

冠突散囊菌与茶叶生物碱共培养液态发酵体系的构建及特性

黄浩¹, 郑红发¹, 赵熙¹, 钟妮^{1,2,3}, 余鹏辉^{1,2,3}, 黄建安^{2,3}, 刘仲华^{2,3}

(1. 湖南省农业科学院茶叶研究所, 湖南长沙 410125) (2. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南长沙 410128) (3. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南长沙 410128)

摘要: 选取茶叶中三种主要生物碱咖啡碱(Caffeine)、可可碱(Theobromine)、茶碱(Theophylline)作为构建单体-冠突散囊菌共培养液态发酵体系(10 d)的添加底物, 考察了冠突散囊菌对茶叶中主要生物碱的发酵特性。结果表明, 与对照组相比, 咖啡碱(0.2 mg/mL)的添加可刺激冠突散囊菌的生长与繁殖, 发酵液中葡萄糖的含量下降更为迅速, pH值随着发酵时间的增加持续下降直至第9 d趋于稳定, 可溶性蛋白含量呈现先增加后下降的趋势, 但在发酵过程中, 冠突散囊菌既不能将其作为碳源、氮源消耗来维持生长, 也不能代谢分解咖啡碱; 可可碱与茶碱(0.08 mg/mL)在发酵体系中的发酵情况与咖啡碱基本相似, 两者均能刺激冠突散囊菌的生长与繁殖, 但均不能将其作为碳、氮源消耗, 且发酵结束后在各自发酵体系中分别检测到0.00091 mg/mL、0.00109 mg/mL的咖啡碱, 这说明冠突散囊菌可能具有以可可碱、茶碱作为前体合成咖啡碱的能力。

关键词: 冠突散囊菌; 咖啡碱; 可可碱; 茶碱; 共培养液体发酵体系; 发酵特性

文章编号: 1673-9078(2018)12-34-39

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.006

Construction and Characteristics of the Liquid Fermentation System

Co-cultured by *Eurotium cristatum* and Alkaloids in Tea

HUANG Hao¹, ZHENG Hong-fa¹, ZHAO Xi¹, ZHONG Ni^{1,2,3}, YU Peng-hui^{1,2,3}, HUANG Jian-an^{2,3},
LIU Zhong-hua^{2,3}

(1. Tea Research Institute, Hunan Academy Agricultural Sciences, Changsha 410125, China) (2. Key Laboratory of Tea Science, Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China) (3. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Changsha 410128, China)

Abstract: Using three representative compounds in tea (caffeine, theobromine and theophylline) as substrates to construct a liquid fermentation system of *Eurotium cristatum* (E.C), the fermentation characteristics of E. C. were preliminarily investigated. Results indicated that the addition of caffeine (0.2 mg/mL) could stimulate the growth of E.C to a certain extent. The content of glucose in the fermentation liquor decreased rapidly, and the pH value progressively declined with the increase of fermentation time until the ninth day, while the content of soluble protein increased first and then decreased. During the fermentation, E.C could not consume the soluble protein as carbon or nitrogen source to maintain its growth, and metabolize caffeine. Similar to caffeine, the theobromine and theophylline (0.08 mg/mL) could also stimulate the growth of *Eurotium cristatum* to some extent, but could not be consumed as a carbon source. However, the caffeine with concentrations of 0.00091 and 0.00109 mg/mL was detected respectively in the fermentation broth of theobromine and the theophylline, implying that *Eurotium cristatum* had the ability to synthesize caffeine with precursor of theobromine and theophylline.

Key words: *Eurotium cristatum*; caffeine; theobromine; theophylline; co-culture liquid fermentation system; fermentation characteristics

收稿日期: 2018-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471706); 湖南省自然科学基金(湖南省科学技术厅与湖南省农业科学院联合基金)资助项目(2016JJ6058); 国家现代农业(茶叶)产业技术体系建设专项(CARS-19)

作者简介: 黄浩(1984-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 茶叶加工与功能成分化学

通讯作者: 郑红发(1975-), 男, 研究员, 研究方向: 茶叶加工与综合利用; 刘仲华(1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 茶叶功能成分利用

茯茶中的优势真菌-冠突散囊菌^[1-3], 俗称“金花”菌, 一直被视作衡量茯茶品质的重要指标。现行研究已从茯茶品质化学^[4]与功能成分化学^[5-7]角度证实了冠突散囊菌对茯茶的重要性。课题组曾借助人工接种冠突散囊菌至茶叶固体发酵-“散茶发花”技术对不同茶类原料“发花”茯茶加工过程中的水浸出物、茶多酚、儿茶素组分、氨基酸、黄酮类、可溶性糖和可溶性蛋白等茶叶常量成分进行含量检测与分析, 并考察加工各阶段微生物及优势真菌的动态变化, 其已基本探明茯茶的品质风味形成机理^[8,9]。然而, 茶是一种较为复杂的基质, 其生化成分因产地、品种而异。因此, 在特定的载体中加入规定的介质对更进一步研究微生物对茶叶单一生化成分的代谢机制具有重要的意义^[10]。王小刚^[11]等人用黑曲霉等5种微生物分别接种绿茶和红茶的干茶与茶汤的发酵体系(32 d)来考察咖啡碱的含量变化, 结果表明不同生长基质的同种真菌发酵体系对咖啡碱的含量产生较大差异。

本研究在前人研究的基础上, 设计已知、固定的培养基作为满足冠突散囊菌生长需要的特定基质, 并以高纯度咖啡碱、可可碱和茶碱作为冠突散囊菌液体发酵培养的唯一外源添加底物, 考察冠突散囊菌对上述3种单体成分为期10 d的发酵特性, 为进一步丰富茯茶品质形成机理提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

“金花”菌-冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*), 为本实验室自藏菌株^[12], 分离自益阳茶厂股份有限公司产茯砖茶(800 g装, 产于2007年)。

冠突散囊菌分离、纯化培养基: PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)、察氏等固体培养基; 种子培养基、发酵培养基: 1.0% (m/V) 葡萄糖, 国药集团化学试剂有限公司; 0.1% (m/V) 蛋白胨, 北京生工生物工程有限公司; 0.05% (m/V) 柠檬酸, 成都市科龙化工试剂厂; 2% (V/V) Vogel's N^[13] (Vogel, 1964)、0.015% (V/V) 吐温 80, 中国医药上海化学试剂公司; 校准 pH 5.5。

马铃薯提取物, 上海一研生物科技; 葡萄糖(食品级), 国药集团化学试剂有限公司; 琼脂粉, 北京振泰生物; 咖啡碱(纯度≥99%)、可可碱(纯度≥95%)、茶碱(纯度≥99%)。葡萄糖试剂盒、蛋白质含量检测试剂盒, 南京建程生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

Delta 320 pH 计, Mettler; Motic B1 光学显微镜, Motic 公司; 万分之一电子天平, Mettler AE240; MIKRO-35 高速冷冻离心机, 德国产; 苏净超净工作台, 苏净集团安泰公司; 振荡式恒温培养箱, 上海苏坤实业有限公司; 恒温培养箱, 江苏环保仪器厂; 高温高压灭菌锅, 上海医用核子仪器厂; 恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备公司; 10 mL 一次性注射器, 河南曙光健士医疗器械集团有限公司; 0.22 μm 过滤器, Millipore; 定量滤纸, 杭州特种纸业公司; 多功能酶标仪, Thermo; 96 孔板, 海门博阳实验器材厂; 7.5 cm 玻璃漏斗、50 mL 三角瓶、隔菌封口膜、10 mL、1.5 mL 离心管、1000 μL、200 μL Tip 头, 上海生工生物工程有限公司等。

1.3 实验方法

1.3.1 种子液培养

将预先培养 5 d 的斜面冠突散囊菌菌种转接于种子培养基(200 mL)中, 置振荡培养箱中 30 °C, 转速 200 r/min 条件下培养 24 h。

1.3.2 诱导培养与取样

从种子液中吸取 4% 接种量转接至 50 mL 发酵培养基中, 添加过滤除菌的 Caffeine 母液终浓度 0.2 mg/mL (Caffeine 组)、可可碱母液终浓度 0.08 mg/mL (Theobromine 组)、茶碱母液终浓度 0.08 mg/mL (Theophylline 组), 未添加单体的培养基为 Caffeine 空白对照 (F-wC 组)、Theobromine 空白对照 (F-wTheob 组)、Theophylline 空白对照组 (F-wTheop 组), 以及设置添加单体但未接种冠突散囊菌的空白对照 (C-wF)、(Theob-wF)、(Theop-wF); 在温度为 28 °C, 转速为 160 r/min 条件下震荡培养 10 d; 每 24 h 取样观察, 三组发酵培养液均经过滤处理, 得到滤液和菌丝体, 测定菌体干重和发酵清液的 pH 值, 剩余葡萄糖含量, 总蛋白质含量。

1.3.3 HPLC 法分析咖啡碱、可可碱、茶碱在发酵液中的代谢情况

采用 HPLC 方法来定量分析底物咖啡碱、可可碱、茶碱在发酵过程中的消耗情况, 反应液原液稀释至合适倍数后经 HPLC 进样分析, 三种生物碱的定量检测方法采用色谱条件^[14,15]: C18 柱 (4.6×200 mm, 5 μm, welchrom), 流动相: A: 去离子水, B: N, N-二甲基甲酰胺: 甲醇: 乙酸=40:2:1.5, 流速: 1 mL/min。进样量: 10 μL 等条件在 278 nm 下检测, 试验重复六次 (n=6), 分析并计算结果。

1.3.4 数据统计分析

试验数据采用数学统计分析软件 SPSS 19.0 进

行检验分析, 试验重复三次并取 3 次重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 冠突散囊菌-咖啡碱共培养发酵液中发酵

产物含量的变化

HPLC 方法对添加咖啡碱的发酵液进行含量检测分析, 图 1 结果显示为期 10 d 的发酵对发酵液中咖啡碱的含量变化无明显影响, 这意味着以发酵液中的咖啡碱不能被冠突散囊菌生长繁殖所直接利用, 这可能与咖啡碱较稳定的化学性质相关。

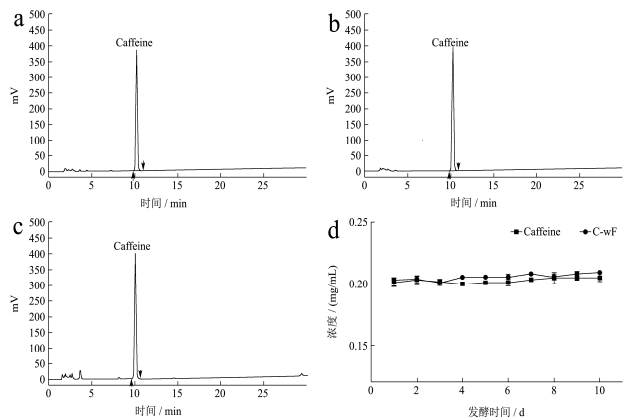


图 1 HPLC 法检测发酵液中咖啡碱的含量

Fig.1 The content of caffeine in the fermentation broth was detected by HPLC

注: a: 发酵第 1 d; b: 发酵第 4 d; c: 发酵第 10 d; d: 发酵过程中 Caffeine 的含量变化。

2.2 冠突散囊菌-咖啡碱共培养发酵体系的理化特性

图 2 结果显示咖啡碱组发酵液的 pH 值随着发酵时间的增加持续下降, 发酵前 6~7 d, 咖啡碱组与未加咖啡碱组变化趋势表现出高度一致, 当发酵进入第 7 d, 咖啡碱组 pH 值下降的幅度逐渐增大直至第 9 d 趋于稳定, 这可能是咖啡碱刺激菌体生长加速菌体代谢出有机酸, 同时延缓了菌体自溶, 进而导致延缓了发酵液 pH 值上升。总得来说, 咖啡碱组菌体生物量增加并不明显, 这可能与咖啡碱的稳定性质而不易被菌体所利用有关。

两组发酵液中剩余葡萄糖含量的变化趋势一致, 相比之下, 添加咖啡碱的发酵液中葡萄糖的含量下降的更为明显, 说明有咖啡碱的存在可能对刺激菌体的生长繁殖存在积极作用, 从而加速冠突散囊菌对发酵

液中葡萄糖的消耗; 二组发酵液总蛋白质含量都随着发酵时间的增加而逐渐升高, 而又分别在发酵第 8、9 d 相继开始下降, 一方面冠突散囊菌在发酵培养过程中胞外酶的分泌和积累, 另一方面, 也可能是由于菌体自溶导致胞内蛋白等大分子物质快速降解。

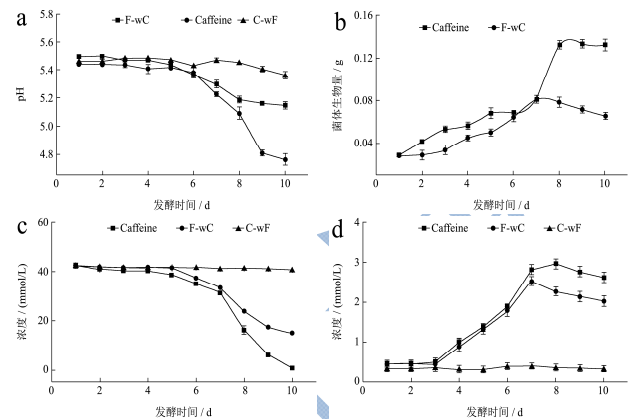


图 2 冠突散囊菌-咖啡碱共培养发酵体系的理化特性

Fig.2 The physical and chemical characteristics of the co-culture fermentation system of *Eurotium cristatum*-caffeine

注: a: pH 值变化; b: 菌体生物量变化; c: 残余葡萄糖含量变化; d: 总蛋白质含量变化; F-wC: 咖啡碱空白对照组 (只接种菌组); Caffeine: 咖啡碱与菌种共培养组; C-wF: 菌种空白对照组 (加咖啡碱未接种菌组)。

2.3 冠突散囊菌-可可碱共培养发酵液中发酵

产物含量的变化

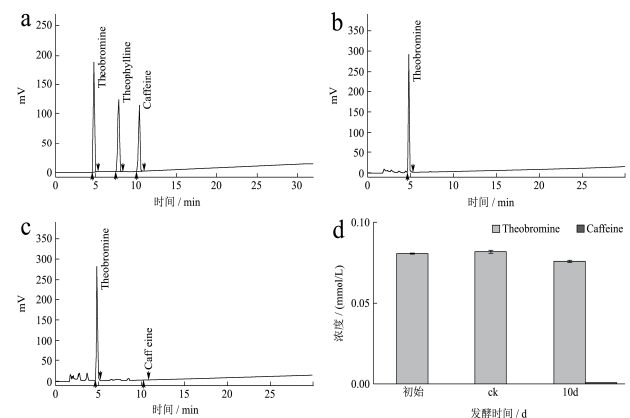


图 3 HPLC 法检测发酵液中可可碱及其发酵产物的含量

Fig.3 The content of theobromine and its fermentation products in the fermentation broth was detected by HPLC

注: a: 生物碱标样; b: 可可碱对照 10 d; c: 发酵第 10 d; d: 发酵过程中可可碱及发酵产物的含量变化。

采用 HPLC 方法对添加可可碱的发酵液进行含量检测分析, 结果显示为期 10 d 的发酵对发酵液中可可碱的含量变化无明显影响, 这意味着发酵液中的可可碱可能不能被冠突散囊菌生长繁殖所直接利用, 这可

能与咖啡碱较稳定的化学性质有关, 由图 3 可知, 发酵结束时在发酵液中能检测到少量的咖啡碱, 这说明冠突散囊菌可能以可可碱为前体合成咖啡碱。

2.4 冠突散囊菌-可可碱共培养发酵体系的理化特性

由图 4 可知, 可可碱添加组发酵液的 pH 值随着发酵时间的增加持续下降, 从发酵开始到结束, 两组变化趋势表现出高度一致, 菌体生长繁殖将碳源转化为有机酸而导致发酵液 pH 值持续下降, 直至第 8 d 趋于稳定。

二组菌体生物量呈现逐渐增加的趋势, 添加可可碱与未添加可可碱对照相比, 其菌体生物量要稍高于后者, 说明可可碱的添加对菌体生长有促进作用。发酵进入第 8 d, 菌体生物量开始下降, 对照 pH 值曲线, 这可能是因为菌体开始自溶所致。

添加可可碱的发酵液与未添加咖啡碱对照组发酵液中剩余葡萄糖含量的变化趋势一致, 相比之下, 添加可可碱的发酵液中葡萄糖的含量下降的更为明显, 说明有可可碱的存在可能对刺激菌体的生长繁殖存在积极作用, 从而加速冠突散囊菌对发酵液中葡萄糖的消耗; 二组发酵液总蛋白质含量均随着时间的增加而逐渐升高, 而又分别在发酵第 8、9 d 相继开始下降, 一方面冠突散囊菌在发酵培养过程中胞外酶的分泌和积累, 另一方面, 也可能是由于菌体自溶导致胞内蛋白等大分子物质快速降解。

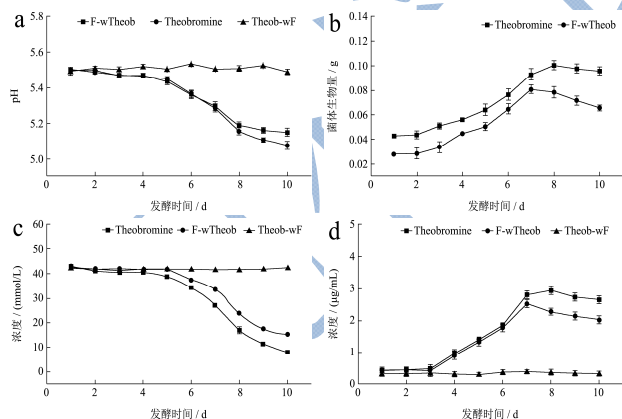


图 4 冠突散囊菌-可可碱共培养发酵体系的理化特性
Fig.4 The physical and chemical characteristics of the co-culture fermentation system of *Eurotium cristatum*-theobromine

注: a: pH 值变化; b: 菌体生物量变化; c: 残余葡萄糖的含量变化; d: 总蛋白质的含量变化; F-wTheob: 可可碱空白对照组 (只接种菌种组); Theobromine: 可可碱与菌种共培养组; Theob-wF: 菌种空白对照组 (加可可碱未接种菌种组)。

2.5 冠突散囊菌-茶碱共培养发酵液中发酵产物含量的变化

采用 HPLC 方法对添加茶碱的发酵液进行含量检测分析, 图 5 结果显示为期 10 d 的发酵对发酵液中茶碱的含量变化无明显影响, 这意味着发酵液中的茶碱不能被冠突散囊菌生长繁殖直接利用; 由图 5-K 可知, 发酵结束时在发酵液中能检测到少量的咖啡碱, 这说明冠突散囊菌可能以茶碱为底物合成咖啡碱。

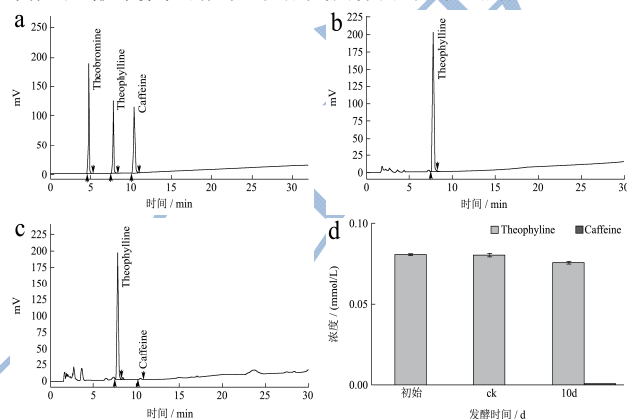


图 5 HPLC 法检测发酵液中茶碱及其发酵产物的含量
Fig.5 The content of theophylline and its fermentation products in the fermentation broth was detected by HPLC

注: a: 生物碱标样; b: 茶碱对照 10 d; c: 发酵第 10 d; d: 发酵过程中茶碱及发酵产物的含量变化。

2.6 冠突散囊菌-茶碱共培养发酵体系的理化特性

图 6 结果显示茶碱组发酵液的 pH 值随着发酵时间的增加持续下降, 从发酵开始到发酵结束, 茶碱组与未加茶碱组变化趋势表现出高度一致, 菌体生长繁殖将碳源转化为有机酸而导致发酵液 pH 值持续下降, 直至第 8 d 趋于稳定。

二组菌体生物量均呈现增加的趋势, 添加茶碱与未添加茶碱对照相比, 其菌体生物量前者要稍高于后者, 说明茶碱能刺激菌体生长。发酵进入第 8 d, 菌体量开始下降, 对照 pH 值曲线, 这可能是由于菌体自溶所引起的。

两组发酵液中剩余葡萄糖含量的变化趋势一致, 添加茶碱的发酵液中葡萄糖的含量下降的更为明显, 说明有茶碱的存在可能对刺激菌体的生长繁殖存在积极作用, 从而加速冠突散囊菌对发酵液中葡萄糖的消耗; 二组发酵液总蛋白质含量都随着时间的增加而逐渐升高, 而又分别在发酵第 8、9 d 相继开始下降, 一

方面冠突散囊菌在发酵培养过程中胞外酶的分泌和积累,另一方面,也可能是由于菌体自溶导致胞内蛋白等大分子物质快速降解。

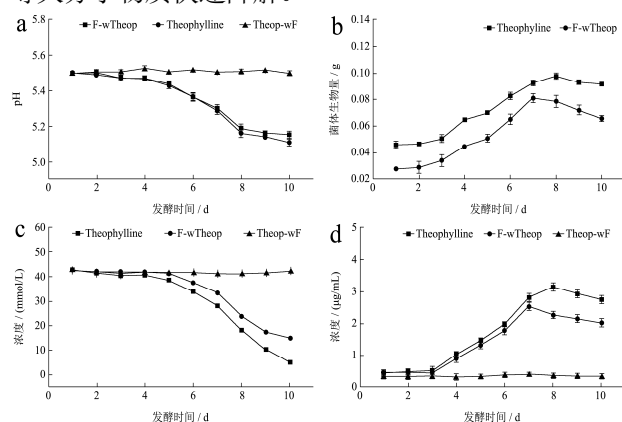


图6 冠突散囊菌-茶碱共培养发酵体系的理化特性

Fig.6 The physical and chemical characteristics of the co-culture fermentation system of *Eurotium cristatum*-theophylline

注: a: pH值变化; b: 菌体生物量变化; c: 残余葡萄糖含量变化; d: 总蛋白质含量变化; F-wTheop: 茶碱空白对照组(只接种菌种组); Theophylline: 茶碱与菌种共培养组; Theop-wF: 菌种空白对照组(加茶碱未接种菌种组)。

3 结论

3.1 茯茶中的“金花”菌(冠突散囊菌)之所以能生长繁殖是因为茶叶能为“金花”菌的生长繁殖提供必需的碳源、氮源,一方面,“金花”菌直接利用简单含碳、氮化合物进行生长繁殖,另一方面,“金花”菌分泌的胞外酶作用于茶叶内含成分发生一系列生化反应,间接的为该菌的生长繁殖提供营养基础。“散茶发花”技术^[16]是在传统茯砖茶加工工艺基础上的创新与升级,其独特之处在于较大地缩短了加工周期,从压制到出烘由传统的1个月的时间缩短至1周左右,且利用该技术加工的茯茶新产品品质无异于传统茯砖,“菌花”香更为浓郁,此得益于人工大量接种纯冠突散囊菌,本研究以此为基础,配制单一基质作为满足冠突散囊菌生长繁殖的基本需求,同时分别添加已知浓度的生物碱单体成分,构建茶叶生物碱单体成分-冠突散囊菌共培养发酵体系(10 d),考察冠突散囊菌对其的发酵特性,为进一步丰富茯茶品质形成机理提供理论依据。

3.2 咖啡碱是一类嘌呤类生物碱,是也茶叶特征性成分之一,占茶叶干重的2%~4%^[17]。本研究以0.2 mg/mL的咖啡碱作为代谢底物添加到冠突散囊菌的发酵培养基中,考察咖啡碱与冠突散囊菌间相互影响,结果表明,该浓度的咖啡碱的添加对冠突散囊菌的生长繁殖,

pH值,剩余葡萄糖含量和总蛋白质含量具有一定影响。咖啡碱的添加能在一定程度上刺激冠突散囊菌的生长,但在发酵过程中,其含量并未出现明显变化,这说明在该发酵系统中,冠突散囊菌既不能将其作为碳源、氮源分解代谢来维持生长,也不能利用共培养发酵体系中其他成分来合成咖啡碱。该结果与前人研究基本一致,且研究表明微生物体系中,利用真菌分解代谢咖啡因远比细菌要难的多^[18],而且只发生在极少数的青霉属和曲霉属类群中,逐级代谢为茶碱和3-甲基黄嘌呤^[19]。

3.3 可可碱与茶碱互为同分异构体,是茶叶中除咖啡碱外两种重要的生物碱,其添加与咖啡碱相似,能在一定程度上刺激冠突散囊菌的生长与繁殖,但不能将其作为碳、氮源消耗和分解,同时经HPLC检测分析,在可可碱、茶碱与冠突散囊菌的共培养发酵体系中均能检测到少量咖啡碱,意味着冠突散囊菌可能具有将可可碱与茶碱作为前提合成咖啡碱的能力,本研究结果为后续研究可可碱、茶碱的具体转化途径及共培养发酵转化体系的进一步优化奠定了重要的前期基础。

参考文献

- [1] 黄浩,刘仲华,黄建安,等.“发花”散茶中“金花”菌的分离鉴定[J].茶叶科学,2010,5:350-354
HUANG Hao, LIU Zhong-hua, HUANG Jian-an, et al. Isolation and identification of “Jinhua” Fungi from the loose tea with ‘Fungus Growing’ [J]. Journal of Tea Science, 2010, 30(5): 350-354
- [2] Xu A, Wang Y, Wen J, et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 14-22
- [3] 刘石泉.茯砖茶金花菌及其相关微生物多样性研究[D].长沙:湖南农业大学,2014
LIU Shi-quan. Diversity research on Fuzhuan brick tea dominant Jinhua fungus and related microbe [D]. Changsha, Hunan Agricultural University, 2014
- [4] 王增盛,施兆鹏,刘仲华,等.论茯砖茶品质风味形成机理[J].茶叶科学,1991,1:49-55
WANG Zeng-sheng, SHI Zhao-peng, LIU Zhong-hua, et al. Discussion on the mechanism of quality and flavor formation of Fuzhuan brick tea [J]. Journal of Tea science, 1991, 1: 49-55
- [5] 熊昌云,屠幼英,欧阳梅,等.人工接种发酵茯砖茶降脂减肥作用研究[J].菌物学报,2011,2:349-354
XIONG Chang-yun, TU You-ying, OUYANG Mei, et al.

- Anti-obesity function naturally and artificially *Eurotium cristatum*-fermentation Fuzhuan brick tea [J]. *Mycosystema*, 2011, 2: 349-354
- [6] 宋鲁彬.中国黑茶药理功能评价及活性物质研究[D].长沙:湖南农业大学,2008
- SONG Lu-bin. Evaluation of physiological and study on ingredient of dark tea [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008
- [7] Fu D, Ryan E P, Huang J, et al. Fermented *Camellia sinensis*, Fu Zhuan Tea, regulates hyperlipidemia and transcription factors involved in lipid catabolism [J]. *Food Research International*, 2011, 44(9): 2999-3005
- [8] 黄浩,郑红发,赵熙,等.基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 的“散茶发花”茯茶加工前后的物质变化分析[J].现代食品科技,2018,34(2):252-264
- HUANG Hao, ZHENG Hong-fa, ZHAO Xi, et al. Analysis of chemical constituents variation in Fu tea before and after processing by the technolu of “fungal fermentation with loose tea” based on UPLC-ESI-Q-TOF-MS [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2018, 2: 252-264
- [9] 刘仲华.黑茶化学物质组学与降脂减肥作用机理研究[D]:北京:清华大学,2014
- LIU Zhong-hua. Research on chemomics and functional mechanism of hypolipidemic and anti-obesity of dark tea [D]. Beijing: Tsinghua University, 2014
- [10] Hakil M, Voisin F, Viniegra-González G, et al. Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamarii*: effects of additional nitrogen sources [J]. *Process Biochemistry*, 1999, 35(1): 103-109
- [11] Wang X, Wan X, Hu S, 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
- [12] 黄浩,郑红发,赵熙,等.不同茶类发花茯茶中“金花”菌的分离、鉴定及产黄曲霉毒素分析[J].食品科学,2017,8:49-55
- HUANG Hao, ZHENG Hong-fa, ZHAO Xi, et al. Identification and aflatoxin production of “Golden Flora” fungi isolated from Fu tea produced from different kinds of tea [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 38(8): 49-55
- [13] A. J, P. S, C. C, et al. Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(5): 1305-1324
- [14] 王增盛,童小麟,朱尚同.茶儿茶素的高效液相色谱测定方法[J].茶叶科学,1991,S1:93-99
- WANG Zeng-sheng, TONG Xiao-lin, ZHU Shang-tong. Quantitative analysis of catechins with HPLC [J]. *Journal of Tea science*, 1991, S1: 93-99
- [15] 王增盛.茶叶中咖啡碱,茶碱,可可碱的高效液相色谱分离测定法[J].茶叶科学,1991,1:100-106
- WANG Zeng-sheng. Method of separation and determination of caffeine theobromine and theophylline in tea with HPLC [J]. *Journal of Tea science*, 1991, 1: 100-106
- [16] 黄浩.“散茶发花”的微生物与化学机制研究[D]:长沙:湖南农业大学,2014
- HUANG Hao. Study the microorganism and chemiactal mechanism in the processing of “fungal fermentation with loose tea” [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2014
- [17] Gramza-Michałowska A. Caffeine in tea *Camellia sinensis*-content, absorption, benefits and risks of consumption [J]. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2014, 18(2): 143-149
- [18] Mazzafera P. Catabolism of caffeine in plants and microorganisms [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2004, 9: 1348-1359
- [19] Hakil M, Denis S, Viniegra-González G, et al. Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 22(5): 355-359