

黑茶微生物研究：从群落组成到安全分析

胥 伟, 吴 丹, 姜依何, 朱 旗*

- (1. 湖南农业大学园艺园林学院茶学教育部重点实验室, 长沙 410128;
2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘 要: 形成黑茶主要品质特征的渥堆(或发花)工艺中的微生物来源于自然环境, 不同地区黑茶的微生物多样性存在较大差异, 为探讨黑茶微生物群落特征, 本文综述了近年来国内外黑茶微生物方面的研究结果、黑茶微生物群落组成及安全分析。结果表明, 曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和散囊菌属(*Eurotium*)是黑茶微生物群落主要的组成部分, 曲霉属真菌存在于黑茶加工的各个环节, 青霉属真菌在初制渥堆过程中极少检出, 但普遍存在于贮存环节。采用宏基因组技术对普洱茶渥堆样进行研究发现, 细菌是其微生物群落的主要部分, 细菌与普洱茶品质特别是其功能成分的关系需要进一步研究。黑茶产品食源性细菌毒素风险极低, 虽然存在大量真菌, 但黑茶在安全仓储下极少检出真菌毒素, 正规厂家生产的黑茶产品是相对安全的。

关键词: 茯砖茶; 康砖茶; 普洱茶; 六堡茶; 微生物

Microbial research on black tea: the community composition and food safety analysis

XU Wei, WU Dan, JIANG Yi-He, ZHU Qi*

- (1. Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China)

ABSTRACT: Microorganism in the process of pile-fermentation (or Fahua-fermentation) which form the main quality of dark tea come from natural environment, and there are great differences in microbial diversity in different areas of dark tea. This article summarized several international research results of the microbial diversity in dark tea recently, microbial community and safety analysis in order to discuss on the microbial community characteristics of dark tea. The results showed that, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Eurotium* mainly composed of microbial communities in dark tea. *Aspergillus* fungi presented in all aspects of the dark tea processing, and *Penicillium* fungi was rarely found during the beginning of pile fermentation process, but widespread in storage. The sample of Pu-er tea in pile fermentation were investigated by metagenomic technology, which found that bacteria was the main part of microbial, so it was necessary to further study on the relationship of bacteria and the quality of Pu-er tea, especially its functional components. The health risk of foodborne bacteriotoxin in dark tea products was rarely. Although there were a large number of fungi, mycotoxin was detected rarely in dark tea which was stored safely, so there was no

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571802)、湖南省教育厅重点项目(14A066)、湖南省研究生科研创新项目(CX2016B283)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31571802), the Key Project of Hunan Provincial Education Bureau (14A066) and Hunan Provincial Innovation Foundation For Postgraduate (CX2016B283)

*通讯作者: 朱旗, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为茶叶加工及品质化学。E-mail: 1965994459@qq.com

*Corresponding author: ZHU Qi, Professor, Ph.D. Supervisor, College of Horticulture and Landscape Architecture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China. E-mail: 1965994459@qq.com

need to worry about drinking dark tea produced by regular manufacturers.

KEY WORDS: Fu Brick tea; Kang Brick tea; Pu-Er tea; Liupao tea; microbes

1 引言

黑茶的品质形成分为初加工和精加工两个阶段。黑茶初制过程中,渥堆是其品质形成的关键工艺。微生物以茶叶为底物,通过代谢途径改变茶叶生化成分,形成黑茶特有品质。黑茶经精制加工后,“发花”是茯砖茶品质形成的关键工艺。通过“冠突散囊菌”的生长发育,转化茶叶底物,形成茯砖茶特有的“菌花香”品质特征。近年来,学者对黑茶加工过程中微生物进行了大量研究,主要关注于微生物群落的种属组成、渥堆环境微生物多样性分析、渥堆过程品质成分变化规律、胞外酶活性等相关特性、安全性评价方面的研究。本文综述了黑茶微生物方面的研究和微生物潜在在安全性问题,以期根据科学研究成果提出黑茶加工及贮存过程中的微生物种群多样性的相关建议,以提高黑茶品质和防范黑茶饮用安全风险。

2 黑茶的发展、特性与现状

黑茶是我国六大茶类之一,初制按照“杀青-揉捻-渥堆-干燥”的工序进行^[1],历史上属于边销茶,是饮食结构以“高脂高蛋白”为主的边疆少数民族用以“消食去腻”不可或缺饮品。边疆少数民族有“宁可三日无食,不可一日无茶”的说法。由此可见黑茶在我国边疆少数民族日常生活中的地位。随着人们对黑茶保健功效的不断重视,以及市场对黑茶“越陈越香”品质特征的不断追捧,黑茶产业得了极大的发展。黑茶产区也不断扩展。据中国茶叶流通协会统计数据显示,全国2014年黑茶总产量约28万吨,占茶叶总产量的13.4%,较2013年增长4万吨,增幅26%,其产量是当年仅次于绿茶产量的第二大茶类^[2]。有报道表明,云南省2014年普洱茶产值已超过百亿元人民币^[3],湖南省2014年黑茶产值约合80亿元人民币^[4]。

3 黑茶微生物多样性分析

3.1 黑茶微生物多样性分析技术的发展

微生物多样性是指微生物所有的生命形式、生态系、生态过程以及可以认识到的有关基因、类群和分子水平上的遗传特性。微生物鉴定是黑茶微生物研究的重要方面,微生物鉴定方法包括形态、生化水平、核酸水平及蛋白质水平^[5]。可归纳为两种主流思维,一是源于分类学基本方法,依据微生物形态特征、生理生化特征等镜检图片或生化指标等表型进行归类的分类鉴定方法,该类技术使用分类学检索表按照表观形态进行逐层检索,最后得出分类学

地位。该类方法步骤复杂,培养条件标准严格,实验周期长,比对过程存在主观误差,同时基于微生物纯培养技术的限制,在现代环境微生物多样性分析研究中逐显劣势;二是依据进化过程物种核酸保守序列表现的同源化差异而构建同源保守序列的系统进化树,按同源性匹配指数反映微生物分类学地位的现代分类法,其目标是探寻各种生物之间的进化谱系,建立反映生物系统发育的分类系统。依据保守序列进行同源性匹配需要基于核酸序列数据库的建立,数据库数据越丰富,可操作性越强。

核酸水平的鉴定技术发展经历以下阶段:基于纯培养的ITS序列分析技术、聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳(PCR-denatured gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)分析技术、16S/18S分析技术和宏基因组技术^[6]。郑小玲等^[7]采用生化鉴定技术、18S序列分析技术和宏基因组测序技术进行鉴定方法比对,在对实验室环境中采集的248株细菌和6株霉菌进行研究时发现18S保守序列测序鉴定结果与生化鉴定结果比对种水平一致率达10/28,属水平一致率达23/28。通过再次镜检结果、菌落形态和生长特性可确保鉴定结果应以18S保守序列鉴定结果为准。而在对分离菌株混合后采用宏基因组技术进行鉴定时却发现宏基因组鉴定结果假阳性较高,表明该方法在测序技术和分析方法方面还需要进一步完善。

3.2 黑茶微生物多样性分析

微生物的作用可参与到黑茶加工的初制、精制及贮存过程的多个环节,黑茶微生物多样性研究成果多侧重于渥堆或发花工艺及成品茶的贮存方面。

3.2.1 黑茶初制过程微生物多样性分析

黑茶初制工序为杀青、揉捻、渥堆和干燥。渥堆是黑茶初制品质形成的关键,其实质为微生物在湿热作用下呼吸放热、利用胞外酶活以理化作用和生化作用为动力促进茶叶底物内含成分的变化^[8],形成叶色黑润、滋味醇和、香气纯正或带陈香、汤色红黄明亮的品质特征^[9]。而微生物的来源并非人工接种,通过对普洱茶的溯源分析发现,渥堆过程中的微生物主要来源于茶树生长区域的空气、茶树内生和茶叶加工环境中^[10]。

周红杰^[11]、赵龙飞等^[12]基于纯培养技术在针对普洱茶加工过程中的微生物种类进行研究发现:黑曲霉(*Aspergillus niger*)、青霉(*Penicillium*)、根霉(*Rhizopus*)、灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)和酵母(*Yeast*)等微生物存在于普洱茶的整个加工过程中,渥堆初期黑曲霉(*Aspergillus niger*)生长迅速,至第一翻时其数量已达可培养微生物的80%,其次为酵母菌(*Saccharomyces*)、灰绿曲霉

(*Aspergillus glaucus*)、根霉(*Rhizopus*)、青霉(*Penicillium*),从第三翻至渥堆结束时,黑曲霉数量回落而酵母菌大量生长。张阳等^[13]在研究普洱茶渥堆过程中真菌群落结构的变化时验证了上述观点,表示除了黑曲霉为普洱茶渥堆过程中的优势真菌外,还存在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和光孢青霉(*Penicillium glabrum*)。陈可可等^[14]从云南省不同地区的普洱熟茶渥堆样中分离出了曲霉属的温特曲霉烟色变种(*Aspergillus wentii* Wegner var. *fumeus* Qi & Sun)、帚状曲霉(*Aspergillus penicillioides* Speg.)、具黄曲霉(*Aspergillus aureolatus* Munt. -Cvet.&Bata)、埃及曲霉(*Aspergillus egyptiacus* Moub.&Moust)、臭曲霉(*Aspergillus foetidus* Thom&Raper)、日本曲霉原变种(*Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*)以及局限灰曲霉(*Aspergillus restrictus* Smith)。李晨晨等^[15]研究发现,普洱茶渥堆样中存在凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*)、嗜热嗜油芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)等嗜热细菌。

对于和普洱熟茶同属于渥堆程度较重的康砖茶而言,有研究表明其渥堆过程微生物种群集中于芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、假丝酵母属(*Candida* spp.)、放线菌属(*Actinomyces*)、葡萄球菌属(*Actinomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、毛霉属(*Mucor*)、枝霉属(*Thamnidium*)和根霉属(*Rhizopus*)^[16,17]。根据形态学结果和 ITS 序列分析,康砖茶的真菌存在黑曲霉(*Aspergillus niger*)、日本曲霉棘孢变种(*Aspergillus japonicus* Saito var. *aculeatus*)、塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis* Moss.)、臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、炭黑曲霉(*Aspergillus carbonarius*)、日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、阿姆斯特丹散囊菌(*Eurotium amstelodami*)、根霉(*Rhizopus Ehrenberg*)、简单枝霉(*Thamnidium simplex* Brefeld)和总状枝毛霉(*M. racemosus* Fres.)^[17, 18]。

随着 DNA 测序技术的不断发展,为减少主观误差,基于纯培养技术进行黑茶微生物多样性的研究方法逐渐被淘汰,PCR-DGGE 技术、16/18S 分析技术及宏基因组学技术在黑茶微生物多样性分析中逐渐得到应用。刘石泉等^[19,20]利用 PCR-DGGE 技术研究了茯砖茶渥堆过程中的微生物种群,鉴定结果显示茯砖茶渥堆过程中存在的细菌种群为诺卡氏菌属(*Nocardia*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、韦龙氏假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、突那梭菌属(*Clostridium ultunense*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、ε-变形菌(ε-*Proteus* Hauser)、腐败螺旋菌

属(*Saprosiraceae*)、粘球菌属(*Myxovoccus*)、根瘤菌属和 6 种未知分类地位的不可培养细菌;茯砖茶渥堆过程中的真菌种群为好干性酵母菌(*Wallemia*sebi)、假丝酵母菌(*Candida* sp.)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、路德酵母属(*Lodderomyces* spp.)、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 dermatitis*)、斜卧青霉(*Penicillium decumbens*)和帚状曲霉(*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。

Abe 等^[21]通过 DGGE 技术对普洱熟茶渥堆发酵过程中的微生物进行分析,得出其优势菌种为黑曲霉(*Aspergillus niger*)和一种未知微生物(*Blastobotrys adeninivorans*),该未知微生物后来在六堡茶中也有发现^[22]。杨瑞娟^[23]和姚静^[24]等利用 ITS 和 16S 技术研究了普洱茶渥堆过程中的嗜热真菌和细菌群落,结果表明嗜热真菌主要为微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)、塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)和埃莫森篮状菌(*Talaromyces emersonii*);嗜热细菌主要为芽孢杆菌(*Bacillaceae*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium*)、短杆菌(*Brevibacterium*)、红球菌(*Rhodococcus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*),而其中芽孢杆菌(*Bacillaceae*)为优势菌群。Zhao 等^[25]通过 16S 技术研究普洱茶渥堆过程(0~20 d)的细菌多样性变化规律,结果显示细菌主要来源于 5 个门 10 个属的微生物。0~10 d 渥堆期间的优势细菌为肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)为主,但 15~20 d 时被芽孢杆菌(*Bacillaceae*)所取代,随后又被凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)取代。Lv 等^[26]通过宏基因组技术对普洱茶渥堆过程中的微生物种群进行了鉴定,结果显示细菌约占 76.26%,真核微生物约占 16.35%,以及其他未知微生物约占 7.16%。其中细菌主要种类为放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*),而真核微生物种类主要为子囊菌门(*Ascomycota*)。如若针对普洱渥堆过程中微生物的分类结果仅界定在“门”这一阶层显然是不够的,但利用宏基因组学技术研究普洱茶的微生物多样性迈出了重要一步,并且针对基因功能给出了详细的结论,为普洱茶品质形成的微生物提供了遗传理论基础。

在对普洱茶微生物种群进一步细分上,Zhao 等^[27]通过宏基因组联合宏蛋白组技术给出了相关结论,即微生物多样性主要由细菌和真菌组成,以细菌为主,各细菌丰度

如下: 17.82%的甲单胞菌属(*Pseudomonas*)、12.33%的乳球菌属 (*Lactococcus*)、9.53%未定义的蓝细菌属 (*Unclassified-Cyanobacteria*)、7.69%未定义的肠杆菌属 (*Unclassified-Enterobacteriaceae*)、7.36%的短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、4.74%的无色杆菌属(*Achromobacter*)、3.99%的不动杆菌属(*Acinetobacter*)、2.97%的红球菌属 (*Rhodococcus*)、2.56%的寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、2.46%的肠球菌属(*Enterococcus*)、2.17%的欧文氏菌属 (*Erwinia*)、2.10%的链霉菌属(*Streptomyces*)、1.51%的肠杆菌属(*Enterobacter*)、1.33%的类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*)、1.27%的产黄杆菌属(*Flavobacterium*)、1.18%的杆菌属 (*Bacillus*)、1.15%的微杆菌属(*Microbacterium*)、1%的克氏杆菌属(*Klebsiella*)和 16.85%的未知种类。检测出的真菌丰度为: 94.98%的曲霉属(*Aspergillus*)、4.88%的根毛霉属 (*Rhizomucor*)及其 0.14%的未知种类。黑茶初制过程微生物多样性研究成果如表 1 所示。

3.2.2 黑茶精制过程微生物多样性分析

黑茶精制过程中依据各个茶类及花色的不同而设计不同的精制工艺流程, 以茯砖茶为例, 其精制流程如下: 筛分-扎切-风选-拼配-匀堆-汽蒸渥堆-蒸压成砖-发花-干

燥。而不同的茯砖茶生产企业依据实际调整精制流程, 而发花是茯砖茶品质形成的关键工艺。茯砖茶因发花工艺而使其形成有别于其他类黑茶的品质特征^[28]。黑茶精制过程中的微生物多样性分析的研究工作则主要侧重于茯砖茶精制过程的发花工艺。

茯砖茶的微生物多样性研究起始于 20 世纪 80 年代, 以“金花”的鉴定为起点, 经过“谢氏瓦曲霉”、“冠突曲霉”、“针刺曲霉”、“灰绿曲霉组谢氏瓦曲霉间型变种”和“冠突散囊菌”等论点的辩证比较, 最终得到“金花”的学名为冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)^[29-32]。存在鉴定结果不一致的可能原因在于不同的生产季节和不同的产地, 茯砖茶“金花”种属存在差异, 有研究对武义和长沙的不同季节“金花”进行鉴定发现存在“冠突散囊菌”、“阿姆斯特丹散囊菌”、“肋状散囊菌”的差异^[33]。虽然陈桂梅等^[34]对陕西茯砖茶的金花鉴定结果显示为“冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)”。但是, 赵仁亮^[35]对湖南长沙冬夏 2 个不同季节加工茯砖茶进行微生物研究发现, 冬季真菌种群多样性较夏季复杂, 冬季样品鉴定出曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、芽枝霉属(*Cladosporium*)、毛霉属(*Mucor*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、木霉属(*Trichoderma*)、冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)、酵

表 1 黑茶初制过程微生物多样性的研究成果
Table 1 Results of microbial diversities during the primary processing of dark tea

茶叶种类	微生物多样性	
	属	种
茯砖茶		好干性酵母菌 (<i>Wallemiacebi</i>);
	短波单胞菌属(<i>Brevundimonas</i>)	假丝酵母菌(<i>Candida</i> spp.);
	诺卡氏菌属(<i>Nocardia</i>)	热带假丝酵母(<i>Candida tropicalis</i>);
	新鞘脂菌属(<i>Novosphingobium</i>)	路德酵母属(<i>Lodderomyces</i> spp.);
	突那梭菌属(<i>Clostridium ultunense</i>)	汉逊德巴利酵母(<i>Debaryomyces hansenii</i>);
	假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i> spp.)	毕赤酵母(<i>Pichia kudriavzevii</i>);
	乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>);
	克雷伯氏菌属(<i>Klebsiella</i>)	隐球酵母(<i>Cryptococcu</i> spp.);
	ε-变形菌(<i>ε-Proteus Hauser</i>)	牧草红酵母(<i>Rhodotorula graminis</i>);
	腐败螺旋菌属(<i>Saprosiraceae</i>)	阿姆斯特丹散囊菌(<i>Eurotium amstelodami</i>);
	粘球菌属(<i>Myxovoccus</i>)	灰绿曲霉(<i>Aspergillus glaucus</i>) ;
	根瘤菌属(<i>Rhizobium</i>)	米赫根毛霉(<i>Rhizomucor miehei</i>);
	散囊菌属(<i>Eurotium</i>)	微小根毛霉(<i>Rhizomucor pusillus</i>);
	根毛霉属(<i>Rhizomucor</i>)	白地霉(<i>Galactomyces geotrichum</i>);
	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	安大略假单胞菌(<i>Candida ontarioensis</i>);
	德巴利酵母属(<i>Debaryomyces</i>)	真皮毛孢子菌(<i>Trichosporondermatis</i>);
	青霉属(<i>Penicillium</i>)	斜卧青霉(<i>Penicillium decumbens</i>);
		帚状曲霉(<i>Aspergillus penicillioides</i>)

续表 1

茶叶种类	微生物多样性	
	属	种
普洱熟茶	克雷伯氏菌属(<i>Klebsiella</i>)	
	鞘氨醇杆菌(<i>sphingobacteriuln</i>)	
	短杆菌(<i>Brevibacterium</i>)	
	不动杆菌(<i>Acinetobacter</i>)	
	肠杆菌科(<i>Enterobacteriaceae</i>)	
	芽孢杆菌(<i>Bacillaceae</i>)	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)
	假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	微小根毛霉(<i>Rhizomucor pusilus</i>)
	乳球菌属(<i>Lactococcus</i>)	塔宾曲霉(<i>Aspergillus tubingensis</i>)
	短小杆菌属(<i>Curtobacterium</i>)	热带假丝酵母(<i>Candida tropicalis</i>)
	无色杆菌属(<i>Achromobacter</i>)	埃莫森篮状菌(<i>Talaromyces emersonii</i>)
	不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>)	凝结芽孢杆菌(<i>Bacillus coagulans</i>)
	红球菌属(<i>Rhodococcus</i>)	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)
	寡养单胞菌属(<i>Stenotrophomonas</i>)	地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>)
	肠球菌属(<i>Enterococcus</i>)	热嗜淀粉芽孢杆菌(<i>Bacillus thermoamylovorans</i>)
	欧文氏菌属(<i>Erwinia</i>)	喜热嗜油芽孢杆菌(<i>Geobacillus thermoleovorans</i>)
	链霉菌属(<i>Streptomyces</i>)	乳酸片球菌(<i>Pediococcus acidilactici</i>)
	类芽孢杆菌属(<i>Paenibacillus</i>)	植物乳杆菌(<i>Lactobacillus plantarum</i>)
	黄杆菌属(<i>Flavobacterium</i>)	鲍曼不动杆菌(<i>A. baumanii</i>)
	杆菌属(<i>Bacillus</i>)	
	微杆菌属(<i>Microbacterium</i>)	
	克氏杆菌属(<i>Klebsiella</i>)	
	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	
	根毛霉属(<i>Rhizomucor</i>)	
康砖茶		黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)
		日本曲霉棘孢变种(<i>Aspergillus japonicus</i> Saito var. aculeatus)
	芽孢杆菌属(<i>Bacillaceae</i>)	塔宾曲霉(<i>Aspergillus tubingensis</i> Moss.)
	假丝酵母属(<i>Candidasp.</i>)	臭曲霉(<i>Aspergillus foetidus</i>)
	放线菌属(<i>Actinomyces</i>)	泡盛曲霉(<i>Aspergillus awamori</i>)
	葡萄球菌属(<i>Actinomyces</i>)	炭黑曲霉(<i>Aspergillus carbonarius</i>)
	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	日本曲霉(<i>Aspergillus japonicus</i>)
	毛霉属(<i>Mucor</i>)	烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>)
	枝霉属(<i>Thamnidium</i>)	阿姆斯特丹散囊菌(<i>Eurotium amstelodami</i>)
	根霉属(<i>Rhizopus</i>)	根霉(<i>Rhizopus ehrenberg</i>)
		简单枝霉(<i>Thamnidium simplex</i> Brefeld)
		总状枝毛霉(<i>M. racemosus</i> Fres.)
六堡茶	未检索到相关研究报道	未检索到相关研究报道

母菌及其他曲霉; 夏季样品鉴定出“金花菌”及其他曲霉。同时, 胡治远等^[36]对湖南地区 18 个不同茯砖茶样品的优势菌进行分离鉴定发现 15 株散囊菌属, 其中 8 株冠突散囊菌、3 株谢瓦散囊菌、2 株肋状散囊菌、1 株阿姆斯特丹散囊菌和 3 株非散囊菌属(鉴定结果为黑曲霉)的真菌。茯砖茶的优势菌种普遍被认为是冠突散囊菌。需要注意的是, “金花”并非茯砖茶特有真菌。陈云兰等^[37]在康砖茶和青砖

茶中亦分离出类似“金花”的真菌并鉴定为“冠突散囊菌”。马燕等^[38]对云南普洱茶中疑似“金花”菌进行了鉴定, 结果显示该“金花”为阿姆斯特丹散囊菌。散囊菌属(*Eurotium*)的部分菌株移入曲霉属(*Aspergillus*)^[39], 同时冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)做异名处理, 移入后其名称变更为冠突曲霉(*Aspergillus cristatum*)^[40]。

表 2 黑茶精制过程微生物多样性的研究成果
Table 2 Results of microbial diversities during the refining process of dark tea

茶叶种类	微生物多样性	
	属	种
茯砖茶	散囊菌属(<i>Eurotium</i>)	
	德巴利酵母属(<i>Debaryomyces</i>)	
	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	
	芽枝霉属(<i>Cladosporium</i>)	
	毛霉属(<i>Mucor</i>)	
	镰刀菌属(<i>Fusarium</i>)	
	木霉属(<i>Trichoderma</i>)	
	轮枝孢属(<i>Verticillium</i>)	
	毕赤酵母属(<i>Pichia</i>)	
	拟盘多孢霉属(<i>Pestalotiopsis</i>)	
	根毛霉属(<i>Rhizomucor</i>)	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)
	白僵菌属(<i>Beauveria</i>)	冠突散囊菌(<i>Eurotium cristatum</i>)
	短波单胞菌属(<i>Brevundimonas</i>);	谢瓦散囊菌(<i>Eurotiumchevalieri</i>)
	诺卡氏菌属(<i>Nocardia</i>);	肋状散囊菌(<i>Eurotium costiforme</i>)
	新鞘脂菌属(<i>Novosphingobium</i>);	阿姆斯特丹散囊菌(<i>Eurotium amstelodami</i>)
	突那梭菌属(<i>Clostridium ultunense</i>);	
	假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i> spp.);	
	乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>);	
	克雷伯氏菌属(<i>Klebsiella</i>);	
	ϵ -变形菌(<i>ϵ-Proteus</i> Hauser);	
	腐败螺旋菌属(<i>Saprospiraceae</i>);	
	粘球菌属(<i>Myxovoccus</i>);	
	根瘤菌属(<i>Rhizobium</i>);	
	青霉属(<i>Penicillium</i>)	
普洱熟茶	/	/
康砖茶	/	/
六堡茶	曲霉属(<i>Aspergillus</i>);	
	散囊菌属(<i>Eurotium</i>);	/
	青霉属(<i>Penicillium</i>);	

备注: “/”表示未检索到相关研究报道

基于 DNA 分析手段的发展, 变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术、16S/18S 分析技术及宏基因组学技术同样在黑茶精制过程微生物多样性研究方面得到了大量应用。Xu 等^[41]通过使用 PCR-DGGE 技术鉴定出茯砖茶中的真菌主要分布于散囊菌属(*Eurotium*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、轮枝孢属(*Verticillium*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、拟盘多孢霉属(*Pestalotiopsis*)、根毛霉属(*Rhizomucor*)和白僵菌属(*Beauveria*), 其中散囊菌属(*Eurotium*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)和曲霉属(*Aspergillus*)为优势真菌。刘石泉等^[42]则通过该技术对茯砖茶发花过程中的细菌多样性进行了分析, 结果显示: 黑毛茶发花过程中有短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)、突那梭菌属(*Clostridium ultunense*)、韦龙氏假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)以及不可培养 ϵ -变形菌(*ϵ -Proteus* Hauser)、腐败螺旋菌属(*Saprospiraceae*)、粘球菌属(*Myxovoccus*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和 6 种未知分类地位的不可培养细菌。有研究表明, 在六堡茶的精制陈化阶段, 真菌多样性主要集中于曲霉属(*Aspergillus*)、散囊菌属(*Eurotium*)和青霉属(*Penicillium*)^[43]。黑茶精制过程微生物多样性的研究成果见表 2。

3.2.3 黑茶贮存过程微生物多样性分析

黑茶属发酵茶, 贮存年限影响黑茶的品质, 民间消费者认为黑茶越陈越好。黑茶贮存过程引起品质转化的动力原因还较模糊。大致认为有以下途径: 微生物作用、残余酶活催化以及自身的热力学反应。现阶段已有部分研究开始着手于黑茶贮存过程的微生物多样性分析。钟涛等^[44]利

用纯培养技术研究了藏茶贮存过程中的真菌种群, 结果表明其主要集中于曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和根霉属(*Rhizopus*)的五类真菌: 黑曲霉(*Aspergillus niger*)、光孢青霉(*Penicillium glabrum*)、娄地青霉(*Penicillium roqueforti*)、巴恩正青霉(*Penicillium baen*)和根霉(*Rhizopus*)。颜正飞等^[45]通过研究贮藏中的茯砖茶优势菌种发现, 冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)为其优势菌种, 同时亦存在其他种霉菌, 但未进行相关分类学研究。Xu 等^[41]利用 PCR-DGGE 技术研究了茯砖茶贮存过程中的微生物种群, 结果表明优势微生物为白僵菌属(*Beauveria*), 并认为该类微生物的存在能预防害虫损害成品茶。周才碧等^[46-49]从优质陈年普洱茶中分离出优势真菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[46]、赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)^[47]、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)^[48]和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)^[49], 并对其安全性进行了相关研究。毛彦等^[50]对六堡茶贮存过程中的“金花”进行形态学鉴定和 ITS 序列测序比对, 结果显示该“金花”为雪黄散囊菌(*Eurotium niveoglaucum*)。徐书泽^[22]对成品六堡茶展开了真菌多样性研究, 发现六堡茶在贮存期真菌种群主要集中于以下 8 属: 曲霉属(*Aspergillus*)、散囊菌属(*Eurotium*)、青霉属(*Penicillium*)、*Blastobotrys*、*Guehomyces*、*Rasamsonia*、*Rossbeevera* 和翘孢霉属(*Emericella*), 其中曲霉属(*Aspergillus*)和散囊菌属(*Eurotium*)为优势真菌。黑茶贮存过程微生物多样性研究成果见表 3。

3.2.4 黑茶微生物多样性研究

黑茶的品质形成离不开微生物的参与, 黑茶微生物的作用参与到黑茶加工的渥堆和发花两个环节。基于纯培养条件的限制, 黑茶微生物的多样性分析以真菌形态学鉴

表 3 黑茶贮存过程微生物多样性研究成果
Table 3 Results of microbial diversities during the storage of dark tea

茶叶种类	微生物多样性	
	属	种
茯砖茶	散囊菌属(<i>Eurotium</i>);	未检索到相关研究报道
	白僵菌属(<i>Beauveria</i>);	
普洱熟茶	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)
	青霉属(<i>Penicillium</i>)	赭曲霉(<i>Aspergillus ochraceus</i>)
		草酸青霉(<i>Penicillium oxalicum</i>)
		产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)
康砖茶		黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)
	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	光孢青霉(<i>Penicillium glabrum</i>)
	青霉属(<i>Penicillium</i>)	娄地青霉(<i>Penicillium roqueforti</i>)
	根霉属(<i>Rhizopus</i>)	巴恩正青霉(<i>Penicillium baen</i>)
		根霉(<i>Rhizopus</i>)

续表 3

茶叶种类	微生物多样性	
	属	种
六堡茶		黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)
		塔宾曲霉(<i>Aspergillus tubingensis</i> Moss.)
		烟曲霉(<i>Aspergillus fumigatus</i>)
		米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)
		萨氏曲霉(<i>Aspergillus sydowii</i>)
		赭曲霉(<i>Aspergillus ochraceus</i>)
	曲霉属(<i>Aspergillus</i>);	溜曲霉(<i>Aspergillus tamarii</i>)
	散囊菌属(<i>Eurotium</i>);	菌核曲霉(<i>Sclerotium aspergillus</i>)
	青霉属(<i>Penicillium</i>);	桔青霉(<i>Penicillium citrinum</i>)
	<i>Blastobotrys</i> ;	产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)
	<i>Guehomyces</i> ;	草酸青霉(<i>Penicillium oxalicum</i>)
	<i>Rasamsonia</i> ;	<i>Penicillium mallochii</i>
	<i>Rossbeevera</i> ;	鲜红青霉(<i>Penicillium chermesinum</i>)
	翘孢霉属(<i>Emericella</i>)	斑点青霉(<i>Penicillium meleagrinum</i>)
		<i>Penicillium brocae</i>
		宛氏拟青霉(<i>Paecilomyces varioti</i>)
		阿姆斯特丹散囊菌(<i>Eurotium amstelodami</i>)
		西弗射盾子囊霉(<i>Stephanoascus ciferrii</i>)
		雪黄散囊菌(<i>Eurotium niveoglaucum</i>)

定为主。主要研究成果体现为曲霉属、青霉属、散囊菌属、根霉属、毛霉属等真菌的形态学鉴定和酵母类真菌的计数。曲霉属、青霉属、散囊菌属及德巴利酵母属真菌存在于茯砖茶的加工环节，曲霉属、冠突散囊菌属及白僵菌属真菌存在于茯砖茶的精制及贮存环节。曲霉属真菌存在于普洱茶和康砖茶的加工及贮存环节。曲霉属、散囊菌属及青霉属真菌存在于六堡茶的精制及贮存环节。随着 DGGE 技术及 16S 技术的发展，细菌在黑茶加工过程中的多样性逐渐得到阐述。短波单胞菌属、诺卡氏菌属、新鞘脂菌属、突那梭菌属、假单胞菌属、乳杆菌属、克雷伯氏菌属、 ϵ -变形菌、腐败螺旋菌属、粘球菌属及根瘤菌属细菌存在于茯砖茶的加工环节。宏基因组技术针对普洱茶渥堆样进行的研究发现，细菌在普洱茶渥堆过程中的比例高达 75%以上。但由于该技术无法精确定位黑茶微生物的作用及种水平分类学地位。因此，微生物与黑茶品质形成及其功能成分的关系未得到阐明，该机制有望在宏转录组学和宏蛋白组学技术应用到黑茶研究后得到突破。不同地区黑茶微生物多样性差异的主要原因在于，加工过程中工艺参数不一致导致茶坯理化条件不一致。湖南黑毛茶的渥堆时间短、

堆温低，而普洱茶和四川康砖茶其渥堆时间长、堆温高。基于此，对温度不同耐受程度的微生物在不同的环境温度条件下必将产生多样性差异。曲霉属真菌存在于各类黑茶的生产及贮存环节，茯砖茶和普洱茶渥堆过程共有假单胞菌属和克雷伯氏菌属细菌，普洱茶和康砖茶共有芽孢杆菌属细菌。鉴于微生物多样性研究手段的发展，有必要利用宏基因组学技术针对不同地区的黑茶按照渥堆及发花的过程取样进行研究，从而将黑茶微生物多样性进行系统阐述。

4 黑茶的微生物毒素风险分析

微生物毒素是一类由微生物生长代谢产生的可引起生物机能破坏的有毒化学物质^[51]，按来源分为细菌毒素、真菌毒素。细菌毒素可分为细菌内毒素和细菌外毒素。细菌内毒素多为革兰氏阴性菌细胞壁脂多糖，细菌外毒素多为细菌分泌的胞外蛋白^[52]。真菌毒素(mycotoxins)是由真菌产生的一类具有致癌、致畸、致突变性的毒性极强的次级代谢产物^[52, 53]。目前已知真菌毒素约为 300 余种^[54]，每年全球粮食产量约有 25%受到真菌毒素的污染^[55]。

4.1 细菌毒素在黑茶产品中的安全风险

Stephen 将易染食源性病原菌分为两类,一是感染型,即沙门氏菌的各种血清型、空肠弯曲杆菌、致病性大肠杆菌;二是毒素型,即蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和肉毒梭菌^[56]。食源性细菌因适应环境压力而产生的毒素可引起食品安全风险,环境温度、湿度等因子的改变能导致食源性细菌致病^[57]。通过检索,现有黑茶微生物多样性的研究成果未见上述种类细菌报道,未见饮用黑茶导致细菌食源性感染病例的报道,饮用安全仓储下正规厂家生产的黑茶产品不存在食源性细菌致病风险。

4.2 真菌毒素在黑茶产品中的安全风险

真菌毒素种类丰富,来源复杂。经过一段平衡生长期后,天气或气候的改变、作物由生长期向成熟期转变及害虫的侵染都会导致真菌产毒。产毒真菌可细分为田间真菌和储藏真菌^[58]。产毒真菌常来源于曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、链格孢属(*Alternaria*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、麦角菌属(*Claviceps*)^[53]。通过检索现有黑茶微生物多样性研究成果,需要规范加工以防止曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)真菌等可能给黑茶产品带来的安全风险。

曲霉属(*Aspergillus*)真菌广泛存在于各类黑茶的各个加工阶段。黄曲毒素(aflatoxins)B1/B2/G1/G2 和赭曲毒素(ochratoxin)A 均由曲霉属真菌产生^[53]。黄曲毒素主要来源于黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)^[59],赭曲毒素 A 则主要来源于赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)和疣状青霉(*Penicillium verrucosum*)^[60]。

青霉属(*Penicillium*)真菌主要存在于黑茶的贮存环节,精制环节偶有发现,鲜见渥堆样中,这可能与渥堆的高温环境有着直接的联系。成品黑茶青霉属(*Penicillium*)真菌主要来源于加工及贮存环境。青霉属(*Penicillium*)真菌主要产生赭曲毒素 A 和棒曲毒素^[53]。

镰刀菌属(*Fusarium*)真菌在黑茶微生物多样性分析中鲜见报道,仅赵仁亮^[35]在对比茯砖茶冬夏季发花微生物多样性差异中有报道。镰刀菌属真菌主要产生白僵菌素(Beauvericin)、恩镰孢菌素(Enniatins)、Fusaproliferin、念珠镰刀菌素(Moniliformin)、伏马毒素(fumonisin)B1/B2、HT-2、T-2 毒素^[53]。

Doris Haas 等^[61]认为不能因为普洱茶生产的微生物发酵体系来源于开放的系统就认为普洱茶的真菌体系会对人体健康产生伤害。虽然陈建玲等^[62]针对广州市场的 70 份湿仓普洱茶进行了真菌毒素的检测,其 AFB1 含量处于较高水平达 0.021~8.521 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但该报道结果所有样品均低于 GB2761-2011 中对大米的限量标准(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,国家未明确茶叶中 AFB1 的限量要求,故采用日常主食做对照)。其

他文献报道,茶叶检测中真菌毒素含量都处于较低水平,低于 1.7 mg/kg 的检测限^[61, 63]。Mo 等^[64]在不同的茶样中通过接种黄曲霉菌考察产黄曲毒素情况,结果显示,大部分茶样能通过下调表达黄曲霉 AFLR 和 AFLS 基因而抑制黄曲霉毒素的产生。因此,饮用安全仓储下正规厂家生产的黑茶产品不存在真菌毒素致病风险。

5 展 望

随着测序平台的建立和发展,微生物多样性分析手段越来越先进,黑茶加工及贮存过程中的微生物种类越来越清晰,但各种微生物在茶叶品质变化过程中的贡献度还没有得到清晰的阐述。黑茶加工的微生物体系来源于开放系统,加工及贮存环境的微生物多样性状态是否会影响黑茶产品的品质有待进一步研究。

黑茶的品质形成离不开微生物的参与,研究各类黑茶加工环节的微生物多样性是我们揭示黑茶品质形成机制的重要途径。曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、散囊菌属(*Eurotium*)是各类黑茶微生物群落结构的主要种群。不同的研究对象显示的微生物多样性结果存在较大的差异,说明黑茶微生物多样性分析手段存在较大的主观误差,同时这也与黑茶产业生产标准化程度较低有着直接的关系。不同的黑茶种类在生产过程中由于原料及技术参数的不一致,导致了微生物多样性的差异。在黑茶生产环节中不仅要重视参与黑茶品质形成的有益微生物,同时也要防范如曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)等可能引起食品安全风险的有害微生物。

现有研究成果显示正规厂家生产的黑茶产品的食品安全风险压力极低,但由于环境状态的改变能诱发真菌产毒的事实存在,因此黑茶产品在制作和贮存过程中的微生物转录组学方面的科研工作需要跟进,用以监测微生物发酵体系中有关产毒基因的转录表达情况,为生产提供保障食品安全的技术参数。黑茶真菌毒素的检测方法和限量标准需要得到开发和制定,为食品安全检验提供相关依据。

参考文献

- [1] 施兆鹏. 茶叶加工学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
Shi ZP. Tea Processing [M]. Beijing: China Agriculture Publishing Press, 1996.
- [2] 梅宇. 2014 年中国茶叶产销报告及 2015 年形势预测[J]. 茶世界, 2015, (06): 50-59.
Mei Y. Chinese tea production and marketing report about 2014 year and the situation forecast about 2015 year [J]. Tea World, 2015, (06): 50-59.
- [3] 新农网. 云南普洱茶产值首破百亿 [EB/OL]. [2014-12-26].
<http://www.xinnong.net/news/20141226/1222651.html>
New Countryside Distribution Network. The number of the Yunnan pu'er tea production value has reached ten billions firstly[EB/OL]. [2014-12-26].
<http://www.xinnong.net/news/20141226/1222651.html>
- [4] 陈张书. 湖南黑茶 2014 年产值 80 亿 [EB/OL]. [2015-03-18].

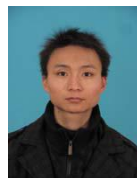
- http://www.xxcb.cn/event/caijing/2015-03-18/8972735.html.
- Chen ZS. The number of Hunan dark tea production value has reached 8 billion during 2014[EB/OL]. [2015-03-18]. http://www.xxcb.cn/event/caijing/2015-03-18/8972735.html.
- [5] Ludwig W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification [J]. *Int J Food Microbio*, 2007, 120(3): 225–236.
- [6] Handelsman J, 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.
- [7] 郑小玲, 王知坚, 李珏, 等. 多种测序技术在药品检测环境微生物鉴定分析中的应用研究[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(1): 46–52.
- Zheng XL, Wang ZJ, Li J, *et al.* Application of a variety of sequencing technology in the identification of environmental microorganisms [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(1): 46–52.
- [8] 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, (S1): 49–55.
- Wang ZS, Shi ZP, Liu ZH, *et al.* Discussing the formation mechanisms of Fuzhuan tea flavor [J]. *J Tea Sci*, 1991, (S1): 49–55.
- [9] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- Wan XC. *Tea Biochemistry* [M]. Beijing: China Agriculture Publishing press, 2003.
- [10] 路伟尧. 普洱茶发酵微生物的溯源分析[D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- Lu WY. Analysis of microbial tracking in pu'er tea fermentation [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013.
- [11] 周红杰, 秘鸣, 韩俊, 等. 普洱茶的功效及品质形成机理研究进展[J]. *茶叶*, 2003, 29(2): 75–77.
- Zhou HJ, Mi M, Han J, *et al.* Review of the studies on the effect and quality formation mechanism of Pu-er tea [J]. *J Tea*, 2003, 29(2): 75–77.
- [12] 赵龙飞, 周红杰. 云南普洱茶渥堆过程中的主要微生物初探[J]. *商丘师范学院学报*, 2005, 21(2): 129–133.
- Zhao LF, Zhou HJ. Study on the main microbes of Yunnan puer tea during pile-fermentation process [J]. *J Shangqiu Teachers Coll*, 2005, 21(2): 129–133.
- [13] 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]. *J Chin Brew*, 2012, 31(1): 122–125.
- [14] 陈可可, 朱宏涛, 王东, 等. 普洱熟茶后发酵加工过程中曲霉的分离和鉴定[J]. *云南植物研究*, 2006, 28(2): 123–126.
- Chen KK, Zhu HT, Wang D, *et al.* Isolation and identification of aspergillus species from the post fermentative process of Pu-Er ripe tea [J]. *Acta Botan Yunnanica*, 2006, 28(2): 123–126.
- [15] 李晨晨, 吕杰, 杨瑞娟, 等. 普洱茶渥堆发酵过程中嗜热细菌的分离和鉴定[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2012, 39(2): 74–78.
- Li CC, Lv J, Yang RZ, *et al.* Isolation and identification of thermophilic bacteria during the pile-fermentation of Pu'er tea [J]. *J Beijing Univ Chem Technol (Nat Sci)*, 2012, 39(2): 74–78.
- [16] 付润华, 齐桂年. 四川康砖茶的微生物研究[J]. *江苏农业科学*, 2008, (5): 231–234.
- Fu RH, Qi GN. Study on the microorganism in Sichuan Kangzhuang tea [J]. *J Jiangsu Agric Sci*, 2008, (5): 231–234.
- [17] 胥伟. 四川康砖茶渥堆过程中真菌种群的鉴定[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- Xu W. Identification of fungal colonization of Sichuan Kangzhuang Tea during Pile-fermentation [D]. Yaan: Sichuan Agriculture University, 2010.
- [18] 李东, 齐桂年, 胥伟, 等. 藏茶渥堆过程中真菌种群的鉴定[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(12): 155–158.
- Li D, Qi GN, Xu W, *et al.* Identification of fungus population in pile fermentation process of Tibetan tea [J]. *J Guizhou Agric Sci*, 2010, 38(12): 155–158.
- [19] 刘石泉, 胡治远, 赵运林. 变性梯度凝胶电泳法初步解析茯砖茶渥堆发酵过程中细菌群落结构[J]. *食品科学*, 2014, 35(15): 172–177.
- Liu SQ, Hu ZY, Zhao YL. Preliminary analysis of bacterial community structure during pile-fermentation process of fuzhuan brick tea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [J]. *Food Sci*, 2014, 35(15): 172–177.
- [20] 刘石泉, 胡治远, 赵运林. 用 DGGE 法初步解析茯砖茶渥堆发酵过程中真菌群落的结构[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2014, 40(5): 494–500.
- Liu SQ, Hu ZY, Zhao YL. Fungal communities structure during the pile-fermentation process of Fuzhuan brick tea by DGGE technology [J]. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 2014, 40(5): 494–500.
- [21] Abe M, Takaoka N, Idemoto Y, *et al.* Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea [J]. *Int J Food Microbio*, 2008, 124(2): 199–203.
- [22] 徐书泽. 六堡茶中真菌的多样性分析[D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- Xu SZ. Fungal community analysis of liupao tea [D]. Nanning: Guangxi University, 2014.
- [23] 杨瑞娟, 吕杰, 严亮, 等. 普洱茶渥堆发酵中嗜热真菌的分离和鉴定[J]. *茶叶科学*, 2011, 31(4): 371–378.
- Yang RZ, Lv J, Yan L, *et al.* Isolation and Identification of thermophilic fungi during the fermentation of Puer Tea [J]. *J Tea Sci*, 2011, 31(4): 371–378.
- [24] 姚静, 陈迪, 郑晓燕, 等. 普洱茶渥堆发酵过程中细菌种群的分离与分子鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(6): 2667–2668, 2671.
- Yao J, Chen D, Zheng XY, *et al.* Isolation and Molecular Identification of the bacterial colonization during the pile fermentation process of Pu-erh Tea [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(6): 2667–2668, 2671.
- [25] Zhao M, Xiao W, Ma Y, *et al.* Structure and dynamics of the bacterial communities in fermentation of the traditional Chinese post-fermented pu-erh tea revealed by 16S rRNA gene clone library [J]. *World J Microbio Biotechnol*, 2013, 29(10): 1877–1884.
- [26] Lv CY, Chen C, Ge F, *et al.* A preliminary metagenomic study of puer tea during pile fermentation [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(13): 3165–74.
- [27] Zhao M, Zhang DL, Su XQ, *et al.* An Integrated Metagenomics/Metaproteomics Investigation of the Microbial Communities and Enzymes in Solid-state Fermentation of Pu-erh tea [J]. *Sci Rep*, 2015, (5): 1–10.
- [28] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 茯砖茶加工过程中主要化学成分的变化[J]. *食品科学*, 2008, 29(2): 64–67.
- Fu DH, Liu ZH, Huang JA, *et al.* Variations of Components of Fuzhuan Tea during Processing [J]. *Food Sci*, 2008, 29(2): 64–67.
- [29] 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, (03): 12–14.
- Cang DP, Wen QY. Isolation and identification the dominant microbe and

- harmful fungal during the fermentation of Fuzhuan Tea [J]. J Tea Comm, 1981, (03): 12–14.
- [30] 齐祖同, 孙曾美. 茯砖茶中优势菌种的鉴定[J]. 真菌学报, 1990, 9(3): 176–179.
- Qi ZT, Sun ZM. Identificating the dominant fungal of Fuzhuan tea [J]. Mycosystema, 1990, 9(3): 176–179.
- [31] 温琼英. 茯砖茶中主要微生物的研究[J]. 茶叶通讯, 1986, (04): 19–21.
- Wen QY. Study on the main microorganism in Fuzhuan brick tea [J]. J Tea Comm, 1986, (04): 19–21.
- [32] 刘作易, 秦京, 李乃亮. 茯砖茶“金花”菌—谢瓦氏曲霉间型变种的孢子产生条件[J]. 西南农业学报, 1991, 4(1): 73–77.
- Liu ZY, Qin J, Li NL. Study of conditions of sporogenesis of *Aspergillus chevalieri* VAR. *intermedius* in Fuzhuan tea [J]. J Southwest Chin Agric Sci, 1991, 4(1): 73–77.
- [33] 阮林浩, 卢秦华, 谭吉慧, 等. 茯砖茶发花过程中冠突散囊菌的变化及差异性初报[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1271–1278.
- Ruan LH, Lu QH, Tan JH *et al.* Report of variations and differences of *Eurotium cristatum* in Fuzhuan brick tea during fungi growing [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(4): 1271–1278.
- [34] 陈桂梅, 黄亚亚, 梁艳, 等. 陕西省茯砖茶“金花”菌的鉴定分析[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(2): 345–348.
- Chen GM, Huang YY, Liang Y, *et al.* Identification and analysis of “golden-flower” fungus from Fu-Brick tea in Shaanxi province [J]. J Hubei Agric Sci, 2013, 52(2): 345–348.
- [35] 赵仁亮. 茯砖茶加工中微生物演变及对品质形成影响的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- Zhao RL. Study the development of the microorganism and the quality of Fu brick tea during the processing [D]. Changsha: Hunan Agric Univ.
- [36] 胡治远, 赵运林, 刘素纯, 等. 不同品种茯砖茶中优势微生物的分离鉴定[J]. 江西农业学报, 2011, 23(12): 60–64.
- Hu ZY, Zhao YL, Liu SC, *et al.* Isolation and identification of dominant microorganisms from different kinds of Fu-brick tea [J]. Acta Agric Jiangxi, 2011, 23(12): 60–64.
- [37] 陈云兰, 于汉寿, 吕毅, 等. 康砖和青砖茶中散囊菌的分离、鉴定及其生物学特性研究[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3): 232–236.
- Chen YL, Yu HS, Lv Y, *et al.* Investigation on the Isolation, Identification and the Biological Characteristic of *Eurotium* Fungi in the Kangzhuan and Qingzhuan brick tea [J]. J Tea Sci, 2006, 26(3): 232–236.
- [38] 马燕, 赵明, 周玲, 等. 普洱茶样中“金花”微生物的分离鉴定[J]. 茶叶通讯, 2011, 38(2): 17–20.
- Ma Y, Zhao M, Zhou L, *et al.* The isolation and identification of jinhua fungi in Pu-Erh tea samples [J]. J Tea Comm, 2011, 38(2): 17–20.
- [39] Hubka V, Kolarik M, Kubatova A, *et al.* Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus* [J]. Mycologia, 2013, 105(4): 912–937.
- [40] 王磊, 谭国慧, 潘清灵, 等. 黑茶砖茶中两种产生“金花”的曲霉菌[J]. 菌物学报, 2015, 34(2): 186–195.
- Wang L, Tan GH, Pan QL, *et al.* Two species of *Aspergillus* forming yellow cleistothecia popularly known as “golden flower” in dark brick tea of China [J]. Mycosystema, 2015, 34(2): 186–195.
- [41] Xu A, Wang Y, Wen J, *et al.* Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea [J]. Int J Food Microbio, 2011, 146(1): 14–22.
- [42] 刘石泉, 胡治远, 赵运林. 基于 DGGE 技术的茯砖茶发花过程细菌群分析[J]. 生态学报, 2014, 34(11): 3007–3015.
- Liu SQ, Hu ZY, Zhao YL. Analysis of bacterial flora during the fahua-fermentation process of fuzhuan brick tea production based on DGGE technology [J]. Acta Ecol Sin, 2014, 34(11): 3007–3015.
- [43] 陈庆金, 黄丽, 滕建文, 等. 基于 Miseq 测序分析六堡茶陈化初期真菌多样性[J]. 食品科技, 2015, 40(8): 67–71.
- Chen QJ, Huang L, Teng JW, *et al.* Fungal community of Liupao tea during the early aging process by high-throughput sequencing technologies with Miseq [J]. Food Sci Technol, 2015, 40(8): 67–71.
- [44] 钟涛, 齐桂年, 胥伟, 等. 藏茶贮存过程中真菌种群的鉴定[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(10): 101–103, 106.
- Zhong T, Qi GN, Xu W, *et al.* Identification of fungal populations during the storage period of Tibetan tea [J]. J Guizhou Agric Sci, 2010, 38(10): 101–103, 106.
- [45] 颜正飞, 郭健, 杨杨, 等. 分离自茯砖茶的真菌菌株 MJAU EC021 的鉴定及培养过程中生理特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 310–321.
- Yan ZF, Guo J, Yang Y, *et al.* Identification and physiological characteristics in cultivation of fungal strain MJAU EC021 isolated from brick tea [J]. Microbio Chin, 2016, 43(2): 310–321.
- [46] 周才碧, 陈文品, 吴钟玲, 等. 普洱茶优势菌株黑曲霉的分离及其功能和安全性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(3): 1006–1010.
- Zhou CB, Chen WP, Wu ZL, *et al.* Research on identification, function and safety of *Aspergillus Niger*, a preponderant fungus during the fermentative process of Pu'er tea [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(3): 1006–1010.
- [47] 周才碧, 陈文品, 赵振军, 等. 普洱茶优势菌株赭曲霉的功能和安全性研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(24): 160–163.
- Zhou CB, Chen WP, Zhao ZJ, *et al.* Research on function and safety of *aspergillus ochraceus*, a preponderant fungus during the fermentative process of Pu'er tea [J]. Food Res Dev, 2015, 36(24): 160–163.
- [48] 周才碧, 陈文品, 吴钟玲, 等. 普洱茶优势菌株草酸青霉的功能和安全性研究[J]. 食品科技, 2015, 40(8): 63–66.
- Zhou CB, Chen WP, Wu ZL, *et al.* Research on function and safety of *Penicillium oxalicum*, a preponderant fungus during the fermentative process of Pu'er tea [J]. Food Sci Technol, 2015, 40(8): 63–66.
- [49] 周才碧, 陈文品, 穆瑞禄, 等. 普洱茶优势菌株黄青霉的功能及安全性研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(6): 21–24.
- Zhou CB, Chen WP, Mu RL, *et al.* Research on function and safety of *Penicillium chrysogenum*, a preponderant fungus during the fermentation process of Pu'er tea [J]. J Guangdong Agric Sci, 2015, 42(6): 21–24.
- [50] 毛彦, 黄丽, 韦保耀, 等. 广西六堡茶“金花”菌的分离与分子鉴定[J]. 茶叶科学, 2013, 33(6): 556–561.
- Mao Y, Huang L, Wei BY, *et al.* Isolation and molecular identification of fungal colonization on Liupao tea in Guangxi [J]. J Tea Sci, 2013, 33(6): 556–561.
- [51] 李晓蓓, 欧杰, 王婧. 食品中微生物毒素检测方法研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 334–339.
- Li XB, Ou J, Wang J. A review of detection methods for microbial toxins in foods [J]. Food Sci, 2011, 32(11): 334–339.
- [52] 傅博强, 陈敏璠, 唐治玉, 等. 生物毒素检测方法及标准物质研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(1): 51–63.
- Fu BQ, Chen MF, Tang ZY, *et al.* Current progress on detection methods and reference materials of biotoxins [J]. Chin Bull Life Sci, 2014, (9):

- 2757–2764.
- [53] Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, *et al.* Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60(10):218–237.
- [54] 张勋. 真菌毒素类高灵敏高通量快速检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- Zhang Y. High-sensitivity, High-Throughput, and rapid detection immunoassay for mycotoxins [D]. Wuxi: Southern Yangtze University, 2014.
- [55] Skrbic B, Zivancev J, Durisic-Mladenovic N, *et al.* Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products [J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 389–396.
- [56] 石阶平. 食品中微生物风险评估[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- Shi JF. The microbiological risk assessment of food [M]. Beijing: China Agriculture University Publishing Press, 2002.
- [57] Alvarez-Ordóñez A, Broussolle V, Colin P, *et al.* The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety [J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 213: 99–109.
- [58] Rodrigues I, Naehrer K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed [J]. *Toxins*, 2012, 4(9): 663–675.
- [59] Yogendrarajah P, Devlieghere F, Njumbe Ediage E, *et al.* Toxicogenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method [J]. *Food Microbiol*, 2015, 52: 185–196.
- [60] Tria SA, Lopez-Ferber D, Gonzalez C, *et al.* Microfabricated biosensor for the simultaneous amperometric and luminescence detection and monitoring of Ochratoxin A [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79: 835–842.
- [61] Haas D, Pfeifer B, Reiterich C, *et al.* Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea [J]. *Int J Food Microbiol*, 2013, 166(2): 316–322.
- [62] 陈建玲, 李文学, 杨光宇, 等. 广州某茶叶市场普洱茶中多种生物毒素污染现状调查[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(1): 68–71.
- Chen JL, Li WX, Yang GY, *et al.* Biological contamination of pu'er tea in Guangzhou tea market [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis Mutagenesis*, 2011, 23(1): 68–71.
- [63] 吴静. 渥堆中普洱茶品质形成及陈化中真菌毒素状况的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- Wu J. Study on pu'er tea quality formation and state of mycotoxins during the aging process [D]. Nanchang: Nanchang Univ, 2013.
- [64] Mo HZ, Zhang H, Wu QH, *et al.* Inhibitory effects of tea extract on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2013, 56(6): 462–466.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



胥 伟, 博士研究生, 主要研究方向为茶叶加工及品质化学。
E-mail: 270396393@qq.com



朱 旗, 教授, 博士, 主要研究方向为茶叶加工及品质化学。
E-mail: 1965994459@qq.com