

贵州茯茶散茶发花条件优化及微生物多样性分析

张舟琼^{1,2}, 曹霞², 任锡毅^{1,2}, 黄永会^{1,2}, 刘永翔^{1,2}, 谭玉梅^{1,2*}

(1. 贵州省农业科学院生物技术研究所, 贵州贵阳 550006)

(2. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州贵阳 550006)

摘要: 贵州是我国茶树品种资源最丰富的省份之一, 茶园面积大, 但经济产值低, 夏秋茶浪费严重, 品种结构单一。该研究以贵州省安顺市黑毛茶为供试原材料, 人工接种茯砖茶“金花”发酵剂, 优化散茯茶发花工艺条件, 并开展了理化指标变化及真菌多样性研究。通过单因素试验及正交优化试验分析不同因素对黑毛茶散茶发花的影响。结果表明, 其最佳发花条件为: 含水量 30%、温度 24 ℃、发酵时间 9 d 及接种量 1:100 (*m/m*)。在此发花条件下, 成品散茯茶冠突曲霉孢子数为 3×10^8 CFU/mL, 水分、总灰分、茶多酚、游离氨基酸、水浸出物含量分别为 3.0%、6.8%、12.0%、2.4%、42.6%。经过上述优化后, 茶汤色明亮, 金花茂盛, 香气纯正, 滋味醇和。通过高通量测序技术分析不同发酵时间下散茯茶的真菌多样性。结果表明, 发酵 3 d 后, 曲霉属 (*Aspergillus*) 相对丰度达到 98.8%。该研究优化了贵州散茶发花的工艺条件, 对提高茯砖茶品质具有重要意义, 为其他茶叶散茶发花工艺提供参考。

关键词: 黑毛茶; 冠突曲霉; 散茶发花; 工艺优化

文章编号: 1673-9078(2023)09-62-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.0691

Process Optimization and Microbial Diversity Analysis of Guizhou Loose Fu-tea

ZHANG Zhouqiong^{1,2}, CAO Xia², REN Xiyi^{1,2}, HUANG Yonghui^{1,2}, LIU Yongxiang^{1,2}, TAN Yumei^{1,2*}

(1. Institute of Biotechnology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

(2. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang 550006, China)

Abstract: Guizhou is one of the provinces with the most abundant tea variety resources in China. The tea garden area is large, but the economic output value is low. The summer and autumn tea resources are seriously wasted and the variety structure is single. The dark tea Maocha was used as the raw material, and the Fuzhuan Brick tea golden flower fermentation agent was artificially inoculated to optimize the flowering process conditions of loose tea, and the changes of physical and chemical indexes and fungal diversity were studied. The effects of different factors on the flowering of dark tea loose tea were analyzed by monofactorial experiments and orthogonal optimization test. The results showed that the optimum conditions were as follows: moisture content was 30 %, temperature was 28 ℃, fermentation time was 9 d, inoculation amount 1:100 (*m/m*). Under these condition, the number of *Aspergillus cristatus* was 3×10^8 CFU/mL, the water content, total ash content, tea polyphenol content, free amino acid content, water extract content was respectively are 3.0%, 6.8%, 12.0%, 2.4%, 42.6%. After the above optimization, Jinhua lush, plump, soup was yellow and bright, taste of alcohol. High-throughput sequencing technology was used to analyze the fungal diversity at different fermentation time. The results showed that the relative abundance of *Aspergillus* reached 98.8 % after 3 days of fermentation. This study optimizes the process conditions of Guizhou loose tea, which is of great significance to improve the quality of Fuzhuan brick tea, and provides reference for the study of other loose tea flowering process.

Key words: dark tea Maocha; *Aspergillus cristatus*; fungal fermentation with loose tea; process optimization

引文格式:

张舟琼, 曹霞, 任锡毅, 等. 贵州茯茶散茶发花条件优化及微生物多样性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(9): 62-71

ZHANG Zhouqiong, CAO Xia, REN Xiyi, et al. Process optimization and microbial diversity analysis of Guizhou loose Fu-tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 62-71

收稿日期: 2023-06-08

基金项目: 中央引导地方项目 (黔科合中引地[2023]027); 国家自然科学基金项目 (31960018); 黔农科青年基金 ([2023]05 号)

作者简介: 张舟琼 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向: 食品微生物学, E-mail: 2549724189@qq.com

通讯作者: 谭玉梅 (1987-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 真菌资源挖掘与利用, E-mail: 540764039@qq.com

茯砖茶,也称“金花茶”,属于后发酵茶,在黑茶市场中深受欢迎^[1]。作为传统的茶叶产品之一,因其独特的品质风味及突出的保健作用被广大消费者所认可^[2-4]。但传统的茯砖茶加工工艺复杂繁琐、发花时间长、质量不可控、砖茶不便于携带和冲泡等严重阻碍了该茶的发展。

为了解决这些问题,“散茶发花”这一概念应运而生。“散茶发花”指的是在茶叶上进行人工接种“金花菌”并通过调节条件使其提前发花,产生大量金黄色闭囊壳(俗称“金花”)的过程^[5,6]。贾洪信等^[7]以湖南地区不同处理的金湘黑毛茶为原料,研究其发花过程。结果表明金湘黑毛茶发花的最佳条件为含水量28%~32% (*m/m*)、接种量0.5‰~1.0‰ (*m/m*)、温度28℃;秦俊哲等^[8]通过人工接种冠突曲霉发酵陕西泾渭黑毛茶制作散茯茶,得出最适发酵条件为含水量40% (*m/m*)、渥堆温度50℃和接种量0.12% (*m/m*)。发花条件的优化能使散茶发花好,生产周期缩短,提高茶叶产品的产量和质量^[7]。目前关于“散茶发花”的研究多集中在湖南、陕西、浙江等地,且不同产地、不同原料的茶叶在散茶发花工艺上有所差别^[9,10]。

贵州茶树品种资源丰富,2022年,贵州省茶园总面积700万亩,但产品结构单一^[11],80%以上夏秋茶资源得不到充分利用,茯砖茶为夏秋茶的利用提供了有利条件^[12]。安顺镇宁县是贵州省重要名优茶叶产区,镇宁团叶茶作为有名的夏秋茶,茶叶味苦,口感较涩,品质虽比不上春茶,但其营养价值高。而发花工艺的优化能够改善夏秋茶的滋味和品质,提高茶叶质量^[7]。因此探究贵州“散茶发花”的最佳工艺条件,能够提高贵州夏秋茶的质量和品质。

之前的研究多集中于砖茶工艺条件优化及冠突曲霉孢子液直接接种于黑毛茶,对散茯茶发花工艺及纯菌种制备发酵剂的研究较少^[13]。而人工接种纯种发酵剂,可促进“金花菌”的快速繁殖,缩短茯茶的“发花”周期,有效改善茯茶品质^[14,15]。发花过程是多种微生物共同参与的发酵过程,能促使散茶形成独特的色泽、香气和滋味^[16-19]。研究表明,“散茶发花”后微生物的变化是影响茯砖茶品质和风味的关键^[20]。而不同产地、不同原料的散茯茶中微生物群落组成不同,所以需要探究贵州黑毛茶发花过程中微生物多样性进行研究。因此,本研究在前期发酵剂的制备基础上,采用正交试验优化散茶发花条件,通过探究发花过程中真菌微生物多样性的变化规律和主要的理化成分变化规律对茶品质的影响,建立稳定的散茶发花工艺,为茯砖茶稳定生产及其深加工产品研发提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冠突曲霉 (*Aspergillus cristatus*, 菌株保藏号为:CGMCC 7.193) 由贵州省农业生物技术重点实验室保存;黑毛茶(品种:镇宁团叶)为贵州安顺地区采集;发酵剂由实验室自制,用于人工接种^[21]。

5% (*m/V*) NaCl MYA 培养基: 麦芽提取物 20 g/L、蔗糖 30 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 50 g/L、琼脂粉 15 g/L, 121℃ 灭菌 15 min。

1.2 仪器与设备

SS-325 高压灭菌锅,日本 Tomy Kogyo 公司; Milli-Q A10 超纯水机, Millipore 公司; 5418 型低速离心机,德国 Eppendorf 公司; THZ-98 恒温摇床,上海一恒仪器有限公司;超净工作台、普通冰箱及其它小型仪器均为国产仪器。

1.3 方法

1.3.1 发酵剂的制备

基于实验室前期茯砖茶最佳制备工艺进行金花发酵剂的制备^[21],散茶 40~50℃ 干燥 1 d 后常温保存。

1.3.2 散茶发花工艺流程

原料选择→含水量调节→灭菌→接种→发花→包装→散茯茶成品

1.3.3 人工接种散茶发花工艺优化

称取 400 g 黑毛茶,将设置好的含水量(31.96%, *m/m*)用喷壶均匀地喷洒在黑毛茶上,密封灭菌 10 min,取出,冷却,用制备好的发酵剂进行接种,置于恒温培养箱调节相应温度,湿度 70% 培养,放入烘箱 70℃,烘干 4 h;设置不同的含水量(10%、20%、30%、40%、50%, *m/m*)、温度(20、24、28、32、36℃)及接种量(0、1:10、1:100、1:1 000、1:10 000, *m/m*),观察不同发酵时间(3、5、7、9、11 d)对散茯茶发花的影响,每个实验重复三次,取平均值。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	含水量 A/%	温度 B/℃	发酵时间 C/d	接种量 D
1	20	24	5	1:10
2	30	28	7	1:100
3	40	32	9	1:1 000

以单因素实验为基础,以含水量、温度、接种量和发酵时间为因素设计 $L_9(3^4)$ 正交实验,以孢子数

为测量指标, 确定散茶发花最优工艺, 正交实验因素水平见表 1。

1.3.4 冠突曲霉孢子数量测定

取 1 g 散茯茶, 放入灭菌过的三角瓶, 加入灭菌水和适量的玻璃珠, 摇匀震荡过滤, 无菌水冲洗 3~5 次, 100 倍稀释孢子液, 用血球计数板计数, 公式如下:

$$n = \frac{N}{5} \times 25 \times 10^4 \times 100 \quad (1)$$

式中:

n ——孢子数量, 每毫升中的个数。

N ——采用 25×16 规格的血球计数板, 5 个中方格孢子总数^[15]。

1.3.5 理化指标分析方法

理化指标测定及感官品质评审委托国家农业农村部茶叶质量监督检验测试中心进行。水分检测: GB 5009.3-2016《食品中水分的测定》; 水浸出物检测: GB/T 8305-2013《茶 水浸出物的测定》; 游离氨基酸检测: GB/T 8314-2013《茶 游离氨基酸总量的测定》; 茶多酚检测: GB/T 8313-2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》; 总灰分检测: GB 5009.4-2016《茶 总灰分的测定》。感官评定方法参考 GB/T 23776-2009。

1.3.6 高通量测序

同一批发酵茶分别取 0、3、6、9 d 后的散茯茶样品于 -80 °C 低温保存。取 25 g 茶样与 125 mL 无菌水混合, 加玻璃珠, 充分震荡混匀, 静置 20 min; 摇床 (150 r/min) 震荡 15 min, 超声波洗菌 10 min (12 000 Hz)。用三层无菌纱布过滤后, 4 °C, 离心 10 min (18 000 r/min)。编号 0 d 为 A 组 (A1、A2、A3)、3 d 为 B 组 (B1、B2、B3)、6 d 为 C 组 (C1、C2、C3)、9 d 为 D 组 (D1、D2、D3), 共 12 组, 通过 E.Z.N.A 土壤 DNA 试剂盒提取微生物基因组 DNA。

Illumina Miseq 高通量基因测序委托北京百迈克生物科技有限公司完成。DNA 序列测序、拼接、质控及生物信息学分析由该公司协助完成。具体如下:

PCR 产物合并: 提取样品总 DNA 后, 根据全长引物序列合成带有 Barcode 的特异引物, 进行 PCR 扩增并对其产物进行纯化, 纯化产物进行浓度

(Qubit) 和条带 (琼脂糖凝胶电泳) 的检测, 符合条件的样品进行混样。

建库测序: 对 PCR 产物定量和均一化形成测序文库, 建好的文库先进行文库质检, 质检合格的文库再进行上机测序。

质控分析: Miseq 测序结果是双端序列数据, 根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对 reads 拼接 (merge) 成一条序列, 同时对 reads 的质量和拼接的效果进行质控过滤, 根据序列首尾两端的 barcode 和引物序列区分样品得到有效序列, 并校正序列方向。

1.3.7 数据分析

用 USEARCH 软件包中的 UPARSE 对所有样品的全部有效数据按照 3% 序列差异的标准, 序列按照标准进行 OTU 聚类归组^[22,23]; 在每个 OTU 聚类中, 选择丰度最高的序列作为该 OTU 代表性序列, 并对 OTU 代表序列进行分类学分析 (RDP classifier 贝叶斯算法), 最后生成一个 OTU 表。表中对每个样品的群落组成情况在各个分类水平 (界、门、纲、目、科、属、种) 描述, 设置置信阈值为 70%, 各分类学水平下的群落结构图使用 R 语言工具绘制。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果分析

2.1.1 含水量对散茶发花的影响

含水量对茯砖茶发花具有重要影响^[7]。本实验研究了不同含水量对散茶发花的影响 (表 2), 结果表明, 当含水量为 10% (m/m) 时, 冠突曲霉孢子数为 2.3×10^8 CFU/mL, 发花较少且不均匀; 含水量增加到 30% (m/m) 时, 冠突曲霉孢子数增加, 滋味醇和且有菌花香; 含水量增加到 50% (m/m) 时, 冠突曲霉孢子数减少将近 1 倍, 口感欠纯正。本研究结果表明含水量过低, 冠突曲霉的生长受到抑制; 含水量过高, 其他杂菌大量生长, 冠突曲霉孢子数变少。在本研究中, 含水量 30% 时最有利于冠突曲霉的生长。

表 2 含水量对冠突曲霉孢子数及感官评审的影响

Table 2 The influence of water content on the number of *Aspergillus cristatus* and sensory evaluation

含水量/%	汤色	香气	滋味	冠突曲霉孢子数/(10^8 CFU/mL)
原茶	黄绿; 微浑; 尚明	酸馊	平和	0
10	深金黄, 较明亮	尚纯正	醇和	2.3 ± 0.45^a
20	深金黄, 较明亮	较纯正, 微粗	醇和, 微粗	2.8 ± 0.71^b
30	橙黄, 较明亮	较纯正, 微粗, 有菌花香	醇和; 微有菌花香	3.0 ± 0.47^b
40	橙黄, 尚明亮	欠纯正	较醇和, 微粗涩, 微有菌花香	3.7 ± 0.41^c
50	橙黄, 尚明亮	欠纯正	较醇和, 微粗涩, 微有菌花香	2.1 ± 0.69^a

注: 表中同列数值不同的小写字母表示 $P < 0.05$ 水平具有显著性差异, 表 3~5 同。

表3 接种量对冠突曲霉孢子数及感官评审的影响

Table 3 The influence of inoculation amount on the number of *Aspergillus cristatus* and sensory evaluation

接种量	汤色	香气	滋味	冠突曲霉孢子数/(10 ⁸ CFU/mL)
原茶	黄绿; 微浑; 尚明	酸馊	平和	0
0	浅金黄; 尚明亮	欠纯正; 略闷	醇和; 微粗	0
1:10	深金黄; 尚明亮	尚纯正; 微粗; 微有菌花香	醇和	2.5±0.7 ^a
1:100	深金黄; 较明亮	尚纯正; 微粗; 有菌花香	较醇和; 微有菌花香	3.4±0.2 ^b
1:1 000	深金黄; 尚明亮	尚纯正; 微粗; 微有菌花香	较醇和; 微粗涩; 微有菌花香	3.0±0.5 ^b
1:10 000	深金黄; 尚明亮	尚纯正; 微涩; 微有菌花香	较醇和; 微粗涩; 微有菌花香	2.6±0.3 ^a

表4 温度对冠突曲霉孢子数及感官评审的影响

Table 4 The influence of temperature on the number of *Aspergillus cristatus* and sensory evaluation

温度/℃	汤色	香气	滋味	冠突曲霉孢子数/(10 ⁸ CFU/mL)
原茶	黄绿; 微浑; 尚明	酸馊	平和	0
20	金黄; 较明亮	纯正; 微青; 微有火工	醇和	0.7±0.1 ^a
24	深金黄; 较明亮	纯正; 较甜; 微有火工; 微粗	醇和	2.2±0.3 ^a
28	金黄; 较明亮	纯正; 较甜; 微有火工; 微粗	醇和	2.6±0.3 ^c
32	深橙黄; 明亮	纯正; 较甜; 微有火工; 微粗	醇和; 微酸	2.2±0.1 ^c
36	金黄; 明亮	纯正; 微有火工; 微青	醇和; 微酸	1.8±0.3 ^b

表5 发酵时间对冠突曲霉孢子数及感官评审的影响

Table 5 The influence of fermentation time on the number of *Aspergillus cristatus* and sensory evaluation

发酵时间/d	汤色	香气	滋味	冠突曲霉孢子数/(10 ⁸ CFU/mL)
原茶	黄绿; 微浑; 尚明	酸馊	平和	0
3	金黄; 泛绿; 明亮	较纯正; 较甜; 微闷	较醇和; 略酸	1.4±0.4 ^a
5	金黄; 较明亮	尚纯正; 略酸	较醇和; 略酸	2.7±0.1 ^b
7	深橙黄; 较明亮	较纯正; 较甜	醇和	3.6±0.3 ^c
9	深橙黄; 较明亮	较纯正; 较甜	醇和	3.4±0.5 ^{bc}
11	深橙黄; 较明亮	较纯正; 较甜; 微粗	醇和	2.9±0.8 ^{ab}

2.1.2 接种量对散茶发花的影响

接种量是影响发花的一个重要指标。本实验研究不同接种量对发花的影响,结果表明(表3),当接种量比例为1:10时,金花茂盛且茶滋味醇和,冠突曲霉孢子数较少,为 2.5×10^8 CFU/mL;当接种量比例为1:100时,冠突曲霉孢子数显著增加为 3.4×10^8 CFU/mL,茶滋味醇和且有菌花香;当接种发酵剂过少时(1:1 000),发花不均匀且影响滋味。推测是由于发酵过程中菌体基数较大,微生物营养供给不足导致冠突曲霉孢子数较少,导致发花不完全;而发酵剂过多,在工艺上会导致大量发酵剂的浪费。本研究最佳接种量为1:100时,冠突曲霉孢子数多,滋味好。

2.1.3 温度对散茶发花的影响

发花是通过控制一定的温度促使微生物的优势菌种生长,从而产生大量金黄色的闭囊壳。因此控制适宜的温度能提高发花质量。从表4可以看出,当发酵温度为20~24℃时,冠突曲霉生长较慢,发花不均匀且冠突曲霉孢子数较少;当温度在28℃时,金花茂

盛且滋味醇和,冠突曲霉孢子数达到最大为 2.6×10^8 CFU/mL;随着温度的持续升高,冠突曲霉的生长受到抑制,冠突曲霉孢子数也开始降低,杂菌生长导致茶滋味较差。本研究中,28℃是冠突曲霉最适生长温度。

2.1.4 发酵时间对散茶发花的影响

发酵时间对冠突曲霉生长起着重要作用。由表5可知,当发花到3d时,微发花;当发花到7d时,发花茂盛且口感醇和,冠突曲霉孢子数达到最大为 3.6×10^8 CFU/mL;当发花时间为11d时,金花茂盛,滋味醇和,但随着发酵时间的增加,散茶营养物质消耗完,冠突曲霉生长缓慢。过长的发花时间在工艺上会降低生产效率。张锐^[24]对散茶发花工艺优化表明,在最佳发酵条件下,其冠突曲霉孢子数为 2.58×10^8 CFU/mL;而冠突曲霉发酵杜仲茶的最优条件下孢子数仅为 1.13×10^6 CFU/mL^[25],低于本研究得到的孢子数。

2.2 散茶发花过程中感官审评与理化成分变化规律分析

在茶叶加工过程中,理化成分的变化对茶叶品质和滋味有显著的影响。影响茯砖茶滋味的成分主要有:氨基酸、水浸出物、茶多酚等^[26]。有研究表明,散茯茶加工过程中茶多酚呈下降趋势,从原料到成品相对下降幅度可达54.62%^[27];本研究中茶多酚含量总体也呈下降趋势(图1)。从图1a可以看出,发花初期3d时茶多酚含量为11.6%,到发花末期11d时散茯茶中茶多酚含量为9.4%,其相对下降幅度为18.9%;这也与张锐^[24]的研究结果一致。推测是由于在发酵过程中,湿热作用能在较短时间内促进茶叶内含物质的氧化、聚合、降解、转化等^[28],冠突曲霉菌体代谢越旺盛,分泌的胞外酶越多,茶多酚及咖啡碱等转化成一

些小分子风味物质就多,砖茶的品质也就越好^[29-31]。而发花7d时茶多酚的含量上升,可能是由于不同茶树上采集的茶叶本身茶多酚含量差别较大的原因,7d时采集到的茶叶茶多酚含量本身较其他同时段的茶叶茶多酚含量高,张锐^[24]的研究中茶多酚含量为14.08%~18.81%,黄浩等^[32]的研究中不同茶叶茶多酚含量从6.13%~13.24%不等,这表明不同茶叶茶多酚含量差异较大。茶多酚是茯砖茶中涩味的主要来源成分,这种苦涩味主要是茶多酚中的酯型儿茶素带来,在茯砖茶的加工过程中,酯型儿茶素转化为简单儿茶素,使茯砖茶滋味醇和,同时,部分儿茶素也转化形成茶色素,从而使得茯砖茶汤色明亮、橙红^[33]。本研究中在发花第9天时茶叶茶汤橙色、明亮、滋味醇和,是由于茶多酚在发酵第9天时含量大幅度下降,多酚类物质转化成一些小分子风味物质,减少了茯茶的粗涩味,增加了醇和味道。

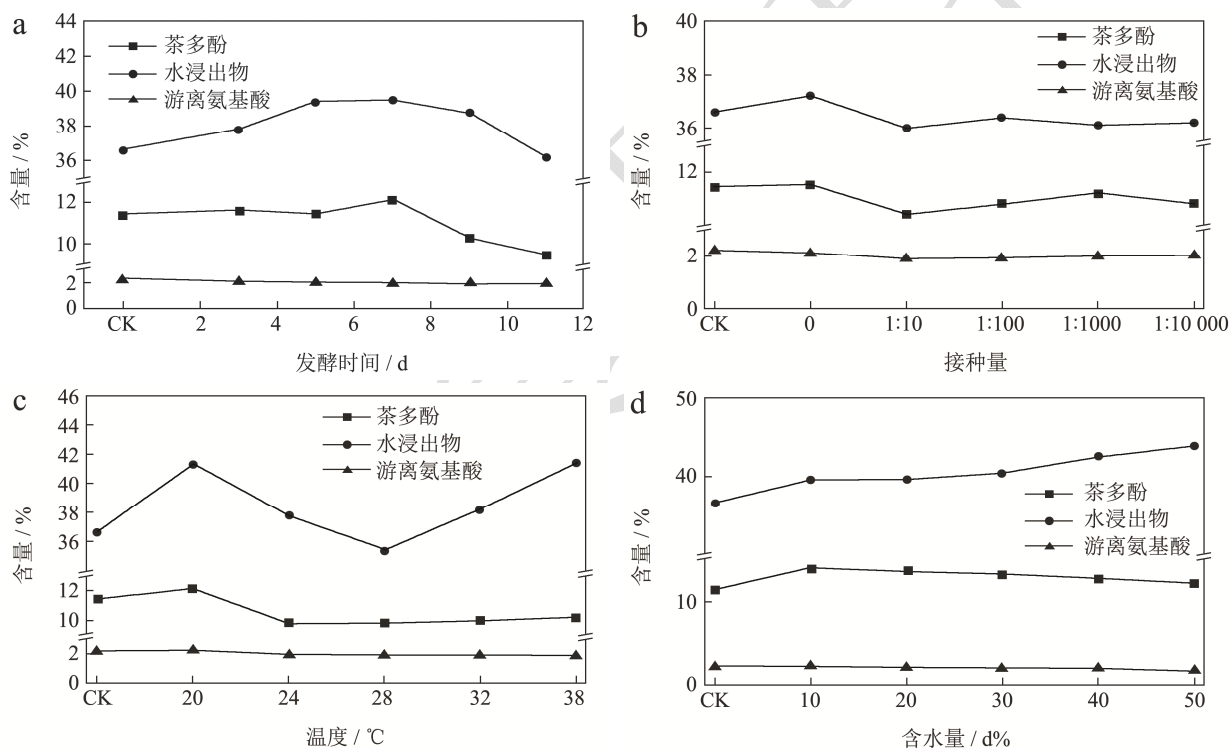


图1 散茶发花过程中主要理化成分含量变化

Fig.1 The content change of main components in the process of Loose Fu-Tea

水浸出物含量是评价茶叶品质好坏的标准之一,水浸出物的含量与茶叶的内含物质成正比^[34]。研究表明,时间越长,茶水水浸出物含量越低。从图1可以看出,水浸出物含量呈现一个动态变化的过程。图1a中水浸出物表现为先增加后降低,但下降幅度并不显著,相对减少幅度为4.2%。推测主要原因为微生物维持生长需要消耗部分的水浸出物,水解反应也使难溶性大分子物质转化为能溶于水的小分子物质,导致水浸出物的含量增加。而水溶性物质之间互相转化生成

难溶性物质,所以水浸出物含量又降低,因而,双向变化最终使水浸出物含量在发花过程中有所减少^[32]。而在不同含水量条件下(图1d)水浸出物含量不断增加,茶叶内含物质也不断丰富。水浸出物是茯砖茶中的呈味物质,与茯砖茶滋味、汤色、色泽等密切相关^[35]。本研究中水浸出物含量丰富,远高于国标规定($\geq 20.0\%$)的合格茯砖茶产品,对发酵茶的红艳汤色和滋味有积极作用。

图1可以看出,随着发酵时间增加,游离氨基酸

含量减少,但减少幅度不显著。推测是由于在发酵过程中,微生物分泌出多种酶类使部分的蛋白质水解成为氨基酸。但由于冠突曲霉的孢子数量急剧上升,需要大量的营养成分来满足微生物自身生长繁殖、代谢的需要,蛋白质水解的氨基酸又被作为碳源或氮源消耗,这一双向变化最终使游离氨基酸含量在发花过程中略微减少。研究表明茶叶中游离氨基酸是茶叶滋味与香气形成的前体物质,是茶叶独特滋味的重要成分

之一^[36]。本研究中游离氨基酸总体变化不大,在游离氨基酸的协同作用下,茶叶收敛苦涩、滋味醇和甘厚。

2.3 正交实验结果

以单因素实验为基础,含水量、接种量、温度及发酵时间4个因素,以冠突曲霉数为评价指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,正交实验结果见表6。

表6 正交实验结果

Table 6 Results of orthogonal experiment

试验号	A 含水量/%	B 温度/°C	C 发酵时间/d	D 接种量	冠突曲霉孢子数/(10^8 CFU/mL)
1	1	1	1	1	1.2
2	1	2	2	2	1.5
3	1	3	3	3	1.7
4	2	1	2	3	1.9
5	2	2	3	1	1.9
6	2	3	1	2	2.0
7	3	1	3	2	2.2
8	3	2	1	3	1.8
9	3	3	2	1	1.6
k1	1.5	1.8	1.7	1.6	
k2	1.9	1.7	1.7	1.9	
k3	1.8	1.7	1.9	1.8	
极差 R	0.4	0.1	0.2	0.3	

注:表中同列数值不同的小写字母表示 $P<0.05$ 水平时差异显著。

表7 成品散茯茶理化性质含量

Table 7 Physicochemical properties and contents of finished

Loose Fu-Tea			
项目		国家标准	散茯茶
水分/%	≤	14.0	3.0
总灰分/%	≤	9.0	6.8
茶梗/%	≤	20	15.0
非茶类杂质物质/%	≤	0.2	0.1
水浸出物/%	≥	20	42.6
冠突曲霉/(CFU/mL)	≥	20×10^4	30×10^7

由表6可知,影响散茶发花因素主要是 $A>D>C>B$,即含水量>接种量>发酵时间>发酵温度。通过正交试验结果得知,散茶发花最佳工艺条件为 $A_2B_1C_3D_2$,即含水量30% (m/m)、温度24 °C、发酵时间9 d、接种量1:100 (m/m)。但在正交实验中并未出现这一组合,因此再对实验进行验证,对散茶发花最优组合($A_2B_1C_3D_2$)进行3次平行试验,记录冠突曲霉孢子数取平均值。得到该条件下的冠突曲霉孢子数为 3.0×10^8 CFU/mL,水分含量为3% (m/m),茶多酚含量为12% (m/m),水浸出物含量42.6% (m/m),

游离氨基酸含量为2.4% (m/m),总灰分含量为6.8% (m/m)。从研究结果表7可知,黑毛茶通过发花形成散茯茶,理化性质明显优于原茶及散茯茶,也优于国标GB/T 9833.3-2013茯砖茶中的理化指标,说明成品散茯茶完全能达到国家标准。在此条件下散茯茶金花茂盛,香气纯正,滋味醇和。

2.4 发花过程中真菌群落的优势菌属及真菌多样性分析

2.4.1 分类学分析

根据物种注释情况,对不同水平各个样品群落组成进行统计,分为4个门、14个纲、21个目、27个科、30个属。说明散茯茶在发花过程中的真菌多样性较为丰富,选取丰度最高的10个属进行丰度变化分析。

2.4.2 属的分类水平上的相对丰度

在属的分类水平上,如图2所示,在0 d时,样品A1、A2、A3真菌的多样性高,分别有粗糙孔菌属(*Trechispora*)、酒香酵母属(*Brettanomyces*)、球壳菌属(*Plectosphaerella*)、镰刀霉属(*Fusarium*)、毕

赤酵母属 (*Pichia*)、分子孢子菌属 (*Cladosporium*)、德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)、被孢霉属 (*Mortierella*) 和曲霉属 (*Aspergillus*)。在发酵初期 (A1、A2、A3)，曲霉属 (*Aspergillus*) 相对丰度最高，分别达 90.3%、98.1%、96.5%，其余 9 组样品 (发酵 3、6、9 d) 曲霉属丰度均高于 98.8%，是绝对优势属。黑毛茶发酵初期实际上是以冠突曲霉为主体多种微生物共同参与的过程，加工中除了优势菌-冠突曲霉之外，还伴生有其他曲霉、孢子菌、酵母菌和大量的细菌，而非冠突曲霉单一菌种的演变，独特品质和风味的形成也是多种微生物共同作用的结果。

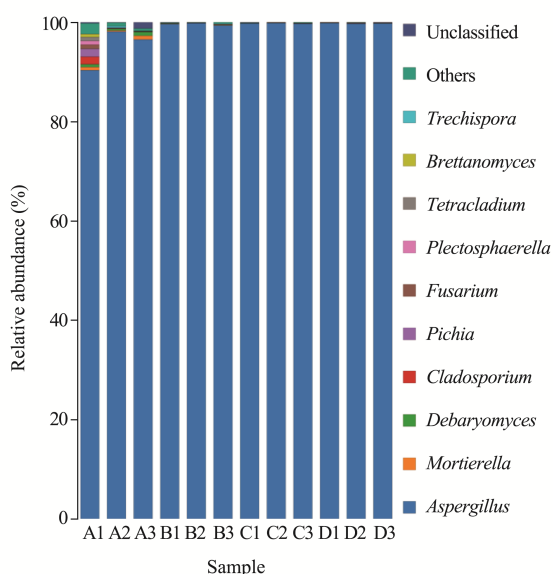


图2 属分类水平上的相对丰度

Fig.2 Relative abundance at the phylum classification level

2.4.3 Alpha 多样性指数统计

表 8 Alpha 多样性指数统计量

Table 8 Alpha diversity index statistics

Sample ID	Feature	Chao1	Simpson	Shannon
A	39.3±6.11	45.1±2.10	0.100±0.730	0.540±0.350
B	10.3±2.08	29.2±4.09	0.008±0.042	0.049±0.020
C	12.7±3.50	28.0±19.07	0.004±0.001	0.027±0.007
D	13.7±2.30	19.7±6.81	0.004±0.002	0.029±0.100

注: Sample ID 为样品名称; Feature 为特征 (OTUs 或 ASVs) 的个数; Chao1 为菌落丰富度指数; Shannon、Simpson 为菌落多样性指数。

用于衡量 Alpha 多样性的指数主要有 Chao1 指数、香农指数 (Shannon)、辛普森指数 (Simpson) 等。其中 Chao1 指数和 ACE 指数与物种丰富度正相关; Shannon 指数值越大, Simpson 指数越小, 则群落多样性越大^[37]。由表 8 可知, A 组发酵时间起始时 (0 d) 的 Chao1 指数和 Shannon 指数最高, 说明在黑毛茶初始阶段真菌多样性及丰富度最高。随着发酵时间增加,

以冠突曲霉为主的微生物占据主要优势, 其他微生物种类逐渐减少, 多样性相应降低。到发酵第 9 天时, 发花效果较好, 优势菌种增多, 真菌群落多样性降低。

2.4.4 真菌群落结构差异性分析

主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 能反应样品间的相似性, 样品距离越近, 其组成越相似^[38]。如图 3 所示, 主成分对样品差异贡献值为 99.77%, 表明图 3 较好地反映出各组之间的种群结构差异能够通过图较好地反映出来。图中 B 组、C 组、D 组距离较近, A 组距离较远, 说明 B 组、C 组、D 组的真菌群落结构较为相似, A 组样品中真菌群落结构及丰度与其他组差异较大。而 A 组内样品间距离也较远, 说明刚开始发酵时, 散茯茶内真菌群落结构差异较大, 微生物种类多。而发酵到后期以冠突曲霉为主, 微生物组成相似, 这也与上述结果一致。

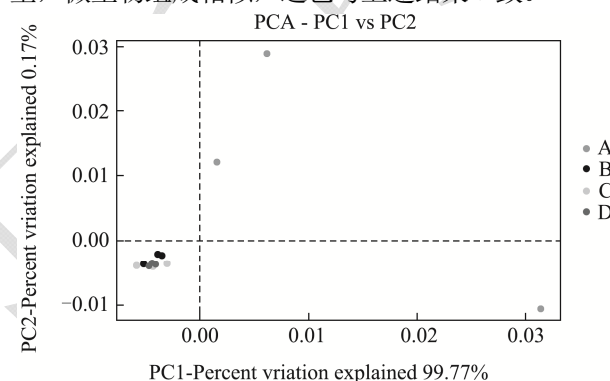


图 3 主成分分析图

Fig.3 Principal component analysis diagram

注: 不同分组的样本用不同颜色的点来表示; 横坐标和纵坐标分别代表第一主成分和第二主成分, 后面的百分比表示不同成分对样品差异的贡献值。

3 讨论

探究散茶发花最佳工艺实质上是综合评估水分、接种量、发酵时间和温度等因素对发花质量影响。加工过程实质也是以冠突曲霉为主多种微生物共同参与的复杂的发酵过程。散茶发花工艺对散茯茶品质至关重要, 但目前贵州散茯茶发花工艺研究不足。其他学者^[39,40]对发花工艺做了大量研究, 研究结果表明, 冠突曲霉具有很强的适生性, 与其生产环境和加工工艺有很大关系。而环境和工艺的不同会导致发花过程中的微生物多样性不同, 这也是不同地域生产的茯砖茶品质和口感不同的原因。

影响发花质量的因素很多, 涉及生产工艺的各个环节。在本研究以镇宁团叶黑毛茶为原料, 将发酵剂接种黑毛茶, 进行发花工艺条件的优化。研究结果表明, 最佳工艺条件为: 原料含水量 30% (m/m), 接种

量为1% (m/m), 温度24 °C、发酵时间9 d。在此条件下, 茶叶品质好, 金花茂盛, 孢子数多, 滋味醇和, 金花香气浓郁。秦俊哲等^[8]人工接种冠突曲霉发酵制作散茯茶, 其适宜发酵条件含水量为40% (m/m), 最佳接种量为0.12% (m/m); 李飞鸣等^[41]以桑叶毛茶和黑毛茶混合作为茶坯原料, 人工接种冠突曲霉发酵制成散茯茶, 茶坯含水量为28% (m/m); 贾洪信^[7]的研究表明散茶接种量为0.5‰~1.0‰ (m/m) 时最有利于发花。含水量的高低显著影响冠突曲霉的生长, 当含水量过低时, 影响冠突曲霉生长; 含水量过高, 霉菌等许多杂菌容易生长, 导致冠突曲霉生长代谢受阻, 抑制菌落生长, 减弱产孢能力, 影响散茯茶口感。而接种量也是影响发花的一个重要指标^[42]。当冠突曲霉接种量较少时, 发花不均匀; 接种量越多, 冠突曲霉越容易生长成优势菌, 其生长代谢旺盛, 能产生丰富的代谢产物。但接种量过大时, 底物的含量有限, 在工艺上会造成发酵剂大量的浪费, 对微生物的生长也有影响^[43]。研究表明散茶发花工艺的最适温度范围是24~30 °C^[39,40,44], 本实验室前期对冠突曲霉的生长发育进行研究, 24~28 °C是最有利于“金花菌”生长的温度范围; 最适发酵时间从7~10 d不等, 因为发酵时间的长短影响散茯茶的品质, 发酵天数较少, 冠突曲霉生长周期可能不完全, 发酵不彻底。若发酵天数过长, 不利于生产, 降低生产效率^[39,40]。以上结果表明, 不同研究中由于原料、地域、加工环境等的不同, 散茯茶最佳发花条件有所差异。研究者们对散茶发花工艺的研究多为直接接种冠突曲霉孢子液。而本研究通过制作发酵剂接种, 显著改善了黑毛茶的发花效果, 缩短发花时间, 在工艺改良取得了成功。

“散茶发花”其独特的发花工序, 是通过控制一定的温度、湿度条件, 促使优势微生物生长繁殖, 使茶叶内含物质发生了复杂的变化过程, 这一过程伴随着微生物发酵。微生物在散茶发花过程中扮演着重要的作用, 我们对不同发酵天数的散茯茶微生物多样性进行了研究。结果表明, 发酵起始时微生物多样性高, 包含较多种属; 发酵3 d之后曲霉属 (*Aspergillus*) 相对丰度达到98.8%, 成为绝对优势属。表明茯砖茶加工中除了接种的优势菌冠突曲霉菌之外, 还存在其他各种大量真菌, 并非只是冠突曲霉单一菌种的发酵过程。而随着发酵时间的延长, 其他各种大量真菌受冠突曲霉这一优势菌种及其他环境条件(含水量、温度、接种量等)的影响, 在优胜劣汰的自然选择后, 微生物群落发生了时间和空间上的变化。这与赵仁亮等^[45]的研究结果相似。赵仁亮等采用 Illumina MiSeq 技术分析不同地区茯砖茶微生物多样性的研究表明, 不同

地区的茶叶产品真菌群落存在差异, 其中曲霉属 *Aspergillus* 在茯砖茶产品中相对丰度均为92%以上。其相对丰度略低于本研究中采集到的(98.8%)。Li等^[46]研究了茯砖茶产品的加工过程中微生物群落变化, 结果表明, 在加工过程中曲霉属相对丰度均呈现先下降后上升的趋势, 这也与本研究结果吻合。由于冠突曲霉能够直接反映茯砖茶的品质, 因此, 茯砖茶中曲霉属的丰度越高, 表明条件控制得越好, 品质也越高。

贵州茶叶历史已有100万余年, 但以绿茶发展为主线的思维占据主导, 导致茶叶结构单一。贵州黑茶的研究起步较晚, 近十年才受到广泛关注。夏秋茶资源浪费严重, 目前贵州黑茶主要以茯砖茶为主, 品种单一, 市场认可度低。因此做好安顺黑茶产业能够丰富贵州茶资源, 促进贵州茶产业的发展^[47]。本研究以贵州安顺地区的镇宁团叶作为原料, 人工接种“金花菌”发酵剂, 工艺优化后形成品质优良的散茯茶, 丰富了贵州黑茶产业的研究, 对促进贵州黑茶产业的可持续发展具有重要的意义。

4 结论

综上所述, 本研究在前人研究的基础上, 首次对贵州安顺镇宁团叶进行接种, 将冠突曲霉接种到黑毛茶中制成发酵剂再接种到黑毛茶上, 进行“散茶发花”, 并成功优化了散茯茶的发花工艺。确定最佳发花工艺条件为: 含水量30% (m/m)、温度24 °C、发酵时间9 d、接种量1:100 (m/m)。在此条件下冠突曲霉数为 3×10^8 CFU/mL, 水分含量为3% (m/m), 营养成分丰富, 金花茂盛, 香气纯正, 滋味醇和。进一步利用高通量测序技术进行多样性分析, 揭示贵州地区散茶发花过程中的微生物多样性, 解决了散茯茶发花难、发花易污染的工艺难题, 为茯茶生产提质增效提供技术支持。发花工艺技术改进是提高茯砖茶品质的重要关键技术, 为深加工产品的开发应用提供一定的实践指导意义。

参考文献

- [1] 王昕, 张宇翔, 任婷婷. 茯砖茶中冠突散囊菌的分离鉴定及其在液态发酵中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 172-178.
- [2] 王茹茹, 肖孟超, 李大祥, 等. 黑茶品质特征及其健康功效研究进展[J]. 茶叶科学, 2018, 38(2): 113-124.
- [3] Fu D H, Ryan E P, Huang J N, et al. Fermented *Camellia sinensis*, Fu Zhuan tea, regulates hyperlipidemia and transcription factors involved in lipid catabolism [J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2999-3005.

- [4] Chen G J, Wang M J, Xie M H, et al. Evaluation of chemical property, cytotoxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharides from Fuzhuan brick teas [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 120-127.
- [5] 黄浩. 茯茶“散茶发花”技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [6] Xia F, Hu S, Zheng X, et al. New insights into metabolomics profile generating in fermented tea: the relevance between bacteria and the metabolites in Fuzhuan brick tea [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 102(1): 350-359.
- [7] 贾洪信, 刘素纯, 黄建安, 等. 影响散茶发花主要因素探讨[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(14): 7541-7543.
- [8] 秦俊哲, 张锐, 刘凯丽. 散茶人工发花工艺研究[J]. 食品工业, 2016, 37(2): 96-98.
- [9] 赵仁亮, 吴丹, 姜依何, 等. 不同产区加工的茯砖茶中“金花”菌的分离及分子鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2016, 42(6): 592-600.
- [10] 虞飞, 黄莹捷, 姚燕妮, 等. 不同原料对金花菌茶品质的影响[J]. 中国农学通报, 2015, 31(19): 222-226.
- [11] 喻丹. 意在言外 事近喻远-“贵州十大名茶”评选的导向与寓意[J]. 当代贵州, 2009, 15: 29-31.
- [12] 邱胜. 贵州茶的前世今生[J]. 当代贵州, 2019, 13: 20-21.
- [13] 武子宁, 张处处, 郭培鸿, 等. 混合型茯茶发酵剂的制备及其在散茯茶中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(20): 6599-6606.
- [14] 胡治远. 湖南地区茯砖茶菌群多样性及发花工艺优化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [15] 罗冰. 茯砖茶发酵菌生物学特性及其发酵剂制备研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2014.
- [16] Li Q, Huang J N, Li Y D, et al. Fungal community succession and major components change during manufacturing process of Fu brick tea [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 6947.
- [17] Xu A Q, Wang Y L, Wen J Y, et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 14-22.
- [18] 徐正刚, 吴良, 刘石泉, 等. 黑茶发酵过程中微生物多样性研究进展[J]. 生物学杂志, 2019, 36(3): 92-95.
- [19] 曾桥, 吕生华, 李祥, 等. 不同原料茯砖茶活性成分及微生物多样性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 69-77.
- [20] Li Z Y, Feng C X, Luo X G, et al. Revealing the influence of microbiota on the quality of Pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis [J]. Food Microbiology, 2018, 76: 405-415.
- [21] 曹霞, 刘永翔, 黄永会, 等. 茯砖茶金花发酵剂的制备工艺优化[J]. 贵州农业科学, 2021, 49(2): 140-145.
- [22] Edgar R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996.
- [23] Zhbannikov I Y, Foster J A. Analyzing High-Throughput Microbial Amplicon Sequence Data Using Multiple Markers [M]. Netherlands: Academic Press, 2018.
- [24] 张锐. 散茶发花工艺研究及其主要功效成分分析[D]. 西安: 陕西科技大学, 2016.
- [25] 张丽华, 李珍珠, 赵光远, 等. 冠突散囊菌发酵杜仲茶的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 118-123.
- [26] 姚茂君, 黄群, 陈林杰, 等. 冠突散囊菌的分离及其液态发酵特性[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(6): 28-31.
- [27] 傅冬和, 刘仲华. 茯砖茶加工过程中主要化学成分的变化[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 64-67.
- [28] 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.
- [29] 杨苗. 泾阳茯砖茶品质与“金花菌”的效应研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019.
- [30] Zhang C T. Association between chemistry and taste of tea: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 101: 139-149.
- [31] Zhu M Z, Li N, Zhou F, et al. Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea [J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126043.
- [32] 黄浩, 黄建安, 刘仲华, 等. 茯茶“散茶发花”加工过程中茶多酚和碳水化合物及冠突散囊菌数量的变化研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 227-232.
- [33] 李佳莲, 胡博涵, 刘素纯, 等. 微生物与茯砖茶品质形成研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 9: 406-408.
- [34] 白玉艳, 赵艳, 王白娟. 云南勐库大叶种普洱茶水浸出物含量的研究[J]. 食品工业, 2013, 34(6): 14-16.
- [35] 耶玉婷, 苟拥军, 李长风, 等. 冠突散囊菌散茶发花工艺提高茯茶品质[J]. 农产品加工, 2020, 13: 31-36.
- [36] 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, 5: 1554-1560.
- [37] Grice E A, Kong H H, Conlans, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324(5931): 1190-1192.
- [38] Dubois P C, Trynka G, Franke L, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression [J]. Nature Genetics, 2010, 42(4): 295-302.

- [39] 纪修扬. 茯茶散茶工艺优化及饮料开发[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018.
- [40] 欧阳梅. 人工发酵黑散茶的工艺及降脂效果研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [41] 李飞鸣, 邵元元, 肖建中, 等. 桑叶茶“散茶发花”工艺研究[J]. 北方蚕业, 2017, 38(3): 12-15, 19.
- [42] 魏晓惠. 金花菌不同接种量固态发酵对绿毛茶品质的影响[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(6): 82-84.
- [43] Lu H, Yue P, Wang Y, et al. Optimization of submerged fermentation parameters for instant dark tea production by *Eurotium cristatum* [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2016, 40(5): 1134-1144.
- [44] 常秋. 散茶发花加工过程中化学成分变化的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013.
- [45] 赵仁亮, 胥伟, 吴丹, 等. 基于 Illumina MiSeq 技术分析不同地域加工的茯砖茶中微生物群落多样性[J]. 生态学杂志, 2017, 36(7): 1865-1876.
- [46] Qin L, Liu Z, Huang J, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of Fuzhuan brick tea water extract in high-fat diet-induced obese rats [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2013, 93(6): 1310-1316.
- [47] 王银诚, 袁海波, 江用文. 黑茶品质成分及加工研究进展[J]. 中国农学通报, 2016, 32(22): 194-199.