

泡椒凤爪溶烂腐败菌的鉴定及其致腐能力分析

尹含靓¹, 刘洋^{1,2,*}, 谭益升³, 孙军华^{1,3}, 蒋立文^{1,2,*}, 杜秋¹

(1.湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128;

2.食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128;

3.盐津铺子食品股份有限公司, 湖南长沙 410000)

摘要:为探究溶烂泡椒凤爪中优势腐败菌及其致腐能力,通过高通量测序技术及传统培养法分离出泡椒凤爪样品中的优势腐败菌并通过反接菌法验证腐败菌的致腐能力。结果表明,溶烂泡椒凤爪样品中的优势菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*),分离得到4株优势菌株为甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、沙福芽孢杆菌(*B. safensis*)。4株菌均具有产蛋白酶及脂肪酶活性,其中沙福芽孢杆菌921-4产蛋白酶活性最强(51.19 U/mL),而甲基营养型芽孢杆菌623-4产脂肪酶活性最强(3.75 U/mL)。接种4株纯培养芽孢杆菌的泡椒凤爪样品pH值、挥发性盐基氮值和硫代巴比妥酸值均高于未接菌对照组样品,表明4株芽孢杆菌均对泡椒凤爪有一定的致腐能力。研究结果将为泡椒凤爪的品质控制,延长其货架期提供理论基础。

关键词:泡椒凤爪;腐败菌;芽孢杆菌;酶活性;致腐能力

Identification of Dominant Spoilage Bacteria in Chicken Feet with Pickled Peppers and Analysis of Their Spoilage Capacity

YIN Hanliang¹, LIU Yang^{1,2,*}, TAN Yisheng³, SUN Junhua^{1,3}, JIANG Liwen^{1,2,*}, DU Qiu¹

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Key Laboratory for Food Science and Biotechnology of Hunan Province, Changsha 410128, China; 3. Yanjinpuzi Food Co. Ltd., Changsha 410000, China)

Abstract: The dominant spoilage bacteria in chicken feet with pickled peppers were analyzed by high-throughput sequencing technology and isolated by the traditional culture method to evaluate their spoilage capacity by back inoculation. The results showed that the dominant genus identified was *Bacillus*, and four dominant strains were identified including *B. methylotrophicus*, *B. velezensis*, *B. subtilis* and *B. safensis*. All these strains were able to produce protease and lipase activity. Among them, *B. safensis* showed the strongest protease activity (51.19 U/mL), while *B. methylotrophicus* showed the strongest lipase activity (3.75 U/mL). The pH, total volatile basic nitrogen (TVB-N) content and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value of the samples inoculated with each of the four *Bacillus* strains were higher than those of the uninoculated control group, indicating that all four *Bacillus* strains had spoilage capacity. This study will provided a theoretical basis for preventing and controlling the spoilage of chicken feet with pickled peppers and extending its shelf life.

Keywords: chicken feet with pickled peppers; spoilage bacteria; *Bacillus*; enzyme activity; spoilage ability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220620-200

中图分类号: TS251.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)16-0312-06

引文格式:

尹含靓, 刘洋, 谭益升, 等. 泡椒凤爪溶烂腐败菌的鉴定及其致腐能力分析[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 312-317.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220620-200. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-06-20

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2019YFC1606200);

湖南农业大学食品科学技术学院与盐津铺子食品股份有限公司横向项目(2021kjc-js018)

第一作者简介: 尹含靓(1998—)(ORCID: 0000-0002-2540-3434), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: 1214057041@qq.com

*通信作者简介: 刘洋(1990—)(ORCID: 0000-0002-7450-3220), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: Fs.ly@hunau.edu.cn

蒋立文(1968—)(ORCID: 0000-0002-8536-8298), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: hnndj1w@163.com

YIN Hanliang, LIU Yang, TAN Yisheng, et al. Identification of dominant spoilage bacteria in chicken feet with pickled peppers and analysis of their spoilage capacity[J]. Food Science, 2023, 44(16): 312-317. (in Chinese with English abstract)
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220620-200. <http://www.spkx.net.cn>

泡椒凤爪是川渝特色风味小吃,是将湿态发酵工艺与肉制品加工技术结合的产品^[1]。凤爪是鸡肉加工的副产品^[2],经过解冻、切分、漂洗、煮制、卤水泡制、调味、真空包装和辐照杀菌后制得泡椒凤爪,其口感酸鲜爽脆,含有丰富的蛋白质,脂肪含量低,是一种深受消费者喜欢的休闲制品。但由于泡椒凤爪营养丰富,有利于微生物生长繁殖,使其在贮藏及销售过程中容易出现溶烂、胀包等品质劣变的现象^[3]。

为保持泡椒凤爪的脆度,产品不能高温或巴氏杀菌处理,以免胶原蛋白析出影响产品脆度和外观。传统泡椒凤爪加工中通常使用过氧化氢对原料进行预处理杀菌,但自2015年国家规定不能使用过氧化氢作为加工助剂(食药监办食监一函〔2015〕609号)后,辐照杀菌和添加复合防腐保鲜剂便成为了泡椒凤爪保质的主要方法^[4-5]。然而,由于辐照剂量的限制和不同防腐剂的抑菌范围有限,导致部分腐败微生物依然可以存活,使泡椒凤爪产品出现溶烂及胀袋等腐败现象。杨琴^[6]发现导致泡椒凤爪胀袋的主要产气微生物为解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、季也蒙毕赤酵母(*Pichia guilliermondii*)、肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)和产阮假丝酵母(*Candida utilis*)。马含笑^[7]从发软的泡椒凤爪中分离得到1株小鱈鱼大洋芽孢杆菌(*Oceanobacillus oncorhynchi*)。国内外已有许多研究对肉制品中特定腐败菌的致病能力进行探究,Liu Xiaochang等^[8]通过测定腐败菌作用于鳙鱼产生的腐败代谢产物,研究了腐败希瓦氏菌、温和气单胞菌、波西米亚不动杆菌和萨拉曼卡假单胞菌的致病能力。王筱梦等^[9]通过腐败代谢产物产量因子发现*Bacillus* sp. M1对熟制羊肉的致病能力最强。然而泡椒凤爪中特定腐败菌致病能力的相关研究还鲜见报道。

本研究通过高通量测序及传统培养法对溶烂泡椒凤爪中的微生物进行菌相分析及分离鉴定,将优势腐败菌接种于泡椒凤爪中判断其致病能力,旨在为后期防控泡椒凤爪的腐败提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泡椒凤爪样品来自湖南某食品公司,为不同生产批次的溶烂样品(YC0411、YC0507、YC0610、YC0623、YC0729、YC0811、YC0917、YC0921)及新鲜(ZC0921)样品,所有样品均按生产时间编号。

硫代巴比妥酸、三氯乙酸、无水乙醇、氯化钠、硼酸、氧化镁、盐酸(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;乙二胺四乙酸二钠 天津市化学试剂研究所有限公司;1,1,3,3-四乙氧基丙烷 上海麦克林生化科技有限公司;平板计数肉汤(plate count broth, PCB) 青岛海博生物技术有限公司;平板计数琼脂(plate count agar, PCA) 广东环凯微生物科技有限公司;核酸定量分析试剂盒(Qubit dsDNA HS Assay Kit) 美国英杰生命技术有限公司;AxyPre聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)清洁试剂盒 美国爱思进公司;RStool DNA试剂盒 美国Omega公司。

1.2 仪器与设备

ReadMax 1900全波长扫描酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司;K9840型自动凯式定氮仪 海能未来技术集团股份有限公司;LDZX-50 KBS型立式高压蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂;SW-CJ-1FD型无菌操作台 苏州净化设备有限公司;SPX-250BIII型恒温培养箱 天津泰斯特仪器有限公司;Centrifuge 5424型常温离心机 德国Eppendorf公司;Microfuge R 22R Centrifuge冷冻离心机 上海鹏仪电子科技有限公司;A200型PCR仪 杭州朗基科学仪器有限公司;MiSeq测序仪 美国Illumina公司;Tanon EPS300型电泳仪、Tanon-2500型凝胶成像仪 上海天能公司。

1.3 方法

1.3.1 高通量测序

DNA提取:采用E.Z.N.A. Soil DNA Kit试剂盒提取泡椒凤爪样品中细菌总DNA。并通过琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,同时采用紫外分光光度计对DNA进行定量。

PCR扩增:利用16S rDNA V3~V4区引物341F~805R进行扩增。PCR扩增体系总体积为25 μ L,其中包含25 ng模板DNA,2 \times Taq master Mix 12.5 μ L,上下游引物各2.5 μ L, ddH₂O补齐至25 μ L。PCR扩增条件为:98 $^{\circ}$ C预变性30 s; 98 $^{\circ}$ C变性10 s, 54 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 32个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C保存。取PCR产物10 μ L用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,将检测合格样品送至杭州联川生物技术有限公司进行高通量测序。

数据处理:对下机数据首先根据样品的条形码(barcode)信息对数据进行拆分,再根据双端序列的重叠(overlap)关系,将序列拼接成长的tags,并将序列上建库引入的barcode和引物序列去除。使用Vsearch(V2.3.4)软件过滤掉质量值低的序列以及嵌合体序列^[10],再将具有97%以上相似性的序列分配给相同的可操作

分类单元 (operational taxonomic units, OTU)。每个OTU选择代表性序列, 然后使用核糖体数据库项目 (ribosomal database project, RDP) 分类器将数据归类到每个代表性序列^[11]。利用MAFFT (V7.310) 软件对不同类群优势种群的差异进行多序列比对, 研究不同OTU间的系统发育关系。以Chao1指数、Shannon指数、Simpson指数和Observed OTUs为指标, 用QIIME (1.8.0版) 计算所有样品的各项指标并进行聚类, 再通过 α 及 β 多样性分析单个样本中物种的多样性以及样本间菌群结构之间的差异^[12-13], 根据每个OTU代表序列与RDP数据库和Unite数据库的比对, 得到各个样本所有OTU的物种注释, 对OTU进行物种分类统计后获得门水平和属水平上的物种丰度。

1.3.2 优势腐败菌分离鉴定

取泡椒凤爪样品25 g于225 mL生理盐水中, 充分振荡摇匀, 并进行梯度稀释。取合适稀释梯度的菌悬液100 μ L涂布至PCA培养基上, 放置于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24~48 h, 挑选平板中的不同形态典型菌落, 在平板上划线2~3次, 直至得到纯化的单个菌落。挑取单菌落, 进行革兰氏染色镜检观察。并对菌种进行DNA提取, 使用细菌通用引物 (27F: 5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行扩增测序, 将所得序列在NCBI上进行序列比对。

1.3.3 优势腐败菌酶活性测定

按1%的接种量将种子液接种到液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、140 r/min培养48 h后, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min离心10 min后取上清液, 即为粗酶液。

蛋白酶活性: 参照GB/T 23527—2009《蛋白酶制剂》中的福林-酚法进行测定。

脂肪酶活性: 参照GB/T 23535—2009《脂肪酶制剂》进行测定。

1.3.4 优势腐败菌致腐能力测定

1.3.4.1 菌悬液制备与接种

供试腐败菌菌株接种于PCB培养基中37 $^{\circ}$ C培养12 h, 用无菌生理盐水将其浓度调至 10^7 CFU/mL。

将泡椒凤爪样品分为6组。4个处理组: 分别吸取0.5 mL腐败菌菌液, 接种至装有10 g无菌样品的真空塑封袋中, 真空包装, 放置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中贮藏; 对照组1: 吸取0.5 mL无菌水, 接种至装有10 g无菌样品的真空塑封袋中, 真空包装, 放置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中贮藏; 对照组2: 吸取0.5 mL无菌水, 接种至装有10 g无菌样品的真空塑封袋中, 真空包装, 放置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中贮藏。在贮藏1个月时, 处理组样品均出现溶烂腐败现象, 对其进行理化指标测定。

1.3.4.2 pH值测定

使用pH计 (Testo 205) 插入泡椒凤爪中测定其pH值。

1.3.4.3 挥发性盐基氮 (total volatile basic nitrogen, TVB-N) 值测定

参照GB 5009.228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》进行测定。

1.3.4.4 硫代巴比妥酸反应物 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 值测定

参照GB 5009.181—2016《食品中丙二醛的测定》进行测定。

1.4 数据处理与分析

理化指标数据为3次平行实验的平均值, 细菌群落数据分析均有4个生物学重复, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过SPSS 26.0进行单因素方差分析 (ANOVA) 后进行Duncan多重比较, $P < 0.05$ 时均值差异显著。采用Origin 2021和Excel绘制数据图。使用MEGA-X软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 高通量测序法分析优势腐败菌

2.1.1 α 多样性分析

α 多样性通常用来表示样品微生物群落组成的丰富度和多样性^[14]。Observed OTUs和Chao1指数用来反映物种丰富度, 而Simpson指数和Shannon指数主要反映物种多样性^[15]。由表1可知, 所有样品的覆盖率均达到0.99以上, 说明本次测序的结果能代表样品中细菌群落组成的真实情况。新鲜样品 (ZC0921) 的Observed OTUs和Chao1指数比大部分异常样品高, 说明溶烂样品中的细菌群落种类相较正常样品下降。同时, 异常样品中的Simpson指数和Shannon指数较低, 可能是优势腐败菌抑制了其他微生物的增殖。江杨阳等^[16]在小龙虾腐败实验中发现, 贮藏时间延长, 微生物种类降低, 与本研究结果相似。

表1 泡椒凤爪样品细菌 α 多样性比较

Table 1 Comparison of bacterial α diversity of chicken feet with pickled peppers

样品	Observed OTUs	Shannon指数	Simpson指数	Chao1指数	覆盖率
ZC0921	338.75 \pm 46.49	2.70 \pm 0.06	0.49 \pm 0.01	339.88 \pm 47.65	1.00 \pm 0.00
YC0921	452.50 \pm 84.38	5.93 \pm 0.17	0.89 \pm 0.01	453.69 \pm 85.14	1.00 \pm 0.00
YC0917	269.25 \pm 62.33	2.62 \pm 0.36	0.48 \pm 0.04	269.95 \pm 62.78	1.00 \pm 0.00
YC0811	15.00 \pm 5.42	0.28 \pm 0.01	0.09 \pm 0.00	15.19 \pm 5.42	1.00 \pm 0.00
YC0729	22.25 \pm 4.11	0.45 \pm 0.01	0.12 \pm 0.00	22.40 \pm 4.16	1.00 \pm 0.00
YC0623	67.50 \pm 32.95	1.12 \pm 0.06	0.39 \pm 0.00	68.60 \pm 33.88	1.00 \pm 0.00
YC0610	64.00 \pm 30.23	0.84 \pm 0.05	0.29 \pm 0.01	65.15 \pm 31.08	1.00 \pm 0.00
YC0507	161.50 \pm 39.95	0.66 \pm 0.09	0.15 \pm 0.01	165.09 \pm 39.85	1.00 \pm 0.00
YC0411	82.25 \pm 32.44	0.94 \pm 0.06	0.26 \pm 0.01	83.52 \pm 33.64	1.00 \pm 0.00

2.1.2 细菌群落组成分析

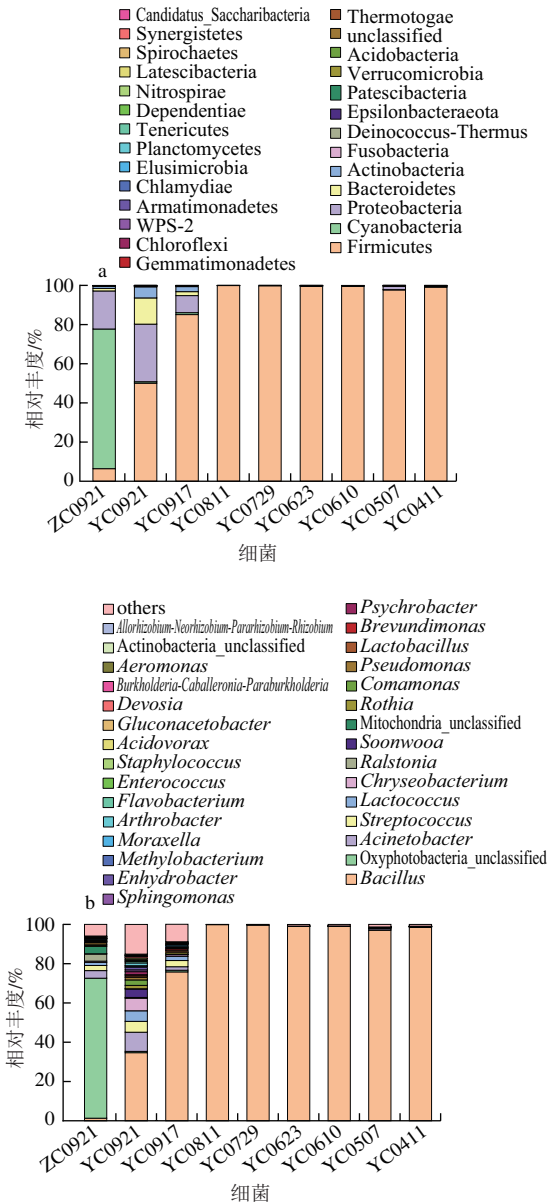


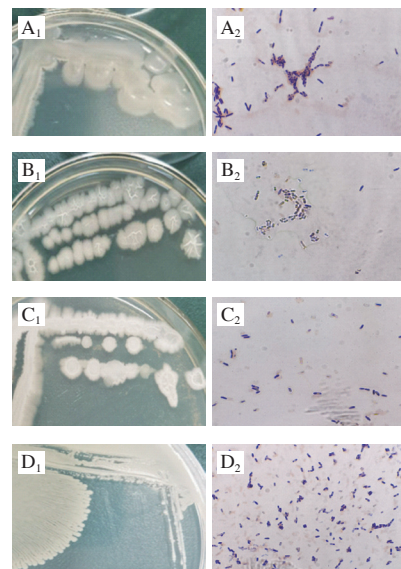
图1 泡椒凤爪样品细菌在门(a)及属水平(b)群落组成
 Fig. 1 Bacterial community composition at the phylum (a) and genus (b) levels in chicken feet with pickled peppers

如图1a所示，溶烂泡椒凤爪样品（YC0411、YC0507、YC0610、YC0623、YC0729、YC0811、YC0917、YC0921）中的优势腐败菌门为厚壁菌门（Firmicutes），而正常样品（ZC0921）中的优势菌门为蓝藻菌门（Cyanobacteria）。YC0921中的厚壁菌门相对丰度在所有异常样品中最低（50.08%），其次为YC0917（85.10%），而2020年8月11日前的样品（YC0411~YC0811）厚壁菌门相对丰度均大于95%，说明随着贮藏时间延长，优势腐败菌门逐渐占据主导地位。

泡椒凤爪样品中细菌群落在属水平上的组成情况如图1b所示。正常样品ZC0921中的优势菌属为Oxyphotobacteria_unclassified（71.27%），Oxyphotobacteria属于蓝藻菌门（Cyanobacteria），其广泛分布于湖泊、土壤等生态环境中^[17]，因此Oxyphotobacteria_unclassified可能来源于环境中。而异常样品中的优势菌属为芽孢杆菌属（Bacillus），YC0921中不动杆菌属（Acinetobacter）、链球菌属（Streptococcus）等也具有相对较高的相对丰度。随着贮藏时间延长（生产时间越早），芽孢杆菌属的相对丰度增加（从34.68%增加至99.90%），而其他细菌属的相对丰度均下降，说明芽孢杆菌属为导致样品溶烂的主要腐败微生物，其抑制了其他微生物生长，使样品中的微生物种类呈降低趋势^[16]。芽孢杆菌属被确定为多种肉制品中的腐败菌，如鲍鱼^[18-19]和盐水鹅^[20]。泡椒凤爪产生溶烂现象可能是由于芽孢杆菌具有产蛋白酶和脂肪酶活性^[21]，导致泡椒凤爪中蛋白质和脂肪降解。

2.2 优势腐败菌的分离鉴定

根据高通量测序结果，对溶烂泡椒凤爪样品的潜在腐败菌进行分离纯化，共得到4株典型菌株，其菌落形态及菌体形态如图2所示。菌株623-4表面隆起，质地黏稠；菌株811-2表面扁平有褶皱；菌株917-1表面干燥凸起，有褶皱，边缘不规则；菌株921-4表面光滑，呈放射状。4株菌株革兰氏染色均为阳性，呈杆状，有芽孢。



A~D.菌株623-4、811-2、917-1、921-4；
 下标1、2.分别为菌落形态和菌体形态。

图2 分离菌株的菌落形态及其菌体形态（×100）
 Fig. 2 Colony morphology and cell morphology of the isolated strains (× 100)

根据16S rDNA建立系统发育树（表2），可知菌株623-4为甲基营养型芽孢杆菌（B. methylotrophicus

L01), 相似度达98%; 菌株811-2为贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis* strain 2586), 相似度达96%; 菌株917-1为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* isolate BS-1), 相似度达100%; 菌株921-4为沙福芽孢杆菌 (*B. safensis* strain HNS004), 相似度达98%。

表2 分离菌株的16S rDNA鉴定结果

Table 2 Results of 16S rDNA identification of the isolates

菌株编号	鉴定结果	相似度/%
623-4	<i>B. methylophilicus</i> L01	98
811-2	<i>B. velezensis</i> strain 2586	96
917-1	<i>B. subtilis</i> isolate BS-1	100
921-4	<i>B. safensis</i> strain HNS004	98

2.3 优势腐败菌的酶活特性

对优势腐败菌株进行蛋白酶及脂肪酶活测定。结果显示, 所有菌株均具有一定的蛋白酶及脂肪酶活性(图3)。菌株921-4蛋白酶活性最强(51.19 U/mL), 其次为623-4(28.81 U/mL)、917-1(7.36 U/mL)和811-2(5.20 U/mL)。而脂肪酶活性最强的菌株为623-4(3.75 U/mL), 其次为811-2(2.92 U/mL), 921-4(2.83 U/mL)和917-1(2.08 U/mL)。研究表明, 芽孢杆菌通常具有较高的产蛋白酶能力^[22]。曹红等^[23]从鲑鱼中筛选出1株蛋白酶活性高达(257.67±2.44) U/mL的甲基营养型芽孢杆菌。沙福芽孢杆菌在优化的发酵培养基中蛋白酶活可达69.26 U/mL^[24]。此外, 芽孢杆菌也是重要的产脂肪酶菌株^[25], 徐伟芳等^[26]从土壤中筛选出的甲基营养型芽孢杆菌在最适条件下脂肪酶活性达21.22 U/mL。本研究分离得到的4株菌可能对泡椒凤爪中的蛋白质和脂肪均具有一定的降解作用。因此, 将分离菌株接种于泡椒凤爪中, 进一步验证其对泡椒凤爪的致腐能力。

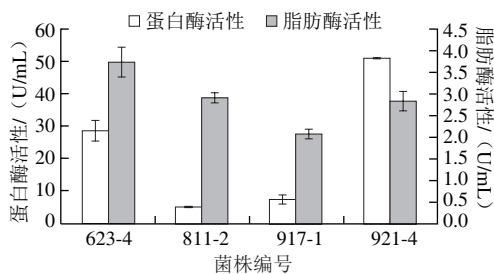


图3 不同菌株的蛋白酶及脂肪酶活性比较

Fig. 3 Comparison of protease and lipase activity of the isolates

2.4 优势腐败菌对泡椒凤爪的致腐性验证

通常, 微生物代谢会产酸或产碱性物质, 因此pH值是评价食品品质的一个重要指标^[27]。由表3可知, 接种不同腐败菌株的泡椒凤爪样品组pH值均高于C组(37 °C贮藏空白对照), 说明4株菌均具有一定的致腐能力, 其分泌的酶类物质可以降解泡椒凤爪中的蛋白质产生氨基酸、胺类等碱性物质^[28-29]。

TVB-N值升高主要是由于微生物和内源酶作用于蛋白质产生氨、胺类等挥发性含氮物质^[27]。4个处理组的TVB-N值均高于同样贮藏温度下的对照C组(表3), 表明4株芽孢杆菌均对泡椒凤爪具有一定的致腐能力。郑瑞生等^[18]研究发现蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*) 可以分解鲍鱼中的蛋白质而导致贮藏18 d TVB-N值达到362.32 mg/100 g。接种623-4菌株的泡椒凤爪TVB-N值最高(25.10 mg/100 g), 接种811-2菌株的样品TVB-N值最低(12.08 mg/100 g)。尽管921-4菌株产蛋白酶能力最强, 但接种921-4菌株的样品TVB-N值并不高(18.57 mg/100 g), 这可能是由于921-4菌株在凤爪中生长能力较弱导致的。张若煜^[30]和Wang Guangyu^[31]等研究亦发现具有较强蛋白酶活性的假单胞菌在肉中生长能力较低, 使TVB-N值较低, 与本研究结果相似。此外, C组(6.50 mg/100 g)的TVB-N值比N组(-20 °C贮藏空白对照)(3.13 mg/100 g)高, 可能是泡椒凤爪中的内源酶降解蛋白质导致, 说明低温可以抑制蛋白质的降解。

油脂中的多不饱和脂肪酸氧化分解会产生醛、酮等物质, 其衍生物丙二醛(malondialdehyde, MDA)通常被用来表示脂质氧化程度^[32]。TBARS值越大, 说明MDA含量越高, 脂质氧化程度也越高^[33]。由表3可知, 811-2组(0.83 mg/kg)和623-4组(0.82 mg/kg)的TBARS值最高, 而917-1组(0.41 mg/kg)的TBARS值比C组(0.45 mg/kg)略低, 表明菌株917-1对泡椒凤爪脂质氧化的影响较小, 与体外脂肪酶活性实验(图3)结果一致。有研究表明, 肉制品的品质在TBARS值大于0.6 mg/kg时会发生变化^[34], 产生不愉悦的氧化风味^[35], 因此菌株623-4、811-2和921-4对泡椒凤爪的品质均有一定的影响, 可能导致产品脂肪降解并产生异味。C组(0.45 mg/kg)的TBARS值比N组(0.33 mg/kg)高, 这可能是由于低温抑制了脂肪氧化^[36]。

表3 接种不同腐败菌的泡椒凤爪理化指标

Table 3 Physicochemical properties of chicken feet with pickled peppers inoculated with each of the spoilage bacteria

指标	菌株编号				C	N
	623-4	811-2	917-1	921-4		
pH	5.28±0.01 ^e	5.48±0.01 ^d	5.43±0.01 ^b	5.16±0.01 ^d	5.04±0.01 ^e	5.01±0.01 ^f
TVB-N值/(mg/100 g)	25.10±0.39 ^a	12.08±0.50 ^f	19.59±0.29 ^b	18.57±1.60 ^b	6.50±0.23 ^d	3.13±0.39 ^f
TBARS值/(mg/kg)	0.82±0.01 ^e	0.83±0.01 ^e	0.41±0.01 ^f	0.64±0.02 ^b	0.45±0.06 ^c	0.33±0.02 ^f

注: C表示37 °C贮藏空白对照; N表示-20 °C贮藏空白对照。同行不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 结论

本研究通过高通量测序技术与传统培养法对溶烂泡椒凤爪样品进行菌相分析及腐败菌分离, 发现溶烂

泡椒凤爪中的优势菌属为芽孢杆菌属, 优势菌株为甲基营养型芽孢杆菌623-4、贝莱斯芽孢杆菌811-2、枯草芽孢杆菌917-1、沙福芽孢杆菌921-4。菌株921-4蛋白酶活性最强(51.19 U/mL), 而菌株623-4脂肪酶活性最强(3.75 U/mL)。此外, 将4株菌分别接种于泡椒凤爪中, 测定样品的pH值、TVB-N值和TBARS值判断其致腐能力。结果表明, 分离得到的4株菌均具有一定的致腐能力, 其中菌株811-2对泡椒凤爪的pH值(5.48)和TBARS值(0.83 mg/kg)影响最大, 菌株623-4对泡椒凤爪TVB-N值(25.10 mg/kg)影响最大。

参考文献:

- [1] 何江红, 丁捷, 陈祖明, 等. 超声辅助提取香辛料对泡椒凤爪保鲜效果的影响[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 68-72. DOI:CNKI:SUN:SPGY.0.2015-11-023.
- [2] 唐春红, 欧阳晚秋, 蒋祖福, 等. 无辐照无双氧水泡椒凤爪新工艺研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 205-209. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.038.
- [3] 吴海虹, 王新新, 刘芳, 等. 泡椒凤爪中解脂耶氏酵母的分离鉴定及生长特性分析[J]. 现代食品科技, 2014, 30(11): 84-88; 64. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.016.
- [4] 李淑荣, 冯敏, 李澧, 等. 辐照对泡椒凤爪在货架期中的营养品质的影响[J]. 核农学报, 2013, 27(10): 1490-1494. DOI:10.11869/hnxb.2013.10.1490.
- [5] 崔龄文, 赵鹏, 周玲. 几种天然保鲜剂对泡椒凤爪保质期的影响[J]. 食品工业, 2011, 32(4): 25-27. DOI:CNKI:SUN:SPGY.0.2011-04-009.
- [6] 杨琴. 泡椒凤爪中兼性厌氧产气微生物的分离、鉴定与控制研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016: 1.
- [7] 马含笑. 真空包装熟肉制品中兼性厌氧污染微生物生物防腐技术的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2011: 1.
- [8] LIU X C, HUANG Z, JIA S L, et al. The roles of bacteria in the biochemical changes of chill-stored bighead carp (*Aristichthys nobilis*): proteins degradation, biogenic amines accumulation, volatiles production, and nucleotides catabolism[J]. Food Chemistry, 2018, 255: 174-181. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.02.069.
- [9] 王筱梦, 孙芝兰, 诸永志, 等. 羊肉屠宰加工场主要污染菌的分布及其对熟制羊肉的致腐能力[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 261-267. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201716042.
- [10] 胡旺, 陈梦娟, 尹含靓, 等. 利用Illumina MiSeq测序技术分析浏阳霉豆腐制作过程中微生物变化[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(24): 265-270. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028253.
- [11] BLAXTER M, MANN J, CHAPMAN T, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2005, 360: 1935-1943. DOI:10.1098/rstb.2005.1725.
- [12] 陈浩, 何国庆. 乳酸菌对发酵豆制品品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12): 4516-4523. DOI:10.3969/j.issn.2095-0381.2017.12.003.
- [13] SUL W J, COLE J R, JESUS E D C, et al. Bacterial community comparisons by taxonomy-supervised analysis independent of sequence alignment and clustering[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(35): 14637-14642. DOI:10.1073/pnas.1111435108.
- [14] 周慧, 盖园明, 徐超, 等. 基于16S rDNA测序及培养基法探究虹鳟鱼贮藏优势腐败菌[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 25-32. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2021.01.004.
- [15] 程伟, 陈雪峰, 陈兴杰, 等. 基于高通量测序解析浓香型大曲真菌群落结构及其与质量指标的关联性分析[J]. 食品与发酵工业, 2022(22): 194-200; 212. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030854.
- [16] 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, 2019, 40(16): 130-136. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180718-229.
- [17] FALKOWSKI P G. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production[J]. Science, 1998, 281: 200-206. DOI:10.1126/science.281.5374.200.
- [18] 郑瑞生, 邹菊琴, 金兴珏, 等. 即食鲍鱼特定腐败菌的鉴定及其致腐能力研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 307-312. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.07.037.
- [19] 郑瑞生, 曹丽娜, 庄端宁. 即食鲍鱼腐败过程蛋白特性的变化[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 142-146. DOI:CNKI:SUN:SSPJ.0.2019-03-025.
- [20] 王虎虎, 董洋, 李诺, 等. 真空包装盐水鹅贮藏期菌群多样性动态分析[J]. 中国食品学报, 2017, 17(4): 258-264. DOI:10.16429/j.1009-7848.2017.04.031.
- [21] 游龙, 韩茵, 张凯, 等. 芽孢杆菌产胞外酶的活性分析及其对凡纳滨对虾的作用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(3): 80-87. DOI:10.16441/j.cnki.hdx.20160404.
- [22] BARZKAR N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 1216-1229. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072.
- [23] 曹红, 王秀娟, 翁佩芳, 等. 海洋源蛋白酶产生菌筛选及酶学特性的初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(2): 93-100. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2019.02.014.
- [24] 刘程程. 芽孢杆菌几种重要酶的酶学特性分析[D]. 福建: 福建农林大学, 2014: 1.
- [25] 多拉娜, 徐伟良, 李春冬, 等. 产脂肪酶微生物的研究进展及其在食品中的应用[J]. 粮食与油脂, 2020, 33(10): 8-10. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2020.10.004.
- [26] 徐伟芳, 黄涛杨, 周敏, 等. 一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定及其酶学性质研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(5): 62-69. DOI:10.13718/j.cnki.xdzk.2017.05.010.
- [27] 顾春涛, 毕伟伟, 朱茉莉. 冷鲜牛肉贮藏中菌群结构及优势菌致腐性的分析[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 76-82. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180925-263.
- [28] 王晓霞, 徐宁, 秦晓杰, 等. 不同贮藏温度泡椒凤爪品质变化及货架期预测[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 315-321. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201322064.
- [29] 冯豪杰, 蓝蔚青, 臧一字, 等. 优势腐败菌对暗纹东方鲀冷藏期间品质变化影响及致腐能力分析[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 1191-1197. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210131-363.
- [30] 张若煜, 罗欣, 朱立贤, 等. 牛肉源假单胞菌的分离鉴定及菌株致腐能力差异比较[J]. 现代食品科技, 2022, 38(3): 115-124. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0523.
- [31] WANG G Y, WANG H H, HAN Y W, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken *in vitro* and *in situ*[J]. Food Microbiology, 2017, 63: 139-146. DOI:10.1016/j.fm.2016.11.015.
- [32] 柴子惠, 李洪军, 李少博, 等. 低盐腊肉贮藏期间菌相和理化性质的变化[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 201-206. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180615-309.
- [33] PIGNOLI G, BOU R, RODRIGUEZ-ESTRADA M T, et al. Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat[J]. Meat Science, 2009, 83(3): 412-416. DOI:10.1016/j.meatsci.2009.06.019.
- [34] 岑南香, 刘宸成, 陈姑, 等. 低温等离子体处理对羊肉脂质与蛋白质氧化性质的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 85-93. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2021100306.
- [35] GREENE B E, CUMUZE T H. Relationship between TBA numbers and inexperienced panelists' assessments of oxidized flavor in cooked beef[J]. Journal of Food Science, 2010, 47(1): 52-54. DOI:10.1111/j.1365-2621.1982.tb11025.x.
- [36] TAN W, SHELEF L A. Effects of sodium chloride and lactates on chemical and microbiological changes in refrigerated and frozen fresh ground pork[J]. Meat Science, 2002, 62(1): 27-32. DOI:10.1016/S0309-1740(01)00223-6.