

## 研究报告



## 红茶菌群中菌株相互作用影响菌体生长和代谢

汪鹏辉 张慧霞 刘斌杰 杨民和\*

福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350107

**摘要:**【背景】红茶菌是一种由细菌和酵母菌共生发酵而成的传统茶饮料。该饮料中含有多种有益人体健康的营养物质,具有促进消化、消炎、抗菌、抗糖尿病等生理作用。这些有益的代谢物是以醋酸菌和酵母菌为主的微生物相互作用而产生的。因此,红茶菌是一个优良的研究微生物相互作用的体系。【目的】分析不同菌株单独培养和混合培养对菌体生长和代谢产物的影响,了解红茶菌群中不同微生物之间的相互作用关系。【方法】利用稀释分离法获得红茶菌优势菌株,并采用形态观察和分子生物学分析相结合鉴定菌株。设计不同的培养组合,考察菌株单独培养和混合培养对发酵液 pH 值、酸度、还原糖和总茶多酚含量的影响。【结果】不同菌株及其组合均能在茶糖水中生长,但生长能力存在显著差异。菌株生长能力与发酵产生还原糖的能力密切相关。葡萄糖醋酸杆菌发酵产生有机酸的能力强,从而影响发酵液的 pH 值。菌株发酵显著提升发酵液中总多酚类化合物的含量。与各菌株单独培养相比,3 个菌株的混合培养有利于菌群稳定,显著促进发酵液中还原糖、有机酸的产生和 pH 值下降,一定程度上促进多酚类物质的含量。【结论】红茶菌群由多种微生物组成,菌株之间有着复杂的相互作用关系。不同菌株之间的混合有利于形成稳定的菌群,促进有机酸、还原糖和多酚化合物的代谢,是红茶菌饮料产生酸甜滋味和生理活性的生化基础。

**关键词:** 红茶菌, 微生物相互作用, 混合培养, 菌体生长, 代谢

## Interaction of strains in kombucha microbial community affects their growth and metabolism

WANG Penghui ZHANG Huixia LIU Binjie YANG Minhe\*

College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350107, China

**Abstract:** [Background] Kombucha is a traditional tea beverage fermented by a symbiotic consortium of bacteria and yeasts. A number of metabolites in kombucha are beneficial to human health such as promoting digestion, anti-inflammatory, antibacterial and anti-diabetes. The beneficial metabolites are mainly produced by complex microbial interactions dominated by acetic acid bacteria and yeasts. Therefore, kombucha is an excellent model for studying metabolic process in a symbiotic microbial consortium. [Objective] To study the effects of interactions among different microorganism on metabolites in kombucha by culturing microbial strains isolated from kombucha singly or in combination under

**Foundation items:** Natural Science Foundation of Fujian Province (2017J01623); Guiding Projects of Science and Technology Program of Fujian Province (2020N1010207)

\*Corresponding author: E-mail: minhe214@fjnu.edu.cn

Received: 26-03-2020; Accepted: 28-08-2020; Published online: 17-11-2020

基金项目: 福建省自然科学基金(2017J01623); 福建省科技计划引导性项目(2020N1010207)

\*通信作者: E-mail: minhe214@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-26; 接受日期: 2020-08-28; 网络首发日期: 2020-11-17

different culture conditions. **[Methods]** Dominant microbial strains were isolated from kombucha consortium by agar plate dilution method. The isolated microbes were identified by morphological observation and molecular biology methods. Different culture combinations were designed to investigate the effects of single-culture and mixed-culture on the pH value, acidity, reducing sugar and total polyphenol contents in fermentation broth. **[Results]** The isolated microbial strains grew well in tea sugar medium singly or in combination, but with different growth rate. The microbial growth rate was closely related to the fermentation ability of the tested strain to produce reducing sugar. pH value of fermentation broth was significantly affected by *Komagataeibacter* sp. strain C6, which showed a strong ability to produce organic acids. The fermentation process by microbes in the broth significantly increased the contents of total polyphenols in the fermentation broth. Compared to the single-culture, the mixed-culture of three strains contributed to the stability of the microbial community, and significantly promoted the production of reducing sugar, organic acid and decreasing of pH value, and slight increase of polyphenols in kombucha. **[Conclusion]** Kombucha is a symbiotic consortium-fermented system with complex interactions between bacteria and yeasts. The multi-strains co-culturing contributes to formation of the stable microbial communities, and also promotes the metabolism of organic acids, reducing sugars and polyphenols in kombucha. The symbiotic fermentation with different microbes is the biochemical basis for the popular kombucha drinks with flavor taste and beneficial physiological activity.

**Keywords:** kombucha, microbial interaction, mixed culture, microbial growth, metabolism

红茶菌(又名康普茶, Kombucha), 在我国旧称“海宝”, 是一种以茶糖水为原料, 通过细菌和酵母组成的共生菌群(Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast, SCOBY)发酵而成、富含益生菌及活性因子的传统发酵茶饮料<sup>[1-3]</sup>。参与红茶菌发酵的微生物种类众多, 主要的微生物有酵母菌、醋酸菌和乳酸菌, 但以酵母菌和醋酸菌居多<sup>[1-2,4]</sup>。现今生产红茶菌饮料以自然发酵、家庭自制和室温静置培养为主, 微生物利用茶糖水里的白糖和茶叶成分而生长, 产生纤维素, 逐渐在液体表面形成一层明显的薄膜——生物膜(Biofilm)<sup>[2,4-5]</sup>。随着发酵时间的延长, 生物膜逐渐增厚, 并伴随着产生 CO<sub>2</sub>, 在发酵液中不时冒出微小的气泡。7-15 d 后发酵完成, 获得一种富含益生菌、细菌纤维素、有机酸和茶多酚等功能成分的酸甜清爽的饮料; 红茶菌已被证实有诸多益生功效, 如抗菌、抗糖尿病、抗炎、抗高血压、抗癌、保肝、保护肠胃等<sup>[1,4,6]</sup>。

在世界范围流行的过程中, 红茶菌发酵系统因发酵原料、微生物类群、产地环境、发酵方式等因素的影响, 生产的红茶菌饮料不尽相同<sup>[1,5]</sup>。红茶菌发酵系统是一个典型的微生物共生体系。

就参与发酵的微生物种群而言, 采用人工分离的方法获得了大量的菌株<sup>[7-9]</sup>, 非培养的高通量测序技术应用于红茶菌菌群分析也积累了一定的试验数据<sup>[10-11]</sup>, 让人们对于红茶菌发酵系统中的核心微生物有了大致的了解。微生物代谢方面, 对发酵原料中白糖(蔗糖)的代谢研究相对较多, 了解也比较清楚<sup>[3,5]</sup>。然而, 人们对菌群中不同类型微生物之间的相互作用关系, 以及共生体系对原料中茶叶成分的代谢和利用效率目前并不清楚。越来越多的研究表明, 微生物之间的共生和协同代谢是提高红茶菌益生效益、风味和质量的关键。

近年来对红茶菌的研究多集中于发酵原料<sup>[12]</sup>、发酵工艺优化<sup>[13-14]</sup>、验证益生功效<sup>[1,4]</sup>和成分分析<sup>[15]</sup>等。对红茶菌群中菌株之间相互作用关系的研究较少。通过了解发酵体系中优势菌株之间的相互作用关系, 应用现代工业发酵、食品微生物核心菌群及微生物生态学的理论和技术, 可以构建稳定、可重复的人工混合菌剂, 促进传统发酵食品的标准化工业生产<sup>[16-18]</sup>。本研究从福建省漳州市乡村采集到一份红茶菌样品, 分离获得微生物菌株; 选取其中的 3 个优势菌株, 设置菌株单独发酵和混合发酵方式, 分析不同发酵方式对发酵液

中菌体生长和代谢产物的影响,以期为利用菌株之间的互作关系构建人工菌群提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 红茶菌和培养基

红茶菌饮料采集自福建省漳州市民间,由福建师范大学生命科学学院陈志红博士惠赠。

酵母菌培养基(g/L): 酵母浸膏 10.0, 蛋白胨 15.0, 无水葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水 1 000 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 20 min。

醋酸菌培养基(g/L): 酵母浸膏 10.0, 蛋白胨 5.0, 无水葡萄糖 50.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水 1 000 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。冷却至 55 °C 左右,加入 2% (体积分数)无水乙醇和 165 °C 干热灭菌 2 h 的  $\text{CaCO}_3$  10.0 g, 分装、冷却后备用。

乳酸菌培养基(g/L): 酵母浸膏 5.0, 无水葡萄糖 10.0, 番茄汁 150 mL, 蛋白胨 5.0, 溴甲酚绿 0.03, 山梨酸 1.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.12, NaCl 0.12,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5, KCl 0.12,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.12, 琼脂 15.0, 蒸馏水 850 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

红茶糖水培养液(g/L): 红茶 6.0, 白糖 40.0, 蒸馏水 1 000 mL。

### 1.2 主要试剂和仪器

无水葡萄糖、碳酸钙、无水乙醇和氢氧化钠均为分析纯,西陇化工股份有限公司;邻苯二甲酸氢钾(分析纯),天津福晨化学试剂厂;酵母浸膏、琼脂和蛋白胨,国药集团化学试剂有限公司;红茶茶叶和白糖,本地大型超市;Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒(离心柱型)、引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit,北京全式金生物技术有限公司;Gel Extraction Kit, Omega 公司。

电子天平和 pH 计,奥豪斯仪器(上海)有限公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;落地高速冷冻离心机, ThermoFisher 公司;

电泳仪,北京六一生物技术有限公司;PCR 仪, Applied Biosystems 公司;显微镜, Carl Zeiss 公司。

### 1.3 红茶菌培养

培养前将所用玻璃器皿用沸水充分荡洗。称取 6.0 g 茶叶,加入 500 mL 开水冲泡 10–15 min 后,两层纱布过滤,去除茶渣获得红茶汤;补充开水至 1 000 mL,加入白糖 40.0 g 充分溶解,即得到红茶糖水。茶糖水分装至 500 mL 的广口玻璃瓶里,每一瓶装入 300–400 mL 茶糖水,接入 10% 在 28 °C 静置培养 7 d 后的红茶菌培养液作为菌种。之后用 2 层纱布封扎瓶口,置于 25 °C 静置培养。该培养 7–14 d 重复 1 次,以保存红茶菌培养物备用。

### 1.4 菌株分离和纯化

采用稀释分离法分离红茶菌中的不同微生物。取梯度稀释后的发酵液各 100  $\mu\text{L}$  分别均匀涂布于酵母菌培养基、醋酸菌培养基和乳酸菌培养基平板上,置于培养箱 28 °C 培养 2–5 d。待平板上长出菌落后,经多次纯化得到单菌落,纯化后的菌株分别在 4 °C 冰箱保存备用。

### 1.5 菌株鉴定

选择分离比例占优势的酵母菌株 C3 和 C5 接种于酵母菌培养基、醋酸菌菌株 C6 接种于醋酸菌培养基,于 28 °C 恒温培养 4–5 d 后分别观察菌落形态,测量菌体大小;菌株 C6 的菌体细胞经结晶紫溶液染色后观察。采用显微镜分别观察菌株 C3、C5 和 C6 的菌体形态并拍照。

按照真菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取不同酵母菌菌株的基因组 DNA,选用真菌核糖体基因的通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT GCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG C-3')对真菌基因组 DNA 的 ITS 区域进行扩增<sup>[8]</sup>。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ):  $2 \times \text{PrimeSTAR Max Premix}$  25  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 基因组 DNA 1  $\mu\text{L}$ , 补齐无菌超纯水至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。

按照细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书步骤提取菌株 C6 的基因组 DNA, 选用原核生物 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')对菌株 C6 的 16S rRNA 基因进行扩增<sup>[8-9]</sup>。PCR 反应体系同上。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 15 min。

PCR 反应结束后, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检验扩增效果并拍照。然后使用 Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行回收, 并将回收的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

测序所得序列提交至 NCBI 数据库中, 获得 C3、C5 和 C6 的 GenBank 登录号分别为 MT396101、MT396177 和 MT396222, 与 GenBank 中已收录菌株的相应基因序列进行同源性比对, 然后利用 BioEdit 软件对相似性较高的序列进行编辑, 再通过 ClustalX 软件进行比对。运用 MEGA 6.0 软件, 酵母菌以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为外群, 细菌以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为外群, 采用邻接法 (Neighbor-Joining Method) 构建菌株系统发育树, 确定待鉴定菌株的分类地位。

## 1.6 发酵液制备

配制红茶糖水水分装于 250 mL (100 mL/瓶) 锥形瓶中, 将 28 °C 活化培养后的菌株 C3、C5、C6 各挑取 2 环分别接种于红茶液体培养基中, 每个处理设置 3 个重复, 并设空白发酵液作对照, 置于摇床 28 °C、180 r/min 下培养。每隔 1 d 取样测定菌株发酵的生长曲线、pH 值、总酸。为了避免潜在的污染, 每次取样均在无菌条件下进行。

## 1.7 生长曲线测定

在无菌环境下每隔 1 d 吸取 5 mL 发酵液, 以没有接种的空白组红茶液体培养基为对照。用

1 cm 比色杯在 600 nm 波长下测定各处理培养液的  $OD_{600}$  值, 每个处理设置 3 个重复, 每份样品测定 3 次取平均值。以光密度 ( $OD_{600}$  值) 为纵坐标, 以培养时间为横坐标, 绘制各菌株的生长曲线。

## 1.8 发酵液 pH 值的测定

直接用 pH 计测定发酵液 pH 值。每天吸取发酵液 5 mL 测 pH 值, 3 组重复样测 3 次取平均值。

## 1.9 发酵液酸度测定

采用直接滴定法检测发酵液中总酸含量。每隔 24 h 取 5 mL 发酵液, 按照国家标准 GB/T 12456-2008<sup>[19]</sup> 的方法操作。用 0.01 mol/L 的氢氧化钠溶液滴定至酚酞变色, 总酸含量以乙酸计。

## 1.10 发酵液还原糖测定

采用 DNS 法测定发酵液中的葡萄糖浓度<sup>[20]</sup>。向 25 mL 具塞刻度试管中加入 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌后的发酵液样品 1.0 mL, 空白对照组用等量蒸馏水代替发酵液样品, 加入 DNS 试剂 2 mL 用沸水浴煮沸 2 min, 取出, 冷却后加入蒸馏水补足 25 mL, 取其中 3 mL 的反应液, 用紫外分光光度计在 540 nm 的波长条件下测定吸光度, 从标准曲线查出葡萄糖浓度数, 求出该反应进程中生成的还原糖的量。

## 1.11 发酵液茶多酚含量测定

参照国家标准 GB/T 21733-2008<sup>[21]</sup> 茶饮料中茶多酚测定的方法进行检测。

## 1.12 优势菌株的混合培养

将 28 °C 活化培养后的菌株 C3、C5 和 C6 分别接种于红茶糖水液体培养基中, 置于摇床中在 28 °C、180 r/min 下培养 48 h 后, 采用血球计数板计数; 菌株 C3 菌悬液的浓度为  $9.42 \times 10^7$  个/mL, C5 为  $7.83 \times 10^6$  个/mL, C6 为  $2.06 \times 10^7$  个/mL。以菌株 C5 的浓度为基准, 稀释菌株 C3 和 C6 的浓度, 使 3 个菌株菌悬液的菌体浓度大致相等。然后, 按 1:1:1 的比例, 各取 0.1 mL 接种至红茶糖水液体培养基, 每个 250 mL 三角瓶中接入 150 mL

培养液,以不接菌的红茶糖水发酵液作为对照,每个处理设置3个重复,放置于28℃恒温培养箱静置培养。观察发酵液的颜色、气味和是否产生菌膜等,作为混合菌发酵液品质的初步鉴别指标。

### 1.13 数据分析

数据用 SPSS 19.0 软件进行方差分析,采用 GraphPad Prism 8.0.1 和 Excel 作图,系统发育树由软件 MEGA 6.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 优势菌株的分离和鉴定

从发酵7d后的红茶菌样品菌液中经分离、纯化得到菌株12株,依菌落形态和初步的显微镜检分成不同的类型。分离获得的11个菌株为酵母菌,1株为醋酸菌,没有分离获得乳酸菌。菌株C3、C5和J5菌落特征和细胞形态经观察为典型的酵母菌形态,菌株C6为典型的细菌形态,从分离平板上得到数量较多的优势菌株形态见图1。后续挑选菌株C3、C5和C6用于试验。

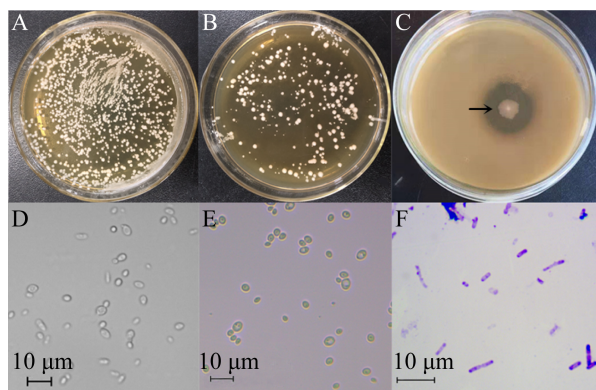


图1 菌株的菌落特征和菌体形态

Figure 1 Colony characteristics on agar media and micro-morphology of isolated strains

注: A: 菌株C3菌落特征; B: 菌株C5菌落特征; C: 菌株C6菌落形态,箭头示溶钙透明圈; D: C3菌体形态; E: C5菌体形态; F: C6菌体形态

Note: A: Colony characteristics of strain C3; B: Colony characteristics of strain C5; C: Colony characteristics of strain C6 with  $\text{CaCO}_3$  dissolving transparent circle (arrow); D: Micro-morphology of strain C3; E: Micro-morphology of strain C5; F: Micro-morphology of strain C6

在酵母菌分离培养基平板上培养36h后观察,菌株C3的菌落相比于菌株C5的菌落较小,呈白色、圆形、突起、边缘整齐;有光泽、不透明;表面湿润、光滑、易挑起。菌体单细胞圆形至椭圆形,大小为 $(1.3-2.2) \mu\text{m} \times (2.0-5.2) \mu\text{m}$ ,芽殖。在红茶糖水液体培养条件下,菌株C3培养液浑浊,但不产生明显的漂浮物。菌株C5的菌落为乳白色、圆形、突起;边缘整齐、不透明;表面湿润、有光泽、易挑起。菌落稍大,生长较快。菌体单细胞圆形至卵圆形,大小为 $(3.5-5.8) \mu\text{m} \times (4.3-6.4) \mu\text{m}$ ,芽殖。在红茶糖水液体培养条件下,菌株C5培养液浑浊,静置培养3d后液体表面形成蜡质状漂浮物,并随着培养时间的延长而增大。在含有 $\text{CaCO}_3$ 的醋酸菌分离培养基平板上,菌株C6培养48h后菌落呈浅灰色,有明显的溶钙透明圈(箭头所示);菌落圆形,边缘不规则,湿润、光滑、稍隆起、不透明;培养时间较长时有黏性,不易挑起。菌体杆状,直或稍弯,两端钝圆,单细胞、成双或成短链状,大小为 $(0.4-0.8) \mu\text{m} \times (1.2-2.9) \mu\text{m}$ 。革兰氏染色阴性。采用红茶糖水液体培养基静置培养,菌株C6的培养物易沉底,不形成明显的漂浮物,上部液体较清澈。

对菌株C3和C5基因组DNA的ITS区进行PCR扩增,获得的PCR产物分子量大小在600bp左右。测序结果在NCBI数据库进行BLAST同源比对,并下载同源性序列,利用邻接法构建系统进化树(图2)。ITS序列的BLAST比对结果表明,菌株C3与两株*Meyerozyma* [无性型为假丝酵母属(*Candida*)]菌株亲缘关系最近,其序列相似性与菌株*M. caribbica* (登录号: NR149348)达到99.65%,与菌株*M. guilliermondii* (登录号: NR111247)达到99.29%,由此初步将菌株C3鉴定为*Meyerozyma* sp. C3(假丝酵母菌)(图2A)。菌株C5与长孢洛德酵母(*Lodderomyces elongisporus*) (登录号: NR111593)聚类在同一支,其相似性达

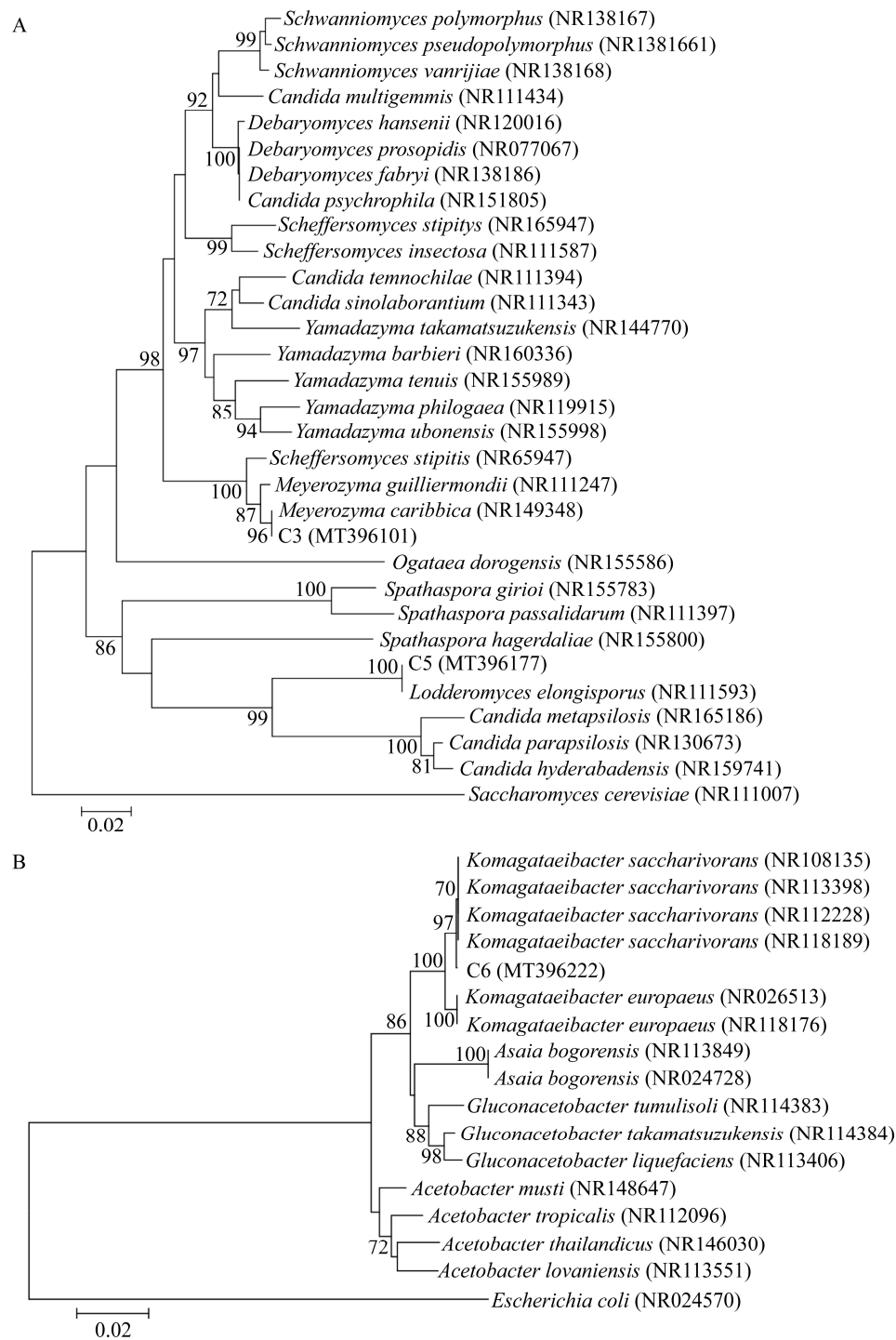


图 2 邻接法构建的菌株 C3、C5 (A)和 C6 (B)系统发育树

Figure 2 Neighbor-joining method phylogenetic trees of strain C3, strain C5 (A) and strain C6 (B)

注: A: 菌株 C3、C5; B: 菌株 C6; 括号内数值为菌株在 GenBank 中的登录号; 进化树中分支点上数字代表 Bootstrap 值, Bootstrap 值<70 未显示; 标尺代表位点的碱基替代率

Note: A: Strain C3 and C5; B: Strain of C6; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The numbers at each node in phylogenetic tree indicate bootstrap value; Bootstrap values <70 are not shown; Scale bar indicates 20 mutations per 1 000 bases



到 100%，由此初步鉴定菌株 C5 为长孢洛德酵母(图 2A)。菌株 C6 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物大小约为 1 500 bp，经序列比对和多个驹形氏杆菌属(*Komagataeibacter*)的菌株聚为一支，与 *K. saccharivorans* 和 *K. europaeus* 的序列相似性均在 99%以上(图 2B)。驹形氏杆菌属是从葡萄糖醋杆菌属(*Gluconacetobacter*)分出而建立的一个新属，与醋杆菌属(*Acetobacter*)关系密切。近年来，醋杆菌属、葡萄糖醋杆菌属和驹形氏杆菌属等 3 个属的一些菌株的分类地位常有调整。由此，初步鉴定并命名菌株 C6 为 *Komagataeibacter* sp. C6。

## 2.2 菌株在红茶糖水培养基中的生长分析

菌株 C3、C5 和 C6 在红茶糖水液体培养基中发酵的菌体浓度(吸光度值)随时间的变化动态见图 3。在培养过程中，菌株 C3 吸光度值总体呈快速上升的趋势，发酵后 10 d 时达到最大值， $OD_{600}$  值为 0.918，其后趋于平缓。菌株 C5、C6 生长速度明显慢于菌株 C3，菌株 C5 和 C6 发酵后 2–6 d 生长迅速，6 d 后进入到稳定期， $OD_{600}$  值在 0.5 左右，培养 11 d 后吸光度值开始下降。醋酸菌 C6 在单独培养至第 6 天时进入稳定期，较 2 株酵母菌生长更缓慢，菌体浓度总体低于菌株 C3、C5，在第 8 天  $OD_{600}$  值最大为 0.266。3 个菌株混合后，总体上菌体浓度上升趋势居于菌株 C3 和菌株 C5、C6 之间，但是菌体生长的势头比

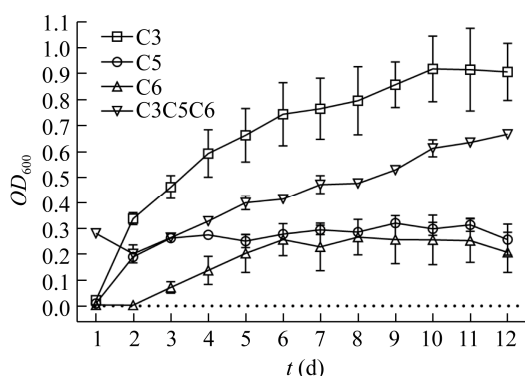


图 3 菌株在红茶糖水培养液中的生长动态

Figure 3 The growth dynamic of different strains in fermented black tea infusion

较强劲，至发酵后 12 d 菌体浓度仍然呈上升的趋势(图 3)。

## 2.3 菌株发酵过程中 pH 值的变化

配制完成的茶糖水 pH 值在 5.3 左右(图 4)。菌株 C5、C3、C6 单独发酵条件下，随着发酵时间的延长，发酵液 pH 值总体上呈现下降的趋势。菌株 C5 在发酵 7 d 前发酵液 pH 值下降不明显，7 d 后缓慢下降。菌株 C3 和 C6 在发酵 6 d 前发酵液 pH 值迅速下降，特别是菌株 C6，表现更为明显。3 个菌株混合培养，发酵液的 pH 值在发酵后第 1 天即明显下降至 3.1 左右，其后略微调整至 3.3，随后逐渐下降；发酵 5 d 后为 2.75 左右，并维持在这一水平至发酵 12 d 试验结束。

## 2.4 菌株发酵对发酵液酸度的影响

菌株发酵后发酵液的酸度动态变化见图 5。3 个菌株单独发酵条件下，菌株 C3、C5 发酵后发酵液总酸含量值变化不显著，在 12 d 的发酵时间内一直处于较低的水平。菌株 C6 发酵液总酸含量从第 2 天开始则一直呈缓慢上升的趋势；至发酵后第 12 天，菌株 C6 的发酵液总酸含量达到 0.99 g/L。3 个菌株混合后，发酵液酸含量相比处于较高的水平，与对照和菌株单独培养的处理之间差异极显著。

## 2.5 发酵过程中还原糖含量的变化

分别取不同浓度的葡萄糖标准溶液于 540 nm 波长处测定吸光度值，以葡萄糖浓度(mg/mL)为

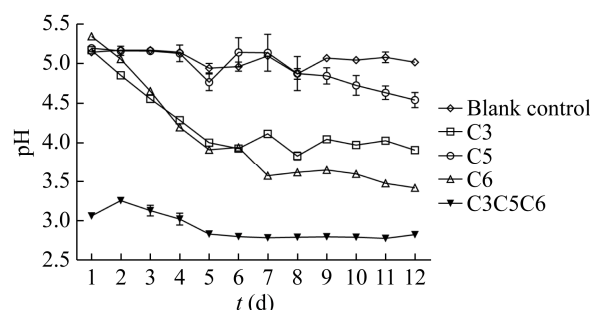


图 4 菌株发酵过程中 pH 的动态变化

Figure 4 Dynamic of pH during fermentation of different strains in black tea infusion

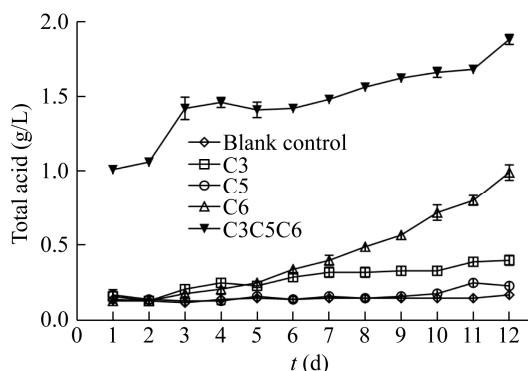


图5 发酵液有机酸含量的动态变化

Figure 5 Dynamic of total acid contents in fermentation broths of different strains

横坐标, 540 nm 波长条件下的吸光度值为纵坐标, 制作葡萄糖标准曲线。葡萄糖含量在 0–0.2 mg/mL 的范围内与吸光值呈线性关系, 线性方程为  $y=0.3685x-0.0068$ ,  $R^2=0.9982$ 。

在添加白糖(主要成分是蔗糖)的红茶水中, 按比例接入不同酵母菌、醋酸菌及其混合菌进行发酵, 发酵过程中蔗糖被微生物利用而生成葡萄糖、果糖等还原糖。在不添加微生物发酵的情况下, 培养液中还原糖水平很低, 处于 1 mg/mL 左右(图 6)。菌株 C6 在茶糖水发酵条件下产生还原糖的能力相对较弱, 发酵的前 7 天其发酵液中还原糖含量低; 发酵 7 d 后则逐渐上升; 至发酵后第 10 天达到 2.98 mg/mL。菌株 C3 发酵后, 发酵液中还原糖含量急剧上升, 一直处于高水平。菌株 C5 发酵后的前 3 天, 发酵液中还原糖含量微小, 至发酵第 4 天后急剧上升。3 个菌株混合生长条件下, 发酵液中还原糖的含量呈直线上升趋势, 极显著高于对照和 3 个菌株的单独培养; 至发酵 9 d 后, 还原糖含量上升趋势趋于平缓。与对照和菌株单独培养相比, 混合菌株培养条件下发酵液中还原糖含量上升时间早、上升幅度大。

## 2.6 菌株发酵对茶多酚含量变化的影响

茶糖水培养液中, 随着放置时间的延长, 溶液中茶多酚含量呈下降的趋势, 特别是第 2 天茶多酚含量下降极显著(图 7)。在新鲜培养液中

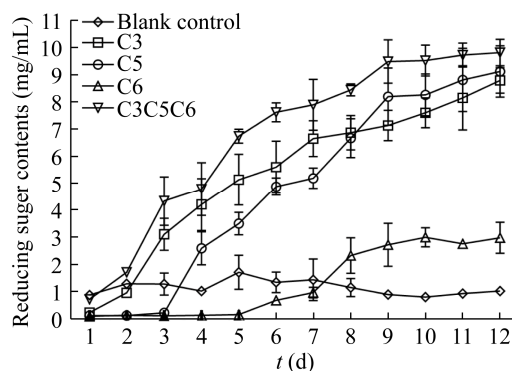


图6 菌株发酵过程中还原糖含量的变化

Figure 6 Changes of reducing sugar contents in fermentation broths of different strains

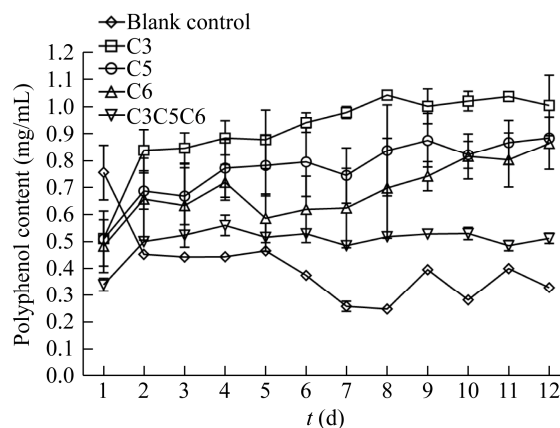


图7 发酵过程中茶多酚含量的变化

Figure 7 Changes of total polyphenol contents in fermented black tea infusion

接入 20% 的菌株母液, 导致培养液中茶多酚含量的极显著下降(发酵第 1 天)。从接种后的第 2 天开始, 菌株 C3、C5 和 C6 的发酵作用导致发酵液中茶多酚含量的持续上升, 以菌株 C3 促进茶多酚含量提升的作用最为显著。至发酵后第 8 天, 菌株 C3 的发酵液中茶多酚含量达到最大值, 为 1.14 mg/mL。3 个菌株的混合培养与单独培养相比, 发酵液中茶多酚含量极显著下降, 但显著高于未接种发酵的对照。

## 3 讨论与结论

本试验从福建省泉州市收集到的红茶菌样品中分离获得多株酵母菌和一株醋酸菌, 其中菌株



C5 [长孢洛德酵母(*Lodderomyces elongisporus*)]在以往的文献中未见报道,是第一次从红茶菌发酵液中获得的新菌株。红茶菌的微生物群体依产地、原料、培养条件等不同而发生很大的变化<sup>[4-5,7-11]</sup>,是一个复杂的微生物共生体系,但主要的微生物均属于醋酸菌、酵母菌和乳酸菌的某些属种<sup>[4,11]</sup>。长孢洛德酵母是一种非酿酒酵母,参与葡萄酒的酿制,对葡萄酒增香有一定的贡献<sup>[22]</sup>。另外,长孢洛德酵母在川南浓香型白酒、新鲜水果和海水石油漂浮层中也有发现<sup>[22-23]</sup>。林娟等从来源于福建省泉州市的红茶菌中分离获得2个新的菌株<sup>[8]</sup>。因此,不同产地的红茶菌菌种资源是比较丰富的。

在本文的试验条件下,供试的3个菌株在红茶水培养液中的生长能力存在显著的差异,酵母菌和醋酸菌的混合生长显著影响菌群对碳水化合物的利用和菌体的生长。醋酸菌和酵母菌的相互作用在葡萄酒<sup>[24-25]</sup>、柿子醋<sup>[26]</sup>、菠萝醋<sup>[27]</sup>、意大利陈醋<sup>[28]</sup>和白酒<sup>[29]</sup>的发酵过程中已有研究,但是在茶菌的发酵中没有具体的实验数据。在红茶糖水培养液中,提供微生物生长的碳源主要是白糖(蔗糖)。一般认为,发酵初期,酵母菌首先分解蔗糖生成葡萄糖和果糖,其后进一步将单糖转化而产生乙醇和二氧化碳;而在发酵后期,醋酸菌启动生长,将乙醇转化为醋酸<sup>[4-5]</sup>。本研究中,发酵2 d之内不同菌株启动生长的能力为菌株C3>C5>C6。2株酵母菌在茶糖水水中的生长能力存在明显差异,菌株C3生长迅速,产生还原糖的能力强;菌株C5生长相对迟缓,产生还原糖的能力弱。发酵后期,菌株C3保持生长优势,可能有较强的耐酸能力<sup>[24]</sup>。菌株C6是一株葡萄糖醋杆菌,单独培养条件下,在茶糖水水中的生长启动能力差,菌体增殖速率低,生长迟缓,是红茶菌混合菌群中的后续生长菌<sup>[26]</sup>。3个菌株混合后,其菌体增长速度明显低于单独培养条件下的菌株C3,但显著高于单独培养条件下的菌株C5和菌株C6。从中可

以分析出3个菌株的混合培养对菌群起到了一定的控制、协调和稳定的作用。

本研究中的酵母菌,特别是菌株C5在发酵过程中产酸能力弱。3个菌株的混合发酵极大地促进了有机酸的产生。葡萄糖醋酸杆菌属的菌株在红茶菌及其他发酵饮料中广泛存在,从世界不同产地的样品中都能分离到这一类菌株<sup>[3-4,8,26]</sup>。酸甜滋味是发酵成熟的红茶菌饮料的典型特征,也是红茶菌爱好者追求的喜好之一<sup>[3-4]</sup>。同时,有机酸,特别是一些短链有机酸,也是红茶菌以及相类似的传统发酵饮料生理功能的主要贡献者<sup>[1]</sup>。红茶菌发酵后所产生的有机酸是决定红茶菌饮料风味、品质和生理功能的重要因素。有研究指出,市场销售的红茶菌产品的pH值不应低于3.0,因为人体消化道的pH值大致维持在3.0左右<sup>[28]</sup>。不同菌株的相互作用可以有效地调节发酵液的酸度和pH值,这对以传统发酵食品的核心微生物群构建人工菌剂有指导意义。在3个菌株的混合群体中,通过代谢组学技术分析不同菌株对不同有机酸种类、产量的作用,对发酵产品控制也有一定的应用价值。

3个菌株混合发酵条件下的多酚类含量显著低于各个菌株的单独发酵,但显著高于不发酵的对照。红茶中主要的多酚类物质是茶红素、茶黄素和茶褐素等,这些化合物大多数是简单儿茶素单体经过氧化后的聚合物,分子量相对比较大;因此,红茶含有的聚合多酚类物质实际上可能不利于人体的吸收<sup>[30]</sup>。微生物能够产生多种类型的水解酶,将分子结构复杂的聚合多酚类物质生物转化为简单的多酚类物质,从而提高发酵液中可检测多酚类物质的含量<sup>[30-32]</sup>。因而,微生物的代谢作用可以提高红茶多酚化合物的人体可利用性,从而增进营养和生理功能<sup>[31,33]</sup>。红茶菌菌群中微生物的发酵作用有利于发酵液中多酚类含量的提高<sup>[4-5,34-35]</sup>。本研究的结果表明微生物发酵促进多酚类物质含量提高,但不同菌株的促进能力

有显著的差异。因此, 综合考虑发酵茶饮料的营养、风味和生理功能, 合理地组合不同微生物对茶叶成分的协同转化作用, 可以生产出个性化的人工发酵茶饮料<sup>[16,18,36]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Sinir GÖ, Tamer CE, Suna S. 10-kombucha tea: a promising fermented functional beverage[J]. *Fermented Beverages*, 2019, 5: 401-432
- [2] Kozyrovska NO, Reva OM, Goginyan VB, De Vera JP. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology[J]. *Biopolymers and Cell*, 2012, 28(2): 103-113
- [3] May A, Narayanan S, Alcock J, Varsani A, Maley C, Aktipis A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7565
- [4] Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A review on kombucha tea: microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(4): 538-550
- [5] Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 220: 63-72
- [6] Bhattacharya D, Ghosh D, Bhattacharya S, Sarkar S, Karmakar P, Koley H, Gachhui R. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against *Vibrio cholerae*: targeting cell membrane[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 66(2): 145-152
- [7] Liu CH, Hsu WH, Lee FL, Liao CC. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation[J]. *Food Microbiology*, 1996, 13(6): 407-415
- [8] Lin J, Ye XY, Cao ZL, Xie FY, Xu MA. Isolation of microbes from kombucha and kombucha fermentation with pure culture combinations[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(2): 39-48 (in Chinese)  
林娟, 叶秀云, 曹泽丽, 谢范英, 徐美爱. “红茶菌”中微生物的分离及纯菌混合发酵生产[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(2): 39-48
- [9] Wang SS, Han YH, Ye YX, Shi XX, Xiang P, Chen DL, Li M. Physicochemical characterization of high-quality bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter* sp. strain W1 and identification of the associated genes in bacterial cellulose production[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(71): 45145-45155
- [10] Reva ON, Zaets IE, Ovcharenko LP, Kukharenko OE, Shpylova SP, Podolich OV, De Vera JP, Kozyrovska NO. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments[J]. *AMB Express*, 2015, 5: 35
- [11] Coton M, Pawtowski A, Taminiau B, Burgaud G, Deniel F, Coulloume-Labarthe L, Fall A, Daube G, Coton E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(5): fix048
- [12] Emiljanowicz KE, Malinowska-Pańczyk E. Kombucha from alternative raw materials-the review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 6(19): 3185-3194
- [13] Nguyen NK, Nguyen PB, Nguyen HT, Le PH. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 64(2): 1149-1155
- [14] De Filippis F, Troise AD, Vitaglione P, Ercolini D. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during kombucha tea fermentation[J]. *Food Microbiology*, 2018, 73: 11-16
- [15] Gaggia F, Baffoni L, Galiano M, Nielsen DS, Jakobsen RR, Castro-Mejía JL, Bosi S, Truzzi F, Musumeci F, Dinelli G, et al. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: a comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity[J]. *Nutrients*, 2018, 11(1): 1
- [16] Wang P, Wu Q, Xu Y. Core microbiota in Chinese liquor fermentation and associations with environmental factors[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(1): 142-153 (in Chinese)  
王鹏, 吴群, 徐岩. 中国白酒发酵过程中的核心微生物群及其与环境因子的关系[J]. *微生物学报*, 2018, 58(1): 142-153
- [17] Liu WW, Wu B, Xiang MC, Liu XZ. From microbiome to synthetic microbial community[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 881-889 (in Chinese)  
刘炜伟, 吴冰, 向梅春, 刘杏忠. 从微生物组到合成功能菌群[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 881-889
- [18] Wolfe BE, Dutton RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems[J]. *Cell*, 2015, 161(1): 49-55
- [19] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, National Standardization Administration of China. GB/T 12456-2008 Determination of total acid in foods[S]. Beijing: China Standard Press, 2009 (in Chinese)  
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12456-2008 食品中总酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009
- [20] Zhang XL, Wang YM. Determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method[A]//Zhang

- XL, Wang YM. Experimental Instruction of Biochemistry[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2017: 45 (in Chinese)
- 张兴丽, 王永敏. 实验 1 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖[A]/张兴丽, 王永敏. 生物化学实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2017: 45
- [21] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, National Standardization Administration of China. GB/T 21733-2008 Tea beverages[S]. Beijing: China Standard Press, 2008 (in Chinese)
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21733-2008 茶饮料[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [22] Mu H. Screening yeast strains for the winemaking of aroma enhancement from the brewing ecosystem of Luzhou flavor liquor in south Sichuan[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2015 (in Chinese)
- 牟含. 川南白酒酿造环境中葡萄酒增香酿造酵母菌株的筛选[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015
- [23] Liu JF, Ma C, Liu ZH, Wang C, Zhou T. Isolation and identification of marine petroleum-degrading yeast and their biodegradation characteristics[J]. Research of Environmental Sciences, 2013, 16(8): 899-905 (in Chinese)
- 刘杰凤, 马超, 刘正辉, 王春, 周天. 海洋石油降解酵母的分离鉴定与降解特性[J]. 环境科学研究, 2013, 16(8): 899-905
- [24] Vilela-Moura A, Schuller D, Mendes-Faia A, Silva RD, Chaves SR, Sousa MJ, Côrte-Real M. The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(2): 271-280
- [25] Pinto L, Malfeito-Ferreira M, Quintieri L, Silva AC, Baruzzi F. Growth and metabolite production of a grape sour rot yeast-bacterium consortium on different carbon sources[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 296: 65-74
- [26] Hidalgo C, Mateo E, Mas A, Torija MJ. Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*)[J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 98-104
- [27] Krusong W, Vichitraka A. An investigation of simultaneous pineapple vinegar fermentation interaction between acetic acid bacteria and yeast[J]. Asian Journal of Food and Agro-Industry, 2010, 3(1): 192-203
- [28] Hutchinson UF. Non-*Saccharomyces* yeast and acetic acid bacteria in Balsamic-styled vinegar production: a biochemical process analysis[D]. Cape Town, South Africa: Cape Peninsula University of Technology, 2016
- [29] Wu XD, Li Z, Zhou SS. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus* in liquor brewing[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(12): 61-67 (in Chinese)
- 吴轩德, 李洲, 周世水. 白酒酿造中酿酒酵母与巴氏醋杆菌相互作用的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 61-67
- [30] Chen HD, Sang SM. Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 26-42
- [31] Chen HD, Hayek S, Guzman JR, Gillitt ND, Ibrahim SA, Jobin C, Sang SM. The microbiota is essential for the generation of black tea theaflavins-derived metabolites[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51001
- [32] Liu ZB, Bruins ME, Ni L, Vincken JP. Green and black tea phenolics: bioavailability, transformation by colonic microbiota, and modulation of colonic microbiota[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(32): 8469-8477
- [33] Pasha C, Reddy G. Nutritional and medicinal improvement of black tea by yeast fermentation[J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 449-453
- [34] Chen C, Liu BY. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(5): 834-839
- [35] Cardoso RR, Neto RO, Dos Santos D'Almeida CT, Do Nascimento TP, Pressete CG, Azevedo L, Martino HSD, Cameron LC, Ferreira MSL, De Barros FAR. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities[J]. Food Research International, 2020, 128: 108782
- [36] Wang SL, Wu Q, Nie Y, Wu JF, Xu Y. Construction of synthetic microbiota for reproducible flavor compound metabolism in Chinese light-aroma-type liquor produced solid-state fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(10): e03090-18