



郫县豆瓣发酵过程的微生物多样性及溯源分析

鲍奕达¹, 张丽杰¹, 郑鹏飞¹, 陈海风², 黄家全², 徐岩^{1*}

¹工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

²四川省郫县豆瓣股份有限公司, 四川 成都 611700

摘要:【目的】解析郫县豆瓣及其酿造半成品-蚕豆醅与辣椒醅微生物多样性和来源, 探究郫县豆瓣酿造过程风味化合物特征。【方法】采用高通量测序法测定蚕豆醅、辣椒醅与混合醅(蚕豆醅-辣椒醅混合物, 发酵成熟形成郫县豆瓣)在酿造过程中的微生物群落结构; 利用高效气相质谱与高效液相色谱高通量检测蚕豆醅及辣椒醅中基础理化指标及挥发性、非挥发性风味化合物浓度; 利用多种生物信息学分析方法对混合醅酿造微生物及风味化合物进行溯源。【结果】微生物方面: 44%–59%的混合醅细菌来源于辣椒醅, 5%–22%的混合醅细菌来源于蚕豆醅, 其他混合醅细菌来源未知。同时, 42%–77%的混合醅真菌来源于辣椒醅, 2%–18%的混合醅真菌来源于蚕豆醅, 其他混合醅真菌来源未知。另外, 16个细菌属由辣椒醅特异性贡献; 2个细菌属及2个真菌属由蚕豆醅特异性贡献。化合物方面: 1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol)、苯乙醛(phenylacetaldehyde)、异丁醛(isobutyraldehyde)、苹果酸(malic acid)与糠醛(furfural)仅由蚕豆醅贡献。辣椒素(capsaicin)、3-甲基-1-丁醇(3-methyl-1-butanol)、己醇(hexanol)与异丁醇(isobutanol)仅由辣椒醅贡献。【结论】郫县豆瓣发酵中大部分微生物来源于辣椒醅, 大部分发酵底物(氨基酸及葡萄糖)来源于蚕豆醅。两种发酵半成品均特异性贡献微生物及风味化合物, 形成郫县豆瓣的独特风味密码。

关键词: 郫县豆瓣, 蚕豆醅, 辣椒醅, 微生物多样性, 溯源分析

郫县豆瓣(pixian broad bean paste)是一种辣味酿造酱, 生产于四川省成都市郫都区, 为我国独特的国家地理标志产品和国家非物质文化遗产^[1], 其味鲜辣醇厚, 瓣粒香脆、化渣, 回味

悠长, 被誉为“川菜之魂”^[2]。与其他传统发酵酱相比, 郫县豆瓣采用独特的双原料双发酵法(以红辣椒(蔬菜)、蚕豆(谷物)为主要原料, 双阶段发酵)^[3]。如图1所示, 发酵第一阶段: 二荆条辣椒

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1604100), 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助(LITE2018-12)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-02-14; 修回日期: 2020-05-11; 网络出版日期: 2020-07-10

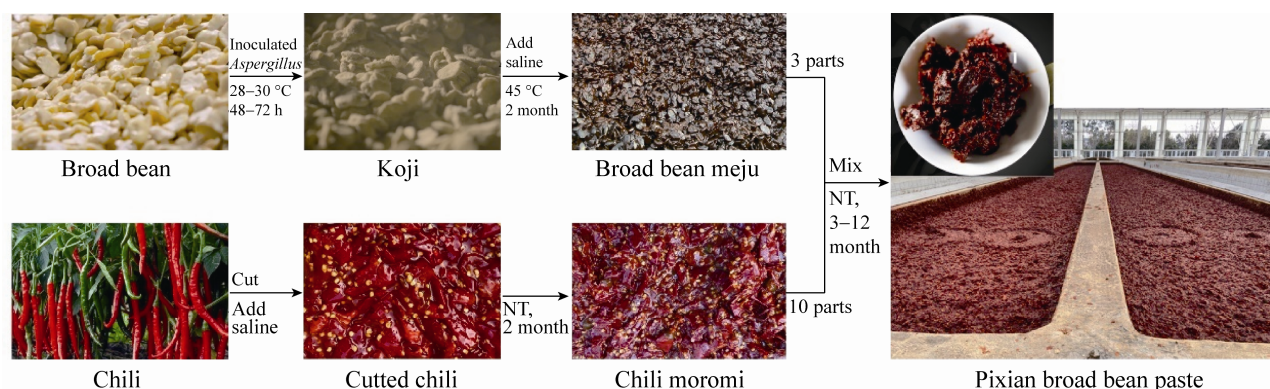


图 1. 郫县豆瓣制作流程

Figure 1. The schematic procedure of Pixian broad bean fermentation at normal temperature.

除杂、切段、加盐，常温发酵约 2 个月，形成辣椒醅(chili moromi)；同时干蚕豆脱壳、热水短时烫瓣、加面粉和米曲霉制曲(28–30 °C，48–72 h)。成曲加入盐水(18% NaCl)，45 °C 恒温发酵约 2 个月(或常温发酵 1 年)，形成蚕豆醅(broad bean meju)。发酵第二阶段：辣椒醅与蚕豆醅混合形成混合醅(10:3, M/M)，混合醅(moromi-meju mixture)常温发酵 3 个月到 3 年，最终得到郫县豆瓣。传承 300 余年的双原料双发酵酿造工艺赋予郫县豆瓣独特的风味、口感魅力及营养价值。然而，独特工艺背后的基础科学问题不清晰，限制了产品品质的控制及进一步提升。

微生物群在郫县豆瓣原料降解及风味化合物形成过程中起到不可替代的作用。同时，酿造工艺本质上即为优化生存条件以适合特定功能微生物的生长^[4]。因此，认识微生物的多样性、微生物的功能以及微生物的来源是指导生产以进行特定功能微生物生长控制的关键，也是近期研究者的热点研究方向。基于高通量测序的快速发展，郫县豆瓣混合醅酿造过程的微生物结构已研究得比较清楚，主要细菌包括 *Tetragenococcus*、

Lactobacillus、*Staphylococcus*、*Acinetobacter*、*Pseudomonas* 和 *Streptococcus* 6 个属，主要真菌包括 *Candida*、*Zygosaccharomyces* 和 *Aspergillus* 3 个属^[3,5]。同时，基于可培养及生物信息学分析，微生物的功能也将逐渐清晰^[3–6]。然而，微生物肉眼不可见且随着酿造环境实时变化，给酿造过程的微生物来源相关研究增添了难度。

另外，酿造底物及风味化合物分别是酿造微生物生长、代谢的关键物质。目前，利用核磁共振、高效气相质谱等高通量检测手段，郫县豆瓣的主要挥发性、非挥发性风味化合物被检测。目前为止，有 21 种脂类、3 种醛类、9 种有机酸、6 种醇类、3 种酚类及其他挥发性化合物，如吡嗪、呋喃化合物等在郫县豆瓣中被检测到^[6–7]。其中，有 22 种化合物对郫县豆瓣有风味贡献^[8]。尽管如此，郫县豆瓣发酵第一阶段——蚕豆醅及辣椒醅(发酵半成品)在发酵过程中底物及风味化合物结构及多样性不清晰，蚕豆醅及辣椒醅对郫县豆瓣发酵过程的贡献不清晰，也使得郫县豆瓣半成品品质控制缺乏理论支持，极大限制了郫县豆瓣的品质控制及进一步提升。

本研究通过高通量测序追踪了郫县豆瓣发酵第一阶段——蚕豆醅及辣椒醅, 和发酵第二阶段——混合醅的微生物结构及演替规律, 并利用生物信息学(Venn分析、PCA分析、Source tracking分析、相关性分析)解析混合醅发酵过程微生物来源及微生物贡献。另外, 定量检测蚕豆醅及辣椒醅挥发性、非挥发性风味化合物。研究结果明确了混合醅发酵过程中的微生物及物质(包括发酵底物及风味化合物)来源。本研究为郫县豆瓣的发酵半成品品质控制及技术升级改造提供理论基础, 也为其他传统发酵调味品的基础研究提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 样品采集

样品取自四川省郫县豆瓣股份有限公司(Sichuan Pixian douban Co., Ltd), 辣椒醅及混合醅均为常温发酵, 蚕豆醅为 45 °C 恒温发酵。本研究按发酵时间 1、7、15、22、29、39、49 d 共 7 个时间点采集辣椒醅及混合醅, 按发酵时间 1、7、15、22、29、39、49、60 d 共 8 个时间点采集蚕豆醅。取样时间为 2018 年 8 月至 2018 年 12 月。为保证取样的科学性及均一性, 每个贮存时间点选取 3 个窖池成 3 个平行样本, 每个窖池采用五点取样法^[9], 每点取约 200 g 混合成一个样本, 置于-20 °C 保藏待用。

1.2 基因组提取、PCR 扩增及测序

豆瓣酱基因组提取采用土壤基因组提取试剂盒(Omega EZNA™), 其中前处理与文献报道方法一致^[10-11]。提取得到的总 DNA 通过 Nanodrop® ND-8000 UV-Vis 进行定量, 并通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测。符合测序要求的样品(浓度>50 ng/μL,

且条带清晰)委托北京奥维森基因科技有限公司(Beijing Auwigene Tech. Ltd.)进行扩增子扩增及测序。细菌扩增以 F338 (5'-ACTCCTACGGGAGG CAGCAG-3')和 R806 (5'-GGACTACHVGGGTWT CTAAT-3')为引物, 扩增 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区^[12]。真菌扩增以 ITS3 (5'-GCATCGATGAA GAACGCAGC-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')为引物, 扩增 ITS2 区^[13], 引物两端带有 8 个随机核苷酸碱基(barcode)作为样品标签^[14]。PCR 产物在 Illumina Miseq 平台上进行 2×300 bp 双端测序。蚕豆醅中细菌和真菌的原始测序数据已上传至 DDBJ 数据库, 检索号(accession number)分别为 DRA009313 和 DRA009305。辣椒醅与混合醅中细菌与真菌的原始测序数据已上传至 NCBI, 检索号(accession number)为 PRJNA604402。

1.3 水分测定及有机酸浓度测定

水分测定与文献报道方法一致^[15]。准确称量 10 g 样品, 105 °C 干燥 2 h, 测定干燥后的质量。有机酸测定参考 Wu 等报道的方法^[16]。高效液相色谱仪(HPLC, Agilent 1260, Santa Clara, CA)系统, 搭配 Aminex HPX-87H (Bio-Rad)色谱柱及紫外检测器。紫外检测波长为 215 nm。柱温设置为 60 °C, 流动相为 5 mmol/L 的稀硫酸, 进样量为 10 μL。样品预处理参考文献报道的方法^[17-18], 并进行适当修改。具体如下: 取 5 g 样品加入 20 mL 超纯水中, 振荡混匀后, 冰浴超声(频率为 40 kHz, 超声功率为 500 W, 温度设为 0 °C, 加热功率为 1000 W)浸提 30 min; 将超声后的混合液在 4 °C 下 8000×g 离心 5 min; 为沉淀上清中的蛋白质, 取上清液加入等体积的 10%三氯乙酸, 静置 30 min。进一步取上清液用 0.22 μm 的水相滤膜过滤, 滤

液转移至液相小瓶中待测。使用标准品进行外标法定量。

1.4 氨基酸浓度测定

游离氨基酸的检测参考文献方法^[19]。使用高效液相色谱仪(HPLC, Agilent 1260, Santa Clara, CA)搭配 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱及可变波长检测器(VWD)检测器。测试前样品进行 OPA-FMOC 柱前衍生^[20]。流动相 A 为 27.6 mmol/L 的乙酸钠-三乙胺-四氢呋喃(50:0.11:2.5, V/V/V), 并通过使用乙酸将 pH 调节至 7.2。流动相 B 为 80.9 mmol/L 的乙酸钠-甲醇-乙腈混合液(1:2:2, V/V/V), 并通过使用乙酸将 pH 调节至 7.2。紫外检测波长和流速分别为 338 nm 和 1 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 10 μL。

1.5 辣椒素与二氢辣椒素浓度测定

辣椒素与二氢辣椒素的检测参考文献^[21]方法。样品预处理方法: 准确称取样品 2.5 g, 放入 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 甲醇后, 70 °C 超声(频率为 40 kHz, 超声功率为 500 W, 温度设为 70 °C, 加热功率为 1000 W)浸提 5 min, 过滤, 残渣再按上述步骤重复提取 1 次, 合并 2 次滤液定容至 50 mL。将上述滤液用 0.22 μm 有机相滤膜过滤, 转入液相小瓶中待测。检测过程采用通过高效液相色谱仪(HPLC, Agilent 1260, Santa Clara, CA)搭配反相 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱及紫外检测器。检测器设置检测波长为 280 nm。流动相为甲醇-水混合液(为 3:1, V/V), 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。使用标准品进行外标法定量。

1.6 挥发性风味成分测定

乙醇含量的检测参考 Wu 等报道的方法^[16]。

挥发性风味成分采用 GC-MS 进行检测。样品预处理方法: 称取一定质量酱醅, 用双蒸水稀释 10 倍, 随后超声(频率为 40 kHz, 超声功率为 500 W, 温度设为 0 °C, 加热功率为 1000 W)提取 30 min, 取 8 mL 稀释液于顶空瓶中, 加入 106.25 mg/L 的薄荷醇 10 μL 作为内标, 加入 3 g 氯化钠混匀待测。HS-SPME-GC-MS (GC 6890N and MS 5975; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)用于挥发性风味成分的分析^[22]。检测方法在参考文献报道基础上有微小改变^[23], 具体程序如下: 采用 FFAP 极性柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm), 气相色谱进样口和检测器温度均为 250 °C, 流动相为氦气, 流速为 2 mL/min; 进样量为 1 μL, 不分流进样; 升温程序为: 初温 50 °C, 保持 2 min, 以 6 °C/min 升至 230 °C, 230 °C 保持 15 min。质谱条件: EI 电离源, 电子轰击能量为 70 eV, 离子源温度为 230 °C; 扫描范围为 35–350 amu。

1.7 数据分析

高通量测序: 通过 QIIME (V.1.8.0)处理所有由 Miseq 生成的原始序列^[18], 所得原始序列按照 Jiang^[15]等方法进行序列质量控制处理最终得到有效序列。本研究利用 QIIME's uclust 程序将相似度为 97%有效序列归为一个 OTU (分类操作单元, operational taxonomic unit)。

Venn 分析是利用 Draw Venn Diagram 网站, 基于 OTU 数据进行的(网址: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)。本研究采用发酵第 1 天样品为混合醅代表样品, 发酵第 49 天样品为辣椒醅代表样品, 发酵第 60 天样品为蚕豆醅代表样品。采用 SPSS (version 24.0)进行基于属为分类单元的主成分分析 (principal component analysis, PCA)。分别选用蚕豆醅、辣椒醅和混合

醅各时间节点(每个时间节点 3 个平行)取样的占比前 20 个属进行分析。

Source tracking 分析: 分别计算蚕豆醅、辣椒醅和混合醅中各种微生物的相对丰度的平均值, 在 R 语言中使用 SourceTracker (版本 1.0)^[24] 预测混合醅中的微生物群落来源。将混合醅样品设置为“sink”, 蚕豆醅和辣椒醅样品设置为“source”, alpha 值设置为 0.001, 其他均使用默认设置, 门、纲、目、科、属每个分类水平上运行 3 次, 取平均值。共现性分析: 使用 QIIME2 分析蚕豆醅、辣椒醅及混合醅中物种信息, 根据来源不同分为 broad bean meju、chili moromi 及 moromi-meju mixture。在 R 语言中使用 intersect (两种或两种以上来源的微生物)与 setdiff (专一来源的微生物)函数分析微生物的来源情况。

混合醅挥发性风味成分数据分析: 采用 SPSS (version 24.0)对不同发酵时间混合醅的挥发性风味物质浓度进行 Z-Score 标准化处理, 之后使用 graph pad prism 软件进行热图绘制。本研究采用 SPSS (version24.0)进行基于微生物属与风味成分浓度的相关性分析。 $|r|$ 大于 0.6 且 P 小于 0.05 被认为是显著相关。使用 Gephi (Web Atlas, Paris, France)进行相关性网络图的绘制。

2 结果和分析

2.1 蚕豆醅、辣椒醅与混合醅的微生物群落结构及演替规律

细菌 16S rRNA 基因 V3-V4 区测序结果每个样品平均获得 36293 条序列(reads), 其中最少 18295 条, 最多 88736 条。真菌 ITS2 区测序结果每个样品平均获得 71171 条序列, 其中最少

20027 条, 最多 653324 条。稀释曲线是表征样品测序结果是否能够反映样品实际生物信息的分析方式, 本研究稀释曲线分析表明所有样品测序都达到或接近平台期, 说明本次测序可覆盖样本中绝大多数微生物种群信息。基于相似性 97%的阈值, 将获得的有效序列进行 OTU (operational taxonomic unit)聚类。

在蚕豆醅酿造过程中, 平均相对丰度大于 0.5%的原核微生物有 13 个属, 分别为葡萄球菌(*Staphylococcus*)、嗜盐杆菌(*Chromohalobacter*)、四联球菌(*Tetragenococcus*)、片球菌(*Pediococcus*)、沙门菌(*Salmonella*)、溶藻菌(*Halomona*)、魏斯氏菌(*Weissella*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、栖热分枝菌属 *Thermobrachium* 及厌氧杆菌 *Anaerobacillus*。平均相对丰度大于 0.5%的真核生物有 4 个属, 分别为曲霉(*Aspergillus*)、假丝酵母(*Candida*)、接合酵母(*Zygosaccharomyces*)及米勒氏酵母(*Millerozyma*)。曲霉属在整个蚕豆醅发酵阶段一直占据主导地位, 平均相对丰度为 77.8%, 细菌中, 前期主要微生物为葡萄球菌(*Staphylococcus*), 后逐渐演替为盐单胞菌(*Chromohalobacter*)及四联球菌(*Tetragenococcus*) (表 1)。

如图 2 所示, 在辣椒醅发酵过程中, 平均相对丰度大于 0.5%的原核微生物有 15 个属, 分别为肠杆菌(*Enterobacter*)、魏斯氏菌(*Weissella*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、根瘤菌(*Rhizobium*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、泛菌(*Pantoea*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、苍白杆菌(*Ochrobactrum*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、漫游球菌(*Vagococcus*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、

表 1. 郫县豆瓣蚕豆醅在不同发酵时间的微生物群落结构

Table 1. The microbiota community structure of broad bean meju of Pixian broad bean paste at different fermentative times

Domain	Genera/%	1 d ^a	7 d ^a	15 d ^a	22 d ^a	29 d ^a	39 d ^a	49 d ^a	60 d ^a
Bacteria	<i>Pantoea</i>	0.03	0.28	0.13	0.83	1.16	0.60	1.11	0.06
	<i>Acinetobacter</i>	1.22	0.67	0.22	0.19	3.53	0.53	0.44	0.33
	<i>Bacillus</i>	2.44	0.35	0.61	1.48	0.73	1.09	2.10	4.46
	<i>Lactobacillus</i>	0.56	4.67	1.81	1.69	1.50	0.70	1.68	2.41
	<i>Halomonas</i>	1.57	0.04	0.24	2.98	1.43	5.85	3.05	6.83
	<i>Weissella</i>	0.38	9.72	4.29	4.45	2.07	0.68	0.83	2.23
	<i>Salmonella</i>	0.35	0.43	0.22	0.04	4.61	3.46	10.02	7.51
	<i>Pediococcus</i>	1.89	10.34	2.79	1.70	1.22	0.64	18.05	2.72
	<i>Tetragenococcus</i>	0.02	0.09	17.13	7.24	4.97	7.72	2.40	6.76
	<i>Chromohalobacter</i>	0.56	0.05	0.17	30.04	35.01	34.40	23.81	14.46
	<i>Staphylococcus</i>	58.14	59.92	52.15	30.28	22.59	22.96	17.44	14.79
Fungi	<i>Millerozyma</i>	0.01	0.12	0.11	5.45	3.07	0.76	3.27	0.28
	<i>Zygosaccharomyces</i>	5.11	0.12	1.22	6.50	7.19	1.83	3.12	2.08
	<i>Candida</i>	25.29	2.18	2.59	4.55	12.15	2.42	3.11	20.95
	<i>Aspergillus</i>	63.74	96.93	93.98	67.06	62.88	90.65	78.20	69.45

^a: Fermentive times; d: days.

俊片菌(*Lampropedia*)、产酮古洛糖酸菌(*Ketogulonicigenium*)及沙雷氏菌(*Serratia*)。平均相对丰度大于 0.5%的真核生物有 4 个属,分别为假丝酵母(*Candida*)、接合酵母(*Zygosaccharomyces*)、毕赤酵母(*Pichia*)及曲霉(*Aspergillus*)。微生物数量及 α 多样性均呈现先增高后降低趋势。假丝酵母属(*Candida*)在整个辣椒醅发酵阶段一直占据主导地位,平均相对丰度为 53.7%。细菌中,魏斯氏菌属(*Weissella*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)及泛菌属(*Pantoea*)是辣椒醅发酵过程主体菌且较稳定存在。

如图 2 所示,在混合醅发酵过程中,平均相对丰度大于 0.5%的原核微生物有 13 个属,分别

为泛菌(*Pantoea*)、魏斯氏菌(*Weissella*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、片球菌(*Pediococcus*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、明串珠菌(*Leuconostoc*)、根瘤菌(*Rhizobium*)、布鲁氏菌(*Brucellaceae*)、沙雷氏菌(*Serratia*)及苍白杆菌(*Ochrobactrum*)。平均相对丰度大于 0.5%的真核生物有 5 个属,分别为假丝酵母(*Candida*)、接合酵母(*Zygosaccharomyces*)、曲霉(*Aspergillus*)、毕赤酵母(*Pichia*)及一种念珠菌(*Diutina*)。与辣椒醅相似,假丝酵母属(*Candida*)在整个混合醅发酵阶段一直占据主导地位,平均相对丰度为 54.4%。细菌中,泛菌属(*Pantoea*)与魏斯氏菌属(*Weissella*)是混合醅发酵过程主体菌且较稳定存在。

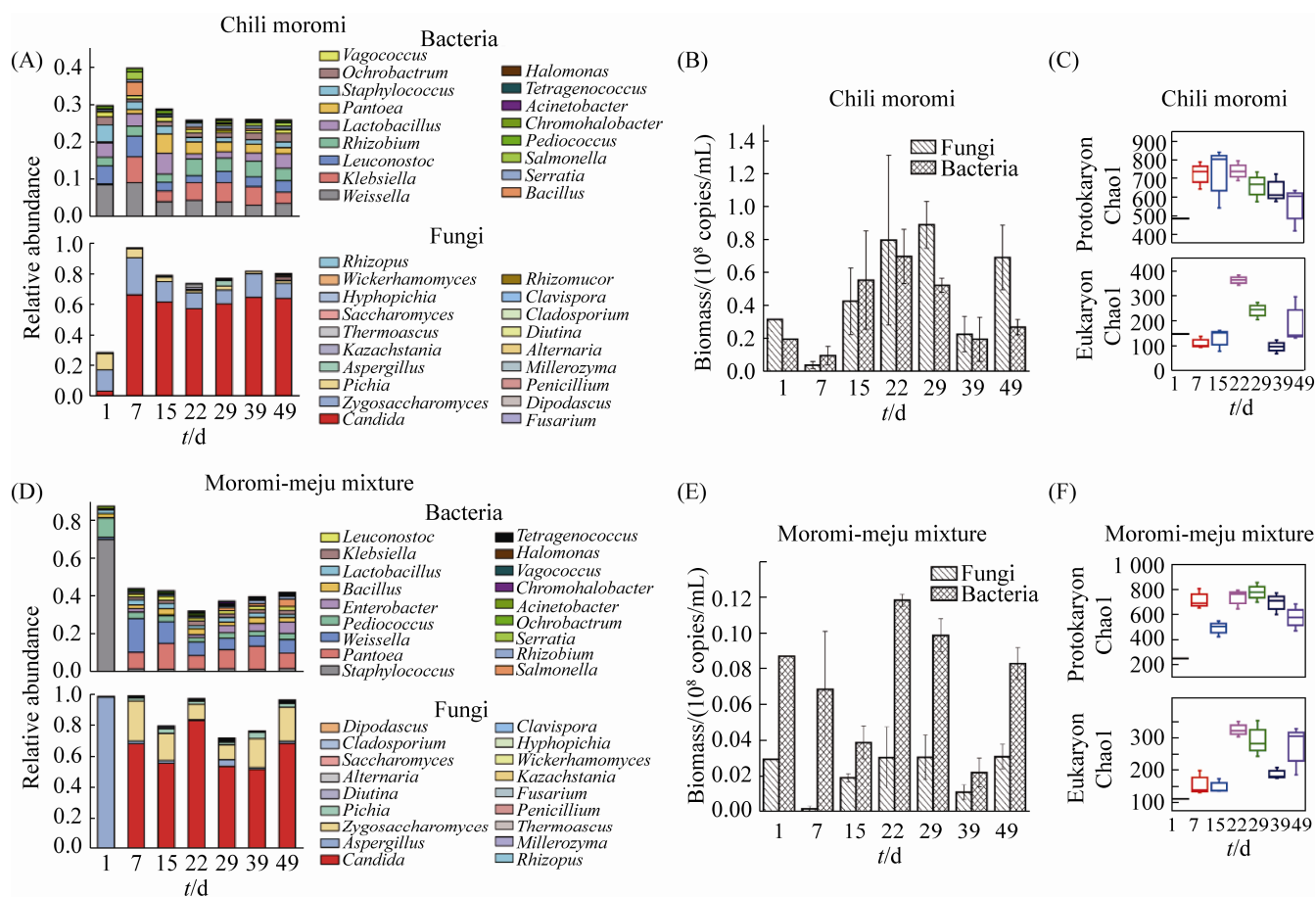


图 2. 辣椒醃及混合醃微生物群落结构及演替规律

Figure 2. Microbial community and dynamic succession in chili moromi and moromi-meju mixture. A: Microbial community of chili moromi at different fermentation time; B: Quantitative analysis of microbiota in chili moromi by RT-PCR; C: α diversity analysis (Chao1 index) of microbiota in chili moromi; D: Microbial community of moromi-meju mixture at different fermentation time; E: Quantitative analysis of microbiota in moromi-meju mixture by RT-PCR; F: α diversity analysis (Chao1 index) of microbiota in moromi-meju mixture.

2.2 混合醃的微生物来源分析

对蚕豆醃、辣椒醃及混合醃中的 OTU 进行 Venn 分析, 结果如图 3-A 所示。29 个 OTU 同时存在于蚕豆醃、辣椒醃及混合醃; 40 个细菌 OTU 同时存在于蚕豆醃与混合醃, 而 84 个细菌 OTU 同时存在于辣椒醃与混合醃。23 个真菌 OTU 同时存在于蚕豆醃与混合醃, 而 32 个真菌 OTU 同时存在于辣椒醃与混合醃。对蚕豆醃、辣椒醃及混合醃中相对丰度大于 0.1% 的属进行 PCA 分析,

结果如图 3-B 所示。除第 1 天外, 其他发酵阶段的混合醃细菌与辣椒醃细菌聚为一类, 蚕豆醃细菌聚为一类。同样地, 除第 1 天外, 其他发酵阶段的混合醃真菌与辣椒醃真菌聚为一类, 蚕豆醃真菌聚为一类。以上结果显示, 混合醃的微生物结构与辣椒醃更为接近, 而非蚕豆醃。

利用 SourceTracker 软件, 基于贝叶斯算法, 设置混合醃为目标样本(sink), 设置蚕豆醃及辣椒醃为微生物来源(source), 以门、纲、目、科、属

5 个分类单元进行混合醪微生物溯源。如图 3-C 所示,从属水平来看,44%–59%的混合醪细菌来源于辣椒醪,5%–22%的混合醪细菌来源于蚕豆醪,其他混合醪细菌来源未知;同时,42%–77%

的混合醪真菌来源于辣椒醪,2%–18%的混合醪真菌来源于蚕豆醪,其他混合醪真菌来源未知。以上结果显示,辣椒醪是混合醪发酵过程最主要的微生物来源。

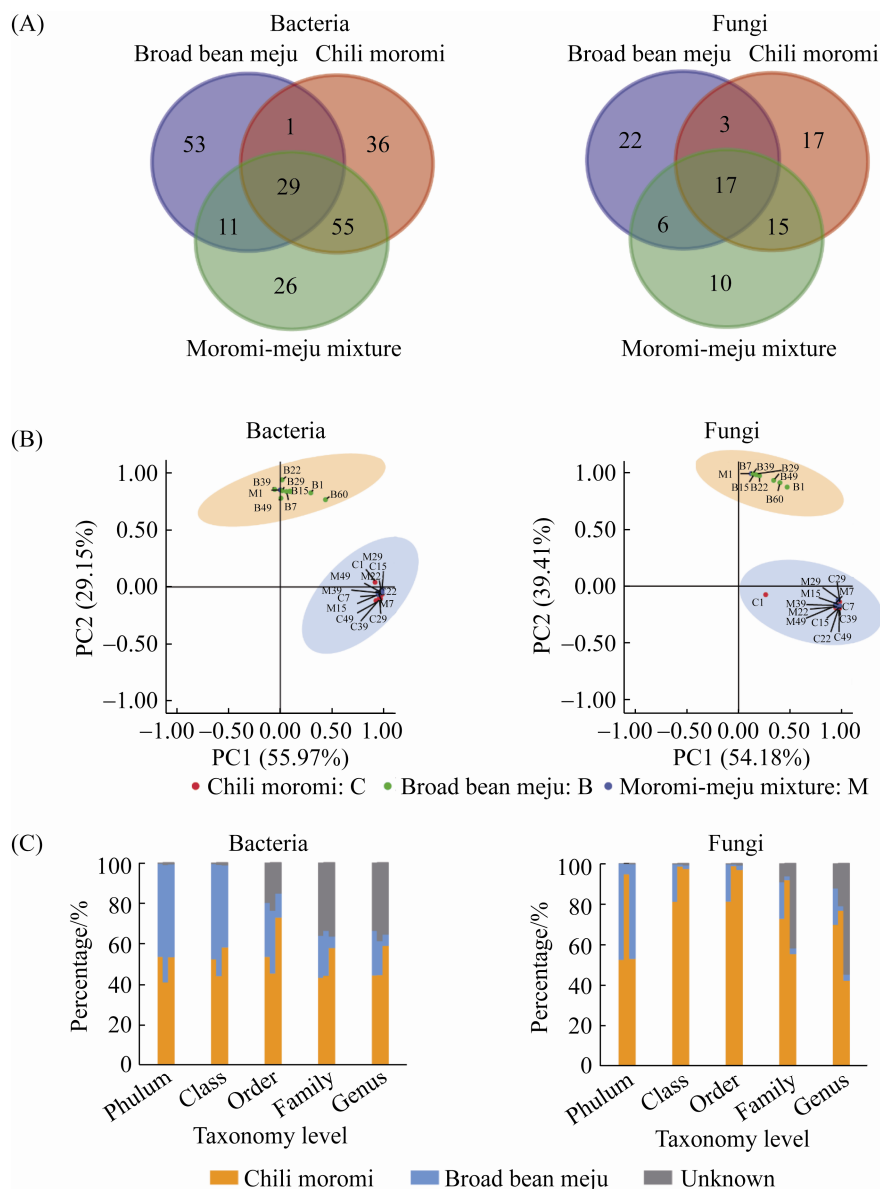


图 3. 郫县豆瓣混合醪微生物溯源分析

Figure 3. Source tracking of microbial communities in moromi-meju mixture of Pixian broad bean paste. A: Venn analysis of microbes (bacteria and fungi, OTU level) between chili moromi, broad bean meju and moromi-meju mixture; B: PCA analysis of microbes (bacteria and fungi, genus level) between chili moromi, broad bean meju and moromi-meju mixture; C: Source tracking analysis of microbes between chili moromi, broad bean meju and moromi-meju mixture; We setted chili moromi, broad bean meju as source, and setted moromi-meju mixture as sink.

本研究通过对相对丰度大于 0.1% 的微生物属进行共现性分析, 以进一步实现微生物的来源分析。如表 2 所示, 20 个混合醪细菌属同时在辣椒醪及蚕豆醪中检测得到, 而 16 个混合醪细菌属只在辣椒醪中检测得到, 2 个混合醪细菌属只在蚕豆醪中检测得到。同时, 6 个混合醪真菌属同时在辣椒醪及蚕豆醪中检测得到, 而 2 个混合醪真菌属只在蚕豆醪中检测得到。如上结果验证了辣椒醪对混合醪微生物来源的重要贡献。同时, 蚕豆醪也向混合醪特异性贡献微生物。

2.3 混合醪中微生物与挥发性风味化合物相关性分析

如上所示, 发酵半成品——蚕豆醪与辣椒醪均向郫县豆瓣后发酵过程——混合醪特异性贡献微生物, 本研究继续探究混合醪发酵阶段微生物对风味化合物的贡献。本研究首先利用 SPME-GC-MS 测定了混合醪不同发酵时间的挥发性风味物质含量(表 3, 图 4-A), 结合混合醪不同发酵时间的微生物结构, 进行了混合醪发酵微生物群落结构与

挥发性风味成分的斯皮尔曼相关性分析, 包含 36 个属(细菌及真菌)与 7 种醇类化合物、3 种醛类化合物、3 种酚类化合物、7 种酯类化合物及 3 种其他类风味物质的相关性, 相关性绝对值 $|\rho|$ 大于 0.6 且 P 小于 0.05 被认为是显著相关。如图 4 所示, 31 个微生物属和 69 种风味成分显著正相关, 6 个微生物属与 19 种风味成分显著负相关。

如表 2 所示, 蚕豆醪特异性贡献四联球菌属(*Tetragenococcus*), 后者是酱类发酵食品中的重要菌种, 已经被应用于改善鱼酱风味^[30]。四联球菌属与 2-乙酰吡咯(methyl 2-pyrrolyl ketone)、乙酸乙酯(ethyl acetate)及异戊酸乙酯(ethyl isovalerate)显著正相关, 而其中异戊酸乙酯是郫县豆瓣的关键风味物质^[8], 且这种具有水果香气的酯类也在蚕豆醪中被检测到。在蚕豆醪发酵过程中, 四联球菌属被认为是主要的产酸菌种^[6], 可能促进了异戊酸的产生, 从而促进了异戊酸乙酯的形成。因此, 蚕豆醪特异性贡献微生物, 后者对郫县豆瓣的风味成分产生积极贡献。

表 2. 郫县豆瓣微生物溯源分析

Table 2. Source tracking of microbial communities in moromi-meju mixture of Pixian broad bean paste

Domain	Source	Number	Genera
Bacteria	Chili moromi	16	<i>Rhizobium</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Lampropedia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Ketogulonicigenium</i> , <i>Pectobacterium</i> , <i>Falsirhodobacter</i> , <i>Tatumella</i> , <i>Kerstersia</i> , <i>Cronobacter</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Comamonas</i>
	Broad bean meju	2	<i>Kocuria</i> , <i>Tetragenococcus</i>
	Both CM and BBM ^a	20	<i>Staphylococcus</i> , <i>Chromohalobacter</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Weissella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Curvibacter</i> , <i>Citrobacter</i>
Fungi	Chili moromi	0	—
	Broad bean meju	2	<i>Rhizopus</i> , <i>Saccharomycetales_fam_Incertae</i>
	Both CM and BBM ^a	6	<i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Saccharomycetales_fam_Incertae</i> , <i>Pichia</i> , <i>Saccharomyces</i>

^a: Microbes can be sourced from both chili moromi and broad bean meju.

表 3. 不同发酵时间混合酯挥发性风味成分定量分析^aTable 3. The concentration of volatile flavor compounds in moromi-meju mixture at different fermentation times^a

Flavor compounds/(mg/kg)	Fermentation time/d						
	1	7	15	22	29	39	49
3-Methyl-1-butanol	ND	0.07±0.07	0.62±0.44	1.18±0.72	0.89±0.25	0.51±0.06	0.56±0.13
1-Octen-3-ol	1.39±0.39	ND	0.13±0.13	0.50±0.12	0.27±0.08	0.23±0.07	ND
Phenylethyl alcohol	ND	0.07±0.1	2.28±0.54	5.67±0.43	1.73±0.19	1.84±0.38	2.37±0.27
1-Hexanol	ND	ND	0.32±0.07	0.54±0.11	0.17±0.14	0.14±0.10	0.13±0.06
Linalool	0.29±0.22	0.85±0.61	2.76±0.16	4.95±0.53	2.09±0.38	2.07±0.49	2.20±0.32
Terpilenol	ND	0.10±0.08	0.72±0.02	1.05±0.68	0.24±0.08	0.21±0.15	0.43±0.07
Isobutanol	0.01±0.01	0.05±0.03	0.34±0.24	0.92±0.20	0.36±0.13	0.32±0.10	0.20±0.04
Benzeneacetaldehyde	ND	0.05±0.04	ND	0.55±0.09	0.10±0.01	0.12±0.02	0.33±0.04
Benzaldehyde	0.26±0.20	0.71±0.44	4.05±0.52	5.86±0.79	1.04±0.13	1.38±0.18	1.44±1.02
2-Methyl propionaldehyde	ND	0.01±0.01	0.04±0.03	0.09±0.03	0.14±0.14	0.03±0.01	0.02±0.00
4-Ethyl phenol	0.05±0.01	0.59±0.20	3.27±0.20	7.14±1.24	1.92±0.28	2.23±0.49	3.13±0.40
4-Ethyl guaiacol	ND	0.59±0.39	5.72±0.27	13.21±2.22	3.47±0.50	3.65±0.95	5.64±0.88
Phenol-(2,4-bis-1,1-dimethylethyl)	0.90±0.22	0.79±0.23	1.87±0.40	1.77±0.88	0.72±0.18	1.10±0.50	0.71±0.17
Methyl acetate	ND	ND	0.05±0.01	0.14±0.02	0.05±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00
Ethyl acetate	0.14±0.04	0.58±0.10	2.35±0.30	7.79±2.15	5.96±2.44	3.75±3.45	0.93±0.09
Ethyl isovalerate	ND	0.31±0.31	1.14±0.32	1.71±0.76	1.29±0.17	1.27±0.19	0.91±0.19
Ethyl 2-methylbutyrate	ND	0.60±0.40	0.71±0.19	0.92±0.44	0.50±0.05	0.71±0.18	0.63±0.14
Ethyl benzoate	ND	ND	0.08±0.02	0.12±0.02	0.07±0.01	0.06±0.01	0.09±0.01
Ethyl phenylacetate	ND	0.04±0.04	0.25±0.03	0.57±0.03	0.14±0.03	0.16±0.02	0.30±0.03
Ethyl palmitate	ND	ND	2.43±1.79	1.08±0.58	0.54±0.13	0.50±0.14	0.68±0.05
Furfurane	ND	ND	0.04±0.06	ND	ND	ND	ND
Furan	ND	0.02±0.02	ND	ND	0.08±0.03	0.07±0.02	0.11±0.01
Methyl 2-pyrrolyl ketone	ND	0.10±0.03	0.39±0.07	0.81±0.17	0.28±0.03	0.30±0.05	0.37±0.03

ND: not detected.

如图 4-B 所示,假丝酵母(*Candida*)与苯甲酸乙酯(ethyl benzoate)显著正相关,可能具有产生苯甲酸乙酯的能力。已经有研究报道假丝酵母是传统酿造体系的重要产香菌种^[28],具有较强的糖醇转化能力和耐盐性,可能推动了群体发酵中酯化反应及氨基酸转氨反应。如表 2 所示,假丝酵母既来源于蚕豆醪也来源于辣椒醪,而且在整个发酵体系中占据主导(图 2-D)。因此,假丝酵母极有可能是郫县豆瓣特征风味产生的关键功能微生物。该微生物的分离纯化以及相关功能分析对郫县豆瓣实现工业化可能极为重要。

如图 4-B 所示,双足囊菌属(*Dipodascus*)与多

种风味成分呈现显著正相关,包括 3-甲基-1-丁醇(3-methyl-1-butanol)、苯乙醇(phenylethyl alcohol)、1-己醇(1-hexanol)、芳樟醇(linalool)、松油醇(terpilenol)、苯乙醛(benzeneacetaldehyde)、4-乙基苯酚(4-ethyl phenol)、4-乙基愈创木酚(4-ethyl guaiacol)、乙酸乙酯(ethyl acetate)、2-甲基丁酸乙酯(ethyl 2-methylbutyrate)、苯甲酸乙酯(ethyl benzoate)、苯乙酸乙酯(ethyl phenylacetate)、棕榈酸乙酯(ethyl palmitate)与 2-乙酰吡咯(methyl 2-pyrrolyl ketone)。其中 3-甲基-1-丁醇(3-methyl-1-butanol)、苯乙醇(phenylethyl alcohol)与苯乙酸乙酯(ethyl phenylacetate)为氨基酸转氨后的产

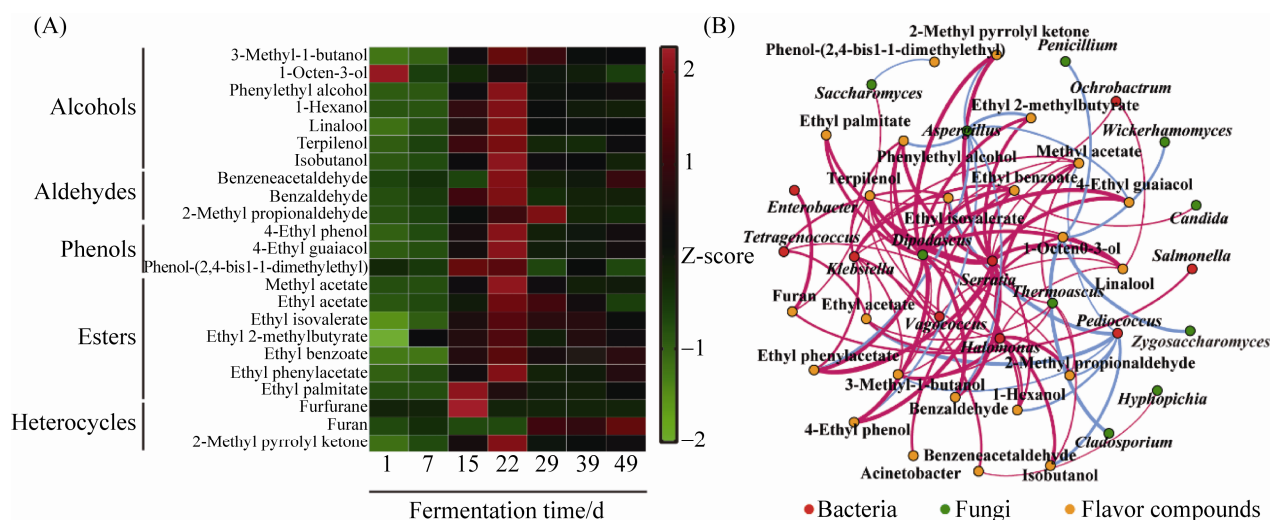


图 4. 混合醪微生物与挥发性风味化合物相关性分析

Figure 4. Correlation analysis between microbial community and volatile flavor compounds. A: The succession of flavor compounds in moromi-meju mixture (1–49 days fermentation); B: The spearman correlation network between the microbes and volatile flavor compounds in moromi-meju mixture. All edges represent significant correlation ($P < 0.05$). The thickness of lines is highly related to the value of Spearman's correlation ($|\rho| > 0.6$, $P < 0.05$). Blue edges mean negative correlation while red edges mean positive correlation.

物, 推测双足囊菌属可能参与到氨基酸分解代谢及风味化合物形成过程中。然而, 如表 2 所示, *Dipodascus* 既不来源于蚕豆醪, 也不来源于辣椒醪, 目前 *Dipodascus* 这一真菌属的来源未知。

2.4 蚕豆醪及辣椒醪对混合醪的物质贡献

实际生产中, 本轮次由发酵 49 d 的辣椒醪与发酵 60 d 的蚕豆醪混合形成混合醪。为探究蚕豆醪与辣椒醪对混合醪的物质贡献, 本研究对发酵第 49 天的辣椒醪和发酵第 60 天的蚕豆醪采样, 并测定其基础理化指标(包括 pH、水分)及挥发性、非挥发性有机化合物。将辣椒醪及蚕豆醪进行适当稀释, 经过 pH 计测定, 辣椒醪 pH 平均为 4.65, 蚕豆醪 pH 平均为 4.94。通过烘箱法, 测得辣椒醪与蚕豆醪含水量分别为 73%及 46%。另外, 本研究利用氨基酸分析仪测定氨基酸浓度, 如表 2 所示, 蚕豆醪含有 27.3 g/kg 可溶性氨

基酸, 辣椒醪含有 5.08 g/kg 氨基酸。蚕豆醪中浓度最高的氨基酸分别为谷氨酸(4.50 g/kg)、天冬氨酸(2.91 g/kg)及精氨酸(2.62 g/kg)。辣椒醪中浓度最高的氨基酸分别为天冬氨酸(1.17 g/kg)和谷氨酸(0.98 g/kg), 其余大部分氨基酸浓度在 0.10–0.30 g/kg 之间。葡萄糖是可以直接被微生物利用的碳源及能源, 本研究通过高效液相色谱测定蚕豆醪及辣椒醪中葡萄糖浓度。如表 4 所示, 蚕豆醪中葡萄糖浓度为 15.29 g/kg, 辣椒醪中葡萄糖浓度为 3.65 g/kg。由此可见, 蚕豆醪比辣椒醪中含有更高浓度的微生物发酵能源物质。

本研究分别利用 SPME-GC-MS 及 HPLC 检测发酵样品中的挥发性及非挥发性风味化合物。如表 4 所示, 在发酵 49 d 的辣椒醪中检测得到 7 种醇类化合物, 包括乙醇(ethanol)、3-甲基-1-丁醇(3-methyl-1-butanol)、苯乙醇(phenylethyl alcohol)、

表 4. 蚕豆醅及辣椒醅中挥发性及非挥发性化合物检测

Table 4. Concentrations of volatile and non-volatile compounds in broad bean meju and chili moromi (mean±SD)

Compounds	Broad bean meju	Chili moromi	Detection methods
Amino acid/(g/kg)			
Threonine (Thr)	1.33±0.12	0.28±0.04	HPLC ^a
Serine (Ser)	0.29±0.14	0.09±0.01	HPLC
Glycine (Gly)	0.89±0.09	0.11±0.02	HPLC
Alanine (Ala)	1.85±0.11	0.26±0.04	HPLC
Proline (Pro)	1.29±0.11	0.28±0.11	HPLC
Glutamic acid (Glu)	4.50±0.21	0.98±0.18	HPLC
Aspartic acid (Asp)	2.91±0.22	1.17±0.20	HPLC
Lysine (Lys)	2.33±0.12	0.24±0.05	HPLC
Histidine (His)	1.01±0.07	0.14±0.03	HPLC
Arginine (Arg)	2.62±0.06	0.35±0.04	HPLC
Methionine (Met)	0.30±0.05	0.09±0.02	HPLC
Isoleucine (Ile)	1.29±0.15	0.15±0.03	HPLC
Leucine (Leu)	2.30±0.28	0.25±0.06	HPLC
Tyrosine (Tyr)	1.40±0.09	0.19±0.04	HPLC
Phenylalanine (Phe)	1.37±0.17	0.18±0.03	HPLC
Valine (Val)	1.63±0.20	0.32±0.08	HPLC
Cysteine (Cys)	0.01±0.01	0.03±0.02	HPLC
Total amino acids	27.32±2.18	5.08±0.83	HPLC
Alcohol/(mg/kg)			
Ethanol	11870±2370	22170±4060	HPLC
3-Methyl-1-butanol	ND	1.03±0.19	GC-MS ^b
1-Octen-3-ol	1.81±0.52	ND	GC-MS
Phenylethyl alcohol	2.07±0.49	5.84±0.49	GC-MS
Hexanol	ND	0.20±0.16	GC-MS
Linalool	0.49±0.23	3.43±0.29	GC-MS
Terpineol	0.25±0.10	0.68±0.05	GC-MS
Isobutanol	ND	0.42±0.12	GC-MS
Aldehyde/(mg/kg)			
Phenylacetaldehyde	1.65±0.33	ND	GC-MS
Benzaldehyde	3.09±0.73	1.94±0.46	GC-MS
Isobutyraldehyde	0.41±0.22	ND	GC-MS
Ester/(mg/kg)			
Ethyl acetate	0.76±0.37	0.38±0.24	GC-MS
Ethyl isovalerate	0.66±0.53	0.41±0.02	GC-MS
Ethyl benzoate	0.00±0.01	0.05±0.01	GC-MS
Ethyl 2-phenylacetate	0.07±0.05	0.17±0.11	GC-MS
Ethyl palmitate	0.97±0.34	0.46±0.05	GC-MS
Phenol/(mg/kg)			
4-Ethylphenol	2.14±1.19	10.48±2.06	GC-MS
4-Ethyl-2-methoxyphenol	2.21±0.94	27.53±1.72	GC-MS

(待续)

(续表 4)

Organic acids/(g/kg)			
Citric acid	1.92±0.53	1.31±0.13	HPLC
Tartaric acid	0.34±0.06	3.92±0.12	HPLC
Malic acid	0.47±0.12	ND	HPLC
Succinic acid	11.07±1.73	2.80±0.13	HPLC
Lactic acid	1.12±0.10	1.00±0.08	HPLC
Acetic acid	1.53±0.23	0.55±0.04	HPLC
Total organic acid	16.46±2.76	9.60±0.50	HPLC
Furfural/(mg/kg)	3.3±1.35	ND	GC-MS
Glucose/(g/kg)	15.29±2.90	3.65±0.24	HPLC
Moisture/(g/kg)	460.0±0.00	730.0±0.20	Drying oven
Capsaicinoids/(mg/kg)			
Capsaicin	ND	9.63±0.61	HPLC
Dihydrocapsaicin	ND	6.06±1.26	HPLC

^a: HPLC: High performance liquid chromatography; ^b: GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry.

己醇(hexanol)、芳樟醇(linalool)、松油醇(terpineol)及异丁醇(isobutanol)。在发酵 60 d 的蚕豆醪中检测得到 5 种醇类化合物, 包括乙醇(ethanol)、1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol)、苯乙醇(phenylethyl alcohol)、芳樟醇(linalool)及松油醇(terpineol)。另外, 在辣椒醪中检测到 1 种醛类化合物、5 种脂类化合物、2 种苯酚类化合物、5 种有机酸。在蚕豆醪中检测得到 3 种醛类化合物、5 种脂类化合物、2 种苯酚类化合物、6 种有机酸及糠醛。如表 4 所示, 蚕豆醪特异性贡献 1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol)、苯乙醛(phenylacetaldehyde)、异丁醛(isobutyraldehyde)、苹果酸(malic acid)与糠醛(furfural)。辣椒醪特异性贡献辣椒素(capsaicin)、3-甲基-1-丁醇(3-methyl-1-butanol)、己醇(hexanol)与异丁醇(isobutanol)。因此, 除微生物外, 发酵半成品——蚕豆醪与辣椒醪也向郫县豆瓣后发酵过程——混合醪特异性贡献风味化合物。

3 讨论

目前国内绝大部分传统酿造调味品为单一

原料单一酿造过程, 如酱油、黄豆酱、豆豉、腐乳、食醋等以谷物或豆类为主要原料进行单阶段酿造; 而酸菜、泡菜等以蔬菜为主要原料进行单阶段酿造^[25]。随着人们消费水平的提升, 消费者对食品安全及品质更加重视, 同时人力成本显著提升, 传统酿造行业同时面对如何在保证或提升产品品质的基础上进行技术升级改造的问题^[26-28]。由于酿造工艺的不同, 日本酱油的酿造理论与自动化装备, 以及国内传统酿造调味品的技术升级成功经验, 很难被郫县豆瓣酿造直接借鉴。因此, 探究郫县豆瓣本身的基础科学问题对郫县豆瓣技术升级尤为关键。其中, 发酵第一阶段对发酵第二阶段具体起到什么作用是首先要解决的问题。

蚕豆醪是由于蚕豆及面粉制曲后加盐得到, 发酵底物为丰富的蛋白质与淀粉^[29], 后者经固态制曲后被水解为肽、氨基酸与葡萄糖。如本研究结果可知, 蚕豆醪可能提供了绝大部分的发酵底物——氨基酸及葡萄糖, 为混合醪微生物提供宝贵的物质与能源。虽然研究者前期在蚕豆醪发酵过程中发现功能微生物群, 后者可以在高盐、半

固态的蚕豆醅发酵期间分解多肽生成氨基酸(数据未发表)。蚕豆醅制曲过程仍然是产生蛋白酶、淀粉酶的关键,曲的好坏决定了蚕豆醅是否能提供充足的郫县豆瓣酿造所需发酵底物^[27]。因此,制曲过程优良曲霉选育、原料预处理及制曲工艺优化以有利于蛋白质及淀粉的降解,是蚕豆醅乃至混合醅品质的关键。

本研究对混合醅发酵过程重要微生物进行来源分析,为发酵半成品的品质控制提供理论基础。然而,双足囊菌属(*Dipodascus*)与多种风味成分呈现显著正相关,是潜在的重要风味化合物产生菌,却既不来源于蚕豆醅,也不来源于辣椒醅。事实上,无论是细菌还是真菌微生物,都存在一定比例的未知来源微生物,其中,细菌最低占比为19%,真菌最低占比为5%。郫县豆瓣酿造工艺复杂,决定了微生物来源分析的复杂性。以双足囊菌属为代表的未知来源微生物,可能来源于混合醅发酵过程中外界环境(工人操作、工具、操作时空气等)。另外,蚕豆醅及辣椒醅中的低丰度微生物,在混合醅中因有了合适的营养及环境微生物的互助条件而得以生长,也有可能導致微生物来源分析结果为未知。风味化合物产生相关微生物的控制对郫县豆瓣风味产生至关重要,因此,未知来源微生物的功能鉴定及来源分析可能是郫县豆瓣后续研究的重点之一。

辣椒素(capsaicin)是一种极度辛辣的天然植物类生物碱,是辣椒的重要且独特成分。辣椒素已被证实对微生物有抑制作用。研究发现,辣椒素可以抑制食品污染菌的繁殖,包括大肠杆菌(*E. coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等^[31-33];同时,辣椒

素对胃病原菌幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)也有抑制效果^[34]。在本研究中,以属为分类单元,蚕豆醅、辣椒醅与混合醅的微生物数目基本一致。但生物信息学分析显示,辣椒醅,而非蚕豆醅,与混合醅微生物结构更相近,且 Source Tracking 显示酿造过程中绝大部分微生物来源于辣椒醅。除辣椒醅加入比例较大,上述结果可能还与辣椒醅和混合醅存在辣椒素,后者特异性抑制某些微生物的生长有关。

如上所述,辣椒作为原料为发酵过程提供辣椒素。除抑菌外,辣椒素被发现具有抗氧化、抗癌及抗肥胖等功效,是郫县豆瓣中宝贵的生物活性资源^[35-37]。另外,辣椒素可被地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、犹他游动放线菌(*Actinoplanes utahensis*)等微生物降解,在酰基转移酶(acylase)及胺氧化酶(amino oxidase)催化作用下生成芳草醛(vanillin,也称香兰素),后者是一种极具价值的风味化合物^[38-40]。本研究仅在辣椒醅发酵中期个别样品中检测到微量的芳草醛(数据未给出),可能与降解微生物或相关酶活性较低有关。关于芳草醛对郫县豆瓣的风味贡献能力,以及芳草醛在郫县豆瓣的合成功能微生物等相关研究相对匮乏,然而,鉴于芳草醛的独特风味价值,后续如何有效降解辣椒素以提高芳草醛含量可能是提升郫县豆瓣风味的研究方向之一。

本研究通过高通量测序、高通量化合物检测及生物信息学分析,解析郫县豆瓣酿造半成品——蚕豆醅及辣椒醅,以及混合醅发酵过程中微生物及风味化合物多样性并进行溯源分析。研究结果对郫县豆瓣发酵半成品的品质控制指标提供理论基础,也为其他发酵调味品的基础研究提供有益借鉴。

参 考 文 献

- [1] 中国非物质文化遗产网. 豆瓣传统制作技艺(郫县豆瓣传统制作技艺). <http://www.ihchina.cn/Article/Index/detail?id=14636>. 2020-02-03.
- [2] Li YJ. Analysis of “Pixian bean paste”. *Sichuan Food and Fermentation*, 2008, 44(1): 19–23. (in Chinese)
李幼筠. “郫县豆瓣”剖析. *四川食品与发酵*, 2008, 44(1): 19–23.
- [3] Lu YH, Tan XY, Lv YP, Yang GH, Chi YL, He Q. Physicochemical properties and microbial community dynamics during Chinese horse bean-chili-paste fermentation, revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Food Microbiology*, 2020, 85: 103309.
- [4] Wolfe BE, Dutton RJ. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell*, 2015, 161(1): 49–55.
- [5] Li Z, Dong L, Huang Q, Wang X. Bacterial communities and volatile compounds in Doubanjiang, a Chinese traditional red pepper paste. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(6): 1585–1594.
- [6] Li ZH, Rui JP, Li XZ, Li JB, Dong L, Huang QL, Huang C, Wang ZP, Li L, Xuan P, Tang YM, Chen FS. Bacterial community succession and metabolite changes during doubanjiang-meju fermentation, a Chinese traditional fermented broad bean (*Vicia faba* L.) paste. *Food Chemistry*, 2017, 218: 534–542.
- [7] Lin HB, Yu XY, Fang JX, Lu YH, Liu P, Xing YG, Wang Q, Che ZM, He Q. Flavor compounds in Pixian broad-bean paste: non-volatile organic acids and amino acids. *Molecules*, 2018, 23(6): 1299.
- [8] Lu YH, Chi YL, Lv YP, Yang GH, He Q. Evolution of the volatile flavor compounds of Chinese horse bean-chili-paste. *LWT*, 2019, 102: 131–135.
- [9] Wang P, Wu Q, Jiang XJ, Wang ZQ, Tang JL, Xu Y. *Bacillus licheniformis* affects the microbial community and metabolic profile in the spontaneous fermentation of *Daqu* starter for Chinese liquor making. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 250: 59–67.
- [10] 王海燕. PCR-DGGE技术对清香型汾酒微生物群落结构演变规律的研究. 江南大学硕士学位论文, 2014.
- [11] Wang SL, Wu Q, Nie Y, Wu JR, Xu Y. Construction of synthetic microbiota for reproducible flavor compound metabolism in Chinese Light-aroma-type liquor produced by solid-state fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(10): e03090-18.
- [12] Zhang XL, Tian XQ, Ma LY, Feng B, Liu QH, Yuan LD, Fan CQ, Huang HL, Yang Q. Biodiversity of the symbiotic bacteria associated with toxic marine dinoflagellate *alexandrium tamarense*. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2015, 3(6): 57105.
- [13] Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S, Sato H. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40863.
- [14] Soergel DAW, Dey N, Knight R, Brenner SE. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *The ISME Journal*, 2012, 6(7): 1440–1444.
- [15] Jiang J, Liu YC, Li HH, Yang Q, Wu Q, Chen SX, Tang J, Xu Y. Modeling and regulation of higher alcohol production through the combined effects of the C/N ratio and microbial Interaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(38): 10694–10701.
- [16] Wu Q, Chen LQ, Xu Y. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese *Maotai*-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(2): 323–330.
- [17] 张艳. 酱香型白酒发酵中乳酸菌群结构及功能研究. 江南大学硕士学位论文, 2015.
- [18] Wang XS, Du H, Zhang Y, Xu Y. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(4): e02369-17.
- [19] Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Sureshkumar K. Simultaneous determination of 17 amino acids in microbial pigments from *Monascus spp* by UHPLC amino acid analyser using pre-column derivatization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2016, 5(3): 354–362.
- [20] Zhang LJ, Cao YL, Tong JN, Xu Y. An alkylpyrazine synthesis mechanism involving L-threonine-3-dehydrogenase describes the production of 2,5-dimethylpyrazine and 2,3,5-trimethylpyrazine by *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(24): e01807-19.
- [21] Jia HF, Peng DC, Liang AH, He JH, Chen ZM, He ZF. Fast determination of capsaicinoids in Douban by high-performance liquid chromatography. *China Condiment*, 2012, 37(2): 104–108. (in Chinese)
贾洪峰, 彭德川, 梁爱华, 何江红, 陈祖明, 贺稚非. 高效液相色谱法测定豆瓣中辣椒素类物质含量. *中国调味*

- 品, 2012, 37(2): 104–108.
- [22] Liu CC, Feng SB, Wu Q, Huang HQ, Chen ZX, Li SW, Xu Y. Raw material regulates flavor formation via driving microbiota in Chinese liquor fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1520.
- [23] He ZL, Fan WL, Xu Y, He SG, Liu XY. The free volatile compounds of the *Cinnamomum cassia* Presl leaf, the raw material of Qu in Chinese Chixiang aroma-type liquor. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(2): 182–186. (in Chinese)
何张兰, 范文来, 徐岩, 何松贵, 刘兴益. 豉香型白酒制曲原料中肉桂叶游离态挥发性成分. *食品与发酵工业*, 2018, 44(2): 182–186.
- [24] Knights D, Kuczynski J, Charlson ES, Zaneveld J, Mozer MC, Collman RG, Bushman FD, Knight R, Kelley ST. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods*, 2011, 8(9): 761–763.
- [25] Ren C, Du H, Xu Y. Advances in microbiome study of traditional Chinese fermented foods. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 885–898. (in Chinese)
任聪, 杜海, 徐岩. 中国传统发酵食品微生物组研究进展. *微生物学报*, 2017, 57(6): 885–898.
- [26] Wang B, Chen J, Du GC, Fang F. Classification and characteristics of *Tetragenococcus halophilus* derived from moromi. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1826–1838. (in Chinese)
王博, 陈坚, 堵国成, 方芳. 酱醪嗜盐四联球菌的分类及特性研究. *微生物学报*, 2018, 58(10): 1826–1838.
- [27] Pan L, Wang B, Guo Y. RAPD analysis of *Aspergilli* and its application in brewing industry. *Acta microbiologica Sinica*, 2007, 47(3): 533–536. (in Chinese)
潘力, 王斌, 郭勇. 曲霉菌的 RAPD 分析及其在酿造工业中的应用. *微生物学报*, 2007, 47(3): 533–536.
- [28] Cui RY, Zheng J, Wu CD, Zhou RQ. Effect of different halophilic microbial fermentation patterns on the volatile compound profiles and sensory properties of soy sauce moromi. *European Food Research and Technology*, 2014, 239(2): 321–331.
- [29] Zhao GZ, Ding LL, Pan ZH, Kong DH, Hadiatullah H, Fan ZC. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, 2019, 271: 606–613.
- [30] Udomsil N, Rodtong S, Choi YJ, Hua YL, Yongsawatdigul J. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(15): 8401–8408.
- [31] Bacon K, Boyer R, Denbow C, O'Keefe S, Neilson A, Williams R. Evaluation of different solvents to extract antibacterial compounds from jalapeno peppers. *Food Science & Nutrition*, 2017, 5(3): 497–503.
- [32] Erfanimanesh S, Eslami G, Taherpour A, Hashemi A. Capsaicin inhibitory effects on *Vibrio cholerae* toxin genes expression. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2019, 9(3): 187–194.
- [33] Wei YX, Shuai L, Guo DS, Li S, Wang FL, Ai GH. Study on antibacterial activity of capsaicin. *Food Science*, 2006, 27(8): 76–78. (in Chinese)
魏玉西, 帅莉, 郭道森, 李钊, 王馥丽, 艾桂花. 辣椒碱的抑菌活性研究. *食品科学*, 2006, 27(8): 76–78.
- [34] Jones NL, Shabib S, Sherman PM. Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 146(2): 223–227.
- [35] Srinivasan K. Biological activities of red pepper (*Capsicum annum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(9): 1488–1500.
- [36] Chapa-Oliver AM, Mejia-Teniente L. Capsaicin: from plants to a cancer-suppressing agent. *Molecules*, 2016, 21(8): 931.
- [37] Zheng J, Zheng S, Feng QY, Zhang Q, Xiao XH. Dietary capsaicin and its anti-obesity potency: from mechanism to clinical implications. *Bioscience Reports*, 2017, 37(3): BSR20170286.
- [38] Cho S, Moon HI, Hong GE, Lee CH, Kim JM, Kim SK. Biodegradation of capsaicin by *Bacillus licheniformis* SK1230. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2014, 57(3): 335–339.
- [39] Romano D, Gandolfi R, Guglielmetti S, Molinari F. Enzymatic hydrolysis of capsaicins for the production of vanillylamine using ECB deacylase from *Actinoplanes utahensis*. *Food Chemistry*, 2011, 124(3): 1096–1098.
- [40] van den Heuvel RHH, Fraaije MW, Laane C, van Berkel WJH. Enzymatic synthesis of vanillin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(6): 2954–2958.

Diversity and source tracking of microbial community in Pixian broad bean paste

Yida Bao¹, Lijie Zhang¹, Pengfei Zheng¹, Haifeng Chen², Jiaquan Huang², Yan Xu^{1*}

¹Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

²Sichuan Pixian Douban Co., Ltd., Chengdu 611700, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] We studied the diversity and traced the source of microbial community in Pixian broad bean paste and its two semi-fermented products, including broad bean meju and chili moromi. In addition, we also characterized the flavor compounds in Pixian broad bean paste. [Methods] High throughput sequencing was used to explore the microbial community structure and succession. Meanwhile, high throughput liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry were used to determine the concentrations of nonvolatile and volatile flavor compounds. Multiple bioinformatic methods were used to trace the microbes and flavor compounds in Pixian broad bean paste. [Results] Chili moromi contributes 44% to 59% bacterial communities and 42% to 77% fungal communities to Pixian broad bean paste fermentation. Broad bean meju contributes 5% to 22% bacterial communities and 2% to 18% fungal communities to Pixian broad bean paste fermentation. In addition, 16 bacterial genera were only contributed by chili moromi. Two bacterial genus and two fungal genera are only contributed by broad bean meju. In addition, 1-octen-3-ol, phenylacetaldehyde, isobutyraldehyde, malic acid and furfural were only traced from broad bean meju. Capsaicin, 3-methyl-1-butanol, hexanol and isobutanol were only traced from chili moromi. [Conclusion] Chili moromi contributes the main microbial communities to Pixian broad bean paste, while broad bean meju contributes the main substrates (including amino acids and glucose). Two semi-fermented products, including chili moromi and broad bean meju, contributed their unique microbes and flavor compounds to Pixian broad bean paste, which might be the reason why Pixian broad bean paste has the characteristic aroma and taste.

Keywords: Pixian broad bean paste, broad bean meju, chili moromi, microbial diversity, source tracking

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key R&D Program of China (2018YFC1604100) and by the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-12)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 14 February 2020; Revised: 11 May 2020; Published online: 10 July 2020