

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

赵馨馨^{1,2}, 崔梦君¹, 董蕴¹, 倪慧¹, 单春会², 郭壮^{1,3}

(1. 湖北文理学院食品科学技术学院, 湖北襄阳 441053) (2. 石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

(3. 恩施市公共检验检测中心, 湖北恩施 445000)

摘要: 为了解湖北省恩施市巴东地区豆瓣酱中微生物的多样性, 采用 Illumina MiSeq 高通量测序技术, 分析豆瓣酱中细菌 16S rRNA 及真菌 18S rRNAV4 区基因序列, 进而比较豆瓣酱微生物的群落结构组成及多样性差异。结果 3 个样品共获得 117644 条有效序列, 867 个 OTUs 数目。多样性分析表明, 豆瓣酱中具有高度的微生物群落多样性。微生物群落组成分析表明, 样品中子囊菌门 (Ascomycota, 95.84%)、变形菌门 (Proteobacteria, 47.13%)、厚壁菌门 (Firmicutes, 32.37%)、放线菌 (Actinobacteria, 12.87%) 为优势菌门, 所占比例都超过了 10.0%。在豆瓣酱样品中分别鉴定出 311 个细菌属和 16 个真菌属, 优势细菌和真菌属平均相对含量分别为 8.09% 和 24.74%, 细菌及真菌多样性在属的水平上差异显著 ($p < 0.05$)。研究结果加深了对豆瓣酱微生物群落组成和多样性的认识, 以期为巴东地区豆瓣酱中微生物菌种资源的发掘与保护提供理论依据。

关键词: 豆瓣酱; 高通量测序技术; 细菌真菌群落结构; 微生物多样性

文章编号: 1673-9078(2019)09-297-303

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.039

Analysis of Microbial Diversity in Badong Bean Paste by Illumina MiSeq High Throughput Sequencing Technology

ZHAO Xin-xin^{1,2}, CUI Meng-jun¹, DONG Yun¹, NI Hui¹, SHAN Chun-hui², GUO Zhuang^{1,3}

(1.School of Food Science and Technology, Hu Bei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China)

(2.The Food College of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

(3.Enshi Public Inspection and Testing Center, Enshi 445000, China)

Abstract: To better understand the microbial diversity of bean paste in Badong area of Enshi City, Hubei Province, Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology was used to analyze the 16S rRNA gene sequence of bacteria and 18S rRNAV4 gene sequence of fungi in bean paste. The community structure and diversity of microorganisms in bean paste was compared. A total of 117644 valid sequences and 867 OTUS was obtained from the three samples. Diversity analysis showed that there was a high degree of microbial community diversity in bean paste. The analysis of microbial community composition indicated that *Ascomycota* (95.84%), *Proteobacteria* (47.13%), *Firmicutes* (32.37%) and *Actinobacteria* (12.87%) were dominant bacteria, accounting for more than 10.0%. There were 311 bacterial genera and 16 fungal genera identified in Badong bean paste samples. The average relative contents of dominant bacteria and fungi were 8.09% and 24.74%, respectively. The diversity of bacteria and fungi was significantly different at the generic level ($p < 0.05$). The results deepened the understanding of microbial community composition and diversity of bean paste, in order to provide a theoretical basis for the excavation and protection of microbial bacterial resources in bean paste in Badong area.

Keywords: bean paste; high-throughput sequencing; bacterial and fungal community; microbial community diversit

豆瓣酱作为一种传统发酵豆制品, 因其具有色红油润、瓣粒香脆、味美辛辣等特点, 长期以来深受全国各地人民喜爱^[1]。当前, 豆酱制品酿制过程中的主

收稿日期: 2019-04-27

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31501455)

作者简介: 赵馨馨 (1994-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 郭壮 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

要微生物可分为三大群体, 即霉菌、细菌和酵母菌^[2]。张颖等^[3]采用 DGGE 技术结合高通量测序的方法分析豆瓣酱中的微生物多样性及动态变化, 发现豆瓣酱中优势细菌属是肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和四链球菌属 (*Tetragenococcus*), 主要真菌是地霉属 (*Geotrichum*); 王静^[4]利用 PCR-DGGE 技术对传统豆酱自然发酵过程中微生物

进行分析, 结果表明, 优势细菌为片球菌属 (*Pediococcus*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus*), 优势真菌为假丝酵母 (*Candida*) 和曲霉属 (*Aspergillus*)。传统发酵豆酱的生产过程中微生物多样性是影响豆酱产品风味和口感的关键^[5], 而越来越多的研究表明每个地区的发酵食品微生物多样性存在较大的差异^[6,7]。

巴东地区隶属恩施土家族苗族自治州, 北靠神农架林区, 温暖多雨, 四季分明, 其发酵食品微生物多样性可能具有一定的独特性, 然而目前关于该地区乃至恩施地区传统发酵微生物多样性的研究尚少。Illumina MiSeq 高通量测序技术可对数百万个 DNA 分子同时测序, 根据基因序列分析特定微生物群体的构成情况或基因组以及功能特性^[8,9], 具有快速、直接和真实等优势现已广泛用于多种发酵食品微生物群体结构的分析, 如奶酪、酸马奶和臭鳊鱼等^[10,11]。目前发酵食品微生物多样性的研究是众多学者研究的热点, 但对于传统自然发酵的豆瓣酱的微生物群落结构鲜见报道。

本研究采用 Illumina MiSeq 技术对豆瓣酱样品中细菌及真菌多样性进行解析, 深入了解传统发酵豆瓣酱中微生物群落结构, 挖掘丰富微生物资源并确定优势菌群, 以期对巴东地区豆瓣酱中微生物菌种资源的发掘与保护提供一定参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂设备

3 份豆瓣酱样品采集于恩施土家族苗族自治州巴东县菜市场, 编号分别为 DBJBD1、DBJBD2 和 DBJBD3, 置于含有冰袋的采样箱中运回实验室分装备用, -20 °C 储存。

QIAGEN Neasymericon Food Kit 提取试剂盒, 德国 QIAGEN 公司; 引物均由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, 信息如表 1 所示。

表 1 实验所用引物序列信息

Table 1 Sequences information of primers used in the study

引物名称	序列 (5'-3')
338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCA
806R	GGACTACHVGGGT
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1495R	CTACGGCTACCTTG
SSU0817F	TTAGCATGGAATAATRRATAGGA
SSU1196R	TCTGGACCTGGTGAGTTTC

注: “F”表示正向引物, “R”表示反向引物。

SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台, 苏州安泰空

气技术有限公司; ND-2000C 微量紫外分光光度计, 美国 Nano Drop 公司; 5810R 台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; VeritiTM96 孔梯度 PCR 扩增仪, 美国 AB 公司; DYY-12 电泳仪, 北京市六一仪器厂; Fluor Chem FC3 型化学发光凝胶成像系统, 美国 Protein Simple 公司; Miseq PE300 高通量测序平台, 美国 Illumina 公司; R930 机架式服务器, 美国 DELL 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 宏基因组提取与检测

参照 QIAGEN DNeasymericon Food Kit 试剂盒方法对豆瓣酱样品中的微生物总 DNA 进行提取, 以获得大片段、高质量和高浓度的微生物宏基因组 DNA。

1.2.2 细菌 16S rRNA 序列扩增

PCR 扩增体系^[12]: 5×PCR 缓冲液 4 μL, dNTPs mix (2.5 mmol/L) 2 μL, 正反向引物 (5 μmol/L) 各 0.8 μL, DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.4 μL, DNA 模板 10 ng, 补充 ddH₂O 至 20 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共循环 30 次; 72 °C 再延伸 10 min。

1.2.3 真菌 18s rRNA 序列扩增

PCR 扩增体系^[13]: 5×PCR buffer 4 μL, dNTPs Mix (2.5 mmol/L) 2 μL, 正反向引物 (正向引物上加 7 个核苷酸标签, 5 μmol/L) 各 0.8 μL, FastPfu Fly DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.4 μL, 模板 DNA 10 ng, 补充无菌超纯水至 20 μL。扩增条件同 1.2.2。

1.2.4 PCR 产物纯化、定量及 MiSeq 高通量测序

全部扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测合格和准确定量后用无菌超纯水将浓度稀释至 100 nmol/L, 置于干冰中冷链寄往上海美吉生物医药科技有限公司完成 MiSeq 高通量测序。

1.3 数据分析处理及图表绘制

1.3.1 数据分析

测得的原始序列 (reads) 数据通过核苷酸标签 (barcode) 分配到每个样品, 得到每个样本的有效序列, 去除末端低质量的序列后, 将成对的 reads 拼接成一条序列, 同时进行质控和过滤, 将模糊碱基、单碱基高重复区、过长和过短的序列、以及 PCR 过程中产生的嵌合体^[14]去除, 从而得到优化序列。使用 QIIME 分析平台^[15]对质控合格的序列进行生物信息学分析: 使用 Py NAST^[16]校准排齐序列, 之后进行两

步 UCLUST 法^[17]归并建立分类操作单元 (operational taxonomic units, OTU) 聚类, 应用 Chimera Slayer^[18] 去除含有嵌合体序列的 OTU 序列, 整合 RDP (Ribosomal Database Project, Release 11.5)^[19]和 Greengenes^[20] (Release 13.8) 两个数据库对细菌 OTU 代表性序列进行同源性比对, 真菌 OTU 代表性序列与 SILVA 数据库^[21]同源性比对, 进而明确不同分类地位微生物菌群的相对含量, 在上述分析基础上, 对巴东豆瓣酱中微生物的超 1 (Chao1) 指数和香农 (Shannon) 指数等 α 多样性指标及门和属分类水平上群落结构等进行多样性和群落结构差异性分析。

1.3.2 图表绘制

使用折线图评判本研究测序深度是否合适, 使用

表 2 豆瓣酱样品测序结果及各分类地位数量

Table 2 Sequencing results and numbers at different taxonomical levels of broad bean pastesample

项目	样品编号	序列数/条	OTU 数/个	门/个	纲/个	目/个	科/个	属/个	超 1 指数*	香农指数*
A	DBJBD1	39751	2066	18	51	86	168	283	1495	6.38
	DBJBD2	38652	2245	15	36	62	111	162	1280	6.14
	DBJBD3	27640	1628	15	42	65	123	171	942	4.48
B	DBJBD1	39911	246	2	9	11	11	10	1183	0.63
	DBJBD2	40808	302	2	6	7	7	5	2424	0.97
	DBJBD3	36925	319	2	7	12	11	10	2698	0.68

注: A 代表细菌, B 代表真菌; *表示细菌超 1 指数和香农指数均在测序量为 26010 条序列时计算所得, 计算真菌超 1 指数和香农指数时, 样品测序量均在 36010 条序列时计算所得。

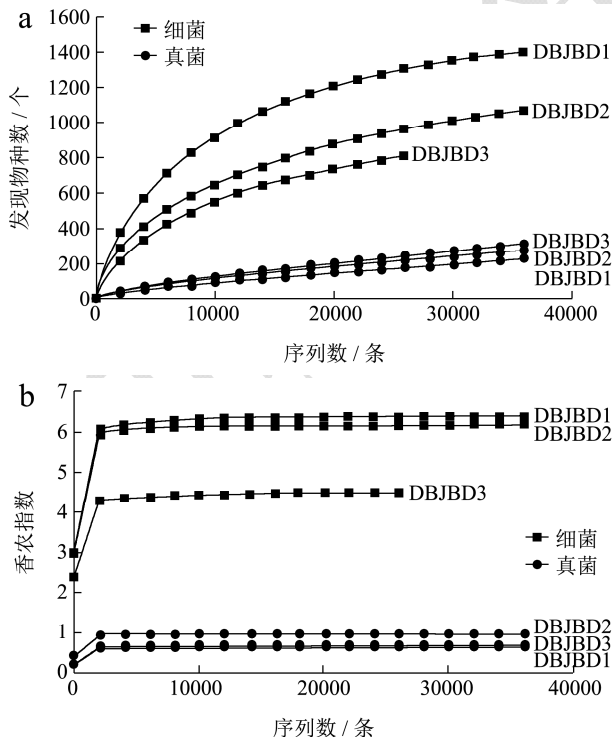


图 1 稀释曲线 (a) 和香农指数曲线 (b)

Fig.1 Rarefaction curves (a) and shannon index curves (b)

基于 Illumina MiSeq 高通量测序技术对纳入本研

究的 3 个豆瓣酱样品 16 S rRNA、18 S rRNA 测序情况及门、纲、目、科和属各分类地位数量进行统计, 结果如表 2 所示。

2 结果与分析

2.1 样品序列丰富度和多样性评估

由表 2A 可知, 3 个样品共产生 106143 条高质量 16 S rRNA 序列, 平均每个样品产生 35381 条, 在 97% 的相似度下划分的 OTU 数分别为 2066 个、2245 个和 1628 个。当测序量达到 26010 条时 DBJBD1、DBJBD2 和 DBJBD3 样品的超 1 指数分别为 1495、1280 和 942, 香农指数分别为 6.38、6.14 和 4.48。其中样品 DBJBD1 的超 1 指数和香农指数值均最大, 由此可见, DBJBD1 样品中细菌微生物的丰富度最大且多样性最高。

样品 DBJBD1、DBJBD2 和 DBJBD3 经质控合格的序列分别为 39911 条、40808 条和 36925 条, 在 97% 的相似度下划分的 OTU 数分别为 246 个, 302 个和 319 个。由表 2B 可知, 样品 DBJBD3 具有最大的微生物丰度, 其超 1 指数为 2698, 而 DBJBD2 样品的生物多样性最高, 其香农指数为 0.97。由表 2 亦可知不同豆瓣酱样品间微生物的丰度和多样性存在较大差异, 样品中细菌丰度和多样性均高于真菌。为进一步评估本研究的测序深度是否满足后续生物信息学分析要求, 以抽到的序列条数 (测序深度) 与其所聚类得

到的 OTU 数目 (97%相似性) 和 Shannon 指数绘制曲线, 结果如图 1a 和 b 所示。

由图 1a 和 b 可知, 随着测序量逐渐增大, OTU 的数量没有达到平衡仍有上升趋势, 而香农指数曲线 >10000 条时已经进入平台期, 说明随着测序量的增加可能会有新的 OTU 和种系被发现, 但在此测序深度水平下, 足以充分体现样品中细菌和真菌的多样性, 说明现有测序量足以反映样品中微生物丰度信息。由图 1a 亦可知, 所有样品中细菌的丰度和多样性均远高于真菌, 这与表 2 的结果一致。

2.2 OTU 统计及分类学分析

Venn 图可用于统计 OTU 数目组成的相似性及其重叠情况, 本研究选用 97%相似度的 OTU, 结果如图 2 所示。由图 2a 可知, 豆瓣酱样品 DBJBD1、DBJBD2 和 DBJBD3 细菌特有的 OTU 分别为 1417 个、1277 个和 969 个, 其所包含序列数分别为 3375 条、7149 条和 1422 条。3 个样品 334 个核心 OTU 共包含了 78014 条序列, 占总序列数为 73.75%, 由此可见, 豆瓣酱样品中含有丰富的细菌种系, 但有近八成的共有核心细菌菌群。

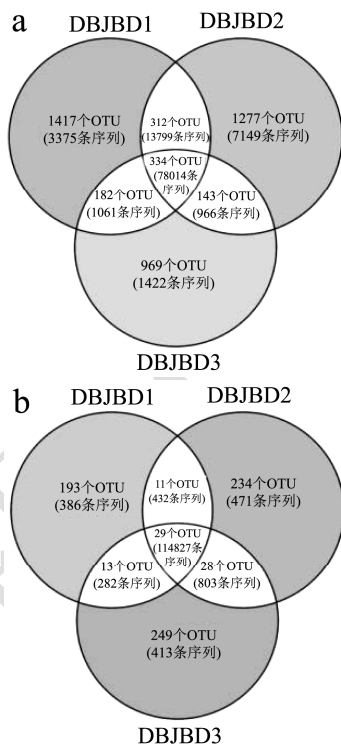


图 2 豆瓣酱样品细菌 (a) 与真菌 (b) OTU 数及序列数

Fig.2 Bean paste bacteria (a) and fungi (b) OTU number and sequence number

由图 2b 可知, 样品 DBJBD1 中真菌 OTU 总数为 246 个, 但其独有的 OTU 数为 193 个, 样品 DBJBD2 中 OTU 总数为 302 个, 其中独有的 OTU 数为 234 个,

样品 DBJBD3 中 OTU 总数为 319 个, 独有 OTU 数为 249 个。三组样品 DBJBD1、DBJBD2 和 DBJBD3 真菌共有 OTU 数为 29 个。

由图 3 可知, 本研究甄别出的 10 个细菌核心 OTU 中 3 个隶属于葡萄球菌 (*Staphylococcus*), 两个隶属于假单胞菌 (*Pseudomonas*), 各有 1 个隶属于克雷伯氏菌 (*Klebsiella*)、短杆菌 (*Brevibacterium*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)。其中 OTU363 (隶属于葡萄球菌) 在 DBJBD3 样品中含量达到 36.30%, OTU4022 (隶属于葡萄球菌) 在 DBJBD1 和 DBJBD2 样品中相对含量分别为 10.88% 和 10.73%, OTU2944 (隶属于假单胞菌) 在 DBJBD1 样品中的相对含量为 15.99%。

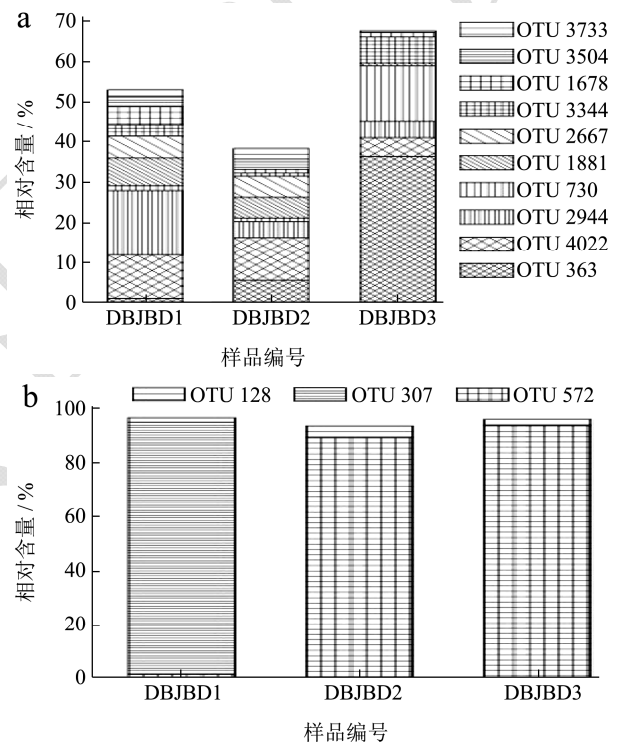


图 3 核心 OTU 中优势细菌属 (a) 和真菌属 (b) 相对含量比较分析

Fig.3 Comparative analysis of relative content of dominant bacteria (a) and fungi (b) in core OTU

豆瓣酱 3 个样品中 3 个核心真菌 OTU 分别隶属于曲霉菌 (*Aspergillus*), 接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) 和横梗霉属 (*Lichtheimia*)。此外, 3 个真菌核心 OTU 相对平均含量为 31.77%, 尤其是 OTU572 (隶属于曲霉菌) 在 DBJBD2 和 DBJBD3 中相对含量高达 89.21% 和 93.57%, OTU307 (隶属于接合酵母属) 在样品 DBJBD1 中的相对含量为 93.46%。值得一提的是, 各核心 OTU 在样品中的分布也存在较大差异, 例如 OTU363 (隶属于葡萄球菌)

在样品 DBJBD3 中高达 36.30%，而在 DBJBD1 和 DBJBD2 样品中仅为 0.98%和 5.48%，OTU572（隶属于曲霉菌）在样品 DBJBD2 和 DBJBD3 中相对含量高达 89.21%和 93.57%，而在 DBJBD1 中的相对含量小于 2%，OTU307（隶属于接合酵母属）在样品 DBJBD1 中的相对含量为 93.46%，而在其他样品中相对含量均小于 0.50%。由此可见，核心 OTU 虽存在于所有样品中，但平均含量差异较大。

2.3 基于不同分类地位微生物菌群相对含量分析

不同样品中细菌在分类门水平上的分布情况如图 4a 所示。在豆瓣酱的 3 个样品（DBJBD1、DBJBD2 和 DBJBD3）中，共鉴定出 21 个细菌门，其中平均丰度大于 1%的细菌门有 5 个，分别为变形杆菌（Proteobacteria, 47.13%）、硬壁菌门（Firmicutes, 32.37%）、放线菌（Actinobacteria, 12.88%）、酸杆菌门（Acidobacteria, 5.35%）和拟杆菌（Bacteroidetes, 1.36%）；在图 4B 中，仅鉴定出 3 个真菌门，平均丰度大于 1%的有 2 个门，为子囊菌门（Ascomycota, 95.84%）和（Mucoromycotina, 3.53%）。

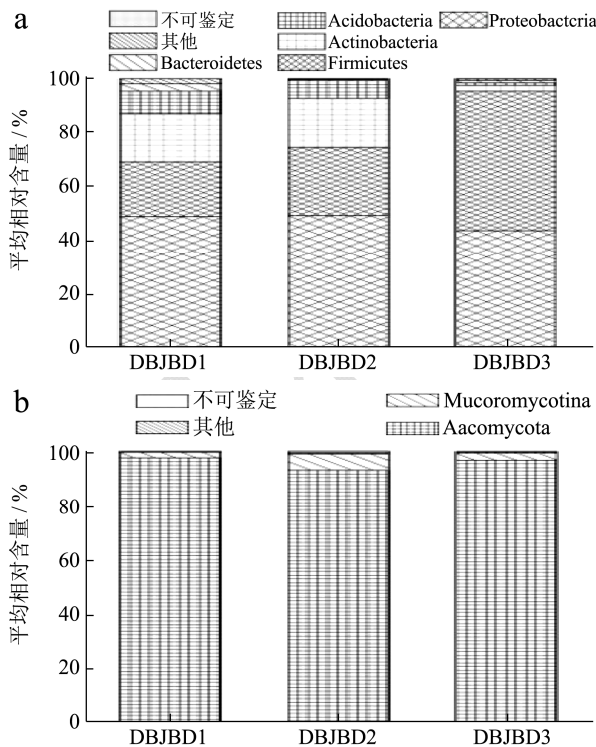


图 4 豆瓣酱样品中优势细菌门 (a) 和真菌门 (b) 的相对含量分析

Fig.4 Relative content analysis of dominant bacterial phyla (a) and Fungus phyla (b) in bean paste samples

在属的分类水平上，注释到明确分类地位的有

312 个属，其中平均相对含量大于 1%的有 10 个，在本研究中，将这 10 个细菌属定义为优势细菌属，其在各样品中的分布情况如图 5a 所示。

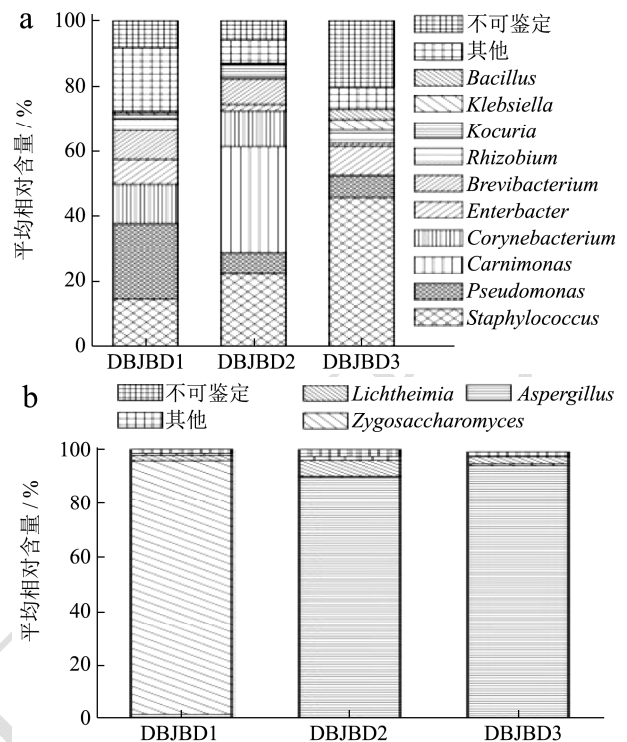


图 5 豆瓣酱中优势细菌属 (a) 和真菌属 (b) 相对含量分析
Fig.5 Analysis of relative content of dominant bacterial genus (a) and fungal genus (b) in bean paste

由图 5a 可知，豆瓣酱样品中优势细菌属为葡萄球菌（*Staphylococcus*）、假单胞菌（*Pseudomonas*）、*Carnimonas*、棒状杆菌（*Corynebacterium*）、肠杆菌（*Enterobacter*）、短杆菌（*Brevibacterium*）、根瘤菌（*Rhizobium*）、*Kocuria* 和芽孢杆菌（*Bacillus*），其平均相对含量分别为 27.55%、12.06%、10.95%、7.75%、6.19%、5.95%、2.32%、2.04%和 1.31%。值得一提的是还有 3.23%无法确认是否为新物种，进一步说明豆瓣酱样品中细菌多样性较高。

纳入本研究的 3 个豆瓣酱样品中真菌属的平均相对含量如图 5b 所示。豆瓣酱中平均相对含量大于 1%的核心真菌属包括隶属于子囊菌门（Ascomycota）的曲霉菌（*Aspergillus*）和接合酵母（*Zygosaccharomyces*），其平均相对含量分别为 61.71%和 31.75%；隶属于 Mucoromycotina 的横梗霉属（*Lichtheimia*），其平均相对含量为 3.50%。另外，DBJBD2 和 DBJBD3 样品中以曲霉菌（*Aspergillus*）为主，其含量高达 89.59%和 93.84%，接合酵母（*Zygosaccharomyces*）在 DBJBD1 中含量为 94.09%，而在 DBJBD2 和 DBJBD3 样品中仅有 0.35%和 0.81%。由此可见，虽然豆瓣酱样品中含有大量真菌菌群，但

其在各样品中并非均匀分布。

本研究共发现 10 个核心细菌属和 3 个核心真菌属，其相关性热图如图 6 所示。

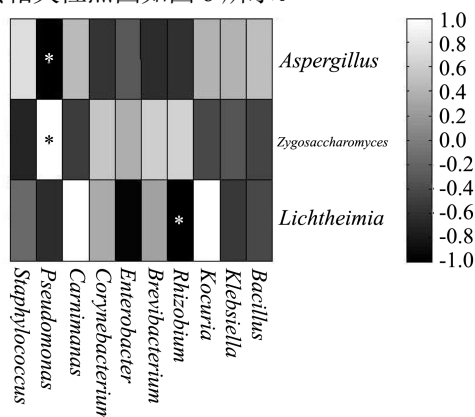


图 6 豆瓣酱优势细菌真菌属相关性热图

Fig.6 Heat map of the genera of dominant bacteria and fungi in bean paste

由图 6 可知，假单胞菌 (*Pseudomonas*) 与曲霉菌 (*Aspergillus*) 呈显著负相关 ($R=-0.997$, $p<0.05$)；假单胞菌 (*Pseudomonas*) 与接合酵母菌 (*Zygosaccharomyces*) 呈显著正相关 ($R=0.999$, $p<0.05$)；根瘤菌 (*Rhizobium*) 与 *Lichtheimia* 呈显著负相关 ($R=-0.999$, $p<0.05$)，其他优势细菌真菌属之间相关性均不显著 ($p>0.05$)。

3 结论

在本研究中利用 Illumina MiSeq 第二代测序技术对豆瓣酱微生物群落结构进行解析，突破了很多微生物尚不能利用培养基进行分离、纯化培养的技术瓶颈，结果表明巴东地区豆瓣酱中确实存在一定丰度的细菌及真菌，显示出高通量技术在豆瓣酱微生物研究中的可行性及明显优势，通过探讨样品中的微生物群落组成，可以把握优势菌群分布情况。对豆瓣酱进行微生物多样性研究后在 3 个样品中共鉴定出 21 个细菌门，平均丰度值大于 1.0% 的有变形菌门 (*Proteobacteria*, 47.1%)、厚壁菌门 (*Firmicutes*, 32.37%)、放线菌 (*Actinobacteria*, 12.87%)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*, 5.35%) 和拟杆菌 (*Bacteroidetes*, 1.36%)，平均丰度值大于 1% 的真菌门仅有 2 个，分别为子囊菌门 (*Ascomycota*, 95.84%) 和 (*Mucoromycotina*, 3.53%)。优势细菌属主要为葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、*Carnimonas*、棒状杆菌 (*Corynebacterium*)、肠杆菌 (*Enterobacter*)、短杆菌 (*Brevibacterium*)、根瘤菌 (*Rhizobium*)、*Kocuria* 和芽孢杆菌 (*Bacillus*)，优势真菌属为隶属于子囊菌门 (*Ascomycota*) 的曲霉菌 (*Aspergillus*) 和接合酵母

(*Zygosaccharomyces*) 以及隶属于 *Mucoromycotina* 的横梗霉属 (*Lichtheimia*)。

参考文献

- 唐筱扬,姜静,陶冬冰,等.东北传统发酵豆酱品质分析[J].食品科学,2017,38,2:121-126
TANG Xiao-yang, JIANG Jing, TAO Dong-bing, et al. Quality analysis of traditional fermented soybean paste in northeast China [J]. Food Science, 2017, 38, 2: 121-126
- 曾灿伟.甜面酱酿制过程中的菌相分析及风味成分研究[D].武汉:湖北工业大学,2009
ZENG Can-wei. Analysis of bacterial phase and flavor composition in the process of making sweet noodle sauce [D]. Wuhan: Hubei Industry University, 2009
- 张颖.豆酱自然发酵过程微生物多样性分析研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2017
ZHANG Ying. Analysis of microbial diversity in natural fermentation process of bean paste [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017
- 王静.传统豆酱中微生物多样性分析[D].石家庄:河北科技大学,2012
WANG Jing. Analysis of microbial diversity in traditionalsoy sauce [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2012
- 姜静,解梦汐,安飞宇,等.应用 MiSeq 测序分析自然发酵豆酱酱块中微生物的多样性[J].食品工业科技,2018,39(16): 92-97
JIANG Jing, XIE Meng-xi, AN Fei-yu, et al. Microbial community analysis in soybean sauce mash of traditional fermented soybean paste by MiSeq sequencing [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(16): 92-97
- 解万翠,尹超,宋琳,等.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 Wan-cui, YIN Chao, SONG Lin, et al. Research progress of microorganism and its metabolism in traditional fermentation food [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(10): 253-259
- 马岳.发酵食品微生物的多样性[J].食品安全导刊,2017,13(15):126-127
MA Yue. Microbial diversity of fermented foods [J]. Food Safety Guide, 2017, 13(15): 126-127
- Sun W, Xiao H, Peng Q, et al. Analysis of bacterial diversity of Chinese Luzhou-flavor liquor brewed in different seasons by Illumina Miseq sequencing [J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1293-1301

- [9] Soon W W, Hariharan M, Snyder M P . High-throughput sequencing for biology and medicine [J] *Molecular Systems Biology*, 2013, 9(1): 640-648
- [10] 布仁其其格,高雅罕,任秀娟,等.不同发酵时期酸马奶细菌群落结构[J].食品科学,2016,37(11):108-113
BUREN Qiqi-ge, GAO Ya-han, REN Xiu-juan, et al. Dynamic changes of bacteria community structure during koumiss fermentation [J]. *Food Science*, 2016, 37(11): 108-113
- [11] 李燕,吴佳佳,张井,等.PCR-DGGE 技术分析传统臭鳊鱼发酵过程中细菌群落结构[J].食品科学,2017,38(18):29-34
LI Yan, WU Jia-jia ZHANG Jing, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial community structure in stinky mandarin fish [J]. *Food Science*, 2017, 38(18): 29-34
- [12] 董蕴,王玉荣,王尧,等.基于变性梯度凝胶电泳和 MiSeq 高通量测序技术分析恩施地区腊肉的细菌多样性[J].肉类研究,2018,32(10):37-42
DONG Yun, WANG Yu-rong, WANG Yao, et al. Evaluation of bacterial diversity in Chinese bacon from Enshi by denatured gradient gel electrophoresis and MiSeq high-throughput sequencing [J]. *Meat Research*, 2018, 32(10): 37-42
- [13] 尚雪娇,王玉荣,杨江,等.应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析析梅干菜中细菌多样性[J].中国酿造,2019,38(1):140-144
SHANG Xue-jiao, WANG Yu-rong, YANG Jiang, et al. Bacterial diversity in preserved vegetable by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology [J]. *China Brewing*, 2019, 38(1): 140-144
- [14] Haas B J, Gevers D, Earl A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. *Genome Research*, 2011, 21(3): 494-504
- [15] 周书楠,王玉荣,周亚澳,等.基于 MiSeq 高通测序技术的米酒真菌多样性分析[J].食品工业科技,2018,40(8):85-89
ZHOU Shu-nan, WANG Yu-rong, ZHOU Ya-ao, et al. Study on the diversity of fungal microflora in rice wine by MiSeq high-throughput sequencing [J]. *Food Industry Technology*, 2018, 40(8): 85-89
- [16] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(2): 266-267
- [17] 王丹丹,沈馨,董蕴,等.孝感凤窝酒曲真菌多样性评价[J].中国酿造,2017,36(11):38-42
WANG Dan-dan, SHEN Xin, DONG Yun, et al. Evaluation of fungal diversity in Xiaogan Fengwo rice wine koji [J]. *China Brewing*, 2017, 36(11): 38-42
- [18] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [19] Cole J R, Chai B, Farris R J, et al. The ribosomal database project (RDP-II) [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(1): 169-172
- [20] Desantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Green genes, a chimera-checked 16S r DNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (7): 5069-5072
- [21] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): 590-596

(上接第 101 页)

- [25] Coimbra M A, Barros A, Barros M, et al. Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy [J]. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 37: 241-248
- [26] Chen H, Ju Y, Li J, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50: 214-218
- [27] Chaouch M A, Hafsa J, Rihouey C, et al. Effect of extraction conditions on the antioxidant and antiglycation capacity of carbohydrates from *Opuntia robusta* [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51: 929-937
- [28] Lyu L, Cheng Y, Zheng T, et al. Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 99:765-773
- [29] Bonnin E, Garnier C, Ralet M C. Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: applications and impacts [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2014, 98: 519-532