

肖婧仪, 祁明慧, 曲安澜, 等. 茶源高产单宁酶菌株的筛选与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2025, 44(6): 117-126.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.012

## 茶源高产单宁酶菌株的筛选与鉴定

肖婧仪, 祁明慧, 曲安澜, 孙榕徽, 秦王念, 申天赐, 黄友谊

华中农业大学园艺林学学院/果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为实现夏秋茶资源的高值化利用、优化黑茶发酵工艺, 以普洱茶渥堆叶、茶园土壤及青砖茶菌库为菌源, 采用单宁酸筛选培养基分离初筛产单宁酶菌株, 通过测定菌株发酵茶的单宁酶活性进行复筛, 对固态发酵茶的感官、品质成分及抗氧化活性等进行分析, 利用形态学观察及26S rDNA序列分析对目标菌株进行鉴定。结果显示, 初筛共获得45株产单宁酶菌株, 挑选酶活较高的9株菌发酵茶叶进行复筛; 其中, 菌株MJ19在茶叶发酵中的单宁酶活性最高, 达21.12 U/g; 与对照相比, 接种MJ19发酵的茶叶感官品质显著提升, 呈现甜香、花香与酯香等愉悦香气特征; 其抗氧化能力明显增强, DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 自由基清除率、ABTS [2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)] 自由基清除率及铁离子还原能力 (ferric reducing antioxidant power, FRAP) 分别提高了117.44%、120.04%和116.60%; 同时, 茶叶中没食子酸含量较对照提升了430%。综上, 本研究筛选获得的菌株MJ19能够有效提高黑茶发酵过程中的单宁酶活性, 最后被鉴定为 *Debaryomyces prosopidis* group, 属于酵母, 能显著改善茶叶的感官品质与抗氧化活性, 可为实现夏秋茶资源的高值化开发利用提供优良菌种资源。

**关键词** 单宁酶; 黑茶; 真菌; 没食子酸; 抗氧化活性; 儿茶素

**中图分类号** TS272 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0117-10

黑茶特征风味的形成依赖于渥堆工序, 渥堆过程中微生物的繁殖和分泌的胞外酶驱动茶叶内含物质的转化<sup>[1]</sup>。微生物是渥堆的核心驱动力, 真菌作为渥堆中的主要菌群, 作用于茶叶的重要媒介就是酶, 主要包括多酚氧化酶、过氧化物酶、单宁酶、蛋白酶等酶类, 其中单宁酶(单宁酯水解酶)对改善茶叶品质至关重要。作为一种诱导酶, 单宁酶能特异性水解多酚类物质的酯键和缩酚酸键, 有效降低酯型儿茶素的含量, 从而减轻茶叶的涩味; 同时, 其酶解反应还能形成茶叶香气的前体物质<sup>[2-4]</sup>, 对黑茶特征风味的形成具有重要贡献。没食子酸(gallic acid, GA)作为单宁酶水解反应的关键产物, 不仅可以增加茶汤鲜味和回甘<sup>[5]</sup>, 更是黑茶中重要的抗氧化剂和重要酚酸<sup>[6]</sup>。因此, 单宁酶是黑茶发酵中不可或缺的重要酶类。

在黑茶传统自然渥堆过程中, 真菌虽然作为产单宁酶的主力, 但由于菌株未经驯化和选育, 其产酶效率普遍不高, 难以满足高效发酵的需求。此外, 黑

茶原料多采用粗老叶或夏秋叶, 其茶多酚含量高、品质基础相对薄弱, 自然渥堆条件下的单宁酶活性往往不足以有效降解引起苦涩味的酯型儿茶素<sup>[7]</sup>, 导致茶汤口感粗糙、苦涩, 茶叶的香气和滋味都比较寡淡。因此, 通过现代微生物技术手段筛选高产单宁酶菌株对于提升黑茶发酵效率、改善黑茶风味品质具有重要的现实意义。本研究以普洱茶渥堆叶、茶园土壤、实验室保藏的青砖茶菌库为菌种来源, 开展高产单宁酶菌株的筛选和鉴定工作, 并深入研究该产酶菌株在发酵过程中对茶叶品质的影响, 以期优化黑茶发酵工艺以及推动粗老茶叶原料和夏秋茶资源的高值化利用提供理论依据与技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

从华中农业大学茶园土壤(距茶树茎约20 cm、深约10 cm处的健康土壤)样品、云南省临沧市开普茶业公司的普洱茶渥堆发酵样品、华中农业大学茶

收稿日期: 2025-08-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1600804)

肖婧仪, E-mail: 418403309@qq.com

通信作者: 黄友谊, E-mail: youyi@mail.hzau.edu.cn

叶加工与生物技术课题组保存的青砖茶菌库,分离筛选产单宁酶菌株。茶叶原料是1芽5~6叶的晒青毛茶,购自湖北洞庄茶业有限公司。菌株活化培养基:1 L水、马铃薯浸粉6 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g,121℃灭菌25 min。液体种子培养基:1 L水、葡萄糖20 g、蛋白胨20 g、酵母粉10 g,121℃灭菌25 min。产单宁酶菌株筛选培养基:1 L水、单宁酸2 g、酵母粉5 g、葡萄糖5 g、琼脂20 g,121℃灭菌25 min。

### 1.2 高产单宁酶菌株初筛方法

取5 g新鲜的土样/普洱茶渥堆样加入到装有45颗玻璃珠的95 mL无菌水中,在28℃、150 r/min的条件下摇30 min,随后制备成 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 的菌悬液,取200  $\mu$ L均匀涂布到筛选培养基,于28℃条件下培养,观察水解圈与菌落直径比值( $D/d$ ),比值大于1的菌株保留;重复培养,延长周期,筛选 $D/d$ 值在全过程或9 d时大于1.5的菌株保留。青砖茶菌库的菌株则先接种到活化培养基进行活化,后转接到筛选培养基培养,筛选条件及标准同土样/普洱茶渥堆样。

### 1.3 高产单宁酶菌株复筛方法

先将初筛的菌株进行活化,其中霉菌需待孢子长出后转接到茶叶中,酵母则先在种子培养基富集培养到生长对数期前转接到茶叶中。接种前需将茶叶灭菌,复水达茶叶含水量为40% ( $V/m$ ),按照接种量 $1 \times 10^6$  CFU/g进行接种,随后28℃恒温培养1周<sup>[8]</sup>。对对照(CK)为灭菌后接入等量无菌水进行发酵的茶叶。将初筛获得的高产单宁酶菌株对茶叶进行接种发酵复筛,复筛主要通过测定单宁酶活性,并对发酵茶进行感官审评以及品质成分、抗氧化能力、儿茶素、咖啡碱、没食子酸含量等测定,综合选出最优菌株。

### 1.4 单宁酶活性测定方法

取5.0 g菌株发酵茶茶样置于100 mL锥形瓶中,加50.0 mL超纯水,置于25℃摇床,160 r/min浸提2 h,浸提液用纱布过滤较大颗粒物,然后在4℃、8 000 r/min条件下离心10 min,所得上清液即为粗酶液。酶活测定以没食子酸丙酯溶液为反应底物,用罗丹宁甲醇和KOH进行显色<sup>[9]</sup>。根据没食子酸标准曲线 $y = 0.0044 \times C + 0.0059$ ,其中 $C$ 为没食子酸浓度, $\mu$ mol/L,求出该反应进程中生成没食子酸的量,从而计算出相应单宁酶活性。单宁酶活性定义:40℃条件下,每克茶叶提取的粗酶液每分钟分解生成1  $\mu$ mol没食子酸所需单宁酶酶量定义为1个酶活单位,  $U$ 。

$$U = \frac{C \times V_1 \times N}{t \times V_2 \times m \times \omega \times 1000}$$

式中, $U$ 为酶活性, $U/g$ ;  $C$ 为没食子酸浓度, $\mu$ mol/L;  $V_1$ 为反应液总体积,mL;  $N$ 为稀释倍数;  $t$ 为反应时间,min;  $V_2$ 为粗酶液测定体积,mL;  $m$ 为茶叶样品质量,g;  $\omega$ 为样品干物率,%。

### 1.5 发酵茶品质成分分析

水分含量测定参照GB/T 8304—2013《茶水分测定》进行;水浸出物(water extract, WE)含量测定参照GB/T 8305—2013《茶 水浸出物测定》进行;茶多酚(tea polyphenols, TP)含量测定参照GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》中的福林酚试剂法进行;游离氨基酸(free amino acids, FAA)含量测定参照GB/T 8314—2013《茶 游离氨基酸总量的测定》;可溶性糖(soluble sugars, SS)含量采用蒽酮-硫酸比色法<sup>[10]</sup>;茶色素参照Roberts等<sup>[11]</sup>、黄意欢<sup>[12]</sup>的系统分析法。茶样审评方法参照GB/T 23776—2018《茶叶感官审评方法》中黑茶散茶的审评步骤。

### 1.6 儿茶素组分、没食子酸、咖啡碱测定方法

儿茶素组分、没食子酸、咖啡碱的提取和检测参考Zhang等<sup>[13]</sup>试验方法,系统洗脱梯度如表1所示。

表1 HPLC系统洗脱梯度(儿茶素)

Table 1 Gradient elution process of HPLC (catechin)

时间/min Time	0	5	15	20	25	30
流动相A/% Eluent A	85	70	40	20	75	75
流动相B/% Eluent B	15	30	60	80	15	15

### 1.7 抗氧化能力测定方法

称取1.5 g茶粉,加20 mL蒸馏水,置于90℃水浴锅中浸提30 min,每10 min振荡1次。提取后冷却至室温,以4 000 r/min离心15 min,取上清液定容至25 mL容量瓶中,根据预实验确定茶汤稀释倍数,用于抗氧化能力的测定。羟基自由基清除能力(hydroxy free radical scavenging activity, HSA)、铁离子还原能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)、DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)自由基清除能力和ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]自由基清除能力测定参照王文凤<sup>[8]</sup>方法。

### 1.8 高产单宁酶菌株鉴定

对26S rDNA(D1/D2区)进行序列鉴定分析,引物序列为NL-1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'和NL-4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'。PCR扩增程序:94℃变性1 min,52℃退火1 min,72℃延伸1 min 30 s;30个循

环,终止。由北京麦克罗泰科技有限公司完成鉴定。使用 NCBI 中 Blast 比较序列相似性,使用 MEGA10.2进行多重序列比较建立系统进化树。

1.9 数据分析

所有试验均重复3次,数据均经 Excel 和 SPSS 20 处理,通过 Excel 软件进行绘图,热图使用联川生物云平台(omicstudio.cn)绘制。

2 结果与分析

2.1 高产单宁酶菌株初筛

筛选平板培养基中添加有单宁酸,如果菌株产

单宁酶就会水解培养基中的单宁酸,菌落周围会形成明显的透明水解圈,在培养第4天时筛选  $D/d$  值大于1的菌株保留,最终共筛选出产酶菌株45株,其中包括6个酵母菌株和39个霉菌菌株。后续通过重复培养并延长时间到9 d,测量  $D/d$  值,筛选全过程或9 d时  $D/d$  值大于1.5的保留菌株(表2),此次共筛选出9株菌,包括4个酵母菌株和5个霉菌菌株,霉菌分别命名为MB74、YFT15、YFT18、TB2和L-②72 h,酵母命名为ET1、ET2、MJ19和YFZT1(图1)。

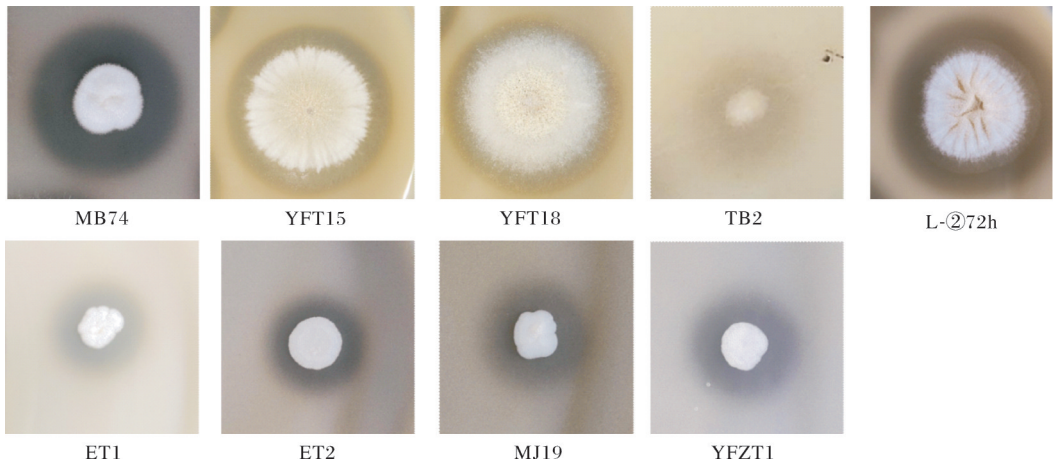


图1 高产单宁酶菌株产酶情况

Fig. 1 Tannase activity of high-tannase-producing strains

表2 菌株水解圈直径比值

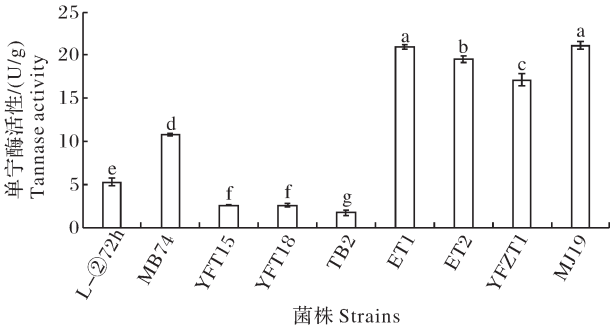
Table 2 Ratio of hydrolysis circle diameter of strain	
菌株 Strains	$D/d$
MB74	2.18
YFT15	1.53
YFT18	1.58
TB2	2.50
L-②72h	1.88
ET1	2.10
ET2	1.93
YFZT1	2.53
MJ19	2.81

2.2 高产单宁酶菌株的复筛

1)高产单宁酶菌株发酵茶的酶活性。将筛选培养基初筛获得高产单宁酶的霉菌菌株 MB74、YFT15、YFT18、TB2 和 L-②72 h,以及酵母菌株 MJ19、YFZT1、ET1 和 ET2 接种到晒青毛茶中进行发酵,发酵7 d后检测单宁酶活性,结果(图2)显示,酵母发酵茶的单宁酶活性均高于霉菌发酵茶,其中 ET1 和 MJ19 的单宁酶活性分别为 20.93 及 21.12 U/g,两

者间无显著差异( $P>0.05$ ),又同时分别显著高于其他菌株发酵茶的单宁酶活性( $P<0.05$ )。由于4个酵母菌株在茶叶发酵过程中产单宁酶的能力优于霉菌,且霉菌发酵茶有较多的孢子和较重的霉味,因此,选用4个酵母菌株进行后续筛选试验。

2)不同酵母菌株发酵茶的感官品质。4个酵母



不同小写字母表示在0.05水平存在显著差异。Different lower-case letters indicate significant differences at 0.05 level.

图2 不同菌株发酵茶的单宁酶活性

Fig. 2 Tannase activity of fermented tea from different strains



菌株发酵茶外形、汤色和叶底如图 3 所示,发酵后茶叶表面的白色圆点即是酵母。以不接菌晒青毛茶样为对照(CK),对 4 个酵母菌株发酵茶进行感官审评(表 3)。CK 茶汤橙红明亮,香气中除了甜香外还带有烟气、青腻气,滋味青涩有腻味。由于酵母菌株发酵茶在茶叶表面长了较多的酵母菌落且易溶于水,因此茶汤浑浊,但整体汤色呈现出橙红较明亮的特

征。MJ19 酵母发酵茶的感官综合得分最高,香气有明显的酯香,并带有酒香和花香,滋味甜醇有酯香,且带有米酒味,综合得分 80.25。ET2 菌株发酵茶的综合得分次之,其干茶表面酵母菌落多且均匀,汤色橙红较亮,内质香气酯香浓郁且带有甜香,茶汤滋味有酯香且甜醇,综合得分 80.10。ET1 和 YFZT1 的综合评分接近,次于 ET2 发酵茶。

表 3 不同高产单宁酶酵母菌发酵茶感官品质

Table 3 Sensory quality of tea fermented by different high yeild tannase yeast strains

茶样 Tea samples	外形 Appearance		汤色 Soup color		香气 Aroma		滋味 Taste		叶底 Infused leaf		总分 Total score
	评语 Comments	评分 Score	评语 Comments	评分 Score	评语 Comments	评分 Score	评语 Comments	评分 Score	评语 Comments	评分 Score	
CK	条索疏松、色泽黄褐	65	橙红亮	84	烟气、甜、青腻味、清凉感	80	青涩、青味、腻味、辛辣味	70	青褐	70	73.65
ET1	条索疏松、色泽黄褐、酵母菌点稍显	68	橙红较亮、浑浊	75	有甜香、花香、酯香	84	甘醇、平和	85	青褐较软	70	78.13
ET2	条索疏松、色泽黄褐、酵母菌点多	70	橙红较亮、浑浊	74	酯香浓、甜香显	87	酯香、甜醇	88	青褐较软	70	80.10
YFZT1	条索疏松、色泽黄褐、酵母菌点多	70	橙红亮、浑浊	80	酯香较浓,带酒香,有花香,略带番茄酱味	84	有酯香、甜醇	84	青褐较软	70	79.26
MJ19	条索疏松、色泽黄褐、酵母菌点多	70	橙红较亮、浑浊	80	有酒香,酯香显,花香	87	甜醇、有酯香,有酒味	85	青褐较软	70	80.25



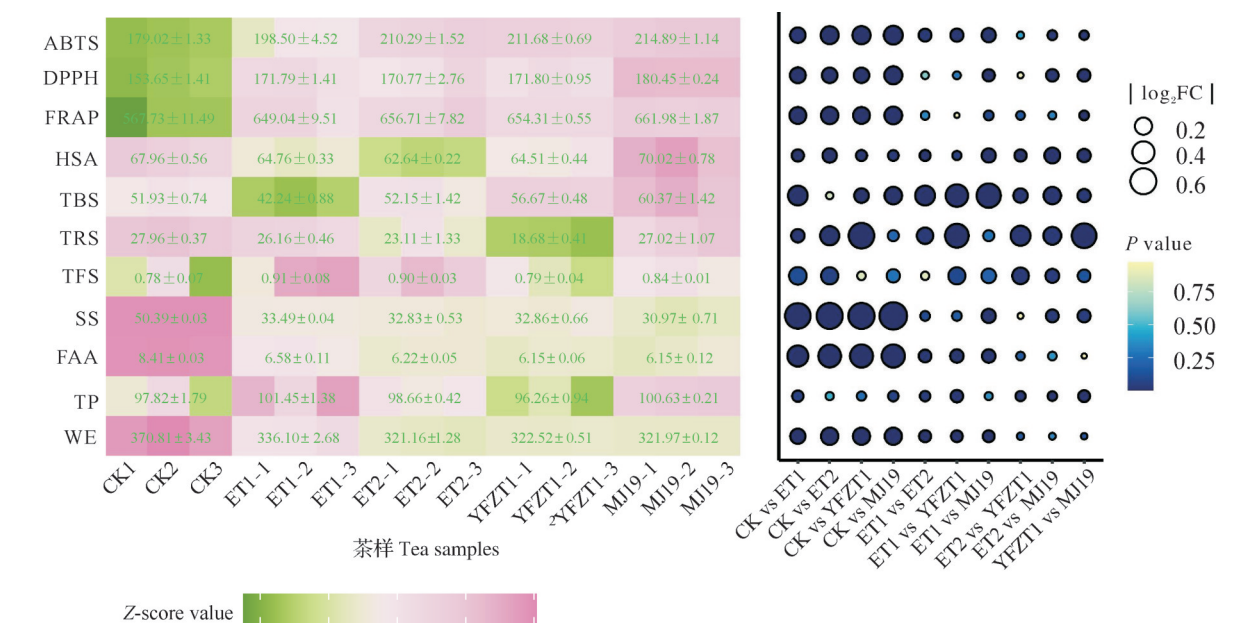
A:不同高产单宁酶酵母发酵茶外观;B:不同高产单宁酶酵母发酵茶汤色及叶底。A: The appearance of tea fermented by different high-yield tannase yeast; B: The tea soup color and infused leaf of tea fermented by different high-yield tannase yeast.

图 3 4 个高产单宁酶酵母菌株发酵茶的外观、汤色与叶底

Fig.3 Appearance, soup color, and the infused leaf of tea fermented by four yeasts with high tannase productivity

3)不同酵母菌株发酵茶的常规品质成分。从图 4 可见,ET1、ET2、YFZT1 和 MJ19 酵母菌株发酵茶之间的水浸出物(WE)、茶多酚(TP)、可溶性糖(SS)、游离氨基酸(FAA)含量差异较小,除茶多酚含量高于 CK 外,WE、FAA 和 SS 含量都显著低于 CK ( $P<0.05$ )。经过酵母发酵后茶叶的茶黄素(theaflavins, TFS)含量均不同程度地上升,其中 ET1 发酵茶 的 TFS 含量最高,为 0.91 mg/g,ET2 和 MJ19 发酵茶 次之,但三者间无显著差异( $P>0.05$ ),YFZT1 发酵 茶的 TFS 含量最低,为 0.79 mg/g,显著低于 ET1 和 ET2( $P<0.05$ ),但仍略高于 CK。4 个酵母菌株对发 酵茶的 TFS 保留可能具有积极作用。茶红素(thea- rubigins, TRS)含量在发酵后相比 CK 均有一定的下 降,其中 MJ19 的 TRS 含量保留较多,为 27.02 mg/g,

与 CK 无显著差异 ( $P>0.05$ ),而 ET1、ET2 和 YFZT1 发酵茶的 TRS 含量都显著低于 CK ( $P< 0.05$ ),其中 YFZT1 发酵茶的 TRS 含量仅有 18.68 mg/g。茶褐素(theabrownins, TBs)含量以 MJ19 最 高,为 60.37 mg/g, YFZT1 次之,含量为 56.67 mg/g, CK 和 ET2 均显著低于 YFZT1 ( $P<0.05$ ),而 ET1 的 茶褐素含量最低,仅为 42.24 mg/g,显著低于所有茶 样( $P<0.05$ )。总体而言,ET1、ET2、YFZT1 三者的 TFS 和 TRS 含量大小均为 ET1>ET2>YFZT1,而 TBS 含量则相反。MJ19 发酵茶的茶色素含量与 CK 相比均呈保留或上升的趋势,表明该菌株可能还有 氧化多酚的能力,且同时还能保留较高含量的 TFS 和 TRS。



热图上的数值为原始数值,热图颜色是根据原始数值 Z-score 缩放后的结果呈现。下图同。The value on the heat map is the original value, and the color of the heat map is presented according to the result of scaling the original value Z-score. The same as below.

图 4 不同酵母发酵茶化学成分及抗氧化能力的热图及显著性差异气泡图

Fig. 4 Heatmap and significant difference bubble plot of chemical composition and antioxidant capacity in yeast-fermented teas

4)不同酵母菌株发酵茶的儿茶素组分、咖啡碱、没食子酸。经过酵母发酵后,儿茶素、咖啡碱、没食子酸组分结果如图 5 所示。茶样经酵母发酵后,ET1 的总儿茶素含量上升,其余茶样下降,其中又以 MJ19 含量最低。酵母发酵后茶样的酯型儿茶素含量显著下降,非酯型儿茶素有所保留或显著上升 ( $P<0.05$ )。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是酯型儿茶素的重要组成部分,其含量在发酵后均显著下降 ( $P<0.05$ ),其中

ET1 发酵茶的 EGCG 含量在 4 种发酵茶中最高,为 32.01 mg/g,而 YFZT1 发酵茶的含量最低,仅为 25.98 mg/g,各发酵茶之间 EGCG 含量具有显著差异 ( $P<0.05$ )。非酯型儿茶素中的没食子儿茶素(gallocatechin, GC)和儿茶素(catechin, C)的含量经酵母发酵后仍有部分保留或显著降低;而表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)和表儿茶素(epicatechin, EC)在酵母发酵后显著上升,其中 EGC 以 YFZT1 含量最高,为 24.98 mg/g。EC 含量经酵母发酵后显著上

升,CK茶样含量最低仅有3.58 mg/g,YFZT1含量(7.82 mg/g)最高,显著高于其余茶样( $P<0.05$ )。

GA作为单宁酶的主要水解产物,其含量在发酵后均显著上升,其中MJ19发酵样没食子酸含量为7.01 mg/g,显著高于其余茶样( $P<0.05$ )。YFZT1发酵茶的没食子酸含量最低,为3.84

mg/g,但显著高于CK茶样,CK样仅有1.63 mg/g( $P<0.05$ )。咖啡碱在发酵后有所保留或下降,其中ET1含量最高,为16.53 mg/g,与CK无显著差异但显著高于其余酵母发酵茶( $P<0.05$ ),而MJ19茶的咖啡碱含量最低,为14.69 mg/g,显著低于其余茶样( $P<0.05$ )。

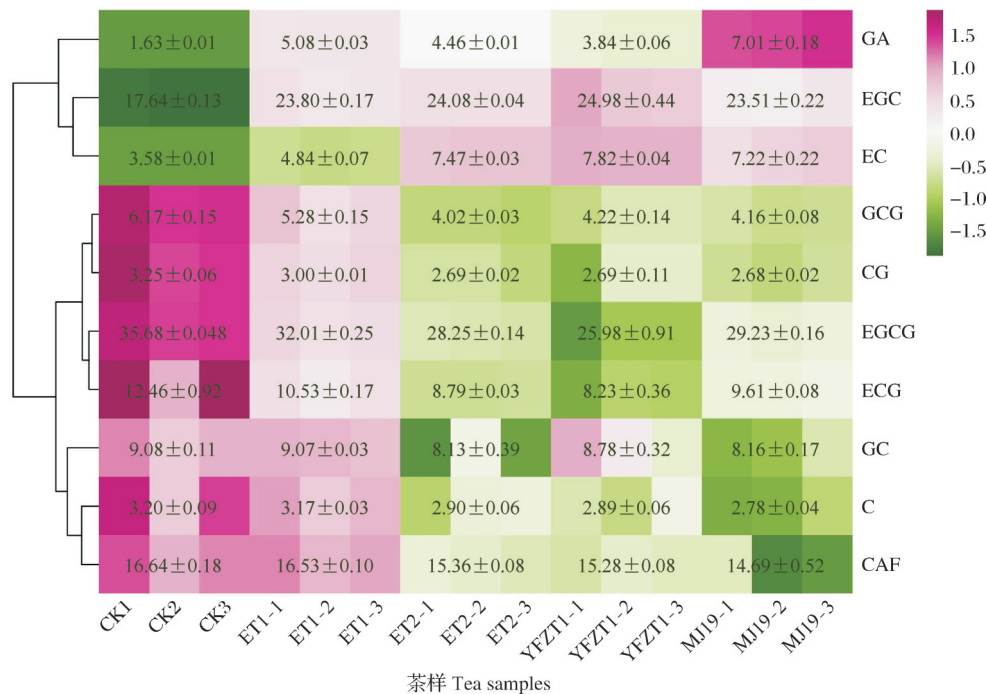


图5 酵母发酵茶儿茶素、咖啡碱、没食子酸含量热图

Fig. 5 Heat map of catechin, caffeine, gallic acid content of yeast fermented tea

5)不同酵母菌株发酵茶的抗氧化能力。茶叶中丰富的内含物质使得茶叶具有较好的抗氧化能力,被认为是天然的抗氧化剂,其抗氧化能力通常可能受到各种因素的影响,一般以HSA、FRAP、DPPH和ABTS自由基清除能力表示茶叶抗氧化活性的高低<sup>[14-16]</sup>。通过酵母发酵,茶叶的抗氧化能力如图4所示,发酵后茶叶的4种抗氧化能力指标都有不同程度的上升。HSA抗氧化测试中,仅MJ19发酵茶显著高于CK,其余3个酵母菌株发酵茶抗氧化能力均显著下降( $P<0.05$ )。同时,MJ19酵母发酵茶的抗氧化能力为所有酵母发酵茶叶中最强者,其4种抗氧化活性在所有发酵茶样中最高,且显著高于CK茶样;其HSA和DPPH抗氧化活性显著高于其余3个酵母菌株发酵茶,ABTS抗氧化活性显著高于ET1和ET2发酵茶( $P<0.05$ )。MJ19发酵茶的4种抗氧化能力指标HSA、FRAP、DPPH、ABTS分别为70.02、661.98、180.45和214.89 mg/g,对比CK分别提升了103.03%、117.44%、120.04%和116.60%。

综上,MJ19发酵茶具有最高的单宁酶活性和更优的感官品质;同时,具有最高的没食子酸含量和最低的咖啡碱含量,且相比于其他酵母菌株发酵茶具有更强的抗氧化能力,所以筛选出最优产单宁酶菌株为MJ19酵母菌株,并进行鉴定。

### 2.3 高产单宁酶酵母菌株MJ19的鉴定

将MJ19酵母菌株划线于PDA培养基,并于28℃培养,观察菌落形态。如图6所示,MJ19酵母生长速度块,一般24 h内能在平板上生长出白色菌落,菌落呈光滑圆形并突起,色泽为白色不透明,正反面颜色相同,湿润黏稠易挑起,且带有明显的酒香。显微观察显示,酵母单细胞形状呈光滑圆形或卵圆形,中心有圆形突起似荷包蛋形状,单细胞直径约在2~5 μm。对MJ19酵母的26S rDNA(D1/D2区)序列进行测序,采用MEGA10.2软件,邻位连接法构建系统发育树。结果显示,MJ19酵母与*Debaryomyces prosopidis* JCM 9913<sup>T</sup> (NG\_055701)和*Debaryomyces*



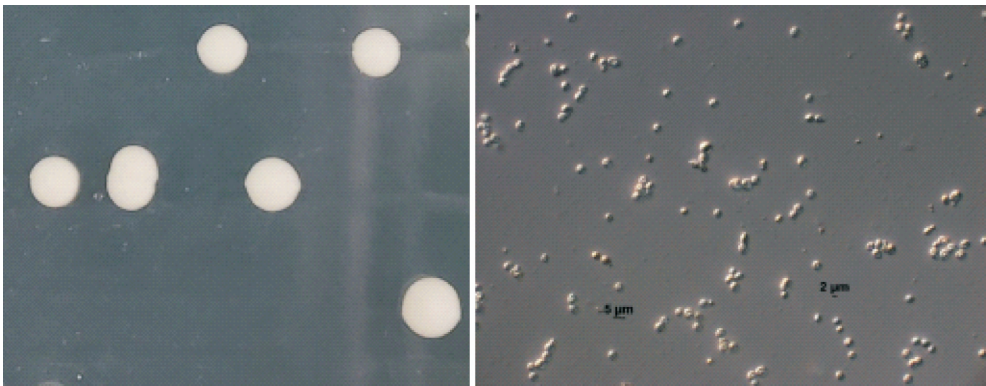
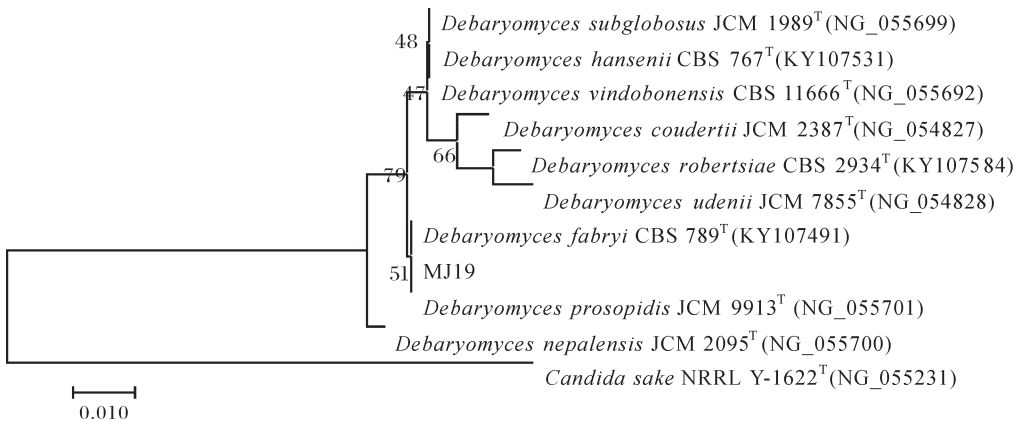


图 6 MJ19 酵母菌落形态及显微形态  
Fig.6 Colony morphology and microscopic state of MJ19



标“T”的表示模式菌株 Model strains marked with “T”.  
图 7 MJ19 基于 26S rDNA 序列的系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree of MJ19 based on 26S rDNA sequence

*fabryi* CBS 789<sup>T</sup>(KY107491)聚集在同一分支,其中 MJ19 与 *Debaryomyces prosopidis* JCM 9913<sup>T</sup> 的 26S rDNA(D1/D2 区)序列的同源相似度为 100%,因此, MJ19 被鉴定为 *Debaryomyces prosopidis* group。

3 讨 论

3.1 酵母菌株在单宁酶生产中优势显著

本研究通过初筛得到 9 个单宁酶活性较高的菌株,包括 4 个酵母菌株和 5 个霉菌菌株,又通过接种茶叶复筛,发现所筛酵母菌株的酶活性均显著高于霉菌菌株( $P<0.05$ ),其中又以酵母菌株 MJ19 的单宁酶活性最高,为 21.12 U/g。据报道,霉菌是黑茶渥堆发酵过程中的主要菌种<sup>[17]</sup>,在本研究的培养基初筛阶段也得到同样的结果;也有研究表明,在黑茶发酵过程中,酵母同样具有重要的作用且酵母有助于增加茶叶甜醇香等品质特征<sup>[18]</sup>。本研究所筛霉菌在接种发酵后酶活性低于酵母发酵茶,且都有

较重的霉味,原因推测为酵母和霉菌在同等接种量时,霉菌生长繁殖需要消耗更多的底物,而茶叶量固定,所以不足以让霉菌在大量生长繁殖的同时产生更多的单宁酶,且因为霉菌菌落体积更大,所以其本身的霉味就容易掩盖其产生的对茶叶积极的甜香、花果香<sup>[19]</sup>。而同样条件下酵母有更高的酶活性,同时还赋予了发酵茶甜香、花香和独特的酯香风味<sup>[20-21]</sup>。

3.2 高产单宁酶菌株可以驱动黑茶品质升级

经酵母发酵后,茶叶中水浸出物、游离氨基酸、可溶性糖含量均显著下降,茶多酚总量保持稳定,这些结果与前人的研究<sup>[8]</sup>相似。4 个酵母菌株发酵茶的茶色素组分呈现差异化改变,其中 MJ19 在维持高茶黄素、茶红素含量的同时显著增加了茶褐素的含量(较 CK 上升),表明其可能还兼具多酚氧化能力。同时, MJ19 因具有高产单宁酶能力,可能通过水解酯型茶黄素从而维持茶黄素的水平<sup>[2]</sup>。儿茶素是茶

叶中一类重要的呈味物质,其中以酯型儿茶素类含量最为丰富,是茶叶保健功能的主要成分,也是茶叶涩味的主要呈味物质,而非酯型儿茶素的滋味则较清爽<sup>[22-24]</sup>。没食子酸(GA)是茶叶中的主要酚酸物质<sup>[25]</sup>,也是单宁酶的主要水解产物<sup>[26-27]</sup>。儿茶素组分分析显示,酵母菌株发酵茶的酯型儿茶素显著降低、非酯型儿茶素上升。值得注意的是,MJ19虽展现出最强单宁酶活性,但其发酵茶的酯型儿茶素降解量不高,推测可能兼具酰基转移酶活性,可水解其他没食子酰基糖苷<sup>[14]</sup>,而非专一靶向水解酯型儿茶素。同时,酵母发酵还显著提升了茶叶抗氧化能力,其中MJ19发酵茶的HSA与DPPH自由基清除能力最优,其机制可能源于发酵茶活性成分的协同作用:(1)保留了EC、ECG、EGC及高活性EGCG<sup>[28]</sup>;(2)经高活性单宁酶水解生成强抗氧化剂没食子酸(GA)<sup>[29-30]</sup>;(3)高活性物质的组合强化了整体抗氧化效果<sup>[31]</sup>。

本研究成功筛选并鉴定出高产单宁酶酵母(*Debaryomyces prosopidis* group)菌株MJ19,该菌株在茶叶发酵中能显著提升茶叶感官品质(赋予甜香、花香特征风味),其高单宁酶活性促进了没食子酸的积累(较CK上升了430%),从而增强了发酵茶的抗氧化能力,可为粗老茶原料和夏秋茶的高值化利用提供核心菌种支撑。后续将聚焦单宁酶合成通路、菌株-底物互作机制及定向发酵工艺的深度解析。

## 参考文献 References

- [1] ZHANG L, ZHANG Z Z, ZHOU Y B, et al. Chinese dark teas: postfermentation, chemistry and biological activities [J]. Food research international, 2013, 53(2): 600-607.
- [2] 蔡少华, 刘仲华, 黄建安, 等. 酯型茶黄素酶促降解条件的优化[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 116-118. CAI S H, LIU Z H, HUANG J A, et al. Optimization on hydrolysis condition of estertheaflavins by hydrolytic enzymes[J]. Food & machinery, 2011, 27(3): 116-118 (in Chinese with English abstract).
- [3] LI H Z, LI M, YANG X R, et al. Microbial diversity and component variation in Xiaguan Tuo Tea during pile fermentation [J/OL]. PLoS one, 2018, 13 (2) : e0190318 [2025-08-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190318>.
- [4] 方欣, 骆爱国, 涂青, 等. 普洱茶(熟茶)发酵过程各层间真菌群落的动态变化[J]. 食品科技, 2019, 44(5): 37-42. FANG X, LUO A G, TU Q, et al. Fungal community dynamic change in different layers of solid-state fermentation of Pu-erh ripe tea [J]. Food science and technology, 2019, 44(5): 37-42 (in Chinese with English abstract).
- [5] ZHANG L, CAO Q Q, GRANATO D, et al. Association between chemistry and taste of tea: a review [J]. Trends in food science & technology, 2020, 101: 139-149.
- [6] 谢志勇, 陈贵杰, 曾子琦, 等. 安化黑茶调节肠道菌群功效及作用机理[J]. 中国茶叶, 2023, 45(11): 1-9. XIE Z Y, CHEN G J, ZENG Z Q, et al. Effect and mechanism of Anhua dark tea on regulating gut microbiota [J]. China tea, 2023, 45(11): 1-9 (in Chinese with English abstract).
- [7] 邹纯, 许勇泉, 陈建新, 等. 利用水果多酚氧化酶改善夏秋红茶品质[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(3): 579-582. ZOU C, XU Y Q, CHEN J X, et al. Study on improving quality of black tea in summer and autumn by using polyphenol oxidase from fruit [J]. Journal of Zhejiang agricultural sciences, 2021, 62(3): 579-582 (in Chinese with English abstract).
- [8] 王文凤. 酵母发酵老青茶的品质研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023. WANG W F. Study on the quality of Laoqing tea fermented by yeasts [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese with English abstract).
- [9] 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 Z C. Detection of extracellular enzymes and initial research on proteomics of the dominant strain for dark tea's fermentation [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [10] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006. GAO J F. Experimental guidance for plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese).
- [11] ROBERTS E A H, SMITH R F. Spectrophotometric measurements of theaflavins and thearubigins in black tea liquors in assessments of quality in teas [J]. Analyst, 1961, 86(1019): 94-98.
- [12] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. HUANG Y H. Experimental technology of tea science [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1997 (in Chinese).
- [13] ZHANG H, LIU Y Z, XU W C, et al. Metabolite and microbiome profilings of pickled tea elucidate the role of anaerobic fermentation in promoting high levels of gallic acid accumulation [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68(47): 13751-13759.
- [14] MUSIAL C, KUBAN-JANKOWSKA A, GORSKA-PONIKOWSKA M. Beneficial properties of green tea catechins [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(5): 1744 [2025-08-01]. <https://doi.org/10.3390/ijms21051744>.
- [15] 余春燕, 朱坤, 黄建安, 等. 茶多酚对心肌保护作用的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 296-305. YU C Y, ZHU K,



- HUANG J A, et al. Advances in the study of cardioprotective effects of tea polyphenols on myocardium [J]. Food science, 2022, 43(3): 296-305 (in Chinese with English abstract).
- [16] 马冰淞, 王佳莱, 徐成成, 等. 不同仓储期普洱茶(生茶)中酚类成分差异及其对体外抗氧化能力的影响[J]. 茶叶科学, 2022, 42(1): 51-62. MA B S, WANG J C, XU C C, et al. Differences of phenolic components in Puer raw tea with various storage periods and their effects on the *in vitro* antioxidant capacities[J]. Journal of tea science, 2022, 42(1): 51-62 (in Chinese with English abstract).
- [17] 黄振兴, 赵明星, 阮文权, 等. 普洱茶渥堆过程中微生物对其品质形成的影响及其研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(28): 12496-12498. HUANG Z X, ZHAO M X, RUAN W Q, et al. Effects of microorganisms on the quality of Puer tea during piling and its research progress[J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2008, 36(28): 12496-12498 (in Chinese with English abstract).
- [18] 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 Puer tea samples during pile fermentation and tank fermentation process[J]. Food science and technology, 2017, 42(6): 35-40 (in Chinese with English abstract).
- [19] 李利君, 李文静, 于智超, 等. 5种黑曲霉粗酶液对乌龙茶溶液挥发性成分的影响[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2019, 24(4): 267-276. LI L J, LI W J, YU Z C, et al. Effects of five crude enzymes from *Aspergillus niger* on volatiles of oolong tea infusions[J]. Journal of Jimei University (natural science), 2019, 24(4): 267-276 (in Chinese with English abstract).
- [20] 石金琴, 刘新宇, 海超, 等. 非酿酒酵母混合发酵对果酒增香的研究进展[J]. 中国酿造, 2025, 44(7): 20-25. SHI J Q, LIU X Y, HAI C, et al. Research progress on the enhancement of aroma in fruit wine by non-*Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentation[J]. China brewing, 2025, 44(7): 20-25 (in Chinese with English abstract).
- [21] DOMIZIO P, ROMANI C, LENCIONI L, et al. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation[J]. International journal of food microbiology, 2011, 147(3): 170-180.
- [22] KOONYOSYING P, KONGKARNKA S, UTHAIPIBULL C, et al. Green tea extract modulates oxidative tissue injury in beta-thalassemic mice by chelation of redox iron and inhibition of lipid peroxidation [J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2018, 108: 1694-1702.
- [23] 李家锋, 李国萍, 欧阳建, 等. 盈江大理种芽孢茶感官品质及滋味化学成分分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 339-347. LI J F, LI G P, OUYANG J, et al. Analysis on the sensory quality and taste's chemical composition of spore tea of Yingjiang *Camellia taliensis* [J]. Science and technology of food industry, 2023, 44(16): 339-347 (in Chinese with English abstract).
- [24] 霍华珍, 郭春雨, 蔡爱华, 等. 广西本地群体种选育的不同茶树品系绿茶适制性研究[J/OL]. 食品工业科技, 2025: 1-22. (2025-06-30) [2025-08-01]. <https://link.cnki.net/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2024100208>. HUO H Z, GUO C Y, CAI A H, et al. Study on the suitability of different strains of locally bred tea plant populations in Guangxi for green tea production[J/OL]. Science and technology of food industry, 2025: 1-22. (2025-06-30) [2025-08-01]. <https://link.cnki.net/doi/10.13386/j.issn1002-0306.2024100208> (in Chinese with English abstract).
- [25] CHEN Y F, JIANG C J, YIN S X, et al. New insights into the function of plant tannase with promiscuous acyltransferase activity[J]. The plant journal, 2023, 113(3): 576-594.
- [26] 马存强, 周斌星, 马冰淞, 等. 茶叶微生物发酵过程中没食子酸代谢研究进展[J]. 中国食品学报, 2024, 24(7): 450-459. MA C Q, ZHOU B X, MA B S, et al. Research advances on Gallic acid metabolism during tea-leaves microbial fermentation [J]. Journal of Chinese Institute Of Food Science And Technology, 2024, 24(7): 450-459 (in Chinese with English abstract).
- [27] 胡玉荣. 外源单宁酶处理对乌龙茶原料品质影响的研究[J]. 饮料工业, 2025, 28(2): 23-26. HU Y R. Study on the technology of improving the quality of oolong tea by exotic tannase [J]. Beverage industry, 2025, 28(2): 23-26 (in Chinese with English abstract).
- [28] KOCHMAN J, JAKUBCZYK K, ANTONIEWICZ J, et al. Health benefits and chemical composition of matcha green tea: a review [J/OL]. Molecules, 2020, 26(1): 85 [2025-08-01]. <https://doi.org/10.3390/molecules26010085>.
- [29] 丁艳, 白姣姣, 萨巴海提·阿不力米提, 等. 基于化学成分、药理作用和网络药理学的没食子质量标志物预测分析[J]. 中南药学, 2024, 22(3): 708-714. DING Y, BAI J J, SABABATI Abulimiti, et al. Prediction of quality markers for *Quercus* infectoria galls based on chemical composition, pharmacological effect and network pharmacology [J]. Central south pharmacy, 2024, 22(3): 708-714 (in Chinese with English abstract).
- [30] 吴荣梅, 余书平, 余秀宏, 等. 单宁酶处理改善夏秋季绿茶滋味品质[J]. 中国茶叶, 2022, 44(3): 38-44. WU R M, YU S P, YU X H, et al. Improving the taste of summer-autumn green tea with tannase [J]. China tea, 2022, 44(3): 38-44 (in Chinese with English abstract).
- [31] 王岳飞, 徐平, 李磊, 等. 茶多酚与几种天然抗氧化物质的协同作用研究[J]. 茶叶科学, 2010, 30(2): 109-114. WANG Y

F, XU P, LI L, et al. Research on total antioxidant activity of tea polyphenols and other natural antioxidants [J]. Journal of

tea science, 2010, 30(2): 109-114 (in Chinese with English abstract).

## Screening and identification of tannase-producing strains with high-yield from tea

XIAO Jingyi, QI Minghui, QU Anlan, SUN Ronghui, QIN Wangnian, SHEN Tianci, HUANG Youyi

*College of Horticulture and Forestry Sciences/National Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Horticultural Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The microbial community in piles of Puer tea, soils from tea garden, and Qingzhuan brick tea was used as bacterial sources to be primarily screened with to tannic acid screening medium to realize the high-value utilization of summer-autumn tea resources and optimize the technology of fermenting dark tea. The rescreening was conducted by measuring the activity of tannase in tea fermented by candidate strains. The characteristics of sensory, components of quality, and antioxidant activity in solid-state fermented tea were analyzed. The targeted strain was identified through morphological observation and 26S rDNA sequence analysis. The results showed that 45 tannase-producing strains were obtained from the primarily screening, and 9 strains with higher activity of enzyme were selected to rescreen the fermented tea. Among them, strain MJ19 had the highest activity of tannase in fermented tea, reaching 21.12 U/g. The sensory quality of tea fermented with MJ19 has significantly improved compared with that in the control, presenting characteristics of sweet, floral, and ester aromas. Its antioxidant activity was significantly enhanced, with the scavenging rate of DPPH radical and ABTS radical, and the reducing ability of FRAP iron increased by 117.44%, 120.04%, and 116.60%, respectively. Meanwhile, the content of gallic acid (GA) in fermented tea increased by 430% compared to that in the control. It is indicated that the strain MJ19 obtained through screening can effectively enhance the activity of tannase during the fermentation of dark tea. Finally, it was identified to be the *Debaryomyces prosopidis* group, belonging to yeast, which can significantly improve the sensory quality and antioxidant activity of the fermented tea. It will provide excellent microbial resources and a theoretical foundation for the high-value development and utilization of summer-autumn tea resources.

**Keywords** tannase; dark tea; fungus; gallic acid; antioxidant activity; catechin

(责任编辑:张志钰)