

贮藏温度对即食小龙虾品质及微生物菌群多样性的影响

Analysis of quality and colony diversity of products of crayfish under different storage temperatures

周 涛 吴晓营 罗海波 满文曾 王 芮 万辰玥

ZHOU Tao WU Xiao-ying LUO Hai-bo MAN Wen-zeng WANG Rui WAN Chen-yue

(南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210097)

(College of Food and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097, China)

摘要:先通过测定理化指标确定即食小龙虾货架期,再分别从 4、25℃两种贮藏温度下中、末期的样品中提取即食小龙虾总 DNA,通过高通量测序技术探究贮藏期间其微生物菌群变化。结果表明:随贮藏时间的延长,物种多样性逐渐降低;4℃贮藏条件下,末期优势菌群为海洋杆菌属(*Oceanobacillus*, 81.522%)和希瓦氏菌属(*Shewanella*, 3.625%);25℃贮藏条件下,末期优势菌群为哈撒韦氏菌属(*Hathewayia*, 78.700%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 12.380%)和狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*, 8.707%)。

关键词:即食小龙虾;高通量测序;优势菌属;菌群多样性

Abstract: In this study, the quality and dominant spoilage flora in products of crayfish during 4 and 25℃ storage were studied. The shelf life was determined by measure its physical and chemical indicators. Microbial genomic DNA was extracted from the collected samples, and the changing trend of microbial community was analyzed by high-throughput sequencing technology. Results showed that, with the extension of storage time, species diversity decreased gradually. The dominant flora at 4℃ were *Oceanobacillus* (81.522%) and *Shewanella* (3.625%). The dominant flora at 25℃ were *Hathewayia* (78.700%), *Bacillus* (12.380%) and *Clostridium sensu stricto* (8.707%). This study provided a theoretical basis for extend the shelf life of conduct of crayfish and targeted research on preservation and preservation technology.

Keywords: products of crayfish; high-throughput sequencing;

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目(编号: CX[16]1057)

作者简介:周涛(1964—),男,南京师范大学副教授,博士。

E-mail: zhoutao@ sina.com

收稿日期:2019-05-15

dominant flora; diversity of bacterial flora

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)又名小龙虾、红螯虾,其肉质鲜美、风味独特、营养价值高,是中国目前市场上最畅销的淡水虾类^[1]。现已形成了集“苗种繁育、健康养殖、加工出口、餐饮物流、节庆文化”于一体的产业链条^[2]。目前,中国淡水小龙虾主要以生鲜销售、冷冻粗加工和即食产品为主,即食小龙虾产品改变了季节性对其销售和消费的限制,但也存在货架期短等问题。水产品腐败变质主要归结于细菌的侵染,随贮藏时间的延长,只有少数特定种类的微生物迅速增长,并逐渐占据主导地位,生长代谢产生一些不良物质,导致产品腐败变质,这类细菌就是特定腐败菌(specific spoilage organisms, SSO)^[3-5],如果能对产品中特定腐败菌进行控制即可有效延长货架期。所以有必要了解产品在贮藏过程中菌群结构与变化规律,对引起产品变质的特定腐败菌进行研究,从而达到靶向抑制产品腐败变质的目的。

近年来,随着分子生物学的发展,高通量测序技术已被广泛应用于分析微生物菌群多样性的变化。高通量测序是一种非培养分析法,无需对菌株进行培养,可以直接通过提取、分析样品的 DNA 来对微生物多样性进行分析^[6],目前已成功应用在鲳鱼^[7]、蟹糊^[8]、带鱼^[9]、虾夷扇贝柱^[10]、南极磷虾^[11]、牡蛎^[12]等水产品中微生物菌群多样性的分析。江杨阳等^[13]同时利用传统培养方法和高通量测序技术对冷藏小龙虾进行优势腐败菌的分析,但通过该技术对小龙虾即食产品菌群多样性进行分析的尚未见报道。试验拟将即食小龙虾产品置于两种常用贮藏温度下,旨在了解产品在不同贮藏温度下品质及菌群多样性变化,为企业在杀菌参数确定、车间卫生管理、靶向抑

制产品腐败变质及研发防腐保鲜技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小龙虾:购于江苏盱眙水产市场;
平板计数琼脂(PCA):海博生物技术有限公司;
细菌基因组 DNA 提取试剂盒:生工生物工程(上海)股份有限公司;
硼酸、MgO:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;
高纯度耐热 DNA 聚合酶:南京诺唯赞生物科技有限公司;
DNA 产物纯化试剂盒:北京全式金生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

自动凯氏定氮仪:K9840 型,海能仪器有限公司;
PCR 仪:T100TM Thermal Cycler 型,美国 BIO-RAD 公司;
电泳槽:DYCZ-21 型,北京市六一仪器厂;
凝胶成像系统:EC3 500 型,美国 UVP 公司;
漩涡混合器:GL-88B 型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;
移液器:Research 型,0.5~10.0 μL,德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品的加工工艺

鲜活小龙虾→盐水吐污 6 h→机械清洗、挑选鲜活小龙虾→油炸→调味煮制→冷却→真空包装→灭菌(100 ℃,20 min)→即食产品

1.3.2 样品的处理 样品分别贮藏于 25,4 ℃ 条件下,分别每隔 2,5 d 取虾肉样品(去头、去壳、去虾线)测定其理化指标。

1.3.3 微生物菌落总数的测定 按 GB 4789.2—2016《食

品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》执行。

1.3.4 挥发性盐基氮(TVB-N)的测定 按 GB/T 5009.228—2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》的自动凯氏定氮仪法执行。

1.3.5 DNA 的提取 分别选取两个贮藏温度下中、末期的小龙虾虾肉(去头、去壳、去虾线),利用液氮研磨的方法处理后,提取样品总 DNA。

1.3.6 PCR 扩增 以提取的基因组 DNA 作为模板,参照江艳华等^[10]的扩增条件对 16S rDNA 序列的 V3-V4 可变区域进行扩增。引物序列如表 1 所示。扩增结束后,检测 DNA 分子质量,质量满足要求的送至生工生物工程(上海)股份有限公司通过高通量测序技术做进一步分析。

1.3.7 数据处理 Miseq 测序系统测序序列中含有标签序列,以及测序时加入的引物和接头序列。首先将成对的测序序列拼接成一条序列,随后根据标签序列区分样品得到各样本数据,对各样本序列进行质量控制,过滤掉质量不符合要求的序列^[14]。将多条序列进行聚类分析,一般将相似性>0.97 的序列进行归并,生成操作分类单元(operational taxonomic units,OTUs)。根据聚类分析结果,计算得到 ACE、Chao1、Shannon、Simpson 指数,进行 Alpha 多样性分析,其中 ACE、Chao1 指数是对菌群丰度进行评估,Shannon、Simpson 指数是对菌群多样性进行评估^[15]。基于分类学分析对比结果,来讨论小龙虾即食产品在不同贮藏温度、时间条件下菌群结构及变化规律。

1.3.8 数据分析 每组试验进行 3 次平行。应用 Excel 2010 软件对数据进行整理、绘图;应用 Prinseq 0.20.4、Pear 0.9.6、Cutadapt 1.2.1 软件对各样本数据进行质控过滤,得到样本有效数据;应用 Usearch 5.2.236、Mothur 1.30.1、R 3.2 等软件对样本进行 OTU 聚类、Alpha 多样性和菌群多样性分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称	序列
341F	5'-CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG(barcode)CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
805R	5'-GACTGGAGTTCCTTGGCACCAGAGAATTCCAGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

2 结果与分析

2.1 小龙虾即食产品在不同贮藏温度下的品质变化

2.1.1 菌落总数 不同贮藏条件下小龙虾即食产品菌落总数变化见图 1、2。Al-Dagal 等^[16]研究表明:虾类产品分两个鲜度,其菌落总数<5.00 lg(CFU/g)为一级鲜度,在 5.00~5.70 lg(CFU/g)的为二级鲜度,当>5.70 lg(CFU/g)时已经腐败不能再食用,即到达货架期末期。

由图 1、2 可知:两个贮藏温度下,菌落总数均呈增长趋势,25 ℃ 条件下增长速度较快,几乎呈直线增长趋势,第 6 天菌落总数指标已超过二级鲜度,到达理论腐败期,第 8 天时菌落总数已远远超过 5.70 lg(CFU/g),酸臭味强烈,达到可接受的极限;4 ℃ 贮藏条件下,前期菌落总数增加缓慢,第 15 天开始增长速度加快,第 35 天时已超过虾类产品的二级鲜度指标,达到理论腐败值。

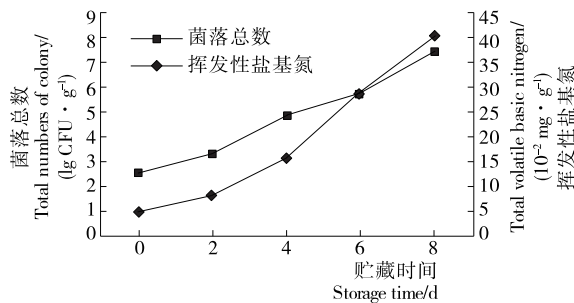


图 1 25 °C 贮藏温度下小龙虾即食产品菌落总数和挥发性盐基氮的变化

Figure 1 The change of total numbers of colony and volatile basic nitrogen on conditioning crayfish during 25 °C storage

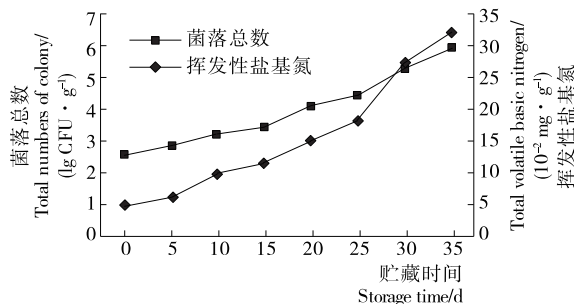


图 2 4 °C 贮藏温度下小龙虾即食产品菌落总数和挥发性盐基氮的变化

Figure 2 The change of total numbers of colony and volatile basic nitrogen on conditioning crayfish during 4 °C storage

初步推断 25 °C 贮藏条件下贮藏期为 6 d, 4 °C 贮藏条件下贮藏期为 35 d。

2.1.2 TVB-N 值 小龙虾蛋白含量较高, 死后其蛋白质等含氮物质在酶和微生物的作用下会分解成挥发性氨以及低级胺类等化合物, 即挥发性盐基氮(TVB-N) [17]。根据 GB 10136—2015《动物性水产制品》规定, 动物性食品中 TVB-N 值 ≤ 30.00 mg/100 g 为合格品。即食小龙虾贮藏期间 TVB-N 变化如图 2 所示。

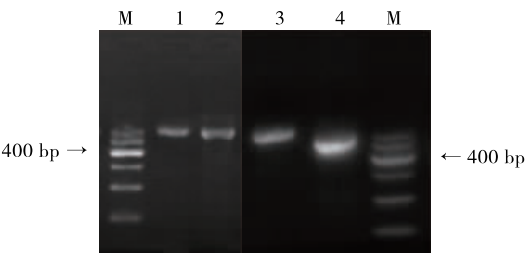
由图 1 可知, 25 °C 贮藏温度下, TVB-N 含量几乎呈直线增长, 第 6 天时 TVB-N 值已达到 28.94 mg/100 g, 临近 GB 10136—2015 规定的限值, 第 8 天已远远超过限

值。结合第 6 天的菌落总数为 5.74 lg(CFU/g), 已超过虾类产品的二级鲜度指标。可看出 TVB-N 值作为鲜度判定要比菌落总数值滞后, 与前人哈氏仿对虾 [18] 和冷藏小龙虾 [13] 的研究结果一致, 故综合两指标认为 25 °C 贮藏温度下货架期为 6 d。中期样品取第 3 天的龙虾肉(记为 C3), 末期样品取第 6 天的龙虾肉(记为 C6)。

由图 2 可知, 4 °C 贮藏温度下, 前期增长缓慢, 后期几乎呈直线增长, 与后期微生物数量大幅度增加有较大关联, 微生物分解蛋白质从而产生挥发性氨以及低级胺类等化合物, 使得 TVB-N 值增加。在第 30 天时 TVB-N 值接近 GB 10136—2015 规定的限值, 第 35 天时稍超过限值, 结合菌落总数变化情况, 将第 35 天视为贮藏末期。中期样品取第 15 天的龙虾肉(记为 B15), 末期样品取第 35 天的龙虾肉(记为 B35)。

2.2 小龙虾即食产品在不同贮藏温度下的菌群变化

2.2.1 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增 分别取不同贮藏温度下中期和末期的龙虾肉 4 份, 利用液氮研磨的方法提取其总 DNA, 经 PCR 扩增 V3-V4 可变区后琼脂糖凝胶电泳检测其质量。如图 3 所示各样品目的片段条带清晰, 满足后续测序试验要求。



M. DNA 分子量标准 1. B15 2. B35 3. C3 4. C6

图 3 高通量测序法下 V3-V4 可变区 DNA 电泳图

Figure 3 Electropherogram of V3-V4 variable DNA area

2.2.2 测序序列分析 为了保证信息分析质量, 必须对杂合的 DNA 片段(即嵌合体)进行剔除, 去除嵌合体与靶区域外序列统计见表 2。从表 2 可看出, 经质控和优化后每个组的有效序列数均在 30 000 以上, 有效序列的百分比达 89.00% 以上, C6 样品达到 99.77%。覆盖率作为样本完整性指标, 表示样品中总物种的百分比 [19]。4 个样品的覆盖率均在 0.99 以上, 表明所得有效序列可达到

表 2 各组样品有效序列与 OTU 数量统计

Table 2 Observed valid sequence and OTU numbers in different crab pastes

样品	处理前总序列	细胞器组织序列数目	非靶区域序列数目	嵌合体数目	处理后剩余序列	覆盖率	OTU 数量
C3	59 107	6 114	15	231	52 747	1.00	2 170
C6	61 024	27	0	108	60 889	1.00	256
B15	31 218	240	109	211	30 658	0.99	1 162
B35	57 192	117	127	465	56 483	1.00	820

后续分析的要求。通过比对 4 个样品的 OTU 数量可知,随贮藏时间的延长,OTU 数量下降,物种丰度下降。

2.2.3 Alpha 多样性分析 使用 Ace、Chao1、Shannon 及 Simpson 指标对微生物菌群的丰富度及其个体分配均匀性进行评估^[20]。由表 3 可知,两种贮藏温度下,中期阶段 25℃ 条件下菌群多样性更高,Ace、Chao1、Shannon 3 个指标变化较大,但 Simpson 并无变化,均为 0.05,可能是 Simpson 数值主要综合体现物种的丰富度和均匀度,在考虑种类数目变化的同时,还考虑了种类之间的配比变化^[13]。随贮藏时间延长,物种丰度和多样性均下降,尤其常温条件下菌群丰度指标急剧下降,证实了贮藏后期优势腐败菌属的大量存在,产生不良代谢物影响其他菌种生长,从而使得物种多样性降低。

表 3 小龙虾不同贮藏时期菌群的 Alpha 多样性比较
Table 3 Alpha diversity of bacterial flora for different storage time of the crayfish

样品	Ace	Chao1	Shannon	Simpson
C3	2240.66	2199.28	5.33	0.05
C6	287.66	271.50	0.85	0.64
B15	1234.33	1218.96	4.39	0.05
B35	869.70	858.47	1.56	0.60

表 4 不同贮藏温度及时期样品菌群在属水平上的分布[†]
Table 4 Relative abundance of genera of bacterial flora under different storage temperatures and periods %

种属	25℃		4℃	
	中期	末期	中期	末期
海洋杆菌属(<i>Oceanobacillus</i>)	0.004	0.001	0.180	81.522
哈撒韦氏菌属(<i>Hathewayia</i>)	0.081	78.700	0.000	0.000
未分类菌(<i>unclassified</i>)	70.761	0.182	45.751	9.197
芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)	0.129	12.380	0.000	0.000
狭义梭菌属(<i>Clostridium sensu stricto</i>)	0.333	8.707	3.074	0.036
棍状厌氧菌属(<i>Anaerorhabdus</i>)	3.595	0.000	18.239	0.356
微生长单胞菌属(<i>Dysgonomonas</i>)	2.862	0.000	8.129	0.009
拟杆菌属(<i>Bacteroides</i>)	3.146	0.000	5.964	0.721
希瓦氏菌属(<i>Shewanella</i>)	0.000	0.000	1.202	3.625
金黄杆菌属(<i>Chryseobacterium</i>)	3.307	0.000	4.255	0.217
黄杆菌属(<i>Flavobacterium</i>)	2.471	0.000	3.049	0.202
菌属 1(<i>Lacihabitans</i>)	3.333	0.000	0.000	0.000
不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>)	2.093	0.005	1.989	0.738
固氮弧菌属(<i>Azoarcus</i>)	0.000	0.000	5.336	0.023
甲基杆菌属(<i>Methylobacterium</i>)	0.000	0.000	2.165	1.091
中慢生根瘤菌属(<i>Mesorhizobium</i>)	0.000	0.000	0.197	1.333
菌属 2(<i>Cobetia</i>)	0.000	0.000	0.469	0.929
硝化螺旋菌属(<i>Nitrospira</i>)	2.765	0.000	0.000	0.000
菌属 3(<i>Brevundimonas</i>)	2.729	0.013	0.000	0.000
假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	2.396	0.013	0.000	0.000

[†] 菌属 1~3 为目前无中文名或统一名称的菌属。

根据以上数据可得到稀释曲线(图 4)。稀释曲线可用来评估样品中物种的丰富度,也可通过观察直线是否趋于平缓来判断样品的测序数据量是否合理。如图 4 所示,在横坐标刚开始,曲线便趋于平缓,说明测序数量已足够。

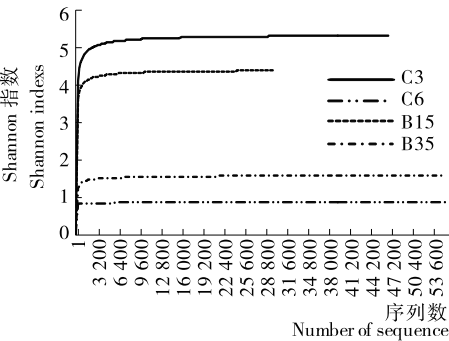


图 4 Shannon 稀释曲线分析

Figure 4 Shannon rarefaction plot of each sample

2.2.4 菌群多样性分析 采用该 RDP classifier 方法对样品获得的 OTU 进行属水平上的物种分类。4 个样品中主要属水平下分类见表 4。由表 4 可知,不同贮藏温度、时期,菌群结构有较大差异。贮藏中期除去未分类菌

群,两种贮藏温度下丰度最大的均为棍状厌氧菌属(4℃条件下:18.239%;25℃条件下:3.595%);贮藏末期,4℃贮藏条件下优势菌群为海洋杆菌属(*Oceanobacillus*, 81.522%) and 希瓦氏菌属(*Shewanella*, 3.625%),25℃贮藏条件下优势菌群为哈撒韦氏菌属(*Hatheway*, 78.700%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 12.380%)和狭义梭菌属(*Clostridium sensu stricto*, 8.707%)。不同的贮藏条件下微生物耐受力不同,故后期菌群结构存在差异。

棍状厌氧菌属(*Anaerorhabdus*)是一种肠杆菌,蔡丽萍等^[20]在野生锯缘青蟹肠道中也检出了该菌属为优势菌群。可能是小龙虾自身所携带的菌体,加工处理过程中未完全灭活或被二次污染使之成为贮藏中期主要菌属。但随贮藏时间的延长,该菌属丰度逐渐降低,尤其在25℃条件下丰度降为0,可能是后期环境不适宜其生长或优势腐败菌的出现抑制其生长。

哈撒韦氏菌属(*Hatheway*)和海洋杆菌属(*Oceanobacillus*)在腐败末期占据主要地位。哈撒韦氏菌属之前被定义为梭状芽孢杆菌属类群二^[21],革兰氏阳性菌,优先分解蛋白,最适生长温度30℃左右,最适pH值6.0~8.5^[22]。25℃贮藏条件下温度、pH正适合哈撒韦氏菌属的生长,且龙虾是高蛋白产品,后期蛋白分解,使得丰度增长到78.700%,成为25℃贮藏末期主要的菌属。海洋杆菌属是与芽孢杆菌属相关的新菌属^[23],呈革兰氏阳性,是一种耐盐亲碱菌。Lu等^[24-25]曾在一种深海生物中分离出海洋杆菌属,Yumoto等^[26]也曾淡水湖里虹鳟的鱼皮中分离出海洋杆菌属。海洋杆菌属在冷藏末期相对丰度达81.522%,表明其可能在产品腐败变质过程中起到重要作用,但中国有关此菌属的研究较少,后续研究应重点关注。

希瓦氏菌属(*Shewanella*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)是常见的水产品中腐败菌属。希瓦氏菌属代谢能力极强,能适应多种盐浓度、温度及气体环境,是一种嗜冷性菌属,故在冷藏期间丰度增加,成为优势菌属之一。其模式菌种为腐败希瓦氏菌,作为冷藏海水鱼中主要腐败菌被人们熟知,但随着研究的深入,在淡水养殖动物中也陆续被发现^[27]。芽孢杆菌属大多来源于土壤和空气中,可能是小龙虾在淤泥中生长,自身感染或在后期加工过程中二次污染所残留的耐热芽孢杆菌,常规杀菌方法难以将其杀灭,在适宜条件下再次生长。此外,还有一些菌属虽然相对丰度较小,但可能在产品腐败变质过程中也起重要作用。

已有研究^[28]表明,水产品中主要的优势腐败菌有弧菌属(*Vibrionaceae*)、肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、乳酸菌(*Lactic acid bacteria*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)及梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)等,不同水产品的腐败菌种类

也大不相同。小龙虾的品种、生长环境和后期加工均会使得优势腐败菌有所不同^[5],故在研发产品保鲜剂时,应针对具体的产品、加工和贮藏条件,综合考虑各种影响因素。此外,低温杀菌虽然对产品肉质影响较小,但具有一定局限性,难以杀死产芽孢的细菌。为了不影响肉制品口感、风味可采用其他温和且安全的杀菌方式,例如辐照杀菌技术或其他的物理杀菌方法,避免对含芽孢的菌属灭菌不彻底,使得后期再次生长。总之,最好采取物理、化学和生物方法相结合的方式有针对性地进行防腐保鲜技术的研究,达到延长产品货架期、保障产品卫生安全的目的。

3 结论

试验对不同贮藏温度下即食小龙虾品质及菌群结构进行了研究。结果表明:产品在25、4℃条件下的货架期分别为6.35d;随着贮藏时间的延长,菌群多样性降低,并出现了优势腐败菌,但两种贮藏温度下优势腐败菌各不同;低温杀菌存在一定局限性,食用前最好经过微波加热。研究通过高通量测序技术分析了贮藏中期和末期菌群在属水平上的变化,但无法确定到具体的腐败菌种,下一步可用传统培养方法对末期样品中腐败菌进行分离纯化,深层次地研究其生长条件和腐败特性,从而有针对性地抑制产品的腐败变质。另外在研究即食小龙虾加工和保鲜的过程中,需综合考虑各种影响因素,进一步探索安全且有效的杀菌方式和保鲜技术,保证即食小龙虾的食用安全性,扩大消费市场。

参考文献

- [1] 郭力. 小龙虾即食产品的研制[D]. 无锡: 江南大学, 2010: 1-4.
- [2] 农业部雨夜渔政管理局. 中国小龙虾产业发展报告: 2017[N]. 中国渔业报, 2017-06-12(A03).
- [3] 邢家溧, 徐晓蓉, 丁源, 等. 水产品中特定腐败菌分析技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(2): 195-201.
- [4] GRAM L, RAVN L, RASCH M, et al. Food spoilage: interactions between food spoilage bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(1/2): 79-97.
- [5] 杨宪时, 许钟, 肖琳琳. 水产食品特定腐败菌与货架期的预测和延长[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 106-111.
- [6] 王伟, 冷凯良, 刘均忠. 微生物扩增子高通量测序技术在水产品加工与贮藏中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(10): 263-268.
- [7] 蓝蔚青, 谢晶, 周会, 等. 不同时期鲢鱼冷藏期间优势腐败菌的多样性变化[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 226-231.
- [8] 李成, 孔晓雪, 余炬波, 等. 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J]. 食品科学, (2018-12-18)[2019-05-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20181218.1211.018.html>.

- [9] 高乾坤, 焦琳舒, 杜贺超, 等. 高通量测序分析不同产地带鱼冷藏时微生物群落多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(18): 127-132.
- [10] 江艳华, 王联珠, 许东勤, 等. 基于高通量测序分析虾夷扇贝柱菌群结构及腐败优势菌[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 140-145.
- [11] 江艳华, 姚琳, 李凤铃, 等. 基于高通量测序的冷冻南极磷虾中细菌菌群结构分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2 840-2 845.
- [12] 曹荣, 刘洪, 赵玲, 等. 基于高通量测序的牡蛎冷藏过程中微生物群落分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(20): 275-280.
- [13] 江杨阳, 杨水兵, 余海霞, 等. 基于培养基法和高通量测序法分析冷藏小龙虾优势腐败菌[J]. 食品科学. (2018-11-01) [2019-05-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20181029.1701.044.html>.
- [14] SCHMIEDER R, EDWARDS R. Quality control and pre-processing of metagenomic datasets[J]. Bioinformatics, 2011, 27(6): 863-864.
- [15] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [16] AL-DAGAL M M, BAZARAA W A. Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria[J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(1): 51-56.
- [17] 魏静. 即食小龙虾的腐败菌相分析及杀菌技术的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2014: 12-23.
- [18] 符莎露. 绿原酸接枝明胶制备新型水产品生物保鲜剂的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 19-25.
- [19] MARIA D L, DOLORES S D, ALESSANDRA D, et al. Characterization of bacterial communities of donkey milk by high-throughput sequencing[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 251(19): 67-72.
- [20] 蔡丽萍, 徐海圣, 何琳, 等. PCR-DGGE 技术分析不同地区野生锯缘青蟹肠道菌群多样性[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 278-282.
- [21] COLLINS M D, LAWSON P A, WILLEMS A. The phylogeny of the genus clostridium: Proposal of five new genera and eleven new species combinations [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 812-826.
- [22] LAWSON P A, RAINEY F A. Proposal to restrict the genus clostridium prazmowski to clostridium butyricum and related species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66: 1 009-1 016.
- [23] TAKAMI H, TAKAKI Y, UCHIYAMA I. Genome sequence of Oceanobacillus iheyensis isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(18): 3 927-3 935.
- [24] LU Jie, NOGI Y, TAKAMI H. Oceanobacillus iheyensis gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1 050 m on the Iheya Ridge [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205: 291-297.
- [25] LU Jie, NOGI Y, TAKAMI H. Oceanobacillus iheyensis gen. nov., sp. nov. in validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52(85): 685-690.
- [26] YUMOTO I, HIROTA K, NODASAKA Y, et al. Oceanobacillus oncorhynchi sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile isolated from the skin of a rainbow trout(Oncorhynchus mykiss), and emended description of the genus Oceanobacillus International[J]. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 1 521-1 524.
- [27] 商宝娣, 杨星, 李正友, 等. 希瓦氏菌属的研究进展[J]. 福建农业, 2015, 7(1): 152-154.
- [28] 李琳, 潘子强. 水产品特定腐败菌的确定及生长模型建立研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(6): 152-156.

(上接第 73 页)

- [22] 李冠龙, 刘晓兰, 波利特. β -半乳糖苷酶的固定化及其在乳清行业中的应用[J]. 食品科技, 2019, 44(2): 264-269.
- [23] MENG Qin, LU De-wei. Biosorption of Ni^{2+} and Fe^{3+} by fungal cell wall sacchrides[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2000(2): 123-127.
- [24] 张亚娟. 黑根霉菌对重金属废物的生物吸附及其固定化技术[J]. 环保科技, 2009, 15(3): 30-34.
- [25] SALLEH A B, MUSANI R, BASRI M, et al. Extra and intracellular lipase from a thermophile *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39(10): 978-981.
- [26] 于大海. 脂肪酶拆分环氧丙醇和 2-辛醇[D]. 吉林: 吉林大学, 2008: 37-38.
- [27] 乐华爱, 谢玉梅, 张树政, 等. 根霉的研究Ⅳ: 根霉淀粉葡萄糖苷酶的研究[J]. 微生物学报, 1966, 12(2): 187-193.
- [28] 范凯, 王栋, 徐岩. 华根霉液态培养生产脂肪酶不同形态菌体的转录组差异分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 29-41.
- [29] 窦晓, 杨建刚, 马莹莹, 等. 华根霉在酿酒中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(4): 246-250.