

分类号:

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530141

书剑普洱茶优势原核功能菌分离及代谢特性研究
ISOLATION OF DOMINANT PROKARYOTIC
FUNCTIONAL BACTERIA FROM SHUJIAN PU-ERH
TEA AND THEIR METABOLIC FUNCTIONS

论 文 作 者 :	韩肋撒
校 内 导 师 :	薛正莲 (教授)
校 外 导 师 :	闫春波
专 业 学 位 类 别 :	生物与医药
研 究 方 向 (领 域):	生物技术与工程

论文答辩日期: 2024.05.30

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：韩勋敬

日期：2024年 05 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：韩勋敬

指导教师签名：何正

日期：2024年05月30日

日期：2024年05月30日

书剑普洱茶优势原核功能菌分离及代谢特性研究

摘 要

普洱茶属于渥堆发酵茶，具有独特的口感与品质，对人体健康有很大的益处。渥堆发酵受原料、环境与微生物等因素的共同影响，微生物为主要影响因素。本研究首先通过化学物质检测、高通量测序等技术分析不同发酵原料、不同发酵程度对普洱成品茶中非挥发性成分与菌群结构的影响。然后追踪整个发酵过程，研究发酵过程中理化参数、原核菌群结构与主要成分的变化，及三者间的联系。最后分离优势原核功能菌，并对其代谢特性进行研究。研究结果如下：

通过分析不同发酵原料、不同发酵程度的普洱茶发现：与浅发酵茶相比，原核菌群结构由 *Pseudomonas* 占优势（绿茶 43.26%、红茶 73.02%）转变为 *Staphylococcus*（38.50%）、*Kocuria*（19.62%）、*Brevibacterium*（18.59%）共同占优势；高发酵茶真核菌群结构由 *Penicillium*（绿茶 49.22%）与 *Mycosphaerella*（红茶 32.59%）占绝对优势转变为 *Blastobotrys*（41.26%）、*Thermomyces*（29.40%）、*Aspergillus*（14.60%）、*Rasamsonia*（11.47%）共同占优势。高发酵程度利于提高可溶性多糖、木质素、总黄酮、蛋白质、茶褐素的含量。茶梗发酵利于提高 *Pseudomonas* 的相对丰度（86.78%），降低蛋白质的含量；蜂蜜发酵利于提高 *Aspergillus* 的相对丰度（87.47%）

与茶褐素的含量；黄片发酵综合提高 *Aspergillus* (31.90%)、*Thermomyces* (41.91%)、*Rhizomucor* (20.09%)、*Pseudomonas* (40.46%) 与 *Bacillus* (21.44%) 的相对丰度与可溶性多糖的含量。通过 PICRUST2 功能预测，普洱茶发酵样本共有优势菌属代谢功能与原料和环境具有一定相关性；其差异特征菌属的代谢功能呈现出一定冗余性。通过冗余分析发现，游离氨基酸、木质素、纤维素和茶褐素与真核菌群显著相关，蛋白质、可溶性多糖与原核菌群显著相关。

通过追踪普洱茶发酵过程发现：随发酵的进行，普洱茶中可溶性多糖 (13.89 → 22.31 mg/g)、总黄酮 (8.79 → 18.45 mg/g)、茶褐素 (18.36 → 60.90 mg/g)、蛋白质 (275.63 → 333.96 mg/g)、木质素 (316.67 → 558.33 mg/g) 的含量逐渐增高；茶多酚 (248.48 → 107.22 mg/g)、游离氨基酸 (21.10 → 13.61 mg/g)、纤维素 (163.89 → 108.33 mg/g) 的含量逐渐降低；绝对优势原核菌属由 unclassified_Enterobacteriaceae、*Bacillus* 转变为 *Staphylococcus* 与 *Kocuria*。通过非靶向代谢组学发现，发酵后期肉桂酸、亚油酸、维生素 E、(-)-石竹环氧烷显著上调，可可碱显著下调。正、负离子模式下的差异代谢物分别主要进行新陈代谢途径 (83.3%) 与不饱和脂肪酸的生物合成 (100%)。通过冗余分析发现，水活度、温度对原核菌群具有显著贡献，游离氨基酸、茶多酚与原核菌群显著相关。

对发酵过程中的优势原核功能菌进行分离，得到 4 种芽孢杆菌：*Bacillus haynesii*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus*

amyloliquefaciens。通过水解实验与摇瓶发酵实验分析其代谢特性发现, *Bacillus subtilis* 水解蛋白质 (2.14)、淀粉 (1.44)、果胶 (1.64) 与代谢游离氨基酸 (5.38 → 1.94 mg/g) 的能力较强, *Bacillus haynesii* 水解纤维素 (1.67) 与代谢茶多酚 (621.55 → 300.87 mg/g)、儿茶素 (11.49 → 6.45 mg/g) 的能力较强。此外发现, *Bacillus subtilis* 产过氧化物酶 (28.38 U/mL) 与多酚氧化酶 (70.67 U/mL) 的活力最好。

关键词: 普洱茶, 发酵基质, 原核菌群, 代谢特征, 微生物组学, 代谢组学

ISOLATION OF DOMINANT PROKARYOTIC FUNCTIONAL BACTERIA FROM SHUJIAN PU-ERH TEA AND THEIR METABOLIC FUNCTIONS

ABSTRACT

Pu-erh tea belongs to the pile-fermented tea, which has a unique taste and quality, and has great benefits to human health. The pile-fermented is affected by the combination of raw materials, environment and microorganisms, and microorganisms are the main influencing factors. First, this study analyzed the effects of different fermentation raw materials and different fermentation degrees on the nonvolatile components and bacterial structure of Pu-erh finished tea by chemical substance detection and high-throughput sequencing. Secondly, the whole pile-fermented process was traced to study the changes in physicochemical parameters, prokaryotic colony structure and major components during the pile-fermented process, as well as the connection between the three. Finally, the dominant prokaryotic functional bacteria were isolated and their metabolic

characterization was studied. The results of the study are as follows:

It was found by analyzing Pu-erh teas with different fermented raw materials and different degrees of pile-fermented: compared to light-fermented teas, the structure of the prokaryotic microbiota of high degree of fermentation were transformed from the absolute dominance of *Pseudomonas* (Green tea, 43.26%; Black tea, 73.02%) to the co-dominance of *Staphylococcus* (38.50%), *Kocuria* (19.62%), and *Brevibacterium* (18.59%); the structure of the eukaryotic microbiota transformed from the absolute dominance of *Penicillium* (Green tea, 49.22%) and *Mycosphaerella* (Black tea, 32.59%) to the co-dominance of *Blastobotrys* (41.26%), *Thermomyces* (29.40%), *Aspergillus* (14.60%) and *Rasamsonia* (11.47%). The high degree of fermentation facilitates the increase of soluble polysaccharides, lignin, total flavonoids, proteins, and teabrownin content. The fermentation of tea stems led to the increase of the percentage-abundance of *Pseudomonas* (86.78%) and decrease of protein content; adding honey led to the increase of the percentage-abundance of *Aspergillus* (87.47%) and increase the content of teabrownin; the fermentation of yellow tea-leaf comprehensively led to the increase of the percentage-abundance of *Aspergillus* (31.90%), *Thermomyces* (41.91%), *Rhizomucor* (20.09%), *Pseudomonas* (40.46%) and *Bacillus* (21.44%), and increase the content of soluble polysaccharide. By PICRUST2 functional prediction, certain correlation was found between the metabolic functions

of fermented Pu-erh tea's co-dominant genera and their raw materials and environment; the metabolic functions of their exclusive genera showed certain functional redundancy. Redundancy analysis reveals that free amino acids, lignin, cellulose and pheophytin were significantly associated with eukaryotic microbiota, while proteins and soluble polysaccharides were significantly associated with prokaryotic microbiota.

Discovered by tracing the pile-fermented process of Pu-erh tea: with pile-fermentation, the contents of soluble polysaccharides (13.89 → 22.31 mg/g), total flavonoids (8.79 → 18.45 mg/g), theaflavins (18.36 → 60.90 mg/g), proteins (275.63 → 333.96 mg/g), and lignin (316.67 → 558.33 mg/g) in Pu'er tea gradually increased; The contents of tea polyphenols (248.48 → 107.22 mg/g), free amino acids (21.10 → 13.61 mg/g), and cellulose (163.89 → 108.33 mg/g) gradually decreased; The absolute dominance genera of prokaryotic change from unclassified_Enterobacteriaceae and *Bacillus* to *Staphylococcus* and *Kocuria*. Significant up-regulation of cinnamic acid, linoleic acid, vitamin E, and (-)-stigmasterol epoxide, and significant down-regulation of theobromine during the later stages of pile-fermented were found by untargeted metabolomics. Differential metabolites in the positive and negative ion modes mainly carried out metabolic pathways (83.3%) and unsaturated fatty acid biosynthesis (100%). Through redundancy analysis, it was found that water activity and temperature contributed significantly

to the prokaryotic flora, while free amino acids and tea polyphenols were significantly associated with the prokaryotic flora.

The isolation of the dominant prokaryotic functional bacteria during pile-fermented yielded four *Bacillus* species: *Bacillus haynesii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus amyloliquefaciens*. Analysis of their metabolic properties through hydrolysis and shake flask fermentation experiments revealed that *Bacillus subtilis* hydrolyzed proteins (2.14), starch (1.44), and pectin (1.64) with a stronger ability to metabolize free amino acids (5.38 $\rightarrow$ 1.94 mg/g), and *Bacillus haynesii* hydrolyzed cellulose (1.67) with a stronger ability to metabolize tea polyphenols (621.55 $\rightarrow$ 300.87 mg/g), and catechins (11.49 $\rightarrow$ 6.45 mg/g). In addition, *Bacillus subtilis* was found to produce the best peroxidase (28.38 U/mL) with polyphenol oxidase (70.67 U/mL) activity.

KEY WORDS: Pu-erh tea, fermentation substrate, prokaryotic flora, metabolic characterization, microbiomics, metabolomics

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
目 录.....	VIII
第 1 章 绪论.....	1
1.1 普洱茶概述.....	1
1.1.1 普洱茶.....	1
1.1.2 普洱茶的作用.....	2
1.2 不同种类的普洱茶.....	3
1.2.1 不同发酵原料普洱茶.....	3
1.2.2 不同发酵程度普洱茶.....	4
1.3 理化参数对渥堆发酵的影响.....	4
1.3.1 发酵温度.....	4
1.3.2 水分.....	5
1.3.3 水活度.....	5
1.3.4 pH.....	5
1.4 普洱茶的发酵过程.....	6
1.4.1 原核微生物的变化.....	6
1.4.2 物质成分的变化.....	7
1.5 微生物代谢对普洱茶品质的影响.....	9
1.6 研究意义与内容.....	9
1.6.1 研究意义.....	9
1.6.2 研究内容.....	10
第 2 章 不同成品普洱茶菌群结构与品质差异.....	11
2.1 实验材料.....	12
2.1.1 实验材料.....	12
2.1.2 实验药品.....	12
2.1.3 实验仪器.....	13

2.2 实验方法.....	13
2.2.1 普洱茶发酵与品评.....	13
2.2.2 DNA 提取、文库构建、扩增子高通量测序	15
2.2.3 高通量测序原始数据处理及分析.....	15
2.2.4 理化参数和主要风味成分检测.....	16
2.3 结果与讨论.....	16
2.3.1 成品普洱茶品评结果.....	16
2.3.2 成品普洱茶的理化参数和主要风味成分.....	17
2.3.3 成品普洱茶菌群结构的 α 多样性参数.....	20
2.3.4 成品普洱茶菌群结构差异.....	21
2.3.5 成品普洱茶差异特征菌属潜在代谢功能预测.....	26
2.3.6 成品普洱茶菌属与理化参数及主要风味成分间的 RDA 相关性	26
2.4 小结.....	27
第 3 章 发酵过程中原核菌群结构与关键风味研究.....	29
3.1 实验材料.....	29
3.1.1 实验药品.....	29
3.1.2 实验仪器.....	29
3.2 实验方法.....	30
3.2.1 小布朗普洱茶发酵.....	30
3.2.2 DNA 提取、文库构建、扩增子高通量测序	31
3.2.3 高通量测序原始数据处理及分析.....	32
3.2.4 非靶向代谢组学分析.....	32
3.2.4 理化参数检测.....	34
3.2.5 主要风味成分含量检测.....	34
3.3 结果与讨论.....	34
3.3.1 理化参数的变化.....	34
3.3.2 主要风味成分的变化.....	35
3.3.3 原核菌群的 α 多样性参数.....	37
3.3.4 原核菌群结构变化.....	38

3.3.5 非靶向代谢组学分析.....	40
3.3.6 原核菌属与理化参数及主要风味成分间的 RDA 相关性	52
3.4 小结.....	52
第 4 章 发酵过程中核心原核功能菌分离及代谢特征分析.....	54
4.1 实验材料.....	54
4.1.1 茶叶原料.....	54
4.1.2 实验药品.....	54
4.1.3 实验仪器.....	55
4.1.4 培养基.....	56
4.2 实验方法.....	56
4.2.1 原核菌种的分离与纯化.....	56
4.2.2 原核菌种形态学鉴定	57
4.2.3 原核菌种分子生物学鉴定.....	57
4.2.4 生理生化检测.....	58
4.2.5 芽孢杆菌摇瓶发酵.....	59
4.3 结果与讨论.....	61
4.3.1 芽孢杆菌的分离与纯化.....	61
4.3.2 形态学鉴定结果.....	61
4.3.3 分子学鉴定结果.....	63
4.3.4 生理生化检测结果.....	65
4.3.5 发酵液酶活性与代谢特性的检测.....	67
4.4 小结.....	68
第 5 章 结论与展望.....	70
5.1 结论.....	70
5.2 展望.....	71
参考文献.....	73
攻读硕士期间发表论文.....	83
致谢.....	84

第 1 章 绪论

1.1 普洱茶概述

1.1.1 普洱茶

我国是茶叶大国，“茶”在我国的历史长流中一直占据着重要地位^[1, 2]。关于制茶、品茶与茶分类，中国具有绝对的发言权。二零二三年四月，安徽农业大学的茶树生物学与资源利用国家重点实验室正式颁布了茶叶分类的国际标准：ISO 20715:2023《茶叶分类》，代表我国对茶叶的分类被国际所认可。《茶叶分类》中将茶叶产品分为绿茶、白茶、黄茶、青茶（即：乌龙茶）、红茶、黑茶 6 类，其发酵程度依次加深。发酵程度是由茶叶中的酶催化导致茶叶发生了不同程度的氧化来定义的^[3]。茶叶发生氧化时会生成可溶性色素：茶黄素、茶红素、茶褐素^[4]。其中，茶黄素的颜色最浅，茶褐素的颜色最深，茶红素的颜色居中。因此，发酵程度越高的茶其汤色越深。

绿茶属于不发酵茶（即未发酵茶），经杀青（固定）、揉捻、干燥三个步骤制作而成^[5]。绿茶的茶汤一般呈绿色或黄绿色，茶汤中含有大量的儿茶素与 L-茶氨酸，在饮用时可以感受到明显的苦涩味与鲜味^[6]。白茶属于微发酵茶，仅由萎凋与干燥两个步骤制作而成。其中烘火（通过毛火与足火来干燥白茶）是生产白茶的一道重要工艺，用于促进茶叶内部进行热化学反应，以提高白茶的香味^[7]。白茶茶汤一般呈淡绿色或杏黄色，其滋味鲜醇，味道清香^[8]。黄茶属于轻发酵茶，经萎凋、杀青、揉捻、闷黄、干燥五个步骤制作而成^[9]。“闷黄”工艺促进黄茶中的叶绿素、氨基酸、表儿茶素没食子酸酯、原花青素 B2 等物质发生分解反应，使得黄茶具备“黄叶、黄汤、黄底”与“苦味低”的特性^[10]，是制作黄茶的重要步骤。乌龙茶属于半发酵茶，经萎凋、摇青、炒青、揉捻、干燥五个步骤制作而成^[11]，以清新的花香与果香闻名。其中，采摘与摇青两个步骤中对乌龙茶茶叶的压力是影响乌龙茶香气形成的关键因素^[11, 12]。乌龙茶的

茶汤一般呈黄绿色、橙黄色或橙红色。红茶属于全发酵茶，经萎调、揉捻、发酵、烘干四个步骤制作而成^[13]，以甜味、蜂蜜味和花香闻名。制作过程中的揉捻和发酵两个步骤决定了红茶风味和质量^[14]，此外，红茶中茶红素的含量较高^[15]，使其茶汤呈红色。黑茶属于后发酵茶，经萎调、揉捻、杀青、晾晒、渥堆五个步骤制作而成。因茶叶经渥堆等工艺后颜色变黑，故名为黑茶。黑茶以其特殊的味道、口感、汤色与健康功效而闻名。

按地域可将黑茶分为：安徽古黟黑茶、云南普洱茶、湖南黑茶、湖北青砖茶、广西六堡茶、陕西茯茶、四川藏茶 7 种。其中，“云南普洱茶”最为典型^[16]。云南普洱茶是以云南大叶种（*Camellia sinensis* var. *assamica*）晒青毛茶为原料，经渥堆发酵制成的后发酵茶^[17, 18]。具备特殊的木味、陈味，低涩味，浓郁醇厚的口感与红浓明亮的汤色等多种特性^[19, 20]。渥堆是普洱茶具有独特口感与品质的关键步骤，其中，木味与陈味是渥堆发酵时产生大量甲氧基酚类化合物与 β -紫罗兰酮的原因^[21]；涩味降低与口感的浓郁醇厚是渥堆发酵时茶氨酸和儿茶素氧化生成葛根素的原因^[22]；红浓的茶汤是渥堆发酵时产生大量茶褐素的原因^[23]。

1.1.2 普洱茶的作用

普洱茶具有抗肥胖、抗高血糖、抗高血脂、抗氧化、抗癌细胞等多种健康益处。因为，制作普洱茶时，除了有“揉捻发酵”外，还有其它茶制作工艺没有的“渥堆发酵”，这使普洱茶具有更丰富的营养价值。此外，渥堆发酵以微生物为主，微生物在进行生长、发育、繁殖等生命活动时会分泌大量生物酶，进而促进某些有益物质的产生。普洱茶中的有益物质通过影响体内的部分代谢功能来维护人类的身体健康。

饮用普洱茶可以抑制促进体内脂肪与长链脂肪酸合成的关键酶：脂肪酸合酶（Fatty Acid Synthases, FASs）、乙酰辅酶 A 羧化酶（Acetyl-Coenzyme A Carboxylase, ACC）与碳水化合物反应元件结合蛋白（Carbohydrate Response Element Binding Protein, ChREBP）等的产生，最终达到抗肥胖的功效^[24, 25]。此外，普洱茶中的多酚物质普洱茶中的儿茶素和生物碱也可以降低体内脂肪的合成^[26]。 α -淀粉酶与 α -葡萄糖苷酶是淀粉代谢途径中的重要酶，有助于人体吸收

碳水化合物。普洱茶中的多酚、多糖与茶褐素可以抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的合成^[27]，故饮用普洱茶可抑制体内 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的产生来抵抗高血糖。Chunxiu Peng 等人^[28]发现，普洱茶中的茶褐素通过刺激肝胆醇转化成胆汁酸与胆固醇的排泄来调节脂质代谢，以降低高血脂。Haipeng Lv 等人^[29]发现，普洱茶中的黄酮类化合物、茶褐素与表没食子儿茶素没食子酸酯与细胞的抗氧化活性显著相关。

1.2 不同种类的普洱茶

1.2.1 不同发酵原料普洱茶

一般普洱茶的发酵原料以云南大叶种的嫩芽为主，但随着普洱茶文化的发展，普洱茶的发酵原料种类也逐渐增多。如添加茶梗的茶梗普洱茶、普洱茶黄片（也称：普洱黄金叶）、柑普茶等。多变的普洱茶产品的研发，一方面是出于市场竞争需要，另一方面则是为了提高普洱茶的品质与功能。

茶梗一般为茶叶生产过程中的废料^[30]，但在普洱茶发酵原料中添加适量的“梗”反而更有利于提高普洱茶的风味。添加适量茶梗的普洱茶比未加茶梗的普洱茶更耐泡^[31]，提升了普洱茶的性价比；其次，茶梗中的纤维素含量较高^[32]，带有茶梗的普洱茶在渥堆发酵时供给微生物的碳源较多，利于可溶性多糖的合成，使得含茶梗的普洱茶汤味道更甜；此外，与嫩叶相比茶梗较老，其内部积累的营养物质多于嫩叶，有助于渥堆发酵时微生物产酶生成香气物质，故而含有茶梗的普洱茶香气丰富；最后，茶梗质地较叶片硬，在渥堆时起到“骨架支撑”作用，更利于渥堆时微生物呼吸进行生长代谢，增强普洱茶的品质。

黄片为茶树中较为粗老的叶片，加工制成的普洱茶较宽大、疏松，外形次于用嫩叶发酵的普洱茶。虽然普洱茶黄片的外形不突出，但由于黄片为生长充分的茶树老叶，其叶片内部积累了较多的营养物质（如：多糖），同时，其内部的多酚、咖啡碱等物质含量变少，使得普洱茶黄片的茶汤苦涩味较低。

柑普茶是由广东新会柑的外皮与普洱茶一起为原料制作而成，新会柑自带果香并含有较多的酶与功能成分^[33]，在发酵时促进普洱茶中柑橘香的形成，丰富柑普茶的香气。此外，柑橘皮中含有丰富的酚酸和类黄酮，其抗氧化活性优

于果肉^[34]，与普洱茶共同发酵提高了其健康功效。陈皮与普洱茶均有“越陈越香”、“越陈越佳”的特色，两者的完美结合提高了产品质量。

1.2.2 不同发酵程度普洱茶

常说的普洱茶为普洱熟茶，即经后发酵制成的“黑茶”。而由于普洱茶文化的不断发展，按照发酵程度目前已经衍生出了未发酵的普洱绿茶与全发酵的滇红（即：普洱红茶）。

普洱绿茶是以云南大叶种经茶萎凋、杀青、晾晒和高压灭菌压制四个步骤制作而成^[35]，与一般绿茶具有相似的化学成分和口感品质。其中杀青与高压灭菌压制显著影响普洱绿茶中的挥发性物质醛类与酮类的含量。普洱熟茶中茶多糖与没食子酸儿茶素没食子酸酯较多，而普洱绿茶中以儿茶素、表儿茶素、咖啡因较多^[36]。

普洱红茶是以云南大叶种茶经萎凋、揉捻（揉切）、发酵、干燥四个步骤制作而成，其茶汤香气馥郁、味道浓醇、色彩红亮^[37]。其中，由揉捻制成的是滇红工夫茶；由揉切制成的是滇红碎茶。普洱红茶的制作过程中发生了发酵，使叶片内的多酚被多酚氧化酶、过氧化氢酶等关键酶催化进行氧化、聚合、缩合反应，生成影响茶汤颜色的可溶性色素，如：茶黄素（Theaflavin, TFs）、茶红素（Thearubigins, TRs）等^[37, 38]。此外，多糖与蛋白质的水解、氨基酸的转化都积极影响了普洱红茶的风味^[38]。

1.3 理化参数对渥堆发酵的影响

渥堆发酵过程中的发酵温度、茶堆水分、茶叶水活度、pH 与微生物等多种因素共同决定着发酵普洱茶的品质。其中微生物是渥堆发酵的主体^[19, 36]，而微生物的生长代谢受渥堆发酵过程中发酵温度、茶堆水分、茶叶水活度、pH 等理化参数的影响。故，发酵过程中的理化参数变化通过影响发酵过程中微生物的生长代谢，来影响普洱茶的质量与品质。

1.3.1 发酵温度

普洱茶的发酵温度一般为 50~60℃^[39]，通常最低温度不低于 40℃，最高温

度不高于 65℃。微生物通常在 40 ~ 50℃时可正常的进行生命活动的代谢。如果温度过低，则不益于微生物的生长与茶堆中酶促反应的发生；而如果温度过高，则容易抑制酶促反应的进行，造成微生物的死亡，严重时还会发生“烧堆”，造成严重的经济损失。发酵温度低于 15℃ 时多酚氧化酶（Polyphenol Oxidase, PPO）和过氧化物酶（Peroxidase, POD）的活性较低^[40]，Tanmoy Samanta 等人^[41]发现发酵温度为 20℃ 时更益于茶黄素与茶红素的产生、35℃ 时更益于儿茶素的降解，有助于茶汤颜色与降低涩味；Fengfeng Qu 等人^[42]研究发现，较高的发酵温度可以催化多糖转化为单糖，进而提高可溶性多糖的含量；范惠贞^[43]在报道中提到，通过控制发酵温度可以促使微生物产生特有的芳香类物质，提升普洱茶风味；张浩^[44]提出茶堆发酵温度控制不当时，有感染黄曲霉的风险。

1.3.2 水分

水是生命的源泉。但由于水分的挥发性和微生物对水分的利用，渥堆发酵时若无外源水分的补充，水分将一直呈降低趋势而降至微量，以至影响微生物的生命代谢活动。因此，为保证发酵质量，在渥堆发酵前与每个发酵周期结束时，师傅会按一定的茶水比对茶叶进行补水工作。此外，若渥堆发酵时茶堆水分过多则会降低茶堆内部氧气的流通，促进厌氧微生物的产生，导致茶叶腐烂。因此，整个渥堆发酵周期，茶叶水分基本维持在 25% 左右。

1.3.3 水活度

水活度（Water Activity, a_w ）可以影响微生物的生长发育、真菌孢子的产生与某些微生物毒素的产生^[45]，也被美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）定为安全参考标准。研究发现^[45]，细菌多在 0.85 ~ 0.90 a_w 的环境中更易于生存，而腐生细菌可生长的最高水活度高达 0.95 a_w 。水活度降低后细菌的生长繁殖将受到抑制。酵母与霉菌则在 0.61 a_w 左右的环境中更易于生存，且水活度值的减少会抑制真菌毒素的产生。

1.3.4 pH

pH 也是影响微生物生长的重要因素之一，过高或过低的 pH 都不宜于微生

物的生长，当 pH 为 6.7~9.0 时比较适合微生物生命活动的进行^[46]。由于在渥堆发酵过程中微生物代谢产物种类多样，使得茶堆中酸性物质与碱性物质的含量不断变化，导致渥堆发酵过程中茶叶的 pH 值处于波动状态。Xiqing Bian 等人^[47]与 Hailong Mao 等人^[48]发现，*Bacillus* 可以产生大量有机酸，如：葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸等，过多有机酸的积累会降低茶汤的 pH^[49]。此外，Zhongyuan Li 等人^[50]发现，普洱茶渥堆发酵过程中 pH 值的波动范围为 5.0~7.0。

1.4 普洱茶的发酵过程

1.4.1 原核微生物的变化

微生物是渥堆发酵的主体^[19, 36]。众所周知，微生物具有广泛的生物功能性，其在生长过程中会分泌大量生物酶，催化发酵茶堆中各种化学反应的进行。如微生物以云南大叶种晒青毛茶为主要营养原料代谢降解叶片中茶多酚、游离氨基酸、纤维素……生成茶褐素、可溶性多糖等风味成分。微生物菌群结构的变化对普洱茶的质量与品质有重要意义。由于真核微生物相对于原核微生物的分解力更强，所以原核微生物在渥堆发酵后期的含量较前期多。

目前研究表明，门水平上，普洱茶中主要以蓝藻菌门（Cyanobacteria）、变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）、放线菌门（Actinobacteria）等为主^[51, 52]；属水平上，主要以葡糖球菌属（*Staphylococcus*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、短杆菌属（*Brevibacterium*）等为主。渥堆发酵后原核微生物的多样性与丰富度均显著增加^[19, 50]。其中，发酵前期主要的原核菌门为：Cyanobacteria、Proteobacteria，主要的原核菌属为：蓝藻细菌属（Cyanobacteria）、未鉴定的叶绿体（norank_o_Chloroplast）、肠杆菌属（Enterobacteriaceae）、无色杆菌属（Achromobacter）、*Staphylococcus* 和鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）^[19, 36, 51, 52]；发酵中期主要的原核菌门为：Proteobacteria，主要的原核菌属为：未鉴定的肠杆菌属（unclassified_Enterobacteriaceae）、泛菌属（*Pantoea*）、*Staphylococcus*^[19, 51, 52]；发酵后期主要的原核菌门为：Firmicutes、Actinobacteria、Proteobacteria，主要的原核菌属为：*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Brevibacterium*、乳酸乳球菌

(*Lactococcus*)、unclassified_Enterobacteriaceae^[19, 36, 51, 52]。

1.4.2 物质成分的变化

1.4.2.1 可溶性多糖

可溶性多糖由多种单糖（如：葡萄糖、甘露糖、木糖、半乳糖）组成的水溶性化合物，是影响普洱茶汤口感的主要化合物之一。可溶性多糖有甜味，在普洱茶中可以缓解咖啡因、茶多酚及其它成分导致的苦涩味^[19, 51, 53]。此外，可溶性多糖有助于增强普洱茶汤的粘稠度^[54]，提高茶汤的醇厚度。由于渥堆发酵过程中微生物对叶片中果胶、纤维素、淀粉等非水溶性大分子碳源的分解^[20, 55]，及真菌细胞壁中的非水溶性多糖的分解^[19]，使可溶性多糖的值在普洱茶发酵过程中呈上升趋势。

1.4.2.2 纤维素与木质素

纤维素与木质素是普洱茶中重要的膳食纤维，可以调节肠道功能、改善便秘^[56]。其中，纤维是一种可以为微生物提供能量的多糖，而木质素则属于多酚一类^[57]，两者通过半纤维素连接^[58]共同组成植物细胞壁的重要部分。由于其特殊的结构性，在渥堆发酵过程中充当茶堆的支撑骨架，利于茶堆内部氧气的流通，保证好氧微生物的生命活动的进行。此外，茶叶是渥堆发酵时微生物唯一的营养物质来源，大量微生物则会对“纤维素-半纤维素-木质素”体系进行分解^[59]，使纤维素与木质素释放出来。进而微生物通过分解纤维素酶等特性酶对纤维素进行进一步的分解，使之转化成为可溶性糖^[20]。纤维素的分解与利用有助于改善普洱茶的风味。

1.4.2.3 总黄酮

黄酮类化合物主要包括黄酮、双黄酮、儿茶素，其中黄酮主要由槲皮素、山柰素等组成^[60]，黄酮有助于茶的颜色和味道^[61]。普洱茶加工过程中黄酮类化合物的总含量显著降低^[19]，Jinhua Qin 等人^[62]推测，黄酮类化合物的降低是类黄酮和黄酮糖苷水解成儿茶素和没食子酸所致。此外，黄酮值的降低有助于降

低普洱茶汤的苦涩味^[63]。

1.4.2.4 茶多酚

茶多酚 (Tea Polyphenols, TPs) 为普洱茶的主要风味物质, 由黄烷醇、花青素、酚酸、木脂素等物质组成^[64]。茶多酚具有较强的抗氧化活性^[16], 并且摄入茶多酚有利于降低体重与防治肥胖^[65]。由于微生物的作用, 渥堆发酵后的普洱茶中茶多酚的含量低于未发酵的普洱茶^[51]。此外, 茶多酚的降低也与其发生了氧化、缩合或与蛋白质结合生成聚合物有关^[66]。

1.4.2.5 茶褐素

茶汤颜色主要由显色物质: 茶黄素、茶红素、茶褐素等决定。其中, 茶褐素是由多糖与酚类或蛋白质结合而成的有色聚合物, 是使普洱茶汤呈现深红色的主要因素^[19, 23]。此外, Yulian Chen 等人^[67]研究表明, 茶褐素的含量与茶汤中的苦涩味呈负相关。随渥堆发酵的进行, 普洱茶中的茶黄素、茶红素在酶的催化作用下含量呈降低趋势, 而茶褐素呈上升趋势^[51]。最后, 茶褐素在普洱茶中除起到显色作用外, 还具有许多健康功能, 如: 抗氧化、抗高胆固醇、抗肿瘤等^[68, 69]。

1.4.2.6 蛋白质

蛋白质是由氨基酸组成的多肽链通过盘曲折叠形成的具有一定空间结构的有机大分子物质, 不易溶于水, 是微生物生命活动的重要承担者。普洱茶中的蛋白质含量较高, 约占茶叶干物质含量的 20 ~ 30%^[56]。部分蛋白质在渥堆发酵过程中被微生物分泌的蛋白水解酶水解成寡肽甚至游离氨基酸^[70]。Tiehan Li 等人^[71]报道, 鲜叶内部的叶绿体由叶绿素与蛋白质结合而成, 渥堆发酵时微生物的分解作用可释放出其中的蛋白质。此外, Shiqiang He 等人^[72]表明, 蛋白质与酚酸、多糖、脂类共同组成高度聚合的棕色物质 (茶褐素)。

1.4.2.7 游离氨基酸

游离氨基酸是含氨基与含羧基的有机化合物, 以游离状态存在于叶片内,

占茶叶干重的 1 ~ 4%，是普洱茶的重要风味成分。游离氨基酸有助于普洱茶汤的鲜味与醇味^[19, 73]，不同的游离氨基酸可以为茶叶提供不同的口感，如：丙氨酸（Ala）和赖氨酸（Lys）有助于茶汤的甜味，谷氨酸（L-Glu）和天冬氨酸（Asp）有助于茶汤的鲜味等^[74]。在渥堆发酵中，游离氨基酸在微生物酶的作用下发生一系列生化反应，如：美拉德反应等，导致渥堆时普洱茶中游离氨基酸的含量呈降低趋势^[71, 75]。其中，美拉德反应的发生有助于挥发性芳香物质（如：醛类）的生成^[66]，有助于增强普洱茶风味。此外，Qingqing Cao 等人^[76]证明，微生物可在渥堆发酵时将游离氨基酸转化成乙酰氨基酸和其他衍生物，从而使黑茶的口感更醇厚顺滑。

1.5 微生物代谢对普洱茶品质的影响

渥堆发酵受湿、热、微生物等因素的影响，微生物是其发酵质量的主要影响因素。随发酵的进行，微生物在茶堆中不断衍生繁殖，同时产生大量的生物酶。这些生物酶可以促进叶片中物质的分解与转化，生成有益于普洱茶品质的关键物质。茶叶中的蛋白质具备抗氧化、抗肿瘤、降血脂、预防冠心病等多种健康功效^[77]。Jing Li 等人^[19]通过冗余分析发现渥堆发酵菌群中 *Blastobotrys* 和 *Thermomyces* 与茶蛋白的值呈正相关。茶褐素可为茶汤增添独特的颜色与味道，其由过氧化物酶与漆酶等催化生成。Zhongyuan Li 等人^[50]研究发现渥堆中的微生物菌群所产过氧化物酶与漆酶含量较高，此外，Teng Wang 等人^[51]发现 *Staphylococcus* 与茶褐素的值呈正相关，推测 *Staphylococcus* 助于茶褐素的生成。除颜色与功效外，普洱茶具有独特的木味与陈味。Zhongyuan Li 等人^[50]报道假单胞菌可以产生甲氧基分类化合物助于丰富普洱茶香气。Xuehang Yan 等人^[21]也发现，微生物协同发酵为普洱茶增添了优质的花香和果香。此外，*Achromobacter* 有助于渥堆发酵过程中可溶性糖的生成^[51]。

1.6 研究意义与内容

1.6.1 研究意义

由于普洱茶具有抗氧化、抗肥胖、抗高血脂等功能作用，普洱茶所受关注

增多，改善普洱茶风味与缩短普洱茶的发酵时间成为目前待解决的问题。微生物是普洱茶发酵的主体，与茶中茶多酚、可溶性多糖、游离氨基酸、茶褐素等关键成分有着密切联系。此外发酵过程中不断变化的温度、水分等影响发酵普洱茶中微生物的生长代谢，使发酵后普洱茶中积累的风味物质不同，最终影响发酵普洱茶品质。加之，目前的研究重心为真核菌群，故有必要对于发酵过程中原核菌群结构的变化规律、理化参数与风味物质的变化趋势进行研究。

因此通过分析发酵过程中原核微生物与关键成分的变化情况，建立两者间相互影响的关系枢纽，有利于将来完善发酵工艺，或通过反添加功能原核菌属以针对性的改善某种品质短板来提升茶叶品质。

1.6.2 研究内容

通过理化检测方法及 16S rRNA、ITS 扩增子测序技术对不同发酵原料、不同发酵程度普洱茶进行研究，以探究发酵程度、原料对普洱成品茶的菌群结构、理化参数与主要风味成分的影响。

通过检测小布朗普洱茶发酵过程中的理化参数、采集发酵过程茶样并进行 16S rRNA、ITS 扩增子测序分析，以研究渥堆发酵过程中理化参数对小布朗普洱茶原核菌群结构的影响及小布朗普洱茶原核菌群结构对主要风味成分的影响。

通过分离纯化、形态学与分子生物学方法鉴定出芽孢杆菌，并通过水解圈与摇瓶发酵检验芽孢杆菌的功能。

第2章 不同成品普洱茶菌群结构与品质差异

普洱茶发酵过程中，真核与原核菌群是渥堆发酵的主体^[19, 36]，其在特定理化条件下以晒青毛茶为主要营养原料代谢降解其中茶多酚、游离氨基酸、纤维素等生成茶褐素、可溶性多糖等风味成分。

发酵原料作为普洱茶发酵培养基，其和发酵程度直接影响发酵菌群的生长。首先，发酵菌群在生长代谢时进行不同生化反应^[78, 79]，故不同的菌群结构会展现不同的代谢功能，使得发酵普洱茶菌群结构、理化参数的变化，进而导致作为代谢产物的风味成分的变化，最终影响普洱茶的发酵品质^[22, 50, 80, 81]。其次，发酵菌群经过不同程度的发酵形成不同风味的茶，如传统未发酵生茶、全发酵红茶和后发酵普洱茶的群落结构和风味成分具有显著差异。以普洱茶为例，普洱生茶风味成分中茶多酚与游离氨基酸的含量以及真核菌群的多样性较高^[36, 70]；而普洱熟茶的风味成分中可溶性多糖与茶褐素的含量以及原核菌群的多样性较高^[19, 36]。此外，研究发现在单独发酵普洱茶特定部位（如茶梗）或在普洱茶原料中添加其它碳源（柑橘、香草）有助于提高后发酵品质，而其发酵过程中的菌群结构尚未明确^[76, 82, 83]。基于普洱茶原料作为普洱茶发酵过程中的培养基对发酵菌群的生长代谢具有重要影响，并且发酵程度直接决定生长代谢的进度，因而有必要详细分析不同原料不同发酵程度对菌群结构、理化参数和风味成分的影响。

本章为探究发酵程度、原料（不同品级、不同部位叶片、额外添加蜂蜜）对普洱茶菌群结构、理化参数与非挥发性成分的影响进行以下研究：首先，检测各普洱茶样本的理化参数与主要非挥发性成分，以分析不同发酵程度普洱茶与不同原料发酵普洱茶的理化参数与非挥发性成分差异；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不同发酵程度普洱茶与不同原料发酵普洱茶的菌群结构及其差异；进而，通过 PICRUST2（Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2）功能预测分析其菌群结构功能差异；最后，通过冗余分析（Redundancy analysis, RDA）分析菌群与理化参数的相关性。

2.1 实验材料

2.1.1 实验材料

茶叶鲜叶和茶梗材料于 2020 年 4 月采自云南勐海布朗茶山；黄片茶叶于 2019 年秋采自云南勐海布朗茶山；大益-益原素与大益-七子茶茶饼于 2020 年购自云南大益茶业集团有限公司。

2.1.2 实验药品

表 2-1 实验药品

Table 2-1 Experimental Drug

药品名称	规格	生产厂家
葡萄糖	AR	生工生物工程（上海）股份有限公司
茚三酮	AR（>98%）	生工生物工程（上海）股份有限公司
无水乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
甲醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
无水碳酸钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
十二水磷酸氢二钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
醋酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
醋酸钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
三氯化铝	AR	国药集团化学试剂有限公司
硼酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
硫酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
甲基红	AR	国药集团化学试剂有限公司
溴甲酚绿	AR	国药集团化学试剂有限公司
硫酸铜	AR	国药集团化学试剂有限公司
硫酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
硝酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
重铬酸钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
碘化钾	AR	国药集团化学试剂有限公司

乙醚	AR	国药集团化学试剂有限公司
蒽酮	AR	上海麦克林生化科技股份有限公司
福林酚	BR	上海麦克林生化科技股份有限公司
没食子酸	99%	上海麦克林生化科技股份有限公司
磷酸氢二钠	99%	上海麦克林生化科技股份有限公司
氯化亚锡	≥99.99%	上海麦克林生化科技股份有限公司
L-茶氨酸	99%	上海麦克林生化科技股份有限公司
芦丁	98%	上海麦克林生化科技股份有限公司
正丁醇	AR, 99.5%	上海麦克林生化科技股份有限公司
无水草酸	AR, 98%	上海麦克林生化科技股份有限公司
氯化钡	99%	上海麦克林生化科技股份有限公司
硫代硫酸钠	0.2 mol/L	平根科技有限公司

2.1.3 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table 2-1 Experimental Instruments

仪器名称	生产厂家
恒温水浴锅 (ZBRTD-211)	上海力辰邦西仪器科技有限公司
pH 计 (PH-100pro)	上海力辰邦西仪器科技有限公司
分析天平 (TLE104E/02)	梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司
可见分光光度计 (V5000)	上海元析仪器有限公司
消化炉 (tecator digester 20)	丹麦福斯 (FOSS) 公司
烘干箱 (BXH-280)	上海博迅实业有限公司
低速离心机 (L2-4K)	湖南可成仪器设备有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 普洱茶发酵与品评

按图 2-1 所示工艺进行发酵, 分别制成绿茶、红茶和发酵普洱茶, 以研究不同发酵程度普洱茶的差异。发酵结束后, 分别使用七号长抖筛、五号圆孔筛和三号圆孔筛将发酵后的发酵普洱茶筛分得到特级、三级和七级发酵普洱茶; 同

时，在特级发酵普洱茶的基础上，人工分筛出芽头，作为宫廷级发酵普洱茶；以研究不同品级普洱茶差异。在“特级”普洱茶原料中添加 20g/kg 蜂蜜发酵，以分析额外添加蜂蜜碳源对普洱茶影响。茶梗、黄片茶叶的发酵工艺与鲜叶发酵工艺相同（图 2-1），以研究不同原料差异。绿茶为鲜叶萎凋、揉捻、晒干后直接制成；红茶为鲜叶萎凋、揉捻后发酵 4 小时后晒干制成；发酵普洱茶渥堆发酵 35 天。发酵在云南书剑茶叶有限公司进行，发酵后，分别取样 100g。此外，以大益-益原素与大益-七子茶茶饼作为对照。样本详情如表 1 所示，每个样本 3 个重复。依据现行茶叶感官评审方法（GB/T 23776-2018）泡茶，并聘请 12 名有资历的专业品茶师（男女比为 1:1）对本研究发酵普洱茶的色泽、香气、滋味、汤色进行品鉴。此外，参照 GB/T22111-2008 与 NY/T 779-2004 进一步确认发酵普洱茶 SF_1 ~ 4 的品级。其中，金色毫毛数量愈多，香气愈浓，滋味愈醇厚柔和，汤色愈红的发酵普洱茶级别愈高。

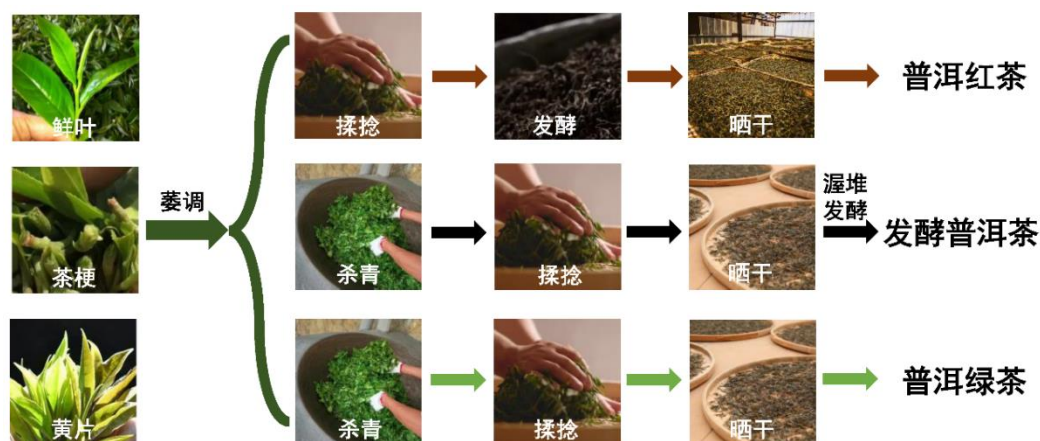


图 2-1 发酵普洱茶的发酵工艺

Fig.2-1 The fermentation process of FPT

表 2-3 样本的详细信息

Table 2-3 The information of samples

样本名称	茶的种类	原料	备注	发酵程度
普洱绿茶 (SF_G)	未发酵生茶	鲜叶	自行发酵	浅
普洱红茶 (SF_B)	全发酵红茶	鲜叶	自行发酵	浅
茶梗发酵普洱茶 (SF_CG)	后发酵茶	茶梗	自行发酵	高
黄片发酵普洱茶 (SF_HP)	后发酵茶	黄片	自行发酵	高
加蜂蜜发酵普洱茶 (SF_FM)	后发酵茶	鲜叶 + 蜂蜜	自行发酵	高

宫廷级发酵普洱茶 (SF_1)	后发酵茶	鲜叶	自行发酵	高
特级发酵普洱茶 (SF_2)	后发酵茶	鲜叶	自行发酵	高
三级发酵普洱茶 (SF_3)	后发酵茶	鲜叶	自行发酵	高
七级发酵普洱茶 (SF_4)	后发酵茶	鲜叶	自行发酵	高
大益-益原素 (DF_Y)	后发酵茶	鲜叶	采购	高
大益-七子茶 (DF_Q)	后发酵茶	鲜叶	采购	高

2.2.2 DNA 提取、文库构建、扩增子高通量测序

通过 DNA 试剂盒 (M5635 - 02) 提取样本 DNA, 通过 ITS5- ITS2 引物 (ITS5: 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS2: 5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GCT-3') 扩增真核 ITS 1 区目标序列; 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') 扩增原核 16S rRNA V3-V4 区目标序列。委托上海派森诺生物技术有限公司进行扩增子高通量测序。

2.2.3 高通量测序原始数据处理及分析

测序原始数据已上传至美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI)。ITS 与 16S 的登录号分别为 SRR25302837 ~ SRR25302847, SRR25318907 ~ SRR25318917。使用 QIIME2 软件对原始数据进行质控、去噪、拼接、去嵌合体得到优质序列, 进一步抽平后, 100%相似度聚类得到 ASVs (Amplicon sequence variants)。分别通过真核 (UNITE, Release 8.0)、原核 (Silva, Release132) 数据库注释得到 ASVs 列表。剔除线粒体、叶绿体等非目标 ASVs 后, 绘制各样本菌群结构柱状图 (Origin 8.5)。计算 α 多样性指数, 并通过方差分析 (Analysis of Variance, ANOVA, SPSS 27.0) 评估 α 多样性指数的差异显著性。通过 R 语言进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 和非加权组平均法 (Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 进行聚类分析, 以分析各样本之间的菌群结构差异。通过偏最小二乘法 (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA) 等多元数据分析不同发酵程度普洱茶中的差异菌属。使用 PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of

Unobserved States 2) 对样本菌群的潜在代谢功能进行预测, 并通过 R 语言绘制相对丰度前 10 的代谢通路的聚类热图。通过 Canoco 5 软件进行 RDA 相关性分析。

2.2.4 理化参数和主要风味成分检测

可溶性多糖含量: 蒽酮-硫酸比色法^[84]。纤维素与木质素含量: 浓硫酸法^[85]。黄酮含量: 三氧化氯法^[41, 86]。游离氨基酸含量: 茚三酮比色法^[87]。蛋白质含量: 凯氏定氮法^[88]。茶多酚含量: 福林酚比色法^[87]。茶褐素含量: 萃取比色法^[89]。茶汤 pH: 茶叶烘干后, 粉碎并过筛。称取 1g 茶叶于 50mL 离心管内, 加 10mL 蒸馏水, 摇匀后浸泡 20min, 用 pH 检测茶汤 pH^[50]。

2.3 结果与讨论

2.3.1 成品普洱茶品评结果

经品茶师就色泽、香气、滋味、汤色进行品鉴可知传统后发酵普洱茶 (SF_1~4) 与对照组 (DF_Y、DF_Q) 差异较小。与传统后发酵普洱茶相比, 浅发酵普洱茶 (SF_G、SF_B) 金毫偏少, 香气偏清香, 滋味偏清爽, 汤色偏浅; 茶梗 (SF_CG)、黄片 (SF_HP) 发酵普洱茶汤色偏浅; 蜂蜜发酵普洱茶 (SF_FM) 香气偏淡。此外, 宫廷级普洱茶 (SF_1) 的综合指标优于特级 (SF_2)、三级 (SF_3) 与七级发酵普洱茶 (SF_4), 其金色毫毛最多, 香气最浓, 滋味最醇厚柔和, 茶汤红色最浓郁。特级、三级和七级发酵普洱茶的金色毫毛依次减少, 口感滑度依次较低, 七级发酵普洱茶汤色相对最浅。

表 2-6 样本的感官品质特征

Table 2-6 The sensory quality characteristics of the samples				
样本名称	色泽	香气	滋味	汤色
SF_G	油润翠绿	高爽清香	青涩	黄绿明亮
SF_B	乌润	花果香	甘醇	红明亮
SF_CG	褐欠润	陈香纯正	醇和回甘	橙红明亮
SF_HP	黄绿欠润	柔和纯正	柔纯甘甜	橙红明亮

SF_FM	褐润显毫	陈香纯正	醇和回甘	红浓明亮
SF_1	金毫显露色泽褐润	陈香簇郁	醇和甘滑	红浓明亮
SF_2	红褐润显毫	陈香浓郁	浓醇甘爽	红艳明亮
SF_3	褐润尚显毫	陈香浓纯	醇厚回甘	红浓明亮
SF_4	褐欠润	陈香纯正	醇和回甘	褐红尚浓
DF_Y	金毫显露	陈香浓郁	醇和甘滑	红浓明亮
DF_Q	金毫显露	陈香簇郁	醇和甘滑	红浓明亮

2.3.2 成品普洱茶的理化参数和主要风味成分

2.3.2.1 标准曲线的建立

对标准品葡萄糖、芦丁、L-茶氨酸、GA 的检测结果进行线性拟合，结果如图 2-所示，四种标准品的拟合方程及调整后的 R^2 分别为： $y=4.38727x+0.17302$ ， $R^2=0.993$ ； $y=0.53959x+0.05959$ ， $R^2=0.999$ ； $y=2.24929x-0.18628$ ， $R^2=0.999$ ； $y=0.00656x+0.05349$ ， $R^2=0.999$ 。

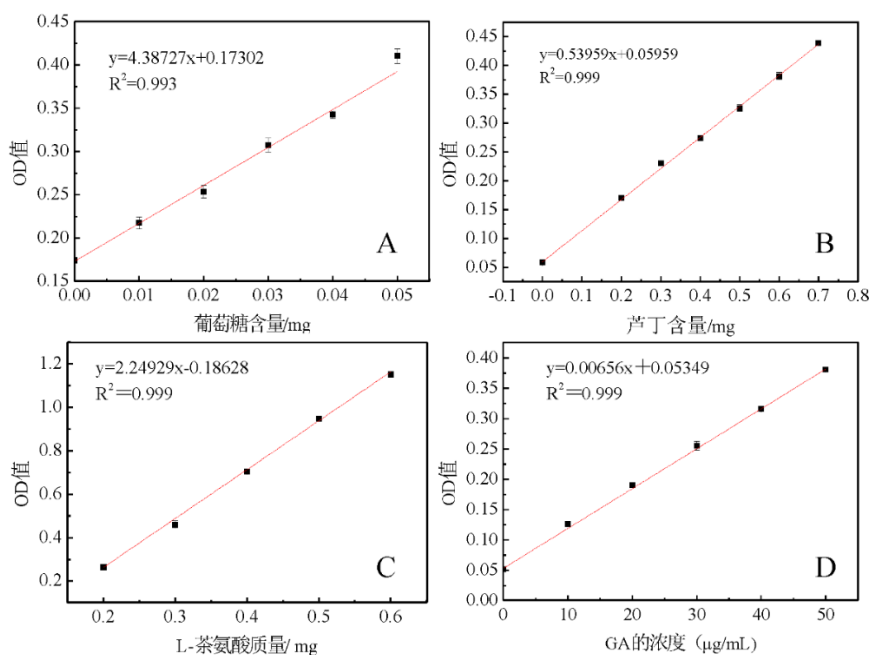


图 2-2 葡萄糖、芦丁、L-茶氨酸、GA 的标准曲线

Fig.2-2 The standard curve of glucose (A), rutin (B), L-theanine (C) and GA (D)

2.3.2.2 理化参数和主要风味成分

十一种普洱茶理化参数与主要风味成分含量值如图 2-3 所示，与 2 个大益发

酵普洱茶对照样本 DY_Y、DY_Q 相比，后发酵普洱茶（SF_1 ~ 4）与其相似度较高。此外，进一步由 PCA 聚类可知，SF_1 ~ 4 与 DY_Y、DY_Q 聚类更接近（图 2-4）。以上结果表明，四个后发酵普洱茶样本的理化参数与主要风味成分与大益发酵普洱茶样本相似度较高，其中，宫廷级发酵普洱茶（SF_1）相似度最高，七级发酵普洱茶（SF_4）的相似度最低。其余样本按照如下顺序相似度依次降低：加蜂蜜发酵普洱茶、普洱红茶、黄片发酵普洱茶、普洱生茶和茶梗发酵普洱茶。

随发酵程度的增高，十一种普洱茶样本中纤维素（图 2-3 B）、游离氨基酸（图 2-3 F）和茶多酚（图 2-3 G）的含量呈降低趋势；可溶性多糖（图 2-3 A）、木质素（图 2-3 C）、总黄酮（图 2-3 D）、蛋白质（图 2-3 E）和茶褐素（图 2-3 H）含量呈增加趋势；pH 值（图 2-3 I）呈先降低再增加的趋势，普洱红茶（SF_B）pH 值最低（4.8）。推测普洱茶样本中纤维素、游离氨基酸和茶多酚含量的降低与渥堆发酵时真核菌群的分解代谢有关^[19,20,50,74,90]，已知 *Aspergillus*、*Rasamsonia* 可以降解纤维素生成可溶性多糖^[36]与木质素^[58, 59]，*Aspergillus*、*Pseudomonas* 可以分解茶多酚生成茶褐素。此外，推测普洱茶样本中蛋白质含量的增加可能与真核、原核菌的代谢有关，已知 Jing Li 等人通过分析证实 *Blastobotrys*、*Thermomyces* 和 *Staphylococcus* 与蛋白质合成呈正相关^[19]。此外，总黄酮值的提高，推测与渥堆发酵时黄酮及黄酮醇的生物合成途径有关^[22]；而 pH 先降后增的结果，则与李中原^[50]的研究结果一致，推测发酵普洱茶中 pH 的升高与茶碱的生成有关。推测延长普洱茶发酵时间有助于提高可溶性多糖与茶褐素并降低茶多酚含量，即有助于降低普洱茶的苦涩味，加深普洱茶汤色，与现有研究结论一致^[51]。

此外，茶梗发酵普洱茶（SF_CG）蛋白质含量（图 2-3 E，175.00 mg/g）相对传统发酵普洱茶（SF_1 ~ 4，340.89 mg/g）偏少，仅为其含量的 51.61%。推测是茶梗中碳源（如纤维素）较鲜叶高，导致茶梗发酵普洱茶中微生物分解碳源产生的二氧化碳量高于传统发酵普洱茶^[91]，又已知，高碳导致微生物细胞产生的蛋白质含量降低^[92]，故茶梗发酵普洱茶中的蛋白质相对于传统发酵普洱茶少。黄片发酵普洱茶（SF_HP）可溶性多糖含量（图 2-3 A，44.91 mg/g）相对传统发酵普洱茶（SF_1 ~ 4，37.64 mg/g）偏多，是其含量的 1.19 倍。推测是黄

片的叶质较软，更易于微生物分解利用生成糖所致。推测原料中适当添加黄片，有助于提高发酵普洱茶中可溶性多糖的含量，将来可通过向原料中添加适量黄片对普洱茶进行调味。加蜂蜜的发酵普洱茶（SF_FM）中木质素（图 2-3 C，454.17 mg/g）相对传统发酵普洱茶（SF_1~4，643.40 mg/g）偏少，仅为其含量的 70.59%；而游离氨基酸（图 2-3 F，9.74 mg/g）、茶多酚（图 2-3 G，148.12 mg/g）和茶褐素（图 2-3 H，102.98 mg/g）相对偏多，分别是传统发酵普洱茶（SF_1~4；6.44 mg/g，68.98 mg/g，85.63 mg/g）的 1.51，2.15，1.20 倍。推测是蜂蜜中葡萄糖和果糖的含量较多，微生物优先利用结构较简单的葡萄糖和果糖所致。

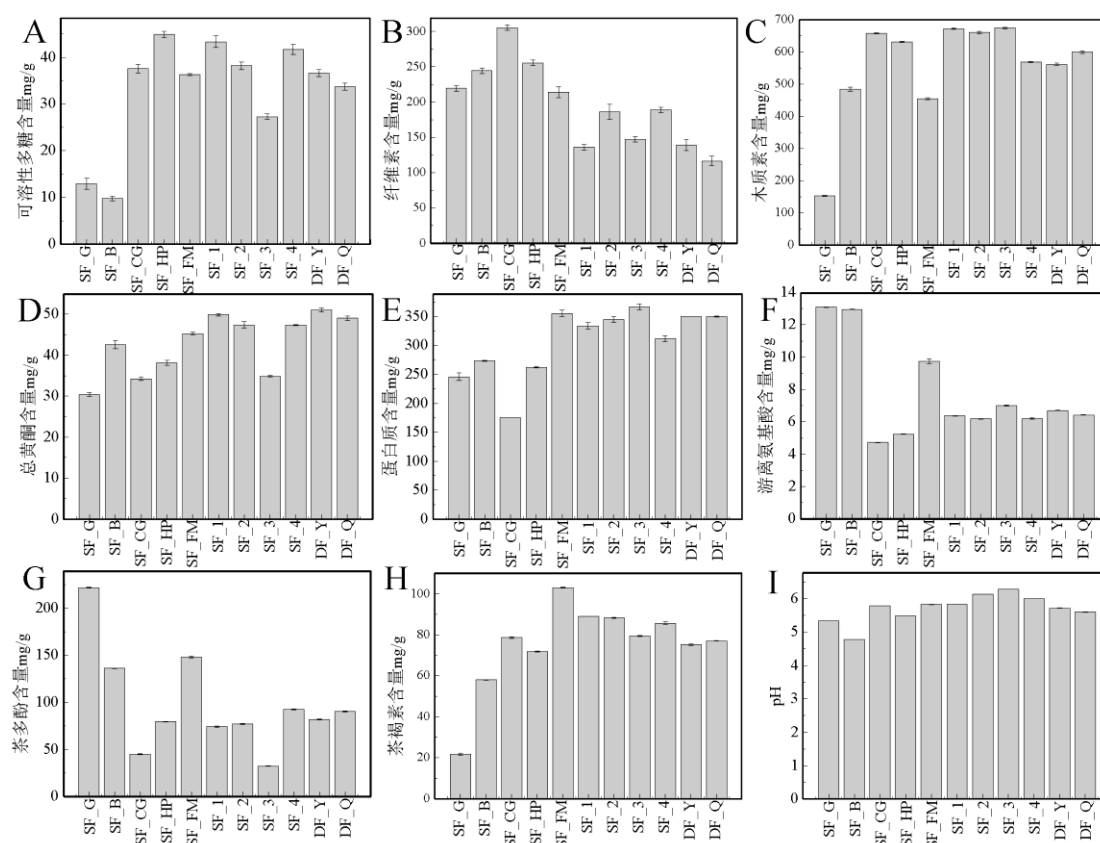


图 2-3 普洱茶中可溶性多糖 (A)、纤维素 (B)、木质素 (C)、总黄酮 (D)、蛋白质 (E)、游离氨基酸 (F)、茶多酚 (G)、茶褐素 (H)、pH (I) 的值 (n=3, 误差棒为方差)

Fig.2-3 The values of soluble polysaccharides (A), cellulose (B), lignin (C), total flavonoids (D), proteins (E), free amino acids (F), tea polyphenols (G), tea fucoxanthin (H) and pH (I) in Pu-erh tea

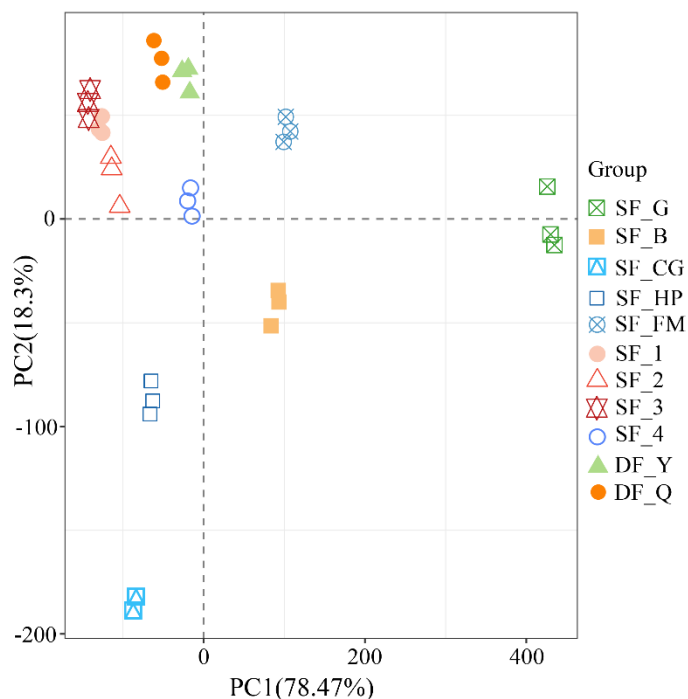


图 2-4 普洱茶理化参数与主要风味的 PCA 聚类结果

Fig. 2-4 The PCA clustering results of physicochemical parameters and main flavors of Pu-erh tea

2.3.3 成品普洱茶菌群结构的 α 多样性参数

表 2-7 菌群结构的 α 多样性参数

Table 2-7 The alpha diversity parameters of microbiota structure

样品名称	真核多样性指数			原核多样性指数		
	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
SF_G	98.91 $\pm$ 4.22 ^a	2.57 $\pm$ 0.96 ^a	0.61 $\pm$ 0.20 ^a	151.89 $\pm$ 59.51 ^e	2.18 $\pm$ 0.61 ^{cd}	0.56 $\pm$ 0.20 ^{cd}
SF_B	39.43 $\pm$ 12.69 ^c	2.34 $\pm$ 1.41 ^a	0.60 $\pm$ 0.37 ^a	162.22 $\pm$ 50.90 ^e	1.81 $\pm$ 0.18 ^{de}	0.43 $\pm$ 0.08 ^{de}
SF_CG	34.28 $\pm$ 4.04 ^{cd}	1.98 $\pm$ 0.47 ^a	0.66 $\pm$ 0.10 ^a	162.16 $\pm$ 14.59 ^e	1.49 $\pm$ 0.28 ^e	0.35 $\pm$ 0.09 ^e
SF_HP	33.77 $\pm$ 7.13 ^{cd}	1.44 $\pm$ 0.64 ^a	0.48 $\pm$ 0.24 ^a	209.12 $\pm$ 15.19 ^{cde}	2.77 $\pm$ 0.69 ^{bc}	0.71 $\pm$ 0.10 ^{bc}
SF_FM	37.24 $\pm$ 5.79 ^{cd}	1.99 $\pm$ 0.39 ^a	0.55 $\pm$ 0.13 ^a	305.55 $\pm$ 117.52 ^{bce}	3.77 $\pm$ 0.66 ^{ab}	0.85 $\pm$ 0.06 ^{ab}
SF_1	41.89 $\pm$ 1.21 ^{bc}	1.88 $\pm$ 0.40 ^a	0.61 $\pm$ 0.15 ^a	458.92 $\pm$ 144.81 ^{ab}	4.69 $\pm$ 0.71 ^a	0.91 $\pm$ 0.03 ^a
SF_2	39.55 $\pm$ 8.33 ^c	2.14 $\pm$ 0.20 ^a	0.66 $\pm$ 0.06 ^a	579.26 $\pm$ 273.87 ^a	5.20 $\pm$ 1.06 ^a	0.92 $\pm$ 0.04 ^a
SF_3	25.64 $\pm$ 2.16 ^d	1.04 $\pm$ 0.22 ^a	0.38 $\pm$ 0.12 ^a	205.37 $\pm$ 5.79 ^{de}	3.27 $\pm$ 0.18 ^{ab}	0.82 $\pm$ 0.02 ^{ab}
SF_4	41.13 $\pm$ 4.00 ^c	2.05 $\pm$ 0.49 ^a	0.65 $\pm$ 0.10 ^a	252.16 $\pm$ 78.57 ^{bcde}	3.73 $\pm$ 0.41 ^{ab}	0.86 $\pm$ 0.02 ^{ab}
DF_Y	54.24 $\pm$ 7.58 ^b	1.75 $\pm$ 0.20 ^a	0.47 $\pm$ 0.07 ^a	444.89 $\pm$ 19.80 ^{abc}	4.00 $\pm$ 0.27 ^{ab}	0.85 $\pm$ 0.03 ^{ab}
DF_Q	39.87 $\pm$ 5.58 ^c	1.21 $\pm$ 0.42 ^a	0.34 $\pm$ 0.15 ^a	418.30 $\pm$ 37.93 ^{abcd}	4.27 $\pm$ 0.34 ^a	0.88 $\pm$ 0.03 ^a

注：参数值为：平均值 $\pm$ 标准差；上标有不同字母标记的即为差异显著 ($P < 0.05$)；n=3。

十一种普洱茶样本彼此之间真核菌群丰度 Shannon 值 (1.04 ~ 2.57) 与多样性 Simpson 值 (0.34 ~ 0.66) 均无显著差异 ($P>0.05$)；其中，未发酵普洱绿茶 (SF_G) 的真核物种丰度值 Chao1 指数 (98.91) 显著较高 ($P<0.05$)。随发酵程度的增高，原核物种丰度值 Chao1 指数、原核菌群丰度 Shannon 值与多样性 Simpson 值呈增高趋势。其中，茶梗发酵普洱茶 (SF_CG) 的原核物种丰度值 Chao1 指数 (162.16)、原核菌群丰度 Shannon 值 (1.49) 与多样性 Simpson 值 (0.35) 偏低，推测是茶梗难分解，不利于微生物的生长导致。Jia Xue 等人^[36]与 Jing Li 等人^[19]研究表明普洱熟茶真核菌群的多样性低于晒青毛茶（等同本研究普洱生茶）普洱熟茶原核菌群丰度和多样性高于晒青毛茶（等同本研究普洱生茶），与本文研究结论一致。

2.3.4 成品普洱茶菌群结构差异

各样本扩增子高通量测序覆盖率 (Coverage) 均高于99.69%，表明测序序列具有代表性。数据分析得到50058个真核ASVs、29427个原核ASVs，其中，真核ASVs 98.58%注释到属，原核ASVs 97.55%注释到属。本研究把相对丰度大于1%的菌属定义为优势菌属，分析真核与原核菌群结构差异。

首先通过主成分分析普洱茶菌群结构的差异 (图2-5)。图2-5 A中，传统后发酵普洱茶 (SF_1 ~ 4) 与对照样本 (DF_Y、DF_Q) 聚类一起，表明两者真核菌群结构相似；浅发酵普洱茶中普洱红茶 (SF_B) 的真核菌群结构与后发酵普洱茶 (SF_1 ~ 4) 相似度较高；茶梗 (SF_CG)、黄片 (SF_HP)、加蜂蜜 (SF_FM) 发酵普洱茶与传统发酵普洱茶 (SF_1 ~ 4) 的真核菌群结构的相似度逐次降低。进一步通过OPLS-DA等多元数据分析发现 (图2-6 A)，*Gibberella*、*Penicillium*、*Mycosphaerella*、*Cyberlindnera*、*Fusarium*、*Plectosphaerella*、*Thermomyces*、*Rasamsonia*、*Blastobotrys*对不同发酵程度普洱茶的真核菌群结构差异影响较大 ($VIP>1$)。图2-5 B中，传统后发酵普洱茶 (SF_1 ~ 4) 与对照样本 (DF_Y、DF_Q) 聚类一起，表明两者原核菌群结构相似；浅发酵普洱茶 (SF_G、SF_B) 的原核菌群结构与后发酵普洱茶 (SF_1 ~ 4) 差异较大；蜂蜜 (SF_FM)、黄片 (SF_HP)、茶梗 (SF_CG) 发酵普洱茶与传统发酵普洱茶 (SF_1 ~ 4) 的原核菌群结构的相似度逐次降低。进一步通过OPLS-DA等多元

数据分析发现（图2-6 B），*Bosea*、*Methylobacterium*、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、*Amycolatopsis*、*Sphingomonas*、*Chryseobacterium*、*Acidovorax*等对不同发酵程度普洱茶的原核菌群结构差异影响较大（VIP>1）。

普洱茶样本菌群结构组成差异如图 2-5 A ~ D 所示。传统后发酵普洱茶（SF_1 ~ 4）与对照样本（DY_Y、DY_Q）以真核菌属 *Blastobotrys*（22.87 ~ 78.87%）、*Thermomyces*（3.30 ~ 33.45%）、*Aspergillus*（5.17 ~ 31.76%）与 *Rasamsonia*（2.86 ~ 14.44%）共同占优势（图 2-5 C），进一步表明两者真核菌群结构相似。传统浅发酵程度的普洱生茶（SF_G）、普洱红茶中（SF_B）中 *Penicillium*（49.22%）与 *Mycosphaerella*（32.59%）分别占优势。与普洱绿茶（SF_G）相比，后发酵普洱茶（SF_1 ~ 4）*Penicillium* 相对丰度的降低（49.22 → 0.0058%），推测与其不适于渥堆发酵的高温环境（50℃）有关^[93, 94]。

此外，不同发酵原料普洱茶中（图 2-5 C），茶梗发酵（SF_CG）提高了 *Rhizomucor* 的相对丰度（0.86 → 17.55%）；黄片发酵（SF_HP）综合提高了 *Aspergillus*（14.60 → 31.90%）、*Thermomyces*（29.40 → 41.91%）与 *Rhizomucor*（0.86 → 20.09%）的相对丰度；加蜂蜜发酵（SF_FM）提高了 *Aspergillus*（14.60 → 87.47%）的相对丰度。PCA 分析表明茶梗发酵普洱茶、黄片发酵普洱茶、加蜂蜜发酵普洱茶与常规发酵普洱茶的真核菌群结构的相似度逐次降低（图 3 E）。黄片发酵普洱茶 *Aspergillus*、*Thermomyces* 与 *Rhizomucor* 相对丰度的提高，推测黄片中的碳源更利于 *Aspergillus* 和嗜热菌（*Thermomyces*、*Rhizomucor*）的生长^[5, 95, 96]。

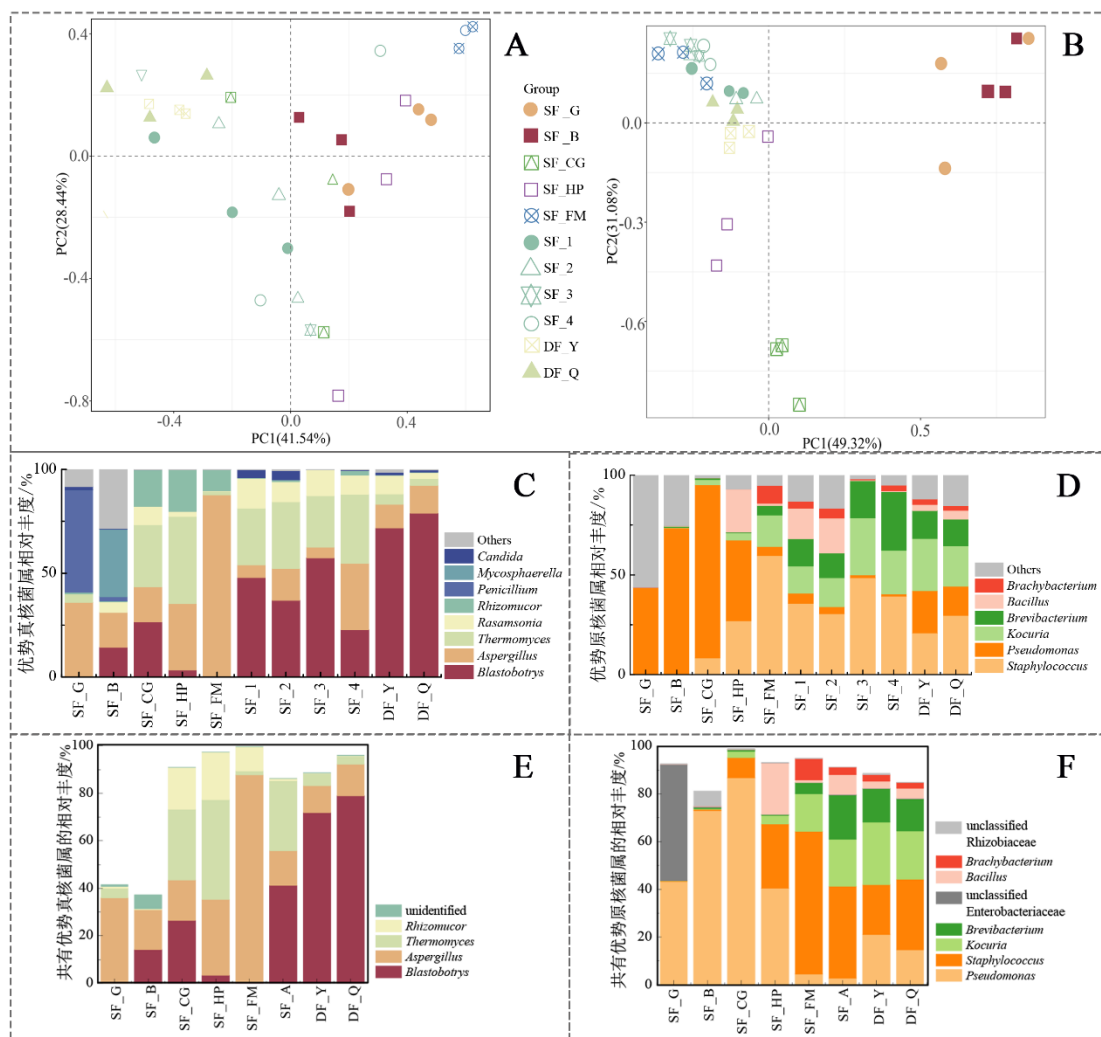


图 2-5 普洱茶真核 (A)、原核 (B) 菌群结构的 PCA 分析；发酵普洱茶优势真核 (C)、原核菌属 (D)，共有优势真核 (E)、原核 (F) 菌属相对丰度；(Others 包括非优势菌、未分类及未定义菌；SF_A 为 SF_1 ~ 4 合并后)

Fig.2-5 The PCA clustering of eukaryotic (A) and prokaryotic (B) microbiota structure of FPT; the relative abundance of dominant eukaryotic (C) and prokaryotic (D) genera, co-dominant eukaryotic (E) and prokaryotic (F) genera of Pu-erh tea

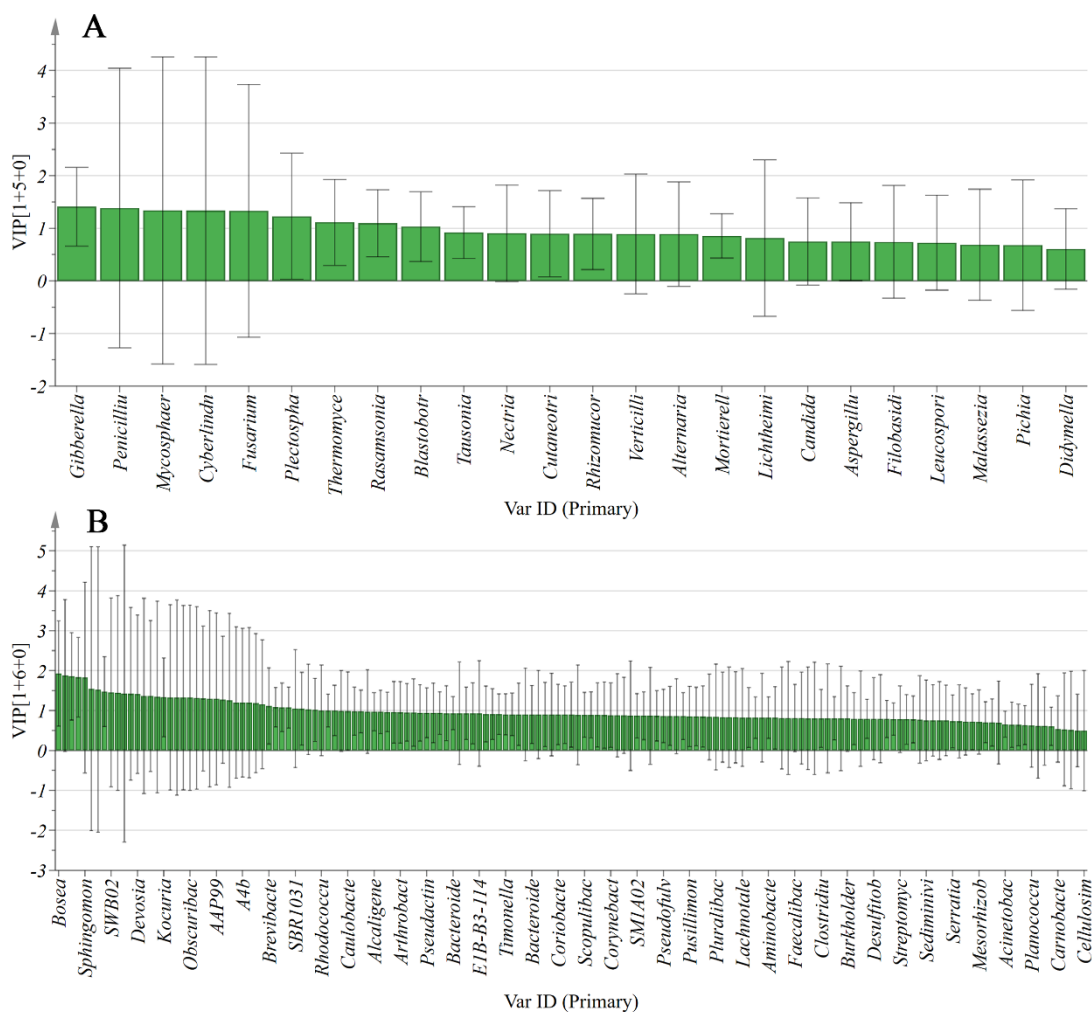


图 2-6 普洱茶差异真核、原核菌属 (VIP 大>1)

Fig.2-6 The discrepancy eukaryotic (A) and prokaryotic (B) genera of Pu-erh tea (VIP large > 1)

传统后发酵普洱茶 (SF_1 ~ 4)、添加蜂蜜发酵普洱茶 (SF_FM) 与对照样本 (DF_Y、DF_Q) 以原核菌属 *Staphylococcus* (20.90 ~ 59.64%)、*Kocuria* (13.57 ~ 28.63%) 与 *Brevibacterium* (4.71 ~ 29.56%) 共同占优势 (图 2-5 D), 进一步表明其原核菌群结构相似。传统浅发酵程度的普洱绿茶 (SF_G)、普洱红茶 (SF_B) 中 *Pseudomonas* (43.26%, 73.02%) 占优势。

此外, 不同发酵原料普洱茶中 (图 2-5 D), 茶梗发酵 (SF_CG) 显著提高了 *Pseudomonas* 的相对丰度 (2.81 → 86.78%), 与普洱红茶 (SF_B) 菌群组成较接近, 推测可能与茶梗较难分解, 原核菌群发酵程度较低有关。黄片发酵 (SF_HP) 显著提高了 *Pseudomonas* (2.81 → 40.46%) 和 *Bacillus* (8.35 → 21.44%) 的相对丰度。添加蜂蜜后其中的葡萄糖、果糖等额外碳源对于原核菌

群生长基本无影响。

进一步分析普洱茶菌群中的共有优势真核和原核菌属组成，如图 2-5 E 和图 2-5 F 所示。为便于分析，将一起发酵的 4 种后发酵普洱茶样本（SF_1 ~ 4）合并为 SF_A，用于后续分析。后发酵普洱茶（SF_A）86.17 ~ 99.64% 的优势真核菌属与普洱绿茶（SF_G，41.47%）和普洱红茶（SF_B，37.14%）的优势真核菌属为共有菌属（图 2-5 E），推测后发酵普洱茶渥堆发酵优势真核菌属主要来自于发酵初期。此外，*Penicillium* 与 *Mycosphaerella*（图 2-5 C）共同存在于浅发酵程度普洱茶（SF_G、SF_B）中，与普洱红茶（2.06%）相比，普洱绿茶（49.22%）相对特异性大量存在真核 *Penicillium*；与普洱绿茶（0.14%）相比，普洱红茶中相对特异性大量存在 *Mycosphaerella*（32.59%）。十一种普洱茶中 81.14 ~ 98.89% 的优势原核菌属为共有原核菌属（图 2-5 F），表明普洱茶发酵菌群中的原核菌属同源，发酵过程使其原核菌群丰度发生变化，进而使其原核菌群结构发生变化。

进一步分析合并后 8 种普洱茶菌群的特异性 ASVs 在属水平上（差异特征菌属）的丰度发现（图 2-7），其普洱茶样本的差异特征真核菌属的相对丰度为 0 ~ 3.8123%（图 2-7 A）；其中，普洱绿茶（SF_G）中的差异特征真菌属相对最多（3.8123%，图 2-7 A），茶梗发酵普洱茶（SF_CG）无差异特征真核菌属（数字为 0，图 2-7 A 中无展示）。8 种发酵普洱茶样本的差异特征原核菌属的相对丰度为 0.0238% ~ 0.1383%（图 2-7 B）。以上结果表明发酵普洱茶样本的真核菌群差异性大于原核菌群。

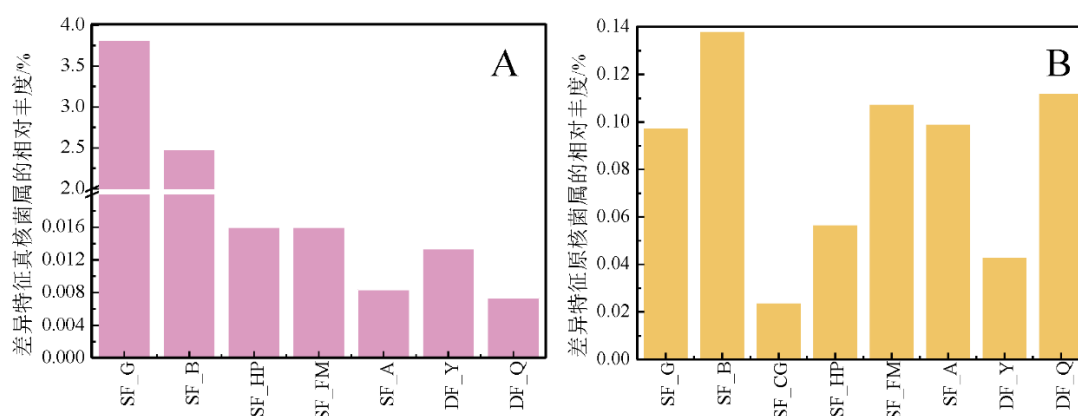


图 2-7 普洱茶差异特征真核（A）、原核（B）菌属的相对丰度

Fig.2-7 The relative abundance of exclusive eukaryotic genera (A), exclusive prokaryotic genera (B) of Pu-erh tea

因茶梗发酵普洱茶无差异特征真核菌属，故 A 中无“SF_CG”

2.3.5 成品普洱茶差异特征菌属潜在代谢功能预测

进一步通过 PICRUST2 分别对各样本的差异特征真核、原核菌属的 ITS 序列、16S rRNA 序列进行潜在功能预测（图 2-8），以分析各普洱茶样本差异特征菌群的潜在代谢功能差异（茶梗普洱茶无差异特征真核菌属，故图 2-8 A 中无“SF_CG”）。本研究后发酵普洱茶（SF_A）、加蜂蜜发酵普洱茶（SF_FM）的差异特征菌群的潜在代谢功能接近，而与对照组（DF_Y、DF_Q）有差异，推测可能与发酵环境不同有关。浅发酵程度的普洱绿茶（SF_G）、红茶（SF_B）菌群的潜在代谢功能更接近，其与后发酵普洱茶菌群的潜在代谢功能差异较大。以上分析表明，与发酵原料相比，发酵程度对差异特征菌属的潜在代谢功能的影响更大，差异特征菌属代谢功能呈现一定的冗余性^[97]。

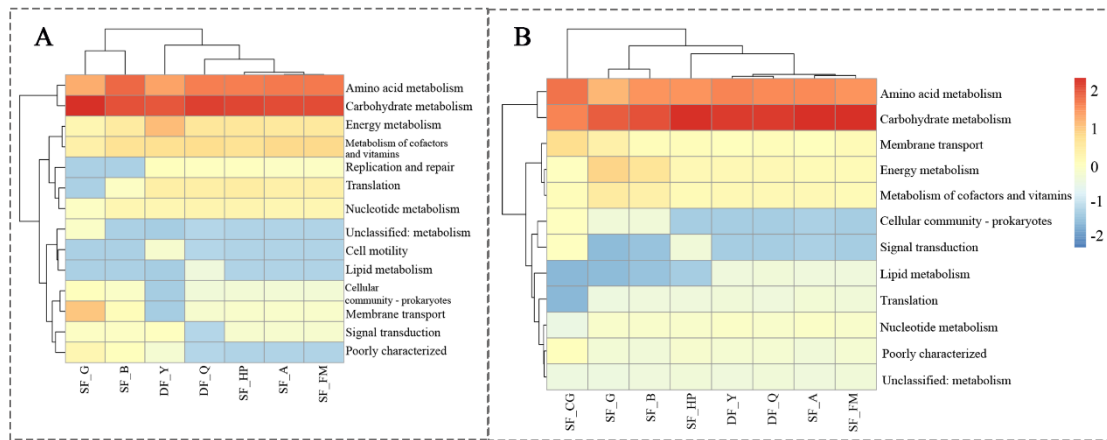


图 2-8 差异特征真核菌属（A）与差异特征原核菌属（B）功能预测聚类热图

Fig. 2-8 The heat map of functional prediction clusters for exclusive eukaryotic genera (A) and exclusive prokaryotic genera (B)

2.3.6 成品普洱茶菌属与理化参数及主要风味成分间的 RDA 相关性

通过 RDA 相关性分析（图 2-9）发现，与真核菌群的相关性具有显著贡献的参数有：游离氨基酸（34.40%， $p=0.002$ ）、木质素（22.40%， $p=0.002$ ）、纤维素（14.10%， $p=0.004$ ）和茶褐素（13.30%， $p=0.04$ ），表明真核菌群对普洱

茶发酵过程中游离氨基酸、木质素、纤维素和茶褐素的代谢贡献较大。此外，总黄酮、蛋白质、茶褐素的值与 SF_1（宫廷级发酵普洱茶）、SF_3（三级发酵普洱茶）、DF_Y（大益-益原素）、DF_Q（大益-七子茶）的真核菌属 *Blastobotrys* 与 *Rasamsonia* 呈强正相关（图 2-9 A），pH、可溶性多糖的值与 SF_CG（茶梗发酵普洱茶）、SF_2（特级发酵普洱茶）、SF_4（七级发酵普洱茶）的真核菌属 *Thermomyces*、*Rhizomucor* 呈强正相关。与原核菌群的相关性具有显著贡献的参数有：蛋白质（65.10%， $p = 0.002$ ）、可溶性多糖（16.00%， $p = 0.002$ ），表明原核菌群对普洱茶发酵过程中蛋白质、可溶性多糖的代谢贡献较大。此外，总黄酮的值与 SF_1（宫廷级发酵普洱茶）、SF_2（特级发酵普洱茶）、DF_Y（大益-益原素）、DF_Q（大益-七子茶）的原核菌属 *Brachybacterium*、*Bacillus* 呈强正相关（图 2-9 B），木质素的值与 SF_4（七级发酵普洱茶）的原核菌属 *Staphylococcus* 呈强正相关。

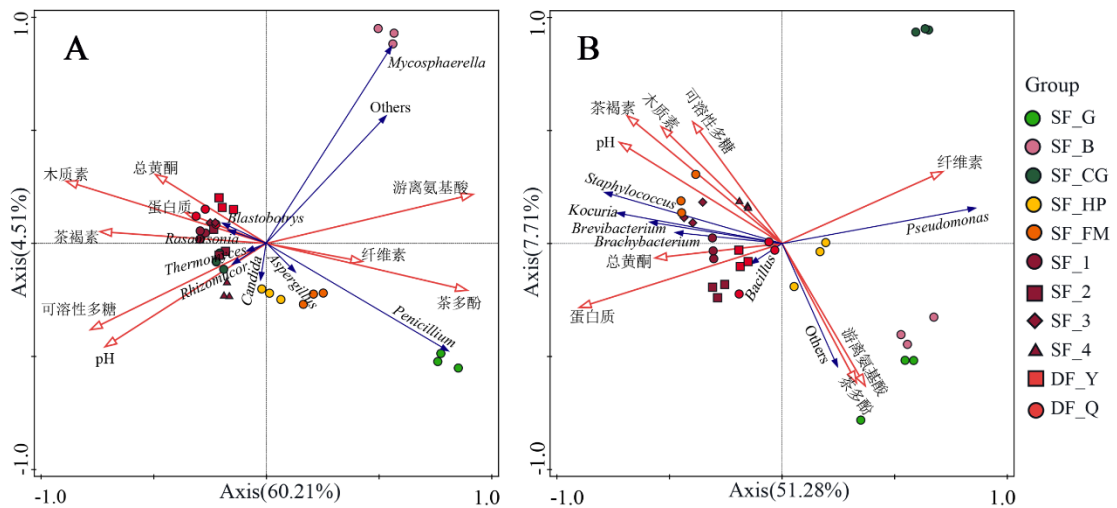


图 2-9 普洱茶优势真核菌属 (A)、优势原核菌属 (B) 与生化指标的冗余分析。

Fig.2-9 The redundancy analysis of eukaryotic microbiota structure (A) and prokaryotic microbiota structure (B) with biochemical indicators of Pu-erh tea.

2.4 小结

为探究发酵程度、原料对发酵普洱茶菌群结构、理化参数与品质的影响，本章通过理化检测方法及 16S rRNA、ITS 扩增子测序技术对不同发酵普洱茶进行了研究。得出以下结果：

(1) 发酵普洱茶渥堆发酵的优势真核菌属主要来自于发酵初期，其真核菌群差异性大于原核菌群。随发酵程度的提高，优势真核菌属由 *Penicillium*（普洱生茶）、*Mycosphaerella*（普洱红茶）转变为 *Blastobotrys*、*Thermomyces*、*Aspergillus* 和 *Rasamsonia*；优势原核菌属由普洱生茶、红茶中的 *Pseudomonas* 转变为 *Staphylococcus* 和 *Kocuria*。

(2) 发酵降低真核菌群丰度的同时显著提高普洱茶原核菌群丰度和多样性以及可溶性多糖、木质素、总黄酮、蛋白质、茶褐素的含量。

(3) 茶梗发酵可提高菌群中 *Pseudomonas* 的相对丰度，降低蛋白质的含量。蜂蜜发酵可提高菌群中 *Aspergillus* 的相对丰度与茶褐素的含量。黄片发酵可提高菌群中 *Aspergillus*、*Thermomyces*、*Rhizomucor*、*Pseudomonas* 与 *Bacillus* 的相对丰度与可溶性多糖的含量。

(4) 最后本章发现，发酵程度和发酵原料对菌群结构的影响较大，而对代谢功能的影响较小。其中，发酵程度对发酵普洱茶菌群与差异特征菌属的潜在代谢功能的影响大于发酵原料。此外，游离氨基酸、木质素、纤维素和茶褐素与真核菌群显著相关，蛋白质、可溶性多糖与原核菌群显著相关。

第3章 发酵过程中原核菌群结构与关键风味研究

微生物的生命活动受其发酵基质中营养物质与发酵过程中理化参数的共同影响。在发酵温度、茶堆水分、水活度、pH 理化参数的影响下，微生物的生长代谢不断发生变化，从而导致不同发酵时间的菌群结构的不同。微生物生长发育时会分泌大量生物酶，除用于分解大分子糖保证自身生命活动的正常进行外，其产生的生物酶也会促进茶叶中风味物质的转化，使普洱茶中积累多种风味物质。因此，研究理化参数、原核微生物、物质成分三者间的关系，有助于改善普洱茶的工艺，提高普洱茶的质量与品质。本章通过跟踪发酵过程，记录理化参数的变化；通过扩增子测序，分析发酵过程中原核菌群结构的变化情况；通过化学检测与非靶向代谢组学，分析普洱茶中的物质成分变化；通过冗余分析构建理化参数-微生物-物质成分的数学模型。为指导发酵工艺的改善提供理论依据。

3.1 实验材料

3.1.1 实验药品

表 3-1 实验药品

Table 3-1 Experimental Drug		
药品名称	规格	生产厂家
甲醇	MS	美国 Thermo Fisher
乙腈	MS	美国 Thermo Fisher
甲酸	MS	美国 Thermo Fisher

注：本章实验用水均为市售哇哈哈纯净水。

3.1.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental Instruments	
实验仪器	生产厂家

电子温度计 (T105)	深圳市拓尔为电子科技有限公司
电热鼓风干燥箱 (101 型)	北京市永光明医疗仪器厂
水分活度仪 (AquaLab Pawkit)	METER Group.Inc.公司
Ultimate 3000 高效液相色谱仪	美国 Thermo Fisher 公司
Q Exactive Focus 型质谱仪	美国 Thermo Fisher 公司
Xcalibur 2.2	美国 Thermo Fisher 公司
Compound Discoverer	美国 Thermo Fisher 公司

3.2 实验方法

3.2.1 小布朗普洱茶发酵

2022 年 8 月 19 日 (发酵第 0 天) 选取云南小布朗春茶鲜叶按照如图 3-1 所示工艺在云南书剑茶叶有限公司进行渥堆发酵, 发酵至 2022 年 9 月 18 日 (发酵第 30 天) 结束, 制成发酵普洱茶, 以研究发酵过程中原核菌群结构与关键风味的变化。采集发酵过程中第 0 (BPT_0D)、1 (BPT_1D)、2 (BPT_2D)、3 (BPT_3D)、5 (BPT_5D)、6 (BPT_6D)、10 (BPT_10D)、12 (BPT_12D)、14 (BPT_14D)、18 (BPT_18D)、20 (BPT_20D)、22 (BPT_22D)、26 (BPT_26D)、28 (BPT_28D)、30 (BPT_30D) 天的茶叶, 每次采集 3 组茶叶样本。在茶堆中层的 A、B、C、D、E 5 点各取 200g 茶叶 (图 3-2), 混匀 5 点样本茶叶装入无菌袋^[98,99], -20℃ 保存至检测。样本信息详见表 3-3。



图 3-1 小布朗普洱茶发酵工艺

Fig.3-1 The fermentation process of Brown Pu-erh Tea

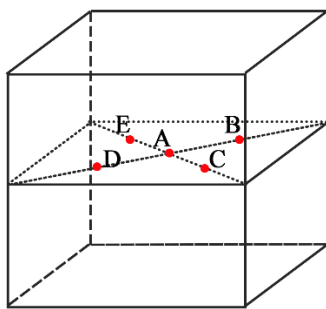
图 3-2 样本采集示意图 ($AB=AC=AD=AE=1\text{ m}$)

Fig.3-2 The schematic diagram of samples collection

表 3-3 小布朗普洱茶样本详细信息

Table 3-3 The detailed information of Brown Pu-erh Tea Sample

样本	简称	备注
发酵第 0 天	BPT_0D	
发酵第 1 天	BPT_1D	
发酵第 2 天	BPT_2D	第 1 个发酵周期
发酵第 3 天	BPT_3D	
发酵第 5 天	BPT_5D	
发酵第 6 天	BPT_6D	
发酵第 10 天	BPT_10D	
发酵第 12 天	BPT_12D	第 2 个发酵周期
发酵第 14 天	BPT_14D	
发酵第 18 天	BPT_18D	
发酵第 20 天	BPT_20D	第 3 个发酵周期
发酵第 22 天	BPT_22D	
发酵第 26 天	BPT_26D	第 4 个发酵周期
发酵第 28 天	BPT_28D	
发酵第 30 天	BPT_30D	第 5 个发酵周期

3.2.2 DNA 提取、文库构建、扩增子高通量测序

通过 DNA 试剂盒 (M5635 - 02) 提取样本 DNA, 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') 扩增原核 16S rRNA V3-V4 区目标序列。委托上海派森诺生物技术有限公司进行扩增子高通量测序。

3.2.3 高通量测序原始数据处理及分析

使用 QIIME2 软件对原始数据进行质控、去噪、拼接、去嵌合体得到优质序列，进一步抽平后，100%相似度聚类得到 ASVs。通过原核（Silva, Release132）数据库注释得到 ASVs 列表。剔除线粒体、叶绿体等非目标 ASVs 后，绘制各样本菌群结构柱状图（Origin 8.5）。计算 α 多样性指数，并通过 ANOVA 分析评估 α 多样性指数的差异显著性。通过 R 语言进行 PCA 分析以分析各样本之间的菌群结构差异。通过 Canoco 5 软件进行 RDA 相关性分析。

3.2.4 非靶向代谢组学分析

3.2.4.1 茶叶样本预处理

将普洱茶样本冷冻干燥后研磨成粉，过筛（100 目）。准备 10 mL 离心管，加入 0.4 g 茶粉与 8 mL 质量分数为 70%的甲醇。空白样试管仅放 8 mL 质量分数为 70%的甲醇。室温超声 30 min，室温静置 4h，摇匀；再次超声 30 min，室温静置 4 h。吸取 1.5 mL 上清置于 2 mL 离心管，12000 rpm，10 min。从离心后的所有样本中各吸取 30 μ L 上清于 EP 管内混匀，作为质控（Quality Control, QC）样本。

吸取 100 μ L 上清液，加入 3.9 mL 质量分数为 70%的甲醇，漩涡混匀，为第一次稀释。之后相同步骤，做第 2 次稀释。吸取 1 mL 上述稀释液，4 $^{\circ}$ C 条件下 12000 rpm 离心 10 min。取上清液过 0.22 μ m 滤膜，滤液置于液相小瓶，体积不少于 100 μ L，待液相色谱-轨道离子阱质谱（LC-Orbitrap-MS）检测。每个样本 6 个平行。

3.2.4.2 液相色谱-高分辨率质谱（LC-HRMS）条件

（1）色谱条件：色谱柱 Thermo Hypersil Gold（100 mm $\times$ 2.1 mm，1.9 μ m）；温箱温度：40 $^{\circ}$ C；流动相 A：0.1%甲酸-水，流动相 B：0.1%甲酸-乙腈，采用梯度洗脱；流速设置为 0.2 mL/min；进样量 2 μ L。洗脱条件如表 3-4 所示。

表 3-4 梯度洗脱条件

Table 3-4 The conditions of gradient elution

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	98	2
2.0	86	14
3.5	85	15
8.0	84	16
10.0	75	25
12.0	70	30
15.5	0	100
19.5	0	100
20.0	98	2
25.0	98	2

(2) 质谱条件：数据采集模式为全扫描-自动触发二级扫描 (Full Mass Spectrometry-Direct Detection Mass Spectrometry 2, Full MS-ddMS2)；离子源为 HESI+/-；喷雾电压为+3400/-3400 V；离子传输管温度为 350°C；鞘气 45 arb；辅助气 15 arb；质荷比范围 m/z 为 100 ~ 1500；Full MS 分辨率 7000；ddMS2 分辨率 17500；碎裂模式为高能碰撞解离 (HCD)，归一化碰撞能量 (Normalized Collision Energy, NCE) 30, 40, 60。

3.2.4.3 数据处理与分析

通过过滤偏离值、过滤缺失值及以最小值二分之一的数学模拟方法填补缺失值以达到调整原始数据的目的；对每个样本的总离子流 (Total Ion Current, TIC) 进行标准化处理，并对其归一化。通过人类代谢组数据库 (Human Metabolome Database, HMDB) 与京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 对物质峰进行注释。

通过 SIMCA 软件 (V16.0.2) 建立主坐标分析 (Principal Co-ordinates analysis, PCoA) 模型与正交偏最小二乘法-判别分析 (Orthogonal Projections To Latent Structures- discriminant analysis, OPLS-DA) 模型；并对 OPLS-DA 进行置换检验，以验证其模型的有效性。以学生 t 检验得到的 P 值 (P -value) 及 OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 (Variable Importance in the Projection, VIP) ($P < 0.05$ 且 $VIP > 1$) 作为筛选组间差异代谢物的标准。通过 KEGG Pathway 数据库对差异代谢的代谢通路进行注释。

3.2.4 理化参数检测

3.2.4.1 普洱茶发酵温度

通过电子温度计测量茶堆中层的对角温度，每次测 3 组。

3.2.4.2 普洱茶 pH

检测方法同 2.2.4。

3.2.4.3 普洱茶水分

通过国标 GB/T 8304-87，检测茶叶中的含水量^[100]，具体操作为：称取 5g（精确至 0.001g）茶叶于已知克重的烘干皿内，置于 103℃ 干燥箱，烘干至连续两次称量差不超过 0.005g。

3.2.4.4 普洱茶水活度

于发酵室检测小布朗普洱茶的水活度。戴上手套，通过 Kimwipes 无尘纸擦拭样品杯，水平放置。剪碎小布朗普洱茶，将之平铺于样品杯（样本以刚好覆盖样品杯底部，且厚度低于样品杯深度的二分之一为宜），通过水分活度仪检测水活度。

3.2.5 主要风味成分含量检测

发酵过程种普洱茶的可溶性多糖、纤维素、木质素、总黄酮、游离氨基酸、蛋白质、茶多酚、茶褐素的检测方法同 2.2.4。

3.3 结果与讨论

3.3.1 理化参数的变化

小布朗发酵普洱茶发酵过程中理化参数的变化如图 3-3 所示。随发酵时间的进行，小布朗普洱茶的发酵温度、水分与水活度呈先升高后降低趋势；pH 基本

不变。

发酵初始温度为28.10℃ (BPT_0D)，发酵第2天温度迅速升高至49.63℃；此后 (BPT_3D ~ BPT_26D) 茶堆维持51.50 ~ 62.90℃的高温进行发酵；发酵第26天后茶堆温度开始降低，发酵结束时 (BPT_30D) 茶堆发酵温度降至45.10℃。发酵初期温度的升高与微生物快速生长代谢产生的生物热有关；发酵后期温度有所下降，推测与可用碳源含量降低，微生物产生的生物热减少有关^[101, 102]。发酵过程中的pH维持在6.0 ~ 7.0；其中，第14天小布朗普洱茶的pH最高 (6.7)，第2天最低 (6.4)。发酵前期 (BPT_0D ~ BPT_5D) 小布朗发酵普洱茶的水分呈增高趋势 (31.81 ~ 43.49%)，推测是发酵前期氧气较多，微生物进行有氧呼吸产生水分导致^[103]；随渥堆发酵的进行 (BPT_6D ~ BPT_30D)，水分降至20.39%，推测是微生物生长代谢与酶促反应消耗水分增多，导致茶叶水分降低。小布朗发酵普洱茶发酵第3天的水活度最高 (0.99 a_w)，此后水活度呈降低趋势，发酵第30天时，水活度降至0.93 a_w 。茶叶中水活度降低，表明微生物生长代谢可利用的自由水含量减少，推测影响发酵后期原核菌群的生长代谢能力。

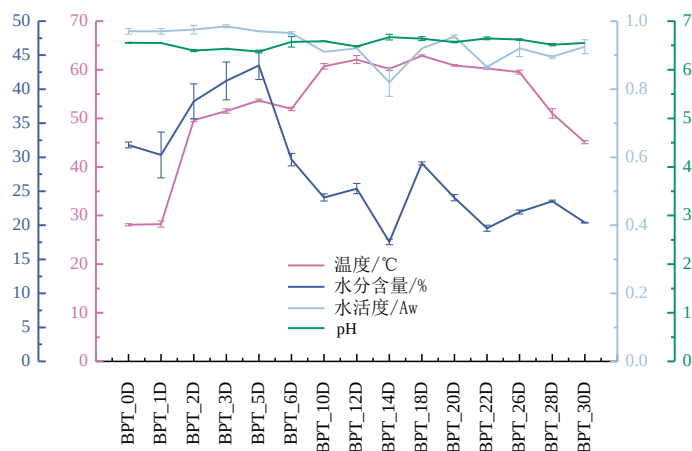


图 3-3 小布朗普洱茶发酵过程中的理化参数值 (n = 3, 误差棒为方差)

Fig.3-3 The Values of physico-chemical parameters during fermentation of BPT (n = 3, error bars are variance)

3.3.2 主要风味成分的变化

通过化学方法检测的小布朗发酵普洱茶发酵过程中主要风味成分的变化如图 3-4 所示。随发酵时间的进行，小布朗发酵普洱茶中可溶性多糖 (13.89 → 22.31 mg/g)、总黄酮 (8.79 → 18.45 mg/g)、茶褐素 (18.36 → 60.90 mg/g)、蛋

白质 (275.63 → 333.96 mg/g)、木质素 (316.67 → 558.33 mg/g) 的含量呈增高趋势；茶多酚 (248.48 → 107.22 mg/g)、游离氨基酸 (21.10 → 13.61 mg/g)、纤维素 (163.89 → 108.33 mg/g) 的含量呈降低趋势。对发酵期间主要风味成分的变化进行拟合，对应的拟合方程如表 3-5 所示。拟合发现，发酵过程中可溶性多糖、总黄酮、茶褐素、蛋白质、木质素的含量变化与发酵时间呈正相关；茶多酚、游离氨基酸、纤维素的含量变化与发酵时间呈负相关。表明渥堆发酵有助于提高普洱茶中可溶性多糖、总黄酮、茶褐素、蛋白质、木质素的含量，进而有助于增加普洱茶的甜味与茶汤颜色的深度。

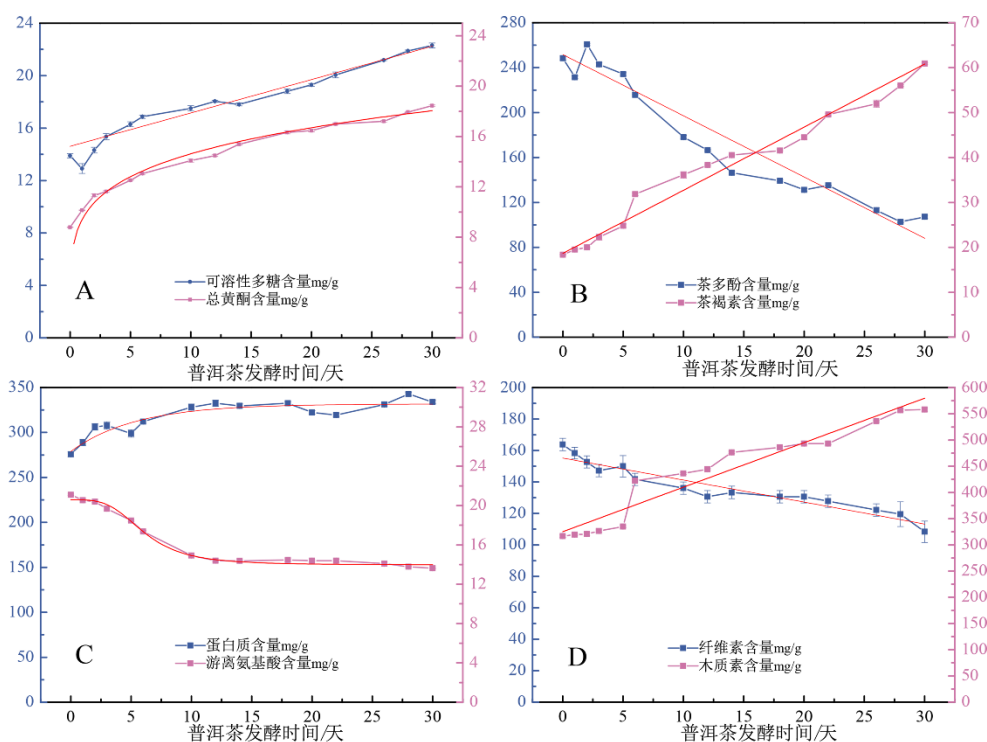


图 3-4 小布朗普洱茶的主要风味成分值 (n = 3, 误差棒为方差, 红色线条为拟合曲线)

Fig.3-4 The values of major flavor components of BPT (n = 3, error bars are variance, the red line is the fitted curve.)

表 3-5 主要风味成分随发酵时间变化的拟合方程

Table 3-5 The fitted equations for the variation of major flavor components with fermentation time

主要风味成分	拟合方程	R ²
可溶性多糖	$y=0.25456x+14.60878$	0.974
总黄酮	$y=9.40673x^{0.19153}$	0.985
茶多酚	$y=-5.45026x+251.60373$	0.938

主要风味成分	拟合方程	R ²
茶褐素	$y=1.40497x+18.66955$	0.984
蛋白质	$y=331.71917-52.82179 \times 0.83044^x$	0.820
游离氨基酸	$y=13.95962+(20.58437-13.95962)/(1+(x/6.07824)^{3.56948})$	0.995
纤维素	$y=-1.39899x+155.21209$	0.875
木质素	$y=8.48978x+325.11047$	0.921

3.3.3 原核菌群的 α 多样性参数

表 3-6 小布朗发酵普洱茶原核菌群结构的 α 多样性参数

Table 3-6 The alpha diversity parameters of prokaryotic flora structure of BPT

样品名称	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
BPT_0D	222.54 ± 99.59 ^{bc}	1.29 ± 0.46 ^e	0.36 ± 0.12 ^f
BPT_1D	178.92 ± 29.87 ^{bc}	1.68 ± 0.40 ^{de}	0.46 ± 0.13 ^{ef}
BPT_2D	173.12 ± 30.24 ^{bc}	2.38 ± 0.94 ^{cde}	0.64 ± 0.19 ^{cde}
BPT_3D	231.80 ± 67.49 ^{bc}	1.51 ± 0.43 ^e	0.32 ± 0.09 ^f
BPT_5D	246.76 ± 57.18 ^{bc}	4.56 ± 0.34 ^{ab}	0.88 ± 0.01 ^a
BPT_6D	143.12 ± 32.41 ^c	3.24 ± 0.27 ^{bcd}	0.81 ± 0.03 ^{abc}
BPT_10D	311.21 ± 78 ^{bc}	3.98 ± 0.68 ^{abc}	0.85 ± 0.03 ^{ab}
BPT_12D	210.17 ± 21.27 ^{bc}	2.65 ± 0.48 ^{cde}	0.67 ± 0.07 ^{bcd}
BPT_14D	353.20 ± 111.7 ^{bc}	3.36 ± 0.80 ^{bcd}	0.78 ± 0.07 ^{abcd}
BPT_18D	623.18 ± 38.43 ^{bc}	4.81 ± 0.53 ^{ab}	0.89 ± 0.04 ^a
BPT_20D	517.41 ± 17.45 ^{bc}	4.37 ± 0.32 ^{ab}	0.87 ± 0.02 ^a
BPT_22D	635.84 ± 83.34 ^b	4.62 ± 0.66 ^{ab}	0.89 ± 0.04 ^a
BPT_26D	664.23 ± 158.90 ^a	5.66 ± 1.78 ^a	0.91 ± 0.05 ^a
BPT_28D	179.56 ± 8.71 ^{bc}	1.71 ± 0.08 ^{de}	0.58 ± 0.01 ^{de}
BPT_30D	274.15 ± 21.56 ^{bc}	2.09 ± 0.09 ^{de}	0.60 ± 0.02 ^{de}

注：参数值为：平均值 ± 标准差；上标有不同字母标记的即为差异显著 ($P < 0.05$)；n=3。

发酵过程中原核菌群结构的 α 多样性参数如表 3-6 所示，随发酵的进行，原核菌群的丰度与多样性呈先增高后降低的趋势。其中，发酵第 26 天 (BPT_26D) 的原核菌群丰度 (664.23、5.66) 与多样性 (0.91) 的值最大，显著高于其余发酵天数 ($P < 0.05$)。此外，小布朗发酵普洱茶原核物种丰度值 Chao1 指数 (199.38、291.53、592.14、421.90、274、15)、原核菌群丰度 Shannon 值 (2.44、3.33、4.60、3.69、2.09) 与多样性 Simpson 值 (0.58、0.77、0.88、0.75、

0.60) 在第 1 个 (BPT_0、1、2、3、5、6D)、第 2 个 (BPT_10、12、14D)、第 3 个 (BPT_18、20、22D) 发酵周期逐渐增高, 推测此阶段可用碳源较多, 利于原核菌群的生长; 而在第 4 个 (BPT_26、28D)、第 5 个 (BPT_30D) 发酵周期逐渐降低, 推测是后期碳源、水分等营养物质降低导致。BPT_28D、BPT_30D 的原核菌群的丰度与多样性无显著差异 ($P>0.05$), 表明发酵末期小布郎普洱茶中的原核菌群的生长趋于稳定。

3.3.4 原核菌群结构变化

各样本扩增子高通量测序覆盖率 (Coverage) 均高于 99.58%, 表明测序序列具有代表性。数据分析得到 39995 个原核 ASVs, 其中, 原核 ASVs 76.30% 注释到属。本研究把相对丰度大于 5% 的菌属定义为优势原核菌属, 以分析原核菌群结构差异。

发酵普洱茶优势原核菌属如图 3-5 A 所示, 发酵过程中优势原核菌属有 14 种, 分别为 *Staphylococcus* (31.41%)、*unclassified_Enterobacteriaceae* (21.51%)、*Kocuria* (11.45%)、*Bacillus* (10.88%)、*Pantoea* (2.44%)、*Brachybacterium* (2.31%)、*Microbacterium* (1.77%)、*Pluralibacter* (1.24%)、*Methylobacterium* (1.14%)、*Curtobacterium* (1.12%)、*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (0.89%)、*Pseudomonas* (0.84%)、*Sphingomonas* (0.45%)、*Sphingobacterium* (0.42%)。第 1 个发酵周期 (BPT_0、1、2、3、5、6D) 的优势原核菌属以 *unclassified_Enterobacteriaceae* (45.23%) 占绝对优势, *Bacillus* (14.19%) 占次要优势, 其中, *Bacillus* 在 BPT_3D ~ BPT_6D 的相对丰度较高; PCoA 主成分分析显示第 1 个发酵周期的原核菌属聚类一起 (图 3-6), 但均一性较差。第 2 个 (BPT_10、12、14D)、第 3 个 (BPT_18、20、22D)、第 4 个 (BPT_26、28D)、第 5 个 (BPT_30D) 发酵周期的优势原核菌属以 *Staphylococcus* (49.61%) 占绝对优势, *Kocuria* (14.94%) 占次要优势; PCoA 主成分分析显示第 2、3、4、5 个发酵周期的原核菌属 (除样本 BPT_10D 外) 聚类一起 (图 3-6), 且均一性较强。其中, BPT_28D、BPT_30D 中 *Staphylococcus* (51.79%、71.40%) 与 *Kocuria* (45.93%、25.62) 的相对丰度差异较小, PCoA 主成分分析显示 BPT_28D、BPT_30D 的原核菌群结构相似度较

高（图 3-6），进一步表明小布朗普洱茶发酵末期原核菌群的生长较稳定。样本 BPT_10D 与第 2、3、4、5 个发酵周期的其余样本聚类结果较差，推测可能是其中 *unclassified_Enterobacteriaceae*（35.31%）的相对丰度较高导致。

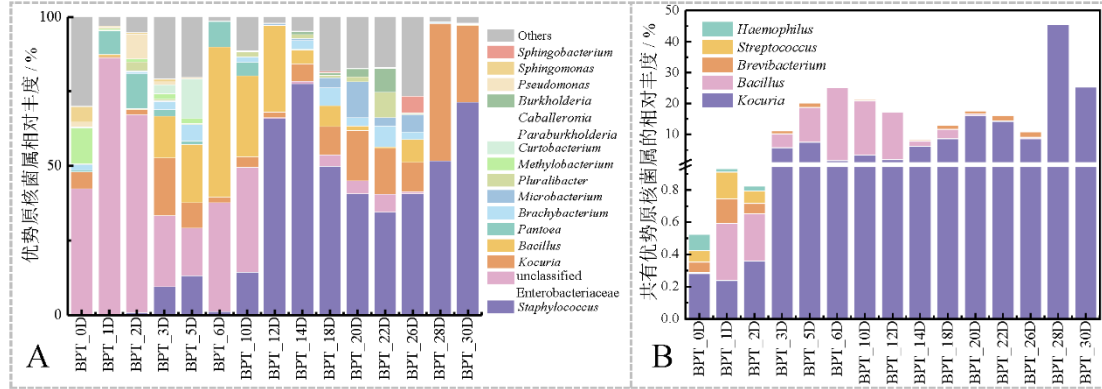


图 3-5 小布朗发酵普洱茶的优势原核菌属（A），共有优势原核菌属（B）的相对丰度

Fig.3-5 The relative abundance of dominant prokaryotic genera (A), co-dominant prokaryotic genera (B) of BPT

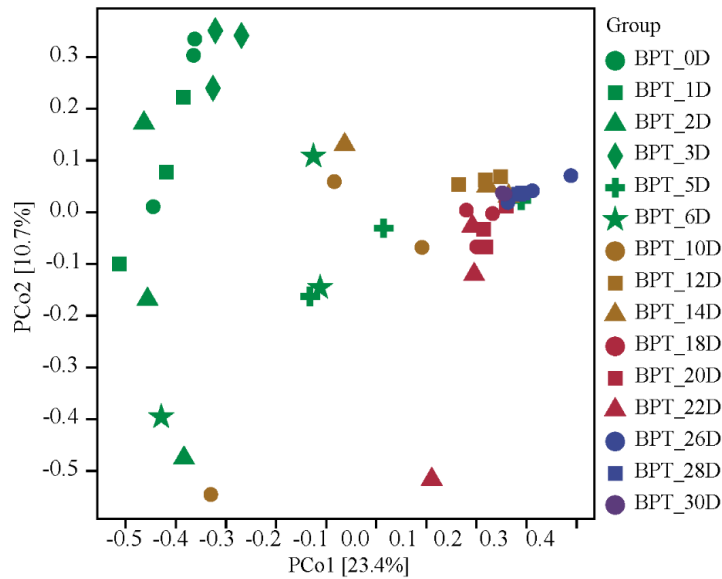


图 3-6 小布朗发酵普洱茶的原核菌属差异

Fig.3-6 The differences in the Prokaryotic Genus of BPT

进一步分析小布朗普洱茶菌群中的共有原核菌属组成（图 3-5B），发酵过程中的共有原核菌属为 *Kocuria*（库克菌属，9.67%）、*Bacillus*（芽孢杆菌属，5.29%）、*Brevibacterium*（短杆菌属，0.67%）、*Streptococcus*（链球菌属，0.07%）、*Haemophilus*（嗜血杆菌属，0.03%）。其中，*Bacillus*（4.51% ~ 23.64%，14.51%）在样本 BPT_3D ~ BPT_12D 中占绝对优势；*Kocuria*（6.15% ~ 45.66%，

17.81%) 在样本 BPT_14D~BPT_30D 中占绝对优势。从发酵第 0 天至发酵第 30 天, 小布朗普洱茶共有原核菌属的相对丰度呈增高趋势 (0.52% → 25.81%), 其中 BPT_28D (46.05%) 包含的共有原核菌属的相对丰度较高。

3.3.5 非靶向代谢组学分析

基于优势原核菌群组成结果 (图 3-5 A、图 3-5 B)、菌群结构相似度分析 (图 3-6) 以及发酵初期茶堆内部变化的不确定性, 选取 BPT_0、1、2、3、5、6、10、12、20、30D 十个样本进行非靶向代谢组学检测。每组 6 个平行。

3.3.5.1 物质分类

对下机原始数据进行过滤、填补、标准化、归一化等处理后, 正、负离子模式下共保留 36747 个物质峰, 其中正离子模式下有 30435 个物质峰、负离子模式下有 6312 个物质峰。向 HMDB 及 KEGG 数据库已有信息进行比对, 正、负离子模式下分别鉴定出 273 种、74 种具体物质, 其分类如图 3-7 所示。

正离子模式下主要包含 (图 3-7 A): 生物碱 (33 种, 12.088%)、氨基酸和肽 (18 种, 6.593%)、有机杂环化合物 (18 种, 6.593%)、脂肪酸 (12 种, 4.396%)、莽草酸盐和苯丙素类药物 (5 种, 1.832%)、苯类 (4 种, 1.465%)、有机氧化合物 (4 种, 1.465%)、聚酮类化合物 (3 种, 1.099%)、萜类化合物 (2 种, 0.733%)、碳水化合物 (1 种, 0.366%)、脂质和脂质样分子 (1 种, 0.366%)、苯丙素类化合物和聚酮类化合物 (1 种, 0.366%) 与其它 (171 种, 62.637%); 负离子模式下主要包含 (图 3-7 B): 莽草酸盐和苯丙酸盐 (3 种, 4.054%)、脂肪酸 (3 种, 4.054%)、脂质和脂质样分子 (2 种, 2.703%)、有机氧化合物 (2 种, 2.703%)、生物碱 (1 种, 1.351%)、碳水化合物 (1 种, 1.351%)、苯丙素类化合物和聚酮类化合物 (1 种, 1.351%)、萜类化合物 (1 种, 1.351%) 与其它 (60 种, 81.081%)。

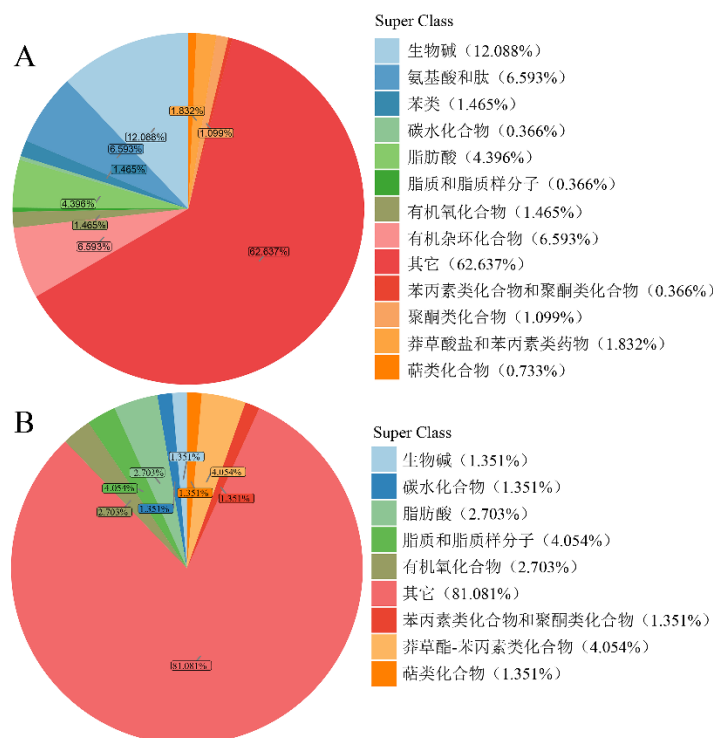


图3-7 不同种类代谢物的占比

Fig.3-7 The percentage of different types of metabolites

3.3.5.2 代谢物主成分分析

对样本进行 PCoA 聚类分析，全部样本（含 QC 样本）的 PCoA 得分散点图（Score Scatter Plot）如图 3-8 所示。图中的样本点分布越靠近，表明两者代谢物的种类和含量越相似；反之，其整体代谢水平差异性越大。

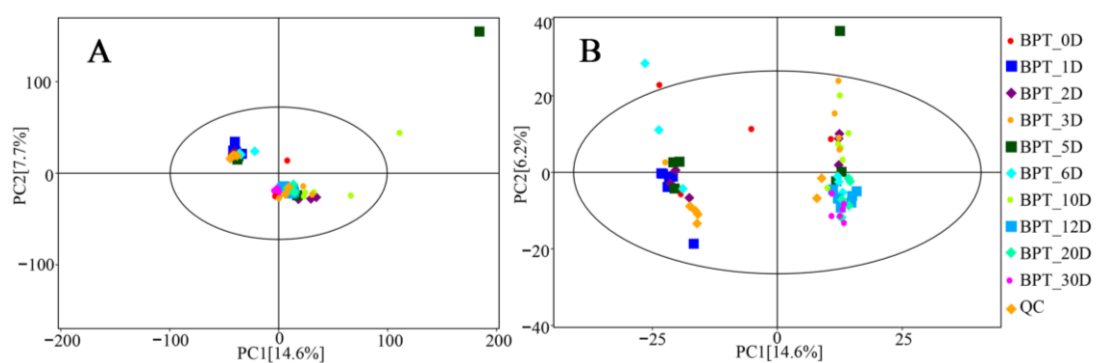


图 3-8 正（A）、负（B）离子模式下总样本代谢物的 PCoA 图

Fig.3-8 The PCoA plots of total sample metabolites in positive (A) and negative (B) ion mode

正离子模式中（图 3-8 A），除 BPT_5D、BPT_10D 的 2 个样本点外，其余样本点均处于 95%置信区间内；负离子模式中（图 3-8 B），BPT_0D、BPT_5D、

BPT_6D 的 3 个样本点外，其余样本点均处于 95%置信区间内，且 QC 样本重合度较好，表明数据可信。此外，正负离子模式下，样本基本聚类为“BPT_0D、BPT_1D、BPT_2D、BPT_3D、BPT_5D、BPT_6D”与“BPT_10D、BPT_12D、BPT_14D、BPT_18D、BPT_20D、BPT_22D、BPT_26D、BPT_28D、BPT_30D”两组，表明前 6 天的普洱茶中的代谢物的种类与含量与后 24 天差异性较大。

为可视化发酵过程中差异代谢物的变化趋势，提高非靶向代谢组学数据的全面性。本章以 VIP 值 >1 且 P 值 <0.05 作为筛选差异代谢物的标准，将全部差异代谢物的相对含量进行 z-score 标准化，进行 K 均值（K-Means）聚类分析，以研究代谢物在发酵过程中的相对含量变化趋势（图 3-9）。正离子模式下共有 9 种变化趋势（图 3-9 A），发酵末期（BPT_30D）相对含量最高的为 2-乙酰-1-吡咯啉（2-Acetyl-1-pyrroline_4，第 7 簇），其次为 2,5-二甲基吡嗪（2,5-Dimethylpyrazine_3，第 6 簇）、绿原酸甲酯（Chlorogenic acid methyl ester，第 9 簇）等。2-乙酰-1-吡咯啉与 2,5-二甲基吡嗪可提供爆米花香与烘焙花香，有助于丰富普洱茶的香气。负离子模式下共有 7 种变化趋势（图 3-9 B），发酵末期

（BPT_30D）相对含量最高的为花生四烯酸（arachidonic acid，第 7 簇），其次为亚油酸（Linolenic acid，第 2 簇）等。花生四烯酸与亚麻酸均为不饱和脂肪酸，具有抗炎作用。发酵后期（BPT_20D、BPT_30D）差异代谢物的变化趋于稳定，推测原核菌群在发酵末期时产生的差异代谢物质的量趋于稳定，进一步推测原核菌群在发酵末期的代谢活动趋于稳定状态。

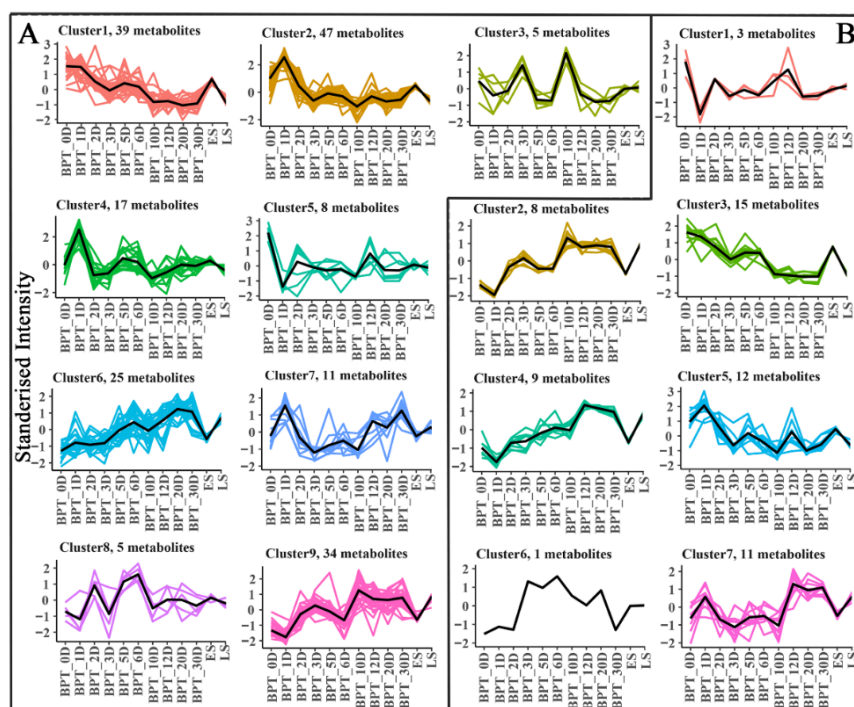


图 3-9 正 (A)、负 (B) 离子模式下的 K 均值聚类分析 (纵坐标表示标准化之后的代谢物相对含量, Cluster 代表相同变化趋势的代谢物为一个簇, “n” metabolite(s) 中的 “n” 代表该簇的代谢物的数目)

Fig.3-9 The K-mean clustering analysis of positive (A) and negative (B) ionic patterns

3.3.5.3 OPLS-DA

基于发酵过程中原核菌群结构差异 (图 3-6) 与代谢物的聚类结果 (图 3-8), 后续将 BPT_0 ~ 6 天样本作为前期 (early stage, ES) 组, 把 BPT_10 ~ 30 天样本作为后期 (later stage, LS) 组, 以便分析发酵前后变化的差异代谢物。

通过 OPLS-DA 分析滤掉不相关的变量, 获取更可靠的代谢物的组间差异与实验组的相关性。后期 (LS) 组对前期 (ES) 组的 OPLS-DA 模型结果如图 3-10 所示, 横坐标为第一主成分的预测主成分得分, 代表样本 LS 与 ES 的组间差异; 纵坐标为正交主成分得分, 代表样本 LS 或 ES 的组内差异。正 (图 3-10 A)、负 (图 3-10 B) 离子模式下 LS 组与 ES 组的代谢物的种类与数量均有差异, 此外, 发酵后期 (LS) 组内均一性较发酵前期 (ES) 好。

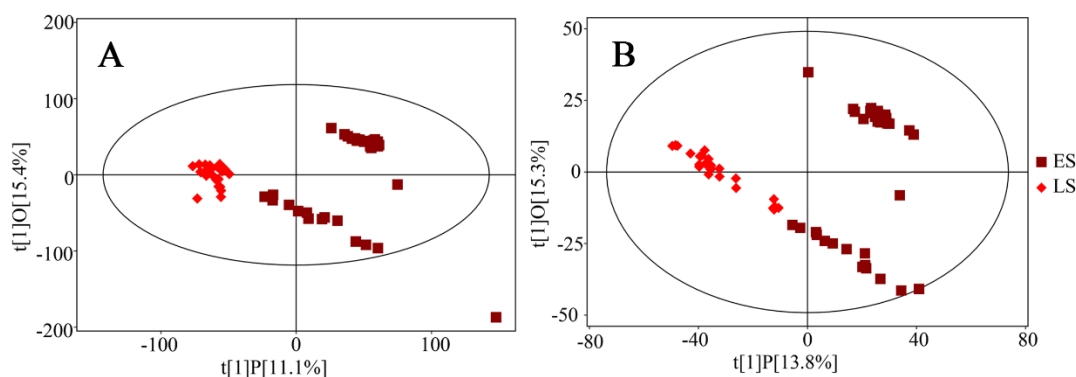


图 3-10 正 (A)、负 (B) 离子模式下 LS 对 ES 的代谢物的 OPLS-DA 图

Fig.3-10 The OPLS-DA plots of metabolites of LS to ES in positive (A) and negative (B) ionic mode

通过置换检验判断OPLS-DA模型的可行性，分析结果如图3-11所示。该图中的横坐标为置换保留度，图中最右侧的 R^2 与 Q^2 表示原OPLS-DA模型的 R^2 与 Q^2 值（置换保留度为1）。正（A）、负（B）离子模式下的随机模型中的 R^2 与 Q^2 值均随置换保留度的降低而降低，表明原OPLS-DA模型没有过度拟合。此外，模型的可解释度（ R^2 ）与可预测性（ Q^2 ）较好，表明原OPLS-DA模型能准确反映前期（ES）与后期（LS）2个样本间的代谢物差异。

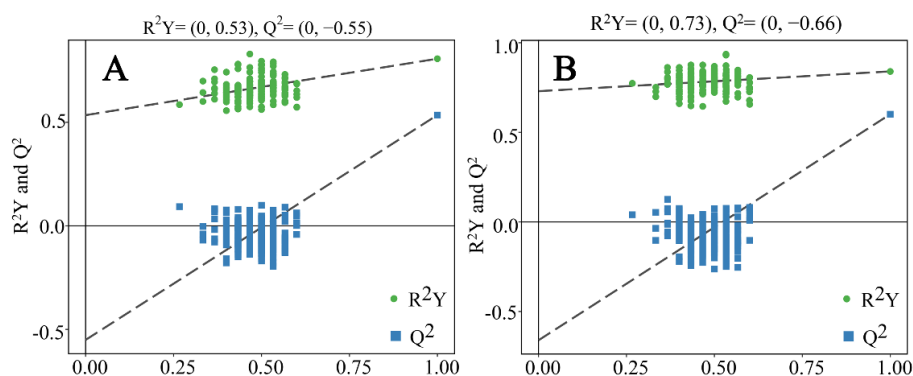


图 3-11 正 (A)、负 (B) 离子模式下 LS 对 ES 的代谢物的 OPLS-DA 模型置换检验

Fig.3-11 The OPLS-DA model substitution test for metabolites of LS to ES in positive (A) and negative (B) ionic modes

3.3.5.4 差异代谢物分析

通过上述分析之后，结合单元变量和多元变量统计分析结果，以 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 筛选发酵后期（LS）与前期（ES）间的差异代谢物。正离子模式下共

有8133个物质峰在LS与ES间有显著差异（图3-12 A），其中4525个物质峰相对前期（ES）显著上调，3607个物质峰相对前期（ES）显著下调；负离子模式下共有1985个物质峰在LS与ES间有显著差异（图3-12 B），其中1645个物质峰相对前期（ES）显著上调，340个物质峰相对前期（ES）显著下调。

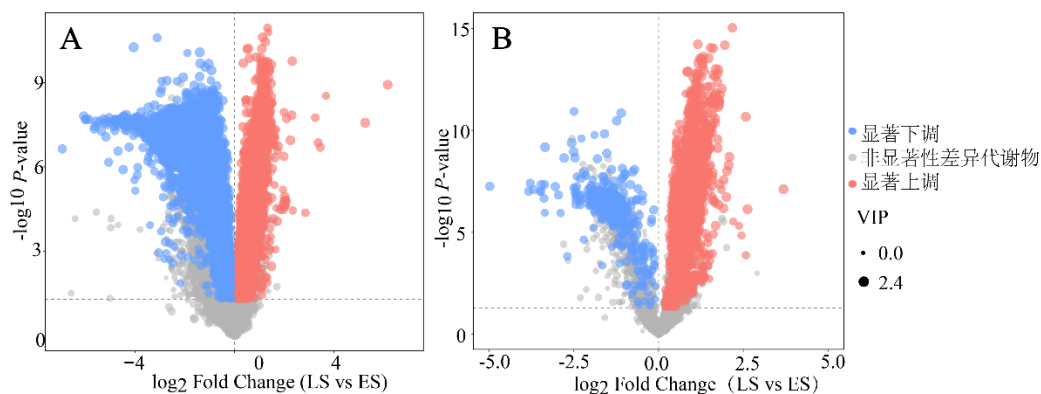
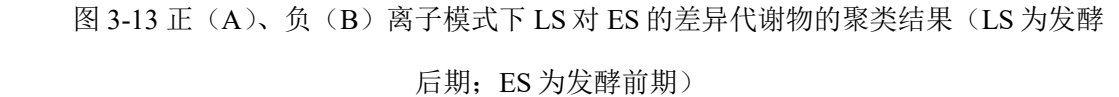


图 3-12 正 (A)、负 (B) 离子模式下 LS 对 ES 的差异代谢物的火山图（横坐标为各物质的倍数变化-取以 2 为底的对数；纵坐标为学生 t 检验的 P 值-取以 10 为底对数的负数）

Fig.3-12 The Volcano plots of differential metabolites of ES by LS in positive (A) and negative (B) ionic mode

通过 HMDB 与 KEGG 数据库对发酵后期 (LS) 与前期 (ES) 组间的差异物质峰进行注释，正、负离子模式下分别注释到 37 种、19 种代谢物质名称。基于两组间差异代谢物的定量值计算欧式距离矩阵，并通过层次聚类对组间的差异代谢物进行聚类分析，最后以热图形式展示两组间差异代谢物的含量差异性。正 (A)、负 (B) 离子模式下，前期 (ES) 与后期 (LS) 的差异代谢物的聚类结果如图 3-13 所示。



为分析对前期（ES）与后期（LS）影响最大的差异代谢物，对差异代谢物的定量值计算对应的比值，并通过以 2 为底的对数进行转换。各组上调及下调

的变化倍数前十的差异代谢物如图 3-14 所示。

正离子模式下 (图 3-14 A), 4-羟基十四烷酸 (4-Hydroxytetradecanoic acid)、黄嘌呤 (Xanthine)、穿心莲内酯 (Andrographolide)、水溶性维生素 E (Trolox)、麝香酮 (Muscone)、(-)-石竹环氧烷 ((-)-Caryophyllene oxide)、环孢菌素 A (Cyclosporine A)、肉桂酸 (Cinnamic acid)、2,5-二甲基吡嗪 (2,5-Dimethylpyrazin)、12-Oleanene-3,16,21,22,28-pentol 的含量在发酵后期显著上调 ($P < 0.05$)；卡地那二烯 (1 (10), 4-卡迪二烯)、2-乙烯基吡嗪 (Vinylpyrazine)、1,1,3-三甲基-1H-茛 (1,1,3-Trimethylindene)、12-氨基十二烷酸甲酯 (Dodecanoic acid)、L-茶氨酸 (L-Theanine)、对羟基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoic acid)、双酸 (Obacunoic acid)、2-乙基-3,5-二甲基吡嗪 (2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine)、3,3',4',5,7-五羟基黄酮 (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone)、可可碱 (Theobromine) 的含量在发酵后期显著下调 ($P < 0.001$)。负离子模式下 (图 3-14 B), 亚油酸 (Linoleic acid)、绿原酸甲酯 (Chlorogenic acid methyl ester)、花生四烯酸 (Arachidonic acid)、甘氨酸酐 (Glycine anhydride)、3-羟基-3-甲基-2,4-壬二酮 (3-Hydroxy-3-methyl-2,4-nonanedione_2)、麝香草酚 (Thymol)、大豆皂甙 (Soyasaponin I)、9,12-十八碳二烯酸 (9,12-Octadecadienoic acid)、5-巨柱头-3,9-二醇 (5-Megastigmene-3,9-diol)、Cis-2-Hexenyl Hexanoate 的含量在发酵后期显著上调 ($P < 0.01$)。

其中, 肉桂酸与亚油酸有助于普洱茶香气的形成, 发酵后期该有机酸的显著上调对普洱茶的香气有所改善^[104, 105]。此外, 发酵后期具有抗氧化性的维生素 E 与(-)-石竹环氧烷显著上调, 有助于改善普洱茶的抗氧化性。发酵后期可可碱的显著下调有助于普洱茶中苦味的降低。

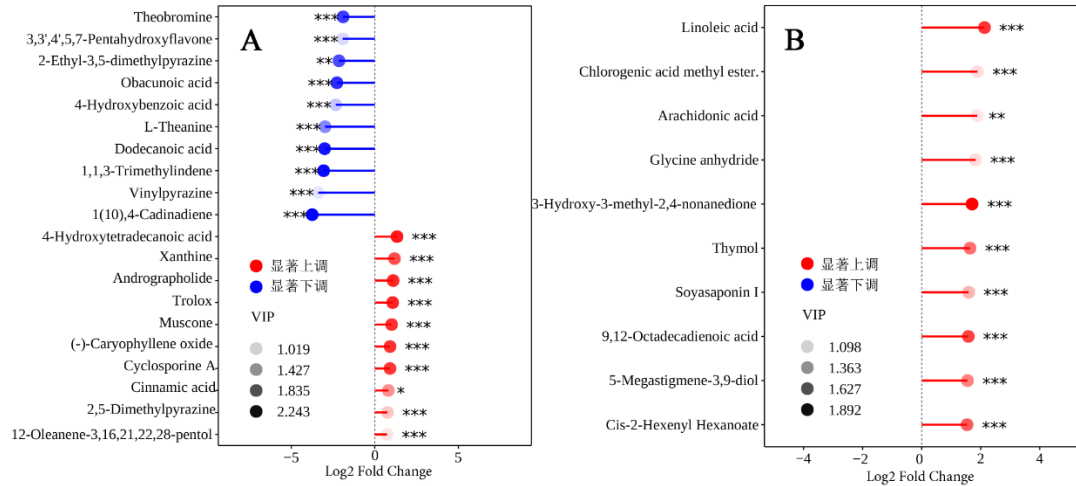


图 3-14 正 (A)、负 (B) 离子模式下 LS 对 ES 的差异代谢物的火柴图 (横坐标为对数转换后的变化倍数, 点色的深浅代表 VIP 值大小; * $0.01 < p < 0.05$, ** $0.001 < p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Fig.3-14 The tinder plots of differential metabolites of LS to ES in positive (A) and negative (B) ionic mode

3.3.5.5 KEGG 代谢通路富集

通过KEGG Pathway数据库对差异代谢物的代谢通路进行注释的结果如图3-15所示。横坐标的百分比表示参与某一代谢通路下的差异代谢物占总差异代谢物的比; 纵坐标为三级代谢通路; Class为二级代谢通路。图3-15 A, 正离子模式下的差异代谢物主要参与新陈代谢途径 (Metabolic pathways, 83.3%)、咖啡因代谢 (Caffeine metabolism, 33.3%) 与不饱和脂肪酸的生物合成 (Biosynthesis of unsaturated fatty acids, 33.3%) 等三级代谢通路。图3-15 B, 负离子模式下的差异代谢物主要参与不饱和脂肪酸的生物合成 (Biosynthesis of unsaturated fatty acids, 100%)、新陈代谢途径 (Metabolic pathways, 50%)、亚油酸代谢 (Linoleic acid metabolism, 50%) 角质、痣和蜡的生物合成 (Cutin, suberine and wax biosynthesis)、脂肪酸生物合成 (Fatty acid biosynthesis, 50%)。

正、负离子模式下的差异代谢物参与新陈代谢通路的丰度均较高, 推测在渥堆发酵过程中原核菌群生命代谢活动活跃。正离子模式下参与咖啡因代谢通路的丰度较高, 推测渥堆发酵有助于降低普洱茶中咖啡因的含量; 此外, 不饱和脂肪酸的生物合成通路有助于积累普洱茶中香气物质的积累^[106]。由于, 发酵

后期亚油酸含量显著上调（图3-14 B），推测在发酵后期亚油酸代谢通路较活跃。

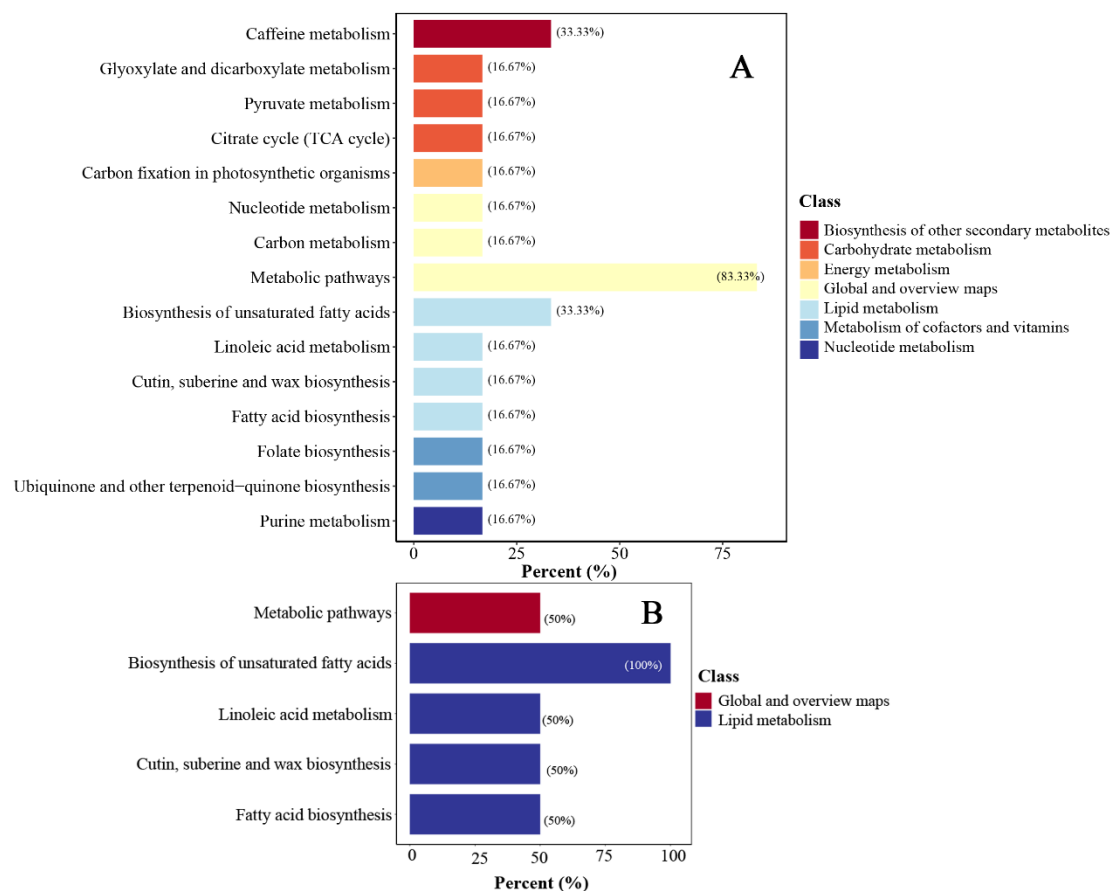


图 3-15 正（A）、负（B）离子模式下 LS 对 ES 的差异代谢物的代谢通路分类

Fig.3-15 The metabolic pathway classification of differential metabolites of ES by LS in positive (A) and negative (B) ionic mode

基于差异代谢物在KEGG代谢通路中的富集结果，计算Rich Factor值。Rich Factor为特定通路中，注释到的差异代谢物与总代谢物的比值，值愈大表明富集度越高。结果如图3-16所示。正离子模式下（图3-16 A），咖啡因代谢（Caffeine metabolism）的Rich Factor值最，表明参与咖啡因代谢中差异代谢物的占比最高、富集程度最大。此外，可可碱在咖啡因代谢中显著下调（图3-17）。负离子模式下（图3-16 B），角质、琥珀和蜡的生物合成（Cutin, suberine and wax biosynthesis）的Rich Factor值最高，表明参与角质，琥珀和蜡的生物合成中差异代谢物的占比最高、富集程度最大。此外，油酸在角质、琥珀和蜡的生物合成中显著上调（图3-18）。

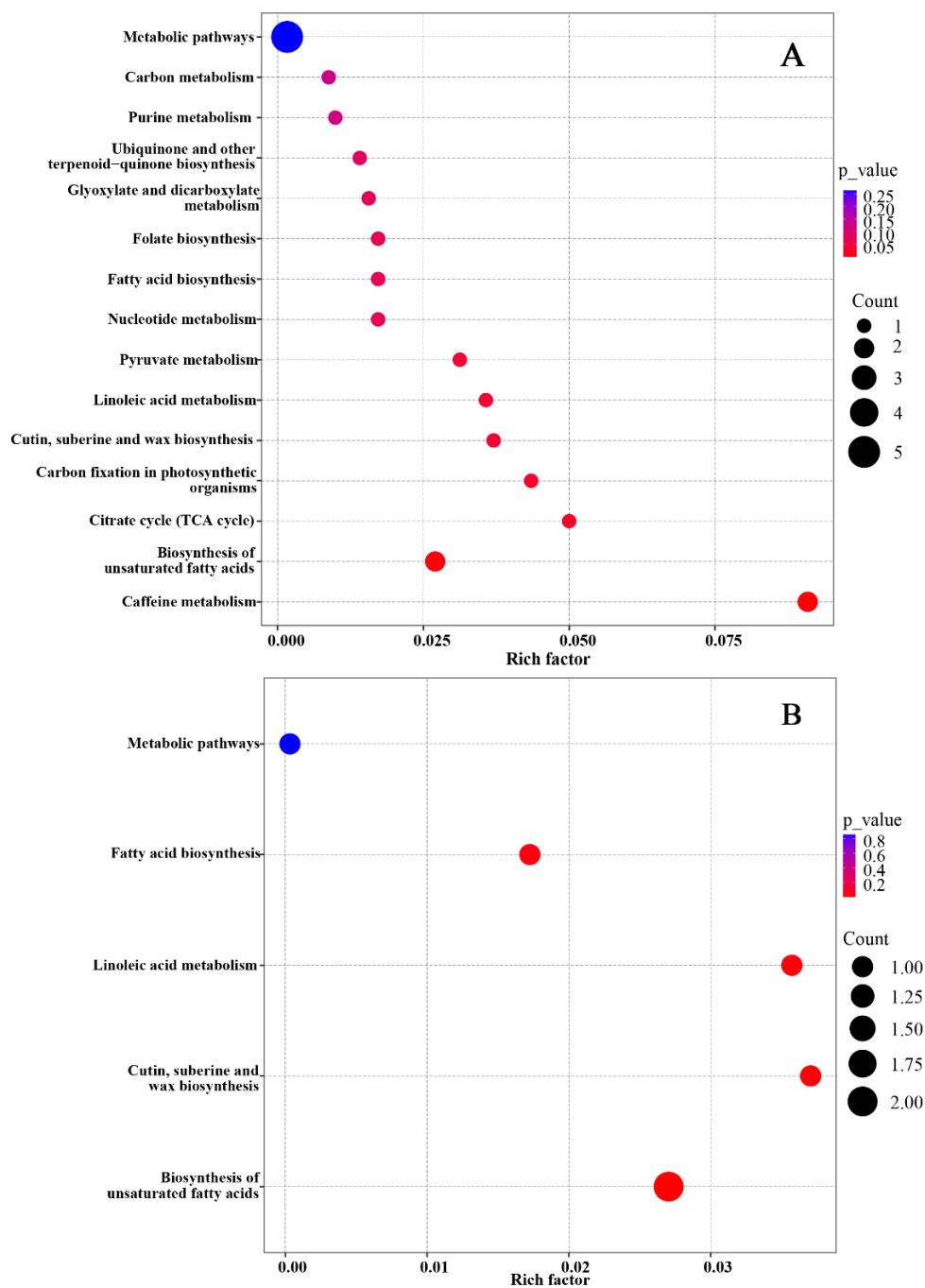


图 3-16 正 (A)、负 (B) 离子模式下 LS 对 ES 的差异代谢物的 KEGG 富集图 (点的大小为富集到的差异代谢物的数量; P 值愈小富集愈显著)

Fig.3-16 The KEGG enrichment maps of differential metabolites of ES by LS in positive (A) and negative (B) ionic mode

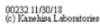


Fig.3-17 Caffeine metabolism

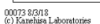


Fig.3-18 Cutin, suberine and wax biosynthesis

3.3.6 原核菌属与理化参数及主要风味成分间的 RDA 相关性

通过 RDA 相关性分析（图 3-19）发现，与原核菌群的相关性具有显著贡献的理化参数有（图 3-19 A）：水活度（63.5%、 $p = 0.002$ ）、温度（23.5%、 $p = 0.01$ ），表明小布朗普洱茶发酵过程中的原核菌群受水活度与温度的影响较大。此外，pH 与 BPT_10D 的原核菌属 *Pluralibacter* 呈强正相关，水分与 BPT_2D 的原核菌属 *Pseudomonas* 呈强正相关。与原核菌群的相关性具有显著贡献的主要风味成分有（图 3-19 B）：游离氨基酸（67.10%、 $p = 0.002$ ）、茶多酚（10.80%、 $p = 0.006$ ），表明原核菌群对普洱茶发酵过程中游离氨基酸与茶多酚的代谢贡献较大。此外，茶褐素的值与 BPT_20D、BPT_22D、BPT_26D 的原核菌属 *Staphylococcus* 呈强正相关，总黄酮、可溶性多糖、木质素、蛋白质的值与 BPT_14D 的原核菌属 *Staphylococcus* 呈强正相关。

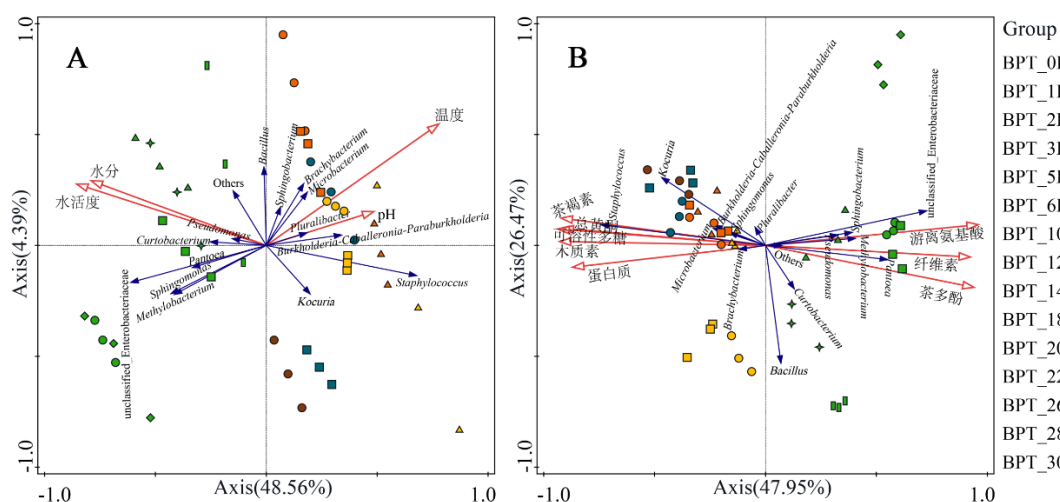


图 3-19 小布朗发酵普洱茶优势原核菌属分别与理化参数（A）和物质含量（B）的冗余分析

Fig.3-19 The redundancy analysis of dominant prokaryotic genera in BPT with physicochemical parameters (A) and substance content (B)

3.4 小结

本章通过检测小布朗普洱茶发酵过程中的理化参数、采集发酵过程茶样并进行 16S rRNA 扩增子测序与非靶向代谢组学分析，以研究渥堆发酵过程中理化参数对小布朗普洱茶原核菌群结构的影响及小布朗普洱茶原核菌群结构对主要

风味成分的影响。本章研究得出以下结果：

(1) 随发酵时间的进行，小布朗普洱茶的发酵温度、水分与水活度呈先升高后降低趋势；pH 基本不变。其中温度最高维持在 51.50 ~ 62.90℃，pH 于 6.0 ~ 7.0 波动，发酵结束后水分降至 20.39%，水活度降至 0.93 a_w；小布朗发酵普洱茶中可溶性多糖、总黄酮、茶褐素、蛋白质、木质素的含量呈增高趋势；茶多酚、游离氨基酸、纤维素的含量呈降低趋势，变化趋势与 2.3.2 结果一致。

(2) 前 3 个发酵周期原核菌群的丰度与多样性呈增高趋势，而后 2 个发酵周期则呈降低趋势。此外，在发酵末期（BPT_28D、BPT_30D）小布朗普洱茶中的原核菌群的生长趋于稳定。

(3) 第 1 个发酵周期的绝对优势原核菌属为 *unclassified_Enterobacteriaceae*，其次为 *Bacillus*，该时期原核菌属均一性较差；第 2、3、4、5 个发酵周期的绝对优势原核菌属为 *Staphylococcus*，其次为 *Kocuria*，该时期的原核菌属（除样本 BPT_10D 外）均一性较强。发酵第 0 ~ 30 天，小布朗普洱茶共有原核菌属的相对丰度呈增高趋势（0.52% → 25.81%）。其中，共有原核菌属 *Bacillus* 的相对丰度在样本 BPT_3D ~ BPT_12D 中较高，*Kocuria* 在样本 BPT_14D ~ BPT_30D 中较高。

(4) 非靶向代谢组学中正、负离子模式下共鉴定出 36747 个物质峰，其中正离子模式下有 30435 个物质峰、负离子模式下有 6312 个物质峰。发酵前期与后期间的差异物质峰在正、负离子模式下分别注释到 37 种、19 种代谢物。发酵后期，普洱茶中的肉桂酸、亚油酸、维生素 E 与(-)-石竹环氧烷等差异代谢物显著上调；可可碱等差异代谢物显著下调。正、负离子模式下的差异代谢物分别主要进行新陈代谢途径（Metabolic pathways, 83.3%）与不饱和脂肪酸的生物合成（Biosynthesis of unsaturated fatty acids, 100%）。

(5) 小布朗普洱茶发酵过程中的原核菌群结构主要受渥堆发酵时水活度与温度的影响，此外，小布朗普洱茶发酵过程中的原核菌群与游离氨基酸与茶多酚的代谢显著相关。

第 4 章 发酵过程中核心原核功能菌分离及代谢特征分析

目前已有许多学者根据菌种的代谢特性，将功能菌种或普洱茶中分离出的菌种与普洱茶共同发酵，以期达到改善普洱茶风味的作用。普洱茶发酵过程中起主要作用的真核与原核菌属分别为曲霉和芽孢杆菌。两者均可促进可溶性多糖、茶褐素、甲氧基酚类化合物等重要风味成分的产生。但目前对于发酵过程中真核菌属的研究较原核菌属多。因此，分离发酵过程中的原核菌属，并将之反添加应用于普洱茶的发酵有重要意义。鉴于 3.4 得出小布朗普洱茶发酵过程中的原核菌群与游离氨基酸与茶多酚的代谢显著相关，且多酚氧化酶与过氧化物酶对普洱茶发酵过程中的重要作用。本章对发酵过程中的茶叶样本中的原核菌属进行富集与分离纯化，并通过形态学与分子生物学方法筛出芽孢杆菌。最后对已鉴定的芽孢杆菌进行功能性检验。本章对于改善普洱茶品质与缩短普洱茶发酵周期有重要意义。

4.1 实验材料

4.1.1 茶叶原料

液体发酵所用茶叶为云南书剑茶叶有限公司提供的小布朗生茶（散茶，2023 年）。

4.1.2 实验药品

表 4-1 实验药品

Table 4-1 Experimental Drugs

药品名称	药品类型	生产厂家
胰蛋白胨	FMB	生工生物工程（上海）股份有限公司
酵母提取物	FMB	生工生物工程（上海）股份有限公司
氯化钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
琼脂条	BR	国药集团化学试剂有限公司

两性霉素 B	USP	生工生物工程（上海）股份有限公司
可溶性淀粉	AR	生工生物工程（上海）股份有限公司
牛肉膏	AR	国药集团化学试剂有限公司
果胶	AR	国药集团化学试剂有限公司
NH ₄ Cl	AR	国药集团化学试剂有限公司
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	AR	国药集团化学试剂有限公司
K ₂ HPO ₄	AR	国药集团化学试剂有限公司
Fe SO ₄ ·7H ₂ O	AR	国药集团化学试剂有限公司
羧甲基纤维素钠	BR (≥99.5%)	生工生物工程（上海）股份有限公司
KH ₂ PO ₄	AR	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	AR	国药集团化学试剂有限公司
脱脂奶粉	商业级	生工生物工程（上海）股份有限公司
结晶紫	AR	国药集团化学试剂有限公司
草酸铵	AR	国药集团化学试剂有限公司
番红 O	AR	国药集团化学试剂有限公司
碘	AR	国药集团化学试剂有限公司
碘化钾	AR	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
琼脂糖	电泳级	生工生物工程（上海）股份有限公司

4.1.3 实验仪器

表 4-2 实验仪器

Table 4-1 Experimental Instruments

实验仪器	生产厂家
恒温恒湿培养箱（PYX-DHS-40X50 型）	上海跃进医疗器厂
恒温恒湿振荡培养箱（SPH-2102c）	上海世平实验设备有限公司
生物显微镜（XSP-2CA）	上海光学仪器六厂
双人单面净化工作台（SW-CJ-2FD）	苏州净化设备有限公司
雷磁牌实验室 pH 计（PHSJ-3F）	上海精密科学仪器有限公司
电热恒温鼓风干燥箱（GZX-GF101-1-BS-II）	上海新苗医疗器械制造有限公司
台式低速离心机 80-2	金坛市杰瑞电器有限公司
SK-1 快速混匀器	上海医用激光仪器厂

4.1.4 培养基

(1) 溶菌肉汤 (Luria-Bertani, LB) 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L; 淀粉培养基: 可溶性淀粉 2 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、牛肉膏 5 g/L; 果胶培养基: 果胶 1.5 g/L、NH₄Cl 0.4 g/L、Mg SO₄·7H₂O 2 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、Fe SO₄·7H₂O 0.01 g/L; 纤维素培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母粉 10 g/L、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 10 g/L、NaCl 5 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L。以上培养基配 pH 调至 7.0, 121℃ 灭菌 20 min。蛋白质培养基: 蛋白胨 5 g/L、酵母粉 5 g/L、葡萄糖 10 g/L、磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 4 g/L、脱脂奶粉 20 g/L, pH 调至 7.0, 115℃ 灭菌 30 min。固体培养基额外加 20 g/L 琼脂粉。

(2) LB 抗性培养基: 高温灭菌后的 LB 培养基 (每瓶 100 mL) 冷至 50℃ 左右, 加入 100 μL 的两性霉素 B (2.5 mg/mL), 使培养基内抗性浓度为 2.5 mg/L。固体培养基额外加 20 g/L 琼脂粉。

(3) 茶汤发酵培养基: 粉碎小布朗生茶, 过筛 (40 目)。按 1:30 固液比向瓶内添加茶叶与蒸馏水, 沸水浸泡 30min (每 5min 搅拌一次), 抽滤, 121℃ 灭菌 20min。

4.2 实验方法

4.2.1 原核菌种的分离与纯化

取 3 g 茶叶置于锥形瓶内, 按 1: 30 的固液比添加蒸馏水, 室温放置 12 h, 以富集发酵过程中茶叶样本所含细菌。

将茶汤进行梯度稀释 (10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6}), 分别吸取 100 μL 稀释液涂布于 LB 抗性平板, 37℃ 静置培养至单菌落出现。挑取单菌落于含 5mL 的液体 LB 抗性培养基内, 于摇床 37℃、220 rpm 培养 16 h, 进行平板划线。重复以上步骤, 直至平板上仅有一种菌株, 则完成细菌的纯化步骤。通过甘油保藏法对已纯化的细菌菌株进行保种, -80℃ 保存至检测。

4.2.2 原核菌种形态学鉴定

参照《伯杰细菌鉴定手册》对菌株的菌落进行观察；通过革兰氏染色法对已纯化的细菌进行染色，最后用显微镜（油镜）观察细胞形态与染色结果。

4.2.3 原核菌种分子生物学鉴定

4.2.3.1 细菌 DNA 的提取、扩增与回收

通过 DNA 提取试剂盒（E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil）提取纯化细菌的 DNA；通过 27F-1492R 引物（27F：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'；1492R：5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'）对原核 16S rRNA V3-V4 区目标序列进行聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）扩增，PCR 扩增反应体系与条件如表 4-3、表 4-4 所示；通过 DNA 凝胶回收试剂盒（AxyPrep）对目的 DNA 进行胶回收。

表 4-3 PCR 扩增反应体系

Table 4-3 The reaction system of PCR amplification

试剂	体积 (μL)
DNA (20 ng/μL)	1.0
10×Buffer (含 2.5 mM Mg ²⁺)	5.0
Taq 聚合酶 (5 μ/μL)	1.0
dNTP (10 mM)	1.0
27F 引物 (10 μM)	1.5
1492R 引物 (10 μM)	1.5
ddH ₂ O	39.0
总体积	50.0

表 4-4 PCR 扩增反应条件

Table 4-4 The reaction condition of PCR amplification

设置	温度 (°C)	时间 (min)
预变性	95	5
变性	95	0.5

退火	58	0.5
延伸	72	1.5
终延伸	72	7
循环数	35	

4.2.3.2 序列的测定

回收的 DNA 交由上海派森诺公司进行 DNA 测序。将测序的序列结果与 NCBI 16S rRNA 数据库进行同源比对，同源性最高的序列即确定为菌株序列。

4.2.4 生理生化检测

4.2.4.1 淀粉水解圈^[17]

将单菌落点接于淀粉培养基，37℃静置培养至出现单菌落。用碘液进行染色，观测透明圈，测量菌落透明圈直径（D）及菌落直径（d），得出比值（D/d）。

4.2.4.2 果胶水解圈^[85]

将单菌落点接于果胶培养基，37℃静置培养至出现单菌落。先用 5 mg/mL 的刚果红溶液染色 15 min，再用 1 mol/L 的氯化钠溶液浸满平板表面，静置脱色 15 min。倒出氯化钠溶液，观测透明圈。测量菌落透明圈直径（D）及菌落直径（d），得出比值（D/d）。

4.2.4.3 纤维素水解圈^[93]

将单菌落点接于纤维素培养基，37℃静置培养至出现单菌落。先用 0.2% 的刚果红染液染色 1 h，再用 1 mol/L 的氯化钠溶液浸满平板表面，静置脱色 1 h。倒出氯化钠溶液，观测透明圈。测量菌落透明圈直径（D）及菌落直径（d），得出比值（D/d）。

4.2.4.4 蛋白水解圈^[70]

将单菌落点接于蛋白质培养基，37℃静置培养至出现单菌落。观测透明圈，测量菌落透明圈直径（D）及菌落直径（d），得出比值（D/d）。

4.2.5 芽孢杆菌摇瓶发酵

活化目标菌株，摇床培养（37℃，220rpm）至细菌指数期，作为种子液。吸取 1 mL 种子液于含 30 mL 茶汤发酵培养基的锥形瓶内，摇床发酵 6 天（30℃，130 rpm），每 48h 检测一次主要代谢物与酶活力。空白组为不加目标菌株的茶汤发酵培养基。每组 3 个平行。

4.2.5.1 总儿茶素的检测：香荚兰素比色法

儿茶素与香荚兰素在强酸条件下可以生成红色络合物，该络合物在 500 nm 处有最大吸收值。通过酶标仪检测 500 nm 处的吸光度，即可检测样本中总儿茶素的含量。

儿茶素标准曲线的建立与发酵液中总儿茶素含量的检测参考赵先明等人^[107]的做法，具体为：吸取 10 μL 待测液，与 2.5 mL 质量分数为 1% 的香荚兰素-乙醇溶液、2.5 mL 体积分数为 30% 的硫酸-乙醇溶液在 20℃ 反应 5 分钟，测 OD₅₀₀，每组 3 个平行。按下述公式计算总儿茶素含量：

$$X = \frac{A \times M}{1000} \times \frac{V_a}{V_b \times m}$$

式中：X 为儿茶素含量，mg/g；A 为吸光度；M 为吸光度为 1 时，被测样本的儿茶素含量，μg；V_a 为总溶液量，mL；V_b 为吸取溶液量，mL；m 为样本干重，g。

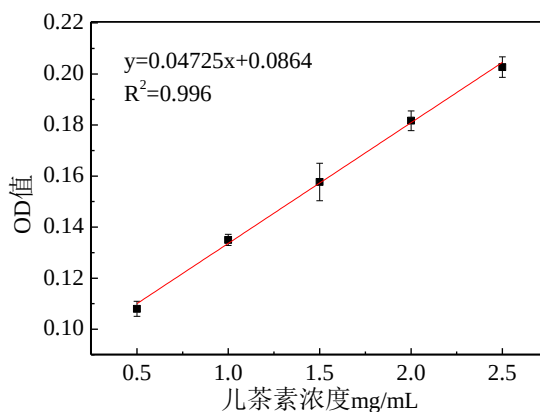


图 4-1 儿茶素的标准曲线

Figure 4-1 The standard curve of catechin

如图 4-1 所示，儿茶素的标准曲线为 $y=0.04725x+0.0864$ ($R^2=0.996$)，吸光度为 1 时，被测液儿茶素含量 $M=19.34 \mu\text{g}$ 。

4.2.5.2 游离氨基酸的检测

参照 2.2.4.5。

4.2.5.3 茶多酚的检测

参照 2.2.4.7。

4.2.5.4 多酚氧化酶的检测

(1) 制备粗酶液^[108]：取适量待测发酵液，4℃条件下 8000 rpm 离心 15 min，取上清，4℃保存至检测。

(2) 检测多酚氧化酶：参照孙会刚等人^[109]的检测方法。取 5 mL 离心管，按 3 mL 磷酸盐缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH 为 6.0)、1 mL 邻苯二酚 (0.1 mol/L)、0.1 mL 粗酶液的顺序加入反应体系。吹吸混匀后反应 10 min，期间每 30 s 测一次 OD_{600} ，空白对照不加粗酶液组。每组 3 个平行。

(3) 多酚氧化酶的计算：

$$\text{多酚氧化酶酶活} = \frac{1}{V} \times \frac{\Delta OD_{600}}{\Delta T} \times 10^3$$

式中：V 为粗酶液体积，mL； ΔOD_{600} 为吸光度变化值； ΔT 为反应时间，min。

对多酚氧化酶的酶活定义：1 mL 粗酶液于 1 min 内让吸光度变化 10^{-3} ，即定义为一个酶活力单位（U/mL）。

4.2.5.5 过氧化物酶的检测

（1）制备粗酶液：参照 4.2.5.4

（2）检测过氧化物酶：参照王雨鑫等人^[110]的检测方法。取 5 mL 离心管，按 1.5 mL 磷酸盐缓冲溶液（pH 为 7.0）、1 mL 愈创木酚（0.3%）、0.5 mL 粗酶液的顺序加入反应体系，吹吸混匀。加 1 mL 过氧化氢（0.3%），35℃水浴 4 min，测 OD₄₇₀，将愈创木酚换成蒸馏水作为空白对照。每组 3 个平行。

（3）过氧化物酶的计算：

$$\text{过氧化物酶酶活} = \frac{1}{V} \times \frac{\Delta OD_{470}}{\Delta T} \times 10$$

对过氧化物酶的酶活定义：35℃时，1 mL 粗酶液于 1 min 内让吸光度增加 10^{-1} ，即定义为一个酶活力单位（U/mL）。

4.3 结果与讨论

4.3.1 芽孢杆菌的分离与纯化

通过含两性霉素 B（2.5 mg/mL）的 LB 培养基对发酵过程茶中所含的细菌进行分离，平板划线纯化后共得到 41 株菌株。对 41 株纯化菌株进行冷冻保藏，以便后续进行形态学鉴定。

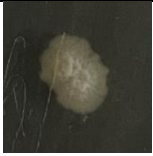
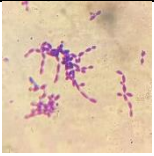
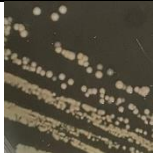
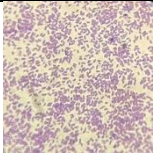
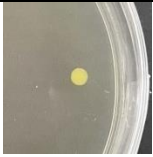
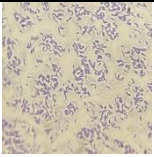
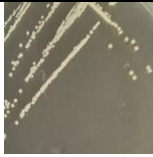
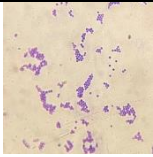
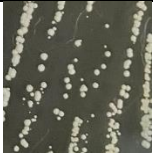
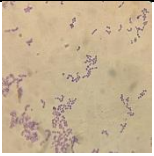
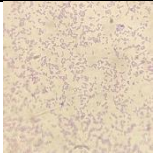
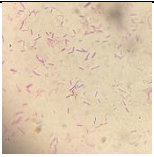
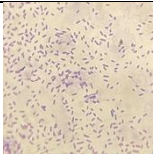
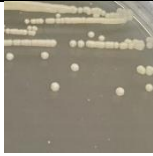
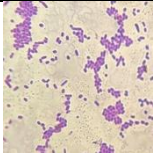
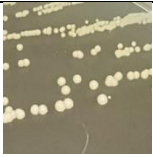
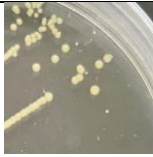
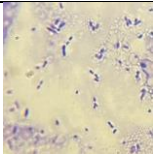
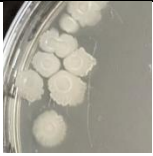
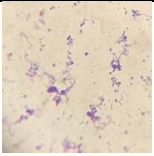
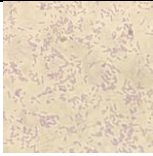
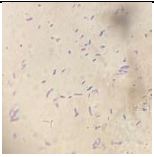
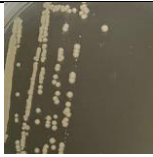
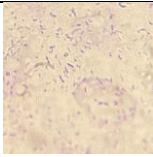
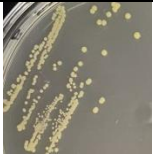
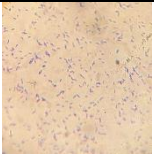
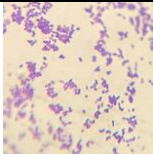
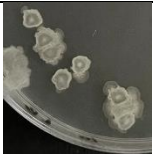
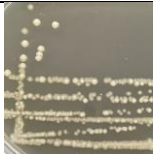
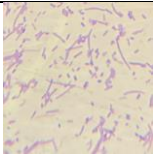
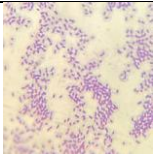
4.3.2 形态学鉴定结果

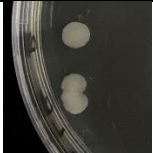
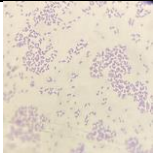
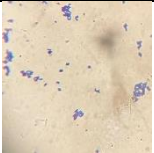
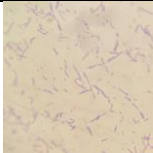
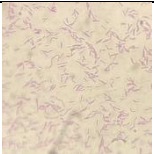
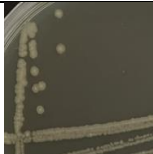
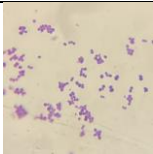
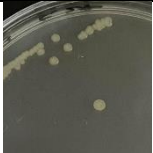
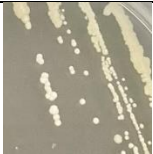
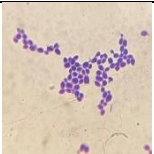
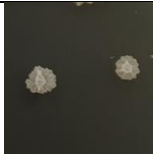
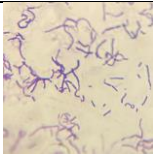
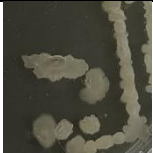
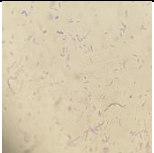
活化保藏的 41 株菌株，通过观察细菌单菌落与其细胞形态排除相似菌株后共得到 35 株菌株。菌株的菌落图片与革兰氏染色的结果如下表 4-5 所示。其中 Puer_04、12、15、18、21、22、23、26、30、31、32 为革兰氏阴性细菌，其余编号为革兰氏阳性细菌。

表 4-5 分离纯化结果

Table 4-5 The results of separation and purification

编号	单菌落图片	显微镜观察	编号	单菌落图片	显微镜观察
----	-------	-------	----	-------	-------

Puer_01			Puer_19		
Puer_02			Puer_20		
Puer_03			Puer_21		
Puer_04			Puer_22		
Puer_05			Puer_23		
Puer_06			Puer_24		
Puer_07			Puer_25		
Puer_08			Puer_26		
Puer_09			Puer_27		
Puer_10			Puer_28		
Puer_11			Puer_29		

Puer_12			Puer_30		
Puer_13			Puer_31		
Puer_14			Puer_32		
Puer_15			Puer_33		
Puer_16			Puer_34		
Puer_17			Puer_35		
Puer_18					

4.3.3 分子学鉴定结果

提取 35 株细菌的 DNA 片段，进行 PCR 扩增。三十五株细菌的 PCR 扩增结果如图 4-2 所示，样本条带位置位于 1500bp 左右，表明为目的条带。



4-2 细菌 PCR 结果

4-2 The results of Bacterial PCR

将公司测定的序列与 NCBI 数据库进行对比，相似度最高的即为目的序列，排除重复的菌种鉴定结果后共得到 17 种细菌。分别为：Puer_01 与海内氏芽孢杆菌（*Bacillus haynesii*，99.66%）的相似度较高；Puer_03 与加利纳鲁葡萄球菌（*Staphylococcus gallinarum*，99.98%）的相似度较高；Puer_04 与地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*，99.93%）的相似度较高；Puer_05、06、11、17 与豚鼠气单胞菌-腹泻（*Aeromonas caviae*，99.86%、99.98%、99.98%、99.98%）的相似度较高；Puer_08 与阿氏芽孢杆菌（*Priestia aryabhattai*，99.80%）的相似度较高；Puer_02、09 与柠檬色短小杆菌（*Curtobacterium citreum*，99.72%、99.51%）的相似度较高；Puer_12 与丝状假单胞杆菌（*Priestia filamentosa*，99.76%）的相似度较高；Puer_14 与罗西亚哈洛托勒兰（*Rothia halotolerans*，99.52%）的相似度较高；Puer_16 与大环内酯赖氨酸杆菌（*Lysinibacillus macroides*，99.45%）的相似度较高；Puer_7、13、15、18 与枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*，99.86%、99.98%、99.79%、99.59%）的相似度较高；Puer_20 与劳埃德葡萄球菌（*Staphylococcus lloydi*，99.79%）的相似度较高；Puer_21、25 与日勾维多细菌（*Pluralibacter gergoviae*，99.58%、99.51%）的相似度较高；Puer_26 与粪肠球菌--兼性厌氧乳酸菌（*Enterococcus faecium*，99.73%）的相似度较高；Puer_28、32 与瓜里科假单胞菌（*Pseudomonas guariconensis*，98.49%、98.49%）的相似度较高；Puer_19、22、23、27、29 与肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*，99.86%、99.59%、99.59%、99.86%、99.31%）的相似度较高；Puer_33、34 与哺乳动物球球菌（*Mammaliicoccus sciuri*，99.93%、99.86%）的相似度较高；

Puer_10、35 与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*, 99.98%、99.93%) 的相似度较高。

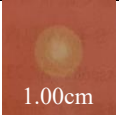
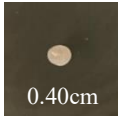
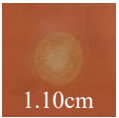
将鉴定出的 4 种 *Bacillus* 重新命名为: Puer_BH (*Bacillus haynesii*)、Puer_BL (*Bacillus licheniformis*)、Puer_BS (*Bacillus subtilis*)、Puer_BA (*Bacillus amyloliquefaciens*) 进一步进行生理生化检测与单菌发酵实验。

4.3.4 生理生化检测结果

通过水解圈, 判定 Puer_BH、Puer_BL、Puer_BS、Puer_BA 对碳氮源的利用能力, 结果如表 4-6 (纤维素)、表 4-7 (蛋白质)、表 4-8 (淀粉)、表 4-9 (果胶) 所示。以透明圈与菌落直径的比值作为代谢能力强弱的标准, 比值大于 1 的代表有代谢能力, 比值为 1 的代表代谢能力很弱。其中代谢纤维素能力由强至弱分别为: Puer_BH (1.67)、Puer_BS (1.34)、Puer_BL (1.25)、Puer_BA (1.00); 代谢蛋白质能力由强至弱分别为: Puer_BS (2.14)、Puer_BA (1.19)、Puer_BH (1.00)、Puer_BL (1.00); 代谢淀粉能力由强至弱分别为: Puer_BS (1.44)、Puer_BH (1.42)、Puer_BL (1.33)、Puer_BA (1.15); 代谢果胶能力由强至弱分别为: Puer_BS (1.64)、Puer_BH (1.42)、Puer_BL (1.33)、Puer_BA (1.14)。综合以上结果可知 Puer_BS 的对碳氮源的水解能力最强, 表明 Puer_BS 有助于可溶性多糖与游离氨基酸的产生, 推测将来可通过向发酵普洱茶添加一定量的 Puer_BS 菌液, 以改善普洱茶中可溶性多糖的含量。

表 4-6 纤维素水解圈结果

Table 4-6 The results of cellulose hydrolysis ring

菌属名称	菌落直径 (D)	透明圈直径 (d)	比值 (d/D)
Puer_BH	 0.60cm	 1.00cm	1.67
Puer_BL	 0.40cm	 0.50cm	1.25
Puer_BS	 0.80cm	 1.10cm	1.34

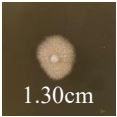
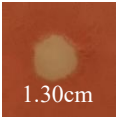
Puer_BA			1.00
---------	---	---	------

表 4-7 蛋白质水解圈结果

Table 4-7 The results of carbohydrate hydrolysis ring

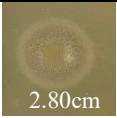
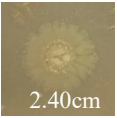
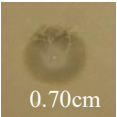
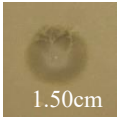
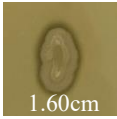
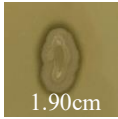
菌属名称	菌落直径 (D)	透明圈直径 (d)	比值 (d/D)
Puer_BH		无水解圈	1
Puer_BL		无水解圈	1
Puer_BS			2.14
Puer_BA			1.19

表 4-8 淀粉水解圈结果

Table 4-8 The results of amylum hydrolysis ring

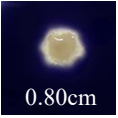
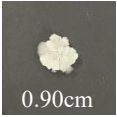
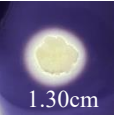
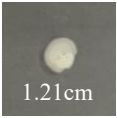
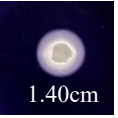
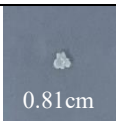
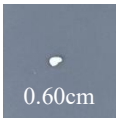
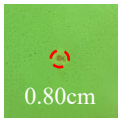
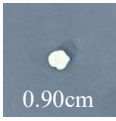
菌属名称	菌落直径 (D)	透明圈直径 (d)	比值 (d/D)
Puer_BH			1.42
Puer_BL			1.33
Puer_BS			1.44
Puer_BA			1.15

表 4-9 果胶水解圈结果

Table 4-9 The results of pectin hydrolysis ring

菌属名称	菌落直径 (D)	透明圈直径 (d)	比值 (d/D)
Puer_BH	 0.81cm	 1.15cm	1.42
Puer_BL	 0.60cm	 0.80cm	1.33
Puer_BS	 0.90cm	 1.48cm	1.64
Puer_BA	 0.70cm	 0.80cm	1.14

4.3.5 发酵液酶活性与代谢特性的检测

芽孢杆菌产茶多酚、儿茶素、游离氨基酸的变化如图4-3所示。随摇瓶发酵的进行,添加芽孢杆菌的发酵液中的茶多酚(图4-3 A)与儿茶素(图4-3 B)均呈降低趋势,游离氨基酸(图4-3 C)呈先升后降趋势,对照组无明显变化。表明4种芽孢杆菌均具备分解利用发酵液中的茶多酚、儿茶素与游离氨基酸的能力。推测,芽孢杆菌对发酵液中蛋白质的分解导致前期发酵液中的游离氨基酸呈上升趋势。此外,本章分离出的Puer_BH对茶多酚($621.55 \rightarrow 300.87 \text{ mg/g}$)、儿茶素($11.49 \rightarrow 6.45 \text{ mg/g}$)的代谢能力较强,Puer_BS对游离氨基酸($5.38 \rightarrow 1.94 \text{ mg/g}$)的代谢能力较强。推测将来利用Puer_BH、Puer_BS与普洱茶共同发酵将有助于改善普洱茶中茶多酚、儿茶素与游离氨基酸的含量。

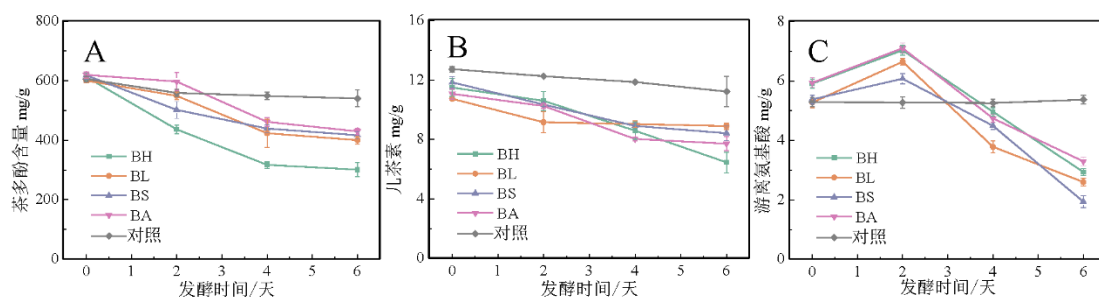


图 4-3 发酵液中茶多酚 (A)、儿茶素 (B)、游离氨基酸 (C) 的变化趋势

Figure 4-3 Trends of tea polyphenols (A), catechins (B) and free amino acids (C) in fermentation broths

芽孢杆菌产多酚氧化酶与过氧化物酶的酶活变化如图4-4所示。随摇瓶发酵的进行，发酵液中多酚氧化酶活性与过氧化物酶活性呈增后降的趋势。其中，本研究中分离出的 Puer_BH (66.67 U/mL)、Puer_BL (58.33 U/mL)、Puer_BS (70.67 U/mL) 与 Puer_BA (66.57 U/mL) 在发酵第4天产生的多酚氧化酶的活性最强；分离出的 Puer_BH (28.13 U/mL)、Puer_BL (25.92 U/mL)、Puer_BS (28.38 U/mL)、Puer_BA (27.05 U/mL) 在发酵第4天产生的过氧化物酶的活性最强。由于多酚氧化酶与过氧化物酶有助于催化茶多酚生成茶褐素，故推测，将来可通过利用 Puer_BS 与普洱茶共同发酵将有助于改善普洱茶的汤色。

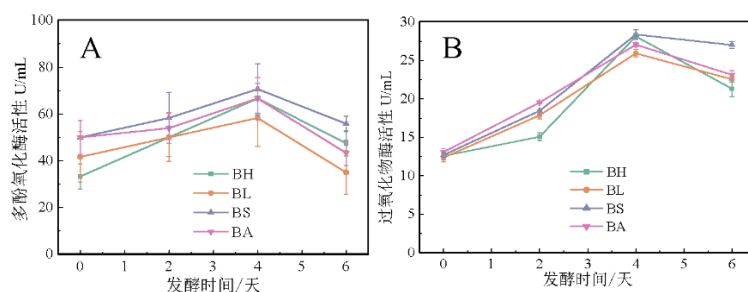


图 4-4 发酵液中多酚氧化酶活性 (A) 与过氧化物酶活性 (B) 的变化趋势

Figure 4-4 Trends of polyphenol oxidase activity (A) and peroxidase activity (B) in fermentation broths

4.4 小结

本章首先通过分离纯化、分子生物学鉴定分离出了普洱茶发酵过程中的 4 种芽孢杆菌，其次，通过水解圈实验与摇瓶发酵检测 4 种芽孢杆菌的代谢特性。本章研究得出以下结果：

(1) 分离纯化普洱茶发酵过程中的茶叶样本，共得到 41 株细菌。通过形态学鉴定后有 35 株细菌，其中，革兰氏阴性细菌有 11 株。进一步通过分子生物学鉴定出 17 种细菌，其中，编号 Puer_01、04、07、10、13、15、18、35 被归为芽孢杆菌属，分别为：*Bacillus haynesii* (Puer_BH)、*Bacillus licheniformis* (Puer_BL)、*Bacillus subtilis* (Puer_BS)、*Bacillus amyloliquefaciens* (Puer_BA)。

(2) 通过水解实验发现，水解纤维素能力最强的为 Puer_BH (1.67)；水解

蛋白质能力最强的为 Puer_BS (2.14); 水解淀粉能力最强的为 Puer_BS (1.44); 水解果胶能力最强的为 Puer_BS (1.64)。四种芽孢杆菌中 Puer_BS 的综合水解能力较强(水解纤维素的能力为 1.34)。

(3) 通过摇瓶发酵实验检测 4 种菌株的酶活力与代谢特性发现, 四种芽孢杆菌对茶多酚、儿茶素、游离氨基酸均有降解能力。其中, 本章分离出的 Puer_BH 对茶多酚、儿茶素的代谢能力较强, Puer_BS 对游离氨基酸的代谢能力较强。此外发现, Puer_BS 产过氧化物酶与多酚氧化酶的酶活力最强。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

(1) 不同成品普洱茶菌群结构与品质差异：

①发酵程度高且品级高的普洱茶其品质综合较好。

②发酵显著提高普洱茶原核菌群丰度和多样性以及可溶性多糖、木质素、总黄酮、蛋白质、茶褐素的含量。

③发酵使优势真核菌属由 *Penicillium*（普洱生茶）、*Mycosphaerella*（普洱红茶）转变为 *Blastobotrys*、*Thermomyces*、*Aspergillus* 和 *Rasamsonia*，优势原核菌属由普洱生茶、红茶中的 *Pseudomonas* 转变为 *Staphylococcus* 和 *Kocuria*。

④茶梗发酵可提高菌群中 *Pseudomonas* 的相对丰度，降低蛋白质的含量。蜂蜜发酵可提高菌群中 *Aspergillus* 的相对丰度与茶褐素的含量。黄片发酵可提高菌群中 *Aspergillus*、*Thermomyces*、*Rhizomucor*、*Pseudomonas* 与 *Bacillus* 的相对丰度与可溶性多糖的含量。

(2) 发酵过程中理化参数、菌群结构与物质成分的变化：

①随发酵时间的进行，小布朗发酵普洱茶中可溶性多糖、总黄酮、茶褐素、蛋白质、木质素的含量呈增高趋势；茶多酚、游离氨基酸、纤维素的含量呈降低趋势。

②前 3 个发酵周期原核菌群的丰度与多样性呈增高趋势，后 2 个发酵周期则呈降低趋势。此外，在发酵末期（BPT_28D、BPT_30D）小布朗普洱茶中的原核菌群的生长趋于稳定。

③非靶向代谢组学分析得出：经发酵普洱茶中的肉桂酸、亚油酸、维生素 E 与(-)-石竹环氧烷等差异代谢物显著上调；可可碱等差异代谢物显著下调。

④通过冗余分析发现，小布朗普洱茶发酵过程中的原核菌群结构主要受渥堆发酵时水活度与温度的影响，此外，其原核菌群与游离氨基酸与茶多酚的代谢显著相关。

(3) 发酵过程中分离纯化结果与芽孢杆菌的主要代谢功能检测:

①通过分离纯化、生物学鉴定与分子生物学鉴定, 得到 17 种细菌。其中, 与芽孢杆菌的相似度最高的细菌有 4 种, 分别为: *Bacillus haynesii*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*。

②通过代谢特性分析发现, *Bacillus haynesii* 对纤维素的代谢能力较强, *Bacillus subtilis* 对蛋白质、淀粉与果胶的代谢能力均较强; *Bacillus subtilis* 产过氧化物酶与多酚氧化酶的酶活力最强。

5.2 展望

本课题首先通过分析不同发酵原料、不同发酵程度普洱成品茶菌群结构与主要非挥发性物质, 得出了发酵程度对于普洱茶菌群结构、非挥发性物质与代谢功能的影响大于发酵原料。随后, 追踪发酵过程普洱茶, 总结其原核菌群、非挥发性物质与理化参数的变化趋势, 构建了数学关系模型, 并分析了功能芽孢杆菌的基本功能。由于研究时间有限, 本课题仍有待完善的部分:

(1) 本课题研究了普洱茶中非挥发性物质, 得到了其基本的变化趋势。但关于普洱茶中的挥发性物质直接体现了普洱茶的气味质量, 将来可通过顶空液相色谱技术研究不同原料普洱茶与发酵过程普洱茶的挥发性物质的差异与变化规律, 以综合评价发酵普洱茶的品质。

(2) 由于不同发酵原料普洱茶中物质成分的差异, 将来可通过向嫩叶发酵原料中添加适量黄片与茶梗, 以助于普洱茶风味的改善。

(3) 本课题仅对发酵过程茶堆中的原核微生物进行富集, 将来可富集小布朗普洱茶发酵间地面与空气中的原核微生物, 以全面分析原核菌群对普洱茶品质的影响。

(4) 本课题发现 *Staphylococcus* 与茶褐素、总黄酮、可溶性多糖等物质呈强正相关, 但由于时间原因未对其进行安全性检测, 此后可对分离出的 *Staphylococcus gallinarum* 与 *Staphylococcus lloydii* 进行表型(血浆凝固酶测定、溶血测定、生物膜形成、抗生素敏感)与基因型(肠毒素基因、脱羧酶基因)研究, 以分析其安全性, 以便开展后续对其代谢特性的研究。

(5) 本课题分离出的 *Bacillus subtilis* 的代谢功能较优秀, 将来可对 *Bacillus*

subtilis 进行代谢组学的检测，进一步全面分析其代谢特性。此外，由于时间原因，本课题对所分离出的功能微生物的代谢特性研究较少，后续可增添功能微生物对可溶性多糖、茶褐素等重要物质的代谢情况。

参考文献

- [1] Pan S Y, Nie Q, Tai H C, et al. Tea and tea drinking: China's outstanding contributions to the mankind[J]. Chinese Medicine, 2022, 17(1): 27.
- [2] 周智修, 薛晨, 阮浩耕. 中华茶文化的精神内核探析——以茶礼、茶俗、茶艺、茶事艺文为例[J]. 茶叶科学, 2021, 41(02): 272-284.
- [3] 谢侗, 燕飞, 曲东, 等. 人工光源对茶树生长及茶叶品质的影响研究进展[J]. 茶叶通讯, 2024, 51(01): 8-15.
- [4] 龙飘飘, 苏胜晓, 张梁. 茶叶颜色成分研究进展[J]. 茶叶科学, 2023, 43(05): 593-606.
- [5] Fu Y Q, Wang J Q, Chen J X, et al. Effect of baking on the flavor stability of green tea beverages[J]. Food Chemistry, 2020, 331(127258).
- [6] Xu Y Q, Zhang Y N, Chen J X, et al. Quantitative analyses of the bitterness and astringency of catechins from green tea[J]. Food Chemistry, 2018, 258(16-24).
- [7] 谢勇, 李江宏, 郑佳颖, 等. 不同工艺对白茶焙火过程美拉德反应的影响[J]. 福建茶叶, 2024, 46(02): 17-22.
- [8] 戴浩民, 张灵枝, 梁轶琳, 等. 乌龙茶茶树品种制白茶的风味特征及特征组分分析[J]. 食品科学, 2024, 45(02): 229-239.
- [9] 葛天睿, 王志远, 张娜, 等. 黄茶品质化学成分及闷黄工艺影响研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(23): 255-263.
- [10] Wei Y, Li T, Xu S, et al. The profile of dynamic changes in yellow tea quality and chemical composition during yellowing process[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2021, 139(110792).
- [11] Chen S, Xie P, Li Y, et al. New Insights into Stress-Induced beta-Ocimene Biosynthesis in Tea (*Camellia sinensis*) Leaves during Oolong Tea Processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(39): 11656-11664.
- [12] Zeng L, Zhou X, Su X, et al. Chinese oolong tea: An aromatic beverage produced under multiple stresses[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 106(242-253).
- [13] 林黎, 江婷, 许鲁杰. 高香型红茶初制加工工艺对茶叶品质的影响[J]. 现代农业科技, 2023, (09): 194-196+220.

- [14] Chen Q, Zhu Y, Liu Y, et al. Black tea aroma formation during the fermentation period[J]. Food Chemistry, 2022, 374(131640).
- [15] Zhu K, Ouyang J, Huang J, et al. Research progress of black tea thearubigins: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(9): 1556-1566.
- [16] Liu J Y, He D, Xing Y F, et al. Effects of bioactive components of Pu-erh tea on gut microbiomes and health: A review[J]. Food Chemistry, 2021, 353(129439).
- [17] 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.
- [18] Zhu J, Chen L, Chen Y, et al. Effect of geographical origins and pile-fermentation on the multi-element profiles of ripen Pu-erh tea revealed by comprehensive elemental fingerprinting. [J] Food Control. 2023. 154 (109978)
- [19] 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, 158, 113128.
- [20] Xu J, Wei Y, Li F, et al. Regulation of fungal community and the quality formation and safety control of Pu-erh tea[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(6): 4546-4572.
- [21] Yan X, Tian Y, Zhao F, et al. Analysis of the key aroma components of Pu'er tea by synergistic fermentation with three beneficial microorganisms[J]. Food Chemistry-X, 2024, 21(101048).
- [22] Li T, Wei Y, Feng W, et al. Exploring the mysterious effect of piling fermentation on Pu-erh tea quality formation: Microbial action and moist-heat action[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 185 (115132).
- [23] 吴恩凯, 王秋萍, 龚加顺, 等. 发酵方法对普洱茶茶褐素样品组成的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(04): 215-221.
- [24] Huang F, Wang S, Zhao A, et al. Pu-erh Tea Regulates Fatty Acid Metabolism in Mice Under High-Fat Diet[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10(63).
- [25] Liu C, Guo Y, Sun L, et al. Six types of tea reduce high-fat-diet-induced fat accumulation in mice by increasing lipid metabolism and suppressing inflammation[J]. Food & Function, 2019, 10(4): 2061-2074.

- [26] Jiang C, Zeng Z, Huang Y, et al. Chemical compositions of Pu'er tea fermented by Eurotium Cristatum and their lipid-lowering activity[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2018, 98(204-211).
- [27] Yang C Y, Yen Y Y, Hung K C, et al. Inhibitory effects of Pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: a systemic review[J]. Nutrition & Diabetes, 2019, 9(1): 23.
- [28] Peng C-X, Wang Q-P, Liu H-R, et al. Effects of Zijuan Pu-erh tea theabrownin on metabolites in hyperlipidemic rat feces by Py-GC/MS[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2013, 104(226-233).
- [29] Lv H P, Zhang Y, Shi J, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Chinese dark teas obtained by different processing technologies[J]. Food Research International, 2017, 100(3): 486-493.
- [30] 王伟伟, 张建勇, 陈琳, 等. 茶梗的综合利用研究进展[J]. 茶叶通讯, 2020, 47(01): 20-24.
- [31] 苏娟. 六堡茶农的制茶技艺与伦理实践[D], 2021.
- [32] 杨刘艳, 江和源, 张建勇, 等. 粒度对茶叶有效成分中温浸出特性的影响[J]. 食品科技, 2015, 40(08): 58-62.
- [33] Jeong B G, Gwak Y J, Kim J, et al. Antioxidative Properties of Machine-Drip Tea Prepared with Citrus Fruit Peels Are Affected by the Type of Fruit and Drying Method[J]. Foods, 2022, 11(14): 2094.
- [34] Deng X, He S, Han Y, et al. Metabolites profiling reveals the dynamic changes of non-volatiles in Pu-erh during Ganpu tea processing[J]. Food Chemistry: X, 2023, 19(100774).
- [35] Fan X, Chen N, Cai F, et al. Effects of manufacturing on the volatile composition of raw Pu-erh tea with a focus on de-enzyming and autoclaving-compressing treatments[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2021, 137(110461).
- [36] 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, 109147.
- [37] Wang H, Shen S, Wang J, et al. Novel insight into the effect of fermentation time on quality of Yunnan Congou black tea[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2022, 155(112939).
- [38] Dong H, Li Y, Lai X, et al. Effects of fermentation duration on the flavour quality of large leaf black tea based on metabolomics[J]. Food Chemistry, 2024, 444(138680).

- [39] 李正南. 普洱茶渥堆过程中主要微生物与品质形成变化研究[D], 湖南农业大学, 2022.
- [40] Asil M H, Rabiei B, Ansari R H J A J O C S. Optimal fermentation time and temperature to improve biochemical composition and sensory characteristics of black tea[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, 6(3):550-558.
- [41] Samanta T, Cheeni V, Das S, et al. Assessing biochemical changes during standardization of fermentation time and temperature for manufacturing quality black tea[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(4): 2387-2393.
- [42] Qu F, Zeng W, Tong X, et al. The new insight into the influence of fermentation temperature on quality and bioactivities of black tea[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2020, 117(108646).
- [43] 范惠贞. 茶叶香气保持与提升的创新策略研究[J]. *食品安全导刊*, 2023, (34): 148-150.
- [44] 张浩. 茶叶发酵过程中的多酚变化及其对黄曲霉产毒的抑制效应 [D], 2014.
- [45] MarÍA S. Tapia, Stella M. Alzamora, Jorge Chirife, et al. Effects of Water Activity (a_w) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation[J]. *Water Activity in Foods*, 2020, 17(323-355).
- [46] 张昊琳, 陈青君, 张国庆, 等. 不同基质培养料理化性状及其对双孢蘑菇农艺性状与产量的影响[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(23): 4622-4631.
- [47] 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).
- [48] Mao H, Wang K, Wang Z, et al. Metabolic function, trophic mode, organics degradation ability and influence factor of bacterial and fungal communities in chicken manure composting[J]. *Bioresour Technol*, 2020, 302(122883).
- [49] Zhang W, Yang R, Fang W, et al. Characterization of thermophilic fungal community associated with pile fermentation of Pu-erh tea[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 227(29-33).
- [50] 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, 76(7): 405-415.

- [51] Wang T, Li R Y, Liu K Y, et al. Changes in sensory characteristics, chemical composition and microbial succession during fermentation of ancient plants Pu-erh tea[J]. Food Chemistry-X, 2023, 20(101003).
- [52] Zhao M, Xiao W, Ma Y, et al. Structure and dynamics of the bacterial communities in fermentation of the traditional Chinese post-fermented Pu-erh tea revealed by 16S rRNA gene clone library[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(10): 1877-1884.
- [53] 王杰, 杨娟, 钟应富, 等. 烘焙对红陈茶感官品质及主要生化成分的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(09): 240-244.
- [54] Ma L, Peng Y, Du L, et al. Effect of main taste compounds on the release of methoxyphenolic compounds in Pu-erh tea[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2022, 160(113293).
- [55] 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).
- [56] 孟圆, 夏婷, 程艳, 等. 碱法提取普洱茶渣膳食纤维的工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(18): 158-164.
- [57] Cuvas-Limon R B, Ferreira-Santos P, Cruz M, et al. Novel Bio-Functional Aloe vera Beverages Fermented by Probiotic *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus lactis*[J]. Molecules, 2022, 27(8): 2473.
- [58] Zhu D, Qaria M A, Zhu B, et al. Extremophiles and extremozymes in lignin bioprocessing[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2022, 157 (112069).
- [59] Raza S, Wdowiak M, Grotek M, et al. Enhancing the antimicrobial activity of silver nanoparticles against ESKAPE bacteria and emerging fungal pathogens by using tea extracts[J]. Nanoscale Advances, 2023, 5(21): 5786-5798.
- [60] 蒋迪尧, 吴肖肖, 梅秀明. 银杏叶中黄酮提取技术研究进展[J]. 食品安全导刊, 2023(35): 163-165.
- [61] He H-F, Wei K, Yin J, et al. Insight into Tea Flavonoids: Composition and Chemistry[J]. Food Reviews International, 2020, 37(8): 812-823.
- [62] Qin J H, Li N, Tu P F, et al. Change in tea polyphenol and purine alkaloid composition during solid-state fungal fermentation of postfermented tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(5): 1213-1217.

- [63] Yang C, Hu Z, Lu M, et al. Application of metabolomics profiling in the analysis of metabolites and taste quality in different subtypes of white tea[J]. Food Research International, 2018, 106(909-919).
- [64] Vuppalanchi R, Bonkovsky H L, Ahmad J, et al. Garcinia cambogia, Either Alone or in Combination With Green Tea, Causes Moderate to Severe Liver Injury[J]. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2022, 20(6): e1416-e1425.
- [65] 王菲, 燕树勋, 王萍. 茶多酚抗肥胖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, (4): 1-11.
- [66] Zhu M Z, Li N, Zhou F, et al. Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea[J]. Food Chemistry, 2020, 312(126043).
- [67] Chen Y, Chen J, Chen R, et al. Comparison of the Fungal Community, Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Taste Characteristics of Fu Brick Tea in Different Regions of China[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9(900138).
- [68] Huang F, Zheng X, Ma X, et al. Theabrownin from Pu-erh tea attenuates hypercholesterolemia via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4971.
- [69] Xu J, Yan B, Zhang L, et al. Theabrownin Induces Apoptosis and Tumor Inhibition of Hepatocellular Carcinoma Huh7 Cells Through ASK1-JNK-c-Jun Pathway[J]. Oncotargets and Therapy, 2020, 13(8977-8987).
- [70] Chen S, Fu Y, Bian X, et al. Investigation and dynamic profiling of oligopeptides, free amino acids and derivatives during Pu-erh tea fermentation by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2022, 371 (131176).
- [71] Li T, Lu C, Wei Y, et al. Chemical imaging for determining the distributions of quality components during the piling fermentation of Pu-erh tea[J]. Food Control, 2024, 158(110234).
- [72] He S, Deng X, Han Y, et al. Metabolites and metagenomic analysis reveals the quality of Pu-erh "tea head"[J]. Food Chemistry, 2023, 429(136992).
- [73] Yu Z, Yang Z. Understanding different regulatory mechanisms of proteinaceous and non-proteinaceous amino acid formation in tea (*Camellia sinensis*) provides new insights into the safe and effective alteration of tea flavor and function[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(5): 844-858.

- [74] Chen Y, Zeng L, Liao Y, et al. Enzymatic Reaction-Related Protein Degradation and Proteinaceous Amino Acid Metabolism during the Black Tea (*Camellia sinensis*) Manufacturing Process[J]. Foods, 2020, 9(1): 66.
- [75] Kai-Yang Syu, Chih-Li Lin, Hsiu-Chen Huang, et al. Determination of Theanine, GABA, and Other Amino Acids in Green, Oolong, Black, and Pu-erh Teas with Dabsylation and High-Performance Liquid Chromatography[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(7637–7643).
- [76] Cao Q Q, Wang F, Wang J Q, et al. Effects of brewing water on the sensory attributes and physicochemical properties of tea infusions[J]. Food Chemistry, 2021, 364(130235).
- [77] 晁雨蕊, 高锦红, 朱文博, 等. 废弃茶中活性成分的研究利用进展[J]. 山东化工, 2023, 52(14): 116-118.
- [78] Yılmaz C, ÖZDEMİR F, Gökmen V. Investigation of free amino acids, bioactive and neuroactive compounds in different types of tea and effect of black tea processing[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 117,108655.
- [79] Lin F-J, Wei X-L, Liu H-Y, et al. State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109(01):126-138.
- [80] Hu S, He C, Li Y, et al. The formation of aroma quality of dark tea during pile-fermentation based on multi-omics[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 147, 111491.
- [81] Zhao M, Su X Q, Nian B, et al. Integrated Meta-omics Approaches To Understand the Microbiome of Spontaneous Fermentation of Traditional Chinese Pu-erh Tea[J]. Msystems, 2019, 4(6): e00680-19.
- [82] Wu J, Wu X, Yuan G, et al. Comparative analysis of aroma substances of vanilla co-fermented black tea[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 651(4): 042047.
- [83] Ni H, Hao S, Zheng F, et al. Effects of two enzyme extracts of *Aspergillus niger* on green tea aromas[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(3): 611-622.
- [84] Gao Y, Xu Y, Yin J. Black tea benefits short-chain fatty acid producers but inhibits genus *Lactobacillus* in the gut of healthy Sprague-Dawley rats[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100 (15): 5466-5475.
- [85] Chen Y, Li P, He W, et al. Analysis of microbial community and the characterization of

- Aspergillus flavus* in Liuyang Douchi during fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154 (112567).
- [86] Ma C, Zhou B, Wang J, et al. Investigation and dynamic changes of phenolic compounds during a new-type fermentation for ripened Pu-erh tea processing[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 180 (114683).
- [87] Li J, Wu S, Yu Q, et al. Chemical profile of a novel ripened Pu-erh tea and its metabolic conversion during pile fermentation[J]. Food Chemistry, 2022, 378 (132126).
- [88] Zhao F, Qian J, Liu H, et al. Quantification, identification and comparison of oligopeptides on five tea categories with different fermentation degree by Kjeldahl method and ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-orbitrap ultra-high resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2022, 378 (132130).
- [89] Wang Q, Peng C, Gong J. Effects of enzymatic action on the formation of theabrownin during solid state fermentation of Pu-erh tea[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(13): 2412-2418.
- [90] 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(02): 108-118.
- [91] Geisen S, Hu S, Dela Cruz T E E, et al. Protists as catalyzers of microbial litter breakdown and carbon cycling at different temperature regimes[J]. Isme Journal, 2021, 15(2): 618-621.
- [92] Wang W, Lu W, Papadakis V G, et al. Microbial protein production under mixotrophic mode: ammonium assimilation pathway and C/N ratio optimization[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024, 12(1): 111727.
- [93] Cao C, Li R, Wan Z, et al. The effects of temperature, pH, and salinity on the growth and dimorphism of *Penicillium marneffe*[J]. Medical Mycology, 2007, 45(5): 401-407.
- [94] 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).
- [95] Tu T, Wang Y, Huang H, et al. Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution[J]. Food Chemistry, 2019, 281(12):163-170.
- [96] Thorwall S, Schwartz C, Chartron J W, et al. Stress-tolerant non-conventional microbes enable

- next-generation chemical biosynthesis[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(2): 113-121.
- [97] Wang T, Weiss A, Aqeel A, et al. Horizontal gene transfer enables programmable gene stability in synthetic microbiota[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(11): 1245-1252.
- [98] Tian D, Huang G, Ren L, et al. Effects of *Monascus purpureus* on ripe Pu-erh tea in different fermentation methods and identification of characteristic volatile compounds[J]. *Food Chemistry*, 2024, 440(138249).
- [99] 单治国, 满红平, 颜学行, 等. 3 种有益菌对联苯菊酯残留晒青毛茶固态发酵过程中多酚类物质含量影响的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(03): 263-272.
- [100] 艾安涛, 何文毅, 潘清华, 等. 腊梅花茶加工工艺研究[J]. *广东茶业*, 2020, (04): 12-17.
- [101] Rai R, Singh R K, Suthar S. Production of compost with biopesticide property from toxic weed *Lantana*: Quantification of alkaloids in compost and bacterial pathogen suppression[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401(123332).
- [102] Zhang W, Si G, Du H, et al. Directional design of a starter to assemble the initial microbial fermentation community of baijiu[J]. *Food Research International*, 2020, 134(109255).
- [103] Xu J, Zhao Y, Jiang Y-M, et al. Dynamic changes of microbial community structure and flavor compounds formation during Qingzhi compound-flavor Baijiu fermentation[J]. *Food Science and Technology*, 2023, 43(e104722).
- [104] Chen H, Yu F, Kang J, et al. Quality Chemistry, Physiological Functions, and Health Benefits of Organic Acids from Tea (*Camellia sinensis*)[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2339.
- [105] 何水平, 郭春芳, 孙云. 茶叶有机酸的研究进展[J]. *亚热带农业研究*, 2015, 11(01): 63-67.
- [106] 马超龙, 李小嫒, 岳翠男, 等. 茶叶中脂肪酸及其对香气的影响研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(04): 220-224.
- [107] 赵先明. 茶叶儿茶素总量的硫酸-香荚兰素检测方法研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(18): 9766-9770.
- [108] 潘雪莉, 罗燕, 胡贤春, 等. 后发酵茶中短短芽孢杆菌产酶能力及其在茶叶渥堆过程酶活性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(17): 78-86.
- [109] 孙会刚, 俞晓丹, 陈志轩, 等. 一株产高活性多酚氧化酶菌株筛选鉴定及其酶学性质[J]. *中国酿造*, 2021, 40(12): 103-108.
- [110] 王雨鑫, 杨慧, 刘建军, 等. 三个黔育茶树品种的主要酶活性及化学成分比较分析[J]. *茶*

叶通讯, 2020, 47(04): 576-581.

攻读硕士期间发表论文

- [1] 韩肋撒, 张会敏, 张文芳, 邢新会, 吕斌, 罗浩, 王怡, 欧书剑, 闫春波, 薛正莲*. 发酵程度与原料对普洱茶菌群结构与品质影响[J].食品与发酵工业
- [2] 张文芳, 张会敏, 韩肋撒, 吕斌, 邢新会, 闫春波, 王怡, 罗浩, 欧书剑, 薛正莲*. 镂空发酵普洱茶菌群结构与风味的分析[J]. 现代食品科技.

致谢

研一、研二时的毕业季，看着师兄、师姐们慢慢完成自己的实验与论文，开始四处投递简历，看着他迈出了走向象牙塔外的第一步。那时还觉得毕业离我很远，未知的外界与我无关。但年后群里一条条艾特全体的消息在一次次的提醒我即将毕业。

三年的研究生生活比我以往的经历都要精彩许多，我也算是莽莽撞撞的过完了充实的 3 年。在跌跌撞撞的 3 年里，我学会了很多专业知识、实验技巧与遇事解决的道理。首先我要郑重的感谢我的导师——薛正莲教授，从论文的选题到完稿，一直离不开您的帮助，感谢您对我课题的悉心指导与帮助。您是一位注重严谨的老师，在课题进行过程中，您总是能敏锐的发现我在实验与分析中出现的漏洞，并对我进行耐心的指导。感谢您对我的淳淳教诲！其次，我要感谢张会敏老师。是您不断耐心的打磨我的写作能力与分析能力，让我学会了许多分析思路与表达方式。也是因为您孜孜不倦的教诲，我才能学会注意到科研中关键的细节，学会严谨对待科研。感谢您陪我字斟句酌的修改论文，倾尽所能的帮助和指导我。

然后在此，我要感谢研一期间带我做实验的凌思雨学姐，谢谢你倾囊相授，耐心温柔的把实验中每一步需要注意的细节和实验小技巧耐心的讲给我听，让我少踩了许多细节坑，与你相处是一件让人很轻松，很快乐的事情；感谢洪家伟学长，在我分析数据与实验期间遇到困难时，你总是会给予我很大的帮助，助我度过难关；感谢黄瑞学长、周健师姐、王芳师姐、周杰学长、王炳生学长，感谢你们在校期间对我的帮助与指导；感谢同门：张文芳与程一晗，读研是一条漫长且不平坦的路，感谢你们与我一起一步步迈过坎坷，走向终点；感谢我的小伙伴们：黎玮、郑鹏、郜远，与你们相处的日子是读研期间最好的回忆，感谢你们在学习与生活上的照顾，得此良友，人生之幸。感谢遇到你们每一位，愿我们不负韶华，前程似锦！

最后，我要感谢我的父母与弟弟，感谢你们对我的支持与付出。