

普洱茶中转化茶多酚的优势菌株筛选与鉴定

冯玲然, 王强, 罗玮, 余晓斌*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 普洱茶是以晒青毛茶为原料,采用独特工艺加工而成的一种发酵性茶叶,其中微生物的发酵对普洱茶的品质形成起着决定性作用。为了提高普洱茶品质和缩短发酵周期,本研究对普洱熟茶样品中转化茶多酚的微生物进行筛选与鉴定。经过固体平板初筛和液体茶汤培养复筛,得到3株氧化茶多酚形成茶褐素能力较强的菌株。将这3株菌回接普洱茶固态发酵,明显促进了茶多酚转化为茶色素,并改善了3种茶色素的比例。分子生物学鉴定结果表明,这3株菌分别为黑曲霉(*Aspergillus niger*)、布朗克假丝酵母(*Candida blankii*)和泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)。

关键词: 普洱茶;多酚氧化酶;茶褐素;筛选;鉴定

中图分类号: TS 272.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)07—0762—05

Screening and Identification of Strains with Tea Polyphenols Conversion Activity in Pu-erh Tea Samples

FENG Lingran, WANG Qiang, LUO Wei, YU Xiaobin*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Pu-erh tea is a kind of tea which uses sun dried green tea as its raw material and processed with a unique technology. Microbial fermentation plays a key role in the formation of Pu-erh tea quality. To improve the quality of Pu-erh tea and reduce fermentation time, some microbes with tea polyphenols conversion activity were isolated and identified from Pu-erh tea samples. After several rounds of screening, three strains with high ability of conversion tea polyphenols to theabrownin were obtained. After the three strains were inoculated to Pu-erh tea solid fermentation, the conversion process of tea polyphenols to tea pigments was obviously stimulated. Meanwhile, the ratio of three pigments have become better. The results of molecular identification showed that these three strains were *Aspergillus niger*, *Candida blankii* and *Aspergillus awamori*, respectively.

Keywords: Pu-erh tea, tea polyphenols, theabrownin, screening, identification

收稿日期: 2013-12-25

* 通信作者: 余晓斌(1965—),男,安徽芜湖人,工学博士,教授,博士研究生导师,从事生物能源与酶技术研究。

E-mail: xbyu@jiangnan.edu.cn

普洱茶是以云南大叶茶中晒青毛茶为原料,经过缓慢的自然和人工促成固体发酵而成的发酵茶,具有独特的品质和风味,深受人们的喜爱^[1]。在普洱茶的品质形成过程中,茶多酚类物质的变化对普洱茶的色泽、滋味等起着决定性的作用。晒青毛茶中的茶多酚在普洱茶发酵过程中大幅度减少,这是由于渥堆过程中某些功能性微生物产生的多酚氧化酶将茶多酚氧化成茶色素类物质,主要包含茶黄素、茶红素和茶褐素,以茶褐素含量为最大^[2]。茶褐素(Theabrownine, TB)是一类能溶于水而不溶于乙醇、乙酸乙酯、正丁醇和氯仿的褐色色素,是一类十分复杂的非透析性高聚化合物^[3]。茶褐素的含量对普洱茶的汤色、风味等起着至关重要的作用。对茶褐素的功能性研究表明,茶褐素在降血脂、预防心脑血管疾病方面具有显著效果^[4-6]。因此,在普洱茶发酵过程中人工接种优势菌株,促进茶多酚氧化形成茶褐素等物质,对普洱茶的品质、风味的形成具有重要意义。

作者以转化晒青毛茶中茶多酚的能力为基础指标,结合转化后茶色素的含量和组成,分离筛选普洱茶中转化茶多酚菌株;并采用 rDNA 片段测序技术,从分子水平来鉴定这些菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 实验所用晒青毛茶、普洱熟茶均由云南中茶茶叶有限公司提供。

1.1.2 分离筛选培养基 晒青毛茶 30 g, 水 1 000 mL, 煮沸 5 min, 纱布过滤去除茶渣, 琼脂 20 g, pH 6.0。121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 液体茶汤培养基 晒青毛茶 40 g, 水 1 000 mL, 煮沸 10 min, 纱布过滤去除茶渣, pH 6.0。110 °C 灭菌 20 min。

1.1.4 固体发酵培养基 按晒青 $m(\text{毛茶}):m(\text{水})=5:2$ 的比例混合, 充分混合后分装 250 mL 三角瓶, 每瓶 20 g。110 °C 灭菌 20 min^[7]。

1.2 实验方法

1.2.1 初筛 取普洱茶熟茶茶叶 1 g, 加入 100 mL 生理盐水中, 浸泡 10 min, 采用稀释涂布法, 将茶叶水稀释至 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 梯度, 分别取 100 μL 涂布于分离筛选培养基表面, 37 °C 下培养 6~7 d, 观察各个平板上的菌落生长状况。

1.2.2 复筛 普洱茶固体发酵周期长, 并且茶黄素(TF)、茶红素(TR)和茶褐素(TB)的含量测定繁琐。为了提高筛选效率, 复筛采用液体茶汤培养, 又将复筛又分为初复筛和再复筛。初复筛仅测茶多酚含量, 再复筛测 3 种茶色素比例及含量。将初筛菌种接入液体茶汤培养基中, 37 °C, 150 r/min 震荡培养 4~5 d。发酵结束后测定茶多酚含量, 根据茶多酚转化率进行初复筛。将初复筛得到的较优菌株重新接种液体茶汤培养基, 发酵结束后测定茶色素的含量, 根据 3 种茶色素比例及含量确定优良菌株做进一步分子生物学鉴定。

1.2.3 固体发酵验证 考虑到普洱茶液体发酵和固体发酵的差异性, 将复筛得到的优良菌株接种固体发酵培养基, 37 °C、湿度 80% 的条件下培养 40 d。发酵结束后测定茶多酚和茶褐素的含量, 与未接种任何菌株的对照组做比较分析, 以确定所筛菌株在固体发酵中的有效性。

1.2.4 菌种鉴定 基因组提取过程: 按照上海生工生物工程有限公司的 SK1375 真菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取。

PCR 扩增的反应体系为: 50 μL 的总反应体积中包含 1 μL DNA 模板, 每个引物 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL dNTP Mixture (10 Mm each), 2.5 μL 10* Taq reaction Buffer, 加水至 25 μL 。扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min。18S rDNA 测序引物序列: NS1: 5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3'; NS6: 5'-GCATCACAGACCTGTTATGCGCTC-3' NS5: 5'-GTTTCTAGGACCGCCGTA-3' (中间引物, 用于测序)。26S rDNA D1/D2 区引物: NL1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'; NL4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外成像系统拍照。由 PCR 产物电泳结果切割所需 DNA 目的条带纯化, 具体操作步骤见说明书。将纯化后的 PCR 产物送往上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。测定的 18S rDNA 序列或者 26S rDNA 序列用 Blastn 工具与 GenBank 数据库中的序列进行相似性比较分析。

1.2.5 茶多酚的测定 酒石酸铁比色法 (GB/T 8313—2008)。

1.2.6 茶黄素、茶红素和茶褐素的测定 准确称取

9.00 g 茶样(不需磨碎)。加入沸水375 mL,摇匀后在沸水浴中浸提 10 min,浸提中摇瓶一次,浸提完毕,取出摇匀,趁热用滤纸过滤于干燥的三角瓶中(残渣不需用水冲洗),滤液冷至空温后,即可进行萃取和分光光度测定。茶黄素、茶红素和茶褐素的具体分离步骤测定参考《茶学实验技术》^[8],最终测定结果为各茶色素占普洱茶干重的质量百分比。

2 结果与讨论

2.1 初筛

在普洱茶发酵过程中,某些微生物能够合成多酚氧化酶作用于茶多酚,将部分茶多酚氧化成茶黄素、茶红素和茶褐素。在普洱熟茶中,茶褐素含量占到总茶色素的 70%以上,而在普洱生茶中仅占 20%左右,茶褐素含量和比例的变化引起平板颜色的变化。因此,可以利用这一特性筛选得到转化茶多酚菌株。本研究采用稀释涂布法,挑选获得 10 株在固体茶叶平板上生长旺盛、生长速度快、产褐色素多的菌株做进一步复筛实验。普洱熟茶中微生物种类复杂,主要来源是加工过程的自然接种和繁殖。初筛结果表明,能在固体筛选培养基上生长并且产生褐色素的微生物以霉菌为主,酵母次之。这是由于霉菌自身的酶系较为发达,并且普洱茶发酵期间,茶叶基质提供的温、湿度环境非常适合真菌的生长繁殖,发酵结束后,大量的真菌特别是优势生长的曲霉和酵母等残留在普洱茶产品之中。

2.2 复筛

2.2.1 初复筛 将初筛得到的 10 株菌进行纯化,纯化后的菌种接种液体茶汤培养基,测定各菌株转化茶多酚的能力,结果如图 1 所示。其中,对照为不接种任何菌株,同等条件培养后测定茶多酚含量,每组数据 3 个重复,误差棒为标准差。与对照相比,初筛菌株中的 d03、d11、d16、d21、d28 和 d34 发酵液体茶汤,使其茶多酚质量分数下降了 10%~14%。杨希^[9]等以云南普洱茶为原料,接种黑曲霉、米曲霉以及红曲霉分别进行发酵,茶多酚含量分别下降 10%、12.5%和 13.5%,并且茶汤色发生明显变化。吴桢^[10]对普洱茶渥堆发酵过程中茶多酚的变化研究表明,在渥堆过程中,茶多酚质量分数显著下降,从原料的 24%降至烘干后的 10%。因此,参考已有报道,这 6 株菌株已具备较强的转化茶多酚能力,可做进一步复筛实验,测定其对茶色素含量的影响。

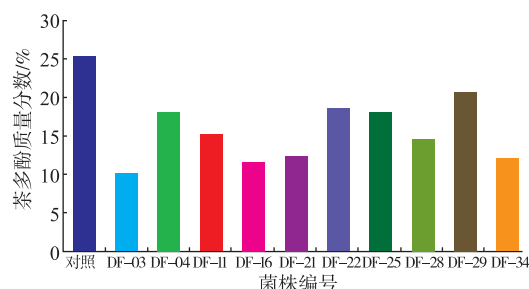


图 1 初筛菌株转化茶多酚能力比较

Fig. 1 Effect of the strains on concentrations of tea polyphenols in tea soup medium

2.2.2 再复筛 将上述 6 株菌重新接种液体茶汤培养基,发酵结束后测定茶色素的含量,结果如图 2 所示,每组数据 3 个重复,误差棒为标准差。筛选转化茶多酚菌株的一个重要目的是转化茶多酚形成茶色素,3 种茶色素的质量分数和比例与汤色、叶底等有着直接的关系。茶色素类物质中含有茶多酚氧化产物、蛋白质、糖类和咖啡碱等物质,成分十分复杂,并由此形成了普洱茶红浓明亮,经久耐泡的品质特征。因此,茶色素的含量和比例也作为筛选目的菌株的一个重要考量指标。茶褐素是儿茶素氧化聚合形成的一类结构十分复杂的产物的总称,在普洱茶的加工过程中,茶多酚氧化形成茶色素的同时,80%的茶黄素和茶红素氧化、聚合形成茶褐素,并使其含量成倍增加,从而使茶汤的收敛性和苦涩味明显降低,再加上较高的糖和可溶性水浸出物含量,这就形成了普洱茶的滋味醇厚,汤色红褐的物质基础^[11-12]。从普洱茶的汤色看,茶黄素是调色“亮”的重要成分,但在普洱茶加工过程中茶黄素由于氧化聚合而大量减少;茶红素是普洱茶汤色“红”的重要成分,滋味强度的主要物质,并与茶汤的浓度有关;茶褐素是汤色暗的主要原因,当茶褐素质量分数达到 6%~8%,汤色可呈现红褐明亮的品质特征,是考察普洱茶品质的关键因素。当茶褐素质量分数低于 5%时,意味着发酵不足,汤色呈现红橙明亮的特征^[13]。由图 2 可知,在普洱生茶中,茶红素含量较高,而茶褐素质量分数不到 3%。经过所筛菌株的发酵,部分茶红素氧化、聚合形成茶褐素。其中,d03、d16 和 d34 转化茶多酚形成茶褐素的能力较其它菌株强,并且发酵结束后 3 种茶色素的比例达到普洱熟茶的要求。因此,选这 3 株菌进行进一步分子生物学鉴定。

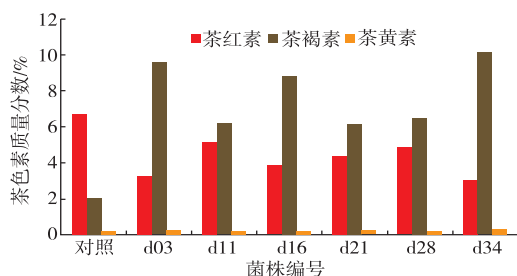


图2 不同菌株对液体茶汤茶色素质量分数的影响

Fig. 2 Effect of the strains on concentrations of tea pigments in tea soup medium

2.3 固体发酵验证

将复筛得到的3株优良菌株d03、d16和d34分别接种固体发酵培养基,发酵结束后测定茶多酚和茶色素的质量分数,结果如图3和图4所示。与不接种任何菌株的对照组相比,茶多酚的含量有较大幅度的下降,3株菌株的下降幅度均超过10%;茶色素的质量分数和比例也发生明显变化,3种茶色素的总量明显增大,茶红素质量分数减少同时茶褐素含量大幅度增大。与液体发酵相比,茶多酚和茶色素的变化幅度稍弱,这可能是由于液体发酵比固体发酵更彻底。通过比较发现,这3株菌在普洱茶固体发酵中依然有较强的转化茶多酚形成茶色素的能力。

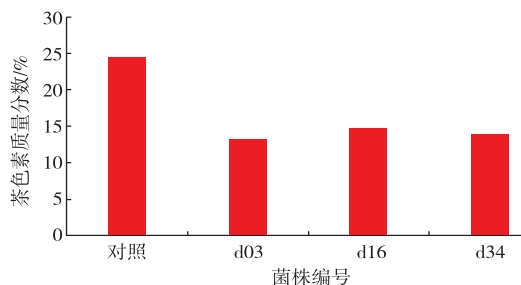


图3 不同菌株对固体发酵培养基茶多酚质量分数的影响

Fig. 3 Effects of the strains on concentrations of tea polyphenol in solid fermentation medium

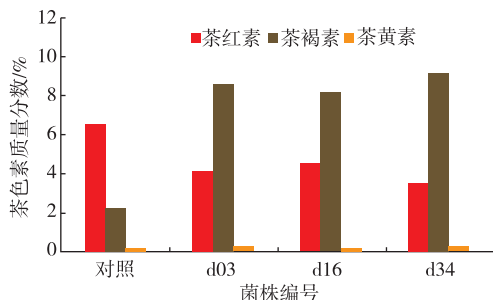


图4 不同菌株对固体发酵培养基茶色素质量分数的影响

Fig. 4 Effects of the strains on concentrations of tea pigments in solid fermentation medium

2.4 菌种鉴定

微生物的传统鉴定方法,主要是根据菌落形态,生理生化等特征进行判断,过程繁琐且准确性差,特别是真菌的形态特征异常复杂,且少数形态特征和生理生化指标会随着环境的变化而不稳定。随着分子生物学的快速发展,核酸序列分析已被广泛的应用于微生物分类鉴定中。根据《真菌鉴定手册》^[14]和《酵母菌的特征与鉴定手册》^[15],对获得的目的菌株进行形态学鉴定,再将d03和d34的18s rDNA序列以及d16的26s rDNA序列提交GenBank数据库,利用blastn工具进行序列比对,对这三株菌进行序列相似性分析。d03、d26和d34在固体平板上的菌落形态分别如图5、图6和图7所示。分子生物学鉴定结果表明,d03为黑曲霉(*Aspergillus niger*),相似度99.92%;d26为布朗克假丝酵母(*Candida blankii*),相似度98.80%,d34为泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*),相似度为99.02%。

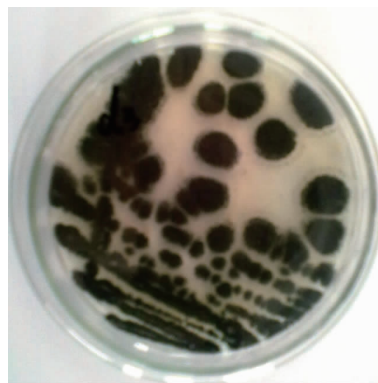


图5 d03 黑曲霉

Fig. 5 d03 *Aspergillus niger*

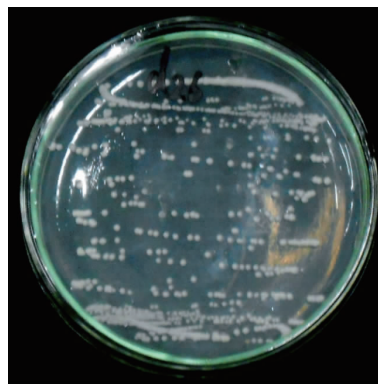


图6 d26 布朗克假丝酵母

Fig. 6 d26 *Candida blankii*

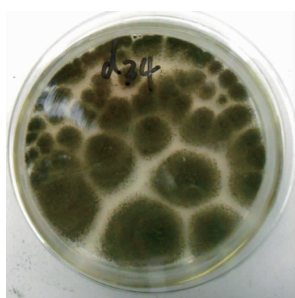


图7 d34 泡盛曲霉

Fig. 7 d34 *Aspergillus awamori*

3 结 语

通过稀释涂布茶叶固体培养基,根据菌落生长

状况和产褐色色素量进行初筛;再根据所筛菌株转化茶多酚以及生成茶色素的能力进行复筛;最终得到3株较优菌株进行固体发酵验证以及分子生物学鉴定。所得到的3株菌株不仅具有较强的氧化茶多酚的能力,而且能生成较高含量的茶褐素。普洱茶的发酵先利用茶叶自身的酶,在湿热条件下转化茶叶供微生物的生长,之后在多种微生物共同作用完成普洱茶的发酵。普洱茶的传统发酵方式是自然发酵,发酵周期长,生产效率低,质量不稳定。因此,筛选优势菌株,然后接种到普洱茶中进行发酵,对缩短发酵周期、提高生产效率、提高普洱茶的品质和稳定性起到重要作用。

参考文献:

- [1] 周红杰,龚加顺,王星银,等. 云南普洱茶[M]. 昆明:云南科技出版社,2004.
- [2] 樊蓉. 普洱茶多酚氧化产物的提取分离、成分分析及活性评价[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [3] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [4] 卓婧,赵明,周红杰. 普洱茶降脂功能及活性成分研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(2):345-348.
ZHUO Jing,ZHAO Ming,ZHOU Hongjie. Research progress on the hypolipidemic effect and ingredients of Pu-erh tea[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2011,27(2):345-348.(in Chinese)
- [5] 龚加顺,陈文品,周红杰,等. 云南普洱茶特征成分的功能与毒理学评价[J]. 茶叶科学,2007,27(3):201-210.
GONG Jiashun,CHEN Wenpin,ZHOU Hongjie,et al. Evaluation on the function and toxicity of extraction of characteristic components in Yunnan Pu-erh tea[J]. **Journal of Tea Science**,2007,27(3):201-210.(in Chinese)
- [6] 张冬英,黄业伟,汪晓娟,等. 普洱茶熟茶抗疲劳作用研究[J]. 茶叶科学,2010,30(3):218-222.
ZHANG Dongying,HUANG Yewei,WANG Xiaojuan,et al. Research on anti-fatigue effect of fermented Pu-erh tea [J]. **Journal of Tea Science**,2010,30(3):218-222.(in Chinese)
- [7] WANG Xiaogang,WAN Xiaochun,HU Shuxia,et al. Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms[J]. **Food Chemistry**,2008,107(3):1086-1091.
- [8] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1997.
- [9] 杨希,陈杰,张春枝,等. 普洱茶发酵过程中茶多酚和茶色素的变化[J]. 2012,12(8):118-120.
YANG Xi,CHEN Jie,ZHANG Chunzhi,et al. Variation of tea polyphenol and tea pigments during the fermentation procedure of Pu-erh tea[J]. 2012,12(8):118-120.(in Chinese)
- [10] 吴桢. 普洱茶渥堆发酵过程中主要生化成分的变化[D]. 重庆:西南大学,2008.
- [11] 张新富,龚加顺,周红杰,等. 云南普洱茶中多酚类物质与品质的关系研究[J]. 食品科学,2008,29(4):230-233.
ZHANG Xinfu,GONG Jiashun,ZHOU Hongjie,et al. Study on relationship between polyphenols and quality of yunnan Pu-erh tea[J]. **Food Science**,2008,29(4):230-233.(in Chinese)
- [12] 隋华嵩,杨旭,周红杰,等. 普洱茶发酵过程中不同外源添加物对氧化酶活性与成分变化的影响[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(5):648-652.
SHUI Huasong,YANG Xu,ZHOU Hongjie,et al. Effects of different exogenous additives on oxidases activity and components during fermentation of Pu-erh tea[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(5):648-652.(in Chinese)
- [13] 何国藩,林月婵. 普洱茶色素类物质及其在沱堆过程中的变化[J]. 中国茶叶,1987,4(5):6-7.
HE Guopan,LIN Yuechan. Variation of tea pigments during the fermentation procedure of Pu-erh tea [J]. **Chinese Tea**,1987,4(5):6-7.(in Chinese)
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [15] 巴尼特,胡瑞卿. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1991.