



· 综述 ·

传统发酵水产品微生物群落与品质相关性的研究进展

吴燕燕^{1*}, 陈茜^{1,2}, 王悦齐¹, 李春生¹, 李来好¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东广州 510300;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 发酵是一种具有悠久历史的食物保存方法。在酶和微生物代谢活动的作用下, 发酵不仅赋予水产品独特的风味和口感, 而且能增加水产品的营养价值。随着高通量测序技术的发展和基因组数据库的创建和完善, 宏基因组成为研究发酵水产食品微生物群落结构、微生物间的相互作用及功能基因挖掘的重要工具。乳杆菌、葡萄球菌以及酵母菌等对发酵水产品品质形成有密切关系, 并常用于发酵水产品微生物发酵剂的研究。本文综述了近年来传统发酵水产品微生物群落的研究方法及其发酵过程中的微生物群落结构和演替, 探讨微生物对传统发酵水产品品质形成的影响, 并对微生物与发酵水产品品质形成二者关系的研究方向进行展望, 以期为发酵水产品行业的品质一致化和工业化生产提供有效的理论依据。

关键词: 水产食品; 微生物; 品质; 宏基因组

中图分类号: TS 254.5⁺⁵

文献标志码: A

发酵是一种具有悠久历史的食物保存方法, 可以有效延长食品保藏期、提升食品的风味和营养价值^[1]。传统发酵食品属于多菌相共栖自然发酵, 众多微生物代谢活动产生种类复杂的风味代谢产物, 使传统发酵食品具有独特的风味。此外, 在发酵过程中微生物群的代谢活动可以产生一些对健康有促进作用的生物活性物质, 从而使发酵食品具有独特的功能特性和保健作用。

水产品是人体蛋白质摄入的重要来源, 并含有丰富的钙、铁等矿物质, 也含有丰富的不饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸的摄入可以有效预防心血管疾病^[2], 有益人体健康。但是由于水产

品具有易腐性, 在传统上, 人们习惯采用腌制发酵的方法延长水产品的保藏期。发酵水产品主要可以分为酸鱼、梅香鱼、臭鳜鱼、鱼酱、虾酱等, 不同的发酵水产品中因其原料、发酵条件和微生物群落的不同, 其独特风味也存在着一定的差异。微生物对传统发酵水产品的品质具有重要作用, 探究传统水产食品发酵过程中微生物菌群演替, 对深入解析传统发酵水产品质形成的机制具有重要的意义。

1 发酵水产品微生物群落的研究方法

微生物群落结构及其多样性对发酵水产品的风味、质量和安全性有着至关重要的影响,

收稿日期: 2020-12-11 修回日期: 2021-06-11

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFD0901903); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 广东省基础与应用基础研究基金(2021A1515010833)

通信作者: 吴燕燕(照片), E-mail: wuyygd@163.com

<https://www.china-fishery.cn>

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



对发酵食品中的微生物群落结构和代谢机理进行研究, 探究发酵水产品发酵过程中微生物菌群演替和挖掘重要的功能基因, 对深入解析发酵水产品风味形成机制和实现对发酵水产品品质的靶向调控具有重要意义。在传统上, 对发酵食品微生物的分析主要利用微生物培养法, 根据特定微生物的营养需求和生理特性, 采用特定的培养基和在特定的培养条件下对目标微生物进行分离培养。通过显微镜观察微生物形态、观察菌落特征和结合微生物的生理生化特征实现微生物的定性, 或利用发酵样品的菌落稀释液在平板中形成的单菌落数实现微生物的定量。如钱茜茜等^[3]通过将由腌干鱼肉中所获得的稀释菌液涂布于生物胺初筛菌培养基中, 分离纯化出产胺菌。

但是传统培养法只能对可培养的活菌进行培养和分离, 而发酵食品的微生物生态环境中可能会存在一些不可培养的活菌^[4]。自然界中能够通过纯培养技术获取的微生物仅占环境微生物总量的1%左右^[5], 因此基于纯培养技术研究传统发酵水产食品微生物群落演替存在局限性, 无法全面解析传统发酵水产食品发酵过程中复杂的微生物菌群真实状况, 也无法对发酵食品中的不能培养的活病原菌进行检测, 这会影响食品的安全性和威胁人体健康^[6]。此外, 传统分离培养方法还存在着耗费大量的时间和材料, 不能实现对微生物数量的准确计算, 对部分不能经培养获得的微生物不能进行鉴别分析等问题。为了更好地研究微生物群落, 16S rRNA的变性梯度凝胶技术(DGGE)和基因克隆文库分析技术逐步发展起来。在20世纪90年代初, Muyzer等^[7]通过利用16S rRNA的聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳法(PCR-DGGE)技术对复杂微生物群的基因多样性进行了分析。随后, 有学者利用温度梯度凝胶电泳(TGGE)^[8]和末端限制性片段多态性(T-RFLP)^[9]分析复杂微生物群落的结构和功能。DGGE和基因文库的方法可以部分减少传统培养法的限制, 但是它对于研究发酵食品中的复杂微生物环境中的微生物信息仍然具有程序繁琐、耗时、信息通量少、效率低等问题, 不能充分反映复杂环境的微生物多样性和分布, 也不能检测到稀有菌群的种类。Handelsman等^[10]在研究土壤中的微生物时, 首次提出了宏基

因组, 其定义为“环境中全部微生物遗传物质得到总和”。紧接着测序技术的发展, 以测序技术为基础的宏基因组学分析技术开始应用于微生物群落的组成分析^[11]、动态演替分析^[12]以及微生物的鉴定^[13]。宏基因组学则通过对特定环境下的微生物群体基因组进行提取并构建宏基因组文库, 然后利用高通量测序的方法对样品中的微生物群体基因组进行测序并利用数据分析方法对测序结果进行分析, 以此探究样品中的微生物多样性、种群结构、进化关系、功能特性和微生物之间或微生物与环境之间的关系。在发酵水产品的微生物研究中常采用纯培养法和宏基因组学的方法相结合, 对其微生物的特性以及基因进行研究^[14]。表1列举了世界不同地区的发酵水产品微生物群落的研究方法及其优势菌属。

2 传统发酵水产品微生物群落组成研究现状

传统发酵水产品多数处于开放式自然环境中生产, 其含有复杂多样的微生物群落结构。微生物多样性是影响发酵水产品质量和安全的重要因素。微生物的种类和丰度与水产品的来源、发酵温度、发酵地的气候与地理环境等因素有关。

2.1 鱼类发酵食品在发酵过程的微生物群落组成分析

鱼类在贮藏过程中, 微生物的群落数量和种类均会发生一定程度的变化^[28]。高通量测序技术广泛应用于微生物群落分析的研究中, 全面准确解析发酵体系中的微生物群落结构, 克服了纯培养技术的短板。PCR-DGGE技术通过从样品中提取总DNA, 能短时、快速、全面分析发酵水产品中微生物菌群的构成和动态变化趋势。利用PCR-DGGE发现了乳球菌和魏斯氏菌对老挝传统发酵鱼Pa-som的发酵过程有重要作用^[29]。宏基因组测序技术能深入基因和功能层面剖析发酵水产品中微生物群落功能, 揭示微生物对发酵水产品的影响。Phewpan等^[23]利用16S rRNA第二代测序技术对泰国发酵淡水鱼Pla-ra的微生物多样性进行研究, 结果显示四联球菌属(*Tetragenococcus* spp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)

表1 发酵水产品微生物群落的研究方法及优势菌属

Tab. 1 Research methods and dominant genus of microbial communities in fermented aquatic products

产品 products	产地 field	研究方法 research method	优势菌 dominant bacteria	参考文献 references
酸鱼 Suanyu	中国	纯培养法、16S rRNA 扩增子测序	植物乳杆菌(<i>Lactobacillus plantarum</i>)、戊糖片球菌(<i>Pediococcus pentosaceus</i>)、明串珠菌(<i>Leuconostoc</i>)、酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	[15-16]
鱼茶 Yucha	中国	纯培养法、16S rRNA高通量测序、Illumina MiSeq测序	乳球菌(<i>Lactococcus</i>)、乳杆菌(<i>Lactobacillus</i>)	[17-18]
臭鳜鱼 Fermented mandarin fish	中国	纯培养法、扩增性核糖体DNA限制性分析(ARDRA)、16S rRNA基因测序分析	清酒乳杆菌(<i>Lactobacillus sakei</i>)、乳球菌(<i>Lactococcus</i>)	[19]
韩国发酵鱼 Hongeo	韩国	鸟枪法基因组学技术	假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)、 <i>Oblitimonas</i> 、嗜冷杆菌属(<i>Psychrobacter</i>)和梭菌属(<i>Clostridium</i>)	[20]
缅甸发酵鱼 Yegyo ngapi	缅甸	纯培养法、16S rRNA基因测序、聚合酶链式反应-限制性片段多态性分析(PCR-RFLP)	四联球菌属(<i>Tetragenococcus</i>)、梭菌属(<i>Clostridium</i>)、盐厌氧菌属(<i>Halanaerobium</i>)	[21]
韩国盐腌虾 Saeu-jeot	韩国	焦磷酸测序	假单胞交替菌属(<i>Pseudoalteromonas</i>)、葡萄球菌属(<i>Staphylococcus</i>)、盐厌氧菌属(<i>Halanaerobium</i>)	[22]
泰国发酵鱼 Pla-ra	泰国	16S rRNA高通量测序	四链球菌属(<i>Tetragenococcus</i>)、葡萄球菌属(<i>Staphylococcus</i>)、乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	[23]
日本发酵鲫鱼寿司 Funazushi	日本	纯培养法、聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳法(PCR-DGGE)	植物乳杆菌(<i>Lactobacillus plantarum</i>)、嗜酸乳杆菌(<i>Lactobacillus acetotolerans</i>)	[24]
冰岛干鲨 hakarl	冰岛	纯培养法、聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳法(PCR-DGGE)、16S rRNA扩增子测序	不动杆菌(<i>Acinetobacter</i>)、乳杆菌(<i>Lactobacillus</i>)、假单胞菌(<i>Pseudomonas</i>)	[25]
鱼露 fish sauce	中国	16S rDNA高通量测序、实时荧光定量PCR法(FQ-PCR)	乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)、链球菌属(<i>Streptococcus</i>)、不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>)、假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	[26]
虾酱 shrimp paste	中国	Illumina Miseq测序	四链球菌属(<i>Tetragenococcus</i>)、乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	[27]

和乳杆菌属(*Lactobacillus* spp.)在发酵鱼微生物群落中占主导地位。在中国传统盐腌发酵鱼微生物变化和多样性的研究中, Zhang 等^[30]采用传统培养法分离出 105 株分离菌, 并利用聚合酶链式反应-限制性片段多态性分析(PCR-RFLP) 和 16SrRNA 测序法对分离菌进行鉴定, 发现随着发酵时间的延长, 葡萄球菌逐渐成为主要的优势菌属。葡萄球菌具有蛋白酶活性, 可以将蛋白质降解成小分子肽和游离氨基酸, 并为乳酸菌的生长和繁殖提供营养。Fujii 等^[24]采用传统平板培养法和聚合酶链式反应-变性凝胶电泳(PCR-DGGE) 技术首次在日本传统发酵鱼脯(funazushi) 的发酵过程中检测出耐酸乳杆菌。采用宏基因组结合传统培养法也发现了黎族传统发酵鱼茶中乳杆菌属在发酵过程中丰度最高^[18]。臭鳜鱼是我国安徽地区特有的发酵鱼产品, 其独特的臭香风味和肉质品质深受大众喜爱^[31]。Dai 等^[19]先通过传统培养法从臭鳜鱼发酵的不同阶段分离出 61 种菌, 并结合扩增性核糖体 DNA 限制性分析(ARDRA) 和 16S rRNA 基因测序分析对菌株进

行鉴定, 发现清酒乳杆菌(*L. sakei*) 所占比例高达 63%。

鱼露是由盐腌的小鱼经过发酵而制成的具有独特咸鲜味的琥珀色透明液体, 是一种具有咸鲜风味的调味品。在鱼露发酵过程中, 鱼肉在鱼自身中的内源酶和由微生物产生的外源酶的共同作用下发生水解, 这是形成鱼露特有营养成分和风味的重要环节。鱼露中的优势菌属主要是乳杆菌属、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等^[26]。对鱼露生产过程中微生物多样性进行研究, 了解优势菌属的分布, 发掘功能性微生物, 为微生物发酵剂的应用研究提供理论依据。常见微生物菌属有微球菌属(*Micrococcus*)、盐杆菌属(*Halanaerobium*)、弧菌属(*Vibrio*)、葡萄球菌属和四联球菌属。Sim 等^[32]利用传统培养法从马来西亚传统鱼酱中分离出 150 株菌株, 主要由细菌和酵母组成, 乳酸菌在发酵初期长势良好, 而在发酵后期 *Staphylococcus arlettae* 成为优势菌种。马臣臣等^[33]基于传统微生物纯培养技术及 16S rRNA 基因序

列分析, 对海南黎族鱼酱进行微生物多样性分析, 也发现乳杆菌属为海南黎族发酵海产品的优势菌属, 植物乳杆菌和发酵乳杆菌为优势菌种。Ohshima 等^[34]通过对样品的 16S rRNA 进行第二代测序, 首次在泰国鱼酱中鉴定出消化链球菌属 (*Peptostreptococcus*)、*Peptoniphilus* sp.、*Gallicola* sp.、*Fusobacterium* sp. 和 *Vagococcus* sp.。

在发酵鱼产品的微生物群落组成研究中可知, 发酵鱼产品中的主要微生物菌群隶属于厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*), 在属水平上包括乳杆菌属、乳球菌属 (*Lactococcus*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*)、葡萄球菌属、肠球菌属 (*Enterococcus*)、假单胞菌属和弧菌属等。乳酸菌和葡萄球菌主要为发酵过程中的优势菌群, 具有较好的耐盐性, 对发酵鱼产品的风味和品质形成具有重要影响。而肠球菌、假单胞菌和弧菌等主要是来源于原料鱼, 其中肠球菌在淡水鱼类和暖水鱼类中较为常见, 假单胞杆菌和弧菌多见于海水鱼类和冷水鱼类中。假单胞菌是水产品贮藏过程中常见的一类腐败菌, 它能产生大量的蛋白水解酶使水产品发生腐败。水产品发酵期间的无氧环境会抑制假单胞菌的生长, 所以其主要在发酵初期丰度较高。乳酸菌是一种能利用碳水化合物产生乳酸的有益菌, 它能在水产品发酵过程分解蛋白质产生小分子物质^[35], 其生长代谢过程产生乳酸, pH 下降, 形成酸性环境, 对弧菌属、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和肠球菌属有抑制作用, 对弧菌、不动杆菌属和肠球菌属对发酵鱼品质有不良影响, 其丰度降低有利于保持发酵鱼的品质。四联球菌属具有良好的耐盐性和产蛋白酶活性, 能较好适应发酵水产品的高盐环境, 分解蛋白质, 提高发酵水产品中呈味氨基酸的含量。

2.2 虾类发酵食品在发酵过程的微生物群落组成分析

虾类发酵食品主要为虾酱, 通过利用小型虾类和虾加工副产物经过腌制发酵制成味道鲜香、营养丰富的一种糊状传统调味品。李文亚等^[27]采用 Illumina MiSeq 测序对虾酱发酵期间的微生物多样性进行分析, 共得到了 29 个门、305 个科和 642 个属, 其中虾酱发酵过程中以变形菌门为优势菌门, 黄杆菌科为优势菌科, 黄杆菌属为优势菌属。由于气候条件等差异, 不

同地区虾酱中的微生物群落组成会具有一定的差异, 如大连地区的虾酱微生物群落组成主要优势菌属为四联球菌、乳杆菌和 *Aspergillus*。

2.3 贝类发酵食品在发酵过程的微生物群落组成分析

目前, 贝类发酵食品主要是贝肉调味液^[36]和贻贝油膏复合调味品^[37]。张大为等^[38]在白贝自然发酵调味液中分离出 26 株乳酸菌, 但其他的优势微生物菌属尚未明确。

2.4 藻类发酵食品在发酵过程的微生物群落组成分析

海藻是生长在海水中的藻类植物, 种类繁多, 我国重视海藻深加工技术的研发, 促使了藻类发酵食品的发展。海藻发酵加工食品有海藻发酵酒^[39]、海藻发酵饮料^[40]、海藻发酵醋^[41]及海藻发酵酱^[42]等产品。但目前对藻类发酵食品的研究仍然停留在工艺的研发和优化上, 对藻类发酵食品中微生物群落结构的组成及其演替的研究甚少。

3 传统发酵水产品微生物群落动态演替的研究现状

宏基因组学能对微生物种群结构、群落动态演替规律以及微生物与环境间的相互关系进行解析。蔡瑞康等^[43]采用宏基因组学技术对大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 在不同糟制阶段的菌相进行研究, 结果表明随着糟制时间的延长, 大黄鱼的菌相逐渐趋于单一, 样品丰富度逐渐减少, 多样性下降, 均匀度变差。赵凤等^[44]在基于 Illumina Hiseq 高通量测序平台, 利用双末端测序的方法, 对鲟发酵过程中的微生物演替变化分析中也得到类似的结果。吴燕燕等^[45]采用 MiSeq 测序技术研究以蓝圆鲹 (*Decapterus maruadsi*) 和海鲈为原料的腌干鱼在不同加工阶段的细菌多样性, 在传统腌制加工过程中, 新鲜蓝圆鲹中的肠杆菌科 (*Enterbacteriaceae*) 和肠球菌科的相对丰度逐渐减为 0, 乳酸菌和葡萄球菌逐渐成为优势菌属; 在新鲜海鲈腌制加工过程中细菌的动态变化结果与之相似。Zeng 等^[16]对酸鱼中微生物群落特性研究也发现类似的结果。在发酵初期, 假单胞菌、肠杆菌 (*Enterobacteria*) 和肠球菌 (*Enterococci*) 主要是来源鱼自身, 这与鱼

所在的养殖环境、运输过程和加工过程中的环境因素有关。在自然发酵水产品制作中，原材料的品质直接关系到发酵过程中微生物群落的组成，而微生物的群落组成会直接影响到发酵水产品的品质。

Du 等^[46]首次采用高通量测序的方法揭示中国传统发酵鱼露过程中的细菌群落变化，变形菌门中的希瓦氏菌(*Shewanella*)是鱼露发酵早期的优势菌，所占比例将近90%；但发酵时间到达12个月时厚壁菌门的盐厌氧菌会快速取代希瓦氏菌成为优势菌；到了发酵后期，厚壁菌门的四链球菌将会取代盐厌氧菌成为优势菌。

Phewpan等^[47]利用第二代测序技术对泰国传统虾酱Ka-pi加工过程中微生物多样性的动态变化及其对风味的影响进行研究，发酵初期，*Salimicrobium*(53.6%)和*Salinicoccus*(44.0%)是优势微生物菌属，随着发酵的进行，其微生物数量逐渐下降；嗜盐嗜碱菌(*Alkalibacterium*)、巨型球菌(*Macrococcusc caseolyticus*)、*Jeotgalicoccus psychophilus*和葡萄球菌逐渐增多，并首次在虾酱中鉴定出*Macrococcusc caseolyticus*和*Jeotgalicoccus psychophilus*，经过2个月的发酵后，乳杆菌成为最丰富的微生物。在锦州虾酱微生物群落演替的研究中也有类似的结果，经过1个月的发酵后，原始优势菌属假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)被四联球菌取代，葡萄球菌逐渐成为发酵过程中的优势菌属^[48]。

由于水产品自身及环境等因素影响，水产品在发酵初期的优势菌群主要为希瓦氏菌、弧菌和假单胞菌，随着发酵时间的延长，含氧量、盐含量以及在香辛料等因素的影响下，水产品中的微生物因环境因子的变化而出现微生物菌群结构的变化和演替。在厌氧环境下，厚壁菌门中的厌氧菌、乳酸菌和四联球菌等会逐步成为发酵水产品中的主要微生物群落。

4 传统发酵水产品中微生物对其品质的影响

发酵水产食品的独特风味和营养与微生物群落的组成、代谢机制密切相关，对发酵水产品的品质具有重要影响^[34]。在不同微生物酶的作用下，水产品在发酵期间会形成不同的风味物质，风味物质是构成发酵水产品品质的重要组

成部分。风味物质的形成主要是由于内源酶和微生物作用使水产品中脂肪和蛋白质分解产生。乳杆菌属、葡萄球菌属和肠球菌属等对发酵水产品风味的形成具有积极作用，而弧菌属则不利于发酵水产品风味的形成^[49]。葡萄球菌在发酵过程中代谢2-甲基丙醛能增强水产品的香气。乳杆菌属是发酵鱼中的优势菌属，而乳杆菌在发酵过程中与氨基酸代谢通路有关联，能产生有机酸等抗菌物质。游刚等^[50]研究发现乳酸菌还能抑制咸鱼腌制过程中有害微生物的生长代谢，产生分解亚硝酸盐或亚硝酸的酶系，减少咸鱼中的亚硝酸盐和亚硝胺的含量。

在鱼酱发酵初期，藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)作为优势菌促进微生物的降解，可产生促进其他微生物生长或微生物代谢的前体物质，微生物作用是形成鱼酱独特风味的重要原因^[32]。四联球菌则能抑制三甲胺的形成，且与游离脂肪酸、总可溶性氮和氨基酸的含量呈正相关^[46]。四联球菌对三甲胺的抑制作用可能是由于其在发酵过程中分解代谢产生的酸性物质使环境中的pH值下降，从而抑制了三甲胺等有害胺类物质的生成。通过对从泰国鱼酱中分离出来的嗜盐四联球菌进行测序发现，其中含有与氮代谢相关的基因，而该氮代谢基因与不同发酵食品中风味形成具有关联，由此可认为嗜盐四联球菌与发酵鱼酱的风味形成有关^[51]。嗜盐四联球菌内天冬氨酸脱羧酶基因的表达可促使其在发酵过程中产生天冬氨酸脱羧酶，促进天冬氨酸转化为丙氨酸，从而增加鱼酱中的鲜味。在李春生等^[52]发现盐厌氧菌属则会促进三甲胺形成并抑制乙酸乙酯的产生，抑制鱼露中水果香味的产生而促进鱼腥味的生成。盐厌氧菌属可以通过分解单糖、氨基酸和甘油等物质产生乙酯和丁酸酯等物质，对发酵水产品的风味形成具有一定的贡献作用。

在韩国盐腌虾(saeu-jeot)发酵期间的微生物群落演替和代谢物变化研究中，Jung等^[22]首次揭示了在盐腌虾的整个发酵过程中的微生物群落演替和代谢物变化之间的关系，发现盐厌氧菌属的数量与乙酸盐、丁酸盐和甲胺等物质的浓度有关，因此，盐厌氧菌数量可作为判断发酵水产品是否过度发酵的指标。

发酵水产品中的微生物在发酵过程中产生

各式各样的酶, 将水产品中的蛋白质、脂肪等生物大分子分解为氨基酸和脂肪酸等小分子物质, 降低总挥发性盐基氮含量和生物胺含量。为了实现靶向控制传统发酵水产品的风味和品质, 通过接种优势菌提升发酵水产品的风味和价值成为了发酵水产品工艺研究的热点。植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)等乳酸菌株能耐受较高的食盐浓度, 最适生长温度约为30 °C且产酸能力稳定, 可作为微生物发酵剂应用于腌制鱼类的快速腌制发酵^[53]。采用低盐乳酸菌法制备的腌干鱼所含的风味物质丰富, 具有独特的花香味、水果味及酒香味^[54], 在降低腌制过程中鱼肉蛋白质降解率的同时, 提升呈味氨基酸的含量, 丰富腌干鱼中的滋味物质含量, 提升腌干鱼的风味和营养价值^[55]。在臭鳜鱼的制作过程中接种 *Lactococcus lactis* M10 和 *Weissella cibaria* M3 可以有效降低臭鳜鱼的TVB-N值、TBA-RS值和生物胺含量, 促进臭鳜鱼风味物质的形成, 提高臭鳜鱼的可接受性并有效缩短臭鳜鱼的发酵期^[56]。木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)可以促进脂质的水解^[57], Xu等在低盐发酵鱼中接种了木糖葡萄球菌和啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 发现可以促进磷脂的水解, 有效提高发酵鱼中的脂肪酸含量, 特别是在提高多不饱和脂肪酸的含量的同时抑制了脂肪的氧化。发酵水产品中, 特别在发酵鱼制品中, 由于微生物和游离氨基酸的作用, 发酵鱼在发酵过程中会产生生物胺等有害物质, 对人类健康产生危害。为了减少发酵鱼中生物胺的积累, 在酸鱼的生产过程中, 以植物乳杆菌和木糖葡萄球菌作为微生物发酵剂可以有效降低酸鱼中腐胺和尸胺的含量, 而啤酒酵母可以减少酸鱼发酵过程中腐胺的积累, 混合发酵剂则可降低酸鱼中酪胺的含量^[58]。

植物乳杆菌微生物发酵剂亦可应用于虾类和贝类发酵水产品的生产中, 可以有效缩短发酵周期, 提升发酵水产品的风味。研究表明, 植物乳杆菌和 *Bacillus amyloliquefaciens* 作为印度虾酱 Terasi 的微生物发酵剂, 可以有效提高虾酱的蛋白质含量和谷氨酸含量, 缩短发酵周期, 提升虾酱营养和风味^[59]。李志敏等^[60]在马氏珠

母贝(*Pinctada martensii*)酶解液中接入木糖葡萄球菌和植物乳杆菌进行混合发酵, 经发酵后, 氨基酸和琥珀酸含量增加, 提升了其整体风味。

5 展望

发酵水产品的微生物研究方法主要有纯培养法、聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳、16S rRNA 扩增子测序和 Illumina MiSeq 测序等。随着宏基因组技术的普及, 实现了传统发酵水产品中痕量微生物和不可培养微生物的定性和定量。16S rRNA 和 ITS 区域扩增技术已较为普遍地应用于发酵水产品微生物菌群的研究中, 通过分析发酵水产品中微生物的基因序列, 研究其菌落结构和功能特性, 分析优势菌属, 了解微生物菌群的演替规律。随着分子生物学技术的发展, 发酵水产品中微生物菌群主要是以厚壁菌门和假单胞菌门为主, 乳酸菌和酵母菌对其风味的形成有重要的影响。梭菌属和肠杆菌属等主要存在于发酵初期, 其丰度会随发酵时间的延长而降低, 最终被厌氧菌、四链球菌、乳酸菌和葡萄球菌等菌属替代。

此外, 对发酵水产品的研究还会结合风味技术, 以风味为导向, 发现和确定关键风味化合物, 研究其形成机制、机理和途径, 并结合微生物高通量技术, 明确发酵水产品中微生物与特征风味品质的关系。目前, 以风味为导向对发酵水产品中微生物及其品质的研究, 仍主要以发酵鱼产品和发酵虾产品为主, 关于发酵贝类和藻类产品研究甚少。在未来开发发酵贝类和藻类产品时, 可考虑应用与发酵鱼、发酵虾产品的风味和品质密切相关的菌株作为发酵剂, 并探明其影响和作用。但宏基因组学对发酵水产品中微生物菌群功能基因的挖掘仍具有一定的局限性, 在未来, 基于多维宏组学技术对传统发酵水产品的微生物多样性、基因和代谢水平的差异进行解析, 明确特征风味物质形成相关的核心功能微生物基因表达, 多维度剖析功能微生物菌群对发酵水产品风味品质形成机理将成为新的研究热点。探明传统发酵食品关键微生物变化规律及特征风味品质关系, 挖掘关键微生物, 对传统发酵水产品的工业生产以及发酵过程中的品质监控具有重要意义。通过对功能微生物的挖掘, 开发微生物发酵剂,

靶向精准控制传统发酵水产品的风味品质及研究快速自动化、智能化水产品发酵新技术，将会成为传统发酵水产品实现工业化生产的重要基础。

参考文献 (References):

- [1] Liu S N, Han Y, Zhou Z J. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. *Food Research International*, 2011, 44(3): 643-651.
- [2] Siscovick D S, Barringer T A, Fretts A M, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease: a science advisory from the American heart association[J]. *Circulation*, 2017, 135(15): e867-e884.
- [3] 钱茜茜, 吴燕燕, 魏涯, 等. 海鲈鱼腌制过程中产胺菌的分离筛选与生物学特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 70-75.
Qian Q Q, Wu Y Y, Wei Y, et al. Study on isolation and biological characteristics of biogenic amine-forming bacteria during the pickled processing of Japanese sea bass[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(1): 70-75(in Chinese).
- [4] Oliver J D. The viable but nonculturable state in bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 43(1): 93-100.
- [5] Giraffa G, Neviani E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 67(1-2): 19-34.
- [6] Fakruddin M, Mannan K S B, Andrews S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective[J]. *International Scholarly Research Notices*, 2013, 2013: 703813.
- [7] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [8] Felske A, Akkermans A D L, De Vos W M. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11): 4581-4587.
- [9] Marsh T L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 323-327.
- [10] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245-R249.
- [11] Bora S S, Keot J, Das S, et al. Metagenomics analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (*Xaj-pitha*) of Assam, India[J]. *3 Biotech*, 2016, 6(2): 153.
- [12] 聂志强, 韩玥, 郑宇, 等. 宏基因组学技术分析传统食醋发酵过程微生物多样性[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 198-203.
Nie Z Q, Han Y, Zheng Y et al. Metagenomic analysis of microbial diversity in the traditional vinegar fermentation process[J]. *Food Science*, 2013, 34(15): 198-203(in Chinese).
- [13] Lu Z M, Liu N, Wang L J, et al. Elucidating and regulating the acetoin production role of microbial functional groups in multispecies acetic acid fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(19): 5860-5868.
- [14] 王悦齐, 李来好, 蔡秋杏, 等. 分离自腌干鱼的抗氧化发酵菌株的筛选及鉴定[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(3): 74-83.
Wang Y Q, Li L H, Cai Q X, et al. Screening and identification of antioxidant starter culture strains from salted dried fish[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 74-83(in Chinese).
- [15] Zang J H, Xu Y S, Xia W S, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession during fermentation of Suan yu, a Chinese traditional fermented fish, determined by high throughput sequencing[J]. *Food Research International*, 2018, 111: 565-573.
- [16] Zeng X F, Chen X H, Zhang W. Characterization of the microbial flora from Suan Yu, a Chinese traditional low-salt fermented fish[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 40(5): 1093-1103.
- [17] Hu N, Lei M, Zhao X L, et al. Analysis of microbiota in Hainan Yucha during fermentation by 16S rRNA gene high-throughput sequencing[J]. *Journal of Food Protection*

- cessing and Preservation, 2020, 44(7): e14523.
- [18] Zhang J C, Wang X R, Huo D X, et al. Metagenomic approach reveals microbial diversity and predictive microbial metabolic pathways in Yucha, a traditional Li fermented food[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32524.
- [19] 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 Mandarinfish)[J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(11): M1778-M1783.
- [20] Zhao C C, Eun J B. Shotgun metagenomics approach reveals the bacterial community and metabolic pathways in commercial *hongeo* product, a traditional Korean fermented skate product[J]. *Food Research International*, 2020, 131: 109030.
- [21] Kobayashi T, Taguchi C, Kida K, et al. Diversity of the bacterial community in Myanmar traditional salted fish *yegyo ngapi*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(10): 166.
- [22] Jung J Y, Lee S H, Lee H J, et al. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood[J]. *Food Microbiology*, 2013, 34(2): 360-368.
- [23] Phewpan A, Phuwapisirisan P, Takahashi H, et al. Investigation of kokumi substances and bacteria in thai fermented freshwater fish (Pla-ra)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(38): 10345-10351.
- [24] Fujii T, Watanabe S, Horikoshi M, et al. PCR-DGGE analysis of bacterial communities in *funazushi*, fermented crucian carp with rice, during fermentation[J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(1): 151-157.
- [25] Osimani A, Ferrocino I, Agnolucci M, et al. Unveiling *hákarl*: a study of the microbiota of the traditional Icelandic fermented fish[J]. *Food Microbiology*, 2019, 82: 560-572.
- [26] 王香君, 段杉. 保温发酵鱼露中细菌群落的16S rDNA分子生态分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 112-119, 127.
Wang X J, Duan S. 16S rDNA-based analysis of bacterial community in fish sauce during temperature-controlled fermentation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(12): 112-119, 127(in Chinese).
- [27] 李文亚, 刘洋, 李宁, 等. 蛋白酶制剂对虾酱发酵过程中理化性质和微生物区系的影响[J]. 食品科学, 2021, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries 42(10): 184-192.
- [28] Li W Y, Liu Y, Li N, et al. Effect of protease preparation on physicochemical properties and microbiota of shrimp paste during fermentation[J]. *Food Science*, 2021, 42(10): 184-192(in Chinese).
- [29] Zhou Q Q, Xie J. Changes of quality characteristics and establishment of shelf-life prediction model for sea bass during storage at different temperatures[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(3): 457-466(in Chinese).
- [30] Marui J, Boulot S, Panthavee W, et al. Culture-independent analysis of the bacterial community during fermentation of *pa-som*, a traditional fermented fish product in Laos[J]. *Fisheries Science*, 2014, 80(5): 1109-1115.
- [31] Zhang H, Li Y, Xu K H, et al. Microbiological changes and biodiversity of cultivable indigenous bacteria in *Sanbao* larger yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*), a Chinese salted and fermented seafood[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(4): 776-781.
- [32] Shen Y Y, Wu Y Y, Li L H, et al. Nutritional components and safety evaluation of fermented mandarin fish[J]. *South China Fisheries Science*, 2020, 16(3): 103-112(in Chinese).
- [33] Sim K Y, Chye F Y, Anton A. Chemical composition and microbial dynamics of *budu* fermentation, a traditional Malaysian fish sauce[J]. *Acta Alimentaria*, 2015, 44(2): 185-194.
- [34] Ma C C, Jiang S M, Peng Q N, et al. Analysis of microbial diversity of traditional fermented seafood from Li Nationality in Hainan[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(8): 270-277(in Chinese).
- [35] Ohshima C, Takahashi H, Insang S, et al. Next-generation sequencing reveals predominant bacterial communities during fermentation of Thai fish sauce in large

- manufacturing plants[J]. *LWT*, 2019, 114: 108375.
- [35] Sanlier N, Gökcen B B, Sezgin A C. Health benefits of fermented foods[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(3): 506-527.
- [36] 张洁, 张大为, 田永航. 白贝自然发酵调味液制备工艺的优化[J]. *中国酿造*, 2020, 39(9): 190-194.
Zhang J, Zhang D W, Tian Y H. Optimization of preparation technology of naturally fermented sauce of *Monetaria moneta*[J]. *China Brewing*, 2020, 39(9): 190-194(in Chinese).
- [37] 卫晓英, 李苹苹, 任秀娟, 等. 贻贝油膏复合调味品的工艺研究[J]. *中国调味品*, 2017, 42(4): 89-91.
Wei X Y, Li P P, Ren X J, et al. Study on processing technology of mussel ointment mixed condiment[J]. *China Condiment*, 2017, 42(4): 89-91(in Chinese).
- [38] 张大为, 张洁, 田永航. 白贝自然发酵调味液中乳酸菌的分离鉴定及生物学特性的研究[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(11): 76-82, 292.
Zhang D W, Zhang J, Tian Y H. Isolation and identification of lactic acid bacteria from natural fermented sauce of monetaria moneta and study of their biological characteristics[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2019, 35(11): 76-82, 292(in Chinese).
- [39] 刘秀河, 张印贞. 海藻酒发酵工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(10): 182-183, 185.
Liu X H, Zhang Y Z. Study on fermentation technology of kelp drinks[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(10): 182-183, 185(in Chinese).
- [40] 王克明. 混种固定化细胞发酵海藻豆乳醋酸饮料的研究[J]. *中国酿造*, 2006(4): 44-45.
Wang K M. Study on soymilk-seaweed vinegar beverage[J]. *China Brewing*, 2006(4): 44-45(in Chinese).
- [41] 侯红漫, 朱蓓薇, 许安邦, 等. 优势醋酸菌的选育及其在海藻醋中的应用[J]. *中国调味品*, 1997(5): 10-13.
Hou H M, Zhu B W, Xu A B, et al. Breeding of dominant acetic acid bacteria and its application in seaweed vinegar[J]. *China Condiment*, 1997(5): 10-13(in Chinese).
- [42] 杨贤庆, 夏国斌, 戚勃, 等. 龙须菜风味海藻酱的加工工艺优化[J]. *食品科学*, 2013, 34(8): 53-57.
Yang X Q, Xia G B, Qi B, et al. Production of *gracilaria lemaneiformis*-based seasoned seaweed sauce[J]. *Food Science*, 2013, 34(8): 53-57(in Chinese).
- [43] 蔡瑞康, 吴佳佳, 戴志远, 等. 大黄鱼糟制过程中宏基因组学研究[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(1): 190-199.
Cai R K, Wu J J, Dai Z Y, et al. Analysis of metagenomics in the muscle of fermented large yellow croaker[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(1): 190-199(in Chinese).
- [44] 赵凤, 李小义, 张效平, 等. 鲟鱼发酵过程中微生物的演替变化分析[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 37(3): 67-75.
Zhao F, Li X Y, Zhang X P, et al. Bacterial community succession analysis of fermented sturgeon at different stages[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 37(3): 67-75(in Chinese).
- [45] 吴燕燕, 钱茜茜, 李来好, 等. 基于 Illumina MiSeq 技术分析腌干鱼加工过程中微生物群落多样性[J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 1-8.
Wu Y Y, Qian Q Q, Li L H, et al. Microbial community diversity in dried-salted fish during processing revealed by illumina miseq sequencing[J]. *Food Science*, 2017, 38(12): 1-8(in Chinese).
- [46] Du F M, Zhang X Y, Gu H R, et al. Dynamic changes in the bacterial community during the fermentation of Traditional Chinese Fish Sauce (TCFS) and their correlation with TCFS quality[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(9): 371.
- [47] Phewpan A, Phuwapisiriswan P, Takahashi H, et al. Microbial diversity during processing of Thai traditional fermented shrimp paste, determined by next generation sequencing[J]. *LWT*, 2020, 122: 108989.
- [48] Lv X R, Li Y, Cui T Q, et al. Bacterial community succession and volatile compound changes during fermentation of shrimp paste from Chinese Jinzhou region[J]. *LWT*, 2020, 122: 108998.
- [49] Zang J H, Xu Y S, Xia W S, et al. Correlations between microbiota succession and flavor formation during fermentation of Chinese low-salt fermented common carp (*Cyprinus carpio* L.) inoculated with mixed starter cultures[J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103487.
- [50] 游刚, 吴燕燕, 李来好, 等. 添加复合乳酸菌再发酵对腌干鱼肉微生物、亚硝酸盐和亚硝胺的影响[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(4): 109-115.
You G, Wu Y Y, Li L H, et al. Effect of inoculating compound lactic acid bacteria on microbial, nitrates and

- nitrosamines of salted fish[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 109-115(in Chinese).
- [51] Chuea-nongthon C, Rodtong S, Yongsawatdigul J, et al. Draft genome sequences of *Tetragenococcus muriaticus* strains 3MR10-3 and PMC-11-5 isolated from Thai fish sauce during natural fermentation[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(15): e00198-17.
- [52] 李春生, 王悦齐, 李来好, 等. 传统鱼露发酵过程中细菌群落演替及其对挥发性风味形成的影响分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(24): 85-92.
Li C S, Wang Y Q, Li L H, et al. Bacterial community succession during fermentation of Chinese fish sauce and its effect on formation of volatile flavor components[J]. *Food Science*, 2018, 39(24): 85-92(in Chinese).
- [53] 游刚, 吴燕燕, 李来好, 等. 分离自传统腌制鱼类的乳酸菌株发酵特性研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(10): 220-223.
You G, Wu Y Y, Li L H, et al. Study on fermentation properties of five bacterial strains separated from traditional salted fish[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(10): 220-223(in Chinese).
- [54] 吴燕燕, 游刚, 李来好, 等. 低盐乳酸菌法与传统法腌干鱼制品的风味比较[J]. *水产学报*, 2014, 38(4): 601-612.
Wu Y Y, You G, Li L H, et al. Comparison of flavor components between low-salt lactic acid fermented fish and traditional salted fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(4): 601-612(in Chinese).
- [55] 吴燕燕, 曹松敏, 李来好, 等. 蓝圆鲹腌干工艺中组织蛋白酶与游离氨基酸和滋味形成的关系[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 13-19.
- Wu Y Y, Cao S M, Li L H, et al. Relationship of cathepsin with free amino acids and flavor substances during salted *Decapterus maruadsi* processing[J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 13-19(in Chinese).
- [56] 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: 3003.
- [57] Chen Q, Kong B H, Han Q, et al. The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavour development[J]. *LWT*, 2017, 77: 389-396.
- [58] Liao E, Xu Y S, Jiang Q X, et al. Effects of inoculating autochthonous starter cultures on biogenic amines accumulation of Chinese traditional fermented fish[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2018, 42(8): e13694.
- [59] Prihanto A A, Nurdiani R, Jatmiko Y D, et al. Physico-chemical and sensory properties of terasi (an Indonesian fermented shrimp paste) produced using *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Microbiological Research*, 2021, 242: 126619.
- [60] 李志敏, 吉宏武, 王博, 等. 混合发酵对马氏珠母贝酶法提取物滋味成分的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(3): 84-88.
Li Z M, Ji H W, Wang B, et al. Effect on taste compounds content of *Pinctada martensii* enzymatic hydrolyzate by fermenting mixed cultures[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(3): 84-88(in Chinese).

Advances in research on the correlation between microbial community and quality of traditional fermented aquatic products

WU Yanyan^{1*}, CHEN Qian^{1,2}, WANG Yueqi¹, LI Chunsheng¹, LI Laihao¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China;

2. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Fermentation is a food preservation method with a long history. Fermentation not only give a unique flavor and taste of sea food, but also improve the nutrition value due to enzymes and microbial metabolic activities. Fermented aquatic products can not only give aquatic products unique flavor and taste, but also increase the nutritional value of aquatic products. With the development of high-throughput sequencing technology and the creation and improvement of genomic databases, metagenomic composition is an important tool for studying the microbial community structure of fermented aquatic foods, the interaction between microorganisms, and functional gene mining. *Lactobacillus*, *Staphylococcus* and *Saccharomyces* have a close relationship with the quality of fermentation aquatic products, and is commonly used as starter in the production of fermented aquatic products. This paper reviews the research method of microbial community in recent years and microbial community structure and success in the fermentation process, to explore the effects of microorganisms on the quality formation of traditional fermented aquatic products. The research direction of the relationship has been prospected in order to provide effective theoretical basis for quality consensus and industrial production in the fermentation water product industry.

Key words: aquatic products; microbial; quality; metagenomics

Corresponding author: WU Yanyan. E-mail: wuyygd@163.com

Funding projects: National Key R & D Program of China(2019YFD0901903); China Agriculture Research System (CARS-47); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2021A1515010833)