

赵仁亮,王亚菲,姚衡斌,等.基于多组学技术解析茯砖茶特征香气“菌花香”的形成[J].华中农业大学学报,2025,44(6):67-78.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.06.007

基于多组学技术解析茯砖茶特征香气“菌花香”的形成

赵仁亮¹,王亚菲¹,姚衡斌¹,郭俊齐¹,夏瑶¹,
贾子璐¹,苏会¹,周琼琼¹,陈振²

1.河南农业大学园艺学院,郑州 450046; 2.清华大学化学工程系,北京 100084

摘要 为探究茯砖茶特征香气“菌花香”的形成机制,选用‘薷北种’鲜叶,制成茯砖茶和白茶砖,进行人工接种发花(单菌发花:仅接种冠突散囊菌)与传统工艺发花,通过代谢组学分析有关“菌花香”特征香气成分的动态变化,并结合转录组学技术研究单菌发花过程中冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)的基因表达。代谢组学结果显示,(*E,E*)-2,4-庚二烯醛、(*E,E*)-2,4-壬二烯醛、(*E,Z*)-2,6-壬二烯醛等形成茯砖茶菌花香的关键呈香物质烯醛类化合物含量显著高于白茶砖,传统工艺发花后期烯醛类化合物含量显著升高,而单菌发花后期烯醛类的前体物质不饱和脂肪酸含量升高,原因可能是生成烯醛类化合物的代谢通路在发花过程中受到抑制。通过转录组测序得到,超过96%的 clean reads 被定位于冠突散囊菌基因组,平均94%的基因在基因组中具有唯一位置。注释分析发现,作为冠突散囊菌碳源的脂肪酸相关基因富集于亚油酸、 α -亚麻酸代谢通路,亚油酸代谢通路注释到2种脂氧合酶, α -亚麻酸代谢通路对应脂氧合酶未注释到。冠突散囊菌发花过程中对脂肪酸的消耗下降,导致其含量的上升,且 α -亚麻酸代谢通路没有注释到脂氧合酶,表明冠突散囊菌不能通过脂氧合酶氧化途径产生双不饱和醛,造成了(*E,E*)-2,4-庚二烯醛、(*E,E*)-2,4-壬二烯醛在单菌发花中含量显著低于传统发花,无法产生菌花香。而传统工艺发花的复杂环境中,会存在其他微生物间的信号传递和物质交换,它们协同发酵将不饱和脂肪酸转化为烯醛类挥发物。研究结果表明,“菌花香”的形成是由黑毛茶的基础香气加上以冠突散囊菌为主体的菌群协同发酵所形成的。

关键词 茯砖茶; 菌花香; 烯醛类化合物; 合成途径; 多组学

中图分类号 S571.1

文献标识码 A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0067-12

茯砖茶(Fuzhuan brick tea, FBT)是以黑毛茶为原料的紧压黑茶,特定环境下茶砖内部会生长出俗称“金花”的黄色菌落。茯砖茶因其具有消食解腻、补充维生素的功效,在以肉食为主的游牧民族中作为边销茶长达数百年。近年来,茯砖茶因其具有调节代谢、调理肠胃、保护肝脏等保健养生功能,逐渐受到内地消费者青睐,由此“边茶内销”模式兴起,市场对高品质茯砖茶的需求逐渐增大^[1-3]。茯砖茶加工分为黑毛茶初制和压制2个阶段:鲜叶经渥堆等工艺制成黑毛茶^[4];黑毛茶再经汽蒸、压制成型、发花等工序形成茯砖茶。发花属于微生物发酵过程,在此过程中,多种微生物进行繁殖,经过菌群演替,冠突散囊菌成为优势菌种,因其呈现金黄色“花状”的形态,俗称“金花菌”,“金花”为其闭囊壳^[5-7]。

菌花香(fungus aroma, FA)是优质茯砖茶的特

征香气,是品质评价的重要标准^[8]。现代科技采用人工接种金花菌虽能稳定发花,但产品香气单薄,缺乏“菌花香”^[9]。笔者所在课题组应用分子感官科学、风味组学、代谢组学等方法,对发花微生物群落与“菌花香”关键香气成分烯醛类物质的相关性进行了深度分析与挖掘,筛选出参与烯醛类物质合成的核心功能微生物。研究结果证实了茯砖茶“菌花香”关键呈香成分是烯醛类物质,进一步的关联分析表明,冠突散囊菌与烯醛类物质相关性最高^[10]。虽然国内外的学者针对茯砖茶发花机理开展了大量工作,但其研究尚存在以下科学问题,在茯砖茶发花过程中,以冠突散囊菌为主体的多菌种是如何协同发酵促进烯醛类物质积累的?微生物是如何利用茶叶释放的前体物质(如糖类、氨基酸等)合成茯茶特征性挥发性香气成分的?在茯砖茶共发酵体系中,“菌花香”特

收稿日期:2025-07-23

基金项目:河南省自然科学基金项目(242300421325);河南省科技研发计划联合基金重点项目(235200810019)

赵仁亮, E-mail: zrenliang@henau.edu.cn

征香气成分烯醛类物质的合成途径及其调控机制,尚不明确。本研究选用‘藪北种’同一原料:(1)制成茯砖茶和白茶砖;(2)进行人工接种金花菌发花与传统发花。基于多组学技术分析与菌花香相关烯醛类化合物的动态变化,从不同毛茶原料和发花方式2个方面探究形成菌花香香气形成的原因;基于转录组学分析单菌发花过程中冠突散囊菌的基因表达情况,从而探究菌花香特征香气的形成机制,以期在传统发酵茯茶的靶向工艺调控、优质品质创造和健康绿色发酵食品开发提供理论基础,并为产业升级开发新型发酵剂。

1 材料与方法

1.1 茯砖茶与白茶砖发花材料的制备方法

本研究供试材料为河南省信阳市罗山县信阳申林茶业开发有限公司的10~20年生‘藪北种’。采摘标准为1芽4~5叶。鲜叶采摘后分别使用黑茶及白茶初制工艺制成相应毛茶,其中黑茶工艺为:杀青、揉捻、渥堆、干燥;白茶工艺:萎凋、干燥。将2种毛茶均潮水至含水量22%,然后汽蒸10 s,压制成砖茶,随机取3个平行样本(黑茶砖D1,白茶砖W1),将剩余茶砖置入全新的烘房(长5 m、宽3 m、高3 m)以避免长期发花的烘房内曲霉属真菌丰度过高,控制烘房温度28℃,湿度80%。分别在发花的第6、9、12、22天采集黑茶砖(D6、D9、D12、D22)和白茶砖(W6、W9、W12、W22)。在第12天后烘房每天升温2℃,最终稳定在40℃直至发花结束。取样后立即置于-80℃冰箱保存,每个样品重复3次。

1.2 茯砖茶单菌发花与传统发花材料的制备方法

传统发花材料为信阳申林茶业开发有限公司的‘藪北种’。采摘标准为1芽4~5叶。鲜叶采摘后制成黑毛茶。潮水至含水量22%,汽蒸10 s,压制砖茶,取砖样(YZ),将剩余茶砖置入烘房,烘房温度28℃,湿度80%,分别在发花的第0、3、6、9、12、15、18、22天(CT0、CT3、CT6、CT9、CT12、CT15、CT18、CT22)取样。在第12天后烘房每天升温2℃,最终稳定在40℃直至发花结束。取样后立即置于-80℃冰箱保存,每个样品重复3次。

单菌发花材料使用传统发酵同样的毛茶原料,控制黑毛茶含水量为28%,装入玻璃组培瓶(500 mL)中进行高压蒸汽灭菌(121℃,30 min),在无菌环境下,将冠突散囊菌培养液(1×10^6 CFU/mL)1 mL接种后置于培养箱(温度28℃,湿度80%)中发

酵。取刚接种的黑毛茶作为对照DJ1。按照冠突散囊菌生长时期,发酵第2、3、4天(DJ2、DJ3、DJ4)取样,随后在金花菌产生大量金黄色闭囊壳时,发酵第5天(DJ5)取样。取样后立即液氮固定并置于-80℃冰箱保存,每个样品重复3次。

1.3 挥发性成分测定方法

1)固相微萃取。取茶叶样品,用混合型研磨仪充分研磨(30 Hz,1.5 min),然后过孔径0.25 mm筛,准确称取300 mg过筛样品于20 mL顶空样品瓶中,加入5 mL饱和NaCl水溶液和10 μ L内标溶液(浓度50 mg/L;癸酸乙酯>98%),在80℃孵化20 min。同时将SPME Arrow在250℃老化20 min,之后插入顶空瓶在80℃萃取40 min。萃取完成后立即取出萃取头并插入气相色谱进样口,在250℃下解吸附3 min。每个样品重复3次。

2)GC方法^[11]。色谱柱:HP-5MS UI(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m);载气:高纯氦气(99.999%),流量1.5 mL/min;进样口温度:250℃;升温程序:初试温度40℃,保持0 min,以2.5℃/min升至150℃,保持0 min,以20℃/min升至230℃,保持5 min。

3)MS方法。离子源:EI;电子能量70 eV;离子源温度230℃。

1.4 单菌发花的转录组方法

选择单菌发花模式下冠突散囊菌DJ2、DJ3、DJ4样品进行转录组分析。RNA提取使用天根多糖多酚试剂盒(TIANGEN,北京)。提取后使用Agilent 2100 bioanalyze检测RNA完整性和总量。使用Total RNA进行建库,建库合格后,使用Illumin测序,生成150 bp的配对末端读数^[12]。

数据质控主要包括去除带接头(adapter)的reads、去除含N(N表示无法确定碱基信息)的reads、去除低质量reads(Qphred \leq 20的碱基数占整个read长度的50%以上的reads)。同时,对clean data进行Q20、Q30和GC含量计算。后续分析均基于clean data进行。从NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_001717485.1/)下载已经进行分子鉴定的冠突散囊菌基因组*Aspergillus cristatus*(GCA_001717485.1),使用HISAT2 v2.0.5将配对末端clean reads与参照基因组比对^[13]。使用featureCounts(1.5.0-p3)用于计算映射到每个基因的读数。然后根据基因丰度计算每个基因的FPKM,并计算映射到该基因的读数^[14]。利用DESeq2(1.20.0)进行2个比较组合之间的差异表达分析($P \leq 0.05$)。使用clusterProfiler(3.8.1)软件进行KEGG通路中差

异表达基因的富集分析^[15]。

2 结果与分析

2.1 茯砖茶与白茶砖发花形态

由图1可知,茯砖茶发花第9天(D9)已有零星“金花菌”出现,第12天(D12)出现大量“金花菌”,第22天(D22)的“金花菌”茂盛;白茶砖发花第12天(W12)有零星“金花菌”,第22天(W22)的“金花菌”较为茂盛。2种类型的茶砖均正常发花。

2.2 茯砖茶与白茶砖发花过程中的挥发性化合物动态变化

由图2可知,茯砖茶与白茶砖发花过程中的挥发

性化合物可聚类为6组。Group 3、Group 4、Group 6的挥发性化合物在茯砖茶发花后期含量高于白茶砖,表明该组化合物是在茯砖茶发花过程中生成的,其可能是致使茯砖茶香气与白茶砖香气存在差异的关键香气成分,其中包含与菌花香相关的烯醛类化合物:(*E,E*)-2,4-壬二烯醛、(*E*)-2-辛烯醛、(*E,E*)-2,4-己二烯醛、(*E*)-2-壬烯醛、(*E,Z*)-2,6-癸二烯醛、(*E,Z*)-2,6-壬二烯醛、(*Z*)-2-癸烯醛、(*E*)-2-庚烯醛、(*Z*)-2-庚烯醛和与菌花香高度相关的(*E,E*)-2,4-庚二烯醛。Group 2、Group 5挥发性化合物在白茶砖中的含量高于茯砖茶,Group 1的挥发性化合物在茯砖茶发花中期含量显著升高。

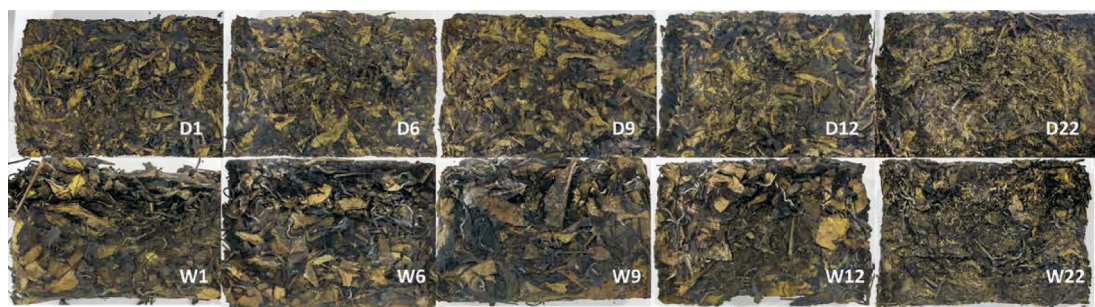


图1 2种类型茶砖发花形态

Fig. 1 The flowering process of two types of tea bricks

2.3 菌花香关键香气组分在茯砖茶和白茶砖发花过程中的动态变化

由图3可知,发花前中期,白茶砖中苯乙醛、香叶醇、(*E*)- β -紫罗酮和二氢猕猴桃内酯的含量高于茯砖茶。在发花后期,茯砖茶中芳樟醇、庚醛、己醛、(*E,E*)-2,4-庚二烯醛、(*E*)-2-辛烯醛、(*E,Z*)-2,6-壬二烯醛、(*E*)-2-壬烯醛、(*E,E*)-2,4-壬二烯醛的含量显著高于白茶砖($P < 0.05$)。在菌花香组分动态变化过程中,1-辛烯-3-醇和4-氧代异佛尔酮在2类茶发花第12天含量较高,可能与某些微生物存在相关。(*E*)- β -大马酮、庚醛、己醛、(*E*)-2-壬烯醛在2类茶发花中含量持续增加,且最终含量在茯砖茶中高于白茶砖;(*E,Z*)-2,6-壬二烯醛、(*E,E*)-2,4-壬二烯醛、(*E*)-2-辛烯醛、(*E,E*)-2,4-庚二烯醛、1,4-二甲氧基苯在茯茶发花后相比于发花初期含量显著增加($P < 0.05$)。值得注意的是:在茯砖茶中芳樟醇含量在发花过程中显著增加,而白毛茶中芳樟醇含量显著下降;(*E*)- β -紫罗酮和二氢猕猴桃内酯含量在茯砖茶中先下降后上升,而在白茶中持续下降,而芳樟醇和(*E*)- β -紫罗酮与菌花香组成中的花香香韵直接相关。发花后期,以(*E,E*)-2,4-庚二烯醛为代表的烯醛类化合物在茯砖茶中含量显著高于白茶砖

($P < 0.05$)。这些关键香气化合物在发花过程中调整至恰当的比例从而形成了菌花香。

2.4 金花菌的人工接种固相发花

将经过鉴定的冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)接种到灭菌后的黑毛茶上,按照金花菌的生长过程可以将整个发酵过程分为5个时期(图4),DJ1为无微生物生长期,该时期没有微生物生长的情况,DJ2为营养菌丝生长期,在黑毛茶的表面有少量气生菌丝及少量闭囊壳,DJ3为菌丝生长期,气生菌丝大量生长,茶叶表面出现大量白色菌丝,DJ4为生殖生长期,表面产生大量金黄色闭囊壳,DJ5为发花结束期,金花菌生长完成。

2.5 菌花香组分在单菌发花与传统发花中的动态变化

用同一黑毛茶原料分别进行单菌发花与传统发花,然后使用GC-MS分析菌花香关键香气组分含量的动态变化。由图5可知,挥发物质芳樟醇、1-辛烯-3-醇、己醛、庚醛、苯乙醛、香叶醇、1,4-二甲氧基苯、对甲氧基苯乙酮的含量在发花过程中显著升高,在单菌与传统发花之间无显著差异,表明这些挥发物含量的动态变化可能与金花菌直接相关。(*E,E*)-2,4-庚二烯醛、(*E,E*)-2,4-壬二烯醛、(*E,Z*)-2,6-壬二烯醛、(*E,E*)-2,4-己二烯醛、(*E*)-2-辛烯醛、(*E,E*)-2,4-庚二烯醛、(*E,Z*)-2,6-癸二烯醛、(*E*)-2-壬烯醛、(*Z*)-2-庚烯醛和与菌花香高度相关的(*E,E*)-2,4-庚二烯醛。

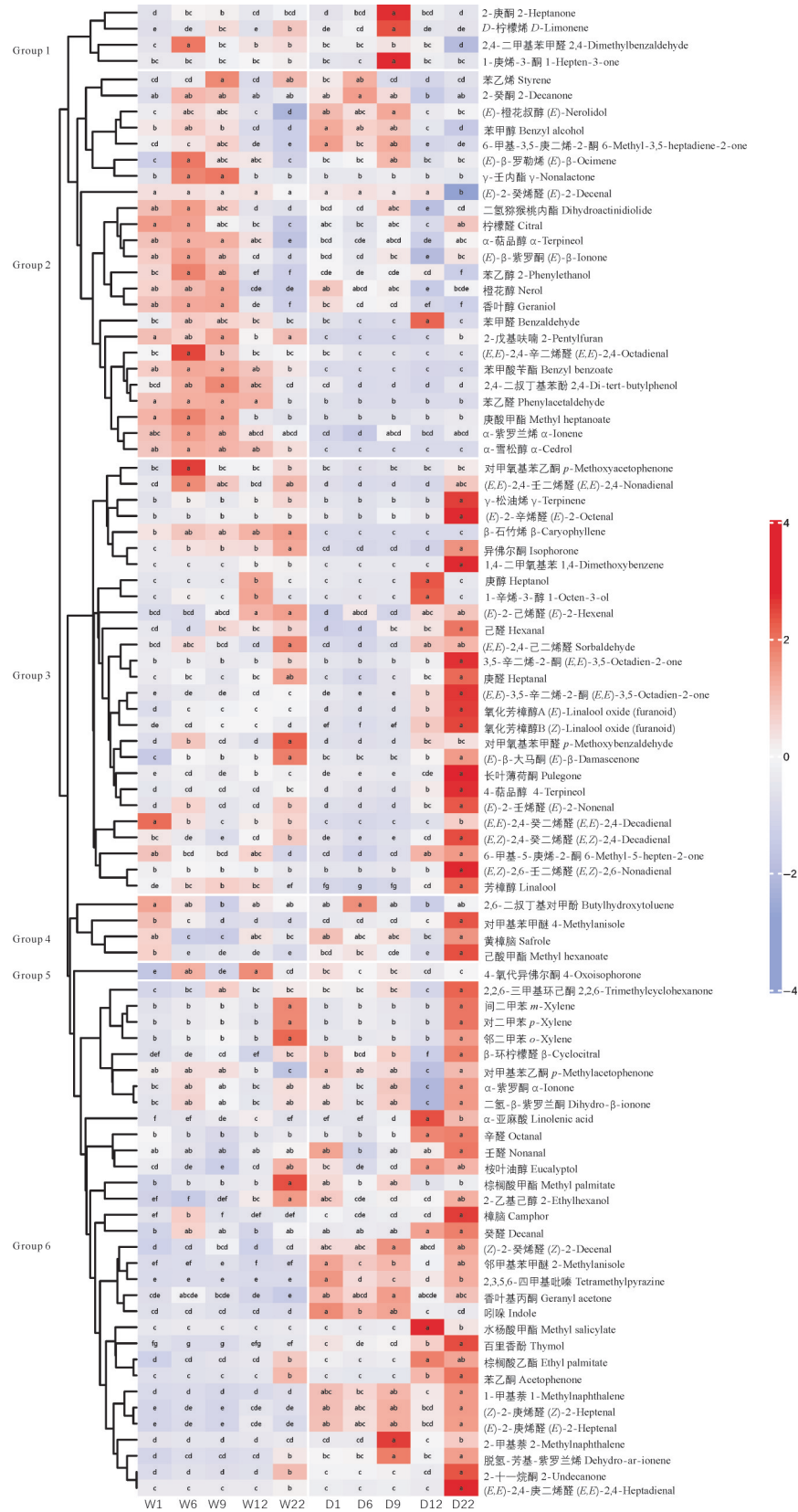


图2 发花过程中的挥发性化合物动态变化

Fig. 2 Dynamics of volatile compounds during flowering

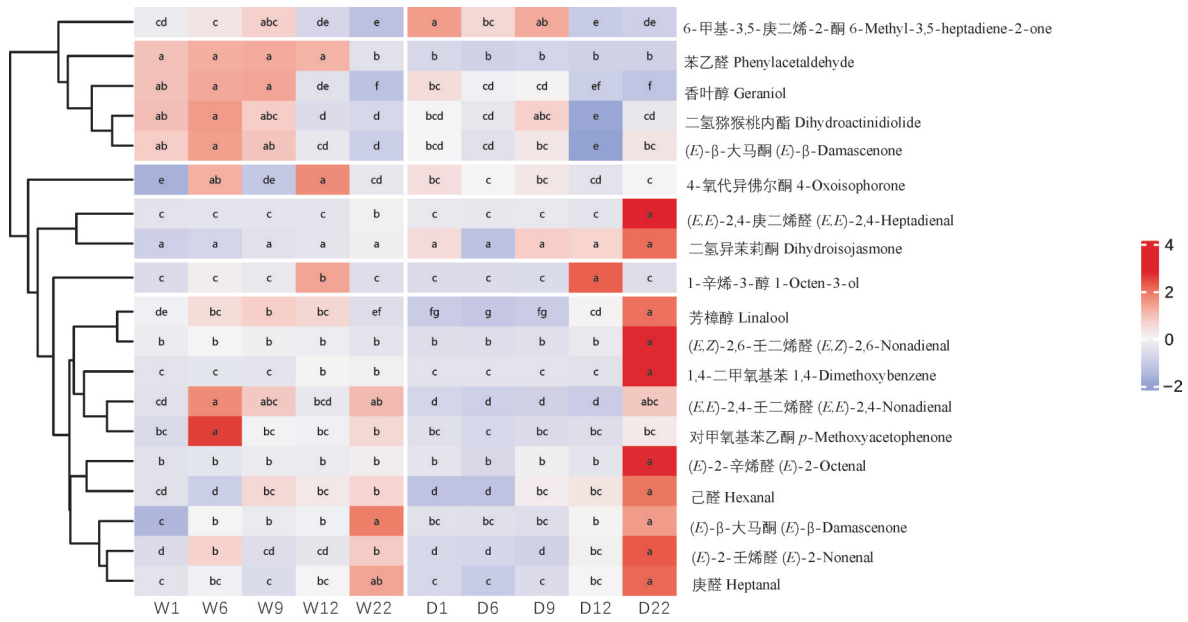


图 3 菌花香关键香气组分在发花过程中的动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of key aroma components of FA during the flowering process



图 4 冠突散囊菌的固相发花过程

Fig. 4 Process of solid phase flowering of *Eurotium cristatum*

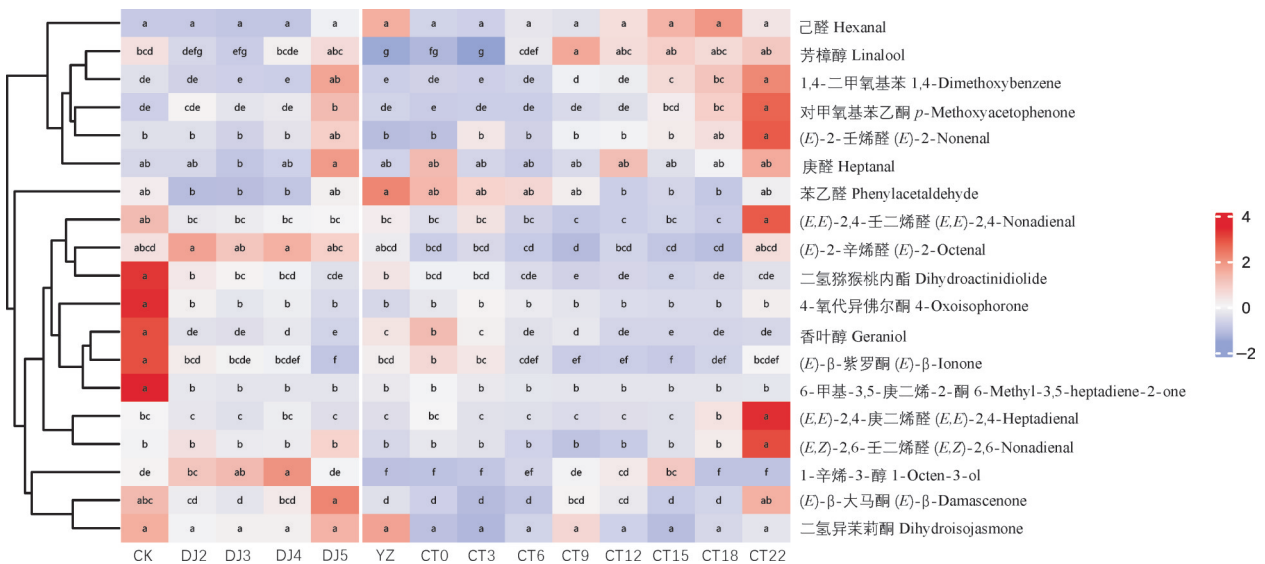


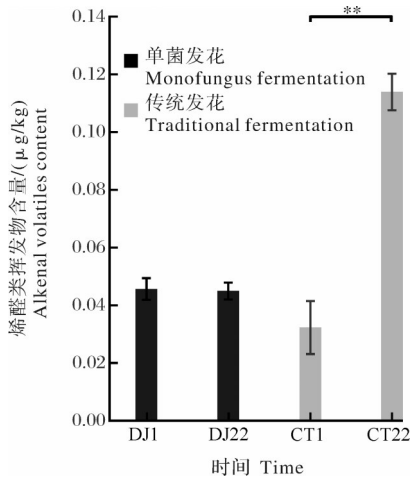
图 5 单菌发花与传统发花菌花香关键成分变化热图

Fig. 5 Heatmap of changes in key components of FA for monofungus and traditional fermentation

-2, 6-壬二烯醛 3种二烯醛处于同一聚类分支,且在传统发花中的含量显著高于单菌发花。

2.6 烯醛类化合物在单菌和传统发花前后的含量变化

由图6可知,烯醛类挥发物含量在单菌发花前后总含量无显著差异,而茯砖茶发花后含量显著升高,表明人工接种单菌发花没有菌花香特征的直接原因可能是烯醛类化合物含量较低。由图7可知,烯醛类含量在传统发花最后阶段显著增加,而单菌发花除了(*E*)-2-壬烯醛、(*E*)-2-辛烯醛外,其他二烯醛类含量并没有显著增加,表明单菌发花模式下,烯醛类组分含量未发生改变,推测二烯醛的合成通路在单菌发花模式下受阻。



DJ1、DJ22为单菌发花第1天和第22天;CT1、CT22为传统发花第1天和第22天。DJ1和DJ22 denote the first and twenty-second days of monofungus fermentation, CT1 and CT22 refer to the first and twenty-second days of the traditional fermentation.

图6 烯醛类挥发物在发花前后的含量变化

Fig. 6 Changes in the content of alkenal volatiles before and after fermentation

2.7 脂肪酸及其衍生物的动态变化

由图8可知,脂肪酸(亚油酸和 α -亚麻酸)及其衍生物在单菌与传统发花中呈现较大的差异,在单菌发花过程中,金花菌会利用脂肪酸作为能量完成自身的合成,使得脂肪酸含量下降,在金花菌快速繁殖进入稳定期后脂肪酸含量逐渐上升;而传统发花却仅在发花第9天脂肪酸含量较高,之后迅速下降。棕榈酸甲酯、棕榈酸乙酯等脂肪酸衍生物在传统发花后期随烘房温度上升含量显著升高,而单菌发花过程中其含量无显著变化。

2.8 单菌发花过程中转录组分析

1)单菌发花的转录组质控分析。为了研究单菌发花条件下冠突散囊菌发酵过程中的基因表达变

化,收集DJ2、DJ3、DJ4样品上的菌丝体,提取RNA,进行高通量Illumina测序,平均产生了7.1G的原始数据,经过原始数据过滤、测序错误率检查、GC含量分布检查,获得后续分析使用的6.96G的clean reads。数据整体测序错误率0.03%,Q20平均值为96.37%,Q30平均值为90.87%,clean reads中GC占4种碱基的百分比为54.58%。超过96%的clean reads被定位于冠突散囊菌基因组(表1),平均94%的基因在基因组中具有唯一位置,仅有平均2.78%的基因比对到基因组多个位置。

对单菌发花过程样品的基因相对表达值(fragments per kilobase million, FPKM)进行了PCA分析,如图9所示,组间样本分散,组内样本聚在一起,结果较为理想。

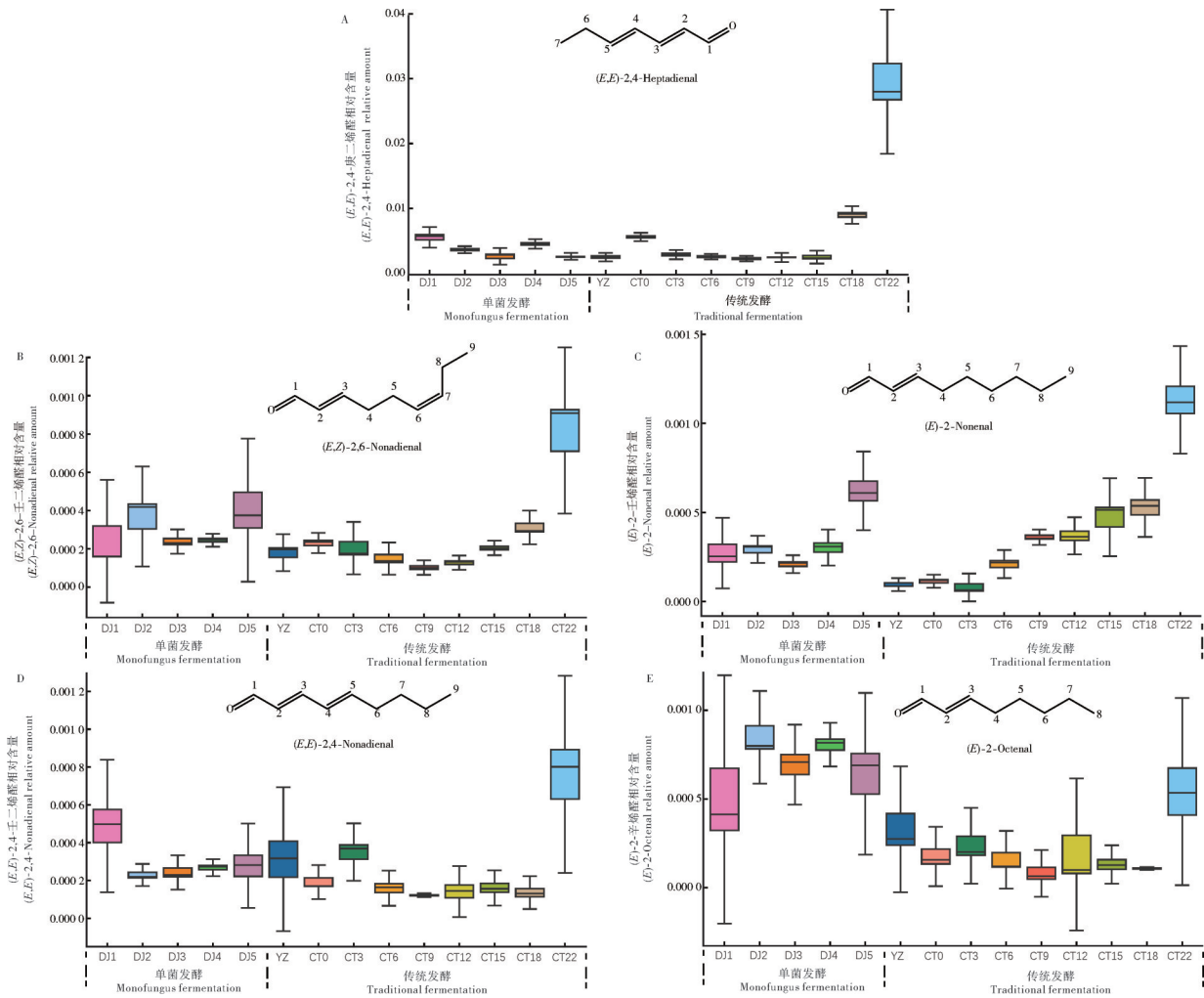
根据各样本所有基因的FPKM值计算组内及组间样本的相关性系数绘制出相关性热图10,组间皮尔逊相关系数的平方(R^2)大于0.92,组内 R^2 大于0.98,表明试验结果可靠、样本选择合理。

2)相关性分析。把脂肪酸数据与脂肪酸代谢相关的基因表达量与脂肪酸含量及脂肪酸前体的菌花香关键香气物质含量进行Spearman相关性分析(图11)。亚麻酸、亚油酸、亚麻酸乙酯的含量与脂肪酸结合蛋白显著正相关,该蛋白参与脂肪酸的储存和代谢。脂肪酰-CoA还原酶与亚油酸甲酯等除十七烷酸甲酯外的脂肪酸及衍生物负相关,其中与亚油酸甲酯显著负相关,该酶参与将脂肪酰-CoA还原为脂肪醇。在单菌发花过程中,脂肪酸结合蛋白含量显著上升与脂肪酰-CoA还原酶含量下降(图12),可能是发花过程中脂肪酸含量升高的原因。

3)KEGG注释。将测序数据进行KEGG注释(图13),脂肪酸相关基因注释在亚油酸代谢通路(ache00591)、 α -亚麻酸代谢通路(ache00592),亚油酸代谢通路中注释到2个脂氧合酶(EC:1.13.11.60, EC:1.13.11.62),而 α -亚麻酸代谢通路的脂氧合酶(EC:1.13.11.12, EC:1.13.11.92)未注释到。

3 讨论

本研究通过改变茶种类以及微生物群体来探究“菌花香”形成的必要条件。通过代谢组学分析茯砖茶和白茶砖发花过程中的菌花香关键香气组分的动态变化,将挥发性化合物聚为6组,有3组挥发性化合物在茯砖茶发花后期含量高于白茶砖,表明该组化合物是在茯砖茶发花过程中生成的,其可能是致



A: (*E,E*)-2,4-庚二烯醛相对含量; B: (*E,Z*)-2,6-壬二烯醛相对含量; C: (*E*)-2-壬烯醛相对含量; D: (*E,E*)-2,4-壬二烯醛相对含量; E: (*E*)-2-辛烯醛相对含量。A: (*E,E*)-2,4-Heptadienal relative amount; B: (*E,Z*)-2,6-Nonadienal relative amount; C: (*E*)-2-Nonenal relative amount; D: (*E,E*)-2,4-Nonadienal relative amount; E: (*E*)-2-Octenal relative amount.

图7 烯醛类菌花香组分在单菌发花与传统发花过程中相对含量的动态变化

Fig. 7 Dynamics of the relative content of FA alkenal components during monofungus and traditional fermentation

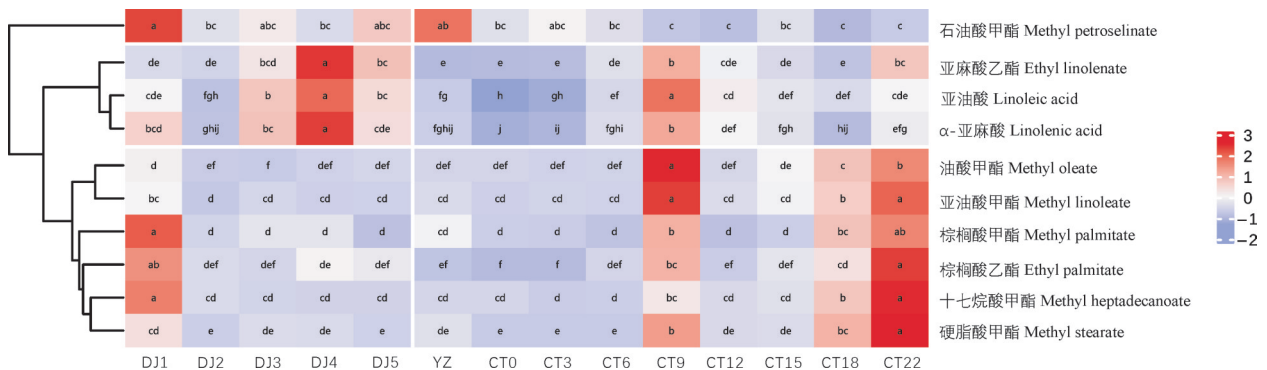


图8 脂肪酸及其衍生物在单菌发花与传统发花中含量的变化

Fig. 8 Dynamics of the content of fatty acids and their derivatives in monofungus and traditional fermentation

使茯砖茶香气与白茶砖香气存在差异的关键香气成分,其中包含与菌花香高度相关的(*E,E*)-2,4-庚二烯醛。2组挥发性化合物在白砖茶中的含量高于茯

砖茶,1组挥发性化合物在茯砖茶发花中期含量显著升高。菌花香关键组分的气味剂在各组中分布,并调整至一个恰当的比例,再通过以烯醛类为主体的

表1 Clean reads与冠突散囊菌基因组比对统计

样本名称 Sample	质控后的 clean reads 数 Total reads	比对到基因组上的 reads 数百分比 Total map	比对到参考基因组 唯一位置的 reads 数 百分比 Unique map	比对到参考基因 组多个位置的 reads 数百分比 Multi map	拆分比对到基因组 上的 reads 数百分比 Splice map	未拆分比对到基因 组上的 reads 数 百分比 Unsplice map
DJ2_1	45 001 996	96.87	94.05	2.82	19.06	75.00
DJ2_2	45 618 778	97.12	94.21	2.92	19.60	74.60
DJ2_3	46 804 646	96.83	93.77	3.06	19.90	73.86
DJ3_1	46 900 958	96.70	94.06	2.64	21.73	72.33
DJ3_2	50 014 412	97.08	94.30	2.78	19.62	74.68
DJ3_3	46 819 590	96.54	93.89	2.64	19.66	74.24
DJ4_1	44 986 486	96.53	93.84	2.68	20.22	73.63
DJ4_2	46 444 246	96.52	93.80	2.72	18.97	74.83
DJ4_3	45 303 812	96.74	93.95	2.79	19.54	74.41

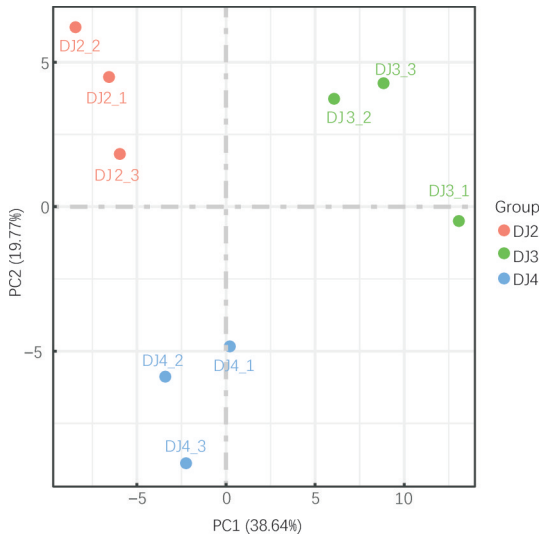


图9 样本基因表达值的PCA图

Fig. 9 PCA plot of sample gene expression values

气味剂相互作用而形成的。过高或过低的组分比例都不能使茶叶呈现对应香气特征,这与刘飞等^[16]在红茶中的研究一致。

本研究发现单菌发花与传统发花模式下的烯醛类挥发物含量存在显著差异。茯砖茶在传统发花后期,烯醛类化合物含量急剧上升,而单菌发花过程中,并未出现类似的烯醛类化合物大量积累的现象,故而缺乏菌花香特征。蒋容港等^[17]以茯砖茶分离出的金花菌体与去金花纯茶为研究材料探究发花过程中挥发性化合物含量,结果显示,去金花纯茶中烯醛类物质含量较高,与本研究传统发花模式下的结论相同。相关研究发现,茯砖茶发花过程中,随着冠突散囊菌的生长繁殖,茶叶中的挥发性物质种类和含量会发生显著变化。在发花前期,茶叶中以青辛气等挥发性物质为主;而到了发花后期,随着冠突散

囊菌代谢活动的增强,烯醛类等挥发性物质逐渐增多,“菌花香”也愈发浓郁^[18]。对于单菌发花后期烯醛类化合物的减少,可能是由于代谢通路的受阻所致。相关研究表明,烯醛类化合物的前体是不饱和脂肪酸类。本研究进一步发现,单菌发花进程中,不饱和脂肪酸类呈现积累态势,这可能是单菌发花茯茶缺乏菌花香特征的原因^[19]。

本研究对单菌发花的样本进行了转录组测序。发现超过96%的clean reads被定位于冠突散囊菌基因组,平均94%的基因在基因组中具有唯一位置。冠突散囊菌利用环境中的脂肪作为碳源,其中甘油酯代谢途径主要是三酰甘油在脂肪酶(ACHE_30971A)的作用下分解为一酰甘油和两分子脂肪酸^[20-21]。脂肪酸降解通路主要涉及脂肪酸的 β -氧化过程,同时,脂肪酸在脂肪酰-CoA还原酶的作用下转变为脂肪醇。脂肪酸生物合成与脂肪酸代谢过程主要是脂肪酸的从头合成过程,合成的脂肪酸可以进入脂肪酸延伸通路进一步延长碳链^[22]。相关研究显示,相较于糖类,真菌更适合以脂肪酸作为碳源^[23]。本研究的结果表明,发花后期,冠突散囊菌对脂肪酸的消耗下降,脂肪酸结合蛋白表达量上升,导致脂肪酸含量的增加。值得注意的是,冠突散囊菌的 α -亚麻酸代谢通路(ache00592)中没有注释脂氧合酶(lipoxygenase, LOX),而亚油酸代谢通路(ache00591)中注释到了脂氧合酶(1.13.11.60, 1.13.11.62)。前人研究表明亚油酸可以通过LOX氧化产生己醛与壬烯醛等饱和醛与单不饱和醛^[24-25]。以上结果表明,冠突散囊菌不能通过LOX氧化途径产生双不饱和醛。这可能是(*E,E*)-2, 4-庚二烯醛、(*E,E*)-2, 4-壬二烯醛在单菌发

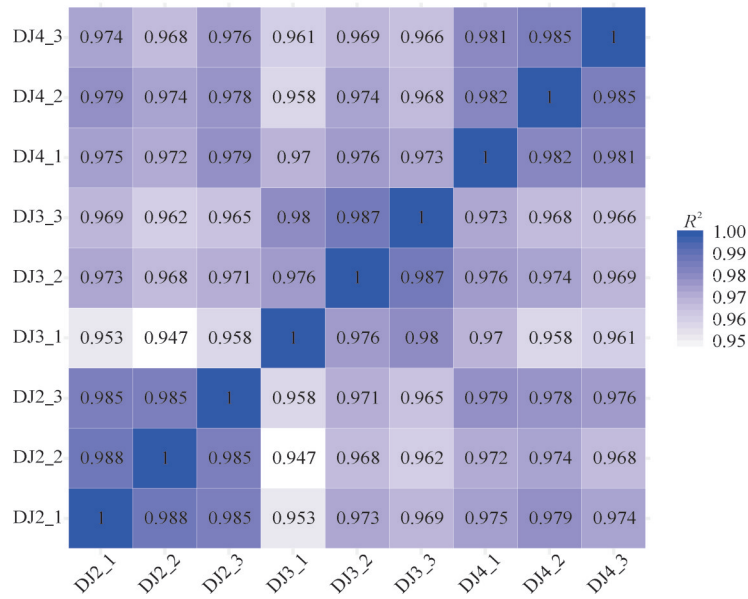


图 10 单菌发花基因表达水平相关性热图

Fig. 10 Correlation of gene expression level of monofungus fermentation samples

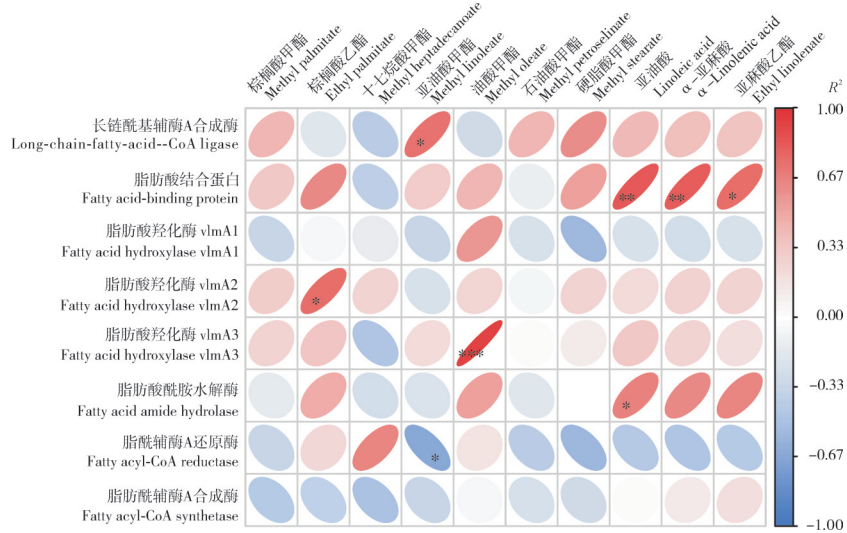


图 11 脂肪酸含量与脂肪酸相关基因表达水平的相关性

Fig. 11 Correlation of gene expression level of monofungus fermentation samples

花中含量显著低于传统发花的原因。

综合表明,菌花香的形成是由黑毛茶的基础香气加上散囊菌菌群协同发酵所形成的,二者缺一不可。冠突散囊菌在发花过程中产生不饱和脂肪酸,这为(*E,E*)-2,4-庚二烯醛为主的烯醛类化合物的生成奠定了物质基础。在传统发花的复杂环境中,有可能存在不同于冠突散囊菌的其他微生物,它们能够将冠突散囊菌产生的不饱和脂肪酸转化为双不饱和醛类挥发物,形成菌花香。本研究尚未定位到该未知微生物,在后期的研究中将用宏转录组等方法开展进一步研究。

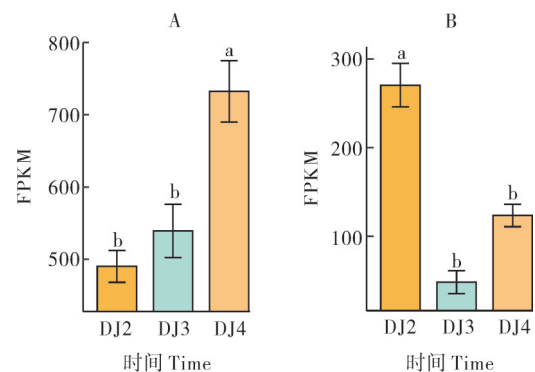


图 12 脂肪酸结合蛋白(A)与脂肪酰-CoA还原酶(B)表达量

Fig. 12 Express of fatty acid binding protein(A) and fatty acyl-CoA reductase(B)

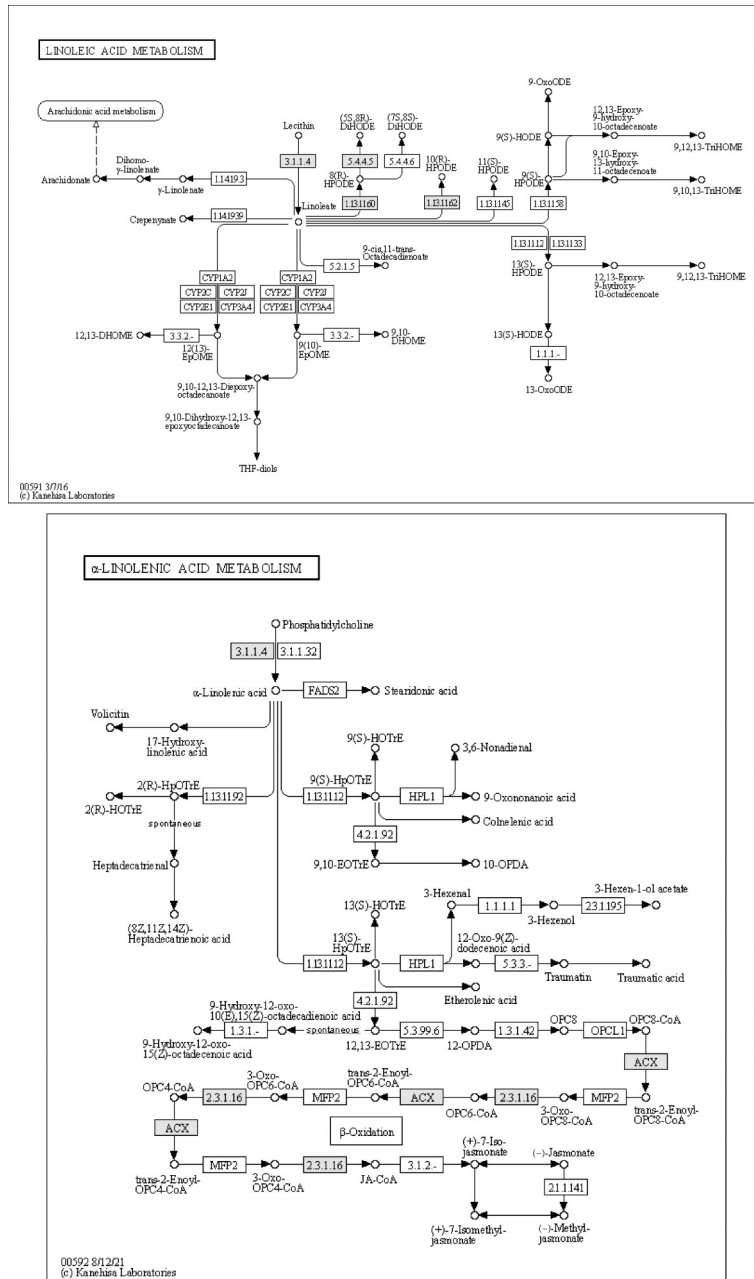


图 13 亚油酸代谢通路(ache00591)与 α -亚麻酸代谢通路(ache00592)KEGG注释
 Fig. 13 KEGG annotation of linoleic acid metabolic pathway (ache00591) and α -linolenic acid metabolic pathway (ache00592)

参考文献 References

[1] LIN F J, WEI X L, LIU H Y, et al. State-of-the-art review of dark tea: from chemistry to health benefits[J]. Trends in food science & technology, 2021, 109: 126-138.
 [2] 柯菀萍, 刘振云, 李孟华, 等. 陈年茯砖茶对高脂血症小鼠的调脂作用[J]. 茶叶科学, 2024, 44(4): 683-693. KE W P, LIU Z Y, LI M H, et al. Alleviative effects of aged Fuzhuan brick tea on lipid metabolism in hyperlipidemic mice [J]. Journal of tea science, 2024, 44(4): 683-693 (in Chinese with English ab-

stract).
 [3] ZHOU X L, GE B G, ZHANG X W, et al. Metabolomics analysis reveals the effects of compound Fuzhuan brick tea (CFBT) on regulating dyslipidemia and metabolic disorders in mice induced by high-fat diet [J/OL]. Nutrients, 2022, 14(6): 1128[2025-07-23]. https://doi.org/10.3390/nu14061128.
 [4] 张亚, 黄亚亚, 梁艳, 等. 黑茶渥堆工艺研究进展[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 216-220. ZHANG Y, HUANG Y Y, LIANG Y, et al. Research progress on pile-fermentation of dark tea [J]. Food & machinery, 2017, 33(3): 216-220 (in Chinese with English abstract).

- [5] 刘石泉,赵运林,胡治远. DGGE法初步解析茯砖茶发花过程中真菌群落结构[J]. 生态学杂志, 2014, 33(10): 2687-2693. LIU S Q, ZHAO Y L, HU Z Y. Analysis of fungal community structure during the Fahua-fermentation process of Fuzhuan brick tea by DGGE technology[J]. Chinese journal of ecology, 2014, 33(10): 2687-2693 (in Chinese with English abstract).
- [6] 刘石泉,胡治远,赵运林. 基于DGGE技术的茯砖茶发花过程细菌群变化分析[J]. 生态学报, 2014, 34(11): 3007-3015. LIU S Q, HU Z Y, ZHAO Y L. Analysis of bacterial flora during the fahua-fermentation process of Fuzhuan brick tea production based on DGGE technology[J]. Acta ecologica sinica, 2014, 34(11): 3007-3015 (in Chinese with English abstract).
- [7] 姚衡斌,马敬宜,冯瀚瀚,等. 基于微生物组扩增子ITS的茯砖茶发花特征真菌菌群演替规律分析[J]. 中国食品学报, 2023, 23(1): 306-317. YAO H B, MA J Y, FENG H H, et al. Analysis on the evolutionary changes of fungus fermentation with the characteristics of Fuzhuan brick tea based on microbiome amplicator ITS[J]. Journal of Chinese institute of food science and technology, 2023, 23(1): 306-317 (in Chinese with English abstract).
- [8] 陈国和,胡腾飞,谢贺,等. 普洱茶与茯砖茶风味轮的构建及应用[J]. 茶叶科学, 2023, 43(5): 631-644. CHEN G H, HU T F, XIE H, et al. Construction of flavor wheel and quantitative sensory description analysis of Pu'er tea and Fuzhuan brick tea[J]. Journal of tea science, 2023, 43(5): 631-644 (in Chinese with English abstract).
- [9] 马雪妮,丁小维,张李旭,等. 一株“金花”菌的分离鉴定及其发酵茶叶研究[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(7): 293-299. MA X N, DING X W, ZHANG L X, et al. Isolation and identification of a “golden flower” fungus (*Aspergillus cristatus*) and study on tea leaves fermented by the fungus[J]. Food and fermentation industries, 2025, 51(7): 293-299 (in Chinese with English abstract).
- [10] ZHAO R L, YAO H B, HOU Z Y, et al. Sensomics-assisted analysis unravels the formation of the fungus aroma of Fuzhuan brick tea [J/OL]. Food chemistry, 2024, 458: 140174 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140174>.
- [11] 马敬宜,姚衡斌,周琼琼,等. 复合光源萎凋对信阳红茶品质的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(9): 192-201. MA J Y, YAO H B, ZHOU Q Q, et al. Effects of compound light source withering on the quality of Xinyang black tea [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(9): 192-201 (in Chinese with English abstract).
- [12] 侯艳. 普洱茶和茶褐素调节小鼠“菌-肠-肝-脑”轴缓解代谢综合征的作用机制研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2023. HOU Y. Study on the mechanism of Pu'er tea and theabrownin regulating the “bacteria-intestine-liver-brain” axis in mice to alleviate metabolic syndrome [D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2023 (in Chinese with English abstract).
- [13] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq [J]. Nature methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [14] GARBER M, GRABHERR M G, GUTTMAN M, et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq [J]. Nature methods, 2011, 8(6): 469-477.
- [15] KANEHISA M, GOTO S. KEGG Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. Nucleic acids research, 2000, 28(1): 27-30.
- [16] 刘飞,王云,张厅,等. 红茶加工过程香气变化研究进展[J]. 茶叶科学, 2018, 38(1): 9-19. LIU F, WANG Y, ZHANG T, et al. Review on aroma change during black tea processing [J]. Journal of tea science, 2018, 38(1): 9-19 (in Chinese with English abstract).
- [17] 蒋容港,黄燕,金友兰,等. 茯砖茶呈香挥发性物质及其来源[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(9): 101-111. JIANG R G, HUANG Y, JIN Y L, et al. Study of aroma compounds and their source in Fuzhuan brick tea [J]. Journal of food science and biotechnology, 2021, 40(9): 101-111 (in Chinese with English abstract).
- [18] 李俊杰,徐元昊,陈梦娟,等. 手筑茯砖茶加工过程中挥发性组分变化分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 144-154. LI J J, XU Y H, CHEN M J, et al. Analysis of changes in volatile components during processing of handmade Fuzhuan brick tea [J]. Food science, 2020, 41(24): 144-154 (in Chinese with English abstract).
- [19] HO C T, ZHENG X, LI S M. Tea aroma formation [J]. Food science and human wellness, 2015, 4(1): 9-27.
- [20] 任鸿宇,张宁,韩晓玉,等. 茶叶培养基对海洋冠突散囊菌代谢途径的调控[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4181-4194. REN H Y, ZHANG N, HAN X Y, et al. Regulation of metabolic pathways of ocean originated *Eurotium cristatum* by tea leaf medium [J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4181-4194 (in Chinese with English abstract).
- [21] 罗密,俞梦瑶,禹利君,等. 冠突散囊菌LJSC.2001对不同黑毛茶发花品质的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(14): 106-115. LUO M, YU M Y, YU L J, et al. Effect of fermentation by *Eurotium cristatum* LJSC. 2001 on the fermentation quality of raw dark tea made from different varieties [J]. Food science, 2023, 44(14): 106-115 (in Chinese with English abstract).
- [22] 王青,王伊秀,李越男,等. 高、低Cd积累小麦对Cd胁迫的转录组学响应差异[J]. 作物学报, 2025, 51(5): 1230-1247. WANG Q, WANG Y X, LI Y N, et al. Differences in transcriptomic responses to cadmium stress in high/low-Cd-accumulation wheat [J]. Acta agronomica sinica, 2025, 51(5): 1230-1247 (in Chinese with English abstract).
- [23] JIANG Y N, WANG W X, XIE Q J, et al. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi [J]. Science, 2017, 356(6343): 1172-1175.
- [24] CHEN Q C, ZHU Y, LIU Y F, et al. Black tea aroma formation during the fermentation period [J/OL]. Food chemistry, 2022, 374: 131640 [2025-07-23]. <https://doi.org/10.1016/j>

foodchem.2021.131640.

[25] 梅江. 油脂氧化过程中氧化 α, β 不饱和醛等挥发物形成规律的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016. MEI J. Study on the forma-

tion law of volatile compounds such as oxidized α, β unsaturated aldehydes during oil oxidation [D]. Nanchang: Nanchang University, 2016 (in Chinese with English abstract).

Analyzing the mechanism of forming the characteristic “fungus aroma” in Fuzhuan brick tea with multi-omics technologies

ZHAO Renliang¹, WANG Yafei¹, YAO Hengbin¹, GUO Junqi¹,
XIA Yao¹, JIA Zilu¹, SU Hui¹, ZHOU Qiongqiong¹, CHEN Zhen²

1. College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract Fresh leaves from ‘Subei Zhong’ were used to make Fuzhuan brick tea and white brick tea to analyze the mechanism of forming the characteristic “fungus aroma” in Fuzhuan brick tea. Artificial inoculation with *Eurotium cristatum* was conducted under two conditions including monofungus fermentation by artificial inoculation (inoculated only with *E. cristatum*) and traditional fermentation. Metabolomics was used to analyze the dynamic changes in key aroma compounds associated with the characteristic “fungus aroma”. The gene expression profile of *E. cristatum* during the process of monofungus fermentation was further studied by combining with transcriptomics. The results of analysis with metabolomics showed that the level of (*E, E*)-2, 4-heptadienal (*E, E*)-2, 4-nonadienal, (*E, Z*)-2, 6-nonadienal and other key alkenal compounds that contribute to the formation of fungal aroma in Fuzhuan brick tea was significantly higher than that in white brick tea. The content of alkenal compounds significantly increased at the later stage of traditional fermentation, while the content of unsaturated fatty acids, the precursor substances of alkenal compounds, increased at the later stage of monofungus fermentation. The reason may be that the metabolic pathway for producing alkenal compounds is inhibited during the process of fermentation. The results of sequencing transcriptome showed that more than 96% of clean reads were identified in the genome of *E. cristatum*, with an average of 94% of the genes having unique locations in the genome. The results of annotation analysis showed that fatty acid-related genes serving as carbon sources for *E. cristatum* were enriched in the linoleic acid and alpha-linolenic acid metabolic pathways, and the linoleic acid metabolic pathway was annotated into two lipoxygenases. The lipoxygenase corresponding to the alpha-linolenic acid metabolic pathway was not annotated. Fatty acid consumption was reduced, leading to their accumulation during the process of fermentation with *E. cristatum*. Moreover, the alpha-linolenic acid metabolic pathway in *E. cristatum* was not annotated with lipoxygenase, indicating that this fungus cannot produce di-unsaturated aldehydes via the lipoxygenase oxidation pathway. This explain why the level of (*E, E*)-2, 4-heptadienal and (*E, E*)-2, 4-nonadienal in the tea of monofungus fermentation was significantly lower than that in traditionally fermented tea. Therefore, monofungus fermentation alone fails to develop the characteristic “fungus aroma”. There may be signal transmission and substance exchange among other microorganisms in the complex environment of traditional fermentation, which work together to ferment and convert unsaturated fatty acids into volatile alkenal compounds by *E. cristatum*. It is indicated that the formation of characteristic “fungus aroma” is achieved through the synergistic fermentation of the basic aroma of raw dark tea and the microbial community mainly composed of *E. cristatum*.

Keywords Fuzhuan brick tea; fungus aroma; alkenal compound; synthetic pathway; multi-omics

(责任编辑: 葛晓霞)