



# 一种自下而上的合成微生物组理性构建策略，用于郫县豆瓣发酵剂设计

郑鹏飞，张丽杰\*，王栋\*，徐岩

江南大学生物工程学院，工业生物技术教育部重点实验室，酿造微生物学与应用酶学研究室，  
江苏 无锡 214122

郑鹏飞，张丽杰，王栋，徐岩. 一种自下而上的合成微生物组理性构建策略，用于郫县豆瓣发酵剂设计. 微生物学报, 2022, 62(10): 3913–3931.

Zheng Pengfei, Zhang Lijie, Wang Dong, Xu Yan. A bottom-up strategy for constructing a synthetic microbiome and its application to the design of Pixian Douban starter. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3913–3931.

**摘要：**【目的】提出一种合成微生物组的理性构建策略，用于构建郫县豆瓣蚕豆醅初始发酵的微生物组合菌剂。【方法】采取自下而上的合成微生物组理性构建策略，以相对丰度、频率和特征向量中心度作为核心微生物属的选择指标，分析确定蚕豆醅发酵核心微生物；设计模拟原位体系的全合成培养基，并利用该培养基快速、稳定地检测核心微生物包括产香性能在内的发酵特征。基于核心微生物的产香互补性能进行双菌组合发酵实验，结合核心微生物之间的生长相互作用，设计三菌组合发酵菌剂并验证其发酵性能。【结果】本研究确定并分离了郫县豆瓣蚕豆醅发酵过程中的9种核心微生物。检测核心微生物产生的挥发性风味化合物，发现酵母菌类、乳酸菌类和其他类微生物之间存在产香互补关系。然后，结合微生物间的生长抑制关系设计了由乳酸片球菌、肉葡萄球菌及异变假丝酵母组成的三菌组合菌剂。与企业原位发酵样品相比，三菌组合菌剂产生的挥发性化合物数量达到原位样品的63.1%，化合物种类结构较为相似。与原位样品相比，组合菌剂样品氨基酸态氮浓度提升了21.8%。【结论】本研究提出了一种自下而上的合成微生物组理性构建策略，基于此策略设计了郫县豆瓣蚕豆醅发酵组合菌剂。使用该组合菌剂作为起始发酵剂发酵的郫县豆瓣蚕豆醅具有良好的风味谱和优异的氨基酸态氮水平。本研究在合成微生物组构建与发酵食品

**基金项目：**国家重点研发计划(2018YFC1604100)；固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金(2018GTY003)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604100) and by the Solid-State Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province (2018GTY003)

\*Corresponding authors. Tel: +86-510-85918201; E-mail: ZHANG Lijie, zhanglj@jiangnan.edu.cn, WANG Dong, dwang@jiangnan.edu.cn

Received: 22 February 2022; Revised: 18 March 2022; Published online: 9 June 2022

工艺改造方面具有较大的科学与应用价值。

**关键词:** 合成微生物组; 发酵剂; 郫县豆瓣; 蚕豆醪; 风味化合物

## A bottom-up strategy for constructing a synthetic microbiome and its application to the design of Pixian Douban starter

ZHENG Pengfei, ZHANG Lijie\*, WANG Dong\*, XU Yan

Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] This study aimed to construct a synthetic microbiome which would be used as a starter for Pixian Douban (broad bean paste) fermentation. [Methods] We analyzed core microorganisms of Pixian Douban fermentation by the combined indicators, including microbial relative abundance, frequency and eigenvector centrality. Then a fully synthetic medium which simulated the *in situ* fermentation system was designed and used to explore the growth and aroma-producing characteristics of core microorganisms. According to the complementary aroma-producing characteristics of core microorganisms, a two-strain co-fermentation experiment was conducted. Moreover, taking the microbial interactions into account, we designed a three-strain community and verified its fermentation performance. [Results] In this study, 9 microorganisms were identified and isolated from Pixian Douban as the core microorganisms. Then the volatile profiles of these core microorganisms were detected and a complementary aroma-producing relationship was found among yeasts, lactic acid bacteria and other microorganisms. Combining the growth inhibition relationship among microorganisms, we formed a three-strain combined inoculum, including *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus carnosus* and *Candida versatilis*. With the three-strain community as the fermentation starter, the fermentation samples showed 63.1% similarity of flavor compounds and 21.8% improvement of amino acid nitrogen content compared to the *in situ* samples. [Conclusion] A bottom-up strategy for constructing a synthetic microbiome community was proposed, and a three-strain microbial community as the starter for Pixian Douban production was built. This study is valuable for synthetic microbiome construction and fermentation process optimization.

**Keywords:** synthetic microbiome; starter; Pixian Douban; broad bean paste; flavor compounds

郫县豆瓣(Pixian Douban)是一种辣味蚕豆发酵酱, 生产于四川省成都市郫都区, 为国家地理标志产品, 被誉为“川菜之魂”。2018年, 郫县豆瓣及衍生产品覆盖全国超过65%的餐饮业, 产值近200亿。包含郫县豆瓣在内的发酵食品不仅给予人们感官上的享受, 也提供了维生素、矿物质、热量和其他营养物质<sup>[1]</sup>, 并参

与肠道微生物群的组建<sup>[2]</sup>, 将底物转化为具有生物活性的代谢产物<sup>[3]</sup>, 从而表现出对健康的有益影响, 如抗高血压、抗癌、抗炎等<sup>[4]</sup>。然而, 以郫县豆瓣为代表的传统发酵食品大多采用暴露于环境中的开放式发酵<sup>[5]</sup>, 季节更替及人工操作等外界条件变化均会影响产品品质与稳定性。随着人们对低盐等健康饮食需求的增

加, 传统的、开放式的人工或半机械化操作已经难以满足产业的实际需求。因此, 设计混合微生物菌剂作为发酵起始培养物(starter), 配合全封闭式的机械化发酵生产, 使得其微生物结构、演替规律及风味化合物产生与传统发酵相似或独具特点, 具有重要的科学意义和实用价值。

受益于高通量测序的快速发展, 郫县豆瓣微生物结构及演替规律相关研究逐步深入。2017–2020年, 研究人员相继解析了郫县豆瓣微生物结构, 其中细菌主要包括葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、色盐杆菌属(*Chromohalobacter*)、四联球菌属(*Tetragenococcus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*), 真菌主要包括曲霉属(*Aspergillus*)、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*)和米勒氏酵母属(*Millerozyma*)<sup>[6–7]</sup>。另一方面, 风味化合物是发酵过程中一系列生物或化学反应的产物, 是衡量发酵食品质量的重要指标之一<sup>[3]</sup>。到目前为止, 研究人员已经在郫县豆瓣中共检测到 100 多种挥发性化合物, 主要包括醇、醛、酮、酸和酯等, 并通过气相色谱-嗅闻法(GC-O)、香气活性值(OAV)和香气缺失重组实验等方法确定了 50 多种化合物为香气活性化合物或关键风味化合物, 如苯乙醇、1-辛烯-3-醇、4-乙基愈创木酚、丙酮、糠醛、异戊醛、苯乙醛和乙酸乙酯等<sup>[8–11]</sup>。郫县豆瓣在微生物结构及关键风味化合物解析方面的重要突破, 为本研究中混合微生物菌剂的设计奠定了坚实基础。

目前, 混合微生物菌剂(发酵剂)的设计通常遵循合成微生物组的 2 种构建思路。第一种, 由于原位菌群的复杂性以及对微生物菌群分子层面的有限了解, 研究者通常采用自上而下的方法, 通过控制环境条件定向驯化微生物菌群

得到一个具有理想功能的合成微生物组<sup>[12–13]</sup>。第二种, 对微生物个体特性进行研究, 通过微生物代谢特征和相互作用构建能够达到理想功能的微生物群落。随着多组学检测技术的发展, 自下而上的理性设计方法逐渐具有了实现的可能<sup>[14]</sup>。然而, 受限于对代谢机制的有限了解, 大多数自下而上的设计都是用于构建由模式微生物组成的简单群落。例如, 将乙酰二醇紫杉醇前体的合成途径划分到不同的菌株, 通过菌株之间的分工达到了较高的乙酰二醇紫杉醇产量<sup>[15]</sup>。而在发酵食品领域, 研究人员以发酵蚕豆酱为研究对象, 通过自下而上的设计手段构建了由 5 种微生物组成的合成微生物组, 实现了低盐条件下的 6 周快速发酵<sup>[14]</sup>。目前, 发酵食品合成微生物组研究关注点在于核心微生物选择, 然而, 不同微生物间复杂的相互作用对微生物组的功能具有重要影响, 值得深入探究。

本研究提出了一种可用于构建具有复杂功能合成微生物组的理性策略(图 1), 并将该策略应用于郫县豆瓣蚕豆醅混合菌剂的构建, 并验证其发酵性能。首先, 根据该策略筛选确定了郫县豆瓣蚕豆醅发酵过程中的核心微生物; 然后, 基于设计的全合成培养基进行核心微生物的纯种发酵, 验证其产香发酵性能; 根据“产香互补”原则进行双菌种组合发酵; 最后, 依据核心微生物的产香性能及相互作用关系, 理性设计三菌微生物组合并进行固态模拟发酵。本研究在合成微生物组研究领域具有良好的科学意义, 在郫县豆瓣的工业化应用方面具有重大的潜在应用价值, 并为其他发酵食品传统工艺改造提供了典型范例。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集

郫县豆瓣蚕豆醅原位发酵样品取自四川省郫县豆瓣股份有限公司(Sichuan Pixian Douban

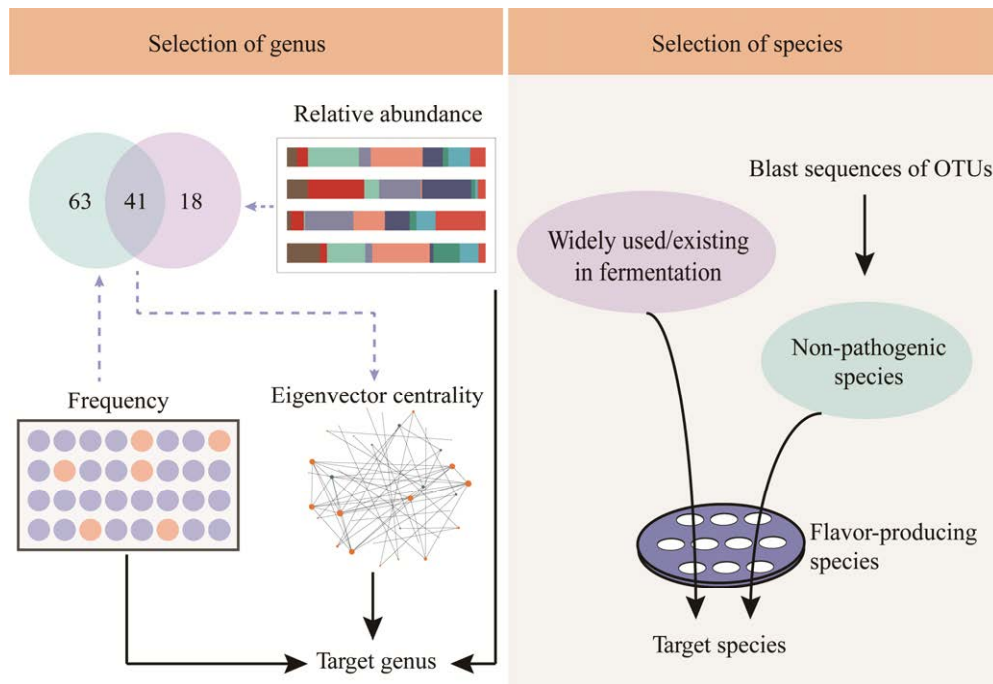


图 1 郫县豆瓣蚕豆醅发酵核心微生物鉴定流程

Figure 1 The identification process of core microorganisms in Pixian Douban broad bean meju.

Co. Ltd.), 取样时间为 2021 年 9 月。为保证取样的科学性及均一性, 每个贮存时间点选取 3 个窖池作为 3 个平行样本, 每个窖池采用五点取样法<sup>[16]</sup>, 每点取约 200 g 混合成一个样本, 置于 $-80^{\circ}\text{C}$  保藏待用。

## 1.2 菌株和培养基

本研究所用的相关菌种为易变假丝酵母(*Candida versatilis*)、鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces*

*rouxii*)、肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、融合魏斯氏菌(*Weissella confusa*)、嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)、植物乳杆菌 [*Lactobacillus plantarum*/*Lactiplantibacillus plantarum* (currently)], 以上菌种均筛选自郫县豆瓣发酵样品中, 详见表 1。

表 1 本研究用到的菌种

Table 1 Strains used in this study

Laboratory number	Names	Sources
LBM 12001	<i>Staphylococcus carnosus</i>	Isolated from Pixian Douban
LBM 12002	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Isolated from Pixian Douban
LBM 12003	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Isolated from Pixian Douban
LBM 12004	<i>Weissella confusa</i>	Isolated from Pixian Douban
LBM 12005	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Isolated from Pixian Douban
LBM 12006	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Isolated from Pixian Douban
LBM 22001	<i>Candida versatilis</i>	Isolated from Pixian Douban
LBM 22002	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Isolated from Pixian Douban

种子培养基: LB 培养基(葡萄球菌属)、YPD 培养基(酵母菌)、MRS 培养基(乳酸菌)。

种曲培养基: 按照麸皮:面粉为 7:3 的比例, 在 250 mL 三角瓶中加入 20 g 过 10 目筛的干料, 并加入干料量 70% (V/W)的蒸馏水, 拌匀。121 °C、 $0.1 \times 10^3$  Pa 灭菌 20 min。

本研究所设计使用的全合成培养基是根据郫县蚕豆酱中糖类<sup>[6]</sup>和氨基酸<sup>[7]</sup>的浓度设计的, 金属离子等微量成分参考相关报道<sup>[17-19]</sup>, 各组分按表 3 浓度配制混匀后使用无菌的 0.22  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤除菌。

### 1.3 核心微生物发酵特征

酵母菌、乳酸菌和肉葡萄球菌种子液分别使用 YPD 培养基、MRS 培养基和 LB 培养基, 在 30 °C 下静置培养 48 h。培养后的种子液使用无菌生理盐水(0.85% NaCl 溶液)清洗, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集菌体沉淀, 使用灭菌的生理盐水吹吸混匀, 再次离心, 重复 3 次。最后使用无菌生理盐水将清洗 3 次后的菌体沉淀混匀, 并调整  $OD_{600}$  至 0.7。

在 50 mL 灭菌离心管中加入 30 mL 无菌全合成培养基, 将上述清洗并调整  $OD_{600}$  至 0.7 的单菌或多菌株组合(多种微生物同时接种时等比例混合)以 3% (V/V)的比例接种至全合成培养基中, 混匀, 旋紧盖子并用封口膜密封, 30 °C 下静置发酵 6 d。

### 1.4 核心微生物相互作用

使用无菌生理盐水将生长至对数生长期的不同微生物菌液清洗并调整  $OD_{600}$  至 0.7。使用上述过滤除菌的全合成培养基与无菌琼脂(121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 并冷却至 50–60 °C, 2%, W/V)在无菌条件下混合, 倒平板, 制成固体培养基。在固体培养基上涂布 100  $\mu\text{L}$  微生物菌液 A (菌液 A、B 均已清洗并调整  $OD_{600}$  至 0.7), 随后将浸满另一种微生物菌

液 B 的滤纸片(菌液 B 体积按滤纸片和平板面积的比值计算, 即菌液 A 体积:菌液 B 体积=平板面积:滤纸片面积)放置在上述涂布菌液 A 的固体培养基上, 正放, 30 °C 静置培养 2 d。观察滤纸片与平板之间是否存在明显的分界线, 并以此判断微生物之间是否存在生长抑制关系。

## 1.5 固态模拟发酵

### 1.5.1 种曲制备

使用 PDA 斜面培养基培养米曲霉 3.042 (购自中国工业微生物菌种保藏管理中心, CICC 2339), 培养 2–3 d 后, 将孢子用接种针接入种曲培养基, 摇匀后, 30 °C 静置培养 3 d, 血球计数法计数种曲中的孢子数。

### 1.5.2 成曲制备

按照企业烫瓣与浸泡条件处理制曲用的蚕豆。面粉与处理后的蚕豆按照 1:3 的质量比混合。以  $6.75 \times 10^6$  个孢子/g 干料的比例接种一定量的种曲至曲料中, 搅拌均匀后在温度为 28 °C, 湿度为 70%的条件下制曲约 72 h, 每隔 12 h 翻曲 1 次, 直到接种米曲霉的曲料上长满黄绿色的孢子。

### 1.5.3 固态模拟发酵

将曲料(以蚕豆干料计算)、氯化钠和水以 4:1.5:3 的比例混合, 充分搅拌混匀。接种用的微生物处理方式与全合成培养基发酵的处理方式相同, 以  $1 \times 10^5$  CFU/g 湿曲料的比例接种筛选出的微生物菌株或微生物组合。微生物组合的成员微生物按不同顺序, 分别在第 0、7、14 天接种, 各菌株接种比例相等。模拟发酵在 150 mL 的三角瓶中进行, 30 °C 下培养 30 d。每 3.5 d 搅拌 1 次, 每 7 d 取样 10 g (每次取样前充分搅拌), -80 °C 保藏备用。

## 1.6 挥发性风味化合物测定

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 1 000 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  $\mu$ L 作为内标, 加入 3 g 氯化钠混匀待测。HS-SPME-GC-MS (GC 6890N, MS 5975; Agilent Technologies, Santa Clara)用于挥发性风味成分的分析, 检测方法在参考文献报道基础上有所改变<sup>[20]</sup>, 具体程序如下: 采用 FFAP 极性柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m), 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  $\mu$ L, 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。

使用正构烷烃 C6–C30 (购自 Sigma-Aldrich) 的混合物作为标准计算保留指数, 将挥发性化合物的保留指数(RI)与真实标准和公布的数据比较, 同时将质谱图和 NIST 数据库(Agilent Technologies Inc.)中的标准质谱进行比较从而进行挥发性化合物的定性。挥发性化合物的半定量数据是通过计算待测物质峰面积与内标薄荷醇的峰面积比值得到的。

## 1.7 数据分析

测序数据来源: 用于选择目标菌株的测序数据来源与本课题组之前的研究<sup>[7]</sup>相同, 根据分析结果选择相对丰度大于 0.1%和在样品中分布频率大于 50%的微生物属进行局部相似性(local similarity analysis, LSA)分析和关联网络的构建。

微生物重要性评价: 基于 Python, 使用 LSA 算法分析不同菌株之间的关联, 该算法可独特地捕获变量之间时间相关的关联, 即考虑了可能存在的时滞效应<sup>[21]</sup>。然后将分析结果用于构建网络, 基于 R 语言使用 igraph 包<sup>[22]</sup>计算

每个节点的特征向量中心性来评估节点的重要性。

每个实验组设置 3 组平行样品, 组间差异检验采用 Wilcoxon 秩和检验,  $P < 0.05$  认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 郫县豆瓣蚕豆醅发酵核心微生物解析

在此前的研究工作中, 本研究团队报道了郫县豆瓣的双原料双阶段酿造工艺及其发酵半成品——蚕豆醅的发酵微生物结构及演替规律<sup>[7]</sup>。在本研究中, 研究者首先以蚕豆醅发酵微生物 16S rRNA 基因和 ITS 测序数据为基础, 选择相对丰度、频率和特征向量中心度作为核心微生物属的筛选指标, 分析确定蚕豆醅发酵核心微生物<sup>[23–25]</sup> (图 1)。其中, 以相对丰度大于 0.1%选择优势属, 共选出 59 个微生物属(表 S1); 为过滤发酵过程偶然出现的微生物, 以在原位发酵样品中出现频率大于 50%作为过滤条件, 共得到有效微生物属 104 个(表 S2); 基于以上 2 项指标所筛选微生物属的相对丰度构建相关性网络, 网络节点的特征向量中心性被用于评价微生物属的重要性。如表 2 所示, 按照相对丰度(>0.1%)、微生物属分布频率(>50%)和特征向量中心性的大小排序, 等权重考虑, 最终选出排名前 15 的微生物属, 分别为葡萄球菌属、曲霉属、假丝酵母属、色盐杆菌属、乳杆菌属、芽胞杆菌属、沙门氏菌属(*Salmonella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、片球菌属、盐单胞菌属、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、米勒氏酵母、接合酵母属、魏斯氏菌属和嗜盐四联球菌属。

为进一步确定郫县豆瓣蚕豆醅核心微生物菌种, 本研究在获得核心微生物属的基础上, 选择属内在工业上广泛应用的微生物或基于丰

度最高的 OTU 序列的比对结果(表 S3), 确定可能的核心微生物菌种(species), 再根据美国食品药品监督管理局 FDA 建议的一般安全菌株 (generally regarded as safe, GRAS)和相关的菌种安全性报道<sup>[26-27]</sup>过滤其中的致病菌, 最后去除一些已知的原料降解微生物, 得到郫县豆瓣蚕豆醅核心微生物菌种, 分别为易变假丝酵母 (*C. versatilis*)、鲁氏接合酵母(*Z. rouxii*)、肉葡萄球菌(*S. carnosus*)、乳酸片球菌(*P. acidilactici*)、戊糖片球菌(*P. pentosaceus*)、融合魏斯氏菌 (*W. confusa*)、嗜盐四联球菌(*T. halophilus*)和植物乳杆菌(*L. plantarum*) (表 2)。

## 2.2 郫县豆瓣蚕豆醅发酵核心微生物单菌发酵特征研究

解析郫县豆瓣蚕豆醅核心微生物的发酵特

征, 是进一步构建合成微生物组的数据基础。其中, 发酵生态位及产香性能是构建蚕豆醅发酵混合菌剂重要的 2 种发酵特征。在传统发酵特征研究过程中, 需要将发酵原料使用米曲霉制曲, 并将成曲与 18% 盐水混合, 作为核心微生物培养基研究菌种产香性能。然而, 传统发酵存在较大的不稳定性, 同时米曲霉制曲过程时间较长、易污染, 其本身也会产生复杂的风味化合物(及其前体), 对蚕豆醅发酵核心微生物的产香性能分析造成干扰。因此, 本研究基于原位体系(即企业自然发酵样品)物质组成设计了一种碳源及氮源物质浓度与原位体系一致<sup>[6-7]</sup>的全合成培养基(表 3), 该全合成培养基可支持所有蚕豆醅核心微生物的生长, 满足核心微生物单菌发酵特征研究的要求(表 S4)。此外, 如

表 2 郫县豆瓣蚕豆醅核心功能微生物种属选择依据

Table 2 Selection basis of core genus and species in Pixian Douban broad bean meju

Genus	RA <sup>a</sup> /%	Frequency/%	Eigenvector	Selection of genus				Selection of species	
				Rank RA <sup>b</sup>	Rank Freq <sup>c</sup>	Rank Eig <sup>d</sup>	Rank sum	Species	Principle
<i>Staphylococcus</i>	34.78	100.00	1.00	42	27	43	112	<i>S. carnosus</i>	h, i
<i>Aspergillus</i>	77.86	100.00	0.79	43	27	41	111	–	e, f
<i>Chromohalobacter</i>	17.31	95.83	0.97	41	23	42	106	–	j
<i>Candida</i>	9.16	100.00	0.28	40	27	36	103	<i>C. versatilis</i>	h
<i>Lactobacillus</i>	1.88	100.00	0.40	33	27	39	99	<i>L. plantarum</i>	i
<i>Bacillus</i>	1.66	100.00	0.40	32	27	38	97	–	e
<i>Salmonella</i>	3.33	100.00	0.19	36	27	32	95	–	g
<i>Halomonas</i>	2.75	91.67	0.68	34	19	40	93	–	j
<i>Acinetobacter</i>	0.89	100.00	0.25	30	27	34	91	–	g
<i>Pediococcus</i>	4.92	100.00	0.07	38	27	26	91	<i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>	h, i, k
<i>Zygosaccharomyces</i>	3.40	95.83	0.12	37	23	29	89	<i>Z. rouxii</i>	g, j
<i>Tetragenococcus</i>	5.79	91.67	0.13	39	19	30	88	<i>T. halophilus</i>	k
<i>Klebsiella</i>	0.44	100.00	0.26	24	27	35	86	–	j
<i>Millerozyma</i>	1.63	100.00	0.09	31	27	27	85	–	j
<i>Weissella</i>	3.08	100.00	0.03	35	27	22	84	<i>W. confusa</i>	k

a: relative abundance; b: rank of relative abundance; c: rank of frequency; d: rank of eigenvector; e: mainly used for other function, such as Koji making and substrate degradation; f: not resistant to high salt; g: pathogenic bacteria; h: widely used in industry; i: generally recognized as safe (GRAS); j: not separated; k: BLAST results of OTUs with the highest abundance in each genus.

表 3 模拟郫县豆瓣蚕豆醅原位发酵体系的全合成培养基配方

Table 3 Composition and nutrient concentration of the fully synthetic medium, which simulated the nutrient concentration of Pixian Douban broad bean meju

Nutrients	Concentration/(g/L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.00
Glucose	4.50
Fructose	1.98
Mannitol	0.91
Arabinose	1.80
Threonine	0.84
Isoleucine	0.80
Leucine	1.38
Phenylalanine	0.81
Glycine	0.51
Alanine	1.06
Lysine	1.53
Histidine	0.06
Arginine	1.73
Methionine	0.25
Serine	0.15
Proline	0.81
Valine	0.98
Glutamate	2.95
Aspartic acid	1.76
Tyrosine	0.85
Glutamine	0.51
Cysteine	0.02
Thiamine hydrochloride	1.00
Riboflavin	1.00
Nicotinic acid	1.00
Calcium pantothenate	1.00
Pyridoxine hydrochloride	2.00
Biotin	10.00
Folic acid	1.00
Para-aminobenzoic acid	10.00
EDTA	50.00
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8.30
ZnCl <sub>2</sub>	0.84
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.13
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.14
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.10
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.02
CaCl <sub>2</sub>	110.98
MgSO <sub>4</sub>	36.11

图 2A 所示, 未接种任何微生物的全合成培养基发酵产生的挥发性化合物与原位固态发酵体系相比, 全合成培养基的平行样品之间差异更小。这表明, 相比于模拟固态发酵, 全合成培养基更加稳定, 也更有利于相关发酵规律的研究。

在本研究提出的策略中, 合成微生物组成员微生物的发酵特征是进行后续研究的基础。为确定核心微生物在全合成培养基上的发酵条件, 本研究同时考虑了原位体系的环境条件和微生物在不同 pH 和温度条件下的生长情况。将上述选择的蚕豆醅核心微生物在合成培养基上进行发酵, 根据培养条件分为 20 组, 分别在 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和温度为 30、37、42、50 °C 的培养条件下发酵 48 h, 根据发酵液的细胞密度 *OD*<sub>600</sub> 评价微生物的生长情况(表 S4)。

如图 2B 所示, 所有的核心微生物在较低 pH 和温度条件下仍生长良好。当 pH 范围在 5.0–7.0, 温度为 30 °C 或 37 °C 时, pH 和温度对微生物生长影响较小; 随着 pH 的增加, 微生物的生长出现小幅度的增加。当温度达到 42 °C 时, 部分微生物, 如 *Z. rouxii* 和 *T. halophilus* 的生长密度明显减小, 可能是如上微生物对温度的敏感造成的。当温度达到 50 °C, 所有微生物的生长都受到抑制, 其中 *C. versatilis* 和 *S. carnosus* 受温度影响最严重, 几乎无法生长。在相关的研究中<sup>[28]</sup>, *C. versatilis* 的最适生长温度在 28–30 °C, 当温度超过 40 °C 后, 微生物生长和代谢会显著下降, 这与本研究的结果是一致的。因此, 本研究选择了微生物生长情况较佳且与原位体系较为接近的发酵条件, 即 pH=5.0、温度为 30 °C 作为微生物在合成培养基的发酵条件, 从而确保核心微生物生长代谢良好。



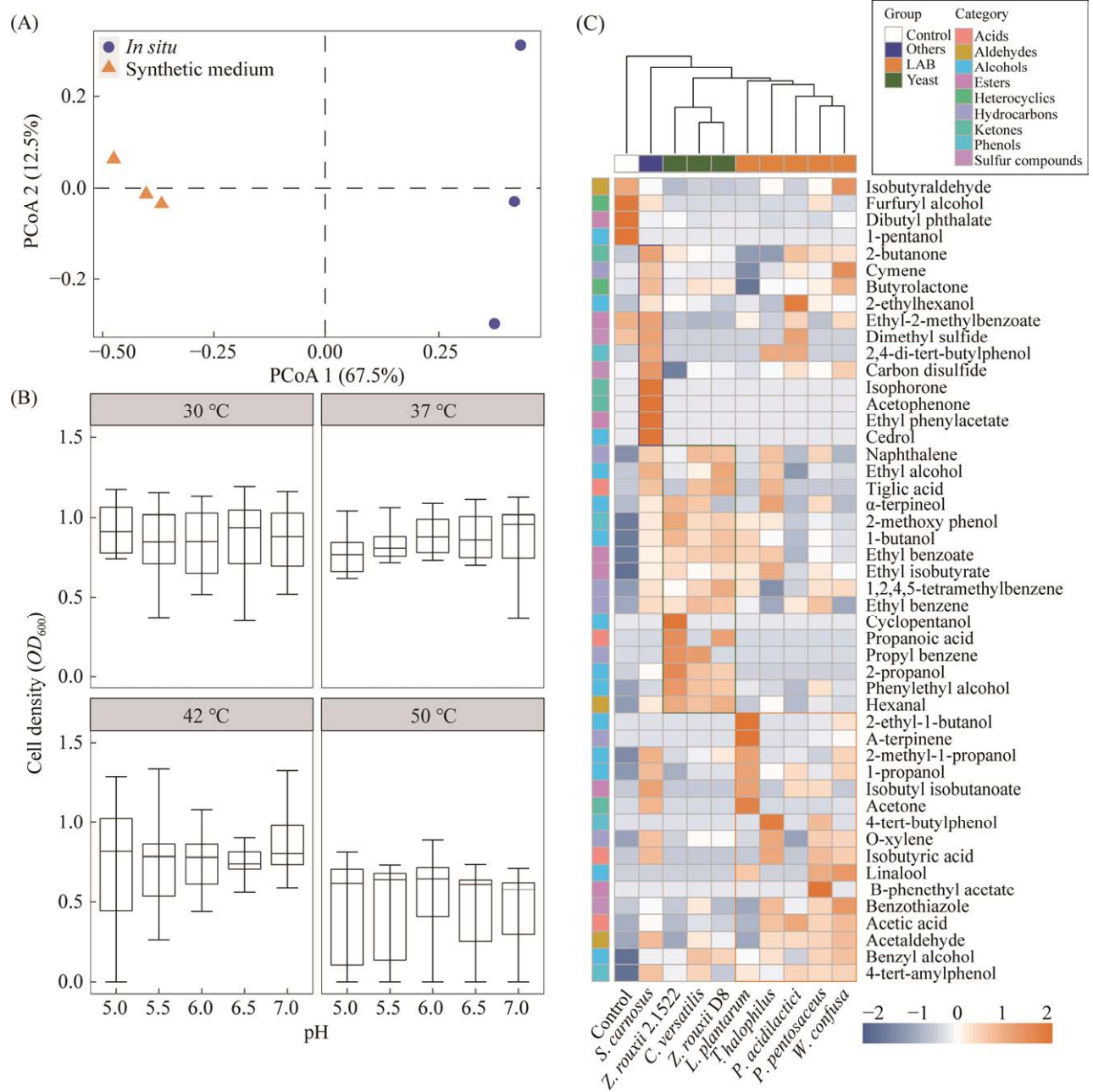


图 2 全合成培养基稳定性评价与核心微生物发酵特性分析

Figure 2 Stability evaluation of the fully synthetic medium and fermentation characteristics of core microorganisms. A: principal component analysis (PCoA) of flavor compounds of *in situ* samples and the synthetic medium; B: growth condition of core microorganisms at different pH and temperature; C: heatmap and cluster analysis of flavor compounds produced by core microorganisms.

香气化合物的形成是郫县豆瓣核心微生物的重要功能，因此，核心微生物的产香性能是构建合成微生物组的必要条件<sup>[12,29]</sup>。本研究使用

全合成培养基，对目标微生物进行了单菌发酵实验，并检测其产生的挥发性化合物谱。检测结果如图 2C 所示，根据核心微生物产生的挥发

性化合物进行聚类, 聚类结果显示, 蚕豆醅核心微生物可被分为3类: 第一类为酵母菌类, 包括鲁氏接合酵母和易变假丝酵母, 主要合成一些醇类化合物, 如乙醇、2-丙醇、苯乙醇等。第二类为乳酸菌类, 主要包括植物乳杆菌、嗜盐四联球菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、融合魏斯氏菌, 能够产生更多的乙酸、2-甲基丙酸等酸类化合物和相关的乙酸酯类化合物。第三类为非乳酸菌细菌, 主要以肉葡萄球菌为代表, 发酵生成了一些酵母菌和乳酸菌类无法产生的醛类化合物, 如乙醛、2-甲基丁醛等。此外, 肉葡萄球菌还产生一些硫化物, 如二硫化碳、2-甲基硫等。因此, 为促进组合菌剂发酵能产生更多挥发性化合物, 本研究首先根据微生物“产香互补”的原则, 进行微生物的理性组合。

### 2.3 双菌种组合发酵分析

不同种类微生物产生的挥发性化合物之间的互补关系为理性设计高维微生物组提供了理论基础。按照产香互补关系, 本研究随机选择归属于不同类别的微生物两两组合, 并在不同的接种顺序下进行发酵。如图3A所示, 不同规模的菌群产生的挥发性化合物存在显著差异( $P=0.001$ )。以易变假丝酵母和乳酸片球菌为例, 空白对照组产生的挥发性化合物种类最少, 这可能是由于对照组中不存在微生物作用, 糖类和氨基酸无法被微生物转化利用, 只能依靠没有微生物参与的非生物作用进行物质转化, 所以挥发性物质较少。当菌群规模为2时, 即接种了2种微生物的实验组产生的挥发性化合物数量最多, 显著高于单菌和空白对照组, 而只接种单一微生物的单菌组产生的挥发性化合物数量多于空白对照, 但少于双菌菌群, 即双菌组合发酵可以提升风味化合物合成种类(图3C)。

值得注意的是, 菌群微生物之间可能存在着复杂的相互作用, 菌群成员微生物通过相互作用实现一些单菌成员无法实现的功能<sup>[30]</sup>。如表4所示, 多种挥发性化合物只在双菌发酵过程中合成, 而在单菌发酵液中未发现, 包括2-甲基-1-丙醛、苯乙醛、正壬醇、二甲基二硫、戊二酸二甲酯、3-甲基-1-己醇、乙醛、邻苯二甲酸二乙酯、水杨醛、2-乙酰基呋喃、糠醛、苯乙酮、1-辛醇、乙酸苯乙酯、异佛尔酮、苯甲醇等。此外, 像2-乙酰基呋喃等化合物的合成途径仍不清晰, 本研究中组合微生物的底物利用和挥发性化合物的产生情况将会对这些化合物的合成途径解析有很大帮助。

不同微生物之间复杂的相互作用, 微生物接种的顺序将可能对菌群功能造成较大的影响。因此, 研究了不同接种顺序对双菌菌群发酵结果的影响。双菌菌群接种顺序可分为3类, 包括先接种酵母菌, 再接种其他微生物(order Y); 或先接种其他微生物, 后接种酵母(order O); 以及2种微生物同时接种(order T)。按以上3种顺序接种至全合成培养基, 30 °C条件下静置发酵6 d后, 使用SPME-GC-MS对发酵样品中的挥发性化合物进行检测。结果显示, 不同接种顺序的发酵样品在挥发性化合物的种类组成与结构方面存在显著差异( $P=0.001$ , 图3B)。如图3D所示, 虽然不同接种顺序下菌群发酵产生的挥发性化合物数量差异在统计学意义上并不显著, 但先接种酵母菌和后接种酵母菌的实验组产生了较多数量的挥发性化合物, 平均分别可达到32和35种以上, 高于同时接种的31种。如图3F和表5所示, 双菌组合产生的挥发性化合物中, 61.29%的化合物, 包括2-甲基-1-丁醇、2-乙酰基呋喃、苯酚等是不同接种顺序的实验组所特有的, 这可能是不同

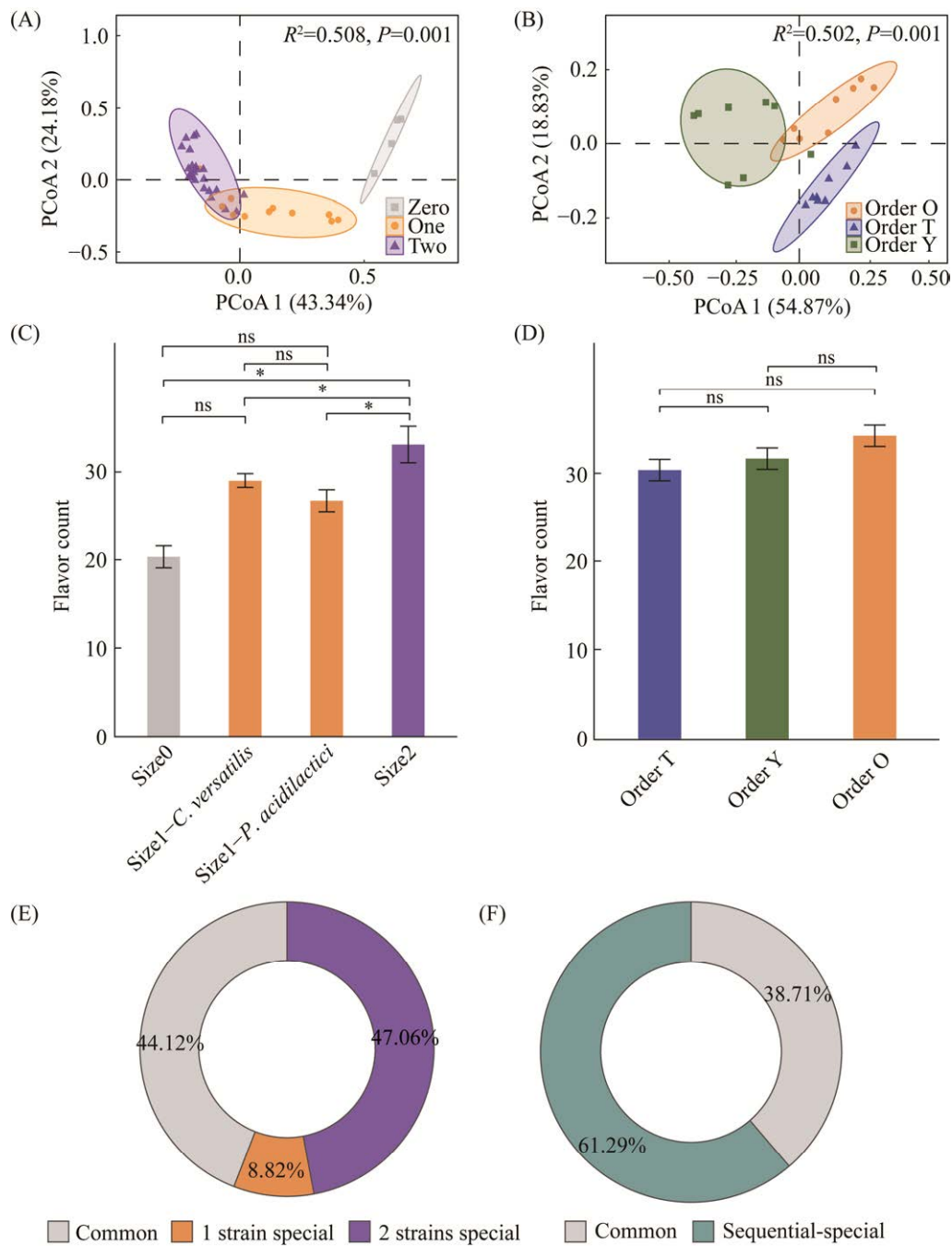


图 3 双菌组合的产香性能分析

Figure 3 Analysis of aroma-producing performance of two-strain communities. A: principal coordinates analysis of volatile compounds of different size communities (control, single strain or two strains); B: principal coordinates analysis of volatile compounds of communities with different inoculation sequences; C: the number of volatile compounds produced by two-strain communities and individual strains (\*:  $0.01 < P \leq 0.05$ ; \*\*:  $0.001 < P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; ns: not significant); D: the number of volatile compounds in two-strain communities with different inoculation order; E: proportion of flavor compounds in the two-strain community compared to single-strain community; F: proportion of volatile compounds produced by sequential inoculation specially.

表 4 挥发性风味化合物在单菌和双菌组合发酵样品中的产生情况

Table 4 Production of volatile compounds by individual strains and the two-strain community

CAS	Names	Types
79-09-4	Propanoic acid	Common
5779-95-3	3,5-dimethylbenzaldehyde	Common
141-78-6	Ethyl acetate	Common
123-51-3	3-methyl-1-butanol	Common
71-41-0	1-pentanol	Common
71-36-3	1-butanol	Common
78-83-1	2-methyl-1-propanol	Common
60-12-8	Phenethyl alcohol	Common
505-10-2	3-ethylthiopropanol	Common
590-86-3	Isovaleraldehyde	Common
6966-10-5	3,4-dimethylbenzyl alcohol	Common
39151-19-4	3',5'-dimethoxyacetophenone	Common
589-35-5	3-methyl-1-pentanol	Common
108-95-2	Phenol	Common
137-32-6	2-methyl-1-butanol	Common
105-30-6	2-methyl-1-pentanol	2 strains special
122-78-1	Phenylacetaldehyde	2 strains special
143-08-8	1-nonanol	2 strains special
624-92-0	Dimethyl disulfide	2 strains special
1119-40-0	Dimethyl glutarate	2 strains special
13231-81-7	3-methyl-1-hexanol	2 strains special
75-07-0	Acetaldehyde	2 strains special
84-66-2	Diethyl phthalate	2 strains special
90-02-8	Salicylaldehyde	2 strains special
1192-62-7	2-acetylfuran	2 strains special
98-01-1	Furfural	2 strains special
98-86-2	Acetophenone	2 strains special
111-87-5	1-octanol	2 strains special
103-45-7	Phenethyl acetate	2 strains special
78-59-1	Isophorone	2 strains special
100-51-6	Benzyl alcohol	2 strains special
2785-89-9	4-ethyl-2-methoxyphenol	1 strain special
123-92-2	Isoamyl acetate	1 strain special
513-86-0	Acetoin	1 strain special

的接种顺序导致了微生物之间不同的相互作用以及不同接种顺序下菌群的优势微生物的差异所导致的<sup>[31]</sup>。因此，本研究进行了蚕豆醅核心微生物之间的两两相互作用实验。

表 5 挥发性化合物在不同接种顺序的双菌种群中的产生情况

Table 5 Production of volatile compounds by a two-strain community with different inoculation order

CAS	Names	Types
123-51-3	3-methyl-1-butanol	Common
71-36-3	1-butanol	Common
78-83-1	2-methyl-1-propanol	Common
60-12-8	Phenethyl alcohol	Common
505-10-2	3-methylthiopropanol	Common
6966-10-5	3,4-dimethylbenzyl alcohol	Common
98-01-1	Furfural	Common
98-86-2	Acetophenone	Common
111-87-5	1-octanol	Common
103-45-7	Phenethyl acetate	Common
78-59-1	Isophorone	Common
100-51-6	Benzyl alcohol	Common
79-09-4	Propanoic acid	Sequential-special (in order O, order Y)
5779-95-3	3,5-dimethylbenzaldehyde	Sequential-special (in order O, order Y)
141-78-6	Ethyl acetate	Sequential-special (in order T, order Y)
71-41-0	1-pentanol	Sequential-special (in order T, order Y)
589-35-5	3-methyl-1-pentanol	Sequential-special (in order T, order Y)
108-95-2	Phenol	Sequential-special (in order O, order Y)
137-32-6	2-methyl-1-butanol	Sequential-special (in order T, order O)
75-07-0	Acetaldehyde	Sequential-special (in order O, order Y)
84-66-2	Diethyl phthalate	Sequential-special (in order O, order Y)
90-02-8	Salicylaldehyde	Sequential-special (in order T, order O)
1192-62-7	2-acetylfuran	Sequential-special (in order O, order Y)
590-86-3	Isovaleraldehyde	Sequential-special (in order Y)
39151-19-4	3',5'-dimethoxyacetophenone	Sequential-special (in order T)
105-30-6	2-methyl-1-pentanol	Sequential-special (in order Y)
122-78-1	Phenylacetaldehyde	Sequential-special (in order Y)
143-08-8	1-nonanol	Sequential-special (in order T)
624-92-0	Dimethyl disulfide	Sequential-special (in order O)
1119-40-0	Dimethyl glutarate	Sequential-special (in order Y)
13231-81-7	3-methyl-1-hexanol	Sequential-special (in order Y)

### 2.4 蚕豆醅核心微生物相互作用

为研究蚕豆醅核心微生物之间的两两相互作用，本研究在固体平板进行了双菌种微生物的生长实验。第 1 种微生物(称为 strain A)将被均匀涂布在由合成培养基制成的固体平板上，然后放置一个沾有第 2 种微生物(称为 strain B)菌液的滤纸片在上述平板表面，密封共培养 48 h。如图 4A 所示，strain A 生长几乎不受 strain B 影响，因此被记录作 strain A 不受 strain

B 抑制。若 strain A 受 strain B 抑制，微生物在平板上的生长情况应如图 4B 所示。所有的微生物相互作用实验结果被汇总到了图 4C，结果显示，在所有目标微生物两两共培养时，酵母菌类抑制其他微生物的生长并占据绝对的生长优势，乳酸菌类竞争能力最弱，而肉葡萄球菌则具有中等竞争优势，这与其他研究人员的结果是相似的<sup>[32]</sup>。因此，根据如上实验结果，若以产生的风味物质数量为参考标准，理想的接

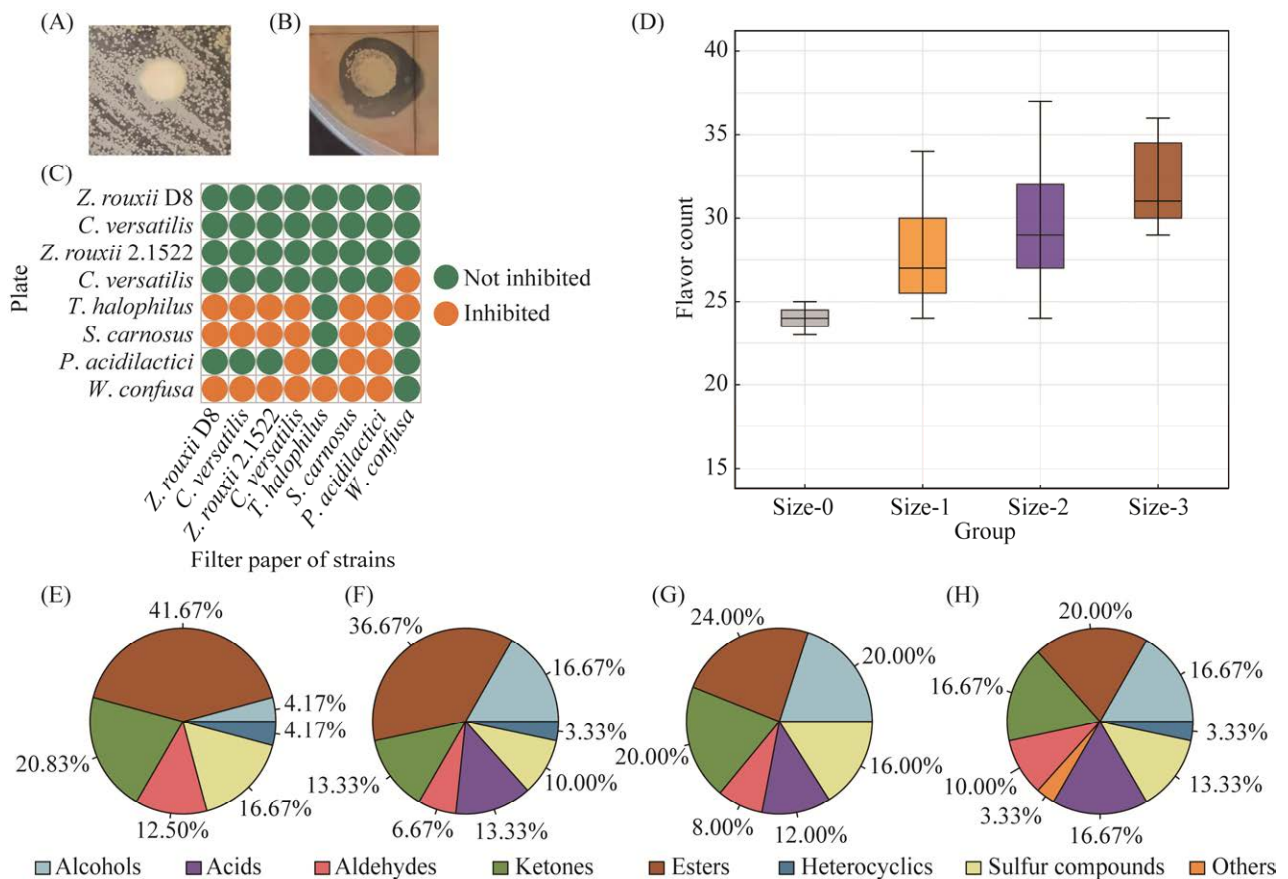


图 4 微生物相互作用和多菌种组合菌群的发酵风味评价

Figure 4 Microbial interactions and flavor evaluation of synthetic microbiomes at different scales. A: it meant that plate strains were not inhibited by the strain on the filter paper; B: it meant that plate strains were inhibited by the strain on the filter paper; C: experimental results of microbial interactions; D: flavor count of synthetic microbiomes at different scales; E–H: composition of flavor compounds detected in fermentation samples of the control (E), single-strain community (F), two-strain community (G) and three-strain community (H).

种顺序应该是先接种乳酸菌,再接种葡萄球菌,最后接种酵母菌类。这样的接种顺序可以尽可能地帮助菌群中所有的微生物正常生长代谢,从而生成更多的挥发性风味化合物。

## 2.5 三菌种组合发酵

为使菌群微生物能够尽可能的发挥作用,从而产生更多的挥发性化合物,本研究从具有产香互补的酵母菌类,乳酸菌类和其他类微生物中分别选择一种,继而进行三菌组合。同时,基于微生物互作实验得出的微生物互作关系,即酵母菌抑制肉葡萄球菌,肉葡萄球菌抑制乳酸菌,选择每类微生物中受到抑制最少的微生物进行组合,形成最终的三菌组合菌剂(*P. acidilactici*-*S. carnosus*-*C. versatilis*),即先接种乳酸片球菌,再接种肉葡萄球菌,最后接种易变假丝酵母。以该菌剂接种发酵,发酵条件与单、双菌相同,发酵6 d后检测发酵产生的挥发性化合物。

如图4D所示,随着菌群数量的增加,挥发性化合物的数量也随之增加,这验证了本研究之前的实验结论。同时,平行样品之间的标准差数据即误差线(error bar)表明,当菌群规模增加到3时,菌群所产生的挥发性化合物数量更加稳定,这可能是由于生物多样性的增加提升了菌群的鲁棒性<sup>[33]</sup>,使得菌群更加稳定。另一方面,菌群规模对挥发性化合物的种类结构也存在重要影响。其中,未接种微生物的空白对照组产生的挥发性物质主要是酯类化合物,而醇、醛、酸类等化合物比例较低(图4E)。与空白对照相比,单菌发酵样品中检测到了更高比例的醇类化合物(图4F)。而双菌实验组的酯类化合物比例有所降低,这是由于随着微生物种类的增加,其他种类化合物的合成也随之增加,因此降低了酯类化合物的比例(图4G)。相比于空白对照、单菌、双菌样品,三菌组合产

生的挥发性化合物种类更多,更均匀(图4H)。

## 2.6 三菌组合的固态模拟发酵性能评价

为避免全合成培养基与固态发酵之间固有的物质和状态差异,本研究使用上述得到的三菌组合在实验室水平模拟原位体系工艺进行了固态发酵。如图5A所示,与郫县豆瓣蚕豆发酵30 d的原位体系相比,三菌组合模拟固态发酵产生了39–44种挥发性化合物,平均占原位挥发性化合物数量的63.1%(图5A),挥发性化合物种类与原位发酵结果表现出较高的相似性(图5B、C)。此外,本研究比较了三菌菌群发酵和原位发酵挥发性化合物的具体差异。如图5D和表S5所示,35种化合物是2类样品共有的,其中1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol,蘑菇香)、3-甲硫基丙醇(3-methylthiopropanol,熟土豆味)、丁香酚(eugenol,丁香香气)等已被鉴定为郫县豆瓣重要风味化合物的化合物<sup>[11]</sup>。另外,合成微生物组发酵体系中特异性产生了9种挥发性化合物,包括2,3-丁二醇(2,3-butanediol,奶油味)等(图5D,表S5),表现出一定的发酵特异性。

氨基酸态氮含量是评价郫县豆瓣等级的重要指标。在本研究中,我们比较了三菌组合和原位发酵样品氨基酸氮浓度的差异。如图5E所示,三菌菌群发酵体系中氨基酸态氮含量平均达到0.45 g/100 g,相比于空白对照组和原位样品分别提高了51.6%和21.8%。3种发酵体系之间pH的差异可能在一定程度上解释了氨基酸态氮水平差异的原因。如图5F所示,原位发酵体系中pH最低,可能是在开放式原位发酵过程中,大量环境微生物的引入,产生了较高浓度的有机酸,在抑制部分有害微生物的同时,也抑制了蛋白质降解和氨基酸代谢相关的微生物的代谢活动,导致氨基酸态氮水平相对降低。

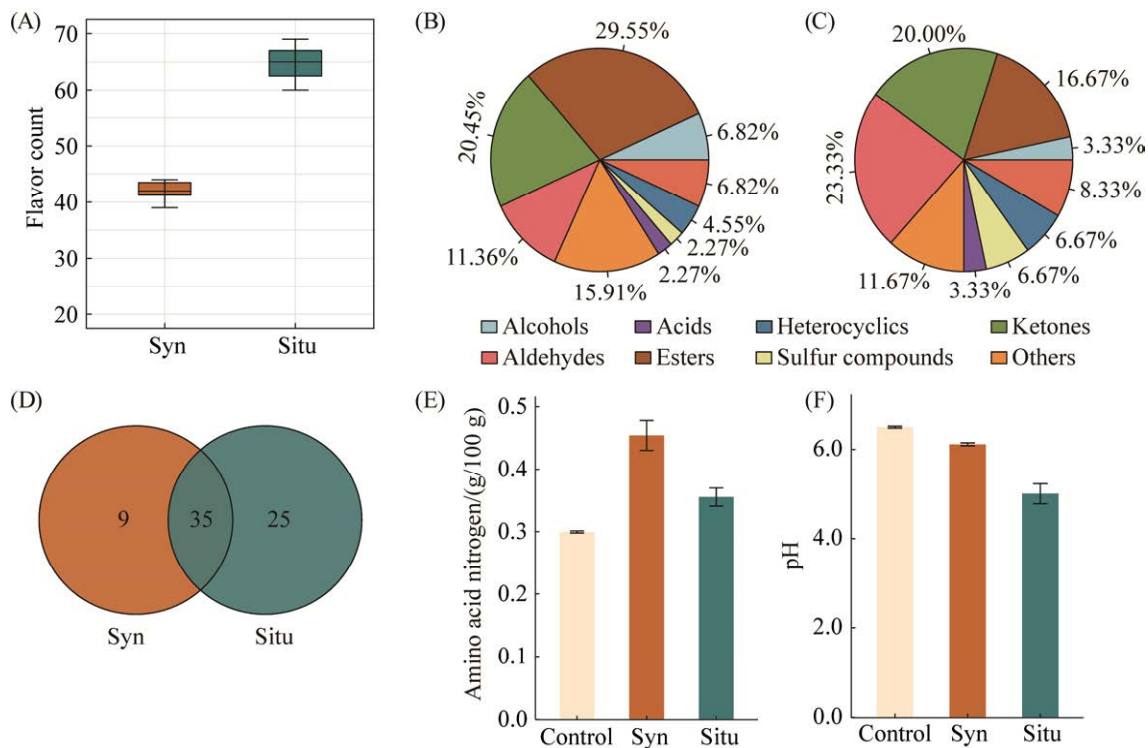


图 5 三菌合成菌群的模拟固态发酵评价

Figure 5 Fermentation performance analysis of the three-strain community. A: flavor count of the three-strain community (syn) and *in situ* samples (situ); B: composition of flavor compounds produced by three-strain community; C: composition of flavor compounds of *in situ* samples. D: comparison of flavor compounds produced by the three-strain community (syn) and *in situ* sample (situ); E–F: amino nitrogen (E) and pH (F) condition among the control (no strain), syn (three-strain community) and situ (30-day fermentation samples of broad bean meju).

### 3 讨论与结论

随着人们消费水平和食品安全意识的提升, 传统暴露于环境中的粗放式发酵已经逐渐无法满足实际的产业需求。微生物发酵剂的研制与应用, 配合适于发酵食品的密闭式发酵罐, 使得风味化合物产生与传统发酵方式相似或更具特点, 是传统食品发酵行业改造的重要方向。与纳豆使用枯草芽胞杆菌单菌种发酵不同<sup>[34]</sup>, 中国传统发酵食品发酵多数是多菌种发酵过程<sup>[6]</sup>, 复杂的微生物结构、演替规律与微生物相互作用造成了组合发酵剂研制的困难<sup>[35]</sup>。基于微生

物特性和相互作用理性构建合成微生物组, 制成菌剂并应用于食品发酵, 是解决上述问题的有效途径。

本研究设计了一种自下而上的合成微生物组理性构建策略。其中, 从复杂的原位发酵微生物中选取核心功能微生物是后续研究的基础。参考核心功能微生物选择的相关报道, 本研究进行了一定优化, 首先, 考虑到在实际固态发酵过程中, 传质的迟滞缓慢导致了部分基于这些物质的微生物相互作用的滞后性, 本研究在构建微生物关联网络时并没有采用相关系数网络<sup>[36]</sup>、考虑相关系数加权值的 WGCNA<sup>[37]</sup>、

基于随机矩阵理论(RMT)的 MENA<sup>[38]</sup>或者是描述变量间非线性关系的最大信息系数 MIC<sup>[39]</sup>等方法,而是采取了一种名为局部相似性的算法。与上述几种方法相比,局部相似性算法可独特地捕获变量之间时间相关的关联,即考虑了可能存在的时滞效应<sup>[21]</sup>,与固态发酵过程更加匹配。其次,在解析核心微生物时,不同于直接从关联网络中选取 hubs 微生物,本研究采用了能够同时考虑节点(即微生物)自身和与该节点相关节点重要性的特征向量中心性作为评价指标<sup>[40]</sup>。最后,考虑到发酵剂最终将使用到食品中,在从目标微生物属中选择微生物种时,本研究考虑了微生物的安全性问题,选择目前食品工业中已有广泛使用或 GRAS 认为的一般安全菌株进行实验。

除核心微生物的选择外,对核心微生物发酵性能的研究是后续组合菌剂理性设计的重要基础。本研究基于全合成培养基进行了单菌纯种发酵,并发现酵母菌类、乳酸菌类和其他微生物类之间存在着产香互补,这与原位菌群部分产香菌株存在功能冗余的结论是相似的<sup>[41-42]</sup>。从挥发性化合物产生的角度看,将这 3 类微生物进行组合发酵将可能得到种类更多的风味化合物,这是本研究微生物组理性构建策略所遵循的重要原则之一。另一方面,微生物间相互作用关系是理性构建合成微生物组的另一个重要原则。不同的微生物相互作用关系将可能导致显著的菌群代谢差异,从而影响产品品质。因此,本研究首先进行了不同接种顺序下的双菌发酵实验,不同接种顺序的双菌组合产生的挥发性化合物的确存在显著差异,肯定了这一推断。随后进行微生物两两相互作用实验研究核心微生物之间存在生长抑制关系,并以此为

依据调整微生物接种顺序。由于菌量会对相互作用结果造成较大影响,我们在设计实验时控制两种微生物在相同面积下的菌量大致相同,这与双菌和三菌实验中微生物的等量接种是对应的。同时,若在相同接种量下微生物被抑制,其在更低浓度下(即第 2、3 次接种时因第 1 次接种微生物已生长一段时间造成的比例失衡)必然仍被抑制,因此在后续的实验我们考虑将其优先接种,避免因被抑制而难以正常生长代谢。

在基于全合成培养基的发酵实验中,虽然全合成培养基配制时已尽可能模拟原位体系的物质含量,但全合成培养基和原位固态发酵体系仍存在固有的物质和状态差异。因此,在评价微生物菌群发酵作用时,基于全合成培养基的发酵实验以产生的挥发性化合物数量与风味种类构成为评价标准,着重于获得能够产生更加丰富的挥发性化合物的菌群。这与固态发酵评价时以与原位发酵效果的差异为评价标准是不同的。也正因如此,最终获得的组合菌剂发酵样品与原位样品的风味存在相对较大的差异,在固态发酵评价时也得到了体现。这是本方法使用全合成培养基替代固态发酵体系,从而缩短发酵周期并提高体系稳定性的同时所造成的不足。

本研究提出了一种基于自下而上的合成微生物组理性构建策略,并以郫县豆瓣蚕豆醅发酵组合菌剂构建为例测试了该策略可行性。结果表明,以基于该策略建立的三菌组合菌剂作为起始发酵物,其风味产生占到原位挥发性化合物种类的 63.1%,且基本理化参数稳定。本研究对合成微生物组构建策略具有较大理论价值,为包括郫县豆瓣在内的发酵食品的工艺改造提供了良好应用示范。



## 参考文献

- [1] Steinkraus KH. Nutritional significance of fermented foods. *Food Research International*, 1994, 27(3): 259–267.
- [2] Taylor BC, Lejzerowicz F, Poirel M, Shaffer JP, Jiang LJ, Aksenov A, Litwin N, Humphrey G, Martino C, Miller-Montgomery S, Dorrestein PC, Veiga P, Song SJ, McDonald D, Derrien M, Knight R. Consumption of fermented foods is associated with systematic differences in the gut microbiome and metabolome. *mSystems*, 2020, 5(2): e00901-19.
- [3] Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligné B, Gänzle M, Kort R, Pasin G, Pihlanto A, Smid EJ, Hutkins R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 44: 94–102.
- [4] Şanlıer N, Gökçen BB, Sezgin AC. Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(3): 506–527.
- [5] Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, Mayo B, Westerik N, Hutkins R. Fermented foods in a global age: east meets west. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(1): 184–217.
- [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] Zhang LJ, Bao YD, Chen HF, Huang JQ, Xu Y. Functional microbiota for polypeptide degradation during hypertonic moromi-fermentation of Pixian broad bean paste. *Foods: Basel, Switzerland*, 2020, 9(7): 930.
- [8] Lu YH, Tan XY, Lv YP, Yang GH, Chi YL, He Q. Flavor volatiles evolution of Chinese horse bean-chili-paste during ripening, accessed by GC × GC-TOF/MS and GC-MS-olfactometry. *International Journal of Food Properties*, 2020, 23(1): 570–581.
- [9] Lin HB, Liu Y, He Q, Liu P, Che ZM, Wang XM, Huang JQ. Characterization of odor components of Pixian Douban (broad bean paste) by aroma extract dilute analysis and odor activity values. *International Journal of Food Properties*, 2019, 22(1): 1223–1234.
- [10] Lu YH, Yang LZ, Yang GH, Chi YL, Sun Q, He Q. Insight into the fermentation of Chinese horse bean-chili-paste. *Food Reviews International*, 2021, 37(7): 683–705.
- [11] Zhao C, Fan WL, Xu Y. Characterization of key aroma compounds in Pixian broad bean paste through the molecular sensory science technique. *LWT*, 2021, 148: 111743.
- [12] Lawson CE, Harcombe WR, Hatzepichler R, Lindemann SR, Löffler FE, O'Malley MA, Martín HG, Pflieger BF, Raskin L, Venturelli OS, Weissbrodt DG, Noguera DR, McMahon KD. Common principles and best practices for engineering microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(12): 725–741.
- [13] Gilmore SP, Lankiewicz TS, Wilken SE, Brown JL, Sexton JA, Henske JK, Theodorou MK, Valentine DL, O'Malley MA. Top-down enrichment guides in formation of synthetic microbial consortia for biomass degradation. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(9): 2174–2185.
- [14] Jia Y, Niu CT, Lu ZM, Zhang XJ, Chai LJ, Shi JS, Xu ZH, Li Q. A bottom-up approach to develop a synthetic microbial community model: application for efficient reduced-salt broad bean paste fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(12): e00306-20.
- [15] Zhou K, Qiao KJ, Edgar S, Stephanopoulos G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(4): 377–383.
- [16] 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.
- [17] Lee KL, Buckley HR, Campbell CC. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycellal and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 1975, 13(2): 148–153.
- [18] Ohira K, Ojima K, Fujiwara A. Studies on the nutrition

- of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant and Cell Physiology*, 1973, 14(6): 1113–1121.
- [19] Lino F, Basso TO, Sommer MOA. A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 221.
- [20] 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.
- [21] Xia LC, Steele JA, Cram JA, Cardon ZG, Simmons SL, Vallino JJ, Fuhrman JA, Sun FZ. Extended local similarity analysis (eLSA) of microbial community and other time series data with replicates. *BMC Systems Biology*, 2011, 5(S2): S15.
- [22] Csardi G, Nepusz T. The igraph software package for complex network research. *Inter Journal Complex Systems*, 2006, 1695(5): 1–9.
- [23] Wang SL, Wu Q, Nie Y, Wu JF, 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.
- [24] Berry D, Widder S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 219.
- [25] Bonacich P. Some unique properties of eigenvector centrality. *Social Networks*, 2007, 29(4): 555–564.
- [26] Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 2007, 85(2): 112–118.
- [27] Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30(1): 409–447.
- [28] Li JL, Huang J, Jin Y, Wu CD, Shen DZ, Zhang SY, Zhou RQ. Mechanism and kinetics of degrading aflatoxin B1 by salt tolerant *Candida versatilis* CGMCC 3790. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 382–387.
- [29] Giri S, Waschina S, Kaleta C, Kost C. Defining division of labor in microbial communities. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(23): 4712–4731.
- [30] D’Souza G, Shitut S, Preussger D, Yousif G, Waschina S, Kost C. Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural Product Reports*, 2018, 35(5): 455–488.
- [31] Wang RF, Zhao SJ, Wang ZT, Koffas MA. Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 65–71.
- [32] Kastman EK, Kamelamela N, Norville JW, Cosetta CM, Dutton RJ, Wolfe BE. Biotic interactions shape the ecological distributions of *Staphylococcus* species. *mBio*, 2016, 7(5): e01157-16.
- [33] Fornoff F, Klein AM, Blüthgen N, Staab M. Tree diversity increases robustness of multi-trophic interactions. *Proceedings Biological Sciences*, 2019, 286(1898): 20182399.
- [34] Kubo YJ, Rooney AP, Tsukakoshi Y, Nakagawa R, Hasegawa H, Kimura K. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6463–6469.
- [35] Xu R, Zhang K, Liu P, Khan A, Xiong J, Tian FK, Li XK. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 1119–1127.
- [36] Gilbert JA, Steele JA, Caporaso JG, Steinbrück L, Reeder J, Temperton B, Huse SS, McHardy AC, Knight R, Joint I, Somerfield P, Fuhrman JA, Field D. Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME Journal*, 2012, 6(2): 298–308.
- [37] Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 559.
- [38] Deng Y, Jiang YH, Yang YF, He ZL, Luo F, Zhou JZ. Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 113.
- [39] Reshef DN, Reshef YA, Finucane HK, Grossman SR, McVean G, Turnbaugh PJ, Lander ES, Mitzenmacher M, Sabeti PC. Detecting novel associations in large data sets. *Science*, 2011, 334(6062): 1518–1524.
- [40] Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, Kalanetra KM, Karvonen AM, Peschel S, Schmausser-Hechfellner E, Roduit C, Frei R, Lauener R, Divaret-Chauveau A,

Dalphin JC, Riedler J, Roponen M, Kabesch M, Renz H, Pekkanen J, Farquharson FM, Louis P, Mills DA, Von Mutius E, Ege MJ. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nature Medicine*, 2020, 26(11): 1766–1775.

[41] Allison SD, Martiny JBH. Colloquium paper:

resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS*, 2008, 105(Suppl 1): 11512–11519.

[42] Louca S, Polz MF, Mazel F, Albright MBN, Huber JA, O'Connor MI, Ackermann M, Hahn AS, Srivastava DS, Crowe SA, Doebeli M, Parfrey LW. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology & Evolution*, 2018, 2(6): 936–943.

---

## 补充材料

表 S1 郟县豆瓣蚕豆醅原核和真核微生物属的相对丰度

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

表 S2 原核和真核微生物属在样品中的分布频率

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

表 S3 微生物属内丰度最高 OTU 的 BLAST 结果

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

表 S4 核心微生物在不同 pH 和温度下的生长情况

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。

表 S5 三菌组合菌剂发酵样品与原位样品的风味物质详表

本文补充材料见网络版 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>。补充材料为作者提供的原始数据，作者对其学术质量和内容负责。