

一株戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 在模拟鱼露中的代谢行为及转录组学分析

李梦茹¹, 王香君¹, 段杉¹, 吴凤英²

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 阳江市永昊食品有限公司, 广东阳江 529500)

摘要: 本文采用模拟鱼露体系, 通过化学成分分析及转录组测序的手段研究了接种 *Pediococcus pentosaceus* 对鱼露发酵效果的影响。结果发现 *Pediococcus pentosaceus* 可显著提高鱼露中 Glu、Gly、Ala、Ser、Asp 等良好风味氨基酸的含量, 降低 Phe 等不良风味氨基酸含量; 并且鱼露的挥发性成分中烃类、酯类的成分的种类和含量均大幅减少, 芳香族化合物的种类大大减少但总量大幅增加; 而醛类、酮类、酸类和胺类成分的种类和含量均显著增加; 感官评定结果表明接种 *Pediococcus pentosaceus* 可显著改善鱼露的鲜味和香气。转录组测序结果表明, 在模拟鱼露中 *Pediococcus pentosaceus* 的碳水化合物和氨基酸的代谢最为活跃, 且处于最活跃的代谢通路中的氨基酸也是鱼露中含量变化最大的氨基酸; 还发现 *Pediococcus pentosaceus* 有较强的蛋白酶和肽酶活性; 柠檬烯和松萜的降解也是 *Pediococcus pentosaceus* 的主要代谢通路之一, 该通路与挥发性成分的产生有关; 本研究未发现 *Pediococcus pentosaceus* 在模拟鱼露发酵过程中有氨基酸脱羧酶表达。

关键词: 鱼露; *Pediococcus pentosaceus*; 转录组; 风味; 游离氨基酸; 挥发性成分

文章编号: 1673-9078(2016)8-54-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.009

Metabolic Behavior and Transcriptomic Analysis of A *Pediococcus pentosaceus* Strain in Simulated Fish Sauce

LI Meng-ru¹, WANG Xiang-jun¹, DUAN Shan¹, WU Feng-ying²

(1. College of Food Science and Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Yangjiang Yonghao Food Co. Ltd., Yangjiang 529500, China)

Abstract: The influence of *Pediococcus pentosaceus* inoculation on the fermentation in a simulated fish sauce system was investigated by chemical analysis and transcriptomic sequencing technique in this paper. The results showed that *P. pentosaceus* remarkably increased the content of amino acids with an agreeable taste, including glutamic acid (Glu), glycine (Gly), alanine (Ala), serine (Ser), aspartic acid (Asp), and others, and reduced the content of amino acids with an unpleasant taste, including phenylalanine (Phe) and others. Additionally, after inoculation with *P. pentosaceus*, the volatile compound content changed significantly. The types and content of hydrocarbon and ester compounds were reduced dramatically; the types of aromatic compounds decreased but the total content was increased greatly; and the types and content of aldehydes, ketones, acids, and amines increased significantly. Sensory evaluation showed that *P. pentosaceus* remarkably improved the flavor and aroma of fish sauce. The results of transcriptomic sequencing indicated that carbohydrate and amino acid metabolism of *P. pentosaceus* in the simulated fish sauce were the most active. The content of the amino acids, which were involved in the most active pathways, showed the most significant changes in fish sauce. Additionally, *P. pentosaceus* had relatively strong protease and peptidase activities. The degradation of limonene and pinene was found to be a major pathway in *P. pentosaceus* and was associated with the formation of volatile compounds. In this study, the expression of various amino acid decarboxylases was not detected in *P. pentosaceus* during fermentation of the simulated fish sauce.

Key words: fish sauce; *Pediococcus pentosaceus*; transcriptome; flavor; free amino acids; volatile ingredients

收稿日期: 2015-12-15

基金项目: 广东省省部产学研合作专项资金项目(2013B090600111); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201353C05); 广东省省部产学研合作专项资金项目(2013B090600111)

作者简介: 李梦茹(1992-), 女, 硕士, 研究方向: 水产品综合利用

通讯作者: 段杉(1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术和水产品综合利用

鱼露是以海产低值鱼等为原料,与一定比例的食盐混合后,利用鱼体自身酶系及多种微生物的协同作用,对原料鱼中的蛋白质、脂肪等成分进行数月乃至数年发酵分解,酿制而成。其营养丰富、风味独特,富含人体所有的必须氨基酸等18种以上的氨基酸。目前鱼露的生产主要集中在东南亚国家,在我国生产多分布于东南沿海地区,以汕头和福州的鱼露生产规模较大。

传统的鱼露产品生产均采用自然发酵方式,发酵周期长达1年至数年;而且自然发酵的工艺受气候条件的影响很大,工艺稳定性差;此外,发酵过程菌相复杂,并产生组胺、亚硝胺等危害食品安全的成分。这种低效、粗放、安全性较低的生产方式不适应现代工业化生产的要求,需要加以改进。

目前国内外学者对于鱼露发酵工艺的改进多采用外加蛋白酶的方式,这种方式虽可以加速蛋白质的水解,但鱼露风味成分不仅仅包括游离氨基酸和短肽等,还包括其他各种微生物代谢产物,如挥发性成分等,因此,简单地采用外加蛋白酶的方式加速鱼露生产难以获得传统鱼露的风味。目前一般认为,某些耐盐/嗜盐乳酸菌对鱼露风味的形成有很大贡献^[1,2],包括 *Tetragenococcus halophilus*^[3,4] 和 *Pediococcus pentosaceus*^[5,6]等食用安全的菌种,因此,采用人工接种的方式对传统鱼露发酵工艺进行改造是解决上述问题的一条有效途径。

鉴于上述问题,本研究采用无菌的模拟鱼露体系,接种特定菌株,在纯种发酵条件下研究接种的菌株对发酵的贡献,采用转录组测序技术分析该菌株在发酵过程中的基因表达情况,同时结合各种风味成分的测定,以期部分阐明接种发酵鱼露的机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

游鳍叶鲮 (*Caranx (Atule) mate* Cuvier, 地方名:黄尾鱼),购于广州市天河区华润万家超市。

Tetragenococcus halophilus CGMCC 1.2492 (嗜盐四联球菌),购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

DNA提取试剂盒:ZR Fungal/Bacterial DNA Kit。

RNA提取试剂盒:Trizol Reagent (Invitrogen)。

引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

复合蛋白酶(BR):广州市天河区远天酶制剂厂。

1.2 方法

1.2.1 模拟鱼露的制备以及接种发酵

用绞肉机将游鳍叶鲮绞碎,按鱼肉质量的10%、8.8%和0.11%加入水、食盐和复合蛋白酶,混匀,于60℃酶解4h,待鱼肉全部液化后用200目尼龙滤布过滤,再用快速滤纸过滤,得到澄清的鱼蛋白水解液。补加食盐,使水解液的盐度达到25% (m/m),再121℃灭菌15min备用,作为模拟鱼露样品。

将CGMCC1.2492用含5% NaCl的MRS肉汤培养基培养48h,无菌条件下离心沉淀菌体,再将菌体接种到灭菌的模拟鱼露样品中,同时作对照(模拟鱼露中不接种任何微生物),并放入35℃培养箱中发酵15d。

1.2.2 化学分析

蛋白酶活力:采用SBT 10317-1999蛋白酶活力测定法稍作改进,将模拟鱼露样品用pH 6.4的磷酸盐缓冲液稀释25倍后测定,并在40℃下反应30min。以在40℃下每min水解酪蛋白产生1μg酪氨酸,定义为1个蛋白酶活力单位(U)。

挥发性成分:采用固相微萃取结合GC-MS法。取样品转入顶空进样瓶中,将SPME针管插入样品瓶中进行萃取,萃取温度50℃、萃取时间30min。取出萃取头,立即插入色谱仪进样口,250℃热解吸3min后进行色谱和质谱分析。采用Agilent 6890N/5975 GC-MS,色谱条件:HP-5MS毛细管柱(30m×250μm×0.25μm);进样口温度为230℃;升温程序:起始温度60℃,保持2min,以5℃/min上升至110℃,保持2min,再以10℃/min升至220℃,保持10min;载气流速为1.0mL/min,不分流。质谱条件:5975 C型四极杆质谱仪,电子轰击(EI)离子源,电子能量为70eV;离子源温度为230℃,四极杆温度为150℃,质量扫描范围:45~550m/z。

pH值:用pH计测定。

可溶性氮(TSN):取发酵液,过滤得上清液,按GB/T 5009.5-2003凯氏定氮法测定上清液中氮含量。

氨基酸态氮(AAN):GB/T 5009.39-2003甲醛滴定法。

挥发性盐基氮(TVB-N):GB/T 5009.44-2003微量扩散法。

游离氨基酸:参照GB/T 5009.124-2003的方法,采用日立-8800型氨基酸自动分析仪检测。

生物胺的测定:采用HPLC法测定,以单一生物胺标准品保留时间定性,外标法定量。样品的前处理及衍生化参考陆永梅^[7]和Mah等^[8]的报道。

1.2.3 感官评定

用商品鱼露作为对照,感官评价小组由10人组成

(5男5女), 并进行总时间不小于2h的培训。对鱼露的颜色、气味(鱼腥味、腐臭味、胺味、奶酪味)和滋味(苦味、酸味、鲜味、咸味)进行感官评价, 评分由从0到5的6个分数给出, “0”代表完全没有所指的味道, “5”代表所指味道非常强烈。

1.2.4 菌种鉴定

提取CGMCC1.2492的DNA, 采用细菌通用引物27F(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和1492R(5'GGTTACCTTGTTACGACTT)扩增全长16S rDNA序列, 扩增产物长度约1500bp^[9]。

PCR反应体系(25 μL)的优化: GoTaq Green Master Mix (2×) 12.5 μL, 引物各1 μL (10 μmol/L), 细菌DNA模板1 μL, dd H₂O 9.5 μL。PCR程序: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 55 °C退火45 s, 72 °C延伸90 s, 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 随后进行测序。测序由上海生工生物公司完成。将测序结果登录NCBI网站用BLAST程序进行序列比对。

1.2.5 细菌转录组分析

1.2.5.1 细菌总RNA的提取

吸取模拟鱼露样品, 离心分离CGMCC1.2492菌体细胞, 采用Trizol Reagent总RNA, 并用DNase I(Promega)消化DNA, 然后提交到华大生物科技公司。

1.2.5.2 测序文库的构建及质检、测序

RNA样品检测合格后, 用Ribo-Zero试剂盒去除rRNA; 加入打断试剂在Thermomixer中适温将mRNA打断成短片段, 以打断后的mRNA为模板合成一链

cDNA, 然后配制二链合成反应体系合成二链cDNA, 并使用试剂盒纯化回收、粘性末端修复、cDNA的3'末端加上碱基“A”并连接接头, 然后进行片段大小选择, 最后进行PCR扩增; 构建好的文库用Agilent 2100 Bioanalyzer和ABI StepOnePlus Real-Time PCR System质检合格后, 使用IlluminaHiSeq™ 2000进行测序。

1.2.5.3 测序和数据处理

对测序所得Raw Data过滤获得Clean Data; 进行数据产量统计及测序数据的成分和质量评估, 包括产量、Q20、GC含量等; 用Trinity软件组装出Contig和Unigene, 并进行质量统计, 并做一个长度分布统计; 再分别将Unigene注释到Nr、Nt、Swiss-Prot、KEGG、COG、GO等库, 并分别对注释到每个库以及所有注释上的Unigene数目进行统计, 给出NR分类图和COG分类图; 根据Nr注释信息得到GO功能注释, 得到每个Unigene的GO注释后, 用WEGO软件对所有Unigene做GO功能分类统计; 根据KEGG数据库的注释信息得到Unigene的Pathway注释; 按NR、Swiss-Prot、KEGG和COG的优先级顺序将Unigene序列与以上蛋白库做blastx比对, 翻译后得到该Unigene编码区的核酸序列(序列方向5'→3')和氨基酸序列, 皆比对不上的Unigene用软件ESTScan预测其编码区。

1.2.5.4 测序数据检索

本论文的转录组测序数据已上传至NCBI的SRA数据库, 登录号: SRA312487。

表1 CGMCC1.2492的16S rDNA序列

Table 1 16S rDNA sequence of CGMCC1.2492

序列 (5'→3')
GCNGCTATACATGCAGTCGACGAACTCCGTTAATTGATATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACAC GAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAACGTTGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACTGGAAAC AGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGA TGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAG AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGT TGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAA CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG CAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACT TGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCACT GGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTA ACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGC ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCCTTGACATCTTCTGACAGT

1.2.6 数据统计分析

测定和分析结果采用 SPSS 16.0 和 Excel 进行数据处理, 结果采取均值±标准差形式。取 $p < 0.05$ 认为具有显著差异。

2 结果与讨论

2.1 CGMCC1.2492 的鉴定结果

CGMCC1.2492 的 16S rDNA 的测序结果如表 1 所示, 将该序列在 NCBI 数据库比对, 发现其与 *Pediococcus pentosaceus* (戊糖片球菌) 的相似度均在 99% 以上, 与 strain 18-2、strain 18-4 和 strain S5 这 3 株戊糖片球菌的相似度为 100% (覆盖度 99%, e-value 0.0); 而与 *Tetragenococcus halophilus* (嗜盐四联球菌) 的相似度则很低, 仅为 85%~91% 之间。这说明 CGMCC1.2492 应为 *Pediococcus pentosaceus*。

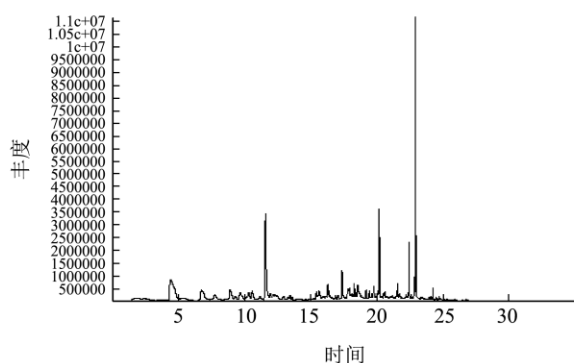


图 1 对照样品的挥发性成分 GC-MS 分析总离子流图

Fig.1 Total GC-MS ion chromatogram of volatile components in the control sample

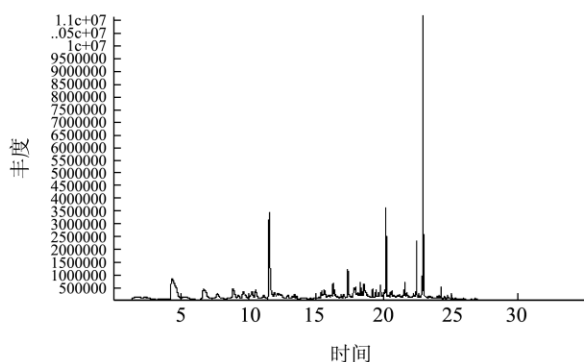


图 2 接种 CGMCC1.2492 的模拟鱼露的挥发性成分 GC-MS 分析总离子流图

Fig.2 Total GC-MS ion chromatogram of volatile components in simulated fish sauce inoculated with CGMCC1.2492

Tetragenococcus halophilus 曾被称为 *Pediococcus halophilus*, 1990 年将其划入新设的 *Tetragenococcus* 属中, 被重新命名为 *Tetragenococcus halophilus*^[10]。由于 *Tetragenococcus halophilus* 与 *Pediococcus*

pentosaceus 的生理生化特性相似, CGMCC1.2492 可能因此被误鉴定为 *Tetragenococcus halophilus*。

2.2 模拟鱼露接种发酵后各成分变化

据报道 CGMCC1.2492 (该菌株的另一编号为 ATCC33315) 能在 pH4.5~9.0, 25% 盐度下生长^[11], 能够适应鱼露的盐度和 pH 条件; Lee 等^[5]和 Ijong 等^[6]均发现 *Pediococcus pentosaceus* 为鱼露中的优势菌之一。因此, 本文将利用 CGMCC1.2492 发酵模拟鱼露, 研究其代谢行为。

表 2 模拟鱼露接种 CGMCC1.2492 发酵后各成分变化

Table 2 Changes in the components of simulated fish sauce after CGMCC1.2492 fermentation

指标	对照样品	接种 CGMCC1.2492 样品
pH 值	5.53±0.01	5.56±0.01
AAN/(g/100 mL)	0.39±0.01	0.46±0.01
TSN×6.25/(g/100 g)	7.82±0.04	8.13±0.14
TVBN/(mg/100 g)	40.14±0.60	45.13±0.41
蛋白酶活力/(U/mL)	0	3.03±0.60
腐胺/(mg/kg)	0	0
尸胺/(mg/kg)	0	1.18±0.017
组胺/(mg/kg)	0	0

表 3 模拟鱼露接种 CGMCC1.2492 发酵后游离氨基酸含量变化

Table 3 Changes in the content of free amino acids of simulated fish sauce after CGMCC1.2492 fermentation

	游离氨基酸含量/(mg/100 mL)		游离氨基酸含量变化百分比/%
	对照	接种 CGMCC1.2492	
Gly	81.89	96.94	18.38
al	149.23	175.52	17.62
lu	172.65	202.44	17.25
ys	411.32	473.68	15.16
hr	109.45	124.57	13.81
la	187.91	213.66	13.70
er	108.03	122.50	13.39
sp	72.29	75.95	5.06
et	141.48	147.77	4.45
is	50.46	52.40	3.85
eu	498.89	511.84	2.60
le	202.75	203.03	0.14
rg	401.07	388.46	-3.14
yr	102.47	99.02	-3.37
he	187.61	180.29	-3.90

由表 2 可知, 在模拟鱼露中接种 CGMCC1.2492 后, pH 值变化不大, 而蛋白酶活力、TSN、AAN、TVBN、尸胺含量都显著提高 ($p < 0.01$)。Lee 等^[5]也

曾发现 *Pediococcus pentosaceus* 有明显的蛋白酶活性。本模拟鱼露在制备过程中, 尽管在酶解后过滤得到澄清的鱼蛋白水解液, 但在补充添加食盐和灭菌以后, 部分蛋白质重新沉淀, 因此, 在接种发酵后, CGMCC 1.2492 的蛋白酶仍可进一步水解沉淀的蛋白质, 导致模拟鱼露的 TSN 含量增加。

从表 3 可知, 接种 CGMCC1.2492 后, 尽管模拟鱼露的游离氨基酸总量仅略有增加, 但 Glu、Gly、Val、

Lys、Thr、Ala 和 Ser 的含量明显增加, Asp、Met、His、Leu 的含量也有所增加, 而 Arg、Tyr、Phe 的含量降低; 而且还可以发现, 增加的氨基酸中绝大部分为鲜味或甜味等风味良好的氨基酸, 而减少的氨基酸中大多为风味不佳的芳香族氨基酸。

对接种 CGMCC1.2492 的鱼露和对照样品的挥发性成分的分析结果见图 1、图 2、表 4。

表 4 接种 CGMCC1.2492 的模拟鱼露中挥发性成分的种类和相对含量

Table 4 Types and relative content of volatile components in simulated fish sauce inoculated with CGMCC1.2492

保留时/min	化合物	相对含量/%	
		对照	样品
烃类			
		39.61	18.43
9.67	亚环丙基环戊烷	2.14	2.85
12.93	环烷	0.65	1.39
15.62	亚甲基环己烷	1.63	0
18.53	正十四碳烷	1.52	0.29
20.17	十五烷	5.41	1.12
22.81	十七烷	1.06	0
22.91	2,6,10,14-四甲基十五烷	12.11	3.44
9.66	1,3-环辛二烯	0	0.34
16.37	1,3-顺式,5-顺式-辛三烯	0.64	0.89
醇类			
		15.26	17.82
4.41	α -呋喃甲醇	8.88	13.81
5.34	3-呋喃甲醇	1.29	0
9.27	2,4-己二烯-1-醇	0	1.07
醛类			
		15.51	21.98
1.80	N-甲基氨基甲醛	1.31	0
5.39	3-甲硫基丙醛	0	2.46
6.74	苯甲醛	3.74	6.79
8.90	苯乙醛	2.25	3.51
10.56	壬醛	1.59	2.19
11.95	(E,E)-2,6-壬二醛	1.00	0
12.24	3-乙基苯甲醛	0	2.80
12.26	间苯二甲醛	1.02	0
13.58	癸醛	0	1.02
13.99	3,5-二甲基苯甲醛	0	1.15
酮类			
		4.81	5.49
10.29	3,5-辛二烯-2-酮	1.56	2.05
15.86	N-溴丁基乙酸-氮己环酮	0.17	0.25
16.27	2-十一酮	1.13	0.60
17.36	3-壬烯-2-酮	0	1.56
19.42	6,10-二甲基-5,9-十一双烯-2-酮	0	0.87
酯类			
		5.61	2.34

转下页

接上页				
	2.38	硅烷二醇二甲酯	1.27	0.35
	17.36	草酸环丁基十五烷基酯	2.19	0
	22.42	磷酸,2-甲氧亚氨基-乙基-双(三甲硅基)酯	2.15	0

酸类			0.38	1.87
	22.41	二(叔丁基二甲基氯硅烷)扁桃酸	0	0.25
	22.57	六十九酸	0	0.17
	24.22	三甲基硅烷基-巯基乙酸	0.38	0

胺类			0	1.08
	2.18	3-异丙氧基丙胺	0	0.14
	15.43	三烯丙基胺	0	0.94

芳香族化合物化			18.00	28.01
	7.48	2-戊基咪喃	0.20	0.58
	7.75	反式-2-(2-戊烯基)-咪喃	1.61	4.20
	11.16	3-乙酰基-2,5-二甲基咪喃	0.90	0
	18.28	2-甲氧基咪喃	0.91	0
	14.63	2,3-二氢(1-甲基乙基)-咪喃	0.14	0
	8.70	3-甲基苯酚	0.12	0
	20.37	2,4-二度-1,1-二甲基乙基苯酚	0.27	0.40
	19.42	[1 α , 4 $\alpha\beta$, 8 α]-十氢-1-萘酚	0.76	0
	20.71	S-乙酰基-4-异丙基苯硫酚	0.20	0
	11.15	4-乙基-1,3-二羟基苯	0	1.90
	19.75	1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)苯	1.24	0
	20.59	1-甲基-3-巯基-2-甲基丙基苯	0.72	0.29
	11.57	苯乙腈	10.80	19.14
	11.94	2-苄基(苯甲基)异氰化	0	1.50

其他			0.54	2.23
	1.72	四甲基高氯酸铵	0	1.45
	17.05	2-氧代-1-甲基-3-异丙基吡嗪	0.54	0.52
	20.49	5-氨基-1-乙基吡唑	0	0.26

注：鉴定的挥发性成分中烃类、醇类、醛类、酮类、酯类和酸类只列出峰面积大于1%的成分；芳香族化合物、胺类、其他等成分全部列出。

由表4可知，经GC-MS分析和鉴定，从模拟鱼露中共鉴定出超过100种挥发性成分。接种CGMCC1.2492的模拟鱼露中烃类、酯类成分的种类和相对含量都明显减少；芳香族化合物的种类大大减少，但总量大幅增加；而醛类、酮类、酸类和胺类成分的种类和相对含量明显增加，其中对照样品中未检测出胺类，但接种CGMCC1.2492的样品中有2种胺

类。

2.3 接种CGMCC1.2492的模拟鱼露的感官评定

表5表明，接种CGMCC1.2492后，模拟鱼露的气味得到改善，鲜味有所增加。

表5 接种CGMCC1.2492的模拟鱼露的感官评定结果

Table 5 Sensory evaluation of the simulated fish sauce inoculated with CGMCC1.2492

样品名称	感官评定结果
对照样品	红棕色，鱼腥味较重，无腐臭味、酸味、苦味等不良气味，鲜味不明显
接种CGMCC1.2492	红棕色，无鱼腥味，有酱香味，香气浓郁，无腐臭味、酸味、苦味等不良气味，鲜味有增加

表6 CGMCC1.2492的测序数据统计

Table 6 Results of sequencing of CGMCC1.2492

总 Raw Reads	总 Clean Reads	总 Clean Nucleotides/nt	Q20 比例/%	N 比例/%	GC 比例/%
12,871,866	12,779,546	1,150,159,140	97.87	0.00	38.89

2.4 CGMCC1.2492 在模拟鱼露中的转录组分析

CGMCC1.2492的测序数据统计如表6所示。

CGMCC1.2492 的测序数据经过过滤，共获得1150159140 nt 的 clean data, 对其进行 *denovo* 拼接后，获得的 769 个 contig, 平均长度 2233 nt, N50 为 6643 nt, 500 nt 以上的 contig 占 52.54%，进一步将 contig 组装成 759 个 Unigene, 平均长度 2238 nt, N50 为 4323 nt. 此 Unigene 即为转录子。

上述转录子在 NR, NT, Swiss-Prot, KEGG, COG, GO 库中注释的统计结果如表 7 所示，从中可见，759 个转录子中共有 705 个被注释。

表 7 CGMCC1.2492 的转录子在各库中的注释结果统计

Table 7 Annotation results of CGMCC1.2492-transcripts in some databases

NR	NT	Swiss-Prot	KEGG	COG	GO	全部
678	654	518	549	560	521	705

其中在 Nr 库注释的转录子中，注释到 *Pediococcus pentosaceus* 的占 85.70%，占绝对多数，而注释到 *Tetragenococcus halophilus* 的仅为 0.15%，进一步证明 CGMCC1.2492 应为 *Pediococcus pentosaceus* 而非 *Tetragenococcus halophilus*。

表 8 鱼露中 CGMCC1.2492 在 KEGG 数据库中注释的各种代谢通路

Table 8 Annotated KEGG metabolic pathways of CGMCC1.2492 in fish sauce

通路名称	注释到该通路的转录子		通路的 ID 号	通路类型
	转录子数目	占全部转录子的百分比/%		
1 Purine metabolism	55	10.02	ko00230	核酸代谢
2 Glycolysis/Gluconeogenesis	31	5.65	ko00010	碳水化合物代谢
3 Pyrimidine metabolism	28	5.10	ko00240	核酸代谢
4 Fructose and mannose metabolism	24	4.37	ko00051	碳水化合物代谢
5 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	23	4.19	ko00520	碳水化合物代谢
6 Pyruvate metabolism	22	4.01	ko00620	碳水化合物代谢
7 Methane metabolism	20	3.64	ko00680	能量代谢
8 Starch and sucrose metabolism	19	3.46	ko00500	碳水化合物代谢
9 Glycine, serine and threonine metabolism	19	3.46	ko00260	氨基酸代谢
10 Butanoate metabolism	18	3.28	ko00650	碳水化合物代谢
11 Tyrosine metabolism	17	3.10	ko00350	氨基酸代谢

从图 3 可以看到，除去 R (General function prediction only) 和 S (Function unknown) 二项外，CGMCC1.2492 表达的基因中涉及碳水化合物运输与代谢 (G) 的最多，涉及氨基酸运输与代谢 (E) 的其次，说明在模拟鱼露中 CGMCC1.2492 的碳水化合物和氨基酸代谢最旺盛。由于鱼露中碳水化合物的含量极少，推测其旺盛的代谢应该与氨基酸的代谢过程相关联。

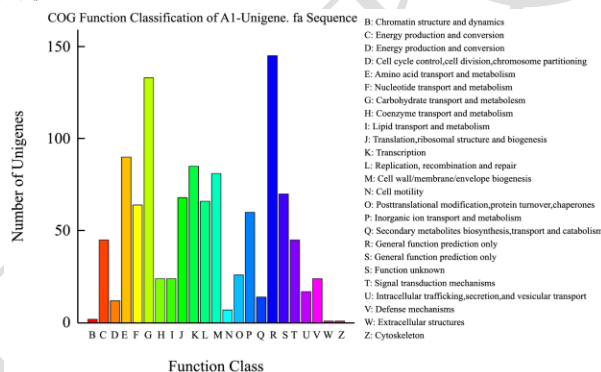


图 3 CGMCC1.2492 的转录子的 COG 功能分类

Fig.3 COG function classification of CGMCC1.2492 transcripts

鱼露中细菌的各种代谢活动将对发酵过程和产品风味和质量产生显著影响，将 CGMCC1.2492 在鱼露中表达的转录子在 KEGG 数据库中进行注释后，找出与各成分代谢有关的通路，并按照转录子数目对其进行排序，结果如表 8 所示。

接上页

12	Benzoate degradation	16	2.91	ko00362	异源物质的生物降解和代谢
13	Pentose phosphate pathway	14	2.55	ko00030	碳水化合物代谢
14	Peptidoglycan biosynthesis	14	2.55	ko00550	聚糖的生物合成和代谢
15	Limonene and pinene degradation	14	2.55	ko00903	萜类和聚酮类化合物的代谢
16	Chloroalkane and chloroalkene degradation	14	2.55	ko00625	异源物质的生物降解和代谢
17	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	14	2.55	ko00250	氨基酸代谢
18	Arginine and proline metabolism	14	2.55	ko00330	氨基酸代谢
19	Lysine biosynthesis	14	2.55	ko00300	氨基酸代谢
20	Naphthalene degradation	13	2.37	ko00626	异源物质的生物降解和代谢
21	Galactose metabolism	12	2.19	ko00052	碳水化合物代谢
22	Propanoate metabolism	11	2.00	ko00640	碳水化合物代谢
23	Pentose and glucuronate interconversions	11	2.00	ko00040	碳水化合物代谢
24	Fatty acid biosynthesis	10	1.82	ko00061	脂类代谢
25	Glycerolipid metabolism	10	1.82	ko00561	脂类代谢

注：本表只列出转录子数目超过 10 个的代谢通路，且未列出总代谢通路。

在 KEGG 的注释中，某一代谢通路的转录子数目大致可以反映该通路的代谢水平，表 8 列出 CGMCC1.2492 在鱼露发酵过程中的 25 条主要代谢通路，从中可以看出，在各类型代谢通路中，最主要的代谢过程包括碳水化合物代谢，共 10 条通路，转录子总数 185；其次为氨基酸代谢和核酸代谢，分别有 5 条和 2 条通路，转录子总数分别为 78 和 83。此外，还有异源物质的生物降解和代谢通路 3 条，转录子总数 43；脂类代谢通路 2 条，转录子总数 20；能量代谢通路 1 条，转录子数目 20；萜类和聚酮类化合物的代谢通路 1 条，转录子数目 14；聚糖的生物合成和代谢，转录子数目 14。

在碳水化合物代谢中，糖酵解和丙酮酸代谢为各种代谢的核心过程，而糖质新生则与氨基酸转化为葡萄糖有关。氨基酸代谢中 Gly、Ser 和 Thr 的代谢最旺盛，其次为 Tyr 代谢、再次为 Ala、Asp、glu、Arg、Pro 和 Lys 代谢。与表 3 对照后发现，这些代谢旺盛的氨基酸基中，除 Asp 含量略有增加，Pro 含量未测定外，其他氨基酸均为发酵过程中含量变化最大的氨基酸，说明转录组分析的结果与氨基酸含量测定的结果基本吻合。

萜类和聚酮类化合物的代谢也是主要代谢途径之一，此代谢过程产生多种挥发性产物及其中间产物，与挥发性成分的代谢有关，本研究发现接种 CGMCC1.2492 后模拟鱼露的挥发性成分变化很大，推测与此代谢通路有关。

鱼露发酵过程中，蛋白酶和肽酶水解原料蛋白，生成短肽和氨基酸等，对鱼露良好风味的形成有重要贡献；氨基酸脱羧酶则催化形成各种生物胺，本文对

注释到 Nr、Swiss-Prot、KEGG、COG 等数据库的上述各种酶进行统计，结果见表 9 所示。

CGMCC1.2492 共有 46 个注释到蛋白酶和肽酶的转录子，其 FPKM 值总和为 28710.73，占总 FPKM 值的 9.50%，表达量较高的蛋白酶和肽酶列在表 9 中。从表 9 可以看出，这些酶主要包括肽酶 (peptidase)、氨肽酶 (aminopeptidase)、羧肽酶 (carboxypeptidase)、Clp 蛋白酶 (ATP-dependent Clp protease、ATP-dependent protease HsIVU(ClpYQ) 等)、金属蛋白酶 (Zn-dependent proteases、ATP-dependent Zn proteases、protease HtpX 等)、细胞内蛋白酶 (intracellular protease)、丝氨酸蛋白酶 (serine proteases 等)、胶原蛋白酶 (collagenase)、周质蛋白酶 (periplasmic protease) 等。有报道指出微生物的肽酶、氨肽酶、羧肽酶等多为胞内酶^[12]；Clp 蛋白酶、细胞内蛋白酶等主要在微生物细胞内起作用^[13]；金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和胶原蛋白酶等是胞外酶^[14]。表 9 中的胞外蛋白酶包括金属蛋白酶 3 种，丝氨酸蛋白酶 4 种，FPKM 值总和 4224.76，占总 FPKM 值的 1.40%，表 2 也测得蛋白酶活力为 3.03 U/mL，这说明 CGMCC1.2492 有较强的蛋白质水解能力。

CGMCC1.2492 中未检测到氨基酸脱羧酶基因表达，表 2 中也仅检测到 1 种生物胺-尸胺，其含量为 1.18 mg/kg，这说明 CGMCC1.2492 的氨基酸脱羧酶活力很弱。

Pediococcus pentosaceus 是 FDA 公布的可以直接饲喂的安全微生物，可用于食品发酵。Lee 等^[5]也曾发现接种 *Pediococcus pentosaceus* 发酵鱼露可改善风味。

表 9 CGMCC1.2492 在模拟鱼露中表达的蛋白酶和肽酶的统计

Table 9 Protease and peptidase genes expressed by CGMCC1.2492 in simulated fish sauce

FPKM 值	数据库			
	Nr	Swissprot	COG	KEGG
10132.93	membrane carboxypeptidase (penicillin-binding protein)	Penicillin-binding protein 1A	Membrane carboxypeptidase (penicillin-binding protein)	penicillin-binding protein 1A
2483.52	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones	Probable ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL
2460.64	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	Protease subunit of ATP-dependent Clp proteases	ATP-dependent Clp protease, protease subunit
850.85	FtsH-2 peptidase	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	ATP-dependent Zn proteases	cell division protease FtsH
681.64	aminopeptidase C	Aminopeptidase C	Aminopeptidase C	bleomycin hydrolase
656.62	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC	Chaperone protein ClpB	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC
591.58	dipeptidase Pep V	Tyrosine-tRNA ligase	Tyrosyl-tRNA synthetase	PTS system, cellobiose-specific IIC component
545.72	phosphoglycerol transferase/alkaline phosphatase superfamily protein	Peptide chain release factor 3	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpE
457.00	aminopeptidase N protein	Aminopeptidase N	Aminopeptidase N	aminopeptidase N
454.18	dipeptidase A	Probable dipeptidase B	Dipeptidase	Dipeptidase
435.84	peptidase C69 family protein	Probable dipeptidase	Dipeptidase	Dipeptidase
425.71	neutral endopeptidase	Neutral endopeptidase	Predicted metalloendopeptidase	putative endopeptidase
386.58	glutamyI-tRNA synthetase	Glutamate-tRNA ligase	Predicted ATP-dependent serine protease	nondiscriminating glut amyI-tRNA synthetase
350.25	peptidoglycan transpeptidase precursor, ErfK-YbiS-YhnG family	-	Uncharacterized protein conserved in bacteria	-
345.44	XRE family transcriptional regulator	LexA repressor	SOS-response transcriptional repressors (RecA-mediated autopeptidases)	repressor LexA
344.51	ATP-binding subunit of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones	Chaperone protein ClpB	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpB
337.05	cell wall hydrolase	Probable peptidoglycan endopeptidase LytE	FOG: LysM repeat	[EC:3.2.1.-]
318.97	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA	Protease HtpX homolog	Superfamily II DNA and RNA helicases	ATP-dependent RNA helicase DeaD
318.26	x-prolyI-dipeptidyl laminopeptidase	Xaa-Pro dipeptidyl I-peptidase	Permeases	X-Pro dipeptidyl I-peptidase

注: 本表只列出转录子的 FPKM 值占总 FPKM 值 (302204.5306) 0.10% 以上的蛋白酶和肽酶。

3 结论

本研究表明, 接种 *Pediococcus pentosaceus* 可显著改善鱼露的风味, 且生物胺等有害代谢产物生成量极低, 可保证食品安全, 适合用于鱼露发酵。

参考文献

- [1] Mehdi Zareia, Hossein Najafzadehb, Mohammad HadiEskandaric, et al. Chemical and microbial properties of mahyaveh, a traditional iranian fish sauce [J]. Food Control, 2012, 23: 511-514
- [2] Kilinc B, Cakli S, et al. Chemical, microbiological and sensory changes associated with fish sauce processing [J]. Eur. Food Res. Technol., 2006, 222: 604-613
- [3] Shozen KI, Satomi M, et al. Effect of sucrose and halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* on chemical characteristics and microbial proliferation during fish sauce fermentation [J]. J. Food Saf., 2012, 32: 389-398
- [4] Udomsil N, Rodtong S, et al. Use of tetragenococcus halophilus as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation [J]. J. Agric. Food Chem., 2011, 59: 8401-8408
- [5] Lee K W, Park J Y, Sa H D, et al. Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented korean sea-food [J]. Anaerobe, 2014, 28: 199-206
- [6] I jong F G, Ohta Y. Physicochemical and microbiological changes associated with bakasang processing-a traditional indonesian fermented fish sauce [J]. J. Sci. Food Agric., 1996, 71: 69-74
- [7] 陆永梅,董明盛,吕欣,等. 高效液相色谱法测定黄酒中生物胺的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 196-199
- [8] LU Yong-mei, DONG Ming-sheng, LU Xin, et al. Biogenic amines contents in rice wine by HPLC [J]. Food Science, 2006, 27(1): 196-199
- [9] Mah J, Han H, Oh Y, et al. Biogenic amines in Jeotkals, Korean salted and fermented fish products [J]. Food Chemistry, 2002, 79(2): 239-243
- [10] Mahmood S, Freitag T E, Prosser J I. Comparison of PCR primer-based strategies for characterization of ammonia oxidizer communities in environmental samples [J]. Fems. Microbiology, 2006, 56(3): 482-493
- [11] Just é A, Lievens B, Rediers H, et al. Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy [M]. Oxford: Wiley-Blackwell, 2014
- [12] Udomsil N, Rodtong S, Tanasupawat S, et al. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds [J]. Int. J. Food Microbiol., 2010, 141: 186-194
- [13] Kunji E R, Mierau I, Hagting A, et al. The proteolytic systems of lactic acid bacteria [J]. Antonie. Van. Leeuwenhoek, 1996, 70(2-4): 187-221
- [14] 王振海,孙野青. Clp 蛋白酶研究进展[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 412-415
- [15] WANG Zhen-hai, SUN Ye-qing. Progress in study on Clp protease [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2005, 12(6): 412-415
- [16] 秦启龙. 深海沉积物细菌和丝状真菌的基因组学研究[D]. 济南: 山东大学, 2010
- [17] QIN Qi-long. Genomic studies of deep-sea sedimentary bacteria and filamentous fungus [D]. Jinan: Shangdong University, 2010