



泾阳茯茶生产环境中冠突散囊菌多样性检测

孟令缘¹, 施东妮¹, 盛焕精¹, 葛武鹏¹,
贺玉锋², 毛敏辉³, 杨保伟¹

(1. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西咸新区市场服务与监督管理局泾河新城分局, 陕西泾阳 713700; 3. 西咸新区泾河新城城乡管理局, 陕西泾阳 713700)

摘要 为阐明陕西省泾阳县茯茶生产环境中冠突散囊菌是否为同一克隆系, 分别从泾阳县 2 个代表不同生产方式的茯茶厂的不同生产工段采集原料茶叶、茯茶半成品及成品、生产环境涂抹拭子、空气沉降样和土壤等样品, 采用平板划线和涂布法分离得到 26 株疑似冠突散囊菌, 并对其进行分类鉴定。结果表明: 基于菌落形态特征鉴定后, 初步确定 26 株菌为“冠突散囊菌”。对 26 株“冠突散囊菌” 26S rDNA D1/D2 区及其内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer; ITS) 序列进行 PCR 扩增、序列测定并提交基因库比对, 使用 Mega 6.0 软件构建进化树分析鉴定后, 确认得到的菌株均为冠突散囊菌, 且菌株的 26S rDNA D1/D2 区及 ITS 序列均具有高度的同源性。研究初步阐明存在于陕西省泾阳县茯茶生产环境的冠突散囊菌相似度极高, 为同一克隆系。

关键词 茯茶; 冠突散囊菌; 分离鉴定

中图分类号 TS201.3

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)01-0139-07

泾阳茯茶是一种全发酵茶, 长期饮用能有效调节人体新陈代谢、促进消化, 并有一定程度的疾病预防和保健作用^[1-3], 在中国西北和蒙古等游牧民族活动地区深受消费者喜爱^[4-6]。

茯茶生产中的“发花”工序实际是“金花菌”在茶叶中生长繁殖, 产生淀粉酶、纤维素酶和果胶酶等有益成分, 从而改善茶叶口感、风味和品质的过程^[7-8]。因此, “金花菌”的数量常作为茯茶品质评价的一项重要指标。然而, 关于茯茶中“金花菌”的多样性研究结果并不一致, 对“金花菌”的分类鉴定尚存在分歧^[9-13]。陕西泾阳是中国茯茶的发源地及现存主要产地之一, 茯茶生产领域也比较认可“金花菌”为冠突散囊菌, 但未见对泾阳茯茶产区“金花菌”多样性进行研究的报道。

本研究对采集自陕西泾阳茯茶厂部分样品中的“金花菌”进行分离, 并对其进行形态学和分子生物学鉴定, 旨在阐明泾阳地区不同茯茶生产厂区、工段和环境中冠突散囊菌的多样性, 以为茯茶工业化和标准化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茶叶和茯茶生产环境样品分别采集自陕西泾阳泾砖茶业(贾根社)有限公司(生产方式为传统手工生产)和泾阳泾普茶业有限公司(生产方式为现代化、机械化工业生产)。采集的样品和数量具体为: 茶叶样品 15 份(原料茶 5 份, 渥堆茶 3 份, “金花菌”发花期半成品茯茶 2 份, 成品茯茶 5 份), 生产环境空气沉降样 34 份, “金花菌”发花室窗台和地板涂抹样 4 份, 土壤样品 5 份, 工厂墙壁涂抹样 2 份, 茶釉样品 3 份。

1.2 培养基

PDA 培养基、察氏培养基和 BPW 肉汤购自北京陆桥生物科技有限公司, 按使用说明配制, 121 °C 灭菌 20 min 后, PDA 和察氏培养基倒入一次性无菌培养皿制备平板, 凝固后密封保存, 备用。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集 茶叶样品采集: 戴上一一次性无

收稿日期: 2018-05-03 修回日期: 2018-09-20

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1601402); 西北农林科技大学大学生科技创新项目; 陕西省科技统筹创新工程计划(2015KTCQ03-08)。

第一作者: 孟令缘, 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: mly0502@foxmail.com

通信作者: 杨保伟, 男, 博士, 教授, 研究方向为食品微生物。E-mail: ybw090925@163.com

菌手套,分别从混合均匀的原料茶和渥堆茶不同位置随机采集约 250 g,装入无菌均质袋,密封保存,备用。发花半成品茯茶和成品茯茶各随机采集 3 块茶饼,实验室无菌条件下打散、混匀后取样。空气沉降样品采集:培养皿做好标记后,打开 PDA 与察氏培养基皿盖,将培养基置于茶厂的发花室内、成品储藏室、厂区院落和走廊等地,暴露 15 min 后,盖上皿盖,28 ℃培养 5~8 d。

涂抹样品采集:使用无菌 BPW 润湿 3~5 根无菌棉签,分别擦取生产车间的窗台、走廊和墙角等位置的浮尘,每样品采样面积约 10 cm × 10 cm。采样后使用无菌剪刀剪下棉签头部,装入 50 mL 无菌离心管,密封保存,备用。

1.3.2 冠突散囊菌分离 茶叶中冠突散囊菌分离。方法一:用无菌镊子夹取茶叶少许,分别置于 PDA 与察氏培养基表面,轻压使茶叶和培养基充分接触,28 ℃培养 5~8 d。

方法二:称取茶叶 25 g,置于装有 225 mL 无菌蒸馏水的三角瓶中,充分振荡,即为 10^{-1} 样品稀释液。倍比稀释,依次得到 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度样品稀释液。分别取 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释液在 PDA 和察氏培养基上连续划线,28 ℃培养 5~8 d。疑似菌单菌落在 PDA 平板多次纯化后转接 PDA 斜面,28 ℃培养 7 d 后用无菌石蜡密封,4 ℃冰箱保存,备用。

为了尽可能分离出茶叶中的冠突散囊菌,研究同时采用涂布法,将 1 mL 10^{-2} 、 10^{-4} 和 10^{-6} 样品稀释液分别滴加于 PDA 和察氏培养基,涂布均匀,28 ℃培养 5~8 d,挑取典型菌落,纯化后石蜡密封保存,备用。

空气沉降样品中冠突散囊菌分离。空气沉降样品于 28 ℃培养 5~7 d,挑取典型菌落,纯化后石蜡密封,4 ℃保存,备用。

土壤中冠突散囊菌分离。具体方法同茶叶中冠突散囊菌的分离。

涂抹样品中冠突散囊菌分离。向保存棉签头的离心管中加入 10 mL 无菌 BPW,充分振荡后,取悬液分别划线于 PDA 和察氏培养基,28 ℃培养 5~8 d,挑取典型菌落,纯化后保存。

1.3.3 形态学鉴定 疑似冠突散囊菌划线接种于 PDA 培养基,28 ℃培养 5~7 d。将适量无菌水加到 PDA 培养基表面,用无菌刮铲轻刮菌落(苔),得到菌悬液。吸取 0.5 mL 菌悬液涂布于另一 PDA 培养基后,将无菌盖玻片以 45°斜角插

入培养基,28 ℃培养 6~8 h 后取出 4~6 片,于盖玻片上滴加少许石炭酸棉兰染液进行染色,显微镜下观察孢子萌发和菌丝分化情况。之后,每隔 6~8 h,取出 4~6 片盖玻片,用吸水纸擦去生长相对较差玻片一面的菌丝后,石炭酸棉兰染色。染色标本在自动摄像显微镜下观察,选取代表性菌丝及相应结构,拍照记录。

1.3.4 分子生物学鉴定 使用 TAKARA 真菌基因组提取试剂盒 (No. 9768; TAKARA MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit) 提取疑似菌的总 DNA,参照 TAKARA 真菌鉴定试剂盒 (No. RR178, Fungi Identification PCR Kit) 说明,对疑似菌的 26S rDNA D1/D2 区和 ITS 序列进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,低温条件下送北京奥科生物科技有限公司测序。将测得的 26S rDNA D1/D2 区和 ITS 序列提交 NCBI 基因库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),通过 Blast 进行同源检索,下载同源序列。使用 Mega 6.0 软件对菌株的 26S rDNA D1/D2 区及 ITS 序列和下载的同源序列进行比对,采用邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树,通过自举 (Bootstrap) 1 000 次重复对系统发育树进行检验以鉴定菌株。

2 结果与分析

2.1 菌株分离及形态学鉴定

共分离得到 26 株疑似冠突散囊菌(图 1 中米粒状黄色菌落即为疑似冠突散囊菌)。菌丝不发达,呈匍匐状生长,PDA 培养基上生长较快。5 d 后 PDA 培养基上菌落直径为 11~16 mm,圆形,结构致密。菌落边缘的新生菌丝生长旺盛,乳白至浅黄色,中央呈金黄色至深褐色,有少量褐色渗出液,菌落背面呈深褐色。在察氏培养基上生长较慢,7 d 后培养基颜色在渗出物的影响下逐渐变深(图 2)。

光学显微镜(10×40 倍)检测发现:培养 12 h 后孢子萌发,分化出一级菌丝;24~48 h 可见菌丝横隔膜;48~72 h 部分菌丝末端出现卷曲,进一步分化;72 h 后可见球状闭囊壳,内有大量金黄色孢子。闭囊壳成熟后破裂,孢子释放,完成一个生长期(图 3)。依据孢子萌发、菌丝分化、分生孢子梗和子囊形成等结果,结合菌落特征、菌丝形态及生长状况,参考《真菌鉴定手册》与文献资料描述,初步鉴定分离菌株为子囊菌纲一真子囊菌

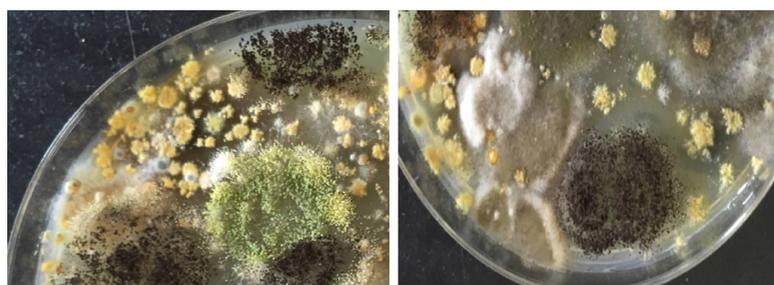


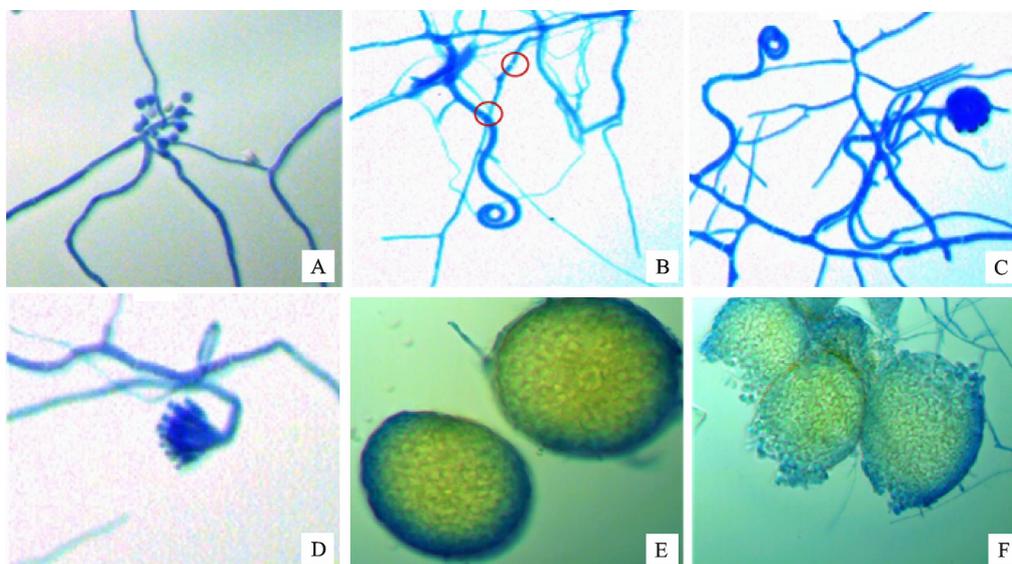
图 1 工厂环境中“冠突散囊菌”和其他真菌菌落

Fig. 1 Colonies of *Eurotium amstelodam* and other fungi in the factory environment



图 2 “冠突散囊菌”在察氏培养基上培养 5 d 的菌落

Fig. 2 Colony morphology of *Eurotium amstelodam* in Czapek's culture after 5 days incubation



A. 冠突散囊菌孢子萌发 Spore germination of *Eurotium cristatum*; B. 有隔菌丝及子囊果形成前期 The formation of hyphae and ascocarp in early stage; C. 子囊果形成前的菌丝卷曲 Hyphae curling before ascocarp formation; D. 曲霉孢子形成 The formation of *Aspergillus* spore; E. 闭囊壳及金黄色孢子 Closed capsule and golden spore; F. 闭囊壳破裂释放孢子 Spores are released by rupture of the capsule

图 3 冠突散囊菌生长状况

Fig. 3 The growth cycle of *Eurotium cristatum*

亚纲—球壳菌目—冠囊菌科—冠散囊菌属。

2.2 分子生物学鉴定

对照测序色谱图，确定 PCR 扩增产物碱基序列无误后，用 Mega 6.0 软件对 26 株菌的 26S

rDNA D1/D2 区序列进行多重比对，相似度为 100%。系统发育树聚类结果表明，26 株供试菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列与登录号为 JN938912. 1、U29549. 1、JF922030. 1 和

AY213699.1 的 *Eurotium amstelodami* 序列聚在同一簇, 同源性 100%, 确定研究中分离得到的菌株为冠突散囊菌(图 4)。

将测序得到的 ITS 序列多次校对编辑后, 使用 Mega 6.0 软件, 选用 *Penicillium restrictum*

AY354256.1 相应序列作为外群(Outgroup)构建系统发育树, 结果表明 26 株分离菌的 ITS 序列与 GenBank 中登录号为 KC466532.1 的 *Eurotium amstelodami* 的 ITS 序列聚在同簇(图 5), 同源性 99%, 鉴定分离株为冠突散囊菌。

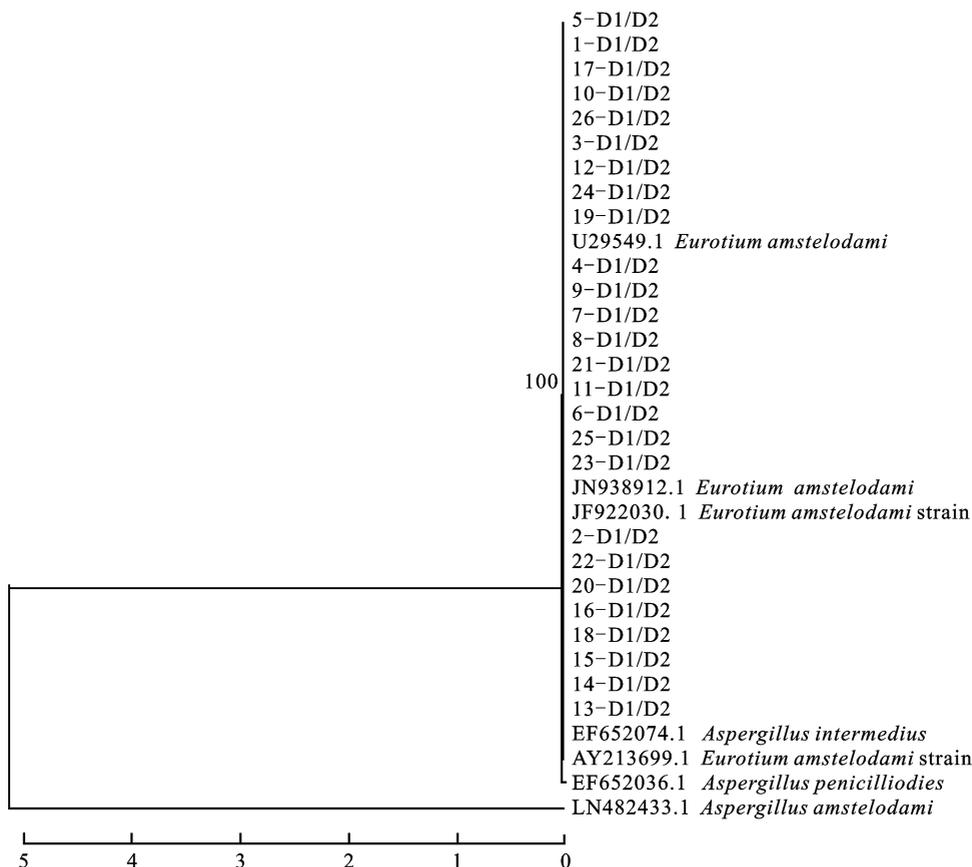


图 4 26 株菌种的 26S rDNA 的 D1/D2 区序列进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of 26 strains based on D1/D2 region of 26S rDNA

3 讨论

近年来, 很多学者对湖南发酵茶中的微生物进行分离鉴定, 结果均表明湖南发酵茶中的主要微生物为冠突散囊菌^[14-17]。另有学者对茯茶中微生物、化学成分及保健功能研究后, 所得结果并不一致, 存在分歧^[18-21]。

Mao 等^[22]、周绍琴^[23] 和 Hong 等^[24] 分别在六堡茶、传统发酵豆瓣酱和韩国豆酱中也检出冠突散囊菌, 表明冠突散囊菌不仅存在茯茶之中, 还可能在许多对人体健康有益的食品中存在。

在陕西泾阳, 人们几百年来一直通过手工方式自然发酵生产茯茶, 但其规模都不大, 产品质量良莠不齐。近年来, 随着市场需求的增加及食品生产规模化、安全化和标准化的驱动, 泾阳茯茶的

生产规模和质量越发受到当地政府重视。可以肯定的是, 在泾阳, 从古到今人们能够自然发酵生产茯茶, 表明该地区的环境中肯定广泛存在能够发酵茶叶生产茯茶的冠突散囊菌。然而, 此前并没有相关研究揭示该地区茯茶及茯茶生产环境中的“金花菌”、流行状况和多样性, 并对之进行分类鉴定。本研究通过对茯茶及茯茶生产环境中“金花菌”进行分离鉴定, 明确该地区茯茶及其生产环境中的“金花菌”为冠突散囊菌, 且在两个不同厂区和不同工段的冠突散囊菌属同一种。

本研究还表明冠突散囊菌在察氏培养基和 PDA 培养基上生长状况略有不同。相对察氏培养基, 冠突散囊菌在 PDA 上更容易生成褐色类物质, 这可能与培养基成分不同有关。该菌代谢产生的褐色物质及其含量可能与茯茶的汤色深浅

间存在一定关系。

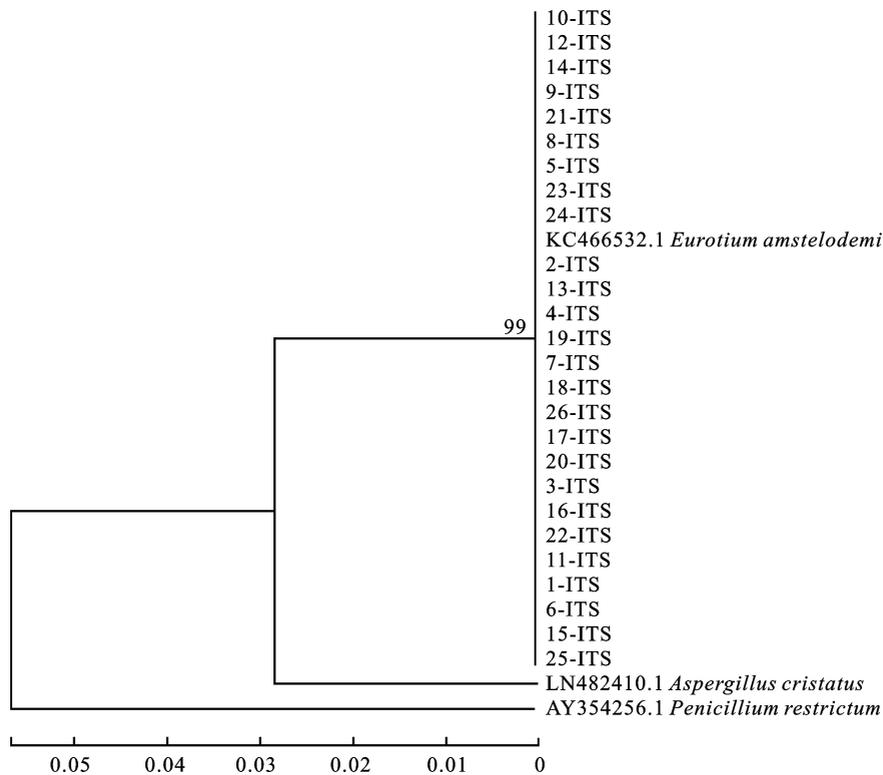


图 5 26 株菌的 ITS 序列进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of 26 strains based on Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence

参考文献 Reference:

- [1] 周杰. 泾渭茯茶降脂减肥功效研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2014.
ZHOU J. The hypolipidemic effects of Jing-wei Fu tea on rats fed with high fat diet[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014.
- [2] 彭雨轩, 刘石泉, 胡治远, 等. 富金花茯茶水提取物对四氧嘧啶诱导糖尿病小鼠的降血糖功效研究[J]. 湖南城市学院学报(自然科学版), 2014, 23(3): 55-58.
PENG Y X, LIU SH Q, HU ZH Y, *et al.* Experiment of "Fujinhua" Fu brick tea extracts on diabetic mice induced by alloxan[J]. *Journal of Hunan City University (Natural Science Edition)*, 2014, 23(3): 55-58.
- [3] 黄 颂, 刘仲华, 黄建安, 等. 茯茶水提取物对 II 型糖尿病小鼠糖代谢紊乱的干预作用[J]. 茶叶科学, 2016, 36(3): 250-260.
HUANG S, LIU ZH H, HUANG J A, *et al.* Intervention effects of Fuzhuan brick tea water extract on glucose metabolism disorder in a mouse model of type II diabetes mellitus[J]. *Journal of Tea Science*, 2016, 36(3): 250-260.
- [4] 王翠英, 崔艳玲. 关中茯茶发展嬗变史[J]. 福建茶叶, 2017, 39(8): 344-345.
WANG C Y, CUI Y L. The development history of Fu tea in Guanzhong[J]. *Tea in Fujian*, 2017, 39(8): 344-345.
- [5] 周兴长, 刘义鹏. 古丝绸之路的神秘之茶—茯茶[J]. 茶报, 2000(1): 20-21.
ZHOU X ZH, LIU Y J. The mysterious tea of the ancient silk road—Fu tea[J]. *Chinese Tea World*, 2000(1): 20-21.
- [6] 韩星海. 揭开泾阳茯砖茶历史文化之谜[J]. 农业考古, 2014(5): 271-273.
HAN X H. Uncover the mystery of Jingyang Fuzhuan tea history and culture [J]. *Agricultural Archaeology*, 2014(5): 271-273.
- [7] 孙胜利. 谈谈茯砖茶的香气[J]. 中国茶叶, 2016(3): 38.
SUN SH L. Talk about the aroma of Fuzhuan tea[J]. *China Tea*, 2016(3): 38.
- [8] 徐国桢. 砖茶黄曲霉之发酵作用[J]. 中华农学会报, 1980: 29-46.
XU G ZH. Fermentation of *Aspergillus flavus* in brick tea [J]. *Chinese Society of Agriculture*, 1980: 29-46.
- [9] 仓道平, 温琼英. 茯砖茶发酵中优势菌与有害菌类的分离鉴定[J]. 茶叶通讯, 1981(3): 14-16.
CANG D P, WEN Q Y. Isolation and identification of dominant and harmful bacteria in the fermentation of Fuzhuan tea[J]. *Tea Communication*, 1981(3): 14-16.
- [10] 温琼英. 茯砖茶中优势菌的种名鉴定[J]. 中国茶叶, 1990(6): 2-3.
WEN Q Y. Identification of dominant bacteria in Fuzhuan

- tea[J]. *China Tea*, 1990(6):2-3.
- [11] Plummer N S. The Genus *Aspergillus*[M]. Springer, Boston, 1965:171-188.
- [12] 齐祖同,孙曾美. 茯砖茶中优势菌种的鉴定[J]. 真菌学报, 1990(3):176-179.
 QI Z T, SUN Z M. Identification of dominant strain in Fuzhuan tea[J]. *Mycosystema*, 1990(3):176-179.
- [13] 杨抚林,邓放明,赵玲艳,等. 茯砖茶发花过程中优势菌的研究进展[J]. 茶叶科学技术, 2005(1):4-7.
 YANG F L, DENG F M, ZHAO L Y, et al. Development of dominant fungi in Fuzhan tea during the growing process[J]. *Tea Science and Technology*, 2005(1):4-7.
- [14] 龚雪. “散茶发花”茯茶微生物生态及其优势种抑菌作用研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2011.
 GONG X. Study on the microbial ecology of Fu tea made by “Fungi growing on loose tea” technology and antibacterial effects of dominant species (*Eurotium sristatum*)[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011.
- [15] 胡治远. 湖南地区茯砖茶菌群多样性及发花工艺优化研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2012.
 HU ZH Y. Flora diversity and fermentation process codition of Fuzhuan brick-tea in Hunan area[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011.
- [16] 黄浩,郑红发,赵熙,等. 不同茶类发花茯茶中“金花”菌的分离、鉴定及产黄曲霉毒素分析[J]. 食品科学, 2017, 38(8):49-55.
 HUANG H, ZHENG H F, ZHAO X, et al. Identification and aflatoxin production of “Golden Flora” fungi isolated from Fu tea produced from different kinds of tea[J]. *Food Science*, 2017, 38(8):49-55.
- [17] 何红霞. “散茶发花”工艺微生物类群及其对茶叶品质形成影响的研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2012.
 HE H X. Study on the microbial population and their effect on the formation of tea quality in the process of “Fungi growing on the loose tea”[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012.
- [18] 袁勇. 茯茶“金花”菌提取物药理功效与化学成分的初步研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2011.
 YUAN Y. Preliminary studies on pharmacological functions and chemical composition of Jinhua fungi extracts in Fu tea [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011.
- [19] 黄浩,黄建安,李适,等. 茯茶“散茶发花”加工过程中茶多酚和碳水化合物及冠突散囊菌数量的变化研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15):227-232.
 HUANG H, HUANG J A, LI SH, et al. Studies on the variation of polyphenol, carbohydrate and the number of *Eurotium cristatum* during the processing of Fu tea with “Fungus growing on the loose tea”[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(15):227-232.
- [20] 卢恒谦. 冠突散囊菌液态发酵制备速溶黑茶及其功能研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2016.
 LU H Q. Preparation of instant dark tea by submerged fermentation with *Eurotium cristatum* and its function research[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016.
- [21] 彭雨轩. 茯茶降低脂肪细胞中脂肪沉积作用研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2013.
 PENG Y X. The fungi in Fuzhuan brick tea improve the beneficial function on inhibiting fat deposition in adipocyte [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013.
- [22] MAO Y, WEI B, TENG J W, et al. Analyses of fungal community by Illumina MiSeq platforms and characterization of *Eurotium* species on Liupao tea, a distinctive post-fermented tea from China[J]. *Food Research International*, 2017, 99(1):641-649.
- [23] 周绍琴. 传统豆瓣辣酱高酶活菌株筛选及促熟应用研究[D]. 贵阳:贵州大学, 2016.
 ZHOU SH Q. Screening of high enzyme activity strains from traditional broad bean sauce with chili and research on promotation application[D]. Guiyang: Guizhou University, 2016.
- [24] HONG S B, KIM D H, SAMSON R A. *Aspergillus* associated with Meju, a fermented soybean starting material for traditional soy sauce and soybean paste in Korea[J]. *Mycobiology*, 2015, 43(3):218-224.

Identification of *Eurotium amstelodam* Isolated from Jingyang Fu Tea and Its Processing Environment

MENG Lingyuan¹, SHI Dongni¹, SHENG Huanjing¹, GE Wupeng¹,
HE Yufeng², MAO Minhui³ and YANG Baowei¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Jinghe Market Service and Supervision Administration Bureau of Xixian New District, Jingyang Shaanxi 713700, China;

3. Jinghe Metro Urban Management Bureau of Xixian New District, Jingyang Shaanxi 713700, China)

Abstract Twenty six presumptive *Eurotium amstelodam* isolates that recovered from raw tea, semi-processed Fu tea, Fu tea products, swabs of the environment, air in two Fu tea processing factories, and soil of the surroundings of the factories by streak and coating method, in Jiangyang, Shaanxi province, were identified in this study to reveal the diversity of *Eurotium amstelodam* in this district. The 26 strains were preliminarily identified as *Eurotium amstelodam* via observing colony and mycelia morphological characteristics by microscope. After the sequences of D1/D2 region and the internal transcribed spacer (ITS) of 26S rDNA in 26 presumptive *Eurotium amstelodam* strains were amplified, sequenced and compared with those submitted in NCBI database, phylogenetic tree was made and confirmed these 26 strains were all *Eurotium amstelodam*. Our results exhibited that *Eurotium amstelodam* existed in various environments of Fu tea processing factories in Jingyang, Shaanxi, and the isolates in these environment settings were highly similar, which supported the possibility for Fuzhuan tea industrial producing by *Eurotium amstelodam* inoculation.

Key words Fuzhuan tea; *Eurotium amstelodam*; Isolation and identification

Received 2018-05-03 **Returned** 2018-09-20

Foundation item National Key R&D Program of China(No. 2017YFC1601402); the Northwest A&F University Students Innovation Training Program; Shaanxi Science & Technology Co-ordination & Innovation Project(No. 2015KTCQ03-08).

First author MENG Lingyuan, female, master student. Research area: food microbiology and food engineering. E-mail: mly0502@foxmail.com

Corresponding author YANG Baowei, male, Ph D, professor. Research area: food safety and food microbiology. E-mail: ybw090925@163.com

(责任编辑: 郭柏寿 **Responsible editor: GUO Baishou**)