

酸菜发酵过程中细菌群落结构变化及驱动机制

贾晶晶, 赵虎威, 燕平梅*
(太原师范学院生物系 山西晋中 030012)

摘要 酸菜质量的标准化依赖于其发酵过程中的微生物群落结构的动态演替。本研究利用高通量测序技术研究酸菜发酵过程细菌群落结构组成的动态变化,以及理化因子的动态变化规律,揭示发酵环境与微生物群落结构之间的相关性,并进行功能预测和代谢通路分析。结果表明:酸菜发酵初期、中期和末期三阶段中初期 S1 阶段的 Simpson 指数显著高于 S2、S3 阶段($P<0.05$), Shannon 指数显著低于 S2、S3 阶段($P<0.05$),表明发酵初期细菌群落的多样性较低。从 9 个酸菜样品中检测到的细菌种类隶属于 6 门、9 纲、29 目、47 科、59 属、83 种。酸菜发酵中主要的优势菌门是厚壁菌门和变形菌门,假单胞菌、乳杆菌、肠杆菌、乳球菌为优势属。细菌群落结构在不同阶段具有明显差异,在发酵初期、中期和末期,厚壁菌门的相对丰度分别是 10.61%、64.83%、77.51%,而变形菌门由 84.18%降至 33.19%,最终降到 17.91%。假单胞菌属相对丰度由发酵初期 65.36%,发酵中期 21.21%降到发酵后期的 7.10%,乳杆菌属由相对丰度小于 1%,到发酵中期迅速增至 58.06%,再到发酵后期增至 67.65%。曲度乳杆菌是发酵中期的主要乳酸菌,植物乳杆菌在发酵后期占据主要优势。通过相关性分析和冗余分析发现,可滴定酸和亚硝酸是引起细菌群落结构变化的主要驱动因子,对细菌群落组成影响最大。亚硝酸盐与发酵初期群落呈正相关关系,氨基酸态氮主要影响发酵中期的细菌群落,可溶性蛋白和可滴定酸对发酵后期的群落结构影响较大。可滴定酸与乳杆菌属呈显著正相关关系,与假单胞菌属呈显著负相关关系,乳酸菌可通过乳酸发酵创造的酸性环境显著抑制假单胞菌等有害微生物的生长。本研究阐明了自然发酵酸菜在不同阶段的群落组成及差异,并说明影响其组成的驱动因子,为酸菜的生产提供理论支持。

关键词 酸菜; 细菌群落结构; 理化因子; 功能预测; 高通量测序

文章编号 1009-7848(2023)08-0354-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.08.035

发酵是世界上最古老的食品保藏方式之一^[1]。传统的东北酸菜是以白菜为主要原料发酵而成。发酵过程中微生物会消化蔬菜中大量的营养物质(如蛋白质、脂类、碳水化合物等),并将其转化为更简单和可吸收的物质(如肽、游离氨基酸、游离脂肪酸、乳酸等)^[2]。因此,发酵制品中的蛋白质溶解度、微量营养素及限制性氨基酸的有效性高于非发酵制品。有试验表明富含有益菌群的发酵酸菜通过减少炎症小体数量,增强抗氧化,并保护细胞,对结肠腺瘤的形成和发展具有明显的抑制作用^[3]。

微生物之间与环境因子的相互作用,形成了复杂的发酵微生物生态系统,发酵系统的理化因子不仅会影响微生物生长所需养分的可利用性,

而且会影响其它有害病菌的生长和存活。覃凤阳等^[4]对不同工厂泡青菜发酵过程中细菌群落和理化因子进行研究,结果表明总酸和盐度对微生物群落组成影响最大。鲁梅等^[5]研究了赤水水晒醋醋酸发酵过程原核微生物群落结构和理化因子的相关性。张倩等^[6]用冗余分析、相关性分析等方法分析理化因子和大曲微生物群落的相关性,揭示了包包曲发酵过程中微生物群落结构及差异。苏鹏伟等^[7]通过冗余分析表明有机碳(Total organic carbon, TOC)、总氮(Total nitrogen, TN)等会驱动牛粪堆肥细菌群落结构变化。杨希^[8]通过冗余分析表明盐和 pH 值是蚕豆酱发酵过程中原核微生物演替的主要驱动力。目前,酸菜中细菌微生物群落和理化因子变化之间的潜在作用和关系还鲜有研究报道,同时缺乏对核心菌群之间相关性和理化因子与菌群相关性的深入研究。对于细菌动力学变化及驱动机制的研究是发酵行业中的一个重要方向,其为发酵性能标准化,安全、可控地生产酸菜提供重要依据。

收稿日期: 2023-01-23

基金项目: 山西省科学技术厅自然科学基金面上项目
(202303021211119)

第一作者: 贾晶晶,女,硕士生

通信作者: 燕平梅 E-mail: yanpingmei1968@163.com

应用于自然发酵蔬菜研究的高通量测序技术可准确分析其微生物群落的组成多样性和动态变化。为探究传统酸菜发酵过程中细菌群落的演替及关键理化因子的变化规律,本研究利用国标方法和高通量测序技术对自然酸菜样品中的理化因子和细菌谱进行测定,同时结合群落和理化因子进行相关性分析和冗余分析,并对细菌的代谢功能进行预测,旨在掌握细菌变化与代谢产物和理化因子之间的关联,为酸菜发酵提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

DNA 提取试剂盒,天根生化科技北京有限公司;PCR 扩增所用试剂,大连宝生生物公司。

1.2 仪器与设备

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)仪、凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;DYY-6 琼脂糖凝胶电泳仪,中国北京市六一仪器厂;高速冷冻离心机,美国赛默飞公司;Illumina Hi Seq 2500 测序平台,美国 Illumina 公司。

1.3 方 法

1.3.1 酸菜的制做方法与样品采集 酸菜的制做方法如下:将新鲜卷白菜置于阴凉通风处干燥脱水 72 h,洗净后分别装入 6 个洗净晾干的泡菜坛中,每坛装 500 g 卷白菜,称取 60 g 食盐分为 3 份,按一层白菜一层盐压紧,最上面用食盐封顶后,用压菜石压紧,倒入 2 L 冷开水,淹没白菜,盖上盖子后,坛沿加水,置于 15 ℃阴凉通风处进行发酵。采用破坏性取样方法采集样品,在发酵时期内选取 3, 15, 30 d 进行取样,每个时间重复取样 3 次,9 个样本编号分别为:A1、A2、A3、B1、B2、B3、C1、C2、C3,3 个阶段的编号为 S1~S3。

1.3.2 理化因子测定 用 pH 计测定酸菜发酵液样品的 pH 值;采用 GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》中的滴定法测定总酸含量;采用 GB/T 5009.33-2016《食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》中的盐酸萘乙二胺法测定亚硝酸盐含量;使用 GB 5009.235-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中的甲醛滴定法测定氨基酸态氮含量,使用 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的

分光光度法测定蛋白质含量,使用 GB/T 5009.7-2008《食品中还原糖的测定》中的直接滴定法测定还原糖含量。

1.3.3 DNA 提取及 PCR 建库 采用 DNA 提取试剂盒提取酸菜样品的 DNA,使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'),806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),扩增细菌 16S rDNA V3~V4 区。PCR 扩增反应参数:95 ℃预变性 3 min;随后 95 ℃变性 30 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,扩增 30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒中纯化回收 PCR 产物。

1.3.4 高通量测序及数据分析 将样品送至上海美吉生物公司进行测序。使用测序平台 Illumina HiSeq 2500 对 16S rDNA 基因的 V3~V4 区进行测序得到不同发酵时间样品基因文库。测序后,对优化序列提取非重复序列,去除没有重复的单序列,按照 97% 相似性的标准对非重复序列进行操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)聚类,在聚类中去除嵌合体,得到 OTU 的代表序列。将 OTU 按最小样本序列数抽平,用于后续分析。按核糖体数据库项目(Ribosomal database project, RDP)classifier 贝叶斯算法将每个 OTU 代表序列与数据库比对,所使用的物种分类数据库是 silva138/16s-细菌数据库,获得细菌分类学注释。16S rRNA 基因序列的 α 多样性和 β 多样性用 QIIME 软件(version 1.9.1)和 R software(version 2.15.3)进行分析。用稀释曲线、Shannon、ACE、Chao1、Simpson 多样指数来评价 Alpha 多样性,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 进行单因素方差分析(ONE-WAY ANOVA),分析每个阶段 Alpha 多样性指数的显著差异, $P < 0.05$ 表示统计学意义。主坐标分析分析(Principal coordinate analysis, PCoA)和冗余分析(Redundancy Analysis, RDA)用于 β 多样性分析,利用 Spearman 相关分析估算了各物种间和物种与理化因子之间的相关性。

1.3.5 基因功能预测分析 使用 PICRUSt 是针对 16S 扩增子测序结果进行功能预测。京都基因和基因组百科全书(the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database, KEGG)编号由

KEGG Orthology 数据库(<http://www.genome.jp>)提供,以统一所有物种的基因和基因产物属性的表示。通过注释基因功能生成同源组(COG)分类簇。

2 结果与分析

2.1 酸菜发酵过程中理化因子的变化趋势

理化因子是决定酸菜产品品质的重要因素,对酸菜口味,品质的形成至关重要^[9]。图 1a 和 1b 是酸菜发酵过程中 pH 值和可滴定酸的变化情况,发酵开始的 1~7 d,发酵液的 pH 值迅速下降,

从 5.702 下降到 4.04,随后 pH 值随着发酵时间的延长而缓慢下降最后趋于稳定,稳定值在 3.855。此外,总酸含量则随着发酵时间的增加而持续增高,在 22 d 达到稳定,含量为 8.596 g/L。亚硝酸盐含量在第 4 天达到亚高峰,含量高达 23 mg/kg,亚硝酸盐含量在发酵后期稳定在 3 mg/kg 左右,其含量远低于国标规定泡菜中的亚硝酸盐含量为 20 mg/L 的限量标准。酸菜属于腌制食品,还原糖是促进微生物生长繁殖的主要能源物质之一。还原糖的含量先下降后上升又趋于稳定的趋势,到后

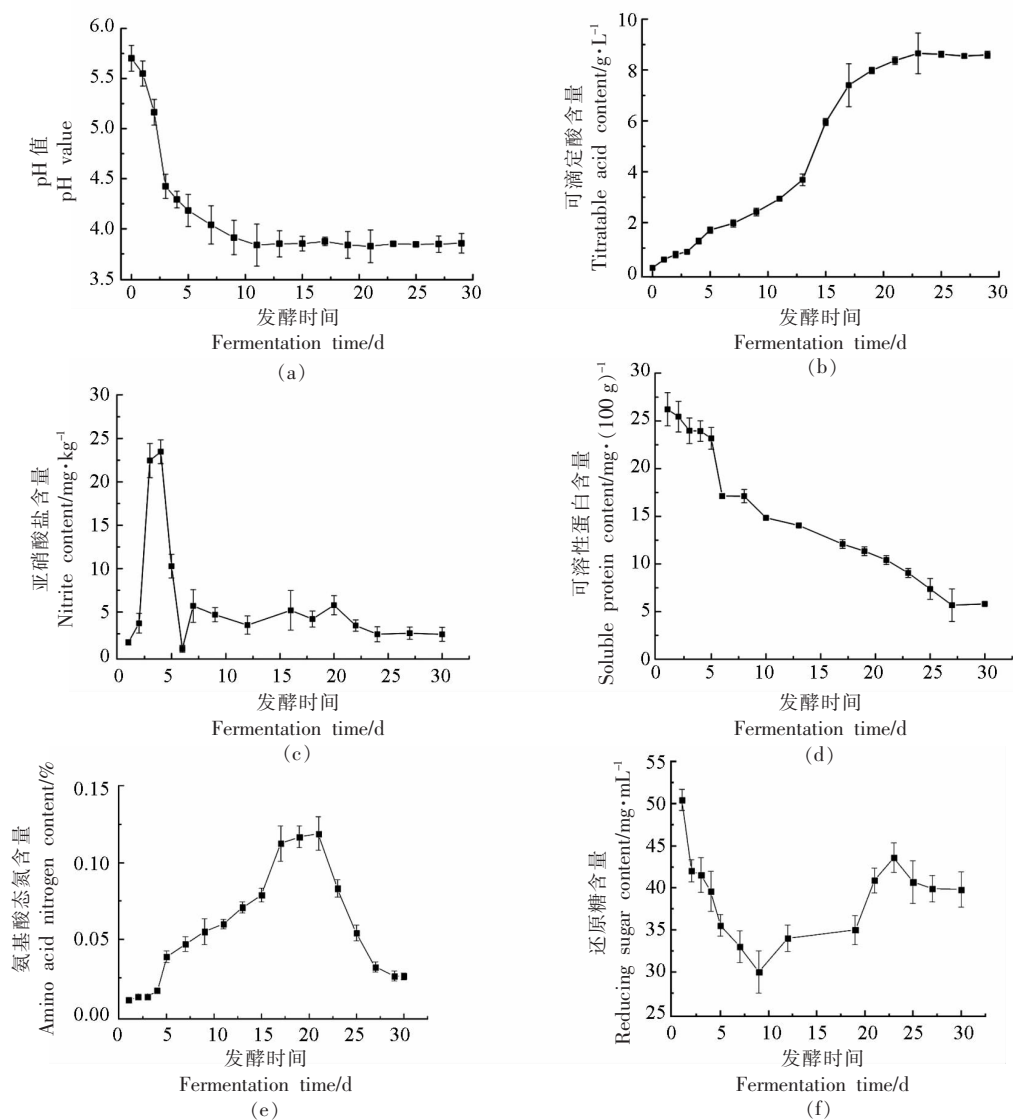


图 1 酸菜发酵过程中 pH 值(a)、可滴定酸含量(b)、亚硝酸盐含量(c)、可溶性蛋白含量(d)、氨基酸态氮含量(e)、还原糖含量(f)的变化趋势

Fig.1 The variation trend of pH value (a), titratable acid content (b), nitrite content (c), soluble protein content (d), amino acid nitrogen content (e) and reducing sugar content (f) during sauerkraut fermentation

期稳定在 39.8 mg/mL。氨基酸态氮是酸菜鲜味的一个重要指标,呈先上升后下降的趋势在第 21 天含量最高为 0.112%。

2.2 Alpha 多样性分析

2.2.1 稀释曲线 稀释曲线 (Rarefaction curve) 表示样品中物种的丰富度和测序数据的合理性^[10],根据曲线是否达到平缓来判断本次测序数据数量是否足够。由图 1 可知,随着测序深度的增加,被检测发现的 OTU 呈先迅速增加,后趋于平稳的趋势,说明本次测序数据合理,测序数据量能够反映样品中细菌微生物信息,测序深度能够覆盖整个酸菜发酵的群落,这也进一步说明高通量测序技术是一种全面解析酸菜微生物群落组成的有效方法。

2.2.2 Alpha 多样性指数分析 在去除低质量、嵌合序列和植物源 16S rRNA 基因序列后,从 9 个样本中获得 337 417 条高质量 16S rDNA 基因序列,平均序列长度 428 bp。3 组酸菜样品的微生物群落的 Alpha 多样性指数分析结果如图表 1 所示。在 S1、S2、S3 之间 Ace 和 Chao1 多样性指数没

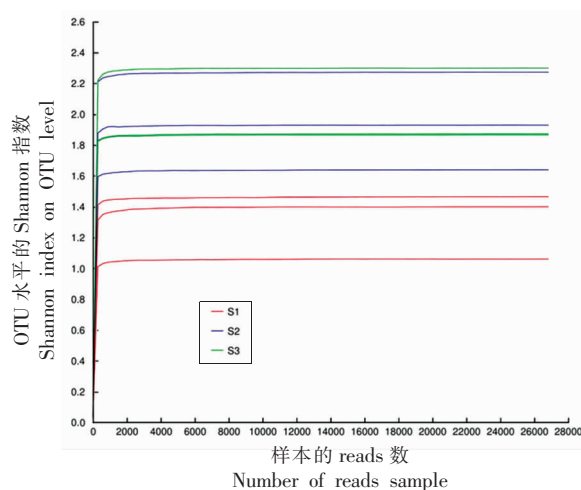


图 2 稀释曲线

Fig.2 Rarefaction curves

有显著性差异,说明在酸菜发酵期间细菌群落的丰度变化不大;而 S1 的 Shannon 指数(1.31)低于 S2(1.95)、S3(2.01)阶段,并具有显著差异($P < 0.05$),Simpson 指数(0.45)高于 S2(0.22)、S3(0.20)阶段,具有极显著差异($P < 0.01$),表明在发酵初期细菌群落的多样性较低。

表 1 Alpha 多样性指数分析
Table 1 Alpha diversity index analysis

	ACE	Chao1	Shannon	Simpson
S1	66.14 ± 6.76	65.00 ± 6.99	1.31 ± 0.22*	0.45 ± 0.10***
S2	66.59 ± 16.29	65.25 ± 15.15	1.95 ± 0.32	0.22 ± 0.03
S3	65.35 ± 18.92	59.05 ± 18.22	2.01 ± 0.25	0.20 ± 0.02

注:*表示具有显著性差异($P < 0.05$),***表示具有极显著差异($P < 0.01$)。

2.2.3 酸菜样品中的细菌群落组成

2.2.3.1 不同样品的细菌群落组成 从 9 个酸菜样品中检测到的细菌种类隶属于 6 个门、9 纲、29 目、47 科、59 属、83 种。在门、科、属水平上分别对 3 组样品的细菌的组成进行了分析。结果显示,在门水平上(图 2a 和 2b),细菌群落结构主要由厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、放线菌门(Actinobacteriota)构成,其中厚壁菌门和变形菌门为主要的优势菌门,在 S1 发酵初期阶段,变形菌门为绝对优势菌门,相对含量达到 84.18%,而厚壁菌门的相对相对丰度只有 10.61%,到了 S2 阶段,变形菌门相对相对丰度减少到 33.19%,厚壁菌门逐渐增加到

64.83%,直到 S3 阶段,厚壁菌门相对丰度进一步增加达到 77.51%,变形菌门相对相对丰度进一步减少到 17.91%。此外,在发酵样品中还含有少量的拟杆菌门(3%)、放线菌门有少量增加的趋势,S1 到 S3 阶段从 1.64%增加到 2.77%。

在科水平上(图 2c 和 2d),乳酸菌科(Lactobacillaceae)和假单胞菌科(Pseudomonadaceae)为主要优势科,在 S1 阶段假单胞杆菌为最优势菌科(65.36%),乳酸菌相对丰度较低(0.21%),此外还含有链球菌科(Streptococcaceae,6.27%)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae,10.33%)、莫拉菌科(Moraxellaceae,4.29%)、微球菌科(Micrococcaceae,1.53%)。在 S2 阶段乳酸菌科(58.06%)为最优势菌科,此外

还含有假单胞杆菌科(21.2%)、链球菌科(4.62%)、肠杆菌科(2.50%)、莫拉菌科(2.56%)、微球菌科(0.08%)。在S3阶段乳酸菌科(67.65%)为最优势菌科,此外还含有假单胞杆菌科(7.10%)、链球菌科(9.33%)、肠杆菌科(2.31%)、莫拉菌科(2.94%)、微球菌科(2.40%)、其它(1.88%)。

在属水平上(图2e和2f),假单胞菌(*Pseudomonas*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)、肠杆菌(*Enter-*

obacteriaceae)、乳球菌(*Lactococcus*)为优势属。在S1阶段,主要含有假单胞菌(65.36%)、肠杆菌(10.33%)、乳球菌(6.27%)、不动杆菌(*Acinetobacter*,4.10%)、希瓦氏菌(*Shewanella*,3.94%)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*,2.85%)、金黄杆菌(*Chryseobacterium*,1.80%),乳杆菌(0.21%)和明串珠菌(*Leuconostoc*,0.20%)。在S2阶段,乳杆菌相对丰度迅速增加(58.06%),假单胞菌相对丰度迅速降

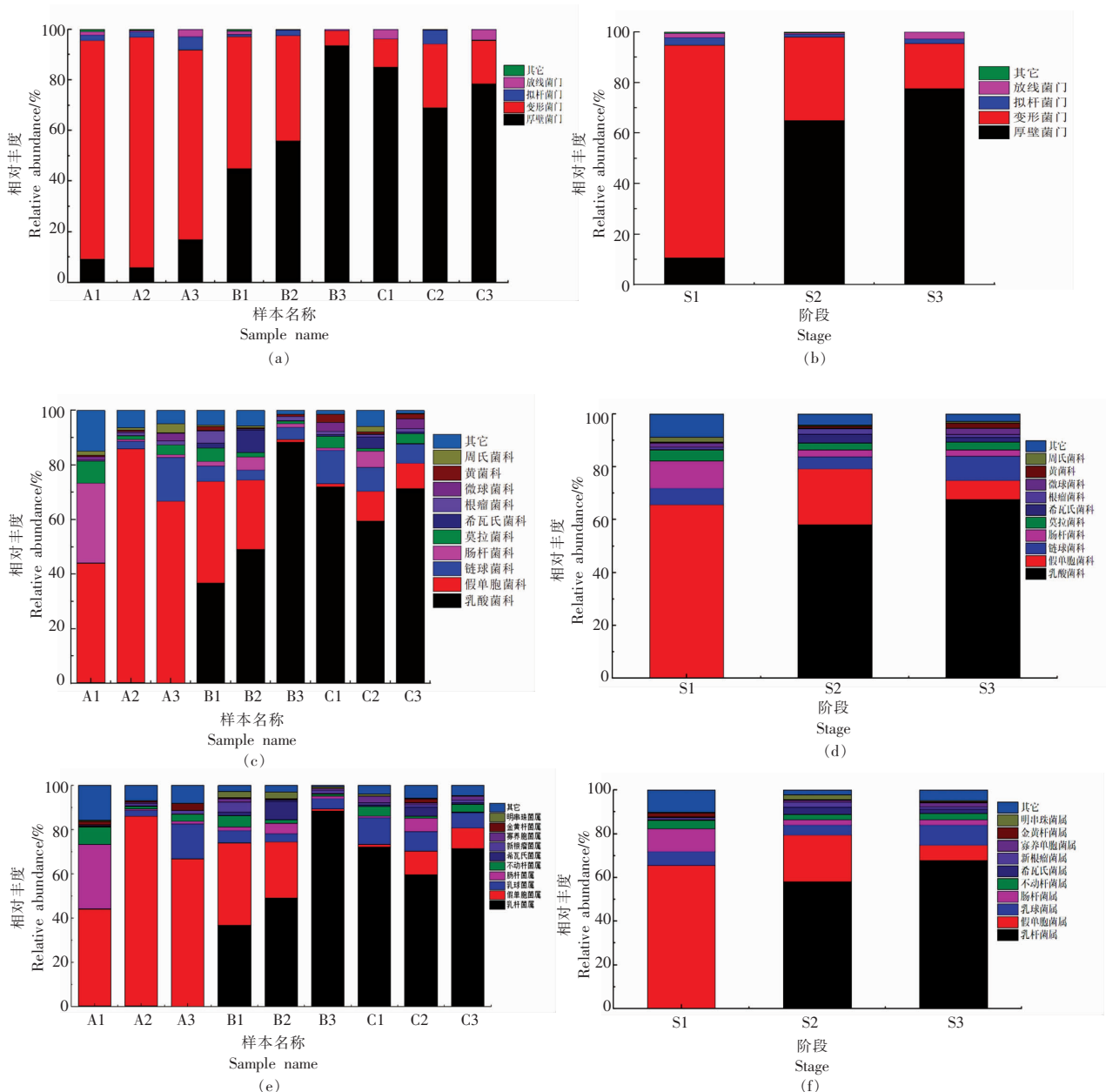


图3 酸菜样品细菌群落在门(a,b)、科(c,d)和属(e,f)水平的相对丰度

Fig.3 Relative abundance of bacteria community in paocai samples at phylum (a, b), family(c, d) and genus (e, f) level

低(21.21%),此外还含有肠杆菌(2.51%)、乳球菌(4.62%)、不动杆菌(2.54%)、希瓦氏菌(3.40%)、明串珠菌(2.08%)、寡养单胞菌(0.81%)和金黄杆菌(0.52%)。在 S3 阶段,乳杆菌相对丰度增加(67.65%),假单胞菌相对丰度迅速降低(7.10%),此外还含有肠杆菌(2.31%)、乳球菌(9.33%)、不动杆菌(2.92%)、希瓦氏菌(1.88%)。

2.2.3.2 不同样品的细菌群落组成比较 三元图展示了 OTU 在 3 个阶段的空间特异性,从图中可以看出倾向于 S1 阶段的 OTU 较多,说明在不同阶段的群落结构不尽相同,结合之前 Alpha 多样性指数,这些结果与微生物多样性有关,也凸显了

在发酵初期阶段酸菜中细菌菌群的复杂性和特殊性。

圈图(Circos)反映了样本和细菌之间的对应关系(图 5),核心丰度较高的 10 个细菌分别是乳杆菌属、假单胞菌属、乳球菌属、肠杆菌属、不动杆菌属、希瓦氏菌属、寡养单胞菌属、金黄杆菌、明串珠菌属。通过圈图可以反映出每组样本中优势物种分布比例,和各优势物种在不同样本中分布比例。从图中可以直观的看出每个样品中的优势微生物,乳杆菌属主要分布在 B1~B3 样品中,且在 B3 样品中分布最多,假单胞菌属主要分布在 A1~A3 中,在 A2 样本中分布最多。

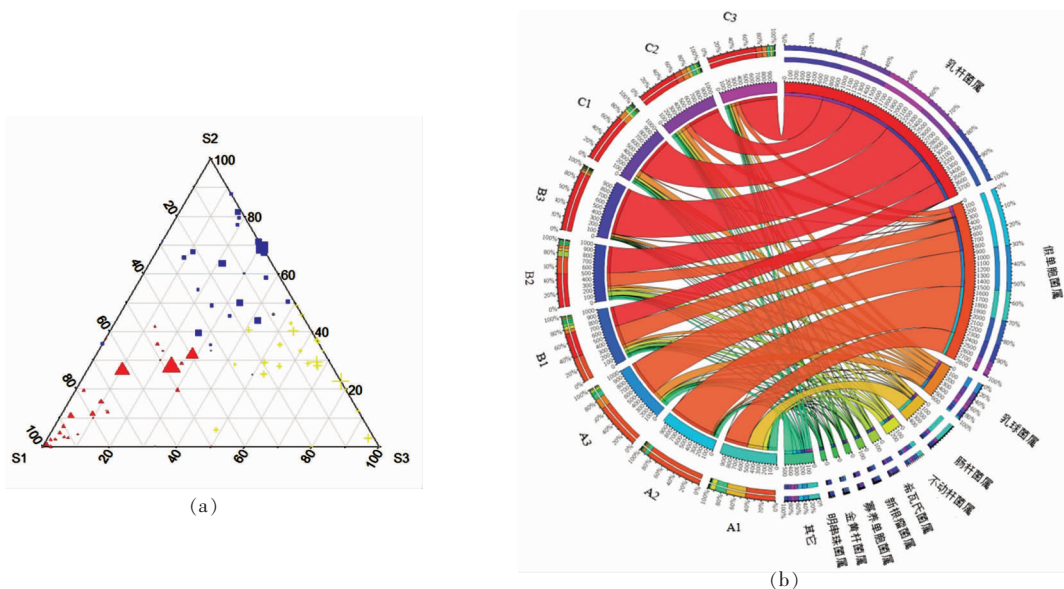


图 4 OTU 在 3 个样本中分布的三元图(a)以及核心微生物与样本之间的圈图(b)

Fig.4 Ternary diagram of OTU distribution in three samples (a) and Circos diagram between core microorganism and sample (b)

3 个时期酸菜样品中前 10 的细菌群落在属水平和种水平上的比较如图 4a 和 4b 所示,可以看到在属水平差别最大的是乳杆菌属和假单胞菌属。乳杆菌属在 S3 阶段相对丰度最高(67.65%),在 S1 阶段几乎没有,而假单胞菌属在 S1 阶段相对丰度最高。同样在种水平上,乳杆菌属主要是植物乳杆菌(*L. plantarum*)和曲度乳杆菌(*L. curvatus*),曲度乳杆菌在 S2 阶段最高(44.13%),而到了 S3 阶段降低到 21.12%。植物乳杆菌在 S3 阶段相对丰度最高(46.51%)。维罗尼假单胞菌(*Pseu-*

domonas_veronii) 在 S1 阶段相对丰度达 59.50%,到了 S3 阶段只有 5.70%。

2.2.3.3 样本的 Beta 多样性及相关性分析 对样品进行 Beta 多样性分析,PCoA 图显示样本之间的差异性,PC1(65.44%)和 PC2(15.43%)共解释了 80.87% 的差异性,发酵前期以 PC1 影响最大,发酵后期以 PC2 影响最大,如图所示在发酵初期 S1 阶段和发酵中期 S2 阶段 3 个样本之间的差异较大,而到了发酵后期 S3 阶段差异变小表明随着发酵时间的延长发酵系统的菌群结构逐渐稳定。

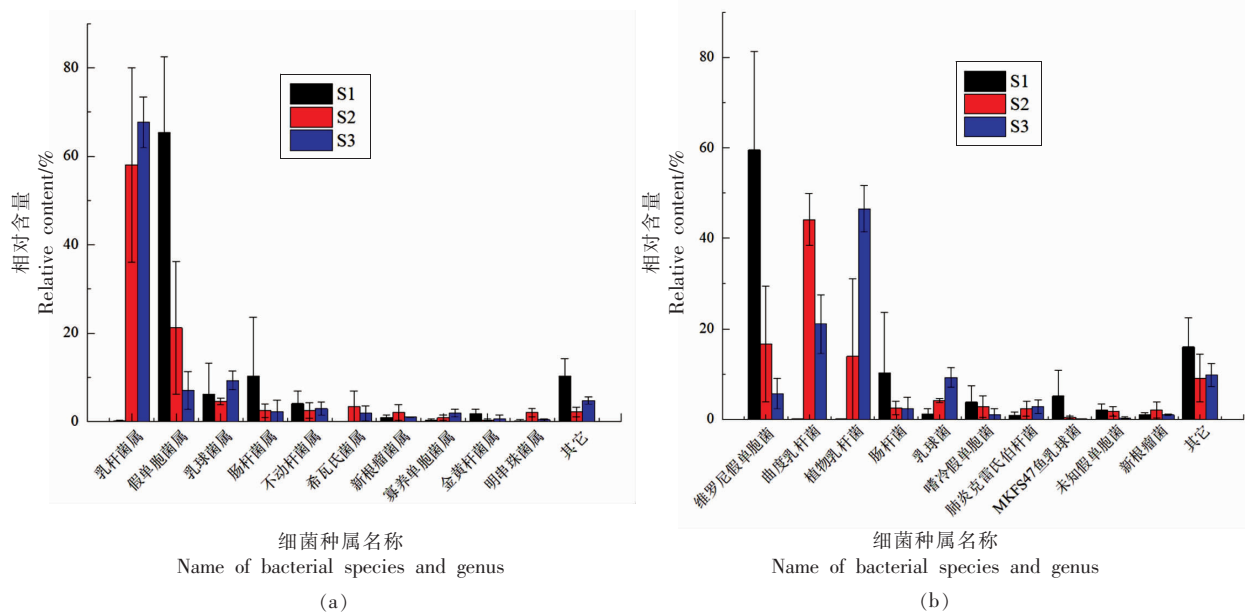


图 5 3 个时期酸菜样品的细菌群落在属水平(a)和种水平(b)的比较

Fig.5 Comparison of bacterial community in three periods of paocai samples groups at genus levels (a) and species levels (b)

自然酸菜发酵过程中理化因子和细菌群落之间的 RDA 分析如图 7 所示,前 2 个成了解释了 67.69%和 17.16%的微生物菌群变异,pH 值、还原糖含量、亚硝酸盐含量与 S1 阶段发酵初期样本菌群呈正相关关系且 pH 值影响较小,S1 阶段样本菌群与可滴定酸呈负相关关系,S3 阶段与之相

反。可溶性蛋白随发酵时间的延长而逐渐降低与发酵后期呈正相关关系,而氨基酸态氮与 S2 阶段样本菌群呈正相关关系,说明氨基酸代谢反应主要发生在发酵中期,这也解释了图 1e 中氨基酸态氮的含量呈先升高后降低的趋势,在发酵中期达到最大。

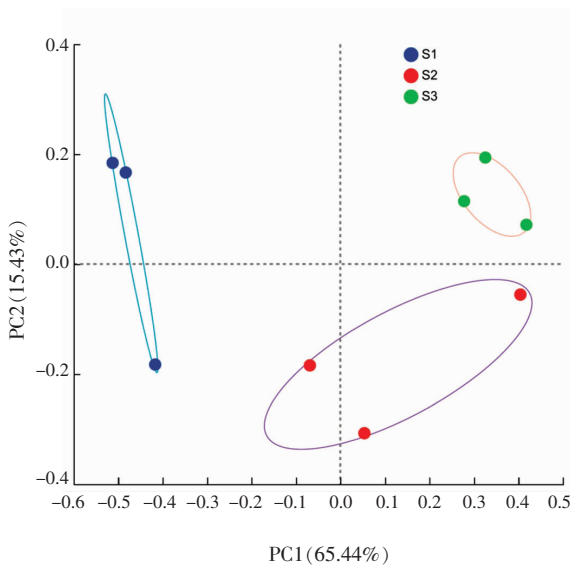
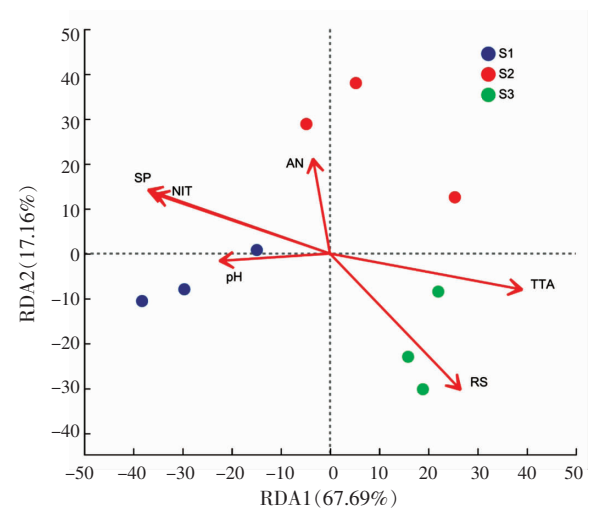


图 6 不同发酵阶段的样本间主坐标分析
Fig.6 Principal coordinate analysis of samples at different fermentation stages



注:TTA. 可滴定酸,NIT. 亚硝酸盐,AN. 氨基酸态氮,SP. 可溶性蛋白,RS. 还原糖。
图 7 酸菜发酵过程中理化因子与细菌菌群之间的 RDA 图
Fig.7 RDA diagram between physical and chemical factors and bacterial flora in paocai fermentation process

进一步分析了在前 18 属之间的相关性,及细菌群落与理化因子的相关性,利用 Pearson 相关系数计算相关性, P 值计算物种之间的差异性,如图 8 所示,假单胞杆菌与乳杆菌属之间存在极显著的负相关关系,相关性为-0.93。乳杆菌属与糖芽胞杆菌属(*Saccharibacillus*)呈显著的负相关关系。

微杆菌属与肠杆菌属和紫色杆菌属呈极显著的正相关关系,此外,寡养单胞菌属与谷氨酸杆菌属呈显著的正相关关系。在自发发酵的生态环境中,发酵环境的变化影响了细菌群落的构成,而细菌的代谢产物如酸等进一步改变了发酵的环境,最终形成一个稳定的群落结构。

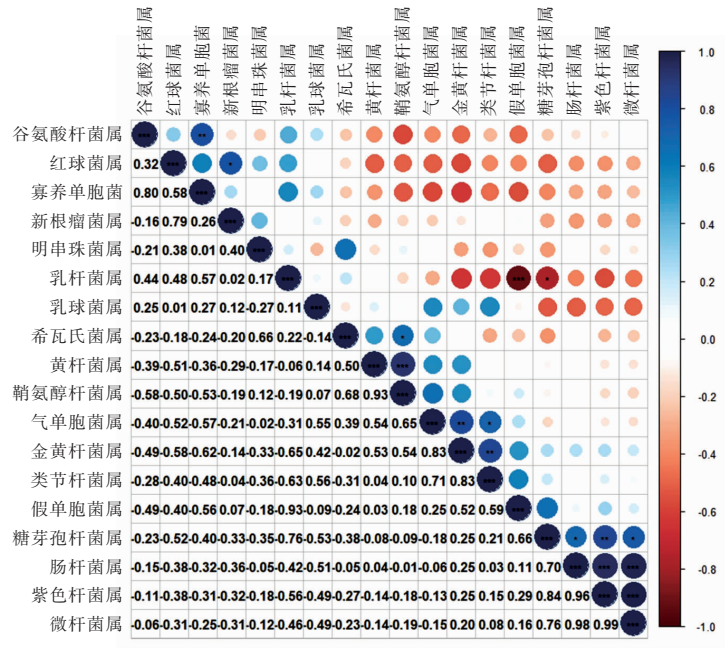
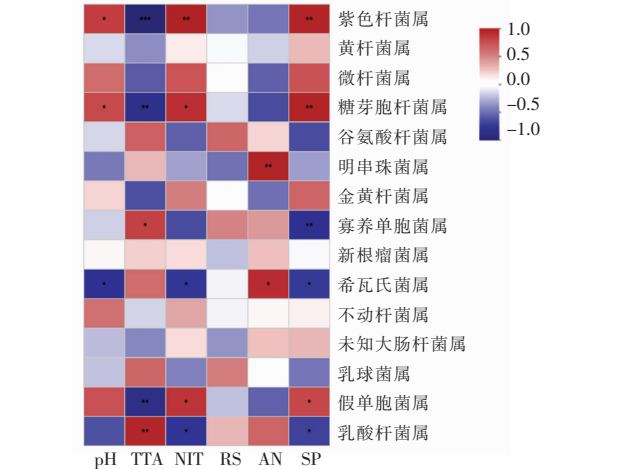


图 8 基于 Pearson 指数的物种之间的相关性

Fig.8 Correlation between species based on the Pearson index

在理化因子与物种之间的相关性如图 9 所示,TTA 与乳酸杆菌属、寡养单胞菌属呈显著正相关关系,与假单胞菌属、糖芽胞杆菌属呈显著负相关关系,与紫色杆菌属呈极显著的负相关关系,而亚硝酸盐 (Nitrite, NIT) 与物种之间的相关性与 TTA 刚好相反,值得注意的是,氨基酸态氮 (Amino nitrogen, AN) 的合成与明串珠菌属和希瓦氏菌属呈显著的正相关关系,可溶性蛋白与乳酸杆菌属、希瓦氏菌属和寡养单胞菌属呈显著负相关关系,与假单胞菌属、紫色杆菌属、糖芽胞杆菌属呈显著正相关关系,进一步说明了乳酸杆菌属与酸菜发酵系统的酸性环境存在正相关的关系,而这种酸性环境会抑制一些有害菌的生长代谢,如假单胞菌属、糖芽胞杆菌属。假单胞菌属与亚硝酸盐的生成呈正相关关系,这也解释了亚硝酸盐含量在



注:*. 具有显著相关性 ($P < 0.05$), **. 具有极显著相关性 ($P < 0.01$).

图 9 基于 Pearson 指数的细菌群落与理化因子之间的相关性

Fig.9 Correlation between bacterial community and physical and chemical factors based on Pearson index

发酵前期会达到最高,到了发酵后期假单胞菌属含量急剧减少,亚硝酸盐含量逐渐降低。然而,乳酸杆菌属、假单胞菌属如何影响发酵系统的可滴定酸和亚硝酸盐含量,还需进一步研究。

2.2.3.4 功能预测和代谢通路分析 进一步对本物种功能进行预测分析,旨在揭示物种如何影响发酵中的环境因子。图 10 对 3 个阶段的样品进行 COG 的功能富集分析,对 COG 的相对丰度分

析表明,不同阶段的样品有非常相似的功能属性,这表明发酵酸菜中相关微生物组的功能组成比分类组成更为保守,氨基酸的转运和代谢、能量产生和转换、碳水化合物的转运和代谢、细胞运动、无机离子运输与代谢是在酸菜发酵过程中起最丰富的功能属性,凸显了这些功能对微生物适应酸菜发酵系统生态位的重要性。

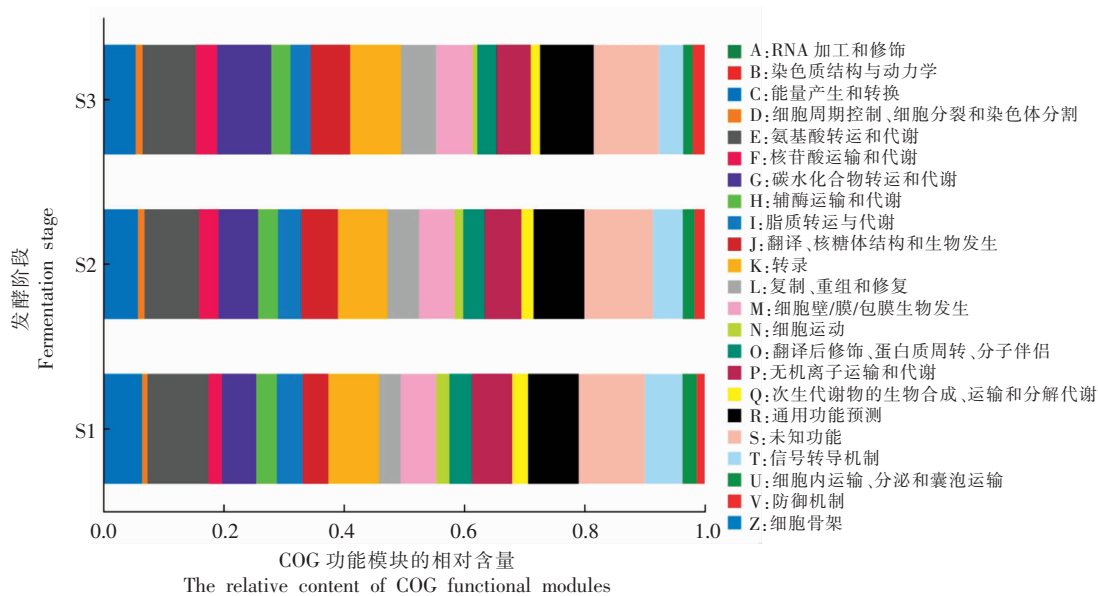
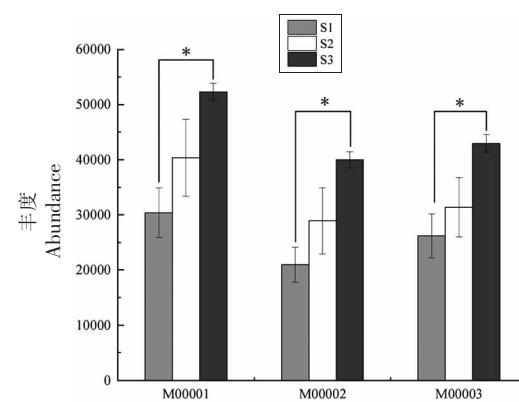


图 10 COG 功能富集分析

Fig.10 Analysis of COG functional enrichment

由于乳酸菌主要参与代谢过程的是糖酵解 (EMP),进一步分析在发酵的 3 个阶段糖酵解代谢通路的差异性,结果如图 11 参与糖酵解的模块 M0001、M0002、M0003 在发酵 S1 阶段和 S3 阶段都存在显著性差异 ($P < 0.05$),糖酵解是在无氧条件下进行的,由细胞中的葡萄糖或糖原分解为丙酮酸,在不同的微生物作用下丙酮酸再生成不同的产物(乙醇或乳酸)。根据主要代谢产物的不同,将微生物通过 EMP 途径发酵分为 6 种类型:同型乳酸发酵(乳酸菌)、乙醇发酵、混合酸发酵(大肠杆菌)、丙酸发酵(丙酸菌)、丙酮-丁醇发酵、丁酸型发酵。本研究结果揭示酸菜发酵过程的主要类型是乙醇发酵以及同型乳酸发酵。糖酵解的代谢途径如图 12 所示,从糖原开始活化阶段、氧化产能阶段、同型乳酸发酵、酒精生成阶段。参与活化



注:*表示具有显著性差异 ($P < 0.05$),M0001 是磷酸化糖分解模块,M0002 是乳酸发酵模块,M0003 是糖酵解模块。

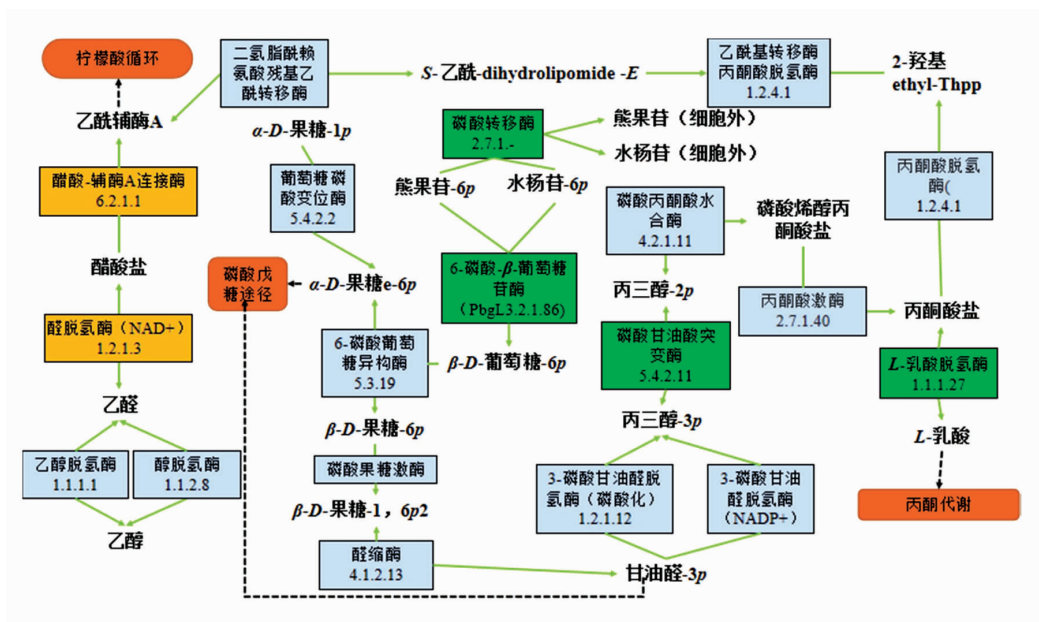
图 11 糖酵解核心模块在不同发酵阶段的差异性

Fig.11 The difference of glycolysis core modules in different fermentation stages

阶段的酶有葡萄糖磷酸变位酶、6-磷酸葡萄糖在异构酶、醛缩酶，参与氧化产能阶段主要的酶有 3-甘油醛脱氢酶（磷酸化）和 3-甘油醛脱氢酶（NADP+），磷酸甘油酸突变酶、磷酸丙酮酸水合酶、丙酮酸激酶，参与同型乳酸发酵阶段的酶主要是乳酸脱氢酶，参与酒精生成阶段的酶主要是丙酮酸脱酸酶、醇脱氢酶（ADH）和乙醛脱氢酶（ALDH）、醋酸-CoA 连接酶。乙酰辅酶 A 进一步

参与柠檬酸循环。

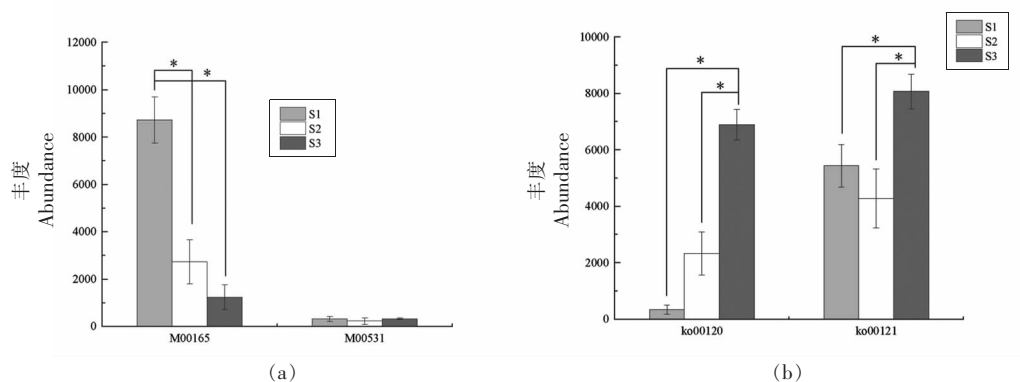
在 S1、S2、S3 阶段中，差异大的酶是 L-乳酸脱氢酶(1.1.1.27)、β-葡萄糖苷酶(3.2.1.86)、磷酸甘油酸突变酶(5.4.2.11)、醋酸-辅酶 A 连接酶(6.2.1.1)、醛脱氢酶(NAD+)(1.2.1.3)，经发现 L-乳酸脱氢酶主要存在于厚壁菌门，乳球菌属中 22 个种全部含有这种酶，如链球菌、乳酸菌、魏氏菌、肠球菌、明串珠菌属，β-葡萄糖苷酶主要存在于后期



注：绿色表示在 S3 阶段的酶丰度高于 S1 阶段，黄色表示 S1 阶段酶丰度高于 S3 阶段。

图 12 糖酵解代谢在酸菜发酵不同阶段的比较及代谢通路图

Fig.12 Comparison of glycolysis metabolism at different stages of paocai fermentation and metabolic pathway diagram



注：* 表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)，其中 M00165 表示硝酸盐同化作用，M00531 表示硝酸盐还原，Ko00120 表示初级胆汁酸生物合成，Ko00121 表示二次胆汁酸生物合成。

图 13 不同发酵阶段在亚硝酸盐还原和胆汁酸生物合成通路的差异性

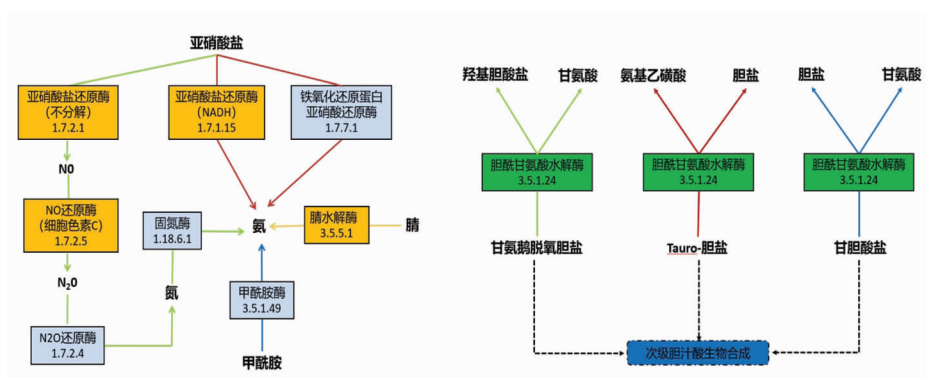
Fig.13 Differences in nitrite reduction and bile acid biosynthesis pathways at different fermentation stages

的乳酸杆菌属和乳球菌属中,磷酸甘油酸突变酶(5.4.2.11)存在于埃希氏菌,肠杆菌,大肠杆菌,埃尔文菌,厚壁菌门的葡萄球菌属、微杆菌属、乳球菌、魏斯氏菌属链球菌、乳杆菌属、肠球菌。这也解释了这3种酶在发酵后期的丰度高于S1、S2阶段,而醋酸-辅酶A连接酶(6.2.1.1)主要存在于变形菌门,醛脱氢酶(NAD⁺)(1.2.1.3)主要存在于假单胞菌属等。这2种酶在乳酸菌中都不存在,这也解释了这2种酶的丰度在发酵前期丰度高于S2、S3阶段,也就说酒精生成阶段主要发生在发酵前期,同型乳酸发酵主要在发酵后期,这与前人的研究结果相同^[4],解释了发酵过程的机制。

如图13和14所示,在S1发酵阶段,M00165(硝酸盐同化作用)显著高于S2($P=0.014$),极显著高于S3阶段($P=0.005$)。M00531(硝酸盐还原)在不同阶段没有显著性差异。大多数微生物吸收的氮素主要是硝酸盐(NO₃⁻),在参与合成体内含氮有机化合物之前,先还原成氨,这个过程称为硝酸盐还原。硝酸盐的还原可分成2大步:硝酸盐还原成亚硝酸盐和亚硝酸盐还原成氨。在本次研究酸菜发酵过程在主要的氮代谢通路中,参与氮代谢的酶主要有甲酰胺酶(3.5.1.49)、亚硝酸盐还原酶NADH(1.7.1.15)、亚硝酸盐还原酶(1.7.2.1)、胍水解酶(3.5.5.1)、铁氧化还原蛋白亚硝酸还原酶(1.7.7.1)、氧化氮还原酶(细胞色素C,1.7.2.5),参与代谢的主要路径如图14所示。硝酸盐还原成氨的过程主要有4条路径:1)甲酰胺通过甲酰胺酶还原成氨,2)胍类通过胍水解酶生成氨,3)亚硝

酸盐通过亚硝酸盐还原酶和铁氧化还原蛋白亚硝酸还原酶生成氨,4)亚硝酸盐通过亚硝酸盐还原酶还原成一氧化氮,最后经固氮酶生成氨。在这4条路径中,路径3)为主要路径,且亚硝酸盐还原酶丰度最高。其中亚硝酸盐还原酶(1.7.2.1)广泛存在于大多数的假单胞菌属,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、希瓦氏菌属。一氧化氮还原酶(细胞色素C)(1.7.2.5)主要存在于放线杆菌属,胍水解酶(3.5.5.1)主要存在于假单胞菌属,但是在铜绿假单胞菌中没有。

另一个有趣的发现是初级胆汁酸生物合成(Ko00120)和二次胆汁酸生物合成(Ko00121)这2条代谢通路S3阶段的丰度高于S1和S2阶段,胆酰甘氨酸水解酶(Choloylglycine hydrolase,3.5.1.24)丰度也是S1阶段高于S2、S3阶段。胆盐水解酶(Bile salt hydrolase, BSH)介导结合型胆汁酸(Conjugated bile acid, CBA)转化为非结合型胆汁酸(Unconjugated bile acid, UCBA)和甘氨酸或牛磺酸,是肠道微生物介导初级胆汁酸转化为次级胆汁酸的关键步骤。在酸菜发酵中胆汁酸的代谢途径主要是胆酰甘氨酸水解酶参与初级胆汁酸生物合成如图所示,主要有3条路径:1)甘氨酸脱氧胆盐经胆酰甘氨酸水解酶水解为羟基胆酸盐和甘氨酸,2)Tauro-胆盐经胆酰甘氨酸水解酶水解为氨基乙磺酸和胆盐,3)甘胆酸盐经胆酰甘氨酸水解酶为胆盐和甘氨酸。胆酰甘氨酸水解酶(3.5.1.24)主要存在于植物乳杆菌和肠球菌中,表达微生物主要属于厚壁菌门,这也间接说明了植



注:绿色表示在S3阶段的酶丰度高于S1阶段,黄色表示S1阶段酶丰度高于S3阶段。

图14 亚硝酸盐还原和初级胆汁酸生物合成代谢路径

Fig.14 Nitrite reduction and primary pyruvate metabolic pathways

物乳杆菌具有良好的胆盐水解酶活性,植物乳杆菌倾向于水解甘氨酸结合型脱氧胆酸,这与前人的研究结果一致^[12]。胆汁酸作为一种多功能信号分子,通过调节多种信号过程,不仅调节自身的合成和循环,还调节甘油三酯、胆固醇、葡萄糖和能量稳态^[13]。这也表明了酸菜作为一种益生菌发酵产品具有潜在的应用价值。

3 结论与讨论

高通量测序结果显示,在自然酸菜发酵过程中,发酵初期变形菌门的假单胞菌为主要优势菌属,假单胞菌属多在新鲜蔬菜中生存,且此类菌属的生存能力较强,能够适应广泛的生存环境且早已在泡菜发酵中被检测到,且被认为是在早期发酵过程中的主要菌群之一^[14]。到了发酵后期厚壁菌门的乳杆菌属为主要优势菌属,变形菌门和厚壁菌门之间的演替在 S1~S2 阶段逐渐发生,这与前人的研究结论相同^[15]。厚壁菌门广泛的厚壁菌门属,如乳杆菌属、乳球菌属、明串珠菌属,这些已知菌属能够影响发酵食品的风味与成熟时间^[16]。乳酸菌、明串珠菌属的代谢有助于风味的形成,与泡菜的风味密切相关^[14]。乳酸菌(植物乳杆菌,曲度乳杆菌)逐渐在自然发酵酸菜样本中成为优势菌,且曲度乳杆菌是发酵中期的主要乳酸菌,发酵后期的主要乳酸菌变成植物乳杆菌。植物乳杆菌到发酵后期大量增加,说明植物乳杆菌在发酵后期起主导作用。植物乳杆菌是一种存在于多种环境生态位的乳酸菌,存在于许多发酵蔬菜或植物产品,此前已有研究表明,植物乳杆菌菌株具有潜在的益生菌特性,具有促进健康的作用,如预防肠道感染,调节宿主免疫反应、降低血清胆固醇水平等^[17]。因此,植物乳杆菌一直被筛选为发酵剂。曲度乳杆菌是发酵蔬菜中的常见物种^[18],丛敏等^[19]也在自然发酵酸菜中发现曲度乳杆菌的存在,且在乳酸菌中,只有异型发酵乳酸菌能将果糖转化为甘露醇,包括曲度乳杆菌和柠檬明串珠局^[20]。

为探究自然发酵酸菜在不同阶段的微生物群落结构的变化原因,根据 RDA 分析发现 S1 阶段样本菌群与 TTA 呈负相关关系,S3 阶段样本菌群与 TTA 呈正相关关系,pH 值与之相反。对理化因子与细菌群落的相关性分析表明可滴定酸与乳杆

菌属呈显著正相关关系,与假单胞菌属呈显著负相关关系,亚硝酸盐与之相反。假单胞菌与乳杆菌之间存在极显著的负相关关系。之前有研究表明乳酸菌属与芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、大肠杆菌属和假单胞菌属之间存在显著的负相关关系^[20]。结合酸菜发酵过程中的糖酵解、氮代谢途径发现,在腌制初期,酸菜及发酵器具上携带的肠杆菌属,假单胞菌属等革兰氏阴性菌会分泌硝酸还原酶,将酸菜中的大量硝酸盐还原为亚硝酸盐,导致发酵前期的亚硝酸盐含量升高,而到了发酵后期乳酸菌会通过乳酸发酵创造无氧酸性环境,抑制假单胞菌、肠杆菌等生长繁殖,降低了假单胞菌的丰度,酸性环境会导致 pH 值下降,有研究表明,pH 值直接影响细菌的丰度和硝化速率^[21],这可促进部分乳酸菌的繁殖抑制假单胞菌的生长,从而进一步导致了总酸含量持续增加,亚硝酸盐含量持续降低。此外,植物乳杆菌等均表达多种 BSH 基因,乳酸菌具有胆盐耐受力^[22],大部分细菌都不耐胆盐,这也进一步说明了到了后期乳酸菌数量增加变形菌门数量减少的原因。TTA 和亚硝酸盐对菌群的影响最大,是引起群落结构变化的主要驱动因子,酸化环境与微生物群落结构的组装密切相关。

可溶性蛋白随发酵时间的延长而逐渐降低与发酵后期呈正相关关系;还原糖也与发酵后期 S3 阶段样本菌群呈正相关关系;可溶性蛋白含量与乳杆菌属、寡养单胞菌属呈显著负相关关系与假单胞菌属呈显著正相关关系;乳糖转化为乳酸后,发酵过程中发生蛋白质消化率提高、脂肪酸释放、生物活性化合物产生等生化变化,使发酵制品的营养和品质得到改善,这也使可溶性蛋白的含量不断降低。发酵后期微生物会将还原糖转化为酸、醇和酯等风味物质,还原糖作为能源物质被消耗,还原糖含量下降。氨基酸态氮与 S2 阶段样本菌群呈正相关关系,氨基酸态氮的合成与明串珠菌属呈显著的正相关关系,说明氨基酸代谢反应主要发生在发酵中期,研究表明乳酸杆菌,乳球菌和肠杆菌与发酵泡菜中的游离氨基酸 (Free amino acid, FAAs) 相关关系^[23]。FAAs 是在食品发酵过程中,通过乳酸菌蛋白酶对原料进行初级蛋白水解产生的,是酸菜中发酵风味的主要贡献者。

揭示微生物的种类和它们在特定的生态系统中的作用是微生物生态学的主要目标之一。本研究为了解中国发酵酸菜中的微生物提供了深刻见解,并有助于对酸菜发酵生产的研究。下一步还需探讨优势种乳酸菌的作用及其对发酵蔬菜风味和感官体验的影响,进一步研究酸菜成分对酸菜发酵的影响,以及微生物群落、代谢物与感官特征之间的关系。此外,在发酵过程中应控制潜在的致病菌,这些研究为优质酸菜的生产标准化和工业化提供有用的指南。

参 考 文 献

- [1] DI CAGNO R, CODA R, DE ANGELIS M, et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation[J]. *Food Microbiol*, 2013, 33(1): 1-10.
- [2] LEE J S, HEO G Y, LEE J W, et al. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 102(2): 143-150.
- [3] PARK J M, LEE W H, SEO H, et al. Fecal microbiota changes with fermented kimchi intake regulated either formation or advancement of colon adenoma[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2021, 68(2): 139-148.
- [4] 覃凤阳, 闫鸣霄, 吴正云, 等. 不同工厂泡青菜发酵过程中理化指标及细菌群落多样性的变化[J]. *食品科技*, 2021, 46(8): 27-32.
QIN F Y, YAN M X, WU Z Y, et al. Changes of physicochemical indexes and bacterial community diversity in fermented cabbage from different factories [J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(8): 27-32.
- [5] 鲁梅, 宋从从, 石桂珍, 等. 赤水晒醋醋酸发酵过程原核微生物群落及理化因子相关性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(10): 219-225.
LU M, SONG C C, SHI G Z, et al. Prokaryotic microbial community and correlation analysis of physical and chemical factors during acetic acid fermentation [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(10): 219-225.
- [6] 张倩, 韩保林, 李子健, 等. 浓香型白酒包包曲微生物种群多样性及形成机制[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(18): 99-106.
- [7] ZHANG Q, HAN B L, LI Z J, et al. Microbial population diversity and formation mechanism of Luzhou-flavor liquor Baqu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(18): 99-106.
- [7] 苏鹏伟, 罗瑾, 狄亚鹏, 等. 牛粪堆肥中细菌群落结构变化及与理化因子的相关性[J]. *山西农业科学*, 2021, 49(11): 1317-1323.
SU P W, LUO J, DI Y P, et al. Changes of bacterial community structure and its correlation with physical and chemical factors in cow manure composting [J]. *Shanxi Agricultural Sciences*, 2021, 49(11): 1317-1323.
- [8] 杨希. 盐浓度对蚕豆酱发酵过程中原核微生物多样性及理化因子的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(4): 200-206.
YANG X. Effects of salt concentration on prokaryotic microbial diversity and physicochemical factors during Fava bean sauce fermentation [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(4): 200-206.
- [9] 杨希, 武爱群. 酸菜发酵过程中理化因子及原核微生物群落结构差异分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(22): 245-251.
YANG X, WU A Q. Analysis of chemical factors and prokaryotic microbial community structure in sauerkraut fermentation [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(22): 245-251.
- [10] SUN Z H, LIU W J, BAO Q H, et al. Investigation of bacterial and fungal diversity in tarag using high-throughput sequencing[J]. *J Dairy Sci*, 2014, 97(10): 6085-6096.
- [11] WECKX S, ALLEMEERSCH J, VAN DER MEULEN R, et al. Metatranscriptome analysis for insight into whole-ecosystem gene expression during spontaneous wheat and spelt sourdough fermentations [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(2): 618-626.
- [12] DE SMET I, VAN HOORDE L, VANDE WOESTYNE M, et al. Significance of bile salt hydrolytic activities of *Lactobacilli*[J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79: 292-301.
- [13] 王朋, 陈倩倩, 方正锋, 等. 肠道微生物代谢产物胆盐水解酶的生物学功能及其抑制剂研究进展[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(3): 1388-1397.
WANG P, CHEN Q Q, FANG Z F, et al. Research progress on biological function and inhibitors

- of intestinal microbial metabolite biliary saline hydrolyase[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(3): 1388–1397.
- [14] JUNG J Y, LEE S H, JIN H M, et al. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation[J]. Int J Food Microbiol, 2013, 163(2/3): 171–179.
- [15] 武俊瑞. 东北传统发酵特色食品中主要微生物多样性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013.
- WU J R. Study on microbial diversity of traditional fermented food in Northeast China [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2013.
- [16] LIU W, ZHENG Y, KWOK L Y, et al. High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia[J]. BMC Microbiol, 2015, 15: 45.
- [17] YU Z, ZHANG X, LI S, et al. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29(3): 489–498.
- [18] JEONG S H, LEE H J, JUNG J Y, et al. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation[J]. Int J Food Microbiol, 2013, 160(3): 252–259.
- [19] 丛敏, 李欣蔚, 武俊瑞, 等. PCR-DGGE 分析东北传统发酵酸菜中乳酸菌多样性[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 78–82.
- CONG M, LI X W, WU J R, et al. Analysis of lactic acid bacteria diversity in traditional fermented pickles from Northeast China by PCR-DGGE[J]. Food Science, 2016, 37(7): 78–82.
- [20] MENEZES L A A, SARDARO M L S, DUARTE R T D, et al. Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil[J]. Food Microbiol, 2020, 85: 103302.
- [21] XIAO H, SCHAEFER D A, YANG X. pH drives ammonia oxidizing bacteria rather than archaea thereby stimulate nitrification under *Ageratina adenophora* colonization[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2017, 114: 12–19.
- [22] 孙熙洽, 崔承弼, 齐仕博, 等. 低盐泡菜中耐酸性乳酸菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. 食品与机械, 2022(1): 24–31.
- SUN X H, CUI C B, QI S B, et al. Screening, identification and characterization of acid resistant *Lactobacillus* in low-salt pickles[J]. Food and Machinery, 2022(1): 24–31.
- [23] RAO Y, QIAN Y, TAO Y F, et al. Characterization of the microbial communities and their correlations with chemical profiles in assorted vegetable Sichuan pickles[J]. Food Control, 2020, 113: 107174.

The Changes and Driving Mechanism of Bacterial Community Structure during Paocai Fermentation

Jia Jingjing, Zhao Huwei, Yan Pingmei*

(Department of Biology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030012, Shanxi)

Abstract The standardization of paocai quality depends on the microbial community structure in the fermentation process. In this study, high-throughput sequencing technology was used to study the dynamic changes of bacterial community structure composition, detect the dynamic changes of physical and chemical factors, reveal the correlation between them, and carry out functional prediction and metabolic pathway analysis. The results showed that: Simpson index in S1 stage was significantly higher than that in S2 and S3 stage, while Shannon index was significantly lower than that in S2 and S3 stage ($P < 0.05$), indicating that the diversity of bacterial community was low in the early fermentation stage. The bacterial species detected from 9 samples of paocai belong to 6 phylum, 9 classes, 29 orders, 47 families, 59 genera, 83 species. Firmicutes and Proteobacteria were the dominant phyla in paocai fermentation. The dominant genera were *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* and *Lactococcus*. The relative abundance of Firmicutes was 10.61%, 64.83% and 77.51% at the beginning, middle and end of fermentation respectively, while Proteobacteria decreased from 84.18% to 17.91%, and *Pseudomonas* decreased from 33.19% at the beginning of fermentation. The relative abundance of

Lactobacillus increased rapidly from less than 1% to 67.65% in the end fermentation period. *L. curvatus* was the main *Lactobacillus* in the middle fermentation period, *L. plantarum* was the main *Lactobacillus* in the late fermentation period. Correlation analysis and Redundancy analysis showed that titratable acid and nitrite were the main driving factors of bacterial community structure change, and had the greatest influence on bacterial community composition. Nitrite was positively correlated with the community at the early fermentation stage, amino acid ammonia mainly affected the community at the middle fermentation stage, soluble protein and TTA had a greater impact on the community structure at the late fermentation stage. Titratable acids were significantly positively correlated with *Lactobacillus* and negatively correlated with *Pseudomonas*. The acidic environment created by lactic acid bacteria through lactic acid fermentation could significantly inhibit the growth of *Pseudomonas* and other harmful microorganisms. In this study, the community composition and differences of naturally fermented paocai in different stages were elucidated, and the driving factors affecting its composition were explained, which provided help for the production of paocai.

Keywords paocai; bacterial community structure; physical and chemical factors; function prediction; high-throughput sequencing