

基于高通量测序的湘派卤牛肉细菌多样性分析

Bacterial diversity analysis of Xiangpai brined beef based on high-throughput sequencing

车丽娜^{1,2}赵良忠^{1,2}周晓洁^{1,2}CHE Li-na^{1,2} ZHAO Liang-zhong^{1,2} ZHOU Xiao-jie^{1,2}

(1. 邵阳学院食品与化学工程学院, 湖南 邵阳 422000;

2. 豆制品加工与安全控制湖南省重点实验室, 湖南 邵阳 422000)

(1. College of Food Science and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang,

Hunan 422000, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Soybean Products

Processing and Safety Control, Shaoyang, Hunan 422000, China)

摘要:目的:为湘派卤牛肉保鲜保味,延长货架期。方法:对不同贮藏时间(0,4,8,12,16 d)的湘派卤牛肉样品中细菌进行多样性测序。结果:高通量测序共获得有效基因序列 1 116 813 条,平均每个样品 74 454 条。Alpha 多样性分析表明,LNR8d 中细菌丰度最高,LNR4d 中细菌丰度最低;细菌门水平结果表明,在贮藏期间,15 个卤牛肉样品中的优势菌门主要有:厚壁菌门、变形菌门和蓝细菌门。细菌属水平结果表明,LNR0d 的样品中优势菌属为芽孢杆菌属;LNR4d 的样品中优势菌属为巨大球菌属;LNR8d 的样品中优势菌属为肠杆菌属;在 LNR12d 的样品中优势菌属为芽孢杆菌属;在 LNR16d 的样品中优势菌属为 unidentified_*Chloroplast*。PCoA 分析显示 15 个样品的组内样本之间距离较大,表明其菌群差异性较大。LEfSe 分析表明,LNR4d~LNR16d 样品中属水平下贡献最大的细菌菌群分别为巨大球菌属、微小杆菌属、乳杆菌属。结论:研究揭示了湘派卤牛肉贮藏过程中的细菌多样性,探索了湘派卤牛肉贮藏过程中的细菌变化情况及其优势菌属。

关键词:脉冲卤制;卤牛肉;细菌多样性;高通量测序

Abstract: Objective: This study aimed to preserve the flavor of Xiangpai brined beef and prolong its shelf life. Methods: High-throughput sequencing was performed in Xiangpai brined beef samples with different storage time (0, 4, 8, 12, 16 d). Results:

基金项目:湖南省研究生科研创新项目(编号: CX20201182);湖南省科技创新计划资助项目(编号: 2019TP1028, 2019SK2122)

作者简介:车丽娜,女,邵阳学院在读硕士研究生。

通信作者:赵良忠(1962—),男,邵阳学院教授,硕士。

E-mail: sys169@163.com

收稿日期:2022-08-16 **改回日期:**2022-12-19

A total of 1 116 813 effective gene sequence bands were obtained, with an average of 74 454 bands per sample. Alpha diversity analysis showed that LNR8d had the highest bacterial abundance, while LNR4d had the lowest bacterial abundance. The results showed that during storage, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Cyanobacteria* were dominant bacteria in the 15 brined beef samples. *Bacillus* was the dominant bacterium in LNR0d samples, while the dominant bacterium in LNR4d samples was *Macrococcus*. The dominant bacterium in LNR8d samples was *Enterobacter*. The dominant bacteria in LNR12d samples also belonged to *Bacillus*, and the dominant bacterium in LNR16d samples was Unidentified chloroplast. PCA analysis showed that the distance between the 15 samples within the group was large, indicating that the microbiota diversity of the 15 samples varied greatly. LEfSe analysis showed that in LNR4d ~ LNR16d samples, the bacteria with the largest contribution at the genus level were *Macrococcus*, *Microbacillus* and *Lactobacillus*. **Conclusion:** This study revealed the diversity of bacteria in the storage process of Xiangpai braised beef and explored the changes of bacteria and its dominant bacteria genus during the storage process.

Keywords: intelligent pulse brine; braised beef; bacterial diversity; high-throughput sequencing

脉冲卤制是指利用真空和微压条件,在低温和中温交替过程中完成新型卤制方法。研究^[1-2]表明,脉冲卤制在生产过程中具有减少卤汁用量,降低卤制温度,缩短卤制时间,提高生产效率,降低生产能耗,保留食品风味,提高产品安全性等特点。采用脉冲卤制工艺生产的湘派卤牛肉风味浓郁、芳香四溢,营养丰富,大大降低了微生物的初始数量级,极大地提高了卤牛肉的安全性^[3]。湘

派卤牛肉作为湖湘人餐桌上不可或缺的即食性食品之一,其使用的湘派卤汁是由八角、桂皮等十多种中药材熬制而成,卤制过程中不添加防腐剂、护色剂。其“药卤”“浸渍”“香辣”的特点深受消费者喜爱,具有广大的消费市场,但其常在无包装的情况下销售,极易被微生物污染变质^[4],进而影响食品的安全性,因此对其细菌多样性进行研究十分必要。现阶段对卤牛肉的研究多集中于加工工艺、品质特性及风味物质变化规律^[5-8]等方面。

微生物作为卤牛肉研究中常测指标之一,主要采用传统的微生物学分析方法,研究方法较为繁琐,无法较全面地探索卤牛肉中细菌的菌群分布和变化情况。为系统研究卤牛肉中细菌群落结构组成及其多样性变化,研究拟采用高通量测序技术对不同贮藏时间湘派卤牛肉的细菌多样性和菌群结构进行分析,揭示湘派卤牛肉贮藏过程中细菌菌群结构的动态变化,以期对湘派卤牛肉的抑菌保鲜、保持风味和延长货架期提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料

牛肉、猪筒子骨:当天新鲜样品,市售;

卤料:八角、桂皮、小茴香、香叶、甘草、花椒等,市售;

十六烷基三甲基溴化铵抽提液(CTAB):北京诺博莱德科技有限公司;

高保真 PCR 预混液与 GC 缓冲液(Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer)、高保真 DNA 聚合酶(Phusion® High-Fidelity DNA polymerase)、DNA 文库制备试剂盒(NEB Next® Ultra DNA Library Prep Kit):New England Biolabs;

DNA 纯化回收试剂盒:天根生化科技有限公司;

琼脂糖:范德北京生物科技有限责任公司。

1.1.2 试验仪器

脉冲卤煮机(真空脉冲卤制设备):FYLZ-1 型,北京康得利机械设 备制造有限公司;

双人单面垂直净化工作台:SW-CJ-2FD 型,江苏通净净化设备有限公司;

酶标仪:Multiskan FC 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

高速冷冻离心机:5084R 型,德国 Eppendorf 公司;

PCR 仪:PTC100TM 型,美国 MJ Research 公司;

拍击式均质机:BagMixer400CC 型,法国 Interscience 公司;

凝胶成像系统:GelDo-cEQ 型,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;

立式高压灭菌锅:GI54DWS 型,美国致微有限责任公司;

测序系统:NovaSeq 6000 型,美国 Illumina 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 湘味特色卤制牛肉样品的制备 湘派卤汁熬制参照伍涛等^[9]的方法,将卤料加入筒子骨高汤中熬制 3 h,过滤后加入菜籽油、自制焦糖、食盐等配料。新鲜牛肉洗净切块,置于 90 ℃ 左右的水中预煮 3 min,冷却后参照李海涛等^[3]的方法进行卤制,卤制参数为卤制温度 80 ℃,卤制时间 80 min,真空度 0.03 MPa,脉冲次数为 3。牛肉经当日熬制好的卤汁卤制、晾凉后,用无菌袋密封包装,放至 4 ℃ 冰箱内冷藏贮存。分别于冷藏 0,4,8,12,16 d 取样,样品于包装内拍击粉碎均匀后,每个时间点取 3 组平行样。其中贮藏 0 d 的样品为对照组,分别记为 LNR0d1, LNR0d2, LNR0d3,其余组为试验组,分别冷藏 4,8,12,16 d,标记为 LNR4d1, LNR4d2, LNR4d3, LNR8d1, LNR8d2, LNR8d3, LNR12d1, LNR12d2, LNR12d3, LNR16d1, LNR16d2, LNR16d3。将拍击粉碎均匀的样品于无菌操作台中称取 10 g,于 20 mL 无菌取 样杯中密封保存,置于一 40 ℃ 冰箱冷冻,留样待测。

1.2.2 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增 采用 CTAB 法^[10]提取样品基因组 DNA,并使用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶对其纯度和浓度进行电泳检测,电泳电压为 100 V,电泳时间为 40 min,再将适量样品 DNA 采用 10 倍稀释法,用无菌水稀释至 1 ng/μL,放入 EP 管中备用。以稀释后的基因组 DNA 为模板,选择 16S rDNA 序列引物^[11]515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')、806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行 PCR。

PCR 反应体系:15 μL 2×Phusion Master Mix,1 μL 1 μmol/μL PrimerF,1 μL 1 μmol/μL PrimerR,10 μL 1 ng/μL gDNA,ddH₂O 补足 30 μL。

反应程序:98 ℃ 预变性 1 min,循环一次;98 ℃ 变性 10 s;50 ℃ 退火 30 s,循环 30 次;72 ℃ 延伸 30 s;72 ℃ 延伸 5 min,循环一次;维持在 4 ℃。

1.2.3 PCR 产物的混样和纯化 取 5 μL PCR 产物使用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,电泳电压为 80 V,电泳时间为 40 min,结合胶图上的 marker,判断分子量是否符合目的条带,合格后,对目的条带进行回收。

1.2.4 文库构建和数据处理 使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,使用 NovaSeq6000 系统进行上机测序。测序完成后,截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH(V1.2.7,http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/)拼接得到原始 Tags 数据经 Qiime 软件(Version 1.9.1,http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html)对 Tags 进行截取、过滤、去除嵌合体序列后,利用 Uparse 算法(Uparse v7.0.1001,http://www.drive5.com/uparse/)对获得的有效序列进行聚类、

利用 blast 方法 (http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html)与 Unit(v8.2)数据库(<https://unite.ut.ee/>)进行物种注释分析后,再使用 MUSCLE(Version 3.8.31,<http://www.drive5.com/muscle/>)软件进行序列比对,最后使用 Qiime 软件(Version 1.9.1)、R 软件(Version 2.15.3,<http://r-project.org>)进行 Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析。

2 结果与分析

2.1 样品基因序列质量评估及 Alpha 多样性分析

2.1.1 Alpha 多样性分析 经高通量测序,15 个样品共获得有效基因序列 1 116 813 条,平均每个样品产生 74 454 条,有效序列平均长度在 415~429,有效序列比例 >87%,采用 Chao1、Ace、Shannon、Simpson 指数以及群落覆盖度指数等对得到的有效优化序列进行分析^[12],结果如表 1 所示。全部样品的 OTU 覆盖率为 97%~99%,说明测序结果能够准确反映全部样品中的细菌组成。OTU 数量与样品中的细菌丰度呈正相关^[13],样品 LNR4d、LNR12d 和 LNR16d 的 OTU 数量偏少,只有 200

左右,其他样品中的 OTU 数量基本均在 300 以上,说明这 3 个样品中细菌种类较少,其中 LNR4d 的 OTU 数量最少,可能是由于样品由室温转至 4℃ 冰箱冷藏,在其冷藏过程中,温度骤降,抑制了细菌的生长繁殖,与孙丹丹等^[14]的研究结果类似:4℃ 的温度对微生物的生长繁殖有一定的抑制作用,也对延长食品的货架期有一定的作用。而 LNR12d 和 LNR16d 的 OTU 数量骤降,可能是因为贮藏前期,好氧微生物大量生长繁殖,消耗了包装中的氧气,导致贮藏后期,环境中氧含量降低,抑制了好氧微生物的生长繁殖,且内源酶和外源酶降解了样品中的蛋白质等大分子物质,为优势菌种的生长提供营养物质,使其大量繁殖并产生代谢物和毒素等引起了部分物种死亡^[15-16]。Shannon 指数大,Simpson 指数小,表明样本菌群多样性指数高。LNR0d 较 LNR16d 而言,菌群多样性高;LNR8d 较 LNR12d 而言,菌群多样性高;LNR4d 菌群多样性最低。Chao1 指数、ACE 指数越大,表明样品中菌群丰度越高。5 组样品中,LNR8d 中细菌菌群丰度最高,LNR4d 中最低,与 OTU 数量的变化一致。

表 1 样品微生物多样性指数

Table 1 Microbial diversity index of samples

样品名称	OTUs 数目	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	ACE	Coverage 指数/%
LNR0d	337	4.07	0.84	583.50	632.50	97
LNR4d	133	3.18	0.78	179.09	198.98	99
LNR8d	415	4.59	0.90	644.12	724.01	97
LNR12d	203	4.28	0.91	283.76	321.32	99
LNR16d	172	3.39	0.84	319.70	419.16	99

2.1.2 细菌群落 OTU 水平的 Venn 图分析 如图 1 所示,LNR0d,LNR4d,LNR8d,LNR12d,LNR16d 样品中的总 OTU 数分别为 835,294,1 046,442,389,独有的 OTU 数分别为 547,136,793,236,220,5 组样品共有的 OTU 数量为 70,而贮藏第 0~4,4~8,8~12,12~16 天的样品中共有的 OTU 数分别为 132,127,148,116。根据总 OTU 数量可知,LNR8d 中的细菌多样性最高,LNR4d 中的细菌多样性最低,与 Alpha 多样性分析结果一致。样本中独有的 OTU 呈先降低后升高再降低的趋势,与总 OTU 变化趋势相似,且前后时间段之间共有的 OTU 变化幅度较小,说明湘派卤牛肉在冷藏过程中其菌群结构变化较大,但主要菌群变化较小^[16]。

2.2.3 Shannon 曲线分析 Shannon 曲线趋于平坦,说明测序深度足够^[17]。由图 2 可知,在对 15 份湘派卤牛肉中的细菌进行高通量测序时,当测序深度达到 50 000 时,曲线均趋于平稳。随着测序增加,细菌的多样性几乎不变,表明测序深度达到 50 000 时已经可以反映样品中细菌的丰度信息。

2.2 湘派卤牛肉贮藏过程中细菌群落组成分析

2.2.1 门水平下的细菌群落组成分析 图 3(a)为 15 个样品除去未分类的菌群,剩余细菌菌群在门分类水平下相对丰度排名前 10 的菌落结构分布图。总体来看:这 15 个样品中的优势菌门为厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌

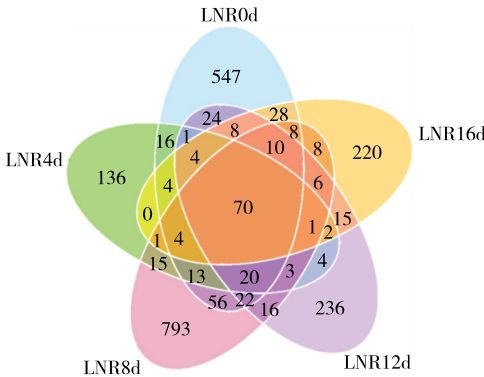


图 1 样品中细菌群落 OTU 的维恩图

Figure 1 Venn diagram of OTU of the bacterial community in the sample

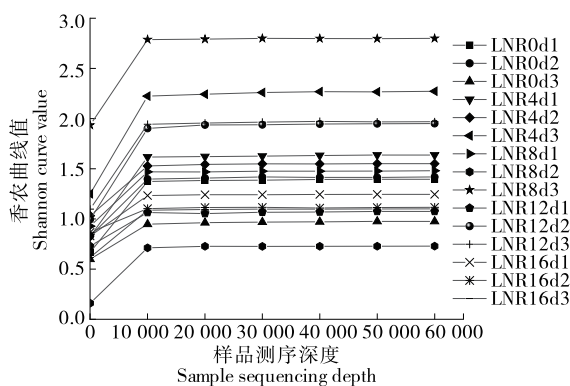
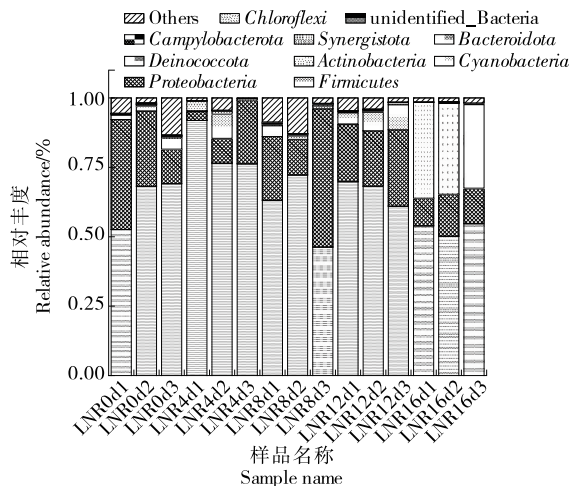
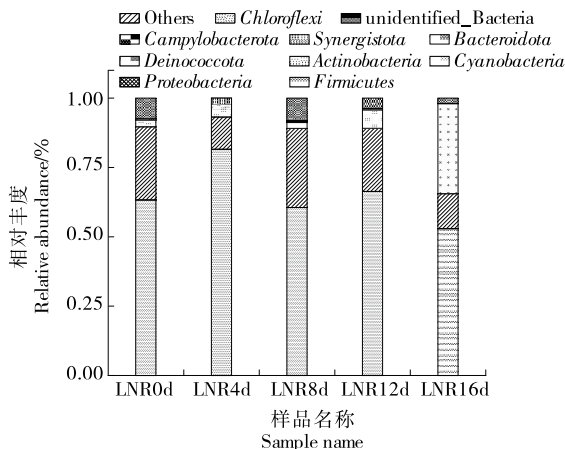


图 2 Shannon 曲线

Figure 2 Shannon index curve



(a) 15 例卤牛肉样品



(b) 5 个取样时间点样品

图 3 各样品和组样品在门水平下的细菌群落结构

Figure 3 Bacterial community structure of the samples and groups at phylum level

等^[19]研究发现厚壁菌门、蓝藻菌门(Cyanophyta)和变形菌门是发酵香肠中的优势菌门。邓祥宜等^[20]发现宣恩火腿发酵过程中细菌门水平上的微生物群落主要有:厚壁菌门、变形菌门等。王馨蕊等^[21]在诺邓火腿加工过程中细菌群落的动态变化研究中发现:厚壁菌门、变形菌门等细菌为发酵过程中的优势菌群。以上研究结果均与湘派卤牛肉的研究结果类似。有研究^[22-25]表明:厚壁杆菌门主要包括一些芽孢杆菌、乳酸菌和葡萄球菌等,其中包括影响食品货架期有害菌,且近年来发现厚壁菌门微生物是高蛋白食品中常见的优势腐败菌。因此,卤牛肉作为高蛋白的动物性食品,需防范厚壁菌门微生物的污染。

2.2.2 属水平下的细菌群落组成分析 图 4(a)显示的是 15 个样品中除去未分类细菌菌群外,剩余相对丰度排名在前 10 的细菌群落结构分布情况;图 4(b)为 15 个样品除去未分类菌群外,剩余细菌菌群组间排名前 10 的细菌群落结构分布情况,在 16 d 的贮藏期内,优势菌种呈不断变化的趋势。在 LNR0d 的 3 个样品中,除了 LNR0d1 的优势菌种为肠杆菌属(*Enterobacter*)以外,优势菌属为芽

孢杆菌属(*Bacillus*)。在 LNR4d 的 3 个样品中,除去 LNR4d2 的优势菌属为芽孢杆菌属外,其余两个样品的优势菌属为巨大球菌属(*Macrococcus*)。在 LNR8d 的 3 个样品中,除去 LNR8d3 的优势菌属为肠杆菌属外,其余两个样品的优势菌属为魏斯氏菌属(*Weissella*)。在 LNR12d 的 3 个样品中,除去 LNR12d3 的优势菌属为肠杆菌属外,其余两个样品的优势菌属为芽孢杆菌属。在 LNR16d 的 3 个样品中,unidentified_Chloroplast 为优势菌属。由图 4(b)可知,在样品 LNR0d、LNR12d 中,优势菌种为芽孢杆菌属,相对丰度为 28.36%、25.96%,且随着贮藏时间的延长,芽孢杆菌属呈动态变化趋势,在样品 LNR4d、LNR8d、LNR16d 中的相对丰度分别为 29.10%、18.24%、14.19%,可能与其生物学特性有关。相关研究^[26]也证实了芽孢杆菌属中部分菌种为兼性厌氧菌,在真空包装条件下可良好生长,芽孢杆菌的这一生物学特性可以很好地解释为何其能成为贮藏期间的优势菌属。肠杆菌属作为优势菌属之一,相对丰度为 19.39%、15.56%,肠杆菌属同样也是样品 LNR8d 的优势菌属,相

门(*Proteobacteria*)和蓝细菌门(*Cyanobacteria*),在贮藏期间,厚壁菌门的相对丰度为 46.27%~91.88%,变形菌门的相对丰度为 3.21%~49.85%,蓝细菌门的相对丰度为 0.31%~34.46%,3 种菌群的相对丰度呈动态变化趋势。图 3(b)为 15 个样品除去未分类的菌群,剩余菌群组间门水平上的物种相对丰度排名前 10 的柱形图。由图 3(b)可知,厚壁菌门基本上是湘派卤牛肉低温贮藏过程中的绝对优势菌门,在 LNR0d、LNR4d、LNR8d、LNR12d 样品中,变形菌门为第二优势菌,而在 LNR16d 样品中,蓝细菌门超过变形菌门(12.63%)成为新的第二优势菌群,相对丰度到达 32.43%。杜瑞等^[18]研究发现厚壁菌门和变形菌门是发酵肉制品的优势菌门。黄郑朝

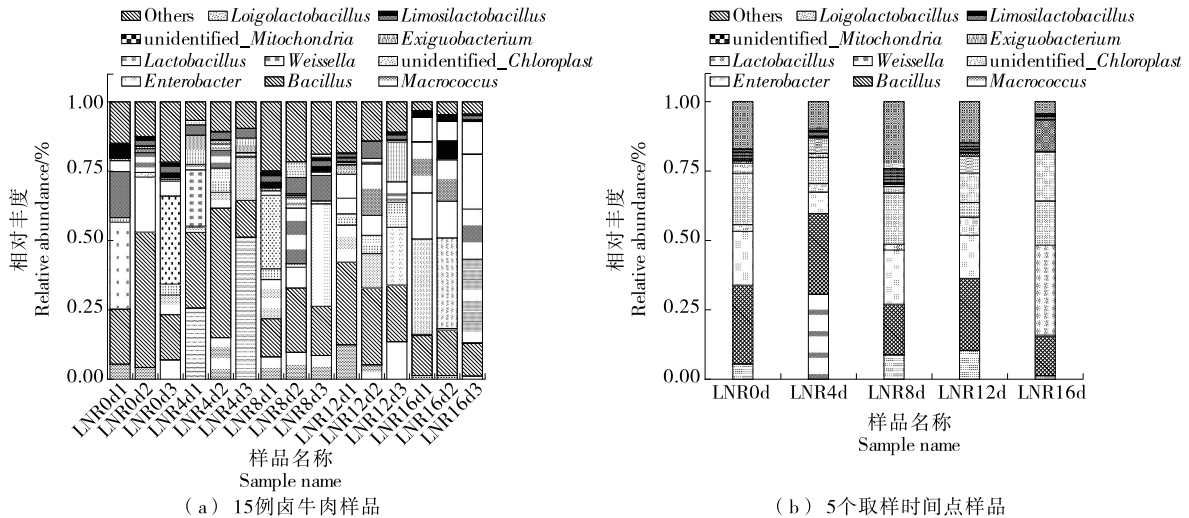


图4 各样品和组样品在属水平下的细菌群落结构

Figure 4 Bacterial community structure at the genus level for each sample and group

对丰度为 19.50%。肠杆菌属兼性厌氧,广泛分布于自然界,普遍存在于人和动物中,卤牛肉样品中含有肠杆菌属,其原因可能是在卤制品卤制好后的摊凉过程中,被空气中的肠杆菌污染,因此,在卤制品的冷却过程中应该特别注意肠杆菌的污染。此外,魏斯氏菌属(18.55%)、芽孢杆菌属(18.24%)、巨大球菌属(8.79%)也同样是湘派卤牛肉贮藏过程中的优势菌属。样品 LNR4d 中,优势菌种为巨大球菌属,相对丰度为 30.62%。且在样品 LNR4d 中,芽孢杆菌属的相对丰度仅次于巨大球菌属。在样品 LNR16d 中,优势菌种虽为 *unidentified_Chloroplast* (32.41%) 但其芽孢杆菌属(14.19%)、巨大球菌属(10.38%)的相对丰度 > 10%。其中芽孢杆菌属、巨大球菌属、魏斯氏菌属均属于厚壁菌门,而肠杆菌属则属于变形菌门。有研究^[27]表明:芽孢杆菌属、乳杆菌属、肠杆菌属为肉类中的优势腐败微生物。在属水平上,随着贮藏时间的延长,优势菌群呈动态变化趋势。

2.2.3 主成分分析 由图 5 可知,累计方差贡献率为 75.02%,其中 PC1 的贡献率为 47.08%,PC2 的贡献率为 27.94%。在所有样品中,LNR4d、LNR12d、LNR16d 组内样品之间距离较小,表明其组内细菌群落结构差异较小,且 LNR16d 组内细菌群落结构相似度较 LNR4d 和 LNR12d 而言高;而 LNR0d 和 LNR8d 组内样品之间距离较大,表明其组内细菌群落结构差异较大。这可能是由于菌群在样品中分布不均导致的。总体来看,LNR0d 和 LNR8d 样品分布于第一、四象限,LNR4d 样品分布于第三、四象限,LNR12d 样品分布于第一、三、四象限,LNR16d 样品分布于第二象限。综上,15 个样品之间的细菌结构差异较大。

2.2.4 湘派卤牛肉的 LEfSe 分析 LEfSe 分析(图 6)表明,5 组不同贮藏时间下的湘派卤牛肉共有 17 个差异指

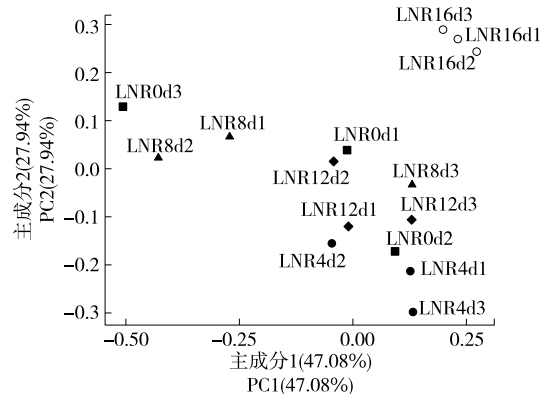


图5 各样品主成分分析图

Figure 5 Principal component analysis diagram of each sample

示种,其中,LNR4d 有 4 个,LNR8d 有 1 个,LNR12d 有 3 个,LNR16d 有 9 个,LNR0d 一组缺失,表明此组中并无差异显著的物种。以 LNR16d 中差异指示种数量最多,丰度最高。其中,LNR4d~LNR16d 样品中属水平下贡献最大的细菌菌群分别为巨大球菌属、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)。相关研究^[19]表明:巨大球菌属中的溶酪巨大菌作为内源发酵剂可提高对脂肪和蛋白质的分解作用,可耐受一定浓度的食盐。其可在卤牛肉中生长繁殖,因对生物体无致病作用^[28],故其存在于卤牛肉中并不会对卤牛肉的安全性造成影响。乳杆菌属中的发酵乳杆菌有抑菌的功能特性^[29-31],这可能也是贮藏后期微生物丰度降低的原因之一。

3 结论

采用高通量测序的方法对湘派卤牛肉 4 °C 贮藏期间的细菌多样性进行分析可知:LNR8d 中细菌多样性和丰度最高,LNR4d 最低;样品贮藏过程中,15 个样品中的优

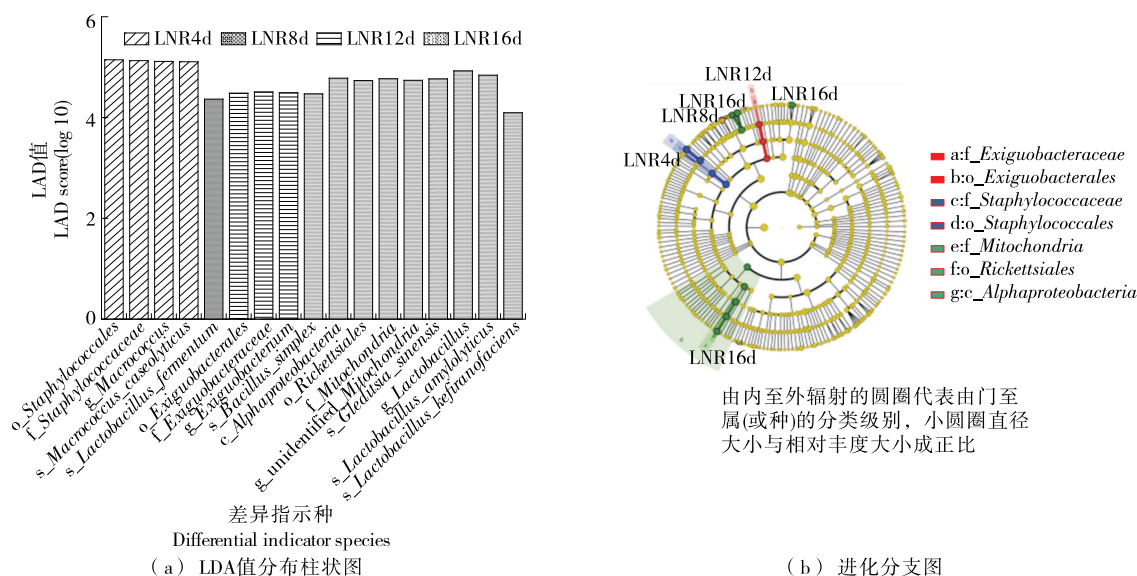


图 6 LDA 值分布柱状图和进化分支图
Figure 6 Histogram of LDA value distribution and evolutionary branching diagram

势菌门为厚壁菌门、变形菌门和蓝细菌门,优势菌属如下:LNR0d 的样品中优势菌属为芽孢杆菌属(28.36%);LNR4d 的样品中优势菌属为巨大球菌属(30.62%);LNR8d 的样品中优势菌属为肠杆菌属(19.50%);LNR12d 的样品中优势菌属为芽孢杆菌属(25.96%);LNR16d 的样品中优势菌属为 *unidentified_Chloroplast* (32.41%)。整体而言,15 个样品的组内样本之间距离较大,表明其菌群差异性较大;由 LEISe 分析可知:样品中属水平下贡献最大的细菌菌群分别为巨大球菌属、微小杆菌属、乳杆菌属,进化分析图表明细菌菌群结构与贮藏时间有关。综上,大致可以推断出引起冷藏过程中卤牛肉货架期的微生物为芽孢杆菌属、乳杆菌属、肠杆菌属中的部分微生物。因此在卤牛肉的贮藏过程中,可通过抑制上述菌属的生长繁殖来延长卤牛肉的货架期,如在卤牛肉包装中充入 CO_2 、 N_2 等气体^[31],或者可加入针对性的抑菌剂如 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐、乳酸链球菌素(Nisin)等^[32],从而达到抑菌的效果。由试验结果可知:芽孢菌属由于其耐高温的特性使其在贮藏 0 d 时属于优势菌属,因此,可根据芽孢杆菌的生理特性适当调整卤制工艺,从而起到抑制其初始菌的效果,其次还可根据芽孢萌发特性^[33]调整其后期贮藏条件。脉冲卤制对于其他菌群有较好的抑制效果,后期优势菌群的改变可能是在样品卤制后的冷却过程中被环境中的微生物所影响,因此在冷却过程中要特别注意冷却环境中的微生物含量,可在冷却前事先对冷却环境采取一定的灭菌措施,如紫外杀菌等。

参考文献

[1] 赵良忠,陈浩,周小虎. 卤制食品冷却装置及卤制食品冷却方法: CN104273638A[P]. 2015-01-14.
ZHAO L Z, CHEN H, ZHOU X H. Braised food cooling device and

marinated food cooling method: CN104273638A[P]. 2015-01-14.
[2] 赵良忠,陈浩,周小虎. 卤制食品冷却装置: ZL204207037U[P]. 2015-03-18.
ZHAO L Z, CHEN H, ZHOU X H. Braised food cooling device: ZL204207037U[P]. 2015-03-18.
[3] 李海涛,赵良忠,范柳,等. 休闲豆干真空脉冲卤制工艺优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 173-179.
LI H T, ZHAO L Z, FAN L, et al. Optimization of vacuum pulse marinating technology for leisure dried tofu [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(17): 173-179.
[4] JORDAN E, EGAN J, DULLEA C, et al. Salmonella surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004[J]. International Journal of Food Micro Biology, 2006, 112(1): 66-70.
[5] 屠明亮. 循环卤煮对卤牛肉、卤汤品质特性及风味物质变化规律的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2021: 43.
TU M L. Effects of circular stewing on quality characteristics and flavor Components of stewed beef and stewed soup[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021: 43.
[6] 潘晓倩,周慧敏,李素,等. 卤牛肉贮藏过程中气味活性化合物变化及异味分析[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 240-248.
PAN X Q, ZHOU H M, LI S, et al. Changes in odor-active compounds during storage and analysis of off-flavor substances in stewed marinated beef[J]. Food Science, 2021, 42(22): 240-248.
[7] 邹云鹤. 超声波辅助煮制对酱卤牛肉品质的影响研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018: 35.
ZOU Y H. Effects of ultrasound assisted cooking on the quality of spiced beef[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018: 35.
[8] 杨爽,杨萍,徐琳,等. 超高压处理协同低温贮藏对卤牛肉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 334-343.
YANG S, YANG P, XU L, et al. Effect of ultra-high pressure combined with low temperature storage on quality of marinated

- beef[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 334-343.
- [9] 伍涛, 彭希林, 赵良忠, 等. 湘派豆干及卤汁在卤制过程中的变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 146-154.
- WU T, PENG X L, ZHAO L Z, et al. Variation law of Xiangpai dried tofu and brine during marinating process [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19): 146-154.
- [10] 杨成, 李晶, 徐悦, 等. 利用 4 种方法对猪肉、牛肉、羊肉 DNA 进行提取比较[J]. 食品工程, 2018(3): 51-53, 61.
- YANG C, LI J, XU Y, et al. Study on four methods of extraction DNA from pork, beef and mutton[J]. Food Engineering, 2018(3): 51-53, 61.
- [11] FADROSH D W, MA B, GAJER P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform[J]. Microbiome, 2014, 2(1): 3-7.
- [12] QIU Z C, LI N Y, LU X M, et al. Characterization of microbial community structure and metabolic potential using Illumina MiSeq platform during the black garlic processing [J]. Food Research International, 2018, 106(1): 428-438.
- [13] MEILING Z, MENGHUI Z, CHENHONG Z, et al. Pattern extraction of structural responses of gut microbiota to rotavirus infection via multivariate statistical analysis of clone library data [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(2): 21-29.
- [14] 孙丹丹, 卢士玲, 李开雄, 等. 贮藏温度对冷鲜羊肉微生物菌群生长变化的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(4): 327-331, 341.
- SUN D D, LU S L, LI K X, et al. Effect of temperature on the quality and safety of chilled mutton[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(4): 327-331, 341.
- [15] HUANG W, XIE J. Characterization of the volatiles and quality of hybrid grouper and their relationship to changes of microbial community during storage at 4 °C [J]. Molecules, 2020, 25(4): 818.
- [16] 赵萍, 金文刚, 兰阿峰, 等. 基于 Illumina MiSeq 测序技术分析大鲵肉冷藏过程中微生物菌群演替规律[J]. 食品科学, 2022, 43(20): 172-182.
- ZHAO P, JIN W G, LAN A J, et al. Succession of microbial community in giant salamander (Andrias davidiauns) meat during cold storage based on Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology[J]. Food Science, 2022, 43(20): 172-182.
- [17] 王俊钢, 李宇辉, 刘成江, 等. 新疆哈萨克族传统风干肉中细菌多样性分析及安全评价[J]. 中国食品学报, 2021, 21(11): 209-218.
- WANG J G, LI Y H, LIU C J, et al. Analysis and safety evaluation of bacterial diversity in traditional air-dried meat of Xinjiang Kazakh[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 209-218.
- [18] 杜瑞, 王柏辉, 罗玉龙, 等. 应用 Illumina MiSeq 测序技术比较传统发酵乳、肉食品中细菌多样性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 269-277.
- DU R, WANG B H, LUO Y L, et al. Illumina MiSeq sequencing technology was used to compare bacterial diversity in traditional fermented milk and meat foods[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 269-277.
- [19] 黄郑朝, 宋莲军, 黄现青, 等. 基于高通量测序对中国不同区域传统发酵香肠细菌多样性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 15-21.
- HUANG Z C, SONG L J, HUANG X Q, et al. Study on bacterial diversity of traditional fermented sausages in different regions of China based on high-throughput sequencing [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(18): 15-21.
- [20] 邓祥宜, 李继伟, 何立超, 等. 宣恩火腿发酵过程中表面微生物群落演替规律[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(7): 34-42.
- DENG X Y, LI J W, HE L C, et al. Microbial community succession pattern on the surface of Xuanen ham during fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(7): 34-42.
- [21] 王馨蕊, 史巧, 刘毕琴, 等. 诺邓火腿加工过程中细菌群落的动态变化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 83-89, 98.
- WANG X R, SHI Q, LIU B Q, et al. Bacterial dynamics during the processing of Nuodeng dry-cured ham[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 83-89, 98.
- [22] 马岩石, 姜明, 李慧, 等. 基于高通量测序技术分析东北豆酱的微生物多样性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 100-105.
- MA Y S, JIANG M, LI H, et al. Analysis of microbial diversity of northeast soy sauce based on high-throughput sequencing technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(12): 100-105.
- [23] 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.
- [24] 毛海萍, 袁开, 金仁耀, 等. 基于传统分离培养和高通量测序分析市售咸鳊鱼中微生物多样性[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(21): 193-201.
- MAO H P, YUAN K, JIN R Y, et al. Study of microbial diversity in commercial salted Chinese herring using culture isolation and high-throughput sequencing[J]. Food Research and Development, 2019, 40(21): 193-201.
- [25] 李伟程, 侯强川, 于洁, 等. 传统发酵乳制品中微生物多样性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 131-136.
- LI W C, HOU Q C, YU J, et al. Study on the diversity of microbial in traditional fermented dairy product[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(1): 131-136.
- [26] 宋思家, 黄子彧, 林莹莹, 等. 基于 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析不同保质期鸡蛋干的微生物群落多样性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 24-30.
- SONG S J, HUANG Z Y, LIN Y Y, et al. Microbial community diversity in egg curds with different shelf life revealed by Illumina MiSeq sequencing[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 24-30.

(下转第 197 页)

- Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 377.
- [3] LI Q, KANG J, MA Z, et al. Microbial succession and metabolite changes during traditional serofluid dish fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 84: 771-779.
- [4] BELL V, FERRAO J, FERNANDES T. Nutritional guidelines and fermented food frameworks[J]. Foods, 2017, 6(8): 65.
- [5] SABO S S S, VITOLO M, JMD G, et al. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria[J]. Food Research International, 2014, 64: 527-536.
- [6] VRIE S, VAUGHAN E E, KLEEREBEZEM M, et al. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1 018-1 028.
- [7] SIEZEN R J, VLIEG J. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(S1): S3.
- [8] ZAGO M, LANZA B, ROSSETTI L, et al. Selection of *Lactobacillus plantarum* strains to use as starters in fermented table olives: Oleuropeinase activity and phage sensitivity [J]. Food Microbiology, 2013, 34(1): 81-87.
- [9] GAO H, WEN J J, HU J L, et al. Momordica charantia juice with *Lactobacillus plantarum* fermentation: Chemical composition, antioxidant properties and aroma profile[J]. Food Bioscience, 2019, 29: 62-72.
- [10] FUENTE B, LUZ C, PUCHOL C, et al. Evaluation of fermentation assisted by *Lactobacillus brevis* POM, and *Lactobacillus plantarum* (TR-7, TR-71, TR-14) on antioxidant compounds and organic acids of an orange juice-milk based beverage[J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128414.
- [11] KWAW E, MA Y, TCHABO W, et al. Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice[J]. Food Chem, 2018, 250: 148-154.
- [12] LI X, GAO J, SIMAL-GANDARA J, et al. Effect of fermentation by *Lactobacillus acidophilus* CH-2 on the enzymatic browning of pear juice [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 147(2): 111489.
- [13] HASHEMI S M B, JAFARPOUR D, JOUKI M. Improving bioactive properties of peach juice using *Lactobacillus* strains fermentation: Antagonistic and anti-adhesion effects, anti-inflammatory and antioxidant properties, and Maillard reaction inhibition[J]. Food Chem, 2021, 365: 130501.
- [14] YANG J, LU J, ZHU Q Z, et al. Isolation and characterization of a novel *Lactobacillus plantarum* MMB-07 from traditional Suanyu for *Acanthogobius hasta* fermentation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(2): 161-166.
- [15] 经联源, 李婷, 曾凡坤, 等. 发酵剂对泡萝卜品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 171-177.
- JING T Y, LI T, ZENG F K, et al. Effect of fermenters on the quality of pickled radish[J]. Food Science, 2021, 42(22): 171-177.
- [16] 付雪. 酸菜生物发酵剂研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018: 45-49.
- FU X. Research on biological fermenters for sauerkraut[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2018: 45-49.
- [17] LI X, XU W, YANG J, et al. Effect of different levels of corn steep liquor addition on fermentation characteristics and aerobic stability of fresh rice straw silage[J]. Anim Nutr, 2016, 2(4): 345-350.
- [18] CHEN A J, LUO W, PENG Y T, et al. Quality and microbial flora changes of radish paocai during multiple fermentation rounds[J]. Food Control, 2019, 106: 106733.
- (上接第 119 页)
- [27] 马恒珍, 南庆贤, 戴瑞彤. 冷却猪肉中腐败菌的分离、初步鉴定与初始菌相分析[J]. 天津农学院学报, 2005, 12(3): 39-43.
- MA L Z, MAN Q X, DAI R T. Isolation and identification of spoilage bacteria of chilled meat and analysis on composition of initial micro-organism[J]. Journal of Tianjin Agricultural College, 2005, 12(3): 39-43.
- [28] BLAIOTTA G, PENNACCHIA C, VILLANI F, et al. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97(2): 271-284.
- [29] OWUSU-KWARTENG J, TANO-DEBRAH K, AKABANDA F, et al. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(1): 261.
- [30] SHAH N, PATERL A, AMBALAM P, et al. Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in co-culture[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1 137-1 143.
- [31] 李天宇. 不同杀菌工艺和包装技术对酱牛肉贮藏品质的影响试验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020: 18.
- LI D Y. Experimental study on the effects of different sterilization processes and packaging techniques on the storage quality of spiced beef[D]. Changchun: Jilin University, 2020: 18.
- [32] 史文艳, 孙震. ϵ -聚赖氨酸盐酸盐与 Nisin 对蜡状芽孢杆菌的协同作用及机理[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 15-19, 103.
- SHI W Y, SUN Z. Synergistic effect and mechanism of ϵ -polylysine hydrochloride and Nisin on *Bacillus cereus*[J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 15-19, 103.
- [33] 程琴, 黄庶识, 陈丽梅. 芽孢杆菌孢子萌发机理的研究进展[J]. 生命科学, 2010, 22(9): 878-885.
- CHENG Q, HUANG S S, CHEN L M. Research advances on the germination mechanism of *Bacillus* spores[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2010, 22(9): 878-885.