

传统发酵食品中功能酶的研究进展

王钰瑶, 张婧, 易卓林, 赵海, 马懿

Research Progress of Functional Enzymes in Traditional Fermented Food

WANG Yuyao, ZHANG Jing, YI Zhuolin, ZHAO Hai, and MA Yi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020301>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

传统发酵食品中微生物多样性与风味形成之间关系及机制的研究进展

Research Progress on Relationship and Mechanism between Microbial Diversity and Flavor Development in Traditional Fermented Foods

食品工业科技. 2021, 42(9): 412-419 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070365>

基于高通量测序技术分析东北豆酱的微生物多样性

Analysis of Microbial Diversity of Northeast Soy Sauce Based on High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2020, 41(12): 100-105 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.12.016>

基于高通量测序的江西特色发酵豆豉中微生物群落多样性及其特征分析

Diversity and Characteristics of Microbial Community in Fermented Douchi from Jiangxi Province Using High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2019, 40(3): 85-89,96 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.014>

基于传统培养和高通量测序方法分析羊肉加工过程中的菌群多样性

Analysis of Microbial Diversity in Mutton Processing Based on Traditional Culture and High-Throughput Sequencing

食品工业科技. 2020, 41(9): 95-101,107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.015>

浓香型白酒大曲在发酵和成熟过程中主要功能酶活力分析

Activities analysis of main functional enzymes from strong-flavour Daqu of Chinese liquor during fermentation and storage stages

食品工业科技. 2018, 39(11): 270-274,286 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.11.046>

基于16S rDNA高通量测序技术分析北京豆汁儿微生物多样性和功能预测的研究

Analysis of Microbial Diversity and Functional Prediction of Douzhi Based on 16S rDNA High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2020, 41(2): 95-100 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.016>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王钰瑶, 张婧, 易卓林, 等. 传统发酵食品中功能酶的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 387-393. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020301

WANG Yuyao, ZHANG Jing, YI Zhuolin, et al. Research Progress of Functional Enzymes in Traditional Fermented Food [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 387-393. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020301

· 专题综述 ·

传统发酵食品中功能酶的研究进展

王钰瑶^{1,2}, 张婧³, 易卓林², 赵海², 马懿^{1,*}

(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 四川宜宾 644000;

2. 中国科学院成都生物研究所, 四川成都 610041;

3. 成都海关技术中心, 四川成都 610041)

摘要: 传统发酵食品是通过微生物发酵产生各种各样的功能酶和丰富风味物质的食品。发酵食品的生产过程不断富集丰富的酶资源, 如何对这些功能酶体系进行系统和科学的研究是当前的研究热点。本文整理了传统分离培养对发酵食品中功能酶的研究, 发现该方法能研究其中关键功能酶的酶活。重点整理了近年来基于 16S rRNA 和 ITS 测序的 PICRUSt 分析、宏基因组、宏转录组和宏蛋白组等高通量技术对发酵食品功能酶的研究, 发现单一高通量技术相对传统筛选培养技术能获取更多的功能酶信息、解析复杂的酶代谢通路及识别活跃的功能酶。还整理了多种高通量技术组合对功能酶的研究, 发现不同手段获取的信息能更深入全面地解析食品的发酶过程。也发现有研究者在高通量技术分析基础上, 通过异源表达进行传统食品的具体功能酶的研究。本文全面总结了各种传统发酵食品中功能酶系的研究结果和方法近况, 旨在为传统发酵食品的功能酶研究与应用提供技术参考。

关键词: 传统发酵食品, 功能酶, 传统分离培养, 高通量测序技术

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0387-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020301



本文网刊:

Research Progress of Functional Enzymes in Traditional Fermented Food

WANG Yuyao^{1,2}, ZHANG Jing³, YI Zhuolin², ZHAO Hai², MA Yi^{1,*}

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin 644000, China;

2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Science, Chengdu 610041, China;

3. Chengdu Customs Technology Center, Chengdu 610041, China)

Abstract: Traditional fermented foods could produce a variety of functional enzymes and plenty of flavor compounds through microbial fermentation. The production process of fermented foods would be constantly enriched with abundant enzymes, and it is the current hotspot to study these functional enzymes systematically and scientifically. In this study, the traditional isolation and culture of functional enzymes from fermented food are analyzed, and it can identify the enzyme activity of key functional enzymes. Furthermore, this work summarizes the recent research on functional enzymes in fermented foods by high-throughput technologies, such as PICRUSt analysis based on 16S rRNA and ITS sequencing, metagenome, metatranscriptome and metaproteome. It is found that, compared to analysis by traditional isolation and culture, single high-throughput technology can obtain more functional enzymes information, analyze complex metabolic pathways and identify active functional enzymes. The research on functional enzymes by combinations of high-throughput technologies is also reviewed, and it is found that combination of different methods can obtain more information to analyze the fermentation process of traditional food comprehensively and deeply. It is also found that, based on analysis of high-throughput technology, some researchers have analyzed the specific functional enzymes in traditional foods by heterologous expression. This

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 西部之光人才计划项目 (2020XBZG_XBQNXZ_A_001)。

作者简介: 王钰瑶 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 962981006@qq.com。

* 通信作者: 马懿 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 191066789@qq.com。

study comprehensively summarizes results and methods of functional enzymes in various traditional fermented foods, aiming to provide technical foundation for the research and application of functional enzymes in traditional fermented foods.

Key words: traditional fermented foods; functional enzymes; traditional isolation and cultivation; high-throughput sequencing technology

人类利用发酵技术对食品进行保藏和加工的历史记载数不胜数,发酵工艺和饮食文化也因为自然环境、地理位置和民俗文化而有所异同。传统发酵食品如白酒、酱油、泡菜等深受大众喜爱,在众人的饮食习惯中占有重要地位^[1-2]。这些传统发酵食品的制作与微生物各种代谢途径和复杂的酶催化有着密切的联系,赋予了发酵食品各式各样独特的风味特点。不同的发酵食品中的微生物群落组成不同,其产生的功能酶系也不同。早期,研究者一般通过分离粗酶的方式去研究传统食品发酵过程中的功能酶系,确认了它们的重要贡献。如曲霉的蛋白酶和糖化酶在发酵过程中直接影响着酱油品质^[3-4];酵母菌产生系列脂酶等酶系促进白酒特殊风味物质的产生^[5]。然而这种方法研究能获得的信息有限。随着高通量测序技术的快速发展,人们获得了更多关于发酵食品中的核心微生物菌落构成,初步解析群体微生物在发酵过程中的关键的代谢通路和功能酶系,为传统发酵食品风味物质的合成和代谢提供理论依据。目前,常见功能酶系研究的高通量检测手段包括 16S rRNA 扩增子分析、宏基因组、宏转录组和宏蛋白质组分析,为深入解析发酵食品的潜在分子机制提供重要技术支持^[6]。本文总结回顾了近年来传统研究方法和高通量测序技术对传统发酵食品中功能酶系的预测和分析应用研究,为提升发酵食品工艺和产品品质奠定基础。

1 传统研究方法

1.1 粗酶液分析法

在食品发酵过程中微生物通过产生大量功能酶,催化了一系列复杂风味化合物的产生。早期,研究者直接通过生化方法分离获得发酵过程中产生的粗酶液,并研究了其中一大类酶的酶学性质。孙冰玉等^[7]通过研究不同发酵时间的发酵腐乳的粗酶液的酶活,在发酵前期腐乳坯阶段蛋白酶中的碱性蛋白酶活力高,在发酵后期成品阶段中性蛋白酶活力更高,而谷氨酰胺酶在前期显著上升而在后期保持恒定。Tian 等^[8-9]用不同提取液获取酱油豆曲中粗酶,研究了其中的蛋白酶、淀粉酶、氨基肽酶等关键酶系,结果表明用蒸馏水代替缓冲液提取粗酶的酶活更简便,且酶活大部分无明显差异,同时,也表明酱油的鲜味与米曲霉的碳水化合物降解酶的活性呈正相关。王奕博等^[10]对淡豆豉前发酵过程进行分析发现中性蛋白酶、纤维素酶活力总体呈上升趋势,碱性蛋白酶、脂肪酶活力先上升后下降,因此可将蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶的活力变化作为淡豆豉发酵过程

进行控制的酶指标。粗酶液分析能直接、简便、真实反映发酵食品在发酵过程中产生的功能酶,通过对其中各种酶类的分析初步评估发酵食品的品质和风味。但是该方法研究的酶系数量有限,只能分析如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等同种功能酶的综合作用,具体酶功能及代谢参与研究不深入,获取的信息相对较少。

1.2 传统分离培养

传统分离培养是指先分离纯化发酵食品中的产酶菌株,然后解析菌株产生的功能酶系。该方法通常利用选择培养基筛选能产生功能酶分解特定底物的微生物,然后对该菌株产生的粗酶进行酶学性质分析。周婉婷等^[11]从豆豉中筛选出高产蛋白酶活菌株 B3,确定了 B3 菌株中与豆豉发酵关键增鲜脱苦风味酶相关的功能基因及其编码的蛋白酶和肽酶。刘学等^[12]从浓香大曲中筛选出 1 株产甘露聚糖酶的嗜热小孢根霉菌 HBFH10,然后克隆这个新型甘露聚糖酶基因,并在毕赤酵母中异源表达后获得重组酶 RmMan134。随后用重组酶液处理果浆,提高了多种果汁的澄清度,证实该甘露聚糖酶在果汁加工中具有较好的应用前景。

此外,在苹果醋^[13]、四川豆瓣酱^[14]、清香型大曲^[15]等其他发酵食品的研究中,大量研究者通过传统分离培养的方法分离各种产酶微生物,确认了乙醇脱氢酶、蛋白酶等功能酶系在食品发酵中的重要作用以及动态变化(详见表 1)。该方法能够从传统的发酵食品中挖掘到特定的酶系,但对于不可培养的微生物而言,该方法存在缺陷导致无法获得目的酶基因。因此,为了更精准解析功能酶的具体作用,以及分析难以通过微生物纯培养获取的功能酶价值,在研究中,需要采用一些能直接获得酶基因并进一步进行酶功能分析的方法。

2 高通量测序技术

2.1 基于 16S 和 ITS 测序进行微生物酶功能预测

PICRUSt 全称为 Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States,是最早被开发的基于 16S rRNA 基因序列预测微生物群落和分析微生物功能酶系的方法^[29]。该方法将测序获得的微生物与已公布的物种序列比对,推断微生物潜在的代谢功能和功能酶系。周亚澳等^[30]基于 16S 测序结果利用 PICRUSt 软件对宜昌腊肠中细菌的基因功能进行预测,并进行 KEGG 功能注释,预测结果表明细菌在碳水化合物代谢、多糖生物合

表 1 近年传统发酵食品中功能酶的种类及作用研究概况

Table 1 An overview of the types and functions of functional enzymes in traditional fermented foods in recent years

传统发酵食品	研究方法	研究内容	参考文献	
豆制品	豆豉	粗酶液分析、宏基因组学	从豆豉发酵阶段蛋白酶、淀粉酶、糖化酶的酶活力较高, 发酵关键酶的酶活力总体上均呈下降趋势	[16]
	酱油	传统分离培养	分解蛋白的酶类(中性蛋白酶、酸性蛋白酶、氨肽酶), 降解碳水化合物酶类(糖化酶、淀粉酶、葡萄糖苷酶)等在米曲霉制成的大曲中活性高, 对后期酱油发酵有益	[3-4]
酒	浓香型白酒酒醅	宏转录组学	对浓香型白酒中重要风味物质乙醇、乙酸和乳酸的合成代谢途径、表达基因的功能特性和重要呈香脂肪酸的合成代谢途径进行研究, 分析得到大量参与这些代谢通路的关键酶	[17]
	清香型大曲	宏蛋白质组学	对酿造所使用的3种中高温大曲进行蛋白质组学分析, 研究米根霉作为产糖化酶的功能菌	[18]
	发酵枣酒	宏基因组学	碳水化合物代谢及氨基酸代谢通路最活跃。糖苷水解酶和糖基转移酶数量占据枣酒酒醅碳水化合物活性酶的70%。氨基酸经过不同的转氨酶、酮酸转化酶转化为相应酯类, 具备形成酯香风味的基础	[19]
	黄酒	宏基因组学	曲霉的纤维素1, 4- β -纤维二糖苷酶和纤维素酶可降解纤维素, 脱羧酶对黄酒中高级醇的形成至关重要	[20]
醋	镇江香醋	宏基因组学、宏转录组学	用多组学技术系统研究了香醋种醋的功能基因。结果显示种醋微生物的酶基因是参与碳水化合物代谢和氨基酸代谢的代谢通路为主, 基于各代谢通路和物质合成还构建了原料分解及风味合成的代谢网络	[21]
	苹果醋	分离培养	乙醇氧化为乙醛的乙醇脱氢酶和将乙醛再氧化成醋酸的乙醛脱氢酶实现食醋酿造	[13]
蔬菜	泡菜	宏转录组学、基于16S rRNA的PICRUST预测	分析得碳水化合物代谢和氨基酸代谢最为活跃, 糖苷水解酶和糖基转移酶表达的基因最多	[22]
		宏转录组学	泡菜发酵过程中编码碳水化合物水解相关酶的基因的随着发酵的进行而逐渐活跃	[23]
	香肠	16S rRNA测序	对广味香肠自然发酵过程中细菌群落结构和演变进行研究	[24]
肉制品	羊肉香肠	宏基因组学	经KEGG数据库注释后, 发现有参与尸胺、腐胺、精胺和亚精胺代谢的酶, 有参与降解色胺、苯乙胺和酪胺代谢的酶, 没有代谢组胺的酶	[23]
	酸鱼	宏基因组学	羧基酯酶、醇脱氢酶和醇酰基转移酶催化脂的合成提供风味	[25]
茶	普洱	16S、18S rRNA、蛋白质组学	研究固态发酵的普洱茶碱性蛋白酶, 内切-1, 4- β -木聚糖酶, 果胶裂解酶和果胶酯酶等与多糖的降解和果胶的水解相关, 且这可能与普洱茶的醇厚味道有关	[26]
		宏基因组学	在普洱茶发酵过程中, 共有78个编码酶的基因存在于16个途径中, 这些途径与“萜烯和聚酮代谢”和“其他次级代谢物的生物合成”有关	[27-28]

成和代谢方面的酶系更为丰富, 这些都与乳酸杆菌的相对丰度显著相关。熊香元等^[31]在米粉发酵过程中使用 PICRUST 进行了酶基因功能预测, KEGG 分析预测到与糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢等与食品风味形成相关的代谢途径丰度更高。且活跃酶更多, 如异构酶中的磷酸甘油酸变位酶、氧化还原酶类中的 L-乳酸脱氢酶和水解酶类中的金属肽酶等。

近期, 停止更新的 Greengene 数据库限制了 PICRUST 的功能预测范围, 满足不了当前的研究需求, 于是开发团队升级了软件, 正式公布了 PICRUST2^[32]。升级后的 PICRUST2 将待预测的 OTU 代表序列置于软件已有的系统发育树进行物种注释, 使得 PICRUST2 不但可以用于 16S 细菌、古菌的功能预测, 也可以用于 18S、ITS 真菌、藻类的功能预测, 这些物种的数据库也在不断更新。王阿利等^[33]基于 16S rRNA 测序和 ITS1 测序技术进行酱油发酵体系中的微生物多样性、群落组成、预测功能的分析, 结果表明酱油发酵体系中的细菌功能主要集中在氨基酸代谢途径, 真菌功能主要集中在由曲霉具有的淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶等多种复合酶系参与的脂肪和碳水化合物代谢。这一方法也使用在泡菜^[22]、香肠^[24]的酶功能预测中。

PICRUST 是测序后利用物种注释匹配至数据库进行功能基因预测, 其准确度一定程度上取决于物种注释结果和数据库的相似度。因此, PICRUST 可以对菌群功能和酶功能进行初步预测, 为后续研究提供

大致方向。但是该方法预测结果不能真实反应发酵过程功能酶系的变化趋势, 预测结果与实际酶基因转录表达情况存在较大差别。

2.2 宏基因组测序分析

宏基因组学是指特定环境中全部微小生物遗传物质的总和, 其中包括可培养的和不可培养的微生物^[34]。该方法绕过菌种分离纯培养, 实现从 DNA 水平直接地获得元基因组数据, 系统地分析发酵食品微生物的代谢、群落之间的相互作用及对环境的反应机制。

在白酒酿造中, 利用宏基因组学技术手段研究对发酵过程中的酶系进行分析和预测。如 Zhang 等^[35]对浓香型大曲发酵过程进行宏基因组测序, 并对其中 40.66% 的个体特征进行了分类和注释, KEGG 注释及相关网络分析, 表明淀粉酶活性与许多碳代谢相关途径呈正相关, 其中 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶丰度最高, 这些功能酶信息为提高和稳定大曲质量提供了理论依据。此外, Yang 等^[36]将中温大曲发酵过程的宏基因组测序结果也进行 KEGG 分析, 获得了注释代谢途径和酶的绝对标准化丰度列表, 可视化了发酵过程中主要微生物分类群与特定功能酶之间的相互联系, 其中推测阿魏酸裂解酶有助于风味物质的形成与积累。

除此以外, 在其他如羊肉香肠^[23]、酸鱼^[25]、醋^[21]、普洱茶^[27-28]、其他发酵酒^[19-20, 37]等发酵食品的研究中也有研究者使用宏基因组学分析了发酵过程中功

能酶系,基于功能酶的动态变化或对风味物质的影响来对这些发酵食品的发酵工艺进行指导。基于功能酶基因注释,宏基因组检测也可以解析产品某些特性,如有助于风味物质产生的功能基因簇和途径。此技术对认识和利用95%以上的未培养微生物提供了一条有效的途径。总体而言,宏基因组更偏向于定性分析,相较其它测序方法能获得更广的功能酶信息,但是无法真实反应微生物的功能酶系的活跃状态。

2.3 宏转录组测序分析

基于DNA的分析方法不能区分微生物的生存状态。存在于发酵原料中,不论死或者活微生物的DNA,在整个发酵过程中都长期稳定存在(且可扩增)。因此,需要利用另一种技术方法来确保检测到的微生物是存活且具有代谢活性的。

宏转录组学是指特定时期的环境样本或组织样本中所有的微生物的RNA的集合。以所得全部RNA为研究对象进行宏转录组测序。这种技术具有宏基因组技术的许多优点,还能检测环境中的活性微生物与转录本并对活性功能进行分析,进而比较不同环境下的差异表达基因和差异功能途径,对研究发酵食品的微生物及其产酶特性具有更深的分析深度^[38-39]。

如今宏转录组测序技术已经广泛被应用来检测各种传统食品(如泡菜^[40-41]、镇江香醋^[21]、和各种香型白酒^[42-43]等)发酵过程中微生物和酶系的多样性,为功能菌株的筛选和分离、风味酶的表达和表征提供了有价值的参考(见表1)。Zhao等^[44]采用宏转录组学的技术对四川工业萝卜泡菜在发酵过程中的活跃功能酶基因进行KEGG注释,随发酵时间增加,代谢途径相关基因丰度上升,其中的碳水化合物和氨基酸代谢活跃,这些代谢途径的丰度增加可能与工业萝卜泡菜风味形成有关(糖基转移酶和葡萄糖苷水解酶主导发酵过程且助于风味形成)。Yi等^[45]基于宏转录组对浓香型白酒大曲宏转录组数据进行注释,存在超过996种碳水化合物活性酶系,其中表达最多的糖苷水解酶主要分为纤维素酶、细胞壁延伸酶、细胞壁脱支酶和寡糖降解酶,研究它们在降解白酒发酵中的协同作用,为优化白酒生产和质量提供方法。

利用宏转录组测序技术对传统食品发酵过程中的酶系进行分析时,对测序样品本身RNA的质量有一定的要求。实际环境中RNA稳定性不高,如提取的RNA质量相对较低,将对测序结果产生不利影响,而且这是一个瞬时状态下生物信息的提取,这也是宏转录组测序所获得信息相较宏基因组更少的一个原因。

2.4 宏蛋白质组学分析

宏蛋白质组学是通过大规模地定性和定量分析蛋白质,从而分析环境中的微生物群落的一门学科。但由于其蛋白提取的复杂性,目前还处于不断完善阶段。但蛋白水平的研究可用于探索特定时间点发酵过程在蛋白质水平上的关键微生物、关键酶、代谢途

径、功能蛋白标志物和蛋白质相互作用,并增强对生态系统的理解^[46]。宏蛋白质组学可以进行微生物群落的一致性、活性和功能分析,能够提供宏基因组无法获取的信息。

为了研究多种糖化酶对中国白酒发酵的协同作用,Wang等^[47]通过宏蛋白质组学分析鉴定了白酒发酵时酒醅中的51种碳水化合物水解酶,且发现酒醅中80%的酶来自酒曲。酒曲中的曲霉、根霉和毛霉所产的 α -淀粉酶和葡糖淀粉酶与发酵过程中的淀粉水解和乙醇生产呈正相关,是白酒发酵中与酒精发酵相关的关键糖化酶。通过宏蛋白质组确定多种糖化酶对白酒发酵中酒精产量的协同作用,为后续添加糖化酶的比例来提高糖化和酒精发酵的效率提供理论依据。范伟业^[48]利用宏蛋白质组学技术对浓香大曲中的功能酶蛋白进行组成分析,揭示了浓香大曲中参与氧化还原过程这一生物途径的酶的数量最多,与生产风味物质途径的酶一样,都与酱香型白酒的酶类相差甚远。此外,也有学者利用宏蛋白质组对清香型白酒大曲^[18,49]、酱香型白酒^[50-51]及普洱茶^[26]中的功能酶系及其作用进行了研究分析,具体见表1。

然而宏蛋白质组测序由于样本需要提取后的蛋白达到标准后才能用于分析,又由于微生物群落的复杂性和异质性,目前宏蛋白质组学研究构建的序列数据库数量不多。因此,将宏蛋白质组用于发酵食品中酶的研究是一件相对不太成熟的研究方法。不过随着蛋白质组学被应用得越来越多,相信未来蛋白质组学会建立更多特异性的数据库供给使用,越来越多地用于发酵食品的研究中。

2.5 多项技术交叉运用

上述多种研究方法由于技术的差异获取酶系信息有差异,从粗酶和纯培养只能研究少数几类酶的性质,而后续发展的高通量测序技术能获得到更庞大的酶基因功能信息,不同的技术所能获得的酶信息数据数量差异显著。如表2所示,通过扩增子测序技术和基于16S rRNA数据库的PICRUSt预测,在发酵米粉的15个样中,可能存在1400余种酶基因,但其预测结果与实际酶基因转录表达情况存在较大差别。通过宏基因组,不仅能确认功能酶基因的存在,而且发现数量还远大于基于扩增子的预测分析,如在浓香白酒大曲中发现265147个功能注释的酶基因,但是该方法难以反应微生物功能酶系的活跃状态。而宏转录组和宏蛋白质组可有效解析发酵系统中存在的活跃功能酶系,但由于测序样本提取难度大,测序获取的数据量信息有限,因此相较于宏基因组,宏转录组和宏蛋白质组测序后获取的功能酶量偏少;如通过宏转录组在酱香型大曲发酵中发现38899个基因,其中有230种碳水化合物活性酶;通过宏蛋白质组发现的更少,在汾酒大曲中仅鉴定成功了122个酶蛋白。

随着科技的发展,如今不再是仅仅寻求单一的

表 2 不同研究方法在发酵食品酶系数量差异对比

Table 2 Comparison of the differences in the number of enzymes in fermented foods by different research methods

研究方法	研究对象	分析结果	参考文献
粗酶液分析	腐乳	研究了蛋白酶和谷氨酰胺酶	[7]
传统分离培养	清香型白酒大曲	筛选了产中性蛋白酶、产淀粉酶的菌株	[15]
基于 16S rRNA 和 ITS 测序的 PICRUST 预测	发酵米粉	KEGG 数据库分析 15 个样品有 1400 余种酶, 其中转移酶类最多占 41.07%, 其次是水解酶类占 22.71%、氧化还原酶类占 12.31%, 其余是裂合酶类、异构酶类和合成酶类。主要富集在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、脂质代谢等新陈代谢中	[31]
宏基因组测序	浓香型白酒大曲	完整基因 265147 个, 在碳水化合物和氨基酸代谢两个次要通道中注释的单基因较多, 碳水化合物代谢类别中单基因为 30 个酶家族	[35]
宏转录组测序	酱香型白酒大曲	对酱香型大曲进行分析, 从中鉴定出共 38899 个单基因, 就碳水化合物代谢通路上, 能得到其中 230 种碳水化合物活性酶被鉴定为酱香型大曲在 70 °C 下的热稳定糖化酶	[42]
宏蛋白组测序	酱香型白酒大曲	强化高温大曲宏蛋白组图谱中共检测到了 89 个蛋白点, 成功鉴定 84 个, 总共 59 种蛋白质。普通型则检测到了 51 个蛋白点, 成功鉴定 43 个, 共有 32 种蛋白质	[51]
	汾酒	在鉴定成功的 122 个蛋白组中 56 个蛋白组分包括糖化酶、淀粉酶、木聚糖酶、葡萄糖苷酶、蛋白酶等	[49]

手段对传统发酵食品发酵过程中微生物酶进行研究分析, 而是常常多种方法一起使用, 从不同角度去获取生物酶信息并解析其对发酵的影响。学者李昊颖^[52] 利用微生物组分析得到米酒发酵过程中微生物群落明显的变化, 一些种属的丰度与发酵相关酶活性有较好的正相关性。宏蛋白组也分析得蛋白主要来源于原料和根霉属微生物, 其中来自根霉的葡萄糖淀粉酶-1 和蛋白酶-2 均在丰度与相关性上表现出与发酵过程高度相关性。后续在米酒发酵前添加蛋白酶, 实验结果表明酸性蛋白酶是米酒糖化酶系的重要组成部分之一, 在米酒初始糖化过程中会影响其发酵表现。Chun 等^[53] 通过结合宏基因组学、宏转录组学对甘让酱油的发酵进行分析, 揭示了蛋白酶、脂肪酶等酶参与发酵过程重要代谢途径, 如氨基酸代谢、TCA 循环代谢、脂质代谢。当多种研究方法共同使用时, 可以得到多个方面验证后的结果, 进行更系统深入地解析发酵过程。

利用高通量测序技术对发酵食品进行分析后将获得大量的功能酶序列, 如何将这些基因信息直观地表达并进行后续的研究以及应用, 则需要借助实验室分子克隆和蛋白质工程等技术。针对生产高效功能酶的未知菌, 为了获取纯酶以进行后续酶学性质分析, 利用合适的表达系统进行异源表达是一种操作简单、培养周期短且生产成本较低的有效方法。

Ali、Yi^[43] 所在的团队基于宏转录组学直接获取了浓香型大曲中的 β -葡聚糖酶和高表达热稳定的 α -淀粉酶基因 (*NFAmy13A* 和 *NFAmy13B*), 将基因在大肠杆菌表达系统中进行异源表达后获取纯酶进行酶学性质分析研究, 证实了在大曲内两个淀粉酶基因之间的高效竞争协同作用。岳晓平等^[54] 通过对发酵豆制品样品进行宏基因组测序, 从中获得米曲霉酸性蛋白酶基因 *pepA*, 在毕赤酵母 GS115 中进行异源表达后, 分析重组蛋白酶的酶学特性, 为米曲霉来源的酸性蛋白酶规模化生产提供依据。

3 结论与展望

如今种类繁多的传统发酵食品, 大多依然保持着传统的生产工艺, 因此保持传统发酵食品的特色传

承以及进一步优化或自动化的需求被研究者越发重视。这些特性的研究、传承与进一步更新都与其中的微生物所产生的酶在发酵时参与的各种代谢密切相关。通过多种技术手段研究分析, 发现豆制品如酱油、腐乳的发酵中高酶活力的蛋白酶、谷氨酰胺酶等酶决定了最终发酵产品的质量与风味构成。发酵酒中的碳水化合物代谢途径中的糖苷水解酶、氨基酸代谢通路的转氨酶和风味形成相关的酯化酶对酒质的影响极大。发酵醋的乙醛脱氢酶的表达量较高, 参与氨基酸代谢的酶基因会更为活跃。发酵蔬菜中水解相关酶类也会随着发酵的进展而更加活跃。肉制品的发酵会产生降解生物胺的酶与催化酯合成的酶类如羧基酯酶。普洱此类发酵茶会因为活跃的果胶酯酶和木聚糖酶等酶类参与多糖降解及果胶水解代谢而产生醇厚的香气。然而这些研究所采用的技术还存在不同的局限性, 包括以下几点:

a. 传统分离培养仅能研究可培养微生物所产生的同种类酶; b. 基于 16S rRNA 和 ITS 测序的 PICRUST 分析预测所得结果与实际酶基因表达存在差异; c. 宏基因组无法区分微生物功能酶的活跃状态; d. 宏转录组的样品收集难度大; e. 宏蛋白组取样困难且数据库构建不完全, 在进行比对预测时信息获取度低。因此在实际应用中, 需要结合研究目的对使用的技术进行选择, 尽可能采取更多的研究手段才能更准确地对发酵食品的发酵机理和质量控制进行研究探讨。最后还可以在高通量技术分析基础上, 通过异源表达对传统食品的具体功能酶进行获取与研究, 为从发酵食品中获取可工业化生产的酶制剂提供理论依据与实践基础。

参考文献

- [1] EL SHEIKHA A F, HU D M. Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(1): 11-32.
- [2] TAMANG J P, WATANABE K, HOLZAPFEL W H. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages[J]. Front Microbiol, 2016, 7.
- [3] 路怀金. 米曲霉的酶系特性及其对酱油风味品质影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [LU H J. Comparison of differ-

- ent *Aspergillus oryzae* strains enzyme profiles and their effects on flavor quality of soy sauce[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]
- [4] 路怀全, 刘通讯, 赵谋明, 等. 2株米曲霉的特色酶系对酱油理化指标及品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(5): 230-237. [LU H J, LIU T X, ZHAO M M, et al. Effects of enzyme profiles of two different *Aspergillus oryzae* strains on physicochemical indexes and quality of soy sauce[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(5): 230-237.]
- [5] 袁海珊, 刘功良, 白卫东, 等. 产酯酵母在发酵食品中的应用研究进展[J]. *中国酿造*, 2023, 42(1): 15-20. [YUAN H S, LIU G L, BAI W D, et al. Research progress on the application of ester-producing yeast in fermented food[J]. *China Brewing*, 2023, 42(1): 15-20.]
- [6] WANG J, WANG R, XIAO Q, et al. Analysis of bacterial diversity during fermentation of Chinese traditional fermented chopped pepper[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2019, 69(5): 346-352.]
- [7] 孙冰玉, 邹丽宏, 刘颖, 等. 克东腐乳生产过程中酶活力的变化[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(6): 226-230. [SUN B Y, ZOU L H, LIU Y, et al. Changes of enzyme activity of KeDong fermented soybean curds during the production[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(6): 226-230.]
- [8] TIAN Y, CHEN Y, TONG X, et al. Flavor differences of soybean and defatted soybean fermented soy sauce and its correlation with the enzyme profiles of the kojis[J]. *Journal of the Science of Food And Agriculture*, 2023, 103(2): 606-615.]
- [9] TIAN Y, FENG Y, ZHAO M, et al. Comparison and application of the extraction method for the determination of enzymatic profiles in matured soybean koji[J]. *Food Bioscience*, 2022, 49: 101875.]
- [10] 王奕博, 钟荣荣, 范亚楠, 等. 淡豆豉前酵过程中蛋白酶纤维酶脂肪酶变化规律[J]. *中国现代中药*, 2022, 24(9): 1754-1759. [WANG Y B, ZHONG R R, FAN Y N, et al. Changes in protease, cellulase and lipase during the pre-fermentation of sojoe semen praeparatum[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2022, 24(9): 1754-1759.]
- [11] 周婉婷, 侯宏伟, 贺瑞琦, 等. 豆豉中产蛋白酶菌株的酶学性质及风味酶基因挖掘[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(24): 181-193. [ZHOU W T, HOU H W, HE R Q, et al. Enzymatic properties of protease-producing strains in Douchi and mining of flavoenzyme genes[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(24): 181-193.]
- [12] 刘学, 韩璞, 陈伟, 等. 嗜热小孢根霉 GH134 家族甘露聚糖酶基因的克隆表达及在果汁加工中的应用[J/OL]. *食品科学*, 2023: 1-11. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.2012.024.html>. [LIU X, HAN P, CHEN W, et al. Cloning and expression of a novel GH134 β -mannanase gene from thermophilic fungus *Rhizopus microsporus* and its application in juice processing[J/OL]. *Food Science*, 2023: 1-11. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.2012.024.html>.]
- [13] 陈伟. 优质醋酸菌的选育、苹果醋酸发酵规律及酶活影响的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2002. [CHEN W. Study on selection of higher quality acetic acid bacteria, fermentative pattern and enzyme activity in vinegar fermentation of apple juice[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2002.]
- [14] 冯璐. 四川郫县传统发酵豆瓣酱安全生产菌种的筛选及生产性能评价[D]. 大连: 大连工业大学, 2021. [FENG L. Screening of safe starter culture strains and evaluation of production performance of traditional fermented doubanjiang in Pixian, Sichuan[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2021.]
- [15] 冯利芳, 李素琴, 刘鹏烩, 等. 清香大曲中性蛋白酶产生菌的分离鉴定及应用研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(11): 1-6. [FENG L F, LI S Q, LIU P H, et al. Isolation, identification and application of bacteria producing neutral protease from light-flavor Daqu[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(11): 1-6.]
- [16] 赵文鹏, 李浩, 杨慧林, 等. 曲霉型豆豉发酵阶段细菌群落的演替及其与环境因子的关系[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 138-144. [ZHAO W P, LI H, YANG H L, et al. Bacterial community succession during the fermentation of *Aspergillus*-type Douchi, a traditional Chinese fermented soybean product, and its relation with environmental factors[J]. *Food Science*, 2021, 42(4): 138-144.]
- [17] 王康丽. 基于宏转录组学的浓香型酒醅微生物群落多样性及代谢特征研究[D]. 郑州: 郑州轻工业大学, 2021. [WANG K L. Study of the diversity and metabolic characteristics of microbial community harbored in fermented grains for the Chinese strong-flavor Baijiu production based on metatranscriptome[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2021.]
- [18] 张秀红, 张武斌, 段江燕. 宏蛋白质组学方法对清香大曲蛋白分析[J]. *食品科技*, 2015, 40(9): 258-264. [ZHANG X H, ZHANG W B, DUAN J Y. Identification of crude proteins from Daqu (yeast for making hand liquor) for light-fragrant Chinese liquor by proteomics method[J]. *Food Science and Technology*, 2015, 40(9): 258-264.]
- [19] 夏亚男, 双全. 基于宏基因组技术分析固态发酵枣酒酒醅的微生物多样性及关键风味基因[J]. *食品科学*, 2022, 43(2): 192-198. [XIA Y N, SHUANG Q. Metagenomic analysis of microbial diversity and key flavor-related genes in solid-state fermented jujube mash for jujube wine[J]. *Food Science*, 2022, 43(2): 192-198.]
- [20] LIU S, CHEN Q, ZOU H, et al. A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development in Shaoxing mechanized Huangjiu fermentation mashes[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 303: 9-18.]
- [21] 黄婷. 镇江香醋酿造微生物功能解析及酿醋人工菌群构建[D]. 无锡: 江南大学, 2022. [HUANG T. Functional analysis of microbial community of Zhenjiang aromatic vinegar and construction of a defined starter for acetic acid production[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.]
- [22] 肖阳生. 四川泡菜功能微生物代谢调控机理的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2020. [XIAO Y S. Study on the mechanism of functional microorganisms in metabolism regulation during Sichuan Pao-cai fermentation[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.]
- [23] 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/OL]. *食品科学*, 2022: 1-12. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.1918.010.html>. [WU S H, NIU Y, HE J K, et al. Analysis of microbial diversity and biogenic amine metabolism in naturally fermented muttunsausage based on metagenome technology[J/OL]. *Food Science*, 2022: 1-12. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221229.1918.010.html>.]
- [24] 王新惠, 张雅琳, 孙劲松, 等. 基于高通量测序技术分析广味香肠中细菌群落结构和演替规律[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(3): 334-340. [WANG X H, ZHANG Y L, SUN J S, et al. Bacterial community structure and succession law in cantonese sausage based on high-throughput sequencing technology[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(3): 334-340.]
- [25] ZANG J, YU D, LI T, et al. Identification of characteristic flavor and microorganisms related to flavor formation in fermented common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Food Research International*, 2022, 155: 111128.]
- [26] ZHAO M, ZHANG D L, SU X Q, et al. An integrated metagenomics/metaproteomics investigation of the microbial communities and enzymes in solid-state fermentation of Pu-erh tea[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 10117.]

- [27] 吕昌勇. 普洱茶渥堆发酵过程中微生物宏基因组学的测定与分析[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2013. [LÜ C Y. Microbial metagenomic study of puer tea during pile-fermentation[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2013.]
- [28] LYU C, CHEN C, GE F, et al. A preliminary metagenomic study of puer tea during pile fermentation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(13): 3165–3174.
- [29] LANGILLE M G I, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 814–21.
- [30] 周亚澳, 黄怡, 王韵博, 等. 宜昌腊肠与恩施腊肠细菌多样性的比较分析[J]. *肉类研究*, 2020, 34(10): 8–13. [ZHOU Y A, HUANG Y, WANG Y B, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in sausages from yichang and enshi[J]. *Meat Research*, 2020, 34(10): 8–13.]
- [31] 熊香元, 张立钊, 陈力力, 等. 米粉发酵过程中乳酸菌多样性及功能分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 85–91. [XIONG X Y, ZHANG L Z, CHEN L L, et al. Analysis of the diversity and function of lactic acid bacteria in fermented rice noodles during fermentation[J]. *Food Science*, 2020, 41(18): 85–91.]
- [32] DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J R, et al. PICRUST2 for prediction of metagenome functions[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(6): 685–688.
- [33] 王阿利, 王子谦, 魏梓晴, 等. 酱油酿造中微生物群落演替及其空间异质性研究[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(12): 257–266. [WANG A L, WANG Z Q, WEI Z Q, et al. Studies on succession and spatial heterogeneity of microbial community during the soy sauce fermentation process[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(12): 257–266.]
- [34] FRANZOSA E A, HSU T, SIROTA-MADI A, et al. Sequencing and beyond: Integrating molecular 'omics' for microbial community profiling[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(6): 360–372.
- [35] ZHANG Y T, DENG Y K, ZOU Y F, et al. Linking microbial functional gene abundance and Daqu extracellular enzyme activity: Implications for carbon metabolism during fermentation[J]. *Foods*, 2022, 11(22): 3623.
- [36] YANG Y, WANG S T, LU Z M, et al. Metagenomics unveils microbial roles involved in metabolic network of flavor development in medium-temperature Daqu starter[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 110037.
- [37] 赵驰. 基于宏基因组和代谢组学解析黑糯米酒发酵菌群与风味代谢网络研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021. [ZHAO C. Analysis of fermentation flora and flavor metabolism network of black glutinous rice wine based on metagenomics and metabolomics[D]. Guizhou: Guizhou University, 2021.]
- [38] BLAZEWICZ S J, BARNARD R L, DALY R A, et al. Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: Limitations and uses[J]. *ISME J*, 2013, 7(11): 2061–2068.
- [39] PORETSKY R S, BANO N, BUCHAN A, et al. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(7): 4121–4126.
- [40] 魏雯丽, 宫尾茂雄, 吴正云, 等. 基于宏转录组学技术解析工业豇豆泡菜发酵过程中活性微生物群落结构变化[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(10): 60–65. [WEI W L, MIYAO S, WU Z Y, et al. Analysis of active microbial community structure changes in industrial cowpea pickle fermentation based on meta-transcriptomics technology[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(10): 60–65.]
- [41] JUNG J Y, LEE S H, JIN H M, et al. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 163(2): 171–179.
- [42] YI Z, JIN Y, XIAO Y, et al. Unraveling the contribution of high temperature stage to Jiang-flavor Daqu, a liquor starter for production of Chinese Jiang-flavor Baijiu, with special reference to metatranscriptomics [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10.
- [43] ALI B, YI Z, FANG Y, et al. Characterization of a fungal thermostable endoglucanase from Chinese Nong-flavor Daqu by metatranscriptomic method[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 183–90.
- [44] ZHAO Y, WU Z, MIYAO S, et al. Unraveling the flavor profile and microbial roles during industrial Sichuan radish Paocai fermentation by molecular sensory science and metatranscriptomics[J]. *Food Bioscience*, 2022, 48: 101815.
- [45] YI Z, FANG Y, HE K, et al. Directly mining a fungal thermostable α -amylase from Chinese Nong-flavor liquor starter[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 30.
- [46] WILMES P, BOND P L. Metaproteomics: Studying functional gene expression in microbial ecosystems[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(2): 92–97.
- [47] WANG B, WU Q, XU Y, et al. Synergistic effect of multiple saccharifying enzymes on alcoholic fermentation for Chinese Baijiu production[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(8).
- [48] 范伟业. 宏蛋白质组学解析浓香型大曲酶系组成[D]. 无锡: 江南大学, 2021. [FAN W Y. Metaproteomic analysis of enzymatic composition in Nong-flavor Daqu[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.]
- [49] 张武斌. 清香大曲糖化酶的提取及宏蛋白质组学分析[D]. 太原: 山西师范大学, 2014. [ZHANG W B. The extraction of glucoamylase and metaproteome analysis of fragrance Daqu[D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2014.]
- [50] 黄永光. 酱香型白酒酿造中 *Aspergillus hennebergii* 及其分泌酸性蛋白酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014. [HUANG Y G. Study on secretome and acid protease of *Aspergillus hennebergii* from the brewing process of Moutai-liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.]
- [51] 刘龙山. 酱香型白酒高温大曲的宏蛋白质组学研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2016. [LIU L S. Metaproteomic research of high temperature Daqu of soy sauce aroma type liquor[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2016.]
- [52] 李昊颖. 基于组学的传统米酒发酵糖化过程相关酶研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022. [LI H Y. Study on enzymes related to saccharification process during the fermentation of traditional Chinese Mijiu based on omics[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.]
- [53] CHUN B H, HAN D M, KIM H M, et al. Metabolic features of Ganjang (a Korean traditional soy sauce) fermentation revealed by genome-centered metatranscriptomics[J]. *mSystems*, 2021, 6(4): e00441–21.
- [54] 岳晓平, 陈朋, 朱玥明, 等. 米曲霉酸性蛋白酶基因在毕赤酵母中的异源表达及酶学性质[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(3): 415–424. [YUE X P, CHEN P, ZHU Y M, et al. Heterologous expression and characterization of *Aspergillus oryzae* acidic protease in *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(3): 415–424.]