

豆酱微生物宏蛋白质组提取及分析

乌日娜^{1,2}, 薛亚婷¹, 张平¹, 唐筱扬¹, 陶冬冰¹, 岳媛媛¹, 张鹏飞¹, 陈卫^{2,*}

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了更进一步探索豆酱中微生物群体的功能, 实验利用分步提取法, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 建立了豆酱微生物宏蛋白质组表达谱, 并利用液相色谱-质谱/质谱联用技术对蛋白质进行鉴定。结果显示, 共鉴定出232种蛋白质, 可归为糖代谢60种、核酸代谢57种, 蛋白质代谢48种, 能量代谢15种, 脂质代谢3种, 其他功能蛋白质49种。来源于细菌的蛋白质数量几乎为来源于真菌蛋白质数量的3倍, 其中细菌来源以枯草芽孢杆菌、明串珠菌、粪肠球菌、肠膜明串珠菌和德氏保加利亚乳杆菌为主, 真菌来源以酿酒酵母、裂殖酵母、链孢霉、白腐菌和棉阿舒囊霉为主。

关键词: 豆酱; 宏蛋白质组; 蛋白质功能; 微生物来源

Metaproteomic Analysis of Traditional Fermented Soybean Paste in Northeast China

WU Rina^{1,2}, XUE Yating¹, ZHANG Ping¹, TANG Xiaoyang¹, TAO Dongbing¹, YUE Yuanyuan¹, ZHANG Pengfei¹, CHEN Wei^{2,*}

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to under the function of the microbial community in fermented soybean paste, we established a metaproteomic expression profile by stepwise extraction and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The proteins extracted were identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry-mass spectrometry (LC-MS/MS). Results obtained were as follows: the number of proteins identified in fermented soybean paste was 232, including 60 proteins participating in sugar metabolism, 57 proteins involved in nucleic acid metabolism, 48 proteins involved in metabolism, 15 proteins related to energy metabolism, 3 proteins related to lipid metabolism and 49 other functional proteins. The number of proteins derived from bacteria was almost three times as large as the number of proteins derived from fungi. Bacterial proteins were mainly derived from *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc*, *Fecal streptococcus*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Deshi Lactobacillus*, while fungal proteins mainly came from *Saccharomyces cerevisiae*, *Fission yeast*, *Alternaria*, white rot fungi and *Ashbya gossypii*.

Key words: fermented soybean paste; metaproteomics; protein function; microbiota

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714003

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)14-0017-07

引文格式:

乌日娜, 薛亚婷, 张平, 等. 豆酱微生物宏蛋白质组提取及分析[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 17-23. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714003. <http://www.spkx.net.cn>

WU Rina, XUE Yating, ZHANG Ping, et al. Metaproteomic analysis of traditional fermented soybean paste in northeast China[J]. Food Science, 2017, 38(14): 17-23. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201714003. <http://www.spkx.net.cn>

豆酱营养丰富、香气馥郁, 是东北很多家庭的必备食品, 而且传承着冬季做酱的传统习俗。豆酱的品质和风味与其中的微生物组成密切相关, 目前对豆酱中微生物

研究已经由纯培养菌种特性研究, 如乳酸菌^[1-3]、酵母菌^[4]、霉菌^[5]等, 转向利用变性梯度凝胶电泳技术、新一代测序技术等对其中微生物多样性进行研究^[6-8], 例如

收稿日期: 2016-06-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31471713); 中国博士后科学基金项目(2014M560395);

辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划项目(2014048); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目(LR2015059);

江苏省博士后科研资助计划项目(1402071C)

作者简介: 乌日娜(1979—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wrn6956@163.com

*通信作者: 陈卫(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: chenwei66@jiangnan.edu.cn

Nam等^[9]利用454焦磷酸测序技术对韩国豆酱细菌多样性进行了分析,提供丰富的物种组成信息。

宏蛋白质组学的概念是在宏基因组学^[10-11]概念的基础上提出的,他们有着共同的优点:将研究对象从单一微生物拓展到复杂的微生物群落,不再依赖于微生物培养^[12-14],但宏基因组学存在诸多限制:如DNA提取较困难,纯度要求高,克隆表达效率低,需要筛选完整的功能基因组,构建大片段的基因组文库十分复杂^[15];重复基因和基因表达的时空特异性也为研究增加了阻碍。转录也面临RNA易降解,萃取时产生的腐殖质难消除,即使相似的基因在不同群落的转录动力学也不同,RNA与相关蛋白质合成关联性低等问题^[16]。宏蛋白质组学的兴起很大程度上弥补了这些缺陷。其对于所研究微生物群体的限制性较小,鉴定蛋白质时无需标记,可通过反向遗传学推测氨基酸序列获得相应的编码基因信息,追踪复杂环境中微生物群体的功能^[17-18],对宏基因组学起到补充作用,将宏基因组数据和自然环境的生物过程联系在一起。宏蛋白质组学在蛋白质鉴定、种系发生以及微生物群体的功能性分析等方面都更具优势^[19]。2004年Rodríguez-Valera^[20]首次提出宏蛋白质组的概念,是指复杂环境微生物群落中所有生物的蛋白质组总和。孔令琼等^[21]利用该技术鉴定了黄酒麦曲浸提液中所有可溶性蛋白质,为探索微生物与黄酒风味之间的关系奠定了基础。张武斌^[22]利用宏蛋白质组学技术对清香白酒生产常用的3种大曲进行分析,检测到酿酒酵母合成的乙醇-*O*-酰基转移酶,确认其为清香白酒酯化功能菌。豆酱中微生物宏蛋白质组还鲜有报道,它是指豆酱中所有微生物产生的全部蛋白质。豆酱微生物宏蛋白质组研究,可为发现功能蛋白质标记物、种系发生以及微生物群体的功能性分析提供依据,也为进一步揭示微生物与豆酱品质形成关系提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

采集自辽宁省沈阳市农家利用传统自然发酵方法制备的豆酱,用保温箱带回实验室,放入-80℃冰箱保存备用。

1.1.2 试剂

丙烯酸胺、Tris、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、四甲基乙二胺(*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED)、*N,N*-甲叉双丙炔酰胺、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA) 美国Sigma公司;尿素、硫脲、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、溴酚蓝、3-(3-胆固醇氨丙基)二甲氨基

基)-1-丙磺酸(3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio) propanesulfonate, CHAPS) 美国Bio-Rad公司;过硫酸铵(ammonium persulphate, AP)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、冰乙酸、无水乙醇、丙酮、考马斯亮蓝G-250 北京鼎国生物技术有限公司。

裂解液:称取尿素8.408 1 g,硫脲3.044 8 g, CHAPS 0.8 g,蛋白质酶抑制剂PMSF 0.003 5 g, DTT 0.2 g于20 mL容量瓶中,加入去离子水定容混匀,分装至2 mL离心管,-20℃条件下保存。

1.1.3 仪器与设备

Centrifuge 5418R小型台式冷冻离心机 德国Eppendorf公司;脱色摇床 上海华亨科学仪器厂;细胞超声仪 上海豫明仪器有限公司;分析天平 荣华仪器有限公司;CDS8000型UPV凝胶成像分析系统、Mini电泳系统、电泳仪 美国Bio-Rad公司;恒温水浴锅 上海精宏实验设备有限公司;VS-1型涡旋仪 上海沪西分析仪器厂有限公司;Cary 50紫外-可见分光光度计 美国Varian公司;Q-Exactive质谱仪 美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 微生物宏蛋白质组的提取

1) 样品初步处理:取豆酱样品70 g放于500 mL离心桶中,加入200 mL磷酸盐缓冲液,放入直径1 cm的玻璃珠30颗,涡旋仪振荡离心桶10 min。将玻璃珠取出,2 000 r/min离心20 min,取出上清液;沉淀中加入150 mL磷酸盐缓冲液摇匀,2 000 r/min离心20 min,取上清液;将收集的所有上清液2 000 r/min离心20 min后,收集上清液,弃去沉淀。

2) 收集菌体沉淀,提取蛋白质:将所得上清液6 000 r/min离心20 min,将沉淀移至研钵中,利用液氮研磨辅助10% TCA/丙酮方法提取蛋白质,得到蛋白质粉末^[23]。

3) 上清液中提取蛋白质:将6 000 r/min离心后所得的上清液12 000 r/min离心20 min,收集沉淀物,用5 mL磷酸盐缓冲液清洗后12 000 r/min离心20 min收集沉淀物并转移至2 mL离心管,每管加入1.5 mL丙酮清洗沉淀,放入-20℃冰箱静置2 h,12 000 r/min离心20 min,弃上清液,收集沉淀物,重复2次,沉淀冰上风干得到胞外蛋白质粉末。

1.2.2 微生物宏蛋白质组的裂解

分别取适量沉淀和上清液蛋白质粉末于2 mL离心管中,按照0.1 g/mL加入裂解液,20% (26 W) 功率超声助溶20 min,工作2 s停3 s,12 000 r/min离心1 h,取上清液。

1.2.3 蛋白质定量

配制10 mg/mL BSA母液,稀释至1 mg/mL,按照Bradford微量蛋白质测定法制作标准曲线,测定蛋白质样品质量浓度^[20]。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测提取效果

利用SDS-PAGE对从豆酱中提取的微生物胞内和胞外宏蛋白质组进行检测。分离胶质量浓度为12 g/100 mL, 浓缩胶浓度为5 g/100 mL。电泳程序为: 80 V, 15 min; 120 V至电泳结束。

1.2.5 液相色谱-串联质谱联用技术 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 鉴定宏蛋白质组

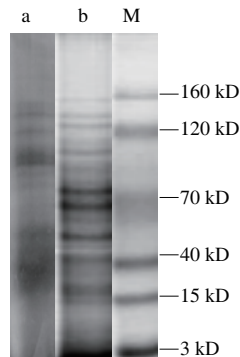
将电泳后的蛋白质泳道切下, 放入1.5 mL离心管中, 加入1 mL灭菌的去离子水, 利用LC-MS/MS进行蛋白质鉴定 (北京华大蛋白质研究公司), 使用Mascot 2.3.01进行数据搜索。

2 结果与分析

2.1 微生物宏蛋白质组定量结果

豆酱中微生物胞内宏蛋白质组蛋白质量浓度为5.45 mg/mL, 胞外宏蛋白质组蛋白质量浓度为5.12 mg/mL。胞内和胞外蛋白质样品的质量浓度均大于5 mg/mL, 能够满足SDS-PAGE的需要。

2.2 SDS-PAGE结果



a.上清液; b.沉淀; M.蛋白质Marker。

图1 豆酱中微生物宏蛋白质组SDS-PAGE结果

Fig. 1 SDS-PAGE of metaproteome in fermented soybean paste

豆酱中微生物胞内和胞外宏蛋白质组的电泳结果如图1所示, 胞外蛋白质条带集中分布在15~40 kD以及70~120 kD之间, 胞内蛋白质可见11条较清晰的蛋白质条带, 这些蛋白质的分子质量在15~160 kD之间。在15~120 kD之间有8条颜色较深的蛋白质条带, 说明在这个分子质量区间的蛋白质数量较多, 在120~160 kD之间有3条颜色较浅的蛋白质条带, 说明在这个分子质量区间的蛋白质数量较少。

2.3 微生物宏蛋白质组LC-MS/MS鉴定结果

利用LC-MS/MS对豆酱中微生物宏蛋白质组进行检测, 搜索细菌和真菌数据库, 其中蛋白质评分在38分以

上为可信 ($P < 0.05$)。在豆酱微生物宏蛋白质组中, 共鉴定出232种蛋白质, 其中包括173种细菌蛋白质, 59种真菌蛋白质, 见表1、2。

表1 细菌蛋白质鉴定结果

Table 1 Identification of bacterial proteins

蛋白质功能	登录号	蛋白质名称	分子质量/kD	蛋白质来源
与蛋白质代谢相关	A7Z7Y9	S-腺苷甲硫氨酸合成酶	44.2	解淀粉芽孢杆菌
	Q8DVV4	伸长因子G	76.6	变形链球菌血清型C
	B1HMZ1	伸长因子G	76.6	赖氨酸球形芽孢杆菌
	Q1GAP9	触发因子	48.6	保加利亚乳杆菌德氏亚种
	Q8Y570	伴侣蛋白ClpB	96.6	李斯特菌血清型1/2A
	Q03WX6	延长因子TS	31.0	明串珠菌
	Q03E40	谷氨酰-tRNA连接酶	56.7	戊糖片球菌
	Q03VI4	S-腺苷甲硫氨酸合成酶	42.1	明串珠菌
	Q9KJV3	含组氨酸的磷酸载体蛋白	92.5	干酪乳杆菌
	Q5SHIG	半胱氨酸合酶	33.0	德氏保加利亚乳杆菌
	A0Q4H2	延长因子TS	31.0	新凶手弗朗西斯菌
	Q2J829	延伸因子P	20.6	弗兰克氏菌
	O07125	含组氨酸的磷酸载体蛋白	93.3	米酒乳杆菌
	AB9DM8	谷氨酰-tRNA (Gln) 酰胺转移酶亚基	53.4	肉葡萄球菌
	B4EW47	谷氨酰胺连接酶	109.5	奇异变形杆菌
	P0C938	伴侣蛋白HspG	78.3	牙龈卟啉单胞菌
	Q7NBB8	苯丙氨酸-tRNA的连接酶 α 亚基	39.8	鸡毒支原体
	A3CQB4	触发因子	47.2	链球菌
	Q03J81	谷氨酰-tRNA (Gln) 酰胺转移酶A亚基	52.1	嗜热链球菌
	Q089Q7	伸长因子	26.3	冷海希瓦氏菌
	B7H047	酮醇酸还原异构酶	36.8	鲍曼不动杆菌
	Q93R27	伴侣蛋白DnaK	66.7	嗜盐四联球菌
	Q93GT6	60 kD伴侣蛋白	57.8	嗜盐四联球菌
	O32211	应激反应蛋白yvgO	17.6	枯草芽孢杆菌
	Q839Q5	鸟氨酸氨甲酰基转移酶	38.1	粪肠球菌
	Q03NY	精氨酸脱亚胺	45.9	短乳杆菌
	5SKE6	蛋白质转位酶亚基SecDF	79.7	嗜热菌
	B1MVQ9	3-异丙基苹果酸脱氢酶小亚基	21.9	明串珠菌
	Q0AUG3	延伸因子Tu	44.5	沃尔夫氏互养单胞菌
	B7HIK5	延伸因子Tu	42.9	鲍曼不动杆菌
	Q03W12	伴侣蛋白的DnaK	65.7	肠膜明串珠菌
	Q03Y12	延伸因子Tu	43.3	肠膜明串珠菌
	B7IT17	延伸因子Tu	43.0	蜡样芽孢杆菌
	A1S204	延伸因子Tu	43.3	希瓦氏菌
	Q3SLQ2	伸长因子G	76.9	脱硫硫杆菌
	C5D3R5	延伸因子Tu	43.4	芽孢杆菌
	B2US27	腺苷甲硫氨酸合成酶	42.3	幽门螺杆菌
与糖代谢相关	Q839C1	L-乳酸脱氢酶	35.5	粪肠球菌
	P51011	D-乳酸脱氢酶	36.4	肠膜明串珠菌
	P0A0A1	丙酮酸脱氢酶E1元件 β 亚基	35.2	德氏保加利亚乳杆菌
	Q03PR5	L-阿拉伯糖异构酶	53.3	短乳杆菌
	Q7NZ60	苹果酸脱氢酶	35.0	紫色杆菌
	B0VQX5	苹果酸脱氢酶	35.3	鲍曼不动杆菌
	A5W114	琥珀酰辅酶A连接酶 β 亚基	41.2	恶臭假单胞菌
	P0AC43	琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基	64.4	大肠杆菌O157:H7
	B7LQ20	甘油醛-3-磷酸脱氢酶A	35.5	大肠杆菌
	Q836R3	ATP依赖性6-磷酸果糖激酶	34.5	粪肠球菌
	Q97FJ6	2,3-二磷酸甘油酸依赖性磷酸甘油酸变位酶	28.1	丙酮丁醇梭菌
	Q88S84	L-阿拉伯糖异构酶	53.5	植物乳杆菌
	Q3JZ19	半乳糖-6-磷酸异构酶亚基LacB	19.0	无乳链球菌血清型IA

续表1

蛋白质功能	登录号	蛋白质名称	分子量/kD	蛋白质来源
与糖代谢相关	Q9WY51	丙酮酸激酶	52.0	海栖热袍菌
	Q38UH2	<i>L</i> -阿拉伯糖异构酶	53.6	清酒乳杆菌
	POCZ58	醛缩酶	31.3	化脓性链球菌血清型M3
	Q38YY6	可能的磷酸转酮酶	88.6	清酒乳杆菌
	A6SZP1	UDP-3- <i>O</i> -酰基葡萄糖- <i>N</i> -酰基转移酶	36.6	紫色杆菌
	Q2ITA9	磷酸转酮酶	88.7	沼泽红假单胞菌
	Q9CG65	α -磷酸甘油氧化酶	67.3	乳酸乳球菌
	P11411	葡萄糖-6-磷酸1-脱氢酶	54.4	明串珠菌
	Q59495	蔗糖磷酸酶	55.7	明串珠菌
	P43774	6-磷酸脱氢脱羧酶	53.4	流感嗜血杆菌
	Q59935	甘露糖-6-磷酸异构酶	35.4	链球菌血清型c
	B9E7B7	醋酸激酶	44.0	巨球菌
	B119A0	乙酸激酶	43.5	肺炎链球菌
	P0859	脱羧NADP(+)依赖性-磷酸葡萄糖脱氢酶	51.9	枯草芽孢杆菌
	A0QWW2	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	36.0	耻垢分枝杆菌
	P0DA16	甘油激酶	56.0	化脓性链球菌血清型M3
	Q5HGY9	丙酮酸脱氢酶	46.4	德氏保加利亚乳杆菌
	A6WXV2	甘油激酶	55.0	人苍白杆菌
	COMC99	磷酸酰基转移酶	35.3	马链球菌
	Q7M9M2	磷酸葡萄糖变位酶	49.0	产琥珀酸沃康菌
	A0Q388	3-磷酸莽草酸1-羧乙烯基转移酶	48.2	诺氏梭状芽孢杆菌
	C7NB67	6-磷酸 α -葡萄糖苷酶	49.9	颊纤毛菌
	P09373	甲酸乙酰转移酶1	85.6	大肠杆菌
	Q03UX8	磷酸激酶	42.7	明串珠菌
	P34038	丙酮酸激酶	63.0	德氏保加利亚乳杆菌
	Q03UX8	磷酸激酶	42.7	肠膜明串珠菌
	Q8GR70	烯醇酶	46.3	肠球菌
	Q04CN9	<i>L</i> -乳酸脱氢酶	32.8	德氏保加利亚乳杆菌
	O32755	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	36.7	德氏保加利亚乳杆菌
	Q03Z94	葡萄糖-6-磷酸异构酶	49.6	肠膜明串珠菌
	A4WE71	磷酸甘油酸激酶	41.2	肠杆菌
	Q8DTX	ATP依赖性6-磷酸酶	35.8	变形链球菌血清型C
	P69799	PTS系统甘露糖特异性 ϵ iiab组件	35.0	大肠杆菌O157:H7
	O34714	草酸脱羧酶OxdC	43.5	枯草芽孢杆菌
	A4W879	琥珀酰-CoA连接酶 β 亚基	41.5	肠杆菌
	Q03ZK4	烯醇酶	47.5	肠膜明串珠菌
	Q88Z84	核糖磷酸焦磷酸激酶	35.9	植物乳杆菌
	B11B05	嘌呤核苷酸化酶deoD基因型	26.2	肺炎链球菌
	C4LG61	二磷酸核苷酶	15.4	微小杆菌
	A4W8F0	DNA饥饿保护蛋白	18.6	肠杆菌
与核酸代谢相关	B0VLZ5	DNA指导的RNA聚合酶 β 亚基	155.0	鲍曼不动杆菌
	A4WFA3	DNA指导的RNA聚合酶 α 亚基	36.4	肠杆菌
	Q5WLS0	DNA指导的RNA聚合酶 β 亚基	13.2	克劳氏芽孢杆菌
	B1Y547	染色体复制起始蛋白DnaA	55.9	克洛德氏纤发菌
	Q88YY5	核糖-5-磷酸异构酶	24.6	植物乳杆菌
	B2GEZ1	腺苷酸合成酶	47.3	发酵乳杆菌
	B1Y547	染色体复制起始蛋白DnaA	55.9	克洛德氏纤发菌
	B2GEZ1	腺苷酸合成酶	47.3	发酵乳杆菌
	B2G680	尿嘧啶磷酸酶	23.4	罗伊氏乳杆菌
	A2RN80	腺苷酸琥珀酸合成酶	47.6	乳酸乳球菌
	A1IUU95	DNA错配修复蛋白mutS	102.8	杆菌状巴尔通氏体
	POCOM9	鸟苷酸激酶	24.1	表皮葡萄球菌
	A8AZM9	腺苷酸合成酶	48.0	戈登链球菌
	POCOH6	肌苷-5'- γ -磷酸脱氢酶	60.3	酿脓链球菌
	Q2GD91	DNA指导的RNA聚合酶 β' 亚基	19.8	埃立克体

续表1

蛋白质功能	登录号	蛋白质名称	分子量/kD	蛋白质来源
与核酸代谢相关	A7H677	DNA复制和修复蛋白RECF	44.7	厌氧黏细菌
	Q2NQZ3	可溶性吡啶核苷酸转氢酶	32.5	内共生菌
	Q7NG73	交叉结脱氧核糖核酸内切酶RuvC	20.7	无类囊体蓝藻
	A7Z501	RNA结合蛋白Hfq	8.5	解淀粉芽孢杆菌
	Q5XAQ7	核糖体相关因子Y	21.1	化脓性链球菌血清型M6
	B21VW4	核糖体循环因子	20.3	点形念珠藻
	Q03ZP4	50S核糖体蛋白L4	22.2	明串珠菌
	Q839F4	50S核糖体蛋白L14	13.1	粪肠球菌
	Q035U8	50S核糖体蛋白L11	14.8	干酪乳杆菌
	Q839G2	50S核糖体蛋白L23	11.1	粪肠球菌
	B5SEF1	50S核糖体蛋白L10	17.5	肺炎链球菌血清型19F
	Q839E9	50S核糖体蛋白L6	19.4	粪肠球菌
	Q839G3	50S核糖体蛋白L4	22.5	粪肠球菌
	Q1WST	50S核糖体蛋白L10	18.1	唾液乳杆菌
	A5VXR3	50S核糖体蛋白L18	12.6	恶臭假单胞菌
	B4F0W9	50S核糖体蛋白L28	9.0	奇异变形杆菌
	B1MW00	50S核糖体蛋白L6	19.0	柠檬明串珠菌
	Q03ZH4	50S核糖体蛋白L10	19.0	明串珠菌
	Q03ZH5	50S核糖体蛋白L1	24.2	明串珠菌
	A7Z0P4	30S核糖体蛋白S3	24.3	植物解淀粉芽孢杆菌
	Q3IJK7	30S核糖体蛋白S11	13.7	交替假单胞菌
	P50889	30S核糖体蛋白S1	46.4	明串珠球菌
	Q03ZM9	30S核糖体蛋白S5	17.5	明串珠菌
	Q03WX5	30S核糖体蛋白S2	28.9	明串珠菌
	A2RNN9	30S核糖体蛋白S8	14.7	乳酸乳球菌
	B1MW23	30S核糖体蛋白S12	15.1	明串珠菌
	A8F991	30S核糖体蛋白S3	24.2	短小芽孢杆菌
	Q7P095	ATP合酶 β 亚基	50.0	根瘤菌
	Q834K4	ATP依赖性蛋白酶ATP酶亚基HslU	52.8	粪肠球菌
	Q2FDV8	ATP依赖性蛋白酶中电ATP结合亚单位CplL	77.9	德氏保加利亚乳杆菌
与能量代谢相关	BQ831A1	ATP合成酶亚基	19.4	粪肠球菌
	Q03V28	ATP合酶 γ 链	33.0	明串珠菌
	Q03V27	ATP合成酶 α 亚基	54.5	肠膜明串珠菌
	Q5WB77	ATP合酶 γ 链	31.9	克劳氏芽孢杆菌
	P0DA04	ATP合酶 β 亚基	51.0	化脓性链球菌血清型M3
	Q834V4	GTP酶	47.9	粪肠球菌
	O32176	可能酰基辅酶A脱氢酶	65.3	枯草芽孢杆菌
	O34153	甘油激酶	37.4	酪黄肠球菌
	P50173	甘油脱氢酶	38.3	恶臭假单胞菌
	P03817	蛋白质MioC	15.9	大肠杆菌
	O42630	液泡蛋白酶	43.5	烟色新萨托菌
	Q93R28	GRPE蛋白	67.9	嗜盐四联球菌
	Q984P3	UvrABC系统蛋白C	33.2	洛蒂根瘤菌
	O08439	细胞分裂蛋白FtsZ	44.1	粪肠球菌
	O07672	细胞分裂的蛋白质FtsA	48.0	肠球菌
	Q6KCJ3	蛋白ecA	37.3	蒙氏肠球菌
	Q8Y5T8	未鉴定的蛋白质Lmo1967	45.5	李斯特菌血清型1/2A
	P0A0J1	超氧化物歧化酶[锰/铁]1	22.7	金黄色葡萄球菌
其他功能	P02930	外膜蛋白TolC	53.7	大肠杆菌
	P02940	主要外膜蛋白	8.4	摩根氏菌
	P02968	鞭毛蛋白	32.6	枯草芽孢杆菌
	O06997	未知的黄素氧化还原酶yvdP	50.1	枯草芽孢杆菌
	P71014	未鉴定的蛋白质YuaB	19.2	枯草芽孢杆菌
	P39790	外金属蛋白酶	33.8	枯草芽孢杆菌
	P39790	细胞外基质金属蛋白酶	33.8	枯草芽孢杆菌

续表1

蛋白质功能	登录号	蛋白质名称	分子质量/kD	蛋白质来源
其他功能	P0ADB2	渗透诱导脂蛋白E	12.0	大肠杆菌O157:H7
	P54944	未知蛋白yxee	14.7	枯草芽孢杆菌
	P06996	外膜蛋白C	40.3	大肠杆菌
	P24017	外膜蛋白A	37.0	肺炎克雷伯氏菌
	P12267	菌毛亚单位型3	20.7	肺炎克雷伯氏菌
	A3M8K2	外膜蛋白Omp38	38.4	鲍曼不动杆菌
	A4WF25	可能的细胞质氨肽酶	54.8	肠杆菌
	P71003	未鉴定的蛋白质YwhK	49.3	枯草芽孢杆菌
	O34789	未鉴定的蛋白质YdjI	36.1	枯草芽孢杆菌
	O34366	假定的鞭毛蛋白YyzB	17.3	枯草芽孢杆菌
	A7Z8B5	可能的胞浆酶	53.3	解淀粉芽孢杆菌
	O07575	未表征氧化还原酶YhdF	31.7	枯草芽孢杆菌
	P9WLL1	未鉴定蛋白Rv2077c	33.4	结核分枝杆菌

表2 真菌蛋白质鉴定结果

Table 2 Identification of fungal proteins

蛋白质功能	登录号	蛋白质名称	分子质量/kD	蛋白质来源
与蛋白质代谢相关	Q10119	延伸因子1- α -B/C	50 099.0	裂殖酵母
	P02992	延伸因子Tu	48.1	酿酒酵母
	Q756G2	可能的E3泛素连接酶蛋白	37.3	棉阿舒囊霉
	P19358	S-腺苷甲硫氨酸合成酶	59.7	酿酒酵母
	O59949	延伸因子1- α	38.3	脂耶氏酵母
	Q9P4Z1	E3泛素连接酶蛋白TOM1	16.5	链孢霉
	P53206	半胱氨酸酶	88.6	酿酒酵母
	P12754	翻译起始因子eIF-2B亚基 δ	59.8	酿酒酵母
	P38986	L-门冬酰胺酶I	26.3	酿酒酵母
	P41887	热休克蛋白90同源	80.5	栗酒裂殖酵母
与糖代谢相关	ASDPE3	延伸因子1- α	23.7	季也蒙毕赤酵母
	P42894	烯醇酶	47.3	灰氧丝状真菌
	Q6FPW3	甘油醛-3-磷酸脱氢酶I	35.9	光滑念珠菌
	Q6BMK0	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	35.9	汉逊德巴利酵母菌
	P36604	葡萄糖调节蛋白同系物	73.2	裂殖酵母
	P38720	1脱羧6-磷酸脱氢酶	53 908.0	酿酒酵母
	Q25BW5	β -葡萄糖苷酶I	52 680.0	白腐菌
	Q5B2E9	吡喃糖氧化酶	68 437.0	构巢裸胞壳
	Q757Q0	磷酸激酶	44 305.0	棉阿舒囊霉
	P09317	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	36.8	玉蜀黍黑粉菌
与核酸代谢相关	Q25BW5	β -葡萄糖苷酶I	52.6	白腐菌
	P29497	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	23.9	异旋胞腔菌
	Q75E44	RNA聚合酶II转录亚基12	66 383.0	棉阿舒囊霉
	O74862	rRNA加工蛋白utp23	29 848.0	裂殖酵母
	Q7SBD5	60 S核糖体蛋白L7	17.5	链孢霉
	P0C016	泛素40 S核糖体蛋白S27A	23.7	裂殖酵母
	P62792	组蛋白H4	11 359.0	白腐菌
	P35177	转录激活因子SP17	77.4	酿酒酵母
	C5DQU9	鸟嘌呤核苷酸交换因子YEL1	78.9	鲁氏酵母
	Q4PCV8	mRNA3'末端加工蛋白RNA14	44.8	玉蜀黍黑粉菌
与能量代谢相关	Q6FT93	U3小核仁RNA结合蛋白10	22.0	光滑念珠菌
	Q2H3D0	组蛋白伴侣RTT106	12.3	球毛壳菌
	Q35135	内含子编码核酸内切酶3	17.4	链孢霉
	P07262	NADP-特异性谷氨酸脱氢酶1	29.3	酿酒酵母
	P02723	ADP-ATP载体蛋白	34.0	链孢霉
	P07251	线粒体ATP合成酶 α 亚基	58.6	酿酒酵母
	P00830	线粒体ATP合成酶 β 亚基	54.8	酿酒酵母
	P49382	ATP载体蛋白	33 187.0	克鲁维酵母
	Q9HGZ0	ATP依赖性6-磷酸果糖激酶2	85 415.0	米曲霉

续表2

蛋白质功能	登录号	蛋白质名称	分子质量/kD	蛋白质来源
其他功能	B0XRVO	二肽基肽5	79 751.0	酿酒酵母
	Q10350	未鉴定的蛋白质CIF12.08	35.9	裂殖酵母
	Q2H922	肌动蛋白细胞骨架的监管复杂蛋白质PAN1	156 114.0	球毛壳菌
	P08468	线粒体蛋白质PET111	56.9	酿酒酵母
	Q06629	HDA1复杂亚基2	44.3	酿酒酵母
	Q9HFR4	自噬相关蛋白2	60.7	毕赤酵母
	P87129	液泡蛋白分选相关蛋白53	55.4	裂殖酵母
	O36031	未鉴定的锌指蛋白C4F10.19c	20.9	裂殖酵母
	P45444	细胞质动力蛋白重链	19.7	构巢裸胞壳
	B3LT17	信号肽复杂的催化亚基SEC11	33.5	酿酒酵母
	P39113	调节蛋白CAT8	45.9	酿酒酵母
	O13339	端粒酶逆转录酶	34.2	裂殖酵母
	P06105	蛋白质SCP160	109.4	酿酒酵母
	B6Q6B6	线粒体分布和形态蛋白10	56.3	马尔尼菲青霉菌
	Q2UMR	液泡膜相关蛋白imL1	16.4	米曲霉
	Q6CM9	蛋白质HIR2	23.5	克鲁维酵母
其他功能	Q0UL22	切丁酶样蛋白2	97.5	颖枯壳针孢
	P40061	雷帕霉素复杂2亚基TSC11 靶靶	70.9	酿酒酵母
	P10982	肌动蛋白1 (片段)	15.7	犁头霉
	ASD174	UPF0507蛋白PGUG_Q2975	45.7	季也蒙毕赤酵母

综合分析,在232种蛋白质中,与糖代谢相关的蛋白质60种,占25.9%,与核酸代谢相关的蛋白质57种,占24.6%,与蛋白质代谢相关的蛋白质48种,占20.7%,与能量代谢相关的蛋白质15种,占6.5%,与脂质代谢相关蛋白质3种,占1.3%,其他功能蛋白质49种,占21.1%。

微生物通过糖代谢为机体供能,并继续进行糖类的合成和分解。在微生物宏蛋白质组中,检测到与糖代谢相关的蛋白质数量最多。而核酸与微生物生长密切相关,其数量次之。蛋白质的表达要经过起始、延伸和终止3个步骤,每一步都需要各种蛋白质发挥作用^[24],其中,与谷氨酸代谢相关的蛋白质数量占优势,可能与其风味相关。

2.4 基于宏蛋白质组微生物来源分析

宏蛋白质组来源于72种细菌,23种真菌。其中来自枯草芽孢杆菌的蛋白质有14种,占6.0%,来自明串珠菌的蛋白质有13种,占5.6%,来自粪肠球菌的蛋白质有11种,占4.7%,来自肠膜明串珠菌和德氏保加利亚乳杆菌的蛋白质有7种,各占3.0%,来自鲍曼不动杆菌、肠杆菌和大肠杆菌的蛋白质有5种,各占2.2%,来自大肠杆菌O157:H7、恶臭假单胞菌、化脓性链球菌血清型M3、解淀粉芽孢杆菌、乳酸乳球菌、嗜盐四联球菌、植物乳杆菌的蛋白质有3种,各占1.3%,来自其他细菌的蛋白质有85种,占36.6%;来自酿酒酵母的蛋白质有17种,占7.3%,来自裂殖酵母的蛋白质有8种,占3.4%,来自链孢霉的蛋白质有4种,占1.7%,来自白腐菌和棉阿舒囊霉的蛋白质有3种,各占1.3%,来自其他真菌的蛋白质24种,占10.3%。

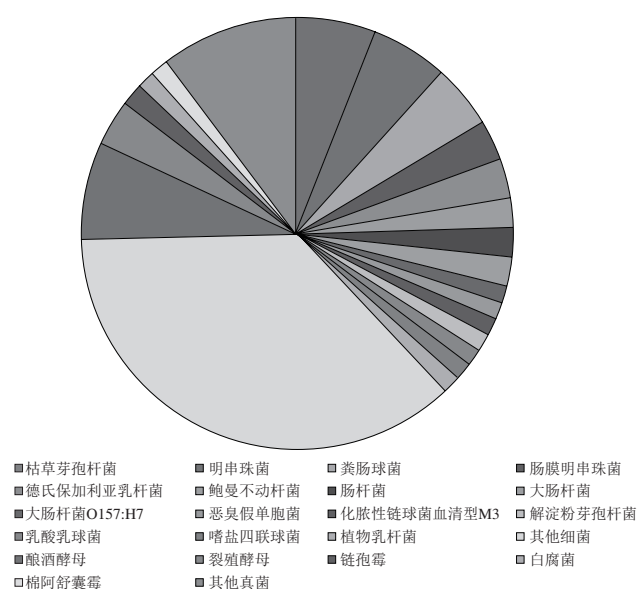


图2 基于宏蛋白质组微生物来源分布图

Fig. 2 Microbiota of fermented soybean paste based on metaproteomic analysis

豆酱微生物宏蛋白质组中,来源于细菌的蛋白质数量几乎为来源于真菌蛋白质数量的3倍,其中细菌来源以枯草芽孢杆菌、明串珠菌、粪肠球菌、肠膜明串珠菌和德氏保加利亚乳杆菌为主,真菌来源以酿酒酵母、裂殖酵母、链孢霉、白腐菌和棉阿舒囊霉为主。

目前已报道的豆酱中的优势细菌相关研究,包括明串珠菌、芽孢杆菌和肠杆菌等^[25-28]。芽孢杆菌可协助真菌分解大豆中的蛋白质和淀粉,而明串珠菌则与豆酱中风味物质的形成相关。尤其是明串珠菌在其中占有优势,与本团队利用宏基因组技术进行的分析,结果一致。之前的研究都还未明确确定明串珠菌在豆酱发酵过程中的重要地位,因此,本团队将继续进行相关研究。此外,棉阿舒囊霉为豆酱中新发现的优势菌种。

除此之外,白色念珠菌、马链球菌、恶臭假单胞菌为条件致病菌,金黄色葡萄球菌为病原菌,希瓦氏菌为腐败菌,创伤弧菌可造成感染,蜡状芽孢杆菌、威氏李斯特菌血清型6b可引起食物中毒,耻垢分枝杆菌可引起皮肤和软组织感染,这些菌种可能来自于环境,也可能是发酵时产生的,它们对食用豆酱的安全性造成了威胁,因此对有害菌种的监控还需加强。

3 结论

实验利用宏蛋白质组学技术,对豆酱中微生物组成和蛋白质功能进行了分析。其中,来源于细菌的蛋白质数量几乎为来源于真菌蛋白质数量的3倍,说明了发酵过程中细菌逐渐取代真菌,占主导地位,而且明串珠菌可能在豆酱发酵过程中起到重要作用。从蛋白质功能角

度,以糖代谢、核酸代谢和蛋白质代谢为主,其中的功能酶及与豆酱风味相关的酶类需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 贡汉坤,王海鸥.传统酱类自然发酵的发酵动态分析[J].食品科技,2003,28(9):54-56. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2003.09.021.
- [2] 梁恒宇,马莺,程建军,等.自然发酵黄豆酱中嗜盐乳酸菌的分离、鉴定与筛选[J].中国酿造,2006,25(8):24-27. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2006.08.006.
- [3] NGONGOLA-MANANI T A, WICKLUND T, MWANGWELA A M, et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria involved in natural and lactic acid bacterial fermentations of pastes of soybeans and soybean-maize blends using culture-dependent techniques and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Food Biotechnology, 2015, 29(1): 20-50. DOI:10.1080/08905436.2014.996894.
- [4] 柴洋洋,葛菁萍,宋刚,等.传统发酵豆酱中酵母菌的分离、筛选及功能酵母的鉴定[J].中国食品学报,2013,13(3):191-196. DOI:10.16429/j.1009-7848.2013.03.034.
- [5] 陈嵘.我国部分地区自然发酵豆酱中真菌的多样性和真菌毒素的检测[D].沈阳:沈阳农业大学,2008.
- [6] 董丹,关统伟,赵辉平,等.两个不同发酵时期豆瓣中微生物多样性的差异对比[J].中国酿造,2014,33(11):55-58. DOI:10.11882/2fj.issn.0254-5071.2014.11.012.
- [7] 高秀芝,王小芬,李献梅,等.传统发酵豆酱发酵过程中养分动态及细菌多样性[J].微生物学通报,2008,35(5):748-753. DOI:10.3969/j.issn.0253-2654.2008.05.018.
- [8] WU J, ZHANG J, SHI P, et al. Bacterial community involved in traditional fermented soybean paste dajiang made in northeast China[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(4): 1417-1421. DOI:10.1007/s13213-013-0604-2.
- [9] NAM Y D, LEE S Y, LIM S. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155: 36-42. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.013.
- [10] HANDELSMAN J, RONDON M R, BRADY S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. Chemistry & Biology, 1998, 5(10): R245-R249. DOI:10.1016/S1074-5521(98)90108-9.
- [11] BÉJÀ O, SUZUKI M T, KOONIN E V, et al. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(5): 516-529. DOI:10.1046/j.1462-2920.2000.00133.x.
- [12] AMANN R I, LUDWIG W, SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [13] RELMAN D A, LOUTIT J S, SCHMIDT T M, et al. The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens[J]. New England Journal of Medicine, 1990, 323(23): 1573-1580. DOI:10.1056/NEJM199012063232301.
- [14] VENTER J C, REMINGTON K, HEIDELBERG J F, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea[J]. Science, 2004, 304: 66-74. DOI:10.1126/science.1093857.
- [15] 魏力,杨成运,李友国.环境微生物群落功能研究的新方法和新策略[J].生态学报,2008,28(9):4424-4429. DOI:10.3321/2fj.issn%3a1000-0933.2008.09.042.
- [16] MARON P A, RANJARD L, MOUGEL C, et al. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(3): 486-493. DOI:10.1007/s00248-006-9196-8.

- [17] SCHULZE W X, GLEIXNER G, KAISER K, et al. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles[J]. *Oecologia*, 2005, 142(3): 335-343. DOI:10.1007/s00442-004-1698-9.
- [18] 郝纯, 刘庆华, 杨俊仕, 等. 宏蛋白质组学: 探索环境微生态系统的功能[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(2): 270-275. DOI:10.3321/j.issn%3a1006-687X.2008.02.026.
- [19] TYERS M, MANN M. From genomics to proteomics[J]. *Nature*, 2003, 422: 193-197. DOI:10.1038/nature01510.
- [20] RODRÍGUEZ-VALERA F. Environmental genomics, the big picture[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 231(2): 153-158. DOI:10.1016/S0378-1097(04)00006-0.
- [21] 孔令琼, 管政兵, 陆健, 等. 绍兴黄酒成品麦曲中微生物胞外酶的双向电泳技术的建立[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(3): 453-457.
- [22] 张武斌. 清香大曲糖化酶的提取及宏蛋白质组学分析[D]. 临汾: 山西师范大学, 2014.
- [23] 乌日娜, 徐鑫, 王茜茜, 等. 植物乳杆菌在不同盐质量浓度下生长至对数期中期全蛋白SDS-PAGE分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(23): 155-161. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201523029.
- [24] MAJUMDERA M, MITCHELLA D, MERKULOV S, et al. Residues required for phosphorylation of translation initiation factor eIF2 α under diverse stress conditions are divergent between yeast and human[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015, 59: 135-141. DOI:10.1016/j.biocel.2014.12.004.
- [25] 武俊瑞, 张苗, 岳喜庆, 等. 黑龙江传统发酵豆酱中乳酸菌的分离鉴定[J]. *食品与发酵工业*. 2014, 40(3): 83-86. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2014.03.001.
- [26] 张巧云, 孟祥晨. 几种发酵豆酱的微生物组成及理化性质分析[J]. *食品科技*, 2013, 38(8): 266-270. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2013.08.040.
- [27] 陈浩, 樊游, 陈源源, 等. 传统发酵豆制品中原核微生物多样性的研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(9): 230-232. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2011.09.064.
- [28] 高秀芝, 王小芬, 刘慧, 等. PCR-DGGE分析天源酱园豆酱发酵过程中微生物多样性[J]. *食品科学*, 2011, 32(1): 112-114.