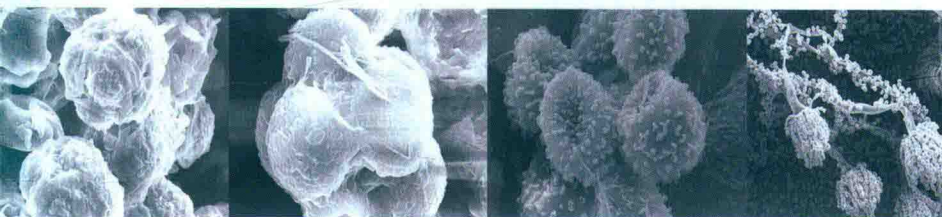


茯砖茶优势金花菌及相关 发酵微生物多样性研究

FUZHUANCHA YOUSHI JINHUAJUN JI XIANGGUAN
FAJIAO WEISHENGWU DUOYANGXING YANJIU

刘石泉 著



中南大学出版社
www.csupress.com.cn

茯砖茶优势金花菌及相关 发酵微生物多样性研究

刘石泉 著



中南大学出版社
www.csupress.com.cn

· 长 沙 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

茯砖茶优势金花菌及相关发酵微生物多样性研究 /
刘石泉著. --长沙: 中南大学出版社, 2017. 8

ISBN 978 - 7 - 5487 - 2983 - 9

I. ①茯… II. ①刘… III. ①茯砖茶—研究 IV. ①TS272. 5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 222575 号

茯砖茶优势金花菌及相关发酵微生物多样性研究

刘石泉 著

☐责任编辑 刘锦伟

☐责任印制 易红卫

☐出版发行 中南大学出版社

社址: 长沙市麓山南路

邮编: 410083

发行科电话: 0731 - 88876770

传真: 0731 - 88710482

☐印 装 长沙印通印刷有限公司

☐开 本 880 × 1230 1/32 ☐印张 7 ☐字数 181 千字

☐版 次 2017 年 8 月第 1 版 ☐2017 年 8 月第 1 次印刷

☐书 号 ISBN 978 - 7 - 5487 - 2983 - 9

☐定 价 36.00 元

图书出现印装问题, 请与经销商调换



前言

茯砖茶是黑茶中的一种，金花灿然，菌香浓郁，冲以沸水，汤色橙黄明亮，滋味醇厚，回味绵长。其独具消食健胃、降脂消滞、软化血管、平衡阴阳之神奇功效。千百年来，茯砖茶被牧民视为珍宝，被誉为“古丝绸之路上的神秘之茶、西北各民族的生命之茶”。在中国西北地区有“宁可三日无粮，不可一日无茶”“一日无茶则滞，三日无茶则病”之说。

《本草纲目拾遗》中记述，安化茶又称湖茶、茯砖茶，粗梗大叶，须以水煎，或滚汤冲入壶内，再次火温之，始出味，其色浓黑，苦味带甘，食之清神和胃，强身延年。《本草求真》则记载陈年茯砖茶有“消宿食”“消饮食”“消积食”“消腥肉之食，解青稞之热”“解酒食之毒”“养脾、食饱最宜”等功能。据《明史·茶法》记载，早在明嘉靖三年即1524年，茯砖茶就被规定为运往西北少数民族所需的官茶，已成为我国西北地区各少数民族居民的生活必需品。

正因为茯砖茶独特保健功效的高社会认可度，时至今日，昔日的边销茶已悄然成为国内外市场的热捧对象，其发展势头十分强劲。

2007年，因一个偶然的机缘我开始接触茯砖茶，通过博士生导师刘仲华教授、赵运林教授的引领，我走上了茯砖茶的研究之路，与茯砖茶结下了深厚的情缘，先后在黑茶发酵工艺与质量控制关键技术湖南省高校产学研合作示范基地、黑茶发酵及功能成分提取技术湖南省应用基础研究基地、黑茶湖南省校企合作人才

培养基地、黑茶加工技术及活性功能成分应用研发湖南省高校科技创新团队、黑茶金花湖南省重点实验室等各级政府平台的支持下，我一直从事茯砖茶研究。

茯砖茶是一种“特殊”的黑茶，其特殊之处在于其发酵工艺，成品茯砖茶需要经过渥堆和发花二次发酵工艺，制作过程中茶叶内成分的生化变化最为复杂，是红茶、绿茶、青茶、黄茶、白茶等其他茶类远远不可比拟的，茯砖茶的保健功效如此突出，显然与发酵过程中的茶叶内成分的生化变化密切相关。

茯砖茶优势金花菌及相关发酵微生物多样性研究，是我们关注茯砖茶微生物作用近 10 年来对茯砖茶发酵微生物初步研究的积累。

研究茯砖茶渥堆、发花过程中微生物，特别是对其发酵中优势微生物金花菌及相关发酵微生物的种类、群落结构、代谢活动等开展深入研究，能充分发挥微生物的发酵功能，充分发挥原料潜力，提高渥堆、发花的效率，将茯砖茶制造技术提高到一个新的技术水平。

本书从茯砖茶优势金花菌鉴定研究，茯砖茶发酵微生物种类多样性研究，茯砖茶渥堆、发花发酵过程中微生物群落动态结构研究这几方面，对茯砖茶优势金花菌及相关发酵微生物多样性研究进行了简要总结。除书中已标注引用的相关成果外，其研究成果都是黑茶研发团队集体智慧的结晶，感谢黑茶研发团队每名成员的辛劳和智慧！同时也希望我们黑茶研发团队在茯砖茶相关研究方面能取得更多的突破性进展。

由于涉足茯砖茶研究时间不长，水平有限，经验不足，难免有不妥甚至错误之处，敬请同行批评指正！

刘石泉

2017 年 8 月 15 日

湖南城市学院



目 录

第1章 绪 论	(1)
1.1 茯砖茶发酵微生物种类鉴定研究	(2)
1.2 茯砖茶发酵微生物种类多样性研究	(3)
1.3 茯砖茶发酵微生物群落结构研究	(4)
第2章 茯砖茶茶叶品质和保健功能与发酵微生物研究 ...	(8)
2.1 金花菌与茯砖茶品质	(9)
2.1.1 胞外酶对茶叶中纤维素的影响	(9)
2.1.2 对色泽的影响	(10)
2.1.3 对风味的影响	(11)
2.2 茯砖茶的保健功能	(12)
2.3 展望	(14)
第3章 黑茶中微生物群落结构和多样性研究方法	(18)
3.1 黑茶中的微生物研究现状	(19)
3.1.1 黑茶加工中微生物的种类	(19)
3.1.2 黑茶中主要优势菌的作用研究	(20)
3.2 微生物类群多样性研究法	(21)
3.2.1 培养基培养分离方法	(21)
3.2.2 群落水平生理学指纹法	(21)
3.2.3 生物标记物法	(22)

2 ■■■ 茯砖茶优势金花菌及相关发酵微生物多样性研究

3.2.4	现代分子生物学法	(22)
3.3	关于黑茶发酵微生物群落结构和多样性研究的思考	(24)
3.3.1	研究对象的零碎性	(24)
3.3.2	研究对象的片面性	(25)
3.3.3	研究手段的单一性	(25)
第4章	湘益牌茯砖茶真菌分离与鉴定初步研究	(29)
4.1	材料与方法	(30)
4.1.1	实验材料	(30)
4.1.2	试剂仪器	(30)
4.1.3	实验方法	(30)
4.2	结果与分析	(31)
4.2.1	真菌分离与计数	(31)
4.2.2	分子生物学鉴定	(32)
4.2.3	平板形态特征鉴定	(33)
4.2.4	显微形态鉴定	(36)
4.3	结论	(37)
第5章	不同品种茯砖茶中优势微生物的分离鉴定	(41)
5.1	材料与方法	(42)
5.1.1	实验材料	(42)
5.1.2	实验方法	(43)
5.2	结果与分析	(44)
5.3	结论	(49)
第6章	茯砖茶中两种产生“金花”的曲霉菌	(52)
6.1	材料与方法	(53)



6.1.1	材料	(53)
6.1.2	形态观察	(54)
6.1.3	基因扩增	(54)
6.1.4	系统发育树构建	(55)
6.2	结果与分析	(56)
6.2.1	形态特征	(56)
6.2.2	多基因鉴定	(61)
6.2.3	鉴定结果	(61)
6.3	结论	(62)

第7章 不同品种茯砖茶优势金花菌形态学多样性研究 (67)

7.1	材料与方法	(68)
7.1.1	实验材料	(68)
7.1.2	实验方法	(71)
7.2	结果与分析	(72)
7.2.1	菌株形态特征	(72)
7.2.2	菌株分型特点	(76)
7.3	结论	(81)

第8章 基于形态学与 ITS 序列对冠突散囊菌多样性研究

		(84)
8.1	材料与方法	(85)
8.1.1	实验材料	(85)
8.1.2	实验方法	(85)
8.2	结果与分析	(88)
8.2.1	形态学鉴定	(88)
8.2.2	菌株间的拮抗作用	(91)
8.2.3	ITS 区域的 PCR 扩增	(92)

4 ■■■ 茯砖茶优势金花菌及相关发酵微生物多样性研究

8.2.4	ITS 序列分析	(93)
8.2.5	ITS 聚类分析	(94)
8.3	结论	(95)
第 9 章 冠状散囊菌基因组 DNA 提取方法比较研究		(98)
9.1	材料与方法	(99)
9.1.1	实验材料	(99)
9.1.2	实验方法	(101)
9.1.3	质量检测	(103)
9.2	结果与讨论	(104)
9.2.1	电泳检测冠状散囊菌基因组 DNA	(104)
9.2.2	DNA 浓度、纯度比较	(105)
9.2.3	ITS 序列 PCR 检测	(106)
9.3	结论	(107)
第 10 章 茯砖茶优势金花菌多样性 RAPD 分析		(113)
10.1	材料与方法	(114)
10.1.1	实验材料	(114)
10.1.2	实验方法	(115)
10.2	结果与分析	(116)
10.2.1	DNA 提取	(116)
10.2.2	体系优化和引物筛选	(117)
10.2.3	金花优势菌遗传差异性	(117)
10.3	结论	(120)
第 11 章 茯砖茶生产过程中微生物动态变化及优势菌鉴定		(123)
11.1	材料与方法	(124)



11.1.1	实验材料	(124)
11.1.2	培养基的选择	(124)
11.1.3	实验方法	(124)
11.2	结果与分析	(126)
11.2.1	茯砖茶加工过程中的微生物变化与分析	(126)
11.2.2	金花菌的特征与分析鉴定	(129)
11.3	结论	(131)

第 12 章 DGGE 法解析茯砖茶渥堆发酵过程中细菌群落结构

		(134)
12.1	材料与方法	(135)
12.1.1	材料	(135)
12.1.2	方法	(136)
12.2	结果与分析	(138)
12.2.1	样本基因组 DNA 提取	(138)
12.2.2	细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增	(139)
12.2.3	PCR 产物变性梯度凝胶电泳	(140)
12.2.4	DGGE 凝胶条带回收测序及序列分析	(143)
12.3	结论	(148)

第 13 章 基于 DGGE 技术的茯砖茶发花过程细菌群分析

		(152)
13.1	材料与方法	(153)
13.1.1	材料	(153)
13.1.2	方法	(154)
13.2	结果与分析	(156)

13.2.1	样本基因组 DNA 提取	(156)
13.2.2	细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增	(156)
13.2.3	PCR 产物的 DGGE 分析	(156)
13.2.4	DGGE 凝胶条带回收测序及序列分析	(160)
13.3	结论	(165)
第 14 章 DGGE 法初步分析茯砖茶渥堆发酵过程中真菌群落结构		
(169)		
14.1	材料与方法	(170)
14.1.1	材料	(170)
14.1.2	方法	(171)
14.2	结果与分析	(173)
14.2.1	样本基因组 DNA 提取	(173)
14.2.2	真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增结果	(173)
14.2.3	PCR 产物的 DGGE 分析	(174)
14.2.4	DGGE 凝胶条带回收测序及序列分析	(177)
14.3	结论	(182)
第 15 章 DGGE 法解析茯砖茶发花过程中真菌群落结构		
(186)		
15.1	材料与方法	(187)
15.1.1	材料	(187)
15.1.2	方法	(188)
15.2	结果与分析	(191)
15.2.1	样本基因组 DNA 提取	(191)
15.2.2	真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增	(191)



15.2.3	PCR 产物 DGGE 分析	(191)
15.2.4	DGGE 凝胶条带回收测序及序列分析	(195)
15.3	结论	(200)
附 录		(203)
附录 1	缩略词符号一览	(203)
附录 2	作者主持黑茶相关科研项目支持一览	(205)
附录 3	作者发表黑茶相关论文与专著一览	(207)
附录 4	作者所获黑茶相关主要奖项一览	(210)
附录 5	作者发表黑茶相关专利一览	(212)

第1章 绪论

茯砖茶始于陕西之泾阳，原称“泾阳砖”，因历史上长期以来是以湖南安化黑毛茶用篾篓包运至泾阳加工的，又称“湖砖”。至于泾阳茯砖茶始于何时，尚无文字考证。据《明会典》载：“明武宗正德十年(1515年)海年招马，蕃人不辨秤衡，止订篾中马，篾大则官亏，小则商病，令酌为中制，每千斤定三百三十篾，以六斤四两为准，正茶三斤篾绳三斤。”很明显这是指散茶，至1630年(明思宗崇祯三年)，有资料记载：“是时西北边销茶已基本使用安化黑茶，先在陕泾阳制成茯砖茶每封旧秤五斤，二封装篾，十篾为一引。”由此推测茯砖茶的诞生可能在1515年至1630年的百年之间。

茯砖茶以助消化、解油腻、顺肠胃、降压、降脂、减肥、软化人体血管、抗氧化、延缓衰老、延年益寿等多种保健功能在茶叶大家庭中获得了世人的青睐。随着人们生活饮食结构的改变，高血压、高血糖、糖尿病、肥胖等富贵病的发病率有明显上升趋势，化学药物治疗的不可根治性弊端日渐显现，人类迫切需要寻找新的高效绿色治疗替代方法。茯砖茶保健功效的实证，正迎合了用天然药物活性成分来实现绿色、有效、持久稳定的现代医学的发展趋势，这也是茯砖茶由原来的边销茶逐渐转入内地市场，受到内地热捧的主要原因之一。

茯砖茶保健功效与茯砖茶独特的发酵工艺是密不可分的，发



酵的质量、保健功效的实现都与发酵微生物有着紧密联系,从2007年茯砖茶有内地消费市场开始,10年来我们先后在黑茶发酵工艺与质量控制关键技术湖南省高校产学研合作示范基地、黑茶发酵及功能成分提取技术湖南省应用基础研究基地、黑茶湖南省校企合作人才培养基地、黑茶加工技术及活性功能成分应用研发湖南省高校科技创新团队、黑茶金花湖南省重点实验室等各级政府平台的支持下,一直从事茯砖茶品质、功效与发酵微生物的种类鉴定、多样性,细菌和真菌动态群落结构等方面的系列研究。

1.1 茯砖茶发酵微生物种类鉴定研究

采用平板梯度稀释法对金湘益特制礼品茯砖茶中真菌进行了分离纯化和计数,获得2031、2401、3302、4304、5402这5株菌株,其中5402为优势菌,达 4.97×10^6 个/g茶样,其余为非优势菌,数目相对较少。运用18S rDNA片段序列进行同源比对,结合形态学鉴定方法对其进行鉴定,实验表明菌株2301为产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)、2401为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、3302为青霉(*Penicillium sp.*)、4304为酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)、5402为蜡叶散囊菌(*Eurotium herbariorum*)。

从湖南地区采集的18个不同品种茯砖茶样品,采用稀释平板法分离得到18株优势菌,观察其平板形态特征与生长特性,以及在电镜下有性与无性生殖结构等特点,初步确定其中15株优势菌为散囊菌属:8株冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)、3株谢瓦散囊菌(*Eurotium chevalieri*)、2株肋状散囊菌(*Eurotium costiforme*)、1株阿姆斯特丹散囊菌(*Eurotium amstelodami*)和1株蜡叶散囊菌(*Eurotium herbariorum*)。另外3株非散囊菌属优势菌为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。实验结果表明茯砖茶中优势微生物存在较大差异。

从湖南和广西产的茯砖茶中分离获得2株“金花菌”，发现它们均能在培养基上形成闭囊壳。根据分离菌株的培养特征和微观形态特征及 β -微管蛋白基因(*BenA*)、钙调蛋白基因(*CaM*)及RNA聚合酶II基因(*RPB2*)的系统发育分析，参照Hubka最新的曲霉属曲霉组(*Aspergillus* section *Aspergillus*)分类系统，将分离菌株分别鉴定为假灰绿曲霉(*A. pseudoglaucus*)及冠突曲霉(*A. cristatus*)。另外，通过扫描电镜对这2株“金花菌”进行了形态观察，并记录了菌株A672闭囊壳的发育过程。在广西产茯砖茶中分离鉴定出的“金花菌”假灰绿曲霉为国内首次报道。通过比较，将过去湖南产茯砖茶中广泛报道的“金花菌”冠突散囊菌修订为冠突曲霉(*A. cristatus*)。茯砖茶中金花菌的分离与鉴定对于黑茶品种的鉴别和质量评价具有重要指导意义。

从益阳茶厂有限公司茯砖茶生产线上取得不同工艺流程的茶叶样本，通过稀释平板培养跟踪其微生物种群动态变化过程，同时分离纯化样品中优势微生物金花菌，并对其进行有性型和无性型的诱导培养，通过光学显微镜、电子显微镜观察其形态特征及18SrDNA序列分析，对该菌株进行分类鉴定。结果表明：茯砖茶渥堆期间的主导微生物为酵母、黑曲霉、青霉与根霉，金花菌数量较少，但压砖进入到发花阶段后，金花菌逐渐成为茯砖茶内的主导微生物；通过对金花菌的形态学与分子鉴定最终将其确认为冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)。

1.2 茯砖茶发酵微生物种类多样性研究

为研究不同品种茯砖茶中优势金花菌(冠突散囊菌)的形态学多样性，选取从我国湖南、湖北、广西、贵州、浙江、江苏、陕西、新疆八个省与自治区的不同茯砖茶企业生产的茯砖茶样品中分离纯化23株优势金花菌作为供试菌株，从形态特征和显微结

构两个方面对各菌株进行初步鉴定,结果发现 23 株优势金花菌株均属于冠突散囊菌。来自全国不同产区茯砖茶分离的优势金花菌可以分为 5 种类型:类型 I 包含 G3、G8、G9、G11、G12、G14、G17、G19、G21、G23;类型 II 包含 G7、G16;类型 III 包含 G13、G15、G20、G22、G24;类型 IV 包含 G2、G18;类型 V 包含 G4、G5、G6、G10。

为研究茯砖茶中冠突散囊菌多样性的问题,以来自中国 3 个省份的 5 种茯砖茶为样品,从中分离出菌株优势微生物金花菌菌株 4、16、B1、B3、B7,依托形态学与和分子生物学技术对菌株进行鉴定。结果发现:这 5 株菌株均属冠突散囊菌,并且存在着遗传多样性,其中 16 号菌株的电镜观察结果与其他 4 株菌株差异明显,且菌孢子囊孢子的“赤道”周围存在较多小孔;在 ITS 序列构建系统发育树中 4、B1、B3、B7 号菌株聚类为一组,16 号菌株聚类成另一组。这说明冠突散囊菌可能存在亚种,这与形态学所得结果一致。

为研究全国各地茯砖茶中优势金花菌的多样性,分别对来自陕西、湖北、广西、湖南生产的茯砖茶中优势金花菌 G3、G9、G13、G15、G19 进行随机扩增多态 DNA(RAPD)研究,结果表明:优势金花菌差异最大的为 G3 和 G13,二者遗传距离(遗传距离为按多元统计分析方法计算品种间多个性状基因型值构成的多维空间的几何距离)为最大(14),遗传相似系数为最小(48.15%);差异最小的为 G15 和 G19,二者遗传距离为最小(2),遗传相似系数为最大(92.59%)。这说明来自陕西、湖北、广西、湖南等地生产的茯砖茶中优势金花菌存在较为明显的多样性。

1.3 茯砖茶发酵微生物群落结构研究

为研究茯砖茶渥堆发酵过程中细菌群落的结构和种类,对渥

堆过程中不同时间段细菌 16S rDNA 的 V3 可变区进行扩增,对细菌 DGGE 图谱中条带进行克隆、测序和序列比对。结果表明:黑毛茶在渥堆过程中以渥堆 24 h 为分界点,各自细菌群落结构相似,但也存在较大差异。16S rDNA 的 V3 可变区比对结果证明:黑毛茶渥堆过程中有诺卡氏菌属、新鞘脂菌属、短波单胞菌属、韦龙氏假单胞菌属、突那梭菌属、克雷伯氏菌属、乳杆菌属以及不可培养的 ϵ -变形菌、腐败螺旋菌属、黏球菌属、根瘤菌属和 6 种未知分类的不可培养细菌。

为研究茯砖茶发花过程中细菌群落的结构和种类,对发花过程中不同时段细菌 16S rDNA 的 V3 可变区扩增,经变性梯度胶电泳(DGGE)后,对细菌 DGGE 条带进行克隆、测序和比对。结果表明:在发花过程的第 0~4 d、6~8 d、10~14 d 茯砖茶发花存在 3 个差异较大的细菌优势种群结构的演变。16S rDNA 的 V3 可变区比对结果证明:黑毛茶发花发酵过程中有短波单胞菌属、诺卡氏菌属、新鞘脂菌属、突那梭菌属、韦龙氏假单胞菌属、乳杆菌属、克雷伯氏菌属以及不可培养 ϵ -变形菌、腐败螺旋菌属、黏球菌属、根瘤菌属和 6 种未知分类的不可培养细菌。

为研究茯砖茶发花过程中真菌群落的结构和种类,对茯砖茶渥堆发酵过程中不同时间段黑毛茶样品中真菌群落的 18S rDNA 高变区进行扩增,对真菌 18S rDNA 的 DGGE 图谱中条带进行回收、克隆、测序和序列比对。结果表明:茯砖茶渥堆发酵过程中真菌类型丰富,有好干性酵母(*Wallemia sebi*)、假丝酵母菌(*Candida sp.*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、路德酵母(*Lodderomyces sp.*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、隐球酵母(*Cryptococcus sp.*)、牧草红酵母(*Rhodotorula graminis*)、阿姆斯特丹散囊菌(*Eurotium amstelodami*)、灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)、米赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)、微小根毛霉