

# 冷藏过程中气调包装烧鸡的理化特性及腐败菌分析

张莉, 马云昊, 王颖\*, 徐宝才\*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘要:** 为探究气调包装烧鸡冷藏过程中的理化特性和微生物多样性及其动态变化, 本实验将高通量测序技术与传统分离鉴定方法相结合, 以烧鸡为研究对象, 研究气调包装 (25% CO<sub>2</sub>/75% N<sub>2</sub>) 烧鸡在4 °C贮藏10 d过程中理化指标和微生物的变化。结果表明, 贮藏期间烧鸡中挥发性盐基氮含量和菌落总数呈显著上升趋势 ( $P < 0.05$ ); pH值在贮藏后期显著下降 ( $P < 0.05$ ); 硫代巴比妥酸反应物值在贮藏末期趋向平稳 ( $P > 0.05$ ), 这些变化与气调包装中气体成分有关。烧鸡微生物物种丰富度在贮藏初期最高, 随后逐渐下降。在贮藏初期, 肠杆菌属 (*Enterobacteriaceae*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的相对丰度较高; 在贮藏中后期, 魏斯氏菌属 (*Weissella*) 和肠杆菌属相对丰度较高。魏斯氏菌属、肠杆菌属、乳球菌属 (*Lactococcus*) 和明串珠菌属 (*Leuconostoc*) 的相对丰度在贮藏期间逐渐增加, 具有生长优势。从MAP烧鸡中分离鉴定出6株腐败菌, 分别为弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、沙福芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*)、哈夫尼菌属 (*Hafnia* sp.)、肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.) 和液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*), 这些腐败菌是使烧鸡在气调包装条件下发生腐败的主要原因。

**关键词:** 烧鸡; 气调包装; 高通量测序; 腐败菌; 微生物多样性

## Physicochemical Characteristics and Spoilage Bacteria of Modified Atmosphere Packaged Braised Chicken during Refrigeration

ZHANG Li, MA Yunhao, WANG Ying\*, XU Baocai\*

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** In order to explore dynamic changes in the physicochemical characteristics and microbial diversity of modified atmosphere packaged braised chicken during refrigeration, high-throughput sequencing technology and traditional isolation and identification methods were combined to study the physical and microbial changes of modified atmosphere packaged (25% CO<sub>2</sub>/75% N<sub>2</sub>) braised chicken during storage at 4 °C for 10 days. The results showed that total volatile basic nitrogen (TVB-N) content and total bacterial count increased significantly during storage ( $P < 0.05$ ). pH decreased significantly in the late storage period ( $P < 0.05$ ). Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels tended to be stable at the end of storage ( $P > 0.05$ ). These changes were related to the gas composition in modified atmosphere packaging. The microbial species richness of braised chicken was the highest at the early stage of storage, and then decreased gradually. At the initial stage of storage, the relative abundance of *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* and *Aeromonas* were high. At the middle and late stages of storage, the relative abundance of *Weissella* and *Enterobacter* were high. The relative abundance of *Weissella*, *Enterobacter*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* increased gradually during the whole storage period and their growth was dominant. Six species of spoilage organisms were isolated and identified, namely, *Lactobacillus curvatus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus safensis*, *Serratia liquefaciens*, *Hafnia* sp. and *Enterobacter* sp., which could be the major causes of the rot of braised chicken under modified atmosphere packaging conditions.

**Keywords:** braised chicken; modified atmosphere packaging; high-throughput sequencing; spoilage bacteria; microbial diversity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220914-122

中图分类号: TS251.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 15-0188-08

收稿日期: 2022-09-14

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2019YFC1605903);

中央高校基本科研业务费专项资金项目 (JZ2022HGQA0141); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32102035)

第一作者简介: 张莉 (1996—) (ORCID: 0000-0002-8193-5718), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉品加工与质量控制。

E-mail: zhangli330113@163.com

\*通信作者简介: 王颖 (1988—) (ORCID: 0000-0001-7073-3654), 女, 讲师, 博士, 研究方向为肉品科学。

E-mail: wywendy8899@126.com

徐宝才 (1973—) (ORCID: 0000-0002-0706-8863), 男, 研究员, 博士, 研究方向为肉品加工与质量控制。

E-mail: baocaixu@163.com

引文格式:

张莉, 马云昊, 王颖, 等. 冷藏过程中气调包装烧鸡的理化特性及腐败菌分析[J]. 食品科学, 2023, 44(15): 188-195.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220914-122. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Li, MA Yunhao, WANG Ying, et al. Physicochemical characteristics and spoilage bacteria of modified atmosphere packaged braised chicken during refrigeration[J]. Food Science, 2023, 44(15): 188-195. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220914-122. <http://www.spkx.net.cn>

酱卤肉制品营养丰富, 风味独特, 深受消费者喜爱<sup>[1-2]</sup>。为保持产品的营养价值和良好口感, 工厂在制作过程中加热温度较低, 而较低温度仅杀死部分耐热性低的细菌, 导致产品易腐败, 保质期短, 这限制了酱卤肉制品的产品质量和销售范围。据联合国粮食及农业组织统计, 全球因食品腐败造成的浪费约占产出的1/3<sup>[3]</sup>。食品腐败除会造成资源浪费, 还会对食品安全带来威胁。因此, 研究不同食品的腐败微生物对控制其腐败变质具有重要意义<sup>[4]</sup>。

微生物污染是食品腐败变质的最根本原因, 酱卤肉制品中的微生物主要是在原材料和卤制完成后的冷却、包装及贮存过程中引入。目前, 许多学者对酱卤肉制品中的腐败菌做了广泛研究。德州扒鸡的主要腐败菌有假单胞菌属、肠杆菌属、葡萄球菌属和乳酸菌属<sup>[5]</sup>; 气调包装狮子头的菌群结构主要由芽孢杆菌属、假单胞菌属、链球菌属、不动杆菌属、热杀索丝菌属、肠杆菌属、乳酸菌属以及嗜冷杆菌属组成<sup>[6]</sup>; 金黄色葡萄球菌、暹罗芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌是笋子烧牛肉中的优势腐败菌<sup>[7]</sup>。前期研究方法主要基于传统的分离培养。传统微生物培养方法肉眼可见酱卤肉制品中微生物数量的变化, 但只适用于可培养的微生物, 如乳酸菌、霉菌和酵母菌等。由于许多微生物无法培养, 因此传统培养方法受到很大限制<sup>[8]</sup>。近年来, 高通量测序技术发展较快, 其具有通量高、成本低、准确率高等优点, 可作为微生物研究的免培养方法之一, 在微生物研究领域得到广泛应用<sup>[9-10]</sup>。

烧鸡是典型的酱卤肉制品, 卤制后的冷却和包装工序容易引入微生物, 造成烧鸡产品的二次污染。微生物的大量繁殖会导致产品货架期缩短, 所以卤制后的杀菌和包装工艺过程对烧鸡的货架期有很大影响<sup>[11]</sup>。气调包装(modified atmosphere packaging, MAP)是一种通过控制充入高阻隔性包装中的气体比例达到延长肉制品货架期目的的保鲜包装方式, 常用的气体有O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>。CO<sub>2</sub>可以抑制假单胞菌属、气单胞菌属、莫拉氏菌属和灰杆菌属等常见肉制品腐败菌的生长, 从而延长产品的保质期, N<sub>2</sub>一般充当填充气体<sup>[12-13]</sup>。近年来MAP已逐渐用于熟肉制品的贮藏, 能够解决高温高压灭菌等传统方法造成的食品品质下降等问题, 在肉品行业被广泛应用, 是肉制品保鲜的重要方法之一<sup>[14]</sup>。与托盘包装相比, MAP避免了产品与外界空气接触, 且充入的气体能有效

延长保质期; 相比于真空包装, MAP不会对产品造成挤压, 从而能够保持产品良好的口感品质。MAP可解决产品短期贮藏销售过程中产品质量劣变等问题<sup>[15-16]</sup>。

本研究选取烧鸡为研究对象, 旨在研究MAP烧鸡在贮藏过程中的理化特性变化, 通过高通量测序技术分析烧鸡在低温贮藏过程中微生物菌群的多样性和动态变化; 在此基础上通过传统微生物培养对腐败菌分离鉴定, 从而明确MAP烧鸡的腐败菌。旨在为烧鸡腐败变质的控制提供技术参考, 也为进一步研究MAP保鲜机制提供理论支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

烧鸡购于安徽省宿州市徽香源食品有限公司。

TG261750 PP气调保鲜盒 上海特冠包装材料有限公司; 乳酸菌MRS (Man Rogosa Sharpe) 选择性培养基、结晶紫中性红胆盐葡萄糖琼脂(violet red bile glucose agar, VRBGA)培养基、平板计数琼脂(plate count agar, PCA)培养基、假单胞菌CFC选择性培养基、葡萄球菌BP (Baird-Parker) 琼脂基础选择性培养基 青岛海博生物技术有限公司; 氯化钠、氯化钾、氧化镁、硼酸、溴甲酚绿、甲基红、琼脂糖(均为化学纯) 国药集团化学试剂(上海)有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)、引物、Phusion Master Mix (2×)、TAE电泳缓冲液生工生物工程(上海)有限公司; E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 美国BioTek公司; AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒 美国Axygen Biosciences公司; NEXTflex® Rapid DNA-Seq Kit 美国Bio Scientific公司。

### 1.2 仪器与设备

pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; SW-CJ-1FD超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; SCIENTZ-09无菌均质器 宁波新芝生物科技股份有限公司; YX280手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器 上海三申医疗器械有限公司; DL-410K气调包装机 大江机械设备有限公司; GeneAmp® 9700聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 美国ABI公司; Quantus™荧光计 美国Promega公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品处理

烧鸡卤煮冷却后,取24只同一批次烧鸡(每只约600 g)作为样品,每只烧鸡单独放入锁鲜盒中进行MAP(25% CO<sub>2</sub>/75% N<sub>2</sub>),然后放入冰盒中,加入冰袋,立即运至实验室,4℃贮藏。在贮藏0、2、4、6、8、10 d取样进行指标测定,每个时间点样品均设4个平行。取贮藏时间为0、4、8 d的样品分别记为Q0(初期)、Q4(中期)和Q8(末期)进行高通量测序。

#### 1.3.2 MAP烧鸡低温贮藏期间理化指标的测定

##### 1.3.2.1 pH值测定

根据GB 5509.237—2016《食品安全国家标准 食品pH值的测定》的方法,选取鸡胸肉和鸡腿肉(不含皮)部位若干小块切碎混合并称质量,按1:10(m/V)加入0.9 g/100 mL氯化钾溶液,用均质器进行均质,过滤,滤液用pH计测定,得到烧鸡pH值。

##### 1.3.2.2 挥发性盐基氮含量测定

根据GB 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并稍作修改,使用全自动凯氏定氮仪测定烧鸡的挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)含量。选取鸡胸肉和鸡腿肉(不含皮)切碎混合均匀,称取10 g加入100 mL蒸馏水,超声15 min。取10 mL液体与10 mL MgO悬液(0.01 g/mL)混合,然后使用全自动凯氏定氮仪测定。根据0.01 mol/L盐酸溶液的消耗量计算TVB-N含量,单位为mg/100 g。

##### 1.3.2.3 硫代巴比妥酸反应物值测定

将鸡胸肉和鸡腿肉(去皮)部分切碎混合均匀,称取10 g,根据Chen Xue等<sup>[17]</sup>的方法使用分光光度法测定硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)值。

##### 1.3.3 微生物计数

每种细菌计数操作按照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》进行。菌落总数(total viable counts, TVC)和乳酸菌分别采用PCA和MRS培养基,分别在正常和厌氧环境下于37℃培养48 h。肠杆菌科细菌和葡萄球菌分别采用VRBGA和MSA培养基,在37℃下培养48 h。假单胞菌在假单胞菌CFC选择性培养基上25℃培养48 h<sup>[5]</sup>。结果以每克烧鸡中所含的细菌总数表示(lg(CFU/g))。

##### 1.3.4 高通量测序

###### 1.3.4.1 样本收集

选取Q0(初期)、Q4(中期)和Q8(末期)鸡胸肉和鸡腿肉(带皮)2 g切碎混合,进行后续实验。

###### 1.3.4.2 DNA抽提和PCR扩增

根据试剂盒说明书进行微生物群落总DNA抽提,使用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量,使用超微量分光光度计测定DNA质量浓度和纯度;使用338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA基因V3~V4可变区进行PCR扩增,扩增程序如下:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,27个循环;然后72℃稳定延伸10 min,最后在4℃保存。PCR反应体系为:5×Trans Start FastPfu缓冲液4 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、上游引物(5 μmol/L)0.8 μL、下游引物(5 μmol/L)0.8 μL、TransStart FastPfu DNA聚合酶0.4 μL、模板DNA 10 ng,高纯水补足至20 μL。每个样本3个重复。

###### 1.3.4.3 Illumina Miseq测序

将同一样本的PCR产物混合后使用2%琼脂糖凝胶回收PCR产物,利用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒进行回收产物纯化,2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用荧光计对回收产物进行检测定量。使用NEXTflex® Rapid DNA-Seq Kit进行建库。具体步骤如下:接头链接;使用磁珠筛选去除接头自连片段;利用PCR扩增进行文库模板的富集;磁珠回收PCR产物得到最终的文库。送至上海美吉生物医药科技有限公司利用Miseq PE300平台(Illumina公司)完成测序。

##### 1.3.5 传统培养微生物的分离、纯化和鉴定

从1.3.3节中培养末期的平板中挑选典型菌落进行纯化培养,通过革兰氏染色、显微镜观察和生理生化实验筛选出目的单菌落进行后续实验。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取纯化菌株DNA。以提取的单菌落细菌DNA为模板,用细菌通用引物进行16S rDNA PCR扩增。扩增产物由生工生物工程(上海)有限公司测序,得到的16S rDNA基因序列与NCBI数据库中进行检索和BLAST比对。选取同源性高的相关菌株的16S rRNA序列作为参考对象,将同源性大于97%的序列归为同一种<sup>[18]</sup>。

#### 1.4 数据处理与分析

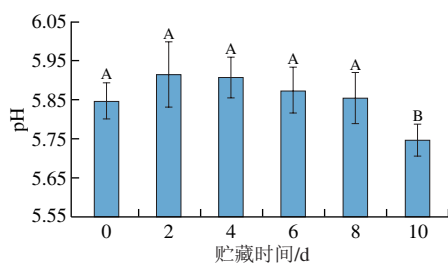
理化实验和微生物实验数据经4次平行实验后得到,结果表示为平均值±标准差。SPSS 17.0和Microsoft Excel 2010软件用于数据分析。高通量测序后,将原始测序数据按序列合并,利用QIIME软件和FLASH功能进行筛选,获得有效序列。为得到每个序列信息扩增序列变体(amplicon sequence variant, ASV)对应的物种分类信息,采用Classify-Sklearn(Naive Bayes)、Classify-Consensus-Vsearch(Vsearch)、Classify-Consensus-Blast(Blast)对ASV代表序列进行分类学分析,获得ASV在不同分类水平的注释信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 MAP烧鸡低温贮藏期间理化指标的变化

#### 2.1.1 pH值

由图1可知,在低温贮藏过程中,MAP烧鸡pH值在贮藏前期无明显变化,在贮藏后期(10 d)显著下降( $P<0.05$ )。这可能与MAP环境中,CO<sub>2</sub>逐渐溶解在水中形成碳酸,从而降低产品的pH值有关<sup>[19]</sup>。同时,微生物的生长繁殖也会影响pH值变化,从样品中分离出的弯曲杆菌等产酸微生物的大量繁殖会导致pH值降低<sup>[20]</sup>。贮藏前中期pH值无显著变化与微生物数量较少有关,其分解糖类物质能力较低,因此pH值变化不显著,贮藏后期微生物大量生长繁殖,消耗营养物质生成乳酸、醋酸等,从而导致pH值下降。



字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。图2、3同。

图1 MAP烧鸡冷藏过程中pH值的变化

Fig. 1 Changes in pH during refrigerated storage of MAP braised chicken

#### 2.1.2 TVB-N含量

如图2所示,MAP烧鸡在4℃贮藏期间TVB-N含量呈逐渐上升趋势。TVB-N通常用作蛋白质和胺降解的生物标志物<sup>[21]</sup>,也常被用作肉制品的腐败标志物。烧鸡经加热卤制后,内源酶已基本失活,TVB-N含量升高主要是微生物的生长繁殖导致。结合表1分析可知,烧鸡达到货架期终点(贮藏4 d)时,其TVB-N含量约为8.68 mg/100 g,随后随着微生物的生长繁殖,TVB-N含量快速升高。

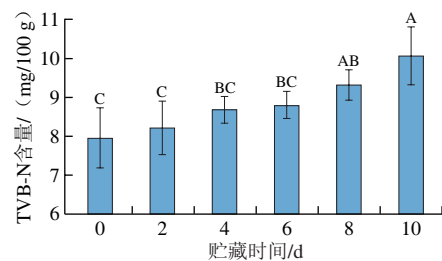


图2 MAP烧鸡冷藏过程中TVB-N含量的变化

Fig. 2 Changes in TVB-N value during refrigerated storage of MAP braised chicken

#### 2.1.3 MAP烧鸡冷藏过程中TBARS值的变化

肉制品的TBARS值反映了脂肪过氧化的程度。

由图3可知,贮藏前中期TBARS值随着贮藏时间的延长呈显著上升趋势( $P<0.05$ );贮藏后期TBARS值不再显著升高( $P>0.05$ )。值得注意的是,贮藏期间虽然TBARS值有所增加,但都维持在较低水平,表明MAP烧鸡几乎未发生氧化酸败。结合后续对微生物生长的分析发现,脂肪氧化不是导致MAP烧鸡腐败变质的主要因素。贮藏末期,样品的TBARS值趋向平稳,可能与MAP中气体成分有关。Demirhan等<sup>[22]</sup>对MAP鸡肉的研究结果表明厌氧环境明显抑制了鸡肉的脂肪氧化。Zhai Yang等<sup>[23]</sup>研究水煮盐水鸭肉在正常和气调贮藏条件下的货架期,发现贮藏结束时MAP处理组样品的TBARS值较低。

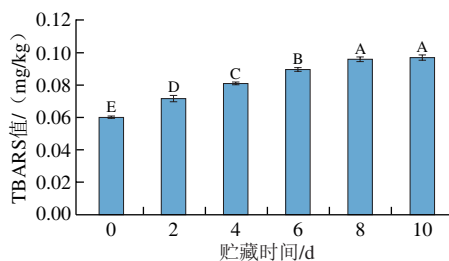


图3 MAP烧鸡冷藏过程中TBARS值的变化

Fig. 3 Changes in TBARS value during refrigerated storage of MAP braised chicken

### 2.2 MAP烧鸡贮藏过程中微生物的变化

由表1可知,MAP烧鸡贮藏过程中主要微生物呈动态变化。贮藏0 d时TVC为3.77 (lg (CFU/g)),到第4天达到5.26 (lg (CFU/g)),超过GB 2726—2016《食品安全国家标准 熟肉制品》规定的熟肉制品可接受阈值( $\leq 5$  (lg (CFU/g)))。在冷藏过程中,葡萄球菌和乳酸菌增殖较快,其次为肠杆菌,假单胞菌增殖最慢。这些结果表明,乳酸菌和葡萄球菌在新鲜烧鸡中就已存在,随着贮藏时间的延长其数量逐渐增长;至贮藏后期,葡萄球菌数量最多,其次是肠杆菌,假单胞菌数量最少。

表1 MAP烧鸡贮藏过程中主要微生物数量的变化

Table 1 Changes in major microorganisms in MAP braised chicken during storage

菌种	贮藏时间/d					
	0	2	4	6	8	10
TVC	3.77±0.22 <sup>D</sup>	4.75±0.46 <sup>C</sup>	5.26±0.39 <sup>C</sup>	6.96±0.22 <sup>B</sup>	7.45±0.56 <sup>AB</sup>	7.78±0.38 <sup>A</sup>
乳酸菌	3.32±0.48 <sup>C</sup>	3.80±0.32 <sup>C</sup>	5.42±0.35 <sup>B</sup>	6.63±0.51 <sup>A</sup>	6.79±0.10 <sup>A</sup>	7.07±0.15 <sup>A</sup>
葡萄球菌	3.75±0.23 <sup>D</sup>	4.48±0.21 <sup>C</sup>	5.07±0.18 <sup>C</sup>	6.83±0.47 <sup>B</sup>	6.58±0.63 <sup>B</sup>	7.56±0.44 <sup>A</sup>
肠杆菌科	ND	4.30±0.31 <sup>D</sup>	5.06±0.10 <sup>C</sup>	6.50±0.32 <sup>B</sup>	6.39±0.56 <sup>B</sup>	7.11±0.25 <sup>A</sup>
假单胞菌	ND	4.39±0.49 <sup>B</sup>	4.42±0.64 <sup>B</sup>	5.01±0.44 <sup>B</sup>	5.99±0.27 <sup>A</sup>	6.11±0.44 <sup>A</sup>

注:同行大写字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ );ND:未检出。

## 2.3 MAP烧鸡高通量测序结果

### 2.3.1 丰度等级曲线

丰度等级曲线可用于解释物种丰度和群落均匀度。物种的丰富度越高,曲线在横轴上的范围越大;曲线越平缓,群落中物种分布越均匀<sup>[24]</sup>。由图4可知,烧鸡贮藏初期的曲线宽度最大,贮藏末期的曲线宽度最小,说明贮藏初期烧鸡中微生物的丰富度很高,随后逐渐下降。与贮藏初期烧鸡相比,贮藏中期和末期烧鸡样本的曲线更陡峭,说明贮藏中期和末期烧鸡中的微生物分布不均匀。贮藏末期样品微生物物种丰富度最小<sup>[25]</sup>,分布不均匀,这同样表明了贮藏末期只有少数细菌占据主要地位,具有生长优势,可能在烧鸡腐败过程中起到主要作用。

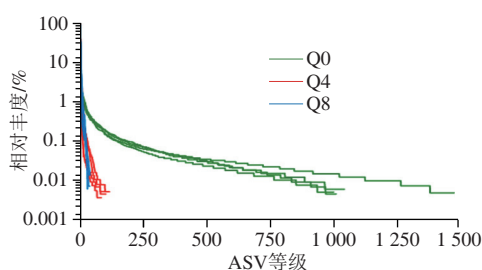


图4 MAP烧鸡贮藏过程中微生物丰度等级曲线

Fig. 4 Rank-abundance curves of bacterial community in MAP braised chicken during storage

### 2.3.2 稀释曲线和Shannon曲线

稀释曲线反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性,可以用于比较测序数据量不同的样本中物种的丰富度、均一性或多样性,也可以用于说明样本的测序数据量是否合理<sup>[26]</sup>。从图5可以看出,当测序数据量大于15 000时,样本曲线上所有点的斜率均趋于0,说明样品的测序数据量科学合理。Shannon曲线趋向平坦时,说明测序数据量足够大,可以反映样本中绝大多数的微生物多样性信息。稀释曲线和Shannon曲线表明,实验中烧鸡样品测序数据合理,测序结果真实有效。

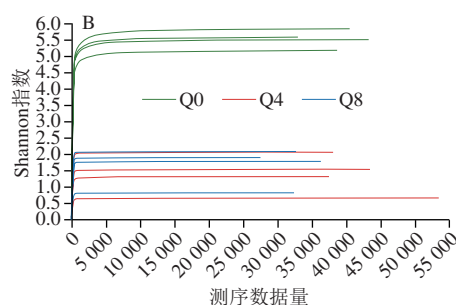
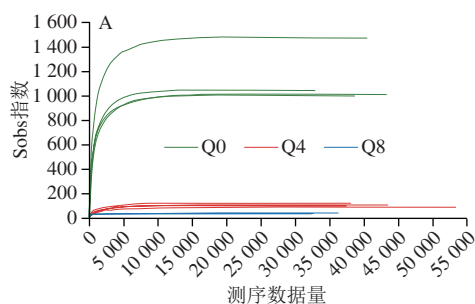


图5 MAP烧鸡贮藏过程中微生物的稀释曲线(A)和Shannon曲线(B)  
Fig. 5 Rarefaction curves (A) and Shannon-Wiener curves (B) of bacterial community in MAP braised chicken during storage

### 2.3.3 $\alpha$ 多样性

$\alpha$ 多样性主要用于研究某一环境内(或样本中)的群落多样性,可获得环境群落中物种的丰富度、多样性等信息。Chao1指数反映群落丰富度,Shannon指数和Simpson指数反映群落多样性,Coverage指数反映群落覆盖率。由表2可知,样本覆盖率均为100%,表明烧鸡样品中几乎所有细菌都可以被检测到。MAP烧鸡中细菌的Chao1指数、Shannon指数和Coverage指数在贮藏0 d时最高,Simpson指数在贮藏0 d时最低;Chao1指数和Simpson指数在贮藏8 d时最低,说明MAP烧鸡在贮藏初期微生物种类、多样性和丰富性最高,随着贮藏时间的延长,一些对冷藏环境不适应的微生物会失去生理活性,而竞争力较强的微生物大量增殖,占据主导地位,导致微生物种群多样性的下降。

表2 MAP烧鸡贮藏过程中微生物种群的 $\alpha$ 多样性指数

Table 2  $\alpha$ -Diversity indexes of bacterial community in MAP braised chicken during storage

样品名称	总Tags数	ASVs数	Chao1指数	Shannon指数	Simpson指数	样本覆盖率/%
Q0	38 789±4 385	1 130±229	1 129.500±229.035	5.538±0.276	0.017±0.005	100
Q4	42 967±7 452	99±13	99.250±13.401	1.397±0.584	0.446±0.211	100
Q8	32 137±3 575	35±4	25.000±4.343	1.643±0.564	0.341±0.216	100

### 2.3.4 MAP烧鸡低温贮藏过程中的菌相变化

如图6A、B所示,贮藏期间,主要菌群为厚壁菌门(Firmicutes, 52.0%(相对丰度,下同))和变形菌门(Proteobacteria, 40.79%),这一结果与关于肴肉的结果<sup>[27]</sup>一致。MAP烧鸡贮藏初期微生物丰富度最高,其中肠杆菌科(Enterobacteriaceae, 15.24%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 13.39%)和气单胞菌属(*Aeromonas*, 8.26%)占优势,地热芽孢杆菌属(*Geobacillus*, 3.81%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 2.09%)、乳杆菌属(*Lactobacillus*, 1.71%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 1.48%)也占有一定比例。这些微生物天然存在于土壤和水中,并且在人体皮肤、家禽胃肠道和肉制品中也检测到<sup>[28-29]</sup>。随着贮藏时间的延长,烧鸡

中的微生物丰富度逐渐下降,到贮藏中期,魏斯氏菌属(*Weissella*)成为MAP烧鸡中的优势菌,相对丰度达到62.79%。哈夫尼亚菌肥杆菌(*Hafnia-Obesumbacterium*, 21.24%)、肠杆菌(7.25%)、乳球菌(2.45%)和嗜冷菌(*Psychrobacter*, 1.01%)也占一定比例。到贮藏末期,魏斯氏菌相对丰度仍为最高(52.60%),肠杆菌相对丰度从初期的15.24%上升到28.62%,明串珠菌属(*Leuconostoc*)相对丰度由贮藏初期的不到1%上升到8.11%,乳球菌属相对丰度从2.09%上升到7.95%。而不动杆菌和假单胞菌相对丰度则不同程度降低。魏斯氏菌属为革兰氏阳性、兼性厌氧菌,属于异型发酵乳酸菌,能够导致食品的腐败变质<sup>[30]</sup>,广泛存在于肉制品中;刘彩云等<sup>[31]</sup>研究发现魏斯氏菌是引起本地卤牛肉腐败变质的腐败菌之一;魏斯氏菌属和乳杆菌属也是MAP烤鸭中常见优势腐败菌<sup>[32]</sup>。明串珠菌属和乳球菌属具有兼性厌氧特性,肉制品厌氧包装条件通常有利于其生长<sup>[33]</sup>。魏斯氏菌属、乳球菌属和明串珠菌属均可利用肉制品中的营养物质进行代谢产酸,以乳酸为主,从而导致产品pH值降低。假单胞菌是一种严格需氧的革兰氏阴性菌,是有氧条件下新鲜肉类和肉制品中常见的腐败菌,在无氧环境下生长受到抑制是其相对丰度降低的主要原因<sup>[34]</sup>。从Circos图(图6C)可以看出,不动杆菌属、气单胞菌属和地热芽孢杆菌属在贮藏过程中相对丰度呈下降趋势,推测它们来源于产品加工过程带入的污染,由于不适应MAP和低温的贮藏环境,生长受到抑制。而魏斯氏菌属、肠杆菌、乳球菌属和明串珠菌的相对丰度在贮藏过程中升高,表明其适应贮藏环境,具有生长优势。这几种微生物耐高温、高盐,在最终产品中存活,具有兼性厌氧特点,可在MAP条件下生长繁殖,进而导致产品变质。它们可能来源于肉制品加工过程(如动物屠宰、食品加工和包装)环境。因此,食品企业需要加强对原料和加工温度的控制,控制生产环境带入的微生物并加强相关抑菌措施,以延长保质期。

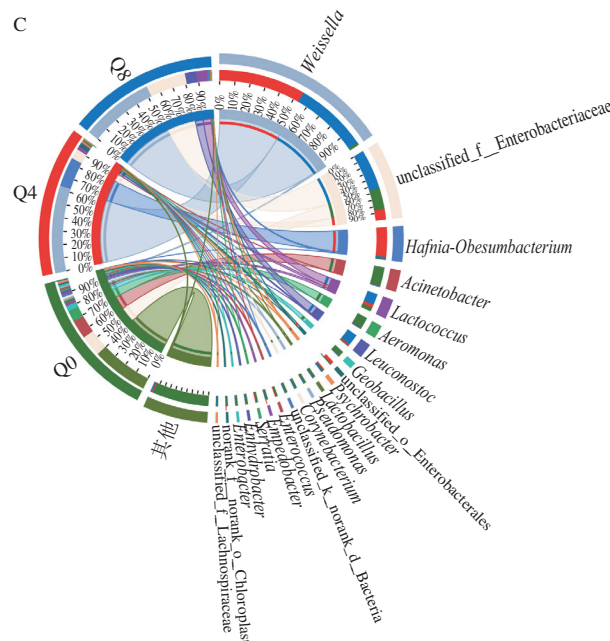
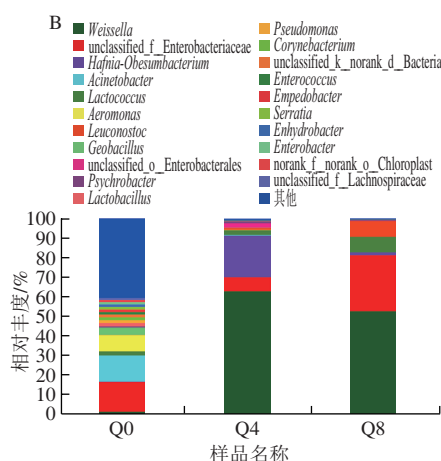
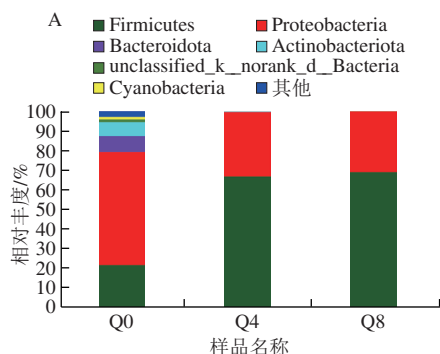


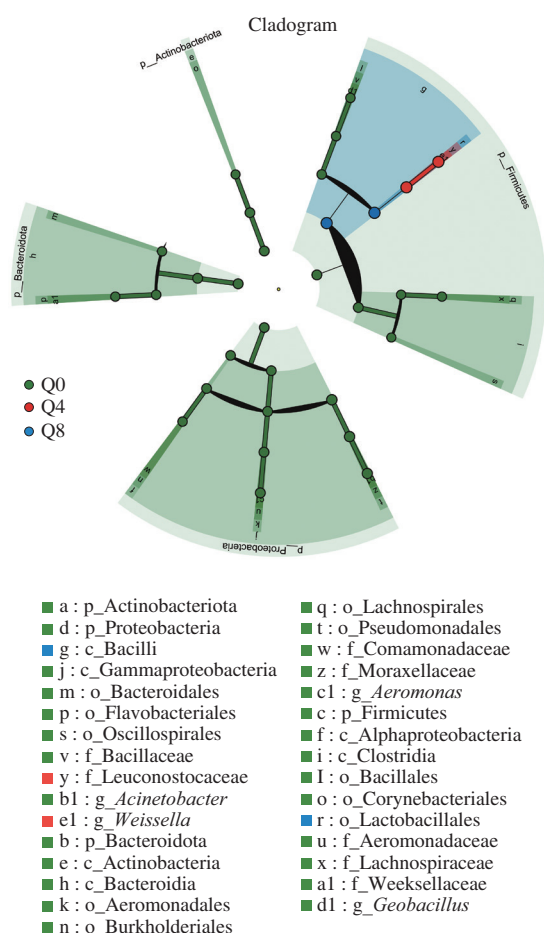
图6 MAP烧鸡贮藏期间细菌在门水平(A)、属水平(B)相对丰度的变化和Circos图(C)

Fig. 6 Changes in the relative abundance of bacteria at phylum level (A) and genus level (B) during storage of MAP braised chicken and Circos plot (C)



### 2.3.5 MAP烧鸡贮藏期间微生物菌群LEfSe分析

LEfSe分析可用于发现两组或多组样本中最能解释组间差异的物种特征。为找到组间丰度(即生物标志物)有显著差异的物种,对不同贮藏时期样品之间的微生物进行LEfSe分析(图7)。MAP烧鸡在贮藏初期微生物丰富度最高,多种微生物在贮藏初期富集;明串珠菌科魏斯氏菌属在贮藏中期显著富集;杆菌纲乳杆菌科在贮藏末期显著富集。肠杆菌科哈夫尼亚肥杆菌属和乳球菌等在贮藏期间没有显著差异。



不同颜色节点表示在对应组别中显著富集且对组间差异存在显著影响的微生物类群；黄色节点表示在不同分组中均无显著差异或对组间差异无显著影响的微生物类群。

图7 MAP烧鸡贮藏期间微生物菌群LEfSe分析

Fig. 7 LEfSe analysis of bacterial community in MAP braised chicken during storage

## 2.4 传统微生物的分离纯化鉴定结果

16S rDNA全长扩增及测序比对结果见表3。从MAP烧鸡中分离得到弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、沙福芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*)、哈夫尼菌属 (*Hafnia* sp.)、肠杆菌 (*Enterobacter* sp.) 和液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*)。大量研究表明, 乳酸菌是低温肉制品在冷藏过程中的腐败菌。烧鸡的主要腐败菌为乳酸菌和假单胞菌<sup>[35]</sup>。乳酸菌和肠杆菌是熏培根的主要腐败菌<sup>[36]</sup>。乳酸菌是革兰氏阳性菌, 在低温肉制品中常分离出的主要乳酸菌有清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌、明串珠菌、肉明串珠菌、肠系膜明串珠菌和绿色魏斯氏菌。芽孢杆菌和肠杆菌在土壤、水、空气以及动物肠道中都有广泛分布<sup>[37]</sup>, 它们对温度和养分的要求较低, 能在低温、高盐环境下生存, 因此可以在MAP烧鸡低温贮藏期间生长繁殖。芽孢杆菌在产品卤制过程中受高温刺激可形成

芽孢进入休眠状态, 在适宜环境条件下会重新恢复活性, 在产品中生长繁殖<sup>[38]</sup>。肠杆菌在卤制过程中很容易被杀死, 但MAP产品在包装前后容易受二次操作的污染而引入肠杆菌。乳酸菌、芽孢杆菌和肠杆菌这3种腐败菌可在厌氧条件下繁殖, 并能发酵产酸。本实验中烧鸡在MAP条件 (25% CO<sub>2</sub>/75% N<sub>2</sub>) 下冷藏, 腐败后产品出现表面发黏、产酸的现象, 结合前人的研究, 乳酸菌、芽孢杆菌和肠杆菌这3种腐败菌可能是使烧鸡在MAP条件下产生腐败的主要原因。

表3 传统分离菌落16S rDNA鉴定结果

Table 3 Results of 16S rDNA identification of traditional colony isolates

菌株编号	碱基对数	GenBank相似菌种	相似性/%	GenBank登录号
QM5	1466	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99.90	MT597519.1
QM3	1420	<i>Bacillus cereus</i>	97.00	KU922224.1
QV1	1423	<i>Bacillus safensis</i>	98.97	MW131521.1
QC2	1414	<i>Hafnia</i> sp.	99.00	MN922944.1
QA7	1408	<i>Enterobacter</i> sp.	99.15	MT270807.1
QC11	1475	<i>Serratia liquefaciens</i>	99.93	MT279350.1

## 3 结论

本实验研究MAP烧鸡冷藏期间理化特性、微生物群落多样性和群落结构的动态变化。TVB-N含量和菌落总数等指标结果表明, 烧鸡在贮藏第4天微生物超标, 到贮藏末期烧鸡已经腐败。乳酸菌在贮藏初期就已大量存在, 来自肉制品加工过程接触的环境。TBARS值在贮藏末期趋向平稳, 与MAP中气体成分有关。魏斯氏菌属、肠杆菌、乳球菌属和气单胞菌属的相对丰度在贮藏期间逐渐增加, 具有生长优势。在MAP烧鸡中分离鉴定出6株腐败菌, 分别为弯曲乳杆菌、蜡状芽孢杆菌、沙福芽孢杆菌、液化沙雷氏菌、哈夫尼亚菌和大肠杆菌, 这些腐败菌可在厌氧条件下繁殖, 是使烧鸡在MAP条件下产生腐败的主要原因。本研究有关MAP烧鸡微生物群落多样性和动态变化的结果可以为MAP烧鸡腐败菌的控制提供理论参考。

## 参考文献:

- [1] YAO W S, CAI Y X, LIU D Y, et al. Analysis of flavor formation during production of Dezhou braised chicken using headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry (HS-GC-IMS)[J]. Food Chemistry, 2022, 370: 130989. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130989.
- [2] 宋波. HACCP体系在低温酱卤肉制品中的应用[J]. 食品工业, 2022, 43(5): 87-91.
- [3] KOUTSOUMANIS K, TSALOUMI S, ASPRIDOU Z, et al. Application of quantitative microbiological risk assessment (QMRA) to food spoilage: principles and methodology[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 114(2): 189-197. DOI:10.1016/j.tifs.2021.05.011.

- [4] MARMION M, FERONE M T, WHYTE P, et al. Changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge[J]. Food Microbiology, 2021, 99(6): 103823. DOI:10.1016/j.fm.2021.103823.
- [5] 汤敏, 黄俊逸, 李聪, 等. 冷藏过程中不同包装德州扒鸡的微生物及理化特性[J]. 食品科技, 2020, 45(6): 122-129. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2020.06.024.
- [6] 李冉, 朱和源, 叶可萍, 等. 气调包装狮子头冷藏过程中微生物变化及菌群结构分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 99-105. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020070316.
- [7] 甯雨莽, 田靓, 袁先铃, 等. 市售笋子烧牛肉中优势腐败菌的分离与鉴定[J]. 农产品加工, 2021(8): 51-55. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2021.04.046.
- [8] 李冬娟. 基于免培养的微生物群落多样性研究方法概述[J]. 长沙大学学报, 2019, 33(5): 73-76.
- [9] 王勇, 周森, 魏金旺. 基于高通量测序技术分析牛栏山大曲微生物多样性[J]. 中国酿造, 2019, 38(2): 58-61. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2019.02.012.
- [10] NILSSON R H, ANSLAN S, BAHRAM M, et al. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(2): 95-109. DOI:10.1038/s41579-018-0116-y.
- [11] 张一鸣, 庄军辉, 高雪琴, 等. 不同杀菌方式对烧鸡品质影响的研究[J]. 肉类工业, 2021(12): 1-7.
- [12] 李雪, 王丽, 刘光宪, 等. 气调包装对酱卤鸭翅品质和保鲜效果的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(23): 9171-9176. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.23.028.
- [13] 张新笑, 章彬, 卞欢, 等. 不同二氧化碳比例气调对冷鲜肉肉中荧光假单胞菌的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 266-271. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813040.
- [14] 王克达. 气调包装对哈尔滨红肠品质及货架期的影响[J]. 农产品加工, 2022(12): 24-29. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2022.06.037.
- [15] 韩吉娜, HIPPOLYTE K S, 杨鸿博, 等. 气调包装对冷却肉肉的保鲜效果研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(9): 159-164. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.018894.
- [16] 席丽琴, 杨君娜, 许随根, 等. 肉及肉制品气调包装技术研究进展[J]. 肉类研究, 2019, 33(9): 64-68. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20190704-157.
- [17] CHEN Xue, ZHAO Jiayue, ZHU Lixian, et al. Effect of modified atmosphere packaging on shelf life and bacterial community of roast duck meat[J]. Food Research International, 2020, 137: 63-69. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109645.
- [18] 赵欣宇, 孙卫青, 熊光权, 等. 冷藏鲑鱼片中优势腐败菌的分离鉴定[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 104-108. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.017.
- [19] 赵菲, 荆红彭, 伍新龄, 等. 不同气调包装结合冰温贮藏对羊肉保鲜效果的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 232-237. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201514045.
- [20] WIMPENNY J W T, LEISTNER L, THOMAS L V, et al. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 28(2): 299-315. DOI:10.1016/0168-1605(95)00065-8.
- [21] BEKHIT E, HOLMAN B, GITERU S G, et al. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 280-302. DOI:10.1016/j.tifs.2021.01.006.
- [22] DEMIRHAN B, CANDOAN K. Active packaging of chicken meats with modified atmosphere including oxygen scavengers[J]. Poultry Science, 2017, 96(5): 1394-1401. DOI:10.3382/ps/pew373.
- [23] ZHAI Yang, HUANG Jichao, KHAN I A, et al. Shelf-life of boiled salted duck meat stored under normal and modified atmosphere[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(1): 147-152. DOI:10.1111/1750-3841.13947.
- [24] CHAN F T, BRADIE J, BRISKI E, et al. Assessing introduction risk using species' rank-abundance distributions[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2015, 282: 20141517. DOI:10.1098/rspb.2014.1517.
- [25] 朱东喜, 邓洁莹, 王志琦, 等. 应用高通量测序分析常温贮藏吴山贡鹅的细菌多样性[J]. 肉类研究, 2021, 35(4): 30-36. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20210316-074.
- [26] 蒋慧丽, 水珊珊, 吴琼静, 等. 基于高通量测序分析紫贻贝冻藏过程中菌群组成变化[J]. 食品与机械, 2021(1): 143-147. DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2021.01.023.
- [27] ZHANG Y, YAO Y, GAO L, et al. Characterization of a microbial community developing during refrigerated storage of vacuum packed Yao meat, a Chinese traditional food[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 562-569. DOI:10.1016/j.lwt.2018.01.005.
- [28] AKINYEMI F T, DING J, ZHOU H, et al. Dynamic distribution of gut microbiota during embryonic development in chicken[J]. Poultry Science, 2020, 99(10): 5079-5090. DOI:10.1016/j.psj.2020.06.016.
- [29] YE K, LIU M, LIU J, et al. Microbial diversity of different modified atmosphere packed pot-stewed duck wings products during 8 °C storage[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(3): 225-230. DOI:10.1111/lam.12704.
- [30] MARTINS W F, LONGHI D A, MENEZES N M C, et al. Predicting growth of *Weissella viridescens* in culture medium under dynamic temperature conditions[J]. Procedia Food Science, 2016, 7: 37-40. DOI:10.1016/j.profoo.2016.02.082.
- [31] 刘彩云, 祝泉馨, 方彦昊, 等. 市售卤牛肉中腐败菌的分离鉴定[J]. 肉类工业, 2020(5): 38-43.
- [32] CHEN X, CHEN W W, LU X, et al. Effect of chitosan coating incorporated with oregano or cinnamon essential oil on the bacterial diversity and shelf life of roast duck in modified atmosphere packaging[J]. Food Research International, 2021, 147: 110491. DOI:10.1016/j.foodres.2021.110491.
- [33] YANG X Y, ZHU L X, ZHANG Y M, et al. Microbial community dynamics analysis by high-throughput sequencing in chilled beef longissimus steaks packaged under modified atmospheres[J]. Meat Science, 2018, 141: 94-102. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.03.010.
- [34] ANDREANI N A, FASOLATO L. *Pseudomonas* and related genera[M]// BEVILACQUA A, CORBO M R, SINIGAGLIA M. The microbiological quality of food. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017: 25-59. DOI:10.1016/B978-0-08-100502-6.00005-4.
- [35] LIU D Y, XIAO X, WANG H H, et al. Characterization of the bacterial community of braised chicken, a specialty poultry product in China[J]. Poultry Science, 2019, 98(2): 1055-1063. DOI:10.3382/ps/pey375.
- [36] LI X F, XIONG Q, XU B C, et al. Bacterial community dynamics during different stages of processing of smoked bacon using the 16S rRNA gene amplicon analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 351: 109076. DOI:10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109076.
- [37] 周涛, 宋方霞, 黄村惠. 克氏原螯虾调理产品中主要腐败菌的分离鉴定[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2017, 40(4): 103-108. DOI:10.3969/j.issn.1001-4616.2017.04.017.
- [38] 肖欢, 曹宏, 翟建青, 等. 地方特色卤鸭掌优势腐败菌的鉴定[J]. 核农学报, 2017(1): 66-72. DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2017.01.0066.