

秦王念, 胡斌, 阳永学, 等. 黑茶渥堆中产脂肪酶菌株的筛选与利用[J]. 华中农业大学学报, 2025, 44(6): 127-134.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.013

黑茶渥堆中产脂肪酶菌株的筛选与利用

秦王念¹, 胡斌², 阳永学³, 申天赐¹, 冯琪¹, 祁明慧¹, 黄友谊¹

1. 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;
2. 宜昌市五峰土家族自治县茶叶发展中心, 五峰 443400; 3. 武汉市农业科学院林业果树研究所, 武汉 430070

摘要 为探究产脂肪酶菌对发酵茶脂肪酸总量的影响, 解析青砖茶风味品质形成机制, 采用中性红橄榄油平板初筛及改进铜皂-分管光度法复筛, 从青砖茶菌库中筛选出 17 株细菌和 19 株霉菌可产脂肪酶, 其中 N8.11-20 的酶活性最高 (7.82 U/mL), 鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。利用单因素试验优化其产酶培养条件, 结果显示, N8.11-20 产酶活性的最适培养条件为接种量 6% (V/V)、培养温度 34℃、初始 pH 7.0、培养时间 72 h; 以 N8.11-20 发酵老青茶 15 d, 含油率由 12.22% 升至 15.37%, 提高了发酵茶总脂肪酸含量。可见, 利用产脂肪酶菌株发酵黑茶, 有助于黑茶香气品质的提升。

关键词 黑茶; 青砖茶; 脂肪酶; 菌株筛选与鉴定; 铜绿假单胞菌; 渥堆发酵

中图分类号 TS272 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0127-08

脂肪酶 (lipase, EC 3.1.1.3) 是一类多功能水解酶, 广泛存在于动物 (胃与胰腺)、植物 (种子) 及微生物中^[1]。提取难度大、生物活性低以及受制于原料与生产条件, 是动物与植物脂肪酶在工业化应用中面临的主要瓶颈。微生物脂肪酶因具备强底物特异性、培养周期短及易于规模化生产等特点, 已成为脂肪酶制剂的主要来源^[2]。目前, 已发现 65 个属的产脂肪酶微生物^[3], 国内仅有 2 种菌株实现了工业化生产^[4]。因此, 分离筛选具有高产酶能力及强环境适应性的脂肪酶产生菌具有重要意义。张传丽等^[5]对油污污染土壤中分离的产脂肪酶菌进行了发酵条件优化, 使酶活性提升至 22.7 $\mu\text{mol}/\text{min}$, 较优化前提高了 12.9%。

黑茶渥堆发酵是品质形成的关键, 微生物酶系是此过程的核心动力^[6]。茶叶中的脂质是香气前体物质的重要来源, 经脂肪酶水解甘油三酯生成游离脂肪酸 (如亚油酸、亚麻酸)^[7], 进一步转化为醇、醛、酯等挥发性芳香物质, 使黑茶呈现显著的陈香、醇厚等特征, 提升其香气品质^[8]。随着茶叶加工中的优势菌被大量分离和鉴定, 微生物活动与茶叶品质的相互作用机制已成为研究热点。利用微生物酶制剂提升茶叶品质的研究日益增多, 即利用微生物分泌的

胞外酶, 分解茶叶有效组分, 如茶叶中的黑曲霉、木霉菌等微生物能产 β -葡萄糖苷酶, 可有效将茶叶中的糖苷类香气前体转化为香气物质^[9]。然而, 目前尚未见产脂肪酶菌直接应用于茶叶发酵的报道。因此, 筛选高产脂肪酶菌应用于茶叶加工, 对提升茶叶品质具有重要意义。本研究通过中性红橄榄油平板法初筛及改进铜皂-分管光度法复筛, 从青砖茶菌库中筛选高产脂肪酶菌株, 并探究其产酶的最适培养条件; 进一步接种该菌株发酵老青茶, 分析其对茶叶脂肪酸总量的影响, 以期的高产脂肪酶菌的选育及规模化生产应用提供参考, 并为阐明青砖茶品质形成机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

青砖茶菌库有 300 多个菌株, 为华中农业大学茶叶加工与生物技术课题组从湖北省赤壁市洞庄茶业青砖茶工厂的青砖茶渥堆发酵样品中分离纯化所得的优势菌株。发酵茶叶原料为同一工厂生产的晒青毛茶。HCl、95% 乙醇、 SnCl_2 、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、KOH、 Na_2CO_3 、蒽酮、水合茚三酮、甲醇、正己烷、谷氨酸、 H_2SO_4 (浓) 等均为国药集团化学试剂有

收稿日期: 2025-07-31

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1600804)

秦王念, E-mail: qinwangnian1112@163.com

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

限公司提供的分析纯产品。

1.2 培养基及溶液配制

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L):蛋白胨 10.0,牛肉浸粉 5.0,NaCl 5.0,琼脂 20.0(液体培养基中无),用于分离纯化细菌;孟加拉红培养基(g/L):葡萄糖 10.0,蛋白胨 5.0,无水硫酸镁 0.5,KH₂PO₄ 10.0,孟加拉红 0.033,氯霉素 0.1,琼脂 20.0,用于分离纯化真菌;初筛培养基:在上述2种培养基中加入橄榄油乳化液 120 mL/L 及 0.1% 中性红溶液;种子培养基(g/L):马铃薯葡萄糖液体培养基(马铃薯浸粉 6.0 g,葡萄糖 20.0 g)用于培养真菌,牛肉膏蛋白胨液体培养基用于培养细菌;发酵培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,(NH₄)₂SO₄ 5.0,K₂HPO₄ 1.0,MgSO₄·7H₂O 0.5(用于培养真菌);蛋白胨 25.0,牛肉膏 5.0,葡萄糖 20.0,(NH₄)₂SO₄ 5.0,K₂HPO₄ 1.0,MgSO₄·7H₂O 0.5(用于培养细菌);茶汤培养基:将晒青毛茶以料液比 1:60(m/V,g/mL)加入沸水,置于 100℃水浴锅中 30 min 后用双层纱布过滤,所得茶汤与牛肉膏蛋白胨液体培养基混合,pH 自然。橄榄油-聚乙烯醇乳化液:参照张传丽等^[5]所采用的方法配制。

1.3 青砖茶渥堆样品产脂肪酶菌株的筛选

首先将青砖茶菌库中的菌株分别接种于牛肉膏蛋白胨培养基(细菌)和孟加拉红培养基(真菌)中活化培养,随后转接至中性红橄榄油初筛平板。通过观察菌落周围红色变色圈的形成情况,初步判定菌株的产脂肪酶能力。基于初筛结果,挑取有红色变色圈的菌落接种至种子培养基进行扩增,再以 1%(V/V)接种量转接至发酵培养基进行液态发酵。发酵结束后,通过离心分离获得上清液,用于后续的酶活性测定分析。

1.4 脂肪酶活性测定

采用铜皂-分光光度法,参考侯爱军等^[10]改良的测定方法,并结合试验条件稍加修改。以橄榄油-聚乙烯醇乳化液作为反应底物,取 2 mL 分装至 2 支具塞试管(反应管与对照管),再添加 0.05 mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液,形成酶促反应体系。置于 40℃恒温水浴预热 10 min。取 3 mL 发酵液至离心管,以 5 000 r/min 离心 2 min,收集上清液作为待测粗酶液,转移至无菌试管于 40℃预热 10 min。吸取 0.5 mL 预热粗酶液加入底物体系,涡旋振荡 10 s 混合均匀,40℃水浴反应 15 min 后迅速添加 1 mL 12 mol/L HCl 与 6 mL 95% 乙醇,剧烈振荡

20 s 终止酶促反应。预先在 0.5 mL 粗酶液中加入 1 mL 12 mol/L HCl 与 6 mL 95% 乙醇,振荡灭活后再加入预热底物,40℃水浴反应 15 min,作为对照管。分别向反应试管中加入 3 mL 异辛烷,涡旋振荡 90 s 以充分萃取游离脂肪酸,60℃水浴 2 h 促进相分离,冷水浴 10 min 使体系降温至室温。取 1 mL 上层有机相转移至新试管,补加 4 mL 异辛烷稀释及 1 mL 乙酸铜显色剂,涡旋振荡 90 s 形成蓝色铜皂络合物。静置分层后取上清液于 714 nm 波长测定吸光值。以乙酸标准曲线为基准,获得产游离脂肪酸量,计算酶活性。将在 40℃反应条件下,每毫升酶液每分钟催化生成 1 μmol 游离脂肪酸所需酶量定义为 1 个脂肪酶活性单位,计算公式为:

$$U = \frac{(A_1 - A_0) / 0.021 \times 3}{t \times V}$$

式中, U 为脂肪酶活性, U/mL ; A_1 、 A_0 分别为反应管与对照管的 D 值, t 为反应时间,min; V 为酶液添加量,mL。

1.5 菌株鉴定

依据菌落形态、生理生化特性以及 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列分析结果,对所得产脂肪酶菌株进行种属鉴定。由北京麦克罗泰科技有限公司完成鉴定。

1.6 产脂肪酶菌株的单因素培养条件优化

利用发酵培养基培养菌株,各单因素条件优化试验的基准参数为菌株接种量为 2%(OD₆₀₀=0.8)、装液量 75 mL/150 mL、38℃、180 r/min 条件下培养 72 h,仅作单一因素替代,其余条件保持一致。测定发酵液中脂肪酶活性,依据酶活性的高低确定适宜条件。

分别培养 24、36、48、60、72、84 h 后取发酵液测定脂肪酶活性,确定最优发酵时间。设置 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%(V/V)的接种量,培养 72 h 测定酶活性,确定最优接种量。分别在 28、30、32、34、36、38℃培养,培养 72 h 测定酶活性,确定最优发酵温度。将发酵培养基初始 pH 分别设置 4.5~9.0 的 pH 梯度(间隔 0.5),培养 72 h 测定酶活性,确定最优初始 pH。

1.7 产脂肪酶菌发酵老青茶

将种子培养基中的菌液以 2% 的接种量接入茶汤培养基,于 38℃、180 r/min 条件下培养 72 h,得到接入老青茶发酵的菌悬液。称取 20.0 g 老青茶于发

酵罐中,121℃灭菌 20 min,接种 1 mL 菌悬液及 8 mL 无菌水,37℃条件下发酵,分别于第 5、7、9、11、13、15 天取样,烘干温度为 45℃,以灭菌茶样为对照(发酵 0 d),每组设置 3 次重复。

1.8 脂肪酸组成测定方法

参考王磊磊等^[11]的 GC-MS 法快速测定茶叶脂肪酸含量。脂肪酸的定性鉴定基于 NIST11 质谱库(匹配度>80 的结果),辅以质谱图解析和文献数据比对,其含量通过面积归一法测定。

1.9 数据处理与分析

每个单因素条件处理均设置 3 个重复试验,所有数据均借助 Excel 2019 和 SPSS 23 软件予以统计分析。

2 结果与分析

2.1 产脂肪酶菌株的筛选

1)产脂肪酶菌株的初筛。根据本文“1.3”的方法,通过中性红橄榄油平板初筛,从青砖茶菌库的

300 余株微生物中分离获得 36 株脂肪酶产生菌,包括 17 株细菌和 19 株霉菌(均呈现明显变色圈),如图 1 所示。

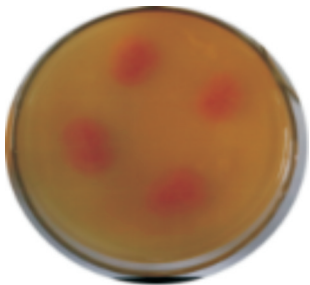


图 1 产脂肪酶菌株在初筛平板上形成的变色圈
Fig.1 The color-changing circle formed by the lipase-producing strain on the first screening plate

2)产脂肪酶菌株的复筛。提取初筛平板中的红色变色圈菌落的粗酶液,并测定脂肪酶活性,结果(表 1)显示,复筛获得 26 株脂肪酶阳性菌株,其中菌株 N8.11-20 的酶活性最高,达 7.82 U/mL,故选择此菌株作为试验菌株开展后续研究。

表 1 复筛菌株的脂肪酶活性

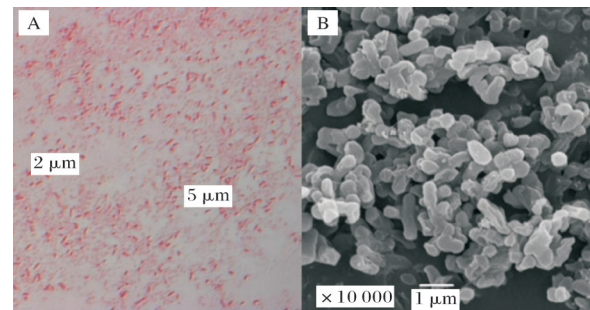
Table 1 Lipase activity of secondary-screened strains						U/mL	
菌株编号 No. of strains	酶活性 Lipase activity	菌株编号 No. of strains	酶活性 Lipase activity	菌株编号 No. of strains	酶活性 Lipase activity	菌株编号 No. of strains	酶活性 Lipase activity
N911	6.39	N7	2.47	MB30	5.69	Mq12	1.02
N2	4.91	N8-2	1.58	Mq24	5.70	MB7	3.60
N9-1	ND	N7-2	0.52	MB19J	3.45	Mq24	ND
N74	ND	N1-3	3.41	Mq13	2.58	Q11-3	ND
N911A	0.33	N8	ND	MB51	4.57	Mq2	3.47
N916	ND	N916②	3.05	Q33	3.54	MB43	ND
N913	ND	N9	1.91	MB74	ND	H17	-0.17
N722	ND	N92-2	0.50	MB33	1.27	MB41-2	3.67
N8.11-20	7.82	MB47J	5.40	Mq23	0.69	MB41-1	3.27

注:ND 表示未检出活性。Note:ND indicates no detectable activity.

2.2 菌种鉴定

对菌株 N8.11-20 进行革兰氏染色观察,可知该菌株为革兰氏阴性菌,呈短小杆状(图 2A);扫描电镜观察显示菌株 N8.11-20 菌体大小为(0.8~1.0) μm×(1.0~1.2) μm,单个或成对排列。生理生化特征分析结果(表 2)显示,菌株 N8.11-20 未形成芽孢,V-P 试验呈阳性,脲酶、接触酶及明胶水解等呈阳性,H₂S 及吲哚试验呈阴性,能利用葡萄糖、果糖、甘油等作为碳源进行发酵,但不能发酵糊精、麦芽糖、海藻糖及纤维二糖等。

对菌株 N8.11-20 进行 16S rDNA 序列分析,结果显示,该菌株的 16s rDNA 核酸片段序列长度为 1 447 bp,*rpoB* 片段的长度为 963 bp。将菌株 N8.11-20



A:革兰氏染色(1 000×); B:扫描电镜图(10 000×)。A:Gram staining 1 000×; B:Scanning electron micrograph(10 000×).

图 2 菌株 N8.11-20 形态学特征观察

Fig.2 Observation on morphological characteristics of the strain N8.11-20

表 2 菌株 N8.11-20 的生理生化特性

Table 2 Biochemical characterization of strain N8.11-20

试验 Test	结果 Result
形成芽孢 Spore formation	—
V-P 试验 V-P test	+
葡萄糖 Glucose	+
果糖 Fructose	+
糊精 Dextrin	—
麦芽糖 Maltos)	—
海藻糖 Trehalose	—
纤维二糖 Cellobiose	—
脲酶 Urease	+
接触酶 Catalase	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+
硫化氢 Hydrogen sulfide	—
吲哚试验 Indole test	—

注：“+”“—”分别表示结果为阳性、阴性。Note: “+” and “—” indicate positive and negative results, respectively.

的序列在 NCBI 数据库中进行比对,结果显示其与铜假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的相似性最高。基于高

相似度序列,利用 MEGA 4.1 软件构建了系统进化树 (图 3)。综合该进化树分析结果与菌株的表型特征,最终将 N8.11-20 鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

2.3 产脂肪酶菌株的单因素培养条件优化

- 1) 培养时间对酶活性的影响。由图 4A 可见,脂肪酶活性随培养时间的延长而发生显著变化,从 24 h 的 1.13 U/mL 逐渐升高至 72 h 的 7.82 U/mL (峰值),峰值较 24 h 时提升 5.23 倍。培养后期,因营养渐缺、菌体自溶引起酶活性下降。故确定最优培养时间为 72 h。
- 2) 接种量对酶活性的影响。由图 4B 可知,在接种量 1%~6% 的范围内,所接入的菌体量越大,酶活性越高,在 6% 接种量时,酶活性达到最高值,为 5.735 U/mL。随着接种量继续增加,菌体可能因底物竞争性耗竭、菌群密度依赖性衰亡以及代谢副产物积累致使酶活性下降。故确定最优接种量为 6%。
- 3) 培养温度对酶活性的影响。由图 4C 可见,在

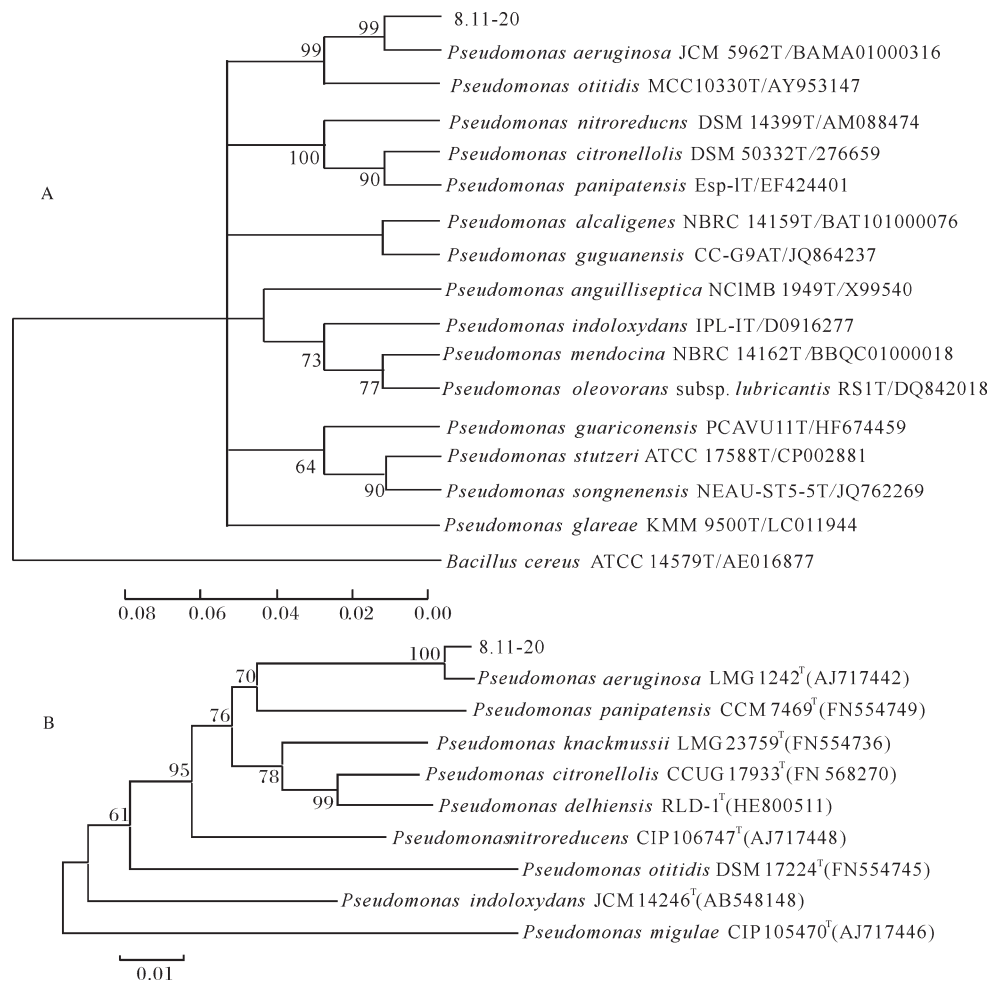
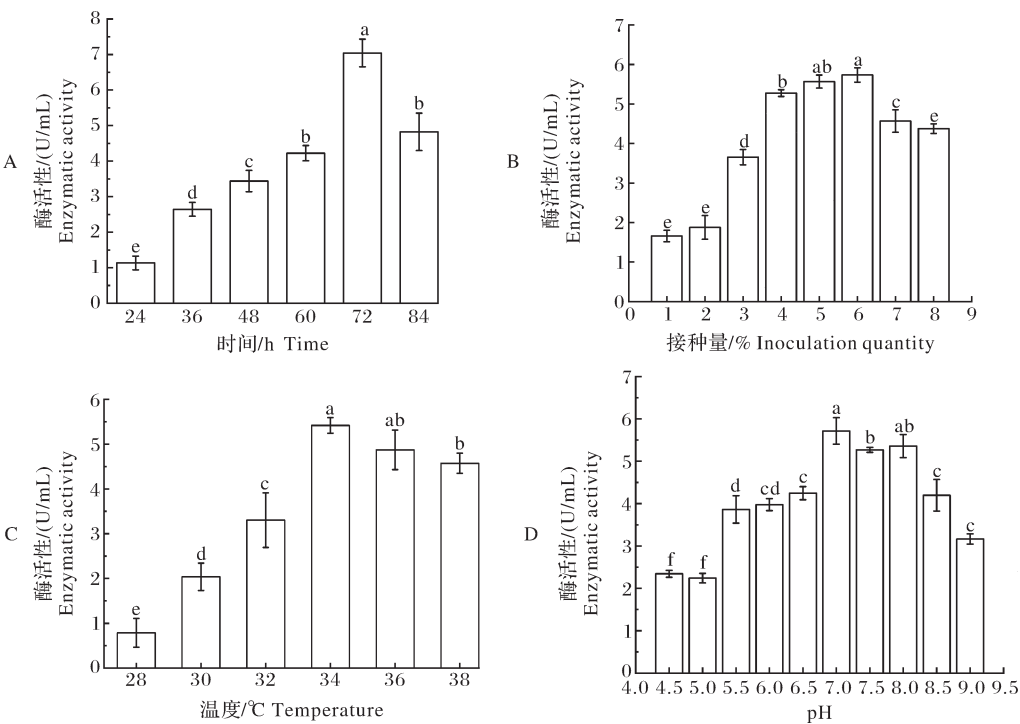


图 3 菌株 8.11-20 的 16S rDNA 序列(A)及 rpoB 序列(B)的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic trees of the 16S rDNA sequences(A) and rpoB sequences(B) of strain 8.11-20



不同小写字母表示不同培养条件下酶活性存在显著差异 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences under different conditions ($P < 0.05$).

图4 培养时间(A)、接种量(B)、温度(C)及初始pH(D)条件下产脂肪酶菌株酶活性变化

Fig.4 Change of lipase activity in producing strains under different culture time (A), inoculation quantity(B), temperature (C) and initial pH values(D)

28 ~ 34 °C, 酶活性逐步增强: 28 °C 时酶活性仅 0.79 U/mL, 34 °C 时达峰值, 5.42 U/mL, 活性提升 7.88 倍。继续升温, 酶活性缓慢回落, 推测高温不利于菌株生长, 进而干扰酶活性。

4) 初始 pH 对酶活性的影响。由图 4D 可知, 菌株产酶的最适 pH 为 7.0, 酶活性可达 5.72 U/mL, 在 pH 7.0~8.0 范围内能保持较高活性, 而在酸性 (pH < 7.0) 或强碱性 (pH > 8.0) 环境下, 酶活性受到抑制, 酶活性较低。故确定最优初始 pH 为 7.0。

2.4 产脂肪酶菌发酵老青茶的脂肪酸含量变化

菌株 N8.11-20 发酵老青茶过程中脂肪酸组成结果 (图 5) 显示, 发酵过程中的各类脂肪酸含量呈现棕榈酸 > 亚麻酸 > 油酸 > 亚油酸 > 硬脂酸 > 花生酸的趋势。棕榈酸占比最高, 其相对含量在 44.10% ~ 50.91%。接菌发酵前期 (0~9 d): 亚油酸短暂积累 (9 d 达峰), 棕榈酸、油酸维持稳定, 亚麻酸开始缓慢下降。发酵后期 (11~15 d): 棕榈酸、油酸协同上升 (15 d 达峰), 亚油酸回落稳定, 亚麻酸持续缓慢下降, 硬脂酸、花生酸无显著变化。

菌株 N8.11-20 发酵老青茶的含油率变化趋势如

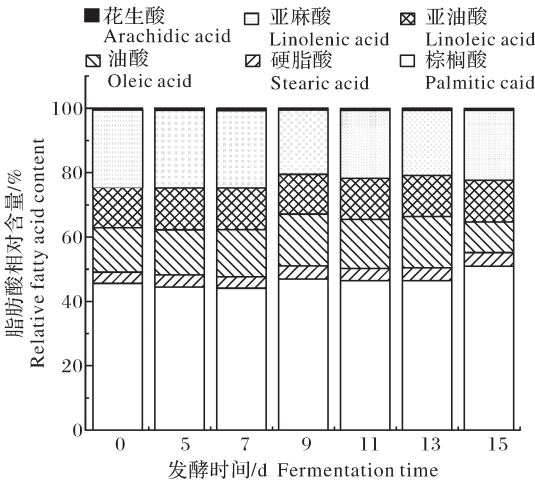


图5 菌株 N8.11-20 发酵过程中脂肪酸组成变化

Fig.5 Changes in relative fatty acid content during tea fermentation process of N8.11-20

图 6 所示。整体来看, 发酵时间对含油率的影响呈现“前期平稳, 中期缓升, 后期快升”的趋势, 发酵 0~5 d 期间, 含油率稳定在 12.22%~12.83%, 可能是发酵初期酶促反应启动但未完全持续增强, 或有其他因素 (如底物消耗、环境适应) 短暂平衡了含油率变化。发酵后期含油率明显上升, 15 d 达 15% 以上。

N8.11-20分泌的胞外脂肪酶持续作用于脂类,分解产生更多游离脂肪酸,推动含油率上升,表明接种菌株N8.11-20可提升发酵茶总脂肪酸含量。

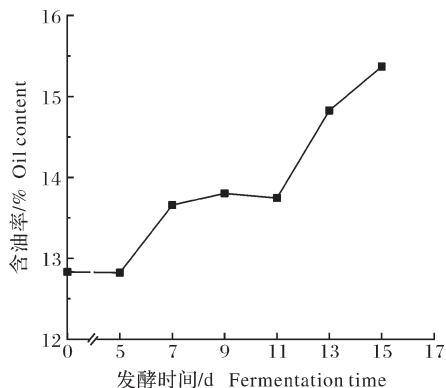


图6 菌株 N8.11-20 发酵过程中的含油率变化

Fig.6 Changes in oil content during tea fermentation process of N8.11-20

3 讨论

本研究从青砖茶菌库中成功筛选并鉴定出1株高产脂肪酶的铜绿假单胞菌菌株N8.11-20,进一步通过单因素试验优化其产酶条件,确定最适培养参数为34℃、初始pH 7.0、接种量6%、培养时间72 h。与胡珺^[12]经紫外及硫酸二乙酯诱变铜绿假单胞菌HFE733提升脂肪酶活性(达5.03 U/mL,较诱变前提高160.62%),以及张谦等^[13]通过优化黑曲霉发酵条件使酶活提高16.7%的研究相比,本研究直接从青砖茶渥堆样品中分离纯化所得的优势菌株中筛选天然高产脂肪酶菌株,优化了菌株培养条件,并评估了菌株在模拟渥堆发酵中对脂肪酸组成及茶叶含油率的影响,可为茶叶发酵微生物资源的定向选育与应用提供新的视角。

本研究利用菌株N8.11-20进行青砖茶渥堆发酵模拟试验,对比发酵0、5、7、9、11、15 d的茶样脂肪酸含量及含油率变化,整个发酵过程中,饱和脂肪酸(棕榈酸、硬脂酸及花生酸)的含量增加,不饱和脂肪酸中的油酸、亚麻酸持续分解。多项研究表明,茶叶中的亚麻酸在氧气充足时,会在脂氧合酶的催化下氧化生成氢过氧化物^[14-15],由于其化学性质不稳定,易分解为一系列低级脂肪醛(如顺-3-烯醛、正己醛等),从而产生类似“油腻味”、令人不愉悦的刺激气味等^[16]。柳荣祥等^[17]研究发现亚麻酸含量与茶叶品质呈显著负相关,推测亚麻酸含量降低可能是青砖茶品质提升的重要标志。此外,接种菌株N8.11-

20可提升发酵茶总脂肪酸含量,而脂肪酸作为脂肪醛的前体物质,其含量增加有助于香味脂肪醛的积累^[18]。如茶叶中的亚麻酸、亚油酸会在脂质氧化反应下生成六碳醛与六碳醇,从而改善青砖茶的香气品质,这一过程与张媛媛等^[19]、Wang等^[20]提出的脂质氧化途径一致,即亚麻酸、亚油酸等通过脂氧合酶途径氧化,最终形成影响茶叶风味的关键挥发性成分,进一步验证了该菌株在调控青砖茶香气形成中的积极作用。

本研究筛选的铜绿假单胞菌N8.11-20在青砖茶发酵过程中可通过调节脂肪酸代谢提升青砖茶香气品质,未来研究可从以下几方面展开:首先,探索菌酶协同发酵模式,如将该菌与产 β -葡萄糖苷酶菌株共培养,系统解析其在香气前体释放中的协同机制;其次,开发耐高温、高活性的复合菌剂,构建脂肪酶活性与关键香气成分的定量关联模型,推动发酵过程的精准调控;最后,结合诱变育种与基因组编辑技术,定向改良菌株的产酶性能,为茶叶品质的定向提升提供高效微生物资源。

参考文献 References

- [1] 杨军方.产脂肪酶细菌的筛选和酶学性质研究[D].南京:南京理工大学,2004.YANG J F.Screening of lipase-producing bacteria and study on enzymatic properties[D].Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [2] HASAN F, ALI SHAH A, HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and microbial technology, 2006, 39(2): 235-251.
- [3] 邓颖颖.黑曲霉脂肪酶的摇瓶发酵、性质及其合成月桂酸单酯的研究[D].无锡:江南大学,2012.DENG Y Y.Studies on the production, properties of lipase from *Aspergillus niger* by shake-flask and its application on synthesis of lauric acid mono-ester[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [4] 曹茜.脂肪酶高产菌的选育、酶的纯化和表征以及两种诱导方式产酶的机理研究[D].杭州:浙江大学,2016.CAO X. Screening of lipase-producing strains, purification and characterization of lipases and the study on two inducing ways[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [5] 张传丽,孙会刚,崔珏,等.高产脂肪酶菌株的筛选及其酶学性质分析[J].食品科技,2019,44(11):30-35.ZHANG C L, SUN H G, CUI J, et al.Study on screening of a strain for high-

- yield lipase and its enzymatic properties[J]. Food science and technology, 2019, 44(11): 30-35 (in Chinese with English abstract).
- [6] 刘仲华, 黄建安, 施兆鹏. 黑茶初制中主要酶类的变化[J]. 茶叶科学, 1991, 11(S1): 17-22. LIU Z H, HUANG J A, SHI Z P. Dynamics of the major enzymes during the primary processing of dark green tea[J]. Journal of tea science, 1991, 11(S1): 17-22 (in Chinese with English abstract).
- [7] XU X Q, MO H Z, YAN M C, et al. Analysis of characteristic aroma of fungal fermented Fuzhuan brick tea by gas chromatography/mass spectrophotometry[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2007, 87(8): 1502-1504.
- [8] YANG Z, BALDERMANN S. Activity of endogenous enzymes during tea processing and their role in aroma formation[J]. Food Chem, 2013, 138(2/3): 1472-1481.
- [9] 荆丰雪, 钟斌, 万娅琼, 等. 微生物源 β -葡萄糖苷酶在发酵食品中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(24): 8041-8049. JING F X, ZHONG B, WAN Y Q, et al. Application of microbial source β -glucosidase in fermented foods[J]. Journal of food safety & quality, 2022, 13(24): 8041-8049 (in Chinese with English abstract).
- [10] 侯爱军, 徐冰斌, 梁亮, 等. 改进铜皂-分光光度法测定脂肪酶活力[J]. 皮革科学与工程, 2011, 21(1): 22-27. HOU A J, XU B B, LIANG L, et al. A modified colorimetric assay of lipase activity using emulsified olive oil as the substrate[J]. Leather science and engineering, 2011, 21(1): 22-27 (in Chinese with English abstract).
- [11] 王磊磊, 陈军辉, 王虹, 等. GC-MS法快速测定茶叶中脂肪酸[J]. 分析试验室, 2009, 28(10): 9-12. WANG L L, CHEN J H, WANG H, et al. Rapid determination of fatty acids in tea by GC-MS[J]. Chinese journal of analysis laboratory, 2009, 28(10): 9-12 (in Chinese with English abstract).
- [12] 胡珺. 脂肪酶产生菌的筛选鉴定、产酶条件优化及酶学性质研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2017. HU J. Screening and identification of lipase production strain and optimization of fermentation conditions and its enzymatic properties[D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [13] 张谦, 贾佳, 林智, 等. 饲料用脂肪酶产生菌: 黑曲霉 G55 高产菌株的选育[J]. 中国饲料, 2014(16): 28-32. ZHANG Q, JIA J, LIN Z, et al. High-yield strains breeding for feed lipase produced by *Aspergillus niger* G55[J]. China feed, 2014(16): 28-32 (in Chinese with English abstract).
- [14] 李璐, 温明椿, 张海伟, 等. 茶叶香气成分研究进展[J]. 中国茶叶加工, 2025(2): 5-21. LI L, WEN M C, ZHANG H W, et al. Advances in research on aroma components of tea[J]. China tea processing, 2025(2): 5-21 (in Chinese).
- [15] 陈韵扬, 赵航晔, 张承铭, 等. 茶叶中脂质含量检测及其方法比较[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2022, 48(4): 465-472. CHEN Y Y, ZHAO H Y, ZHANG C M, et al. Measuring the contents of tea lipids and comparison of qualitative analyzing methods[J]. Journal of Zhejiang University (agriculture and life sciences), 2022, 48(4): 465-472 (in Chinese with English abstract).
- [16] 吴小崇. 游离脂肪酸组成在绿茶贮藏中的变化[J]. 茶叶通讯, 1990, 17(1): 23-24. WU X C. Changes in free fatty acid composition during green tea storage[J]. Tea communication, 1990, 17(1): 23-24 (in Chinese).
- [17] 柳荣祥, 朱全芬, 夏春华. 龙井茶游离脂肪酸组成的研究[J]. 中国茶叶, 1991, 13(6): 20-21. LIU R X, ZHU Q F, XIA C H. Study on the composition of free fatty acids in Longjing Tea[J]. China tea, 1991, 13(6): 20-21 (in Chinese).
- [18] 周敬涛. 不同发酵程度工夫红茶关键香气成分表征与形成机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2024. ZHOU J T. Study on the characterization and formation mechanism of key aroma components in congou dark tea with different fermentation degrees[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024 (in Chinese with English abstract).
- [19] 张媛媛, 杨启良, 陈绍民, 等. 凝结芽孢杆菌发酵三七叶茶抗氧化活性及其香气成分研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(10): 9-16. ZHANG Y Y, YANG Q L, CHEN S M, et al. Antioxidant activity and aroma components of *Panax notoginseng* leaf tea fermented with *Bacillus coagulans*[J]. Food and fermentation industries, 2023, 49(10): 9-16 (in Chinese with English abstract).
- [20] WANG K B, LIU F, LIU Z H, et al. Comparison of catechins and volatile compounds among different types of tea using high performance liquid chromatograph and gas chromatograph mass spectrometer[J]. International journal of food science & technology, 2011, 46(7): 1406-1412.

Screening and utilization of lipase-producing strains in dark tea with pile-fermentation

QIN Wangnian¹, HU Bin², YANG Yongxue³, SHEN Tianci¹, FENG Qi¹, QI Minghui¹, HUANG Youyi¹

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

2.Tea Development Center of Wufeng Tujia Autonomous County, Yichang City, Wufeng 443400, China;

3.Institute of Forestry and Fruit, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430070, China

Abstract A microbial library of Qingzhuan brick tea with pile-fermentation was screened with neutral red-olive oil plate assays and an improved copper soap method to study the effects of lipase-producing strains on the content of fatty acids in the fermented tea and analyze the mechanism of forming flavor quality in Qingzhuan tea. 17 strains of bacteria and 19 strains of fungi capable of producing lipase were screened from the microbial library of Qingzhuan tea. Among them, N8.11-20 strain had the highest activity of lipase (7.82 U/mL) and was identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The results of optimizing the culture conditions for producing lipase with single factor experiments showed that the optimal culture conditions for the activity of lipase in N8.11-20 strain are an inoculation volume of 6% (V/V), a culture temperature of 34 °C, an initial pH of 7.0, and a culture time of 72 hours. The content of oil in Laoqing tea fermented with N8.11-20 strain for 15 days increased from 12.22% to 15.37%, which increased the content of total fatty acid in the fermented tea. It is indicated that using lipase-producing strains to ferment dark tea can help improve the aroma quality of dark tea.

Keywords dark tea; Qingzhuan brick tea; lipase; screening and identification of strains; *Pseudomonas aeruginosa*; pile-fermentation

(责任编辑:张志钰)