

庞春霞, 李艺, 虞任莹, 等. 基于 Illumina Miseq 技术比较不同地区传统发酵大豆制品细菌多样性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 133-140. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070215

PANG Chunxia, LI Yi, YU Renying, et al. Comparison of Bacterial Diversity of Traditional Fermented Soybean Products from Different Regions Based on Illumina Miseq Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 133-140. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070215

· 生物工程 ·

基于 Illumina Miseq 技术比较不同地区传统发酵大豆制品细菌多样性

庞春霞¹, 李 艺¹, 虞任莹¹, 甘 甜¹, 郭斯统², 陈育如¹, 罗海波^{1,*}

(1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏南京 210023;

2. 宁波市鄞州三丰可味食品有限公司, 浙江宁波 315145)

摘 要: 为深入挖掘和利用传统发酵大豆制品微生物菌种资源, 采用 Illumina Miseq 高通量测序技术, 分析了不同地区 5 类传统发酵大豆制品 (纳豆、豆豉、大酱、霉豆渣、天贝) 的细菌多样性。结果表明, 5 类产品菌落总数都在 7.0~10.1 lg (CFU/g) 之间。5 类产品中共鉴定出相对丰度大于 1% 的细菌 58 个属, 其中相对丰度大于 10% 的主要优势菌属有杆菌属 (*Bacillus*)、枝芽孢菌属 (*Virgibacillus*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、依格纳季氏菌属 (*Ignatzschineria*)、四联球菌属 (*Tetragenococcus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、解脲芽孢杆菌属 (*Ureibacillus*)、泛菌属 (*Pantoea*) 和片球菌属 (*Pediococcus*)。主成分分析和聚类分析发现, 纳豆 1、纳豆 2 和豆豉 1 菌群结构相似, 霉豆渣 1 和霉豆渣 2 菌群结构相似, 霉豆渣 3 和大酱 1 菌群结构相似, 天贝 1 与其他 4 类产品菌群结构差异较大。本研究结果为传统发酵大豆制品微生物资源的挖掘及其工业化利用提供了理论基础。

关键词: 传统发酵大豆制品, 高通量测序, 主成分分析, 微生物多样性

中图分类号: TQ646.4; TS255.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)

08-0133-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070215



本文网刊:

Comparison of Bacterial Diversity of Traditional Fermented Soybean Products from Different Regions Based on Illumina Miseq Technology

PANG Chunxia¹, LI Yi¹, YU Renying¹, GAN Tian¹, GUO Sitong², CHEN Yuru¹, LUO Haibo^{1,*}

(1. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;

2. Ningbo Yinzhou Sanfeng Kewei Foodstuff Co., Ltd., Ningbo 315145, China)

Abstract: In order to explore and utilize the microbial strain resources of traditional fermented soybean products, the bacterial diversity of five traditional fermented soybean products (natto, douche, soybean paste, meitauza, tempeh) from different regions were analyzed by using Illumina Miseq high-throughput sequencing technology. The results showed that the total bacteria count of 5 products were at 7.0~10.1 lg (CFU/g). There were 58 genera whose relative abundance was more than 1% in 5 products. Among them, the dominant bacteria with relative abundance more than 10% were *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Proteus*, *Ignatzschineria*, *Tetragenococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ureibacillus*, *Pantoea* and *Pediococcus*. Principal component analysis and cluster analysis showed that the microbial community structure of Natto 1, Natto 2 and Douchi 1 were similar, Meitauza 1 and Meitauza 2 were similar, and Meitauza 3 and Soybean paste 1 were similar, however, Tempeh 1 was significantly different from the other 4 products. This study would provide a theoretical basis for the exploitation and industrial utilization of microbial resources in traditional fermented soybean products.

收稿日期: 2021-07-20

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(20)3176)。

作者简介: 庞春霞 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: pangchunxiajk@163.com。

* 通信作者: 罗海波 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, Email: luohaibo_1216@126.com。

Key words: traditional fermented soybean products; high-throughput sequencing; principal component analysis; bacterial diversity

大豆是我国古老的农作物之一,其种植历史可往前追溯五千年^[1]。在漫长的历史文明延续中,传统发酵工艺得到了广泛传播和良好传承,目前我国典型的传统发酵大豆制品主要有纳豆、大酱、腐乳、酱油、豆豉、霉豆渣、天贝等^[2],这些食品不仅满足了人们多样化饮食需求,而且具有良好的营养价值和保健功能。许多发酵豆制品都具有一定的保健功效,如纳豆含有大豆磷脂、皂苷类、低聚糖、纳豆激酶等,具有抗骨质疏松、溶解血栓、降血压、等保健功能^[3];豆豉具有抗氧化、降血糖等作用^[4];腐乳具有降血压、降胆固醇、改善阿尔兹海默症的功效^[5-6]。

微生物是主导发酵大豆制品品质形成的关键因素,微生物的共同作用促进产品的成熟及风味的形成,同时影响产品的营养成分、色泽及质构特性。因受地域和环境的影响,不同产品中菌群结构差异较大,形成了各具特色的风味。因此,开展传统发酵大豆制品微生物多样性研究,对发酵菌种的挖掘利用和推动传统发酵大豆制品的工业化、规范化生产具有重要意义。

关于传统发酵大豆制品微生物资源挖掘研究,在真菌分离鉴定方面开展了大量的研究工作,研究表明毛霉^[7]和曲霉^[8]是主要优势菌属,同时发现在不同发酵阶段优势微生物菌群有较大差异,细菌在后发酵阶段发挥了重要作用,形成了不同地域产品的特殊风味^[9]。Feng 等^[10]采用聚合酶链反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)法分析腐乳的菌落结构,发现克东腐乳腌坯时期藤黄微球菌、鸟肠球菌、粪肠球菌、肉葡萄球菌为优势菌群。石聪等^[11]运用高通量焦磷酸测序技术对浏阳豆豉的微生物多样性进行动态结构观察,发现主要优势菌群为芽孢杆菌属。本文前期研究也发现不同传统发酵大豆制品中菌落总数高达 1.0×10^7 CFU/g 以上。然而,目前对传统发酵大豆制品中细菌菌群结构及其多样性的系统性研究鲜见报道。

Illumina Miseq 高通量测序技术是高灵敏度的微生物多样性分析技术,可一次性对上百万条基因分子进行并行测序,因而具有高强的灵敏度和检测效率,能够检测出浓度含量很低的微生物^[12-13]。本实验以不同地区的 5 大类 8 种传统发酵大豆制品为研究对象,利用 Illumina Miseq 技术分析传统发酵大豆制品中微生物的多样性,比较分析不同种类以及同种类不同地区产品的细菌菌群结构异同及其分布规律。同时,深度剖析核心细菌类群,挖掘功能性菌种资源,为传统发酵大豆制品工业化、标准化生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

纳豆 1(ND1) 山东省日照市莒县小店镇农贸

市场;纳豆 2(ND2) 吉林省龙井市锋山食品有限公司;豆豉 1(DC1) 贵州省遵义市新佳裕食品有限公司;大酱 1(DJ1) 黑龙江省哈尔滨市双城区公正镇英久酱茶厂;霉豆渣 1(MDZ1) 湖北省随州市随县韩耀食品公司;霉豆渣 2(MDZ2) 湖北省咸宁市旺业农产品有限公司;霉豆渣 3(MDZ3) 湖南省邵阳市隆回县隆回人家电铺;天贝 1(TB1) 上海市松江区新桥镇上海鑫宝康食品有限公司;DNA 提取试剂盒(E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit) 美国 Omega 公司;Qubit3.0 DNA 检测试剂盒 美国 Life 公司;2×Hieff® PCR 预混液(2×Hieff® Robust PCR Master Mix)、Hieff NGSTM DNA 分选磁珠(Hieff NGSTM DNA Selection Beads) 翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

Pico-21 型台式离心机 美国 Thermo Fisher 公司;GL-88B 型漩涡混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;TND03-H-H 混匀型干式恒温器 深圳拓能达科技有限公司;DYY-6C 型电泳仪电源、DYCZ-21 型电泳槽 北京市六一仪器厂;FR-1000 凝胶成像系统 上海复日科技有限公司;Q32866 型 Qubit® 3.0 荧光计、ETC 811 型 PCR 仪 北京东胜创新生物科技有限公司;Miseq 型测序仪 美国 Illumina 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的预处理 样品共有 8 种,包括固态样品和半固态样品。用高温灭菌的剪刀将固态样品(纳豆、豆豉、霉豆渣、天贝)剪碎后混合均匀,半固态样品(大酱)无需处理,称取 0.5 g 样品放入 2 mL 样品管中,置组织破碎仪中破碎 10 s,备用。

1.2.2 微生物菌落总数(Aerobic plate count, APC)测定 参考 GB 4789.2-2016 食品微生物学检验 菌落总数测定方法进行测定^[14]。称取 10 g 样品置无菌均质袋中,加入 90 mL 无菌生理盐水,用拍击式均质器拍打 2 min,制成 1:10 的样品匀液,按照 10 倍稀释法稀释至 10^{10} 倍。吸取合适的稀释度样品匀液 100 μ L,涂布接于胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA),置于 36 ± 1 °C 培养 48 ± 2 h。选取菌落数在适宜计数范围内的稀释度进行计数,每个稀释度重复 3 次,结果表示为 lg(CFU/g)。

1.2.3 DNA 的提取 采用基因组 DNA 提取试剂盒提取 8 种发酵大豆制品微生物 DNA,用 1×TAE 配制 0.8% 琼脂糖凝胶,电泳缓冲液为 1×TAE,在电压 230 V 下,电泳 12~15 min,检测 DNA 的完整性。

1.2.4 PCR 扩增及高通量测序 以提取的基因组 DNA 为模板,扩增 16S rDNA 序列的 V3~V4 区域,并在 8 种发酵大豆制品样本的正向引物(341F: 5'- CCTACG

GGNGGCWGCAG; 805R: 5'- GACTACHVGGGTA TCTAATCC)上连接含不同碱基的标签 barcode(条码)序列(ND1, GCCATC; ND2, TGTGTT; DC1, TAGGAC; DJ1, TGGACG; MDZ1, CGATGT; MDZ2, TCCTGT; MDZ3, GAAGGC; TB1, ATGTCA)以区分不同样本。经过两轮 PCR 扩增后,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测文库大小,使用 Qubit3.0 荧光定量仪进行文库浓度测定,随后进行 Illumina Miseq 高通量测序。

1.2.5 高通量测序结果分析 8 种传统发酵大豆制品样本通过 Illumina Miseq 高通量测序处理后得到双端序列,本实验根据连接不同碱基的标签,找到对应引物之间的接口,取出接头序列。根据 PE reads(读取)之间的 overlap(覆盖)关系进行拼接,再依据条码序列和引物序列进行区分和比较得到有效序列。最后,根据序列质量(reads 质量和 merge 效果)进行质量控制和筛选,过滤复杂且难处理的短序列,去除末端质量值 20 以下的序列,得到各个样本的有效序列。

在 16S rDNA 高通量测序过程中,97% 的相似性进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类分析和物种分类学分析。根据 OTU 聚类分析的结果,研究各个样品微生物的菌群多样性。通过 Alpha 多样性来分析不同样品的菌群多样性和相对丰度,并运用 Ace、Chao1、Shannon、Simpson 指数以及 Coverage 来进行评估。其中 ACE、Chao1 指数评估菌群丰度,Shannon、Simpson 指数评估菌群多样性。Coverage 指数是测序深度指标,表示每个样本文库的覆盖率。

利用 Blast 将序列与 GTDB 数据库进行比对,筛选出序列最佳比对结果并进行过滤,默认满足相似度>90% 且 Coverage>90% 的序列用于后续分类,不满足条件的序列为 unclassified,并在各个水平上统计群落结构并讨论 8 种发酵大豆制品微生物群落特征。

1.3 数据处理

采用 Cutadapt 1.18、PEAR 0.9.8、PRINSEQ 0.20.4、Usearch 11.0.667、RDP classifier 2.12、Mothur 1.40.3、Muscle 3.8.31、BMGE 1.12、Krona 2.7.1、FAPROTAX 1.2.1、R 3.6.0、UpSetR 1.4.0、cluster 2.10、VennDiagram 1.6.20、PICRUSt 1.14、Origin2018、SPSS19.0 等软件进行数据处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同样品菌落总数检测结果

按照 10 倍稀释梯度法,对样品菌液进行处理,对 8 种样品进行菌落总数的测定,结果见图 1。从图 1 可以看出,8 种样品的菌落总数在 7.0~10.1 lg(CFU/g)之间,其菌落总数由多到少顺序为 ND2>DC1>ND1>MDZ1>DJ1>MDZ2>MDZ3>TB1。各种样品的菌落总数差异性较大,其中 ND2 菌落总数远高于 ND1,

三种霉豆渣的菌落总数也差异较大,这可能与不同地域环境微生物种类及加工工艺不同有关。

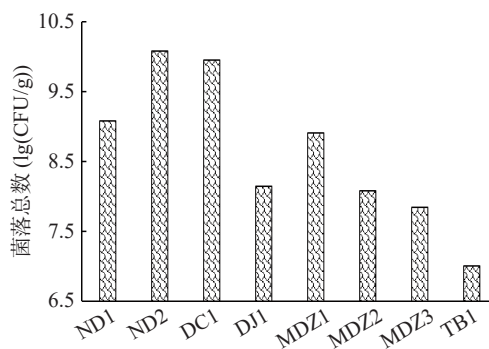


图 1 8 种传统发酵大豆制品菌落总数

Fig.1 Total bacterial count of eight traditional fermented soybean products

2.2 样品 DNA 提取及 PCR 扩增结果

以提取的微生物基因组 DNA 作为模板,16S rDNA V3-V4 区序列扩增,电泳图见图 2,大约在 500~600 bp 之间有清晰、明亮的可见条带,且没有明显的非特异性扩增现象,结果满足后续测序实验的要求。

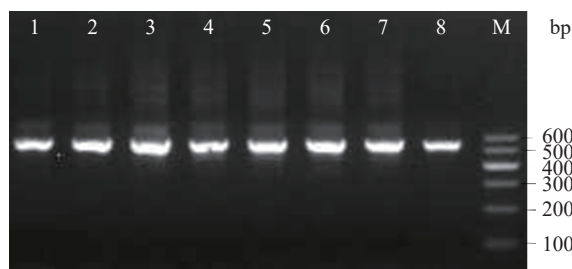


图 2 PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of polymerase chain reaction products

注: M: DNA 分子量标准; 1: ND1; 2: ND2; 3: DC1; 4: DJ1; 5: MDZ1; 6: MDZ2; 7: MDZ3; 8: TB1。

2.3 Illumina 高通量测序数据分析

采用 Illumina 高通量测序方法对 8 种发酵大豆制品进行测序,通过对获得的样本原始序列进行质控筛选及软件优化后,得到 8 种样品的有效序列为 226517 条,所得到的有效序列可达到后续微生物多样性分析的要求。进而对样品的序列进行聚类分析,在 97% 相似水平下的 OTU 生物信息统计发现,8 种样品处理组得到的 OTU 数量范围为 64~144,得到有效 OTUs 为 839(表 1)。

2.4 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析可以反映微生物群落的丰度和多样性^[15]。根据 97% 相似性水平下的 OTU 信息,采用 Alpha 多样性指标的 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数及 Simpson 指数对样品微生物物种丰富度和多样性进行评估,结果见表 1。

ACE 和 Chao1 指数是样本群落丰富度的表征,数值越高表明群落丰富度越高^[16]。由表 1 可知, DJ1 样品的 ACE 和 Chao1 指数最高,其次是 DC1 样品,

表 1 8 种传统发酵大豆制品测序 OTU 数量和 Alpha 多样性指数

Table 1 Number of OTU and Alpha diversity index of eight traditional fermented soybean products

样品	序列数	OUT数量	Shannon指数	Chao1指数	ACE指数	Simpson指数	Coverage
ND1	33334	78.0	1.58	89.4	89.3	0.25	1.00
ND2	27004	64.0	0.94	107.9	97.7	0.47	1.00
DC1	30793	115.0	1.56	138.6	138.7	0.32	1.00
DJ1	25473	144.0	3.32	164.0	165.3	0.06	1.00
MDZ1	26974	128.0	2.70	137.1	136.1	0.18	1.00
MDZ2	29803	111.0	2.38	128.3	138.2	0.15	1.00
MDZ3	24427	109.0	2.37	123.1	128.7	0.14	1.00
TB1	28709	90.0	0.96	118.2	125.1	0.57	1.00

ND1 样品的 ACE 和 Chao1 指数最低。根据 Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数及 Simpson 指数进行 Alpha 多样性分析,对样品微生物物种丰富度和多样性进行评估,可知本研究中五大类传统发酵豆制品丰度排序为:大酱>霉豆渣>豆豉>纳豆>天贝。

Shannon 和 Simpson 指数与样本中菌群多样性相关,其中 Shannon 指数与菌群多样性呈正相关,而 Simpson 指数与菌群多样性呈负相关^[17]。由表 1 看出,纳豆、豆豉、大酱、霉豆渣、天贝样品中细菌 Shannon 指数的平均值(Shannoneven)分别为 0.295、0.330、0.670、0.523、0.210。Shannon 指数越大,表示群落多样性指数越高。因而,可知本研究中 5 类传统发酵豆制品菌群多样性排序为:大酱>霉豆渣>豆豉>纳豆>天贝。

2.5 主成分分析和聚类分析 (Cluster analysis)

主成分分析(Principal Component Analysis, PCA),可以通过分析不同样本群落组成反映样本间的差异和距离,如样品物种组成越相似,反映在 PCA 图中的距离越近^[18]。PCA 分析表明,PCA1 和 PCA2 两主轴贡献之和为 85.67%,说明其已能够反映样品中大部分的信息(图 3)。根据样品分布,ND1、ND2 和 DC1 相距较近,说明纳豆和豆豉菌群结构相似;MDZ1 和 MDZ2 相距较近,MDZ3 与这两者相距较远,说明不同地区的霉豆渣之间菌群结构存在相似性,但地域环境对菌群结构有一定影响;而 MDZ3 与 DJ1 相距较近,说明 MDZ3 与大酱的菌群结构具有一定的相似性。TB1 与其他 7 种样品相距较远,说明天贝的菌群结构与其他 7 种样品差异较大。

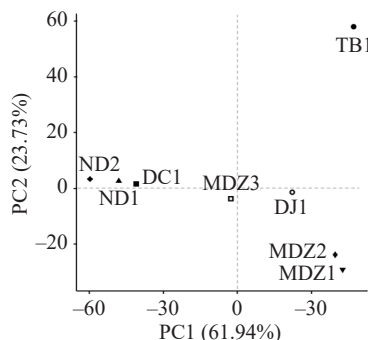


图 3 8 种传统发酵大豆制品主成分分析图

Fig.3 Principal component analysis of eight traditional fermented soybean products

对距离矩阵进行层级聚类(Hierarchical clustering)分析,构建树状结构,得到树状关系形式用于可视化分析。树枝的长度代表样本间的距离,越相似的样本会越靠近。由图 4 可知,8 份样品可分为三大类,其中 TB1 和 DJ1 聚为第一类,ND1、ND2、DC1 和 MDZ3 聚为第二类,MDZ1 和 MDZ2 聚为第三类。第三类中,MDZ1 和 MDZ2 分支较短,表明相似性较高;在第二类中,不同类样品产生了差异,但是 ND1、ND2 和 DC1 距离较近,表明三者的相似性较高;TB1 和 DJ1 虽然在同一个分支上,但有一定差异。以上结果表明,不同种类的传统发酵豆制品细菌群落多样性差异较大,而在不同来源的同种类发酵制品中,细菌群落多样性具有一定的相似性。

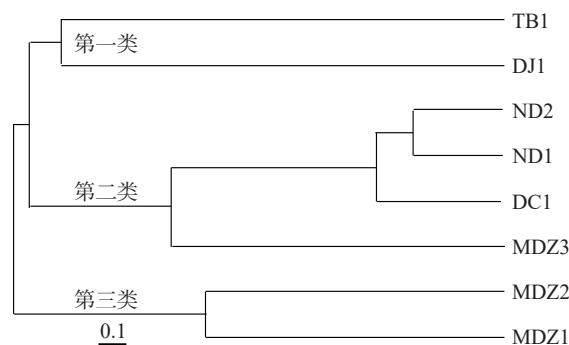


图 4 8 种传统发酵大豆制品聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis of eight traditional fermented soybean products

2.6 菌群多样性分析

对 OTU 序列进行分类学分析,获得 8 种发酵大豆制品样本在属分类水平上的菌群组成统计(见表 2 和图 5)。根据表 2 可知,ND1、ND2、DC1、DJ1、MDZ1、MDZ2、MDZ3、TB1 在属水平上相对丰度大于 1% 的菌属分别有 3、2、3、18、13、6、9、4 属。ND1 的主要优势菌属是杆菌属(*Bacillus*)、枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)、亚硝化单胞菌目(*Streptophyta*);ND2 的主要优势菌属是杆菌属(*Bacillus*)、环丝菌属(*Brochothrix*);DC1 的主要优势菌属是杆菌属(*Bacillus*)、变形杆菌属(*Proteus*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*);DJ1 的主要优势菌属有杆菌属(*Bacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、依格纳季氏菌属(*Ignatzschinaria*)、四联球菌属(*Tetragenococcus*)、奇枝菌属(*Atopostipes*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)等;MDZ1

表 2 不同地区发酵大豆制品菌群在属水平上的相对丰度(%)
Table 2 Relative abundance of bacterial flora at the genus level in different samples (%)

菌属名称(Genus)	ND1	ND2	DC1	DJ1	MDZ1	MDZ2	MDZ3	TB1
杆菌属(<i>Bacillus</i>)	81.78	95.1	74.3	10.12	0.05	0.65	33.33	0.73
枝芽孢菌属(<i>Virgibacillus</i>)	13.69	0.07	0.04	0.69	0	0	0.02	0.02
片球菌属(<i>Pediococcus</i>)	0.08	0.14	0.09	5.94	0.12	0.13	0.09	73.59
亚硝化单胞菌目(<i>Streptophyta</i>)	3.26	0.01	0.02	0.01	0.05	0.31	1.1	13.58
变形杆菌属(<i>Proteus</i>)	0.01	0	14.93	1.62	0.05	0.06	0.01	0.01
肠杆菌科(<i>Enterobacteriaceae</i>)	0.08	0	0.16	4.58	53.41	29.14	0.51	0.17
假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	0.05	0.01	0.13	0.13	5.68	30.46	0.21	0.15
不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>)	0.02	0	0.52	0.05	5.95	0.93	21.46	0.09
泛菌属(<i>Pantoea</i>)	0.02	0	0.06	0.28	1.82	18.31	0.2	0.28
依格纳季氏菌属(<i>Ignatzschinaria</i>)	0.02	0.02	0.03	15.53	0.02	0.04	0.01	0.01
解脲芽孢杆菌属(<i>Ureibacillus</i>)	0.03	0.03	0.01	0	0	0.01	15.49	0.02
环丝菌属(<i>Brochothrix</i>)	0.01	3.64	0	0	0	0	0	0.02
丛毛单胞菌属(<i>Comamonas</i>)	0	0	4.99	0.02	2.83	0.05	0.77	0.01
肠球菌属(<i>Enterococcus</i>)	0.25	0.04	0.54	4.22	1.45	0.16	0.4	7.46
魏斯氏菌属(<i>Weissella</i>)	0.02	0.24	0.02	1.78	0.23	6.87	0.07	3.08
葡萄球菌属(<i>Staphylococcus</i>)	0.1	0.03	0.02	3.66	0.96	8.16	0.02	0.19
明串珠菌属(<i>Leuconostoc</i>)	0	0.28	0	0.1	0.8	1.84	0.02	0.01
鞘氨醇杆菌属(<i>Sphingobacterium</i>)	0	0	0.06	0.05	7.1	0.53	0.05	0
嗜麦芽窄食单胞菌(<i>Stenotrophomonas</i>)	0	0	0	0.04	5.39	0.19	0.13	0.06
栖水菌属(<i>Enhydrobacter</i>)	0	0	0	0	2.87	0.04	0.01	0.01
稳杆菌属(<i>Empedobacter</i>)	0	0	0.03	0	2	0.01	0.01	0
黄杆菌属(<i>Flavobacterium</i>)	0	0	0.01	0.02	1.6	0	0	0
赖氨酸芽孢杆菌(<i>Lysinibacillus</i>)	0.01	0	0.73	0	1.54	0.01	0.05	0.01
乳球菌属(<i>Lactococcus</i>)	0	0	0	0	1.1	0.08	0.02	0.01
芽孢杆菌目(<i>Bacillales</i>)	0.01	0.01	0	0	0	0	8.34	0
链球菌属(<i>Streptococcus</i>)	0.01	0	0.15	0.08	0	0.06	7.21	0.01
大肠志贺氏菌属(<i>Escherichia Shigella</i>)	0	0	0.25	0	0.02	0.01	4.02	0.03
乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	0.03	0.02	0.2	1.72	0.02	0.03	2.92	0.03
短芽孢杆菌属(<i>Brevibacillus</i>)	0.06	0.06	0.06	0	0	0.01	1.56	0.03
四联球菌属(<i>Tetragenococcus</i>)	0.01	0.01	0.01	9.92	0	0	0.01	0
奇枝菌属(<i>Atopostipes</i>)	0	0	0.01	8.2	0	0	0.01	0.01
产碱杆菌属(<i>Alcaligenes</i>)	0	0	0.01	5.3	0	0	0	0
棒杆菌属(<i>Corynebacterium</i>)	0	0	0	4.32	0.85	0.09	0	0
产碱菌属(<i>Paenalcaligenes</i>)	0	0	0	3.56	0	0	0	0
海洋芽孢杆菌属(<i>Oceanobacillus</i>)	0.01	0.01	0.02	3.07	0	0	0.02	0.02
克罗诺杆菌(<i>Cronobacter</i>)	0	0	0.2	1.17	0.04	0.02	0.03	0
八叠球菌属(<i>Sporosarcina</i>)	0	0	0.01	1	0	0	0.01	0
未命名菌属(<i>Paenochrobactrum</i>)	0	0	0	1.13	0	0	0	0
其他菌属(<i>Othergen</i>)	0.24	0.1	2.05	6.26	3.17	0.89	1.67	0.15
未分类菌属(<i>Unclassified</i>)	0.19	0.15	0.35	5.43	0.88	0.91	0.23	0.2

的主要优势菌属有肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas*)等; MDZ2 的主要优势菌属是肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、泛菌属(*Pantoea*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*); MDZ3 的主要优势菌属是杆菌属(*Bacillus*)、亚硝化单胞菌目(*Streptophyta*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、解脲芽孢杆菌属(*Ureibacillus*)、芽孢杆菌目(*Bacillales*)、链球菌属(*Strepto-*

coccus)、大肠志贺氏菌属(*Escherichia Shigella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*); TB1 的主要优势菌属是亚硝化单胞菌目(*Streptophyta*)、片球菌属(*Pediococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)。

表 2 结果还显示, 5 类样品中细菌种类在属水平上的多样性及其丰度存在较大差异, 但不同地区的同类样品之间存在一定的相似性。对于纳豆和豆豉而言, 杆菌属是主要的优势菌属, 且丰富度居于绝对优势, 其中 ND1 为 81.78%、ND2 为 95.10%、DC1 为 74.30%。此外, ND1 中还含有 13.69% 的枝芽孢菌

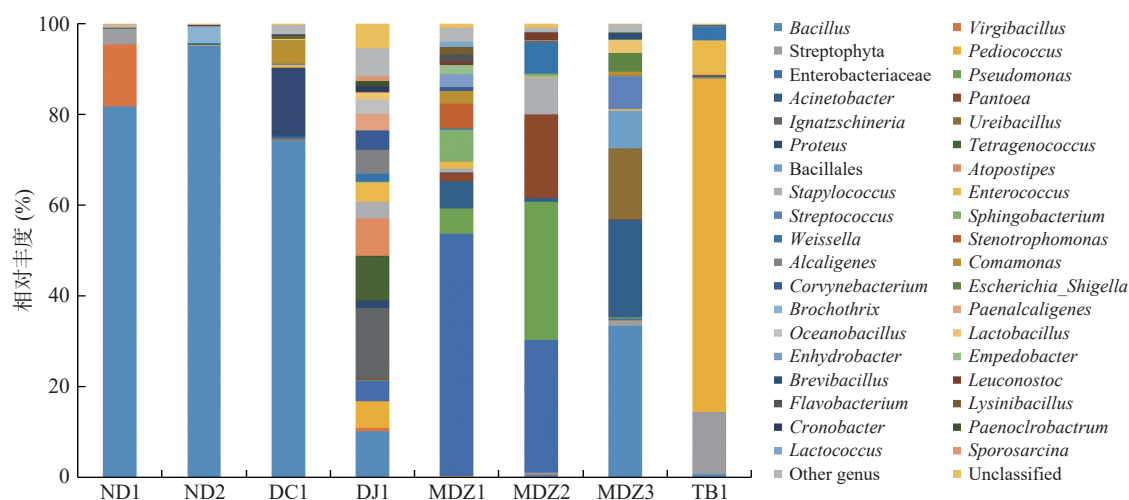


图5 不同地区发酵大豆制品属水平群落结构分布图

Fig.5 Distribution map of the community structure of different samples at genus level

属(*Virgibacillus*)和 3.26% 的亚硝化单胞菌目(*Streptophyta*)；而 ND2 中含有 3.64% 的环丝菌属(*Brochothrix*)，可见来自不同地域的纳豆菌群有差异性。DJ1 中菌群结构较为复杂，菌种丰度高，有 18 属菌丰度较高。三种霉豆渣中，MDZ1 和 MDZ2 菌群结构接近，都含有相当量的肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)，而 MDZ3 菌群结构与前两者有差异，杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和解脲芽孢杆菌属(*Ureibacillus*)相对丰度居于前三位。TB1 中的菌群结构与其他四类样品有很大的差异，片球菌属(*Pediococcus*)是主要的菌属，相对丰度高达 73.59%，其次是 13.58% 的亚硝化单胞菌目(*Streptophyta*)。菌属结构与产品的风味形成息息相关，菌属结构的差异性是产品之间风味物质差异的根本因素。

2.7 PICRUSt 功能预测

PICRUSt 全称为“Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states”，即通过将现有的 16S rRNA 基因测序数据与代谢功能已知的微生物参考基因组数据库相对比，从而实现细菌代谢功能的预测^[19]。通过 PICRUSt 功能预测，微生物主要功能包括：化学异养、发酵、共生体、好氧化学异养、人类病原体、硝酸盐还原、氮呼吸、芳香化合物降解等功能。该分析结果表明，样品中的微生物代谢功能非常丰富。

由图 6 可知，ND1、ND2 和 DC1 菌群代谢功能较为接近；三种霉豆渣的菌落代谢功能最为接近，化能异养功能、发酵功能最为明显。此外，DJ1、TB1 菌群也具有化能异养功能和发酵功能，但是在其他预测功能上存在差异。值得一提的是，TB1 样品的菌群功能与其他 7 个样品存在较大的差异，究其原因可能与制作环境、制作工艺不同导致的菌群结构不同有关。

3 讨论

发酵豆制品中微生物是影响发酵过程的关键因

素，越来越多的研究表明细菌在发酵大豆制品生产过程中发挥着重要作用，大豆中的蛋白质、脂肪、纤维素等营养成分可在细菌的作用下分解为小分子物质^[20]，同时产生脂肪族化合物和芳香族化合物等主要挥发性成分，包括酯类、醇类、醛类、酚类、呋喃类等^[21-22]。关于发酵豆制品细菌多样性的研究较为广泛，也有相关报道对豆酱发酵过程中细菌的多样性及动态变化进行研究分析，对微生物多样性结果和代谢组学分析结果进行相关性分析^[23-24]。已有研究表明，不同传统发酵大豆制品中细菌多样性十分丰富，各种细菌的协同作用影响着产品的形态、品质、营养价值功效以及风味。Seumahu 等^[25]利用扩增核糖体基因间测序分析(amplified ribosomal intergenic sequence analysis, ARISA)技术对豆豉细菌、真菌多样性进行了分析，发现细菌的多样性高于真菌多样性。此外，有研究表明豆酱发酵过程中明串珠菌属(*Leuconostoc*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、四联球菌属(*Tetragenococcus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)是豆酱样品不同发酵阶段的优势细菌菌属^[26-27]，这些菌群产生的胞外酶促进发酵底物中营养物质的分解，产生生物活性物质及风味成分^[28]。陈浩^[29]对豆豉、豆酱、酱油及腐乳中细菌多样性进行了分析，发现样品中的优势菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)等，另外还发现了葡萄球菌(*Staphylococcus*)、肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)等。Li 等^[26]和张颖^[27]研究表明，豆酱发酵过程中的主要优势细菌菌属为四联球菌属(*Tetragenococcus*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和链球菌属(*Streptococcus*)，同时发现假单胞菌属(*Pseudomonas*)与 10 种含氮代谢产物显著相关，链球菌属(*Streptococcus*)与 6 种碳代谢产物和 8 种含氮代谢产物显著相关。本研究中，8 种传统发酵大豆制品中菌落总数高达 7.0~10.1 lg(CFU/g)，表明细菌可能对不同地域和不同种类发

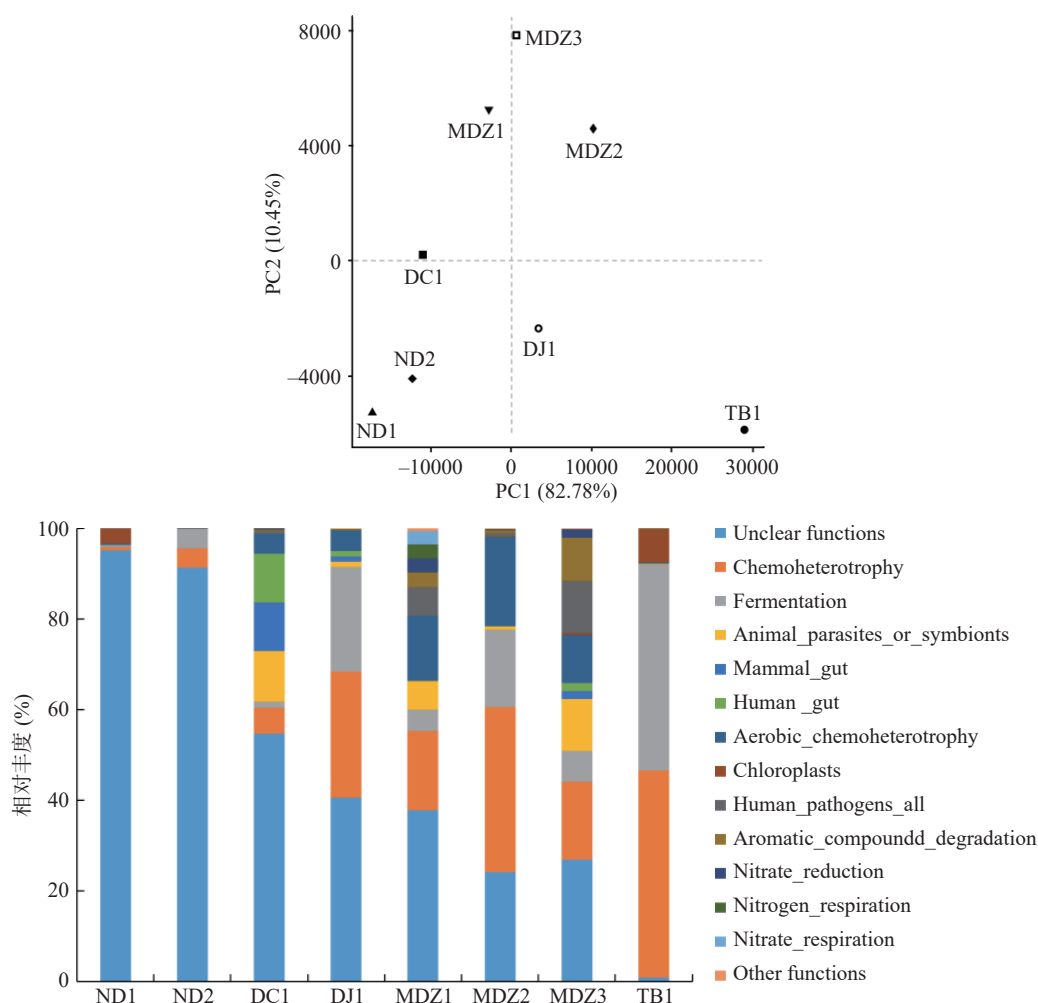


图 6 不同地区发酵大豆制品菌群功能主成分分析及在属水平上的相对丰度

Fig.6 Functional principal component analysis and relative abundance of bacteria in different samples at genus level

醇大豆制品独特风味的形成具有重要贡献。同时,本研究还发现,除了鉴定到上述已报道的优势菌属外,在 8 种传统发酵大豆制品中还发现了枝芽孢菌属(*Virgibacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、亚硝化单胞菌目(*Streptophyta*)、变形杆菌属(*Proteus*)、泛菌属(*Pantoea*)、依格纳季氏菌属(*Ignatzschineria*)和解脉芽孢杆菌属(*Ureibacillus*)等相对丰度大于 10% 的优势菌属,这些结果为传统发酵大豆制品微生物资源的挖掘利用提供了参考价值。

4 结论

a. 从不同地区收集 8 种样品, ND1、ND2、DC1、DJ1、MDZ1、MDZ2、MDZ3、TB1 在属水平上相对丰度大于 1% 的菌属分别有 3、2、3、18、13、6、9、4 属,各种菌属在豆制品发酵生产过程中发挥协同作用机制,使发酵制品产生了独特的风味。

b. 五类发酵制品的微生物菌群结构存在差异,特别是大酱、天贝的菌落结构最具特殊性,与纳豆、豆豉、霉豆渣相比较,大酱的菌落结构最为复杂,天贝的优势菌属相对单一。研究发现 ND1、ND2 和 DC1 主要优势菌属均是芽孢杆菌属; DJ1 中的菌落结构较为复杂,共检测到了 18 属在水平上相对丰度大于 1% 的菌属; MDZ1、MDZ2 和 MDZ3 中的优势

菌属有肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等; TB1 中的主要优势菌属是片球菌属(*Pediococcus*)、亚硝化单胞菌属(*Streptophyta*)。由此可见,在同类产品中,来自不同地区的产品菌群结构存在差异,这可能与地域环境中微生物差异以及加工工艺条件不同有关。

c. 功能预测分析表明,五类产品微生物菌群的化能异养功能、发酵功能占主导地位,这也是细菌在豆制品成熟的过程中发挥的主要功能。

本研究为大豆发酵制品的研究提供了微生物信息,为后续作用机制研究、菌种资源开发奠定了基础,对形成标准化、规范化的工业生产链,实现我国大豆发酵制品的产业化发展具有积极的意义。

参考文献

- [1] 李二玲, 位书华, 胥亚男. 中国大豆种植地理集聚格局演化及其机制[J]. 经济经纬, 2016, 33(3): 37-42. [LI E L, WEI S H, XV Y N. An analysis of the evolution and mechanism of china's soybean planting agglomeration and geographic pattern[J]. Economic Survey, 2016, 33(3): 37-42.]
- [2] 孙洁雯, 李燕敏, 刘玉平. 固相微萃取结合气-质分析东北大酱的挥发性成分[J]. 中国酿造, 2015, 34(8): 139-142. [SUN J W, LI Y M, LIU Y P. Analysis of volatile components from north-

- east soybean paste by SPME-GC/MS[J]. *China Brewing*, 2015, 34(8): 139-142.]
- [3] ESCAMILLA D M, ROSSO M L, HOLSHOUSER D L, et al. Improvement of soybean cultivars for natto production through the selection of seed morphological and physiological characteristics and seed compositions: A review[J]. *Plant Breeding*, 2019, 138(2): 131-139.
- [4] OJOKOH A O, WEI Y M. Effect of fermentation on chemical composition and nutritional quality of extruded and fermented soya products[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2011, 7(4): 1-2.
- [5] WEI G M, YANG Z H, REGENSTEIN J M, et al. Characterizing aroma profiles of fermented soybean curd with ageing solutions during fermentation[J]. *Food Bioscience*, 2020: 33.
- [6] LIU P, XIANG Q, GAO L, et al. Effects of different fermentation strains on the flavor characteristics of fermented soybean curd[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(1): 154-164.
- [7] 袁华伟, 闵小兰, 陆巧玲, 等. 腐乳毛霉 SH12 生长性能及产酶特性研究[J]. *中国调味品*, 2017, 42(11): 69-73. [YUAN H W, MIN X L, LU Q L, et al. Study on growth performance and enzyme production property of mucor SH12 from sufu[J]. *China Condiment*, 2017, 42(11): 69-73.]
- [8] 李婷婷, 程江华, 张焕焕, 等. 现代传统发酵豆制品中微生物资源的挖掘与应用[J]. *农产品加工*, 2021(6): 63-69. [LI T T, CHENG J H, ZHANG H H, et al. Microorganisms in modern traditional fermented soybean products mining and application of resources[J]. *Farm Products Processing*, 2021(6): 63-69.]
- [9] 李薇, 罗沈斌, 邱泽瑞, 等. 永川毛霉型豆豉传统发酵过程中微生物群落结构及动态演替规律[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(23): 60-67. [LI W, LUO S B, QIU Z R, et al. Microbial community structure and dynamic succession in traditional fermentation of Mucor-type Yongchuan Douchi[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(23): 60-67.]
- [10] FENG Z, GAO W, REN D, et al. Evaluation of bacterial flora during the ripening of Kedong sufu, a typical Chinese traditional bacteria-fermented soybean product[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(6): 1471-1478.
- [11] 石聪, 李世瑞, 李跑, 等. 基于高通量测序浏阳豆豉不同发酵阶段微生物多样性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(2): 27-32, 39. [SHI C, LI S R, LI P, et al. Analysis of microbial diversity in different stages of Liuyang Douchi based on high throughput sequencing[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(2): 27-32, 39.]
- [12] 李成, 孔晓雪, 余炬波, 等. 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 134-139. [LI C, KONG X X, YU J B, et al. Analysis of microbial community diversity of crab paste by high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2020, 41(4): 134-139.]
- [13] PICHLER M, COSKUN O K, ORTEGA ARBULU A S, et al. A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform[J]. *Microbiologyopen*, 2018: e00611.
- [14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准物质出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China's Food and Drug Administration. GB 4789.2-2016 National food safety standards Food microbiological analysis-determination of total bacterial count[S]. Beijing: China Standard Press, 2016.]
- [15] 虞任莹, 彭思佳, 李艺, 等. 梅干菜和腌制雪菜细菌菌群多样性分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(18): 126-133. [YU R Y, PENG S J, LI Y, et al. Analysis of bacterial diversity of the pickled and dried mustard and the fermented potherb mustard[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(18): 126-133.]
- [16] BLANCO C, VERBANIC S, SEELIG B, et al. EasyDIVER: A pipeline for assembling and counting high-throughput sequencing data from *in vitro* evolution of nucleic acids or peptides[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2020, 88(6): 477-481.
- [17] MAHE F, MAYOR J, BUNGE J, et al. Comparing high-throughput platforms for sequencing the V4 region of SSU-rDNA in environmental microbial eukaryotic diversity surveys[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2015, 62(3): 338-345.
- [18] NELSON M C, MORRISON H G, BENJAMINO J, et al. Analysis, optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys[J]. *PloS One*, 2014, 9(4): e94249.
- [19] ZHANG F, WANG Z, LEI F, et al. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(10): 7812-7824.
- [20] YANG Y, WANG B, FU Y, et al. HS-GC-IMS with PCA to analyze volatile flavor compounds across different production stages of fermented soybean whey tofu[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128880.
- [21] HE W, CHUNG H Y. Exploring core functional microbiota related with flavor compounds involved in the fermentation of a natural fermented plain sufu (Chinese fermented soybean curd)[J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103408.
- [22] AN F, LI M, ZHAO Y, et al. Metatranscriptome-based investigation of flavor-producing core microbiota in different fermentation stages of dajiang, a traditional fermented soybean paste of Northeast China[J]. *Food Chemistry*, 2021, 343: 128509.
- [23] ZHANG Q Q, LI D, ZHANG W, et al. Comparative analysis of the bacterial diversity of Chinese fermented sausages using high-throughput sequencing[J]. *LWT*, 2021, 150: 111975.
- [24] LEE S, LEE S, SINGH D, et al. Comparative evaluation of microbial diversity and metabolite profiles in doenjang, a fermented soybean paste, during the two different industrial manufacturing processes[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1578-1586.
- [25] SEUMAHU C A, SUWANTO A, RUSMANA I, et al. Bacterial and fungal communities in tempeh as reveal by amplified ribosomal intergenic sequence analysis[J]. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2013, 20(2): 65-71.
- [26] LI Z, RUI J, LI X, et al. Bacterial community succession and metabolite changes during doubanjiang-meju fermentation, a Chinese traditional fermented broad bean (*Vicia faba* L.) paste[J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 534-542.
- [27] 张颖. 豆酱自然发酵过程微生物多样性分析研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017. [ZHANG Y. Microbial diversity during fermentation of traditional Dajiang in northeast of China[D]. Shenyang: Shenyang Agriculture University, 2017.]
- [28] ZHAO S, NIU C, SUO J, et al. Unraveling the mystery of 'bask in daytime and dewed at night' technique in doubanjiang (broad bean paste) fermentation[J]. *LWT*, 2021, 149: 111723.
- [29] 陈浩. 传统发酵豆制品中微生物多样性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011. [CHEN H. Studies on microbial biodiversity in traditional fermented soybean processing[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011.]