

桑叶茯砖茶“金花”菌的分离鉴定

邵元元 肖建中 李飞鸣 李一平 张俊 邹湘月 龙唐忠 黄仁志 颜新培

(湖南省蚕桑科学研究所, 湖南长沙 410127)

摘要 从桑叶茯砖茶中分离出“金花”菌,经过继代纯化,以长势较好的桑叶茯砖茶“金花”菌作为供试菌株,用传统微生物形态学鉴定方法,观察其形态特征与生长特性等;运用光学显微镜观察菌株的有性型和无性型形态,并在扫描电镜下观察菌株的孢子、分生孢子等,同时结合 ITS 测序,在分子水平上对分离菌株进行鉴定。结果表明:桑叶茯砖茶中分离的“金花”菌,菌株的形态特征和生长特性、光学显微镜和扫描电镜显微特征与冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)相似,通过 ITS 序列分析,确认该桑叶茯砖茶“金花”菌株为冠突散囊菌。试验鉴定为借鉴传统茯砖茶的相关研究成果开展桑叶茯砖茶品质形成机理、功能性作用及其加工工艺比较研究奠定了基础。

关键词 桑叶茯砖茶 “金花”菌; 冠突散囊菌; 分离培养; 形态学鉴定

中图分类号 S886.9 文献标识码 A 文章编号 1007-0982(2017)03-0011-05

茯砖茶是以三级或四级黑毛茶为原料,经过筛分、拼配、汽蒸、渥堆、筑制、发花、干燥和成品包装等工艺制成的黑茶产品^[1]。茯砖茶内生长着大量特征性优势益生菌——冠突散囊菌,冠突散囊菌的闭囊壳色泽金黄,俗称“金花”。“金花”菌利用茶砖内部的营养物质进行代谢转化,抑制其它微生物的生长繁殖^[2],产生各种胞外酶^[3-5]和生物活性物质^[6-7],赋予了茯砖茶独特的品质和较强的降脂、降压以及调节糖类代谢等功效^[8],并对人体没有毒副作用^[9],因此“金花”的数量和质量已成为判断茯砖茶品质优劣的重要标志^[10]。

茯砖茶一直以来以茶科茶属的茶树叶为原料,2013年湖南省蚕桑科学研究所桑叶黑茶创新团队,首次以桑叶毛茶为原料,接种培养从安化茯砖茶中分离得到的“金花”菌株制作茯砖茶获得成功。李飞鸣等^[11]和邵元元等^[12]进行了以桑科桑属的桑叶和黑毛茶制作桑叶茯砖茶和复配桑叶茯砖茶的工艺研究及其他有关桑叶茯砖茶的研究。本文采用微生物经典鉴定法^[13-14]对桑叶茯砖茶“金花”菌株的形

态特征进行了光学显微镜与扫描电镜分析研究,并在微生物分类学上对桑叶茯砖茶“金花”菌进行了鉴定,期望为桑叶茯砖茶的发花工艺、品质形成机理与功能性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试桑叶茯砖茶 2014年安化云天阁茶叶有限公司生产的桑叶茯砖茶。

1.1.2 供试药剂 硝酸钠(分析纯)、硫酸亚铁(分析纯)均为台山市化工有限公司产品;磷酸氢二钾(分析纯)、氯化钾(分析纯)、蔗糖(分析纯)、石炭酸(分析纯)均为国药集团化学试剂有限公司产品;七水硫酸镁(分析纯),西陇化工股份有限公司产品;乳酸(分析纯),无锡市亚泰联合化工有限公司产品;琼脂,Biosharp公司产品;DNA提取试剂盒,天根生化科技有限公司产品;PCR产物试剂盒、扩增引物 ITS1、扩增引物 ITS4,均为生工生物工程有限公司产品;棉兰染色剂,罗基生物技术有限公司产品。

1.1.3 主要仪器设备 LRH-150 培养箱,上海一恒科学仪器有限公司产品;SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司产品;AL204 型电子天平,梅特勒-托利多(中国)仪器有限公司产品;YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸汽灭菌器,上海博

收稿日期: 2017-04-03; 接受日期: 2017-07-19

资助项目: 湖南省科技重点研发计划项目(编号 2015NK3054)。

第一作者信息: 邵元元(1987—)女,湖南常德,硕士,助理研究员。

Tel: 0731-84692978, E-mail: amiliyayuan@163.com

通讯作者信息: 颜新培(1966—)男,湖南南县,博士,研究员。

Tel: 13755179825, E-mail: yanxinpei@sina.com

迅实业有限公司产品;JSM-6380LV型电子显微镜,日立电子株式会社产品;SS3型多功能液晶数码显微镜,深圳市爱科学数码科技有限公司产品;电子万用炉,郑州中天仪器有限公司产品;XC-750型中药粉碎机,深圳雷粤机械设备有限公司产品;PCR反应扩增仪,加拿大BBI公司产品;BCD-208K/A型海尔冰箱,海尔公司产品;DK-8D型电热恒温水槽,上海森信实验仪器有限公司产品;DYY-8型稳压稳流电泳仪,上海琪特分析仪器有限公司产品;凝胶成像系统,Gene Genius公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基制备 (1) 普通察氏固体培养基的制备: 硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、七水硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL。(2) 20%高糖察氏固体培养基的制备: 硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、七水硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 200 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL。将琼脂煮沸搅拌均匀,其余的药品用蒸馏水溶解,再将二者混合定容,封口后高压灭菌备用。

1.2.2 培养基平板和斜面的浇制 (1) 固体培养基平板的浇制。分别将配制好的普通察氏固体培养基、20%高糖察氏固体培养基和玻璃培养皿在 121 °C 条件下灭菌 20 min,灭菌完毕后培养基在超净工作台上冷却至 50 °C,培养皿在烘箱内 70 °C 烘干,准备完毕后开始浇制平板,每个平板倒入培养皿容量三分之一左右的培养基,将培养皿水平放置待培养基完全冷却凝固制成普通察氏固体培养基平板和 20%高糖察氏固体培养基平板(用于菌落的分离纯化培养)后放入冰箱 4 °C 冷藏备用。(2) 固体培养基斜面的浇制。将配制好的普通察氏培养基分装到试管中,每支试管约装 10 mL 培养基,盖上硅胶塞,每 7 只试管为 1 捆,用皮筋扎好,然后用牛皮纸包好,在 121 °C 条件下灭菌 20 min,灭菌完成后 15° 倾斜放置在超净工作台上,冷却凝固制成普通察氏固体培养基斜面(用于纯化菌种的繁殖保种)后放入冰箱 4 °C 冷藏备用。

1.2.3 桑叶茯砖茶“金花”菌(S1)的分离、纯化 取桑叶茯砖茶 25 g,放置在盛有玻璃珠和 225 mL 无菌水的 500 mL 锥形瓶中,在摇床中恒温震荡,相关参数为温度 28 °C,转速 180 r/min,时间 20 min,

使菌落分散,用纱布过滤除去残渣,以滤液为 10^{-1} 液。在超净工作台上,用灭菌水进行梯度稀释,将滤液分别稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 液,每个梯度溶液取 0.5 mL 分别涂布于普通察氏固体培养基平板上,做好标记并封口,静置 10 min 后,倒置于 28 °C 恒温培养箱中。待长出单个菌落后观察其生长情况,适时对长势较好的“金花”菌菌落进行划线分离,经多次划线分离,待菌种纯化后转接到普通察氏固体培养基斜面上,培养 7 d 后转入 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.4 S1 的培养与菌落形态观察 在超净工作台上将 4 °C 冰箱保存的纯化后菌种取出,在常温下复苏 24 h 后,分别接种于普通察氏固体培养基平板和 20%高糖察氏固体培养基平板上,置于 28 °C 恒温培养箱中培养,每天观察菌落的生长状况,并做好记录、拍照。

1.2.5 S1 的光学显微镜观察 采用直接插片观察和形态学观察的方法^[15]。普通察氏固体培养基平板接种时,将灭菌的盖玻片靠近接种点 5 mm 处呈 45°~50° 斜插入普通察氏固体培养基平板中;从第 3 天起,每隔 1 d 对 S1 菌落的菌株生长情况进行观察。待菌丝扩展至盖玻片处(盖玻片上有明显的菌丝体覆盖)时将其取下,在载玻片上滴 1 滴棉兰染色液(棉兰染色液的配方如下:石炭酸 10 g,乳酸 10 mL,蒸馏水 10 mL,加棉蓝染色剂 0.22 g),小心将盖玻片有菌丝体的一面正对着载玻片上的棉兰染色液,轻轻盖上避免产生气泡,染色 5 min 后于光学显微镜下观察。

1.2.6 S1 的扫描电镜观察 取普通察氏固体培养基平板培养 7~14 d 的 S1 菌落,从中挑取少许 S1 菌落制成标本并固定,按常规方法制片后在扫描电镜下观察。

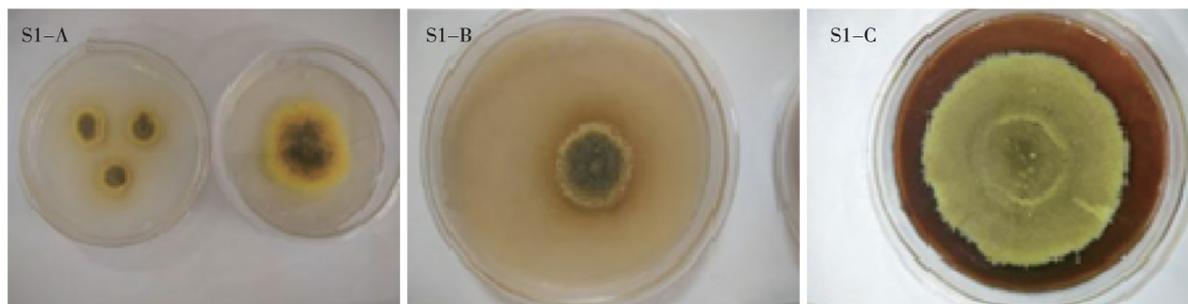
1.2.7 S1 的 DNA 序列分析 挑取少量 S1 菌落,利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA,扩增引物为 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),扩增 S1 菌株的 ITS 区序列,用 PCR 产物试剂盒回收和纯化,最后送交生工生物工程(上海)有限公司进行测序。其顺序的相似性在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中使用 BLAST 工具进行比较。

2 结果与分析

2.1 S1 的菌落形态和生长特性

S1 在普通察氏固体培养基平板上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径为 18~25 mm, 菌落较致密, 边缘淡黄色, 中央部分为浅褐色, 呈不规则圆形, 菌落周围和背面开始产生色素, 有黄色晕圈(图 1 S1-A 左)。在 20% 高糖察氏固体培养基平板上 28 °C 培养 7 d, 生长较快, 菌落直径达 40~55 mm, 呈不规则圆形,

菌落周围和背面没有明显的色素产生, 边缘金黄色(图 1 S1-A 右)。在普通察氏固体培养基平板上 28 °C 培养 14 d, 菌落直径为 28~35 mm, 呈圆形或近圆形, 菌落边缘呈浅黄色, 中间呈浅褐色或褐色, 均开始产生褐色晕圈(图 1 S1-B)。在普通察氏固体培养基平板上 28 °C 培养 21 d, 菌落直径为 46~62 mm, 呈金黄色或浅黄色, 表面无液滴渗出, 菌落致密, 平、薄无隆起, 整个平板充满茶褐色色素(图 1 S1-C)。



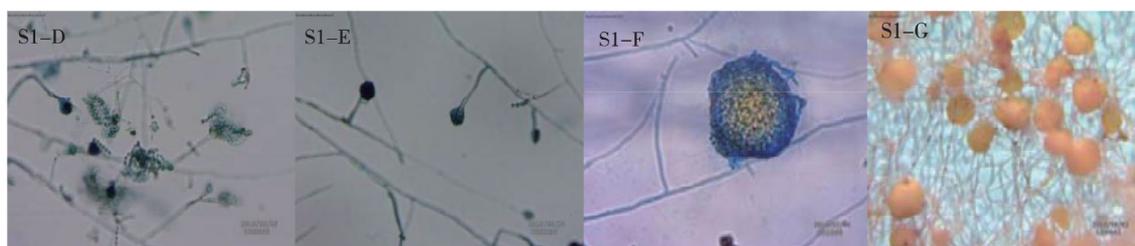
S1-A. 左为普通察氏固体培养基, 右为 20% 高糖察氏固体培养基(28 °C, 7 d); S1-B. 普通察氏固体培养基(28 °C, 14 d); S1-C. 普通察氏固体培养基(28 °C, 21 d)。

图 1 普通与高糖察氏固体培养基平板的 S1 菌落形态

2.2 S1 的光学显微镜显微特征

由图 2 可以看出, 在光学显微镜下 S1 的分生孢子向外呈放射状生长, 链簇在一起, 呈扫把状(图 2 S1-D)。S1 的分生孢子头均呈疏松放射形, 顶囊较大(图 2 S1-E)。其有性生殖结构以闭囊壳为主, 在

光学显微镜下观察 S1 的染色闭囊壳, 发现 S1 的闭囊壳为球形、扁球形或椭球形, 大小 100~175 μm, 闭囊壳里可以清晰看到子囊(图 2 S1-F)。S1 的未染色闭囊壳丛生在菌丝体中间, 均为球形, 颜色为金黄色(图 2 S1-G)。



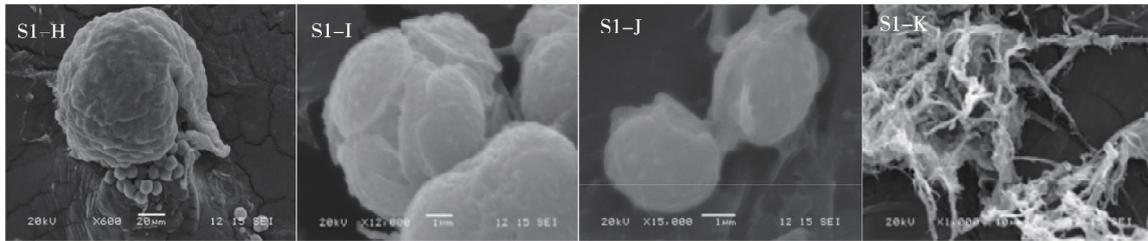
S1-D. S1 的分生孢子; S1-E. S1 的分生孢子及顶囊; S1-F. S1 的染色闭囊壳; S1-G. S1 的未染色闭囊壳。

图 2 S1 的光学显微镜显微特征

2.3 S1 的扫描电镜显微特征

由图 3 可以看出, 在扫描电镜下 S1 的闭囊壳为近球形, 存在于黄色具饰菌丝网中, 直径为 100~150 μm, S1 的闭囊壳无规律破裂释放出子囊(图 3 S1-H); S1 的每个子囊内均含有 8 个子囊孢子, 直径为 9~14 μm(图 3 S1-I)。S1 的子囊孢子呈双凸

镜形, “赤道”部分具有明显的沟和 2 个明显的纵向鸡冠状凸起, 宽约为 0.8~1.1 μm, S1 的子囊孢子体大小为 5.2~6.3 μm×4.3~5.1 μm, 凸面较粗糙, 具有尖疣(图 3 S1-J)。S1 的菌丝体为有分枝的丝状长管, 有隔, 每隔有细胞核; 菌丝体周围布满小丝(图 3 S1-K)。



S1-H.S1 的闭囊壳释放子囊 ,S1-I.S1 的子囊 ,S1-J.S1 的子囊孢子 ,S1-K.S1 的菌丝体。

图3 S1 的扫描电镜显微特征

2.4 S1 的分子鉴定结果

利用引物 ITS1 和 ITS4 扩增 S1 菌株的 ITS 区序列,该序列片段为 426 bp,在 NCBI 数据库中利用 BLAST 进行对比,结果显示扩增 S1 菌株的 ITS 片段与数据库中的冠突散囊菌 [*Eurotium cristatum* (Accession: NO.KR812327.1)] 有 100% 的相似性,由此确认该桑叶茯砖茶“金花”菌株 S1 为冠突散囊菌。

3 小结与讨论

桑叶是国家卫生部门认定的药食同源植物叶,桑叶茯砖茶是茯砖茶家族的创新品种。本试验以形态结构为主要分类依据,首次对 S1 进行分离培养,通过普通光学显微镜和电子显微镜对其菌落形态、分生孢子、闭囊壳、子囊孢子等进行观察,从菌落形态和生长特性、光学显微镜与扫描电镜显微特征可以看出,S1 具有下述特征:菌落周边黄色,或近于橄榄浅黄色,中心部分颜色较深,近于褐色;闭囊壳量大,黄色。在普通察氏固体培养基平板上 28℃ 培养 21 d 菌落颜色变成橄榄褐或丁香褐,菌落背面黑褐色。在 20% 高糖察氏固体培养基平板上 28℃ 培养生长较快,闭囊壳和子囊球形或近球形;子囊孢子双凸镜形,具有 2 个明显的纵向鸡冠状突起,凸面表面明显粗糙,具尖疣。对照《中国真菌志》(第五卷)^[13],S1 具有冠突散囊菌的典型特征,结合 DNA 序列分析,根据相关学者关于不同亲缘关系研究成果^[14-18],可以判断桑叶茯砖茶“金花”菌 S1 为真菌门(Fungi)子囊菌纲(Ascomycetes)真子囊菌亚纲(Euascmycetes)曲霉目(Eurotiales)曲霉科(Eurotiaceae)散子囊菌属(*Eurotium* Link ex Fires)冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)。

传统茶叶茯砖茶是在前期渥堆时通过曲霉、青霉、根霉、酵母菌等多种微生物的发酵作用转化黑毛

茶的内含成分后,再经人工控制发酵条件使“金花”菌成为优势菌,最终形成其独特的品质^[19]。冠突散囊菌能分泌胞外酶并与茶叶本身的酶协同作用,分解黑毛茶中的单宁和淀粉等,使茶黄素(TF)、茶红素(TR)和茶褐素(TB)含量升高,蔗糖、茶多酚、儿茶素总量逐渐减少,从而完成茯砖茶风味物质的转化,形成茯砖茶特有的滋味。“金花”菌菌丝体本身含有丰富的、几乎所有人体必需的氨基酸,具有浓郁的菌花香且能分泌水溶性色素,在增强茶营养及其风味的同时,还能改善茶汤的颜色和香气^[20-27]。本试验开展 S1 的鉴定,为借鉴传统茯砖茶茶叶的相关研究成果,开展桑叶茯砖茶品质形成机理、功能性作用及其加工工艺比较研究奠定了基础。不仅为桑资源利用和茶产业发展开辟了新的途径,也为桑、茶跨学科深入研究搭建了广阔舞台。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.紧压茶第 3 部分:茯砖茶,GB/T 9833.3—2013[S].全国茶叶标准化技术委员会,1988.
- [2] MO H Z,ZHANG H,LI Y Q,et al.Antimicrobial activity of the indigenously microbial fermented Fuzhuan brick-tea[J].J Biotechnol,2008(136):722-729.
- [3] 杨抚林.冠突散囊菌液体发酵工艺及其发酵液对消化酶活性影响的研究[D].长沙:湖南农业大学,2005.
- [4] 蔡正安,刘素纯,刘仲华,等.茯砖茶中冠突散囊菌纤维素酶的酶学性质研究[J].茶叶科学,2010,30(1):57-62.
- [5] 邓放明.茯砖茶中冠突散囊菌分离培养及其发酵液胞外多糖与应用酶学研究[D].长沙:湖南农业大学,2007.
- [6] 黄怀生,郑红发,栗本文,等.茯砖茶中冠突散囊菌的代谢产物研究 I 冠突散囊菌的液体培养[J].茶叶通讯,2010,37(2):15-17.
- [7] 邓放明,龚淑莉,杨伟丽.冠突散囊菌胞外多糖生物活性高通量筛选试验[J].食品与机械,2007,23(6):48-52.
- [8] 屠幼英,梁慧玲,陈喧,等.紧压茶儿茶素和(下转第 18 页)

表3 不同除草剂对桑园杂草的防除成本

除草剂	面积/ m ²	除草剂费用/ 元	用工时间/ h	工时费/ (元/h)	用工费用/ 元	费用合计/ 元
180 g/L 草铵膦异丙胺盐 AS 120 倍	180	6.76	0.21	12.50	2.63	9.39
200 g/L 氯氟吡氧乙酸 EC 500 倍	180	2.70	0.21	12.50	2.63	5.33
41%草甘膦异丙胺盐 AS 94 倍	180	7.50	0.21	12.50	2.63	10.13
200 g/L 氯氟吡氧乙酸 EC 500 倍+41%草甘膦异丙胺盐 AS 94 倍	180	10.20	0.21	12.50	2.63	12.83
人工除草(对照)	180	0	2.40	12.50	30.00	30.00

3 结论

本次田间试验结果表明:使用除草剂对饲料桑园杂草的防除成本约为人工除草成本的 1/3,经济效益较好;饲料桑园除草可以选择 41%草甘膦异丙胺盐 AS 94 倍稀释药液和 180 g/L 草铵膦异丙胺盐 AS 120 倍稀释药液等除草效果较好的广谱内吸性除草剂;饲料桑园喷药时间以每次桑树收割清除树上的叶片后,桑芽未萌发时为最佳时间,此时桑树不易受到广谱内吸性除草剂的药害,能确保饲料桑园内的桑树发芽生长正常,最好边收割边清除树上的叶片后,及时施药。

参考文献

[1] 鲁琴.桑园杂草发生动态及化学防除技术[J].农技服务,2012,29(9):1047.

[2] 秦光良,郭俊英,陈荣智,等.桑园杂草发生动态及防除技术研究[J].湖北植保,2012(5):39-40.

[3] 方荣俊,潘一乐.桑园恶性杂草种类及其防除方法[J].中国蚕业,2005,26(1):68-69.

[4] 高树梅.除草剂对桑园杂草的效果及其对土壤的影响[J].植物医生,2016,26(5):41-42.

[5] 戴建忠,陈伟国,钱秋杰,等.草铵膦对桑园杂草的防除效果和对家蚕的毒性试验[J].蚕业科学,2017,43(2):268-274.

[6] 中华人民共和国农业部.中国饲料植物图谱[M].北京:科学普及出版社,1959.

(上接第 14 页)

有机酸的组成分析[J].茶叶,2002,28(1):22-24.

[9] 肖文军,傅冬和,任国谱,等.茯茶毒理学试验报告[J].食品科学,2007,27(4):307-310.

[10] 杨抚林,邓放明,赵玲艳,等.茯砖茶发花过程中优势菌的研究[J].茶叶科学技术,2005(1):5-6.

[11] 李飞鸣,李一平,邵元元,等.不同渥堆发酵时间对复配桑叶茯砖茶发花效果及感官质量的影响[J].中国蚕业,2016,37(3):7-11.

[12] 邵元元,李飞鸣,李一平,等.不同茶砖进烘含水率对复配桑叶茯砖茶发花效果及感官质量的影响[J].中国蚕业,2017,38(1):11-15.

[13] 齐祖同.中国真菌志 第五卷 曲霉及相关有性型[M].北京:科学出版社,1997.

[14] RAPER K,FENNELL D,AUSTWICK P.The genus aspergillus [M].Baltimore:Williams & Wilkins Baltimore,1965.

[15] 周传云.食品微生物实验技术[M].长沙:湖南农业大学食品科技学院微生物研究室,1999.

[16] 胡治远,赵运林,刘石泉.茯砖茶冠突散囊菌多样性初步研究[J].茶叶,2012,38(2):82-88.

[17] 王文涛.茯砖茶中冠突散囊菌分类学研究[D].长沙:湖南农业

大学,2014.

[18] 王磊,谭国慧,潘清灵,等.黑砖茶中两种产生“金花”的曲霉菌[J].菌物学报,2015,34(2):186-195.

[19] 金冬双,龚淑英.黑茶的微生物研究进展[J].茶叶,2007,33(4):203-207.

[20] 温琼英.茯砖茶中主要微生物的研究[J].茶叶通讯,1986(4):19-21.

[21] 邓放明.茯砖茶中冠突散囊菌分离培养及发酵液胞外多糖与应用酶学研究[D].长沙:湖南农业大学,2007.

[22] 刘作易,秦京.“金花”菌与茯砖茶品质[J].贵州农学报,1991,10(1):79-82.

[23] 刘仲华,黄建安,王增盛,等.茯砖茶加工中色素物质与色泽品质的形成[J].茶叶科学,1991,11(增刊):76-80.

[24] 王华夫,李名君,刘仲华,等.茯砖茶在发花过程中的香气变化[J].茶叶科学,1991,11(增刊):81-86.

[25] 王增盛,施兆鹏,刘仲华,等.论茯砖茶品质风味形成机理[J].茶叶科学,1991,11(增刊):49-55.

[26] 黄建安,刘仲华,施兆鹏.茯砖茶中主要酶类的变化[J].茶叶科学,1991,11(增刊):63-68.

[27] 王增盛,谭湖伟,张莹,等.茯砖茶制造中主要含氮、含碳化合物的变化[J].茶叶科学,1991,11(增刊):69-75.