

## 冠突散囊菌发酵型茶饮料的研究\*

田 鸿<sup>1</sup>, 齐桂年<sup>1</sup>, 尹旭敏<sup>2</sup>

1(四川农业大学, 四川雅安, 625014) 2(重庆市茶叶科学研究所, 重庆, 402160)

**摘 要** 对分离自四川自然发酵砖茶中的冠突散囊菌发酵粗老的绿毛茶茶汁的单个优化条件进行了研究, 并用正交设计优化了条件组合。结果表明, 茶水比为 1:30、时间 180~216 h、接种量 0.8%~1.0%、温度 28~30℃ 为较优的工艺参数; 液体发酵过程中茶多酚氧化率影响的主次顺序为接种量>温度>时间>茶水比; 试验中各因素水平的优化组合为: 接种量 1% (孢子悬液浓度为  $1.6 \times 10^7 \sim 2.0 \times 10^7$  个/mL)、温度为 26℃、时间为 216 h、茶水比 1:30。

**关键词** 绿茶茶汁, 冠突散囊菌, 发酵, 正交试验

近年来, 茶饮料受到市场的欢迎。目前市场销售的茶饮料主要是由茶叶直接加工而成的调味型茶饮料, 产品类型单一。国内有关发酵型茶饮料有一些报道, 但产品尚未推向市场。

冠突散囊菌是黑茶类的茯砖茶发花过程的主要微生物<sup>[1~3]</sup>, 直接关系茯砖的品质。冠突散囊菌在康砖和青砖加工中也存在<sup>[4]</sup>。国内对冠突散囊菌有一些研究, 主要集中在形态结构、分类鉴定<sup>[2,3]</sup>、生物学特性<sup>[5~7]</sup>、发花工艺控制等<sup>[8]</sup>方面。本研究利用冠突散囊菌发酵中低档茶的茶汁, 为我国中低档茶叶的深加工提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 试验材料

菌种: 经分离鉴定后的冠突散囊菌菌株, 保藏在 4℃ 冰箱中备用。

茶叶: 采自四川名山县省茶良种茶园福选 9 号一芽 4、5 叶的鲜叶, 滚筒杀青后揉捻烘干。

#### 1.1.2 主要试验仪器

超净工作台 (SW-CJ-IF), 苏净集团安泰公司; 双层立式蒸汽压力消毒器 (YX-400B), 上海三申医疗器械有限公司; 恒温培养箱 (HPG-280B), 哈尔滨市车联电子技术开发有限公司; 恒温振荡器 (THZ-82), 苏太仓实验设备厂; 试验室离心机 (SIGMA), 可见分光光度计 (723), 上海精密科仪厂; 紫外/可见分光光度计 (UV-2300), 上海天美科学仪器有限公司。

第一作者: 在读博士研究生 (齐桂年教授为责任作者)。

\* 四川省应用基础研究项目

收稿日期: 2007-08-17, 改回日期: 2007-10-12

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 冠突散囊菌的活化培养及孢子悬液的制备

将在 4℃ 冰箱中保存的冠突散囊菌种取出在 25℃ 下培养 24 h, 用接种环取菌种在 PDA 平板上活化培养 7 d, 待长满金黄色的闭囊壳后, 刮取平板上的冠突散囊菌菌丝体于带小玻璃珠的无菌水中, 充分振荡后经灭菌脱脂棉过滤, 血球计数板计数孢子浓度, 调节孢子浓度到  $1.8 \times 10^7$  个/mL。

### 1.2.2 单个发酵条件对发酵茶汁品质的影响

研究冠突散囊菌液体发酵在不同发酵时间、温度、接种量和茶水比条件下的综合感官品质的变化, 确定发酵条件。

#### 1.2.2.1 发酵时间对发酵液态茶感官品质的影响

按常规茶叶审评的茶水比 (g:mL) 1:30 制备茶汁, 将茶样在 95℃ 水浴中浸提 40 min, 过滤, 分装 250 mL 三角瓶, 每瓶 100 mL, 121℃ 灭菌 30 min, 冷却接入 1% 孢子浓度为  $1.8 \times 10^7$  个/mL 的孢子悬液, 30℃, 120 r/min 摇床, 分别在 36 h、72 h、108 h、144 h、180 h、216 h 取样, 对发酵液态茶进行感官品质评分。感官审评综合品质分数参考文献[9], 品质指标包括香气、滋味和汤色, 确定发酵时间。试验设置 3 个重复 (以下茶汁制备、灭菌时间、茶汁的装瓶量、转速、评价和检测的指标、重复次数均与此同)。

#### 1.2.2.2 发酵温度和时间对发酵液态茶感官品质的影响

将灭菌茶汁, 接种 1% 孢子浓度为  $1.8 \times 10^7$  个/mL 的孢子悬液, 120 r/min 摇床, 在 21、26、30、34、38 和 42℃ 下, 每个温度分别在 36、72、108、144、180、216 h 取样, 感官审评, 确定发酵温度的优水平。

#### 1.2.2.3 茶水比对发酵液态茶感官品质的影响

研究不同浓度茶汁发酵的感官品质的变化, 设置

1:20,1:30,1:40,1:50,1:60 等不同的茶水比,分别接种 1% 孢子浓度为  $1.8 \times 10^7$  个/mL 的孢悬液,30℃,120 r/min 摇床,在 72、108、144、180、216 h 取样感官审评,确定茶水比的优水平。

#### 1.2.2.4 接种量对发酵液态茶感官品质的影响

按茶水比 1:30 制备茶汁,分别按 0.4%、0.6%、0.8%、1%、1.2% 的接种量接种孢子浓度为  $1.8 \times 10^7$  个/mL 的孢悬液,30℃,120 r/min 摇床。每个接种量分别在 72、108、144、180、216 h 取样感官审评,确定发酵接种量。

#### 1.2.3 发酵工艺参数的优化

根据单因素试验的结果,采用正交试验  $L_{16}(4^5)$  设计,优化各单因素的最佳条件组合,正交试验设计各因素水平编码见表 1,试验设置 3 个重复。

表 1 参数优化正交试验条件因素水平表

试验因素	水平			
	1	2	3	4
接种量(A)/%	0.6	0.8	1	1.2
发酵温度(B)/℃	21	26	30	34
发酵时间(C)/h	108	144	180	216
茶水比(D)	1:10	1:20	1:30	1:40

#### 1.2.5 数据处理

试验数据采用 LSD 法进行多重比较,结果数据采用 DPS 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素发酵条件对液态茶品质的影响

#### 2.1.1 发酵时间对液态茶品质的影响(图 1)

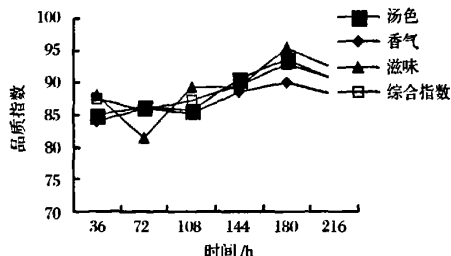


图 1 不同时间发酵液态茶品质变化曲线

从图 1 可以看出,综合品质分数在 180 h 达到最高,感官品质汤色、滋味、香气明显优于其他时间从 36~180 h 汤色的透明度逐渐增加,颜色由黄色逐渐变为橙红,清澈透明,无沉淀。汤色的这种变化可能是发酵过程中菌丝分泌的多种酶把茶多酚逐渐氧化为茶黄素、茶红素,不溶性大分子物质水解为可溶性小分子物质,从而使汤色红艳、透明。

#### 2.1.2 发酵温度对发酵液态茶品质的影响

选取 21、26、30、34、38、42℃ 六个温度,每 36 h 取样,结果见图 2。结果表明,21℃ 时茶汤的品质改变较慢,发酵温度在 26~34℃ 时品质改善较快。26℃ 和 30℃ 发酵茶汁品质最好,有很浓的发酵甜香味,发酵茶汤色明亮,透明,红艳;38℃ 和 42℃ 发酵液态茶的品质最差,所以,发酵茶汁的适宜温度为 26~30℃。

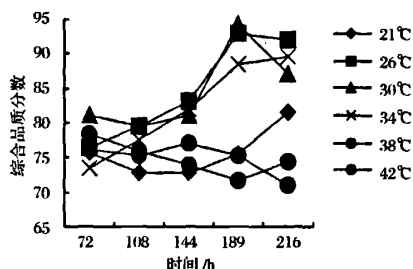


图 2 不同温度发酵茶汁综合品质分数曲线

#### 2.1.3 接种量对发酵液态茶品质的影响

图 3 和感官审评表明,不同接种量对发酵液态茶品质有较大的影响,当接种量在 0.8%~1.2% 时,汤色、透明度及香气都比 0.4% 和 0.6% 的好,在最佳发酵时间 108 h 时,1.2% 的接种量,其综合品质分数最高,但汤色透明度比 0.8%~1% 时略差,因此接种量以 0.8%~1.0% 为好。

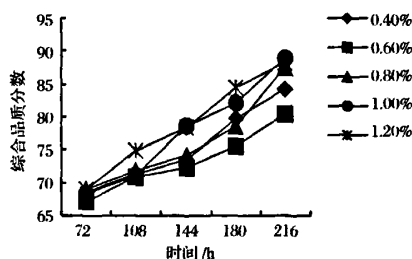


图 3 不同接种量对发酵茶汁品质的影响

#### 2.1.4 茶水比对发酵液态茶品质的影响

不同茶水比对茶汁发酵品质影响的结果见图 4。

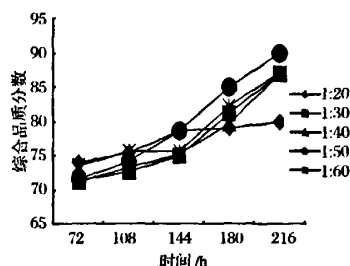


图 4 不同茶水比对发酵茶汁综合品质的影响

当发酵 180 h,茶水比为 1 : 20 时,发酵茶汁混浊、暗黄、滋味浓苦。茶水比为 1 : 30 时,汤色透明,橙红,滋味醇和略涩,甜香味明显,但综合品质分数不如 1 : 50 和 1 : 60 的处理。茶水比为 1 : 50 和 1 : 60 时,发酵 180 h,发酵茶汤汤色橙红、明亮,具有浓郁的甜香,经过稀释之后,其滋味仍醇和。高浓度条件下发酵,然后再稀释分装,这对降低成本有重要意义,

因此茶水比以(1 : 30)~(1 : 60)均可。

2.2 发酵工艺参数的优化

研究表明,茶叶中多酚类物质的变化与茶叶感官品质有重要关系,根据单因素试验结果,选择茶多酚的氧化率为试验生化指标结合感官审评对发酵工艺参数进行综合优化。优化设计及结果见表 2。

表 2 试验设计编码及结果

实验号	A 接种量/%	B 温度/℃	C 时间/h	D 茶水比	茶多酚氧化率/%			
					I	II	III	T(t)
1	1	1	1	1	12.51	12.12	13.04	37.67
2	1	2	2	2	17.19	16.50	18.00	51.69
3	1	3	3	3	22.55	24.77	23.94	71.26
4	1	4	4	4	22.15	22.00	21.18	65.33
5	2	1	2	3	23.18	24.00	24.11	71.29
6	2	2	1	4	30.12	29.88	27.65	87.65
7	2	3	4	1	33.36	34.16	31.28	98.80
8	2	4	3	2	25.11	21.01	22.19	68.31
9	3	1	3	4	28.00	28.17	27.14	83.31
10	3	2	4	3	35.43	36.22	34.92	106.57
11	3	3	1	2	29.91	27.61	28.12	85.64
12	3	4	2	1	21.30	18.20	19.31	58.81
13	4	1	4	2	17.51	18.25	18.20	53.96
14	4	2	3	1	33.33	32.90	34.11	100.34
15	4	3	2	4	27.14	26.52	25.59	79.25
16	4	4	1	3	19.91	21.11	23.13	64.15
K <sub>1</sub>	225.95	246.23	275.11	295.62				184.03(T)
K <sub>2</sub>	326.05	346.25	261.04	259.60			1	
K <sub>3</sub>	334.33	334.95	323.22	313.27				
K <sub>4</sub>	297.7	256.6	324.66	315.54				
k <sub>1</sub>	18.83	20.52	22.93	24.64				
k <sub>2</sub>	27.17	28.85	21.75	21.63				24.67(x)
k <sub>3</sub>	27.86	27.91	26.94	26.11				
k <sub>4</sub>	24.81	21.38	27.06	26.30				
R	9.03	8.34	5.30	4.67				

在试验条件限定范围内,从表 2 中极差大小可以看出,茶多酚氧化率影响的主次顺序为接种量>温度>时间>茶水比,接种量对茶多酚氧化率影响最大,其次是发酵温度和时间,茶水比对发酵影响最小。

表 3 表明,接种量、温度、时间、茶水比对茶多酚氧化率的影响都达到了极显著水平。根据表 2 中极差大小和表 4 各处理显著性差异检验的结果,各因素最优的水平组合为试验号 10,即 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>4</sub>D<sub>3</sub>,接种量 1%、温度 26℃、时间 216 h、茶水比 1 : 30。表 5 感官审评的结果与多重比较的结果基本一致,在最优水平

组合下,发酵茶汁汤色红艳透明、香气浓郁、滋味甜香醇和。

表 3 正交设计方差分析

变异来源	SS	df	MS	F
区组	1.5888	2	0.7944	—
接种量(A)	606.8403	3	202.2801	161.7738**
温度(B)	672.6315	3	224.2105	179.3126**
时间(C)	268.4098	3	89.4699	71.5537**
茶水比(D)	167.0974	3	55.6991	44.5455**
误差	37.5112	30	1.2504	
总变异	1864.1182	44		

### 3 讨 论

本研究用分离自川产自然发酵砖茶中的有益的冠突散囊菌直接发酵茶汁,研究了发酵过程各工艺参数及最优组合对品质的影响。结果表明,各因素组合与单因素试验中接种量、温度、茶水比相符合,即3个工艺参数的最优组合为接种量1%、温度26℃、茶水比1:30。对于时间因素,优化结果为时间216h,与单因素试验中的最佳时间(180h)有差异,可能各因素间有交互效应,需要更准确的试验。感官审评结果表明,最优参数组合下,发酵茶汁具有很好的感官品质,汤色红艳透明、甜香味浓郁、滋味醇和。

表4 试验处理间显著性差异检验

试验号	均值	显著性差异	
		5%	1%
10	35.5233	a	A
14	33.4467	b	AB
7	32.9333	b	B
6	29.2167	c	C
11	28.5467	c	CD
9	27.7700	cd	CD
15	26.4167	d	D
5	23.7633	e	E
3	23.7533	e	E
8	22.7700	ef	E
4	21.7767	f	EF
16	21.3833	fg	EF
12	19.6033	gh	FG
13	17.9867	hi	G
2	17.2300	i	G
1	12.5567	j	H

表5 正交试验感官审评及评分结果

试验号	汤色	评分	香气	评分	滋味	评分	综合评分	试验号	汤色	评分	香气	评分	滋味	评分	综合评分
1	橙黄混浊	74.3	茶香平淡	76.6	酸、涩	78.0	76.54	9	红亮略透明	88.7	甜 香	90.2	醇和、略酸	84.1	87.01
2	橙红较透明	75.2	甜香淡	76.3	略醇和	78.7	76.91	10	透明红艳	98.0	甜 香	94.3	醇 和	96.2	96.27
3	橙红较透明	88.1	甜 香	84.8	醇 和	78.7	83.05	11	橙红尚亮	86.0	热闷味	88.3	酸 涩	87.0	87.03
4	橙红混浊	76.2	热闷味	80.2	平 淡	80.3	79.05	12	橙红混浊	84.1	热闷味	74.5	略酸涩	74.4	77.34
5	橙黄混浊	84.8	茶香平淡	80.4	酸、涩	86.9	84.65	13	橙红明亮	78.2	略甜香	76.9	略酸涩	76.6	77.16
6	橙红略混浊	88.4	茶香平淡	90.0	略 酸	88.2	88.71	14	橙红透明	96.5	甜 香	94.1	醇和略涩	94.3	94.91
7	橙红透明	90.3	纯 正	88.7	醇 和	88.2	88.96	15	橙红尚透明	84.6	略甜香	90.0	醇和略酸	88.2	87.57
8	橙红尚明亮	82.2	热闷气	80.8	略醇和	82.8	82.12	16	橙红混浊	78.7	热闷味	76.0	酸、涩	78.1	77.76

#### 参 考 文 献

- 温琼英. 获砖茶中主要微生物的研究[J]. 茶叶通讯, 1986, (4): 19~21
- 温琼英. 获砖茶中优势菌的种名鉴定[J]. 中国茶叶, 1990, (6): 2~3
- 齐祖同, 孙曾美. 获砖茶中优势菌群的鉴定[J]. 真菌学报, 1990, 9(3): 176~17
- 陈云兰, 于汉寿, 吕 毅, 等. 康砖和青砖茶中散囊菌的分离、鉴定及其生物学特性研究[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3): 232~236
- 刘作易, 秦 京, 等. 获砖茶“金花”菌—谢瓦氏曲霉同型变种的孢子产生条件[J]. 西南农业学报, 1991, 4(1): 73~77
- 刘作易, 秦 京. 获砖茶“金花”菌生长条件研究[J]. 贵州科学, 1991, 8(1): 20~24
- 刘作易, 秦 京. 获砖茶“金花”菌对营养成分的利用[J]. 贵州农业科学, 1992, (1): 36~40
- 夏 明, 丁深根. 获砖茶接种发花的研究[J]. 中国茶叶, 1991, (5): 15~17
- 季玉琴. 液态茶饮料的审评方法[J]. 茶叶通报, 1997, 19(1): 30~31
- 汪东风. 粗老茶中的多糖含量及保健作用[J]. 茶叶科学, 1994, (1): 73~74

## Study on the Fermentation of Green Tea Juice with *Eurotium cristatum* Isolated from Brick Tea

Tian Hong<sup>1</sup>, Qi Guinian<sup>1</sup>, Yin Xumin<sup>2</sup>

1(Sichuanagricultural University, Ya'an 625014, China)

2(The Research Institute of Tea Science of Chongqing, Changqing 402160, China)

**ABSTRACT** The green tea juice fermentation with a *Eurotium cristatum* strains isolated from Sichuan Brick Tea were studied by using single fermentation condition and orthogonal test. The results showed the 1:30 tea/water ratio, 180~216h fermentation time, 0.8%~1.0% inoculation size and 28℃~30℃ fermentation temperature were the optimum fermentation conditions. Tea polyphenol oxidant rate was affected in successive order of inoculation size, fermentation temperature, time, ratio of tea/water in the experiment. Specifically, 1.0% inoculation size, 26℃ fermentation temperature, 216h fermentation time, 1:30 tea/water ratio were the optimal fermentation conditions of this experimental study.

**Key words** green tea juice, *Eurotium cristatum*, fermentation, orthogonal test