

一株冠突散囊菌的分离鉴定、基因组成及其枇杷花发酵特性分析

陈小红¹, 王靖芳¹, 郑欣萍¹, 林海清¹, 洪燕萍^{1,2}, 林标声^{*1,2,3}

1 龙岩学院生命科学学院, 福建 龙岩 364012

2 龙岩学院 预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室, 福建 龙岩 364012

3 龙岩学院生物科技与健康产品工程技术研究中心, 福建 龙岩 364000

陈小红, 王靖芳, 郑欣萍, 林海清, 洪燕萍, 林标声. 一株冠突散囊菌的分离鉴定、基因组成及其枇杷花发酵特性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5376-5391.

CHEN Xiaohong, WANG Jingfang, ZHENG Xinping, LIN Haiqing, HONG Yanping, LIN Biaosheng. Isolation, identification, gene composition, and fermentation characterization of a *Eurotium cristatum* strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5376-5391.

摘要:【背景】冠突散囊菌 LYEC03 是从陕西泾阳茯砖茶中分离得到的主要发酵菌株。【目的】研究冠突散囊菌 LYEC03 菌株的基因组信息及其发酵枇杷花产品的特性, 从分子水平阐明冠突散囊菌的发酵机制。【方法】应用形态和显微形态观察、ITS 序列鉴定、重测序及框架图测序对所分离的菌株 LYEC03 进行鉴定和基因组信息解析, 采用所分离的菌株 LYEC03 发酵枇杷花, 研究冠突散囊菌对枇杷花主要功效成分及抗氧化性能的影响。【结果】陕西泾阳茯砖茶中分离得到的主要发酵菌株 LYEC03 确定为冠突散囊菌。菌株 LYEC03 与参考基因组覆盖率高, 含有丰富的纤维素酶、蛋白酶、氧化酶和脂肪酶相关基因; 基因组相关整体变异较小, 其中假设蛋白、碳水化合物激酶、纤维素酶家族糖基水解酶、位点 2 蛋白酶家族蛋白、多酚氧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等与菌株生长、能量代谢调节、产纤维酶、产蛋白酶和产氧化酶相关的基因发生了变异。菌株 LYEC03 基因组序列长度 30 623 602 bp、GC 含量 51.70%、编码 13 033 个基因、编码基因占比 55.74%, 参与了碳水化合物代谢、氨基酸代谢、外源生物降解代谢、能量代谢、脂质代谢与萜类化合物和聚酮类化合物的代谢等多种物质的代谢途径转化过程。菌株 LYEC03 生长、主要功效成分含量的变化与总抗氧化活性、2,2-二苯基-1-苦基肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine, DPPH)自由基清除率和羟自由基清除率 3 个抗氧化指标变化一致, 均呈现先增加后缓慢降低的趋势。【结论】冠突散囊菌的发酵特性与其基因组纤维素酶、蛋白酶和氧化酶基因的含量丰富密切相关, 对冠突散囊菌的基因组信息分析及其发酵特性研究有利于其发酵产品性能的提升, 并为其在食品、轻工业及医药等方面的应用提供科学依据。

关键词: 茯砖茶; 枇杷花; 冠突散囊菌; 基因组; 发酵; 抗氧化

资助项目: 福建省科技特派员后补助项目(2022S2087); 福建省大学生创新创业训练计划项目(S202211312033)

This work was supported by the Post Subsidy Projects of Technology Commissioner in Fujian Province (2022S2087) and the College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (S202211312033).

*Corresponding author. E-mail: 82009040@lyun.edu.cn

Received: 2023-05-20; Accepted: 2023-07-17; Published online: 2023-09-05

Isolation, identification, gene composition, and fermentation characterization of a *Eurotium cristatum* strain

CHEN Xiaohong¹, WANG Jingfang¹, ZHENG Xinping¹, LIN Haiqing¹, HONG Yanping^{1,2}, LIN Biaosheng^{*1,2,3}

1 College of Life Sciences, Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China

2 Key Laboratory of Fujian Universities Preventive Veterinary Medicine and Biotechnology, Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China

3 Engineering Technology Research Center of Biotechnology and Health Products, Longyan University, Longyan 364000, Fujian, China

Abstract: **[Background]** Strain LYEC03 is a major fermentation strain isolated from Fuzhuan tea in Jingyang county, Shaanxi province, China. **[Objective]** To reveal the genomic information of strain LYEC03 and the fermentation characteristics of the strain for loquat flower products, and clarify the fermentation mechanism of *Eurotium cristatum* at the molecular level. **[Methods]** Morphological and microscopic observation, ITS sequence identification, next-generation sequencing, and whole genome sequencing were employed to identify and analyze the genomic information of strain LYEC03. Furthermore, the strain was used to ferment loquat flowers and the effects of the strain on the main functional components and antioxidant properties of loquat flowers were studied. **[Results]** Strain LYEC03 isolated from Fuzhuan tea in Jingyang, Shaanxi was identified as *Eurotium cristatum*. The genome of strain LYEC03 had a high coverage of the reference genome and contained abundant genes related to cellulase, protease, oxidase, and lipase. The genes associated with bacterial growth, energy metabolism regulation, fiber production, protease production, and oxidase production had undergone mutations, including hypothetical protein, carbohydrate kinase, cellulase family glycosylhydrolase, site-2 protease family protein, polyphenol oxidase, and glutathione peroxidase. The genome sequence of strain LYEC03 had a length of 30 623 602 bp and the GC content of 57.70%, encoding 13 033 genes, among which 55.74% were coding genes and involved in the carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, xenobiotics biodegradation and metabolism, energy metabolism, lipid metabolism, and metabolism of terpenoids and polyketides. The growth of strain LYEC03 and the content of its main functional components presented consistent trends (first increasing and then slowly decreasing) with the three antioxidant indicators: total antioxidant activity, DPPH free radical scavenging rate, and hydroxyl free radical scavenging rate. **[Conclusion]** The fermentation characteristics of *E. cristatum* were related to the rich cellulase, protease, and oxidase genes in its genome. Probing into the genomic information and fermentation characteristics of *E. cristatum* will provide a basis for improving the fermentation performance and applying the strain in food, light industry, medicine and other fields in the future.

Keywords: Fuzhuan tea; loquat flowers; *Eurotium cristatum*; genome; fermentation; antioxidant

冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)是茯砖茶发酵中的优势菌,在一定的条件下可产孢子,形成黄色闭囊壳,俗称“金花”^[1]。茯砖茶是一种全发酵茶,属于黑茶,在所有黑茶中加工最为独特,而陕西省泾阳县茯砖茶为“茯茶之源”,茯砖茶以其独特的作用成为了西北各族人民的生活必需品^[2]。冠突散囊菌可分泌多种胞外酶,如纤维素酶、蛋白酶、酯酶、果胶酶和多酚氧化酶等,帮助茶叶中物质的转化降解,在满足自身生长需要的同时,形成了茯砖茶独特的色香风味^[3]。

冠突散囊菌不仅被应用于发酵黑茶^[4],还被广泛用于发酵红茶以及绿茶等传统茶的研究^[5-6]。近年来,有些研究者将其用于发酵杜仲茶、苦丁茶、桑叶茶和荔枝草茶等其他茶类的研究^[7-10],以期提升茶的品质,还有一些研究者甚至将其用于发酵葛根、苦荞和燕麦^[11-13]等,以充分发挥冠突散囊菌的发酵特性,生产对人类健康有益的物质。研究表明,冠突散囊菌分泌的多酚氧化酶(polyphenol oxidase)可分解茶叶中的单宁物质,使茶多酚氧化变成茶红素(thearubigin)、茶黄素(theaflavin)以及茶褐素(theabrownine),使茶叶滋味醇和,减少了苦涩味^[14]。冠突散囊菌分泌的蛋白酶(protease)能使茶叶中蛋白质分解形成人体必需的几乎所有氨基酸,冠突散囊菌分泌的阿魏酸酯酶(ferulic acid esterase)可水解茶叶中的阿魏酸酯(ferulate)释放出游离的阿魏酸(ferulic),而阿魏酸具有多种生物学活性功效^[15]。同时,冠突散囊菌发酵生成的儿茶素(catechin)、儿茶素氧化聚合物及其与有机酸形成的络合物,形成了独特的香气、色泽和滋味^[16]。此外,冠突散囊菌发酵的一些次级代谢产物具有降脂减肥、抗氧化、调节免疫力、抗肿瘤和抑菌等多种功效^[17-18],因而具有良好的研究价值和应用潜力。目前,对

冠突散囊菌的研究较多聚焦在发酵工艺优化、代谢活性物质分析、产孢机制和抗氧化活性分析等方面^[19-21],但从分子水平上进行发酵机理和抗氧化机理研究较少。

我国是世界上最大的枇杷生产国,产量占世界的2/3以上。枇杷花资源充足,具有多种营养成分和较强的生物活性,如抗氧化、止咳抗炎、抑菌、保肝护肝和抗肿瘤等。枇杷花在我国具有较长的药食两用历史,作为新食品原料,枇杷花的开发利用前景广阔^[22]。近年来,以枇杷花茶为主的枇杷花相关专利和产品不断涌现,对枇杷花茶产品品质提升的研究也成为枇杷花研究的一个热点^[23-24]。因此,本研究从陕西泾阳茯砖茶中分离其主要的发酵菌株冠突散囊菌,对其进行ITS序列鉴定及基因组测序,揭示该菌的种属亲源关系、基因组变异情况和基因的功能组成。本研究还利用冠突散囊菌的发酵特性来发酵枇杷花,分析冠突散囊菌对枇杷花的主要功效成分及抗氧化性能的影响,以期从分子水平上揭示冠突散囊菌的发酵机理、提高茯砖茶、绿茶和枇杷花茶等冠突散囊菌发酵产品品质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

茯砖茶:从市场购买的陕西省泾阳县黑茶。

枇杷花:普通栽培(*Eriobotryajaponica* Lindl)

枇杷花采自福建莆田。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖营养琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 25.0,琼脂 20.0, pH 自然。

1.1.3 主要试剂和仪器

TsingKE Master Mix,广州市康润生物制品

开发有限公司; DL2000 DNA Marker、RNA 提取及反转录试剂、各限制性内切酶、*Taq* 酶等试剂, 宝生物工程(大连)有限公司; 引物合成, 北京奥维森基因科技有限公司; 纤维素含量测定试剂盒, 苏州科铭生物技术有限公司; 真菌基因组 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒, 赛默飞世尔科技有限公司。PCR 仪和 NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 赛默飞世尔科技有限公司; 凝胶成像系统, 北京君意东方电泳设备有限公司; Qubit4 Fluorometer 核酸蛋白荧光定量仪, 上海艾研生物科技有限公司。

1.2 菌株的分离和形态特征鉴定

称取 1 g 茯砖茶加 100 mL 无菌水, 28 °C、120 r/min 振荡培养 30 min, 用稀释涂布平板法分离菌株, 挑取长势较好、菌丝粗壮、菌落形态为金黄色的“金花菌”, 进行传代纯培养并保种。将纯培养的菌株转接至 PDA 平板中, 28 °C 培养箱中培养 3–4 d, 观察培养后的菌落形态特征。再取一干净载玻片, 滴半滴蒸馏水, 以接种针取出菌丝体, 分散均匀后盖上盖玻片, 于光学显微镜下观察, 记录菌丝的形状、大小、颜色等特性。

1.3 菌株的基因组 DNA 提取、ITS 序列 PCR 扩增和测序比对

用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取分离菌株的 DNA, 以提取的 DNA 为模板采用真菌通用的转录间隔区序列(internal transcribed spacer, ITS)引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 反应, 扩增片段长度为 600 bp。PCR 反应体系(30 μ L): 2 \times TsingKE Master Mix 15.0 μ L, Primer F (10 μ mol/L) 1.5 μ L, Primer R (10 μ mol/L) 1.5 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, ddH₂O 11.0 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 52 °C 20 s,

72 °C 20 s, 33 个循环; 72 °C 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 按凝胶回收试剂盒说明进行凝胶回收、纯化, 并委托北京奥维森基因科技有限公司完成测序。通过 NCBI 数据库中的 BLASTn 程序, 将所获得的菌株 ITS 序列与数据库中相似性最高的 10 株基因序列进行比对, 利用 DNAMAN 软件构建系统发育树, 明确所测序菌株的种类属性^[25]。

1.4 菌株重测序和分析

利用高通量测序技术 (high-throughput sequencing)将测序获得的基因组序列与近缘参考基因组进行比对, 检测获得菌株的单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入缺失(insertion/deletion, InDel)、结构变异(structure variation, SV)和拷贝数变异(copy number variation, CNV)等遗传变异信息。

在进行文库构建之前, 对所提取的菌株基因组 DNA 进行严格检测, 包括 DNA 纯度(NanoDrop 检测、 OD_{260}/OD_{280} 比值)和 DNA 完整性及浓度(Qubit4 Fluorometer 和琼脂糖凝胶电泳检测)。样品检测合格后, 经基因组 DNA 片段化处理、构建 DNA 小片段文库、上机测序, 把有效测序数据比对到参考基因组中, 获得相应的遗传变异信息进行比对分析^[26]。

1.5 菌株基因组框架图的构建及基因组功能注释

将获得的菌株基因组采用全基因组鸟枪(whole genome shotgun sequencing, WGS)法构建数据文库, 由北京奥维森基因科技有限公司 Illumina MiSeq 测序平台完成菌株的二代测序, 所测定的数据采用 spades genome assembler v3.11.1 软件进行校正、拼接、组装, 构建分离菌株的基因组框架图, 再进行菌种基因组功能注释^[27]。

1.6 分离菌株接种枇杷花发酵特性分析

1.6.1 发酵过程及主要功效成分测定

将分离菌株接种至 PDA 平板上进行扩大培养,长满至整个平板后加入 5 mL 无菌生理盐水洗脱,转移至带玻璃珠的 100 mL 生理盐水中,30 °C、150 r/min 摇床培养 30 min,孢子浓度达 10^6 CFU/mL 时作为发酵菌液备用。取露白期的枇杷花 10 g 装入 250 mL 三角瓶中,中高火微波灭菌 2 min 后加无菌水使发酵物料最终含水量为 40%,孢子液按接种量 5% 接种,28 °C、180 r/min 培养 7 d。培养 1–7 d 每天各取 3 份先进行平板活菌计数,再进行冷冻干燥,测定其水浸出物、纤维素、总多糖、粗蛋白、氨基酸、总酚、总黄酮苷和总儿茶素的含量变化,求均值。水浸出物采用《GB/T 8305—2013 茶水浸出物测定》^[28]方法进行测定,纤维素含量采用纤维素含量测定试剂盒测定(微量法),总多糖含量采用苯酚-硫酸法测定,粗蛋白含量采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定,氨基酸含量采用茚三酮比色法测定,多酚含量采用福林酚试剂法测定,具体测定均参照肖咪等^[29]的方法进行。总黄酮苷的含量采用紫外分光光度法测定,以异鼠李素为对照品,检测波长为 372 nm^[30];总儿茶素含量的测定采用酸性介质中香兰素与儿茶素的显色反应进行比色法测定,检测波长为 505 nm^[31]。

1.6.2 发酵样品的抗氧化性能测定

取上述不同发酵时间的冻干样品 1 g,用中药粉碎机粉碎后加入 20 倍乙醇进行回流浸提 24 h,4 000 r/min 离心 10 min 收集滤液,滤渣再重复浸提一次,合并 2 次滤液。将滤液浓度配制成 0.1 mg/mL,测定其总抗氧化活性、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率,测定时以维生素 C (vitamin C, Vc) 为阳性对照。其中,总抗氧化活性的测定采用三价铁还原抗氧化能力(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)测定,样品

测定时以同样达到标准品测定吸光度所需 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 毫摩尔数表示,单位 mmol/g; 2,2-二苯基-1-苦基肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine, DPPH) 自由基清除率采用抗氧化法测定,羟自由基清除率采用 Fenton 反应原理测定,单位均为%,具体测定均参照陈小红等^[32]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 茯砖茶发酵菌株的分离鉴定

实验从陕西泾阳茯砖茶中共分离得到了 13 株菌,其中一株编号为 LYEC03 的菌株菌丝粗壮、生长速度快、纯度高、无污染,选定其作为研究的目的菌株。如图 1 所示,所挑选的菌株 LYEC03 在 PDA 培养基上菌落呈较规则圆形(图 1A),质地较致密,有黄色晕圈,边缘淡黄色,中央部分颜色较深,呈现大量黄色具饰菌丝,老后变成褐色,符合冠突散囊菌的基本形态及生物学特征。普通显微镜下观察发现,该菌由金黄色子囊果和无色透明菌丝组成,菌丝有隔,有隔膜和菌核,子囊球形或近球形,混生于具饰菌丝网中(图 1B)。

2.2 菌株 LYEC03 同源进化分析

菌株 LYEC03 ITS 序列扩增的 PCR 电泳图如图 2 所示,符合预期的序列长度,其 PCR 产物为 600 bp 左右。NCBI 数据库中的 BLASTn 比对

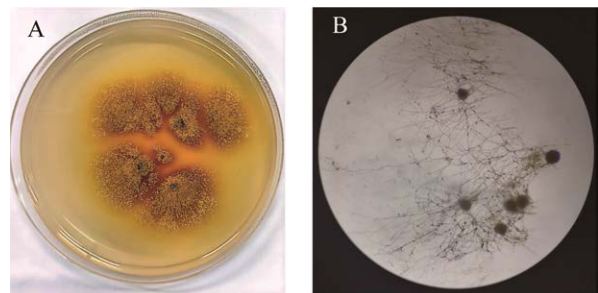


图 1 菌株 LYEC03 菌落形态(A)和显微镜下形态(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and microscopic morphology (1 000×) (B) of strain LYEC03.

及 DNAMAN 软件(neighbor-joining, NJ)法构建的系统发育树如图 3 所示, 结果表明菌株 LYEC03 与散囊菌属(*Eurotium*)几个菌株的相似性最高, 均为 100%。综合前述菌株 LYEC03 的菌落形态特征和显微特征, 将所分离得到的菌株 LYEC03 确定为冠突散囊菌 (*Eurotium cristatum*), 俗称“金花菌”。

2.3 菌株 LYEC03 的重测序结果

2.3.1 比对参考基因组的结果

经测定, 菌株 LYEC03 基因组样品质量符合建库要求, 为 B 级。其原始测序数据为: raw base 4 090 943 100 bp、effective rate 99.21%、GC content 49.23%; 通过 BlueWater 运算程序将 effective rate 与参考基因组进行比对, 匹配率(mapping rate)为 97.76%、平均测序深度(average depth)为 107.23、测序深度为 1X 的最小覆盖范围(coverage at least)为 98.52%、测序深度为 4X 的最小覆盖范围为 98.40%, 表明菌株 LYEC03 所获得的测序数据与参考基因组比对匹配性较好(图 4)。查找测序基因描述文件“gene description”发现菌株 LYEC03 中含有假设蛋白、碳水化合物激酶、纤维素酶家族糖基水解酶、位点 2 蛋白酶家族蛋白、丝氨酸蛋白酶、核心启动子结合蛋白(core promoter-binding protein, CPBP)家族膜内金属蛋白酶、糖原/淀粉/ α -葡聚糖磷酸化

酶、脂肪酶、含 patatin 样磷脂酶域蛋白 3、磷脂酶 D 家族蛋白、多酚氧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、甘油-3-磷酸脱氢酶/氧化酶、脱氢酶/氧化酶和含多铜氧化酶结构域的蛋白质原卟啉原氧化酶、细胞色素 c 氧化酶组装因子(cytochrome c oxidase assembly factor) CtaG、细胞色素 c 氧化酶亚基 II、细胞色素 c 氧化酶亚基 I、R2 样配体结合氧化酶、乙醇酸氧化酶亚基(glycolate oxidase subunit) GlcD、巯基过氧化物酶、L-天冬氨酸氧化酶、2-羟

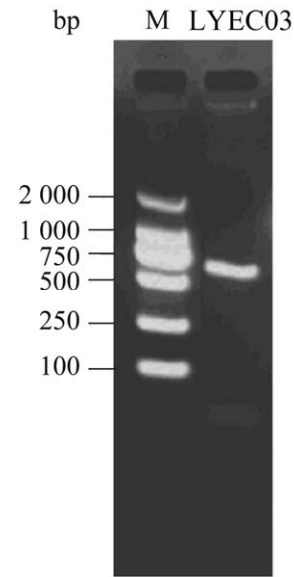


图 2 菌株 LYEC03 的 PCR 电泳图

Figure 2 PCR electrographic diagram of strain LYEC03. M: DL2000 DNA Marker.

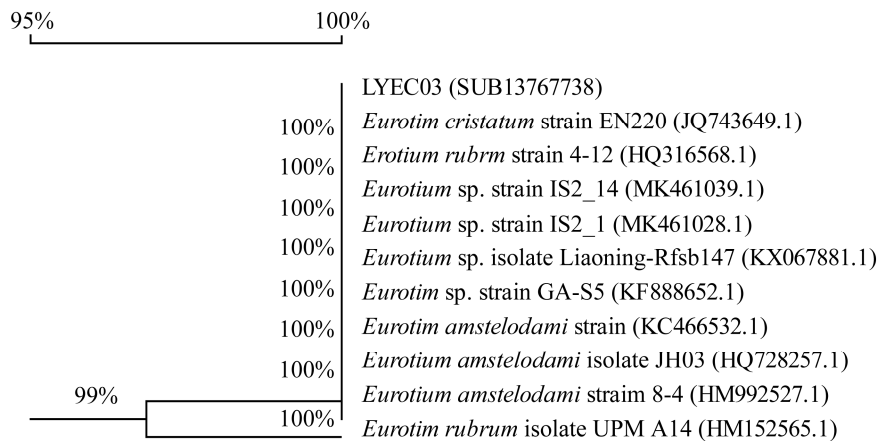


图 3 菌株 LYEC03 基于 ITS 测序的同源进化树

Figure 3 Homologous evolutionary tree of strain LYEC03 based on ITS sequencing.

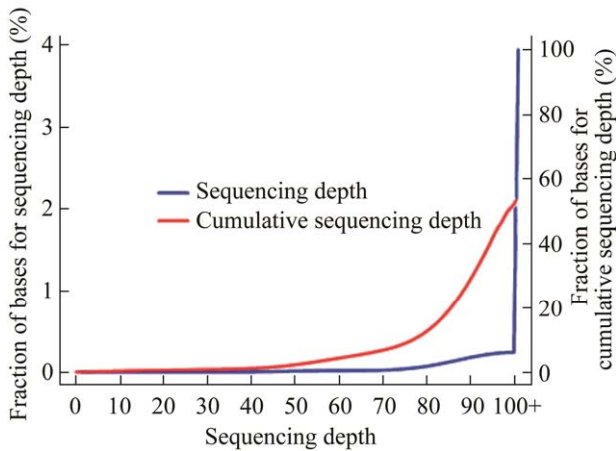


图4 与参考基因组相比菌株 LYEC03 的测序深度及累计分布

Figure 4 Sequencing depth and cumulative distribution of LYEC03 strain compared to the reference genome.

基酸氧化酶等大量与菌株生长、能量代谢调节和产纤维酶、产淀粉酶、产蛋白酶、产脂肪酶、产氧化酶的基因，特别是与氧化酶相关的基因种类较多。

2.3.2 菌株基因组的变异信息分析

相较于参考基因组，菌株 LYEC03 SNP 注释中，其全基因组杂合比率(het rate)为 0.044%，变异总计 4 991 个(占整个基因组 0.017 5%)；InDel 注释中，其插入突变(insertion)总和 844 个、缺失突变(deletion)总和 506 个，总计 1 350 个(占 0.004 7%)；CNV 注释中，增加(duplication number)和减少的拷贝数(deletion number)均为 0；SV 注释中，大片段的插入(insertion)为 0，片段丢失(deletion)为 17，倒置(inversion)为 29，染色体内部迁移(intra-chromosomal translocation, ITX)为 20，染色体间的迁移(inter-chromosomal translocation, CTX)为 247，总计 375 个(占 0.001 3%)。其中，突变基因为假设蛋白、碳水化合物激酶、纤维素酶家族糖基水解酶、位点 2 蛋白酶家族蛋白、多酚氧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等与菌株生长、能量代谢调节和产淀粉酶、产氧化酶和产纤维酶有关

的基因，分布于 JXNT01000001.1、JXNT01000002.1 和 JXNT01000003.1 等 8 条染色体的多条序列上(图 5、表 1)。

2.4 菌株 LYEC03 基因组框架图测序分析

2.4.1 菌株序列测定的基本信息

菌株 LYEC03 通过二代测序获得高质量的基因组序列，该基因组中总碱基数为 4 090.943 1 Mb。经过序列拼接得到 2 518 个 scaffold，其中 1 144 个大于 1 200 bp，GC 含量为 51.70%，序列长度为 30 623 602 bp。预测该菌株含有 13 033 个基因编码区，基因总长度为 17 068 197 bp，编码区总长度占全基因组的比例为 55.74%。

2.4.2 基因功能注释

将菌株 LYEC03 基因编码序列引入直源同源群集(clusters of orthologous groups, COG)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、基因产物功能数据库(gene ontology, GO)、非冗余蛋白质序列数据库(non-redundant proteins sequence database, NR)和碳水化合物活性酶数据库(carbohydrate-active enzymes database, CAZymes)中进行比对(diamond, E value $\leq 1E^{-5}$)，分别注释得到 5 689、13 734、23 345、3 726 和 559 个基因。其中在 COG 注释中，数量最多的几个类别分别是仅通用功能预测(general function prediction only) 742 个、碳水化合物运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism) 539 个、氨基酸运输和代谢(amino acid transport and metabolism) 513 个、脂质运输和代谢(lipid transport and metabolism) 463 个、翻译、核糖体结构与生物发生(translation, ribosomal structure and biogenesis) 457 个和能量产生和转化(energy production and conversion) 420 个；此外，次生代谢产物的生物合成、运输和分解代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism)注释到基因数也较多，

达 325 个(图 6)。KEGG 注释中, 数量最多的代谢通路类别分别是: 全局与概述图谱(global and overview maps) 4 078 个、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism) 894 个、氨基酸代谢(amino acid metabolism) 850 个、外源生物降解代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism) 719 个、能量代谢(energy metabolism) 670 个、脂质代谢(lipid metabolism) 588 个和萜类化合物和聚酮类化合物的代谢(metabolism of terpenoids and polyketides) 405 个(图 7)。这表明菌株 LYEC03 参与碳水化合物、氨基酸、脂类和能量

代谢比较活跃, 且将一些外源性的化学物质进行了生物降解, 转化生成了一些萜类或者聚酮类的次级代谢产物。

2.5 菌株 LYEC03 发酵枇杷花特性分析

2.5.1 不同发酵时间样品的“金花菌”数量

菌株 LYEC03 发酵枇杷花不同发酵时间样品的“金花菌”数量如图 8 所示, 接种 1 d 后菌株开始大量生长, 出现了明显的菌丝; 接种第 3 天开始出现孢子, 接种 4 d 后孢子数最多、最密, 平板活菌计数菌株数量达到峰值(5.45×10^6 CFU/g); 随后菌株数量增长放缓, 孢子变少。

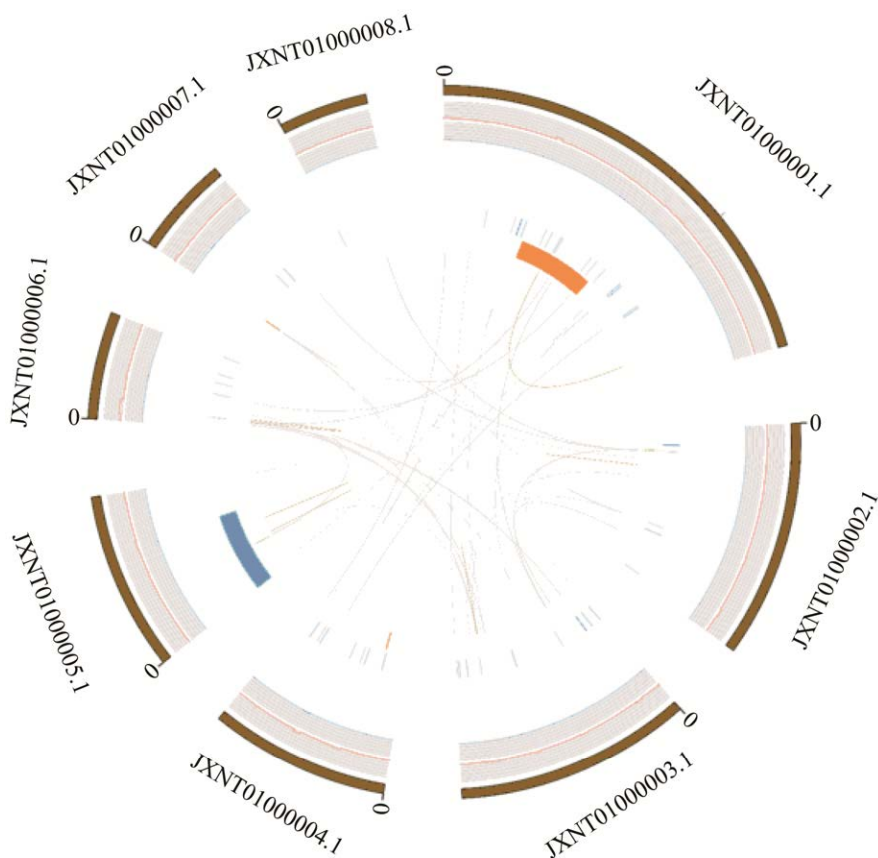


图 5 菌株 LYEC03 遗传变异 Circos 图 由外到内变异类型依次为染色体、SNP、InDel、CNV duplication、CNV deletion、SV insertion、SV deletion、SV inversion、SV ITX、SV CTX

Figure 5 Circos diagram of genetic variation of strain LYEC03. The types of variation from outside to inside were chromosome, SNP, InDel, CNV duplication, CNV deletion, SV insertion, SV deletion, SV inversion, SV ITX and SV CTX.

表 1 菌株 LYEC03 部分突变基因在染色体上的分布情况

Table 1 Distribution of partial mutated genes in strain LYEC03 on chromosomes

突变类型		行号	基因组序列编号	功能预测	功能分类
Mutation type		Line No	Genome sequence No.	Function prediction	Functional classification
SNP 注释	非同义 SNP	Line47,	JXNT01000001.1	假设蛋白	细胞周期控制、细胞分裂和染色体分割
		Line50		Hypothetical protein	
SNP annotation	Nonsynonymous SNP	Line11	JXNT01000003.1	纤维素酶家族糖基水解酶	能源生产和转换
				Cellulase family glycosylhydrolase	Energy production and conversion
	同义 SNP	Line367,	JXNT01000001.1	碳水化合物激酶	碳水化合物运输和代谢
		Line525		Carbohydrate kinase	
	Synonymous SNP	Line12	JXNT01000004.1	纤维素酶家族糖基水解酶	能源生产和转换
				Cellulase family glycosylhydrolase	Energy production and conversion
InDel 注释	非移位插入	Line2438	JXNT01000002.1	位点 2 蛋白酶家族蛋白	转录、复制、重组和修复
				Site-2 protease family protein	
InDel annotation	Nonframeshift insertion	Line6039	JXNT01000008.1		
		Line4688	JXNT01000005.1	谷胱甘肽过氧化物酶	辅酶运输和代谢
				Glutathione peroxidase	Coenzyme transport and metabolism
	移码删除	Line5892	JXNT01000007.1	碳水化合物激酶	碳水化合物运输和代谢
				Carbohydrate kinase	
	Frameshift deletion	Line5991	JXNT01000008.1	多酚氧化酶	次级代谢产物的生物合成、运输和分解代谢
				Polyphenol oxidase	

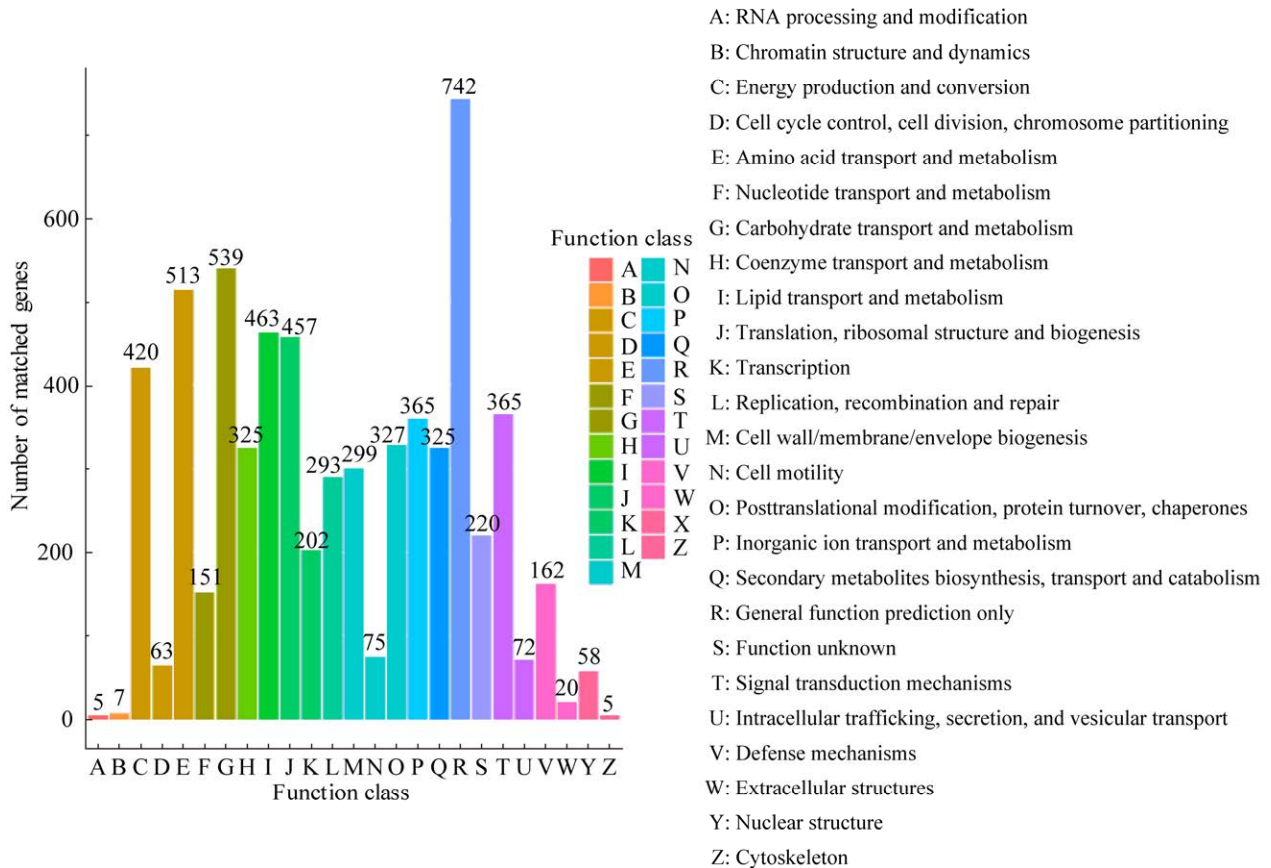


图 6 菌株 LYEC03 的 COG 数据库注释
Figure 6 COG database annotation of strain LYEC03.

2.5.2 不同发酵时间样品主要功效成分分析

不同发酵时间样品主要功效成分含量变化如图 9 所示。结果表明, 样品中含量最高的为纤维素(295.80 mg/mL), 随着发酵的进行, 样品中的纤维素含量逐渐开始降低, 其趋势为先迅速下降而后平缓。水浸出物中含有蛋白质、氨基酸和多酚等各类丰富物质, 是茶叶类饮料感官与风味物质评定的重要指标^[33]。未发酵前, 样品中的水浸出物含量为 365.52 mg/mL, 发酵前期, 随着发酵时间的延长, “金花菌”菌株开始生长, 分泌大量的纤维素酶、蛋白酶, 将枇杷花样品中的纤维素、蛋白质等成分降解, 生成了可溶性糖、氨基酸、多酚等物质, 样品中的水溶性物质明显增加, 至第 4 天达到峰值为 523.12 mg/mL; 发

酵后期, “金花菌”产生孢子, 菌株数量达到峰值需要消耗大量的能量, 水浸出物可为菌株提供大量的 C 源和 N 源, 其含量略微降低。样品中多糖、粗蛋白的含量表现出先下降后平缓的趋势, 总酚和氨基酸的含量表现为先上升后缓慢下降的趋势, 且峰值均在发酵第 4 天。推测原因可能是发酵前期, “金花菌”菌株生长较为缓慢, 用于维持菌株生长的多糖、粗蛋白减少较为缓慢, 菌株酶解样品中的纤维、蛋白、多糖等大分子物质转化生成了总酚、氨基酸, 但由于菌株数量较低, 因此总酚、氨基酸增长缓慢; 发酵第 4 天, 菌株大量生长需要消耗能量, 多糖、粗蛋白含量明显降低, 达到峰值分别为 25.56 mg/mL 和 11.62 mg/mL, 总酚、氨基酸增

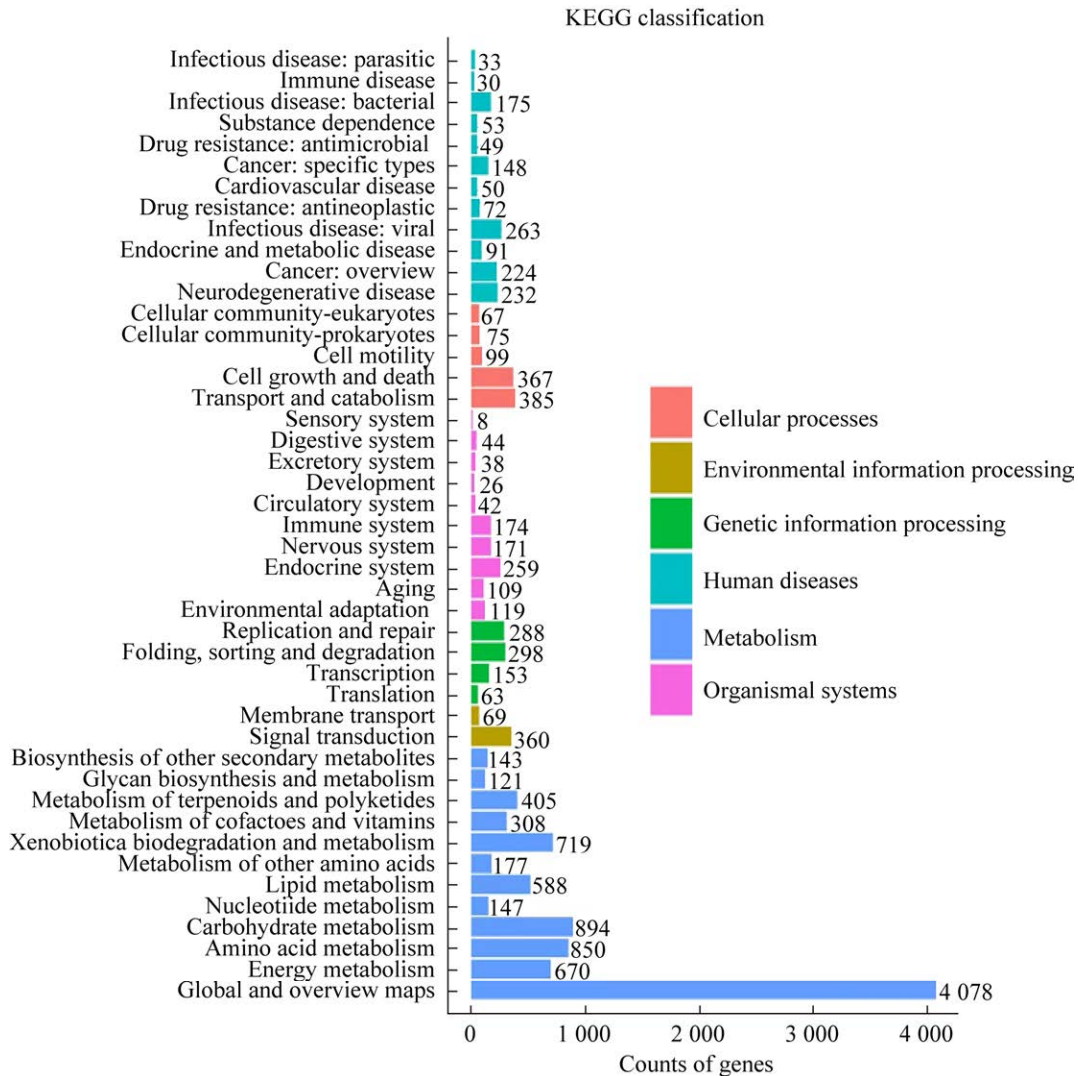


图 7 菌株 LYEC03 KEGG 数据库注释

Figure 7 KEGG database annotation of strain LYEC03.

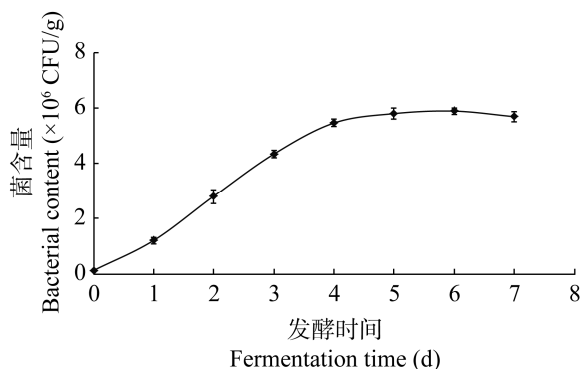


图 8 不同发酵时间样品的活菌数

Figure 8 Live bacterial count of samples at different fermentation time.

长也达到峰值,分别为 34.81 mg/mL 和 6.86 mg/mL; 发酵后期菌株生长平稳,多糖、粗蛋白的消耗也表现为缓慢下降。与纤维素含量相比,蛋白质含量的降低相对更为缓慢,原因可能是菌株生长过程中分泌了大量的酶,特别是后期菌丝体分泌的酶含量更多造成测定的蛋白含量略微上升,发酵后期样品中的多糖、蛋白含量相对不足,总酚、氨基酸可能作为 C 源和 N 源被菌株消耗,因而含量缓慢下降。

在各大类物质具体组分分析中,本文重点研究了黄酮苷和儿茶素的组成及变化。黄酮类

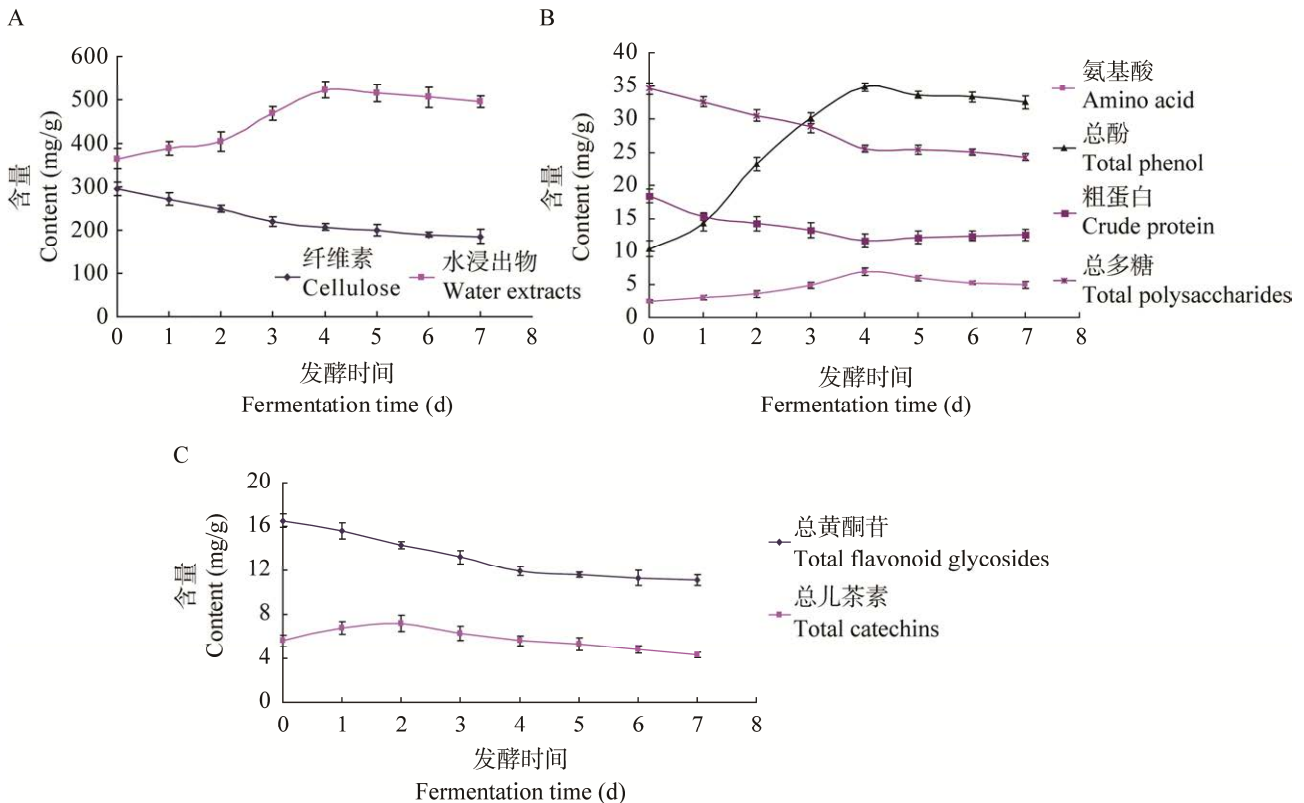


图 9 不同发酵时间样品的主要功效成分含量 A: 纤维素和水浸出物. B: 总多糖、粗蛋白、氨基酸和总酚. C: 总黄酮苷、总儿茶素.

Figure 9 Content of main functional components in samples at different fermentation times. A: Cellulose and water extracts. B: Total polysaccharides, crude protein, amino acids, and total phenol. C: Total flavonoid glycosides, total catechins.

化合物是枇杷花的主要活性物质之一, 含量较为丰富^[34]. 黄酮类化合物主要以黄酮苷的形式存在于发酵样品中, 含量 16.52 mg/mL; 随着发酵时间的延长, 样品中总黄酮苷的含量逐步下降. 黄酮苷通过配糖化作用以黄酮醇与糖基连接而成, 其在微生物分泌的胞外酶与热作用下容易发生水解释放糖基, 从而加速其氧化分解, 能起到降低茶汤苦涩味的作用. 儿茶素是茶叶中一类重要的品质成分和功能成分, 是茶类发酵样品中多酚类物质的主要组成部分^[35], 但儿茶素在多酚氧化酶或过氧化酶的作用下很快会被氧化成各种儿茶素的单体(如茶黄素、茶红素和茶褐素等), 也能起到降低茶汤苦味从而改善茶汤滋味的作用. 发酵开始, “金花菌”菌

株分解底物生成儿茶素为主体的多酚类物质, 儿茶素生成的速度超过了氧化分解的速度, 因而总儿茶素含量呈微量上升的趋势, 至第 2 天达到峰值为 7.23 mg/mL; 而后儿茶素氧化分解的速度加快, 总儿茶素含量呈下降趋势.

2.5.3 不同发酵时间样品的抗氧化能力测定

不同发酵时间样品总抗氧化活性、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率的变化如图 10 所示. 结果表明, 随着发酵时间的延长, 枇杷花样品 3 个抗氧化能力指标均呈现先增加后缓慢降低的趋势, 且均在发酵第 4 天达到峰值, 分别为 10.56 mmol/g、90.89% 和 76.68%, 均与阳性对照 Vc 测定数值接近.

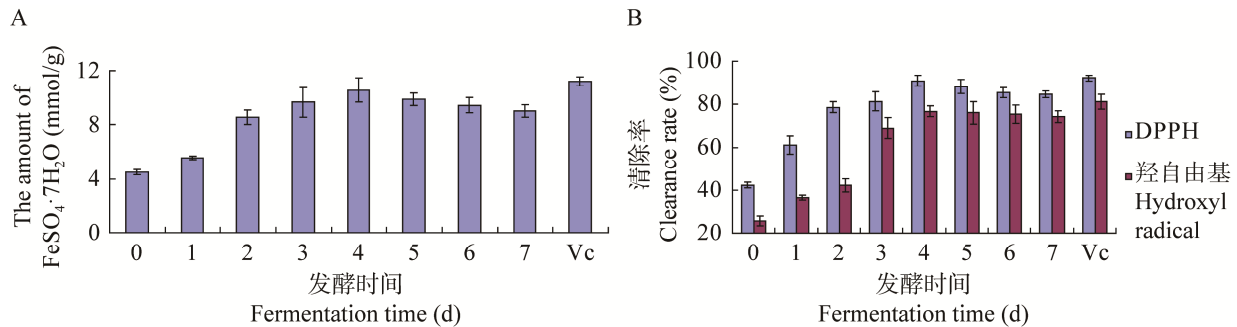


图 10 不同发酵时间样品的抗氧化能力 A: 总抗氧化活性. B: DPPH 自由基清除率、羟自由基清除率
Figure 10 Antioxidant capacity of samples at different fermentation times. A: Total antioxidant activity. B: DPPH free radical clearance rate, hydroxyl free radical clearance rate.

3 讨论与结论

近年来, 生物技术的发展日新月异, 高通量测序技术已成为微生物基因组和功能研究的重要工具, 目前从传统发酵食品中分离得到的许多微生物菌株都进行了基因组测序, 如从酱油卤水发酵中分离的葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) AL1^[36], 从食醋中分离得到的葡糖醋杆菌(*Gluconacetobacter* sp.) SXCC-11^[37], 从福建武平“红菌豆腐”中分离得到的粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)^[25]。通过对这些微生物菌株基因组核苷酸序列的测定和基因组功能解析, 有利于从分子水平上探究微生物菌株的发酵特性。本研究从陕西泾阳茯砖茶中分离得到其主要的发酵菌株 LYEC03, 经形态学观察、ITS 序列鉴定及基因组测序, 确定该菌株为冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)。菌株 LYEC03 重测序表明其与参考基因组覆盖率高, 整体变异较小, 但其中假设蛋白、碳水化合物激酶、纤维素酶家族糖基水解酶、位点 2 蛋白酶家族蛋白、多酚氧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶等与菌株生长、能量代谢调节、产纤维素酶、产蛋白酶和产氧化酶相关的基因发生变异, 表明分离的 LYEC03 菌株可能增强了其产纤维素酶、产蛋白酶和产氧化酶能力。二代基因组框

架图测序及编码基因蛋白的功能注释表明, 碳水化合物代谢、氨基酸代谢、外源生物降解代谢、能量代谢、脂质代谢与萜类化合物和聚酮类化合物的代谢等注释得到的基因数目较多, 表明 LYEC03 菌株参与碳水化合物、氨基酸、脂类和能量代谢较为活跃, 其生长过程中能分泌大量的淀粉酶、氧化酶和纤维酶将一些外源性的化学物质进行生物降解, 如催化淀粉转化为单糖、催化多酚类化合物氧化, 进而生成了一些萜类、聚酮类的次级代谢产物。

冠突散囊菌(金花菌)被视为茯砖茶品质的重要因素, 意味着该菌与茯砖茶相关品质成分有着不可分割的联系。研究表明, 无论是原料相对单一的传统茯砖茶还是类型多样、品质各异的冠突散囊菌发酵物, 其在接种冠突散囊菌发酵制备过程中, 可溶性浸出物、氨基酸、可溶性糖、可溶性蛋白及茶多酚和儿茶素等物质成分的含量变化均随着优势真菌“金花”菌群的演变而表现出不同程度的规律性^[38]。然而, 冠突散囊菌发酵不同底物其各大类的营养物质变化不一, 品质差异较大, 因而需要从更深层次探究其底物代谢的机制才能为进一步证实冠突散囊菌发酵物品形成机理提供理论依据。本研究中, LYEC03 菌株发酵枇杷花主要功效成分及抗氧化能力测

定表明, 其菌株生长能分泌大量的纤维素酶、蛋白酶, 随着发酵时间的延长, 样品中的纤维、蛋白质成分降解, 生成了可溶性糖、氨基酸和多酚等物质, 增加了样品中水浸出物的含量, 降低了总黄酮苷和总儿茶素的含量, 减少了茶汤的苦涩味, 还能提升样品的抗氧化活性, 为后续枇杷花茶产品的制备, 风味、色泽的改善, 以及产品品质的提升提供了一个参考方案和理论依据。LYEC03 菌株总抗氧化活性、DPPH 自由基清除率和羟自由基清除率 3 个抗氧化指标均呈现先增加后缓慢降低的趋势, 与菌株生长、主要功效成分含量的变化一致, 再次验证了 LYEC03 菌株具有较强的产纤维酶、产蛋白酶和产氧化酶的能力^[39]。

总之, 本研究对茯砖茶主要发酵菌株进行分离鉴定、基因组成及发酵特性分析, 证实了冠突散囊菌的发酵特性与其基因组中含有丰富的纤维素酶、蛋白酶、氧化酶和脂肪酶基因相关, 特别是其产氧化酶基因的种类较多, 有利于样品中的一些物质如多酚进一步氧化进而提升抗氧化活性。本研究揭示了冠突散囊菌的发酵本质, 为其发酵相关茶产品在分子水平上相关基因、代谢过程的调控提供了理论基础, 也为冠突散囊菌在食品、轻工业以及医药等方面的开发利用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] 黄浩, 郑红发, 赵熙, 银霞, 黄怀生, 粟本文, 钟兴刚, 黄建安, 刘仲华. 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, 38(8): 49-55.
HUANG H, ZHENG HF, ZHAO X, YIN X, HUANG HS, SU BW, ZHONG XG, HUANG JA, LIU ZH. Identification and aflatoxin production of ‘golden flora’ fungi isolated from Fu tea produced from different kinds of tea[J]. Food Science, 2017, 38(8): 49-55 (in Chinese).
- [2] 张月, 崔旋旋, 刘英学, 盖永强, 朴美子. 茯砖茶中冠突散囊菌的分离鉴定及其发酵工艺和生物活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(22): 202-207.
ZHANG Y, CUI XX, LIU YX, GAI YQ, PIAO MZ. Isolation, identification, fermentation technology and bioactivity of *Eurotium cristatum* in Fuzhuan brick tea[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(22): 202-207 (in Chinese).
- [3] WANG X, LI XX, LIU B, LONG FY, WEI JP, ZHANG YX, CUI YY, YUAN YH, YUE TL. Comparison of chemical constituents of *Eurotium cristatum*-mediated pure and mixed fermentation in summer-autumn tea[J]. LWT, 2021, 143: 111132.
- [4] 王琪琪. 黑茶中散囊属真菌及其对茶叶品质提升研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学硕士学位论文, 2021.
WANG QQ. The diversity of *Eurotiums* SP. in dark tea and its effect on the quality improvement[D]. Guiyang: Master’s Thesis of Guizhou Normal University, 2021 (in Chinese).
- [5] 罗春燕, 姚新转, 陈佳, 吕立堂. 基于非靶向代谢组学分析冠突散囊菌发酵红茶茶汤前后代谢物变化[J]. 食品科技, 2021, 46(5): 246-253.
LUO CY, YAO XZ, CHEN J, LV LT. Analysis of substance differences before and after fermentation of black tea infusion by *Eurotium cristatum* based on non-targeted metabonomics[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(5): 246-253 (in Chinese).
- [6] 龚受基, 滕翠琴, 曹惠怡, 张均伟, 谢加仕, 蒙彦妃. 冠突散囊菌对夏秋绿茶发酵的影响[J]. 食品科技, 2020(1): 134-140.
GONG SJ, TENG CQ, CAO HY, ZHANG JW, XIE JS, MENG YF. Influences on summer-autumn tea fermented with *Eurotium cristatum*[J]. Food Science and Technology, 2020(1): 134-140 (in Chinese).
- [7] 张丽华, 李珍珠, 赵光远, 纵伟. 冠突散囊菌发酵杜仲茶的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 118-123.
ZHANG LH, LI ZZ, ZHAO GY, ZONG W. Process optimization of fermentation of *Eucommia ulmoides* tea by *Eurotium cristatum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(21): 118-123 (in Chinese).
- [8] 陈敏, 谢发, 游玲, 王涛. 冠突散囊菌发酵苦丁茶工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(6): 224-228.
CHEN M, XIE F, YOU L, WANG T. Fermentation of *Ligustrum robustum* by *Eurotium cristatum*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(6): 224-228 (in Chinese).
- [9] 郑升海, 黄丹, 罗惠波, 张玲玲, 龚大刚, 杜鸿, 曲都, 韩保林. 冠突散囊菌发酵桑叶茶品质研究[J]. 食品科技, 2021, 46(3): 44-48.
ZHENG SH, HUANG D, LUO HB, ZHANG LL, GONG DG, DU H, QU D, HAN BL. Study on the quality of mulberry leaf tea fermented by *Eurotium cristatum*[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(3): 44-48 (in Chinese).
- [10] 杨立娜, 吴凯为, 徐清莹, 王如意, 曲歌, 吴昊桐, 朱力

- 杰, 马涛. 冠突散囊菌发酵对荔枝草茶主要成分及风味的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 121-125.
- YANG LN, WU KW, XU QY, WANG RY, QU G, WU HT, ZHU LJ, MA T. Effects of *Eurotium cristatum* fermentation on main quality components and flavor of *Salvia plebeia* tea[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(13): 121-125 (in Chinese).
- [11] 胡谢馨, 易有金, 柏连阳, 李高阳, 周红丽, 周金伟, 夏波. 茯砖茶“金花”菌的分离、鉴定及转化葛根产物研究[J]. 茶叶科学, 2016, 36(3): 268-276.
- HU XX, YI YJ, BO LY, LI GY, ZHOU HL, ZHOU JW, XIA B. Research on separation, identification and transformation products transformed kudzu root of Jinhua' fungus[J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(3): 268-276 (in Chinese).
- [12] 兰晓勇, 刘素纯, 李再贵. 冠突散囊菌不同发酵条件对苦荞蛋白质的影响[J]. 中国酿造, 2019, 38(10): 72-76.
- LAN XY, LIU SC, LI ZG. Effects of different fermentation conditions of *Eurotium cristatum* on the protein of Tartary buckwheat[J]. China Brewing, 2019, 38(10): 72-76(in Chinese).
- [13] 王家琛, 刘素纯, 刘善鑫. 冠突散囊菌发酵燕麦对多酚含量影响的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(8): 104-108.
- WANG JC, LIU SC, LIU SX. Effect of *Eurotium cristatum* fermentation on polyphenol content in oats[J]. China Brewing, 2017, 36(8): 104-108 (in Chinese).
- [14] 刘玉倩, 杨家干. 茯砖茶发花过程菌落及主要内含物质变化[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2017(5): 31-34.
- LIU YQ, YANG JG. Changes of colonies and main contents in Fuzhuan tea during flowering[J]. Newsletter of Sericulture and Tea, 2017(5): 31-34 (in Chinese).
- [15] 刘善鑫, 刘素纯, 李再贵. 冠突散囊菌发酵燕麦对阿魏酸含量的影响[J]. 中国酿造, 2018, 37(6): 165-169.
- LIU SX, LIU SC, LI ZG. Effect of *Eurotium cristatum* fermentation on ferulic acid content in oats[J]. China Brewing, 2018, 37(6): 165-169 (in Chinese).
- [16] 侯粲, 杜昱光, 王曦, 肖杰, 范怡航, 应剑, 李颂, 董志忠. 冠突散囊菌发酵对 2 种新工艺茶叶成分及活性的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 90-97.
- HOU C, DU YG, WANG X, XIAO J, FAN YH, YING J, LI S, DONG ZZ. Effects of *Eurotium cristatum* on chemical compositions and activities of the new process teas[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(10): 90-97 (in Chinese).
- [17] 黄彦, 石瑞, 苏二正. 冠突散囊菌的研究与应用进展[J]. 生物加工过程, 2017, 15(1): 49-56.
- HUANG Y, SHI R, SU EZ. Progress in the research and application of the *Eurotium cristatum*[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(1): 49-56 (in Chinese).
- [18] 覃金球, 罗美玲, 张旋, 林发全. 冠突散囊菌医药价值研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24): 336-339.
- QIN JQ, LUO ML, ZHANG X, LIN FQ. Research process on medical value of *Eurotium cristatum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(24): 336-339 (in Chinese).
- [19] XU AQ, WANG YL, WEN JY, LIU P, LIU ZY, LI ZJ. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan brick-tea[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(1): 14-22.
- [20] 李响. 冠突散囊菌发酵工艺的优化及其免疫活性的初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2019.
- LI X. Optimization of fermentation technology of Ascomycetes coronatus and preliminary study on its immune activity[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2019 (in Chinese).
- [21] 郑欣欣. 茯砖茶中“金花”菌产孢机制及其功能性研究[D]. 西安: 陕西科技大学硕士学位论文, 2015.
- ZHENG XX. Study on sporulation mechanism and functionality of 'Jinhua' bacteria in Fuzhuan tea[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi University of Science & Technology, 2015 (in Chinese).
- [22] 李臣, 周超. 枇杷花的生物活性及食品开发利用研究进展[J]. 现代食品, 2021(24): 45-48.
- LI C, ZHOU C. Research progress on the biological activity and food development and utilization of loquat flower[J]. Modern Food, 2021(24): 45-48 (in Chinese).
- [23] 张庆荣. 一种枇杷花茶饮品的制备方法及产品: CN111296604A[P]. 2020-06-19.
- ZHANG QR. Preparation method of loquat flower tea beverage and product: CN111296604A[P]. 2020-06-19 (in Chinese).
- [24] 石勇, 石训, 孙晓瑞, 张卫卫, 邵海洋, 王静. 冷冻干燥联合微波干燥对枇杷花茶品质的影响[J]. 保鲜与加工, 2023, 23(1): 52-56.
- SHI Y, SHI X, SUN XR, ZHANG WW, SHAO HY, WANG J. Effect of freeze-drying combined with microwave-drying on the quality of loquat flower tea[J]. Storage and Process, 2023, 23(1): 52-56 (in Chinese).
- [25] 林标声, 何玉琴, 陈小红, 罗茂春. 一株粗糙链孢菌的分离、鉴定及其基因组变异和功能分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 771-781.
- LIN BS, HE YQ, CHEN XH, LUO MC. Isolation, identification, genome variation and functional analysis of a strain form *Neurospora crassa*[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 771-781 (in Chinese).
- [26] 胡晓冰, 林标声, 王振伟, 郑黎静. 1 株利用乳酸的猪

- 源丁酸梭菌的分离鉴定及基因组序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(2): 569-578.
- HU XB, LIN BS, WANG ZW, ZHENG LJ. Isolation, identification and genomic sequence analysis of a strain of *Clostridium butyricum* from pigs utilizing lactic acid[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(2): 569-578 (in Chinese).
- [27] AL-BULUSHI IM, BANI-URABA MS, GUIZANI NS, AL-KHUSAIBI MK, AL-SADI AM. Illumina MiSeq sequencing analysis of fungal diversity in stored dates[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 1-10.
- [28] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 茶水浸出物测定: GB/T 8305—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Tea—Determination of water extracts content: GB/T8305—2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014 (in Chinese).
- [29] 肖咪, 刘利敏, 李鹏程, 薛宏坤, 邹先伟, 唐劲天, 苏彦奇, 蔡旭. 冠突散囊菌发酵湖北海棠茶过程中主要成分及活性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(1): 79-86.
- XIAO M, LIU LM, LI PC, XUE HK, ZOU XW, TANG JT, SU YQ, CAI X. Dynamic analysis of the main active components and activity in fermentation process of *Malus hupehensis* by *Eurotium cristatum*[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(1): 79-86 (in Chinese).
- [30] 翁水旺, 周继斌. 紫外分光光度法测定醋柳黄酮片总黄酮甙元的含量[J]. 光谱仪器与分析, 2000(2): 33-34.
- WENG SW, ZHOU JB. The content of total flavonoid glycoside in vinegar willow flavone tablets was determined by ultraviolet spectrophotometry[J]. Spectronic Instruments & Analysis, 2000(2): 33-34 (in Chinese).
- [31] 魏毅, 王娟, 罗杰英. 茶多酚口含片中总儿茶素的含量测定[J]. 湖南中医学院学报, 1998(1): 13-14.
- WEI Y, WANG J, LUO JY. Determination of catechins in tea polyphenols buccal tablets[J]. Journal of Hunan College of Traditional Chinese Medicine, 1998(1): 13-14 (in Chinese).
- [32] 陈小红, 马芳, 严云斌, 林标声, 沈绍新. 茯苓多糖的结构改性及抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(18): 4563-4566.
- CHEN XH, MA F, YAN YB, LIN BS, SHEN SX. Study on the structural modification and antioxidative activity of *Poria cocos* polysaccharides extracted from traditional Chinese medicine[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(18): 4563-4566 (in Chinese).
- [33] 倪子鑫, 周子维, 刘彬彬, 高峰, 李林金, 武清扬, 邓慧莉, 孙云. “周宁高山云雾茶”绿茶风味成分分析研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(3): 214-221, 229.
- NI ZX, ZHOU ZW, LIU BB, GAO F, LI LJ, WU QY, DENG HL, SUN Y. Study on flavor components in ‘Zhouning cloud-mist mountain tea’ green tea[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(3): 214-221, 229 (in Chinese).
- [34] 杨子敬, 饶桂维, 王磊. 超声波辅助双水相提取枇杷花总黄酮工艺优化及其抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 218-225.
- YANG ZJ, RAO GW, WANG L. Optimization of ultrasonic assisted aqueous two-phase extraction of total flavonoid from loquat flower and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 218-225(in Chinese).
- [35] 周露露, 高原, 牛智慧, 咸玥桐, 张晓萌, 高紫薇. 茶叶中儿茶素的药理作用及其研究进展[J]. 辽宁化工, 2018, 47(4): 316-318, 363.
- ZHOU LL, GAO Y, NIU ZH, XIAN YT, ZHANG XM, GAO ZW. Pharmacological effect of catechin in tea and its research progress[J]. Liaoning Chemical Industry, 2018, 47(4): 316-318, 363 (in Chinese).
- [36] CHONG TM, TUNG HJ, YIN WF, CHAN KG. Insights from the genome sequence of quorum-quenching *Staphylococcus* sp. strain AL1, isolated from traditional Chinese soy sauce brine fermentation[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(23): 6611-6612.
- [37] DU XJ, JIA SR, YANG Y, WANG S. Genome sequence of *Gluconacetobacter* sp. strain SXCC-1, isolated from Chinese vinegar fermentation starter[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(13): 3395-3396.
- [38] 黄浩. “散茶发花”的微生物与化学机制研究[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2014.
- HUANG H. Study on microbial and chemical mechanism of ‘loose tea and blooming flowers’[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [39] 邹金美, 宋宗仁, 蔡咚玲, 蔡滨雅, 张敬虎, 张国广. 冠突散囊菌固体发酵铁观音茶的主要活性成分及其抗氧化性分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 369-375.
- ZOU JM, SONG ZR, CAI DL, CAI BY, ZHANG JH, ZHANG GG. Analysis on the main active components and antioxidant activity of tieguanyin tea fermentation by *Eurotium cristatum*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 369-375 (in Chinese).