

茶叶厌氧发酵中咖啡碱的降解途径研究

张欢^{1*}, 黄友谊², 王成柳¹, 刘子涵¹, 周洁¹, 白颖新³

(1. 潍坊学院现代农学院/“十三五”山东省高等学校生物化学与分子生物学重点实验室, 潍坊 261061;
2. 华中农业大学园艺林学学院/果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室,
武汉 430070; 3. 泰山区农业农村局, 泰安 271000)

摘要: **目的** 探究茶叶厌氧发酵过程中咖啡碱的降解途径。**方法** 本研究利用高效液相色谱仪检测茶叶厌氧发酵过程中咖啡碱含量的变化, 结合对发酵中代谢组和微生物群落结构的分析, 获得厌氧发酵过程中咖啡碱的降解产物以及作用咖啡碱降解的微生物群。**结果** 经18 d发酵后, 茶叶中咖啡碱含量由37.05 mg/g显著下降至5.91 mg/g, 腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、依他茶碱和羟基腺嘌呤含量显著上升, 同时, 92个细菌属和16个真菌属的丰度显著上升。以上结果表明咖啡碱的降解途径主要通过脱甲基化反应生成黄嘌呤, 该反应的中间产物—茶碱, 可能与三乙胺生成依他茶碱; 细菌中芽孢杆菌(*Bacillus*)和赖氏菌(*Leifsonia*)等以及真菌赛博德林酵母菌(*Cyberlindnera*)、突脐蠕胞菌(*Exserohilum*)等可能是降解咖啡碱的关键微生物。**结论** 厌氧发酵可以显著降低茶叶咖啡碱的含量, 本研究结果可为低咖啡碱茶产品的研制提供参考。

关键词: 酸茶; 咖啡碱; 黄嘌呤; 微生物群; 降解

Degradation pathway of caffeine in tea anaerobic fermentation

ZHANG Huan^{1*}, HUANG You-Yi², WANG Cheng-Liu¹,
LIU Zi-Han¹, ZHOU Jie¹, BAI Ying-Xin³

(1. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in University of Shandong Province During the 13th Five-year Period, School of Advanced Agricultural Science, Weifang University, Weifang 261061, China; 2. National Key Laboratory for Germplasm Innovation & Utilization of Horticultural Crops, College of Horticulture and Forestry Science Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Taishan District Agriculture and Rural Bureau, Tai'an 271000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the the degradation pathway of caffeine during anaerobic fermentation of tea. **Methods** High performance liquid chromatography was used to detect the changes of caffeine during tea anaerobic fermentation. The metabolic and microbial community structures during fermentation were also analyzed to explore the degradation products of caffeine and the microbial communities that contribute to caffeine degradation. **Results** After 18 days of fermentation, the caffeine content in tea leaves decreased significantly from 37.05 mg/g to 5.91 mg/g, and the content of adenine, hypoxanthine, xanthine, etafylline and hydroxyadenine increased significantly. Meanwhile, the abundance of 92 bacterial genera and 16 fungal genera increased significantly. These results indicated that the degradation pathway of caffeine was mainly through demethylation to produce xanthine; theophylline, the intermediate product of the demethylation reaction, might form etafylline with triethylamine. Moreover, *Bacillus*,

基金项目: 博士科研启动基金项目(2023BS28)

Fund: Supported by the Doctoral Research Initiation Fund Project (2023BS28)

*通信作者: 张欢, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品功能微生物和酶技术应用方面的研究工作。E-mail: zhanghuanqnd2014@126.com

*Corresponding author: ZHANG Huan, Ph.D, Lecturer, Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in University of Shandong Province during the 13th Five-year Period, School of Advanced Agricultural Science, Weifang University, Weifang 261061, China. E-mail: zhanghuanqnd2014@126.com

Leifsonia in bacteria and *Cyberlindnera*, *Exserohilum* in fungi might be the key microbiota for caffeine degradation.

Conclusion The content of caffeine in tea can be significantly reduced by anaerobic fermentation, which will provide a reference for the development of low caffeine tea products.

KEY WORDS: pickled tea; caffeine; xanthine; microbiota; degradation

0 引言

茶(*Camellia sinensis*)因富含茶多酚、生物碱、氨基酸和维生素等活性成分而具有抗氧化、降血脂和抑菌抗癌等多种保健功能^[1]。咖啡碱(1,3,7-三甲基黄嘌呤, caffeine)是茶叶中最主要的生物碱,占干物质含量的2%~5%^[2],冲泡时会溶于茶汤中,是茶汤重要的滋味成分之一,其具有提神醒脑、控制体重、解热镇痛等功效,且能有效防治阿尔兹海默症和糖尿病^[3]。然而,过量摄入咖啡碱会引起肠胃功能失调、心悸、焦虑等不适症状,咖啡碱敏感的人群一次性摄入10 mg便会引起睡眠障碍,甚至心血管问题^[4]。因此,低咖啡碱茶产品(国内标准为咖啡碱含量小于1%)成为人们关注的热点。

茶产品中的咖啡碱一直是人们研究的热点。不同茶类中咖啡碱的含量具有显著差异^[5],黑茶在发酵过程中的优势菌^[6-8]对咖啡碱有降解作用,因此,咖啡碱在这类发酵茶中的相对含量较低。利用冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)发酵绿茶水^[9]、曲霉(*Aspergillus sydowii*)发酵绿茶^[10]、酵母菌(*Dabaryomyces hansenii*)发酵红茶^[11]、青霉菌(*Penicillium simplicissimum*)发酵青砖茶^[12],均可以显著降低咖啡碱含量。然而,因发酵原料、菌种、发酵条件的不同,咖啡碱在不同发酵茶中的降解途径和降解产物存在差异,尚需进行研究。

酸茶(pickled tea)是我国云南省传统的特色厌氧发酵茶,其口感呈现酸味、微甜、涩味和天然苔藓味^[13],也可作为零食、配菜和沙拉来食用^[14]。同时,具有提神解渴和利于消化的功能^[15],近年来受到广泛关注。值得注意的是,潘联云等^[16]认为厌氧发酵会降低咖啡碱的含量从而减少酸茶的苦涩味,利于柔和醇厚滋味品质的形成。然而,咖啡碱在酸茶厌氧发酵中的降解途径尚不清楚。为此,本研究拟探讨酸茶厌氧发酵过程中咖啡碱含量的变化,并基于厌氧发酵过程中代谢物和菌群变化解析降解咖啡碱的微生物及其降解产物,阐述厌氧发酵中咖啡碱的降解途径,以促进低咖啡碱茶产品开发。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

福鼎大白(*Camellia sinensis*)茶树鲜叶于2019年6月8日采自华中农业大学茶学实验基地(地理位置:114°22'E、30°28'N),鲜叶规格为一芽三、四叶。

超纯水、乙腈、甲酸(色谱纯,美国赛默飞世尔科技公司);甲醇、乙酸(色谱纯,美国Tedia公司);咖啡碱标准品(纯度99.9%,上海源叶生物科技有限公司)。

PTX-FA110 电子天平(精度0.1 mg,福州华志科学仪器有限公司);FreeZone 4.5 冷冻干燥机(美国Labconco公司);LEGEND MACH 1.6R 离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);HPLC1200 高效液相色谱仪、C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.60 mm, 0.45 μm)(美国安捷伦科技有限公司);TripleTOF[®]5600TM 高分辨质谱仪(美国AB Sciex公司);BEH C₁₈ 反向色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国Waters公司)。

1.2 茶样制备

采摘后的茶鲜叶在室温(25~26℃)下进行自然萎凋(约5 h,每1 h翻一次),至茶叶含水量约为70%左右时,于龙井锅中杀青(150℃,8 min)。杀青叶及时冷却后,至揉捻机中揉捻(40 min)。揉捻叶(含水量约为50%)部分用于厌氧发酵实验,剩余部分样品保存于-80℃下备用。取少量发酵0 d的揉捻叶,作为对照组。取约120 g揉捻叶装入100 mL发酵罐中,边装边压紧,至刚好装满发酵罐,拧紧盖,使其达到完全密封。装好后,所有发酵罐置于37℃恒温箱中发酵30 d。每隔6 d,随机选取3个发酵罐在超净工作台上取发酵样,作为3个生物学重复。将收集后的样品平均分为两份,一份用于微生物群落分析,另一份经冷冻干燥机冻干(-42℃,3 d)后,用于后续的咖啡碱和代谢物分析。

1.3 方法

1.3.1 茶叶含水量和咖啡碱含量检测

茶叶含水量的测定(120℃烘干法)参照GB/T 8304—2013《茶水浸出物测定》。

咖啡碱含量的提取与检测:将0.3 g冻干茶粉加入5 mL混合提取液(水:甲醇=3:7, V:V)中,充分混匀后静置提取(4℃,12 h)。将提取液进行离心(8000 r/min,4℃,10 min),收集上清液,用0.22 μm 无菌针头过滤器聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)滤膜过滤,取1 mL过滤后的上清液用于高效液相色谱仪检测咖啡碱含量。使用C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.60 mm, 0.45 μm),A相为甲醇,B相为水(1%甲酸, V:V)溶液,流速0.6 mL/min,梯度洗脱^[22],在278 nm处检测。在相同液相条件下,制作咖啡碱标准曲线(方程为 $Y=0.0539X+5.0732$, $r^2=0.987$)。

1.3.2 代谢物检测

非靶代谢组学的检测流程参照ZHANG等^[17]方法。在

800 μL 水:甲醇:乙腈(1:6:1, V:V:V)的混合提取液中加入冷冻茶粉(50 mg), 振荡摇匀 60 s, 于 -20°C 下提取 30 min。随后, 将提取液进行离心(1300 r/min, 4°C , 15 min), 将收集的上清液进行过滤(0.22 μm PTFE), 于高分辨质谱仪检测。选用 BEH C_{18} 反向色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm), A 相为超纯水(1%甲酸), B 相为乙腈:异丙醇(1:1, V:V), 以 0.4 mL/min 流速进行梯度洗脱, 在一定的质谱检测参数下获得各物质的 MS 数据^[17]。同时, 混合所有检测的茶样本作为质量控制(quality control, QC)样本, 与分析样本在同等液相色谱-质谱条件下进行检测, 检验以上分析系统检测代谢物的稳定性。正负离子色谱图均使用 Progenesis Q1 软件(美国, v 3.0)进行基线过滤、峰值提取、信号积分和基于特定参数的初始峰值分布等处理, 再对代谢物的峰强度使用峰面积进行归一化处理^[17]。基于各个代谢物在特定电离模式下的 MSⁿ 数据以及紫外光谱等基本参数值, 通过与 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)和 Metlin (<http://metlin.scripps.edu/>)数据库比对, 获得代谢物的名称和分类等定性信息。

1.3.3 微生物 DNA 提取、扩增与测序

使用 DNA 提取试剂盒提取发酵茶鲜样(2 g)中的微生物总 DNA, 在 NanoDrop 2000(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)上测定 DNA 浓度, 使用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。使用 799F/1193R^[18](5'-AACMGGATAGATACCCCKG-3'和 5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3')和 ITS1F/ITS2R^[19]引物(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAA GTAA-3'和 5'-GCTGCGTTCCTCATCGATGC-3')分别扩增细菌 16S rRNA 基因的 V5-V7 区域和真菌内源转录间隔区(internally transcribed spacer, ITS)基因的 ITS1 区域。经 PCR 扩增后, 所获扩增子在 Illumina MiSeq 平台(PE 300)上进行测序, 由上海美吉生物医药科技有限公司完成。原始数据已提交至美国国家生物技术信息中心(national center of biotechnology information, NCBI)的 ReadArchive (SRA)数据库, 检索号为 SRP285199。对获得的高通量序列进行筛选和过滤, 后对所获样本的有效分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)序列进行物种注释以及生物信息学分析, 包括 OUT 分类、分类归属、群落丰富度等^[17]。选用属水平上的物种相对丰度值进行组间差异比较, 揭示发酵过程中微生物群落结构的差异性。

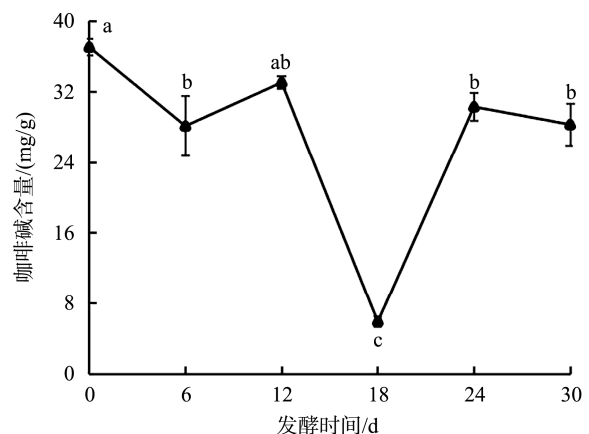
1.4 数据处理

本研究中所有实验均重复 3 次。使用 SPSS(v19.0)统计软件对咖啡碱的定量数据进行方差分析(analysis of variance, ANOVA), 经最小显著性差异法(least-significant difference, LSD)检验, 数据均为平均值 \pm 标准偏差, $P < 0.05$ 为显著性水平; 使用 ChemDraw20.0 绘制化学结构式; 用 R 统计软件计算相关系数(Pearson R); 利用 Cytoscape(v 3.7.1)展示咖啡碱与微生物属之间的相关性网络图。

2 结果与分析

2.1 酸茶厌氧发酵中咖啡碱的含量变化

对酸茶厌氧发酵全过程中的咖啡碱含量进行了分析, 结果如图 1。从图 1 可见, 在酸茶厌氧发酵前咖啡碱的初始含量为 37.05 mg/g, 发酵 18 d 后咖啡碱含量显著下降至 5.91 mg/g ($P < 0.05$), 随后其含量又呈现显著上升趋势, 至发酵 30 d 时咖啡碱含量为 28.35 mg/g(图 1); 这说明厌氧发酵可以显著降低发酵茶中咖啡碱的含量, 而确定适当的发酵时间是获得低咖啡碱茶的关键。咖啡碱在不同类型的发酵茶中存在不同的变化趋势, 例如, 厌氧型发酵茶如 Miang 茶^[20]中咖啡碱的含量呈现下降趋势, 好氧型发酵茶如普洱茶^[21]、青砖茶^[22]的渥堆发酵中则呈现波动变化或略呈下降的趋势。发酵原料、微生物种类等差异直接影响发酵中代谢产物的特性。因此, 低氧、酸性的厌氧发酵环境下独特的微生物菌群可能是引起咖啡碱剧烈变化的主要原因。



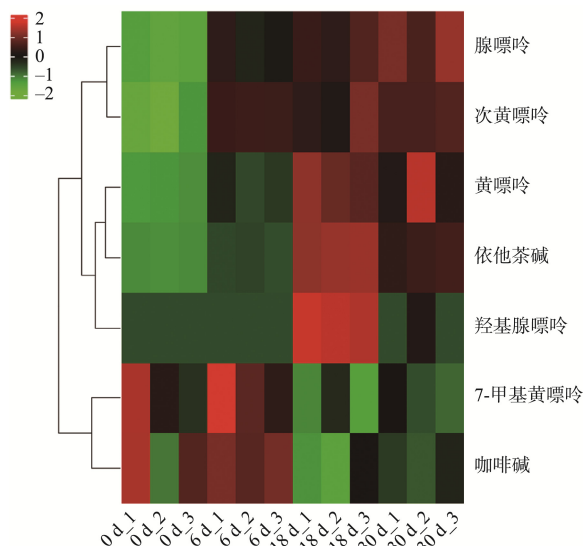
注: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同。

图 1 酸茶厌氧发酵过程中咖啡碱的含量变化
Fig.1 Changes of caffeine content in pickled tea during anaerobic fermentation

2.2 酸茶厌氧发酵中咖啡碱的降解途径

探究茶叶厌氧发酵中咖啡碱的降解途径, 更有利于了解咖啡碱降解的机制。在之前的研究中, 利用非靶代谢组学技术全面检测了厌氧发酵过程中(0、6、18、30 d)茶叶代谢成分, 共鉴定出 3840 种物质; 以变量投影重要性(variable importance in projection, VIP) > 1 和 $P < 0.05$ 为阈值在 3 个比较组合(0 vs 6 d、0 vs 18 d 和 0 vs 30 d)中进行了差异代谢物的筛选, 共筛选出 428 种产生显著变化的差异代谢物(图 2), 这些差异代谢物主要涉及脂类、黄酮类、有机酸及其衍生物类等物质^[17]。咖啡碱的代谢产物主要是嘌呤生物碱类物质^[23]。基于代谢组学的分析, 发现厌氧发酵茶中有 11 种嘌呤及其衍生物类物质, 包括: 咖啡碱、鸟嘌呤、可可碱、7-甲基鸟嘌呤、土壤杆菌素 84、腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、依他茶碱、羟基腺嘌呤、7-甲基黄嘌呤; 其中, 咖啡碱、腺嘌呤、

次黄嘌呤、黄嘌呤、依他茶碱、羟基腺嘌呤和 7-甲基黄嘌呤等在发酵过程中产生了显著变化($P < 0.05$) (图 2); 值得注意的是, 非靶代谢组学中咖啡碱相对丰度值的变化, 与咖啡碱的定量检测结果相同(图 1); 咖啡碱相对丰度值的降低主要表现在发酵前 18 d 内(0~18 d), 在此期间, 7-甲基黄嘌呤也显著下降, 而腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、依他茶碱、羟基腺嘌呤均呈现上升的趋势, 但在 18~30 d 发酵中, 除了羟基腺嘌呤的相对丰度值降低, 其他 4 种物质的相对丰度值则基本保持稳定(图 2)。

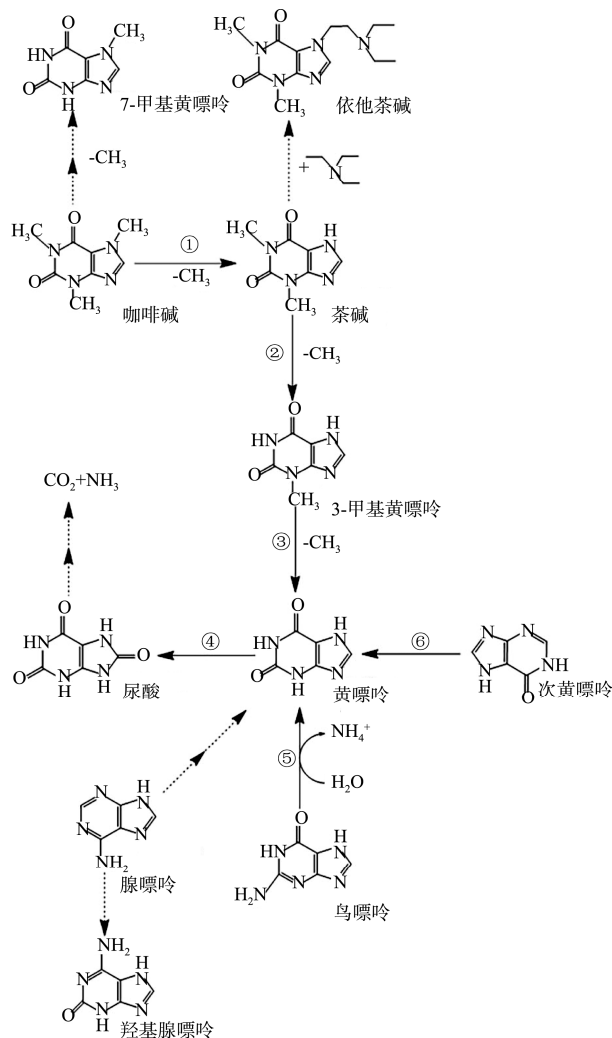


注: 每一行代表一个代谢物在发酵过程中的变化趋势, 红色和绿色分别代表在发酵样本中含量相对较高和较低; 0 d: 未发酵的揉捻叶, 6~30 d: 发酵样本。

图 2 7 种嘌呤生物类物质在茶叶厌氧发酵过程中的变化
Fig.2 Changes of 7 kinds of purine alkaloid during anaerobic fermentation of tea

咖啡碱的降解途径主要有 N-脱甲基化和氧化途径, 即咖啡碱首先经 3 步脱甲基化生成黄嘌呤: 咖啡碱→茶碱→3-甲基黄嘌呤→黄嘌呤, 黄嘌呤再经氧化途径转化成尿酸, 最终生成 CO_2 和 NH_3 [24-25]。还存在咖啡碱→1,7-二甲基黄嘌呤→7-甲基黄嘌呤辅助降解途径 [8,10,26], 也有报道发现咖啡碱会依次降解为茶碱和可可碱(3,7-二甲基黄嘌呤) [27-28]。本研究发现, 伴随着厌氧发酵茶中咖啡碱含量的下降, 茶碱和 3-甲基黄嘌呤并没有显著变化, 但 7-甲基黄嘌呤却显著下降(图 2), 因而可以认为这 3 种物质不会是咖啡碱降解的积累产物; 而黄嘌呤含量在咖啡碱降低的同时却显著上升, 由此可认为黄嘌呤是 N-脱甲基作用下咖啡碱降解的主要产物(图 3), 这与已知脱甲基化反应是咖啡碱在微生物发酵茶中的主要降解方式一致 [29]。同时, 黄嘌呤作为咖啡碱的关键降解产物已在多种茶叶发酵中被报道, 多数研究在该降解途径中发现了茶碱、3-甲基黄嘌呤等中间产物 [8,26], 尽管这些中间产物在酸茶发酵中并未被检测

到, 但本研究发现依他茶碱的含量在咖啡碱降解的过程中显著上升(图 2); 根据其化学结构, 推测依他茶碱可能由茶碱与三乙胺生成, 然而关于茶叶中依他茶碱的研究报道较少, 该步转化尚需进一步证实。本研究初步认为, 厌氧发酵茶中咖啡碱在脱甲基化作用下的主要产物为黄嘌呤, 其中间产物—茶碱, 可能与三乙胺生成依他茶碱(图 3)。



注: ① 7-N-脱甲基酶; ② 1-N-脱甲基酶; ③ 3-N-脱甲基酶; ④ 黄嘌呤氧化酶; ⑤ 鸟嘌呤脱氨酶; ⑥ 黄嘌呤脱氢酶。

图 3 厌氧发酵茶中咖啡碱可能的降解途径
Fig.3 Possible degradation pathways of caffeine in anaerobic fermentation of tea

黄嘌呤, 作为咖啡碱发生脱甲基化反应后的关键产物, 会在黄嘌呤氧化酶的作用下生成尿酸 [24-25], 然而, 厌氧发酵茶中尚未检测到尿酸等黄嘌呤下游的代谢物。WU 等 [30] 认为茶叶代谢物, 特别是没食子酸, 会显著抑制黄嘌呤氧化酶活性, 从而减少尿酸的生成。值得注意的是, 厌氧发酵茶富含没食子酸, 特别是发酵 18 d 时, 没食子酸的含量达到最高值 [17], 因此, 高含量的没食子酸可能是黄嘌呤无

法被有效转化成尿酸的关键因素。另外, 本研究发现次黄嘌呤、腺嘌呤和羟基腺嘌呤的含量伴随黄嘌呤含量的增加也被显著提高(图 2)。次黄嘌呤是生成黄嘌呤的直接前体物之一, 而腺嘌呤经多步核苷水解反应对黄嘌呤的积累也有一定的促进作用^[31]。羟基腺嘌呤在发酵中显著上升可能是部分腺嘌呤被羟基化的结果(图 3)。由此可见, 厌氧发酵不仅会促进咖啡碱转化生成黄嘌呤, 也会通过调控嘌呤核苷酸代谢途径来促进黄嘌呤的生成(图 3)。在后期研究中, 需定量检测黄嘌呤、咖啡碱以及以上几种嘌呤代谢物在发酵过程中的变化, 以进一步明确咖啡碱的降解途径。

咖啡碱的含量在发酵前 18 d 内逐渐下降至最低点, 随后出现 V 形急剧反转(图 1)。结合以上分析, 咖啡碱在发酵前期可能发生了脱甲基化反应形成黄嘌呤导致其含量降低(图 3)。然而, 这种降解反应并没有伴随发酵而持续进行, 这可能是发酵后期湿度、pH 和微生物及其酶活性的改变抑制了该降解途径的进行。另外, 发酵中结合态咖啡碱的存在可能也是游离咖啡碱含量降低的重要因素, 结合态咖啡碱的形成与多酚、糖类物质的转化和聚合密切相关^[32]。酸茶发酵的进行伴随可溶性糖、茶多酚以及黄烷三醇等酚类

物质的多种复杂转化反应^[13,17], 这些物质的含量变化是否与结合态咖啡碱的形成和解离有关, 值得后续进一步研究。

2.3 厌氧发酵中降解咖啡碱的微生物

微生物是降解咖啡碱的主要驱动力。为了解厌氧发酵过程中促进咖啡碱降解的关键菌群, 利用发酵中(0、6、18 和 30 d)具有显著变化的细菌属和真菌属的丰度值^[17], 分别与咖啡碱的含量进行线性相关性分析。结果发现, 不存在与咖啡碱呈显著正相关的菌属($P < 0.05$), 共有 108 个微生物属(包括 16 个真菌属和 92 个细菌属)与咖啡碱的含量变化存在显著的负相关性($P < 0.05$), 相关值在-0.95至-0.98之间(图 4); 其中, 细菌中有 66 个菌属以及 26 个未被分类的菌属, 例如 *g__unclassified_f__Bacillaceae*、*g__unclassified_f__Rhodobacteraceae* 和 *g__unclassified_f__Micromonosporaceae* 等, 真菌中有 9 个真菌属(图 4)以及 *g__unclassified_f__Pyronemataceae*、*g__unclassified_f__Pleosporales_fam__Incertae_sedis* 和 *g__unclassified_f__Chaetosphaeriaceae* 等 7 个未被分类的菌属(图 4)。由图 5 可知, 这些菌属的丰度值在 0~18 d 内显著上升, 由此本研究推测厌氧发酵可能会通过提高这些微生物的活性进而促进咖啡碱的降解。



注: 节点(圆圈)对应于咖啡碱或微生物属; 节点和线条的不同颜色相对应的属性展示在图例中。

图 4 厌氧发酵中咖啡碱和菌属的相关性网络图

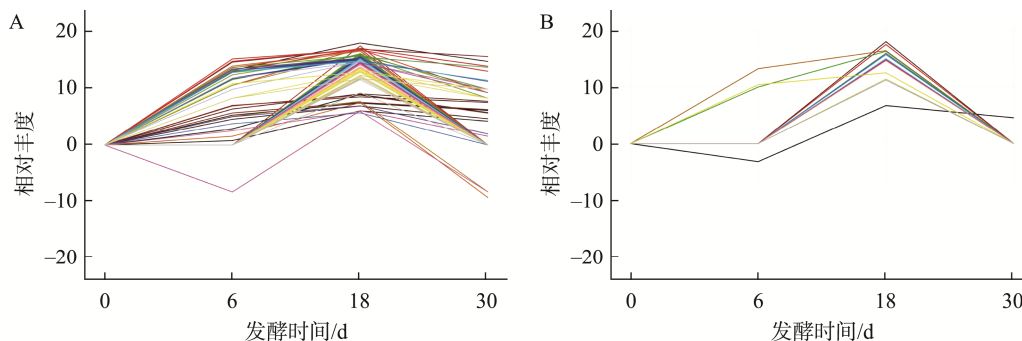
Fig.4 Correlation network diagram of caffeine and microbial genera in anaerobic fermentation

微生物为适应氧气含量降低、pH下降、水浸出物增加等厌氧发酵环境,不断进行着群落更替。之前的研究表明,酸茶发酵中细菌群落的丰富度和多样性变得越来越高^[17]。在发酵中后期(18~30 d),占细菌总类群的百分比比较高的菌属有:罗尔斯通菌属(*Ralstonia*) (18.9%~14.2%)、微杆菌属(*Microbacterium*) (8.9%~9.2%)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*) (6.3%~9.5%)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*) (4.5%~4.8%)和 *Aureimonas* (3.6%~4.7%)^[17]。与咖啡碱降解显著相关的66个菌属(图4)在发酵前期(0~18 d)丰度逐渐上升,因此与含量显著降低的咖啡碱呈显著负相关(图5A)。然而本研究发现,这些微生物在整个细菌群落中丰度较低,属于中低丰度的细菌。同时,发酵后期(18~30 d)细菌群落结构整体趋向复杂、多样性,与咖啡碱降解相关的中低密度菌属却呈现逐渐消亡的状态。在这些菌属中,芽孢杆菌属(*Bacillus*) (11.9%)在厌氧发酵18 d时丰度占比相对较高,其次为丹皮菌属(*Paeniclostridium*) (0.7%)、*Denitratisoma* (0.6%)和阿马里科球菌属(*Amaricoccus*) (0.6%),剩余菌属的丰度均低于0.3%^[17]。已有研究证实解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)可以将咖啡碱依次去甲基化,转化形成可可碱、对黄嘌呤、黄嘌呤等,且没有不良物质产生^[32]; VEGA等^[33]也发现了多个 *Bacillus* 菌株

能够通过作用咖啡碱的C8氧化途径降解咖啡果中的咖啡碱。据此,本研究推测芽孢杆菌在酸茶发酵中对咖啡碱的降解可能有着一定贡献。

随着发酵的持续进行,真菌逐渐演变成成为以曲霉属为绝对优势菌的菌群,发酵结束(30 d)时曲霉属占真菌总类群的88.6%^[17]。本研究发现,与咖啡碱降解相关的9个真菌属,相比于曲霉属,其在真菌总类群中占比较低(<1%),这些菌属在发酵前期(0~18 d)丰度逐渐上升,发酵后期(18~30 d)逐渐趋向消亡(图5B)。其中,赛博德林酵母菌(*Cyberlindnera*)^[34]在康普茶中已被证实具有降解咖啡碱的能力,被孢霉属(*Mortierella*)^[35]、爪甲白癣菌(*Arthrographis*)^[36]报道能分泌出多种与糖、纤维素降解相关的酶蛋白,推测这些真菌在酸茶发酵中可能会促进茶叶细胞壁的溶解进而利于咖啡碱的代谢反应。

综合上述分析,基于相关性分析所认识到的这些与咖啡碱降解相关的细菌和真菌,在其他发酵茶类中的研究报道较少,可能这些微生物是酸茶发酵中所特有的,其对咖啡碱的降解作用尚需进一步探讨,而发酵中的优势微生物,特别是分泌N-脱甲基酶以及促进结合态咖啡碱释放的水解酶的功能微生物的分离、鉴定以及优势菌种发酵茶叶等实验的开展是十分有必要的。



注: A 细菌属; B 真菌属; 图中每条线代表一个菌属。

图5 与咖啡碱具有显著相关性的微生物属的趋势变化

Fig.5 Trends in microbial genera with significant correlation with caffeine

3 结论

本研究对茶叶厌氧发酵过程中咖啡碱的含量变化及其降解产物进行分析,并对降解咖啡碱的微生物进行探讨。结果发现,厌氧发酵18 d可以显著降低咖啡碱的含量,咖啡碱的降解产物主要是依他茶碱、黄嘌呤和腺嘌呤等物质;发酵中较多低丰度菌属与咖啡碱的降解存在显著相关性,其中,芽孢杆菌(*Bacillus*)和赖氏菌(*Leifsonia*)等92个细菌属以及赛博德林酵母菌(*Cyberlindnera*)、突脐蠕胞菌(*Exserohilum*)等16个真菌属可能是降解咖啡碱的主要微生物

菌群。因此,酸茶有望成为一款低咖啡碱的茶产品,而合理的发酵时间是生产低咖啡碱茶产品的关键,这将为定向开发低咖啡碱茶产品提供理论基础。

参考文献

- [1] KOTTAWA-ARACHCHI JD, GUNASEKARE MTK, RANATUNGA MAB. Biochemical diversity of global tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] germplasm and its exploitation: A review [J]. Genet Resour Crop Evol, 2019, 66: 259-273.
- [2] 闫振, 黄健奎, 高路, 等. 茶树体内咖啡碱生物代谢研究进展[J]. 中国

- 茶叶, 2020, 42(7): 7.
- YAN Z, HUANG JY, GAO L, *et al.* Research progress on the biological metabolism of caffeine in tea plants [J]. *China Tea*, 2020, 42(7): 7.
- [3] HECKMAN MA, WEIL J, MEJIA EG. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(3): R77–R87.
- [4] WIKOFF D, WELSH BT, HENDERSON R, *et al.* Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 109(1): 585–648.
- [5] YONG L, SONG Y, XIAO X, *et al.* Quantitative probabilistic assessment of caffeine intake from tea in Chinese adult consumers based on nationwide caffeine content determination and tea consumption survey [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 165: 113102.
- [6] QIN JH, LI N, TU PF, *et al.* Change in tea polyphenol and purinealkaloid composition during solid state fungal fermentation of post fermented tea [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(5): 1213–1217.
- [7] ZHOU BX, MA CQ, WANG HZ, *et al.* Biodegradation of caffeine by whole cells of tea-derived fungi *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus niger* and optimization for caffeine degradation [J]. *BMC Microbiol*, 2018, 18(1): 53.
- [8] ZHOU BX, MA CQ, REN XY, *et al.* LC-MS/MS-based metabolomic analysis of caffeine-degrading fungus *Aspergillus sydowii* during tea fermentation [J]. *J Food Sci*, 2020, 85: 477–485.
- [9] 许瑞瑞, 李立详, 倪媛, 等. 绿茶液冠状散囊菌发酵期间品质变化的研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2010, 37(3): 478–482.
- XU RR, LI LX, NI Y, *et al.* Changes of the quality of green tea liquid fermented with *Eurotium cristatum* [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2010, 37(3): 478–482.
- [10] 郑城钦, 马存强, 张正艳, 等. 茶叶微生物固态发酵中咖啡碱降解途径初探[J]. *茶叶科学*, 2020, 40(3): 386–396.
- ZHENG CQ, MA CQ, ZHANG ZY, *et al.* A preliminary study on the degradation pathway of caffeine in tea microbial solid-state fermentation [J]. *J Tea Sci*, 2020, 40(3): 386–396.
- [11] PASHA C, REDDY G. Nutritional and medicinal improvement of black tea by yeast fermentation [J]. *Food Chem*, 2005, 89(3): 449–453.
- [12] YU ZL, DENG HH, QU H, *et al.* *Penicillium simplicissimum* possessing high potential to develop decaffeinated Qingzhuan tea [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 165: 113606.
- [13] HUANG YY, LIU C, XIAO XD. Quality characteristics of a pickled tea processed by submerged fermentation [J]. *Int J Food Prop*, 2016, 19: 6, 1194–1206.
- [14] HIASA M, KUROKAWA M, OHTA K, *et al.* Identification and purification of resorcinol, an antioxidant specific to Awa-ban (pickled and anaerobically fermented) tea [J]. *Food Res Int*, 2013, 54: 72–80.
- [15] ADAMCZAK A, OZAROWSKI M, KARPINSKI TM. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants [J]. *J Clin Med*, 2019, 9(1): 109.
- [16] 潘联云, 赵碧, 冉隆珣, 等. 厌氧发酵促进酸茶中抗氧化物质生成的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2023. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033176.
- PAN LY, ZHAO B, RAN LX, *et al.* Research progress of anaerobic fermentation to promote antioxidant substances synthesis in pickled tea [J]. *Food Ferment Ind*, 2023. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033176
- [17] ZHANG H, LIU YZ, XU WC, *et al.* The metabolite and microbiome profilings of pickled tea elucidates the role of anaerobic fermentation in promoting high levels of gallic acid accumulation [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68: 13751–13759.
- [18] BULGARELLI D, GARRIDO-OTER R, MUNCH PC, *et al.* Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17: 392–403.
- [19] ADAMS RI, MILETTO M, TAYLOR JW, *et al.* Dispersal in microbes: Fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances [J]. *ISME J*, 2013, 7: 1262–1273.
- [20] KODCHASEE P, NAIN K, ABDULLAHI AD, *et al.* Microbial dynamics-linked properties and functional metabolites during Miang fermentation using the filamentous fungi growth-based process [J]. *Food Biosci*, 2021, 41: 100998.
- [21] LIANG Y, ZHANG L, LU J. A study on chemical estimation of Pu-erh tea quality [J]. *J Sci Food Agric*, 2005, 85: 381–390.
- [22] 黄逢阳, 谭倩怡, 张娜, 等. 青砖茶的加工工艺、品质及生理作用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(20): 104–111.
- HUANG FY, TAN QY, ZHANG N, *et al.* Research progress on the processing, quality, and physiological action of Qingzhuan tea [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(20): 104–111.
- [23] GONCALVES BD, WINDSON IHC, CRISTINA PA, *et al.* Processing chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview [J]. *Food Chem X*, 2021, 12: 100160.
- [24] ASHIHARA H, SANO H, CROZIER A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(4): 841–856.
- [25] MAZZAFERA P. Catabolism of caffeine in plants and microorganisms [J]. *Frontiers in Biosci*, 2004, 9: 1348–1359.
- [26] HAKIL M, DENIS S, VINIEGRA-GONZALEZ G, *et al.* Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi [J]. *Enzyme Microb Tech*, 1998, 22(5): 355–359.
- [27] DASH SS, GUMMADI SN. Biodegradation of caffeine by *Pseudomonas* sp. NCIM 5235 [J]. *Res Microbiol*, 2010, 5(5): 395–403.
- [28] 周晨阳, 金基强, 姚明哲, 等. 茶树等植物中嘌呤生物碱代谢研究进展[J]. *茶叶科学*, 2011, 31(2): 87–94.
- ZHOU CY, JI JQ, YAO MZ, *et al.* Progress on purine alkaloids metabolism in tea and other plants [J]. *J Tea Sci*, 2011, 31(2): 87–94.

- [29] MCCARTHY AA, MCCARTHY JG. The structure of two N-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(2): 879–889.
- [30] WU D, CHEN H, ZHANG WJ, *et al.* Tea and its components reduce the production of uric acid by inhibiting xanthine oxidase [J]. *J Food Nutr Res*, 2022, 66: 10.29219.
- [31] ZRENNER R, STITT M, SONNEWALD U, *et al.* Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 805–836.
- [32] JIANG YL, LU Y, HUANG Y, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-12 heterologously expressing *NdmABCDE* with higher ability of caffeine degradation [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 109: 387–394.
- [33] VEGA FE, EMCHE S, SHAO J, *et al.* Maul cultivation and genome sequencing of bacteria Isolated from the coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*), with emphasis on the role of caffeine degradation [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 644768.
- [34] YANG JP, LAGISHETTY V, KURNIA P, *et al.* Microbial and chemical profiles of commercial kombucha products [J]. *Nutrients*, 2022, 14: 670.
- [35] LEE JV, FURMAN R, AXELSEN PH. Biosynthesis of uniformly labeled 13C- and 14C-arachidonic acid in *Mortierella alpine* [J]. *Bioresour Technol*, 2017, 227: 142–146.
- [36] OKEKE BC, OBI SK. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species [J]. *World J Microbiol*, 1993, 9: 345–349.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介

张欢, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品功能微生物和酶技术应用方面的研究工作。

E-mail: zhanghuanqnd2014@126.com