

普洱茶固态发酵中 转化咖啡碱为茶碱菌株的鉴定与应用

马存强^{1,2,3}, 王洪振², 周斌星^{2,*}, 王子浩^{1,*}, 李肖宏², 伍 扬²

(1. 信阳农林学院河南省豫南茶树资源综合开发重点实验室, 河南信阳 464000;

2. 云南农业大学龙润普洱茶学院, 云南昆明 650201;

3. 昆明大朴茶业有限公司, 云南昆明 650224)

摘要:目的:在普洱茶渥堆发酵中分离并鉴定能够转化咖啡碱为茶碱的有效菌株,研究其在液态发酵与固态发酵中转化咖啡碱为茶碱的能力,为高茶碱茶叶的开发提供菌种。方法:采用咖啡碱琼脂固态筛选培养基,从普洱茶渥堆发酵中筛选出2株潜在菌株,通过18SrDNA序列测定结合菌落特征、分生孢子结构对菌株进行鉴定。采用不同浓度的咖啡碱液态培养基、茶汤液态发酵和茶叶固态发酵探究潜在菌株咖啡碱转化为茶碱的能力。结果:潜在菌株分别鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger* NCBT110A)和聚多曲霉(*Aspergillus sydowii* NRRL250)。经富含咖啡碱的液态培养发现,黑曲霉对咖啡碱的利用有限;聚多曲霉能促使咖啡转化为茶碱。在一定咖啡碱浓度下,聚多曲霉对咖啡碱的降解率在90%以上,促使一半以上的咖啡碱转化为茶碱。聚多曲霉接种的茶汤液态发酵、茶叶固态发酵表明,聚多曲霉发酵过程中咖啡碱显著性下降($p < 0.05$),茶碱急剧增加;在发酵结束时,咖啡碱的降解率分别为85.43%和87.37%,茶碱含量分别为 (501.2 ± 13.55) mg/L和 $3.3293\% \pm 0.2463\%$ (w/w)。在咖啡碱存在情况下,聚多曲霉能将咖啡碱大幅度转化为茶碱。结论:本研究揭示了聚多曲霉(*Aspergillus sydowii* NRRL250)具备将咖啡碱转化茶碱的特性,为高茶碱茶叶或茶饮料的开发提供了优异菌种。

关键词:聚多曲霉,茶碱,普洱茶,发酵,咖啡碱,菌株鉴定

Identification and Application of Fungal Converting Caffeine to Theophylline from Pu-erh Tea Solid-state Fermentation

MA Cun-qiang^{1,2,3}, WANG Hong-zhen², ZHOU Bin-xing^{2,*}, WANG Zi-hao^{1,*}, LI Xiao-hong², WU Yang²

(1. Henan Key Laboratory of Tea Plant Comprehensive Utilization in South Henan,

Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, China;

2. LongRun Pu-erh Tea College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. Kunming Dapu Tea Industry Co., Ltd., Kunming 650224, China)

Abstract: Objective: The aim of this study was to identify fungus species capable of converting caffeine to theophylline, and to provide strain to develop high-theophylline tea. Methods: With caffeine-agar solid selective medium, 2 potential strains were screened out, and colony characteristics and conidial structure were identified by sequence determination of 18SrDNA. Based on liquid mediums with different concentrations of caffeine, tea soup submerged fermentation and tea-leaves solid-state fermentation, the ability of conversion from caffeine to theophylline of potential strains were studied. Results: Potential strains were identified as *Aspergillus niger* NCBT110A and *Aspergillus sydowii* NRRL250. The secondary screening in liquid-state cultivation with caffeine showed that caffeine utilization of *A. niger* NCBT110A was restrained, *A. sydowii* NRRL250 could convert caffeine to theophylline. In a certain caffeine concentration, caffeine degradation rate of *A. sydowii* NRRL250 was beyond 90% and more than half of caffeine was converted to theophylline. Tea soup submerged and sun-dried tea solid-state fermentation of *A. sydowii* NRRL250 showed that caffeine decreased significantly and theophylline increased sharply during *A. sydowii* NRRL250 fermentation ($p < 0.05$). The caffeine degradation rates were 85.43% and 87.37%, theophylline reached (501.2 ± 13.55) mg/L and $3.3293\% \pm 0.2463\%$ (w/w), respectively. In the presence of caffeine, *A. sydowii* NRRL250 could

收稿日期: 2017-11-02

作者简介: 马存强(1988-), 男, 硕士, 研究方向: 茶叶加工与综合利用, E-mail: macunqiang1208@aliyun.com。

* 通讯作者: 周斌星(1963-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 茶叶加工, E-mail: bxzhou01@126.com。

王子浩(1988-), 男, 硕士, 研究方向: 茶资源开发及综合利用, E-mail: 80638796@qq.com。

基金项目: 紫鹃茶树调控花色苷生物合成的MBW转录因子复合体研究(C161104); 云南农业云南省现代农业茶叶产业体系(2017KJTX007); 河南省豫南茶树资源综合开发重点实验室开放基金资助项目(HNKLT0F2017006)。

convert caffeine to theophylline sharply. Conclusion: *A. sydowii* NRRL250 could convert caffeine to theophylline, which provided excellent strain to develop high-theophylline pu-erh tea or tea drinks.

Key words: *Aspergillus sydowii*; theophylline; pu-erh tea; fermentation; caffeine; identification of strains

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)15-0119-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.15.022

引文格式: 马存强, 王洪振, 周斌星, 等. 普洱茶固态发酵中转化咖啡碱为茶碱菌株的鉴定与应用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 119-124.

嘌呤碱是茶叶中主要的生物碱, 主要包括咖啡碱(1,3,7-三甲基黄嘌呤)、可可碱(3,7-二甲基黄嘌呤)、茶碱(1,3-二甲基黄嘌呤)等。在一般茶叶和茶树品种中, 咖啡碱含量较高, 为2%~5%; 可可碱含量次之, 为0.2%~0.4%; 茶碱含量最少, 仅为0.008%~0.2%^[1]。三种嘌呤碱具有不同的保健功效和生理活性。咖啡碱和可可碱主要具有兴奋中枢神经、降低胆固醇、强心、利尿等功效^[2-4]。茶碱可松弛支气管平滑肌, 具有良好的平喘作用^[5]; 对肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放组胺有抑制作用, 具有良好的抗炎症效果^[6]; 在急性和慢性哮喘治疗中有广泛应用^[6-8]。由于茶叶中茶碱含量极低, 以及咖啡碱等其他嘌呤碱的存在造成茶碱提纯困难, 茶碱的获得主要来源于化工合成和对咖啡碱合成料液的选择性吸附与富集, 存在着一定的安全隐患和潜在的健康威胁^[9-10]。

黑茶是在中国特有的微生物主导下的后发酵茶类^[11]。普洱茶(熟茶)作为黑茶的一种, 是以云南大叶种晒青毛茶为原料, 经微生物、酶、湿热、氧化等综合作用形成具有独有品质特征的茶叶类型^[12]。渥堆发酵(后发酵, 固态发酵)是普洱茶品质形成的关键工序。在渥堆发酵过程中, 咖啡碱呈现增加或减少的变化趋势^[13-16]。在以茶叶为基质的微生物单菌落发酵中, 酵母菌(*Saccharomycetes* sp.)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)能小幅度降低咖啡碱含量^[17-18]。在茶树生理^[19]与微生物次生代谢^[20]中, 茶碱是咖啡碱主要降解产物和限速步骤。因此, 在普洱茶渥堆发酵过程中筛选产茶碱功能的目的菌株具有一定的可操作性和实用价值。

本文以咖啡碱为底物, 分别以固态培养和液态培养等方式对普洱茶渥堆中产茶碱的菌株进行有效筛选, 通过18SrDNA序列测定对目的菌株进行分子生物学鉴定, 并分别以茶叶、茶汤为基质进行单菌落发酵, 探究目的菌株转化咖啡碱为茶碱的能力, 以期为高茶碱茶叶的开发提供菌种。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

云南大叶种晒青毛茶 主要用于发酵, 昆明大朴茶业有限公司; 菌株共11株 分离自普洱茶渥堆茶样中的优势真菌, 在实验室-20℃下纯甘油保存; 咖啡碱、茶碱等色谱纯标准品 纯度≥99%, 美国sigma公司; DNA Marker、PCR扩增引物、IST1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、IST4(5'-TCCTCCGCTTATTGATAGC-3') 日本TaKaRa公司; 咖啡碱 纯度≥98%, 分析纯, 培养基用, 上海梯希爱化成工业发展有限公司。

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 美国安捷伦公司; BH-2 OLYMPUS 光学显微镜 日本奥林巴斯公司; PCR 扩增仪 美国Bio-Rad公司; ABI Prism 3730 型DNA自动测序仪 美国ABI公司。

咖啡碱固态筛选培养基: 琼脂20g、氯霉素0.1g、蒸馏水1000mL, 分别添加600、1200、1800mg咖啡碱, 121℃灭菌15min制成不同咖啡碱浓度的固态筛选培养基。

咖啡碱液态培养基: 水溶性淀粉4g、葡萄糖20g、氯霉素0.1g、蒸馏水1000mL, 分别添加600、1200、1800mg咖啡碱, 121℃灭菌15min制成不同咖啡碱浓度的液态培养基, 用于产茶碱菌株的筛选。

PDA培养基: 水溶性淀粉4g、葡萄糖20g、琼脂20g、氯霉素0.1g、蒸馏水1000mL。

察氏固态培养基: 硝酸钠3g、磷酸氢二钾1g、七水合硫酸镁0.5g、氯化钾0.5g、硫酸亚铁0.01g、蔗糖30g、琼脂20g、蒸馏水1000mL。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子菌悬液的制备 真菌菌株活化后, 用无菌水进行洗脱, 转移至锥形瓶, 充分振荡摇匀, 并调节孢子浓度约为 1.0×10^8 cfu/mL, 于4℃保存备用。

1.2.2 目标菌株在固态培养基上的定性筛选 采用20μL接种环分别挑取不同菌株的孢子菌悬液均匀涂抹在琼脂葡萄糖固态培养基(自制: 葡萄糖20g、琼脂20g、蒸馏水1000mL, 并调整pH为7)和不同咖啡碱浓度的无糖固态筛选培养基(分别调整pH为7)^[21]。30℃倒置培养5d后, 观察菌株菌落生长状况, 并测定菌落大小。

1.2.3 目标菌株的鉴定 DNA提取: 目标菌株分别接种至PDA培养基以及察氏固态培养基, 27℃培养观察菌落生长状况, 并在高倍显微镜观察菌株形态特征。并将目标菌株接种至察氏(CYA)液态培养基中培养、收集菌丝体、-80℃冷冻干燥后采取真菌DNA提取试剂盒法提取DNA。

PCR扩增: ITS序列通过引物ITS1和IST4进行扩增。PCR反应程序为: 95℃预变性5min; 94℃变性1min; 54℃退火1min; 72℃延伸1.5min; 共35个循环; 72℃延伸10min。

rDNA序列分析: 委托云南省微生物研究所对PCR产物通过DNA自动测序仪进行测序, 并将所获序列提交到NCBI的Genbank数据库进行同源序列搜索, 并调出相关菌株ITS1-5.8S-ITS2 rRNA基因序列, 用ClustalX1.8软件进行多序列比对, 通过MEGA4软件选用Kimura2-parameter距离模型计算进化距离, 用Nerghbor-Joining法构建系统发育树,

表1 茶叶分离菌株在含有葡萄糖的琼脂固态培养基(对照)和仅有咖啡碱琼脂培养基中生长情况($\bar{x} \pm SD$)
Table 1 Growth of tea-derived fungi in agar medium with glucose(control culture) or presence of caffeine only($\bar{x} \pm SD$)

真菌菌株编号	菌落大小(cm)			
	对照	600 mg/L 咖啡碱	1200 mg/L 咖啡碱	1800 mg/L 咖啡碱
PE-1	3.5 ± 0.5	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.5	2.0 ± 0.5
PE-2	2.5 ± 1.0	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.5
PE-3	3.0 ± 0.5	0.5 ± × 0.3	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5
PE-4	3.0 ± 0.5	-	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3
PE-5	3.0 ± 1.0	2.0 ± 0.5	2.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0
PE-6	2.5 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
PE-7	3.0 ± 0.5	-	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1

注:“-”表示未生长。

1000 次随机抽样计算 Bootstrap 值以评估系统发育的置信度。

1.2.4 目标菌株的液态培养 分别将目标菌株孢子菌悬液(含有相应咖啡碱浓度)按 5% (v/v) 接种于 600、1200 和 1800 mg/L 不同底物浓度的咖啡碱液态培养基中(分别调整 pH 为 7), 30 ℃, 180 r/min 振荡培养, 在培养 5、10 和 15 d 时分别取样, 三次重复。液态培养基过滤后, 在 35 ℃ 下烘干 24 h 即为真菌细胞干重。采取高效液相色谱法(HPLC)测定不同阶段液态培养基中咖啡碱、茶碱含量。

1.2.5 目标菌株的茶汤与茶叶单菌种发酵 按照 1:30 (w/v) 的料液比将云南大叶种晒青毛茶在沸水中浸提 15 min, 过滤定容即为茶汤, 茶汤中可溶物含量为 10~15 g/L, 用于茶汤的液态发酵。121 ℃ 灭菌 15 min 后, 将目标菌株孢子菌悬液(相应茶汤为稀释液)按 5% (v/v) 接种于灭菌茶汤中, 30 ℃, 180 r/min 振荡培养, 在培养 3、6、9、12、15 d 时分别取样, 三次重复, 采取 HPLC 测定不同发酵阶段咖啡碱、茶碱含量。

称取 20 g 晒青毛茶与 12.25 mL 蒸馏水混合, 1 × 10⁵ Pa 灭菌后, 每培养瓶接种 1 mL 目标菌株的种子菌悬液, 并以接种 1 mL 无菌水的发酵组作为对照。培养瓶均放置于恒温恒湿培养箱内(30 ℃, 85%) 进行茶叶发酵。参照普洱茶渥堆发酵方法, 每 5 d 取样一次, 三次平行重复, 采取 HPLC 测定茶样中咖啡碱、茶碱含量。

1.2.6 咖啡碱、茶碱含量测定 上样液制备: 称取 3 g 磨碎试样于 500 mL 锥形瓶中, 加沸蒸馏水 450 mL, 立即移入沸水浴, 浸提 45 min(每隔 10 min 摇动一次)。浸提完毕后立即趁热减压过滤, 并定容至 500 mL。茶汤经 0.45 μm 水系膜过滤后进样, 进样量为 10 μL。咖啡碱液态培养基与茶汤发酵样用去离子水稀释 5 倍过滤后, 直接上样测定。

色谱条件^[22]为: 流动相为乙腈和 0.2% 乙酸水溶液的混合溶液, A 相为乙腈, B 相为 0.2% 乙酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 色谱柱: 安捷伦反相 C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长为 280 nm; 柱温为 30 ℃。洗脱程序为: 0 min, A 相(%): 8%, B 相(%): 92%; 50 min, A 相(%): 31%, B 相(%): 69%。采取梯度洗脱。后运行 10 min 后进下一样品。

1.2.7 咖啡碱转化的动力学分析 参照

Sirisansaneeeyakul^[23]对咖啡碱转化为茶碱的动力学参数进行计算。C_{咖啡碱, f} 为咖啡碱最终浓度(mg/L), C_{茶碱, f} 为茶碱最终浓度(mg/L); Q_{咖啡碱} 为单位时间内咖啡碱降解速率(mg/L d); Q_{茶碱} 为单位时间内茶碱产出速率(mg/L d);

茶碱收益率, 即茶碱产出率与咖啡碱降解率的比例, 计算公式如下:

茶碱收益率(%) = Q_{茶碱}/Q_{咖啡碱} × 100 式(1)

啡碱降解率采用以下公式计算:

咖啡碱降解率(%) = (C₀ - C_t)/C₀ × 100 式(2)

式(2)中: C₀ 为初始咖啡碱浓度, mg/L, C_t 为剩余咖啡碱浓度, mg/L。

1.3 数据统计分析

数据分析采用 SPSS 20.0 软件。采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)分析不同组别之间差异的显著性(p < 0.05)水平。

2 结果与分析

2.1 潜在目的菌株的筛选

发现其中 7 株真菌菌株能够在咖啡碱固态筛选培养基中存活, 存活菌株菌落大小见表 1。PE-4、PE-7 仅能在高浓度(1200、1800 mg/L)咖啡碱固态筛选培养基中存活, 可见两株菌株对咖啡碱利用能力有限。PE-1、PE-2、PE-3、PE-5、PE-6 等 5 株菌株在不同浓度的咖啡碱固态筛选培养基中均能成活, 说明此五株菌株均能直接或间接利用咖啡碱作为碳源或氮源。其中, PE-1 和 PE-5 在较低浓度(600 mg/L)的咖啡碱固态筛选培养基中生存良好。作为潜在目的菌株, 对 PE-1 和 PE-5 进行分子生物学鉴定。

2.2 潜在目的菌株的鉴定

采用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 对 PE-1 和 PE-5 的 ITS 序列进行扩增, 将获得的 18SrDNA 序列在 NCBI 使用 Blast 比对, 显示 PE-1 与黑曲霉典型菌株 *Aspergillus niger* NCBT110A 同源性高达 100%; PE-5 与聚多曲霉典型菌株 *A.sydowii* NRRL250 同源性为 99.8%。结合目标菌株菌落特征、分生孢子显微结构(图 1 和图 2), 将 PE-1、PE-5 分别鉴定为黑曲霉(*A. niger* NCBT110A)(GenBank 登录号为 JX863374)和聚多曲霉(*A. sydowii* NRRL250)(GenBank 登录号为 EF652450), 同属于曲霉属真菌。

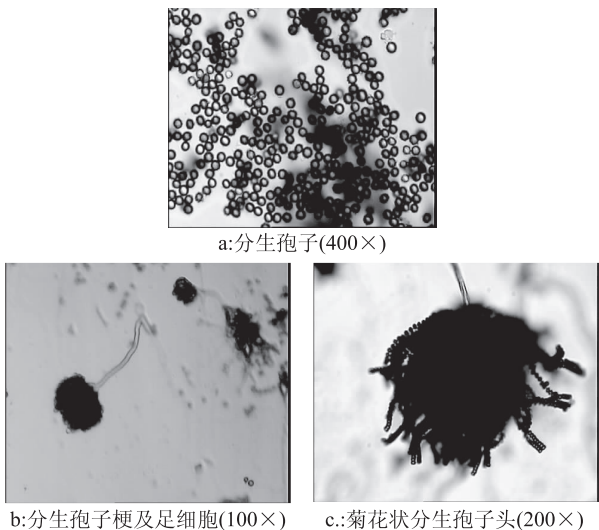


图1 PE-1在光学显微镜下的形态特征
Fig.1 Morphological characteristics of PE-1 under optical microscope

2.3 目标菌株在底物液态培养中茶碱产出结果分析
不同菌株在5、10、15 d时的真菌干重以及咖啡

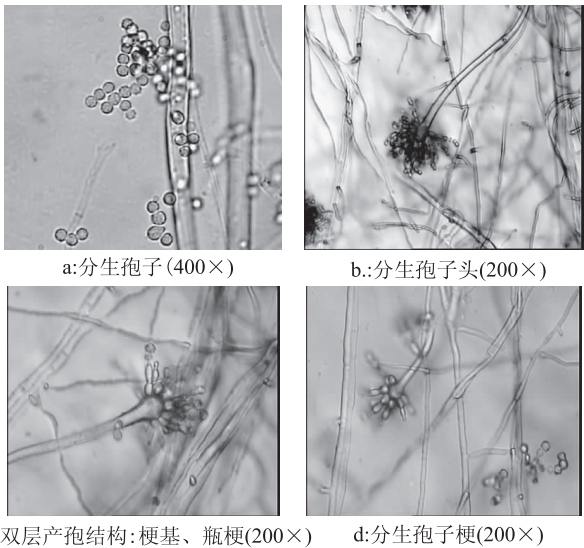


图2 PE-5在光学显微镜下的形态特征
Fig.2 Morphological characteristics of PE-5 under optical microscope

表2 聚多曲霉与黑曲霉底物培养时咖啡碱的生物降解效率与茶碱浓度(̄x ± SD)
Table 2 Biodegradation efficiency of caffeine and concentration of theophylline during the substrate cultivation by *A.sydowii* and *A.niger* .(̄x ± SD)

反应时间(d)	真菌干重(g)	C 咖啡碱(mg/L)	C 茶碱(mg/L)	咖啡碱降解率(%)
<i>A.sydowii</i> NRRL250 (600 mg/L 咖啡碱)				
5	0.23 ± 0.02	431.5 ± 39.7	40.4 ± 1.0	28.1 ± 6.6
10	0.24 ± 0.02	134.8 ± 6.5	209.9 ± 22.6	77.5 ± 1.1
15	0.22 ± 0.01	3.7 ± 0.8	262.6 ± 20.7	99.4 ± 0.1
<i>A.niger</i> NCBT110A (600 mg/L 咖啡碱)				
5	0.28 ± 0.03	592.6 ± 3.1	NF	1.2 ± 0.5
10	0.29 ± 0.02	580.0 ± 2.9	NF	3.3 ± 0.5
15	0.27 ± 0.01	577.3 ± 6.0	NF	3.8 ± 1.0

注:NF 为未发现。

碱、茶碱含量如表 2 所示,聚多曲霉、黑曲霉在液态培养基中均生长良好。由于水溶性淀粉、葡萄糖等营养物的存在,黑曲霉优先利用水溶性淀粉、葡萄糖等营养物,咖啡碱的降解率仅为 3% 左右,未产生茶碱等降解产物。聚多曲霉对咖啡碱的降解作用不受糖类营养物质存在的影响,在液态培养 15 d 时,咖啡碱降解率在 99% 以上,产生大量的茶碱。作为产茶碱的优势菌株,本文对聚多曲霉在咖啡碱液态培养基中茶碱生成的动力学参数进行了分析,并探究聚多曲霉在茶汤液态发酵、茶叶固态发酵中茶碱的产出率。

2.4 聚多曲霉在咖啡碱液态培养基中茶碱生成动力学分析

将聚多曲霉菌悬液接种至含有 1200 mg/L 咖啡碱的液态培养中,分别测定不同阶段真菌干重以及咖啡碱、茶碱含量,并通过相应方程式分析不同阶段咖啡碱降解速率、茶碱产出速率、茶碱收益率以及咖啡碱降解率等动力学参数。聚多曲霉在 1200 mg/L 咖啡碱液态培养中,不同阶段真菌干重以及咖啡碱转化为茶碱的动力学参数见表 3。随着反应的进行,咖啡碱浓度逐渐降低,茶碱浓度逐渐增加;在 15 d 时,咖啡碱的降解率达 90% 以上,液态培养基中咖啡碱浓度仅为 (105.0 ± 16.9) mg/L,茶碱浓度高达 (549.4 ± 29.3) mg/L,在整个反应过程中,有将近一半的咖啡碱转化为茶碱。由此可知,在聚多曲霉参与下,茶碱为咖啡碱的主要降解产物之一。

2.5 不同底物浓度对茶碱产出率的影响

为探究咖啡碱浓度对茶碱产出率的影响,分别将聚多曲霉菌悬液接种至 600、1200 与 1800 mg/L 不同咖啡碱浓度的液态培养基中,振荡培养 15 d 后,对液态培养基中真菌干重以及咖啡碱、茶碱浓度进行测定,不同底物初始浓度下,真菌干重以及动力学参数如表 4 所示。在不同底物浓度下,真菌干重无显著性变化($p > 0.05$),显示咖啡碱浓度对聚多曲霉生长不存在抑制作用;随着底物浓度的提高,咖啡碱降解量与茶碱产出速率显著性增加($p < 0.05$),而咖啡碱降解率显著性下降($p < 0.05$),在 1800 mg/L 咖啡碱浓度下,咖啡碱的降解率仅为 62.9% ± 2.1%。由此可知,聚多曲霉对咖啡碱的降解与转化能力有限,

表3 聚多曲霉在咖啡碱液态培养基中茶碱生成动力学参数($\bar{x} \pm SD$)

反应时间 (d)	真菌干重 (g)	C _{咖啡, f} (mg/L)	C _{茶碱, f} (mg/L)	Q _{咖啡碱} (mg/L d)	Q _{茶碱} (mg/L d)	茶碱收益率 (%)	咖啡碱降解率 (%)
5	0.21 ± 0.02	804.1 ± 26.5	201.2 ± 8.4	79.2 ± 5.3	40.2 ± 1.7	50.7 ± 3.1	33.0 ± 2.2
10	0.22 ± 0.02	566.3 ± 16.5	274.7 ± 14.7	63.4 ± 1.7	27.5 ± 1.5	43.4 ± 4.3	52.8 ± 1.4
15	0.22 ± 0.03	105.0 ± 16.9	549.4 ± 29.3	73.0 ± 1.1	36.6 ± 2.0	50.2 ± 3.3	91.3 ± 1.4

表4 不同底物浓度茶碱生成动力学参数对照($\bar{x} \pm SD$)

底物浓度 (mg/L)	真菌干重 (g)	C _{咖啡, f} (mg/L)	C _{茶碱, f} (mg/L)	Q _{咖啡碱} (mg/L d)	Q _{茶碱} (mg/L d)	茶碱收益率 (%)	咖啡碱降解率 (%)
600	0.22 ± 0.02 ^A	3.7 ± 0.8 ^A	262.6 ± 20.7 ^A	39.8 ± 0.5 ^A	17.5 ± 1.4 ^A	44.0 ± 3.5 ^A	99.3 ± 0.1 ^A
1200	0.22 ± 0.03 ^A	105.0 ± 16.9 ^B	549.4 ± 29.3 ^B	73.0 ± 1.1 ^B	36.6 ± 2.0 ^B	50.2 ± 3.3 ^B	91.3 ± 1.4 ^B
1800	0.23 ± 0.02 ^A	668.2 ± 37.3 ^C	643.8 ± 25.3 ^C	75.5 ± 2.5 ^B	42.9 ± 1.7 ^C	56.9 ± 0.7 ^C	62.9 ± 2.1 ^C

注:图中不同大写字母表示同列数据差异显著($p < 0.05$)。

在一定程度上受咖啡碱初始浓度的影响;在高咖啡碱初始浓度下,咖啡碱的降解速率无显著性提高($p > 0.05$)。

2.6 聚多曲霉等菌株在茶碱生产中的应用

为考察目的菌株在高茶碱茶叶或茶饮料生产中的应用潜力,将聚多曲霉(PE-5)、黑曲霉(PE-1)菌悬液接种至已灭菌的茶汤与晒青毛茶中,并以灭菌处理作为对照,分别进行液态发酵与固态发酵,在不同阶段采取HPLC对咖啡碱、茶碱含量进行测定。茶汤液态发酵与茶叶固态发酵不同处理,咖啡碱(A)和茶碱含量变化分别见图3和图4。如图所示,在聚多曲霉茶汤液态发酵与茶叶固态发酵中,与咖啡碱液

态培养基中变化规律一致,咖啡碱显著下降,茶碱急剧增加;在发酵结束时,咖啡碱的降解率分别为85.43%和87.37%,茶碱含量分别为(501.2 ± 13.55) mg/L和3.3293% ± 0.2463% (w/w),并成为主要嘌呤碱。在黑曲霉接种发酵与灭菌处理中,咖啡碱与茶碱均无显著性变化。由此可知,聚多曲霉具有将咖啡碱转化为茶碱的能力;在咖啡碱等前体物质存在情况下,聚多曲霉具有强大的转化茶碱能力,可运用于高茶碱茶叶或茶饮料的生产中,从而提高茶叶的保健功效。

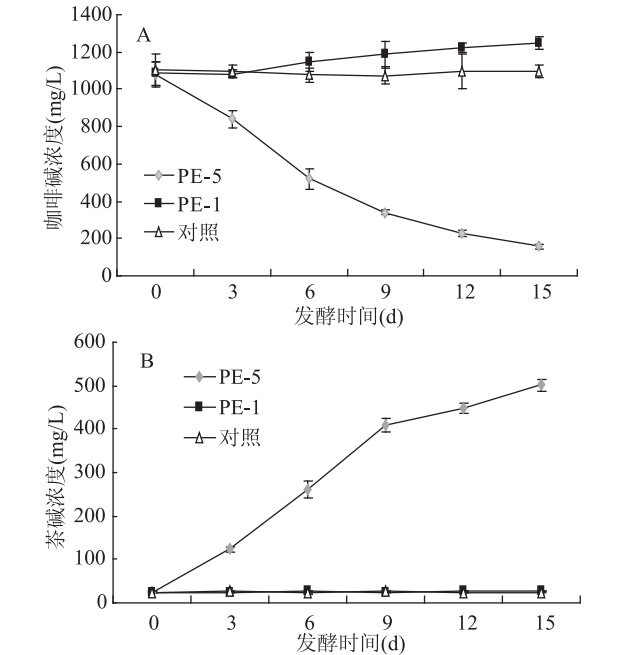


图3 茶汤液态发酵过程中不同处理组咖啡碱(A)、茶碱(B)含量变化

Fig.3 Changes of caffeine(A) and theophylline(B) in different treatment groups during tea infusion submerged fermentation
注:PE-1、PE-5 分别为黑曲霉(*A.niger* NCBT110A)、聚多曲霉(*A.sydowii* NRRL250)液态发酵;对照为灭菌处理。图4 同。

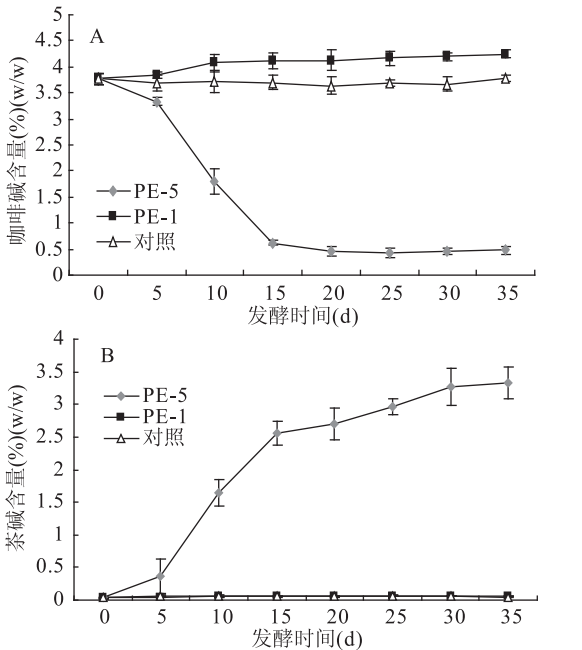


图4 茶叶固态发酵过程中不同处理组咖啡碱(A)、茶碱(B)含量变化

Fig.4 Changes of caffeine(A) and theophylline in different treatment groups during tea solid-state fermentation

3 结论

本文采用以咖啡碱为底物的筛选培养基对普洱茶渥堆中分离纯化的11种微生物进行了筛选,筛选出2株能利用咖啡碱的潜在菌株。经显微结构观察与

18S rDNA 序列测定,分别鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger* NCBT110A)和聚多曲霉(*Aspergillus sydowii* NRRL250)。接种至含有 600 mg/L 咖啡碱的液态培养基进行培养发现,在水溶性淀粉、葡萄糖等营养物质存在下,黑曲霉对咖啡碱的利用受到限制,而聚多曲霉可促使咖啡碱大量转化为茶碱。不同咖啡碱浓度验证表明,聚多曲霉(*A. sydowii* NRRL250)是一株有效的转化茶碱菌株;在一定底物浓度下,咖啡碱的降解率在 90% 以上,并有一半以上的咖啡碱转化为茶碱;在高底物浓度下,咖啡碱的降解速率与茶碱的产出速率均受到一定限制。

前人研究表明,聚多曲霉是一种安全有效的药源真菌,能分泌产生多种具有抗癌活性的吲哚生物碱和杂氧蒽酮^[24-25];并能分解纤维素^[26]和生物降解甲基对硫磷^[21],在工业与农药的生物降解等方面有广泛的应用前景。为探究聚多曲霉在高茶碱茶叶或茶饮料中的应用潜力,将聚多曲霉菌悬液分别接种至已灭菌的茶汤和晒青毛茶中进行液态发酵和固态发酵。在发酵结束时,咖啡碱的降解率分别为 85.43% 和 87.37%,茶碱含量分别为 (501.2 ± 13.55) mg/L 和 $3.3293\% \pm 0.2463\%$ (w/w)。在咖啡碱等前体物质存在情况下,聚多曲霉是一株高效转化茶碱的优势菌株,为高茶碱普洱茶的开发提供了有效菌株。

参考文献

- [1] Wei Kang, Wang Li-Yuan, Zhou Jian, et al. Comparison of catechins and purine alkaloids in albino and normal green tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) by HPLC [J]. Food Chemistry, 2012, 130: 720-724.
- [2] 潘集阳, 廖继武, 田径, 等. 神经肽 Y 系统在高剂量咖啡因、可可碱诱导的大鼠焦虑行为中的作用机制 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27(18): 3298-3300.
- [3] 纪振宇, 陈蓓迪, 倪曲波, 等. 长期摄入咖啡因对幼年大鼠神经内分泌代谢功能的影响 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2014, 35(1): 93-97.
- [4] 翟心慧, 王志华, 吴清华, 等. 咖啡碱对蟾蜍坐骨神经干动作电位和离体心脏活动的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2008, 24(4): 397-398, 467.
- [5] 姚志红, 吴肖蒙, 孙璐, 等. 柱前衍生化结合 LC-MSⁿ 分析人尿中茶碱及其代谢物 [J]. 分析测试学报, 2015, 34(7): 795-801.
- [6] 翁端丽, 张新. 茶碱类药物在哮喘治疗中的应用 [J]. 上海医药, 2014, 35(5): 16-19.
- [7] 黄少丹, 阳隽, 张世叶, 等. 茶碱对慢性哮喘和肺功能改善的作用 [J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(3): 325-327.
- [8] Karademir L D, Dogiruel F, Kocyigit I, et al. The efficacy of theophylline in preventing cisplatin-related nephrotoxicity in patients with cancer [J]. Renal failure, 2016, 38(5): 806-814.
- [9] 吕建峰, 许振良, 马晓华. 茶碱分子印迹聚酰亚胺纳米纤维膜的制备与表征 [J]. 功能高分子学报, 2016, 29(1): 91-97.
- [10] 常怀春, 韩光喜, 白珂, 等. 茶碱印迹酚醛吸附树脂的研究 [J]. 高分子学报, 2011(4): 340-346.
- [11] Zhang Liang, Zhang Zheng-zhu, Zhou Yi-bin, et al. Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities [J]. Food Research International, 2013, 53: 600-607.
- [12] GB/T 22111-2008 中华人民共和国标准 地理标志产品 普洱茶 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [13] Zhang Liang, Li Ning, Ma Zhi-Zhong, et al. Comparison of the chemical constituents of aged pu-erh tea, ripened pu-erh tea, and other teas using HPLC-DAD-ESI-MS [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59: 8754-8760.
- [14] Lv Hai-peng, Zhang Ying-jun, Lin Zhi, et al. Processing and chemical constituents of pu-erh tea: A review [J]. Food research international, 2013, 53: 608-618.
- [15] Wang Di, Xu Kunlong, Zhang Ying, et al. Acute and subchronic oral toxicities of pu-erh black tea extract in Sprague-Dawley rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 134: 156-164.
- [16] Wang Di, Xiao Rong, Hu Xue-Ting, et al. Comparative safety evaluation of Chinese pu-erh green tea extract and pu-erh black tea extract in Wistar rats [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58: 1350-1358.
- [17] Qin Jin-Hua, Li Ning, Tu Peng-Fei, et al. Change in tea polyphenol and purine alkaloid composition during solid-state fungal fermentation of postfermented tea [J]. J Agric Food Chem., 2012, 60: 1213-1217.
- [18] Wang Xiaogang, Wan Xiaochun, Hu Shuxia, et al. Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms [J]. Food Chemistry, 2008, 107: 1086-1091.
- [19] Ashihara H, Gillies FM, et al. Metabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. Plant Cell Physiol., 1997, 38(4): 413-419.
- [20] Woolfolk CA. Metabolism of M-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen [J]. J Bacteriol, 1975, 123: 1088-1106.
- [21] Alvarenga N, Biroli W G, Seleghim M, et al. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense* [J]. Chemosphere, 2014, 117: 47-52.
- [22] 马存强, 周斌星, 王洪振, 等. 普洱茶渥堆发酵中可降解咖啡碱菌株的筛选和鉴定 [J]. 茶叶科学, 2017, 37(2): 211-219.
- [23] Sirisansaneeyakul S, Wannawilai S, Chisti Y. Repeated fed-batch production of xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663 [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2013, 88: 1121-1129.
- [24] He Fei, Sun Lin, Liu Kai-sheng, et al. Indole alkaloids from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO00305 [J]. J Antibiotics, 2012, 65: 109-111.
- [25] Song Xian-Qin, Zhang Xin, Han Qiu-Ju, et al. Xanthone derivatives from *Aspergillus sydowii*, an endophytic fungus from the liverwort *Scapania ciliate* S. Lac and their immunosuppressive activities [J]. Phytochemistry Letters, 2013, 6: 318-321.
- [26] Matkar Ketna, Chapla D K, Divecha Jyoti. Production of cellulase by a newly isolated strain of *A. sydowii* and its optimization under submerged fermentation [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 78: 24-33.