

六堡茶香气特征和真菌群落鉴定分析

龚受基^{1,2}, 滕翠琴³, 郭德军^{1,2*}, 黄丽¹, 陈德强¹

(1. 北部湾大学食品工程学院, 广西钦州 535011) (2. 钦州市特色果蔬发酵重点实验室, 广西钦州 535011)

(3. 梧州市农业科学研究所, 广西梧州 543000)

摘要: 分别利用气相色谱-离子迁移谱联用仪、高通量测序方法检测六堡茶的香气成分和真菌群落构成。从六堡茶中鉴定出醛类13种, 酯类9种, 醇类8种, 酮类8种, 烃类2种, 酸类1种, 杂环类2种, 香气类型以花香、果香、甜香、草香为主, 六堡茶呈现多种香气综合特征。不同样品中鉴定的真菌丰度差别较大, 属水平真菌占比较多的有 *Aspergillus*、*Rhodotorula*、*Geosmithia*、*Wallemia*、*Penicillium*、*Blastobotrys* 和 *Fusarium* 等, *Aspergillus*、*Rhodotorula* 两个属的微生物占比达到 82.57%~99.73%, 为六堡茶中的主要真菌。*Aspergillus*、*Wallemia* 丰度与陈香关键成分壬醛相对含量的相关系数分别为-0.89、0.83, *Aspergillus*、*Rhodotorula*、*Penicillium*、*Blastobotrys*、*Fusarium* 与槟榔香特征成分芳樟醇氧化物相关系数分别为-0.84、0.97、0.96、0.83 和 0.84。推测 *Aspergillus*、*Wallemia* 可能参与了六堡茶陈香特征形成, *Aspergillus*、*Rhodotorula*、*Penicillium*、*Blastobotrys*、*Fusarium* 可能参与了槟榔香的形成, 结果说明, 六堡茶香气特征与真菌群落结构相关性较高。

关键词: 六堡茶; 香气; 真菌; 气相色谱-离子迁移谱

文章编号: 1673-9078(2023)06-252-262

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0487

Identification and Analysis of Aroma Characteristics and Microbial Communities in Liu-pao Tea

GONG Shouji^{1,2}, TENG Cuiqin³, GUO Dejun^{1,2*}, HUANG Li¹, CHEN Deqiang¹

(1.College of Food Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China)

(2.Qinzhou Key Laboratory of Characteristic Fruits and Vegetables Fermentation, Qinzhou 535011, China)

(3.Wuzhou Institute of Agricultural Sciences, Wuzhou 543000, China)

Abstract: The aroma components and fungal community compositions of Liu-pao tea were detected using gas chromatography-ion mobility spectrometry and high-throughput sequencing, respectively. Thirteen different aldehydes, nine esters, eight alcohols, eight ketones, two hydrocarbons, one acid, and two heterocyclic compounds were identified along with various integrated aroma characteristics, mainly floral, fruity, sweet and herbaceous. Fungi in the different tea samples varied greatly, with *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Geosmithia*, *Wallemia*, *Penicillium*, *Blastobotrys*, and *Fusarium* accounting for the majority at the genus level and the most abundant fungi, *Aspergillus* and *Rhodotorula*, reaching as high as 82.57% to 99.73% of the total. Correlation coefficients obtained between the abundances of *Aspergillus* and *Wallemia* and the relative content of the key aged aroma component, nonanal, were -0.89 and 0.83, respectively. Meanwhile, correlation coefficients of -0.84, 0.97, 0.96, 0.83, and 0.84 were obtained between the abundances of *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Blastobotrys*, *Fusarium* and linalool oxide (characteristic component of the betel nut aroma), respectively. *Aspergillus* and *Wallemia* are thus thought to be involved in the characteristic aged aroma of Liu-pao tea, while *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Blastobotrys*, and *Fusarium* may be involved in the formation of the betel nut aroma. The aroma characteristics of Liu-pao tea are therefore highly correlated with the composition of the fungal community.

引文格式:

龚受基,滕翠琴,郭德军,等.六堡茶香气特征和真菌群落鉴定分析[J].现代食品科技,2023,39(6):252-262.

GONG Shouji, TENG Cuiqin, GUO Dejun, et al. Identification and analysis of aroma characteristics and microbial communities in Liu-pao tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 252-262.

收稿日期: 2022-04-21

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA20302018-15); 北部湾大学校级科研项目(2017KYQD223); 钦州市科技攻关(202014820)

作者简介: 龚受基(1970-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: gong5895801@163.com

通讯作者: 郭德军(1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物, E-mail: guodejun356@126.com

Key words: Liu-pao tea; aroma; fungal community; gas chromatography-ion mobility spectrometry

六堡茶原产于广西梧州市苍梧县六堡乡, 文献记载其生产历史已经有 1 500 多年。六堡茶属于黑茶, 传统上常用于消渴降暑、除腻去积、调整肠胃等, 现代研究证实其具有良好的降脂功效^[1], 能够抑制消化酶活性以及增加其 mRNA 表达从而缓解胰岛素抵抗症状^[2,3], 平衡能量代谢, 具有改善糖尿病症状潜力^[2,4,5], 有潜在的健康价值。

六堡茶属于后发酵茶, 与其他五大茶类不同, 细菌与真菌在黑茶生产、陈化和存放过程中持续存在生理活动^[6], 苦涩茶汤变得柔和爽口, 使黑茶感官品质得到提升。一般认为, 微生物与酶共同作用, 在湿热条件下催化多酚、多糖、蛋白质等成分发生化学反应, 或聚合为茶褐素大分子, 或降解为单糖双糖、小肽氨基酸和其他小分子物质。黑茶为微生物发酵, 不同黑茶微生物组成结构存在差异, 已有研究表明六堡茶中青霉、灰绿曲霉及黑曲霉丰度较高^[7], 散囊菌^[8,9]、杨雅焯等^[10]为特有的优势菌种, 这些优势菌的生长繁殖有助于六堡茶槟榔香和茶汤红、浓、陈、醇特色的形成。微生物利用茶叶中化学成分进行代谢, 但微生物参与六堡茶品质特征形成机制并不明确, 六堡茶中微生物、香气与品质相关性成果少。气相色谱-离子迁移谱联用仪 (Gas Chromatography Ion Mobility Spectrometry, GC-IMS) 分析茶叶挥发性香气成分具有独到之处^[11], 高通量测序是非常好的研究微生物方法, 真菌采用内转录间隔区 (ITS) 扩增子方法测序成熟可靠。本研究尝试利用 GC-IMS 方法检测六堡茶中挥发性香气成分, 利用 ITS 方法检测六堡茶中真菌组成, 探讨六堡茶香气成分和真菌结构相关性, 期待能进一步阐述六堡茶香气成分、微生物等的内在特征。

1 材料与方法

1.1 材料

六堡茶为广西壮族自治区梧州茶厂产品, 分别为木板陈仓三年陈茶 (一级) (编号为 LW1, 2011 年 7 月起木板干仓陈化, 2014 年 8 月包装)、窗花六堡茶 (一级) (编号为 LW2, 2012 年 6 月置于木板干仓陈化, 2016 年 5 月包装)、六堡茶紧压茶 (原种茶柱) (特级) (编号为 LW3, 2013 年 8 月起木板干仓陈化, 2015 年 4 月包装), 3 种茶于 2020 年 8 月购于梧州市西江三路茶叶市场, 分别送样上海欧易生物医学科技有限公司、山东海能科学仪器有限公司进行真菌多样性和挥发性成分检测。

1.2 仪器与设备

FlavourSpec1H1-00053 型气相色谱-离子迁移谱联用仪, 德国 G.A.S.公司; CTC-PAL 自动进样装置, 瑞士 CTCAnalyticsAG 公司; CLOT 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.50 μm), 德国 CS-Chromatographie ServiceGmbH 公司; FlavourSpec 风味分析仪, 德国 G.A.S.公司; 580BR10905 PCR 仪, 美国 BIO-Rad 公司; HE-120 电泳仪、2500 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; Nova seq 6000 测序仪, 美国 Illumina 公司; 2100 Bioanalyzer 分析系统, 美国 Agilent 公司; SN002358Qiaextractor 高通量核酸纯化工作站, 德国 QIAGEN 公司。

1.3 香气成分检测

1.3.1 样品处理和香气特征描述

分别取 1 g 样品置于 20 mL 顶空进样瓶中, 80 °C 孵育 15 min 后进样, 每个样品做三个平行。

鉴定香气成分后, 对鉴定的香气成分进行特征描述。

1.3.2 色谱条件

顶空孵化温度: 80 °C; 孵化时间: 15 min; 进样体积: 500 μL, 不分流模式; 进样针温度: 85 °C; 载气: 高纯 N₂ (纯度≥99.999%), 孵化转速: 500 r/min。

色谱柱类型: FS-SE-54 15 m ID 0.53 mm; 色谱柱温: 60 °C; IMS 温度: 45 °C; 运行时间: 20 min; 载气: 高纯 N₂ (纯度≥99.999%); 载气流速: 起始流速 2 mL/min, 20 min 后 100 mL/min。

1.4 微生物检测

1.4.1 基因组 DNA 提取

采用 DNA 抽提试剂盒 (DNeasyPowerSoil Kit (100), 12888-100, QIAGEN) 对样品基因组 DNA 进行提取, 并测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀、进行琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度。

1.4.2 PCR 扩增与建库

根据真菌内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 序列特征, 根据常用 ITS 测序鉴定引物确定前端引物: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'、后端引物: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'^[12], 以 Takara 公司的 Takara Ex Taq 高保真酶进行 PCR。按照 TksGflex DNA Polymerase 说明书确定 PCR 条件。一轮 PCR 反应体系: 2×GflexPCRBuffer 15 μL、5 pmol/μL primer F 1 μL、5 pmol/μL primer R 1 μL、

Template DNA 1 μL、TksGflex DNA Polymerase (1.25 U/μL) 0.6 μL、H₂O 11.4 μL, 总计 30 μL; PCR 条件: 94 °C 5 min、94 °C 30 s、56 °C 30 s 26 cycles、72 °C 20 s、72 °C 5 min、4 °C hold; 二轮 PCR 反应体系: 2×Gflex PCR Buffer 15 μL、TksGflex DNA Polymerase(1.25 U/μL)0.6 μL、Adapter I5 1 μL、Adapter I7 1 μL、第一轮产物 1 μL (50 ng)、H₂O 11.4 μL, 总计 30 μL; PCR 条件: 94 °C 5 min、94 °C 30 s、56 °C 30 s 7 cycles、72 °C 20 s、72 °C 5 min、4 °C hold。PCR 完成后对产物进行电泳检测, 然后进行磁珠纯化, 纯化产物作为二轮 PCR 模板, 进行二轮 PCR 扩增, 并再次电泳检测、磁珠纯化, 对纯化 PCR 产物进行 Qubit 定量, 根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 上机测序。

1.5 数据分析

气相色谱-离子迁移谱信息利用 VOCal 0.1.1 和 Dynamic PCA 插件、Gallery Plot 插件、Reporter 插件以及 GC×IMS Library Search 等软件进行数据分析。

香气检测数据每个样品进行三次重复, 最后数据取平均值; 微生物检测进行 3 个生物样重复, 数据取平均值。

2 结果与分析

2.1 六堡茶香气物质分析

气相色谱-离子迁移谱联用仪检测得到的挥发性成分分离三维谱图具有保留时间、迁移时间和峰强度等分离特征, 能够比较直观地表达不同化学成分分离差异情况, 六堡茶挥发性香气成分分离情况见图 1, 各挥发性成分可以三维图谱表示, 直观明了, 见图 1a; 经过色谱分离、离子迁移分离后处理得到挥发性香气的分离二维谱图, 谱图中存在颜色深浅不一的斑点, 斑点间距离代表各香气物质分离程度, 颜色深浅代表水平, 浅色代表低水平, 红色代表高水平, 见图 1b; 三种六堡茶样品香气成分指纹图谱详细见图 1c, 红色虚线区域内为 LW1 和 LW2 含量较大的物质, 绿色虚线内为 LW3 含量较大的物质。LW1 中丁酸丙酯、β-罗勒烯、2-萜烯、6-甲基-5-庚烯-2-酮、环己酮、2-庚酮、2-戊酮、2-丁酮、丙酮、E-2-己烯醇、甲硫基丙醛、壬醛、庚醛、己醛、3-甲基丁醛、丁醛、苯甲醛、2,5-二甲基呋喃等物质含量较高; 而 LW2 中丁酸戊酯、丁酸乙酯、乙酸丁酯、芳樟醇氧化物、戊醛、2-环己烯-1-酮、E-2-辛烯醛、1-己醇、1-戊醇、3-甲基-3-丁烯-1-醇等物质含量较高; LW3 中苯乙醛、2-乙酰基吡咯、乙酸丙酯、己酸乙酯、2-辛酮、2-丙醇、乙酸等含量较高。

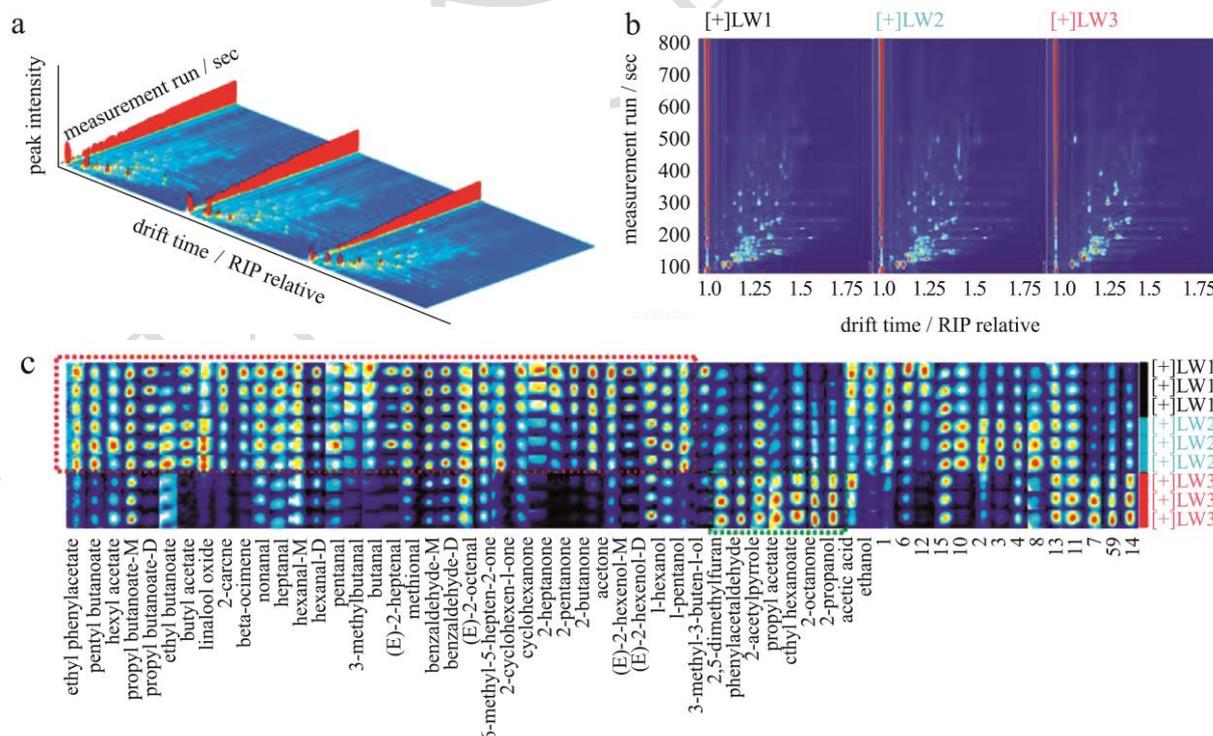


图 1 六堡茶香气成分的 GC-IMS 检测图

Fig.1 Detection of aroma components in Liupao tea with GC-IMS

注: a 三维图; b 二维图; c 指纹图谱。

表 1 六堡茶香气成分分析

Table 1 Qualitative analysis of main aroma components of Liupao tea

序号	化合物	分子式	Rt [sec]	Dt [RIPrel]	相对含量/%			香气特征描述
					LW1	LW2	LW3	
1	丁醛 Butanal	C ₄ H ₈ O	141.58	1.296 68	1.22	0.93	0.75	-
2	3-甲基丁醛 3-methylbutanal	C ₅ H ₁₀ O	153.81	1.402 84	1.58	1.17	0.82	苹果香
3	戊醛 Pentanal	C ₅ H ₁₀ O	166.76	1.425 82	0.79	1.11	0.88	草香
4	己醛-D hexanal-D	C ₆ H ₁₂ O	202.42	1.565 47	2.96	2.30	2.59	草香、清香
5	己醛-M hexanal-M	C ₆ H ₁₂ O	202.76	1.256 79	1.64	1.89	2.02	草香、清香
6	庚醛 Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	259.99	1.330 55	0.69	0.64	0.69	油脂香
7	(E)-2-庚烯醛 (E)-2-heptenal	C ₇ H ₁₂ O	304.51	1.675 44	0.82	0.86	0.52	草香、奶油香
8	苯甲醛-D benzaldehyde-D	C ₇ H ₆ O	305.06	1.474 76	1.73	1.94	1.64	甜香、杏仁香
9	苯甲醛-M benzaldehyde-M	C ₇ H ₆ O	307.78	1.154 86	2.60	2.56	2.17	甜香、杏仁香
10	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	396.46	1.249 84	1.22	1.54	3.16	杏仁香
11	(E)-2-辛烯醛 (E)-2-octenal	C ₈ H ₁₄ O	425.43	1.328 78	0.94	0.99	1.31	黄瓜香、肉香
12	壬醛 Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	494.47	1.476 85	1.24	1.21	1.29	橙香、玫瑰香
13	甲硫基丙醛 Methional	C ₄ H ₈ OS	267.69	1.095 64	1.02	1.08	0.96	肉香、酱香
14	(E)-2-己烯醇-D (E)-2-hexenol-D	C ₆ H ₁₂ O	229.87	1.184 16	1.95	1.61	1.40	果香、草香
15	(E)-2-己烯醇-M (E)-2-hexenol-M	C ₆ H ₁₂ O	230.54	1.524 62	3.29	2.13	2.03	果香
16	1-戊醇 1-pentanol	C ₅ H ₁₂ O	190.68	1.256 83	1.21	1.41	1.72	谷香、果香
17	2-丙醇 2-propanol	C ₃ H ₈ O	121.36	1.088 15	5.89	10.62	18.24	酒甜香
18	乙醇 Ethanol	C ₂ H ₆ O	107.76	1.049 8	0.81	0.64	1.06	酒香
19	3-甲基-3-丁烯-1-醇 3-methyl-3-buten-1-ol	C ₅ H ₁₀ O	176.21	1.249 24	0.88	0.88	0.70	花香
20	1-己醇 1-hexanol	C ₆ H ₁₄ O	244.09	1.328 3	1.30	1.37	1.52	-
21	氧化芳樟醇 linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	450.15	1.263 02	1.93	2.98	1.05	木香、花香
22	乙酸丙酯 propyl acetate	C ₅ H ₁₀ O ₂	169.98	1.164 53	0.97	1.16	1.86	梨香、草莓香
23	乙酸丁酯 butyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₂	209.08	1.628 76	0.16	0.23	0.06	果香
24	乙酸己酯 hexyl acetate	C ₈ H ₁₆ O ₂	400.20	1.415 34	0.98	1.20	1.03	苹果香、梨香
25	丁酸丙酯-D propyl butanoate-D	C ₇ H ₁₄ O ₂	256.31	1.269 27	1.90	1.97	2.28	蕉香、菠萝香
26	丁酸丙酯-M propyl butanoate-M	C ₇ H ₁₄ O ₂	256.98	1.691 44	1.30	1.23	0.71	蕉香、菠萝香
27	丁酸戊酯 pentylbutanoate	C ₉ H ₁₈ O ₂	418.31	1.403 62	1.94	2.31	1.46	香蕉香
28	丁酸乙酯 ethyl butanoate	C ₆ H ₁₂ O ₂	198.74	1.212 53	0.44	0.74	0.51	果酒香
29	己酸乙酯 ethyl hexanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	346.87	1.337 17	0.65	0.80	2.08	菠萝香、蕉香
30	苯乙酸乙酯 ethyl phenylacetate	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	682.20	1.292 28	1.46	1.69	1.41	蜜香、玫瑰香
31	丙酮 Acetone	C ₃ H ₆ O	120.93	1.120 98	19.84	17.60	6.51	辛辣香
32	2-丁酮 2-butanone	C ₄ H ₈ O	138.95	1.251 91	11.76	7.70	2.72	药香
33	6-甲基-5-庚-2-酮 6-methyl-5-hepten-2-one	C ₈ H ₁₄ O	335.02	1.179 65	2.40	2.23	2.44	香茅草香
34	2-庚酮 2-heptanone	C ₇ H ₁₄ O	252.18	1.635 51	0.32	0.23	0.14	果香、药香
35	2-辛酮 2-octanone	C ₈ H ₁₆ O	334.58	1.327 86	1.18	1.34	2.58	陈香、菌香
36	环己酮 Cyclohexanone	C ₆ H ₁₀ O	257.25	1.153 24	0.72	0.56	0.66	-
37	2-环己烯-1-酮 2-cyclohexen-1-one	C ₆ H ₈ O	275.72	1.415 67	0.82	1.05	0.60	木香
38	2-戊酮 2-pentanone	C ₅ H ₁₀ O	164.98	1.363 15	6.68	4.13	0.84	果香、酒香
39	2-萜烯 2-carene	C ₁₀ H ₁₆	346.46	1.229 23	1.06	0.89	0.50	松香
40	β -罗勒烯 beta-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	417.06	1.223 48	1.93	1.67	0.79	橙花香
41	乙酸 acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	138.47	1.155 79	5.03	8.61	17.62	刺激香
42	2-乙酰吡咯 2-acetylpyrrole	C ₆ H ₇ NO	496.94	1.105 84	1.69	2.12	5.72	花香、酒香
43	2,5-二甲基呋喃 2,5-dimethylfuran	C ₆ H ₈ O	185.17	1.366 01	1.05	0.67	0.98	陈香

注: 保留时间 Rt, 漂移时间 Dt.

从三种六堡茶中共分离出 58 种物质, 鉴定出 43 种, 包括醛类 13 种、醇类 8 种、酯类 9 种、酮类 8 种、炔类 2 种、羧酸 1 种、杂环化合物 2 种, 各类物质呈现不同的香味特征, 见表 1。六堡茶中鉴定出的香气成分呈现不同香型特征, 香气类型以花香、果香、木香、陈香、草香为主, 呈现复合香气特征。

2.2 六堡茶香气成分差异性分析

在对三种六堡茶样品的香气成分进行分析比较中, 最近邻算法和 PCA 发现 LW1 和 LW2 比较相近, 含有相同的香气成分苯乙酸乙酯、丁酸戊酯、乙酸丁酯、芳樟醇氧化物、2-萜烯、 β -罗勒烯、3-甲基丁烯醛、丁醛、2-庚醛、丙酮、2-丁酮、2-戊酮等, 而 LW3 距离相对较远, 上述香气成分含量非常少, 差异较大, 见图 2。

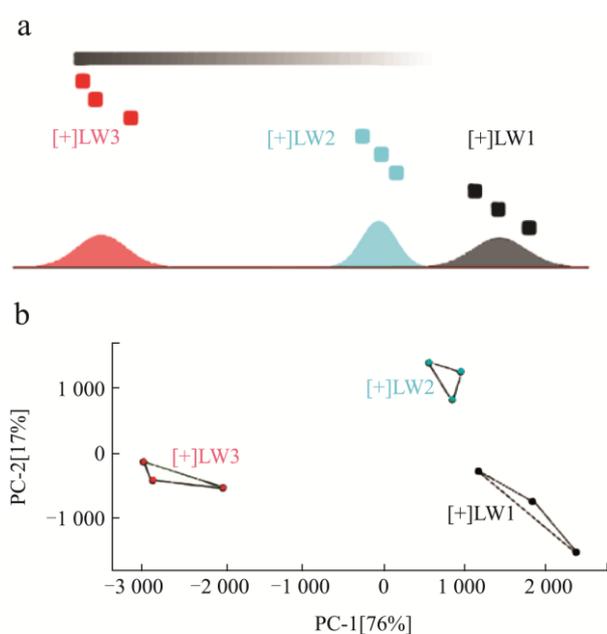


图 2 六堡茶香气成分分析图

Fig.2 Analysis of Liupao tea's aroma components

注: a: 最近邻算法距离图; b: PCA 图。

挥发性香气成分是茶叶感官感受的重要物质基础, 是评价茶叶质量的重要指标, 测定香气成分对评价总体风味有重要意义。GC-IMS 检测香气成分速度快、灵敏度高, 样品无需前处理, 特别适合于挥发性化合物的痕量分析与检测, 在六堡茶和其他类型茶叶的香气检测上已经得到了较好的应用^[14-16]。众多学者对六堡茶香气进行了研究, 黄林杰等^[17]鉴定的香气成分以酯类和醇类为主, 与此不同 Lv 等^[18]研究发现碳氢化合物 (54.05%) 是六堡茶中最丰富的香气成分, 穆兵等^[19]的研究则显示酮类化合物数量最多, 刘泽森等^[20]认为以醇类为主的六堡茶香气成分是影响六堡

茶槟榔香味的重要物质, 温立香等^[21]研究了“陈香”六堡茶的主要特征性芳香物质 α -雪松醇、 β -芳樟醇、二氢猕猴桃内酯、 α -萜品醇和 β -紫罗酮, 而舒娜等^[22]的研究结果与上述学者略有差异, 其认为陈香的物质主要以甲氧基苯类、雪松醇及 α -紫罗酮、 α -松油醇及壬醛等化合物为主, 马士成等^[23]利用相对气味活性值 (ROAV)、气相色谱-嗅闻-质谱 (GC-O-MS) 技术分析确定了陈香特征香气可能来源于 4 个关键香气成分, 即 1-甲基萘、癸醛、 β -紫罗兰酮、壬醛。研究结果不完全相同, 基本上都存在差异, 说明六堡茶香气多样化, 传统上的“陈香”还需要深入研究和阐述。

陈香是六堡茶的一个重要特征, 与壬醛相关, 壬醛呈现橙香、玫瑰香, 被认为是陈香的关键成分之一^[23], 但在某些研究中感官审评结果的陈香与壬醛含量相关性并不强^[21]。槟榔香是传统优质六堡茶的特征香气, 传统上在某一时间段内具有类似淡雅果香、回味呈现甘味, 同时具有一种以上类似槟榔的其他香气和滋味即可以视为有槟榔香气或槟榔滋味。刘泽森和黄林杰通过现代分析技术认为槟榔香成分包括 α -雪松醇、 β -雪松烯、 β -芳樟醇、氧化芳樟醇等, 但对于是否包括 1,2,3-三甲氧基苯、水杨酸甲酯、苯甲酸甲酯、萘和甲氧基萘等物质的认识并不相同^[17,20]。本研究鉴定的化合物类别与上述研究存在一定的差异, 壬醛平均相对百分含量为 1.25%, 氧化芳樟醇平均含量 1.85%, 在一定程度上具备六堡茶陈香、槟榔香的特征。众多成分中壬醛、3-甲基-3-丁烯-1-醇、芳樟醇氧化物、苯乙酸乙酯、罗勒烯、2-乙酰吡咯呈现花香特征, 2-己烯醇、1-戊醇、乙酸丙酯、乙酸丁酯、乙酸己酯、丁酸丙酯、丁酸戊酯、己酸乙酯、2-庚酮、2-戊酮等化合物呈现果香特征, 芳樟醇氧化物、2-环己烯-1-酮、2-萜烯呈现木香特征, 2-辛酮、2,5-二甲基呋喃呈现出陈香特征, 同时甲硫醇、(E)-2-辛烯醛兼备肉奶香, 可见六堡茶香气是多种成分综合作用的结果, 陈香和槟榔香成分具有交集, 与其他学者研究结果类似^[23]。

2.3 微生物结构分析

质控之后测序得到的 clean tags 数据量分布在 32 650~45 581 之间, clean tags 经过去除嵌合体得到 valid tags 数据量分布在 32 265~48 261 之间, valid tags 平均长度分布在 212.99~266.03 bp, 各样品 OTU 个数分布在 79~190 之间。

2.3.1 群落结构分析

从六堡茶样品 Venn 图中发现共有 OTUs 个数为 253 个, LW1、LW2 和 LW3 OTUs 个数分别为 110、

190 和 79, 共有 OTUs 为 38 个, 独有 OTUs 个数分别为 37、103 和 21, 见图 3a。LW1、LW2 和 LW3 鉴定

出的 OTUs 主要归属于 Ascomycota 门, 归属于 Basidiomycota 门的 OTUs 数量较少, 见图 3b。

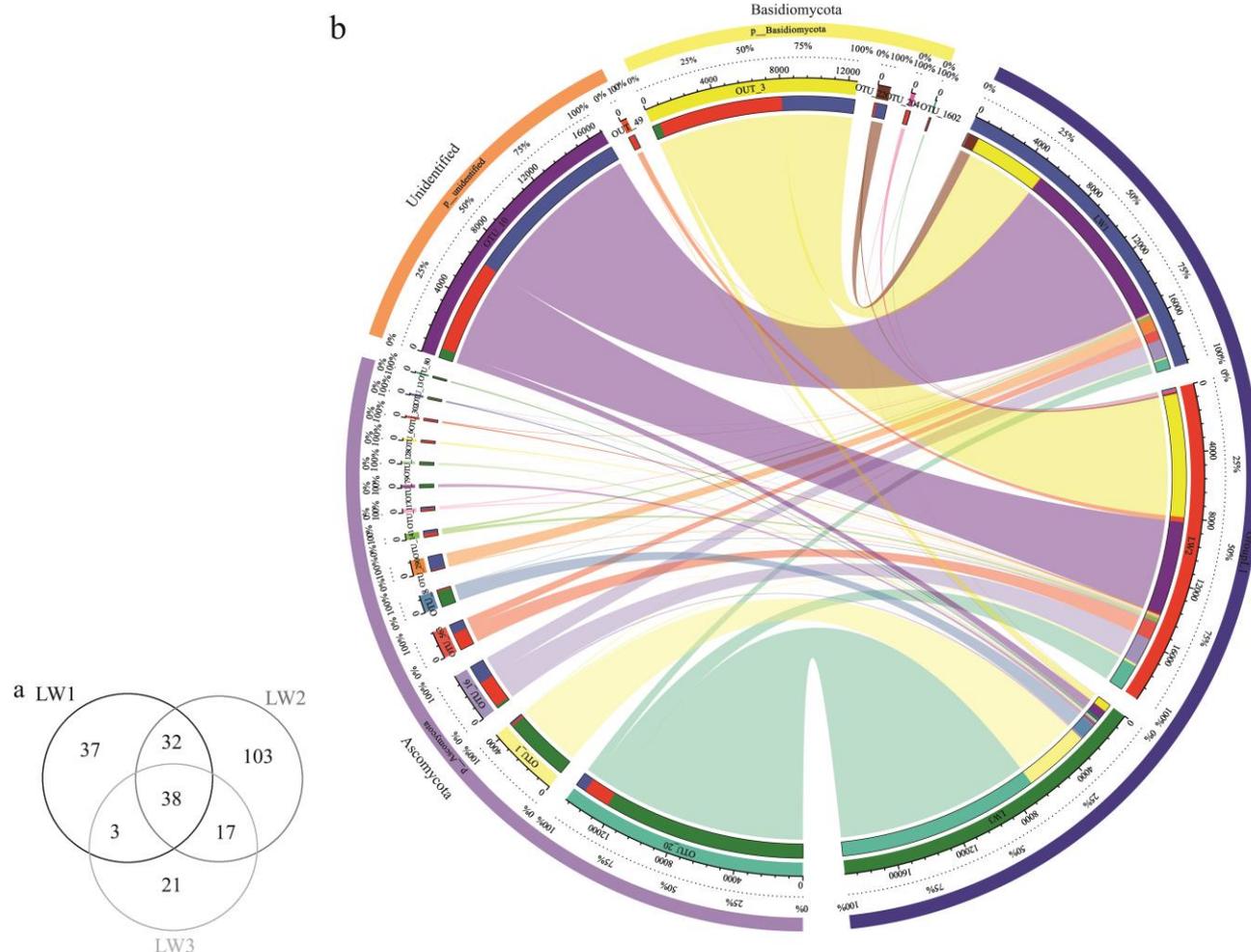
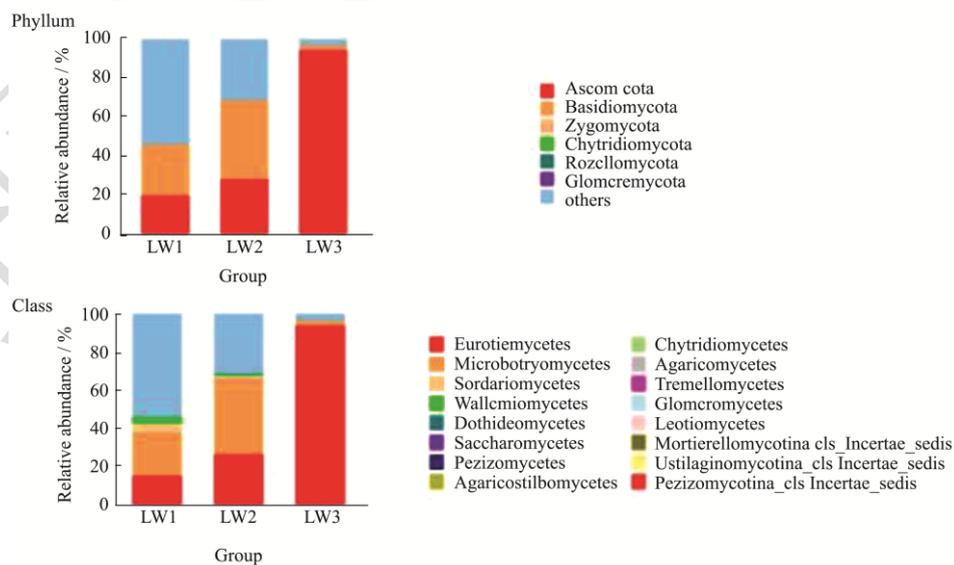


图 3 六堡茶样品中微生物结构分析

Fig.3 Analysis of microbial profile in Liupao tea

注: a: 韦恩图; b: 弦图。



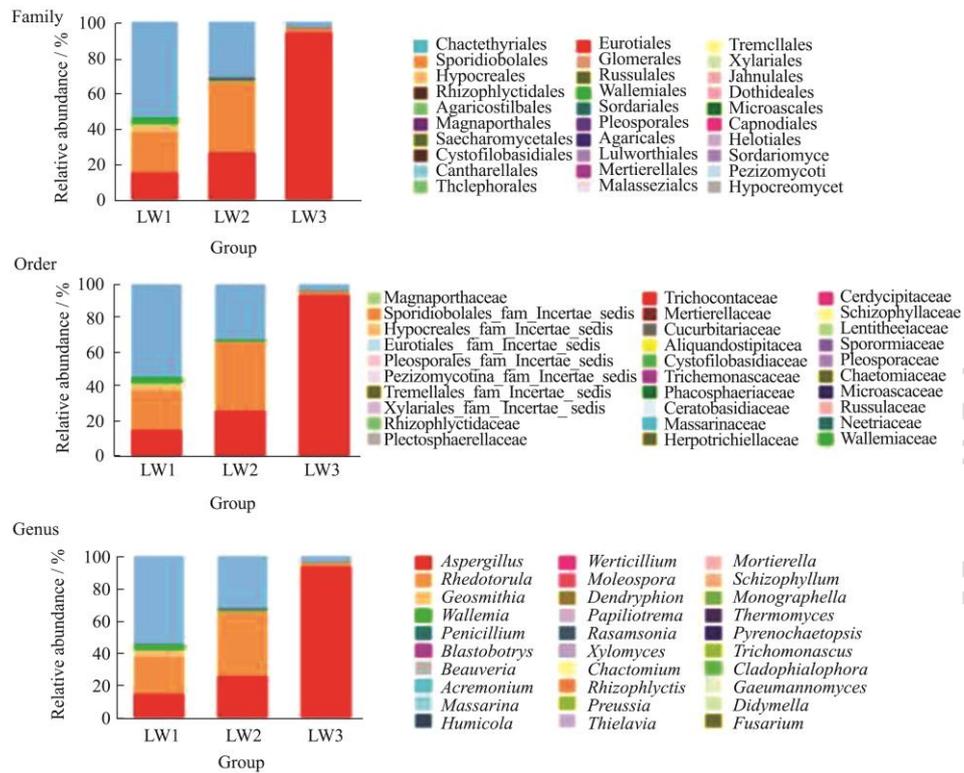


图4 六堡茶样品生物分类系统微生物结构组成

Fig.4 Bar chart of microbial profile in Liupao Tea

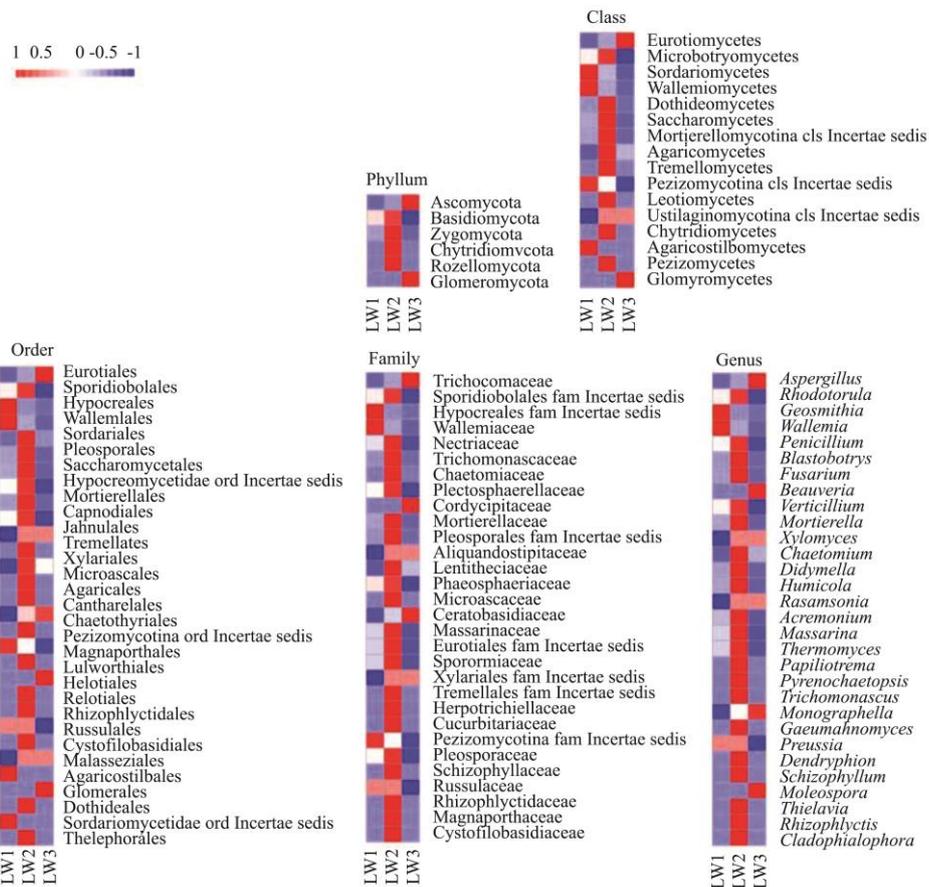


图5 六堡茶样品微生物结构热图

Fig.5 Heat map of microbial profile in Liupao tea

对各分类系统丰度最大微生物进行了统计, 从柱状图看 LW2 中微生物种类较丰富, 而 LW1、LW3 微生物种类相对较少, 与 LW2 比较差异较大, 见图 4。在生物分类系统门纲目科属等水平上, LW2 主要微生物在热图上以红色表示, 丰度较高, 而 LW1、LW3 大多微生物以蓝色表示, 丰度较低, 热图上分辨得非常清楚, 见图 5。在属水平上, 样品 LW1 中红酵母属 (*Rhodotorula*) 丰度为 50.41%、曲霉属 (*Aspergillus*) 为 32.16%、地丝霉属 (*Geosmithia*) 为 9.34%、节担菌属 (*Wallemia*) 为 7.21%, 其他丰度大于 0.01% 的有 12 种; 样品 LW2 中 *Rhodotorula* 丰度为 59.10%、*Aspergillus* 为 38.01%, 其他丰度大于 0.01% 的有 26 种; 样品 LW3 中 *Aspergillus* 丰度为 97.26%、*Rhodotorula* 为 2.47%, 其他丰度大于 0.01% 的 11 种。

2.3.2 beta 分析

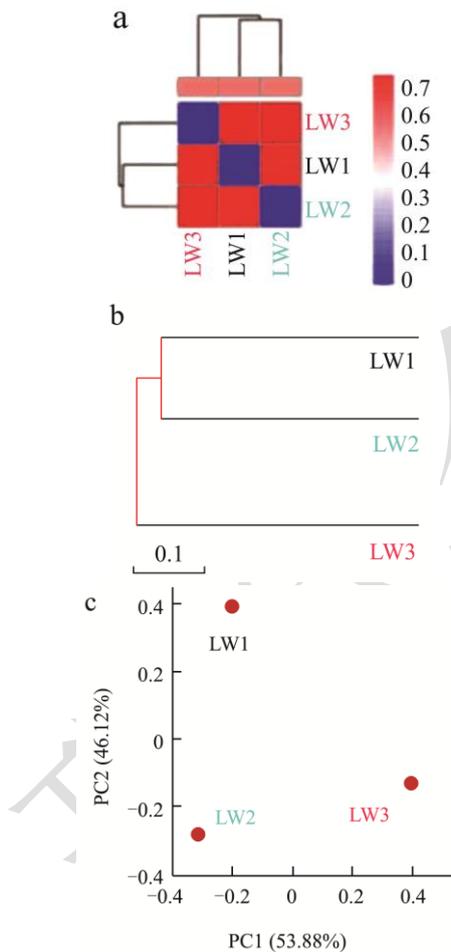


图 6 六堡茶样品的 beta 分析

Fig.6 beta-Analysis of microorganisms in Liupao tea

注: a: 热图; b: 进化树图; c: PCA、

从热图、聚类 and PCA 等多个角度分析六堡茶样品微生物的差异性发现, 三个样品微生物结构存在一定程度上的差异, 微生物组成与丰度并不尽相同, 生产工艺、环境、陈化时间和生产时间都可能产生影响,

差异性见图 6。

对六堡茶样品中微生物相关性 Spearman 系数进行分析计算, 将获得的数值矩阵展示到热图中。热图中圈直径、颜色深浅代表相关性大小, 直径越大表示相关性越大, 红色越深表示正相关越大, 蓝色越深表示负相关越大, 见图 7a。从图中可以明显看出, 代表不同微生物相关性的圆形图案大小、颜色深浅并不尽相同, 说明微生物间相互依存、作用程度有别, 可能存在不同途径和方式影响六堡茶的品质。从图 7a 可见, 属水平微生物间相关性不同, *Aspergillus* 与 *Geosmithia*、*Wallemia* 相关性较大, 为负相关; *Rhodotorula* 与 *Penicillium*、*Blastobotrys*、*Fusarium* 三者, *Penicillium* 与 *Blastobotrys*、*Fusarium* 二者, *Blastobotrys* 与 *Fusarium* 等相关性较大, 为正相关, 微生物间其他关系相关性较低。

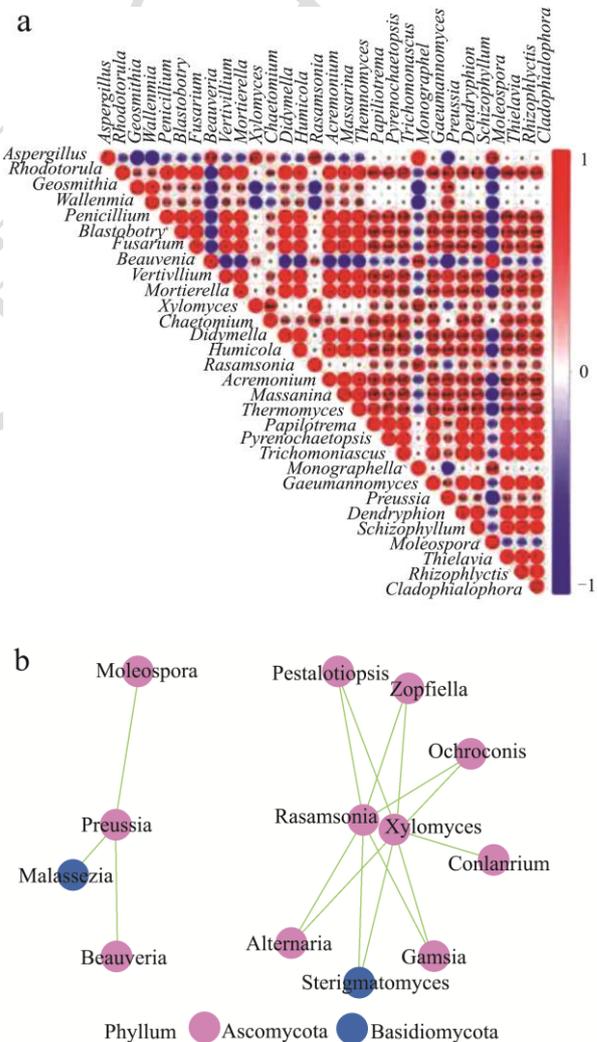


图 7 六堡茶样品微生物相互作用分析

Fig.7 Interaction analysis in the microbial communities of Liupao tea

注: a: 热图; b: 网络图。

选取|Spearman Coef|>0.8 且 $P<0.01$ 的微生物, 制作六堡茶中属水平总丰度前 30 的微生物相关性网络图, 见图 7b, 发现子囊菌门 (Ascomycota) 不同微生物间相互作用更加密切, *Rasamsonia* 属、*Xylomyces* 属在六堡茶微生物相关性网络图中处于核心地位, *Preussia* 属与其他微生物关系也比较密切。担子菌门 (Basidiomycota) 与子囊菌门 (Ascomycota) 联系相对较多, 可能在六堡茶香气形成过程中起重要作用。

高通量测序法能够快速鉴定微生物, 获取微生物多样化信息, 可以利用来鉴定六堡茶中的真菌和细菌^[10,24,25]。一般认为六堡茶中 *Aspergillus*、*Penicillium*、*Blastobotrys* 等属丰度较高, 但不同学者鉴定得到优势属也有差异, 徐书泽等鉴定了 4 个来自梧州茶厂的茶样, 发现 3 个样品中 *Eurotium* 属丰度在 59.4%~95.6% 间, 另外 1 种样品 *Eurotium* 属仅次于 *Aspergillus*, 占 4.6%^[26]; 而梁剑锋等鉴定出曲霉属平均相对含量在 50.6%~99.9%, *Wallemia* 属丰度也较高^[27]; 杨雅焯等对比六堡茶和重庆沱茶的微生物多样性区别, 发现 *Blastobotrys* 是六堡茶的真菌优势菌, *Aspergillus* 和 *Penicillium* 丰度也较高^[10]。本研究中鉴定属水平微生物主要有 *Aspergillus*、*Rhodotorula*、*Geosmithia*、*Wallemia*、*Penicillium*、*Blastobotrys* 和 *Fusarium*, *Aspergillus* 丰度在 32.2%~93.7% 间, *Rhodotorula* 丰度

在 2.5%~59.1% 间, *Aspergillus*、*Rhodotorula* 两个属的微生物占比达到 82.57%~99.73%, 为六堡茶中主要的微生物, 也鉴定了 *Blastobotrys*, 其他几种属水平微生物丰度较低, 与其他学者研究类似^[10,27]。但在属水平上没有鉴定出 *Eurotium*, 与其他学者研究不同。从其他学者和本文研究结果看, 不同公司产品优势微生物结构差异较大, 可能会导致六堡茶内在成分结构不同, 产品风味多样化。

2.4 微生物丰度与香气成分相关性分析

从微生物基因组分析推测样品 LW2 微生物多样性较丰富, LW1 和 LW3 微生物多样性相对单一; 从弦图也发现, LW1 和 LW2 具有较多共有微生物, 共有微生物丰度较高, LW2 和 LW3 共有微生物数量少且丰度较低, LW3 与 LW1、LW2 微生物结构差异较大。微生物组成差异可能受样品原料、陈化时间长短、生产时间、环境影响, 从而影响香气结构, 导致同一厂家、不同产品香气特征差别较大, 其他研究也有类似结果^[13]。LW1 和 LW2 香气成分相似成分较多, 而与 LW3 相似度较低, 在属水平上比较 LW1、LW2 和 LW3 微生物构成, 发现 *Rhodotorula*、*Geosmithia*、*Wallemia*、*Penicillium*、*Verticillium*、*Mortierella* 等微生物在 LW1 和 LW2 中丰度较高, 而在 LW3 中丰度较低。

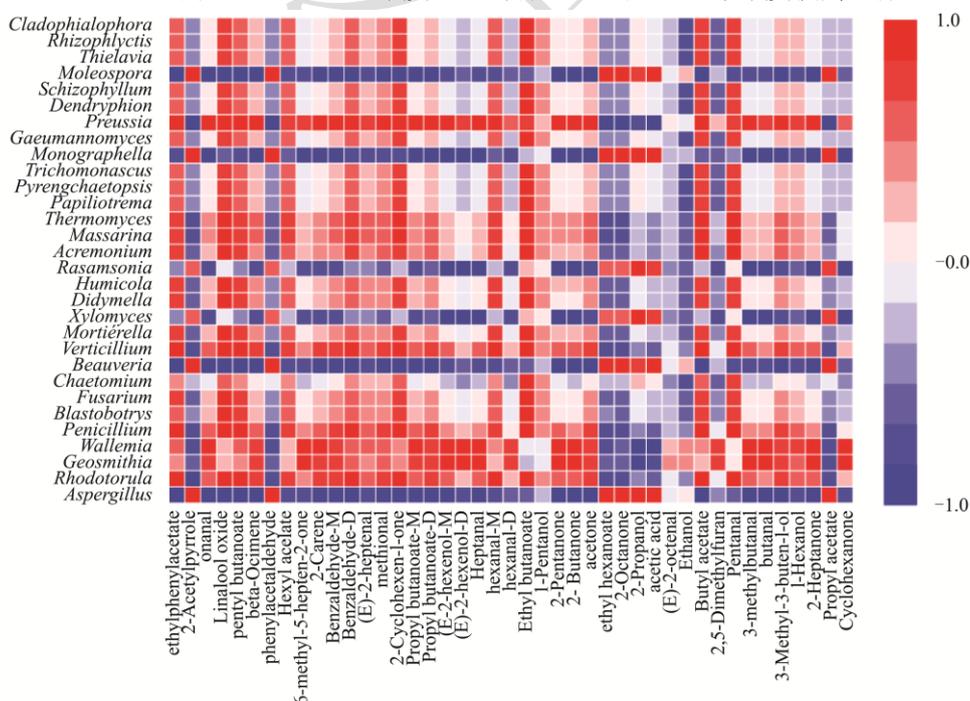


图 8 六堡茶样品微生物属水平与香气成分相关性分析

Fig.8 Correlation analysis between the microbial communities in genus level and the aroma in Liupao tea

陈化是六堡茶生产的重要工艺, 微生物在陈化过程中缓慢作用, 影响香气成分的生成和水平, 调控六堡茶品质形成。对真菌与香气组成进行皮尔逊相关性

分析, 形成热图如图 8。对相关系数绝对值大于 0.85 的属进行统计, 与 *Aspergillus* 正相关的有 6 种、负相关 20 种, 与 *Geosmithia* 正相关的有 9 种、负相关 1

种,与 *Wallemia* 正相关的有 10 种、负相关 1 种,与 *Penicillium*、*Rhodotorula* 正相关各为 7 种,与 *Blastobotrys*、*Fusarium* 正相关各为 1 种,提示这些微生物可能在六堡茶特征香气形成中发挥重要作用,在以后的研究中需要多加注意。

Aspergillus、*Rhodotorula*、*Geosmithia*、*Wallemia* 和 *Penicillium* 等属微生物与香气成分相对含量相关性较强。与 *Aspergillus* 正相关的香气成分有 6 种、负相关香气成分有 20 种, *Aspergillus* 与陈香关键成分壬醛相关系数为-0.89,与槟榔香特征成分氧化芳樟醇相关系数为-0.84,对香气结构有重要意义。此外 *Wallemia* 与壬醛的相关系数为 0.83, *Rhodotorula*、*Penicillium*、*Blastobotrys*、*Fusarium* 与氧化芳樟醇相关系数分别为 0.97、0.96、0.83 和 0.84。可能暗示 *Aspergillus*、*Wallemia* 与六堡茶陈香特征有密切关系, *Aspergillus*、*Rhodotorula*、*Penicillium*、*Blastobotrys*、*Fusarium* 与槟榔香的形成有比较密切的关系。

六堡茶中的微生物研究取得了一定的进展^[6],新的微生物不断被鉴定,作用机制也逐渐被揭示,但是微生物与香气特征相关性研究还很少,机制还不清楚,需要深入研究。

3 结论

从六堡茶中鉴定出醛类 13 种,酯类 9 种,醇类 8 种,酮类 8 种,烃类 2 种,酸类 1 种,杂环类 2 种,不同成分呈现花香、果香、陈香、木香,确证六堡茶香气成分是多种成分综合作用结果。样品中鉴定的属水平真菌丰度较高的有 *Aspergillus*、*Rhodotorula*、*Geosmithia*、*Wallemia*、*Penicillium*、*Blastobotrys* 和 *Fusarium* 等, *Aspergillus* 和 *Rhodotorula* 两个属的微生物占比达到 82.57%~99.73%,为本次研究的六堡茶的主要微生物, *Aspergillus*、*Wallemia* 与壬醛相关性较高,推测与六堡茶陈香形成有密切关系, *Aspergillus*、*Rhodotorula*、*Penicillium*、*Blastobotrys*、*Fusarium* 与氧化芳樟醇相关性较高,与槟榔香的形成存在比较密切的关系。

参考文献

- [1] Mao Y, Wei B, Teng J, et al. Polysaccharides from Chinese Liupao dark tea and their protective effect against hyperlipidemia [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53: 599-607.
- [2] 滕翠琴,刘仲华,龚受基,等.六堡茶对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的影响[J].茶叶科学,2014,34(3):230-238.
- [3] 龚受基,谢加仕,张均伟,等.六堡茶化学成分对胰 α -淀粉酶的抑制作用[J].钦州学院学报,2018,33(8):42-47.
- [4] Ding Q, Zhang B, Zheng W, et al. Liupao tea extract alleviates diabetes mellitus and modulates gut microbiota in rats induced by streptozotocin and high-fat, high-sugar diet [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109262.
- [5] 龚受基.六堡茶和茉莉花改善胰岛素抵抗功效及机制研究[D].长沙:湖南农业大学,2012.
- [6] Mao Y, Wei B, Teng J, et al. Analyses of fungal community by Illumina MiSeq platforms and characterization of *Eurotium* species on Liupao tea, a distinctive post-fermented tea from China [J]. Food Res Int, 2017, 99(Pt 1): 641-649.
- [7] 张均伟,侯燦,杜昱光,等.基于高分辨质谱结合主成分分析技术评价发酵过程对六堡茶关键品质成分的影响[J].食品科技,2019,44(12):328-334.
- [8] 毛彦,黄丽,韦保耀,等.广西六堡茶“金花”菌的分离与分子鉴定[J].茶叶科学,2013,33(6):556-561.
- [9] 欧惠算,邓旭铭,张灵枝,等.六堡茶中金花菌的分离与鉴定[J].南方农业学报,2017,48(4):658-662.
- [10] 杨雅焯,汪迎,李辉,等.广西六堡茶和重庆沱茶的微生物多样性分析[J].茶叶学报,2019,60(3):93-98.
- [11] Li J, Yuan H, Yao Y, et al. Rapid volatiles fingerprinting by dopant-assisted positive photoionization ion mobility spectrometry for discrimination and characterization of Green tea aromas [J]. Talanta, 2019, 191: 39-45.
- [12] 代真林,汪娅婷,姚秀英,等.玉米大豆间作模式对玉米根际土壤微生物群落特征、玉米产量及病害的影响[J].云南农业大学学报(自然科学),2020,35(5):756-764.
- [13] 杜金杰,刘晓纯,吴新慧,等.六堡茶微生物多样性研究进展[J].广东茶业,2021,4:2-8.
- [14] 覃榕珍,黄丽,滕建文,等.基于 GC-IMS 法分析不同烘焙温度对六堡茶香气品质的影响[J].食品科技,2022,47(5):282-290.
- [15] 王志华,薛志慧,朱文伟,等.基于 GC-IMS 的不同年份紧压白茶挥发性物质分析[J].食品与生物技术学报,2021,40(8): 85-94.
- [16] 祁兴普,刘纯友,侣再勇,等.基于风味指纹谱的庐山云雾茶品质等级研究[J].食品研究与开发,2021,42(14):152-157.
- [17] 黄林杰,罗达龙,钟家良.六堡茶中槟榔香气主要成分的研究[J].农业与技术,2018,38(8):12-14.
- [18] Shidong Lv, Yuanshuang Wu, Jiangsheng Zhou, et al. Analysis of aroma components of dark teas from five different production regions by fully automatic headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chemical & Pharmaceutical Research, 2014, 6(1): 246-253.

- [19] 穆兵,朱荫,马士成,等.六堡茶香气成分的全二维气相色谱-飞行时间质谱分析[J].食品科学,2017,38(22):169-177.
- [20] 刘泽森,邓庆森,何志强,等.槟榔香六堡茶的特征香气成分研究[J].农业研究与应用,2016,3:36-42.
- [21] 温立香,张芬,何梅珍,等.陈香六堡茶品质特征及香气质量评价方法建立[J].食品工业科技,2021,42(2):230-236.
- [22] 舒娜.六堡茶关键风味物质研究[D].重庆:西南大学,2021.
- [23] 马士成,王梦琪,刘春梅,等.六堡茶挥发性成分中关键香气成分分析[J].食品科学,2020,41(20):191-197.
- [24] 梁剑锋,李亚,王华,等.基于高通量测序的两种香型六堡茶微生物多样性及其特征分析[J].食品安全质量检测学报,2021,12(24):9565-9573.
- [25] 龙峻瑶,张均伟,黄丽,等.六堡茶乳酸菌多样性及其降胆固醇特性分析[J].食品科学,2021,42(18):58-64.
- [26] 徐书泽.六堡茶中真菌的多样性分析[D].南宁:广西大学,2014.
- [27] 梁剑锋,李亚,宾月景,等.梧州六堡茶中真菌多样性分析及真菌毒素残留量的测定[J].食品研究与开发,2022,43(15):195-200.