

固态培养对普洱熟茶后发酵过程中优势菌 日本曲霉原变种生长的影响

朱宏涛^{1,2}, 陈可可¹, 王东¹, 杨崇仁¹, 李元², 张颖君^{1*}

¹中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204;

²云南农业大学资源与环境学院, 昆明 650201

摘要: 本文通过不同碳原、氮原、pH 值和温度的实验, 对普洱熟茶后发酵优势菌之一的日本曲霉原变种的生物学特性进行研究。同时, 对菌落的生长规律及形态特征进行了观察与分析。结果表明, 该菌株对酸碱度有广幅的适应性; 在硝酸钠或硫酸铵为氮源, 麦芽糖或玉米粉为碳源的培养基中生长迅速; 培养温度以 30 °C 最为适宜。研究结果为该菌株的大量培养, 以及普洱茶的规范化生产技术提供了基础。

关键词: 固态培养; 普洱熟茶; 日本曲霉原变种; 生长温度; 培养基

中图分类号: R285; Q58

文献标识码: A

Effects on Growth in Solid Culture of *Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*, a Preponderant Microbe during the Post Fermentative Process of Pu-Er Ripe Tea

ZHU Hong-tao^{1,2}, CHEN Ke-ke¹, WANG Dong¹, YANG Chong-ren¹, LI Yuan², ZHANG Ying-jun^{1*}

¹State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; ²College of Resources and Environment,

Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China.

Abstract: As a preliminary study to understand the fermentative process of Pu-Er tea, the investigation on biological characteristics of *Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*, one of the dominant strains during the post-fermentation process of Pu-Er tea, was conducted by experiments of different carbon source, nitrogen source, pH value and temperature. At the same time, the morphologic characters and the growth rules of this strain were observed. Result indicated that this fungus adapted well to a wide pH range and the optimal culture temperature was about 30 °C. The result also showed that *A. japonicus* Saito var. *japonicus* was able to grow well in the medium with either ammonium sulfate or sodium nitrate as the nitrogen source and maltose or corn powder as the carbon source. The study will provide scientific guide for the massive culture of this microbe as well as the standardization of Pu-Er tea producing technique.

Key words: solid culture; Pu-Er ripe tea; *Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*; growth temperature; culture medium

普洱茶是以云南特产大叶茶的晒青毛茶为原料经长时间的陈化或经人工后发酵再加工生产的茶类, 包括普洱陈茶和普洱熟茶^[1]。两类普洱茶的生产形成过程都离不开微生物的参与。普洱熟茶是晒青毛茶以渥堆的方式, 在一定温湿度条件下, 多种微生物参与下进行快速发酵生产形成的。我们曾对云南省多个普洱熟茶生产地区(临沧、思茅、版纳等)

渥堆过程中的微生物菌群进行系统的分离和鉴定, 并发现共性的优势菌群和差异较大的优势菌株^[2]。经菌物学鉴定, 主要的优势菌种为曲霉属的真菌, 其中, 日本曲霉原变种为菌群中的优势菌之一。不同地区普洱熟茶生产过程中的主要菌群种类及优势菌株存在着差异^[2,5,13-15]。

微生物对普洱茶风味、品质及化学成分变化有着显著的影响。有报道认为酵母菌在普洱茶生产过程中是形成普洱茶甘、滑、甜、醇等品质和风味的重要因子^[3]。最近, 台湾学者报道从陈年普洱茶(大红印和大黄印)中分离到放线菌属和链霉菌属菌

收稿日期: 2008-07-31 接受日期: 2008-09-11

* 通讯作者 Tel: 86-871-5223235; E-mail: zhangyj@mail.kib.ac.cn

株,发现杆状链霉菌和灰色链霉菌在接种茶叶后可提高茶多酚、氨基丁酸(GABA)和甲羟戊二酸单酰辅酶A还原酶抑制剂的含量^[4]。亦有报道认为黑曲霉、青霉、根霉、灰绿曲霉和酵母菌对云南普洱茶品质有着较大的影响^[5]。显然,茶叶后发酵过程中的微生物直接影响普洱茶的品质。并且,不同风味和品质的普洱茶往往是由于其在发酵过程中存在着不同的优势菌群所导致。然而,对普洱茶发酵过程中存在的优势菌株,除我们曾对臭曲霉原变种生物学特性研究外,该方面的研究报道甚少^[6]。日本曲霉作为普洱茶生产后发酵过程中的主要优势菌物之一,除有一些分子、核酸及其酶等方面的研究外^[7],有关该菌生物学、形态学方面的研究未见报道。从后发酵生产技术规范和普洱熟茶新品牌构建的角度,对优势菌株的各种特性的研究成为必要,本文报道日本曲霉原变种生物学特性的实验研究结果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品

日本曲霉原变种(*Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*) KZ-6 从云南省产茶区普洱熟茶渥堆过程中的茶堆中采样分离得到。

1.1.2 氮源实验培养基配方

以改良 PDA 培养基为基本培养基。分别加入牛肉膏 5 g(N1),酵母浸膏 5 g(N2),蛋白胨 3 g(N3),硝酸钠 2.2 g(N4),硫酸铵 1.7 g(N5),麸皮 11 g(N6),豆饼粉 7 g(N7)等含有机氮或无机氮的物质。

1.1.3 碳源培养基配方

以改良 PDA 培养基为基本培养基。分别加入蔗糖 8.6 g(C1),麦芽糖 9 g(C2),玉米粉 7.2 g(C3),D-果糖 9 g(C4), α -乳糖 9 g(C5),葡萄糖 10 g(C6)等含有机碳或无机碳的物质。

1.1.4 培养温度的设置

将菌种接种在准备好的 PDA 固体培养基中,分别置于 4、10、20、30、40、50、60 °C 的条件下进行培养,观察菌丝体的生长状况。

1.1.5 酸碱度的设置

将菌种分别接种在 pH = 1,2,3,⋯,14 的 PDA 固体培养基中,置于 30 °C 的条件下进行黑暗培养并观察菌丝体的生长状况。

1.2 实验方法

在超净工作台内,用接种针均匀挑取经转代活化 2 次的日本曲霉原变种孢子,接种于事先准备好的固体培养基中。除温度因素实验外,平板皆于 30 °C 条件下黑暗培养。接种后分别以第 4、6、8、10 和 12 d 测量菌落直径和菌落中产孢圈直径,并观察描述菌落形态,每项实验设五个重复,取平均值。

2 观察与结果

2.1 pH 值对日本曲霉原变种生长与形态的影响

实验结果表明,培养基酸碱度对日本曲霉原变种菌株生长无显著的影响。在 pH = 2,3,4,⋯,13 的情况下均能正常生长菌丝和产生孢子。在不同 pH 值的培养条件下,孢子产生的初始时间相似。该菌喜好中至微碱性的环境,在 pH 值等于 7 或 8 时产生的产孢圈和整个菌落的直径都明显大于其他处理。而当 pH 值以 7 为起点逐渐降低或以 8 为起点逐渐增加时,该菌的生长速度都有逐渐减小的趋势,当 pH 值降至 1 或升至 14 时该菌不能生长(图 1)。同时,该菌在不同 pH 值条件下培养还存在着诸多形态上的差异:供试培养基在 pH 值为 1,2,3 时不能凝固,成耐火砖红色的透明液体。该菌除在 pH 值等于 1 的培养基中不能生长外,在 pH 值等于 2 和 3 时能正常生长,其中菌丝灰白色,孢子灰褐色产生于菌丝顶端的孢子囊内。由于培养基不能凝固,菌落不能形成同心圆菌落而是形成满天星状的许多菌落,在培养的第三天布满整个培养皿表面。当 pH 值升至 5,6 时,菌落圆形,菌丝疏松,有较多的气生菌丝,菌丝初始时灰白色,孢子橄榄绿色,长至后期(培养第十天左右)菌丝顶部完全布满了橄榄绿色的孢子,整个菌落呈现出橄榄绿色。菌落中央有稀疏的辐射状沟纹。当 pH = 7,8 时,菌落生长与产孢速度最快,菌落圆形,菌落周围排列整齐,无或少有气生菌丝,菌丝初始乳白色,后期与孢子同色,孢子深橄榄绿至褐绿色,菌落正面及背面均布有细密的辐射状沟纹。菌落背面乳白色,无分泌物(如图 7A)。当 $14 > \text{pH} > 10$ 时,培养基成栗色质地坚硬。该菌生长在其上,菌落圆形,周围排列不整齐,孢子暗灰绿色或浅黄绿色,菌丝生长和产孢速度缓慢,孢子的弹出范围较菌丝覆盖范围大,菌落正面无褶皱,具赭褐色分泌物。菌落正面及背面均无褶皱(图 7B)。

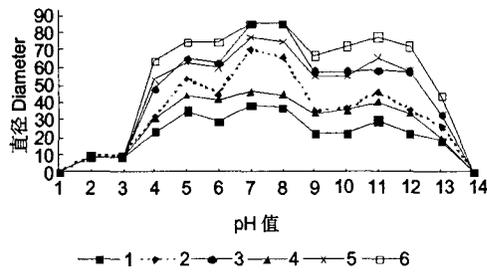


图1 pH 值对日本曲霉原变种生长的影响

Fig. 1 Effects on the growth of *A. japonicus* Saito var. *japonicus* by pH

注:1~3 分别为第 4、8、12 d 检测的产孢圈;4~6 分别为第 4、8、12 d 检测菌落

2.2 氮源对日本曲霉原变种生长与形态的影响

氮原实验结果表明,日本曲霉原变种在以硝酸钠(N4)或硫酸铵(N5)为氮源的培养基中生长迅速,在以牛肉膏(N1),酵母浸膏(N2),蛋白胨(N3),麸皮(N6),豆饼粉(N7)为氮源的培养基中生长相对缓慢(图 2,3)。同时,氮源对菌落在培养基表面的形态有明显的影响。该菌在 N1 培养基中培养初期菌落圆形,菌落中央有直径约 22 mm 的暗橄榄绿色产孢圈,在产孢圈与菌丝交界处有宽 3~5 mm 皂蓝色的菌丝环。其余菌丝为灰白色、棉絮状,菌落边缘排列整齐,菌落中央长有浓密孢子的部位具稀疏的辐射状沟纹。培养 8~10 d 后,菌落中菌丝布满整个培养皿,菌丝灰白色至铅灰色,孢子暗橄榄绿色集中于菌落中心部位,菌落背面无色无分泌物(图 7C)。在 N2 培养基中,初期菌落圆形,菌落中央有黄褐色产孢圈,在产孢圈与菌丝交界处有宽 3~5 mm 驼色的孢子菌丝混杂环,菌落中央有细密的辐射状沟纹。培养 8 d 后,菌落中孢子布满整个培养皿,菌落中央浓密凹陷的产孢圈呈现棕绿色,周围有突起的菌索,菌索周围是橄榄棕色的孢子层。菌落仅中心部位的正面及背面有细密整齐的辐射状沟纹(图 7D)。菌落正面无分泌物,菌落背面培养基呈现墨蓝色(图 7E)。在 N3 培养基中,该菌生长初期,菌落圆形,菌丝白色、疏松程棉絮状,密集的孢子堆呈现暗橄榄绿色,培养后期,产孢速度极快,整个菌落中已看不到菌丝。菌落正面成黄橄榄色,密布均匀的辐射状沟纹,菌落背面无色,亦密布均匀的辐射状沟纹。N4 培养基中,初期菌丝黄绿或灰白色,孢子灰褐色至深橄榄色,产孢部位突出,菌落有较少或无褶皱。生长后期,产孢速度极快,整个菌落中也已看不到菌丝。菌落表面棕黄色,菌落正面及

反面具均匀细密的辐射状沟纹(图 7F)。N5 培养基中,初期菌丝生长迅速,后期产孢迅速,孢子排列密集,整个菌落呈现深橄榄绿色,菌落中部可见稀疏的絮状菌丝。N6 培养基中,菌落生长极为特别,整个菌落呈现出同心圆环状图案,在近圆心处有一棕褐色凹陷的产孢圈,周围有一黄白、军绿相间的交混凸圈,凸圈外是军绿与土黄混杂的菌丝产孢圈(孢子产生于菌丝顶部),如(图 7G)。整个菌落正面及背面均无褶皱亦无分泌物。该菌在 N7 培养基中的菌落形态特征与其在 N6 中极为相似。

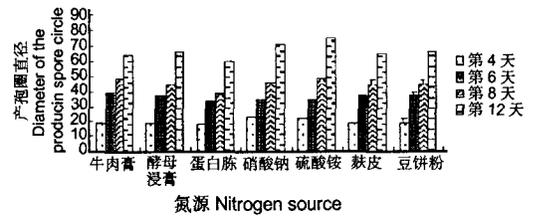


图2 氮源对日本曲霉原变种产孢速度的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen source on producing spore speed of *A. japonicus* Saito var. *japonicus*

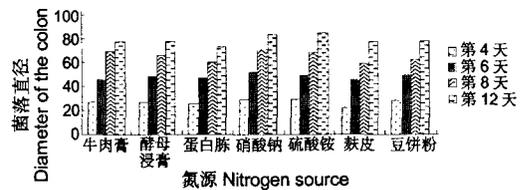


图3 氮源对日本曲霉原变种菌落生长的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen source on the colony growth of *A. japonicus* Saito var. *japonicus*

2.3 碳源对日本曲霉原变种生长与形态的影响

碳源实验结果表明,麦芽糖(C2)和玉米粉(C3)培养基对日本曲霉原变种的生长最为有利(图 4,5)。同时,不同碳源的培养基对菌株的菌落形态也有一定的影响。在蔗糖(C1)培养基初期菌落生长缓慢,菌丝黄白或白色,孢子浅灰绿色,菌落正反面均有细密的褶皱。生长后期,菌丝生长迅速,菌丝黄白或灰白色,孢子深灰绿色,菌落中央凹陷,仅菌落中央部位具细密整齐的褶皱。在麦芽糖(C2)培养基中,初期菌落形态与蔗糖培养基相似,生长至第 7、8 d 时,整个培养皿表面看不到菌丝体,密布有灰黑色的孢子层,菌落两面具细密的辐射状沟纹(图 7H),且菌落背面培养基呈浅黄绿色。在玉米粉(C3)培养基中,培养初期,孢子颜色灰橄榄色,菌落中央产孢部位外凸,菌落无褶皱。后期,菌落生长速

度极快,孢子聚集成堆,呈现出灰褐色,菌落正面有细密的辐射状沟纹,背面无沟纹(图7I)。在d-果糖(C4)培养基中,初期菌落形态与蔗糖培养基相似,生长至第7、8 d时,菌落中央凹陷,四周凸起,孢子密集与菌落中部呈现橄榄黄色。菌丝灰绿或灰白色、絮状;菌落正反面均具细密沟纹,菌落背面有黄绿色。在 α -乳糖(C5)培养基中,菌落前期生长十分缓慢,菌丝黄白色,孢子灰褐色。培养至第七、八天时菌落圆形,孢子灰褐色,菌丝灰白色,菌落中有较多的气生菌丝,孢子产生于菌落中央的菌丝底部。菌落中央凹陷,四周凸起(图7J),菌落正面背面有褶皱且培养基背面有较大的裂纹。在葡萄糖(C6)培养基中,在N3培养基中,该菌生长初期,菌落圆形,菌丝白色、疏松棉絮状,密集的孢子堆呈现暗橄榄绿色,培养后期,产孢速度极快,整个菌落中已看不到菌丝。菌落正面成黄橄榄色,密布均匀的辐射状沟纹,菌落背面无色,亦密布均匀的辐射状沟纹。

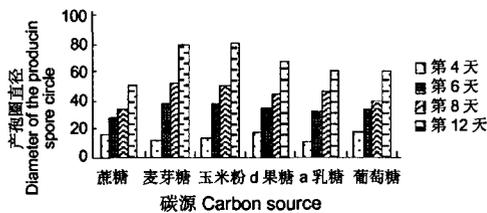


图4 碳源对日本曲霉原变种产孢速度的影响

Fig. 4 Effect of carbon source on producing spore speed of *A. japonicus* Saito var. *japonicus*

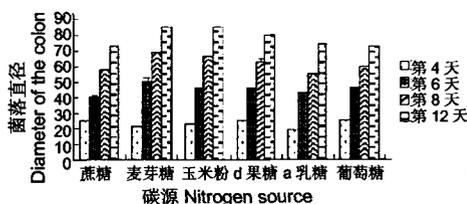


图5 碳源对日本曲霉原变种菌落生长的影响

Fig. 5 Effect of carbon source on colony growth of *A. japonicus* Saito var. *japonicus*

2.4 温度对日本曲霉原变种生长的影响

温度实验结果表明(图6),日本曲霉在温度为30℃条件下无论是菌丝生长或孢子的产生都十分迅速,培养9 d时,菌丝长满整个培养皿,培养第12 d时,菌丝的中上部被所产生的棕黄色孢子覆盖(图7K)。温度在4℃时菌丝和孢子的生长完全受到抑制,该菌的孢子在4℃时不能萌发。在20℃或40

℃时菌丝、孢子能正常生长,但生长速度较慢。当温度升至50℃时,菌丝、孢子的生长都受到抑制,菌丝缩卷成乳白色厚厚的革质状物,孢子的生长也非常缓慢,表现出一种不正常的生理状态(图7L)。当培养温度升至60℃时菌株死亡。

3 讨论

日本曲霉原变种属半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢纲(Hyphomycetes)丝孢目(Hyphomycetales)丛梗孢科(Moniliaceae)曲霉属(*Aspergillus*)黑色曲霉类真菌,广泛存在于土壤、霉腐物、牛粪、羊粪及白蚁中^[8]。富含 β -呋喃果糖苷酶等生物酶,该酶能催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖,并且具有转糖基作用,能够制取高含量的低聚果糖^[9]。而低聚果糖具有独特的保健功能,被广泛应用于食品、饲料和医药工业^[10]。我们首次从普洱茶生产过程中分离到的日本曲霉原变种是普洱茶的优势菌物之一^[2]。生物学实验结果表明,该菌株在pH=2,3,4...13范围内均能正常生长,孢子形成的初始时间相同,对酸碱度的适应性较强,符合曲霉属真菌通常对pH值的广幅适应特性^[11]。该菌株在中性偏碱(pH=7或8)的培养条件下生长迅速。菌丝体呈乳白色或灰白色,孢子深橄榄绿色或褐绿色,产孢圈排列整齐,菌丝紧密且排列整齐,菌落背面乳白色。当pH值较高时,菌落生长缓慢,产孢数量少,孢子主要呈现灰绿色,培养后期,菌落中出现赭褐色露珠状分泌物。碳原和氮原实验结果显示该菌较为优化的氮源为硝酸钠或硫酸铵,较为优化的碳源则是麦芽糖和玉米粉。日本曲霉原变种在所选的一系列培养基中除生长速度有明显不同外,其基本菌落形态均表现为孢子深橄榄绿色至褐绿色,菌丝乳白或灰白色,菌落正面或背面具细密的辐射状沟纹或无,菌落背面

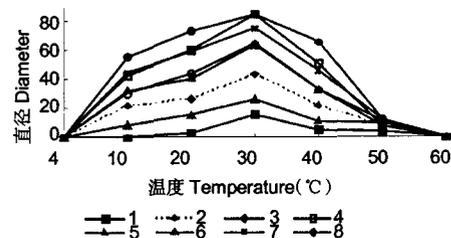


图6 温度对臭曲霉生长的影响

Fig. 6 Effects on the growth of *A. japonicus* Saito var. *japonicus* by temperature

注:1~4分别为第4、6、8、12 d检测的产孢圈;5~8分别为第4、6、8、12 d检测菌落

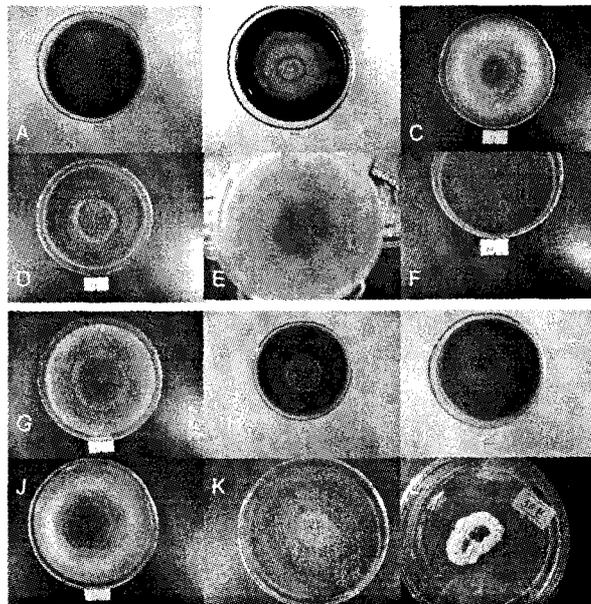


图7 pH值,氮源,碳源实验部分图片

Fig. 7 Some photos during the experiments on pH value, nitrogen source, carbon source and temperature

注:A-B: pH = 7, 13 的实验菌落; C-D, F-G: N1, N2, N4, N6 实验的菌落; E: N2 实验的菌落背面; H-J: C2, C3, C5 实验的菌落; K-L: 30 °C 和 50 °C 实验的菌落

培养基颜色乳白、黄褐或墨蓝色。上述观察结果与中国真菌志中描述的日本曲霉原变种菌落紫黑色或紫褐色,菌落反面黄褐色的菌落特征有所差异(齐祖同,1997)。这可能与菌株来源与培养基不同有关^[12]。通过温度梯度实验得出,本实验所选用的日本曲霉原变种 KZ-6 的最适生长温度为 30 °C,次适温度范围 20 ~ 40 °C。当温度降低到 4 °C 时,该菌停止生长,当温度升高至 60 °C 时该菌完全死亡。虽同为曲霉属黑色曲霉类真菌,但日本曲霉原变种与笔者先前报道的臭曲霉在生长特性方面仍存在着较大的差异。臭曲霉在微酸至中性的 pH 值条件下生长迅速。同时,臭曲霉在 50 °C 左右的温度下,菌落生长速度缓慢,但菌落形态正常,这说明臭曲霉对相对高温的承受能力比日本曲霉原变种强^[6]。鉴于该菌株为普洱茶后发酵生产中的主要优势菌物之一,以上的实验研究结果将为菌株的大量制备,“普洱茶麴”的研制提供关键的技术基础。

致谢:感谢云南农业大学刘云龙教授鉴定菌种。

参考文献

1 Yang CR(杨崇仁), Chen KK(陈可可), Zhang YJ(张颖君). 茶叶的分类与普洱茶的定义. *Tea Sci Tech*(茶叶科学技术), 2006, 191, (12): 37-38.

2 Chen KK(陈可可), Zhu HT(朱宏涛), Wang D(王东), et al. Isolation and identification of *Aspergillus* species from the post fermentative process of Pu-Er ripe tea. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2006, 28: 123-126.

3 Zhao LF(赵龙飞), Zhou HJ(周红杰). Preliminary study on function of yeast in developing Pu-Er tea quality. *Tea Center* (茶苑), 2003, 1(2): 4-6.

4 Jeng KC, Chen CS, Fang YP, et al. Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-Erh Tea. *J Agric & Food Chem*, 2007, 55: 8787-8792.

5 Zhou HJ(周红杰), Li JH(李家华), Zhao LF(赵龙飞), et al. Study on main microbes on quality formation of Yunnan Pu-Er tea during Pile-fermentation process. *J Tea Sci* (茶叶科学), 2004, 24: 212-218.

6 Zhu HT(朱宏涛), Chen KK(陈可可), Wang D(王东), et al. The biological characteristics of *Aspergillus foetidus*, a preponderant microbe during the post fermentative process of Pu-Er ripe tea. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2008, 30: 510-514.

7 Kozakiewicz Z. *Aspergillus* species on stored products. *Mycol*, 1990, 82: 407-408.

8 Qi ZT(齐祖同). 中国真菌志. Beijing: Science Press, 1997, 5: 98-99.

(下转第 85 页)

37	α -Bergamotene α -香柠檬烯	0.312	0.289
38	β -Santalene β -檀香烯	0.838	0.778
39	α -Humulene β -葎草烯	0.856	0.766
40	β -Santalene β -檀香萜烯	0.309	0.298
41		0.660	3.581
42	α -Ylangene α -衣蓝烯	1.700	5.764
43	Geranyl isobutyrate 异戊酸异丁酸酯	7.162	2.317
44	α -Muurolene α -依兰油烯	0.202	0.166
45	β -Bisabolene β -甜没药烯	0.346	0.294
46	Nerolidol 橙花叔醇	0.513	0.424
47	-	4.367	4.025
48	Geranyl isovalerate 异戊酸香叶酯	3.079	3.256
49	Caryophyllene oxide 石竹烯氧化物	1.628	1.519
50	Caryophylla-4,8-dien-5, β -ol 石竹-4,8-二烯-5, β -醇	0.290	0.406
51	β -Italicene β -愈创烯		0.279
52	Epiglobulol 表蓝按醇	0.251	0.303
53	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone 6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	0.300	0.314
54	Palmitic acid 棕榈酸	0.333	0.801
55	Propanoic acid,2-methyl-,2-[3-[(acetyloxy)methyl]oxiranyl]-5-methylphenyl ester	1.564	2.632

微粉)。对本品挥发性成分的分析研究,为深度开发该民族用药以及其质量控制提供必要的基础数据。本文虽确定了鹅不食草中挥发性成分的化学结构,但均有约 50% 的成分未鉴定出,有待进一步研究。

参考文献

- 1 ChP. (中国药典). 2000. Vol I(一部). Appendix64;285.
- 2 Bao J(包骏), Ran MX(冉懋雄). Research and development of MIAOZU medicine of Guizhou(贵州苗族医药研究

与开发). Guiyang: Guizhou Technology Press(贵州科技出版社), 1999. 240.

- 3 Institution of exploitation of Medical plant resource(中国医学科学院药用植物资源开发研究所). Reviews of Traditional Medicine Vol. 4(中药志,第四册). Beijing: People's Medical Press(人民卫生出版社), 1993.
- 4 Liu J(刘杰), Hou HM(侯惠鸣), Tu WQ(屠万倩). Study on determination of volatile constituents of the grass of *Centipeda minima* (L.) A. Br. et Aschers by GC-MS. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2002, 33: 785-786.

(上接第 50 页)

- 9 Zhao XH(赵秀红), Li CB(李长彪), Liu CJ(刘长江). Characterization study of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. *Biotechnology*(生物技术), 2006, 16(3): 33-35.
- 10 Hidada H, Hirayama M, Sumi N. A fructo-oligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* TCC20611. *Agric Biol Chem*, 1988, 52: 1181-1187.
- 11 Huang FX(黄福新), Zhu GN(朱桂宁), Yan WH(晏卫红), et al. Biological characteristics of three species of *Aspergillus causing* mildew of store tobacco. *Chin Agric Sci Bull*

(中国农学通报), 2005, 25(3): 93-97.

- 12 Jing DB(靖德兵), Li PJ(李培军), Sun TH(孙铁珩), et al. Study on the optimization of solid fermentation for the production of cellulase from *Aspergillus niger*. *Chin J Eco-Agriculture*(中国生态学报), 2004, 12: 172-174.
- 13 Chen ZD(陈宗道), Liu QJ(刘勤晋), Zhou CQ(周才琼). 微生物与普洱茶发酵. 茶叶科技, 1985, (4): 4-7.
- 14 Hu JC(胡建程), Hu YL(胡月龄), Qian ZS(钱泽树). 茶叶中霉菌的研究. 茶叶, 1979, (1): 25-30.
- 15 Hu JC(胡建程), Hu YL(胡月龄). 四种边茶中微生物分离和鉴定. 茶叶, 1957, (2): 20-22.