

研究报告

多组学技术解析客家“红菌豆渣”发酵过程中风味及物质的转化

林标声^{1,2}, 黄奕¹, 胡冰冰¹, 温文英³, 黎英¹, 陈小红^{*1}

1 龙岩学院生命科学学院, 福建 龙岩 364012

2 龙岩学院生物科技与健康产品工程技术研究中心预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室,
福建 龙岩 364012

3 武平县质量计量检验检测中心, 福建 武平 364300

林标声, 黄奕, 胡冰冰, 温文英, 黎英, 陈小红. 多组学技术解析客家“红菌豆渣”发酵过程中风味及物质的转化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2733-2754.

LIN Biaosheng, HUANG Yi, HU Bingbing, WEN Wenying, LI Ying, CHEN Xiaohong. Multiomics reveal the flavor and compound transformation during the fermentation process of Hakka Hongjundouzha[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2733-2754.

摘要: 【背景】“红菌豆渣”是闽西客家地区特有的一种传统美食。【目的】解析客家传统发酵食品“红菌豆渣”物质转化、形成具有特殊风味的发酵过程。【方法】分析不同发酵时间“红菌豆渣”样品的感官特征, 采用 GC-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术、RNA-Seq 转录组学测序技术和 Label-Free 非标记定量蛋白质组学技术分析不同发酵时间样品的风味物质组成, 寻找影响菌株发酵的主要差异表达基因和蛋白。【结果】不同发酵时间“红菌豆渣”样品共得到风味物质 198 种, 主要包括(*E,E*)-2,4-癸二烯醛、(*E*)-2-己烯醛、1-辛醇、奥昔菊环和 2-戊基呋喃等。发酵 d2 是“红菌”发酵基因转录、表达的主要时期, 最多基因参与“红菌豆渣”样品的发酵过程, 筛选得到的差异基因、差异蛋白数量最多, 分别为 2 814 个和 415 个。发酵 d3, 样品趋于成熟, 参与发酵过程的基因及其转录、表达的蛋白数量最少, 分别为 99 个和 43 个。发酵 d2-d3, 菌株进行淀粉和糖类的代谢、氨基酸的合成与脂肪酸的代谢, 样品的豆腥味下降, 产生了许多具有特殊香气的醇、酮、酯类物质, 使得样品呈现可持续性感知的鲜味(丰富性)和甜味, 样品的硬度、剪切力和咀嚼性增加。发酵 d4, “红菌豆渣”样品开始产生了一些指示食品腐败的油脂和氯环己烷、硝基环己烷等物质, 使得样品开始老化, 产品品质开始下降。【结论】本研究通过多组学联用技术, 从分子水平上解析了客家“红菌豆渣”不同发酵时间风味物质的组成及其物质转化的过程, 可为提高“红菌豆渣”的发

资助项目: 福建省科技厅农业科技引导性项目(2022N0028); 福建省自然科学基金(2022J011154)

This work was supported by the Agricultural Science and Technology Guidance Project of Fujian Provincial Department of Science and Technology (2022N0028) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J011154).

*Corresponding author. E-mail: 82001018@lyun.edu.cn

Received: 2024-12-02; Accepted: 2025-01-20; Published online: 2025-02-18

酵效率和品质，促进产品实现高值化的精深加工和走向工业化生产奠定基础。

关键词：红菌豆渣；物质转化；风味物质；转录组学；蛋白质组学

Multiomics reveal the flavor and compound transformation during the fermentation process of Hakka Hongjundouzha

LIN Biaosheng^{1,2}, HUANG Yi¹, HU Bingbing¹, WEN Wenying³, LI Ying¹, CHEN Xiaohong^{*1}

1 College of Life Science, Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China

2 Key Laboratory of Fujian Universities Preventive Veterinary Medicine and Biotechnology, Biotechnology and Health Products Engineering Technology Research Center of Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China

3 Quality Measurement Inspection and Testing Center of Wuping County, Wuping 364300, Fujian, China

Abstract: [Background] Hongjundouzha was a traditional delicacy unique to the Hakka region of western Fujian. [Objective] To analyze the compound transformation and special flavor formation during the fermentation process of the Hakka traditional fermented food Hongjundouzha. [Methods] Analyzed the sensory characteristics of Hongjundouzha samples collected at different time points of fermentation. GC-MS/MS-based widely targeted metabolomics, RNA-Seq-based transcriptomics, and Label-Free quantitative proteomics were used to analyze the flavor composition of samples and identify the main differentially expressed genes and proteins that affect strain fermentation. [Results] A total of 198 flavor compounds were obtained from the samples at different time points of fermentation, mainly including (*E,E*)-2,4-decadienal, (*E*)-2-hexenal, 1-octanol, azulene, and 2-pentylfuran. Day two of fermentation was the main period for transcription and expression of genes involved in the fermentation with *Neurospora crassa*, with the most genes involved in the fermentation process of Hongjundouzha samples. The number of differentially expressed genes and proteins screened out was the highest (2 814 and 415, respectively) on this day. On day three of fermentation, the sample tended to become mature, and the number of genes and proteins involved in the fermentation process was the least, at 99 and 43, respectively. From day two to three, the strain underwent metabolism of starch and sugars, synthesis of amino acids, and metabolism of fatty acids, which were accompanied by a decrease in the beany smell and the production of alcohols, ketones, and esters with special aromas, resulting in a sustainable sense of freshness (richness) and sweetness in the sample. At the same time, the hardness, shear strength, and chewiness of the sample increased. On day four, the Hongjundouzha sample began to produce some oils indicating food spoilage and compounds such as chlorocyclohexane and nitrocyclohexane, causing the sample to age and the product quality to decline. [Conclusion] This study utilized multiomics to elucidate the composition and transformation of flavor compounds in Hakka Hongjundouzha at different time points of fermentation from a molecular level. This can lay a foundation for improving the fermentation efficiency and quality of Hongjundouzha, promoting the deep processing of value-added products, and moving towards industrial production.

Keywords: Hongjundouzha; compound transformation; flavor compounds; transcriptomics; proteomics

“红菌豆渣”是闽西客家地区特有的一种传统美食，其经豆渣压制、撒菌、发酵而制成，是一种表面布满有益红色菌毛的口感鲜美、风味独特、具有鲜明个性的菜肴，富含膳食纤维、蛋白质和有机酸等营养成分^[1]。“红菌豆渣”制作主要由当地小作坊完成，传统操作是通过将收集的“菌孢”按经验播撒到预制好的豆渣表面，3–4 d 就发酵完成；由于各家所用菌株质量、接种量不一，造成了“红菌豆渣”在外观、口感、豆腥异味去除等方面存在较大的差别，成为其走向工业化生产的限制因素。因而，将“红菌豆渣”发酵主要菌株进行工业化培养，按统一标准进行接种、发酵，是提升其发酵性能、拓宽产业发展道路的良好途径。以往豆渣发酵的研究主要集中在菌株分离、营养成分的分析、工艺优化等方面^[2–3]，多为形态、生理特性等指标测定，缺乏从分子水平上的深入分析，而随着现代生物学技术的进步，能通过多分子层次系统全面了解生物体内多种分子相互作用的多组学联用技术，成为了近年来从分子水平上对物质进行系统水平分析的研究热点^[4–5]。

本研究前期已从“红菌豆渣”中分离得到其主要的发酵菌株粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*, CGMCC3.19233)，并从其基因组中探究得到大量的纤维酶基因，该基因的转录、表达及代谢在纤维构成为主的豆渣发酵及物质成分的转化中起着至关重要的作用^[6–7]。因此，本研究结合不同发酵时间“红菌豆渣”样品的感官特征分析，采用 GC-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术，分析了不同发酵时间样品的风味物质组成，并进行了样品 RNA-Seq 转录组学测序、Label-Free 非标记定量蛋白质组学测序及结果关联分析，以期获得不同发酵时间菌株发酵的主要差异表达基因和蛋白，从分子水平上解析“红菌豆渣”不同发酵时间风味物质组成及物质转化的过程，为提高“红菌豆渣”发酵转化效率提供理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 样品

“红菌豆渣”：采用龙岩学院生命科学学院微生物发酵研究室前期分离的 *Neurospora crassa* (CGMCC3.19233)^[6]菌株纯种发酵而成。

1.2 主要试剂和仪器

SDT 裂解液：4%十二烷基硫酸钠，100 mmol/L Tris-HCl pH 7.6，0.1 mol/L 二硫苏糖醇。

扫描电镜，日立公司；质构仪，北京盈盛恒泰科技有限责任公司；电子舌味觉分析系统，Insent 公司；Agilent 生物分析仪、GC-MS/MS 气相色谱-质谱联用仪，安捷伦科技有限公司；凝胶成像系统，上海天能科技有限公司；NanoDrop 微量核酸测定仪、超高效液相仪和高分辨质谱仪，赛默飞世尔科技有限公司；荧光定量 PCR 仪，应用生物系统公司；Real time PCR 试剂盒，南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 不同发酵时间“红菌豆渣”样品感官特征分析

市场购买新鲜豆渣，按 0.1%接种量将 *Neurospora crassa* 菌株接种至炒熟冷却至 40 °C 的豆渣中，在竹簸箕上压紧，28 °C、75%湿度的光照培养箱中发酵 1、2、3、4 d (标记为发酵 d1–d4)。观察不同时间样品的外观特性(同时以未接菌样品为对照)，收集表层，通过扫描电镜观察菌丝体的生长情况；通过 GB 29946—2013《食品添加剂纤维素》、硫酸-蒽酮法和 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》分别测定样品的主要物质成分纤维、总糖和蛋白^[8–10]，并采用 GB 5009.3—2016《食品中水分的测定》测定样品水分^[11]；通过质构仪测定样品的硬度、剪切力和咀嚼性，并以市场购买的当天制作的水豆腐和豆干(八宝豆干，河南世通食品有限公司产)为对照，分析各样品的物理特性；采用电子舌味觉分析系统对样品进行 5 种基本味(酸、涩、苦、咸、鲜)和甜味的评价，并分析样品中含有的可持续性感知的鲜味，即丰富性^[12]。上

述感官特征分析最终统计的数据均为不同发酵时间“红菌豆渣”3个批次样品测定均值。

1.4 不同发酵时间“红菌豆渣”样品风味物质组成分析

采用 GC-MS/MS 广泛靶向代谢组学方法分析不同时间样品风味物质组成。从 -80°C 取出发酵 d1-d4 的样品各 3 份进行液氮研磨(同时以未接菌样品为对照,标记为 d0),混匀后各称取 0.2 g 于顶空瓶中。分别加入 0.2 g NaCl、10 μL 内标(2,2,4,4-四氘代-3-己酮)溶液于顶空瓶中,加盖密封。全自动顶空固相微萃取(headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)进行样本萃取,再采用 GC-MS/MS 气质联用分析所萃取的不同时间样品风味物质组成及差异^[13]。气相色谱分析条件:DB-5MS 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm),以高纯氦气($\geq 99.999\%$)为载体,恒流流速 1.2 mL/min,便携式氢火焰离子化检测器检测。进样口温度 250°C ,溶剂延迟 3.5 min。程序升温: 40°C 保持 3.5 min,以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 100°C ,再以 $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 180°C ,最后以 $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 280°C ,保持 5 min。质谱分析条件:电子轰击离子源,离子源温度 230°C ,四级杆温度 150°C ,质谱接口温度 280°C ,电子能量 70 eV,扫描方式为离子检测模式(selected ion monitoring, SIM),定性定量离子精准扫描(GB 23200.8—2016)^[14]。

采用 MassHunter 软件处理质谱分析后的下机原始数据,通过积分和校正后的数据用于定性定量分析。采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)了解各组样品之间的代谢物质含量差异和组内样品之间的变异度大小,以 $P<0.05$ 且变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) >1 为差异显著的筛选标准^[15]。对应用筛选标准鉴定得到的差异代谢物质(风味物质)的原始相对含量采用单位方差缩放(unit variance scaling, UV)处理,通过 R 软件

ComplexHeatmap 包绘制热图,分析各组风味物质相对含量的变化规律^[16]。

1.5 不同发酵时间“红菌豆渣”样品有参转录组学分析

取“红菌豆渣”发酵 d1-d4 样品各 3 份,分别提取各样本总 RNA,通过 NanoDrop 微量核酸测定仪和 Agilent 生物分析仪检测各样本 RNA 的纯度(OD_{260}/OD_{280} , OD_{260}/OD_{230})及 RNA 片段长度,检验合格后送至北京奥维森基因科技有限公司采用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序平台进行有参转录组测序,所得的测序数据经过滤、Trimmomatic 软件(v0.33)去除带有测序接头及一些低质量的 Reads,通过 TopHat 2、Cufflinks v2.1.1 软件对所获得的优质序列进行比对、组装,再进行 RNA-Seq 相关性检查。根据基因表达水平分析中得到的 read count 数据进行基因差异表达分析,使用 DESeq1.10.1 进行差异表达分析^[17]。所得差异表达分析结果 P value 使用 Benjamini-Hochberg 方法控制错误发生率(false discovery rate, FDR),差异基因筛选的标准为: $Q \text{ value}<0.05$ ^[18]。

1.6 不同发酵时间“红菌豆渣”样品 Label-Free 相对定量蛋白质组学分析

采用 SDT 裂解法提取发酵 d1-d4 样品各 3 份的总蛋白,用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法进行蛋白定量^[19]。每组样品取适量蛋白,按过滤辅助样品制备进行蛋白酶酶解,采用 C18 Cartridge 对酶解肽段进行脱盐,冻干后加入 40 μL 0.1%甲酸溶液复溶,肽段定量(OD_{280})。每份样品采用纳升流速的超高效液相仪液相系统 EASY-nLC 进行分离,缓冲液 A 液为 0.1%甲酸水溶液, B 液为 0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为 84%)。色谱柱以 95% A 液平衡,样品由自动进样器上样到上样柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap100, 100 $\mu\text{m}\times 2 \text{ cm}$, nanoViper C18),经过分析柱(ThermoScientific EASY column, 10 cm, ID 75 μm , 3 μm , C18-A2)分离,流速为 300 nL/min。各组样品经色谱分离后进行质谱分析,检测方

式为正离子, 离子源电压 1 800 V, 母离子扫描范围为 300–1 800 m/z , 一级分辨率为 70 000 at 200 m/z , 二级分辨率为 17 500 at 200 m/z , 通过高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)进行碎裂, 归一化碰撞能量值 30 eV^[20]。

质谱分析获得原始数据采用 MaxQuan (v1.5.3.17)软件进行查库鉴定及定量分析^[21]。首先对各组目标蛋白集合的定量信息数据进行归一化处理, 再使用 MaxQuant (v1.5.3.17)软件将获得的原始数据与 *Neurospora crassa* 蛋白质 UniProtKB 数据库(www.uniprot.org)进行比对分析。参数设置为: 酶类型 trypsin, 允许的最大漏切位点数目 2, 一级离子质量容差 6 mg/L, 二级离子质量容差 20 ppm, 固定修饰 carbamidomethyl, 可变修饰 oxidation, 可信蛋白质和可信肽段的筛选标准 ≤ 0.01 , 采用唯一肽段和 razor 肽段的定量强度值进行蛋白质定量, 蛋白质定量的计算方法采用非标记定量法(label-free quantification, LFQ), 允许最大漏切数 1。以 $Q < 0.05$ 为标准对所获得的各组样品差异蛋白采用 Perseus 软件进行筛选^[22], 并利用 David 软件^[23]对所获得的各组差异蛋白靶基因进行 GO、KEGG 功能注释和富集分析, 以 $P < 0.05$ 为 GO 条目和 KEGG 的显著富集^[24]。

1.7 不同发酵时间“红菌豆渣”样品的转录组学、蛋白组学关联分析

将发酵 d1–d4 的样品在转录、蛋白水平中测得的基因和蛋白序列进行比对, 以蛋白序列作为数据库, 筛选相似度 $\geq 99.5\%$ 的结果; 通过 R 语言的 dplyr、ggplot2、ggrepel 包绘制九象限图。基于九象限分析结果, 筛选出各个比较组中同时上调和同时下调的基因/蛋白[筛选条件: $Q \text{ value_RNA} < 0.05$, $P \text{ value_protein} < 0.05$, $\log_2 \text{FC (protein)}$ 的绝对值 > 1 , 且 $\log_2 \text{FC (RNA)}$ 和 $\log_2 \text{FC (protein)}$ 同正或同负]^[25], 基于 R 语言的 cor 函数进行 spearman 相关性分析, 得到相关性 r 值, 并进行 GO 和 KEGG 注释分析。GO 和 KEGG 柱状图通过 R 语言的 ggplot2 包进行绘

制, 绘制转录组跟蛋白组共有通路 KEGG 图^[26]。

1.8 共有差异表达基因和蛋白的 RT-qPCR 验证

对筛选得到的不同发酵时间 d2 vs. d1、d3 vs. d2、d4 vs. d3 这 3 个具有相同表达模式的共有差异表达基因和蛋白进行 RT-qPCR 表达分析验证试验^[27]。筛选得到的基因引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件进行设计, 并使用广泛通用的基因数据库(UniGene)作为参考。对检验合格的各组总 RNA 样品按照 Real time PCR 试剂盒说明书进行 cDNA 的合成。RT-qPCR 反应体系和反应条件按 Lin^[28]的方法进行, 以 18S rRNA 基因为内参基因, 按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 不同发酵时间“红菌豆渣”样品感官分析结果

“红菌豆渣”发酵 d1–d4 样品和未接菌样品(d0)的外观形状及扫描电镜图如图 1 所示, 未接菌发酵 d0 样品表面灰白色, 无菌丝生长; 发酵 d1 样品表面开始出现红点, 电镜下菌丝开始生长; 发酵 d2、d3 样品, 菌丝体生长最旺盛, 橙黄色菌丝长满样品表面, 电镜下菌丝致密、粗壮; 发酵 d4 样品出现破裂, 电镜下部分菌丝老化坍塌、扭曲现象明显。不同发酵时间样品的主要物质成分变化如图 2A 所示, 硬度、剪切力和咀嚼性等产品特性如图 2B 所示。豆渣的主要物质成分为纤维、总糖和蛋白, 未接菌发酵 d0 时, 样品的纤维和总糖含量较高, 但松散、不成型, 无法用质构仪进行测定。接菌以后, 随着菌株的生长, 其分泌的菌丝将样品固定成型, 可通过质构仪测定不同时间样品的硬度、剪切力和咀嚼性。“红菌”*Neurospora crassa* 为优良的纤维素分解菌, 具有较强的纤维分解能力^[29], 但其蛋白酶分解能力较弱。因此, 随着发酵时间的延长, *Neurospora crassa* 产生大量纤维酶将样品中的纤维、总糖分解, 特别是发酵 d2、d3 样品菌丝大量生长, 样品的纤维含量明

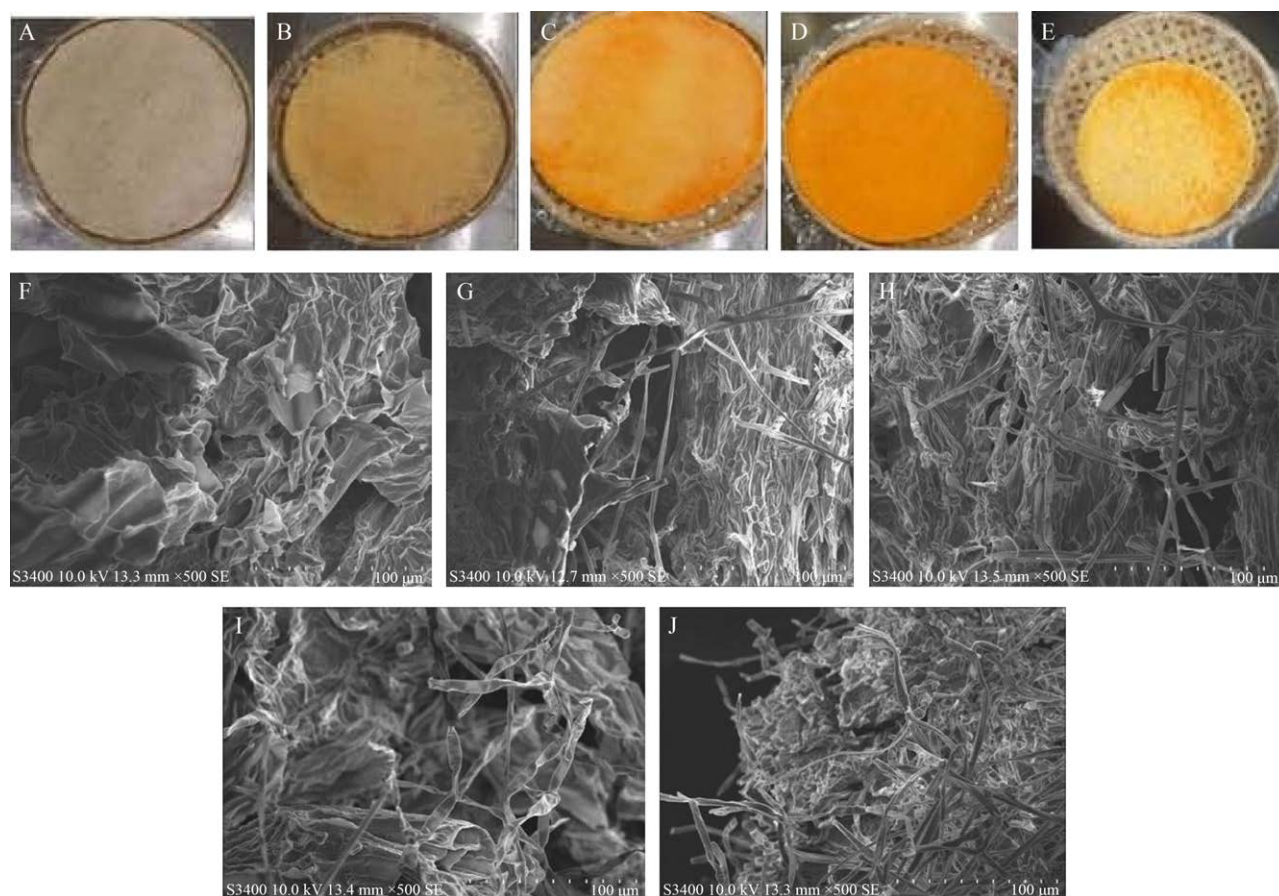


图 1 不同发酵时间“红菌豆渣”样品的外观形态及菌丝扫描电镜图(500×) A–E: 分别为发酵 d0–d4 样品; F–J: 发酵 d0–d4 样品的菌丝扫描电镜图。

Figure 1 Appearance morphology and mycelium scanning electron microscopy image of Hongjundouzha samples at different fermentation times (500×). A–E: Samples from fermentation d0 to d4, respectively; F–J: Scanning electron microscopy images of mycelium of fermented d0–d4 samples.

显下降;但蛋白分解较少,其相对含量呈上升趋势。图中发酵 d2 样品各物质成分的变化尤为明显,为“红菌豆渣”样品物质转化的关键时间。随着发酵时间的延长,样品中水分含量下降,菌丝在样品中生长更加致密,样品中的硬度、剪切力和咀嚼性增加,并且变化规律一致;样品的硬度介于市场上购买的水豆腐和豆干之间。不同发酵时间样品电子舌味觉分析系统结果如图 3 所示,以 d0 为参照换算不同发酵时间样品的绝对输出值绘制雷达图,结果表明,随着发酵时间的延长,酸味一直增长,鲜味、丰富性和甜味均是一直增长最后略微下降,苦味、苦

味回味、涩味、涩味回味、咸味均是先降低再逐渐增大;其中发酵 d2 时,样品的鲜味值绝对输出值最高,为样品主要的呈味物质,同时期其样品的苦味、涩味、咸味也最少。发酵 d3 时,样品的丰富性、甜味最高,但鲜味比发酵 d2 时略微下降,苦味、涩味、咸味开始上升。

2.2 不同发酵时间“红菌豆渣”样品风味物质的组成及变化分析

GC-MS/MS 广泛靶向代谢组分析表明,不同发酵时间样品共得到风味物质 198 个,其中醛 9 个、醇 10 个、酯 19 个、芳烃 15 个、杂环化合物 26 个、酮 24 个、含硫化合物 3 个、卤代

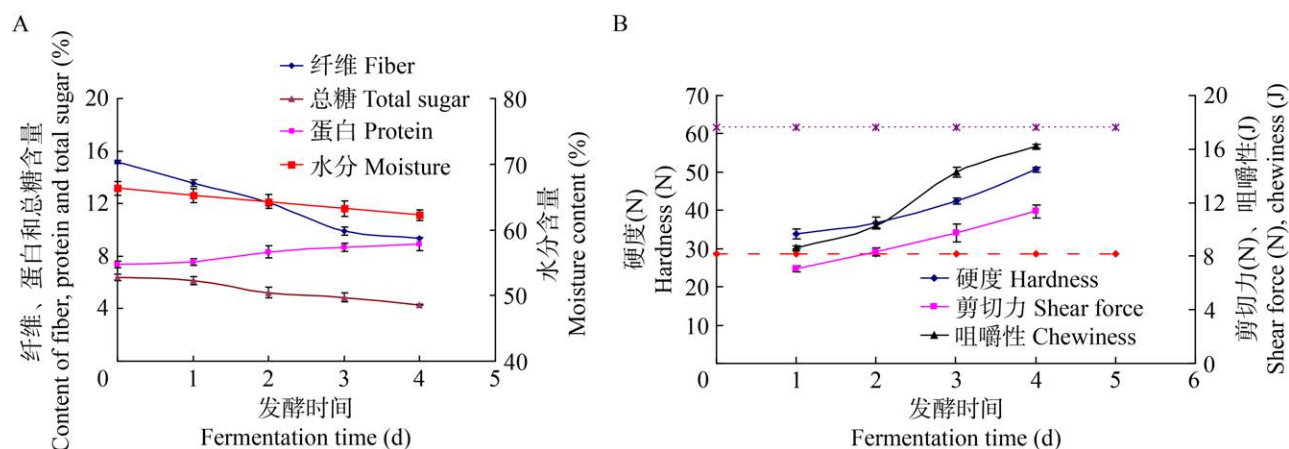


图 2 不同发酵时间“红菌豆渣”样品的主要物质成分、水分(A)及物理特性(B)的变化

Figure 2 Changes in main material components, moisture content (A), and physical property (B) of Hongjundouzha samples at different fermentation times.

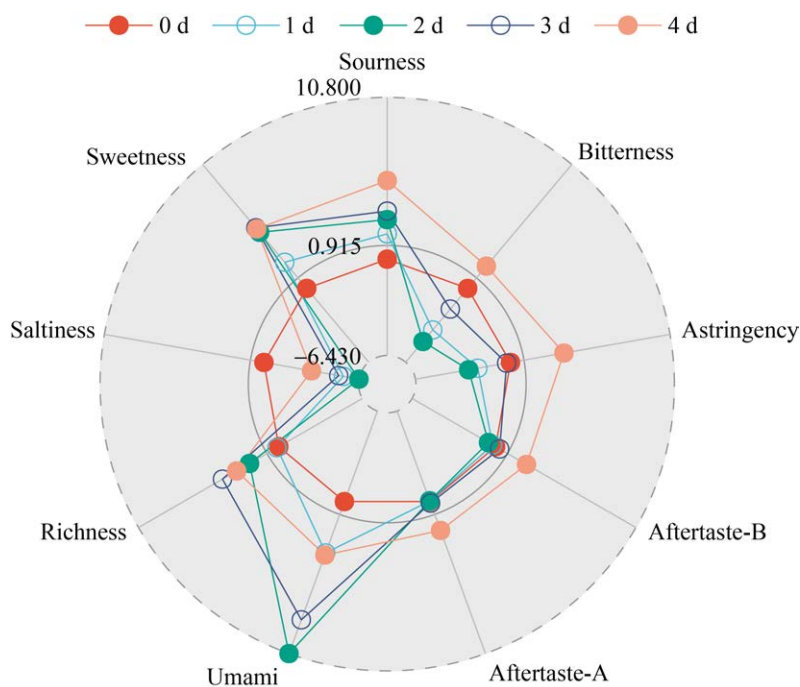


图 3 不同发酵时间“红菌豆渣”样品的电子舌雷达图

Figure 3 Electronic tongue radar chart of Hongjundouzha samples at different fermentation times.

烃 3 个、酸 4 个、含氮化合物 3 个、烃类 60 个、萜类 12 个、胺类 6 个、酚 2 个和其他类 2 个。为了研究各代谢物质在不同分组中的相对含量变化趋势，将所有比较组中按照筛选标准鉴定得到全部差异风味物质的相对含量进行 UV 处理，随后进行 K 均值(K-means)聚类分析^[30]，如

图 4 所示。

PCA 和 OPLS-DA 分析表明(图 5)，发酵后的样品其风味物质组成与发酵前差异较大，无法聚类在一起；总体上，发酵 d1 和 d2、发酵 d3 和 d4 样品的物质能部分聚类在一起，具有一定的相似性。不同发酵时间“红菌豆渣”样品

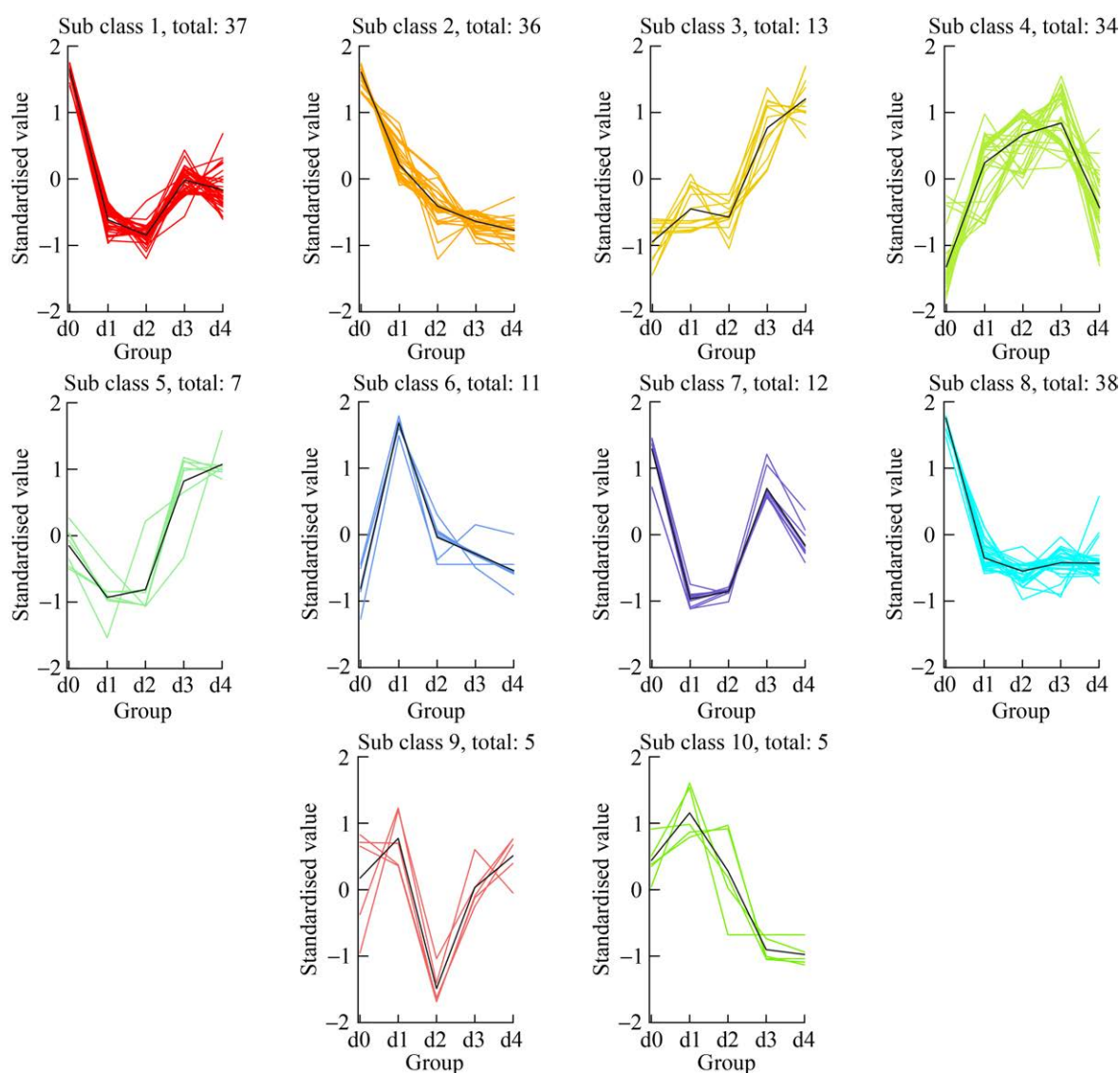


图 4 不同发酵时间“红菌豆渣”样品风味物质的 K-means 分析图

Figure 4 K-means analysis of flavor substances in samples of Hongjundouzha at different fermentation times.

主要测定的差异显著性风味物质按 VIP 值大小排列, 前 20 的统计信息如表 1 所示、绘制的热图如图 6 所示。

综上所述, 相较于未接菌的样品(d0), 随着发酵时间的延长, 样品中主要豆腥味物质(*E,E*)-2,4-癸二烯醛、(*E*)-2-己烯醛、2-戊基呋喃和正壬醛, 与一些具有刺激性气味的物质如 3-巯基己醇、二烯丙基二硫化物、氯环己烷和硝基环己烷等含量均显著下降, 而一些具有特殊香气的醇、酮、酯类物质, 如 1-辛醇、奥甘菊环、

3-(羟甲基)-2-壬酮、2,3-己二酮、1-辛烯-3-醇、月桂酸甲酯、2-甲基-2-癸烯、2-乙基己基草酸戊酯、丁酸乙酯、辛酸甲酯、1-庚醇和十一碳烯酸等含量显著上升(部分物质因菌丝老化 d4 含量有所下降)^[31-32], 成为了构成“红菌豆渣”样品风味的关键物质。

2.3 不同发酵时间“红菌豆渣”样品差异基因及蛋白的数量

如图 7 所示, 通过设定标准 d2 vs. d1 期筛选得到的差异基因、差异蛋白数量最多, 分别

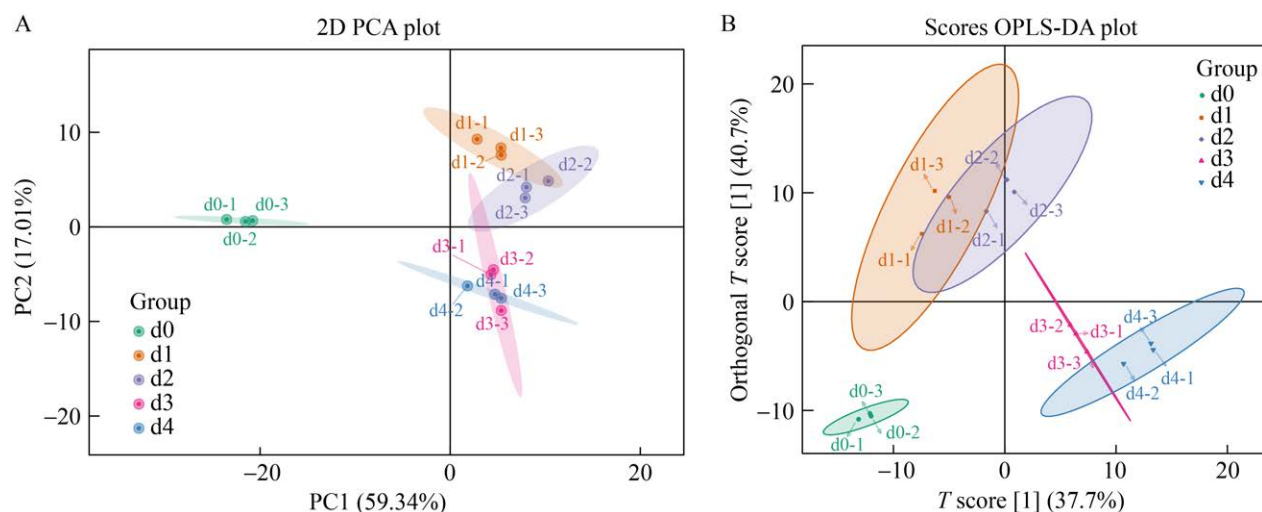


图 5 不同发酵时间“红菌豆渣”样品 PCA (A)和 OPLS-DA (B)分析图

Figure 5 PCA (A) and OPLS-DA (B) analysis of samples from Hongjundouzha at different fermentation times.

为 2 814 个和 415 个；d3 vs.d2 期筛选得到的数量最少，分别为 99 个和 43 个。结果表明，d2 是“红菌”发酵基因转录、表达的主要时期，最多基因参与“红菌豆渣”样品的发酵过程；d2–d3 发酵趋于稳定，参与发酵过程的基因及其转录、表达的蛋白数量最少；d3–d4 由于菌丝体老化，在逆境条件下有部分基因参与了相应的发酵代谢过程，差异基因及其转录、表达的蛋白数量有所增加。

2.4 不同发酵时间“红菌豆渣”样品的差异基因及蛋白的关联分析

各样品鉴定出的蛋白质表达水平和结果如图 8、表 2 所示。d2 vs. d1、d3 vs. d2、d4 vs. d3 不同时期差异表达蛋白与其对应基因相关性系数分别为 0.532 4、0.204 5 和 0.474 5，关联到差异表达蛋白与 mRNA 表达量变化趋势一致的基因数量分别是 474、3 和 74 个，即差异表达蛋白在转录、翻译水平不被调控的基因数；变化趋势相反的基因数为 76、3 和 33 个，即差异表达蛋白在转录、翻译水平被调控的基因数。通过关联分析，发现一些可能与“红菌豆渣”纤维分解、脂肪、氨基酸合成相关的靶标蛋白(表 3)，如 d2 vs. d1、d3 vs. d2 时期上调表达的糖苷水

解酶家族 5 蛋白(glycoside hydrolase family 5 protein)、几丁质酶(chitinase)、脂肪酶(lipase)、L-天冬酰胺酶(L-asparaginase)、精氨酸转运蛋白(arginine transporter)等，表明随着发酵时间的延长,发酵菌株 *Neurospora crassa* 纤维分解、脂肪、氨基酸合成的基因表达越来越活跃。同时在 d4 vs. d3 时期还发现了溶血磷脂酶(lysophospholipase)表达上调，提示其可能参与了溶血磷脂酰胆碱(18:1)代谢生成与食品腐败相关的油脂^[33]。

2.5 变化趋势一致的共有差异表达基因和蛋白生物信息学分析

2.5.1 GO 功能注释

对关联到的蛋白和 mRNA 表达趋势相同的共有差异表达基因和蛋白进行 GO 功能显著性富集分析，用以分析共有差异表达基因行使的主要功能。如图 9 所示，d2 vs. d1 组中，在生物过程(biologicalprocess)中主要表现为小分子代谢过程(small molecule metabolic process)，细胞组分(cellularcomponent)为细胞质(cytoplasm)，分子功能(molecularfunction)为分子功能(molecularfunction)和催化活性(catalytic activity)。表明 d2 vs. d1 时期基因主要在细胞质

表 1 不同发酵时间“红菌豆渣”样品的主要测定的风味物质信息统计

Table 1 Statistics of main flavor substance information determined in samples of Hongjundouzha at different fermentation times

序号 Serial number	物质名称 Material name	物质一级分类 Primary classification of substances	VIP	P	子类 Sub class	风味描述 Flavor description
1	(E,E)-2,4-癸二烯醛 (E,E)-2,4-decadienal	醛 Aldehyde	1.61	1.83×10^{-11}	II	豆腥味、柑橘味 Bean flavor, citrus flavor
2	(E)-2-己烯醛 (E)-2-hexenal	醛 Aldehyde	1.61	8.77×10^{-8}	II	豆腥味、草莓味 Bean flavor, strawberry flavor
3	1-辛醇 1-octanol	醇 Acohol	1.60	3.91×10^{-11}	III	柑橘香味 Citrus aroma
4	奥昔菊环 Azulene	芳烃 Aromatics	1.59	4.23×10^{-11}	IV	萘相似的特殊香气 The special aroma similar to naphthalene
5	2-戊基呋喃 2-pentylfuran	杂环化合物 Heterocyclic compound	1.59	9.86×10^{-10}	VIII	豆腥味 Bean like odor
6	3-(羟甲基)-2-壬酮 3-(hydroxymethyl)-2-nonone	酮 Ketone	1.55	3.83×10^{-2}	III	水果、花、油脂和药草香气 The aroma of fruits, flowers, oils, and herbs
7	正壬醛 Nonanal	醛 Aldehyde	1.55	2.79×10^{-9}	X	豆腥味、玫瑰香味 Bean flavor, rose fragrance
8	3-巯基己醇 3-mercaptohexanol	含硫化合物 Sulfur compounds	1.55	2.46×10^{-11}	II	强烈的臭味 Strong odor
9	2,3-己二酮 2,3-hexanedione	酮 Ketone	1.55	3.83×10^{-2}	III	具有甜的奶油、焦糖、水果气味 Has a sweet aroma of cream, caramel, and fruit
10	二烯丙基二硫化物 Diallyl disulphide	含硫化合物 Sulfur compounds	1.54	3.64×10^{-7}	II	强烈的洋葱味 Strong onion flavor
11	1-辛烯-3-醇 1-octen-3-ol	醇 Acohol	1.54	6.46×10^{-11}	I	草本味、泥土味 Herbal and earthy
12	月桂酸甲酯 Methyl laurate	酯 Ester	1.53	3.37×10^{-5}	III	花香、奶油、椰子、蘑菇香气 Floral, creamy, coconut, and mushroom aromas
13	2-甲基-2-癸烯 2-methyl-2-decene	芳烃 Aromatics	1.53	2.08×10^{-10}	IV	柑橘味 Citrus flavor
14	2-乙基己基草酸戊酯 2-ethylhexyl oxalate amyl ester	酯 Ester	1.53	2.07×10^{-8}	IV	茶香味 Tea aroma
15	丁酸乙酯 Ethyl butyrate	酯 Ester	1.51	3.36×10^{-5}	III	凤梨、玫瑰香气 Pineapple and rose aromas
16	辛酸甲酯 Methyl octanoate	酯 Ester	1.50	2.97×10^{-8}	III	甜橙味 Sweet orange flavor
17	1-庚醇 1-heptanol	醇 Acohol	1.50	9.35×10^{-9}	IV	草莓、香蕉、蘑菇香味 Strawberry, banana, mushroom fragrance
18	氯环己烷 3-mercaptohexanol	卤代烃 Halogenated hydrocarbons	1.50	1.82×10^{-5}	VIII	类似氯仿窒息性气味 Similar to the suffocating odor of chloroform
19	十一碳烯酸 Undecylenic acid	酸 Acid	1.48	1.06×10^{-4}	III	水果和玫瑰花香 Fruit and rose fragrance
20	硝基环己烷 Nitro-cyclohexane	含氮化合物 Nitrogen compounds	1.48	4.29×10^{-12}	VIII	刺激性气味 Pungent smell

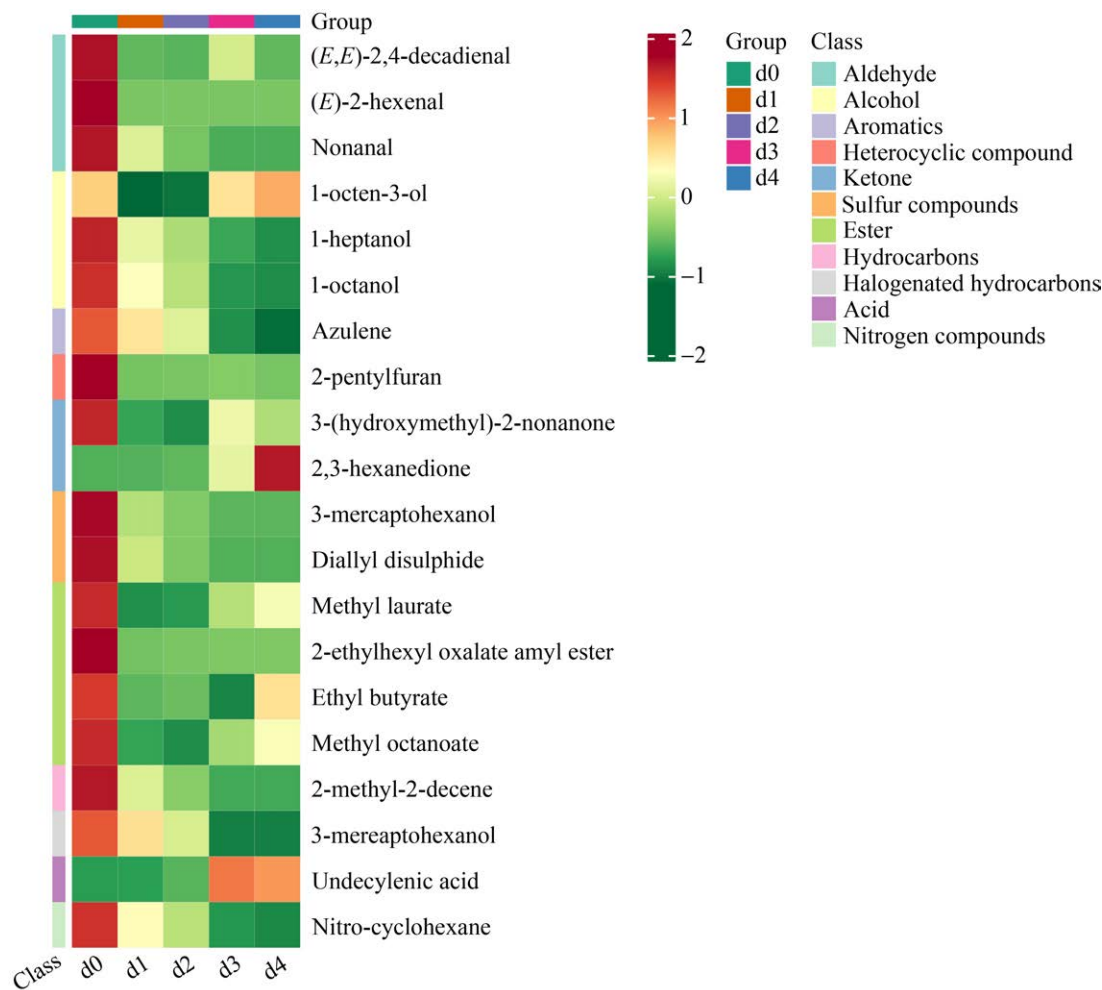


图 6 不同发酵时间“红菌豆渣”样品差异显著性风味物质的热图分析
Figure 6 Heat map analysis of flavor compounds with significant differences in samples of Hongjundouzha at different fermentation times.

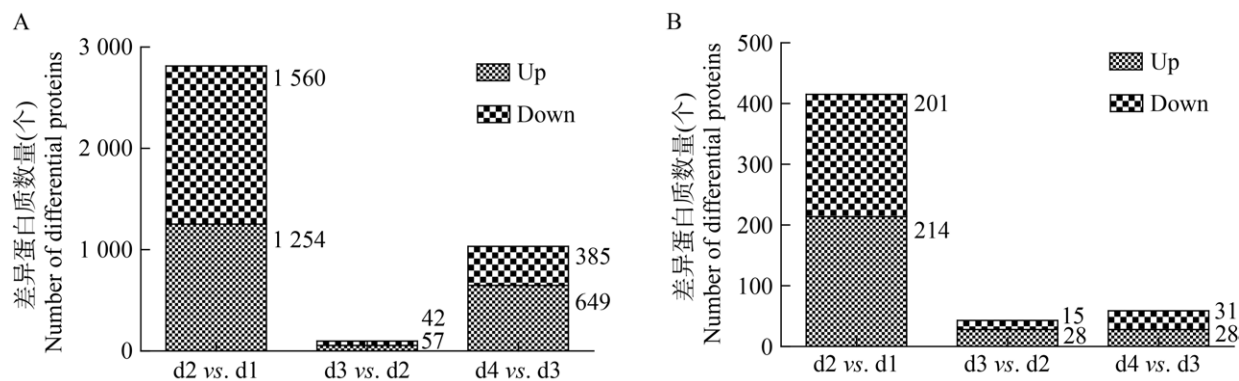


图 7 不同发酵时间“红菌豆渣”样品差异基因(A)、蛋白(B)的统计
Figure 7 Statistical analysis of differentially expressed genes (A) and proteins (B) in samples of Hongjundouzha at different fermentation times.

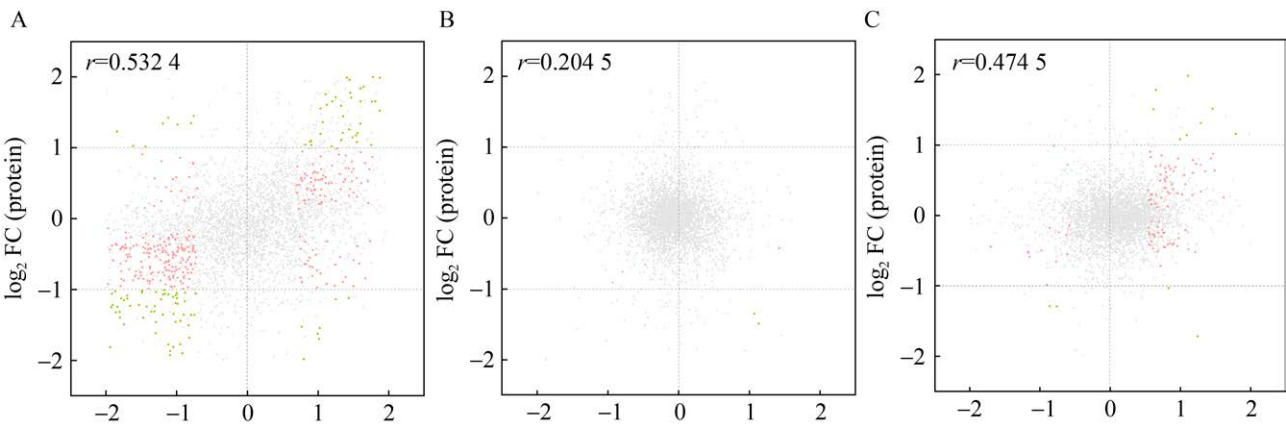


图 8 差异表达蛋白与其对应基因相关性的九象限图 A: d2 vs. d1; B: d3 vs. d2; C: d4 vs. d3。图中从上至下、从左往右依次为 1–6 区域, 红点表示 3、4 区域中的 $Q\text{ value_RNA}<0.05$ 、 $P\text{ value_protein}<0.05$ 的点; 绿点表示 1、2、5、6 区域 $Q\text{ value_RNA}<0.05$ 、 $P\text{ value_protein}<0.05$, 且 $\log_2\text{ FC (protein)}$ 绝对值 >1 的点; 灰色的是各个区域 $Q\text{ value_RNA}>0.05$ 、 $P\text{ value_protein}>0.05$, 且 $\log_2\text{ FC (protein)}$ 绝对值 <1 的点。

Figure 8 Nine quadrant diagram of the correlation between differentially expressed proteins and their corresponding genes. A: d2 vs. d1; B: d3 vs. d2; C: d4 vs. d3. In the figure, from top to bottom and from left to right, there are regions 1–6. The red dots represent the points in regions 3 and 4 where $Q\text{ value_RNA}<0.05$ and $P\text{ value_protein}<0.05$ are located; Green dots indicate points in regions 1, 2, 5, and 6 where $Q\text{ value_RNA}<0.05$, $P\text{ value_protein}<0.05$, and $\log_2\text{ FC (protein)}$ absolute value >1 ; The gray areas are the points where $Q\text{ value_RNA}>0.05$, $P\text{ value_protein}>0.05$, and $\log_2\text{ FC (protein)}$ absolute value <1 in each region.

表 2 差异表达蛋白与 mRNA 表达量变化关系

Table 2 Relationship between differentially expressed proteins and changes in mRNA expression levels			
组别 Group	趋势相同		趋势相反
	Expression_Cor_same (per)		Expression_Cor_diff (per)
	均上调 Up-regulated	均下调 Down-regulated	小计 Subtotal
d2 vs. d1	170	304	474
d3 vs. d2	0	3	3
d4 vs. d3	59	15	74

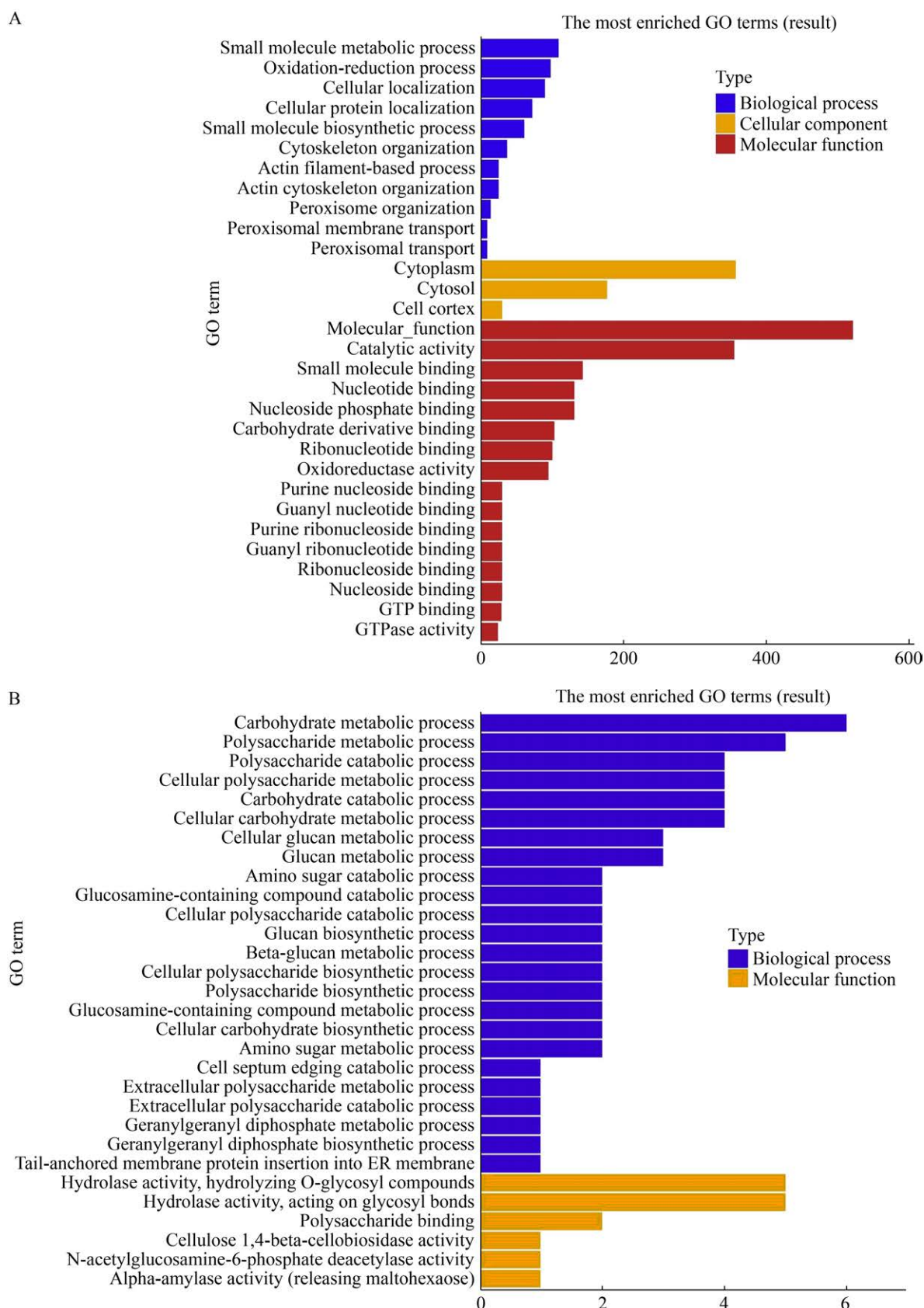
中参与了氨基酸、糖类、脂类等小分子物质合成、分解和转化的各种代谢活动, 菌体的代谢活动主要在于维持自身的能量代谢, 对于样品豆渣的物质转化活动较少。d3 vs. d2 组中, 生物过程(biologicalprocess)主要表现为碳水化合物代谢过程(carbohydrate metabolic process), (分子功能 molecularfunction)为水解酶活性, 水解 O-糖基化合物(hydrolase activity、hydrolyzing O-glycosyl compounds)、水解酶活性, 作用于糖基键(hydrolase activity、acting on glycosyl bonds)和多糖结合(polysaccharide binding), 表明 d3 vs.

d2 时期与总糖、纤维代谢相关基因功能活性明显增强, 菌体开始大量参与样品豆渣的纤维分解的物质转化活动。d4 vs. d3 组中, 生物过程(biologicalprocess)主要表现为代谢过程(metabolic process), 分子功能(molecularfunction)为催化活性(catalytic activity)、 β -葡萄糖苷酶活性(beta-glucosidase activity)和 L-氨基酸氧化酶活性(L-amino-acid oxidase activity), 表明 d4 vs. d3 时期与葡萄糖、氨基酸代谢相关基因功能活性增强, 菌体利用葡萄糖参与了各种代谢活动, 并促进了氨基酸的合成。总之, 随着发酵时间

表 3 鉴定出的表达量变化趋势一致或相反的共有差异表达基因和蛋白

Table 3 Identified differentially expressed genes and proteins with consistent or opposite trends in expression levels

组别 Group	蛋白编号 Accession No.	Protein name	蛋白变化 倍数(log ₂ fold change) The fold change of protein (log ₂ fold change)	Up/ down	基因编号 Gene No.	基因差异 倍数(log ₂ fold change) The fold change of gene (log ₂ fold change)	Up/ down	Correlation ($P < 0.05$)
d2 vs. d1	Q6MGI3	Glycoside hydrolase family 5 protein	9.51	Up	NCU00762	2.87	Up	Yes
	Q7S062	Chitinase	7.84	Up	NCU03209	0.73	Up	Yes
	Q7S324	1,3-beta glucanase	7.84	Up	NCU04947	6.13	Up	Yes
	V5IKV9	NADP-dependent alcohol dehydrogenase C, variant	6.25	Up	NCU04823	3.68	Up	Yes
	A0A0B0DXQ7	Glycoside hydrolase family 64 protein	5.19	Up	NCU06505	6.08	Up	Yes
d3 vs. d2	Q7S5Y2	L-asparaginase	4.58	Up	NCU09635	0.53	Up	Yes
	Q7S6E3	Lipase	4.50	Up	NCU17267	0.98	Up	Yes
	V5INL1	Bric-a-Brac, Tramtrack, Broad-complex (BTB) domain-containing protein	-4.43	down	NCU08847	0.088	Up	Yes
	Q8WZU5	Chromatin modification-related protein	4.22	Up	NCU00070	0.288	Up	Yes
d4 vs. d3	Q7S8G5	Arginine transporter	4.00	Up	NCU07108	0.37	Up	Yes
	Q7S0U1	Flavin adenine dinucleotide (FAD)-binding pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (PCMH)-type domain-containing protein	3.96	Up	NCU02926	0.26	Up	Yes
	Q7S1C3	Aminotransferase class V domain-containing protein	2.84	Up	NCU02777	0.87	Up	Yes
	Q7SET0	Non-anchored cell wall protein 5	2.65	Up	NCU00716	0.907	Up	Yes
	Q8WZU5	Chromatin modification- related protein	-2.40	down	NCU03461	0.22	Up	Yes
	Q7SA89	Lysophospholipase	2.35	Up	NCU07325	0.37	Up	Yes



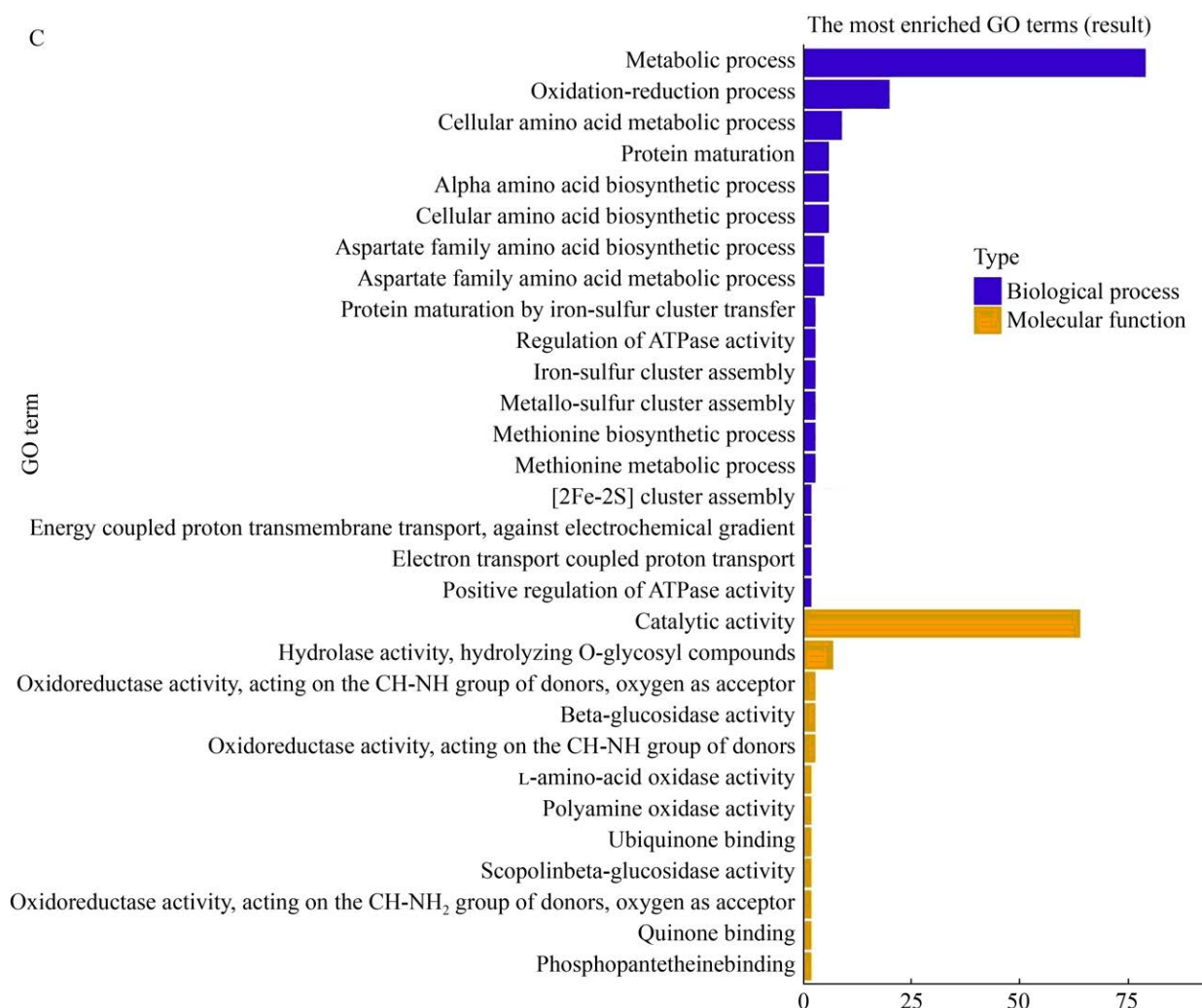


图 9 变化趋势一致的共有差异表达基因和蛋白 GO 注释

Figure 9 GO annotation of common differentially expressed genes and proteins with consistent trends of change. A: d2 vs. d1. B: d3 vs. d2. ER: Endoplasmic reticulum. C: d4 vs. d3.

的延长,“红菌”*Neurospora crassa* 增强了机体内的代谢活动,提升各种酶的活性,促进了纤维分解,脂肪、氨基酸合成的能力。

2.5.2 KEGG pathway 注释

对关联到的蛋白和 mRNA 表达趋势相同的共有差异表达基因和蛋白输入 KEGG 数据库,进行 Pathway 富集分析,每个时期选取富集到的前 10 条代谢通路用以分析共有差异蛋白质参与的主要生化代谢途径和信号转导途径,如图 10 所示。d2 vs. d1 组,关联到的主要代谢通路均为代谢途径(metabolic pathways)、碳代谢

(carbon metabolites)和淀粉和糖代谢(starch and sucrose metabolism); d3 vs. d2 组为氨基酸合成(biosynthesis of amino acids)、代谢途径(metabolic pathways)和脂肪酸代谢(fatty acid metabolism); d4 vs. d3 组为代谢途径(metabolic pathways)、次级代谢途径(biosynthesis of secondary metabolites)和氨基酸合成(biosynthesis of amino acids)。结果表明,随着发酵时间的延长,“红菌”*Neurospora crassa* 增强了机体内的代谢活动,与纤维分解,脂肪、氨基酸合成的代谢途径增加。

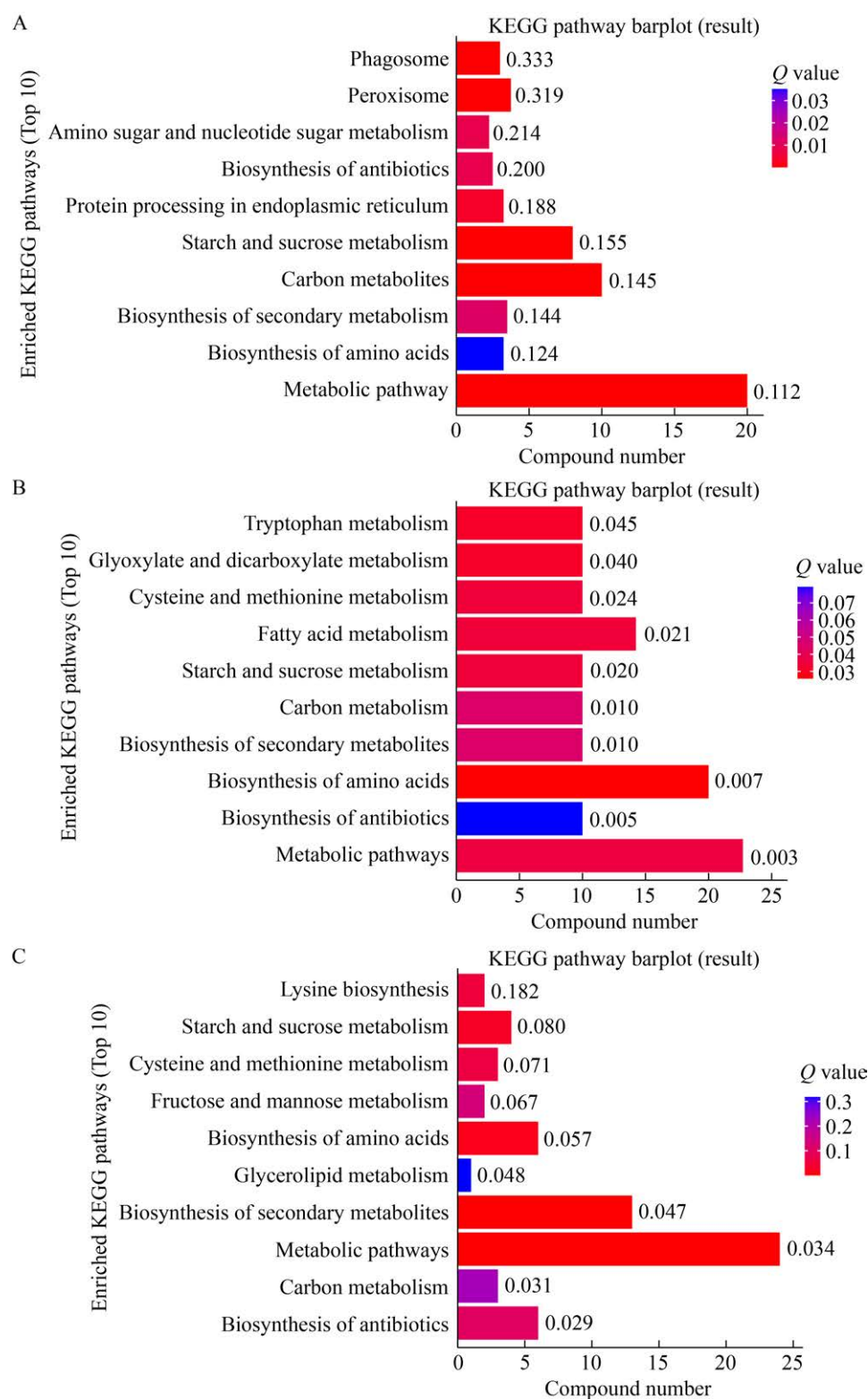


图 10 变化趋势一致的共有差异表达基因和蛋白 KEGG pathway 注释

Figure 10 KEGG pathway annotation of common differentially expressed genes and proteins with consistent trends of change. A: d2 vs. d1. B: d3 vs. d2. C: d4 vs. d3.

2.6 共有差异表达基因和蛋白功能方面关联分析

有些共有差异表达基因和蛋白虽然在定量上没有被关联,但它们可能同时参与某条 Pathway 通路,从而使该条通路发生变化。因此利用 KEGG 数据库对转录组和蛋白组数据同时进行 Pathway 注释,把这些共有差异表达基因和蛋白进行功能关联,能从生物学代谢通路的角度进一步说明蛋白组和转录组富集关联情况^[34]。功能方面关联到的代谢通路中涉及的差异蛋白直接或间接参与“红菌”*Neurospora crassa* 分解原料豆渣物质转化的过程,基因与蛋白共同参与数最多的前 10 个通路结果如图 11 所示。结果表明,与变化趋势一致的共有差异表达基因和蛋白 KEGG pathway 注释相比,按功能关联的 KEGG pathway 注释结果具有一致性,表明 d2 vs. d1 时期基因及其表达的蛋白主要参与了淀粉和糖类的代谢; d3 vs. d2 时期主要进行氨基酸的合成和脂肪酸的代谢; d4 vs. d3 时期主要为次级代谢产物及部分氨基酸的合成。

2.7 共有差异表达基因和蛋白的 RT-qPCR 验证结果

为了验证转录组和蛋白质组关联分析结果的可信度,分别对 d2 vs. d1、d3 vs. d2、d4 vs. d3 3 个具有相同表达模式的共有差异表达基因和蛋白进行了 RT-qPCR 表达分析验证试验,如图 12 所示。3 组差异表达基因和蛋白的 RT-qPCR 变化趋势的表达模式与其 RNA-Seq 和 iTRAQ 结果一致,表明所筛选得到的差异表达基因和蛋白较为可靠,转录组和蛋白质组关联性较好。

3 讨论

本文研究了不同发酵时间“红菌豆渣”样品的感官特征,采用 GC-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术分析了样品风味物质的组成及变化,结果表明,随着发酵时间的延长,橙黄色菌丝慢慢长满样品表面,将样品中主要物质成分纤维、总糖、蛋白分解,转化生成了脂肪、氨基酸等

物质,样品中主要豆腥味物质与一些具有刺激性气味的物质含量显著下降,而一些具有特殊香气的醇、酮、酯类物质含量显著上升,使得样品的苦味、涩味降低,鲜味、丰富性和甜味得到明显的提升,特别是使得鲜味成为了样品的主要呈味物质,这也是千百年来“红菌豆渣”在闽西地区当作味精用于食品提鲜的原因^[35]。研究发现,发酵 d2 是样品物质转化的关键时间,样品鲜味值绝对输出值最高;发酵 d3,样品菌丝橙红,逐渐趋于成熟,丰富性、甜味最高;发酵 d4,样品菌丝开始老化,苦味、涩味、咸味增多。此外,本研究还发现,随着发酵时间的延长,菌丝生长逐渐致密、粗壮,水分丢失,样品的硬度、剪切力和咀嚼性增加;样品硬度适中,介于水豆腐和豆干之间,使得“红菌豆渣”目前在实际生活中大多数采用发酵 d2-d3 产品进行切片煎炒的方式进行烹饪。

“红菌豆渣”发酵菌株 *Neurospora crassa* 含有丰富的酶系,如纤维素酶、蛋白酶等^[36-37],菌株良好的生长条件(如温度、湿度)与其产酶效率密切相关,各类酶系通过参与各种代谢过程调控“红菌豆渣”产品的物质转化并影响、形成特定的风味物质。通过转录组学和蛋白质组学关联分析可以深入了解发酵菌株行使功能时其 mRNA 表达和蛋白表达的内在联系,揭示基因表达的转录后调控状态,寻找获得更多的关键基因和蛋白,进而从分子水平上解析“红菌豆渣”不同发酵时间风味物质组成及物质转化的过程。本研究结果表明 d2 vs. d1、d3 vs. d2、d4 vs. d3 不同时期差异表达蛋白与其对应基因相关性系数分别为 0.532 4、0.204 5 和 0.474 5, d2 vs. d1 和 d4 vs. d3 相关性较好, d3 vs. d2 相关性不高,原因可能是 d2 vs. d1 和 d4 vs. d3 筛选得到的差异基因、差异蛋白数量较多,而 d3 vs. d2 最少,并且从 DNA 到 mRNA 到蛋白质的转录翻译过程中会受到各种因子对转录、翻译及翻译后调控的调节及影响,从而使得 mRNA 转录子的数目及蛋白质数量、位置与功能发生

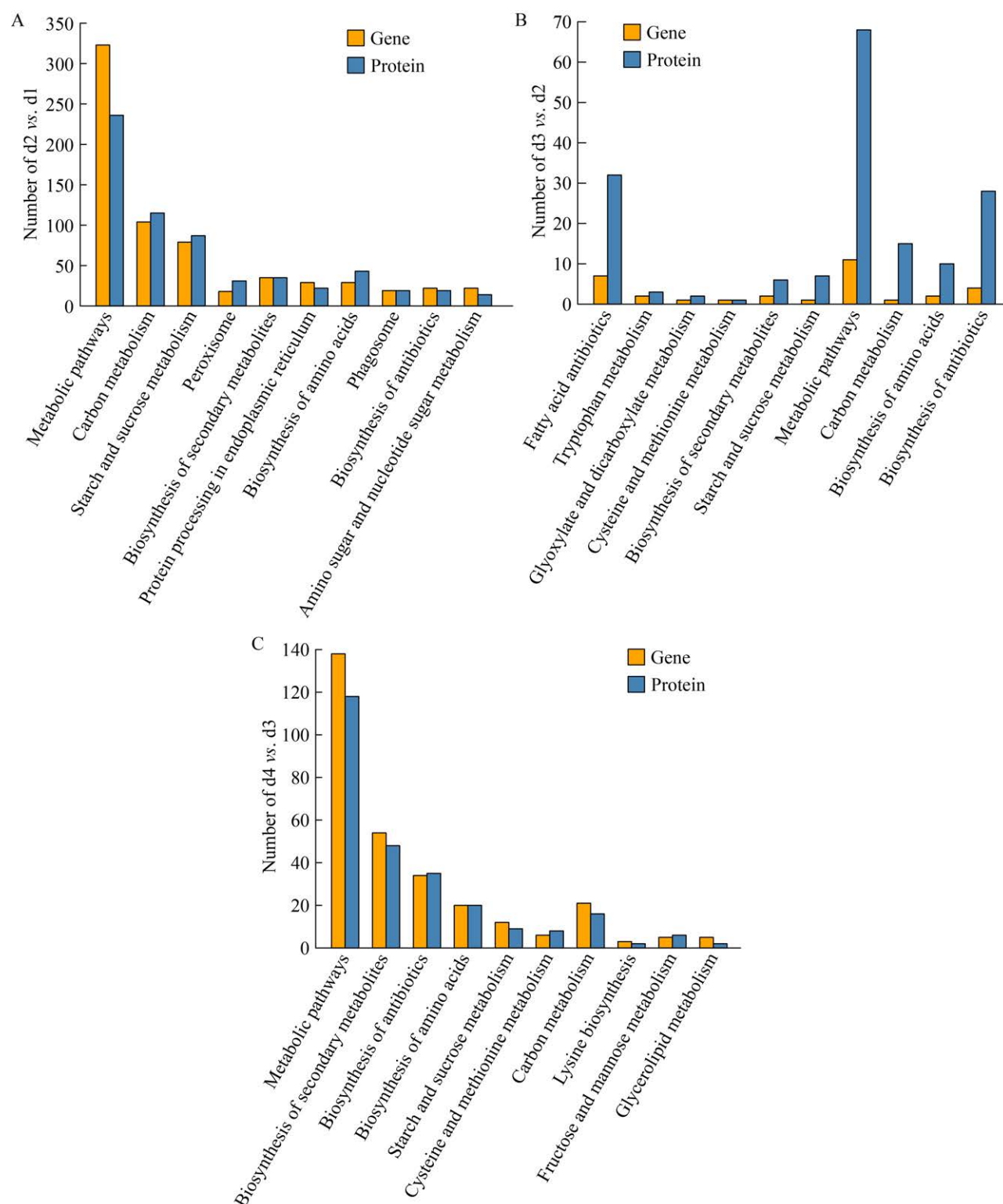


图 11 按功能关联共有差异表达基因和蛋白的 KEGG pathway 注释

Figure 11 KEGG pathway annotation of common differentially expressed genes and proteins associated by function. A: d2 vs. d1. B: d3 vs. d2. C: d4 vs. d3.

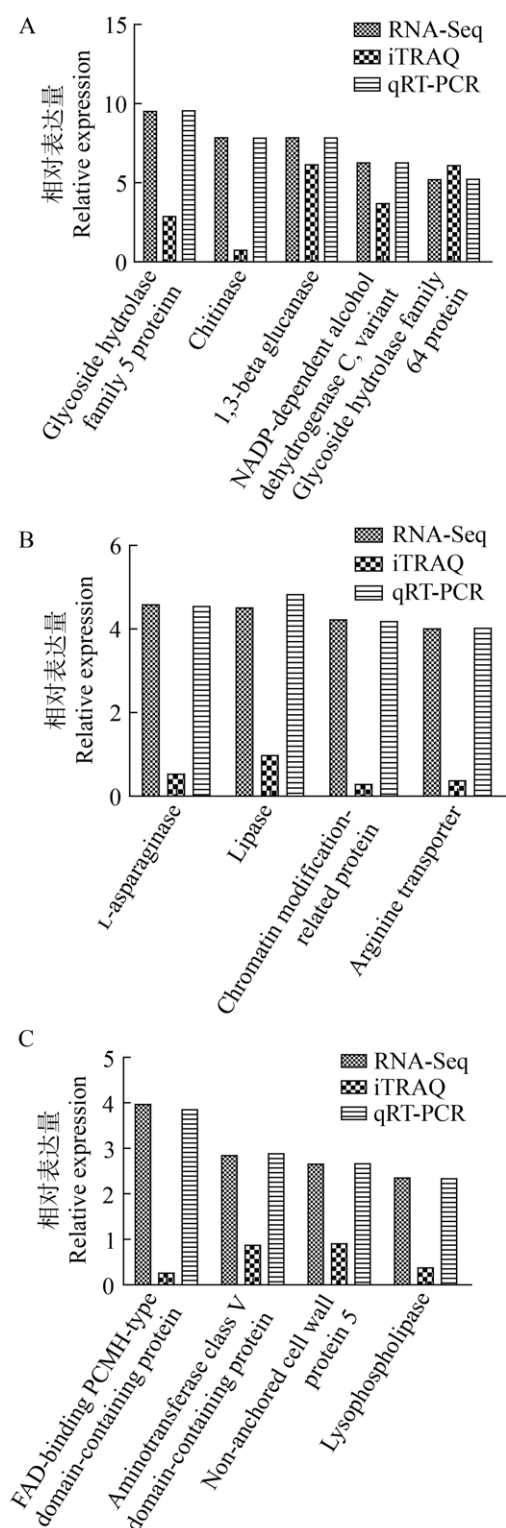


图 12 共有差异表达基因和蛋白的 RT-qPCR 验证
Figure 12 RT-qPCR validation of common differentially expressed genes and proteins. A: d2 vs. d1. B: d3 vs. d2. C: d4 vs. d3.

改变,导致 mRNA 与相对应蛋白质的关联性丢失。本研究通过转录组与蛋白质组关联分析的技术,寻找得到了“红菌豆渣”物质转化的关键基因和蛋白。研究表明,按功能关联的 KEGG pathway 注释与变化趋势一致的共有差异表达基因和蛋白 KEGG pathway 注释两者结果具有一致性,结合定量关联分析结果和感官特征分析结果,d2 vs. d1 时期主要进行淀粉和糖类的代谢,其主要参与的基因及其表达的蛋白为糖苷水解酶家族 5 蛋白(glycoside hydrolase family 5 protein)、几丁质酶(chitinase)、1,3- β -葡聚糖酶(1,3-beta glucanase)和糖苷水解酶家族 64 蛋白(glycoside hydrolase family 64 protein),参与的代谢通路主要为代谢途径(metabolic pathways)、碳代谢(carbon metabolites)和淀粉和糖代谢(starch and sucrose metabolism);这些基因和蛋白表达上调,促进了样品中原有豆腥味物质[如(*E,E*)-2,4-癸二烯醛、(*E*)-2-己烯醛、2-戊基呋喃、正壬醛]和纤维的降解,产生了许多具有特殊香气的醇、酮、酯类物质,如具有柑橘香味的 1-辛醇^[38],具有甜的奶油、焦糖、水果气味的 2,3-己二酮和具有茶香味的 2-乙基己基草酸戊酯^[39-40]。d3 vs. d2 时期主要由脂肪酶(lipase)、L-天冬酰胺酶(L-asparaginase)和精氨酸转运蛋白(arginine transporter)等关键基因和蛋白通过氨基酸合成(biosynthesis of amino acids)、代谢途径(metabolic pathways)和脂肪酸代谢(fatty acid metabolism)等代谢途径进行氨基酸的合成和脂肪酸的代谢;这些基因和蛋白表达上调,促进了样品中氨基酸和脂肪酸大量合成,1-辛醇、1-辛烯-3-醇、奥甘菊环、月桂酸甲酯等醇、芳烃、酯类物质增加,样品丰富性、甜味最高,逐渐趋于成熟。d4 vs. d3 时期主要由溶血磷脂酶(lysophospholipase)、含氨基转移酶 V 类结构域的蛋白质(aminotransferase class V domain-containing protein)等关键基因和蛋白通过代谢途径(metabolic pathways)、次级代谢途径(biosynthesis of secondary metabolites)和氨基酸

合成(biosynthesis of amino acids)等代谢途径进行次级代谢产物及部分氨基酸的合成;这些基因和蛋白表达上调,如溶血磷脂酶(lysophospholipase)参与溶血磷脂酰胆碱(18:1)和油脂溶血磷脂酰胆碱(18:4/18:1)的代谢^[41],促进了样品苦味、涩味、咸味增多,产生了一些指示食品腐败的油脂和氯环己烷、硝基环己烷等物质,使得样品开始老化,出现类似氯仿窒息性气味和一些含氮化合物的刺激性气味,产品品质开始下降。共有差异表达基因和蛋白的 RT-qPCR 验证结果表明,所筛选得到的差异表达基因和蛋白较为可靠,转录组和蛋白质组关联性较好,是“红菌豆渣”不同发酵时间物质转化的关键基因和蛋白。因此,针对“红菌豆渣”不同发酵时间的关键基因和蛋白,可通过基因工程或者代谢工程技术促进发酵菌株脂肪酶、L-天冬酰胺酶等关键基因和蛋白的表达,添加相应的底物或调节代谢途径促进特定风味物质生成等方法提高“红菌豆渣”产品的风味和营养价值^[42-43];还可通过功能性基因和蛋白的筛选,筛选出与特定风味物质合成相关的基因和蛋白,如糖苷水解酶家族蛋白、几丁质酶等,并将其应用于食品开发中,以提高食品的营养价值和口感^[44-45]。

4 结论

本研究通过多组学联用技术,获得了“红菌豆渣”不同发酵时间菌株发酵的主要差异表达基因和蛋白,从分子水平上解析了客家“红菌豆渣”不同发酵时间风味物质组成及其物质转化的过程,为提高“红菌豆渣”的发酵效率和品质,促进产品实现高值化的精深加工和走向工业化生产奠定了基础。

作者贡献声明

林标声:实验操作、结果验证和论文撰写;黄奕:“红菌豆渣”样品的制作及协助产品感官特征分析;胡冰冰:共有差异表达基因和蛋白 RT-qPCR 验证的实验操作及数据分析;温文英:

实验产品性能的测定;黎英:实验设计及文献整理;陈小红:实验设计、结果验证及文献整理。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] ZHOU RL, REN ZQ, YE J, FAN YW, LIU XR, YANG JY, DENG ZY, LI J. Fermented soybean dregs by *Neurospora crassa*: a traditional prebiotic food[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 189(2): 608-625.
- [2] 黄文利, 欧阳耀铭, 卢玲, 邓泽元, 范亚苇. 粗壮脉纹孢菌发酵前后豆渣多糖理化性质和结构特性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 26-32.
HUANG WL, OUYANG YM, LU L, DENG ZY, FAN YW. Functional components and structural characteristics of soybean dreg polysaccharides fermented by *Neurospora crassa*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 26-32 (in Chinese).
- [3] XU XF, ZHANG XJ, SUN MB, LI D, HUA M, MIAO XY, SU Y, CHI YP, WANG JH, NIU HH. Optimization of mixed fermentation conditions of dietary fiber from soybean residue and the effect on structure, properties and potential biological activity of dietary fiber from soybean residue[J]. Molecules, 2023, 28(3): 1322.
- [4] ZENG LT, YU GP, YANG KL, HE Q, HAO WS, XIANG W, LONG ZY, CHEN H, TANG XJ, SUN LY. Exploring the mechanism of celastrol in the treatment of rheumatoid arthritis based on systems pharmacology and multi-omics[J]. Scientific Reports, 2024, 14: 1604.
- [5] MA QY, WANG YX, LI SS, WEN J, ZHU L, YAN KY, DU YM, LI SX, YAN LP, XIE ZJ, LYU YZ, SHEN F, LI QZ. Ribosome footprint profiling enables elucidating the systemic regulation of fatty acid accumulation in *Acer truncatum*[J]. BMC Biology, 2023, 21(1): 68.
- [6] 林标声, 何玉琴, 陈小红, 罗茂春. 一株粗糙脉孢菌的分离、鉴定及其基因组变异和功能分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 771-781.
LIN BS, HE YQ, CHEN XH, LUO MC. Isolation, identification, genome variation and functional analysis of a strain form *Neurospora crassa*[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 771-781 (in Chinese).
- [7] HUBERMAN LB, CORADETTI ST, GLASS NL. Network of nutrient-sensing pathways and a conserved kinase cascade integrate osmolarity and carbon sensing in *Neurospora crassa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(41): E8665-E8674.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品添加剂纤维素: GB 29946—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
National Health and Family Planning Commission. National Food Safety Standards Food additive cellulose: GB 29946—2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014 (in Chinese).

- [9] WANG LY, TANG M, HUANG XM, CHEN PZ, LEI X, HOU AL. 14 Effects of sample extract methods on the production and antioxidant activity of *Lepistasordida* polysaccharides[C]//Oral Session. BMJ Publishing Group Ltd, 2016: A5.2-A5.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, National Medical Products Administration. National Food Safety Standard Determination of protein in food: GB 5009.5—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中水分的测定: GB 5009.3—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission. National Food Safety Standard Determination of Moisture in Food: GB 5009.3—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [12] 冉乾松, 刘忠英, 方仕茂, 尹杰, 戴宇樵, 李琴, 杨婷, 潘科. 贵州 5 个代表性绿茶滋味特征与其呈味化合物相关性分析[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(11): 2451-2461. RAN QS, LIU ZY, FANG SM, YIN J, DAI YQ, LI Q, YANG T, PAN K. Correlation analysis between taste characteristics and taste compounds of five representative green teas in Guizhou, China[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2022, 34(11): 2451-2461 (in Chinese).
- [13] RUAN JG, WU ZC, XU JB, YU YR, TANG Y, XIE XR, CHEN JX, WANG ZM, ZHANG D, TANG J, LI HJ. Effects of replacement partial sodium chloride on characteristic flavor substances of bacon during storage based on GC × GC-MS and non-targeted metabolomics analyses[J]. Food Chemistry, 2023, 428: 136805.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会, 农业部, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留量的测定气相色谱-质谱法: GB 23200.8—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. National Health and Family Planning Commission, Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, National Medical Products Administration. National food safety standards: determination of 500 pesticides and related chemicals residues in fruits and vegetables Gas chromatography-mass spectrometry: GB 23200.8—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [15] LI J, XU YX, DU WB, JIN LX, REN PF, REN F, XIE JC. Comparative analysis of aroma compounds in Chinese traditional dry-rendered fat by HS/GC-IMS, SPME/GC-MS, and SPME/GC-O[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 107: 104378.
- [16] GU ZG, HÜBSCHMANN D. Make interactive complex heatmaps in R[J]. Bioinformatics, 2022, 38(5): 1460-1462.
- [17] WANG LK, FENG ZX, WANG X, WANG XW, ZHANG XG. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-Seq data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 136-138.
- [18] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1): 57-63.
- [19] 江宝塔·穆哈德斯, 木扎帕尔·木合塔尔, 丁泽人. 基于蛋白组学技术的骆驼乳和牛乳蛋白差异分析[J]. 现代食品, 2022, 28(16): 179-189. Jiangbaota·Muhadesi, Muhetaer·Muzhapaer, DING ZR. Analysis of protein differences between camel milk and cow milk based on proteomics technology[J]. Modern Food, 2022, 28(16): 179-189 (in Chinese).
- [20] LIANG M, DU S, DONG WJ, FU JT, LI ZH, QIAO YD, YIN XJ, NIE FG, YANG XY, WANG R. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Mycelium* in different predation periods in nematode trapping fungus *Duddingtonia flagrans*[J]. Biological Control, 2019, 134: 63-71.
- [21] 杨妮, 雷莉, 王海, 郭媛, 孙媛, 张明, 张正良. iBAQ 非标定量分析生物被膜形成能力不同的鲍曼不动杆菌的蛋白质组学差异[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2020, 41(1): 33-38, 83. YANG N, LEI L, WANG H, WU Y, SUN Y, ZHANG M, ZHANG ZL. Proteomic differences of biofilm with different formation ability in *Acinetobacter baumannii* by iBAQ quantification methods[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2020, 41(1): 33-38, 83 (in Chinese).
- [22] YU SH, FERRETTI D, SCHESSNER JP, RUDOLPH JD, BORNER GH, COX J. Expanding the *Perseus* software for omics data analysis with custom plugins[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2020, 71(1): e105.
- [23] 王伟, 滚双宝, 王鹏飞, 黄晓宇, 谢开会, 雒瑞瑞, 高小莉, 张博, 闫尊强, 杨巧丽, 马艳萍. 猪 miR-204 组织表达与重要靶基因筛选[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(9): 1564-1573. WANG W, GUN SB, WANG PF, HUANG XY, XIE KH, LUO RR, GAO XL, ZHANG B, YAN ZQ, YANG QL, MA YP. Tissue expression and significant target genes analysis of swine miR-204[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(9): 1564-1573 (in Chinese).
- [24] SHI TM, CHEN JC, LI J, YANG BY, ZHANG QL. Identification of key gene modules and pathways of human glioma through coexpression network[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(2): 1862-1870.
- [25] 曾维英, 孙祖东, 赖振光, 蔡昭艳, 陈怀珠, 杨守臻, 唐向民. 大豆抗豆卷叶螟的转录组和蛋白质组关联分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(7): 1244-1260. ZENG WY, SUN ZD, LAI ZG, CAI ZY, CHEN HZ, YANG SZ, TANG XM. Correlation analysis on transcriptomic and proteomic of soybean resistance to bean pyralid (*Lamprosema in dicata*)[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(7): 1244-1260 (in Chinese).
- [26] 李富恒, 张晓雯, 张永芳, 于萍, 张宏发. 不同发育阶段老山芹种子多组学联合分析[J]. 东北农业大学学报, 2021, 52(10): 32-46. LI FH, ZHANG XW, ZHANG YF, YU P, ZHANG HF. Integration analysis on multiple omics of *Heracleum moellendorffii* Hance seeds at different developmental stages[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2021, 52(10): 32-46 (in Chinese).
- [27] LU Q, HUANG H, LIU Q, WANG YQ, MENG Q, FANG SH, LIU P, ZHOU H. The quantitative proteomic analysis reveals schisantherin a prevents liver fibrosis through regulating extracellular matrix organization[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2022, 480: 116898.
- [28] LIN BS, LIU JM, ZHANG X, WENG CR, LIN ZX. The

- flora compositions of nitrogen-fixing bacteria and the differential expression of *nifH* gene in *Pennisetum giganteum* z.x. Lin roots[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 5568845.
- [29] LI QX, NG WT, WU JC. Isolation, characterization and application of a cellulose-degrading strain *Neurospora crassa* S1 from oil palm empty fruit bunch[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 157.
- [30] SHARMAN K, PATTERSON NH, WEISS A, NEUMANN EK, GUIBERSON ER, RYAN DJ, GUTIERREZ DB, SPRAGGINS JM, van de PLAS R, SKAAR EP, CAPRIOLI RM. Rapid multivariate analysis approach to explore differential spatial protein profiles in tissue[J]. Journal of Proteome Research, 2023, 22(5): 1394-1405.
- [31] 宋虹, 李一雪, 李然, 张尊琴, 许新月, 杨立娜, 王胜男, 朱丹实, 刘军, 霍达非, 刘贺. 顶空固相微萃取/气质联用技术结合电子鼻分析类干酪乳杆菌发酵豆渣饮料过程中风味特征[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 253-262.
- SONG H, LI YX, LI R, ZHANG ZQ, XU XY, YANG LN, WANG SN, ZHU DS, LIU J, HUO DF, LIU H. SPME/GC-MS combined with electronic nose to analyze the flavor characteristics of okara beverages fermented by *Lactobacillus casei*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(5): 253-262 (in Chinese).
- [32] 郭帅, 韩之皓, 白梅, 孙天松, 张和平, 王记成. 嗜热链球菌 S10 复合植物乳杆菌 P-8 发酵豆乳中挥发性风味物质的 SPME-GC-MS 分析[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10): 268-279.
- GUO S, HAN ZH, BAI M, SUN TS, ZHANG HP, WANG JC. Analysis of fermented soybean milk produced by *Streptococcus thermophilus* S10 compound *Lactobacillus plantarum* P-8 by SPME-GC-MS[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(10): 268-279 (in Chinese).
- [33] CHEN J, KONG Q, SUN ZT, LIU JY. Freshness analysis based on lipidomics for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stored at different times[J]. Food Chemistry, 2022, 373: 131564.
- [34] 吉福桑, 杨振, 徐亚, 汪奇, 李新国, 乔飞. 盐胁迫下巴西蕉叶片的转录组和蛋白质组关联分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(23): 7671-7678.
- JI FS, YANG Z, XU Y, WANG Q, LI XG, QIAO F. Association analysis on transcriptomics and proteomics of *Musa paradisiaca* banana leaf under salt stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(23): 7671-7678 (in Chinese).
- [35] 李存港. 红菌豆腐工艺优化、关键菌群及其功能性成分研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2023.
- LI CG. Research on the optimization of production, key microbial community, and functional components of Hong Jun tofu[D]. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2023 (in Chinese).
- [36] 张玲秀, 白建华, 郝瑞林, 董社琴. 一株粗糙脉孢菌的鉴定及产纤维素酶发酵工艺优化[J]. 中国饲料, 2018(1): 27-31.
- ZHANG LX, BAI JH, HAO RL, DONG SQ. The culture conditions optimization of cellulases fermentation and species identification of *Neurospora crassa*[J]. China Feed, 2018(1): 27-31 (in Chinese).
- [37] 邱重晏, 王正祥. 粗糙脉孢霉酸性蛋白酶基因的克隆与鉴定[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 91-94.
- QIU CY, WANG ZX. Cloning and identification of a gene encoding an acidic protease from *Neurospora crassa*[J]. Microbiology China, 2006, 33(4): 91-94 (in Chinese).
- [38] 乔宇, 谢笔钧, 张弛, 张妍, 潘思轶. 顶空固相微萃取-气质联用技术分析 3 种柑橘果实的香气成分[J]. 果树学报, 2007, 24(5): 699-704.
- QIAO Y, XIE BJ, ZHANG C, ZHANG Y, PAN SY. Analysis of aromatic components from three *Citrus* fruits by HS-SPME-GC-MS[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(5): 699-704 (in Chinese).
- [39] 赵秀芳, 姚海燕, 袁江兰, 康旭. 粗糙脉孢菌发酵豆渣产物的品质和抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(5): 97-105.
- ZHAO XF, YAO HY, YUAN JL, KANG X. Quality and antioxidant activity of soybean residue fermented by *Neurospora crassa*[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 97-105 (in Chinese).
- [40] 戴意强, 周剑忠, 刘小莉, 王喆, 董明盛, 夏秀东. 不同凝固剂对豆腐品质特性及风味成分的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 17-26.
- DAI YQ, ZHOU JZ, LIU XL, WANG Z, DONG MS, XIA XD. Effects of different coagulants on quality characteristics and flavor components of tofu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 17-26 (in Chinese).
- [41] 高岩, 卞永霞, 庄姣, 齐瑾, 陈彦辉, 史玉东, 尉村. 冷藏过程中原料乳脂代谢变化的靶向脂质组学分析[J]. 农业工程学报, 2023, 39(24): 306-315.
- GAO Y, BIAN YX, ZHUANG J, QI J, CHEN YH, SHI YD, JU N. Targeted lipidomic analysis of the changes in lipid metabolism of raw milk during refrigeration[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2023, 39(24): 306-315 (in Chinese).
- [42] CHATRATH A, DEY P, GREELEY K, MACIEL G, HUANG L, HEISS C, BLACK I, AZADI P, FREE SJ. Characterization of the *Neurospora crassa* galactosaminogalactan biosynthetic pathway[J]. Microorganisms, 2024, 12(8): 1509.
- [43] ZHAO JJ, MA CH, MEI YJ, HAN JJ, ZHAO C. Effect of itaconic acid production on *Neurospora crassa* in consolidated bioprocessing of cellulose[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 28.
- [44] 谈苏慧, 卢海强, 陈伟, 张莉娟, 田洪涛, 谷新晰. 1 株产甘露聚糖酶嗜热真菌的鉴定、酶学性质表征及转录组学分析[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 65-72.
- TAN SH, LU HQ, CHEN W, ZHANG LJ, TIAN HT, GU XX. Identification, enzymatic characterization and transcriptomic analysis of a mannanase-producing thermophilic fungus[J]. Food Science, 2021, 42(18): 65-72 (in Chinese).
- [45] 肖宇, 刘洋, 刘建军, 卢海强, 桑亚新, 孙纪录. 1 株高产几丁质脱乙酰酶红球菌的基因组测序及其应用潜力分析[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 157-163.
- XIAO Y, LIU Y, LIU JJ, LU HQ, SANG YX, SUN JL. Genomic analysis of a *Rhodococcus* strain with high chitin deacetylase activity and its application potential[J]. Food Science, 2021, 42(18): 157-163 (in Chinese).