

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.08.025

槟榔贮藏及加工过程中细菌群落结构变化

Variations of bacterial community structure during storage and processing of the betelnut

阮志强¹ 邓建阳² 蒋雪薇¹ 姚力²RUAN Zhi-qiang¹ DENG Jian-yang² JIANG Xue-wei¹ YAO Li²李浩¹ 罗晓明¹ 卢克强²LI Hao¹ LUO Xiao-ming¹ LU Ke-qiang²

(1. 长沙理工大学化学与食品工程学院, 湖南 长沙 410114;

2. 湖南皇爷食品有限公司, 湖南 湘潭 411207)

(1. School of Chemistry and Food Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. Hunan Onyear Food Company Limited, Xiangtan, Hunan 411207, China)

摘要:目的: 确保槟榔产品细菌指标合格。方法: 采用 Illumina Miseq 高通量测序技术对槟榔由原料到成品全过程关键工序样品进行测序分析。结果: 7 个样品共获得 191 456 条有效序列, 隶属于 239 科 790 属, 优势菌属包括 *Bacillus* (芽孢杆菌属)、*Pseudomonas* (假单胞菌属)、*Hydrogenophaga* (氢噬胞菌属)、*Leuconostoc* (明串珠菌属) 和 *Chryseobacterium* (金黄杆菌属)。槟榔原籽贮藏前后细菌的群落结构存在显著差异, 贮藏前(新籽)的物种丰富度要高于贮藏后(老籽)的, 而老籽则拥有更高的物种多样性。槟榔加工过程中煮籽及切籽后的工序能有效减菌, 两阶段消灭细菌属数量分别为 216 和 227, 煮籽到闷香之间的工序易受到环境中细菌污染, 新增细菌属数量为 126。结论: 槟榔加工过程中污染细菌多样性变化的研究指示细菌污染应重点防控闷香中的细菌增殖及各工序中的环境污染, 而用好煮籽工序及成品前工序是减菌的关键。

关键词: 槟榔; 高通量测序; 细菌; 多样性; 群落结构; 污染防控

Abstract: Objective: This study focuses on ensuring qualified bacterial indicators during betelnut processing. **Methods:** The key

processing samples from the raw material to the finished product were analyzed by the Illumina Miseq high-throughput sequencing technology. **Results:** The results showed that a total of 191 456 effective sequences were obtained from the 7 kinds of betelnut samples, belonging to 790 genera, 239 families. The dominant bacteria genera include *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Hydrogenophaga*, *Leuconostoc*, and *Chryseobacterium*. Significant differences in the bacterial community structure was found in the betelnuts between before and after storage. The species richness in betelnuts before storage (new betelnut) was higher than those after storage (old betelnut), while the bacteria in the old betelnut had higher species diversity. During the processing, the boiled betelnut process and the process from cut betelnut to product betelnut could effectively kill bacteria. The number of extinct bacteria genera in the two stages was 216 and 227 respectively. The process from boiled betelnut to stuffy fragrant betelnut was susceptible to bacterial contamination in the environment, and the number of new bacterial genera was 126. **Conclusion:** The variation of the polluting bacteria diversity during betelnut processing indicated that the control and prevention of pollution should focus on bacterial proliferation in the pickling and flavoring process, as well as the environmental pollution in each process. The key to reducing bacteria is to make good use of the boiling and the process before product finished.

Keywords: betelnut; high-throughput sequencing; bacterial; diversity; community structure; pollution prevention and control

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(编号: 2021JJ30700); 长沙市重点研发项目(编号: kq2004072, kh2005095)

作者简介: 阮志强, 男, 长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者: 蒋雪薇(1972—), 女, 长沙理工大学副教授, 硕士生导师, 博士。E-mail: jxw_72@sina.com

卢克强(1961—), 男, 湖南皇爷食品有限公司高级工程师, 硕士生导师, 硕士。

E-mail: 13600007949@sina.com

收稿日期: 2021-07-21

槟榔(*Areca catechu* L.), 是棕榈科槟榔属常绿乔木, 主要分布在亚洲的热带地区^[1]。目前中国槟榔生产主要集中在海南, 深加工主要集中在湖南^[2]。槟榔被称为四

大南药(槟榔、砂仁、益智、巴戟天)之首^[3], 由于咀嚼后会产生产欣快感和轻微兴奋性, 颇受特定人群喜爱, 已逐渐成为第四大嗜好品。槟榔鲜果不耐贮藏^[4], 故需在产地经干制加工成槟榔原籽运至湖南进行贮藏或加工。不同槟榔厂家加工工艺略有不同^[5-6], 但主要工艺比较相似, 一般为: 槟榔原籽→煮籽→发制→烤籽→闷香→压籽→上胶→切籽(含去核、点卤)→晾籽→包装等多个工序^[7]。根据这些工序的加工特点及细菌数量变化发现, 原籽的初始带菌对整个工艺过程细菌总数影响较大; 煮籽是一个降细菌数量比较有效的工序; 发制→烤籽→闷香是一个连续的过程, 且对细菌数量提升有促进作用, 是加工过程中的重要风险点; 压籽→上胶→切籽中的压籽和上胶均为设备操作, 而切籽(含去核、点卤)则大多为人工操作, 成为闷香后的又一个风险点; 晾籽是包装前进一步降低水含量的过程, 且伴随着紫外杀菌等措施, 被认为是槟榔包装前的减菌工序^[6]。从上述工序分析可以发现, 槟榔原籽(含新籽和老籽, 新籽为当年采摘后干制而成的原籽, 老籽为新籽贮藏1年及以上的原籽)、煮籽、闷香、切籽、晾籽以及成品为槟榔加工过程中控制的关键点。

槟榔污染菌分为细菌和霉菌两大类。霉菌主要生长在槟榔产品表面, 污染后易长成肉眼可见的菌丝体, 霉菌在槟榔加工中可以从环境管控及产品水分控制两个方面入手, 目前课题组及其他研究团队针对霉菌群落结构及其控制已经开展了较多研究^[8-9]。槟榔加工中的细菌相较霉菌来说, 其生长周期更短, 且不易发觉, 更难防控。槟榔的污染细菌主要来源于成果时的内生菌^[7]以及加工污染^[10], 是槟榔腐败的主要因素, 能使成品槟榔表面发黏, 严重的情况下还会引起腹泻等急性症状, 而且耐热的细菌(芽胞杆菌属等)在槟榔加工中难以被杀灭, 而目前对槟榔污染细菌及细菌在槟榔贮藏和加工过程中的变化尚未见报道。

高通量测序技术(HTS)因其效率高及通量高的优势^[11-12], 目前已被广泛应用于基因组学研究中, 其在肠道^[13-14]、土壤^[15-16]和发酵食品^[17-18]等样品的微生物多样性研究领域具有明显的先进性和优势。蒋雪薇等^[8]通过高通量测序技术发现槟榔原籽贮藏前后优势真菌为散囊菌属(*Eurotium*)、曲霉属(*Aspergillus*); 张祺玲等^[9]通过高通量测序技术发现在食用槟榔整个加工过程中, 槟榔内生菌 *Aspergillus* 均为绝对优势真菌, 相对丰度达 66.70%~97.67%。刘媛等^[19]通过高通量测序技术发现在三药槟榔种子的内生细菌中, 肠球菌属(*Enterococcus*)占比 42.9%, 为第一优势菌属。文章拟利用高通量测序技术对槟榔原籽贮藏前后及加工过程中的细菌群落结构进行研究, 获得槟榔原籽贮藏前后及加工过程中的细菌群落结构及变化信息, 为分析槟榔原籽贮藏及加工过程中细菌的污染源提供依据, 在减少污染的同时为槟榔生产全线防控细菌污染提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品采集

槟榔样品采自湖南某槟榔公司, 包括当年产的槟榔原籽新籽(BL1)、BL1 贮藏 1 年的原籽老籽(BL2, 贮藏条件为室温避光通风干燥)、煮籽后样品(BL3, 原料为槟榔原籽新籽 BL1)、闷香后样品(BL4)、压籽后样品(BL5)、切籽样品(BL6)和成品(CP7), 随机采集样品低温运回实验室, 编号后于-80℃贮藏备用。

1.1.2 主要试剂

平板计数琼脂(PCA): 杭州微生物世纪有限公司;
氯化钠: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司;
E.Z.N.A. Soil DNA Kit 试剂盒: 美国 Omega 生物试剂公司;

Taq DNA Polymerase 及 dNTP-mix: 美国 Thermo Fisher 科技公司;

SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒: 上海生工生物工程有限公司;

琼脂糖: 北京天根生化科技有限公司;

16S rDNA V3~V4 区引物: 上游引物为 341F^[20](5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 下游引物为 805R^[20](5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3'), 上海生工生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

立式压力蒸汽灭菌锅: BXM-30R 型, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

恒温培养箱: MJ-250 II 型, 上海一恒科技有限公司;

台式离心机: Pico-21 型, 美国 Thermo Fisher 科技公司;

荧光定量仪: Qubit2.0 型, 美国 Life 科技公司;

漩涡混合器: GL-88B 型, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

混匀型干式恒温器: TND03-H-H 型, 深圳拓能达科技;

电泳仪电源: DYYY-6C 型, 北京市六一仪器厂;

电泳槽: DYCZ-21 型, 北京市六一仪器厂;

凝胶成像系统: ChampGel5000 型(增强型), 北京赛智公司。

1.3 试验方法

1.3.1 细菌总数计数 参照 GB 4789.2—2016。

1.3.2 含水量测定 选取同一工序样品 6~8 个, 去核切碎后混匀, 准确称取 5.00 g 于称量瓶中, 105℃烘干至恒重后计算样品含水量。

1.3.3 总 DNA 提取及 PCR 扩增 采用 E.Z.N.A. Soil DNA Kit 试剂盒提取槟榔样品中细菌总 DNA, 用 Qubit

2.0 荧光定量仪检测 DNA 浓度,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,于-20℃贮藏备用。选用 16S rDNA V3~V4 区通用引物 341F-805R 进行扩增。

(1) 初次 PCR 扩增反应体系为 50 μL:10×PCR Buffer 5 μL,dNTP(10 mmol/L each) 0.5 μL,Genomic DNA 10 ng,Bar-PCR primer F(50 μmol/L) 0.5 μL,Primer R(50 μmol/L) 0.5 μL,Plantium Taq(5 U/μL) 0.5 μL,ddH₂O 补齐至 50 μL。PCR 反应程序:95℃预变性 30 s;95℃变性 15 s,55℃退火 15 s,72℃延伸 30 s;5 个循环,最终 72℃延伸 5 min。

(2) 初次 PCR 结束后进行第二轮扩增,第二轮扩增体系为 50 μL:10×PCR Buffer 5 μL,dNTP(10mmol/L each) 0.5 μL,DNA 20 ng,Primer F(50 μmol/L) 0.5 μL,Primer R(50 μmol/L) 0.5 μL,Plantium Taq(5 U/μL) 0.5 μL,ddH₂O 补齐至 50 μL。PCR 反应程序与初次相同。PCR 结束后,将产物于 1%琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色,在凝胶成像系统下观察。

1.3.4 高通量测序 采用 DNA 回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶回收,利用 Qubit2.0 荧光定量仪对回收的 DNA 进行精确定量。根据获得的 DNA 浓度,将所有样品按质量比 1:1 进行混合,混合后的样品寄往上海生工进行测序,测序平台为 Illumina MiSeq 平台。

1.3.5 测序结果预处理 通过 Flash 软件融合双末端序列,使其形成一条序列,根据各样品的 barcode 序列使数据回归样品。通过 Prinseq 软件对各样品序列进行质量控制(QC),去除引物序列、短片段、低复杂度序列和低质量序列^[21]。利用 Uchime 和 pre.cluster 软件去除嵌合体及靶区域外序列以获得最终可用于分析的序列^[22]。

1.3.6 生物信息分析 利用 uclust 软件(uclust v1.1.579)以 97%的相似性为阈值对序列进行 OTU 聚类。根据样品的 OTU 及序列关系,采用 mothur 软件^[23]对样品进行 Alpha 多样性分析,计算各物种多样性指数,衡量样本物种多样性。采用 RDP classifier 软件^[24]将序列进行物种分类,RDP classifier 参数:-f allrank -q input -g 16s -o rdp_out,分类阈值默认为 0.8。

1.3.7 数据分析 采用 Excel 软件对数据进行处理,Origin 2021 软件绘图;所有样品均采用 3 平行样分析,测序结果取均值用于后续绘图。

2 结果与讨论

2.1 槟榔加工过程中关键工序样品细菌总数及水分含量变化

由图 1 和图 2 可知,整个贮藏及加工过程中,槟榔样品的细菌总数在数量级上的差异较小。槟榔原籽贮藏 1 年后,细菌总数从 1.5×10^4 CFU/g 降至 7.1×10^3 CFU/g,水分含量从 18.32%降至 10.50%。加工过程中,槟榔原

籽经一系列工序加工后,成品样品中细菌总数为 8.7×10^3 CFU/g,达到产品出厂前的标准要求 5.0×10^3 CFU/g,水分含量为 27.23%。加工过程中出现细菌总数升高的是煮籽到闷香的中间阶段,包括发制、烤籽和闷香等工序,这是由于发制与闷香是槟榔加工中入味及定香的工序,一般在密闭的罐内进行,此时样品的水分含量达到了最大值,为 30.35%,较为适合微生物的生长。加工过程中多项工序的细菌总数与出厂标准相差不大,多依赖于晾籽工序中的食用酒精处理和紫外照射等消毒杀菌措施使成品达到产品的出厂标准,但这两种处理方式会出现不均匀的情况,影响成品的细菌总数稳定达标。

2.2 测序数据处理与分析

将待测序样品添加 barcode 序列作为测序标签后进行样品建库与测序,测序结束后,根据 barcode 序列对获得的测序序列进行区分,其中质控后 BL1 样品获得序列数为 62 470,BL2 样品获得序列数为 36 624,BL2、BL3 和 BL4 样品获得的序列数较为接近,分别为 18 980,15 940,19 511,BL6 样品获得序列数为 35 915,CP7 样品获得序

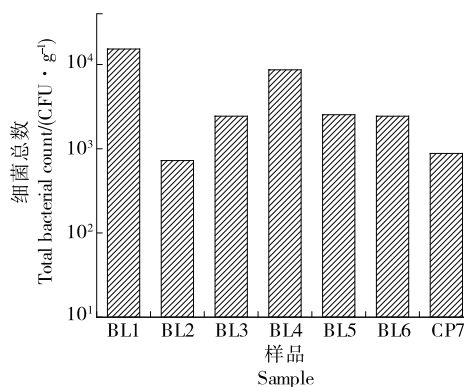


图 1 槟榔加工过程中关键工序样品细菌总数变化
Figure 1 Changes in the total number of bacteria in the key samples during betelnut processing

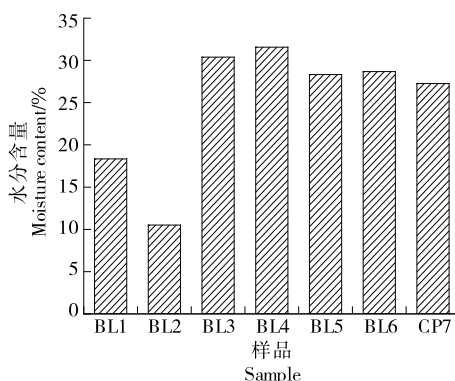


图 2 槟榔加工过程中关键工序样品水分含量变化
Figure 2 Changes of the moisture content in the key samples during betelnut processing

列数为 10 465。完成质控处理后,通过 Uchime 和 pre-cluster 软件去除嵌合体及靶区域外序列,各样本处理后统计结果如表 1 所示。其中 BL1~BL6 样品最终获得可用于分析的序列数均在 10 000 以上,满足基本分析要求,CP7 样品最终获得可用于分析的序列数为 9 444,序列数较少,最终分析结果可能会有误差。经最后处理后样品的序列分布如图 3 所示。由图 3 可知,大部分序列长度分布在 421~440 bp,符合 16S rDNA 高通量测序 V3~V4 区的要求和标准。

表 1 各样本数据信息统计
Table 1 Statistics of sample data

样品	QC 序列数	QC 序列平均长度	靶区域外序列数	嵌合体数	处理后序列数
BL1	62 470	425.8	6	2 170	60 294
BL2	36 624	418.3	6	2 038	34 580
BL3	18 980	425.2	3	297	18 680
BL4	15 940	423.8	0	703	15 237
BL5	19 511	422.8	10	403	19 098
BL6	35 915	422.6	7	1 785	34 123
CP7	10 465	424.2	20	1 001	9 444

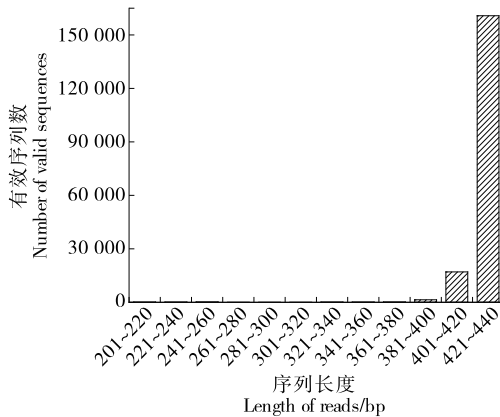


图 3 有效序列长度分布图

Figure 3 Available sequences length distribution

2.3 高通量测序数据统计分析

2.3.1 OTU 统计分类 将多条序列按其序列间的距离进行聚类,根据序列之间的相似性作为阈值为操作分类单元(OTU),阈值的序列相似性为 97%。通过 uclust 软件对 7 个样品的序列进行聚类(见表 2),共获得 6 447 个 OTU,其中获得 OTU 数量最多的是 BL2 样品,为 3 028 个,获得 OTU 数量最小的是 CP7 样品,为 505 个。

为验证 OTU 分类能否真实反映样品中微生物的群落多样性,对各样品采用 Coverage 及丰富度指数进行评估。由表 2 可知,Coverage 值最大的是 BL6 样品,为 0.977 1,Coverage 值最小的是 BL4 样品,为 0.950 3,7 个样品的 Coverage 值均在 0.95 以上,表明此次测序结果基本可以代表样品中微生物的真实情况。

由图 4 可知,BL1、BL2 和 BL6 样品的稀释性曲线均趋于相对平稳,而 BL3、BL4、BL5 和 CP7 样品的稀释性曲线还有较大增长的可能性,表示增大测序深度可以获得更多的 OTU,但是结合样品的 Coverage 值来看,此次测序结果已覆盖到样本中绝大多数微生物,故 7 个样品的 OTU 分类基本能够真实反映样品中微生物的群落多样性。

2.3.2 细菌菌群 Alpha 多样性分析 由表 2 可知,BL1 样品的香农指数为 2.831 6、辛普森指数为 0.325 7,BL2 样品的香农指数为 5.513 6、辛普森指数为 0.032 9,说明 BL1 样品的细菌群落物种多样性低于 BL2 样品。BL1 样品的 Chao1 指数为 5 810.01、ACE 指数为 9 499.26,远高于 BL2 样品的 Chao1 指数(3 733.47)和 ACE 指数(3 748.95),说明 BL1 样品的细菌群落物种丰富度高于 BL2 样品。结合 2 个样品的物种多样性和丰富度来看,BL1 样品具有更高的物种丰富度,但是物种多样性低于 BL2 样品,说明槟榔原籽在贮藏前后所含细菌的丰富度逐渐降低,但是物种多样性逐渐升高。在各生产工序样品中,BL3 样品的物种多样性最低,物种丰富度也处于较低水平,说明煮籽工序具有较好的杀菌作用,能降低样品中细菌数量;BL4 样品的物种多样性最高,物种丰富度也

表 2 样品的 OTU 数量及 Alpha 多样性
Table 2 OTU number and alpha diversity of samples

样品	OTU 数	Coverage	Shannon 指数	ACE 指数	Chao1 指数	Simpson 指数
BL1	2 628	0.973 6	2.831 6	9 499.26	5 810.01	0.325 7
BL2	3 028	0.973 9	5.513 6	3 748.95	3 733.47	0.032 9
BL3	1 167	0.961 4	2.437 2	4 200.83	2 414.89	0.302 1
BL4	1 235	0.950 3	3.600 8	4 542.47	2 932.65	0.131 6
BL5	1 222	0.963 3	3.481 9	3 699.67	2 448.75	0.116 8
BL6	1 370	0.977 1	3.431 5	4 596.59	2 848.59	0.109 1
CP7	505	0.970 0	2.975 7	1 601.33	1 170.05	0.149 1

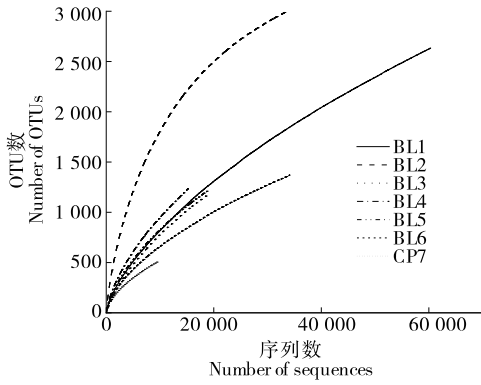


图 4 样品丰度稀释性曲线

Figure 4 Richness rarefaction of sample

处于较高水平,结合细菌总数检测数据,说明在煮籽后至闷香结束的过程中温度、水分等环境条件适宜细菌的生长;BL5、BL6 样品的物种多样性和物种丰富度较 BL4 样品均有所降低,这是由于压籽到切籽工序样品水分蒸发,含水量下降导致部分细菌死亡;CP7 样品的物种丰富度降至最低,但其物种多样性仍维持在较高水平,是因为晾籽工序进一步降低了样品水分,加上晾籽过程中采用食用酒精消毒处理和紫外线照射,使细菌总数进一步降低,但由于槟榔加工为固体物料的半连续化加工,所有工序受到环境因素的影响较大,致使成品(CP7)的细菌多样性在 7 个样品中依然维持较高水平。

2.4 槟榔贮藏前后及加工过程中细菌群落结构变化

在“科”的分类水平上,7 个样品共获得 239 个细菌科,单个样品获得的细菌科数量依次为 165,207,146,153,137,140,75。7 个样品的物种丰度图如图 5 所示,其中槟榔原籽新籽 BL1 样品的优势细菌为芽胞杆菌科(*Bacillaceae* 1),占比 72.91%,其次是假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)占比 11.28%,丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)占比 9.43%,unclassified 细菌占 1.01%,其余占比均低于 1%。而槟榔原籽老籽 BL2 样品的物种含量则更加均一,其中以 *Pseudomonadaceae* 占比最高,为 27.7%,其次为 *Comamonadaceae* 占比 17.76%,unclassified 序列占比 7%,其他细菌如疣微菌科(*Verrucomicrobiaceae*)、紫单胞菌科(*Porphyromonadaceae*)、黄单胞菌科(*Xanthomonadaceae*)等 10 个科占比 >1%。通过对比可知,两种槟榔原籽在“科”的分类水平上存在较大差异,经贮藏后老籽细菌的相对丰度更为均衡,所以物种的多样性明显升高。而在各加工工序样中,BL3 样品的明串珠菌科(*Leuconostocaceae*)和 *Bacillaceae* 1 占主要地位,占比分别为 47.01%,33.51%;BL4~CP7 样品中优势菌群较为相似,均为 *Comamonadaceae* 和 *Pseudomonadaceae*,综合占比均在 70%以上。此外,黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)在加工过程中含量逐渐递增,在 CP7 样品中占比 14.71%。

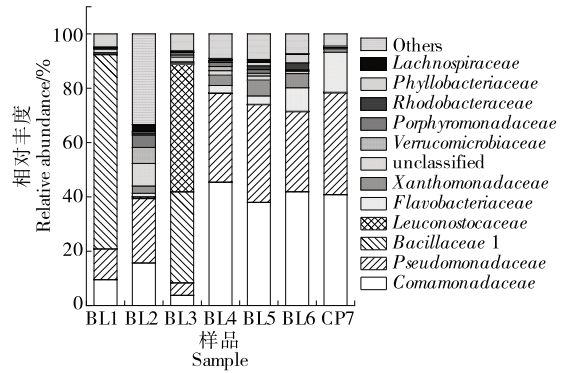


图 5 槟榔加工过程中关键工序样品科水平物种丰度图

Figure 5 Species richness at family level of the key samples during betelnut processing

在“属”的分类水平上,7 个样品共获得 790 个细菌属,单个样品获得的细菌属数量依次为 458,579,343,353,353,340,133。7 个样品的物种丰度图如图 6 所示,BL1 样品中以芽胞杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)及氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*)为主要污染细菌,分别占比 72.90%,11.21%,9.23%。其他细菌如嗜热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacterium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)与沙雷氏菌属(*Serratia*)等也有少量存在,占比均 <1%。BL2 样品中,*Pseudomonas* 与 *Hydrogenophaga* 占比分别为 27.40%,16.61%,在 BL1 样品中占比较高的 *Bacillus* 在老籽中仅占 0.59%。此外,在 BL1 样品中含量较低的菌如艾克曼菌属(*Akkermansia*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)与 *Thermoanaerobacterium* 等,贮藏 1 年后在 BL2 样品中占比均有所提升,分别为 6.24%,2.23%,2.12%。而在各加工工序样中,BL3 样品的明串珠菌属(*Leuconostoc*)和 *Bacillus* 占主要地位,占比分别为 47.01%,33.5%;BL4~CP7 样品中均为 *Hydrogenophaga* 和 *Pseudomonas*,综合占比均在 70%以上。根据污染细菌群落结构及细菌的生活习

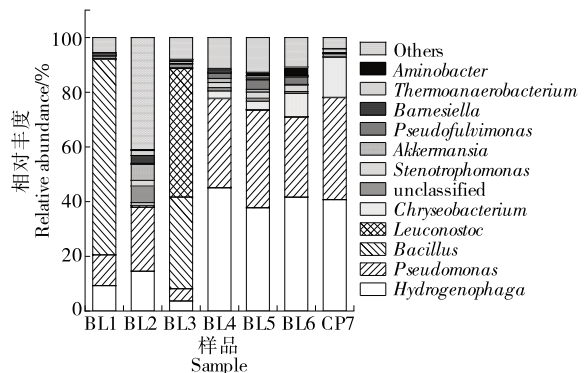


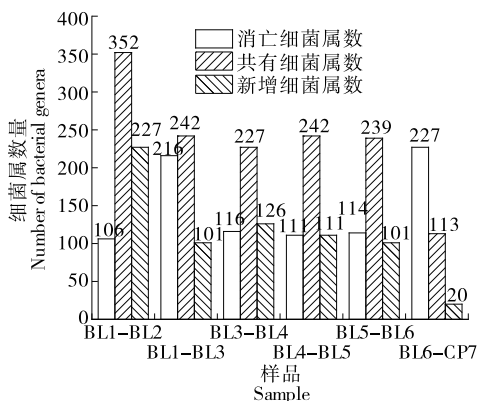
图 6 槟榔加工过程中关键工序样品属水平物种丰度图

Figure 6 Species richness at genus level of the key samples during betelnut processing

性分析, *Pseudomonas*、*Bacillus* 和 *Hydrogenophaga* 属于槟榔内生菌^[25], 对于不耐热的革兰氏阴性菌, 如 *Hydrogenophaga* 和 *Pseudomonas*, 煮籽工序可以将其有效杀死; 而耐热的革兰氏阳性菌 *Bacillus* 则很难用单纯的煮籽工序将其杀死, 需选择其他抑菌杀菌工艺。随着工序的进行, 金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*) 逐渐增加, 在 CP7 样品中占比 14.64%。*Chryseobacterium* 为革兰氏阴性菌, 广泛存在土壤、水、植物等自然环境及医院环境中, 为条件致病菌, 可能是在发制入味工序中由环境带入, 此外发制及闷香工序的环境条件有利于此菌繁殖, 从而导致其数量增殖^[26]。

2.5 槟榔加工过程中各工序污染细菌属数量变化

槟榔加工过程中的污染细菌主要来源于两个方面, 一方面为槟榔成果时的内生菌^[27], 另一方面为贮藏及加工各工序的污染菌。在属水平对相邻工序样品共有细菌属、消亡细菌属及新增细菌属进行分析, 可以反映槟榔加工过程中两相邻工序间细菌菌属的消长。由图 7 可知, 每两相邻工序均有新增细菌属, 说明槟榔加工过程的每个工序样品都会受到来自环境的微生物污染; 除 BL6 与 CP7 样品外, 每相邻两工序中共有细菌属数量均比消亡细菌属及新增细菌属数量多, 说明槟榔加工过程中, 每个关键工序的污染细菌多数由上一工序传递而来; 原料新籽 (BL1) 贮藏 1 年后成为老籽 (BL2) 是新增细菌属最多的过程, 达 227 个属, 说明在原籽贮藏过程中受到环境污染较大, 促进了新增细菌属的数量, 需对贮藏环境进行消杀, 减少贮藏过程中的细菌污染; 煮籽 (BL3) 到闷香 (BL4) 中新增细菌属数量居次, 为 126 个属, 结合细菌总



横坐标为贮藏前后或加工过程中的两相邻工序样品; 消亡细菌属数为两相邻工序样品中下游工序样品相对上游工序样品消亡的细菌属数量; 共有细菌属数为两相邻工序样品共有的细菌属数; 新增细菌属数为两相邻工序样品中下游工序样品相对上游工序样品新增的细菌属数量

图 7 槟榔测序样品相邻工序细菌属数量变化

Figure 7 Changes in the number of bacterial genera in adjacent steps of betelnut processing

数的变化(图 1)及样品水分含量变化(图 2), 可以发现这一工序样品细菌总数及样品含水量均为加工过程中的最大, 说明槟榔加工中的闷香(含前序的发制)由于温度及水分含量适宜, 成为细菌从数量到种类上的增殖阶段, 为后续工序减菌带来困难, 需重点关注; 切籽 (BL6) 到成品 (CP7) 中消亡细菌属数量最多, 为 227 个属, 切籽(含去核、点卤)后、成品包装前, 槟榔企业一般会进行晾籽及一些表面杀菌处理, 随着水分含量的下降及表面杀菌处理, 成品中由上一工序带来的细菌出现较大幅度的消亡, 也是槟榔加工工序中最后一道可以进行有效减菌的工序; 新籽 (BL1) 到煮籽 (BL3) 工序细菌消亡属的数量位居其次, 为 216 个属, 煮籽工序是槟榔加工中唯一的一个热加工工序, 后续工序处于对槟榔风味的保持, 无法再采用热加工工序, 因此, 煮籽对于细菌的防控具有一定作用。综上, 槟榔加工过程中细菌污染的防控重点应为控制好槟榔发制闷香中的细菌增殖、各工序中的环境污染、用好煮籽工序及成品前工序的减菌措施。

3 结论

采用 Illumina Miseq 高通量测序技术对槟榔原籽贮藏和加工过程中细菌多样性和群落结构进行分析。结果表明, 槟榔原籽在贮藏过程中, 新籽的物种丰富度高于老籽, 而老籽拥有更高的物种多样性。7 个关键工序样品共检出 239 个科, 790 个属, 其中 *Bacillus*、*Pseudomonas* 和 *Hydrogenophaga* 为优势菌属。通过对关键工序样品的细菌总数、水分含量及细菌属数量进行分析, 发现槟榔成果时带来的内生菌属于槟榔比较主要的细菌来源; 加工过程中每个工序样品都会受到环境中细菌的污染; 新籽贮藏为老籽、煮籽到闷香的工序中新增细菌属数量较多, 属于重点防控环节; 切籽到成品、新籽到煮籽工序新增细菌属数量较少, 属于合适的减菌环节。槟榔鲜果成果时的内生菌在槟榔加工过程中仍占据一定比例, 这对槟榔产品的细菌指标有较大影响, 如何降低槟榔鲜果的内生菌并保持生产环境的洁净将是今后槟榔加工细菌防控的重点。

参考文献

- [1] PENG Wei, LIU Yu-jie, WU Na, et al. Areca catechu L. (Arecaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 164: 340-356.
- [2] 张容鸽, 邓浩, 邢福能, 等. 槟榔干果贮藏中优势腐败霉菌的分离及鉴定[J]. 现代食品科技, 2020, 36(9): 26-33. ZHANG Rong-hu, DENG Hao, XING Fu-neng, et al. Isolation and identification of predominant decaying molds from dried betelnut during storage[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 26-33.
- [3] 孔丹丹, 李欲悦, 赵祥升, 等. 药食两用槟榔的国内外研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1 053-1 059.

KONG Dan-dan, LI Xin-yue, ZHAO Xiang-sheng, et al. International research progress of edible and medicinal Arecae Semen[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(5): 1 053-1 059.

[4] 张玉锋, 宋菲, 唐敏敏, 等. 槟榔采后生理与贮藏保鲜技术研究进展[J]. 保鲜与加工, 2020, 20(2): 239-242.

ZHANG Yu-feng, SONG Fei, TANG Min-min, et al. Research advances on postharvest physiology and storage preservation technology of Areca catechu L.[J]. Storage and Process, 2020, 20(2): 239-242.

[5] 陈耕, 刘忠义. 食用青果槟榔加工工艺研究[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 80-83.

CHEN Geng, LIU Zhong-yi. Study on the processing technique of edible areca with green areca fruit[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(8): 80-83.

[6] 陈文学, 豆海港, 李从发, 等. 食用槟榔加工工艺研究[J]. 食品科技, 2007(1): 57-59.

CHEN Wen-xue, DOU Hai-gang, LI Cong-fa, et al. Study on the processing technique of edible areca[J]. Food Science and Technology, 2007(1): 57-59.

[7] 邓建阳, 李浩, 蒋雪薇, 等. 食用槟榔加工工艺及其化学与微生物污染研究进展[J]. 食品与机械, 2018, 34(1): 173-176.

DENG Jian-yang, LI Hao, JIANG Xue-wei, et al. Research progress on processing technology, chemical and microbial contamination of edible areca nut[J]. Food & Machinery, 2018, 34(1): 173-176.

[8] 蒋雪薇, 李浩, 熊久松, 等. 基于高通量测序分析槟榔原籽贮藏过程中真菌群落结构[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 238-243.

JIANG Xue-wei, LI Hao, XIONG Jiu-song, et al. Analysis of fungal community structure during storage of the raw betelnut by high-throughput sequencing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(6): 238-243.

[9] 张祺玲, 彭玲, 陈雪梅, 等. 食用槟榔加工过程中真菌群落组成及变化研究[J]. 核农学报, 2020, 34(11): 2 541-2 550.

ZHANG Qi-ling, PENG Ling, CHEN Xue-ming, et al. The composition and changes of fungi community during processing of edible betelnut[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(11): 2 541-2 550.

[10] 肖栋天, 石发恩. 通风空调环境中微生物气溶胶污染及其防治[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(8): 139-152.

XIAO Dong-tian, SHI Fa-en. Microbial aerosol pollution in ventilation and air conditioning systems: prevention and control[J]. Environmental Science and Technology, 2017, 40(8): 139-152.

[11] KING J, LARUE B L, NOVROSKI N M, et al. High-quality and high-throughput massively parallel sequencing of the human mitochondrial genome using the Illumina MiSeq[J]. Forensic Science International: Genetics, 2014, 12: 128-135.

[12] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The ISME Journal, 2012, 6(8): 1 621-1 624.

[13] XIE Guo-zhen, TAN Kai, PENG Mai-jiao, et al. Bacterial diversity in intestinal mucosa of antibiotic-associated diarrhea mice[J]. 3 Biotech, 2019, 9(12): 1-8.

[14] LONG Cheng-xing, LIU Ya-wei, HE Lu, et al. Bacterial lactase genes diversity in intestinal mucosa of dysbacterial diarrhea mice treated with Qiweibaizhu powder[J]. 3 Biotech, 2018, 8(10): 1-8.

[15] 杨立宾, 隋心, 魏丹, 等. 大兴安岭棕色针叶林土壤的真菌多样性[J]. 应用生态学报, 2019, 30(10): 3 411-3 418.

YANG Li-bin, SUI Xin, WEI Dan, et al. Fungal diversity in the brown coniferous forest soils of Daxing'anling Mountains, Northeast China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2019, 30(10): 3 411-3 418.

[16] 黄亚丽, 郑立伟, 黄媛媛, 等. 枯草芽孢杆菌菌剂不同施用方式对甜瓜土壤微生物多样性及生长的影响[J]. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2 644-2 656.

HUANG Ya-li, ZHENG Li-wei, HUANG Yuan-yuan, et al. Effects of different application methods of *Bacillus subtilis* agent on soil microbial diversity and growth of muskmelon[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(12): 2 644-2 656.

[17] 智楠楠, 宗凯, 杨捷琳, 等. Illumina Miseq 平台深度测定酸奶中微生物多样性[J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 78-82.

ZHI Nan-nan, ZONG Kai, YANG Jie-lin, et al. Microbial diversity of yogurt depth detected by Illumina Miseq platform[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(24): 78-82.

[18] HU Xiao-long, DU Hai, REN Cong, et al. Illuminating anaerobic microbial community and co-occurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2 506-2 515.

[19] 刘媛, 渠露露, 叶美迪, 等. 棕榈科植物种子内生细菌群落多样性的高通量测序分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(3): 554-565.

LIU Yuan, QU Lu-lu, YE Mei-di, et al. Diversity of bacterial endophytes communities in the seeds of several *Palmae* plants via high throughput sequencing method [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(3): 554-565.

[20] WEI Feng, FAN Rong, THOMAS P, et al. Identification of candidate soil microbes responsible for small-scale heterogeneity in strawberry plant vigour [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(9): 2 049-2 058.

[21] MAGOC T, SALZBERG S L. Flash: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2 957-2 963.

[22] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection [J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2 194-2 200.

[23] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7 537-7 541.

[24] COLE J R, CHAI B, FARRIS R J, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33: 294-296.

(下转第 245 页)

食品加工工业实现全自动化发展不仅是实现企业经济效益提升的关键路径,而且也是现代食品加工工业发展的重要趋势。基于经济全球化发展背景,人们对于食品的需求也在不断地发生变化,所以食品加工企业只有不断地创新与优化食品加工机械与设备,才能在保证食品安全与质量的前提下为人们提供丰富优质的食品。因此,结合该书中的相关论述,食品加工中常用机械设备的设计必须满足以下要求:① 食品生产过程中在达到最大效率的基础上,要注重优化加工机械与设备,使之能够有效地降低生产原材料的浪费与损耗,但是必须保证不能影响食品成品后的化学成分以及生物学特性;② 为了食品加工过程中避免外界因素或者有害物质的影响,食品机械设备在设计时要考虑其使用材料的耐磨性,进而保证食品加工安全性的同时增加机械设备的使用寿命;③ 食品加工中常用机械设备在日常生产加工过程中需要进行定期的保养、清洁,在设计时要考虑机械设备维修、保养、清洁的便捷性,所以食品机械设备往往是由单个或者简单的连接方式的部件和组合件构成;④ 食品加工生产中,食品的质量与安全始终是食品生产的核心,所以针对机械设备等零件材料的选择,首先要满足其符合食品加工生产的相关规定,避免存在对人体有害的物质;其次,要保证食品物料与食品机械表面黏合力较小,在最后加工环节要选择合理的工艺来满足食品机械设备的工作要求。

3 逻辑严谨,内容清晰

该书在对食品加工中常用机械与设备的基本工作原理与特性的论述基础上,不仅对相关的机械设备设计要求与理念进行了详细论述,而且还针对当前时代发展提出了食品加工中常用机械设备制造的优化与完善的建议。通过前文的论述可以清晰地了解到食品加工机械设备的制造除了要满足上述的设计与制造要求外,还应该考虑到随着食品种类的多样化发展,导致食品加工生产过程中的影响因素越来越多,其中主要的影响因素为湿度、温度、酸碱腐蚀因素等方面的影响,而且还要考虑实际生产过程中各个部件或者生产物料之间的摩擦而增加机械设备的磨损等,这些因素必须在设计制造和选购食品加工机械和设备时考虑,也是要必须给予特别注意的。此外,在食品机械和设备制造时,要特别注重机械设备与食品物料直接接触部位材料的选择,一般必须满足下面条件:① 材料的选择必须选择符合国家相关规定。这样可以有效避免机械设备中的某些元素在食品生产过程中与食品物料之间发生化学反应而产生对人体健康有害的物质。② 要注重考虑食品加工机械设备材料的耐腐蚀性。耐腐蚀性是食品加工机械设备选用材料的重要标准之一,因为在食品生产过程中如果机械设备中出现锈蚀情况,锈蚀所产生的各种微量元素如果在食品加工过程

中与食品物料混合在一起,极容易产生物理反应与化学反应,不仅会影响食品成品的食用口感、营养成分等,还会导致食品质量问题,对人体健康造成损害,有的甚至还会危及人的生命。所以,在食品机械设备设计以及制造过程中,必须考虑耐腐蚀性因素,通过在设计与制造阶段合理地选择耐腐蚀性的材料来有效提升机械设备与食品物料接触面的耐腐蚀性,为食品安全提供必要的基础保障。实际食品生产过程中,由于不同食品物料中含有的元素也会导致食品机械设备出现腐蚀的情况,而这种情况不会引起食品物料的物理反应与化学反应,不会对食品口感、外观、品质等造成影响,可以有效减少食品安全问题的发生。因此,随着现代食品日益多样化、丰富化发展,不仅要注重食品机械设备的维护与保护,而且还要注重对机械设备的优化与完善,这样才能切实地推动食品加工工业的稳定有序发展,在保证为社会民众提供更加优质、安全、健康的食品供应的前提下,实现食品加工企业生产效率与经济效益的全面提升。

综上,民以食为天,自古以来食品的生产与安全得到了广泛的关注与重视,所以注重食品加工中常用机械设备的基本工作原理与特性的研究,深入地探究食品机械设备的内部构造、影响因素等,进而有针对性地进行不断优化与完善,一方面可以有效地推动食品加工工业的全面发展,另一方面还可以为食品的质量与安全提供重要的基础保障。《食品机械与设备》一书针对食品机械与设备进行了详细的研究与论述,该书结构分明、逻辑性、指导性较强,不仅可以为相关从业者提供重要的参考,对于现代食品加工中常用机械设备的优化与完善有着重要的指导价值,同时还可以作为高等教育特色专业教材使用。

(作者:邱弘华,男,驻马店幼儿师范高等专科学校高级讲师)

(上接第 152 页)

- [25] 王鑫毅,韩艳楠,金珊,等. 乌鳢产啉噪金黄杆菌的鉴定及其胞外产物特性分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(3): 641-646.
WANG Xin-yi, HAN Yan-nan, JIN Shan, et al. Identification and analysis on extracellular products characteristics of *Chryseobacterium indologenes* isolation from *Channa argus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(3): 641-646.
- [26] 靳锦,赵庆,张晓梅,等. 植物内生菌活性代谢产物最新研究进展[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(3): 103-113.
JIN Jin, ZHAO Qing, ZHANG Xiao-mei, et al. Research progress on bioactive products from endophytes [J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(3): 103-113.
- [27] ZHONG Zhi-ping, LIU Ying, HOU Ting-ting, et al. *Pseudomonas salina* sp. nov., isolated from a salt lake[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(9): 2 846-2 851.