葛英亮, 王艺臻, 仲瑞文, 等. 基于 Illumina PE300 高通量测序的传统与工业化生产东北豆酱微生物群落分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(2): 217−226. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020027
GE Yingliang, WANG Yizhen, ZHONG Ruiwen, et al. Microbial Community Analysis of Northeast Soybean Paste Produced Traditionally and Commercially Based on Illumina PE300 High-throughput Sequencing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(2): 217−226. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020027

· 生物工程 ·

基于 Illumina PE300 高通量测序的传统与工业化生产东北豆酱微生物群落分析

葛英亮*, 王艺臻, 仲瑞文, 李明翠
（海南热带海洋学院食品科学与工程学院, 海南三亚 572022）

摘　要: 为掌握传统与工业化生产东北豆酱中微生物差异，获取风险微生物信息，研究采用 Illumina PE300 技术对传统与工业化生产东北豆酱中细菌 16S rDNA 序列 V3-V4 区（338F/806R）和真菌 ITS 序列 1 区（ITS1F/ITS2R）扩增测序，进行生物信息学分析。结果表明，传统工艺生产豆酱中，乳杆菌属（*Lactobacillus*）、四链球菌属（*Tetragenococcus*）和芽孢杆菌属（*Bacillus*）等属的细菌及曲霉属（*Aspergillus*）、青霉属（*Penicillium*）、念珠菌属（*Candida*）和丝孢菌属（*Trichosporon*）等属的真菌丰度较高，其中存在肠杆菌（*Enterobacteriaceae*）和葡萄球菌（*Staphylococcus*）等潜在风险微生物，不同家庭生产豆酱中高丰度的明串珠菌属（*Leuconostoc*）等细菌和梗孢酵母属（*Sterigmatomyces*）、镰刀菌属（*Fusarium*）等真菌丰度存在明显差异。工业化生产豆酱中高丰度细菌为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、真菌为曲霉属（*Aspergillus*），群落构成简单，在微生物群落组成和代谢功能等方面与传统工艺生产豆酱相比存在的差异明显。经 PICRUSt2 功能预测分析知：传统工艺生产豆酱在糖酵解、糖异生、甘油酸代谢、有机酸的转化、蛋白质的磷酸化、嘌呤代谢、乙醛酸循环等功能丰度占优，工业化生产豆酱中在蛋白质降解和氨基酸代谢功能方面具有较高的丰度，揭示了传统工艺生产豆酱风味更佳，而工业化生产豆酱风味更稳定且生产周期短的原因。采用自建风险菌 16S rDNA 全长基因数据库比对发现：工业化生产豆酱的生物安全性更好，传统工艺生产豆酱可能存在更多的风险菌如：创伤弧菌（*Vibrio vulnificus*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）等，揭示传统豆酱发酵过程中可能存在厌氧环境控制不足、原料污染或加工环节卫生缺陷导致产毒菌株增殖风险，工业化生产工艺在控制潜在风险菌方面具有显著优势。本研究为优化豆酱生产工艺、提高产品质量和保障食品安全提供了科学依据。

关键词: Illumina PE300 测序, 东北豆酱, 微生物群落, 评估, 传统工艺, 工业化生产, 功能预测
中图分类号: TS264.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)02−0217−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025020027
本文网刊:

Microbial Community Analysis of Northeast Soybean Paste Produced Traditionally and Commercially Based on Illumina PE300 High-throughput Sequencing

GE Yingliang*, WANG Yizhen, ZHONG Ruiwen, LI Mingcui
（College of Food Science and Engineering, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China）

Abstract: To understand the microbial differences in traditional and industrial production of Northeast soybean paste and identify potential risk microorganisms, this study analyzed the microbial communities in Northeast soybean paste that are produced traditionally and commercially. The bacterial 16S rDNA V3-V4 region (338F/806R) and fungal ITS1 region (ITS1F/ITS2R) were amplified and sequenced using Illumina PE300 sequencer followed by bioinformatics analysis. The

收稿日期: 2025−02−08
基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目（520RC659）; 2022 年三亚市科技创新专项（2022KJCX29）; 海南热带海洋学院“四新”研究与改革实践项目（RHYxgnw2023-05）。
作者简介/通信作者*: 葛英亮（1979−）, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术、饮用水生物安全、食品加工废弃物资源化, E-mail: geyingliang@126.com。

results revealed that in the traditionally produced soybean paste, the abundance of bacteria such as *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, and *Bacillus*, and fungi such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, and *Trichosporon* were relatively high. Among these, potential risk microorganisms such as *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus* were present. There were significant differences in the abundance of high-abundance bacteria like *Leuconostoc* and fungi like *Sterigmatomyces* and *Fusarium* between different soybean pastes that are family-produced. In commercially produced soybean paste, the high-abundance bacteria were *Lactobacillus*, while the predominant fungus was *Aspergillus*, albeit with a less diverse microbiota. The differences in microbial community and metabolic functions between traditional and commercial production processes were evident. Functional prediction analysis using PICRUSt2 revealed that traditional soybean paste had higher gene expressions in functions related to glycolysis, gluconeogenesis, glycerol metabolism, organic acid conversion, protein phosphorylation, purine metabolism, and acetaldehyde acid cycle. In contrast, commercial soybean pastes showed higher expressions in protein degradation and amino acid metabolism, which explains why traditional soybean paste has a better flavor, while industrial soybean paste has more stable flavor and shorter production cycle. Comparison with a self-constructed full-length 16S rDNA gene database of pathogens revealed that the biosafety of commercially produced soybean paste is better, while traditional soybean paste may contain more pathogens such as *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*. This indicates that during the fermentation of traditional soybean paste, there may be a risk of insufficient control for anaerobic environment, raw material, or hygiene level in the processing stages, leading to the proliferation of toxin-producing strains. Commercial production have a significant advantage in controlling potential risk bacteria. This study provides scientific evidence for optimizing soybean paste production processes, improving product quality, and ensuring food safety.

Key words: Illumina PE300 sequencing; northeast soybean paste; microbial community; evaluation; traditional process; commercial production; functional prediction

中国制酱的历史悠久，自西汉即有以大豆和面粉为主要原料的发酵型酱制品出现[1−2]。在豆酱的发酵制作过程中，霉菌、酵母菌、乳酸菌等微生物协同发酵，大豆蛋白质在酶的作用下进行蛋白质水解、有机酸发酵等一系列生化反应，赋予豆酱独特的风味、优良的口感、丰富的营养和一定的健康功能[3−5]。

中国东北地区是豆酱的主要生产和消费地区，农村多采用传统制酱工艺进行豆酱的制作，其中微生物菌群多样性丰富，风味良好，但制酱过程繁琐、生产方式较为原始，发酵条件控制随机且相对粗放，导致不同农户制作的豆酱在风味和品质上存在显著差异，同时，豆酱的发酵过程也容易受到外源微生物的干扰[6−8]。随着豆酱生产技术的发展，工业化逐渐成为东北豆酱生产的主要方式，其发酵控制工艺相对严格，发酵微生物控制相对精确，避免了传统制酱过程中温度、发酵微生物的不可控因素，使得豆酱的安全、品质和风味得到更好的保障。研究表明，无论是传统发酵还是工业发酵，动态变化的微生物群落在豆酱发酵过程中都是至关重要的[9]。在豆酱生产中存在大量复杂的微生物，如：生念珠菌、乳酸克鲁维酵母菌、胭脂酵母菌和土星拟威尔酵母等[10]；在同样食用发酵豆制品的韩国发酵豆砖中也发现了复杂多样的微生物群落[11]。Lee 等[12] 研究了不同工业化生产豆酱微生物多样性和代谢物，强调了了解工业环境中微生物组成的重要性。然而，当前研究尚未充分关注同一气候条件、同一地区内，采用相同传统制作工艺的不同农家豆酱中的微生物群落及其潜在生物风险，同时也未深入探讨传统工艺与工业化生产豆酱在风险微生物群落及功能上的差异，因此有必要进一步加强对豆酱中风险微生物的分析。

Illumina PE300 生物多样性测序具有成本低、通量高、速度快、数据准确等优点，被广泛应用于食品、土壤、人体内环境等生物多样性分析检测[13−14]。本研究以中国东北传统和工业化生产工艺生产的豆酱为样本，基于 Illumina PE300 生物多样性测序技术进行多样性测序比较分析，将获得的细菌 16S rDNA 序列与自建的风险菌 16S rDNA 基因全长数据库进行比对分析，分析传统和工业化生产发酵豆酱产品风险菌多样性，以期高效、快速、高通量获得豆酱产品风险微生物信息，降低检测成本，提高东北豆酱产品的生物风险分析预测能力，为保障传统豆酱产品的生物安全提供有益参考，为进一步建立豆酱生产风险微生物基因数据库奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

FastDNA Spin Kit For Soil　北京智杰方远科技有限公司；Biospin Fungus Genomic DNA　北京博迈斯生物科技有限公司；QuickClean II PCR 抽提试剂盒　南京金斯瑞生物科技有限公司；TransStart Fastpfu DNA Polymerase　北京全式金生物技术有限公司；TruSeq TM DNA Sample Prep Kit　Illumina 公司；AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒　AXYGEN 公司。

GeneAmp9700 PCR 仪　美国应用生物系统（ABI）公司；DYCZ—24K/S 型双板垂直电泳仪　北京六一生物科技有限公司；Miseq PE300 二代高通量测序仪　美国 Illumina 公司；Micro 17R 高速冷冻离心机、Nano-Drop2000 超微量紫外分光光度计

ThermoFisher 公司；BSC-1300IIS A2 型生物安全柜　上海沪净医疗器械有限公司；Scan500 全自动菌落计数仪　Interscience 公司；HS-IE 数显振荡培养箱　上海和盛仪器科技有限公司；QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统　Promega 公司；PCR 扩增引物：338F-806R、524F10extF-Arch958RmodR、ITS1F-ITS2R　均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.2　实验方法

1.2.1　样本采集与制备　传统制酱工艺样本采自东北某地区四个农户（同一村落，气候基本一致），并将样本分别编号为 CT-1、CT-2、CT-3、CT-4 进行进一步分析。

农户制酱工艺及参数如下：采用自然发酵工艺，平均气温范围为 12.6 ℃ 至 20.6 ℃，发酵时间自农历三月初十至四月二十八，共计约 50 个自然日。制酱基础工艺如图 1 所示。

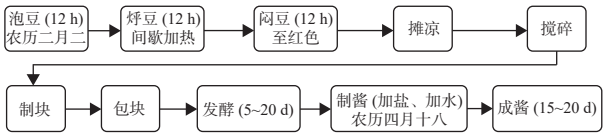


图 1　绥化地区某农家传统制酱工艺

Fig.1　Traditional sauce making process in a farmer in Suihua area

工业化生产豆酱样本取自与传统制酱相同的地区（某企业，两地气候相近），该企业年产量 4000 吨。研究样本依据生产流程，在与农家酱相同的取样时期进行采集，并编号为 GY-1。

工业化制酱工艺及参数如下：豆酱发酵周期为 20 d，制曲时间为 48 h，制曲室温度为 38±2 ℃，发酵温度为 45 ℃。如图 2 所示。

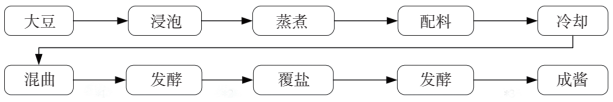


图 2　某企业工业制酱工艺

Fig.2　Industrial sauce making process of a certain enterprise

上述样本均为多点采样、并均一化后 4 ℃ 暂存，后置于−80 ℃ 冰箱保存送样及备用。

1.2.2　基因组 DNA 提取　将所获样本进行基因组 DNA 抽提，基因组抽提按照 FastDNA Spin Kit For Soil 试剂盒说明进行，后采用 1% 琼脂糖凝胶电泳 120 V、30 min 检测提取基因组质量，浓度合格样本用于 PCR 扩增。

1.2.3　细菌 16S rDNA、真菌 ITS、古菌 PCR 扩增体系　基因组分别以 338F-806R 引物扩增 16S rDNA 片段、524F10extF-Arch958RmodR 引物扩增古菌特异基因片段、以 ITS1F-ITS2R 扩增真菌 ITS 片段，每个样本进行三个重复，将各样本获得的 PCR 扩增产物分别混合后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测（120 V，30 min）。经多次预试验后古菌 524F 10extF-Arch 958 RmodR 通用引物序列扩增失败，古菌特异性序列无法扩增，古菌含量极低或不存在，后续无法对古菌进行多样性测序及分析。

实验确定 16S rDNA 扩增采用 20 μL 反应体系[15]：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、FastPfu Polymerase 0.4 μL、BSA 0.2 μL、Template DNA 10 ng、补 ddH_2O 至 20 μL；ITS 序列扩增采用 20 μL 反应体系：10× Buffer 2 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、正向引物（5 μmol/L）0.8 μL、反向引物（5 μmol/L）0.8 μL、TaKaRa rTaq DNA Polymerase 0.2 μL、BSA 0.2 μL、Template DNA 10 ng、补 ddH_2O 至 20 μL。PCR 反应参数为：95 ℃、3min；35 个循环：95 ℃ 30 s、退火温度（338F-806R 为 55 ℃、ITS1F-ITS2R 为 55 ℃）30 s、72 ℃ 45 s；72 ℃、10 min、4 ℃ 保存。

1.2.4　PCR 产物回收、Miseq 文库构建及 Miseq 测序　切胶回收 PCR 产物，Tris HCl 洗脱，2% 琼脂糖凝胶电泳检测。获得 PCR 产物委托上海美吉生物医药有限公司进行定量、采用 Illumina PE300 进行 DNA 测序、拼接、质控和过滤。

1.2.5　生物信息学分析　基于美吉生物云平台（https://cloud.majorbio.com）按照 97% 相似性对非重复序列进行 OTU（Operational Taxonomic Units）聚类分析和分类学分析、多样性指数分析[16]；基于细菌 Silva138（https://www.arb-silva.de）及真菌 ITS 数据库 UNITE8.0（https://unite.ut.ee）数据库进行细菌、真菌群落结构统计学分析；采用 mothur 软件（http://www.mothur.org/wiki/Calculators）计算 Alpha 多样性[17]；采用 Wilxocon 秩和检验进行 Alpha 多样性的组间差异分析；采用基于 bray-curtis 距离算法的 PCoA 分析（主坐标分析）检验样本间微生物群落结构的相似性，并结合 PERMANOVA 非参数检验分析样本组间微生物群落结构差异是否显著；用 LEfSe 分析（Linear discriminant analysis Effect Size，http://huttenhower.sph.harvard.edu/LEfSe）（LDA>2，P<0.05）确定不同组间从门到属水平丰度显著差异的细菌类群[18]；基于 spearman 相关性 $|r|$>0.6，P<0.05 挑选物种进行相关性网络图分析[19]；使用 PICRUSt2（version 2.2.0）软件进行 16S 功能预测分析[20]。

1.2.6　风险菌序列比对及多样性分析　采用 16S rDNA 测序的方法可获得大量的基因信息，难以逐一分辨风险菌，导致风险微生物群落的丰度和多样性研究相对困难。本研究依据 VFDB（http://www.mgc.ac.cn /VFs /main.htm）常见人畜及植物致病菌、条件致病菌的信息[21−22]，从 NCBI 基因组数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）中抽取风险微生物 16S rDNA 全长序列构建数据库，共享至百度网盘（链接：https://pan.baidu.com/s/1_MZkHvAFv1RCO-

Bld__ko8w?pwd=path)，此数据库共包含 352 种常见致病微生物（动物、植物、人类致病菌），共 1549 条 16S rDNA 全长序列，研究采用美吉生物云平台进行比对分析，以了解传统工艺和工业生产豆酱可能出现的风险菌多样性。

2 结果与分析

2.1 基因组提取及 PCR 扩增

提取基因组采用 NanoDrop 2000 检测，见表 1。

表 1 样本基因组提取信息

Table 1 Sample genome extraction information

项目	样本				
	CT-1	CT-2	CT-3	CT-4	GY-1
OD260/280	1.52	1.61	1.58	1.55	1.56
浓度(ng/μL)	12.77	9.61	10.53	10.40	11.63

表 1 表明，OD260/280≥1.5 且浓度≈10 ng/μL 说明提取基因组质量较好、浓度适当，可以按 1.2.3 进行 PCR 扩增，扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，见图 3。

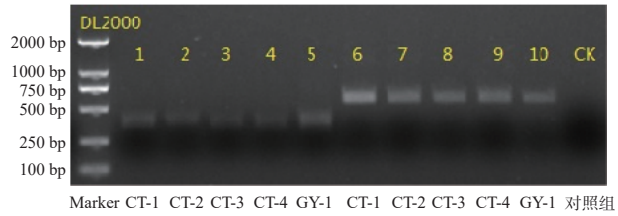


图 3 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 PCR amplification product agarose gel electrophoresis

注：图中序号 1~5 分别为样品 CT-1、CT-2、CT-3、CT-4、GY-1 的 16S rDNA PCR 扩增产物，6~10 分别为 CT-1、CT-2、CT-3、CT-4、GY-1 的 ITS1F-2RPCR 扩增产物，Marker 为 DNA marker 2000，CK 为对照组。

基因组 PCR 扩增后的 16S rDNA 扩增产物 DNA 条带长度 400~500 bp 左右，ITS 扩增产物 DNA 条带长度为 700~800 bp 左右，条带长度与预期相符，浓度适中（见图 3），可以满足后续测序实验的要求。

2.2 Illumina PE300 多样性测序数据分析

2.2.1 多样性测序结果及 Alpha 多样性分析 样本进行 338F_806R PCR 扩增，并测序后进行双端序列质控拼接，共获得 265915 条序列（Sequences），114055742 bp（base pair），平均长度为 428.92 bp，传统工艺组（A~D）样本测序获得序列数量差异较大，且均略高于工业化组（E）样本测序获得序列数量，测序获得 88 个 OTU，被注释到 6 个门、11 个纲、24 个目、39 个科、58 个属、86 个种。样本 ITS1f_2R 扩增后测序，获得序列进行双端序列质控拼接，共获得 359277 条序列，86982558 bp，平均长度为 242.10 bp，传统制酱样本测序获得序列数目差异较大，且均高于工业化制酱样本测序获得序列数量。测序获得 105 个 OTU，被注释到 4 个门、14 个纲、22 个目、35 个科、53 个属、81 个种。

分别对样本 16S rDNA 和 ITS 扩增序列测序结果进行 Alpha 多样性分析，以评估样本细菌和真菌群落的多样性，见表 2 和表 3。

表 2 样本 16S rDNA 测序 Alpha 多样性分析结果

Table 2 Alpha diversity analysis results of sample 16S rDNA sequencing

样品编号	sobs	Shannon	Simpson	ACE	Chao1	Coverage
CT-1	33	0.637563	0.706892	37.71922	37.2	0.999888
CT-2	53	1.84714	0.236719	56.19261	54.875	0.999859
CT-3	48	0.291604	0.9079	53.29703	52.5	0.999809
CT-4	56	1.953972	0.27899	60.44167	59.5	0.999861
GY-1	29	0.167022	0.949135	30.32052	29.75	0.999937

表 3 样本 ITS 测序 Alpha 多样性分析结果

Table 3 Alpha diversity analysis results of sample ITS sequencing

样品编号	sobs	Shannon	Simpson	ACE	Chao1	Coverage
CT-1	26	0.222776	0.927159	27.79434	29	0.99996
CT-2	39	1.718913	0.229681	39.93609	39.33333	0.999973
CT-3	46	1.202287	0.45793	47.71062	46.75	0.999958
CT-4	55	1.628349	0.286077	57.37072	56.42857	0.999932
GY-1	51	1.728865	0.24343	51	51	1

图 4 显示样本中细菌和真菌群落的稀释曲线趋近平缓，并且覆盖度高，样本细菌和真菌群落的测序比率接近饱和，测序量能够覆盖样本中的绝大部分物种，不同样品来源的 Shannon 曲线说明，同一地区的传统制酱样品微生物群落多样性可能存在较大差异，且工业化制酱样本中细菌和真菌群落多样性与传统

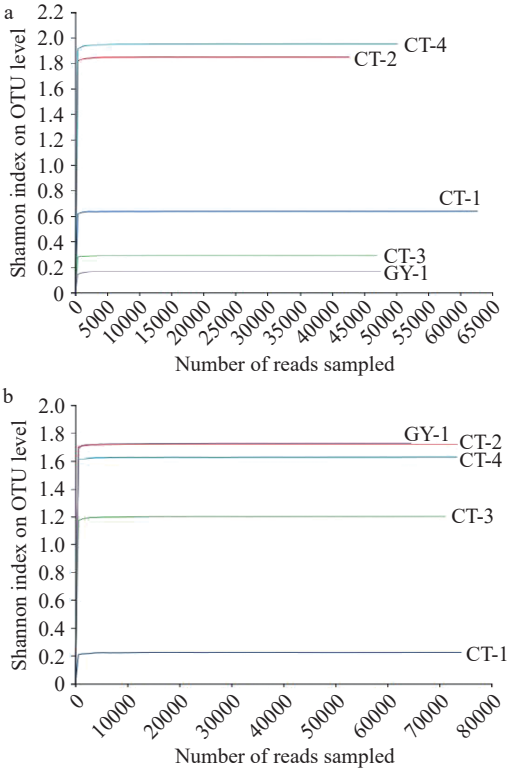


图 4 样本测序 Shannon 指数曲线

Fig.4 Sample sequencing Shannon index curve

注：a 和 b 分别为细菌样本和真菌样本的 Shannon 指数曲线。

制酱样本也存在差异。

2.2.2　微生物群落构成分析　基于 Venn 图分析传统工艺组(CT-1~CT-4)和工业化组(GY-1)样本中细菌群落和真菌群落的属水平多样性差异，见图 5。

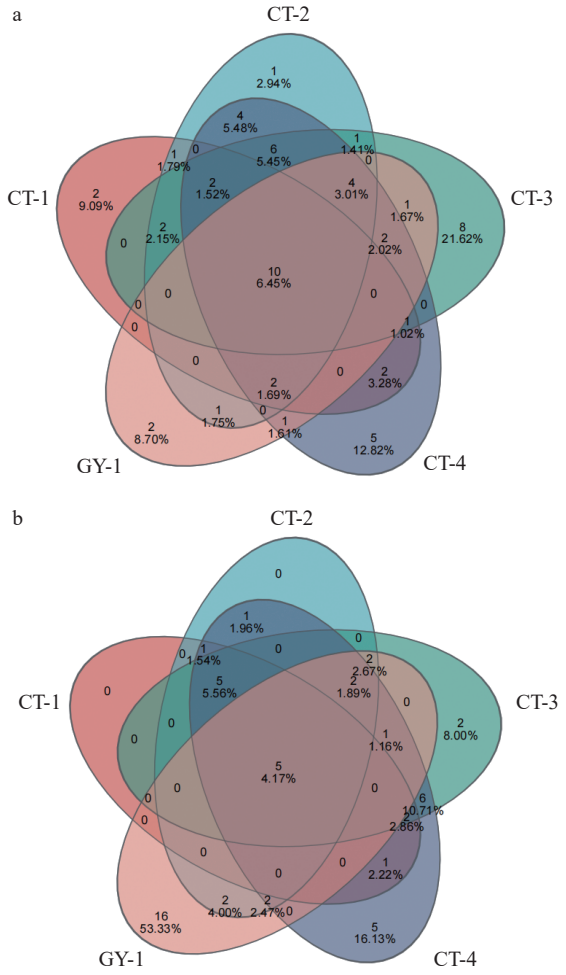


图 5　不同来源样本属水平 Venn 图

Fig.5　Venn diagram of genera from different sources

注：a 和 b 分别为样本细菌群落和真菌群落。不同椭圆区域代表不同样本，重合区域代表共有微生物的属的数量，非重合区域为样本独有微生物的属的数量。

传统工艺组(CT-1~CT-4)中的细菌群落结构复杂，共有属数量众多，且在不同样本间表现出较大变化，这反映出传统发酵过程中细菌群落的多样性及相对较低的稳定性。组间共有属比例的波动较大(例如 CT-1 组的 6.45% 与 CT-4 组的 5.48%)进一步揭示了自然发酵对环境因素的强烈依赖性。工业化组 GY-1 细菌属的数量相对少，可能与标准化菌种添加有关，同时提示其细菌组成与传统工艺不同样品间差异较大。传统工艺组中 CT-4 组独有真菌属最多为 6(占 16.13%)，工业化组 GY-1 独有属为 16(占 53.33%)，工业化生产的真菌群落展现出极高的独特性，这很可能源于人工接种特定的发酵真菌。相比之下，传统工艺组间的共有属比例较低，群落异质性较高，更多地依赖于自然接种及环境条件，从而反映出传统工艺样本中的真菌群落显著受到环境波动的影响。初步揭示工业生产酱的样品风味不如农家酱风味丰富，但风味较为稳定，可能存在的微生物风险更小。

2.2.3　样本物种组成分析　为进一步揭示传统工艺与工业化生产样本中微生物群落差异，分析样本中微生物的群落变化，分别绘制细菌(图 6)和真菌(图 7)群落属水平的 heatmap 图。

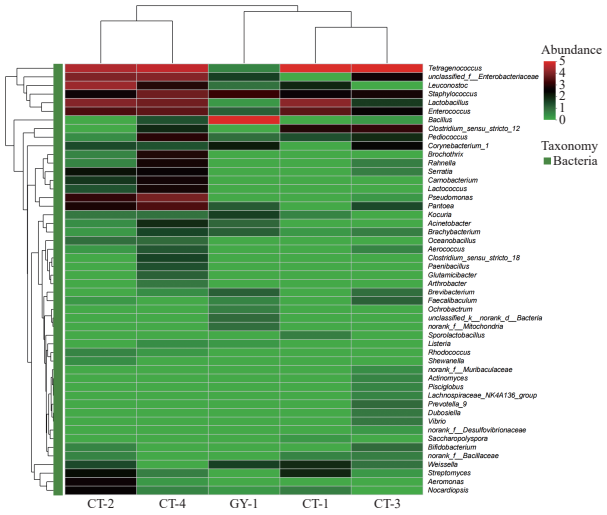


图 6　不同样本细菌(属水平)heatmap 图

Fig.6　Heatmap of bacteria at the genus level in different samples

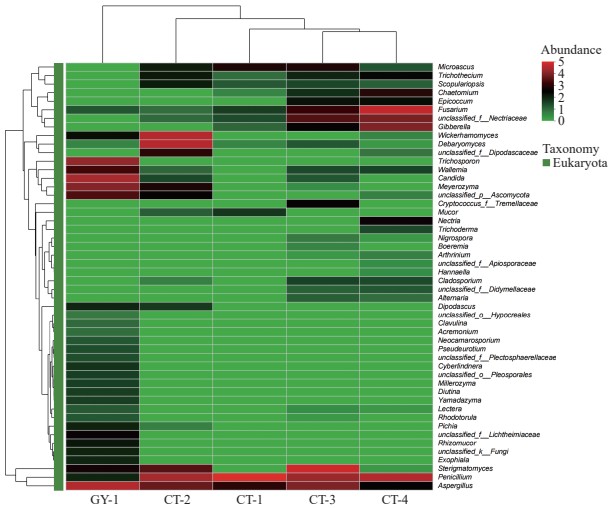


图 7　不同样本真菌(属水平)heatmap 图

Fig.7　Heatmap of fungi at the genus level in different samples

聚类树表明，尽管传统工艺组(CT-1~CT-4)样本选取地点为同一地理区位，气候条件一致，但样本 CT-1、CT-3 与样本 CT-2、CT-4 间细菌群落亦存在较大差异。

在传统工艺组(CT-1~CT-4)样本中丰度较高的属为：*Lactobacillus*(乳酸菌属)，降低 pH，抑制样品中杂菌，且贡献酸味和风味物质[23]，揭示了自然发酵中乳酸菌的相对主导地位；*Tetragenococcus*(四联球菌属)耐高渗环境，参与氨基酸代谢，可能贡献鲜味[24]；*Bacillus*(芽孢杆菌属)可产蛋白酶、淀粉酶等，分解蛋白质和碳水化合物[25]，生成风味前体物质。同

时存在 unclassified_f_*Enterobacteriaceae*(肠杆菌属)、*Leuconostoc*(明串珠菌属)、*Staphylococcus*(葡萄球菌属)、*Serratia*(沙雷氏菌属)等潜在的风险微生物,环境微生物及气候条件对细菌群落影响较大。相较而言,工业化组(GY-1)高丰度细菌较少,但 *Lactobacillus* 的丰度更高,*Tetragenococcus* 和 *Bacillus* 丰度较低,而传统工艺组中存在的风险微生物在工业化组中均未发现,这表明工业化生产对关键发酵微生物的依赖性更高,细菌群落多样性更简单,标准化接种、外源微生物污染的减少,虽导致细菌群落多样性的丧失,风味变劣,但食品生物安全风险更低。

聚类树表明,传统工艺组(CT-1~CT-4)样本真菌群落相关度较高,其与工业化组(GY-1)真菌群落丰度及种类差异明显。

传统工艺组(CT-1~CT-4)中主要的真菌有:*Aspergillus*(曲霉属)产酶(如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶),分解蛋白质和碳水化合物,生成风味前体物质,在自然发酵中占主导地位[26−28];*Penicillium*(青霉属)部分菌株产酶(如脂肪酶),可能贡献风味物质(如酯类),也有部分产毒素,可能影响食品安全[29−30];*Candida*(假丝酵母属)发酵糖类产乙醇和有机酸,贡献风味和香气[31];*Trichosporon*(丝孢酵母属)参与氨基酸代谢,可能贡献风味[32]。也存在较多种属的风险真菌:*Fusarium*(镰刀菌属)部分菌株产酶(如纤维素酶),部分种(如 *F. graminearum*)产生霉菌毒素(如脱氧雪腐镰刀菌烯醇,DON),需监控其丰度[33];*Alternaria*(链格孢属)部分种产生霉菌毒素(如交链孢霉烯,AOH)[34];*Penicillium*(青霉属)部分种(如 *P. citrinum*)产生霉菌毒素(如桔青霉素)[34]。在传统工艺组中高丰度真菌较细菌更为集中,说明其对豆酱的发酵贡献较大。

总体而言,工业化组(GY-1)的真菌群落相对单一,优势菌属显著,反映人工菌种添加和灭菌工艺对菌群结构的强烈影响。工业化组(GY-1)中 *Aspergillus*(曲霉属)丰度显著高于传统组,反映工业化工艺对曲霉的依赖,其为工业化生产的核心菌种;*Penicillium*(青霉属)和 *Candida*(假丝酵母属)丰度则显著低于传统组,工业化发酵真菌菌种控制更为严格,同样在传统工艺生产中可能存在的风险真菌,在工业化生产中也未出现,进一步说明工业化生产的生物风险较低。

2.2.4 样本多样性比较分析 研究基于 NMDS(非度量多维尺度分析,non-metric multidimensional scaling)在 OTU 水平对传统工艺组(CT-1~CT-4)和工业化组(GY-1)样本进行降维分析,用于可视化样本间的群落相似性或差异性,见图 8。图中不同颜色点的距离越近,表示样本间群落结构越相似;距离越远,表示差异越大。图 8a 表明传统工艺组(CT-1~CT-4)相互距离较近,细菌群落组成相似度远远高于工业化组(GY-1);图 8b 中各样本点距离相对分

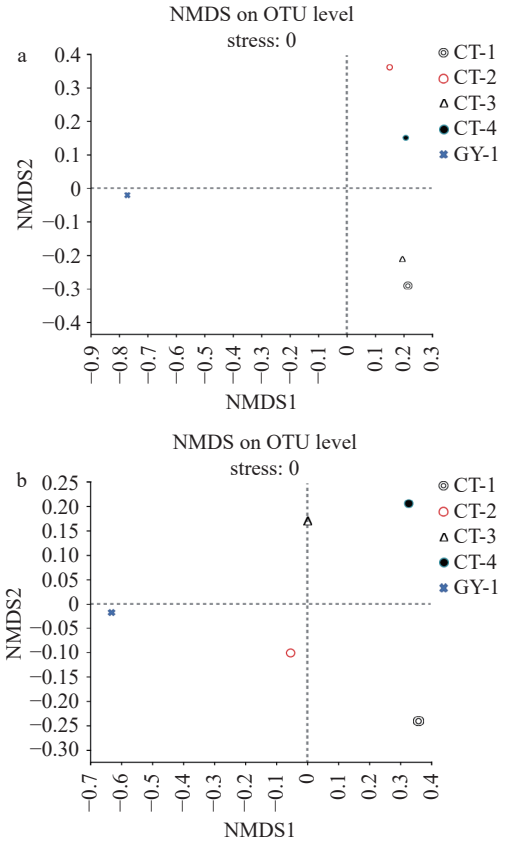


图 8 样本间非度量多维尺度分析

Fig.8 Non-metric multidimensional scaling analysis between samples

注:a 和 b 分别为样本细菌群落和真菌群落。

散,这表明在不同样本中,真菌群落的组成存在显著差异。特别是工业化组(GY-1),其群落结构的差异性尤为突出,这可能与工业化酿造环境的特定条件有关。

2.2.5 样本间差异性比较 基于 2.2.4 中 NMDS 分析,选取差异性最大的样本 CT-1(传统工艺样本)和 GY-1(工业化生产样本)基于 Fisher 检验(Fisher's exact test)对传统工艺 CT-1 样本与工业化 GY-1 样本在细菌群落(图 9)和真菌群落(图 10)属水平上的比例差异进行分析,并计算 95% 置信区间及 P 值,以进一步分析其细菌群落构成和真菌群落的构成,获取具有显著性差异的细菌和真菌信息,这些差异的微生物可能是样本差异风味的关键物种。

研究运用 Fisher 精确检验对传统工艺 CT-1 样本与工业化 GY-1 样本在细菌属水平的差异进行了比较分析,并计算了 95% 置信区间及 P 值。结果显示,*Kocuria*、*Streptomyces*、*Leuconostoc*、*Corynebacterium*_1、*Clostridium*_sensu_stricto_12、*Staphylococcus*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Tetragenococcus* 和 *Bacillus* 等细菌属在两组样本间存在显著差异(P 值分别为 3.728×10^{-9}、1.363×10^{-18}、5.519×10^{-12}、2.82×10^{-41}、6.195×10^{-133}、7.448×10^{-114} 等,均小于 0.001),同样的分析表明:*Rhizomucor*、*Wickerhamomyces*、*Sterigmatomyces*、*Microascus*、

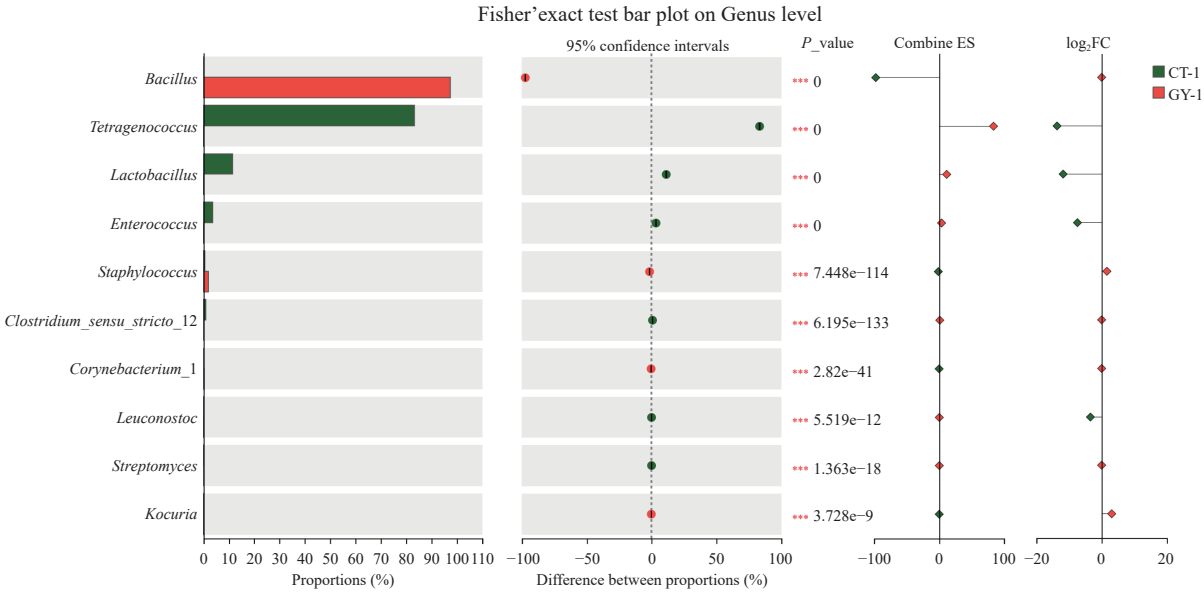


图 9　样品间细菌群落差异性比较

Fig.9　Comparison of bacterial communities between samples

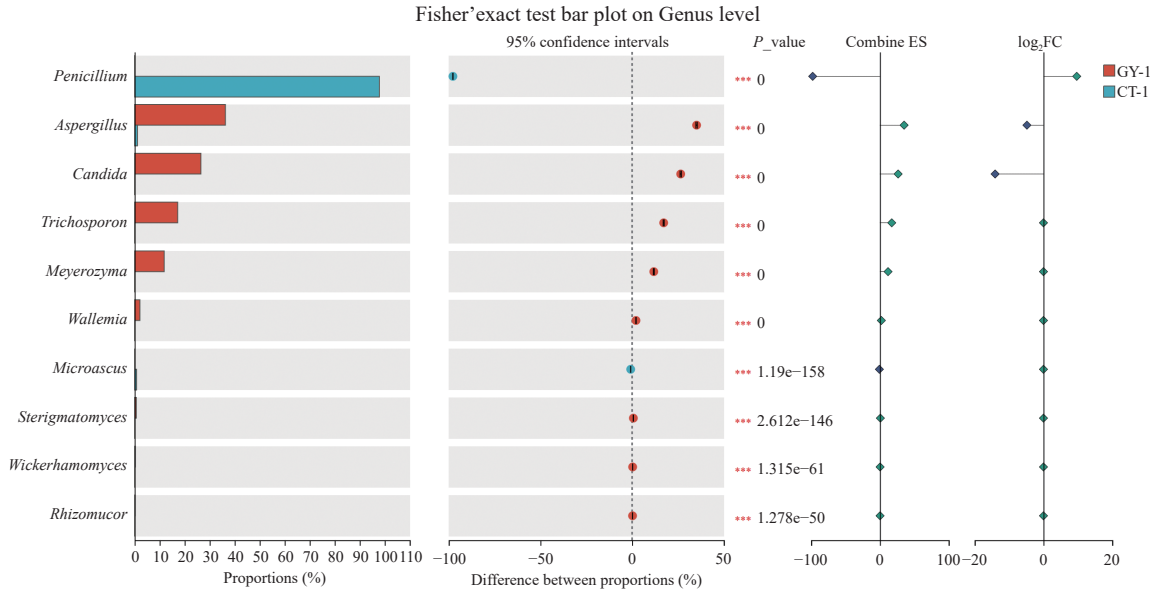


图 10　样品间真菌群落差异性比较

Fig.10　Comparison of differences in fungal communities between samples

Wallemia、*Meyerozyma*、*Trichosporon*、*Candida*、*Aspergillus* 和 *Penicillium* 等真菌在两组样本间也存在显著差异（*P* 值均小于 0.001），这些细菌和真菌在工业化和传统工艺生产大豆酱中可能扮演重要角色，其丰度变化可能对产品的风味、质地和保质期产生影响。Log_2FC 值进一步揭示了两组样本间细菌和真菌属丰度的变化方向，正值表示工业化 E 样本中该细菌（或真菌）属的丰度高于传统工艺 A 样本，负值则表明传统工艺 A 样本中该细菌（或真菌）属的丰度更高。传统工艺 A 样本可能保留了更多的传统发酵微生物，对产品的传统风味和质地有重要贡献，而工业化 E 样本可能通过优化发酵条件或引入特定菌种，改变了微生物群落结构，从而影响产品的品质和稳定性。其中 *Streptomyces* 和 *Bacillus* 等细菌可能参与蛋白质和碳水化合物的分解，影响风味物质的生成；*Lactobacillus* 和 *Leuconostoc* 等乳酸菌属可能参与乳酸发酵，影响产品的酸度和保存性；*Staphylococcus* 和 *Enterococcus* 等细菌属可能参与氨基酸代谢，影响产品的风味和营养价值。*Aspergillus* 和 *Penicillium* 等真菌常见于食品发酵过程，参与蛋白质和碳水化合物的分解，影响风味物质的生成；*Candida* 等酵母菌则参与酒精和有机酸的代谢，影响产品的酸度和香气。

2.2.6　样本微生物群落功能预测　本研究通过 PICRUSt2 预测的功能 Heatmap 对传统工艺组（CT-1~CT-4）与工业化组（GY-1）豆酱细菌群落（图 11a）和真菌群落（图 11b）在多个酶功能分类（EC 编号）上的预测丰度进行了比较分析，揭示了两组间在代谢功

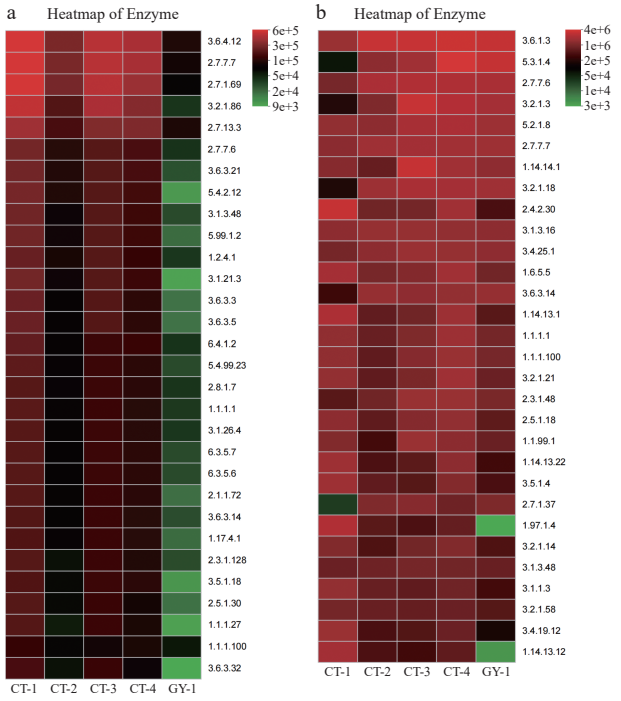


图 11 微生物群落酶功能丰度分析

Fig.11 Microbial community enzyme functional abundance analysis

注: a 和 b 分别为细菌群落和真菌群落的酶功能 Heatmap 图。

能上的显著差异。

由图 11a 知: 传统工艺组(CT-1~CT-4)中各样本多个酶的功能丰度表现出较好的同一性, 传统工艺组(CT-1~CT-4)中 EC 3.6.4.12(3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸磷酸化酶)、EC 3.2.1.86(β-半乳糖苷酶)、EC 2.7.7.7(蛋白激酶 A)、EC 2.7.1.69(甘油激酶)、EC 2.7.13.3(磷酸果糖激酶 2)、EC 2.7.7.6(磷酸甘油酸激酶)、EC 3.6.3.21(焦磷酸酶)、EC 3.6.3.3(焦磷酸酶)等功能丰度较高。在硫酸化反应和糖苷水解、蛋白质磷酸化和甘油代谢、糖代谢调节、无机焦磷酸代谢和能量代谢方面均具有较高的活性, 为豆酱的复杂风味奠定了基础。相比之下, 工业化组(GY-1)样本中的酶功能丰度展现出显著的差异性, 这种差异同样体现在与传统工艺组样本的对比中。其中, 仅 EC 5.4.2.12(谷胱甘肽合成酶)和 EC 5.99.1.2(异构酶)等少数酶功能的丰度较高, 这揭示了工业化组细菌功能的相对单一性, 尤其在谷胱甘肽代谢及代谢物生成与转化方面展现出明显优势, 进而确保了产品品质的均一性。这些差异反映了传统工艺组和工业化生产组在微生物群落结构和功能上的显著不同。传统工艺豆酱保留了更多的传统发酵微生物, 这些微生物在多种代谢途径中具有较高的活性, 从而影响大豆酱的风味、质地和保质期。工业化生产豆酱微生物群落结构较为单一的, 增强了特定代谢途径的活性, 从而提高了产品的稳定性。

由图 11b 知: 在真菌群落酶功能丰度方面, 传统工艺组(CT-1~CT-4)与工业化组(GY-1)差异并不大, EC 3.6.1.3(3-磷酸甘油酸磷酸酶)、EC 5.3.1.4(甘油酸-2-脱氢酶)、EC 2.7.7.6(磷酸甘油酸激酶)、EC 3.2.1.3(α-酮戊二酸脱氢酶)、EC 5.2.1.8(顺乌头酸水合酶)、EC 1.14.14.1(黄嘌呤氧化酶)、EC 3.2.1.18(草酰乙酸水解酶)、EC 2.7.7.7(蛋白激酶 A)等丰度略高, 在糖酵解、糖异生、甘油酸代谢、有机酸的转化、蛋白质的磷酸化、嘌呤代谢、乙醛酸循环等催化功能丰度占优, 可能与传统发酵过程中微生物群落的多样性和复杂性有关, 这些微生物可能在发酵过程中产生了更多的风味物质和代谢产物, 工业化组(GY-1)则在 EC 2.4.2.30(N-乙酰神经氨酸合成酶)、EC 3.1.3.16(磷酸二酯酶)、EC 3.4.25.1(肽基脯氨酸水解酶)、EC 1.6.5.5(甲硫氨酸合成酶)等功能上表现出较高的丰度, 在蛋白质降解和氨基酸代谢方面具有较高的活性, 在糖苷代谢和核酸代谢方面具有显著优势, 也揭示在一定条件下工业化生产周期更短, 风味更为稳定的原因。

2.3 风险微生物分析

通过 1.2.6 方法, 对获得的 16S rDNA 序列进行 blast 分析, 以识别不同生产方式下豆酱中的风险菌见图 12。

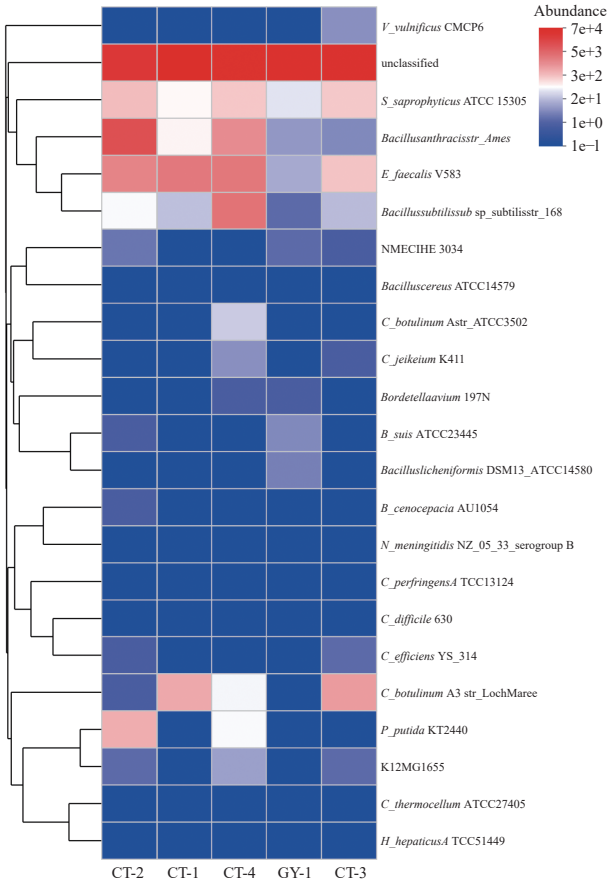


图 12 不同豆酱产品风险菌 heatmap 图

Fig.12 Heatmap of risk bacteria in different bean paste products

基于不同分组豆酱样本(传统工艺组 CT-1~CT-4 与工业化组 GY-1)的风险菌 heatmap 图分析, 两组样本在可能存在的风险菌构成上存在显著差异, 传统

工艺组中，尤其是样本 CT-1 和样本 CT-2 中，致病性弧菌（*Vibrio vulnificus*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）等风险菌丰度显著偏高；产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）与艰难梭菌（*C. difficile*）的存在则提示传统发酵过程中可能存在厌氧环境控制不足；蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）的高检出可能源于原料污染或加工环节卫生缺陷导致产毒菌株增殖风险。这些微生物可能引起食源性疾病的风险菌种，其存在可能对豆酱的食品安全性构成威胁。工业化组（GY-1）中这些风险微生物的相对丰度显著降低，表明工业化生产工艺在控制潜在致病菌方面具有显著优势。因此，在豆酱生产，特别是传统工艺的生产过程中，必须高度重视潜在风险菌的控制。

3　结论

本研究对中国东北地区传统工艺和工业化生产的豆酱样本进行微生物群落结构分析发现，不同农户传统工艺生产的豆酱微生物群落稳定性差、代谢功能复杂，发酵的核心微生物为乳酸菌属（*Lactobacillus*）、曲霉属（*Aspergillus*），微生物代谢功能如硫酸化反应、糖苷水解、蛋白质磷酸化和甘油代谢等活性高，更好地解释了豆酱的复杂风味生成原因。基于自建风险菌 16S rDNA 全长基因数据库比对发现传统工艺生产的豆酱中可能存在致病性弧菌（*Vibrio vulnificus*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）等风险菌。相比之下，工业化生产通过标准化菌种接种和工艺控制明显减少了风险菌的存在，虽然微生物群落结构单一，风味多样性丧失，但菌群稳定性强（乳酸菌属和曲霉属丰度提升），在蛋白质降解、氨基酸代谢、糖苷代谢、核酸代谢等方面具有显著优势，工业化生产的周期短，食品安全性更高。研究揭示了生产工艺对豆酱微生物生态和食品属性的双重影响，为传统工艺生产豆酱的生物风险防控和工业化生产豆酱的菌群优化提供了理论依据，未来可通过功能性菌种的筛选培育或可控混合发酵等生产策略平衡豆酱风味和安全性。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

［1］张发柱. 豆酱制作起源考辨[J]. 调味副食品科技，1983(1)：17−20. ［ZHANG F Z. On the origin of Doubanjiang production[J]. Technology of Flavoring and Auxiliary Food Products, 1983(1): 17−20.］

［2］魏艳丽，鲁绯. 中国传统发酵酱的演变[J]. 中国酿造，2019，38(2)：7−10. ［WEI Y L, LU F. Evolution of traditional fermented sauces of China[J]. China Brewing, 2019, 38(2): 7−10.］

［3］姜锦惠，潘国杨，陶鑫禹，等. 基于 HS-SPME-GC-MS 结合多元统计分析市售豆酱的挥发性风味物质[J]. 食品工业科技，2025，46(16)：323−334. ［JIANG J H, PAN G Y, TAO X Y, et al. Analysis of volatile flavor substances in commercial soybean paste based on HS-SPME-GC-MS combined with multivariate statistics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(16): 323−334.］

［4］金曼芹，罗丹，薛文通. 豆酱的风味物质及微生物多样性的研究进展[J]. 中国酿造，2023，42(11)：1−8. ［JIN M Q, LUO D, XUE W T. Research progress of flavor components and microbial diversity in soybean paste[J]. China Brewing, 2023, 42(11): 1−8.］

［5］陈玉婷. 自然发酵豆酱中产蛋白酶、淀粉酶霉菌的分离筛选及应用[D]. 沈阳：沈阳农业大学，2019. ［CHEN Y T. Isolation, screening and application of molds producing protease and amylase in naturally fermented soybean paste[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.］

［6］王哲. 东北传统豆酱制作工艺及酱文化发展研究[D]. 南京：南京农业大学，2017. ［WANG Z. Research on the traditional bean paste production process and the development of paste culture in northeast China[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.］

［7］任晓蕾，鲍捷，郭宝松，等. 东北传统大酱中产抗菌物质菌株的筛选及安全性研究[J]. 中国食品学报，2024，24(7)：100−110. ［REN X L, BAO J, GUO B S, et al. Screening of antibacterial substance-producing strains and safety study in traditional soybean paste from northeast China[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(7): 100−110.］

［8］王亚琦，童星. 豆酱发酵过程升温及通气对其风味形成的影响[J]. 中国调味品，2024，49(9)：96−100,108. ［WANG Y Q, TONG X. Effects of temperature increase and aeration on the flavor formation during the fermentation process of bean paste[J]. China Condiment, 2024, 49(9): 96−100,108.］

［9］GE J W, JIANG C. The Dynamics analysis of fungal community diversity during the fermentation process of Chinese traditional soybean paste[J]. Waste Biomass, 2020, 11: 4789−4797.

［10］ZHAO J, DAI X, LIU X, et al. Changes in microbial community during Chinese traditional soybean paste fermentation[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2009, 44(12): 2526−2530.

［11］KIM Y, KIM M, KWON S, et al. Analyses of bacterial communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods[J]. The Journal of Microbiology, 2011, 49(3): 340−348.

［12］LEE S, LEE S, SINGH D, et al. Comparative evaluation of microbial diversity and metabolite profiles in doenjang, a fermented soybean paste, during the two different industrial manufacturing processes[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1578−1586.

［13］CHENG W, XU F, LI G. The correlation between the determination of vaginal micro-ecological composition and the outcome of HPV Infection by high-throughput metagene sequencing information technology on the Illumina platform[J]. Journal of Infection and Public Health, 2020, 12(13): 1961−1966.

［14］BREITENWIESER F, DOLL E V, CLAVEL T, et al. Complementary use of cultivation and high-throughput amplicon sequencing reveals high biodiversity within raw milk microbiota[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11(1664-302X): 1−12.

［15］LIU C, ZHAO D, MA W, et al. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas sp*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(3): 1421−1426.

［16］HAN C, SHI C, LIU L, et al. Majorbio Cloud 2024: Update single-cell and multiomics workflows[J]. iMeta, 2024, 3(4): e217.

[17] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537−7541.
[18] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol, 2011, 12(6): R60.
[19] BARBERÁN A, BATES S T, CASAMAYOR E O, et al. Erratum: Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. The ISME Journal, 2014, 8(4): 952.
[20] DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J R, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 685−688.
[21] CHEN L, YANG J, YU J, et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(suppl-1): D325−D328.
[22] ZHOU S, LIU B, ZHENG D, et al. VFDB 2025: An integrated resource for exploring anti-virulence compounds[J]. Nucleic Acids Research, 2025, 53(D1): D871−D877.
[23] ELENA BARTKIENE R L V L. Agar-immobilized basil–lactic acid bacteria bioproducts as goat milk taste-masking agents and natural preservatives for the production of unripened goat cheese[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 12(101): 10866−10876.
[24] ZHANG J, ZHANG C, WU W, et al. Correlation of the bacterial communities with umami components, and chemical characteristics in Zhejiang xuecai and fermented brine[J]. Food Research International, 2021, 140: 109986.
[25] M. SHAUKAT M B H S. Determination and optimization of crude extracellular amylase extracted from different bacillus species[J]. Pakistan Journal of Science, 2021, 73(1): 1-12.
[26] 桑梓晴, 谢强, 裴志亮, 等. 甜面酱发酵过程中微生物多样性及其与风味形成关系的研究进展[J]. 中国调味品, 2024, 49(2): 192−198. [SANG Z Q, XIE Q, PEI Z L, et al. Research progress on microbial diversity and its relationship with flavor formation during the fermentation process of sweet bean paste[J]. China Condiment, 2024, 49(2): 192−198.]
[27] LEGODI L M, LA GRANGE D C, VAN RENSBURG E L J. Production of the cellulase enzyme system by locally isolated *Trichoderma* and *Aspergillus* species cultivated on banana *Pseudostem* during solid-state fermentation[J]. Fermentation, 2023, 9(2311−5637): 412.
[28] MANIMEKALAI D, SENTHILKUMAR G, AMBIKAPATHY V, et al. Efficacy of *Aspergillus* sp in the production of protease enzyme with different substrates[J]. Journal of Pharmaceutical Research International, 2021, 0(2456-9119): 643−653.
[29] 刘思佳, 孙晓东, 卢萌萌, 等. 传统发酵豆酱中产脂肪酶菌株的筛选[J]. 中国酿造, 2015, 34(12): 34−37. [LIU S J, SUN X D, LU M M, et al. Screening of lipase-producing strains in traditional fermented bean paste[J]. China Brewing, 2015, 34(12): 34−37.]
[30] 吴学凤, 武光龙, 李兴江, 等. 雪茄烟叶关键致霉菌分离鉴定与拮抗菌株筛选及抑霉效果[J]. 烟草科技, 2024, 57(11): 36−46. [WU X F, WU G L, LI X J, et al. Isolation and identification of key mold-causing fungi in cigar tobacco leaves and screening of antagonistic bacterial strains and their anti-mold effects[J]. Tobacco Science and Technology, 2024, 57(11): 36−46.]
[31] 王新珂. *Candida glycerinogenes* 有氧条件下乙醇发酵的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2024. [WANG X K. Study on ethanol fermentation of *Candida glycerinogenes* under aerobic conditions[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2024.]
[32] STEFAN FREESE T V F S. C- and N-catabolic utilization of tricarboxylic acid cycle-related amino acids by *Scheffersomyces stipitis* and other yeasts[J]. Yeast, 2011, 28(5): 375−390.
[33] 宋琛琛, 何丽君, 王若冰, 等. 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测及去除研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2025, 46(1): 114−125. [SONG C C, HE L J, WANG R B, et al. Research progress on detection and removal of deoxynivalenol in food[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2025, 46(1): 114−125.]
[34] LUO S, DU H, KEBEDE H, et al. Contamination status of major mycotoxins in agricultural product and food stuff in Europe[J]. Food Control, 2021, 127: 108−120.