

基于高通量测序分析豆粕发酵过程中 细菌群落结构及多样性

王 格¹ 董胜奇¹ 张 涛² 葛向阳¹

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070;
2. 湖北邦之德牧业科技有限公司, 黄石 435000

摘要 为分析豆粕发酵过程中各阶段的细菌群落结构及多样性, 利用 MiSeq 高通量测序技术检测 2 批发酵豆粕中细菌的 16S rRNA 基因 V3-V4 高变区序列, 比较发酵 0、24、48 h 时细菌群落的差异。结果显示: 在属水平上, 发酵豆粕中的主要优势菌属($\geq 1.0\%$) 为芽胞杆菌属(*Bacillus*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、乳酸片球菌属(*Pediococcus*); 随发酵进行芽胞杆菌属相对丰度逐渐降低, 乳杆菌属相对丰度先升高后趋于稳定; 2 批豆粕在整个发酵过程中细菌群落结构变化相似, 发酵后期细菌群落结构均趋于稳定; 结果表明豆粕发酵过程中微生物群落结构变化是相对稳定的。

关键词 豆粕; 发酵; 高通量测序; 细菌群落; 多样性

中图分类号 S 188⁺.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)05-0089-06

豆粕是大豆榨油后的副产物, 其产量高、价格便宜, 而且含有大量种类丰富的蛋白质^[1], 已经成为动物饲料重要的蛋白质来源^[2]。然而豆粕中所含的大分子蛋白^[3]具有抗原性, 不利于动物尤其是幼龄动物的消化吸收, 并且豆粕中含有的抗营养因子容易导致动物腹泻等症状^[4]。利用微生物进行豆粕发酵, 可以有效地将大豆中的粗蛋白分解为氨基酸和小肽, 改善豆粕的营养成分^[5]; 降低抗营养因子的含量^[6], 有利于动物的吸收利用; 豆粕发酵后风味改善, 对动物具有一定的诱食作用^[7]; 发酵过程中微生物代谢产生的活性成分还具有促进健康、预防疾病等功效^[8]。

芽胞杆菌、乳酸菌是目前应用于豆粕发酵的主要菌种^[9], 生产中通常采用混菌发酵的方式^[10-11]。微生物在发酵过程中会根据自己的生长喜好而处于不同的生长态势, 而且采用的是生料固态发酵, 条件较为粗放, 使得发酵体系的微生物群落变化更加复杂。采用 DGGE、克隆文库等技术可以对发酵体系中的微生物分布进行检测, 然而这些检测技术具有较大的局限性, 无法全面地揭示群落结构^[12]。随着分子生物学技术的发展, 高通量测序可以一次性对数百万 DNA 分子进行检测, 全面且准确地反映出

不同种类微生物的分布状况^[13-15], 已经广泛应用于各种环境条件下的微生物菌群分析。

目前对于发酵豆粕的研究主要以消除抗营养因子和提高营养成分为主, 对于发酵过程中微生物群落结构的分析鲜有报道。本研究通过高通量测序技术对不同发酵阶段的豆粕进行检测, 研究微生物群落的动态变化及演替规律, 明确不同发酵阶段下起主导作用的优势菌种, 揭示发酵过程微生物菌群的变化与产品品质的关系, 以为菌种筛选、组合以及工艺优化提供基础。对微生物群落的检测还能及时反映出发酵过程中是否混入有害菌种, 进而对有害菌种的数量进行控制, 避免发酵过程中产生有毒物质从而损害禽畜健康, 促进发酵豆粕向着安全、健康方向发展。

1 材料与方法

1.1 样品来源

发酵豆粕样品取自湖北省邦之德牧业科技有限公司, 采用 5 点取样法, 选取发酵池中 5 个不同的发酵点, 每个点取 100 g 样品, 混合均匀, 作为 1 个样本。选取 2 个不同的发酵池, 在发酵 0、24、48 h 分别取样, 在第 1 池取得的样本标记为 1_0h、1_24h、

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 湖北省科技支撑计划项目(2015BBA186)

王 格, 硕士研究生. 研究方向: 微生物学与发酵工程. E-mail: 1697277225@qq.com

通信作者: 葛向阳, 副教授. 研究方向: 微生物学与发酵工程. E-mail: gxy@mail.hzau.edu.cn

1_48h, 在第 2 池取得的样本标记为 2_0h、2_24h、2_48h, 共 6 个样本。将取好的样品装入样品袋, 用液氮保存, 送去测序。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 抽提试剂盒 (OMEGA-soil DNA Kit), 美国 Omega Bio-Tek 公司; 2% agarose gels, 西班牙 Biowest 公司; FastPfu Polymerase、FastPfu Buffer 和 dNTPs, 中国 TransGen 公司; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, 美国 Axygen 公司; IlluminaMiSeq platform, 美国 Illumina 公司; FastDNASPINKit for Soil, 美国 MP 公司。

ABI GeneAmp © 9700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; NanoDrop2000 型超微量分光光度计, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; TBS380 微型荧光计, 美国 TurnerBioSystems 公司; BioTek ELx800 酶标仪, 美国 Biotek 公司; IlluminaMiSeq 测序仪、IlluminaHiSeq 测序仪, 美国 Illumina 公司。

1.3 样品总 DNA 的抽提

利用 Omega-soil DNA Kit 试剂盒抽提发酵豆粕样品的总 DNA, 利用 NanoDrop2000 检测 DNA 浓度和纯度, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取的质量。

1.4 细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增

对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增, 所用到的引物为 338F (5'-ACTCCTACGG-GAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACH-VGGGTWTCTAAT-3')。PCR 反应体系 (20 μ L): FastPfu Buffer (5 \times) 4.0 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 引物 F (5 μ mol/L) 0.8 μ L, 引物 R (5 μ mol/L) 0.8 μ L, FastPfu Polymerase 0.4 μ L, DNA 模板 10 ng, 补加灭菌超纯水至 20 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性处理 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收 PCR 产物并纯化, 检测合格后构建文库, 由上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序和分析。

1.5 测序数据的质控和处理

使用 Trimmomatic 软件对原始测序序列进行质控, 再用 FLASH 软件进行拼接^[16]后获得优质序列。

1.6 OTU 聚类 and 物种分类

数据质控后得到优质序列, 利用 UPARSE 软件列按 97% 的相似度进行聚类分析^[17], 再利用 UCHIME 软件将嵌合体去除^[18], 得到 OTU (opera-

tional taxonomic units) 代表序列, 获得每个 OTU 分类信息。对各样本中 OTU 的丰度信息进行统计处理, 最终得到物种 OTU 丰度表^[19]。

1.7 Alpha 多样性分析

根据 OTU 聚类分析的结果, 采用 Mothur (version v.1) 在 OTU 相似水平 97% 的条件下计算多样性指数, 包括 OTU 数量、香农指数、Ace 指数和覆盖率指数。

1.8 群落组成分析

利用 RDP classifier 对获得的 OTU 序列进行物种分类注释, 并与 Silva 数据库 (SSU123) 进行对比, 将比对阈值设定为 70%。选取不同的分类水平进行群落组成的统计分析, 根据分析结果, 通过 QI-ME (v1.8.0) 软件绘制样品菌群分布柱状图、热图等可视化方法研究群落组成。

2 结果与分析

2.1 物种多样性分析

测序数据统计如表 1 所示, 经数据质控后 6 份样品共得到 217 275 条优质序列。优质序列长度分布在 421~460 bp, 集中在 441~460 bp, 满足序列分析要求。在发酵 0、24、48 h 这 3 个时间点, 2 批样品的 OTU 数量和 Ace 指数总体上变化不大, 表明随着发酵进行, 豆粕中的细菌群落丰富度变化不大, 趋于稳定。对 2 批样品的 Shannon 指数随发酵时间的变化进行显著性检验, 结果显示差异不显著 ($P > 0.05$), Shannon 指数趋于稳定, 表明随着发酵进行, 豆粕中的细菌群落多样性趋于稳定。Coverage 指数都在 99.99% 以上, 表明测序数据能够覆盖目前状态下样品中的细菌种类, 能真实反映样本中的细菌群落情况, 可用于后续分析。

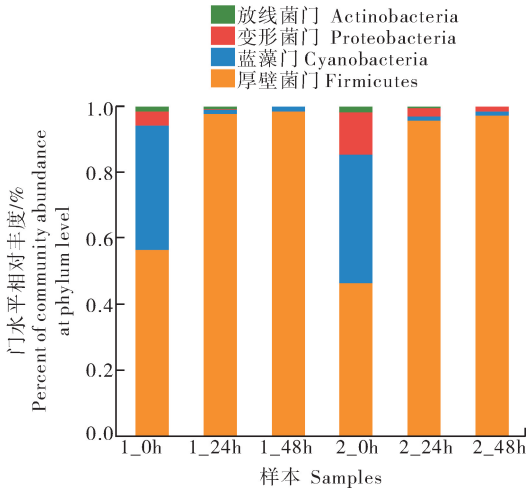
2.2 物种组成分析

在门分类水平上, 以相对丰度 $\geq 1\%$ 为阈值, 2 批样本共检测到 4 个细菌门, 如图 1 所示, 分别为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、蓝藻门 (Cyanobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。厚壁菌门 (Firmicutes) 是豆粕发酵整个过程中的绝对优势菌门, 发酵起始时其平均相对丰度为 51.60%, 发酵 24 h 达到 97.06%, 48 h 为 98.16%, 随发酵进行, 相对丰度先升高之后趋于稳定。蓝藻门 (Cyanobacteria, 38.43%) 和变形菌门 (Proteobacteria, 8.47%) 在发酵起始时占据着较高比例, 随发酵进行, 其相对丰度逐渐降低, 在发酵过

表 1 各样本 Alpha 多样性指数

Table 1 The Alpha diversity index in each sample

样本 Sample	Tag 数量 Tag number	OTU 数量 OTU number	香农指数 Shannon index	Ace 指数 Ace index	覆盖率/% Coverage
1_0h	41 952	56	2.30	56.36	99.99
1_24h	32 041	55	2.16	55.87	99.99
1_48h	37 392	54	2.28	60.78	99.97
2_0h	30 350	57	2.32	57.23	99.99
2_24h	30 749	58	2.26	58.30	99.99
2_48h	44 791	58	2.33	58.64	99.99



不同颜色的柱子代表不同的物种，柱子的长短代表这物种所占比例大小。The columns of different colors represent different species, and the length of the column represents the proportion of the species.

图 1 细菌门分类水平的比较

Fig.1 Comparison of bacteria groups at phylum level

程中一直存在。放线菌门 (Actinobacteria) 发酵起始相对丰度偏低，随发酵进行，相对丰度逐渐降低。

在属分类水平上，以相对丰度 $\geq 1\%$ 为阈值，2 批样本共检测到 16 个细菌属，如图 2 所示。乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*) 为豆粕发酵过程中的绝对优势菌属。发酵 0 h，二者平均相对丰度之和为 17.07%，24 h 为 84.13%，48 h 为 85.73%，随发酵进行先升高后趋于稳定。芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 的相对丰度逐渐降低，在发酵过程中一直存在。乳酸片球菌属 (*Pediococcus*) 随发酵进行其相对丰度不断升高，属于优势菌属。

2.3 相似性聚类分析

对 6 个样本微生物丰度的相似性进行聚类，选取总丰度前 50 的物种绘制热图 (图 3)，使高丰度和低丰度的物种分区域聚集。热图中颜色的深浅分别代表物种丰度的高低，越偏绿丰度越低，越偏红丰度越高。1_0h、2_0h 这 2 个样本聚为一簇，说明这 2

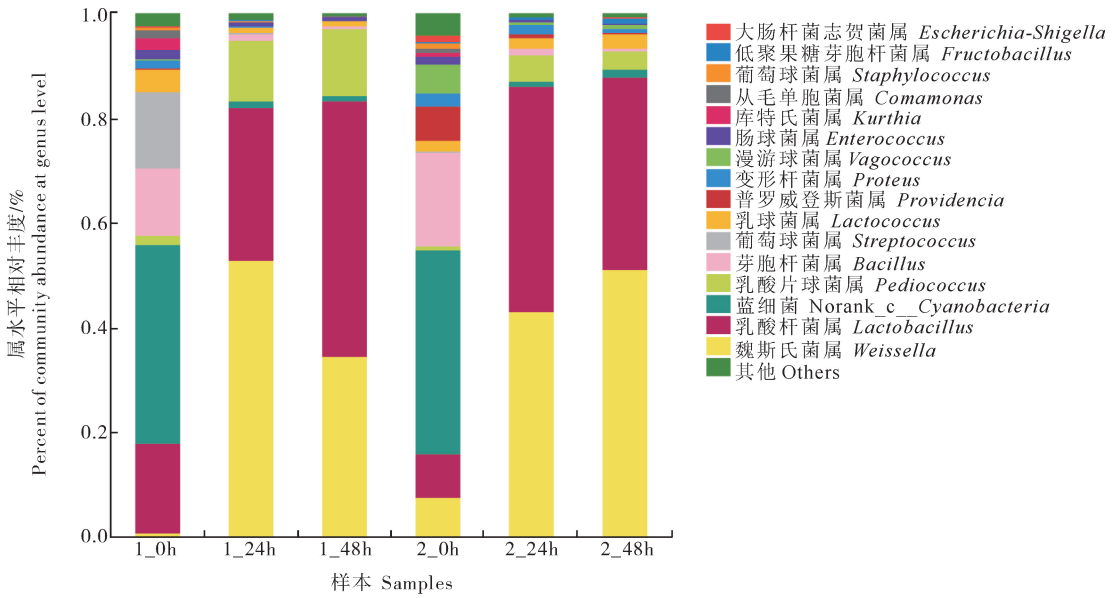
个样本相似，即发酵起始时样本的细菌群落结构相似性高，差异较小。1_24h、1_48h、2_24h、2_48h 这 4 个样本聚为一簇，说明 2 批豆粕经过发酵后细菌群落结构相似。综上，发酵初期 (0~24 h)，豆粕细菌群落结构变化都较大，发酵后期 (24~48 h) 趋于稳定。乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳酸片球菌属 (*Pediococcus*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 在 2 批样本中均具有较高的相对丰度。

2.4 细菌群落的主成分分析

样本通过降维分析后，在主成分上有相对坐标点，样本点的距离越近，代表了样本的微生物群落结构越相似。由图 4 可知，豆粕发酵起始时细菌群落结构 (发酵 0 h) 与其他发酵时期豆粕中的细菌群落有较大差异。主成分 1 (PC1) 和主成分 2 (PC2) 对样本差异性的贡献分别达到了 84.88% 和 6.67%，共计 91.55%，可以代表绝大部分变量信息，并且豆粕细菌群落随发酵时间的变化过程主要是在 PC1 轴方向发生，据此可以将豆粕发酵过程分为 2 个阶段：第 1 个阶段为起始阶段 (发酵 0 h)，第 2 个阶段为发酵中后期 (发酵 0~48 h)。这种分类表明豆粕的细菌菌群在发酵前后是有差异的，并且是按照一定的规律 (由芽胞杆菌为主导的菌群过渡到乳酸菌为主导的菌群) 在变化，这种变化为建立发酵豆粕的监控模型奠定了理论基础。

3 讨论

目前，利用高通量测序技术研究环境中微生物的群落结构及多样性呈逐渐上升的趋势^[20]。传统的 DGGE 和克隆文库等分子检测技术，检测限低、工作量大，只能检测到部分具有较高丰度的优势菌群，难以获得整个环境中微生物的菌群结构与多样性信息，具有较大的局限性。单次高通量测序分析获得的基因序列数以百万甚至亿万计，能更灵敏检测到稀少的微生物菌群，更真实反映不同样本间菌群结构差异^[21]。



在分类学数据库中存在的一些没有确切分类学名称的中间等级,用“Norank”标记。There is no clear classification information or classification name at the level of taxonomy,marked with “Norank” as a marker.

图 2 细菌属分类水平的比较

Fig.2 Comparison of bacteria groups at genus level

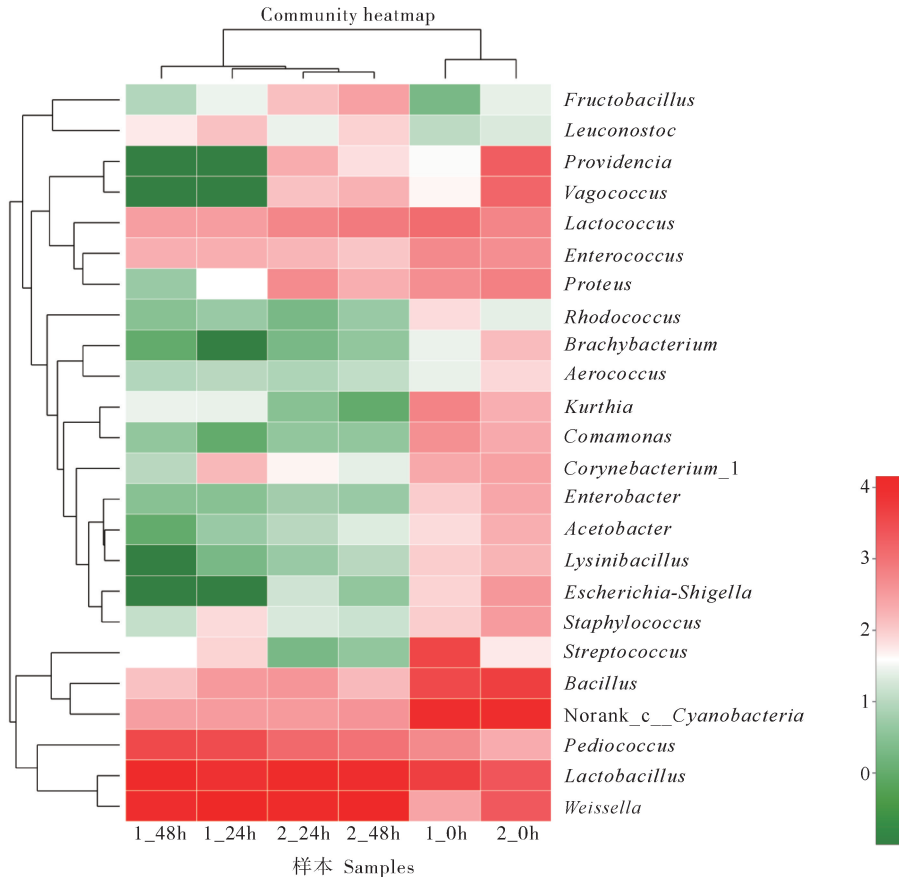


图 3 各样本细菌聚类分析热图

Fig.3 Based on the level of genus cluster analysis of bacteria in each sample

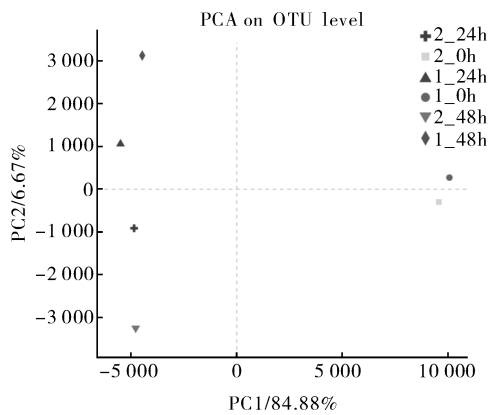


图4 各样本在 OTU 水平上的细菌主成分分析

Fig.4 Analysis of the principal component of bacteria at the level of the OTU in each sample

本研究对豆粕发酵过程中各个阶段的细菌群落结构及多样性进行了分析,结果显示:发酵 0 h,细菌菌群的种类和丰度差异主要由豆粕原料、水、菌种和环境中的细菌决定。2 批样本的 Shannon 指数和 Ace 指数随着发酵进程变化不显著,说明豆粕在发酵过程中的细菌多样性变化不大,趋于稳定。虽然发酵后乳酸菌大量生长繁殖,成为绝对的优势菌群,造成其他细菌相对丰度偏低,但这些细菌在发酵过程中一直存在,所以总体上细菌的多样性变化不大。芽胞杆菌属在 2 批样本中的相对丰度逐渐降低,但在发酵过程中一直存在,这极有可能是因为发酵过程中逐渐形成厌氧环境,使菌群中比例占优势的好氧菌大量减少而造成的^[21],厌氧型的乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、兼性厌氧型的魏斯氏菌属(*Weissella*)则迅速增长,成为绝对优势菌属,细菌群落结构达到相对稳定状态。在发酵 0 h 时,豆粕中含有大量蓝细菌(*Cyanobacteria*),平均相对丰度 38.42%,可能是因为发酵用水是没有经过除菌处理的自来水。随着发酵进行,其相对丰度逐渐降低,对发酵过程影响不大。乳酸片球菌属(*Pediococcus*) 在发酵过程中相对丰度逐渐升高,为发酵过程中的优势菌属。

通过比较不同批次发酵豆粕细菌菌群结构,发现在不同批次的豆粕发酵过程中细菌群落主要组成及其动态变化规律大体一致,接入的乳酸杆菌(*Lactobacillus*)和芽胞杆菌(*Bacillus*)在发酵过程中一直存在,证明豆粕固态发酵工艺是相对稳定的。由于固态基质菌群的复杂性和不均一性,豆粕发酵过程中细菌群落的丰富度和多样性一直处于与外界环境的适应和平衡中,微生物经过不断的适应和代

谢调整逐渐形成稳定的群落结构,这与王宗敏^[23]研究镇江香醋醋酸发酵阶段菌群结构变化得到的结论是一致的。

豆粕发酵是一个相对开放的固态发酵过程,其生物安全性一直受到用户的关注甚至质疑。目前多数厂家未对豆粕原料进行筛选和灭菌处理,原料和环境中的各种杂菌在发酵过程中也可能生长繁殖,这些杂菌是否有害将直接影响发酵豆粕的品质。其中大肠杆菌和沙门氏菌通常作为饲料生物安全指标,本研究没有检测到豆粕发酵中有大肠杆菌(*Escherichia*)和沙门氏菌(*Salmonella*),表明该发酵菌种组合及微生态环境能有效抑制有害菌生长繁殖,发酵工艺是安全的。

本研究只针对发酵豆粕中的细菌群落结构进行了分析,后续将对真菌群落结构进行分析,从而更加完整地揭示豆粕发酵过程中的微生物菌群结构和动态变化规律,为发酵豆粕的菌株筛选和工艺调整提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 李俊.以豆粕为基质进行酵母培养物的研究[D].武汉:华中农业大学,2014.
- [2] MA C Y, LIU W S, KWOK K C. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue(Okara)[J]. Food research international, 1996, 29(8): 799-805.
- [3] SOTAK-PEPER K M, GONZALEZ-VEGA J C, STEIN H H. Concentrations of digestible, metabolizable, and net energy in soybean meal produced in different areas of the United States and fed to pigs [J]. J Anim Sci, 2015(93): 5694-5701.
- [4] SOLOMON S G, OKOMODA V T, OGUCHE O. Nutritional value of raw *Canavalia ensiformis* and its utilization as partial replacement for soybean meal in the diet of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings [J]. Food science & nutrition, 2018, 6(1): 207-213.
- [5] 徐倩.外加酶提高豆粕水解度的研究[D].武汉:华中农业大学, 2009.
- [6] NGONGOLA-MANANI T A, ØSTLIE H M, MWANGWELA A M, et al. Metabolite changes during natural and lactic acid bacteria fermentations in pastes of soybeans and soybean-maize blends[J]. Food science & nutrition, 2014, 2(6): 768-785.
- [7] 马文强,冯杰,刘欣.微生物发酵豆粕营养特性研究[J].中国粮油学报, 2008, 23(1): 121-124.
- [8] OMAFUVBE B O, FALADE O S, OSUNTOGUN B A, et al. Chemical and biochemical changes in African locust bean (*Parkia biglobosa*) and melon (*Citrullus vulgaris*) seeds during fermentation to condiments[J]. Pakistan journal of nutri-

- tion, 2004, 3: 140-145.
- [9] 刘萍. 降解豆粕抗营养因子菌株的筛选及发酵条件优化[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [10] MUKHERJEE R, CHAKRABORTY R, DUTTA A. Role of fermentation in improving nutritional quality of soybean meal: a review[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29(11): 1523-1529.
- [11] 詹滢滢, 柯芙蓉, 陈庆达, 等. 发酵时间和料水比对豆粕发酵的影响[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2015, 44(2): 193-197.
- [12] NAIM M. Soybean isoflavones, characterization, determination and antifungal activity[J]. *Journal of agriculture food chemistry*, 1974, 22(5): 806-810.
- [13] 成敏玲, 刘陈飞, 程丹逸, 等. 春夏季节东湖不同富营养化区域水体细菌群落的动态变化[J]. *华中农业大学学报*, 2017, 36(5): 52-59.
- [14] 陶勇, 芮俊鹏, 李家宝, 等. 浓香型白酒窖泥中细菌和古菌的组成与多样性[J]. *化工学报*, 2014, 6(5): 1800-1806.
- [15] 石焱, 马徐发, 吴志新, 等. 水雍菜浮床养殖模式下黄颡鱼肠道菌群结构分析[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(2): 69-76.
- [16] 黄莹娜, 熊小毛, 胡远亮, 等. 基于 PCR-DGGE 和高通量测序分析白云边酒窖泥细菌群落结构与多样性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 375-383.
- [17] MAGOCC T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [18] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [19] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [20] SCHUSTER S C. Next-generation sequencing transforms today's biology[J]. *Nature methods*, 2008, 5(1): 16-18.
- [21] ZHOU J Z, WU L Y, DENG Y, et al. Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection[J]. *ISME journal*, 2011, 5(8): 1303-1313.
- [22] 陈曦, 李英英, 宋铁英. 乳酸菌对豆粕发酵中特定菌群与多肽水平的影响[J]. *粮食与饲料工业*, 2017, 12(6): 46-49.
- [23] 王宗敏. 镇江香醋醋酸发酵阶段菌群结构变化与风味物质组成之间的相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.

High-throughput sequencing based analyses of structure and diversity of bacterial community during fermentation process of soybean meal

WANG Ge¹ DONG Shengqi¹ ZHANG Tao² GE Xiangyang¹

1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;
2. Bangzhide Company Limited of Hubei Province, Huangshi 435000, China

Abstract In order to analyze the bacterial community structure and diversity at various stages during the fermentation process of soybean meal, MiSeq high-throughput sequencing technology was used to detect V3-V4 hypervariable region sequences of the 16S rRNA gene of two batches fermented soybean meal. The differences of bacterial community between the two batch fermented soybean meal at 0 h, 24 h, 48 h were compared. The results showed that the main dominant genus ($\geq 1.0\%$) in fermented soybean meal was *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Pediococcus*. The relative abundance of *Bacillus* was gradually reduced. The relative abundance of *Lactobacillus* increased first and then tended to be stable. The changes of bacterial community structure in the two batches of soybean meal during the entire fermentation process were similar, but the bacteria community structure in the late fermentation stage tended to be stable. It is indicated that the composition and change of microbial community during the fermentation process of different batches of soybean meal were relatively stable. It will provide guidance for the improvement and regulation of fermentation technology.

Keywords soybean meal; fermentation; high-throughput sequencing; bacterial community; diversity

(责任编辑: 张志钰)