

基于宏基因组学分析苯扎氯铵对发酵乳中乳酸菌功能及代谢变化的作用

代聪聪, 姚笛, 王新媛, 范绮雯, 陈冲, 申宝堂, 曹荣安*, 张建强*

(黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 为探究苯扎氯铵(BAC)作为乳制品生产中常用消毒剂的残留对发酵乳中乳酸菌的影响, 该文通过宏基因组学解析 BAC 对乳酸菌基因功能和代谢途径的作用机制。结果表明, 从 3 个不同含量的 BAC 发酵乳中共检测到 216 种乳酸菌, 以唾液链球菌嗜热亚种为主, 占总菌株数的 99.78%~98.45%, 且 BAC 对乳酸菌的生长和繁殖具有显著抑制作用。基因功能注释分析显示, COG 数据库共注释了 16 112 个基因, 对氨基酸转运代谢功能单元影响最高; 在 KEGG 数据库中, 碳水化合物和氨基酸代谢为主要代谢途径, 随 BAC 含量增加, 基因数量降低了 7.76%~9.10%; CAZy 分析显示, 糖苷水解酶(Glycoside Hydrolases, GHs)和糖基转移酶(Glycosyl Transferases, GTs)丰度最高(占比 79.08%~80.38%), 且 BAC 对 GT8 基因具有显著上调作用。代谢途径差异分析显示, BAC 对葡萄糖激酶和丙酮酸激酶具有下调作用, 导致 BAC2.0 样品组产酸能力降低, 可能进一步影响发酵乳的质构和风味特性。研究结果为深入理解 BAC 对乳酸菌的潜在影响提供了重要依据, 并为后续探讨 BAC 在其他发酵食品中潜在风险提供了基础。

关键词: 宏基因组; 苯扎氯铵; 发酵乳; 乳酸菌; 功能基因注释; 代谢途径

文章编号: 1673-9078(2026)03-93-105

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1770

Metagenomic Analysis of the Effects of Benzalkonium Chloride on Lactic Acid Bacteria Function and Metabolism in Fermented Milk

DAI Congcong, YAO Di, WANG Xinyuan, FAN Qiwen, CHEN Chong, SHEN Baotang,

CAO Rongan*, ZHANG Jianqiang*

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Benzalkonium chloride (BAC) is a commonly used disinfectant in dairy production. To investigate the effects BAC has on lactic acid bacteria (LAB) in fermented milk, the mechanisms by which BAC influences LAB gene functions and metabolic pathways were investigated using metagenomic analysis. The results identified a total of 216 LAB taxa isolated from fermented milk samples containing three different concentration levels of BAC. *Streptococcus thermophilus* was identified as the predominant species, accounting for 99.78%~98.45% of the total bacterial strains. BAC significantly inhibited the growth and

引文格式:

代聪聪,姚笛,王新媛,等.基于宏基因组学分析苯扎氯铵对发酵乳中乳酸菌功能及代谢变化的作用[J].现代食品科技, 2026,42(3):93-105.

DAI Congcong, YAO Di, WANG Xinyuan, et al. Metagenomic analysis of the effects of benzalkonium chloride on lactic acid bacteria function and metabolism in fermented milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 93-105.

收稿日期: 2024-11-27; 修回日期: 2025-03-20; 接受日期: 2025-03-28

基金项目: 黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动(XYB202117); 大庆市科技创新引导资金项目(DQ23KJYD002); 黑龙江八一农垦大学研究生创新基金项目(YJSCX2023-Y45)

作者简介: 代聪聪(2000-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1608626578@qq.com

通讯作者: 曹荣安(1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: racao@163.com; 共同通讯作者: 张建强(1982-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品科学, E-mail: ziq049@163.com

proliferation of LAB. Gene function annotation analysis showed that 16,112 genes were annotated in the COG database, with the highest impact observed on amino acid transport and metabolic functional units. In the KEGG database, carbohydrate and amino acid metabolism were the primary pathways involved, with gene counts decreasing by 7.76%~9.10% as the BAC concentration increased. CAZy analysis indicated that glycoside hydrolases and glycosyl transferases were the most abundant enzyme families (accounting for 79.08%~80.38%), and BAC significantly upregulated genes in the GT8 family. Differential metabolic pathway analysis demonstrated that BAC downregulated glucose kinase and pyruvate kinase. This resulted in a decreased acidification capacity in the BAC2.0 sample group, potentially affecting the texture and flavor characteristics of fermented milk. These findings provide critical insights into the potential impact that BAC has on LAB and lay a foundation for further exploration of BAC-related risks in other fermented foods.

Key words: metagenome; benzalkonium chloride; fermented milk; lactic acid bacteria; functional gene annotation; metabolic pathway

发酵乳具有促进健康的特性, 包括提高免疫力^[1]、改善慢性便秘^[2]、保护肝脏^[3]、降低血液胆固醇含量和血糖水平^[4]。发酵乳在发酵过程中, 各种微生物改变了原料的化学组成, 其中乳酸菌起着核心作用^[5]。乳酸菌是传统酸奶菌群中最常见的菌群之一, 通常占细菌总数的 90% 以上, 其中乳杆菌、乳球菌和链球菌是最常见的属^[6]。乳制品生产加工中原料乳的获取、发酵以及运输和储存过程中都使用苯扎氯铵 (Benzalkonium Chloride, BAC) 作为消毒剂, BAC 是一种季铵盐类杀菌剂^[7], 其对生物菌群具有毒性, 对微生物的生长有明显的抑制作用^[8-10]。欧洲食品安全局不断严格控制食品中季铵盐消毒剂的最大残留限量 (Maximum Residue Limits, MRLs)。2012 年, 欧盟委员会 (European Commission, EC) 颁布的 No 396/2005 法规规定, BAC 的 MRLs 为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。2014 年, 牛奶中 BAC 的 MRLs 已由欧盟委员会确定在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围内^[11]。2015 年, 德国检测机构在中国婴幼儿奶粉中检测出季铵盐^[12]。2016 年, Xian 等^[13]从广东当地市场采集的 27 份婴幼儿配方奶粉样品和 10 份盒装液态奶样品进行检测, 结果发现 6 份奶粉和 1 份液态奶样品中 BAC 的浓度范围为 $31.9 \sim 122 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。因此, 评估 BAC 对乳品中的影响是有必要的。尽管传统的发酵乳制品通常被认为具有较低复杂性的微生态环境, 但要揭示乳中微生物组的新分类群和宏基因组特征, 仍需使用宏基因组高通量测序技术^[14]。

宏基因组学通过对基因组组装进行非选择性基因注释, 可以概述微生物多样性和结构, 并预测代谢途径和功能, 从而提供更高的分辨率和准确性^[15-18]。Qu 等^[19]利用宏基因组学研究巴氏酸奶和益生菌酸奶中细菌耐药性和抗生素耐药基因组成之间的差异, 分析发

酵乳制品可能存在的安全隐患。夏亚男等^[20]采用宏基因组技术分析酸马奶的微生物多样性, 并探讨其基因功能。Li 等^[21]通过高通量宏基因组测序技术, 对不同发酵剂发酵的酵母中微生物类群的多样性进行了研究, 并对其功能容量进行了评价。尽管目前使用宏基因组学对酸奶的研究较为广泛, 但对 BAC 影响发酵乳菌群和代谢途径变化的研究未见报道, 因此, 宏基因组高通量测序与复杂生物信息学分析方法联合使用, 可以有效提高解码 BAC 对微生物组数据集的分辨率。

本研究通过设置不同 BAC 添加量, 结合宏基因组技术, 系统探讨 BAC 在发酵乳发酵过程中对微生物群落结构变化的作用, 深入解析其对乳酸菌基因功能的调控机制。该研究旨在阐明 BAC 对发酵乳微生物代谢路径的调节效应, 揭示其对酶功能特征的影响规律, 为 BAC 残留对其他发酵产品中潜在危害的影响研究提供重要的理论基础和参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

苯扎氯铵, 武汉华翔科洁生物技术有限公司; 发酵剂德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、唾液链球菌嗜热亚种 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), 丹尼斯克 (中国) 有限公司; MRS 琼脂, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; PPF Mag-Bind Stool DNA Kit 基因组提取试剂盒, 美国 Omega Bio-tek 公司; NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (300 cycles) 测序试剂盒, 美国 Illumina 公司; NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq 建库试剂盒, 美国 Bioo Scientific 公司; 琼脂糖, 美国 Thermo Scientific 公司。

Eppendorf 5424R 高速台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; JY600C 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; Novaseq 6000 测序仪, 美国 Illumina 公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Qubit 4.0 荧光定量仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Eppendorf N13462C 移液器, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 乳酸菌计数测定和样品采集

根据《婴幼儿配方食品中消毒剂残留检测》(BJS 202007) 检测出原料奶粉中 BAC 含量为 $137\sim1\,956\,\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 因此, 设置牛奶中 BAC 添加量为 0.2 和 $2\,\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别命名为 BAC0.2 样品组和 BAC 2.0 样品组, 对照组命名为 BAC0 样品组。每个样品重复三次, 接混合菌种 (乳酸菌种), 以接种量为 1% (m/m , 混合菌种为冻干粉) 进行 $37\,^{\circ}\text{C}$ 发酵 48 h, 每个发酵乳样品取 1 mL 与 9 mL 无菌生理盐水 ($0.85\%\,m/V$, pH 值 7.2) 中均质。使用三个梯度为 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 和 1×10^{-7} 的稀释度配置稀释液, 并将 0.1 mL 接种于 MRS 琼脂上, 并在 $37\,^{\circ}\text{C}$ 厌氧条件下孵育 48 h, 菌落计数并以菌落形成单位 (CFU/mL) 表达^[22]。

将九个样品组放入带有密封盖的灭菌瓶中, 每瓶样品混匀分别取出约 10 g。采集后, 发酵乳样品立即储存在冰盒中以保持其低温状态, 并在 $-80\,^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.3 宏基因组DNA提取

根据 PF Mag-Bind Stool DNA Kit 的严格操作指南, 用液氮研磨后提取发酵乳的总基因组 DNA, 提取的 DNA 保存在 $-20\,^{\circ}\text{C}$, 以便进一步评估。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000 测定 DNA 的完整性和纯度, 这些片段将被用于构建 PE 文库。

1.4 宏基因组测序

使用 Covaris M220 聚焦超声仪将基因组 DNA 随机剪切为约 400 bp 的片段, 然后使用 NEXTFLEX[®] Rapid DNA-Seq 构建宏基因组测序文库。使用 Majorbio Biopharm Technology 软件的 Novaseq 6000 平台进行 DNA 配对测序。

使用 Fastp (版本 0.20.0)^[23] 剪切宏基因组测序的原始片段类型, 以获得原始数据用于后续分析: (1) 适配器序列; (2) 长度 $<50\,\text{bp}$ 的片段; (3) 包含 N 碱基; (4) 平均碱基质量值分数 <20 。使用 Megahit 软件 (版本 1.1.2) 对每个样本的高质量 contigs ($\geq 300\,\text{bp}$) 进行共组装, 并通过运

行 MetaGene^[24] 软件对开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 进行基因预测。预测的基因 ($\geq 100\,\text{bp}$) 通过 CD-HIT (版本 4.6.1)^[25] 聚类, 具有 90% 的一致性和 90% 的覆盖率。根据生物技术信息中心翻译表将长度在 100 bp 或 100 bp 以上的 ORF 翻译成蛋白质序列。使用 SOAPaligner 软件^[26] 将高质量片段与非冗余基因目录进行比对, 一致性为 95%, 并评估每个样本中的基因丰度。

1.5 分类和基因功能注释

在 Diamond 软件 (版本 0.2.13)^[27] 中使用 BLASTP 分别在 NR 数据库 (Non-Redundant Protein Sequence Database, NR)、直系同源基因蛋白质组 (Clusters of Orthologous Groups, COG)、碳水化合物活性酶数据库 (Carbohydrate-Active Enzymes Database, CAZy) 和《京都基因和基因组百科全书》数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 进行注释, 设置 e 值 $\leq 1\times 10^{-5}$, 获得非冗余基因的功能谱。此外, 利用 KEGG 数据库和文献, 基于物种与功能的对应关系及其在样品中的相对丰度, 进行物种与功能的相关性分析, 获得物种对特定酶的贡献。

1.6 数据处理

数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 通过 SPSS 24.0 采用单因素方差分析 ($P<0.05$) 计算统计学显著性, 使用 “pheatmap” 包在 R 中执行热图, 柱状图由 Origin 2021 执行。

2 结果与分析

2.1 发酵乳中乳酸菌总数计数

本研究中 9 份发酵乳中乳酸菌总数在 $4.93\times 10^8\sim 1.10\times 10^9\,\text{CFU/mL}$ 范围之间, 具体结果如图 1a 所示。肉眼观察离散菌落呈白色、乳白色、不透明、半透明, 边缘规则, 直径在 1~3 mm 范围内, 乳酸菌总数能够反映发酵乳制品储藏过程中菌株的生长状态。图 1b 发现 BAC 含量增加到 $0.2\,\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 同 BAC0 样品组相比, 乳酸菌活菌数减少 30.11%, 当 BAC 含量增加到 $2.0\,\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 同 BAC0 样品组相比, 乳酸菌活菌数减少 54.29%, 具有显著差异性 ($P<0.05$), 可能由于 BAC 能与细胞膜组分形成胶束, 破坏菌群的细胞膜, 导致膜增溶和细胞裂解^[28]。如图 1c 所示, 发酵乳的 pH 值随着 BAC 含量的增多, 由 pH 值 4.70 增长到 pH 值 4.82, 有显著差异性 ($P<0.05$), 这表明与

发酵乳的 pH 值负相关。因此, 可以通过宏基因组更进一步研究 BAC 对微生物菌群以及功能的影响。

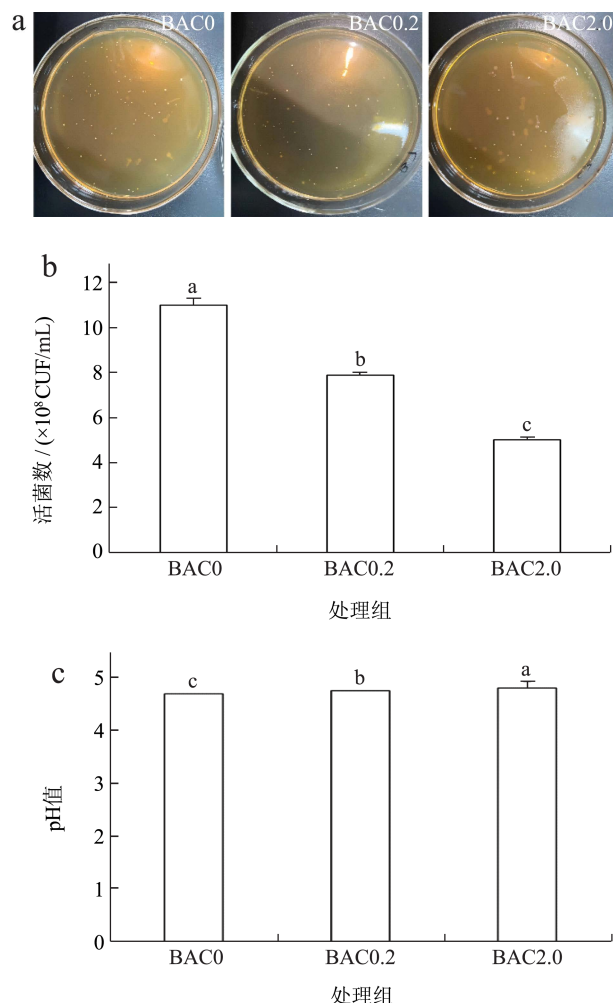


图1 不同含量 BAC 处理发酵乳中乳酸菌的菌落形态、活菌数和 pH 值

Fig.1 Colony morphology, viable count and pH value of lactic acid bacteria in fermented milk treated with different BAC contents

注: (a) 不同含量 BAC 处理发酵乳中乳酸菌的菌落形态; (b) 不同含量 BAC 处理发酵乳中乳酸菌的活菌数; (c) 不同含量 BAC 处理发酵乳中 pH 值。柱上小写字母不同表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)

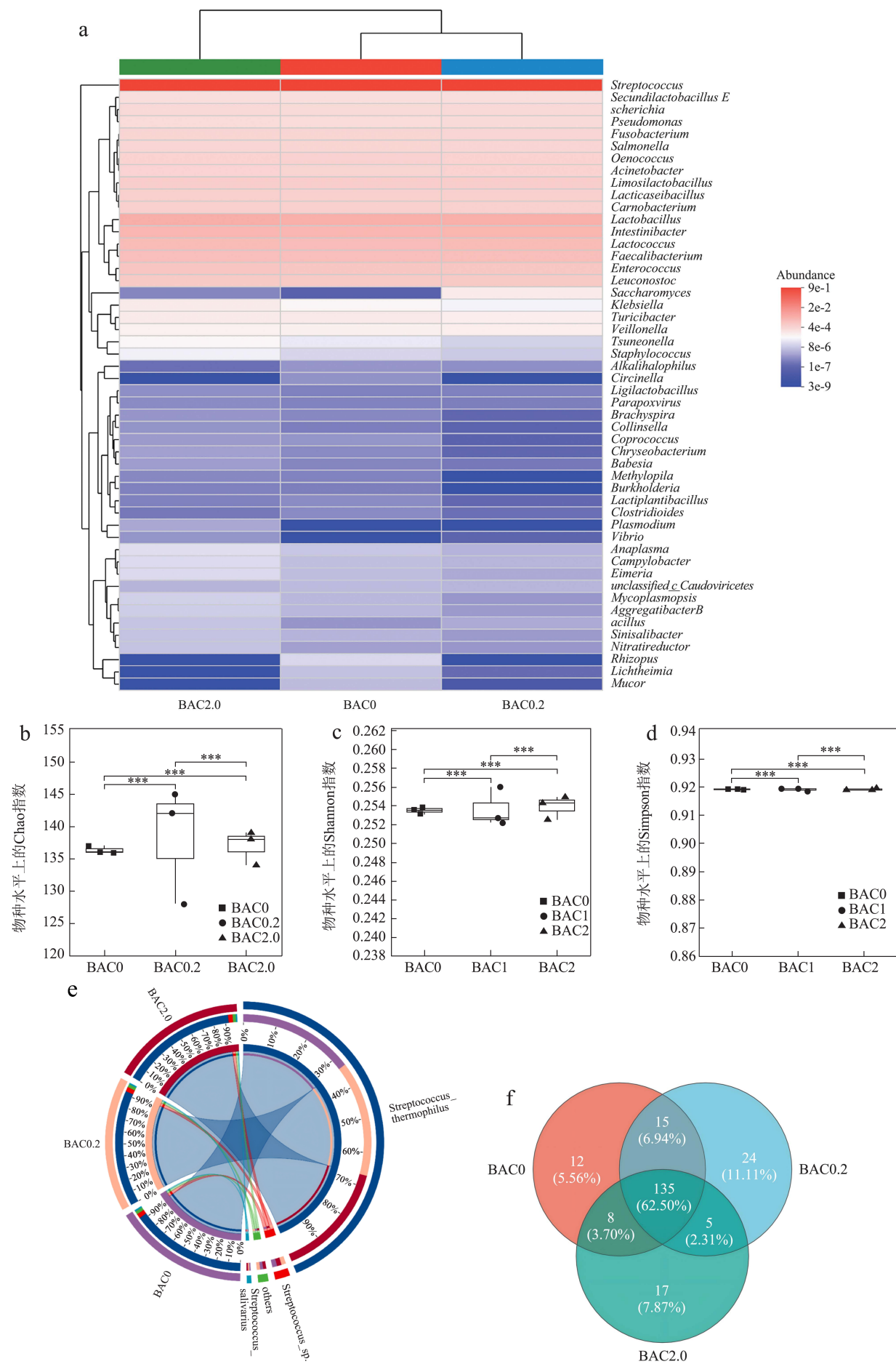
2.2 微生物群落的 α 多样性及其丰度

如图 2a 分层聚类热图显示, 与 BAC0 样品组相比, BAC0.2 样品组和 BAC2.0 样品组中有 9 个物种

有不同的梯度, 表明不同含量 BAC 会影响发酵乳中细菌群落。图 2b~2d 描述了不同类型发酵乳中细菌 α -多样性。BAC0 样品组的平均 Chao 指数为 136.33, BAC0.2 样品组的平均 Chao 指数为 138.33, BAC2.0 样品组的平均 Chao 指数为 137, 表明 BAC0.2 样品组的物种丰富度显著高于 BAC0 样品组和 BAC2.0 样品组 ($P < 0.05$)。BAC0 样品组、BAC0.2 样品组和 BAC2.0 样品组的 Shannon 指数分别为 0.253 4、0.253 6 和 0.253 9, Simpson 指数分别为 0.919 1、0.918 9、和 0.919。虽然 BAC0.2 样品组的细菌多样性指数较高, 但经统计分析, 两组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

如图 2e 所示, 观察到 *Streptococcus* 是发酵乳中的优势菌属 (98.45%), 其中链球菌种水平有 4 个 (*Streptococcus-sp*、*Streptococcus-salivarius*、*Streptococcus-vestibularis* 和 *Streptococcus-pyogenes*)。同时, 如图 2f 所示, 在鉴定的 216 个种水平中, BAC0 样品组和 BAC0.2 样品组分别获得了 170 和 179 个种, 而 BAC2.0 样品组仅包含 165 个种。其中, BAC0 样品组特有种水平 12 个, BAC0.2 样品组特有种水平 24 个以及 BAC2.0 样品组特有种水平 17 个。Olszewska^[29]研究发现, 平板计数法显示季铵盐中的氯离子对植物乳杆菌有影响, 导致菌数显著降低。然而, 采用共聚焦激光扫描显微镜观察时发现, 乳酸菌能形成生物膜, 其对季铵盐的抗性是相应浮游细胞的两倍。因此, 随着苯扎氯铵浓度的升高, 虽然会破坏乳酸菌的总菌数, 但对特有种的影响则不显著。

此外, 如图 2g 和 2h 所示, 在 BAC0 样品组中还发现了其他几种乳酸菌, 包括德氏乳杆菌、乳酸球菌、鼠李糖乳酸杆菌、罗伊乳酸杆菌和明串珠菌, 发现德氏乳杆菌保加利亚亚种的相对丰度仅为 0.59%, 这一现象可能与发酵初期以唾液链球菌嗜热亚种为主的生长环境有关, 唾液链球菌嗜热亚种通过糖酵解途径产生甲酸、叶酸等有机物, 促进了保加利亚乳杆菌的生长。然而, 由于发酵时间较短, 这一因素可能限制了德氏乳杆菌保加利亚亚种的数量^[30]。还发现在 BAC0 样品组、BAC0.2 样品组和 BAC2.0 样品组中都存在粪肠球菌、粪大肠杆菌、肠道沙门氏菌、肠道杆菌-巴氏杆菌和肠杆菌, 虽然它们的丰度不到 1%, 但可能对人体健康构成潜在威胁, 并可能成为抗性基因的潜在宿主^[31]。



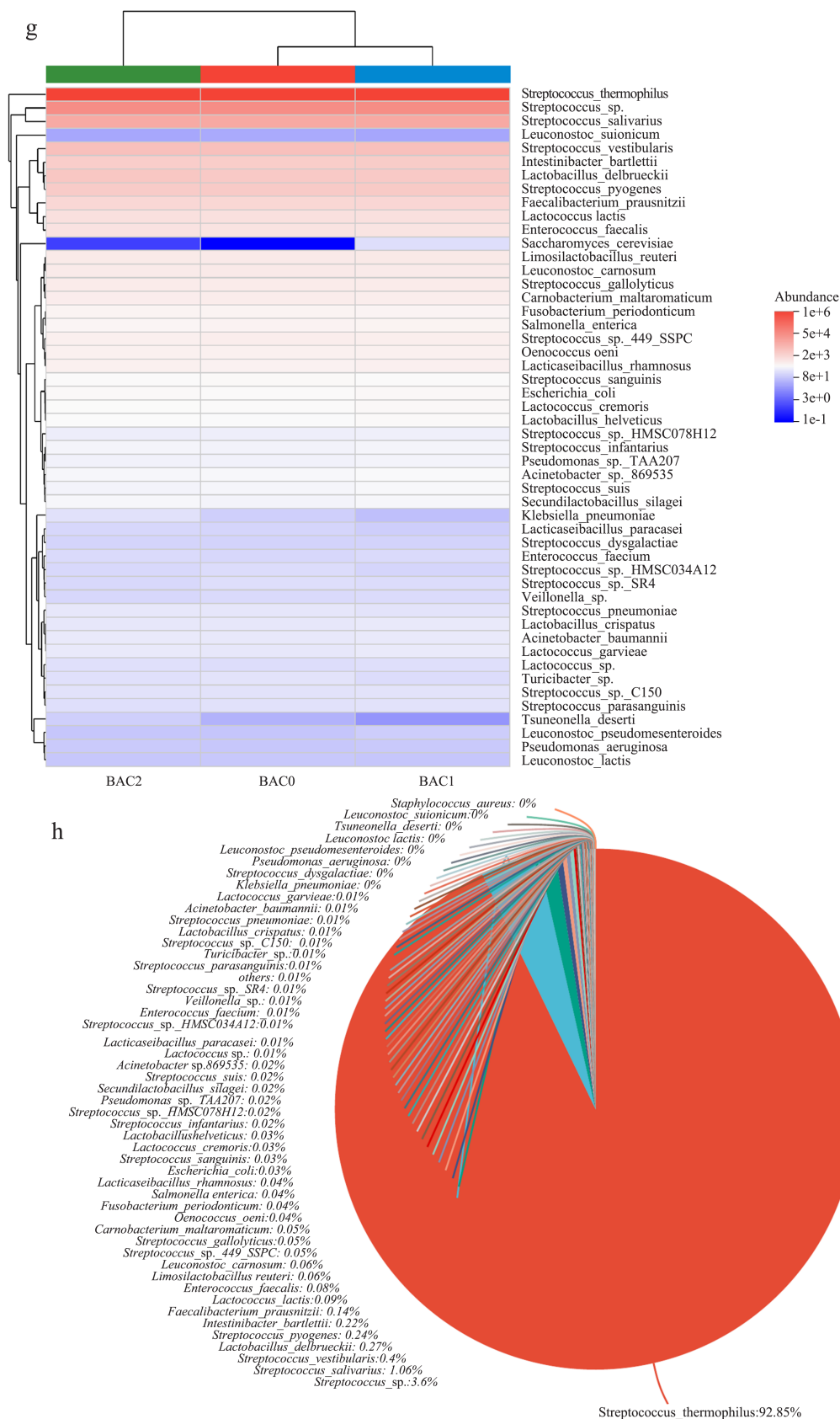
图 2 不同含量 BAC 发酵乳中细菌群落的 α 多样性和相似性

Fig.2 A diversity and similarity of bacterial communities in fermented milk with different BAC content

注: (a) 不同处理属水平热图; (b) Chao 指数估算的细菌丰富度; (c) Shannon 指数估算的细菌多样性; (d) Simpson 指数估算的细菌多样性; (e) 细菌多样性的维恩图; (f) 不同处理发酵乳属水平的群落结构; (g) 不同处理种水平热图; (h) 不同处理发酵乳种水平的群落结构。

2.3 数据库注释分析

2.3.1 发酵乳COG功能注释

利用 COG 数据库进行基因注释，总共有 16 112 个基因被映射到 eggNOG 数据库中。不同的途径反映了细菌代谢的潜力，以代谢为主（如碳水化合物、氨基酸、无机物、辅酶），其次是信息储存和加工（如转录；复制、重组和修复；翻译、核糖体和生物结合），以及细胞过程和信号传导（例如，细胞壁 / 膜 / 包膜生物合成）。由图 3a~3c 中可以看出，BAC 不同含量的 3 个

样品分别注释到 5 127、5 829、和 5 156 个基因，被注释到最多的与代谢相关的 3 个功能单元为氨基酸转运和代谢（3 个阶段样品注释基因数量和占比分别为 542 个，10.57%；600 个，10.29%；539 个，10.45%）、碳水化合物转运和代谢（336 个，6.55%；414 个，7.10%；354 个，6.86%）与细胞壁 / 膜 / 包膜生物合成（408 个，7.95%；436 个，4.74%；428 个，8.30%）。BAC0.2 样品组中氨基酸转运代谢相对丰度呈显著上升趋势（ $P<0.05$ ），这可能是 BAC 促进了蛋白质水解和微生物代谢产物的合成。

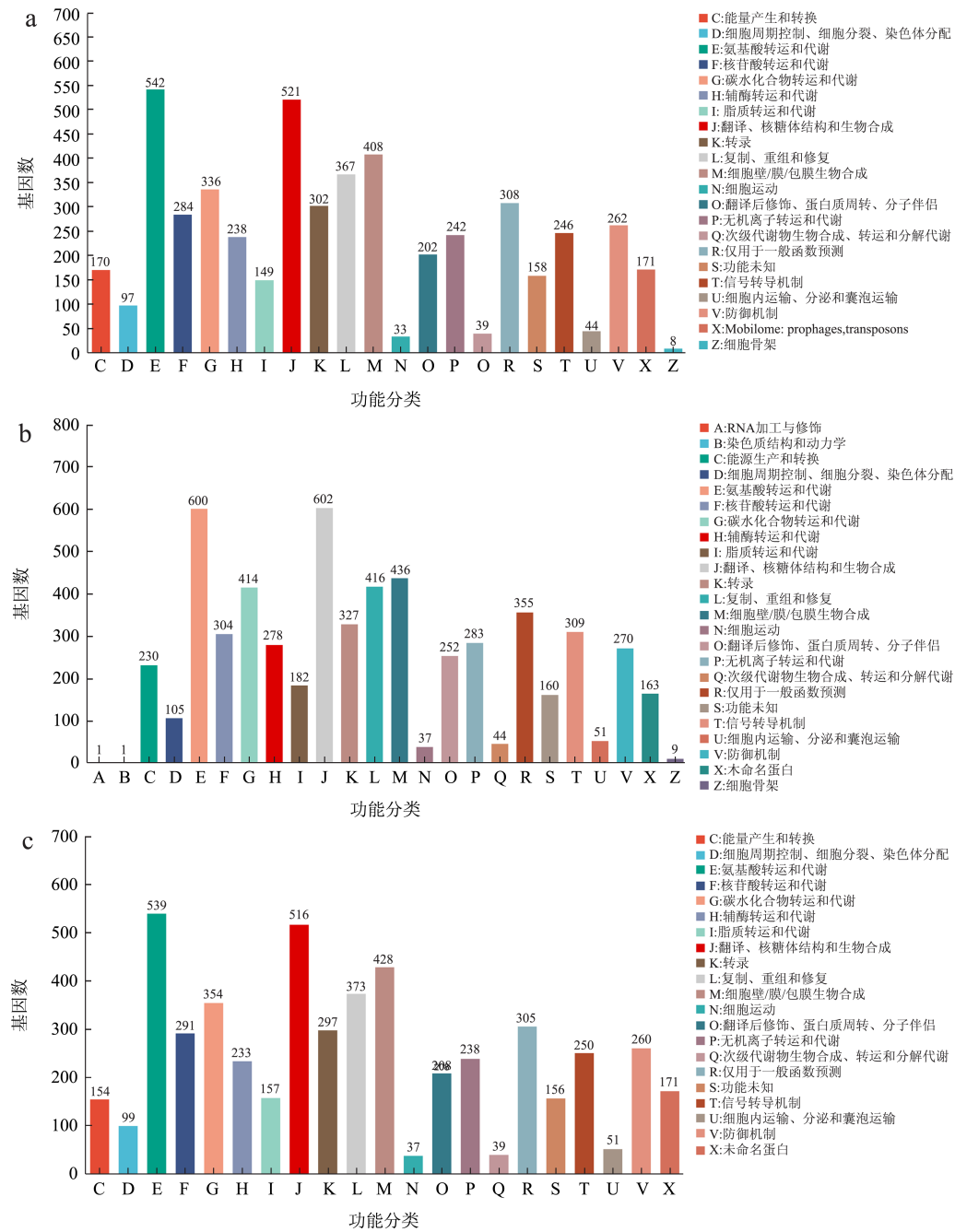


图 3 不同含量 BAC 发酵乳的 COG 代谢通路统计

Fig.3 Statistics of COG metabolic pathway in fermented milk fermentation with different BAC content

注: 图 a、b、c 分别代表 BAC 含量为 0、0.2 和 2.0 mg·kg⁻¹。

2.3.2 发酵乳KEGG功能注释

为了更深入地了解功能通路和预测基因之间的关联,用KEGG通路数据库对基因进行了注释。共有131 201 054个基因注释到KEGG数据库中。由数据库来分析基因注释结果,不同样品组在基因水平上可分为6类,每一类都可以分成几个小类。其中,代谢途径相对丰度最高,注释最多的6条代谢通路包括氨基酸代谢(3个样品的注释基因数量分别为8 515 310、8 536 586、7 843 098个)、碳水化合物代谢(7 197 614、7 190 832、6 603 952个)、辅助因子和维生素代谢(5 127 956、5 110 688、4 698 368个)、聚糖生物合成与代谢(4 397 236、4 405 266、4 061 788个)、核苷酸代谢(4 163 778、4 155 792、3 820 160个)与能量代谢(3 255 654、3 244 984、2 985 384个)。由图4a所示,碳水化合物代谢和氨基酸代谢占据了主要途径,这与Liu等^[32]及冼芳莹等^[33]研究发酵食品的结果相似。碳水化合物是细胞结构的主要组成部分和供能物质,调节细胞的生命活动,为其他代谢提供物质基础^[34]。因此,碳水化合物代谢在代谢类中占第二高的比例。与BAC0样品组相比,BAC2.0样品组五大功能二级通路中注释的基因数量降低了7.76%~9.1%。

基于KEGG注释结果,探讨各个BAC处理组和对照组之间的代谢差异,如图4d所示,不同含量BAC组的显著富集代谢途径相似,这些代谢途径的酶的丰度存在显著差异。本研究中,EC:3.2.1.41(支链淀粉酶)是ko 00500(淀粉和蔗糖代谢)中各组丰度明显差异的酶($P<0.05$),且BAC0样品组、BAC0.2样品组和BAC2.0样品组的丰度较高。它促进了从UDP-Glu(UDP-葡萄糖)到 α -D-Glu-1-P(α -D-葡萄糖-1-磷酸酯)的催化过程,但随着BAC含量的增多,会抑制 α -D-Glu-1,6-P2(α -D-葡萄糖1,6-二磷酸酯)的生成。ko 00500途径参与糖原的降解,使糖原转化为Glu-6P(葡萄糖-6磷酸酯)。 α -D-Glu-1-P进一步被分解成乙酰辅酶a和丙酮酸。乙酰辅酶a通过ko 00020途径参与TCA循环,TCA循环生成草酰乙酸和2-氧-戊二酸盐。EC:4.2.1.9(二羧基酸脱水酶)是ko 0029(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成)中各组丰度明显差异的酶($P<0.05$),该酶在BAC0.2样品组和

BAC2.0样品组的丰度较BAC0样品组含量高。(R)-2,3-二羟基-3-甲基丁酸酯通过该酶催化生成缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,并联系着ko 00260(甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢)的相互转化。

2.3.3 发酵乳CAZy功能注释

为了确认功能谱,这些基因被注释到CAZy数据库中。酶可分为辅助活性酶(AAs)、糖结合酶(CBMs)、糖酯酶(CEs)、糖苷水解酶(GHs)、糖基转移酶(GTs)和多糖裂解酶(PLs)。如图5a所示,GHs和GTs是发酵过程中最丰富的酶,BAC0样品组、BAC0.2样品组和BAC2.0样品组分别约占总酶丰度的79.1%、80.4%和80.0%。BAC0样品组、BAC0.2样品组和BAC2.0样品组三个阶段样品注释酶中CEs、AAs和PLs的相对丰度分别为4.58%、3.92%和0.65%;5.37%、3.41%和0.98%;3.75%、3.75%和0.63%。由此可知,发酵乳中最丰富的酶是GHs,占总酶的近一半。GHs负责糖苷键的水解或转糖基化,在碳水化合物分解中起着关键作用^[35]。GTs是第二丰富的酶,它将糖残基从供体转移到蛋白质糖基化的受体^[36],从而产生多种功能(如蛋白质稳定性、结合、折叠和活性)。CEs是第二丰富的基因,通过去除碳水化合物中的酯修饰而成为重要的生物催化剂^[37]。Li等^[38]通过宏基因组分析了不同处理中CAZy基因的总体分布,发现乳酸菌对面团中有GHs(56%)、GTs(17%~20%)和CEs(22%),而只有少量AAs和CBM存在,本研究进一步证明发酵基因主要富集在GHs、GTs和CEs中,相对较少富集在AAs、CBMs和PLs中。

10个最丰富的GH亚家族,其中有5个大量存在于乳制品中,包括GH1、GH25、GH36、GH8和GH510。值得注意的是,GH1、GH2、GH5、GH8、GH13、GH30和GH99家族与果胶、纤维素、半纤维素和淀粉相连,并促进多糖被EC:3.2.1.21(β -葡萄糖苷酶)、EC:3.2.1.23(β -半乳糖糖苷酶)、EC:3.2.1.78(β -1,4-甘露聚糖酶)、EC:3.2.1.4(纤维素酶)、EC:3.2.1.1(α -淀粉酶)和 α -1,2甘露糖苷降解^[39]。此外,如图5b所示,对于CTs家族来说,GT8、GT2、GT4、GT32和GT41在乳制品中含量丰富,与此同时,CEs家族中CE10、CE12、CE7和CE1家族序列在乳制品中含量丰富。

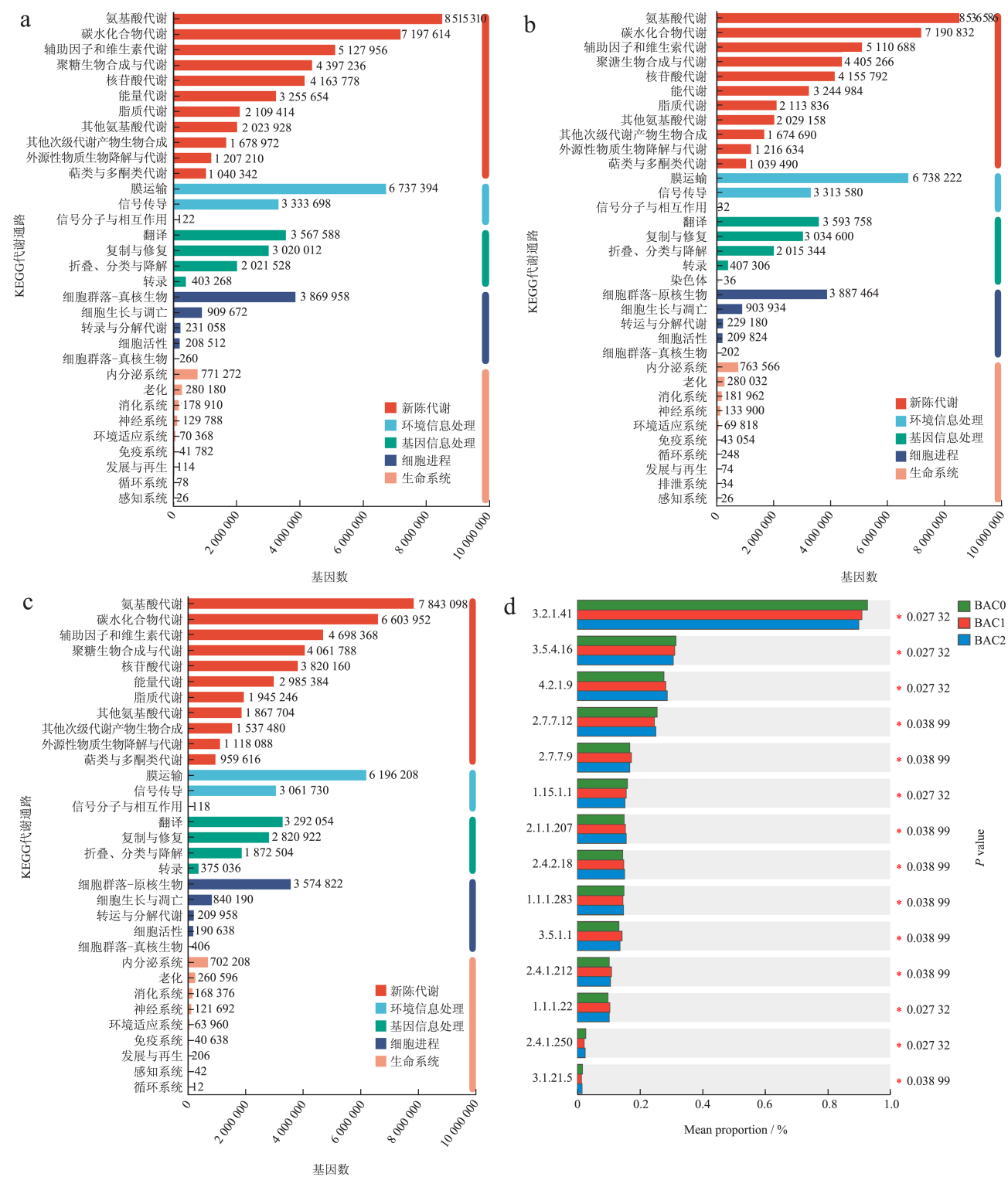


图 4 不同含量 BAC 发酵乳基因的 KEGG 代谢通路统计和多组比较

Fig.4 Statistics and comparison of KEGG metabolic pathway of fermented milk fermentation genes with different BAC content

注: (a) BAC0 发酵乳 KEGG 代谢通路统计; (b) BAC0.2 发酵乳 KEGG 代谢通路统计; (c) BAC2.0 发酵乳 KEGG 代谢通路统计; (d) KEGG 相关代谢酶与基因功能的多组比较。

如图 5c, CZAymes 组成及在不同 BAC 处理组中, 随着 BAC 含量的增加, 对 GT8 具有上调作用, 差异性极显著 ($P<0.01$)。GT8 是一种脂多糖 α -1,3-半乳糖转移酶 (EC:2.4.1.44) 多糖作为底物^[40], 反映了

CAZyme 在发酵食品风味形成中的重要性。同时, BAC 对 GH13 亚族的影响差异性显著 ($P<0.05$)。GH13 家族具有降解复杂碳水化合物的功能。因此, 证实图 5a 中基因功能表达中, GHs 和 GTs 的丰度最高的结论。

Liang 等^[41]已研究乳酸菌和乳球菌与 GHs 和 GTs 亚家族密切相关, 这表明发酵乳制品中的微生物可能通过 GHs 和 GTs 介导的多糖和不溶性膳食纤维的降解, 在形成独特风味物质中发挥重要作用, 特别是在乳酸菌和乳球菌属中。

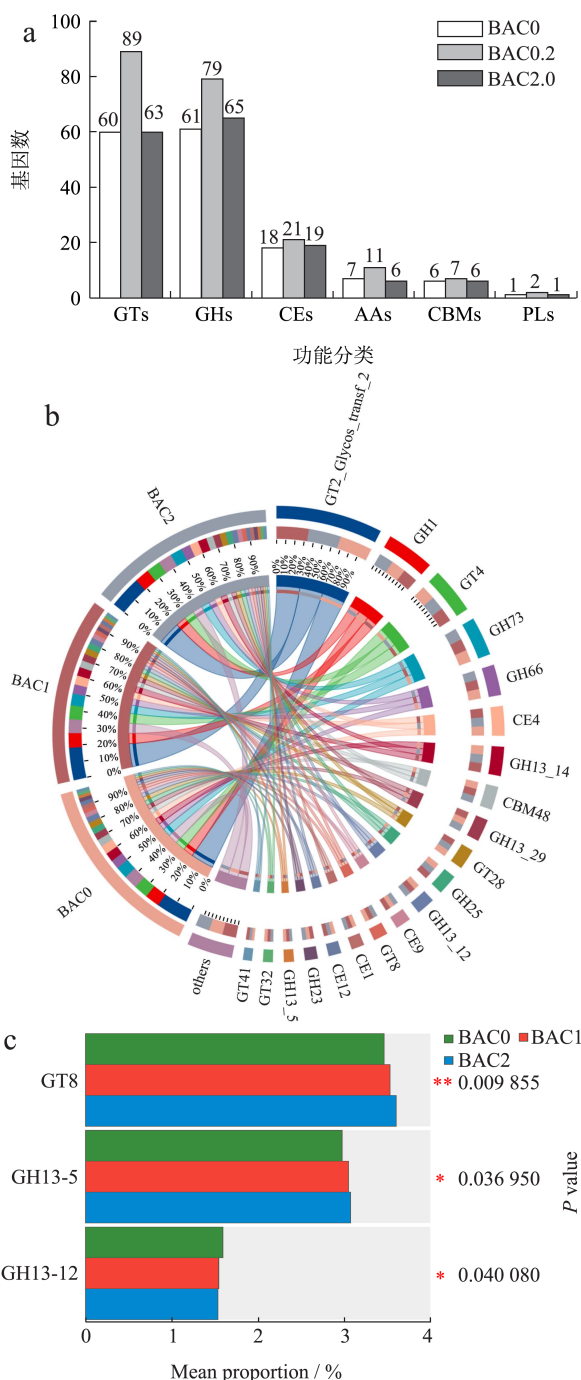


图5 不同含量BAC发酵乳基因的CAZy代谢通路统计和多组比较
Fig.5 Statistics and multi-group comparison of CAZy metabolic pathway of fermented milk genes with different BAC content

注:(a) 不同BAC含量发酵乳基因的CAZy代谢通路统计;
(b) CAZy物种功能Circos图;(c) CAZy碳水化合物酶与基因功能的多组比较。

2.4 BAC对发酵乳中碳水化合物代谢和氨基酸代谢途径的影响

基于宏基因组数据的基础上进一步研究了代谢途径相关数据。研究发现, 基因注释最多的是碳水化合物代谢和氨基酸代谢。其中碳水化合物代谢包括糖酵解途径、碳水化合物运输和柠檬酸循环, 在厌氧系统的能量产生和细胞生物合成中起着关键作用^[42]。通过三级注释来分析碳水化合物相关的代谢过程, 本研究关注不同BAC含量对发酵乳的影响机制, 选择糖酵解代谢和氨基酸生物合成代谢途径网络分析如图6所示。

糖酵解被认为是碳水化合物代谢的主要途径, 与葡萄糖转化和能量生成有关^[43]。其中, 编码碳水化合物利用酶的基因主要富集在乳酸菌中。在发酵乳发酵过程中, 蔗糖和葡萄糖是大多数细菌的主要碳和能量来源^[44]。对于糖酵解代谢途径中, α -D-Glucose-1-P(α -D-葡萄糖-1-磷酸)和D-Glucose(右旋葡萄糖)通过EC:5.4.2.2(磷酸葡萄糖变位酶)和EC:2.7.1.199(葡萄糖PTS系统EIICB)降解为 α -D-Glucose-6-P(α -D-葡萄糖-6-磷酸)。在EC:2.7.1.2(葡萄糖激酶)的作用下降解为D-Fructose-6-P(右旋果糖-6-磷酸), 并进一步生成D-Fructose-1,6P2(D-果糖-1,6-二磷酸)。同时, 蔗糖(Sucrose)和 α -D-Glucose-6-P在不需要酶作用的情况下, 产生Fructose(果糖)。 α -D-Glucose-1P, α -D-Glucose-6-P, α -D-Fructose-6P产生后, 通过后续的糖酵解和丙酮酸代谢途径进一步被利用, 产生氨基酸代谢的酸和底物。尤其专性异性发酵乳酸菌, 进一步产生乳酸、乙醇和CO₂。因此, 乳酸菌可能是利用葡萄糖进行糖酵解从而形成丙酮酸, 丙酮酸是产生有机酸、乙醇和几种氨基酸的重要前体。

丙酮酸代谢是代谢途径中底物转化的基础。*Streptococcus* 有良好发酵特性的乳制品发酵剂有助于酸化和风味合成, 其中乳酸是主要产物^[45]。*Lactobacillus* 可能有利于EC:1.1.1.27(1-乳酸脱氢酶)将丙酮酸转化为乳酸。对于葡萄糖至丙酮酸途径, 在BAC含量增多的情况下, EC:2.7.1.2(葡萄糖激酶)和EC:2.7.1.40(丙酮酸激酶)的相对丰度显著降低, 葡萄糖激酶和丙酮酸激酶相对丰度的降低导致丙酮酸减少, 进一步抑制乳酸的生成^[46], 这也是BAC2.0组产酸较少的原因之一。磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate, PEP)利用EC:2.7.1.40和EC:2.7.9.2(丙酮酸, 水二激酶)降解为丙酮酸盐, 进一步通过EC:1.2.4.1(丙酮酸脱氢酶E1成分)、EC:2.3.1.12(二氢脂酰赖氨酸残基乙酰转移酶)和

EC:1.8.1.4 (二氢脂酰脱氢酶) 转化为乙酰辅酶 a。此外, 乙酸或丙酮酸可转化为乙醛, 乙醛可转化为乙醇, 这是另一种含量较多的代谢物。

在氨基酸代谢方面，丙酮酸盐是氨基酸生物合成所必需的物质。丙酮酸直接生成丙氨酸、丝氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和半胱氨酸，然后形成其他氨基酸（如酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、脯氨酸和精氨酸），其中脯氨酸和精氨酸可以通过尿素循环生成。先前的报道表明，亮氨酸、谷氨酸、丙氨酸、丝氨酸和缬氨酸是酸奶中的主要氨基酸^[47]，它们在发酵乳风味的形成中起着关键作用。丙酮酸盐分别通

过 EC:2.2.1.6 (乙酰乳酸合酶) 和 EC:2.6.1.42 (支链氨基转氨酶) 生产亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸。它们被降解为脂肪酸衍生的醛和醇, 如壬烷醇、戊醇和辛醇。发酵乳发酵过程中增加了芳香氨基酸 (如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸) 的产生, 这些氨基酸可以转化为苯甲醛、苯乙醇和苯乙酸等代谢物^[48]。其中, 苯乙醛和苯乙醇是由苯丙氨酸的转氨化和脱羧得到的^[49]。此外, 预苯酸盐通过 EC:2.6.1.9 (磷酸组氨酸转氨酶) 和 EC:1.3.1.12 (预苯酸脱氢酶) 产生的苯丙氨酸和酪氨酸。总的来说, BAC 对氨基肽酶和转氨酶具有上调作用, 可能影响氨基酸对风味物质的合成。

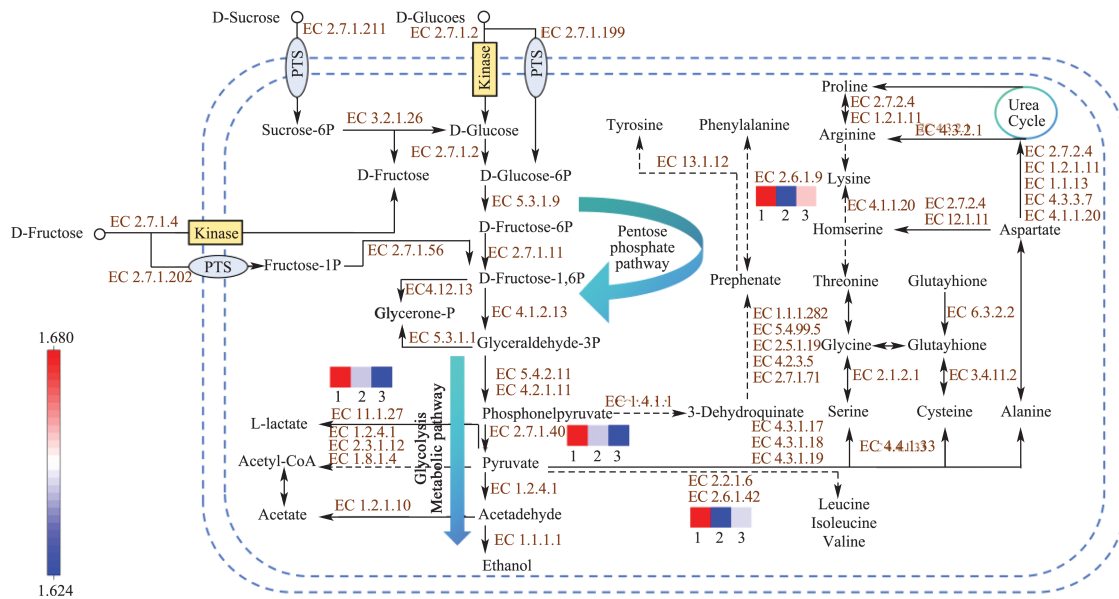


图 6 BAC 对发酵乳中碳水化合物代谢和氨基酸代谢途径的影响

Fig.6 Effect of BAC on carbohydrate and amino acid metabolism pathway in fermented milk

注: 虚线和实线分别代表多步反应和一步反应; 1、2 和 3 分别代表 BAC0 样品组、BAC0.2 样品组和 BAC2.0 样品组。

3 结论

该研究发现,不同含量的 BAC 对发酵乳的微生物多样性和代谢功能具有显著影响。随着 BAC 含量的增加,乳酸菌接种的发酵乳 pH 值从 4.70 升高至 4.82,呈现显著差异。同时,BAC 显著抑制了 *Lactobacillus* 在发酵乳中的生长速度。通过宏基因组测序技术分析了不同 BAC 含量发酵乳样品的微生物群落组成和基因功能。分类分析显示,处理样品中主要的属为链球菌属、乳酸杆菌属和乳球菌属。功能谱注释分析表明,BAC 含量越高,对各功能单元的影响越显著,尤其对细胞壁/膜/包膜生物合成功能单元影响最大,这可能与 BAC 能够破坏细菌细胞壁、进而影响细胞膜修饰的特性有关。在代谢类别中,碳水化合物代谢和氨基酸代谢是注释最显著的代谢通路,随着 BAC 含量的增加,相关基因注释数量最高减少了 9.1%。同时,BAC

对 GT8 基因具有显著上调作用。进一步探究 BAC 对代谢通路的影响机制发现, BAC 在糖酵解、丙酮酸代谢及氨基酸代谢过程中,对相关酶具有上调作用。然而,随着 BAC 含量的增加,葡萄糖激酶和丙酮酸激酶呈现下调趋势,导致乳酸生成量减少,可能对发酵乳的风味特性产生影响。目前对于食品中苯扎氯铵消毒剂残留量的检测研究还较少,并且对其他食品潜在危害的有待探索。此外,不同 BAC 含量的发酵乳样品在属水平上表现出相似的微生物结构,但这些属的相对丰度存在显著差异。该研究首次揭示了 BAC 对发酵乳代谢功能的影响,为 BAC 在发酵食品中的潜在风险提供理论支持。

参考文献

- [1] LOLLO P C B, DE MOURA C S, MORATO P N, et al. Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey

- beverage [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 118-124.
- [2] LIU Z, XU Z, HAN M, et al. Efficacy of pasteurised yoghurt in improving chronic constipation: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. International Dairy Journal, 2015, 40: 1-5.
- [3] NABAVI S, RAFRAF M, SOMI M H, et al. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(12): 7386-7393.
- [4] RODRIGUEZ-FIGUEROA J C, GONZALEZ-CORDOVA A F, ASTIAZARAN-GARCIA H, et al. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains [J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(7): 4094-4099.
- [5] GAO J, LI X, ZHANG G, et al. Probiotics in the dairy industry—advances and opportunities [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(4): 3937-3982.
- [6] MALLAPPA R H, BALASUBRAMANIAM C, NATARAJ B H, et al. Microbial diversity and functionality of traditional fermented milk products of India: Current scenario and future perspectives [J]. International Dairy Journal, 2021, 114: 104941.
- [7] 代聪聪, 范绮雯, 王新媛, 等. 不同高级氧化法处理苯扎氯铵研究进展[J/OL]. 现代食品科技, 1-16[2025-03-12].
- [8] WANG N, HE G. Dynamic tracing of bacterial community distribution and biofilm control of dominant species in milk powder processing [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112855.
- [9] FÜR RISIKOBEWERTUNG B. Health assessment of benzalkonium chloride residues in food [J]. BfR Opinion, 2012, 32: 2012.
- [10] 牛洪梅, 朱华剑, 许莉, 等. 苯扎氯铵适应对食源性致病菌杀菌剂耐受性影响的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(11): 329-337.
- [11] European Food Safety Authority. Reasoned opinion on the dietary risk assessment for proposed temporary maximum residue levels (MRLs) of didecylidimethylammonium chloride (DDAC) and benzalkonium chloride (BAC) [J]. European Food Safety Authority Journal, 2014, 12(4): 3675.
- [12] 韩丽. 奶粉中的季铵盐咋回事[J]. 江苏卫生保健, 2019, 11: 55.
- [13] XIAN Y, DONG H, WU Y, et al. QuEChERS-based purification method coupled to ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to determine six quaternary ammonium compounds (QACs) in dairy products [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 96-103.
- [14] YOU L, YANG C, JIN H, et al. Metagenomic features of traditional fermented milk products [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155: 112945.
- [15] MU Y, HUANG J, ZHOU R, et al. Comprehensive analysis for the bioturbation effect of space mutation and biofortification on strong-flavor Daqu by high-throughput sequencing, volatile analysis and metabolomics [J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134440.
- [16] HU Y, HUANG X, YANG B, et al. Contrasting the microbial community and metabolic profile of three types of light-flavor Daqu [J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101395.
- [17] HOU Q, WANG Y, CAI W, et al. Metagenomic and physicochemical analyses reveal microbial community and functional differences between three types of low-temperature Daqu [J]. Food Research International, 2022, 156: 111167.
- [18] YANG Y, WANG S T, LU Z M, et al. Metagenomics unveils microbial roles involved in metabolic network of flavor development in medium-temperature daqu starter [J]. Food Research International, 2021, 140: 110037.
- [19] QU T, WANG P, ZHAO X, et al. Metagenomics reveals differences in the composition of bacterial antimicrobial resistance and antibiotic resistance genes in pasteurized yogurt and probiotic bacteria yogurt from China [J]. Journal of Dairy Science, 2024, 107(6): 3451-3467.
- [20] 夏亚男, 刘皓, 双全, 等. 基于宏基因组分析酸马奶的微生物多样性及功能基因[J]. 中国食品学报, 2022, 22(2): 301-309.
- [21] LI H F, FU J K, HU S, et al. Comparison of the effects of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria on the microbial diversity of and the functional pathways in dough as revealed by high-throughput metagenomics sequencing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 346: 109168.
- [22] OLATUNDE O O, OBADINA A O, OMENU A M, et al. Screening and molecular identification of potential probiotic lactic acid bacteria in effluents generated during ogi production [J]. Annals of Microbiology, 2018, 68: 433-443.
- [23] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.
- [24] NOGUCHI H, PARK J, TAKAGI T, et al. MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(19): 5623-5630.
- [25] FU L, NIU B, ZHU Z, et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data [J]. Bioinformatics, 2012, 28(23): 3150-3152.
- [26] LI R, LI Y, KRISTIANSEN K, et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program [J]. Bioinformatics, 2008, 24(5): 713-714.
- [27] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H, et al. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 59-60.
- [28] MERCHEL PIOVESAN PEREIRA B, TAGKOPOULOS I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(13): e00377.
- [29] OLSZEWSKA M A, NYNCA A, BIALOBRZEWSKI I, et al. Assessment of the bacterial viability of chlorine- and quaternary ammonium compounds-treated *Lactobacillus* cells via a multi-method approach [J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(4): 1070-1080.
- [30] 唐凯伟, 黄晓英, 易宇文, 等. 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌单菌发酵与复配发酵对酸奶品质的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 127-132.
- [31] DIWAN A D, HARKE S N, PANCHE A N. Studies on exploring the potentials of gut microbiomes to mitigate the bacterial and viral diseases of fish and shellfish in aquaculture farming [J]. The Microbe, 2024, 2: 100031.
- [32] LIU S, CHEN Q, ZOU H, et al. A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development

- in Shaoxing mechanized huangjiu fermentation mashers [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 303: 9-18.
- [33] 洗芳莹,赵文鹏,王思宇,等.基于宏基因组测序技术解析高温快速发酵豆豉菌群结构与功能注释[J].食品工业科技,2023,44(2): 159-169.
- [34] SANKUAN X, CUIMEI Z, BINGQIAN F, et al. Metabolic network of ammonium in cereal vinegar solid-state fermentation and its response to acid stress [J]. Food Microbiology, 2021, 95: 103684.
- [35] LIBERATO M V, PRATES E T, GONCALVE T A, et al. Insights into the dual cleavage activity of the GH16 laminarinase enzyme class on β -1, 3 and β -1, 4 glycosidic bonds [J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, 296: 100385.
- [36] COSTA O Y A, DE HOLLANDER M, PIJL A, et al. Cultivation-independent and cultivation-dependent metagenomes reveal genetic and enzymatic potential of microbial community involved in the degradation of a complex microbial polymer [J]. Microbiome, 2020, 8: 1-19.
- [37] AMRMENDARIZ-RUIZ M, RODRIGUEZ-GONZALEZ J A, CAMACHO-RUIZ R M, et al. Carbohydrate esterases: An overview [J]. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, 2018, 1835: 39-68.
- [38] LI H, FU J, HU S, et al. Comparison of the effects of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria on the microbial diversity of and the functional pathways in dough as revealed by high-throughput metagenomics sequencing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 346: 109168.
- [39] SINGH A, ADSUL M, VAISHNAV N, et al. Improved cellulase production by *Penicillium janthinellum* mutant [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2017, 55(7): 436-440.
- [40] HOULISTON R S, BERNATCHEZ S, KARWASKI M F, et al. Complete chemoenzymatic synthesis of the Forssman antigen using novel glycosyltransferases identified in *Campylobacter jejuni* and *Pasteurella multocida* [J]. Glycobiology, 2008, 19(2): 153-159.
- [41] LIANG 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.
- [42] LIU D, YANG Y, AI J, et al. Research on microbial structures, functions and metabolic pathways in an advanced denitrification system coupled with aerobic methane oxidation based on metagenomics [J]. Bioresource Technology, 2021, 332: 125047.
- [43] FULLER G G, KIM J K. Compartmentalization and metabolic regulation of glycolysis [J]. Journal of Cell Science, 2021, 134(20): jcs258469.
- [44] ZHANG J, WANG Q, GONG Q, et al. Symbiotic bacteria diversity and metabolome analyses of *Nostoc sphaeroides* grown under different organic carbon sources [J]. Algal Research, 2024, 81: 103592.
- [45] YANG S, ZHAO Q, WANG D, et al. The interaction between *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* M58 and *Streptococcus thermophilus* S10 can enhanced texture and flavor profile of fermented milk: Insights from metabolomics analysis [EO/OL]. Journal of Dairy Science, 2024, 107(11): 9015-9035.
- [46] ZHANG R, LIU J, JIANG L, et al. Effect of high-concentrate diets on microbial composition, function, and the VFAs formation process in the rumen of dairy cows [J]. Anim Feed Sci Tech, 2020, 269: 114619.
- [47] WANG R, MA C, WANG K. Comparison of the physicochemical property and volatile flavour compounds of yoghurt made from ultra-pasteurised and membrane-filtered milk [J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 203: 116338.
- [48] KUM S J, YANG S O, LEE S M, et al. Effects of *Aspergillus species* inoculation and their enzymatic activities on the formation of volatile components in fermented soybean paste (doenjang) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(5): 1401-1418.
- [49] ETSCHMANN M, BLUEMKE W, SELL D, et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59: 1-8.