

酱块发酵过程中真菌和细菌群落的演替

安飞宇, 王俊瑞, 解梦汐, 姜静, 邱博书, 唐筱扬, 乌日娜

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要: 豆酱是中国传统的发酵豆制品。酱块制作是豆酱发酵的前期阶段, 为后期发酵提供丰富的微生物和酶制剂, 对豆酱的品质至关重要。为了探究自然发酵豆酱酱块发酵过程中微生物多样性, 采用第二代测序 Illumina MiSeq 方法对采集自开原的 4 个不同发酵阶段的酱块样品进行微生物多样性分析。结果表明: 在属级水平上, 共鉴定出 21 个真菌分类群, 其中霉菌 (*Mucor*)、青霉菌 (*Penicillium*)、德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*) 和根霉菌 (*Rhizopus*) 为优势类群; 细菌共鉴定出 40 个细菌分类群, 其中乳杆菌 (*Lactobacillus*)、魏斯氏菌 (*Weissella*) 和肠球菌 (*Enterococcus*) 为优势类群。豆酱酱块中多样性的真菌和丰富的细菌在发酵过程中可能共同发挥特定的作用。本研究阐明了传统发酵豆酱酱块的微生物群落特征, 揭示了传统酱块发酵过程中真菌和细菌的群落演替, 为豆酱发酵过程控制奠定了理论基础。

关键词: 酱块; Illumina MiSeq 测序; 微生物多样性; 细菌; 真菌

文章编号: 1673-9078(2018)07-61-67

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.010

Succession of Fungal and Bacterial Communities during Meju Fermentation

AN Fei-yu, WU Jun-rui, XIE Meng-xi, JIANG Jing, QIU Bo-shu, TANG Xiao-yang, WU Ri-na

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Soybean paste is a traditional fermented bean product in China. The production of meju is the early stage of fermented soybean paste, which provides abundant microorganisms and enzyme preparations for later fermentation, and is crucial to the quality of bean paste. In order to explore the microbial diversity during the fermentation process of natural fermented meju, Illumina MiSeq sequencing technology was used to analyze microbial diversity of four different fermentation stages of meju samples, which collected from Kaiyuan. The results showed that 21 fungal taxa were identified in the genus level, of which *Mucor*, *Penicillium*, *Debaryomyces* and *Rhizopus* were the dominant groups. A total of 40 bacterial taxa were identified in bacterial, of which *Lactobacillus*, *Weissella* and *Enterococcus* were the dominant groups. The diverse fungi and rich bacteria in meju may play a specific role in the fermentation process. This study clarified the microbial community characteristics of traditional fermented meju, revealed the community succession of fungi and bacteria in the fermentation process of traditional meju, and laid a theoretical foundation for controlling the fermentation process of soybean paste.

Key words: meju; Illumina MiSeq Sequencing; microbial diversity

豆酱又名黄豆酱、黄酱或大豆酱, 是以大豆为主要原料制得而成, 经自然发酵而成的半流动状态的发酵食品, 在我国北方地区称为大酱^[1]。传统发酵豆酱作为日常的调味品, 因其独特的风味在中国、日本^[2]、韩国^[3]都深受人们的喜爱。豆酱中富含大豆蛋白质、蛋白黑素、肽类、异黄酮和维生素等^[4]。最近, 豆酱

收稿日期: 2018-02-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31471713、31470538); 辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目 (LR2015059、LJQ2015103); 辽宁省百千万人才工程资助项目; 沈阳市中青年科技创新人才支持计划 (RC170212)

作者简介: 安飞宇 (1994-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品微生物研究

通讯作者: 乌日娜 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

引起人们广泛的关注, 不仅是因为其丰富的营养价值, 还因为豆酱具有抗氧化性^[5]、抑制血清胆固醇上升、降血压^[6]、抗诱变性^[7]和抗癌^[8]等保健功能。

传统的豆酱制作工艺分为两个阶段, 分别为制块阶段及制酱阶段。制块阶段较为重要, 酱块可以给豆酱提供丰富的细菌及真菌, 进而使其产生独特的风味。近年来, 工厂通过纯种发酵的方法生产豆酱, 缩短了生产周期并保持产品稳定性。然而工业化豆酱菌种单一, 使豆酱的酱香、风味和适口性远不及传统发酵豆酱^[9]。因此, 研究传统发酵酱块中的微生物多样性至关重要。2010 年 Lee 等应用 DGGE 技术研究了韩国酱块微生物群落, 发现了芽孢杆菌 (*Bacillus*) 和耐久肠球菌 (*Enterococcus durans*) 为主要细菌; 犁头霉

(*Absidia*)、曲霉 (*Aspergillus*) 和假丝酵母 (*Candida*) 为主要真菌^[10]。2014 年孙雯等应用纯培养的方法鉴定出豆酱中的霉菌有米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、雅致放射毛霉(*Actinomucor elegans*)、犁头霉属(*Absidia*)、大毛霉组(*Mucedo*)及曲霉属(*Aspergillus*)^[11]。目前国内外对豆酱的微生物多样性、加工工艺等做了大量研究,但对于东北传统自然发酵豆酱酱块的研究涉及甚少且主要集中于对其真菌的研究^[3,10]。

近年来测序技术不断的进步,越来越多的研究者利用新一代测序技术对发酵食品微生物进行分析。2014 年焦晶凯等采用第二代测序 Illumina MiSeq 方法,全面的展现了内蒙古四个不同地区的自然成熟干酪中的细菌微生物多样性^[12]。2016 年陈泽斌等首次应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析玉米内生细菌多样性,全面而准确地分析了玉米内生细菌的种类组成^[13]。本试验采用高通量测序技术分析传统酱块发酵过程中真菌和细菌的群落演替,揭示传统发酵豆酱微生物群落特征,为提高豆酱品质奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品的制作工艺及采集

样品采自开原传统自然发酵豆酱酱块。春季制酱块,采用传统工艺室温发酵,具体生产工艺为:取新鲜的大豆,去掉杂质后浸泡 12 h,蒸煮 3~5 h,直至大豆变软,搅碎后制成长方形酱块,自然发酵 2 个月后制成成熟酱块。从制成酱块起,每隔 20 d 采集一次样品,样品编号分别为 KY 0 d、KY 20 d、KY 40 d、KY 60 d。取样后置于冰盒中,并迅速转移至-80 °C 冰箱保藏。

1.2 主要试剂与仪器

基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型),PCR 引物由金唯智公司设计, Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA), Qubit2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA), MetaVx™文库构建试剂盒(GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ, USA), Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA), Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)等。

1.3 样品总 DNA 的提取

按照参考文献^[14]的方法提取酱块的总 DNA,使用 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA)检测 DNA 样品的浓度。琼脂凝胶电泳检测 DNA 的完整性。所提取的 DNA 于-20 °C 保存备用。

1.4 PCR 扩增及测序

以 50 ng DNA 为模板,用上游引物 (CCTACGRRBGCASCAGKVRVGAAT) 和下游引物 (GGACTACNVGGGTWTCTAATCC) 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3 和 V4 区,同时使用上游引物 (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) 和下游引物 (CTTGTGCGGKCCCCGYCAATTC) 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V4 和 V5 区。并在其 PCR 产物的末端加上含有 Index 的接头。

以 50 ng DNA 为模板。使用上游引物 (ACCTGCGGARGGAT) 和下游引物 (GAGATCCRTTG YTRAA) 扩增真菌的 ITS1 区,用上游引物 (GTGAATCATCGARTC) 和下游引物 (TCCTCCGCTTATTGAT) 扩增真菌的 ITS2 区。并在其 PCR 产物末端加上含有 Index 的接头。

采用 Agilent 2100 生物分析仪对文库质量进行检测,并且通过 Qubit 和实时定量 PCR 检测文库浓度。DNA 文库混合后进行双端测序(PE),通过 MiSeq 工具中的 MiSeq Control Software (MCS)进行图像分析和碱基识别。

1.5 数据分析

在 Illumina basespace 云端计算平台进行初始分类分析^[14],以 16S rDNA 序列 97% 相似度作为分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)的划分标准。使用 QIIME 平台计算 Chao1 多样性指数。对样品中物种多样性信息进行分析,使用 Ribosomal Database Project (RDP) classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并在各个水平统计每个样品的群落组成。

2 结果与讨论

2.1 样品复杂度分析

样品的复杂度即 Alpha 多样性反映微生物的多样性和群落的物种丰富度,包括可操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 数、Chao1 指数、Shannon 指数等(如表 1)。酱块发酵不同阶段共得到细菌的有效序列数为 365,765 条,平均为 91,441 条;酱块发酵不同阶段共得到真菌的有效序列数为 251,053 条,平均为 62,763 条。样品 OTU 及 Chao1 指数可反映微生物群落的物种丰富度,酱块发酵 0 d 时细菌和真菌的 OTUs 数分别为 38 和 40,此时 OTUs 数最高,说明此时物种最为丰富。酱块发酵 20 d 时细

菌 OTUs 数为 19, 40 d 时细菌 OTUs 数为 16, 60 d 时细菌 OTUs 数为 26, 可以看出细菌物种丰富度先降低再升高。酱块各个发酵阶段真菌的 OTUs 数总体变化不太明显。但除发酵 0 d 外, 真菌的 OTUs 数明显高于细菌。说明就各个发酵阶段而言, 真菌均为优势菌群。

群落生态学可通过样品的 Shannon 指数来反应微生物群落的多样性, 就酱块中的细菌而言, 发酵 0 d 时多样性最高, 后同其物种丰度的变化趋势一致, 呈先降低后升高趋势。就真菌而言, 其多样性呈先升高

后降低趋势。两种截然相反的变化趋势表明, 酱块发酵过程中的细菌和真菌可能存在一些相互作用。此前, 虽有学者研究表明发酵食品中细菌真菌存在相互作用^[15-17], 但所研究大多为单一菌种之间的互作, 且鲜有有关传统发酵豆酱中菌群间相互作用的报道。同时值得一提的是, 60 d 时细菌 OTUs 数仅为 26, 但其多样性指数却是所有样品中最高的, 说明发酵末期酱块中细菌分布的均匀度较高。此外, 所有样品 Coverage 值均接近于 1, 表明覆盖率较高, 测序结果代表了样本中微生物的真实情况。

表 1 Alpha 多样性

Table 1 Alpha diversity

样品名称	细菌					真菌				
	有效序列数	OTUs	Chao1	Shannon	Coverage/%	有效序列数	OTUs	Chao1	Shannon	Coverage/%
KY 0 d	156574	38	30.5	1.74	0.99	64427	40	34	2.56	0.99
KY 20 d	52183	19	19.5	1.73	0.99	55136	37	40	2.85	0.99
KY 40 d	96291	16	13	1.75	1.00	75455	39	46	2.29	0.99
KY 60 d	60717	26	23.5	2.51	0.99	56035	36	38	2.43	0.99

2.2 稀释性曲线

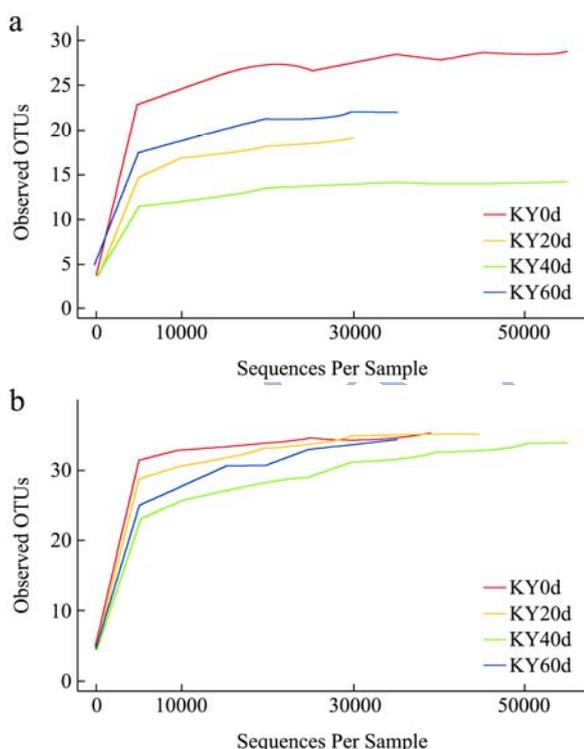


图 1 酱块发酵不同阶段的稀疏曲线

Fig.1 Rarefaction analysis of meju in different fermentation stages

采用对序列进行随机抽样的方法, 以抽到的序列数与其所能代表 OTUs 的数目构建稀释曲线。如图 1 所示, 图 a 为酱块细菌稀释性曲线, 图 b 为酱块真菌稀释性曲线。在 <5000 条序列时, 所测得的 OTUs 数

量随测序深度的增加而迅速增加; 在 >5000 条序列时, 所测得的 OTUs 数目增长速度减慢, 最终趋于平台期, 说明测序深度合理, 能够较为全面地反应酱块各发酵时期微生物多样性变化情况。

2.3 发酵不同阶段门级水平菌群结构分析

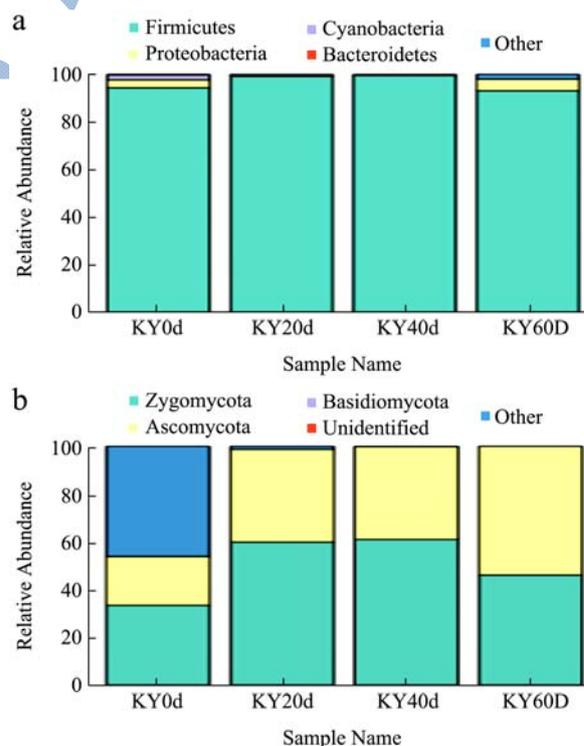


图 2 门级水平下酱块样品微生物群落变化

Fig.2 Microbial community changes in meju samples at the phylum level

对样品中物种多样性信息进行分析, 比对数据库可知, 酱块发酵不同阶段的细菌主要分四大门, 分别为厚壁菌门(*Firmicutes*)、蓝细菌门(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)。由图 2a 可知, 酱块发酵不同阶段的优势细菌均为厚壁菌门(*Firmicutes*) (占总数 93.02%~99.51%), 其次为变形菌门(*Proteobacteria*)。

不同发酵时期酱块的真菌组成主要分三大门, 分别为接合菌门(*Zygomycota*)、子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*), 且不同发酵阶段优势菌门不同。由图 2b 可知, 在酱块发酵 0 d 时优势真菌为其他(46.16%), 酱块发酵 20 d 和 40 d 时优势真菌为接合菌门(占总数 59.95%和 61.03%), 酱块发酵 60 d 时优势真菌为子囊菌门(占总数 53.85%)。由此可知, 相对于细菌而言, 酱块发酵期间真菌群落变化较大, 占主导作用。

2.4 酱块发酵不同阶段属级水平菌群结构分析

析

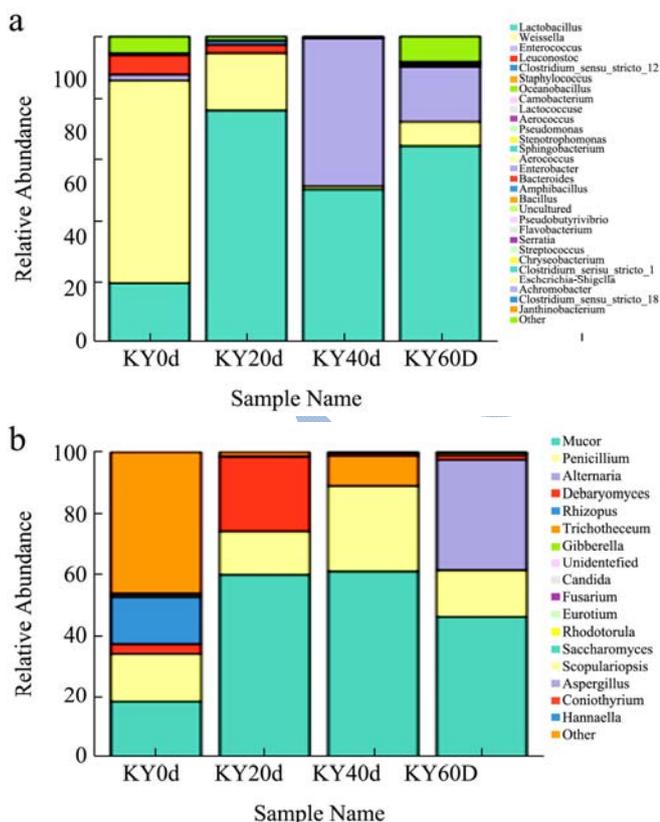


图 3 属级水平下酱块样品微生物群落变化

Fig.3 Microbial community changes in meju samples at the genus level

通过对酱块发酵不同阶段样品进行检测, 动态跟踪了整个酱块发酵过程中细菌群落变化。在属水平共

检测出细菌 40 个细菌群落, 主要为厚壁菌门中的乳杆菌、魏斯氏菌、肠球菌和明串珠菌等。群落组成如图 3a 所示。

酱块发酵初期, 魏斯氏菌为优势细菌类群达到 66.5%。这一结果与陈浩等人的研究结果相似^[18]。其次的优势细菌类群为乳杆菌(占总数 19.31%), 明串珠菌(占总数 6.26%)为主要细菌类群。此外, 梭菌(*Clostridium*)、乳球菌(*Lactococcus*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)和肠杆菌(*Enterobacter*)仅在此阶段(0 d)被检测出, 有可能是豆酱酱块在制作过程中, 人员、器具或豆子上沾染了杂菌, 同时刚制好的酱块湿度高, 有助于某些细菌生长, 但随着发酵酱块逐渐风干以及微生物之间相互作用, 这些细菌的数目会逐渐减少。

酱块发酵中期(20 d 和 40 d), 乳杆菌的数目逐渐增加, 最高可达 76.12%, 成为优势细菌, 其次为魏斯氏菌、肠球菌和明串珠菌。肠球菌在发酵 0 d 和 20 d 时仅占 1.81%和 0.11%, 在 40 d 时增长到 48.34%, 末期 60 d 降到 17.68%。2015 年田甜应用高通量测序法检测出中国传统发酵豆酱中肠球菌属和四联球菌属为主要菌种^[19]。说明肠球菌不仅在酱块发酵期间起到一定作用, 其作用也可以延续至液态豆酱发酵阶段。此外, 2009 年, Kim 等应用 DGGE 的方法检测出韩国豆酱的主要细菌为明串珠菌、肠球菌和四联球菌^[20]。由此可见, 肠球菌不仅在中国传统发酵豆酱中起重要作用, 在韩国豆酱中也广泛存在, 同时也说明有潜在致病菌存在于传统发酵豆酱酱块中, 有必要使用分子生物学方法进行检测。

酱块发酵末期 60 d 时, 乳杆菌(占总数 64.26%)仍为优势细菌, 其次为肠球菌(占总数 17.68%)和魏斯氏菌(占总数 8.13%)。由此可见, 乳杆菌为酱块发酵中后期的优势菌种(占总数 50.03%和 76.12%), 在本研究中, 乳杆菌在 0 d 时含量较低, 随着发酵迅速增长后有所减低, 最后增长到 64.26%, 说明乳杆菌在酱块发酵中起到重要作用。并且本研究中乳杆菌主要为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) (占总数 2.93%~63.14%)。植物乳杆菌是一种食品及药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)认可的乳杆菌, 在酱油、豆酱中广泛存在^[21], 在酶的作用下, 可以将精氨酸、组氨酸、天门冬氨酸等氨基酸分解代谢转化成杂醇, 对豆酱风味形成起到重要作用。2011 年赵建新利用 PCR-DGGE 技术在自然发酵豆酱中鉴定出植物乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌等^[22]。因此, 我们认为酱块的发酵对最终成品酱的风味有着一

定的影响, 其中的乳杆菌起到了重要作用。

此外, 一些含量较少但种类较多的微生物及未鉴定出的微生物都被归类为 Other, 在 0 d 时为 5.55%, 中期降到 1.33% 和 0.49%, 在末期升到 8.33%。这些含量相对较低的微生物可能对维持微生物环境稳定起重要作用, 同时也有潜力在适合的环境下变为优势菌群。因此说明影响酱块发酵的微生物群落中不仅包括上述相对含量较多的优势微生物, 也还包含许多不能忽视的稀少微生物。

酱块发酵不同阶段共检测出真菌 21 种。主要为接合菌门中的毛霉菌 (*Mucor*) 和根霉菌 (*Rhizopus*) 以及子囊菌门中的青霉菌 (*Penicillium*)、链格孢属 (*Alternaria*)、德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*)、单端孢属 (*Trichothecium*) 等。如图 3b 所示, 酱块发酵初期 0 d 时, Other (占总数 46.27%) 为优势真菌, 其次为毛霉菌 (占总数 18.16%)、青霉菌 (占总数 15.95%) 和根霉菌 (占总数 15.31%)。此时真菌种类较为丰富, 另外根霉菌仅在此时被检测出。相似的结果已有报道, 如陈嵘等人在我国多个地区的传统发酵豆酱中均分离出根霉菌, 但大多分离自发酵初期的酱醅样品, 且生长并不旺盛, 不能在整个酱醅发酵过程中占据优势^[23]。因此可以认为, 根霉菌可能仅在酱块发酵初期起到一定作用, 随着发酵的进行, 其作用逐渐减小。同时, 虽然根霉菌可以产出乳酸、蛋白酶和苹果酸等物质, 并已广泛应用于腐乳、酱油等传统发酵食品中^[24-26], 但尚未有应用到我国工业生产豆酱中的相关报道。

酱块发酵中期 20~40 d 时, 毛霉菌 (占总数 59.94%~61.03%) 数目迅速升高并保持稳定, 成为优势真菌。20 d 时除优势菌属毛霉菌外, 其它主要菌属依次为德巴利氏酵母 (占总数 24.14%) 和青霉菌 (占总数 14.41%)。酱块发酵 40 d 时, 毛霉菌 (占总数 61.03%) 仍为优势真菌, 其次为青霉菌 (占总数 27.84%) 和单端孢属 (占总数 9.86%)。酱块发酵末期 60 d 时, 毛霉菌 (占总数 46.11%) 仍为优势真菌, 其次为链格孢属 (占总数 36.14%) 和青霉菌 (占总数 15.26%)。可以看出, 毛霉菌在整个酱块发酵过程中均大量存在, 毛霉菌为湿性真菌, 酱块的环境有利于毛霉菌的生长。毛霉菌可以分泌蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等复杂酶系, 这些蛋白酶降解蛋白质大分子形成多肽或氨基酸, 并协同细菌、酵母的发酵作用, 生成一些有机酸、酯类等物质。同时, 毛霉菌也是腐乳发酵的主要菌种, 其对大豆蛋白有较高的水解率^[27-29]。但也有报道称毛霉菌仅在酱块发酵初期为优势菌属, 随着发酵的进行, 曲霉菌含量不断升高并在发酵中后期逐渐成为优势菌属^[30]。此

外, 本试验中发酵末期被大量检出的链格孢属 (36.14%) 在其他文献中鲜有报道, 鉴于传统发酵豆酱酱块中微生物群落变化研究报道较少的现状, 本试验结果与以往研究存在差异, 因此我们认为传统发酵豆酱酱块中微生物群落组成与原料组成, 取样时间, 所在区域, 制作方法均有密切联系, 还需要进行后续试验及数据积累, 以期进一步了解酱块发酵过程中微生物组成差异的原因。

3 结论

3.1 本试验首次应用高通量测序技术分析传统发酵酱块不同阶段的细菌及真菌的群落结构, 揭示了传统发酵豆酱酱块在 0 d、20 d、40 d、60 d 四个发酵阶段中细菌及真菌的群落组成。在门级水平上共检测出细菌四个类群, 其中厚壁菌门为优势细菌; 检测出真菌三个类群, 其中接合菌门和子囊菌门为优势真菌。在属水平上共检测出 40 个细菌分类群, 其中乳杆菌、魏斯氏菌和肠球菌为优势细菌。乳杆菌、魏斯氏菌、肠球菌、明串珠菌和葡萄球菌在各阶段均被检测出。共检测出 21 个真菌分类群, 其中毛霉菌、青霉菌、德巴利氏酵母属和根霉菌为主要真菌。毛霉菌、青霉菌、德巴利氏酵母属、根霉菌假丝酵母、链格孢属、根霉菌和镰刀菌属在发酵各阶段均被检测出。

3.2 近年来, 工业生产制作酱块通常添加黑曲霉或米曲霉, 但单一的菌种使发酵豆酱的风味远不及传统自然发酵所制作出来的豆酱。本研究发现自然发酵酱块中细菌资源十分丰富, 可以将有益细菌如乳杆菌、魏斯氏菌、明串珠菌等混合添加到酱块中发酵, 提高商业豆酱的风味及品质。此外, 还需结合代谢组学, 宏转录组学等其他技术, 更加全面地分析酱块发酵过程中微生物的相互作用及其作用机制, 从而指导生产。

参考文献

- [1] 辛星, 宋刚, 周晓杭. 传统发酵豆酱中乳酸菌的分离、筛选及鉴定[J]. 中国食品学报, 2014, 14(9): 202-207
XIN Xing, SONG Gang, ZHOU Xiao-hang. Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from the traditional fermented soybean paste [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(9): 202-207
- [2] Kim T W, Lee J H, Park M H, 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
- [3] Kim Y S, Kim M C, Kwon S W, et al. Analyses of bacterial

- communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods [J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 49(3): 340-348
- [4] 五明纪春,陈晓光,刘宇峰.大豆豆酱、酱油中褐色色素的生理功能作用[J].大豆科技,2001,1:28-29
WUMING Ji-chun, CHEN Xiao-guang, LIU Yu-feng. Physiology function and effect of brown pigment of soybean fermentation products soybean sauce [J]. *Soybean Bulletin*, 2001, 1: 28-29
- [5] Park J S, Park H Y, Dong H K, et al. ortho-Dihydroxyisoflavone derivatives from aged Doenjang (Korean fermented soypaste) and its radical scavenging activity [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(18): 5006-5009
- [6] 包启安.豆酱的功能性[J].中国酿造,2002,21(3):1-6
BAO Qi-an. Functionality of soybean paste [J]. *China Brewing*, 2002, 21(3): 1-6
- [7] Kim J G. Antigenotoxic effects of water extract from Korean fermented soybean paste (doen-jang) [J]. *Journal of Food Protection*, 2004, 67(1): 156-161
- [8] Jung K O, Park S Y, Park K Y. Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of doenjang [J]. *Nutrition*, 2006, 22(5): 539-545
- [9] 高秀芝,王小芬,李献梅,等.传统发酵豆酱发酵过程中养分动态及细菌多样性[J].微生物学通报,2008,35(5):748-753
GAO Xiu-zhi, WANG Xiao-fen, LI Xian-mei, et al. Changes of nutrition and bacterial diversity during traditional soypaste fermentation [J]. *Microbiology*, 2008, 35(5): 748-753
- [10] Lee J H, Kim T W, Lee H, et al. Determination of microbial diversity in meju, fermented cooked soya beans, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(4): 388-394
- [11] 孙雯,葛菁萍,叶广彬,等.传统豆酱发酵过程中霉菌的形态学分析[J].中国农学通报,2014,30(15):298-304
SUN Wen, GE Qing-ping, YE Guang-bin, et al. Morphological analysis of fungus from the traditional fermented soybean paste [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(15): 298-304
- [12] 焦晶凯,莫蓓红.Illumina MiSeq 平台高覆盖率测定干酪中的细菌微生物多样性[J].中国酿造,2014,33(5):34-38
JIAO Jing-kai, MO Bei-hong. Bacteria diversity of cheeses with high coverage by Illumina MiSeq Platform [J]. *China Brewing*, 2014, 33(5): 34-38
- [13] 陈泽斌,李冰,王定康,等.应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析玉米内生细菌多样性[J].现代食品科技,2016,32(2):113-120
CHEN Ze-bin, LI Bing, WANG Ding-kang, et al. Analysis of diversity of endophytic bacteria in maize using Illumina MiSeq high throughput sequencing [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2016, 32(2): 113-120
- [14] 邵明旭.小尾寒羊肠道正常菌群高通量测序分析及羊源微生物生态制剂的研制[D].泰安:山东农业大学,2016
SHAO Ming-xu. High-throughput sequencing analysis of normal intestinal flora in small tail han sheep and development of sheep source probiotics [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2016
- [15] 玲杰,吴群,徐岩.酱香型白酒发酵中地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的相互作用[J].微生物学通报,2013,40(11):2014-2021
LING Jie, WU Qun, XU Yan, et al. Interactions between *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of soy-sauce flavor liquor [J]. *Microbiology*, 2013, 40(11): 2014-2021
- [16] R Tabasco, T Paarup, C Janer, et al. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk [J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(9): 1107-1114
- [17] R Ashraf, NP Shah. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 149(3): 194-208
- [18] 陈浩,樊游,陈源源,等.传统发酵豆制品中原核微生物多样性的研究[J].食品工业科技,2011,9:230-232
CHEN Hao, FAN You, CHEN Yuan-yuan, et al. Study on the prokaryotic microbial diversity of Chinese traditional fermented soybean foods [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 9: 230-232
- [19] 田甜.东北豆酱自然发酵过程中风味品质与微生物变化规律研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2015
TIAN Tian. Study on the changes of flavor quality and microbial of soybean paste during the fermentation in northeast of China [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2015
- [20] Kim T W, Lee J H, Kim S E, et al. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 131(2-3): 265-271

- [21] Tanasupawat S, Thongsanit J, Okada S, et al. Lactic acid bacteria isolated from soy sauce mash in Thailand [J]. *Journal of General & Applied Microbiology*, 2002, 48(4): 201-209
- [22] 赵建新.传统豆酱发酵过程分析与控制发酵的研究[D].无锡:江南大学,2011
ZHAO Jian-xin. Investigation of traditional soybean paste fermentation process and study on the inoculation fermentation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011
- [23] 陈嵘.我国部分地区自然发酵豆酱中真菌的多样性和真菌毒素的检测[D].沈阳:沈阳农业大学,2008
CHEN Rong. Fungal diversity and detection of mycotoxins in naturally fermented soybean paste in some regions of China [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2008
- [24] 刘全德,刘恩岐,贺菊萍,等.多菌种发酵丹贝的制作工艺与营养成分分析[J].*食品与发酵工业*,2011,37(3):104-108
LIU Quan-de, LIU En-qi, HE Ju-ping, et al. Production process and nutritional components analysis of multi- strain fermented danbei [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2011, 37(3): 104-108
- [25] 张斌,莫琼,陈书洁,等.腐乳混合发酵菌的筛选及发酵条件研究[J].*食品工业*,2011,7:15-18
ZHANG Bin, MO Qiong, CHEN Shu-jie, et al. Screening of sufu mixed fermentation strains and study on their fermentation conditions [J]. *Food Industry*, 2011, 7: 15-18
- [26] 靳文生.酱油多菌种制曲改善酶系组成的研究[J].*现代食品科技*,2011,27(8):977-979
JIN Wen-sheng. Improvement of composition of enzyme system and sauce fermentation by using multi-strain koji starters [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2011, 27(8): 977-979
- [27] 潘进权,罗晓春,谢明权.毛霉蛋白酶的组分特性及对大豆蛋白水解的研究[J].*中国粮油学报*,2009,24(5):31-35
PAN Jin-quan, LUO Xiao-chun, XIE Ming-quan. Characterization of proteases from *actinomucor elegans* and application in hydrolysis of soy protein [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2009, 24(5): 31-35
- [28] 曹翠峰.大豆发酵食品-腐乳的微生物学研究[D].北京:中国农业大学,2001
CAO Cui-feng. Microbiological study of sufu-A fermented soybean food [D]. Beijing: China Agricultural University, 2001
- [29] 李晶晶.霉菌蛋白酶酸性条件下水解大豆蛋白及其产物特性研究[D].广州:华南理工大学,2013
LI Jing-jing. Enzymatic hydrolysis of soybean protein by mould proteases under acidic condition and its hydrolysates characteristics [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [30] JY Jung, SH Lee, CO Jeon. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185: 112