

# 浅盘与传统普洱茶发酵的 微生物群落和化学成分比较研究<sup>①</sup>

王兴华<sup>1,3</sup>, 蒋 宾<sup>2</sup>, 王利妍<sup>2</sup>, 马 燕<sup>2</sup>, 罗朝光<sup>1,3</sup>,  
蒋 勋<sup>1,3</sup>, 催廷宏<sup>1,3</sup>, 胡艳萍<sup>1</sup>, 张 军<sup>1,3</sup>,  
郑文忠<sup>1,3</sup>, 姚启萍<sup>1,3</sup>, 严 亮<sup>4</sup>, 赵 明<sup>2</sup>

1. 云南省普洱茶树良种场, 云南 普洱 665000; 2. 云南农业大学 龙润普洱茶学院, 昆明 650201;  
3. 普洱茶树良种场, 云南 普洱 665000; 4. 普洱茶研究院, 云南 普洱 665000

**摘要:** 传统普洱茶渥堆发酵一般包含数吨茶叶基质, 发酵中存在热传递不均匀的问题. 为此建立了浅盘普洱茶发酵系统, 并比较了浅盘与传统普洱茶发酵的微生物群落结构和化学成分差异. 测定发现 2 种发酵过程化学成分变化规律类似, 浅盘发酵出堆样的水浸出物、可溶性糖、茶红素和黄酮质量分数显著高于传统发酵出堆样( $p < 0.05$ ), 茶褐素质量分数显著低于传统发酵出堆样( $p < 0.05$ ). 2 种发酵过程微生物群落结构不同, 传统发酵出堆样品优势细菌为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和考克菌(*Kocuria*), 优势真菌为曲霉属(*Aspergillus*)、芽生葡萄孢酵母属(*Blastobotrys*)和根毛霉(*Rhizomucor*); 浅盘发酵出堆样品优势细菌为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和欧文氏菌属(*Erwinia*), 优势真菌为 *Brunneoclavispora* 和曲霉属(*Aspergillus*). 审评结果表明, 2 种发酵出堆茶样都具有较好的感官品质. 今后还应研究优化浅盘发酵的条件, 以提高普洱茶品质.

**关键词:** 普洱茶; 渥堆发酵; 浅盘发酵; 高通量测序; 微生物多样性

**中图分类号:** Q93-331; TS272

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2019)10-0028-09

普洱茶是以云南大叶种茶树[*Camellia sinensis* (Linn.) var. *assamica* (Masters) Kitamura]晒青茶为原料, 经后发酵等工序加工而成的茶叶产品, 具有汤色红浓明亮、滋味醇厚回甘、陈香显著等风味品质特点<sup>[1]</sup>. 除风味独特外, 国内外研究还报道其具有降脂减肥、抗氧化、抗菌、抗突变、保护神经损伤、保护肝脏、抗疲劳和抗辐射等保健功能或生物活性<sup>[2-3]</sup>. 由于独特的风味和良好的保健功能, 普洱茶在国内外有着较好的市场, 不仅是云南茶叶的特色优势产品和最重要的组成部分, 也是我国重要茶叶品种之一<sup>[4]</sup>.

后发酵是普洱茶加工的关键工序, 是形成其品质特征和保健功能的核心步骤<sup>[5]</sup>. 目前, 普洱茶的后发酵一般是将晒青毛茶加入适量水分, 混匀、渥堆, 根据发酵进程, 经过数次潮水、翻堆的过程<sup>[6]</sup>. 从微生物学角度来看, 这是一个固态发酵(Solid state fermentation)过程. 固态发酵是指微生物在没有或几乎没有游离水的培养基上生长的过程<sup>[7]</sup>. 传统固态发酵食品有白酒、酱油、醋、豆豉、腐乳等, 现代固态发酵技术生产的产品扩展至酶制剂、有机酸、风味调料、食用菌和功能性食品等<sup>[8]</sup>. 但是目前普洱茶的固态发酵采用数吨至数十吨茶叶渥堆的方法, 存在茶叶基质热传递困难的问题, 亟待改变.

为了解决传统渥堆普洱茶固态发酵存在的问题, 课题组建立了 PLC 系统控制发酵室温度、湿度的浅盘

① 收稿日期: 2018-11-13

基金项目: 国家茶叶产业技术体系普洱综合试验站项目(CARS-19); 云南省现代农业茶叶产业技术体系建设云南省普洱茶树良种场试验站项目(2018KJTX007); 国家自然科学基金项目(31760225).

作者简介: 王兴华(19-), 男, 高级农艺师, 主要从事茶树育种、栽培及茶叶加工的研究.

发酵(25kg 茶叶)普洱茶发酵系统<sup>[9]</sup>。为评价该系统发酵普洱茶的可行性,本研究以同一批次晒青茶为原料分别进行了传统渥堆和浅盘发酵,并利用高通量测序技术分析比较发酵过程中微生物群落结构和化学成分的异同,为后期采用浅盘发酵方式发酵普洱茶提供理论依据和指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集与处理

普洱茶发酵样于 2017 年 10 月 28 日—12 月 30 日在云南省普洱茶树良种场开展。传统渥堆发酵为三级晒青茶 3 t,堆高 0.8 m,潮水量 40%,覆盖湿麻布进行发酵,间隔 7 d 翻堆补水;浅盘发酵为三级晒青茶 0.375 t,潮水量 40%,潮水混匀后,将茶叶盛满大号塑料框,每框 25 kg 左右,放置在多层发酵架上置于发酵室发酵,发酵室全封闭,应用 PLC 系统对温度、湿度、供氧、排碳进行调控,实现发酵过程茶叶温度、湿度、氧气的自动化监测与控制,发酵间隔 5 d,混合补水。每天 8:00 和 17:30 记录茶叶温度和环境湿度,取平均值,每隔 5 d 翻堆前,采用 5 点取样法,上、中、下 3 层分别取样混合,分为 2 份,一份于 -80 °C 保存,进行微生物多样性高通量测序分析;一份自然风干,测定化学成分。样品具体信息、茶叶温度和环境湿度见表 1。

表 1 样品信息

样品编号	样品描述	发酵温度/°C, 湿度/%	样品编号	发酵温度/°C, 湿度/%	样品描述
RM	晒青茶(原料)	—	RM	—	晒青茶(原料)
PF1	传统发酵第 7 d(第 1 次翻堆)	46, 62	STF1	53, 81	浅盘发酵第 5 d(第 1 次翻堆)
PF2	传统发酵第 14 d(第 2 次翻堆)	47, 68	STF2	54, 74	浅盘发酵第 10 d(第 2 次翻堆)
PF3	传统发酵第 28 d(第 3 次翻堆)	49, 59	STF3	50, 78	浅盘发酵第 15 d(第 3 次翻堆)
PF4	传统发酵第 35 d(第 4 次翻堆)	52, 68	STF4	49, 72	浅盘发酵第 20 d(第 4 次翻堆)
PF5	传统发酵第 42 d(第 5 次翻堆)	52, 60	STF5	36, 77	浅盘发酵第 25 d(出堆)
PF6	传统发酵第 49 d(出堆)	33, 66			

### 1.2 试剂与仪器

试剂:甲醇、硫酸亚铁、酒石酸钾钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、食用乙醇、茚三酮、三氯化铝、氢氧化钠等(以上药品试剂均为国产分析纯),去离子水;色谱纯乙腈为 Sigma 产品,咖啡碱(Caffeine CA)、儿茶素(Catechins, C)、表儿茶素(Epicatechin, EC)、表没食子儿茶素(Epigallocatechin, EGC)、没食子儿茶素(gallocatechin, GC)、表儿茶素没食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)、儿茶素没食子酸酯(catechin gallate, CG)、表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)、没食子儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate, GCG)、没食子酸(Gallic acid GA)、鞣花酸(Ellagic acid)、杨梅素(Myricetin)、槲皮素(Quercetin)、木樨草素(Luteolin)、山奈酚(Kaempferol)对照品均购自天津一方科技有限公司。

仪器:电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司;HH-S28S 数显恒温水浴锅,金坛市大地自动化仪器厂;101A-2 型电热鼓风恒温干燥箱,上海市崇明实验仪器厂;756CRT 紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;1200 型高速液相色谱系统,美国安捷伦等;Illumina Miseq 高通量测序由派森诺生物完成。

### 1.3 化学成分测定与数据处理

按 2015 版国标测定茶样水浸出物<sup>[10]</sup>,茶叶茶多酚、茶多糖和茶色素(茶黄素、茶褐素和茶红素)的质量分数分别应用酒石酸铁比色法<sup>[11]</sup>、硫酸蒽酮法<sup>[12]</sup>和萃取比色法<sup>[13]</sup>测定。应用实验室建立的高效液相色谱法(HPLC)测定茶叶儿茶素、没食子酸、咖啡碱和黄酮的质量分数,主要方法如下:

样品处理:称取磨碎茶样 0.2 g,加甲醇 8 mL,盐酸 0.8 mL,于圆底烧瓶 85 °C 水浴回流 90 min,过滤于 10 mL 容量瓶,用甲醇定容,摇匀,0.45 μm 过滤膜过滤,待测。

高效液相色谱条件:使用 TSKgel ODS-80TM 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 日本 TOSOH)分离;儿茶素测定流动相 A 为 0.261%磷酸,5%乙腈,流动相 B 为 80%甲醇。洗脱梯度为 0 min(5% B)→

0.5 min(50% B)→25 min(20% B)→25.5 min(100% B)→29.5 min(100% B)→29.9 min(100% A), 30 min 程序停止并以 10% B 后运行 6 min, 进样量 2  $\mu$ L, 流速 0.8 mL/min, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 检测波长 280 nm. 黄酮测定流动相 A 为 0.2% 磷酸, 流动相 B 为 80% 甲醇. 洗脱梯度为 0 min(10% B)→0.5 min(45% B)→10 min(50% B)→18 min(85% B)→18.2 min(100% B)→21.5 min(100% B)→21.9 min(10% B), 22 min 程序停止并以 10% B 后运行 6 min, 进样量 5  $\mu$ L, 流速 0.8 mL/min, 柱温 40  $^{\circ}$ C, 检测波长 360 nm, 由保留时间确定化合物, 使用外标法根据峰面积定量.

应用软件 SPSS 22.0 进行统计分析和数据处理, 每个处理重复 3 次, 每个测定重复 2 次, 以平均值  $\pm$  标准差( $M \pm SD$ )表示平均值.

## 1.4 基于高通量测序的微生物多样性分析

### 1.4.1 DNA 提取及高通量测序

将样品充分混匀, 每份样品随机取样 3 次(每次 2 g)分别用液氮充分研磨, 通过磁珠组织 DNA 提取试剂盒提取样品基因组, 利用微量核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度及纯度, 将 3 个重复提取的基因组 DNA 混合, 利用 Illumina Miseq 高通量测序平台对真菌 DNA 片段 18S V4 区、细菌 16S V3-V4 区进行双末端测序.

### 1.4.2 高通量测序数据分析

下机数据经过滤, 首先运用 QIIME 软件识别疑问序列, 随后, 通过 QIIME 软件检查并剔除嵌合体序列, 去除可能含有模糊碱基(ambiguous)、单碱基高复区(homologous), 得到有效序列(序列长度大于 150 bp), 利用软件 UCLUST 对前述获得的序列按 97% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分, 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列<sup>[14]</sup>, 通过 RDP classifier 软件将 OTU 代表序列与真菌 ITS 数据库(UNITE)、真菌 18S rRNA 数据库(Silva)和细菌 16S rRNA 数据库(Greengenes)比对进行物种注释, 基于 OTU 的表达谱数据和物种注释结果对样品中微生物物种丰度与多样性进行分析, 用软件 Canoco5.0 进行主成分分析(principal component analysis, PCA).

## 2 结果与分析

### 2.1 两种发酵过程茶叶生化成分测定与比较

测定 2 种发酵方式普洱茶样品及发酵原料的水浸出物、茶多酚、氨基酸、咖啡碱和没食子酸等质量分数见表 2. 由表 2 可知, 经发酵后, 茶多酚、游离氨基酸、茶红素质量分数均降低( $p < 0.05$ ), 茶多酚由原料的 29.84% 下降为出堆样的 11.01% 和 11.60%, 游离氨基酸由 3.12% 下降为 1.31% 和 1.69%, 茶红素由 2.71% 下降为 0.97% 和 1.61%. 2 种发酵方式水浸出物、茶黄素和没食子酸质量分数先升高后降低, 均显著低于原料质量分数( $p < 0.05$ ); 而可溶性糖和咖啡碱质量分数较原料显著升高( $p < 0.05$ ). 另外, 传统渥堆发酵茶样中游离氨基酸和茶红素下降较浅盘发酵明显, 出堆样中鞣花酸质量分数也显著高于浅盘发酵( $p < 0.05$ ).

表 2 发酵样品及原料中水浸出物、茶多酚、氨基酸、多糖和咖啡碱等质量分数

样品 编号	水浸出物/ %	茶多酚/ %	游离氨 基酸/%	可溶性糖/ %	茶红素/ %	茶黄素/ %	茶褐素/ %	咖啡碱/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	没食子酸/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	鞣花酸/ ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
RM	43.74 $\pm$ 0.1fg	29.84 $\pm$ 0.1a	3.12 $\pm$ 0.0b	4.80 $\pm$ 0.1i	2.71 $\pm$ 0.1b	0.08 $\pm$ 0.0e	1.12 $\pm$ 0.2h	35.01 $\pm$ 0.3c	2.98 $\pm$ 0.1h	8.53 $\pm$ 0.4b
PF1	47.80 $\pm$ 0.8b	14.73 $\pm$ 0.3c	2.66 $\pm$ 0.0c	5.13 $\pm$ 0.2h	2.60 $\pm$ 0.3b	0.08 $\pm$ 0.0e	1.28 $\pm$ 0.4g	37.83 $\pm$ 1.4b	17.21 $\pm$ 0.9c	8.90 $\pm$ 0.5b
PF2	51.71 $\pm$ 0.8a	11.90 $\pm$ 0.3d	2.52 $\pm$ 0.0d	5.16 $\pm$ 0.0h	3.04 $\pm$ 1.5a	0.16 $\pm$ 0.0a	1.93 $\pm$ 0.1f	39.48 $\pm$ 1.5b	27.86 $\pm$ 0.5a	10.92 $\pm$ 0.2a
PF3	48.47 $\pm$ 0.7b	11.70 $\pm$ 0.1de	2.31 $\pm$ 0.0g	5.35 $\pm$ 0.0f	1.94 $\pm$ 0.8c	0.11 $\pm$ 0.1c	2.47 $\pm$ 0.1d	44.06 $\pm$ 1.2a	17.53 $\pm$ 0.7c	10.39 $\pm$ 2.4a
PF4	48.35 $\pm$ 0.3b	11.30 $\pm$ 0.1f	1.69 $\pm$ 0.0i	5.37 $\pm$ 0.1ef	1.57 $\pm$ 0.1d	0.06 $\pm$ 0.0f	3.23 $\pm$ 0.4c	44.19 $\pm$ 1.5a	26.71 $\pm$ 1.5b	8.97 $\pm$ 0.3b
PF5	44.62 $\pm$ 1.0de	11.65 $\pm$ 0.1de	1.44 $\pm$ 0.0j	5.54 $\pm$ 0.0d	1.19 $\pm$ 0.9e	0.07 $\pm$ 0.0f	4.41 $\pm$ 0.1b	38.65 $\pm$ 0.4b	13.77 $\pm$ 0.4d	9.45 $\pm$ 0.3b
PF6	43.59 $\pm$ 0.4g	11.01 $\pm$ 0.1g	1.31 $\pm$ 0.0k	5.64 $\pm$ 0.0c	0.97 $\pm$ 0.1f	0.04 $\pm$ 0.1h	6.42 $\pm$ 0.5a	39.81 $\pm$ 0.4b	4.96 $\pm$ 0.7g	10.44 $\pm$ 0.4a
STF1	44.96 $\pm$ 0.9de	15.87 $\pm$ 0.3b	3.30 $\pm$ 0.0a	5.45 $\pm$ 0.0de	2.66 $\pm$ 0.2b	0.10 $\pm$ 0.0d	1.31 $\pm$ 0.1g	34.37 $\pm$ 0.8c	10.90 $\pm$ 0.8e	6.73 $\pm$ 0.3c
STF2	44.18 $\pm$ 0.8de	11.48 $\pm$ 0.3ef	2.47 $\pm$ 0.0e	5.26 $\pm$ 0.1g	2.14 $\pm$ 0.1c	0.12 $\pm$ 0.0b	1.87 $\pm$ 0.2f	37.75 $\pm$ 1.6b	10.95 $\pm$ 0.9e	6.55 $\pm$ 0.7c
STF3	38.49 $\pm$ 1.0h	11.04 $\pm$ 0.1g	2.35 $\pm$ 0.1h	5.53 $\pm$ 0.1d	1.61 $\pm$ 0.2d	0.11 $\pm$ 0.0c	2.36 $\pm$ 0.2e	39.55 $\pm$ 2.9b	11.47 $\pm$ 0.5e	5.99 $\pm$ 0.2c
STF4	46.71 $\pm$ 0.3c	10.97 $\pm$ 0.1g	1.97 $\pm$ 0.0h	5.95 $\pm$ 0.0b	1.61 $\pm$ 0.4d	0.05 $\pm$ 0.0h	2.52 $\pm$ 0.3d	44.71 $\pm$ 0.0a	9.21 $\pm$ 0.0f	5.93 $\pm$ 0.1c
STF5	45.33 $\pm$ 0.8d	11.60 $\pm$ 0.2g	1.69 $\pm$ 0.0l	6.42 $\pm$ 0.1a	1.61 $\pm$ 0.7d	0.05 $\pm$ 0.0h	2.52 $\pm$ 0.3d	39.84 $\pm$ 0.4b	4.74 $\pm$ 0.2g	6.11 $\pm$ 0.2c

注: 表中小写字母不同表示样品间化学成分质量分数差异有统计学意义,  $p < 0.05$ .

应用 HPLC 测定各样品的儿茶素和黄酮单一组分质量分数见图 1, 由图 1 可知, 除表儿茶素(EC)和没食子儿茶素(GC)外, 随着发酵进行其他儿茶素组分质量分数均降低( $p < 0.05$ ), 2 种发酵方式出堆样的儿茶素总量差异无统计学意义( $p > 0.05$ ); 传统渥堆发酵黄酮质量分数总体呈下降趋势, 且显著低于发酵原料( $p < 0.05$ ), 浅盘发酵中、后期黄酮质量分数较原料和渥堆发酵显著升高( $p < 0.05$ ), 其中山奈酚增加最为明显, 出堆样质量分数达到 2.87 mg/g, 是原料的 1.72 倍、渥堆发酵的 3.02 倍。

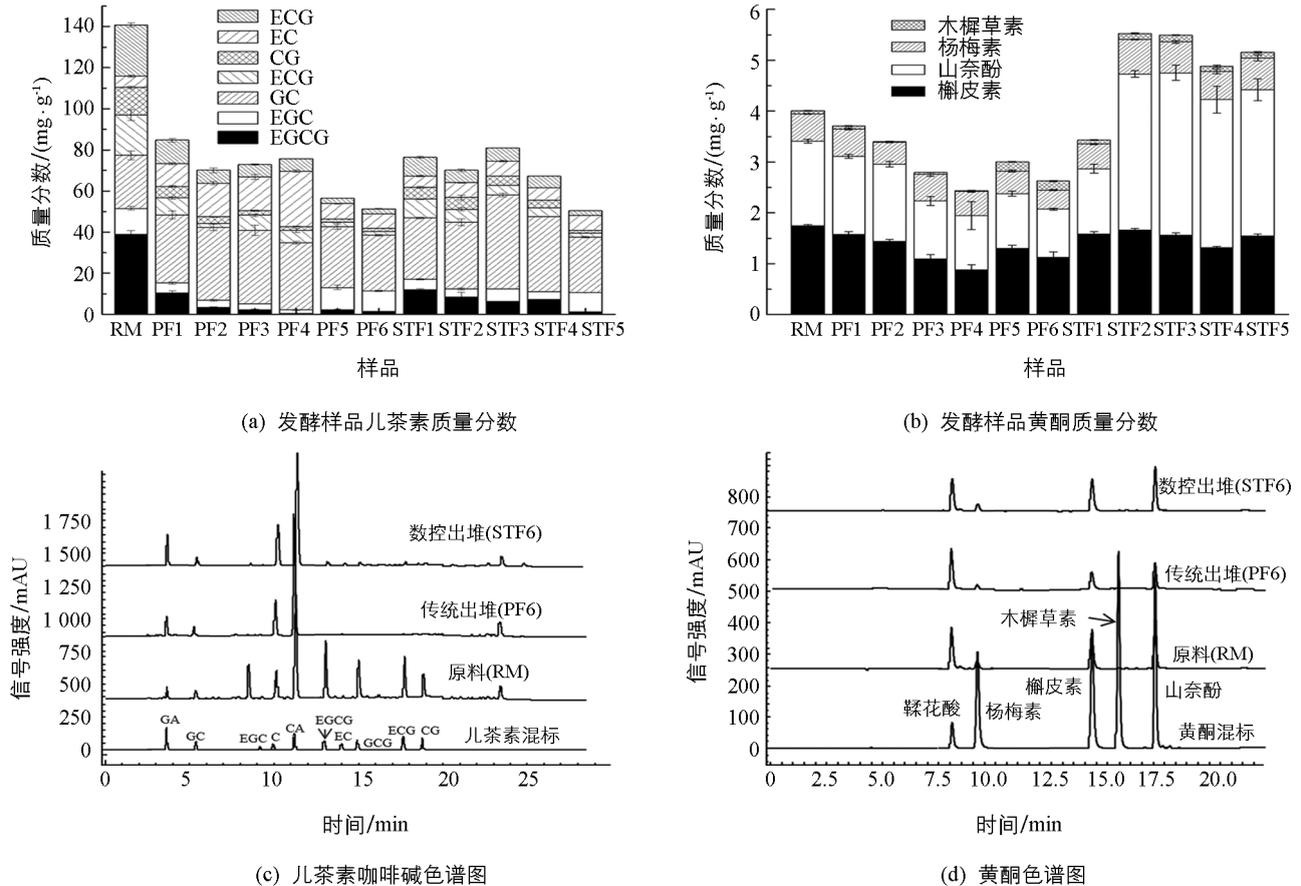


图 1 发酵样品儿茶素(a)和黄酮(b)质量分数, 儿茶素咖啡碱(c)和黄酮组分(d)测定色谱图

以发酵原料和发酵出堆样的茶多酚、儿茶素总量、游离氨基酸、可溶性糖、水浸出物、咖啡碱和黄酮等化学成分质量分数进行 PCA 分析(图 2a), 2 种发酵方式的出堆样品分别聚为一簇, 样品化学成分质量分数差异较大; 比较 2 种方式发酵出堆样品化学物质质量分数(图 2b), 可知浅盘发酵出堆样(STF5)的水浸出物、可溶性糖、茶红素和黄酮显著高于传统渥堆发酵出堆样(PF6) ( $p < 0.05$ ), 而茶褐素质量分数显著低于 PF6 ( $p < 0.05$ )。

## 2.2 发酵样品微生物群落结构与动态变化分析

### 2.2.1 微生物多样性与变化

每个样品得到 33 839~68 663 条有效序列, 在 97% 的相似水平, 进一步聚类为 405~2 249 OTUs; 各样品 shannon、simpson、Chao1 和 ACE 指数见表 3。由表 3 可知发酵前期样品细菌多样性较高, 其中传统渥堆发酵第 1 翻(PF1)、浅盘发酵第 3 翻(STF3)中细菌数量最多, 传统渥堆发酵出堆样细菌多样性和数量均高于浅盘发酵。每个样品得到 44 921~58 919 条真菌有效序列, 在 97% 的相似水平, 进一步聚类为 166~311 个 OTUs; 各样品 shannon、simpson、Chao1 和 ACE 指数见表 3。由表 3 可知传统渥堆发酵过程中真菌多样性及数量在后期较高, 浅盘发酵在第 2 翻(STF2)时真菌多样性和数量达到最大。

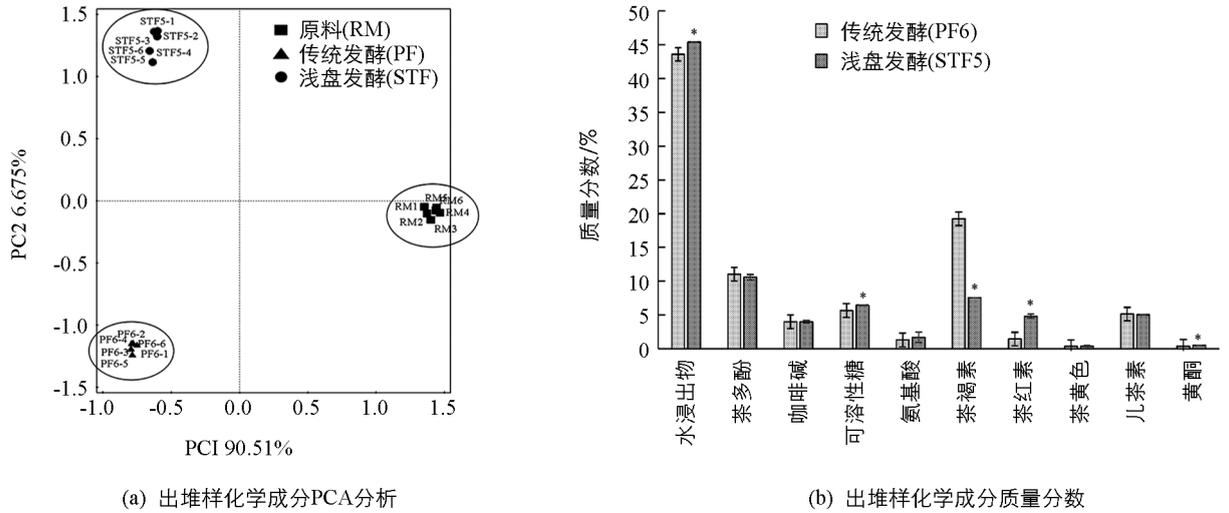


图 2 发酵原料与出堆样品化学成分主成分分析 (a) 和 2 种方式发酵出堆样品生化成分质量分数 (b)

表 3 茶样测序序列、OTU、丰度与多样性指数

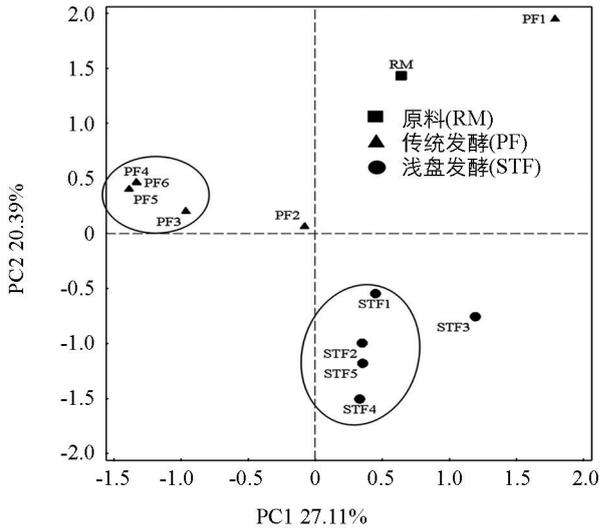
微生物类别	样品编号	RM	PF1	PF2	PF3	PF4	PF5	PF6	STF1	STF2	STF3	STF4	STF5	
细菌	高质量 reads 数	68 663	55 035	53 929	60 329	61 750	42 751	50 929	47 039	50 760	33 839	5 5703	54 840	
	OTU	1 255	2 220	2 249	1 567	2 126	2 025	405	1 296	1 640	1 732	1 865	1 674	
	菌群丰度	ACE	211	377	271	264	148	317	261	298	275	356	276	218
		Chao1	213	352	252	245	139	298	246	278	258	332	258	198
	菌群多样性	Shannon	6.08	7.09	6.18	5.9	3.58	6.79	6.58	6.31	6.48	6.7	6.57	5.32
		Simpson	0.97	0.98	0.93	0.9	0.72	0.97	0.98	0.96	0.96	0.99	0.97	0.9
真菌	高质量 reads 数	48 830	51 323	56 277	54 813	44 921	55 599	58 919	51 866	55 541	55 257	58 695	50 813	
	OTU	191	261	311	262	205	248	242	299	301	251	258	166	
	菌群丰度	ACE	203	348	402	358	359	441	452	372	426	385	393	235
		Chao1	199	344	390	362	354	462	439	363	418	383	380	231
	菌群多样性	Shannon	0.71	2.47	6.18	3.41	3.84	4.07	4.11	3.24	3.26	3.05	2.64	2.62
		Simpson	0.14	0.52	0.78	0.73	0.81	0.84	0.84	0.71	0.75	0.71	0.62	0.53

### 2.2.2 细菌群落结构与变化

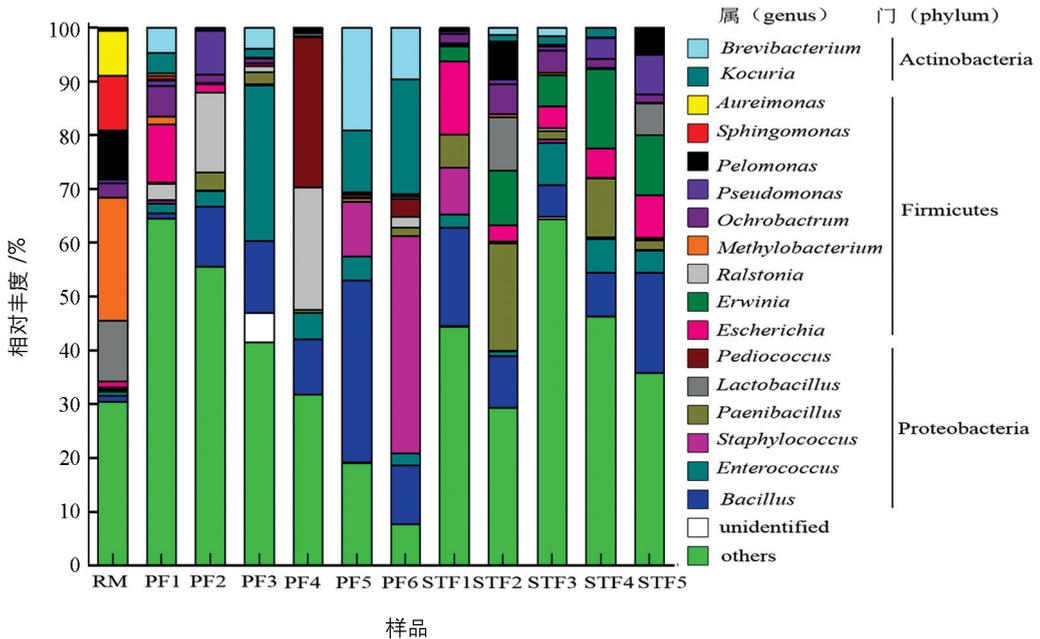
将上述聚类得到的 OTU 代表序列与细菌 16S rRNA 数据库(Greengenes)比对进行物种注释, 各发酵样品超过 90% 的序列被鉴定到属的水平, 因此后续在属水平分析群落组成. 对各样品所有属的相对丰度进行 PCA 分析(图 3a), 样品间越靠近, 说明两个样品的物种组成越相似, 由图可知样品 RM(晒青茶)与其他发酵阶段的样品细菌多样性相差最远, 传统渥堆发酵中后期 PF3, PF4, PF5, PF6 和浅盘发酵前期、后期 STF1, STF2, STF4, STF5 分别聚成一簇, 较相近.

选取相对丰度大于 5% 的细菌属进行分析, 各发酵样品属水平的物种表达谱见图 3b. 由图可知, 发酵普洱茶样品中细菌主要以厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)为主, 各样品属级分类单元细菌的结构变化为, 发酵原料的优势菌是甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、青枯菌属(*Ralstonia*)和鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*), 传统渥堆发酵前期, 3 翻、4 翻样品的优势菌为肠球菌属(*Enterococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和片球菌属(*Pediococcus*); 出堆样的优势菌是芽孢杆菌属

(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)和考克菌(*Kocuria*)，相对丰度分别为 10.85%，40.40%，9.57%和 21.35%；浅盘发酵前期，1 翻、2 翻的优势菌为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)，发酵出堆样中欧文氏菌属(*Erwinia*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)成为优势菌，分别占 8.06%和 18.64%。



(a) 细菌群落PCA分析



(b) 细菌群落组成

others 指图中未显示的其他分类单元的和。

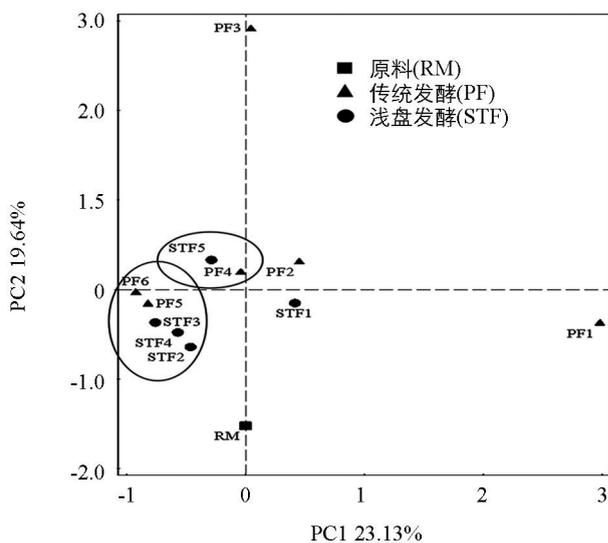
图 3 发酵茶样细菌群落 PCA 分析(a)与群落组成(b)

### 2.2.3 真菌群落结构与动态变化

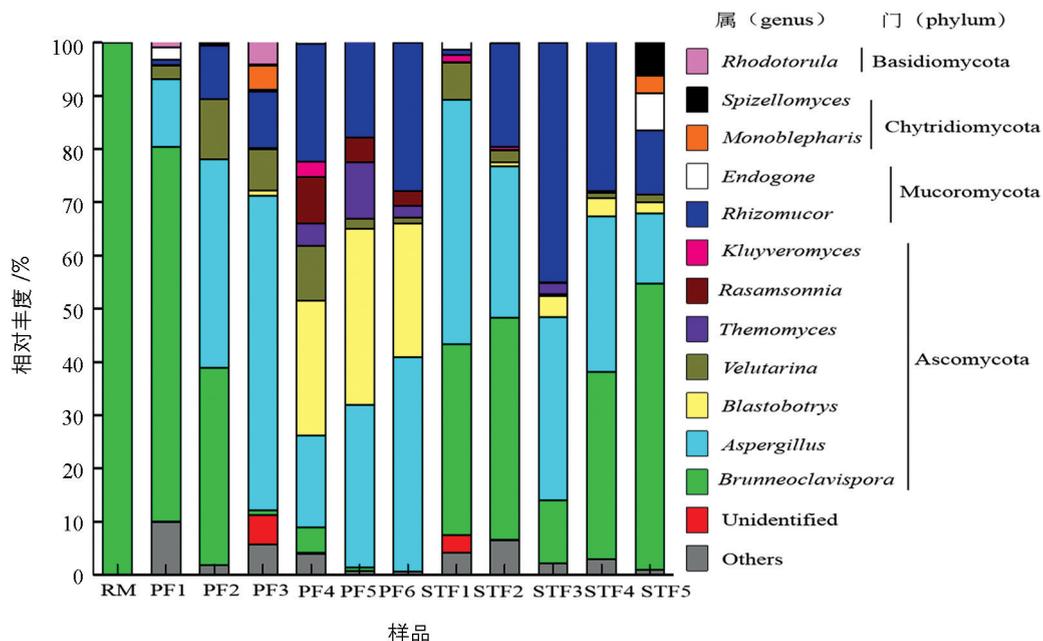
将聚类得到的 OTU 代表序列与真菌 ITS 数据库(UNITE)、真菌 18S rRNA 数据库(Silva)比对进行物种注释,各发酵样品超过 90%的序列被鉴定到属的水平,因此后续在属水平分析群落组成.对各样品所有属的相对丰度进行 PCA 分析(图 4a),由图可知样品 RM(晒青茶)与其他发酵阶段的样品真菌多样性相差最远,浅盘发酵前、中期 STF2,STF3,STF4 和传统渥堆发酵后期 PF5,PF6 聚成一簇,较相近。

发酵样品真菌主要以子囊菌门(Ascomycota)和毛霉门(Mucoromycota)为主,各样品属级分类单元真

菌结构为, 发酵原料以 *Brunneoclavispora* 为主, 占 99.97%, 随着发酵的进行, 其在 2 种发酵方式中的相对丰度均降低, 变为 0.01% 和 53.84%; *Brunneoclavispora*, 根毛霉(*Rhizomucor*)和曲霉属(*Aspergillus*)共同成为 2 种发酵方式的优势菌, 除 *Brunneoclavispora* 外, 均是后发酵产生的真菌; 传统发酵出堆样品优势真菌是曲霉属(*Aspergillus*)、芽生葡萄孢酵母属(*Blastobotrys*)和根毛霉(*Rhizomucor*), 相对丰度分别为 40.28%, 25.17% 和 27.89%; 浅盘发酵出堆样品的优势真菌是 *Brunneoclavispora* 和曲霉属(*Aspergillus*), 相对丰度分别为 53.84% 和 13.17%. 此外, 在浅盘发酵出堆样中检测到了内囊霉属(*Endogone*)和棘孢霉属(*Spizellomyces*), 相对丰度分别为 7.02% 和 6.15%, 这两属真菌在传统渥堆发酵出堆样中并未检测到。



(a) 真菌群落PCA分析



(b) 真菌群落组成

others 指图中未显示的其他分类单元的和。

图 4 发酵茶样真菌群落 PCA 分析 (a) 与群落组成 (b)

### 3 讨论和结论

本研究应用浅盘系统和传统渥堆方法进行普洱茶发酵,通过测定发酵样品的化学成分发现,2种发酵过程茶多酚、游离氨基酸、茶红素和儿茶素质量分数降低;茶褐素、咖啡碱质量分数增加;水浸出物、茶黄素、没食子酸质量分数先升高后降低,研究结果与罗龙新等<sup>[15]</sup>报道基本一致,传统渥堆总黄酮质量分数变化与李华等<sup>[16]</sup>研究结果相符,而浅盘发酵出堆样中总黄酮质量分数较李家华等<sup>[16]</sup>研究结果高.以生化成分进行 PCA 分析发现浅盘发酵与传统发酵出堆样品聚成不同的簇,进一步比较发现浅盘发酵出堆样的主要呈味物质茶多酚、水浸出物和咖啡碱等质量分数高于传统渥堆发酵,表明 2 种发酵方式化学成分变化规律类似,但是出堆样品化学成分质量分数差异有统计学意义.

目前已从普洱茶发酵产品中分离鉴定出曲霉属、青霉属等真菌,以及放线菌和芽孢杆菌等多种细菌<sup>[17-18]</sup>.另外,应用 PCR 变性梯度凝胶电泳<sup>[19-21]</sup>、454 焦磷酸测序等免培养技术<sup>[19]</sup>,基本阐明了发酵过程微生物多样性与动态变化,已有研究表明,阐明微生物在后发酵中的作用是研究普洱茶品质形成的前提与关键.本文应用 Illumina Miseq 高通量测序,结合生物信息学分析了 2 种发酵方式普洱茶的微生物多样性差异,发现普洱茶发酵原料的优势细菌为甲基杆菌属、青枯菌属和鞘脂单胞菌属, *Brunneoclavispora* 为原料中绝对优势真菌,占 99.97%;发酵初、中期优势细菌为肠球菌属、片球菌属和类芽孢杆菌属,后期优势细菌为芽孢杆菌;发酵初期优势真菌为 *Brunneoclavispora* 和曲霉属,发酵中、后期根毛霉大量繁殖,与曲霉属真菌共同成为优势真菌,以上研究结果与已有研究结果基本一致<sup>[22-24]</sup>.此外,传统渥堆发酵出堆样品中检测到大量优势细菌考克菌、葡萄球菌属和短杆菌属,而浅盘发酵中丰度很低,囊霉属、欧文氏菌属和棘孢霉属为浅盘发酵出堆样中特有的真菌群落.

本研究测定发现两种方式普洱茶发酵过程化学成分与微生物存在差异,但感官审评表明发酵普洱茶均具有甘滑、醇厚的特点,表明浅盘发酵系统也可以进行发酵,缩短发酵时间,得到品质符合要求的普洱茶.但是,发酵过程的条件控制,微生物变化及其与化学成分之间的关系还需要进一步研究.

#### 参考文献:

- [1] LV H P, ZHANG Y J, LIN Z, et al. Processing and Chemical Constituents of Pu-Erh Tea: A Review [J]. Food Research International, 2013, 53(2): 608-618.
- [2] LEE L K, FOO K Y. Recent Advances on the Beneficial Use and Health Implications of Pu-Erh Tea [J]. Food Research International, 2013, 53(2): 619-628.
- [3] 赵明,周玲,李家华,等.普洱茶英文科技论文研究概述 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(35): 400-408.
- [4] 朱永兴. 中国历年茶叶出口量和出口值(分茶类) [J]. 茶叶科学, 2013, 33(1): 33.
- [5] 宛晓春. 茶叶生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [6] 朱广鑫,周红杰,赵明. 普洱茶发酵技术研究进展 [J]. 江西农业学报, 2011(5): 76-81.
- [7] 许贇荣,胡文锋. 固态发酵原理、设备与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [8] 隋文杰,刘锐,吴涛,等. 固态发酵在食品加工中的应用研究进展 [J]. 生物产业技术, 2018(3): 13-23.
- [9] 王兴华,念波,段双梅,等. 数控与传统发酵普洱茶抗氧化活性与化学成分的比较 [J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 138-143.
- [10] 周卫龙. GB《茶水浸出物测定》的测定方法研究 [J]. 中国茶叶加工, 1999(2): 36-38.
- [11] 中华全国供销合作总社杭州茶叶研究所. 茶多酚测定: GB/T 8313-2002 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [12] 傅博强,谢明勇,聂少平,等. 茶叶中多糖含量的测定 [J]. 食品科学, 2001(11): 69-73.
- [13] 谭和平,叶善蓉,陈丽,等. 茶叶中色素的测试方法概述 [J]. 中国测试, 2009(2): 78-82.
- [14] EDGAR R C. UPARSE: Highly Accurate OTU Sequences from Microbial Amplicon Reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [15] 罗龙新,吴小崇,邓余良,等. 云南普洱茶渥堆过程中生化成分的变化及其与品质形成的关系 [J]. 茶叶科学, 1998, 18(1): 53-60.
- [16] 李家华,赵明,胡艳萍,等. 普洱茶发酵过程中黄酮醇类物质含量变化的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2012, 34(2): 59-65.

- [17] 高晓余, 严 亮, 赵 艳, 等. 微生物多样性与普洱茶品质关系研究进展 [J]. 广东农业科学, 2014, 41(22): 13-17.
- [18] 朱宏涛, 杨崇仁, 李 元, 等. 普洱茶后发酵过程中微生物的研究进展 [J]. 云南植物研究, 2008, 30(6): 718-724.
- [19] 赵 明, 张冬莲, 袁文侠, 等. 普洱茶发酵过程微生物多样性的 454 pyrosequencing 研究 [C]. 昆明: 第十六届中国科协年会论文集, 2014.
- [20] 张 阳, 赵树欣, 梁慧珍, 等. 普洱茶发酵过程中真菌群落结构的变化分析 [J]. 中国酿造, 2012, 31(1): 122-125.
- [21] ABE M, TAKAOKA N, IDEMOTO Y, et al. Characteristic Fungi Observed in the Fermentation Process for Puer Tea [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(2): 199-203.
- [22] 苏小琴. 普洱茶发酵过程微生物群落与蛋白的多组学研究 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2016.
- [23] 白飞荣, 姚 粟, 田海霞, 等. 基于高通量测序和可培养方法的勐海发酵普洱茶真菌多样性分析 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 43-51.
- [24] 杨晓苹, 罗剑飞, 刘 昕, 等. 普洱茶固态发酵过程中微生物群落结构及变化 [J]. 食品科学, 2013, 34(19): 142-147.

## A Comparative Study of Microbial Community and Chemical Components Between the Shallow Tray and the Traditional Fermentation Systems of Pu-erh Tea

WANG Xing-hua<sup>1,3</sup>, JIANG Bin<sup>2</sup>, WANG Li-yan<sup>2</sup>, MA Yan<sup>2</sup>,  
LUO Chao-guang<sup>1,3</sup>, JIANG Xun<sup>1,3</sup>, CUI Ting-hong<sup>1,3</sup>,  
HU Yan-ping<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1,3</sup>, ZHENG Wen-zhong<sup>1,3</sup>,  
YAO Qi-ping<sup>1,3</sup>, YAN Liang<sup>4</sup>, ZHAO Ming<sup>2</sup>

1. Pu-er Tea Variety Multiplication Farm of Yunnan, Puer Yunnan 665000, China;

2. College of Long Run Pu-erh Tea, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. Pu-erh Tea Variety Multiplication Farm, Puer Yunnan 665000, China;

4. Pu-erh Institute of Pu-erh Tea, Puer Yunnan 665000, China

**Abstract:** Traditionally, the system of pile fermentation is used for the fermentation of tons of Pu-erh tea. Such a system has a disadvantage of uneven transfer of heat. In order to improve heat transfer in Pu-erh tea fermentation, the authors have developed a shallow tray fermentation system. In a study reported herein, the microbial community structure and the chemical composition in the two systems were compared so as to evaluate the feasibility of the shallow tray fermentation system. Determination showed that the change laws of chemical compounds were similar in both fermentation systems. However, in the final fermented tea leaves, the contents of water extract, soluble sugars, thearubigins and flavonols were significantly higher and theabrownine was significantly lower in shallow tray fermentation than in traditional fermentation. The structure of microbial communities in the final fermented tea leaves was different. The dominant bacteria in the final fermented tea leaves were *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Kocuria* and the dominant fungi were *Aspergillus*, *Blastobotrys* and *Rhizomucor* in pile fermentation. In contrast, the dominant bacteria in the final fermented tea leaves were *Bacillus* and *Erwinia* and the dominant fungi were *Brunneoclavispora* and *Aspergillus* in shallow tray fermentation. Sensory evaluation indicated that the final fermented tea leaves of both systems were of good quality. In our further work, the condition control of shallow tray fermentation is to be investigated so as to produce better and stable Pu-erh tea products.

**Key words:** Pu-erh tea; pile fermentation; shallow tray fermentation; high-throughput sequencing; microbial diversity