

# 利用高通量测序分析云南两个地区豆豉微生物群落的多样性

李晓然, 刘晓峰, 张海燕, 罗义勇, 柳陈坚

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500)

**摘要:** 豆豉是一种具有独特风味的传统发酵食品。研究豆豉的微生物群落多样性, 对于提高豆豉质量和食用安全性具有重要意义。本研究分别采取云南西双版纳州的景洪市和勐海县的两个豆豉样品, 提取 DNA, PCR 扩增细菌 16S rDNA 和真菌 ITS 区域并进行焦磷酸测序, 通过分析测序所得结果比较两个豆豉样品中的细菌和真菌群落多样性。结果表明: 景洪样品的最优势细菌是 *Leuconostoc mesenteroides*, 其次是 *Leuconostoc fallax*。勐海样品中丰度最高的细菌是 *Staphylococcus gallinarum*, 其次是 *Tetragenococcus halophilus*。两个样品中都含有少数序列与能够产细菌素的 *Weissella confusa* 和 *Weissella cibaria* 具有较高相似性。两个样品的优势真菌都是耐盐的 *Candida etchellsii* 和 *Candida versatilis*。总之, 西双版纳的豆豉具有较高的微生物群落多样性, 以嗜盐菌居多。

**关键词:** 豆豉; 微生物群落; 多样性

文章编号: 1673-9078(2014)12-61-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.011

## Microbial Community Diversity in *Douchi* from Yunnan Province Using High-throughput Sequencing Technology

LI Xiao-ran, LIU Xiao-feng, ZHANG Hai-yan, LUO Yi-yong, LIU Chen-jian

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** *Douchi* is a traditional fermented food with a unique flavor. Studying microbial diversity within *douchi* is important to improve the quality and food safety related to consumption of *douchi*. In this study, two kinds of *douchi* samples were collected from Jinghong (JH) and Menghai (MH) regions of Xishuangbanna Dai autonomous prefecture in the Yunnan Province. After DNA extraction, the bacterial 16S ribosomal DNA (rDNA) and fungal internal transcribed spacer (ITS) region were amplified and bar-coded pyrosequencing was carried out. The diversity of bacterial and fungal communities in the two samples was analyzed and compared based on the sequencing data. The results indicated that the predominant bacterium in the JH sample was *Leuconostoc mesenteroides*, followed by *L. fallax*. The most abundant bacterium in the MH sample was *Staphylococcus gallinarum*, followed by *Tetragenococcus halophilus*. The results for both samples showed a small number of sequences, which showed high similarity with those of salt-tolerant *Candida etchellsii* and bacteriocin-producing *C. versatilis*, both of which were the dominant fungi in both samples. In conclusion, the *douchi* from Xishuangbanna showed high microbial diversity and the predominant microorganisms were salt tolerant.

**Key words:** *douchi*; microbial community; diversity

豆豉是利用微生物发酵制成的一种具有独特风味的传统发酵豆制品, 其特有的风味和色泽特征与微生物发酵有着重要的关系。微生物发酵还改善了大豆中的营养成分, 形成了多种功能性物质, 因此豆豉在降血压、降血糖、抗氧化以及溶解血栓等方面具有重要

收稿日期: 2014-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260397); 云南省科技厅项目 (KKS201226110)

作者简介: 李晓然 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物分子生态学; 刘晓峰 (1989-), 并列第一作者

通讯作者: 柳陈坚 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物学

的保健功能。根据豆豉制曲的主要微生物种类的差异, 豆豉大体可分为五大类, 分别是: 曲霉型豆豉、毛霉型豆豉、根霉型豆豉、细菌型豆豉及脉孢菌型豆豉。云南的豆豉在基于微生物培养法研究中主要以细菌型豆豉为主, 细菌型豆豉不仅可以开胃增食, 还可以提高大豆营养素的消化吸收。

云南省西双版纳州位于北回归线以南, 属热带季雨林气候, 日照充足, 雨量充沛, 平均气温在 21 °C 左右。中国云南省传统发酵豆豉的生产主要以家庭小作坊式为主, 发酵过程大都是在开放的环境下进行的, 参与自然发酵的微生物种类繁多, 这些天然微生物在

适宜的养分、水分、温度、湿度等条件下共栖生长形成的。不同的地域环境,由于其气候的差异,豆豉中发酵微生物的组成也各有差异。由于豆豉是自然开放式制曲,不仅发酵周期长,也存在一定的食品安全隐患,因此,研究豆豉中的微生物群落结构是非常有必要的。最初研究豆豉中微生物的方法多采用的是微生物培养法<sup>[1]</sup>,通过这种方法也获得了一些有用的信息,但是自然界绝大部分的微生物不能在实验室通过常规的方法获得,极大的限制了实验的广泛性。基于PCR的分子生物学方法规避了微生物培养法的局限性,极大地促进了环境中微生物群落多样性的研究。2008年,Hamady等<sup>[2]</sup>展示了一种添加序列标签(barcode)的焦磷酸测序方法,通过这一方法能够得到更多的序列,更加全面而准确地展示样品的微生物群落结构。

云南的豆豉多以细菌型豆豉为主,我们分析了云南省不同地区的几十个豆豉样品,在提取样品中微生物DNA时,同时加了溶菌酶和溶壁酶,发现其他样品只含有细菌,并且coverage均较高,只有西双版纳州景洪市和勐海县的两个样品中同时含有细菌和真菌。为了更加全面的研究豆豉中的微生物群落结构,确定真菌在豆豉发酵中是否发挥作用,本研究利用焦磷酸高通量测序的方法来分析西双版纳州景洪市和勐海县两个豆豉样品微生物群落多样性,为进一步研究豆豉中微生物或者功能性成分或豆豉的食品安全问题提供有用信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

试验用的两个豆豉样品购于云南省西双版纳州景洪市和勐海县的农贸市场,由当地百姓自制,分别命名为JH和MH。购买后置于便携式冰箱,并运送到实验室,-80℃保存。

### 1.2 主要仪器和试剂

#### 1.2.1 仪器与设备

ABI 7200PCR仪,美国ABI公司;罗氏GS-FLX测序仪,瑞士Roche公司;Nanodrop ND-1000分光光度计,美国Thermo公司;Sigma 3-18K离心机,美国Sigma公司。

#### 1.2.2 主要试剂

DNA提取裂解缓冲液:0.1 mol/L Tris/HCl, 0.1 mol/L EDTA, 0.75 mol/L 蔗糖;TE缓冲液:0.01 mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.001 mol/L EDTA, pH 8.0; Premix Ex Taq™, 大连TaKaRa公司; QIAquick Gel Extraction

Kit, 德国Qiagen公司。

### 1.3 方法与步骤

#### 1.3.1 DNA提取

DNA提取方法是在参考Schmidt等<sup>[3]</sup>的方法的基础上做了适当的修改。取约0.2 g豆豉置于无菌的2.0 mL离心管中,加入450 μL裂解缓冲液以及10 μL 50 mg/mL溶菌酶(lysozyme)和10 μL 20 mg/mL溶壁酶(lyticase),充分混合均匀后,37℃水浴30 min。然后上述混合液中加入25 μL 20% SDS和5 μL 20 mg/mL蛋白酶K,充分混合均匀后,55℃水浴2 h以上。再加入80 μL 5 mol/L NaCl和60 μL 10% CTAB/NaCl,小心混匀后,65℃水浴20 min。继续加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,体积比),颠倒混匀后于12000 r/min离心10 min,将上层水相转移至新的1.5 mL离心管中,然后加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1,体积比),颠倒混匀后于12000 r/min离心10 min。将上层水相转移至新的1.5 mL离心管中,再加入0.6体积的异丙醇,-20℃沉淀过夜后于12000 r/min离心15 min,倒掉液体,加入500 μL预冷的70%乙醇洗涤沉淀,12000 r/min离心15 min,将离心管打开盖子,尽量倒掉液体后,放置于60℃烘干箱干燥30 min,每10 min轻弹管壁,促进液体挥发,待液体全部挥发后取出,加入50 μL TE缓冲液溶解DNA。提取好的DNA存放于-20℃。

#### 1.3.2 细菌16S rDNA和真菌ITS区域扩增及焦磷酸测序

使用16S rDNA通用引物为338F(5'-ACHYCTACGGGAGGCHGC-3')和907R(5'-CCGTCAATTCMTTGTGATTT-3')对细菌DNA的V3-V5高变区进行扩增,扩增真菌ITS区域的引物为NSII(5'-GATTGAATGGCTTAGTGAGG-3')和58A2r(5'-CTGCGTTCCTCATCGAT-3')。为了减少PCR过程中产生过多的非特异性扩增的异源双链DNA,将PCR产物稀释10倍作为模板,然后按照原来的条件再做5个循环<sup>[4]</sup>。PCR扩增采用Premix Ex Taq™(TaKaRa,大连),具体体系及程序如下。在50 μL的反应体系中,加入18 μL ddH<sub>2</sub>O、2 μL Forward引物(5 μM)、2 μL Reverse引物(5 μM)、25 μL Premix Ex Taq™、3 μL模板(15 ng)。按照95℃预变性5 min;94℃变性1 min,56℃复性1 min,72℃延伸1 min,共30个循环;最后72℃延伸10 min的PCR扩增程序扩增,4℃保存PCR产物。将PCR产物在1% (m/v)的琼脂糖凝胶中电泳,电泳后将凝胶浸泡于含有20 μg/mL EB的TAE缓冲液中10 min后在紫外灯(216

nm) 照射下呈现橙色条带, 目标条带割下后使用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, 德国) 对 PCR 产物进行回收。使用 Nanodrop ND-1000 分光光度计 (Thermo, 美国) 对完成纯化的 PCR 扩增产物定量。使用 GS-FLX (Roche, 瑞士) 测序系统对 DNA 进行测序。

### 1.3.3 测序结果分类鉴定

焦磷酸测序后所得序列根据 barcode 将序列分配到其所属样品中, 并去除 barcode 和引物序列, 得到有效的序列文件。然后对得到的质量文件做进一步处理, 去掉测序质量不好的序列, 并对序列长度进行筛选, 只保留长度大于 400 bp (细菌) 或者 300 bp (真菌) 的序列。对于细菌序列使用 mothur v1.25.1<sup>[5]</sup> 的 classify.seqs 命令, 采用 Silva 的核糖体小亚基 (SSU) rRNA 序列数据库 V102 的分类信息, 得到序列的分类信息。对于真菌序列则从每个 OTU 中选择代表性序列, 与 NCBI 的 GenBank 进行 Blast 比对, 确定真菌序列的分类信息。

### 1.3.4 多样性指数和系统发育分析

关于多样性指数的分析, 使用 mothur v1.25.1<sup>[5]</sup> 来完成, 以 0.03 为 cutoff 值划分可操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU), 计算样品的 ACE

和 Chao1 值, 并根据所得到 rarefaction 文件绘制 rarefaction 曲线。细菌的 16S rDNA 和真菌 ITS 区域的在样品中的覆盖度, 根据序列中的 singleton (只有一条序列的 OTU) 用公式  $C = [1 - (n_1/N)] \times 100$  来计算。其中,  $n_1$  代表 singleton 的数量,  $N$  则表示总序列数。使用 mothur v1.25.1<sup>[5]</sup> 的 anosim 命令分析了两个豆豉样品的相似性。确定用于构建系统发育树的 OTU 数目, 然后从每个 OTU 选取一条代表性序列, 将其与 NCBI 的 GenBank 中的序列进行 Blast 比对, 然后将结果中具有确定分类信息的序列用 ClustalX 1.83 进行比对, 再将比对的结果用 Mega v4.0 中的 Neighbour-joining 方法构建系统发育树。

### 1.3.5 核苷酸序列的访问号 (Accession numbers)

豆豉样品的细菌 16S rDNA 序列和真菌 ITS 序列已提交到序列片段归档 (Sequence read archive, SRA) 中, 访问号为 SRP042005。

## 2 结果与讨论

### 2.1 多样性指数和 OTU 丰度

表 1 豆豉中细菌和真菌的丰度 (Cutoff 0.03)

Table 1 Bacterial and fungal richness in the *douchi* with cutoff of 0.03

Target	Samples	NO. of reads	Average length/bp	NO. OTUs	NO. Singletons	Coverage /%	Chao1	ACE
16S rDNA	JH	621	563	23	54	91.3	199	270
	MH	427	570	17	29	93.21	119	149
ITS	JH	7134	359	16	24	99.66	83	238
	MH	5236	362	24	23	99.56	92	103

通过添加的 barcode 将序列分到两个样品中, 对焦磷酸测序所得序列进行预处理, 去除低质量和污染的序列, JH 和 MH 两个样品最终分别得到 621 和 427 条细菌序列及 7134 和 5236 条真菌序列 (表 1)。样品中细菌和真菌序列的 OTU 数量分别是根据 3% 的序列差异和分类信息的不同来确定的。图 1 展示的分别是细菌和真菌有效序列 (包括引物) 长度分布图。从图中可以看出, 细菌序列主要分布在 601~650 bp 之间, 而真菌序列相对较短, 近 90% 的序列均分布在 351~400 bp 之间。两个样品的细菌和真菌多样性都比较高。由豆豉中细菌和真菌的 rarefaction 曲线 (图 2) 可看出, 曲线并未达到平台期, 呈现一直上升的趋势, 说明测序所得序列还不能完全展示样品的微生物群落多样性。虽然如此, 但是两个样品所得到的序列的覆

盖度均高于 90%, 说明基于本实验的测序深度, 尽管会忽略样品中某些含量较少的微生物群落 (rare biosphere), 但在豆豉发酵过程中占主要优势的微生物均已得到分析。样品 JH 中, 细菌群落的多样性高于 MH, 而其真菌群落多样性则低于 MH。两个豆豉样品的细菌群落相似性分析 (anosim) 的结果是: R 值 0.20, P 值 < 0.001; 真菌群落的相似性分析结果为: R 值 0.12, P 值 < 0.001, 表明两个样品的细菌和真菌群落结构具有显著性差异。通过多样性指数和 rarefaction 曲线的结果可以看出, 两个样品都具有较高的微生物群落多样性。真菌群落的覆盖度都非常高, 达到了 99% 以上, 两个样品中占主导地位的是乳酸菌和酵母菌, 并未检测到任何霉菌, 说明在本研究中的两个豆豉中可能并没有霉菌参与其发酵过程。

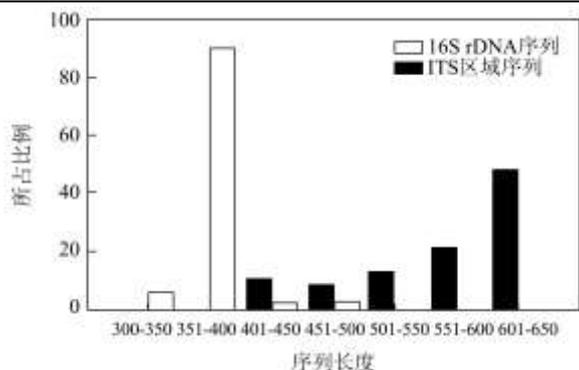


图1 豆豉样品细菌和真菌有效序列长度分布图

Fig.1 Distribution of bacterial and fungal sequence lengths in the douchi samples

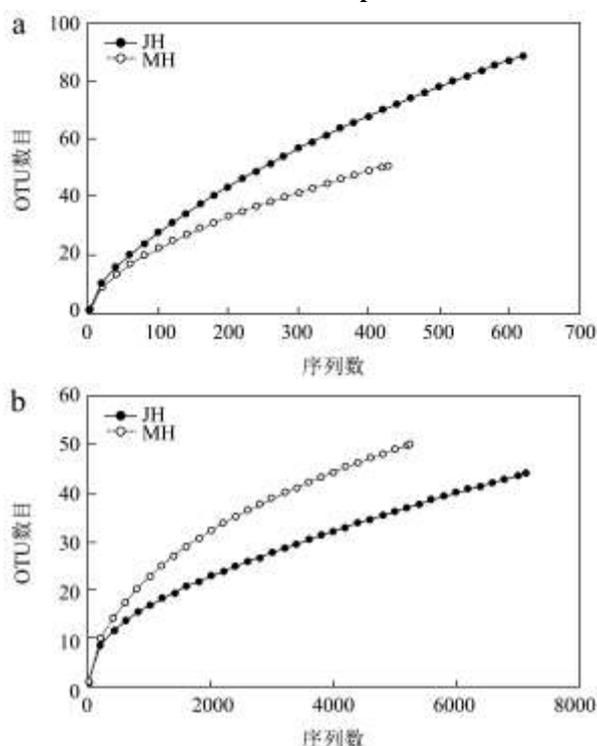


图2 根据 rarefaction 方法估计豆豉样品细菌和真菌的多样性

Fig.2 Estimated OTU numbers for bacteria and fungi in the douchi samples

注：a：细菌；b：真菌。

## 2.2 细菌群落多样性

由于豆豉的发酵过程大都是在开放的环境中进行的，传统豆豉的生产有着很大的地域性差异，因此参与其发酵的微生物组成也各有差异。将两个豆豉样品筛选后所得到的序列与 Silva 的 SSUrRNA 序列数据库进行比对，经分析，两个样品的细菌群落结构的组成存在一定的差异。图 3 展示的是两个豆豉中细菌在不同分类水平（科和属）的分布情况。样品 JH 中，共检测到 3 个细菌门，优势菌门是厚壁菌门（Firmicutes），属于厚壁菌门的序列数占总序列数的

96.14%。在检测到的 15 个细菌科中，优势菌科是明串珠菌科（*Leuconostocaceae*），占总序列数的 59.58%，其次是芽孢杆菌科（*Bacillaceae*）（15.30%）和葡萄球菌科（*Staphylococcaceae*）（14.49%）。其丰度最高的菌属是明串珠菌属（*Leuconostoc*）（33.98%），它与片球菌属（*Pediococcus*）、乳杆菌属一样，参与食品的发酵过程，能够将糖类转化成乳酸，赋予食品一定的酸味，延长食品的保质期。另外有 16.40%、15.30% 和 14.17% 的序列分别属于 *Fructobacillus*、芽孢杆菌属（*Bacillus*）和葡萄球菌属（*Staphylococcus*）。而在样品 MH 中，检测到 5 个细菌门，比样品 JH 中增加了拟杆菌门（*Bacteroidetes*）和蓝藻细菌（*Cyanobacteria*），但是其优势菌门也是厚壁菌门，其序列比例高达 96.25%。在科和属的水平上，两个样品中的细菌类型具有很明显的差异性。在 MH 中共检测到 17 个细菌科，其中优势菌科是葡萄球菌科（31.62%），其次是肠球菌科（*Enterococcaceae*）（25.76%）和明串珠菌科（24.12%）。在属这一分类水平上，MH 中丰度最高的是葡萄球菌属，占总序列的 31.62%，25.53% 和 22.72% 的序列分别属于四联球菌属（*Tetragenococcus*）和魏斯氏菌属（*Weissella*），另外，有 6.09% 的序列属于乳杆菌属（*Lactobacillus*）。

通过比较上述结果，可以看出，两个样品的细菌群落结构具有显著的差异性。样品 JH 中丰度最高的明串珠菌属在样品 MH 中的比例还不足 1%。而且在 JH 中丰度比较高的几个细菌属，在 MH 中所占比例均极低；同样的，在 MH 中丰度较高的细菌属，只有极少量的存在于样品 JH 中。这些差异性可能主要是由于制作豆豉的地区不同而造成的。Chen 等<sup>[6]</sup>利用细胞计数和变性梯度凝胶电泳（Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE）的方法研究了豆豉表面和内部的微生物群落结构，发现豆豉表面只有乳酸乳球菌乳酸亚种（*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*）和淀粉芽孢杆菌（*B. thermoamylovorans*），而豆豉内部的优势菌群则是乳酸乳球菌乳酸亚种、*S. lentus* 和两株不可培养的细菌。Chen 等的研究结果与本实验的结果具有明显差异，可能是因为 Chen 等的所用的样品是由工厂加工制造的，而本实验的所用样品则是由西双版纳当地居民通过自然发酵制成的，未人为添加任何菌种，其微生物群落结构主要与当地自然环境和制作工具有关。Liu 等<sup>[7]</sup>利用微生物培养法和分子生物学方法相结合的方式对云南省 6 个市和县的豆豉所含细菌进行了分离鉴定，共鉴定出 6 个属和 14 个种的细菌，分别是：*Lactobacillus* (4 spp.)，*Weissella* (3 spp.)，

*Pediococcus* (2 spp.), *Staphylococcus* (2 spp.), *Enterococcus* (1 sp.)和 *Bacillus* (2 spp.)，本实验所得到的细菌类型均包含上述 6 个属的细菌。因此，与上述两个实验的结果相比，利用高通量测序研究豆豉的微生物群落多样性所得到的细菌类型远远多于基于微生物培养法和传统分子生物学方法得到的细菌类型。Nam 等<sup>[8]</sup>利用焦磷酸测序的方法研究了韩国大豆酱的细菌群落结构，发现韩国中部地区样品中丰度最高的是芽孢杆菌（58.3~91.6%），而在其他地区乳酸菌（39.8%~77.7%）则是优势菌群；通过实验还发现与利用传统工艺制作的大豆酱相比，商业化的大豆酱中所含的细菌类型较为单一，主要是四联球菌属和葡萄球菌属。

分别选取两个样品中序列数大于 5% 的 OTU 来构建细菌的系统发育树，如图 4 所示。在样品 JH 中，丰度最高的 OTU 是 JH\_16S\_4 (30.76%)，它与肠膜明串珠菌 (*L. mesenteroides* strain CM135) (EU074836) 呈现出较高的相似度，肠膜明串珠菌无致病性，在低温及盐分适当的情况下与发酵过程具有密切联系，常常用于食品和饮料工业上，在新鲜蔬菜和水果中也检测到这种菌的存在。丰度第二高的是 JH\_16S\_3 (11.59%)，其 16S rDNA 序列与 *L. fallax* strain BFE 6696 (AY929288) 和 *L. fallax* strain 1L48P14 (EU439432) 都具有极高的相似度，*L. fallax* 分离自一种德国泡菜 (sauerkraut) 中<sup>[9]</sup>。OTU JH\_16S\_1 中有 68 条 (10.95%) 序列，它与枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* strain HKG199) (KF947108) 和甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methylotrophicus* strain SCDB) (KJ469801) 都具有 98% 的相似度。枯草芽孢杆菌广泛存在于自然界的土壤和空气中，在人体肠道中也多次被检出，属于正常肠道菌群。枯草芽孢杆菌在食品发酵中也发挥着重要的作用，日本纳豆就是通过枯草芽孢杆菌发酵而成。高健等<sup>[10]</sup>研究发现一株分离自废弃矿山周边土壤的甲基营养型芽孢杆菌能够产纤维素酶，它在豆豉发酵过程中可能具有降解大豆纤维素的作用。因此，无论是枯草芽孢杆菌还是甲基营养型芽孢杆菌在发酵过程中都具有举足轻重的地位。景洪样品中丰度相对较低的 OTU JH\_16S\_5 (8.37%)，与松鼠葡萄球菌 (*S. sciuri* strain Zagazig 9) (KJ000305) 相似度比较高。所含序列数较少的 OTU JH\_16S\_2，有 40 条 (6.44%) 序列，它与融合魏斯氏菌 (*W. confusa* strain 3133O2) (KF598945) 和 *W. cibaria* strain SD2S4L4 (KJ095644) 都显示出较高的相似度，样品 MH 中的 MH\_16S\_4 (11.71%) 和 MH\_16S\_5 (7.26%) 两个 OTU 的 16S

rDNA 序列也与上述两株菌呈现出较高的相似度。有研究表明，从发酵食品中分离到的这类菌都具有产细菌素 (bacteriocin) 的能力<sup>[11]</sup>，细菌素是由细菌产生的具有杀菌或抑菌作用的物质，有生物防腐功能。在样品 MH 中，丰度最高的 OTU 是 MH\_16S\_2 (25.76%)，它与鸡葡萄球菌 (*S. gallinarum* strain TR6T2) (KF737153) 相似度较高，鸡葡萄球菌最初是从鸡中分离出来的，健康人的唾液中也有这种菌的存在，能够产生抗生素 gallidermin<sup>[12]</sup>，有利于延长豆豉的储藏时间以及其良好的品质的形成。其次是 OTU MH\_16S\_1，有 96 条 (22.48%) 序列，与嗜盐四联球菌 (*T. halophilus* strain IAM 1673) (EU689054) 呈现出较高的相似度，嗜盐四联球菌作为一种能够适应高盐等极端环境的乳酸菌，通常存在于豆瓣酱<sup>[13]</sup>等发酵食品中，表明传统豆豉中含盐量可能比较高，这一点并不利于人体健康。有 24 条序列属于 OTU MH\_16S\_3，占总序列数的 5.62%，它与 *Lb. acidipiscis* strain Ni1465 (AB598991) 具有较高相似度，*Lb. acidipiscis* 是一种同型发酵的乳杆菌，分离自发酵鱼<sup>[14]</sup>，能够将糖类转化成乳酸，并在 PH 较低的环境中稳定生长。乳酸具有较高的抑菌活性，能够抑制其他微生物的生长繁殖。

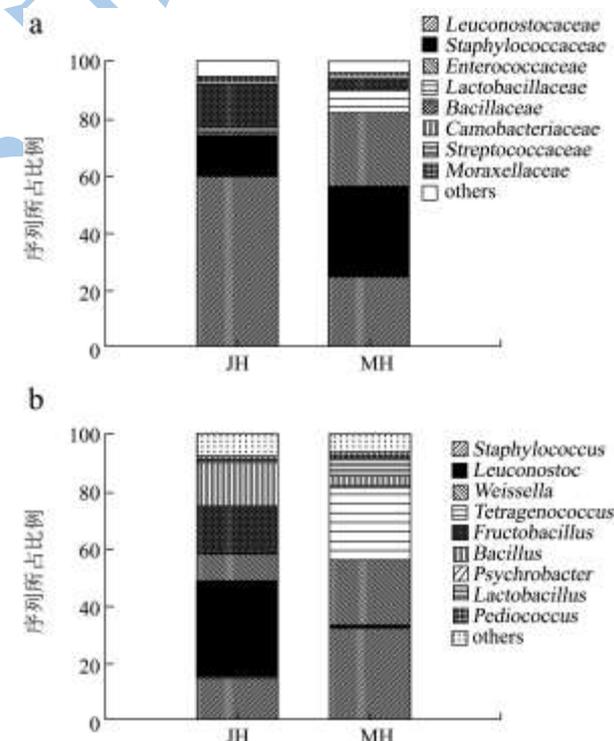


图 3 两个豆豉中细菌在不同分类水平的分布

Fig.3 Distribution of major families and genera in the douchi samples

注：a：科；b：属。

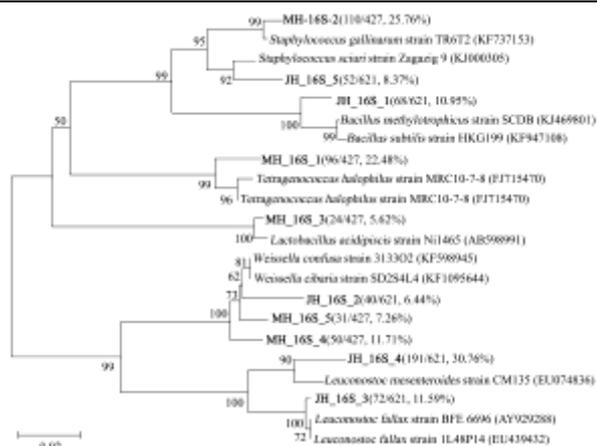


图4 细菌的系统发育树

Fig.4 Bacterial phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences and their phylogenetic relationships

### 2.3 真菌群落多样性

由于真菌 ITS 区域序列和长度差异较大，很难做序列比对，因此无法构建系统进化树。以 0.03 为 cutoff，样品 JH 得到 16 个 OTU，样品 MH 得到 24 个 OTU。选择序列数大于 1% 的 OTU，各选取一条代表性序列，在 NCBI 的 GenBank 进行 Blast 比对，以此确定每个 OTU 的分类信息。在 JH 和 MH 这两个样品中，真菌群落显示较高的一致性，丰度最高的 OTU 均与 *Candida etchellsii* 显示了较高的相似性（表 2）。两个样品中，丰度第二高的 OTU 中的序列都属于皱状假丝酵母（*C. versatilis*）。*C. etchellsii* 和皱状假丝酵母都是耐盐菌，分离自大豆酱等高盐环境中<sup>[15]</sup>，对于食品发酵中的香气物质产生具有重要作用<sup>[16]</sup>。由此我们推测，在这西双版纳的豆豉中只有能够适应高盐环境的真菌才能大量繁殖。除此之外，鲁氏酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）在两个样品中也均被检测到。鲁氏酵母在乳酸菌发酵之后出现并产生乙醇，而乙醇发酵之后，皱状假丝酵母和 *C. etchellsii* 能够产生芳香族化合物，有助于豆豉良好风味的形成<sup>[17]</sup>。在两个样品中，约有 <5% 的序列在分类上存在一定差异。样品 JH 中，总序列的 2.61% 属于 *C. apicola*，但在样品 MH 中并未检测到。属于粉状毕赤酵母（*Pichia farinosa*）和汉逊德巴利酵母（*Debaryomyces hansenii*）的序列只在样品 MH 中被检测到，分别占总序列的 2.60% 和 2.48%。Kim 等<sup>[18]</sup>利用 DGGE 的方法不仅研究了日本和中国发酵大豆酱的细菌群落结构，同时也比较了两种大豆酱真菌群落的不同，发现不论在中国的样品还是日本的样品中，大部分都能检测到米曲霉（*Aspergillus oryzae*）和鲁氏酵母的存在。通过本实验的结果可以看出，两个样品中均未检测到米曲霉等任

何霉菌，但是鲁氏酵母在两个样品中均被检测到，只是含量不多，并不是优势真菌类型。在景洪和勐海的两个豆豉样品中主要的真菌类型是皱状假丝酵母和 *C. etchellsii*，这主要是因为景洪和勐海的豆豉含盐量较高，而皱状假丝酵母和 *C. etchellsii* 都是耐盐菌，能够稳定生存并繁殖。除此之外，皱状假丝酵母、*C. etchellsii* 和鲁氏酵母都对豆豉良好风味的形成具有重要作用。

表 2 真菌 OTU 及其分类信息

Table 2 Fungal OTUs and their closest taxonomic annotations

OTU	Sequence percent /%	Closest taxonomic annotations	Related GenBank sequence	Identity /%
JH_ITS_1	30.61	<i>Candida etchellsii</i>	AB196222	97
JH_ITS_2	30.61	<i>Candida etchellsii</i>	AB196222	97
JH_ITS_3	16.82	<i>Candida versatilis</i>	AB196242	97
JH_ITS_4	13.74	<i>Candida etchellsii</i>	AB196222	97
JH_ITS_5	2.68	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	AM943655	98
JH_ITS_6	2.61	<i>Candida apicola</i>	EU926485	99
MH_ITS_1	41.71	<i>Candida etchellsii</i>	AB196222	97
MH_ITS_2	41.71	<i>Candida etchellsii</i>	AB196222	97
MH_ITS_3	5.84	<i>Candida versatilis</i>	AB196242	99
MH_ITS_4	2.60	<i>Pichia farinosa</i>	GU256765	97
MH_ITS_5	2.48	<i>Debaryomyces hansenii</i>	JQ912667	98
MH_ITS_6	1.18	<i>Candida etchellsii</i>	AB196222	97
MH_ITS_7	1.11	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	AM943655	98
MH_ITS_8	1.07	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	AM943655	98

### 3 结论

景洪市和勐海县虽然都位于西双版纳州，但是由于豆豉的生产大都是家庭作坊式生产，属自然发酵，受气候环境等外界因素的影响比较大，所以采自这两个地区的豆豉的微生物群落结构具有一定的差异性。实验结果表明，在本研究的豆豉中，耐盐菌占有极大的比例，这可能与西双版纳地处热带有关，当地居民只有通过添加食盐来延长豆豉的保存时间。豆豉的高盐特点应引起我们足够的重视，摄入食盐量过多是引发高血压的重要因素。日本纳豆和印度天培均为无盐发酵，这也是纳豆和天培能够成为一种保健食品，而豆豉只能作为调味品的重要原因之一。参与豆豉发酵的部分乳酸菌能够产生细菌素和有机酸，这两种物质

是天然的防腐剂,因此可以通过人为添加乳酸菌的方法来减少食盐的添加量。在两个样品中都检测到了葡萄球菌属的存在,虽然部分葡萄球菌属的细菌能够参与豆豉的发酵过程,但是并不能确定它们是否存在潜在致病性。食品的质量安全问题一直是我们的重点,所以研究发酵食品的微生物群落结构能够使我们对其中的各种微生物有比较全面的了解,是一项非常有必要的工作。

### 参考文献

- [1] 孙森,宋俊梅,曲静然.豆豉后发酵过程中微生物菌相的变化[J].中国食品添加剂,2008,2:139-143  
SUN Sen, SONG Jun-mei, QU Jing-ran. The change of microorganisms in the later fermentation of Dou-chi [J]. China Food Additives, 2008, 2: 139-143
- [2] Hamady M, Walker J, Harris J, et al. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex [J]. Nature Methods, 2008, 5(3): 235-237
- [3] Schmidt T, DeLong E, Pace N. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173: 4371-4378
- [4] Thompson J R, Marcelino L A, Polz M F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR' [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(9): 2083-2088
- [5] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541
- [6] Chen T, Wang M, Li S, et al. Molecular identification of microbial community in surface and undersurface douchi during postfermentation [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(4): M653-M658
- [7] Liu Cj, Gong Fm, Li Xr, et al. Natural populations of lactic acid bacteria in douchi from Yunnan Province, China [J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2012, 13(4): 298-306
- [8] Nam Y D, Lee S Y, and Lim S I. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(1-2): 36-42
- [9] Schillinger U, Holzäpfel W, Kandler O. Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative *Lactobacilli* and description of *Leuconostoc amelii* sp. nov. [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1989, 12(1): 48-55
- [10] 高健,肖丹青,刘喜平,等.一株产纤维素酶的甲醇利用细菌的鉴定及其纤维素降解条件优化[J].工业微生物,2012, 42(2):51-57  
GAO Jian, XIAO Dan-qing, LIU Xi-ping, et al. Identification and optimal degradation conditions for cellulase-degrading enzyme of a methanol-utilizing and cellulase-producing bacterium [J]. Industrial Microbiology, 2012, 42(2): 51-57
- [11] Sriannual S, Yanagida F, Lin L, et al. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaasom, a fermented fish product from Thailand [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2247-2250
- [12] Kempf M, Theobald U, Fiedler HP. Economic improvement of the fermentative production of gallidermin by *Staphylococcus gallinarum* [J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(8): 663-667
- [13] Tanasupawat S, Thongsanit J, Okada S, et al. *Lactic acid bacteria* isolated from soy sauce mash in Thailand [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2002, 48(4): 201-209
- [14] Tanasupawat S, Shida O, Okada S, et al. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(4): 1479-1485
- [15] Ozaki S, Fukuda S, Fujita T, et al. RAPD analysis of salt-tolerant yeasts from contaminated seasoned pickled plums and their growth inhibition using food additives [J]. Biocontrol Science, 2008, 13(4): 125-130
- [16] Suezawa Y, Kimura I, Inoue M, et al. Identification and typing of miso and soy sauce fermentation yeasts, *Candida etchellsii* and *C. versatilis*, based on sequence analyses of the D1D2 domain of the 26S ribosomal RNA gene, and the region of internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2006, 70(2): 348-354
- [17] Yokotsuka T, Sasaki M. Fermented protein foods in the Orient: shoyu and miso in Japan [J]. Microbiology of Fermented Foods, 1997: 351-415
- [18] Kim TW, Lee JH, Park MH, et al. Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese- and Chinese-fermented soybean pastes using nested PCR-DGGE [J]. Current Microbiology, 2010, 60(5): 315-320

现代食品科技