

基于宏基因组学分析不同发酵时期新疆沙棘酵素微生物群落结构及功能

范蕊, 王文文, 魏琳娜, 王腾斌, 魏思佳, 刘锦蓉, 李芳

Metagenomic Analysis of Microbial Community Structure and Functional Profiling during Different Fermentation Stages of Xinjiang Sea Buckthorn Jiaosu

FAN Rui, WANG Wenwen, WEI Linna, WANG Tengbin, WEI Sijia, LIU Jinrong, and LI Fang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024050247>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

黄精对麦曲微生物群落结构及其功能基因的影响

Effects of *Polygonatum sibiricum* on Microbial Community Structure and Functional Genes of Wheat Qu

食品工业科技. 2024, 45(3): 56-64 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030131>

基于宏基因组测序技术解析高温快速发酵豆豉菌群结构与功能注释

Analysis of the Structure and Function of High Temperature and Rapid Fermentation Douchi Flora Based on Macrogenome Sequencing Technology

食品工业科技. 2023, 44(2): 159-169 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030348>

沙棘酵素自然发酵过程中品质特征和细菌群落动态变化

Quality Changes and Bacterial Community Dynamics of Sea Buckthorn Jiaosu during Nature Fermentation

食品工业科技. 2021, 42(23): 150-157 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040326>

山西陈醋发酵过程微生物群落动态分析及差异菌属筛选

Dynamic Analysis of Microbial Community and Selection of Different Genera During Fermentation of Shanxi Vinegar

食品工业科技. 2022, 43(24): 171-179 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030192>

贵州腌鱼中微生物群落的多样性研究

Analysis of Microbial Community Diversity in Guizhou Suan Yu

食品工业科技. 2021, 42(5): 119-125 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040117>

酱腌菜中微生物及与产品风味品质关系研究进展

Research Progress of Microorganisms in Pickles and Their Relationship with Flavor and Quality of Products

食品工业科技. 2022, 43(14): 475-483 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070300>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

范蕊, 王文文, 魏琳娜, 等. 基于宏基因组学分析不同发酵时期新疆沙棘酵素微生物群落结构及功能 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(8): 173–181. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050247

FAN Rui, WANG Wenwen, WEI Linna, et al. Metagenomic Analysis of Microbial Community Structure and Functional Profiling during Different Fermentation Stages of Xinjiang Sea Buckthorn Jiaosu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(8): 173–181. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050247

· 生物工程 ·

基于宏基因组学分析不同发酵时期新疆沙棘 酵素微生物群落结构及功能

范蕊, 王文文, 魏琳娜, 王腾斌, 魏思佳, 刘锦蓉, 李芳*
(新疆维吾尔自治区分析测试研究院, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要:目的: 采用宏基因组学分析技术, 对新疆沙棘酵素自然发酵过程中不同时期的微生物群落结构及功能变化进行探究。方法: 对沙棘酵素发酵 10、20、30、40、50、60 d 的样品进行基因组 DNA 提取、PCR 产物扩增及纯化、Illumina PE 文库构建及宏基因组测序等程序, 分析沙棘酵素发酵过程中微生物群落结构, 通过与京都基因与基因组百科全书 (KEGG)、直系同源蛋白分组 (EggNOG)、碳水化合物活性酶 (CAZy) 数据库 3 个数据库比对, 进行功能基因注释及差异分析。结果: 沙棘酵素不同发酵时期微生物丰富多样, 共鉴定出 48 个门、106 个纲、222 个目、438 个科、881 个属和 1561 个种的微生物。发酵前期的优势菌是乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp., 33.03%)、库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 89.06%); 发酵中期的优势菌是日本葡糖杆菌 (*Gluconobacter japonicus*, 40.3%)、库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 71.12%); 发酵后期的优势菌是日本葡糖杆菌 (*Gluconobacter japonicus*, 35.71%)、近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*, 66.01%)。发酵前期被注释最多的代谢途径是碳水化合物代谢、氨基酸代谢; 参与能量形成与转换的有 1628 个基因, 参与氨基酸代谢的共 2654 个基因, 参与碳水化合物转运与代谢的共 2275 个基因; 发酵中期被注释最多的代谢途径是辅酶因子及维生素代谢, 参与翻译、核糖体结构及合成的共 2629 个基因, 参与翻译后修饰、蛋白质翻译的有 1692 个基因。糖基转移酶、糖苷水解酶是沙棘酵素整个发酵周期中的主要酶。结论: 本文阐明了沙棘酵素不同发酵时期样品微生物群落结构及功能差异, 为后续全面研究其微生物群落的生态组成和动态变化提供科学依据。

关键词: 沙棘, 宏基因组学, 微生物, 群落结构, 功能分析

中图分类号: Q180.61

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)08-0173-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024050247



本文网刊:

Metagenomic Analysis of Microbial Community Structure and Functional Profiling during Different Fermentation Stages of Xinjiang Sea Buckthorn Jiaosu

FAN Rui, WANG Wenwen, WEI Linna, WANG Tengbin, WEI Sijia, LIU Jinrong, LI Fang*

(Xinjiang Academy of Analysis and Testing, Urumqi 830011, China)

Abstract: Objective: The aim of this study was to investigate the dynamics of microbial community structure and function during the natural fermentation process of sea buckthorn ferment at different stages using metagenomic analysis techniques. Methods: Genomic DNA extraction, PCR amplification, and purification were carried out on samples collected from fermentation process of sea buckthorn ferment at 10, 20, 30, 40, 50, and 60 d. Subsequently, Illumina PE library construction and metagenomic sequencing were performed to analyze the microbial community structure during the fermentation process of sea buckthorn ferment. Functional gene annotation and differential analysis were conducted by

收稿日期: 2024-05-27

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2022D01B49)。

作者简介: 范蕊 (1990-), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 食品微生物及营养安全, E-mail: 3047665049@qq.com。

* 通信作者: 李芳 (1977-), 女, 硕士, 正高级实验师, 研究方向: 食品安全及天然产物, E-mail: ocean5678@126.com。

comparing with three databases: KEGG, EggNOG, and CAZy. Results: The microbial communities exhibited high diversity and abundance throughout the different stages of fermentation process of sea buckthorn ferment. A comprehensive analysis revealed the presence of 48 phyla, 106 classes, 222 orders, 438 families, 881 genera, and 1561 species of microorganisms. Notably, *Lactobacillus* sp. (33.03%) and *Pichia kudriavzevii* (89.06%) dominated in the early stage of fermentation. *Gluconobacter japonicus* (40.3%) and *Pichia kudriavzevii* (71.12%) were prevalent in the middle stage, while *Gluconobacter japonicus* (35.71%) and *Candida parapsilosis* (66.01%) were dominant in the late stage. Prior to fermentation, annotated metabolic pathways primarily involved carbohydrate metabolism and amino acid. Metabolism with a total of 1628 genes related to energy formation and conversion, 2654 genes associated with amino acid metabolism, and 2275 genes involved in carbohydrate transport and metabolism. The most annotated metabolic pathways during the mid-fermentation stage were those related to coenzyme factors and vitamin metabolism, with a total of 2629 genes involved in translation, rRNA structure and synthesis, as well as 1692 genes involved in post-translational modification and protein folding. Throughout the entire fermentation period of sea buckthorn ferment, glycosyltransferase and glycoside hydrolase were the main enzyme in the entire fermentation cycle of sea buckthorn ferment. Conclusion: This study elucidates the variations in microbial community structure and function of sea buckthorn ferment at different fermentation stages, thereby providing a scientific foundation for further comprehensive research on the ecological composition and dynamic changes of its microbial community.

Key words: sea buckthorn; metagenomics; microbiology; community structure; functional analysis

食用植物酵素,是以可用于食品加工的植物为主要原料,添加或不添加辅料,经微生物发酵制得的含有特定生物活性成分的酵素产品,如多糖类、寡糖类、氨基酸、蛋白质及多肽、维生素等^[1-2],该类产品具有消炎、抑菌、抗衰老、清热解毒、抗氧化等特点^[3-5]。众所周知,沙棘是珍贵的药食同源植物,其果实中含有大量黄酮类、多酚类、多糖、维生素、有机酸、不饱和脂肪酸、氨基酸、超氧化物歧化酶等生物活性成分,具有止咳化痰、健胃消食、活血散瘀、抗肿瘤、预防心脑血管疾病等功效^[6-8]。沙棘酵素拥有丰富的次生代谢产物、多种活性营养成分、益生菌等功能成分,具有加速新陈代谢、增强机体免疫力、调理肠道、解毒抗癌、美容养颜等功效^[9-11]。

随着信息技术跨领域的飞速发展,全基因组、转录组、蛋白质组、代谢组等跨组学成为目前研究的热点。宏基因组学是近年来研究的热点学科,它能够克服传统微生物分析可分离培养微生物的局限,通过分析样品中微生物的基因序列,快速区分微生物的种类、丰度及功能,获得更加准确的物种鉴定和分类信息,揭示微生物群落多样性、种群间的结构及进化关系、功能活性及环境之间的相互协作关系等^[12-14]。与传统测序技术相比,宏基因组学分析技术能够准确将样品中的微生物种类鉴定到属种水平,并深入到基因和功能层面^[15-16]。王海英^[17]采用高通量测序分析技术对自然发酵方式制备的番木瓜酵素微生物的群落组成及多样性进行测序分析,为有效调控发酵过程中微生物菌群提供了方向。邸鹏月等^[3]采用宏基因组技术分析桑葚酵素发酵前、中、后期微生物的丰度及多样性。结果表明在属水平上,桑葚酵素发酵过程中的优势菌是乳杆菌属。在发酵前期的优势菌是酵母(92.16%),为后续开发新型人工可控桑葚酵素提供理论基础。王玉荣等^[18]采用纯培养技术联合宏基因组学分析技术对高温大曲中的微生物多样性进行

分析,分离出212株芽孢杆菌:77株索诺拉沙漠芽孢杆菌(*Bacillus sonorensis*)、39株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、19株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)等。吴双慧等^[19]以不同发酵时期的羊肉香肠为例,采用高效液相色谱法联合宏基因组技术,分析其发酵过程中生物胺含量变化和微生物群落动态演替过程,共鉴定出43个门、60个纲、112个目、201个科、465个属、2156个种的微生物。

沙棘酵素不同发酵时期微生物结构较为复杂,因此,通过宏基因组学分析技术探索其过程中的微生物群落结构及功能十分必要。截至目前,采用宏基因组学分析技术对沙棘酵素自然发酵过程中的微生物群落结构及功能基因方面的研究未见报道。本研究以新疆地区沙棘为研究对象,采用宏基因组学分析技术对沙棘酵素自然发酵过程中不同时期的微生物群落结构及功能进行探索,利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)、直系同源蛋白分组(EggNOG)、碳水化合物活性酶(CAZy)数据库等,对样本基因丰度与功能进行注释及差异分析,探究微生物群落动态演替变化规律,为进一步筛选沙棘酵素自然发酵优势微生物菌种,实现人工控制沙棘酵素系列新产品以及功能性产品的研发提供科学依据。同时,为后期对沙棘酵素自然发酵过程中微生物群落进行系统水平的研究,建立预测模型,代谢网络重构与模拟,更加全面地研究其微生物群落的代谢物、代谢能力、生态组成和动态变化等信息奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

沙棘鲜果 中亚沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. subsp. *turkestanica*, 产自中国新疆,生长于海拔800~3000 m的河谷阶地、山坡,常见于河漫滩;基因组DNA提取试剂盒(FastDNA™ spin Kit for Soil) 美

国 MP Biomedicals 公司; 基因组测序仪 (NovaSeq 6000) 美国柏尔 Bioo Scientific 公司; 琼脂糖(琼脂糖 Agarose75510019) 赛默飞世尔(Thermo Scientific)公司。

Eppendorf 5424R 高速台式冷冻离心机、Eppendorf 5430 R 小型离心机 德国艾本德 Eppendorf 公司; NanoDrop2000 超微量分光光度计、Qubit 4.0 荧光定量仪 赛默飞世尔(Thermo Scientific)公司; FastPrep-24 5GMP 研磨仪 美国 MP 公司; JY600C 双稳定时电泳仪 北京君意东方电泳设备有限公司; Novaseq 高通量测序仪 美国 Illumina 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 将采摘的沙棘鲜果用灭菌蒸馏水清洗干净沥干, 榨汁机打浆, 无菌纱布四层过滤, 将汁液滤入灭菌锥形瓶中, 加入 2%(W/W) 的白砂糖, 混匀, 封口, 置于 25 °C 培养箱中自然发酵 60 d。在超净工作台中分别取发酵 10、20、30、40、50、60 d 的样品汁液 15 mL 于灭菌离心管中, 9000 r/min、4 °C 冷冻离心 10 min, 弃上清, 重复 3 次, 将带有沉淀的离心管置于-80 °C 冰箱保存。

1.2.2 总 DNA 提取、文库构建及高通量测序分析 将样本送至上海美吉生物有限公司进行宏基因组测序, 每个样本 3 个重复, 共计 18 个样本。

用基因组 DNA 提取试剂盒完成沙棘酵素 18 个样本基因组 DNA 提取, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA。将 DNA 片段化, 筛选约 400 bp 的片段, 用于构建 PE 文库。构建 PE 文库: 使用磁珠筛选去除接头自连片段; 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; 磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库。桥式 PCR: 文库分子一端与引物碱基互补, 经过一轮扩增, 将模板信息固定在芯片上; 固定在芯片上的分子另一端随机与附近的另外一个引物互补, 也被固定住, 形成“桥(bridge)”; PCR 扩增, 产生 DNA 簇; DNA 扩增子线性化成为单链。Illumina Hiseq 测序: 加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP, 每次循环只合成一个碱基; 用激光扫描反应板表面, 读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类; 将“荧光基团”和“终止基团”化学切割, 恢复 3'端粘性, 继续聚合第二个核苷酸; 统计每轮收集到的荧光信号结果, 获知模板 DNA 片段的序列。

1.3 数据处理

对原始序列进行拆分、质量剪切以及去除污染等优化处理。使用优化序列进行拼接组装及基因预测^[20], 获得的基因进行物种和功能上的注释以及分类, 包括 NR、EggNOG、KEGG 等。使用 MetaGene (<http://metagene.cb.k.u-tokyo.ac.jp/>) 对拼接结果中的 contig 进行 ORF 预测。将所有样品预测出来的基因序列用 CD-HIT 软件 (<http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>) 进行聚类, 每个类取最长的基因作为

代表序列, 构建非冗余基因集。使用 SOAPaligner 软件分别将每个样品的高质量 reads 与非冗余基因集进行比对, 统计基因在对应样品中的丰度信息。对预测出的基因进行物种及功能上的注释分类, 包括 eggNOG、CAZy 和 KEGG 等^[21], 并进行样本相似性聚类及基因功能差异统计比较分析。

2 结果与分析

2.1 沙棘酵素发酵过程中细菌群落演替规律

基于基因的物种分类学注释, 比对 NR 数据库, 获得每个样本中的各个分类学水平(域, 界, 门, 纲, 目, 科, 属, 种)的物种和丰度信息。提取沙棘酵素 18 个样本基因组 DNA, 共获得 131119182113 bp, 871665198 条序列。通过 NR 物种注释共鉴定出 48 个门、106 个纲、222 个目、438 个科、881 个属、1561 个种, 选取种水平上相对丰度排名前 30 的细菌进行物种组成分析。

如图 1 所示, 发酵 10 d 的样本中相对丰度前 5 的微生物有: 日本葡萄糖杆菌(*Gluconobacter japonicus*, 18.98%)、弗氏葡萄糖球菌(*Gluconobacter frateurii*, 12.94%)、葡萄糖杆菌属(unclassified g *Gluconobacter*, 5.83%)、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp., 33.03%)、副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*, 10.64%); 发酵 20 d 的样本中相对丰度前 5 的微生物有: 日本葡萄糖杆菌(*Gluconobacter japonicus*, 40.78%)、弗氏葡萄糖球菌(*Gluconobacter frateurii*, 28.52%)、葡萄糖杆菌属(unclassified g *Gluconobacter*, 12.09%)、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp., 5.81%)、副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*, 1.72%); 发酵 30 d 的样本中相对丰度前 5 的微生物有: 日本葡萄糖杆菌(*Gluconobacter japonicus*, 41.28%)、弗氏葡萄糖球菌(*Gluconobacter frateurii*, 25.95%)、葡萄糖杆菌属(unclassified g *Gluconobacter*, 12.15%)、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp., 7.11%)、副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*, 2.21%); 发酵 40 d 的样本中相对丰度前 5 的微生物有: 日本葡萄糖杆菌(*Gluconobacter japonicus*, 40.3%)、弗氏葡萄糖球菌(*Gluconobacter frateurii*, 26.32%)、葡萄糖杆菌属(unclassified g *Gluconobacter*, 11.85%)、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp., 7.25%)、副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*, 2.28%); 发酵 50 d 的样本中相对丰度前 5 的微生物有: 日本葡萄糖杆菌(*Gluconobacter japonicus*, 32.54%)、弗氏葡萄糖球菌(*Gluconobacter frateurii*, 21.87%)、葡萄糖杆菌属(unclassified g *Gluconobacter*, 9.26%)、乳杆菌属(*Lactobacillus* sp., 13.92%)、副干酪乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus paracasei*, 4.45%); 发酵 60 d 的样本中相对丰度前 5 的微生物有: 日本葡萄糖杆菌(*Gluconobacter japonicus*, 35.71%)、弗氏葡萄糖球菌(*Gluconobacter frateurii*, 24.41%)、葡萄糖杆菌属(unclassified g *Gluconobacter*, 10.06%)、乳杆菌属

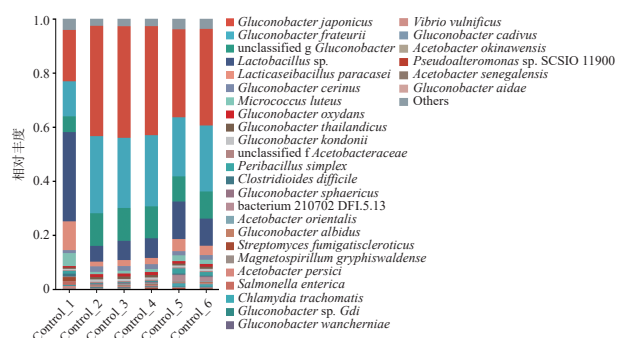


图1 沙棘酵素不同发酵时期细菌种水平的相对丰度

Fig.1 Relative abundance of bacterial species at different stages of sea buckthorn Jiaosu fermentation

注: Control_1 代表发酵 10 d 的沙棘酵素样本, 依此类推, Control_6 代表发酵 60 d 的沙棘酵素样本; 图 2、图 6 同。

(*Lactobacillus* sp., 10.01%)、副干酪乳酪杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*, 3.44%)。

从发酵过程的菌相变化来看, 沙棘酵素 6 个时期发酵过程中的优势菌种类型基本保持稳定状态, 日本葡糖杆菌经历了从相对丰度 18.98%(10 d) 上升至 41.28%(30 d) 然后下降至 35.71%(60 d) 的变化过程, 弗氏葡萄糖球菌在发酵中期相对丰度上升至 25.95%(30 d) 后保持稳定状态, 与葡糖杆菌属的变化趋势一致, 而乳杆菌属和干酪乳酪杆菌在整个发酵过程中均保持下降趋势。在发酵前期, 葡糖菌属丰度升高, 可能是酵素制备过程中加入了白砂糖及沙棘本身的糖分作用, 使得大量微生物分解糖分产生次生代谢产物, 如乳酸、有机酸、乙醇、甘露醇等化合物, 为酵素独特的风味品质作出贡献。乳杆菌能够发酵糖类产生乳酸, 并产生细菌素等有利于其他菌种生存, 其对酸性环境具有较强耐受力^[22]。乳杆菌属微生物也是酵素常用的发酵菌种, 可以提高酵素产品整体风味, 增加抗氧化活性物质及感官品质的提升^[23]。在发酵 50 d 时, 糖类物质逐渐减少, 酸类酯类物质逐渐增多, 葡糖菌属及乳杆菌属相对丰度亦逐渐下降。

2.2 沙棘酵素发酵过程中真菌群落演替规律

在真菌的种水平上, 选取相对丰度排名前 30 的微生物进行分析, 真菌群落结构如图 2 所示, 展示了沙棘酵素不同发酵时期真菌群落构成的异同。发酵 10 d 的样本中相对丰度前 3 的真菌有: 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 89.06%)、克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*, 2.36%)、膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*, 1.8%); 发酵 20 d 的样本中相对丰度前 3 的真菌有: 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 91.6%)、克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*, 2.99%)、膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*, 0.58%); 发酵 30 d 的样本中相对丰度前 3 的真菌有: 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 92.07%)、克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*, 2.4%)、膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*, 0.74%); 发酵 40 d 的样本中相对

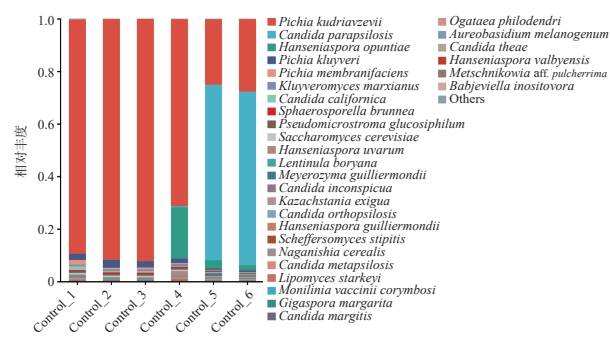


图2 沙棘酵素不同发酵时期真菌种水平的相对丰度

Fig.2 Relative abundance of fungal species at different stages of sea buckthorn Jiaosu fermentation

丰度前 5 的真菌有: 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 71.12%)、近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*, 0.48%)、孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora opuntiae*, 19.43%)、克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*, 1.72%)、膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*, 0.35%); 发酵 50 d 的样本中相对丰度前 5 的真菌有: 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 24.88%)、近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*, 66.79%)、孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora opuntiae*, 3.09%)、克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*, 0.55%)、膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*, 0.1%); 发酵 60 d 的样本中相对丰度前 5 的真菌有: 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, 27.58%)、近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*, 66.01%)、孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora opuntiae*, 1.94%)、克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*, 0.6%)、马克思克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*, 0.19%)。

由上述结果可以看出, 沙棘酵素真菌群落结构变化复杂, 在发酵 20 d 时, 库德里阿兹威氏毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*) 为优势菌种, 而在发酵第 40 d 时, 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) 相对丰度从 0.48%(40 d) 快速上升至 66.01%(60 d), 成为发酵中后期的优势真菌。与此同时, 孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora opuntiae*) 相对丰度剧增, 在发酵后期又呈现下降趋势。克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*)、膜醭毕赤酵母 (*Pichia membranifaciens*) 两类菌种的相对丰度在整个发酵过程中呈逐渐降低趋势。在发酵前期酵母菌启动了发酵程序, 它们分解环境中的糖产生乙醇和二氧化碳, 成为发酵前期的优势菌, 随着发酵的进行, 它们在高糖、高酸、高渗透的环境中, 随着不同微生物间相互作用及各种代谢产物的影响而逐渐减少或死亡。在发酵进程中, 酵母菌可产生醇类物质, 它们与有机酸结合可促进多种特征性风味物质的形成^[24]。相关研究表明, 耐高渗酵母是发酵过程中潜在的优良菌株, 它能够将糖酵解等途径中的葡萄糖转变为甘油、乙醇等物质, 而甘油是一种耐高渗介质, 当环境中的渗透压不断升高时, 耐高渗酵母大量合成同时在胞内积累大量的多元醇, 以此维持细

胞内外的渗透压平衡^[25]。近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)在沙棘酵素中后期相对丰度不断上升,推测可能是发酵环境中渗透压不断上升所致,后续研究中还需通过试验进行验证。

2.3 沙棘酵素发酵过程宏基因组学分析

2.3.1 沙棘酵素发酵过程 EggNOG 数据库注释分析

如图 3 所示,将沙棘酵素 18 个样本 DNA 测序后得到的数据与 EggNOG 数据库进行比对,注释出不同功能单元的基因数共计 25000 个,这些功能单元属于 25 个不同的功能大类。其中,基因数排名前 5 的共有 10878 个基因,发酵前期参与能量形成与转换的有 1628 个基因,参与氨基酸代谢的共 2654 个

基因,参与碳水化合物转运与代谢的共 2275 个基因;发酵中期参与翻译、核糖体结构及合成的共 2629 个基因,参与翻译后修饰、蛋白质翻转的有 1692 个基因。

2.3.2 沙棘酵素发酵过程 KEGG 数据库注释分析

如图 4 所示,将 NR 基因在 KEGG 数据库中进行注释,18 个样本 DNA 序列中有 90531 个 NR 基因被注释到 KEGG 的 48 条代谢通路中。在 KEGG 第 1 水平代谢通路中,新陈代谢通路的丰度值最高,环境信息处理代谢通路的丰度值最低,其次是人类疾病代谢通路、遗传信息处理、生命系统、细胞过程。在第 2 水平的 KEGG 新陈代谢通路中,被注释最多的

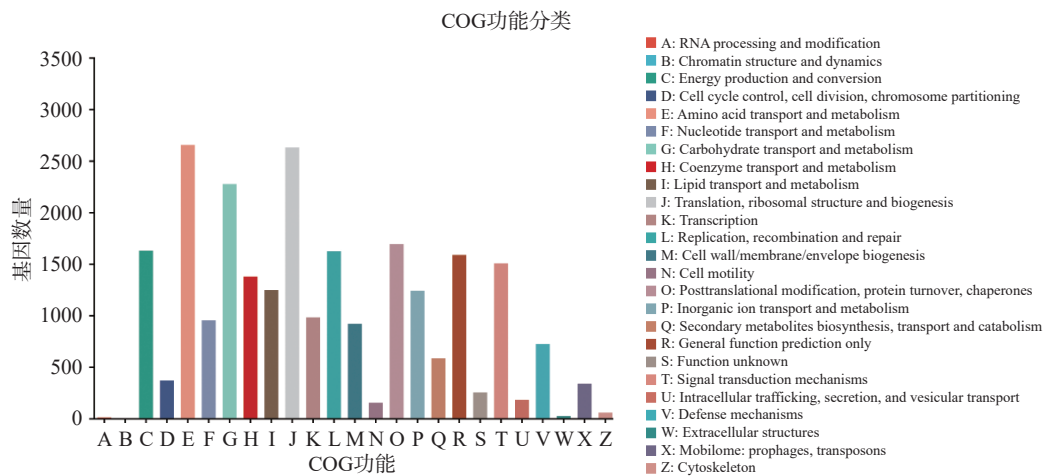


图 3 沙棘酵素不同发酵时期基因序列 EggNOG 数据库注释统计图

Fig.3 Annotation statistics of gene sequences using the EggNOG database at different stages of sea buckthorn Jiaosu fermentation

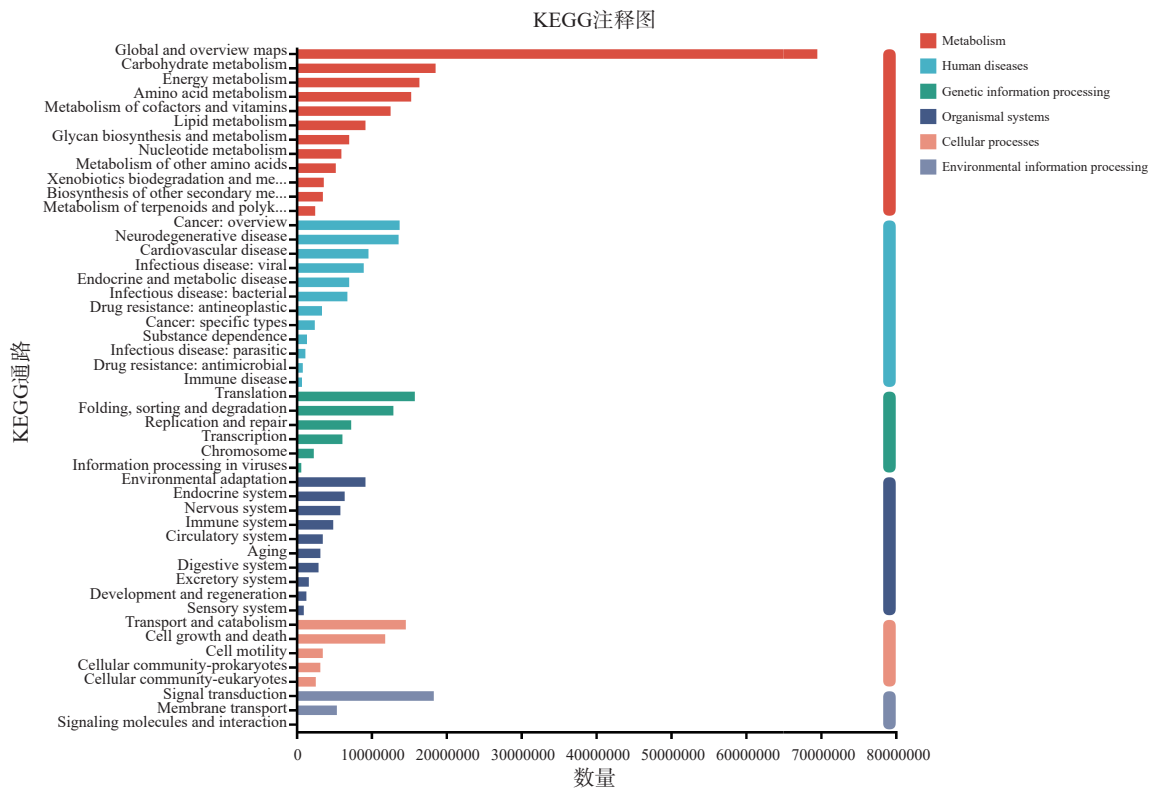


图 4 沙棘酵素不同发酵时期 KEGG 代谢通路注释图

Fig.4 KEGG metabolic pathway annotations at different stages of sea buckthorn Jiaosu fermentation

代谢途径是碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅酶因子及维生素代谢;在人类疾病代谢通路的第 2 水平中,癌症和神经类疾病代谢是被注释最多的途径;在遗传信息处理代谢通路的第 2 水平中,翻译、折叠和降解是被注释最多的途径;在生命系统代谢通路的第 2 水平中,环境适应和内分泌系统是被注释最多的途径;在第 2 水平的细胞过程代谢通路中,细胞运输、分解代谢、生长、凋亡是被注释最多的途径;在环境信息处理代谢通路的第 2 水平中,信号转导及膜输送是被注释最多的代谢途径。沙棘酵素 KEGG 数据库注释结果显示,沙棘酵素发酵前期,被注释最多的代谢途径是碳水化合物代谢、氨基酸代谢;在发酵中期被注释最多的代谢途径是辅酶因子及维生素代谢,推测这些途径可能是微生物群落影响沙棘酵素风味物质形成的重要途径。

2.3.3 沙棘酵素发酵过程 CAZy 数据库注释分析
通过比对 CAZy 数据库,获得碳水化合物活性酶基因功能注释信息进行分析。在发酵前期,糖缀合物、寡糖、多糖在生命中起着至关重要的作用,不仅作为结构和能量储备成分,而且在细胞内和细胞间识别事件中也起着重要作用^[26]。

将沙棘酵素 18 个样本基因序列与 CAZy 数据库比对,共鉴定出 231 个碳水化合物酶。如图 5 所示,在整个发酵过程中共注释到 2409 个基因,在发酵前期(10~20 d),碳水化合物结合模块编码基因数 79 个,辅助氧化还原酶编码基因数 253 个;在发酵中

期及后期(30~60 d),糖基转移酶编码基因数量最多(1082 个),糖苷水解酶编码基因数 769 个,糖脂酶编码基因数 189 个;发酵后期多糖裂解酶编码基因最少(37 个)。结果显示,糖基转移酶、糖苷水解酶是沙棘酵素整个发酵周期中的主要酶。

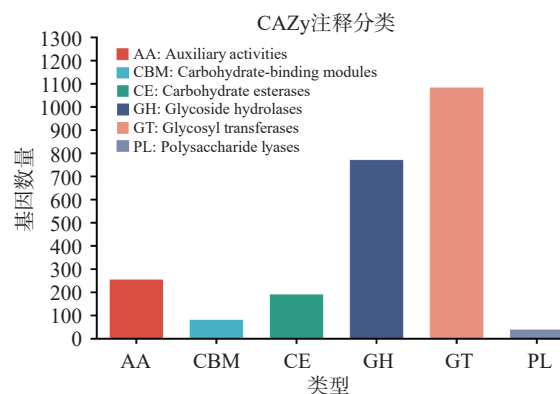
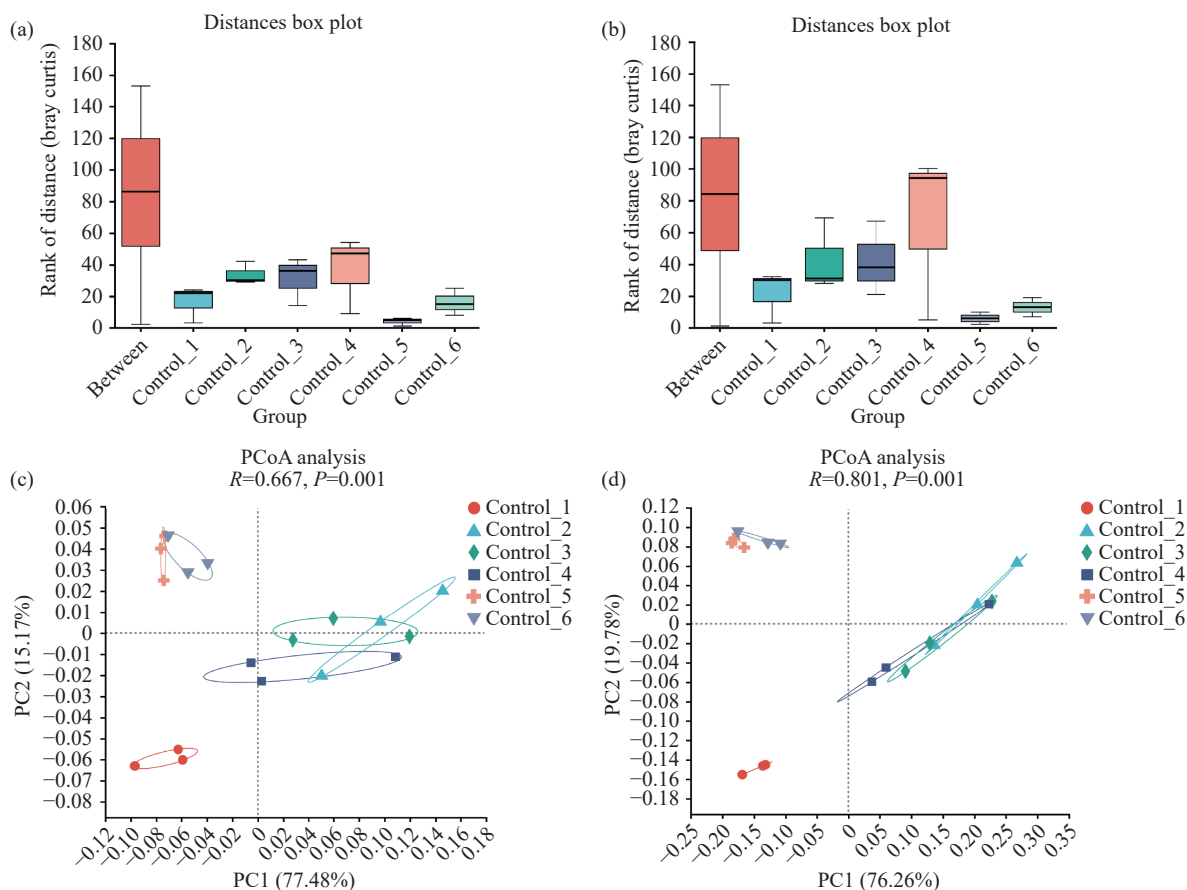


图 5 沙棘酵素不同发酵时期基因序列 CAZy 注释分类统计
Fig.5 CAZy annotation classification statistics for gene sequences at different stages of sea buckthorn fermentation

2.3.4 沙棘酵素发酵过程基因功能差异分析 沙棘酵素不同发酵时期的物种基因及功能各有差异,如图 6 所示,从图 6a、图 6b 可以看出,沙棘酵素功能基因数组间及组内均有差异。利用二维可视化的散点图展示沙棘酵素群落功能的相似度和差异度,以样本间的距离大小反应样本群落的聚散程度,由图 6c、



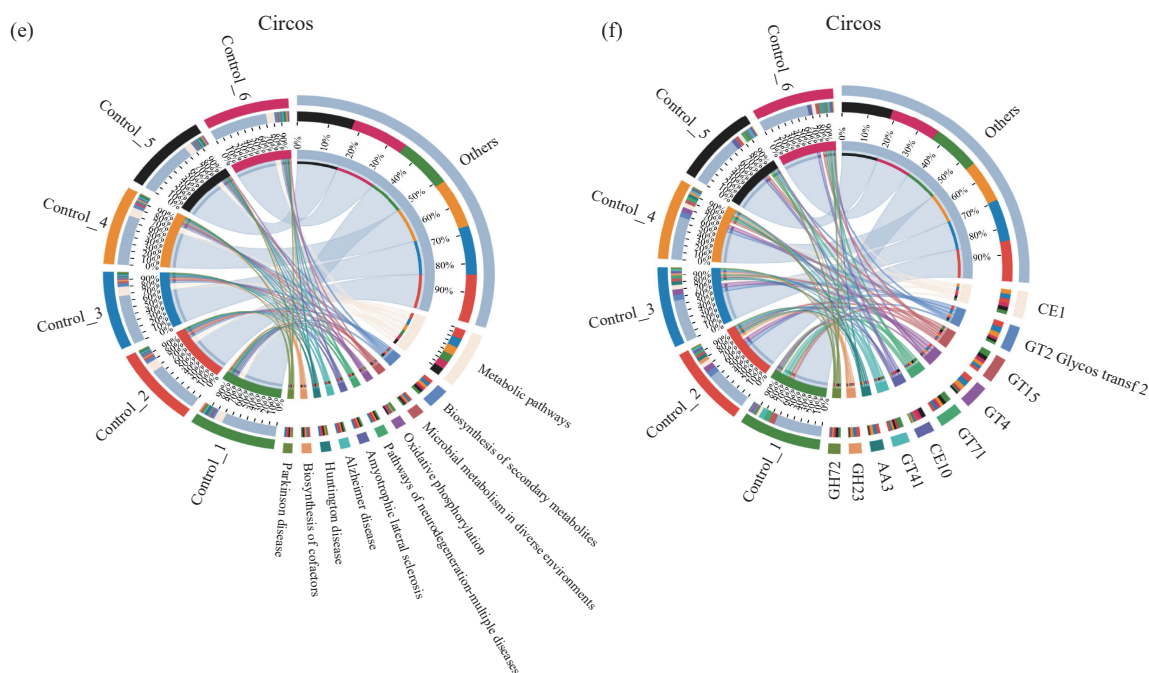


图 6 沙棘酵素不同发酵时期群落基因功能差异分析

Fig.6 Differential analysis of community gene functions at different stages of sea buckthorn Jiaosu fermentation

注: (a)KEGG 注释功能 Anosim 分析图; (b)CAZy 注释功能 Anosim 分析图; (c)KEGG 注释功能 PCoA 聚类分析图; (d)CAZy 注释功能 PCoA 聚类分析图; (e)KEGG 注释功能 Circos 图; (f)CAZy 注释功能 Circos 图。

图 6d 可知,各样本间距离及离散程度较大,反应出沙棘酵素整个发酵周期中物种功能具有明显差异。Circos 样本与功能关系图通常展示不同微生物样本中存在的功能分布情况。由图 6e、图 6f 看出,沙棘酵素不同样本间主要功能组成并无差异,但在不同功能丰度比例上差异较为显著^[27]。

3 讨论与结论

沙棘酵素不同发酵时期的微生物群落结构复杂多样,在细菌种水平上发现 5 类优势菌种,日本葡萄糖杆菌经历了从相对丰度 18.98% 上升至 41.28% 然后下降至 35.71% 的变化过程,弗氏葡萄糖球菌在发酵中期相对丰度上升至 25.95% 后保持稳定状态,与葡萄糖杆菌属的变化趋势一致,而乳杆菌属和干酪乳酪杆菌在整个发酵过程中均保持下降趋势。在真菌水平上群落结构变化复杂,在发酵前期和中期,库德里阿兹威氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)为优势菌种,而在发酵第 40 d 时,近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)相对丰度从 0.48% 快速上升至 66.01%,成为发酵中后期的优势真菌。与此同时,抱汉逊酵母(*Hanseniaspora opuntiae*)相对丰度剧增,在发酵后期又呈现下降趋势。克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)两类菌种的相对丰度在整个发酵过程中呈逐渐降低趋势。通过与 EggNOG、KEGG、CAZy 3 个数据库进行比对,共注释出不同功能单元的基因数 25000 个,这些功能单元分属于 25 个不同的功能大类。KEGG 数据库注释分析到 48 条代谢通路,结果表明,沙棘酵素发酵过程中被注释最多的代谢途径是碳

水化合物代谢、氨基酸代谢、辅酶因子及维生素代谢。CAZy 注释结果表明,糖基转移酶、糖苷水解酶是沙棘酵素发酵过程中与碳水化合物相关的主要酶,在发酵过程中注释到的功能基因数最多。利用 KEGG 及 CAZy 注释功能 Anosim 分析、PCoA 聚类分析、Circos 样本层级聚类分析,结果表明沙棘酵素不同发酵时期的物种基因及功能差异较为显著。

本研究利用宏基因组学分析技术对沙棘酵素不同发酵时期 18 个样本进行微生物群落结构及功能探究,在种水平得出主要的优势菌群为葡萄球菌属、乳杆菌属、酵母属。葡萄球菌属的存在推测与酵素的发酵工艺、培养环境、微生物间的相互作用有着紧密联系^[28]。在发酵进程中,酵母的代谢活性与微生物群落的丰度有密切关联。丰富的微生物群落可以在发酵环境中利用不同的底物加速发酵的进程。除此之外,不同的地理环境、采集地等因素也会造成沙棘酵素微生物群落结构的差异,这些微生物群落的不同组成能够使酵素产品呈现出个性化口感与风味^[29]。在功能方面,沙棘酵素存在多条差异代谢通路,显著性较高的差异代谢通路大多与碳水化合物代谢、氨基酸代谢相关,糖类及氨基酸降解后产生香气化合物如有机酸、酯类、酮类和一些挥发性酸等,赋予酵素产品特有的芳香气味和口感^[30-31]。不同的代谢通路中有不同的微生物作出贡献,不同微生物在发酵过程中形成不同的微生态环境,菌种间的相互作用决定了产品的风味特征、活性物质等。这也使得沙棘酵素在不同发酵时期的物种基因表达及功能具有较为显著的差异表现,进而影响着酵素发酵进程的动态变

化^[32-34]。

综上所述,后续研究中可进一步对优势菌株进行筛选应用,分析优势菌株在主要代谢通路中的作用,对沙棘酵素自然发酵过程中微生物群落进行系统水平的研究,建立基因组与代谢组关联模型,更加全面地分析其微生物群落的生态组成和动态变化可能是今后研究的重点。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] 张琪,朱丹,牛广财,等.高通量测序分析沙棘酵素自然发酵过程中细菌多样性[J].食品科学,2022,43(8):158-165. [ZHANG Q, ZHU D, NIU G C, et al. Bacterial diversity analysis during natural fermentation of sea buckthorn Jiaosu by high-throughput sequencing[J]. Food Science, 2022, 43(8): 158-165.]
- [2] 金哲宁,方晟,沙如意,等.沙棘酵素功能成分及其体外抗氧化性能研究[J].食品研究与开发,2020,41(17):20-28. [JIN Z N, FANG S, SHA R Y, et al. Study on the functional components and *in vitro* antioxidant activity of sea-buckthorn jiaosu[J]. Food Research and Development, 2020, 41(17): 20-28.]
- [3] 邱鹏月,彭宇,李晨,等.基于宏基因组分析桑基酵素的微生物多样性[J].中国食品学报,2020,20(5):251-257. [DI P Y, PENG Y, LI C, et al. Diversity analysis of microorganisms of mulberry Jiaosu based on metagenomics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 251-257.]
- [4] 宋丹丹,陈娟,杨亮.酵素的研究现状[J].现代食品,2020,6(8):52-55. [SONG D D, CHEN J, YANG L. Development status of ferment[J]. Modern Food, 2020, 6(8): 52-55.]
- [5] WANG X, LIU J R, ZHANG X H, et al. Sea buckthorn berry polysaccharide extracts protect against acetaminophen induced hepatotoxicity in mice via activating the Nrf-2 /HO-1-SOD-2 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2018, 38: 90-97.
- [6] OLAS B. Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases[J]. Food and Chemical Toxicology, 2016, 97(11): 199-204.
- [7] ZHANG W, ZHANG X H, ZOU K, et al. Sea buckthorn berry polysaccharide protects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: Via anti-oxidative and anti-inflammatory activities[J]. Food & Function, 2017, 8(9): 3130.
- [8] MA X Y, MOILANEN J, LAAKSONEN, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of tea -type infusions processed from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) leaves[J]. Food Chemistry, 2019, 272(1): 1-11.
- [9] LIU F T, WANG T, LI X X, et al. Involvement of NF- κ B in the reversal of CYP3A down-regulation induced by sea buckthornin-BCG-induced rats[J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0238810.
- [10] 张浩然,范昊安,顾逸菲,等.沙棘酵素发酵过程中代谢产物及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2020,41(11):125-133. [ZHANG H R, FAN H A, GU Y F, et al. Study on metabolites and antioxidant activities of sea buckthorn in fermentation process[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 125-133.]
- [11] FU Jia, ZHANG Yan, HU Yichen, et al. Concise review: Coarse cereals exert multiple beneficial effects on human health[J]. Food Chem, 2020, 325: 126761.
- [12] YANG C C, YOU L J, KWOK L Y, et al. Strain-level multi-omics analysis reveals significant variation in cheeses from different regions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 151(11): 112043.
- [13] TAŞ N, DE JONG A E, LI Y, et al. Metagenomic tools in microbial ecology research[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 67: 184-191.
- [14] 夏梦雷,杨帆,陆锴,等.高通量测序技术在传统发酵食品微生物群落中的应用研究[J].中国酿造,2021,40(5):1-7. [XIA M L, YANG F, LU K, et al. Application of high-throughput sequencing technology in microbial communities of traditional fermented foods[J]. China Brewing, 2021, 40(5): 1-7.]
- [15] 王慧丽,江娟.锯末牛粪堆肥微生物多样性的宏基因组学分析[J].江苏农业科学,2017,45(7):28-32. [WANG H L, JIANG J. Metagenomic analysis of microbial diversity in sawdust cow manure compost[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(7): 28-32.]
- [16] AYOMIDE E F, OLUBUKOLA O B. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review[J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 170: 105860.
- [17] 王海英.番木瓜酵素的研究与制备[D].天津:天津科技大学,2018. [WANG H Y. Research and preparation of papaya enzyme[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018.]
- [18] 王玉荣,侯强川,田龙新,等.基于纯培养和超高深宏基因组测序技术分析茅台镇两企业高温大曲微生物多样性差异[J].食品科学,2024,45(4):108-115. [WANG Y R, HOU Q C, TIAN L X, et al. Pure culture and ultra-high deep metagenomic sequencing for analysis of the differences in microbial diversity of high temperature Daqu from two distilleries in Maotai town[J]. Food Science, 2024, 45(4): 108-115.]
- [19] 吴双慧,牛茵,何济坤,等.基于宏基因组技术分析自然发酵羊肉香肠中微生物多样性及生物胺的代谢[J].食品科学,2023,44(18):133-140. [WU S H, NIU Y, HE J K, et al. Metagenomic analysis of microbial diversity and biogenic amine metabolism in naturally fermented mutton sausage[J]. Food Science, 2023, 44(18): 133-140.]
- [20] LI R Q, ZHU H M, RUAN J, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. Genome Research, 2010, 20(2): 265-272.
- [21] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Artificial Intelligence, 2006, 28(1): 27-30.
- [22] KEMP P F, ALLERJY. Bacterial diversity in aquatic and other environment: What 16S rDNA libraries can tell us[J]. Fems Microbiology Ecology, 2004, 47(47): 161-177.
- [23] 边名鸿,袁萌,杨南,等.乳杆菌强化发酵对苦荞酵素抗氧化特性及风味的影响[J/OL].食品工业科技:1-15[2023-07-11]. doi:10.13386/j.issn1002-0306.2023020286. [BIAN M H, YUAN M, YANG N, et al. Effects of *Lactobacillus* intensive fermentation on antioxidant properties and flavor of Tartary buck wheat[J/OL]. Science and Technology of Food Industry: 1-15[2023-07-11]. doi:10.13386/j.issn1002-0306.2023020286.]
- [24] 周映君,谢纯良,陈柏忠,等.不同酵母菌与植物乳杆菌复合发酵对新会柑酵素品质的影响[J/OL].食品工业科技:1-13[2021-10-20]. doi:10.13386/j.issn1002-0306.2021060189. [ZHOU Y J, XIE C L, CHEN B Z, et al. Effects of complex fermentation of different yeasts and *Lactobacillus plantarum* on the quality of Xinhui citrus enzyme[J/OL]. Science and Technology of Food Industry

- try: 1–13 [2021-10-20]. doi:10.13386/j.issn1002-0306.2021060189.]
- [25] FATMA S, HAMEED A, NOMAN M, et al. Lignocellulosic biomass: Asustainable bioenergy sourcefor the future[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2018, 25(2): 148–163.
- [26] VINCENT L, HEMALATHA G R, ELODIE D, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42: 490–495.
- [27] 王国峥, 陈笔, 卢建军, 等. 基于宏基因组学测序技术分析 3 个轮次高温大曲微生物群落 [J]. *食品科学*, 2023, 44(16): 220–227. [WANG G Z, CHEN B, LU J J, et al. Analysis of microbial communities in three rounds of high-temperature Daqu using metagenomic technology[J]. *Food Science*, 2023, 44(16): 220–227.]
- [28] LI Y Y, CHENG Y X, WANG H, et al. Diverse structure and characteristics of the fungal community during the different rounds of Jiang-flavoured baijiu production in Moutai town[J]. *LWT-Food-Science and Technology*, 2022, 161(5): 113313.
- [29] 侯强川, 王玉荣, 王文平, 等. 茅台和尧治河高温大曲细菌群落结构差异及功能预测[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(1): 36–44. [HOU Q C, WANG Y R, WANG W P, et al. Structural differences and functional prediction of high-temperature Dakoji bacteria communities in Maotai and Yaozhi rivers[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(1): 36–44.]
- [30] ADESULU-DAHUNS A T, DAHUNSI S O, OLAYANJUI A. Synergistic microbial interactions between lactic acid bacteria and yeasts during production of Nigerian indigenous fermented foods and beverages[J]. *Food Control*, 2020, 110(4): 106963.
- [31] DAI J, SHA R, WANG Z, et al. Edible plant Jiaosu: Manufacturing, bioactive compounds, potential health benefits, and safetyaspects[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(15): 5313–5323.
- [32] ZHANG Y D, SHEN Y, NIU J, et al. Bacteria-induced amino acid metabolism involved in appearance characteristics of high-temperature Daqu[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023, 103(1): 243–254.
- [33] STOEGER V, HOLIK A K, HOLZ K, et al. Bitter-tasting amino acids L-arginine and L-isoleucine differentially regulate proton secretion via t2r1 signaling in human parietal cells in culture[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 68(11): 3434–3444.
- [34] ZHENG Y T, LI Y P, YANG Y Y, et al. Recent advances in bioutilization of marine macroalgae carbohydrates: Degradation, metabolism, and fermentation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(5): 1438–1453.