

普洱茶与微生物

——普洱茶中微生物研究进展

报告人：季爱兵

工作单位：普洱茶研究院

2017年9月26日

主要内容

- 普洱茶
- 微生物
- 普洱茶加工（发酵）与环境微生物
- 研究普洱茶中微生物的方法
- 普洱茶中微生物种群与普洱茶品质的关系

普洱茶

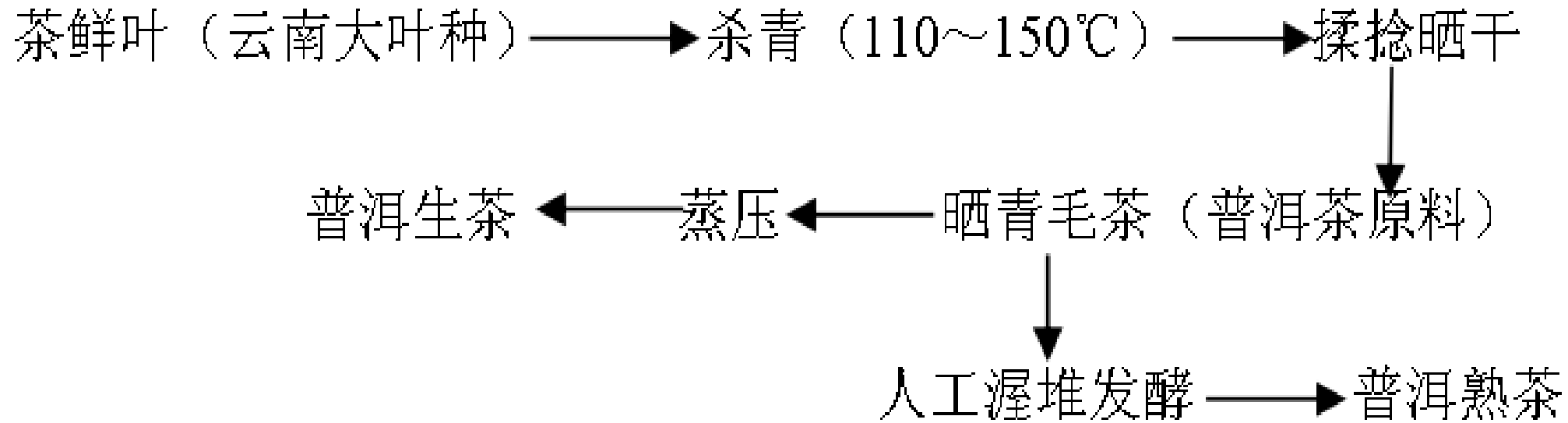
- 普洱茶是以云南大叶种晒青毛茶为原料经后发酵加工而成的紧压茶或散茶。
- 普洱茶又按照其加工工艺将其分为普洱生茶和普洱熟茶。
- 普洱熟茶是晒青毛茶经潮水、渥堆，经渥堆过程中物质变化是由微生物、酶、湿热、氧化等综合作用的结果，因其经过人工后发酵以区别于普洱生茶。

微生物

- **A. van Leeuwenhook和Louis Pasteur**
- 微生物包括细菌（原核生物）和真菌（真核生物）

普洱茶加工（发酵）与环境微生物

- 普洱茶制作工艺流程图



- 普洱原料晒青毛茶就有大量的内生菌，晒青毛茶又长期暴露在空气中，我们在研究中发现很多发酵过程中的微生物都在普洱茶鲜叶中和茶园空气中都有发现。普洱茶渥堆时，刚开始温度由室温缓慢升高，其潮水量常达到40%左右，堆温一般保持在从28~55℃左右，非常适合微生物的生长。在发酵过程中，我们能肉眼可见真菌菌丝，一般认为普洱茶的加工过程离不开微生物的作用，普洱茶的品质与微生物的消亡有密切关系。

- 茶园空气微生物的采集和鲜叶内生菌样本的采集



研究普洱茶中微生物的方法

- 微生物的传统分离鉴定
- 微生物自动鉴定系统
- 分子生物学方法
 - 宏基因组学高通量测序

微生物的传统分离鉴定

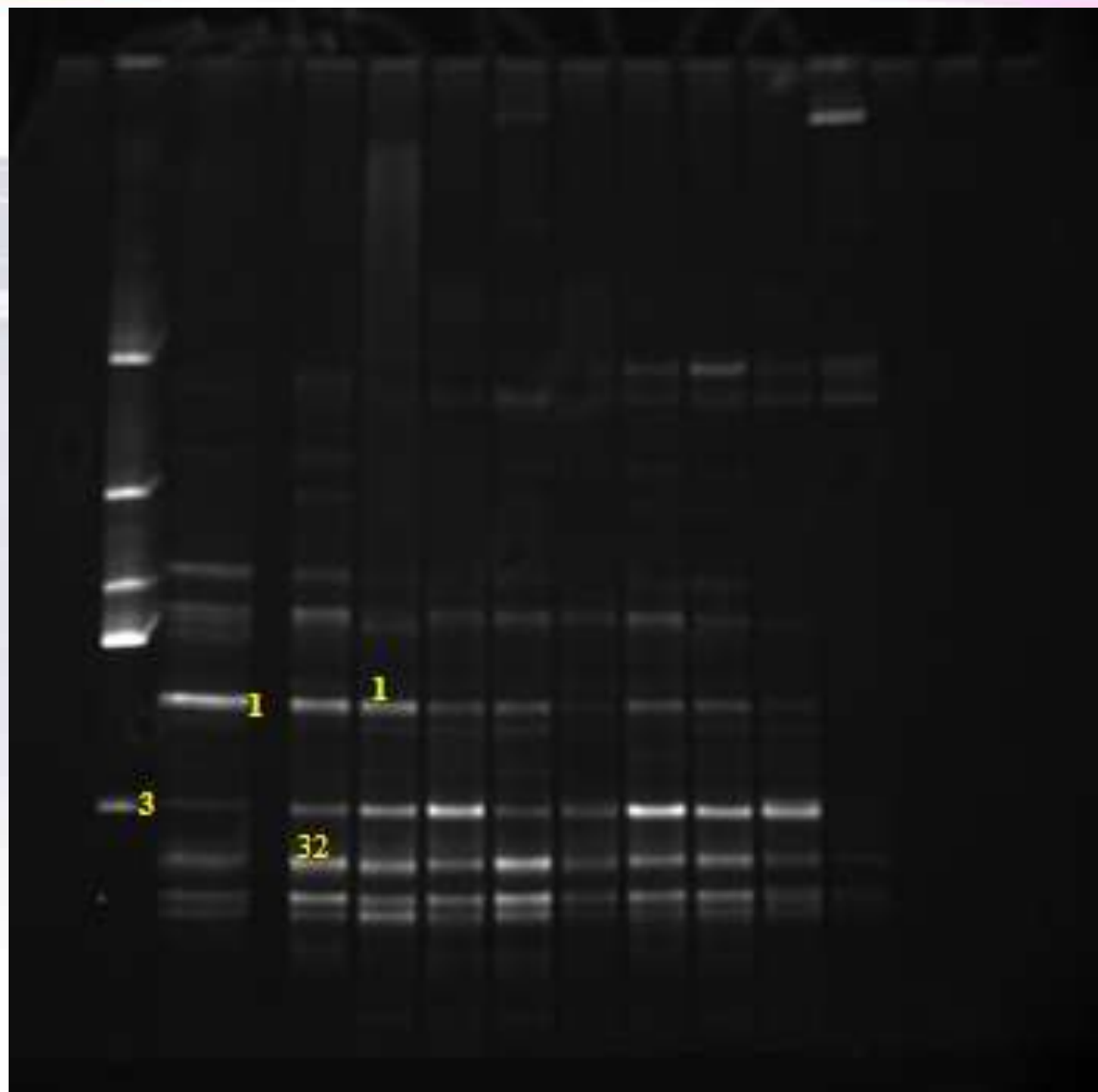
- 茶叶与无菌水按一定比例进行均质，然后再做稀释梯度培养，初步了解渥堆发酵中普洱茶中微生物总量，分离纯化微生物，保存菌种鉴定。
- 鉴定方法主要为形态学鉴定，或根据生理生化性状，一般将结果与标准分类系统中微生物形态或生理生化性状进行对比。该方法是研究微生物的主要方法，该方法已成功在证实普洱茶中确实存在细菌、酵母、霉菌和放线菌。

微生物自动鉴定系统

- 微生物快速鉴定仪是将微生物与底物反应的生化类型与已知建立的数据库中的类型比较，使微生物鉴定更加快速、准确。Mo等利用API ID 32C和API ID 50 CHL微生物快速鉴定系统对普洱茶发酵过程中的微生物进行鉴定，发现了多种酵母和细菌。但由于该系统是根据现有数据库中所提供的背景资料进行微生物鉴定，数据库资料会影响微生物鉴定的种类及准确性。

分子生物学方法

- PCR（聚合酶链式反应）
- 16S或23S rRNA序列DNA标记技术和ITS测序技术
细菌核糖体16SrDNA基因序列全长约1550bp。
真菌核糖体基因由小亚单元(18 S), ITS 1区、5.8S区、ITS2区和大亚单元（28S）构成，首尾串联形成重复序列，一个基因组内有60~200个拷贝。真菌ITS区域一般长650~750bp。
- PCR变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)



宏基因组学高通量测序

- 高通量测序技术（High-throughput sequencing）又称“下一代”测序技术（"Next-generation" sequencing technology），以能一次并行对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定和一般读长较短等为标志。根据发展历史、影响力、测序原理和技术不同等，主要有以下几种：大规模平行签名测序（Massively Parallel Signature Sequencing, MPSS）、聚合酶克隆（Polony Sequencing）、454焦磷酸测序（454 pyrosequencing）、Illumina (Solexa) sequencing、ABI SOLiD sequencing、离子半导体测序（Ion semiconductor sequencing）、DNA 纳米球测序（DNA nanoball sequencing）等。

- 吕昌勇等人利用宏基因组学高通量测序研究方法认为，细菌是普洱茶渥堆发酵过程中的主要菌群，占总微生物的76.26%；真核生物次之，占16.35%。目前应用高通量测序在普洱茶渥堆发酵微生物的研究中很少涉及，赵明等人在利用高通量测序方法研究普洱茶发酵过程中的微生物，对参与普洱茶渥堆发酵微生物种群作了初步的鉴定。

- 微生物第二代测序技术在环境微生物的研究方面已经非常成熟，已经广泛地应用于环境微生物的研究，而在普洱茶中的微生物的研究结果却少之又少。吕昌勇和赵明等人利用高通量测序方法对普洱茶渥堆发酵中的微生物进行了研究，这一技术的应用为普洱茶中非培养微生物的研究提供了新的可能。高通量测序技术在环境微生物的研究中常比PCR-DGGE法检测灵敏度高 3.8~39.4倍。

普洱茶中微生物种群与普洱茶品质的关系

- 普洱茶中微生物种群
- 优势种群与普洱茶品质的关系

普洱茶中微生物种群

- 从不同年代的普洱茶和渥堆发酵的普洱茶中分离得到了霉菌（黑曲霉，微小根毛霉，牛根毛霉）、酵母、细菌(芽孢杆菌，*Bacillus coagulans*，球菌，无芽孢短杆菌，乳酸菌，植物乳杆菌，类乳酸片球菌和大量嗜热细菌)、放线菌。
- 吕昌勇等人认为，普洱茶发酵初期的优势细菌是变形菌门（*Proteobacteria*），随后厚壁菌门（*Firmicutes*）上升成为优势菌，放线菌门（*Actinobacteria*）与*Firmicutes*在发酵后期繁成为共同优势菌。原料的优势真菌归类为no-rank-Fungi（65.39%），发酵过程中，曲霉属（*Aspergillus. sp*）真菌一直处于优势；发酵中期环境中的根毛霉属（*Rhizomucor. sp*）先升高后降低。

优势种群与普洱茶品质的关系

- 近年来，关于普洱茶与微生物关系研究更多地集中在优势菌种对普洱茶品质影响的研究，多数是将分离纯化后的微生物再接种到普洱茶中，用来研究普洱茶品质改变情况。
- 陈秀燕等人将灰绿曲霉和青霉接种到普洱生饼茶和散茶中，能明显加速普洱茶陈化的作用，且能提高茶汤的香气。研究表明，灰绿曲霉和青霉接能加速茶叶中纤维和果胶的降解，使普洱茶更加甘滑、醇厚。

- 董文明等人认为，普洱茶发酵过程中，黑曲霉产淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶、果胶酶，酵母菌产淀粉酶、蛋白酶、果胶酶，细菌只产淀粉酶、蛋白酶。经过这些酶的作用后普洱生茶形成了普洱熟茶甘厚浓醇的品质特征。
- 周才碧等利用优势菌株黑曲霉纯种对普洱茶进行发酵实验，得到的茶样香气浓纯、汤色黑褐色、滋味较平和，且茶色素发生明显变化，表明黑曲霉可以作为发酵用菌种，适于普洱茶的渥堆发酵。
- 康燕山等人对普洱茶在普洱茶发酵过程中添加外源酶和接种酵母，其结果表明，使用外源酶可增加普洱茶所含水溶性总糖及游离氨基酸的含量，接种酵母可明显加速普洱茶茶多酚的转化。

普洱茶与有害微生物

- 非茶类杂质引进有害微生物
- 不当加工方式引进有害微生物
- 不当储藏方式引进有害微生物

谢谢!

Thanks for your attention!

THANKS FOR YOUR ATTENTION!