

doi: 10.3969/j.issn.1672-3678.2017.01.008

# 冠突散囊菌的研究与应用进展

黄彦石 瑞苏二正

(南京林业大学 轻工科学与工程学院 酶与发酵技术实验室 江苏 南京 210037)

**摘要:**冠突散囊菌是茯砖茶发酵中的优势菌,其数量和质量直接关系到茯砖茶的品质,国内外学者对其进行了比较全面的研究。本文中,笔者综述了冠突散囊菌的分离鉴定、分子生物学、培养、发花过程、保健功能及其应用等几个方面,并对其研究与应用前景进行了展望。

**关键词:**茯砖茶;冠突散囊菌;发酵;保健功能

中图分类号:TQ272; Q949.32

文献标识码:A

文章编号:1672-3678(2017)01-0049-08

## Progress in the research and application of the *Eurotium cristatum*

HUANG Yan, SHI Rui, SU Erzhen

(Enzyme and Fermentation Technology Laboratory, College of Light Industry Science and Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** *Eurotium cristatum* is the dominant fungus in the fermentation of 'Fu-brick' tea. The quantity and quality of *E. cristatum* are directly related to the quality of brick tea. Extensive studies had been done. We review the researches in the isolation and identification, molecular biology, cultivation, growing process of the so-called 'golden flower' fungus *E. cristatum*. We also indicate the research and application prospects of *E. cristatum*.

**Keywords:** Fu-brick tea; *Eurotium cristatum*; fermentation; health function

冠突散囊菌,俗称“金花”,属于散囊菌目发菌科散囊属的一种真菌。冠突散囊菌是茯砖茶在“发花”过程中的优势菌<sup>[1]</sup>。茯砖茶独特的品质和别具的风味都主要归功于冠突散囊菌<sup>[2]</sup>。所以,在茯砖茶的发酵过程中,冠突散囊菌有着举足轻重的作用。在国家标准中,茯砖茶也是黑茶中唯一有“冠突散囊菌”这一指标的品种<sup>[3]</sup>。

在黑茶发酵的过程中,“金花”的数量和质量往往直接决定了茯砖茶的品质。茯砖茶作为一种发酵茶,具有抗氧化、助消化、降脂减肥、降低胆固醇等保健功效<sup>[4]</sup>。近年来,随着人们生活水平的日益提高,不少学者致力于研究饮用茯砖茶的安全性、

挖掘其营养价值,以开拓其市场价值<sup>[1]</sup>。本文就冠突散囊菌的分离鉴定、分子生物学、培养、发花过程、保健功能研究及其应用等几个方面进行了较为系统的综述。

## 1 冠突散囊菌的研究

### 1.1 冠突散囊菌的分离、纯化及鉴定

冠突散囊菌的分离一般采用稀释平板法。黄浩等<sup>[2]</sup>研究发现,称取2008年的一品茯茶,置于带有玻璃珠的无菌水中,充分振荡,再用10倍稀释法稀释 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 和 $10^6$ 倍后涂布于察氏培养基(CZ)平板上,在28℃恒温培养直至长出单个菌落。

收稿日期:2016-04-11

基金项目:国家自然科学基金(31401679);江苏省六大大人才高峰项目(2015-JY-016)

作者简介:黄彦(1992—),女,江苏宜兴人,研究方向:食品生物技术;苏二正(联系人),副教授,E-mail: ezhshu@njfu.edu.cn

菌株纯化采用平板划线法,具体操作是在超净工作台上选取长势较好的平板,用接种环挑取少量菌体在新鲜的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上划线,然后28℃恒温培养4d后选取长势较好的平板,挑取单个菌落于斜面上28℃恒温培养,这样反复继代3~4次后即可获得纯菌株<sup>[2]</sup>。

将纯化后的冠突散囊菌接种到CZ上,在28℃左右的温度下恒温恒湿倒置培养7~10d后,对菌落进行鉴定。传统的菌种鉴定有3种方法:宏观目测法、光学显微镜观察法和电镜扫描法。宏观目测法的操作方法是培养一定时间后定时观察记录菌落的颜色、形态,进行初步判断。光学显微镜法则可以运用插片法、棉兰染色法等,在显微镜下观察分生孢子、子囊孢子的形态结构等。

早在1986年以前,冠突散囊菌被认为是谢瓦氏曲霉,因为当时的研究受到条件的限制,仅靠光学显微镜的结果并未能够将冠突散囊菌的命名盖棺定论。温琼英<sup>[3]</sup>、齐祖同等<sup>[4]</sup>研究发现,冠突散囊菌的有性型孢子——子囊孢子的特征是具有冠状的突起、表面明显粗糙;无性型的分生孢子则具有小刺。对比谢瓦氏曲霉,这一特征与之并不相符。之后的研究中,齐祖同等<sup>[4]</sup>分别对分离自广西砖茶、湖南茯砖茶、湖南桃江茯砖茶、湖南益阳茯砖茶的冠突散囊菌进行了鉴定,发现在25℃下培养12d,菌落直径达到45~50mm,周边为浅黄色,中心为褐色,黄色的闭囊壳大量包缠于具饰菌丝中;21d后菌落直径达到了60~65mm,颜色都变为深褐色。闭囊壳呈球形或半球形,子囊孢子为双凸镜型,有两个明显的冠状突起,凸面明显粗糙,具小疣,分生孢子头灰绿色,幼时呈球型、老时呈放射状。于是,按照国际植物命名规则,推翻了“冠突曲霉”的命名,正式更名为冠突散囊菌。

王文涛<sup>[5]</sup>将来自于全国各地的茯砖茶样品中分离出的23株“金花”菌株与标准菌株对比,通过形态学鉴定,发现它们有一些共同的特征:如菌落中心颜色为深褐色,周边为浅黄色。但5株菌株之间也存在着差异,例如,相比已有文献的描述,4号菌株边缘有乳白色至浅黄色过渡,子囊孢子也偏小;B1号菌株的分生孢子与子囊孢子的大小等特征与冠突散囊菌的特征相同<sup>[5]</sup>。该实验说明在茯砖茶发花的过程中,优势微生物具有多样性。

胡治远等<sup>[6]</sup>从18种茶叶样品中分离出18株菌株,通过电镜扫描进行形态学鉴定,并根据微生物

经典鉴定法<sup>[7-8]</sup>,得出其中8株为冠突散囊菌,3株为黑曲霉,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1株蜡叶散囊菌。在这些菌株中,15株为散囊属,说明散囊属的菌株在茯砖茶发花过程中已占据了主导地位。

阮林浩等<sup>[9]</sup>对从浙江武义和湖南长沙的茶叶样品中分离出的冠突散囊菌进行了形态学鉴定,得到初步分离纯化的鉴定结果,其中5株(标号为G1~G5)为冠突散囊菌,2株散囊属(G6、G7),其中G3为标准的冠突散囊菌菌株,G6为阿姆斯特丹散囊菌,G7为肋状散囊菌。

黄浩等<sup>[2]</sup>将冠突散囊菌的培养分别置于CZ和含200g/L蔗糖CZ(CZ20)上,发现冠突散囊菌在CZ20上生长较快。这在一定程度上说明培养条件不同,对冠突散囊菌的生长也会产生不同的影响。

## 1.2 冠突散囊菌的分子生物学研究

刘石泉等<sup>[10]</sup>研究发现溶菌酶破壁法、纤维素酶破壁法、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法等提取冠突散囊菌DNA效果较为理想。魏国美等<sup>[11]</sup>分别用超声破碎和液氮研磨的方式来提取冠突散囊菌基因组DNA,结果发现,200W的超声波无法破碎冠突散囊菌的细胞壁,因此不能提取DNA;而用600W超声波和液氮研磨的方式提取的基因组DNA的杂质含量均较高;相对而言,400W超声波的提取方法所提取的基因组DNA浓度大、纯度高、效果好,更加适用于冠突散囊菌的基因组DNA的提取。

据报道,真菌中的*veA*基因片段参与了细胞有性发育和无性发育的调节。利用DNA克隆技术,可探究冠突散囊菌中与有性发育有关联的*veA*基因片段<sup>[12-14]</sup>。马权等<sup>[15]</sup>先通过液体培养抑制菌体产生孢子,待其生长到足够的量之后,固体培养诱导其产生子囊果及子囊孢子,16h左右收集菌丝体提取RNA,结果证明,该基因片段确实为*veA*基因片段。而就目前而言,关于无性孢子的发育过程的研究已经较为透彻,而有性孢子的研究却尚未成熟,进一步研究冠突散囊菌*veA*基因片段,能够为冠突散囊菌产生有性孢子的研究提供一定的理论依据。谭玉梅等<sup>[16]</sup>利用cDNA末端快速克隆技术获得冠突散囊菌*stf1*基因的全长DNA序列,并利用相对定量SYBR Green I荧光定量PCR技术检测该基因在不同发育时期的表达量的差异,该实验为深入研究冠突散囊菌产孢调控机制奠定了理论基础。

### 1.3 培养条件对冠突散囊菌的影响

#### 1.3.1 用于冠突散囊菌培养的培养基

苏凤等<sup>[17]</sup>为了确定最佳的培养基,将等量的孢子悬液培养在 PDA、改良察氏培养基(CZG)和察氏培养基上,96 h 后测定菌丝干质量浓度分别为 1.064、1.625 和 1.348 g/L,以此为指标,确定最佳培养基为 CZG 培养基。而刘作易等<sup>[18]</sup>用了 8 种培养基来观测冠突散囊菌在这些培养基上的生长状况,结果发现,在温度相同时,两种孢子在这些培养基上生长的菌落大小相似、生长速度一致。该实验结果与周杨艳等<sup>[19]</sup>的实验结果相去甚远。周杨艳等<sup>[19]</sup>在其他实验条件相同的情况下,将优势菌接种在 14 种培养基上 9 和 18 d 后进行形态学观察,判断其生长状况,结果显示,冠突散囊菌在不同培养基上的生长情况差异较大,产生孢子的数量与分泌色素物质情况的差异最为明显,并且差异随着时间的延长更加明显。

#### 1.3.2 碳源和氮源的影响

冠突散囊菌的繁殖方式分为有性繁殖(子囊孢子)和无性繁殖(分生孢子)两种。碳源和氮源对冠突散囊菌孢子的产生都有不同程度的影响。碳源的浓度不仅会影响孢子产生的数量,而且会影响冠突散囊菌的繁殖方式。刘作易等<sup>[20]</sup>研究发现,在不同蔗糖浓度下,冠突散囊菌的繁殖方式也不同:当蔗糖浓度较低时,繁殖方式以有性孢子为主;当蔗糖浓度较高时,繁殖方式以无性孢子为主。郑欣欣<sup>[21]</sup>以蔗糖、葡萄糖和淀粉为碳源,设置浓度梯度来测定最佳的碳源,结果表明:碳源为 50 g/L 时,有性孢子的数量最多,几乎不产生无性孢子;碳源为 200 g/L 左右时,无性孢子开始出现,并随浓度的增加而增加。进一步研究确定蔗糖为最佳碳源,在以蔗糖为碳源的研究中发现,蔗糖浓度过高和过低都不利于孢子的产生,蔗糖浓度过低时几乎不产生孢子;而过高的蔗糖浓度则会抑制孢子的产生,当蔗糖为 50 和 300 g/L 时,菌落直径和有性孢子的数量都多,但考虑到 300 g/L 时已有无性孢子产生,因此最终选定 50 g/L 蔗糖为最佳碳源<sup>[21]</sup>。尹旭敏<sup>[22]</sup>以淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖等作为碳源,考察碳源的影响结果,发现菌丝生长以葡萄糖和蔗糖最好,麦芽糖和乳糖较差,而可溶性淀粉最差。刘作易<sup>[23]</sup>用蔗糖、葡萄糖、山梨糖、棉子糖和单宁等 17 种糖作为碳源来考察碳源的影响,结果发现:其中只有 14 种糖能被利用,D-果糖效果最好,山梨糖

生长最差,还有 3 种糖不能利用,分别是琼脂、单宁和淀粉。

在含有不同氮源的培养基上,冠突散囊菌的生长繁殖情况也不尽相同。无机氮源和有机氮源对冠突散囊菌的影响也各异。无机氮源对菌落直径的影响小于有机氮源<sup>[23-24]</sup>。但是,无机氮源促进孢子萌发的效果较好,而有机氮源对菌落生长的促进作用较大。所以,在配制冠突散囊菌培养基时,可以采用有机氮源和无机氮源相结合的方式。为了探究氮源对冠突散囊菌生长的影响,尹旭敏<sup>[22]</sup>测定了  $\text{KNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、蛋白胨、牛肉膏和酵母膏等作为氮源时的影响,结果与上述一致,无机氮源的影响明显不如有机氮源大,菌丝在牛肉膏、蛋白胨和酵母膏上生长最好,菌丝发达,在对照和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  上生长最差。但刘作易<sup>[23]</sup>研究发现,在促进孢子萌发的方面,无机态氮、酰胺态氮和氨基态氮更具优势;而有机氮源中,DL-苏氨酸、L-谷氨酰胺、DL- $\alpha$ -氨基丙酸对菌落生长的促进作用较大。

#### 1.3.3 pH 的影响

冠突散囊菌可以在偏酸性的环境下生长,而碱性环境不利于其生长。刘作易等<sup>[18]</sup>研究,冠突散囊菌生长的最适 pH 为 3~6,在 pH 为 4~6 时,菌株生长较好,最适 pH 为 5。当 pH 小于 2 或大于 7 的时候均不能萌发生长。而吕嘉枋等<sup>[25]</sup>研究发现,培养基的 pH 达到 10 时,冠突散囊菌几乎不生长;pH 为 7 时,有性孢子和无性孢子的数量都达到极值,随着 pH 的增大,有性孢子的数量呈现出先增加后减小的趋势,无性孢子的趋势则相反。郑欣欣<sup>[21]</sup>的研究也表明:pH 为 7 时产生的有性孢子数量最多,而在极酸或极碱的环境中,都极易容易产生无性孢子。这些结果都说明,pH 也会影响冠突散囊菌的繁殖方式。但在不同的 pH 环境下,冠突散囊菌的繁殖方式也有所不同。陈云兰<sup>[26]</sup>研究发现冠突散囊菌普遍在偏酸性的条件下生长较好,而培养基呈碱性时,菌株生长较慢。

#### 1.3.4 培养温度的影响

极端的高温和低温环境都不利于冠突散囊菌的生长。低温有利于有性孢子的产生,高温有利于无性孢子的产生。冠突散囊菌的最适生长温度在 28℃ 左右。在适宜的温度下,有性孢子的产量较高;当温度升高到一定程度时,开始产生无性孢子;当培养温度过高,甚至高于冠突散囊菌自身生长繁殖所需的温度时,冠突散囊菌的生长受到抑制,菌

落直径相应变小。由此表明,冠突散囊菌的生长和繁殖方式不仅受到碳源、氮源和 pH 的影响,培养温度同样有影响。

陈云兰<sup>[26]</sup>在研究中发现,25~35℃为冠突散囊菌生长的适宜的温度。大多数菌株在25℃时生长最快,35℃时生长较慢,当温度升高到40℃时,一些菌株停止生长。曹聪等<sup>[27]</sup>研究发现,在40℃条件下培养的菌株形成的菌落较稀疏,颜色较浅;经过镜检发现,菌落基本由菌丝组成,并有灰绿色分生孢子头产生。由此可见,高温可促使冠突散囊菌进行无性繁殖。温琼英等<sup>[28]</sup>对“金花”菌进行温度培养实验,发现冠突散囊菌在28℃时生长较快,在20~22℃时生长缓慢,而在32~34℃时比在28℃时生长得缓慢。吕嘉栎等<sup>[25]</sup>通过实验发现,在28℃时菌落直径最大,有性孢子密集,30℃时开始产生无性孢子。因此,28℃通常用作冠突散囊菌培养的最适温度。

#### 1.4 冠突散囊菌发花过程中的色、香、味变化

##### 1.4.1 冠突散囊菌产生色素类物质的研究

经压制后的茯砖茶呈黑褐色,茶砖中有冠突散囊菌发花后形成的金黄色“金花”,烹煮后的茶汤色泽鲜明,呈透亮的橙红色。温琼英等<sup>[28]</sup>在研究茯砖茶加工过程中的微生物优势种群变化规律中提到,在发花过程中大量繁殖的冠突散囊菌的生长趋势与色素物质的变化呈现出高度的同步性。以此推测,色素物质的形成与积累可能与微生物代谢有关,也就是说,茯砖茶鲜亮色泽的形成与冠突散囊菌的生长代谢休戚相关。刘仲华等<sup>[29]</sup>利用薄层色谱分析法和分光光度法分析了加工过程中茯砖茶的脂溶性色素和水溶性色素的变化,以此来弄清色素形成的机制,结果显示:在冠突散囊菌的繁殖过程中,会产生大量的胞外多酚氧化酶(PPO)<sup>[30-31]</sup>,这种酶可以将儿茶素氧化为茶褐素、茶黄素和茶红素等水溶性的色素。这些色素的积累,共同形成了茯砖茶的独特色泽。

##### 1.4.2 冠突散囊菌发花香气来源的研究

因加工工艺的特殊性,茯砖茶中香气成分的组成比较复杂,除原料黑毛茶自身具有的香气成分外,还具有一种独特的菌花香。吕毅<sup>[32]</sup>研究发现,在茯砖茶中没有检测到在其他茶叶中常见的香叶醇,但是检测到了与这种萜烯类化合物类似的酮类化合物香气成分,这被认为是茯砖茶也是黑茶香气上的一个特点。

在茯砖茶特有的香气中有许多具有挥发性香气成分,如戊醛、正乙醛和1-戊烯-3-酮等。王华夫等<sup>[33]</sup>研究发现,在发花的过程中,还添加了一些新的特征化合物,如芳樟醇、 $\alpha$ -紫罗酮和壬酸等,这些香气成分在发花前能够检测到的含量还很低,发花后含量明显增加,并且在茯砖茶压制成型的过程中,含量可以一直维持在较高的水平。同时,还检测到了一种独特的成分——愈创木酚。愈创木酚是一种微生物作用后的茶叶降解产物<sup>[34]</sup>,广泛应用于医药行业、香料及染料的合成,它是一种受热不稳定的香气物质。

由于冠突散囊菌的作用,在发花过程中,部分醛、酮类香气化合物明显增加。一些杂环化合物的含量,如2,5-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪和1-甲基吡咯等,也随着发花过程的深入而增加。这类化合物通常被认为是糖和氨基酸加热后降解的产物<sup>[35-36]</sup>,就是所谓的“火功香”。糖类物质在高温条件下会产生脱水、聚合发生焦糖化反应,产生焦糖的香气。

由此可见,发花过程中香味的形成,是微生物分泌胞外酶、发酵热和空气中的水和氧气等许多因素共同作用的结果。

##### 1.4.3 冠突散囊菌发花过程中风味的形成

茶叶中的水溶性成分通常是赋予茶叶香醇口感的主要因素。刘武娣等<sup>[37]</sup>研究发现,在发花过程中,茶多酚、游离氨基酸、生物碱、可溶性糖、儿茶素和没食子酸等含量均发生了不同程度的变化。其中,由于生物作用,冠突散囊菌在代谢过程中会大量消耗茶叶中原有的游离氨基酸,使得茶汤风味更加醇和;冠突散囊菌在代谢过程中还会分泌一些胞外酶,如纤维素酶,它可将原料中的纤维素分解成麦芽糖,使得茶汤风味更加甘甜;另外,一些酯类儿茶素被微生物降解生成没食子酸,可以降低茶汤中的涩味。

茯砖茶在发花过程中,尽管物质的味感与物质结构的内在联系并不十分明确,但分子结构上的细微变化,如取代基发生变化、立体位置的差异都是有可能导致呈味的差异因素。王增盛等<sup>[38]</sup>研究发现,游离氨基酸总量较原料中的相对含量降低了38.7%,且各类氨基酸组成的配比发生了较大的变化,其中茶氨酸、谷氨酸和丙氨酸等主要氨基酸降解幅度较大。而在发花期间,苏氨酸、酪氨酸和赖氨酸的含量则有所增加<sup>[31]</sup>。这些氨基酸的变化对

协调茶汤的滋味形成了不容忽视的作用。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)茶多酚的相对含量降低了46.6%,儿茶素组分中下降的幅度最大<sup>[31]</sup>,这对进一步改善茶汤滋味、使之醇而不涩具有积极的作用。同时,在生物酶的作用下,儿茶素氧化产物的进一步形成与积累,不仅对色泽品质具有极为重要的意义,而且在形成茯砖茶品质风味中起着不可替代的作用<sup>[38]</sup>。此外,茶黄素的鲜爽、刺激性口感,茶红素的甜醇滋味及其咖啡碱形成的络合物,使得茯砖茶成品茶滋味在黑毛茶的基础上进一步协调而独具一格;不溶于水的纤维素在微生物胞外酶的作用下,分解成可溶于水的多糖、双糖或单糖,对增进茶汤干厚醇和的口感起着不容小觑的作用<sup>[38]</sup>。

最后,冠突散囊菌在发花过程中大量繁殖,后期发生菌体自溶,菌体自身的代谢产物又溶入茶汤中,对茶汤风味的形成同样也是不无裨益。

## 1.5 冠突散囊菌次生代谢产物活性研究

### 1.5.1 降脂减肥活性成分的研究

吕嘉栢等<sup>[39]</sup>用乙酸乙酯从冠突散囊菌的液体发酵物中分离提取目标物,用薄层色谱析法和高效液相色谱法来分析提取物,结果与以纯度为99.8%的类脂类物质——洛伐他汀一致,说明在冠突散囊菌的发酵液中,含有降脂类物质。与此同时,傅冬和等<sup>[40-41]</sup>采用高通量筛选的方式研究了茯砖茶降低血脂的功效,结果发现,茯砖茶有多条降脂途径,综合降脂减肥效果强。宋鲁彬等<sup>[42-43]</sup>研究发现,黑茶不仅具有良好激活PRAR $\delta$ 和PRAR $\gamma$ (PRAR为过氧化物酶体增殖物激活受体)核受体模型的作用,而且具有良好的法尼基衍生物X受体(FXR)活性。

黄群等<sup>[44]</sup>通过研究冠突散囊菌发酵液中的酶类在模拟肠液、胃液中的作用,发现冠突散囊菌发酵液对 $\alpha$ -淀粉酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶的活性都有激活作用,而对脂肪酶的活性具有抑制作用。这就说明冠突散囊菌发酵液能够有效地阻止脂肪的消化代谢,从而起到减肥的作用。

综上所述,黑茶具有良好的降脂减肥、调节糖代谢的作用。

### 1.5.2 抗氧化活性成分的研究

在冠突散囊菌黑茶发酵的过程中,发酵液中含有相当的儿茶素,由于菌体的代谢作用,儿茶素会被进一步氧化。儿茶素及其氧化物是含有酚羟基

的化合物,具有酚类抗氧化剂的性质。相关研究表明,儿茶素及其氧化物可以直接清除自由基,避免氧化损伤<sup>[45-46]</sup>。Charlton等<sup>[47]</sup>研究发现,儿茶素及其氧化物具有抗氧化、预防心血管疾病、引发肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤转化等防癌抗癌功效以及抗突变、抗辐射、抗菌抗病毒等多种药理作用。

在邓放明<sup>[48]</sup>的研究中,提到了一种绿原酸的物质。绿原酸是一种有效的酚型抗氧化剂,其抗氧化能力要强于一些常见的抗氧化剂,如丁基羟基茴香醚和生育酚,和丁基羟基甲苯的抗氧化能力相当<sup>[49]</sup>。

### 1.5.3 调节免疫、抗肿瘤活性成分的研究

在冠突散囊菌液体发酵过程中,由于菌体的生长代谢作用,会分泌一定量的胞外多糖。真菌多糖是一种很好的免疫调节剂,能够有效地激活免疫细胞,参与宿主的特异性和非特异性的免疫,从而调节机体的免疫功能。Honda等<sup>[50]</sup>的研究证实,来自真菌多糖的抗肿瘤活性与其相对分子质量的大小有关,只有当分子质量大于 $1.6 \times 10^4$ 时,才具有抗肿瘤活性。在邓放明<sup>[48]</sup>的实验中,通过分析冠突散囊菌胞外多糖的相对分子质量,判断其具有抗肿瘤活性。其实,冠突散囊菌液体发酵提取物的成分相当复杂,就拿胞外多糖来说,它不仅具有抗肿瘤活性的作用,而且同样具有降血脂、抗氧化等功效。所以,冠突散囊菌发酵过程中的次生代谢产物的保健功效,是多种生物活性成分相辅相成、共同作用的结果。对于某一特定成分的功效,还需要对代谢产物进行进一步的分离纯化,进行分类研究,方能弄明白。

## 2 冠突散囊菌的应用

### 2.1 冠突散囊菌在食品方面的应用

目前,市售的色素与香料都分为天然与合成两种。随着生活水平的提高,人们对食品安全性的关注度日趋提高,而食品的生产离不开食品添加剂的锦上添花,以改善食品感观性质,增强其市场竞争力。因此,使用天然的香料、色素等食品添加剂必定是大势所趋。

冠突散囊菌在茯砖茶的发酵过程中,是形成其独特的感官品质的首要“功臣”。王波<sup>[51]</sup>在分离提取冠突散囊菌产黄色素的研究中发现,冠突散囊菌的色素并不稳定,不能成为理想的食品添加剂。因此,能否进一步提高色素的稳定性,使其成为优良

的食品添加剂,还有待研究。

冠突散囊菌发酵产物——愈创木酚,是一种重要的精细化工的中间体。因为天然合成的愈创木酚的量不能满足生产生活的需要,而且提取天然愈创木酚步骤繁琐、耗费巨大,所以目前有不少研究者致力于其人工合成的研究,但是,这种化学合成物质在医药、食品中的应用受到限制。因此,天然的愈创木酚依然有很大的发展空间。

蔡正安等<sup>[52]</sup>研究发现,冠突散囊菌不仅可以在以黑茶作为原料的基础上进行“发花”,而且在没有人工接种冠突散囊菌的条件下也可以进行“发花”,这个实验就为冠突散囊菌发酵复合茶奠定了基础。

黄亚亚<sup>[53]</sup>研究发现,茯砖茶中多酚类、咖啡碱等物质的部分减少,在一定程度上对其饮料的开发提供了良好的基础。因此,作为饮料开发的原料用茶,茯砖茶有其独特的品质特色。

田鸿等<sup>[54]</sup>用冠突散囊菌直接发酵茶汁,研究了发酵过程各工艺参数及最优组合对品质的影响,最后感官评审的结果表明,在最优参数组合下,发酵茶汁具有很好的感官品质,汤色红艳透明、味道香甜浓郁、滋味醇和。

欧阳梅<sup>[55]</sup>选用炒青绿茶作为茶坯,人工接种冠突散囊菌,制成一种新型的黑散茶。

## 2.2 冠突散囊菌在医药方面的应用

刘闫等<sup>[56]</sup>从冠突散囊菌含阿魏酸的初筛培养基上看到了清晰可见的透明圈,由此证明了冠突散囊菌能够产生阿魏酸酯酶,并且通过水解透明圈的大小,证明了阿魏酸酯酶的活性较高。阿魏酸酯酶是冠突散囊菌分泌的一种胞外酶,能够通过水解作用,释放出游离的阿魏酸。阿魏酸具有抗氧化、消炎止痛、增强免疫功能等作用。刘闫等<sup>[56]</sup>进一步研究发现:冠突散囊菌在麸皮和黑茶发酵中都能产生一定量的阿魏酸,与其他原料相比,黑茶因为纤维素、半纤维素和果胶含量较高,产生的阿魏酸丰富,因此具有更好的保健功能。

吕嘉枏等<sup>[57]</sup>以金花菌固态培养物为研究对象,选择降脂类物质洛伐他汀标品为对照,采用高效液相色谱法确定了该菌种含有具备降脂功能的洛伐他汀,对金花菌固态发酵样品进行测定,最高洛伐他汀含量为0.49 mg/kg。该实验为开发他汀类药物提供了理论依据。

杨丽等<sup>[58]</sup>通过对冠突散囊菌、黑茶和菊苣根等的研究分析,研制了黑茶复方颗粒,可以缓解高血

压、高血脂等病症。

李莹<sup>[59]</sup>采用混合发酵的方式,研究了药物及细菌对冠突散囊菌的代谢调控,其结果显示:烟酰胺、伏立诺他和5-氮杂胞嘧啶核苷对冠突散囊菌的代谢调控均显示出负调控的效果;Vc对冠突散囊菌没有代谢调控效果;金黄色葡萄球菌对冠突散囊菌的代谢调控显著,刺激产生大量新物质,可成为冠突散囊菌发酵的新研究方向;肺炎链球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌对冠突散囊菌的代谢调控均有一定的作用,但并不显著。

## 3 展望

当前,分子生物学技术手段日趋完善,但冠突散囊菌的分子生物学研究还处于初步阶段,未来可以通过分子生物学手段,改造冠突散囊菌,使其次生代谢产物高效表达,成为各类生物活性成分的高产菌株。冠突散囊菌产孢子受很多因素影响,未来可以通过分子生物学手段阐明基因影响冠突散囊菌产孢方式的机制,并利用基因工程的手段定向改造,达到只产并且高产有性孢子的目的。

目前,“金花”菌发花固态砖茶的研究和生产工艺已经较为成熟,而液态茶发酵却鲜有报道。因此,优化冠突散囊菌液态发酵条件,组合优化工艺参数,开发金花茶饮料也将成为冠突散囊菌发展蓝图中的黄金板块。另外,冠突散囊菌能够在多种植物、药物材料上进行发花,并且具有各种保健功效,有望开发成多功能的复合保健类饮品。

此外,冠突散囊菌次生代谢产物的活性成分有降脂功效,有望生产降脂类药物或保健品。金黄色葡萄球菌对冠突散囊菌的代谢调控作用相当明显,也将成为冠突散囊菌研究发展的新方向。

### 参考文献:

- [1] 杨抚林,邓放明,赵玲艳,等.茯砖茶发花过程中优势菌的研究进展[J].茶叶科学技术,2015(1):4-7.
- [2] 黄浩,刘仲华,黄建安,等.“发花”散茶中“金花”菌的分离鉴定[J].茶叶科学,2010,30(5):350-354.
- [3] 温琼英.茯砖茶中优势菌的种名鉴定[J].中国茶叶,1990(6):2-3.
- [4] 齐祖同,孙曾美.茯砖茶中优势菌群的鉴定[J].菌物学报,1990(3):176-179.
- [5] 王文涛.茯砖茶中冠突散囊菌分类学研究[D].长沙:湖南农业大学,2014.
- [6] 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.

- [7] 齐祖同.中国真菌志(第五卷):曲霉属及相关有性型[M].北京:科学出版社,1997.
- [8] RAPER K B, FENNEL D I. The genus *Aspergillus* [M]. Baltimore: Williams & Wilkins Baltimore, 1965.
- [9] 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(4): 1271-1278.
- [10] 刘石泉, 赵运林, 胡治远, 等. 冠突散囊菌基因组 DNA 提取方法比较研究[J]. 茶叶, 2011, 37(4): 225-230.
- [11] 魏国美, 韩涛, 许任伟, 等. 冠突散囊菌 DNA 提取方法的比较[J]. 福建轻纺, 2014(1): 43-47.
- [12] KIM H S, HANK K Y, KIM K J, et al. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans* [J]. Fungal Genet Biol, 2002, 37(1): 72-80.
- [13] XU A Q, WANG Y L. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 146(6): 14-22.
- [14] 肖岩岩, 陈超, 董建飞, 等. 冬虫夏草子囊孢子及其无性型在培养过程中的形态学观察[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(4): 587-591.
- [15] 马权, 刘永翔, 刘作易. 冠突散囊菌有性孢子发育基因 *veA* cDNA 片段的克隆[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(3): 25-27.
- [16] 谭玉梅, 王玉臣, 刘永翔, 等. 冠突散囊菌转录因子 *stf1* 基因的克隆及其表达分析[J]. 菌物学报, 2015, 34(1): 91-97.
- [17] 苏凤, 种方旭, 彭友瑞, 等. 冠突散囊菌接种发酵茯砖茶的初步研究[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(7): 30-33.
- [18] 刘作易, 秦京. 茯砖茶“金花”菌生长条件研究[J]. 贵州科学, 1991(1): 20-24.
- [19] 周杨艳, 李雨枫, 白雪, 等. 茯砖茶中优势微生物在不同培养基的差异性比较[J]. 中国酿造, 2014, 33(9): 75-80.
- [20] 刘作易, 秦京. 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.
- [21] 郑欣欣. 茯砖茶中“金花”菌产孢机制及其功能性的研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2015.
- [22] 尹旭敏. 四川“金花”菌生物学特性及其发酵液态茶工艺的初步研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2006.
- [23] 刘作易, 秦京. 茯砖茶“金花”菌对营养成分的利用[J]. 贵州农业科学, 1992(1): 36-40.
- [24] 刘作易. 一种决定茯砖茶品质的重要真菌“金花”菌的研究进展[J]. 贵州茶叶, 1993(2): 33-35.
- [25] 吕嘉彬, 郑欣欣, 李文娟, 等. 影响冠突散囊菌孢子产生的因素[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2015(2): 116-120.
- [26] 陈云兰. 茯砖茶“金花菌”的分类鉴定及其对茯砖茶品质的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- [27] 曹聪, 刘素纯, 达海韬, 等. 不同原料及生长因子对冠突散囊菌固体培养特性的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 9178-9179.
- [28] 温琼英, 刘素纯. 茯砖茶发花中优势菌的演变规律[J]. 茶叶科学, 1991(增刊): 56-62.
- [29] 刘仲华, 黄建安, 王增盛, 等. 茯砖茶加工中色素物质的变化与色泽品质的形成[J]. 茶叶科学, 1991(增刊): 76-78.
- [30] 黄建安, 刘仲华, 施兆鹏. 茯砖茶制造中主要酶类的变化[J]. 茶叶科学, 1991(增刊): 63-68.
- [31] 王增盛, 谭胡伟, 张莹, 等. 茯砖茶制造中主要含氮、含碳化合物的变化[J]. 茶叶科学, 1991(增刊): 69-75.
- [32] 吕毅. 氟与茶叶品质化学和微生物学的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [33] 王华夫, 李明俊, 刘仲华, 等. 茯砖茶发花过程中的香气变化[J]. 茶叶科学, 1991(增刊): 81-86.
- [34] KAWAKAMI M, CHAIROTE G, KOBAYASHI A. Flavor constituents of picked tea, miang, in Thailand [J]. Agric Biol Chem, 1987, 51(6): 1683-1687.
- [35] WANG P S, KATO H, FUJIMAKI M. Studies on flavor components of roasted barley: part II. the major volatile carbonyl compounds [J]. Agric Biol Chem, 1969, 33: 1775-1781.
- [36] KOEHLER P E, ODELL G V. Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions [J]. J Agric Food Chem, 1970, 18(5): 895-898.
- [37] 刘武娣, 仇云龙, 黄建安, 等. 冠突散囊菌对发花黑毛茶品质呈味成分的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(5): 1554-1560.
- [38] 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(增刊): 49-55.
- [39] 吕嘉彬, 郑欣欣, 马亚宁. 冠突散囊菌液体发酵产降脂类物质的初步研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2014(6): 115-118.
- [40] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 高通量筛选研究茯砖茶降脂减肥功效[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3): 209-214.
- [41] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 高通量筛选研究茯砖茶对 FXR 模型的作用[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 331-334.
- [42] 宋鲁彬, 黄建安, 刘仲华, 等. 中国黑茶对 PPARs 的作用研究[J]. 茶叶科学, 2008, 28(5): 319-325.
- [43] 宋鲁彬. 中国黑茶药理功能评价及活性物质研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- [44] 黄群, 陈林杰, 李彦坡, 等. 冠突散囊菌黑茶发酵液对消化酶活性影响的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 917-920.
- [45] BURTON G W, FOSTER D O, PERLY B, et al. Biological antioxidants [J]. Philos Trans Royal Soc London B, 1985, 311: 565-578.
- [46] JOVANOVIĆ S V, HARA Y, STEENKEN S, et al. Antioxidant potential of gallic acid: a pulse radiolysis and laser photolysis study [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(39): 9881-9888.
- [47] CHARLTON A J, DAVIS A L, JONES D P, et al. The self-association of the black tea polyphenol theaflavin and its complexation with caffeine [J]. J Chem Soc, Perkin Trans 2, 2000, 2: 317-322.
- [48] 邓放明. 茯砖茶中冠突散囊菌分离培养及其发酵液胞外多糖与应用酶学研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [49] 杜延兵, 裘爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯化[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 250-252.
- [50] HONDA S, SUZUKI S, NITTA A. Application of high-performance capillary electrophoresis to the analysis of

- conformation and interaction of metal-binding proteins [J]. J Chromatogr A, 1991, 559: 345-356.
- [51] 王波.青砖茶中的真菌及其散囊菌黄色素的研究[D].南京:南京农业大学, 2009.
- [52] 蔡正安,刘素纯,刘杏益,等.冠突散囊菌在不同茶类及几种植物材料上“发花”的研究[J].茶叶科学, 2010, 30(4): 263-268.
- [53] 黄亚亚.茯砖茶饮料开发的探讨[J].贵州茶叶, 2012(4): 15-18.
- [54] 田鸿,齐桂年,尹旭敏.冠突散囊菌发酵型茶饮料的研究[J].食品与发酵工业, 2008, 34(1): 164-167.
- [55] 欧阳梅.人工发酵黑散茶的工艺及降脂效果研究[D].杭州:浙江大学, 2012.
- [56] 刘闫,胡茂丰,刘素纯.冠突散囊菌产阿魏酸酯酶及其发酵麸皮和黑毛茶形成阿魏酸的研究[J].农产品加工·月刊, 2015(4): 1-3.
- [57] 吕嘉彬,王珊,王柳.高效液相色谱法检测金花菌固态发酵中他汀类药物[J].陕西科技大学学报(自然科学版), 2014(1): 114-118.
- [58] 杨丽.冠突散囊菌生药学研究及复方黑茶颗粒的研制[D].济南:山东中医药大学, 2012.
- [59] 李莹.冠突散囊菌化学成分及其抗氧化活性研究[D].北京:北京中医药大学, 2014.

(责任编辑 荀志金)

### 《Advanced Functional Materials》报道我刊编委徐虹教授课题组仿生水凝胶敷料最新成果

水凝胶作为一种软物质材料,往往具有良好的生物相容性,可以为细胞提供高度模拟细胞外基质(ECM)的微环境而在组织工程与再生医学领域得到了广泛的研究。然而,潮湿的生理环境和水凝胶固有的高水含量引发的“氢键失效效应”严重阻碍了凝胶材料与生物体组织表面的整合并引起伤口感染,成为制约水凝胶材料整体性能提升和医学应用的瓶颈。

近日,《Advanced Functional Materials》报道了我校材料化学工程国家重点实验室、食品与轻工学院徐虹教授、迟波副教授及其博士后王瑞等人在仿生水凝胶敷料领域的最新成果。该水凝胶从海洋贝类生物湿性粘合的灵感出发,在抗菌高分子材料 $\epsilon$ -聚赖氨酸体系中引入多巴胺基团,采用酶催化原位构建了贻贝仿生水凝胶。聚合物中邻近的赖氨酸-邻苯二酚(catechol-lysine)仿生结构分布产生的“协同粘合效应”赋予水凝胶材料在生理条件下高强度的湿性组织整合强度( $\sim 147$  KPa)和伤口封堵止血能力,同时,该水凝胶呈现出优异的体外抗菌和体内抗感染能力,高效诱导皮肤再生修复。该研究为海洋贝类仿生材料的设计提供了新的思路。

相关工作发表在材料领域著名期刊《Advanced Functional Materials(先进功能材料)》。A Biomimetic Mussel-Inspired  $\epsilon$ -poly-L-lysine Hydrogel with Robust Tissue-Anchor and Anti-Infection Capacity (DOI: 10.1002/adfm.201604894, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.201604894/epdf>)。(王瑞:第一作者,徐虹、迟波:共同通讯作者)。

徐虹教授实验室主要通过微生物代谢工程及酶催化的手段,开发聚氨基酸和功能糖(醇)的绿色生产工艺,并探索基于聚氨基酸设计的组织修复与再生医用高分子材料的应用研究。实验室现有教授2人,副教授3人,讲师1人,博士后2人,博士研究生8人,硕士研究生20余人。

徐虹教授本课题组当前的研究方向为生物基材料的生物制造与应用研究,主要涉及以下方面:

#### 1、生物基材料的生物制造

1) 生物高分子功能开发与应用; 2) 高效生物催化剂的发现与改造; 3) 生物高分子发酵过程的调控优化; 4) 生物大分子结构解析和构效机制。

#### 2、组织工程与再生医学材料的开发及应用

1) 组织修复再生支架材料的设计(功能水凝胶、纳米纤维等); 2) 材料与细胞的相互作用; 组织诱导再生材料的应用研究(皮肤、软骨、骨等)。

(供稿人:李莎)