基于宏基因组技术分析传统酸笋中微生物多样性

陈晓东[1]，朱志勇[1]，张 韫[1]，吴昌明[1]，郭起荣[*2,1]

（1. 国际竹藤中心 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室，北京 100102；2. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心，江苏 南京 210037）

摘要：酸笋富含挥发性风味物质、有机酸、细菌素等，是重要的副食品之一。为全面了解酸笋微生物种类及特征，以桂林、柳州、来宾、百色、南宁、贵港6个传统产地的酸笋为对象，采用Illumina HiSeq宏基因组测序技术对酸笋发酵液测序，并对群落结构、多样性及功能基因进行分析。结果表明，6个产地酸笋样品中共鉴定出156种微生物，乳杆菌属（*Lactobacillus*）占主要优势，种类比例高达81%，其中植物乳杆菌（*L. plantarum*）等12种乳杆菌为主要菌种。α多样性表明，贵港地区的微生物多样性最高（shannon指数1.65），检测到的微生物种类最多（77种）。β多样性表明，桂林、柳州、来宾3个产地酸笋微生物组成相似；百色、南宁酸笋微生物组成相似；而贵港与其他5个产地的微生物组成差异较大。12 751个unigene注释到代谢通路中，分属385类代谢通路，其中2 927个unigene参与碳水化合物代谢。本研究结果为进一步研究酸笋品质形成机制、发掘微生物资源提供依据。

关键词：酸笋；宏基因组；微生物多样性

中图分类号：O 657.63; TS 255.5 **文章编号：**1673-1689(2020)08-0089-10 **DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.08.011

Microbial Community Diversity Analysis of Traditional Fermented Bamboo Shoots Using Metagenomic Technology

CHEN Xiaodong[1], *ZHU Zhiyong*[1], *ZHANG Yun*[1], *WU Changming*[1], *GUO Qirong*[*2,1]

（1. SFA Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 2. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China）

Abstract: Fermented bamboo shoots, one of the important non-staple foods, are rich in volatile flavor substances, organic acids, and bacteriocin, etc. To fully understandthe diversity and characteristic of microbial community in fermented bamboo shoots, the Illumina HiSeqmetagenomic sequencing was used to study the community structure, diversity and functional gene of fermented bamboo shootsfrom six different traditional regions of China (Guilin, Liuzhou, Laibin, Baise, Nanning and Guigang). A total of 156 species of microbe were identified and the main advantagewith an 81% proportion was the *Lactobacillus* species, among which12 species including *L. plantarum* were the main strains. The alpha diversity analysis revealed that the highest microbial diversity (shannon index

收稿日期：2019-01-15

基金项目：中央级公益性科研院所基本业务费项目（1632016009）。

* **通信作者：**郭起荣（1968—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事森林种质资源方面的研究。E-mail：QRGUO@126.com

1.65) was found in Guigang where the largest number of 77 microbial species was detected.The beta diversity analysis showed a similarmicrobial communities of fermented bamboo shoots in Guilin, Liuzhou and Laibin, and those from Baise and Nanning also had similar microbial composition, while that of Guigang samples exhibited significant difference from other 5 regions. Additionally, 12751 unigenes were annotated in the KEGG database and belonged to 385 metabolic pathways, in which 2927 unigenes were involved in carbohydrate metabolism. The study provide a fundamental basisfor further research on the mechanism of quality controlof traditional fermented bamboo shootsand the exploration of microbial resources.

Keywords: fermented bamboo shoots, metagenomics, microbial diversity

酸笋是以鲜笋为原料,经过天然混合菌群发酵而成的一种传统食材,因为其良好贮藏特性和独特的风味,受到广大消费者的喜爱。早在《诗经》中就有“加豆之实,笋菹鱼醢”的记载。笋菹即酸笋。现今,如我国西南地区的螺蛳粉、多民族酸食,酸笋皆为其常见配料。闽、赣、黔、湘、鄂、川、渝等地的侗、苗、瑶和汉族人,四季皆喜食酸笋。酸笋中的乳酸菌不仅具有益生功能[1-2],而且还能产生丰富的挥发性风味物质、有机酸、细菌素等,食用品质大为提高[3-4]。随着人们生活水平的提高,诸如高血压、高血脂、糖尿病、心脑血管疾病等常见疾病愈发引起社会关注。竹笋作为森林蔬菜之一,其肉质鲜嫩,营养丰富,富含膳食纤维、多种氨基酸和维生素,同时含有铁、磷、镁、钙等矿质元素[5],已然成为人们重要的副食品之一。研究表明,竹笋采后易木质化,食性锐减。有些种类常温下贮藏 2~3 d 后便失去鲜嫩口感[6],竹笋保鲜贮藏加工成为其大规模生产和流通的关键瓶颈。而酸笋容易保存,且风味更佳。Bekele A Z 等研究发现,酸笋的膳食纤维具有改善并调节小鼠胃肠道菌群、润肠通便的保健功能[7]。Singh 等研究发现,酸笋还具有抗氧化的功能[8]。此外,微生物在酸笋发酵过程中发生一系列变化,因此分析微生物对酸笋质量及风味的形成有重要意义。目前,W Romi 等利用 16S rRNA 对印度传统酸笋菌微生物动态进行了检测[9],Buddhiman T 等发现 *L. brevis*、*L. plantarum*、*L. fallax* 是酸笋美食 Soibum 的主要微生物[10]。我国酸笋多集中于营养成分、口感、风味等研究[11],传统培养法和 16S rRNA 基因分析仅提供了关于微生物组成的有限信息[12],大量的微生物种类、功能不明确,缺乏对酸笋微生物宏基因组系统深入的解析。近年来,宏基因组测序技术的不断进步,为解析环境中复杂的微生物体系提供了一种便捷、有效的方法,在发酵食品如泡菜、黄酒、红茶、酸粥等领域得以应用[13-16]。作者采集广西 6 个传统产地的酸笋,对其微生物进行 Illumina Hiseq 宏基因组测序和分析,为更全面掌握酸笋微生物种类、特征及酸笋品质创新、加工业发展提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品以及来源

2017 年 8 月,取样于广西的桂林、柳州、来宾、百色、南宁、贵港 6 个地区,见图 1。选择当地酸笋做得道地的农户,泡制酸笋的材料为麻竹笋(*Dendrocalamuslatiflorus* Munro)。在酸笋坛中用 5 mL 无菌移液器从笋坛的上、中、下部位各取 10 mL 发酵液,总量 30 mL 置于 50 mL 无菌离心管中混合,重复 3 次,样品置于液氮条件下保存,运回实验室待测,采集地情况见表 1。

天根植物基因组提取试剂盒、缓冲液 GA:购自天根生化科技(北京)有限公司;PBS 缓冲液:购自江苏绿叶生物科技有限公司。

高速低温离心机 ALLSHENG ICEN 24:购自杭州奥盛公司;Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒:购自 Life 公司;DYY-11 电泳仪:购自北京市六一仪器厂;Illumina Hiseq 测序仪:购自美国 Illumina Hiseq 公司。

1.2 宏基因组 DNA 提取

将 30 mL 酸笋发酵液样品从液氮中取出,融化后置于 50 mL 大离心管中,于 4 ℃高速离心机 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,再用 PBS 洗涤大离心管中沉淀物,将菌体收集在 1.5 mL 的 EP 管中,用于总 DNA 提取。采用天根植物基因组提取试



图 1　酸笋样品采集地点

Fig. 1　Collection sites of fermented bamboo shoots

表 1　酸笋样品采集信息

Table 1　Information of fermented bamboo shoots samples

地点	编号	经度	纬度	温度/℃	笋液 pH
桂林	GL	E110.503 263	N25.192 763	20.3	4.76
柳州	LZ	E109.604 333	N24.407 747	21.4	4.37
来宾	LB	E110.067 813	N24.339 637	20.8	4.71
百色	BS	E106.236 487	N24.286 277	20.5	4.63
南宁	NN	E108.346 990	N22.913 850	22.0	4.55
贵港	GG	E109.671 320	N22.925 288	21.3	4.27

剂盒[17]提取样品中所有微生物的总 DNA。经 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶电泳(电压 100 V,时间 40 min)检测无明显降解、无杂质,质量合格样品,利用 Qubit 对总 DNA 质量浓度进行精确定量(DNA 质量浓度≥30 ng/μL,DNA 质量≥3 μg),保证达到二代测序文库构建要求。

1.3　文库构建及 Illumina HiSeq 高通量测序

检测合格的 DNA 样品用超声波破碎仪随机打断成 300 bp 的片段,经末端修复、加 A 尾、加测序接头、凝胶法纯化、PCR 扩增等过程完成文库构建,同时使用 Qubit 2.0 进行初步定量,稀释文库至 2 ng/μL,采用实时荧光核酸扩增检测系统(Q-PCR)方法对文库的有效浓度进行精确定量(文库有效浓度>3 nmol/L),以保证文库质量。宏基因测序在北京源宜基因科技股份有限公司进行。

1.4　数据分析

先将 HiSeq 原始测序数据进行质控,得到高质量的有效读长(reads)。使用 MetaPhlAn2[18]软件进行微生物种类注释,高通量解析酸笋微生物组成与数量。其中,α 多样性是指生境内物种多样性程度、丰富度(包含物种的多寡)和均匀度(样品中各个种类的相对密度)两个指标,使用 mothur 软件[19]进行分析。β 多样性能反映时空尺度上物种的组成变化,分析不同地区样品间(组间)的微生物组成差异,使用 Jaccard 软件[20]进行分析。不同组分共有种越少,则 β 多样性越大。将 Unigene 与 KEGG 数据库进行比对统计(http:www.genome.jp/kegg)。

2　结果与分析

2.1　HiSeq 测序结果统计分析

桂林、柳州、来宾、百色、南宁、贵港等 6 地麻竹酸笋发酵液宏基因组测序获得的宏基因组数据见表 2。其中平均读长 141.2 bp,有效读长 68.75 M,占原始 read 的 91.5%;有效碱基数 9.697 G,占原始碱基数的 85.9%。相较于 16S 测序的序列读长约 200 bp,有效数据量在 10~70 M 之间[21],本次宏基因组测序共产生有效数据 58.18 G(每个样本平均为 9.69 G),有较高的文库覆盖度,捕获了样品中更多微生物。

将有效读长通过 SOAPdenovo2[22]进行迭代拼接(overlap),得到 66 157 个更长的片段(scaffold),将获得的 scaffold 使用MetaGeneMark[23]进行基因预测,

表 2　不同地区酸笋微生物宏基因组测序结果

Table 2　Microbialmetagenomic sequencing results of different regions fermentedbamboo shoots

样品	原始 read (M)	原始碱基数 (G)	有效 read (M)	有效碱基数 (G)	平均长度/bp	重叠数	非冗余基因集
GL	71.92	10.78	66.82	9.54	143.6		
LZ	67.06	10.06	62.05	8.91	143.7		
LB	75.85	11.37	69.78	10.04	143.8		
BS	84.85	12.72	76.03	10.56	139.4		
NN	77.59	11.63	70.62	9.79	138.6		
GG	73.30	10.99	67.21	9.32	138.2		
合计	450.60	67.59	412.53	58.18	847.2	66 175	54 416
平均值	75.10	11.27	68.75	9.70	141.2		

共测得 75 681 个基因。将预测出来的基因序列使用 CD-HIT [24] 软件进行聚类（参数为：95%相似度、90%覆盖度），得到 54 416 个非冗余基因集（unigene），用于生物信息学分析。

2.2　酸笋微生物群落结构分析

通过 MetaPhlAn 2 软件对有效读长进行物种分类，MetaPhlAn 2 基于 17 000 个已有的基因组（13 500 原核生物，3 500 病毒，110 真核生物）得到约一百万个特异性的标记，分类水平达到种水平。从所采集的 6 个地区 18 个酸笋样品中，鉴定出 156 种微生物，隶属于 9 门 16 纲 30 目 63 科 92 属。酸笋基因集中有 71.9%可以在总界水平上进行分类，其中细菌（Bacteria）占已分类基因的 98.89%，其余1%来自真菌（Eukaryota）、古菌（Archaea）和病毒（Viruses）。

在门水平上，18 个样品中共检测到 8 个门，见表 3。超过 98.86%的细菌基因来自 4 个主要的门类，分别为厚壁菌门（Firmicute）、变形菌门（Proteobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、放线菌门（Actinobacteria），其中硬壁菌门的比例高达 86.10%；真菌基因主要为子囊菌门（Ascomycota），比例仅为 0.001%。与 Romi.W 等[9]以 PCR-DGGE 结合 16S 测序为手段分析印度酸笋菌群结构仅发现硬壁菌门和子囊菌门两个门的微生物相比，本研究结果显示，微生物宏基因组的技术先进性。

18 个样品中共检测出 92 个属，见图 2。桂林、柳州、来宾、百色、贵港 5 个产地的主要菌属为乳杆菌属（*Lactobacillus*），丰度为 81.06%~99.17%；南宁产地的酸笋主要菌属还包含假单胞菌属（*Pseudomonas*），丰度为 32.24%；此外还包括片球菌属（*Pediococcus*）、明串珠菌属（*Leuconostoc*）、魏斯氏菌属（*Weissella*）、乳球菌属（*Lactococcus*）等具有益生功能的微生物，与泡菜[25]、酸菜[21]、酸粥[16]等传统发酵食品的主要微生物大体相同，见表 4。乳球菌属对发酵乳的酸化和风味的形成贡献较大[26]，其对酸笋风味的形成亦有重要的作用。从属的分类级别来看，本次宏基因组测序与 16S 测序的鉴定结果水平相当[26]，但在种水平上，宏基因组测序检测出的微生

表 3　门水平上样品中微生物的相对丰度

Table 3　Relative abundance of microbial at phylum levels in each sample

门水平	样品比例/%					
	桂林	柳州	来宾	百色	南宁	贵港
厚壁菌门（Firmicute）	90.80	99.95	94.79	99.72	49.47	98.15
变形菌门（Proteobacteria）	9.20	0.011	0.061	0.116	34.76	0.852
拟杆菌门（Bacteroidetes）	0	0	0	0.034	8.13	0.03
放线菌门（Actinobacteria）	0	0	0.025	0.002	6.42	0.347
Deinococcus Thermus	0	0	0.004	0	0	0.07
Tenericutes	0.003	0	0.001	0	0	0.001
子囊菌门（Ascomycota）	0	0	0	0.005	0	0.001
广古菌门（Euryarchaeota）	0	0	0	0	0	0.007

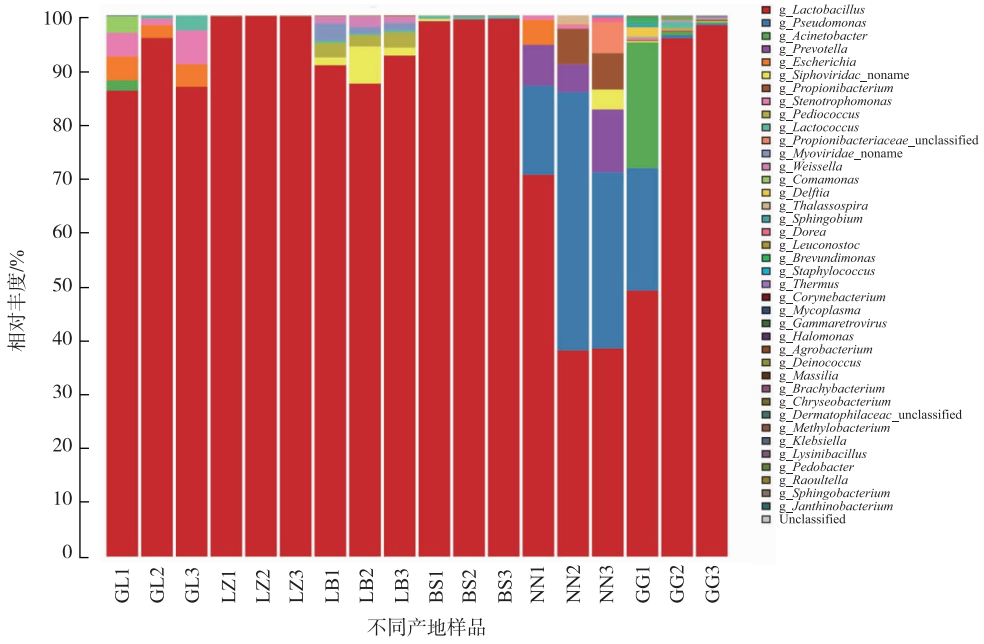


图 2　属水平上酸笋微生物菌群相对丰度

Fig. 2　Microbial relative abundance on the genus level in thefermented bamboo shoot

表 4　4 种传统发酵食品的主要微生物

Table 4　The main microbials of 4 traditional fermented foods

发酵食品	主要菌种	鉴定菌种	鉴定方法
酸笋	乳杆菌属:*L.plantarum*、*L.fermentum*、*L.brevis*、*L.pentosus*、*L.phage*、*L.rossiae*、*L.amylolyticus*、*L.amylovorus*、*L.casei*、*L.buchneri*、*L.johnsonii*、*L.mucosae* 片球菌属:*P.pentosaceus* 明串珠菌属:*Leuconostoccitreum* 魏斯氏菌属:*W.cibaria*、*W.confusa*、*W.paramesenteroides*	156 种	宏基因组测序
国外酸笋	乳杆菌属:*L.brevis*、*L.plantarum*、*L.lactis* 片球菌属:*P.pentosaceus* 明串珠菌属:*Leuconostoccitreum* 魏斯氏菌属:*W.cibaria*、*W.oryzae*	22 种	16S 测序、PCR-DGGE 法
泡菜	乳杆菌属:*L.plantarum*、*L.paraplantarum*、*L.alimentarius*、*L.pentosus*、*L.brevis*、*L.casei*、*L.sakei*、*L.coryniformis*、*L.buchneri*、*L.fermenti*、*L.parabrevis*、*L.parafarraginis*、*L.versmoldensis* 片球菌属:*P.parvulus*、*P.pentosaceus*、*P.ethanolidurans* 明串珠菌属:*L.mesenteroides* 魏斯氏菌属:*W.viridescens* 芽孢杆菌属:*B.subtilis*、*B.pumilus*、*B.megaterium*、*B.licheniformis*	22 种	传统分离法、16S 测序
酸菜	乳杆菌属:*L.plantarum*、*L.brevis*、*L.casei*、*L.rhamnosus*、*L.reuteri*、*L.sakei*、*L.curvatus*、*L.harbinensis*、*L.paracasei* 片球菌属:*P.acidilactici* 明串珠菌属:*L.mesenteroides*	13 种	传统分离法、PCR-DGGE 法
酸粥	乳杆菌属:*L.fermentum*、*L.pentosus*、*L.casei*、*L.brevis*、*L.coryniformis*、*L.rossiae*、*L.reuteri*	26 种	传统分离法、16S 测序

物种类则更丰富。本研究中 18 个样品中鉴定到植物乳杆菌(*L. plantarum*)等 12 种乳杆菌,见表 5。而 Romi.W[9]等在印度酸笋中仅发现 *L. brevis*、*L. plantarum* 和 *L. lactis* 3 种乳杆菌,远远低于本研究结果。可能的原因是 16S 测序大多数只能注释到属水平,而宏基因组测序可直接注释到种水平,还

表 5　不同地区酸笋乳酸杆菌的相对丰度

Table 5　Relative abundance of Lactobacillus in different areas

乳杆菌种	GL	LZ	LB	BS	NN	GG
植物乳杆菌 *L. plantarum*	7.25	0.39	7.98	67.26	40.29	30.29
短乳杆菌 *L. brevis*	3.89	—	0.10	14.85	4.40	5.32
发酵乳杆菌 *L. fermentum*	38.33	44.79	80.02	3.02	—	0.60
戊糖乳杆菌 *L. pentosus*	4.18	0.02	1.44	0.82	—	0.20
嗜淀粉乳杆菌 *L. amylovorus*	24.83	54.54	0.02	—	0.49	—
解淀粉乳杆菌 *L. amylolyticus*	11.11	—	0.66	—	—	—
干酪乳杆菌 *L. casei*	—	—	—	5.28	3.41	0.21
布氏乳杆菌 *L. buchneri*	—	—	—	—	—	43.96
约氏乳杆菌 *L. johnsonii*	—	0.02	—	—	—	—
粘膜乳杆菌 *L. mucosae*	—	0.03	—	—	—	—
L. phage	—	0.02	4.49	—	1.22	—
L. rossiae	—	—	0.04	7.94	0.45	0.47

可以从基因和功能层次进行更深入分析。同时，6个产地酸笋微生物的种类和数量也存在着一定的差异，可能由于采样地区的地理位置、气候、农户制作酸笋工艺(发酵时长、发酵温度、容器)等客观因素引起。

2.3　酸笋微生物 α 多样性分析

α 多样性是生境中微生物丰富度和均匀度的综合指标[27]，本研究所得到微生物物种数、均匀度指数、shannon 指数等信息参见表 6。Shannon 指数反映样品微生物的丰富程度[28]。结果表明，贵港样品中观察到的微生物物种数多达 77 种，与其他地区具有显著差异。南宁地区样品均匀度指数最高为 0.69，表明该地区物种分布更均匀。

表 6　不同样品细菌的多样性指数、均匀度指数及丰度

Table 6　Bacterial diversity index，evenness index and abundance of different samples

样品	观察到物种数		均匀度		Shannon 指数	
GL	9.67±1.53	d	0.72±0.06	a	1.64±0.15	a
LZ	16.33±1.53	c	0.26±0.00	c	0.73±0.01	b
LB	25.33±1.53	b	0.27±0.04	c	0.88±0.13	b
BS	17.00±4.36	c	0.39±0.06	b	1.10±0.09	b
NN	9.00±1.00	d	0.69±0.04	a	1.52±0.17	a
GG	77.00±0.00	a	0.38±0.12	bc	1.65±0.55	a

注：采用 Duncan 多重比较，显著水平 0.05，相同列中不同的英文小写字母的数值间的差异显著($p \leqslant 0.05$)

2.4　酸笋微生物 β 多样性分析

2.4.1　群落距离分析　以检测到微生物属水平数量为指标，采用 Jaccard 方法，考虑物种组成、不考虑其丰度，计算样品间的群落距离、生成距离矩阵，进行距离热图分析，结果见图 3。可以聚为 3 类：桂林、柳州、来宾 3 个产地酸笋微生物群落距离在 0.44~0.57 之间，根据微生物相对丰度的分布的分析发现，发酵乳杆菌含量均最多，说明这 3 个产地细菌群落结构更相似；百色、南宁 2 个产地酸笋微生物群落距离为 0.7，植物乳杆菌为丰度最高；而贵港产地酸笋与其他 5 个产地群落距离大，布氏乳杆菌为主要菌种，说明贵港与其他 5 个产地酸笋的细菌群落结构差异更大。

2.4.2　酸笋微生物主成分分析　PCA 是一种非限制性排序的组间差异分析方法（即只考虑物种组成），基于 Jaccard 算法计算样本中的物种距离，将原始复杂信息进行降维排序，找出数据中最主要的元素或结构，样品组成越相近，反映在 PCA 图中的距离越近。结果见图 4。前三个主成分贡献率分别是 38.2%、29.3%、18.9%，累计贡献率达 86.4%，符合主

成分分析要求。

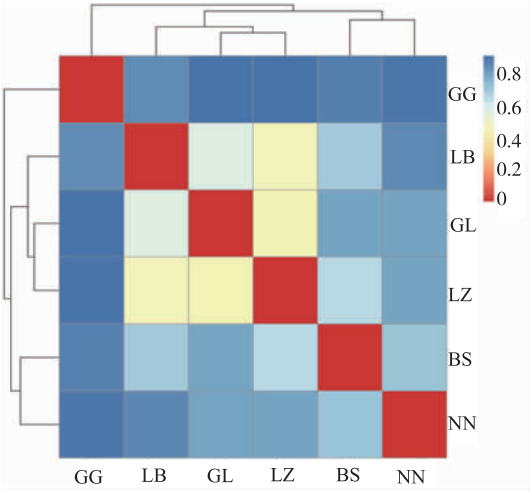


图 3　不同产地酸笋微生物群落的距离热图

Fig. 3　Heatmap of microbialcommunities distance of fermented bamboo shoot from different regions

PCA 结果表明,桂林、柳州、来宾 3 个产地酸笋微生物群落结构相似,可以聚为一类;百色、南宁 2 个产地酸笋微生物群落结构相似,聚为一类;贵港与其他 5 个产地酸笋的微生物群落结构差异较大,单独聚为一类。主成分分析结果与群落距离热图分析结果相一致,地理距离的差异可能是造成酸笋微生物群落结构不同的主要因素,产地越近,群落结构越相似。

2.5　功能基因 KEGG 统计

将非冗余基因集与 KEGG 数据库进行对比,共有 19 743 个 unigene 得到注释。其中 12 751 个 unigene 参与微生物新陈代谢,分属 385 类代谢通路。其中发现了 49 条碳水化合物代谢通路,主要包括糖酵解、磷酸戊糖代谢、三羧酸循环等代谢途径,这些代谢途径产生了大量的乙酸、苹果酸、丁酸等有机酸丰富了酸笋的风味;30 条代谢氨基酸代谢通路,其中包括苏氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸 3 种必需氨

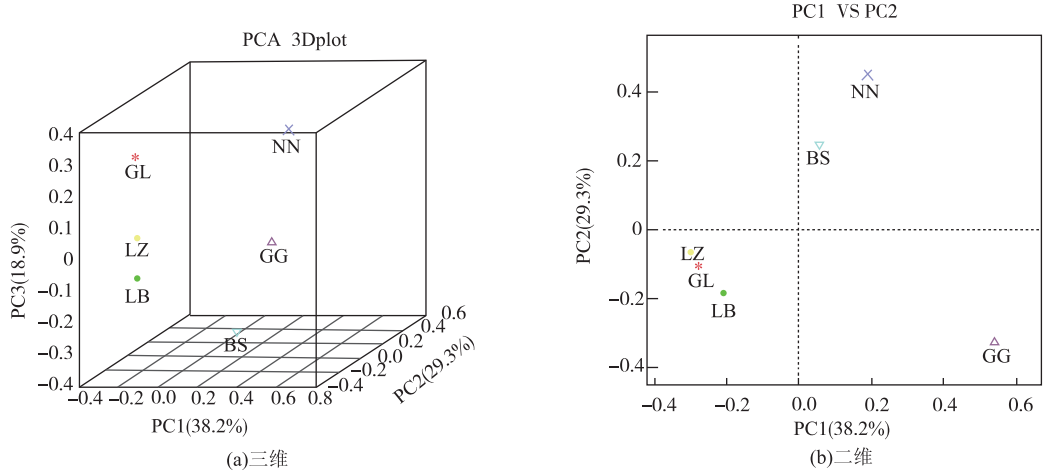


图 4　酸笋微生物在属水平的 PCA 分析

Fig. 4　PCA analysis of the bacteria of fermented bamboo shoot

基酸的代谢途径,同时部分 unigene 参与基因维生素及其他辅助因子的代谢,结果见图 5。有关生物系统,人类疾病,细胞移动,细胞对环境信息处理,遗传信息的传递注释基因数量相对较少。

3 讨　论

酸笋与云南豆豉、四川泡菜、东北酸菜等传统发酵食品相比,以其独特的风味、丰富的营养及益生功能受到人们的欢迎[29-30]。目前,国内外学者利用传统培养法和 16S 测序对中国台湾、泰国、印度、印度尼西亚等地酸笋[31-34]研究表明,*L.plantarum*、*L.buchneri*、*L.brevis*、*L.fermentum*、*Enterococcus faecium* 是这些酸笋中的主要微生物,这与本实验结果具有共同性的同时也存在一定的差异。除上述菌种以外,我国酸笋中还发现了 *L.rossiae*、*L.pentosu*、*L. amylolyticus* 等乳酸杆菌,菌群种类更加丰富,是宏基因组技术发现更多还是其特有,还有待进一步研究。同时 6 个产地酸笋微生物的种类和数量也存在一些差异,可能是由于采样地区的地理位置、环境气候、制作方法等因素造成的。

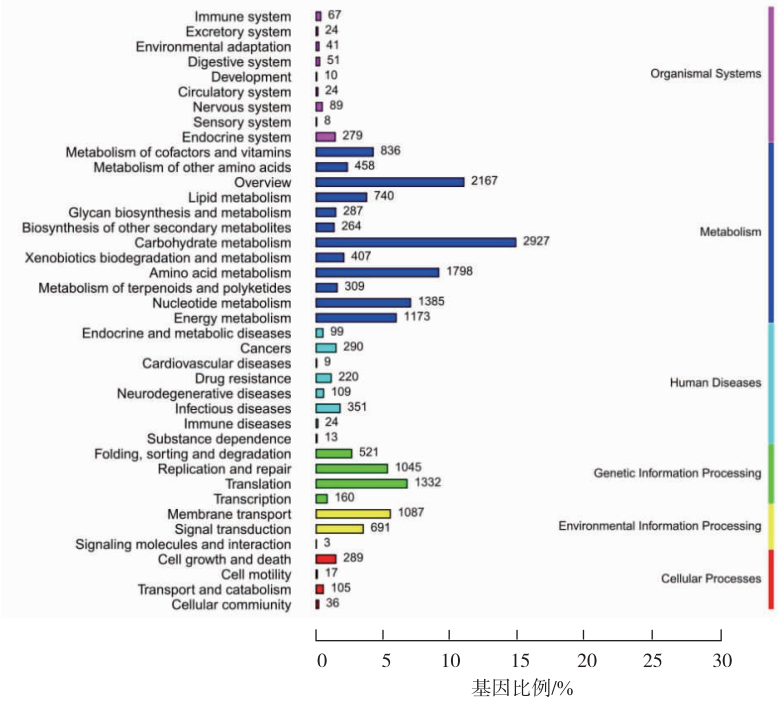


图 5　功能基因 KEGG 统计

Fig. 5　KEGG analysis of functional genes

本研究结果表明，酸笋中存在多种有益微生物，如 *L. plantarum* 具有高产叶酸的功能[35]，*Pediococcus pentosaceus* 等具有提高免疫功能、*Leuconos toccitreum* 产生具有广谱抑菌作用的细菌素[36]，*Alistipes putredinis* 可调节人体肠道菌群[37]、*Prevotella* 可降解淀粉、蛋白质[38]。同时，酸笋富含的膳食纤维是肠道菌群最好的养料，细菌消化纤维生成的短链脂肪酸能滋养肠屏障，提高免疫机能，帮助预防炎症，抵抗肿瘤发病风险[7]。酸笋的益生性表现在其中的乳酸杆菌代谢产生的诸如有机酸、过氧化氢、细菌素等物质，具有促进营养吸收、较强的抗氧化、抑制病菌等能力。

酸笋中少量的真菌、古菌、噬菌体病毒均为发酵食品中常见的微生物。德巴利酵母科（*Debaryomycetaceae*）在冰葡萄酒酿造过程中，提高冰葡萄酒风味和口感[39]；*Halococcus* 可产生多种胞内、胞外多糖酶，如淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶[40]，这些酶在高盐度的环境中显示良好的活性；*Siphoviridae*、*Myoviridae* 噬菌体病毒与 Lu Z[41]等在泡菜中分离出 26 种不同的噬菌体研究结果一致。虽然这些微生物在提高风味等方面具有一定的作用，但是在食用酸笋之前提倡加热烹饪，利用高温杀死酸笋中一些有害的细菌及病毒，保证食用安全。发现酸笋发酵液中微生物存在多样性，各菌群的功能尚有待进一步深入研究。

4　结　语

广西传统麻竹酸笋样本中含有 8 门 16 纲 30 目 63 科 92 属 156 种的微生物，不同地区微生物群落组成略有不同，同时均伴生有其他种类的细菌或真菌，在属水平上，乳杆菌属丰度高达 81%，片球菌属、明串珠菌属、魏斯氏菌属、乳球菌属丰度均不足 1%，这些都是发酵体系中广泛存在的乳酸菌。植物乳杆菌等 12 种乳酸杆菌是我国广西产地酸笋微生物的主要菌种。产地间微生物有地区差异，产地越近，微生物的群落结构越相似。

参考文献：

[1] 林晓姿，梁璋成，何志刚，等. 两株自选乳酸菌的益生特性[J]. 北京工商大学学报：自然科学版，2012，30(1)：30-35.

[2] 常健. 晋西北酸粥发酵过程中细菌种群分析及乳酸菌、醋酸菌的分离鉴定[D]. 太原：山西大学，2016.

[3] 朱照华. 酸笋的营养成分检测及其主要风味物质的研究[D]. 南宁：广西大学，2014.

[4] BADWAIK L S,BORAH P K,DEKA S C. Production and purification of anti-bacterial biometabolite from wild-type *Lactobacillus*,isolated from fermented bamboo shoot:future suggestions and a proposed system for secondary metabolite onsite recovery during continuous fermentation[J]. **Applied Biochemistry & Biotechnology**,2015,175(4):1915-1925.
[5] 林超,林钫蝶,严舜萍,等. 潮州江东竹笋营养成分分析及膳食纤维性能研究[J]. 广东化工,2010,37(12):33-34.
[6] 张慧. 两种竹笋采后木质化的发生及褪黑素的保鲜作用机制[D]. 临安:浙江农林大学,2018.
[7] BEKELE A Z,KOIKE S,KOBAYSHI. Genetic diversity and diet specificity of ruminal Prevotella revealed by 16S rRNA gene-based analysis[J]. **Fems Microbiology Letters**,2010,305(1):49-57.
[8] SINGH S A,SINGH H D,NONGMAITHEM R,et al. Biochemical composition of aoibum-a fermented bamboo shoot and its dynamics during fermentation in real time model[J]. **International Conference on Food Engineering and Biotechnology**,2011,1(2):1114-1118.
[9] ROMI W,AHMED G,JEYARAM K. Three-phase succession of autochthonous lactic acid bacteria to reach a stable ecosystem within 7 days of natural bamboo shoot fermentation as revealed by different molecular approaches[J]. **Molecular Ecology**,2015,24(13):3372-3389.
[10] BUDDHIMAN T,TAMANG J. Lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented bamboo products of arunachalpradesh in India and their functionality[J]. **Food Biotechnology**,2009,23(2):133-147.
[11] 陆胜民,许峰. 不同发酵方法对泡雷笋品质的影响[J]. 食品与发酵工业,2004,30(3):30-32.
[12] AMANN R I,LUDWIG W,SCHLEIFER K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**,1995,59(1):143-169.
[13] 李恒,陈功,伍亚龙,等. 高通量测序方法研究传统四川泡菜母水中微生物群落的动态变化[J]. 食品科学,2018,39(24):131-138.
[14] 牟穰,毛健,孟祥勇,等. 黄酒酿造过程中真菌群落组成及挥发性风味分析[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(3):303-309.
[15] 徐伟,葛阳阳,陈翠婷,等. 基于宏基因组技术分析传统红茶菌中菌群组成及其主要代谢通路[J]. 食品工业科技,2013,34(15):198-203.
[16] QIN H B,SUN Q H,PAN X W,et al. Microbial diversity and biochemical analysis of Suanzhou:a traditional Chinese fermented cereal gruel[J]. **Frontiers in Microbiology**,2016,7(1311):1-13.
[17] 高岳. 一种适宜于文库构建的土壤微生物总 DNA 提取方法[J]. 安徽农业科学,2014,42(34):12041-12042.
[18] TRUONG D T,FRANZOSA E A,TICKLE T L,et al. MetaPhlAn2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling[J]. **Nature Methods**,2015,12(10):902-903.
[19] SCHLOSS P D,WESTCOTT S L,RYABIN T,et al. Introducing mothur:open-source,platform-independent,community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2009,75(23):7537-7541.
[20] JACCARD P. The distribution of flora in the alpine zone[J]. **New Phytologist**,2010,11(2):37-50.
[21] 李欣蔚,丛敏,武俊瑞,等. 基于 16S rRNA 基因 V3-V4 区高通量测序分析东北自然发酵酸菜中细菌群落结构[J]. 现代食品科技,2017,33(2):69-76.
[22] LUO R B,LIU B H,XIE Y L,et al. SOAPdenovo2:an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. **Gigascience**,2012,1(1):18-24.
[23] ZHU W H,LOMSADZE A,BORODOVSKY M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences[J]. **Nucleic Acids Research**,2010,38(12):13-19.
[24] FU L M,NIU B F,ZHU Z W,et al. CD-HIT:accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. **Bioinformatics**,2012,28(23):3150-3152.
[25] 朱琳,高凤,曾椿淋,等. 萝卜泡菜细菌多样性的高通量测序分析[J]. 现代食品科,2018,34(2):225-231.
[26] 玛依乐·艾海提,西热娜依·阿布力克木,努尔古丽·热合曼. 应用高通量测序法检测南疆传统酸奶中微生物多样性[J]. 食品科学,2018,39(20):126-131.
[27] 陈梅春,朱育菁,刘波,等. 基于宏基因组茉莉花植株土壤细菌多样性研究[J]. 农业生物技术学报,2018,26(9):1480-1493.
[28] XIA F,CHEN X,GUO MY,et al. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the Chinese cordyceps reveals unexpectedly high fungal diversity[J]. **Scientific Reports**,2016,6:33437-33448.

[29] 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.

[30] 杨洪岩,李超,刘通,等. 传统东北酸菜发酵过程中的细菌动态及多样性[J]. 食品工业科技,2015,36(1):154-159.

[31] CHEN Y S,YANAGIDA F,HSU J S. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan-tsai (fermented mustard),a traditional fermented food in Taiwan[J]. **Folia Microbiologica**,2013,58(2):103-109.

[32] THAKUR K,PANMEI A,LALRINSANGPUII,et al. Bamboo shoots:their evolution from grass to health food[J]. **Scientific India**,2016,4(3):9-12.

[33] SONAR N R,HALAMI P M. Phenotypic identification and technological attributes of native lactic acid bacteria present in fermented bamboo shoot products from North-East India[J]. **Journal of Food Science & Technology**,2014,51(12):4143-4148.

[34] AYMERICH M T,GARRIGA M,MONFORT J M,et al. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages:characterization of bacteriocins[J]. **Food Microbiology**,2000,17(1):33-45.

[35] 张海燕,柳陈坚,何树芬,等. 高产叶酸植物乳杆菌的筛选及应用研究[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(5):487-494.

[36] 韩璠,刘振民,郭本恒,等. 柠檬明串珠菌的研究进展[J]. 食品研究与开发,2014,35(16):126-131.

[37] LI F,HULLAR M A J,SCHWARZ Y,et al. Human gut bacterial communities are altered by addition of aruciferous vegetables to a controlled fruit and vegetable-free Diet[J]. **Journal of Nutrition**,2009,139(9):1685-1691.

[38] VALDES A M,WALTER J,SEGAL E,et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. **British Medical Journal**,2018,361:36-44.

[39] 刘壮,江洁,涂茂林,等. 1 株从冰葡萄汁中分离的德巴利酵母菌的鉴定及耐性研究[J]. 食品与发酵工业,2015,41(7):51-56.

[40] 杨丹丹,黎乾,黄晶,等. 岱山盐场可培养嗜盐菌的多样性及其产酶活性筛选[J]. 应用生态学报,2012,23(11):3103-3108.

[41] ZHANG L,BREIDT F,PLENGVIDHYA V,et al. Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations[J]. **Applied & Environmental Microbiology**,2003,69(6):3192-3202.

科　技　信　息

中国科学家创建出新型糖基化酶碱基编辑器

作为基因组编辑前沿技术,碱基编辑(base editing, BE)无需产生 DNA 双链断裂,也无需供体 DNA 的参与,可实现靶位点的精准点突变,已成为基因编辑的重要研究方向。现有碱基编辑器只能实现嘧啶间(胞嘧啶碱基编辑器)和嘌呤间(腺嘌呤碱基编辑器)的碱基转换,尚没有碱基编辑器实现嘧啶与嘌呤间的特异性碱基颠换。 开发新型碱基编辑技术实现碱基颠换甚至任意碱基变换,在合成生物体系构建、遗传疾病的基因治疗、生物性状修饰等领域具有重要意义。

中科院天津工业生物所张学礼研究员带领的微生物代谢工程研究团队和毕昌昊研究员带领的合成生物技术研究团队联合攻关,设计构建了胞嘧啶脱氨酶–nCas9–Ung 蛋白复合物,创建出新型糖基化酶碱基编辑器(GBE),开发了可实现嘧啶和嘌呤间颠换的单碱基基因编辑系统。

基于该系统,国际上首次在微生物中实现任意碱基编辑、在哺乳动物细胞中实现 C–G 碱基特异性颠换。2020 年 7 月 20 日,研究论文发表于《自然—生物技术》。

传统的胞嘧啶碱基编辑器(CBE)在脱氨酶(AID)的作用下,将 DNA 单链上的 C 转变为尿嘧啶(U),经过多次 DNA 复制才转化为 T。新型 GBE 碱基编辑器独辟蹊径,利用细胞自身 DNA 修复系统直接修复该“非常规碱基”,生成特定碱基,实现碱基编辑:将尿嘧啶糖基转移酶(Ung)带到由胞嘧啶脱氨酶形成的尿嘧啶碱基位点,在该位点脱去尿嘧啶,建立无嘌呤/无嘧啶(AP)位点,DNA 损伤位点诱导启动 DNA 修复,从而实现碱基的转变。实验结果证明,GBE 碱基编辑器在大肠杆菌中可将 C 特异性颠换为 A,编辑特异性平均达到(93.8±4.8)%,并实现任意碱基间的变化(NBE)。

GBE 作为新一代碱基编辑技术,摆脱传统碱基编辑依赖多次 DNA 复制的缺点,直接将目标碱基特异性修改成目的碱基,该技术进一步完善碱基编辑系统,填补了现有碱基编辑技术的空缺,在国际上首次实现微生物基因碱基的任意编辑改造,极大提升了基因编辑和合成生物构建能力。

GBE 也是第一个可在哺乳动物细胞进行 C–G 特异性颠换的碱基编辑器,具有较高的特异性和较窄的编辑窗口,将为 3 000 多种已知 CG 碱基突变引起的人类遗传疾病治疗带来曙光。该碱基编辑技术的突破,进一步提高了我国生物技术的底层技术能力,将为生物产业核心关键技术的自主创新发挥重要作用。

[信息来源]科学网. 中国科学家创建出新型糖基化酶碱基编辑器 [EB/OL]. (2020–07–24). http://paper.sciencenet.cn//htmlpaper/2020/7/20207241141391685779 2.shtm