

# 三种酵素的抗氧化活性与微生物多样性的相关性研究

姚笛\*,徐磊,李佳慧

黑龙江八一农垦大学食品学院,大庆 163319

**摘要:** 酵素含有多种微生物,为了探明不同酵素的微生物群落构成及抗氧化活性,本研究以火龙果酵素、蓝莓酵素、桑葚酵素为样品,测定其 pH 值和总酚含量,以 DPPH 自由基、羟自由基清除能力为指标分析其抗氧化活性,通过高通量测序分析其细菌和真菌群落结构组成。结果表明,三种酵素中蓝莓酵素的总酚含量和抗氧化活性最高,pH 值最低。三种酵素共获得 2 122 个细菌 OTU 和 2 592 个真菌 OTU, $\alpha$ -多样性分析发现样品中的细菌群落多样性均高于真菌群落多样性。三种酵素的优势菌门为变形菌门(Proteobacteria)和子囊菌门(Ascomycota),其中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)等菌属的丰度较高且差异较大。微生物群落构成与 pH 值、总酚含量、羟自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力具有一定的相关性。本研究结果可为功能性酵素产品的研发优化提供理论参考。

**关键词:** 酵素;微生物多样性;抗氧化活性

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)6-0928-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.004

## Correlation research on antioxidant activity and microbial diversity of three Jiaosu

YAO Di\*, XU Lei, LI Jia-hui

College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

**Abstract:** Jiaosu contains a variety of microorganisms. In order to explore the microbial community composition and antioxidant activity of different Jiaosu, the pH value and total phenol content of pitaya, blueberry and mulberry Jiaosu were determined. The antioxidant activity was analyzed by DPPH free radical and hydroxyl radical scavenging ability. The structure of bacterial and fungal communities was analyzed by high-throughput sequencing. The results showed that the total phenol content and antioxidant activity of blueberry Jiaosu in the three Jiaosu was the highest and the pH value was the lowest. A total of 2122 bacterial OTUs and 2592 fungal OTUs were obtained from the three Jiaosu. The  $\alpha$ -diversity analysis showed that the diversity of bacterial community was higher than that of fungal community. Proteobacteria and Ascomycota are the dominant phylum of the three Jiaosu, and the abundance of *Mesorhizobium* and *Hanseniaspora* was higher and different. The composition of microbial community was correlated with pH value, total phenol content, hydroxyl radical scavenging capacity and DPPH radical scavenging capacity. The results of this study provided a theoretical reference for the development and optimization of functional Jiaosu products.

**Key words:** Jiaosu; microbial diversity; antioxidant activity

酵素是以动植物等为原料,经微生物发酵制得的具有特定生物活性的产品<sup>[1]</sup>。酵素含有大量的微生物代谢产物,其中酶、氨基酸等营养成分含量丰

富,因此,酵素具有延缓衰老、抑菌及提高机体免疫力等功能<sup>[2,3]</sup>。酵素在发酵过程中的抗氧化活性研究是近年来关注的焦点,Chen<sup>[4]</sup>和Dong<sup>[5]</sup>等对火龙果酵素发酵过程中的抗氧化活性与功能变化规律进行了研究;Guan 等<sup>[6]</sup>研究了蓝莓酵素发酵过程中抗氧化性能的变化;Wang 等<sup>[7]</sup>对桑葚酵素的多酚和原花青素等生物活性成分的含量进行测定,并分析了 DPPH 自由基清除作用、ABTS 自由基清除作用和

收稿日期:2019-10-10 接受日期:2020-05-21

基金项目:黑龙江省农垦总局攻关项目(HNK12KF-13);黑龙江省自然科学基金(LH2019C049);黑龙江八一农垦大学青年创新人才项目(CXRC2017010);黑龙江八一农垦大学博士启动计划(XDB-2017-12)

\*通信作者 Tel:86-459-6819236;E-mail:yaodi0226@163.com

SOD 活性等指标。多项研究结果表明不同酵素的抗氧化活性存在差别,这可能与不同酵素中的微生物群落构成和丰度有关,但是,迄今关于酵素的微生物菌群多样性和抗氧化活性的相关性研究未见报道<sup>[8]</sup>。

发酵食品的微生物多样性研究方法主要有传统培养法、底物利用分析法和分子生物学等方法<sup>[9]</sup>。目前,对于酵素样品的微生物多样性研究十分贫乏,Jiao 等<sup>[10]</sup>运用 PCR-DGGE 技术分析了木瓜酵素自然发酵过程中的微生物多样性。然而,随着高通量测序技术的飞速发展<sup>[11]</sup>,第二代测序技术已经能够将稳定可逆的终止法边合成边测序反应应用在样品中<sup>[12]</sup>。因此,利用高通量测序技术对不同酵素的微生物多样性进行分析切实可行。

研究酵素的抗氧化活性与微生物多样性的相关性对于酵素发酵菌种的选择至关重要。发酵菌种很大程度上决定着酵素的生理活性和安全性,并能缩短发酵时间<sup>[13]</sup>,同时也直接影响产品的生产工艺和品质<sup>[14]</sup>,而结合微生物多样性和抗氧化活性,从酵素中筛选有益菌种的研究未见报道,因此,本研究以火龙果酵素、蓝莓酵素、桑葚酵素为样品,测定其 pH 值和总酚含量,以 DPPH 自由基、羟自由基清除能力为指标分析其抗氧化活性,同时,利用高通量测序技术对其中的 16S rDNA 基因 V3-V4 区和 ITS 基因 1-2 区进行扩增测序,分析样品中细菌和真菌的群落结构组成<sup>[15]</sup>,结合 pH 值、总酚含量、羟自由基和 DPPH 清除能力,探讨微生物多样性与抗氧化活性的相关性,从而为酵素功能特性的阐释和优质酵素的开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

新鲜的火龙果、桑葚、蓝莓、柠檬等均购自大型超市。

DPPH 购自北京索莱宝科技有限公司;羟自由基测定试剂盒购自南京建成科技有限公司;E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 购自 Omega 公司;Qu-bit3.0 DNA 检测试剂盒购自 Life 公司;2 × Taq Master Mix 购自 Vazyme 公司;Magic Pure Size Selection DNA Beads 为 Transgen 公司产品;碳酸钠等试剂均为国产分析纯;酵素发酵桶为特百惠(Tupperware Brands Corporation)公司产品。

### 1.2 仪器与设备

Q32866 型 Qubit® ubi 荧光计,Invitrogen 公司;T100™ Thermal Cyeler 型 PCR 仪,BIO-RAD 公司;

DETA320 型精密 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;A360 型紫外可见分光光度计,翰艺仪器(上海)有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 酵素的制作

将火龙果去皮切块,按照火龙果:蔗糖:柠檬汁 = 5:5:1 的比例放入酵素发酵桶中,混合均匀,发酵三个月;将桑葚、蓝莓洗净,自然晾干,按水果:蔗糖:柠檬汁 = 5:5:1 的比例放入酵素发酵桶中,混合均匀,25 ℃ 发酵三个月。

#### 1.3.2 pH 值的测定

利用 pH 计校准后测定三种酵素的 pH 值。

#### 1.3.3 总酚含量测定

在 100 μL 样品中加入 45.9 mL 去离子水,然后与 1 mL Folin-Ciocalteau 试剂混合,反应 3 min,再向其中加入 3 mL 20% 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液,25 ℃ 恒温水浴振荡 2 h,然后测定 760 nm 下的吸光度,总酚含量是借助没食子酸等价物来表示,根据标准曲线的方程  $y = 0.0917x + 0.0208, R^2 = 0.9996$  计算总酚含量( $y$  表示吸光度, $x$  表示样品浓度)。

#### 1.3.4 羟自由基清除能力测定

将三种酵素样品分别混匀,取 1 mL 样品进行羟自由基清除能力的测定,按照试剂盒操作说明进行,羟自由基清除率按照如下公式进行计算:

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_3} \times 100\%$$

#### 1.3.5 DPPH 自由基的清除能力测定

将 4 mL DPPH(0.025 g/L)溶液中加入 1 mL 样品中,室温下避光 30 min,然后测定其在 517 nm 下的吸光度值,DPPH 自由基的清除能力按照如下公式进行计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_1 - A_2}{A_2} \times 100\%$$

#### 1.3.6 微生物多样性的测定

##### 1.3.6.1 样品处理

将三种酵素样品分别混匀,取 4 mL 样品分多次加入 2 mL 灭菌离心管中,10 000 rpm 室温下离心 3 min,弃上清液,再将离心管倒置在吸水纸上,保持 1 min,至没有液体流出,取离心管内沉淀备用。

##### 1.3.6.2 DNA 提取

利用 E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 对样品中的 DNA 进行提取,具体方法参照试剂盒说明书进行。利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,

Qubit 3.0 DNA 检测试剂盒测定 DNA 浓度。

### 1.3.6.3 PCR 扩增和纯化

以检测合格的 DNA 样品为模板, 以 341F (CCCTACACGACGCTCTCCGATCTG) 和 805R (GA CTGGAGTTCCCTGGCACCCGAGAATTCCA) 为引物, 对细菌 16s rDNA 的 V3-V4 区进行扩增; 同时以 ITS1F (CCCTACACGACGCTCTCCGATCTN) 和 ITS2R (GTGACTGGAGTCCTGGCACCCGAGAATTCCA) 为引物, 对真菌 ITS 区进行 PCR 扩增。扩增产物利用 Magic Pure Size Selection DNA Beads 进行纯化, 具体操作按照说明书进行。

### 1.3.6.4 测序

利用 Qubit 3.0 DNA 检测试剂盒对回收的 PCR 产物进行精确定量, 按照每个样品的测序量要求进行混合, 将接头序列添加至目标区域外端后, 氢氧化钠变性产生单链 DNA 片段, 利用 Illumina HiSeq 平台进行测序。

表 1 酶素的 pH 值和总酚含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 pH and total phenols content in Jiaosu ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

酶素种类 Jiaosu type	发酵前 Before fermentation		发酵后 After fermentation	
	pH	总酚含量 Total phenol (mg/mL)	pH	总酚含量 Total phenol (mg/mL)
T1	5.93 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.66 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>a</sup>
T2	5.15 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.03 <sup>b</sup>	3.30 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>b</sup>
T3	4.37 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.94 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>c</sup>

注:T1:火龙果酵素;T2:桑葚酵素;T3:蓝莓酵素。上角标字母相同表示差异不显著,  $P > 0.05$ ; 上角标字母不相同表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Note: T1:Pitaya Jiaosu; T2:Mulberry Jiaosu; T3:Blueberry Jiaosu. Same superscript letters indicate no significant difference,  $P > 0.05$ ; Different superscript letters indicate significant difference,  $P < 0.05$ .

### 2.2 三种酵素的抗氧化活性

三种酵素发酵前后的 DPPH 自由基和羟自由基清除能力如表 2 所示, 由表可知, 发酵后蓝莓酵素的 DPPH 自由基和羟自由基清除能力最高, 说明其抗

### 1.3.7 序列及相关性分析

测序获得的原始数据利用 QIIME 进行质控过滤及 OTU 聚类, 然后与 RDP 等数据库进行比对, 对各个样品的 OTU 在门和属水平等级上的群落组成进行注释和  $\alpha$ -多样性分析。微生物多样性与抗氧化活性等环境因子的 CCA 分析采用 Canoco 4.5 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 三种酵素的 pH 值和总酚含量

三种酵素发酵前后的 pH 值和总酚含量如表 1 所示, 由表可知, 三种酵素发酵后的 pH 值均降低, 其中, 蓝莓酵素(T3)的 pH 值最低, 酵素的 pH 较低是由于发酵过程中微生物利用糖产生了大量的有机酸; 酵素的总酚含量比发酵前明显升高, 其中, 蓝莓酵素的总酚含量最高, 火龙果酵素(T1)最低, 桑葚酵素(T2)的两项指标居于中等水平。

表 2 酶素的抗氧化活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Antioxidant activity of Jiaosu ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

酶素种类 Jiaosu type	发酵前 Before fermentation		发酵后 After fermentation	
	DPPH 自由基清除能力 DPPH free radical scavenging ability	羟自由基清除能力 Hydroxyl radical scavenging ability	DPPH 自由基清除能力 DPPH free radical scavenging ability	羟自由基清除能力 Hydroxyl radical scavenging ability
T1	58.75 ± 0.14 <sup>a</sup>	20.16 ± 0.23 <sup>a</sup>	90.29 ± 0.69 <sup>a</sup>	42.36 ± 0.48 <sup>a</sup>
T2	53.14 ± 0.26 <sup>b</sup>	19.31 ± 0.21 <sup>b</sup>	92.30 ± 1.17 <sup>b</sup>	44.42 ± 0.72 <sup>b</sup>
T3	59.36 ± 0.15 <sup>a</sup>	18.42 ± 0.16 <sup>c</sup>	94.29 ± 1.15 <sup>c</sup>	46.54 ± 1.21 <sup>c</sup>

注:T1:火龙果酵素;T2:桑葚酵素;T3:蓝莓酵素。上角标字母相同表示差异不显著,  $P > 0.05$ ; 上角标字母不相同表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Note: T1:Pitaya Jiaosu; T2:Mulberry Jiaosu; T3:Blueberry Jiaosu. Same superscript letters indicate no significant difference,  $P > 0.05$ ; Different superscript letters indicate significant difference,  $P < 0.05$ .

氧化活性较好, 火龙果酵素的抗氧化活性较低, 桑葚酵素的抗氧化活性居于中等水平。比较发酵前后三种酵素的自由基清除能力可知, 经微生物作用后酵素的抗氧化活性明显增强。

### 2.3 三种酵素中细菌和真菌的 $\alpha$ -多样性分析

对样品进行 $\alpha$ -多样性分析,可反映出微生物群落的多样性与丰度。三种酵素样品中细菌和真菌的 $\alpha$ -多样性分析结果如图1、2、3和表3所示。根据Shannon、Ace和Chao指数分析可知,随着测序量的增加,细菌和真菌的稀释曲线均趋向平坦,说明实验测序量合理,可涵盖酵素样品中的物种总数,反映样品内细菌、真菌等微生物信息全貌,其中蓝莓酵素的细菌测序量少于其他两种酵素,而真菌的测序量高

于其他两种酵素,这与样品中的物种构成和丰度相关。由表3可知,三种酵素的覆盖率均大于98%,覆盖率表示检测样品文库覆盖率( $\text{Max} = 1$ ),数值越大表示更真实的反映样品情况。三种酵素的细菌Shannon指数均大于真菌的Shannon指数,说明三种酵素的细菌多样性高于真菌多样性,其中蓝莓酵素细菌和真菌的Shannon指数最高,分别为4.03和2.37,说明蓝莓酵素的微生物多样性高于其他两种酵素。根据Chao指数可确定酵素样品的物种丰度,

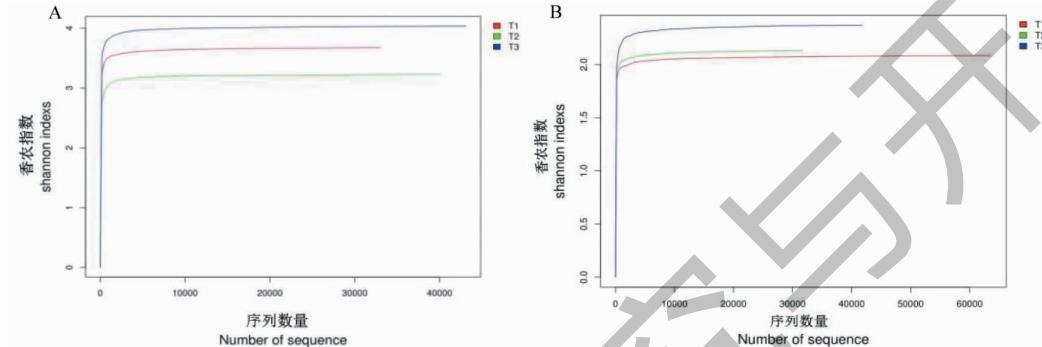


图1 酵素中细菌(A)与真菌(B)的Shannon指数

Fig. 1 Shannon index of bacteria (A) and fungi (B) in Jiaosu

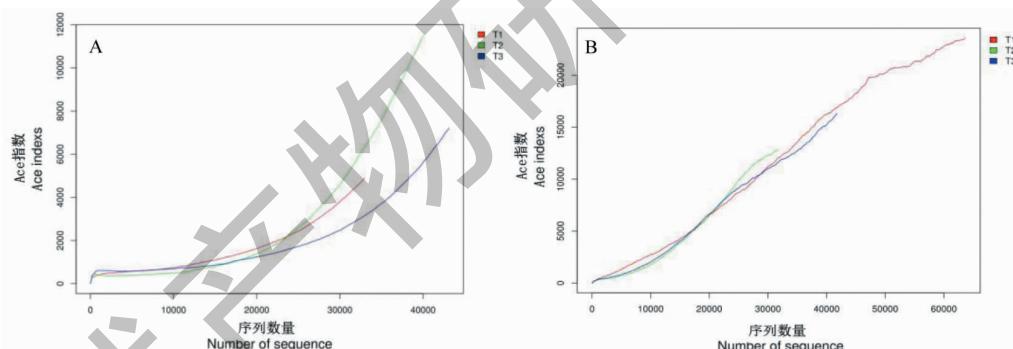


图2 酵素中细菌(A)与真菌(B)的Ace指数

Fig. 2 Ace index of bacteria (A) and fungi (B) in Jiaosu

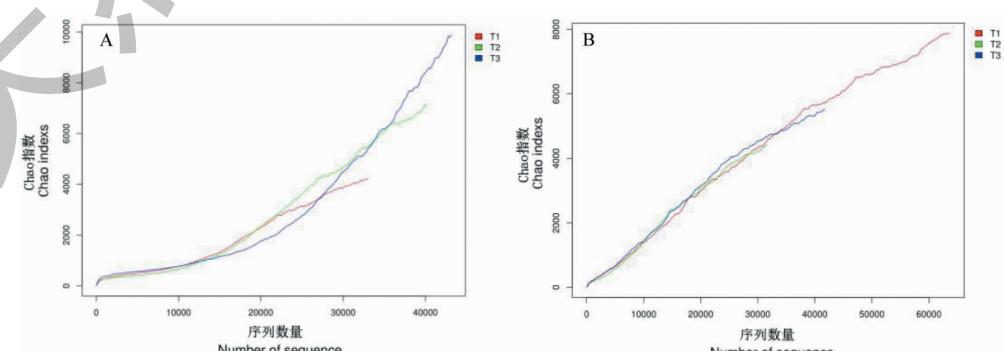


图3 酵素中细菌(A)与真菌(B)Chao指数

Fig. 3 Chao index of bacteria (A) and fungi (B) in Jiaosu

表 3 酵素中细菌和真菌的  $\alpha$ -多样性指标统计

Table 3 Alpha diversity index statistics of bacteria and fungi in Jiaosu

微生物类别 Microbial category	样品编号 Sample number	有效序列 Valid sequence	OTU 数目 OTU number	香农指数 Shannon index	Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index	覆盖率 Coverage
细菌 Bacterial	T1	33003	757	3.67	4 914.26	4 087.29	98.68%
	T2	40099	705	3.23	11 215.42	6 995.08	98.99%
	T3	43121	965	4.03	7 024.45	9 721.56	98.77%
真菌 Fungus	T1	33003	1 140	2.09	23 623.19	7 883.88	98.51%
	T2	40099	669	2.13	12 822.59	4 435.89	98.37%
	T3	43121	1 012	2.37	16 325.25	5 530.44	98.17%

细菌中蓝莓酵素的 Chao 指数最高,为 9 721.56,说明蓝莓酵素的细菌丰度高于其他两种酵素,真菌中火龙果酵素的 Chao 指数最高,为 7 883.88,说明火龙果酵素的真菌丰度高于其他两种酵素。Ace 指数与 Chao 指数的算法不同,也能反映 OTU 的数目和物种丰度。综上所述,三种酵素样品原料的差异性可诱导微生物群落多样性的不同。

## 2.4 OTU 分布韦恩图分析

韦恩图用于表示多个样本共有和特有 OTU 的情况<sup>[16]</sup>。如图 4 所示,三种酵素样品的细菌 OTU 总数为 2 122,对 3 种酵素含有的细菌和真菌分别进行基于 OTU 的韦恩分析,发现 T1(火龙果酵素)有

757 个细菌 OTU,T2(桑葚酵素)有 705 个细菌 OTU,T3(蓝莓酵素)有 965 个细菌 OTU,其中 T1、T2 共有 117 个细菌 OTU,T2、T3 共有 127 个细菌 OTU,T1、T3 共有 149 个细菌 OTU,T1、T2、T3 具有 88 个共有细菌 OTU。T3(蓝莓酵素)的特有细菌 OTU 数目最多。三种酵素样品的真菌 OTU 总数为 2592,T1 有 1140 个真菌 OTU,T2 有 669 个真菌 OTU,T3 有 1012 个真菌 OTU,其中 T1、T2 具有 116 个共有真菌 OTU,T2、T3 具有 70 个共有真菌 OTU,T1、T3 共有 78 个真菌 OTU,T1、T2、T3 共有 36 个真菌 OTU。T1(火龙果酵素)的特有真菌 OTU 数目最多。

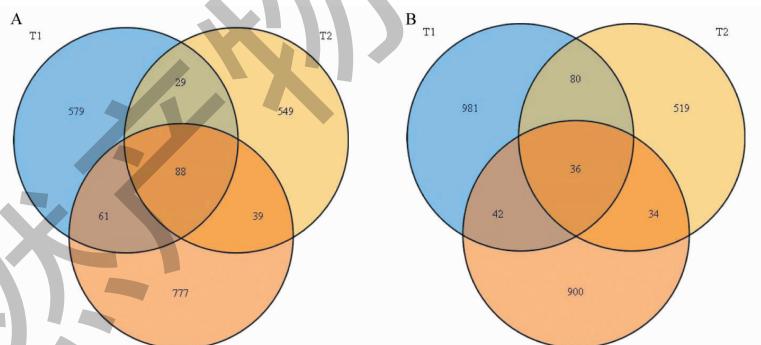


图 4 酵素样品中细菌(A)及真菌(B)的 OTU 分布韦恩图

Fig. 4 Venn diagrams of bacteria (A) and fungi (B) in Jiaosu

## 2.5 群落结构组分分析

基于各样本物种丰度通过 Bray-Curtis 算法构建样本聚类树<sup>[17]</sup>,与物种丰度柱状图结合能直观的看出样本间的关系及物种构成。由图 5 可知,在细菌的门水平群落结构组分中共分析了 29 个细菌门,三种酵素的细菌门水平的群落构成相似,其中变形菌门(*Proteobacteria*)丰度最高,其次是厚壁菌门(*Firmicutes*),第三是放线菌门(*Actinobacteria*);在细菌

属水平群落结构组分中共分析了 50 个细菌属,其中火龙果酵素与蓝莓酵素的细菌属水平的群落构成相似,桑葚酵素的菌属丰度与其他两种酵素有一定差别,总的来说,高丰度的细菌是中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和盐单胞菌属(*Halomonas*)。由图 6 可知,在真菌门水平群落结构组分分布中共分析了 11 个真菌门,三种酵素的真菌门水平的群落构成相似,优势真菌均为子囊菌门(*Ascomycota*),其中蓝

莓酵素的未分类菌门 (unclassified) 也占有一定比例;在真菌属水平群落结构组分分布中共分析了 50 个真菌属,其中火龙果酵素和桑葚酵素的优势真菌

为奥默柯达酵母属 (*Kodamaea*) , 蓝莓酵素的优势真菌为帚枝霉属 (*Sarocladium*) 和汉逊酵母属 (*Hanseniaspora*)。

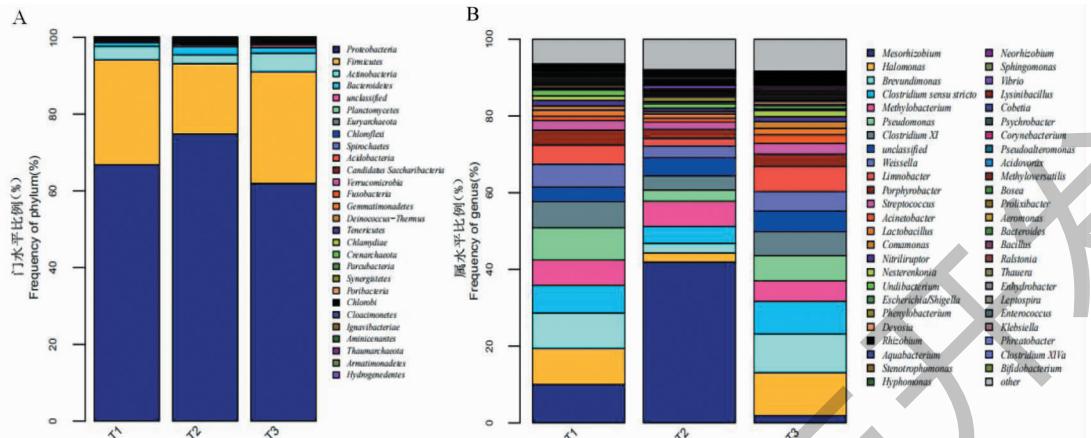


图 5 不同酵素样本间细菌门水平(A)和属水平(B)的相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of bacteria at the phylum (A) and genus (B) level in Jiaosu

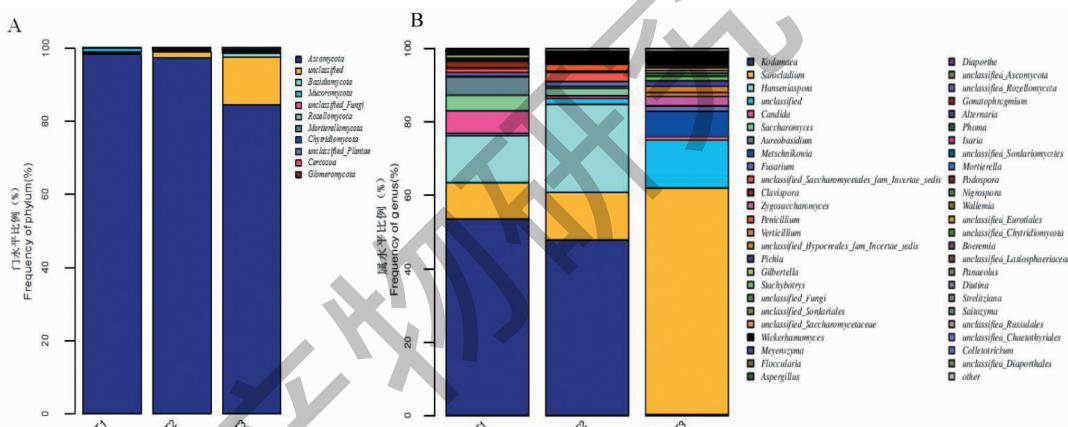


图 6 不同酵素样本间真菌门水平(A)和属水平(B)的相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of fungi at the phylum (A) and genus (B) level in Jiaosu

## 2.6 物种丰度的聚类分析

Heatmap 的颜色变化可反映群落分布的丰度信息。将门、属水平上的分类信息进行组间丰度相似性聚类,通过颜色梯度及相似程度来反映样品在各分类水平上群落组成的相似性和差异性<sup>[18]</sup>。

由菌群组成的热图(图 7、8)可知,红色代表丰度高,蓝色代表丰度低,在细菌群落构成中火龙果酵素和蓝莓酵素归属同一分支,桑葚酵素与其他两种酵素差距较大,如酸杆菌门 (Acidobacteria)、梭杆菌门 (Fusobacteria)、苯基杆菌属 (*Phenylobacterium*)、弧菌属 (*Vibrio*) 在火龙果和蓝莓酵素中丰度较低,但在桑葚酵素中丰度较高。

火龙果酵素和桑葚酵素的真菌群落构成差异较

小,归属同一分支,蓝莓酵素与另外两种酵素差异较大,如类原生动物门 (Rozellomycota)、梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)、接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 在火龙果酵素和桑葚酵素中丰度较低,在蓝莓酵素中丰度较高。

## 2.7 酵素的抗氧化活性与部分微生物群落丰度之间的相关性分析

酵素的抗氧化活性与微生物群落丰度的相关性分析如图 9 和 10 所示,由图可知,酵素的 pH 值、总酚含量、羟自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力与其微生物群落构成有一定的相关性。与 pH 值呈正比的细菌有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*)、紫杆菌属 (*Porphyrobacter*)、中慢生根

瘤菌属(*Mesorhizobium*)；真菌有奥默柯达酵母属(*Kodamaea*)、汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)、假丝酵母属(*Candida*)、酵母属(*Saccharomyces*)、短梗霉属

(*Aureobasidium*)、棒孢酵母属(*Clavispora*)。与总酚含量呈正比的细菌有伯克氏菌属(*Limnobacter*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、链球菌属(*Streptococcus*)、

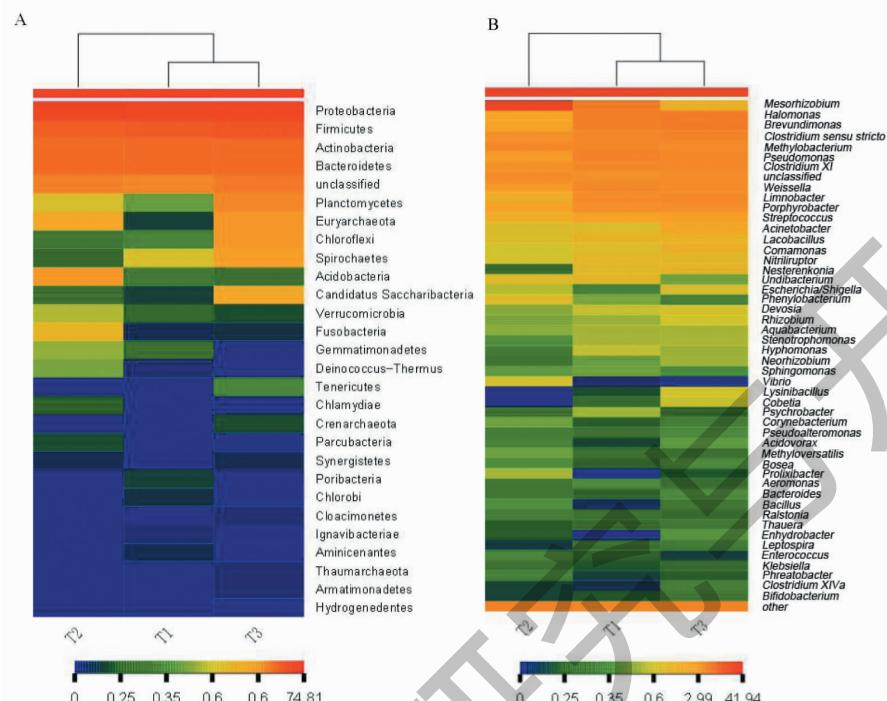


图7 不同酵素样本间具有丰度差异的细菌门(A)和属(B)水平热图

Fig. 7 Bacterial heat map at phylum(A) and genus(B) level with abundance difference between different Jiaosu samples

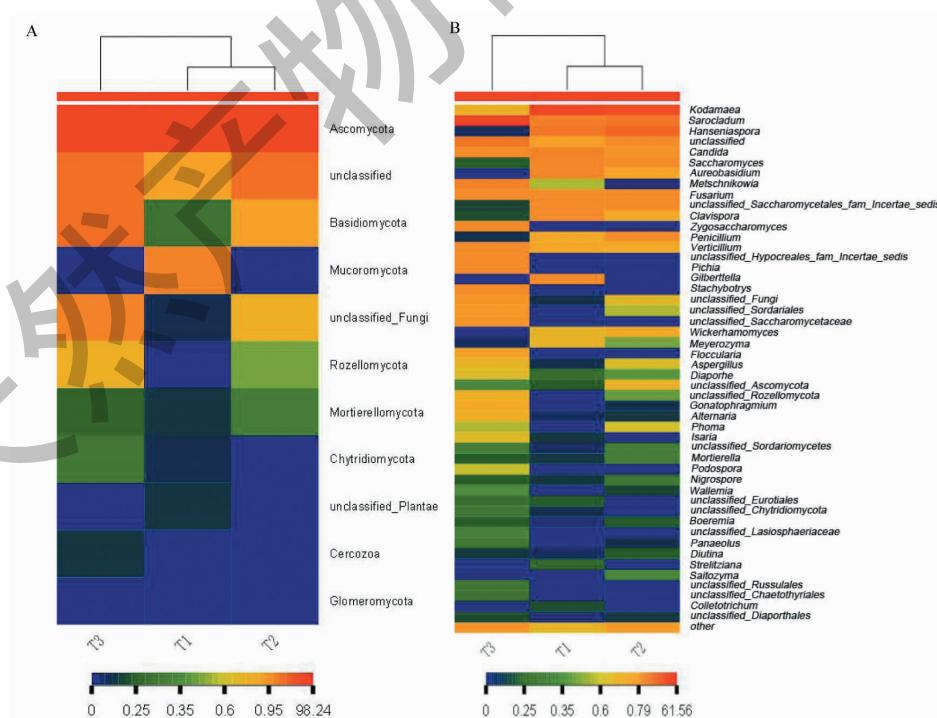


图8 不同酵素样本间具有丰度差异的真菌门(A)和属(B)水平热图

Fig. 8 Fungi heat map at phylum(A) and genus(B) level with abundance difference between different Jiaosu samples

盐单胞菌属 (*Halomonas*)、短单胞菌属 (*Brevundimonas*)；真菌有帚枝霉属 (*Sarocladium*)、梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*)。与羟自由基清除能力呈正比的细菌有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*)、短单胞菌属 (*Brevundimonas*)、梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*)、伯克氏菌属 (*Limnobacter*)、链球菌属 (*Streptococcus*)；真菌有假丝酵母属 (*Candida*)、酵母属 (*Saccharomyces*)、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、梅奇酵母属 (*Metschnikowia*)、棒孢酵母 (*Clavispora*)、

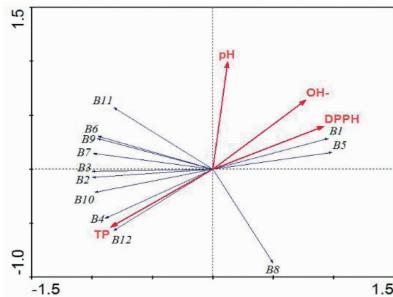


图 9 酵素的细菌属水平群落与抗氧化活性的关系

Fig. 9 Relationship between bacterial flora at genus level and antioxidant activity in Jiaosu

注:B1: *Mesorhizobium* (中慢生根瘤菌属); B2: *Halomonas* (盐单胞菌属); B3: *Brevundimonas* (短单胞菌属); B4: *Clostridium sensu stricto* (梭状芽孢杆菌属); B5: *Methylobacterium* (甲基杆菌属); B6: *Pseudomonas* (假单胞菌属); B7: *Clostridium* (梭状芽孢杆菌属); B8: unclassified (未分类菌属); B9: *Weissella* (魏斯氏菌属); B10: *Limnobacter* (柠檬酸杆菌); B11: *Porphyrobacter* (紫杆菌属)、B12: *Streptococcus* (链球菌属)。

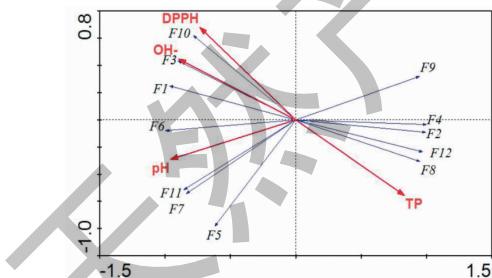


图 10 酵素的真菌属水平群落与抗氧化活性的关系

Fig. 10 Relationship between fungi flora at genus level and antioxidant activity in Jiaosu

注:F1: *Kodamaea* (奥默柯达酵母属)、F2: *Sarocladium* (帚枝霉属)、F3: *Hanseniaspora* (汉逊酵母属)、F4: unclassified (未分类菌属)、F5: *Candida* (假丝酵母属)、F6: *Saccharomyces* (酵母属)、F7: *Aureobasidium* (短梗霉属)、F8: *Metschnikowia* (梅奇酵母属)、F9: *Fusarium* (镰刀菌属)、F10: unclassified *Saccharomycetales* (未分类酵母属)、F11: *Clavispora* (棒孢酵母)、F12: *Zygosaccharomyces* (接合酵母属)。

接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*)。与 DPPH 自由基的清除能力呈正比的细菌有中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*)、短单胞菌属 (*Brevundimonas*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)；真菌有奥默柯达酵母属 (*Kodamaea*)、汉逊酵母属 (*Hanseniaspora*)、未分类酵母属。

### 3 讨论

本文结合不同酵素的抗氧化活性与微生物群落组成的差别,探讨两者之间的相关性。酵素具有一定的抗氧化活性,但不同原料来源的酵素的抗氧化活性存在差异。羟自由基是一种活性氧,在体内可与金属离子作用,形成高氧化态,清除体内羟自由基可有效控制高氧化状态,而 DPPH 自由基相较于超氧自由基等更加稳定,能更好的评价抗氧化活性。本文结合不同酵素的总酚含量及 DPPH、羟自由基清除率评价其抗氧化性。三种酵素中,蓝莓酵素的自由基清除能力最强,并与总酚含量成正相关,这与蒋增良等研究蓝莓酵素的抗氧化性与多酚含量呈正相关性的结果吻合<sup>[19]</sup>。酵素中自由基清除率的上升可能是由于多酚含量的增加和多糖的共同作用<sup>[20]</sup>,还有研究表明,多酚分子中活性酚羟基具有较强的还原力,即具有较强的抗氧化活性<sup>[19]</sup>。

本文利用高通量测序技术探讨不同酵素的微生物多样性,从结果可以看出,不同酵素在门水平上差异不大,其中变形菌门和厚壁菌门是细菌的优势菌门,子囊菌门为真菌的优势菌门;不同酵素在属水平上差异较大,其中火龙果酵素和蓝莓酵素在细菌属水平上较为相近,火龙果酵素和桑葚酵素在真菌属水平上较为相近,例如中慢生根瘤菌属为优势细菌属,优势真菌为奥默柯达酵母属和汉逊酵母属。这表明果蔬的营养成分不同,最终使不同酵素在细菌和真菌的构成上存在差异。

虽然不同酵素的抗氧化活性研究已有较多报道,但对于不同酵素的微生物多样性与抗氧化活性之间的相关性分析未见报道。本研究表明,三种酵素的抗氧化活性与细菌的相关性较小,DPPH、羟自由基的清除率与两个细菌菌属(中慢生根瘤菌属、甲基杆菌属)等呈现正相关;与真菌的相关性较大,如奥默柯达酵母属、汉逊酵母属等多个真菌菌属与抗氧化指标呈现正相关。

### 4 结论

三种酵素中蓝莓酵素的总酚含量和抗氧化活性最高,pH 值最低。三种酵素共获得 2 122 个细菌

OTU 和 2 592 个真菌 OTU,  $\alpha$ -多样性分析发现样品中的细菌群落多样性均高于真菌群落多样性, 三种酵素的细菌群落丰富度高于真菌群落丰富度。三种酵素的优势菌门为变形菌门(*Proteobacteria*)和子囊菌门(*Ascomycota*), 其中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)等菌属的丰度较高且差异较大。微生物群落构成与 pH 值、总酚含量、羟自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力具有一定的相关性。不同微生物与抗氧化活性的相关性分析结果可为微生物酵素产品的研发优化提供有用参考。

## 参考文献

- 1 Jiang ZL. Study on fermentation mechanism, metabolic process and biological activity of natural microbial enzymes [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University(浙江理工大学), 2013.
- 2 Wang ZD. Research progress on microbial enzymes [J]. Agr Sci Tech Equip(农业科技与装备), 2015, 254(8): 67-68.
- 3 Cheng YJ, Chen XW, Jiang LX, et al. Evaluation of changes in amino acids in fermented Jiaosu of *Cudrania tricuspidata* green fruits with different fermentation periods [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 1402-1409.
- 4 Sha RY, Wang ZZ, Chen XW, et al. Changes in functional components of pitaya enzymes during fermentation and their correlation with antioxidant [J]. Bio Res(生物资源), 2018, 40: 208-217.
- 5 Dong YM, He CF, Wang L, et al. Preliminary study on the biological activity of pitaya enzyme [J]. Food Sci Tech(食品科技), 2009, 34: 192-196.
- 6 Guan ZR, Tian R, Zhao N, et al. Study on the change of antioxidant activity in the process of blueberry enzyme fermentation [J]. Mod Food Sci Tech(现代食品科技), 2016, 32(12): 74-80.
- 7 Wang J, Liu XL. Detection and research on biological activity of mulberry enzyme [J]. China Condient(中国调味品), 2018, 43(2): 28-31.
- 8 Shu C, Wu CS, Zhong CP, et al. Progress in research methods of microbial diversity in fermented foods [J]. Food Sci(食品科学), 2013, 34: 397-402.
- 9 Xu WT, Guo X, Luo YB, et al. Advances in research on microbial flora diversity analysis methods [J]. Food Sci(食品科学), 2009, 30: 258-265.
- 10 Du LP, Liu Y, Jiao CY, et al. PCR-DGGE analysis of microbial diversity in papaya enzyme natural fermentation process [J]. Mod Food Sci Tech(现代食品科技), 2017, 33(8): 80-87.
- 11 Wu C, Wang CX, Wang XD, et al. Application of high-throughput sequencing technology in the study of microbial diversity of winemaking [J]. Food Sci(食品科学), 2019, 40: 357-364.
- 12 Wu LH. Application of high-throughput sequencing technology in food microbiology research [J]. Chin J Biotechnol(生物工程学报), 2016, 32: 1164-1174.
- 13 Lee MH, Lee YC, Kim SS, et al. Quality and antioxidant activity of ginseng seed processed by fermentation strains [J]. J Ginseng Res, 2015, 39: 178-182.
- 14 Cheng T, Liu H, Zou H, et al. Enzymatic process optimization for the *in vitro* production of isoprene from mevalonate [J]. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 8.
- 15 Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. Nat Genet, 2008, 40: 1413-1415.
- 16 Pitta DW, Pinchak WE, Dowd SE, et al. Rumenbacterial diversity dynamics associated with changing from bermuda grass hay to grazed winter wheat diets [J]. Microb Ecol, 2010, 59: 511-522.
- 17 Vishnivetskaya TA, Layton AC, Lau MCY, et al. Commercial DNA extraction kits impact observed microbial community composition in permafrost samples [J]. Fems Microbiol Ecol, 2014, 87: 217-230.
- 18 Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data [J]. Bioinformatics, 2016, 32(18): 2847.
- 19 Jiang ZL, Mao JW, Huang J, et al. Changes in antioxidant activity of blueberry-ferment during natural fermentation process [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技), 2013, 2: 194-197.
- 20 Guan ZR, Tian Y, Zhao N, et al. Changes in antioxidant activity of blueberry Jiaosu during fermentation [J]. Mod Food Sci Tech(现代食品科技), 2016, 12: 80-86.