

# 基于 454 方法分析曲霉型豆豉发酵中 细菌群落多样性

## Analyzing of bacterial diversity involved in *Aspergillus*-type Douchi by 454 pyrosequencing

李世瑞<sup>1,2</sup> 石 聪<sup>1,2</sup> 蒋立文<sup>1</sup> 廖卢艳<sup>1,2</sup> 周红丽<sup>1,2</sup> 李 跑<sup>1,2</sup>

LI Shi-rui<sup>1,2</sup> SHI Cong<sup>1,2</sup> JIANG Li-wen<sup>1</sup> LIAO Lu-yan<sup>1,2</sup> ZHOU Hong-li<sup>1,2</sup> LI Pao<sup>1,2</sup>

(1. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, Changsha, Hunan 410128, China;

2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

**摘要:**采用 454 高通量焦磷酸测序技术测定了曲霉型豆豉发酵周期 8 个不同阶段样品细菌多样性变化, 研究不同阶段细菌群落变化及多样性。结果表明: 细菌在门、纲两个水平各个不同样品主要微生物类别相似度很高, 总共有厚壁菌门、变形菌门、放线菌门三者占 90% 以上, 但目、科、属水平差别较大, 样品均一性最好的样品为 HY04, 有 31 个主要属, 魏斯氏菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属、乳球菌属、肠球菌属、假单胞菌在发酵不同阶段出现, 丰度差异较大。证明曲霉型豆豉发酵过程中微生物群落结构复杂, 主要菌群相对稳定。

**关键词:**豆豉; 曲霉型; 微生物群落; 多样性; 高通量测序

**Abstract:** The changes of bacterial diversity in eight stages of *Aspergillus* fermented bean curd fermentation were determined by 454 high-throughput pyrosequencing technique. The changes and diversity of bacterial community at different stages were studied. The results showed that the similarity of the major microorganisms in different samples at the two levels was high, with a total of more than 90% of the total, including three types of Phytophagous, Proteobacteria and Actinomycetes. The samples with the highest level of homogeneity were HY04, and 31 major genera were found in it. It was also found that the abundance of *Weissella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* were different in different fermentation stages appears. The results showed that the microbial community structure was complicated during the fermentation of *Aspergillus flavus*, and the main flora was relatively stable. However, the relationship among flora, quality and flavor, safety e-

valuation deserved further attention.

**Keywords:** Douchi; *aspergillus*; microbial community; diversity; high-throughput sequencing

豆豉是一种传统发酵大豆制品, 按照主要优势微生物不同可以分为毛霉型、曲霉型、细菌型、根霉型<sup>[1]</sup>。毛霉型和曲霉型作为中国豆豉发酵的主要类型, 以开放式制曲和长时间后期发酵为主要工艺特点, 发酵过程粗放, 除接入的纯种发酵剂外, 还有来自生产环境及工具上的微生物, 如豆豉发酵过程中具有溶纤作用的枯草芽孢杆菌<sup>[2-4]</sup>和产生抗菌等作用的乳酸菌<sup>[5-7]</sup>等, 这些微生物可能对豆豉的发酵及功能提供一定的作用。

基于开放式发酵, 不同地域、不同环境、同样原料和同样生产工艺, 其微生物种类差别很大。微生物数量和种类变化是一种彼消此长的动态平衡过程, 目前传统发酵食品发酵过程中微生态变化是研究的热点, 不仅可以挖掘与产品品质密切相关微生物资源, 为多菌种混合发酵提供基础, 而且可以为发酵食品功能性提供依据, 还能传统发酵食品安全控制提供参考。研究发酵食品微生态变化一般为传统的可培养方法和结合 PCR-DGGE 等方法, 分析其中关键微生物, 揭示微生物在发酵中作用, 如白酒<sup>[8-10]</sup>、泡菜<sup>[11-12]</sup>、豆豉<sup>[13-15]</sup>、乳制品<sup>[16]</sup>、豆酱<sup>[17-18]</sup>中有很多的研究报道。

借助于微生物分类学技术的日益进步, 揭示传统曲霉型豆豉中微生物多样结构, 对探明豆豉风味形成机理、优化生产工艺具有重要意义。454 高通量焦磷酸测序方法在环境监测方面应用较多<sup>[19-20]</sup>, 能较好地反映微生物信息, 在食品方面的应用主要集中在肠道微生物研究<sup>[21]</sup>、发酵乳制品<sup>[22]</sup>、独流醋<sup>[23]</sup>等。本试验拟采用 454 方法, 对米曲霉豆豉发酵过程中参与细菌做跟踪研究, 探索前期开放发酵、后期厌氧

**基金项目:**国家自然科学基金项目(编号:31371828)

**作者简介:**李世瑞, 男, 湖南农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:**蒋立文(1968—), 男, 湖南农业大学教授, 博士。

E-mail: 1024305380@qq.com

**收稿日期:**2017-07-25

发酵、堆积发酵不同阶段微生物消长规律,为发酵机理的研究和安全控制提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要仪器

PCR仪:ABI GeneAmp®9700型,美国ABI公司;  
荧光定量:QuantiFluor-ST蓝色荧光定量系统,美国Promega公司;  
pH计:FE20K型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;  
电热鼓风干燥箱:101-2AB型,天津市泰斯特仪器有限公司。

### 1.2 材料与试剂

豆豉样品:湖南华越食品公司;  
黄豆:湖南农业大学东之源超市;  
蒸馏酒:湖南湘窖酒业有限公司;  
食盐:湖南盐业股份有限公司;  
AxyBep DNA凝胶回收试剂盒:美国Axygen公司;  
曲精:以米曲霉为主,孢子数量在 $10^{10}$  CFU/g以上,上海迪发酿造生物制品有限公司;  
E.Z.N.A Soil DNA试剂盒:美国OMEGA公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 样品预处理 采取无菌操作方式利用经过高温灭菌处理牛皮纸袋包装,取样时采用不同部位分层取样直接密封做好标记,每个样品3个重复样,分别于制曲4 d和后发酵15,25,35,45,75,90,125 d取样(编号为HY08, HY01, HY02, HY03, HY04, HY05, HY06, HY07), $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻贮藏用于多样性分析。

#### 1.3.2 样品制作方法

(1) 黄豆原料:选用东北大豆,蛋白质含量28%~32%,油脂17%左右。

(2) 浸泡:加入3倍质量的纯净水进行浸泡,时间为1.5~4.0 h(夏季)。

(3) 蒸:采用木甑蒸料的办法,上大气后蒸2 h。

(4) 接种:接入曲精0.2 g/kg,用适量的面粉混合均匀后撒入。

(5) 制曲:温度 $31\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,制曲72~96 h,22 h翻曲1次,制曲温度不宜超过 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(6) 复水:按照1 000 kg加入400 kg冷开水、5 kg甜酒酿、10 kg白酒(50% Vol)、盐150 kg,混合均匀静置24 h。

(7) 装坛厌氧发酵:发酵温度 $50\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,当氨基酸态氮达到0.5%时,出坛进行堆积发酵,发酵时间30~60 d。

(8) 堆积二次发酵:将恒温发酵完成的豆豉转移到敞口的发酵池进行堆积发酵,堆积时间依据生产情况定,时间90 d以上。

上述样品均在规模化生产企业现场采集。

#### 1.3.3 454技术试验方法

(1) DNA的提取与纯化:使用E.Z.N.A Soil DNA试剂盒。

(2) 基因组DNA的鉴定:抽提的基因组DNA经1%琼

脂糖凝胶电泳检测,DNA无明显降解、浓度合适,无杂质。

(3) PCR扩增:选定V1~V3区,以豆豉样品总DNA为模板,以27F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',533R5'-TTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC-3'为引物,PCR采用TransGen AP221-02; TransStart Fastpfu DNA Polymerase。

20  $\mu\text{L}$ 反应体系:5  $\times$  Fastpfu Buffer 4  $\mu\text{L}$ ; 2.5  $\times 10^{-3}$  mol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ ; 正向引物( $5 \times 10^{-4}$  mol/L) 0.4  $\mu\text{L}$ /0.8  $\mu\text{L}$ ; 反向引物( $5 \times 10^{-4}$  mol/L) 0.4  $\mu\text{L}$ /0.8  $\mu\text{L}$ ; FasterPfu聚合酶0.4  $\mu\text{L}$ ;模板DNA 10 ng;补dd H<sub>2</sub>O至20  $\mu\text{L}$ 。

PCR扩增条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;25循环( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性30 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火30 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。每个样品3个重复,将统一样品的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒切胶回收PCR产物,Tris-HCl洗脱;2%琼脂糖电泳检测。

(4) 荧光定量:参照电泳初步定量结果,将PCR产物用Quanti Fluor-ST蓝色荧光定量系统进行定量检测,按照每个样品测序量要求,进行相应比例的混合。

(5) EmPCR:按照Roche GS FLX Titanium emPCR Kits的操作进行。

(6) 测序:委托上海美吉生物公司进行。

(7) 生物信息分析:使用Qiime(vsesion 1.17 <http://qiime.org/>)对原始数据进行过滤处理得到优化序列。具体分析包括OTU聚类(Operational Taxonomic Units)、分类学分析、多样性指数分析(用于指数评估的OTU相似水平97%)、稀释性曲线(使用97%相似度的OTU,利用mothur做rarefaction分析,利用R语言工具制作曲线图)、Shannon-Wiener曲线、Rank-Abundance曲线、主成分分析(principal components analysis,PCA)、群落Heatmap图<sup>[24-27]</sup>。

### 1.4 主要理化指标测定方法

(1) pH值:用pH计测定。

(2) 酸度:按GB 5413.34—2010执行。

(3) 氨基酸态氮(AAN):按GB 18186—2000执行。

(4) 食盐:按GB 5461—2000执行。

(5) 水分:按GB 5009.3—2010执行。

### 1.5 数据处理

所有理化指标平行测定3次,采用SPSS Statistics 19软件对数据进行单因素方差分析,数据表达成平均值 $\pm$ 标准方差。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同阶段样品主要理化指标的变化

由表1可知,HY08为制曲4 d,微生物生长成熟并形成酶系,氨基酸态氮、酸度较低、水分含量较低,但后期发酵过程水明显增高,有利于酶的作用和风味形成。后发酵阶段氨基酸态氮增长较快,酸度略有提高,食盐的浓度和水分含量变化不显著。仅从氨基酸态氮和酸度指标来说,发酵1个月就可以达到企业生产要求,只是风味欠佳。

2.2 不同发酵阶段不同水平细菌菌群的变化规律

由表 2 可知:HY08、HY01、HY02 的门水平基本一致,说明样品特性比较接近,但 HY03~HY07 的门又比较接近,说明发酵过程中微生物大类有变化,但还是厚壁菌门、放线菌门、变形杆菌门仍然占据绝对优势;纲水平中杆菌比例最低都有 79%;目的水平中芽孢杆菌目和乳杆菌目的比例较

高;科的水平上以葡萄球菌科、芽孢杆菌科、链球菌科比例较高;在属的水平上比例较高的芽孢杆菌属、葡萄球菌属、肠球菌属、乳杆菌属、链球菌属,这些属可能给产品代谢带来了新的成分甚至保健因子。但同时出现的假单胞菌属、人苍白杆菌属中有条件致病菌,可能给产品带来安全隐患。这方面有过类似的报道<sup>[28-30]</sup>。

表 1 不同阶段豆豉主要理化指标的变化  
Table 1 the change of physical and chemistry content in Douchi

编号	pH 值	氨基态氮/ (10 <sup>-2</sup> g·g <sup>-1</sup> )	酸度/ (10 <sup>-2</sup> g·g <sup>-1</sup> )	盐度/ (g·kg <sup>-1</sup> )	水分/ (10 <sup>-2</sup> g·g <sup>-1</sup> )
HY08	5.14	0.11±0.07	0.35±0.53	7.93±0.08	43.65±1.23
HY01	5.28	0.37±0.01	0.44±1.00	7.79±0.11	57.32±0.23
HY02	5.06	0.45±0.40	0.48±0.93	7.39±0.10	53.95±0.73
HY03	5.15	0.71±0.14	0.49±0.91	7.81±0.14	51.35±1.73
HY04	5.42	0.78±0.20	0.57±1.10	7.77±0.16	49.65±1.03
HY05	5.41	0.94±0.07	0.71±1.06	7.79±0.17	48.78±0.88
HY06	5.24	1.01±0.02	0.79±0.46	7.79±0.17	47.35±1.43
HY07	5.34	0.97±0.08	0.81±0.37	7.85±0.11	49.05±0.94

表 2 不同样品不同水平微生物水平比较<sup>†</sup>  
Table 2 Comparing different samples of different microbial levels

编号	门	纲	目	科	属
HY08	5(厚壁菌门 85.24%;放线菌门 7.71%;变形菌门 4.12%)	9(杆菌纲 85.13%;线菌纲 7.69%;变形菌纲 4.00%)	15(乳杆菌目 58.05%;芽孢杆菌目 25.68%;棒杆菌目 7.21%)	24(明串珠菌科 29.54%;肠球菌科 25.74%;葡萄球菌科 19.74%)	27(魏斯氏菌属 29.35%;肠球菌属 25.69%;葡萄球菌属 19.71%)
HY01	4(厚壁菌门 79.65%;变形菌门 15.26%;放线菌门 2.46%)	7(杆菌纲 79.64%;变形菌纲 11.76%;变形菌纲 3.34%)	11(芽孢杆菌目 71.45%;根瘤菌目 11.63%;乳杆菌目 7.16%)	22(葡萄球菌科 34.82%;芽孢杆菌科 33.80%;布鲁氏菌科 10.85%)	22(杆菌属 33.54%;葡萄球菌属 34.77%;苍白杆菌属 10.41%)
HY02	6(厚壁菌门 97.91%;放线菌门 1.11%;变形菌门 0.28%)	8(杆菌纲 97.87%;线菌纲 1.11%;变形菌纲 0.11%)	13(芽孢杆菌目 84.69%;乳杆菌目 11.59%;棒杆菌目 0.59%)	19(葡萄球菌科 67.17%;芽孢杆菌科 15.38%;肠球菌科 10.96%)	20(葡萄球菌属 67.11%;芽孢杆菌属 15.32%;肠球菌属 10.92%)
HY03	8(厚壁菌门 90.23%;变形菌门 5.78%;拟杆菌门 2.94%)	13(杆菌纲 89.64%;变形菌纲 4.43%;黄杆菌纲 1.93%)	20(乳杆菌目 46.79%;芽孢杆菌目 42.50%;假单胞菌目 3.77%)	31(链球菌科 45.27%;芽孢杆菌科 41.52%;假单胞菌科 2.93%)	28(乳球菌属 44.04%;芽孢杆菌属 41.71%;假单胞菌属 2.91%)
HY04	8(厚壁菌门 84.97%;变形菌门 9.43%;拟杆菌门 3.84%)	12(杆菌纲 84.05%;变形菌纲 7.32%;黄杆菌纲 2.53%)	21(乳杆菌目 60.67%;芽孢杆菌目 23.11%;假单胞菌目 4.63%)	32(链球菌科 58.53%;芽孢杆菌科 20.39%;假单胞菌科 3.39%)	31(乳球菌属 56.80%;芽孢杆菌属 20.30%;假单胞菌属 3.38%)
HY05	8(厚壁菌门 92.23%;变形菌门 4.46%;拟杆菌门 1.77%)	12(杆菌纲 91.61%;变形菌纲 3.53%;黄杆菌纲 1.12%)	21(芽孢杆菌目 54.61%;乳杆菌目 36.56%;假单胞菌目 2.56%)	32(芽孢杆菌科 47.84%;链球菌科 34.75%;葡萄球菌科 5.56%)	31(芽孢杆菌属 47.67%;乳球菌属 33.58%;葡萄球菌属 5.44%)
HY06	7(厚壁菌门 84.93%;变形菌门 8.92%;放线菌门 4.11%)	11(杆菌纲 84.6%;变形菌纲 6.04%;放线菌纲 4.08%)	16(芽孢杆菌目 55.86%;乳杆菌目 28.13%;肠杆菌目 4.12%)	28(芽孢杆菌科 34.06%;链球菌科 25.26%;葡萄球菌科 20.80%)	28(芽孢杆菌属 33.74%;乳球菌属 24.76%;葡萄球菌属 20.80%)
HY07	8(厚壁菌门 97.85%;变形菌门 1.25%;拟杆菌门 0.44%)	12(杆菌纲 97.61%;变形菌纲 0.84%;黄杆菌纲 0.31%)	17(芽孢杆菌目 87.48%;乳杆菌目 9.80%;假单胞菌目 0.72%)	24(芽孢杆菌科 80.63%;链球菌科 8.46%;葡萄球菌科 4.80%)	23(芽孢杆菌属 80.17%;乳球菌属 8.18%;葡萄球菌属 4.80%)

† 每列总数字为各类总数,括号内为各水平排名前 3 位的类别。

### 2.3 微生物多样性稀释曲线

使用 97% 相似度的 OTU 利用 mothur 做 rarefaction 分析曲线图, 见图 1。

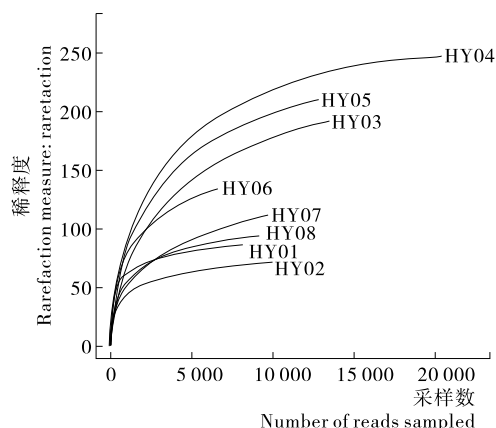


图 1 8 个样品的细菌变化稀释曲线(相似度 0.97)

Figure 1 Rarefaction analysis of bacterium changes dilution curve of 8 samples

由图 1 可知:随着发酵时间延长,细菌数量逐渐增加,装坛厌氧发酵 45 d 左右细菌数量较多。另外,由于曲线比较平坦,说明样品序列数量达饱和。HY04 样品的均一性最好,说明在后发酵期间微生物生态有一个自我调节过程,这与恒温发酵、堆积发酵及相关指标变化密切相关。也可能与微生物代谢形成环境有密切关系,如细菌较高温度下生长较快,乳酸细菌大量繁殖使发酵体系的 pH 值降低,这为可能出现的真菌如酵母菌等生长创造了有利的条件。

### 2.4 微生物样品 97% 范围内细菌多样性的变化

由表 3 可知,制曲完成到保温发酵,其 OTU 数量变化明显,这与保温发酵温度较高有关。后期堆积发酵细菌群落丰富度变化明显,Chao1 和 ACE 数据差别不大, HY01 的香农多样性(H)最大和辛普森多样性(D)最小, OTU 数量最大的是 HY04,与图 1 分析一致,其它几个样品香农值比较稳定、辛普森指数值比较小。HY08 和 HY01 相比, HY01 的 OTU 下降和保温发酵温度较高有关,而进入堆积发酵后,温度降低到室温,代谢减缓,微生物 OTU 数显著增加,但后期趋于稳定、酸度达到一定值后,微生物数量下降。

表 3 不同发酵阶段细菌多样性变化规律(97%)

Table 3 Variation within 97% range of the diversity of the different stages of fermentation

样品名称	有效读数	分类单位	估计值	多样性指数	香农多样性(H)	辛普森多样性(D)
HY08	9 122	94	101 (97,116)	105 (97,134)	2.85 (2.83,2.88)	0.110 9 (0.106 8,0.115 1)
HY01	8 213	86	92 (88,107)	92 (88,113)	3.39 (3.36,3.41)	0.057 6 (0.055 2,0.060 1)
HY02	9 983	71	78 (73,93)	77 (72,95)	2.26 (2.23,2.30)	0.268 5 (0.259 2,0.277 8)
HY03	13 390	191	225 (210,251)	222 (205,256)	2.50 (2.47,2.53)	0.155 1 (0.151 7,0.158 6)
HY04	20 479	248	261 (254,276)	256 (251,270)	2.67 (2.64,2.70)	0.182 2 (0.178 0,0.186 4)
HY05	12 854	210	235 (224,257)	229 (218,251)	2.90 (2.87,2.93)	0.108 8 (0.106 1,0.111 4)
HY06	6 579	134	167 (150,199)	190 (157,271)	3.16 (3.13,3.20)	0.082 3 (0.079 1,0.085 5)
HY07	9 672	111	142 (126,175)	140 (123,181)	2.29 (2.26,2.33)	0.195 2 (0.190 0,0.200 4)

### 2.5 微生物多样性的 PCA 分析

PCA 分析结果见图 2。两组分 PC1、PC2 总和达到 93.01%,可以说 2 个组分占绝对优势。从 PC1 指标来看,除 HY04 外其它样品差别不大, HY08、HY01 非常接近, HY03、HY04、HY05、HY06、HY07 之间差异不明显。主成分 PC2 中 HY01、HY02、HY04 对豆豉贡献率大,特别是 HY02 和 HY08,意味着在保温发酵前后的主成分 PC2 影响很大,与产品品质有关。另外从 8 个时间段来看,制曲阶段起到决定性作用,后发酵 45 d 对豆豉发酵风味、品质有非常重要的影响,所以 PC1 占 78.4%。在所有样品中 HY02 和 HY04 差异最大,说明保温发酵和发酵时间对产品品质有重要影响。

### 2.6 微生物多样性的 Heatmap 图

由图 3 可知,不同阶段除杆菌外其它微生物比例不同,而综合聚类分析发现,制曲 4 d 后(HY08)微生物基本上进入整个发酵体系,加入食盐、白酒、水后 24 h 进入陶瓷坛厌氧发酵并逐步进入恒温发酵,所有微生物大类相似,所以后发酵 15 d(HY01)微生物的纲很多相同,只是比例略有差异。纵向 43 类纲的分类中,按照聚类分析分为四大门类,分别有

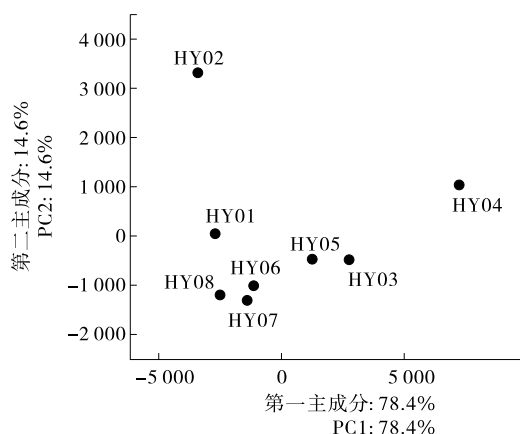


图 2 不同样品之间微生物多样性的主成分分析图

Figure 2 Principal component analysis diagram microbial diversity between different samples

9、12、11、7 个纲;从横向角度分析, HY03、HY04、HY05 和 HY06、HY08 基本接近, HY02、HY07 属于同一类, HY01 与其它比较差别最大。HY01 为添加配料并恒温发酵,这时的微生物种类决定了后续发酵微生物菌相,杆菌在整个发酵中

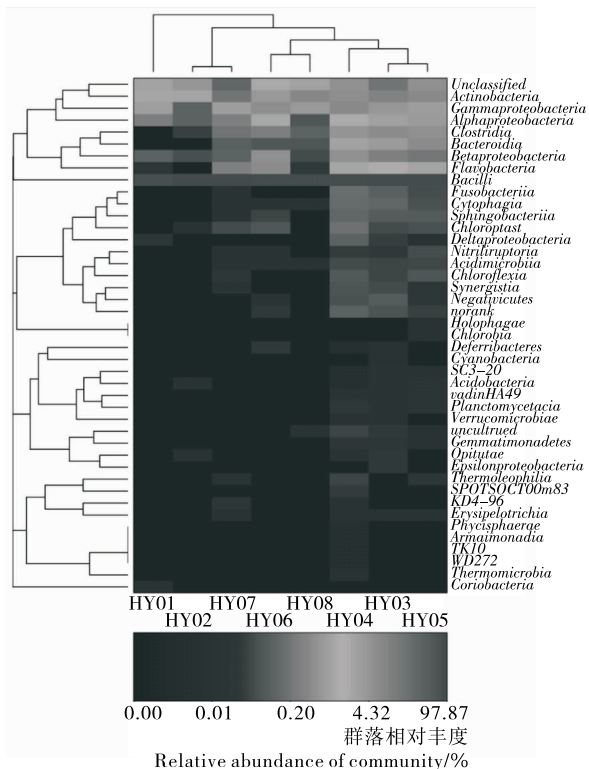


图 3 OTU 数据标准化处理后细菌多样性的 heatmap 图

Figure 3 OTU data standardization process heatmap draft

丰度最高,说明杆菌对豆豉发酵有重要作用,但其具体作用有待进一步深入研究。

### 3 结论

从曲霉型豆豉生产过程来说,尽管前期制曲接入曲精,但发酵过程开放性、周期较长,每个阶段细菌类微生物的动态变化明显,每个阶段微生物种类、丰度表现出了多样性和差异性。

(1) 曲霉型豆豉发酵中,芽孢杆菌属、肠球菌属、乳杆菌属、魏斯杆菌属、葡萄球菌属大量出现,细菌数量高峰出现在后发酵 45 d 左右,只是各属相之间差别较大,结合文献[29~31],在整个豆豉发酵过程中可以分析发现,不同微生物属之间差异性与整个发酵过程代谢控制如酸度变化、温度变化等密切相关。

(2) 不同阶段出现的细菌如芽孢杆菌、肠球菌、葡萄球菌等,有必要利用可培养方法将微生物的出现与产品的品质如新型物质生成、挥发性组分相关性等结合进行分析<sup>[32-33]</sup>,探讨其存在与产品品质的关系;不同阶段微生物之间相互作用、微生物与品质、营养方面相互关系、微生物本身安全性评价等也有待进一步深入研究。

### 参考文献

[1] 蒋立文. 发酵豆豉研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1 808-1 814.  
 [2] 朱春节, 汤祝华, 谢秀祯, 等. 一株新的豆豉纤溶酶产生菌的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 7-15.  
 [3] 宋园亮, 黄文宇, 张忠华, 等. 云南传统发酵豆豉中高产豆豉纤

溶酶菌株的筛选及其酶谱分析[J]. 生物技术通报, 2011(5): 126-131.

[4] 孙力军, 王雅玲, 刘唤明, 等. 抗菌豆豉发酵菌株的筛选及其脂肽组分鉴定和特性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7): 50-56.  
 [5] 宋园亮, 张忠华, 熊骏, 等. 元阳豆豉中高产蛋白酶乳酸菌的筛选及其产酶条件的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(1): 8-12.  
 [6] 龚福明. 云南传统发酵豆豉中乳酸菌多样性及高产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2010: 23-28.  
 [7] 熊骏, 韩瑞娜, 张忠华, 等. 豆豉中高效抑菌活性乳酸菌的筛选及其抑菌研究[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(6): 485-489.  
 [8] 邵明凯, 王海燕, 徐岩, 等. 酱香型白酒发酵中酵母群落结构及其对风味组分的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2 466-2 473.  
 [9] 张艳, 杜海, 吴群, 等. 酱香型白酒发酵中两株主要乳酸菌对酿造微生物群体的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2 087-2 097.  
 [10] 路晓伟, 吴群, 徐岩. 中国酱香型白酒酿造酿酒酵母的独特生理代谢特征[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2 098-2 107.  
 [11] 张锐, 吴祖芳, 沈锡权, 等. 榨菜低盐腌渍过程的微生物群落结构与动态分析[J]. 中国食品学报, 2011, 11(3): 175-180.  
 [12] JUNG J Y, LEE S H, KIM J M, et al. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2 264-2 274.  
 [13] 索化夷, 赵欣, 骞宇, 等. 永川毛霉菌豆豉在发酵过程中微生物总量与区系变化规律[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 124-131.  
 [14] 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.  
 [15] SHI Peng-jun, MENG Kun, WU Ning-feng, et al. Application of PCR DGGE to study microbial diversity in glacier No. 1 soils in Xinjiang[J]. Microbiology, 2006, 33(4): 58-63.  
 [16] 张和平. 自然发酵乳制品中乳酸菌的生物多样性[J]. 生命科学, 2015, 27(7): 837-846.  
 [17] KIM T W, LEE J H, PARK M H, et al. Analysis of bacterial and fungal communities in Japanese and Chinese-fermented soybean pastes using nested PCR-DGGE[J]. Current Microbiology, 2010, 60(5): 315-320.  
 [18] WU Jun-rui, ZHANG Jia-chao, PU Shi, et al. Bacterial community involved in traditional fermented soybean paste dajiang made in northeast China[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(4): 1-5.  
 [19] 李桥, 王龙龙. 454 高通量测序技术在土壤微生物中的应用[J]. 绿色科技, 2013(8): 203-205.  
 [20] 蔡元锋, 贾仲君. 基于新一代高通量测序的环境微生物转录组学研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 401-410.  
 [21] 郑艺, 张家超, 郭壮, 等. 基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展[J]. 中国食品学报, 2014, 14(11): 157-164.  
 [22] 乌仁图雅. 应用 454 焦磷酸测序技术对传统发酵乳制品微生物多样性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.

(下转第 118 页)

计具有审美的艺术性,以其独有的艺术魅力吸引和感染消费者<sup>[11]</sup>。书法艺术注重“形”与“势”,形是指书法的具体形式,意在“结字之美”;书法艺术的整体布局讲究“势”,书法之势,可分为点画之笔势、结字之体势、通篇之气势,而不同书体、不同书家的笔势、体势、气势都不相同。笔势产生的态势,再加上结字上透视原理的应用,才能综合地形成了书法的立体感。蔡邕《论书》曰:“为书之体,须入其形,若坐若行,若飞若动,若往若来,若卧若起,若愁若喜,若虫食木叶,若利剑长戈,若强弓硬矢,若水火,若云雾,若日月,纵横有可象者,方得谓之书也”。可见,在书法结字谋篇上要重视“力”,注意布局上的疏密有致,方能展现出包装设计作品所蕴含的情致和文化神韵。

### 3.3 遵循统一原则

包装设计的设计元素历来主张繁而不杂,简约见长。就书法而言,不仅要注重字的构型与平衡,还要注重设计版面的整体布局疏密合理。为了凸显品牌的辨识度,设计过程中对字体的运用不能选择太多种类;书体的选择应与底色、底纹以及该产品的文化背景相适宜。否则,会破坏版面的整体感,产生文化或视觉上的违和感,进而损害品牌的形象<sup>[12]</sup>。所以,不仅在字体的搭配上要强调“和而不同”“杂而不乱”。在色彩的应用上,讲究简约、朴拙,计白当黑;过多的色彩,只会削弱包装的整体感和韵律感<sup>[10]</sup>。

### 3.4 体现文化内涵

在进行传统食品包装设计时,更需注意书法元素与传统食品文化内涵的契合度,尤其是中国道家哲学与儒家哲学所传递的“和而不同”“天人合一”“己所不欲勿施于人”等文化理念,从传统文化的深层次根源出发,使设计形式与文化相符合、相统一,做到形神兼备<sup>[13]</sup>。

### 3.5 注意版权问题

在使用书法作品时不要照搬照抄,简单地应用现有字库的字体进行商标注册,不仅注册商标易被侵权,还可能侵犯他人版权。设计者应根据传统食品蕴含的文化意义,选择相应的字体,进行字体的再设计;对包装上书法家的手书作品,必要时可以进行商标注册保护。

## 4 结语

将中国书法元素融入到传统食品包装设计是极为适宜的,从极具中国传统文化特色和深厚文化积淀的书法出发,设计出的传统食品包装既凸显了东方文化的神秘和源远流长,同时又展示了中国传统文化中博大精深的哲学理念与东方智慧。书法元素让传统食品更具有中华民族传统文化的特色和内涵,是符合当今消费者的审美需求,而且让传统食品更加具有文化价值及全球竞争力。

### 参考文献

- [1] 李莉. 民间美术情感元素在传统食品包装设计中的应用研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 105-109, 152.
  - [2] 刘宗明, 赵月浩, 刘文金. 基于用户需求的食物包装扁平化设计[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 99-102.
  - [3] 武晓丽, 武道房. 浅谈了解汉字起源对语文字词教学的重要性[J]. 时代教育, 2017(12): 16-17.
  - [4] 宗白华. 中国书法艺术的性质[M]//宗白华全集: 第j卷. 合肥: 安徽教育出版社, 2008: 611-612.
  - [5] 李莉, 陈斌. 从“PENTAWARDS”获奖作品看全球传统食品包装设计创意潮流[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 98-105.
  - [6] 毛鸿达. 现代标识设计中传统汉字图形运用分析[J]. 湖南包装, 2017, 32(2): 36-38.
  - [7] 李佳. 传统文化中吉祥图案及色彩在包装设计中的应用[J]. 湖南包装, 2017, 32(3): 70-72.
  - [8] 赵锦星. 高职艺术设计专业书法课程教学探析[J]. 长沙民政职业技术学院学报, 2011, 18(1): 115-116.
  - [9] 刘畅. 书法艺术在茶叶包装设计中的应用[J]. 福建茶叶, 2017(2): 127-128.
  - [10] 谭万宝. 试论书法艺术的美学特征[J]. 西藏民族学院学报: 哲学社会科学版, 2006, 27(5): 101-104.
  - [11] 范小英. 包装视觉传达设计之文字简析[J]. 产业与科技论坛, 2011, 10(15): 189-190.
  - [12] 李虹萱. 虚实: 国画意境的建构手段[J]. 湖南包装, 2017, 32(2): 73-74, 117.
  - [13] 丁颖. 传统食品包装设计中的儒家文化解析[J]. 包装工程, 2013(8): 90-93.
- (上接第15页)
- [23] PENG Qian, YANG Ping, GUO Yan-yun, et al. Analysis of bacterial diversity during acetic acid fermentation of tianjin duliug aged vinegar by 454 Pyrosequencing[J]. Current Microbiology, 2015, 71(2): 195-203.
  - [24] 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.
  - [25] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics 2010, 26(19): 2 460-2 461.
  - [26] WANG Qiong, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5 261.
  - [27] QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al. The Silva ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41: 590-596.
  - [28] 汪孟娟. 豆豉的菌群动态变化及其功能性成分对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2011: 45-50.
  - [29] 陈晨. 豆豉功能微生物的筛选与应用[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 50-55.
  - [30] 董素琴. 豆豉中发酵细菌的安全性评价及其乳酸菌的生物学特性分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2014: 48-60.
  - [31] 陈廷涛. 发酵乳和豆豉中微生物菌群 DGGE 分析及益生作用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013: 35-57.
  - [32] 明红梅, 余欢, 周健, 等. 大曲中产香兼性厌氧细菌的筛选及挥发性成分分析[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 7-10.
  - [33] 孙夏冰, 王松涛, 陆震鸣, 等. 浓香型大曲酒窖泥中挥发性化合物的测定与分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 54-58.