

基于 Miseq 高通量测序技术 对细菌型豆豉细菌类群的评价

董 蕴¹, 许小玲¹, 代凯文², 尚雪娇¹, 沈 馨¹, 郭 壮^{1*}

(1. 湖北文理学院化学工程与食品科学学院, 鄂西北传统发酵食品研究所, 湖北襄阳 441053;

2. 当阳市食品药品监督管理局, 湖北宜昌 444100)

摘 要: 采用 Miseq 高通量测序技术对 6 个细菌型豆豉细菌多样性进行了评价, 同时使用电子舌对不同样品各滋味指标的相对强度进行了测定, 进而探讨了细菌类群对产品滋味品质的影响。结果表明, *Bacillus* (芽孢杆菌) 是细菌型豆豉中的优势细菌, 其相对含量为 95.26%。在分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTU) 水平上, 发现 5 个核心 OTU 相对含量大于 0.1%, 其中 4 个隶属于 *Bacillus*, OTU2133 (隶属于芽孢杆菌) 的平均相对含量为 91.91%。酸味是豆豉间差异最大的滋味指标, 且 *Bacillus*、*Staphylococcus* (葡萄球菌) 和 *Lactobacillus* (乳酸杆菌) 与豆豉酸味的形成均呈正相关。由此可见, 鲜广椒中细菌微生物主要是由 *Bacillus* 组成, 且 *Lactobacillus* 和 *Staphylococcus* 对豆豉滋味的形成具有影响。

关键词: 细菌型豆豉; Miseq 高通量测序技术; 细菌; 电子舌

Characterization of Bacterial Microflora of Bacteria-fermented Douchi by Miseq High Throughput Sequencing

DONG Yun¹, XU Xiao-ling², DAI Kai-wen², SHANG Xue-jiao¹, SHEN Xin¹, GUO Zhuang^{1*}

(1. Northwest Hubei Research Institute of Traditional Fermented Food, School of Chemical Engineering and Food Science, Hu Bei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China;

2. Dangyang Municipal Food and Drug Administration, Yichang 444100, China)

Abstract: To investigate the bacterial microflora and its influence on taste quality, the bacterial diversity and taste quality of 6 bacteria-fermented Douchi samples were revealed by Miseq high throughput sequencing and electronic tongue technologies. The results indicated that *Bacillus* was the dominant bacteria genus in Douchi with the relatively abundant of 95.26%. At the OTU level, 5 OTUs with the relative abundance more than 0.1% were shared by all samples and 4 OTUs were belonged to *Bacillus*. It was worth to mention that the relative abundance of OTU2133 was 91.91% of total qualified sequences. Sourness was the most significant difference taste index, and the contents of *Bacillus*, *Lactobacillus* and *Staphylococcus* positively correlated with the formation of taste quality in bacteria-fermented Douchi. The results indicated that the bacterial microbiota of Douchi mainly consisted of *Bacillus*, meanwhile *Lactobacillus* and *Staphylococcus* played active roles in the taste formation of samples.

Key words: bacteria-fermented Douchi; Miseq high throughput sequencing technologies; bacterium; electronic tongue

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2018)13-0150-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.13.027

引文格式: 董蕴, 许小玲, 代凯文, 等. 基于 Miseq 高通量测序技术对细菌型豆豉细菌类群的评价[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 150-154, 247.

作为我国传统的发酵调味品, 豆豉通常以黄豆或黑豆为主要原料, 接入产生蛋白酶的细菌或霉菌同时辅以盐、酒和干燥等工艺制作而成^[1]。因制作过程中用到的微生物种类不同, 豆豉可分为细菌型、毛霉型、曲霉型、根霉型和脉孢菌型五大类^[2]。其中细菌型豆豉主要分布在我国湖北、贵州和云南地区, 通常

由芽孢杆菌、微球菌和乳酸菌等菌种发酵而成^[3]。虽然国内学者采用传统微生物学手段^[4-5]和指纹图谱技术^[6-7]对细菌型豆豉中微生物的多样性进行了研究, 然而传统微生物学手段主要依赖纯培养技术, 无法完全捕获发酵食品中微生物种群信息, 指纹图谱技术亦存在通量低和无法实现样品间平行分析的

收稿日期: 2017-10-11

作者简介: 董蕴(1997-), 女, 本科, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1124222758@qq.com。

* 通讯作者: 郭壮(1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: guozhuang1984@163.com。

基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T201616)。

不足。

以焦磷酸^[8]和 Miseq^[9]为代表的第二代高通量测序技术,采用宏基因组学的研究策略,弥补了传统微生物学手段和指纹图谱技术的不足,实现了多个样本中微生物群落信息的全面、平行分析,同时亦实现了微生物多样性与产品品质的关联分析,为研究传统发酵食品中微生物多样性及其对产品品质的影响提供了新视角。通过采用焦磷酸测序技术,柳陈坚等^[10]对云南省普洱市传统发酵豆豉微生物的群落多样性进行了研究,结果发现 *Tetragenococcus* (四联球菌) 和 *Staphylococcus* (葡萄球菌) 为其优势细菌,而李晓然等^[11]研究发现云南省玉溪市豆豉中细菌以 *Lactobacillus* (乳酸杆菌) 和 *Bacillus* (芽孢杆菌) 为主。由于豆豉的制作多采用传统制作工艺,制作环境相对开放,因而不同地区产的豆豉其微生物多样性可能存在较大差异^[12]。然而令人遗憾的是,目前关于湖北地区细菌型豆豉微生物多样性研究的报道尚少。

本研究采用 Miseq 高通量测序技术,以 16S rRNA 序列 V₄-V₅ 区为测序靶点,对 6 份采集自湖北当阳地区细菌型豆豉中细菌的多样性进行了解析,同时使用电子舌对产品的滋味品质进行了评价,探讨了核心细菌类群对豆豉品质的影响,以期为后续豆豉中优势菌株的分离提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

样品采集 从湖北省当阳市草埠湖镇 6 个农户家中,分别采集 200 g 左右细菌型豆豉(以下简称豆豉)样品,装入无菌采样管并置于采样箱中低温运回实验室; E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 试剂盒 美国 OMEGA 公司; dNTPs Mix、5 × TransStart™ FastPfu Buffer 和 FastPfu Fly DNA Polymerase 北京全式金生物技术有限公司; 参比溶液、味觉标准溶液、阴离子溶液、阳离子溶液和内部溶液 日本 Insent 公司。

Miseq 高通量测序平台 美国 Illumina 公司; SA 402B 电子舌(配备 AAE、CTO、CAO、AE1 和 COO 测试传感器) 日本 Insent 公司; UVPCDS8000 凝胶成像分析系统 美国 BIO-RAD 公司; vetiri 梯度基因扩增仪 美国 AB 公司; 5810R 台式高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司; DYY-12 电泳仪 北京六一仪器厂; R920 机架式服务器 美国 DELL 公司; ND-2000C 微量紫外分光光度计 美国 Nano Drop 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 10 g 豆豉使用灭菌研钵研碎后,取 1.0 g 采用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 试剂盒按照约束步骤进行微生物宏基因组 DNA 提取。使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳对宏基因组 DNA 样品的完整性进行检测,使用微量紫外分光光度计对纯度和浓度进行检测,电泳条带清晰无明显拖尾现象,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0,浓度在 30 ng/μL(260 nm) 的样品做为模板进行 PCR 扩增。

1.2.2 细菌 16S rRNA 序列 V₄-V₅ 区扩增及高通量

测序 扩增体系为: 10 ng DNA 模板 5 μmol/L 正向和反向引物各 0.8 μL 0.4 μL 5 U/μL DNA 聚合酶, 2 μL 2.5 mmol/L dNTPs mix 4 μL 5 × PCR 缓冲液, 体系用 ddH₂O 补充至 20 μL。其中: 正向引物为 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'), 反向引物为 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 且在正向引物前端加入了 7 个核苷酸标签 (barcode)。

扩增条件为: 95 °C 3 min 95 °C 30 s 55 °C 30 s, 72 °C 45 s 35 个循环 72 °C 10 min。检测合格后的 PCR 产物置于干冰中冷链寄往上海美吉生物医药科技有限公司,使用 Miseq 高通量测序平台进行测序。

1.2.3 序列质控 高通量测序数据下机后按照以下流程进行序列质控:

a. 根据成对序列之间的重叠关系,将双端序列拼接成一条序列,在拼接过程中若重叠区小于 10 bp、最大错配比率大于 0.2、barcode 碱基存在错配或引物碱基错配数大于 2 bp,则该序列予以剔除;

b. 根据 barcode 信息将拼接好的序列划分到 6 个样品并对序列方向进行校正;

c. 去除序列中的 barcode 和引物,若去除 barcode 和引物后引物的序列长度小于 50 bp,则该序列亦予以切除;

d. 将 6 个样品的序列合并为一个文件,进行生物信息学分析。

1.2.4 生物信息学分析 使用 QIIME (v1.7.0) 分析平台^[13]对 1.2.3 中形成的序列文件进行分析,具体流程为:

a. 使用 PyNAST^[14] 软件将所有序列对齐;

b. 采用 UCLUST 算法^[15]进行序列划分并建立分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTU);

c. 使用 ChimeraSlayer 对可能存在嵌合体的 OTU^[16] 进行去除;

d. 挑选 OTU 中的代表性序列同时使用 RDP (Ribosomal Database Project, Release 11.5)^[17] 和 Greengenes (Release 13.8)^[18] 数据库明确 OTU 分类学地位;

e. 使用挑选出的代表性序列使用 FastTree 软件^[19]绘制系统发育进化树;

f. 在绘制系统发育树基础上计算 α 多样性指数—香农指数 (Shannon index) 和超 1 指数 (Chao1 index);

g. 基于 OTU 矩阵,采用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 进行 β 多样性分析。

1.2.5 核心细菌类群的定义 若隶属于某一细菌门、细菌属或 OTU 的微生物类群在 6 个豆豉中均存在,则将其定义为核心门、属或 OTU^[20]。

1.2.6 核酸登录号 所有 Miseq 高通量测序数据均已提交至 MG-RAST 数据库, ID 号为 mgp82587。

1.2.7 豆豉滋味品质的分析 100 g 豆豉使用组织捣碎机捣碎后,取 40.0 g 用 100 mL 蒸馏水 4 °C 浸泡过夜。浸泡液 3000 r/min 离心 10 min 后取上清,中速滤纸过滤后倒入电子舌样品杯中进行测试。测试

表1 样品16S rRNA测序情况及各分类地位数量

Table 1 16s rRNA read counts and number of identifiable units at different taxonomical levels

样品编号	序列数 (条)	OTU (个)	门 (个)	纲 (个)	目 (个)	科 (个)	属 (个)	超1指数	香农指数
DC1	31491	366	8	10	15	24	31	1753	0.48
DC2	31966	358	7	14	18	31	35	2000	0.32
DC3	43371	541	7	12	24	49	72	1774	1.00
DC4	35274	595	11	20	32	65	93	2003	1.74
DC5	36980	543	8	19	33	53	64	2687	0.60
DC6	33942	1142	16	45	67	127	177	3171	1.11

注: 计算每个样品 Chao1 和 Shannon 指数时 样品的测序量均为 31410 条序列。

方法同参考文献[21] 即:

a. COO、AE1、CAO、CTO 和 AAE 5 个传感器分别活化、清洗后, 在参比溶液中测得电势值 V_r ;

b. 5 个传感器在样品中测得电势 V_s , $V_s - V_r$ 值即为样品酸、苦、涩、咸和鲜味等 5 个基本味的相对强度值;

c. 经洗涤后, COO、AE1 和 AAE 3 个传感器分别在参比溶液中测得电势 V_r' , $V_r' - V_r$ 值为豆豉后味 A (涩的回味)、后味 B (苦的回味) 和丰度 (鲜的回味) 的相对强度值。

每个样品重复测定 4 次, 选后 3 次纳入数据分析。

1.2.8 数据统计学分析 使用皮尔森相关性分析法 (Pearson correlation analysis) 对豆豉中的核心细菌类群和各滋味指标相对强度之间的相关性进行计算, 同时选取相关系数绝对值大于 0.5 的指标, 采用 Cytoscape 软件 (v3.5.1) 绘制网络图。采用 Mega 5.0 软件绘制核心 OTU 系统发育树; 采用 Origin 8.6 软件作图。

2 结果与分析

2.1 序列丰富度和多样性分析

6 个豆豉 16S rRNA V_4-V_5 区序列测序情况及各分类地位数量如表 1 所示。

由表 1 可知 6 个样品共产出 213024 条高质量 16S rRNA 序列, 根据 100% 的相似性划分共得到了 45943 条代表性序列, 根据 97% 相似性划分得到了 2885 个 OTU。在采用 ChimeraSlayer 进行嵌合体检查时, 没有检测到嵌合体存在。在 6 个豆豉中 DC6 的超 1 指数最高而 DC4 的香农指数最大, 由此可见, DC6 样品中细菌的丰富度最大而 DC4 样品多样性最高。进一步采用稀疏曲线和香农指数曲线对每个样品平均产出 35504 条 16S rRNA 序列的测序深度是否满足后续生物信息学分析要求进行了进一步的评估, 其结果如图 1 所示。

由图 1(A) 可知, 稀疏曲线并未达到饱和, 这说明随着产出序列的增加, 豆豉中新的细菌种型可能会被发现。由图 1(B) 可知, 在测序深度为 10000 条时, 所有样品的香农指数曲线均进入了平台期, 且随着测序深度的增加, 其数值几乎不再发生变化。由此可见, 本研究的测序深度已经完全捕获了豆豉中细菌的多样性, 因而每个样品平均产出 35504 条

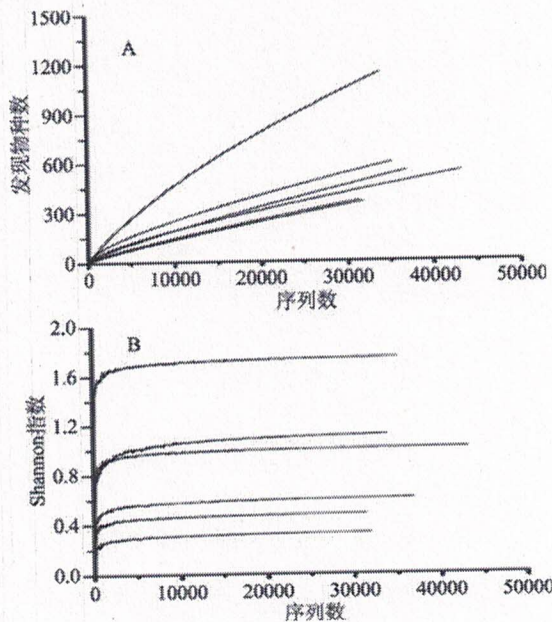


图1 稀疏曲线图(A)和香农指数曲线图(B)

Fig.1 Rarefaction analysis (A) and shannon diversity estimates (B)

16S rRNA 序列是可以满足后续生物信息学分析要求的。

2.2 基于各分类学地位鲜广椒细菌相对含量的分析

在 OTU 划分的基础上, 使用 RDP 和 Greengenes 数据库将质控合格后的序列鉴定为 17 个门、49 个纲、79 个目、161 个科和 269 个属, 其中仅有 0.063% 和 3.92% 的序列不能鉴定到门和属水平。豆豉中相对含量大于 0.1% 的核心细菌门构成如图 2 所示。

由图 2 可知, 在门水平上, 豆豉中的核心细菌类群主要隶属于 Firmicutes (硬壁菌门)、Proteobacteria (变形菌门)、Actinobacteria (放线菌门) 和 Bacteroidetes (拟杆菌门), 其平均相对含量分别为 97.84%、0.92%、0.79% 和 0.11%。豆豉中相对含量大于 0.1% 的核心细菌属构成如图 3 所示。

由图 3 可知, 豆豉中平均相对含量大于 0.1% 的核心细菌属包括隶属于 Firmicutes 的 Bacillus、Staphylococcus 和 Lactobacillus, 其平均相对含量分别为 95.26%、1.11% 和 0.11%。由此可见, 豆豉中的核心细菌类群主要由隶属于 Firmicutes 的 Bacillus 构成。本研究进一步统计了 2885 个 OTU 在 6 个豆豉

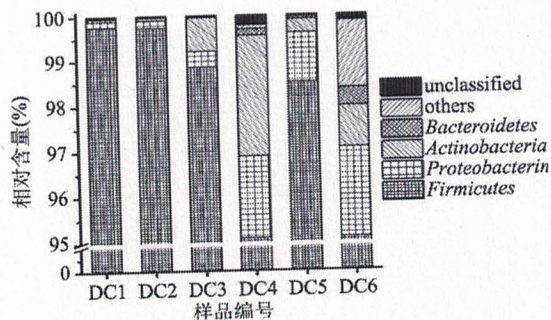


图2 豆豉中相对含量大于0.1%的核心细菌门

Fig.2 Core bacterial phyla with relative abundance more than 0.1% in bacteria-fermented Douchi samples

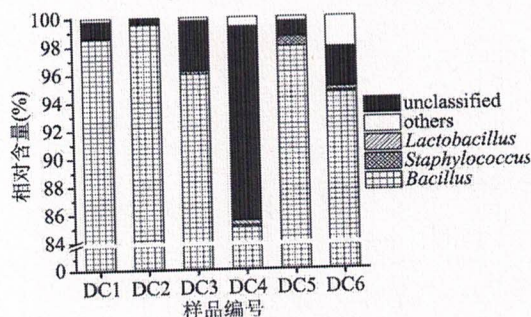


图3 豆豉中相对含量大于0.1%的核心细菌属

Fig.3 Core bacterial genera with relative abundance more than 0.1% in bacteria-fermented douchi samples

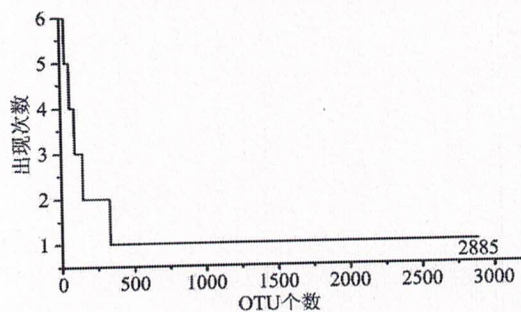


图4 OTU在6个样品中出现次数统计

Fig.4 Distribution of OTU as a function of their prevalence in 6 samples

中出现的次数,其结果如图4所示。

由图4可知,虽然核心 OTU 有 30 个,仅占 OTU 总数的 1.04%,但其包含了 199532 条序列,占有质控后合格序列数的 93.67%。尽管在 6 个样品中仅出现 1 次的 OTU 多达 2553 个,占到 OTU 总数的 88.49%,但其仅包含 4264 条序列,仅占有质控后合格序列数的 2.00%。在 6 个样品中分别出现 5 次、4 次、3 次和 2 次的 OTU 分别有 30 个、33 个、52 个和 187 个,分别占 OTU 总数的 1.04%、1.14%、1.80% 和 6.48%。4 类 OTU 共包含 9228 条序列,占有质控后合格序列数的 4.33%。由此可见,虽然个别样品含有一些相对含量较低且较为独特的细菌种系型,但在 OTU 水平上 6 个豆豉亦共有大量的细菌类群,其平均相对含量达到 93% 以上。

由图5可知,在 30 个核心 OTU 中,平均相对含

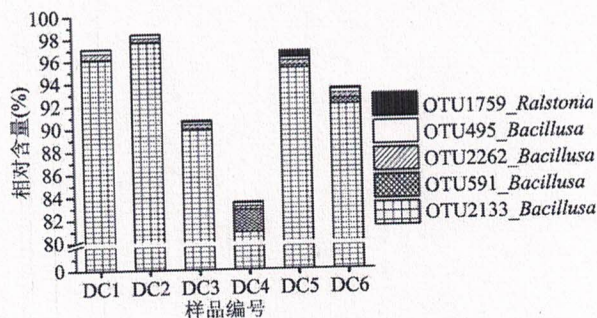


图5 豆豉中相对含量大于0.1%的核心 OTU

Fig.5 Core bacterial OTUs with relative abundance more than 0.1% in bacteria-fermented douchi samples

量大于 0.1% 的 OTU 仅有 5 个,其中 4 个隶属于 *Bacillus*, 1 个隶属于 *Ralstonia* (罗尔斯通菌), 5 个 OTU 的累计平均相对含量为 93.31%, 其中 OTU2133 (隶属于芽孢杆菌) 在 6 个样品中的平均相对含量为 91.91%。

2.3 6 个豆豉细菌群落结构的研究

在对核心细菌类群进行研究的基础上,进一步采用基于 UniFrac 非加权和加权的 UPGMA 对 6 个豆豉细菌群落结构进行了研究。相对于 UPGMA 分析,基于 UniFrac 的 UPGMA 不仅考虑了 OTU 的相对含量,同时亦考虑了各 OTU 间的遗传进化关系。若某一样品中某一 OTU 的相对含量不为 0,则将其定义为 1,反之定义为 0,在重新构建 OTU 矩阵的基础上进行非加权的 UPGMA 分析,而基于 UniFrac 加权的 UPGMA 分析使用的是 OTU 实际相对含量的矩阵。基于 UniFrac 非加权和加权 UPGMA 的 6 个豆豉细菌群落结构的研究如图 6 所示。

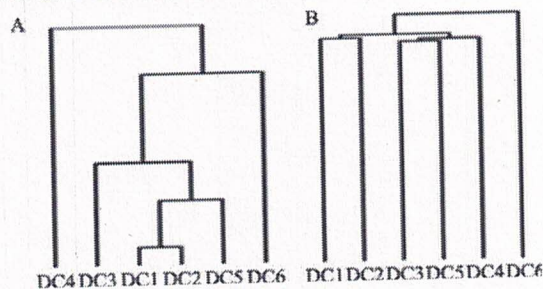


图6 基于 UniFrac 非加权(A)

和加权(B)的豆豉 UPGMA 聚类

Fig.6 UPGMA clustering of OTUs based on unweighted(A) or weighted(B) UniFrac distance in bacteria-fermented douchi samples

由图6可知,DC4 和 DC6 号样品的细菌类群结构较之其他样品有较大不同,结合图1和表1可知,这可能与上述两个样品细菌多样性较高和丰度较大有关。

2.4 豆豉核心细菌类群与滋味品质的关联性分析

在采用 Miseq 高通量测序技术对细菌型豆豉核心细菌类群进行解析的基础上,本研究进一步使用电子舌对细菌型豆豉的滋味品质进行了评价,并构建了核心细菌类群与滋味品质相关性的网络图。豆豉各滋味指标相对强度值的箱形图如图7所示。

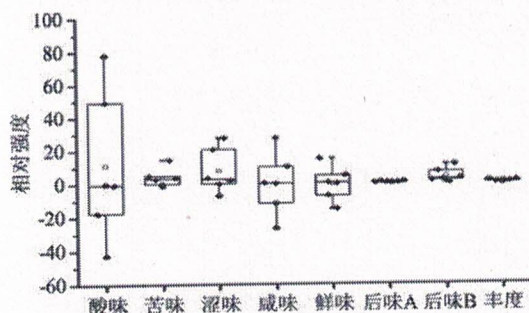


图7 豆豉各滋味指标相对强度值的箱形图

Fig.7 The box plot of relative intensity of each taste index in bacteria-fermented douchi samples

由图7可知6个豆豉在5个基本味上的差异明显大于3个回味,尤其是在酸味上的差异最大,究其原因可能与样品中含有0.11%的 *Lactobacillus* 有关,通过代谢原料中的碳水化合物产生有机酸,乳酸菌赋予了产品良好的滋味品质。豆豉核心细菌类群和滋味物质相关性的网络图如图8所示。

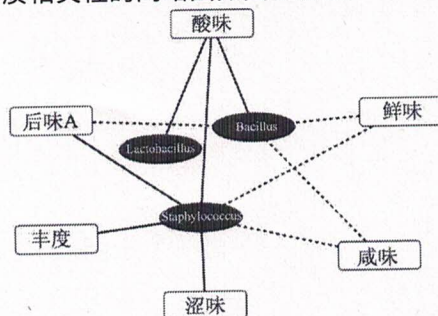


图8 豆豉核心细菌类群和滋味指标相关性的网络图

Fig.8 Correlation network diagram of core bacterial microflora and taste indexes among bacteria-fermented douchi samples

注:实线表示正相关,虚线表示负相关。

由图8可知, *Lactobacillus* 与豆豉的酸味呈现正相关, *Bacillus* 亦与豆豉的酸味呈现正相关,而与鲜味和咸味均呈现负相关。 *Staphylococcus* 与豆豉的酸味、丰度、涩味和涩味的后味均呈现正相关,而与鲜味和咸味均呈现负相关。由此可见,豆豉中的 *Staphylococcus* 含量可能对豆豉品质的形成具有较大的影响,其与多种滋味品质均呈现相关性。

3 结论

细菌型豆豉中的优势细菌主要由隶属于 *Firmicutes* 的 *Bacillus* 构成,且5个平均相对含量大于0.1%的核心OTU中4个隶属于 *Bacillus*。酸味是豆豉间差异最大的滋味指标, *Bacillus*、*Staphylococcus* 和 *Lactobacillus* 与酸味的形成均呈正相关。由此可见,鲜广椒中细菌微生物主要是由 *Bacillus* 组成,且 *Lactobacillus* 和 *Staphylococcus* 对豆豉滋味的形成具有影响。

参考文献

- [1]蔡尤林,杜冰,余飞,等.豆豉营养成分及研究进展[J].中国调味品,2015,40(6):119-123.
- [2]谢艳华,谢靓,李跑,等.GC-MS分析毛霉型、细菌型、曲霉型豆豉中脂肪酸组成[J].中国油脂,2017,42(7):115-119.

[3]刘毕琴,芦夏霏,柳陈坚,等.乳酸菌贡献细菌型豆豉风味的研究进展[J].核农学报,2016,30(1):136-144.

[4]李华,沈立荣,冯凤琴,等.细菌型豆豉发酵菌株的鉴定[J].食品工业科技,2009,30(30):212-214.

[5]王报贵,董素琴,许恒毅,等.豆豉中发酵菌株的分离与鉴定[J].中国微生物学杂志,2012,24(12):1060-1063.

[6]朱海针,谢卫华,龙凯,等.PCR-DGGE技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群的动态变化[J].中草药,2017,48(17):1757-1765.

[7]汪孟娟,熊顺强,陈廷涛,等.PCR-DGGE监测豆豉制曲过程中菌群的动态变化[J].南昌大学学报:理科版,2010,34(6):571-574.

[8] Sundberg C, Al-Soud W A, Larsson M, et al. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2013, 85(3):612-626.

[9] Kozich J J, Westcott S L, Baxter N T, et al. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(17):5112-5120.

[10]柳陈坚,刘晓峰,张海燕,等.云南省普洱市传统发酵豆豉微生物的群落多样性[J].食品与发酵工业,2015,41(1):47-51.

[11]李晓然,李洁,刘晓峰,等.利用高通量测序分析云南豆豉中细菌群落多样性[J].食品与生物技术学报,2014,33(2):137-142.

[12]李晓然,刘晓峰,张海燕,等.利用高通量测序分析云南两个地区豆豉微生物群落的多样性[J].现代食品科技,2014,30(12):61-67.

[13] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5):335-336.

[14] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment [J]. Bioinformatics, 2010, 26(2):266-267.

[15] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26(19):2460-2461.

[16] Haas B J, Gevers D, Earl A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. Genome Research, 2011, 21(3):494-504.

[17] Cole J R, Chai B, Farris R J, et al. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(1):169-172.

[18] Desantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(7):5069-5072.

[19] Price M N, Dehal P S, Arkin A P. FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix

(下转第247页)

- [10] Meurillon M, Engel E. Mitigation strategies to reduce the impact of heterocyclic aromatic amines in proteinaceous foods [J]. Trends in Food Science & Technology 2016, 50: 70–84.
- [11] Viegas O, Moreira PS, Ferreira IM. Influence of beer marinades on the reduction of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled pork meat [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 2015, 32(3): 315–323.
- [12] Hasnol ND, Jinap S, Sanny M. Effect of different types of sugars in a marinating formulation on the formation of heterocyclic amines in grilled chicken [J]. Food Chem 2014, 145: 514–521.
- [13] Viegas O, Amaro LF, Ferreira IM, et al. Inhibitory effect of antioxidant-rich marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef [J]. J Agric Food Chem 2012, 60(24): 6235–6240.
- [14] Keskekoglu H, Uren A. Inhibitory effects of pomegranate seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs after cooking by four different methods [J]. Meat Sci 2014, 96(4): 1446–1451.
- [15] Natale D, Gibis M, Rodriguez-Estrada MT, et al. Inhibitory effect of liposomal solutions of grape seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines [J]. J Agric Food Chem 2014, 62(1): 279–287.
- [16] Sabally K, Sleno L, Jauffrit JA, et al. Inhibitory effects of apple peel polyphenol extract on the formation of heterocyclic amines in pan fried beef patties [J]. Meat Sci 2016, 117: 57–62.
- [17] Awney H. The effect of green tea and olive oil on the mutagenic activity of heterocyclic amines extracted from common food consumed in Saudi Arabia [J]. Int J Food Sci Nutr 2011, 62(3): 295–302.
- [18] Zeng M, He Z, Zheng Z, et al. Effect of six Chinese spices on heterocyclic amine profiles in roast beef patties by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis [J]. J Agric Food Chem 2014, 62(40): 9908–9915.
- [19] Gibis M, Weiss J. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties [J]. Food Chem 2012, 134(2): 766–774.
- [20] Zeng M, Li Y, He Z, et al. Effect of phenolic compounds from spices consumed in China on heterocyclic amine profiles in roast beef patties by UPLC-MS/MS and multivariate analysis [J]. Meat Sci 2016, 116: 50–57.
- [21] Haskaraca G, Demirok E, Kolsarlar N, et al. Effect of green tea extract and microwave pre-cooking on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried chicken meat products [J]. Food Research International 2014, 63: 373–381.
- [22] Shabbir MA, Raza A, Anjum FM, et al. Effect of thermal treatment on meat proteins with special reference to heterocyclic aromatic amines (HAAs) [J]. Crit Rev Food Sci Nutr 2015, 55(1): 82–93.
- [23] 张恬静, 顾媛, 卢彩霞. 肉制品中香辛料的应用 [J]. 肉类研究 2009(1): 78–81.
- [24] 史奎春, 林苏荣. 香辛料在肉制品中的应用探讨 [J]. 中国调味品 2010, 35(4): 39–42.
- [25] 冯治平, 张亚娜, 刘达玉. 香辛料对羊肉罐头品质影响研究 [J]. 肉类工业 2011(10): 20–23.
- [26] Shen XC, Zhang YL, Cui YQ, et al. Simultaneous determination of 9 heterocyclic aromatic amines in pork products by liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry [C]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2017. 77. 012021.
- [27] Liao GZ, Wang GY, Zhang YJ, et al. Formation of heterocyclic amines during cooking of duck meat [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 2012, 29(11): 1668–1678.
- [28] 潘晗. 酱肉中 norharman 和 harman 形成机理的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院 2014.
- [29] Lan CM, Chen BH. Effects of soy sauce and sugar on the formation of heterocyclic amines in marinated foods [J]. Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2002, 40(7): 989.
- [30] 姚瑶, 彭增起, 邵斌, 等. 20 种市售常见香辛料的抗氧化性对酱牛肉中杂环胺含量的影响 [J]. 中国农业科学 2012, 45(20): 4252–4259.
- [31] 吕慧超, 彭增起, 刘森轩, 等. 温和条件下模型体系中烧烤风味及杂环胺形成测定 [J]. 食品科学 2015, 36(8): 150–155.
- [32] 万可慧. 牛肉干制品中杂环胺的形成与控制研究 [D]. 南京: 南京农业大学 2013.
- [33] 罗雨婷, 谷大海, 徐志强, 等. 天然香辛料在肉制品中抗氧化活性研究进展 [J]. 肉类研究 2017(10): 53–57.
- [34] 杜红霞, 李洪军, 李小勇, 等. 国内外香辛料抗氧化效果最新研究进展 [J]. 食品科学 2008, 29(1): 359–363.
- [35] Oz F, Kaya M. The inhibitory effect of red pepper on heterocyclic aromatic amines in fried beef longissimus dorsi muscle [J]. Journal of Food Processing and Preservation 2011, 35(6): 806–812.
- [36] Oz F, Kaya M. The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball [J]. Food Control 2011, 22(3–4): 596–600.
- [37] Janoszka B. Heterocyclic amines and azaarenes in pan-fried meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic [J]. Food Chemistry 2010, 120(2): 463–473.
- [J]. Molecular Biology and Evolution 2009, 26(7): 1641–1650.
- [20] Zhang J, Guo Z, Xue Z, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities [J]. The ISME Journal 2015, 9(9): 1–12.
- [21] 郭壮, 汤尚文, 王玉荣, 等. 基于电子舌技术的襄阳市售米酒滋味品质评价 [J]. 食品工业科技 2015, 36(15): 289–293.