

利用Illumina MiSeq测序分析手筑茯砖茶发酵及干燥阶段真菌群落多样性

陈梦娟¹, 蒋立文^{1,2,*}, 徐元昊¹, 周红丽^{1,2}, 周 辉^{1,2}

(1.湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南 长沙 410128;

2.食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为了解手筑茯砖茶发酵与干燥过程中真菌种类变化, 以发酵(0、4、8、12 d)及干燥阶段(17、22 d)的手筑茯砖茶样品为研究对象, 应用Illumina MiSeq技术进行扩增测序, 为手筑茯砖茶发酵及干燥阶段样品中真菌多样性研究奠定基础。结果表明: 手筑茯砖茶的发酵初期真菌群落结构存在较大差异, 但随着发酵及干燥的进行真菌多样性整体呈下降趋势。测序及数据清理后共得到990 522个有效的Tags, 聚类后有186个可操作分类单元, 注释到5个门、14个纲、29个目、47个科、65个属。其中0 d的真菌多样性最高, 且相对丰度最高的为曲霉属(*Aspergillus*), 达40.59%。其次为德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、散囊菌属(*Eurotium*)和青霉属(*Penicillium*)等。而在4、8、12 d及17、22 d茯砖茶样品中, 散囊菌属是绝对优势菌属, 第4天时其相对丰度已达到97.27%, 在这5组样品中其平均相对丰度高达98.81%。本研究采用Illumina MiSeq测序分析更准确、全面地反映手筑茯砖茶发酵与干燥过程中真菌群落结构和多样性动态变化, 为手筑茯砖茶工艺的改进及机理的研究提供了新思路。

关键词: 手筑茯砖茶; Illumina MiSeq技术; 真菌多样性

Analysis of Fungal Community Diversity during Fermentation and Drying of Hand-Made Fu Brick Tea by Illumina MiSeq Sequencing

CHEN Mengjuan¹, JIANG Liwen^{1,2,*}, XU Yuanhao¹, ZHOU Hongli^{1,2}, ZHOU Hui^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to understand the changes in fungal species during the fermentation and drying of hand-made Fu brick tea, the fungal diversity at different times of fermentation (0, 4, 8 and 12 d) and drying (17 and 22 d) was analyzed using Illumina MiSeq high-throughput sequencing. The results showed that the fungal community was diverse during the early fermentation stage, but this diversity exhibited an overall declining trend as fermentation and drying proceeded successively. After sequencing and data cleansing, a total of 990 522 valid Tags were obtained. After clustering, there were 186 operational taxonomic units (OTUs), which were annotated to 5 phyla, 14 classes, 29 orders, 47 families and 65 genera. Among all time points, the highest diversity of fungi was observed on fermentation day 0, and *Aspergillus* showed the highest relative abundance (40.59%), followed by *Debaryomyces*, *Eurotium* and *Penicillium*. However, *Eurotium* was the absolutely dominant genus at the other five time points. Its relative abundance reached 97.27% on fermentation day 4, and the average relative abundance of these five time points was 98.81%. In this study, accurate and detailed analysis of the changes in the bacterial community structure and diversity during the fermentation and drying of hand-made Fu brick tea was achieved using Illumina MiSeq sequencing, which will provide a new idea for improving the processing of hand-made Fu brick tea and for understanding the underlying mechanism.

Keywords: hand-made Fu brick tea; Illumina MiSeq technology; fungal community diversity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181104-041

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2020)02-0126-07

收稿日期: 2018-11-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571819)

第一作者简介: 陈梦娟(1992—)(ORCID: 0000-0001-9801-1215), 女, 博士研究生, 研究方向为园艺产品采后科学与技术。

E-mail: 715657977@qq.com

*通信作者简介: 蒋立文(1968—)(ORCID: 0000-0002-8536-8298), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: 1024305380@qq.com

引文格式:

陈梦娟, 蒋立文, 徐元昊, 等. 利用Illumina MiSeq测序分析手筑茯砖茶发酵及干燥阶段真菌群落多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 126-132. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181104-041. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Mengjuan, JIANG Liwen, XU Yuanhao, et al. Analysis of fungal community diversity during fermentation and drying of hand-made Fu brick tea by Illumina MiSeq sequencing[J]. Food Science, 2020, 41(2): 126-132. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181104-041. <http://www.spkx.net.cn>

安化茯砖茶是我国一种独具特色的后发酵茶,也是湖南安化县的地理标志产品^[1-2]。其成品呈黑褐色、香气沁心,“金花”浓密,而茶汤浓郁清透,甘而不涩。随着学者对茯砖茶研究的不断深入,发现茯砖茶不仅含有丰富的茶类功能性成分,诸如多酚、多糖和氨基酸等^[3-4],其独特的“金花”还具有调节脂代谢、肠道微生物、抗炎防癌等功效^[5-8],因而受到人们极大的关注。

目前对茯砖茶中微生物的相关研究主要集中于优势菌种的分离与鉴定^[9-10]、优势菌种代谢物的生理活性研究^[11-12]及生产中某阶段微生物菌群结构的研究等,但是对生产全过程中微生物菌群结构变化的研究较少。近年来,基于分子生物学技术的不断发展,对茯砖茶中微生物多样性的探索已逐渐深入化、全面化。Xu Aiqing等^[13]采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)法对原料、发酵及贮藏中的茶样进行真菌多样性分析,发现了8个属,而散囊菌属(*Eurotium*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)和曲霉属(*Aspergillus*)是茯砖茶发酵过程中的优势菌属。刘石泉等^[14]对发花阶段茯砖茶样中的真菌进行18S rDNA区扩增并采用DGGE技术分析,发现发花过程前期与后期优势菌群有明显差异,并检测到32株真菌,包括好干性酵母(*Wallemia sebi*、*Wallemia muriae*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、假丝酵母菌(*Candida* sp.)、阿姆斯特丹散囊菌(*Eurotium amstelodami*)、曲霉(*Aspergillus penicillioides*)等。随着高通量技术的发展和运用,越来越多的研究者也将其运用于茯砖茶微生物群落结构的研究,相较于PCR-DGGE法所得的结果,Illumina MiSeq测序所得结果能更准确反映出菌群结构及动态变化。赵仁亮等^[15]采用MiSeq技术对不同产地茯砖茶中细菌和真菌多样性进行分析发现,湖南产区加工的茯砖茶中曲霉属是优势菌种且相对丰度高于90%,其次是*Trichocomaceae* unclassified、*Eurotiomycetes* unclassified和*Eurotiales* unclassified。Li Qin等^[16]采用Illumina MiSeq测序技术研究了产自湖南益阳的机压茯砖茶样品中的微生物菌群变化,结果表明发酵前3 d相对丰度较高的是曲霉属、*Cyberlindnera*和念珠菌属(*Candida*),3~22 d的样品中曲霉属为绝对优势菌种。

茯砖茶按照现有工艺分为两类,即机压茯砖茶和手筑茯砖茶两类,前者采用机械自动成型,后者茶叶经汽蒸软化后人工成型,两者由于成型工艺不同有所差异。本实验中的毛茶原料产自湖南安化,原料中加入12%的茶汁,梗的比例约为8%,然后进行2次汽蒸软化(105℃汽蒸,搅拌20 s),再渥堆发酵14~16 h。在筑制之前测定茶叶的水分,并用105℃蒸汽蒸制茶筑10 s,手筑成砖时茶砖中水分约为26%。然后将手筑并包装后的茶砖置于发酵房(相对湿度70%~75%)28℃发酵10~15 d,以2.5℃/d的速率缓慢升温10 d进行干燥制成成品。本实验采用Illumina MiSeq技术^[17]对“控温发酵及升温干燥一条龙”的手筑茯砖茶中真菌菌群结构变化进行研究,以期合理调控加工进程、揭示微生物的作用机理及构建产品安全保障体系的研究提供一定的参考依据^[18]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 茶样

手筑茯砖茶样品来自湖南安化连心茶厂:经手筑成型后的样品从发酵到干燥完成周期为22 d,其中发酵和干燥阶段分别为12 d和10 d。取样分别按照发酵阶段0、4、8、12 d,样品干燥阶段17、22 d样品,每块手筑茯砖茶质量为500 g,每次取样是同批次样品4块,取样后置于-80℃冰箱保藏,待样品全部取完后,在无菌条件下捣碎取样,分别编号为Fj_0 d、Fj_4 d、Fj_8 d、Fj_12 d及Gz_17 d、Gz_22 d。

1.1.2 试剂

Pusion Hot start flex 2X Master Mix 上海仪涛生物仪器有限公司; DL2000 DNA Maker 宝日医生物技术(北京)有限公司; Gene colour 北京金博益生物技术有限公司; Qubit dsDNA HS Assay Kit 美国Invitrogen Life Technologies公司; 琼脂糖G-10 西班牙Biowest公司; 50×TAE Buffer 生工生物工程(上海)股份有限公司; AxyPrep PCR Cleanup Kit 美国Axygen公司; Soil DNA Kit 美国OMEGA BioTek公司。

1.2 仪器与设备

5424型常温离心机 德国Eppendorf Centrifuge公司;

Microfuge 22R型冷冻离心机 美国Beckman Coulter公司；WH-861型旋涡振荡仪 太仓市华利达实验设备有限公司；DK-8D型三温三控恒温水浴锅 上海博迅实业有限公司；A200型PCR仪 杭州朗基科学仪器有限公司；MiSeq pe300测序仪 美国Illumina公司；Tanon-2500型电泳仪、凝胶成像仪 上海天能公司；DW-HL388型超低温冷冻储存箱 中科美菱低温科技有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 PCR扩增和ITS 2测序

使用OMEGA的土壤提取试剂盒对各个茶叶样本的总DNA进行提取，提取步骤均按照试剂盒说明书完成，然后将总DNA加入到50 μ L缓冲液中并贮存在-80 $^{\circ}$ C备用。扩增真菌ITS 2区所选用的引物为：ITS7（5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3'）和ITS4（5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）。PCR体系为25 μ L，包含DNA模板25 ng、上下游引物各2.5 μ L、PCR预混合物12.5 μ L。PCR条件：98 $^{\circ}$ C预变性30 s；98 $^{\circ}$ C循环35次，变性10 s；52 $^{\circ}$ C退火30 s；72 $^{\circ}$ C延伸45 s，循环35次，最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取PCR产物10 μ L用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测，将检测合格样品送至杭州联川生物技术有限公司进行高通量测序。

1.3.2 数据分析

对下机数据首先根据样品的barcode信息对数据进行拆分，使用PEAR合并成对端读数。在特定的过滤条件下对原始标签进行质量过滤，以获得符合FastQC（V 0.10.1）的高质量Tags^[19]。通过Verseach（V2.3.4）将具有97%以上相似性的序列分配给相同的可操作分类单元（operational taxonomic unit，OTU）^[20-21]。每个OTU选择代表性序列，然后使用RDP分类器将数据归类到每个代表性序列。利用PyNAST软件对不同类群优势种群的差异进行多序列比对，研究不同OTU间的系统发育关系，并使用对应于具有最少序列的样品的序列号进行OTU丰度信息的归一化。以Chao 1指数、Shannon指数、Simpson指数和Observed species指数为指标，用QIME（1.8.0版）计算所有样品的各项指标并进行聚类，分析各个样品中的 α 多样性。再通过QIME（1.8.0版）进行主成分分析和主坐标分析分析计算 β 多样性^[22-24]。同时，根据每个OTU代表序列与RDP数据库和Unite数据库的比对，得到各个样本所有OTU的物种注释^[25-26]，经分类和统计后以R语言绘制各分类水平物种丰度表及热图。

1.4 样品数量及数据处理

按照生物学样品处理基本要求，所有样品均有4个生物学重复样品。

2 结果与分析

2.1 测序数据优化及统计

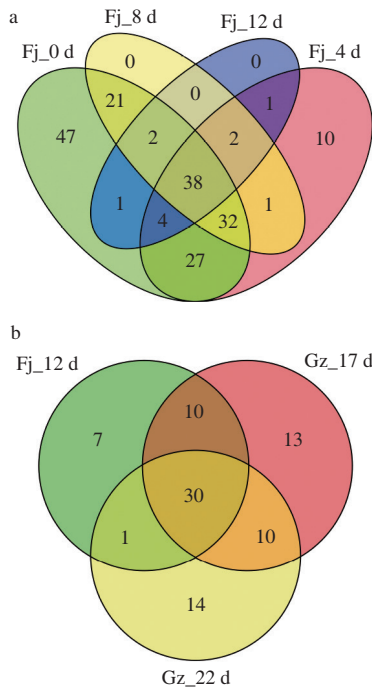
表1 有效数据统计
Table 1 Statistic analysis of effective data

样品名称	原始序列数	原始序列长度($\times 10^6$)	有效序列数	有效序列长度($\times 10^6$)	有效数据与原始数据比值/%	有效数据中数据质量 $\geq Q_{20}$ 的数据比例/%	有效数据中数据质量 $\geq Q_{30}$ 的数据比例/%
Fj_0 d_1	49 790	29.97	49 757	13.79	99.93	99.65	98.77
Fj_0 d_2	28 252	17.01	28 236	7.70	99.94	99.61	98.67
Fj_0 d_3	33 284	20.04	33 254	8.98	99.91	99.64	98.76
Fj_0 d_4	32 396	19.50	32 362	8.81	99.90	99.69	98.91
Fj_4 d_1	31 088	18.71	31 074	7.85	99.95	99.79	99.23
Fj_4 d_2	42 481	25.57	42 477	10.87	99.99	99.75	99.08
Fj_4 d_3	39 292	23.65	39 288	10.05	99.99	99.76	99.09
Fj_4 d_4	35 661	21.47	35 654	9.11	99.98	99.76	99.10
Fj_8 d_1	37 390	22.51	37 386	9.52	99.99	99.79	99.20
Fj_8 d_2	32 403	19.51	32 399	8.29	99.99	99.76	99.10
Fj_8 d_3	45 783	27.56	45 779	11.67	99.99	99.81	99.26
Fj_8 d_4	43 108	25.95	43 100	11.03	99.98	99.72	98.98
Fj_12 d_1	49 570	29.84	49 565	12.71	99.99	99.80	99.23
Fj_12 d_2	42 431	25.54	42 426	10.86	99.99	99.81	99.27
Fj_12 d_3	57 968	34.90	57 959	14.78	99.98	99.78	99.19
Fj_12 d_4	39 487	23.77	39 485	10.15	99.99	99.79	99.22
Gz_17 d_1	46 364	27.91	46 355	11.83	99.98	99.78	99.16
Gz_17 d_2	58 099	34.98	58 081	14.87	99.97	99.79	99.23
Gz_17 d_3	54 344	32.72	54 336	13.91	99.99	99.80	99.22
Gz_17 d_4	37 470	22.56	37 455	9.48	99.96	99.78	99.20
Gz_22 d_1	40 495	24.38	40 487	10.25	99.98	99.78	99.19
Gz_22 d_2	28 174	16.96	28 171	7.13	99.99	99.78	99.18
Gz_22 d_3	43 729	26.32	43 720	11.11	99.98	99.80	99.23
Gz_22 d_4	41 724	25.12	41 716	10.72	99.98	99.79	99.21

为提高后续分析质量和可靠性，对原始下机数据进行双端拼接、质量控制、嵌合体过滤后，统计有效数据得到表1。可以看出，本次测序质量值较高，6组样品中有效Tags数均在35 000条以上，并且数据质量 $\geq Q_{20}$ 和 $\geq Q_{30}$ 的数据比例高，所有样品的测序数据都已达到后续分析的要求。

2.2 OTU统计及分类学分析

按照97%相似性对非重复序列进行OTU聚类，在聚类过程中去除嵌合体，得到OTU的代表序列，并绘制出Venn图（图1）。根据对有效数据进行聚类总共得到186个OTU，图1a 4组样品中OTU数目分别为172、115、96和48，而共有OTU仅38个。图1b 3组样品的OTU数量相近，且共有的OTU数为30个。根据统计这两个阶段样品中OTU数目可以发现，放入控温室后物种的数量总体呈现出下降的趋势。



a.发酵阶段; b.干燥阶段。

图1 OTU分布Venn图

Fig. 1 Venn diagram of OTU distribution

2.3 样品的 α 多样性分析

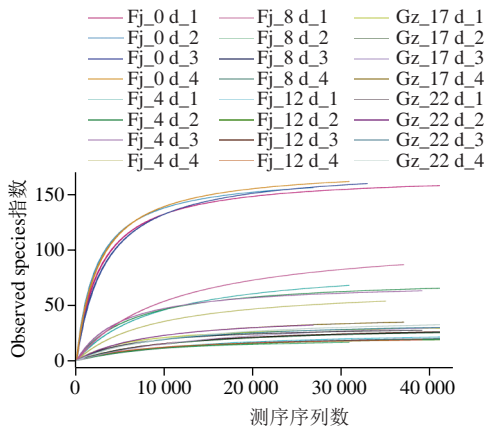


图2 稀释性曲线

Fig. 2 Rarefaction curves

稀释曲线用于反映测序数据量的合理性及样品中物种的丰富程度,由图2可以看出,曲线已趋向平坦,说明测序数据量已接近饱和。表2为发酵及干燥过程中真菌群落多样性指数的结果,其中发酵0 d组(Fj_0 d)的Chao 1指数和Shannon指数最高,表明在毛茶渥堆过程中实际上是一个重要前发酵过程,孕育中微生物孢子萌发,对不耐热营养细胞、细菌类微生物有杀灭效果,使得真菌多样性及丰富度高。但随着发酵的进行各项指数都在逐步下降,在发酵成熟时(12 d)真菌群落多样性降至最低。

表2 发酵及干燥阶段真菌群落多样性指数

Table 2 Diversity indexes of fungal community during fermentation and drying

样品编号	Observed species指数	Shannon指数	Simpson指数	Chao 1指数
Fj_0 d	156.50±4.04	3.61±0.03	0.84±0.01	160.40±5.73
Fj_4 d	62.00±6.98	0.41±0.05	0.08±0.01	79.94±11.63
Fj_8 d	17.00±1.73	0.35±0.01	0.11±0.01	30.00±6.06
Fj_12 d	19.00±3.16	0.12±0.01	0.03±0.01	36.52±12.16
Gz_17 d	25.33±3.21	0.10±0.04	0.01±0.01	31.82±8.00
Gz_22 d	28.25±3.20	0.23±0.01	0.06±0.01	48.96±9.45

2.4 发酵及干燥过程中组间真菌群落结构差异性分析

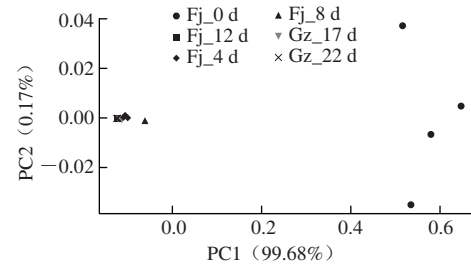


图3 主坐标分析

Fig. 3 Principal coordinate analysis

表3 Anosim分析结果

Table 3 Results of Anosim analysis

计算方法	R值	P值
Unweighted Unifrac	0.45	0.00
Weighted Unifrac	0.48	0.00

以发酵及干燥阶段样品中的OTU进行作图得到主坐标分析图,通过分析多组样本中OTU组成结构,反映样本间的距离和差异性。如图3所示,主要贡献度之和为99.85%,表明已经可以较好地反映出样本间的种群结构差异,同时根据表3可知,在Weighted Unifrac距离算法下,R值为0.48,且P值为0.00,表明各组的组间差异还是大于组内差异的。图3中发酵阶段4、8、12 d以及干燥阶段17、22 d聚离较近,但与0 d距离较远,表明4、8、12 d及17、22 d样品中真菌菌群结构较为相似,而0 d样品中的群落结构及丰度与其他样品的差异大。同时0 d组内样品间的距离也较远,说明发酵起始,经汽蒸软化、渥堆及手筑成型的茶砖内真菌菌群结构差异较大。

2.5 物种注释及分类统计

根据测序结果及物种注释结果,在门和属两个水平上对物种组成进行统计分析并构建对应的丰度谱。本实验共注释到5个门、14个纲、29个目、47个科、65个属,选取丰度最高的20个物种分类进行真菌菌群结构及丰度变化分析。

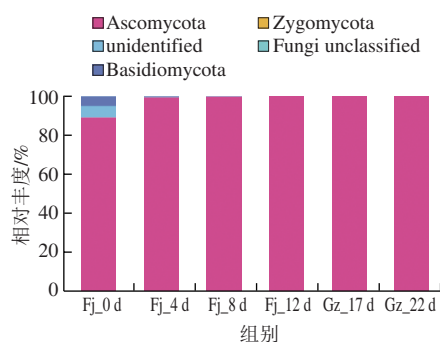


图4 门分类水平上的相对丰度
Fig. 4 Relative abundance at the phylum level

由图4可知,在门分类水平上,发酵及干燥过程中共注释到3个门的真核微生物,1个未知分类地位的Fungi unclassified及1个无法确认分类学信息的unidentified。3个门类分别是子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和接合菌门(Zygomycota)。其中子囊菌门在这6组样品中占绝对优势,在Fj_0 d、Fj_4 d、Fj_8 d、Fj_12 d、Gz_17 d及Gz_22 d中的丰度依次是89.12%、99.32%、99.74%、99.98%、99.88%和99.89%。其次是担子菌门及接合菌门,但这两个门类在6组样品中的相对丰度较低。

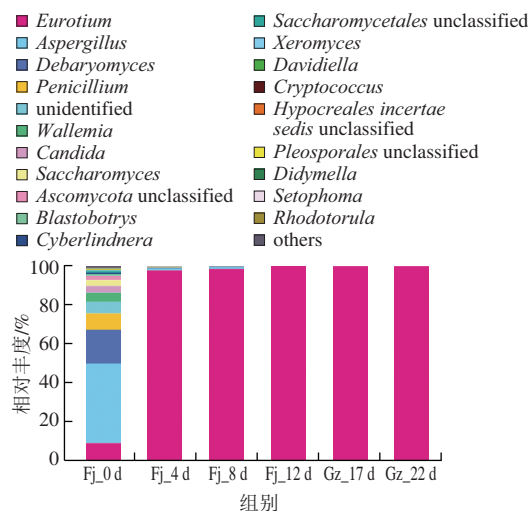
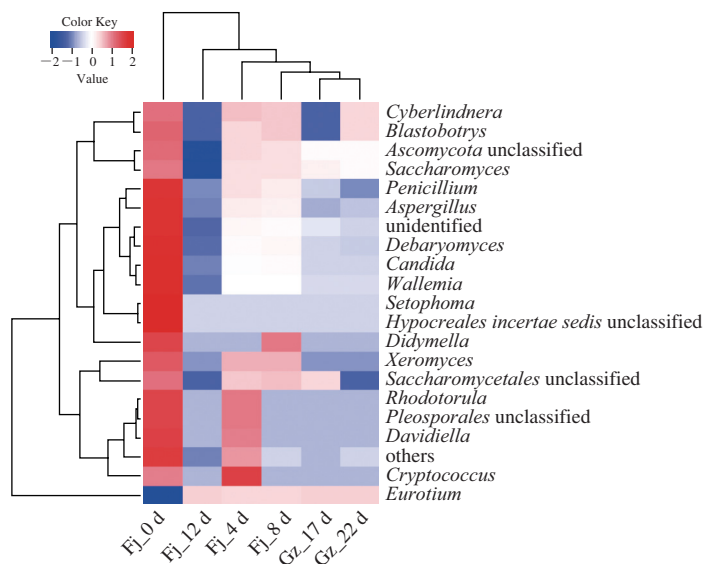


图5 属分类水平上的相对丰度
Fig. 5 Relative abundance at the genus level

由图5所示,在属分类水平上,明确注释到分类地位的有15个属,还有1个无法确认分类学信息的unidentified及4个未知分类地位(Ascomycota unclassified、Saccharomycetales unclassified、Hypocreales incertae sedis unclassified、Pleosporales unclassified)。在0 d时,真菌的多样性最高,其中相对丰度最高的是曲霉属(Aspergillus),达40.59%。其次是德巴利酵母属(Debaryomyces)、散囊菌属(Eurotium)和青霉属(Penicillium),相对丰度分别为17.26%、9.02%、

8.55%。在4 d时,手筑茯砖茶样中散囊菌属的相对丰度上升至97.27%,而其他属相对丰度的总和已降至3%以下,并且在手筑茯砖茶发酵的中后期(8、12 d)及干燥阶段(17、22 d)的样品中,相对丰度最高的菌属均为散囊菌属,分别为97.94%、99.85%、99.51%及99.50%。



蓝色到红色的渐变色反映丰度由低到高的变化,颜色越趋近于红色,丰度越高。

图6 属分类水平上热图分析
Fig. 6 Heatmap analysis at the genus level

本实验选择丰度排行前20的物种进行制图,对6组样本中的基因进行聚类分析。由图6可看出明显的优势菌群更替过程,除散囊菌属(Eurotium)外,曲霉属(Aspergillus)、德巴利酵母属(Debaryomyces)、青霉属(Penicillium)、酵母菌属(Sacharomyces)、红酵母属(Rhodotorula)、隐球酵母属(Cryptococcus)等菌属的相对丰度均随发酵及干燥的进行呈现出明显下降趋势。这表明了在手筑茯砖茶制作初期的汽蒸软化过程后,原料经过两次高温瞬时处理后湿热渥堆一段时间,样品微生物已经交替发生变化。但随着恒温发酵的进行,优势菌群发生了明显的交替变化,可能是因为茶叶中物质的消耗及代谢产物不断地积累,不同类型微生物代谢产物形成相互抑制,使复杂系统微生物群落得到进一步优化。而干燥阶段由于温度逐步升高茶砖中水分缓慢蒸发,因此仅有部分耐高温、好干性的真菌得以生存。

3 讨论

茯砖茶生产过程中有多种微生物参与,但因以前的研究侧重点在茶样中的优势菌种,并且研究的方法和检测技术受到限制,因此对微生物的多样性及其作用机制研究较少。随着高通量测序技术的出现及更新,使发酵

茶领域的微生物多样性研究取得了巨大的进展^[27-29],从而得到发酵茶中更加全面和准确的菌群结构信息。本实验采用高通量测序技术对手筑茯砖茶生产过程中真菌多样性及分类学概况进行了研究,在6组样品中共得到990 522个有效Tags,并注释到5个门、14个纲、29个目、47个科、65个属。与赵仁亮^[15]及Li Qin^[16]等的研究结果不同,根据其文献中注释结果发现茯砖茶成品中曲霉属为优势菌属,并且在属的类别及数量上与本研究结果存在较明显的差异,推测差异的原因可能与加工工艺及生产环境相关。而与胡治远^[2]采用的传统分离鉴定及18S rDNA测序技术和文字杰^[30]所采用的PCR-DGGE技术相比,Illumina MiSeq技术所检测到的微生物种类及相对丰度信息更加全面、准确,为后续研究提供了更多的数据依据。

本实验样品经汽蒸软化、手工压制及完成包装后放入控温室中进行发酵并干燥制成的成品,从属分类水平上可看出,发酵4 d时,散囊菌属的相对丰度已经达到较高的水平,并且在发酵后期及干燥阶段中散囊菌属都是绝对优势菌种。据现有研究报道可知,散囊菌是茯砖茶中的有益菌,其在茶砖的内部生长时会以其产生的多种酶类分解淀粉、单宁等物质还可以氧化多酚类物质,并且该属的真菌可合多种成具有重要生理活性的次级代谢产物^[31-32]。本实验结果表明,采用控温室发酵可能对手筑茯砖茶发花过程中散囊菌属的生长起促进作用,同时,由于茶砖已用牛皮纸包装,所以不易受到外界环境污染,更有利于手筑茯砖茶的后期保存。

研究也发现,在手筑茯砖生产过程中,发酵过程中微生物主要来源于毛茶及茶梗本身带入,也可能是生产环境中带入,在恒温控湿发酵过程中,散囊菌属一开始就占据比较高的比例,尽管其他微生物也存在,但包装后创造相对密封条件微生物之间相互拮抗、相互协调创造了必要环境^[33-34],微生物群属也会发生相应变化,而缓慢升温干燥水分减少为微生物“适者生存”提供了外部条件,这些相互影响因素值得以后研究中进一步探索。

由于目前对冠突散囊菌具体特征属性物质的研究还不多,它是否属于散囊菌属也还存在一些争议,而实验结果中高表达丰度的散囊菌属,其具体的种以及涉及的功能,还有待进一步研究分析。因此后续实验将利用蛋白组学、代谢组学等^[35-37]技术对手筑茯砖茶中微生物间的相互作用、特征性物质种类的鉴定及特殊风味物质形成的机理进行进一步深入分析。

参考文献:

- [1] 孟涛, 邹勋. 安化黑茶产业现状与发展策略[J]. 茶叶通讯, 2011, 38(1): 17-20. DOI:10.3969/j.issn.1009-525X.2011.01.005.
- [2] 胡治远. 湖南地区茯砖茶菌群多样性及发花工艺优化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012: 13-21.
- [3] 钟兴刚, 刘淑娟, 赵国清, 等. 湖南黑茶茯砖与天尖茶多糖含量的比较研究[J]. 茶叶通讯, 2014, 41(3): 28-30. DOI:10.3969/j.issn.1009-525X.2014.03.007.
- [4] 黄亚辉, 陈建华, 周筠, 等. 不同年代茯砖茶感官品质和化学成分的差异性[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 228-232.
- [5] PENG Y, XIONG Z, LI J, et al. Water extract of the fungi from Fuzhuan brick tea improves the beneficial function on inhibiting fat deposition[J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition, 2014, 65(5): 610-614. DOI:10.3109/09637486.2014.898253.
- [6] WANG Y, XU A, PING L, et al. Effects of Fuzhuan brick-tea water extract on mice infected with *E. coli* O157:H7[J]. Nutrients, 2015, 7(7): 5309-5326. DOI:10.3390/nu7075218.
- [7] PENG X Y, LIANG F L, LI D L, et al. Secondary metabolites of *Eurotium cristatum* from Fu brick tea and their biological activities[J]. Chinese Traditional & Herbal Drugs, 2013, 44(14): 1881-1886. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.004.
- [8] CHEN G, XIE M, DAI Z, et al. Kudingcha and Fuzhuan brick tea prevent obesity and modulate gut microbiota in high-fat diet fed mice[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(6): 1700485. DOI:10.1002/mnfr.201700485.
- [9] 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. DOI:10.3969/j.issn.1001-8581.2011.12.018.
- [10] 胡治远, 刘素纯, 赵运林, 等. 茯砖茶生产过程中微生物动态变化及优势菌鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 244-248.
- [11] WU Y Y, DING L, XIA H L, et al. Analysis of the major chemical compositions in Fuzhuan brick-tea and its effect on activities of pancreatic enzymes *in vitro*[J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 9(40): 6748-6754. DOI:10.5897/AJB10.947.
- [12] XU J, HU F L, WANG W, et al. Investigation on biochemical compositional changes during the microbial fermentation process of Fu brick tea by LC-MS based metabolomics[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 176-184. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.12.045.
- [13] XU A Q, WANG Y L, WEN J Y, et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 14-22. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.024.
- [14] 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变化分析[J]. 生态学报, 2014, 34(11): 3007-3015. DOI:10.5846/stxb201308052024.
- [15] 赵仁亮, 胥伟, 吴丹, 等. 基于Illumina MiSeq技术分析不同地域加工的茯砖茶中微生物群落多样性[J]. 生态学杂志, 2017, 36(7): 1865-1876. DOI:10.13292/j.1000-4890.201707.012.
- [16] LI Q, HUANG J, LI Y D, et al. Fungal community succession and major components change during manufacturing process of Fu brick tea[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 6947.
- [17] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59. DOI:10.1038/nmeth.2276.
- [18] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. ISME Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 2012, 6(8): 1621-1624. DOI:10.1038/ismej.2012.8.
- [19] BLAXTER M, MANN J, CHAPMAN T, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data[J]. Philosophical Transactions Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1935-1943. DOI:10.1098/rstb.2005.1725.

- [20] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. PeerJ, 2016, 4(10): e2584. DOI:10.7717/peerj.2584.
- [21] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336. DOI:10.1038/nmeth.f.303.
- [22] LOZUPONE C A, HAMADY M, KELLEY S T, et al. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(5): 1576-1585. DOI:10.1128/AEM.01996-06.
- [23] RAMETTE A. Multivariate analyses in microbial ecology[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 62(2): 142-160.
- [24] KÖLJALG U, LARSSON K H, ABARENKOV K, et al. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi[J]. New Phytologist, 2005, 166(3): 1063-1068.
- [25] COLE J R, CHAI B, FARRIS R J, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: 294-296. DOI:10.1093/nar/gki038.
- [26] 张泽生, 王春龙, 刘清岱, 等. 扩增子测序技术分析红茶菌中优势微生物的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 185-188. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2016.16.045.
- [27] ZHANG Y, SKAAR I, SULYOK M, et al. The microbiome and metabolites in fermented Pu-erh tea as revealed by high-throughput sequencing and quantitative multiplex metabolite analysis[J]. PLoS ONE, 2016, 11(6): e0157847. DOI:10.1371/journal.pone.0157847.
- [28] 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. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2015.08.016.
- [29] ZHANG W, YANG R, FANG W, et al. Characterization of thermophilic fungal community associated with pile fermentation of Pu-erh tea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 227: 29-33. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.025.
- [30] 文杰宇. 茯砖茶“发花”过程中微生物多样性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011: 19-30.
- [31] SLACK G J, PUNIANI E, FRISVAD J C, et al. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus*, and *A. insuetus*, common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities[J]. Mycological Research, 2009, 113(4): 480-490. DOI:10.1016/j.mycres.2008.12.002.
- [32] 散囊菌属真菌胞外水解酶和菌株LP-7分泌蛋白分析[J]. 菌物学报, 2017, 36(6): 691-704. DOI:10.13346/j.mycosystema.160208.
- [33] 王胜利, 龚晓, 周双德, 等. 姜瘟致病菌的分离与鉴定及其拮抗菌的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, 39(3): 282-285. DOI:10.3724/SP.J.1238.2013.00282.
- [34] 冯俊清, 李媛媛, 杨扬, 等. 木霉的分离和对辣椒白绢病致病菌的抑制效果研究[J]. 湖南农业科学, 2010, 2010(15): 83-85. DOI:10.3969/j.issn.1006-060X.2010.15.028.
- [35] 张磊, 曾仲大, 叶国注, 等. 基于气相色谱-质谱联用与液相色谱-质谱联用的非靶向代谢组学用于3类茶叶中化学成分分析[J]. 色谱, 2014, 32(8): 804-816. DOI:10.3724/SP.J.1123.2014.04029.
- [36] 何庆华, 吴永宁, 印遇龙. 蛋白组学技术及其在营养学研究中的应用[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 439-442. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2008.04.099.
- [37] 虞昕磊, 艾于杰, 曲凤凤, 等. 代谢组学在研究茶叶品质形成中的应用[J]. 茶叶科学, 2018, 38(1): 20-32. DOI:10.13305/j.cnki.jts.2018.01.003.