

用 DGGE 法初步解析茯砖茶渥堆 发酵过程中真菌群落的结构

刘石泉^{1,2}, 胡治远², 赵运林^{2*}

(1.湖南农业大学生物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南城市学院化学与环境工程学院, 湖南 益阳 413000)

摘要: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 变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱中的条带进行回收、克隆、测序和序列比对。结果表明:茯砖茶渥堆发酵过程中的真菌类型丰富,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(*Rhizomucor pusillus*)、白地霉(*Galactomyces geotrichum*)、安大略假单胞菌(*Candida ontarioensis*)、真皮毛孢子菌(*Trichosporon dermatis*)、斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)、曲霉(*Aspergillus penicillioides*)等真菌存在;以渥堆 24 h 为分界点,真菌群落结构在分界点前后变化较大;真菌群落多样性指数在渥堆 0~16 h 呈升高趋势,>16~24 h 略有降低,>24 h 后继续升高,在渥堆后 40 h 上升到最高水平 2.348,而渥堆 >40~48 h 仍然维持在较高水平;在整个渥堆过程中,优势菌路德酵母、汉逊德巴利酵母和次优势菌阿姆斯特丹散囊菌均有出现,在渥堆后期出现了次优势菌好干性酵母、汉逊德巴利酵母和酿酒酵母;比对结果表明,渥堆过程中同时存在 3 株好干性酵母菌和 7 株阿姆斯特丹散囊菌,说明在渥堆发酵过程中优势菌种存在多样性。本研究结果表明,采用 DGGE 指纹图谱能全面、真实地反映茯砖茶渥堆发酵过程中真菌群落的结构和多样性变化。

关键词:茯砖茶;渥堆发酵;变性梯度凝胶电泳(DGGE);真菌群落

中图分类号: S571.1; Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)05-0494-07

Fungal communities structure during the pile-fermentation process of Fuzhuan brick tea by DGGE technology

LIU Shi-quan^{1,2}, HU Zhi-yuan², ZHAO Yun-lin^{2*}

(1.College of Biology and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.College of Chemistry and Environment Engineering, Hunan City University, Yiyang, Hunan 413000, China)

Abstract: To explore fungal community structure and species composition in the pile-fermentation process of Fuzhuan brick tea(FBT), the fungal variable region of 18S rDNA was amplified in different periods of pile-fermentation process. Amplified products were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and the bands were cloned, sequenced and aligned. The results showed that fungal species were rich in pilefermentation process of FBT, including *Wallemia sebi*, *Candida* sp., *Candida tropicalis*, *Lodderomyces* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula graminis*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus glaucus*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Galactomyces geotrichum*, *Candida ontarioensis*, *Trichosporon dermatis*, *Penicillium decumbens* and *Aspergillus penicillioides*. Two distinctive kinds of fungal communities, correlating to the

收稿日期: 2014-02-16

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(13JJ6074); 湖南省高校产学研合作示范基地产业化项目(13CY025, 11CY003, 11CY004); 湖南省科学技术厅科技计划国际合作项目(2012WK2013); 湖南省普通高校生物工程专业校企合作人才培养示范基地项目(湘教通[2012]434号); 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支持计划资助项目(湘教通[2014]207号); 益阳市科学技术局科技计划(2013YK1323)

作者简介: 刘石泉(1969—), 男, 湖南益阳人, 博士研究生, 副教授, 主要从事黑茶微生物技术研究, lsq205@tom.com; *通信作者, zyl8291290@163.com

pile-fermentation times: 0–24 h and >24–48 h, were found. The fungi Shannon-Wiener Index gradual tended to increase during 0–16 h in pile-fermentation process of FBT and to reduce slightly during >16–24 h, it reached to the maximum 2.348 after 40 h, and still maintained the higher level during >40–48 h. The dominant fungi were *Lodderomyces* sp. and *Debaryomyces hansenii*, the sub-dominant were *Eurotium amstelodami* throughout the pile-fermentation process of FBT, and sub-dominant fungi, *Wallemia muriae*, *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* were appeared in the later of pile-fermentation. The 18S rDNA alignment results also proved that there were three strains *Wallemia sebi* and 7 strains *Eurotium amstelodami*, which indicated that a wide variety of subspecies and ecotype existed in the dominant fungi. This study showed a detailed spectrum of fungi at different time periods during the pile-fermentation process. DGGE fingerprint, a novel technique could obtain a comprehensive, detailed fungal community structure and variation in the pile-fermentation process of FBT.

Key words : Fuzhuan brick tea; pile fermentation; denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE); fungi communities structure

茯砖茶属于后发酵茶,是黑茶家族中重要的一员^[1],具有降低人体类脂肪化合物、血脂^[2-4]、血压、血糖^[5]、胆固醇^[6]和抗腹泻^[7]、整肠胃^[8]、抗氧化^[9]等功效。茯砖茶发酵工序分为“前发酵”和“后发酵”两部分。前发酵和后发酵在制茯砖茶行业一般被分别称为“渥堆”与“发花”^[10]。传统的观点认为茯砖茶的独特保健功效源于黑毛茶本身含有的功能成分,如茶多酚、茶多糖、茶氨酸等,但更多的学者认为是源于黑毛茶“渥堆”与“发花”过程中因微生物代谢而产生的生物活性成分^[11-12],认为微生物作用是提升其内在品质的关键。对茯砖茶参与发酵微生物作用的研究主要集中在茯砖茶发花这一工艺环节^[13],而对渥堆过程中微生物的研究相对较少。用未经渥堆或渥堆工艺控制不佳的茶叶加工的茯砖茶的成品品质较差,汤色浅,滋味涩,香气淡或有异味^[14]。对茯砖茶渥堆过程中微生物的研究多采用梯度稀释和平板培养计数法。这些方法存在一定的局限性^[15]。变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术常被用于对复杂环境中微生物种群进行分析鉴定,具有可靠性强、重现率高等优点,能检测到群落中 90%~99%的微生物物种^[16-17],在茯砖茶发花、发酵过程中能跟踪微生物群落多样性的动态变化^[18-19]。笔者用 DGGE 技术研究渥堆过程中不同发酵时期黑毛茶真菌群落的结构及其动态变化,以期对茯砖茶渥堆工艺的改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 茯砖茶样品

以湖南省高校黑茶发酵与关键技术控制产学研合作示范基地——湖南益阳茶厂有限公司茯砖茶渥堆生产线上分别经过 0、8、16、24、32、40、

48 h 渥堆的一级黑毛茶叶为试验样品(分别编号为 W₁、W₂、W₃、W₄、W₅、W₆、W₇),用上、中、下 3 层分层独立取样后,经四分法逐步缩分至 500 g 左右,置 -20 °C 冰箱保存。

1.1.2 主要试剂

PCR 引物 FR1(5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3')、GC-FR1(5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGCGGGGCGCGGGGGGAICCATTCAATCGGTAIT-3')和 FF390(5'-CGATAACGAACGAGACCT-3')由北京美亿美生物技术有限公司合成;扩增试剂均购自北京美亿美生物技术有限公司;PCR 产物采用 AXYGEN 公司的 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收;DGGE 目的条带采用 OMEGA 公司的 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收;其他试剂为国产,分析纯。

1.1.3 主要仪器与设备

主要仪器与设备为 PTC220 型 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)、Gel-Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)和 DGGE-2401 变性梯度凝胶电泳仪(美国 C.B.S.Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 真菌基因组的提取

用超声波振荡法^[20]提取茶叶样品中真菌的基因组 DNA,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品,于 -20 °C 冰箱保存。

1.2.2 真菌 18S rDNA 片段的 PCR 扩增与回收

以基因组 DNA 为模板,采用通用引物 GC-FR1(含 GC 夹,便于 DGGE 分离)和 FF390 扩增 18S rDNA 的高变区序列^[21]。

PCR 扩增体系参照文献^[19],将引物替换为 GC-FR1(20 mmol/L, 1 μL)和 FF390(20 mmol/L,

1 μL)。PCR 扩增程序：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 1 min，55 °C 退火 45 s，72 °C 延伸 1 min，30 个循环；72 °C 延伸 10 min。PCR 产物采用 Axygen 公司的 DNA Gel Extraction Kit 进行纯化回收。

1.2.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳

按照文献[20]的方法，取 10 μL PCR 产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)。

1.2.4 DGGE 凝胶条带的回收测序

用灭菌手术刀切下待回收的 DGGE 条带，采用 OMEGA 公司的 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收目的条带。

以 2 μL 回收产物为模板，以 FR1/FF390 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系参照文献[19]，将引物替换为 FR1(20 mmol/L，1 μL)和 FF390(20 mmol/L，1 μL)。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 4 min；94 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，30 个循环；72 °C 延伸 10 min。

将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化，连接到 pMD18-T 载体上，并转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆，送华大基因公司进行序列测定。每个回收条带重复选取 3 个克隆。

1.2.5 真菌群落结构的多样性分析

采用 Quantity one 软件对每个茶叶样品的电泳条带数、条带密度进行数字化，导出的结果用于多样性分析和主成分分析。用香农指数(Shannon-Wiener Index, *H*)、丰度(Richness, *S*)和均衡指数(Evenness, *E*)等指标比较不同渥堆时期茶叶样品中真菌的多样性^[22]，其算法如下：

$$H = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i = -\sum_{i=1}^S (N_i / N) \ln(N_i / N);$$

$$E = H / H_{max} = H / \ln S.$$

其中： P_i 是茶叶样品中单一条带的强度占该样品所有条带总强度的比率； N 为 DGGE 图谱单一泳道上所有条带的丰度； N_i 为第 i 条带的丰度； S 为某个茶叶样品中所有条数目的总和。

采用 CANOCO 排序软件，根据不同样品条带亮度和位置的数值对真菌群落结构组成进行主成分分析。

测序结果采用 DNASTar 和 Cluster 软件进行序列分析。将所得正确长度的序列用 Blast 法与基因库中的序列进行比对。下载最相似的菌株序列作为系统发育树的参考序列。采用 MEGA 软件，用

Neighbor-joining 法构建系统发育树，自展数(bootstrap)为 1 000。

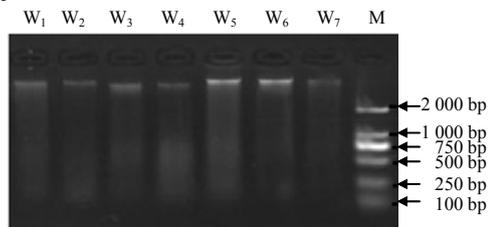
将 DGGE 凝胶条带分别回收、测序，在 GenBank 数据库中使用 Blast 程序进行同源性比较，获得最相似典型菌株的 18S rDNA 序列。根据这些 DGGE 条带所代表的微生物来判定茯砖茶不同渥堆阶段的真菌群落组成。

用软件 MEGA5 对 18S rDNA 的高变区序列和 GenBank 中相关种属代表菌株的 18S rDNA 序列构建系统进化树^[23]。

2 结果与分析

2.1 样品基因组的 DNA 提取结果

由图 1 可见，提取的 DNA 大小远远大于 2 000 kb，说明成功获得了样本 $W_1 \sim W_7$ 的真菌基因组 DNA。



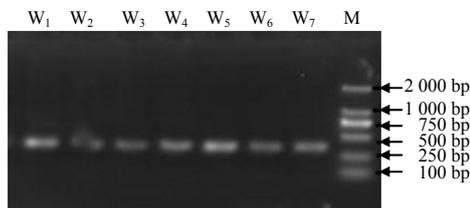
M DL 2 000 DNA marker； W_1 、 W_2 、 W_3 、 W_4 、 W_5 、 W_6 、 W_7 为试验样品。

图 1 茶叶样本中提取的真菌基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of fungal DNA extracted from tea samples

2.2 真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增结果

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，获得了约 390 bp 的 DNA 片段。该片段大小与预期 DNA 片段的大小相符(图 2)。



M DL 2 000 DNA marker； W_1 、 W_2 、 W_3 、 W_4 、 W_5 、 W_6 、 W_7 为试验样品。

图 2 茶叶样本中真菌的 18S rDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 Partial sequence of fungal 18S rDNA by PCR amplification agarose gel electrophoresis of tea samples

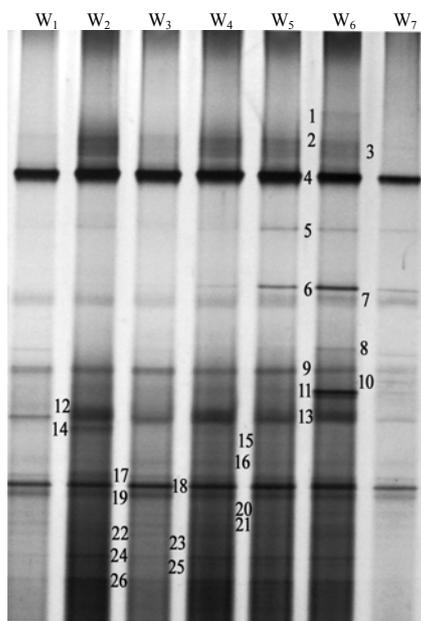
2.3 PCR 产物的变性梯度凝胶电泳结果

由图 3 可见，在黑毛茶渥堆过程中，18S rDNA

的高变区序列类型丰富。图 3 中从渥堆开始到渥堆结束的 DGGE 条带变化清晰地反映出整个渥堆过程真菌群落的动态发展变化过程。仅从优势菌的变化来看，渥堆 24 h 前和 24 h 后，优势菌带型差别较为明显：渥堆 24 h 前有 4 号优势条带、17 号次优势条带；在渥堆 24 h 后，4 号、17 号 2 个染色较浓的条带仍然维持，且在 40 h 时增加了 6 号和 11 号 2 条染色较浓的次优势条带；渥堆结束时 6 号和 11 号染色减弱。这说明随着渥堆进程的推进，参与渥堆作用的真菌群落结构显著不同。主成分分析结果(图 4)和不同渥堆阶段进化树分析结果(图 5)都表明，渥堆过程中真菌群落结构显著不同，其原因主

要是渥堆的温度、相对湿度等环境变化和微生物种间的相互促进、共生、竞争等，使渥堆开始出现的真菌在后续渥堆过程中出现适应性生长，当渥堆环境的改变有利于特定真菌适应性生长时，该菌就有可能成为该渥堆时间段的优势种群，从而实现优势菌群的更替变化。

结合表 1 中结果可以看出，多样性指数在渥堆发酵全程中的变化较大，在渥堆前期(0~16 h)呈升高趋势，在渥堆中期阶段(>16~24 h)略有降低，>24 h 之后又继续升高，在渥堆 40 h 时升到最高(2.348)，而渥堆末期(>40~48 h)仍然维持在较高水平。均匀性指数、丰度指数和多样性指数均呈升高、降低、升高、维持稳定的变化趋势，表明茯砖茶不同渥堆阶段真菌群落的结构差异较大，且随渥堆时间的推移呈较有规律的变化。多样性指数在渥堆前期呈升高趋势的原因可能是渥堆开始时，随着环境湿度、热度等的变化，黑毛茶本身携带的大量真菌开始萌动，随着渥堆时间的推移，适应渥堆环境的真菌慢慢滋生，代谢逐渐活跃；在渥堆中期(24 h)略有降低的原因可能是渥堆温度增加、湿度增大和堆内微生物活动等导致渥堆的环境条件发生了改变，参与渥堆的真菌进行优胜劣汰的自然选择，真菌群落结构随着渥堆环境的变化而不断进行适应性调整。



M DL 2 000 DNA marker ; W1、W2、W3、W4、W5、W6、W7 为试验样品；图片中 1~26 分别代表 2.4 中回收测序的条带。

图 3 茯砖茶不同渥堆阶段真菌 18S rDNA-PCR 产物的 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE chromatogram of fungi 18S rDNA-PCR products in different pile fermentation stages of Fuzhuan brick tea

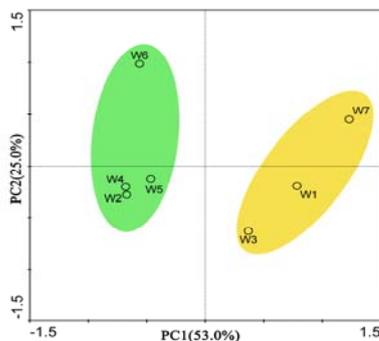


图 4 茯砖茶不同渥堆发酵阶段的主成分分析结果

Fig.4 PCA analysis in different pile fermentation stages of Fuzhuan brick tea

表 1 茯砖茶不同渥堆发酵阶段真菌群落的特征

Table 1 Characteristics of fungi community in different pile fermentation stages of Fuzhuan brick tea

样品	发花时间/d	香农指数	均匀性指数	丰度指数
W ₁	0	2.030	0.847	11
W ₂	8	2.045	0.853	11
W ₃	16	2.204	0.887	12
W ₄	24	1.939	0.842	10
W ₅	32	2.141	0.893	11
W ₆	40	2.348	0.916	13
W ₇	48	2.298	0.884	12

0.68 0.80 1.00

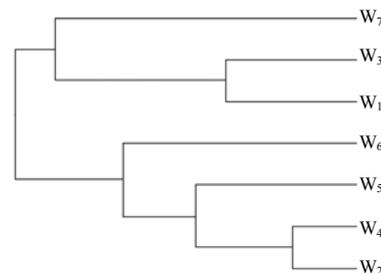


图 5 茯砖茶不同渥堆发酵阶段的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree in different pile fermentation stages of Fuzhuan brick tea

2.4 DGGE 凝胶条带的回收测序及序列分析

由表 2 中 DGGE 凝胶条带回收序列比对分析结果和图 6 中真菌的 18S rDNA 序列系统进化树可知,在茯砖茶渥堆发酵过程中存在的真菌包括好干性酵母菌 (*Wallemia sebi*)、假丝酵母菌(*Candida* sp.)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、路德酵母属(*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(*Rhizomucor pusillus*)、白地霉(*Galactomyces geotrichum*)、安大略假单胞菌(*Candida ontarioensis*)、真皮毛孢子菌(*Trichosporon dermatis*)、斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)、曲霉(*Aspergillus penicillioides*)，其中属于子囊菌门的有 22 株，属于担子菌门的有 7 株，属于毛霉亚门的有 2 株。

表2 DGGE 凝胶条带回收序列分析结果

Table 2 Analysis results of DGGE gel bands recovery sequences

条带编号	相似菌	登录号	相似度/%	分类
Band1	<i>Wallemia sebi</i> strain UPSC 2502	AF548108	99	Basidiomycota
Band2	<i>Candida</i> sp. BG01-7-26-007B-1-1	AY242226	100	Ascomycota
Band3	<i>Candida tropicalis</i> strain BG090819.10.1.1.2.19	JQ008834	99	Basidiomycota
Band4	<i>Lodderomyces</i> sp. BG090819.10.1.1.3.32	JQ008833	99	Ascomycota
	<i>Debaryomyces hansenii</i> strain Y3	KC534843	99	Ascomycota
Band5	<i>Rhizomucor miehei</i>	AF113432	93	Zygomycota
Band6	<i>Wallemia muriae</i> strain MZK1 B-952	AY741381	100	Basidiomycota
Band7	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain NRRL 3695	HQ845298	99	Zygomycota
Band8	<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-70	JQ668740	99	Ascomycota
Band9	<i>Pichia kudriavzevii</i>	JF274497	99	Ascomycota
	<i>Candida ontarioensis</i> strain BC 2A	JN820129	99	Ascomycota
Band10	<i>Rhodotorula graminis</i> strain SCAU-13	HM371376	99	Basidiomycota
Band11	<i>Debaryomyces hansenii</i> strain Y3	KC534843	100	Ascomycota
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain Y3	JQ585703	100	Ascomycota
Band12	<i>Trichosporon dermatis</i> strain BG090815.8.3.1.2.5	JQ008925	100	Basidiomycota
	<i>Cryptococcus</i> sp. YY1	AF331952	100	Basidiomycota
Band13	<i>Wallemia sebi</i> strain UPSC 2502	AF548108	99	Basidiomycota
Band14	<i>Debaryomyces hansenii</i> strain Y3	KC534843	100	Ascomycota
Band15	<i>Eurotium amstelodami</i>	GU733352	87	Ascomycota
Band16	<i>Candida ontarioensis</i> strain BC 2A	JN820129	99	Ascomycota
Band17	<i>Eurotium amstelodami</i> strain CBS 518.65	GU733352	99	Ascomycota
Band18	<i>Penicillium decumbens</i>	KC842215	100	Ascomycota
	<i>Aspergillus glaucus</i> strain NCPF 2653	AY083218	99	Ascomycota
Band19	<i>Eurotium herbariorum</i> strain TPID14	EU263606	99	Ascomycota
Band20	<i>Eurotium amstelodami</i> strain CBS 518.65	GU733352	99	Ascomycota
Band21	<i>Eurotium amstelodami</i> strain CBS 518.65	GU733352	99	Ascomycota
Band22	<i>Eurotium amstelodami</i> strain CBS 518.65	GU733352	99	Ascomycota
Band23	<i>Eurotium amstelodami</i> strain CBS 518.65	GU733352	99	Ascomycota
Band24	<i>Aspergillus penicillioides</i> strain 987	DQ985959	99	Ascomycota
Band25	<i>Aspergillus penicillioides</i> strain 987	DQ985959	99	Ascomycota
Band26	<i>Aspergillus penicillioides</i> strain 987	DQ985959	99	Ascomycota

由图 3 中的 DGGE 条带可知,在整个渥堆过程中存在有 4 号优势带(路德酵母和汉逊德巴利酵母)和 17 号次优势带(阿姆斯特丹散囊菌)。2 个染色一直较浓的条带对应的真菌为整个渥堆过程的优势菌和次优势菌。在渥堆 32~40 h 时出现了 6 号(好干性酵母)和 11 号(汉逊德巴利酵母和酿酒酵母)2 个染色较浓的次优势条带,且这 2 个条带在渥堆 48 h 时减弱。这可能是由渥堆中后期环境的改变所致;一

方面微生物代谢释放热量导致堆温升高,另一方面微生物释放的代谢产物使得生存环境的 pH、相对湿度、渗透势、含氧量等发生改变,导致特定种类酵母菌(6 号和 11 号)的营养体在渥堆末期停止生长,甚至死亡。这一结果说明,随着渥堆时间的推进,参与渥堆作用酵母的种类和各类的数量发生着较大的改变。

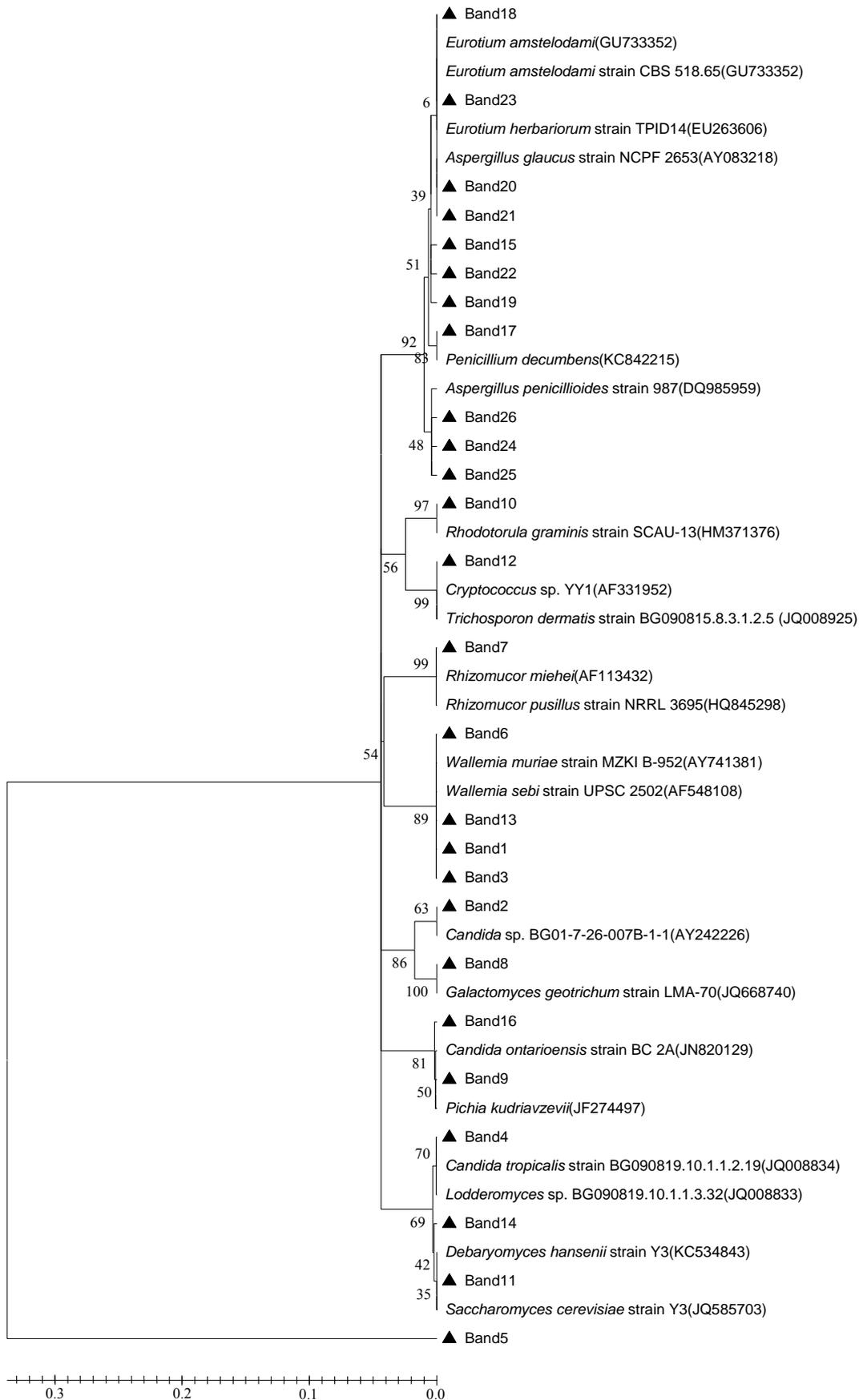


图 6 茯砖茶渥堆过程中 26 个真菌的 18S rDNA 序列的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of the 26 strain fungi 18S rDNA sequence during the pile fermentation process of Fuzhuan brick tea

3 结论与讨论

本研究结果表明,不同渥堆时间段真菌群落结构以渥堆 24 h 为分界点,分界点前后真菌群落结构的变化较大。真菌群落多样性指数在渥堆 0~16 h 呈升高趋势,>16~24 h 略有降低,>24 h 之后又继续升高,在渥堆后期(40 h 时)升到最高(2.348),而渥堆末期(>40~48 h)仍然维持在较高水平。随着渥堆时间的推移,茶堆内部温度、相对湿度的变化和茶堆内部微生物的活动及其对堆内微环境的影响,加上人为翻堆等环境控制因素,导致真菌群落结构发生变化,进而有助于形成茯砖茶特有的品质。茯砖茶渥堆优势菌的出现时间、种类、多少、背景(如温度、湿度、协同菌等)等有望作为人为控制渥堆过程的依据。

试验结果表明,茯砖茶渥堆过程中的真菌类型十分丰富。18S rDNA 序列比对获得的最相似菌株分别属于子囊菌门、担子菌门、毛霉亚门等,其中一部分真菌,如路德酵母属、斜卧青霉、阿姆斯特丹散囊菌在黑茶渥堆过程中较为常见(已于文献[24]中报道),而另一部分真菌,如安大略假单胞菌、牧草红酵母等在传统培养方法中都未曾检出过。

试验中检出的微生物种群中以酵母菌的种类最为丰富。本研究中发现有好干性酵母、假丝酵母菌、热带假丝酵母、路德酵母属、汉逊德巴利酵母、毕赤酵母属、酿酒酵母、隐球酵母、牧草红酵母等 9 种酵母,其中路德酵母属和汉逊德巴利酵母存在于渥堆的整个过程,渥堆至 40 h 时,又增加了好干性酵母和汉逊德巴利酵母、酿酒酵母 2 个次优势酵母菌条带;同源性比对也发现了 3 株好干性酵母,其中好干性酵母在渥堆后期成为了次优势菌,说明茯砖茶渥堆过程中酵母存在多种类型的生态适应种群,对渥堆质量起着极为重要的作用。

试验结果表明,阿姆斯特丹散囊菌存在多种类型的生态适应种群。在发花过程中大量存在的微生物阿姆斯特丹散囊菌(次优势菌条带 17 号)在渥堆开始时就较多,并且一直维持到渥堆结束,至于阿姆斯特丹散囊菌(优势菌条带 17 号)是否与茯砖茶发花、发酵过程的优势菌为同一种群,还有待确证。本研究中发现渥堆全过程中有 7 株阿姆斯特丹散囊菌,其中除 17 号阿姆斯特丹散囊菌在渥堆全过程中为次优势菌外,其余 6 株在渥堆过程中的亮度较

为一致,能与阿姆斯特丹散囊菌(17 号)共存。渥堆过程中 7 株阿姆斯特丹散囊菌的存在说明了阿姆斯特丹散囊菌种群内有较大的差异。这与全国各地关于茯砖茶中优势菌阿姆斯特丹散囊菌差异的研究结果^[15]是一致的。

茯砖茶对降低高血压、肥胖、糖尿病等高发“富贵病”具有较明显的效果,所以,其市场开发前景较为广阔。根据微生物群落结构的类型及其作用,实现精控发酵,充分发挥发酵微生物的协同作用,使生物转化作用朝着有益于改善茯砖茶品质、提高茯砖茶活性物质转化效率的方向进行将成为今后研究的重点。

参考文献:

- [1] 陈宗懋,杨亚军.中国茶经[M].上海:上海文化出版社,2011:313-317.
- [2] 傅冬和,刘仲华,黄建安,等.茯砖茶降脂功能成分研究[J].茶叶科学,2012,32(3):217-223.
- [3] 彭晓赟,赵运林,何小书,等.茯砖茶茶叶品质和保健功能的研究概况[J].湖南城市学院学报,2011,20(4):45-48.
- [4] Martins F, Noso T M, Porto V B, et al. Maté tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice[J]. Obesity, 2010, 18(1):42-47.
- [5] Kang L, Chen X, Sebastian B M, et al. Chronic ethanol and triglyceride turnover in white adipose tissue in rats inhibition of the anti-lipolytic action of insulin after chronic ethanol contributes to increased triglyceride degradation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(39):28465-28473.
- [6] Lee S M, Kim C W, Kim J K, et al. GCG-rich tea catechins are effective in lowering cholesterol and triglyceride concentrations in hyperlipidemic rats [J]. Lipids, 2008, 43(5):419-429.
- [7] 曾婷玉,李恒彪,曾斌,等.茯砖茶对肠道 4 种常住微生物的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2013,39(4):387-392.
- [8] 刘平,李宗军,许爱清.茯砖茶水提物对大肠杆菌感染小鼠的免疫调节作用[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2011,37(5):537-539,566.
- [9] 丁金祥,黄昀,李勇,等.茯砖茶抗氧化活性物质的提取工艺研究[J].食品研究与开发,2013,34(16):12-14,35.
- [10] 蔡正安,唐和平.湖南黑茶:中国古丝绸之路的神秘之茶[M].长沙:湖南科学技术出版社,2006:12-35.