

“金花”菌的分离鉴定及其对紫娟红茶发酵品质的影响

周祎炜¹, 燕飞^{1,2,3,4*}, 曲东^{1,2,4}, 李新生^{1,2,3,4}, 谢桐¹, 闫瑞瑞¹, 习林杰^{1,2}, 陈小华^{1,2,3,4}, 赵璇^{1,2,3,4}
(1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000; 3. 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心, 陕西 汉中 723000; 4. 陕西省“四主体一联合”茶产业校企联合研究中心, 陕西 汉中 723000)

摘要: 为探究泾阳散装茯砖茶中“金花”菌的种类及其对紫娟红茶品质的影响, 从泾阳散装茯砖茶中分离得到谢瓦曲霉(*Aspergillus chevalieri*), 并用其对紫娟红茶进行固态发酵。结果表明, 紫娟红茶经发酵后, “金花”菌数量极显著增加, 茶汤色泽由亮黄色变为橙红色; 同时茶多酚、儿茶素、水浸出物、游离氨基酸、茶黄素和茶红素均整体出现不同程度的下降, 而花青素、总黄酮含量整体呈升高的变化趋势。经谢瓦曲霉发酵后的紫娟红茶不仅能有效改善其茶汤色泽滋味, 还可以促进紫娟红茶发酵过程中抗氧化物质的释放。
关键词: 紫娟红茶; 谢瓦曲霉; 散茶发花; 茶叶品质; 抗氧化活性

Isolation and Identification of 'Golden-Flower' Fungus and Its Influence on Fermentation Quality of Zijuan Black Tea

ZHOU Yiwei¹, YAN Fei^{1,2,3,4*}, QU Dong^{1,2,4}, LI Xinsheng^{1,2,3,4}, XIE Tong¹, YAN Ruirui¹,
XI Linjie^{1,2}, CHEN Xiaohua^{1,2,3,4}, ZHAO Xuan^{1,2,3,4}

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, Shaanxi, China; 2. Shaanxi Bio-resources Key Laboratory, Hanzhong 723000, Shaanxi, China; 3. Coordination and Innovation Center for Comprehensive Development of Qinba Biological Resources, Hanzhong 723000, Shaanxi, China; 4. Shaanxi Province 'Four Subjects and One Joint' Tea University & Enterprise Alliance Research Center, Hanzhong 723000, Shaanxi, China)

Abstract: In order to explore the species of 'golden-flower' fungus in bulk Fu brick tea from Jingyang and its effect on the quality of Zijuan black tea, *Aspergillus chevalieri* was isolated from the bulk Fu brick tea from Jingyang and used for solid-state fermentation of Zijuan black tea. The results showed that after fermentation, the number of 'Jinhua' fungus in Zijuan black tea increased significantly. The color of the tea soup has been changed from bright yellow to orange-red, and the levels of tea polyphenols, catechins, water extracts, free amino acids, theaflavins, and thearubins decreased to varying degrees. The content of anthocyanins and total flavonoids increased overall. The Zijuan black tea fermented by *Aspergillus chevalieri* could not only improve the color and taste of the tea soup effectively but also promote the release of antioxidant substances during the fermentation process.

Key words: Zijuan black tea; *Aspergillus chevalieri*; loose tea flowering; quality of tea; antioxidant activity

引文格式:

周祎炜, 燕飞, 曲东, 等. “金花”菌的分离鉴定及其对紫娟红茶发酵品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(5): 44-52.
ZHOU Yiwei, YAN Fei, QU Dong, et al. Isolation and Identification of 'Golden-Flower' Fungus and Its Influence on Fermentation Quality of Zijuan Black Tea[J]. Food Research and Development, 2024, 45(5): 44-52.

基金项目: 陕西省科技厅项目(2021NY-044, 2017ZDXM-NY-032); 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心项目(QBXT-Z(Z)-15-2)

作者简介: 周祎炜(1999—), 男(汉), 在读硕士研究生, 研究方向: 茶叶种植及加工。

*通信作者: 燕飞, 男(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 茶叶种植及加工。

“紫娟”是云南省农科院茶叶研究所于1985年利用云南大叶群体国家级茶树良种单株培育而成,因其芽尖、叶片、茎干、花萼、花梗和茶汤等多为紫红色而得名^[1]。茶树鲜叶常用于制作干茶,具有较高的饮用价值及色素利用价值,其中的花色苷、总黄酮、咖啡因和锌含量均高于大叶茶。此外,大量研究表明,紫娟茶还具有降血压、降血糖、保护肝脏、增强记忆力、影响脂类代谢和抗氧化等作用。但紫娟绿茶汤色偏暗紫,相较于绿茶,紫娟茶鲜叶更适合制作红茶。而高花青素含量又会让茶汤产生涩感,“紫娟”制作的生茶涩感明显、草香强烈,口腔有收敛,相较于其他品种茶叶其品质与饮用口感欠佳。

“金花”菌是茯砖茶“发花”过程中形成的优势菌种,是目前研究较深入的发酵类真菌。茶叶经“金花”菌发酵后,具有改善茶汤滋味与香气、赋予茶叶多种活性生理功能的作用。人们最早从茯砖茶中发现了“金花”菌的存在,研究发现,“金花”菌可以使茶叶在发酵过程中布满金黄色颗粒状的“金花”,赋予茶叶独特的风味与滋味。齐祖同等^[2]从茯砖茶中分离出优势菌株并通过形态学鉴定其为冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*),它的无性型是针刺曲霉(*Asperillus spiculosus* Blaser),异名是冠突曲霉(*A. cristatus* Raper & Fenel)。刘作易等^[3]对不同来源茯砖茶上的“金花”菌进行形态学观察,发现茯砖茶中优势菌种为灰绿曲霉组谢瓦曲霉间型变种(*A. Chevalieri* var. *intermedius* Thom and Raper)。Wang等^[4]通过多重聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)鉴定,从六堡茶中分离鉴定出一株优势菌为谢瓦曲霉。由于相似的特征,且同样都能在茶叶中生长并产生金黄色的闭囊壳,因此,“金花”茶中的金色颗粒数量成为评价“金花”茶感官和品质的重要指标之一。研究发现,传统的茯砖茶与“金花”黑茶相较于普通黑茶,具有更强的抗氧化功效,这也使得“金花”菌在茶叶中的应用逐渐受到关注。现阶段,“金花”菌发酵茶的接种方法主要为自然发花和人工接种发花两种,自然发花多应用于茯砖茶、六堡茶等传统压砖茶的生产,而人工接种发花技术主要以固体发酵菌剂与孢子悬液接种为主,人工发花技术相较于传统的自然发花技术而言,具有污染率低、可控性高、生产周期较短的优点。本研究为降低污染与缩短发酵周期,利用从茯茶中分离得到的“金花”菌,对紫娟红茶进行单菌株固态发酵,探究“金花”菌发酵对紫娟红茶主要成分与活性的影响,以期对紫色茶树资源的深加工及其营养活性功效开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茯砖茶:陕西怡泽茯茶有限公司;紫娟茶鲜叶:采

自陕西省汉中市特殊教育园艺圃试验地茶园并采用传统红茶工艺加工制成。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)、马铃薯葡萄糖肉汤培养基(potato dextrose broth, PDB):北京奥博星生物技术有限责任公司;芦丁、甲醇、磷酸、福林酚、乙腈(均为色谱纯)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]:美国Sigma公司;没食子酸(gallic acid, GA)(纯度≥99%):上海麦克林生化科技有限公司;L-茶氨酸(纯度≥99%):北京百灵威科技有限公司;儿茶素(catechin, C)、表儿茶素(epicatechin, EC)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)、表没食子酸儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、表没食子酸酯儿茶素(epigallocatechin, EGC)、没食子儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate, GCG)、没食子酸儿茶素(gallocatechin, GC)(纯度均≥98%):上海同田生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

H1850R 低温冷冻离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;BH-2 光学显微镜:日本奥林巴斯公司;1260 高效液相色谱仪:美国安捷伦科技有限公司;BMJ-160C 霉菌培养箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂;SW-CJ-2D 型超净工作台:苏州净化设备有限公司;ULD1602012 紫外可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;SMY-2000 色差仪:北京盛名扬科技开发有限公司;JY-6CHZ-1B 型茶叶烘焙机:福建佳友茶叶机械智能科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 “金花”菌的分离纯化、形态学与分子生物学鉴定

“金花”菌的分离纯化、形态学观察以及基因测序参考张月等^[5]的方法。“金花”菌分离于泾阳散装茯砖茶,并命名为JH-1。将纯化菌株接种于PDA培养基,于28℃恒温培养10 d,观察、记录菌落的生长状况,并通过光学显微镜进行形态学观察。系统发育进化树的构建采用邻接法(neighbor-joining algorithm, NJ),选择全部点构建系统树,自展值(Bootstrap)1 000次检验。

1.3.2 孢子悬液制备

取单菌落PDA培养基,在无菌操作条件下,用接种环将黄色闭囊壳刮下,悬浮于150 mL装有玻璃珠的无菌水中,置于摇床1 min使菌均匀分散,调整孢子液浓度为 1×10^8 CFU/mL,将“金花”菌孢子引种至含200 mL液体PDB培养基的锥形瓶中,摇床转速设置为180 r/min,25℃恒温培养7 d,冷藏备用。

1.3.3 紫娟“金花”茶样品的制备

“金花”散茶的制备参考Xu等^[6]的方法并稍作修改,基本工艺流程:紫娟红茶→称样→复水→灭菌(汽

蒸)→接种→发花→干燥→“金花”散茶。

每组取 50 g 紫娟红茶(共 5 组),置于 250 mL 锥形瓶中,121 °C 灭菌 20 min,在室温下放置 30 min 后,使用“金花”菌孢子悬液(接种量为 35%)接种 5 组灭菌紫娟红茶,紫娟红茶组作为对照组进行指标测定。调整含水量至 60%,使茶叶充分湿润,在 28 °C 的霉菌培养箱中进行固态发酵,每 2 d 取出一组。在 60 °C 茶叶烘焙机中干燥 3 h,得到茶样,发酵 10 d 后取出全部样品,分别为紫娟红茶组(对照组)、发酵 0 d 组、发酵 2 d 组、发酵 4 d 组、发酵 6 d 组、发酵 8 d 组、发酵 10 d 组。

1.3.4 发酵茶“金花”菌数量测定

参照 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》中的方法,对各发酵茶样“金花”菌及其他真菌数量进行测定。

1.3.5 发酵茶色差测定

茶汤的制作:取烘干茶样 3 g,加入煮沸蒸馏水 120 mL 冲泡 5 min,趁热过滤,将滤液采用煮沸蒸馏水定容至 150 mL。滤液冷却至室温,用色差仪测定,3 次重复。其中, L^* 值代表明度; a^* 值代表红绿色度,正值表示红色程度,负值表示绿色程度; b^* 值代表黄蓝色度,正值表示黄色程度,负值表示蓝色程度。 ΔE^* 值

代表总色差,它通常是以数值的形式表示的色差,即两种颜色之间的差异程度。

1.3.6 功能成分含量及抗氧化活性的测定

茶多酚、儿茶素含量参考 GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》测定;水浸出物含量参考 GB/T 8305—2013《茶 水浸出物测定》测定;总花青素含量采用酸性乙醇提取并利用分光光度法进行测定^[7];总黄酮含量采用三氯化铝比色法测定;游离氨基酸含量参考 GB/T 8314—2013《茶 游离氨基酸总量的测定》测定;茶色素含量参考红茶色素系统分析法测定。抗氧化活性(DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率)参考张波^[8]的方法进行测定。

1.4 数据处理与分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,采用 Excel 2016 进行数据统计和图表制作。

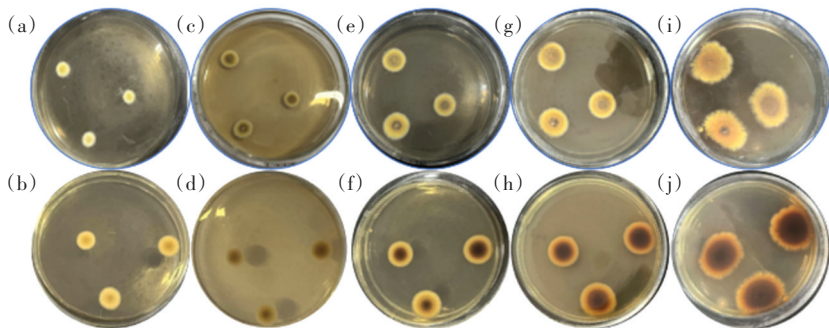
2 结果与分析

2.1 “金花”菌的鉴定结果

2.1.1 菌落形态结构特征

“金花”菌的菌落形态结构特征如图 1 所示。

由图 1 可知,在 PDA 培养基 28 °C 温度下培养



(a)、(b)分别为“金花”菌培养 2 d 的正面、背面;(c)、(d)分别为“金花”菌培养 4 d 的正面、背面;(e)、(f)分别为“金花”菌培养 6 d 的正面、背面;(g)、(h)分别为“金花”菌培养 8 d 的正面、背面;(i)、(j)分别为“金花”菌培养 10 d 的正面、背面。

图 1 “金花”菌的菌落形态

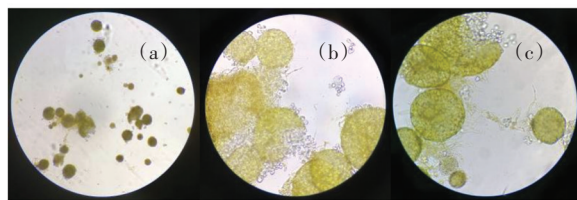
Fig.1 Colony morphology of 'golden-flower' fungus

10 d,前 4 d 菌落生长较平整且分布稀疏,形态为完整的同心圆,颜色整体为浅黄色,由里到外依次为土黄色、白色,菌落中央有棕黄色的菌核,边缘整齐;背面整体为棕黄色,周围呈土黄色,外围呈白色。第 6~10 天,菌落稀疏较平,表面形态变为绒粉状,颜色从内到外变浅,依次为黑棕色、棕色、土黄色,同时产生的菌核颜色明显加深,培养皿出现无色透明水珠;背面整体呈现黑棕色,周围土黄色,菌落中间稍有皱缩。通过菌落形态特征将 JH-1 初步鉴定为曲霉属真菌。

2.1.2 显微镜形态结构特征

菌株在光学显微镜下的形态特征如图 2 所示。

由图 2 可知,JH-1 菌株分生孢子形态呈球形或椭圆形,颜色为暗黄色;子囊果呈球形或近球形,具有丰



(a)PDA、8 d、28 °C、100×;(b)PDA、8 d、28 °C、400×;(c)PDA、10 d、28 °C、400×。

图 2 菌株在光学显微镜下的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of strain under light microscope

富的隔菌丝与子囊果,子囊果相互缠绕,并伴生在菌丝间,内部含有丰富的子囊。随着菌株的生长发育,子囊

果破裂释放出子囊,成熟后释放子囊孢子。结合菌落形态与光学显微镜结果可知 JH-1 菌株为曲霉属真菌,观察结果与黄浩等^[9]的研究结果一致。冠突曲霉、谢瓦曲霉和阿姆斯特丹曲霉在形态特征上类似,均能形成黄褐色闭囊壳^[4]。冠突曲霉和谢瓦曲霉之间的区别仅在于前者真菌子囊孢子凸面较为粗糙而后者较光滑,推测可能与冠突曲霉子囊孢子发育的成熟程度有一定的关系。

2.1.3 内转录间隔(internal transcribed spacer, ITS)序列比对结果与系统发育树

优势菌株 ITS PCR 扩增产物电泳分析及系统发育树如图 3、图 4 所示。

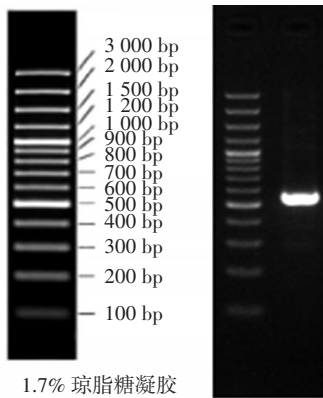


图 3 优势菌株 ITS PCR 扩增产物电泳分析
Fig.3 Electrophoretic analysis of ITS PCR amplification products of dominant strain

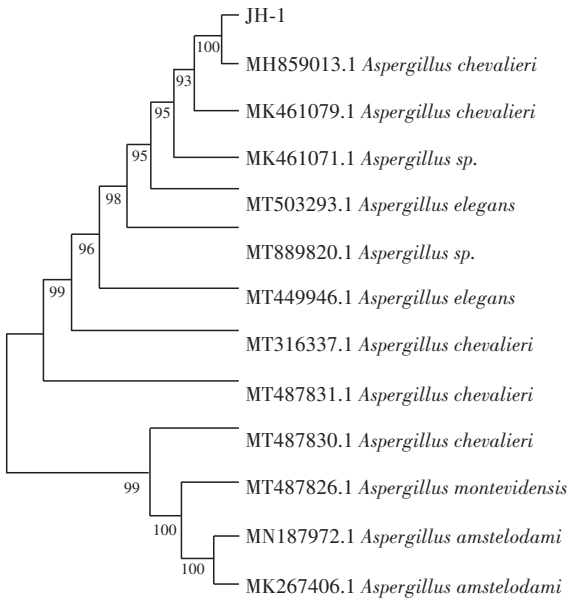


图 4 邻接法构建的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree constructed by adjacent method

由图 3 可知,利用通用引物 NS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增获得菌株内转录间隔区 1 和 2,测序显示,菌

株 PCR 长度为 533 bp,且呈现单一、明亮的条带,表明分离得到的菌株 DNA 纯度较高、无污染。通过 ITS 在 NCBI 上 blast 比对,结果显示,该菌株 JH-1 序列与数据库中谢瓦曲霉、冠突曲霉、阿姆斯特丹等序列同源性达到 99% 以上,然后将 JH-1 菌株基因序列测序结果分别与曲霉属曲霉组内标准菌株的相应序列进行 Clusta W 比对。由图 4 可知,JH-1 菌株与谢瓦曲霉(*Aspergillus chevalieri*)标准菌株 MH859013.1 聚为一支,且自展支持率为 100%。因此,综合菌落形态特征、光学显微结构特征、ITS 区序列比对以及多基因系统发育进化树分析,综合鉴定菌株 JH-1 为谢瓦曲霉。

2.2 发酵茶中“金花”菌数量分析

“金花”菌的数量和质量一般作为判断茯砖茶质量好坏的直接标准。紫娟红茶发酵过程中发花情况及孢子数量见表 1。

表 1 紫娟红茶发酵过程中发花情况及孢子数量
Table 1 Situation of 'flowering' and number of spores during fermentation of Zijuan black tea

项目	发花情况	菌数/(CFU/g)
发酵 0 d 组	无颗粒	0 ^F
发酵 2 d 组	无明显颗粒	(1.50±1.53)×10 ^{1 E}
发酵 4 d 组	有明显白色菌膜生长,无明显颗粒	(2.60±4.04)×10 ^{2 D}
发酵 6 d 组	金花较多,分散分布,颗粒颜色浅黄	(3.50±5.50)×10 ^{3 C}
发酵 8 d 组	金花茂盛,分布较均匀,颗粒金黄	(5.30±1.53)×10 ^{5 B}
发酵 10 d 组	金花茂盛,均匀分布,颗粒金黄饱满	(1.40±5.51)×10 ^{6 A}

注:同列不同字母表示差异极显著($p<0.01$)。

由表 1 可知,发酵 2 d 组谢瓦曲霉菌数量最少,为 15.0 CFU/g,发酵 8 d 组和发酵 10 d 组茶样中谢瓦曲霉数量均达到 10⁵ CFU/g,随着发酵时间的延长,谢瓦曲霉数量呈指数倍增长。紫娟红茶“金花”菌数量超过 2×10⁵ CFU/g,达到 GB/T 32719.5—2018《黑茶 第 5 部分:茯茶》的规定。

2.3 不同发酵阶段茶汤色泽的变化

色差仪通过模拟人眼辨别颜色的过程,利用三变数原理,可以消除在判别颜色的过程中因主观因素造成的误差,对茶汤色泽的测定更加精准^[10]。在紫娟红茶发酵过程中,2 d 取样一次并测定发酵茶汤的色差值。不同发酵阶段茶汤色泽的变化见表 2,不同发酵时间紫娟红茶茶汤见图 5。

由表 2、图 5 可知,对照组茶汤外观亮度 L^* 值为 22.45,显著低于发酵 0、2、4、6 d 组,说明“金花”茶发酵工艺对紫娟红茶汤色色泽的影响明显,原因可能是复水与汽蒸使紫娟红茶中的色素物质浸出和分解,从而导致发酵前期(0~6 d)试验组茶汤亮度 L^* 值显著大于

表2 不同发酵阶段茶汤色差的变化

Table 2 Changes of color difference of tea soup in different fermentation stages

项目	L^* 值	a^* 值	b^* 值	ΔE^* 值
对照组	22.45±0.71 ^e	23.59±0.53 ^e	66.95±0.89 ^a	72.65±0.65 ^a
发酵0 d组	32.55±0.46 ^a	13.20±0.30 ^e	29.24±0.79 ^{ef}	33.11±0.79 ^f
发酵2 d组	31.50±0.46 ^b	12.53±0.21 ^e	30.17±0.42 ^e	34.20±0.60 ^e
发酵4 d组	27.85±0.23 ^c	20.26±0.34 ^d	41.38±0.45 ^d	47.62±0.40 ^d
发酵6 d组	25.21±0.37 ^d	23.27±0.37 ^c	46.58±0.50 ^c	54.14±0.43 ^c
发酵8 d组	16.17±0.35 ^f	30.18±0.28 ^b	28.81±0.18 ^f	45.19±0.23 ^c
发酵10 d组	14.87±0.22 ^s	32.88±0.14 ^a	53.21±0.34 ^b	67.90±0.14 ^b

注:同列不同小写字母表示差异显著($p<0.05$)。



A. 对照组; B. 发酵0 d组; C. 发酵2 d组; D. 发酵4 d组; E. 发酵6 d组; F. 发酵8 d组; G. 发酵10 d组。

图5 不同发酵时间紫娟红茶茶汤

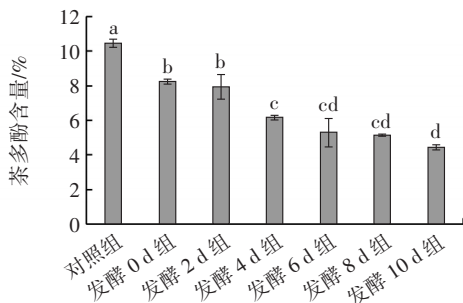
Fig.5 Zijuan black tea soup in different fermentation stages

对照组。随发酵时间的延长, L^* 值下降趋势明显,说明发酵对茶汤亮度变化影响较大,发酵结束时 L^* 值为14.87。对照组红绿色度 a^* 值为23.59,呈亮黄色,显著高于发酵0~4 d组,与发酵6 d组差异不显著。发酵0~2 d, a^* 值降低,随着发酵时间的延长,发酵4~10 d, a^* 值增加,发酵结束时的 a^* 值为32.88,此时的茶汤呈红褐色。 b^* 值代表黄蓝色度,发酵0 d组的 b^* 值为29.24,随着发酵的进行, b^* 值的变化呈现总体波动上升的趋势,发酵结束时 b^* 值增长至53.21。2~4 d和8~10 d的 ΔE^* 值变化较显著,说明这两个时期发酵过程中色素物质变化较剧烈,发酵8~10 d茶汤呈现红褐色,与对照组相比变化明显。

2.4 不同发酵阶段功能成分含量及抗氧化活性分析

2.4.1 茶多酚含量的变化

茶多酚是茶叶中多酚物质的混合物,是茶叶的主要代表物质,同时也是茶叶中涩味的主要来源之一^[11],茶多酚含量影响着茶叶醇和滋味与茶汤色泽的形成。紫娟红茶发酵过程中茶多酚含量的变化见图6。



不同小写字母表示差异显著($p<0.05$)。

图6 紫娟红茶发酵过程中茶多酚含量的变化

Fig.6 Changes of tea polyphenol content during fermentation of Zijuan black tea

由图6可知,在发酵过程中茶多酚含量总体呈下降趋势,与对照组相比,发酵0 d组茶多酚含量显著降低2.2%。可能是因为发酵茶制作过程中,在汽蒸工艺的影响下,高温、高压导致茶多酚在发酵初期发生氧化和分解。与对照组相比,茶多酚含量下降最多的是发酵10 d组,下降了6.01%。这种变化主要是因为谢瓦曲霉在生长代谢过程中分泌出大量多酚氧化酶、过氧化物酶等胞外酶,将茶多酚转化为茶黄素、茶红素等呈色物质;同时,在发酵过程中,由于高湿、高温的作用,茶多酚发生非酶促反应、自动水解等反应,也会导致茶多酚含量的下降。随着发酵程度的加深,紫娟红茶茶多酚含量明显降低,进而使茶汤滋味逐渐醇和、甘厚。

2.4.2 儿茶素含量的变化

儿茶素又称茶单宁,是茶叶中的主要功能成分,占茶叶干物质质量的12%~24%,同时也是茶叶苦涩滋味的主要来源之一^[12]。利用液相色谱法对紫娟红茶发酵过程中的儿茶素单体含量进行测定,结果如表3所示。

由表3可知,部分儿茶素含量出现了不同程度的下降,与对照组相比,发酵10 d组C、EGC、GC、GCG、EGCG含量均显著下降($p<0.05$),降幅分别为69.6%、55.6%、23.2%、41.5%、81.1%,其中EGCG下降最为明显,儿茶素中ECG在发酵过程中降幅最小。非酯型儿茶素与酯型儿茶素比值的大小是影响茶汤滋味品质是否醇和苦涩的重要指标之一,由于微生物强烈的代谢反应,同时在湿热的影响下,导致儿茶素发生氧化和异构化转化等化学反应,从而使大量酯型儿茶素降解为简单儿茶素^[13],发酵10 d组较对照组非酯型儿茶素与酯型儿茶素比值增大了133.2%,二者比值的增大而使发酵茶滋味醇和,苦涩味减轻。

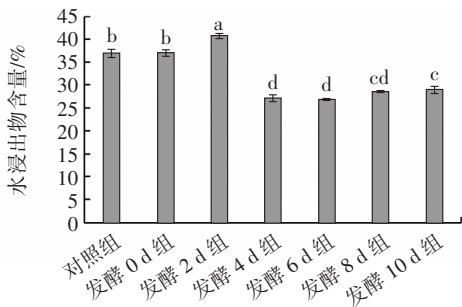
表3 紫娟红茶发酵过程中各类儿茶素含量的变化
Table 3 Changes of catechin content during fermentation of Zijuan black tea

项目	含量/(mg/g)						
	C	EC	ECG	EGC	GC	GCG	EGCG
对照组	2.47±0.01 ^a	0.92±0.01 ^d	2.29±0.01 ^b	3.76±0.06 ^a	0.95±0.06 ^c	1.59±0.01 ^a	5.71±0.06 ^a
发酵0 d组	1.03±0.04 ^b	2.10±0.25 ^b	3.83±0.29 ^a	2.97±0.31 ^b	0.76±0.13 ^d	1.57±0.12 ^a	4.18±0.35 ^b
发酵2 d组	1.03±0.08 ^b	2.30±0.24 ^b	3.91±0.26 ^a	1.48±0.10 ^d	1.12±0.11 ^b	1.15±0.26 ^b	4.50±0.44 ^b
发酵4 d组	1.03±0.06 ^b	1.71±0.01 ^c	4.04±0.06 ^a	1.27±0.01 ^d	1.37±0.01 ^a	1.44±0.22 ^a	3.21±0.19 ^c
发酵6 d组	0.83±0.06 ^c	2.69±0.20 ^a	2.16±0.12 ^b	2.04±0.46 ^c	0.65±0.05 ^d	1.04±0.07 ^b	1.30±0.02 ^d
发酵8 d组	0.81±0.01 ^c	2.72±0.06 ^a	2.25±0.05 ^b	1.96±0.07 ^c	0.78±0.08 ^d	0.97±0.01 ^b	1.14±0.01 ^d
发酵10 d组	0.75±0.01 ^c	1.08±0.03 ^d	2.18±0.08 ^b	1.67±0.07 ^{cd}	0.73±0.04 ^d	0.93±0.02 ^b	1.08±0.01 ^d

注:同列不同小写字母表示差异显著($p<0.05$)。

2.4.3 水浸出物含量的变化

茶叶的滋味通常是由茶多酚、可溶性糖、氨基酸、咖啡碱等水溶性物质构成的一种多味复合体。紫娟红茶发酵过程中水浸出物含量的变化见图7。



不同小写字母表示差异显著($p<0.05$)。

图7 紫娟红茶发酵过程中水浸出物含量的变化
Fig.7 Change of water extract content during fermentation of Zijuan black tea

由图7可知,发酵0~2 d,水浸出物含量显著上升($p<0.05$),这可能是因为微生物在生长过程中,为了满足自身所需不断进行养分摄取,从而促进水溶性物质不断溶出^[14],发酵第4天开始,紫娟红茶中的水浸出物含量开始显著下降,可能是由于随着茶叶中水分含量的减少,谢瓦曲霉由营养生长转为生殖生长,需要大量的营养物质维持自身必须的代谢和繁殖,从而吸收利用紫娟红茶中的水溶性物质^[13]。发花后期(发酵8~10 d)紫娟红茶水浸出物含量变化并不显著,这可能是不溶性物质在多酚氧化酶、纤维素酶的作用下分解浸出,与谢瓦曲霉生长繁殖所利用的水溶性物质达到了动态的平衡。

2.4.4 总花青素含量的变化

花青素是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,属生物类黄酮化合物,同时也是紫娟红茶苦涩味的来源之一^[15],紫娟红茶则因富含花青素具有很强的抗氧化活性和显著的降血压功效^[16],但花青素含量同样影响着紫娟红茶品质。紫娟红茶发酵过程中总花青素

含量的变化见图8。

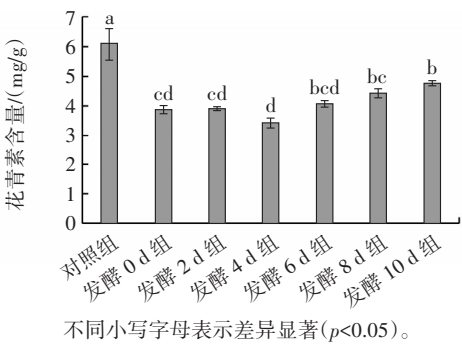


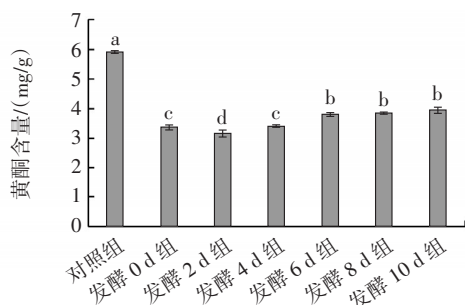
图8 紫娟红茶发酵过程中总花青素含量的变化
Fig.8 Changes of total anthocyanin content during fermentation of Zijuan black tea

由图8可知,在发酵过程中紫娟红茶总花青素含量整体呈现先下降后升高的趋势,与对照组相比,发酵0 d组总花青素含量显著降低约36.63%,降低了2.22 mg/g。可能是发酵茶制作过程中,在汽蒸过程的影响下,由于高温与高压的作用花青素发生了降解。发酵4~10 d,总花青素含量明显升高,出现这种现象主要是因为谢瓦曲霉在生长繁殖过程中分泌的多种胞外酶作用于茶叶细胞壁,改变了其通透性,从而有利于键合态黄酮类化合物的释放^[17]。紫娟红茶经发酵后,花青素在微生物胞外酶的影响下发生降解^[18],含量降低,有助于降低紫娟红茶本身的苦涩味,促进回甘滋味的形成。

2.4.5 总黄酮含量的变化

黄酮类化合物具有柔和的涩感,是茶叶品质的一个重要影响因子^[19],也是茶叶滋味的贡献物之一,具有良好的清除自由基能力,是一种具有良好抗氧化活性的多酚物质^[20],黄酮类物质的变化与紫娟红茶茶汤滋味的醇化和茶汤色泽的形成呈正相关。紫娟红茶发酵过程中总黄酮含量的变化如图9所示。

由图9可知,紫娟红茶经发酵后,茶叶总黄酮含量总体呈下降趋势,与对照组相比,发酵2 d组总黄酮含量降低最多(2.74 mg/g),降幅约为46.77%。发酵8、



不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

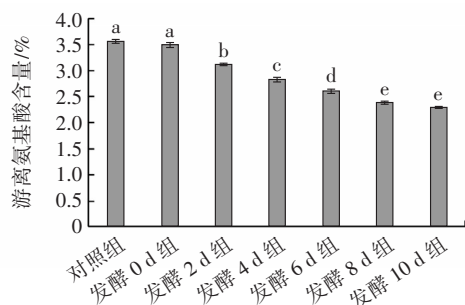
图9 紫娟红茶发酵过程中总黄酮含量的变化

Fig.9 Changes of total flavone content during fermentation of Zijuan black tea

10 d 组分别降低了 35.03%、33.33% (2.06、1.96 mg/g)。发酵 2 d 后,总黄酮含量呈现上升趋势,与发酵 2 d 组相比,发酵 4、6、8、10 d 组均显著增加,其中发酵 10 d 组总黄酮含量增加幅度最大(0.788 mg/g),约为 25.13%。与对照组相比,发酵 0、2、4、6、8、10 d 组总黄酮含量降低的原因一方面可能是汽蒸工艺使黄酮类物质在高温、高压的作用下发生降解,另一方面,紫娟红茶在发酵过程中,谢瓦曲霉分泌多酚氧化酶、过氧化氢酶等蛋白酶,从而导致黄酮类化合物出现降解。发酵 4~10 d 组总黄酮含量出现明显上升的原因可能是谢瓦曲霉生长过程中分泌的胞外酶作用于紫娟红茶细胞壁,增加了细胞壁的通透性,降低了对黄酮类物质溶出的阻碍作用,从而导致总黄酮含量显著增加^[21]。

2.4.6 游离氨基酸含量的变化

游离氨基酸是茶叶滋味和香气形成的重要前体物质,氨基酸含量的增减对茶叶鲜爽味的形成有直接影响^[22]。紫娟红茶发酵过程中游离氨基酸含量的变化见图 10。



不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

图10 紫娟红茶发酵过程中游离氨基酸含量的变化

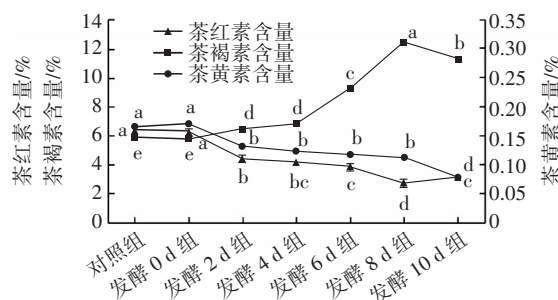
Fig.10 Changes of free amino acid content during fermentation of Zijuan black tea

由图 10 可知,随着发酵时间的延长,游离氨基酸的含量呈下降的趋势,与对照组相比,发酵 2、4、6、8、10 d 组均显著降低($p < 0.05$),其中发酵 10 d 组游离氨

基酸含量下降最多,降幅达到 35%。一方面可能是因谢瓦曲霉在发花期间,生长繁殖过程中利用了茶叶中的氨基酸作为自身所需的氮源物质,从而造成氨基酸含量的显著下降^[23];另一方面,在紫娟红茶发酵过程中,由于温度与湿度的变化,造成氨基酸与其他多酚类物质发生反应从而生成色素类物质或与糖类物质发生美拉德反应,进而导致氨基酸含量的下降^[24]。

2.4.7 茶色素含量的变化

茶色素是茶叶汤色品质形成的关键物质,茶色素分为茶黄素、茶红素及茶褐素,是茶叶中多酚类物质的水溶性氧化产物,是构成茶汤滋味和色泽的重要物质^[25]。紫娟红茶发酵过程中各茶色素含量变化如图 11 所示。



不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

图11 紫娟红茶发酵过程中茶红素及茶褐素动态变化

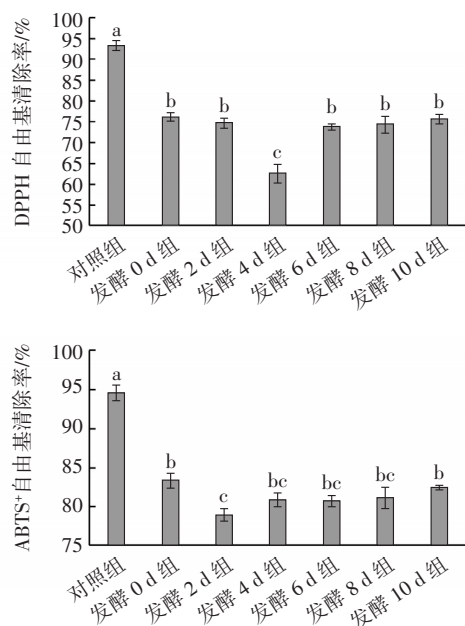
Fig.11 Changes of thearubigins and theabrownin during fermentation of Zijuan black tea

由图 11 可知,随发酵不断进行,茶黄素总量逐渐下降,发酵 0 d 时茶黄素含量为 0.169%,发酵 10 d 后下降至 0.077%,降幅达到 54.4%。茶黄素含量在发酵 0~2 d 和 8~10 d 时下降最为明显。相较于发酵 0 d 组,发酵 10 d 组茶红素含量降低了 3.151%,降幅达到 50.3%,发酵 8~10 d 茶红素含量小幅上升。紫娟红茶发酵 0~8 d 茶褐素含量增加了 5.53%,其中发酵 6~8 d 茶褐素含量增加最为明显,增幅达 33.8%。主要是因为“发花”过程中谢瓦曲霉分泌的胞外酶及湿热作用下,茶色素发生相互转化,在发花后期会因为茶多酚物质氧化形成茶褐素^[26-27],这与 Xiao 等^[28]的研究结果一致。除此之外,谢瓦曲霉在生长繁殖过程中也会利用茶叶中的营养物质进行代谢转化,从而分泌水溶性褐色色素,茶色素的变化有利于紫娟红茶茶汤色泽的形成。紫娟红茶随发酵时间的延长,茶红素及茶黄素会进一步聚合成为茶褐素^[29]。因此茶褐素含量在发酵过程中不断增加,茶黄素与茶红素含量随着发酵程度的加深明显下降。说明发酵期间茶色素含量的变化与微生物的生理活动直接相关。

2.5 紫娟红茶发酵过程中抗氧化活性变化

通过 DPPH 自由基清除率和 ABTS⁺自由基清除率

两个抗氧化活性指标来评价紫娟红茶发酵过程中抗氧化活性的变化,结果如图12所示。



不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。

图12 紫娟红茶发酵过程中对DPPH自由基和ABTS⁺自由基的清除能力

Fig.12 Scavenging capacity of DPPH radicals and ABTS⁺ radicals during fermentation of Zijuan black tea

由图12可知,随着发酵时间的延长,紫娟红茶的两个抗氧化活性指标都呈现先下降后升高的趋势,与对照组相比,发酵0 d组的DPPH自由基清除率和ABTS⁺自由基清除率均显著下降($p < 0.05$),可能由于高温灭菌导致紫娟红茶中的某些抗氧化活性物质急剧降低。在发酵4~10 d时,紫娟红茶的DPPH自由基清除率和ABTS⁺自由基清除率逐渐升高,发酵结束分别达到75.52%和82.39%,说明谢瓦曲霉在发酵紫娟红茶时能较明显提升紫娟红茶的抗氧化活性,其原因可能是谢瓦曲霉发酵过程中,在微生物代谢的作用下,促进了紫娟红茶中总黄酮及花青素等活性物质的转化与浸出^[30],从而提升其抗氧化活性。

3 结论

结合形态学观察与分子生物学鉴定结果发现,从茯茶中分离的“金花”菌属谢瓦曲霉,利用该谢瓦曲霉对紫娟红茶进行单菌株人工接种“发花”处理,结果发现,紫娟红茶“发花”过程中,随着发酵时间的延长,谢瓦曲霉数量极显著增加,发酵8 d后数量与质量均达到茯茶标准;茶汤汤色变化明显,颜色从亮黄转变为橙红,汤色的变化与茶叶中不同茶色素含量的变化结果一致。发酵过程中紫娟红茶茶多酚、儿茶素、水浸出物、游离氨基酸、茶黄素及茶红素均整体出现不同程度

的下降,总花青素、总黄酮等功能性成分含量均整体呈升高的趋势,紫娟红茶DPPH自由基与ABTS⁺自由基清除率呈先降低后升高的变化趋势。研究结果表明,向高花青素、口感苦涩的紫娟红茶中接种谢瓦曲霉,随着谢瓦曲霉的生长、代谢活动以及多种胞外酶的分泌,会促使紫娟红茶内含物质的改变,使得茶叶中的理化成分降解、聚合以及相互转化,进而影响紫娟红茶的品质与活性功能。利用单一“金花”菌发酵紫娟红茶,可以有效避免杂菌污染、缩短发酵周期,通过谢瓦曲霉发酵紫娟红茶不仅可以有效减少其苦涩味成分含量、促进紫娟茶汤色的形成,还可以为紫色茶树资源的利用与“金花”菌在食品及茶叶行业的产品开发提供参考。

参考文献:

- [1] 杨兴荣,包云秀,黄玫.云南稀有茶树品种“紫娟”的植物学特性和品质特征[J].茶叶,2009,35(1):17-18,54.
YANG Xingrong, BAO Yunxiu, HUANG Mei. The botanical and quality characteristics of the tea cultivar 'zi-juan' in Yunnan Province[J]. Journal of Tea, 2009, 35(1): 17-18, 54.
- [2] 齐祖同,孙曾美.茯砖茶中优势菌种的鉴定[J].真菌学报,1990,9(3):176-179.
QI Zutong, SUN Zengmei. Identification of predominant species in brick tea[J]. Mycosystema, 1990, 9(3): 176-179.
- [3] 刘作易,秦京,王迺亮.茯砖茶“金花”菌分离及鉴定[J].贵州农学院学报,1990,9(1):69-74.
LIU Zuoyi, QIN Jing, WANG Nailiang. Isolation and identification of 'golden-flower' fungus on the fuzhan tea[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 1990, 9(1): 69-74.
- [4] WANG Z, JIN Q F, LI Q, et al. Multiplex PCR identification of *Aspergillus cristatus* and *Aspergillus chevalieri* in Liupao tea based on orphan genes[J]. Foods, 2022, 11(15): 2217.
- [5] 张月,崔旋旋,刘英学,等.茯砖茶中冠突散囊菌的分离鉴定及其发酵工艺和生物活性研究[J].食品与发酵工业,2020,46(22):202-207.
ZHANG Yue, CUI Xuanxuan, LIU Yingxue, et al. Isolation, identification, fermentation technology and bioactivity of *Eurotium cristatum* in Fuzhuan brick tea[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(22): 202-207.
- [6] XU S, ZHOU Y F, YU L J, et al. Protective effect of *Eurotium cristatum* fermented loose dark tea and *Eurotium cristatum* particle on MAPK and PXR/AhR signaling pathways induced by electronic cigarette exposure in mice[J]. Nutrients, 2022, 14(14): 2843.
- [7] 刘长蛟,郑霞,熊湘炜,等.分光光度法测定黑米花青素方法的建立[J].粮食与油脂,2019,32(1):73-77.
LIU Changjiao, ZHENG Xia, XIONG Xiangwei, et al. Detection of anthocyanin in black rice by spectrophotometry[J]. Cereals & Oils, 2019, 32(1): 73-77.
- [8] 张波.冠突散囊菌固态发酵对葛根黄酮组分及抗氧化活性的影响[D].南京:南京农业大学,2017.
ZHANG Bo. Effects of solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* on flavonoids constituents and antioxidant activities of kudzu root (*Pueraria lobata*) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [9] 黄浩,郑红发,赵熙,等.不同茶类发花茯茶中“金花”菌的分离、鉴定及产黄曲霉毒素分析[J].食品科学,2017,38(8):49-55.
HUANG Hao, ZHENG Hongfa, ZHAO Xi, et al. Identification and

- aflatoxin production of 'golden flora' fungi isolated from fu tea produced from different kinds of tea[J]. Food Science, 2017, 38(8): 49-55.
- [10] 赵飞, 马圣洲, 吴琴燕, 等. 色差法监测红茶发酵适度技术[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 157-160.
- ZHAO Fei, MA Shengzhou, WU Qinyan, et al. Technology of monitoring moderate fermentation of black tea by color difference method[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(10): 157-160.
- [11] 刘武娣, 仇云龙, 黄建安, 等. 冠突散囊菌对发花黑毛茶品质呈味成分的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1554-1560.
- LIU Wuchang, QIU Yunlong, HUANG Jian'an, et al. Studies on *Eurotium cristatum* fungus growing affects quality tasting ingredients of primary dark tea[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(5): 1554-1560.
- [12] 陆昌琪, 毛世红, 童华荣, 等. 儿茶素及其衍生物合成研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 316-326.
- LU Changqi, MAO Shihong, TONG Huarong, et al. Progress in the synthesis of catechin and its derivatives[J]. Food Science, 2018, 39(11): 316-326.
- [13] 罗密, 俞梦瑶, 禹利君, 等. 冠突散囊菌 LJSC.2001 对不同黑毛茶发花品质的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(14): 106-115.
- LUO Mi, YU Mengyao, YU Lijun, et al. Effect of fermentation by *Eurotium cristatum* LJSC.2001 on the fermentation quality of raw dark tea made from different varieties[J]. Food Science, 2023, 44(14): 106-115.
- [14] ZHU Y C, LUO Y H, WANG P P, et al. Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 643-649.
- [15] WANG Q P, PENG C X, GAO B, et al. Influence of large molecular polymeric pigments isolated from fermented Zijuan tea on the activity of key enzymes involved in lipid metabolism in rat[J]. Experimental Gerontology, 2012, 47(9): 672-679.
- [16] GAO X, HO C T, LI X F, et al. Phytochemicals, anti-inflammatory, antiproliferative, and methylglyoxal trapping properties of zijuan tea[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(2): 517-524.
- [17] 顾秋亚, 李姝瑶, 杨文华, 等. 富含黄酮苷元沙棘叶发酵茶的制备及其生物活性[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(24): 118-124.
- GU Qiuya, LI Shuyao, YANG Wenhua, et al. Preparation and activity of the fermented tea of seabuckthorn leaf rich in flavonoid glycosides[J]. Food Research and Development, 2022, 43(24): 118-124.
- [18] AN T T, CHEN M X, ZU Z Q, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal changes in the chemical constituents of instant dark tea during liquid-state fermentation by *Eurotium cristatum*[J]. Food Research International, 2021, 148: 110623.
- [19] GUO X Y, LV Y Q, YE Y, et al. Polyphenol oxidase dominates the conversions of flavonol glycosides in tea leaves[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128088.
- [20] WANG C Z, MEHENDALE S R, CALWAY T, et al. Botanical flavonoids on coronary heart disease[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2011, 39(4): 661-671.
- [21] 尹家全, 刘歆旖, 王兰, 等. 冠突散囊菌发酵罗汉果渣过程中功能性成分及抗氧化活性的变化[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 88-95.
- YIN Jiaquan, LIU Xinyi, WANG Lan, et al. Changes in functional components and antioxidant activity during the fermentation of *Siraitia grosvenorii* pomace by *Eurotium cristatum*[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 88-95.
- [22] 刘亚军, 范明慧, 闫航宾, 等. 黄山毛峰茶呈味物质冲泡浸出与滋味形成的研究[J]. 茶叶通讯, 2023, 50(1): 1-12.
- LIU Yajun, FAN Minghui, YAN Hangbin, et al. Study on flavor substances leaching and taste formation of Huangshan Maofeng tea[J]. Journal of Tea Communication, 2023, 50(1): 1-12.
- [23] 邹金美, 宋宗仁, 蔡咚咚, 等. 冠突散囊菌固体发酵铁观音茶的主要活性成分及其抗氧化性分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 369-375.
- ZOU Jinmei, SONG Zongren, CAI Dongling, et al. Analysis on the main active components and antioxidant activity of tieguanyin tea fermentation by *Eurotium cristatum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 369-375.
- [24] XIAO Y, ZHONG K, BAI J R, et al. The biochemical characteristics of a novel fermented loose tea by *Eurotium cristatum* (MF₈₀₀₉₄₈) and its hypolipidemic activity in a zebrafish model[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 117: 108629.
- [25] 薄佳慧, 宫连瑾, 叶兴妹, 等. 金花白茶加工过程中主要滋味物质的动态变化[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 306-314, 20.
- BO Jiahui, GONG Lianjin, YE Xingmei, et al. Dynamic changes of main quality components in Jinhua white tea processing[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 306-314, 20.
- [26] AN T, WANG Z L, LI G L, et al. Monitoring the major taste components during black tea fermentation using multielement fusion information in decision level[J]. Food Chemistry: X, 2023, 18: 100718.
- [27] 王宇, 胡文忠, 管馨馨, 等. 茯砖茶主要化学成分及其功效研究进展[J]. 大连民族大学学报, 2020, 22(1): 16-20.
- WANG Yu, HU Wenzhong, GUAN Qingxin, et al. Advances in studies on main chemical constituents and their functions of fu brick tea[J]. Journal of Dalian Minzu University, 2020, 22(1): 16-20.
- [28] XIAO Y, HE C, CHEN Y L, et al. UPLC-QQQ-MS/MS-based widely targeted metabolomic analysis reveals the effect of solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* on the dynamic changes in the metabolite profile of dark tea[J]. Food Chemistry, 2022, 378: 131999.
- [29] WANG K B, CHEN Q C, LIN Y, et al. Comparison of phenolic compounds and taste of Chinese black tea[J]. Food Science and Technology Research, 2014, 20(3): 639-646.
- [30] 谢晓娜, 杨郑州, 王建晖, 等. 紫芽茶叶茶花青素研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(11): 204-211.
- XIE Xiaona, YANG Zhengzhou, WANG Jianhui, et al. Research progress on anthocyanins in purple bud tea[J]. Food Research and Development, 2021, 42(11): 204-211.

加工编辑:张昱
收稿日期:2023-08-12