

Biolog-ECO 解析淡豆豉发酵过程中微生物群落碳代谢特征

李东文,朱海针,苏明声,梁永红,谢小梅

(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)

摘要:微生物是淡豆豉发酵的核心,研究淡豆豉发酵炮制过程中微生物群落碳代谢情况,对于揭示淡豆豉炮制机理意义重大。采用 Biolog 生态微平板研究了不同发酵时间点淡豆豉样品的碳代谢特征。结果表明:发酵第 6 天样品的 AWCD 值在整个培养过程中明显高于其它样品,发酵第 1 天,再闷 9 和 15 d 样品的 AWCD 值曲线差异不明显;多样性分析显示,各样品间微生物 Shannon-Wiener 指数 H' 值相近,而第 6 天样品的 McIntosh 指数 U 值明显高于其它发酵时间点的样品;各样品微生物的最佳碳源种类相近,主要利用了 β -甲基-D-葡萄糖苷、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-甘露醇、葡萄糖-1-磷酸盐、D-半乳糖醛酸、吐温 40 等碳源,对 γ -羟丁酸、 α -丁酮酸、L-精氨酸、L- α -甘油、i-赤藻糖醇等利用较少。研究表明,发酵第 6 天微生物群落的碳代谢活性最高;各样品微生物的丰富度相近,第 6 天样品微生物的均匀度与其它样品差别较大;整个发酵过程微生物的最佳碳源种类相近,主要利用了糖类及其衍生物,而对氨基酸、脂肪酸、脂类利用较少。ECO 板能真实反映出淡豆豉发酵中微生物对碳源利用的整体代谢情况,但也有其局限性。

关键词:淡豆豉;微生物;Biolog 生态微平板;代谢活性;多样性

中图分类号:R283.3

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0889

An Analysis of Carbon Metabolic Characteristics of Microbial Community in the Fermentation Process of Fermented Soybean Using Biolog-ECO Method

LI Dong-wen, ZHU Hai-zhen, SU Ming-sheng, LIANG Yong-hong, XIE Xiao-mei

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine/Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

Abstract: In order to study the carbon metabolic characteristics of microbial community and reveal its mechanism in the fermentation process of fermented soybean, we cultivated the samples in different processing time of fermentation process through Biolog Eco Plate, measured the OD and analyzed its metabolic activities. The results showed that the AWCD in the 6th-day fermentation was obviously higher than other samples; the AWCD curves were similar among the samples which go through the first day fermentation, and secondary fermentation for 9 and 15 days respectively; the diversity analysis showed that the index Shannon(H') among different samples were close, but the index McIntosh(U) of the sample in the 6th day was obviously higher than others; the best carbon sources utilized by microorganisms among different samples were close and they utilize more β -Methyl-D-Glucoside, N-Acetyl-D-Glucosamine, D-Mannitol, Glucose-1-phosphate, D-Galacturonic-Acid, Tween 40 etc and less of γ -Hydroxybutyric acid, α -Ketobutyric acid, L-Arginine, L- α -Glycerol and *i*-Erythritol. The research showed that the microorganism in the 6th-day fermentation had a higher biodiversity and metabolic activity of carbon; the richness among different samples was close, and the homogeneity of sample in the 6th day was obviously higher than others; the best carbon sources utilized by microorganisms among different samples were close; the microorganisms utilize more of saccharides and their derivants, less amino acid, fatty acid and lipid. ECO Plate could truly reflects the overall situation of the microorganisms' carbon sources utilization in the process of fermentation, but also has limitations.

Keywords: Fermented soybean; Microorganism; Biolog Ecoplate; Metabolic activity; Diversity

淡豆豉是我国特有的经固态发酵制备的中药之一,以黑色种皮品系大豆为主要原料,辅以桑叶、青蒿等药材发酵加工而成,为历版《中国药典》的收录品种。淡豆豉能解表、除烦、宣发郁热,临床上用于感冒、寒热头痛,烦躁胸闷,虚烦不眠等^[1]。发酵过程中微生物体系的动态变化是淡豆豉发酵炮制的核心,但迄今对淡豆豉发酵过程中起关键性作用的微生物学研究甚少,少数的文献报道也只是依赖传统的培养分离方法,不能反映微生物群落整体代谢活性。

Biolog-ECO 板通过微生物对碳源的利用能力来表征微生物群落代谢多样性和功能性特征,该方法最初用于纯种微生物的鉴定,现已广泛应用于土壤微生物群落的研究^[2],但其在发酵中药上的研究尚未见文献报道。ECO 板无需分离培养微生物,可最大限度地保留微生物群落原有的代谢特征,通过分析混合微生物菌群利用碳源的差异,来表征其代谢多样性特征。本文首次采用 Biolog-ECO 法分析淡豆豉炮制过程微生物代谢活性特征,为揭示淡豆豉炮制机理奠定基础。

收稿日期:2014-12-16

基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ13615);江西省研究生创新专项资金项目(YC2014-S282);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(JZYC14C02);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(JZYC14A03)。

第一作者简介:李东文(1989-),女,硕士,主要从事中药学研究。E-mail:lidongwen77@163.com。

通讯作者:谢小梅(1964-),女,教授,硕士,主要从事微生物学研究。E-mail:jxsm1964@sina.com。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器设备

Biolog Microstation 主机、V 型加样槽、八通道加液器、Biolog-Eco 板(均购于美国 Biolog 公司),LRH-150 生化培养箱(上海一恒科技有限公司),MILLI-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司),AIR TECH 洁净工作台(苏净集团安泰公司)等。

1.2 样品制备

按本实验室前期参照 2010 版《中国药典》制法结合古法炮制建立的规范化淡豆豉炮制工艺^[3]制备淡豆豉。简述如下:桑叶、青蒿各 100 g,用 10 倍、8 倍水各煎煮 1 次,合并滤液。称取黑大豆 1 kg 浸于滤液中 6 h,再蒸煮 1.5 h,置于适当容器内,药渣覆盖,放于温度 30℃、湿度 70% 的培养箱内发酵至“黄衣上遍”(此过程第 1 天、6 天各取样一次),洗去药渣,罐内再闷 15 d,每 3 d 取出晒一次(此过程再闷 9 及 15 d 各取样一次),略蒸,干燥即为成品。发酵过程所取样品置于收集袋后尽快放置 4℃ 冰箱保存,并于 7 d 内进行 Biolog-ECO 板培养和微生物群落碳代谢功能分析,采样过程均无菌操作。

1.3 Biolog-ECO 技术

Biolog 技术通过分布于 96 孔中的碳源底物来分析评价微生物生理代谢特征^[4],本研究采用 31 种碳源的生态板(Biolog-ECO 板)分析不同发酵时间淡豆豉样品中微生物群落的碳代谢活性特征,即功能多样性^[5]。采用 Classen 等^[6]的方法结合淡豆豉发酵炮制的环境来制备 ECO 板接种液。首先,将淡豆豉样品在 30℃ 培养箱内活化 24 h,称取 3 g 样品至于 27 mL 0.85 mol · mL⁻¹ NaCl 溶液中,200 r · min⁻¹ 振荡 30 min,确保所有真菌孢子混合均匀,让淡豆豉颗粒沉降 30 min。取 3 mL 上清液加至 27 mL NaCl 溶液中,混匀后,再取 3 mL 上清液加至 27 mL NaCl 溶液,最终稀释比例为 1:1 000。将稀释好的菌液倒入 V 型加样槽内,用八通道移液枪向 ECO 板

的各孔中加入 150 μL 的液体,每个样品的稀释液按方法要求设置 3 组平行^[7]。将接种好的微孔板放在保湿的容器中,并置于 30℃(淡豆豉发酵温度)的恒温培养箱中,分别于 4, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h 在 Microstation 读数仪中测定,测定波长分别为 590 nm(颜色 + 浊度)和 750 nm(浊度)。采用 ML3 读数软件导出数据。

1.4 数据处理

孔的平均颜色变化率(average well color development, AWCD),即孔的平均吸光度值,计算方法如下: $AWCD = \sum (C_i - R) / n$ ^[8]。其中, C_i 是各孔吸光度值,用 590 nm 下的吸光度值减去 750 nm 下的吸光度值表示, R 是对照孔吸光度值, n 为微平板中碳源种类(本研究中为 31)。

样品多样性指数的计算参照 Magurran 的方法^[9]。Shannon-Wiener 指数 $H' = - \sum (P_i \cdot \ln P_i)$, 式中 P_i 表示第 i 个非对照孔的吸光度值与所有非对照孔吸光度值总和的比值,即 $P_i = (C_i - R) / \sum (C_i - R)$, 做这个除法的目的是对变量进行标准化,消除在点样及培养过程中对吸光度变化带来的影响误差。McIntosh 指数 $U = \sqrt{\sum (n_i^2)}$, $n_i = c_i - R$ 。

2 结果与分析

2.1 淡豆豉炮制过程微生物代谢活性变化

AWCD 值能反映不同炮制时期样品中微生物群落对碳源利用的整体情况和代谢活性,根据 1.4 的公式计算本研究中各淡豆豉样品中微生物利用 31 种碳源的 AWCD 值曲线如图 1 所示。随着培养时间的延长,各样品微生物利用碳源量呈逐渐增加的趋势,后趋于平缓。各曲线显示样品微生物在 24 h 时对碳源利用率较低,24 ~ 48 h 对碳源的利用率迅速增高,48 ~ 120 h 增长较慢,120 ~ 168 h 基本稳定;再闷 9 d 和再闷 15 d 样品的 AWCD 曲线与第 1 天非常接近,而发酵第 6 天样品的碳源利用率在整个培养过程都显著高于其它样品。

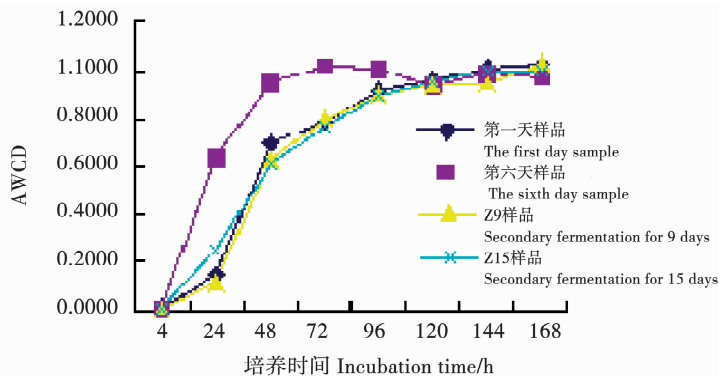


图 1 不同发酵时间点样品 AWCD 值随时间变化情况

Fig. 1 The AWCD curves of samples in different processing time of fermentation process

在培养初期,各种微生物利用微平板中丰富的碳源不断繁殖增长,其 AWCD 值呈直线上升状态,当可利用的碳源底物消耗殆尽时,微生物生长缓慢甚至停止生长,此时 AWCD 值趋向平缓最后达到一个稳定值。第 6 天样品的 AWCD 值曲线明显高于其它的样品,表明发酵第 6 天的微生物碳代谢活性明显强于其它发酵时间的样品。

2.2 淡豆豉炮制过程微生物多样性分析

对各样品进行多样性分析,按照 1.4 的公式计算各样品不同测量时间的多样性指数 McIntosh (U) 和 Shannon-Wiener (H'),并求其平均值(表 1)。Shannon-Wiener(H')指数反映微生物群落碳源利用多样性水平,表征微生物的丰富度;McIntosh(U)指数表征微生物群落的均匀度。由表 1 可知,各样品间微生物群落的 Shannon-Wiener(H')值相近,而第 6 天样品的 McIntosh(U)值明显高于其它发酵时间的样品。说明各样品间微生物的丰富度相近,但是第 6 天样品微生物的均匀度与其它样品有明显差异。

2.3 微生物对各碳源的利用情况

通过计算不同发酵时间点样品微生物利用每种碳源的 AWCD 值,绘出微生物以 ECO 板上 31 种碳源为生长基质的 AWCD 值随时间变化的曲线(图 2)。

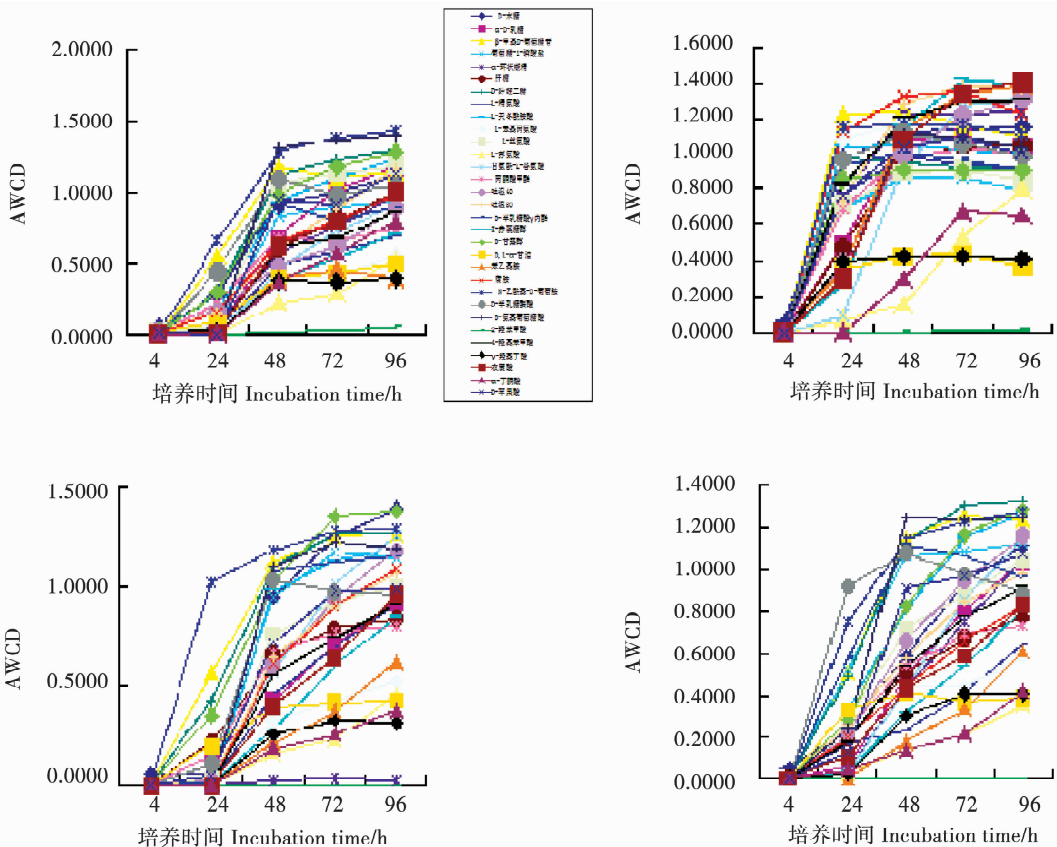
表 1 各样品微生物群落多样性指数分析($\bar{X} \pm S$)

Table 1 Diversity index analysis for the microorganism of samples in different processing time of fermentation process

样品 Sample	McIntosh(U)	Shannon-Wiener(H')
1#	4.7182 ± 1.65926	3.2742 ± 0.22939
2#	5.4837 ± 0.64951	3.3456 ± 0.4732
3#	4.7189 ± 1.63142	3.1524 ± 0.41441
4#	4.7151 ± 1.43548	3.2974 ± 0.11300

1#:第 1 d 样品;2#:第 6 d 样品;3#:再焖 9 d 样品;4#:再焖 15 d 样品。

1#:The first day sample;2#:The 6th day sample;3#:The secondary fermentation for 9 days sample;4#:The secondary fermentation for 15 days sample.



A:第 1 天样品;B:第 6 天样品;C:再焖 9 d 样品;D:再焖 15 d 样品。

A:The first day sample; B:The 6th day sample; C:The secondary fermentation for 9 days sample; D:The secondary fermentation for 15 days sample.

图 2 各样品微生物对 ECO 板 31 种碳源利用情况

Fig. 2 The utilization of 31 carbon sources in the ECO plate by the microorganisms among different samples

图2中各图直观反映了不同样品微生物群落对31种碳源的利用情况。通过比较A,B,C,D中各样品微生物对31种碳源的利用情况,分别挑选出各发酵时间点样品微生物群落的最佳碳源和其利用较少的碳源。从表2和表3中可以看出:4个样品中微生物群落的最佳碳源相似性较大,它们均对N-乙酰-D-葡萄糖胺利用较好;发酵第1天、6天和再闷9d的样品微生物对 β -甲基-D-葡萄糖苷利用率较高;

表2 各样品微生物群落的最佳碳源

Table 2 The best carbon sources utilized by microorganisms among different samples

样品 Sample	碳源 Carbon sources
发酵1 d Fermentation for the first day	β -甲基-D-葡萄糖苷、D-甘露醇、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-半乳糖醛酸
发酵6 d Fermentation for the sixth day	β -甲基-D-葡萄糖苷、N-乙酰-D-葡萄糖胺、腐胺、葡萄糖-1-磷酸盐
再闷9 d Secondary fermentation for nine days	β -甲基-D-葡萄糖苷、N-乙酰-D-葡萄糖胺、D-甘露醇、葡萄糖-1-磷酸盐
再闷15 d Secondary fermentation for fifteen days	N-乙酰-D-葡萄糖胺、吐温40、葡萄糖-1-磷酸盐、D-半乳糖醛酸

表3 各样品微生物群落利用较少的4种碳源

Table 3 The worst carbon sources utilized by microorganisms among different samples

样品 Sample	碳源 Carbon sources
发酵1 d Fermentation for the first day	L-精氨酸、L-苏氨酸、 α -丁酮酸、 γ -羟基丁酸
发酵6 d Fermentation for the sixth day	L-精氨酸、 γ -羟基丁酸、L- α -甘油、 α -丁酮酸
再闷9 d Secondary fermentation for nine days	γ -羟基丁酸、 α -丁酮酸、D-苹果酸、I-赤藻糖醇
再闷15 d Secondary fermentation for fifteen days	γ -羟基丁酸、I-赤藻糖醇、 α -丁酮酸、L- α -甘油

3 结论与讨论

Biolog-ECO方法是基于测定微生物对不同碳源利用程度的差异来表征其生理特性不同,其原理是通过直接在微平板中进行针对微生物群体的培养,并实时监测其引起的吸光度变化来表征其生理特性,该方法是揭示微生物群落间差异的强大工具^[10]。ECO板孔的平均吸光度值(AWCD)反映了微生物利用碳源的整体能力及微生物活性^[5],可作为微生物代谢活性的有效指标。我们利用Biolog-ECO法研究淡豆豉发酵过程微生物群落碳代谢情况,结果表明,发酵第6天微生物代谢活性最强,发酵第1天、再闷9d和再闷15d代谢活性差别不大;各样品间微生物的丰富度相近,即各淡豆豉样品微生物的多样性相近,而第6天样品的均匀度与其他样品有明显差异,这可能是因为发酵第6天淡豆豉中的微生物比例发生了明显的变化,这也是第6天样品微生物代谢活性最强的原因。

从不同样品微生物对31种碳源利用的情况来看,各样品微生物群落利用碳源的种类相近,整个发酵过程微生物群落主要利用了 β -甲基-D-葡萄糖苷、N-乙酰-D-葡萄糖胺、葡萄糖-1-磷酸盐、D-甘露醇、D-半乳糖醛酸、吐温40等碳源,对 γ -羟基丁酸、

发酵第6天、再闷9d和再闷15d的样品微生物对葡萄糖-1-磷酸盐利用率较高;发酵第1天、再闷9d对D-甘露醇利用率较高;发酵第6天和再闷15d分别对腐胺、吐温40利用率较高;所有的样品微生物在培养前期均对D-半乳糖醛酸有较高的利用率,到后期培养中利用率大幅度下降。各样品微生物对 γ -羟基丁酸、 α -丁酮酸、L-精氨酸、L- α -甘油、i-赤藻糖醇等利用较少。

α -丁酮酸、L-精氨酸、L- α -甘油、i-赤藻糖醇等利用较少。由此可见,在发酵过程中微生物对糖类及其衍生物利用较多,而对氨基酸、脂肪酸和脂类利用较少。这与淡豆豉发酵中微生物的生理特性相关,微生物的种类决定其偏好的碳源。其中,N-乙酰-D-葡萄糖胺是许多真菌细胞壁的重要组成部分,能为发酵过程中真菌的繁殖提供物质基础^[11];葡萄糖-1-磷酸盐是由1-磷酸葡萄糖生成的盐,1-磷酸葡萄糖能参与糖酵解和糖异生,有助于发酵过程中微生物营养成分的摄取;D-半乳糖醛酸存在于细菌多糖中^[11],所有样品的微生物在培养前期均对D-半乳糖醛酸有较高的利用率,到培养后期利用率大幅度下降,这可能是由于培养前期细菌代谢较快,需要较多的D-半乳糖醛酸参与其多糖的形成,到后期代谢缓慢,对D-半乳糖醛酸的需求也大幅度下降。吐温40是由聚氧乙烯失水山梨醇与单棕榈酸生成的脂类碳源,在发酵过程中,不仅能为解脂微生物提供选择性培养基,还能作为微生物培养基的分散剂^[11],促进微生物对营养成分的摄取。

Biolog-ECO法对淡豆豉发酵炮制中微生物对碳源利用情况的分析有其局限性,首先,ECO板局限于31种碳源,而淡豆豉炮制过程中微生物很可能利用其它碳源。此外,淡豆豉发酵的“再闷阶段”大部分微生物属于厌氧微生物,且发酵温度偏高,而

ECO 板是在 30℃ 的有氧环境中培养,不适合厌氧菌的代谢,不能全面反映“再闷阶段”微生物的代谢水平。

微生物在淡豆豉发酵炮制过程中起着关键的作用,正是复杂的微生物作用才使淡豆豉拥有特殊的性味和功能。本文首次将 Biolog-ECO 法运用到发酵中药的微生物研究当中,虽然有一定的局限性,但初步揭示了淡豆豉炮制过程微生物对碳源代谢的情况。通过明确微生物发酵与碳源的关系,今后可在炮制过程中添加相应碳源或者有效碳源的辅料,以此来改变发酵体系中菌系变化,优化炮制工艺。

参考文献

- [1] 李娜,黄庆柏. 淡豆豉中的异黄酮成分及药理作用与临床应用[J]. 中国现代中药,2008,10(7):18-19. (Li N, Huang Q B. The pharmacological effects and clinical application of isoflavone contents in *Semen sojae praeparatum* [J]. Modern Chinese Medicine,2008,10(7):18-19.)
- [2] 周庆伍,李红歌,李安军,等. Biolog Eco 解析不同产地大曲微生物群落功能多样性特征[J]. 食品与发酵科技,2014,50(3):53-56. (Zhou Q W, Li H G, Li A J, et al. Analysis of microbial community functional diversity in Daqu from different regions using Biolog-Eco method[J]. Food and Fermentation Technology, 2014, 50(3): 53-56.)
- [3] 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. (Li G, Liang Y H, Long K, et al. Effect of secondary fermentation on processing technology for fermented soybeans [J]. Chinese Traditional Herbal Drugs, 2014, 45(8): 1083-1088.)
- [4] 金剑,王光华,陈雪丽,等. Biolog-ECO 解析不同大豆基因型 R1 期根际微生物群落功能多样性特征[J]. 大豆科学,2007,26(4):565-570. (Jin J, Wang G H, Chen X L, et al. Analysis of microbial community functional biology diversity in rhizosphere of different soybean genotypes at R1 stage using Biolog-ECO method[J]. Soybean Science,2007,26(4):565-570.)
- [5] 郑丽萍,龙涛,林玉锁,等. Biolog-ECO 解析有机氯农药污染场地土壤微生物群落功能多样性特征[J]. 应用与环境生物学报,2013,19(5):759-765. (Zheng L P, Long T, Lin Y S, et al. Biolog-ECO analysis of microbial community functional diversity in organochlorine contaminated soil [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(5): 759-765.)
- [6] Classen A T, Boyle S I, Haskins K E, et al. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: Plate type and incubation temperature influences on contrasting soils [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44 (3): 319-328.
- [7] 罗倩,黄宝灵,唐治喜,等. 新疆盐渍土 3 种植被类型土壤微生物碳源利用[J]. 应用与环境生物学报,2013,19(1):96-104. (Luo Q, Huang B L, Tang Z X, et al. Carbon source utilization of microbes in saline soil of three vegetation types in Xinjiang, China [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(1): 96-104.)
- [8] Choi K, Dobbs F C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36: 203-213.
- [9] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement [M]. New Jersey:Princeton University Press, 1988: 43-47.
- [10] 贾夏,董岁明,周春娟. 微生物生态研究中 Biolog Eco 微平板培养时间对分析结果的影响[J]. 应用基础与工程科学学报,2013,21(1):10-18. (Dong X, Dong S M, Zhou C J. The effect of incubation time of Biolog-ECO Plate on the analysis result in the study of microbial ecology [J]. Journal of Basic Science and Engineering,2013,21(1):10-18.)
- [11] 张燕燕,曲来叶,陈利顶. Biolog Ecoplate™ 实验信息提取方法改进[J]. 微生物学通报,2009,36(7):1083-1091. (Zhang Y Y, Qu L Y, Chen L D. An amendment on information extraction of Biolog ECOpate™ [J]. Microbiology China, 2009,36(7): 1083-1091.)

欢迎订阅《现代农业研究》

邮发代号:14-41 每册 80 页 定价 8.90 元 全年价 106.8 元

《现代农业研究》(Modern Agricultural Research)由黑龙江省科学技术情报研究院主办。本刊于 1995 年 1 月创刊,前身为《农村实用科技信息》,本刊设有政策解读、专家视野、种植研究与实践、养殖研究与实践、动植物保护、林业研究与实践、园艺研究与实践、农机装备、农田水利、农业经济研究、绿色食品、生态环境、经验推广等主要栏目,以宣传国家农业方针政策,刊载现代化农业发展的成果与经验,探索农业发展新方式,服务农业现代化为宗旨。主要面向农业领域的广大科技工作者以及农、林、牧、渔等涉农行业的工作者。集科普性与学术性为一体,信息量大,内容丰富实用,深受广大新老读者欢迎。

国际连续出版物刊号:ISSN 1674-0653

国内连续出版物刊号:CN 23-1596/S

欢迎订阅,欢迎赐稿,我刊可承揽广告业务。

《现代农业研究》编辑部电话:0451-51920689 E-mail:xdny51920689@163.com

通讯地址:黑龙江省哈尔滨市松北区创新三路 600 号科技大厦 613 室邮编:150028

全国各地邮政局(所)均可订阅。