

自然发酵腐乳中细菌多样性评价

李娜¹, 崔梦君¹, 马佳佳¹, 余海忠¹, 张振东¹, 郭壮^{1,2}, 赵慧君^{1,*}

(1. 湖北文理学院 食品科学技术学院 鄂西北传统发酵食品研究所, 湖北 襄阳 441053; 2. 恩施市公共检验检测中心, 湖北 恩施 445000)

摘要:以腐乳为研究对象,利用变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术与 Miseq 高通量测序技术相结合的手段解析及评价细菌多样性,同时利用传统纯培养的方法对乳酸菌进行分离、纯化与鉴定。结果显示:腐乳中主要微生物为变形菌门(Proteobacteria, 80.45%),其中绿脓杆菌属、不动杆菌属、鞘氨醇杆菌属、布丘氏菌属和草螺菌属细菌为优势细菌属。同时通过 PCR-DGGE 和纯培养发现腐乳中鉴定出 7 株乳酸菌,其中 2 株为戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*),1 株为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*),4 株为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。由此可知腐乳中蕴含着丰富的微生物资源,同时屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)为优势乳酸菌。

关键词:腐乳;变性梯度凝胶电泳;Miseq 高通量测序;细菌多样性;乳酸菌

Evaluation of Bacterial Diversity in Natural Fermented Sufu

LI Na¹, CUI Meng-jun¹, MA Jia-jia¹, YU Hai-zhong¹, ZHANG Zhen-dong¹,
GUO Zhuang^{1,2}, ZHAO Hui-jun^{1,*}

(1. Northwest Hubei Research Institute of Traditional Fermented Food, College of Food Science and Technology, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China; 2. Enshi Public Inspection and Testing Center, Enshi 445000, Hubei, China)

Abstract: The bacterial diversity of sufu in Enshi was analyzed and evaluated by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technologies and Miseq high throughput sequencing. The results showed that Proteobacteria(80.45%) was main microbial in sufu and the dominant bacteria generas were *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Buttiauxella* and *Herbaspirillum*. Furthermore, by using of PCR-DGGE and pure culture methods turned out that there were 7 strains of Lactic acid bacteria were isolated from sufu and 2 strains were *Pediococcus pentosaceus*, one strain was *Pediococcus acidilactici* and 4 strains

基金项目:湖北省荆楚卓越工程师协同育人计划(201657);湖北文理学院 2018 年度学科开放基金项目(931102)

作者简介:李娜(1998—),女(汉),学士,研究方向:食品生物技术。

* 通信作者:赵慧君(1979—),女(汉),副教授,博士,研究方向:食品生物技术。

technology, 2015, 32(4): 21-27

- [12] 郭壮,蔡宏宇,杨成聪,等. 六名襄阳地区青年志愿者肠道菌群多样性的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(9): 998-1004
- [13] 王笋,吕嘉彬,辛博,等. 西北地区泡菜中乳酸杆菌的生物学特性[J]. 中国调味品, 2014, 39(3): 15-18
- [14] 王伟宏,杜晓华,张家超,等. 内蒙古鄂尔多斯地区酸粥发酵液中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(2): 265-270
- [15] 杨成聪,刘丹丹,葛东颖,等. 基于气相色谱-质谱联用技术结合电

子鼻评价浸米时间对黄酒风味品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(8): 265-270

- [16] 王玉荣,张俊英,潘婷,等. 糯米米酒和糯米米酒品质的评价[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 186-191
- [17] 杨成聪,沈馨,马雪伟,等. 高效液相色谱法测定米酒中有机的含量[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(10): 116-123
- [18] 徐亚丹,王俊,赵国军. 基于电子鼻的对掺假的“伊利”牛奶的检测[J]. 中国食品学报, 2006, 19(5): 111-118

收稿日期:2018-10-19

were *Enterococcus faecium*. It showed that an abundant microbial resource in sufu, and *Enterococcus faecium* was the dominant lactic acid bacteria.

Key words: sufu; polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis (PCR–DGGE); Miseq high throughput sequencing; bacterial diversity; lactic acid bacteria

引文格式:

李娜,崔梦君,马佳佳,等.自然发酵腐乳中细菌多样性评价[J].食品研究与开发,2019,40(16):165–171

LI Na, CUI Mengjun, MA Jijia, et al. Evaluation of Bacterial Diversity in Natural Fermented Sufu[J]. Food Research and Development, 2019, 40(16): 165–171

腐乳,又称豆腐乳,是一种中国传统的大豆发酵食品,也是由微生物作用的代表性豆制品^[1]。根据加工方式不同,腐乳可分为细菌型腐乳、霉菌型腐乳、酶法发酵以及自然发酵腐乳^[2]。在腐乳自然发酵过程中,由于制作环境和人工因素等的影响,导致其蕴含的微生物的种类丰富多样,从而使腐乳具有别样风味。众多学者对腐乳中微生物群落构成进行了研究,其中程永强等^[3]在低温发酵腐乳中发现1株嗜低温的毛霉——黄色毛霉(*Mucor flavus*),同时姚翔等^[4]在益阳自然发酵腐乳中分离出总状毛霉(*Mucor racemosus*)和鲁氏毛霉(*Mucor roxianus*),而鲁菲等^[5]在青方腐乳中分离出植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和短小奇异菌,然而关于湖北地区腐乳微生物多样性的研究较少。

变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis, PCR–DGGE)技术是一种可以对微生物的群落结构及遗传多样性进行连续分析的技术^[6],同时具有重复性好、检测结果可靠以及应用范围广等优点^[7],目前应用于葡萄酒^[8]、香肠^[9]和奶酪^[10]等领域。Illumina Miseq 高通量测序技术可以从宏基因组层面对样品中的微生物多样性进行全方位且客观的分析评价,同时克服了传统微生物学手段耗时长、工作量大等缺点^[11],广泛应用于研究肠道菌群^[12]、发酵食品^[13]以及环境检测^[14]等方面。

本试验以恩施地区自然发酵腐乳为研究对象,利用PCR–DGGE结合Illumina Miseq高通量测序技术相结合的手段对腐乳中的微生物群落组成及多样性进行解析,同时利用传统微生物学方法分离鉴定腐乳中的乳酸菌。通过本研究的开展,可促进腐乳产业化生产,为大豆发酵食品领域提供一个重要的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品:采购于恩施市菜市场。

三羟甲基氨基甲烷(分析纯)、乙酸(分析纯)、乙二醇四乙酸(分析纯)、丙烯酰胺(分析纯)、甲叉双丙烯酰胺(分析纯)、去离子甲酰胺(分析纯)、(分析纯)、过硫酸铵(分析纯)、四甲基乙二(分析纯)、乙醇(分析纯)、冰醋酸(分析纯)、甲醛(分析纯)、硝酸银(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、MRS合成培养基:国药集团化学试剂有限公司;D5625–01 DNA提取试剂盒、DNA marker、PCR清洁试剂盒:北京科博汇智科技发展有限公司;2xPCR mix:南京诺唯赞生物科技有限公司;rTaq、dNTP mix、pMD18–T vector:大连宝生物技术有限公司;正向引物338F(加入7个核苷酸标签 barcodes)和反向引物806R、PCR引物合成和测序:武汉天一辉远生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

VeritiTM 96–well thermal cycler PCR仪、NanoDrop 2000/2000c:美国Thermo Fisher公司;DCodeTM System:美国Bio Red公司;DYY–12电泳仪:北京六一仪器厂;Miseq PE300高通量测序平台:美国Illumina公司;R920机架式服务器:美国DELL公司;CT15RE冷冻离心机:日本HITACHI公司;Bio–5000 plus扫描仪:上海中晶科技有限公司;Whitley DG250厌氧工作站:英国DWS公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品宏基因组提取与检测

采用试剂盒方法提取腐乳样品中的宏基因组,用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳检测,测定各样品宏基因组DNA浓度。

1.3.2 PCR–DGGE

将宏基因组DNA浓度调整为一致后作为模板细菌16S rRNA V3区域基因片段PCR扩增。采用25 μL体系进行PCR扩增:10xPCR Buffer(含Mg²⁺)2.5 μL, dNTP 2 μL,上下游引物各0.5 μL, rTaq 0.5 μL,模板1 μL,灭菌超纯水补充至25 μL。其中上游引物为

ALL-GC-V3F (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGCCCCGGGGCACCGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 下游引物为 ALL-V3R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。扩增程序:95℃ 4 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环, 72℃ 10 min。扩增结束后, PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

采用 8% 的聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=38.93:1.07, 质量比)、变性范围为 35%~52% (100% 变性剂:尿素 42 g, 去离子甲酰胺 40 mL) 的凝胶进行分析。将凝胶置于温度为 60℃ 的 0.5×TAE 电泳缓冲液中, 于每个胶孔点样 10 μL, 先电压 120 V, 持续 80 min 后, 电压 80 V, 持续 13 h。电泳结束后, 采用硝酸银法染色, 使用扫描仪对电泳图进行观察拍照, 找出各泳道优势条带并切胶, 将胶块捣碎于 50 μL 无菌超纯水中, 4℃ 静置过夜。用不含 GC 夹的引物(ALL-V3F 和 ALL-V3R) 将回收胶块进行 PCR 扩增, 扩增体系及条件同 DGGE 扩增。用清洁试剂盒纯化 PCR 产物, 并与载体(PMD18-T) 连接后转化到感受态细胞中进行克隆培养, 筛选阳性克隆进行测序。使用 BioEdit 软件将去除载体序列后在 NCBI 中进行同源性比对。

1.3.4 样品细菌 16S rRNA PCR 扩增及 Miseq 高通量测序

参考王玉荣等^[15]方法进行样品细菌 16S rRNA PCR 扩增及 Miseq 高通量测序。采用 20 μL 扩增体系:5×PCR 缓冲液 4 μL, dNTP mix 2 μL, 上游引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和下游引物 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 各 0.8 μL, rTaq 酶 0.4 μL, 模板 10 ng, 灭菌超纯水补充至 20 μL。扩增条件为:95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共运行 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。扩增结束后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 合格后进行高通量测序。

1.3.5 序列拼接及质量控制

参照于丹等^[16]和陈泽斌等^[17]的方法, 在除去不合格序列、barcode 序列和引物序列的基础上, 将数据序列进行拼接。同时利用 PyNAST 软件将所有的序列对齐, 采用 UCLUST 算法将相似度>97% 序列划分为一个操作单元(operational taxonomic units, OTU), 从而进行物种鉴定和相对含量分析, 对腐乳中的微生物多样性进行解析。

1.3.6 腐乳中乳酸菌的分离与鉴定

腐乳样品中乳酸菌的分离采用倍比稀释涂布法。将各样品稀释液涂布于改良 MRS 固体培养基(含 1.5%

CaCO₃) 上, 置于 37℃ 厌氧培养 48 h, 挑选具有不同特征且透明圈现象明显的菌落划线纯化。纯化后的菌株进行革兰氏染色镜检、过氧化氢试验及冻存。参考文献[18] 提取各菌株 DNA, 并参照张晓辉等^[19]方法使用通用正向引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和反向引物 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR 扩增和测序。测序结果分析同 1.3.3。

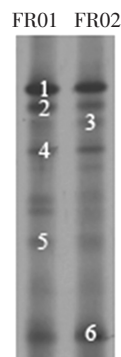
1.4 数据处理

通过 Origin 8.5 软件对 DGGE 图谱特征条带序列进行统计, 同时对样品的稀释曲线及香农指数曲线(shannon diversity index curve) 的作图。系统发育树由 BioEdit 软件和 MEGA 5.0 软件共同绘制。使用 Office 2016 绘制平均相对含量>5% 的属水平饼图。Venn 图由在线绘图网页(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 进行绘制。相对含量>1.5% 的核心 OTU 热图由 Matlab 2010b 绘制。

2 结果与分析

2.1 腐乳中细菌 DGGE 图谱及分析

本研究首先使用变性梯度凝胶电泳技术对样品 16S rRNA V3 区域细菌群落组成进行研究, 如图 1 所示。



FR01, FR02: 腐乳样品名称; 1~6: DGGE 胶上条带编号。

图 1 腐乳细菌 PCR-DGGE 图谱

Fig.1 PCR-DGGE analysis of bacteria in sufu

由图 1 可知, 图谱中共出现 6 条明亮的条带, 同时条带 1、2、4、5 和 6 是两个样品的共有条带, 说明不同腐乳样品中存在一些共有的细菌种群, 其中条带 1 最亮且存在于两个样品中, 说明此条带所对应的细菌在腐乳中发挥着重要的作用。值得一提的是各条带亮度不同, 条带 2 和条带 5 在 FR01 中亮度较高, 条带 6 在 FR02 中亮度较高, 表明在细菌种群丰富度存在差异。而条带 3 仅存在 FR02 样品中, 说明不同腐乳样品中存在着不同的细菌菌群。进一步将各条带进行序列分析, 结果如表 1 所示。

表1 腐乳细菌 DGGE 比对结果

Table 1 Blast results of bacteria DGGE in sufu

菌株编号	近源种	相似度	登录号
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	MH544641.1
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	MH544641.1
3	<i>Halobacillus karajiensis</i>	100	AJ486874.2
4	<i>Acinetobacter oryzae</i>	100	MH071139.1
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	LS483372.1
6	<i>Tetragenococcus halophilus</i>	99	NR115655.1

由表1可知,各条带序列与数据库中16S rRNA序列均具有较高的相似度。其中条带1和2为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),条带3为嗜盐芽孢杆菌属细菌(*Halobacillus karajiensis*),条带4为不动杆菌属细菌(*Acinetobacter oryzae*),条带5为荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*),条带6为嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)。由此可知,腐乳样品中微

生物构成具有多样性,而且隶属于乳杆菌属(*Lactobacillus*)的植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为优势细菌。陈颖慧^[20]利用PCR-DGGE技术对4种不同品牌腐乳中的细菌多样性进行了研究,结果发现乳酸菌属、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)和屎肠球菌(*Enterococcus Faecium*)在各腐乳样品中均存在,进一步发现乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)为优势细菌。陈浩等^[21]利用构建16S rRNA基因文库的方法对豆酱样品进行研究,结果发现嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)为优势细菌,同时不动杆菌(*Acinetobacter baylyi*)也被检测到存在于样品中。王夫杰等^[22]在青方腐乳中分离出植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)等乳酸菌。这与上述结论相一致。

本研究进一步将各条带序列与模式菌株序列进行系统发育树的构建,结果图2所示。

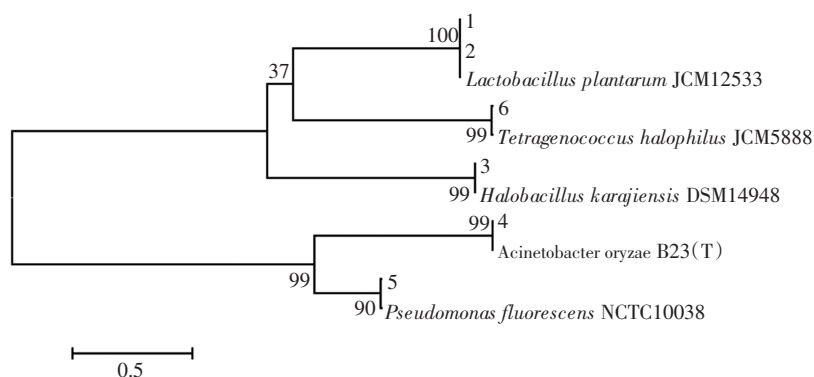


图2 腐乳中细菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of bacteria in sufu

由图2可知,系统发育树被分为2大分支,其中条带1和2与*Lactobacillus plantarum*聚为一类,条带6与*Tetragenococcus halophilus*聚为一类,条带3与*Halobacillus karajiensis*聚为一类。而条带4和条带5聚集在另外一支上,其中条带4和*Acinetobacter oryzae*聚为一类,条带5和*Pseudomonas fluorescens*聚为一类。由此可知,不同腐乳样品中细菌群落构成存在一定的差异性。

2.2 序列丰富度及多样性分析

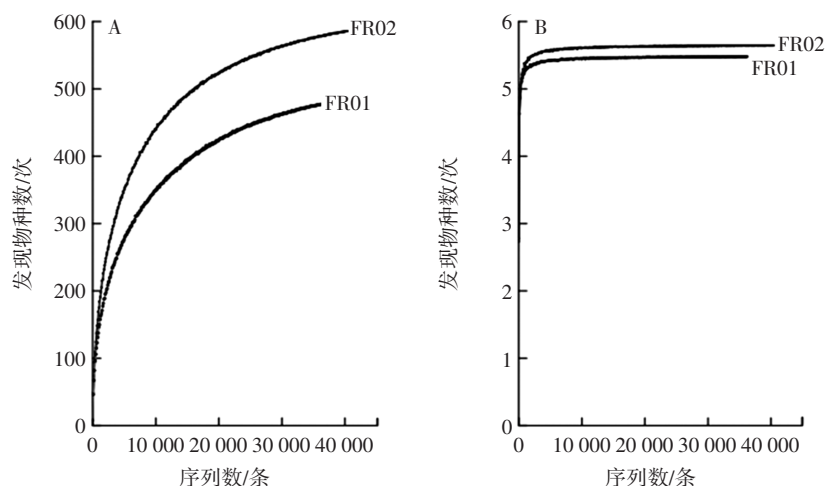
通过Miseq高通量测序发现,两个样品共产生78 412条高质量16S rRNA序列。本研究采用两步UCLUST算法分别以100%和97%的相似度进行序列划分并建立OTU,首先根据100%相似度进行序列划分得到33 254条序列,根据97%相似度进行OTU划分后得到2 317个OTU,平均每个样品1 158个OTU。当样品测序量为36 219条序列时,FR02样品具有最

大的细菌物种丰富度同时细菌多样性最高,其Chao 1指数为611,Shannon指数为5.64。进一步通过稀疏曲线和香农指数曲线图对各样品产生的数据量来判定是否满足后续生物信息学分析,其结果如图3所示。

由图3A可知,随着测序量不断的增加,各样品被发现OTU的数量也随之增加,而由图3B可知,当序列数达到10 000条时,各样品的香农多样性曲线已处于饱和状态,由此可知随着测序序列数的增加,尽管会有新的细菌种系型出现,但其多样性不再发生变化,可以反映样品中绝大多数微生物物种信息。因而本研究中每个样品产生的序列数是可以将样品中细菌微生物多样性表现出来,同时可以满足后续生物信息学分析需求。

2.3 基于不同分类地位腐乳样品核心细菌菌群相对含量分析

纳入本研究的序列被鉴定为14个门,24个纲,53个



FR01, FR02: 腐乳样品名称; A 稀疏曲线图; B 香农指数曲线图。

图3 稀疏曲线图和香农指数曲线图

Fig.3 Rarefaction curve and Shannon diversity index curve

目, 84 个科, 145 个属, 其中只有 5.3 % 的序列不能鉴定到属水平。研究发现腐乳样品中平均相对含量 >1 % 的细菌门为变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和硬壁菌门 (Firmicutes), 其含量分别为 80.45 %、10.7 % 和 6.81 %。同时在 2 个样品中隶属于变形菌门 (Proteobacteria) 的细菌相对含量分别为

77.29 % 和 83.61 %, 隶属于拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的细菌相对含量为 17.19 % 和 4.22 %, 而隶属于硬壁菌门 (Firmicutes) 的细菌相对平均含量为 3.76 % 和 9.87 %。由此可知, 在门水平上各样品中的微生物存在差异, 本试验进一步对各样品在属水平上进行分析, 如图 4 所示。

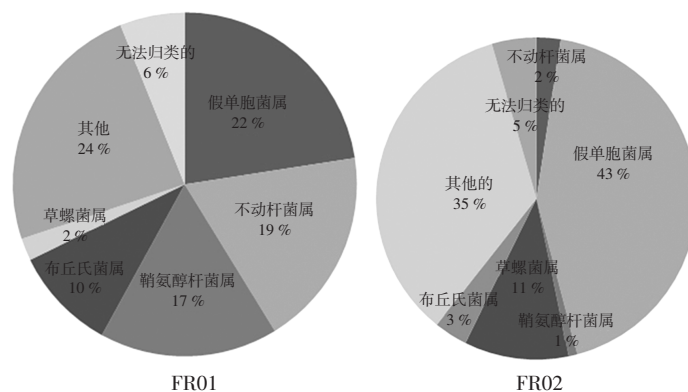


图4 腐乳中优势细菌属平均相对含量比较分析

Fig.4 Comparative analysis the dominant bacterial genera with average relative abundance in sufu

由图 4 可知, 腐乳样品中平均相对含量 >5 % 的细菌属包括绿脓杆菌属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*)、布丘氏菌属 (*Buttiauxella*) 和草螺菌属 (*Herbaspirillum*), 其平均相对含量分别为 33 %、10.56 %、8.82 %、6.57 % 和 6.32 %。然而各细菌属在 2 个样品中的相对含量均存在很大差异, 其中绿脓杆菌属 (*Pseudomonas*) 的相对含量分别为 22.56 % 和 43.46 %, 同时不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 的相对含量分别为 18.68 % 和 2.43 %, 鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*) 的相对含量分别为

16.77 % 和 0.88 %, 这与 PCR-DGGE 结果相一致。刘亚栋^[23]利用 16S rDNA 测序的方法对腐乳中的微生物多样性进行鉴定分析, 结果发现变形菌门 (*Proteobacteria*)、硬壁菌门 (*Firmicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 为腐乳样品中的优势细菌门, 进一步分析发现四联球菌属 (*Tetragenococcus*)、盐单胞菌属 (*Halanaerobium*)、*Rummeliibacillus* 属和乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 均为腐乳汇样品中的优势属, 这与本文结论一致。

本试验进一步统计了 OTU 在两个样品中出现次数,如图 5 所示。

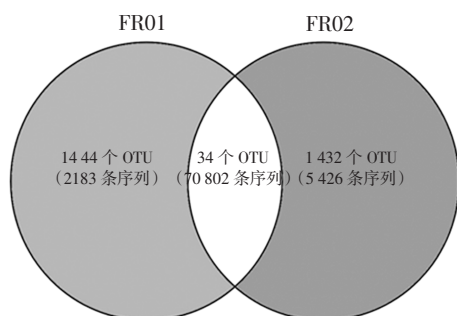


图 5 基于 OTU 水平的 Venn 图
Fig.5 Venn diagram based on OTU level

由图 5 可知,在两个腐乳样品中出现 1 次的 OTU 数量分别为 1 144 个和 1 432 个,分别占 OTU 总数的 43.8 %和 54.9 %,序列数分别为 2 183 条和 5 426 条。同时核心 OTU 共有 34 个,占 OTU 总数的 1.3 %,包含 70 802 条序列。进一步分析发现有 9 个核心 OTU 的相对含量>1.5 %,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,OTU874 和 OTU1711 隶属于绿脓杆菌属(*Pseudomonas*),OTU1671 和 OTU894 隶属于不动杆菌属(*Acinetobacter*),OTU577 隶属于沙雷菌属(*Serratia*),OTU1973 隶属于短波单胞菌属(*Brevundimonas*),OTU1907 隶属于草螺菌属(*Herbaspirillum*),OTU635 隶属于鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*),而

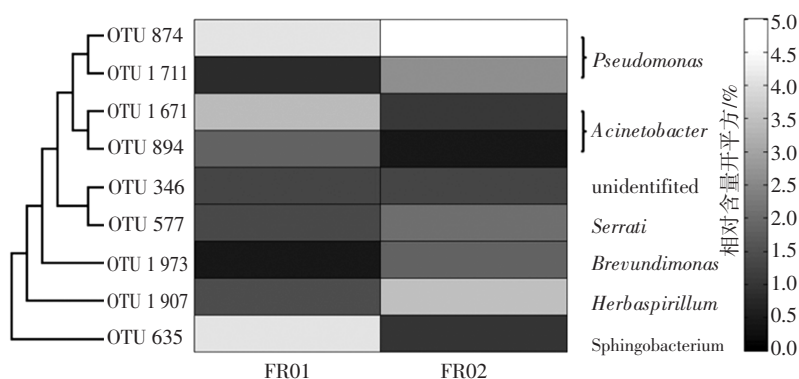


图 6 相对含量>1.5 %的核心 OTU 热图

Fig.6 Heat map of the relative abundance more than 1.5 % of cores OTUs

OTU346 未鉴定在属水平,只鉴定在 *Enterobacteriaceae*。同时由图 6 可以发现,OTU874、OTU635 和 OTU1671 在 FR01 中含量较高,其相对含量分别为 16.89 %、16.73 %和 11.32 %,同时 OTU874 和 OTU1907 在 FR02 中含量较高,其相对含量分别为

28.56 %和 11.85 %。

2.4 腐乳中乳酸菌分离鉴定结果及系统发育分析

通过传统微生物培养手段结合 16S rDNA 测序方法对腐乳样品中的乳酸菌进行分离与鉴定,其鉴定结果和数据库中模式菌的系统发育树如图 7 所示。

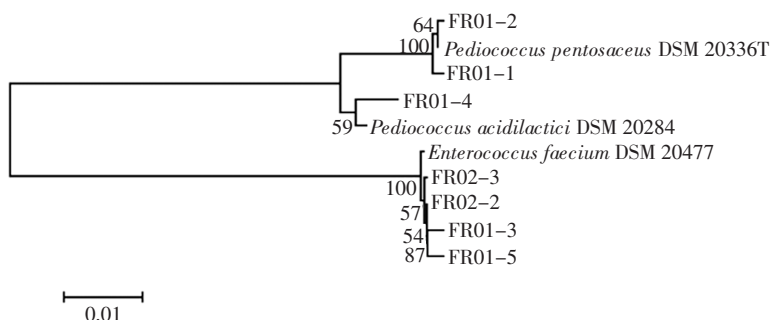


图 7 腐乳中乳酸菌系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree of *Lactobacillus* in sufu

由图 7 可知,在腐乳样品中共分离出 7 株乳酸菌,其中 2 株为戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*),1 株为乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*),4 株为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。由此可知,腐乳中乳酸菌

种类具有多样性。

3 结论

本文使用 PCR-DGGE 技术和 Illumina Miseq 第二

代高通量测序技术相结合的手段对恩施地区腐乳中的微生物群落组成及多样性进行解析,同时利用传统纯培养的方法对其乳酸菌资源进行发掘。结果表明:隶属于变形菌门的绿脓杆菌属、不动杆菌属、鞘氨醇杆菌属、布丘氏菌属和草螺菌属为腐乳样品中的优势细菌属,同时 PCR-DGGE 技术与传统微生物培养方法显示腐乳中的微生物资源较为丰富且具有多样性。通过本研究的开展,可为传统大豆发酵食品提供优秀的菌种资源,同时更好地促进其产业化生产。

参考文献:

- [1] 梁彦君. 传统发酵豆制品中微生物的发掘和利用[J]. 民营科技, 2018(3): 33
- [2] 李大鹏, 卢红梅. 微生物在腐乳生产中作用的研究进展[J]. 中国酿造, 2011(8): 13-16
- [3] 程永强, 王晓辉, 呼晴, 等. 低温发酵腐乳生产菌的微生物鉴定[J]. 食品科技, 2009, 34(5): 2-5
- [4] 姚翔, 邓放明, 陆宁. 自然发霉条件下腐乳醅中优势微生物的分离与初步鉴定[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 209-211
- [5] 鲁菲, 张京生, 刘子鹏, 等. 青方腐乳中乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 38-41
- [6] Chahorm K, Prakitchaiwattana C. Application of Reverse Transcriptase-PCR-DGGE as a rapid method for routine determination of *Vibrio* spp. in foods[J]. International journal of food microbiology, 2018, 264: 46-52
- [7] 王俊刚, 李开雄, 卢士玲. PCR-DGGE 技术在食品微生物中应用的研究进展[J]. 肉类研究, 2009(6): 59-62
- [8] Escribano-Viana R, López-Alfaro I, López R, et al. Impact of Chemical and Biological Fungicides Applied to Grapevine on Grape Biofilm, Must, and Wine Microbial Diversity[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 59
- [9] Montanari C, Gatto V, Torriani S, et al. Effects of the diameter on physico-chemical, microbiological and volatile profile in dry fermented sausages produced with two different starter cultures [J]. Food bioscience, 2018, 22: 9-18
- [10] de Freitas Martins M C, de Freitas R, Deuvaux J C, et al. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons[J]. Food Research International, 2018, 108: 295-300
- [11] Xie G, Lan W, Gao Q, et al. Microbial community structure in fermentation process of Shaoxing rice wine by Illumina-based metagenomic sequencing[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2013, 93(12): 3121-3125
- [12] Kassam F, Gurry T, Aldarmaki A, et al. Sa1841-The Impact of the Gut Microbiome in Developing Uveitis Among Inflammatory Bowel Disease Patients: A Case-Control Study[J]. Gastroenterology, 2018, 154(6): S-415
- [13] Sun X, Lyu G, Luan Y, et al. Analyses of microbial community of naturally homemade soybean pastes in Liaoning Province of China by Illumina Miseq Sequencing[J]. Food Research International, 2018, 111: 50-57
- [14] Zhu J, Chen L, Zhang Y, et al. Revealing the anaerobic acclimation of microbial community in a membrane bioreactor for coking wastewater treatment by Illumina Miseq sequencing[J]. Journal of Environmental Sciences, 2018, 64: 139-148
- [15] 王玉荣, 孙永坤, 代凯文, 等. 基于单分子实时测序技术的 3 个当阳鲜广椒样品细菌多样性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 108-118
- [16] 余丹, 毛娉, 宋硕, 等. 基于高通量测序的传统甜面酱自然发酵过程中的微生物群落结构及其动态演替[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1061-1072
- [17] 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
- [18] Soares S, Amaral J S, Oliveira M B P P, et al. Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification[J]. Food control, 2015, 48(2): 130-136
- [19] 张晓辉, 杨靖鹏, 王少军, 等. 浆水中细菌多样性分析及乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 70-76
- [20] 陈颖慧. PCR-DGGE 分析不同品牌腐乳中细菌的多样性[J]. 中国调味品, 2017, 42(7): 29-32
- [21] 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, 32(9): 230-232
- [22] 王夫杰, 鲁绯, 渠岩, 等. 腐乳中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国调味品, 2010, 35(7): 98-101
- [23] 刘亚栋. 利用 16S rDNA 测序的方法鉴定腐乳中微生物的种类多样性[D]. 济南: 山东师范大学, 2017

收稿日期: 2018-10-23