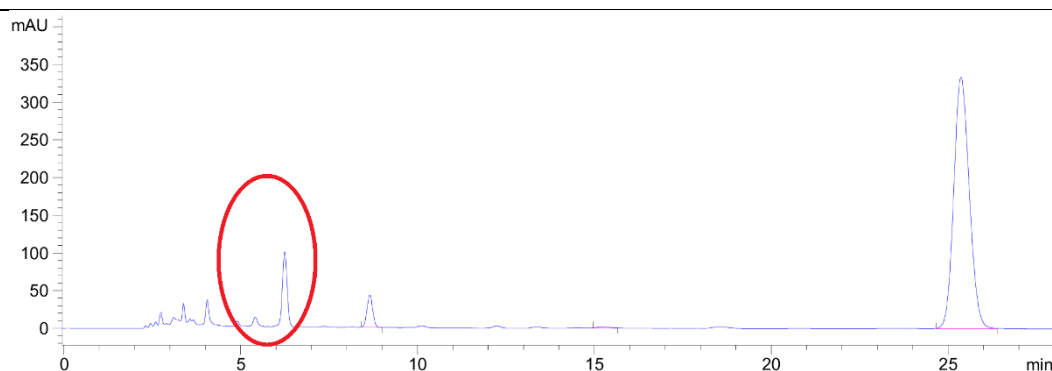
Rynek
lokalny



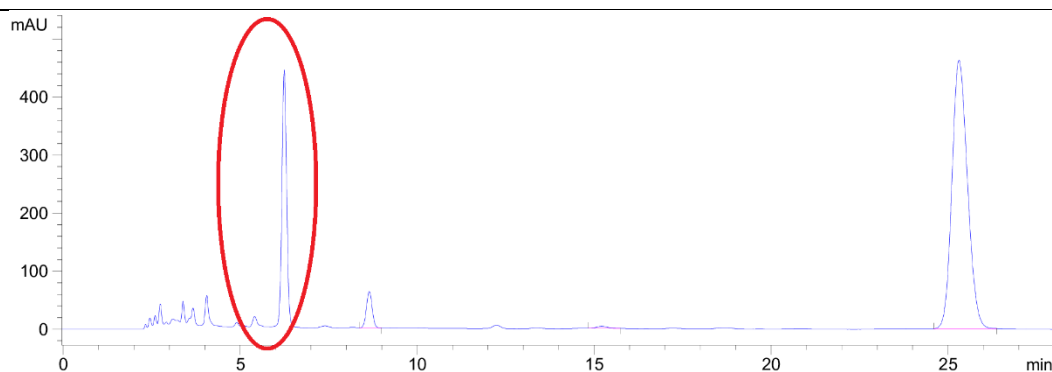
Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”



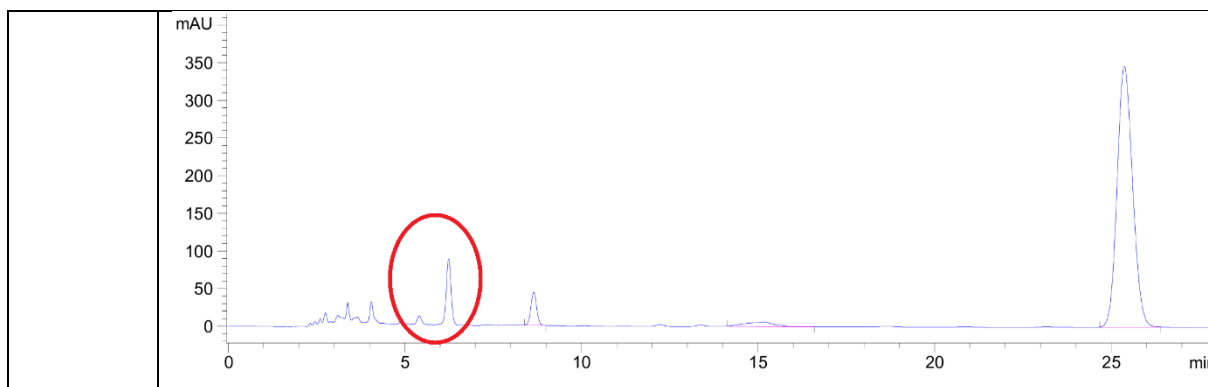
Astra



Haichao



Mayo



Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

Analiza chromatograficzna połączona ze spektrometrią mas wykazała, iż pierwszą wskazaną substancją była teogalina, a drugą – kwas galusowy. Oznaczenie ilościowe wykazało, że *maocha* oraz tradycyjna Pu-erh zawierały kilkakrotnie więcej teogaliny niż kwasu galusowego. Z kolei w sztucznie postarzonej Pu-erh zależność była odwrotna, to znaczy – kwasu galusowego było kilkakrotnie więcej niż teogaliny (Tab. 7.6).

Maocha oraz wersja tradycyjna herbaty Pu-erh zawierały największe z oznaczonych zawartości teogaliny. Zauważono, że w grupie tej próby starsze miały mniejszą zawartość teogaliny niż próby młodsze. Z kolei zawartość kwasu galusowego była największa w przypadku herbaty Raw z 2003 roku. W grupie herbat Ripe sprowadzonych bezpośrednio z Chin zawartość teogaliny była kilkadziesiąt razy mniejsza niż w wersji tradycyjnej. Za to zawartość kwasu galusowego w Ripe Pu-erh z 2010 roku była największa spośród oznaczonych (247,2 mg/100 g produktu). Próby zakupione na lokalnym rynku zawierały teogalinę na podobnym poziomie co wersje Ripe sprowadzone bezpośrednio z Chin. Natomiast zawartość kwasu galusowego była bardzo zróżnicowana. Najmniej tego związku oznaczono w produkcie firmy Astra (71,2 mg/100 g produktu), a najwięcej w produkcie firmy Haichao – aż 640,1 mg/100 g produktu. Jedynie w grupie herbat Ripe Pu-erh (sprowadzonych bezpośrednio z Chin i zakupionych na lokalnym rynku) występuje korelacja między zawartością teogaliny i kwasu galusowego. Jednak to nie taki rodzaj zależności jest tutaj istotny. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że to stosunek zawartości tych dwóch związków może stanowić narzędzie do identyfikacji rodzaju herbaty Pu-erh. Jego skuteczność i niezawodność oraz dalsze możliwości wykorzystania należałoby potwierdzić dalszymi badaniami.

Tab. 7.6 Zawartość teogaliny i kwasu galusowego w 100g produktu

Oznaczenie	Rodzaj	Rok produkcji	Ilość w 100g produktu (mg)	
			TG	KG
Herbaty sprowadzone z Chin				
Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha	Maocha	2014	667,6	60,9
Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess	Raw	2007	795,1	118,2
Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw	Raw	2003	629,5	165,4
CNNP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake	Raw	1998	576,1	148,3
Shuangli Jingmaishan Ripe	Ripe	2010	27,8	247,2
Jinggu Bai Long TF A Grade „Zao Xiang” Ripe Puerh	Ripe	2005	19,2	114,5
Herbaty zakupione na lokalnym rynku				
Herbaciarnia „Czas na Herbatę”	Ripe	b.d.	22,7	221,0
Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”	Ripe	b.d.	29,0	224,9
Astra	Ripe	b.d.	15,4	71,2
Haichao	Ripe	b.d.	46,8	640,1
Mayo	Ripe	b.d.	18,1	75,1

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

b.d – brak danych

TG – teogalina

KG – kwas galusowy

W dostępnej literaturze nie znaleziono doniesień mówiących wprost o zależności zawartości teogaliny i kwasu galusowego. Mimo to pojedyncze wyniki uzyskane przez Hou i in. (2009) oraz Pedan i in. (2018) potwierdzają tę zależność. Z tym że pierwszy zespół nie wykrył kwasu galusowego w niefermentowanej Pu-erh, a w wersji fermentowanej nie wykrył teogaliny. Z kolei drugi zespół przeprowadził oznaczenie wybranych związków aktywnych w dojrzałych Raw Pu-erh (5 egzemplarzy z 2005 roku oraz po jednym z 1992 i 1980 roku) oraz młodych Ripe Pu-erh (5 egzemplarzy z 2016 roku, 5 egzemplarzy z 2017 roku oraz po jednym z 1994 i 1980 roku) różnego pochodzenia. We wszystkich tradycyjnych Pu-erh zawartość teogaliny była od 2,6 do 11,1 razy większa od zawartości kwasu galusowego, a we wszystkich sztucznie postarzanych próbach tej herbty kwasu galusowego oznaczono od 1,2 do 16,6 razy więcej niż teogaliny. Również Wang i in. (2018b) wykonali oznaczenie dwóch omawianych związków w Raw i Ripe Pu-erh i uzyskali taką samą zależność – z jednym wyjątkiem. Analizę ilościową wykonano dla prób z 2015, 2012 oraz 2011 roku. W tradycyjnej wersji tej herbaty

oznaczona zawartość teogaliny była ponownie kilkukrotnie większa (około 4,3 razy) od zawartości kwasu galusowego. W przypadku sztucznie postarzonej Pu-erh z 2015 i 2012 roku zawartość kwasu galusowego była 1,2-1,5 razy większa od zawartości teogaliny. Zależność ta nie występowała w próbie z 2011 roku. Wszystkie Ripe Pu-erh charakteryzowały się stosunkowo niską zawartością kwasu galusowego, którego po fermentacji mikrobiologicznej powinno być zdecydowanie więcej niż w Raw Pu-erh (Hou i in. 2009; Ku i in. 2010; Zhang i in. 2011; Lv i in. 2013; Ge i in. 2019). Wątpliwość może również budzić duże zróżnicowanie wyników uzyskanych dla Ripe Pu-erh. Z tego względu autorka niniejszej dysertacji uważa, iż powyższe odstępstwo od zaproponowanej zasady nie przekreśla jednoznacznie możliwości występowania zależności między teogaliną i kwasem galusowym, dzięki której możliwa jest identyfikacja rodzaju herbaty Pu-erh. Potwierdzeniem mogą być również wyniki zaprezentowane przez Ge i in. (2019), którzy za pomocą nowo opracowanej metody przeprowadzili profilowanie oraz ilościowe oznaczenie kwasów fenolowych w próbkach Pu-erh. Autorzy podkreślili w swojej pracy, że kwas galusowy jest głównym kwasem fenolowym sztucznie postarzanego Pu-erh, podczas gdy teogalina – surowego Pu-erh.

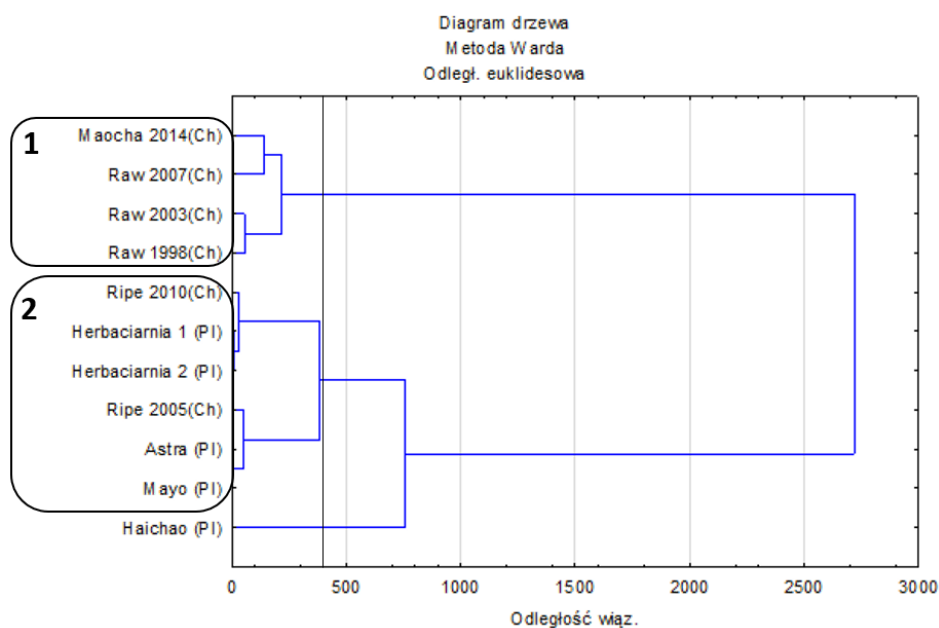
Wykazaną w badaniach własnych oraz innych autorów zależność można wytłumaczyć przemianami, zachodzącymi w trakcie fermentacji. W Ripe Pu-erh zawartość teogaliny maleje, ponieważ jest metabolizowana przez mikroorganizmy właśnie do kwasu galusowego. Zawartość kwasu galusowego zdecydowanie wzrasta także za sprawą innych przemian (np. z EGCG) (Ge i in. 2019).

Teogalina (kwas 3-galloilochinowy) jako ester kwasu galusowego jest najbardziej rozpowszechnionym kwasem fenolowym obecnym we wszystkich rodzajach herbaty. Wykazano, że w zielonych japońskich herbatach jest jednym ze związków wzmacniających intensywność smaku umami. Jego zawartość różni się w zależności od gatunku *Camellia sinensis*, dojrzałości liści, a także pory zbiorów. Teogalina wykazuje działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne. W organizmie jest metabolizowana do kwasu galusowego i kwasu chinowego (Stagg i Swaine, 1971; Kaneko i in. 2006; Dimpfel i in. 2007a; Yagi, Goto i Nanjo, 2009; Stodt i Engelhardt, 2013; Tan i in. 2017; Ge i in. 2019). Niemieccy naukowcy wykazali, że teogalina wraz z kwasem chinowym mogą być skuteczne w zapobieganiu, względnie leczeniu, demencji (np. choroby Alzheimera lub Parkinsona), depresji, a także zaburzeń zdolności do koncentracji, takich jak zespół nadpobudliwości ruchowej z deficytem uwagi. Naukowcy opatentowali w roku 2007 zastosowanie tych dwóch związków do wytwarzania środka leczniczego (Dimpfel i in. 2007b; Kler, Zenger i Dimpfel 2014). Mimo iż teogalina nie jest nowo poznanym związkiem, a jej obecność w herbacie była intensywnie

analizowana już w latach 60. i 80. XX wieku, to w literaturze przedmiotu znajduje się mało informacji na jej temat.

Z kolei kwas galusowy (kwa 3,4,5-trihydroksybenzoesowy) jest szeroko rozpowszechnionym w królestwie roślin związkami fenolowym. Występuje w postaci wolnej lub jako fenolowe metabolity wtórne. Kwas galusowy jest wykorzystywany przede wszystkim w branży farmaceutycznej oraz chemicznej ze względu na kilka ważnych właściwości. Jako silny przeciwutleniacz skutecznie wychwytuje wolne rodniki, redukując skutki stresu oksydacyjnego. Wykazuje również działanie przeciwnowotworowe (poprzez hamowanie proliferacji komórek i indukowanie apoptozy), przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, neuroprotektoryjne oraz ochronne dla układu sercowo-naczyniowego (Al Zahrani, El-Shishtawy i Asiri 2020; Liao i in. 2018; Liu i in. 2020). Na zawartość kwasu galusowego w herbacie znaczący wpływ ma zastosowana obróbka technologiczna surowca. Wykazano bowiem, że wraz ze wzrostem stopnia przetworzenia surowca rośnie zawartość kwasu galusowego w produkcie końcowym. Tak więc herbaty czarne i ciemne zawierają większe ilości tego związku w porównaniu z herbatami zielonymi czy białymi (Jiang i in. 2019; Kongpichitchoke i in. 2016; Lin i in. 1998). W herbacie Pu-erh galusany katechiny i teaflawiny są hydrolizowane przez tanazę (wytwarzaną przez grzyby), uwalniając kwas galusowy, katechiny (EC, C, GC i EGC) i teaflawinę. Następnie katechiny ulegają dalszej polimeryzacji lub izomeryzacji, a kwas galusowy jest estryfikowany do galusanu etylu (Lin i in. 1998; Liu i in. 2020). Stwierdzono również, że w trakcie procesów ogrzewania przy wytwarzaniu herbaty, *strictinin* ulega rozpadowi na kwas elagowy oraz kwas galusowy (Chen i in. 2015).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała zróżnicowanie uzyskanych wyników w zależności od miejsca zakupu badanych herbat, z uwzględnieniem zawartości kwasu galusowego w produkcie. Mając na uwadze, że t Stat dla kwasu galusowego jest większe od 0 (2,77) i $P(T \leq t)$ jednostronny jest mniejszy od założonego $\alpha=0,05$ (0,0108), możemy stwierdzić, że średnia zawartość kwasu galusowego dla herbat, których próby pochodzą bezpośrednio z Chin, jest istotnie większa od średniej zawartości tego kwasu w herbatach, których próby zakupiono na lokalnym rynku. Dodatkowo wyniki wielowymiarowej analizy skupień pozwoliły na uzyskanie dwóch skupień (odległość aglomeracyjna równa 400) (Rys. 7.6).



Rys. 7.6 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość kwasu galusowego oraz teogaliny
Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Przy wybranej odległości aglomeracyjnej pierwsze skupienie tworzą *maocha* oraz wszystkie Raw Pu-erh sprowadzone z Chin. Herbaty te charakteryzują największa zawartość kwasu galusowego (576,1-795,1 mg/100 g produktu) oraz zbliżona zawartość teogaliny (poza *maocha*). W grupie tej największe podobieństwo pod kątem analizowanych czynników wykazywały dwie starsze Raw – z 1998 roku oraz z 2003 roku (odległość euklidesowa=56), a następnie *maocha* i Raw z 2007 roku (odległość euklidesowa=140). Drugie skupienie tworzyły Ripe Pu-erh sprowadzone bezpośrednio z Chin, dwie próby zakupione w lokalnych herbaciarniach oraz produkty firmy Astra i Mayo. Obie próby zakupione w herbaciarniach (odległość euklidesowa=7) charakteryzowały bardzo zbliżone zawartości obu analizowanych związków (teogalina: 221,0 i 224,9 mg/100 g produktu, kwas galusowy: 22,7 i 29,0 mg/100 g produktu). Największe podobieństwo do tych dwóch prób wykazywała herbata Ripe Pu-erh z 2010 roku sprowadzona bezpośrednio z Chin (teogalina: 247,2 mg/100 g produktu, kwas galusowy: 27,8 mg/100 g produktu). Z kolei do produktów firm Astra i Mayo (odległość euklidesowa=5), największe podobieństwo wykazywała Ripe Pu-erh z 2005 roku sprowadzona bezpośrednio z Chin, ze względu na zbliżony poziom zawartości kwasu galusowego. Poza omówionymi skupieniami znalazła się herbata firmy Haichao, którą wyróżniała zawartość

teogaliny – największa spośród oznaczonych – oraz zawartość kwasu galusowego, różniaca się od pozostałych wyników uzyskanych dla herbat Raw i Ripe Pu-erh.

Uzyskane wyniki badań własnych wskazują, że analiza zawartości teofiliny, teobrominy oraz kofeiny nie może być wykorzystywana z powodzeniem do identyfikacji rodzaju herbaty Pu-erh. Natomiast analiza zawartości kwasu galusowego i teogaliny, określana jako stosunek zawartości tych dwóch substancji, może być z powodzeniem wykorzystywana w tym kierunku. Jednak aby potwierdzić skuteczność tej metody potrzebne są dalsze badania, w których wykorzystano by bardziej zróżnicowany materiał badany, co pozwoliłoby wykluczyć istnienie pewnych wyjątków.

7.5. Pomiar zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego

Kwas szczawiowy jest naturalnie występującym w roślinach związkim. W żywności występuje w formie nierozpuszczalnej (jako szczawian wapnia, magnezu i żelaza) lub rozpuszczalnej (jako szczawian potasu, sodu, amonu i litu). Jego antyżywniowe działanie związane jest w głównej mierze z obecnością form rozpuszczalnych, które są wchłaniane z przewodu pokarmowego i tworzą z jonami wapnia nierozpuszczalne kompleksy – szczawiany wapnia. Efektem tej reakcji jest między innymi zwiększone ryzyko rozwoju kamicy nerkowej. Kwas szczawiowy może również zmniejszać biodostępność minerałów i niezbędnych śladowych pierwiastków. Jest on dostarczany głównie z pożywieniem, ale może też być wytwarzany w organizmie jako produkt metabolizmu niektórych substancji (na przykład kwasu askorbinowego). Herbata obok rabarbaru, buraka, szpinaku, szczawiu i innych używek, uznawana jest za produkt, w którym występują największe ilości kwasu szczawiowego (Hönow i in. 2010; Koza i in. 2015; Łącka i Bielawska 2015; Michalak-Majewska 2013b).

Analizując uzyskane wyniki, szczególnie dla naparów herbat sprowadzonych z Chin, zaobserwowano, że Raw pu-erh charakteryzowały się mniejszą zawartością rozpuszczalnego kwasu szczawiowego (od 21,38 do 31,95 mg/100ml naparu) niż wersja Ripe Pu-erh (od 37,13 do 50,18 mg/100ml naparu) (Tab. 7.7).

Tab. 7.7 Średnia zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawowego w mg na 100 ml naparu herbat sprowadzonych z Chin

Oznaczenie	Rodzaj	Rok produkcji	Średnia i zakres (mg/100ml)
2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha	Maocha	2014	18,68; 18,00 – 19,35
2007 Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess	Raw	2007	21,38; 20,25 – 22,50
2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw	Raw	2003	23,85; 23,40 – 24,30
1998 CNRP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake	Raw	1998	31,95; 31,50 – 32,40
2010 Shuangli Jingmaishan Ripe	Ripe	2010	50,18; 49,50 – 50,85
2005 Jinggu Bai Long TF A Grade „Zao Xiang” Ripe Puerh	Ripe	2005	37,13; 36,90 – 37,35

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

b.d – brak danych

Dodatkowo wśród tradycyjnie wytwarzanych herbat zauważono, że próby starsze zawierały większe ilości analizowanego związku w porównaniu z młodszymi odpowiednikami. W grupie Ripe Pu-erh możliwe jest istnienie odwrotnej zależności, ponieważ w herbacie z 2010 roku oznaczono większą zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawowego niż w herbacie z 2005 roku. Jednak ze względu na posiadanie zaledwie dwóch reprezentantów tej grupy, postawienie takiej tezy jest nieuzasadnione.

Na zawartość rozpuszczalnych szczawianów w herbacie wpływ ma wiele czynników, do których zaliczyć można: kraj/region pochodzenia surowca, prowadzony typ upraw, warunki pogodowe panujące podczas wzrostu rośliny, wiek rośliny, wykorzystana część rośliny oraz zastosowana obróbka technologiczna surowca. Z kolei zawartość szczawianów obecnych w spożywanym napoju będzie determinowana sposobem jego przygotowania.

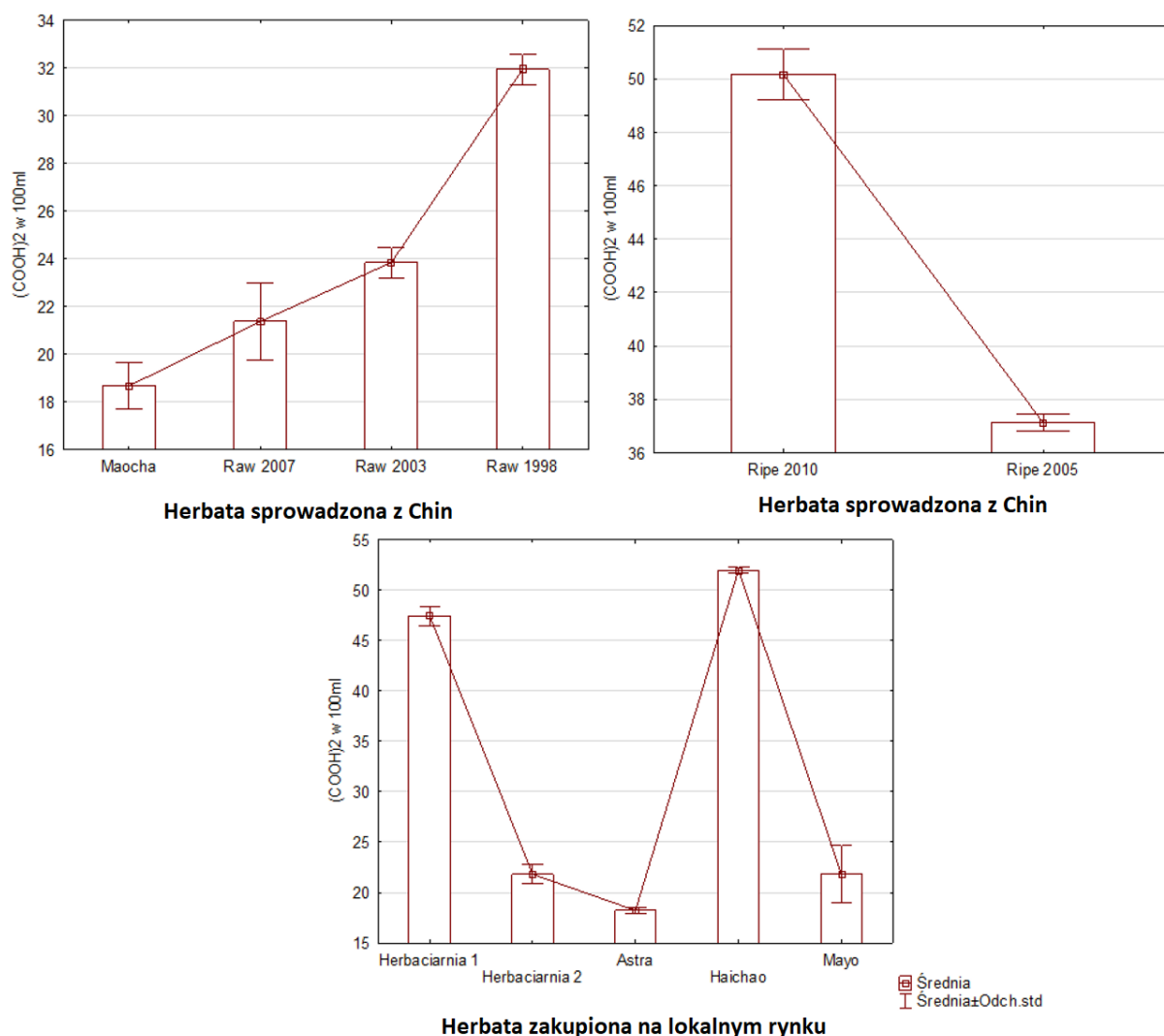
Surowiec pozyskany z różnych krajów, ale również z różnych regionów kraju, będzie się różnić pod kątem zawartości szczawianów. Nie można jednak przyjąć, aby konkretne kierunki (północ lub południe kraju) charakteryzowały się surowcem o mniejszej zawartości omawianych związków. Herbata niskiej jakości wykazuje niższą zawartość szczawianów niż ta wysokiej jakości. Spowodowane jest to najprawdopodobniej tym, że do produkcji herbaty niskiej jakości wykorzystuje się również górne części łodyg, które w porównaniu z liśćmi zawierają mniej szczawianów. Zawartość szczawianów rośnie wraz z wiekiem samej rośliny. Materiał pozyskany w trakcie zbiorów jesiennych zawiera więcej kwasu szczawowego niż ten

zbierany wiosną. Stosowanie pożywek bogatych w jon amonowy (w uprawach hydroponicznych) skutkuje uzyskaniem liści o zmniejszonej zawartości szczawianów (Hönow i in. 2010; Mahdavi i in. 2013; Morita, Suzuki i Yokota 2004; Morita i Tuji 2002; Noonan i Savage 1999).

Z danych zaprezentowanych w tabeli 7.7 wynika, że surowiec poddany tradycyjnej obróbce technologicznej będzie zawierać mniejszą zawartość analizowanego związku niż ten sam surowiec poddany procesowi sztucznego postarzenia. Dodatkowo czas i warunki dojrzewania produktu będą wpływać na zmiany zawartości tych szczawianów w produkcie końcowym. Przy takich założeniach najmniejszą zawartość rozpuszczalnych szczawianów mogą zawierać młode Raw Pu-erh lub Ripe Pu-erh poddane bardzo długiemu procesowi dojrzewania – co jednak nie jest opłacalnym dla producenta rozwiązaniem.

Zestawienie wyników zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego uzyskanych dla herbat zakupionych na rynku lokalnym z wynikami uzyskanymi dla herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin przedstawiono na rysunku 7.7. Przeprowadzona analiza wykazała duże zróżnicowanie wyników uzyskanych w tej grupie produktów.

Najmniejszą zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oznaczono w naparach herbaty firmy Astra (18,23 mg/100ml), a następnie firmy Mayo (21,83 mg/100ml) i z herbaciarni „Herbata-kawa.pl” (21,83 mg/100ml). Z kolei największą oznaczono w produkcie firmy Haichao (51,98 mg/100ml). Próby zakupione w herbaciarniach wykazywały duże zróżnicowanie w zawartości analizowanego związku. Produkt z herbaciarni „Czas na herbatę” zawierał 47,48 mg rozpuszczalnych szczawianów w 100ml naparu. Natomiast drugi o ponad połowę mniej – 21,83 mg rozpuszczalnych szczawianów w 100ml naparu. Pierwszy z przedstawionych produktów, zgodnie z deklaracją sprzedawcy, poddany był 3-letniemu procesowi dojrzewania, a drugi – 6-letniemu procesowi leżakowania. Tak więc wraz z wydłużaniem okresu leżakowania możliwe jest zmniejszanie zawartości rozpuszczalnych szczawianów w produkcie.



Rys. 7.7 Zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawowego w naparach wszystkich analizowanych herbat z uwzględnieniem podziału na grupy: Raw z Chin, Ripe z Chin, herbaty z rynku lokalnego

Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Oznaczenie zawartości kwasu szczawowego wykonano, biorąc pod uwagę bezpieczeństwo zdrowotne badanych herbat Pu-erh. Dokonując porównania uzyskanych wyników w grupie Raw Pu-erh i Ripe Pu-erh oraz herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin i zakupionych na lokalnym rynku, występuje duże zróżnicowanie oznaczonej zawartości rozpuszczalnych szczawianów w naparach tych herbat. Dodatkowo ze względu na liczne czynniki wpływające na zawartość analizowanych związków w tym rodzaju herbat, nie można jednoznacznie wskazać który rodzaj tej herbaty lub gdzie zakupiony będzie zawierał najmniejszą z możliwych zawartość kwasu szczawowego.

Niektórzy autorzy wskazują, że herbaty o większym stopniu utlenienia składników, będą zawierać większe ilości rozpuszczalnego kwasu szczawowego (Liebman i Murphy 2007). Jednak analiza dostępnej literatury nie pozwala na jednoznaczne wskazanie konkretnego rodzaju herbaty, który charakteryzuje się największą lub najmniejszą zawartością szczawianów rozpuszczalnych. Powodem zróżnicowanych wyników jest ilość czynników, wpływających na skład produktu końcowego. Jabłońska-Ryś (2012) spośród analizowanych herbat białych, zielonych, żółtych, czerwonych i czarnych, największą zawartość szczawianów rozpuszczalnych oznaczyła w herbacie czerwonej (438,26 mg/100 g s.m.). Kolejną herbatą o wysokiej zawartości analizowanej substancji były dwie herbaty czarne (374,09 oraz 338,67 mg/100 g s.m.). Herbaty o najmniejszy stopniu utlenienia składników nie charakteryzowała najmniejsza ilość szczawianów rozpuszczalnych, ponieważ najmniej wykryto ich w kolejnych dwóch próbach herbat czarnych (poniżej 200 mg/100 g s.m.). Z kolei Michalak-Majewska (2013b) otrzymała wyniki odmienne od prezentowanych przez Jabłońską-Ryś (2012). Największe ilości analizowanych związków zawierały herbaty czarne i zielone, odpowiednio 16,81 i 10,67 mg/g produktu, podczas gdy w herbacie czerwonej oznaczyła 8,32 mg szczawianów na 1g produktu, a w herbacie białej tylko 9,87 mg/g produktu. Zróżnicowane poziomy szczawianów rozpuszczalnych otrzymali również Nawalany i Suwała (2016), którzy porównali herbaty czarne, czerwone, zielone i białe w torebkach. Największą ilość szczawianów w naparach 5-minutowych odnotowali w jednej próbie (na dwie analizowane) herbaty czerwonej (13,19 mg/g suchego produktu). Z kolei druga próba tego rodzaju herbaty zawierała już znacznie mniejsze ilości oznaczanych związków (4,41 mg/g suchego produktu). Najniższe wyniki zaobserwowano w przypadku jednej herbaty zielonej (3,32 mg/g suchego produktu) i jednej herbaty czarnej (3,91 mg/g suchego produktu). Pozostałe próby zawierały od 4,66 (herbata czarna) do 6,45 mg szczawianów rozpuszczalnych/g suchego produktu (herbata biała). Interesujące wydaje się opracowanie Brzezicha-Cirocka i wsp. (2016), w którym autorzy przeprowadzili porównawczą ocenę zawartości szczawianów rozpuszczalnych jedynie w trzech rodzajach herbaty: zielonych (10 prób), czarnych (10 prób) i ciemnych (10 prób). Analizowane napary herbat Pu-erh zawierały największe ilości szczawianów – średnia wyniosła 224 mg/200 ml naparu (122-342 mg/200 ml). Wyraźnie mniejszą zawartość analizowanych składników miały herbaty czarne – 156 mg/200 ml naparu (51-304 mg/200 ml), a najmniejszą herbaty zielone – średnio 80 mg/200 ml naparu (49-139 mg/200 ml). Niektóre herbaty zielone zawierały więcej szczawianów niż herbaty ciemne. Niektóre próby herbat Pu-erh miały mniejszą zawartością oznaczanych związków niż niektóre herbaty czarne.

Niestety w dostępnej literaturze nie znaleziono wyników badań, dotyczących analizy zawartości szczawianów rozpuszczalnych w różnych rodzajach herbaty Pu-erh, a także zmian ich zawartości w zależności od warunków oraz okresu przechowywania. Takie opracowania mogłyby wskazać możliwe zróżnicowanie w kwestii bezpieczeństwa spożywania tego rodzaju herbaty.

7.6. Oznaczenie ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu oraz w naparach

Bezpieczeństwo zdrowotne żywności jest dla konsumenta najważniejszą cechą żywności. Podstawowym celem prawa żywnościowego – zarówno krajowego, jak i unijnego – jest zapewnienie bezpieczeństwa żywności i kompleksowej ochrony jej konsumenta. Zapewnienie bezpieczeństwa żywności wymaga uwzględnienia wszystkich aspektów łańcucha produkcyjnego oraz sprzedaży i dostawy produktu do konsumenta, ponieważ każdy etap może mieć potencjalny wpływ na bezpieczeństwo żywności (Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 PE i Rady z 28 stycznia 2002).

Produkcja i jakość herbaty Pu-erh są ściśle związane z aktywnością drobnoustrojów, zarówno bakterii, jak i drożdży oraz pleśni. Jak przedstawiono w rozdziale 2.4, jakość końcowa Ripe Pu-erh jest kształtowana przez odpowiednio dobraną kompozycję grzybów. Herbata ta przechodzi gwałtowny proces wymuszonej fermentacji mikrobiologicznej, który hamowany jest jedynie przez suszenie surowca na słońcu (w wersji tradycyjnej; w dużych fabrykach stosuje się autoklawowanie). Wątpliwości autora budzi fakt, iż po tym etapie każda Pu-erh może przechodzić proces nawet wieloletniego dojrzewania, w którego trakcie może dojść do rozwoju pleśni zdolnych do wytwarzania mykotoksyn (np.: aflatoksyna, ochratoksyna, fumonizyna). Z tego względu postanowiono sprawdzić, czy Raw i Ripe Pu-erh różnią się pod względem jakości mikrobiologicznej oraz czy jakość mikrobiologiczna herbat Pu-erh obecnych na rynku krajowym jest inna od tych oferowanych na rynku azjatyckim. W tym celu przeprowadzono badania, prowadzące do oznaczenia ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu herbacianego oraz w gotowych naparach. Choć nie istnieje opracowanie, w którym określono by dopuszczalne poziomy poszczególnych grup drobnoustrojów, to nie należy spożywać produktów o wątpliwej jakości mikrobiologicznej ze względu na potencjalne ryzyko dla zdrowia (m.in. zatrucie pokarmowe).

Z danych zaprezentowanych w tabeli 7.8 wynika, że oznaczona ogólna liczba drożdży i pleśni na powierzchni suszu herbat pozyskanych bezpośrednio z rynku chińskiego nie różniła

się pomiędzy badanymi rodzajami. W obydwu rodzajach uzyskano wyniki poniżej 1 jtk/g produktu.

Tab. 7.8 Ogólna liczba drożdży i pleśni na powierzchni suszu

Oznaczenie	Rodzaj	Rok produkcji	Ogólna liczba drożdży i pleśni (jtk/g)
Herbaty sprowadzone z Chin			
2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha	Maocha	2014	< 1
2007 Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess	Raw	2007	< 1
2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw	Raw	2003	< 1
1998 CNRP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake	Raw	1998	< 1
2010 Shuangli Jingmaishan Ripe	Ripe	2010	< 1
2005 Jinggu Bai Long TF A Grade „Zao Xiang” Ripe Puerh	Ripe	2005	< 1
Herbaty zakupione na lokalnym rynku			
Herbaciarnia „Czas na Herbatę”	b.d.	b.d.	$9,4 \times 10^4$
Herbaciarnia „Herbata-kawa.pl”	b.d.	b.d.	$2,5 \times 10^6$
Astra	b.d.	b.d.	< 1
Haichao	b.d.	b.d.	$2,2 \times 10^4$
Mayo	b.d.	b.d.	$9,1 \times 10^4$

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

b.d – brak danych

W związku z tym można przyjąć, że zarówno proces wytworzenia, jak i dojrzewania nie stanowią zagrożenia dla bezpieczeństwa produktu – pod względem analizowanego parametru. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że herbaty te sprowadzono do Polski z wykorzystaniem transportu lotniczego.

Herbaty zakupione na rynku lokalnym, pod kątem zawartości drożdży i pleśni, wykazują duże zróżnicowanie. Wielkość populacji drożdży i pleśni wahała się od < 1 do $2,5 \times 10^6$ jtk/g. Tak więc jakość mikrobiologiczna herbat Pu-erh obecnych na rynku krajowym jest niższa od tych oferowanych na rynku azjatyckim.

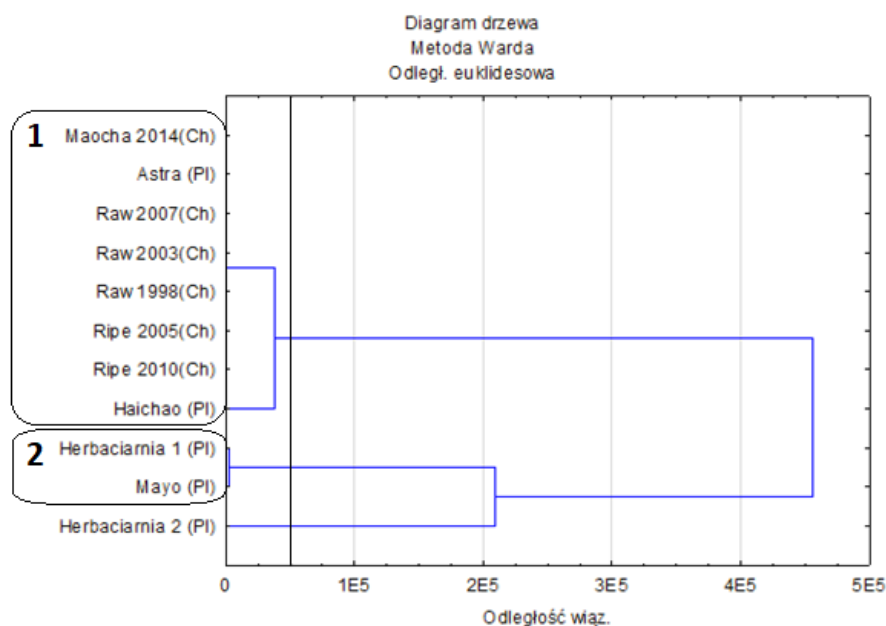
Duże zanieczyszczenie występowało w herbatach zakupionych w herbaciarniach ($9,4 \times 10^4$ jtk/g $2,5 \times 10^6$ jtk/g). Ich jakość mikrobiologiczna może wynikać z nieprawidłowo przeprowadzonego procesu produkcyjnego, nieodpowiednich warunków panujących w trakcie transportu, a także z nieodpowiedniego sposobu przechowywania. Jeśli produkt zostanie dostarczony do sklepu w warunkach niewpływających na pogorszenie jego cech

mikrobiologicznych, to sam sposób przechowywania i prezentacji produktu potencjalnym klientom wpływa na jego zanieczyszczenie. W herbaciarni nowo dostarczony produkt może mieć kontakt z wcześniej zanieczyszczoną partią produktu, zanieczyszczonym opakowaniem (pojemnikiem szklanym lub metalowym) oraz z powietrzem, w którym ilość zanieczyszczeń biologicznych może wynosić nawet 34% (wszystkich zanieczyszczeń) (Korta-Peplowska, Chmiel i Frączek 2016). Z kolei Hać-Szymańczuk i in. (2017) nie potwierdzili większej ilości drożdży i pleśni w produktach zakupionych na wagę niż w herbatach paczkowanych.

W przeprowadzonym oznaczeniu w grupie herbat zaskupionych na lokalnym rynku jedynie w produkcie firmy Astra nie zaobserwowano obecności drożdży i pleśni. Może to świadczyć o pakowaniu produktu w miejscu jego produkcji lub o odpowiednich warunkach zapewnionych podczas transportu i pakowania produktu. Niestety nie można tego stwierdzić jednoznacznie, gdyż na opakowaniach produktów paczkowanych (Astra, Mayo, Haichao) nie zamieszczono informacji o miejscu ich pakowania.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała zróżnicowanie uzyskanych wyników w zależności od miejsca zakupu badanych herbat, z uwzględnieniem ogólnej liczby drożdży i pleśni na powierzchni suszu (Załącznik 6). Mając na uwadze, że t Stat dla drożdży i pleśni jest mniejsze od 0 (-2,31) a $P(T \leq t)$ jednostronny mniejszy od założonego $\alpha=0,05$ stwierdzono, że średnia zawartość drożdży i pleśni na powierzchni suszu mierzona w jtk/g dla herbat, których próby pochodzą bezpośrednio z Chin, jest istotnie mniejsza od średniej zawartości tych grzybów oznaczonych w herbatach, które zakupiono na lokalnym rynku.

Dodatkowo przeprowadzono łączną analizę wyników uzyskanych z oznaczenia zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oraz ogólnej liczby drożdży i pleśni na powierzchni suszu w celu sprawdzenia czy herbaty Pu-erh obecne na lokalnym rynku charakteryzują się odmienną jakością w porównaniu z herbatami sprowadzonymi bezpośrednio z Chin. Grupowanie z wykorzystaniem metody Warda wykazało przy długości aglomeracyjnej równej 50 000 dwa skupienia (Rys. 7.8).



Rys. 7.8 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oraz ogólnej liczby drożdży i pleśni na powierzchni suszu
Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Pierwsze skupienie tworzyły wszystkie herbaty sprowadzone bezpośrednio z Chin, a także dwie herbaty zakupione na lokalnym rynku – Astra i Haichao. Herbaty sprowadzone z Chin oraz produkt firmy Astra charakteryzowała najmniejsza ogólna liczba drożdży i pleśni (< 1 jtk/g) oraz zróżnicowana zawartość kwasu szczawiowego (18,23-50,18 mg/100ml). Najbardziej zbliżone wyniki analizowanych parametrów wykazywała herbata firmy Haichao (odległość euklidesowa 21 999). Podobieństwo tego produktu wynikało z jednej z najniższych oznaczonej ogólnej liczby drożdży i pleśni na powierzchni suszu ($2,2 \times 10^4$ jtk/g). Zawartość kwasu szczawiowego była największa spośród wszystkich oznaczonych (51,98 mg/100ml). Drugie skupienie tworzyły herbata z herbaciarni „Czas na Herbatę” oraz produkt firmy Mayo. Obie próby charakteryzowała zbliżona ogólna liczba drożdży i pleśni ($9,1$ oraz $9,4 \times 10^4$ jtk/g). Zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego w naparach była zróżnicowana (21,83 oraz 47,48 mg/100ml). Ze wszystkich analizowanych prób najbardziej wyróżniała się herbata zakupiona w herbaciarni „Herbata-kawa.pl”, ponieważ charakteryzowała ją największa ogólna liczba drożdży i pleśni ($2,5 \times 10^6$ jtk/g).

Na podstawie przeprowadzonej oceny można stwierdzić, że herbaty Pu-erh dostępne na lokalnym rynku wykazują zróżnicowaną jakość pod kątem analizowanych parametrów.

Oznaczona w tych produktach zawartość kwasu szczawiowego była podobna do zawartości tego związku w produktach sprowadzonych bezpośrednio z Chin. Z kolei pod kątem ogólnej liczby drożdży i pleśni produkty zakupione na lokalnym rynku były odmienne od herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin. Wyjątek stanowił produkt firmy Astra. Nie można więc stwierdzić, że herbaty Pu-erh obecne na lokalnym rynku są niższej jakości od herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin.

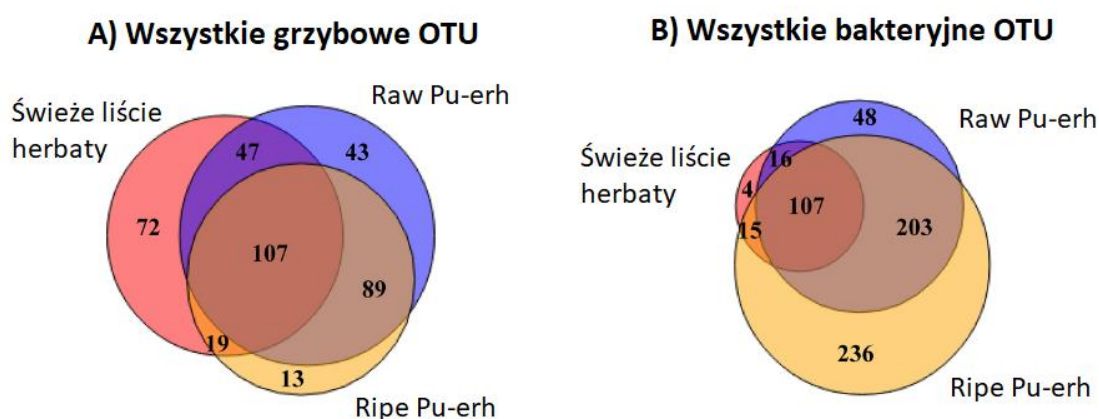
Po pierwszym etapie badań stwierdzono, że poprawnie przeprowadzony proces produkcji umożliwi otrzymanie produktu wolnego od zanieczyszczeń grzybami. Jednak etap transportu również może wpływać na jakość mikrobiologiczną produktu, trafiającego ostatecznie do konsumenta. Ze względów ekonomicznych, większość herbaty jest transportowana drogą morską – trwa to nawet kilka miesięcy. Herbatę zalicza się do ładunków wrażliwych na obce zapachy oraz fluktuacje temperatury i wilgotności otoczenia. Ładownia lub kontenery przeznaczone do transportu herbaty muszą być wolne od wszelkich obcych zapachów, ponieważ herbata ma zdolność do trwałego wchłaniania zapachów z otoczenia, które obniżają lub pozbawiają ją wartości handlowej. Produkt musi być zabezpieczony przed wpływem zmiennych warunków pogodowych, panujących w trakcie transportu. Herbata jest produktem o niskiej zawartości wody (poniżej 9%) i higroskopijnym. Warunki panujące w trakcie transportu nie mogą prowadzić do przesuszenia produktu (wilgotność produktu poniżej 2%), ponieważ obecne w nim olejki eteryczne łatwo się ulatniają i produkt staje się „jałowy” pod kątem sensorycznym. Jeżeli w trakcie transportu wilgotność produktu przekroczy 9%, to zacznie on pleśnieć, zbrylać się i nabierać stęchłego zapachu oraz smaku. Zalecana temperatura otoczenia w trakcie transportu to od 5 do 25°C, a wilgotność względna powietrza – od 60 do 65%. Niezapewnienie odpowiednich warunków będzie skutkowało wieloma niekorzystnymi zmianami (biochemicznymi, fizykochemicznymi i mikrobiologicznymi), prowadzącymi do utraty walorów biologicznych oraz sensorycznych (Dmowski i Ruszkowska 2018).

W procesie produkcyjnym obu rodzajów Pu-erh udział biorą mikroorganizmy, wśród których mogą występować te niewrażliwe na działanie podwyższonej temperatury (mikroflora ciepłooporna). Należą do nich przede wszystkim bakterie, takie jak ziarniaki *Micrococcus sp.*, *Enterococcus sp.* oraz przetrwalniki laseczki *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.* i *Geobacillus sp.* Także niektóre drożdże i pleśnie wykazują oporność na działanie podwyższonej temperatury (m.in. *Byssosclamyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*). Wykazano również, że w pewnych warunkach (ilość mikroorganizmów, wiek przetrwalników, zawartość wody, pH produktu, temperatura otoczenia) mogą one przetrwać krótkotrwałe działanie temperatury wynoszącej 100°C. Zdolność ta związana jest ze szczególną odpornością zarodników tych pleśni

(Łaniewska-Trokenheim i in. 2009; Piotrowska 2017). W związku z tym w kolejnym etapie badań sprawdzono, czy po zalaniu suszu wodą o odpowiedniej temperaturze, napary będą wolne od drożdży i pleśni, czy może część z nich będzie odporna na działanie wysokiej temperatury – odpowiedniej dla herbat Pu-erh. Oznaczenie ogólnej liczby drożdży i pleśni w naparach wykazało, że przygotowanie naparów z wykorzystaniem wody o wysokiej temperaturze ($98^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) skutecznie zmniejsza ich ilość. We wszystkich analizowanych herbatach otrzymano wyniki poniżej 1 jtk/ml.

Ze względu na potencjalne zagrożenia zdrowotne, największe znaczenie mają grzyby zdolne do wytwarzania mykotoksyn (m.in. aflatoksyny, ochratoksyny czy patuliny). W niektórych opracowaniach autorzy informują, że dominującym mikroorganizmem w herbacie Pu-erh jest *Aspergillus niger* (Chen i in. 2009; Chen, Liu i Chang 2010; Wang i in. 2013). Natomiast Mogensen i in. (2009) przeanalizowali 10 herbat czarnych (w tym 5 Pu-erh) i na podstawie wykrytych metabolitów podjęli się identyfikacji grzybów z sekcji *Nigri* – są one trudne do zidentyfikowania ze względu na bardzo zbliżoną morfologię. Analiza uzyskanych izolatów wykazała, że *Aspergillus niger* nie był dominującym grzybem. Był nim *Aspergillus acidus*. Dodatkowo autorzy nie stwierdzili w analizowanych herbatach obecności ochratoksyny A oraz fumonizyny B2 i B4. Z kolei Haas i in. (2013) zbadali 36 prób Ripe Pu-erh pod kątem zawartości grzybów nitkowatych oraz aflatoksyny (B1, B2, G1, G2), fumonizyny (B1, B2 i B3) i ochratoksyny A. Na powierzchni analizowanych prób zidentyfikowali 19 rodzajów grzybów. Do najliczniej prezentowanych rodzajów należały: *Aspergillus*, *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium*. Najliczniej występującymi gatunkami były: *Aspergillus acidus*, *Aspergillus fumigatus* oraz *Rhizomucor sp.* Najwięcej gatunków grzybów oznaczono w herbatach liściastych luźnych, a ich ogólne zawartości były największe (od $1,0 \times 10^1$ do $2,6 \times 10^6$ jtk/g) spośród analizowanych rodzajów produktu. Dominującymi rodzajami grzybów były *Aspergillus* oraz *Penicillium*. W żadnej z badanych próbek herbaty nie potwierdzono obecności aflatoksyny i fumonizyny. Z kolei ochratoksyna A została oznaczona w 4 próbach, a jej stężenie wynosiło $0,65 \mu\text{g}/\text{kg}$ (w dwóch próbach luźnych), $14,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ (próba organiczna luźna) oraz $94,7 \mu\text{g}/\text{kg}$ (próba sprasowana). Z kolei Zhang i in. (2016) dokonali szerokiej analizy porównawczej świeżych liści *Camellia sinensis var. assamica*, Raw i Ripe Pu-erh (zróznicowanych pod względem czasu składowania) pod kątem obecności w nich grzybów, bakterii i ich metabolitów. Wykazano, że świeże liście są ważnym rezerwuarem mikrobiologicznym dla procesu fermentacji herbaty, szczególnie jeżeli chodzi o występujące na nich grzyby. We wszystkich próbach Pu-erh wykryto obecność *Aspergillus niger*, którego większe ilości występowały w odmianie Ripe. Jednak dominującym grzybem w Raw Pu-erh był *Aspergillus sp.* o nieokreślonym gatunku,

a w odmianie Ripe – *Blastobotrys adeninivorans*. W przypadku bakterii najliczniej występowały: *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Świeże liście zawierały więcej grzybowych OTU (operacyjne jednostki taksonomiczne) a mniej bakteryjnych niż herbata Pu-erh (Rys. 7.9). Większe zróżnicowanie między rodzajami Pu-erh zaobserwowano w przypadku bakterii w nich występujących. Proces dojrzewania herbaty powoduje znaczne zmiany w różnorodności drobnoustrojów występujących w surowej Pu-erh, ale nie w postarzonej. Odmiana Ripe oraz Vintage Raw wykazywały zbliżone społeczności drobnoustrojów, różniące je od surowej Pu-erh.



Rys. 7.9 Diagramy ilustrujące liczbę wspólnych OTU (operacyjne jednostki taksonomiczne) grzybowych i bakteryjnych dla świeżych liści, surowej i sztucznie postarzonej Pu-erh

Źródło: Zhang i in. 2016

Zhang i in. (2016) wykryli również 25 toksycznych metabolitów – głównie pochodzenia grzybowego. Dominowała patulina (w 9 na 15 prób Raw, w średnim stężeniu 1169 $\mu\text{g}/\text{kg}$; w 2 na 16 prób Ripe, w średnim stężeniu 915 $\mu\text{g}/\text{kg}$) oraz *asperglaucide* (octan N-benzoilofenyloalanylofenyloaliny) (wykryty we wszystkich próbach; średnie stężenie w Raw – 6596 $\mu\text{g}/\text{kg}$, średnie stężenie w Ripe – 6799 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Pozostałe związki występowały w niewielkich ilościach, niezagrażających bezpieczeństwu konsumentów. Wyniki te wskazują, iż chiński zwyczaj wylewania pierwszego naparu może mieć uzasadnienie zdrowotne. Również Li i in. (2018a) potwierdzili, że w procesie sztucznego postarzania najczęściej występującymi grzybami są *Aspergillus niger* oraz *Blastobotrys adeninivorans*. Naukowcy wykazali dodatkowo, że całkowita liczba mikroorganizmów w trakcie procesu sztucznego postarzania waha się od $2,3 \times 10^2$ do $4,0 \times 10^8$ komórek na gram próbki i jest zdominowana głównie przez grzyby. Na wczesnych etapach fermentacji dominują pleśnie, a w końcowych – drożdże. Ich zdaniem bakterie mają niewielki udział w przebiegu procesu. Jednak Li i in. (2018b) donieśli,

iż na początku procesu sztucznego postarzania (pomiar w czasie 0) herbat ciemnych, dominującymi rodzajami grzybów były *Cyberlindnera*, *Aspergillus*, *Uwebraunia* i nieznanymi *Pleosporales*, a obok nich bakterie z rodzaju *Klebsiella* i *Lactobacillus*. Po fermentacji trwającej 3 oraz 6 godzin tylko *Cyberlindnera* i *Klebsiella* nadal dominowały i pozostawały na niemal stałym poziomie aż do zakończenia procesu. Aktywność oksydazy polifenolowej, celulazy i pektynazy rosła wraz ze wzrostem społeczności drobnoustrojów i zapewniła efektywną moc biochemiczną, prowadzącą do biotransformacji związków chemicznych zawartych w liściach, w trakcie procesu fermentacji.

Większość przytoczonych badań dotyczy wersji Ripe Pu-erh, jednak nie zawsze autorzy zaznaczają to w swoich pracach. Pozyskanie Vintage Raw Pu-erh, dojrzewającej jedynie w suchym oraz jedynie w mokrym magazynie, uzyskanej z tego samego surowca i wytworzonej przez tę samą fabrykę jest rozwiązaniem trudnym lub nawet niemożliwym, drogim oraz wymagającym zastosowania nowoczesnych metod izolacji i identyfikacji drobnoustrojów. Stąd porównanie środowiska mikrobiologicznego tej samej herbaty przechowywanej w różnych warunkach lub świeżej i dojrzałej Raw stanowi wyzwanie dla naukowców, zajmujących się tym produktem. Autorce nieniejszej dysertacji udało się dotrzeć do dwóch opracowań naukowych, traktujących o zmianach środowiska mikrobiologicznego w trakcie dojrzewania produktu. W pierwszym z nich Tian i in. (2013) porównali zmiany różnorodności drobnoustrojów w 9 Raw Pu-erh przechowywanych od 1 do 192 miesięcy oraz 10 Ripe Pu-erh przechowywanych od 12 do 132 miesięcy. Łączna liczba grzybów była mniejsza w próbach surowych niż sztucznie postarzanych. W obu rodzajach herbaty wraz ze wzrostem czasu leżakowania ilość wykrytych grzybów malała. Może to być spowodowane spadkiem zawartości wody lub ograniczoną ilością dostępnych składników odżywczych. Zaobserwowano również dodatnią korelację między ilością obecnych bakterii i grzybów, co najprawdopodobniej było spowodowane ilością rozkładanych przez grzyby związków, stanowiących pożywkę dla bakterii. Długi czas dojrzewania prowadził do zwiększonej różnorodności bakteryjnej w obu odmianach Pu-erh i może stanowić zwiększone ryzyko zanieczyszczeń produktu bakteriami chorobotwórczymi i odpowiedzialnymi za jego psucie. Doniesienie to jest zgodne z poglądami niektórych kolekcjonerów Pu-erh, którzy twierdzą, że herbata ta powinna starzeć się nie dłużej niż 120 miesięcy. Drugie opracowanie Zhou i in. (2020a) prezentuje różnice zachodzące w środowisku mikrobiologicznym w trakcie przechowywania Ripe Pu-erh w suchym i mokrym magazynie przez okres 15 lat. Autorzy stwierdzili, że można było zauważyć istotne różnice już po samej ocenie wizualnej badanego materiału. Materiał przechowywany w wilgotnym otoczeniu charakteryzował się ciemną zieloną barwą z rozwiniętą żółtą *cleistothecia*

(tzw. „złotym kwiatem”). Z kolei próba przechowywana w suchym otoczeniu pozostała ciemnobrązowa i nie posiadała złotej *cleistothecia*. Naukowcy wyizolowali oraz zidentyfikowali pięć grzybów nitkowatych: *Aspergillus niger*, *Aspergillus pallidofulvus*, *Aspergillus sesamicola*, *Aspergillus tamarii* oraz *Penicillium mangini*, które dominowały w analizowanym produkcie. Obecność *A. niger* i *A. tamarii* miała ścisły związek z przeprowadzonym procesem sztucznego postarzenia. Przechowywanie Ripe Pu-erh w wilgotny środowisku prowadzi do znaczącego zmniejszenia ilości *A. niger*, *A. tamarii* oraz zwiększonego udziału *A. pallidofulvus*, *A. sesemicola* i rozwoju *P. manginii*, których nie wykryto w materiale przechowywanym w suchym środowisku. Ostatnim trzem gatunkom grzybów przypisano zdolność do wytwarzania tzw. „złotego kwiatu”. Zmiany w społeczności grzybów należy przypisać zmianom zawartości wody oraz warunkom przechowywania. Autorzy badania wykazali również, że grzyby nitkowane miały znaczący wpływ na zmiany zawartości polifenoli, teaflawin, tearubigin, *theabrownin* i cukrów rozpuszczalnych w wodzie.

Herbaty Pu-erh nie powinny stanowić zagrożenia dla konsumenta pod warunkiem, że proces produkcyjny został przeprowadzony należycie, a warunki jego składowania były odpowiednie dla tego rodzaju produktu. Transport herbaty z krajów azjatyckich do Europy odbywa się przede wszystkim drogą morską, a w tym czasie materiał jest narażony na niekorzystne warunki otoczenia. Ewentualne zmiany w produkcie mogłyby zminimalizować paczkowanie produktu w miejscu jego wytworzenia. Jednak byłoby to trudne do zrealizowania ze względu na organizację transakcji kupna-sprzedaży. Analizowane herbaty dostępne na lokalnym rynku były zróżnicowane pod względem jakości mikrobiologicznej. Po analizie dostępnej literatury można stwierdzić, iż herbata Pu-erh może stanowić potencjalne zagrożenie dla bezpieczeństwa konsumenta ze względu na obecność grzybów i bakterii, mogących wytwarzać mykotoksyny. Herbaty Pu-erh (nawet tego samego rodzaju) różnią się między sobą pod względem ilości drobnoustrojów oraz ich zróżnicowania, ponieważ wpływ na to mają w głównej mierze: pochodzenie surowca, lokalizacja i warunki panujące w fabryce oraz przebieg procesu produkcyjnego. Kontrola jakości produktu wwożonego na teren kraju powinna wychwycić ewentualne nieprawidłowości i zapewnić, iż produkt jest odpowiedniej jakości. Niestety wymagania dla produktu, jakim jest herbata, są bardzo ogólne i tak naprawdę zostały przedstawione jedynie dla herbaty czarnej. W normie PN-ISO 3720:1997 zawarto podstawowe wymagania, jakie musi spełniać herbata czarna. Przede wszystkim musi być ona wolna od zanieczyszczeń obcych i nie może być zepsuta (nie podano narzędzi stosowanych do tej oceny, ponieważ określa je Główny Inspektor Sanitarny). Z wymagań chemicznych podano oznaczenia: wyciągu wodnego, popiołu rozpuszczalnego w wodzie, alkaliczności popiołu

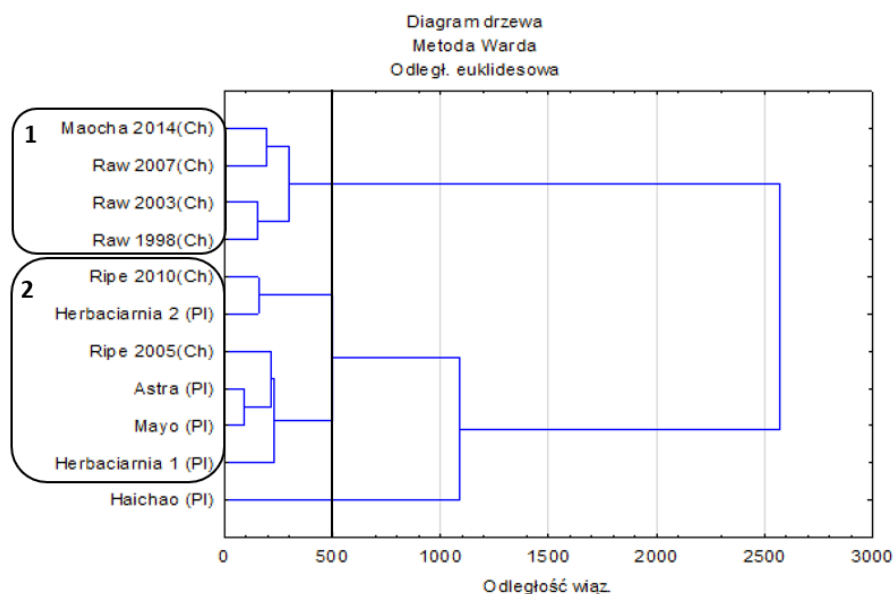
rozpuszczalnego w wodzie, popiołu nierozpuszczalnego w wodzie oraz włókna surowego. Oznaczenia te nie obejmują analizy zawartości metali ciężkich, pestycydów czy mykotoksyn, co w przypadku herbaty, a zwłaszcza Pu-erh, byłoby zasadne. Za nadzór nad jakością zdrowotną herbaty odpowiedzialny jest Główny Inspektorat Sanitarny. Jednak kontrole bezpośrednio prowadzone są tylko w uzasadnionych przypadkach. W przypadku kontroli inspektorzy nie opierają się na normach jakościowych, a jedynie na deklaracji kontrolowanego podmiotu gospodarczego. Kontrolom granicznym poddawane są wyłącznie produkty oznaczone kodem CN 0902 30 00 lub CN 0902 40 00 tj. herbaty czarne, co do których zostały określone wymagania zawarte zarówno w polskiej normie, jak i w odrębnych kodeksach. W przypadku importu herbaty zielonej czy Pu-erh nie przeprowadza się kontroli jakości handlowej produktu, chyba że ma on być wprowadzony jako produkty rolnictwa ekologicznego. Wówczas kontrola odbywa się zgodnie z zasadami odrębnych przepisów.

7.7. Analiza skuteczności zastosowanych narzędzi badawczych

Zaprezentowane do tej pory wyniki badań własnych wykazały, że dzięki zastosowaniu różnych analiz instrumentalnych (zaczynając od pomiaru barwy, na analizie chromatograficznej kończąc) możliwe jest określenie rodzaju herbaty Pu-erh. Problem pojawia się, gdy produkt tradycyjny poddany jest wieloletniemu procesowi starzenia się, ponieważ może wtedy wykazywać elementy wspólne ze sztucznie postarzaną wersją. Dlatego w przypadku tego produktu tak ważna jest dokładna charakterystyka chemiczna produktu oraz znajomość zachodzących przemian w trakcie różnych warunków dojrzewania. Odpowiednia analiza chemometryczna powinna pomóc w uzyskaniu dokładniejszych informacji o analizowanym produkcie.

Dzięki zebranim wynikom i opisanym do tego miejsca analizom (z wykluczeniem oznaczenia ogólnej liczby drożdży i pleśni⁸) można stwierdzić, że herbaty zakupione na rynku lokalnym reprezentują Ripe Pu-erh – choć herbata Haichao najbardziej wyróżniała się spośród wszystkich analizowanych prób (Rys. 7.10).

⁸ Ze względu na brak uzyskanego w tym oznaczeniu podziału na rodzaje herbaty Pu-erh. Oznaczenie ogólnej liczby drożdży i pleśni wykazało podział na herbaty zakupione na lokalnym rynku oraz sprowadzone bezpośrednio z Chin.



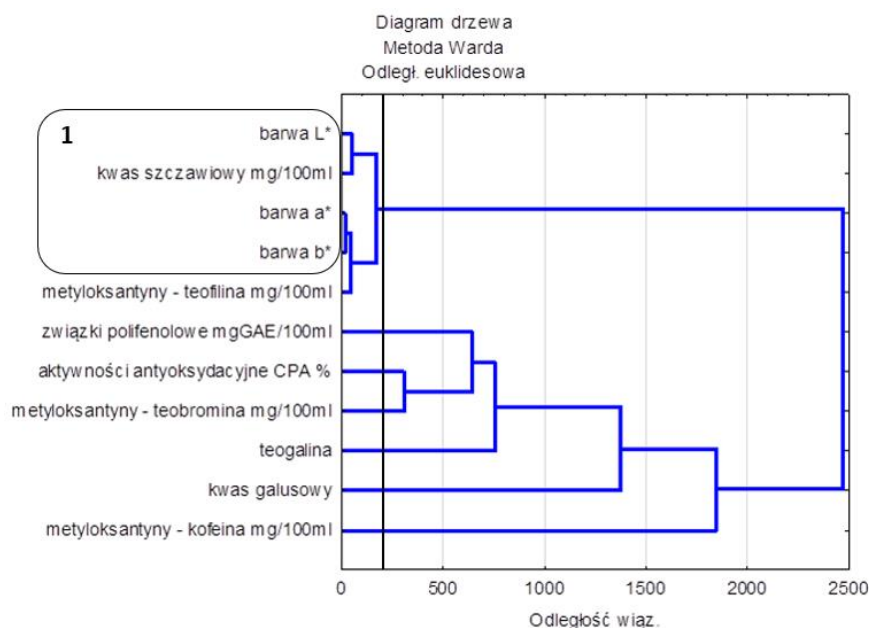
Rys. 7.10 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na wszystkie badane czynniki (bez drożdży i pleśni).
Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Wyniki wielowymiarowej analizy skupień pozwoliły na wyodrębnienie dwóch skupień (przy odległości aglomeracyjnej równej 500). Pierwsze z nich stanowiły surowiec i wersje tradycyjne badanych herbat. Przy czym najbardziej do siebie zbliżone były *maocha* i próba z 2007 roku (odległość euklidesowa=195) oraz Raw z 2003 i z 1998 roku (odległość euklidesowa=156). Drugie skupienie tworzyły dwie Ripe Pu-erh sprowadzone bezpośrednio z Chin oraz 4 próby zakupione na lokalnym rynku (poza produktem firmy Haichao). W tej grupie największe podobieństwo, pod kątem analizowanych czynników, wykazywały produkty firmy Astra i Mayo (odległość euklidesowa=92), a także Ripe Pu-erh z 2010 roku oraz próba z herbaciarni „Herbata-kawa.pl” (odległość euklidesowa=158). Tak jak już wspomniano, herbata firmy Haichao wyróżniała się spośród innych analizowanych herbat, wykazując mimo wszystko słabe podobieństwo do herbat tworzących drugie skupienie.

W związku z powyższym w ostatnim etapie badań przyjęto, iż herbaty zakupione na trójmiejskim rynku stanowią Ripe Pu-erh.

Wielowymiarową analizę skupień wykorzystano również do sprawdzenia powiązania czynników opisujących poszczególne rodzaje herbat. Wykazano, że najskuteczniej podział ten charakteryzują parametry barwy naparów, zawartość teofiliny oraz kwasu szczawowego (odległość wiązania równa 180) (Rys. 7.11).



Rys. 7.11 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Powiązania czynników opisujących poszczególne rodzaje herbat (bez drożdży i pleśni)
Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Oba rodzaje herbaty Pu-erh najskuteczniej różnicują parametry barwy a* i b* (odległość euklidesowa=18) w połączeniu z zawartością teofiliny (odległość euklidesowa=44), a także parametr barwy L* i zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawowego (odległość euklidesowa=171). Należy jednak zaznaczyć, że uzyskane wyniki oznaczenia zawartości teofiliny faktycznie dokładnie różnicowały Raw od Ripe Pu-erh, ale wyniki uzyskane przez innych naukowców nie były już takie jednoznaczne. Najmniejszą ilość informacji o rodzaju produktu dawała analiza zawartości teogaliny, kwasu galusowego oraz kofeiny. Jak wykazano wcześniej, to nie konkretna zawartość a stosunek zawartości teogaliny i kwasu galusowego może być skutecznym narzędziem do określania rodzaju herbaty Pu-erh.

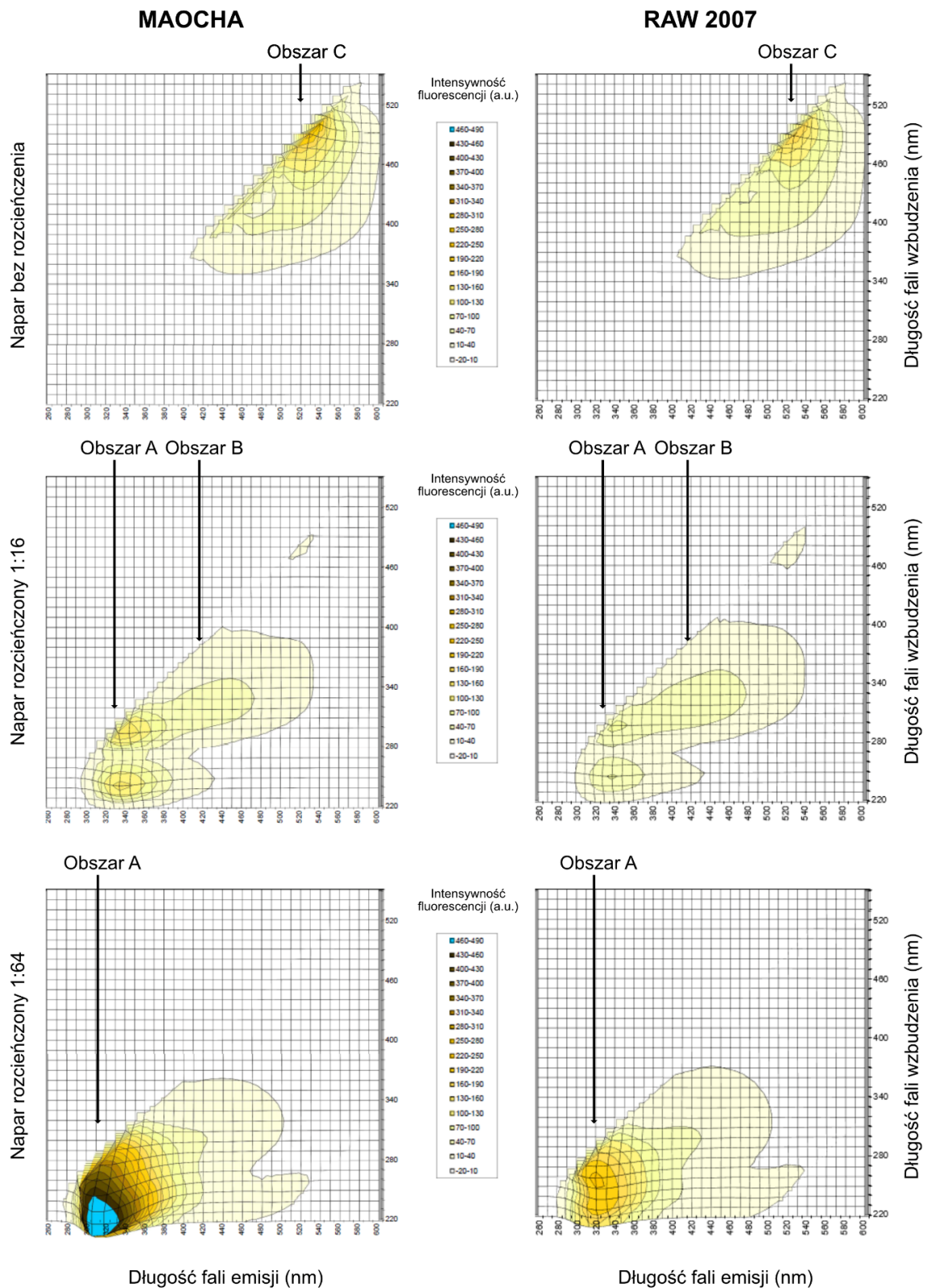
7.8. Pomiar widma fluorescencyjnego

W przytoczonych w części teoretycznej pracach (rozdział 4.4) zastosowano różne metody przygotowania próbek do analizy fluorymetrycznej. Tam, gdzie wymagano próbek w postaci płynnej, część autorów (Dong i in. 2014; Shan i in. 2017; Casale i in. 2018; Marguí i Voutchkov, 2018; Shan i in. 2018; Dankowska i Kowalewski, 2019; Tan, Li i Yang, 2020) wybrała prosty schemat postępowania, składający się z następujących etapów: rozdrobnienie, ekstrakcja (lub wielokrotna ekstrakcja), chłodzenie (w temperaturze pokojowej lub w łaźni lodowej), filtrowanie, ewentualne rozcieńczenie. Dodatkowo Marguí i Voutchkov (2018) zaznaczyli, iż

analizowane napary zostały przygotowane w sposób naśladujący pospolite użytkowanie produktu przez konsumenta. Mając na uwadze opisane zalety metod fluorescencyjnych oraz uwzględniając potrzeby rynku aukcyjnego, postanowiono w badaniach własnych zastosować najprostszą możliwą procedurę przygotowania próbek do analizy. Jednak ze względu na złożoność produktu, możliwość zachodzenia reakcji między składnikami, potrzebę zapewnienia odpowiedniego środowiska dla każdego fluoroforu oraz uwzględniając brak addytywności intensywności fluorescencji w takim układzie, postanowiono przeanalizować różne rozcieńczenia naparów.

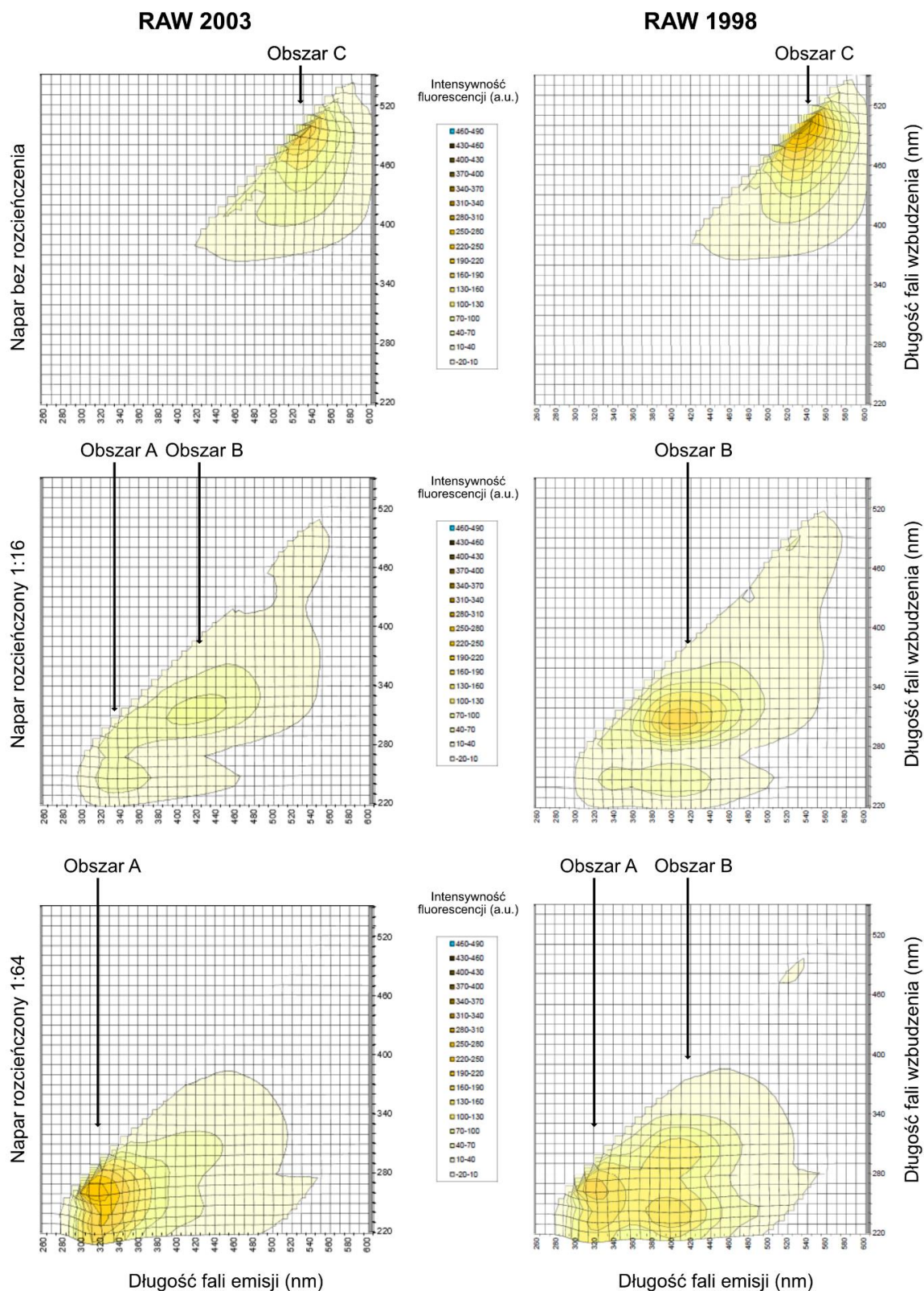
Na podstawie analizy uzyskanych w badaniach własnych widm fluorescencji macierzy wzbudzenia i emisji różnych rodzajów herbaty Pu-erh, można wskazać na występowanie pewnych charakterystycznych fluoryzujących składników. Ze względu na uzyskanie więcej niż jednej macierzy dla każdej analizowanej próby postanowiono wyznaczyć 3 obszary, charakteryzujące poszczególne rodzaje produktu. Obszar A wyznaczono dla zakresu wzbudzenia 220-320 nm i emisji 280-370 nm, obszar B dla zakresu wzbudzenia 280-340 nm i emisji 370-460 nm, a obszar C dla zakresu wzbudzenia 430-530 nm i emisji 490-590 nm.

Surowiec, jakim jest *maocha*, wykazywał maksimum fluorescencji w obszarze C w naparze bez rozcieńczenia. W obszarze B nie zaobserwowano wyraźnej aktywności. Natomiast w obszarze A pasmo zaczęło się kształtować przy rozcieńczeniu 1:8, osiągając maksimum fluorescencji przy rozcieńczeniu 1:64 (EX: 250nm, EM: 340 nm). Żadna z pozostałych prób nie wykazywała w tym obszarze tak dużej intensywności (Rys. 7.12 i 7.13). Aktywność w tym obszarze miała charakter dwupunktowy. Raw Pu-erh charakteryzowały się osiągnięciem maksimum pasma w obszarze C oznaczonym w naparach bez rozcieńczeń. Im starsza herbata, tym intensywniejsza fluorescencja w tym obszarze. Dla Raw Pu-erh z 2007 roku w obszarze B nie zaobserwowano wyraźnej aktywności, podobnie jak w przypadku surowca. Jednak już w przypadku Raw Pu-erh z 1998 roku obszar ten był aktywny i wyraźnie zaznaczony. Pasma zaczynało się kształtować dla rozcieńczenia 1:4, a wygasało przy 1:64, osiągając maksimum intensywności fluorescencji przy rozcieńczeniu 1:16 (EX: 310nm, EM: 410nm). Aktywność w obszarze A dla Raw Pu-erh zaczynała się kształtować przy rozcieńczeniu 1:8 lub 1:16. Zauważono, że im starsza herbata, tym później aktywność zaczynała się kształtować. Również wraz z wiekiem zmieniała się intensywność fluorescencji – im starsza herbata, tym mniejsza intensywność. Aktywność w tym obszarze najdłużej utrzymywała się w surowcu, a najkrócej w najstarszej Raw Pu-erh. Aktywność widma fluorescencyjnego tradycyjnej Pu-erh w tym obszarze miała charakter dwupunktowy (EM₁: 320-340, EX₁: 220-250 oraz EM₂: 320-340, EX₂: 270-300).



Rys. 7.12 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla 2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha (Maocha) i 2007 Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess (Raw 2007)

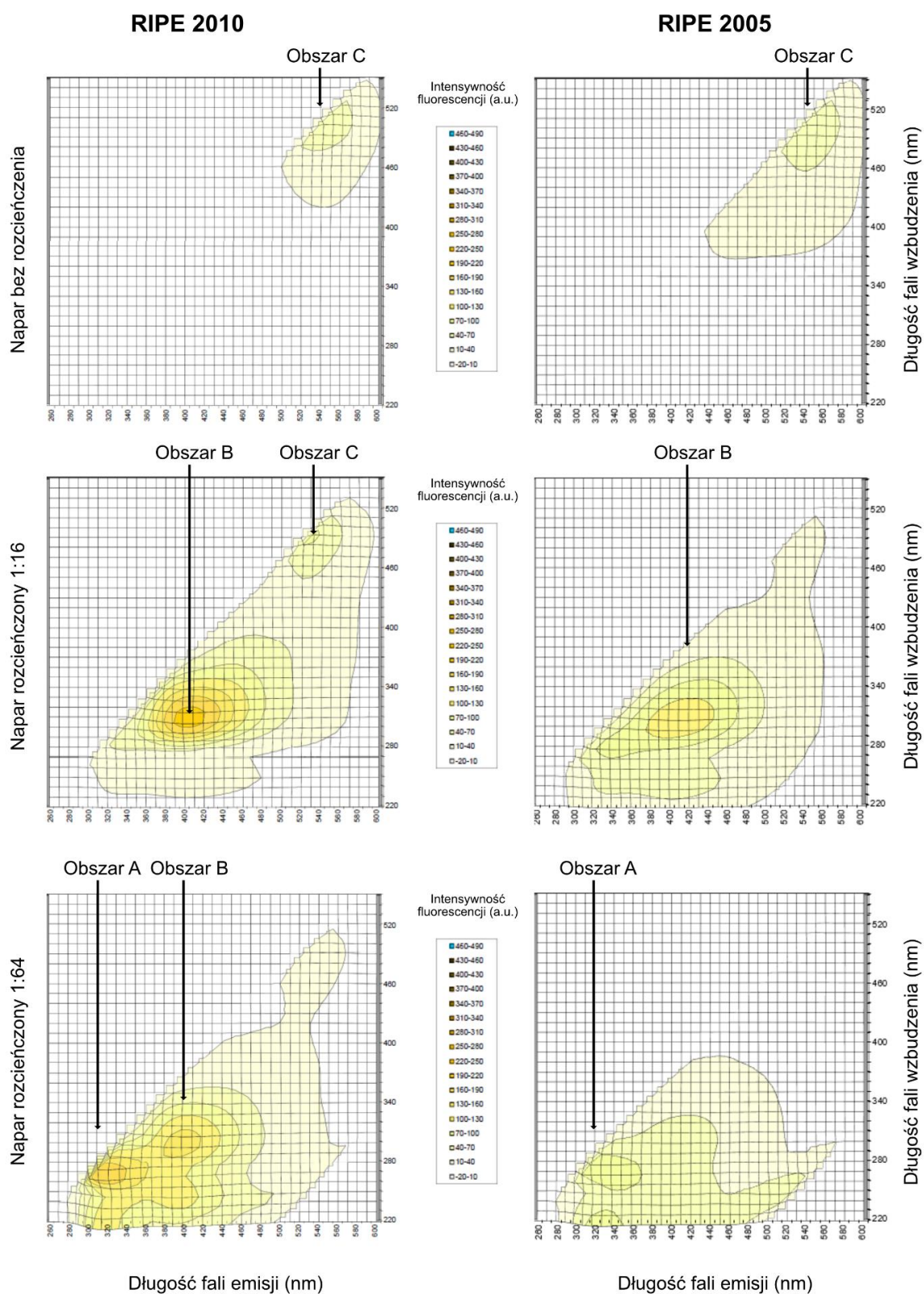
Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych



Rys. 7.13 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla 2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw (Raw 2003) i 1998 CNNP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake (Raw 1998)

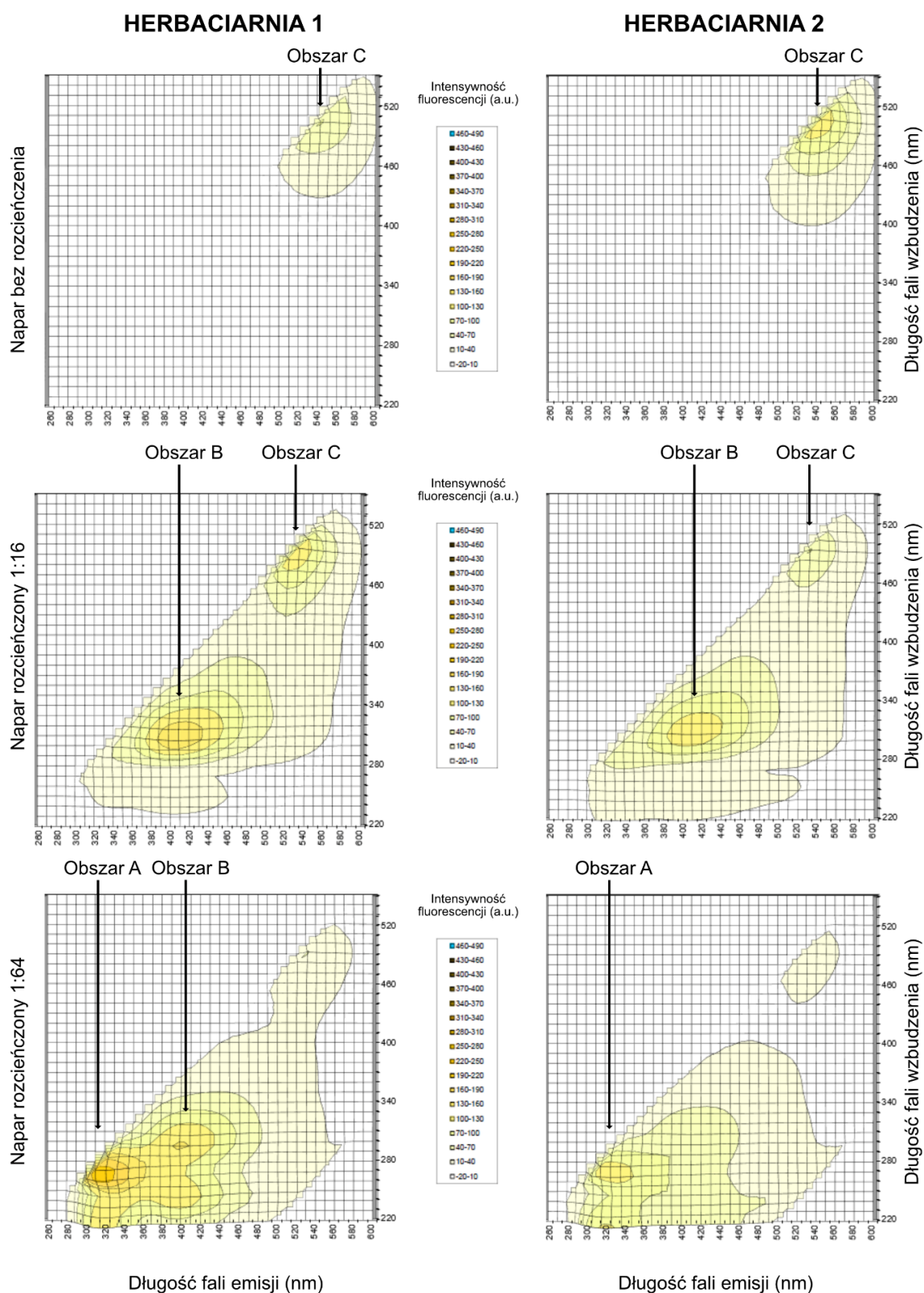
Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Herbaty Ripe Pu-erh, zarówno te pozyskane z lokalnego rynku, jak i te sprowadzone bezpośrednio z rynku chińskiego, wykazywały pewne wspólne elementy w uzyskanych widmach fluorescencyjnych (Rys. 7.14, 7.15, 7.16 i 7.17) oraz elementy różnicujące je od *maocha* i wersji tradycyjnych. Pierwszym wyraźnym elementem odróżniającym wersję Raw od Ripe jest aktywność w obszarze C.



Rys. 7.14 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla 2010 Shuangli Jingmaishan Ripe (Ripe 2010) i 2005 Jinggu Bai Long TF A Grade Zao Xiang Ripe Puerh (Ripe 2005)

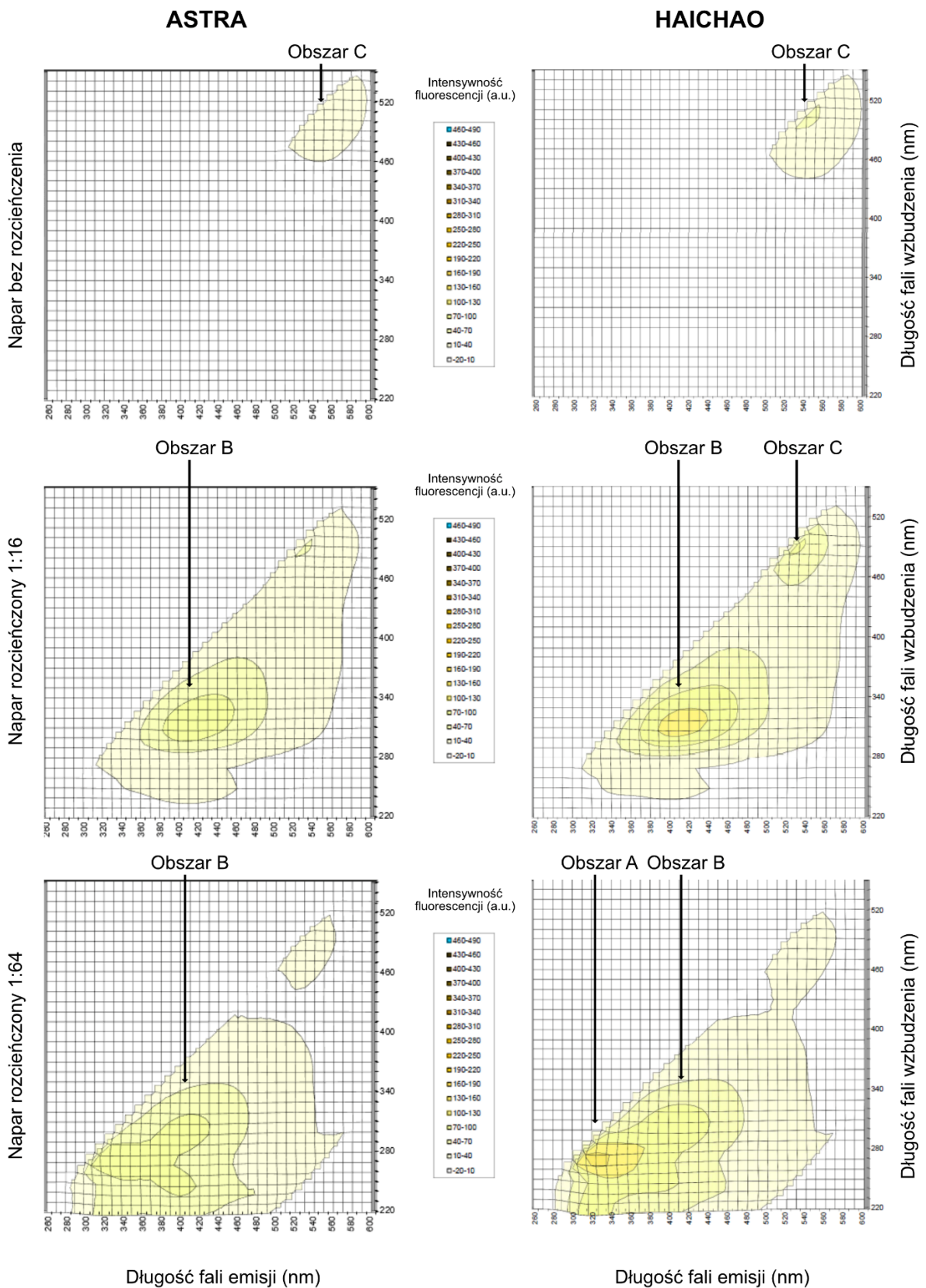
Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych



Rys. 7.15 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla herbat z herbaciarni

Objaśnienia: Herbaciarnia 1: „Czas na Herbatę”; Herbaciarnia 2: „Herbata-kawa.pl”.

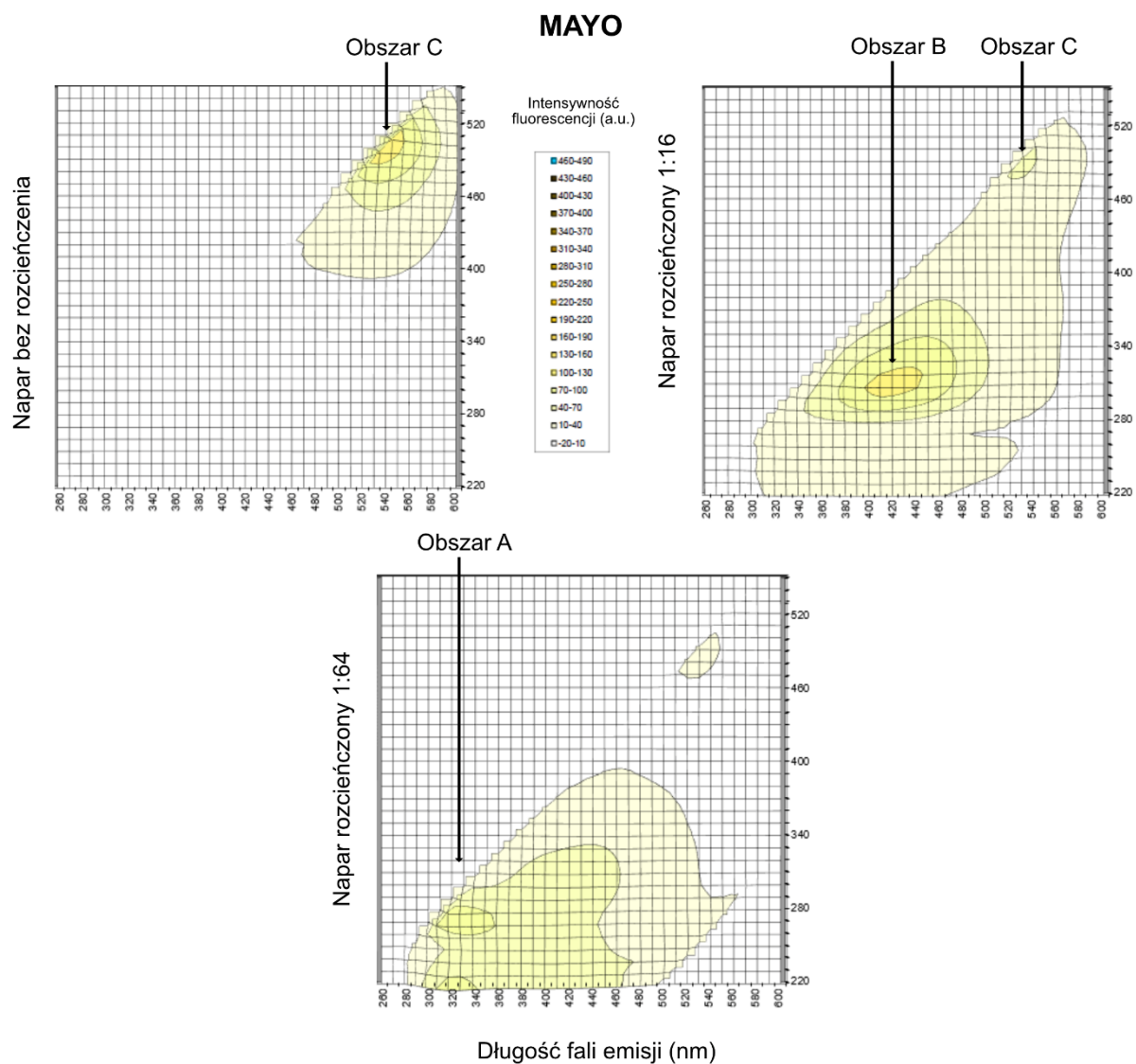
Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych



Rys. 7.16 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla herbat firm

Astra i Haichao

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych



Rys. 7.17 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla herbaty firmy Mayo

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

W Ripe Pu-erh intensywność fluorescencji w tym obszarze jest wyraźnie mniejsza, a jej maksimum zaobserwowano przy rozcieńczeniu 1:2 (wyjątek dla próby z herbaciarni „Czas na Herbatę”, gdzie maksimum odnotowano dla rozcieńczenia 1:4). Dwie herbaty zakupione w lokalnych herbaciarniach wykazywały zdecydowanie większą intensywność w analizowanym obszarze od pozostałych Ripe Pu-erh, a w przypadku próby starszej – zgodnie z deklaracją sprzedawcy (6 lat dojrzewania) – zaobserwowano większą intensywnością fluorescencji od herbaty leżakującej krócej (3 lata). W próbach bez rozcieńczeń w obszarze

C jest wykształcone pasmo, jednak jedynie w przypadku herbat Mayo i z herbaciarni „Herbata-Kawa.pl” posiada ono wyraźnie zaznaczone maksimum.

W obszarze B również można wskazać różnice między Raw i Ripe Pu-erh. W przypadku wersji sztucznie postarzonej zaobserwowano większą aktywność w omawianym obszarze, a maksima pojawiały się w rozcieńczeniach 1:16 oraz 1:32. Ripe Pu-erh 2010 jako próba młodsza wykazywała większą intensywność fluorescencji niż Ripe Pu-erh 2005. Może to oznaczać, że im starsza próba, tym mniejsza jest zawartość związku odpowiedzialnego za aktywność w tym obszarze. Potwierdziła to również obserwacja dla herbat zakupionych w herbaciarniach: herbata leżakująca 3 lata („Czas na Herbatę”) wykazywała większą intensywność fluorescencji (EX: 310nm, EM: 410nm) od herbaty leżakującej 6 lat („Herbata-kawa.pl”) (EX: 310, EM: 400). Największe maksimum w tym obszarze zaobserwowano dla Ripe 2010, które było większe od maksimum uzyskanego przez najstarszą herbatę Raw z 1998 roku. Zawartość związku odpowiedzialnego za aktywność w wyznaczonym obszarze B może być związana z aktywnością drobnoustrojów, a tym samym wiekiem herbat. W Raw Pu-erh im starsza próba tym większa intensywność, a w Ripe Pu-erh – im młodsza próba tym większa intensywność. Na podstawie obserwacji aktywności jedynie tego obszaru nie można jednoznacznie zidentyfikować rodzaju herbaty Pu-erh, ponieważ przy wiekowych Raw i młodych Ripe różnice w widmie fluorescencyjnym będą się zacierać.

Obszar A w Ripe Pu-erh zaczyna się kształtować w rozcieńczeniach 1:16 oraz 1:32. Pod tym względem widma są zbliżone do dwóch starszych Raw Pu-erh – z 2003 oraz 1998 roku. Aktywność w całym obszarze również ma charakter dwupunktowy, choć jest mniejsza od tej zaobserwowanej w Raw Pu-erh. Dokonując analizy porównawczej dwóch par herbat: z 2010 i 2005 roku, sprowadzonych z rynku chińskiego oraz leżakującej 3 i 6 lat, zakupionych w herbaciarniach na rynku lokalnym, zauważono pewne prawidłowości. Im herbata była starsza/dłużej dojrzewająca, tym wykazywała mniejszą intensywność fluorescencji w omawianym obszarze, a obserwowana aktywność trwała krócej. W herbatach starszych maksymalną intensywność odnotowano przy mniejszych rozcieńczeniach naparów. Ripe Pu-erh z herbaciami „Czas na herbatę” (dojrzewająca 3 lata) wykazywała maksymalną intensywność fluorescencji w rozcieńczeniu 1:128 (EX: 220, EM: 320), a próba zakupiona w herbaciarni „Herbata-kawa.pl” (dojrzewająca 6 lat) w rozcieńczeniu 1:64 (EX: 270, EM: 330). Podobna zależność występowała w herbatach sprowadzonych bezpośrednio z Chin. Ripe Pu-erh z 2010 roku wykazywała maksymalną intensywność fluorescencji w rozcieńczeniu 1:64 (EX: 280, EM: 330), a Ripe Pu-erh z 2005 roku w rozcieńczeniu 1:32 (EX: 280, EM: 340).

Z pozostałych Ripe Pu-erh największą aktywność w obszarze A wykazywała herbata Haichao, a najmniejszą – Astra i Mayo.

Ze względu na to, że każdy produkt tworzy charakterystyczne środowisko dla substancji fluoryzujących i każdy naturalny fluofofor będzie nieco inaczej się zachowywać w różnych produktach, problemem może być porównanie uzyskanych wyników z wynikami innych autorów (Casale i in. 2018; Lia i in. 2020; Muhammad, Sahar i Hitzmann, 2017; Sikorska, Khmelinskii i Sikorski, 2019).

Stąd znaczącym uzupełnieniem przedstawionych wyników badań jest identyfikacja związków odpowiedzialnych za aktywności w wyznaczonych obszarach, która pozwoliła na pozyskanie większej ilości danych o jakości produktu. Następstwem tego był kolejny etap badań, polegający na identyfikacji związków kształtujących uzyskane widma fluorescencyjne. W badaniu wykorzystano związki zastosowane w analizie chromatograficznej (Tab. 7.9).

Tab. 7.9 Lokalizacja maksymalnych wartości fluorescencji uzyskanych dla analizowanych związków

Wzorzec	λ EX (nm)	λ EM (nm)
Kofeina	320	380
Teofilina	320	370
Teobromina	340	380
Kwas galusowy	340	400
Teogalina	250	310

Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

λ EX – długość fali wzbudzenia

λ EM – długość fali emisji

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że aktywności widm analizowanych związków nie były tożsame z aktywnościami zaobserwowanymi w analizowanym materiale (dokumentacja badań w załączeniu na nośniku danych). Przesunięcia aktywnych obszarów mogą wynikać z różnych środowisk analizowanych związków. Biorąc powyższe pod uwagę można przypuszczać, że za aktywność w obszarze A odpowiedzialna może być teogalina. Jednak analiza chromatograficzna wykazała, że surowiec i wszystkie herbaty Raw Pu-erh posiadały dużą zawartość teogaliny, tak więc wszystkie te herbaty powinny wykazywać zbliżoną aktywność fluorescencyjną w obszarze A. Takiej zależności jednak nie wykazano. Kwas galusowy oraz teobromina wykazywały aktywność w wyznaczonym obszarze B, jednak

były najbardziej oddalone od wyznaczonych punktów maksymalnej intensywności fluorescencji, jaką wykazywały herbaty. Teofilina a tym bardziej kofeina, wykazywały aktywność fluorescencyjną odpowiadającą wyznaczonemu obszarowi B i najbardziej zbliżoną do tej odnotowanej w analizowanych herbatach. Ze względu na bardzo zbliżoną budowę cząsteczek oznaczanych metyloksantyn, wykazują one aktywność fluorescencyjną w podobnym obszarze. Można jedynie domniemywać, iż za aktywność w wyznaczonym obszarze B, odpowiedzialna jest jedna z metyloksantyn lub inny związek o podobnej budowie cząsteczki. Żaden z wykorzystanych wzorców nie wykazywał aktywności fluorescencyjnej odpowiedniej dla obszaru C.

Pomiar widma fluorescencyjnego w zaprezentowanym układzie zajmuje około 20 minut dla jednego rozcieńczenia. W celu skrócenia czasu pomiaru, wymaganego dla odpowiedniej charakterystyki każdej herbaty, należałoby ograniczyć ilość rozcieńczeń niezbędnych do oceny badanego materiału.

Przeprowadzoną analizę widma fluorescencyjnego herbat Pu-erh należy uznać za badania wstępne, które potwierdziły potencjał zastosowania tej analizy w przypadku takiego rodzaju produktu. Przegląd dostępnej literatury wykazał, że metoda ta może być z powodzeniem wykorzystywana do identyfikacji wybranych związków lub charakterystyki przemian zachodzących w różnych produktach spożywczych. Jednak zaledwie pojedyncze opracowania dotyczyły herbaty. Z tego powodu wydaje się, że ten obszar wiedzy nie został jeszcze odpowiednio rozpoznany, co może stanowić przyczynek do dalszych badań w tym zakresie.

8. Podsumowanie i wnioski

Informacje na temat herbaty Pu-erh, przedstawione w części teoretycznej niniejszej pracy, świadczą o wyjątkowości omawianego produktu – zarówno pod kątem historycznym, kulturowym, zdrowotnym, jak i organoleptycznym. Dla niektórych smakoszy herbaty sam fakt jej wyboru na wzór wyboru wina, a następnie degustacji wydaje się niezwykle intrygujący. Również z tego względu herbata Pu-erh zyskała i nadal zyskuje uznanie na całym świecie. Natomiast konfrontacja z produktami dostępnymi na rynku krajowym wypada zdecydowanie niekorzystnie. Niewątpliwie największym uchybieniem dystrybutorów jest brak informacji na opakowaniu o rodzaju oferowanego produktu. Konsument ma zatem ograniczony dostęp do podstawowej wiedzy o spożywanym produkcie. Również ceny herbaty Pu-erh na rynku polskim są wielokrotnie niższe od cen tego produktu na rynkach zagranicznych i w handlu internetowym. Produkty dostępne w herbaciarniach nie różnią, pod względem wrażeń organoleptycznych, za bardzo od produktów zakupionych w sklepach niespecjalistycznych. Trudno jest również doszukać się w produktach zakupionych na lokalnym rynku atrybutów smaku czy zapachu, prezentowanego w opracowaniach naukowych. Z tego względu jednym z postawionych w pracy celów była ocena jakości herbaty Pu-erh dostępnej na rodzimym rynku w aspekcie jej autentyczności. Jako drugi cel wyznaczono sobie próbę poszukiwania prostej i szybkiej metody identyfikowania różnych rodzajów herbaty Pu-erh.

Do realizacji postawionych celów niezbędny był materiał wzorcowy, dlatego z chińskiej prowincji Yunnan sprowadzono oryginalne herbaty Raw i Ripe Pu-erh. Ocena jakości herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin oraz zakupionych na trójmiejskim rynku obejmowała oznaczenie: parametrów barwy, zawartości związków polifenolowych, aktywności antyoksydacyjnej, zawartości wybranych metyloksantyn i rozpuszczalnego kwasu szczawiowego, a także ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu i w naparach. W celu zidentyfikowania poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh zaproponowano metodę spektrometrii fluorescencyjnej.

Parametry jakościowe takie jak barwa, zawartość związków polifenolowych i wybranych metyloksantyn w oryginalnych Raw i Ripe Pu-erh stanowiły układ odniesienia dla oceny jakości herbat dostępnych na trójmiejskim rynku. Wykorzystanie metody hierarchicznej analizy skupień pozwoliło na pogrupowanie badanych herbat w zakresie ich barwy, gdzie pierwszą grupę stanowiły *maocha* oraz wszystkie próby Raw Pu-erh, drugą Ripe Pu-erh sprowadzone bezpośrednio z Chin oraz dwie herbaty zakupione na lokalnym rynku, a trzecią pozostałe 3 herbaty zakupione na lokalnym rynku. Podobieństwo herbat z rynku lokalnego do

rodzaju Ripe Pu-erh, czyli herbat sztucznie postarzanych, potwierdzają też wyniki oznaczenia zawartości polifenoli w naparach oraz ich zdolność do redukcji wolnych rodników DPPH. Zastosowana dla tych parametrów wielowymiarowa analiza skupień ponownie wykazała podobieństwo *maocha* do dwóch Raw Pu-erh, a z kolei herbat zakupionych na trójmiejskim rynku do Ripe Pu-erh. Należy zaznaczyć, że Vintage Raw wykazywała największe podobieństwo względem herbaty Ripe Pu-erh sprowadzonej bezpośrednio z Chin. W tym samym skupieniu znalazły się także dwie herbaty zakupione na rynku lokalnym. Takie podobieństwo herbaty Raw do Ripe nie jest zaskoczeniem, ponieważ zgodnie z informacjami zawartymi w części teoretycznej, wynika to ze zmian zachodzących w składzie herbaty związanych z długim okresem przechowywania produktu tradycyjnego (wiekiem herbaty). Wykonane oznaczenie wybranych metyloksantyn jednoznacznie wykazało, że obecność teofiliny jest charakterystyczna dla sztucznie postarzanej Pu-erh, choć wyniki uzyskane przez innych naukowców wykazują, że związek ten był również wykrywany w Raw Pu-erh.

Na podstawie przeprowadzonych badań możliwe było określenie rodzaju herbaty Pu-erh dostępnej na lokalnym rynku. W ten sposób osiągnięto cel szczegółowy. Dodatkowo oznaczenie zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oraz ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu pozwoliło na porównanie jakości produktów zakupionych na trójmiejskim rynku z produktami sprowadzonymi bezpośrednio z Chin. Wyniki uzyskane w pierwszym oznaczeniu wykazały zróżnicowaną zawartość kwasu szczawiowego w herbatkach zakupionych na rynku lokalnym. Największą zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oznaczono w produkcie firmy Haichao oraz z herbaciarni „Czas na Herbatę”. W grupie herbat sprowadzonych bezpośrednio z Chin wersja Raw charakteryzowała się mniejszą zawartością oznaczonego związku niż wersja Ripe. Tak więc pod tym kątem nie można jednoznacznie stwierdzić, aby produkty zakupione na lokalnym rynku były niższej jakości w porównaniu z produktami sprowadzonymi bezpośrednio z Chin. Może to wynikać z ilości czynników, które wpływają na zawartość tego związku w produkcie końcowym. Z kolei oznaczenie ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu wykazało, że produkty dostępne na rynku lokalnym były niższej jakości w porównaniu z produktami sprowadzonymi bezpośrednio z Chin.

Do identyfikacji poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh zaproponowano metodę spektrometrii fluorescencyjnej. Wykazano, że widma fluorescencyjne naparów herbacianych poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh wykazują pewne różnice, co pozwala na określenie rodzaju produktu oraz potwierdzenie jego autentyczności. Dodatkowo analiza chromatograficzna wykazała, że stosunek zawartości teogaliny do kwasu galusowego może stanowić skuteczne narzędzie, służące do potwierdzania autentyczności rodzajów herbaty

Pu-erh. Oznaczenie ilościowe wykazało, że *maocha* oraz tradycyjna Pu-erh zawierały kilkukrotnie więcej teogaliny niż kwasu galusowego. Z kolei w sztucznie postarzonej Pu-erh to kwasu galusowego było kilkukrotnie więcej niż teogaliny. Tak więc obok metody spektrometrii fluorescencyjnej określenie zawartości teogaliny i kwasu galusowego może być kolejnym narzędziem do badania autentyczności herbaty Pu-erh. W ten sposób osiągnięto główny cel sformułowany w pracy.

Otrzymane wyniki badań umożliwiły weryfikację postawionych w pracy hipotez badawczych:

1. **Biorąc pod uwagę zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oraz ogólną liczbę grzybów na powierzchni suszu nie można jednoznacznie stwierdzić, że herbata Pu-erh dostępna na lokalnym rynku jest niższej jakości w porównaniu z herbatą sprowadzoną bezpośrednio z Chin.** Na te parametry wpływ ma duża ilość czynników wewnętrznych i zewnętrznych, których nie można było uwzględnić w zaplanowanych badaniach. **Hipoteza została zweryfikowana negatywnie.**
2. **Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na pozytywną weryfikację hipotezy, dotyczącej rodzaju herbaty Pu-erh, jaką reprezentują produkty dostępne na trójmiejskim rynku. Nie stanowią one tradycyjnej wersji tego produktu, ponieważ zostały poddane procesowi sztucznego postarzenia.**
3. **Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że stosunek zawartości teogaliny do kwasu galusowego może stanowić marker autentyczności (parametr różnicujący) herbaty Raw od Ripe. Hipoteza została zweryfikowana pozytywnie.**
4. **W wyniku przeprowadzonej analizy widm fluorescencyjnych stwierdzono, że metody fluorymetryczne mogą być wykorzystywane do identyfikacji poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh. Hipoteza została zweryfikowana pozytywnie.**

Tematyka niniejszej pracy wpisuje się w aktualny stan badań krajowych i światowych ośrodków naukowych, wypełniając tym samym lukę poznawczą i badawczą. O oryginalności przedstawionej pracy świadczy fakt, że po raz pierwszy w Polsce podjęto temat autentyczności herbaty Pu-erh, dokonano dokładnej charakterystyki tego produktu, a w badaniach wykorzystano zarówno Raw jak i Ripe Pu-erh. Z kolei za pomocą wybranych metod analitycznych zidentyfikowano rodzaj herbaty Pu-erh, oferowanej na trójmiejskim rynku. Jako innowacyjną metodę określania jakości i badania autentyczności herbat Pu-erh zaproponowano pomiar widm fluorescencyjnych naparów, a także określenie zawartości teogaliny i kwasu

galusowego. Praca ma charakter interdyscyplinarny i niewątpliwie swoim zakresem wpisuje się w wymagania właściwe dla dyscypliny Nauki o zarządzaniu i jakości.

W świetle aktualnego stanu wiedzy z zakresu zarządzania i jakości produktów spożywczych oraz nauk o zdrowiu, sformułowano następujące wnioski ogólne:

1. Należy wprowadzić odpowiednie sposoby przekazywania informacji o herbacie Pu-erh dostępnej na krajowym rynku. Obecnie nie mamy wiedzy jaka herbata Pu-erh jest dostępna na rynku.
2. Wyniki niniejszej pracy powinny przyczynić się do podniesienia świadomości i wiedzy wśród dystrybutorów, konsumentów, ale również dietetyków i żywieniowców w zakresie pochodzenia, jakości i właściwości herbaty Pu-erh.
3. Dalsze badania powinny skupiać się na badaniach w zakresie przeznaczenia dietetycznego i leczniczego herbaty Pu-erh, przede wszystkim w chorobie otyłości i cukrzycy typu II.
4. Wiedza o herbacie Pu-erh, jak również warunkach i zabiegach technologicznych stosowanych w jej produkcji może być w przyszłości wykorzystana do projektowania nowych produktów jak żywność funkcjonalna i suplementy diety.

9. Bibliografia

Publikacje (druki zwarte i artykuły)

1. Abe M., Takaoka N., Idemoto Y., Takagi C., Imai T., Nakasaki K. (2008), *Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea*, International Journal of Food Microbiology, 124, 199-203.
2. Ahmed S., Peters Ch.M., Chunlin L., Meyer R., Unachukwu U., Litt A., Kennelly E., Stepp J.R. (2013), *Biodiversity and phytochemical quality in indigenous and state-supported tea management systems of Yunnan, China*, Conservation Letters, 6, 28-36.
3. Ahmed S., Stepp J.R. (2013a), *Green Tea: The Plants, Processing, Manufacturing and Production*, [w:] Preedy V.R. (red.), *Tea in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Londyn, 19-31.
4. Ahmed S., Stepp J.R. (2013b), *Pu-erh Tea: Botany, Production, and Chemistry*, [w:] Preedy V.R. (red.), *Tea in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Londyn, 59-71.
5. Ahmed S., Unachukwu U., Stepp J.R., Peters C.M., Long C., Kennelly E. (2010), *Pu-erh tea tasting in Yunnan, China: Correlation of drinkers' perceptions to phytochemistry*, Journal of Ethnopharmacology, 132, 176-185.
6. Almajano M.P., Carbo S., Jimenez J.A.L., Gordon M.H. (2008), *Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions*, Food Chemistry, 108, 55-63.
7. Al Zahrani N.A., El-Shishtawy R.M., Asiri A.M. (2020), *Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review*, European Journal of Medicinal Chemistry, 204, 112609.
8. Bilge G., Özdemir K.S. (2020), *Synchronous fluorescence spectroscopy combined with chemometrics for determination of total phenolic content and antioxidant activity in different tea types*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 100(9), 3741-3747.
9. Borawska M.H., Markiewicz-Żukowska R., Naliwajko S.K., Socha K. (2014), *Skrypt do wybranych ćwiczeń z analizy żywności*, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok.
10. Bose A. (2016), *Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis*, Journal of Luminescence, 169, 220-226.
11. Brzezicha-Cirocka J., Grembecka M., Szefer P. (2016), *Oxalate, magnesium and calcium content in selected kinds of tea: impact on human health*, European Food Research and Technology, 242, 383-389.

12. Budinova G., Vlacil D., Mestek O., Volka K. (1998), *Application of infrared spectroscopy to the assessment of authenticity of tea*, *Talanta*, 47, 255-260.
13. Cai X., Fang C., Hayashi S., Hao S., Zhao M., Tsutsui H., Nishiguchi S., Sheng J. (2016), *Pu-erh tea extract ameliorates high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance by modulating hepatic IL-6/STAT3 signaling in mice*, *The Japanese Society of Gastroenterology*, 51, 819-829.
14. Cao L., Guo X., Liu G., Song Y., Ho C.T., Hou R., Zhang L., Wan X. (2018), *A comparative analysis for the volatile compounds of various Chinese dark teas using combinatory metabolomics and fungal solid-state fermentation*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 112-123.
15. Casale M., Pasquini B., Hooshyari M., Orlandini S., Mustorgi E., Malegori C., Turrini F., Ortiz M.C., Sarabia L.A., Furlanetto S. (2018), *Combining excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy, parallel factor analysis, cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography and partial least squares class-modelling for green tea characterization*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159, 311-317.
16. Chen C.S., Chan H.C., Chang Y.N., Liu B.L., Chen Y.S. (2009), *Effects of bacterial strains on sensory quality of Pu-erh tea in an improved pile-fermentation process*, *Journal of Sensory Studies*, 24, 534-553.
17. Chen G.H., Lin Y.L., Hsu W.L., Hsieh S.K., Tzen J.T.C. (2015), *Significant elevation of antiviral activity of strictinin from Pu'er tea after thermal degradation to ellagic acid and gallic acid*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(1), 116-123.
18. Chen T.-Y., Wang M.M.C., Hsieh S.-K., Hsieh M.-H., Chen W.-Y., Tzen J.T.C. (2018), *Pancreatic lipase inhibition of strictinin from Pu'er tea (Cammelia sinensis) and its anti-obesity effects in C57BL6 mice*, *Journal of Functional Foods*, 48, 1-8.
19. Chen Y.-S., Liu B.-L., Chang Y.-N. (2010), *Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109 (6), 557-563.
20. Chiang C.T., Weng M.S., Lin-Shiau S.Y., Kuo K.L, Tsai Y.J., Lin J.K. (2006), *Pu-erh tea supplementation suppresses fatty acid synthase expression in the rat liver through downregulating Akt and JNK signaling as demonstrated in human hepatoma HepG2 cells*, *Oncology Research*, 16 (3), 119-128.
21. Chuan C. (1981), *Tea classification in theory and practice*, *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 28 (3-4), 329-344.

22. Climent E., Perez-Calahorra S., Marco-Benedi V., Plana N., Sanchez R., Ros E., Ascaso J.F., Puzo J., Almagro F., Lahoz C., Civeira F., Pedro-Botet J. (2017), *Effect of LDL cholesterol, statins and presence of mutations on the prevalence of type 2 diabetes in heterozygous familial hypercholesterolemia*, Scientific Reports, 7 (5596), 1-8.
23. Dalipi R., Borgese L., Tsuji K., Bontempi E., Depero L.E. (2018), *Elemental analysis of teas, herbs and their infusions by means of total reflection X-ray fluorescence*, Journal of Food Composition and Analysis, 67, 128-134.
24. Dankowska A. (2016), *Advances in Fluorescence Emission Spectroscopy for Food Authenticity Testing*, [w:] Downey G. (red.), *Advances in Food Authenticity Testing*, Woodhead Publishing, Londyn, 117-145.
25. Dankowska A., Kowalewski W. (2019), *Tea types classification with data fusion of UV–Vis, synchronous fluorescence and NIR spectroscopies and chemometric analysis*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 211, 195-202.
26. Das A.P., Ghosh Ch. (2016), *Camellia sinensis var. lasiocalyx (G. Watt) A.P. Das & C. Ghosh – new combination name for the Cambod variety of tea*, Pleione, 10 (1), 167-168.
27. Dimpfel W., Kler A., Kriesl E., Lehnfeld R. (2007a), *Theogallin and L-theanine as active ingredients in decaffeinated green tea extract: I. electrophysiological characterization in the rat hippocampus in-vitro*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 59, 1131-1136.
28. Dimpfel W., Kler A., Kriesl E., Lehnfeld R., Keplinger-Dimpfel I.K. (2007b), *Source density analysis of the human EEG after ingestion of a drink containing decaffeinated extract of green tea enriched with L-theanine and theogallin*, Nutritional Neuroscience, 10, 169-180.
29. Dmowski P., Ruszkowska M. (2018), *Equilibrium Moisture Content Importance in Safe Maritime Transport of Black Tea*, the International Journal on Marine Navigation and Safety of Sea Transportation, 12(2), 399-404.
30. Dong Y., Liu X., Mei L., Feng C., Yan C., He S. (2014), *LED-induced fluorescence system for tea classification and quality assessment*, Journal of Food Engineering, 137, 95-100.
31. Du W.-H., Peng S.-M., Liu Z.-H., Shi L., Tan L.-F., Zou X.-Q. (2012), *Hypoglycemic effect of the water extract of pu-erh tea*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 10126-10132.
32. Duh P.-D., Wang B.-S., Liou S.-J., Lin C.-J. (2010), *Cytoprotective effects of pu-erh tea on hepatotoxicity in vitro and in vivo induced by tert-butyl-hydroperoxide*, Food Chemistry, 119, 580-585.

33. Duh P.-D., Yen G.-C., Yen W.-J., Wang B.-S., Chang L.-W. (2004), *Effects of Pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 8169-8176.
34. Fik M., Zawislak A. (2004), *Porównanie właściwości przeciwutleniających wybranych herbat*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 3(40), 98-105.
35. Freeman M., Ahmed S. (2015), *Tea Horse Road. China's ancient trade road to Tibet*, Wydawnictwo River Books, Tajlandia.
36. Fung K.F., Carr H.P., Poon B.H.T., Wong M.H. (2009), *A comparison of aluminium levels in tea products from Hong Kong markets and in varieties of tea plants from Hong Kong and India*, Chemosphere, 75, 955-962.
37. Gall G., Colquhoun I.J., Defernez M. (2004), *Metabolite Profiling Using 1H NMR Spectroscopy for Quality Assessment of Green Tea, Camellia sinensis (L.)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 692-700.
38. Ge Y., Bian X., Sun B., Zhao M., Ma Y., Tang Y., Li N., Wu J.L. (2019), *Dynamic Profiling of Phenolic Acids during Pu-erh Tea Fermentation Using Derivatization Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Approach*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67, 4568-4577.
39. Gong J., Peng C., Chen T., Gao B., Zhou H. (2010), *Effects of Theabrownin from Pu-erh Tea on the Metabolism of Serum Lipids in Rats: Mechanism of Action*, Journal of Food Science, 75 (6), 182-189.
40. Gonzalez A.L., Lozano V.A., Escandar G.M., Bravo M.A. (2020), *Determination of ochratoxin A in coffee and tea samples by coupling secondorder multivariate calibration and fluorescence spectroscopy*, Talanta, 219, 121288.
41. Haas D., Pfeifer B., Reiterich Ch., Partenheimer R., Reck B., Buzina W. (2013), *Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea*, International Journal of Food Microbiology, 166, 316-322.
42. Hać-Szymańczuk E., Fiziari M., Cegiełka A., Piwowarek K., Misiura S. (2017), *Porównanie jakości mikrobiologicznej herbat czarnych, zielonych i czerwonych dostępnych na rynku warszawskim*, Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 591, 33-42.
43. Hou Y., Shao W., Xiao R., Xu K., Ma Z., Johnstone B.H., Du Y. (2009), *Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model*, Experimental Gerontology, 44, 434-439.

44. Hönow R., Gu K.L.R., Hesse A., Siener R. (2010), *Oxalate content of green tea of different origin, quality, preparation and time of harvest*, Urological Research, 38, 377-381.
45. Hsieh S.-K., Xu J.-R., Lin L.-H., Li Y.-C., Chen G.-H., Kuo P.-C., Chen W.-Y., Tzen J.T.C. (2016), *Antibacterial and laxative activities of strictinin isolated from Pu'er tea (Camellia sinensis)*, Journal of Food and Drug Analysis, 24, 722-729.
46. Huang F., Zheng X., Ma X., Jiang R., Zhou W., Zhou S., Zhang Y., Lei S., Wang S., Kuang J., Han X., Wei M, You Y., Li M., Li Y., Liang D., Liu J., Chen T., Yan C., Wei R., Rajani C., Shen C., Xie G., Bian Z., Li H., Zhao A., Jia W. (2019), *Theabrownin from Pu-erh tea attenuates hypercholesterolemia via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism*, Nature Communications, 10 (1), 1-17.
47. Huang Q., Chen S., Chen H., Wang Y., Hochstetter D., Xu P. (2013), *Studies on the bioactivity of aqueous extract of pu-erh tea and its fractions: In vitro antioxidant activity and α -glycosidase inhibitory property, and their effect on postprandial hyperglycemia in diabetic mice*, Food and Chemical Toxicology, 53, 75-83.
48. Hu L., Yin C. (2017), *Development of a New Three-Dimensional Fluorescence Spectroscopy Method Coupling with Multilinear Pattern Recognition to Discriminate the Variety and Grade of Green Tea*, Food Analytical Methods, 10, 2281-2292.
49. Hu Y., Jia J., Qiao J., Ge C., Cao Z. (2010), *Antimicrobial activity of pu-erh tea extracts in vitro and its effects on the preservation of cooled mutton*, Journal of Food Safety, 30, 177-195.
50. Hung P.Y. (2013), *Tea forest in the making: Tea production and the ambiguity of modernity on China's southwest frontier*, Geoforum, 47, 178-188.
51. Hwang L.S., Lin L.C., Chen N.T., Liuchang H.C., Shiao M.S. (2003), *Hypolipidemic Effect and Antiatherogenic Potential of Pu-erh Tea*, ACS Symposium Series, 859, 87-103.
52. Icken D., Feller S., Engeli S, Mayr A, Müller A., Hilbert A., de Zwaan M. (2016), *Caffeine intake is related to successful weight loss maintenance*, European Journal of Clinical Nutrition, 70, 532-534.
53. International Food Information Service (2009), *Dictionary of Food Science & Technology*, Wiley-Blackwell, Wiley-Blackwell, Wiley-Blackwell.
54. Ivanisowa E., Tokar M., Mocko K., Bojnanska T., Merecek J., Mendelova A. (2013), *Antioxidant activity of selected plant products*, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science, 2(1), 1692-1703.

55. Jabłońska-Ryś E. (2012), *Wpływ sposobu parzenia różnych rodzajów herbat na zawartość w nich szczawianów rozpuszczalnych*, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1(80), 187-195.
56. Jawień E. (2012), *Wykorzystanie metabolomiki w analizie produktów rolnych i spożywczych*, *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania*, 17(4), 36-39.
57. Jeng K.-C., Chen C.-S., Fang Y.-P., Hou R.C.-W., Chen Y.-S. (2007), *Effect of Microbial Fermentation on Content of Statin, Gaba, and Polyphenols in Pu-erh Tea*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8787-8792.
58. Jiang H., Yua F., Qinc L., Zhang N., Cao Q., Schwab W., Li D., Song C. (2019), *Dynamic change in amino acids, catechins, alkaloids, and gallic acid in sixtypes of tea processed from the same batch of fresh tea (Camellia sinensisL.) leaves*, *Journal of Food Composition and Analysis*, 77, 28-38.
59. Jimenez-Zamora A., Delgado-Andrade C., Rufian-Henares J.A. (2016), *Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusions*, *Food Chemistry*, 199, 339-346.
60. Jin W., Zhou L., Yan B., Yan L., Liu F., Tong P., Yu W., Dong X., Xie L., Zhang J., Xu Y., Li C., Yuan Q., Shan L., Efferth T. (2018), *Theabrownin triggers DNA damage to suppress human osteosarcoma U2OS cells by activating p53 signalling pathway*, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22, 4423-4436.
61. Kaneko S., Kumazawa K., Masuda H., Henze A., Hofmann T. (2006), *Molecular and Sensory Studies on the Umami Taste of Japanese Green Tea*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2688-2694.
62. Karwowska K. (2017), *Typy upraw krzewu herbacianego w Chinach*, [w:] Panfil M. (red.), *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Agronomia i ochrona roślin*, Młodzi Naukowcy, Poznań, 103-108.
63. Kazan R.M., Seddik H.A., Marstani Z.M., Elsutohy M.M., Yasri N.G. (2019), *Determination of amino acids content in tea species using liquid chromatography via pre-column fluorescence derivatization*, *Microchemical Journal*, 150, 104103.
64. Kim E., Park S.B. (2010), *Discovery of New Fluorescent Dyes: Targeted Synthesis or Combinatorial Approach?*, [w:] Demchenko A. (red.), *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I*. Springer Series on Fluorescence (Methods and Applications) vol 8, Springer, Berlin, 149-186.
65. Kłódka D., Bońkowski M., Telesiński A. (2008), *Zawartość wybranych metyloksantyn i związków fenolowych w naparach różnych rodzajów herbat rozdrobnionych (dust*

- i fannings*) w zależności od czasu parzenia, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1(56), 103-113.
66. Kongpichitchoke T., Chiu M.T., Huang T.C., Hsu J.L. (2016), *Gallic Acid Content in Taiwanese Teas at Different Degrees of Fermentation and Its Antioxidant Activity by Inhibiting PKC δ Activation: In Vitro and in Silico Studies*, *Molecules*, 21, 1346.
 67. Kopczyńska K., Ponder A., Król K., Misztal K. (2019), *Metabolomika jako narzędzie badawcze w ocenie żywności*, [w:] Budryn G., Śliżewska K. (red.) *Nuka, Technologia Innowacje w Żywności i Żywieniu*, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 14-24.
 68. Korta-Pepłowska M., Chmiel M.J., Frączek K. (2016), *Zagrożenia mikrobiologiczne w środowisku pomieszczeń*, *Environmental Medicine*, 19(2), 48-54.
 69. Kozak M., Sobczak P., Krajewska M., Ślaska-Grzywna B., Zawiślak K., Żukiewicz-Sobczak W. (2015), *Ocena zawartości rozpuszczalnych szczawianów w granulowanych herbatkach zielonych*, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 583, 107-114.
 70. Ku K.M., Kim J., Park H.-J., Liu K.-H., Lee C.H. (2010), *Application of Metabolomics in the Analysis of Manufacturing Type of Pu-erh Tea and Composition Changes with Different Postfermentation Year*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 345-352.
 71. Kuo K.L., Weng M.S., Chiang C.T., Tsai Y.J., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. (2005), *Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 480-489.
 72. Kumar K., Tarai M., Mishra A.K. (2017), *Unconventional steady-state fluorescence spectroscopy as an analytical technique for analyses of complex-multifluorophoric mixtures*, *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 216-243.
 73. Kumar R.S.S., Murugesan S., Kottur G., Gyamfi D. (2013), *Black Tea: The Plants, Processing/Manufacturing and Production*, [w:] Preedy V.R. (red.), *Tea in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Londyn, 41-57.
 74. Lee J.E., Lee B.J., Chung J.O., Shin H.J., Lee S.J., Lee Ch.H., Hong Y.S. (2011), *¹H NMR-based metabolomic characterization during green tea (Camellia sinensis) fermentation*, *Food Research International*, 44, 597-604.
 75. Lia F., Formosa J.P., Zammit-Mangion M., Farrugia C. (2020), *The First Identification of the Uniqueness and Authentication of Maltese Extra Virgin Olive Oil Using 3D-Fluorescence Spectroscopy Coupled with Multi-Way Data Analysis*, *Foods*, 9, 498.

76. Liao C.C., Chen S.C., Huang H.P., Wang C.J., (2018), *Gallic acid inhibits bladder cancer cell proliferation and migration via regulating fatty acid synthase (FAS)*, Journal of Food and Drug Analysis, 26, 620-627.
77. Li C., Chai S., Ju Y., Hou L., Zhao H., Ma W., Li T., Sheng J., Shi W. (2017), *Pu-erh Tea Protects the Nervous System by Inhibiting the Expression of Metabotropic Glutamate Receptor 5*, Molecular Neurobiology, 54, 5286-5299.
78. Li D., Wang R., Huang J., Cai Q., Yang C.S., Wan X., Xie Z. (2019), *Effects and Mechanisms of Tea Regulating Blood Pressure: Evidences and Promises*, Nutrients, 11, 1115.
79. Liebman M., Murphy S. (2007), *Low oxalate bioavailability from black tea*, Nutrition Research, 27, 273-278.
80. Li H., Li M., Yang X., Gui X., Chen G., Chu J., He X., Wang W., Han F., Li P. (2018a), *Microbial diversity and component variation in Xiaguan Tuo Tea during pile fermentation*, PLoS ONE, 13(2).
81. Lin H., Li Z., Lu H., Sun S., Chen F., Wei K., Ming D. (2019), *Robust Classification of Tea Based on Multi-Channel LED-Induced Fluorescence and a Convolutional Neural Network*, Sensors, 19(21), 4687.
82. Lin H.C., Lee C.T., Yen Y.Y., Chu C.L., Hsieh Y.P., Yang C.S., Lan S.J. (2019), *Systematic review and meta-analysis of anti-hyperglycaemic effects of Pu-erh tea*, International Journal of Food Science and Technology, 54, 516–525.
83. Lin J.K., Lin C.L., Liang Y.C., Shiau S.Y.L., Juan I.M. (1998), *Survey of Catechins, Gallic Acid, and Methylxanthines in Green, Oolong, Pu-erh, and Black Teas*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 3635-3642.
84. Lin J., Zhang P., Pan Z., Xu H., Luo Y., Wang X. (2013), *Discrimination of oolong tea (Camellia sinensis) varieties based on feature extraction and selection from aromatic profiles analysed by HS-SPME/GC–MS*, Food Chemistry, 141, 259-265.
85. Li Q., Chai S., Li Y., Huang J., Luo Y., Xiao L., Liu Z. (2018b), *Biochemical Components Associated with Microbial Community Shift During the Pile-Fermentation of Primary Dark Tea*, Frontiers in Microbiology, 9, 1509.
86. Liu J., Peng C.X., Gao B., Gong J.S. (2016), *Serum metabolomics analysis of rat after intragastric infusion of Pu-erh theabrownin*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 96 (11), 3708-3716.
87. Liu M., Xie H., Ma Y., Li H., Li C., Chen L., Jiang B., Nian B., Guo T., Zhang Z., Jiao W., Liu Q., Ling T., Zhao M. (2020), *High Performance Liquid Chromatography and*

- Metabolomics Analysis of Tannase Metabolism of Gallic Acid and Gallates in Tea Leaves*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68, 4946-4954.
88. Liu T., Ding S., Yin D., Cuan X., Xie C., Xu H., Wang X., Sheng J. (2017), *Pu-erh Tea Extract Ameliorates Ovariectomy-induced Osteoporosis in Rats and Suppresses Osteoclastogenesis In Vitro*, Frontiers in Pharmacology, 8, 324.
 89. Liu T., Xiang Z., Chen F., Yin D., Huang Y., Xu J., Hu L., Xu H., Wang X., Sheng J. (2018), *Theabrownin suppresses in vitro osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized rats*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 106, 1339-1347.
 90. Liu Z., Bruins M.E., Bruijn W.J.C., Vincken J.P. (2020), *A comparison of the phenolic composition of old and young tea leaves reveals a decrease in flavanols and phenolic acids and an increase in flavonols upon tea leaf maturation*, Journal of Food Composition Analysis, 86, 103385.
 91. Li Y., Sun J., Wu X., Lu B., Wu M., Dai C. (2019), *Grade Identification of Tieguanyin Tea Using Fluorescence Hyperspectra and Different Statistical Algorithms*, Journal of Food Science, 84(8), 2234-2241.
 92. Lu M.-J., Chen C. (2008), *Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea*, Food Research International, 41 (2), 130-137.
 93. Luo D., Chen X., Zhu X., Liu S., Li J., Xu J., Zhao J., Ji X. (2019), *Pu-erh tea relaxes the thoracic aorta of rats by reducing intercellular calcium*, Frontiers in Pharmacology, 10, 1430.
 94. Lv H.P., Zhang Y., Shi J., Lin Z. (2017), *Phytochemical profiles and antioxidant activities of Chinese dark teas obtained by different processing technologies*, Food Research International, 100, 486-493.
 95. Lv H.-P., Zhang Y.-J., Lin Z., Liang Y.-R. (2013), *Processing and chemical constituents of Pu-erh tea: A review*, Food Research International, 53, 608-618.
 96. Lv S.D., Wu Y.S., Song Y.Z., Zhou J.S., Lian M., Wang C., Liu L., Meng Q.X. (2015), *Multivariate Analysis Based on GC-MS Fingerprint and Volatile Composition for the Quality Evaluation of Pu-Erh Green Tea*, Food Analytical Methods, 8, 321-333.
 97. Lv S., Wu Y., Zhou J., Lian M., Li C., Xu Y., Liu S., Wang C., Meng Q. (2014), *The Study of Fingerprint Characteristics of Dayi Pu-Erh Tea Using a Fully Automatic HS-SPME/GC-MS and Combined Chemometrics Method*, Plos One, 9(12).
 98. Łącka A., Bielawska M. (2015), *Zawartość rozpuszczalnych szczawianów w naparach herbat czarnych i zielonych*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLVIII, 58-73.

99. Łaniewska-Trokenheim Ł., Warmińsk-Radyko I., Kłębukowska L., Zadernowska A. (2009), *Mikrobiologia w towaroznawstwie żywności*, Wydawnictwo UWM, Olsztyn.
100. Mahdavi R., Yagin N.L., Liebman M., Nikniaz Z. (2013), *Effect of different brewing times on soluble oxalate content of loose-packed black teas and tea bags*, *Urolithiasis*, 41, 15–19.
101. Mao J.T. (2013), *White tea: The Plants, Processing, Manufacturing, and Potential Health Benefits*, [w:] Preedy V.R. (red.), *Tea in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Londyn, 33-40.
102. Marguí E., Voutchkov M. (2018), *Multielement Analysis of Tea and Mint Infusions by Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry*, *Food Analytical Methods*, 11, 282-291.
103. Medina S., Pereira J.A., Silva P., Perestrelo R., Camara J.S. (2019), *Food fingerprints – A valuable tool to monitor food authenticity and safety*, *Food Chemistry*, 278, 144-162.
104. Michalak-Majewska M. (2013a), *Analiza jakości i pożądalności konsumenckiej wybranych czerwonych herbat liściastych*, *Towaroznawcze Problemy Jakości*, 3(36), 92-102.
105. Michalak-Majewska M. (2013b), *Analiza zawartości szczawianów w popularnych naparach herbat lub kaw*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLVI, 74-79.
106. Mogensen J.M., Varga J., Thrane U., Frisvad J.C. (2009), *Aspergillus acidus from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B₂*, *International Journal of Food Microbiology*, 132, 141–144.
107. Mohanpuria P., Kumar V., Joshi R., Gulati A., Ahuja P.S., Yadav S.K. (2009), *Caffeine Biosynthesis and Degradation in Tea [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze] is under Developmental and Seasonal Regulation*, *Molecular Biotechnology*, 43, 104-111.
108. Mohanpuria P., Kumar V., Yadav S.K. (2010), *Tea Caffeine: Metabolism, Functions, and Reduction Strategies*, *Food Science and Technology*, 19(2), 275-287.
109. Moreda-Pineiro A., Fisher A., Hill S.J., (2003), *The classification of tea according to region of origin using pattern recognition techniques and trace metal data*, *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 195–211.
110. Morita A., Tuji M. (2002), *Nitrate and Oxalate Contents of Tea Plants (Camellia sinensis L.) with Special Reference to Types of Green Tea and Effect of Shading*, *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(4), 547-553.
111. Morita A., Suzuki R., Yokota H. (2004), *Effect of Ammonium Application on the Oxalate Content of Tea Plants (Camellia sinensis L.)*, *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(5), 763-769.

112. Mu B., Zhu Y., Lv H.P., Yan H., Peng Q.H., Lin Z. (2018), *The enantiomeric distributions of volatile constituents in different tea cultivars*, Food Chemistry, 265, 329-336.
113. Muhammad H.A., Sahar A., Hitzmann B. (2017), *Fluorescence Spectroscopy for the Monitoring of Food Processes*, [w:] Hitzmann B. (red.), Measurement, Modeling and Automation in Advanced Food Processing. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology vol 161, Springer, Cham, 121-151.
114. Nawalany K., Suwała G. (2016), *Wybrane, roślinne składniki antyodżywcze występujące w żywności*, [w:] Żuchowski J., Zieliński R. (red.) Ocena Jakości Żywności, Wydawnictwo Naukowe Instytutu Technologii Eksploatacji-PIB, Radom, 190-199.
115. Noonan S.C., Savage G.P. (1999), *Oxalate content of foods and its effect on humans*, Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 8(1), 64-74.
116. Oi Y., Hou I.-C., Fujita H., Yazawa K. (2012), *Antiobesity effects of chinese black tea (Pu-erh tea) extract and gallic acid*, Phytotherapy Research, 26, 475-481.
117. Ostadalova M., Tremlova B., Straka I., Bartl P. (2014), *Wpływ przechowywania na zawartość teaflawin i tearubigin w herbatach typu oolong*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 5 (96), 217-227.
118. Öksüz N., Saçmacı S. Saçmacı M., Ülgen A. (2019), *A new fluorescence reagent: Synthesis, characterization and application for speciation of arsenic (III)/(VI) species in tea samples*, Food Chemistry, 270, 579-584.
119. Pedan V., Rohn S., Holinger M., Hühn T., Chetschik I. (2018), *Bioactive Compound Fingerprint Analysis of Aged Raw Pu'er Tea and Young Ripened Pu'er Tea*, Molecules, 23, 1931.
120. Pei S., Zhang Y., Xu H., Chen X., Chen S. (2011), *Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by Pu-erh tea extracts*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 9927-9934.
121. Peng C.-X., Wang Q.-P., Liu H.-R., Gao B., Sheng J., Gong J. (2013), *Effects of Zijuan pu-erh tea theabrownin on metabolites in hyperlipidemic rat feces by Py-GC/MS*, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 104, 226-233.
122. Piotrowska M. (2017), *Pleśnie w żywności trudny przypadek*, Przemysł Spożywczy, 11(71), 20-23.
123. Piskula P., Astel A. (2017), *Rola suplementacji w zbilansowanym żywieniu człowieka. Cz. 2, Charakterystyka oraz skład jonowy ekstraktów z herbat*, LAB, 5, 16-23.
124. Pong Ch. K. (2006), *First step to Chinese Puerh Tea*, Wushing Books Publication, Tajpej.

- 125.Roda G., Marinello C., Grassi A., Picozzi C., Aldini G., Carini M., Regazzoni L. (2019), *Ripe and Raw Pu-erh Tea: LC-MS Profiling, Antioxidant Capacity and Enzyme Inhibition Activities of Aqueous and Hydro-Alcoholic Extracts*, *Molecules*, 24 (473), 1-16.
- 126.Rusinek E. (2012), *Evaluation of soluble oxalates content in infusions of different kinds of tea and coffee available on the polish market*, *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 63(1), 25-30.
- 127.Sabarwal A., Kumar K., Singh R.P. (2018), *Hazardous effects of chemical pesticides on human health – Cancer and other associated disorders*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103-114.
- 128.Saha R.K., Takahashi T., Kurebayashi Y., Fukushima K., Minami A., Kinbara N., Ichitani M., Sagesaka Y.M., Suzuki T. (2010), *Antiviral effects of strictinin on influenza virus replication*, *Antiviral Research*, 88 (1), 10-18.
- 129.Sano M., Takenaka Y., Kojima R., Saito S.-I., Tomita I., Katou M., Shibuya S. (1986), *Effects of Pu-erh tea on lipid metabolism in rats*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34 (1), 221-228.
- 130.Schwartz J.C., Cech T.R., Parker R.R. (2015), *Biochemical Properties and Biological Functions of FET Proteins*, *Annual Review of Biochemistry*, 84, 355-379.
- 131.Shan J., Wang X., Russel M., Zhao J. (2017), *Rapid determination of flavonoids in green tea by synchronous fluorescence spectra coupled with chemometrics*, *Spectroscopy Letters*, 50(9), 501-506.
- 132.Shan J., Wang X., Zhou H., Han S., Al Riza D.F., Kondo N. (2018), *Variable Selection based on Clustering Analysis for Improvement of Polyphenols Prediction in Green Tea Using Synchronous Fluorescence Spectra*, *Methods and Applications in Fluorescence*, 6(2), 025006.
- 133.Sikorska E. (2012), *Metody fluorescencyjne w ocenie jakości żywności*, *Zeszyty Naukowe/Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*, 234, 59-75.
- 134.Sikorska E., Khmelinskii I., Sikorski M. (2019), *Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation*, [w:] Zhong J., Wang X. (red.), *Evaluation Technologies for Food Quality*, Woodhead Publishing, Sawston, 491-533.
- 135.Słowikowska A., Toczyłowska B., Cichoń R., Hendzel P. (2016), *Metabolomika – chemiczny „odcisk palca” i istotny element medycyny spersonalizowanej*, *Folia Cardiologica*, 11(4), 353-358.

136. Song J.-H., Miyazaki H., Yoshida S. (2017), *Simple Method for the Preparation of Teadenols A and B by a Combined Process of Submerged Culture with Aspergillus sp. and Chromatographic Separation*, Food Science and Technology Research, 23 (1), 91-100.
137. Stagg G.V., Swaine D. (1971), *The identification of theogallin as 3-galloylquinic acid*, Phytochemistry, 10, 1671-1673.
138. Stodt U., Engelhardt U.H. (2013), *Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20 years*, Food Research International, 53, 636-648.
139. Sun L., Gidley M.J., Warren F.J. (2017), *The mechanism of interactions between tea polyphenols and porcine pancreatic alpha-amylase: Analysis by inhibition kinetics, fluorescence quenching, differential scanning calorimetry and isothermal titration calorimetry*, Molecular Nutrition, 61(10), 1700324.
140. Su X.-Q., Zhang G.-J., Ma Y., Chen M., Chen S.-H., Duan S.-M., Wan J.-Q., Hashimoto F., Lv H.-P., Li J.-H., Lin Z., Zhao M. (2016), *Isolation, Identification, and Biotransformation of Teadenol A from Solid State Fermentation of Pu-erh Tea and In Vitro Antioxidant Activity*, Applied Sciences, 6, 161.
141. Śmiechowska M. (2013), *Autentyczność jako kryterium zapewnienia jakości żywności*, Annales Academiae Medicae Gedanensis, 43, 175-181.
142. Śmiechowska M. (2014), *Zapewnienie autentyczności i wiarygodności produktom regionalnym i tradycyjnym*, Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu, 16 (3), 282-287.
143. Śmiechowska M., Dmowski P., Karwowska K. (2015), *Sensory characterization of pu-erh tea beverages*, Joint Proceedings, 89, 5-14.
144. Tang G.Y., Zhao C.N., Xu X.Y., Gan R.Y., Cao S.Y., Liu Q., Shang A., Mao Q.Q., Li H.B. (2019), *Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of 30 Chinese Teas*, Antioxidants, 8, 180.
145. Tang H., Cui F., Li H., Huang Q., Li Y. (2018), *Understanding the inhibitory mechanism of tea polyphenols against tyrosinase using fluorescence spectroscopy, cyclic voltammetry, oximetry, and molecular simulations*, RSC Advances, 8, 8310-8318.
146. Tan J., Engelhardt U.H., Lin Z., Kaiser N., Maiwald B. (2017), *Flavonoids, phenolic acids, alkaloids and theanine in different types of authentic Chinese white tea samples*, Journal of Food Composition and Analysis, 57, 8-15.
147. Tan X., Li Q., Yang J. (2020), *CdTe QDs based fluorescent sensor for the determination of gallic acid in tea*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 224, 117356.

148. Tao M.-K., Xu M., Zhu H.-T., Cheng R.-R., Wang D., Yang C.-R., Zhang Y.-J. (2014), *New Phenylpropanoid-Substituted Flavan-3-ols from Pu-er Ripe Tea*, *Natural Product Communications*, 9 (8), 1167-11-70.
149. Tian J.Q., Zhu Z.X., Wu B., Wang L., Liu, X.Z. (2013), *Bacterial and fungal communities in pu er tea samples of different ages*, *Journal of Food Science*, 78(8), 1249-1256.
150. Tomczyk R. (2009), *Zapiski o herbacie*, Wydawnictwo Fu Kang, Warszawa.
151. Tomin V.I. (2010), *Physical Principles Behind Spectroscopic Response of Organic Fluorophores to Intermolecular Interactions*, [w:] Demchenko A. (red.), *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I. Springer Series on Fluorescence (Methods and Applications) vol 8*, Springer, Berlin, 189-223.
152. Wachira F.N., Kamunya S., Karori S., Chalo R., Maritim T. (2013a), *The Tea Plants: Botanical Aspects*, [w:] Preedy V.R. (red.), *Tea in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Londyn, 3-17.
153. Wachira F.N., Karori S., Kerio L.C., Wanyoko J.K. (2013b), *Cultivar Type and Antioxidant Potency of Tea Product*, [w:] Preedy V.R. (red.), *Tea in Health and Disease Prevention*, Academic Press, Londyn, 41-57.
154. Wang C., Zhang C.X., Shao C.F., Li C.W., Liu S.H., Peng X.P., Xu Y.Q. (2016), *Chemical Fingerprint Analysis for the Quality Evaluation of Deepure Instant Pu-erh Tea by HPLC Combined with Chemometrics*, *Food Analytical Methods*, 9, 3298-3309.
155. Wang D., Meng J., Gao H., Xu K., Xiao R., Zhong Y., Luo X., Yao P., Yan H., Liu L. (2013), *Evaluation of reproductive and developmental toxicities of Pu-erh black tea (Camellia sinensis var. assamica) extractin Sprague Dawley rats*, *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 90–198.
156. Wang F., Gong J., Ren Y., Zhang J. (2017a), *Eco-dyeing with biocolourant based on natural compounds*, *Royal Society Open Science*, 5, 171134.
157. Wang Q., Belščak-Cvitanović A., Durgo K., Chisti Y., Gong J., Sirisansaneeyakul S., Komes D. (2018a) *Physicochemical properties and biological activities of a high-theabrownins instant Pu-erh tea produced using Aspergillus tubingensis*, *LWT- Food Science and Technology*, 90, 598-605.
158. Wang T., Li X., Yang H., Wang F., Kong J., Qiu D., Li Z. (2018b), *Mass spectrometry-based metabolomics and chemometric analysis of Pu-erh teas of various origins*, *Food Chemistry*, 268, 271-278.

159. Wang Q., Guan W.B., Wong M.H.G., Ranjitkar S., Sun W.N., Pan Y., El-Kassaby Y.A., Shen L.X. (2017b), *Tree size predicts vascular epiphytic richness traditional cultivate tea plantations in Southwestern China*, *Global Ecology and Conservation*, 10, 147-153.
160. Wang X., Wan X., Hu S., Pan C. (2008), *Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms*, *Food Chemistry*, 107, 1086-1091.
161. Wu E., Zhang T., Tan C., Peng C., Chisti Y., Wang Q., Gong J. (2019), *Theabrownin from Pu-erh tea together with swinging exercise synergistically ameliorates obesity and insulin resistance in rats*, *European Journal of Nutrition*, 4 lipiec.
162. Wulandari R.A., Amano M., Yanagita T., Tanaka T., Kouno I., Kawamura D., Ishimaru K. (2011), *New phenolic compounds from Camellia sinensis L. leaves fermented with Aspergillus sp.*, *Journal of Natural Medicines*, 65, 594-597.
163. Wu S.-C., Yen G.-C., Wang B.-S., Chiu C.-K., Yen W.-J., Chang L.-W., Duh P.-D. (2007), *Antimutagenic and antimicrobial activities of Pu-erh tea*, *LWT*, 40, 506-512.
164. Wu Y., Lv S., Wang C., Gao X., Li J., Meng Q. (2016), *Comparative analysis of volatiles difference of Yunnan sun-dried Pu-erh green tea from different tea mountains: Jingmai and Wuliang mountain by chemical fingerprint similarity combined with principal component analysis and cluster analysis*, *Chemistry Central Journal*, 10, 11.
165. Xie G., Ye M., Wang Y., Ni Y., Su M., Huang H., Qiu M., Zhao A., Zheng X., Chen T., Jia W. (2009), *Characterization of Pu-erh Tea Using Chemical and Metabolic Profiling Approaches*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3046-3054.
166. Xue J., Yang L., Yang Y., Yan J., Ye Y., Hu C., Meng Y. (2020), *Contrasting microbiomes of raw and ripened Pu-erh tea associated with distinct chemical profiles*, *LWT – Food Science and Technology*, 124, 109147.
167. Yagi K., Goto K., Nanjo F. (2009), *Identification of a Major Polyphenol and Polyphenolic Composition in Leaves of Camellia irrawadiensis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(11), 1284-1288.
168. Yamazaki K., Murakami T., Okada N., Terai H., Miyase T., Sano M. (2013), *Fluorescence Characteristics of Pu-erh Tea*, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 60(2), 87-95.
169. Yang D., Hwang L.S. (2006), *Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in pu-erh tea*, *Journal of Chromatography A*, 1119, 277–284.
170. Yang T.T., Koo M.W. (1997), *Hypocholesterolomic effects of Chinese tea*, *Pharmacological Research*, 35(6), 505-512.

171. Yang X. R., Ye C. X., Xu J. K., Jiang, Y. M. (2007), *Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in Camellia sinensis, Camellia ptilophylla and Camellia assamica var. kucha by HPLC*, Food Chemistry, 100, 1132–1136.
172. Yu Y., Hayashi S., Cai X., Feng C., Shi W., Tsutsui H., Sheng J. (2014), *Pu-erh Tea Extract Induces the Degradation of FET Family Proteins Involved in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis*, BioMed Research International, 2014, 254680.
173. Yu Y., Luo X., Wang X., Sun Z., Song C., You J. (2018), *A novel high-performance liquid chromatography-fluorescence analysis coupled with in situ degradation-derivatization technique for quantitation of organophosphorus thioester pesticide residues in tea*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410, 6911-6922.
174. Zhang H.J., Gao P.F., Guo X.F., Wang H. (2013a), *Simultaneous determination of selenium containing amino acids and their sulfur-analogues in green tea and gynostemma pentaphyllum infusion with high performance liquid chromatography based on fluorescence labeling*, Microchemical Journal, 110, 192-197.
175. Zhang J. (2014), *Puer Tea. Ancient Caravans and Urban Chic*, University of Washington Press, Seattle & Londyn.
176. Zhang L., Li N., Ma Z.Z., Tu P.F. (2011), *Comparison of the Chemical Constituents of Aged Pu-erh Tea, Ripened Pu-erh Tea, and Other Teas Using HPLC-DAD-ESI-MSⁿ*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 8754-8760.
177. Zhang L., Shao W.-F., Yuan L.-F., Tu P.-F., Ma Z.-Z. (2012), *Decreasing pro-inflammatory cytokine and reversing the immunosenescence with extracts of Pu-erh tea in senescence accelerated mouse (SAM)*, Food Chemistry, 135, 2222-2228.
178. Zhang L., Zhang Z.-Z., Zhou Y.-B., Ling T.-J., Wan X.-C. (2013b), *Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities*, Food Research International, 53, 600-607.
179. Zhang Y., Skaar I., Sulyok M., Liu X., Rao M., Taylor J.W. (2016), *The Microbiome and Metabolites in Fermented Pu-erh Tea as Revealed by High-Throughput Sequencing and Quantitative Multiplex Metabolite Analysis*, PLoS ONE, 11(6).
180. Zhao H., Yu C., Li M. (2017), *Effects of geographical origin, variety, season and their interactions on minerals in tea for traceability*, Journal of Food Composition and Analysis, 63, 15-20.
181. Zhao L., Jia S., Tang W., Sheng J., Luo Y. (2011a), *Pu-erh Tea Inhibits Tumor Cell Growth by Down-Regulating Mutant p53*, International Journal of Molecular Science, 12, 7581-7593.

- 182.Zhao Y., Chen P., Lin L., Harnly J.M., Yu L., Li Z. (2011b), *Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green pu-erh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS*, Food Chemistry, 126(3), 1269-1277.
- 183.Zhao X., Qian Y., Zhou Y.-L., Wang R., Wang Q., Li G.-J. (2014), *Pu-erh Tea Has In Vitro Anticancer Activity in TCA8113 Cells and Preventive Effects on Buccal Mucosa Cancer in U14 Cells Injected Mice In Vivo*, Nutrition and Cancer, 66(6), 1059-1069.
- 184.Zhiguo S., Chunhua Z., Jiye Q., Hongping M. (2019), *Isolation of Tea Brown Pigment from Pu'er Tea and Its Balance of Human Metabolic Function*, Med SBE 2019, 39-44.
- 185.Zhou B., Ma C., Ren X., Xia T., Li X., Wu Y. (2019), *Production of theophylline via aerobic fermentation of pu-erh tea using tea-derived fungi*, BMC Microbiology, 19, 261.
- 186.Zhou B., Ma C., Ren X., Xia T., Zheng C., Liu X. (2020a), *Correlation analysis between filamentous fungi and chemical compositions in a pu-erh type tea after a long-term storage*, Food Science and Nutrition, 8, 2501-2511.
- 187.Zhou B., Ma C., Wang H., Xia T. (2018), *Biodegradation of caffeine by whole cells of tea-derived fungi Aspergillus sydowii, Aspergillus niger and optimization for caffeine degradation*, BMC Microbiology, 18, 53.
- 188.Zhou B., Ma C., Xia T., Li X., Zheng C., Wu T., Liu X. (2020b), *Isolation, characterization and application of theophylline-degrading Aspergillus fungi*, Microbial Cell Factories, 19, 72.
- 189.Zhou B., Yang L., Liu Z.-L. (2004), *Strictinin as an efficient antioxidant in lipid peroxidation*, Chemistry and Physics of Lipids, 131(1), 15-25.
- 190.Zhou L., Wu F., Jin W., Yan B., Chen X., He Y., Yang W., Du W., Zhang Q., Guo Y., Yuan Q., Dong X., Yu W., Zhang J., Xiao L., Tong P., Shan L., Efferth T. (2017), *Theabrownin Inhibits Cell Cycle Progression and Tumor Growth of Lung Carcinoma through c-myc-Related Mechanism*, Frontiers in Pharmacology, 8, 75.
- 191.Zhou Z.-H., Zhang Y.-J., Xu M., Yang C.-R. (2005), *Puerins A and B, Two New 8-C Substituted Flavan-3-ols from Pu-erh Tea*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 8614-9617.

Akty prawne

1. Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z 28 stycznia 2002 r ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (z późn. zm.), Dz.Urz. UE L31/1 z 01.02.2002.

Normy

1. ISO 14502-1:2005, *Determination of substances characteristic of green and black tea – Part 1: Content of total polyphenols in tea – Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.*
2. PN-EN ISO 6887-4:2017-05, *Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Przygotowanie próbek do badań, zwiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych – Część 4: Specyficzne zasady przygotowania próbek produktów różnorodnych.*
3. PN-ISO 21527-2:2009, *Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni – Część 2: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95.*
4. PN-ISO 3720:1997, *Herbata czarna. Definicja i podstawowe wymagania.*
5. PN-ISO 6078:1996, *Herbata czarna – terminologia.*

Zgłoszenia patentowe:

1. Kler A. Zenger R., Dimpfel W. (2014), Tłumaczenie patentu europejskiego pt. Zastosowanie teogaliny do leczenia umysłowych zaburzeń zdolności do koncentracji, depresji i demencji, Plantextrakt GmbH&Co. Kg, nr PL/EP 2066314 z dnia 30.05.2014 r

Dokumenty elektroniczne

1. CBI (2016), *CBI Product Factsheet: Tea in Poland*, https://cbi.eu/sites/default/files/market_information/researches/cbi_2016_-_tea_-_pfs_pl_-_final_draft.pdf, pobrane: 10.02.2020.
2. CIE Draft Standard 014-4.3/E:2007 (2007), *Colorimetry – Part 4: CIE 1976 L*a*b* colour space*, <http://www.unife.it/scienze/astro-fisica/insegnamenti/ottica-applicata/materiale-didattico/colorimetria/CIE%20DS%20014-4.3.pdf>, pobrane: 02.12.2020.
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016), *Report of The Working Group on Climate Change of the FAO Intergovernmental Group on Tea*, <http://fao.org/3/a-i5743e.pdf>, pobrane: 2.06.2018.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018), *Report of Intergovernmental Group of Tea, Current Market Situation and Medium Term Outlook*, <http://fao.org/economic/est/est-commodities/tea/tea-meetings/tea23/en>, pobrane: 5.10.2018.

5. Tea. An INFOCOMM Commodity Profile (2016), *UNCTAD Trust Fund on Market Information on Agricultural Commodities*, United Nations Conference on Trade and Development, New York and Geneva, https://unctad.org/en/PublicationsLibrary/INFOCOMM_cp11_Tea_en.pdf, pobrane: 11.04.2018.

Strony internetowe

1. Bana Tea Company, <https://banateacompany.com>, dostęp: 10.02.2018.
2. China Daily, *Tempest over Tea: What is the true Puer?*, http://chinadaily.com.cn/bizchina/2009-06/15/content_8286028.html, dostęp: 1.02.2020.
3. Cha Wang Shop, <https://chawangshop.com>, dostęp: 11.02.2018.
4. Czas na Herbatę, https://czasnaherbate.net/herbaty-czerwone-c-2_6.html, dostęp: 8.11.2016.
5. Farmerleaf, <https://farmer-leaf.com>, dostęp: 25.08.2019.
6. Flavourful, *The Most Expensive Pu-erh Tea in History*, <https://flavourful.co/blog/the-most-expensive-pu-erh-tea-in-history>, dostęp: 9.02.2020.
7. Herbata-Kawa.pl, <http://herbata-kawa.pl/herbata-czerwona.html>, dostęp: 8.11.2016.
8. Hojo, <https://hojotea.com/indexe.html>, dostęp: 5.02.2020.
9. National public service platform for standards information (China), <http://std.samr.gov.cn>, dostęp: 22.07.2021.
10. Portal Spożywczy, *Rynek kawy w Polsce wart 5,3 mld zł, a herbaty – 2 mld zł*, <http://portalspozywczy.pl/napoje/wiadomosci/rynek-kawy-w-polsce-wart-5-3-mld-zl-a-herbaty-2-mld-zl,140293.html>, dostęp: 6.02.2020.
11. Rapid Alert System of Food and Feed, https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en, dostęp: 25.04.2018.
12. Teachat, *Distinguishing between fake and real 2009 Menghai 7572 901*, <https://teachat.com/viewtopic.php?f=20&t=12141>, dostęp: 10.02.2020.
13. Teaedgemarkets, *Tea as an alternative investment (Part 1)*, <https://theedgemarkets.com/article/tea-alternative-investment-part-1>, dostęp: 9.02.2020.
14. Teasenz, *The 2007 Pu erh Tea Market Crash: The Boom and Bust Revisited*, <https://teasenz.com/chinese-tea/2007-pu-erh-tea-market-crash-boom-bust-crisis-recession.html>, dostęp: 8.02.2020.

15. Teasommelier, *Aged Pu'erh reached a record high price in Hong Kong Autumn auction*, <http://teasommelier.be/aged-puerh-reached-a-record-high-price-in-hong-kong-autumn-auction>, dostęp: 9.02.2020.
16. Teavivre, <https://teavivre.com>, dostęp: 25.08.2019.
17. www.puercn.com, <https://www.puercn.com/puerchazs/peczs/125495.html>, dostęp: 22.07.2021.
18. www.puertea8.com, <http://www.puertea8.com/puerchazhishi/puerchajichu/1834.html>, dostęp: 22.07.2021.

Pobrana grafika

1. Bana Tea Company, <https://banateacompany.com/pages/tea-mastery-pu-erh-teas.html>, pobrano: 10.07.2018.
2. Farmerleaf, <https://farmer-leaf.com>, pobrano: 10.07.2019.
3. Riyang Teayard, <http://riyang-teayard.com/about-tea>, pobrano: 6.05.2019.
4. Teavivre, <https://teavivre.com/info/difference-between-raw-and-ripe-puerh-tea.html>, pobrano: 25.06.2019.
5. Wonders of Yunnan, <http://wondersofyunnan.com/destinations/yunnan/maps>, pobrano: 1.06.2019.

Spis tabel

	Strona
Tab. 2.1 Wygląd suszu i naparów różnych rodzajów herbaty Pu-erh.....	22
Tab. 3.1 Porównanie zawartości wybranych związków w Raw i Ripe Pu-erh.....	32
Tab. 6.1 Charakterystyka herbat sprowadzonych z Chin.....	62
Tab. 6.2 <i>Maocha</i> 2014 r.....	64
Tab. 6.3 Raw Pu-erh 2007 r.....	64
Tab. 6.4 Raw Pu-erh 2003 r.....	65
Tab. 6.5 Raw Pu-erh 1998 r.....	66
Tab. 6.6 Ripe Pu-erh 2010 r.....	66
Tab. 6.7 Ripe Pu-erh 2005 r.....	67
Tab. 6.8 Charakterystyka herbat Pu-erh zakupionych na rynku trójmiejskim.....	67
Tab. 6.9 Pu-erh Superior.....	68
Tab. 6.10 Pu-erh Premium.....	68
Tab. 6.11 Pu-erh firmy Astra.....	69
Tab. 6.12 Pu-erh firmy Haichao.....	69
Tab. 6.13 Pu-erh firmy Mayo.....	70
Tab. 7.1 Porównanie barwy 5-minutowych naparów herbat sprowadzonych z Chin.....	78
Tab. 7.2 Wartości parametrów barwy naparów sprowadzonych bezpośrednio z Chin oraz zakupionych na rynku lokalnym.....	79
Tab. 7.3 Porównanie barwy 5-minutowych naparów herbat zakupionych na rynku lokalnym.....	80
Tab. 7.4 Zawartość wybranych metyloksantyn w 100g produktu.....	96
Tab. 7.5 Zależność między pikami w czasie 5,4 oraz 6,2 minuty w poszczególnych grupach badanego materiału.....	101
Tab. 7.6 Zawartość teogaliny i kwasu galusowego w 100g produktu.....	105
Tab. 7.7 Średnia zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego w mg na 100 ml naparu herbat sprowadzonych z Chin.....	110
Tab. 7.8 Ogólna liczba drożdży i pleśni na powierzchni suszu.....	115
Tab. 7.9 Lokalizacja maksymalnych wartości fluorescencji uzyskanych dla analizowanych związków.....	135

Spis rysunków

	Strona
Rys. 1.1 Klasyfikacja herbat ze względu na proces produkcyjny.....	11
Rys. 2.1 Skrócony proces produkcyjny herbaty Pu-erh z uwzględnieniem różnych jej rodzajów.....	21
Rys. 2.2 Najczęściej spotykane formy po prasowaniu.....	24
Rys. 2.3 Zmiany wyglądu naparu w zależności od okresu przechowywania (od 1 roku do 30 lat).....	26
Rys. 3.1 Przemiany z udziałem teaflawin, tearubigin i <i>theabrownin</i>	31
Rys. 3.2 Struktura chemiczna teadenolu A i teadenolu B.....	37
Rys. 4.1 Wygląd wprasowanego bilecika.....	49
Rys. 6.1 Rejony zbioru surowca do poszczególnych herbat z tabeli 6.1.....	63
Rys. 6.2 Procedura przygotowania rozcieńczeń próbek do oznaczenia ogólnej liczby grzybów metodą posiewu zalewowego.....	74
Rys. 6.3 Wygląd zestawu pomiarowego i wnętrza komory pomiarowej.....	75
Rys. 7.1 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na ich barwę określoną przez parametry L^* , a^* , b^*	82
Rys. 7.2 Zawartość związków polifenolowych dla poszczególnych herbat z uwzględnieniem podziału na grupy: Raw z Chin, Ripe z Chin, herbaty z rynku lokalnego.....	84
Rys. 7.3 Aktywność antyoksydacyjna wszystkich analizowanych naparów herbat względem odczynnika DPPH z uwzględnieniem podziału na grupy: Raw z Chin, Ripe z Chin, herbaty z rynku lokalnego.....	91
Rys. 7.4 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość polifenoli i aktywność antyoksydacyjną.....	94
Rys. 7.5 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość wybranych metyloksantyn.....	100
Rys. 7.6 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość kwasu galusowego oraz teogaliny...108	108
Rys. 7.7 Zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawowego w naparach wszystkich analizowanych herbat z uwzględnieniem podziału na grupy: Raw z Chin, Ripe z Chin, herbaty z rynku lokalnego.....	112

Rys. 7.8 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oraz ogólnej liczby drożdży i pleśni na powierzchni suszu.....	117
Rys. 7.9 Diagramy ilustrujące liczbę wspólnych OTU (operacyjne jednostki taksonomiczne) grzybowych i bakteryjnych dla świeżych liści, surowej i sztucznie postarzonej Pu-erh.....	120
Rys. 7.10 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Grupowania rodzajów herbat ze względu na wszystkie badane czynniki (bez drożdży i pleśni).....	124
Rys. 7.11 Poziomy, hierarchiczny wykres drzewa analizy skupień wybranych zmiennych. Powiązania czynników opisujących poszczególne rodzaje herbat (bez drożdży i pleśni).....	125
Rys. 7.12 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla 2014 Autumn Di Jie Village Old Tree Maocha (Maocha) i 2007 Dai Jia Gong Zhu Raw: Dai princess (Raw 2007).....	127
Rys. 7.13 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla 2003 Xiaguan FT 7623 – 3 Yi Ji Toucha Raw (Raw 2003) i 1998 CNNP Youle Qiaomu Raw Puerh Cake (Raw 1998).....	128
Rys. 7.14 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla 2010 Shuangli Jingmaishan Ripe (Ripe 2010) i 2005 Jinggu Bai Long TF A Grade Zao Xiang Ripe Puerh (Ripe 2005).....	130
Rys. 7.15 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla herbat z herbaciarni.....	131
Rys. 7.16 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla herbat firm Astra i Haichao.....	132
Rys. 7.17 Wybrane widma wzbudzenia-emisji w postaci map konturowych dla herbaty firmy Mayo.....	133

Streszczenie w języku polskim

Historia herbaty Pu-erh sięga kilku tysięcy lat, jednak jej światowa kariera zaczęła się kilkadziesiąt lat temu, a polski konsument zna ją znacznie krócej. Oryginalna Pu-erh była wytwarzana od wieków w kilku chińskich prowincjach w wersji, która jest obecnie znana jako Raw. Na światowym rynku herbata Pu-erh występuje w trzech rodzajach jako Raw, Vintage Raw oraz Ripe. Do tej pory większość polskich konsumentów nie ma wiedzy z jakim rodzajem tej herbaty spotyka się w handlu, gdyż na opakowaniach i etykietach produktów przeznaczonych do sprzedaży takich określeń nie znajdujemy.

Odróżnienie tych rodzajów herbaty Pu-erh nie jest sprawą prostą. Raw Pu-erh jest otrzymywana z zielonej herbaty, która jest poddawana wieloletniemu i naturalnemu procesowi dojrzewania i nosi nazwę Vintage Raw. Jest to wersja tradycyjna tego produktu, najchętniej spożywana w Chinach. Natomiast Ripe Pu-erh poddawana jest procesowi tzw. sztucznego postarzenia, który został wprowadzony w celu skrócenia procesu produkcyjnego. Takie różnice w obróbce technologicznej surowca prowadzą do otrzymania produktów o różnych profilach chemicznych i sensorycznych. Rozróżnienie Raw i Ripe Pu-erh nie jest trudne, jeśli wersja Raw jest stosunkowo młoda. Jednak w przypadku Vintage Raw oraz wysokiej jakości Ripe Pu-erh różnice nie są już tak oczywiste. Potwierdzenie pochodzenia danej herbaty, jej rocznika i typu należy do mistrzów herbaty. Handlowcy dokonujący jej zakupu najczęściej opierają się na opiniach mistrzów, ale od lat poszukuje się metod, które pozwoliłyby określić rodzaj herbaty Pu-erh za pomocą metod instrumentalnych.

Stąd też głównym celem niniejszej pracy była próba określenia parametrów, pozwalających na identyfikację rodzajów herbaty Pu-erh. Celem szczegółowym była ocena jakości herbaty Pu-erh dostępnej na trójmiejskim rynku w aspekcie jej autentyczności, za pomocą wybranych metod analitycznych.

Analiza jakości herbaty Pu-erh zarówno zakupionej w Trójmieście jak i herbaty zakupionej w Chinach polegała na określeniu takich parametrów jak: zawartość związków polifenolowych, zawartość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego oraz wybranych metyloksantyn, oznaczenie parametry barwy, oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej oraz oznaczenie ogólnej liczby grzybów na powierzchni suszu i w naparach. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że herbata Pu-erh dostępna na trójmiejskim rynku, stanowi wersję Ripe Pu-erh. Jest to zatem produkt poddany procesowi sztucznego postarzenia.

W celu zidentyfikowania poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh zaproponowano metodę spektrometrii fluorescencyjnej. Wykazano, że widma fluorescencyjne naparów

herbacianych poszczególnych rodzajów herbaty Pu-erh wykazują pewne różnice, co pozwala na określenie rodzaju produktu oraz potwierdzenie autentyczności. Z kolei przeprowadzona analiza chromatograficzna wykazała, że stosunek zawartości teogaliny do kwasu galusowego może stanowić skuteczne narzędzie, służące do potwierdzania autentyczności rodzajów herbaty Pu-erh. Dotychczasowe badania wykazały, że w produktach tradycyjnych jak Raw Pu-erh, zawartość teogaliny przewyższała oznaczoną zawartość kwasu galusowego. Z kolei surowiec poddany procesowi sztucznego postarzenia, czyli Ripe charakteryzował się większą zawartością kwasu galusowego. Obok metody spektrometrii fluorescencyjnej określenie zawartości teogaliny i kwasu galusowego może być kolejnym narzędziem do badania autentyczności herbaty Pu-erh.

Zaproponowane w pracy metody nie były dotąd wykorzystywane w badaniu autentyczności herbaty Pu-erh. Mogą więc stanowić inspirację dla naukowców do dalszych prac w tym kierunku, bowiem ten obszar wiedzy nie został jeszcze odpowiednio rozpoznany.

Streszczenie w języku angielskim

The history of Pu-erh tea goes back several thousand years but its world career began several decades ago, and the Polish consumer has known it much less. The original Pu-erh has been manufactured for centuries in a few Chinese provinces in which it is known as Raw Pu-erh. On the global market, Pu-erh tea is available in three types: Raw, Vintage Raw and Ripe. Most Polish consumers do not know what type of tea is available in shops, because packages are not labeled with such an information.

It is not easy to distinguish between these types of Pu-erh tea. Raw Pu-erh is obtained from green tea, which undergoes a long and natural maturation process and is called Vintage Raw. It is a traditional version of this product, most often consumed in China. Ripe Pu-erh, on the other hand, undergoes the process of the so-called artificial aging which was introduced to shorten the manufacturing process. Such differences in the technological processing of the raw material lead to the production of tea with different chemical and sensory profiles. Distinguishing Raw and Ripe Pu-erh is not that hard if the Raw version is relatively young. However, in the case of Vintage Raw and high-quality Ripe Pu-erh, the differences are not so obvious. Confirmation of the origin of a given tea, its age, and type should be done by tea masters. While purchasing Pu-erh tea, traders most often rely on the opinions of the tea masters, but instrumental methods allowing determination of the type of Pu-erh tea have been searched for years.

Therefore, the main aim of this study was to determine the parameters that allow the identification of types of Pu-erh tea. The specific aim was to assess the quality of Pu-erh tea available on the Tri-City market in terms of its authenticity, using selected analytical methods.

The analysis of the quality of Pu-erh tea, both purchased in the Tri-City and purchased in China, consisted in determining such parameters as content of polyphenolic compounds, content of soluble oxalic acid and selected methyloxanthines, determination of color parameters, determination of antioxidant activity, and also determination of the total number of fungi on the dried surface and in infusions. On the basis of the obtained results, it was found that Pu-erh tea available on the Tri-City market is the Ripe Pu-erh version. It is therefore a product that has undergone a process of artificial aging.

The method of fluorescence spectrometry was proposed to identify the different types of Pu-erh tea. It has been shown that the fluorescence spectra of tea infusions of particular types of Pu-erh tea showed some differences, which allows for the determination of the type of product and confirmation of its authenticity. In turn, the chromatographic analysis performed

showed that the ratio of theogallin to gallic acid can be an effective tool for confirming the authenticity of Pu-erh tea types. Previous studies have shown that in traditional products such as Raw Pu-erh, the theogallin content exceeded the determined content of gallic acid. In turn, the raw material subjected to the artificial aging process, i.e. Ripe, was characterized by a higher content of gallic acid. In addition to the fluorescence spectrometry method, the determination of theogallin and gallic acid content can be another tool to test the authenticity of Pu-erh tea.

The methods proposed in the study have not been used so far to test the authenticity of Pu-erh tea. As this area has not been fully explored, the results obtained could inspire scientists to conduct further research on Pu-erh tea authenticity.

Dokumentacja pracy

Załącznik 1: Oznaczenie barwy badanych naparów

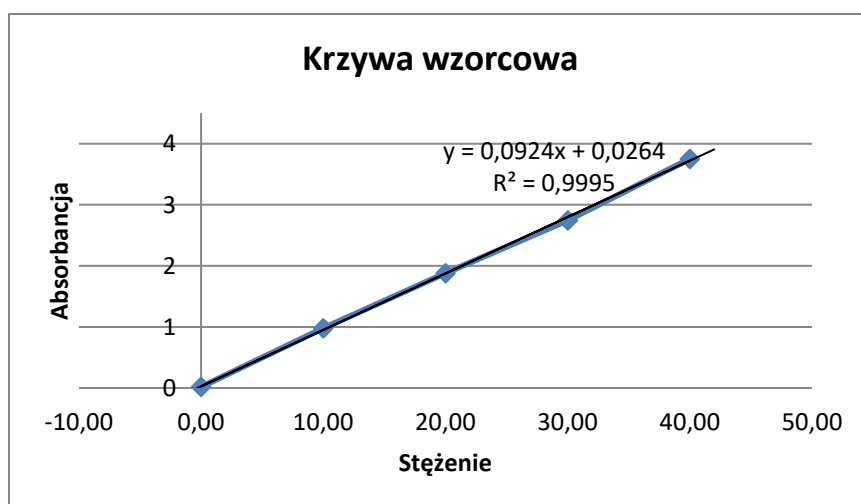
Herbata		L*	Śr.	a*	Śr.	b*	Śr.
Pu-erh (Chiny)	Maocha	41,34	41,67	-1,37	-1,36	6,28	6,28
		41,68		-1,30		6,10	
		41,99		-1,41		6,46	
	Raw 2007	39,70	40,13	0,13	0,13	10,89	10,88
		40,14		0,10		10,41	
		40,55		0,16		11,34	
	Raw 2003	37,75	37,74	2,22	2,21	10,31	10,30
		37,35		2,00		9,74	
		38,12		2,41		10,85	
	Raw 1998	37,50	37,50	2,59	2,58	10,16	10,16
		37,19		2,44		9,71	
		37,81		2,71		10,61	
	Ripe 2010	32,66	32,65	3,15	3,14	3,47	3,47
		32,56		2,89		3,32	
		32,73		3,38		3,62	
Ripe 2005	34,28	34,28	4,01	4,00	5,96	5,96	
	34,18		3,85		5,78		
	34,38		4,14		6,14		
Pu-erh (rynek)	Herb. 1	27,23	27,23	1,17	1,16	2,12	2,11
		27,22		1,09		2,08	
		27,24		1,22		2,13	
	Herb. 2	21,93	21,92	6,25	6,25	4,77	4,76
		21,90		6,27		4,74	
		21,93		6,23		4,77	
	Astra	20,95	20,95	4,32	4,31	3,97	3,97
		20,95		4,21		3,20	
		20,95		4,40		4,74	
	Haichao	22,08	22,08	6,22	6,21	4,72	4,72
		22,09		6,14		4,71	
		22,07		6,27		4,73	
	Mayo	27,76	27,75	2,14	2,13	3,31	3,30
		27,73		2,07		3,28	
		27,76		2,18		3,31	

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

Załącznik 2: Pomiar zawartości związków polifenolowych

Herbata		ABS	ŚL.	Z KRZYWEJ	mg GAE/100ml
Pu-erh (Chiny)	Maocha	2,135	0,031	461,500	463,7
		2,155	0,032	465,818	
		2,146	0,032	463,870	
	Raw 2007	1,722	0,031	372,106	371,4
		1,716	0,032	370,797	
		1,719	0,032	371,446	
	Raw 2003	1,534	0,031	331,413	330,0
		1,520	0,032	328,372	
		1,528	0,032	330,104	
	Raw 1998	1,262	0,021	272,647	271,1
		1,248	0,019	269,639	
		1,255	0,021	271,132	
	Ripe 2010	1,170	0,031	252,626	253,7
		1,180	0,032	254,779	
		1,175	0,032	253,697	
Ripe 2005	0,588	0,031	126,652	124,7	
	0,570	0,032	122,745		
	0,579	0,032	124,693		
Pu-erh (rynek)	Herb. 1	0,941	0,016	203,221	204,1
		0,949	0,016	204,952	
		0,945	0,016	204,087	
	Herb. 2	0,512	0,016	110,364	111,2
		0,520	0,016	112,095	
		0,516	0,016	111,229	
	Astra	0,561	0,016	120,970	121,9
		0,570	0,016	122,918	
		0,565	0,016	121,835	
	Haichao	0,782	0,021	168,751	168,5
		0,780	0,019	168,340	
		0,781	0,021	168,535	
	Mayo	0,447	0,021	96,240	96,1
		0,446	0,019	96,045	
		0,446	0,021	96,024	

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych



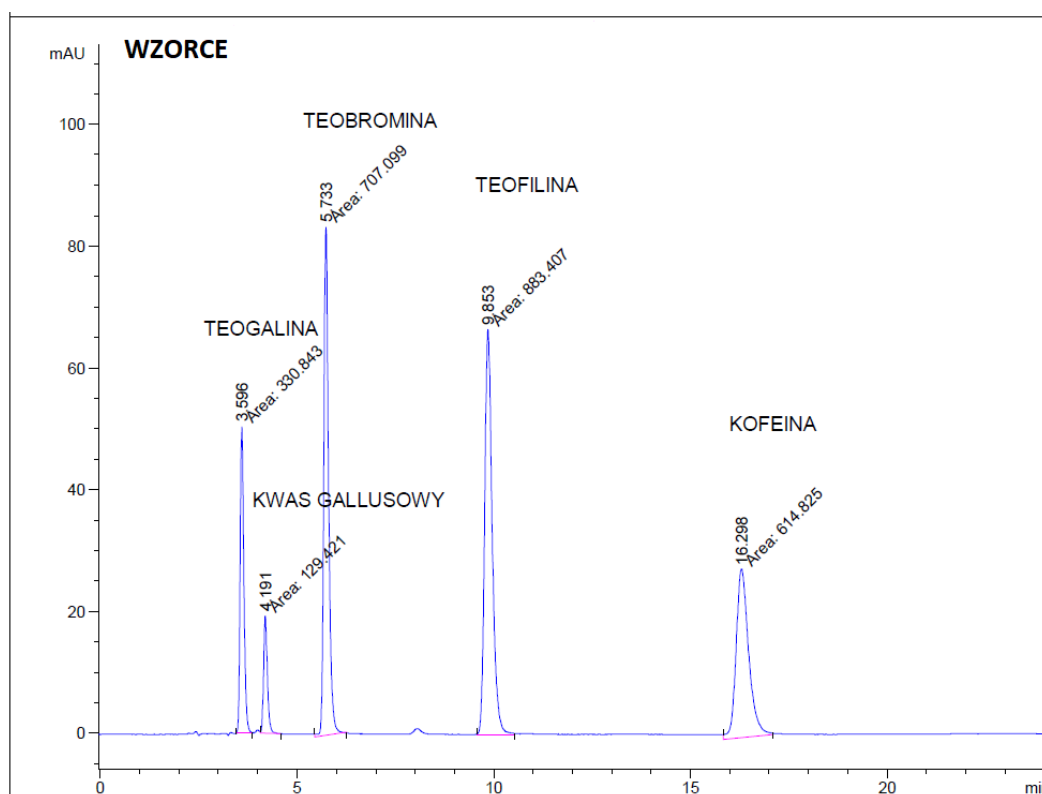
Źródło: opracowanie na podstawie wyników badań własnych

Załącznik 3: Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej

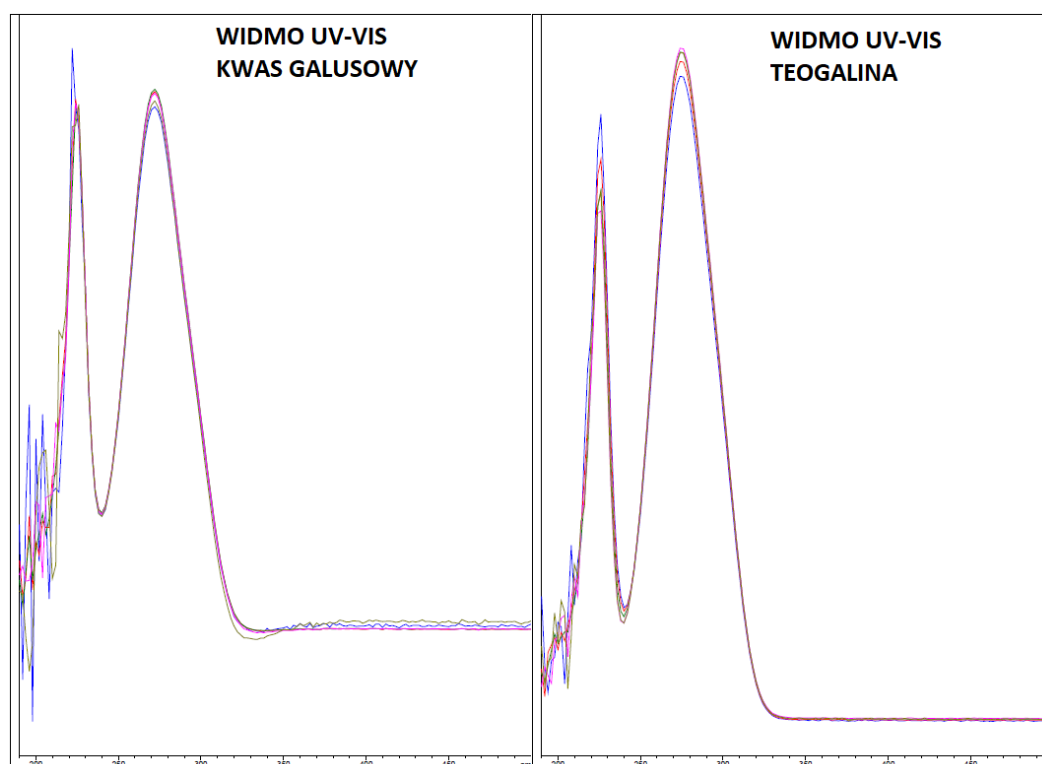
Herbata		DPPH	ABS	CPA (%)	ŚR. CPA (%)
Pu-erh (Chiny)	Maocha	1,154	0,114	90,121	91,1
		1,278	0,102	92,019	
		1,402	0,124	91,155	
	Raw 2007	1,154	0,088	92,374	92,4
		1,278	0,097	92,410	
		1,402	0,107	92,368	
	Raw 2003	1,154	0,094	91,854	92,4
		1,278	0,090	92,958	
		1,402	0,106	92,439	
	Raw 1998	1,358	0,129	90,501	90,5
		1,350	0,129	90,444	
		1,355	0,126	90,701	
	Ripe 2010	1,154	0,151	86,915	87,5
		1,278	0,153	88,028	
		1,402	0,173	87,660	
Ripe 2005	1,154	0,121	89,515	90,1	
	1,278	0,119	90,689		
	1,402	0,139	90,086		
Pu-erh (rynek)	Herb. 1	1,466	0,139	90,518	90,6
		1,452	0,135	90,702	
		1,458	0,136	90,672	
	Herb. 2	1,466	0,158	89,222	89,6
		1,452	0,146	89,945	
		1,458	0,150	89,712	
	Astra	1,466	0,138	90,587	90,2
		1,452	0,149	89,738	
		1,458	0,140	90,398	
	Haichao	1,358	0,150	88,954	88,9
		1,350	0,150	88,889	
		1,355	0,152	88,782	
	Mayo	1,358	0,165	87,850	88,2
		1,350	0,154	88,593	
		1,355	0,160	88,192	

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

Załącznik 4: Oznaczenie zawartości kofeiny, teobrominy, teofiliny, kwasu galusowego i teogaliny



Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych



Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

Załącznik 5: Pomiar zawartości rozpuszczalnego kwasu szczawiowego

Herbata		10 ml	100 ml	(COOH) ₂ w 100 ml	ŚR.	100 g	(COOH) ₂ w 100 g	ŚR.
Puerh (Chiny)	Maocha	2,00	20,00	18,00	18,68	100,00	90,00	93,3
		2,07	20,76	18,69		103,50	93,15	
		2,15	21,50	19,35		107,50	96,75	
	Raw 2007	2,25	22,50	20,25	21,38	112,50	101,25	106,8
		2,37	23,76	21,39		118,50	106,65	
		2,50	25,00	22,50		125,00	112,50	
	Raw 2003	2,60	26,00	23,40	23,85	130,00	117,00	119,25
		2,65	26,50	23,85		132,50	119,25	
		2,70	27,00	24,30		135,00	121,50	
	Raw 1998	3,60	36,00	32,40	31,95	180,00	162,00	159,75
		3,55	35,50	31,95		177,50	159,75	
		3,50	35,00	31,50		175,00	157,50	
	Ripe 2010	5,50	55,00	49,50	50,18	275,00	247,50	250,8
		5,57	55,76	50,19		278,50	250,65	
		5,65	56,50	50,85		282,50	254,25	
	Ripe 2005	4,10	41,00	36,90	37,13	205,00	184,50	185,55
		4,12	41,26	37,14		206,00	185,40	
		4,15	41,50	37,35		207,50	186,75	
Puerh (rynek)	Herbaciarnia 1	5,20	52,00	46,80	47,48	260,00	234,00	237,400
		5,28	52,77	47,49		263,83	237,45	
		5,35	53,50	48,15		267,50	240,75	
	Herbaciarnia 2	2,35	23,50	21,15	21,83	117,50	105,75	109,05
		2,42	24,27	21,84		121,00	108,90	
		2,50	25,00	22,50		125,00	112,50	
	Astra	2,00	20,00	18,00	18,23	100,00	90,00	91,05
		2,02	20,27	18,24		101,00	90,90	
		2,05	20,50	18,45		102,50	92,25	
	Haichao	5,75	57,50	51,75	51,98	287,50	258,75	259,8
		5,77	57,77	51,99		288,50	259,65	
		5,80	58,00	52,20		290,00	261,00	
	Mayo	2,65	26,50	23,85	21,83	132,50	119,25	109,05
		2,42	24,27	21,84		121,00	108,90	
		2,20	22,00	19,80		110,00	99,00	

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych

Załącznik 6: test t-Studenta, miejsce zakupu jako determinant kształtujący jej parametry

Oznaczenia	Średnia		t Stat	df	P(T<=t) dwu- stronny	P(T<=t) jedno- stronny	Odch.std		iloraz F	p
	Próby z Chin	Próby z Polski					Próby z Chin	Próby z Polski		
barwa L*	37,33	23,98	6,6155	9	0,0001	0,0000	2,01	2,33	1,34	0,74
barwa a*	1,78	4,01	-1,7045	9	0,1225	0,0612	3,02	1,11	7,45	0,07
barwa b*	7,84	3,77	2,8351	9	0,0196	0,0098	115,29	44,72	6,65	0,09
związki polifenolowe mgGAE/100ml	302,42	140,39	2,9421	9	0,0164	0,0082	3,62	13,07	13,02	0,01
aktywności antyoksydacyjne CPA %	89,01	83,50	0,9970	9	0,3448	0,1724	11,84	16,09	1,85	0,52
kwas szczawiowy mg/100ml	30,53	32,27	-0,2071	9	0,8405	0,4203	0,00	97891,57	0,00	1,00
drożdże i pleśni jtk/g	0,90	91400,18	-2,3129	9	0,0460	0,0230	98,09	76,32	1,65	0,65
metyloksantyny - teobromina mg/100ml	148,78	61,36	1,6209	9	0,1395	0,0697	9,73	12,42	1,63	0,60
metyloksantyny - teofilina mg/100ml	5,35	10,80	-0,8177	9	0,4347	0,2173	53,17	271,01	25,98	0,00
metyloksantyny - kofeina mg/100ml	508,05	558,26	-0,4483	9	0,6645	0,3323	340,11	12,51	738,54	0,00
kwas galusowy	452,55	26,40	2,7747	9	0,0216	0,0108	62,54	232,46	13,82	0,01
teogalina	142,42	246,46	-1,0618	9	0,3160	0,1580	2,01	2,33	1,34	0,74

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych