

# 镂空发酵普洱茶菌群结构与风味的分析

张文芳<sup>1</sup>, 张会敏<sup>1</sup>, 韩肋撒<sup>1</sup>, 吕斌<sup>2</sup>, 邢新会<sup>3</sup>, 闫春波<sup>2</sup>, 王怡<sup>3</sup>, 罗浩<sup>2</sup>, 欧书剑<sup>2</sup>, 薛正莲<sup>1\*</sup>

(1. 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽芜湖 241000)

(2. 云南书剑茶叶有限公司, 云南西双版纳 650000) (3. 清华大学化工系, 北京 100084)

**摘要:** 微生物菌群及其发酵方式影响普洱茶发酵过程中微生物的生长代谢, 最终影响普洱茶发酵品质。该研究通过感官评测、理化检测、扩增子高通量测序和高效液相色谱-质谱联用研究镂空发酵对普洱茶理化参数、菌群结构和风味影响。结果表明: 镂空发酵普洱茶与传统接地发酵普洱茶感官评测结果无显著差异。两者菌群聚类较接近。镂空发酵普洱茶中真核菌群物种丰度提高, 原核菌群的物种丰度和多样性指数显著降低。镂空发酵普洱茶 *Rasamsonia* (8.02%→32.29%) 及 Unclassified Micrococcaceae (8.51%→18.36%) 的相对丰度显著提高, *Aspergillus* (46.03%→28.91%), *Blastobotrys* (10.14%→1.4%) 及 *Bacillus* (7.11%→0.60%) 的相对丰度显著降低。同时, 镂空发酵普洱茶的 pH 值 (6.07→6.55)、可溶性多糖 (21.70→28.29 mg/g)、茶褐素 (86.41→109.43 mg/g) 和咖啡因 (1.59→4.59) 显著较高; 而游离氨基酸绝对含量 (7.23→7.03 mg/g) 和儿茶素类 (0.06→0.01) 相对含量显著较低。冗余分析表明茶多酚和表儿茶素没食子酸酯与真核菌群显著相关, 总黄酮和表儿茶素没食子酸酯与原核菌群显著相关。该研究为普洱茶的传统发酵工艺改良提供理论支持。

**关键词:** 发酵普洱茶; 镂空发酵; 传统接地发酵; 菌群结构; 风味成分

文章编号: 1673-9078(2025)05-302-311

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0177

## Analysis of the Microbial Community Structure and Flavor of Hollow-fermented Pu-erh Tea

ZHANG Wenfang<sup>1</sup>, ZHANG Huimin<sup>1</sup>, HAN Leisa<sup>1</sup>, LYU Bin<sup>2</sup>, XING Xinhui<sup>3</sup>, YAN Chunbo<sup>2</sup>,  
WANG Yi<sup>3</sup>, LUO Hao<sup>2</sup>, OU Shujian<sup>2</sup>, XUE Zhenglian<sup>1\*</sup>

(1. College of Biology and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

(2. Yunnan Shujian Tea Co. Ltd., Xishuangbanna 650000, China)

(3. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** The microbial flora and fermentation methods affect the growth and metabolism of microorganisms during the fermentation of Pu-erh tea, which ultimately affects its fermentation quality. In this study, sensory evaluation, physicochemical analyses, amplicon high-throughput sequencing, and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry were used to investigate the effects of hollow-fermentation on Pu-erh tea's physicochemical parameters, microbial community structure and flavor. The results showed that there was no significant sensory difference between the

引文格式:

张文芳,张会敏,韩肋撒,等. 镂空发酵普洱茶菌群结构与风味的分析[J].现代食品科技,2025,41(5):302-311.

ZHANG Wenfang, ZHANG Huimin, HAN Leisa, et al. Analysis of the microbial community structure and flavor of hollow-fermented Pu-erh tea [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 302-311.

收稿日期: 2024-02-07

基金项目: 书剑古茶发酵菌群研究项目 (KH10001725)

作者简介: 张文芳 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: 17856691286@163.com

通讯作者: 薛正莲 (1967-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 工业微生物育种, E-mail: xuezl@ahpu.edu.cn

hollow-fermented Pu-erh tea and traditional ground-fermented Pu-erh tea; and the microbial clustering of the two types of tea resembled. Compared with the traditional grounded-fermented Pu-erh tea, the species abundance of the eukaryotic microbiota in the hollow-fermented Pu-erh tea increased whilst the species abundance and diversity indices of its prokaryotic microbiota decreased significantly. For the hollow-fermented Pu-erh tea, the relative abundance of *Rasamsonia* (8.02%→32.29%) and Unclassified Micrococcaceae (8.51%→18.36%) increased significantly, whereas, the relative abundance of *Aspergillus* (46.03%→28.91%), *Blastobotrys* (10.14%→1.4%) and *Bacillus* (7.11%→0.60%) decreased. Meanwhile, the absolute values of pH (6.07→6.55), the contents of soluble polysaccharides (21.70→28.29 mg/g), theabrownin (86.41→109.43 mg/g), and caffeine (1.59→4.59) were significantly higher in hollow-fermented Pu-erh tea. The absolute contents of free amino acids (7.23→7.03 mg/g) and the relative contents of catechins (0.06→0.01) were significantly lower. Redundancy analysis showed that tea polyphenols and epicatechin gallate were significantly correlated with eukaryotic microbiota, while total flavonoids and epicatechin gallate were significantly correlated with prokaryotic microbiota. This study provides theoretical support for the improvement of traditional Pu-erh tea fermentation process.

**Key words:** fermented Pu-erh tea; hollow-fermentation; traditional ground-fermentation; microbial community structure; flavor components

发酵普洱茶（即“普洱熟茶”）是以云南大叶种（*Camellia sinensis* var. *assamica*）晒青毛茶（压制形成“普洱生茶”）为原料发酵而成<sup>[1]</sup>。传统发酵是在地面发酵池中以与地面直接接触的方式进行发酵<sup>[2,3]</sup>，即传统接地发酵方式。在传统接地发酵过程中，发酵菌群通过生长代谢将晒青毛茶中的茶多酚、黄酮、蛋白质、纤维素等大分子物质降解，生成茶褐素、单糖、有机酸等风味成分<sup>[2-5]</sup>。与“普洱生茶”相比，发酵普洱茶涩味降低，同时醇厚、顺滑的口感提高<sup>[6]</sup>。因此，发酵菌群对普洱茶品质具有重要影响<sup>[7]</sup>。已知，普洱茶发酵菌群来源于茶树根系土壤、茶叶叶片、空气、发酵地面等与发酵原料和发酵环境相关的体系<sup>[8,9]</sup>。因此，如何在保证环境微生物参与普洱茶发酵的情况下提高其卫生性能是普洱茶发酵研究的重要方面。近年来，普洱茶现代发酵技术不断创新<sup>[10]</sup>，如恒温恒湿数控发酵和立体小罐发酵，其卫生要求普遍提高，但也可能其因缺少发酵池中微生物菌群的充分参与而导致发酵的普洱茶风味成分有所失调，口感欠缺<sup>[11-13]</sup>。基于此，云南书剑茶叶有限公司在传统接地发酵方式基础上，将发酵池底部与地面之间做镂空处理，设计不锈钢发酵池（专利号：CN216018919U）进行发酵，即镂空发酵方式。该镂空发酵方式将原料茶叶主体置于池体内离地的底部及四周镂空的不锈钢框体内（图1b），保证茶叶卫生性能的同时，不影响空气中的微生物菌群参与茶叶的发酵<sup>[8]</sup>。与传统接地发酵菌群相比，镂空发酵菌群缺乏与地面的直接接触，其菌群结构、感官评测、风味成分的变化尚未明确。因此，有必要

深入分析镂空发酵普洱茶在菌群结构、风味成分及口感变化，为普洱茶发酵工艺定向改良提供理论依据。

本研究为分析镂空发酵工艺普洱茶菌群结构、口感和风味成分的变化，以传统接地发酵为对照进行如下研究：首先，以晒青毛茶为原料，分别通过传统接地发酵和镂空发酵对普洱茶进行发酵得到对照样本和实验样本；其次，通过感官评测获得两组普洱茶样本的感官品质差异；然后，通过理化检测分析两组普洱茶样本的理化参数和主要风味成分；然后，通过16S rRNA、内源转录间隔区（Internally Transcribed Spacer, ITS）扩增子高通量测序分析两组普洱茶样本菌群结构及其差异；然后，通过高效液相-质谱联用（High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS）分析两组普洱茶样本非挥发性风味成分差异；通过冗余分析（Redundancy Analysis, RDA）探究发酵菌群与理化参数、风味成分的相关性。本研究为普洱茶发酵工艺改良提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

葡萄糖、没食子酸、L-茶氨酸、芦丁等标准品购于上海麦克林生化科技股份有限公司；其余试剂购于生工生物工程（上海）股份有限公司与国药集团化学试剂有限公司，以上均为分析纯。

### 1.2 仪器

ZBRTD-211 恒温水浴锅，上海力辰邦西仪器科

技术有限公司；PH-100pro pH计，上海力辰邦西仪器科技有限公司；V5000可见分光光度计，上海力辰邦西仪器科技有限公司；TLE104E/02分析天平，上海梅特勒-托利多仪器有限公司；Tecator digester 20消化炉，丹麦福斯公司；BXH-280烘干箱，上海博迅实业有限公司；Heraeus Fresco17离心机，美国赛默飞世尔科技公司；ExionLC AD高效液相，美国赛默飞世尔科技公司；QTrap 6500+高灵敏度质谱，美国赛默飞世尔科技公司。

### 1.3 普洱茶发酵

2021年3月选取云南勐海茶山春茶依次经过萎凋、杀青、揉捻、晒干制成晒青毛茶(PuerO)，并分别取200 kg晒青毛茶为原料分别如图1a、1b所示的发酵池内进行传统接地发酵和镂空发酵，参照传统普洱茶发酵工艺进行<sup>[3]</sup>，本实验茶叶初始含水量为35%，每7 d翻一次堆并加3%水，发酵28 d结束，发酵结束样本分别命名为传统接地发酵普洱茶(PuerG)、镂空发酵普洱茶(PuerH)。分别取晒青毛茶100 g以及普洱茶发酵结束后不同方位的6个位点的堆心(堆深30 cm以上)与表面(堆深10 cm之内)各50 g样本混匀<sup>[14]</sup>，为保证样本更具代表性，从混匀的样本中取出6个重复样本，于-20 ℃保存备用。茶叶样本详细信息如表1所示。

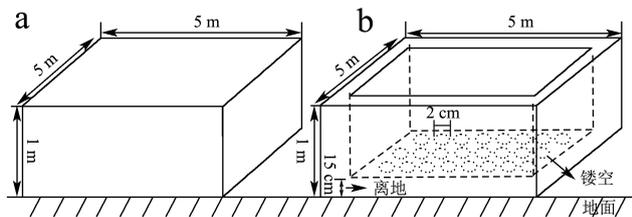


图1 接地(a)、镂空(b)发酵装置图

Fig.1 Grounded (a), hollow (b) fermentation device diagram

注：镂空发酵池框体离地15 cm，且框体底部与四周都有直径为2 cm的圆孔。

表1 普洱茶样本的详细信息

Table 1 The detailed information of Pu-erh tea samples

样品名称	类型	取样时间
PuerO	晒青毛茶	2021年3月
PuerG	传统接地发酵普洱茶	2021年4月
PuerH	镂空发酵普洱茶	2021年4月

### 1.4 感官评测

六名专业审评人员对普洱茶样品进行评估。称取3 g茶叶加入150 mL纯净水于100 ℃下浸泡5 min，随后转移到白色瓷碗中，参照GB/T 14487-2017评定两组普洱茶样本的色泽、香气、滋味、汤色进行品鉴<sup>[15]</sup>。其中，叶片越紧实，显毫毛程度越高，汤色越红浓，香气越浓厚，滋味越浓醇，叶底嫩度越高，感官评测的得分越高。

### 1.5 理化参数和主要风味成分的检测

茶叶样本的温度利用温度计检测；pH值的检测是将2 g茶叶样本常温浸泡于20 mL去离子水静置20 min<sup>[16]</sup>。通过比色法和滴定法检测茶样样本中主要风味成分的绝对定量。茶样样本中茶多酚通过GB/T 31740.2-2015福林酚比色法检测；茶褐素通过萃取比色法检测<sup>[17,18]</sup>；蛋白质通过GB/T 5009.5-2016凯氏定氮法检测；总游离氨基酸通过GB/T 8314-1987茚三酮比色法检测；可溶性多糖通过蒽酮比色法检测<sup>[2]</sup>；总黄酮通过三氯化铝比色法检测<sup>[19]</sup>；纤维素和木质素通过滴定法检测<sup>[20]</sup>。

### 1.6 扩增子高通量测序

采用DNA试剂盒(M5635-02)提取普洱茶样本宏基因组DNA，通过ITS1F-ITS2R引物(ITS1F: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS2R: 5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GCT-3')对真核ITS 1区目标序列进行扩增，通过338F-806R引物(338F: 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC A-3'; 806R: 5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3')对原核16S rRNA V3-V4区目标序列进行扩增。委托上海派森诺生物技术有限公司NovaSeq6000平台进行扩增子测序。

### 1.7 HPLC-MS分析

通过非靶向HPLC-MS对茶样样本中非挥发性风味成分进行相对定量检测。将普洱茶样本冷冻干燥，研磨成粉末，称取10 mg的样本到离心管中，加入500 μL的含内标且经-40 ℃预冷的φ=75%甲醇(内标2-氯苯丙氨酸: 1 mg/L)；涡旋30 s，40 Hz匀浆4 min，冰水浴超声5 min；重复匀浆超声3次；在混匀仪上4 ℃过夜。然后在4 ℃，12 000 r/min条件下离心15 min，0.22 μm微孔滤膜过滤。用含内标的φ=75%甲醇稀释10倍，涡旋30 s。

表 2 普洱茶茶样本感官审评结果

Table 2 Results of sensory evaluation of Pu-erh tea samples

样本	外形	汤色	香气	滋味	叶底	总分
PuerG	较紧结, 尚显毫, 色泽红褐, 尚匀净, 稍有梗片	深红明亮	陈香浓厚	浓醇回甘	红褐尚嫩	85.32 ± 0.75
PuerH	较紧结, 尚显毫, 色泽红褐, 尚匀净, 稍有梗片	红浓明亮	陈香浓厚	浓醇回甘	红褐尚嫩	85.83 ± 0.55

注: 总分 = 外形得分 × 0.20 + 汤色得分 × 0.15 + 香气得分 × 0.25 + 滋味得分 × 0.30 + 叶底得分 × 0.10; n=6。

表 3 普洱茶样本的理化参数和主要风味成分

Table 3 Physicochemical parameters and major flavor components of Pu-erh tea samples

理化指标	PuerO	PuerG	PuerH
pH 值	5.56±0.03 <sup>c</sup>	6.07±0.03 <sup>b</sup>	6.55±0.03 <sup>a</sup>
可溶性多糖/(mg/g)	14.63±0.6 <sup>c</sup>	21.70±1.01 <sup>b</sup>	28.29±0.48 <sup>a</sup>
茶多酚/(mg/g)	216.21±3.00 <sup>a</sup>	82.44±2.07 <sup>b</sup>	84.22±3.79 <sup>b</sup>
游离氨基酸/(mg/g)	12.82±0.03 <sup>a</sup>	7.23±0.03 <sup>b</sup>	7.03±0.05 <sup>c</sup>
总黄酮/(mg/g)	17.50±0.19 <sup>c</sup>	47.89±0.19 <sup>b</sup>	48.63±0 <sup>a</sup>
蛋白质/(mg/g)	295.31±0 <sup>b</sup>	360.94±15.47 <sup>a</sup>	328.13±15.46 <sup>ab</sup>
茶褐素/(mg/g)	18.17±0.22 <sup>c</sup>	86.41±0.49 <sup>b</sup>	109.43±0.28 <sup>a</sup>
纤维素/(mg/g)	169.44±3.93 <sup>a</sup>	163.89±4.81 <sup>b</sup>	161.11±4.81 <sup>b</sup>
木质素/(mg/g)	91.67±5.89 <sup>b</sup>	487.5±3.4 <sup>a</sup>	459.72±1.96 <sup>a</sup>

注: 表中参数值为: 平均值 ± 标准差; 有不同字母标记的即为差异显著 ( $P < 0.05$ ); n=6。

委托上海百趣生物有限公司进行采用 Waters Acquity HPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 进行 HPLC-MS 检测。色谱条件: 柱温: 40 °C; 流量 0.4 mL/min; 进样量: 2 μL; 流动相: 0.1% 甲酸-水 (A 相) / 乙腈 (B 相); 洗脱程序: 0~10 min, 2% 流动相 B, 10~11 min, 50% 流动相 B, 11~13 min, 95% 流动相 B, 13.1~15 min, 2% 流动相 B。质谱条件: 采用电喷雾电离 (ESI), 正负离子模式 gas1 和 gas2 为 60 psi, 帘式气体为 35 psi, 离子源温度 400 °C, 正负离子源气压分别为 5 000 V 和 -4 500 V。

## 1.8 数据分析

扩增子高通量测序的原始数据通过 QIIME2 软件进行质控、去噪、拼接、去嵌合体得到优质 ITS、16S rRNA 序列, 聚类得到优质序列得到各真核 OTUs (Operational Taxonomic Units)、原核 ASVs (Amplicon Sequence Variants)。OTUs 与 ASVs 在代表菌群丰富度和多样性方面相似<sup>[21,22]</sup>。将真核 OTUs 序列与真核数据库 (UNITE, Release 8.0)、原核 ASVs 序列与原核数据库 (Silva, Release132) 进行对比注释分别得到真核菌群 OTUs 丰度表和原核菌群 ASVs 丰度表。抽平后, 通过 QIIME2 软件计算 α 多样性指数。通过 R 语言完成主成分分析。

HPLC-MS 的原始数据通过 SCIEX Analyst

Work Station Software (1.6.3) 软件采集, 通过 ProteoWizard (4.7.2) 软件将质谱数据转换为 mzXML 格式, 并通过 MAPS 软件 (1.0) 计算谱图峰面积比值的数据矩阵, 并与 MS2 数据库注释得到风味成分, 形成完善的风味成分相对丰度表。通过 SIMCA-P 14.1 软件, 以  $P < 0.05$ 、VIP > 1 为标准并结合文献筛选风味成分<sup>[23]</sup>。通过 Origin 8.5 软件绘制相对丰度图和柱状图。通过 SPSS 27.0 方差分析 (ANOVA) 完成样本间的差异显著性分析。通过 Canoco 5.0 软件对菌群结构及理化参数和风味成分进行冗余分析 (Redundancy Analysis, RDA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 普洱茶样本感官评测

晒青毛茶 (PuerO) 外形“紧结尚显毫”, 色泽绿润, 尚匀净, 稍有梗片, 汤色呈黄绿明亮, 香气为清香尚浓, 滋味回甘, 叶底肥厚。两种发酵普洱茶的感官评测结果如表 2 所示, 镂空发酵普洱茶 (PuerH) 的感官评测结果略好于传统接地发酵普洱茶 (PuerG), 差异不显著。

### 2.2 普洱茶样本的理化参数与主要风味成分

两种发酵方式普洱茶发酵结束时含水量约

20%，无显著差异。两种方式普洱茶发酵过程中的温度变化规律一致，其中镂空发酵的温度高约 2℃，无显著差异。推测可能与镂空发酵中好氧微生物代谢旺盛产热更多有关<sup>[24]</sup>。普洱茶样本的理化参数与主要风味成分的结果如表 3 所示，两种发酵方式普洱茶（PuerG、PuerH）的可溶性多糖、总黄酮、茶褐素和木质素的含量及 pH 值显著高于晒青毛茶（ $P < 0.05$ ，下同）；而茶多酚、游离氨基酸的含量显著低于晒青毛茶。其中，与传统接地发酵普洱茶相比，镂空发酵普洱茶中可溶性多糖、总黄酮、茶褐素的含量及 pH 值较高；游离氨基酸的含量较低。推测与镂空发酵普洱茶在发酵过程中供氧更多，相对更利于 *Aspergillus*、*Rhizomucor* 和 *Rasamsonia* 等可溶性多糖、茶褐素等合成功能的好氧真核菌属大量繁殖有关<sup>[16,25,26]</sup>。已知，普洱茶发酵过程中茶碱的生成促进 pH 值升高，Li 等<sup>[3]</sup>发现 *Blastobotrys*、*Thermomyces* 与茶碱的含量呈正相关，推测镂空发酵可能更有利于以上菌属的代谢，因而导致 pH 值比传统接地发酵普洱茶的 pH 值较高。游离氨基酸的减少，推测其作为微生物生长代谢的氮源被消耗<sup>[25]</sup>，镂空发酵过程中氧气供应更多使得菌群丰度增加<sup>[24,27]</sup>，游离氨基酸被消耗的更多，故镂空发酵普洱茶中游离氨基酸的含量较低。

### 2.3 普洱茶样本菌群的 $\alpha$ 多样性参数

普洱茶样本的  $\alpha$  多样性参数如表 4 所示，两种发酵方式普洱茶的真核菌群的物种丰度（Chao1 指数）、丰富度（Shannon 指数）、多样性（Simpson 指数）显著低于晒青毛茶，原核菌群的物种丰度显著、丰富度和多样性显著高于晒青毛茶。其中，晒青毛茶样本的 99.66% 真核 OTUs 经 UNITE 数据库注释为“Unidentified Fungi”，NCBI 数据库进一步注释为 *Neomelanconium*（Query Coverage, 11%，

NR\_177137.1）、*Lysurus*（Query Coverage, 11%，NR\_119473.1）等，表明在晒青毛茶中绝大多数真核菌属为未知菌，目前尚未研究，推测其可能来自于茶叶叶片生长环境或毛茶加工环境<sup>[28,29]</sup>。与传统接地发酵相比，镂空发酵普洱茶真核菌群的物种丰度较高，原核菌群的物种丰度、丰富度和多样性显著较低，推测与镂空发酵过程更利于好氧真核菌属生长<sup>[30]</sup>，而传统接地发酵过程更利于 *Staphylococcus*、*Bacillus* 等耐热兼性厌氧菌原核菌属生长<sup>[31,32]</sup>。

### 2.4 普洱茶样本菌群结构

各样本高通量测序序列的覆盖率（Coverage）均高于 95.54%，表明测序序列具有代表性。数据分析得到 38140 个真核 OTUs、77967 个原核 ASVs。真核 OTUs 序列有 96.59% 注释到属，原核 ASVs 序列有 80.09% 注释到属（此外，还有 15.02% 注释到科，共计 95.92%）。本研究定义相对丰度大于等于 1% 的菌属为优势菌属，分别分析真核与原核优势菌属差异。

将晒青毛茶中占绝对优势的“Unidentified Fungi”（99.66%）剔除后，重点分析发酵菌群结构如图 2 所示。晒青毛茶的真核优势菌属是毕赤酵母属（*Pichia*, 13.29%）、根霉菌属（*Rhizopus*, 9.13%）及其它（Others, 55.84%）（图 2a）；两种发酵方式普洱茶共同的真核优势菌属是曲霉属（*Aspergillus*, 46.03%→28.91%）、嗜热真菌属（*Thermomyces*, 31.17%→30.59%）、罗萨氏菌属（*Rasamsonia*, 8.02%→32.29%）。与传统接地发酵普洱茶相比，镂空发酵普洱茶菌群中 *Aspergillus* 及 *Blastobotrys*（10.14%→1.4%）的相对丰度显著较低，*Rasamsonia* 的相对丰度显著较高。PCA 聚类分析（图 3a）进一步表明，与晒青毛茶相比，两种发酵方式普洱茶的菌群聚类更接近，相似性更强。

表 4 普洱茶样本菌群的  $\alpha$  多样性参数

Table 4 The alpha diversity index of microbiota in Pu-erh tea samples

样本	真核菌群的 $\alpha$ 多样性参数			原核菌群的 $\alpha$ 多样性参数		
	Chao1	Simpson	Shannon	Chao1	Simpson	Shannon
PuerO	15 773.60 ± 2 498.39 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.001 <sup>a</sup>	11.56 ± 0.38 <sup>a</sup>	85.02 ± 24.98 <sup>c</sup>	0.44 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.18 <sup>c</sup>
PuerG	223.25 ± 26.56 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.2 ± 0.13 <sup>b</sup>	580.25 ± 118.8 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.82 <sup>a</sup>
PuerH	322.51 ± 41.74 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.13 ± 0.24 <sup>b</sup>	288.68 ± 112 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.51 ± 0.64 <sup>b</sup>

注：表中参数值为：平均值 ± 标准差；有不同字母标记的即为差异显著（ $P < 0.05$ ）； $n=6$ 。

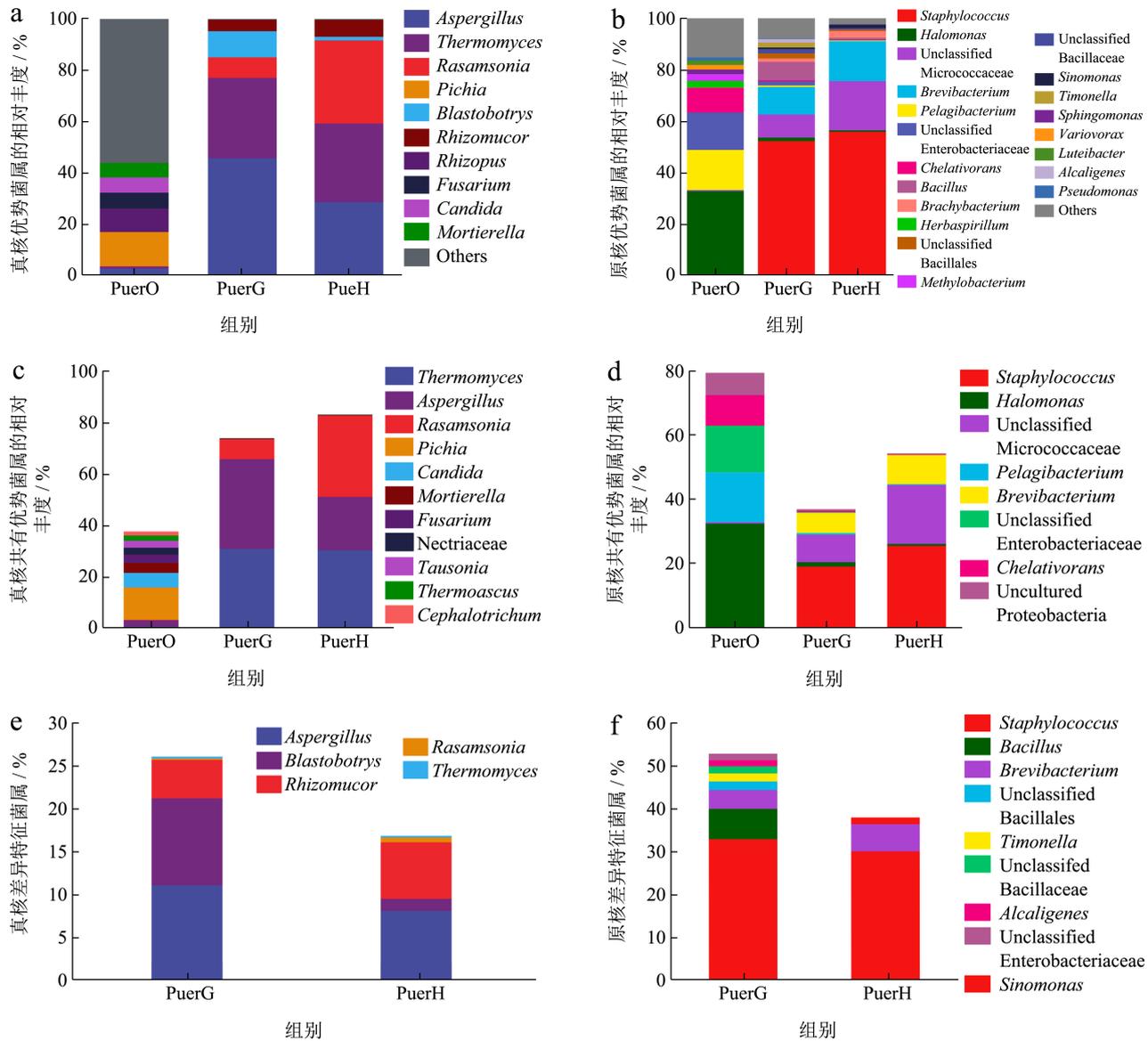


图2 普洱茶样本的真核 (a)、原核 (b) 优势菌属, 真核 (c)、原核 (d) 共有优势菌属及真核 (e)、原核 (f) 差异特征菌属的相对丰度 (Others 是非优势菌)

Fig.2 The relative abundance of dominant eukaryotic (a), prokaryotic(b) genera, co-dominant eukaryotic (c), prokaryotic (d) genera, and exclusive eukaryotic (e), and prokaryotic (f) genera in Pu-erh tea samples

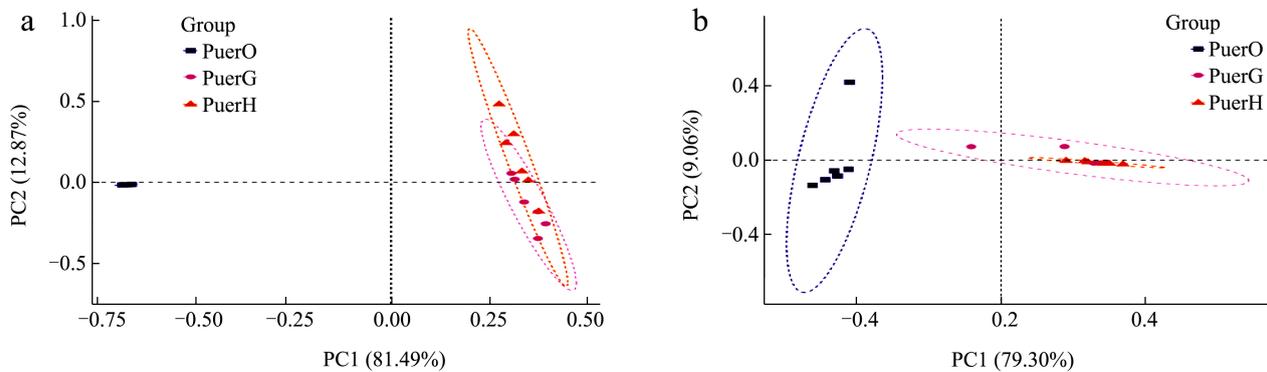


图3 普洱茶样本的真核菌群结构 (a)、原核菌群结构 (b) 的主成分分析  
 Fig.3 The principal component analysis (PCA) of Pu-erh tea samples' eukaryotic (a) and prokaryotic (b) community structure

晒青毛茶的原核优势菌属是 *Halomonas* (32.47%)、*Pelagibacterium* (15.61%)、未分类的肠杆菌科 (Unclassified Enterobacteriaceae, 14.58%) 及其它 (Others, 15.23%)。两种发酵方式普洱茶共同的原核优势菌属是葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, 2.17%→55.81%)。此外, 与传统接地发酵普洱茶相比, 镂空发酵普洱茶芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的相对丰度显著较低 (7.11%→0.60%), 未分类的微球菌科 (Unclassified Micrococcaceae) 的相对丰度显著较高 (8.51%→18.36%)。已知地面菌群中 *Bacillus* 的相对丰度较高<sup>[8]</sup>, 推测本研究中传统接地发酵普洱茶样本中 *Bacillus* 较高的相对丰度可能与接地环境中孢子含量较多, 且其耐热、兼性厌氧的特性有关<sup>[28]</sup>。PCA 聚类分析 (图 3b) 进一步表明, 与晒青毛茶相比, 两种发酵方式普洱茶的菌群聚类更接近, 相似性更强。

传统接地发酵普洱茶和镂空发酵普洱茶分别有 73.79%、82.96% 的真核菌属与晒青毛茶 37.47% 的优势真核菌属为共有菌属 (图 2c), 推测发酵普洱茶中的真核菌群大多来自于发酵初期的晒青毛茶, 而由本研究前述结论可知, 晒青毛茶中绝大部分真核菌属为未知真核菌属, 其未在普洱茶发酵过程中实现生长代谢。传统接地发酵普洱茶和镂空发酵普洱茶分别有 53.39%、40.01% 的原核菌属与晒青毛茶 79.43% 的优势原核菌属为共有菌属 (图 2d), 推测发酵普洱茶中的原核菌群相当一部分来自于发酵后期的代谢过程。

进一步分析两种发酵方式普洱茶菌群的特异性 OTUs/ASVs 在属水平上 (差异特征菌属) 的丰度发现, 传统接地发酵普洱茶真核差异特征菌属的相对丰度为 26.08%, 镂空发酵普洱茶真核差异特征菌属的相对丰度为 16.83% (图 2e), 推测有可能传统接地发酵有利于特异性外源真核菌属的生长代谢; 两者在属水平上无特异性, 其真核差异特征菌属均属于 *Aspergillus*、*Blastobotrys*、*Rhizomucor*、*Rasamsonia* 或 *Thermomyces*, 即其真核差异特征菌属具有代谢冗余性。

传统接地发酵普洱茶原核差异特征菌属的相对丰度为 52.77%; 镂空发酵普洱茶原核差异特征菌属的相对丰度为 37.87% (图 2f), 推测有可能传统接地发酵有利于地面原核菌属的生长代谢; 传统接地发酵普洱茶原核差异特征菌属主要是 *Staphylococcus*、*Bacillus*、短杆菌属 (*Brevibacterium*、未分类的

芽孢杆菌目 (Unclassified Bacillales)、*Timonella*、未分类的芽孢杆菌科 (Unclassified Bacillaceae)、*Alcaligenes* 或 Unclassified Enterobacteriaceae; 镂空发酵普洱茶原核差异特征菌属主要是 *Staphylococcus* 或 *Brevibacterium*。表明镂空发酵使得原核菌群的多样性和丰度降低, 推测是镂空发酵普洱茶缺乏与地面原核菌属的接触所致<sup>[8]</sup>。

## 2.5 普洱茶样本风味成分的含量

通过 HPLC-MS 检测对普洱茶样本非挥发性代谢组分进行分析鉴定, 共检测到 1033 种代谢物质, 主要是生物碱、黄酮、酚类、氨基酸、有机酸等 21 类物质。如图 4 所示, 两种发酵方式普洱茶在成分上相似, 主要非挥发性代谢组分均为生物碱、黄酮、酚类和有机酸, 在含量上差异较大, 形成了各自特有的滋味特征。

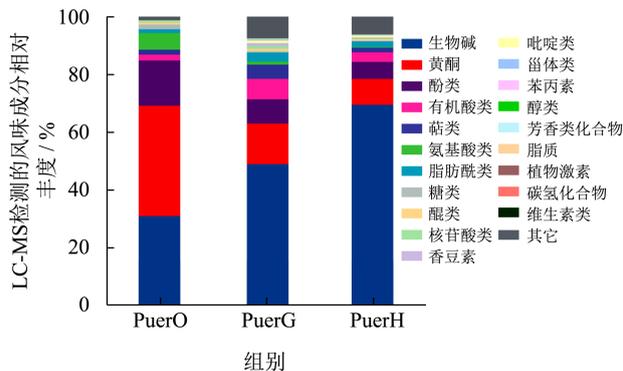


图 4 HPLC-MS 检测的普洱茶样本的非挥发性代谢组分的相对丰度

Fig.4 Relative abundance of Non-volatile metabolic fractions in Pu-erh tea samples detected by HPLC-MS

筛选差异代谢成分重点分析了 25 种关键风味物质。如图 5 所示, 与晒青毛茶相比, 发酵普洱茶降低了茶叶固有的苦味、涩味、鲜味、甜味等风味成分含量, 同时醇厚口感的风味成分含量显著提高。与传统接地发酵普洱茶相比, 镂空发酵普洱茶中 L-脯氨酸、松二糖和蔗糖等甜味物质 (0.02→0.01) 及没食子酸儿茶素酯、表儿茶素没食子酸酯和表没食子儿茶素没食子酸酯等儿茶素类涩味物质 (0.06→0.01) 的含量显著较低; 咖啡因 (1.59→4.59) 等苦味物质的含量显著较高, 其余物质无显著差异。在感官上呈现镂空发酵普洱茶的甜度及涩感较低、苦味较高, 与本研究感官评测结论一致。其中, 与传统发酵普洱茶相比, 镂空发酵普洱茶中的氧气供应较多, 微生物的生

长代谢更旺盛<sup>[24]</sup>，需要更多的蔗糖和 L-脯氨酸等物质作为其生长代谢的碳氮源<sup>[2,25]</sup>，推测镂空发酵普洱茶中蔗糖和 L-脯氨酸的含量较低可能与此有关；儿茶素类物质的氧化降解与氧气供应呈正相关<sup>[27]</sup>，镂空发酵普洱茶中儿茶素类含量较低可能与其氧气供应较多有关；咖啡因可以被 *Aspergillus* 等菌属降解<sup>[30,33,34]</sup>，镂空发酵普洱茶中咖啡因含量较高，推测可能是其 *Aspergillus* 的相对丰度较低导致咖啡因降解的较少。

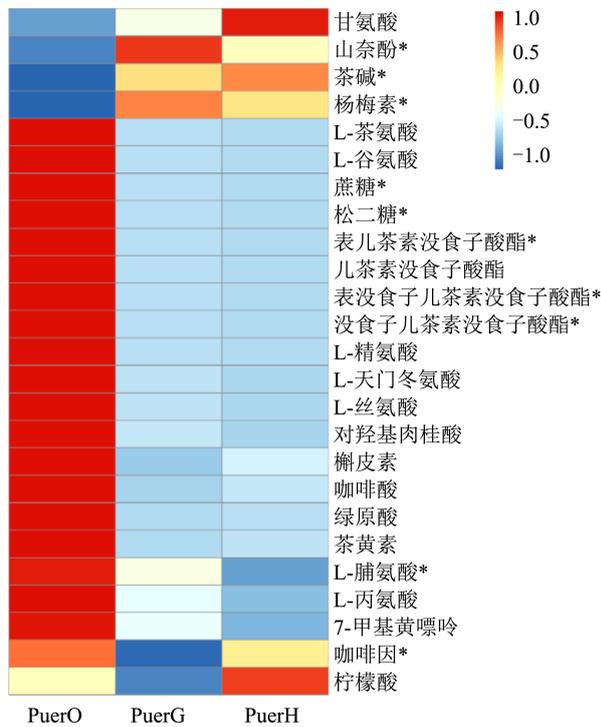


图 5 HPLC-MS 检测的普洱茶样本的风味成分的差异

Fig.5 Differences in flavor compositions of Pu-erh tea samples detected by HPLC-MS

注：\* 表示该风味成分在镂空发酵普洱茶与传统接地发酵普洱茶中有显著差异。

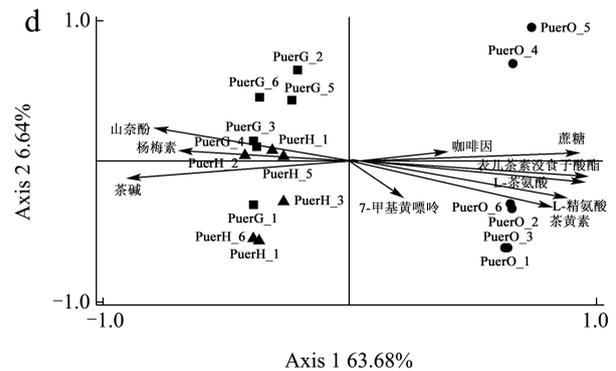
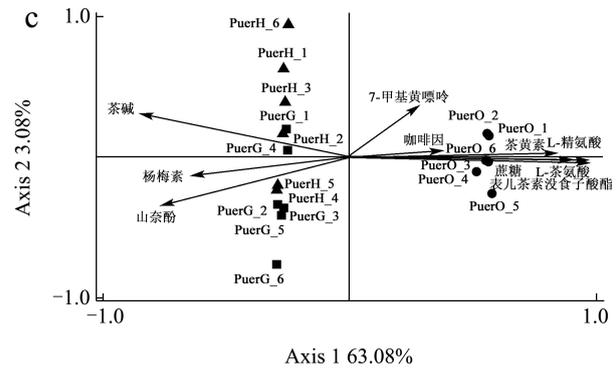
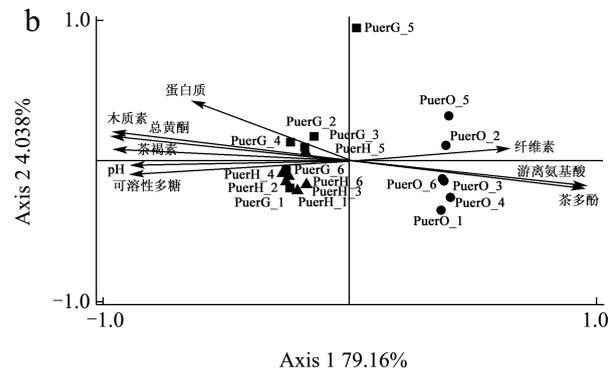
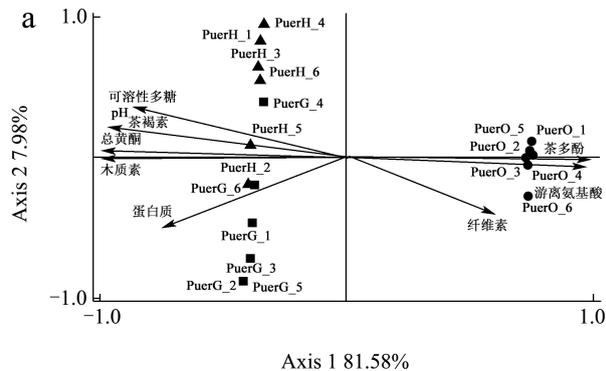


图 6 普洱茶样本的真核 (a)、原核 (b) 优势菌属与理化参数、真核 (c)、原核 (d) 优势菌属与风味成分的冗余分析

Fig.6 Redundancy analysis of eukaryotic (a) and prokaryotic (b) dominant genera and physiochemical parameters, eukaryotic (c) and prokaryotic (d) dominant genera and flavor compositions in Pu-erh tea samples

注：箭头与点的夹角表示指标与样本的相关性；锐角表示正相关。

### 2.6 普洱茶样本优势菌属与理化参数、差异风味成分的相关性

通过 RDA 相关性分析 (图 6) 发现，与真核菌群的相关性具有显著贡献的参数有：茶多酚 (88.6%)、茶褐素 (5.70%)、蛋白质 (2.10%)

(图 6a), 及表儿茶素没食子酸酯 (89.90%) (图 6b), 真核菌属的丰度与茶多酚、茶褐素、蛋白质、表儿茶素没食子酸酯的含量呈正相关。其中, *Aspergillus*、*Blastobotrys*、*Rhizomucor* 具有降解普洱茶中的儿茶素类、茶多酚, 合成茶褐素的代谢功能<sup>[22,35,36]</sup>; *Blastobotrys*、*Thermomyces* 具有合成蛋白质的潜在代谢功能<sup>[3]</sup>。此外, 蛋白质、山奈酚、杨梅素的值与传统接地发酵普洱茶的真核菌群呈强的正相关; pH、可溶性多糖、甘氨酸、茶碱的值与镂空发酵普洱茶的真核菌群呈强正相关 (图 6a、6c)。与原核菌群的相关性具有显著贡献的参数有: 总黄酮 (83.80%) (图 6b) 和表儿茶素没食子酸酯 (84.70%) (图 6b), 可能与原核菌群在普洱茶发酵过程中进行总黄酮、表儿茶素没食子酸酯的合成代谢有关<sup>[29,31]</sup>。且木质素、总黄酮、茶褐素、pH、可溶性多糖、山奈酚、茶碱、甘氨酸的值与两种发酵方式普洱茶的原核菌群均呈强正相关 (图 6b、6d)。

### 3 结论

本研究通过感官评测、扩增子高通量测序、理化检测和高效液相色谱-质谱联用研究镂空发酵普洱茶发现以下结论: 在感官评测上, 镂空发酵普洱茶与传统接地发酵普洱茶的感官评测无差异; 在菌群结构上, 与传统发酵相比, 镂空发酵普洱茶中 *Rasamsonia* 相对丰度较高, *Aspergillus*、*Blastobotrys* 及 *Bacillus* 的相对丰度较低; 在风味成分上, 镂空发酵普洱茶中可溶性多糖、茶褐素和咖啡因的含量较高, 游离氨基酸和儿茶素类的含量较低。

镂空发酵普洱茶和传统接地发酵普洱茶的感官评测无差异, 为普洱茶的传统发酵技术的创新提供了理论支持。镂空发酵普洱茶因缺乏地面菌群的参与, 故其游离氨基酸等风味成分的含量较低, 可探究地面菌群的代谢功能, 确定核心功能菌属, 在镂空发酵时添加核心功能菌属以提高其品质。

### 参考文献

- [1] WANG S, QIU Y, GAN R Y, et al. Chemical constituents and biological properties of Pu-erh tea [J]. Food Research International, 2022, 154: 110899.
- [2] BIAN X, MIAO W, ZHAO M, et al. Microbiota drive insoluble polysaccharides utilization via microbiome-metabolome interplay during Pu-erh tea fermentation [J]. Food Chemistry, 2022, 377: 132007.
- [3] LI J, WU J, XU N, et al. Dynamic evolution and correlation between microorganisms and metabolites during manufacturing process and storage of Pu-erh tea [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 11(10): 703.
- [4] CHEN Q, ZHU Y, LIU Y, et al. Black tea aroma formation during the fermentation period [J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131640.
- [5] GE Y, BIAN X, SUN B, et al. Dynamic profiling of phenolic acids during Pu-erh tea fermentation using derivatization liquid chromatography-mass spectrometry approach [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(16): 4568-4577.
- [6] ZHU M, LI N, ZHOU F, et al. Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea [J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126043.
- [7] XUE J, YANG L, YANG Y, et al. Contrasting microbiomes of raw and ripened Pu-erh tea associated with distinct chemical profiles [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 124(C): 109147.
- [8] 王桥美, 彭文书, 杨瑞娟, 等. 普洱茶发酵过程中可培养微生物的群落结构分析 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(20): 88-93.
- [9] 王桥美, 严亮, 杨瑞娟, 等. 普洱地区茶叶内生细菌与根际土壤细菌群落结构分析 [J]. 微生物学报, 2022, 62(2): 703-714.
- [10] 赵苗苗, 何鲁南, 李果, 等. 普洱茶机械化生产及数控发酵的品质研究 [J]. 茶叶科学, 2020, 40(5): 676-688.
- [11] 赵苗苗, 严亮, 张文杰, 等. 不同渥堆发酵方法对普洱茶品质的影响 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(8): 2640-2648.
- [12] 田海霞, 魏珍珍, 马跃, 等. 普洱茶立体小罐发酵加工工艺技术的应用研究 [J]. 茶叶科学, 2022, 42(4): 577-587.
- [13] 罗慧, 王庆华, 施宗运, 等. 不同方法渥堆发酵的普洱熟茶品质比较分析 [J]. 茶叶通讯, 2024, 51(1): 60-97.
- [14] 周斌星, 孔令波, 李发志. 普洱茶(熟茶)发酵过程中不同堆层主要生化成分的变化 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(7): 63-68.
- [15] LI T H, WEI Y M, FENG W Z, et al. Exploring the mysterious effect of piling fermentation on Pu-erh tea quality formation: Microbial action and moist-heat action [J]. LWT, 2023, 185: 115132.
- [16] LI Z, FENG C, LUO X, et al. Revealing the influence of microbiota on the quality of Pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis [J]. Food Microbiology, 2018, 308(76): 405-415.
- [17] WANG Q, BELŠČAK-CVITANOVIĆ A, DURGO K, et al. Physicochemical properties and biological activities of a high-theabrownins instant Pu-erh tea produced using *Aspergillus tubingensis* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 598-605.

- [18] 邓俊琳,何扬航,陈建,等.渥堆发酵过程中藏茶化学成分的变化[J].食品与机械,2023,39(9):26-31.
- [19] MA C Q, ZHOU B X, WANG J C, et al. Investigation and dynamic changes of phenolic compounds during a new-type fermentation for ripened Pu-erh tea processing [J]. LWT, 2023, 180: 114683
- [20] 熊素敏,左秀凤,朱永义.稻壳中纤维素、半纤维素和木质素的测定[J].粮食与饲料工业,2005,8:40-41.
- [21] LEHO T, MOHAMMAD B, LUCIE Z, et al. Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results [J]. Molecular Ecology, 2022, 31(10): 2769-2795.
- [22] ZAK K, STEVEN D. Patterns of relative bacterial richness and community composition in seawater and marine sediment are robust for both operational taxonomic units and amplicon sequence variants [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 796758.
- [23] 王娟,肖巧梅,张晓宇,等.不同等级普洱熟茶的代谢物差异分析[J].现代食品科技, 2022,38(11):122-131.
- [24] 戴蕾.普洱茶发酵过程中的主要微生物及影响发酵因素分析[J].科技创新导报,2011,28:57-58.
- [25] ZHU Y, LUO Y, WANG P, et al. Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation [J]. Food Chemistry, 2016, 194: 643-649.
- [26] WANG Q, GONG J, CHISTI Y, et al. Fungal isolates from a Pu-erh type tea fermentation and their ability to convert tea polyphenols to theabrownins [J]. J Food Sci, 2015, 80(4): M809-M817.
- [27] 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,2011,23(5):76-81.
- [28] HERMANN V, WALTER M J, SALVADOR T. *Mycosphaerangium* and *Neomelanconium* (Cenangiaceae) are closest relatives: phylogenetic relationships, morphology and a new species [J]. Mycological Progress, 2020, 19(11): 1329-1352.
- [29] MARIA H L M C, EDUARDO R N, FRANCISCO K, et al. *Lysurus fossatii* (Lysuraceae, Basidiomycota). A new species with simple stem-like receptacle structure, from Argentina [J]. Darwiniana, 2022, 10(1): 178-186.
- [30] ZHOU B, MA C, XIA R, et al. Production of theophylline via aerobic fermentation of pu-erh tea using tea-derived fungi [J]. BMC Microbiology, 2019, 19(1): 261.
- [31] ZHAO Z, LOU Y, SHUI Y, et al. Ochratoxigenic fungi in post-fermented tea and inhibitory activities of *Bacillus* spp. from post-fermented tea on ochratoxigenic fungi [J]. Food Control, 2021, 126: 108050.
- [32] 张欣,姚粟,白飞荣,等.基于高通量测序和可培养方法的勐海发酵普洱茶细菌多样性分析[J].食品与发酵工业, 2018,44(9):15-21.
- [33] ZHOU B, MA C, REN X, et al. LC-MS/MS-based metabolomic analysis of caffeine-degrading fungus *Aspergillus sydowii* during tea fermentation [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(2): 477-485.
- [34] 马存强,王洪振,周斌星,等.普洱茶固态发酵中转化咖啡碱为茶碱菌株的鉴定与应用[J].食品工业科技,2018, 39(15):119-124.
- [35] 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.
- [36] 刘琨毅,王利妍,安江珊,等.接种地衣芽孢杆菌发酵的普洱茶品质与微生物群落分析[J].食品科学技术学报,2022, 40(2):108-118.