

沙棘酵素自然发酵过程中真菌多样性及群落结构

牛广财^{1,2}, 张琪^{1,2}, 朱丹³, 颜飞翔^{1,2}, 魏文毅^{1,2}, 宁志雪^{1,2}, 王思溥^{1,2}

(¹黑龙江八一农垦大学食品学院 黑龙江大庆 163319

²黑龙江省农产品加工工程技术研究中心 黑龙江大庆 163319

³黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 黑龙江大庆 163319)

摘要 为研究自然发酵过程中沙棘酵素真菌多样性及其群落结构的变化,采用高通量测序技术对沙棘酵素自然发酵过程中真菌 rRNA 基因 ITS1 区进行测序。结果显示:根据 97% 的相似度对序列进行可操作分类单元分析,得到 4 个门,16 个纲,35 个目,71 个科,98 个属,112 个种;真菌群落结构的多样性和丰富度在发酵前期(F22_Q)最高,随着发酵的进行,真菌群落的物种丰富度和多样性均呈下降趋势;真菌组成在发酵前、中期的绝对优势菌门均为子囊菌门,相对丰度为 76.97%~96.30%,毛霉菌门是发酵后期的绝对优势菌门,相对丰度为 2.39%~77.50%;在属水平上,刺盘孢属为发酵前期绝对优势菌属,相对丰度为 30.64%,发酵中期绝对优势菌属为未分类的酵母目,相对丰度为 58.06%,毛霉属为发酵后期绝对优势菌属,相对丰度为 77.50%;3 个发酵阶段可聚为两类,F22_Q 聚为一类,中期(F22_Z)和后期(F22_H)聚为一类,样本在毛霉属、未分类的酵母目、红酵母属 3 种菌属之间具有显著性差异($P < 0.05$);在种水平上,发酵前期绝对优势种为未分类的刺盘孢菌,占比为 31%,发酵中期未分类的酵母目和未分类的裸节菌的比例最高,分别为 58% 和 22%,发酵后期真菌卷枝毛霉菌的比例最高(75%),占主导地位。本研究结果为开发沙棘酵素发酵过程中的优势真菌菌群和挖掘益生真菌提供参考。

关键词 沙棘酵素;自然发酵;高通量测序;真菌多样性;群落结构

文章编号 1009-7848(2022)07-0267-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.07.027

沙棘(*Hippophae rhamnoides* Linn.),为胡颓子科沙棘属,果实呈类球形或圆球形,为药食同源植物^[1]。沙棘果实中富含维生素 C、多种微量元素、有机酸、黄酮、胡萝卜素、氨基酸等营养成分^[2-6],对心脑血管、肿瘤等疾病都有良好的治疗效果,且具有抗菌、抗氧化,降低心脑血管疾病和美容等功效^[7-11]。

食用植物酵素是植物原料经微生物发酵制得的含有某些特定生物活性成分的可食用酵素产品^[12-13]。该产品一般具有消炎杀菌,加速新陈代谢,调理肠道功能以及修容抗老等效果^[14-15]。当前,我国酵素的发酵方式仍依靠较为传统的自然发酵,这种发酵方式存在发酵持久,易受环境影响等多种弊端,进而导致发酵液中微生物结构复杂,最终难以保证酵素类产品的质量。一些学者也研究了

酵素中的微生物,然而,传统分离培养方法得到的微生物十分有限,且耗时耗力。近年来,高通量测序技术在微生物多样性和群落结构的研究方面,有明显的先进性和优势^[16-17],可以快捷地得到样品中复杂的微生物结构,是分析复杂多菌种样品的首选方法^[18-19]。例如,陈宠等^[20]通过高通量测序技术分析海棠酵素发酵过程中微生物的变化规律,结果表明,发酵 0~31 d 时真菌主要为酵母属(*Saccharomyces*)和假丝酵母属(*Candida*)。康晓乐等^[21]在研究苹果自然发酵酵素微生物多样性时得出:在属水平上,真菌主要有酵母属、汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)和接合酵母属(*Zygosaccharomyces*),其中,前期、中期和后期的接合酵母属(89.5%,18.2%,80.3%)和汉逊酵母属(9.7%,60.6%,8.7%)为真菌中的优势菌属。姚笛等^[22]在研究火龙果、蓝莓、桑葚 3 种酵素中真菌的群落结构中得出:3 种酵素的绝对优势菌门均为子囊菌门(Ascomycota),而在优势真菌属方面,奥默柯达酵母属(*Kodamaea*)在火龙果和桑葚酵素中占据主要地位,帚枝霉属(*Sarocladium*)与汉逊酵母属是蓝莓酵素的绝对优势真菌属。

收稿日期: 2021-07-21

基金项目: 黑龙江省-八一农垦大学自然科学人才支持计划项目(ZRCPY201911);黑龙江省高校首批“新工科”研究项目(黑教高函[2018]681号)

作者简介: 牛广财(1971—),男,博士,教授

E-mail: geniu@126.com

截止目前, 尚未见自然发酵过程中沙棘酵素真菌群落等方面的研究。本试验通过高通量测序技术分析沙棘酵素自然发酵过程中真菌 *rRNA* 基因 ITS1 区, 揭示沙棘酵素发酵过程中真菌群落的演替规律, 以期开发出沙棘酵素的优良菌种, 为后期的工业化生产提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

深秋红大果沙棘, 黑龙江省孙吴县, 在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

DNA 抽提试剂盒 (FastDNA[®] Spin Kit for Soil), 美国 MP Biomedicals 公司; Axygen Biosciences AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, 美国 Axygen 公司; biowest agArose 琼脂糖, 西班牙 biowest 公司; FastPfu Polymerase DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术股份有限公司; MiSeq Reagent Kit v3 测序试剂盒, 美国 Illumina 公司。

1.2 设备与仪器

QMZ-PBJ-11 多功能榨汁机, 德国科玛斯 (KORMES) 公司; GHP-9160 隔水式恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; DW-86L158 超低温冰箱, 杭州艾普仪器设备有限公司; Eppendorf 5424R 高速台式冷冻离心机, 德国艾本德公司; Quantus[™] Fluorometer 微型荧光计, 美国普洛麦格公司; ELx800 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一仪器厂; ABI GeneAmp[®] 9700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; Illumina Miseq 测序仪, 美国 Illumina 因美纳公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 前期处理: 将自然缓冻后的冷冻大果沙棘, 用打浆机打浆, 加入 2.0 mL/kg 的 Pectinex BEXXL 果胶酶, 在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下酶解 4 h ^[23]; 然后调糖至 $21\text{ }^{\circ}\text{Brix}$ ^[3], 于 $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温发酵。

样品采集: 分 3 个阶段进行样品采集, 前期 (F22_Q): 发酵 72 h ; 中期 (F22_Z): 发酵 624 h ; 后期 (F22_H): 发酵 $1\ 584\text{ h}$ 。将样品混合均匀后, 取 15 mL 置于离心管中, 在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存待测^[13]。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳 适量样品在冰上融化, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min 后取样, 电泳条件:

2% 琼脂糖胶, 电压 5 V/cm , 时间 20 min 。

1.3.3 DNA 抽提和 PCR 扩增 总 DNA 抽提依照说明书的步骤进行, 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量, 使用 NanoDrop2000 测定 DNA 浓度和纯度^[24]; 使用 ITS1 区域进行扩增, 选用引物 ITS1F ($5\text{ }^{\prime}\text{-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3}^{\prime}$) 和 ITS2R ($5\text{ }^{\prime}\text{-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3}^{\prime}$) 对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 扩增程序如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min , 30 个循环, 然后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 稳定延伸 10 min ^[25], 最后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存^[26]。PCR 反应体系为: $5\times\text{Fast Pfu Buffer}$ 缓冲液 $4\text{ }\mu\text{L}$, 2.5 mmol/L dNTPs $2\text{ }\mu\text{L}$, 上游引物 ($5\text{ }\mu\text{mol/L}$) $0.8\text{ }\mu\text{L}$, 下游引物 ($5\text{ }\mu\text{mol/L}$) $0.8\text{ }\mu\text{L}$, DNA 聚合酶 $0.4\text{ }\mu\text{L}$, 模板 DNA 10 ng , 补足至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。每个样本 3 个重复^[27]。

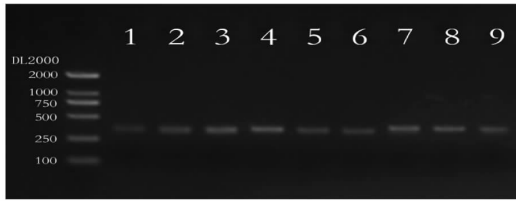
1.3.4 Illumina Miseq 测序 利用 Miseq PE300 平台测序, 此过程送至上海美吉生物医药科技有限公司进行操作。

1.3.5 数据处理 利用上海美吉生物医药科技有限公司的 I-Sanger 生信云平台 (<https://www.i-sanger.com>) 对高通量测序数据进行分析。分别使用 Trimmomatic 软件原始测序序列和 FLASH 软件进行质控和拼接; 继续使用 UPARSE 软件, 采用 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体^[28]。然后用 RDP classifier 对每条序列进行物种分类注释^[29], 设置比对阈值为 70% ^[30], 进行 Unite 的真菌数据库比对。采用随机抽样的方法, 以抽到的序列数与它们对应的多样性指数, 构建 Rarefaction curve, 选择 97% 相似度的属水平, 利用 mothur 计算不同随机抽样下的 α -多样性指数, 然后用 R 语言工具作图^[31]; 采用 Kruskal-Wallis 秩和检验评估物种丰度差异的显著性水平 ($P<0.05$); 采用 Circos-0.67-7 软件制作 Circos 图。

2 结果与分析

2.1 琼脂凝胶电泳鉴定

由沙棘酵素发酵液中真菌 16S rRNA PCR 扩增产物琼脂凝胶电泳图 (图 1) 可知, 3 个发酵阶段共采集了 9 个样本, 其 PCR 扩增产物条带大小正确, 特异性和亮度等也都符合要求。



注:1~3 为前期 F22_Q,4~6 为中期 F22_Z,7~9 为后期 F22_H。

图 1 PCR 扩增电泳图

Fig.1 PCR amplification electrophoresis

2.2 测序样本数据分析

对 9 个样品进行高通量测序, 序列扩增区域为 ITS1F_ITS2R, 进而得到原始序列信息, 插入线片段长度为 300, 测序长度为 PE300, 原始序列数目为 1691062×2, 总碱基数为 1 018 019 324。进一步得到优化序列信息如表 1 所示, 有效序列数目为 1 691 062, 有效碱基数目为 433 941 642, 序列平均长度为 256 bp。即沙棘酵素样本优化序列区间为 56 927~70 448 条, 平均长度区间为 236.85~258.95 bp。

表 1 测序样本信息

Table 1 Sequencing sample information

| 样本 | 优化序列数 | 碱基数/bp | 平均长度/bp | 最短序列长度/bp |
|---------|--------|------------|---------|-----------|
| F22_Q_1 | 68 776 | 16 289 664 | 236.85 | 154 |
| F22_Q_2 | 69 070 | 16 470 955 | 238.47 | 143 |
| F22_Q_3 | 69 352 | 16 692 588 | 240.69 | 140 |
| F22_Z_1 | 56 927 | 14 269 402 | 250.66 | 209 |
| F22_Z_2 | 70 448 | 17 325 604 | 245.93 | 154 |
| F22_Z_3 | 69 440 | 16 964 861 | 244.31 | 175 |
| F22_H_1 | 61 982 | 16 050 235 | 258.95 | 251 |
| F22_H_2 | 64 276 | 16 644 350 | 258.95 | 252 |
| F22_H_3 | 61 896 | 16 028 047 | 258.95 | 253 |

2.3 测序深度分析

用 Sobs 和 Shannon 指数稀释曲线来反映不同发酵时期沙棘酵素在不同测序数量时的真菌多样性。如图 2 和图 3 所示, 由 sobs 指数可知, 在小于 40 000 时, 多样性指数增加较快, 之后开始趋

于平缓。说明测序的数据量是合理的^[33], 更多的数据量只会产生少量新的物种^[32]。当其多样性指数为 Shannon 时, 曲线已经趋向平坦, 说明测序数据量已够大^[33], 说明能够真实反应此发酵液中所包含真菌的信息^[34]。

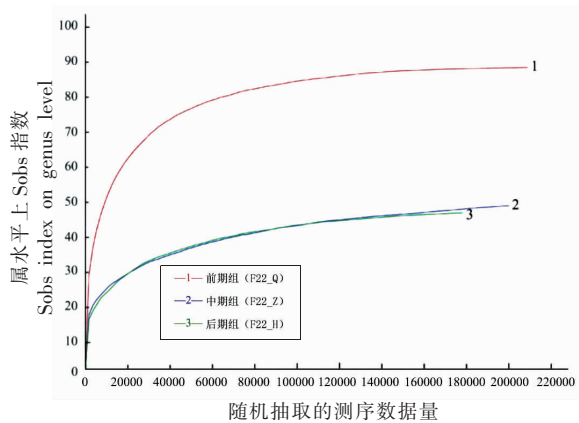


图 2 Sobs 指数稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curves of Sobs index

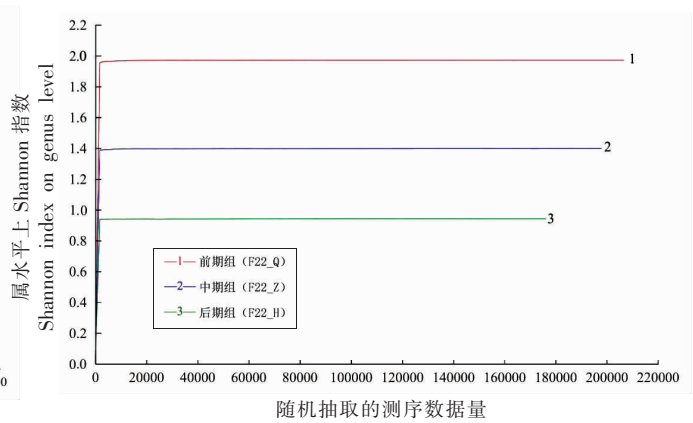


图 3 Shannon 指数稀释曲线

Fig.3 Rarefaction curves of Shannon index

2.4 α -多样性分析

根据样本中的 α -多样性分析结果,能够得知沙棘酵素发酵液中微生物群落结构的多样性和丰富度。根据表 2 数据可知,沙棘酵素不同发酵时期每组的 Coverage 值均在 99.99% 以上,说明该测序深度完全能够覆盖该酵素发酵过程中真菌的种类,能够真实反映发酵液中真菌种类的多样性及丰度^[35]。由 Shannon 指数可以看出群落分布的多样性情况,该指数越大,表明发酵液中真菌的多样性越高^[36],Simpson 指数与 Shannon 指数的作用一致,均可估算群落多样性的高低,不同的是利用 Simpson 指数估算发酵液中微生物的多样性时,指

数越大,则微生物群落的多样性越低^[37]。纵观整个发酵进程,Shannon 指数逐渐下降,这与张琪等^[13]的结果一致。Simpson 指数逐渐升高,说明随着发酵时间的延长,沙棘酵素真菌群落的多样性在逐渐降低。Ace 指数和 Chao 指数反映的是群落的丰富度,根据表 2 中数据可以明显看出 2 个指数均呈现减少的趋势,说明,群落的丰富度逐渐减少。其原因可能是随着发酵时间的延长,发酵液中酸含量增加,导致不耐酸的真菌逐渐消失,因此真菌群落的丰富度和多样性有所减少,也可能是发酵液中糖类营养物质逐渐被消耗,导致部分真菌死亡,从而使得群落的丰富度和多样性下降。

表 2 α -多样性指数表

Table 2 Table of α -diversity indexes

| 样本名称 | Shannon | Simpson | Ace | Chao | Coverage/% |
|-------|---------|---------|-------|-------|------------|
| F22_Q | 1.97 | 0.19 | 89.18 | 88.11 | 100.00 |
| F22_Z | 1.40 | 0.39 | 55.32 | 70.50 | 99.99 |
| F22_H | 0.94 | 0.61 | 49.43 | 48.67 | 100.00 |

由图 4 可知,9 个样本中共有 182 个 OTU,其中 F22_Q、F22_Z、F22_H 分别含有 OTU 的数量为 87,48,47,其中特有的 OTU 数分别为 35,6,5。根据 OTU 统计得到 1 个界,4 个门,16 个纲,35 个目,71 个科,98 个属,112 个种。由此可见,随着沙棘酵素的自然发酵,OTU 数呈下降趋势,说明发酵

前期真菌群落结构最复杂,而后期真菌菌群的多样性在逐渐降低。即沙棘酵素在自然发酵的整个过程中真菌群落变化较大,该结果与之前 α -多样性指数分析情况相同。

2.5 样品间门水平真菌群落组成分析

图 5 所示为门水平上沙棘酵素发酵液中真菌

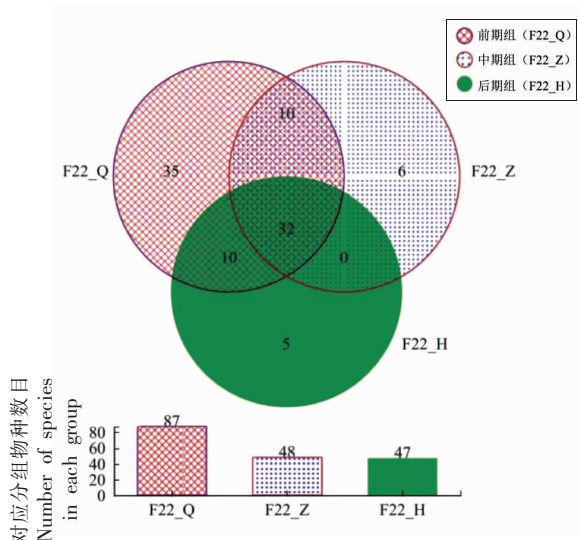
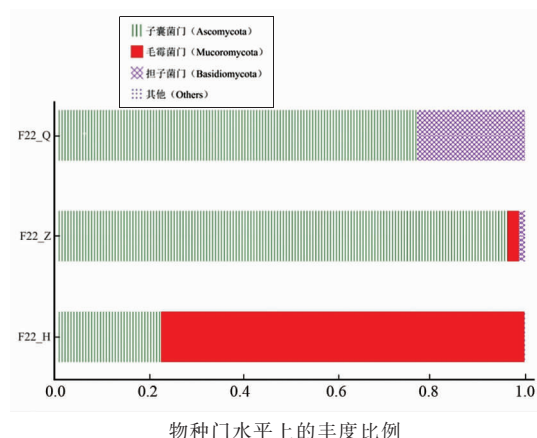


图 4 不同发酵阶段中真菌 OTU 韦恩图

Fig.4 Venn diagram of fungus OTU during different fermentation stages



物种门水平上的丰度比例
The abundance ratio of phylum level

图 5 门水平上群落丰度比例

Fig.5 The ratio of community abundance of phylum level

群落结构分布情况,将丰度较小的门除掉后,样本中主要含有子囊菌门、毛霉菌门(Mucoromycota)以及担子菌门(Basidiomycota)这 3 个门,与韩国强等^[35]研究复配小曲白酒发酵过程中真菌菌门的类型一致。其中,子囊菌门为发酵前期和中期的绝对优势菌门,相对丰度比例为 76.97%~96.30%,毛霉菌门在发酵过程中相对丰度为 2.39%~77.50%,是发酵后期的绝对优势菌门;担子菌门的相对丰度为 1.30%~23.01%,是发酵前期的优势菌门。该发酵过程中毛霉菌门的相对丰度逐渐升高,而担子菌门呈逐渐降低的趋势。

2.6 样品间真菌群落属水平组成分析

表 3 为沙棘酵素自然发酵中发酵液中真菌在属水平上的变化情况。发酵前期刺盘孢属(*Colletotrichum*)为绝对优势菌属,所占比例为 30.64%,然而在整个发酵过程中,该菌属丰度逐渐减少,中期所占比例为 0.81%,至后期减少至

0.69%;之后各真菌属及比例依次为:红酵母属(*Rhodotorula*)22.84%,*Hymenopleella* 19.30%,链格孢属(*Alternaria*)6.84%,附球菌属(*Epicoccum*)5.18%,拟茎点霉属(*Phomopsis*)4.20%,未分类的亚隔孢壳科真菌(*unclassified_f_Didymellaceae*)4.08%,迷迭菌属(*Didymella*)2.42%,葡萄孢属(*Botrytis*)1.06%,镰孢霉属(*Fusarium*)0.61%,青霉属(*Penicillium*)0.24%和曲霉属(*Aspergillus*)0.04%;发酵中期未分类的酵母目(*unclassified_o_Saccharomycetales*)为绝对优势菌属,所占比例为 58.06%,之后的优势菌属及比例分别为:黄丝曲霉属(*Talaromyces*)21.85%、威克汉姆酵母菌属(*Wickerhamomyces*)5.70%;发酵后期毛霉属(*Mucor*)成为绝对优势菌属,所占比例为 77.50%,之后依次为:镰孢霉属 7.91%和威克汉姆酵母菌属 6.25%。综合来看,在沙棘酵素发酵过程中,毛霉属逐渐增加,刺盘孢属和红酵母属则逐渐下降。

表 3 沙棘酵素样本中真菌在属水平上的种类构成

Table 3 The composition of fungi at genus level in sea buckthorn Jiaosu samples

| 种属名称 | 物种的相对丰度/% | | |
|--|-----------|-------|-------|
| | F22_Q | F22_Z | F22_H |
| 毛霉属(<i>Mucor</i>) | 0.00 | 2.39 | 77.50 |
| 未分类的酵母目(<i>unclassified_o_Saccharomycetales</i>) | 0.00 | 58.06 | 1.90 |
| 刺盘孢属(<i>Colletotrichum</i>) | 30.64 | 0.81 | 0.69 |
| 红酵母属(<i>Rhodotorula</i>) | 22.84 | 1.24 | 0.11 |
| 黄丝曲霉属(<i>Talaromyces</i>) | 0.05 | 21.85 | 0.05 |
| <i>Hymenopleella</i> | 19.30 | 0.58 | 0.80 |
| 威克汉姆酵母菌属(<i>Wickerhamomyces</i>) | 0.00 | 5.70 | 6.25 |
| 镰孢霉属(<i>Fusarium</i>) | 0.61 | 1.91 | 7.91 |
| 拟茎点霉属(<i>Phomopsis</i>) | 4.20 | 0.19 | 3.25 |
| 链格孢属(<i>Alternaria</i>) | 6.84 | 0.20 | 0.24 |
| 附球菌属(<i>Epicoccum</i>) | 5.18 | 0.30 | 0.20 |
| 青霉属(<i>Penicillium</i>) | 0.24 | 4.24 | 0.21 |
| 未分类的亚隔孢壳科真菌(<i>unclassified_f_Didymellaceae</i>) | 4.08 | 0.20 | 0.29 |
| 迷迭菌属(<i>Didymella</i>) | 2.42 | 0.24 | 0.19 |
| 曲霉属(<i>Aspergillus</i>) | 0.04 | 1.85 | 0.21 |
| 葡萄孢属(<i>Botrytis</i>) | 1.06 | 0.00 | 0.00 |
| 其它(others) | 2.49 | 0.24 | 0.17 |

2.7 真菌群落热图分析

由图 6 沙棘酵素真菌群落结构热图可知,该酵素整个发酵过程能够聚为两类,在发酵前期(F22_Q)一类,发酵中期(F22_Z)与后期(F22_H)一类。总丰度排在前 15 位的真菌菌属可聚为 3

类,即刺盘孢属、红酵母属、*Hymenopleella*、迷迭菌属、拟茎点霉属、链格孢属、附球菌属、未分类的亚隔孢壳科真菌聚为一类,发酵前期丰度较高,发酵中后期丰度下降;毛霉属单独聚为一类,随着发酵时间的延长,真菌群落相对丰度呈先升高后下降

的趋势,以中期相对丰度最高;未分类的酵母目与黄丝曲霉属,威克汉姆酵母菌属与镰孢霉属,青霉属与曲霉属聚为一类,菌属丰度趋势均是中后期逐渐升高。

2.8 沙棘酵素不同发酵阶段真菌群落差异分析

采用 Kruskal-Wallis 秩和检验评估物种丰度

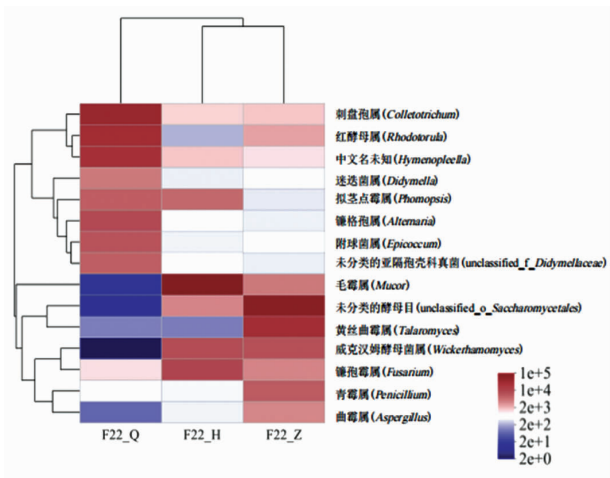


图6 真菌属水平群落结构热图

Fig.6 Fungi community structure heatmap of genus level

2.9 真菌群落组成种水平 Circos 图分析

Circos 样本与物种关系图,一方面可以看出优势物种组成比例^[38],另一方面也反映各优势物种在不同样本(分组)中的分布比例^[39]。由图8可知,在种水平上,未分类的刺盘孢菌(unclassified_g_Colletotrichum)为发酵前期绝对优势菌种,所占比例为31%,其它前期占比较高的有胶红酵母(Rhodotorula_mucilaginosa)和Hymenoplectella_sp,所占比例分别为23%和19%;发酵中期未分类的酵母目和未分类的裸节菌的占比最高,分别为58%和22%;然而在发酵后期,真菌卷枝毛霉所占比例最高,达到75%,已经占据主导地位,而发酵前期的绝对优势菌种未分类的刺盘孢菌在中期和后期则迅速减少,到后期时已降至6.9%。由此可见,该自然发酵条件下沙棘酵素真菌群落结构的多样性及动态变化的复杂性。

3 讨论

沙棘酵素在自然发酵过程中真菌群落结构及

差异的显著性水平,获得样本间显著性差异物种。如图7所示,在属水平上对3组不同发酵阶段的沙棘酵素进行优势属的组间差异性检验分析,显示毛霉属、未分类的酵母目和红酵母属这3个菌属,在3组样本之间有显著差异(P<0.05)。

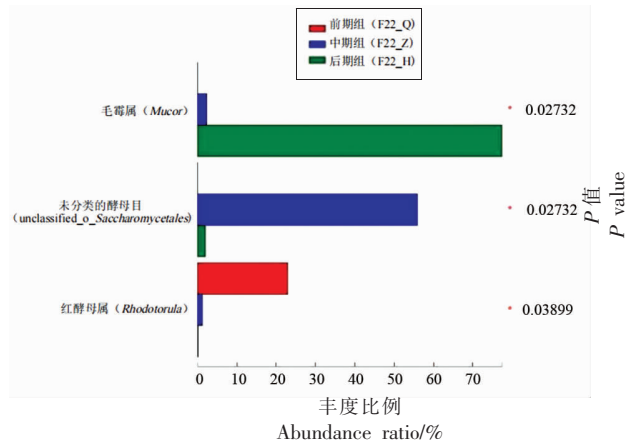


图7 沙棘酵素自然发酵过程中真菌差异性检验图

Fig.7 Diversity test chart during sea buckthorn Jiaosu natural fermentation

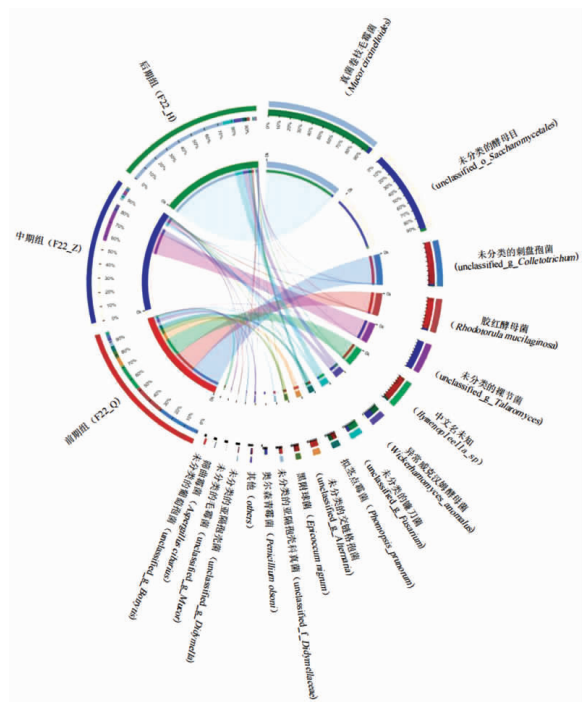


图8 真菌群落组成种水平 Circos 图

Fig.8 The Circos map of fungi community structure of species level

多样性较为复杂,在发酵前期、中期和后期独有 OTU 数分别为 35,6 和 5,说明随着发酵时间的延长,一些微生物之间竞争激烈,在酵素体系中适应能力相对较弱的真菌会被淘汰^[40],沙棘酵素真菌菌群的丰富度和多样性逐渐降低。在发酵前期,刺盘孢属为绝对优势菌属,所占比例为 30.64%,随着发酵的进行,该菌属呈现逐渐下降的趋势,占比降至中期的 0.81%和后期的 0.69%;发酵中期未分类的酵母属为绝对优势菌属,所占比例为 58.06%;而在发酵后期,毛霉属则为绝对优势菌属,所占比例为 77.50%。高庆超等^[40]在研究黑果枸杞酵素自然发酵过程中真菌群落的动态演替中得到 32 种已知真菌属,在发酵 0,10,20,30 d 时,绝对优势真菌属均为链格孢属,所占比例分别为 25.52%,18.84%,38.97%,17.60%,在发酵 40 d 和 50 d 时绝对优势真菌为锁瑚菌属 (*Membranomyces*),所占比例分别为 34.42%,23.59%,在发酵 60 d 时,绝对优势真菌为酵母属,所占比例为 89.83%,发酵 60 d 后,主要真菌属为酵母属中的啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。这说明沙棘酵素和黑果枸杞酵素在自然发酵的中后期,酵母菌和霉菌起主要作用,这与 Okada 等^[41]研究结果一致。然而,与邸鹏月等^[42]和阴芳冉^[43]的结果不同,邸鹏月等^[42]分析桑葚酵素发酵中微生物多样性时发现,桑葚酵素发酵过程中,发酵前期的优势真菌属是酵母(92.16%),随着发酵时间的延长,酵母逐渐减少甚至消亡;阴芳冉^[43]采用高通量测序技术研究红树莓自然发酵过程中微生物的群落演替得出,树莓发酵液 CD 中真菌的优势菌属酵母属的丰富度由发酵 30 d 的 65.74%,降低至发酵 120 d 的 29.39%;同时,哈萨克斯坦酵母属 (*Kazachstani-a*) 的丰富度由发酵 30 d 的 19.72%,逐渐升高至 120 d 的 44.91%,逐步替代酿酒酵母属转变为树莓发酵液中的优势菌,汉逊酵母属的丰富度也由发酵 30d 时的 14.35%,升高至发酵 120d 的 25.47%。说明红树莓酵素自然发酵中后期,其真菌菌落结构发生了变化,由酿酒酵母属向哈萨克斯坦酵母属和汉逊酵母属演替。上述研究结果说明,在酵素发酵过程中真菌动态变化是非常复杂的,许多真菌可能受发酵环境中渗透压、酸度或者乙醇等物质的影响,以及不同微生物间的相互作用而发生

不同的动态演替变化。因此,深入挖掘不同酵素发酵过程中的微生物变化规律,进而探究其与营养成分结构之间的关系,将是今后重点研究的方向。

4 结论

本研究利用高通量测序技术,对于自然发酵的沙棘酵素中真菌群落结构及其多样性进行了分析。根据 OTUs 得到 4 个门,16 个纲,35 个目,71 个科,98 个属,112 个种。真菌群落结构的多样性和丰富度在前期(F22_Q)最高,之后真菌群落的物种丰富度和多样性均呈下降趋势;发酵前、中期的绝对优势菌门均为子囊菌门,相对丰度为 76.97%~96.30%,毛霉菌门是发酵后期的绝对优势菌门,相对丰度为 2.39%~77.50%;在属水平上,刺盘孢属为发酵前期绝对优势菌属,相对丰度为 30.64%,发酵中期绝对优势菌属为未分类的酵母目,相对丰度为 58.06%,毛霉属为发酵后期绝对优势菌属,相对丰度为 77.50%;整个发酵阶段可聚为 F22_Q 一类和 F22_Z 与 F22_H 一类,样本在毛霉属、未分类的酵母目、红酵母属 3 种菌属之间具有显著性差异($P<0.05$);在种水平上,发酵前期绝对优势菌种为未分类的刺盘孢菌(所占比例 31%),发酵中期未分类的酵母目和未分类的裸节菌的占比最高,分别为 58%和 22%,发酵后期真菌卷枝毛霉所占比例最高,达到 75%。本试验研究了自然发酵过程中沙棘酵素真菌多样性及其结构变化规律,从而为今后沙棘酵素的开发提供理论依据,以期生产出更高质量的沙棘酵素产品。

参 考 文 献

- [1] 郝娟, 方亮. 沙棘各营养成分测定方法研究进展[J]. 现代食品, 2020, 6(13): 32-35.
HAO J, FANG L. Research progress on the determination methods of various nutrients in seabuckthorn[J]. Modern Food, 2020, 6(13): 32-35.
- [2] 卢顺光, 卢健, 温秀凤. 沙棘植物资源分布与营养学应用综述[J]. 中国水土保持, 2019, 40(7): 45-49.
LU S G, LU J, WEN X F. Summary of distribution of seabuckthorn plant resources and application of nutrition[J]. Soil and Water Conservation in China,

- 2019, 40(7): 45-49.
- [3] 张琪, 朱丹, 牛广财, 等. 沙棘果酒发酵动力学及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 53-58.
- ZHANG Q, ZHU D, NIU G C, et al. Fermentation kinetics and antioxidant activity of sea buckthorn wine[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 53-58.
- [4] ZHENG L, SHI L K, ZHAO C W, et al. Fatty acid, phytochemical, oxidative stability and *in vitro* antioxidant property of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) oils extracted by supercritical and subcritical technologies[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 86(12): 507-513.
- [5] CHEN C, XU X M, CHEN Y, et al. Identification, quantification and antioxidant activity of acylated flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *sinensis*) [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 1573-1579.
- [6] MA X Y, MOILANEN J, LAAKSONEN O, 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.
- [7] 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 buckthorn in BCG-induced rats[J]. PloS One, 2020, 15(9): e0238810.
- [8] MICHEL T, DESTANDAU E, GAËTAN LE FLOCH, et al. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed[J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 754-760.
- [9] YUE X F, SHANG X, ZHANG Z J, et al. Phytochemical composition and antibacterial activity of the essential oils from different parts of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(2): 327-332.
- [10] SURYAKUMAR G, GUPTA A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 138(2): 268-278.
- [11] VASHISHTHA V, BARHWAL K, KUMAR A, et al. Effect of sea buckthorn seed oil in reducing cardiovascular risk factors: A longitudinal controlled trial on hypertensive subjects[J]. Clinical Nutrition, 2017, 36(5): 1231-1238.
- [12] 中国生物发酵产业协会. 中国生物发酵产业协会团体标准食用植物酵素: T/CBFIA 08003-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 1-7.
- Chinese Biotech Fermentation Industry Association. Edible plant source Jiaosu of Chinese Biotech Fermentation Industry Association group standard: T/CBFIA 08003-2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017: 1-7.
- [13] 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.
- [14] 赵金凤, 宿秀芹, 曲佳乐, 等. 敖东酵素对脾淋巴细胞增殖作用的影响[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(3): 50-52.
- ZHAO J F, SU X Q, QU J L, et al. Effect on the splenic lymphocyte proliferation functionary of Aodong enzyme[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2014, 50(3): 50-52.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] YANG F, ZENG X W, NING K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations[J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 1-10.
- [18] 王新珍, 王凤花, 孙瑞波, 等. 高通量测序技术在微生物分子生态学研究中的应用[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(10): 1593-1600.
- WANG X Z, WANG F H, SUI R B, et al. Application of high-throughput DNA sequencing in microbial ecology[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2018, 26(10): 1593-1600.
- [19] SOON W W, HARIHARAN M, SNYDER M P. High-throughput sequencing for biology and medicine[J]. Molecular Systems Biology, 2013, 9

- (1): 640.
- [20] 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 C, SU Y P, YUE Y X, et al. Analysis of microbial community in *Malus prunifolia* Jiaosu and preliminary study on its function[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 70-76.
- [21] 康晓乐, 李东霓, 李晨, 等. 苹果自然发酵酵素微生物多样性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 283-290.
KANG X L, LI D N, LI C, et al. Analysis of microbial diversity of naturally fermented apple Jiaosu[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 283-290.
- [22] 姚笛, 徐磊, 李佳慧. 三种酵素的抗氧化活性与微生物多样性的相关性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(6): 928-936.
YAO D, XU L, LI J H. Correlation research on antioxidant activity and microbial diversity of three Jiaosu[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(6): 928-936.
- [23] 朱立斌, 朱丹, 牛广财, 等. 沙棘果汁饮料的研制及其抗氧化活性研究[J]. 饮料工业, 2020, 23(2): 45-50.
ZHU L B, ZHU D, NIU G C, et al. Preparation and antioxidant activity of sea buckthorn juice beverage[J]. Beverage Industry, 2020, 23(2): 45-50.
- [24] 李文亚, 刘洋, 李宁, 等. 蛋白酶制剂对虾酱发酵过程中理化性质和微生物区系的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 184-192.
LI W Y, LIU Y, LI N, et al. Effect of protease preparation on physicochemical properties and microbiota of shrimp paste during fermentation[J]. Food Science, 2021, 42(10): 184-192.
- [25] 阮志强, 董玺梅, 蒋雪薇, 等. 高盐稀态酱油发酵优势真菌与风味物质相关性分析[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 172-179.
RUAN Z Q, DONG X M, JIANG X W, et al. Correlation between dominant fungi and variation of flavor compounds during high-salt liquid-state soy sauce fermentation[J]. Food Science, 2022, 43(10): 172-179.
- [26] 赵丽君, 田雪, 钟威, 等. 基于高通量测序技术分析预包装豆干生产过程中的真菌污染风险[J]. 食品工业科技, 2021, 42(9): 207-213.
ZHAO L J, TIAN X, ZHONG W, et al. Analysis of fungal contamination risk in pre-packaged dried soybean curd processing line based on high-throughput sequencing technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(9): 207-213.
- [27] 邹妍, 陈中爱, 董楠, 等. 贵州腌鱼中微生物群落的多样性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 119-125.
ZOU Y, CHEN Z A, DONG N, et al. Analysis of microbial community diversity in Guizhou Suan Yu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(5): 119-125.
- [28] LIU Y R, DELGADO-BAQUERIZO M, BI L, et al. Consistent responses of soil microbial taxonomic and functional attributes to mercury pollution across China[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 1-12, 183.
- [29] 谢芳, 谢华德, 唐振华, 等. 基于高通量测序分析不同品种水牛生乳中细菌多样性[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7527-7535.
XIE F, XIE H D, TANG Z H, et al. Bacterial diversity of fresh milk in different buffalo breeds by high throughput sequencing[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(20): 7527-7535.
- [30] 王能, 张瑞雪, 吴攀, 等. 贵州某废弃煤矿酸性废水处理系统中细菌群落结构及功能分析[J]. 环境科学研究, 2021, 34(9): 2154-2163.
WANG N, ZHANG R X, WU P, et al. Analysis of bacterial community structure and function in acid wastewater treatment system of an abandoned coal mine in Guizhou province[J]. Research of Environmental Sciences, 2021, 34(9): 2154-2163.
- [31] 苏日娜, Erdenedalai M, 孟根达来, 等. 原麝和林麝冬夏两季粪便真菌菌群多样性[J]. 菌物学报, 2022, 41(1): 17-29.
SU R N, ERDENEDALA M, MENG G D L, et al. Fungal diversity of Siberian musk deer and forest musk deer feces in winter and summer[J]. Mycosystema, 2022, 41(1): 17-29.
- [32] 王琪, 王红兰, 孙辉, 等. 蚕豆间作对羌活次生代谢产物及根际土壤微生物多样性的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(10): 2597-2604.
WANG Q, WANG H L, SUN H, et al. Effect of intercropping with *Vicia faba* on secondary metabolites and rhizosphere soil microbial diversity of *Notopterygium incisum*[J]. China Journal of Chinese

- Materia Medica, 2022, 47(10): 2597–2604.
- [33] 唐佳代. 贵州传统小曲微生物群落结构及功能酵母的筛选[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- TANG J D. Microbial community structure and screening of functional yeasts in Guizhou traditional Xiaoqu[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019.
- [34] 陈冉, 张艳欣, 王丹丹. 基于高通量测序与 UPLC-Q-TOF/MS 技术的不同产地银杏叶内生菌与其主要化学成分相关性探究[J]. 中国现代中药, 2021, 23(12): 2096–2106.
- CHEN R, ZHANG Y X, WANG D D. Correlation between diversity of endophytic bacteria and fungi in *Ginkgo biloba* leaves from different areas and their main chemical components based on high-throughput sequencing and UPLC-Q-TOF/MS technology [J]. Modern Chinese Medicine, 2021, 23(12): 2096–2106.
- [35] 韩国强, 孙协平, 吴鹏飞, 等. 基于高通量测序分析复配小曲白酒发酵过程中微生物群落结构及多样性[J/OL]. 食品科学: 1–10[2021-02-15].
- HAN G Q, SUN X P, WU P F, et al. High throughput sequencing-based analysis of microbial community structure and diversity during Baijiu fermentation with mixed-strain Xiaoqu[J/OL]. Food Science: 1–10[2021-02-15].
- [36] 许晴, 张放, 许中旗, 等. Simpson 指数和 Shannon-Wiener 指数若干特征的分析及“稀释效应”[J]. 草业科学, 2011, 28(4): 527–531.
- XU Q, ZHANG F, XU Z Q, et al. Some characteristics of Simpson index and the Shannon-Wiener index and their dilution effect[J]. Pratacultural Science, 2011, 28(4): 527–531.
- [37] YAO D, XU L, WANG C Y. Diversity of the microbial community and antioxidant activity during fermentation of red raspberry Enzymes[J]. Food Science & Nutrition, 2020(7): 99–110.
- [38] 邓祥宜, 李继伟, 何立超, 等. 宣恩火腿发酵过程中表面微生物群落演替规律的研究[J/OL]. 食品与发酵工业: 1–11[2021-03-01].
- DENG X Y, LI J W, HE L C, et al. Microbial community succession pattern on the surface of Xuanen ham during fermentation[J/OL]. Food and Fermentation Industries:1–11[2021-03-01].
- [39] SUI Q W, LIU C, ZHANG J Y, et al. Response of nitrite accumulation and microbial community to free ammonia and dissolved oxygen treatment of high ammonium wastewater[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(9): 4177–4187.
- [40] 高庆超, 常应九, 马蓉, 等. 黑果枸杞酵素自然发酵过程中微生物群落的动态变化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 126–133.
- GAO Q C, CHANG Y J, MA R, et al. Dynamic changes in microbial community during natural fermentation of *Lycium ruthenicum* Murr. enzymes [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(13): 126–133.
- [41] OKADA H, KAWAZOE N, YAMAMORI A, et al. Structural analysis and synthesis of oligosaccharides isolated from fermented beverage of plant extract[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2008, 55(2): 143–148.
- [42] 邸鹏月, 彭宇, 李晨, 等. 基于宏基因组分析桑葚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.
- [43] 阴芳冉. 红树莓自然发酵过程中生物活性研究与微生物多样性分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
- YIN F R. Bioactivity and microbial diversity analysis of red raspberry during the natural fermentation process[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2019.

Fungal Diversity and Community Structure during Natural Fermentation of Sea Buckthorn Jiaosu

Niu Guangcai^{1,2}, Zhang Qi^{1,2}, Zhu Dan³, Yan Feixiang^{1,2}, Wei Wenyi^{1,2}, Ning Zhixue^{1,2}, Wang Sipu^{1,2}

¹Food College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang

²Agri-food Processing and Engineering Technology Research Center of Heilongjiang Province,

Daqing 163319, Heilongjiang

³College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang)

Abstract In order to study the changes of sea buckthorn Jiaosu fungi and their community structure during natural fermentation, the fungal rRNA gene ITS1 region was analyzed by high-throughput sequencing technology. The results indicated that 4 phyla, 16 classes, 35 orders, 71 families, 98 genera and 112 species were identified according to 97% similarity of operational taxonomic units (OTUs). The fungal community structure diversity and richness in the early fermentation stage (F22_Q) were the highest than those of the others. With the progress of fermentation, the species richness and diversity of fungal community showed a decreasing trend. At the level of fungal phylum, Ascomycota was the dominant phyla in the F22_Q and middle stage (F22_Z), and the relative abundance ranged from 76.97% to 96.30%, Mucoromycota was absolute dominant phyla in the later stage (F22_H) and the relative abundance ranged from 2.39% to 77.50%. At the level of fungal genus, *Colletotrichum* was absolute dominant genus in the F22_Q and the relative abundance was 30.64%, unclassified_o_Saccharomycetales was absolute dominant genus in the F22_Z and the relative abundance was 58.06%, *Mucor* was absolute dominant genus in the F22_H and the relative abundance was 77.50%. The three fermentation stages could be divided into two groups, the F22_Q was clustered into one group, the F22_Z and the F22_H were clustered into one group. The samples showed significant differences ($P < 0.05$) among *Mucor*, unclassified_o_Saccharomycetales and *Rhodotorula*. At the level of fungal species, in the F22_Q, unclassified_g_Colletotrichum was absolute dominant species and the ratio was 31%. In the F22_Z, unclassified_o_Saccharomycetales and unclassified_g_Talaromyces were the highest and the proportions were 58% and 22% respectively. In the F22_H, the proportion of *Mucor_circinelloides* was the highest (up to 75%), which was the dominant position. The study provided strong support for the development of the dominant fungus community and the excavation of probiotics in the fermentation of sea buckthorn Jiaosu.

Keywords sea buckthorn Jiaosu; natural fermentation; high throughput sequencing; fungal diversity; community structure