

夏秋灵芝菌茶的制备及内含物质分析研究

刘亚兵, 戴宇樵, 王 敏, 罗学尹, 蒲璐璐, 冉乾松, 潘 科*

(贵州省农业科学院茶叶研究所, 贵阳 550025)

摘要: 目的 探究灵芝菌(*Ganoderma lucidum*)对夏秋茶品质的影响, 提高夏秋茶资源利用率。**方法** 以夏秋茶为原料, 经加工成黑毛茶后, 灵芝菌作为发酵剂进行发酵制备灵芝菌茶, 测定发酵前后茶中 18 种游离氨基酸含量、茶多酚、pH、感官评分、色差 L^* 及滋味(酸、甜、苦、鲜、涩度)等品质指标, 运用 Plackett-Burman 实验对夏秋茶品质指标参数进行优化, 建立综合评价指标的回归模型。**结果** 黑毛茶经灵芝菌发酵处理后, 游离氨基酸总含量增加了 8.70 mg/g, 茶多酚质量分数减少了 0.9%, 甜度由 11.12 增加到 14.36, 苦涩度由 4.98 减少到 2.53; 构建数学模型 $Y(\text{综合评分})=93.00-0.23A-0.84B+0.21C+0.01AB+2.100AC+1.50BC-3.40A^2-3.20B^2-2.60C^2$ (A 、 B 、 C 分别表示茶多酚含量、感官评分、氨基酸含量), 模型决定系数 $R^2=0.9812$, 调整决定系数 $R^2_{\text{adj}}=0.9570$ 。**结论** 灵芝菌发酵夏秋黑毛茶在一定程度上能改善夏秋茶滋味品质, 降低其苦、涩味, 增加甜味, 所建模型可应用于实际夏秋茶品质评价。为提高夏秋茶资源利用率及产业化建设提供了科学支撑。

关键词: 灵芝菌; 夏秋茶; 发酵; 品质; 模型

Study on the preparation and content analysis of *Ganoderma lucidum* tea in summer and autumn

LIU Ya-Bing, DAI Yu-Qiao, WANG Min, LUO Xue-Yin, PU Lu-Lu, RAN Qian-Song, PAN Ke*

(Tea Research Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT: Objective To explore the effects of *Ganoderma lucidum* on the quality of summer and autumn tea and improve the utilization rate of summer and autumn tea resources. **Methods** The research takes summer and autumn tea as raw material, after processing into dark tea, and then uses *Ganoderma lucidum* as starter to make *Ganoderma lucidum* tea. The content of 18 kinds of free amino acids, tea polyphenols, pH, sensory score, color difference L^* and taste (sour, sweet, bitter, fresh and astringent) in tea was determined before and after fermentation. Plackett-Burman test was used to optimize the parameters of summer and autumn tea quality index, and the regression model of comprehensive evaluation index was established. **Results** The total content of free amino acids increased by 8.70 mg/g, the mass fraction of polyphenols decreased by 0.9%, the sweetness increased from 11.12 to 14.36, and the bitterness decreased from 4.98 to 2.53 after fermented by *Ganoderma lucidum*. Mathematical model $Y(\text{comprehensive score})=93.00-0.23A-0.84B+0.21C+0.01AB+2.100AC+1.50BC-3.40A^2-3.20B^2-2.60C^2$ (A , B and C

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2020]1Y009号)、贵州省基础研究计划项目(黔科合基础-ZK[2023]一般166)、贵州省农业科学院青年基金项目(黔农科院青年基金[2022]08号)

Fund: Supported by the Science and Technology Support Plan Project of Guizhou Province (Guizhou Science and Technology Support [2020]1Y009), the Basic Research Plan Project of Guizhou Province (General 166 of Qiankehe Foundation ZK [2023]), and the Youth Fund of Guizhou Academy of Agricultural Sciences (Youth Fund of Guizhou Academy of Agricultural Sciences [2022] 08)

*通信作者: 潘科, 博士, 研究员, 主要研究方向为茶叶精深加工。E-mail: 14850502@qq.com

*Corresponding author: PAN Ke, Ph.D, Professor, Tea Research Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025, China. E-mail: 14850502@qq.com

represent tea polyphenol content, sensory score and amino acid content, respectively) was constructed, model determination coefficient was $R^2=0.9812$, adjusted determination coefficient was $R^2_{adj}=0.9570$. **Conclusion** *Ganoderma lucidum* fermentation can improve the taste quality, reduce bitter and astringent taste, and increase sweetness. The model can be applied to the actual quality evaluation of summer and autumn tea and provide scientific support for improving the utilization rate of summer and autumn tea resources and industrial construction.

KEY WORDS: *Ganoderma lucidum*; summer and autumn tea; fermentation; quality; model

0 引言

近年来, 贵州茶园面积位居全国首位, 夏秋茶资源丰富, 但利用率低下, 究其原因夏秋季茶树碳代谢强、茶叶粗老、营养成分含量低, 使得制成的茶叶具有滋味较淡薄、苦涩味重、鲜爽度不足等特点^[1], 导致夏秋茶下树率低、综合利用率低。因此增加夏秋茶资源利用, 避免资源浪费, 将有利于推动贵州茶产业的持续高效发展。

黑茶是一种后发酵茶, 大都采用较粗老的鲜叶为原料制成毛茶^[2], 黑茶后发酵在黑曲霉、青霉属、酵母属、根霉属、乳酸杆菌、冠突散囊菌等主要微生物作用下^[3-4], 形成黑茶特异滋味和香气, 谭雪^[5]研究表明, 微生物不仅可以改善茶叶中风味, 通过代谢还可提高营养价值, 利用微生物作为发酵剂在夏秋茶中的应用越来越受到人们的重视。虽然有报道^[4]黑茶在传统渥堆过程中由于微生物的代谢活动而分泌了不同于鲜叶内源酶的多酚氧化酶、纤维素酶、果胶酶和蛋白酶等胞外酶, 为茶叶中儿茶素的氧化、纤维素的分解、蛋白质和果胶的水解等提供了有效的生化动力, 但这是混合微生物还是具体某种微生物的作用不明确, 只能证明微生物酶促作用在黑茶特征性品质风味形成中具有重要的作用, 不能从科学角度解释赋予风味的机制。XIAO 等^[6]研究发现, 秋茶经冠突散囊菌 PW-1 发酵后, 儿茶素总量从 118.35 mg/g 下降到 10.58 mg/g, 下降幅度达 91.06%, 表明菌株 PW-1 发酵可显著降低秋茶中的儿茶素含量; 通过电子舌技术对秋茶和冠突散囊菌 PW-1 发酵秋茶的滋味特征进行分析, 发现秋茶的涩味显著降低而鲜味强度有所增加, 表明秋茶经菌株 PW-1 发酵后的滋味品质得到显著提高。

灵芝菌(*Ganoderma lucidum*)属于担子菌纲多孔菌科灵芝属, 是一种药食两用真菌, 具有抗炎、抗病毒、抗衰老、抗肿瘤以及提高免疫能力等药用功效, 其菌丝体可用于食品发酵的酶类物质^[7]。灵芝菌生长过程中能够分解蛋白质、纤维素、木质素等物质^[8-9], 一定程度上可增加茶叶中氨基酸、降解茶多酚^[10], 因此以茶叶为生长基质, 接种已活化灵芝菌菌种进行培养, 可形成微生物菌体与茶叶其他代谢物混合物为主体的灵芝菌茶^[11]。如刘良琴^[12]利用灵芝与绿茶混合粉碎后, 可制得灵芝绿茶; 杜洋^[13]直接将绿茶茶汤与蛹虫草灵芝汁液进行无生化反应混合制得灵芝茶; 林戎斌等^[14]分别以茶鲜叶和干茶为生长基质灵芝菌为发

酵剂混合进行固态发酵, 指出茶鲜叶制得灵芝茶品质优于干茶制得灵芝茶。

夏秋茶是一种特殊的营养成分较全面的基质, 利用灵芝菌以茶叶为基质生长这一特性, 将其接种至夏秋茶中, 通过菌株利用基质或分泌胞外酶等途径来改变茶叶中甜味物质含量, 降低苦涩味物质含量从而改善夏秋茶品质。因此本研究以采摘自贵州省湄潭县夏秋季鲜叶为原料, 经加工成黑毛茶后, 以食用灵芝菌作为发酵剂接种在黑毛茶中, 制备成灵芝菌茶, 测定发酵前高温灭菌茶样和接灵芝菌发酵后茶样中 18 种游离氨基酸含量、茶多酚含量、pH、色差 L^* 等品质指标, 运用 Plackett-Burman 实验^[15-17]对夏秋茶品质指标参数进行优化, 建立综合评价指标的回归模型, 同时结合感官审评和电子舌对所制茶样品质进行综合感官评价, 以探究灵芝菌在夏秋黑毛茶加工中的应用及效果, 以期为提高夏秋茶叶的综合开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料与菌株

夏秋茶鲜叶: 采自贵州省湄潭县, 采摘一芽二叶和一芽三叶, 采集时间为 2021 年 7~10 月。灵芝菌(*Ganoderma lucidum*): 贵州科学院生物技术研究所提供并鉴定, 菌株经活化、驯化后保存作为夏秋茶后发酵制剂。

1.1.2 试剂

茶氨酸标准品(纯度 98%)、咖啡碱标准品、儿茶素类标准品、没食子酸标准品、抗坏血酸(纯度 98%)、氯化钾、甲醇、乙腈、乙酸(色谱纯)(贵州源叶生物科技有限公司); Waters Acc Q.Tag 化学试剂包[(硼酸缓冲液、衍生剂粉末、衍生剂稀释液、混合氨基酸水解标样), 美国 Waters 公司]。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 马铃薯 200 g 制成浸出液、葡萄糖 20 g、琼脂 15~20 g、水 1000 mL。将马铃薯去皮切块, 加 1000 mL 蒸馏水, 煮沸 10~20 min。用纱布过滤, 补加蒸馏水至 1000 mL。加入葡萄糖和琼脂, 加热溶化, 分装, 121°C 高压灭菌 20 min, 备用。

PDB 培养基: PDA 培养基完全去除琼脂。

灭菌条件: 121°C 条件下, 高温高压灭菌 30 min。

1.2 仪器与设备

CS-280 分光色差仪(上海高致精密仪器有限公司); 雷磁 PHS-3C 型实验室酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司); 日本 INSENT 味觉分析系统(电子舌)(北京盈盛恒泰科技有限责任公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); SHZ-III 型真空抽滤装置(天津市恒奥公司); GC-MS QP2010、LC-2030C 型高效液相色谱仪[谱质分析检测技术(上海)有限公司]; WGL-230B 型电热鼓风干燥箱、DK-98-II型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); TG16A 型离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); YXQ-LS-30S II 立式压力蒸汽灭菌器、BSD-150 震荡培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); FBS-750A 型快速水分测干仪(深圳弗布斯仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 灵芝菌茶制备及操作要点

黑毛茶制备: 夏秋茶鲜叶→洒水灌浆(15%)→杀青(250°C, 3~4 min)→初揉(含水量 75%)→渥堆(38 h)→干燥(初干: 150°C, 4~5 min; 复干 80°C, 2 h)→黑毛茶备用。

灵芝菌制备: 取 0.5 m² 灵芝菌饼→PDB 培养基活化(3次)→驯化培养(含茶汤培养基)→清洗除去培养基质→灵芝菌种子液备用。

灵芝菌茶制备: 将黑毛茶样品灭菌(121°C, 20 min)后于无菌环境中以 100 mL/kg 的用量将灵芝菌种子液接种至黑毛茶, 湿度为 85%, 在 25°C 条件下发酵培养 10 d 后, 于 70°C 条件下烘干至水分达到 3%~4%, 接灵芝菌发酵后茶样用于理化分析, 发酵前高温灭菌茶样作为对照组。

操作要点:

洒水灌浆: 黑茶原料粗老, 为避免出现因水分不足而

杀青不足、不透现象, 在杀青前按 100 kg 鲜叶洒水 10 kg 的比例进行洒水灌浆, 在翻动鲜叶的同时进行洒水, 使鲜叶均匀一致, 便于杀青杀匀、杀透。

杀青: 采用滚筒杀青, 温度 280~320°C, 叶子在筒内经历约 3~5 min。

初揉: 杀青叶出锅后, 迅速曾热揉捻, 使用揉捻机采取轻压、短时、慢揉, 要求大部分初步成皱褶条, 茶汁揉出黏附于叶表面。

渥堆: 将初揉完成的原料于 25°C 以上的室温环境中, 相对湿度保持在 85% 左右条件下进行, 立即将初揉后茶坯堆积, 高 70~100 cm, 并加盖湿布, 以便保温保湿。要求手伸入堆内可感觉发热, 叶温达 45°C 左右, 茶堆表面出现水珠, 叶片颜色呈黄褐色, 带有刺激的酒糟味或酸辣气需立即开堆解块。

干燥: 干燥包括初烘和复烘两个阶段, 先于 150°C 初烘 4~5 min, 后于 80°C 中复烘至含水量为 8%~10%。

1.3.2 分析检测

黑毛茶发酵前后检测分别指发酵前高温灭菌黑毛茶和接灵芝菌发酵后黑毛茶茶样的检测。游离氨基酸参照 GB/T 8314—2013《茶 游离氨基酸总量的测定》中的茚三酮比色法进行测定; 茶多酚参照 GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》进行测定; pH 采用酸度计进行测定; 色差 L^* 采用 CS-280 分光色差仪进行测定; 滋味(酸甜鲜苦涩度)采用日本 INSENT 味觉分析系统(电子舌)进行测定。

1.3.3 感官评价

参照 GB/T 23776—2009《茶叶感官审评方法》进行评价, 由 20 名专业评价人员进行评价, 从外形、汤色、香气、滋味和叶底等因子进行评价, 满分为 100 分, 感官评价标准见表 1。

表 1 感官评价标准
Table 1 Standards of sensory evaluation

因子	档次	品质特征	得分	评分系数/%
外形	1	条索重实匀齐, 色泽黑褐油润	90~99	20
	2	条索重实较匀齐, 色泽黑褐尚油润	80~89	
	3	条索重实尚匀齐, 色泽黑褐尚油润	70~79	
汤色	1	橙黄(橙红), 清亮	90~99	10
	2	橙黄(橙红), 尚清亮	80~89	
	3	橙黄(橙红)欠亮, 有浑浊	70~79	
香气	1	香气纯正, 陈茶带陈香, 不能有霉味、杂味, 烟味不可刺鼻、过重	90~99	25
	2	香气较纯正, 无杂气味	80~89	
	3	香气尚纯	70~79	
滋味	1	醇厚, 回味好	90~99	35
	2	较醇厚	80~89	
	3	尚醇	70~79	
叶底	1	暗黄褐, 暗褐	90~99	10
	2	较暗褐	80~89	
	3	尚暗褐	70~79	

1.3.4 黑毛茶品质评价指标优化响应面实验

(1) Plackett-Burman 实验

以接种灵芝菌进行发酵后黑毛茶品质指标氨基酸含量(X_1)、茶多酚含量(X_2)、pH (X_3)和色差 L^* 值(X_4)、感官评分(X_5)为因素,以综合评分为指标,采用 $N=12$ 的 Plackett-Burman (PB)实验设计,每个因素分别取高、中、低 3 个水平,高水平是低水平的 1.5 倍,筛选影响综合评分的主要因素。PB 实验因素与水平见表 2。

表 2 Plackett-Burman 实验因素与水平
Table 2 Factors and levels of Plackett-Burman experiments design

因素	水平		
	-1	0	1
X_1	1.59	2.02	2.46
X_2	13.20	13.65	14.10
X_3	6.80	7.05	7.30
X_4	65.35	66.78	68.21
X_5	87.00	89.50	92.00

(2) 最陡爬坡实验

依据 Plackett-Burman 实验结果,以各个显著影响因素效应的大小设计步长,根据变化的梯度方向确定爬坡方向,快速逼近最佳值区域,确定主要的影响因素为茶多酚含量、感官评分及氨基酸含量,将此 3 个因素进行 Box-Behnken 实验。

(3) Box-Behnken 实验设计

以综合评分为响应值,以因素茶多酚含量(A)、感官评分(B)及氨基酸含量(C)为自变量,采用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 实验设计优化黑毛茶品质评价指标。Box-Behnken 实验的因素及水平见表 3。

表 3 Box-Behnken 实验设计因素与水平
Table 3 Factors and levels of Box-Behnken experiments design

因素	水平		
	-1	0	1
A	13.20	13.65	14.10
B	87.00	89.50	92.00
C	1.59	2.02	2.46

1.3.5 黑毛茶综合评分赋值标准

采用评价小组(20 人)打分制确定,感官评分定为 100 分,将其权重系数设为 20%;茶多酚含量(苦涩味)越小越好,定为 100 分,设其权重系数设为 15%;色差 L^* 越好,定为 100 分,设其权重系数设为 20%;氨基酸含量(鲜爽味)越高越好,定为 100 分,设其权重系数设为 30%;pH 定为 100 分,设其权重系数设为 15%。

综合得分 (Y)= $N_1 \times 20\% - N_2 \times 15\% + N_3 \times 20\% + N_4 \times 30\% + N_5 \times 15\%$

式中, N_1 为感官评分值,分; N_2 为茶多酚含量,%; N_3 为色差 L^* ; N_4 氨基酸含量,mg/g; N_5 为 pH。

1.4 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 19.0 和 Design Expert 8.0.6 对数据进行统计分析,其中 $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 为差异不显著,实验重复 3 次,数据用“平均值±标准偏差”表示。

2 结果与分析

2.1 黑毛茶发酵前后游离氨基酸含量变化

利用茚三酮比色法对发酵前高温灭菌黑毛茶和接灵芝菌发酵后黑毛茶中 18 种游离氨基酸组分含量定量分析见表 4,茶氨酸、苯丙氨酸和苏氨酸发酵前分别为 11.40、0.10、0.20 mg/g,发酵后均未检测出。18 种游离氨基酸组分总含量由 15.90 mg/g 增加至 24.60 mg/g,增加了 8.70 mg/g,茶叶在微生物及其分泌的酶类和湿热环境共同作用下,茶叶中大分子蛋白质水解为游离氨基酸,分解成小分子游离氨基酸,使得部分游离氨基酸含量增加,同时氨基酸作为微生物的主要碳源物质被利用,又在酶的作用下转换为香气物质,导致其含量不断下降^[18-21]。因此茶氨酸、苯丙氨酸和苏氨酸含量的降低,可能是随着发酵的进行被灵芝菌体利用所致。

表 4 黑毛茶发酵前后 18 种游离氨基酸含量变化(mg/g)
Table 4 Changes of 18 kinds of free amino acids before and after fermentation of black tea (mg/g)

序号	18 种游离氨基酸	发酵前黑毛茶	发酵后黑毛茶
1	丙氨酸(Ala)	0.21±0.0010	4.86±0.020
2	精氨酸(Arg)	0.10±0.0001	1.90±0.003
3	天冬氨酸(Asp)	1.20±0.0100	8.95±0.043
4	半胱氨酸(Cys)	0.30±0.0004	1.94±0.010
5	谷氨酸(Glu)	0.19±0.0100	1.14±0.004
6	甘氨酸(Gly)	0.04±0.0001	0.03±0.001
7	组氨酸(His)	0.20±0.0300	0.13±0.001
8	异亮氨酸(Ile)	0.01±0.0002	0.18±0.005
9	亮氨酸(Leu)	0.04±0.0003	1.98±0.018
10	赖氨酸(Lys)	0.10±0.0020	1.23±0.004
11	甲硫氨酸(Met)	0.10±0.0003	0.42±0.004
12	苯丙氨酸(Phe)	0.10±0.0004	-
13	脯氨酸(Pro)	0.04±0.0003	0.35±0.009
14	丝氨酸(Ser)	0.20±0.0100	0.45±0.007
15	茶氨酸(Thea)	11.40±0.0600	-
16	苏氨酸(Thr)	0.20±0.0010	-
17	酪氨酸(Tyr)	0.10±0.0003	0.36±0.005
18	缬氨酸(Val)	0.10±0.0001	0.62±0.002
19	合计	15.90±0.0050	24.60±0.008

注: -表示未检出,表 6 同。

2.2 黑毛茶发酵前后理化指标和感官评分变化

黑毛茶发酵前后茶多酚含量、色差值、pH 和感官评分变化见表 5。由表 5 可知, 与发酵前黑毛茶相比, 发酵后黑毛茶的茶多酚含量减少了 0.9%, 感官评分有所上升, 而灵芝菌对黑毛茶色差 L^* 、pH 影响略有下降, 表明接种灵芝菌对黑毛茶中茶多酚有直接作用, 这主要是由于灵芝菌丝体的耗氧生长繁殖, 发酵前由于菌体的大量生长繁殖, 在这个过程中通过糖酵解途径(glycolytic pathway, EMP)和三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环途径产生有机酸等酸性物质, 消耗茶多酚等物质^[22], 导致茶多酚、pH 略有下降。色差是反映茶汤色泽的指标之一, 其中 L^* 表征茶汤明暗度^[23], 研究表明黑茶在后发酵过程中, 在湿热作用下, 黑茶中大量酚类物质转化为茶褐素, 叶绿素降解为脱镁叶绿素类、脱镁叶绿素酸酯类物质, 叶黄素和 β -胡萝卜素含量增加, 这些色素的形成与积累形成了黑茶干茶色泽褐黑、汤色红褐的特征^[24-25], 因此导致黑毛茶接种灵芝菌后色差值下降。

表 5 黑毛茶发酵前后茶多酚含量、色差值、pH 和感官评分变化
Table 5 Changes of tea polyphenol content, color difference value, pH and sensory score before and after fermentation of black hair tea

类型	茶多酚含量/%	色差 L^*	pH	感官评分/分
发酵前黑毛茶	14.1±0.8	68.21±2.50	7.3±0.4	87±3
发酵后黑毛茶	13.2±0.4	65.35±1.90	6.8±0.6	92±2

2.3 黑毛茶发酵前后滋味的变化

滋味是评价茶叶品质优异的重要指标之一, 是指可溶性物质综合味觉表征。电子舌通过茶汤综合表征滋味物质呈味特性, 是量化滋味评价的一种新技术手段^[26]。茶汤滋味由苦、涩、鲜、甜、酸 5 种滋味属性构成^[27], 本研究利用电子舌测定黑毛茶发酵前后滋味的变化如表 6 所示, 发酵前后, 未检测出黑毛茶酸味, 与发酵前黑毛茶相比较, 发酵后黑毛茶甜味值有所增加为 14.36, 涩味值由-4.44 降为-7.02, 苦味值由 4.98 降为 2.53, 鲜味值由 9.54 降为 7.64, 表明黑毛茶接种灵芝菌后, 滋味发生了明显的改善。

总体而言, 灵芝菌后发酵夏秋黑毛茶能提高茶叶甜味, 降低苦涩味。氨基酸是鲜味的主要贡献物质^[28], 其中茶氨酸和谷氨酸是茶叶中主要鲜味氨基酸^[29], 在鲜味属性上, 由于茶叶在微生物作用下, 使得茶氨酸和谷氨酸含量降低, 因此黑毛茶接种灵芝菌后鲜度降低; 茶叶中带甜味氨基酸主要有甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、色氨酸等^[30], 黑毛茶接种灵芝菌后甜味氨基酸均有所增加, 因此在甜味属性上, 黑毛茶接种灵芝菌后甜度增加; 茶叶中呈苦涩味成分主要是多酚类物质, 多酚在微生物及其分泌的氧化酶和湿热环境共同作用下发生分解转化使含量明显降低^[22], 因此在一定程度上降低了茶汤苦涩味。茶多酚、氨基酸、

色差值以及茶汤各滋味属性值客观验证了表 5 中感官审评的结果。

表 6 黑毛茶发酵前后滋味的变化
Table 6 Changes in the taste of black tea before and after fermentation

名称	发酵前黑毛茶	发酵后黑毛茶
酸味值	-	-
苦味值	4.98±0.02	2.53±0.03
涩味值	-4.44±0.03	-7.02±0.18
鲜味值	9.54±0.01	7.64±0.05
甜味值	11.12±0.17	14.36±0.11

2.4 黑毛茶品质评价指标优化 Plackett-Burman 实验

感官评价是茶叶品质评价的主要方法, 但该方法易受评茶人员主观因素和环境因素影响, 在一定程度上限制了其评价客观性; 电子舌是综合表征味觉成分的共同味道特性, 目前还不能整体评价茶汤品质^[31]; 避免评茶人员主观因素及仅以味觉成分含量或各滋味属性反映茶叶质量优劣的误区。Plackett-Burman 设计是一种经典的两水平实验设计方法^[32], 它利用最少的实验次数, 从众多考察因素中快速有效地筛选出最为重要的几个因素, 供进一步研究所用。

运用 Plackett-Burman 实验^[33]对夏秋茶品质指标参数进行优化, 建立综合评价指标的回归模型^[34-35]。以综合评分为响应值, 选用 5 因素(氨基酸含量、色差 L^* 、感官评分、pH、茶多酚含量), $N=12$ 次的实验表格, 各因子取高低 2 个水平, Plackett-Burman 实验因素及水平见表 3, 方差分析见表 7。

由表 8 可知, 模型的 $P<0.05$, 表明所建模型具有显著性, 拟合良好。在 5 个变量中, 对综合评分影响显著的显著性从大到小排序为: X_1 (氨基酸含量) $>X_3$ (茶多酚总含量) $>X_5$ (感官评分) $>X_2$ (色差 L^*) $>X_4$ (pH)。其中, 氨基酸含量(X_1)、感官评分(X_3)和茶多酚总含量(X_5)对感官评分有显著影响($P<0.05$), 其他 2 个因素影响不显著($P>0.05$)。可以确定氨基酸含量、感官评分和茶多酚总含量为影响黑毛茶品质的影响显著因素, 以这 3 个因素为研究对象, 进行最陡爬坡实验。

2.5 最陡爬坡实验

根据 Plackett-Burman 实验结果设定 3 个影响显著因素的爬坡方向及步长, 最陡爬坡实验设计及结果见表 9。

由表 9 可知, 随着茶多酚含量、感官评分和氨基酸含量的变化, 其综合评分均呈现出先增大后减小的趋势, 感官评分在第 3 组实验达到最大值, 当茶多酚含量、感官评分和氨基酸含量值分别为 13.2%、92 分和 2.46 mg/g 时, 其综合评分最好(93 分), 说明其比较接近最佳响应区域。因此, 以这 3 个数值作为实验中心点, 进行响应面实验。

表 7 Plackett-Burman 实验设计结果

Table 7 Results of Plackett-Burman experimental design

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	综合评分/分
1	1.00	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	82
2	-1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	86
3	1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	88
4	-1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	90
5	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	1.00	93
6	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	93
7	1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	91
8	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	94
9	1.00	1.00	-1.00	-1.00	1.00	84
10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	88
11	-1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	89
12	1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	80

表 8 Plackett-Burman 实验结果方差分析

Table 8 Variance analysis of Plackett-Burman tests results

因素	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	159.23	5	31.85	6.37	0.021	*
X ₁	53.26	1	53.26	10.65	0.014	*
X ₂	15.44	1	15.44	3.09	0.120	
X ₃	37.68	1	37.68	7.54	0.033	*
X ₄	7.36	1	7.36	1.47	0.260	
X ₅	45.49	1	45.49	9.10	0.024	*
残差	28.16	6	4.69			
总变异	187.39	11				

注: *表示对结果影响显著($P<0.05$)。

表 9 最陡爬坡实验设计与结果

Table 9 Design and results of the steepest climbing tests

实验号	茶多酚含量/%	感官评分/分	氨基酸含量/(mg/g)	综合评分/分
1	15.2	96	2.66	80
2	14.2	94	2.56	89
3	13.2	92	2.46	93
4	12.2	90	2.36	88
5	11.2	88	2.26	81

2.6 响应面实验

2.6.1 Box-Behnken 实验设计及结果

利用方差分析法,对黑毛茶品质评价指进行 3 因素 3 水平的响应面分析,以茶多酚含量(A)、感官评分(B)及氨基酸含量(C)为自变量,以综合评分为响应值(Y),进行响应面实验,响应面实验设计及结果见表 10。

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 10 进行分析,构建数学模型,得到茶多酚含量、感官评分及氨基酸含量对综合评分影响的二次回归方程为:

$$Y=93.00-0.23A-0.84B+0.21C+0.01AB+2.100AC+1.50BC-3.40A^2-3.20B^2-2.60C^2$$

其中,A、B、C 为自变量编码值;编码值=(实际值-中心值)/

步长。

由综合评分模型可知,当随机测定黑毛茶中茶多酚含量、感官评分和氨基酸含量值时,可以算出综合得分,根据得分可以评估其滋味品质,因此该模型在一定程度上可以用于评价夏秋茶品质,为夏秋茶高品质的挖掘和加工提供参考。

对该模型进行方差分析,结果见表 11 可知,该模型显著($P<0.0001<0.05$),而失拟项不显著($P=0.7022>0.05$),模型的决定系数 $R^2=0.9812$,调整决定系数 $R^2_{adj}=0.9570$,说明此模型与实验值的拟合程度良好、实验误差较小,可用于对黑毛茶品质评价指标参数的预测和分析。由 F 可知,各因素对综合评分影响的次序为 $A>C>B$ 。由 P 可知,一次项 A 对结果影响显著($P<0.05$),二次项 C^2 对结果影响显著($P<0.05$),二次项 A^2 、 B^2 对结果影响极显著($P<0.01$),交互项 AB、AC 对结果影响显著($P<0.05$),交互项 BC 对结果影响极显著($P<0.01$)。由此可知,接灵芝菌后对黑毛茶内含成分茶多酚含量影响极大,氨基酸含量次之,对感官评分影响最小。

2.6.2 响应面交互作用分析

各因素交互作用对综合评分影响的响应曲面和等高线分别见图 1~3。

表 10 响应面实验设计及结果

Table 10 Response surface experimental design and results

实验号	A 茶多酚含量/%	B 感官评分/分	C 氨基酸含量/(mg/g)	Y 综合评分/分
1	12.20	92	2.56	90
2	13.20	94	2.56	87
3	13.20	92	2.46	93
4	13.20	92	2.46	94
5	14.20	92	2.36	89
6	14.20	94	2.46	86
7	14.20	90	2.46	84
8	13.20	90	2.56	91
9	13.20	92	2.46	93
10	13.20	92	2.46	92
11	12.20	92	2.36	90
12	13.20	90	2.36	88
13	12.20	94	2.46	86
14	12.20	90	2.46	88
15	13.20	92	2.46	93
16	14.20	92	2.56	86
17	13.20	94	2.36	91

表 11 响应面实验方差分析

Table 11 Response surface experiment analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	143.49	9	15.94	40.58	<0.0001	**
A	101.30	1	10.13	25.77	0.0014	**
B	0.12	1	0.12	0.32	0.5903	不显著
C	2.00	1	2.00	5.09	0.0587	不显著
AB	4.00	1	4.00	10.18	0.0153	*
AC	2.25	1	2.25	5.37	0.0479	*
BC	12.25	1	12.25	31.18	0.0008	**
A ²	59.21	1	59.21	150.72	<0.0001	**
B ²	44.47	1	44.47	113.21	<0.0001	**
C ²	1.05	1	1.05	2.68	0.0146	*
残差	2.75	7	0.39			
失拟项	0.75	3	0.25	0.50	0.7022	不显著
误差项	2.00	4	0.50			
总变异	146.24	16				

注: *表示对结果影响显著($P < 0.05$); **表示对结果影响极显著($P < 0.01$)。

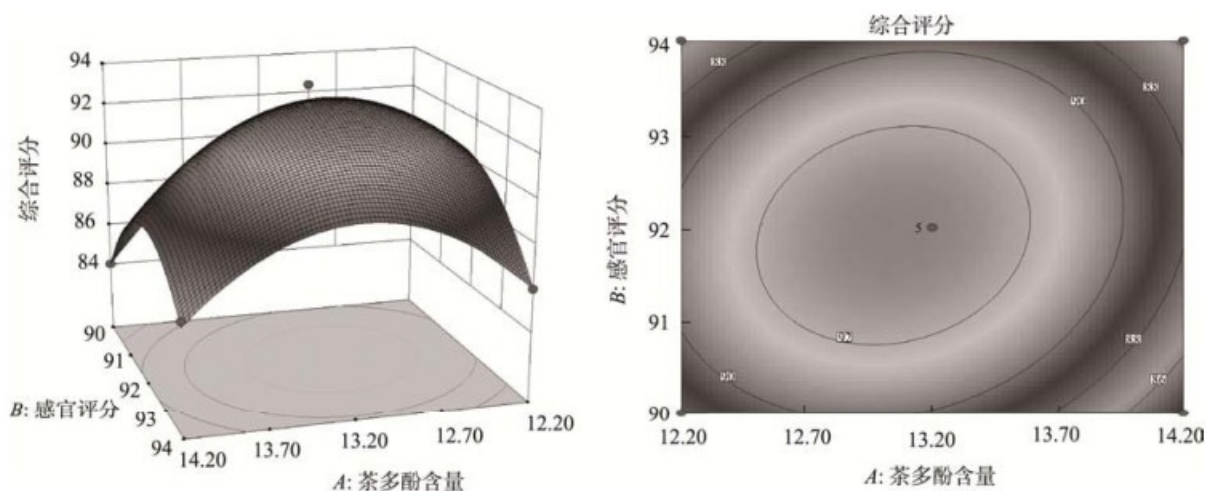


图 1 感官评分与茶多酚含量交互作用

Fig.1 Interaction between sensory score and tea polyphenol content

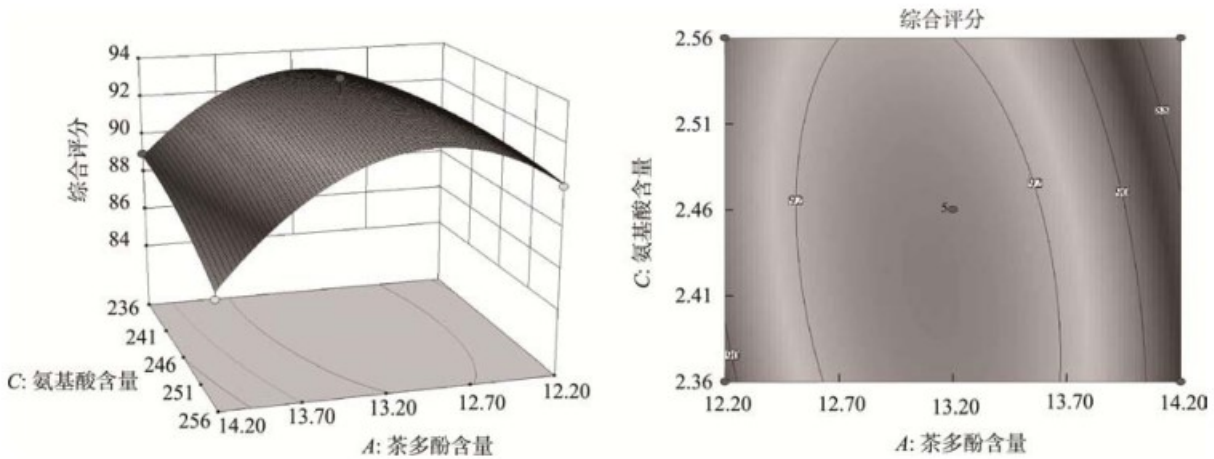


图 2 氨基酸含量与茶多酚含量交互作用

Fig.2 Interaction between amino acid content and tea polyphenol content

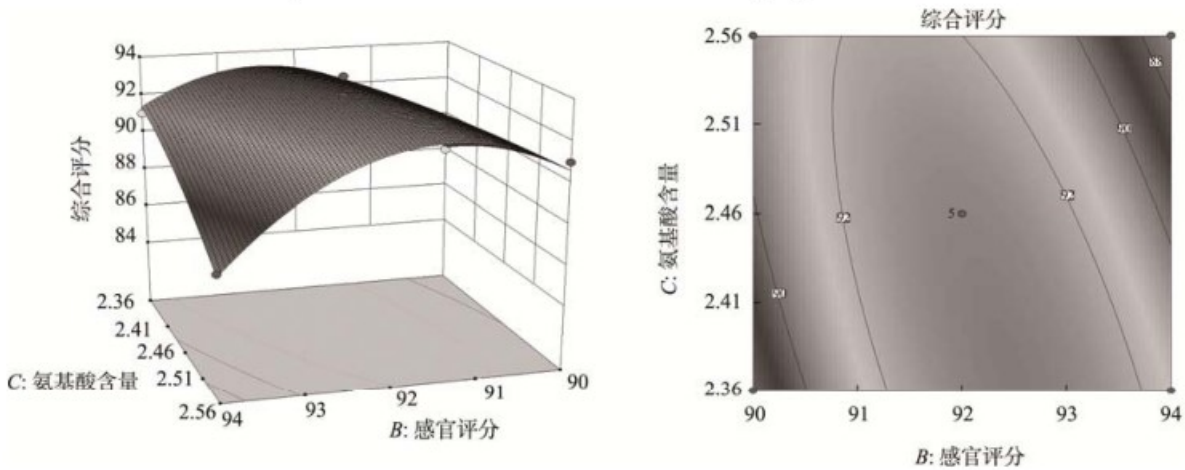


图 3 氨基酸含量与感官评分交互作用

Fig.3 Interaction between amino acid content and sensory score

图 1 显示了感官评分对茶多酚含量的交互影响, 其交互作用显著, 随着感官评分的增加及茶多酚含量的减少, 黑毛茶感官评分呈上升趋势, 这是由于灵芝菌生长过程中消耗茶多酚等物质, 导致苦涩味值降低, 从而综合评分增高。图 2 表明氨基酸含量与茶多酚含量交互作用, 氨基酸含量的增加导致茶鲜爽味增加, 茶多酚含量的减少导致黑毛茶苦涩味值降低, 从而使得综合分值增加的可能。图 3 揭示氨基酸含量与感官评分交互作用情况, 氨基酸和感官评分值高时综合评分值较高, 响应面交互作用情况与实际综合评分相符。

2.6.3 模型验证

分别选取 10 个黑毛茶样品验证回归模型效果, 将茶多酚含量、感官评分和氨基酸含量等初始指标数据代入综合品质评价模型, 得出黑毛茶综合指标预测值, 将预测值与实际综合品质指标观测值进行对比验证, 得出观测值与预测值相关系数(R^2)数为 0.992, 即在 0.05 水平上显著相关, 说明综合品质评价模型能有效地预测黑毛茶品质。图 4 为验证实验的观测值与预测值散点图, 样品点较集中分布在

45°线周围, 表明预测值接近观测值, 即通过测定不同夏秋茶的茶多酚含量、感官评分和氨基酸含量等指标, 可以较准确地预测综合品质。

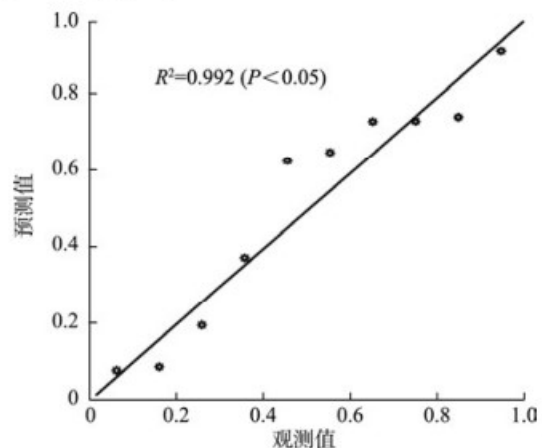


图 4 黑毛茶综合评价指标预测值与观测值散点图

Fig.4 Scatter plot of predicted value and observed value of comprehensive evaluation index of black hair tea

3 结论

本研究探究了经灵芝菌后发酵处理的夏秋黑毛茶主要活性成分的变化情况,并分析灵芝菌接种夏秋黑毛茶前后感官品质、氨基酸组分含量、茶多酚、色差值、pH 以及 5 种滋味属性值的差异,构建灵芝菌后发酵处理夏秋黑毛茶品质评价模型,为后续利用灵芝菌提升夏秋茶品质及标准化生产提供理论依据。经分析发现与发酵前黑毛茶相比,接种灵芝菌黑毛茶综合感官品质提升,大部分氨基酸含量增加,茶多酚、色差值及 pH 降低,这些成分含量的变化与 5 种滋味属性值结果较一致,选择 Plackett-Burman 设计,以茶多酚含量、感官评分及氨基酸含量为自变量,以综合评分为响应值进行考察,并采用 Box-Behnken 设计得到了茶多酚含量、感官评分及氨基酸含量对综合评分影响的二次回归方程,进一步对模型进行交互作用分析和验证分析,模型显示响应面交互作用情况与实际综合评分相符,且响应面预测值接近观测值,结果准确可靠,为利用灵芝菌提高夏秋茶品质及准确预测茶叶综合品质提供了新的参考方法。

参考文献

- [1] 张六六,王亚,吴燕.冠突散囊菌发酵夏秋茶工艺优化研究[J].安徽农业科学,2020,48(9):174-176.
ZHAN LL, WANG Y, WU Y. Study on optimization of fermentation process of summer and autumn tea by *Monocystis coronatus* [J]. J Anhui Agric Sci, 2020, 48(9): 174-176.
- [2] 戴宇樵,潘科,李琴,等.黑茶品质形成与功效研究进展[J].江苏农业科学,2021,49(10):24-29.
DAI YQ, PAN K, LI Q, et al. Black tea quality formation and efficacy research progress [J]. J Jiangsu Agric Sci, 2021, 49(10): 24-29.
- [3] 吴志超.黑茶发酵优势菌株的胞外酶检测及蛋白组学初探[D].福州:福建师范大学,2018.
WU ZC. Extracellular enzyme detection and proteomics of dominant strains of dark tea fermentation [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2018.
- [4] 熊元元.四川黑茶渥堆微生物多样性及空气微生物研究[D].成都:四川农业大学,2017.
XIONG YY. Study on microbial diversity and airborne microorganisms of black tea heap in Sichuan [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2017.
- [5] 谭雪.利用夏秋鲜叶发酵金花菌茶的工艺技术研究[D].武汉:华中农业大学,2017.
TAN X. Study on the technology of fermenting Jinhua mushroom tea with fresh leaves in summer and autumn [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [6] XIAO Y, LI MY, GAO H. The effect of *Eurotium cristatum* (MF800948) fermentation on the quality of autumn green tea [J]. Food Chem, 2021, 358: 129848.
- [7] CAI M, XING H, TIAN B, et al. Characteristics and antifatigue activity of graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* separated by cascade membrane technology [J]. Carbohydr Polym, 2021, 269: 118329.
- [8] 裴海生,孙君社,王民敬,等.木质素对灵芝菌丝体生长的影响[J].农业工程学报,2017,33(6):6-10.
FEI HS, SUI JS, WANG MJ, et al. Effects of lignin on mycelium growth of *Ganoderma lucidum* [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2017, 33(6): 6-10.
- [9] 刘凌云,黄在兴,邢世和,等.灵芝生长过程中培养料中的碳转化及子实体的CO₂排放[J].园艺学报,2019,46(10):8-9.
LIU LY, HUANG ZX, XIN SH, et al. Carbon conversion and CO₂ emission from fruitum of *Ganoderma lucidum* during growth [J]. Acta Horti Sinica, 2019, 46(10): 8-9.
- [10] 陈志杰,顾振新,解春艳.灵芝发酵过程中营养物质及相关酶活性变化研究[J].中国酿造,2008,(1):26-29.
CHEN ZJ, GU ZX, XIE CY. Study on the changes of nutrients and related enzyme activities during *Ganoderma lucidum* fermentation [J]. China Brew, 2008, (1): 26-29.
- [11] 黄友谊.茶叶微生物产品学[M].北京:中国轻工业出版社,2017.
HUANG YY. Microbiology of tea [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2017.
- [12] 刘良琴.灵芝多糖的提取纯化、结构表征及灵芝茶的质量控制研究[D].贵阳:贵州师范大学,2017.
LIU LQ. Study on extraction, purification, structure characterization and quality control of *Ganoderma lucidum* tea [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2017.
- [13] 杜洋.蛹虫草灵芝复合茶饮料的研制[D].沈阳:沈阳农业大学,2016.
DU Y. Development of Cordyceps militaris *Ganoderma* composite tea beverage [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.
- [14] 林戎斌,陈济琛,郑永标,等.三种药用菌发酵茶的最适茶培养基[J].食用菌学报,2004,(3):38-42.
LIN RB, CHEN JC, ZHENG YB, et al. Three in the optimal tea fermentation culture medium [J]. J Edible Fungi, 2004, (3): 38-42.
- [15] FILGUEIRAS AV, GAGO J, GARCÍA I, et al. Plackett-Burman design for microplastics quantification in marine sediments [J]. Mar Pollut Bull, 2020, 162: 111841.
- [16] ALI H, AKANIHU CN, NAHUM HE, et al. Fitting Plackett-Burman design on child disease experiment [J]. Sci World J, 2021, 16(2): 123-128.
- [17] GUERRINI L, TIRINNANZI A, GUASCONI F, et al. A Plackett-Burman design to optimize wood chipper settings [J]. Croat Fore Eng, 2019, 40(1): 81-87.
- [18] KOHL KD, STENGEL A, DEARING MD. Inoculation of tannin-degrading bacteria into novel hosts increases performance on tannin-rich diets [J]. Environ Microbiol, 2016, 18(6): 1720-1729.
- [19] 郑梦霞,李会娟,陈淑娜,等.冠突散囊菌发酵对茶汤香气成分的影响[J].食品科学,2019,40(18):223-228.
ZHENG MX, LI HJ, CHEN SN, et al. Effects of *R. coronoides* fermentation on aroma components of tea soup [J]. Food Sci, 2019, 40(18): 223-228.
- [20] 王亚丽,秦俊哲,黄亚亚,等.冠突散囊菌对茯砖茶品质形成的影响[J].食品与发酵工业,2018,44(4):194-197.

- WANG YL, QIN JZ, HUANG YY, *et al.* Effects of *L. coronoidi* on the quality of Fuzhuan tea [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(4): 194–197.
- [21] XU N, CHU J, WANG M, *et al.* Large yellow tea attenuates macrophage-related chronic inflammation and metabolic syndrome in high-fat diet treated mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(15): 3823–3832.
- [22] 罗龙新. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J]. *茶叶科学*, 1998, 18(1): 53–60.
- LUO LX. Changes of biochemical components and their relationship with quality formation of Yunnan Puer tea during stacking process [J]. *Tea Sci*, 1998, 18(1): 53–60.
- [23] 王伟伟, 张建勇, 王洪波, 等. 开花对寿眉品质及主要活性成分的影响研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(24): 7892–7898.
- WANG WW, ZHANG JY, WANG HB, *et al.* Study on the effects of the flower on the quality and main active ingredients of the **Shoumei** [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(24): 7892–7898.
- [24] 刘仲华, 王增盛, 黄建安, 等. 黑茶初制中主要色素物质的变化与色泽品质的形成[J]. *茶叶科学*, 1991, (S1): 34–41.
- LIU ZH, WANG ZS, HUANG JAN, *et al.* Changes of main pigment substances and formation of color quality in black tea [J]. *Tea Sci*, 1991, (S1): 34–41.
- [25] 肃力争. 黑茶加工过程中色泽的形成机理[J]. *中国茶叶*, 1994, (1): 2–3.
- XIAO LZ. Mechanism of color formation of dark tea during processing [J]. *China Tea*, 1994, (1): 2–3.
- [26] LIU T, CHEN Y, LI D, *et al.* Electronic tongue recognition with feature specificity enhancement [J]. *Sensors*, 2020, 20: 772.
- [27] 陈冬, 马涛, 伞惟林, 等. 优质祁门红茶滋味特征分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 168–174.
- CHEN D, MA T, SHAN WL, *et al.* Analysis on taste characteristics of high-quality Qimen black tea [J]. *Food Sci*, 2017, 38(18): 168–174.
- [28] YU Z, YANG Z. Understanding different regulatory mechanisms of proteinaceous and non-proteinaceous amino acid formation in tea (*Camellia sinensis*) provides new insights into the safe and effective alteration of tea flavor and function [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(5): 844–858.
- [29] 刘忠英, 冉乾松, 潘科, 等. 基于电子舌的 3 种氨基酸单体呈味特性研究[J]. *食品科技*, 2022, 47(4): 296–302.
- LIU ZY, RAN QS, PAN K, *et al.* Study on flavor characteristics of three amino acid monomers based on electronic tongue [J]. *Food Sci Technol*, 2022, 47(4): 296–302.
- [30] 冉乾松, 刘忠英, 方仕茂, 等. 贵州 5 个代表性绿茶滋味特征与其呈味化合物相关性分析[J]. *浙江农业学报*, 2022, 34(11): 2451–2461.
- RAN QS, LIU ZY, FANG SM, *et al.* Correlation analysis of taste characteristics of five representative green teas in Guizhou and their flavor compounds [J]. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2022, 34(11): 2451–2461.
- [31] 冉乾松, 刘忠英, 尹杰, 等. 贵州绿茶滋味分属性二次多项回归模型构建[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(4): 1131–1142.
- RAN QS, LIU ZY, YIN J, *et al.* Construction of quadratic multinomial regression model for the flavor attribute of green tea in Guizhou [J]. *Acta Agric South China*, 2022, 53(4): 1131–1142.
- [32] THIRUCHELVI R, VENKATARAGHAVAN R, SHARMILA D. Optimization of environmental parameters by Plackett-Burman design and response surface methodology for the adsorption of Malachite green onto *Gracilaria edulis* [J]. *Mater Today Proc*, 2021, 37(2): 1859–1864.
- [33] 陈济琛, 郑永标, 林新坚, 等. 乌龙型灵芝发酵茶的 Ames 试验及其品质特征分析[J]. *福建农业大学学报*, 2004, (3): 333–335.
- CHEN JC, ZHENG YB, LIN XJ, *et al.* Ames test and quality characteristics analysis of Ulong *Ganoderma lucidum* fermented tea [J]. *J Fujian Agric Univ*, 2004, (3): 333–335.
- [34] YAMASHITA H, SONOBE R, HIRONO Y, *et al.* Potential of spectroscopic analyses for non-destructive estimation of tea quality-related metabolites in fresh new leaves [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23–25.
- [35] 王胜鹏, 龚自明, 郑鹏程, 等. 青砖茶茶汤滋味成分分析及品质评价模型建立[J]. *食品科学*, 2019, 40(10): 6–8.
- WANG SP, GONG ZM, ZHEN PC, *et al.* Analysis of flavor components and establishment of quality evaluation model for tea soup of green brick tea [J]. *Food Sci*, 2019, 40(10): 6–8.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



刘亚兵, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为茶叶加工。
E-mail: lybgz628@163.com

潘科, 博士, 研究员, 主要研究方向为茶叶精深加工。
E-mail: 14850502@qq.com