

## 洛阳传统绿豆酸浆细菌群落组成分析和功能预测

范鑫诺<sup>1,2</sup>, 李海阳<sup>1,3</sup>, 郑毅恒<sup>1,3</sup>, 李毅昊<sup>1,3</sup>, 侯颖<sup>1,3\*</sup>, 徐建强<sup>4</sup>

<sup>1</sup>河南科技大学食品与生物工程学院 河南洛阳 471023

<sup>2</sup>河南省食品微生物工程技术研究中心 河南洛阳 471023

<sup>3</sup>微生物资源开发与利用河南科技大学重点实验室 河南洛阳 471023

<sup>4</sup>河南科技大学园艺与植物保护学院 河南洛阳 471023)

**摘要** 为探究洛阳传统特色食品浆面条核心元素绿豆酸浆的细菌群落组成,利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对洛阳 6 家浆坊的绿豆酸浆进行细菌 16S rDNA 测序。结果表明:从 6 个绿豆酸浆样本中共鉴定出 8 个细菌门,涉及 75 个属和 106 个种;其中厚壁菌门为优势菌门(占比 78.57~97.17%),乳杆菌属(占比 20.95%~90.36%)和乳球菌属(占比 3.26%~62.68%)为优势菌属,寡发酵乳杆菌、未分类乳球菌属是对应的优势菌种,而植物乳杆菌、弯曲乳杆菌、食木薯乳杆菌等是常见的次优势菌种;这些优势细菌均为乳酸菌,具有广泛益生作用。对绿豆酸浆中细菌群落进行功能预测,发现细菌群落的碳水化合物代谢和氨基酸代谢丰度高,特别是呈味氨基酸代谢通路和 L-乳酸脱氢酶丰度均较高,推断绿豆酸浆独特的酸香味与细菌的氨基酸代谢以及乳酸合成有关。本研究结果为进一步研究绿豆酸浆发酵机理及开发相应发酵剂奠定了理论基础。

**关键词** 绿豆酸浆;高通量测序;细菌群落组成;功能预测

**文章编号** 1009-7848(2024)06-0369-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.032

传统发酵食品因具有提高食品营养价值,改善食品风味和口感等优点而深受人们的喜爱。不同民族、不同地域都有自己传统的特色发酵食品。浆面条又称浆饭,是洛阳颇具浓厚地方特色的传统美食,其不仅味道鲜美,制作简单,还能驱逐寒气、健胃消食,自古以来流传不衰<sup>[1-2]</sup>。洛阳有句民谚“浆饭热三遍,拿肉都不换”,足见浆面条的魅力。浆面条与其它面条的区别是煮面条时不是用清水,而是用发酵的绿豆酸浆。绿豆酸浆是以绿豆为原料,经过浸泡、磨浆、纱布除渣后,由微生物自然发酵而成的,与北京豆汁有着异曲同工之妙<sup>[3]</sup>。传统发酵食品在自然发酵过程中都是混菌发酵,往往存在产品性质不稳定,或伴随致病菌、有害菌生成等问题<sup>[4-6]</sup>。为了了解绿豆酸浆的食品安全性,掌握其发酵机理,有必要对绿豆酸浆的细菌群落组成进行研究。

近年来快速发展的高通量测序技术,不仅可以检测特定环境下的微生物,结合生物信息学来分析样本中各种微生物种类、物种丰度、系统演变等相关信息,还可以根据种群信息预测其代谢功能等<sup>[7-9]</sup>。基于 16S rDNA 序列分析的高通量测序技术,是研究传统发酵食品微生物多样性最常见、成本较低的方法,目前该方法在很多传统发酵食品微生物分析中得到应用。杜瑞等<sup>[10]</sup>运用基于 16S rDNA 的高通量测序技术分析内蒙古发酵乳制品和发酵肉制品中细菌群落组成和多样性,并通过 16S rDNA 预测功能分析发酵乳、肉食品中的绝大部分细菌与转运代谢有关,如脂肪代谢、氨基酸代谢等功能。李墨钊等<sup>[11]</sup>利用高通量测序发现新疆奶疙瘩的优势细菌菌群有乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和乳球菌属(*Lactococcus*),并从中分离获得具有延寿功效的耐酸、耐胆盐益生菌鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)R4。张莉力等<sup>[12]</sup>通过高通量测序技术分析北京豆汁和麻豆腐中的细菌群落组成及多样性等。

本文通过 16S rDNA 高通量测序技术分析洛阳浆面条核心元素——绿豆酸浆的细菌群落组成及其优势菌种,并预测其代谢功能,为揭示绿豆酸

**收稿日期:** 2023-06-10

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31400098);农业农村部农业微生物资源收集与保藏重点实验室开放基金项目(KLMRCP2021-06);河南省科技攻关计划项目(202102110071)

**第一作者:** 范鑫诺,女,硕士生

**通信作者:** 侯颖 E-mail: houying76@126.com

浆发酵机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

浆面条绿豆酸浆,2021年11月从洛阳市老城区和瀍河区的王家浆坊、刘家浆坊、绿源浆坊、张记浆坊、贾记浆坊和马家浆坊6家浆坊的酸浆缸中表层、中部和底部,分别采集发酵成熟处于销售阶段的绿豆酸浆样品各200 mL,混合均匀后,保存在4℃恒温箱中带回实验室,分别编号为L1、L2、L3、L4、L5、L6。

### 1.2 主要仪器与试剂

H1850R台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;Nano Drop2000超微量核酸蛋白浓度测定仪,美国Thermo公司;DYY-6C电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Gel Doc EZ凝胶成像系统,美国BIO-RAD公司;TP600PCR仪,日本TaKaRa公司。E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA抽提试剂盒,美国Omega公司;TransStart FastPfu Polymerase,北京全式金生物技术有限公司;DNA Gel Extraction Kit,美国Axygen公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 样品DNA抽提** 分别取6个绿豆酸浆样品各200 mL,12 000 r/min离心5 min,去除上清后,使用E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA抽提试剂盒对沉淀中微生物基因组总DNA进行抽提,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA的质量,并使用超微量核酸蛋白测定仪测定DNA浓度和纯度。

**1.3.2 PCR扩增和测序文库构建** 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')<sup>[13]</sup>对16S rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增。PCR反应体系为:5×FastPfu缓冲液4 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,上游引物(5 μmol/L) 0.8 μL,下游引物(5 μmol/L) 0.8 μL,FastPfu DNA聚合酶0.4 μL,模板DNA 10 ng,BSA 0.2 μL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

45 s),然后72℃稳定延伸10 min,最后在10℃进行保存。每个样本3个重复。将同一样本的PCR产物混合后使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用DNA Gel Extraction Kit进行回收产物纯化。纯化后的PCR产物送上海美吉生物医药科技有限公司进行建库后,利用Illumina公司的Miseq PE300平台进行测序。

**1.3.3 数据分析与处理** 所有数据分析与处理在美吉生物云平台(<http://cloud.majorbio.com>)完成,具体如下:使用Fastp<sup>[14]</sup>(<https://github.com/OpenGene/fastp>,version 0.19.6)软件对双端原始测序序列进行质控,使用Flash<sup>[15]</sup>(<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>,version 1.2.11)软件进行拼接。使用Uparse<sup>[16-17]</sup>软件(<http://drive5.com/uparse/>,version 7.1),根据97%的相似度对质控拼接后的序列进行操作分类单元OTU聚类并剔除嵌合体。聚类后去除比对到叶绿(Chloroplast)和线粒体(Mitochondria)序列的OTU,并按最小样本序列数量进行抽平后,以Silva(Release138 <http://www.arb-silva.de>)数据库为参考,采用RDP classifier(<http://rdp.cme.msu.edu/>,version 2.11)对97%相似水平的OTU代表序列进行分类学注释,置信度阈值为70%,并在各个物种分类学水平统计各样本的群落物种组成<sup>[18]</sup>。使用PICRUSt2<sup>[19]</sup>(version 2.2.0)软件进行16S功能预测分析。采用Circos-0.67-7、mothur(version v.1.30.2 <https://mothur.org/wiki/calculators/>)<sup>[20]</sup>、R语言(version 3.3.1)等软件进行数据统计和作图<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA提取与PCR扩增

6个绿豆酸浆样本所提DNA质量浓度为103.7~278.6 ng/μL,OD<sub>260/280</sub>为1.86~1.90。PCR扩增结果如图1所示,6个样品PCR产物目的条带

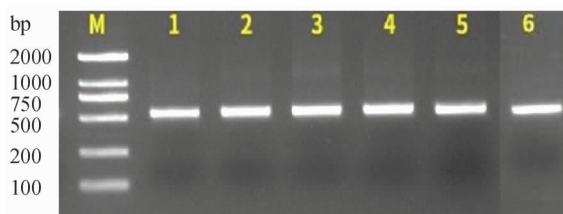


图1 16S rDNA V3-V4区PCR扩增产物

Fig.1 PCR product of V3-V4 region of 16S rDNA

大小正确,浓度合适,可进行后续试验。

## 2.2 样本 OTU 及 Alpha 多样性分析

6 个绿豆酸浆样品共获得平均长度为 468 bp 的原始序列 493 916 条,质控处理后得到平均长度为 418 bp 的优化序列 286 297 条。将这些序列按 97% 的序列相似度进行聚类,并去除比对到叶

绿体和线粒体序列的 OTU 和按最小样本序列进行抽平后,共保留有效序列 97 674 条。这些有效序列共聚类为 125 个 OTU,分类注释结果为 1 个域,1 个界,8 个门,12 个纲,25 个目,51 个科,75 个属,106 个种。

表 1 Alpha 多样性分析

Table 1 Alpha diversity analysis

样本	浆坊名称	OUT 数量	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖率/%
L1	王家浆坊	86	109.23	107.08	1.75	0.32	99.86
L2	刘家浆坊	68	98.30	91.00	1.40	0.43	99.85
L3	绿源浆坊	81	97.07	103.67	2.66	0.12	99.90
L4	张记浆坊	45	76.10	67.00	1.93	0.22	99.93
L5	贾记浆坊	59	80.31	77.33	2.12	0.22	99.93
L6	马家浆坊	75	84.41	81.07	1.51	0.42	99.91

6 个样本的 Alpha 多样性分析如表 1 所示。Sobs、Ace 和 Chao 指数能够反映群落的丰富度,样品 L1 的这 3 个指数分别为 86,109.23 和 107.08,都高于其它样本,说明 L1 样本群落丰富度最高。Shannon 和 Simpson 指数能够反映群落的多样性,Shannon 值越大,Simpson 值越小,则说明群落多样性越高。根据 Shannon 和 Simpson 指数分析 6 个绿豆酸浆样本细菌 Alpha 多样性顺序为 L3>L5>L4>L1>L6>L2。覆盖率能反映测序结果是否代表了样本中微生物的真实情况,本研究 6 个样本测序覆盖率均大于 99%,表明本次测序结果能够代表各个样本真实的微生物情况。

稀释曲线可以用来说明样本的测序数据量是否合理,6 个绿豆酸浆样本在不同测序量情况下的稀释曲线如图 2 所示。随着测序数据量的增加,各个样本的曲线均渐趋平缓,结合表 1 各个样本的覆盖率均大于 99%,说明样本的测序数据量合理。

## 2.3 物种组成分析

2.3.1 OTU 水平物种 Venn 图分析 Venn 图能分析多个样本共有和特有的物种情况,可直观的反映样本物种组成的相似性和区别。绿豆酸浆样品在 OTU 水平上的 Venn 图分析结果如图 3 所示,6 个样本共有 OTU 数目 25 个,占 OTU 总数的 20%;其中 L1 和 L6 的共有 OTU 数目最多,有 60 个,表明这两个样品的物种组成更为一致。群组

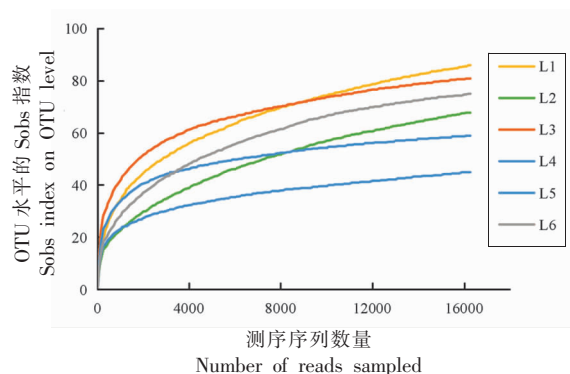


图 2 6 个绿豆酸浆样本的稀释曲线

Fig.2 The rarefaction curve of 6 samples of mung bean sour pulp

L1&L2、L1&L3、L2&L3、L3&L6 的共有 OTU 数目也都大于 50 个,而各个样本独有 OTU 数目均小于 10 个,说明上述样本的 OTU 组成具有高度相似性。

2.3.2 门水平群落组成分析 通过 SILVER 数据库同源性序列比对,绿豆酸浆样本中共鉴定出 8 个细菌门,即厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteriota)、拟杆菌门(Bacteroidota)、粘球菌门(Myxococcota)、变形菌门(Proteobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteriota)、弯曲杆菌门(Campilobacterota)和骸骨细菌门(Patescibacteria)。通过分析发现,各个样本的优势菌门比较一致,均为厚壁菌门占比最高,其在各样本占比达到 78.567%~97.174%

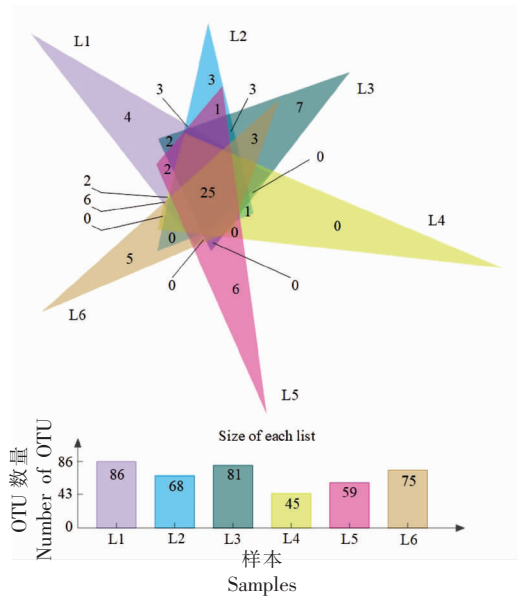


图3 OTU水平韦恩图

Fig.3 Venn diagram on OTU level

之间;其次为变形菌门、拟杆菌门和放线菌门。弯曲杆菌门为除样本 L3 以外的其余 5 个样本所共有, 骸骨细菌门为除样本 L4 和 L6 以外的其余 4 个样本所共有, 梭杆菌门为 L1 和 L6 共有, 而粘球菌门为 L1 独有。

2.3.3 属水平群落组成分析 6 个绿豆酸浆样本共鉴定出 75 个属的细菌。如表 3 所示, 总体丰度占比高于 1.0% 的属有 12 个, 其中乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和乳球菌属 (*Lactococcus*) 是各个样本中丰度最高的 2 个菌属; 但在各样本中, 二者丰度大小关系却不尽相同。在 L1、L4 和 L6 中, 乳杆菌属的丰度占比 (75.50%~90.36%) 远远高于乳球菌属的丰度占比 (3.26%~18.47%); 在 L3 中乳杆菌属的丰度占比 (37.65%) 略高于乳球菌属的丰度占比 (27.01%); 而在 L2 和 L5 中, 则是乳球菌属的丰度

表 2 门水平群落组成 (%)

Table 2 Community composition on phylum level (%)

门	L1	L2	L3	L4	L5	L6
厚壁菌门 ( <i>Firmicutes</i> )	95.043	93.949	78.567	97.174	80.828	94.490
变形菌门 ( <i>Proteobacteria</i> )	1.763	5.529	13.785	2.236	9.276	2.580
拟杆菌门 ( <i>Bacteroidota</i> )	2.353	0.147	3.305	0.184	4.619	2.580
放线菌门 ( <i>Actinobacteriota</i> )	0.774	0.338	4.306	0.399	5.123	0.332
弯曲杆菌门 ( <i>Campilobacterota</i> )	0.018	0.025	0.000	0.006	0.147	0.012
骸骨细菌门 ( <i>Patescibacteria</i> )	0.031	0.012	0.037	0.000	0.006	0.000
梭杆菌门 ( <i>Fusobacteriota</i> )	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
粘球菌门 ( <i>Myxococcota</i> )	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 属水平群落组成 (%)

Table 3 Community composition on genus level (%)

属	L1	L2	L3	L4	L5	L6
乳杆菌属 ( <i>Lactobacillus</i> )	75.50	20.95	37.65	90.36	35.50	88.97
乳球菌属 ( <i>Lactococcus</i> )	18.47	62.68	27.01	3.26	42.48	4.07
未分类肠杆菌科 ( <i>unclassified_Enterobacteriaceae</i> )	0.50	5.36	11.36	1.81	0.56	0.90
明串珠菌属 ( <i>Leuconostoc</i> )	0.09	6.83	5.34	2.27	1.62	0.06
链球菌属 ( <i>Streptococcus</i> )	0.79	1.74	6.30	0.90	0.43	1.21
金黄杆菌属 ( <i>Chryseobacterium</i> )	1.97	0.05	2.45	0.10	0.65	2.40
双歧杆菌属 ( <i>Bifidobacterium</i> )	0.17	0.02	4.01	0.33	4.74	0.07
不动杆菌属 ( <i>Acinetobacter</i> )	0.82	0.08	1.56	0.41	0.65	1.46
假单胞菌 ( <i>Pseudomonas</i> )	0.22	0.01	0.22	0.01	6.56	0.02
普雷沃菌属 ( <i>Prevotella</i> )	0.20	0.01	0.37	0.07	3.92	0.02
韦荣氏球菌属 ( <i>Veillonella</i> )	0.08	1.57	0.04	0.02	0.72	0.01
魏斯氏菌属 ( <i>Weissella</i> )	0.01	0.02	1.53	0.00	0.00	0.02
其它 ( <i>Others</i> )	1.19	0.66	2.17	0.47	2.17	0.79



占比(62.68%和 42.48%)高于乳杆菌属的丰度占比(20.95%和 35.50%)。

除乳杆菌属和乳球菌属外,其它菌属在各样本中的丰度占比也明显不同。未分类肠杆菌科(*unclassified\_Enterobacteriaceae*)丰度占比在 L3 中最大(11.36%),其次为 L2(5.36%);明串珠菌属(*Leuconostoc*)在 L2 和 L3 中丰度占比较高,分别为 5.34%和 6.83%;链球菌属(*Streptococcus*)在 L3 中丰度占比较高(6.30%);金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)在 L1、L3 和 L6 中丰度占比相近,均在 2.0%左右。双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)只在 L3 和 L5 中含量丰富,丰度占比分别为 4.01%和 4.74%;不动杆菌属(*Acinetobacter*)只在 L3 和 L6 中丰度占比大于 1.0%;假单胞菌(*Pseudomonas*)和

普雷沃菌属(*Prevotella*)则只在 L5 中丰度最高,丰度占比分别为 6.56%和 3.92%;韦荣氏球菌属(*Veillonella*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)分别在 L2 和 L3 中丰度占比超过 1.50%。

2.3.4 属水平群落热图分析 群落 Heatmap 图可对样本进行物种相对丰度相似性聚类,并将高丰度和低丰度物种分块聚集,通过颜色梯度和相似程度直观的反映多个样本在各分类水平上群落组成的相似性和差异性<sup>[22]</sup>。丰度占比前 30 的属在绿豆酸浆样本中的群落组成 heatmap 如图 4 所示,乳杆菌属和乳球菌属在 6 个样本中含量最丰富,且二者丰度相似性距离最小;其余丰度较高的属还有未分类肠杆菌科、明串珠菌属、链球菌属、金黄杆菌属和不动杆菌属等。

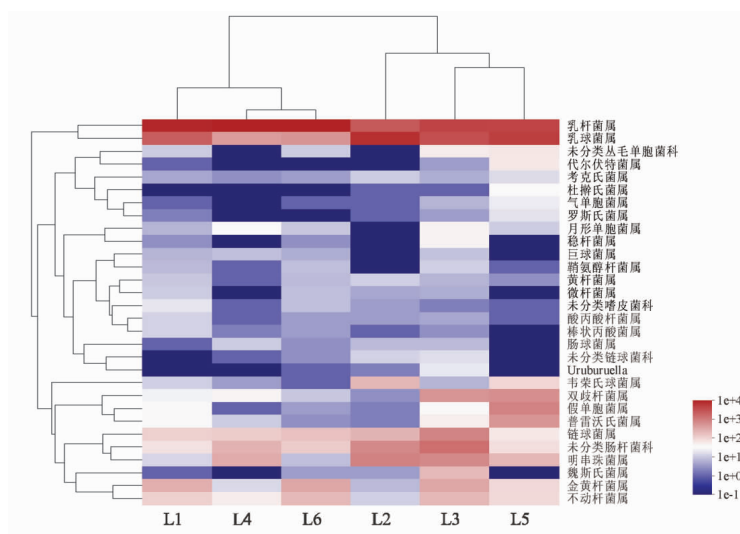


图 4 属水平群落热图

Fig.4 Community heatmap on genus level

根据各个样本中属水平物种相对丰度的相似性,6 个样本被聚类为 2 个大分支,说明这 2 个分支所含样本之间群落组成差异性较大。第 1 个大分支包括样本 L1、L4 和 L6,说明这 3 个样本群落组成相似性较高;而其中样本 L4 和 L6 又被聚类成为一个小分支,说明这 2 个样本群落组成相似性更高一些,而它们与样本 L1 群落组成则有一定差异;第 2 个大分支包括样本 L2、L3 和 L5,说明这 3 个样本群落组成相似性较高,同样其中 L3 与 L5 又被聚类成为一个小分支,说明这 2 个样本群落组成相似性更高一些,而它们与样本 L2 群落组成也有一定差异。这些结果说明不同浆坊绿豆酸

浆中的细菌群落组成虽然相似,但也有差异,这与各个样本在 OTU 水平的 Venn 图分析及细菌群落在属水平上的组成分析结果相一致。

2.3.5 种水平群落组成分析 6 个样本共鉴定出 106 个种,选择丰度占比大于 1.0%的物种构建其与样本的 circos 关系图,结果如图 5 所示。在样本 L1、L4、L6 中优势菌种都是寡发酵乳杆菌(*Lactobacillus oligofermentans*),其在 3 个样本中的丰度占比分别为 51.77%,37.91%和 62.41%;样本 L1 中次优势菌种为未分类乳球菌属(*unclassified\_Lactococcus*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),二者丰度占比分别为 18.43%和

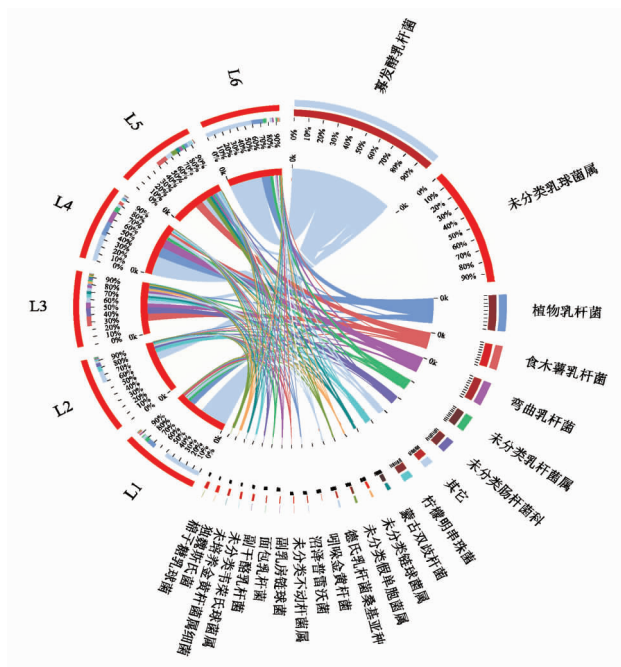


图5 样本与物种关系图

Fig.5 Sample and species diagram

10.81%；样本 L4 中次优势菌种为植物乳杆菌和弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*), 二者丰度占比分别为 20.05%和 16.17%；而样本 L6 中次优势菌种为植物乳杆菌, 丰度占比为 15.01%。

在样本 L2、L3、L5 中优势菌种均为未分类乳球菌属, 其在 3 个样本中丰度占比分别为 62.66%、25.92%和 62.41%；样本 L2 中次优势菌种为寡发酵乳杆菌, 丰度占比 16.54%；而样本 L3

中次优势菌种为食木薯乳杆菌 (*Lactobacillus manihotivorans*) 和未分类肠杆菌科, 二者丰度占比分别为 13.88%和 11.36%；L5 中次优势菌种为食木薯乳杆菌和寡发酵乳杆菌, 二者丰度占比分别为 14.44%和 9.65%。

在各样本中丰度占比具有一定优势的种还有未分类乳杆菌属 (*unclassified\_Lactobacillus*)、柠檬明串珠菌 (*Leuconostoc citreum*)、蒙古双歧杆菌 (*Bifidobacterium mongoliense*)、未分类假单胞菌属 (*unclassified\_Pseudomonas*) 和未分类链球菌属 (*unclassified\_Streptococcus*) 等。如未分类乳杆菌属在样本 L1、L4、L5 和 L6 中的丰度占比, 柠檬明串珠菌在样本 L2、L3 和 L5 中的丰度占比以及蒙古双歧杆菌在 L3 和 L5 中的丰度占比均超过 4.0%。此外, 弯曲乳杆菌在样本 L3 和 L5 中也具有一定优势, 其丰度占比分别为 7.72%和 4.37%, 而未分类肠杆菌科在样本 L2 中丰度占比也达到了 5.36%。

### 2.4 功能预测分析

为探究样本中微生物在绿豆酸浆发酵过程中的功能, 采用 PICRUSt2 对 OTU 丰度表进行标准化后, 进行同源蛋白簇 (COG) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 功能注释, 以获得 OTU 在 COG、KEGG 各功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的丰度信息。

2.4.1 COG 数据库注释分析 COG 功能分类统计图分析结果如图 6 所示, L1-L6 的 COG 功能组成相似, 功能注释结果均分为 23 类, 其中负责翻

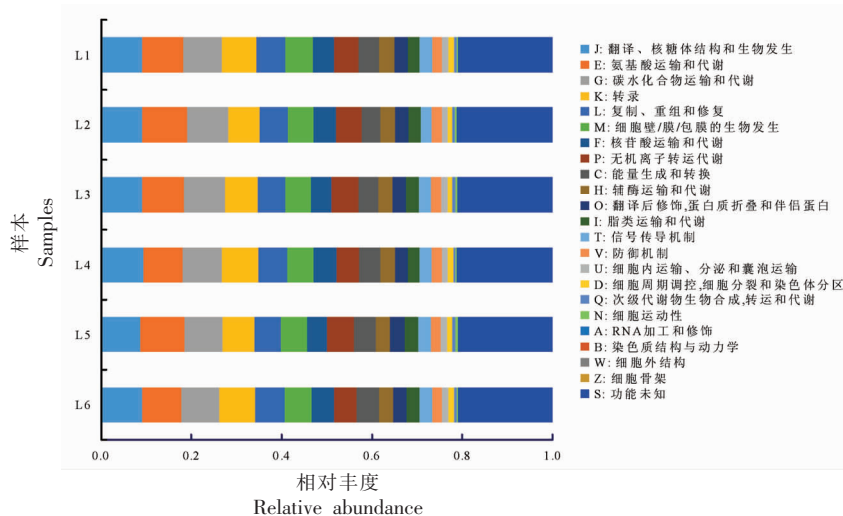


图6 COG 功能分类统计图

Fig.6 COG functional classification statistical map

译、核糖体结构和生物发生,氨基酸运输和代谢,碳水化合物运输和代谢,转录,复制、重组和修复、细胞壁/膜/包膜的生物发生,核苷酸运输和代谢,无机离子运输和代谢,能量生成和转换等维持微生物基本生命活动的物质和能量代谢的功能基因丰度占比之和均在 60%以上,但功能未知基因丰度占比均在 20%以上,说明相关微生物功能基因的研究还需深入。

2.4.2 KEGG 数据库注释分析 6 个样本 KEGG 数据库的预测功能也较为相似,如在二级代谢通路中都具有 44 种代谢通路,除总览图外,注释到碳水化合物代谢通路最多,其次为氨基酸代谢、膜运输、转录、能量代谢、核苷酸代谢和复制和修复等(表 4);在氨基酸代谢的三级代谢通路中,胱氨酸、蛋氨酸以及各种呈味氨基酸谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸的合成和代谢丰度均较高(表 4)。在酶水平上,L1-L6 中共有 1 743 余种酶,表 5 共展示了丰度均值较高的

前 22 种酶类,其中含有需要利用谷氨酰胺水解提供氨基从而产生谷氨酸的氨甲酰磷酸合酶(Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing))、天冬酰胺-tRNA 合酶(Asparaginyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing))和谷氨酰胺-tRNA 合酶(Glutaminyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing))以及乳酸形成所需的 L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase)等。

### 3 讨论

绿豆酸浆是洛阳地区传统食品浆面条制作的关键原料,生产方式为小作坊式自然发酵,其发酵微生物群落组成及其功能等目前还尚无报道。本研究采用高通量测序技术对来自洛阳 6 家浆坊的绿豆酸浆中的细菌群落组成进行了测定与分析,发现绿豆酸浆中细菌多样性十分丰富,共涵盖了 8 个门,75 个属和 106 个种的细菌,其中以厚壁菌门中乳杆菌属的寡发酵乳杆菌、植物乳杆菌、弯曲

表 4 KEGG 数据库主要代谢通路丰度值

Table 4 Abundance of main metabolic pathways in KEGG database

二级代谢通路	L1	L2	L3	L4	L5	L6	均值
总览图	13 455 756	13 651 095	11 539 898	12 044 334	14 509 026	13 044 610	13 040 786
碳水化合物代谢	3 615 346	3 589 901	3 186 277	3 430 933	3 785 687	3 514 539	3 520 447
氨基酸代谢	2 217 335	2 239 980	1 894 742	1 895 067	2 510 326	2 150 595	2 151 341
膜运输	1 294 415	1 337 944	1 314 400	1 339 340	1 546 938	1 244 097	1 346 189
复制和修复	1 327 121	1 267 408	1 121 441	1 255 926	1 304 327	1 320 859	1 266 180
能量代谢	1 160 478	1 159 202	1 064 115	1 065 767	1 357 630	1 124 192	1 155 231
辅助因子和维生素的代谢特征差	1 160 939	1 166 750	981 622	1 030 902	1 298 651	1 128 639	1 127 917
核苷酸代谢翻译	1 171 323	1 108 509	960 029	1 093 058	1 140 696	1 168 929	1 107 091
复制和修复	1 126 858	1 626 317	1 751 822	1 201 908	1 272 996	1 673 614	1 487 549
脂质代谢	841 147	1 603 748	1 724 283	1 090 711	1 086 082	1 575 191	1 390 721
氨基酸代谢的三级代谢通路	L1	L2	L3	L4	L5	L6	均值
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	363 206	345 403	290 821	326 815	359 424	357 753	340 570
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸新陈代谢	345 284	313 047	284 252	320 542	357 701	344 614	327 573
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	313 499	279 031	244 369	287 983	307 906	316 207	291 499
赖氨酸生物合成	289 810	223 232	182 382	261 137	221 543	304 910	247 169
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	170 251	240 122	172 455	127 805	238 135	143 624	182 065
精氨酸生物合成	123 391	180 645	125 632	88 977	184 595	100 874	134 019
精氨酸和脯氨酸代谢	105 692	104 526	94 931	89 044	135 977	102 731	105 483
酪氨酸代谢	125 033	78 503	76 288	114 443	99 582	137 927	105 296
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成	80 348	142 152	99 901	52 462	140 895	57 133	95 482
组氨酸代谢	82 416	117 458	92 448	66 448	123 651	69 347	91 961

表5 KEGG数据库主要酶丰度值

Table 5 Abundance of main enzyme in KEGG database

丰度均值	酶名称	丰度均值	酶名称
145 178	DNA 解旋酶	46 088	乙酰辅酶 A 羧化酶
137 207	DNA 指导的 DNA 聚合酶	45 452	肽基脯氨酰异构酶
101 932	蛋白质-N (pi)-磷酸组氨酸-糖磷酸转移酶	44 155	半胱氨酸脱硫酶
68 089	磷酸甘油酸变位酶 (2,3-二磷酸甘油酸非依赖性)	43 943	天冬酰胺-tRNA 合成酶(谷氨酰胺水解)
61 288	DNA 指导的 RNA 聚合酶	43 943	谷酰胺酰基-tRNA 合成酶 (谷氨酰胺水解)
61 136	组氨酸激酶	42 742	麦芽糖 O-乙酰转移酶
56 928	6-磷酸-β-葡萄糖苷酶	42 580	位点特异性甲基化转移酶 (腺嘌呤特异性)
52 997	23S rRNA 假尿苷 (1911/1915/1917) 合酶	42 047	磷酸核糖甲酰甘氨酸合成酶
49 369	氨甲酰磷酸合酶(谷氨酰胺水解)	41 911	蛋白质酪氨酸磷酸酶
47 506	乙醇脱氢酶	41 433	L-乳酸脱氢酶
46 615	极性氨基酸转运 ATP 酶	40 767	GTP 二磷酸激酶

乳杆菌和食木薯乳杆菌以及乳球菌属的未分类乳球菌为主,这些优势菌种均为乳酸菌。乳酸菌不仅可以使碳水化合物转化为乳酸,使食品具有酸味;还具有调节胃肠道正常菌群、维持微生态平衡,从而改善胃肠道功能、提高食物消化率、降低血清胆固醇、抑制肠道内腐败菌生长、提高机体免疫力等益生作用<sup>[23]</sup>。此外,来源于不同浆坊的绿豆酸浆细菌群落组成也存在一定差异,通过属水平群落热图发现王家浆坊、张记浆坊和贾记浆坊3家浆坊的绿豆酸浆细菌多样性组成丰度相似度较高,而刘家浆坊、绿源浆坊和贾记浆坊3家浆坊绿豆酸浆细菌多样性组成丰度相似性较高,分析认为这与绿豆酸浆本身是自然发酵的产物,其细菌群落组成容易受到原料、加工和操作条件等因素的影响。

作为与绿豆酸浆类似的绿豆发酵食品——北京豆汁儿,其细菌多样性已被广泛报道,如袁钰等<sup>[24]</sup>研究的北京豆汁样本涵盖5个门,35个属,51个种的细菌,其中乳杆菌属是豆汁儿中的优势菌属;优势菌种为食窦魏斯氏菌 (*Weissella cibaria*)、沙克乳酸杆菌 (*Lactobacillus sakei*)。而张莉力等<sup>[12]</sup>则报道3个不同商家来源的北京豆汁中优势菌属均为乳球菌属、链球菌属、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 和乳杆菌属,其中乳球菌属含量均最高。据此认为,绿豆酸浆与北京豆汁儿的细菌组成多样性存在一定差异,这主要是因为二者制作工

艺不同,北京豆汁儿是在绿豆研磨和淀粉沉淀后,取上层澄清液进行发酵;而洛阳绿豆酸浆是在绿豆研磨后直接发酵,在发酵和分层后可获得酸浆和淀粉<sup>[25]</sup>,因此也使得二者具有了不同的风味特色。此外,我国西北地区广为流传一种以发酵蔬菜为元素的浆水面,有研究表明其浆水中的优势细菌也为乳杆菌属,但因地域不同,有的浆水中还含有醋酸杆菌属 (*Acetobacter*)、片球菌属 (*Pediococcus*) 和明串菌属等,而乳球菌属则很少<sup>[26-28]</sup>。这与绿豆酸浆中细菌多样性组成有明显区别,分析认为是因其发酵原料以及发酵工艺不同造成的,因而蔬菜浆水与绿豆酸浆品质不同<sup>[25,27,29]</sup>,使得浆水面与浆面条风味也不同。

本研究还对绿豆酸浆中细菌群落的代谢功能进行了预测,经 COG 和 KEGG 两个数据库进行功能注释后,发现绿豆酸浆细菌群落中碳水化合物代谢和氨基酸代谢的基因丰度均较高;并且在氨基酸代谢中,胱氨酸、蛋氨酸以及谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸等呈味氨基酸的合成与代谢丰度相对较高。在酶水平上,除具有催化丙酮酸转化为乳酸的乳酸脱氢酶丰度比较高以外,需要利用谷氨酰胺水解提供氨基的氨甲酰磷酸合酶、天冬酰胺-tRNA 合酶和谷氨酰胺-tRNA 合酶丰度都非常高,这些酶的催化反应均会产生大量的谷氨酸<sup>[30]</sup>。这些功能预测结果与李璇等<sup>[25]</sup>报道的绿豆酸浆中含有丰富的淀粉、还原糖、蛋白质以



及谷氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸等氨基酸相一致,分析认为正是通过微生物的碳水化合物代谢和氨基酸代谢,绿豆中的淀粉、蛋白质等被转化为乳酸和呈味氨基酸,使得绿豆酸浆具有了独特的酸味和香味。

#### 4 结论

通过高通量测序技术测定与分析发现洛阳传统发酵型绿豆酸浆具有丰富的细菌多样性,其中寡发酵乳杆菌、未分类乳球菌、植物乳杆菌、弯曲乳杆菌和食木薯乳杆菌是绿豆酸浆的优势菌种,这些优势菌种都是乳酸菌,具有广泛的益生作用。绿豆酸浆中细菌功能预测表明,高丰度的碳水化合物代谢和氨基酸代谢使得绿豆中的淀粉、蛋白质等转化为还原糖、乳酸和氨基酸等物质,不仅提高了绿豆的营养价值,还使其具有独特的风味。本研究为进一步探究绿豆酸浆发酵机理以及从绿豆酸浆中分离筛选优良发酵菌株,并将其开发为发酵菌剂应用于绿豆酸浆的制作,传承和发展地方特色美食等奠定了理论基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 柏乃冰. 洛阳浆饭——浆面条[J]. 食品与健康, 2005(7): 40.  
BAI N B. Luoyang pulp rice-pulp noodles[J]. Food and Health, 2005(7): 40.
- [2] 苗君甫. 洛阳美食「漿」面條[J]. 内蒙古林业, 2017(2): 32.  
MIAO J F. Luoyang delicacy pulp noodles[J]. Inner Mongolia Forestry, 2017(2): 32.
- [3] 史有君. 中原人的乡愁——浆面条[J]. 餐饮世界, 2016(5): 11.  
SHI Y J. Homesickness of central plains people - pulp noodles[J]. World Cuisine, 2016(5): 11.
- [4] FLIBERT G, ABEL T, ALY S. African cassava traditional fermented food: The microorganism's contribution to their nutritional and safety values: A review[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2016, 5(10): 664-687.
- [5] HOLCK A, AXELSSON L, MCLEOD A, et al. Health and safety considerations of fermented sausages[J]. Journal of Food Quality, 2017, 2017: 9753894.
- [6] ANALA K, PERPETUINI G, PETCHKONGKAEW A, et al. Food safety risks in traditional fermented food from South-East Asia[J]. Food Control, 2019, 109: 106922.
- [7] 陈镜如, 边鑫, 杨杨, 等. 中国传统发酵食品微生物多样性研究进展[J]. 中国调味品, 2022, 47(2): 205-210.  
CHEN J R, BIAN X, YANG Y, et al. Research progress on microbial diversity of traditional fermented food in China[J]. China Condiment, 2022, 47(2): 205-210.
- [8] 夏梦雷, 杨帆, 陆锴, 等. 高通量测序技术在传统发酵食品微生物群落中的应用研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(5): 1-7.  
XIA M L, YANG F, LU K, et al. Application of high-throughput sequencing technology in the microbial communities of traditional fermented food products[J]. China Brewing, 2021, 40(5): 1-7.
- [9] HE G Q, LIU T J, SADIQ F A, et al. Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high-throughput sequencing approaches[J]. Journal of Zhejiang University -Science B (Biomedicine & Biotechnology), 2017, 18(4): 289-302.
- [10] 杜瑞, 王柏辉, 罗玉龙, 等. 应用 Illumina MiSeq 测序技术比较传统发酵乳、肉食品中细菌多样性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 269-277.  
DU R, WANG B H, LUO Y L, et al. Comparison of bacterial diversity in traditional fermented dairy and meat products by Illumina MiSeq sequencing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 269-277.
- [11] 李墨钊, 热米拉·阿扎提, 郑晓冬, 等. 新疆特色奶疙瘩的菌群分析与抗衰老研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 149-156.  
LI M Z, AZAT R, ZHENG X D, et al. Microflora analysis and anti-aging research of Xinjiang milk knot[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 149-156.
- [12] 张莉力, 刘黎莹, 许云贺. 北京豆汁微生物群落分析及淀粉絮凝菌分离鉴定[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 136-141.  
ZHANG L L, LIU L Y, XU Y H. Analysis of Beijing douzhi microbiota and isolation and identifica-

- tion of advantage bacterium capable of flocculating starch[J]. Food Industry Technology, 2017, 38(16): 136-141.
- [13] LIU C, ZHAO D, MA W, et al. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(3): 1421-1426.
- [14] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [15] MAGO T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [16] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [17] STACKEBRAND T E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849.
- [18] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [19] DOUGLAS G M, MAFFEI V J, ZANEVELD J R, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 685-688.
- [20] 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.
- [21] 苟萌, 胡婕, 张彤彤, 等. Illumina MiSeq 高通量测序技术研究原料乳冷藏过程中微生物群落演替规律[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 313-319.
- GOU M, HU J, ZHANG T T, et al. The succession of microbial community in raw milk during cold storage by Illumina MiSeq high-throughput sequencing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 313-319.
- [22] 孙思雨, 陈炼红, 王琳琳. 应用 Illumina Miseq 测序分析川西高原传统牦牛发酵酸奶中细菌多样性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 98-103.
- SUN S Y, CHEN L H, WANG L L. Analysis of bacterial diversity in traditional fermented Yak yoghurt in west Sichuan plateau by Illumina Miseq sequencing[J]. Food Industry Technology, 2019, 40(23): 98-103.
- [23] KIM S, LEE J Y, JEONG Y, et al. Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria[J]. Fermentation, 2022, 8(1): 29.
- [24] 袁钰, 李静, 林少华, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序技术分析北京豆汁儿微生物多样性和功能预测的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 95-100.
- YUAN Y, LI J, LIN S H, et al. Analysis on the microbial diversity and function prediction of Beijing bean juice son based on 16S rDNA high-throughput sequencing technology[J]. Food Industry Technology, 2020, 41(2): 95-100.
- [25] 李璇, 韩四海, 李鑫玲, 等. 洛阳传统绿豆酸浆营养成分分析与品质多样性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(14): 228-233.
- LI X, HAN S H, LI X L, et al. Analysis of nutrition composition and quality diversity of traditional mung bean acid slurry in Luoyang[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(14): 228-233.
- [26] 张晓辉, 杨靖鹏, 王少军, 等. 浆水中细菌多样性分析及乳酸菌的分离鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 70-76.
- ZHANG X H, YANG J P, WANG S J, et al. Bacterial diversity analysis and isolation and identification of cactic acid bacteria from Jiangshui, a traditional Chinese fermented vegetable product[J]. Food Science, 2017, 38(4): 70-76.
- [27] 魏本良, 刘长根, 肖阳生, 等. 基于 Illumina HiSeq 技术分析浆水中细菌多样性及理化性质[J]. 食品科学, 2019, 40(6): 62-68.
- WEI B L, LIU Z G, XIAO Y S, et al. Bacterial diversity analysis using Illumina HiSeq sequencing of Jiangshui, a Chinese fermented vegetable food, and its physicochemical properties[J]. Food Science, 2019, 40(6): 62-68.
- [28] 向书娅, 翟茹, 张海燕, 等. 不同地区发酵浆水中微生物群落结构比较及优势菌群的鉴定[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 121-128.
- XIANG S Y, ZHAI R, ZHANG H Y, et al. Comparison of microbial community structure and identification of dominant flora in fermented Jiangshui

- from different regions[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2023, 39(3): 121–128.
- [29] 贾雄飞. 不同蔬菜浆水营养成分分析与芹菜浆水饮料研制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- JIA X F. Analysis of nutrient composition of different Jiangshui and development of celery Jiangshui beverage[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018.
- [30] GASTEIGER E, GATTIKER A, HOOGLAND C, et al. ExPasy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3784–3788.

## Bacterial Community Composition Analysis and Function Prediction of Luoyang Traditional Mung Bean Sour Pulp

Fan Xinnuo<sup>1,2</sup>, Li Haiyang<sup>1,3</sup>, Zheng Yiheng<sup>1,3</sup>, Li Yihao<sup>1,3</sup>, Hou Ying<sup>1,3\*</sup>, Xu Jianqiang<sup>4</sup>

<sup>1</sup>School of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan

<sup>2</sup>Henan Food Microbiology Engineering and Technology Research Center, Luoyang 471023, Henan

<sup>3</sup>Key Laboratory of Microbiology Resources Development and Utilization of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan

<sup>4</sup>School of Horticulture and Plant Protection of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan

**Abstract** In order to explore the bacterial community composition of mung bean sour pulp, the core element of Luoyang traditional and special pulp noodles, the bacteria 16S rDNA of mung bean sour pulp from six pulp workshops in Luoyang was sequenced using Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology. The results showed that 8 bacterial phyla were identified from 6 samples of mung bean sour pulp, involving 75 genera and 106 species; and Firmicutes is the dominant phylum (78.57%–97.17%), *Lactobacillus* (20.95%–90.36%) and *Lactococcus* (3.26%–62.68%) are the dominant genus, *Lactobacillus oligofermentans*, *unclassified\_Lactococcus* are the corresponding dominant species, while *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus manihotivorans* are common sub dominant bacteria. These dominant bacteria are all lactic acid bacteria, which have extensive prebiotic effects. The functional prediction of the bacterial community in mung bean sour pulp showed that the carbohydrate metabolism and amino acid metabolism abundance of the bacterial community are high, especially the abundance of flavor amino acid metabolic pathway and *L*-lactate dehydrogenase are relatively high. It was inferred that the unique acid and flavor of mung bean sour pulp was related to the bacterial amino acid metabolism and lactic acid synthesis. The results of this study provided a theoretical basis for further study on the fermentation mechanism of mung bean sour pulp and development of corresponding starter.

**Keywords** mung bean sour pulp; high-throughput sequencing; bacterial community composition; function prediction