

# 不同加工阶段普洱茶的微生物多样性与品质研究

杨瑞娟<sup>1,2,3</sup> 於莉军<sup>1</sup> 王桥美<sup>2,3</sup> 彭文书<sup>2,3</sup> 严亮<sup>2,3\*</sup>

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 滇西应用技术大学普洱茶学院, 云南 普洱 665000; 3. 普洱茶研究院, 云南 普洱 665000)

**摘要:**【目的】探究不同加工阶段(制作、发酵、贮藏)普洱茶的微生物多样性,明确不同加工阶段普洱茶的品质差异。【方法】采用平板涂布分离技术和PCR测序技术,对普洱茶不同加工阶段的细菌进行培养和分子鉴定,并通过感官测评、成分检测和电子鼻对茶品质进行判定。【结果】经分离纯化得到218株细菌,制作阶段的晒青毛茶(SQ)、发酵阶段的普洱熟茶(SC1)和贮藏阶段窖藏2年的普洱熟茶(SC2)中分别分离到77株、59株、82株细菌,未分离到真菌。16S rRNA基因测序结果表明,该细菌主要归类为无色杆菌属、芽孢杆菌属、杆菌属、短状杆菌属、短芽孢杆菌属、金黄杆菌属、葡萄球菌属、短小杆菌属、拉乌尔菌属、肠杆菌属、泛菌属、草螺菌属、类芽孢杆菌属、考克氏菌属、干燥杆菌属和黄杆菌属,芽孢杆菌属是SQ、SC1、SC2中共同的优势菌属,37℃条件下培养,其相对分离频率(RDF)分别为35.06%、55.93%、36.59%。除了芽孢杆菌,SQ中主要菌属为金黄杆菌属(19.48%)、无色杆菌属(12.99%)和短小杆菌属(6.49%);SC1中主要菌属为链霉菌属(11.86%)、短小杆菌属(10.17%)和库克菌属(10.17%);SC2中主要菌属为类芽孢杆菌属(15.85%)、肠杆菌属(12.20%)和葡萄球菌属(10.98%)。重金属、农药残留、致病菌、粉末、总灰分、粗纤维、茶多酚和水浸出物的检测结果均符合国家标准。SC1中总游离氨基酸、茶红素、茶褐素、氟化物的质量分数以及儿茶素等茶多酚的质量分数均高于SC2;SC2中咖啡碱、茶多糖的质量分数均高于SC1;SC1和SC2中的咖啡碱、茶褐素的质量分数均高于SQ,而总游离氨基酸、茶氨酸、茶红素、茶黄素的质量分数以及儿茶素等茶多酚的质量分数均低于SQ。香气物质主要集中在甲基类、对硫化物、烃类、醇类、醛酮类、芳香成分、有机硫化物、苯类等。【结论】该研究可为普洱茶产业的发展提供理论依据。

**关键词:**微生物多样性;茶品质;电子鼻;香气;主成分分析

## Microbial Diversity and Quality of Pu-erh Tea at Different Processing Stages

YANG Ruijuan<sup>1,2,3</sup> YU Lijun<sup>1</sup> WANG Qiaomei<sup>2,3</sup> PENG Wenshu<sup>2,3</sup> YAN Liang<sup>2,3\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Tea (Pu'er), West Yunnan University of Applied Sciences, Pu'er 665000, China; 3. Pu'er Institute of Pu-erh Tea, Pu'er 665000, China)

**Abstract:** [Objective] The author aimed to explore the microbial diversity and quality variations of Pu-erh tea at different processing stages (manufacturing, fermentation, and storage). [Method] The microorganisms isolated from tea were cultured and molecularly identified by using plate coating and PCR sequencing technologies. The quality of Pu-erh tea was determined by sensory evaluation, component detection, and electronic nose. [Result] A total of 218 strains of bacteria were isolated and purified, with 77, 59, and 82 strains isolated from sun-dried raw tea (SQ) at the manufacturing stage, fermented ripened Pu-erh tea (SC1) during the fermentation stage, and cellar-aged ripened Pu-erh tea stored for 2 years (SC2) during the storage stage, respectively, and no fungi were isolated. The 16S rRNA gene sequencing revealed

基金项目:云南农业大学科研启动基金项目(KY2022-54);创新引导与科技型企业培育计划项目(202104BI090008)。

通信作者:严亮(1983—),男,博士,研究员,主要从事茶叶科学研究。E-mail:jacky\_4680@163.com

收稿日期:2023-09-17 修回日期:2023-11-06

that the bacteria mainly classified as *Achromobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Brachy bacterium*, *Brevibacillus*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, *Curtobacterium*, *Raoultella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Kocuria*, *Siccibacter*, and *Xanthomonas*. *Bacillus* was the common dominant bacterium in SQ, SC1, and SC2, with relative isolation frequencies (RDF) of 35.06%, 55.93%, and 36.59%, respectively when incubated at 37 °C. In addition to *Bacillus*, the main bacteria in SQ were *Chryseobacterium* (19.48%), *Achromobacter* (12.99%), and *Curtobacterium* (6.49%). The main bacteria in SC1 were *Streptomyces* (11.86%), *Curtobacterium* 10.17%, and *Kocuria* (10.17%). The main bacteria in SC2 were *Paenibacillus* (15.85%), *Enterobacter* (12.20%), and *Staphylococcus* (10.98%). The levels of heavy metals, agricultural residues, pathogenic bacteria, powder, total ash content, crude fiber, tea polyphenol, and water extract of Pu-erh tea all complied with national standards. The mass fractions of total free amino acids, thearubigins, theabrownins, and fluoride, as well as the mass fraction of catechins and other tea polyphenols, were higher than those in SC2, while the mass fractions of caffeine and tea polysaccharides in SC2 were higher than those in SC1. The mass fractions of caffeine and theabrownin in SC1 and SC2 were higher than those in SQ, while the mass fractions of total free amino acid, theanine, thearubigins, and theaflavin as well as the mass fraction of catechins and other tea polyphenols, were all lower than those in SQ. Aroma substances were mainly concentrated in methyl groups, *p*-sulfide, hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, aromatic components, organic sulfide, and benzene. [Conclusion] This study provides a theoretical basis for the development and promotion of the Pu-erh tea industry.

**Keywords:** microbial diversity; tea quality; electronic nose; aroma; PCA

普洱茶是云南省地理标志保护产品,具有历史性、原生态性、多样性等特征<sup>[1]</sup>。由于得天独厚的地理条件和丰富的文化底蕴,普洱茶越来越受消费者喜爱,并被评为中国茶叶区域公用品牌。普洱茶是以云南大叶种(*Camellia sinensis* (Linn.) var. *assamica* (Masters) Kitamura)晒青毛茶制成的,采用特定的加工工艺,具有独特的品质特征。根据加工工艺和品质特点,普洱茶可分为普洱生茶和普洱熟茶<sup>[2]</sup>。

普洱熟茶是以晒青毛茶为原料进行发酵,经过一系列的缩合、氧化、降解等反应制成的。传统的渥堆发酵(固态发酵)是将晒青毛茶堆放4~6周,为了预防温度过高发生“烧堆”现象,中间要进行4次左右的翻堆。普洱熟茶特定品质的形成离不开渥堆发酵,它是在高温、高湿、氧气和一系列酶的综合作用下,通过热催化和酶促催化作用,使发酵茶叶产生一系列化学和生物转化反应<sup>[3]</sup>,使色泽黄绿、滋味纯正、香气清新的晒青毛茶转变为具有红褐色泽、醇和滋味、口感甘滑、滋味醇厚、风味陈香等特点的普洱熟茶。在普洱茶品质的形成过程中,微生物发挥了关键作用<sup>[4]</sup>。与传统普洱生茶后发酵相比,渥堆发酵可以明显缩短发酵的时间,降低生产成本。渥堆发酵是普洱茶生产的关键环节,普洱茶色、香、味的形成和保健功效的产生离不开微生物的重要作用。近年来,关于普洱茶仓储的

研究较多<sup>[5-10]</sup>,影响因素的研究主要集中在水分、温度、光照、氧气、压力等,关于微生物的研究较少。

窖藏普洱茶是一个新兴的概念,与酒的窖藏本质相似,主要是尝试普洱茶更科学的发酵方法。云南普洱茶产“窖藏”模式的优点是“窖”中的特征性微生物最接近于茶园,具有特殊的地理位置优势,且恒温恒湿及密闭的空间可以更好地控制茶品质的稳定性。目前,普洱茶的微生物研究局限于渥堆发酵过程,针对普洱茶原料及后期窖藏过程的研究较少,微生物与茶品质的研究更少。作者选取了制作阶段的SQ、发酵阶段的SC1和贮藏阶段的SC2为研究对象,用纯培养和PCR测序技术对不同加工阶段普洱茶的微生物、茶品质及茶香气成分进行研究,为促进普洱茶产业的发展提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

SQ:以云南大叶种茶叶为原料,经杀青、揉捻、晒干制作的晒青毛茶(普洱熟茶的发酵原料); SC1:以SQ为原料经渥堆发酵的普洱熟茶; SC2:将SC1在恒温恒湿(34.5 °C、70%)条件下窖藏2年的普洱熟茶。

甲醇、乙腈、乙酸铵、甲酸、氨水:色谱纯,德国CNW公司。FeSO<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、水杨酸、阿卡波糖、碳酸

钠、氢氧化钠、3,5-二硝基水杨酸、酒石酸钾钠、苯酚、硫酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

电热恒温培养箱:DHP-9162型,上海一恒科学仪器有限公司;培养箱/干燥箱:PH240A型,上海一恒科学仪器有限公司;微量分析天平:XS204型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;分析天平:PL203型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;快速水分测定仪:MJ33型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;立式压力蒸汽灭菌器:LDZX-50KB型,上海申安医疗器械厂;隔膜真空泵:SCJ-10型,上海晖创化学仪器有限公司;雷磁pH计:PHS-3C型,上海仪电科学仪器股份有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 茶样微生物的培养

无菌水冲洗 10 min 后用质量分数 2.5% 的硫代硫酸钠溶液浸洗 10 min,接着用体积分数 5% 的次氯酸钠溶液浸洗 3 min,再用体积分数 75% 乙醇溶液浸洗 5 min,随后再用无菌水冲洗 10 min。使用已灭菌的刀头将茶叶粉碎,将茶叶与无菌水按照料液比 1 g:9 mL 进行稀释,即制备得到  $1 \times 10^{-1}$  的稀释液。将  $1 \times 10^{-3}$  和  $1 \times 10^{-4}$  的稀释液分别均匀涂布在 LB、YEPD、PDA 和高氏共 4 种培养基上。将培养皿分别放入 28、37 °C 条件下倒置培养 48~72 h,并进行纯化培养备用<sup>[11]</sup>。

### 1.3.2 微生物的鉴定

细菌引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'),真菌引物为 ITS1F(5'-CTTGGTCA TTTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS4R(5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3'),将纯化的微生物制成菌悬液进行 PCR 反应<sup>[12-13]</sup>。将扩增成功的样品送至北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序,在 GenBank 数据库中查出相应微生物<sup>[12]</sup>。于 27 °C 与 37 °C 培养条件下测定各阶段茶样中可分离菌株种类及数量,将分离到的某个物种与分离菌株总量的占比用 RDF 表示。

基于 Clustalx 1.81 软件进行同源性比较和比对测序,MEGA6 软件包采用 HKY85 距离矩阵构建系统发育树<sup>[13]</sup>。

### 1.3.3 茶样理化指标的检测

茶叶中的水浸出物参照 GB/T 8305—2013

《茶水浸出物测定》进行检测;茶叶中的粉末参照 GB/T 8311—2013《茶粉末和碎茶含量测定》进行检测;茶叶中的茶多酚参照 GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》进行检测;茶叶中的粗纤维参照 GB/T 5009.10—2003《植物类食品中粗纤维的测定》进行检测;茶叶中的游离氨基酸参照 GB/T 8314—2013《茶游离氨基酸总量的测定》进行检测;茶叶中的茶氨酸参照 GB/T 23193—2017《茶叶中茶氨酸的测定 高效液相色谱法》进行检测;茶叶中的咖啡碱参照 GB/T 8312—2013《茶咖啡碱测定》进行检测;茶叶中的含氟量参照 GB/T 5009.18—2003《食品中氟的测定》进行检测;茶叶中的可溶性糖用硫酸-蒽酮法进行检测;茶红素、茶黄素、茶褐素用直接萃取比色法<sup>[14]</sup>进行检测。

### 1.3.4 安全指标的检测

农药残留和致病菌的检测由普洱市质量技术监督综合检测中心完成,其中农药残留参照 GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》进行检测,致病菌参照 GB 29921—2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》进行检测。

### 1.3.5 感官评定

感官审评参照 GB/T 23776—2018《茶叶感官审评方法》中的方法,采用密码审评茶样外形(条索、色泽、整碎、净度)和内质(香气、滋味、汤色、叶底)。感官审评由具有评茶职业资格的 5 位高级评茶员完成。

### 1.3.6 茶样香气的电子鼻评价

在 100 mL 锥形瓶中放入 1 g 茶样,用保鲜膜密封放置 30 min 进行干茶香气检测。于锥形瓶中注入 50 mL 沸水,用保鲜膜密封 45 min,降至室温后进行茶汤香气检测;将茶汤倒掉,密封 30 min,进行叶底香气检测。

电子鼻参数设置:检测项目为茶叶香气成分(10 个传感器分别对 10 类成分敏感),各个传感器的名称与性能描述详见表 1。传感器自动清洗 300 s,传感器归零时间 10 s,进样准备时间 5 s,分析采样时间 80 s,采样时间间隔 1 s,进样流量 400 mL/min,选取 57~60 s 的检测数值分析各组分质量分数<sup>[15]</sup>。

## 1.4 数据分析

用 IBM SPSS Statistics 27.0 统计软件进行 ANOVA 单因素显著性分析,以平均值±标准差表

表 1 PEN3 电子鼻传感器敏感物质

序号	传感器	主要性能
R1	W1C	对芳香成分、苯类灵敏
R2	W5S	对氮氧化合物灵敏
R3	W3C	对芳香成分、氨类灵敏
R4	W6S	对氢化物灵敏
R5	W5C	对短链烷烃、芳香成分灵敏
R6	W1S	对甲基类灵敏
R7	W1W	对硫化物、烃类灵敏
R8	W2S	对醇类、醛酮类灵敏
R9	W2W	对芳香成分、有机硫化物灵敏
R10	W3S	对长链烷烃灵敏

示。用 WinMuster 进行电子鼻分析。理化指标与安全性指标对比采用邓肯多重比较分析。用 GraphPad Prism 9.3.1 绘制图形。

## 2 结果与讨论

### 2.1 普洱茶不同加工阶段的微生物群落组成分析

形态学去重复后共纯化得到 218 株细菌(SQ、SC1 和 SC2 中分别分离到 77 株、59 株、82 株),进行 16S rRNA 基因测序、比对,选取代表序列构建系统发育树(见图 1)。茶样中的细菌可以归类到无色杆菌属、短状杆菌属、芽孢杆菌属、杆菌属、葡萄球菌属、短小杆菌属、短芽孢杆菌属、考克氏菌属、干燥杆菌属、黄杆菌属、泛菌属、草螺菌属、金黄杆菌属、拉乌尔菌属、肠杆菌属、类芽孢杆菌属等。作者未从茶样中分离到真菌,由于真菌仅在普洱茶渥堆发酵过程中存在,晒青毛茶经过商业杀青处理后不会检出真菌,且普洱茶在渥堆发酵结束经过烘干、紧压等工艺处理制成成品茶后,几乎没有真菌的存在,而普洱茶自然陈化过程中真菌的来源主要是茶叶生产与加工过程中接触到的真菌以及茶窖环境中存在的真菌<sup>[14]</sup>。

### 2.2 普洱茶不同加工阶段微生物群落的属间特征

由表 2 可知,SQ、SC1 和 SC2 的微生物群落均含有芽孢杆菌属、肠杆菌属、库克菌属和细杆菌属。结合实际发酵与生产环境,采用 37 °C 培养条件下测定的 RDF 进行后续分析。SQ 中共分离出 77 株菌株,分布于 13 个属,以芽孢杆菌属、金黄杆菌属、无色杆菌属和短小杆菌属为主要菌群,其 RDF 依次为 35.06%、19.48%、12.99% 和 6.49%。SC1 共分离出 59 株菌株,分布于 8 个属,其中芽孢杆菌属的

占比最高,RDF 为 55.93%,其次为链霉菌属、短小杆菌属和库克菌属,RDF 分别为 11.86%、10.17% 和 10.17%。SC2 中共分离出 82 株菌株,分布于 11 个属,其中芽孢杆菌属的占比也是最高,RDF 为 36.59%,其次为类芽孢杆菌属、肠杆菌属和葡萄球菌属,RDF 分别为 15.85%、12.20% 和 10.98%。假单胞菌属、无色杆菌属、拉乌尔菌属、金黄杆菌属、黄杆菌属和草螺菌属存在于 SQ 中,而 SC1 和 SC2 中没有检测到。杆菌属在 SQ 中没有检测到,都存在于 SC1 和 SC2 中。短芽孢杆菌属、短小杆菌属和链霉菌属在 SQ 和 SC1 中都有,但是在 SC2 中没有。分离到的茶叶微生物以杆菌属为主,SC1 和 SC2 均含有大量的芽孢杆菌属。Unban 等<sup>[16]</sup>研究发现杆状菌还能产生丰富的多酚氧化酶、过氧化物酶等,可促进儿茶素的转化,从而提高普洱茶品质。冯玲然等<sup>[17]</sup>研究发现普洱茶固态发酵过程中黑曲霉、布朗克假丝酵母对茶样中茶多酚的转化起着决定性作用。

### 2.3 普洱茶不同加工阶段的理化指标和安全性指标对比

由表 3 可知,SQ、SC1 与 SC2 的总灰分、粉末、水浸出物、粗纤维、茶多酚的质量分数都符合 GB/T 22111—2008《地理标志产品 普洱茶》的规定。SC1 中总游离氨基酸、茶红素、茶褐素、氟化物的质量分数以及儿茶素等茶多酚的质量分数均高于 SC2,SC2 中咖啡碱、茶多糖的质量分数均高于 SC1,但均相差不大。SC1 和 SC2 中的咖啡碱、茶褐素的质量分数均高于 SQ,而总游离氨基酸、茶氨酸、茶红素、茶黄素的质量分数以及儿茶素等茶多酚的质量分数均低于 SQ。SQ、SC1 和 SC2 的安全性指标(重金属、农药残留、大肠菌落数和致病菌)检测结果见表 4,其重金属、农药残留、大肠菌落数和致病菌等安全性指标均符合标准。

咖啡碱是茶叶中主要的嘌呤碱,是构成茶汤滋味的重要物质,SC2 的咖啡碱略高于 SC1,但茶汤并不苦涩,滋味更加醇厚,这可能是由于呈苦味的茶叶生物碱(包括咖啡碱)与茶色素通过某种作用结合,使其呈味物质协调重组<sup>[18]</sup>。王茹芸等<sup>[19]</sup>研究发现,随着普洱茶贮藏时间的加长,普洱茶中游离氨基酸总量明显降低,其中丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、组氨酸含量显著降低。该研究中 SC2 的总游离氨基酸质量分数低于 SC1,茶氨酸均未检出,这说明经过继续存放,普洱熟茶进行了转化。

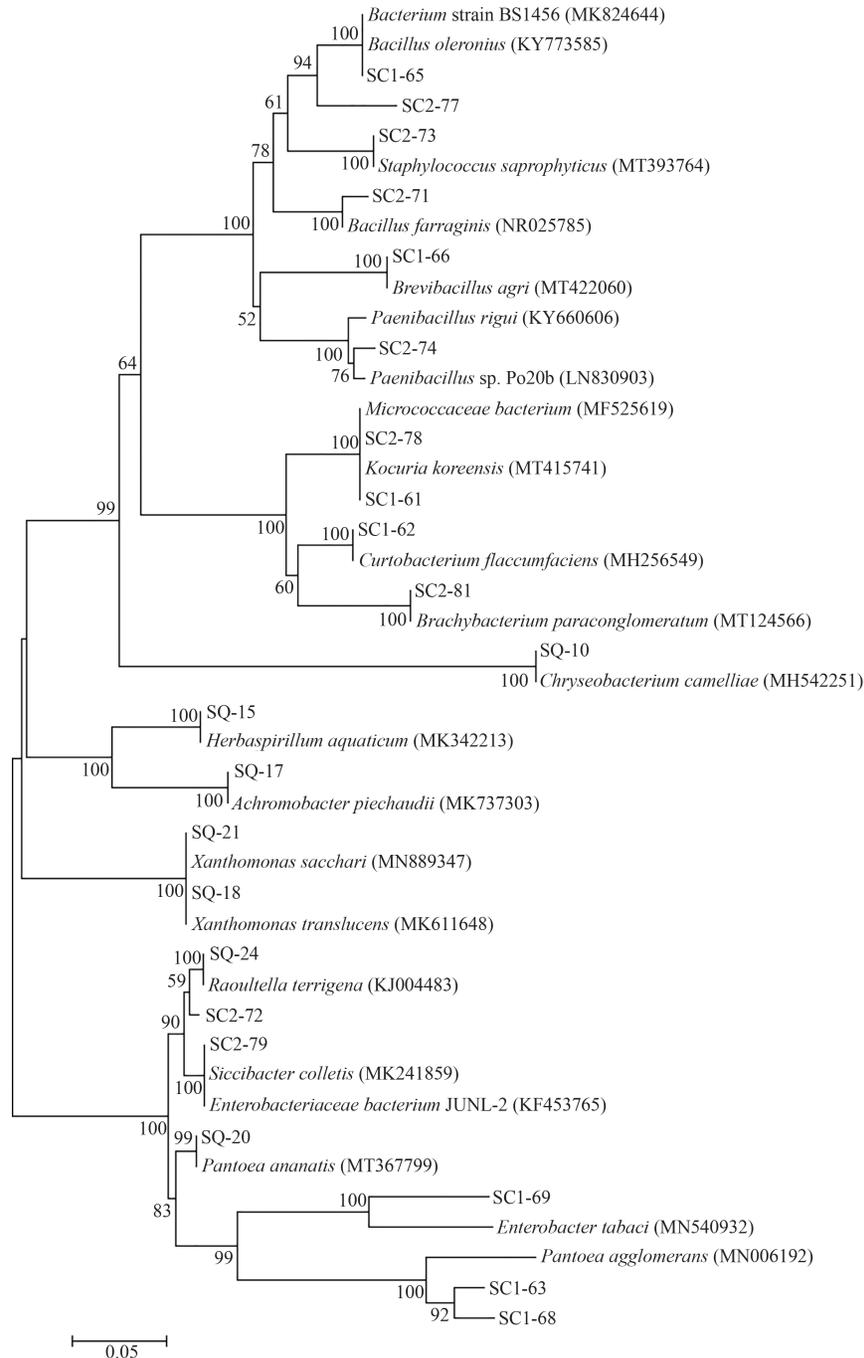


图1 普洱茶不同加工阶段的细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of bacteria in Pu-erh tea at different processing stages

#### 2.4 普洱茶不同加工阶段感官评定结果对比

普洱茶不同加工阶段的外形(条索、色泽、整碎、净度)和内质(香气、滋味、汤色、叶底)的感官评定结果见表5。相比于SQ, SC1香气以及滋味都发生了较大的变化,茶叶整体风味偏向于后发酵茶的陈香醇正,而SC2的色泽更润,内质中香气更浓厚、滋味更醇厚,符合人们对普洱“越陈越香”的认知。窖藏2年后,茶样中微生物菌属的相对丰

度发生了较大改变,在微生物参与下,茶多酚发生氧化、缩合等反应,同时蛋白质和氨基酸也会降解。此外,碳水化合物也会分解,各种产物之间会发生聚合和缩合等反应。这些反应会生成更加复杂的物质,例如茶多酚的氧化产物和衍生物,这些物质均有利于提升普洱茶的品质。因此,窖藏茶样呈现出红褐色的色泽,具有醇厚的滋味,且具有回甘和香气持久的特点。

表 2 普洱茶不同加工阶段中的菌属及其 RDF

Table 2 Composition and RDF of microorganisms of Pu-erh tea at different processing stages

样品	温度/°C	无色杆菌属	杆菌属	芽孢杆菌属	短状杆菌属	短芽孢杆菌属	金黄杆菌属	阪崎肠杆菌属	短小杆菌属	肠杆菌属	埃希氏菌属
		RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF
SQ	28	10.00	—	27.00	—	3.00	15.00	—	5.00	2.00	—
	37	12.99	—	35.06	—	3.90	19.48	—	6.49	2.60	—
SC1	28	—	1.00	33.00	—	3.00	—	—	6.00	1.00	—
	37	—	1.69	55.93	—	5.08	—	—	10.17	1.69	—
SC2	28	—	1.00	30.00	6.00	—	—	4.00	—	10.00	1.00
	37	—	1.22	36.59	7.32	—	—	4.88	—	12.20	1.22

样品	温度/°C	草螺菌属	库克菌属	细杆菌属	类芽孢杆菌属	假单胞菌属	拉乌尔菌属	沙雷氏菌属	葡萄球菌属	链霉菌属	黄杆菌属
		RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF	RDF
SQ	28	3.00	3.00	3.00	—	1.00	2.00	—	—	2.00	1.00
	37	3.90	3.90	3.90	—	1.30	2.60	—	—	2.60	1.30
SC1	28	—	6.00	2.00	—	—	—	—	—	7.00	—
	37	—	10.17	3.39	—	—	—	—	—	11.86	—
SC2	28	—	3.00	2.00	13.00	—	—	3.00	9.00	—	—
	37	—	3.66	2.44	15.85	—	—	3.66	10.98	—	—

注：“—”代表未检测到。

表 3 普洱茶不同加工阶段理化指标对比

Table 3 Comparison of physicochemical indexes of Pu-erh tea at different processing stages

样品	水分	总灰分	粉末	水浸出物	粗纤维	茶多酚	咖啡碱	儿茶素
	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%
SQ	8.90 <sup>a</sup>	6.80 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	40.10 <sup>a</sup>	13.90 <sup>a</sup>	12.80 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	1.30 <sup>a</sup>
SC1	12.70 <sup>b</sup>	7.30 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	38.80 <sup>b</sup>	13.80 <sup>a</sup>	9.60 <sup>b</sup>	4.10 <sup>a</sup>	0.26 <sup>b</sup>
SC2	10.30 <sup>c</sup>	7.40 <sup>b</sup>	0.05 <sup>a</sup>	37.30 <sup>c</sup>	13.80 <sup>a</sup>	9.20 <sup>b</sup>	4.20 <sup>b</sup>	0.24 <sup>b</sup>

样品	总游离氨基酸	茶氨酸	茶多糖	茶红素	茶黄素	茶褐素	花青素	氟化物
	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/%	质量分数/(mg/g)	质量分数/(mg/kg)
SQ	1.70 <sup>a</sup>	0.86 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>	2.31 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>	1.08 <sup>a</sup>	—	72.10 <sup>a</sup>
SC1	1.00 <sup>b</sup>	—	0.70 <sup>ab</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>	5.39 <sup>a</sup>	—	71.80 <sup>a</sup>
SC2	0.90 <sup>b</sup>	—	0.90 <sup>b</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>	4.89 <sup>b</sup>	—	64.80 <sup>a</sup>

注：不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )；“—”代表未检测到。

## 2.5 普洱茶不同加工阶段香气的电子鼻 PCA 和 Loadings 分析

普洱茶不同加工阶段香气的 PCA 分析见图 2，2 个主成分贡献率之和均大于 85%，能代表样品的主要信息特征。在 Correlation-M 矩阵下，干茶香气 PCA 分析结果显示，SQ、SC1、SC2 之间的干茶香气差异较大，其中第一主成分(PC1)贡献率高达 98.83%，说明 SQ、SC1、SC2 的共有香气成分对干茶香气类型起到的作用基本一致，各自特有香气成分对干茶香气类型起主导作用。茶汤香气 PCA 分析结果显示，SQ、SC1、SC2 之间的茶汤香气差异较大，较干茶香气存在一定差异，与叶底香气相似，这可能是由于 3 个样品的香气成分在干茶状态下不容易挥发。表明茶样的品质比较稳定，电子鼻能较好区分普洱茶不同加工阶段的香气，且区

分效果良好。

普洱茶不同加工阶段的 Loadings 分析见图 3，2 个主成分贡献率之和均大于 85%，能代表样品的主要信息特征。干茶的 Loadings 分析结果见图 3(a)，传感器 R6(对甲基类灵敏)对 PC1、第二主成分(PC2)的贡献率最大，传感器 R8(对醇类、醛酮类灵敏)对 PC1 的贡献仅次于 R6，而传感器 R1(对芳香成分、苯类灵敏)对 PC2 的贡献率仅次于 R6。说明干茶主要的香气成分为甲基类、醇类、醛酮类及少部分芳香成分。茶汤的 Loadings 分析结果见图 3(b)，传感器 R7(对硫化物、烃类灵敏)对 PC1 的贡献率最大，且该风味为主要风味，传感器 R8 对 PC2 的贡献率最大，传感器 R6 次之。说明茶汤主要的香气成分为硫化物、烃类、醇类、醛酮类及少部分

表4 普洱茶不同加工阶段安全性指标对比

Table 4 Comparison of safety indexes of Pu-erh tea at different processing stages

样品 (标准)	铅质量分数/ (mg/kg)	氯菊酯 质量分数/(mg/kg)	联苯菊酯 质量分数/(mg/kg)	氰氟菊酯 质量分数/(mg/kg)	溴氰菊酯 质量分数/(mg/kg)	顺式氰戊菊酯 质量分数/(mg/kg)	氟氰戊菊酯 质量分数/(mg/kg)
SQ	0.20	—	0.09	—	—	—	—
SC1	0.13	—	0.06	—	—	—	—
SC2	0.10	—	0.02	—	—	—	—
标准要求	≤5.0	≤20	≤5.0	≤0.5	≤5.0	≤2.0	≤20
单项判定	符合	符合	符合	符合	符合	符合	符合

样品 (标准)	乐果质量分数/ (mg/kg)	六六六 质量分数/(mg/kg)	敌敌畏质量分数/ (mg/kg)	滴滴涕 质量分数/(mg/kg)	杀螟硫磷 质量分数/(mg/kg)	啶硫磷 质量分数/(mg/kg)
SQ	—	—	—	—	—	—
SC1	—	—	—	—	—	—
SC2	—	—	—	—	—	—
标准要求	≤0.1	≤0.2	≤0.1	≤0.2	≤0.5	≤0.2
单项判定	符合	符合	符合	符合	符合	符合

样品 (标准)	乙酰甲胺磷 质量分数/(mg/kg)	大肠菌落数/ (MPN/100 g)	金黄色葡萄球菌/ (CFU/25 g)	沙门氏菌/ (CFU/25 g)	溶血性链球菌/ (CFU/25 g)	志贺氏菌/ (CFU/25 g)
SQ	—	<30.00	—	—	—	—
SC1	—	<30.00	—	—	—	—
SC2	—	<30.00	—	—	—	—
标准要求	≤0.1	≤300	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出
单项判定	符合	符合	符合	符合	符合	符合

注：“—”代表未检测到。

表5 普洱茶不同加工阶段感官评定结果对比

Table 5 Sensory evaluation results of Pu-erh tea at different processing stages

普洱茶样品	条索	色泽	整碎	净度	香气	滋味	汤色	叶底
SQ	粗松欠嫩	黄绿	老嫩整齐	匀齐带梗	香低无异味	淡薄青涩	橙黄尚亮	黄绿花杂
SC1	尚紧实	褐欠润	尚匀整	尚净带梗	陈香	醇正	深红明亮	红褐尚嫩
SC2	尚紧实	红褐尚润	尚匀整	尚净带嫩梗	陈香浓厚	醇厚回甘	深红明亮	红褐尚嫩

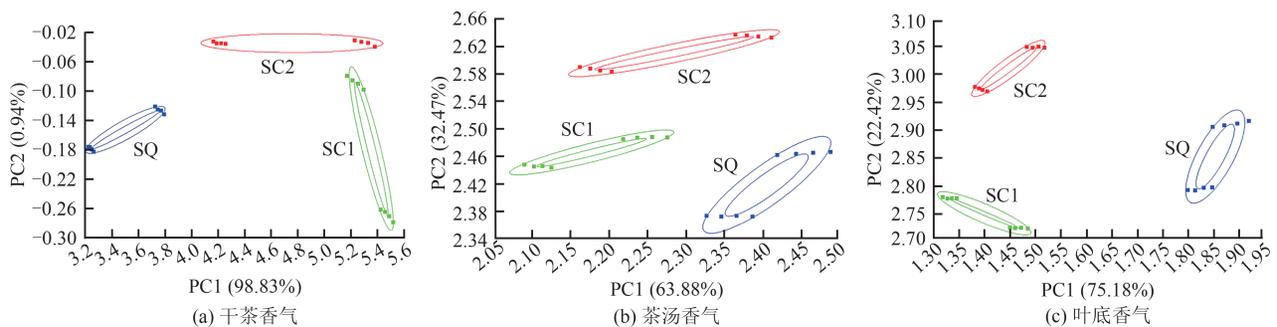


图2 普洱茶不同加工阶段干茶、茶汤与叶底的PCA分析图

Fig. 2 PCA of dry tea, tea broth and leaf base of Pu-erh tea at different processing stages

甲基类。叶底的Loadings分析结果见图3(c),传感器对主成分的贡献率与茶汤相似,R7对PC1的贡献率最大,传感器R9次之,而传感器R8对PC2贡献率最大,传感器R6次之,说明叶底主要的香气成分为硫化物、烃类、醇类、醛酮类、芳香成分、有机硫化物及少部分甲基类。综合上述分析,普洱茶不同加工

阶段的香气物质主要为甲基类、硫化物、烃类、醇类、醛酮类、有机硫化物、苯类等。

茶叶香气是各种芳香物质按不同占比组合形成的特有香型,一般在茶中的绝对质量很少,只占干物质质量的0.02%,但却是决定茶叶品质的重要因素之一<sup>[20]</sup>。普洱茶香气研究历来备受关注,目前研究

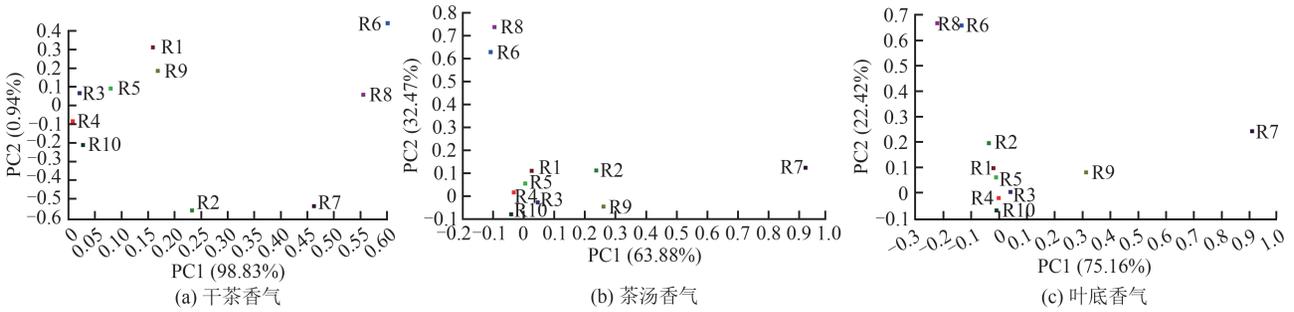


图 3 普洱茶不同加工阶段干茶、茶汤与叶底的 Loadings 分析图

Fig. 3 Loadings analysis of dry tea, tea broth and leaf base of different Pu-erh tea at different processing stages

发现普洱茶独特的香气是在后发酵过程中形成的<sup>[21]</sup>。近年来,相关研究表明电子鼻技术可以通过检测香气对茶叶进行区分<sup>[22-24]</sup>。通过电子鼻技术对香气进行判定分析,能够反映普洱茶不同加工阶段香气的差异性以及变化规律,可为普洱茶香气的成分组成和不同加工阶段、不同等级茶叶间香气成分差异的研究提供参考。

### 2.6 普洱茶不同加工阶段微生物与茶品质的相关性分析

普洱茶不同加工阶段在香气品质及理化品质上有显著差异,普洱茶不同加工阶段微生物的

RDF 以及茶样中的咖啡碱、游离氨基酸以及儿茶素等茶多酚与电子鼻传感器灵敏度之间的相关性分析结果见图 4。无色杆菌属、杆菌属、金黄杆菌属、草螺菌属、细杆菌属、假单胞菌属、拉乌尔菌属、黄杆菌属 RDF 与茶样理化指标均有较强相关性。除杆菌属外,所有菌属 RDF 均与游离氨基酸和儿茶素等茶多酚呈显著正相关( $P<0.05$ ),而与咖啡碱呈显著负相关( $P<0.05$ )。只有杆菌属 RDF 与其他菌属相反,与游离氨基酸和儿茶素等茶多酚呈显著负相关( $P<0.05$ ),与咖啡碱呈显著正相关( $P<0.05$ )。可见不同加工阶段微生物的变化会

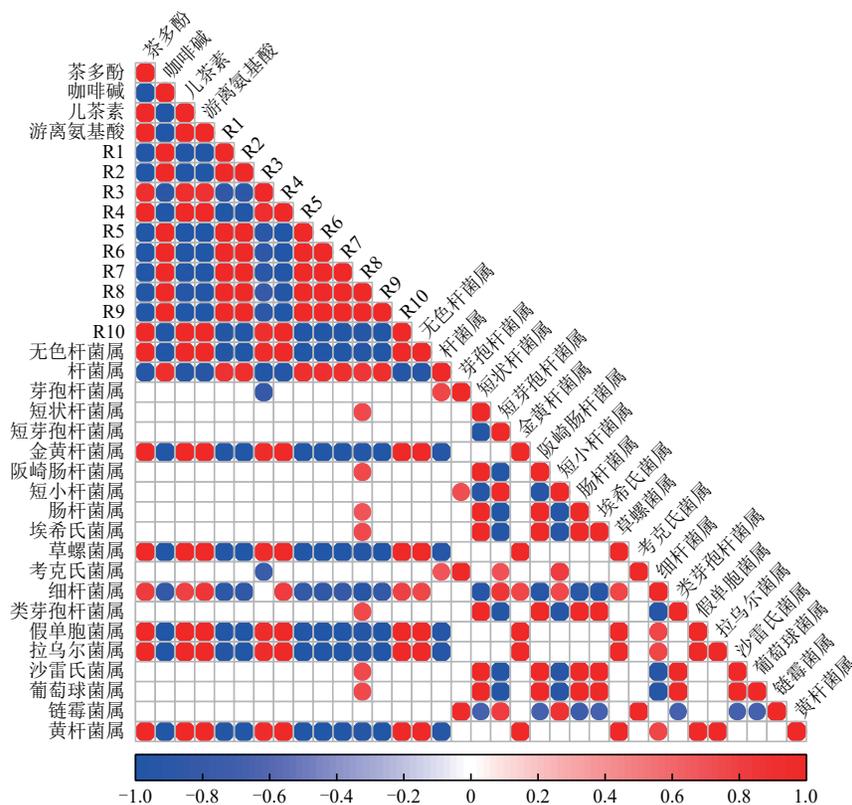


图 4 微生物与茶品质的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis between microorganisms and tea quality

对茶样中的游离氨基酸、咖啡碱以及儿茶素等茶多酚产生不同程度的正面影响,这可能就是导致茶样在窖藏过程中游离氨基酸和儿茶素等茶多酚的质量分数降低、咖啡碱质量分数升高的主要原因。另外,无色杆菌属、金黄杆菌属、草螺菌属、细杆菌属、假单胞菌属、拉乌尔菌属、黄杆菌属 RDF 与茶汤电子鼻传感器灵敏度也有较强的相关性,以上菌属的 RDF 均与 R1、R2、R3、R6、R7、R8、R9 传感器呈显著负相关( $P < 0.05$ ),而与 R3、R4、R10 传感器呈显著正相关( $P < 0.05$ ),且杆菌属在与茶汤香气相关性分析中也与其他菌属呈相反趋势。R3、R4、R10 探头分别对氨类、氢化物、长链烷烃灵敏,这可能是茶叶在窖藏过程中产生“陈味”以及醇香味的主要原因。严宽等<sup>[25]</sup>研究发现细菌在发酵茶品质形成的过程中发挥着重要作用。Sun 等<sup>[26]</sup>发现细菌会对茶叶中的总黄酮、绿原酸等理化成分产生较大的影响。高晓余等<sup>[27]</sup>发现在茶叶发酵过程中微生物会影响酶的产生、改变理化物质的化学性质,从而改变茶叶香气物质的组成。

### 3 结论

作者在利用平板稀释涂布分离法获得纯培养物(微生物菌株)的同时,采用分子生物学技术和分类鉴定方法进行鉴定,确定了纯培养物的归属。该研究分析了不同加工阶段普洱茶的微生物群落组成和差异,保存了大量微生物菌种资源,较微生物免培养法有较大优势。但由于该研究收集样品的范围及数量有限,后期作者会进一步扩大样本采集范围与数量,并优化分析模型。后续也将通过检索相关微生物资源信息及应用,进一步探究具有特定功能的微生物变化对茶叶品质的影响,该研究为普洱茶产业的发展提供了理论依据。

### 参考文献

- [1] 史晓红. 试析普洱茶文化的特征[J]. 边疆经济与文化, 2018(7):28-30.  
SHI X H. An analysis of the characteristics of Pu'er tea culture[J]. The Border Economy and Culture, 2018(7): 28-30. (in Chinese)
- [2] 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.  
WANG Q M, PENG W S, YANG R J, et al. Community structure of culturable microbes during the fermentation of Pu-erh tea[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(20):88-93. (in Chinese)
- [3] 董文明, 谭超, 付晓萍, 等. 5种成品普洱茶中微生物的分离及其产酶特性研究[J]. 食品科技, 2013, 38(6):22-25, 30.  
DONG W M, TAN C, FU X P, et al. Enzyme production characteristics and isolation of microorganism from five kinds of Pu'er tea[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(6):22-25, 30. (in Chinese)
- [4] 董文明, 谭超, 刘华戎, 等. 不同微生物在不同发酵阶段对普洱茶理化成分的影响[J]. 食品工业, 2014, 35(6):179-182.  
DONG W M, TAN C, LIU H R, et al. Effect of physical and chemical composition on Pu-erh tea with different microbes in different fermentation stage[J]. The Food Industry, 2014, 35(6):179-182. (in Chinese)
- [5] 管俊岭. 贮藏环境与普洱茶风味品质陈化相关性研究[D]. 广州:华南农业大学, 2016.
- [6] 邢倩倩, 李思佳, 周红杰, 等. 浅析专业仓储在普洱茶产业中的地位和作用[J]. 保鲜与加工, 2015, 15(4):77-80.  
XING Q Q, LI S J, ZHOU H J, et al. Position and role of professional storage in Pu-erh tea industry[J]. Storage and Process, 2015, 15(4):77-80. (in Chinese)
- [7] 沈丽萍, 刘春丽, 刘智敏. 贮藏条件对普洱茶品质成分的影响研究[J]. 生物技术世界, 2015, 12(4):156.  
SHEN L P, LIU C L, LIU Z M. Study on the influence of storage conditions on the quality components of Pu'er tea[J]. Biotech World, 2015, 12(4):156. (in Chinese)
- [8] 念晓. 干仓贮藏与湿仓贮藏对普洱茶化学成分的影响[J]. 广东化工, 2018, 45(3):60-61.  
NIAN X. The influence of dry storage and wet storage on the chemical compositions of Pu'er tea[J]. Guangdong Chemical Industry, 2018, 45(3):60-61. (in Chinese)
- [9] 许腾升, 刘洋, 李亚莉, 等. 不同仓储地区普洱茶品质差异研究[J]. 保鲜与加工, 2016, 16(4):89-93, 98.  
XU T S, LIU Y, LI Y L, et al. Quality difference of Pu-erh tea in different preservation areas[J]. Storage and Process, 2016, 16(4):89-93, 98. (in Chinese)
- [10] 单虹丽, 唐茜. 对影响茶叶贮藏质量因素的分析[J]. 保鲜与加工, 2004, 4(4):23-25.  
SHAN H L, TANG Q. Analysis of effect factors of tea quality during storage[J]. Storage and Process, 2004, 4(4):23-25. (in Chinese)
- [11] 杨瑞娟, 王桥美, 彭文书, 等. 茶窖中微生物群落分布多样性及普洱茶内生菌和茶品质的研究[J]. 热带农业科学, 2021, 41(1):97-105.  
YANG R J, WANG Q M, PENG W S, et al. Microbial community diversity, and endophytes and quality of Pu'er tea in tea cellar[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2021, 41(1):97-105. (in Chinese)
- [12] 杨瑞娟, 吕杰, 严亮, 等. 普洱茶渥堆发酵中嗜热真菌的分离和鉴定[J]. 茶叶科学, 2011, 31(4):371-378.  
YANG R J, LYU J, YAN L, et al. Isolation and

- identification of thermophilic fungi during the fermentation of Puer tea [J]. *Journal of Tea Science*, 2011, 31(4):371-378. (in Chinese)
- [13] 严亮, 杨瑞娟, 王桥美. 云南铁皮石斛内生菌的分离与鉴定 [J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2015, 30(5):760-765. YAN L, YANG R J, WANG Q M. Isolation and identification of endophytic microorganisms in Yunnan *Dendrobium officinale* [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2015, 30(5):760-765. (in Chinese)
- [14] 杨瑞娟, 王桥美, 龚婉莹, 等. 云南景迈山不同生境茶园及茶窖空气微生物群落分布多样性研究 [J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2020, 35(4):659-666. YANG R J, WANG Q M, GONG W Y, et al. Distribution diversity of microbial communities in the air of tea gardens and tea cellars in different habitats of Jingmai Mountain, Yunnan Province [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2020, 35(4):659-666. (in Chinese)
- [15] 王淼霜, 全艳军, 蒋雨桥, 等. 苦荞对发酵豆乳纳豆激酶活力、风味及抗氧化活性的影响 [J]. *食品与生物技术学报*, 2023, 42(7):62-71. WANG M S, TONG Y J, JIANG Y Q, et al. Effects of Tartary buckwheat on nattokinase activity, flavor and antioxidant activity of fermented soybean milk [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2023, 42(7):62-71. (in Chinese)
- [16] UNBAN K, KOCHASEE P, SHETTY K, et al. Tannin-tolerant and extracellular tannase producing *Bacillus* isolated from traditional fermented tea leaves and their probiotic functional properties [J]. *Foods*, 2020, 9(4):490.
- [17] 冯玲然, 王强, 罗玮, 等. 普洱茶中转化茶多酚的优势菌株筛选与鉴定 [J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(7):762-766. FENG L R, WANG Q, LUO W, et al. Screening and identification of strains with tea polyphenols conversion activity in Pu-erh tea samples [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(7):762-766. (in Chinese)
- [18] 李芬, 陈春林, 田玉萍, 等. 云南不同品种大叶种茶树生化成分季节变化特征分析 [J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(3):88-95. LI F, CHEN C L, TIAN Y P, et al. Seasonal variation of biochemical components of different cultivars of *Camellia sinensis* var. *assamica* in Yunnan [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2022, 41(3):88-95. (in Chinese)
- [19] 王茹芸, 李亚莉, 周红杰. 普洱茶中氨基酸与贮期、级别及品质关系的研究 [J]. *西南农业学报*, 2012, 25(4):1222-1226. WANG R Y, LI Y L, ZHOU H J. Study on relationship between amino acid and storage period, grade, quality of Pu-erh tea [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 25(4):1222-1226. (in Chinese)
- [20] YUAN H B, CHEN X Q, SHAO Y D, et al. Quality evaluation of green and dark tea grade using electronic nose and multivariate statistical analysis [J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(12):3411-3417.
- [21] 念波, 焦文文, 和明珠, 等. 花果香与陈香型普洱茶生化成分与香气物质的比较 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2):241-248. NIAN B, JIAO W W, HE M Z, et al. Determination and comparison of biochemical components and aroma substances in the Pu-erh teas with mellow flavor and floral-fruity aroma [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(2):241-248. (in Chinese)
- [22] 刘学艳, 王娟, 彭云, 等. 基于电子鼻与 GC-IMS 技术南昌宁红茶香气研究 [J]. *茶叶通讯*, 2021, 48(1):80-89. LIU X Y, WANG J, PENG Y, et al. Study on the aroma of Yunnan Changning black tea based on electronic nose and gas chromatography-ion mobility spectroscopy [J]. *Journal of Tea Communication*, 2021, 48(1):80-89. (in Chinese)
- [23] 王宝怡, 王培强, 李晓晗, 等. 基于电子鼻技术对不同季节山东绿茶香气的分析 [J]. *现代食品科技*, 2020, 36(10):284-289, 259. WANG B Y, WANG P Q, LI X H, et al. Analysis of aroma of Shandong green tea in different seasons based on electronic nose technology [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(10):284-289, 259. (in Chinese)
- [24] 姚璐, 丁亚明, 马晓钟, 等. 基于电子鼻技术的金华火腿鉴别与分级 [J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(10):1051-1056. YAO L, DING Y M, MA X Z, et al. Identification and classification of Jinhua ham by electronic nose [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(10):1051-1056. (in Chinese)
- [25] 严宽, 李翔宇, 张建, 等. 四川黑茶渥堆发酵不同时期细菌群落结构与多样性 [J]. *宜宾学院学报*, 2023, 23(12):38-43. YAN K, LI X Y, ZHANG J, et al. Bacterial community structure and diversity in different periods of Sichuan dark tea [J]. *Journal of Yibin University*, 2023, 23(12):38-43. (in Chinese)
- [26] SUN T, YANG Y R, DUAN K L, et al. Biodiversity of endophytic microbes in diverse tea *Chrysanthemum* cultivars and their potential promoting effects on plant growth and quality [J]. *Biology*, 2023, 12(7):986.
- [27] 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. GAO X Y, YAN L, ZHAO Y, et al. Advance in relationship between microbial diversity and Pu'er tea quality [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(22):13-17. (in Chinese)

(责任编辑: 闫林红)