

产气变质食醋中微生物组和优势微生物耐酸基因分析

赵奎, 周力, 王兴洁, 李建龙, 赵宁, 刘书亮*

(四川农业大学食品学院 四川雅安 625014)

摘要 食醋产气变质问题严重困扰生产企业,造成一定的经济损失。本研究对产气食醋中微生物进行分离鉴定,同时结合宏基因组测序技术揭示引起产气变质食醋的主要微生物及其耐酸基因。从产气食醋中分离得到 23 株细菌,16S rDNA 鉴定结果均为金山醋酸乳杆菌。宏基因组测序注释到微生物分别属于 24 个门、42 个纲、94 个目、149 个科、233 个属、450 个种,其中金山醋酸乳杆菌在属、种水平相对丰度均大于 98%,结合培养基平板分离鉴定结果表明该菌为产气变质食醋优势菌。在 Egg-NOG 数据库中注释到 2 176 个 COG 功能单元,在 KEGG 数据库中注释到 46 个 KEGG 通路,在 CAZy 数据库中注释到 81 个碳水化合物活性酶。通过 CARD 数据库及 VFDB 毒力因子数据注释可知,金山醋酸乳杆菌是 1 株不产毒素的安全菌株。结合测序结果和数据库分析共筛选出 13 个疑似金山醋酸乳杆菌耐酸基因,涉及氨基酸代谢(*pata*、*metE*、*lysC* 等)、细胞膜脂肪酸组成(*fadB*、*fadA*、*fadI*)、H⁺-ATPase(*capB*)和双组分系统(*luxS*)。研究结果为阐明产气变质食醋微生物组及其防控提供了理论依据。

关键词 食醋; 产气; 宏基因组学; 金山醋酸乳杆菌; 耐酸基因

文章编号 1009-7848(2025)02-0399-12 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.035

食醋在后工序、陈酿、运输、销售过程中可能因残留或二次污染微生物而导致食醋发生产气(胀气)、发黏等变质现象。食醋生产企业陈酿大罐贮存过程中发生产气,或预包装食醋产品出现产气,甚至胀壶或暴瓶现象,影响食醋品质以及增加二次加热及去除沉淀等生产成本。这不仅对食醋行业造成一定经济损失,还带来一系列的食品安全问题。张怀敏等^[1]采用传统培养法从产气老陈醋中分离得到 1 株产气微生物,结合生理生化指标鉴定,该菌为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。栾春光等^[2]采用高通量测序结合实时定量 PCR 检测技术对胀壶食醋微生物进行鉴定,结果表明造成食醋胀壶的主要微生物为芽孢杆菌。

乳酸菌可以通过氨基酸代谢、脲酶体系、柠檬酸盐代谢等来维持胞内 pH 值的稳定,从而提高耐酸能力。张彦位等^[3]通过添加外源天冬氨酸使得干酪乳杆菌(*Lactococcus casei*)在 pH=3.6 条件下存活率提高 11.11 倍,胞内 ATP 含量提高 42 倍。Zhang 等^[4]通过添加外源谷胱甘肽使乳酸乳球菌

(*Lactococcus lactis*)SK11 在 pH=4.0 中存活率提高了 15.9 倍。食醋中氨基酸含量可达 3 311.5 mg/dL^[5],而氨基酸代谢能有效提高乳酸菌的耐酸性,这导致除芽孢杆菌外,乳酸菌使食醋变质成为可能。Entani 等^[6]首次从日本变质的谷物醋中分离鉴定出耐酸乳酸菌(*Lactobacillus acetotolerans*),该菌生长缓慢,能引起谷物醋浑浊变质。Wang 等^[7]从产气变质食醋中分离得到金山醋酸乳杆菌(*Acetilactobacillus jinshanensise*)的一个亚种 Z-1(*Acetilactobacillus jinshanensis* subsp. *aerogenes*),研究表明该亚种在食醋中有产气能力。

宏基因组测序可以系统展示某一体系全部微生物 DNA 信息,能够将物种注释到种乃至菌株水平,并可对该微生物种群进行功能及代谢通路分析,为研究该体系基因功能提供有效的方法^[8]。刘爱平等^[9]基于宏基因组测序分析四川麸醋醋醅中微生物组成,为揭示风味形成机制奠定了基础。Wu 等^[10]采用宏基因组测序揭示了镇江香醋的微生物组成及其功能。目前未见运用宏基因组测序解析产气变质食醋微生物组的相关研究。本研究以产气食醋为研究对象,采用传统分离培养法结合宏基因组技术分析其微生物组成和代谢功能,研究了优势微生物可能存在的耐酸基因,为产气变质食醋中微生物的深入研究及其防控提供理

收稿日期: 2024-02-07

基金项目: 四川省科技厅项目(2023ZHCG0081)

第一作者: 赵奎,男,硕士生

通信作者: 刘书亮 E-mail: lsliang999@163.com

论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 产气食醋 采集经热灭菌进入陈酿大罐中的 6 g/100 mL 食醋样品,由取样阀无菌取出,装于无菌塑料瓶中,每瓶 500 mL,共 3 瓶,放置于 37 °C 恒温培养出现产气,编号 YJC;在 YJC 出现产气后,再从该陈酿大罐中无菌取样 3 瓶,每瓶 500 mL,37 °C 培养 2~3 d,待装有醋液的塑料瓶发生产气现象,说明大罐醋液出现产气变质,编号 CD,食醋样品来源于四川某麸醋厂。

传代产气食醋样品:将总酸 6 g/100 mL 醋液与水以体积比 2:1 混合,添加质量浓度 10 g/L 葡萄糖,121 °C 灭菌 15 min,制备成总酸 4 g/100 mL 的醋液。再将 CD 醋样按 10% 接种量接于总酸 4 g/100 mL 的醋液中,37 °C 培养 7~10 d,待发生产气现象后编号为 YJCD,重复 3 次。

1.1.2 试剂 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒,MP Biomedicals 公司;PCA 培养基、MRS 培养基、醋酸菌培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;改良 MRS 培养基,由四川农业大学食品学院研发^[7]。

1.1.3 仪器与设备 LDZF-75L-1 高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Stratos16R 多功能高速冷冻离心机,Thermo Electron Corporation;LRH-150F 生化培养箱,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;SW-CJ-1F 超净工作台,杭州川一实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 产气食醋微生物分离鉴定 将 YJC、YJCD、CD 产气食醋样品,用无菌生理盐水进行梯度稀释,取 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的样品 1 mL 于无菌培养皿,分别倾注 PCA 培养基、MRS 培养基、醋酸菌培养基、改良 MRS 培养基置于 37 °C 下进行厌氧和好氧培养,每个稀释梯度做 3 个平行。将分离得到菌落经平板划线 2~3 次进行纯化。将分离得到的菌株接种于装有杜氏小管的 5 mL 总酸 4 g/100 mL 的醋液中观察是否导致食醋出现产气变质^[11],将导致食醋产气的菌株送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rDNA 测序。

1.2.2 DNA 的提取及送样测序 将各组产气食醋样品离心(8 000 r/min,10 min,4 °C),收集菌体沉淀约 0.1 g,按 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒说明书步骤提取样品中总 DNA,送至上海美吉生物医药科技有限公司进行宏基因组测序。

1.2.3 生物信息学分析

1.2.3.1 数据拼接 基于 Hiseq 原始测序数据,使用 BWA 软件去除宿主序列,Fastp 软件进行质控,得到高质量 reads。使用 Megahit 软件对序列进行拼接,选择最佳拼接方法,获得 Contigs,并进行基因预测。

1.2.3.2 非冗余基因集构建 用 CD-HIT 软件进行聚类,每个类取最长的基因作为代表序列,构建非冗余基因集。

1.2.3.3 数据库注释 使用 DIAMOND 软件将非冗余基因序列与 NR 数据库(Non-Redundant Protein Sequence Database)、Egg-NOG 数据库(evolutionary genealogy of genes:Non-supervised Orthologous Groups)、KEGG 数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、CARD 数据库(Comprehensive Antibiotic Resistance Database)、VFDB 毒力因子数据库进行比对,对比类型为 BLASTP,使用 hmmscan 工具将非冗余基因集与 CAZy 数据库(Carbohydrate-active enzymes)进行比对,以上比对参数均设置期望值 e-value 为 1×10^{-5} ,完成丰度计算和功能注释。

1.2.3.4 统计分析和作图 采用 Origin2022 和 R 软件完成作图。以上生物信息学分析均采用美吉生物云平台(www.majorbio.com)。

2 结果与分析

2.1 产气变质食醋微生物分离及鉴定

采用 PCA 培养基、MRS 培养基、醋酸菌培养基、改良 MRS 培养基对产气变质食醋进行微生物分离,仅改良 MRS 培养基厌氧培养下检出菌落(如图 1),其菌落形态为边缘整齐,圆形,表面湿润,呈黄白色,革兰氏染色呈阳性,菌体呈长杆菌,无芽孢。牟娟等^[12]采用 PCA 培养基、虎红培养基、醋酸菌分离培养基、MRS 培养基均未从胀气食醋中检测出微生物,而对其进行镜检发现胀气食醋中存在革兰氏阳性菌。该结论与本研究结论一致,

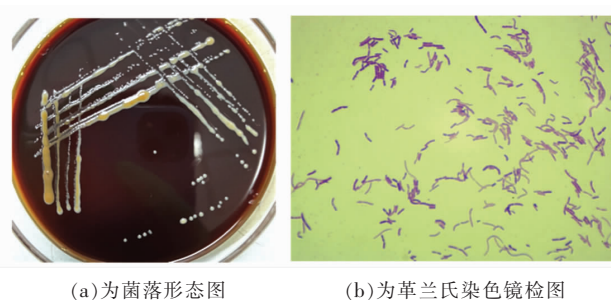
采用普通培养基不能检测出引起食醋变质的微生物。分别从 YJD、YJCD、CD 食醋样品中共计分离得到 23 株菌,将上述菌株回接与食醋中均可导致食醋发生产气变质现象,16S rDNA 测序结果表明 23 株菌均为金山醋酸乳杆菌,结果与 Wang 等^[7]相一致。Yu 等^[13]首先从镇江香醋醋醅中分离得到金山醋酸乳杆菌,该菌能在 pH 值为 3.0~5.0 (最适 pH=4.0),温度为 20~40 °C (最适为 35 °C) 条件下生长,能够耐受成品醋的高酸性环境。金山醋酸乳杆菌不仅是食醋酿造中的优势微生物,该菌在白酒酿造过程中同样也发挥着重要作用。邢敏钰等^[14]通过相关性分析表明该菌含量与原酒质量呈正相关关系,在发酵过程中扮演重要角色。

2.2 宏基因组测序和质量控制

本研究对 YJC、YJCD、CD 组 ($n=3$) 共计 9 个样品进行了宏基因组测序,结果显示 9 个样品共产生了 423 670 626 个总长约为 6.4×10^{10} bp 的 Raw reads,去除低质量数据后,Clean reads 占 97% 以上。拼接得到 Conting 数较小,中位数为 575。通常认为 N50 值(N50 表示将 contigs 由大到小叠加至总长的 50% 时对应的 contigs 长度)越大,拼接效果越好;本文拼接数据显示 N50 值中位数为 153 869,最小值大于 500,说明本次组装效果良好,可用于后续试验分析^[15]。

2.3 物种水平分析

表 1 为基于种水平的 Alpha 多样性分析,结果表明 CD 组和 YJC 组的 Chao1 指数和 ACE 指数显著大于 YJCD 组,说明 CD 组和 YJC 组群落丰富度显著大于 YJCD 组群落丰富度。Shannon 指数综合菌群组成丰富度与均匀度,从而反映样本多样性,数据显示 YJCD、CD 组和 YJC 组多样性无显著差异,推测导致 YJCD 组中群落丰富度较低的原因可能为:总酸 4 g/100 mL 的醋液中原有的微生物 DNA 经高温灭菌后被降解,接种后培养 7~10 d 后优势微生物繁殖导致出现产气现象,而非优势微生物繁殖较慢尚未到达检出水平,从而 YJCD 组中物种丰富度较 CD 组、YJC 组低。Venn 图可以比较直观地反映出样品的相似性和重叠情况,图 2 为种、属水平 Venn 图。从属水平分析 YJC 组独有菌属有 18 个、YJCD 独有菌属有 15 个、CD 组独有菌属有 25 个。从种水平分析 YJC 组独有菌



(a) 为菌落形态图 (b) 为革兰氏染色镜检图

图 1 产气食醋分离细菌菌落形态及菌体形态 (1 000×)

Fig.1 Colonial and mycelial morphology of strain isolated from gas-producing vinegar (1 000×)

表 1 菌种水平 Alpha 多样性分析

Table 1 Species level Alpha diversity analysis

Alpha 多样性指数	样品		
	CD	YJC	YJCD
ACE	238.67 ± 15.57 ^a	236.67 ± 47.29 ^a	119.00 ± 16.37 ^b
Chao1	238.67 ± 15.57 ^a	236.67 ± 47.29 ^a	119.00 ± 16.37 ^b
Shannon	0.11 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.00 ^a

注:同行不同字母代表差异显著 $P < 0.05$ 。

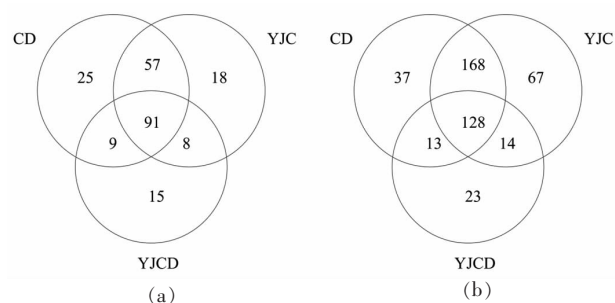


图 2 产气食醋中物种在属(a)和种(b)分布 Venn 图

Fig.2 Venn diagram of species distribution at genus (a) and species (b) in gas-producing vinegar

种有 67 个、CD 组独有菌种有 37 个、YJCD 独有菌种有 23 个。

对产气食醋基因组进行物种注释,共鉴定出 24 个门、42 个纲、94 个目、149 个科、233 个属、450 个种,其在属、种水平上的结果组成和丰度图 3 所示。从属水平分析,丰度从大到小依次为 98.69% 醋酸乳杆菌属 (*Acetolactobacillus*)、0.56%

乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、0.35% 顶乳杆菌属 (*Apilactobacillus*)、0.12% 厌氧杆菌属 (*Anoxybacillus*) 和 0.10% 慢乳杆菌属 (*Lentilactobacillus*)。从种水平分析, 丰度从大到小依次为 98.69% 金山醋酸乳杆菌 (*Acetilactobacillus jinshanensis*)、0.41% 乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp. Sy-1)、0.12% 新益顶乳杆菌 (*Apilactobacillus xinyiense*)、0.12% 厌氧芽孢杆菌 (*Anoxybacillus* sp. KU2-611K)。Huang 等^[16]通过基于宏基因组、宏转录组对醋发酵剂进行研究, 表明金山醋酸乳杆菌为醋发酵剂的优势菌。对比 YJC、CD、YJCD 3 组样品, 金山醋酸乳杆菌的丰度均超过 98%, 其它微生物丰度均低于 1% 且几乎无差异, 结合平板分离鉴定结果, 表明金山醋酸乳杆

菌是导致食醋产气的主要微生物。虽然其它乳杆菌及芽孢杆菌等存在于产气变质食醋中但是其相对丰度较低且未能从平板中分离出, 故无法直接判断这些微生物与食醋产气变质是否有直接关联。与本文研究不同, 孙文丽等^[17]认为特基拉芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*) 是引起食醋胀气的潜在微生物。李盈颖等^[18]对山西老陈醋产气样品进行微生物鉴定, 认为引起山西老陈醋产气的微生物主要为头状葡萄球菌头状亚种 (*Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*), 而其中少量芽孢杆菌处于休眠态, 不是引起山西老陈醋产气的优势菌。

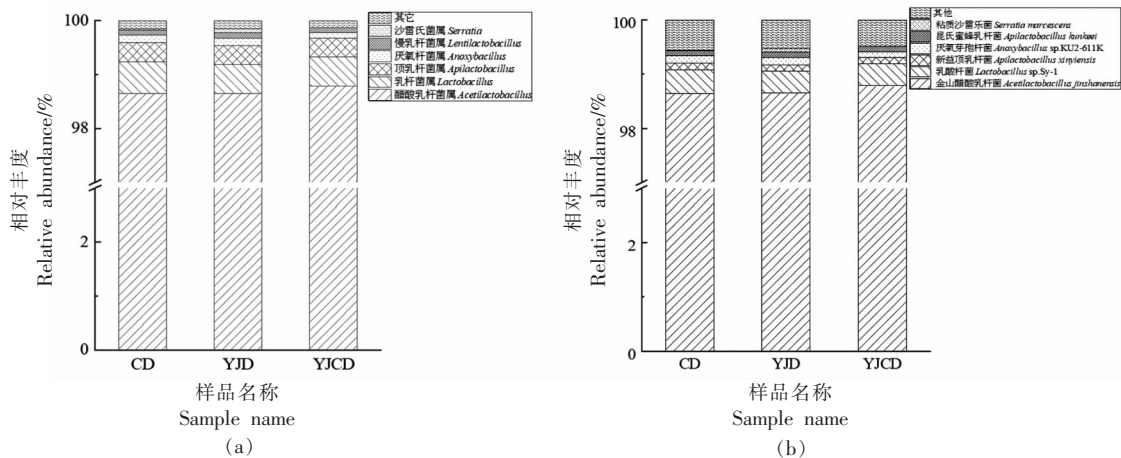


图3 产气食醋中细菌属(a)、种(b)水平物种相对丰度

Fig.3 Relative abundance of bacterial species at the genus (a) and species (b) in gas-producing vinegar

2.4 功能注释

2.4.1 Egg-NOG 数据库注释分析 将测序数据与 Egg-NOG 数据库比对, 获得各基因注释概况和主要 COG 功能单元 (表 2 和图 4)。本次共检测出 2 176 个 COG 功能单元, 分别属于 21 个主要功能大类, 其中丰度大于 5% 主要为氨基酸转运和代谢 (13.86%), 翻译、核糖体结构和生物合成 (13.85%), 复制、重组和修复 (9.20%), 碳水化合物转运和代谢 (8.77%), 主要功能预测 (8.73%), 细胞壁/膜/被膜的生物合成 (8.03%), 核苷酸转运和代谢 (5.92%), 辅酶转运和代谢 (5.29%)。丰度排名前 20 的 COG 功能单元主要涉及氨基酸转运和代谢, 细胞壁/膜/被膜的生物合成, 碳水化合物转运和代谢等。图 5 为产气食醋中优势微生物对 COG

功能注释贡献度分析, 结果表明金山醋酸乳杆菌对 21 个 COG 主要功能大类贡献率均大于 93%, 以上数据说明产气食醋的优势微生物-金山醋酸乳杆菌具有较强的抗逆性、能量代谢旺盛、繁殖能力强等特点。

2.4.2 KEGG 数据库注释分析 将 3 个类型的 9 个产气食醋样品中的 reads 匹配到 KEGG 数据库中得到 6 类共计 46 个 KEGG 通路, 对富集度较高的通路进行注释, 结果如图 6 所示, 在 level 1 分类水平新陈代谢占比最高 (65.57%), 其次分别为遗传信息处理 (15.22%)、环境信息处理 (6.43%)、人体疾病 (5.83%)、细胞过程 (4.62%)、有机体系统 (2.32%); 在 level 2 分类水平中相对丰度占比高于 4% 的有全局和概览地图 (26.38%)、碳水化合物

表 2 产气食醋微生物基因中主要 COG 功能单元

Table 2 Main COG functional units in gas-producing vinegar genes

COG 编号	COG 描述	功能分类	相对丰度/%
COG0531	丝氨酸和谷氨酸转运蛋白 AimA/YbeC, 氨基酸;H ⁺ 同向转运蛋白家族(Serine and glutamate transporter AimA/YbeC, amino acid; H ⁺ symporter family)	A	2.604
COG2814	预测的阿拉伯糖外排通透酶 AraJ, MFS 家族(Predicted arabinose efflux permease AraJ, MFS family)	B	2.228
COG4975	葡萄糖摄取蛋白 GleU(Glucose uptake protein GleU)	B	1.037
COG4690	二肽酶(Dipeptidase)	A	0.868
COG0747	ABC 型运输系统, 周质组分 (ABC-type transport system, periplasmic component)	A	0.814
COG0697	药物/代谢物转运蛋白(DMT)超家族的透光酶[Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily]	A、B、I	0.728
COG0436	天冬氨酸/蛋氨酸/酪氨酸转氨酶 (Aspartate/methionine/tyrosine aminotransferase)	A	0.693
COG0675	转座酶(Transposase)	K	0.674
COG0730	亚硫酸盐输出剂 TauE/SafE/YfcA 和相关通透酶, UPF0721 家族 (Sulfite exporter TauE/SafE/YfcA and related permeases, UPF0721 family)	G	0.650
COG1113	L-天冬酰胺转运蛋白或相关通透酶 (L-asparagine transporter or related permease)	A	0.628
COG0561	羟甲基嘧啶焦磷酸酶和其它 HAD 家族磷酸酶 (Hydroxymethylpyrimidine pyrophosphatase and other HAD family phosphatases)	C、I	0.595
COG0834	ABC 型氨基酸转运/信号转导系统, 周质成分/结构域 (ABC-type amino acid transport/signal transduction system, periplasmic component/domain)	A、J	0.494
COG3579	氨肽酶 C(Aminopeptidase C)	A	0.477
COG0438	参与细胞壁双合成的糖基转移酶 (Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis)	E	0.471
COG2801	转座因子 Rve(逆转录病毒整合酶)家族 IS3 的转座酶 InsO[Transposase InsO of transposable element IS3, Rve (retroviral integrase) family]	K	0.442
COG0463	参与细胞壁双合成的糖基转移酶 (Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis)	E	0.422
COG0178	核酸提取酶 UvrABC ATP 酶亚基(Excinuclease UvrABC ATPase subunit)	D	0.421
COG0656	醛/酮还原酶, 与二酮谷氨酸还原酶有关(Aldo/keto reductase, related to diketogulonate reductase)	H	0.420
COG0028	乙酰乳酸合酶大亚基或其它焦磷酸硫胺素需求酶(Acetolactate synthase large subunit or other thiamine pyrophosphate-requiring enzyme)	A、C	0.414
COG0542	ATP 依赖性 Clp 蛋白酶, ATP 结合亚基 ClpA (ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpA)	F	0.407

注:A. 氨基酸转运和代谢;B. 碳水化合物转运和代谢;C. 辅酶转运和代谢;D. 复制,重组和修复;E. 细胞壁/膜/被膜的生物合成;F. 翻译后修饰,蛋白质周转,分子伴侣;G. 无机离子转运代谢;H. 次级代谢物生物合成,转运和分解代谢;I. 主要功能预测;J. 信号转导机制;K. 未命名蛋白。

代谢(7.75%)、氨基酸代谢(6.30%)、翻译(5.79%)、复制和修复(5.64%)、核苷酸代谢(5.64%)、辅助因子和维生素的代谢(4.59%)、能

量代谢(4.26%)、膜运输(4.11%)。

进一步对新陈代谢中富集度较高的氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢以及脂类代谢与优

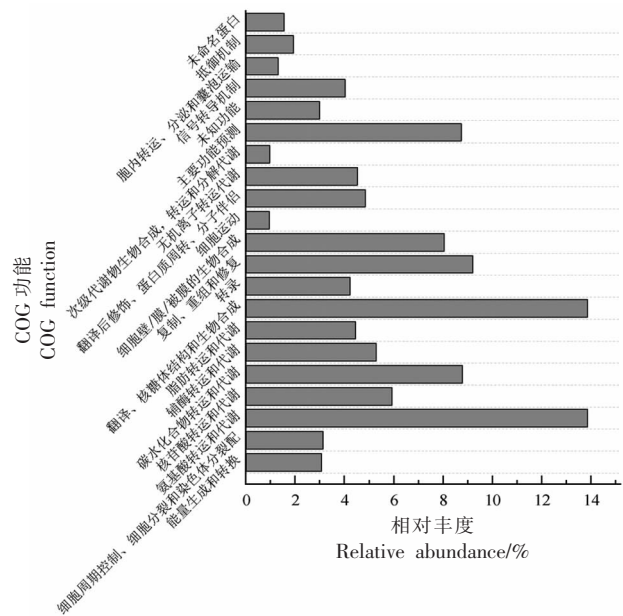


图 4 产气食醋微生物基因的 COG 功能分类

Fig.4 Functional classification of COG in gas-producing vinegar

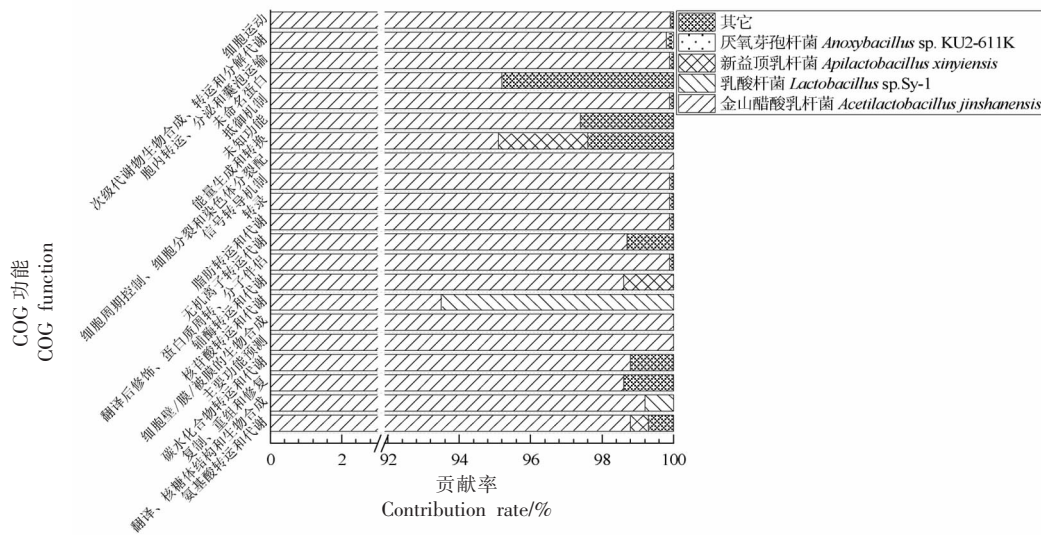


图 5 产气食醋中优势微生物与 COG 功能贡献度分析

Fig.5 Analysis of dominant microbe and COG functional contribution in gas-producing vinegar

势微生物进行贡献度分析和注释 (如图 7 和图 8)。金山醋酸乳杆菌对氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、脂类代谢对贡献率分别为 97.21%, 98.51%, 99.88%, 99.96%, 对上述代谢起主要贡献作用, 也表明金山醋酸乳杆菌是产气食醋的绝对优势菌。在氨基酸代谢中丰度较高的为赖氨酸生物合成(1.10%)和丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢(0.91%)。有研究表明生物体赖氨酸生物合成可

以促进碱性物质的合成。丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢可转胺催化氨的形成从而增强微生物的抗酸性, 有利于微生物在食醋中存活^[9]。在碳水化合物代谢中丰度较高的为丙酮酸代谢、氨基糖和核苷酸糖的代谢以及磷酸戊糖途径等。本课题组研究表明产气食醋中还原糖、丙酮酸含量下降而乳酸和乙酸含量增加^[7], 这可能与金山醋酸乳杆菌碳水化合物代谢水平旺盛有关。Wu 等^[20]研究山西

老陈醋同样表明碳水化合物代谢中丰度较高的为淀粉和蔗糖代谢、丙酮酸代谢、糖酵解/糖异生以及氨基糖和核苷酸糖代谢。在能量代谢中丰度较高的为氧化磷酸化,氧化磷酸化产生大量 ATP,有利于细胞维持正常生命活动,抵御外界环境胁迫,

从而有利于产气食醋中微生物进行生命活动^[21]。在脂类代谢中,基因功能主要富集到甘油酯代谢和脂肪酸生物合成。乳酸菌可根据生长条件的变化改变细胞膜中脂肪酸组成,从而减少外界胁迫对细胞造成的损伤^[22-23]。

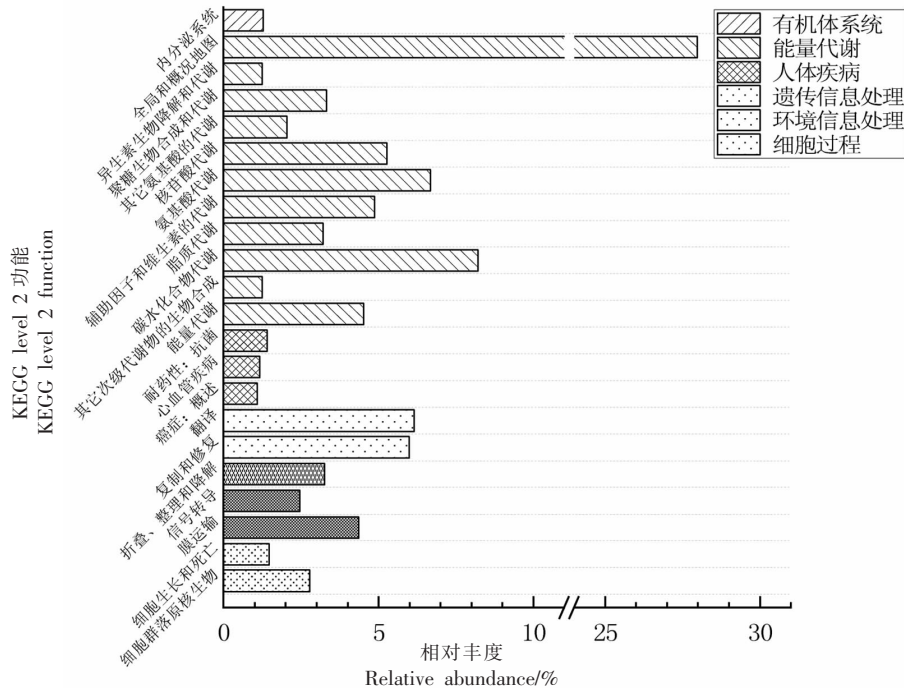


图 6 产气食醋微生物基因的 KEGG 通路分析

Fig.6 KEGG pathway analysis in gas-producing vinegar genes

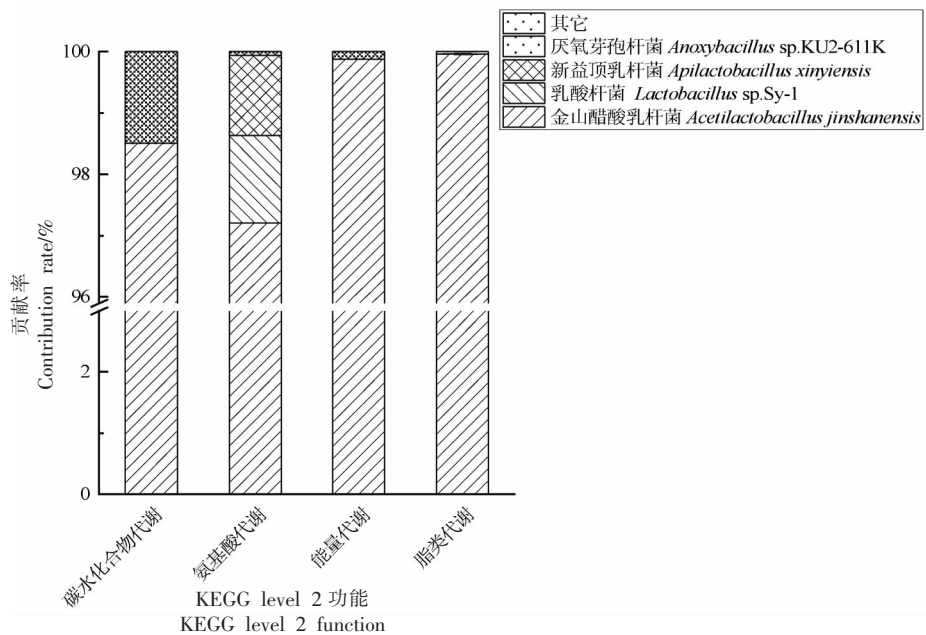


图 7 产气食醋中优势微生物与 KEGG 通路 level 2 贡献度分析

Fig.7 Analysis of dominant microbe and KEGG pathway level 2 contribution in gas-producing vinegar

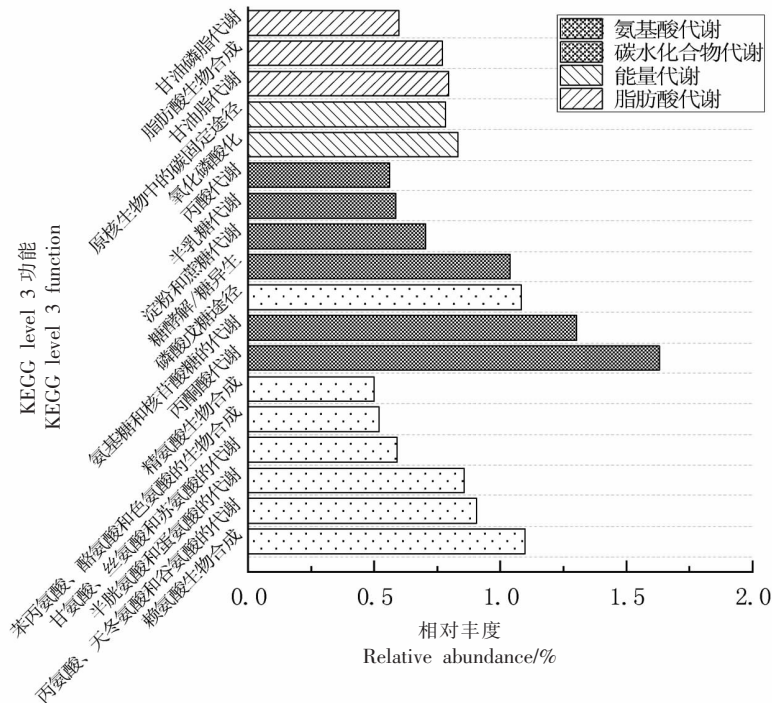


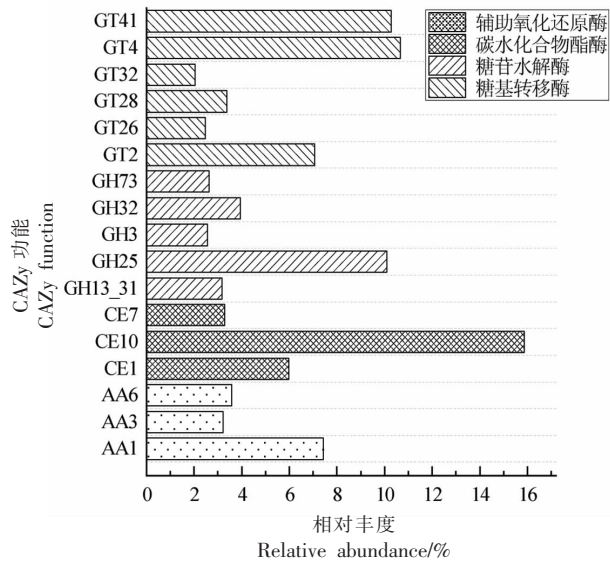
图8 产气食醋微生物基因的KEGG通路level 3分析

Fig.8 KEGG pathway level 3 analysis in gas-producing vinegar genes

2.5 CAZy 数据库注释分析

根据 Egg-NOG 数据库和 KEGG 数据库注释信息显示,产气食醋中碳水化合物代谢水平较高,为进一步揭示其中碳水的代谢机制,采用 CAZy 数据库对主要碳水化合物活性酶进行注释(图9)。共注释到 81 个不同的碳水化合物活性酶,分别为糖基转移酶(Glycosyl transferases, GT,占比 35.901%)、碳水化合物酯酶(Carbohydrate esterases, CE,占比 27.450%)、糖苷水解酶(Glycoside hydrolases, GH,占比 22.408%)、辅助氧化还原酶(Auxiliary activities, AA,占比 14.240%)、碳水化合物结合模块(Carbohydrate-binding modules, CBM,占比 0.002%),未注释到多糖裂解酶,该酶在食醋中活性较低^[24]。该结论与山西老陈醋醋醅中微生物碳水化合物注释存在差异,在山西老陈醋醋醅中糖基转移酶占比最高,其次为糖苷水解酶,碳水化合物结合模块、碳水化合物酯酶、辅助氧化还原酶、多糖裂解酶,存在这种差异的主要原因是醋醅中微生物组成与变质食醋存在较大差异^[25]。

在辅助活动模块家族中 AA1 相对丰度最高



注:GT2 包含 GT2_Glyco_trans_2_3 和 GT2_Glycos_transf_2;碳水化合物结合模块图中未体现。

图9 产气食醋微生物基因的碳水化合物分析

Fig.9 Carbohydrate analysis in gas-producing vinegar gene

占比达 7.43%,具有漆酶(EC 1.10.3.2)、铁氧化物酶(EC 1.10.3.-)等酶活。碳水化合物酯酶家族中

CE10 相对丰度最高,占比达 15.86%,具有芳基酯酶(EC 3.1.1.-)、羧基酯酶(EC 3.1.1.3)、乙酰胆碱酯酶(EC 3.1.1.7)、胆碱酯酶(EC 3.1.1.8)等酶活。糖苷水解酶家族中 GH25 相对丰度最高,占比达 10.10%,具有溶菌酶(EC 3.2.1.17)活性。糖基转移酶家族中 GT4 相对丰度最高为 10.66%,具有蔗糖合酶(EC 2.4.1.13)、蔗糖磷酸合酶(EC 2.4.1.14)、 α -葡萄糖基转移酶(EC 2.4.1.52)、脂多糖 *N*-乙酰葡萄糖胺基转移酶(EC 2.4.1.56)、磷脂酰肌醇 α -甘露糖基转移酶(EC 2.4.1.57)等酶活。

2.6 金山醋酸乳杆菌耐酸性及安全性分析

产气食醋具有较低的 pH 值,金山醋酸乳杆菌作为其绝对优势菌,推测其具有较强的耐酸性。根据目前研究表明,乳酸菌的耐酸机制主要取决于细胞膜及胞外保护机制和细胞内调节机制^[26]。具体可以划分为细胞内 pH 值的调控、细胞膜脂肪酸组成调控、DNA 和蛋白质等生物大分子的修复和保护等方面。结合其他学者的研究和宏基因组测序数据对金山醋酸乳杆菌疑似耐酸基因进行分析,结果见表 3。

氨基酸是维持生命活动不可缺少的物质,是细胞正常生长的重要原料,近年来有不少研究证明氨基酸代谢在乳酸菌耐酸性方面发挥着重要作用^[27]。*arcA* 调节精氨酸脱亚胺酶活性,促使乳酸菌利用精氨酸产生 NH_3 ,中和胞内 H^+ ,从而维持胞内 pH 值相对平衡。除此以外谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸等氨基酸代谢也可以通过脱羧反应来消耗胞内

H^+ ,从而减少 H^+ 对细胞的损害^[28]。

H^+ -ATPase 可以将 ATP 的产生和质子动力势(Proton-motive force, PMF)偶联起来。PMF 能够促进细胞质中质子排出,有利于降低胞内 pH 值^[29]。赵皓静^[30]对耐酸乳杆菌耐酸性进行分析,发现酸胁迫后调节 H^+ -ATPase 的相关基因(*copB*、*cadA* 和 *copA*)表达水平显著提高。然而,在金山醋酸乳杆菌中仅 *copB* 被注释,说明金山醋酸乳杆菌与耐酸乳杆菌耐酸机制存在一定的差别。

根据 CARD 数据库及 VFDB 毒力因子数据库注释可知,金山醋酸乳杆菌在标准毒力因子数据库中未匹配到大肠杆菌、单核细胞增生性李斯特菌、金黄色葡萄球菌和肠杆菌属等常见致病菌毒力因子和耐药性,因此被该菌污染的食醋可采取热杀菌后重新进行灌装。上述注释结果表明该菌是一株不产生毒素的安全菌株,可用于食醋生产环节。孙佳^[31]的研究表明表明金山醋酸乳杆菌用于食醋生产可以加快葡萄糖的消耗,缩短发酵周期,显著提高醋醅总酸、氨基酸和酯类物质含量。这与本课题组对产气食醋研究结果相一致,食醋产气变质后总糖与还原糖含量下降,总酸上升^[12]。研究表明金山醋酸乳杆菌用于食醋发酵,在一定程度上可以促进食醋发酵产酸。Wang 等^[7]对金山醋酸乳杆菌产气亚种研究表明该菌在 65 °C 加热 15 min 便可全部失活。然而,经热杀菌后储存于陈酿大罐中的食醋仍出现产气现象,罐管路污染是导致食醋出现产气变质的主要因素之一。陈菊

表 3 筛选的金山醋酸乳杆菌疑似耐酸基因

Table 3 Suspected acid-resistant genes screening in *Acetivibrio jinshanensis*

基因名称	对应酶编号	代谢通路	KO 通路	耐酸机制	参考文献
<i>patA</i>	2.6.1.-	赖氨酸的生物合成	K00841	生碱机制	[7], [33]
<i>metE</i>	2.1.1.14	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	K00549	生物膜、生碱机制	[33]
<i>lysC</i>	2.7.2.4	赖氨酸生物合成	K00928	生碱机制	[7], [19]
<i>luxS</i>	4.4.1.21	双组分系统	K07173	生物膜	[19], [34], [35]
<i>dapH</i> , <i>dapD</i>	2.3.1.89	赖氨酸的生物合成	K05822	生碱机制	[7], [19]
<i>dapA</i>	4.3.3.7	赖氨酸的生物合成	K01714	生碱机制	[7], [19]
<i>asnB</i>	6.3.5.4	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	K01953	转氨催化氨的形成	[7]
<i>arcA</i>	3.5.3.6	精氨酸的生物合成	K01478	生碱机制	[7]
<i>fadB</i>	1.1.1.35	脂肪酸代谢	K01825	细胞膜脂肪酸组成	[36]
<i>fadA</i> , <i>fadI</i>	2.3.1.9, 2.3.1.16	脂肪酸代谢	K00632	细胞膜脂肪酸组成	[36]
<i>capB</i>	7.2.2.9	P 型铜离子转运蛋白	K01533	H^+ -ATPase 的产生	[30]

等^[32]对苹果醋污染关键环节进行分析表明,运输管道和储存罐中含有较多微生物,如果灭菌不彻底,可能会造成微生物污染。因此,在生产过程中应定期对罐管路、陈酿大罐进行清洗消毒,并对生产车间进行净化处理,才能有效防控食醋产气变质问题。

3 结论

食醋产气问题一直困扰着企业,导致企业生产效率的降低,严重损害企业利益。本试验采集产气食醋 YJC、YJCD、CD 样品进行平板分离鉴定和宏基因组测序,并进行 NR 数据库、Egg-NOG 数据库、KEGG 数据库、CAZy 数据库、CARD 数据库及 VFDB 毒力因子数据库注释,并揭示了产气食醋中优势菌及相关功能性。

本试验研究表明产气食醋中的优势菌为金山醋酸乳杆菌,相对丰度占比达 98.69%。Egg-NOG 数据库、KEGG 数据库注释结果表明碳水化合物代谢、氨基酸代谢是产气食醋微生物最旺盛的代谢功能,两者一定程度上与微生物抵抗酸胁迫有关。CARD 数据库及 VFDB 毒力因子数据注释可知,金山醋酸乳杆菌是一株不产毒素的安全菌株,可用于食醋发酵。结合 KEGG 注释结果和其他学者研究对金山醋酸乳杆菌耐酸相关基因进行筛选,共筛选出 13 个疑似耐酸基因,涉及氨基酸代谢、细胞膜脂肪酸组成、H⁺-ATPase 和双组分系统,后期可进一步结合宏转录组和宏蛋白组进行验证。论文研究结果为产气变质食醋中微生物的深入研究及其防控提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 张怀敏,段国锋,李江涌,等. 导致老陈醋产气微生物的分离和鉴定[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2016, 36(8): 594-598.
ZHANG H M, DUAN G F, LI J Y, et al. Isolation and identification of microorganism which led the vinegar gas-producing[J]. Shanxi Agric Univ (Natural Science Edition), 2016, 36(8): 594-598.
- [2] 栾春光,郝建秦,李伦,等. 高通量测序技术在食醋涨壶微生物鉴定中的应用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 273-279.
- [3] 张彦位,张娟,堵国成,等. 天冬氨酸提高乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 酸胁迫抗性的作用机制[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2563-2575.
ZHANG Y W, ZHANG J, DU G C, et al. Improvement of acid-tolerance of *Lactococcus lactis* NZ9000 by aspartate[J]. Microbiology Bulletin, 2018, 45(12): 2563-2575.
- [4] ZHANG J, FU R Y, HUGENHOLTZ J, et al. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5268-5275.
- [5] 李婷,王争争,李慧,等. 四大名醋呈味物质比较分析[J]. 中国调味品, 2020, 45(10): 144-147.
LI T, WANG Z Z, LI H, et al. Comparative analysis of flavor substances in the four famous Chinese vinegar[J]. Chinese Condiment, 2020, 45(10): 144-147.
- [6] ENTANI E, MASAI H, SUZUKI K I. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1986, 36(4): 544-549.
- [7] WANG X J, HU K D, LIU F, et al. Isolation and characterization of a gas-producing and acid-resistant bacterium from spoiled vinegar[J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 394(2): 110167.
- [8] BELLEGGIA L, AQUILANTI L, FERROCINO I, et al. Discovering microbiota and volatile compounds of surströmming, the traditional Swedish sour herring[J]. Food Microbiol, 2020, 91: 103503.
- [9] 刘爱平,吴洁,王玉婷,等. 基于宏基因组测序的四川麸醋醋醅微生物组和风味形成相关基因分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(3): 806-812.
LIU A P, WU J, WANG Y T, et al. Microbiota and flavor formation-related genes of Sichuan bran vinegar Pei: Insights from metagenome[J]. Jiangsu J of Agr Sci, 2022, 38(3): 806-812.
- [10] WU L H, LU Z M, ZHANG X J, et al. Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota[J]. Food Microbiology, 2017, 62: 23-31.

- [11] 刘芳. 胀气变质食醋特性及其污染微生物检测与控制研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
LIU F. Characteristics of flatulent spoiled vinegar and its detection and control of polluting microorganisms[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2020.
- [12] 牟娟, 刘芳, 王兴洁, 等. 胀气变质食醋理化指标及细菌多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(20): 278–284.
MOU J, LIU F, WANG X J, et al. Analysis of physicochemical indexes and bacterial diversity of swollen vinegar[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(20): 278–284.
- [13] YU Y J, LI X, ZHANG J H, et al. *Lactobacillus jinshani* sp. nov., isolated from solid-state vinegar culture of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2020, 113(1): 43–54.
- [14] 邢敏钰, 杜海, 徐岩. 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌多样性及其演替规律[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 19–28.
XING M Y, DU H, XU Y. Diversity and succession of lactic acid bacteria during sesame-flavor liquor fermentation[J]. Microbiology Bulletin, 2018, 45(1): 19–28.
- [15] STEWART R D, AUFFRET M D, WARR A, et al. Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 953–961.
- [16] HUANG T, LU Z M, PENG M Y, et al. Constructing a defined starter for multispecies vinegar fermentation via evaluation of the vitality and dominance of functional microbes in an autochthonous starter[J]. Appl Environ Microbiol, 2022, 88(3): e0217521.
- [17] 孙文丽, 孙玲, 邢政, 等. 胀气食醋中污染微生物的分离鉴定及其生理生化特性 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 99–105.
SUN W L, SUN L, XING Z, et al. Separation, identification, physiological and biochemical characteristics of pollution microbes in swollen vinegar[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(17): 99–105.
- [18] 李盈颖, 高雯, 周帼萍. 山西老陈醋样品的污染微生物分析[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 226–231.
LI Y Y, GAO W, ZHOU G P. Case analysis of contaminated Shanxi aged vinegar[J]. Food Science, 2016, 37(12): 226–231.
- [19] 程娜. 基于组学技术解析保加利亚乳杆菌 LJJ 的耐酸机制[D]. 太原: 山西师范大学, 2018.
CHENG N. A study on the acid resistance of *Lactobacillus bulgaricus* LJJ based on the omics technology[D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2018.
- [20] WU Y, XIA M, ZHANG X, et al. Unraveling the metabolic network of organic acids in solid-state fermentation of Chinese cereal vinegar[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(8): 4375–4384.
- [21] ZHENG Y, MOU J, NIU J W, et al. Succession sequence of lactic acid bacteria driven by environmental factors and substrates throughout the brewing process of Shanxi aged vinegar[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(6): 2645–2658.
- [22] 解寒. 乳酸菌耐受柠檬酸的适应性进化及其机制解析[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
XIE H. Adaptive evolution of lactic acid bacteria to improve citric acid tolerance and the analysis of its mechanism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [23] BROADBENT J R, LARSEN R L, DEIBEL V, et al. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(9): 2445–2458.
- [24] 汤涵岚. 基于宏基因组分析增温对食醋大曲固态发酵过程中微生物菌群的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
TANG H L. Influence of temperature increase on microbiota during the solid-state fermentation process of vinegar daqu based on metagenome[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [25] 刘丹彤. 基于宏基因组测序揭示山西老陈醋菌群功能[D]. 太原: 山西农业大学, 2021.
LIU D T. Metagenomic analysis of the function of Shanxi aged vinegar microflora[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2021.
- [26] WANG C, CUI Y, QU X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria [J]. Archives of Microbiology, 2018, 200(2): 195–201.
- [27] ILLEGHEMS K, DE VUYST L, WECKX S. Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* 222 and *Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes [J]. BMC Genomics,

- 2015, 16: 766.
- [28] TANAKA Y, KIMURA B, TAKAHASHI H, et al. Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: Kinetics of transcription and role in acid resistance [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(5): 1283–1293.
- [29] GUAN N, LIU L. Microbial response to acid stress: Mechanisms and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 51–65.
- [30] 赵皓静. 耐酸乳杆菌产酸特性及酸胁迫应答机制[D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- ZHAO H J. Acid-producing characteristics of *Lactobacillus acidotolerant* and response mechanism to acid stress[D]. Guiyang: Guizhou University, 2022.
- [31] 孙佳. 金山醋酸乳杆菌比较基因组分析与酿醋功能评价[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- SUN J. Comparative genome analysis of *Acetilactobacillus jinshanensis* and its function in vinegar fermentation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [32] 陈菊, 陈林, 胡涛, 等. 苹果醋饮料生产过程微生物污染关键点的分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(21): 195–200.
- CHEN J, CHEN L, HU T, et al. Analysis of key points of microbial contamination in the production process of apple cider vinegar beverages [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(21): 195–200.
- [33] LI W, YANG L, NAN W, et al. Whole-genome sequencing and genomic-based acid tolerance mechanisms of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(17): 7631–7642.
- [34] AZCARATE-PERIL M A, MCAULIFFE O, ALTERMANN E, et al. Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 5794–5804.
- [35] 张悦. LuxS/AI-2 群体感应系统调控乳酸菌的生物膜形成机制及其抗逆性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- ZHANG Y. Study on mechanism of biofilm formation and stress resistance by lactic acid bacteria based on LuxS/AI-2 quorum sensing system[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022.
- [36] YU L, ZHANG S, XU Y, et al. Acid resistance of *E. coli* O157:H7 and O26:H11 exposure to lactic acid revealed by transcriptomic analysis [J]. LWT, 2021, 136: 110352.

Analysis of Microbiota and Acid-resistant Genes in Gas-producing Degenerative Vinegar

ZHAO Kui, ZHOU Li, WANG Xingjie, LI Jianlong, ZHAO Ning, LIU Shuliang*
(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan)

Abstract The problem of gas-producing vinegar production seriously troubles production enterprises and causes certain economic losses. In this study, the microorganisms in gas-producing vinegar were isolated and identified, and the main microorganisms and their acid tolerance genes were revealed by metagenomic sequencing technology. Twenty-three bacterial strains were isolated from gas-producing vinegar, all of which were identified as *Acetilactobacillus jinshanensis* by 16S rDNA. The results showed that the microorganisms in gas-producing vinegar belonged to 24 phyla, 42 classes, 94 orders, 149 families, 233 genus and 450 species, among which the relative abundance of *Acetilactobacillus jinshanensis* in genera and species levels was greater than 98%, combined with the isolation and identification results of culture medium plate showed that the bacteria was a dominant bacteria in gas-producing vinegar. Egg-NOG database annotated to 2 176 COG functional units, KEGG database annotated to 46 KEGG pathways, CAZy database annotated to 81 carbohydrate active enzymes. The CARD database and VFDB virulence factor data annotations showed that *Acetilactobacillus jinshanensis* was a safe strain that does not produce toxins. Combined with the sequencing results and database analysis, a total of 13 suspected acid tolerance genes of *Acetilactobacillus jinshanensis* were screened, involving amino acid metabolism (*patA*, *metE*, *lysC*), cell membrane fatty acid composition (*fadB*, *fadA*, *fadI*), H⁺-ATPase (*capB*) and two-component system (*luxS*). The results provided a reference for elucidating the microbiota and prevention and control provide a theoretical basis of gas-producing vinegar.

Keywords vinegar; gas-production; metagenomics; *Acetilactobacillus jinshanensis*; acid tolerance genes