

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90134

红茶菌菌相分析及优势菌的分离与鉴定

Analysis of kombucha microflora and the isolation and identification of dominant bacteria

徐素云 李佳佳 方伟 王艳萍 耿伟涛
XU Su-yun LI Jia-jia FANG Wei WANG Yan-ping GENG Wei-tao

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

摘要:目的:了解红茶菌菌相结构及获取发酵菌株。方法:采用 16S rDNA 高通量测序技术和传统微生物培养法对红茶菌菌相组成和优势菌株进行分析。结果:高通量测序显示红茶菌的细菌群落丰富度与多样性大于真菌。结论:细菌中驹形氏杆菌(*Komagataeibacter*)、醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*) 为优势菌株,真菌中德克酵母属(*Dekkera*)、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*) 为优势菌株。传统平板培养法分离得到 7 株醋酸菌、3 株酵母菌和 1 株乳酸菌,其中食糖驹形氏杆菌(*Komagataeibacter saccharivorans*) 1 株、腐烂苹果醋酸杆菌(*Acetobacter malorum*) 1 株、木驹形氏菌(*Komagataeibacter xylinus*) 4 株、醋酸杆菌属(*Acetobacter*) 1 株、拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*) 2 株、布鲁塞尔德克酒香酵母(*Dekkera bruxellensis*) 1 株、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) 1 株。

关键词:红茶菌;菌相;优势菌;高通量测序;微生物平板培养法

Abstract: Objective: To understand bacterial composition and obtain isolated fermentative strains found in kombucha. **Methods:** The bacterial composition and dominant strains were analyzed using 16S rDNA high-throughput sequencing technology and traditional microbial culture method. **Results:** High-throughput sequencing showed that the bacterial community is richer and more diverse than the fungi community. *Komagataeibacter*, *Acetobacter* and *Lactobacillus* were the dominant bacterial strains, while *Dekkera* and *Zygosaccharomyces* were the dominant fungal strains. At the same time, 7 strains of acetic acid

bacteria, 3 strains of yeast and 1 strain of lactic acid bacteria were isolated by traditional plate culture method, including 1 strain of *Komagataeibacter saccharivorans*, 1 strain of *Acetobacter malorum*, 4 strains of *Komagataeibacter xylinus*, 1 strain of *Acetobacter*, 2 strains of *Zygosaccharomyces bailii*, 1 strain of *Dekkera bruxellensis* and 1 strain of *Lactobacillus plantarum*.

Conclusion: The results from high throughput sequencing were consistent with those obtained from traditional culture method.

Keywords: kombucha; microbial phase; dominant bacteria; high-throughput sequencing; microbial plate culture method

红茶菌是一种历史悠久的民间传统发酵茶饮料,是以糖、茶、水为原料,经醋酸菌、酵母菌和乳酸菌等多种微生物共同自然发酵而成,口感宜人,富含茶多酚、有机酸等多种活性功能成分,营养丰富^[1]。目前红茶菌发酵多使用天然混菌体系家庭式发酵,其菌相组成复杂,菌种差异较大,导致发酵后的红茶菌品质不稳定^[2],发酵菌种的确定是关键因素。在菌相学分析方面,红茶菌中可能出现的优势菌主要包括三大类:醋酸菌、酵母菌及乳酸菌^[3]。其中又以醋酸菌和酵母菌更为常见,且不同产地来源的红茶菌其菌相组成有所不同,代谢产物也不一样,因此想要实现工业化生产,还需进一步对菌种进行基础研究。

研究拟以河南济源地区民间流传的红茶菌为原料,采用传统分离培养技术,对红茶菌发酵液中可培养微生物进行分离鉴定,同时,采用高通量测序技术对红茶菌菌相进行测序和菌相组成分析,一方面可系统了解红茶菌中微生物多样性及菌相结构,另一方面可为丰富微生物菌种资源库及实现红茶菌的工业化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 原辅材料与试剂

绿茶:杭州明杭茶叶有限公司;

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31801514)

作者简介:徐素云,女,天津科技大学在读博士研究生。

通信作者:耿伟涛(1985—),男,天津科技大学讲师,博士。

E-mail: gengwt@tust.edu.cn

收稿日期:2022-01-02

蔗糖:河南金润食品添加剂有限公司;

DNA Marker Taq 酶、dNTP、引物、琼脂糖、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、酵母基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.2 菌种及培养基

红茶菌母液菌种:河南中沃实业有限公司;

MRS 培养基、Elliker 培养基、YPD 培养基:天津市江天化工技术有限公司;

溴甲酚紫显色培养基:天津市博迪化工有限公司。

1.2 仪器与设备

恒温培养箱:HT-400B 型,上海赫田科学仪器有限公司;

台式高速冷冻离心机: Sorvall ST 8R 型, 美国 Thermo fisher Scientific 公司;

凝胶成像采集分析系统: Gel Doc XR+ 型, 美国伯乐 BIO-RAD 公司;

扩增仪: ETC 811 PCR 型, 上海珂准仪器有限公司;

显微镜: YS100 型, 日本 Nikon 公司;

超净工作台烘箱: HF safe 900 型, 杭州旭众机械设备有限公司;

酶标仪: Multiskan GO 型, 美国 Thermo 公司;

电泳仪: DYY-6D 型, 北京市六一仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 红茶菌发酵液制备 将 10 g 绿茶放入刚煮沸的开水中浸泡 10 min, 用纱布过滤后加入 80 g 蔗糖, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 分装于食品级玻璃瓶中, 90 °C 水浴 10 min。冷却后按体积分数 8% 接种量将红茶菌母液接种于茶汤中, 常温发酵 12 d, 得到 pH 值为 2.3~2.9 的红茶菌发酵液。

1.3.2 采用 16S rDNA 和 ITS 高通量分析红茶菌中微生物组成 选择红茶菌发酵液作为样品进行微生物相探究, 试验分为细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 测序, 由广州基迪奥生物科技有限公司完成。

(1) DNA 提取及扩增: 采用基因组提取试剂盒提取总 DNA。以 20~30 ng DNA 为模板, 细菌选择 V4~V5 区通用扩增引物 341F 和 806 R 的 16S rDNA 基因进行扩增^[4]; 真菌选择引物 ITS1F 和 ITS2 的 ITS 区进行 PCR 扩增试验^[5-7], 引物设计见表 1。

(2) 生物信息学分析:

① 序列处理与优化: 通过 Illumina Miseq 高通量测序平台整理原始数据, 采用 QIIME 软件检查及剔除嵌合体序列^[8]。

表 1 PCR 引物设计

Table 1 Primers of PCR

组别	引物名称	引物序列
细菌	F1	5'-AYTGGGYDTAAAGNG
	R5	5'-CCGTCAATYYTTTTRAGTTT
真菌	ITS1	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

② Alpha 多样性分析: 根据最低的测序深度, 随机重复提取 OTU 丰度矩阵中的所有样本, 并使用 QIIME 软件计算每个样本的生物多样性, 主要包括 Shanno、Simpson、Chao1、Ace 指数等^[9]。

③ 分类信息分析: 通过 RDP classifier 软件对各样品中 OTU 依次进行门、纲、目、科、属水平的分类统计。

1.3.3 红茶菌中醋酸菌、乳酸菌、酵母菌的筛选与鉴定

(1) 菌株初筛: 参照王洁琛等^[10-11]的方法略作修改。将红茶菌发酵液依次稀释为 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ 浓度的样品, 涂布至不同分离培养基上, 观察菌落特征及菌株个体形态, 初步区分菌种的差异和类别。在溴甲酚紫显色培养基上挑选有明显菌落形态、革兰氏染色阴性和过氧化氢酶试验阳性的菌株, 初步视为醋酸菌; 在 MRS 及 Elliker 培养基上挑选有明显菌落形态、革兰氏染色阳性和过氧化氢酶试验阴性菌株, 初视为乳酸菌; 在 YPD 培养基上挑选具有明显菌落形态特征, 镜检个体较大的菌株, 初步视为酵母菌。

(2) 分子生物学鉴定: 参照陈宠等^[12]的方法, 并将 PCR 扩增产物送至广州基迪奥生物有限责任公司进行测序, 其测序结果上传 NCBI 数据库进行 BLAST 在线比对分析。

1.3.4 数据统计分析 采用 SPSS 16.0 和 Origin 8.5 软件分析和处理数据。

2 结果与讨论

2.1 红茶菌中细菌和真菌群落多样性及其组成

2.1.1 细菌及真菌 Alpha 多样性 由表 2 可知, 红茶菌中细菌及真菌的 Coverage 值均达到 99.9% 以上, 表明样本测序结果可以反映样品的真实情况, 即此次取样是合理的。此外, 红茶菌中细菌的 Shannon、Simpson、ACE、Chao1 指数和 OTU 数量均极显著大于真菌 (P<0.01), 表明细菌群落丰富度与多样性大于真菌, 与徐伟等^[4]的结果一致。

表 2 Alpha 多样性[†]

Table 2 Alpha diversity

组别	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao 指数	ACE 指数	OTU 数量	Coverage/%
细菌	1.82±0.15	0.50±0.05	307.00±21.51	307.00±22.51	307.00±24.00	99.99±0.00
真菌	1.47±0.11 ^{##}	0.47±0.09 ^{##}	39.00±3.25 ^{##}	39.00±2.22 ^{##}	38.00±2.00 ^{##}	99.95±0.00

† #. 真菌组与细菌组比较具有显著性差异 (P<0.05); ##. 真菌组与细菌组比较具有极显著性差异 (P<0.01)。

2.1.2 细菌的微生物组成 由图 1(a)可知,在门水平下,从红茶菌发酵液中共鉴定出 5 个细菌门,其中变形菌门 (*Proteobacteria*) 相对含量占绝对优势,相对丰度高达 99.20%,其次为厚壁菌门 (*Firmicutes*),相对丰度为 0.54%,其他菌门总体丰度为 0.07% 左右。因此,在门水平下,可以确定变形菌门为优势菌。由图 1(b)可知,在纲水平下,共鉴定出 5 个细菌纲,其中丰度最高的是 α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*),相对丰度为 99.20% 左右,其次为芽孢杆菌纲 (*Bacilli*),相对丰度为 0.50%,其他菌纲总体丰度在 0.07% 左右,表明 α -变形菌纲为优势菌。由图 1(c)可知,在目水平下,共鉴定出 5 个细菌目,丰度最高的是醋酸菌目 (*Acetobacterales*),相对丰度为 99.20%,其次是乳杆菌目 (*Lactobacillales*),含量占 0.48%,还有少量的拟杆菌目 (*Bacteroidales*)、梭杆菌目 (*Fusobacterium*) 和栖热菌目 (*Thermales*) (共占 0.07% 左右),表明目水平下醋酸菌目及乳杆菌目为优势菌。由图 1(d)可知,在科水平下,共鉴定出 6 个细菌科,丰度最高的是醋酸菌科 (*Acetobacteraceae*) 占 92.20%,其次是乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*)、明串珠菌科 (*Leuconostocaceae*),分别占 0.45%,

0.03%,还有少量的拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*)、梭杆菌科 (*Fusobacteriaceae*)、栖热菌科 (*Thermaceae*) (共占 0.05% 左右),表明科水平下醋酸菌科和乳杆菌科为优势菌。由图 1(e)可知,在属水平下,共鉴定出 7 个细菌属,丰度最高的是驹形氏杆菌 (*Komagataeibacter*) 占 97.85%,其次是醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 分别占 1.23%,0.43%,还有少量的明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、亚栖热菌属 (*Meiothermus*) (总体丰度为 0.08% 左右),表明驹形氏杆菌属、醋酸杆菌属和乳酸杆菌属为优势菌,与 Xia 等^[2] 结果相似。驹形氏杆菌多为专性好氧菌,可产生细菌纤维素,且产酸能力强,在工业上常用于生产醋酸^[13]。醋酸杆菌对有机酸及挥发性风味物质的形成至关重要。乳酸杆菌属是红茶菌发酵液中常见的优势菌属,能使红茶菌口感更柔和饱满,促进挥发物质酯类、酸类、醇类等物质的产生^[14]。因此,将红茶菌细菌群落在门、纲、目、科、属水平下的组成关系绘制成图(见图 2)。

由图 2 可知,红茶菌发酵液的细菌菌落组成中,主要为驹形氏菌属(97.85%)、醋酸菌属(1.23%)和乳酸菌属

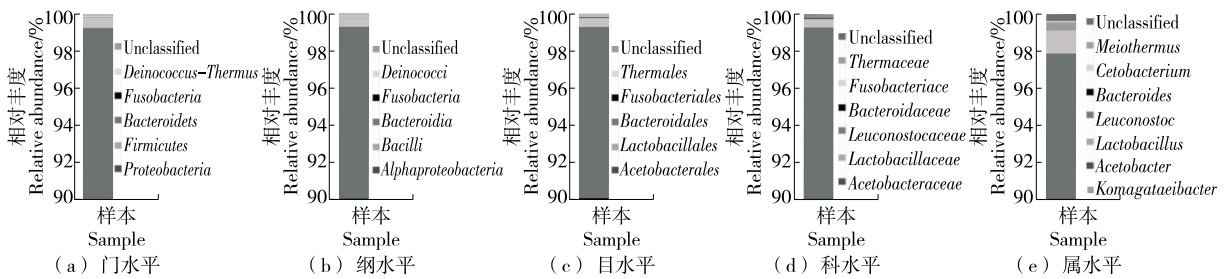


图 1 各水平下细菌群落的相对百分含量
Figure 1 Relative percentage of bacterial community at each level

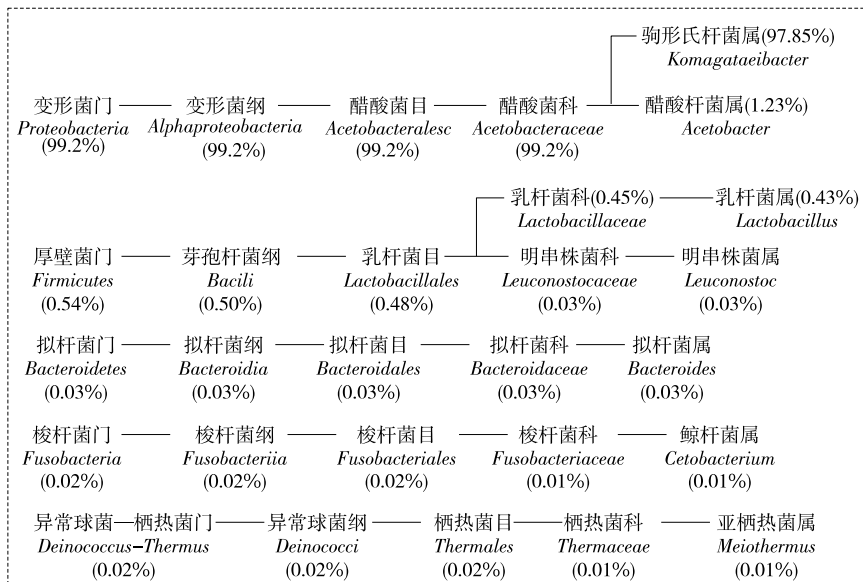


图 2 细菌群落组成关系
Figure 2 Microbial community composition of bacteria

(0.43%)，其中驹形氏菌属和醋酸菌属均属于变形菌门，并且是变形菌门的两大主要菌属；乳杆菌属属于厚壁菌门，在厚壁菌门中所占相对比例达 79.6%。

2.1.3 真菌的微生物组成 由图 3 可知，在门水平下，子囊菌门(*Ascomycota*)的丰度最高，占 92.87%，为门水平下的优势菌。子囊菌门是真菌中最大的一个门，相对于其他真菌而言，子囊菌门结构复杂，因此称为高等真菌；在纲水平下，酵母纲(*Saccharomycetes*)的丰度最高，占 92.04%，其次为粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)，占 0.001%，表明酵母纲为优势菌；在目水平下，酵母目(*Saccharomycetales*)的丰度最高，占 92.04%，其次为粪壳菌(*Sordariales*)占 0.001%，可认为酵母目为目水平下的优势菌。粪壳菌目多含有各种腐败菌，可能是传统自然发酵红茶菌中不良的杂菌，可对风味产生不良影响，与王春龙^[15]结果相似；在科水平下，丰度最高的是酵母科(*Saccharomycetaceae*)，占 71.5%，其他未鉴定菌科总体丰度为 20.55%左右；在属水平上，丰度最高的是德克酵母属(*Dekkera*)占 42.1%，其次是接合酵母

属(*Zygosaccharomyces*)占 29.42%，其他未识别的属占 20.74%，可认为德克酵母属、接合酵母属为优势菌。酿酒酵母和接合酵母是传统发酵制品中最常用的菌种，也是产生酒精及各种挥发性风味物质的主要菌种，在发酵过程中，两种酵母均能够产生酯类、高级醇类和酸类等挥发性化合物^[16]。因此，将红茶菌真菌群落在门、纲、目、科、属水平下的组成关系绘制成图(见图 4)。

由图 4 可知，传统红茶菌发酵液的真菌菌落构成中，德克酵母属和接合酵母属为主要优势菌属，且均属于酵母菌纲。

2.2 红茶菌中优势菌的分离与鉴定

2.2.1 醋酸菌的筛选与鉴定 通过溴甲酚紫平板筛选试验、过氧化氢酶试验、革兰氏染色试验及菌落个体形态观察，初步筛选出 7 株具有典型形态的菌株，其菌落特征和镜检形态观察如图 5 所示，特征描述见表 3。

由图 6 可知，扩增产物电泳带均明亮单一，其片段长度均为 1 500 bp 左右。将 7 株菌株的测序结果上传

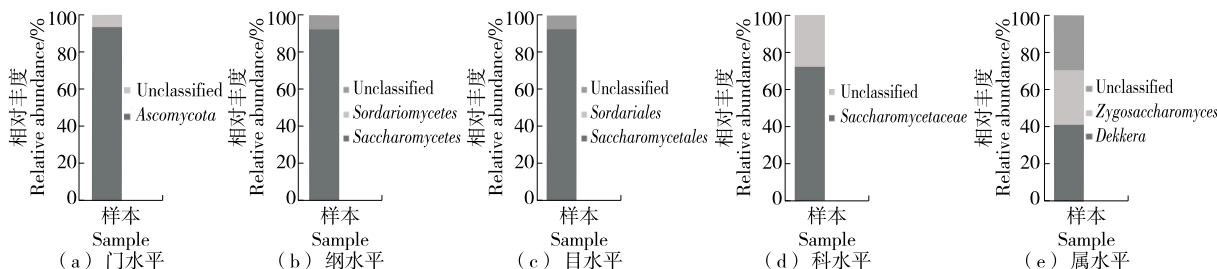


图 3 各水平下真菌群落的相对百分含量

Figure 3 The relative percentage of microorganisms at the various level

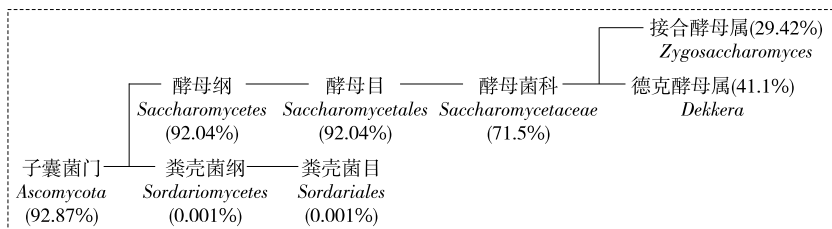
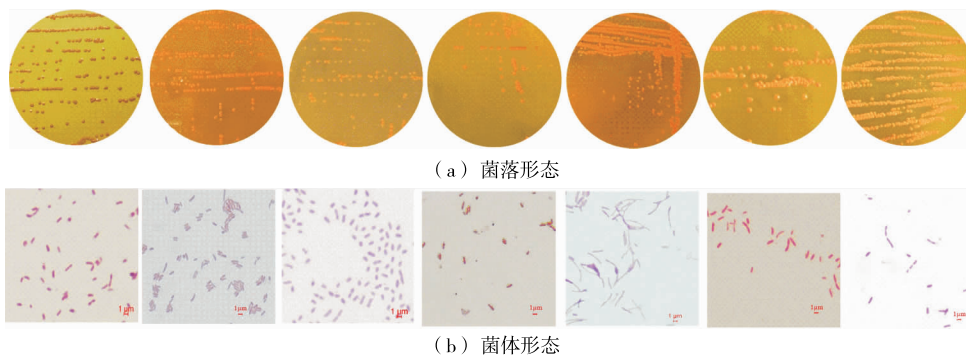


图 4 真菌群落组成关系

Figure 4 Microbial community composition of fungus



从左至右依次编号为 1478, 1480, 1506, 1508, 1510, 1512, 1514

图 5 各菌株的菌落及菌体形态

Figure 5 Bacterial colonies and individual morphology of each strain

表 3 醋酸菌的菌落形态和镜检形态的特征描述

Table 3 The described of colony morphology and microscopic morphology of acetic acid bacteria

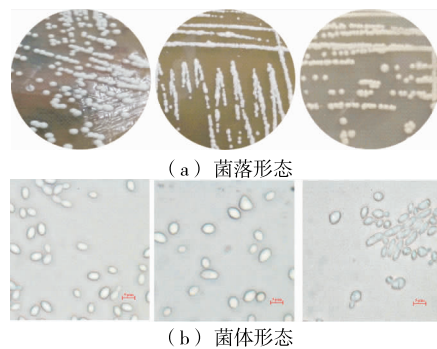
菌株编号	菌落形态	液体形态	镜检形态
1478	圆形,偏黄,扁平,边缘整齐易挑起,有酸甜味	产膜能力差	单生或成对出现,G-短杆
1480	圆形,偏红,扁平,边缘整齐易挑起,有酸甜味	不产膜	单生或成对出现,G-短杆
1506	圆形,偏黄,扁平,边缘整齐易挑起,有酸甜味	产膜能力强	单生或成对出现,G-小短杆
1508	圆形,偏黄,扁平,边缘整齐易挑起,有酸甜味	产膜能力强	单生或成对出现,G-小短杆
1510	圆形,偏红,扁平,边缘整齐易挑起,有酸甜味	产膜能力少差	单生或成对出现,G-中长杆
1512	圆形,偏黄,扁平,边缘整齐易挑起,有酸甜味	产膜能力强	单生或成对出现,G-短杆
1514	圆形,偏黄,扁平,边缘整齐易挑起,有酸甜味	产膜能力强	单生或成对出现,G-短杆

NCBI 数据库进行 BLAST 在线比对发现,菌株 1478 与食糖驹形氏杆菌(*Komagataeibacter saccharivorans*)比对相似度为 98%,菌株 1480 与腐烂苹果醋酸杆菌(*Acetobacter malorum*)比对相似度为 99%,菌株 1506/1508/1512/1514 与木驹形氏菌(*Komagataeibacter xylinus*)比对相似度均为 100%,菌株 1510 与醋酸杆菌属(*Acetobacter*)比对相似度为 100%。结合醋酸菌落形态、个体形态分析,参考细菌鉴定手册,可以鉴定菌株 1478 为食糖驹形氏杆菌、1480 为腐烂苹果醋酸杆菌、1506/1508/1512/1514 为木驹形氏菌醋酸菌、1510 为醋酸杆菌属。7 株菌大致分为 4 个种 2 个属,与高通量研究结果吻合,表明试验分离出的菌株为优势菌株,其中 1506/1508/1512/1514 木驹形氏菌的产酸能力、产膜能力较强,1478 食糖驹形氏杆菌的代谢糖能力强且能产生很多风味物质,1510 醋酸杆菌经常被用来酿造食醋^[17-18]。

2.2.2 酵母菌的筛选与鉴定 通过对红茶菌发酵液中真菌的分离筛选,挑选出 3 株疑似酵母菌株,其菌落特征和镜检形态观察如图 7 所示,特征描述见表 4。

由图 8 可知,扩增产物电泳带均明亮单一,其片段长度均为 600 bp 左右。将 3 株菌株的测序结果上传 NCBI 数据库进行 BLAST 在线比对发现,菌株 1482、1484 与拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)比对相似度均为 100%,菌株 1486 与布鲁塞尔德克酒香酵母(*Dekkera bruxellensis*)比对相似度为 98%。结合酵母菌落形态、个体形态分析,参考真菌鉴定手册,可以鉴定筛选的目的酵母菌 1482 及 1484 为拜耳接合酵母、1486 为布鲁塞尔德克酒香酵母。分离出的 3 株菌大致分为接合酵母属和德

克酵母属 2 个属,与高通量研究结果相吻合,再一次证明了分离出的菌株为优势菌株,其中菌株 1482 及 1484 为拜耳接合酵母,被应用于各种发酵制品如酒类、醋类,其代谢能力强,菌株风味好^[19];菌株 1486 酿酒酵母因代谢乙



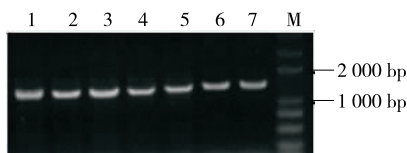
从左至右依次编号为 1482,1484,1486
图 7 各菌株的菌落及菌体形态

Figure 7 Bacterial colonies and individual morphology of each strain

表 4 酵母菌落形态和镜检形态的特征描述

Table 4 Cellular and colonial morphology of yeast

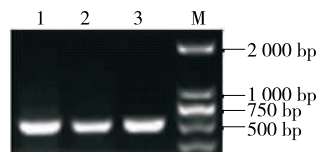
菌株编号	菌落形态	镜检形态
1482	圆形菌落,表面光滑,较大,低凸起,边缘齐整,乳白色	长杆,产生假菌丝
1484	圆形菌落,表面光滑,低凸起,边缘齐整,乳白色	椭圆形,棱角较大
1486	圆形菌落,表面光滑,低凸起,边缘齐整,乳白色	椭圆形,较小



M 为 DNA Marker;1~8 依次为菌株 1478、1480、1506、1508、1510、1512 和 1514 的扩增产物

图 6 PCR 产物电泳图

Figure 6 Electrophoresis of PCR products



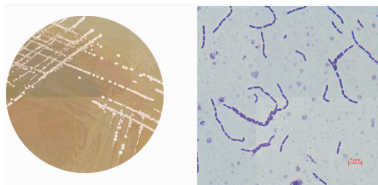
M 为 DNA Marker;1~3 依次为菌株 1482、1484 和 1486 的扩增产物

图 8 PCR 产物电泳图

Figure 8 Electrophoresis of PCR products

醇能力强,常被用作酿酒菌种^[20]。

2.2.3 乳酸菌的筛选与鉴定 从 MRS 及 Elliker 培养基中筛选能使溴甲酚紫-乳粉培养基变黄,革兰氏阳性,过氧化氢接触酶阴性的菌株,初步筛选出一株菌落干燥,较小,圆形,边缘整齐,低凸起,白色,镜检为短杆的菌株,其菌落特征和镜检形态观察如图 9 所示。

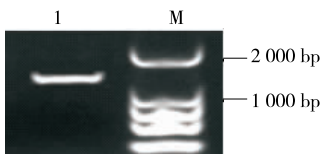


(a) 菌落 (b) 菌体

图 9 菌株 1298 的菌落、菌体形态图

Figure 9 Morphology of bacterial colonies and bacteria of strain 1298

由图 10 可知,扩增产物电泳带均明亮单一,其片段长度均为 1 500 bp 左右。将菌株的测序结果上传 NCBI 数据库进行 BLAST 在线比对发现,菌株 1298 与植物乳杆菌(*Lactobacillus. plantarum*)的同源性为 99%。结合乳酸菌落形态、个体形态分析,参考细菌鉴定手册,可以鉴定筛选的目的乳酸菌 1298 为植物乳杆菌,与高通量研究结果相吻合,表明分离出的菌株为优势菌株。植物乳杆菌是红茶菌发酵液常见优势菌株,具有产乳酸、丁酸等特性^[21-22]。



M 为 DNA Marker;1 为菌株 1298 扩增产物

图 10 PCR 产物电泳图

Figure 10 Electrophoresis of PCR products

3 结论

采用 16S rDNA 和 ITS 高通量分析了红茶菌发酵液中微生物组成。高通量测序结果表明:细菌群落丰富度与多样性大于真菌。细菌中驹形氏杆菌(*Komagataeibacter*)、醋酸杆菌属(*Acetobacter*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)为优势菌株;真菌中德克酵母属(*Dekkera*)和接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)为优势菌株。通过传统平板分离法得到醋酸菌 7 株,分别为食糖驹形氏杆菌 1478 (*Komagataeibacter saccharivorans* 1478)、腐烂苹果醋酸杆菌 1480 (*Acetobacter malorum* 1480)、木驹形氏菌 1506/1508/1512/1514 (*Komagataeibacter xylinus* 1506/1508/1512/1514)、醋酸杆菌属 1510 (*Acetobacter*1510);酵母菌 3 株,分别为拜耳接合酵母 1482/1484 (*Zygosaccharomyces bailii* 1482/1484)和布鲁塞尔德克酒香酵母

1486(*Dekkera bruxellensis* 1486);乳酸菌 1 株,为植物乳杆菌 1298(*Lactobacillus. plantarum* 1298)。后续需对优势菌株性能进行深入研究。

参考文献

[1] MINDANI I, NILAKSHI J, CANDY C, et al. Retracted: Application of the Kombucha ‘tea fungus’ for the enhancement of antioxidant and starch hydrolase inhibitory properties of ten herbal teas[J]. Food Chemistry, 2016, 194(1): 304-311.

[2] XIA X D, DAI Y Q, WU H, et al. Kombucha fermentation enhances the health-promoting properties of soymilk beverage[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 62: 103549.

[3] SOMNATH C, SEMANTEEN B, ANTONIS C, et al. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 220(30): 63-72.

[4] 徐伟, 葛阳阳, 陈翠婷, 等. 基于宏基因组技术分析传统红茶菌中菌群组成及其主要代谢通路[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 119-129.

XU Wei, GE Yang-yang, CHEN Cui-ting, et al. Microorganism composition and main metabolic pathways analysis of traditional Kombucha by metagenomic technology[J]. Technology Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(5): 119-129.

[5] GAO F F, ZENG G H, WANG B, et al. Discrimination of the geographic origins and varieties of wine grapes using high-throughput sequencing assisted by a random forest model [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 145: 111333.

[6] 李洋, 赵欣, 张玉, 等. 牦牛酸乳中耐酸耐胆盐乳酸菌的分离筛选和鉴定[J]. 食品与机械, 2018, 34(7): 23-28.

LI Y, ZHAO X, ZHANG Y, et al. Separation and screening of lactic acid bacteria from the traditional yak yogurt resistant against of acid and bile salts[J]. Food & Machinery, 2018, 34(7): 23-28.

[7] LIN S P, HUANG Y H, CHEN Y K, et al. Isolation and identification of cellulose-producing strain *Komagataeibacter intermedius* from fermented fruit juice[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 151(20): 827-833.

[8] RUAN R, FENG T, LI Y, et al. Screening and identification of female-specific DNA sequences in octaploid sturgeon using comparative genomics with high-throughput sequencing[J]. Genomics, 2021, 113(6): 4 237-4 244.

[9] GULITZ A, STADIE J, EHRMANN M, et al. Comparative phylogenomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis[J]. Appl Microbiol, 2013, 114(4): 1 082-1 091.

[10] 王洁琛, 陈志周, 王颖, 等. 红茶菌中醋酸菌和酵母菌的分离鉴定及其相互作用[J]. 中国酿造, 2020, 39(3): 126-130.

WANG Jie-chen, CHEN Zhi-zhou, WANG Ying, et al. Isolation, identification and interaction of acetic acid bacteria and yeast in kombucha[J]. Chinese Brew, 2020, 39(3): 126-130.

[11] 郭志华, 张兴桃, 段腾飞, 等. 泡菜中降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选及生物学特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(17):

- 66-72.
GUO Zhi-hua, ZHANG Xing-tao, DUAN Teng-fei, et al. Screening and biological characterization of nitrite degrading lactic acid bacteria in kimchi[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(17): 66-72.
- [12] 陈宠, 苏亚平, 岳雅欣, 等. 海棠酵素微生物菌相分析及其功能初步研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 70-76.
CHEN Chong, SUN Ya-ping, YUE Ya-xin, et al. Analysis of microbial community in *Malus prunifolia* Jiaosu and preliminary study on its function[J]. Chinese Brew, 2020, 39(8): 70-76.
- [13] JIANG Y, LU X, ZHANG C, et al. Microbial dynamics and flavor formation during the traditional brewing of *Monascus* vinegar[J]. Food Research International, 2019, 125: 108531.
- [14] PEI J J, JIN W G, GUO X Y, et al. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by *Lactobacillus plantarum* found in conventional kombucha[J]. Food Control, 2020, 110: 106923.
- [15] 王春龙. 红茶菌发酵饮料中的菌群分析与功能评价[D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 20-27.
WANG Chun-long. Microflora analysis and functional evaluation of kombucha fermented beverage[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017: 20-27.
- [16] HIRST M B, RICHTER C L. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2016, 67(4): 361-370.
- [17] DE ROOS J, DE VUYST L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 115-119.
- [18] AHMET E, YETIMAN ZULAL K. Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 204: 9-16.
- [19] GAGGIÀ F, BAFFONI L, GALIANO M, et al. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity[J]. Nutrients, 2019, 11(1): 1-22.
- [20] MARSH A J, O'SULLIVAN O, HILL C, et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples[J]. Food Microbiology, 2014, 38(1): 171-178.
- [21] 赵沁雨, 兰天, 袁取予, 等. 植物乳杆菌发酵对果汁品质的影响研究概述[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(16): 300-307.
ZHAO Qin-yu, LAN Tian, YUAN Qu-yu, et al. Research progress on the effect of *Lactobacillus plantarum* fermentation on juice quality [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 300-307.
- [22] LIN R Q, SUN Y, MU P Q, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation modulates the gut microbiota to promote butyrate production, protecting against deoxynivalenol exposure in nude mice[J]. Biochemical Pharmacology, 2020, 175: 113868.
-
- (上接第 41 页)
- [31] JING H, KITTS D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugarMaillard reaction products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(7): 1 007-1 015.
- [32] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 441-444.
WU Hui-ling, WANG Zhi-qiang, HAN Chun, et al. Factors affecting the Maillard reaction[J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(5): 441-444.
- [33] HODGE J E. Chemistry of browning reactions in model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1953, 1(15): 928-943.
- [34] YAYLAYAN V A, HUYGHUES-DESPOINTES A. Chemistry of Amadori rearrangement products: Analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34(4): 321-369.
- [35] BRANDS C M J, BOEKEL MARTINUS A J S. Kinetic Modeling of reactions in heated monosaccharide-Casein systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(23): 6 725-6 739.
- [36] YAYLAYAN Varoujan A, KEYHANI Anahita. Origin of carbohydrate degradation products in L-Alanine/D-¹³C glucose model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(6): 2 415-2 419.
- [37] WEENEN H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry[J]. Food Chemistry, 1998, 62(4): 393-401.
- [38] SMARRITO-MENOZZI C, MATTHEY-DORET W, DEVAUD-GOUMOENS S, et al. Glycerol, an underestimated flavor precursor in the Maillard reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(43): 10 225-10 230.
-
- (上接第 46 页)
- [16] VALENTOVÁ H, SKROVÁNKOVÁ S, PANOVSÁ Z, et al. Time-intensity studies of astringent taste[J]. Food Chemistry, 2002, 78(1): 29-37.
- [17] OZDAL T, CAPANOGLU E, ALTAY F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes[J]. Food Research International, 2013, 51(2): 954-970.
- [18] 王兴亚, 庞广昌, 李阳. 电子舌与真实味觉评价的差异性研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 213-216, 220.
WANG Xing-ya, PANG Guang-chang, LI Yang. Research progress of difference between electronic tongue and real taste evaluation[J]. Food & Machinery, 2016, 32(1): 213-216, 220.
- [19] 张清华, 张玲. 菊花化学成分及药理作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(2): 60-63.
ZHANG Qing-hua, ZHANG Ling. Research advance in chemical composition and pharmacological action of *chrysanthemum morifolium*[J]. Food and Drug, 2007, 9(2): 60-63.