

引用格式:

戚少含, 赵力超, 梁惠贤, 梁汶怡, 蒋芙蓉, 谭贵良. 酱醪中嗜盐四联球菌定量和分离及基因组特性分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(5): 111–120.

QI S H, ZHAO L C, LIANG H X, LIANG W Y, JIANG F R, TAN G L. Quantification, isolation and genome characteristics of *Tetragenococcus halophilus* in soy sauce moromi[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(5): 111–120.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 酱醪中嗜盐四联球菌定量和分离及基因组特性分析

戚少含<sup>1</sup>, 赵力超<sup>1</sup>, 梁惠贤<sup>2</sup>, 梁汶怡<sup>3</sup>, 蒋芙蓉<sup>3</sup>, 谭贵良<sup>2\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642; 2. 电子科技大学中山学院, 广东 中山 528402; 3. 中山市动物疾病预防控制中心, 广东 中山 528403)

**摘要:** 为了解嗜盐四联球菌在日式酱油发酵过程中的丰度及功能, 利用芯片式数字PCR(dPCR)定量分析不同发酵阶段酱醪样品中嗜盐四联球菌的绝对丰度, 再从酱醪中分离获得9株嗜盐四联球菌, 并绘制其在不同NaCl质量分数和pH环境下的生长曲线, 筛选生长性能最优的菌株YC24进行全基因组测序、代谢功能注释及盐胁迫响应基因解析, 同时挖掘前噬菌体的辅助代谢功能。结果表明: 嗜盐四联球菌的绝对丰度呈先增加后下降的趋势, 在发酵60 d时达到最高值( $1.86 \times 10^6$ 拷贝数/g); 其最适生长条件为10%(质量分数)NaCl和pH 7.0。菌株YC24的基因组大小为2 328 497 bp, G+C含量为35.69%, 共注释到2 232个COG功能基因、1 065个KEGG功能基因及227个碳水化合物活性酶。此外, YC24携带多种与渗透保护剂合成和转运相关的基因, 并鉴定出1个前噬菌体, 注释到2个辅助代谢基因。综上可知, 嗜盐四联球菌通过参与多种代谢途径, 在酱油发酵过程中展现出重要的生态适应性和功能潜力。

**关键词:** 嗜盐四联球菌; 酱醪; 数字PCR; 全基因组测序; 盐胁迫响应基因; 前噬菌体

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)05-0111-10

## Quantification, isolation and genome characteristics of *Tetragenococcus halophilus* in soy sauce moromi

QI Shaohan<sup>1</sup>, ZHAO Lichao<sup>1</sup>, LIANG Huixian<sup>2</sup>, LIANG Wenyi<sup>3</sup>, JIANG Furong<sup>3</sup>, TAN Guiliang<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. Zhongshan Institute, University of Electronic Science and Technology of China, Zhongshan, Guangdong 528402, China; 3. Zhongshan Animal Disease Control Center, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

**Abstract:** To investigate the abundance and function of *Tetragenococcus halophilus* in the Japanese style soy sauce fermentation process, this study first quantified its absolute abundance in soy sauce moromi samples at different fermentation stages using chip-based digital PCR(dPCR). Subsequently, nine *T. halophilus* strains were isolated from the soy sauce moromi, and their growth curves under different mass fraction of NaCl and pH conditions were plotted. The strain YC24, which exhibited the best growth performance, was selected for whole-genome sequencing, metabolic function annotation, and analysis of genes related to salt stress response, while the auxiliary metabolic functions of its prophage were also explored. The results showed that the absolute abundance of *T. halophilus* increased initially and then declined, reaching a peak of  $1.86 \times 10^6$  copies/g on the 60th day of fermentation. The optimal growth conditions for *T. halophilus* were found to be 10%(mass fraction) NaCl and pH 7.0. The genome size of strain YC24 was 2 328 497 bp, with a G+C content of 35.69%, and a total of 2 232 COG functional genes, 1 065 KEGG functional genes, and 227

收稿日期: 2025-03-19

修回日期: 2025-04-11

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2022A1515012158); 电子科技大学中山学院校级科研团队培育项目(424YT02); 中山市社会公益重大项目(2020B2010); 广东省教学质量与教学改革工程建设项目(SJD202001)

作者简介: 戚少含(2000—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品微生物研究, [qishaohan2022@163.com](mailto:qishaohan2022@163.com); \*通信作者, 谭贵良, 博士, 教授, 主要从事食品微生物、食品质量与安全检测研究, [joe88tan@126.com](mailto:joe88tan@126.com)

carbohydrate-active enzymes were annotated. Additionally, YC24 was found to carry multiple genes associated with the synthesis and transport of osmoprotectants, and one prophage was identified, in which two auxiliary metabolic genes were annotated. In conclusion, *T. halophilus* exhibited significant ecological adaptability and functional potential in soy sauce fermentation through its participation in various metabolic pathways.

**Keywords:** *Tetragenococcus halophilus*; soy sauce moromi; digital PCR; whole-genome sequencing; salt stress response genes; prophage

嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*)是一种广泛存在于高盐发酵食品(如酱油、鱼露、虾酱和豆瓣酱等)中的中度嗜盐乳酸菌,能够促进发酵食品整体风味与品质的提升<sup>[1-2]</sup>。ZHANG等<sup>[3]</sup>研究表明,接种嗜盐四联球菌的酱油样品较未接种的样品含有更高浓度的醇、酯、酚、醛和酮。房峻等<sup>[4]</sup>的研究发现,在酱油发酵过程中,联合接种嗜盐四联球菌和鲁氏接合酵母的样品的氨基酸和有机酸总量较单独接种酵母的分别提高了43.8%和55.6%。UDOMSIL等<sup>[5]</sup>研究发现,将鱼露源嗜盐四联球菌接种至鱼露发酵体系,其游离氨基酸和总氨基酸含量均明显提高。此外,共接种嗜盐四联球菌和鲁氏接合酵母不仅有助于减少生物胺的产生、提升广式酱油中的坚果和水果香气<sup>[6]</sup>,还促进了酱油二次发酵过程中多种挥发性物质的产生,并提高了醇类和醛类的含量<sup>[7]</sup>。这些研究结果表明,嗜盐四联球菌在食品发酵过程中发挥着重要作用。然而,上述研究主要通过外源添加嗜盐四联球菌来评估其对发酵食品的影响,对于其在自然发酵体系中的代谢机制仍缺乏深入探讨。从基因水平解析嗜盐四联球菌在食品发酵过程中的代谢特性及功能贡献的研究<sup>[8-9]</sup>仍较少,且少见关于嗜盐四联球菌分离菌株携带的前噬菌体辅助代谢功能的相关报道。

高通量测序的快速发展推动了宏基因组学在揭示酱油发酵过程中微生物群落动态变化方面的应用<sup>[10-12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>发现,四联球菌属在发酵中后期占主导地位,且在发酵中期的相对丰度可达到30%以上。然而,宏基因组学仅提供嗜盐四联球菌的相对丰度信息。关于其在酱油中的绝对丰度,现有数据非常有限。除CHUN等<sup>[11]</sup>对韩式酱油的研究外,其他类型酱油中嗜盐四联球菌的绝对丰度仍然缺乏系统报道。芯片式数字PCR利用专用芯片将样本分割成数万个微小反应孔(微反应体系),根据阳性反应孔的比例并结合泊松分布公式,无需建立标准曲线即可计算样本中目标核酸分子的绝对拷贝数<sup>[14]</sup>,

可为酱油发酵过程嗜盐四联球菌的绝对定量提供高灵敏度、无需标定标准曲线的精确方法<sup>[15]</sup>。

本研究中,采用数字PCR技术对不同发酵阶段日式酱醪中的嗜盐四联球菌进行绝对定量分析,随后从酱醪中分离嗜盐四联球菌,并绘制分离菌株在不同盐浓度和pH环境下的生长曲线,筛选出生长性能最优的1株进行全基因组测序,注释其代谢功能、盐胁迫响应基因及前噬菌体功能,以探究其在酱油发酵中的丰度及功能,为解析其代谢机理及潜在应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

#### 1.1.1 供试样品

从广东省中山市一家酱油厂收集采用日式工艺的发酵罐在6个发酵阶段(1、15、30、60、90、120 d)的酱醪样品,用于总DNA提取,其中发酵90 d的样品也用于菌株分离。

#### 1.1.2 主要试剂

MRS培养基、MRS肉汤,北京陆桥技术股份有限公司产品;NaCl,天津市大茂化学试剂厂产品;细菌DNA提取试剂盒、引物27F/1492R、Tet-F20/Tet-R107和探针Tet-FAM,湖南艾科瑞生物工程有限公司产品;PCR Mix,北京擎科生物科技股份有限公司产品;Sepharose 6B琼脂糖,北京索莱宝科技有限公司产品;核酸染液、DNA Marker,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司产品;土壤DNA提取试剂盒、QIAcuity®探针PCR试剂盒,凯杰企业管理(上海)有限公司产品;Eco RI酶,赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品。

#### 1.1.3 主要仪器

FA2004B电子分析天平,上海佑科仪器仪表有限公司产品;ANOXOMAT AN2CTS厌氧培养系统,

荷兰Anoxomat公司产品; LRH-150F生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司产品; QIAcuity Four芯片式数字PCR仪, 凯杰企业管理(上海)有限公司产品; HBC900V超净工作台, 青岛海尔生物医疗股份有限公司产品; DSX-24L-1D 高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂产品; LRH-150F生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司产品; ST 8R高速冷冻离心机、MAXQ4000 台式恒温冷冻摇床、2720 Thermal Cycler PCR仪、多功能酶标仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品; DYY-6C电泳仪, 北京六一生物科技有限公司产品; BIO-RAD-GelDoc GO凝胶成像系统, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司产品; PB-10酸度计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产品; 905型自动电位滴定仪, 瑞士万通中国有限公司产品。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 酱醪嗜盐四联球菌的绝对定量

按照土壤DNA提取试剂盒的说明书, 提取日式工艺下不同发酵时间(1、15、30、60、90、120 d)的酱醪样本的总DNA。经1%琼脂糖凝胶电泳检测无误后, 利用嗜盐四联球菌引物Tet-F20(5'-GGTCAAGGGTTTCTCGAAGGT-3')、Tet-R107(5'-AATCAACACCAACCGAGAATCC-3')和探针Tet-FAM(FAM-TTGAGCGATCAAAGCCCTTCGAACA-BHQ1)<sup>[16]</sup>进行数字PCR扩增。PCR反应体系(40  $\mu\text{L}$ ): 4 $\times$ Probe PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , Tet-F20(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.6  $\mu\text{L}$ , Tet-R107(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.6  $\mu\text{L}$ , Tet-FAM(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.2  $\mu\text{L}$ , *Eco* RI酶1.0  $\mu\text{L}$ , DNA模板4.0  $\mu\text{L}$ , 无酶水20.6  $\mu\text{L}$ 。数字PCR反应条件: 98  $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 57  $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸30 s, 40个循环; 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 1.2.2 嗜盐四联球菌的分离纯化

称取10 g酱醪样品于90 mL0.9%(质量分数)无菌NaCl水溶液中充分振荡, 获得 $10^{-1}$ 浓度的稀释液, 依次进行10倍梯度稀释, 获得 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 浓度的稀释液。从3个不同浓度的稀释液中各取80  $\mu\text{L}$ 涂布于含15% NaCl的MRS培养基平板上, 倒置于密封的厌氧培养罐中, 采用厌氧培养系统抽出罐内空气并充入气体(体积分数6.0%  $\text{O}_2$ 、7.1%  $\text{CO}_2$ 、7.1%  $\text{H}_2$ 、79.8%  $\text{N}_2$ )形成微需氧环境, 在30  $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中静置培

养7~10 d, 挑取形态不同的单菌落, 按上述纯化过程重复2~3次。对纯化后的菌株用含5% NaCl的MRS肉汤富集, 获得种子菌液, 置于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

### 1.2.3 菌株的16S rRNA基因PCR扩增及鉴定

按照细菌基因组DNA提取试剂盒的说明书, 提取纯化菌株DNA。利用16S rRNA基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')进行PCR扩增。PCR反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 1 $\times$ TSE101 Mix 45  $\mu\text{L}$ , 27F(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 1492R(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , DNA模板1  $\mu\text{L}$ 。PCR反应条件: 98  $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 98  $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 56  $^{\circ}\text{C}$ 退火10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s/kb, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸5 min; 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测无误后, 送至深圳市易科吉生物科技有限公司测序, 根据测序结果, 鉴定耐盐乳酸菌所属的物种。

### 1.2.4 酱油发酵过程中pH的测定

称取5 g酱醪样品, 用蒸馏水定容至250 mL, 静置后取20 mL上清液, 使用自动电位滴定仪测定pH。

### 1.2.5 菌株在不同NaCl质量分数下生长曲线的绘制

分别配制含0%、5%、10%、15%和20% NaCl的MRS肉汤, 并根据1.2.4的结果将pH调至合适的值。将嗜盐四联球菌接种至无菌肉汤, 分别于培养的0、2、4、6、8、10 d测定其光密度( $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ ), 以对应NaCl质量分数的空白培养基为对照, 绘制生长曲线。

### 1.2.6 菌株在不同pH环境下生长曲线的绘制

根据1.2.5的结果选择合适的NaCl质量分数, 配制含该质量分数NaCl的MRS肉汤, 分别将pH调至4.0、5.0、6.0、7.0。将嗜盐四联球菌接种至无菌培养基, 分别于培养的0、2、4、6、8、10 d测定其 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ , 以对应pH的空白培养基为对照, 绘制生长曲线。

### 1.2.7 生长性能最优菌株的全基因组测序及注释

提取分离纯化后生长性能最优的嗜盐四联球菌菌株的基因组DNA, 送至北京诺禾致源生物科技有限公司进行高通量测序(Illumina NovaSeq 6000测序平台)。测序完成后, 运用Trimmomatic软件<sup>[17]</sup>对

获得的原始序列读长(read)进行数据质控,再通过MEGAHIT工具<sup>[18]</sup>对过滤后的序列进行组装,以注释菌株基因组的基本特征。依次通过蛋白质直系同源簇(COG)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、碳水化合物活性酶(CAZyme)三大数据库对菌株的功能基因进行注释,筛选出与嗜盐四联球菌高盐胁迫相关的基因,并对其进行进一步表征。运用PhiSpy和PhageScope软件<sup>[19]</sup>对菌株的前噬菌体进行注释。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酱油发酵过程中嗜盐四联球菌的定量结果

日式工艺发酵1、15、30、60、90、120 d的酱醪样本中的嗜盐四联球菌绝对丰度分别为 $4.25 \times 10^3$ 、

$3.13 \times 10^4$ 、 $1.82 \times 10^6$ 、 $1.86 \times 10^6$ 、 $1.67 \times 10^6$ 、 $1.36 \times 10^6$  拷贝数/g,可以看出在酱油发酵过程中嗜盐四联球菌的丰度表现出先增加后下降的趋势,60 d时达到最高。这与韩式酱油(Ganjang)发酵过程中观察到的趋势一致<sup>[11]</sup>。

### 2.2 嗜盐四联球菌菌株筛选及鉴定结果

根据嗜盐四联球菌菌落的形态学特征<sup>[20]</sup>,从高盐(15% NaCl)MRS培养基中筛选出13株疑似耐盐乳酸菌,经16S rRNA基因鉴定,9株(YC11、YC12、YC13、YC15、YC21、YC22、YC23、YC24、YC25)被鉴定为嗜盐四联球菌。9株嗜盐四联球菌的系统发育树如图1所示。

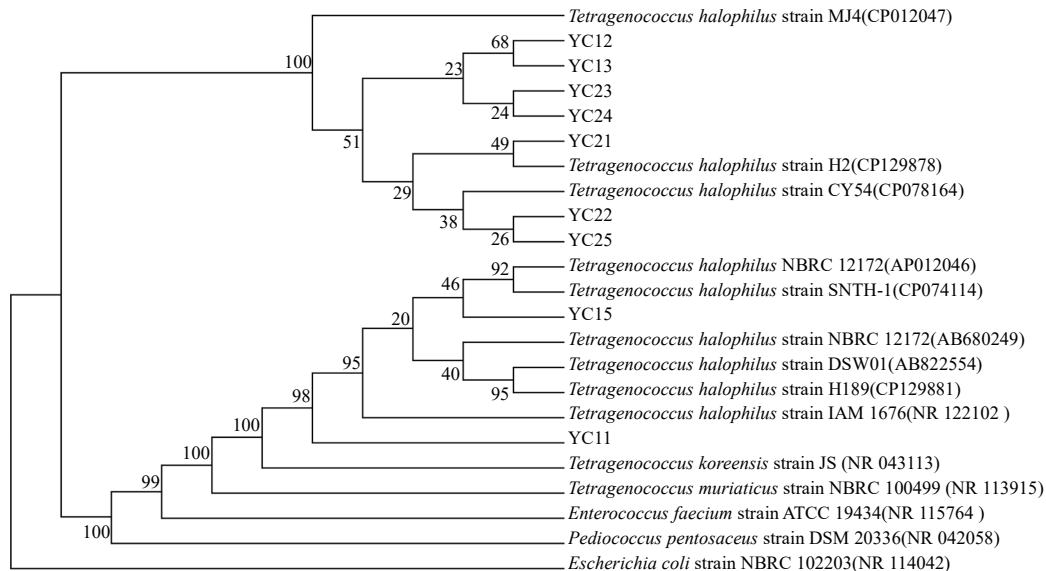


图1 基于16S rRNA基因序列的9株待测菌株的系统发育分析结果

Fig.1 Phylogenetic analysis result of the nine tested strains based on 16S rRNA gene sequences

### 2.3 酱油发酵过程中pH变化

日式工艺发酵1、15、30、60、90、120 d的酱醪样本的pH分别为 $6.52 \pm 0.01$ 、 $6.17 \pm 0.00$ 、 $5.68 \pm 0.00$ 、 $5.39 \pm 0.00$ 、 $5.22 \pm 0.02$ 、 $5.16 \pm 0.00$ ,可以看出pH随发酵时间延长逐渐下降,并在发酵后期趋于相对稳定,因此,在后续NaCl质量分数对菌株生长的影响的研究中选择pH 5.5。有研究<sup>[21]</sup>结果表明,酱油发酵过程的酸化变化是乳酸菌发挥作用的结果。

### 2.4 环境因子对嗜盐四联球菌生长特性的影响

#### 2.4.1 NaCl质量分数对菌株生长的影响

从图2可知:在0% NaCl的环境中,嗜盐四联球菌的生长受限;随着NaCl质量分数的升高,其生长

速度先增大后减小。在高渗透胁迫下,细菌需要消耗更多能量来维持细胞内外的渗透压平衡,从而导致生长速度降低<sup>[22]</sup>。在5% NaCl环境下,菌株YC23在培养开始时生长速度最快,但最大生长量小于菌株YC21的。10% NaCl为最适生长质量分数,在此环境下,菌株YC24的生长能力最强。因此,在后续pH环境对菌株生长的影响的研究中选择NaCl质量分数为10%。当环境盐质量分数为15%时,嗜盐四联球菌生长速度开始减慢,但菌株YC24的最大生长量略高于其他菌株的。在20% NaCl环境下,菌株的生长速度较慢,其中菌株YC12和YC23在4 d后进入对数期,而大多数菌株在6 d后进入对数期,菌株YC24则在8 d才进入对数期,但其仍表现出较强的

生长能力。即使在高盐环境下，所有嗜盐四联球菌依然展现出较强的耐受性。研究<sup>[23]</sup>表明，嗜盐四联球菌最高可耐受26% NaCl，而高盐稀态酱油发酵体系中的盐质量分数通常为15%~18%。与吕冉晖等<sup>[20]</sup>

对不同来源嗜盐四联球菌耐盐性的研究相比，本研究中，嗜盐四联球菌的生长速度较慢，这可能与本研究设定的较低pH有关。

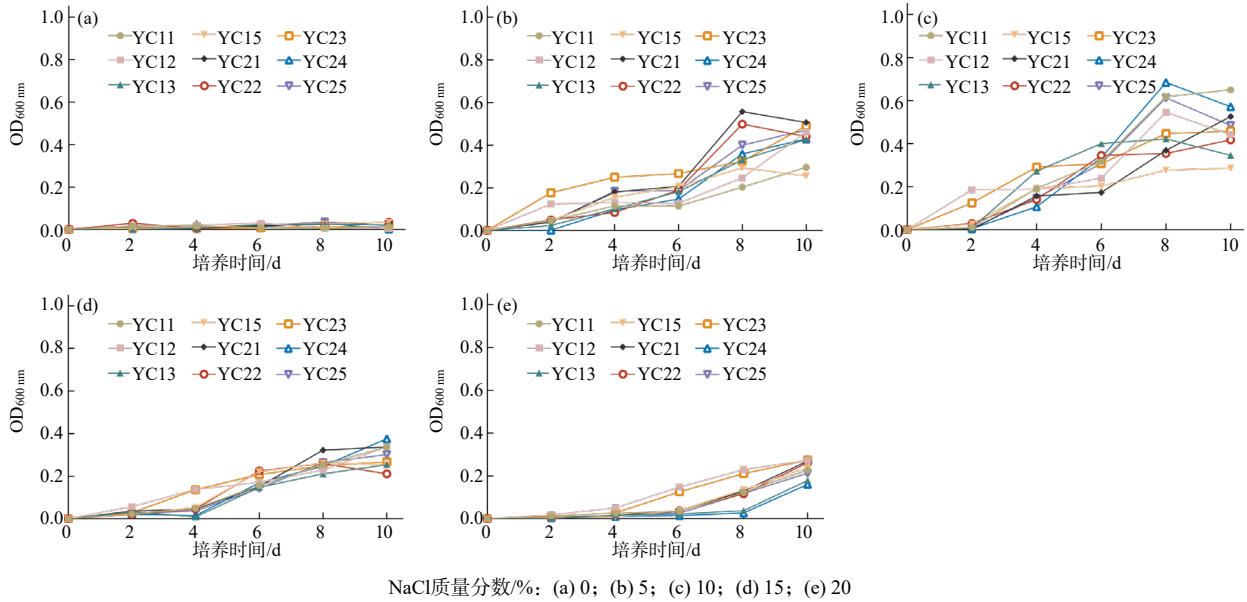


图2 不同NaCl质量分数下嗜盐四联球菌的生长曲线

Fig.2 Growth curves of *Tetragenococcus halophilus* under different NaCl mass fractions

2.4.2 pH环境对菌株生长的影响

从图3可知：当环境pH为4.0时，嗜盐四联球菌基本上不生长；当环境pH为5.0时，其生长速度较慢，受到一定限制；当环境pH为6.0或7.0时，其生

长速度较快，其中在pH 7.0条件下，其生长速度和最大生长量均优于pH 6.0的。在低pH环境中，过量的氢离子内流改变细胞质的阴离子平衡，进而影响嘌呤碱基的完整性并导致必需酶变性，最终影响嗜

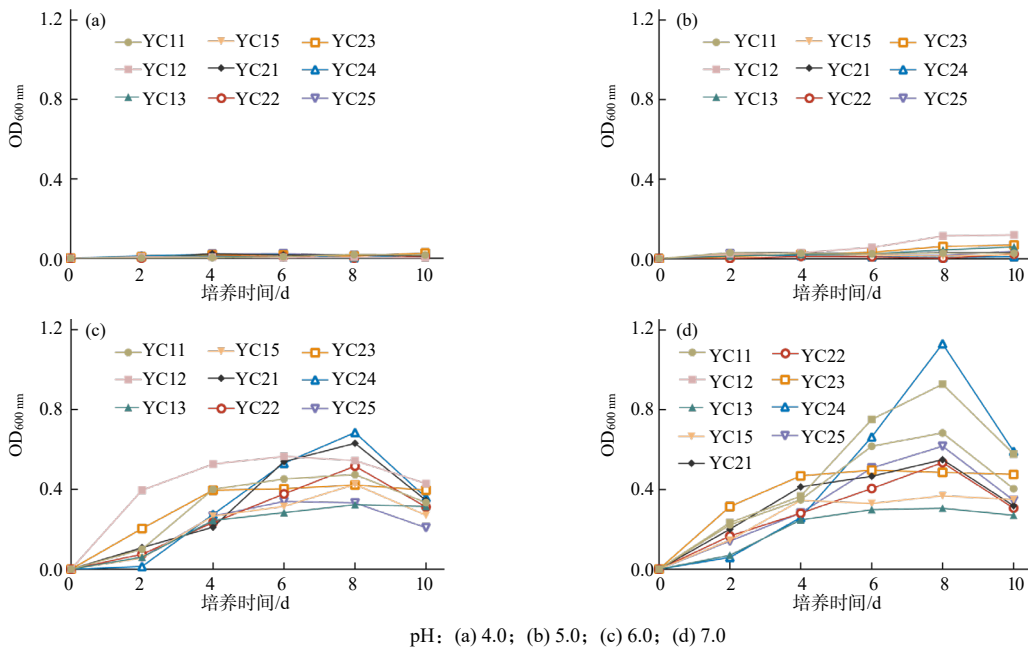


图3 不同pH环境下嗜盐四联球菌的生长曲线

Fig.3 Growth curves of *Tetragenococcus halophilus* under different pH conditions

盐四联球菌的正常生长代谢<sup>[24]</sup>。值得注意的是,在pH 6.0和pH 7.0条件下,菌株YC24的最大生长量均高于其他菌株的。此外,耐盐性分析结果表明,菌株YC24在pH 5.5环境下同样表现出较优的生长性能(图2)。以上结果表明,菌株YC24在中性及弱酸性(pH 5.5~7.0)环境下具有较强的环境适应性和生长潜力,因此,后续选择菌株YC24进行全基因组分析。

## 2.5 菌株YC24全基因组分析结果

### 2.5.1 菌株YC24全基因组基本信息

菌株YC24经高质量过滤后的长度为2 328 497 bp, G+C含量为35.69%。使用CGView软件绘制YC24的全基因组图谱(图4)。该菌株的基因组中包含编码序列(CDS) 2 228个,转运RNA(tRNA)基因53个,核糖体RNA(rRNA)基因8个,CRISPR序列5个。对菌株YC24与参考菌株*T. halophilus* NBRC 12172、MJ4、KUD23、YJ1、LMG 26042及SNTH-1进行全基因组序列比对,结果显示其平均核苷酸一致性(ANI)均在96%以上。

### 2.5.2 菌株YC24基因组功能注释结果

从图5可知,2 232个基因被注释为19个COG功能类别,其中已知功能的基因主要富集在碳水化合物转运与代谢(225个),转录调控(221个),复制、重组与修复(186个),翻译、核糖体结构与生物合成(167个)、氨基酸转运与代谢(165个)等5个功能类别。此外,还鉴定到了与无机离子运输和代谢相关的功能基因,这类基因特别是编码Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>转运蛋白的基因,可能在维持嗜盐四联球菌在高盐环境下的细胞内外渗透压平衡中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。然而菌株仍有约20%的基因功能未知,这表明嗜盐四联球菌的基因功能有待进一步挖掘。菌株YC24基因组中存在大量与碳水化合物和氨基酸转运与代谢相关的功能基因,这表明嗜盐四联球菌可能在酱油发酵过程中通过促进碳水化合物和氨基酸的水解,参与风味物质的合成,从而提升酱油的风味品质<sup>[26]</sup>。潘国杨<sup>[27]</sup>研究表明,额外接种嗜盐四联球菌能够提升豆酱的鲜味以及综合品质。与嗜盐四联球菌CGMCC 3792相比<sup>[8]</sup>,菌株YC24的氨基酸转运与代谢相关基因的丰度略高,但碳水化合物转运与代谢相关基因的丰度略低。

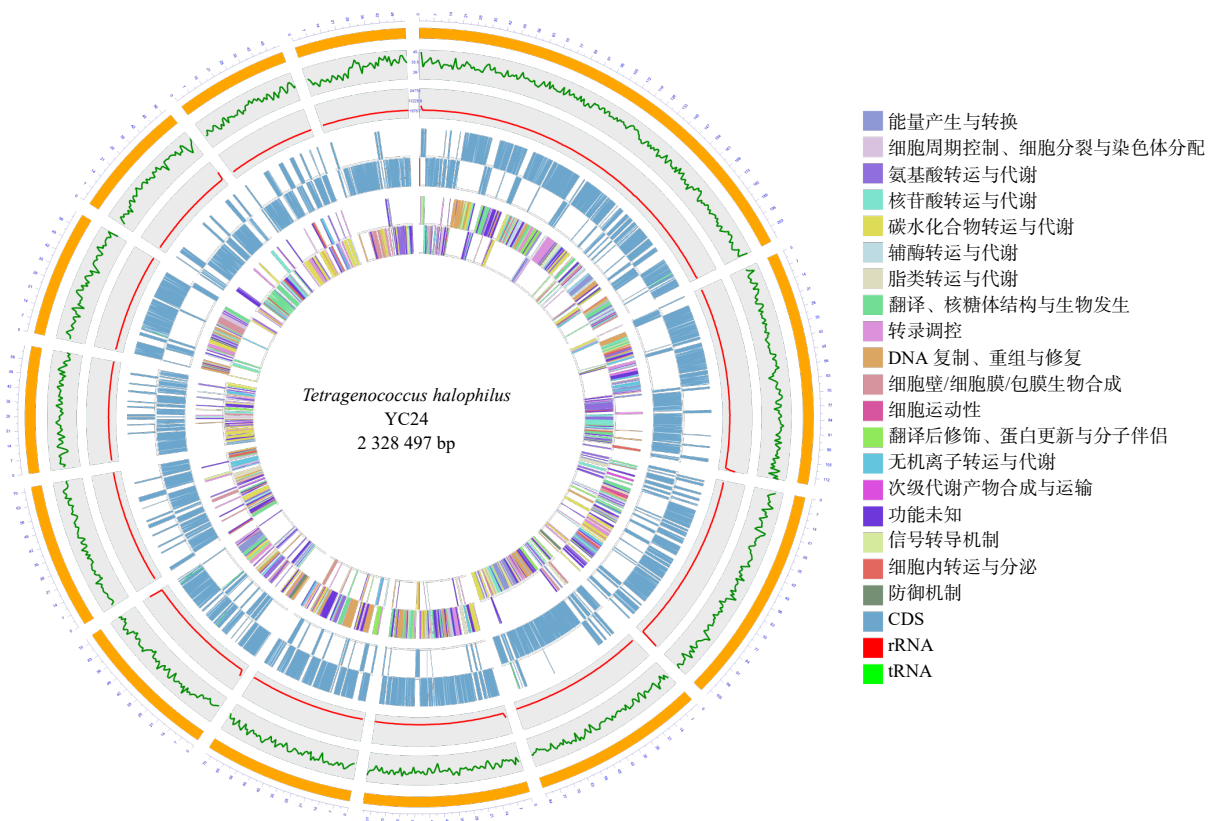


图4 菌株YC24全基因组图谱

Fig.4 Whole-genome map of the strain YC24



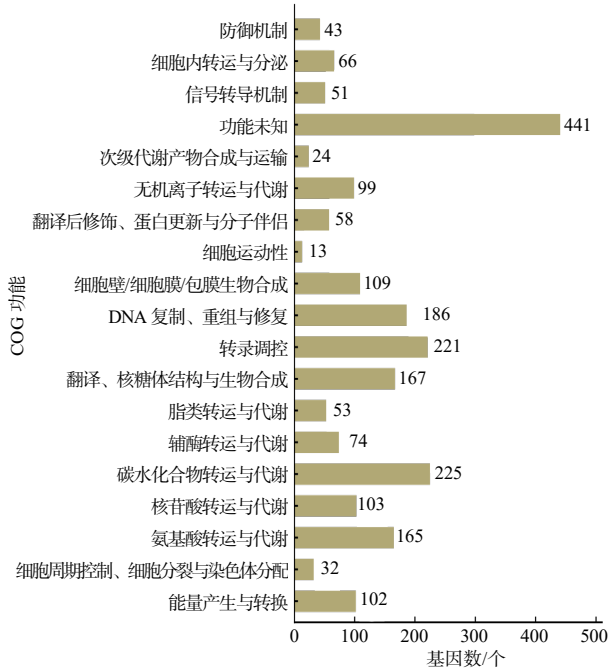


图5 菌株YC24的COG功能注释结果

Fig.5 COG functional annotation results of the strain YC24

从图6可知，将菌株YC24的开放阅读框与KEGG数据库进行比对，发现共有1 065个功能基因被注释到4个一级分类：细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理和代谢。其中，超过一半(58.8%，627个)

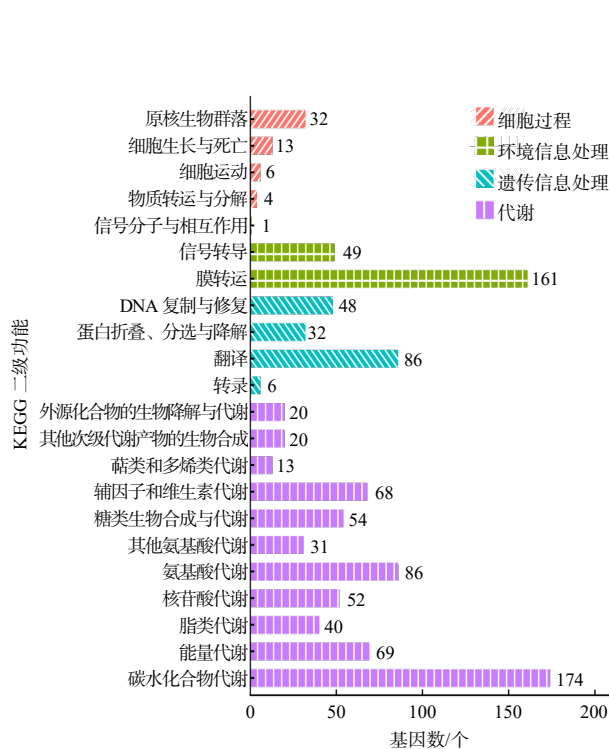
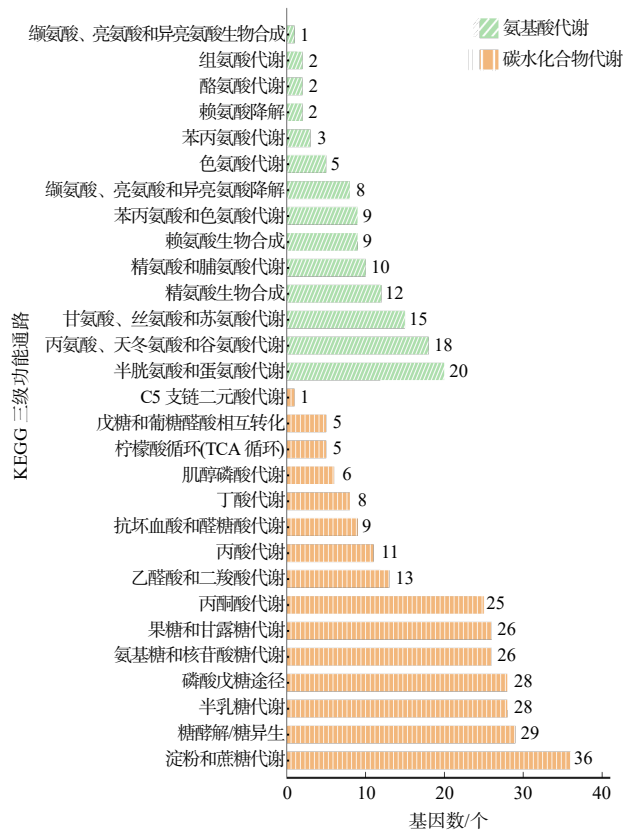


图6 菌株YC24的KEGG通路注释结果

Fig.6 KEGG metabolic pathway annotation results of the strain YC24

的功能基因被注释为代谢类。在二级分类中，碳水化合物代谢(174个)、膜转运(161个)和氨基酸代谢(86个)等相关的功能基因富集度较高。高丰度的碳水化合物代谢和氨基酸代谢基因与COG功能注释结果相一致。在三级分类中，在与氨基酸代谢相关的通路中，与半胱氨酸和蛋氨酸代谢(20个)，丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(18个)，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(15个)相关的基因较为丰富；而在碳水化合物代谢方面，菌株YC24的功能基因主要分布于淀粉和蔗糖代谢(36个)、糖酵解/糖异生(29个)、半乳糖代谢(28个)、磷酸戊糖途径(28个)、氨基糖和核苷酸糖代谢(26个)、果糖和甘露糖代谢(26个)以及丙酮酸代谢(25个)这7个代谢通路中。这与宏基因组学揭示的酱油发酵过程代谢基因注释结果高度一致<sup>[10]</sup>，进一步表明嗜盐四联球菌在酱油发酵中具有重要的贡献作用。CHUN等<sup>[28]</sup>研究表明，嗜盐四联球菌普遍具有D-葡萄糖、D-核糖、D-果糖、D-甘露糖和D-麦芽糖等碳水化合物的代谢能力，但对乳糖、乳二糖、棉子糖、水苏糖、L-木纤维糖和甘油等的代谢能力具有菌株依赖性。



从图7可知,在菌株YC24的基因组中,共鉴定到了227个碳水化合物活性酶,包括1个辅助活性酶(AA)、7个碳水化合物酯酶(CEs)、110个糖苷水解酶(GHs)、83个糖基转移酶(GTs)以及26个碳水化合物结合模块(CBMs)。GHs和GTs是菌株YC24中较丰富的碳水化合物活性酶, GHs能特异性地水解复杂多糖(如纤维素、半纤维素和淀粉)中的糖苷键,催化这些多糖的降解<sup>[29]</sup>;而GTs则将单糖单元转移至受体分子上,促进新糖苷键的形成<sup>[30]</sup>。菌株YC24中GHs和GTs的丰度与嗜盐四联球菌CICC 10469的接近<sup>[9]</sup>。在GH家族中, GH13和GH1的丰度较高。同样, GH13也是嗜盐四联球菌CGMCC 3792中丰度最高的糖苷水解酶<sup>[8]</sup>。GH13家族的 $\alpha$ -淀粉酶有助于食品工业中淀粉的液化和糖化,而GH1家族的 $\beta$ -半乳糖苷酶常用于生产低乳糖乳制品和低聚半乳糖<sup>[31]</sup>。在GT家族中, GT4和GT2丰度较高。GH1、GH13、GT2和GT4在发酵乳制品来源的植物乳杆菌Lp84-3中也很丰富<sup>[32]</sup>,它们极大地促进了发酵食品风味物质的形成<sup>[33]</sup>。在CBM家族中, CBM50丰度最高。CBMs具有碳水化合物结合活性,能促进酶与底物的相互作用,有利于提高酶效率<sup>[34]</sup>。其他嗜盐四联球菌菌株如CICC 10469中也鉴定到了CBMs相关基因,其丰度高于菌株YC24的,但在一些菌株中未发现CBMs,如嗜盐四联球菌CGMCC 3792<sup>[8-9]</sup>。

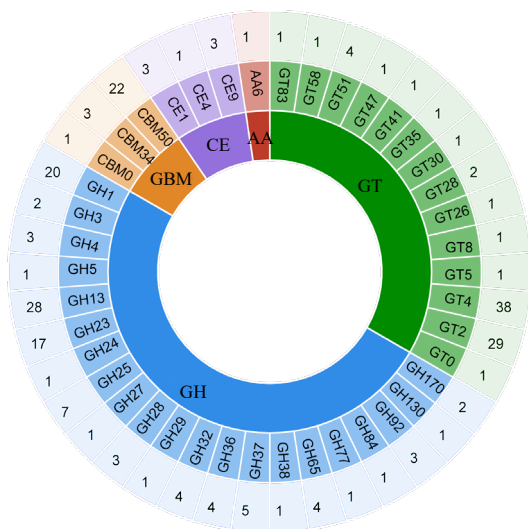


图7 菌株YC24基因组中CAZyme注释结果

Fig.7 Annotation results of CAZymes in the genome of the strain YC24

### 2.5.3 菌株YC24应对高盐胁迫的适应性策略

嗜盐四联球菌除了通过调节胞内离子浓度来应对高渗透环境外,还能够合成或吸收氨基酸、糖类及其衍生物等相容性溶质,以维持渗透平衡<sup>[35]</sup>。

本研究中,在菌株YC24的基因组中鉴定到多种与渗透保护剂合成和转运系统相关的基因(表1)。

表1 菌株YC24应对高盐胁迫的相关基因

基因参与的代谢或转运途径	基因
甘氨酸-甜菜碱合成	<i>BetB</i>
脯氨酸合成途径	<i>ProA</i> 、 <i>ProB</i> 、 <i>ProC</i>
精氨酸代谢(合成瓜氨酸)	<i>ArcA</i> 、 <i>ArcB</i> 、 <i>ArcC</i> 、 <i>ArgH</i>
细胞膜磷脂合成	<i>gpsA</i> 、 <i>plsC</i> 、 <i>plsY</i>
转运蛋白	<i>busAB</i> 、 <i>opuAB</i> 、 <i>opuAA</i> 、 <i>opuAC</i> 、 <i>opuCC</i> 、 <i>opuCD</i>

鉴定到的基因包括产甘氨酸-甜菜碱的基因(*BetB*)、产脯氨酸的基因(*ProA*、*ProB*和*ProC*)、产瓜氨酸的基因(*ArcA*、*ArcB*、*ArcC*和*ArgH*)、合成细胞膜磷脂的基因(*gpsA*、*plsC*、*plsY*)以及编码转运蛋白的基因(*busAB*、*opuAB*、*opuAA*、*opuAC*、*opuCC*和*opuCD*)。甘氨酸-甜菜碱作为一种典型的渗透保护物质,由*BetB*基因编码的甜菜碱醛脱氢酶催化胆碱转化而成<sup>[9]</sup>。然而,嗜盐四联球菌并不具备合成胆碱的能力,需依赖转运蛋白从外界获取胆碱,甚至直接摄取甘氨酸-甜菜碱,以适应高渗透压环境<sup>[9]</sup>。脯氨酸和瓜氨酸是常见的氨基酸类相容性溶质,其中脯氨酸已被证实是中度嗜盐细菌盐球菌属(*Salinicoccus*)某些种的主要渗透保护剂<sup>[36]</sup>。HE等<sup>[37]</sup>研究发现,在高盐(18% NaCl)胁迫条件下,嗜盐四联球菌的脯氨酸和瓜氨酸含量均显著升高,进一步证实了其在渗透压调节中的重要作用。杜钦钦等<sup>[38]</sup>研究表明,包括脯氨酸、瓜氨酸在内的7种氨基酸可参与融合魏斯菌(*Weissella confusa*)的盐胁迫响应。

### 2.5.4 菌株YC24前噬菌体鉴定及功能

通过PhiSpy工具,在菌株YC24的基因组中鉴定出1个前噬菌体,其基因组长度为44 020 bp, G+C含量为35.88%。该前噬菌体隶属于有尾噬菌体纲(Caudoviricetes)。已有研究<sup>[39-42]</sup>结果表明,从酱醪分离培养的嗜盐四联球菌噬菌体均属于有尾噬菌体纲。利用PhageScope软件分析,在该前噬菌体基因组中共鉴定出2个辅助代谢基因(AMGs),分别编码含铁醇脱氢酶和醛糖1-差向异构酶(图8)。含铁醇脱氢酶(EC 1.1.1.1)由*adh*基因编码,可参与宿主的醇类物质的氧化还原代谢;醛糖1-差向异构酶(EC 5.1.3.3)由*galM*基因编码,可参与宿主的糖酵解和半乳糖代谢。噬菌体能够编码AMGs以调控宿主代谢,且在溶原循环中,AMGs对宿主的影响通常



比在裂解循环中更大<sup>[43]</sup>。TAN等<sup>[26]</sup>研究表明, 酱油体系噬菌体编码的AMGs普遍参与宿主的碳利用和有机氮代谢。

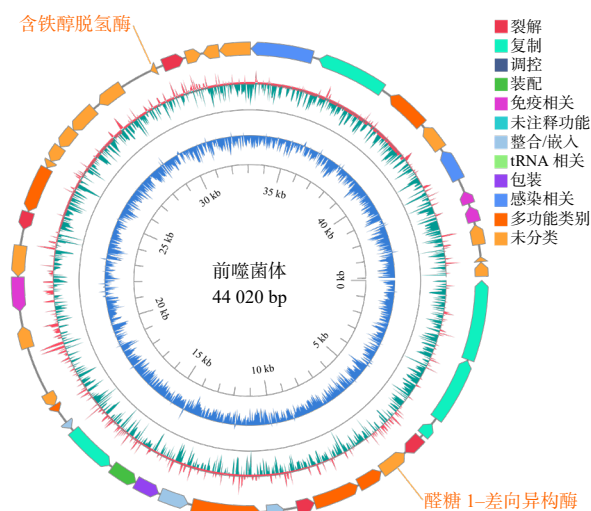


图8 前噬菌体基因组相关蛋白分布可视化图谱

Fig.8 Visualization map of the distribution of proteins related to the prophage genome

### 3 结论

本研究中, 嗜盐四联球菌在酱油发酵中期达到最高丰度, 表明其在酿造过程中扮演着关键角色; 从日式酱醪样品中分离获得9株嗜盐四联球菌, 其中菌株YC24具有最优的生长性能; 嗜盐四联球菌菌株在高盐环境下表现较强的生长性能与耐受性, 且在中性及弱酸性环境中生长良好。基因组分析结果表明, 嗜盐四联球菌携带大量与碳水化合物代谢、氨基酸代谢等相关的功能基因, 具有多种碳水化合物活性酶, 在酱油发酵过程中发挥重要作用; 此外, 嗜盐四联球菌通过编码与无机离子运输及代谢相关的基因来调节胞内离子浓度, 同时合成甜菜碱、脯氨酸等相容性溶质, 从而适应高渗透压环境胁迫; 在嗜盐四联球菌YC24前噬菌体中, 注释到2个辅助代谢基因, 这些基因可能参与宿主醇类物质的氧化还原代谢、糖酵解和半乳糖代谢。

### 参考文献:

[1] 宁豫昌, 吴祖芳, 翁佩芳. 微生物促进传统鱼酱油发酵和品质改善的研究进展[J]. 水产学报, 2018, 42(9): 1497-1509.

[2] 舒亦雄. 以虾头虾壳为原料制备发酵调味基料的工艺研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020.

[3] ZHANG L J, ZHANG L, XU Y. Effects of *Tetragenococcus halophilus* and *Candida versatilis* on the

production of aroma-active and umami-taste compounds during soy sauce fermentation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(6): 2782-2790.

- [4] 房峻, 刘佳乐, 彭玉慧, 等. 强化嗜盐四联球菌对模拟低盐酱油发酵的影响[J]. 中国酿造, 2020, 39(12): 146-152.
- [5] UDOMSIL N, RODTONG S, CHOI Y J, et al. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(15): 8401-8408.
- [6] QI Q, HUANG J, ZHOU R Q, et al. Abating biogenic amines and improving the flavor profile of Cantonese soy sauce via co-culturing *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. Food Microbiology, 2022, 106: 104056.
- [7] ZHANG L, ZHANG Z, HUANG J, et al. Co-culture of *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* to improve microbiota and metabolites in secondary fortified fermented soy sauce[J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104850.
- [8] 张敏, 金垚, 黄钧, 等. 嗜盐四联球菌CGMCC 3792全基因组测序和胞外多糖基因簇分析[J]. 中国食品学报, 2025, 25(1): 314-321.
- [9] 林婕婷. 嗜盐四联球菌盐胁迫适应性甘氨酸甜菜碱ABC转运系统及精氨酸代谢通路的表达调控研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [10] TAN G L, WANG Y, HU M, et al. Comparative evaluation of the microbial diversity and metabolite profiles of Japanese-style and Cantonese-style soy sauce fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 976206.
- [11] CHUN B H, HAN D M, KIM H M, et al. Metabolic features of ganjang(a Korean traditional soy sauce) fermentation revealed by genome-centered metatranscriptomics[J]. mSystems, 2021, 6(4): 10.1128/msystems.00441-21.
- [12] CHEN C, WEN L F, YANG L X, et al. Metagenomic and metaproteomic analyses of microbial amino acid metabolism during Cantonese soy sauce fermentation[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1271648.
- [13] LIU H, CHEN Z Q, MA M T, et al. Metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development during soy sauce fermentation[J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103193.
- [14] TIWARI A, AHMED W, OIKARINEN S, et al. Application of digital PCR for public health-related water quality monitoring[J]. Science of the Total Environment, 2022, 837: 155663.
- [15] KIM E, YANG S M, CHOI C H, et al. Droplet digital PCR method for the absolute quantitative detection and monitoring of *Lactocaseibacillus casei*[J]. Food Microbiology, 2023, 113: 104265.
- [16] UDOMSIL N, CHEN S, RODTONG S, et al. Quantification of viable bacterial starter cultures of *Virgibacillus* sp. and *Tetragenococcus halophilus* in fish sauce fermentation by real-time quantitative PCR [J]. Food Microbiology,

- 2016, 57: 54–62.
- [17] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [18] LI D H, LIU C M, LUO R B, et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly *via* succinct de Bruijn graph[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(10): 1674–1676.
- [19] DE SOUSA A L, MAUÉS D, LOBATO A, et al. PhageWeb-web interface for rapid identification and characterization of prophages in bacterial genomes[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 644.
- [20] 吕冉晖, 钟燕华, 游阳, 等. 不同来源嗜盐四联球菌的分离及其耐盐耐酸性与基因关联分析[J]. *广东海洋大学学报*, 2024, 44(5): 64–75.
- [21] 罗艺璇, 张菊华, 赖慧婷, 等. 酱油发酵过程中的微生物多样性及功能研究进展[J]. *食品工业科技*, 2025, 46(18): 458–468.
- [22] BREMER E, KRÄMER R. Responses of microorganisms to osmotic stress[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2019, 73: 313–334.
- [23] 姜锦惠, 赵悦, 李盈烁, 等. 自然发酵豆酱中嗜盐四联球菌的分离筛选及生长特性研究[J]. *中国酿造*, 2021, 40(10): 36–42.
- [24] YAO S J, TU R K, JIN Y, et al. Improvement of the viability of *Tetragenococcus halophilus* under acidic stress by forming the biofilm cell structure based on RNA-Seq and iTRAQ analyses[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2024, 104(6): 3559–3569.
- [25] GUNDE-CIMERMAN N, PLEMENITAŠ A, OREN A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42(3): 353–375.
- [26] TAN G L, QI S H, WANG Y, et al. Uncovering differences in the composition and function of phage communities and phage-bacterium interactions in raw soy sauce[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1328158.
- [27] 潘国杨. 嗜盐四联球菌对豆制品品质提升作用及其中鲜味肽的分离鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- [28] CHUN B H, HAN D M, KIM K H, et al. Genomic and metabolic features of *Tetragenococcus halophilus* as revealed by pan-genome and transcriptome analyses[J]. *Food Microbiology*, 2019, 83: 36–47.
- [29] SHRIVASTAVA S. Introduction to glycoside hydrolases: classification, identification and occurrence[M]//SHRIVASTAVA S. *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases*. Singapore: Springer Singapore, 2020: 3–84.
- [30] GAVANDE P V, GOYAL A, FONTES C M G A. Chapter 1-Carbohydrates and carbohydrate-active enzymes(CAZyme): an overview[M]//GOYAL A, SHARMA K. *Glycoside Hydrolases*. Academic Press, 2023: 1–23.
- [31] SATHYA T A, KHAN M. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry[J]. *Journal of Food Science*, 2014, 79(11): R2149–R2156.
- [32] LIANG T T, JIANG T, LIANG Z, et al. Carbohydrate-active enzyme profiles of *Lactiplantibacillus plantarum* strain 84-3 contribute to flavor formation in fermented dairy and vegetable products[J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 20: 101036.
- [33] YOU L J, YANG C C, JIN H, et al. Metagenomic features of traditional fermented milk products[J]. *LWT*, 2022, 155: 112945.
- [34] LUO J Y, HUANG W X, GUO W, et al. Novel strategy to stimulate the food wastes anaerobic fermentation performance by eggshell wastes conditioning and the underlying mechanisms[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 398: 125560.
- [35] 王博, 周朝晖, 李铁桥, 等. 嗜盐四联球菌及其在发酵食品中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(8): 267–272.
- [36] VENTOSA A, NIETO J J, OREN A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(2): 504–544.
- [37] HE G Q, WU C D, HUNAG J, et al. Effect of exogenous proline on metabolic response of *Tetragenococcus halophilus* under salt stress[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(9): 1681–1691.
- [38] 杜钦钦, 崔艺敏, 彭冲, 等. 氨基酸对盐胁迫下融合魏斯氏菌生长的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(8): 45–52.
- [39] HIGUCHI T, UCHIDA K, ABE K. Preparation of phage-insensitive strains of *Tetragenococcus halophilus* and its application for soy sauce fermentation[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63(2): 415–417.
- [40] UCHIDA K, KANBE C. Occurrence of bacteriophages lytic for *Pediococcus halophilus*, a halophilic lactic-acid bacterium, in soy sauce fermentation[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1993, 39(4): 429–437.
- [41] WAKINAKA T, MATSUTANI M, WATANABE J, et al. Identification of capsular polysaccharide synthesis loci determining bacteriophage susceptibility in *Tetragenococcus halophilus*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e00385–23.
- [42] WAKINAKA T, MATSUTANI M, WATANABE J, et al. Ribitol-containing wall teichoic acid of *Tetragenococcus halophilus* is targeted by bacteriophage phiWJ7 as a binding receptor[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e00336–22.
- [43] SUN M M, YUAN S J, XIA R, et al. Underexplored viral auxiliary metabolic genes in soil: diversity and eco-evolutionary significance[J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25(4): 800–810.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳正