

野化白云黄茶闷黄过程中的品质成分变化及其菌种分离鉴定

刘展良^{1*}, 吴晓蓉¹, 黄溢锯², 黄锡朋², 黄雪雅², 伍锡岳¹, 林月春², 陈玲³, 周巧仪⁴

(1. 广东科贸职业学院餐旅学院, 茶叶研究所, 广东广州 510430) (2. 台山市四九镇瓶山野化白云茶场, 广东台山 529200) (3. 广东省微生物研究所, 广东省微生物分析检测中心, 广东广州 510070)

(4. 广东省农业科学院茶叶研究所, 广东广州 510640)

摘要: 为了掌握野化白云茶树鲜叶加工成黄茶加工过程的影响因素, 该研究对比分析了野化白云茶加工的黄茶、烘青绿茶、半烘半炒绿茶的主要品质成分; 分析了野化白云茶鲜叶加工黄茶过程中的依工艺阶段取 8 个茶样(茶青、杀青叶、揉捻叶、再炒叶(脱水叶)、闷黄 24 h、闷黄 48 h、闷黄 72 h、毛茶)可培养菌种的变化。野化白云茶与烘青绿茶、半烘半炒绿茶比较, 除氨基酸、咖啡碱含量略有下降外, 水浸出物含量分别高出 4.80%、7.11%, 可溶性糖含量分别高出 0.41%、0.36%, 茶多酚含量、儿茶素总含量呈下降趋势, 酯型儿茶素总量下降 21.62 mg/g、19.08 mg/g, EGCG 下降 9.99 mg/g、6.98 mg/g, GCG 下降 14.23 mg/g、13.80 mg/g, 以上成分变化均差异显著 ($p < 0.05$); 非酯型儿茶素组分中除 C 减小 2.49 mg/g、1.75 mg/g ($p < 0.05$) 外, 其余非酯型儿茶素组分和总含量变化差异不显 ($p > 0.05$); 闷黄 24 h, 酵母菌数量明显, 至 72 h 霉菌成优势菌种 (3.5×10^5 CFU/g); 分离鉴定出 8 株微生物, 包括 1 株拟盘多毛孢属, 4 株青霉属, 1 株枝孢属及 2 株酵母菌属, 其中 *Penicillium exsudans* 菌首次从茶叶加工中和茶叶中分离并鉴定。说明闷黄使茶叶水溶性物质、可溶性糖增加, 茶多酚、酯型儿茶素下降, 闷黄阶段有微生物繁殖并参与黄茶品质的形成。

关键词: 白云黄茶; 闷黄; 品质成分; 菌种分离鉴定

文章编号: 1673-9078(2021)12-65-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0200

Changes in Tea Quality Components in the Yellowing Process of Wild Baiyun Yellow Tea and the Isolation and Identification of Microbial Strains

LIU Zhanliang^{1*}, WU Xiaorong¹, HUANG Yiju², HUANG Xipeng², HUANG Xueya², WU Xiyue¹, LIN Yuechun², CHEN Ling³, ZHOU Qiaoyi⁴

(1. Institute of Tea, Cuisine and Tourism College, Guangdong Polytechnic of Science and Trade, Guangzhou 510430, China)

(2. Pingshan Weediness Baiyun Tea Farm, Sijiu Town, Taishan 529200, China) (3. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Detection Center of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

(4. Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to investigate the factors influencing the processing of yellow tea from fresh leaves of wild Baiyun tea species, the main quality components of yellow tea, roasted green tea and half-baked and half-fried green tea processed from wild Baiyun tea were analyzed. The changes of culturable strains in the 8 tea samples (green tea, pan-fried green tea, rolling leaves, refried leaves (dehydrated leaves), leaves with 24 h smothering, leaves with 48 h smothering, leaves with 72 h smothering, and raw tea) withdrawn from the yellow tea processing of the

引文格式:

刘展良, 吴晓蓉, 黄溢锯, 等. 野化白云黄茶闷黄过程中的品质成分变化及其菌种分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 65-71, +39

LIU Zhanliang, WU Xiaorong, HUANG Yiju, et al. Changes in tea quality components in the yellowing process of wild Baiyun yellow tea and the isolation and identification of microbial strains [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 65-71, +39

收稿日期: 2021-02-26

基金项目: 广东省生态型野化茶现代农业科技创新中心(粤科函社农字[2017]1133号)

作者简介: 刘展良(1965-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 茶叶化学、茶叶生物化学, E-mail: 1073777137@qq.com

fresh leaves of wild Baiyun tea were examined. The comparison of the wild Baiyun tea with the baked green tea, and the half-baked and half-fried green tea revealed that in addition to the slight decreases in amino acid and caffeine contents, the wild Baiyun tea had a higher water extract content (increased by 4.80% and 7.11%, respectively), a higher soluble sugar content (increased by 0.41% and 0.36%, respectively), but lower tea polyphenol content and total catechin content (ester-type catechin content decreased by 21.62 mg/g and 19.08 mg/g, EGCG content decreased by 9.99 mg/g and 6.98 mg/g, and GCG content decreased by 14.23 mg/g and 13.80 mg/g, respectively). All these changes were significant ($p < 0.05$). There were no significant changes in the contents of the non-ester catechins and the total content of non-ester catechins, except that C was reduced by 2.49 mg/g and 1.75 mg/g, respectively ($p < 0.05$). After smothering for 24 hours, a significant number of yeast was detected, and fungi became dominant (3.5×10^5 CFU/g) after smothering for 72 hours. Eight microbial strains were isolated and identified, including 1 *Pestalotiopsis* strain, 4 *Penicillium* strains, 1 *Cladosporium* strain and 2 yeast strains, with *Penicillium exsudans* being isolated and identified for the first time from tea processing and tea leaves. The results indicated that smothering of tea increased the water-soluble and soluble sugar contents of tea, decreased the contents of tea polyphenols and ester-type catechins. Microbial reproduction occurred in the yellowing stage and participated in the formation of yellow tea quality.

Key words: Baiyun yellow tea; yellowing process; quality components; isolation and identification of microbial strains

广东省作为我国第一大茶叶消费省、第一大茶叶流通省,同时粤东西北均有野生树种质资源,其中白云茶是广东台山新会一带野生群体种^[1]。广东省农业科学院茶叶研究所于1985年完成两地的茶树资料调查^[2],周顺祥^[3]对台山白云茶等5个品种形态特征差异分析发现云南凤庆种和台山白云茶最相似。当地民众采摘野生白云茶叶加工利用超过300年历史。在上世纪50、60年代国有林场茶场从高海拔山上移植到海拔300 m的茶园,从此白云茶开始被人工种植利用。近年当地茶叶企业为对白云茶树进行无性扦插繁殖取得成功,将其种植在海拔300~500 m临崖山海岸几十公里荒山丛林中,让茶树回归生态自然环境生长,这种茶树为野化白云茶树。

黄茶属中国特有茶类,与绿茶加工比较,其特殊性在揉捻工序后加入闷黄工艺形成了“黄汤黄叶”的品质特征。因而黄茶融合了绿茶和黑茶的品质特征,香气清悦、味厚爽口,及其对胃肠道、消化道疾病有一定的保健护理作用,因而受到消费者的喜爱。国内外喜爱及研究绿茶和红茶的人群占绝大部分,而黄茶在六大茶类中声名不显,加工等研究内容较少,为了发展黄茶,增加对黄茶的研究非常有必要。

将广东特有的野化白云茶叶经过萎凋→杀青→揉捻→再炒(除去部分水分)→闷黄→干燥工艺过程开发出黄茶,并对闷黄过程微生物生长和品质成分变化进行研究,旨在揭示野化白云黄茶品质形成机制和主要成分的变化,推动野化白云黄茶产品标准化生产,形成量产。在国家实施乡村振兴战略的背景下,开展利用对当地特有种质资源创新发展适销、有市场潜力的茶叶产品积极意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

试验材料于2020年4月中旬采自广东省江门市台山市四九镇白云野化茶场无性扦插野化白云茶树,采摘标准为1芽2、3叶。黄茶于2020年4月在台山市四九镇白云野化茶场加工厂进行。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器

HWS-26型电热恒温水浴锅,上海一恒科技仪器有限公司;AE 200型分析天平,上海梅特勒-托利多公司;752N型紫外分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;Agilent 1200系列安捷伦高效液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2.2 主要试剂

福林酚(分析纯),上海麦克林生化科技有限公司;儿茶素类标准品:儿茶素(catechin, C)、表儿茶素(epicatechin, EC)、没食子儿茶素(gallocatechin, GC)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、儿茶素没食子酸酯(catechin gallate, CG)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)、没食子儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate, GCG)及表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG) 8种儿茶素单体,咖啡碱茶氨酸标准品均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 取样流程

鲜叶采回来后,按照以下加工工艺流程进行取样:

采摘鲜叶(样号1)→摊青(萎凋)→杀青(2)→揉捻(3)→再炒(滚炒除水)(4)→闷黄24 h(5)→闷黄48 h(6)

→闷黄 72 h (7) →干燥 (滚炒) (8)

以上各过程分别取样 1200.0 g, 其中 600.0 g 茶样立即在恒温烘箱 110 °C 烘干, 其中, 3 号样直接烘干作为烘青绿茶, 4 号样后烘干作为半炒半烘绿茶, 8 号样为黄茶; 另 600.0 g 茶样装入无菌袋密封置冰箱冷藏, 收集 1~8 号茶样后进行微生物分析。

1.3.2 相关理化指标测定

茶多酚测定按 GB/T 8313-2018 方法, 游离氨基酸含量测定按 GB/T 8314-2013 方法, 可溶性糖含量测定参照 GB 5009.8-2016 第二法进行。

咖啡碱及儿茶素的测定: 采用 HPLC 检测法, 色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱 (5 μm, 250 mm×4.6 mm); 流动相: A 相为乙酸:乙腈:甲醇:水=0.5:1.2:96.5 (V:V:V:V); B 相为乙酸:乙腈:甲醇:水=0.5:10:20:69.5 (V:V:V:V); 流速为 1 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL; 紫外检测波长为 280 nm。梯度洗脱程序如下: 0 min~30 min, 27.5% B~80% B; 30 min~35 min, 80% B~7.5% B; 35 min~0 min, 27.5% B。

1.3.3 微生物分析

1.3.3.1 样品

根据 GB 4789.1-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》中样品的采集规则进行采样。依照 1.3.1 采集黄茶闷黄过程中不同时间段 (闷黄堆表面、堆下 1/4 处、堆中心、堆下 3/4 处、堆底) 8 份冷藏样品, 每份不少于 500 g。

1.3.3.2 主要试剂和仪器

微生物培养所用的培养基由广东环凯微生物科技有限公司生产, 真菌基因组提取试剂盒购自美国 Omega 公司, PCR 扩增试剂购自广州东盛生物科技有限公司, PCR 引物由北京六合华大基因科技有限公司广州分公司合成。

灭菌锅、生化培养箱、PCR 仪、恒温水浴锅、超净工作台、生物安全柜。

1.3.3.3 微生物计数和分离纯化

菌落总数参照 GB 4789.2-2016《食品微生物学检验 菌落总数测定》、霉菌和酵母计数参照 GB 4789.15-2016《食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》。用接种针挑取优势真菌纯化到 CYA 固体培养基上分离纯化, 获得纯种菌株。

1.3.3.4 菌种鉴定

(1) 传统形态学鉴定

将菌株三点接种于 CYA 培养基上, 25 °C 培养 7 d, 观察菌落特征并记录, 利用光学显微镜进行显微形态观察。

(2) 基于 ITS rDNA 序列分析的系统发育方法

采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的 DNA, 具体步骤参照试剂盒说明书。利用引物 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 扩增 ITS rDNA 序列; PCR 扩增条件: 94 °C 预变性, 5 min; 94 °C 变性, 40 s; 56 °C 退火, 45 s; 72 °C 延伸, 45 s; 共进行 30 循环; 最后 72 °C 终延伸, 5 min。扩增产物交付北京六合华大基因科技有限公司广州分公司进行测序分析。最后将所得测序结果提交到 GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行比对, 分析其与数据库中序列的相似性。在采用 MEGA 7.0 进行 Neighbor-Joining 法聚类系统发育及分子进化分析 1000 次重复自检分析。

1.3.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行处理, 用 SPSS 22.0 进行统计分析。运用多重比较 LSD 法对不同处理进行显著性分析, 显著性水平选择 0.05。

2 结果与分析

2.1 黄茶与绿茶的茶多酚含量、儿茶素各组分及总含量比较

野化白云黄茶与同样原料加工的烘青绿茶、半炒半烘绿茶的茶多酚含量、儿茶素各组分及总含量分析结果列于表 1。

从表 1 可知, 野化白云黄茶与烘青、半烘炒绿茶的茶多酚含量比较下降了 4.08%、7.18% 与周继荣等^[4-5]研究鹿苑黄茶加工时闷堆 19.5 h 后, 与鲜叶样相比, 茶多酚含量下降 1.53% (下降率 6.14%) 的结果一致。儿茶素总含量下降 21.70 mg/g、18.48 mg/g 与董占波等^[6]研究平阳黄汤儿茶素总量为的 10.69% 与平阳早香茶 11.50% 比较下降的结果一致。酯型儿茶素总量下降 21.62 mg/g、19.08 mg/g, EGCG 下降 9.99 mg/g、6.98 mg/g, GCG 下降 14.23 mg/g、13.80 mg/g, 都差异性显著, $p < 0.05$ 。非酯型儿茶素, EGC 和 EC 基本保持不变, GC 增加 2.41 mg/g、2.56 mg/g, C 减小 2.49 mg/g、1.75 mg/g, 都有显著性差异, $p < 0.05$; 这样非酯型儿茶素各组分中既有增加的又有减小的, 其总量变化差异性不显著, $p > 0.05$; 与龚永新等^[7]进行鹿苑黄茶加工 12 h 闷黄与不闷黄处理的比较研究得到黄茶中酯型儿茶素 (EGCG) 含量大大降低, 比绿茶少 13.27 mg/g, 而非酯型儿茶素 EC 的含量却明显高于绿茶的结果一致。

表1 黄茶与烘青绿茶、半炒半烘绿茶的茶多酚含量、儿茶素各组分及总含量

Table 1 Contents of tea polyphenols, catechins and total catechin fraction in yellow tea, roasted green tea and semi-roasted green tea

检测指标	烘青绿茶 (3)	半炒半烘绿茶 (4)	黄茶 (8)
茶多酚/%	32.2±0.31 ^a	34.4±0.43 ^b	27.22±0.31 ^a
EGCG/(mg/g)	51.1±1.74 ^a	48.09±0.53 ^b	41.11±0.73 ^c
CG/(mg/g)	9.94±0.79 ^a	10.79±0.06 ^a	12.65±4.18 ^a
GCG/(mg/g)	80.83±3.60 ^b	80.4±1.10 ^b	66.6±0.54 ^a
ECG/(mg/g)	1.43±0.08 ^b	1.46±0.02 ^b	1.31±0.02 ^a
酯型儿茶素/(mg/g)	143.29±6.09 ^b	140.75±1.48 ^b	121.67±5.41 ^a
GC/(mg/g)	5.38±0.11 ^a	5.23±0.20 ^a	7.79±0.35 ^b
EGC/(mg/g)	12.13±0.36 ^a	12.04±0.37 ^a	12.06±0.85 ^a
C/(mg/g)	14.25±0.38 ^a	13.51±0.28 ^b	11.76±0.21 ^c
EC/(mg/g)	6.08±1.24 ^a	6.38±0.45 ^b	6.15±0.11 ^{ab}
非酯型儿茶素/(mg/g)	37.84±0.99 ^a	37.17±0.89 ^a	37.77±0.87 ^a
总儿茶素/(mg/g)	181.13±7.00 ^b	177.91±2.19 ^b	159.43±6.27 ^a

注: 无字母或相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。括弧内数字为茶样号。

表2 黄茶与绿茶的游离氨基酸、咖啡碱、可溶性糖含量分析结果

Table 2 Analysis results of free amino acids, caffeine and soluble sugar in yellow tea and green tea

样品名称(茶样号)	水浸出物/%	氨基酸/%	咖啡碱/%	可溶性糖/%
烘青绿茶 (3)	51.66±0.37 ^a	2.68±0.02 ^a	5.03±0.12 ^a	3.6±0.05 ^a
半炒半烘绿茶 (4)	49.35±0.15 ^b	2.56±0.03 ^b	4.91±0.05 ^a	3.65±0.04 ^a
黄茶(8)	56.46±0.1 ^c	2.52±0.01 ^b	4.86±0.07 ^a	4.01±0.09 ^b

注: 无字母或相同字母表示差异不显著 ($p>0.05$), 不同字母表示差异显著 ($p<0.05$), 括弧内数字为茶样号。

表3 野化白云黄茶加工过程微生物生长变化

Table 3 Microorganism growth during processing of weedness Baiyun yellow tea

样品号	物料状况	菌落总数/(CFU/g)	霉菌计数/(CFU/g)	酵母计数/(CFU/g)
1	茶青	1.0×10^3	4.8×10^3	2.2×10^3
2	杀青叶	35	<10	<10
3	揉捻叶	8.2×10^4	<10	2.6×10^5
4	再炒叶	1.3×10^2	10	<10
5	闷黄 24 h	<10	<10	9.7×10^4
6	闷黄 48 h	1.7×10^2	2.2×10^2	9.3×10^4
7	闷黄 72 h	1.2×10^2	3.5×10^5	1.1×10^4
8	毛茶	<10	10	<10

2.2 黄茶与绿茶的水浸出物、游离氨基酸、咖啡碱、可溶性糖含量比较

野化白云黄茶与同样原料加工的烘青绿茶、半炒半烘绿的游离氨基酸、咖啡碱、可溶性糖含量分析结果列于表2。从表2可知, 与两款绿茶比较, 黄茶的水浸出物分别高出4.80%、7.11%差异性显著, $p<0.05$, 黄茶内含可溶性物质更加丰富; 氨基酸、咖啡碱含量黄茶略有下降, 差异不显著 ($p>0.05$); 黄茶可溶性糖含量发别高出0.41%、0.36%。刘晓慧^[8]利用泰山小津

口茶园黄山群体品种的春季1芽1叶鲜叶为原料加工成黄茶、绿茶比较, 两者品质成分水浸出物含量分别为43.92%、42.38%, 黄茶高出1.54%; 可溶性糖含量分别为4.88%、4.70%, 黄茶高出0.18%, 与本研究结果一致。

2.3 黄茶闷黄过程中微生物变化及分离鉴定

2.3.1 黄茶闷黄过程中微生物数量

黄茶加工过程中微生物类群及数量变化如表3所示, 茶青进行萎凋时从环境感染微生物, 经杀青后, 真菌被杀死, 只少量细菌仍然存在, 闷黄过程微生物

又开始繁殖。从微生物总数变化分析,从再炒叶即是闷黄开始至 24 h,酵母菌数量明显,到了 48 h 细菌和霉菌也增至二次方数量级,至 72 h 霉菌成优势菌种 (3.5×10^5 CFU/g),酵母菌、细菌呈下降趋势。干燥后的毛茶(8号样),细菌和酵母菌已检测不到,可检测 10 CFU/g 霉菌存在。

2.3.2 黄茶闷黄过程中微生物分离鉴定

从工序 4 开始茶样中共分离出 8 株微生物,包括 1 株拟盘多毛孢属,4 株青霉属,1 株枝孢属及 2 株酵母菌,菌株的形态学描述见表 4,从 GenBank 中选取与菌株较近的序列构建系统发育树见图 1。根据菌株的形态学特征与国内外文献进行对比,结合系统发育分析方法,将 8 株分离株鉴定到种水平,从 4 号样分离出 1 株拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis diploclisiae*, 5 号分离到汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*), 6 号分离出 1 株汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 和 1 株青霉属 *Penicillium exsudans*, 7 号样分离得到 1 株短密青霉 (*Penicillium brevicompactum*) 和 1 株青霉属 *Penicillium exsudans*, 8 号样分离出 1

株短密青霉 (*Penicillium brevicompactum*) 和 1 株极细枝孢 (*Cladosporium tenuissimum*)。

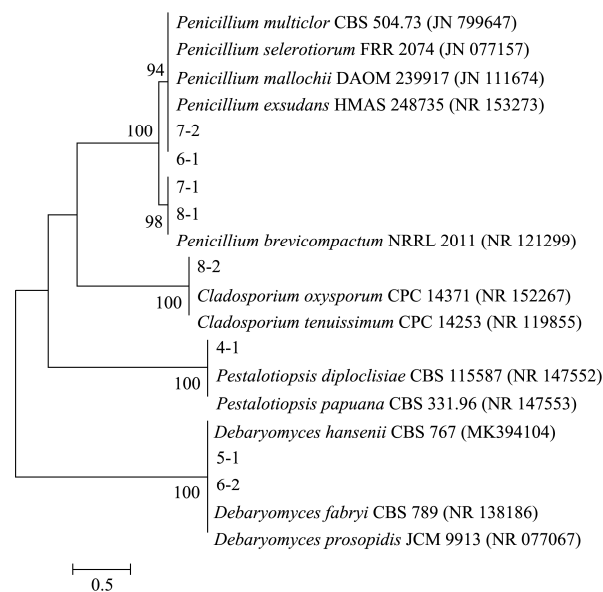


图 1 基于 ITS 序列构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on ITS sequence construction

表 4 黄茶闷黄过程中真菌鉴定结果

Table 4 Results of identification of fungi in the yellowing process of tea

菌株编号(来源)	菌落形态 ^b	显微特征	鉴定结果(形态特征结合系统发育分析方法)
4-1(滚炒除水叶)	菌落呈白色棉絮状,反面呈黑褐色	菌丝细长,未见隔膜,分生孢子5细胞,中间3色孢,顶端无色孢锥形,具顶端附属丝2~3根	<i>Pestalotiopsis diploclisiae</i> ^a
5-1(闷黄24h) 6-2(闷黄48h)	乳白色,圆形,粘稠	细胞圆形、椭圆形;芽殖	<i>Debaryomyces hansenii</i> 汉逊德巴利酵母
6-1(闷黄48h) 7-2(闷黄72h)	具放射状皱纹,分生孢子面灰绿色,中心为橙色,质地绒状,反面橙黄色	帚状枝,瓶梗安瓿状,分生孢子近球形	<i>Penicillium exsudans</i> ^a
7-1(闷黄72h) 8-1(毛茶)	具放射状皱纹,分生孢子结构大量产生,菌丝体白色,质地绒状,无渗透液,反面黄褐色	帚状枝三轮生,瓶梗瓶状,分生孢子椭圆形	<i>Penicillium brevicompactum</i> 短密青霉
8-2(毛茶)	菌落灰橄榄色,边缘白色,质地丝绒状,反面墨绿色	菌丝有隔膜,分生孢子链生并具枝链,柠檬形、椭圆形	<i>Cladosporium tenuissimum</i> 极细枝孢

注:菌种编号第1个数字为取样号,第2个数字代表该样分离出的菌种编号。a为未查到中文种名;b为CYA培养基上25℃培养3~7d的菌落宏观形态。

3 讨论

3.1 野化白云黄茶与绿茶的茶多酚含量、儿茶素各组分及总含量比较

结合本文 2.3(黄茶闷黄过程中微生物变化及分

离鉴定)的实验结果,闷黄过程中存在微生物生长繁殖,在湿热和微生物繁殖的条件下,使茶叶中酯型儿茶素 EGCG、ECG 等含量减少,转化为 GC、EC 等非酯型儿茶素,多酚物质被微生物利用和被氧化而减少。

3.2 野化白云黄茶与绿茶的水浸物、游离氨基

酸、咖啡碱、可溶性糖含量比较

刘晓等^[9]对蒙顶黄茶不同闷黄时间的跟踪,发现多酚氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和纤维素酶活性随闷黄进程出现了动态变化。4种酶在杀青之后活性大幅下降,酶活基本丧失,但在闷黄1h酶活性又得到一定的回升。其中,多酚氧化酶、过氧化氢酶、纤维素酶活性在闷黄6h达到最大,与闷黄1h的酶活性相比,增加了7.79倍、14.15倍、1.57倍。过氧化物酶活性在闷黄过程中呈先增加后减少的趋势,在闷黄2h达到峰值,相较于闷黄1h增加了2.38倍,在闷黄6h时,该酶活性降至最低,与闷黄2h呈显著差异。

野化白云黄茶加工过程与蒙顶黄茶加工工艺基本相同,因此野化白云黄茶水浸出物、可溶性糖含量与同种原料加工的两款绿茶比较增加明显,说明闷黄过程中在湿热、微生物繁殖以及微生物分泌胞外多酚氧化酶、纤维素酶等^[10]酶促氧化和水解反应多重因素作用下,黄茶水溶性物质增加。

3.3 野化白云黄茶闷黄过程中微生物变化和菌种鉴定

从4号样开始到10号,五阶段中共分离出8株微生物。4号样中分离得到 *Pestalotiopsis diploclisiae* (无中文名) 属拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*), 是黑盘孢科 (*Amphisphaeriaceae*) 中的无性形真菌, 其分生孢子具附属丝。该真菌类群在热带和亚热带生态系统中。从5号样到8号样中没有再分离出这类真菌。因此认为这类真菌是从茶叶生长环境中带来的。但类似盘多毛孢真菌作为内生真菌的重要类群, 能够产生多种具有生物活性的次级代谢产物, 如具有抗癌、抗HIV等活性的物质^[11-12], 说明在闷黄开始阶段茶样中分离 *Pestalotiopsis diploclisiae* 菌株, 该菌不会给黄茶质量安全带来风险。同时在茶叶加工过程分离 *Pestalotiopsis diploclisiae* 菌株中未见文献报道。

5、6号样分离得到汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 是一种耐盐的酵母, 并且能在低温生长。它作为发酵剂中的重要成分在食品, 特别是肉制品中广泛应用。该种酵母菌具有 QPS 身份, 具有食品安全性。文杰宇^[13]从茯砖茶中分离出优势酵母汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*), 并将培养汉逊德巴利酵母接种到察氏液体培养基中进行 28℃、4~7d 培养粗提酶可降解纤维素, 说明汉逊德巴利酵母菌能分泌胞外纤维素酶。因而黄茶闷黄过

程中有汉逊德巴利酵母繁衍和分泌胞外纤维素酶, 可导致茶叶中的纤维素等物质的水解, 提高黄茶水浸出物含量。

6、7号样中分离出1株汉逊德巴利酵母、3株青霉菌属 *Penicillium exsudans* 和1株短密青霉 (*Penicillium brevicompactum*)。人类利用青霉生产抗生素已多年, 除此青霉还产生柠檬酸、葡萄糖酸等有机酸, 纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶、核酸酶等代谢产物^[9-10]。*Penicillium exsudans* 首次在茶叶中被分离鉴定出来。短密青霉 (*Penicillium brevicompactum*) 次级代谢分泌产生的一种抗生素, 它具有抗真菌、抗肿瘤和免疫抑制的作用。青霉菌在黄茶闷黄过程中逐步成为优势菌种, 依据前人的研究结论^[9-10]可以认为青霉菌代谢产生有机酸和纤维素酶、蛋白酶等胞外酶, 酶促反应使茶叶的更多物质转化成可溶性成分, 这与2.1、2.2结果一致。

8号样中分离出来1株短密青霉 (*Penicillium brevicompactum*) 和1株极细枝孢霉 (*Cladosporium tenuissimum*)。周红杰等^[14]在黑茶类普洱茶中分离1株枝孢霉。傅冬和等^[15]筛选出极细枝孢霉发酵获得多酚氧化酶可以较高收率地体外合成茶黄素粗提物, 因此说明该菌能分泌多酚氧化酶。从黄茶中分离能得到极细枝孢霉, 说明黄茶是绿茶与黑茶加工工艺一定程度结合的产品, 同时黄茶长期贮存可能存在微生物分泌胞外多酚氧化酶促使多酚氧化的现象。

以上说明野化白茶黄茶加工过程, 尤其在闷黄阶段微生物生长种类和数量来看, 与国内对黄茶加工微生物的影响研究结果比较, 细菌、霉菌、酵母菌生长变化趋势一致。国内学者研究黄茶加工过程中分析了多酚氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和纤维素酶活性变化, 鲜叶中酶活性高, 杀青后失活, 随闷黄进程出现了微生物种类和数量的增加同时这些酶的活性逐步增强^[9]。这些微生物的生长繁殖及其分泌胞外酶深刻影响黄茶的品质成分的变化。

从野化白云黄茶闷黄过程各工序取样进行可培养微生物分析和产品对照绿茶品质成分分析, 说明过程中既有湿热作用又有微生物的作用。同时也提示微生物分泌的胞外酶的种类和活性变化等问题需进行一步深入研究。

4 结论

4.1 野化白云黄茶与烘青绿、半烘半炒绿茶比较, 茶多酚总量、儿茶素总量、酯型儿茶素类总量均呈下降趋势, EGCG 下降 9.99 mg/g、6.98 mg/g, GCG 下降 14.23 mg/g、13.80 mg/g, 都是差异性显著, $p < 0.05$ 。

非酯型儿茶素组分 EGC 和 EC 基本保持不变, GC 增加 2.41 mg/g、2.56 mg/g, C 减小 2.49 mg/g、1.75 mg/g, 都有显著性差异, $p < 0.05$; 非酯型儿茶素总量因各组分既增加的又有减小的, 总量的变化差异性不显著, $p > 0.05$ 。

4.2 野化白云黄茶与两款绿茶比较, 水浸出物分别高出 4.80%、7.11%, 差异显著 ($p < 0.05$), 闷黄使野化白云黄茶内含可溶性物质更加丰富; 氨基酸、咖啡碱含量黄茶略有下降, 差异不显著 ($p > 0.05$); 黄茶可溶性糖含量分别高出 0.41%、0.36%, 差异显著 ($p < 0.05$)。

4.3 野化白云黄茶加工可培养微生物分析表明, 杀青和炒制可以杀死真菌和部分细菌, 闷黄 24 h 细菌和酵母生长, 48 h 酵母菌为优势菌种、72 h 霉菌则为优势菌种; 在闷黄过程及干燥 4 个阶段取的茶样中共分离鉴定出 8 株微生物, 包括 1 株拟盘多毛孢属, 4 株青霉属, 1 株枝孢霉及 2 株酵母属, 其中拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis diploclisiae*、青霉属 *Penicillium exsudans* 首次从茶叶加工中和茶叶中分离并鉴定。结合前人^[8,9]研究结果, 认为微生物繁殖和分泌胞外酶如多酚氧化酶、纤维素酶、果胶酶促使茶多酚氧化、酯型儿茶素水解, 可溶性物质增加。闷黄过程的微生物繁殖影响黄茶品质的形成。

参考文献

- [1] 李斌. 乳源白毛茶和台山白云茶的细胞学研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(3): 10-14
LI Bin. Cytological study on Ruyuan Baimao tea and Taishan Baiyun tea varieties [J]. Journal of South China Agricultural University, 1998, 19 (3): 10-14
- [2] 广东省茶树品种资源调查组. 台山新会县茶树品种资源调查报告[J]. 广东茶叶科技, 1986, 2: 1-18
Investigation group of tea varieties resources in Guangdong province. Investigation report of tea variety resources in Xinhui, Taishan county of Guangdong province [J]. Journal of Guangdong Tea Science and Technology, 1986, 2: 1-18
- [3] 周顺祥. 广东省台山白云茶等 5 个品种形态特征差异分析[J]. 茶叶通讯, 1993, 2: 8-14
ZHOU Shunxiang. Analysis of morphological characteristics of five varieties including Baiyun tea in Taishan, Guangdong Province [J]. Tea Communication, 1993, 2: 8-14
- [4] 周继荣, 陈玉琼, 孙娅, 等. 鹿苑茶加工过程中品质的变化[J]. 华中农业大学学报 2005, 24(1): 88-92
ZHOU Jirong, CHEN Yuqiong, SUN Ya, et al. Change of quality of Luyuan yellow tea during processing [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2005, 24(1): 88-92
- [5] 周继荣, 倪德江, 陈玉琼, 等. 黄茶加工过程品质变化的研究[J]. 湖北农业科学, 2004, 1: 93-95
ZHOU Jirong, NI Dejiang, CHEN Yuqiong, et al. Study on quality variation of yellow tea during processing [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2004, 1: 93-95
- [6] 董占波, 许金伟, 张星海, 等. 平阳早香茶与平阳黄汤主要品质成分分析[J]. 广州化工, 2017, 21: 109-111
DONG Zhanbo, XU Jinwei, ZHANG Xinghai, et al. Analysis of main quality components of Pingyang early tea and Pingyang yellow soup [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2017, 21: 109-111
- [7] 龚永新, 蔡烈伟, 蔡世文, 等. 闷堆对黄茶滋味影响的研究[J]. 茶叶科学, 2000, 20(2): 110-113
GONG Yongxin, CAI Liewei, CAI Shiwen, et al. Study on the effect of stack-cover process on the taste of yellow tea [J]. Journal of Tea Science, 2000, 20(2): 110-113
- [8] 刘晓慧. 山东黄茶加工工艺及品质研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010:
LIU Xiaohui. Research on processing technology and quality of yellow tea in Shandong [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2010
- [9] 刘晓, 张厅, 刘飞, 等. 蒙顶黄茶闷堆过程中主要品质成分及酶活性变化研究[J]. 中国农学通报, 2017, 33(27): 97-101
LIU Xiao, ZHANG Ting, LIU Fei, et al. Variations of quality ingredients and primary enzymes activities of Mengding yellow tea during the piling process [J]. Chinese Agriculture Science Bulletin, 2017, 33(27): 97-101
- [10] 孔华忠. 中国真菌志(35)-青霉属及其相关有性型属[M]. 北京: 科学出版社, 2007
KONG Huazhong. Flora Fungorum Sinicorum (35) -*Penicillium* et Teleomorphi Cognati [M]. Beijing: Science Press, 2007
- [11] 宋玉. 拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)真菌系统学研究及条形码基因的评价[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015
SONG Yu. Taxonomy of genus *Pestalotiopsis* and evaluation of its DNA barcoding [D]. Guiyang: Guizhou University, 2015
- [12] 陈霏雯, 彭家茵, 陈茵宜, 等. 拟盘多毛孢属活性次级代谢产物的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 2019, 34(5): 519-525
CHEN Peiwen, PENG Jiayin, CHEN Yinyi, et al. Research progress on active secondary metabolites of *Paecilomyces* [J]. West China Pharmaceutical Journal, 2019, 34(5): 519-525

(下转第 39 页)