

宏基因组学在普洱茶微生物研究中的应用

王辉¹, 李亚莉¹, 苏丹¹, 肖炜², 周红杰^{1*}

(1. 云南农业大学龙润普洱茶学院, 昆明 650091; 2. 云南大学微生物研究所, 昆明 650201)

摘要: 宏基因组学(metagenomics)又叫微生物环境基因组学。通过从环境样品中提取全部微生物的 DNA 从而构建宏基因组文库, 利用基因组学研究环境样品中所包含的全部微生物的遗传组成及其群落功能。它是在微生物基因组学的基础上发展起来的一种研究微生物多样性、开发新的生理活性物质(或获得新基因)的新理念和新方法。近几年宏基因技术广泛应用于微生物研究。本研究就宏基因组学应用于普洱茶微生物群落结构及其动态变化等方面进行总结, 展望宏基因组学应用于普洱茶微生物研究的发展前景。

关键词: 宏基因组学; 普洱茶; 微生物

Application of metagenomics in microbial research of Pu-erh tea

WANG Hui¹, LI Ya-Li¹, SU Dan¹, XIAO Wei², ZHOU Hong-Jie^{1*}

(1. Longrun Pu-erh Tea Academy, Yunnan Agricultural University, Kunming 650091, China;
2. Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650201, China)

ABSTRACT: Metagenomics is also called microbial metagenomics. DNA of all microorganisms was extracted from environmental samples so as to establish the metagenomic library, the genetic composition and community function were studied by genomic research strategies. On the basis of the microbial genomics study, metagenomics was developed, which was a new idea and new method to research the microbial diversity and the development of new bioactive substances (acquire new gene). In recent years, metagenomic technology is widely used in microbiological research. In this paper, the current status of research of metagenomics applied in Pu'er tea microbial community structure and its dynamic change have been summarized. And the future prospects of metagenomics that have been applied to the development of microbiological research in Pu'er tea have also been stated.

KEY WORDS: metagenomics; Pu'erh tea; microbiology

1 引言

普洱茶以云南大叶种晒青茶为原料, 并在地理标志保护范围内采用特定加工工艺制成, 具有独特品质^[1,2]。按其加工工艺及品质特征, 普洱茶分为普洱(生茶)和普洱(熟茶)两种类型。现代普洱茶制作中最为重要的工艺是渥堆发

酵, 其实质是以微生物活动为中心的微生物固态发酵(solid state fermentation, SSF)。在这一发酵过程中, 微生物对于普洱茶品质的形成起到极其重要的作用^[3-7]。

从 20 世纪 70 年代后期开始, 人们对于普洱茶发酵过程中的微生物进行研究, 研究方法主要是传统的平板培养法^[8-12], 直到近几年宏基因组学才应用于普洱茶微生物研

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260197, 31480215)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260197, 31480215)

*通讯作者: 周红杰, 教授, 主要研究方向为云南普洱茶和茶叶综合利用及民族茶文化。E-mail: 1051195348@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Hong-Jie, Professor, College of Pu'erh tea, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China. E-mail: 1051195348@qq.com

究, 本文对此进行综述, 并展望宏基因组学应用于普洱茶微生物研究的发展前景。

2 宏基因组学的概念

随着分子生物学技术的快速发展及其在微生物生态学和环境微生物学研究中的广泛应用, 促进了以环境中未培养微生物(uncultured microorganisms)为研究对象的新兴学科——微生物环境基因组学(又叫宏基因组学、元基因组学)的产生和快速发展。宏基因组^[13](metagenome)是由 Handelsman 于 1998 年提出的, 其定义为生境中全部微生物遗传物质的总和(the genomes of the total microbiota found in nature), 又称为微生物环境基因组(microbial environmental genome)或元基因组, 包括可培养和非培养的微生物的基因^[14,15]。

宏基因组学是一种整体性的研究策略, 涵盖生物信息统计分析和基因组两方面的意义和技术, 宏基因组学以基因组技术为基础^[16,17]。基本程序包括: 环境样品中宏基因组的提取, 将 DNA 克隆到载体中, 载体转化宿主细菌建立环境基因组文库, 环境基因组文库分析和筛选。近年来, 随着新一代高通量、低成本测序仪的问世, 宏基因组的研究可对特定环境中的基因组片段直接进行测序而不用构建文库, 从而避免了在文库构建过程中利用细菌对样品进行克隆以及克隆中引起的偏差和微生物多样性的缺失, 简化了宏基因组研究的基本操作, 提高了测序效率, 极大地促进宏基因组学发展^[18,19]。

3 宏基因组学研究的基本方法

3.1 宏基因组 DNA 的提取

宏基因组 DNA 的提取方法可分为原位裂解法和异位裂解法。

原位裂解法主要是通过去污剂处理(如 SDS), 酶解法(如蛋白酶 K)等直接破碎样品中的微生物而使 DNA 得以释放。原位裂解所得 DNA 能更好地代表样品微生物的多样性, 且操作简单, 成本低, DNA 提取率高。但该方法提取的 DNA 片段较小(1~50 kb), 通常适用于构建小片段文库的 DNA 提取^[20]。

异位裂解法先用物理方法将微生物从样品中分离, 然后采用较温和的方法抽提 DNA, 可获得纯度较高的大片段 DNA(20~500 kb), 但该方法操作繁琐, 一些微生物基因组在分离过程中可能丢失, 温和条件下一些细胞壁较厚的微生物 DNA 抽提不出来, 提取率较低且成本高, 通常适用于构建大片段插入文库的 DNA 提取^[21]。

3.2 宏基因组文库构建与筛选

构建宏基因组文库的技术主要包括: 提取和纯化环境微生物的 DNA、选取合适的克隆载体以及宿主菌株。基

本原则是以分离独立基因或一些编码新代谢功能的小操纵子为目的, 以插入小片段载体(如质粒)构建文库, 提取和纯化 DNA 时只需考虑纯度和物种的丰度^[22]; 而插入大片段构建文库(如 cosmid、fosmid), 需要获取编码更复杂的生物合成途径大基因片段或者基因簇, 构建这种文库需要提取和纯化更高长度和更高质量的 DNA。由于宏基因组的高度复杂性, 需要通过高通量和高灵敏度的方法来筛选和鉴定文库中的有用基因。目前对环境宏基因组文库的筛选有 3 种途径^[23]: 一种是基于基因活性的功能筛选法(function driven screening)、一种是基于基因序列特异性的序列筛选法(sequence driven screening)以及基于底物诱导基因表达的筛选, 也叫 SIGEX 法(substrate induced gene expression screening method)^[24]。

3.3 宏基因组文库的分析

根据不同的研究目的, 宏基因组文库的分析可以从生物活性水平、化合物结构水平以及 DNA 序列水平设计不同的筛选方案, 可分为功能分析和序列分析^[25-27]。功能分析是根据重组克隆产生的新活性进行筛选, 可用于检测编码新型酶的全部新基因或者获取新的生物活性物质。例如从文库中筛选能表达抗菌物质的克隆。功能分析法根据重组克隆产生的新活性进行筛选, 可用于检测编码新型酶的全部基因或者获取新的生物活性物质。序列分析有 2 种主要方法: 一种是根据已知保守序列设计引物或探针, 通过 PCR 扩增或杂交来筛选出目的克隆。另一种方法是对含有 16S rRNA 等系统进化锚定基因的克隆进行测序。一个典型的宏基因组分析涉及多个轮次, 以确保从生态环境标本中分离到目的基因, 及尽可能多地分析 DNA 序列所编码的信息。

4 宏基因组学在研究普洱茶微生物的应用

4.1 普洱茶中微生物 DNA 的提取

普洱茶中微生物的 DNA 提取是普洱茶微生物群落研究中最重要、最关键的一步, 不仅要尽可能地将普洱茶中所有微生物的 DNA 提取出来, 还要保证一定 DNA 片段长度和完整性。周杨等^[28]通过改进的 CTAB 方法来提取分离云南普洱茶总 DNA, 试验表明, 采用改进的 CTAB DNA 微量提取法, 可以得到高质量的云南普洱茶 DNA。张阳等为了快速提取普洱茶发酵过程中微生物总 DNA, 对比研究总 DNA 提取的 4 种方法: 酶法、试剂盒法、超声波法和变性剂法, 综合各项指标研究表明, 总 DNA 提取方法以变性剂法为优, 其次是试剂盒法、超声波法和酶法^[29]。孙婷婷等^[30]研究普洱茶发酵样品中细菌和真菌 DNA 同时提取方法, 发现茶样(5 g)加 Tween-NaCl 缓冲液(50 mL), 静置 30 min, 超声波振荡 10 min, 离心(10 min, 12000 r/min)的菌体收集方法和在 omega 小量植物 DNA 提取试剂盒中引入液

氮研磨、溶菌酶和破壁酶联合裂解细胞的方法提取出的 DNA 纯度好, 可以分别扩增出细菌 16S rDNA 和真菌 β -微管蛋白基因, 建立了普洱茶发酵样品细菌和真菌 DNA 同时提取方法, 为开展普洱茶固态发酵过程微生物多样性的分子生物学研究奠定了基础。

4.2 鉴定普洱茶中的微生物

普洱茶发酵过程中传统的微生物学研究方法是根据微生物形态学、生理生化性状等对分离到的微生物进行鉴定。但是由于微生物的形态特征异常复杂, 自然界中有 85% ~ 99.9% 的微生物不可纯培养^[31]。且少数形态特征和生理生化指标会随着环境的变化而不稳定, 因此采用形态学的方法来鉴定真菌, 结果一直就备受争议。如茯砖茶中冠突散囊菌, 采用形态学方法先后均鉴定为灰绿曲霉群中的谢瓦氏曲霉^[32,33], 直到后来通过扫描电镜图片, 才由齐祖同等^[34]确认为冠突散囊菌。因此随着人们对普洱茶研究的深入, 普洱茶中微生物种群形态学鉴定的结果也同样受到质疑。为此很多研究学者采用分子生物学的技术来鉴定普洱茶中微生物的种属关系。如 Jeng 等^[35]对七子饼、生茶、易武山茶、沱茶、黄印、红印、新鲜茶叶等茶样进行分子生物学鉴定, 分离到青霉属(*Penicillium*)、根霉(*Rhizopus*)、酵母属(*Saccharomyces*)、曲霉(*Aspergillus*)、游动放线菌属(*Actinoplane*)、链霉菌(*Streptomyces*)、细菌(*Bacterium*) 七类菌。其中两株链霉菌属: *Streptomyces bacillarys* 和 *Streptomyces cinereus*。Oh HW 等^[36]以中国普洱茶为实验材料进行分离及分子生物学鉴定分离鉴定出类芽孢杆菌(*Paenibacillus camelliae*)。赵振军等^[37]以 13 个茶厂的 60 个普洱茶样品进行分离及分子生物学鉴定鉴定 71 株真菌, 分为 40 个不同的种, 数量上占优势的真菌种群是酵母和曲霉属的不同种, 其中大多数真菌是普洱茶中新鉴定的菌种。

4.3 普洱茶中微生物群落结构及其动态变化

普洱茶在渥堆发酵过程中, 不同的原料和不同的环境会导致其微生物的种群有所不同, 不同时期其微生物菌群结构也会不同, 且在发酵过程中其优势菌也在发生相应的变化。开展普洱茶发酵过程微生物宏基因组研究, 能够准确地分析出发酵过程中微生物群落结构及其群落的动态变化, 筛选优势微生物。姜妹等^[38]运用宏基因组学技术研究普洱茶不同发酵时期微生物群落结构, 研究结果表明黑曲霉(*Aspergillus niger*) 在两个阶段都占有绝对优势; 对两个样本差异表达部分 GENE ONTOLOGY 功能和 KEGG PATHWAY 的对比分析表明, 适应渥堆发酵环境变化的微生物(如黑曲霉等)对普洱茶发酵过程起到了决定性作用。孙婷婷等^[39]基于宏基因组学, 建立了普洱茶发酵过程中真菌群落结构的 ITS 文库, 对普洱茶渥堆过程中真菌群落的动态变化进行研究, 发现在一翻样品中汉逊德巴利酵母比

例为 100%; 在二翻样品中发现了汉逊德巴利酵母和新型隐球酵母, 优势菌仍为汉逊德巴利酵母(比例为 98%); 三翻样品发现微小根毛霉、汉逊德巴利酵母、布兰克念珠菌 *Arxula adenivorans* (*Blastobotrys adenivorans*), 优势菌为微小根毛霉(比例为 81%), 汉逊德巴利酵母数量上已经减少, 新出现布兰克念珠菌及 *Arxula adenivorans* (*Blastobotrys adenivorans*), 真菌多样性逐渐丰富; 四翻样品中发现微小根毛霉、汉逊德巴利酵母、布兰克念珠菌、*Arxula adenivorans* (*Blastobotrys adenivorans*)、疏绵状嗜热丝孢菌。优势菌为微小根毛霉(比例为 55%), 其中新出现了疏绵状嗜热丝孢菌; 在出堆样品中发现布兰克念珠菌、微小根毛霉、*Arxula adenivorans* (*Blastobotrys adenivorans*), 其中布兰克念珠菌为优势菌(比例为 83%)。张阳等^[40]通过变性剂法研究普洱茶样品中微生物的群落结构, 研究结果表明: 普洱茶不同发酵阶段的真菌多样性呈现出一定差异和变化趋势, 黑曲霉(*Aspergillus niger*) 在整个发酵过程中占有优势地位, 此外还包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 和光孢青霉(*Penicillium glabrum*)。杨晓苹^[41]等研究表明, 茶叶堆表和堆芯的微生物群落结构差异小; 在发酵过程中, 细菌和真菌的种类均在二翻时迅速增加, 群落结构产生显著变化; 而后不同种类的数量随着发酵时间的推进有规律地增加或减少, 最后趋于稳定。黑曲霉是发酵前期的优势菌种, 芽孢杆菌属和 *Arxula adenivorans* 是普洱茶发酵后期的主要优势菌群。吕昌勇等基于宏基因组高通量测序技术对普洱茶固态发酵过程中微生物多样性分析, 得出普洱茶固态发酵的群落组成由 76.26% 细菌、6.35% 真核生物、0.05% 古菌、0.17% 病毒和 7.16% 的分类未定条带构成^[42]。

普洱茶发酵过程中运用宏基因组学技术研究不同层间微生物群落结构, 结果表明: (1) 上层: *Arxula* 属为主要优势真菌菌属, 随着发酵进行 *Arxula* 属所占比例逐渐升高, 后期达到 90% 以上; 曲霉属在发酵前期所占比例较大, 接近 50%, 到发酵后期降到 2% 以下。芽孢杆菌属、欧文氏菌属、鞘氨醇杆菌属在发酵过程中为上层的主要优势细菌。且发酵前期芽孢杆菌属占比较大, 后期欧文氏菌属和鞘氨醇杆菌属占比较大。(2) 中层: *Arxula* 属整体呈现先增加后下降再增加趋势, 篮状菌属出现先增加后下降趋势。*Arxula* 属在前期和后期占比较大, 为主要的优势真菌菌属。中期篮状菌属为主要的优势菌属。同时检测出嗜热菌属。在发酵过程中中层的优势细菌种群相对丰富, 以欧文氏菌属、无色杆菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属、鞘氨醇杆菌属为主, 不同阶段占比变化较大。(3) 下层: *Arxula* 属随着发酵的进行整体呈现先增加后下降再增加趋势, *Arxula* 属整个发酵过程中都为优势菌属, 占比都在 70% 以上。欧文氏菌属、芽孢杆菌属、鞘氨醇杆菌属在发酵过程中为上层的主要优势细菌, 且与发酵过程中上层变化相似。

5 宏基因组学在普洱茶研究的应用前景

5.1 构建优质普洱茶微生物群落体系

对普洱茶发酵过程中微生物的分离、菌种鉴定及其发酵过程中微生物群落结构及其动态变化的研究已经有了一些成果,但是不同发酵环境下以及同一发酵环境不同层间其温湿度、含氧量等影响微生物生长的环境因素差异较大,导致微生物的群落结构不同,研究人员对普洱茶发酵过程中不同层间的微生物群落结构研究较少。通过宏基因组学方法的研究,建立系统的微生物群落体系,以便人工发酵过程中控制微生物菌落,达到成品普洱茶品质稳定、优质的目的。同时普洱茶在合适的贮藏条件下随着时间的推移其品质会越来越好,这是后发酵的作用结果,应用宏基因组学分析不同年份普洱茶的微生物群落结构,建立微生物群落动态变化体系,进一步研究微生物与普洱茶贮藏品质变化的关系。

5.2 应用于普洱茶茶园管理

茶园土壤中含有大量的微生物,这些微生物对茶树的生长发育起着重要作用。梁慧玲等研究表明:不同茶树品种根系微生物不同^[43]。田永辉等研究表明:不同季节根系微生物数量不同,总体来说为:秋季>夏季>春季>冬季。利用宏基因组学研究茶园土壤微生物的群落结构,构建不同茶树品种最优生长环境下土壤微生物的群落结构,同时研究制成不同茶树品种的微生物菌肥,施用微生物菌剂可以改良茶园土壤理化性质、提高土壤肥力水平,使其最适合茶树生长发育,以提高茶园的产茶量和鲜叶质量^[44]。

5.3 开发普洱茶深加工新产品

微生物发酵茶饮料是一种新型保健茶饮料,目前已经应用到茶饮料中发酵的微生物主要有细菌、酵母菌、霉菌和食用真菌。微生物应用于普洱茶饮料开发上的研究还很少见,利用宏基因组技术研究找出适合于普洱茶饮料开发的微生物^[45,46]。进一步筛选优势微生物用于普洱茶保健型茶饮料的开发,丰富茶饮料种类。

参考文献

- [1] GB/T 22111-2008 地理标志产品普洱茶国家标准[S]. GB/T 22111-2008 Product of geographical indication-the national standards of Pu-erh tea [S].
- [2] 周红杰. 实施国家地理标志产品_普洱茶标准的意义[J]. 茶世界, 2009, 1: 42-58. Zhou HJ. The implementation of the national products of geographical indication-the significance of Pu-erh tea standard [J]. Tea World, 2009, 1: 42-58.
- [3] 鲍晓华, 董维多, 马志云. 普洱茶加工工艺的演变[J]. 中国茶叶, 2006, 5: 40-41. Bao XH, Dong WD, Ma ZY. The evolution of the Pu-erh tea processing technology [J]. Chin Tea, 2006, 5: 40-41.
- [4] 梁名志. 普洱茶固态发酵工序的研究现状[C]. 中国茶叶学会首届海峡两岸茶叶科技学术研讨会, 2000, 7: 175-177. Liang MZ. The current research status of Pu-erh tea process of solid-state fermentation [C]. China Tea Science Society: the First Tea Science and Technology Symposium on both Sides of the Taiwan Straits, 2000, 7: 175-177.
- [5] 周红杰, 李家华, 甘月明, 等. 普洱茶固态发酵过程化学成分变化与品质形成的关系[J]. 茶苑, 2004, 1: 6-8. Zhou HJ, Li JH, Gan YM, et al. Changes in chemical composition and quality formation of the relationship on the Pu-erh tea solid-state fermentation process [J]. Tea Center, 2004, 1: 6-8.
- [6] 周红杰. “湿仓”普洱茶的功效及其鉴别方法[J]. 茶叶机械杂志, 2002, 4: 29-30. Zhou HJ. “West storehouse” the effect of Pu-erh tea and its identification method [J]. J Tea Mach, 2002, 4: 29-30.
- [7] 赵龙飞, 徐亚军, 周红杰. 微生物固态发酵提高普洱茶品质风味研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 155-156. Zhao LF, Xu YJ, Zhou HJ. Research on microbes improve quality and flavor of Pu-erh solid fermentation [J]. Food Res Devt, 2006, 27(4): 155-156.
- [8] 周红杰, 李家华, 赵龙飞, 等. 固态发酵过程中主要微生物对云南普洱茶品质形成的研究[J]. 茶叶科学, 2004, 24(3): 212-218. Zhou HJ, Li JH, Zhao LF, et al. Research on the main microbes of solid-state fermentation process of Yunnan Pu-erh tea quality [J]. J Tea Sci, 2004, 24(3): 212-218.
- [9] 龚加顺, 周红杰, 张新富, 等. 云南晒青绿毛茶的微生物固态发酵及成分变化研究[J]. 茶叶科学, 2005, 25(4): 300-306. Gong JS, Zhou HJ, Zhang XF, et al. Study on Yunnan sundried green tea of microbes on solid-state fermentation process and changes in chemical composition [J]. J Tea Sci, 2005, 25(4): 300-306.
- [10] 罗龙新, 吴小崇, 邓余良, 等. 云南普洱茶固态发酵过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系[J]. 茶叶科学, 1998, 1: 54-57. Luo LX, Wu XC, Deng YL, et al. Changes in chemical composition and quality formation of the relationship on the Yunnan Pu-erh tea solid-state fermentation process [J]. J Tea Sci, 1998, 1: 54-57.
- [11] 赵龙飞, 徐亚军, 周红杰. 黑曲霉在普洱茶发酵过程中生长特性的研究[J]. 食品开发与研究, 2007, 28(10): 1-3. Zhao LF, Xu YJ, Zhou HJ. Study on *Aspergillum Niger*'s growth property during pile-fermentation process [J]. Food Res Devel, 2007, 28(10): 1-3.
- [12] 周红杰, 李家华, 赵龙飞, 等. 渥堆过程中主要微生物对云南普洱茶品质形成的研究[J]. 茶叶科学, 2004, 24(3): 212-218. Zhou HJ, Li JH, Zhao LF, et al. Study on the main microbes of pile fermentation process of Yunnan Pu-erh tea quality [J]. J Tea Sci, 2004, 24(3): 212-218.
- [13] Handels MJ, Rondon MR, Brady SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. Chem Biol, 1998, 5(10): 245-249.
- [14] Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing [J]. J Bacteriol, 1991, 173(14):4371-4378.
- [15] Huguenbult P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach [J]. Trends Biotechnol, 1996, 14(6): 190-197.

- [16] Knietzsch A, Waschkowitz T, Bowien S, et al. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1408–1416.
- [17] Healy FG, Ray RM, Aldrich HC, et al. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in an anaerobic digester maintained on lignocelluloses [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 43(4): 667–674.
- [18] Wexler M, Bond PL, Richardson DJ, et al. A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase [J]. Environ Microbiol, 2005, 7(12): 1917–1926.
- [19] 赵蓉, 胡永峰, 金奇. 宏基因组学及其在医学微生物学领域的应用[J]. 病毒学报, 2009, 25(3): 125–128.
Zhao R, Hu YF, Jin Q. Metagenomics and its application in the field of medical microbiology [J]. Chin J Virol, 2009, 25(3): 125–128.
- [20] Henne A, Rolf Daniel, Ruth A, et al. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 42 hydroxybutyrate [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(9): 3901–3907.
- [21] Courtois, Maria Ball J, L Pernodet, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 49–55.
- [22] 芦晓飞, 罗坤, 谢丙炎, 等. 宏基因组学及其在植物病害生物防治中的应用[J]. 生物防治通报(增刊), 2010, 26: 106–112.
Lu XF, Luo K, Xie BY, et al. Metagenomics and its application in biological control of plant diseases [J]. Chin J Biol Control (Suppl), 2010, 26: 106–112.
- [23] 阎冰, 洪葵, 许云, 等. 宏基因组克隆微生物活性物质筛选的新途径[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 113–117.
Yan B, Hong K, Xu Y, et al. Metagenome cloning—a new approach for novel microbial bioactive compounds discovery [J]. Ins Microbio, 2005, 32(1): 113–117.
- [24] Delong EF, Preston CM, Mincer T, et al. Community genomics among stratified microbial assemblages in the oceans interior [J]. Science, 2006, (311): 496–503.
- [25] 楚雅烈, 杨娥. 宏基因组学及其技术的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2008, 29(6): 79–86.
Chu YL, Yang E. Research progress of metagenomics and its technology [J]. J Xian Jiaotong Univ (Med Sci), 2008, 29(6): 79–86.
- [26] 盛桂莲, 赖旭龙, 侯新东. DNA 实验体系及技术[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(2): 116–125.
Sheng GL, Lai XL, Hou XD. Standard experimental system and new technologies on DNA research [J]. Chin J Biochem Mol Bio, 2009, 25(2): 116–125.
- [27] Singh J, Behal A, Singla N, et al. Metagenomics, concept, methodology, ecological inference and recent advances [J]. Biotechnol J, 2009, 4(4): 480–494.
- [28] 周杨, 龚加顺, 和志娇, 等. 不同年代云南普洱茶 DNA 提取分离方法初探[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(3): 396–398.
Zhou Y, Gong JS, He ZJ, et al. Study on extraction and separation of DNA of Yunnan Pu-erh tea in different years [J]. J Yunnan Agric Univ, 2006, 21(3): 396–398.
- [29] 张阳, 赵树欣, 李巍, 等. 普洱茶发酵过程中微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. 食品工业科技, 2012, (12): 230–238.
Zhang Y, Zhao SX, Li W, et al. Comparison of total microbial DNA extraction methods from Pu-erh tea fermentation samples [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 12: 230–238.
- [30] 孙婷婷, 赵明, 李亚莉, 等. 普洱茶发酵样品细菌和真菌 DNA 同时提取方法研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(15): 249–253.
Sun TT, Zhao M, Li YL, et al. Simultaneous isolation of bacterial and fungal DNA from Pu-erh tea fermentation samples [J]. Chin Agric Sci Bull, 2011, 27(15): 249–253.
- [31] 余龙江, 李为. 微生物生态学领域的研究动向[J]. 国际学术动态, 2007, 6: 20–23.
Yu LJ, Li W. Research trends in the field of microbial ecology [J]. Int Acad Devel, 2007, 6: 20–23.
- [32] 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, 2: 12–14.
Cang DP, Wen QY. Identification of harmful species and predominant species in brick tea [J]. Tea Commun, 1981, 2: 12–14.
- [33] 温琼英. 茯砖茶中主要微生物的研究[J]. 茶叶通讯, 1986(4): 19–21.
Wen QY. Main microbial research in brick tea [J]. Tea Commun, 1986, 4: 19–21.
- [34] 齐祖同, 孙曾. 茯砖茶中优势菌群的鉴定[J]. 真菌学报, 1990, 9(3): 176–179.
Qi ZT, Sun Z. Identification of predominant species in brick tea [J]. Acta Mycologica Sinica, 1990, 9(3): 176–179.
- [35] Jeng KC, Chen CS, Fang YP. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA and polyphenols in Pu-erh tea [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(21): 8787–8792.
- [36] Oh HW, Kim BC, Lee KH, et al. *Paenibacillus camellia* sp. nov. isolated from fermented leaves of *Camellia sinensis* [J]. J Microbiol, 2008, 46(5): 530–534.
- [37] 赵振军, 董华荣, 周黎, 等. 普洱茶中真菌种群的分离与分子鉴定[J]. 茶叶科学, 2009, 29(6): 436–442.
Zhao ZJ, Tong HR, Zhou L, et al. Isolation and molecular identification of fungal colonization of Pu-erh tea [J]. J Tea Sci, 2009, 29(6): 436–442.
- [38] 姜妹, 吕杰, 李灏. 普洱茶不同发酵时期微生物群落宏转录组学研究[J]. 北京化工大学学报, 2012, 39(6): 84–89.
Jiang S, Lv J, Li H. Comparative metatranscriptomic analysis of microbial Communities at 2 different stages during the pile-fermentation of Puer tea [J]. J Beijing Univ Chem Technol, 2012, 39(6): 84–89.
- [39] 孙婷婷. 普洱茶发酵过程真菌群落结构的 ITS 文库研究[D]. 云南农业大学, 2011.
Sun TT. Fungal communities during Pu-erh tea fermentation revealed by ITS library [D]. Yunnan Agricultural University, 2011.
- [40] 张阳, 赵树欣, 梁慧珍, 等. 普洱茶发酵过程中真菌群落结构的变化分析[J]. 中国酿造, 2012, 31(1): 122–125.
Zhang Y, Zhao SX, Liang HZ, et al. Changes of fungal community in Puer tea fermentation [J]. Chin Brew, 2012, 31(1): 122–125.
- [41] 杨晓苹, 罗剑飞, 刘昕, 等. 普洱茶固态发酵过程中微生物群落结构及变化[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
Yang XP, Luo JF, Liu X, et al. Microbial community structure and change during solid fermentation of Pu-erh tea [D]. Guangzhou: South China

- University of Technology, 2013.
- [42] 吕昌勇. 普洱茶渥堆发酵过程中微生物宏基因组学的测定与分析[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013.
- Lv CY. Microbial metagenomic study of puer tea during pile-fermentation [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2013.
- [43] 梁慧玲. 茶园土壤微生物研究现状[J]. 茶叶 2001, 27(4): 3-5.
- Liang HL. Research status of tea garden soil microbe [J]. Tea, 2001, 27(4): 3-5.
- [44] 田永辉, 魏杰. 不同无性系茶树品种的根际细菌及酶活性动态研究[J]. 西南农业学报, 2001, 4 (14): 63-66.
- Tian YH, Wei J. Dynamic state of bacteria and enzyme activity in rhizosphere of tea different varieties [J]. Southwest China J Agric Sci, 2001, 4 (14): 63-66.
- [45] 罗红玉, 钟应富, 袁林颖, 等. 微生物在茶叶深加工中的应用研究进展[J]. 福建茶叶, 2004.1: 02-05.
- Luo HY, Zhong YF, Yuan LY, *et al.* Microbe research progress in the application of the tea deep processing [J]. Tea Fujian, 2004, 1: 02-05.
- [46] 邹礼根, 丁玉庭, 陈艳. 微生物在发酵茶饮料中的应用[J]. 食品工业科技, 2004, 1(49): 142-144.
- Zou LG, Ding YT, Chen Y. The application of the microbe in the fermented tea drinks [J]. Sci Technol Food Ind, 2004, 1(49): 142-144.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王 辉(1988), 男, 云南农业大学, 在读硕士研究生, 主要研究方向为普洱茶加工及微生物研究。

E-mail: 499575741@qq.com

周红杰, 教授, 云南农业大学, 主要研究方向为云南普洱茶和茶叶综合利用及民族茶文化。

E-mail: 1051195348@qq.com