

基于高通量测序技术分析辣椒粉 细菌多样性

唐晓阳^{1,2}

¹康师傅控股中央研究所, 上海

²上海康识食品科技有限公司, 上海

收稿日期: 2024年6月22日; 录用日期: 2024年7月23日; 发布日期: 2024年7月30日

摘要

本研究以全国6个不同省市的辣椒粉和1组花椒粉为研究对象, 利用高通量测序技术对不同辣椒样本的微生物菌群多样性进行分析。结果表明, 综上所述, 6组辣椒粉和1组花椒粉样本中除含有各自都有的物种外, 所共有的物种有46个, 结合 α 多样性和 β 多样性分析可知, A_2组和C组的微生物种类丰度和多样性优于其他5组。6组辣椒粉和1组花椒粉样本中共鉴定出5个门、6个纲、24个目、57个科和91个属, 优势菌门主要有变形菌门(*Proteobacteria*) (84.27%)、厚壁菌门(*Firmicutes*) (8.93%)、放线菌门(*Actinobacteriota*) (4.72%)和拟杆菌门(*Bacteroidota*) (1.5%), 优势菌属主要有泛菌属(*Pantoea*) (39.79%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (20.01%)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*) (3.08%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (2.72%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*) (1.79%)、普罗维登斯菌属(*Providencia*) (1.44%)、沙雷氏菌属(*Serratia*) (1.41%)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*) (1.28%)和鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*) (1.23%)。

关键词

辣椒粉, 高通量测序, 细菌多样性

Analysis of Bacterial Diversity in Chili Powder Using High-Throughput Sequencing Technology

Xiaoyang Tang^{1,2}

¹Central Research Institute, Masterkong Holding, Shanghai

²Shanghai Kangshi Food Science and Technology Co., Ltd., Shanghai

Received: Jun. 22nd, 2024; accepted: Jul. 23rd, 2024; published: Jul. 30th, 2024

文章引用: 唐晓阳. 基于高通量测序技术分析辣椒粉细菌多样性[J]. 农业科学, 2024, 14(7): 818-825.

DOI: 10.12677/hjas.2024.147102

Abstract

This study utilized high-throughput sequencing technology to analyze the microbial community diversity of different chili powder samples from six different provinces and cities across the country and one group of Sichuan pepper powder. The results indicate that, in summary, besides the species unique to each group, there are 46 species common across the six groups of chili powder and the one group of Sichuan pepper powder. Combined with α -diversity and β -diversity analysis, it is evident that the microbial species richness and diversity of group A₂ and group C are superior to the other five groups. In total, 5 phyla, 6 classes, 24 orders, 57 families, and 91 genera were identified in the six groups of chili powder and one group of Sichuan pepper powder. The dominant phyla were *Proteobacteria* (84.27%), *Firmicutes* (8.93%), *Actinobacteriota* (4.72%), and *Bacteroidota* (1.5%). The dominant genera were *Pantoea* (39.79%), *Pseudomonas* (20.01%), *Staphylococcus* (3.08%), *Acinetobacter* (2.72%), *Bacillus* (1.79%), *Providencia* (1.44%), *Serratia* (1.41%), *Xanthomonas* (1.28%), and *Sphingobacterium* (1.23%).

Keywords

Chili Powder, High-Throughput Sequencing, Bacterial Diversity

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

辣椒是一种茄科辣椒属的灌木植物，辣椒因其独特的辣味而受到广大消费者的喜爱，是人们生活中不可或缺的蔬菜及调味品[1]，主要种类有甜辣椒、朝天椒、小米椒和菜椒等[2]，富含多种维生素，且维生素 C 的含量在蔬菜中名列前茅[3]，作为重要的蔬菜和主要的香辛料，辣椒除了食用价值外，还具有更重要的经济价值，21 世纪以来，我国辣椒的种植规模和产量逐年提高，辣椒产业发展迅速，据世界粮农组织统计，我国的辣椒产量约占全球辣椒产量的一半，是世界上产量最大的国家[4]。辣椒除了直接烹饪外，还可腌渍、晒干，加工成辣椒粉和辣椒酱等[3]。

高通量测序技术是新一代测序技术，具有高效和准确的优点[5]，常用于研究微生物多样性方面[6]，目前，该技术已在农学、医学和食品等重要领域被广泛应用，尤其食品领域[7]-[9]，食品中含有多种丰富的营养物质，在生产、销售和贮藏过程中，微生物的不断变化影响食品的品质和货架期，应用高通量测序技术可鉴定出食品中微生物的组成和相对丰度，为食品保鲜提供一定的理论基础[10]。张睿艺[11]等通过高通量测序技术分析不同品种辣椒发酵而成的辣椒酱中的真菌多样性，发现高通量测序技术可为筛选辣椒酱中优势微生物提供基础。付为艺等[12]利用高通量测序技术探究夏季引起糟辣椒发生胀罐的微生物，研究结果表明乳酸杆菌属是潜在的产气菌属，高通量技术为糟辣椒的安全质量控制研究奠定了基础。钱杨等[13]采用高通量测序技术对不同蔬菜(萝卜、豇豆、辣椒和混合蔬菜)作为原料的四川泡菜中微生物多样性进行分析，研究结果发现辣椒泡菜中微生物多样性最丰富，高通量测序技术为指导泡菜的可持续发展及产业转型升级提供了一定的理论基础。

目前，关于辣椒粉及其制品的微生物多样性尚未有研究报道，因此，本研究以全国 6 个辣椒主产地的辣椒粉和花椒粉为研究对象，利用高通量测序技术对不同样本的微生物菌群多样性进行分析，并且花

椒粉与辣椒粉的菌落组成也相似, 以期为香辛料微生物的风险识别提供一套技术方法, 有利于提高为香辛料加工以及以香辛料为原料的美味食品的配方设计、工艺设计提供理论方法与数据支持, 从而促进食品安全和辣椒粉等香辛料用于食品深加工的进一步发展。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 样品采集

主要从6个辣椒主产地和1个花椒粉产地采集样品(表1)。

Table 1. Different sources of chili powder

表 1. 不同产地辣椒粉

编号	产地	产品名称	产品配料
A_1	山东省德州市	辣椒片	朝天椒
A_2	吉林省长春市	辣椒片	辣椒
B	湖南茶陵	农家干辣椒面(中辣)	
C	四川省自贡市	辣椒面	辣椒
D	河北省廊坊市	干辣椒碎	干辣椒
F	河南省驻马店市	花椒粉	花椒
G	贵州省遵义市	红辣椒面	辣椒干

2.1.2. 主要试剂和仪器

E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA 抽提试剂盒(美国 Omega 公司); FastPfu Polymerase (北京全式金生物技术有限公司); ABI GeneAmp®9700 型 PCR 仪(美国 ABI 公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。Illumina MiSeq 高通量测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

2.2. 试验方法

2.2.1. 样品 DNA 的提取

采用 FastPure Stool DNA Isolation Kit (MJYH, Shanghai, China)基因组提取试剂盒提取辣椒粉和花椒粉样品中微生物群落总基因组的 DNA, 待提取完成后, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 使用 NanoDrop2000 (美国 Thermo Scientific 公司)测定 DNA 浓度和纯度。

2.2.2. PCR 扩增

以上述提取的 DNA 为模板, 使用携带 Barcode 序列的上游引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和下游引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') [1]对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为: 5 × TransStart FastPfu 缓冲液 4 μL, 2.5 mM dNTPs 2 μL, 上游引物(5 uM) 0.8 μL, 下游引物(5 uM) 0.8 μL, TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL, 模板 DNA 10 ng, 补足至 20 μL。扩增程序如下: 95℃ 预变性 3 min, 27 个循环(95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 然后 72℃ 稳定延伸 10 min, 最后在 4℃ 进行保存(PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型)。扩增结束后采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

2.2.3. Illumina 文库构建和测序

使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 对扩增纯化后的 PCR 产物构建 DNA 文库, 步骤分为 4 步: ① 将

IIlumina 官方接头序列添加到目标全区域外端；② 采用磁珠进行筛选并去除片段；③ 利用 PCR 扩增富集文库模板；④ 磁珠回收 PCR 产物，得到最终的文库。最后使用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

2.2.4. 试验方法

Excel 2021 统计和计算数据，Origin 2021 软件作图，IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素分析，不同字母表示显著差异不同($P < 0.05$)。

3. 结果与分析

3.1. 不同产地辣椒粉的微生物群测序结果分析

为评价不同辣椒粉样本的测序结果的充足性和合理性，通过比较各组间的稀释曲线和 shannon 指数曲线(图 1)，发现 35 个辣椒样本中稀释曲线和 shannon 指数曲线末端均趋于平稳，且观测到的物种数量(Sobs)随序列数增加而增多(图 1A)，表明样本的测序量充足且合理，同时微生物的新物种可能随着序列数的升高而被观测到。其中 35 个辣椒样本中的 shannon 指数曲线趋势为先升高后趋于平稳(图 1B)。因此，通过稀释曲线和 shannon 指数曲线分析可知，35 个样本的测序结果可进一步生物信息分析。

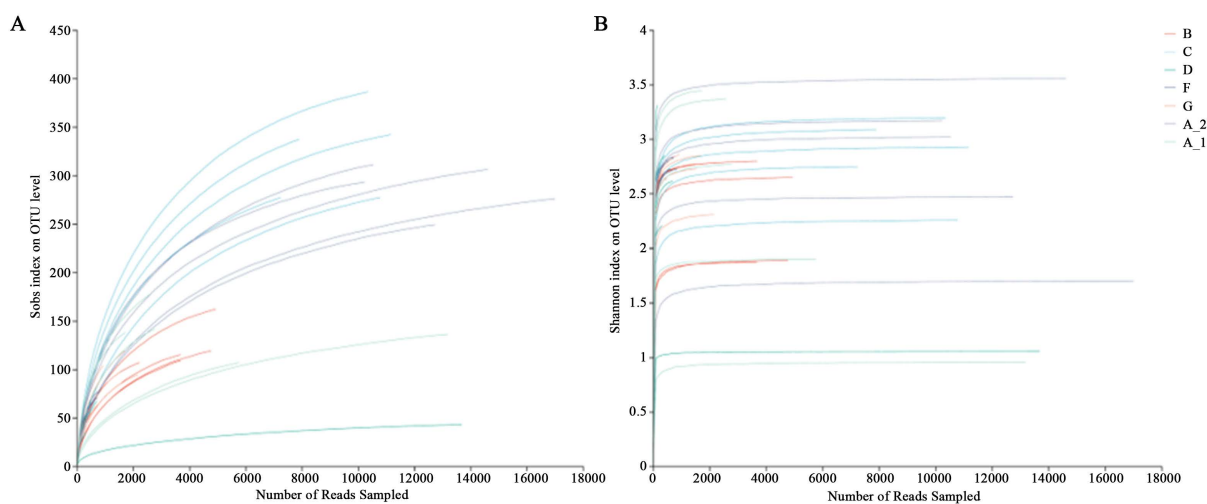


Figure 1. Dilution curve (A) and Shannon index curve (B)

图 1. 稀释曲线(A)和 Shannon 指数曲线(B)

3.2. 不同产地辣椒粉的微生物群特征操作分类单位(OTU)分析

由图 2A 可知，7 组样本中 A_2 组和 C 组的平均 OUT 数最高，分别为 154.2 和 150.8 个，其余组中平均 OUT 数从高到底依次是 A_1 组：100.2 个，B 组：88 个，G 组：74.2 个，D 组：37.4 个，F 组最低，仅有 35.4 个。花瓣图是统计多个样本中所共有和独有物种的一种手段[14]，如图 2B 所示，A_1 组、A_2 组、B 组、C 组、D 组、F 组、G 组特有的物种数分别为 27 个、132 个、19 个、229 个、5 个、30 个、9 个，此外，7 组样本中所共有的物种有 46 个。

3.3. 不同产地辣椒粉的微生物群多样性分析

α 多样性是度量样本含有多少微生物物种，及每个物种所占的比例，而 chao 1 和 shannon 指数可较好地反映物种的丰富度和均匀度， β 多样性则是观察各样本的微生物群落组成差异。 α 多样性方面，由图 A

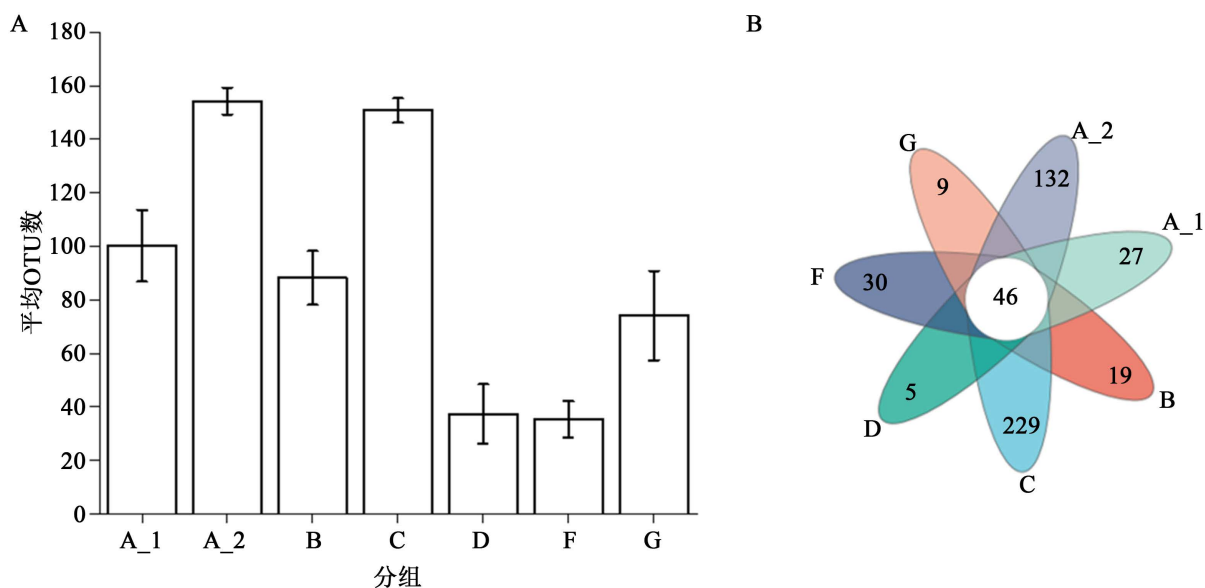


Figure 2. Average OUT number (A) and Petal diagram (B)

图 2. 平均 OUT 数(A)和花瓣图(B)

可知, A_2 组和 C 组的 chao 1 指数显著高于其他 5 组($P < 0.05$), 且 D 组和 F 组的 chao 1 指数最低(图 3A)。在 shannon 指数中同样观察到类似的结果(图 3B), A_2 组和 C 组的 shannon 指数显著高于其他 5 组($P < 0.05$)。β 多样性方面, 由 PCoA 图可知, A_2 组和 C 组的聚类性优于其他组(图 3C)。结合 α 多样性和 β 多样性分析可知, A_2 组和 C 组的微生物种类丰度和多样性优于其他 5 组。

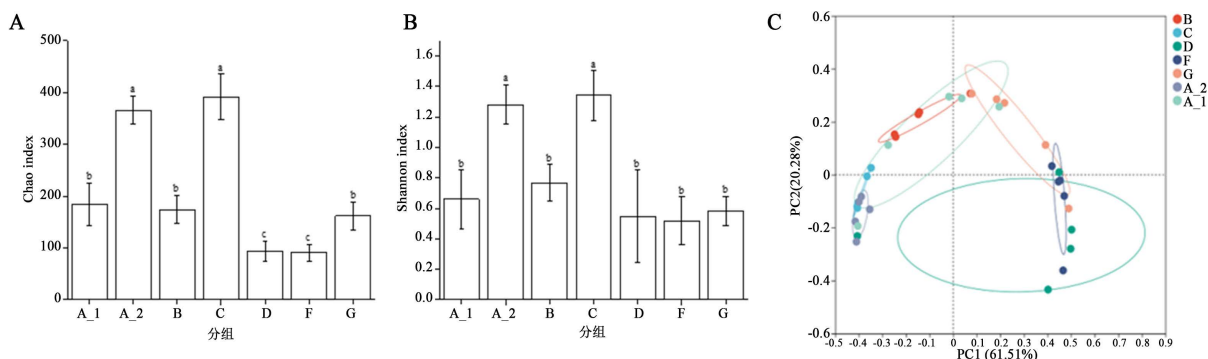


Figure 3. Chao 1 index (A), Shannon Index (B), PCoA chart (C)

图 3. Chao 1 指数(A), Shannon 指数(B), PCoA 图(C)

3.4. 不同产地辣椒粉的微生物菌群结构分析

6 组辣椒粉和 1 组花椒粉样本中共鉴定出 5 个门、6 个纲、24 个目、57 个科和 91 个属。在门水平方面, 样本中相对含量较高的门有变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*), 4 种优势门的平均相对含量均大于 1%, 分别为 84.27%、8.93%、4.72%和 1.5%, D 组样本中无拟杆菌门, 且厚壁菌门和放线菌门相对含量也较低, 仅有 0.35%和 0.37% (图 4)。进一步在属水平方面对辣椒粉样本种的微生物菌群结构进行分析, 样本中相对含量较高的属有泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、普罗维登斯菌属(*Providencia*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)和鞘氨醇杆菌属

(*Sphingobacterium*), 9 种优势属的平均相对含量均大于 1%, 分别为 39.79%、20.01%、3.08%、2.72%、1.79%、1.44%、1.41%、1.28% 和 1.23%, D 组和 F 组中无葡萄球菌属、不动杆菌属和芽孢杆菌属等优势

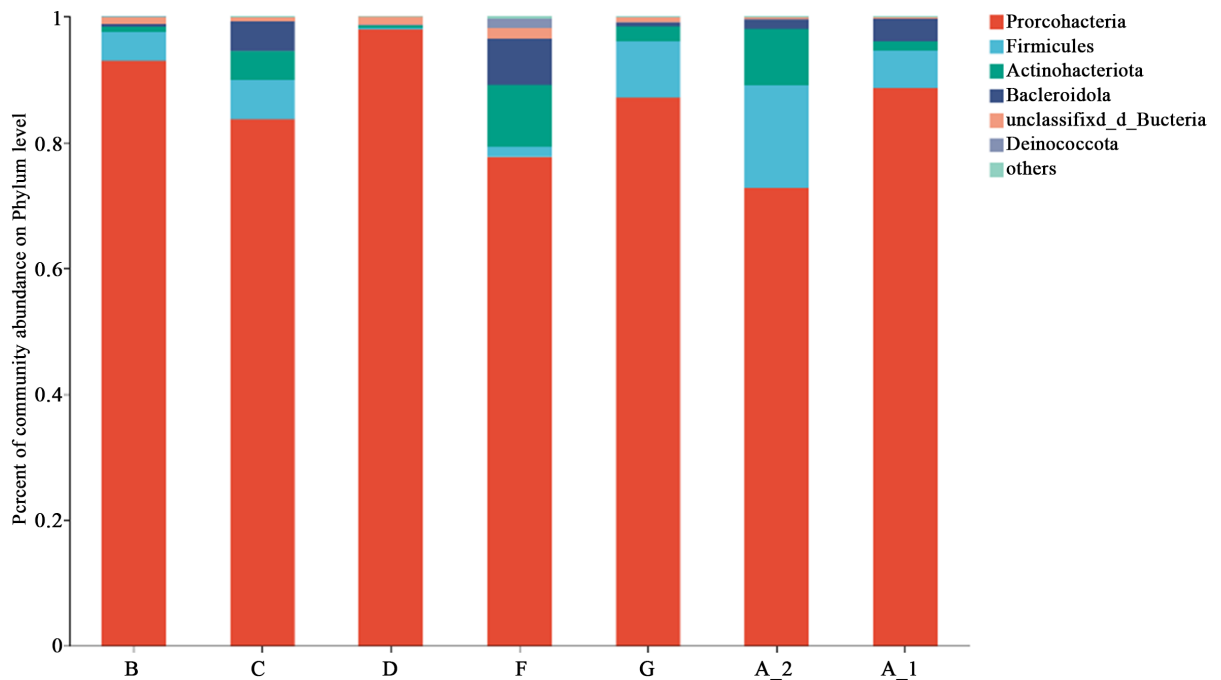


Figure 4. Composition and relative content of chilli pepper and Sichuan pepper powder samples at the phyla level

图 4. 辣椒粉及花椒粉样本在门水平上的组成和相对含量

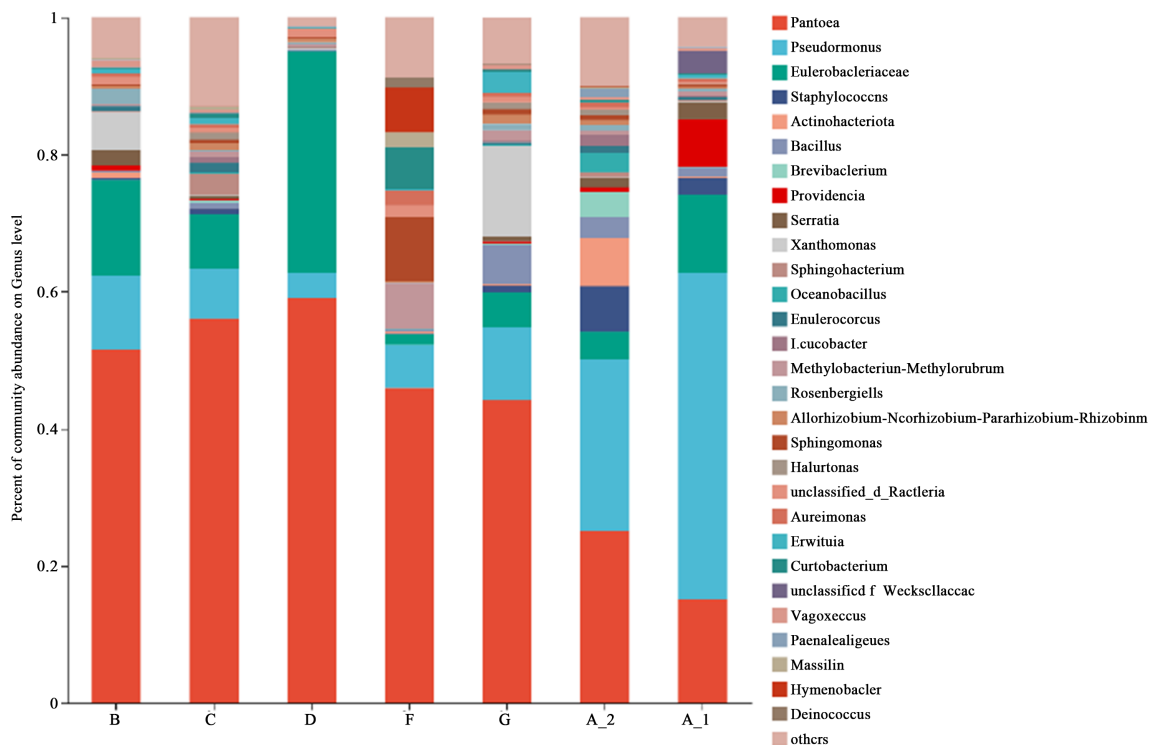


Figure 5. Composition and relative content of chilli pepper and Sichuan pepper powder samples at the generic level

图 5. 辣椒粉及花椒粉样本在属水平上的组成和相对含量

菌属,此外,还有 11.10%的细菌序列还未鉴定到属水平(图 5)。

泛菌属(*Pantoea*)是属于革兰氏阴性菌,常见于植物内生菌,可有效减少致病菌对植物的侵害作用[15],柯红娇等[16]从番茄中分离成团泛菌(*Pantoea agglomerans*) Ljb-2,对番茄黄化曲叶病毒病具有良好的拮抗效果,同时提高番茄的品质和产量。假单胞菌属(*Pseudomonas*)广泛存在于植物根系土壤中,可通过产生抑菌物质或调节植物相关抗性蛋白酶的表达的方式抑制病原菌[17],常琳等[18]发现生防细菌 FD6 可产生硝吡咯菌素,其可有效拮抗番茄灰霉病菌孢子萌发和菌丝的生长。在主要发现的菌属中,建议芽孢杆菌属需引起关注,芽孢杆菌属包含致病菌和腐败菌,作为原料使用后,在后续加工过程中建议针对详细的芽孢杆菌属种类,如蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等进行耐热性研究,通过挑战实验、工艺验证等技术来测试和确保含辣椒粉等含香辛料食品的配方设计和工艺设计,保障食品质量安全。

4. 结论

综上所述,首次,在微生物菌群特征方面,6 组辣椒粉和 1 组花椒粉样本中除含有各自都有的物种外,所共有的物种有 46 个;其次,在微生物群多样性方面,结合 α 多样性和 β 多样性分析可知,A_2 组和 C 组的微生物种类丰度和多样性优于其他 5 组。最后,在微生物菌群结构方面,6 组辣椒粉和 1 组花椒粉样本中共鉴定出 5 个门、6 个纲、24 个目、57 个科和 91 个属,优势菌门主要有变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门,优势菌属主要有泛菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属、不动杆菌属、芽孢杆菌属、普罗维登斯菌属、沙雷氏菌属、黄单胞菌属和鞘氨醇杆菌属。本研究基于高通量测序技术对不同产地辣椒粉的微生物多样性进行分析,填补了辣椒粉为代表的香辛料微生物多样性的研究空白,以期对香辛料微生物的风险识别提供一套技术方法,从而促进食品安全和辣椒粉等香辛料用于食品深加工的进一步发展。

基金项目

上海市工程技术研究中心项目(19DZ2251500)。

参考文献

- [1] 张怡文,徐兰婷,王飞,等. 辣椒雄性不育的分子研究进展[J]. 中国瓜菜, 2024, 37(2): 1-7.
- [2] 申煜丽,牛欣璐,贾若蕴,等. 辣椒秸秆高效利用的研究现状[J]. 现代园艺, 2021, 44(23): 20-24.
- [3] 吴耕民. 中国蔬菜栽培学[M]. 北京: 科学出版社, 1957.
- [4] 林巧,辛竹琳,孔令博,等. 我国辣椒产业发展现状及育种应对措施[J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(5): 82-95.
- [5] 陈莉,郑耿东,周广彪,等. 高通量测序技术在海关监管中的应用概述[J]. 质量与安全与检验检测, 2023, 33(6): 61-66.
- [6] Reuter, J.A., Spacek, D.V. and Snyder, M.P. (2015) High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, **58**, 586-597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>
- [7] 李奕萱,姜春明. 高通量测序分析妊娠期糖尿病对早产儿肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(5): 542-547.
- [8] 邱艳红,田文,徐秀兰. 高通量测序技术在植物病毒检疫中的应用与发展[J]. 植物检疫, 2020, 34(3): 1-6.
- [9] 赵馨馨,崔梦君,董蕴,等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析巴东地区豆瓣酱中微生物多样性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(9): 297-303.
- [10] 徐攀,王田田,张雁君,等. 基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析电子束辐照对手撕牛肉微生物多样性的影响[J/OL]. 食品与发酵工业: 1-8. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.038616>, 2024-03-14.
- [11] 张睿艺,谢辽辽,田星. 辣椒品种对发酵辣椒酱真菌多样性及其理化指标的影响[J]. 食品科技, 2024, 49(1): 282-289.
- [12] 付为艺,苏伟,母应春,等. 产气糟辣椒的微生物与挥发性风味物质研究及相关性分析[J]. 食品与发酵工业,

-
- 2024, 50(4): 143-153.
- [13] 钱杨, 饶瑜, 蒋云露, 等. 基于高通量测序技术分析不同蔬菜种类四川泡菜中微生物多样性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 277-284.
- [14] Ji, P., Rhoads, W.J., Edwards, M.A. and Pruden, A. (2017) Impact of Water Heater Temperature Setting and Water Use Frequency on the Building Plumbing Microbiome. *The ISME Journal*, **11**, 1318-1330.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2017.14>
- [15] 陈容钦, 李玲, 李晓云. 泛菌属内生菌 YMR3 提高花生植株对几种病虫害生物胁迫的抗性研究[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(1): 71-79.
- [16] 柯红娇, 王勇, 卫甜, 等. 成团泛菌 Ljb-2 对番茄黄化曲叶病毒病的田间防效初步研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(5): 985-993.
- [17] 赵子璇, 李俊辉, 杜公福, 等. 防御假单胞 ZF509 的分离鉴定及其对甜瓜细菌性果斑病的防治效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(3): 690-700.
- [18] 常琳, 李倩, 童蕴慧, 等. 生防细菌 FD6 的鉴定及其对番茄灰霉病菌的作用机制[J]. 植物保护学报, 2011, 38(6): 487-492.