

微生物对茶叶中嘌呤生物碱代谢的研究进展

马存强¹, 杨超¹, 周斌星^{1,2,*}, 任小盈¹, 李静¹, 李发志³

(1. 云南农业大学龙润普洱茶学院, 云南 昆明 650201; 2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036;

3. 云南省保山市隆阳区茶叶技术推广站, 云南 保山 678000)

摘要: 嘌呤碱是茶叶中重要的内含物质, 常应用于医疗保健和食品饮料等行业。在黑茶渥堆和茶叶微生物发酵期间嘌呤碱出现种类和含量的变化。为探究微生物与嘌呤碱代谢的关系, 本文对近年国内外相关研究进行综述, 发现不同微生物单菌种发酵对嘌呤碱含量和种类影响不一, 顶头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*) 能显著提高茶叶中咖啡碱含量; 烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、乳酸菌 (*Lactobacillus*)、醋酸型乳酸菌 (acetic acid *Lactobacillus*) 等对嘌呤碱含量影响不大; 酵母菌 (yeast)、聚多曲霉 (*Aspergillus sydowii*) 对咖啡碱有降低作用; 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 对嘌呤碱代谢影响存在争议; 咖啡碱与茶叶碱存在消长关系。

关键词: 茶叶; 微生物; 嘌呤碱; 咖啡碱; 代谢

Recent Progress in Microbial Metabolism of Purine Alkaloids in Fermented Tea

MA Cun-qiang¹, YANG Chao¹, ZHOU Bin-xing^{1,2,*}, REN Xiao-ying¹, LI Jing¹, LI Fa-zhi³

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

2. College of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3. Yunnan Province Baoshan City Longyang Tea Technical Extension Station, Baoshan 678000, China)

Abstract: As important substances present in tea, purine alkaloids are often employed in medicine and health care as well as drinks. The kinds and contents of purine alkaloids are potentially changed during microbial fermentation of tea. After reviewing recent literature regarding the association of microorganisms with the metabolism of purine alkaloids in fermented tea, this article finds that different strains, when used individually to ferment tea, have different effects on the kinds and contents of purine alkaloids. *Cephalosporium acremonium* can substantially enhance caffeine contents in tea, *Aspergillus fumigatus*, *Lactobacillus*, and acetic acid *Lactobacillus* have little impact on the contents purine alkaloids, and yeast and *Aspergillus sydowii* NRRL 250 can reduce caffeine contents. However, the effect of *Aspergillus niger* on purine alkaloid metabolism remains controversial. In addition, a trade-off relationship between caffeine and theophylline exists during tea fermentation.

Key words: tea; microorganism; purine alkaloids; caffeine; metabolism

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 21-0292-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201421057

茶叶年人均消费量已达0.5 kg, 已经超过咖啡、啤酒、葡萄酒和碳酸饮料, 成为第一大饮料^[1]。这得益于人们对茶叶保健功效的认识和认可。大量在人体、动物和实验室状态下的研究表明, 茶叶具有减少腰部脂肪堆积^[2]、抗炎杀菌^[2-3]、抗氧化^[4]、减少动脉粥样硬化机率^[5]和一定的防癌抗癌^[6-8]等功效作用。这得益于茶叶中的功能成分, 如茶多酚、茶色素、茶多糖、氨基酸等。嘌呤类生物碱亦是茶叶中重要的呈味物质和功能成分。

1 茶叶中嘌呤生物碱的种类和功效

茶叶生物碱主要为嘌呤类生物碱以及少量的嘧啶类生物碱。嘌呤类生物碱有咖啡碱 (1,3,7-三甲基黄嘌呤, caffeine)、茶碱 (1,3-二甲基黄嘌呤, theophylline)、可可碱 (3,7-二甲基黄嘌呤, theobromine)、黄嘌呤 (xanthine)、次黄嘌呤 (hypoxanthine)、拟黄嘌呤 (1,7-二甲基黄嘌呤, paraxanthine), 以及在云南省苦茶中首次分离出的苦茶碱 (1,3,7,9-四甲基尿酸,

收稿日期: 2013-12-27

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2007BAD58B03); 保山市科技项目-保山市特种茶叶开发与研究项目

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

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

theacrine)^[9]和云南普洱熟茶中分离鉴定出的8-氧化咖啡因(8-oxocaffeine)^[10]。其结构特点是以嘌呤环为基本骨架,嘌呤碱的种类取决于嘌呤环上甲基的位置和个数。嘧啶类生物碱有胸腺嘧啶脱氧核苷(deoxythymidine)、胸腺嘧啶(hymine)、尿嘧啶(uraci)。在普通品种中,咖啡碱占干质量的2%~4%,可可碱约占0.05%,茶碱约占0.002%。

生物碱的种类和含量受到茶树生长的季节、品种以及茶叶加工工艺不同的影响。Wang等^[11]对2009年4—9月生长的茶鲜叶研究表明嘌呤类生物碱的含量随季节起伏较大,并在8月份含量达到顶峰,咖啡碱含量相对稳定,只有波浪状起伏。在不同品种生物碱含量研究中,较具有代表性的为可可茶无性系品种^[12],其鲜叶不含咖啡碱和茶碱,而是以可可碱为主;苦茶树(*Camellia assamica* var. *kucha*)^[13]的鲜叶中含有苦茶碱(1,3,7,9-四甲基尿酸),对咖啡碱引起的神经系统兴奋有抑制作用^[9]。在对同为绿茶品种的龙井43号和安吉白茶生物碱差异化研究中发现,可可碱含量有显著差异,咖啡碱差异明显^[14]。加工工艺的不同也造成了茶叶中生物碱含量的变化,一般咖啡碱含量高低的次序为:红茶(完全发酵茶)>乌龙茶(半发酵茶)>绿茶(不发酵茶)^[15]。同时也有研究表明随着发酵程度的加深,咖啡碱和可可碱含量降低^[16]。这或许与咖啡碱的存在形式、测定方法以及茶树生长地理环境、鲜叶的年龄和质量有关(表1)。

表1 茶叶中主要嘌呤碱的能效与潜在危险

Table 1 Efficacy and potential risks of principal purine alkaloids in tea

嘌呤碱名称	能效	潜在危险	备注
咖啡碱	医学方面:强心剂 ^[17] 、利尿剂、止痛药等,对骨肉瘤细胞株顺铂化疗具有显著增效作用 ^[18] 食品方面:碳酸饮料添加剂	无致癌、致畸和致突变作用。高剂量摄取有影响睡眠、增加血压等不良反应;不当使用可造成孕妇流产 ^[23-24]	茶叶中的主要嘌呤碱,含量占2%~5%
可可碱	具有兴奋中枢神经、利尿和强心作用;可用于治疗持续咳嗽	高剂量服用可引起神经肽Y系统的焦虑 ^[25]	在可可茶中含量丰富,含量达4.3%
茶叶碱	支气管解痉剂、老年COPD急性加重期的治疗、早产儿原发性呼吸暂停的治疗 ^[19-21]	毒副作用大、安全范围小、个体差异大	在茶叶中含量较低,仅为0.002%左右
苦茶碱	具有镇静、催眠的药理活性 ^[22] ,在治疗抑郁症方面有一定应用价值	毒性小、无积蓄毒性 ^[26]	苦茶中富含的甲基黄嘌呤类生物碱

2 茶叶加工中的微生物

在普洱生茶、普洱熟茶、茯砖茶、康砖茶的加工与贮藏过程中,微生物大量参与并对茶叶的化学成分和品质产生深远影响(表2)。早期普洱茶(普洱生茶)自然存放,通过自然环境中微生物类群作用以达到自然陈化^[27]。对陈放15、25年普洱生茶作微生物分离鉴定得到橙黄

色游动放线菌(*Actinoplanes aurantiacus*)、淡橘橙游动放线菌(*Actinoplanes pallidoaurantiacus*)、绛红褐游动放线菌(*Actinoplanes purpeobrunneus*)、链霉菌属(*Streptomyces bacillaris*)、卡伍尔链霉菌卡伍尔亚种(*Streptomyces cavourensis* subsp. *cavourensis*)、灰黑色链霉菌(*Streptomyces cinereus*)^[28-29]。Zhao等^[30]在2010年从60个不同茶样中分离出71种真菌,鉴定出其中的63种,分属于19个不同的属,分别为曲霉属(*Aspergillus* sp.)、青霉属(*Penicillium* sp.)、酵母菌属(yeast)、木霉属(*Trichoderma* sp.)、芽枝霉菌属(*Cladosporium* sp.)、子囊菌属(*Ascomycete* sp.)和黏隔孢属(*Septogloeum* sp.)、小球腔菌属(*Leptosphaeria* sp.)、脉孢菌属(*Neurospora* sp.)、踝节菌属(*Talaromyces* sp.)、根毛菌属(*Rhizomucor* sp.)、*Pezia* sp.、弯孢聚壳属(*Eutypella* sp.)、肉座菌属(*Hypocrea* sp.)、镰刀霉菌(*Fusarium* sp.)、白腐菌属(*Phanerochaete* sp.)、松庆病菌属(*Trametes* sp.)、柯楠属(*Corynascus* sp.)、犁头霉菌属(*Absidia* sp.)。普洱熟茶以云南晒青毛茶为原料,经潮水渥堆加工而成。在普洱茶渥堆过程中分离出40余种真菌,分属于19个不同的属,其中曲霉属、青霉属、酵母菌属占普洱茶菌落的80%左右^[31]。随着温度的升高,嗜热菌在渥堆中后期大量出现^[32],并鉴定为微小根毛霉(*Rhizomucor pusilus*)、牛根毛霉(*Rhizomucor tauricus*)、疏棉嗜热丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)、埃莫森篮状菌(*Talaromyces emersonii*)等嗜热菌。黑曲霉^[33]和酵母菌^[34]被认为是普洱茶的优势菌,并在普洱茶加工中得以应用。茯砖茶与普洱茶同属于黑茶范畴,以独特的发花工序而著称。茯砖茶中鉴定出的微生物有冠突散囊菌、间型散囊菌、匍匐散囊菌、谢瓦散囊菌、阿姆斯特丹散囊菌、赤散囊菌、散囊菌、黑曲霉、毛霉、拟青霉、草酸青霉、短密青霉、谢瓦氏曲霉、冠突曲霉等。优势菌群为冠突散囊菌(*Eurotium cristatum* (Raper & Fennell) Malloch & Cain)。冠突散囊菌在四川康砖茶中亦有检出,对康砖茶品质产生影响的微生物同时还有放线菌属、毛霉属和耐热葡萄球菌等。以岭头单丛晒青毛茶为原料后发酵而成广东陈香茶中的优势菌群分别为黑曲霉、产黄青霉和灰绿霉^[35]。

绿茶、黄茶和白茶为不发酵或微发酵茶,加工过程应杜绝微生物的参与,以避免污染。然而,微生物在茶的再加工与深加工有巨大应用前景。酵母菌、真菌、细菌等三大微生物是影响红茶品质的最主要微生物,研究表明红茶、乌龙茶中有益微生物的适度添加可显著提高茶叶品质^[36]。

表2 茶叶加工中的微生物种类
Table 2 Major microorganism species during tea processing

茶叶名称	微生物种类	备注
普洱生茶	微生物种类达71种,分属于19个属;另有4种放线菌;普洱茶生茶亦有“金花现象”,“金花”由塔宾曲霉、全枝犁头霉菌、阿姆斯特丹散囊菌和黑附球菌构成	普洱生茶微生物呈现先减后增的变化趋势;微生物的种类和数量与仓储条件有关
普洱熟茶	渥堆期间分离出19个属40余种真菌,曲霉属、青霉属、酵母菌属种类最多。嗜热菌有微小根毛霉、牛根毛霉、疏棉嗜热丝孢菌、埃莫森篮状菌	优势真菌为黑曲霉、酿酒酵母和光孢青霉等
茯砖茶	主要微生物有冠突散囊菌、间型散囊菌、匍匐散囊菌、谢瓦散囊菌、阿姆斯特丹散囊菌、赤散囊菌、散囊菌、黑曲霉、毛霉、拟青霉、草酸青霉、短密青霉、谢瓦氏曲霉、冠突曲霉等	冠突散囊菌为优势菌群
其他茶类	四川康砖茶:冠突散囊菌、放线菌属、毛霉;广东陈香茶:黑曲霉、产黄青霉、灰绿霉;在绿茶、黄茶等不发酵或微发酵茶应避免微生物的参与	微生物在乌龙茶和红茶中亦有所运用,以提高茶叶品质

3 微生物对茶叶中嘌呤碱含量的影响

3.1 自然渥堆发酵过程中嘌呤碱含量的变化

黑茶渥堆是以茶叶为基质,众多微生物参与的固态发酵过程。在普洱茶渥堆期间,水浸出物略微下降、茶多酚含量大幅度下降、茶褐素急剧上升^[37-38]。不同产地的普洱茶咖啡碱含量无显著性差异。在普洱茶自然渥堆过程中,咖啡碱略有上升^[39]。Wang Di等^[40]研究与之相反,渥堆末期咖啡碱含量较原料有所降低。这或许与渥堆过程中优势菌种的差异相关。在普洱茶渥堆期间添加发酵剂可加快咖啡碱的变化,降低熟茶的生产周期。在利用添加鲜叶浸提物的微生物发酵实验中^[41],浸提物的添加可降低咖啡碱的含量,而菌种不同会对咖啡碱产生不同的结果。

3.2 可降解咖啡碱菌株的筛选

为了生产低咖啡碱茶叶(咖啡碱含量小于1%),国内外科技工作者采取热水浸提、超临界CO₂提取、有机物萃取等物理化学方法脱去茶叶中多余的咖啡碱,或通过杂交育种选育低咖啡碱的茶树新品种。通过茶、咖

啡园土壤筛选可降解咖啡碱的菌株同样取得可喜成果。利用咖啡碱作为唯一碳源和氮源,Gokulakrishnan等^[42]从土壤中筛选出*Pseudomonas* sp. GSC1182菌株,该菌株在48 h内能降解掉培养基中80%的咖啡碱。Brand等^[43]研究发现微生物的咖啡碱降解效率与温度有关,曲霉菌和青霉菌等真菌在25℃条件下的降解率为100%,在30℃条件下时仅为80%。国内同样有相关研究^[44-45],栗娜等^[44]在杭州茶园筛选出对咖啡碱降解效率达100%的菌株,经分子学鉴定为假单胞菌属的*Pseudomonas lutea*。柴洁^[45]以普洱茶渥堆茶样为实验材料,筛选出可降解咖啡碱菌株,经18S rDNA测序鉴定为聚多曲霉(*Aspergillus sydowii* NRRL250),并进行单菌落茶叶发酵发现,咖啡碱含量大幅度下降,至末期含量甚微;茶叶碱含量大幅度上升,末期时茶叶碱含量达2.814%。咖啡碱与茶叶碱存在消长关系。在微生物发酵过程中,咖啡碱存在着与植物中咖啡碱相似的降解途径。

3.3 单菌株茶叶发酵嘌呤碱含量变化

对不同微生物单菌株发酵的研究证实不同微生物对嘌呤碱含量和种类影响不一(表3)。利用顶头孢霉的单菌落发酵普洱茶过程中咖啡碱含量大幅度上升^[46]。在Qin Jinhua等^[47]研究中证实烟曲霉(*Aspergillus fumigatu*)对咖啡碱和可可碱的含量影响不大,黑曲霉(*Aspergillus niger*)可显著降低咖啡碱的含量。Wang Xiaogang等^[48]对不同微生物对茶叶发酵过程中咖啡碱及生物碱含量的研究发现,Tieghem ACCC30005、*R. arrhizus* Fisher3.2893和*M. circinelloides* van. Tieghem AS3.2484,能够提高发酵过程中咖啡碱的含量而酵母菌、*C. albicans* (Robin) Berkhout ACCC2100和*C. famata* (Saito) Lodder ACCC2052能够降低发酵过程中咖啡碱的含量。这与Pasha等^[49]研究酵母菌能降低红茶发酵咖啡碱含量的结论相符。在黑曲霉发酵普洱茶过程中咖啡碱含量略有上

表3 不同微生物对嘌呤类生物碱的影响
Table 3 Effects of different microorganisms on purine alkaloids

微生物名称	对嘌呤碱的影响	备注
<i>Pseudomonas</i> sp. GSC1182	对咖啡碱有降解作用,48 h内降解80%的咖啡碱	含有蔗糖的培养基内,咖啡碱降解率达100%
曲霉菌和青霉菌	对咖啡碱有降解解作用	25℃条件下降解率为100%,30℃仅为30%
<i>Pseudomonas hutea</i>	可利用咖啡碱作为唯一碳源和氮源	属于假单胞属
乳酸菌、醋酸型乳酸菌	绿茶废料发酵,咖啡碱含量无明显变化	在添加乳酸菌的普洱茶渥堆发酵中,咖啡碱略有下降
冠突散囊菌	菌丝体产生期间,咖啡碱含量下降	冠突散囊菌为茯砖茶渥堆过程优势菌群
Tieghem ACCC30005、 <i>R. arrhizus</i> Fisher 3.2893、 <i>M. circinelloides</i> van. Tieghem AS3.2484	提高茶叶发酵过程中咖啡碱含量	菌种来自于中国菌种站,以绿茶和红茶为发酵原料
酵母菌、 <i>C. albicans</i> (Robin) Berkhout ACCC 2100、 <i>C. famata</i> (Saito) Lodder ACCC2052	对茶叶发酵过程中的咖啡碱有降低作用	菌种来自于中国菌种站,以绿茶和红茶为发酵原料
曲霉属	绿毛茶发酵中,可可碱、茶叶碱含量上升,咖啡碱含量下降	茶叶碱上升波峰与咖啡碱降低波峰一致
聚多曲霉	茶叶发酵中,咖啡碱下降至几乎为零,茶叶碱大幅度上升,发酵末期含量达2.814%	聚多曲霉属于曲霉属,被折改梅等 ^[50] 认为普洱茶渥堆优势菌种之一
酵母菌	降低红茶发酵过程中咖啡碱含量	与Wang Xiaogang等 ^[48] 研究结果一致
烟曲霉	对咖啡碱、可可碱含量影响不大	属于曲霉属,在黑茶渥堆过程中检出机率较少
黑曲霉	可显著降低咖啡碱含量	黑曲霉为普洱茶渥堆优势菌种。黑曲霉对咖啡碱代谢存在不一致,柴洁 ^[45] 研究发现单菌种发酵过程中咖啡碱含量显著上升
顶头孢霉 ^[28]	普洱茶后发酵期间咖啡碱显著上升,增幅为60%~70%	工业发酵菌株,在普洱茶渥堆期间检出

升,与Wang Xiaogang等^[48]结果不一致。Nishino等^[50]通过乳酸菌和醋酸型乳酸菌对湿润的绿茶废料发酵,发现咖啡碱含量没有明显变化。研究冠突散囊菌^[51]对绿茶液发酵过程中的影响,在0~8 d的发酵液中咖啡碱含量保持稳定,随着菌丝体的产生,咖啡碱下降到11.97 mg/mL。

4 结 语

目前,在普洱茶以及黑茶渥堆发酵与陈化过程中分离鉴定出超过71株真菌,6株放线菌和7类细菌。另外有5类微生物被证实对咖啡碱有显著降解作用。这为研究微生物与咖啡碱等嘌呤碱的关系以及低咖啡碱茶叶的生产提供了丰富的菌种来源。在以晒青毛茶、绿茶、红茶等不同茶叶为基质的微生物发酵中,黑曲霉、酵母菌、顶头孢霉、聚多曲霉等真菌对茶叶中咖啡碱含量有显著影响。烟曲霉、乳酸菌、醋酸型乳酸菌、冠突散囊菌等微生物对咖啡碱、可可碱等嘌呤碱含量产生或多或少的影响。而茶叶微生物发酵过程中,咖啡碱、可可碱、茶叶碱等嘌呤碱的代谢途径尚不清晰;不同嘌呤碱之间的消长关系和内在联系值得进一步研究。

参考文献:

- [1] RIETVELD A, WISEMAN S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(10): 3285S-3292S.
- [2] KUBOTA K, SUMI S, TOJO H, et al. Improvements of mean body mass index and body weight in preobese and overweight Japanese adults with black Chinese tea (Pu-erh) water extract[J]. Nutrition Research, 2011, 31(6): 421-428.
- [3] HU Yongjin, JIA Junjing, QIAO Jingling, et al. Antimicrobial activity of Pu-erh tea extracts *in vitro* and its effects on the preservation of cooled mutton[J]. Journal of Food Safety, 2010, 30(1): 177-195.
- [4] SU Yajuan, ZHANG Chenlu, WANG Yan, et al. Antibacterial property and mechanism of a novel Pu-erh tea nanofibrous membrane[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(4): 1663-1671.
- [5] GONG Jiashun, PENG Chunxiu, HE Xiang, et al. Antioxidant activity of extracts of Pu-erh tea and its material[J]. Asian Journal of Agricultural Sciences, 2009, 1(2): 48-54.
- [6] HOU Yan, SHAO Wanfang, XIAO Rong, et al. Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model[J]. Experimental Gerontology, 2009, 44(6): 434-439.
- [7] ZHAO Hang, ZHANG Min, ZHAO Lu, et al. Changes of constituents and activity to apoptosis and cell cycle during fermentation of tea[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(3): 1862-1875.
- [8] WAY T D, LIN Huiyi, KUO D H, et al. Pu-erh tea attenuates hyperlipogenesis and induces hepatoma cells growth arrest through activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human HepG2 cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12): 5257-5264.
- [9] 折改梅, 陈可可, 张颖君, 等. 8-氧化咖啡因和嘧啶类生物碱在普洱熟茶中的存在[J]. 云南植物研究, 2007, 29(6): 713-716.
- [10] 王冬梅, 卢嘉丽, 程悦, 等. 苦茶的急性毒性与神经药理活性初步研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2010, 49(1): 76-79.
- [11] WANG L Y, WEI K, JIANG Y W, et al. Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.)[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(6): 1049-1055.
- [12] 何玉媚, 彭力, 李成仁, 等. 可可茶无性系品种的生化成分研究[J]. 广东农业科学, 2011, 38(6): 10-13.
- [13] YE Chuangxing, HIROSHI A, ZHENG Xinqiang, et al. New discovery of pattern of purine alkaloids in wild tea trees[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2002, 42(1): 62-65.
- [14] WEI Kang, WANG Liyuan, 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(3): 720-724.
- [15] ZUO Yuegang, CHEN Hao, DENG Yiwei. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and Pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector[J]. Talanta, 2002, 57(2): 307-316.
- [16] KIM Y, GOODNER K L, PARK J D, et al. Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1331-1342.
- [17] 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心脏活动的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2008, 24(4): 397-398; 467.
- [18] 崔秋, 李鼎锋, 尉承泽, 等. 咖啡因在骨肉瘤细胞株顺铂化疗中增效作用的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(5): 582-583; 592.
- [19] CULPITT S V, de MATOS C, RUSSELL R E, et al. Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2002, 165(10): 1371-1376.
- [20] 原红, 董莉, 张英民. 茶碱对慢性阻塞性肺疾病稳定期诱导痰白细胞介素-8及肺功能的影响[J]. 中国实用医药, 2011, 6(5): 28-29.
- [21] 朱峥, 周奇兴, 张云凤, 等. 茶碱治疗慢性阻塞性肺病急性加重期的疗效[J]. 中国药师, 2010(7): 1006-1008.
- [22] XU Jiekun, KURIHARA H, ZHAO Liang, et al. Theacrine, a special purine alkaloid with sedative and hypnotic properties from *Camellia assamica* var. Kucha in mice[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2007, 9(7): 665-672.
- [23] SHILO L, SABBAH H, HADARI R, et al. The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion[J]. Sleep Medicine, 2002, 3(3): 271-273.
- [24] BUERGE I J, POIGER T, MÜLLER M D, et al. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(4): 691-700.
- [25] 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.
- [26] 王园园, 杨晓绒, 莫昉, 等. 苦茶碱对大鼠的长期毒性实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2439-2441.
- [27] HUANG Jianping, WU Chucai. Distribution of the microorganism groups in the air of forest area[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(2): 173-176.
- [28] CHEN Y S, LIU Binglan, CHANG Y N. Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109(6): 557-563.
- [29] CHEN C S, CHAN H C, CHANG Y N, et al. Effects of bacterial strains on sensory quality of Pu-erh tea in an improved pile-fermentation process[J]. Journal of Sensory Studies, 2009, 24(4): 534-553.

- [30] ZHAO Z J, TONG H R, ZHOU L, et al. Fungal colonization of Pu-erh tea in Yunnan[J]. Journal of Food Safety, 2010, 30(4): 769-784.
- [31] 赵振军, 童华荣, 周黎, 等. 普洱茶中真菌种群的分离与分子鉴定[J]. 茶叶科学, 2009, 29(6): 436-442.
- [32] 杨瑞娟, 吕杰, 严亮, 等. 普洱茶渥堆发酵中嗜热真菌的分离和鉴定[J]. 茶叶科学, 2011, 31(4): 371-378.
- [33] XU X, YAN M, ZHU Y. Influence of fungal fermentation on the development of volatile compounds in the Puer tea manufacturing process[J]. Engineering in Life Sciences, 2005, 5(4): 382-386.
- [34] ABE M, TAKAOKA N, IDEMOTO Y, et al. Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(2): 199-203.
- [35] 陈栋, 李晶晶, 方祥, 等. 广东陈香茶后发酵过程中主要微生物种群和酶类活性变化的研究[J]. 茶叶科学, 2010, 30(6): 429-434.
- [36] 李萍, 刘通讯. 微生物发酵对乌龙茶内在品质的影响[J]. 现代食品科技, 2008, 24(8): 773-776.
- [37] 田军, 沈舫, 梁自达, 等. 普洱茶渥堆过程中总水溶性碳水化合物和茶多酚的变化分析[J]. 价值工程, 2011(29): 313-314.
- [38] ZHANG Liang, LI Ning, MA Zhizhong, et al. Comparison of the chemical constituents of aged Pu-erh tea, ripened Pu-erh tea, and other teas using HPLC-DAD-ESI-MSn[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(16): 8754-8760.
- [39] LIANG Yuerong, ZHANG Lingyun, LU Jianliang. A study on chemical estimation of Pu-erh tea quality[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(3): 381-390.
- [40] WANG Di, ZHONG Ying, LUO Xiao, et al. Pu-erh black tea supplementation decreases quinocetone-induced ROS generation and oxidative DNA damage in Balb/c mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(2): 477-484.
- [41] HOU C W, JENG K C, CHEN Y S. Enhancement of fermentation process in Pu-erh tea by tea-leaf extract[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(1): H44-H48.
- [42] GOKULAKRISHNAN S, CHANDRARAJ K, GUMMADI S N. A preliminary study of caffeine degradation by *Pseudomonas* sp. GSC 1182[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 346-350.
- [43] BRAND D, PANDEY A, ROUSSOS S, et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(1): 127-133.
- [44] 栗娜, 籍保平, 李博, 等. 可降解咖啡碱菌株的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 218-221.
- [45] 柴洁. 优势菌株发酵普洱茶咖啡碱含量的影响[D]. 昆明: 云南农业大学, 2013.
- [46] 陈华红, 李雪玲, 岩燕, 等. 顶头孢霉对普洱茶品质的影响[J]. 食品科技, 2011, 36(10): 53-56; 61.
- [47] QIN Jinhua, LI Ning, TU Pengfei, 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.
- [48] 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(3): 1086-1091.
- [49] PASHA C, REDDY G. Nutritional and medicinal improvement of black tea by yeast fermentation[J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 449-453.
- [50] NISHINO N, KAWAI T, KONDO M. Changes during ensilage in fermentation products, tea catechins, antioxidative activity and *in vitro* gas production of green tea waste stored with or without dried beet pulp[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(9): 1639-1644.
- [51] 徐瑞瑞, 李立祥, 倪媛, 等. 绿茶液冠突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.