

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

潘雪莉, 罗 燕, 胡贤春, 赵振军*

(长江大学园艺园林学院, 荆州 434025)

摘要: 目的 全面了解源自后发酵茶中短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*, *Br. brevis*)的产酶特性, 揭示其对后发酵茶品质形成的作用。**方法** 对短短芽孢杆菌进行全基因组测序和关键酶预测, 结合预测结果对短短芽孢杆菌进行纯培养、接种茶叶渥堆, 分析其纯培养和参与茶叶渥堆过程的产酶能力、酶活性及渥堆茶叶主要品质成分动态变化。**结果** 测序结果表明短短芽孢杆菌糖苷水解酶、糖基转移酶得到注释基因最多, 分别占比 39.22% 和 33.33%。在短短芽孢杆菌的纯培养和参与茶叶渥堆过程中, 短短芽孢杆菌具有产生蛋白酶、淀粉酶、果胶酶、纤维素酶、过氧化物酶和多酚氧化酶的能力, 其中蛋白酶、淀粉酶和果胶酶活性较强, 纯培养条件下蛋白酶活力最高可达到 550.91 U/mL; 相较于液体纯培养, 在茶叶基质上培养有助于短短芽孢杆菌纤维素酶活力的提高, 增幅达到 691.02%; 在短短芽孢杆菌参与的茶叶渥堆过程中, 茶多酚、儿茶素、氨基酸和黄酮呈现下降趋势, 茶多酚最大降幅为 80.61%, 咖啡碱检测含量显著增加, 增幅最大为 56.15%; 相关性分析结果表明, 渥堆过程短短芽孢杆菌产生的纤维素酶等与茶叶品质成分的变化表现出显著的正相关。**结论** 短短芽孢杆菌在后发酵茶渥堆过程可以分泌多种胞外酶, 通过酶促作用影响后发酵茶理化成分的改变。

关键词: 短短芽孢杆菌; 后发酵茶; 基因组测序; 酶活性; 理化成分

Enzyme production capacity of *Brevibacillus brevis* in post-fermented tea and its enzyme activity in the process of pile-fermentation

PAN Xue-Li, LUO Yan, HU Xian-Chun, ZHAO Zhen-Jun*

(College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the enzyme-producing characteristics of *Brevibacillus brevis* (*Br. brevis*) from post-fermented tea and reveal its effect on the quality formation of post-fermented tea. **Methods** The whole genome of *Br. brevis* was sequenced and the key enzymes were predicted. Combined with the predicted results, the ability to produce enzyme, enzymatic activities and the dynamic change of tea quality components were analyzed during pure culture and inoculation of tea. **Results** The sequencing results showed that the most annotated genes were glycoside hydrolase and glycosyltransferase, which accounted for 39.22% and 33.33% respectively. In the process of pure culture and participation in tea pile-fermentation. *Br. brevis* had the ability to produce protease, amylase, pectinase, cellulase, peroxidase and polyphenol oxidase. The activities of protease, amylase and pectinase

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972464)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31972464)

*通信作者: 赵振军, 博士, 副教授, 主要研究方向为茶叶加工与综合利用。E-mail: zzjswu@126.com

*Corresponding author: ZHAO Zhen-Jun, Ph.D, Associate Professor, College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, No.266, Jingmi Road, Jingzhou District, Jingzhou 434025, China. E-mail: zzjswu@126.com

were stronger, and the highest activity of protease was 550.91 U/mL under pure culture condition. The activity of *Br. brevis* cellulase was increased by 691.02% when cultured on tea substrate. In the process of tea pile-fermentation with the participation of *Br. brevis*, tea polyphenols, catechins, amino acids and flavonoids showed a decreasing trend, the maximum decrease of tea polyphenols was 80.61%, and the content of caffeine was significantly increase, with the maximum increase of 56.15%. The results of correlation analysis showed that the cellulase produced by *Br. brevis* during pile-fermentation process had a significant positive correlation with the changes of tea quality components. **Conclusion** During pile-fermentation process of the post-fermented tea, *Br. brevis* can secrete a variety of extracellular enzymes, which can affect the changes of physical and chemical components of post-fermented tea through enzymatic action.

KEY WORDS: *Brevibacillus brevis*; post-fermented tea; genome sequencing; enzyme activity; physicochemical components

0 引言

后发酵茶, 又称黑茶, 主要有云南普洱茶、湖北老青砖、湖南茯砖茶、广西六堡茶, 以其独特的陈化香气、醇厚甘甜等风味品质与保健功能深受消费者喜爱^[1]。后发酵茶以较为粗老的鲜叶为原料, 经过杀青、揉捻、渥堆和干燥等工艺加工而成, 其中渥堆是后发酵茶品质形成的关键工序^[2], 微生物在渥堆中能够分泌多种胞外酶^[3], 通过酶促作用使茶多酚类物质氧化、缩合、蛋白质和氨基酸分解、降解, 碳水化合物被消耗和分解并导致各产物之间的聚合、缩合等一系列反应的发生, 最终形成后发酵茶的色泽红褐、香气陈醇等特有品质^[4]。

后发酵茶渥堆发酵过程中微生物种群主要以细菌为主, 其次是霉菌, 酵母较少^[5]。后发酵茶中主要的细菌群落为欧文氏菌属、芽孢杆菌属、无色杆菌属和类芽孢杆菌属等^[6], 且芽孢杆菌属被认为是黑茶渥堆过程的优势微生物菌群^[7]。张欣等^[8]基于 Illumina 高通量测序分析发现普洱茶在渥堆过程中细菌种群丰富, 芽孢杆菌属细菌是普洱茶渥堆过程中的优势菌, 并推测芽孢杆菌在后发酵茶渥堆过程中发挥着重要作用。朱雯等^[9]通过对青砖茶渥堆发酵中嗜热细菌的筛选, 发现芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌能够产生纤维素酶、淀粉酶和单宁酶。刘红强等^[10]通过黄水芽孢杆菌进行全基因组测序, 利用平板圈法, 发现该菌株具有产生蛋白酶和多种碳水化合物的潜力。本项目组在前期的研究中, 从后发酵茶中分离到多种芽孢杆菌属细菌, 其中短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*, *Br. brevis*)对赭曲霉毒素 A 产生菌具有较强的抑制作用^[1], 而关于短短芽孢杆菌的产酶特性及其对后发酵茶渥堆过程茶叶品质成分变化的影响尚未见报道。

本研究以从后发酵茶中分离的短短芽孢杆菌为实验对象, 通过对短短芽孢杆菌进行全基因组测序、纯培养, 分别预测并分析其产酶能力; 将短短芽孢杆菌接种至茶叶参与后发酵茶的渥堆, 分析其在后发酵茶渥堆过程时的产酶活性, 并结合渥堆发酵过程中茶叶理化成分的动态变化, 揭示短短芽孢杆菌在后发酵茶渥堆过程发挥的酶促作用及

其与后发酵茶品质形成间的相关关系, 旨在为后发酵茶渥堆过程优势微生物功能的评价与后发酵茶渥堆工艺技术的改良提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株短短芽孢杆菌(*Br. brevis*)由本实验室从后发酵茶中分离、纯化并保存。茶叶原料为晒青毛茶, 采自湖北咸宁福鼎大白群体种的一芽五、六叶, 经过杀青、揉捻、晒干制作而成, 由湖北洞庄茶叶有限公司提供。

福林酚(纯度 99%, 北京素莱宝科技有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮、三氯乙酸、碳酸钠、氢氧化钠、羟甲基纤维素钠、茚三酮、盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

AB204-N 型电子天平(精度 0.001 g, 艾科仪器设备有限公司); TGL-16 台式高速冷冻离心机(浙江明德仪器有限公司); HH-6 智能数显恒温水浴锅(上海越众仪器设备有限公司); YMMD-65 立式压力蒸汽灭菌器(上海三申医疗仪器有限公司); CHA-S 气浴恒温振荡器(常州金坛良友仪器有限公司); UV-4800 紫外可见分光光度计(尤尼克上海仪器有限公司); DHG-903385 电热恒温干燥箱、SPX-80B5H 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化与培养条件

取经甘油-20℃冷冻保存的 *Br. Brevis* 纯菌株, 在 LB 固体培养基平板上划线, 37℃培养 48 h, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37℃、180 r/min 条件下培养 72 h, 取活化的菌液用于后续实验^[11]。

1.3.2 菌株全基因组测序

取适量活化的菌液送武汉贝纳科技有限公司开展全基因组测序, 测序基于 Nanopore 三代测序平台和二代测序

技术平台完成, 利用 prokka、Prodigal 软件对组装后的基因组进行编码基因预测, 利用 Aragorn 预测 tRNA、RNAmmer 预测 rRNA、Infernal 预测 rRNA、miscRNA, 最终预测出各类基因元件加以汇总并完成初步注释。将预测得到的基因序列与 COG、KEGG、Uniprot、Refseq 等功能数据库做 BLAST 比对分析, 得到基因功能注释结果。

1.3.3 短短芽孢杆菌纯培养发酵液中的产酶能力

取活化后的短短芽孢杆菌菌株接种于 LB 液体培养基中, 37℃、180 r/min 摇床培养 1、2、3、4 和 5 d 5 个时间段, 分别取发酵液, 8000 r/min 离心 30 min, 取上清液分别测定菌株纯培养过程中产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、过氧化物酶、果胶酶以及多酚氧化酶 6 种基本酶活性。

酶活力测定方法: 蛋白酶酶活性参照艾雨晴^[12]三氯乙酸(trichloroacetic acid solution, TCA)法, 蛋白酶酶活力定义在 40℃条件下, 1 mL 酶液 1 min 分解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为一个酶活力单位(U); 淀粉酶、纤维素酶、果胶酶测定方法采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS reagent, DNS)法测定还原性糖含量: 淀粉酶酶活力定义在 40℃条件下, 1 mL 酶液 1 min 催化可溶性淀粉生成 1 mg 葡萄糖所需淀粉酶为一个酶活单位(U)^[13]; 纤维素酶酶活力定义在 50℃条件下, 1 mL 酶液 1 min 分解羧甲基纤维素钠生成 1 mg 葡萄糖所需纤维素酶为一个酶活单位(U)^[14]; 果胶酶酶活力定义在 50℃条件下, 1 mL 酶液 1 min 分解果胶产生 1 μg 半乳糖醛酸为一个酶活力单位(U)^[15]。多酚氧化酶参照孙会刚等^[16]方法, 多酚氧化酶酶活力定义 1 mL 粗酶液在 1 min 内使得吸光度变化 0.001 定义为 1 个酶活力单位(U); 过氧化物酶参考王雨鑫等^[17]、王伟伟等^[18]方法略加修改, 过氧化物酶酶活力定义在 35℃条件下, 1 mL 酶液每分钟增加 0.1 的吸光度强度。

1.3.4 短短芽孢杆菌菌株在茶叶发酵中的产酶特性

纯菌发酵茶样的制备: 将晒青毛茶进行装罐处理, 每罐 250 g, 加入适量的无菌水后 121℃灭菌 30 min, 冷却备用^[9]。在无菌条件下, 将短短芽孢杆菌接种于 LB 液体培养基中, 29℃ 180 r/min 摇床培养 72 h, 以 8000 r/min 将已制备的菌液离心 15 min, 收集菌体, 将菌体稀释至 1×10^5 CFU/mL 的菌悬液后, 适量接种于已灭菌的茶叶中, 使发酵含水量达到 65%左右即可。于室温条件下分别渥堆发酵 3、6、9、12 和 15 d 后, 进行取样, 依次编号为 W-1~W-5, 以未经接种发酵的晒青毛茶为对照, 编号为 W-0, 测定 6 项基本酶活力以及后续理化成分检测。

酶液提取与活性分析: 多酚氧化酶、淀粉酶参考 SUN 等^[19]的方法进行提取; 过氧化物酶的测定方法参考 GAA 等^[20]方法; 纤维素酶和蛋白酶参照徐倩^[21]的方法; 果胶酶参考龚玉雷^[22]的方法。具体如下: 称取已渥堆发酵茶叶 1.5 g, 加入 0.3 g 聚乙烯吡咯烷酮、0.2 g 石英砂以及适量预冷的缓冲液, 冰上充分研磨混合后, 加入对应的缓冲液定容

至 10 mL, 于 4℃下静置 12 h, 取出, 在 4℃以 8000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液测定茶叶中酶活力, 酶活性分析方法参照 1.3.3, 其中多酚氧化酶和淀粉酶活性测定利用 pH 为 5.6 的柠檬酸缓冲液, 过氧化物酶活性测定利用 pH 为 7.0 的柠檬酸缓冲液, 纤维素酶和淀粉酶活性测定利用 pH 为 5.0 的柠檬酸缓冲液; 果胶酶活性测定利用浓度为 0.15 mol/L 的 NaCl 缓冲液。

1.3.5 茶样理化成分检测

儿茶素含量参考香莢蓝素比色法^[23]; 茶多酚含量参照 GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚与儿茶素类含量的检测方法》; 游离氨基酸含量测定参考 GB/T 8314—2013《茶游离氨基酸总量的测定》; 咖啡碱含量参照 GB/T 8312—2013《茶咖啡碱测定》; 黄酮含量测定采用三氯化铝法^[24]。

1.4 数据处理

COG、KEGG 注释和酶活性等相关图使用 Graphad 8 作图, 理化成分分析和碳水化合物酶注释利用 Excel 2022 作图, 酶活性和理化成分相关性分析使用 Origin 2022 中 Correlation Plot 的 Pearson 方法绘制。利用 *t* 检验对所有数据进行统计处理, 定量结果均以平均值±标准偏差表示。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义, 其中*: $P < 0.05$, 表示存在显著性差异; **: $P < 0.01$, 表示显著性差异明显, ***: $P < 0.001$, 表示极显著性差异。

2 结果与分析

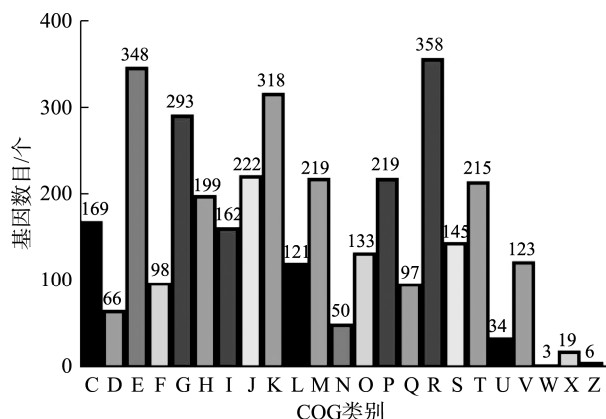
2.1 短短芽孢杆菌的基因注释和功能分类

2.1.1 COG 注释分析

COG 是对基因产物进行直系同源分类的数据库, 将预测基因的序列与 Unigene 数据库进行对比, 从而预测 gene 可能的功能并对其做功能分类统计。结果显示: 短短芽孢杆菌共有 26 类 3617 个基因得到了 COG 注释, 占基因总数的 81.79%; 预测主要功能的数量最多, 共有 358 个, 占注释基因的 9.89%; 其次是氨基酸转运代谢、转录和碳水化合物代谢相关基因, 分别为 348 个、318 个和 293 个, 分别占注释基因的 9.62%、8.79%和 8.10%(图 1)。

2.1.2 KEGG 注释分析

KEGG 是系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物功能的主要公共数据库, 利用 KEGG 以进一步探究基因在生物学上的复杂行为。经过 KEGG 注释分析, 共有 2418 个基因得到了注释, 占有注释基因的 32.89%。如图 2 所示, 代谢通路第一层级共有 5 个分类, 代谢通路所得注释基因最多, 占所注释基因的 75.55%。在第二层级中, 除了全局与概览图的注释基因有 722 个外, 与碳水化合物代谢通路相关的注释基因最多为 244 个, 占所获得注释基因的 10.09%, 显著高于其他代谢通路, 这一结



注: C: 能量生成与转运; D: 细胞周期控制、细胞分裂和染色体分裂; E: 氨基酸转运代谢; F: 核苷酸转运和代谢; G: 碳水化合物转运代谢; H: 辅酶转运代谢; I: 脂肪转运代谢; J: 翻译, 核糖体结构和生物合成; K: 转录; L: 复制, 重组和修复; M: 细胞壁/膜/被膜的生物合成; N: 细胞运动; O: 翻译后修饰, 蛋白质折叠和伴侣蛋白; P: 无机离子转运代谢; Q: 次生代谢物生物合成, 转运和代谢; R: 主要功能预测; S: 未知功能; T: 信号传导机制; U: 胞内转运、分泌和小泡运输; V: 抵御机制; W: 胞外结构; Y: 核酸结构; Z: 细胞骨架。

图 1 *Br. brevis* 基因的 COG 注释与分类

Fig.1 COG annotation and classification of *Br. Brevis*

果进一步证明了短短芽孢杆菌具有碳水化合物代谢的代谢通路和功能基因, 因此, 可以推测其对复杂的化合物进行降解、转化以及利用的潜力。

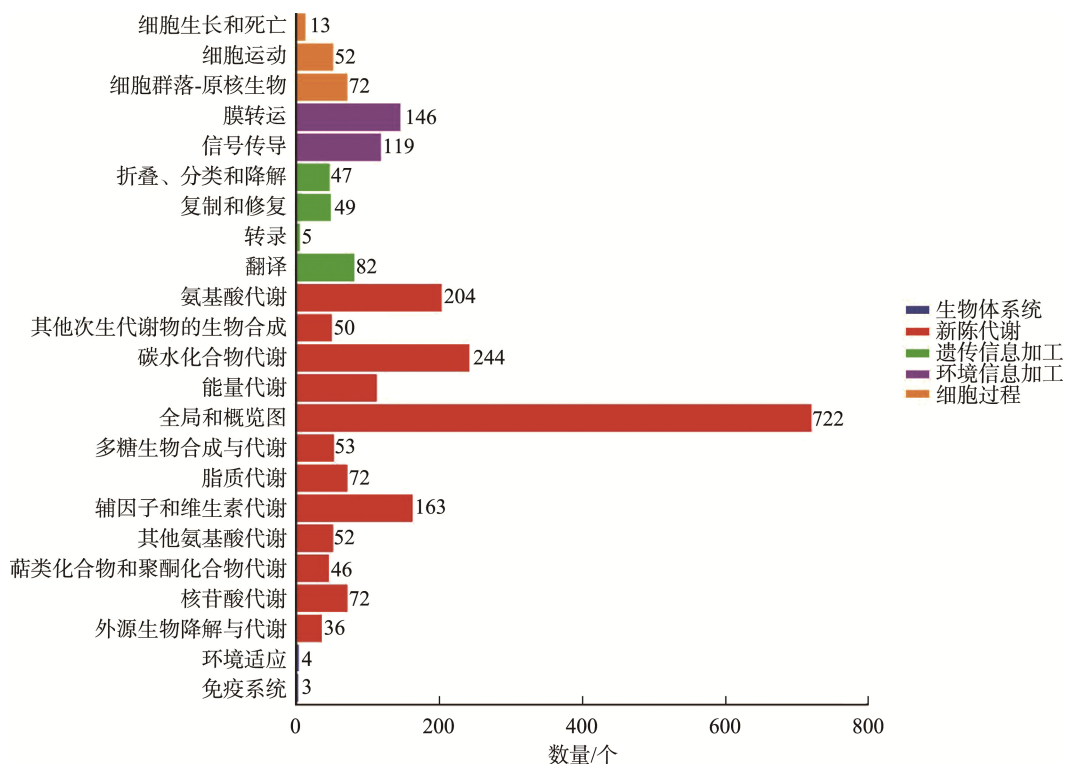


图 2 *Br. brevis* 基因的 Pathway 注释和分类

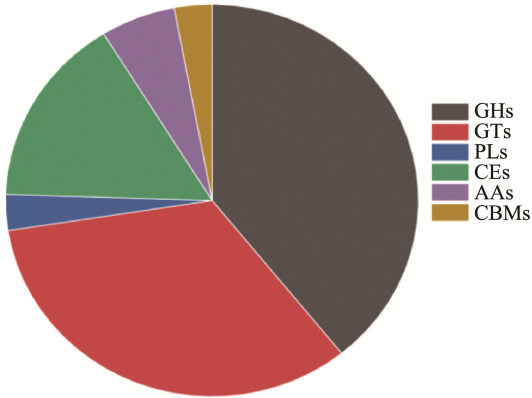
Fig.2 Pathway annotation and classification of *Br. Brevis*

2.1.3 碳水化合物酶注释

碳水化合物在很多生物学功能中具有重要的地位, 用 HMMER 基于 CAZy 数据库对蛋白质序列进行注释^[25], 将菌株编码出的 102 个碳水化合物酶基因分为 6 大类, 如图 3 所示。糖苷水解酶、糖基转移酶和碳水化合物酯酶占比较大, 分别占编码基因的 39.22%、33.33%和 15.69%。对碳水化合物的注释为后续短短芽孢杆菌纯培养以及茶叶发酵定量研究提供了指导性方向。

2.2 短短芽孢杆菌纯培养发酵液产酶特性分析

本研究对短短芽孢杆菌纯培养条件下可能的产酶(包括: 蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、多酚氧化酶和过氧化物酶)能力进行研究。结果表明, 该菌株纯培养时蛋白酶(图 4A)、淀粉酶(图 4B)和果胶酶(图 4D)酶活力显著高于其他 3 种酶活力, 蛋白酶酶活力在培养第 4 d 时最高为 550.91 U/mL, 在发酵的第 5 d 开始降低, 但均显著高于发酵前期, 这与贾仲昕等^[26]研究中关于贝莱斯芽孢杆菌 A1 结果相似, 推测该菌株在快速生长期的中后期大量产生蛋白酶, 生长后期发酵液中菌体含量过大, 抑制了蛋白酶活性。淀粉酶与果胶酶在短短芽孢杆菌纯培养的 5 d 时间范围内, 其活性随着发酵时间的延长表现为增加趋势, 这与张运祺等^[27]、AIQAHTANI 等^[28]研究枯草芽孢杆菌产淀粉酶和果胶酶活力先增高后减少的规律略有差异, 这可能与不同菌种各自产酶特性和菌种的培养时间长短相关, 而关于短短芽孢杆菌纯培养 5 d 以上淀粉酶和果胶酶活性的变化趋势有待进一步研究。



注: GHs: 糖苷水解酶; GTs: 糖基转移酶; PLs: 多糖裂解酶; CEs: 碳水化合物酯酶; AAs: 辅助氧化还原酶; CBMs: 碳水化合物结合模块。

图 3 *Br. brevis* 基因的 CAZy 注释和分类

Fig.3 CAZy annotation and classification of *Br. Brevis*

2.3 短短芽孢杆菌发酵茶叶时的产酶特性

将短短芽孢杆菌接种至经无菌处理后的毛茶中, 分析不同培养时段短短芽孢杆菌在茶叶中的产酶特性, 结果表明, 蛋白酶(图 5A)、淀粉酶(图 5B)、纤维素酶(图 5C)、果胶酶(图 5D)、多酚氧化酶(图 5E)、过氧化物酶(图 5F)酶活力显著高于对照组。其中蛋白酶、过氧化物酶、纤维素酶和多酚氧化酶随着渥堆时间的延长先增加后降低, 淀粉酶和

果胶酶与渥堆时间呈正相关。纤维素酶、多酚氧化酶、过氧化物酶酶活力显著高于菌种纯培养, 推测短短芽孢杆菌在茶叶渥堆过程中可能受到茶叶中纤维素等底物的影响, 激发了相应酶的产生与酶活性升高^[29]。

2.4 短短芽孢杆菌发酵茶叶过程中主要成分变化

通过对短短芽孢杆菌参与渥堆发酵后的茶叶样品主要理化成分进行分析, 发现与初始茶样(W-0)相比, 发酵完成茶样(W-5)的茶多酚、氨基酸、黄酮含量均表现为显著降低, 儿茶素含量略微低于初始茶样(W-0)(表 1)。在茶叶的渥堆发酵过程中, 接种芽孢杆菌后会产生大量的代谢酶, 而这些酶类的出现降解茶叶理化成分。朱雯等^[9]对接种嗜热菌种后测定其理化成分, 发现茶多酚和游离氨基酸含量低于对照组; 茶多酚和氨基酸含量的降低, 有助于茶叶涩味的降低, 口感更加醇和; 刘琨毅等^[30]在茶叶中接种地衣芽孢杆菌强化发酵有利于提高普洱茶的品质。咖啡碱是构成茶汤的重要滋味物质之一, 随着渥堆时间的延长含量增加, 最大增幅为 56.15%, 与张厅等^[31]研究结果一致, 茶叶中的咖啡碱具有稳定的环状结构^[32], 几乎未见微生物在茶叶中合成咖啡碱的报道^[33], 而短短芽孢杆菌发酵茶叶过程中咖啡碱含量的升高, 可能在于短短芽孢杆菌分泌的胞外酶如纤维素酶、多酚氧化酶等有助于茶叶中的咖啡碱解吸附、解络合作用的发生, 进而表现出茶叶中游离咖啡碱检测含量的增加。

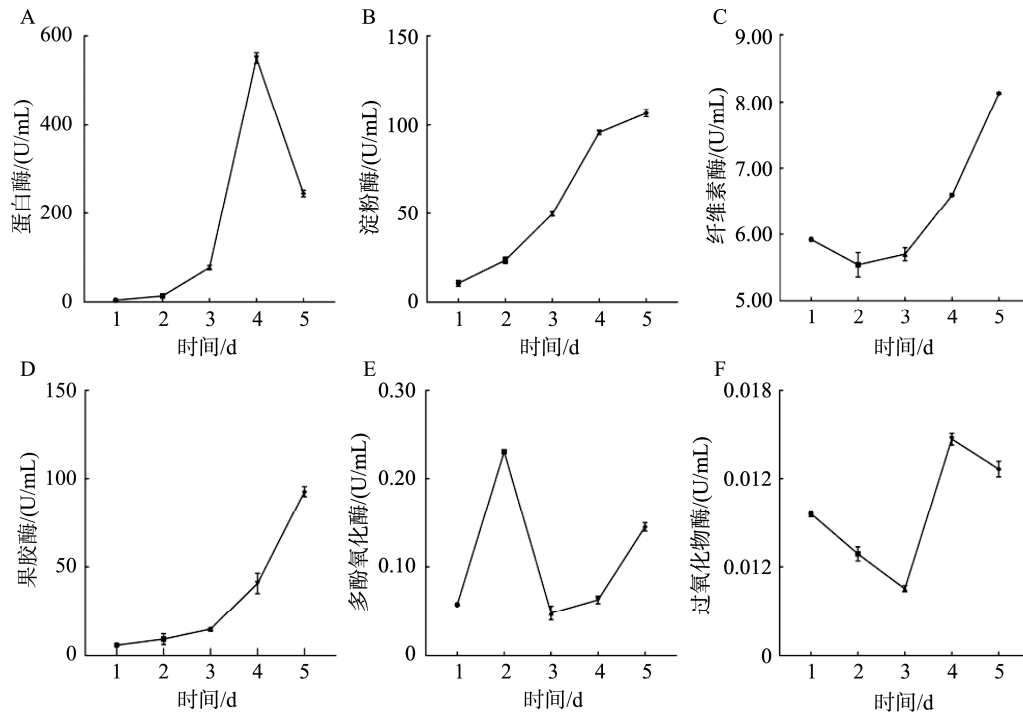


图 4 不同培养阶段微生物培养液的酶活力($n=3$)

Fig.4 Enzyme activity of microbial culture medium at different culture stages ($n=3$)

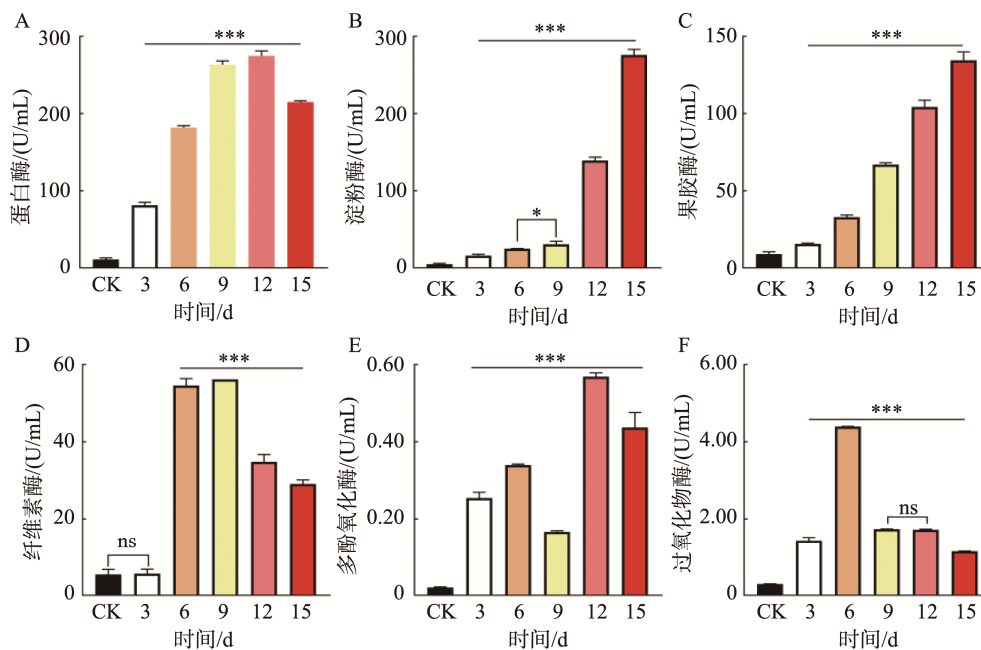


图 5 不同渥堆阶段茶叶基质中酶活性

Fig.5 Enzyme activity of in tea substrate at different stacking stages

表 1 后发酵茶渥堆过程中主要理化成分变化($n=3, \%$)Table 1 Changes of main physicochemical components in post-fermented tea during the process of pile-fermentation ($n=3, \%$)

| 样品 | W-0 | W-1 | W-2 | W-3 | W-4 | W-5 |
|-----|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 茶多酚 | 10.83±0.34 ^a | 5.90±0.04 ^b | 5.70±0.05 ^b | 3.63±0.06 ^c | 2.33±0.05 ^c | 2.10±0.17 ^c |
| 儿茶素 | 7.24±0.08 ^b | 4.19±0.11 ^c | 2.08±0.11 ^d | 12.88±0.1 ^a | 6.58±0.05 ^b | 5.443±0.07 ^c |
| 氨基酸 | 1.59±0.02 ^b | 3.64±0.01 ^a | 1.25±0.01 ^b | 1.11±0.02 ^b | 0.65±0.01 ^c | 0.38±0.01 ^c |
| 黄酮 | 3.10±0.11 ^a | 1.54±0.03 ^b | 1.33±0.21 ^b | 0.99±0.04 ^b | 1.40±0.01 ^b | 0.97±0.01 ^c |
| 咖啡碱 | 1.30±0.04 ^b | 1.34±0.01 ^b | 1.43±0.03 ^b | 1.69±0.01 ^b | 1.94±0.03 ^a | 2.03±0.01 ^a |

注: 同行不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

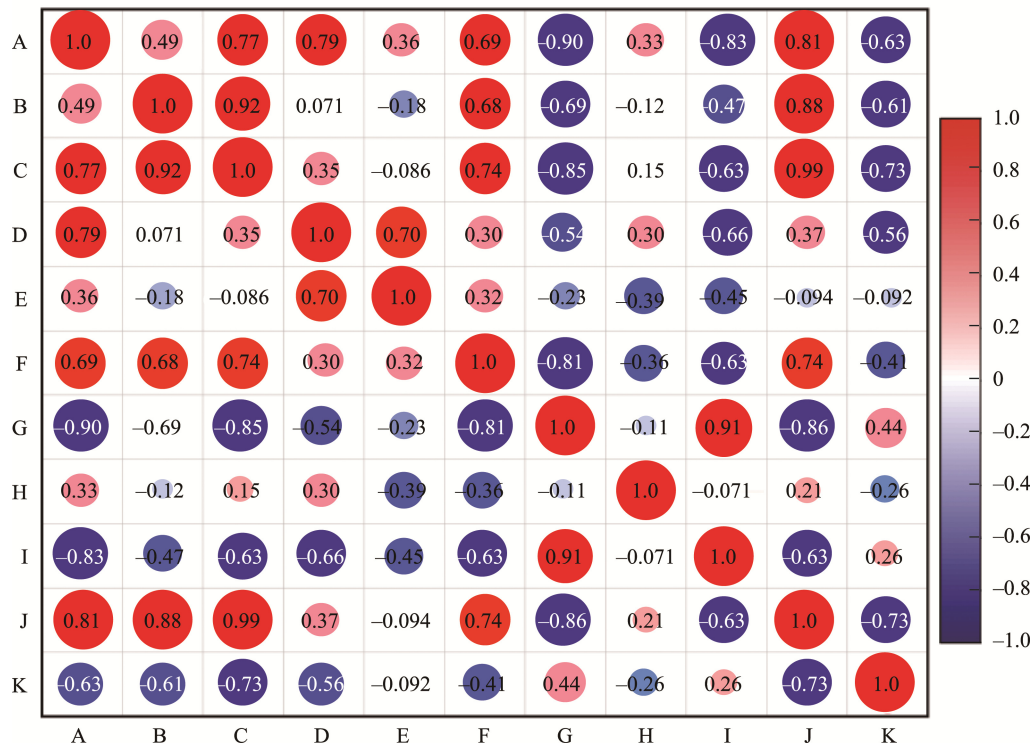
2.5 纯菌发酵茶叶中短短芽孢杆菌产酶特性与茶叶主要成分变化相关性分析

微生物参与发酵是渥堆过程中茶叶物质变化的决定因素, 直接影响茶叶的汤色、香气和滋味等特有品质的形成^[34-35]。对纯菌发酵茶叶短短芽孢杆菌产酶特性与品质成分变化做相关性分析, 结果如图 6 所示。纤维素酶和果胶酶为胞壁水解酶, 可以通过增加细胞壁的通透性, 来促进多酚类物质和游离氨基酸等的溶出; 蛋白酶为水解酶, 可以来催化蛋白质中的肽键水解来形成氨基酸和多肽^[36]。茶多酚与六大酶类均呈负相关, 联合添加纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等多种酶类制成复合酶对云南大叶种进行液态发酵, 结果表明可以大幅度地降低茶多酚含量, 促进茶叶内含物质的氧化^[37]。氨基酸与六大酶类呈负相关, 推测一部分在茶叶渥堆过程中被氧化、降解和转化, 和多酚类反应生成褐色色素, 另外一部分被微生物中释放的酶类所消耗, 发生脱氨、脱羧反应形成芳香物质, 使得茶叶的香气更加丰

富^[38]。咖啡碱、儿茶素与蛋白酶呈正相关, 相关系数分别为 0.81、0.33; 纤维素酶与儿茶素、咖啡碱呈正相关, 相关系数分别为 0.30 和 0.37; 多酚氧化酶、淀粉酶与咖啡碱呈正相关, 相关系数分别为 0.74、0.88。咖啡碱与多种酶类呈现正相关, 进一步暗示短短芽孢杆菌分泌的胞外酶在茶叶渥堆过程中可能存在的对咖啡碱的解吸附、解络合作用。

3 结论

本研究通过对从后发酵茶中分离得到的短短芽孢杆菌进行全基因组测序, 经过 COG、KEGG 分析和与 CAZy 数据库比对, 分别注释到 293 个、9 个和 102 个碳水化合物酶基因。通过进一步生物信息学分析表明, 短短芽孢杆菌具有产生糖基水解酶、糖基转移酶和碳水化合物酯酶等的的能力。通过对短短芽孢杆菌纯培养和接种茶叶上培养, 发现其具有产生纤维素酶等多种酶的能力, 其中产生的蛋白酶、淀粉酶和果胶酶的活性较强, 相较于液体纯培养,



注: A: 蛋白酶; B: 淀粉酶; C: 果胶酶; D: 纤维素酶; E: 过氧化物酶; F: 多酚氧化酶; G: 茶多酚; H: 儿茶素; I: 黄酮; J: 咖啡碱; K: 氨基酸。

图 6 茶叶渥堆发酵 *Br. brevis* 酶活性与茶叶内含物质变化相关性分析

Fig.6 Analysis of the correlation between the enzyme activities of *Br. brevis* and the changes of tea contents in the process of tea pile-fermentation

在茶叶基质上培养有助于短短芽孢杆菌纤维素酶活力的提高,增幅可达到 691.02%;在短短芽孢杆菌的酶促作用下,茶叶中的茶多酚、氨基酸、咖啡碱、儿茶素、黄酮均会受到影响,其中茶多酚最大降幅为 80.61%,有利于后发酵茶特有的品质特征的形成。

综上所述,通过从短短芽孢杆菌的基因注释、菌株纯培养和接种茶叶渥堆发酵酶活力及茶叶理化成分动态变化分析等角度的研究,深化了对后发酵茶渥堆过程短短芽孢杆菌功能的评价,可为在后发酵茶渥堆工艺技术改良上的实际应用提供理论参考。

参考文献

- [1] ZHAO ZJ, ZHANG LL, LOU YG, *et al.* Inhibitory effect of polypeptides produced by *Brevibacillus brevis* on ochratoxigenic fungi in the process of pile-fermentation of post-fermented tea [J]. *Foods*, 2022, 11(20): 3243–3243.
- [2] 孙丹. 普洱茶不同发酵微生物的发酵功能及氧化酶研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
SUN D. Study on fermented functions and oxidases of different microorganism for Puer tea [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017.
- [3] ZHU MZ, LI N, ZHOU F, *et al.* Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea [J]. *Food Chem*, 2019, 312: 126043.
- [4] 朱广鑫, 周红杰, 赵明. 普洱茶发酵技术研究进展[J]. *江西农业学报*, 2011, 23(5): 76–81.
ZHU GX, ZHOU HJ, ZHAO M. Research progress in fermentation technology of Puer tea [J]. *J Guangxi Agric*, 2011, 23(5): 76–81.
- [5] 张丹丹, 王佳佳, 朱雯, 等. 青砖茶渥堆发酵中微生物的变化[J]. *食品科学*, 2019, 40(6): 166–172.
ZHANG DD, WANG JJ, ZHU W, *et al.* Changes of microbial community during pile fermentation of Qingzhuana Tea [J]. *Food Sci*, 2019, 40(6): 166–172.
- [6] YAN K, ABBAS M, MENG L, *et al.* Analysis of the fungal diversity and community structure in Sichuan dark tea during pile-fermentation [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12(18): 706714.
- [7] LIN FJ, WEI XL, LIU HY, *et al.* State-of-the-art review of dark tea: From chemistry to health benefits [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 109(31): 126–138.
- [8] 张欣, 姚粟, 白飞荣, 等. 基于高通量测序和可培养方法的勐海发酵普洱茶细菌多样性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(9): 15–21.
ZHANG X, YAO S, BAI FR, *et al.* Analysis on bacterial diversity in Menghai fermented Pu-erh tea by high throughput sequencing and culture method [J]. *Food Ferment Ind*, 2018, 44(9): 15–21.
- [9] 朱雯, 吴双, 王文凤, 等. 青砖茶渥堆发酵中嗜热细菌筛选、鉴定及产

- 酶特性研究[J]. 茶叶科学, 2022, 42(2): 211–221.
- ZHU W, WU S, WANG WF, *et al.* The screening, identification and enzyme production of thermophilic *Bacteria* in pile-fermentation of Qingzhuang Tea [J]. Tea Sci, 2022, 42(2): 211–221.
- [10] 刘红强, 程坤, 于学健, 等. 黄水芽孢杆菌(*Bacillus aquiflavi* 3H-10)全基因组序列分析及功能探究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(15): 41–46.
- LIU HQ, CHENG K, YU XJ, *et al.* Genome sequence analysis and mining of *Bacillus aquiflavi* 3H-10 [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(15): 41–46.
- [11] 李洪飞, 孙大庆, 曹龙奎. 莱鲍迪忒 C 高效转化细菌 *Paenarthrobacter ilicis* CR5301 全基因组测序及关键糖苷酶分析[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 166–175.
- LI HF, SUN DQ, CAO LK. Whole genome sequencing and key glycosidase analysis of *Paenarthrobacter ilicis* CR5301, an efficient rebaudioside c-converting *Bacterium* [J]. Food Sci, 2022, 43(18): 166–175.
- [12] 艾雨晴. 纳豆芽孢杆菌发酵刺参中多糖的结构表征及消化特性研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2022.
- AI YQ. Structural characterization and digestive characteristics of polysaccharides from *Apostichopus japonicus* fermented by *Bacillus natto* [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2022.
- [13] 许楚旋, 江北, 张琪, 等. 紫色红曲霉 M-35 菌株产淀粉酶发酵条件和培养基配方的优化[J]. 湖南农业科学, 2017, 379(4): 5–10.
- XU CX, JIANG B, ZHANG Q, *et al.* Fermentation conditions and medium optimizing of *Monascus purpureus* strain M-35 producing high-yielding amylase [J]. Hunan Agric Sci, 2017, 379(4): 5–10.
- [14] 傅科鹤, 范莉莉, 陈慧颖, 等. 高产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(3): 214–218.
- FU KH, FAN LL, CHEN HY, *et al.* Screening of cellulase-producing strains and optimization of enzyme-producing conditions [J]. Jiangsu Agric Sci, 2021, 49(3): 214–218.
- [15] MOHANDAS A, RAVEENDRAN SH, PARAMESWARAN B, *et al.* Production of pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1 [J]. Food Technol Biotechnol, 2018, 56(1): 110–116.
- [16] 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.
- SUN HG, YU XD, CHEN ZX, *et al.* Screening and identification of a strain producing polyphenol oxidase with high activity and its enzymatic properties [J]. China Brew, 2021, 40(12): 103–108.
- [17] 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(4): 576–581.
- WANG YX, YANG H, LIU JJ, *et al.* Comparative analysis of main enzyme activities and chemical components of three tea cultivars in Guizhou [J]. Tea Commun, 2020, 47(4): 576–581.
- [18] 王伟伟, 江和源, 江用文, 等. 红茶萎凋处理温湿度条件对 PPO、POD 及茶多酚和色素的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 86–90.
- WANG WW, JIANG HY, JIANG YW, *et al.* Effect of different withering temperature and humidity conditions on activity of PPO, POD and black tea polyphenols and pigments [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(13): 86–90.
- [19] SUN Y, HUANG YY, LU T, *et al.* Temporal kinetics of changes in color, phytochemicals, γ -aminobutyric acid, enzyme activity and antioxidant activity of coffee leaves during postharvest storage [J]. Sci Hortic, 2022, 304: 110–113.
- [20] GAA R, ABREU MD, PINTO F, *et al.* *Phialomyces macrosporus* decreases anthracnose severity on coffee seedlings by competition for nutrients and induced resistance [J]. Biol Control, 2016, 103: 119–128.
- [21] 徐倩. 青砖茶渥堆过程中优势耐热菌对茶叶品质的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- XU Q. Effects of dominant thermophilic microorganisms on pile-fermentation processing of Qingzhuang Brick tea [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018.
- [22] 龚玉雷. 纤维素酶和果胶酶复合体系在茶叶提取加工中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.
- GONG YL. Study on tea extraction process of tea leaves with compound enzymes including cellulase and pectinase [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013.
- [23] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- ZHANG ZZ. Experimental course of tea biochemistry [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2009.
- [24] 李焱, 黄筑艳, 宴雨寒, 等. 紫茎泽兰中黄酮类色素含量的三氯化铝比色法测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1363–1364.
- LI Y, HUANG ZY, YAN YH, *et al.* Determination of flavonoids in *eupatorium adenophora* by $AlCl_3$ colorimetry [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(6): 1363–1364.
- [25] RIGDEN DJ, FERNÁNDEZ XM. The 2022 nucleic acids research database issue and the online molecular biology database collection [J]. Nucl Acids Res, 2022, 50: 4313–4330.
- [26] 贾仲昕, 赵佳男, 季芳, 等. 高产中性蛋白酶芽孢杆菌的筛选鉴定及酶学性质研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023, 2(1): 106–112.
- JIA ZX, ZHAO JN, JI F, *et al.* Study on screening, identification and enzymatic properties of high neutral protease-producing *Bacillus* [J]. Heilongjiang Anim Sci Ver Med, 2023, 2(1): 106–112.
- [27] 张运祺, 郑自强, 邢浩博, 等. 一株嗜热脂肪芽孢杆菌的筛选及其产酶特性研究[J]. 酿酒科技, 2023, 345(5): 78–84.
- ZHANG YQ, ZHENG ZQ, XING HB, *et al.* Screening a *Geobacillus stearothermophilus* strain and study on its enzyme-producing characteristics [J]. Liquor-Marking Sci, 2023, 345(5): 78–84.
- [28] AIQAHTANI YYS, SHAIKH IA, NIYONZIMA FN, *et al.* Production and purification of pectinase from *Bacillus subtilis* 15A-B92 and its biotechnological applications [J]. Molecules, 2022, 27(13): 4195–4195.
- [29] 张灵枝, 程楚镇, 李焱. 普洱茶渥堆过程主要酶系活性变化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 1–4.
- ZHANG LZ, CHENG CZ, LI Y. Change of major enzymes during pile-fermentation process of Pu-er tea [J]. Food Sci, 2010, 31(11): 1–4.

- [30] 刘琨毅, 王利妍, 安江珊, 等. 接种地衣芽孢杆菌发酵的普洱茶品质与微生物群落分析[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(2): 108–118.
LIU KY, WANG LY, AN JS, *et al.* Quality and microbial community analysis of fermented Pu-erh tea inoculated with *Bacillus licheniformis* [J]. J Food Sci Technol, 2022, 40(2): 108–118.
- [31] 张厅, 刘晓, 熊元元, 等. 四川黑茶渥堆过程中主要品质成分和茶汤色差变化及其相关性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(9): 154–162.
ZHANG T, LIU X, XIONG YY, *et al.* Correlation between main quality components and tea soup color of Sichuan dark tea during post-fermentation [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(9): 154–162.
- [32] 余书平, 尹军峰, 袁海波, 等. 小叶种红茶发酵外观色差及其主要品质成分相关性[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2201–2208.
YU SP, YIN JF, YUAN HB, *et al.* Appearance chromatic aberration of fermented leaves of small leaf black tea and correlation analysis of main quality components [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(6): 2201–2208.
- [33] 柴洁, 郭威, 杨超, 等. 普洱茶后发酵中咖啡碱变化研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2013, 42(2): 182–186.
CAI J, GUO W, YANG C, *et al.* Research progress in the variations of caffeine during the post-fermentation of Pu-erh tea [J]. Subtropical Plant Sci, 2014, 42(2): 182–186.
- [34] 郝彬秀, 李颂, 田海霞, 等. 普洱熟茶的发酵微生物研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(8): 203–206.
HAO BX, LI S, TIAN HX, *et al.* Research progress of fermented microber in Pu-erh tea [J]. Food Res Dev, 2018, 39(8): 203–206.
- [35] XU J, HU FL, WANG W, *et al.* Investigation on biochemical compositional changes during the microbial fermentation process of Fu brick tea by LC-MS based metabolomics [J]. Food Chem, 2015, (186): 176–184.
- [36] 付秀娟. 普洱茶发酵优势微生物、酶与主要功能物质关系的研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2012.
FU XJ. Study on predominant microorganism and enzyme and their relations to main functionality components during the fermentation process of Puer tea [D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2012.
- [37] WANG QP, PENG CX, GONG JS. Effects of enzymatic action on the formation of theabrownin during solid state fermentation of Puerh tea [J]. J Sci Food Agric, 2011, 91(13): 2412–2418.
- [38] 罗燕, 唐玉雪, 文敏, 等. 青砖茶渥堆过程中理化特性及细菌多样性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5128–5136.
LUO Y, TANG YX, WEN M, *et al.* Analysis of physicochemical property and bacterial diversity during the pile-fermentation of Qingzhuana tea [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(16): 5128–5136.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



潘雪莉, 硕士研究生, 主要研究方向为茶及类茶植物活性成分开发利用。

E-mail: 3043784308@qq.com



赵振军, 博士, 副教授, 主要研究方向为茶叶加工与综合利用。

E-mail: zzjswu@126.com