

## 臭鳊鱼发酵过程中细菌群落结构及功能预测

周迎芹<sup>1,2</sup>, 王浩<sup>3</sup>, 黄晶晶<sup>1,2</sup>, 罗格格<sup>4</sup>, 鄢嫣<sup>1,2</sup>, 谢宁宁<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>安徽省农业科学院农产品加工研究所 合肥 230031

<sup>2</sup>安徽省食品微生物发酵与功能应用工程实验室 合肥 230031

<sup>3</sup>浙江海洋大学食品与药学学院 浙江舟山 316022

<sup>4</sup>安徽科技学院 食品科学与工程学院 安徽滁州 233100

**摘要** 以臭鳊鱼为研究对象,采用高通量测序技术解析臭鳊鱼发酵过程中的细菌群落结构变化,并利用 PICRUSt 预测细菌群落的代谢功能。结果表明,臭鳊鱼细菌群落主要由未分类鼠杆菌科菌属、卡氏伯克霍尔德菌属、乳杆菌属、嗜冷杆菌属、泛菌属、哈夫尼亚-肥杆菌属、柠檬酸杆菌属、沙雷氏菌属等组成。基于 OTU 水平,可将臭鳊鱼样品聚类为发酵前期(0~2 d)、发酵中期(4~8 d)和发酵后期(10~16 d)。发酵中、后期优势菌群丰度均高于发酵前期,乳杆菌属细菌在发酵中、后期占绝对优势,且以清酒乳杆菌为主,相对丰度最高达 43.43%,对臭鳊鱼的风味品质形成可能起到重要作用。臭鳊鱼发酵过程中的细菌群落功能主要集中在氨基酸转运和代谢、碳水化合物转运和代谢方面,不同发酵阶段样品功能组成较为相似。通过研究臭鳊鱼发酵过程中细菌群落结构变化规律和代谢功能,以为臭鳊鱼中微生物资源的开发与应用提供理论依据。

**关键词** 臭鳊鱼; 高通量测序; 发酵过程; 细菌群落结构; 功能预测

**文章编号** 1009-7848(2025)02-0411-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.02.036

传统臭鳊鱼是一种具有特殊风味的发酵鱼制品<sup>[1]</sup>,主要采用自然发酵方式<sup>[2]</sup>,发酵体系中蕴藏着丰富的微生物<sup>[3-4]</sup>,而微生物群落的生长代谢作用与臭鳊鱼风味和品质密切相关<sup>[5-7]</sup>。解析臭鳊鱼微生物群落结构及其代谢功能,对揭示臭鳊鱼风味和品质形成具有重要意义。

最早以传统培养为基础的微生物群落组成研究发现,乳酸菌在臭鳊鱼发酵过程中占有绝对优势,主要是格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)和食蜜魏斯氏菌(*Weissella cibaris*)等<sup>[8-9]</sup>。Dai 等<sup>[9]</sup>通过传统培养分析臭鳊鱼中的细菌群落变化规律,发现细菌群落结构在整个发酵过程中变化显著,且清酒乳杆菌在自然发酵中、后期生长繁殖旺盛,具

有数量上的绝对优势。

近年来,分子生物学各项技术被用于臭鳊鱼发酵体系研究,使臭鳊鱼中微生物菌群结构得到进一步解析。李燕等<sup>[10]</sup>采用变性梯度凝胶电泳技术研究臭鳊鱼在自然发酵过程中的微生物菌群结构,其中粪肠球菌、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)、溶酪大球菌(*Macroboccus caseolyticus*)等是发酵过程中的优势微生物。Shen 等<sup>[11]</sup>和 Wang 等<sup>[12]</sup>利用高通量测序技术分析自然发酵臭鳊鱼中的微生物菌群结构,发现臭鳊鱼中主要含有弧菌属(*Vibrio*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和乳球菌属(*Lactococcus*)细菌,且不同发酵阶段的微生物群落结构存在明显差异。然而,目前这些研究多集中于臭鳊鱼发酵过程中的微生物群落结构组成,尚缺乏针对微生物群落的代谢功能研究,特别是利用生物信息学对臭鳊鱼发酵过程微生物群落的功能预测研究。

本研究以自然发酵臭鳊鱼为研究对象,采用高通量测序技术解析臭鳊鱼自然发酵过程细菌群落结构,并通过 PICRUSt 菌群代谢功能预测工具对细菌功能进行预测,深入了解臭鳊鱼发酵过程中微生物的代谢功能差异,为臭鳊鱼发酵基础研究和工业化生产提供理论依据。

**收稿日期:** 2024-02-06

**基金项目:** “十四五”国家重点研发计划项目(2023YFD2401404); 安徽省财政农业科技成果转化项目(2024ZH009); 安徽省省级科技特派团项目(2023tpt141)

**第一作者:** 周迎芹,女,博士,助理研究员

**通信作者:** 谢宁宁 E-mail: ningxie512@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鳊鱼,购自池州市池一鱼有限公司,质量规格为500~600 g/尾;食用钠盐、花椒,合肥市庐阳区中菜市。

MagPure Soil DNA LQ Kit, 美国Magen公司;Qubit dsDNA Assay Kit, 美国Life Technologies公司;Tks Gflex DNA Polymerase, 日本Takara公司;细菌16S rRNA V3-V4区扩增引物(343F:5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'和798R:5'-AGGGTATCTAATCCT-3'),生工生物工程(上海)股份有限公司。其它试剂均为国产分析纯级。

### 1.2 设备与仪器

臭鳊鱼腌制发酵专用装置,本实验室自行设计<sup>[13]</sup>;Centrifuge5418台式高速离心机,德国Eppendorf公司;580BR10905 PCR仪,美国Bio-rad公司;SN 002358 QIAextractor, 德国Qiagen公司;HE-120电泳仪,上海Tanon公司;2500凝胶成像仪,上海Tanon公司;NanoDrop 2000超微量分光光度计,美国ThermoFisher公司;Illumina NovaSeq6000高通量测序仪,美国Illumina公司。

### 1.3 方法

1.3.1 臭鳊鱼样品制备 以新鲜鳊鱼为试验原料,参照前期试验方法<sup>[14]</sup>进行自然发酵,在发酵0,1,2,4,6,8,10,12,14,16 d时采集样品,分别标记为S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10,每个阶段各采集3条臭鳊鱼。利用解剖刀在无菌操作条件下剔取鱼肉,并用绞肉机绞碎,待用。

1.3.2 DNA提取 按照MagPure Soil DNA LQ Kit说明对样品基因组DNA进行提取,使用琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop2000对DNA的浓度和纯度进行检测。

1.3.3 PCR扩增及高通量测序 以基因组DNA为模板,细菌16S rDNA的V3-V4区343F和798R为上、下游引物,Tks Gflex DNA Polymerase进行第1轮PCR扩增。扩增体系:2×Gflex PCR Buffer 15 μL,5 pmol/μL F 1 μL,5 pmol/μL R 1 μL,基因组DNA模板1 μL(50 ng),Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/μL)0.6 μL,ddH<sub>2</sub>O补足至30 μL。扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸20 s,26个循环;72

℃终延伸5 min。扩增产物经电泳检测后使用磁珠纯化,纯化后作为PCR模板进行第2轮PCR扩增。扩增体系:2×Gflex PCR Buffer 15 μL,Adapter I5 1 μL,Adapter I7 1 μL,第1轮PCR产物1 μL(50 ng),Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 U/μL)0.6 μL,ddH<sub>2</sub>O补足至30 μL。扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸20 s,7个循环;72℃终延伸5 min。将第2轮PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳后切胶并利用Beckman公司的Agencourt AMPure XP beads纯化回收PCR产物。最后对PCR产物进行Qubit定量,根据PCR产物浓度进行等量混样测序。测序由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

1.3.4 生物信息学分析 原始数据为FASTQ格式,使用Trimmomatic软件对原始双端序列进行去杂。去杂后的双端序列利用FLASH软件进行拼接,同时利用UCHIME检测并去除序列中的嵌合体序列。得到的序列再使用VSEARCH软件按照97%的相似度进行操作分类单元(Operational taxonomic units, OTU)聚类分析,最后用RDP classifier 贝叶斯算法比对Silva 16S rRNA数据库(version138)进行OTU序列的物种分类注释,并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成。根据样品中各ASV代表序列及其丰度表,使用PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2)算法的标准集成基因组数据库推断16S rRNA基因序列定位到京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库进行注释,并通过PICRUSt2算法预测群落的代谢途径丰度。

### 1.4 数据分析与处理

所有试验重复进行3次。采用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 为差异显著。采用Origin 2018和Excel绘制图表。

## 2 结果与讨论

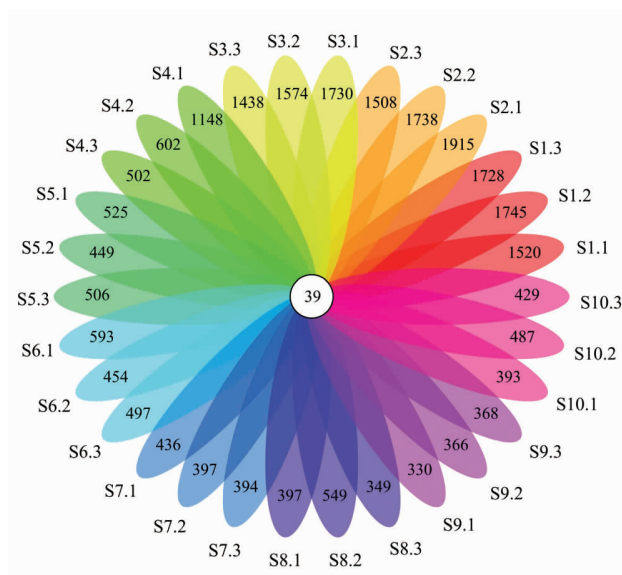
### 2.1 臭鳊鱼发酵过程细菌 OTU 分布特征

通过高通量测序技术对臭鳊鱼发酵过程30个样品的16S rRNA基因V3-V4区进行微生物

菌群检测,共获得 1 721 397 条有效序列,每个样品至少产生 121 285 条有效序列,平均产生 172 140 条有序序列,平均长度在 400~425 bp。通过 OTU 聚类,共产生 5 128 个 OTU 分类。维恩图直观地展示了臭鳊鱼发酵过程中细菌群落共有和特有的 OTU 数目(图 1)。由图 1 可知,所有臭鳊鱼样品共有 OTU 数量为 39 个,发酵过程中,OTU 数量基本呈逐渐降低趋势,说明随着发酵时间的延长,臭鳊鱼中的微生物菌群结构变化明显,且生物多样性逐渐降低。发酵前期,臭鳊鱼中的物种数占整个发酵过程总数比例较高,而发酵中期至发酵后期物种数下降明显,占总数比例低。从前期对风味的研究结果看,发酵前期和发酵中、后期臭鳊鱼的风味差距较大<sup>[14-15]</sup>。因此,推断发酵前期大部分物种对臭鳊鱼风味不起作用,发酵中、后期的共有物种及独有物种可能是影响臭鳊鱼风味关键物种。

2.2 臭鳊鱼发酵过程细菌群落 α-多样性分析

不同发酵阶段臭鳊鱼样品细菌群落的 α-多样性测定结果见表 1。由表 1 可知,样品覆盖率均大于 0.98,表明样品采集合理,测定结果可靠。在发酵过程中,Chao1 指数、Shannon 指数基本呈逐渐降低趋势,表明细菌群落丰富度和多样性均逐渐降低。这主要是由于发酵前期臭鳊鱼自身携带



注:以 S1.1、S1.2、S1.3 为例,分别代表 3 个平行样品。

图 1 臭鳊鱼发酵过程细菌群落维恩图  
Fig.1 Venn map of bacteria communities in stinky mandarin fish during the fermentation

的微生物及接触到的环境微生物较多,随着发酵过程的进行,在低温和盐腌发酵条件下,发酵体系中的微生物代谢产酸,导致 pH 值降低,使不耐酸和不耐低温的细菌生长受到抑制,从而逐渐减少或消失。

表 1 臭鳊鱼细菌群落 α-多样性测定结果

Table 1 Determination of α-diversity index of bacterial community of stinky mandarin fish

样品	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖率/%
S1	1 923.69 ± 119.01	8.16 ± 0.18	0.98 ± 0.00	98.53 ± 0.08
S2	1 940.32 ± 183.30	8.01 ± 0.44	0.98 ± 0.01	98.45 ± 0.22
S3	1 859.72 ± 152.62	7.59 ± 0.42	0.98 ± 0.01	98.28 ± 0.01
S4	882.20 ± 297.37	4.69 ± 2.36	0.82 ± 0.13	99.30 ± 0.08
S5	658.42 ± 76.77	2.94 ± 0.26	0.59 ± 0.05	99.38 ± 0.06
S6	670.05 ± 81.82	4.35 ± 0.55	0.86 ± 0.03	99.43 ± 0.03
S7	532.20 ± 12.50	3.93 ± 0.04	0.89 ± 0.00	99.48 ± 0.03
S8	506.22 ± 77.58	4.22 ± 0.23	0.90 ± 0.01	99.52 ± 0.06
S9	430.03 ± 43.54	4.36 ± 0.006	0.91 ± 0.00	99.59 ± 0.04
S10	512.59 ± 39.49	4.60 ± 0.65	0.91 ± 0.02	99.54 ± 0.08

2.3 臭鳊鱼发酵过程细菌群落 β-多样性分析

基于 Bray curtis 距离对细菌群落进行 PcoA 分析。由图 2a 可知,主成分 PC1 和 PC2 分别可以解释 51.33%和 23.41%的细菌群落结构变化,合

计解释细菌群落结构变化 74.74%。臭鳊鱼各发酵阶段平行样品之间距离较近,说明样品相似度较高,群落结构较一致,不同阶段样品之间呈现明显的分离状态且距离较远,说明菌群结构存在明显

差异。由图 2b 可知,不同发酵阶段的臭鳊鱼样品可以聚为 3 类,S1、S2、S3 样品为 1 类,即发酵 0~2 d 的样品;S4、S5、S6 样品为 1 类,即发酵 4~8 d 的样品;S7、S8、S9、S10 样品为 1 类,即发酵 10~16 d

的样品,与图 2a 的结果一致,表明臭鳊鱼的发酵过程可以分为 3 个阶段,即发酵前期(0~2 d)、发酵中期(4~8 d)和发酵后期(10~16 d),与前期研究结果一致<sup>[14]</sup>。

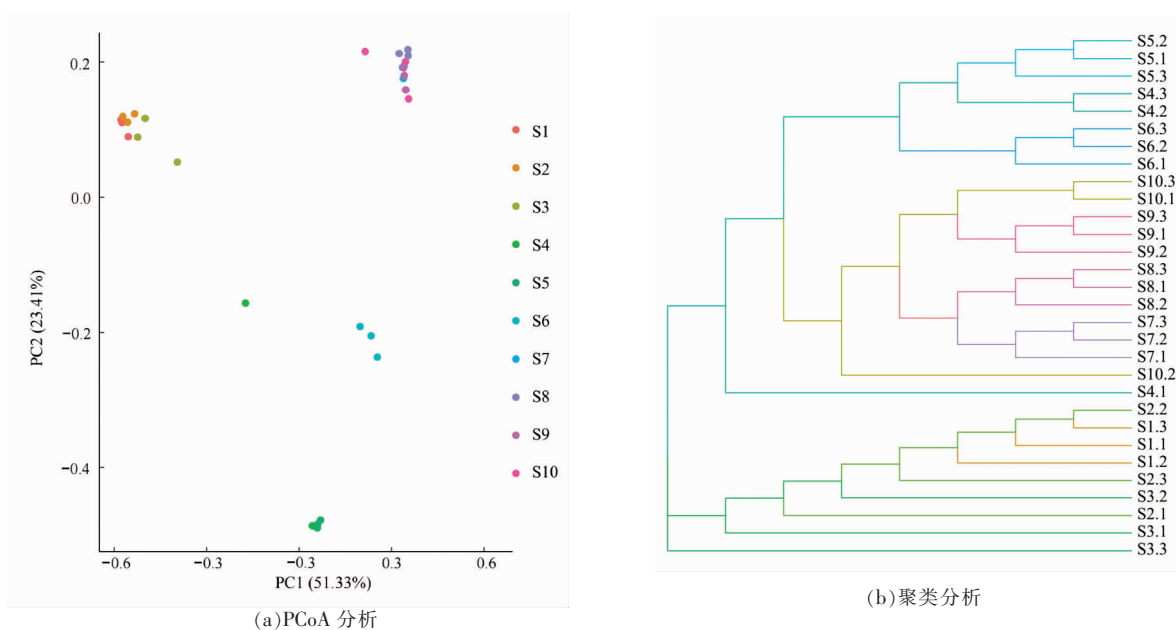


图 2 臭鳊鱼细菌群落的 PCoA 分析和聚类分析

Fig.2 PCoA and cluster analysis of bacterial community of stinky mandarin fish

## 2.4 臭鳊鱼发酵过程细菌群落结构分析

不同发酵阶段臭鳊鱼样品中细菌群落在种属水平上的组成如图 3 所示。由图 3a 可知,臭鳊鱼在发酵初期的优势菌属主要为未分类鼠杆菌科 (*Muribaculaceae*) 菌属、卡氏伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*) 和埃希氏-志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*),所占比例分别为 14.91%, 8.03% 和 3.66%; 发酵中期的优势菌属为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、嗜冷杆菌属和泛菌属 (*Pantoea*), 分别占 44.15%, 8.47% 和 10.69%; 发酵后期则主要包含乳杆菌属、哈夫尼亚-肥杆菌属 (*Hafnia-Obesumbacterium*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 和弧菌属细菌, 分别占 14.47%, 14.87%, 13.23%, 12.09% 和 4.90%。发酵前期位居前 3 的微生物菌属在发酵中、后期的含量明显降低, 其它微生物菌属, 如乳杆菌属虽然在整个发酵过程中均有体现, 但在发酵中、后期相对丰度显著高于发酵前期, 是构成发酵体系的优势微生物菌群。

由图 3b 可知,臭鳊鱼在发酵初期的优势菌群为大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 占比为 5.92%; 发酵中期的菌群主要包含清酒乳杆菌和消化嗜冷杆菌 (*Psychrobacter alimentarius*), 分别占 43.43% 和 7.48%, 而发酵后期则以清酒乳杆菌、蜂房哈夫尼亚菌 (*Hafnia alvei*)、普城沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica*)、留荫弧菌 (*Vibrio rumoiensis*) 等优势细菌为主, 分别占 13.94%, 14.85%, 12.06% 和 4.89%。清酒乳杆菌在发酵初期相对丰度较低, 至发酵中期相对丰度明显增加, 并成为发酵体系中的优势菌群, 至发酵后期相对丰度虽然有所下降, 但仍然是发酵体系中的主要优势菌群之一, 提示清酒乳杆菌在自然发酵臭鳊鱼中占据主导地位, 与李燕<sup>[3]</sup>对自然发酵臭鳊鱼微生物菌群组成的研究结果一致。

通过主成分分析 (PCA) 更直观得到细菌群落和不同发酵阶段样品之间的关系 (图 4)。图 4 明确发酵前期菌群主要为卡氏伯克霍尔德菌属、埃希氏-志贺氏菌属等, 发酵中期菌群主要为乳杆菌

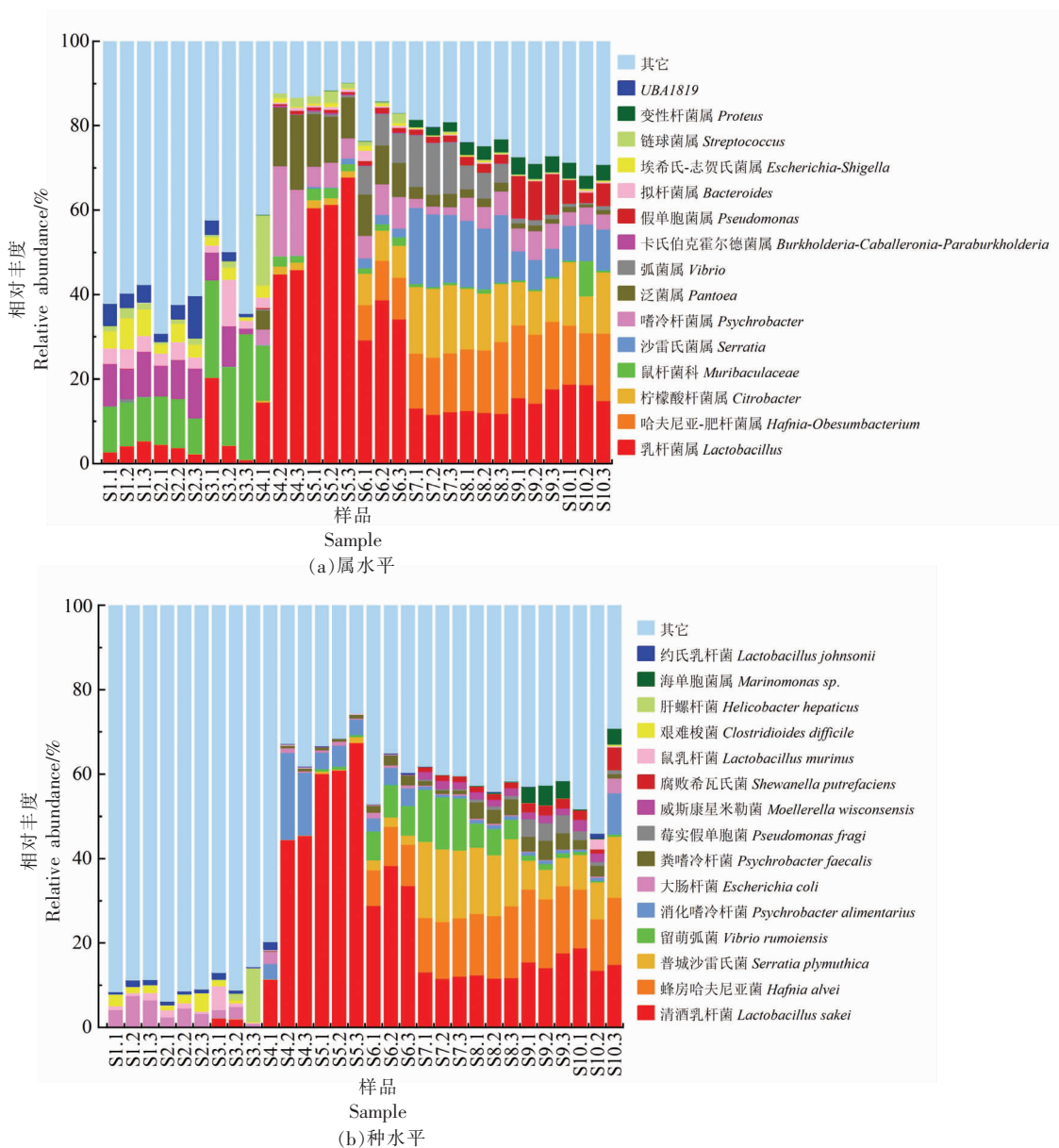


图 3 臭鳊鱼发酵过程中细菌群落分布在属、种水平上的分布

Fig.3 Distrubution of bacterial community in stinky mandarin fish during the fermentation at the genus and species level

属、嗜冷杆菌属和泛菌属细菌,其中清酒乳杆菌和消化嗜冷杆菌是主要的优势菌,发酵后期的菌群主要为乳杆菌属、弧菌属、沙雷氏菌属、柠檬酸杆菌属、变形杆菌属、沙雷氏菌属和假单胞菌属细菌,如清酒乳杆菌、蜂房哈夫尼亚菌、留萌弧菌、普城沙雷氏菌。这些结果表明,臭鳊鱼的发酵过程是一个动态变化的过程,发酵环境的改变导致了发酵过程中微生物群落结构产生明显差异。

传统臭鳊鱼发酵是一个多菌种共同作用的自

然发酵过程,鱼体是其发酵微生物的主要来源。埃希氏菌属、嗜冷杆菌属细菌是鳊鱼自身易携带的微生物,其它菌属如弧菌属、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、哈夫尼亚菌属和希瓦氏菌属 (*Shewanella*)细菌也在鳊鱼中大量存在<sup>[13]</sup>。这些细菌是鱼类及其发酵制品中常见的腐败微生物<sup>[16-19]</sup>,严重影响产品质量和安全。微生物接种发酵是改善发酵鱼制品品质的有效途径之一<sup>[20-23]</sup>。用于接种发酵的微生物通常是从自然发酵制品中分离获

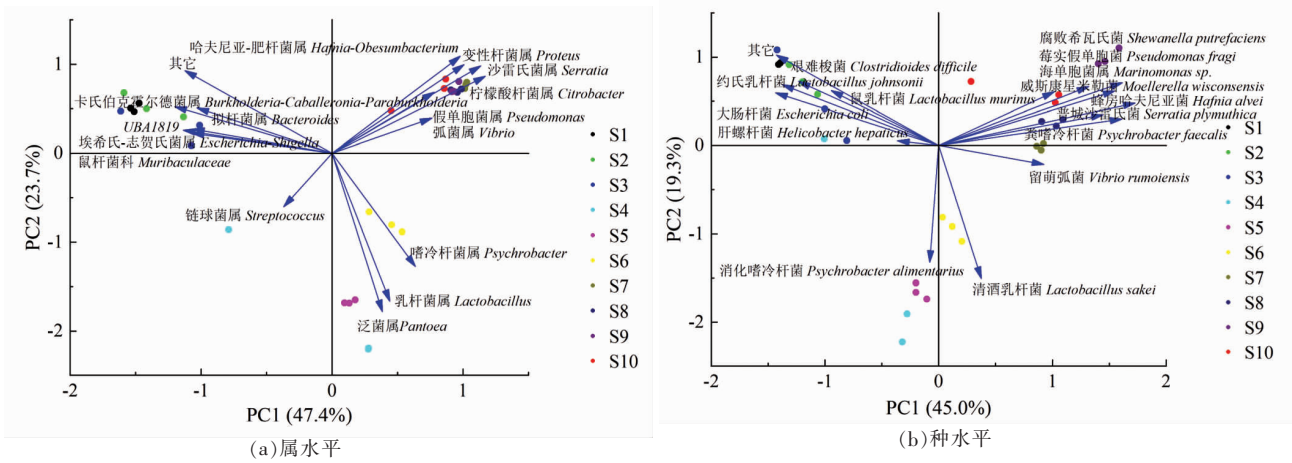


图 4 臭鳊鱼发酵过程中细菌群落主成分分析

Fig.4 Pricpal component analysis of bacterial community during fermentation of stinky mandarin fish

得,包括细菌和真菌<sup>[24]</sup>,而传统上乳酸菌是许多发酵鱼制品中的优势微生物,分离到的乳酸菌主要包括清酒乳杆菌<sup>[25]</sup>、短乳杆菌(*L. brevis*)<sup>[26]</sup>、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)<sup>[27-29]</sup>、植物乳杆菌(*L. plantarum*)<sup>[30]</sup>和乳酸乳球菌(*L. lactis*)<sup>[8]</sup>等,对发酵鱼制品风味和品质形成具有重要贡献。本研究通过高通量测序技术研究臭鳊鱼菌群组成得出,清酒乳杆菌是臭鳊鱼中的优势乳酸菌类群,这为臭鳊鱼工业化生产用发酵剂的研发提供了良好的菌种资源。

### 2.5 臭鳊鱼发酵过程细菌群落功能预测

为了解臭鳊鱼发酵过程中微生物菌群的潜在功能,借助 KEGG 功能注释数据库,使用 PICRUSt 软件对 16S rRNA 测序结果进行细菌群落

功能预测,得到 COG 功能相对丰度(图 5)和 KEGG 通路相对丰度(图 6)。

通过 PICRUSt 功能预测,从臭鳊鱼样品中共分析得到 4 441 个 COG,忽略未知功能的 COG,其它则隶属于 24 个功能类别。由图 5 可知,一般功能预测(R 类,11.00%~11.63%),氨基酸运输与代谢(E 类,7.80%~9.35%),转录(K 类,7.91%~8.92%),碳水化合物转运代谢(G 类,7.35%~9.20%),细胞壁/膜/被膜生物合成(M 类,5.67%~6.89%),转录、核糖结构和生物转化(J 类,5.22%~6.72%),能量生成和转化(C 类,5.13%~5.70%),复制、重组和修复(L 类,4.80%~6.17%)以及无机离子转运和代谢(P 类,4.69%~5.64%)功能在臭鳊鱼中表现较高的丰度,且这 9 类主要功能相对丰度

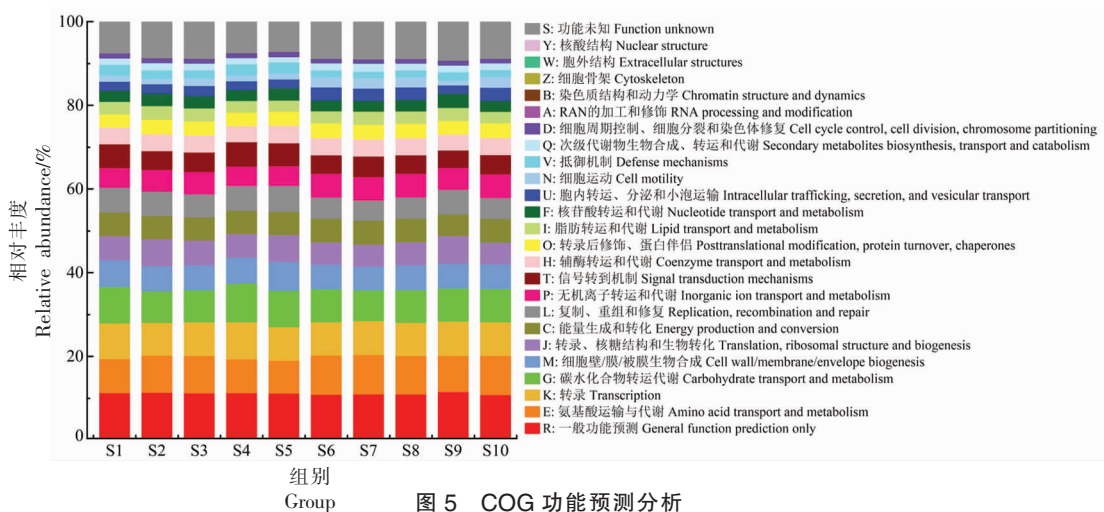


图 5 COG 功能预测分析

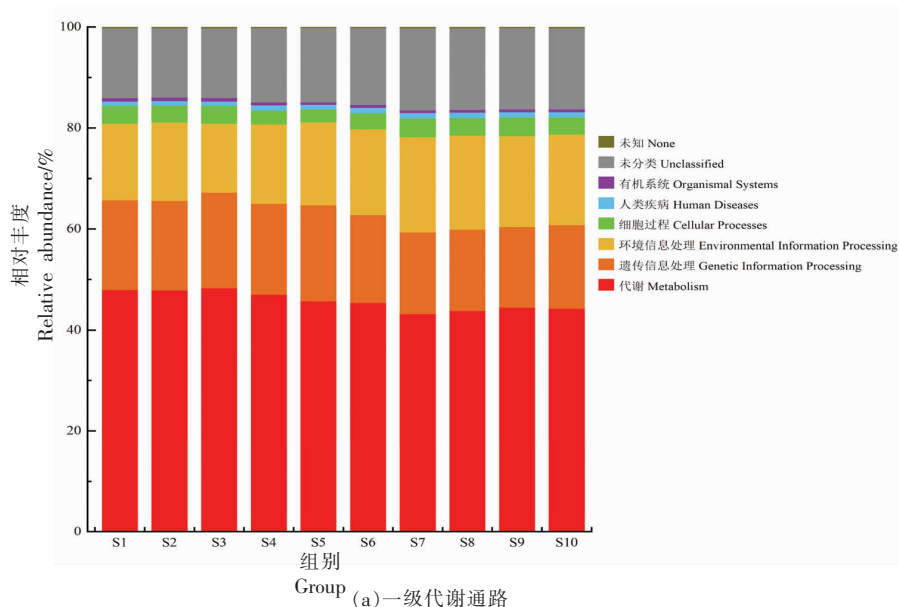
Fig.5 COG function prediction

总和在 50%以上,其中一般功能预测相对丰度最高,其次是氨基酸运输与代谢,转录、碳水化合物转运与代谢。氨基酸运输与代谢相对丰度在发酵过程中的排序为:发酵前期<发酵中期<发酵后期,转录、碳水化合物转运与代谢相对丰度在发酵过程中的排序均为:发酵前期>发酵中期≈发酵后期。其它 COG 功能,如信号转到机制(T类,4.22%~5.89%),辅酶转运和代谢(H类,3.85%~4.22%),转录后修饰、蛋白伴侣(O类,3.10%~3.51%),脂肪转运和代谢(I类,2.68%~3.21%)以及核苷酸转运和代谢(F类,2.57%~3.40%)等在臭鳊鱼中的相对丰度则较低。

COG 功能预测结果表明,在臭鳊鱼所有代谢途径中,碳水化合物转运代谢、氨基酸运输与代谢最为活跃,且与风味物质形成密切相关,发酵中、后期是臭鳊鱼中微生物生成氨基酸类物质并进一步代谢转化成小分子风味物质的主要阶段。研究发现多数乳酸菌如清酒乳杆菌、植物乳杆菌、德氏乳杆菌(*L. delbrueckii*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、乳酸片球菌(*P. acidilactici*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、乳酸乳球菌等均具有产氨基酸的能力<sup>[31-34]</sup>。结合图 2b 显示臭鳊鱼发酵中、后期清酒乳杆菌丰度较高,推测其对臭鳊鱼中风味物质的形成具有重要作用。

通过 PICRUS1 软件对臭鳊鱼发酵过程中的细菌群落结构进行功能预测,在 KEGG 数据库中共注释到 6 类一级代谢通路,其中代谢、遗传信息处

理和环境信息处理是臭鳊鱼菌群主要的代谢通路,这 3 类代谢通路在发酵过程中的丰度值排序均为:发酵前期<发酵中、后期,在所有代谢通路中的相对丰度分别为 43.24%~48.36%、15.96%~19.00%和 13.69%~18.60%(图 6a)。注释到 41 类二级代谢通路,其中属于上述 3 类通路的二级代谢通路相对丰度均大于 0.1%。臭鳊鱼发酵过程中的微生物菌群代谢途径主要富集在碳水化合物代谢(9.23%~11.14%)、氨基酸代谢(8.16%~9.75%)、能量代谢(4.64%~5.95%)、复制和修复(6.74%~8.48%)、翻译(4.09%~5.45%)、膜运输(11.75%~16.12%)等通路(图 6b)。具体来讲,碳水化合物代谢主要包括三羧酸循环、糖酵解和磷酸戊糖途径等,氨基酸代谢主要包括半胱氨酸和蛋氨酸代谢、赖氨酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等(图 6c)。在臭鳊鱼发酵体系中,鱼体为微生物生长代谢提供基质,微生物通过碳水化合物代谢、氨基酸代谢等途径将糖类、蛋白质、脂质等大分子物质先分解为有机酸、小肽和氨基酸类物质,再进一步代谢为醇类、醛类、酸类和酯类等小分子风味物质。各发酵阶段菌群三级代谢功能无显著差异,表明臭鳊鱼中的微生物菌群结构虽然在发酵过程中不断变化,而微生物发挥的主体代谢功能较一致,发酵过程中受影响的细菌群落代谢功能可能存在于未知部分。



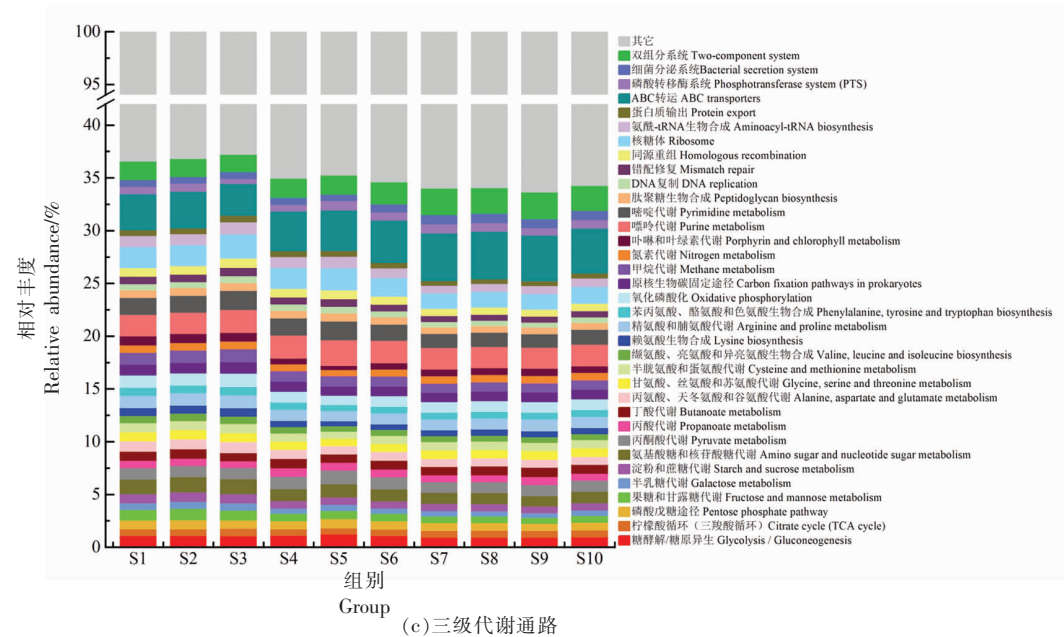
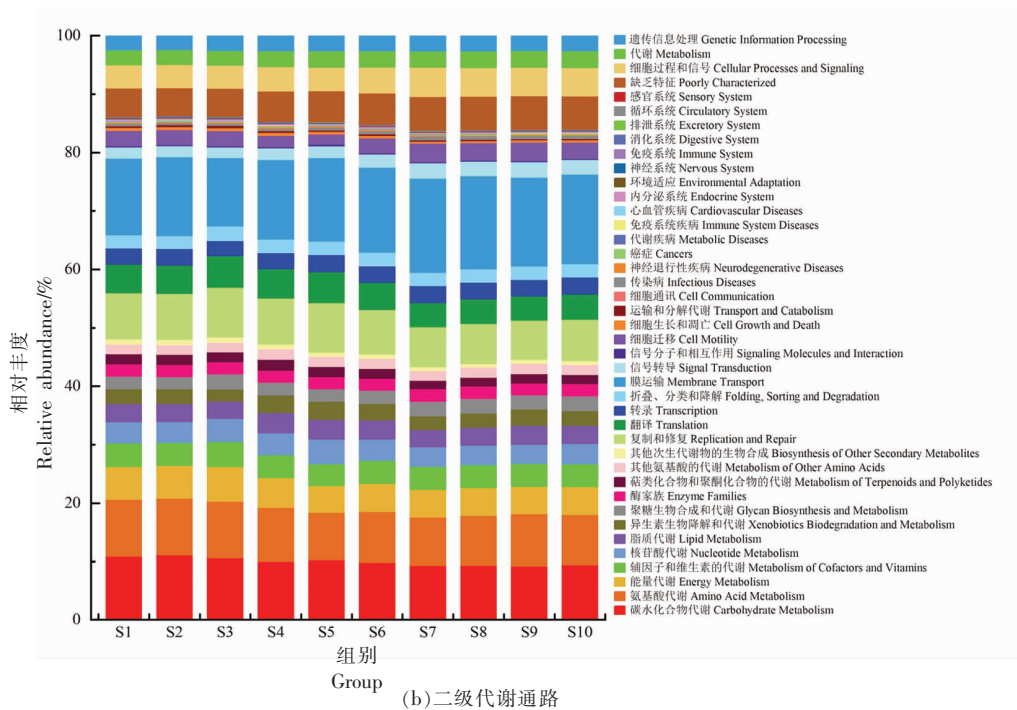


图 6 臭鳊鱼发酵过程细菌群落的代谢通路分析

Fig.6 Metabolic pathway analysis of microbial community in stinky mandarin fish during the fermentation

### 3 结论

本文通过高通量测序揭示了臭鳊鱼发酵过程中微生物群落结构的变化规律，发现不同发酵阶段微生物群落结构存在显著差异。发酵中期和发酵后期的优势菌群丰度均高于发酵前期，且结构较相似。发酵前期表现为病原微生物较多，发酵后

期则表现为优势物种更突出，且以乳杆菌属细菌为主，占绝对优势的乳酸菌为清酒乳杆菌。清酒乳杆菌可能是自然发酵臭鳊鱼中的关键微生物，对臭鳊鱼风味品质的形成起到重要作用。通过细菌群落代谢功能预测，发现碳水化合物代谢和氨基酸代谢的相对丰度最大，这两类代谢是臭鳊鱼风



味物质形成的主要动力来源,发酵中、后期的细菌群落结构对臭鳊鱼风味品质形成更为有利。

### 参 考 文 献

- [1] 李春萍, 吴佳佳, 李燕, 等. 臭鳊鱼的风味物质及风味活性物质分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 178-184.
- LI C P, WU J J, LI Y, et al. Study of volatile compounds and odor-active compounds in stinky mandarin fish[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(7): 178-184.
- [2] 周迎芹, 鄢嫣, 林心萍, 等. 安徽省臭鳊鱼加工产业调研及分析[J]. 农产品加工, 2020, 503(9): 67-71, 75.
- ZHOU Y Q, YAN Y, LIN X P, et al. Research and analysis on the processing industry of *Siniperca chuatsi* in Anhui Province[J]. Farm Products Processing, 2020, 503(9): 67-71, 75.
- [3] 李燕. 黄山臭鳊鱼发酵过程中微生物多样性的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2014.
- LI Y. Research on bio-diversity of microorganisms in Huangshan stinky mandarin fish[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2014.
- [4] 杨召侠, 刘洒洒, 高宁, 等. 臭鳊鱼发酵工艺优化及挥发性风味物质分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 253-262.
- YANG Z X, LIY S S, GAO N, et al. Fermentation process optimization and volatile flavour analysis of stink mandarin fish (Chouguiyu)[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(5): 253-262.
- [5] 周迎芹, 孙子怡, 黄晶晶, 等. 臭鳊鱼源清酒乳杆菌的分离鉴定及其在臭鳊鱼发酵中的应用[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 194-202.
- ZHOU Y Q, SUN Z Y, HUANG J J, et al. Isolation and identification of *Lactobacillus sakei* from fermented mandarin fish and its application in fermented mandarin fish[J]. Food Science, 2022, 43(12): 194-202.
- [6] 刘洒洒. 臭鳊鱼自然及接菌发酵过程中微生物菌落演化与品质变化规律研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018.
- LIU S S. Microbial community succession and the quality changes during spontaneous and inoculation fermentation of stinky mandarin fish (Chouguiyu)[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018.
- [7] 马晓飞, 黄宁, 梁钻好, 等. 混合菌发酵臭鳊鱼工艺优化[J]. 农业工程, 2022, 12(6): 84-89.
- MA X F, HUANG N, LIANG Z H, et al. Optimization of fermentation technology of stinky mandarin fish with mixed bacterial[J]. Agricultural Engineering, 2022, 12(6): 84-89.
- [8] BAO R Q, LIU S S, JI C F, et al. Shortening fermentation period and quality improvement of fermented fish, Chouguiyu, by co-inoculation of *Lactococcus lactis* M10 and *Weissella cibaria* M3[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1-11.
- [9] DAI Z Y, LI Y, WU J J, et al. Diversity of lactic acid bacteria during fermentation of a traditional Chinese fish product, Chouguiyu (stinky mandarin fish)[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(11): 1778-1783.
- [10] 李燕, 吴佳佳, 张井, 等. PCR-DGGE 技术分析传统臭鳊鱼发酵过程中细菌群落结构[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 29-34.
- LI Y, WU J J, ZHANG J, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial community structure in stinky mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Food Science, 2017, 38(18): 29-34.
- [11] SHEN Y Y, WU Y Y, WANG Y Q, et al. Contribution of autochthonous microbiota succession to flavor formation during Chinese fermented mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Food Chemistry, 2021, 348: 129107.
- [12] WANG Y Q, SHEN Y Y, WU Y Y, et al. Comparison of the microbial community and flavor compounds in fermented mandarin fish (*Siniperca chuatsi*): Three typical types of Chinese fermented mandarin fish products[J]. Food Research International, 2021, 144: 110365.
- [13] 周迎芹, 鄢嫣, 殷俊峰, 等. 发酵方式对黄山臭鳊鱼菌群组成及挥发性物质的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(10): 36-43.
- ZHOU Y Q, YAN Y, YIN J F, et al. Effect of fermentation methods on microflora and volatile compounds in Huangshan smelly mandarin fish[J]. Meat Research, 2019, 33(10): 36-43.
- [14] 周迎芹, 杨明柳, 殷俊峰, 等. 臭鳊鱼低温发酵过程中品质及挥发性物质的变化[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 179-186.

- ZHOU Y Q, YANG M L, YIN J F, et al. Changes of quality and volatile compounds in stinky mandarin fish during low-temperature fermentation [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(4): 179-186.
- [15] 李春萍. 臭鳊鱼发酵中营养和风味变化的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2014.
- LI C P. Study on the changes in nutrition and flavor of stinky mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) during fermentation [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2014.
- [16] 郭全友, 朱彦祺, 姜朝军, 等. 鱼源腐败希瓦氏菌生长/非生长界面模型的建立和验证[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 172-180.
- GUO Q Y, ZHU Y Q, JIANG C J, et al. Establishment and validation of growth/non-growth interface model of *Shewanella putrefaciens* isolated from fish [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(3): 172-180.
- [17] 郑振霄, 戴志远. 鲈鱼冷海水贮藏期间特定腐败菌的鉴定[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 246-255.
- ZHENG Z X, DAI Z Y. Identification of the specific spoilage bacteria of mackerel during cold seawater storage [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 246-255.
- [18] 高乾坤, 焦琳舒, 杜贺超, 等. 高通量测序分析不同产地带鱼冷藏时微生物群落多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 127-132.
- GAO Q K, JIAO L S, DU H C, et al. High-throughput sequencing analysis of microbial community diversity of hairtail from different waters during chilled storage [J]. Food Chemistry, 2018, 39(18): 127-132.
- [19] 程三红, 汤海青, 欧昌荣, 等. 鲈鱼和大黄鱼冷藏期间体表细菌群落组成和代谢功能的比较分析[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 218-225.
- CHENG S H, TANG H Q, OU C R, et al. Comparative analysis of compositions and metabolic functions of bacterial communities on the surface of mackerel and large yellow croaker during refrigerated storage [J]. Food Science, 2018, 39(19): 218-225.
- [20] 郑志颖, 周晶, 袁丽, 等. 混合菌株和外源赖氨酸对鱼酱发酵品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 108-114.
- ZHENG Z Y, ZHOU J, YUAN L, et al. Effects of mixed starter cultures and exogenous L-Lys on fermentation quality of fish paste [J]. Food Science, 2019, 40(12): 108-114.
- [21] 蓝翔, 朱翠翠, 何晓霞, 等. 接种生物胺降解菌对鱼露生物胺含量及品质的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(4): 55-64.
- LAN X, ZHU C C, HE X X, et al. Effects of inoculated biogenic amines degrading bacteria on biogenic amines concentration and quality of fish sauce [J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(4): 55-64.
- [22] 周迎芹, 杨明柳, 殷俊峰, 等. 清酒乳杆菌对臭鳊鱼食用品质及挥发性风味物质的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 160-168.
- ZHOU Y Q, YANG M L, YIN J F, et al. Effect of *Lactobacillus sakei* on edible quality and volatile flavor of stinky mandarin fish [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 160-168.
- [23] 田旭艳, 高沛, 夏文水, 等. 接种戊糖乳杆菌和酿酒酵母菌对低盐发酵鳊鱼品质的影响[J]. 南方水产科学, 2022, 18(2): 124-133.
- TIAN X Y, GAO P, XIA W S, et al. Effects of inoculation of *Lactiplantibacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* on quality of low-salt fermented bream [J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(2): 124-133.
- [24] 周袁璐, 师苑, 陆跃乐, 等. 传统发酵过程微生物互作研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, 21(11): 349-358.
- ZHOU Y L, SHI Y, LU Y L, et al. Research progress on microbial interaction in traditional fermentation [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 349-358.
- [25] ZHOU Y Q, WU S M, PENG Y L, et al. Effect of lactic acid bacteria on mackerel (*Pneuma tophorus japonicus*) seasoning quality and flavor during fermentation [J]. Food Bioscience, 2021, 41: 100971.
- [26] 张豪, 章超桦, 曹文红, 等. 传统鱼露发酵液中优势乳酸菌的分离、纯化与初步鉴定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 186-188, 194.
- ZHANG H, ZHANG C H, CAO W H, et al. Isolation, purification and identification of dominant lactic acid bacteria from traditional fish sauce [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 186-188, 194.
- [27] 林胜利, 张琦琳, 聂小华. 发酵鱼制品中乳酸菌的

- 筛选鉴定及其初步应用[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 61–65.
- LIN S L, ZHANG Q L, NIE X H. Screening and application of lactic acid bacteria from fermented fish products[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(2): 61–65.
- [28] 贺林娟, 汤海青, 曹锦轩, 等. 糟鱼中乳酸菌的分离鉴定及鳊鱼发酵条件优化[J]. 核农学报, 2013, 27(4): 458–466.
- HE L J, TANG H Q, CAO J X, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria from traditional vinasse fish and optimization of parameters for preparing fermented Chinese herring[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(4): 458–466.
- [29] 唐思, 刘章武. 醉鱼中菌种的分离筛选与鉴定研究[J]. 中国酿造, 2010(12): 120–123.
- TANG S, LIU Z W. Isolation and identification of microbes from vinasse fish[J]. China Brewing, 2010(12): 120–123.
- [30] 曾雪峰, 夏文水. 湘西传统酸鱼中乳酸菌的分离及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(12): 40–44.
- ZENG X F, XIA W S. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Xiangxi traditional low salt fermented fish (Suan yu)[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(12): 40–44.
- [31] SANZ Y, TOLDRÁ F. Purification and characterization of an X-prolyl-dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus sakei*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1815–1820.
- [32] 郭文瑞, 韩云飞, 杨扬, 等. 植物乳杆菌对发酵香肠蛋白质分解及游离氨基酸的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(4): 209–215.
- GUO W R, HAN Y F, YANG Y, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* on protein decomposition and free amino acids in fermented sausages[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(4): 209–215.
- [33] 赵春雨, 曲晓军, 崔艳华, 等. 德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌的共生机制研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2015, 38(4): 21–24.
- ZHAO C Y, QU X J, CUI Y H, et al. Review on protocoooperation between *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2015, 38(4): 21–24.
- [34] CHEN Q, LIU Q, SUN Q X, et al. Flavour formation from hydrolysis of pork sarcoplasmic protein extract by a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage[J]. Meat Science, 2015, 100: 110–117.

### Microbial Community Structure and Function Prediction during the Fermentation of Stinky Mandarin Fish

ZHOU Yingqin<sup>1,2</sup>, WANG Hao<sup>3</sup>, HUANG Jingjing<sup>1,2</sup>, LUO Gege<sup>4</sup>, YAN Yan<sup>1,2</sup>, XIE Ningning<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Agro-products Processing Research, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031

<sup>2</sup>Anhui Engineering Laboratory of Food Microbial Fermentation and Functional Application, Hefei 230031

<sup>3</sup>College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang

<sup>4</sup>College of Food Science and Engineering, Anhui Science and Technology University, Chuzhou 233100, Anhui

**Abstract** In this study, high-throughput sequencing was used to analyze the changes of bacterial community structure during fermentation of stinky mandarin fish, and PICRUSt was used to predict the metabolic function of bacterial community. The results showed that the bacterial community of stinky mandarin fish was mainly consists of *Muribaculaceae*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, *Lactobacillus*, *Psychrophilic*, *Pantobacterium*, *Hafnia-Obesumbacterium*, *Citrobacillus*, *Serratia*, etc. Based on OTU level, the samples of stinky mandarin fish could be clustered into three fermented stages including early stage (0–2 d), middle stage (4–8 d) and late stage (10–16 d). The abundance of dominant bacteria at the middle and late stages of fermentation were higher than those at the early stages of fermentation. *Lactobacillus* occupied absolute advantage at the middle and late stages of fermentation, mostly of *Lactobacillus sakei* with the largest relative abundance of 43.43%, and played an important role during the formation of flavor quality in

stinky mandarin fish. PICRUSt analysis showed that the bacterial community function in the fermentation system of stinky mandarin fish mainly focused on amino acid transport and metabolism, carbohydrate transport and metabolism, and the functional composition of samples at different fermentation stages was relatively similar. This study aimed to provide theoretical basis for the development and application of microbial resources of stinky mandarin fish by studying the changes of bacterial community structure and metabolic functions during its fermentation process.

**Keywords** stinky mandarin fish; high-throughput sequencing; fermentation process; bacterial community structure; functional prediction