

PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群的动态变化

朱海针¹, 谢卫华^{2#}, 龙 凯², 苏明声¹, 王立元^{3*}, 谢小梅^{1*}

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

3. 江西中医药大学基础医学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 采用PCR-变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术研究淡豆豉 *Sojae Semen Praeparatum* 炮制过程中微生物菌群的动态变化, 为揭示其炮制机制奠定基础。方法 运用PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制不同时间的样本中细菌、真菌菌群种类和数量的动态变化, 通过非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)聚类分析各炮制时间点的菌系差异。结果 发酵至“黄衣上遍”过程中细菌种类丰富, 真菌以曲霉菌为主; 再闷过程中细菌以乳杆菌为主, 真菌以隐球菌为主。发酵第1天恶臭假单胞菌、枯草芽孢杆菌占优势; 发酵第3天嗜麦芽寡养单胞菌、鞘氨醇杆菌属和米曲霉为优势菌种; 发酵第6天解淀粉芽孢杆菌、曲霉菌和丝孢酵母为优势菌种; 再闷第3天以枯草芽孢杆菌、丝孢酵母和黑曲霉占优势; 再闷第9天以枯草芽孢杆菌、那须乳杆菌、弧形乳杆菌和隐球菌为优势菌株; 再闷第15天以枯草芽孢杆菌、弧形乳杆菌、隐球菌、丝孢酵母属和2株不可培养真菌为优势菌。整个炮制过程中, 产酸克雷伯氏菌、枯草芽孢杆菌、弧形乳杆菌作为优势菌种始终参与。“黄衣上遍”阶段与再闷阶段的微生物群落结构差异大。发酵第3天与第6天的细菌、真菌群落结构相似度最高, 分别达76.4%和66.1%; 而发酵第3、6天与再闷第9天的细菌群落结构相似度均最低, 仅为24.5%, 发酵第3天与再闷第15天真菌群落结构相似度最低, 仅11.2%。结论 炮制过程中微生物群落结构的动态变化和独特的微生物种类可能决定了淡豆豉特有的性味、功能, 同时也从微生物学角度印证了再闷的重要性。

关键词: 淡豆豉; PCR-变性梯度凝胶电泳; 菌群; 优势菌种; 非加权组平均法; 产酸克雷伯氏菌; 枯草芽孢杆菌; 弧形乳杆菌; 再闷

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)09-1757-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.010

Study on dynamic changing regularity of microflora in fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* by PCR-DGGE

ZHU Hai-zhen¹, XIE Wei-hua², LONG Kai², SU Ming-sheng¹, WANG Li-yuan³, XIE Xiao-mei¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. School of Basic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To reveal the dynamic changing regularity of microflora in the fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum* (SSP) and lay the foundation for revealing the mechanism of SSP processing by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Methods** The dynamic changes of microflora, both bacteria and fungi in fermentation process were monitored by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. According to the unweighted pair group method using arithmetic average clustering, the samples of SSP in various stages were analyzed. **Results** Bacterial flora had diversity, and *Aspergillus* was the major fungus in the

收稿日期: 2016-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660664); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ13615); 江西省卫生和计划生育委员会中医药科研项目(2015B044); 江西中医药大学校级课题(2014BS020)

作者简介: 朱海针(1988—), 女, 硕士研究生, 从事中西医结合基础研究。Tel: (0791)87118707 E-mail: 704672457@qq.com

*通信作者 谢小梅(1964—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事微生物学研究。Tel: (0791)87118707 E-mail: jxxm1964@sina.com

王立元(1983—), 男, 博士, 讲师, 从事微生物学研究。Tel: (0791)87118931 E-mail: jtemwangly1983@sina.com

#并列第一作者 谢卫华(1977—), 男, 硕士, 副教授, 主要从事中药学研究。Tel: (0791)87118911 E-mail: 306194111@qq.com

first stage called “yellow cladding”. The major bacteria was *Lactobacillus*, while the major fungus was *Cryptococcus* at the “secondary fermentation” stage. The major microorganism was *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* on day 1, and *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingobacterium* sp, and *A. oryzae* on day 3. Then on day 6, *B. amyloliquefaciens*, *Aspergillus*, and *Trichosporon ovoides* became the primary microorganisms. *B. subtilis*, *T. ovoides*, and *A. niger* were the major microorganism on day 3 of “secondary fermentation”. On day 9 of this stage, the major strains were *B. subtilis*, *L. concavus*, *L. nasuensis*, and *Cryptococcus randhawi*. On day 15 of “secondary fermentation”, they were *B. subtilis*, *L. concavus*, *C. randhawi*, *Trichosporon*, and two fungi cannot be cultured. *Klebsiella oxytoca*, *B. subtilis*, and *L. concavus* were dominant strains in the whole fermentation process. The composition of microflora in “yellow cladding” stage was different to that of the “secondary fermentation”. The microbial community on day 3 and 6 was similar to 76.4%. While the lowest similarity between the samples on day 3 and 9, it was similar to 24.5% during samples on day 6 and 9 in “secondary fermentation” stage. The highest similarity of fungal composition was between day 3 and 6 samples, and the lowest one was between day 3 and 15 of “secondary fermentation”, which was similar to 11.2% only. **Conclusion** The results show that the unique flavor and function of SSP may be determined by the dynamic microbial communities and microbial flora in the fermentation process, and the secondary fermentation is proved to be irreplaceable from the microbiological point of view.

Key words: *Sojae Semen Praeparatum*; PCR-DGGE; microflora; dominant strain; UPGMA; *Klebsiella oxytoca*; *Bacillus subtilis*; *Lactobacillus concavus*; secondary fermentation

淡豆豉 *Sojae Semen Praeparatum* 为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子的发酵炮制品, 以黑色种皮品系大豆为主要原料, 桑叶 *Mori Folium*、青蒿 *Artemisiae Annuae Herba* 等药材配以其中经发酵炮制而成; 具有解表、除烦、宣发郁热等功能, 用于感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠等症^[1]。淡豆豉炮制是自然发酵过程。存在于空气、原料、加工器具等环境中的多种微生物参与了淡豆豉的炮制, 在淡豆豉独特的炮制工艺(发酵方式、发酵条件、辅料等因素)影响下, 将形成淡豆豉炮制中特有的复杂微生物体系^[2-3]。然而, 迄今对淡豆豉炮制中起决定作用的微生物的研究极少, 仅有 5 篇文献(其中 2 篇为本课题组发表)报道用传统微生物学方法对参与淡豆豉炮制的菌种进行了分离鉴定^[4-8]。

因技术限制, 传统微生物学方法无法满足分析淡豆豉中复杂微生物体系的需要, 需借助现代分子生物学技术对淡豆豉炮制过程中丰富的微生物群落进行深入解析。PCR-变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是一种直接利用 DNA 或 RNA 对微生物组成的遗传特性进行表征的分子生物学技术, 避免了耗时的传统菌种分离, 并可以鉴定出传统方法无法分离培养的菌种, 能够快速、准确地进行复杂微生物区系菌群结构演替和多样性分析^[9-10]。因此, 本实验首次运用 PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群种类和数量的动态变化, 为揭示淡豆豉的炮制机制奠定基础。

1 仪器与材料

Mastercycler gradient PCR 仪, Eppendorf 公司;

Dcode 突变检测系统, Bio-Rad 公司; MILLI-Q 超纯水仪, Millipore 公司; I-16K 高速低温离心机, Sigma 公司。

DM2000 Marker, 北京康为世纪生物科技有限公司; PCR 引物, 上海生工生物工程技术有限公司; 琼脂糖, Invitrogen 公司; 尿酸、过硫酸胺、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), Solaribio 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、2 $\times$ Taq PCR master Mix, 天根生化科技(北京)有限公司; PEASY-T3 Cloning Kit, 北京全式金生物技术有限公司; 十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、核糖核酸酶 A(Ribonuclease A, RNase A)、溶菌酶, 北京索莱宝科技有限公司; 去离子甲酰胺、二甲基甲酰胺, Biotopped 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺, Amresco 公司; 硝酸银、酚、氯仿、异戊醇、乙酸钠、异丙醇等常用生化试剂, 上海申试化工工贸公司。

黑大豆、桑叶、青蒿均购自安国冷背药材有限公司, 由江西中医药大学附属医院杨安金主任中药师鉴定, 分别为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子, 桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分。

2 方法

2.1 样品制备

按本实验室前期已建立的规范炮制工艺^[11]制备淡豆豉, 获得不同炮制时间点样品。简述如下: 取桑叶 90 g、青蒿 100 g, 分次加入生药量 18 倍水煎煮 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并 3 次滤液, 药液浓

缩至1 000 mL,将洗净的黑大豆1 000 g拌入药液中,待煎液吸尽,蒸煮后平铺竹编中,药渣覆盖,置温度 $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、湿度70%的培养箱内发酵6 d至豆粒表面均匀布满黄衣(称“黄衣上遍”,此过程在发酵第1、3、6天取样)。洗去黄衣,置于陶瓷容器中,置温度为 $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 的培养箱再闷15 d,再闷期间每3天倒出,翻动(此过程在再闷第3、9、15天取样),至充分发酵,香气溢出时取出,最后蒸0.5~1.0 h,晒干,即为淡豆豉成品。各样品尽快置于 -80°C 保存,于1个月内进行微生物总DNA提取。

2.2 淡豆豉中微生物总DNA的提取

称取5 g淡豆豉样品置于灭菌小锥形瓶中,加入45 mL灭菌生理盐水振荡,离心,吸取上清;8 000 r/min离心10 min,收集沉淀;加入无菌磷酸盐缓冲液(PBS),离心,弃上清,反复3遍,得菌体沉淀。加入细胞裂解液充分悬浮,置液氮中凝固后,迅速放入 65°C 水浴融化,反复冻融5次;将离心管置于 37°C 水浴10 min;加10% SDS溶液30 μL 和50 mg/mL溶菌酶30 μL , 37°C 水浴30 min,加等体积的苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1),冰上放置8 min,12 000 r/min,离心3 min,重复抽提2次;上清液中加入0.1倍体积乙酸钠和0.8倍体积异丙醇,轻轻混匀, -20°C 沉淀30 min,12 000 r/min离心5 min,收集核酸沉淀,用冷70%乙醇洗涤沉淀,DNA沉淀干燥后溶于TE缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)100 μL 中,加入终质量浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A溶液并在 37°C 下水浴消化2 h,以去除RNA,置 -20°C 冰箱保存备用。

2.3 细菌16 S rDNA与真菌18 S rDNA基因的PCR扩增

在引物一端加入GC夹(CGCCCGCCGCGCC-CCGCGCCCGGCCCCGCCGCCCGCCCGCCCGG-CCCGCCCGCCCGGCCCCCTACGGGAGGCAGC-AG-3',R518:5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3';真菌使用18 S rDNA通用引物NS1/GC-Fung,NS1:5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3',GC-Fung:5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGGTTACCCGTTG-3'。

细菌使用降落式PCR程序(touchdown-PCR)。细菌PCR反应体系(50 μL):2 $\times$ Taq PCR master Mix

25 μL ,DNA模板2 μL ,上下游引物各1 μL ,补充ddH₂O至50 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,65~56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,20个循环,每个循环降0.5 $^{\circ}\text{C}$;72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,10个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。真菌PCR反应体系(50 μL):2 $\times$ Taq PCR master Mix 25 μL ,DNA模板4 μL ,上下游引物各1 μL ,补充ddH₂O至50 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,30个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

2.4 DGGE电泳

借鉴李挺等^[12]研究方法,采用Bio-Rad公司的Dcode突变检测系统对PCR产物进行电泳分离,将PCR产物加入到含梯度变性剂(尿素、甲酰胺)的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。使用8%的聚丙烯酰胺凝胶,细菌应用40%~60%变性梯度,真菌应用20%~40%变性梯度。先在电压75 V预电泳30 min,随后调节电压至100 V,电泳9 h。电泳结束后,进行硝酸银染色。

2.5 DGGE图谱分析

利用Quantity One软件对DGGE图谱进行条带识别、将DGGE图谱各泳道条带的相似性转化为相似性矩阵数据进行非加权组平均法^[13](unweighted pair-group method with arithmetic means,UPGMA)相似性聚类分析、条带相对定量分析。

2.6 DGGE胶回收和克隆测序鉴定

对DGGE图谱中特征性条带进行切胶回收,胶回收的条带最后进行一次无GC夹的PCR扩增。试剂盒纯化PCR产物,克隆,挑取克隆子,送华大基因测序。将测序结果在NCBI比对,下载NCBI比对后同源性最高的序列,用Clustalx1.83软件对所有序列进行重组,再用MEGA 5.0软件的邻位相连(neighbor-joining,NJ)法构建系统进化树鉴定菌种。

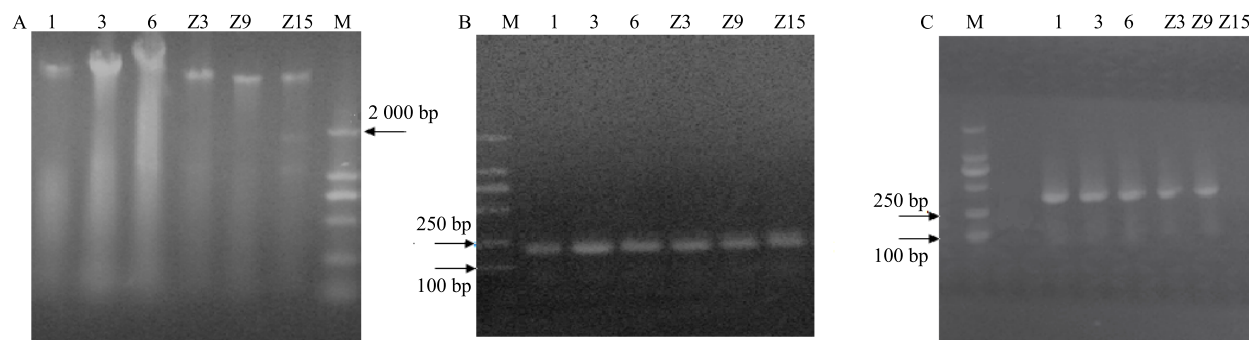
3 结果与分析

3.1 微生物总DNA提取结果

各样品中提取的微生物总DNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图1-A。液氮冻融法提取微生物DNA较好,发酵3、6 d条带较亮,可能是样品中微生物较多,DNA浓度较大。

3.2 细菌16 S rDNA和真菌18 S rDNA的PCR扩增结果

PCR扩增产物的电泳结果见图1-B、C。细菌PCR产物片段为230 bp,真菌PCR产物片段为350



泳道 1、3、6 为发酵第 1、3、6 天样品，Z3、Z9、Z15 为再闷第 3、9、15 天的样品，M-Marker

Lane 1, 3, 6 represents respectively the sample of first, the 3th and the 6th day of fermentation, while lane

Z3, Z9, Z15 represents respectively secondary fermentation for 3, 9, and 15 d, M-Marker

图 1 微生物总 DNA 电泳图谱 (A)、PCR 扩增 16 S rDNA (B) 和 18 S rDNA (C) 电泳图谱

Fig. 1 Microbial total DNA electrophoretogram (A), PCR product electrophoretogram of 16 S rDNA (B), and 18 S rDNA (C)

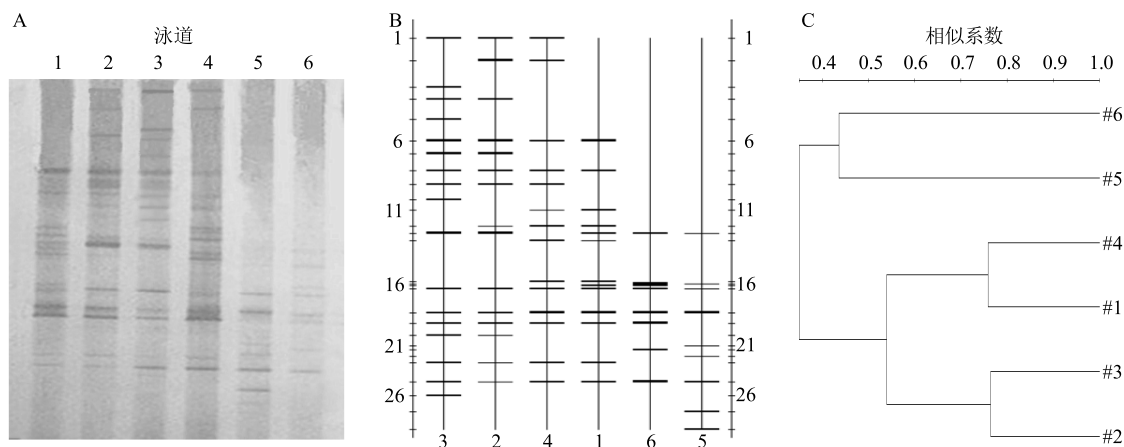
bp, 目的条带特异性良好, 适用于 DGGE 电泳。

3.3 DGGE 电泳结果与分析

3.3.1 细菌 DGGE 电泳结果与分析

(1) 细菌 DGGE 电泳结果: 将细菌 16 S rDNA 基因的 PCR 产物进行 DGGE 电泳, 得到细菌 DGGE 指纹图谱, 见图 2-A, 不同条带代表不同的细菌种类, 条带的亮度代表相对数量, 反映了淡豆豉炮制中不同时间点细菌群落结构的组成和演变过程。应用 Quantity One 软件获得条带识别型图, 见图 2-B。共检测出 29 条细菌条带, 不同泳道之间不仅条带数

量在变化, 条带位置也有差异, 表明淡豆豉炮制过程中细菌种类此消彼长。发酵第 1 天条带共 13 条, 亮度比其他发酵时间弱; 发酵第 3 天至第 6 天条带仍逐渐增多, 由 15 条增加到 17 条, 部分条带亮度增加; 再闷第 3 天条带减少为 14 条, 再闷第 9 天减少为 9 条, 最后淡豆豉成品仅剩 7 条条带, 且条带亮度弱。总体上看, 淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中, 细菌种类、数量逐渐增多, 而再闷过程细菌种类和数量又逐渐减少。UPGMA 相似性聚类分析结果见图 2-C, 更直观地显示出不同炮制时间的细



泳道 1~3 表示发酵第 1、3、6 天样品, 泳道 4~6 表示再闷第 3、9、15 天样品; #1~#3 表示发酵第 1、3、6 天样品, #4~#6 表示再闷第 3、9、15 天样品

Lane 1—3 represents respectively the sample of first, the 3th and the 6th day of fermentation, while lane 4—6 represents respectively secondary fermentation for 3, 9, and 15 d; #1—#3 represents respectively the sample of first, the 3th and the 6th day of fermentation, #4—#6 represents respectively secondary fermentation for 3, 9, and 15 d

图 2 细菌 16 S rDNA DGGE 图谱 (A)、不同发酵时间样品的 Quantity One 条带识别型图 (B) 和细菌多样性相似性聚类分析 (C)

Fig. 2 DGGE profiles of bacterial 16 S rDNA genes (A), lane image by Quantity One at different time of fermentation (B), and diversity similarity analysis of bacterial at different time of fermentation (C)

菌群落结构的相似性。发酵至“黄衣上遍”过程(#1、#2、#3)和再闷第3天(#4)细菌群落结构较为相似,而“黄衣上遍”过程(#1、#2、#3)和再闷后期(#5、#6)细菌群落结构差异较大。

(2) 细菌 DGGE 图谱显著性条带的回收、克隆测序和鉴定:将细菌 DGGE 图谱(图 2-A)中显著性条带进行切胶回收,再次 PCR 后进行克隆测序。经序列分析、相似性比对构建系统进化树。结果见表 1 和图 3。将测序结果结合图 2-A、B 分析可知,发酵第 1 天就存在恶臭假单胞菌、解淀粉芽孢杆菌、中生根瘤菌、芽孢杆菌、鞘氨醇杆菌属、巨大芽孢杆菌、产酸克雷伯菌、枯草芽孢杆菌、不可培养细菌、肠杆菌属和弧形乳杆菌等,其中恶臭假单胞菌、枯草芽孢杆菌所在的条带较亮,为优势菌种;发酵第 3 天增加了鲍氏不动杆菌、嗜麦芽寡养单胞菌、欧文氏菌、那须乳杆菌、节杆菌,而中生根瘤菌、巨大芽孢杆菌未检出,以恶臭假单胞菌、嗜麦芽寡

养单胞菌、鞘氨醇杆菌属、枯草芽孢杆菌为优势菌种;发酵第 6 天微生物种类最多,增加了酪黄肠球菌、粉尘肠杆菌、产酸克雷伯菌、苍白杆菌,以恶臭假单胞菌、嗜麦芽寡养单胞菌、鞘氨醇杆菌属、解淀粉芽孢杆菌为优势菌种。

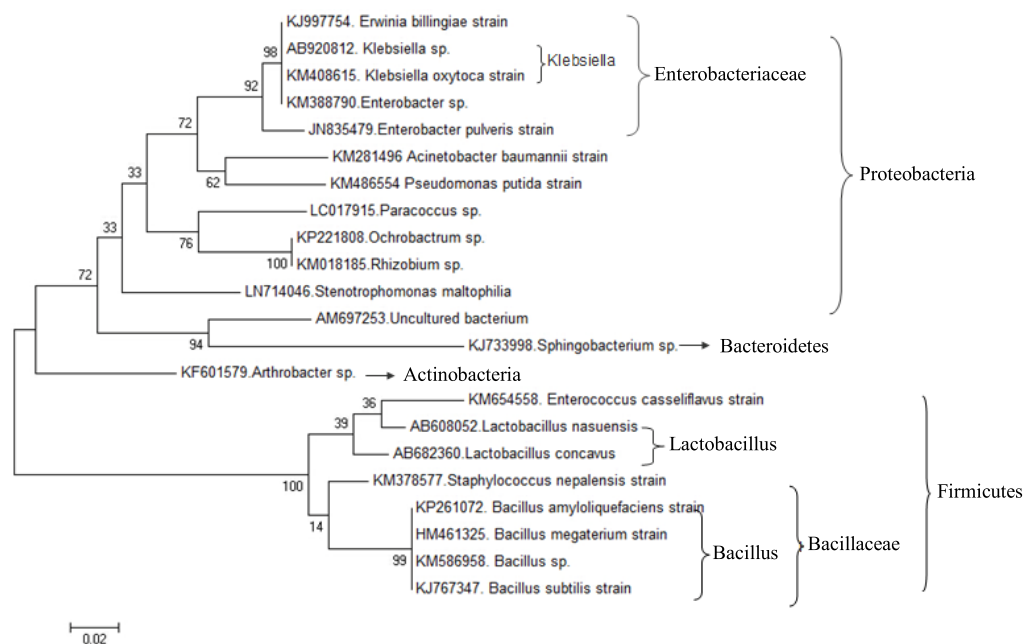
再闷第 3 天检测到中生根瘤菌、巨大芽孢杆菌,而酪黄肠球菌、鲍氏不动杆菌、嗜麦芽寡养单胞菌、粉尘肠杆菌、鞘氨醇、杆菌属、节杆菌、苍白杆菌等未检出,主要以枯草芽孢杆菌为优势菌种。再闷第 9 天新增加了鞘氨醇杆菌属、副球菌、尼泊尔葡萄球菌、克雷伯菌等,多种细菌消失,以枯草芽孢杆菌和弧形乳杆菌为优势菌种;再闷第 15 天时尼泊尔葡萄球菌、微副球菌、克雷伯菌属消失,以枯草芽孢杆菌、那须乳杆菌和弧形乳杆菌为优势。

“黄衣上遍”阶段存在较多的恶臭假单胞菌、嗜麦芽寡养单胞菌、鞘氨醇杆菌,再闷阶段乳酸杆菌数量增多,成为再闷环节的优势菌种。整个炮制过

表 1 细菌 DGGE 主要条带测序结果

Table 1 Tentative identification of main DGGE bands of bacteria by sequencing

条带编号	片段大小/bp	相似菌名称	相似度/%	GenBank 编号
3	194	酪黄肠球菌 <i>Enterococcus casseliflavus</i>	100	KM654558
4	194	鲍氏不动杆菌 <i>Acinetobacter baumannii</i>	100	KM281496
6	193	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	100	KM486554
7	193	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	LN714046
8	194	解淀粉芽孢杆菌菌株 <i>Bacillus amyloliquefaciens strain</i>	100	KP261072
9	193	比林欧文菌 <i>Erwinia billingiae</i>	100	KJ997754
10	193	粉尘肠杆菌 <i>Enterobacter pulveris</i>	100	JN835479
11	168	根瘤菌属 <i>Rhizobium sp.</i>	100	KM018185
12	194	芽孢杆菌属 <i>Bacillus sp.</i>	100	KM586958
13	188	鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium sp.</i>	100	KJ733998
15	194	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	100	HM461325
16	193	那须乳杆菌 <i>Lactobacillus nasuensis</i>	95	AB608052
18	193	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	100	KM408615
19	194	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	100	KJ767347
20	193	不可培养细菌	100	AM697253
21	173	节杆菌属 <i>Arthrobacter sp.</i>	100	KF601579
22	168	副球菌属 <i>Paracoccus sp.</i>	100	LC017915
25	193	肠杆菌属 <i>Enterobacter sp.</i>	100	KM388790
26	198	弧形乳杆菌 <i>Lactobacillus concavus</i>	100	AB682360
27	168	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum sp.</i>	100	KP221808
28	193	尼泊尔葡萄球菌 <i>Staphylococcus nepalensis</i>	100	KM378577
29	193	克雷伯氏菌 <i>Klebsiella sp.</i>	100	AB920812



分枝结点数值表示 500 次 bootstrap 分析所支持的次数；比例尺 (0.02) 表示序列差异的分枝长度

The number of branch nodes indicates the result of 500 bootstrap analysis; The scale (0.02) represents the branch length of sequence difference

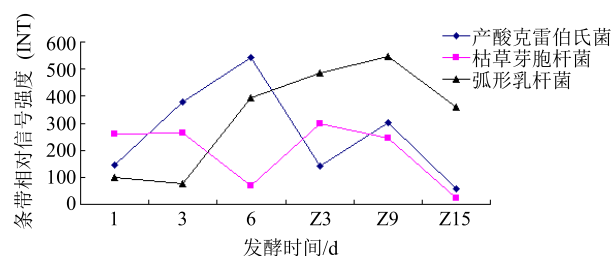
图 3 细菌 16S rDNA 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree generated from 16S rDNA gene of bacteria

程产酸克雷伯氏菌、枯草芽孢杆菌、弧形乳杆菌始终存在 (图 4)。

3.3.2 真菌 DGGE 电泳结果与分析

(1) 真菌 DGGE 电泳结果：将真菌 18S rDNA 基因的 PCR 产物进行 DGGE 电泳，得到真菌 DGGE 指纹图谱，见图 5-A、B，共检测出 19 条真菌条带。淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中，真菌种类、数量逐渐增多，再闷第 3 天时保留了部分真菌，同时新增加了 6 种真菌，经历再闷后的真菌种类和数量减少。UPGMA 相似性聚类分析 (图 5-C) 显示，



1、3、6 表示发酵第 1、3、6 天；Z3、Z9、Z15 表示再闷第 3、9、15 天
1, 3, 6 represents respectively the sample of the 1st, the 3th and the 6th day of fermentation; Z3, Z9, Z15 represents respectively secondary fermentation for 3, 9, and 15 d

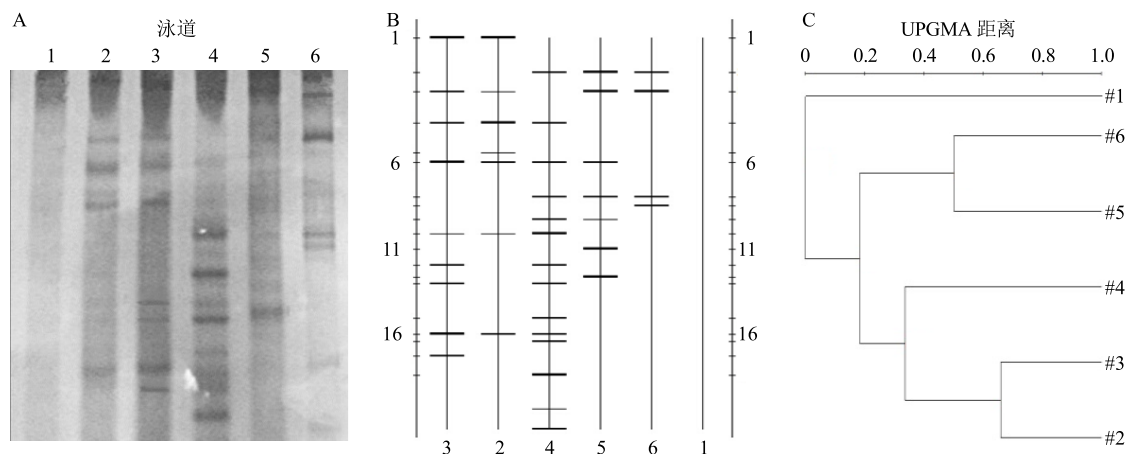
图 4 细菌 DGGE 图谱中优势菌株的相对数量分析

Fig. 4 Relative quantity analysis of dominant strains in bacteria DGGE

#2、#3 被聚在一起，#5、#6 被聚在一起，#2、#3、#4 被聚成大簇，说明发酵第 3 天和发酵第 6 天相似性较高，再闷第 9 天和再闷第 15 天相似性较高，而再闷第 3 天的真菌群落结构较接近于发酵第 6 天，整个炮制过程中“黄衣上遍”阶段与“再闷”阶段真菌群落结构差异较大。

(2) 真菌 DGGE 图谱显著性条带克隆测序、鉴定：将真菌 DGGE 图谱 (图 5-A) 中显著性条带进行切胶回收，再次 PCR 后克隆测序。经序列分析、相似性比对构建系统进化树。结果见表 2 和图 6。

发酵第 1 天没有真菌；第 3 天新增加了不可培养真菌、米曲霉、丝孢酵母、黑曲霉、曲霉菌，以米曲霉为优势菌种；第 6 天新增加了土曲霉、栓菌属、局限曲霉，以曲霉菌、卵形丝孢酵母为优势菌种；再闷第 3 天时真菌种类较为丰富，大部分保持原有的菌种，新增 1 株不可培养真菌和隐球菌，局限曲霉消失，以卵形丝孢酵母和黑曲霉为优势；再闷第 9 天真菌种类变少，米曲霉、黑曲霉、土曲霉、曲霉菌等消失；以兰德哈瓦隐球菌为优势菌种；再闷第 15 天只剩隐球菌、丝孢酵母属和 2 株不可培养真菌。发酵至“黄衣上遍”阶段的真菌以曲霉菌为主，米曲霉占主要优势，同时存在卵形丝孢酵母。再闷阶段主要以隐球菌和丝孢酵母为主 (图 7)。



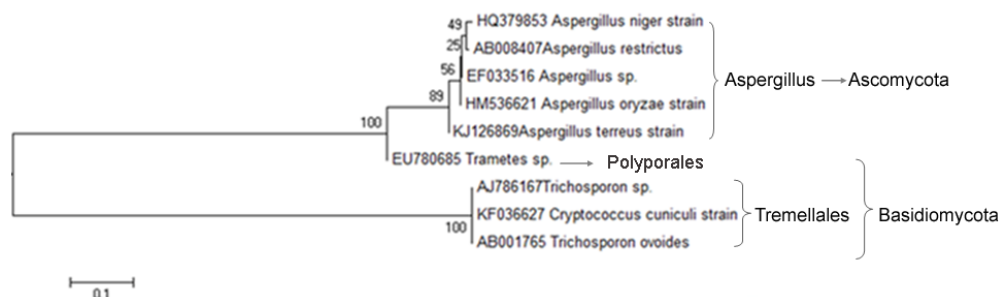
泳道 1~3 表示发酵第 1、3、6 天，泳道 4~6 表示再闷第 3、9、15 天；#1~#3 表示发酵第 1、3、6 天，#4~#6 表示再闷第 3、9、15 天
Lane 1—3 represents respectively the sample of first, the 3th and the 6th day of fermentation, while lane 4—6 represents respectively secondary fermentation for 3, 9, and 15 d; #1—#3 represents respectively the sample of first, the 3th and the 6th day of fermentation, #4—#6 represents respectively secondary fermentation for 3, 9, and 15 d

图 5 真菌 DGGE 图谱 (A)、不同发酵时间样品的 Quantity One 条带识别型图 (B) 和真菌多样性相似性聚类分析 (C)
Fig. 5 DGGE profiles of fungus (A), lane image by quantity one at different time of fermentation (B), and diversity similarity analysis of fungus at different time of fermentation (C)

表 2 真菌 DGGE 条带测序结果

Table 2 Tentative identification of main DGGE bands of fungus by sequencing

条带编号	条带大小/bp	相似菌名称	相似率/%	GenBank 编号
2	288	不可培养真菌	100	KJ879553
3	283	不可培养真菌	100	KJ879553
4	347	米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	100	HM536621
6	348	卵形丝孢酵母 <i>Trichosporon ovoides</i>	100	AB001765
7	210	兰德哈瓦隐球菌 <i>Cryptococcus randhawi</i>	100	KF036627
8	210	丝孢酵母属 <i>Trichosporon</i> sp.	100	AJ786167
10	347	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	98	HQ379853
12	347	土曲霉 <i>Aspergillus terreus</i>	99	KJ126869
14	351	栓菌属 <i>Trametes</i> sp.	99	EU780685
16	347	曲霉属 <i>Aspergillus</i> sp.	100	EF033516
18	205	局限曲霉 <i>Aspergillus restrictus</i>	96	AB008407

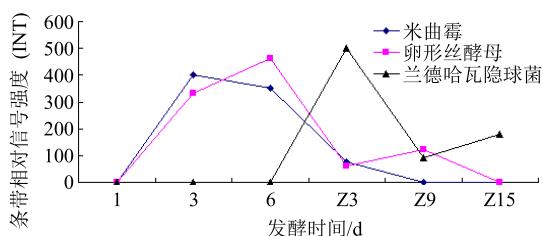


分枝结点数值表示 500 次 bootstrap 分析所支持的次数；比例尺 (0.02) 表示序列差异的分枝长度

The number of branch nodes indicates the result of 500 bootstrap analysis; The scale (0.02) represents the branch length of the sequence difference

图 6 真菌 18 S rDNA 基因的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree generated from 18 S rDNA gene of fungus



1、3、6 表示发酵第 1、3、6 天; Z3、Z9、Z15 表示再闷第 3、9、15 天
1, 3, 6 represents respectively the sample of first, the 3th and the 6th day of fermentation; Z3, Z9, Z15 represents respectively secondary fermentation for 3, 9, and 15 d

图 7 真菌 DGGE 图谱中优势菌株的相对数量分析

Fig. 7 Relative quantity analysis of dominant strains in fungus DGGE

4 讨论

淡豆豉炮制工艺独特, 历代本草和历版《中国药典》记载的制法中均包括“黄衣上遍”“再闷”环节^[1]。炮制过程中微生物的群落结构和变化决定了淡豆豉的性、味和功能。迄今, 对淡豆豉炮制过程中的微生物学研究极少。本实验首次运用 PCR-DGGE 技术研究了淡豆豉炮制过程中细菌和真菌的动态变化。发现了食用豆豉中并未报道的多种微生物, 这可能是淡豆豉发酵方式、辅料等与食用豆豉不同, 导致参与发酵的微生物不同, 使淡豆豉拥有其特有的性味和功效。

发酵第 1 天存在十多种微生物, 可能是黑大豆、桑叶、青蒿等原料中自带或是环境中带入。炮制过程中, 部分微生物不断生长繁殖成为优势菌种, 而有些微生物逐渐消失。炮制至“黄衣上遍”过程中菌群种类较多: 细菌以嗜麦芽寡养单胞菌、恶臭假单胞菌、鞘氨醇杆菌为主; 真菌以曲霉菌为主, 包括米曲霉、黑曲霉、土曲霉、局限曲霉, 米曲霉占优势, 同时存在丝孢酵母。

嗜麦芽寡养单胞菌^[14]广泛分布水、土壤及食物中, 具有高代谢能力, 但其在食品发酵中的作用未见报道。淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中嗜麦芽寡养单胞菌大量存在, 可能正是其高代谢能力使黑大豆及辅料快速降解, 启动整个发酵体系的形成。恶臭假单胞菌、鞘氨醇杆菌在淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中存在较多, 在淡豆豉炮制过程的作用有待研究。解淀粉芽孢杆菌在发酵第 1 天至再闷第 3 天一直稳定存在, 代谢产物丰富, 能产生蛋白酶、淀粉酶、凝乳酶等。

黑曲霉是淡豆豉发酵前期的优势菌种^[15], 在食

品发酵中较为多见, 同时是制酱、酿酒、制醋的主要菌种。黑曲霉分泌生产淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、柠檬酸等物质, 具有裂解大分子有机物和难溶无机物的作用。其代谢糖类产生大量的单糖和多糖, 可为再闷阶段酵母菌的生长繁殖提供充足营养。淡豆豉炮制后期兰德哈瓦隐球菌一直存在, 为再闷过程的优势真菌, 也是炮制最后主要剩余的菌种之一。

随着发酵强度增大和发酵体系温度升高, 多数耐热性差的细菌逐渐减少, 加之再闷阶段的无氧环境, 一些需氧菌如恶臭假单胞菌、鲍氏不动杆菌、苍白杆菌、中生根瘤菌等减少甚至消失, 而厌氧菌或兼性厌氧菌如副球菌、葡萄球菌、弧形乳杆菌和隐球菌等出现或增多, 导致细菌和真菌的群落结构在再闷第 3 天后发生显著变化。到炮制后期, 剩余的微生物较少, 至炮制结束时最后形成了一个相对稳定的微生物生态系统。

枯草芽孢杆菌、产酸克雷伯菌和弧形乳杆菌在整个发酵炮制过程一直存在。枯草芽孢杆菌作为淡豆豉炮制中常见的优势细菌^[4-5], 世界公认其安全性。其分泌的 β -葡萄糖苷酶能使异黄酮糖苷水解为更易人体吸收的游离型苷元。研究表明, 黑大豆炮制成淡豆豉后药理作用增强, 主要是大豆异黄酮苷元类组分的增多引起^[16-18], 枯草芽孢杆菌在严峻的环境条件下能形成芽孢, 以休眠态存活很长一段时间。本研究中发现枯草芽孢杆菌除发酵第 6 天减少外, 整个炮制过程中数量较稳定。发酵第 6 天数量下降, 可能与此时微生物种类最多有关, 微生物间相互竞争, 导致枯草芽孢杆菌数量相对减少。产酸克雷伯氏菌和弧形乳杆菌是淡豆豉整个炮制过程中的优势细菌, 在其他品种豆豉的微生物研究中未见报道。产酸克雷伯菌因其兼性厌氧, 营养要求不高等特点, 在淡豆豉炮制整个过程始终存在, 并发挥其作用。其发酵产酸产气, 产纤维素酶。弧形乳杆菌也是本研究中首次发现的优势菌种, 其在发酵食品中的研究未见报道。乳杆菌是一种获得人们认可的益生菌, 能够将碳水化合物发酵成乳酸, 对人类健康起到积极作用。

整个炮制过程中真菌主要以米曲霉、卵形丝孢酵母和兰德哈瓦隐球菌为优势菌。丝孢酵母和隐球菌是炮制后期的优势真菌, 在其他品种豆豉的研究中均未报道。炮制过程中酵母菌将淀粉分解为葡萄糖, 再转化成酒精, 这可能促使淡豆豉炮制后期产生特有的香味, 与淡豆豉感官品质有关。米曲霉主

要应用在食品酿造方面,其发酵产蛋白酶、淀粉酶、 β -半乳糖苷酶、脂肪酶,纤维素酶、大豆异黄酮糖苷酶。其中 β -半乳糖苷酶具有降低血糖、促进钙吸收的作用,这可能与淡豆豉降血糖^[19-21]、抗骨质疏松^[22-23]等功效有关。大豆异黄酮糖苷酶使大豆异黄酮结合型糖苷转化成游离型苷元,生理活性更强。

鉴于淡豆豉炮制过程中复杂的微生物群落和独特的微生物种类,本实验室后续将进一步研究优势微生物在淡豆豉炮制中的作用,为揭示淡豆豉发酵炮制机制、规范淡豆豉炮制工艺奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 乔明,张蓉,张厚宝. 关于 2015 年版《中国药典》一部中淡豆豉炮制内容的商榷 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1961-1962.
- [3] 李东文,朱海针,苏明声,等. Biolog-ECO 解析淡豆豉发酵过程中微生物群落碳代谢特征 [J]. 大豆科学, 2015, 34(5): 889-893.
- [4] 李华,冯凤琴,沈立荣,等. 淡豆豉优势菌株的鉴定及其对大豆蛋白质的分解作用 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(1): 1-6.
- [5] 汤扬,熊敏刚. 贵州中成药用淡豆豉发酵菌种的分离鉴定及纯种发酵 [J]. 贵州医药, 1999, 23(4): 318-319.
- [6] 蔡琨,田维毅,韩洁,等. 中药淡豆豉高效发酵菌株的筛选 [J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(24): 51.
- [7] 李刚,龙凯,苏明声,等. 淡豆豉炮制至“黄衣上遍”过程中微生物菌群动态变化的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 139-142.
- [8] 朱海针,龙凯,梁永红,等. Biolog 技术监测淡豆豉发酵炮制过程中微生物种类动态变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 14-17.
- [9] 于莲,徐新,张磊,等. PCR-DGGE 法测定纳米山药多糖靶向制剂对大鼠肠道菌群失调的调整作用 [J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(11): 1269-1272.
- [10] 吕晓丹,陈芳,陈智超,等. 解析红曲黄酒酿造体系真菌多样性的 PCR-DGGE 引物筛选方法 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(7): 231-238.
- [11] 李刚,梁永红,龙凯,等. 再闷过程影响淡豆豉炮制工艺研究 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1083-1088.
- [12] 李挺,宋斌,王超群,等. 冬虫夏草促繁地土壤真菌种群结构的变性梯度凝胶电泳技术分析 [J]. 中草药, 2013, 44(4): 478-481.
- [13] 毕雅坤. 贵阳市耐多药结核分枝杆菌耐药突变特征及散在分布重复单位基因分型 [D]. 贵阳: 贵阳医学院, 2015.
- [14] 孙安民,王亚强,王伟. 嗜麦芽寡养单胞菌检出率与耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(23): 5317-5319.
- [15] 杨丹,王洪礼,马丹宁,等. 不同发酵条件对淡豆豉中总异黄酮含量及蛋白酶活力的影响 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(7): 826-830.
- [16] 牛丽颖,刘敏彦,王玉峰,等. 河北产淡豆豉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 大豆科学, 2009, 28(2): 329-331.
- [17] 柴川,崔小兵,戴贞丽,等. 淡豆豉炮制前后异黄酮成分的测定及炮制工艺的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 72-76.
- [18] 张静. 中药淡豆豉有效成分含量与结构分析以及降血糖机理研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2008.
- [19] 牛丽颖,常淑凤,刘姣,等. 淡豆豉正丁醇提取物对糖尿病大鼠血糖及糖耐量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1398-1399.
- [20] 葛喜珍,葛喜亮,林强,等. 淡豆豉与黑大豆降糖作用比较 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 76-77.
- [21] 马立新. 中药治疗 2 型糖尿病随机对照试验的系统综述及方法学评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [22] 毛俊琴,李铁军,黄晓瑾. 中药淡豆豉防治去卵巢大鼠骨质疏松的实验研究 [J]. 解放军药学报, 2006, 22(2): 136-138.
- [23] 赵丽军. 中药淡豆豉的质量及其抗骨质疏松的物质基础研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.