

# 普洱茶优势菌株黑曲霉的分离及其功能和安全性研究

周才碧<sup>1</sup>, 陈文品<sup>1\*</sup>, 吴钟玲<sup>2</sup>, 张敏星<sup>1</sup>, 管俊岭<sup>1</sup>, 李涛<sup>1</sup>, 穆瑞禄<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学园艺学院茶叶科学系, 广州 510642; 2. 广州质量监督检测研究院, 广州 510642)

**摘要:** **目的** 了解黑曲霉在普洱茶渥堆发酵中的功能和安全性。**方法** 利用平板涂布法从普洱茶中分离、纯化得优势菌株 S6, 通过分子鉴定为黑曲霉; 将黑曲霉按照悬浮液  $10^7$  个/mL, 接种于潮水量 35% 的云南大叶种晒青毛茶, 30 °C、发酵 25 d 制备得发酵茶样, 按照 GB 22111-2008 进行感官、理化和安全性评价。**结果** 优势菌株黑曲霉纯种发酵的茶样香气浓纯、汤色黑褐色、滋味较平和, 达到三级茶叶标准要求, 对比对照茶样, 具有茶褐素、红度和黄度等变化较为深刻, 且赭曲霉毒素的含量为 3.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 低于国内外限量。**结论** 优势菌株黑曲霉可以作为发酵用菌种, 适于普洱茶的渥堆发酵, 发酵样的安全性高。

**关键词:** 普洱茶; 黑曲霉; 分离; 鉴定; 赭曲霉毒素; 安全性

## Research on identification, function and safety of *Aspergillus Niger*, a preponderant fungus during the fermentative process of Pu'er tea

ZHOU Cai-Bi<sup>1</sup>, CHEN Wen-Pin<sup>1\*</sup>, WU Zhong-Ling<sup>2</sup>, ZHANG Min-Xing<sup>1</sup>, GUAN Jun-Ling<sup>1</sup>, LI Tao<sup>1</sup>, MU Rui-Lu<sup>1</sup>

(1. Department of Tea Science, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
2. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510642, China)

**ABSTRACT: Objective** To understand the function and safety of *Aspergillus niger* during the fermentative process of Pu'er tea. **Methods** The preponderant fungus S6 was separated and purified from Pu'er tea in the plate method, and it was *Aspergillus niger* through the use of molecular identification. Then *Aspergillus niger*, following suspension  $10^7/\text{mL}$ , was inoculated on the sun-dried green tea with 35% water, cultured for 25 d with 30 °C, then the sensory, security, physical and chemical evaluations of fermented sample were operated according to GB 22111-2008. **Results** The research results showed that compared with CK, the content of the tea sample in fermentation of *Aspergillus niger* was the abrownins, redness and brightness. It was achieved the third standard and was changed significantly in the fermented sample with sweet aroma, black brown tang, velvety flavor, and the content of *ochratoxin* was 3.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  under the limitation of home and abroad. **Conclusion** *Aspergillus niger* is one of preponderant fungus during the fermentative process of Pu'er tea, and plays a very important role to the formation of Pu'er tea quality with high safety.

**KEY WORDS:** Pu'er tea; *Aspergillus niger*; separation; identification; *ochratoxin*; safety

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270725)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270725)

\*通讯作者: 陈文品, 副教授, 主要研究方向为茶叶加工与安全。E-mail: cwptea@scau.edu.cn

\*Corresponding author: CHEN Wen-Pin, Associate Professor, Tea Science Department, Horticultural College, South China Agricultural University, No.483, Wu-Shan Road, Tian-He District, Guangzhou 510642, China. E-mail: cwptea@scau.edu.cn

## 1 引言

普洱茶是云南大叶种晒青毛茶在湿热作用和微生物酶促作用下形成一种特种茶叶,微生物的发酵作用在云南普洱茶品质形成中起决定性的作用,是云南普洱茶品质形成的必要条件<sup>[1]</sup>,而黑曲霉(*Aspergillus niger*)是普洱茶渥堆的发酵优势菌株之一<sup>[2]</sup>。

普洱茶具有降脂<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抗过敏<sup>[5]</sup>、降血糖<sup>[6]</sup>、抗肿瘤、抗病毒<sup>[7]</sup>、逆转免疫衰老<sup>[8]</sup>等功能,其自身的卫生品质是决定普洱茶产品能否被安全食用、能否作为商品的基本条件,也是普洱茶产业可持续发展的前提<sup>[9]</sup>。但普洱茶渥堆发酵过程是一个多种微生物混合发酵体系,有多种微生物毒素残留的可能。

微生物毒素具有器官毒性、细胞毒性、分子毒性、遗传毒性和联合毒素,使机体产生免疫机能下降、生长受阻、生产性能减弱、抗病力降低、神经毒性和致癌性等危害<sup>[10]</sup>,甚至中毒致死,而且一般微生物毒素的化学结构都很稳定,很难去除<sup>[11]</sup>。

赭曲霉毒素(*ochratoxin*, OCT)是由曲霉属<sup>[12,13]</sup>或青霉产生的有毒代谢产物,在湿度较高的条件下才能产生<sup>[14]</sup>,以 OCTA、OCTB 和 OCTC 等 7 种结构类似的化合物为主<sup>[15]</sup>,AFT、AFB1 和 OTA 在 50℃温水中易浸出,且表现在植物间相互传递和感染的现象<sup>[16]</sup>。常污染粮食、花生、蔬菜、高粱<sup>[17]</sup>和咖啡豆等农作物<sup>[18-21]</sup>,及酵母片也有检出<sup>[22]</sup>,且从市售的红茶和普洱茶中尚未检测到曲霉菌株产生的赭曲霉毒素 A 和伏马毒素<sup>[23]</sup>。OCT 主要侵害动物肝脏与肾脏,抑制动物细胞有丝分裂,有致畸和致癌作用,IARC 将其定为 2B 类致癌物。谷物及其制品、豆类及其制品中 OCTA 的限量不得超过 5 μg/kg<sup>[24]</sup>,动物饲料中限量范围在 100~1000 μg/kg 之间,根据世界卫生组织(WHO),OCTA 在谷物中的最高浓度应为 5 μg/kg。

目前,对于普洱茶中黑曲霉的分离、鉴定和功能性以及安全性方面的研究未见报道。在普洱茶生产、运输和陈化过程,有曲霉属菌株的参与,普洱茶中存在产生赭曲霉毒素的可能性,因此对普洱茶优势菌株黑曲霉的功能和安全性研究有特别重要的意义。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 仪器与设备

SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设

备有限公司),恒温恒湿培养箱(宁波江南仪器厂),立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司),RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),AB204-N 电子分析天平,THA-82A 台式恒温震荡仪,DGX-9143B-2 型数码电热鼓风干燥箱(上海福马实验设备有限公司),SMART 生物显微镜(重庆奥特光学有限公司),HWS28 型恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司),UV5100 型紫外可见分光光度计(上海元析一起有限公司),岛津 LC20A 型高效液相色谱仪等。

#### 2.1.2 样品与试剂

陈年普洱茶饼(七彩云南)、云南大叶种晒青毛茶(云南勐宋)、桔青霉素和赭曲霉毒素标样(Pribolab),以及查氏琼脂培养基和马铃薯葡萄糖琼脂培养基等。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 菌株分离和鉴定

#### 2.2.1.1 菌株分离和形态鉴定

陈年普洱茶饼,制备  $10^{-2}$ ~ $10^{-7}$  稀释梯度,涂布分离培养菌株,纯化保藏;根据初分菌落的形状、大小、颜色和表面特征等形态特征,结合《中国真菌志》对获得的各菌株进行初步的形态鉴定。

#### 2.2.1.2 分子鉴定

采用改良 CTAB 法提取菌株 DNA;使用 KOD 高保真 DNA polymerase 进行 PCR 扩增目的片段,进行 3730XL 常规测序反应,依照 ABI 标准程序操作完成全序列基因;在 NCBI 数据库中进行比对,确定菌株的分类地位,构建进化树。

#### 2.2.2 发酵茶样制备

制备  $10^7$  个/mL 上述普洱茶中分离的优势菌株孢子悬浮液,接种于潮水量为 35% 的云南大叶种晒青毛茶中,在 30℃气候箱中培养 25 d,取出进行 45℃干燥,得到普洱茶发酵茶样,不加菌株发酵茶样为对照 CK。

#### 2.2.3 检测方法

水浸出物,GB/T 8305-2002;茶多酚,GB/T 8313-2002;氨基酸,GB/T 8314-2002;可溶性糖,蒽酮比色法;茶色素,系统分析法;色差,色差仪;展青霉素,GB/T 5009.185。

## 3 结果与讨论

### 3.1.1 形态鉴定

采用涂布平板,从陈年普洱茶饼中分离得到优势菌株 S6。S6 在查氏琼脂培养基上菌落生长迅速,

28 °C培养6 d, 菌落在20~30 mm之间, 菌落较大, 地毯式蔓延生长, 呈同心轮纹状, 菌落正面黑色, 边缘产生白色次生菌丝, 反面灰黑色; 在显微镜下观察, 菌丝有隔, 在菌丝的壁厚而膨大成“足细胞”, 产生分生孢子梗, 无隔, 梗顶端膨大成球状泡囊, 即为分生孢子头, 菌落和孢子形态见图1。以上培养性状和形态特征符合黑曲霉的标准形态, 初步命名为黑曲霉S6(*Aspergillus niger* S6)。

### 3.1.2 S6菌株进化树构建

以真菌基因组DNA为模板, 利用通用引物扩增获得ITS基因的序列(如PCR图); 利用NCBI中BLAST搜索, 得到匹配度较高的已知序列, 利用MEGA软件进行多序列比对。结果显示, S6基因序列与已知的*Aspergillus niger*(AB363747.1), 相似度达到99%, 与*Aspergillus nomius*和*Aspergillus brasiliensis*的相似度相对较低, S6菌株系统进化树结果构建见图2:

其具体分类地位如下:

- 界 真菌界 *Mycota*
- 门 子囊菌门 *Ascomycota*
- 纲 散囊菌纲 *Eurotiomycetes*
- 目 散囊菌目 *Eurotiales*

——科 发菌科 *Trichocomaceae*

——属 曲菌属 *Aspergillus*

——种 黑曲霉 *Aspergillus niger*

## 3.2 黑曲霉对普洱茶发酵茶样的影响

### 3.2.1 黑曲霉发酵茶样的感官品质

由图3和表1可以看出: 与CK相比, 黑曲霉发酵茶样附有棕、褐色菌体, 香气浓纯、有特殊的蘑菇香, 汤色黑褐色较浑浊, 滋味较平和、无刺激性、无特殊的口感。结果表明, 黑曲霉菌株 $10^7$ 个/mL孢子悬浮液接种于潮水量35%的云南大叶种晒青毛茶中, 30 °C发酵25d, 菌落生长旺盛, 对普洱茶影响较深刻。

### 3.2.2 黑曲霉发酵茶样的成分变化

由表2和图3可以看到: 与CK相比, 黑曲霉发酵茶样水浸出物、茶多酚、可溶性糖、茶红素、亮度、的含量呈下降趋势, 变化幅度分别为6.23%、58.2%、10.3%、59.4%、281.43%; 氨基酸、茶褐素、红度和黄度的含量呈上升趋势, 变化幅度为64%、633.2%、552.5%和210.53%。pH值变化不明显。结果表明, 黑曲霉渥堆发酵, 对普洱茶发酵茶样的茶褐素、红度和黄度影响较深刻。

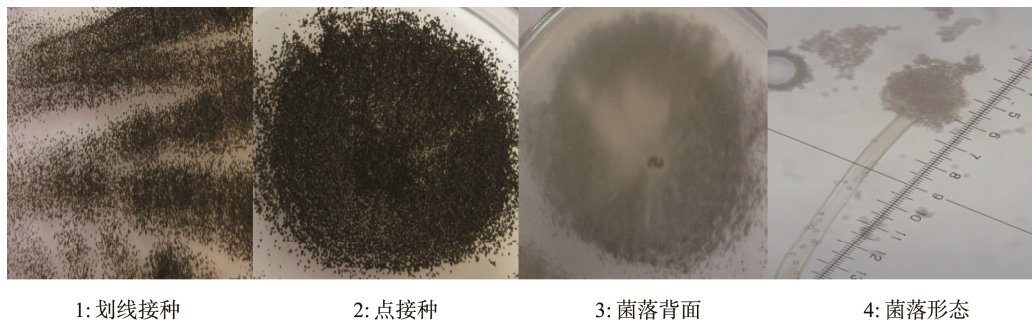


图1 黑曲霉

Fig. 1 *Aspergillus niger*

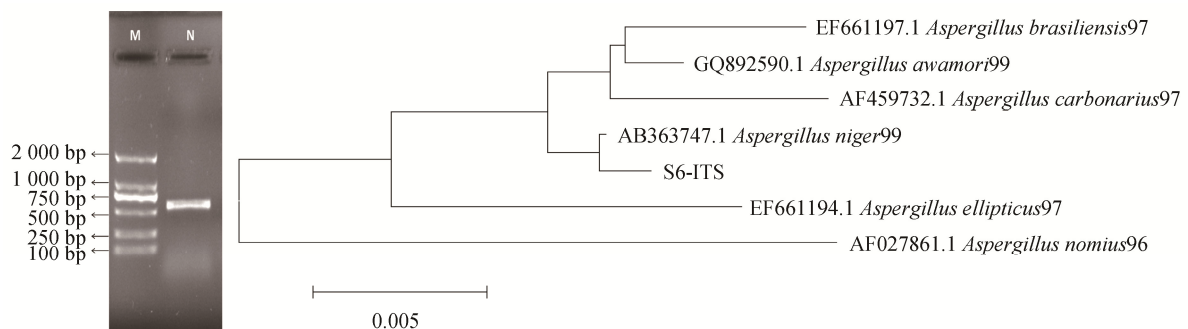


图2 PCR和进化树

Fig. 2 PCR and evolutionary tree

表 1 发酵茶样的感官审评  
Table 1 The sensory evaluation of the fermented sample

菌株	外形	香气	汤色	滋味	叶底
CK	墨色	清香	黄	涩	褐
S6	深棕褐色	蘑菇香	乌褐色、浑	浓厚、平和	褐



对照组

发酵组

图 3 发酵茶样及感官审评

Fig. 3 The fermented sample and the sensory evaluation

表 2 发酵茶样的成分分析

Table 2 The component analysis of the fermented sample

指标	CK	黑曲霉发酵茶样
水浸出物%	48.16±1.61	45.18±1.51
茶多酚%	25.00±0.83	10.44±0.35
氨基酸%	2.54±0.08	4.39±0.15
可溶性糖%	5.35±0.18	4.82±0.16
赭曲霉毒素 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.00±0.00	3.80±0.13
茶红素	6.04±0.20	2.50±0.08
茶褐色	2.99±0.10	18.90±0.63
亮度	-7.01±0.23	-19.45±0.65
红度	4.21±0.14	21.95±0.73
黄度	10.00±0.33	21.89±0.73
pH	7.07±0.24	7.20±0.24

注: 数据为均值±标准误

### 3.2.3 黑曲霉发酵茶样的安全性

利用 HPLC 测定黑曲霉发酵茶样中赭曲霉毒素的含量, 由表 2 知, 赭曲霉毒素的含量为 3.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (低于国内外限量 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。结果表明, 黑曲霉在潮水量 35%云南大叶种晒青毛茶中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 发酵 25 d, 发酵茶样赭曲霉毒素低于国内外限量, 安全性高。

## 4 结论

黑曲霉在查氏琼脂培养基上菌落生长迅速, 28  $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 d, 菌落在 20~30mm 之间, 菌落较大, 地毯式蔓延生长, 呈同心轮纹状, 菌落正面黑色, 边缘

产生白色次生菌丝, 反面灰黑色; 在潮水量 35%云南大叶种晒青毛茶中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 发酵 25 d, 发酵茶样附有棕、褐色菌体, 香气浓纯、有特殊的蘑菇香, 汤色黑褐色较浑浊, 滋味较平和、无刺激性、无特殊的口感, 茶褐素、红度和黄度等变化较为深刻, 且赭曲霉毒素低于国内外限量, 安全性高, 适于普洱茶的渥堆发酵。

## 参考文献

- [1] Hou WC, Jeng CK, Chen SY. Enhancement of fermentation process in Pu-erh tea by tea-leaf extract [J]. J Food Sci, 2010, 75(1): 44-48.
- [2] 周才碧, 张敏星, 蒋陈凯, 等. 黑曲霉及其与普洱茶品质关系研究进展[J]. 微生物学杂志, 2014, (2): 88-90.  
Zhou CB, Zhang MX, Jiang CK, et al. Researches progress on *Aspergillus niger* and relationship between it and quality of Pu'er tea [J]. J Microbiol, 2014, (2): 88-90.
- [3] Cao ZH, Yang H, He ZL, et al. Effects of aqueous extracts of raw Pu-er tea and ripened Pu-er tea on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. Phytotherapy Research, 2013, 27(8): 1193-1199.
- [4] Fan JP, Fan C, Dong WM, et al. Free radical scavenging and anti-oxidative activities of an ethanol-soluble pigment extract prepared from fermented Zijuan Pu-erh tea [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 59: 527-533.
- [5] Yamazaki K, Yoshino K, Yagi C, et al. Inhibitory effects of Pu-er tea leaves on mouse type IV allergy [J]. Food Nutrit Sci, 2012, 3(3): 394-400.
- [6] Huang Q, Chen S, Chen H, et al. Studies on the bioactivity of aqueous extract of pu-erh tea and its fractions: In vitro antioxidant activity and  $\alpha$ -glycosidase inhibitory property, and their effect on postprandial hyperglycemia in diabetic mice [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 53:75-83.
- [7] Huang N, Yang L, Li X, et al. Anti-HIV activities of extracts from Pu-erh tea [J]. Chin J Natural Med, 2012, 10(5): 347-352.
- [8] Zhang L, Shao W, Yuan L, et al. Decreasing pro-inflammatory cytokine and reversing the immunosenescence with extracts of Pu-erh tea in senescence accelerated mouse (SAM) [J]. Food Chem, 2012, 135(4): 2222-2228.
- [9] 陈文品, 许玫. 普洱茶卫生与安全控制及相关研究现状[J]. 食

- 品安全质量检测学报, 2013(05):1373-1378.
- Chen WP, Xu M. Hygiene and safety control related research status of Pu'er tea [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(5): 1373-1378.
- [10] Vidal JC, Bonel L, Ezquerra A, *et al.* Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49(2): 146-158.
- [11] Corcuera L A, Ibanez-Vea M, Vettorazzi A, *et al.* Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(26): 2733-2740.
- [12] Mata M M, Taniwaki M H, Iamanaka B T, *et al.* Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* [J]. *Can J Microbiol*, 2007, 53(1): 148-151.
- [13] Sugita-konishi Y. Occurrence of ochratoxin A and distribution of ochratoxin A producing fungi in Japan [J]. *Mycotoxins*, 2007, 57(1): 31-36.
- [14] 韩铮. 中药材中常见真菌毒素分析方法学及代谢动力学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- Hang Z. Study on Analytical Methodology and Pharmacokinetics of the Mycotoxins in Traditional Chinese Medicines [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [15] Kong W, Wei R, Logrieco A F, *et al.* Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets [J]. *Food Chem*, 2014, 146(1): 320-326.
- [16] Iha MH, Trucksess MW. Aflatoxins and ochratoxin A in tea prepared from naturally contaminated powdered ginger [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2010, 27(8): 1142-1147.
- [17] Elbashir AA, Ali SE. Aflatoxins, ochratoxins and zearalenone in sorghum and sorghum products in Sudan [J]. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 2014, 7(2): 135-140.
- [18] Issa GA, Hassan G, Samaneh R. Ochratoxin A analysis in rice samples of different cities of Mazandaran (a province in Northern Iran) [J]. *Nutrit Food Sci*, 2014, 44(3): 178-183.
- [19] Jersek B, Poklar U N, Skrt M, *et al.* Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum* [J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2014, 65(2): 199-208.
- [20] Levi C. Mycotoxins in coffee [J]. *J Assoc Anal Chem*, 1980, 63(6): 1282-1285.
- [21] Faucet-Marquis V, Joannis-Cassan C, Hadjeba-Medjdoub K, *et al.* Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(17): 7583-7586.
- [22] Faucet-Marquis V, Joannis-Cassan C, Hadjeba-Medjdoub K, *et al.* Development of an in vitro method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(17): 7583-7596.
- [23] Mogensen JM, Varga J, Thrane U, *et al.* *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B<sub>2</sub> [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 132(2-3): 141-144.
- [24] 国家质检总局. GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 国家质检总局, 2011.
- AQSIQ. GB 2761-2011 Food security national standards: Fungal toxins in food [S]. AQSIQ(General Administration of Quality Supervision), 2011.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



周才碧, 研究生, 主要研究方向为茶叶加工与安全。

E-mail: teasky@foxmail.com



陈文品, 副教授, 主要研究方向为茶叶加工与安全。

E-mail: cwptea@scau.edu.cn