

普洱茶不同贮藏时期微生物种群的鉴定

方祥¹, 陈栋², 李晶晶¹, 赵超艺², 李斌¹, 黄国资², 陈忠正¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642) (2. 广东省农科院茶叶研究所, 广东 英德 513042)

摘要: 本研究在 8 个不同贮藏时期的普洱茶中鉴定出黑曲霉、产黄青霉、根霉、木霉、灰绿曲霉、酵母、芽孢杆菌、无芽孢杆菌、球菌、乳酸菌、放线菌等微生物类群。

关键词: 普洱茶; 贮藏时期; 微生物种群

中图分类号: S571.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)02-0105-05

Identification of Microbial Species in Pu-erh Tea with Different Storage Time

FANG Xiang¹, CHEN Dong², LI Jing-jing¹, ZHAO Chao-yi², LI Bin¹, HUANG Guo-zhi², CHEN Zhong-zheng¹

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Tea Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Science, Yingde 513042, China)

Abstract: Eight kinds of microbial species were found in eight samples of Pu-erh tea with different storage time, which were *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus glaucus*, *Saccharomyces sp.*, Actinomycetales and Bacterium.

Key words: Pu-erh tea; storage time; microbial species

近年来, 以普洱茶为代表的黑茶在市场掀起热潮, 微生物对其品质的影响也成为研究热点。本研究以 8 个不同贮藏时期的普洱茶为实验材料, 对其中的主要微生物类群进行分类鉴定, 为从微生物角度分析普洱茶品质形成机理提供研究基础。

1 实验材料

供试材料均由广东省农科院茶叶科学研究所提供, 具体样品及来源见表 1。

2 实验方法

2.1 培养基的配制

按 GB/T4789.28-2003《食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂》^[1]配制马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、MRS 琼脂培养基、高氏一号(Gause)琼脂培养基、麦氏(McClary)琼脂培养基。

2.2 微生物分离纯化

(1) 样品稀释液的制备按 GB/T4789.2-2003《食

品卫生微生物学检验 菌落总数测定》^[2]进行。

(2) 微生物的分离培养按 GB/T4789.2-2003《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》^[2]进行, 真菌采用平板涂布法, 细菌采用倾注平皿法。

(3) 微生物的纯培养按《微生物学实验手册》^[3]进行, 真菌用三点接种法, 细菌用划线分离法。

2.3 微生物分类鉴定

按照《微生物学实验手册》^[3]、《真菌鉴定手册》^[4]、《中国真菌志》^[5]进行真菌鉴定。

表 1 不同贮藏期普洱茶样品及来源

Table 1 Resources of Pu-erh tea with different store time

样品	来源
>30 年生茶	中茶牌黄印圆茶
>30 年熟茶	文革方砖
23 年广东生茶	广东烘青绿茶, 广东省农科院茶叶科学研究所制
15 年广东生茶	广东烘青绿茶, 广东省农科院茶叶科学研究所制
9 年云南熟茶	吉幸牌云南普洱茶砖, 云南茶叶进出口公司制
9 年广东熟茶	广东普洱茶, 广东省农科院茶叶科学研究所制
2 年云南熟茶	云南七子茶饼, 中国云南昆明云普茶厂制
2 年广东熟茶	广东陈香凤凰单枞茶饼, 广东省农科院茶叶科学研究所制

3 结果与分析

收稿日期: 2007-11-05

基金项目: 广东省科技计划项目 (2004B20801013)

作者简介: 方祥 (1971-), 男, 副教授

通讯作者: 李斌, 教授

本实验对 8 个贮藏期为 10~30 年的普洱茶样品进行系统的微生物分离培养, 共发现、鉴定 6 种真菌、1 种放线菌、4 种细菌等。

3.1 普洱茶的真核微生物

3.1.1 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)

黑曲霉是普洱茶中数量最多的微生物, 约占微生物总量的 80%。黑曲霉属半知菌亚门 (*Deuteromycotina*)、丝孢纲 (*Hyphomycetes*)、丝孢目 (*Hyphomycetales*)、丛梗孢科 (*Moniliaceae*)、曲霉属 (*Aspergillus*)^[4]。黑曲霉可产生多种酶类, 如果胶酶、葡萄糖淀粉酶、纤维素酶、柚苷酶、单宁酶、

葡萄糖氧化酶、糖苷酶等。在普洱茶发酵渥堆过程中, 黑曲霉作为优势种群, 其单宁酶可分解茶叶中的单宁, 解除其对于后续微生物的抑制起到重要作用, 同时纤维素酶、果胶酶等酶类对于分解茶叶中的高分子碳水化合物、增加普洱茶溶出物、对普洱茶甘醇品质的形成起着关键作用。

本实验对从普洱茶中分离纯化的黑曲霉进行菌落形态的观察, 并采用乳酸苯酚染色法在光学显微镜下对其个体形态、产孢结构、足细胞等进行观察和显微摄影, 结果如图 1 所示。



黑曲霉菌落形态

产孢结构和分生孢子, 400×

产孢结构和足细胞, 400×

图 1 普洱茶中的黑曲霉

Fig.1 *Aspergillus niger* within Pu-erh tea

3.1.2 灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*)

灰绿曲霉属半知菌亚门 (*Deuteromycotina*)、丝孢纲 (*Hyphomycetes*)、丝孢目 (*Hyphomycetales*)、丛梗孢科 (*Moniliaceae*)、曲霉属 (*Aspergillus*)^[4]。从普洱茶中分离纯化的灰绿曲霉, 其菌落形态、产孢结构、分生孢子如图 2 所示。

3.1.3 产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)

在普洱茶的真菌中, 产黄青霉的数量仅次于黑曲霉。产黄青霉属半知菌亚门 (*Deuteromycotina*)、丝孢纲 (*Hyphomycetes*)、丝孢目 (*Hyphomycetales*)、丛梗孢科 (*Moniliaceae*)^[4]。从普洱茶中分离纯化的产黄青霉, 其菌落形态、个体形态如图 3 所示。

产黄青霉可产生多种酶类及有机酸, 并可代谢产生青霉素, 能在一定程度上抑制普洱茶中的杂菌、腐败菌等, 对普洱茶形成醇和品质有积极影响。

3.1.4 根霉属 (*Rhizopus spp.*)

根霉属接合菌亚门 (*Zygomycotina*)、接合菌纲 (*Zygomycetes*)、毛霉目 (*Mucorales*)、毛霉科 (*Mucor*)^[4]。本实验对普洱茶中分离纯化的根霉进行菌落形态的观察, 并采用乳酸石炭酸染色法在光学显微镜下对其进行个体形态观察并拍照, 结果如图 4 所示。

根霉的淀粉酶、果胶酶活力较高, 能产生芳香酯类物质, 也能转化甾醇族化合物。在普洱茶中生成一

定数量的根霉, 有利于甜香品质的形成和茶叶的软化。

3.1.5 木霉属 (*Trichoderma spp.*)

木霉属于半知菌亚门 (*Deuteromycotina*)、属半知菌亚门 (*Deuteromycotina*)、丝孢纲 (*Hyphomycetes*)、丝孢目 (*Hyphomycetales*)、木霉属 (*Trichoderma*)^[4]。本实验对普洱茶中分离纯化的木霉进行菌落形态的观察, 并采用乳酸苯酚染色法在光学显微镜下对木霉的个体形态、分生孢子、节状枝、菌丝等进行观察, 结果如图 5 所示。

3.1.6 酵母

酵母属真菌门 (*Eumycota*)、子囊菌纲 (*Ascomycetes*)、半子囊菌亚纲 (*Hemiascomycetes*)、酵母目 (*Endomycetales*)、酵母亚科 (*Saccharomyces Toideae*)^[4]。

本实验对普洱茶中分离纯化的酵母进行菌落形态的观察, 并采用美兰染色后在光学显微镜下对酵母的个体形态、出芽生殖、假菌丝等进行观察, 结果见图 6。

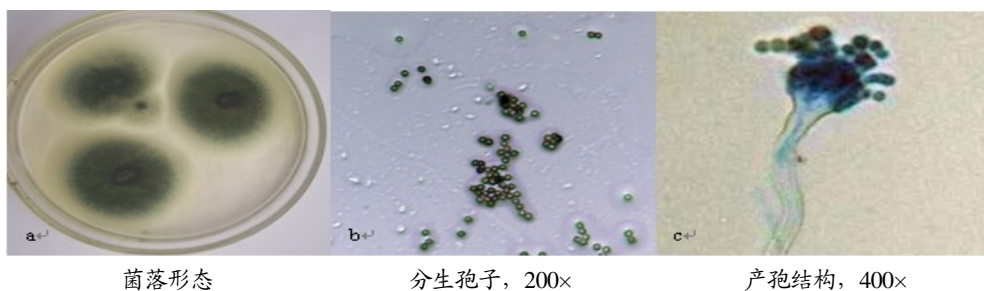
酵母含有极丰富的蛋白质、氨基酸、维生素、脂肪、粗纤维素、碳水化合物、矿物质及微量元素等, 有利于普洱茶形成甜醇、爽滑的品质风格。

3.2 普洱茶的原核微生物

放线菌是普洱茶中数量较少的原核微生物之一,

仅占微生物总量的 0.04%~0.06%，其代表属有链霉菌属 (*Streptomyces*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、小单胞菌属 (*Micromonospora*)、链孢囊菌属 (*Streptosporagium*) 等。本实验对普洱茶中分离纯化的放线菌进行菌落形态观察，采用美兰染色法对放线菌的营养菌丝、气生菌丝、孢子丝等进行观察，结果见图 7。

普洱茶中细菌数量众多，常见的有芽孢杆菌属 (*Bacillus spp.*)、短杆菌 (*Brevibacterium spp.*)、球菌 (*Staphylococcus spp.*)、乳酸菌 (*Lactobacillus spp.*) 等。本实验对采用平板划线法分离纯化普洱茶中的细菌，并在光学显微镜下对细菌的个体形态、芽孢、荚膜等进行观察，结果见图 8。



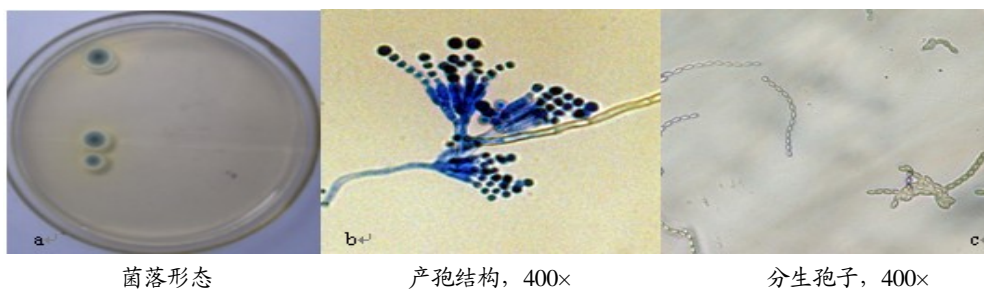
菌落形态

分生孢子, 200×

产孢结构, 400×

图 2 普洱茶中的灰绿曲霉

Fig.2 *Aspergillus glaucus* within Pu-erh tea



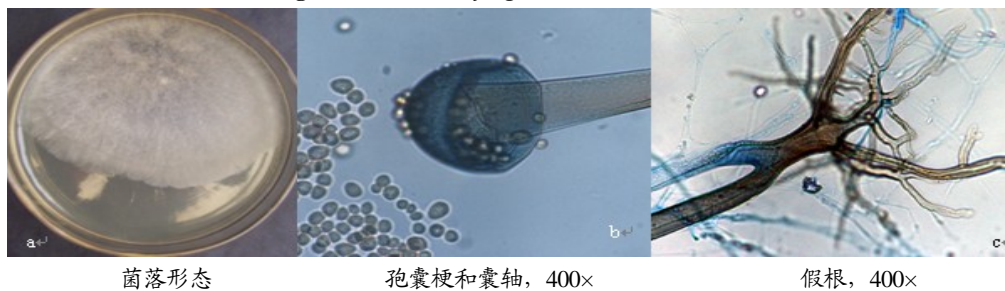
菌落形态

产孢结构, 400×

分生孢子, 400×

图 3 普洱茶中的产黄青霉

Fig.3 *Penicillium chrysogenum* within Pu-erh tea



菌落形态

孢囊梗和囊轴, 400×

假根, 400×

图 4 普洱茶中的根霉

Fig.4 *Rhizopus sp.* within Pu-erh tea

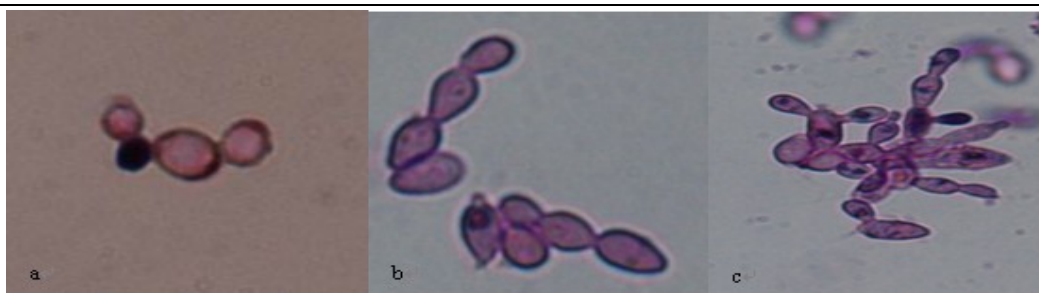


菌落形态

分生孢子和分生孢子梗, ×400

图 5 普洱茶中的木霉

Fig.5 *Trichoderma sp.* within Pu-erh tea



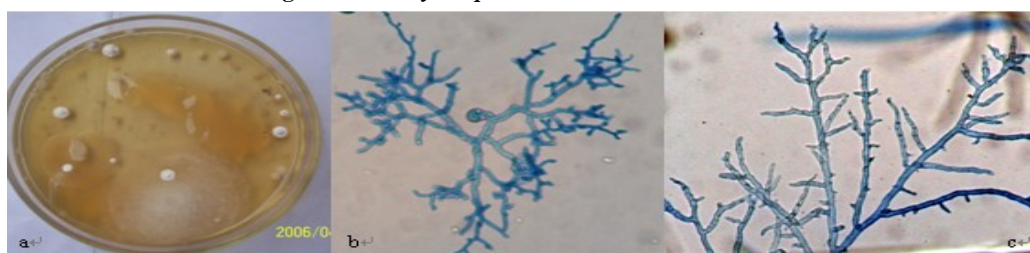
细胞形态, 400×

出芽生殖后形成串生细胞, 400×

酵母的假菌丝, 400×

图6 普洱茶中分离的酵母

Fig.6 *Saccharomyces* sp. were isolated from Pu-erh tea



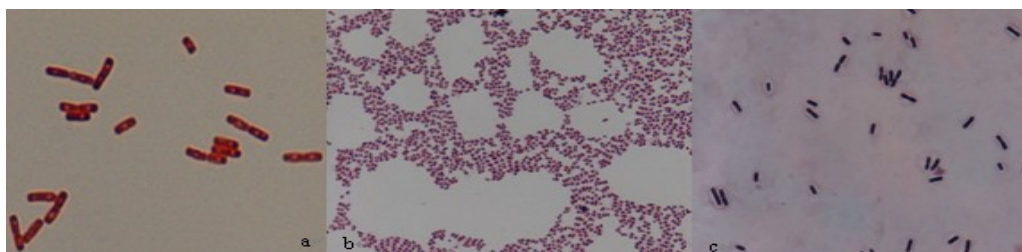
菌落形态

基内菌丝, 1000×

气生菌丝, 1000×

图7 普洱茶中分离的放线菌

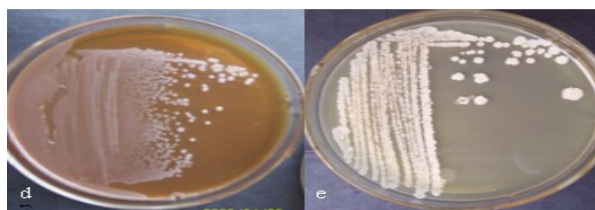
Fig.7 *Actinomyces* were isolated from Pu-erh tea



芽孢杆菌, 1000×

球菌, 1000×

荚膜细菌, 1000×



乳酸菌菌落形态

芽孢杆菌菌落形态

图8 普洱茶中分离的细菌

Fig.8 Bacterium were isolated from Pu-erh tea

4 讨论

不同贮藏期普洱茶中的微生物种类较多, 是一个多种微生物类群并存的体系。主要的微生物类群包括霉菌(黑曲霉、灰绿曲霉、根霉、酵母、木霉、产黄青霉等)、酵母、细菌(芽孢杆菌、球菌、无芽孢短杆菌、乳酸菌)、放线菌。以上微生物类群均为自然环境常见微生物, 未发现致病菌和特殊微生物类群。该结

果与刘勤晋^[6]、何国藩^[7]、温琼英^[8]及周红杰^[9]对普洱茶渥堆过程中微生物的分析结果相同。

本研究认为黑曲霉为不同贮藏期普洱茶中第一优势类群, 该结果与刘勤晋^[6]、何国藩^[7]、温琼英^[8]、周红杰^[9]的结论一致; 本研究中多次检出放线菌, 该结果也与何国藩^[7]对广东普洱茶微生物的分析结果相符。

(下转第 160 页)