

莫宏婷,陈智雄,胥伟.藏茶渥堆过程中嗜热菌的分离及对藏茶品质形成影响[J].华中农业大学学报,2025,44(6):106-116.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.011

藏茶渥堆过程中嗜热菌的分离及对藏茶品质形成影响

莫宏婷¹,陈智雄²,胥伟¹

1. 四川农业大学园艺学院,成都 611130; 2. 贵阳学院生物与环境工程学院,贵阳 550005

摘要 为探究嗜热菌对藏茶品质形成的影响,对藏茶渥堆样中的微生物进行高温(45、60℃)筛选和分离纯化,共获得7株嗜热细菌,经形态学鉴定和分子生物学鉴定后确认为芽孢杆菌属(*Heyndrickxia*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)和戈里斯芽孢杆菌属(*Terribacillus*),接种至绿毛茶进行单菌恒温固态发酵。审评结果显示:试验中各处理茶样香气在渥堆过程中呈现“栗香”到“陈香”再到“闷味”的变化,嗜热细菌对滋味产生一定影响,使滋味在渥堆过程中呈现“浓厚”到“醇厚”再到“醇和”的变化,并具有“滑”和“爽”的口感。生化测定结果显示:发酵过程中茶多酚含量呈减少趋势,戈里斯芽孢杆菌和高浓度短芽孢杆菌有助于茶多酚降解,可能是滋味变得“醇和”的原因;游离氨基酸含量呈先增后减的趋势,主要是由湿热作用导致;可溶性糖含量呈先增后减再增的趋势,儿茶素总量变化与茶多酚趋一致,发酵结束时,各处理的没食子酸含量均增加,其他组分总体减少。

关键词 藏茶;黑茶;渥堆;嗜热菌;品质鉴定

中图分类号 S571.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0106-11

黑茶是六大茶类之一,是中国典型的后发酵茶,由茶叶固态发酵而成,包括藏茶、熟普、茯砖茶和六堡茶等,渥堆处理是黑茶品质形成的关键步骤,其实质是茶原料在一系列微生物的作用下,经酶促反应和发酵过程,形成叶色棕褐、香气纯正的品质特征的过程^[1-3]。黑茶渥堆过程中的高温、湿热环境对微生物具有筛选作用,也为嗜热微生物的繁殖提供了良好的条件,同时微生物的分解代谢对黑茶品质的形成起到了决定性作用^[4-6]。有关研究表明,在同等湿热条件下采用无菌发酵技术无法达到黑茶独特的陈香醇韵品质,因此研究黑茶渥堆过程中微生物的种类、代谢对理解黑茶品质的形成原理有极大价值,也对优化制茶工艺、规范黑茶安全性生产具有积极作用^[7-8]。

此前有研究者对熟普制作全过程的茶样在高温条件下进行细菌的分离、纯化及鉴定^[9],结果发现有大量嗜热细菌的存在,包括凝结芽孢杆菌*Bacillus coagulans*、枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*、地衣芽孢杆菌*Bacillus licheniformis*、热嗜淀粉芽孢杆菌*Bacillus thermoamylovorans*、*Bacillus shackletonii*、喜热噬油芽孢杆菌*Geobacillus thermoleovorans*、乳酸片球菌

Pediococcus acidilactici、植物乳杆菌*Lactobacillus plantarum*等,这些嗜热细菌同嗜热真菌一起在熟普的发酵过程中起到了关键作用。其中,地衣芽孢杆菌被Zhu等^[10]接种于茶叶上,发现其使(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯、(-)-表没食子儿茶素、(-)-表儿茶素没食子酸酯和(-)-表儿茶素的含量在黑茶渥堆过程中显著降低。

藏茶作为黑茶鼻祖,历史悠久,文化内涵丰富,其独特而复杂的制作工序,使其具有“红、浓、陈、醇”的品质特点。多种微生物参与的渥堆工序是藏茶品质形成的关键,茶叶内含物质在湿热作用和微生物胞外酶的共同影响下发生不可逆转的变化。近年来,相关研究发现,藏茶具有降脂减肥、调理肠胃、降血糖、抗衰老、抗氧化和抗辐射等保健功效,使其逐渐受消费者青睐^[11-13]。但传统藏茶具有生产周期长、品质不稳定、易受有害微生物污染等问题,一定程度上阻碍了藏茶的销售和推广。

研究者利用发酵罐生产普洱茶,可以更为精确地控制发酵条件,充分的搅拌也更有利于微生物生长,可以适当缩短发酵时间,减少污染,适合小批量和大规模机械化生产^[14]。因此,对藏茶渥堆过程中

收稿日期:2025-07-23

基金项目:四川省重点研发计划项目(2023YFN0010);贵州省基础研究(自然科学)计划项目(黔科合基础-ZK[2021]一般149)

莫宏婷,E-mail:2413449698@qq.com

通信作者:胥伟,E-mail:xuweianti@sicau.edu.cn

的嗜热微生物进行分离鉴定及接种至藏茶渥堆环境研究其对藏茶品质形成的作用具有重要意义,也能为精准利用微生物制剂生产品质稳定的藏茶提供一定的参考^[15]。本研究对藏茶渥堆来源的微生物进行高温筛选、分离纯化和鉴定(形态学鉴定+分子生物学鉴定),探究藏茶渥堆过程的嗜热菌种类,制成菌悬液后接种到灭菌绿毛茶上进行恒温发酵试验,定时取样进行感官品质审评并采用化学计量法测定发酵后茶叶的组分,探究嗜热菌发酵绿毛茶品质转化机制,以期为藏茶加工提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)供试茶样。①渥堆藏茶:马边绿1号渥堆第10天堆芯茶样,2022年11月取自马边星农现代制茶中心,作为嗜热菌来源。②绿毛茶:购自马边文彬茶叶有限公司,用于单菌固态发酵,由2023年4月一芽二三叶为原料生产的绿毛茶。

2)试验药品及试剂。马铃薯、无水葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、琼脂;细菌基因组DNA快速抽提试剂盒、乙醇、Taq酶、引物、双蒸水、革兰氏染色液试剂盒;碳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、浓硫酸、茚三酮、氯化亚锡、蒽酮、福林酚、谷氨酸。

3)试验设备。试验所需的主要设备有上海博讯的超净工作台(YS-100B)和高压灭菌锅(YXQ-LS-70A)、上海申贤的恒温培养箱(SPX-250)、安捷伦的液相色谱仪(1260 Infinity II型)和常州澳华的水浴锅(HH-6)。

1.2 试验方法

1)培养基的配制。试验采用牛肉膏蛋白胨培养基(培养细菌),将3.0 g牛肉膏、10.0 g蛋白胨、5.0 g NaCl和20.0 g琼脂溶于1 L蒸馏水,调节pH在7.0~7.2,121 °C灭菌20 min。液体培养基不加琼脂。

2)嗜热菌的筛选和分离纯化。①筛选:取1.0 g茶叶,在超净工作台上按10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴的梯度用无菌水稀释,再用移液枪吸取0.10 mL涂布于固体培养基上,置于45、60 °C恒温培养箱中培养1~3 d(在培养期间观察单菌落,及时进行分离纯化)。②分离纯化:在超净工作台上根据菌落特征将不同菌落分别划线接种至固体培养基上,45、60 °C恒温培养1 d,挑取单菌落划线接种至新的培养基,37 °C培养1 d,重复多次划线分离,纯化出不同菌株,编号。

3)嗜热菌的鉴定。①形态学鉴定:观察菌落特

征,区分真菌和细菌,利用革兰氏染色液分别对细菌进行染色制片,使用光学显微镜观察,并拍照记录。②分子生物学鉴定:使用液体培养基进行振荡培养,利用DNA提取试剂盒分别提取嗜热菌的DNA用于PCR扩增,PCR扩增16S,扩增引物及序列为27F:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',扩增条件为预变性:94 °C, 5 min; 变性:94 °C, 1 min; 退火:58 °C, 1 min; 延伸:72 °C, 3 min; 最后延伸:72 °C, 10 min; 循环30次。PCR扩增产物送至生工生物工程公司进行测序。在GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)中进行同源性比对,使用MEGA-X软件对同源性98%以上的序列构建系统发育树,以鉴定嗜热菌。

4)嗜热菌接种发酵。①菌悬液制备:按配方制作适量液体培养基,将培养基和50 mL锥形瓶进行高压蒸汽灭菌,在超净工作台上将灭菌后的液体培养基倒入无菌锥形瓶至20 mL刻度线附近,用接种环将嗜热菌接种于培养基内,振荡培养1 d,用无菌水稀释后制成菌悬液,通过测OD_{600 nm}确定每种菌的菌悬液浓度,得到浓度分别为(4.84±0.28)×10⁷、(5.15±0.06)×10⁸、(3.87±0.07)×10⁸、(8.87±0.27)×10⁷和(4.56±0.35)×10⁷CFU/mL的CA、CB、HY、B和LR的菌悬液。②绿毛茶处理:每个发酵瓶放入20.0 g绿毛茶,12个发酵瓶为1组,分成CA、CB、HY、B、LR和MJ共6组(前5组分别对应接种CA、CB、HY、B和LR的菌悬液,MJ即灭菌处理),6组茶叶均经过高压蒸汽灭菌。③嗜热菌接种发酵:CA、CB、HY、B、LR分别加入9.0 mL对应的菌悬液,使含水量约为31%,MJ组加入等量无菌水,摇匀,封口,防止杂菌进入;置于45 °C培养箱中,每隔2 d摇动发酵瓶混匀茶叶,在第0、7、14和21天取样,使用柜式提香机80 °C干燥30 min,参照GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》测定含水量在10%左右,装入塑封袋并编号,在-20 °C冰箱中保存。

5)感官审评与生化测定方法。感官审评参照GB/T23776—2018《茶叶感官审评方法》和GB/T14487—2017《茶叶感官审评术语》对茶样外形、汤色、香气、滋味和叶底进行审评。儿茶素和咖啡碱采用高效液相色谱法检测,可溶性糖参照《茶叶生物化学试验教程》系统分析法^[16-17]。水浸出物参照GB 8305—2013《茶水浸出物测定》、游离氨基酸参照

GB 8314—2013《茶游离氨基酸总量的测定》、茶多酚参照GB 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法》中的福林酚法。

2 结果与分析

2.1 嗜热菌鉴定

1) 形态学鉴定结果。经过45、60℃高温筛选后共获得7株细菌,编号分别为CA、CB、CC、HY、

B、LY和LR,其中,LY和LR是60℃下筛选获得;如图1所示,采用划线法接种在牛肉膏蛋白胨培养基上,37℃下培养1d,呈现乳白色、边缘光滑、直径1.0~1.2 mm的圆形菌落;油镜观察细菌的革兰氏染色制片,结果如图2所示,7个菌都被染成紫色,均为革兰氏阳性菌,CA的细胞呈椭圆状,CB、CC和B的细胞呈短杆状,HY、LY和LR的细胞呈杆状。

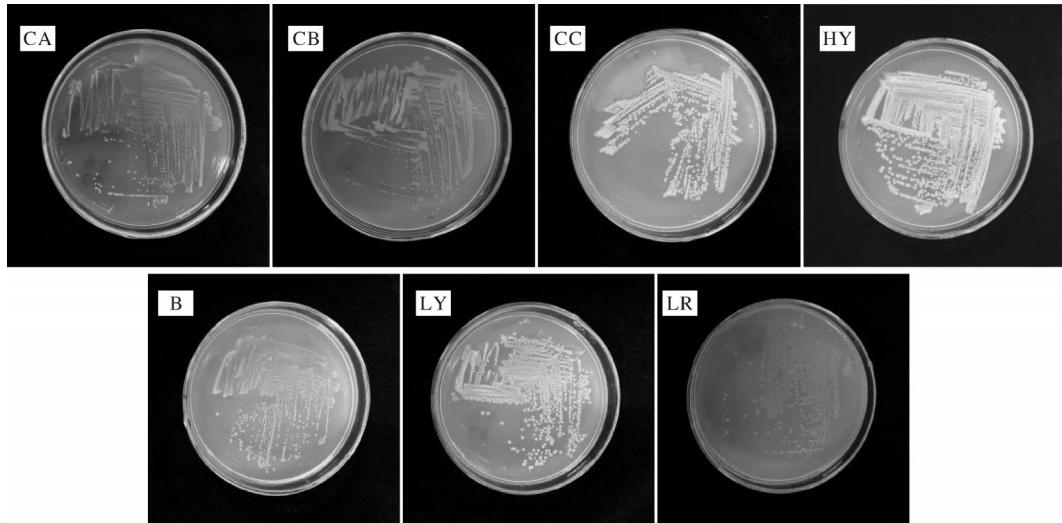


图1 7种嗜热菌株的平板划线菌落图

Fig.1 Plating and streaking colony images of 7 bacterial strains

2) 分子生物学鉴定结果。Blast比对后,选择部分相似度大于98%的序列,使用MEGA-X软件,选择邻接矩阵法(neighbor-joining)建树系统发育树,使用自展检验(Bootstrap),检验次数为1 000次,替换模型采用Kimura 2-parameter,CA鉴定为戈里斯芽孢杆菌属(*Terribacillus*),HY、LY和LR均为芽孢杆菌属(*Heyndrickxia*),B、CB和CC均为短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*),如图3所示。

2.2 感官审评

从分离得到的菌株中选取CA、CB、B、HY和LR共5株具有代表性且生长良好的嗜热细菌分别用于固态发酵,最终感官审评结果见表1和图4。随着发酵进行,各处理茶样的感官品质均呈下降趋势,在香气方面,各处理在第7天具有陈香,但随发酵时间延长香气逐渐变闷;在滋味方面,MJ处理从“浓厚有高火味”变为“醇厚”,其余处理从初始的“浓厚有高火味”逐渐变为“醇厚”,再变为“醇和”,部分处理还出现“滑”和“爽”的口感;此外,各处理的汤色随发酵时间逐渐加深,叶底变软,在第14天和21天出现明显的泥滑感,各处理的干茶外形无明显变化。

2.3 生化检测

1) 水浸出物含量变化。如图5A所示,水浸出物含量总体变化不明显。随发酵进行,各处理的水浸出物含量大致呈先减后增的趋势,除MJ处理的最低值出现在第14天,其余试验处理的最低值均出现在第7天,各处理在发酵结束时,水浸出物含量几乎与初始持平。

2) 茶多酚含量变化。传统藏茶渥堆过程中茶多酚含量逐渐降低,结果如图5B所示,CA、CB和MJ处理的茶多酚含量在固态发酵过程中呈下降趋势,HY和B处理呈先下降后上升的趋势,LR处理在第7天有小幅度上升,但总体呈下降趋势;各处理第21天时的茶多酚含量相较于第0天均明显下降,CA、CB、HY、B、LR和MJ分别下降了23.5%、23.9%、9.7%、4.9%、10.6%和14.3%,相较于MJ处理,CA和CB处理下降较多,HY和LR下降较少,B最少,推测湿热作用能使茶多酚分解;CA处理的细菌产生了大量降解茶多酚的酶,使茶多酚含量显著下降;而CB和B虽为同属细菌,但CB处理接种量大于B处理,推测该属细菌在营养匮乏竞争大的情况下能以茶多酚为

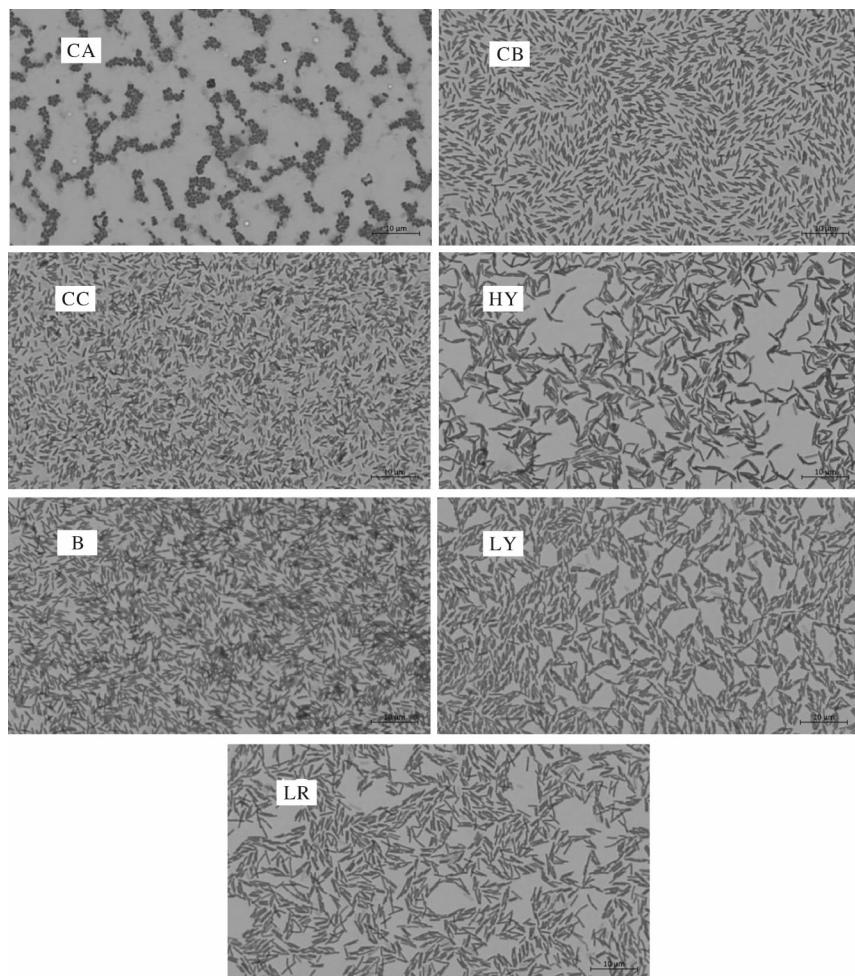


图 2 7种嗜热菌株的显微图

Fig.2 Microscopic images of seven bacterial strains

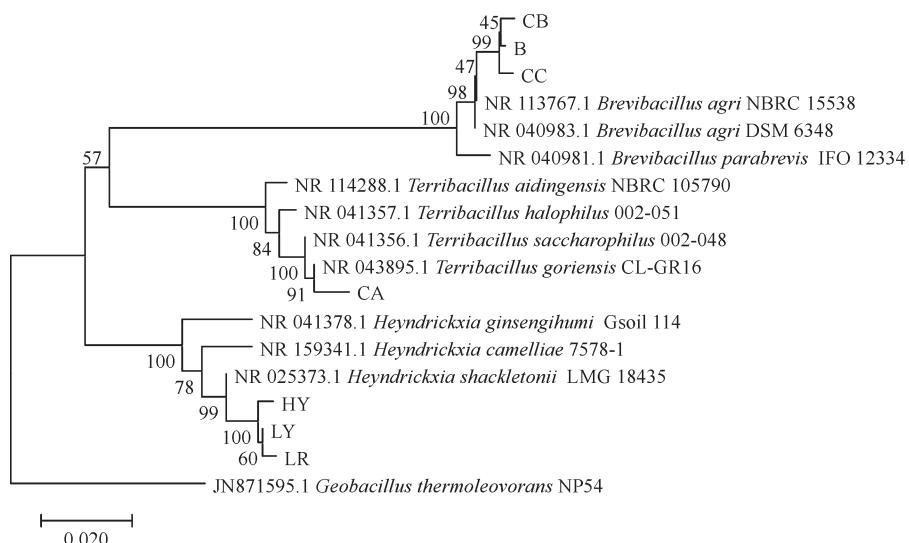


图 3 嗜热细菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of thermophilic bacteria

主要碳源,导致低接种量的B处理茶多酚保留较多,而高接种量的CB处理茶多酚被大量降解;同理,HY 和LR接种量不同,但差异不大,说明该属细菌可能没有产生分解茶多酚的酶^[18]。

表1 各处理茶样的感官评语及得分

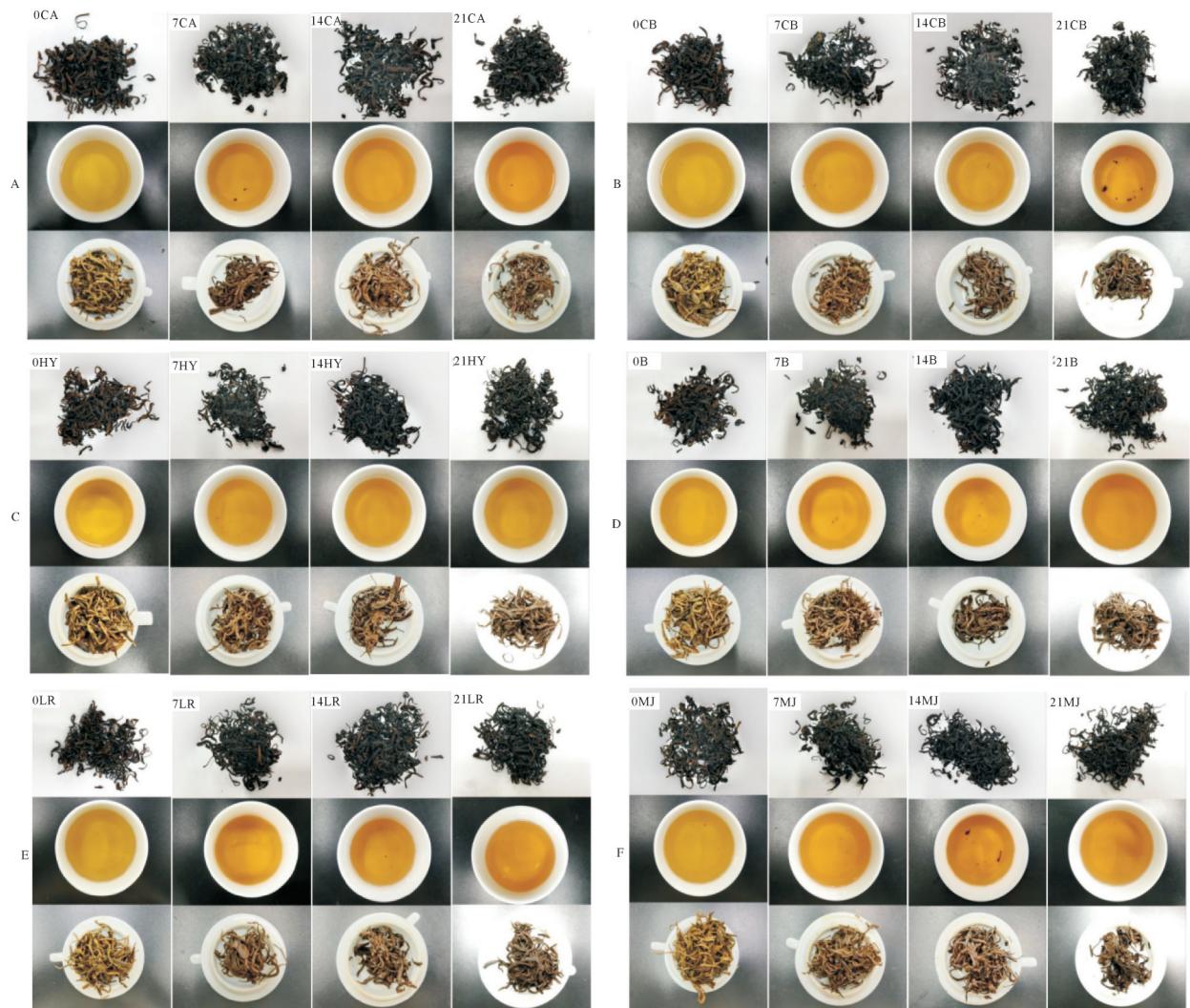
Table 1 Sensory evaluation and scores of each treated tea sample

处理 Treatment	发酵时间/d Fermentation time	外形(20%) Appearance	得分 Score	内质 Endoplasmic						总分 Total score	
				汤色(15%) Liquid color	得分 Score	香气(25%) Aroma	得分 Score	滋味(30%) Taste	得分 Score	叶底(10%) Infused leaf	
CA	0	黑褐带黄卷曲较匀	85	黄亮清澈	84	栗香带高火味	84	浓厚有高火味	83	绿黄较柔软	79 83.40±1.50
	7	乌黑带红卷曲较匀	82	橙黄明亮清澈	86	陈香带发酵味	82	醇厚	84	黄褐柔软	80 83.00±0.69
	14	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄明亮清澈	86	闷味	79	醇厚	84	褐色带泥滑感	75 81.95±0.37
	21	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄较亮清澈	83	水闷味,陈味	76	醇和爽口	86	褐色带泥滑感	75 81.35±0.24
CB	0	黑褐带黄卷曲较匀	85	黄亮清澈	84	栗香带高火味	84	浓厚有高火味	83	绿黄较柔软	79 83.40±0.53
	7	乌黑带黄卷曲有结块	80	橙黄明亮清澈	86	陈香	86	醇厚	84	黄褐柔软	80 83.60±0.49
	14	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄明亮清澈	86	闷味	77	醇和滑爽	86	褐色带泥滑感	75 82.05±0.24
	21	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄较亮清澈	83	水闷味,陈味	79	醇和爽口略酸	85	褐色带泥滑感	75 81.80±0.24
HY	0	黑褐带黄卷曲较匀	85	黄亮清澈	84	栗香带高火味	84	浓厚有高火味	83	绿黄较柔软	79 83.40±0.08
	7	乌黑带棕卷曲较匀	84	橙黄明亮清澈	86	陈香	86	醇厚	82	黄褐柔软	80 83.80±0.73
	14	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄明亮清澈	86	闷味	82	醇厚	85	褐色带泥滑感	75 83.00±0.24
	21	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄较亮清澈	83	水闷味,陈味	79	醇和爽口	87	褐色带泥滑感	75 82.40±0.49
B	0	黑褐带黄卷曲较匀	85	黄亮清澈	84	栗香带高火味	84	浓厚有高火味	83	绿黄较柔软	79 83.40±0.37
	7	乌黑带棕卷曲较匀	86	橙黄明亮清澈	86	陈香	86	醇厚	84	黄褐柔软	80 84.80±0.20
	14	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄明亮清澈	86	闷味	78	醇厚带酸	82	褐色带泥滑感	75 81.10±1.06
	21	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄较亮清澈	83	水闷味,陈味	77	醇厚	83	褐色带泥滑感	75 80.70±1.31
LR	0	黑褐带黄卷曲较匀	85	黄亮清澈	84	栗香带高火味	84	浓厚有高火味	83	绿黄较柔软	79 83.40±0.08
	7	乌黑带棕卷曲较匀	85	橙黄明亮清澈	86	陈香,温嗅愉悦	88	醇厚	81	黄褐柔软	80 84.20±0.69
	14	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄明亮清澈	86	闷味	80	醇厚,滑	84	褐色带泥滑感	75 82.20±0.08
	21	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄较亮清澈	83	水闷味,陈味	77	醇厚	84	褐色带泥滑感	75 81.00±0.49
MJ	0	黑褐带黄卷曲较匀	85	黄亮清澈	84	栗香带高火味	84	浓厚有高火味	83	绿黄较柔软	79 83.40±0.65
	7	乌黑带棕卷曲较匀	86	橙黄明亮清澈	86	陈香	86	浓厚	83	黄褐柔软	80 84.50±1.35
	14	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄明亮清澈	86	闷味	81	醇厚	84	褐色带泥滑感	75 82.45±0.23
	21	乌黑带黄条索松卷	83	橙黄较亮清澈	83	水闷味,陈味	76	醇厚	84	褐色带泥滑感	75 80.75±0.29

3)游离氨基酸含量变化。原料嫩度、海拔、品种等因素对绿茶的游离氨基酸含量影响较大,藏茶毛茶渥堆过程中氨基酸含量通常呈下降趋势^[18-19]。如图5C所示,第0天时,高压蒸汽灭菌导致游离氨基酸含量下降,MJ处理在发酵过程中虽有波动但最终仍是下降趋势,推测湿热作用会导致游离氨基酸含量减少,可能促使游离氨基酸与其他物质的结合;CA、CB、HY、B和LR处理的游离氨基酸含量呈先升后降的趋势,可能是嗜热细菌大量繁殖并分解蛋白质导致含量上升,但后期细菌逐渐死亡,湿热作用占据上风,游离氨基酸含量下降;CB、HY、B、LR和MJ处理发酵至第21天,游离氨基酸含量下降率在20%~30%,推测在发酵时间足够长时,CB、HY、B和LR对茶叶中游离氨基酸含量的最终变化没有太大影响,主要还是湿热作用导致游离氨基酸的变化^[20]。

4)可溶性糖含量变化。如图5D所示,各处理的可溶性糖含量随发酵时间总体呈现先增后减再增的趋势,与传统藏茶渥堆发酵一致^[18,21]。在整个发酵过程中,CA、CB、HY、B、LR和MJ都在第7天达到含量高峰,相对第0天分别增长了24.8%、35.2%、25.9%、19.7%、30.1%和35.1%;CB、LR和MJ处理增长率居高,推测可能是湿热作用导致可溶性糖含量上升,CA为戈里斯芽孢杆菌属,对葡萄糖、蔗糖、果糖等可溶性糖利用能力较强,可能是导致CA组可溶性糖增长率不及MJ处理的原因;CB和B同为短芽孢杆菌属,B处理的可溶性糖含量增加少于CB,推测可能是由于CB的菌量更大,分泌大量的纤维素酶,将不溶于水的纤维素分解成溶于水的葡萄糖,补充了呼吸消耗的可溶性糖,HY和LR同理^[22-23]。

可溶性糖含量从第7天到第14天大幅度下降,



A:CA处理0、7、14、21 d的茶样 0, 7, 14 and 21 days of CA treatment; B:CB处理0、7、14、21 d的茶样 0, 7, 14 and 21 days of CB treatment; C:HY处第0、7、14、21 d的茶样 0, 7, 14 and 21 days of HY treatment; D:B处理0、7、14、21 d的茶样 0, 7, 14 and 21 days of B treatment; E:LR处理0、7、14、21 d的茶样 0, 7, 14 and 21 days of LR treatment; F:MJ处理0、7、14、21 d的茶样 0, 7, 14 and 21 days of MJ treatment.

图4 不同嗜热细菌处理后的干茶、茶汤和叶底

Fig.4 Dry tea, tea soup, and leaf base treated with different thermophilic bacteria

第14天相对第0天分别减少了25.8%、5.4%、20.5%、9.8%、24.8%和11.9%，推测可能是湿热作用下产生的可溶性糖大量溶于水中，摇晃发酵瓶时沾于瓶壁上，45℃下水分逐渐蒸发，可溶性糖仍留在瓶壁上，导致茶样的测量值偏低。第14天至第21天除B处理外，其他处理的可溶性糖含量均出现小幅度回升，除B处理外，其他处理第21天的可溶性糖含量几乎回到第0天的水平，推测在经过足够长时间的发酵后，嗜热细菌和湿热作用对茶叶中的可溶性糖含量无明显影响。

5)茶色素含量变化。茶色素影响着茶汤的色泽及滋味，茶褐素还是重要的功能物质，黑茶中的茶褐

素含量较高，且在渥堆发酵中逐渐升高，茶黄素含量变化较小，茶红素通常呈先升高后降低的变化趋势^[24]。如图6所示，MJ处理的茶黄素含量随发酵时间呈先增后减再增的变化趋势，其余试验组都呈先减后增再减的变化趋势，在第14天达到含量高峰；MJ处理的茶红素含量呈先增后减再增的变化趋势，LR处理呈先增后减的趋势，其余试验组都呈先减后增再减的变化趋势，在第7天达到含量最低；HY和MJ处理的茶褐素含量先增后减，CA处理呈先增后减再增的变化趋势，B和LR处理呈先减后增的趋势，但LR变化不明显。综上，试验组的茶黄素和茶红素含量变化趋势与对照组(MJ处理)的变化趋势相反，

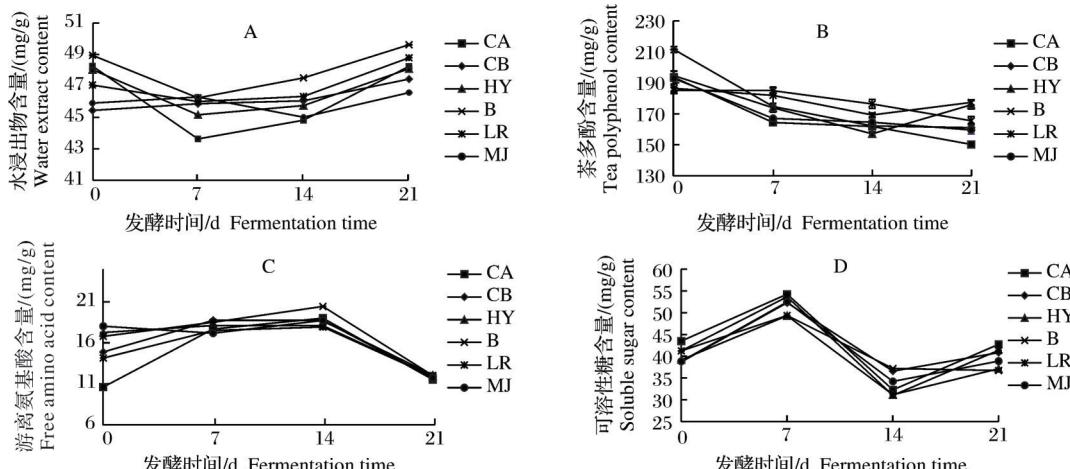


图5 不同嗜热细菌处理藏茶水浸出物、茶多酚、游离氨基酸和可溶性糖含量变化

Fig.5 Changes in contents of water extract, tea polyphenols, free amino acids and soluble sugars in Tibetan tea treated with different thermophilic bacteria

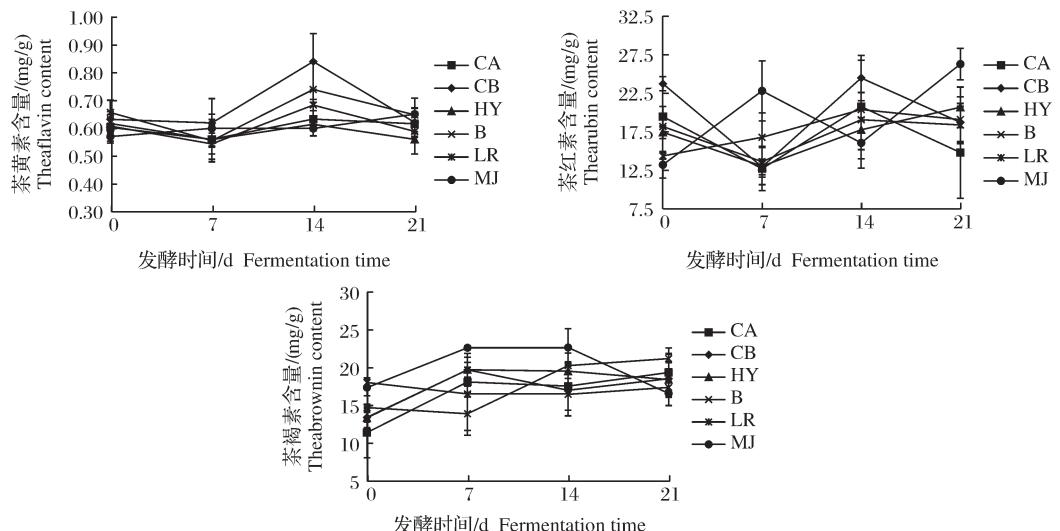


图6 不同嗜热细菌处理藏茶茶色素含量变化

Fig.6 Changes in tea pigment content in Tibetan tea treated with different thermophilic bacteria

推测本试验的嗜热细菌对茶叶中的茶黄素和茶红素含量变化有一定影响,尤其是对茶红素的含量影响较明显。

6)咖啡碱含量变化。研究结果显示,咖啡碱含量在藏茶传统发酵过程中较稳定,如图7所示,各处理咖啡碱含量随发酵时间没有明显变化^[18,21,24]。CA处理茶样的咖啡碱含量随发酵时间呈现先减后增的变化,CB处理茶样呈现先减后增再减的变化,HY、B和LR处理的茶样呈现先增后减的变化,且都在第14天达到最大值,MJ处理呈现先增后减再增的变化趋势。Zhu等^[10]研究发现,嗜热微生物通过脱甲基化和氧化反应2个途径影响黑茶渥堆过程的咖啡碱代谢。

7)儿茶素含量变化。如表2所示,各处理儿茶素

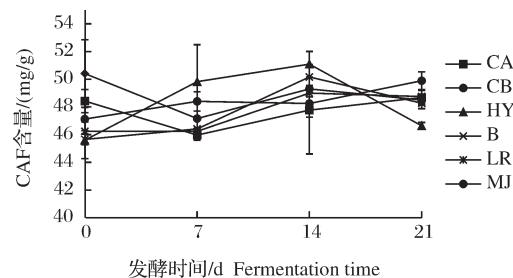


图7 不同嗜热细菌处理藏茶咖啡碱含量变化

Fig.7 Changes in caffeine content in Tibetan tea treated with different thermophilic bacteria

总量均随发酵时间降低,和茶多酚含量变化一致,CA处理的没食子酸(GA)含量呈先减后增的趋势,其余处理都呈上升趋势;各处理的没食子儿茶素(gallocatechin, GC)呈下降趋势;CB和MJ处理的表

没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)呈下降趋势,其余呈先增后减趋势;CB处理的儿茶素(catechin, C)呈下降趋势,其余呈先增后减趋势;CA处理的表儿茶素(EC)呈先减后增再减的趋势,其余呈下降趋势;B和MJ处理的表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)呈先减后增的趋势,其余均下降;LR处理的没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)呈现先减后增的趋势,其余处理均下降;CA处理的儿茶素没食子酸酯(CG)含量呈现先减后增趋势,CB处理呈先减后增再减趋势,HY、B和MJ处理呈先增后减趋势,LR呈

先增后减再增趋势;CA处理的表儿茶素没食子酸酯(ECG)呈先增后减趋势,HY呈先减后增再减趋势,其余都呈下降趋势。

发酵结束时,各处理的GA含量均增加,GC含量均减少;CA处理的EGC含量增加,其余处理均减少;CA和CB处理C含量减少,其余处理均增加;各处理的EC、EGCG和GCG含量均减少;CA处理的CG含量减少,其余处理增加;CA处理的ECG含量在经过先增后减的趋势后恢复到第0天时的水平,其余处理均减少。

表2 不同嗜热细菌处理藏茶儿茶素含量变化

Table 2 Changes in catechin content in Tibetan tea treated with different thermophilic bacteria mg/g

处理 Treatment	发酵时间/d Fermentation time	GA	GC	EGC	C	EC	EGCG	GCG	CG	ECG
CA	0	3.20±0.07	36.33±1.18	2.02±0.05	5.49±0.02	8.46±0.09	54.00±1.21	25.97±0.45	7.87±0.12	2.60±0.01
	7	2.70±1.52	26.31±1.35	9.11±0.45	7.07±0.63	6.23±0.29	42.43±0.39	22.53±0.46	4.63±0.36	10.83±0.18
	14	ND	18.98±0.75	7.83±0.56	6.42±0.12	7.34±0.51	43.34±1.35	16.42±0.44	4.96±0.16	10.83±0.36
	21	5.59±0.03	15.19±0.18	7.66±0.21	5.25±0.02	5.49±0.06	31.36±0.11	14.31±0.12	5.57±0.09	2.79±0.03
CB	0	3.09±0.11	38.17±2.34	11.98±0.68	6.06±0.17	11.26±0.48	61.86±3.72	25.53±1.59	5.76±0.11	15.61±0.63
	7	4.00±0.08	27.34±0.57	8.46±0.19	ND	7.87±0.45	44.27±0.60	22.60±0.29	4.34±0.09	11.16±0.20
	14	6.32±0.08	20.90±0.20	5.50±0.03	3.98±0.10	5.63±0.05	32.24±0.27	21.55±0.29	8.31±0.20	8.89±0.05
	21	ND	17.77±0.25	4.10±0.05	2.83±0.05	4.44±0.05	25.55±0.29	18.27±0.30	7.91±0.21	2.66±0.11
HY	0	2.82±0.10	35.45±1.06	10.61±0.30	5.20±0.12	10.14±0.73	52.68±1.76	23.32±0.69	4.86±0.26	12.98±0.54
	7	ND	26.84±1.33	11.51±0.54	6.66±0.32	9.72±0.73	49.32±2.80	19.42±1.15	5.75±0.08	9.94±0.55
	14	ND	20.28±0.52	7.46±0.24	6.45±0.19	7.47±0.09	42.56±1.25	19.14±0.59	6.17±0.20	11.01±0.37
	21	4.39±0.02	19.83±0.26	6.85±0.09	5.74±0.19	7.07±0.03	39.25±0.48	16.00±0.24	5.23±0.14	2.69±0.07
B	0	3.22±0.03	35.69±0.71	8.72±0.08	4.47±0.8	9.43±0.06	46.80±0.91	26.65±0.52	4.82±0.23	12.37±0.29
	7	ND	25.42±0.28	10.49±0.72	5.90±0.02	9.03±0.14	44.59±1.77	17.87±0.68	5.37±0.16	11.26±0.50
	14	ND	25.60±0.22	6.00±0.05	3.18±0.03	6.00±0.07	32.68±0.63	23.80±0.60	9.75±0.53	8.78±0.24
	21	5.06±0.04	17.62±0.29	5.71±0.22	5.53±0.07	6.21±0.02	35.55±0.70	16.25±0.41	5.86±0.22	2.75±0.10
LR	0	3.51±0.06	37.30±0.54	8.66±0.12	4.08±0.03	8.10±0.65	43.28±0.97	27.83±0.57	5.22±0.20	11.55±0.31
	7	ND	27.59±0.49	8.99±0.17	5.42±0.18	8.09±0.24	42.30±0.63	20.54±0.27	6.74±0.13	10.61±0.12
	14	4.35±0.11	21.19±0.17	7.84±0.15	6.36±0.05	7.79±0.30	43.57±0.61	16.79±0.37	5.31±0.10	2.82±0.15
	21	5.42±0.03	16.89±0.74	1.42±0.03	5.12±0.07	4.02±0.03	32.70±0.45	16.97±0.33	6.20±0.32	2.80±0.20
MJ	0	2.65±0.07	36.86±1.47	11.66±0.13	5.05±0.15	9.46±0.34	57.15±1.48	24.62±0.68	4.98±0.17	13.77±0.47
	7	ND	27.03±1.4	8.63±0.14	5.40±0.24	7.99±0.15	42.06±1.35	22.72±0.71	7.54±0.35	10.86±0.48
	14	4.70±0.62	21.83±0.50	6.70±0.29	4.90±0.11	6.68±0.14	35.44±0.53	18.10±0.24	6.37±0.22	2.68±0.09
	21	5.55±0.04	16.60±0.33	1.68±0.14	6.12±0.10	4.17±0.02	35.19±0.71	15.76±0.49	6.00±0.18	2.80±0.05

注:“ND”表示未检出。Note: “ND” means not detected.

3 讨论

本研究从渥堆10 d的藏茶堆芯筛选分离纯化获得7株嗜热细菌,经形态学鉴定和分子生物学鉴定,

这7株细菌分属于芽孢杆菌属(*Heyndrickxia*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)和戈里斯芽孢杆菌属(*Terribacillus*),前2个属的细菌在黑茶中被检出过,多为益生菌^[25-27]。有研究发现芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属

存在抗真菌能力,尤其后者一直是抗菌肽的丰富来源^[28-29]。戈里斯芽孢杆菌属目前只有4个已命名的种,国内外对该属细菌的研究极少,在茶叶中的研究则更为罕见,该属细菌具有嗜盐和嗜糖的特性,可以解释其在发酵前期抑制可溶性糖含量上升^[22,30]。这一发现丰富了藏茶渥堆微生物资源库,为该属细菌在复杂发酵体系中的功能研究提供了新线索。

经过单菌固态发酵,审评结果表明试验筛选获得的嗜热细菌对藏茶滋味形成有一定影响,使藏茶滋味随发酵呈现“浓厚”到“醇厚”再到“醇和”的变化趋势,部分还带有“滑”和“爽”的口感,对外形、香气、汤色和叶底方面影响不大;与对照组(MJ处理)相比,戈里斯芽孢杆菌属和短芽孢杆菌属对发酵过程茶多酚含量变化的影响显著,促进茶多酚减少,可能是茶汤滋味变“醇和”的原因。各处理游离氨基酸的最终含量与对照组无显著差异,进一步印证了游离氨基酸含量变化以湿热作用为主导。水浸出物和咖啡碱的含量虽有波动,但总体与对照组一致,对于发酵结束时的最终含量变化无显著影响。嗜热细菌对茶黄素和茶红素的影响较为明显,各试验组的茶黄素含量变化趋势均与对照组相反,除低浓度的芽孢杆菌属外,其余处理的茶红素含量变化与对照组相反。此外,各处理的儿茶素总量均随发酵时间降低,和茶多酚含量变化一致,发酵结束时,只有没食子酸含量上升。

由于藏茶渥堆是一个复杂的过程,从感官审评的结果看各处理间无明显差异,但在生化结果中却略有不同,有研究者基于代谢组学对嗜热微生物在黑茶渥堆中的作用进行了研究,发现地衣芽孢杆菌对咖啡因的代谢有显著影响,但咖啡因含量变化却并不大^[10]。因此,推测本研究的嗜热细菌对生化成分的影响较小,不足以引起感官审评结果的差异。同时,尽管 *Heyndrickxia*、*Brevibacillus* 和 *Terribacillus* 同属芽孢杆菌科,但其对藏茶成分的转化呈现靶向性差异,今后可进一步聚焦到“种”水平解析其具体作用机制;考虑到实际生产中藏茶渥堆依赖多菌互作,还需探究这些嗜热细菌在复合菌群中的功能。此外,有研究利用气相色谱联用质谱和气味活性值研究发现渥堆过程中地衣芽孢杆菌对黑茶香气具有有益影响^[31],因此,嗜热细菌在挥发性物质的转化方面也有待进一步研究。

参考文献 References

- [1] MENG T, ZENG X, ZHANG L, et al. Advances in China dark tea[J]. Agricultural biotechnology, 2020, 9(2): 97-100.
- [2] 黄友谊,方欣,隋梦圆,等.茶叶微生物研究现状与展望[J].华中农业大学学报,2022, 41(5) : 24-32. HUANG Y Y, FANG X, SUI M Y, et al. Situation and prospect of studying tea microorganisms[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41 (5) : 24-32 (in Chinese with English abstract).
- [3] ZHU M Z, LI N, ZHOU F, et al. Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea[J/OL]. Food chemistry, 2020, 312: 126043 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126043>.
- [4] 李雪玲,陈华红,段海秀,等.普洱茶渥堆及发酵罐发酵过程中优势微生物的研究[J].食品科技,2017,42(6):35-40. LI X L, CHEN H H, DUAN H X, et al. The dominant microbes from Pu'er tea samples during pile fermentation and tank fermentation process[J]. Food science and technology, 2017, 42 (6):35-40(in Chinese with English abstract).
- [5] CHENG L Z, YANG Q Q, CHEN Z Y, et al. Distinct changes of metabolic profile and sensory quality during Qingzhuan tea processing revealed by LC-MS-based metabolomics [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68 (17) : 4955-4965.
- [6] GUO W L, ZHAO M M, CHEN Q J, et al. Citrinin produced using strains of *Penicillium citrinum* from Liupao tea[J]. Food bioscience, 2019, 28: 183-191.
- [7] 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.
- [8] 朱燕.四川藏茶渥堆过程中主要真菌的分离及初步鉴定[J].贵州茶叶,2019(1) : 18-21. ZHU Y. Isolation and preliminary identification of main fungi in Sichuan Tibetan tea pile-fermentation process[J]. Journal of Guizhou tea, 2019(1) : 18-21 (in Chinese).
- [9] 李晨晨,吕杰,杨瑞娟,等.普洱茶渥堆发酵过程中嗜热细菌的分离和鉴定[J].北京化工大学学报(自然科学版),2012, 39 (2) : 74-78. LI C C, LÜ J, YANG R J, et al. Isolation and identification of thermophilic bacteria during the pile-fermentation of Pu'er tea[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (natural science edition), 2012, 39 (2) : 74-78 (in Chinese with English abstract).
- [10] ZHU W, WANG W F, XU W C, et al. Influence of thermophilic microorganism on non-volatile metabolites during high-temperature pile-fermentation of Chinese dark tea based on metabolomic analysis[J]. Food science and biotechnology, 2022, 31 (7):827-841.
- [11] LIU M, GONG Z, LIU H, et al. Structural characterization and anti-tumor activity *in vitro* of a water-soluble polysaccharide

- from dark brick tea[J]. International journal of biological macromolecules, 2022, 205: 615-625.
- [12] XIE H, LI X C, REN Z X, et al. Antioxidant and cytoprotective effects of Tibetan tea and its phenolic components[J/OL]. Molecules, 2018, 23(2) : 179 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.3390/molecules23020179>.
- [13] ZHENG Q R, LI W F, GAO X. The effect of storage time on tea Polyphenols, catechin compounds, total flavones and the biological activity of Ya'an Tibetan tea (*Camellia sinensis*) [J/OL]. Journal of food processing and preservation, 2021, 45(12) : e16004 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16004>.
- [14] MEHTA D, SATYANARAYANA T. Diversity of hot environments and thermophilic microbes [M]//Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013: 3-60.
- [15] 张晓.一株嗜热菌的分离及其次生代谢产物的研究[D].金华:浙江师范大学,2015.ZHANG X. Isolation and identification of a thermophilic bacterium and study on its secondary metabolites[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2015(in Chinese with English abstract).
- [16] XU Y Q, JI W B, YU P G, et al. Effect of extraction methods on the chemical components and taste quality of green tea extract[J]. Food chemistry, 2018, 248: 146-154.
- [17] 张正竹.茶叶生物化学实验教程[M].北京:中国农业出版社,2009.ZHANG Z Z. Tea biochemistry experiment course [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2009(in Chinese).
- [18] 罗世杰.基于多组学对两种渥堆方式雅安藏茶品质的研究[D].雅安:四川农业大学,2024.LUO S J. Study on the quality of Ya'an Tibetan tea by two pile-fermentation methods based on multiomics[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2024(in Chinese with English abstract).
- [19] 任志红,肖文敏,吴焕焕,等.不同采摘时间谷雨茶的品质成分研究[J].食品安全质量检测学报,2024,15(18) : 32-38. REN Z H, XIAO W M, WU H H, et al. Study on quality components of Guyu tea at different picking time [J]. Journal of food safety & quality, 2024, 15 (18) : 32-38 (in Chinese with English abstract).
- [20] 徐倩.青砖茶渥堆过程中优势耐热菌对茶叶品质的影响[D].合肥:安徽农业大学,2018.XU Q. Effects of dominant thermophilic microorganisms on pile-fermentation processing of qing-zhuan brick tea[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [21] 郭金龙.雅安藏茶活性级分筛选和评价研究[D].雅安:四川农业大学,2010.GUO J L. The research of apprising and screening on the Ya'an Tibetan tea activity fractions[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [22] 卢鹏.拮抗菌 *Terribacillus aidengensis* MP602 生物学特性及全基因组测序[D].杭州:浙江农林大学,2015.LU P. Biological characteristics and complete genome sequencing of *Terribacillus aidengensis* MP602 [D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2015(in Chinese with English abstract).
- [23] 潘雪莉,罗燕,胡贤春,等.后发酵茶中短芽孢杆菌产酶能力及其在茶叶渥堆过程酶活性分析[J].食品安全质量检测学报,2023,14(17) : 78-86.PAN X L, LUO Y, HU X C, et al. Enzyme production capacity of *Brevibacillus brevis* in post-fermented tea and its enzyme activity in the process of pile-fermentation[J]. Journal of food safety & quality, 2023, 14(17) : 78-86 (in Chinese with English abstract).
- [24] 邓俊琳,何扬航,陈建,等.渥堆发酵过程中藏茶化学成分的变化[J].食品与机械,2023,39(9) : 26-31.DENG J L, HE Y H, CHEN J, et al. Changes of chemical components of Tibetan tea during pile fermentation process [J]. Food & machinery, 2023, 39(9) : 26-31 (in Chinese with English abstract).
- [25] 严宽,李翔宇,张建,等.四川黑茶渥堆发酵不同时期细菌群落结构与多样性[J].宜宾学院学报,2023,23(12) : 38-43. YAN K, LI X Y, ZHANG J, et al. Bacterial community structure and diversity in different periods of Sichuan dark tea [J]. Journal of Yibin University, 2023, 23(12) : 38-43 (in Chinese with English abstract).
- [26] 王桂友,王昭月,梁思威,等.黑茶渥堆发酵过程中微生物的研究进展[J].中国茶叶,2024,46(9) : 21-27.WANG G Y, WANG Z Y, LIANG S W, et al. Research progress of microorganisms during fermentation of dark tea[J]. China tea, 2024, 46(9) : 21-27 (in Chinese with English abstract).
- [27] 黄紫衡,陈欢,黄丽,等.六堡茶渥堆过程中可培养微生物的分离与鉴定[J].食品科学,2022,43(16) : 177-185.HUANG Z H, CHEN H, HUANG L, et al. Isolation and identification of culturable microbes during the fermentation of Liupao tea [J]. Food science, 2022, 43 (16) : 177-185 (in Chinese with English abstract).
- [28] ZHAO Z J, ZHANG L L, LOU Y G, et al. Inhibitory effect of polypeptides produced by *Brevibacillus brevis* on ochratoxigenic fungi in the process of pile-fermentation of post-fermented tea[J/OL]. Foods, 2022, 11(20) : 3243 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.3390/foods11203243>.
- [29] YANG X, YOUSEF A E. Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review [J/OL]. World journal of microbiology and biotechnology, 2018, 34 (4) : 57 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2437-4>.
- [30] SINGH P, HIRA P, RAWAT C D, et al. Genome-based reclassification of *Amycolatopsis eurytherma* as a later heterotypic synonym of *Amycolatopsis thermoflava* [J/OL]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2021, 71 (2) : 004642 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004642>.
- [31] ZHU W, FANG X, WANG W F, et al. Aroma effects of critical volatile compounds during thermophilic bacteria pile-fer-

mentation in dark tea using gas chromatography mass spectrometry and odor activity value [J/OL]. Food science and

technology, 2022, 42: e87022 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.1590/fst.87022>.

Isolation of thermophilic bacteria during pile-fermentation of Tibetan tea and their effects on formation of quality in Tibetan tea

MO Hongting¹, CHEN Zhixiong², XU Wei¹

1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. College of Biology and Environmental Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005, China

Abstract The microorganisms in the samples of pile-fermented Tibetan tea were isolated and purified under the high temperature including 45 °C and 60 °C to study the effects of thermophilic bacteria on the formation of quality in Tibetan tea. 7 thermophilic bacteria were obtained and identified as the genera *Heyndrickxia*, *Brevibacillus*, and *Terribacillus* with morphological and molecular biological methods. They were inoculated into green tea for the solid-state fermentation of single strain under the constant temperature. The results of evaluation showed that the aroma of each treated tea sample in the experiment varied from “chestnut aroma” to “aged aroma” and then to “stuffy taste” during the process of pile-fermentation. Thermophilic bacteria had a certain effect on the taste, resulting in the flavor changing from “strong” to “mellow” and then to “smooth” during the process of pile-fermentation, with a “smooth” and “refreshing” taste. The results of biochemical testing showed that the content of tea polyphenols had a trend of decreasing during the process of pile-fermentation. *Bacillus subtilis* and the high concentration of *Bacillus subtilis* contributed to the degradation of tea polyphenols, which may be the reason for the “smooth” taste. The content of free amino acids had a trend of first increasing and then decreasing, but mainly due to the effects of hot and humid. The content of soluble sugar had a trend of first increasing and then decreasing, and then increasing again. The total amount of catechins changed in line with the trend of tea polyphenols. The content of gallic acid in all treatments increased at the end of pile-fermentation, while the content of other components generally decreased.

Keywords Tibetan tea; dark tea; pile; thermophilic bacteria; quality identification

(责任编辑:陆文昌)