

冻干/新鲜青稞老面发酵青稞面团的细菌群落结构比较分析

张文会¹, 王 波¹, 薛 蓓², 刘振东², 姚莉萍², 李 梁²

(1. 西藏农牧科学院农产品开发与食品科学研究所, 拉萨 850000; 2. 西藏农牧学院, 西藏 林芝 860000)

摘 要:为初步探讨青稞老面冻干粉作为发酵剂, 发酵生产青稞馒头的可行性, 本研究分别以冻干青稞老面(QKDG)与新鲜青稞老面(QKXX)发酵生产青稞面团, 同时利用高通量测序技术对青稞面团细菌群落结构进行比较分析。结果表明: 细菌门水平上, 在QKDG和QKXX中硬壁菌门都是优势种群, 分别占到各时期菌落种群的81.76%和92.47%; 细菌科水平, 在QKDG和QKXX中明串珠菌科都是优势种群, 分别占到各时期菌落种群的70.29%和48.24%; 细菌属水平, 在QKDG和QKXX中魏斯氏菌属都是优势种群, 分别占到各时期菌落种群的68.41%和44.39%。从细菌群落热图可以看出, QKDG和QKXX细菌分布有一定的差别, 但样品之间微生物群落结构差距不大, 有一定的相似性; 系统进化树表明在QKDG和QKXX两个样本中的优势菌群为魏斯氏菌属、乳杆菌属、明串珠菌属和蓝细菌, 其进化关系是魏斯氏菌属和明串珠菌属的进化关系最近, 其次为乳杆菌属、蓝细菌与其他属之间的进化关系最远。通过比较初步确定冻干青稞老面可以作为青稞馒头生产的发酵剂。

关键词:青稞; 面团; 细菌群落; 高通量测序

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)03-0111-04

Comparative Analysis of Bacterial Community Structure between Freeze-dried and Fresh Highland Barley Fermenting Dough

ZHANG Wenhui¹, WANG Bo¹, XUE Bei², LIU Zhendong², YAO Liping², LI Liang²

(1. Institute of Agriculture Products Development and Food Science Research, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850000; 2. Tibet Agricultural & Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China)

Abstract: In order to explore the feasibility of highland barley flour freeze-dried powder as fermentation agent to produce highland barley steamed bread, this study used freeze-dried highland barley flour (QKDG) and fresh highland barley flour (QKXX) to produce highland barley dough. Meanwhile, the bacterial colony structure of highland barley dough was compared and analyzed by high-throughput sequencing technology. The results showed that: at the level of *bacterioidea*, *Firmicutes* was the dominant population in QKDG and QKXX, accounting for 81.76% and 92.47% of the colony population in each period, respectively. At the bacterial family level, *Leuconostocaceae* are the dominant family in both QKDG and QKXX, accounting for 70.29% and 48.24% of the community populations, respectively. At the bacterial genus level, *Weissella* are the dominant genus in both QKDG and QKXX, accounting for 68.41% and 44.39% of the community populations, respectively. From the bacterial community thermogram, we can see that QKDG and QKXX have some differences in the distribution of bacteria, but there is little difference in the microbial community structure between the samples, and there is a certain similarity. Phylogenetic tree showed that the dominant microflora in the QKDG and QKXX samples are *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Cyanobacteria*. The evolutionary relationship between *Weissella* and *Leuconostoc* are the closest, followed by *Lactobacillus*, and *Cyanobacteria* is the farthest. Through comparisons, it is preliminarily determined that the freeze-dried highland barley flour can be used as the starter for the production of highland barley steamed bread.

收稿日期: 2018-09-11

基金项目: 国家现代农业(大麦、青稞)产业技术体系建设经费项目(CARS-05); 西藏农牧学院国家级大学生创新创业训练计划(201710693008)

作者简介: 张文会(1979-), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为农产品加工。

Key words: Highland barley; Dough; Bacterial community; High-throughput sequencing

馒头作为东方典型主食,其起源可以追溯到三国时期,经过千百年的演变发展,早已融入到每个中国人的日常生活中。随着人们生活水平的逐步改善,大众对馒头品质的要求也不断提高,特别是馒头的营养及风味。当前市场已涌现出添加各类谷物、果蔬等成分的馒头,如:红枣馒头^[1]、荞麦馒头^[2]以及青稞馒头等,其中青稞馒头关注度最高。近年来,随着西藏与内地在饮食文化方面的交流日益频繁,我国北方传统馒头也逐渐融入到藏族群众的饮食当中,大多数藏族群众以青稞和白面的混合粉作为原料制作馒头,其独特的口感和特殊浓郁香味受到大家的一致好评。当前,青稞馒头生产中主要以活性干酵母作为发酵剂,通过一次发酵法生产。而活性干酵母中菌种相对单一,虽然在生产中便于控制,效率高,但与老面发酵生产的青稞馒头相比其风味明显单一,且在香味和口感上都存在一定的差距。因此要解决青稞馒头的风味问题,必须要从老面发酵剂的工业化入手,本研究即运用当下热门的 Illumina MiSeq 测序分析技术^[3-4]比较了适用于馒头工业化生产的冻干老面与传统手工馒头生产的新鲜老面发酵面团的细菌群落结构,明确老面冻干前后发酵生产的面团中益生菌及潜在致病菌的变化,以期为传统老面发酵剂的工业化生产提供一定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验用老面购于林芝市巴宜区菜市场;小麦粉:五得利面粉集团有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;PCR Purification Kit:QIAquick 公司;DNA 凝胶回收试剂盒:碧云天科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 老面冻干粉的制备

将实验用青稞老面 20 g,均分为 2 份各 10 g,一份置于 4℃冷鲜保藏备用,一份置于冷冻干燥机内冻干得到冻干青稞老面干粉。

1.2.2 发酵面团的制备

分别以冷鲜保藏老面 10 g 和冻干前为 10 g 的冻干老面为发酵剂,在相同条件下以 100 g 青稞及小麦混合粉(1:4)和 50 mL 蒸馏水于 UKOEO 全自动揉面机智能模式下揉面 15 min,38℃醒发 4 h 后,分别制备得到青稞冻干老面(QKDG)发酵面

团与新鲜青稞老面(QKXX)发酵面团。

1.3 DNA 抽提和 PCR 扩增

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行总 DNA 抽提,并用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的纯度和浓度。PCR 扩增引物采用 338F₁-806R,即 338F₁'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。PCR 扩增正式试验采用 TransGen AP221-02:TransStartFastpfu DNA Polymerase,20 μmol/L 反应体系如下:5×FastPfu Buffer 4 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,Forward Primer (5 μmol/L) 0.8 μL,Reverse Primer (5 μmol/L) 0.8 μL,FastPlu Polymerase 0.4 μL,BSA 0.2 μL,Template DNA 10 ng,补 ddH₂O 至 20 μL^[5]。PCR 反应参数:95℃预变性 3 min,95℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,30 个循环后,72℃延伸 10 min。

1.4 Illumina Miseq 测序及数据处理

2017 年 10 月于上海进行试验,利用 Illumina 公司 Miseq PE300 平台进行测序。在上海美吉生物医药科技有限公司云平台上进行在线分析(www.i-sanger.com)。使用 UPARSE 软件(version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>),根据 97%的相似度对序列进行 OTU 聚类;使用 UCHIME 软件剔除嵌合体。利用 RDP classifier(<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 数据库(SILVA SSU Ref v. 128),设置比对阈值为 70%^[6]。其他数据处理采用 SPSS 20 软件。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增反应结果

2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,3 μL 上样检测电泳图见图 1。

从图 1 可知,PCR 产物目的条带大小正确,浓度合适,可进行后续上机实验。



M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: QKDG PCR 产物;
Lane 2: QKXX PCR 产物

图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

2.2 稀释曲线

以多样性指数为 sobs (表征实际观测到的物种数目) 做稀释曲线如图 2。从图 2 可知, 2 个样品的稀释曲线还未基本趋于平缓, 说明要覆盖完全的细菌群落多样性需要更多的序列, 但主要细菌基本能覆盖。

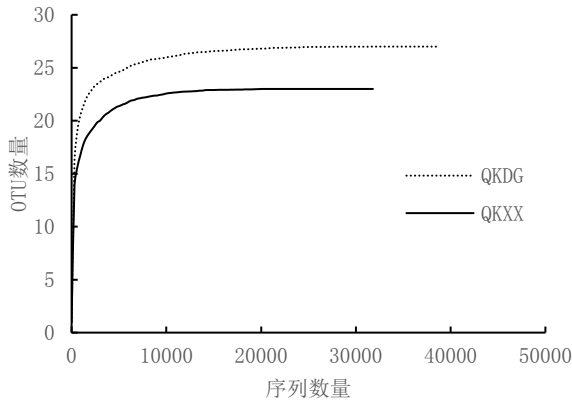


图2 不同样品测序的稀释曲线

2.3 韦恩图

利用韦恩图 (Venn diagram) 进一步研究二种发酵面团中细菌群落结构关系 (图 3)。结果显示, 二个样品中共同含有 37 个 OTUs, QKXX 独有 OTUs 为 0, QKDG 独有的有 5 个 OTUs。

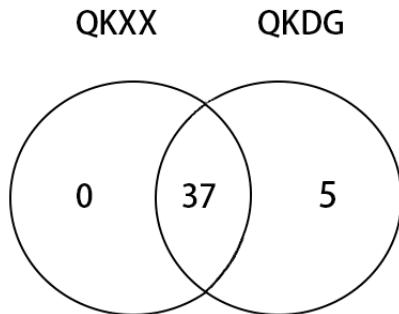


图3 不同区组细菌群落 OTUs 韦恩图

2.4 样品间 Alpha 多样性分析

Chao 指数、Ace 指数用来反映微生物群落的丰度, Chao 指数、Ace 指数越大, 群落的丰度越大; Shannon 指数和 Simpson 指数均是用来反映微生物群落的多样性, Shannon 指数值越大, Simpson 指数越小时, 说明群落多样性越高, 相反则群落多样性越低, 从图 4 可知, QKDG 样品中 Ace 指数、Chao 指数、Simpson 指数较 QKXX 中的高, 说明 QKDG 样品中群落的丰度较大; Shannon 指数在 QKXX 中稍大于 QKDG, 说明 QKXX 中微生物群落的多样性较高^[7]。

2.5 门水平各样本菌群分布

从图 5 可知, 在 QKDG 和 QKXX 中硬壁菌门是

优势种群, 分别占到各时期菌落种群的 86.51% 和 92.47%; 其次为蓝藻门, 分别占到各时期菌落种群的 11.05% 和 4.65%; 其他为变形菌门和一些仍未分类的序列。

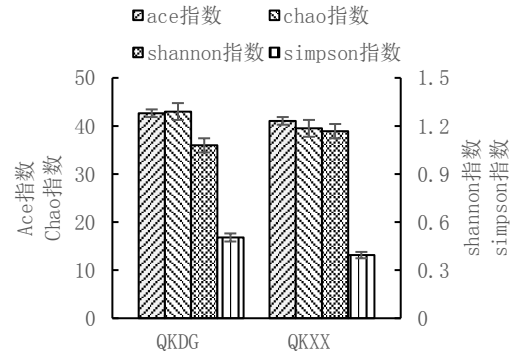


图4 样品间 Alpha 多样性统计

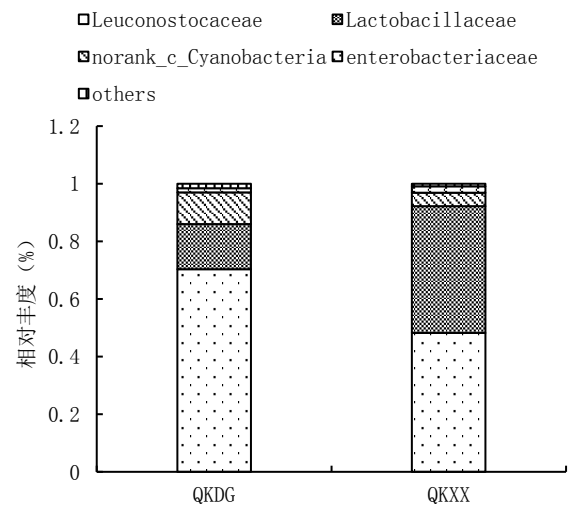


图5 门水平上不同样品间细菌群落变化

2.6 科水平上不同发酵面团细菌相对丰度

从图 6 可知, 在 QKDG 和 QKXX 中明串珠菌科是优势种群, 分别占到各时期菌落种群的 70.29% 和 48.24%; 其次为乳杆菌科, 分别占各时期菌落

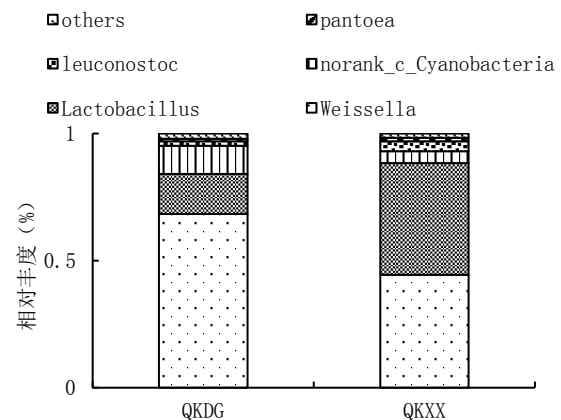


图6 科水平下不同样品间细菌群落变化

种群的15.65%和43.98%;排在第三位的是没有明确分类名称的蓝细菌,在QKDG和QKXX中分别占11.05%和4.65%。

2.7 属水平上不同发酵面团细菌相对丰度

在QKDG中优势菌属是魏斯氏菌属,其相对丰度占68.41%,其次为乳酸菌属;在QKXX中优势菌属是魏斯氏菌属和乳酸菌属,两者丰度相差不多,分别为44.39%和43.98%。

2.8 细菌群落热图

热图中的QKXX样品中检测到21个属,QKDG中检测到22个属(分别为明串珠菌属、泛菌属、尚未分类的蓝细菌、魏斯氏菌属、乳酸菌属、寡养单胞菌属、放线菌属、苏氏血杆菌属、肠球菌属、紫色杆菌属、红球菌属、土地杆菌属、金黄杆菌属、黄杆菌属、蛭弧菌属、欧文氏菌属、乳球菌属、假单胞菌属、沙雷氏菌属、不动杆菌属和类芽孢杆菌属。在QKDG样品中丰度最大的是魏斯氏菌属,其次为乳酸菌属、尚未分类的蓝细菌和明串珠菌属;在QKXX样品中丰度最大的是魏斯氏菌属和乳酸菌属,两者丰度相当,其次为尚未分类的蓝细菌和明串珠菌属。在QKXX中缺少蛭弧菌属这个属。从细菌群落热图可以看出,从细菌群落热图可以看出,QKXX和QKDG细菌分布有一定的差别,但样品之间微生物群落结构差距不大,有一定的相似性^[8]。

2.9 系统进化树

在分子进化研究中,系统发生的推断能够揭示出有关生物进化过程的顺序,了解生物进化历史和机制,可以通过某一分类水平上序列间碱基的差异构建进化树。本研究运用软件FastTree(version 2.1.3 <http://www.microbesonline.org/fasttree/>),通过选择属水平上分类信息对应的序列根据最大似然法(approximately-maximum-likelihood phylogenetic trees)构建进化树,使用R语言作图绘制进化树。从进化树可知,在两个样本中的优势菌群魏斯氏菌属、乳杆菌属、明串珠菌属和蓝细菌,其进化关系是魏斯氏菌属和明串珠菌属的进化关系最近,其次为乳杆菌属,蓝细菌与其他属之间的进化关系最远。

3 结论与讨论

老面中微生物群落结构是保障老面发酵食品质量的前提及基础,除酵母菌外,乳酸菌等细菌也起着

极为重要的作用,通过本研究发现新鲜青稞老面与冻干青稞老面发酵制备的面团其优势细菌均为明串珠菌和乳杆菌,在QKDG和QKXX中明串珠菌科是优势种群,分别占到各时期菌落种群的70.29%和48.24%;其次为乳杆菌科,分别占各时期菌落种群的15.65%和43.98%。乳杆菌和明串珠菌作为人们广泛关注的益生菌,其益生功效受到广泛关注,其中明串珠菌由于安全性高、好氧厌氧都能较好生长、能分泌产生葡聚糖和K族维生素等特点在面制品风味上具有良好的潜在价值^[9-10];而乳杆菌作为乳酸菌中最大的一个属,其在人和动物肠道微生态中起着重要的益生作用^[11-12]。由此可见,冻干操作并未使青稞老面群落结构的本质发生变化,但其影响了各菌属的丰度,同时也发现QKDG由于明串珠菌占优其发酵面团的风味可能占优,这为今后冻干青稞老面发酵剂的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郦梅,沈馨,郭壮,等.红枣保健馒头生产工艺研究[J].粮食与油脂,2018,31(1):60-64.
- [2] 杨双,郭晓娜,朱科学.碳酸氢钠添加对荞麦馒头品质的影响[J].中国粮油学报,2018,33(6):6-12.
- [3] 刘建利,孙敏,袁凤霞,等.利用高通量测序技术分析传统面引子中的酵母菌多样性[J].食品科技,2018,43(4):15-22.
- [4] 高佳媛,邵玉宇,雷飞艳,等.陕西关中地区羊乳中细菌多样性的分析[J].食品与发酵工业,2018,44(1):52-59.
- [5] 乌日娜,于美玲,孟令帅,等.PCR-DGGE分析东北自然发酵酸菜中的微生物多样性[J].现代食品科技,2014,30(10):8-12.
- [6] 蔡丽云,黄泽彬,须子唯,等.处理垃圾渗滤液的SBR中微生物种群与污泥比阻[J].环境科学,2018,39(2):880-888.
- [7] 刘若诗,万晶晶,张坤,等.燕麦酸面团发酵剂的冻干和储藏对面包风味的影响[J].食品科学,2010,31(21):15-19.
- [8] 张新杰.东北地区传统粘豆包发酵面团的微生物多样性及其与理化性质的关系[D].哈尔滨:东北农业大学,2017.
- [9] 杨吉霞,曾祥平,蒲慧敏,等.陕西茯砖茶的微生物多样性和群落结构[J].食品与发酵工业,2020,46(3):50-57.
- [10] 张平,张鹏飞,刘斯琪,等.自然发酵豆酱中明串珠菌的分离鉴定[J].食品科学,2018,39(22):110-115.
- [11] 陈佳,邓源喜,张斌,等.产CLA植物乳杆菌对小鼠肠道免疫屏障功能的影响[J].食品科技,2017,42(4):7-12.
- [12] 房珈慧,刘颖,薛美兰,等.干酪乳杆菌对D-半乳糖所致衰老小鼠抗氧化系统及肠黏膜屏障功能的作用[J].营养学报,2016,38(6):580-585.

(责任编辑:王昱)