



郫县豆瓣细菌多样性及群落结构动态变化

任文博^{1,2,3}, 陈楠^{3,6}, 律娜^{3,5}, 谢建将⁷, 朱宝利^{3,5*}, 曾斌^{1,2,4*}

- 1 江西科技师范大学 江西省生物加工重点实验室, 江西 南昌 330013
- 2 江西科技师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330013
- 3 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101
- 4 深圳技术大学药学院, 广东 深圳 518118
- 5 济南微生态生物医学山东省实验室, 山东 济南 250117
- 6 微源数智(北京)医疗科技有限公司, 北京 100101
- 7 四川高福记生物科技有限公司, 四川 成都 610000

任文博, 陈楠, 律娜, 谢建将, 朱宝利, 曾斌. 郫县豆瓣细菌多样性及群落结构动态变化[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2809-2821.

REN Wenbo, CHEN Nan, LÜ Na, XIE Jianjiang, ZHU Baoli, ZENG Bin. Diversity and dynamics of bacteria in Pixian broad-bean paste[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2809-2821.

摘要: 【目的】通过检测郫县豆瓣在不同发酵阶段细菌的种类、丰度及数量, 探究郫县豆瓣的不同发酵产品发酵过程中细菌的动态变化情况。【方法】采用 16S rRNA 基因测序对郫县豆瓣 4 个发酵阶段中细菌种类及丰度进行分析, 利用荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 方法检测不同发酵阶段的细菌总数。【结果】郫县豆瓣在初期的发酵过程中细菌群落处于动态稳定, 在不同发酵阶段细菌群落组成相对丰富, 从郫县豆瓣整个初期的发酵过程来看, 细菌群落多样性呈现升高的趋势, Shannon 指数从 1.25 升高到 3.50; 在郫县豆瓣初期发酵过程中细菌群落的数量以及多样性与发酵环境息息相关, 不同发酵阶段细菌群落的多样性也有所不同, 其中在干辣椒发酵阶段中泛菌属 (*Pantoea*) 为最优势菌属, 占比为 20%; 在蚕豆瓣发酵阶段中葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 的相对丰度最高, 占比为 38%; 混合发酵后, 在红油豆瓣发酵阶段的最优势菌属是乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*), 占比达到 27%, 郫县豆瓣发酵阶段的最优势菌属是乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*), 占比为 62%。【结论】推断在郫县豆瓣不同发酵阶段初期相对丰度较大的菌属对郫县豆瓣的质量以及产量可能会产生重大影响。

关键词: 郫县豆瓣; 发酵; 细菌群落结构; 多样性

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFC2000505); 济南微生态生物医学省实验室科研项目(JNL-2022013B)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC2000505) and the Research Project of Jinan Provincial Laboratory of Microecological Biomedicine (JNL-2022013B).

*Corresponding authors. ZHU Baoli, Tel: +86-10-64807362, E-mail: zhubaoli@im.ac.cn;

ZENG Bin, Zengtx001@aliyun.com

Received: 2022-10-28; Accepted: 2023-02-15; Published online: 2023-05-10

Diversity and dynamics of bacteria in Pixian broad-bean paste

REN Wenbo^{1,2,3}, CHEN Nan^{3,6}, LÜ Na^{3,5}, XIE Jianjiang⁷, ZHU Baoli^{3,5*}, ZENG Bin^{1,2,4*}

1 Jiangxi Key Laboratory of Biological Processing, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

2 College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

3 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 College of Pharmacy, Shenzhen Technology University, Shenzhen 518118, Guangdong, China

5 Jinan Microecological Biomedicine Shandong Laboratory, Jinan 250117, Shandong, China

6 Weiyuan Shuzhi (Beijing) Medical Technology Co., Ltd., Beijing 100101, China

7 Sichuan Gao Fu Ji Biotechnology Co., Ltd., Chengdu 610000, Sichuan, China

Abstract: [Objective] The dynamic changes of bacteria in the fermentation process of Pixian broad-bean paste were explored from the species, abundance, and number of bacteria. **[Methods]** The 16S rRNA gene sequencing was carried out to analyze the bacterial species and abundance at four fermentation stages of Pixian broad-bean paste, and qPCR was employed to determine the total number of bacteria at different fermentation stages. **[Results]** The bacteria in Pixian broad-bean paste showed a dynamically stable community at the initial fermentation process, high richness during the whole fermentation period, and increased diversity over fermentation time (Shannon index increased from 1.25 to 3.50). The number and diversity of bacteria were associated with the fermentation environment at the early fermentation stage, and the bacterial diversity varied at different fermentation stages. *Pantoea* was the dominant genus during the fermentation of dry pepper, accounting for 20%. During the fermentation of broad bean, *Staphylococcus* had the highest relative abundance, which reached 38%. The dominant genus was *Lactobacillus* at the fermentation stages of red oil broad bean and Pixian broad-bean paste, with the relative abundance of 27% and 62%, respectively. **[Conclusion]** The relatively abundant bacteria at the early fermentation stage might have a significant impact on the quality and yield of Pixian broad-bean paste.

Keywords: Pixian broad-bean paste; fermentation; bacterial community structure; diversity

郫县豆瓣是四川省成都市郫都区特产,是中国地理标志产品之一^[1],具有辣味重、鲜红油润、辣椒块大、回味香甜的特点,有“川菜之魂”之称^[2]。作为传统的豆瓣发酵调味品,郫县豆瓣有着悠久的历史,随着时间的推移,也在不断地改进发酵技术和发酵环境,从而提升豆瓣的品质、营养价值和安全性。郫县豆瓣包含红油豆瓣,其发酵一般分为2个阶段,第一阶段为蚕豆醅和

辣椒醅单独发酵:蚕豆醅是将原料蚕豆瓣经过蒸煮、摊晾,之后加入小麦粉和米曲霉孢子发酵180 d形成;辣椒醅是将原料干辣椒经过清洗粉碎后发酵30 d形成。第二阶段是混合发酵阶段,即将发酵完成的蚕豆醅和辣椒醅按1:5进行混合发酵15 d形成红油豆瓣,而郫县豆瓣是将发酵好的蚕豆醅和辣椒醅按1:1混合发酵90 d以上形成。

现有研究表明,豆酱制品酿制过程中的微生

物主要包括细菌、丝状真菌和酵母菌三大类群,且越来越多的研究表明不同地区的发酵食品微生物存在较大的差异^[3-5],具有地域特异性。郫县豆瓣酿制采用开放式的发酵体系^[6],利用发酵环境中的各类微生物进行物质代谢、转换和信息传递,从而形成了郫县豆瓣特有的风味特征。后熟发酵主要指发酵后的干辣椒和蚕豆瓣进行混合发酵的过程,是郫县豆瓣特有的日晒夜露工艺。近年来,高通量测序技术越来越多的应用于食品发酵微生物的研究,涉及范围包括食品发酵过程中的菌群结构动态变化、主要的功能菌群组成,以及相关微生物菌群代谢能力等多个方面的研究^[7-10]。针对郫县豆瓣的发酵研究,马岩石等^[11]采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对 5 种常见豆瓣酱进行细菌 16S rRNA 基因 V4 区及真菌 ITS1-2 区基因序列分析,研究其微生物群落结构组成及其多样性,结果表明细菌优势菌属主要为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、色盐杆菌属 (*Chromohalobacter*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)。贾云等^[12]运用高通量测序解析了豆瓣酱发酵过程中微生物的群落结构和演替,结果发现细菌群落结构在发酵初期有显著变化,而后逐渐趋于平稳,优势细菌主要是葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和魏斯氏菌属 (*Weisiella*),其中葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 在整个发酵过程中呈上升趋势,而芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和魏斯氏菌属 (*Weisiella*) 呈下降趋势。赵红宇等^[13]利用 16S rRNA 基因高通量测序技术分析郫县豆瓣后发酵过程中细菌的多样性变化,结果显示在后发酵阶段随着发酵时间的延长,细菌多样性总体呈现先下降再上升后下降的趋势。关于发酵食品微生物多样性的研究是当前的研究热点之一,但针对

自然发酵的豆瓣酱微生物群落结构的研究尤其是前期发酵相关的研究还相对较少。

本研究以传统郫县豆瓣制作过程中不同发酵阶段的产物干辣椒醅和蚕豆瓣醅,以及发酵的最终产物红油豆瓣酱和郫县豆瓣酱为研究对象,采用 16S rRNA 基因扩增子高通量测序技术和分析方法比较不同发酵阶段和不同发酵时段发酵物中的细菌组成成分和丰度,阐明郫县豆瓣不同发酵阶段发酵产物中的细菌菌群变化规律,形成郫县豆瓣发酵过程中微生物组动态组成结构的数据库,为进一步优化发酵工艺和提高产品质量提供理论依据和基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

本研究采集了四川省成都市郫县安德中国川菜产业化园区郫县豆瓣 2 个发酵阶段的 4 种发酵物在发酵初期的样本,分别为第一阶段的干辣椒发酵阶段(A)和蚕豆瓣发酵阶段(B),以及第二阶段的红油豆瓣发酵阶段(C)和郫县豆瓣发酵阶段(D)。不同发酵过程具体采样时间和位点如表 1 所示。

干辣椒发酵阶段,自发酵开始之日起,进行 2 次取样,分别为物料混合开始发酵样品和发酵 6 d 的样品,取样点为发酵池正中间物料上表面以下 1.0 m 深度的点位,每次取样点位相同,编号为 A0、A2。

蚕豆瓣发酵阶段,自物料混合放入发酵池开始发酵之日起,进行 4 次取样,分别为物料混合开始发酵时的样品、发酵 6 d 样品和发酵 30 d 样品,取样点为发酵池正中间物料上表面以下 0.7 m 深度的点位,每次取样点位相同,编号为 B0、B2、B10。

表 1 样本采集点和时间

Table 1 Sample collection point and time

Fermentation stage	Stage	Sampling time	Sample No.
Separate	Dry pepper fermentation stage	First day	A0-1, A0-2, A0-3
		Sixth day	A2-1, A2-2, A2-3
	Fermentation stage of broad bean clove	First day	B0-1, B0-2, B0-3
		Sixth day	B2-1, B2-2, B2-3
		Thirtieth day	B10-1, B10-2, B10-3
Mixed	Fermentation stage of red oil broad bean	First day	C0-1, C0-2, C0-3
		Sixth day	C2-1, C2-2, C2-3
		Fifteenth day	C5-1, C5-2, C5-3
	Fermentation stage of Pixian broad bean paste	First day	D0-1, D0-2
		Sixth day	D2-1, D2-2, D2-3

红油豆瓣发酵阶段, 自发酵开始之日起, 进行 3 次取样, 物料混合开始发酵样品、发酵 6 d 样品和发酵 15 d 样品, 取样点为发酵池正中间物料上表面以下 0.7 m 深度的点位, 每次取样点位相同, 编号为 C0、C2、C5。

郫县豆瓣发酵阶段, 自发酵开始之日起, 进行 2 次取样, 物料混合开始发酵样品和发酵 6 d 样品, 取样点为发酵池正中间物料上表面以下 0.7 m 深度的点位, 每次取样点位相同, 编号为 D0、D2。

1.2 发酵物元基因组 DNA 提取

取郫县豆瓣不同发酵时期采集的样本 200–250 mg, 按照 QIAamp PowerFecal DNA 试剂盒(QIAGEN)的标准操作流程提取元基因组 DNA。所有 DNA 溶于 Tris 缓冲液中, 保存于 -20°C 冰箱。

1.3 荧光定量 PCR 检测

为了鉴定不同发酵物中的细菌数, 本研究利用 Taqman 探针荧光定量 PCR 法检测郫县豆瓣不同时期发酵物的细菌数。引物及探针信息: F (5'-CGTCAGCTCGTGYCGTGAG-3'), R (5'-CGT CRTCCCCRCCTTCC-3'); 探针: FAM-TTAAGTCCRYAACGAGCGCAACCC-TAMRA。PCR 反应体系: 10 μL qPCR 2 \times Master Mix, 0.5 μL KAPA

dNTP Mix, 0.4 μL 正向或反向引物, 0.2 μL 探针和 250 ng 模板 DNA, 无菌水补平终体积为 20 μL 。PCR 反应条件为: 95°C 2 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环。每个样本做 3 个重复。

1.4 16S rRNA 基因扩增子高通量测序文库制备与测序

本研究采用 2 次扩增方法构建 16S rRNA 基因 V3–V4 区高通量测序文库, 特异性扩增引物为 341F (5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3') 和 805R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3')。PCR 反应体系为: 5 μL 5 \times GC 缓冲液, 0.5 μL KAPA dNTP Mix, 0.5 μL KAPA-HiFi HotStart DNA 聚合酶, 0.5 μL 正向或反向引物和 50 ng 模板 DNA, 最终体积为 25 μL 。PCR 反应条件为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 25 个循环; 72°C 5 min。AMPure XP 磁珠用于纯化 PCR 产物。第二次扩增用以给每个样本加入不同的 index 序列并添加完 Illumina 测序所需的所有序列信息。PCR 反应体系为: 5 μL 5 \times GC 缓冲液, 0.75 μL KAPA dNTP Mix, 0.5 μL KAPA-HiFi HotStart DNA 聚合酶, 1.5 μL 正向或反向引物和 5 μL 纯化的第一次扩增产物。PCR 反应条件为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 8 个循环; 72°C 5 min。随后

通过 0.8XAMPure XP 磁珠纯化扩增产物, 完成文库构建。

质检合格的 16S rRNA 基因文库, 利用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台的 Pair-end 250 模式进行测序, 所得数据过滤后进行后续的生物信息学分析。

1.5 不同发酵阶段产物的微生物菌群统计和数据分析

将郫县豆瓣不同发酵阶段 29 个样本采用 FLASH (fast length adjustment of short reads) 将测序得到的双端序列拼接成一条目标区域序列。对目标序列进行质控过滤, 过滤后的序列与参考数据库 USEARCH 64 bit v8.0.1517 作比对, 去除嵌合体序列得到最终优化序列。通过随机减法, 根据样本的最小值对每个样本的读取次数进行归一化。根据 97% 的序列相似性水平, 利用 QIIME 软件包中的 Uclust 算法进行分类操作单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类分析, 然后基于 Silva 参考数据库, 对每个样品的 OTUs 进行物种分类学注释, 并计算每个物种的相对丰度。根据 QIIME 软件, 并基于加权和非加权 Unifrac 距离矩阵计算样本的 α 多样性, 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。根据 STAMP 软件, 采用两组间分析, 运用 Welch's *t*-test 差异检验算法进行组间差异分析。

2 结果与分析

2.1 郫县豆瓣不同阶段不同时期发酵产物的 α 多样性

本研究对整个发酵过程的 4 个发酵阶段的 29 个样本进 16S rRNA 基因的 V3-V4 区高通量测序, 每个样本获得 142 477-248 623 条序列 (reads)。所有样本的测序数据均已达到平台期, 不会因为数据量的增加而获得更多的 OTU 数目, 表明所有样本的测序深度均已满足后续生物

信息学分析要求。

郫县豆瓣不同阶段发酵产物的 α 多样性结果表明, 不同发酵阶段细菌多样性存在显著差异 (图 1)。本研究检测的郫县豆瓣不同发酵阶段细菌 Shannon 指数和 Chao1 指数均存在显著差异。不同发酵阶段 Shannon 指数为 1.25-3.50, 其中郫县豆瓣干辣椒发酵阶段 Shannon 指数最低在 1.25-2.10 范围内, 其次是蚕豆瓣发酵阶段中发酵物的 Shannon 指数在 2.50-2.75 范围内。郫县豆瓣混合发酵阶段的 Shannon 指数显著高于单独发酵阶段, 其中红油豆瓣发酵阶段中 Shannon 指数最高在 3.1-3.5 范围内, 郫县豆瓣发酵阶段 Shannon 指数在 2.8-3.0 范围内。不同发酵阶段中发酵物中细菌的 Shannon 指数变化规律也存在差异, 干辣椒发酵阶段中随着发酵时间的增加 Shannon 指数呈现下降趋势, 而蚕豆瓣发酵阶段中 Shannon 指数为先下降后上升, 红油豆瓣发酵阶段 Shannon 指数先有一个上升的过程后呈现下降趋势, 郫县豆瓣发酵阶段初期 Shannon 指数一直处于稳定状态。

作为评价菌群丰富度的 Chao1 指数, 在郫县豆瓣不同发酵阶段的不同发酵时期也表现出显著差异 ($P < 0.01$), 其中红油豆瓣的 Chao1 指数为 130-107, 郫县豆瓣发酵阶段为 93-86, 蚕豆瓣发酵阶段的 Chao1 指数为 30-47, 干辣椒发酵阶段的 Chao1 指数高于豆瓣醅的发酵过程, 即不同发酵过程细菌物种的丰富度为 $C > D > A > B$ 。不同发酵过程的 Chao1 指数的变化趋势与 Shannon 指数具有差异, 在干辣椒发酵过程中 Chao1 指数呈现下降趋势, 蚕豆瓣发酵过程呈现先下降后上升, 红油豆瓣发酵过程中 Chao1 指数先下降后上升, 郫县豆瓣发酵过程的 Chao1 指数处于稳定状态。

另外通过对郫县豆瓣同一发酵阶段不同样

本 Chao1 指数对比可知, 在干辣椒发酵阶段, A0 和 A2 差异不显著($P>0.05$); 在蚕豆瓣发酵阶段, B0、B2、B10 中, B0 和 B2 具有显著差异($P<0.05$), 其他样本两两对比差异均不显著($P>0.05$); 在红油豆瓣发酵阶段, 各发酵阶段间均未检测到显著差异($P>0.05$), 在郫县豆瓣发酵阶段, D0 和 D2 间无显著差异($P>0.05$)。

2.2 郫县豆瓣不同发酵阶段产物的细菌群落结构

不同发酵阶段的样本在门水平上的菌群结构如图 2 所示。在郫县豆瓣不同发酵阶段的 29 个样本中, 共检测到 4 个细菌门, 分别为厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆

菌门 (*Bacteroidota*) 和 放 线 菌 门 (*Actinobacteriota*)。其中干辣椒发酵阶段样本中检测到 3 个门, 其中变形菌门(*Proteobacteria*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)为优势菌门, 平均相对丰度分别为 63%、36%; 蚕豆瓣发酵阶段样本中检测到 4 个菌门, 优势菌门为厚壁菌门(*Firmicutes*), 平均相对丰度达到 96%; 经过混料发酵后, 红油豆瓣发酵阶段和郫县豆瓣发酵阶段的样本中均检测到 4 个门, 优势门均为厚壁菌门(*Firmicutes*)和变形菌门(*Proteobacteria*), 但是平均相对丰度具有一定差异, 红油豆瓣发酵阶段厚壁菌门和变形菌的丰度分别为 76%和 20%, 而郫县豆瓣发酵阶段的丰度为 68%和 30%。

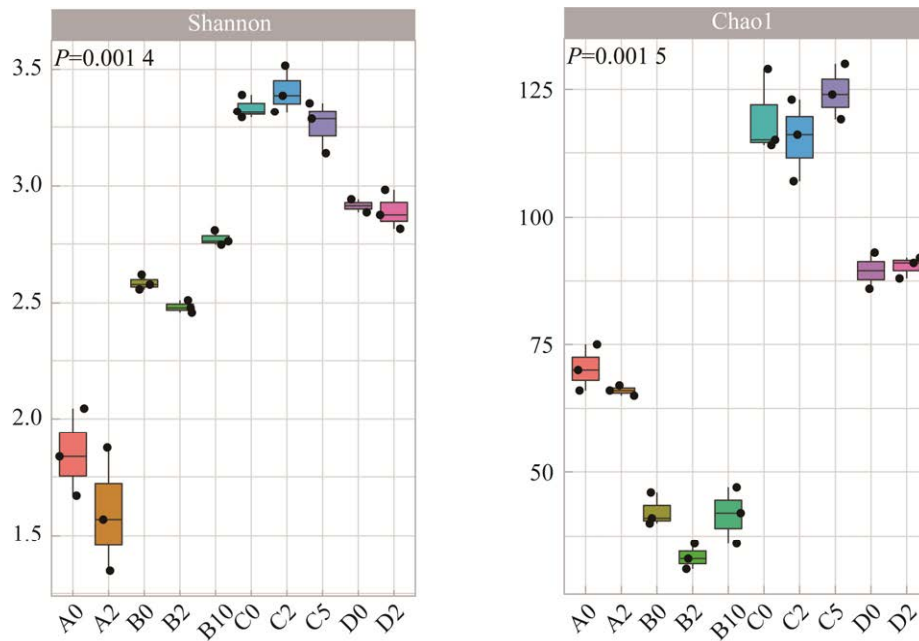


图 1 郫县豆瓣不同发酵阶段细菌 Shannon 指数和 Chao1 指数

Figure 1 Bacterial Shannon index and Chao1 index of Pixian broad-bean paste at different fermentation stages. A0: Samples for first day of the dry pepper fermentation phase; A2: Samples for sixth day of the dry pepper fermentation phase; B0: Sample for first day of fermentation stage of broad bean clove; B2: Sample for sixth day of fermentation stage of broad bean clove; B10: Sample for thirtieth day of fermentation stage of broad bean clove; C0: Sample for first day of fermentation stage of red oil broad bean; C2: Sample for sixth day of fermentation stage of red oil broad bean; C5: Sample fifteenth day of fermentation stage of red oil broad bean; D0: Sample for first day of fermentation stage of Pixian broad bean; D2: Sample for sixth day of fermentation stage of Pixian broad bean.

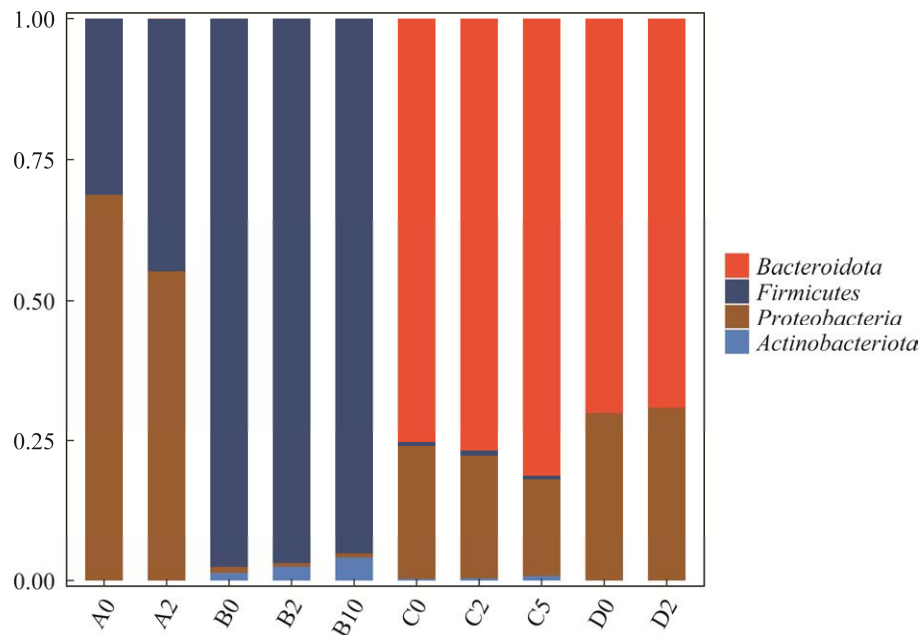


图 2 郫县豆瓣不同发酵阶段样本间门水平细菌群落结构

Figure 2 Phyla level bacterial community structure of Pixian broad-bean paste samples at different fermentation stages.

本研究中的 29 个发酵产物样本共检测到 33 个属, 干辣椒发酵阶段有 19 个属, 蚕豆瓣发酵阶段有 10 个属, 红油豆瓣发酵阶段有 21 个属, 郫县豆瓣发酵阶段有 11 个属, 结果如图 3 所示。不同发酵阶段优势菌属组成差异明显。干辣椒发酵阶段中共检测到 19 个属, 其中排名前三的优势细菌属为泛菌属 (*Pantoea*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 平均相对丰度分别为 20%、17% 和 12%; 蚕豆瓣发酵阶段中共检测到 10 个属, 其中排名前三的优势细菌属为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和链球菌属 (*Streptococcus*), 平均相对丰度分别为 38%、35% 和 17%; 混料发酵后, 红油豆瓣发酵阶段样品中共检测到 21 个属, 排名前三的优势细菌属为乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 平均相对丰度分别为 27%、

24% 和 13%; 郫县豆瓣发酵阶段中共检测到 11 个属, 其中乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、泛菌属 (*Pantoea*) 和科萨孔菌属 (*Kosakonia*) 为排名前三的优势细菌属, 平均相对丰度分别为 62%、18% 和 7%。

2.3 郫县豆瓣不同发酵阶段产物的细菌群落差异分析

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 可以直观显示不同环境样本中微生物群的相似性和差异性, 通过 PCA 结果中的点的位置, 可以判断样本间的群落结构是否相近。本研究对不同发酵阶段初期样本的细菌群落结构进行了 PCA 分析, 结果如图 4 所示, 干辣椒发酵阶段、蚕豆瓣发酵阶段的细菌群落结构差异明显, 混合发酵阶段 (红油豆瓣发酵、郫县豆瓣发酵) 的细菌群落结构相较单独发酵阶段的样本更相似。

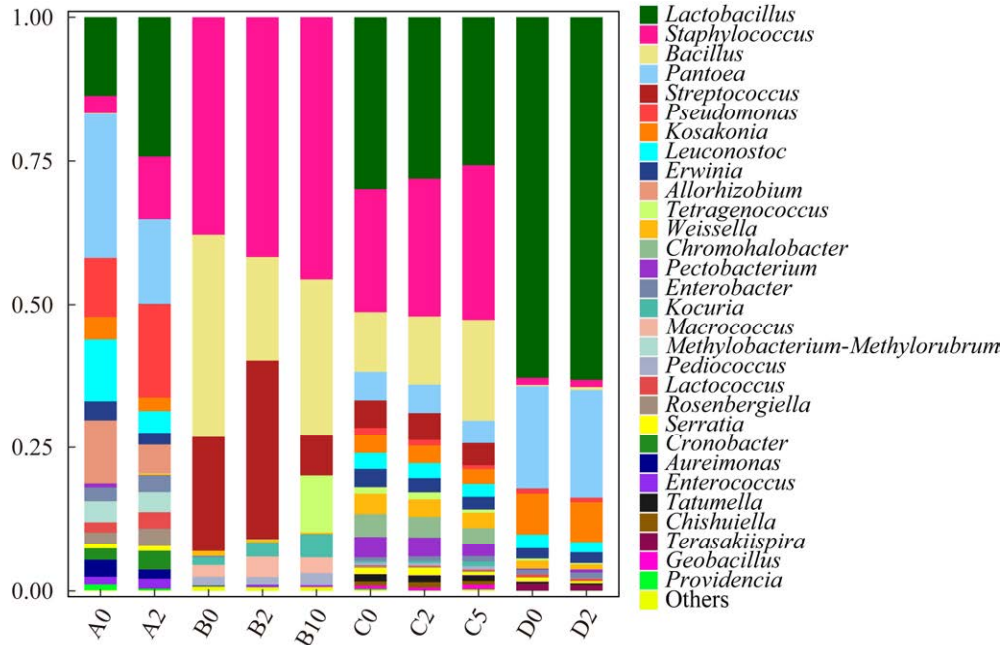


图 3 郫县豆瓣不同发酵阶段样本间属水平细菌群落结构

Figure 3 Genus level bacterial community structure of Pixian broad-bean paste samples at different fermentation stages.

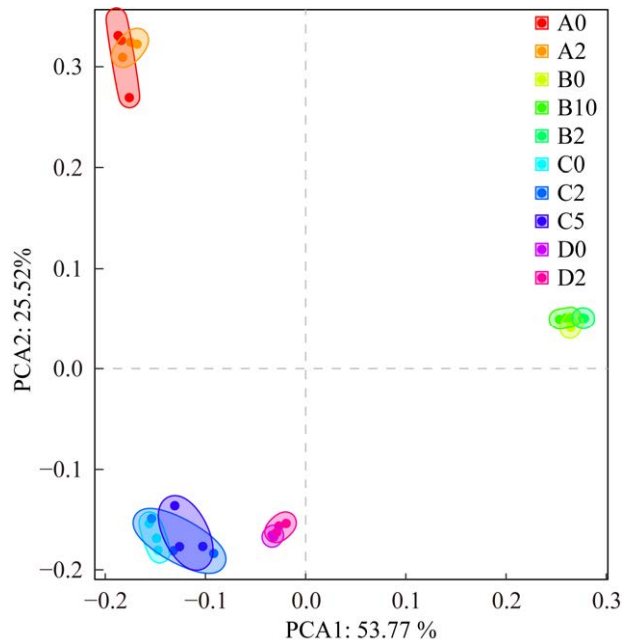


图 4 郫县豆瓣不同发酵阶段样本间细菌群落 PCA

Figure 4 Bacterial community PCA between samples at different fermentation stages of Pixian broad-bean paste.

如图 5 所示,列出了在郫县豆瓣和红油豆瓣发酵阶段具有显著差异的 14 个细菌类群。其中包括葡萄球菌属、链球菌属、色卤杆菌属、果胶杆菌属、魏斯氏菌属、赤水杆菌属、嗜热脂肪芽孢杆菌属、片球菌属、罗森博格氏菌属、科萨孔菌属、泛菌属、乳酸杆菌属等。图中左侧为柱状图,显示 2 组间的物种相对丰度差异。右侧为点棒图,显示 2 组间的物种分别在两组样本中所有物种的百分比。与郫县豆瓣发酵阶段相比,红油豆瓣发酵阶段中葡萄球菌属、芽孢杆菌属、链球菌属、色卤杆菌属、果胶杆菌属、魏斯氏菌属、赤水杆菌属、嗜热脂肪芽孢杆菌属、片球菌属、罗森博格氏菌属、塔特姆菌属相对丰度显著增加 ($P < 0.05$),科萨孔菌属、泛菌属和乳酸杆菌属相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。其中乳酸杆菌属在红油豆瓣和郫县豆瓣中含量具有明显差异,葡萄球菌属在红油豆瓣中含量较多,而在郫县豆瓣中含量极少。而这些红油豆瓣和郫县豆瓣所含有的优

势细菌不同可能就是导致 2 种豆瓣酱品质风味有所不同的原因所在^[9]。

2.4 郫县豆瓣不同发酵阶段产物的微生物菌群功能分析

本研究利用 PICRUSt 软件预测了郫县豆瓣不同发酵阶段样本中菌群的功能基因和代谢通路, 并对排名前二十的代谢通路绘制了热图(图 6)。从图 6 可以发现, 不同发酵阶段、不同发酵过程代谢通路的丰度表现出明显的差异。除细菌生长代谢所需基础代谢通路外, 次级胆汁酸的生物合成在干辣椒发酵阶段和蚕豆瓣发酵阶段比例很小, 但是在经过混合发酵后, 在红油豆瓣和郫县豆瓣发酵过程中比例增加, 尤其是在豆瓣发酵阶段, 随着发酵时间的增加, 次级胆汁酸合成的相关基因增加。从总体上看, 4 个发酵阶段的功能基因都有所不同, 在干辣椒发酵阶段功能基因相对丰度较为稳定, 在蚕豆瓣发酵阶段随着发酵时间的推移, 功能基因的相对丰度越来越高, 而在经过混合发酵后,

在红油豆瓣发酵阶段功能基因的相对丰度也是随发酵时间的推移逐渐升高, 在郫县豆瓣发酵阶段, 功能基因相对丰度较为稳定。而郫县豆瓣和红油豆瓣相比次级脂肪酸代谢相对丰度具有显著差异, 硫辛酸代谢在红油豆瓣中相对丰度比在郫县豆瓣中高。

2.5 郫县豆瓣不同发酵产物内细菌数目定量分析

荧光定量 PCR 的结果如表 2 所示, 每克发酵物中, 细菌总数为 5.91×10^8 – 2.00×10^{11} copy/g, 不同发酵时期的细菌总数存在明显差异。干辣椒发酵过程细菌数最少为 5.91×10^8 – 7.19×10^8 copy/g, 其次是红油豆瓣发酵过程(3.58×10^9 – 7.04×10^9 copy/g)和蚕豆瓣发酵过程(1.80×10^{10} – 5.32×10^{10} copy/g); 细菌数最高的样本为郫县豆瓣发酵阶段为 6.27×10^9 – 2.00×10^{11} copy/g。在郫县豆瓣混合发酵阶段, 随着发酵时间的增加, 细菌数有明显上升, 而其他发酵阶段每个样本的细菌数未根据发酵时间的增加而增加。

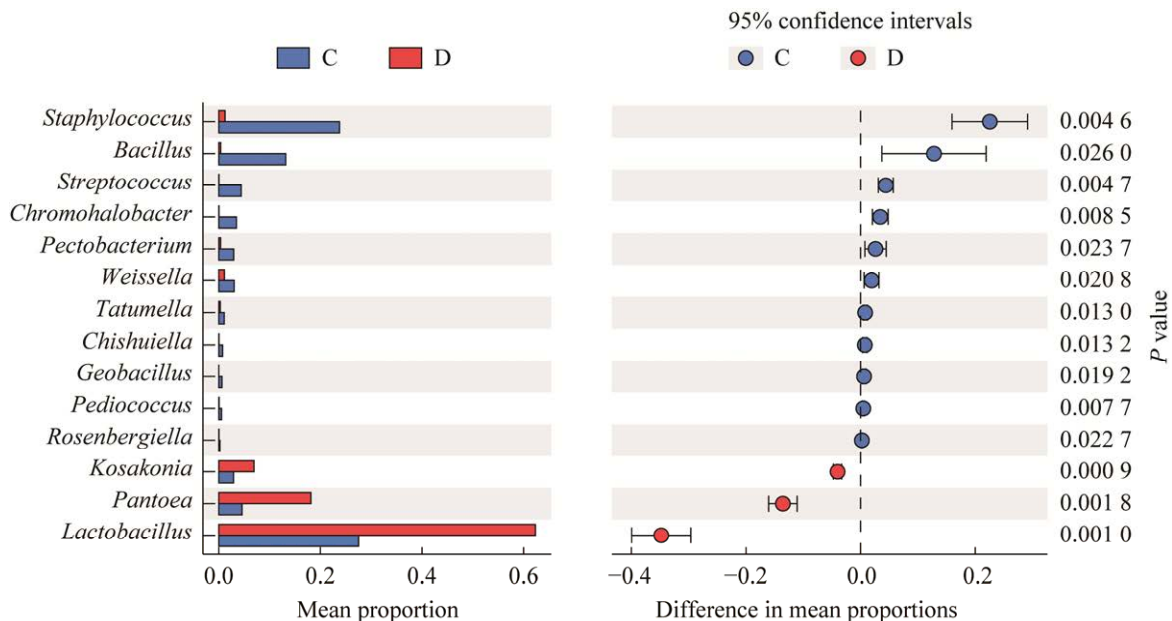


图 5 红油豆瓣和郫县豆瓣发酵阶段样本间差异细菌

Figure 5 Difference of bacteria between red oil broad-bean paste and Pixian broad-bean paste in fermentation stage.

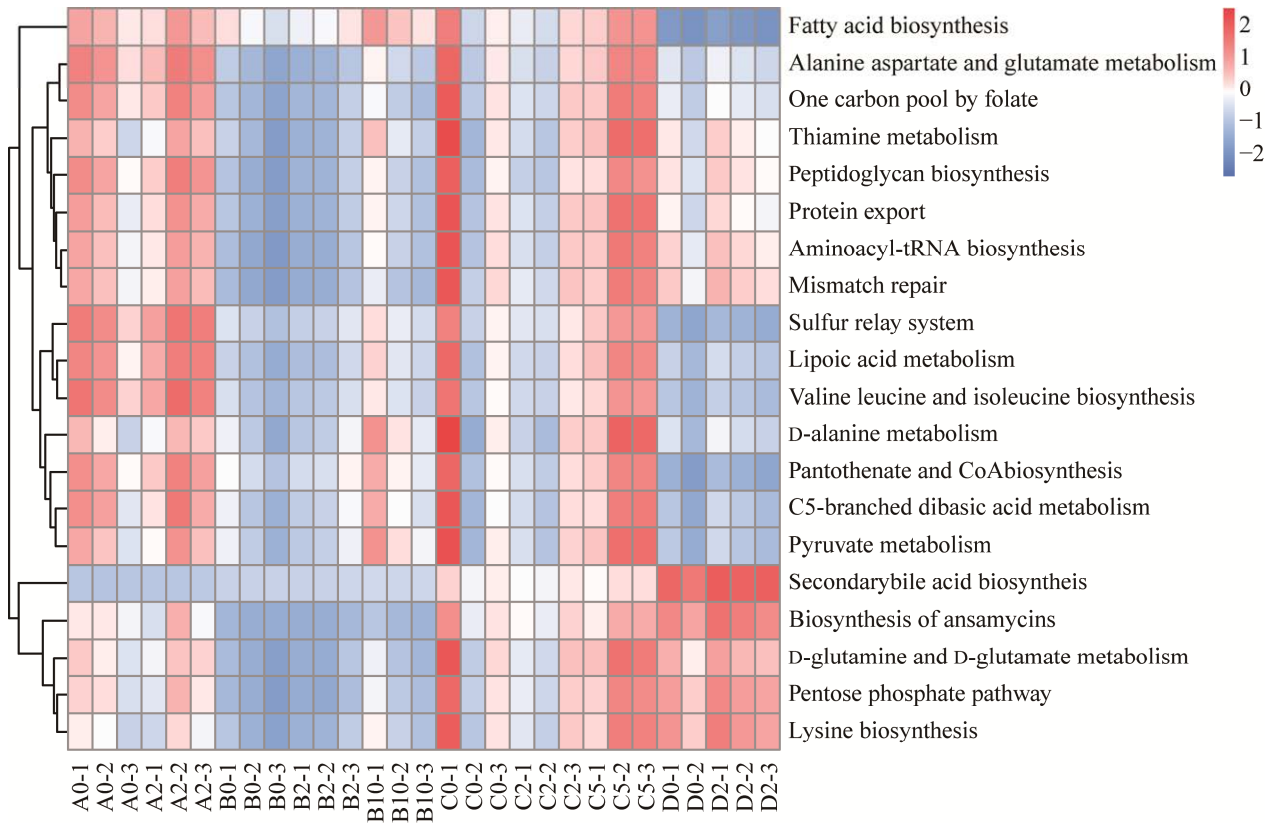


图 6 郫县豆瓣不同发酵阶段初期的功能预测

Figure 6 Function prediction of Pixian broad-bean paste in different early fermentation stages.

表 2 不同发酵时期细菌数

Table 2 Number of bacteria in different fermentation stages (qPCR method)

Sample	Number of bacteria (average)	Sample	Number of bacteria (average)
A0	7.19×10^8	C0	7.04×10^9
A2	5.91×10^8	C2	6.08×10^9
B0	2.78×10^{10}	C5	3.58×10^9
B2	5.32×10^{10}	D0	6.27×10^9
B10	1.80×10^{10}	D2	2.00×10^{11}

3 讨论与结论

郫县豆瓣是我国著名的发酵食品,采用的是独特的开放式半固体发酵体系。目前的研究表明,豆瓣的不同发酵阶段,微生物组成具有较大差异。早期的研究,鲍奕达等^[1]利用高通量测序技术检测了蚕豆醪、辣椒醪和混合醪各 7 个样本

在发酵过程中的菌群结构,通过测序结果平均获得了 36 293 条序列。其中在蚕豆醪中优势菌属前期主要为葡萄球菌,后逐渐演替为盐单胞菌及四联球菌,在辣椒醪中优势菌属主要是魏斯氏菌属、克雷伯氏菌属、明串珠菌属、根瘤菌属、乳酸杆菌属及泛菌属,在混合醪中优势菌主要是泛菌属和魏斯氏菌属。与本研究的 16S rRNA 基因高通测序结果相对比,本研究中每个样品最低获得 142 477 条序列。且不同发酵阶段豆瓣酱中的菌群差异明显,在干辣椒发酵阶段中,主要菌群为泛菌属(20%)、乳酸杆菌属(17%)和假单胞菌属(12%);蚕豆瓣发酵阶段,主要是葡萄球菌属(38%)、芽孢杆菌属(35%)和链球菌属(17%);红油豆瓣发酵阶段的优势菌群为乳酸杆菌属(27%)、葡萄球菌属(24%)和芽孢杆菌属(13%);

而郫县豆瓣发酵阶段中乳酸杆菌属(62%)、泛菌属(18%)和科萨孔菌属(7%)为主要优势类群。在贾云等^[12]的研究报告中发现共通过运用高通量测序测定 14 个样本, 且在整个发酵过程中优势微生物主要是葡萄球菌属(79.8%)、芽孢杆菌属(7.5%)、魏斯氏菌属(5.9%)。这 2 项研究结果与本研究相比, 都是不同发酵阶段细菌群落结构不同, 但是三者细菌组成相似, 丰度差别较大。同时我们也发现, 不同的研究中虽然物种一致, 但是丰度上存在差异, 推断是因为原料产地、发酵条件、发酵工艺等不同所导致的。

贾云等^[12]在分析传统豆瓣酱微生物群落发酵演替规律时提出, 细菌群落结构的差异可能与发酵原料相关, 干辣椒发酵和蚕豆瓣发酵分别以辣椒(蔬菜)和蚕豆(谷物)为主要原料, 原料成分差异较大, 细菌种类差异明显; 而红油豆瓣和郫县豆瓣是用蚕豆瓣发酵产物和干辣椒发酵产物按照不同比例混合后再进行发酵, 而且两者的发酵环境也有所不同, 因此细菌种类也存在差异。不同发酵阶段的差异不仅表现在物种组成上, 细菌的多样性在不同发酵阶段间同样存在显著差异 [$P=0.001\ 5$ (Chao1) 和 $P=0.001\ 4$ (Shannon)]。另外不同发酵阶段的 β 多样性的结果也存在显著差异, 尤其是辣椒醃和豆瓣培的发酵阶段, 从结果中我们也发现辣椒醃的红油豆瓣与辣椒醃更近, 而郫县豆瓣与豆瓣培更近。由于本研究的不同样本发酵环境和发酵工艺相同, 因此我们也认为不同发酵阶段的微生物差异源自不同发酵阶段的原材料的差异。

由 Chao1 指数和 Shannon 指数可知, 在不同的发酵阶段物种的多样性变化趋势不同。在郫县豆瓣发酵阶段, 细菌多样性相对稳定; 在蚕豆瓣发酵阶段, 细菌多样性随发酵时间呈现先下降再所上升的趋势; 在干辣椒发酵阶段, 细菌多样性呈现下降趋势。以上 3 个发酵阶段 2 个多样性

指数的变化趋势是一致的, 但是在红油豆瓣发酵阶段, 用于评价细菌丰富度的 Chao1 指数展现出先下降后上升的趋势, 而综合评价细菌多样性的 Shannon 指数则展现出先上升后下降的趋势。同时也发现, 干辣椒发酵与蚕豆瓣发酵阶段 2 个多样性指数存在差异, 干辣椒发酵阶段的 Chao1 指数高于蚕豆瓣发酵, 但是蚕豆瓣发酵阶段确有更高的 Shannon 指数。所以可能是因为红油豆瓣发酵阶段的发酵环境是有利于某一种细菌的生长。我们推测这可能也是造成红油豆瓣发酵阶段 2 个多样性指数变化趋势存在差异的原因, 因为红油豆瓣是由蚕豆醃和辣椒醃按 1:5 进行混合发酵形成的。

对郫县豆瓣不同发酵阶段功能基因的相关分析可知, 在郫县豆瓣发酵的 4 个不同时期都有许多代谢途径, 其中除了维持细菌生命活动的基本代谢途径以外, 还具有像硫辛酸代谢、硫胺素代谢、次级胆汁酸代谢和安沙霉素的生物合成等有益的代谢途径。硫胺素又称维生素 B_1 , 有保护神经系统的作用, 还能促进肠胃蠕动, 增加食欲。本研究中, 通过细菌的种类推测功能基因发现硫胺素代谢基因在红油豆瓣中富集, 因此认为红油豆瓣中可能含有更多的代谢硫胺素的细菌, 红油豆瓣中有更多的对人神经系统具有一定的保护作用。而在郫县豆瓣发酵过程中硫胺素代谢途径所占比例一直较高, 具有生成硫胺素的潜能。通过对不同发酵阶段推测功能基因可知, 次级胆汁酸代谢在郫县豆瓣发酵阶段中富集, 而次级胆汁酸能够促进促进脂质物质的吸收以及抑制胆汁中胆固醇的析出, 防止胆石的生成, 具有生成胆汁酸的潜能。

在本研究中郫县豆瓣有 60% 以上的细菌属于乳酸杆菌属。乳酸杆菌属细菌的代谢产物有 50% 以上是乳酸, 除此之外还有有机酸, 胞外多糖等, 均对人体有益^[14]。乳酸杆菌已经广泛应

用于商业化产品，它们能够促进人体肠道健康，有效地抑制有害细菌的生长繁殖，具有抗菌、抑制腐菌、提高人体免疫力等功效。乳酸杆菌属是郫县豆瓣发酵产物(红油豆瓣、郫县豆瓣)中最优势的菌属，尤其是在郫县豆瓣中，因此可以推断食用郫县豆瓣对人体健康有益。

参考文献

- [1] 鲍奕达, 张丽杰, 郑鹏飞, 陈海风, 黄家全, 徐岩. 郫县豆瓣发酵过程的微生物多样性及溯源分析[J]. 微生物学报, 2020, 60(11): 2555-2571.
BAO YD, ZHANG LJ, ZHENG PF, CHEN HF, HUANG JQ, XU Y. Diversity and source tracking of microbial community in Pixian broad bean paste[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(11): 2555-2571 (in Chinese).
- [2] 李幼筠. “郫县豆瓣”剖析[J]. 四川食品与发酵, 2008, 44(1): 19-23.
LI YJ. Analysis of “Pixian bean paste”[J]. *Sichuan Food and Fermentation*, 2008, 44(1): 19-23 (in Chinese).
- [3] 吴林寰, 陆震鸣, 龚劲松, 史劲松, 许正宏. 高通量测序技术在食品微生物研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1164-1174.
WU LH, LU ZM, GONG JS, SHI JS, XU ZH. Application of next generation sequencing in studying food microorganisms-a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(9): 1164-1174 (in Chinese).
- [4] WOLFE BE, BUTTON JE, SANTARELLI M, DUTTON RJ. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity[J]. *Cell*, 2014, 158(2): 422-433.
- [5] LIU WJ, XI XX, SUDU Q, KWOK L, GUO Z, HOU QC, MENHE B, SUN TS, ZHANG HP. High-throughput sequencing reveals microbial community diversity of Tibetan naturally fermented yak milk[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(3): 1741-1751.
- [6] 邓杰, 黄治国, 卫春会, 罗惠波, 杜礼泉, 苟云凌. 基于高通量测序的浓香型白酒窖池细菌群落结构分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 50-55.
DENG J, HUANG ZG, WEI CH, LUO HB, DU LQ, GOU YL. High-throughput sequencing reveals bacterial structure in the mud pits of heavy-fragrance Baijiu[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(7): 50-55 (in Chinese).
- [7] 左勇, 王小龙, 叶碧霞, 江鹏, 傅彬, 杨小龙. 基于高通量测序对宜宾芽菜中细菌群落结构分析[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 242-245, 250.
ZUO Y, WANG XL, YE BX, JIANG P, FU B, YANG XL. Based on high-throughput sequencing analysis of bacterial community structure in Yibin sprouts[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 242-245, 250 (in Chinese).
- [8] 解万翠, 尹超, 宋琳, 许志颖, 于文露, 贾俊涛, 赵宏伟, 张俊逸, 李钰金, 杨锡洪. 中国传统发酵食品微生物多样性及其代谢研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 253-259.
XIE WC, YIN C, SONG L, XU ZY, YU WL, JIA JT, ZHAO HW, ZHANG JY, LI YJ, YANG XH. Research progress of microorganism and its metabolism in traditional fermentation food[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(10): 253-259 (in Chinese).
- [9] 杨帆, 邓维琴, 李恒, 唐浪, 马嫫. 不同来源及不同发酵阶段豆瓣酱微生物多样性的比较分析[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(6): 27-34, 119.
YANG F, DENG WQ, LI H, TANG L, MA Y. Comparative analysis of microbial diversity of doubanjiang from different place, different process and different fermentation period[J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2021, 57(6): 27-34, 119 (in Chinese).
- [10] 赵馨馨, 崔梦君, 董蕴, 倪慧, 单春会, 郭壮. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析巴东地区豆瓣酱中微生物多样性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 297-303.
ZHAO XX, CUI MJ, DONG Y, NI H, SHAN CH, GUO Z. Analysis of microbial diversity in Badong bean paste by Illumina MiSeq high throughput sequencing technology[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(9): 297-303 (in Chinese).
- [11] 马岩石, 姜明, 李慧, 裴芳艺. 基于高通量测序技术分析东北豆瓣的微生物多样性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 100-105.

- MA YS, JIANG M, LI H, PEI FY. Analysis of microbial diversity of Northeast soy sauce based on high throughput sequencing technology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(12): 100-105 (in Chinese).
- [12] 贾云, 钮成拓, 郑飞云, 刘春风, 王金晶, 李崎. 传统豆瓣酱微生物群落发酵演替规律及其功能分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(9): 2749-2764.
- JIA Y, NIU CT, ZHENG FY, LIU CF, WANG JJ, LI Q. Succession and function analysis of microbial community during traditional broad bean paste fermentation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(9): 2749-2764 (in Chinese).
- [13] 赵红宇, 徐炜桢, 杨国华, 刘元福, 岳鹏, 张良. 基于高通量测序的郫县豆瓣后发酵期细菌多样性研究[J]. *食品科学*, 2017, 38(10): 117-122.
- ZHAO HY, XU WZ, YANG GH, LIU YF, YUE P, ZHANG L. Bacterial community analysis of Pixian soybean paste during post-fermentation by high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2017, 38(10): 117-122 (in Chinese).
- [14] 王巧丽, 季海峰, 韩向敏, 王四新, 王晶, 张董燕, 刘辉. 饲用乳酸菌的主要代谢产物及其作用[J]. *饲料研究*, 2012(10): 22-24.
- WANG QL, JI HF, HAN XM, WANG SX, WANG J, ZHANG DY, LIU H. Main metabolites of feed lactic acid bacteria and their functions[J]. *Feed Research*, 2012(10): 22-24 (in Chinese).