信阳黑猪腊肉的微生物多样性分析及优势菌分离鉴定

崔文明[1,2], 杨书婷[1,2], 张秋会[1,2], 祝超智[1,2], 李苗云[1,2], 赵改名[1,2], 柳艳霞[1,2*]

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002; 2. 河南省肉制品加工与质量安全控制重点实验室, 郑州 450002)

摘 要: 目的 通过全面解析信阳光山自然发酵黑猪腊肉中的微生物菌落结构, 并分离鉴定腊肉中的优势菌, 为后续改善自然发酵腊肉品质稳定性差的问题提供理论依据和技术支撑。**方法** 采用 Illumina MiSeq 高通量测序和传统选择性培养基分离筛选相结合的方法, 分析腊肉中的细菌和真菌多样性, 并对分离优势细菌和真菌进行 16S rDNA 和 26S rDNA 鉴定。**结果** 信阳腊肉优势细菌中厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)相对丰度占比均值之和达到 99.67%, 为绝对优势细菌门; 优势真菌为酵母, 其菌落总数为 4.65 lg cfu/g 低于细菌 2 个数量级。在属水平上, 相对丰度占比前 5 的优势细菌依次为乳球菌属(*Lactococcus*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。从腊肉中分离鉴定得到 6 株优势细菌和 2 株优势酵母分别为格氏乳球菌、清酒乳杆菌、马胃葡萄球菌、广布肉毒杆菌、溶酪巨球菌、孤独四联球菌及胶红酵母和隐球酵母各 1 株。**结论** 信阳腊肉微生物菌落构成以细菌为主, 酵母为辅, 分离得到 8 株优势发酵菌株可用于后续潜在肉品发酵剂的开发。

关键词: 信阳腊肉; 高通量测序; 微生物多样性; 菌种鉴定

Microbial diversity analysis and dominant microorganisms identification and isolation of Xinyang black pig bacon

CUI Wen-Ming[1,2], YANG Shu-Ting[1,2], ZHANG Qiu-Hui[1,2], ZHU Chao-Zhi[1,2], LI Miao-Yun[1,2], ZHAO Gai-Ming[1,2], LIU Yan-Xia[1,2*]

(1. *College of Food Science and Technology*, *Henan Agricultural University*, *Zhengzhou* 450002, *China*; 2. *Henan Key Lab of Meat Processing and Quality Safety Control*, *Henan Agricultural University*, *Zhengzhou* 450002, *China*)

ABSTRACT: Objective To explore the microbial community structures of Xinyang spontaneously fermented black pig bacon from Guangshan, and isolate and identify the dominant microorganisms of bacon, so as to provide theoretical basis and technical support for improving the poor stability of naturally fermented meat. **Methods** Illumina MiSeq high-throughput sequencing combined with traditional selective culture-medium isolation and screening were used

基金项目: 国家自然科学基金项目(32001727)、国家现代农业产业技术体系项目(CARS-37)、河南省重点研发专项(221111111900)、河南省大学生创新创业训练计划项目(201910466025)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32001727), the National Beef Cattle Industrial Technology System (CARS-37), the Henan Province Key Research and Development Project (221111111900), and the Henan Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (201910466025)

***通信作者:** 柳艳霞, 博士, 副教授, 主要研究方向为肉制品加工与质量控制。E-mail: Liuyanxia@henau.edu.cn

***Corresponding author:** LIU Yan-Xia, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, No.65, Nongye Road, Jinshui District, Zhengzhou 450002, China. E-mail: Liuyanxia@henau.edu.cn

to analyze the bacterial and fungal diversity. Subsequently, the culturable dominant microorganisms were identified by 16S rDNA and 26S rDNA methods. **Results** *Firmicutes* and *Proteobacteria* were the absolute dominant bacteria and the sum of their relative abundance reached 99.67%; yeast was dominant fungal and their total viable count was 4.65 lg cfu/g, which was 2 orders of magnitude lower than the total number of bacteria. At the genus level, the top 5 dominant bacterial genera were *Lactococcus*, *Psychrobacter*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, and *Staphylococcus*. Six strains of bacteria and 2 strains of yeast were isolated and identified from Xinyang bacon, including *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus equinus*, *Carnobacterium divergens*, *Macrococcus caseolyticus*, *Tetracoccus solitarius*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Cryptococcus magnus*. **Conclusion** The bacterial colonies of Xinyang cured bacon are mainly composed of bacteria, supplemented by yeast. Eight dominant fermentation strains have been isolated, which can be used for the development of potential meat starter.

KEY WORDS: Xinyang bacon; high-throughput sequencing; microbial diversity; strain identification

0 引 言

发酵肉制品是指在自然或人工控制条件下，通过微生物发酵，烟熏或不烟熏，形成具有地域独特风味[1]和质构[2]并可长时间保存的肉制品[3]。发酵肉制品地域特征突出，世界上几乎每个国家都有自己的传统特色发酵肉制品[4–7]。我国传统发酵肉制品已有上千年的历史，许多极具地方特色的腊肉，深受特定人群喜爱[8–10]。河南省比较有名的腊肉主要是信阳腊肉，制作一般都选择农历十二月份，自然发酵条件下，短期 15 d 即可，半年以上则风味尤佳。但信阳腊肉目前仍以自然发酵为主，主要依赖肉中内源性微生物菌群和自然环境中发酵微生物与杂菌的竞争作用实现发酵，制作周期长，不同批次产品品质一致性差异较大，生产环节受气候条件的严重制约[11]，且无法避免发酵过程中生物胺[12–13]及亚硝酸盐的产生[14–15]和有害微生物的生长[16–17]，存在安全隐患。因此，由人工接种发酵剂[18–19]的可控制发酵替代传统自然发酵，不仅能够缩短发酵周期，减少对自然气候的依赖[20]，而且能够有效降低产品中的杂菌生长和有害污染物的产生[21]。

基于此，李福荣等[22]曾采用传统培养基培养方法对信阳腊肉中的优势细菌进行分离并筛选得到 6 株细菌，通过生化鉴定和菌落计数发现其优势细菌为葡萄球菌属和微球菌属。赵改名等[23]也曾对信阳腊肉中的细菌多样性进行高通量测序分析，发现其中优势菌属为 *Staphylococcus* 和 *Psychrobacter*，且两者占比超过 95.41%。但上述研究中都仅对发酵过程中的优势细菌在属水平进行探究，并未确定信阳腊肉在种水平的细菌组成，也并未获得可用发酵菌株。而本研究希望通过对信阳黑猪腊肉中的微生物进行高通量测序，分析信阳黑猪腊肉中优势细菌和真菌的种属及比例，分离得到腊肉中的优势发酵细菌和真菌，为后续开发可用的肉制品发酵菌种，实现发酵肉发酵工艺的工业化、标准化生产提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豫南黑猪腊肉：购买自信阳光山县文殊乡杜槐村、文殊乡撞山寺村、晏河乡晏河村、南向店乡陈墩村制作自然发酵黑猪腊肉的 4 家农户，分别购买代表性黑猪腊肉 1 份，不少于 500 g。

DP302-02 细菌总 DNA 提取试剂盒(50T，北京天根生物科技有限公司)；*Taq* DNA 聚合酶(1 KU)、引物(上海生工生物工程有限公司)；无菌均质袋(郑州博兴生物科技有限公司)；营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基、营养肉汤培养基、MRS 培养基、MRS 液体培养基(北京陆桥技术股份有限公司)；孟加拉红(rose bengal chloramphenicol, RBC)琼脂培养基和酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)液体培养基(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)；HiCrome™双歧杆菌显色琼脂(bifidobacterium agar, HBA)培养基(HiMedia Leading BioSciences Company)；AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒[爱思进生物技术(杭州)有限公司]。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD 无菌操作台(美国 Airtech 公司)；TGradient 梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司)；EC3-310 凝胶成像系统(美国 UVP 公司)；DYY-12 电泳仪(北京市六一仪器厂)；DHP-9272 低温培养箱(上海一恒科技有限公司)；Easy MIX 拍击式均质仪(法国 AES 公司)；HVE-50 高压灭菌器(华粤行仪器有限公司)；JA2003N 分析天平(精确至 0.0001 g，上海菁海仪器有限公司)

1.3 实验方法

1.3.1 腊肉中微生物培养

在无菌操作条件下，称取肉样 25 g 置于无菌均质袋中，加入 225 mL 无菌生理盐水，用拍打式均质仪拍打 120 s,

取上清液进行 10 倍系列稀释，选取 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 共计 3 个稀释度，分别吸取 100 μL 样液放入不同的培养基进行分离计数。参照 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》、GB 4789.35—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》和 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》计数，并为每个稀释度制作 3 个平行样品。

1.3.2　腊肉中微生物总 DNA 的提取和 PCR 扩增

分别取 30 g 样品加入 300 mL 无菌蛋白胨水，匀浆，拍打，振摇后的样品采用四层无菌纱布过滤，收集滤液，取 30 mL 滤液加入灭菌后的离心管中，在 4℃、4000 r/min 离心 5 min，取离心后的上清液 10 mL 放入另外的无菌离心管中，在 4℃、9500 r/min 离心 10 min，弃去上清液，取沉淀。使用总 DNA 提取试剂盒，按照说明书步骤对收集的菌体进行基因组提取。将提取出的细菌总 DNA 溶于 100 μL 的 TE 缓冲液，在通过 2%的琼脂糖凝胶电泳检测后，放入–20℃冰箱保存备用。用 338F (5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′) 和 806R (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′) 引物对 V3~V4 区进行 PCR 扩增；扩增程序为：95℃预变性 3 min，27 个循环(95℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s)，最后 72℃延伸 10 min。扩增体系为 20 μL：4 μL 5×PCR 扩增缓冲液、2 μL 2.5 mmol/L dNTPs、0.8 μL 引物(5 μmol/L)、0.4 μL *Taq* DNA 聚合酶、10 ng DNA 模板，补水至 20 μL。

1.3.3　文库构建和上机测序

使用 2%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行回收，利用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒进行纯化，Tris-HCl 进行洗脱，2%琼脂糖进行电泳检测。QuantiFluor™-ST 微型荧光剂用来进行检测定量。根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段构建文库。利用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台进行测序。

1.3.4　高通量测序数据处理

高质量序列数据使用 UPARSE 软件(version 7.0.1090, http://drive5.com/uparse/)进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类，默认相似度为 97%。通过比对 Silva 138 rRNA 数据库，结合 RDP classifier 2.11 (http://rdp.cme.msu.edu/)对每条序列进行物种分类注释。最后，利用 Qiime 软件 1.9.1 生成不同样本中各分类学水平丰度图。

1.3.5　信阳黑猪腊肉中微生物的分离

将 1.3.1 中不同培养基在无氧和有氧条件中培养 48 h 后，用无菌接种环挑取出平板上大小、颜色、形态各不相同的菌落，接种至已经灭菌处理后的 MRS 液体培养基、营养肉汤培养基和 YPD 培养基中，振荡均匀后在适当恒温条件下放入培养箱中培养 24~48 h，将不同的样品编号，用高速离心机以 12600 r/min 的转速离心 1 min 后收集菌体沉淀并编号保存。

1.3.6　16S rDNA 和 26S rDNA 菌种鉴定

将细菌和真菌分别进行 16S rDNA (27F/1492R)和 26S rDNA (NL1/NL4)片段的 PCR 扩增，PCR 扩增的程序：95℃预变性 3 min，95℃变性 30 s，54℃退火 1 min，72℃延伸 100 s，一共经历 30 个循环，72℃延伸 7 min。扩增体系为 30 μL：15 μL 2×*Taq* PCR master mix、2 μL 上游引引物(5 μmol/L)、2 μL 下游引引物(5 μmol/L)、3 μL gDNA 模板，补水至 30 μL。扩增结束后进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，并在紫外凝胶成像仪中观察扩增情况，检测合格 PCR 产物送华大基因科技有限公司测序。

1.3.7　分离菌株系统发育树构建

得到测序结果后，进入 NCBI 网站通过 BLAST 的方法将各个待测菌株的基因序列进行比对，选择其推荐得到的相似性最高的菌株初步确定各待测菌株的种属，并选取与待测菌株亲缘关系最近的菌株及其他常见菌株的基因序列，通过 MEGA 6.06 软件使用 Test Neighbor-Joining Tree 的方法进行系统发育树的构建。

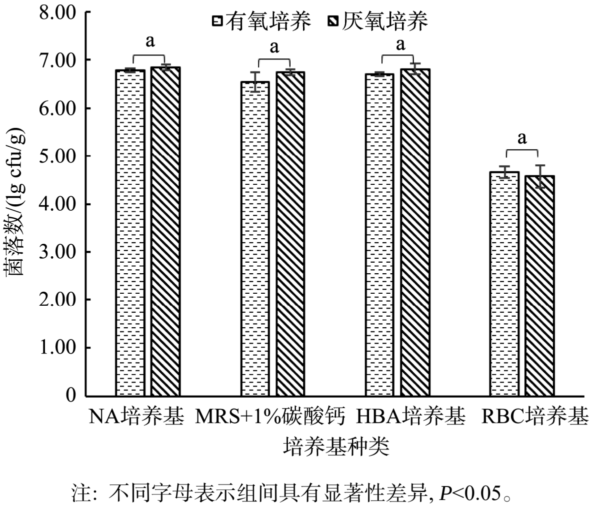
1.4　数据处理

实验共进行 3 次重复，每个测试进行 3 个平行，结果以平均值±标准偏差表示，实验数据采用 SPSS 11.0 软件进行数据进行统计分析。

2　结果与分析

2.1　信阳黑猪腊肉中可培养微生物组成

由图 1 可知，在 NA 培养基、MRS 培养基、HBA 培养基和 RBC 培养基上，信阳黑猪腊肉中微生物的数量并不相同，其中在前 3 种细菌类培养基上，菌落数均处于相同数量级约 6.5 lg cfu/g 且无氧与有氧培养条件下对其菌落数量并未产生显著性影响(P>0.05)。而 RBC 真菌类培养基上生长菌落数量明显少于前 3 种细菌类培养基，仅为 4.65 lg cfu/g，表明信阳黑猪腊肉中细菌占比较多而真菌占比较少，两者



注：不同字母表示组间具有显著性差异，P<0.05。

图1　信阳黑猪腊肉中不同微生物在4种培养基中的菌落数

Fig.1　Colony counts of microorganisms in 4 kinds of culture media from Xinyang black pig bacon

在数量上相差 2 个数量级。同时常用于筛选乳酸菌的 MRS 培养基中的菌落数与 NA 培养基中的数量相当，一定程度上反映了腊肉中的乳酸菌数量可能较多并占据优势。HBA 培养基虽然用于选择性筛选双歧杆菌，但其他乳酸菌或其他菌种也可以在其上生长并显示不同颜色，但由于图 1 中结果显示无氧和有氧培养条件下其菌落数无显著变化，而双歧杆菌为严格厌氧细菌，无法在有氧环境下生长繁殖，表明腊肉中双歧杆菌数量可能较少。

2.2 信阳黑猪腊肉中的细菌多样性分析

2.2.1 门水平菌群结构

由图 2 可知，信阳黑猪腊肉中的优势细菌在门水平主要集中在 3 个门，按丰度优势依次为厚壁菌门(Firmicutes)，平均占比 75.21%，变形菌门(Proteobacteria)，平均占比 24.46%，放线菌门(Actinobacteria)，平均占比 0.24%，其中，厚壁菌门和变形菌门占比之和高达 99.67%，处于绝对优势。信阳黑猪腊肉的主要优势菌门占比顺序与川渝、湖南烟熏腊肉、陇西腊肉、浙江咸肉[24]、金华火腿、如皋火腿、宣威火腿[11]、湖南酸肉[16]均基本保持一致，而西藏地区的牦牛肉干中主要优势菌门则为蓝藻细菌门和变形菌门[25]。同时，信阳黑猪腊肉的优势菌门数量仅为 3 个，与川渝地区的烟熏腊肉相当，而火腿、咸肉、酸肉和牦牛肉干中的优势菌门数量普遍多于 5 个[25]。

2.2.2 属水平菌群结构

由图 3 中可知，信阳黑猪腊肉中的优势菌属水平的平均占比依次为乳球菌属(*Lactococcus*)占比 20.03%、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)占比 19.62%、乳杆菌属(*Lactobacillus*)占比 17.11%、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)占比 11.02%、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)占比 10.04%、巨型球菌(*Macrococcus*)占比 7.02%、哈夫尼-肥杆菌属(*Hafnia-Obesumbacterium*)占比 3.70%、漫游球菌属(*Vagococcus*)占比 2.86%、无法分类的乳杆菌属(unclassified_*Lactobacillales*)和四联球菌属(*Tetragenococcus*)分别占比 2.50%和 2.37%。发酵肉中乳球菌属和乳杆菌属是较为普遍的存在，只是在不同产品的占比有所不同，其在酸肉中占比最高可达到 49%，而在腊肉中占比一般低于葡萄球菌属[26]。乳球菌属和乳杆菌属在整个发酵过程中主要起到产酸的作用，可以有效抑制发酵初期的杂菌生长，部分菌株还能够降低发酵过程中生物胺和亚硝酸盐的产生。葡萄球菌属和四联球菌属均可耐受高盐环境，是干腌火腿和烟熏腊肉中的优势菌属，其中葡萄球菌属是绝对优势菌属，此类产品中占比可高达 95%以上，是腊肉特殊风味的关键成因[2,24]。

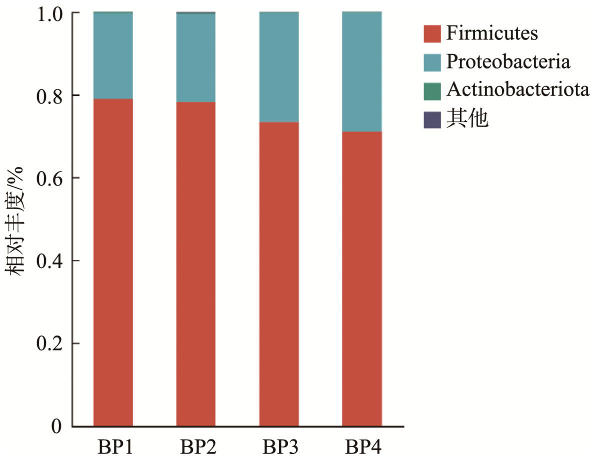


图2 门水平信阳黑猪腊肉中物种分布相对丰度

Fig.2 Percent of community abundance of Xinyang black pig bacon on phylum level

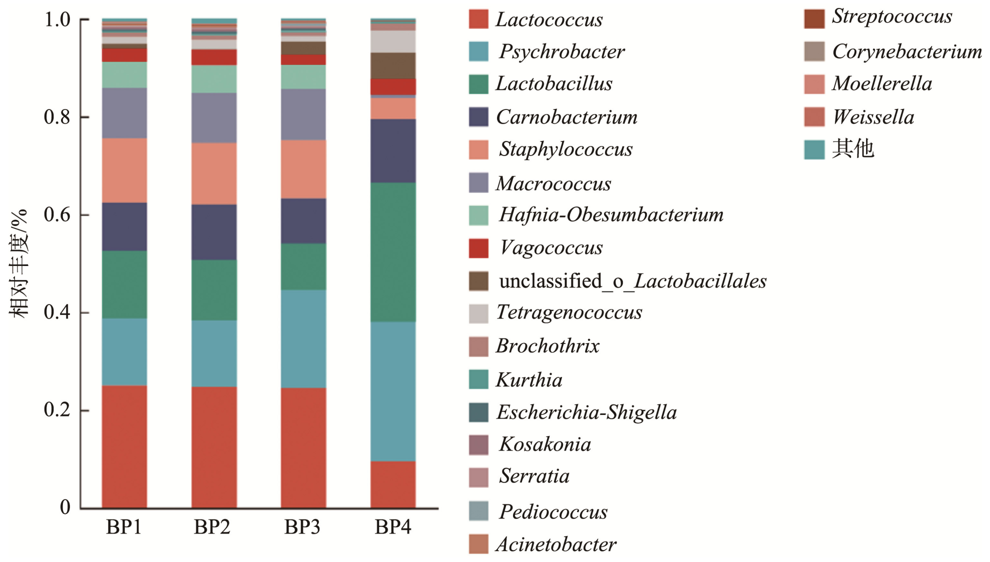


图3 属水平信阳黑猪腊肉中物种分布相对丰度

Fig.3 Percents of community abundance of Xinyang black pig bacon on genus level

2.2.3　种水平菌群结构

结果如图 4 所示，信阳黑猪腊肉中的优势菌种水平的平均占比依次为格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)占比约为 17.62%，清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)占比约为 16.12%，其次为，养料嗜冷杆菌(*Psychrobacter cibarius*)占比约为 13.35%，广布肉毒杆菌(*Carnobacterium divergens*)占比约为 11.02%，马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)占比约为 9.64%，然后依次为，溶酪巨球菌(*Macrococcus caseolyticus*)，蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)、近海生嗜冷杆菌(*Psychrobacter maritimus*)、孤独四联球菌(*Tetragenococcus solitarius*)、热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)，其占比分别 7.29%、3.70%、3.60%、2.37%和 1.08%。格氏乳球菌虽然是食品中广泛存在的致病菌，但在发酵食品中特别是发酵乳中分离出来部分格氏乳球菌反而能够产生胞外多糖和细菌素，从而在发酵中起到抑制有害微生物生长和产生生物活性物质的效果[27–29]。因此，在本研究中格氏乳球菌作为腊肉中的优势菌可能也具备上述的特性，但具体有待后续进一步研究。清酒乳杆菌是发酵食品中最常分离得到的乳酸菌菌株，在发酵肉和香肠、日本清酒、面团、酸菜和泡菜中均存在[30]。清酒乳杆菌在发酵过程具有产酸效率高且风味良好的特征，常作为辅助发酵剂用于改善发酵肉中醛类物质的强烈风味和用于抑制有害菌[31]。马胃葡萄球菌和孤独四联球菌在腊肉发酵过程中能够通过影响游离氨基酸的组成和含量，从而决定产品风味。其中，马胃葡萄球菌可以通过氨基酸代谢生成苯甲醛，而孤独四联球菌通过提高食品中有机酸、醛类和酯类等风味物质含量，赋予产品特征香味[11,13,16]。市售溶酪巨球菌主要分离自国外火腿，国内则由华南理工大学从广式腊肠中分离得到 1 株并进行研究，发现其具有脂肪和蛋白降解活性并可耐受一定浓度的食盐，同时还具备亚硝酸盐分解能力，在发酵中人为添加溶酪巨球菌可以增加广式腊肉中的 3-甲基丁酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯和乙酸乙酯生成，进而赋予腊肠更好的风味[32]。

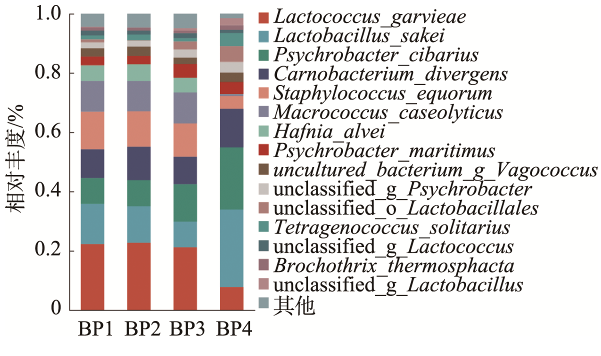


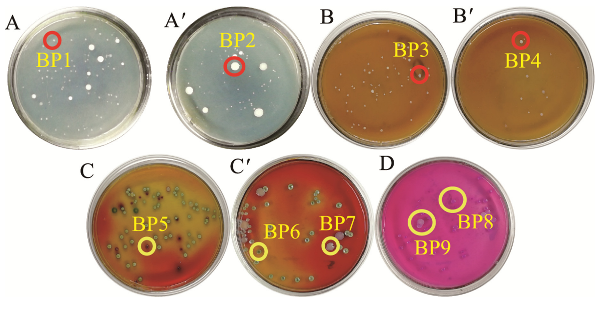
图4　种水平信阳黑猪腊肉中物种分布相对丰度

Fig.4　Percents of community abundance of Xinyang black pig bacon on species level

2.3　信阳黑猪腊肉中分离微生物的菌落形态学观察

由图 5 所示，样品在 NA 培养基、MRS 培养基、HBA 培养基和 RBC 培养基上经有氧和无氧环境培养后，发现有氧或无氧环境仅对 HBA 琼脂培养上生长的菌落形态存在影响，其中无氧条件下该培养基上部分菌落显深红色，而有氧或无氧环境对其余 3 种培养基上分离菌株的形态影响较小。反而培养基种类对筛选分离菌株的菌落形态有较大影响。

如图 5A 和图 5A′所示，根据菌落形态不同，NA 培养基上可大致分为 2 种菌，分别编号 BP1 和 BP2，其中 BP1 呈现白色圆形小菌落，直径在 1~2 mm 之间，表面及边缘光滑，菌落中心稍凸起；BP2 呈现乳白色圆形大菌落，直径在 2~5 mm 之间，表面及边缘光滑，菌落中心稍凸起偏扁平。如图 5B 和图 5B′所示，根据菌落形态不同，MRS+1%碳酸钙培养基上可大致分为 2 类，其中 BP3 呈现稍透明乳白色圆形小菌落，表面光滑，边缘整齐，直径约在 2.0 mm 左右，且在培养基上形成明显碳酸钙水解圈；BP4 呈现不透明乳白色圆形小菌落，表面光滑，边缘整齐，中间稍凸起，直径约在 2.0 mm 左右，无明显碳酸钙水解圈。由图 5C 和图 5C′所示，依据菌落显色情况，HBA 琼脂培养基上可大致分为 3 类，其中 BP5 仅出现在有氧培养环境中且呈现稍透明深红色圆形菌落，中心凸起明显，表面光滑，边缘整齐，直径约 1.0~3.0 mm 间；BP6 呈现绿色不透明圆形菌落，中心凸起明显略显乳白色，表面光滑，边缘整齐，直径约 2.0~4.0 mm 之间；BP7 呈现稍透明偏扁平偏圆形乳白色菌落，表面光滑，边缘稍不规则，直径约 3.0~6.0 mm 之间。如图 5D 所示，RBC 培养基上依据菌落形态不同可大致分为 2 类，其中 BP8 呈透明红色圆形菌落，中心凸起明显，表面光滑，边缘整齐，直径约 2~3 mm 之间；BP9 则呈不透明或稍透明乳白色扁平圆形菌落，中心无凸起或凸起不明显，表面较光滑，边缘整齐，直径约 3~5 mm 之间。



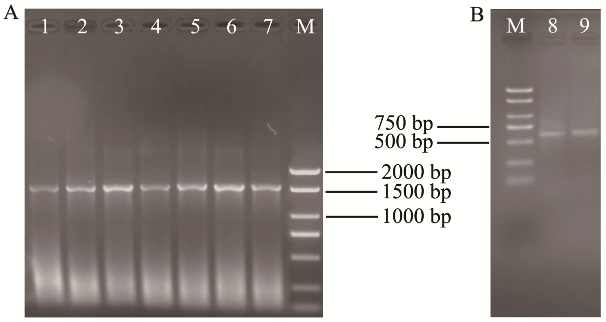
注：其中A和A′：NA培养基；B和B′：MRS+1%碳酸钙培养基；C和C′：HBA培养基；D：RBC培养基；A~D为有氧条件下培养，A′~C′为无氧条件下培养。

图5　不同培养基中信阳黑猪腊肉中分离菌株菌落形态

Fig.5　Colony morphology of strains isolated from Xinyang black pig bacon in different media

2.4 信阳腊肉中分离细菌和真菌的 PCR 扩增及电泳检测结果

如图 6A 所示, BP1~7 号分离菌株的 16S rDNA PCR 扩增序列在 1500 bp 处有明显亮带并且与目标片段相符合, 说明此次进行的 16S rDNA PCR 扩增成功, 虽然扩增下端有部分引物二聚体存在, 但主条带清晰明亮, 不影响后续进行测序。同时, 图 6B 显示分离菌株 BP8 和 BP9 26S rDNA PCR 扩增产物均在 500~750 bp 之间出现一条清晰明亮的条带, 条带长度与 NL1/NL4 目标产物长度 600 bp 左右相符, 无其他非特异性条带。因此, BP1~9 分离菌株扩增产物质量符合测序的要求, 可送出测序。



注: 图A为BP1~7号分离菌株的16S rDNA PCR产物; 图B为BP8和BP9的26S rDNA PCR产物; M为: 100 bp DNA ladder。

图6 分离菌株的16S rDNA和26S rDNA PCR扩增产物电泳

Fig.6 Electrophoresis of 16S rDNA and 26S rDNA PCR amplification products of isolated strains

2.5 信阳黑猪腊肉中分离菌株的基因序列比对结果

将 9 株菌株的测序结果在 NCBI 网站上通过 BLAST 比对的方法将各个待测菌株的基因序列进行一一比对, 比对出的结果显示 9 株菌株与其推荐的相似性最高的菌株同源性均大于 99%, 可认为是同一种属。通过比对结果整理出数据库中与待测菌株相同的标准菌株。比对结果如表 1 所示。

结果表明, 经 16S rDNA 分子生物学鉴定后, 其中 BP1 与 BP6 相同均为马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*), 其余 BP2、BP3、BP4、BP5、BP7 分别为格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、广布肉毒杆菌(*Carnobacterium divergens*)、溶酪巨球菌(*Macrococcus caseolyticus*)和孤独四联球菌(*Tetragenococcus solitarius*)。经过 26S rDNA 分子生物学鉴定后, 菌株 BP8 与胶红酵母属相似度为 100%, 菌株 BP9 与隐球酵母菌相似度为 100%, 所以信阳黑猪腊肉中鉴定出胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、隐球酵母(*Cryptococcus magnus*)、马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)、格氏乳球菌(*Lactococcus garvicae*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、广布肉毒杆菌(*Carnobacterium divergens*)、溶酪巨球菌(*Macrococcus caseolyticus*)和孤独四联球菌(*Tetragenococcus solitarius*)各 1 株。

2.6 信阳黑猪腊肉中分离菌株系统发育树的构建

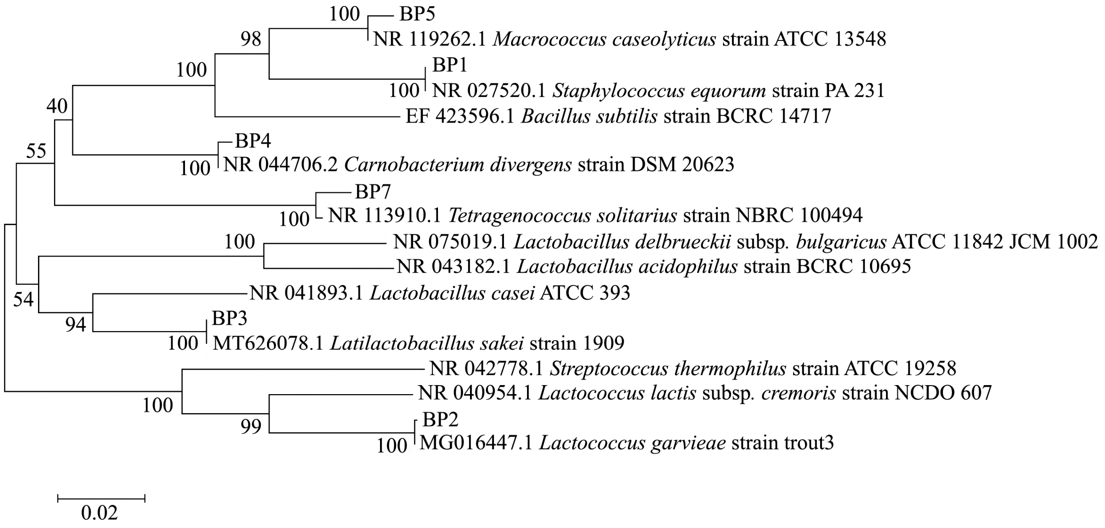
由图 7 可知, 18 个序列的系统发育树呈现出 6 个分支, 其中 BP5 与 BP1 形成一个分支, 表明这两种菌的亲缘关系较近。而 BP4 和 BP7 分别单独处于一个分支, 表明其与另外 17 种菌的亲缘关系均较远。6 株鉴定细菌与同一分支上模式菌株的验证可信度均达到 100%, 也进一步证明了上述的测序鉴定结果。系统发育树的分析依据来自于其中的数值即进化距离和分支长度, 将两者综合则可以分析出相互之间的同源性, 分支长度越长且数值越小则亲缘关系越远, 分支长度越短且数值越大则亲缘关系越近。

由图 8 可知, 8 个序列的系统发育树上显示出 5 大分支, 菌株 BP8 和 BP9 均与 *Cryptococcus flavescens* 处于在同一个较大分支上, 显示三者间的亲缘关系较近。而且 BP9 与 *Cryptococcus flavescens* 的亲缘关系要比 BP8 近。BP8 和 BP9 与其对应模式菌株均处于同一分支上且验证可信度均达到 100%, 也进一步证明了菌株 BP8 鉴定为胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*), 菌株 BP9 鉴定为隐球酵母(*Cryptococcus magnus*)测序鉴定结果。胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、隐球酵母(*Cryptococcus magnus*)分别与常见的发酵毕赤酵母(*Pichia fermentans*)相似度为 91%、80%, 表明它们之间的亲缘关系比较近。

表 1 分离菌株的分子生物学鉴定结果

Table 1 Molecular biological identification results of isolated strains

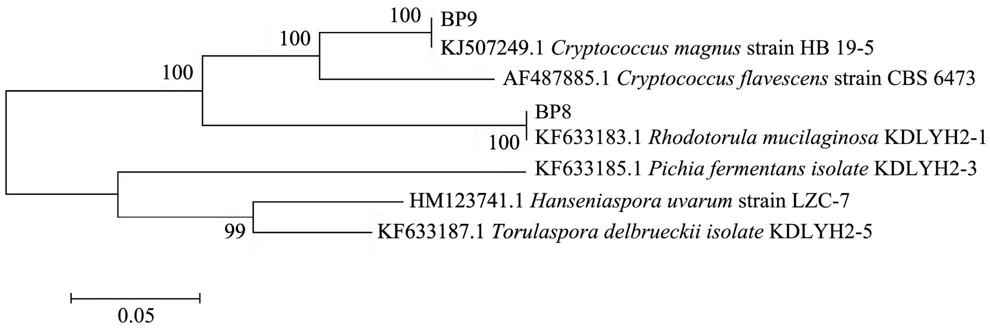
序号	样品	碱基长度/bp	相似度/%	菌株名称	Genebank 登录号
1	BP1	1422	100	*Staphylococcus equorum*	KJ920933.1
2	BP2	1454	99.65	*Lactococcus garvieae*	MG016447.1
3	BP3	1415	100	*Lactobacillus sakei*	MT626078.1
4	BP4	1440	99.93	*Carnobacterium divergens*	AM179875.1
5	BP5	1457	99.47	*Macrococcus caseolyticus*	MK443060.1
6	BP6	1401	100	*Staphylococcus equorum*	KJ920933.1
7	BP7	1554	99.81	*Tetragenococcus solitarius*	KM259982.1
8	BP8	590	100	*Rhodotorula mucilaginosa*	KF633183
9	BP9	610	100	*Cryptococcus magnus*	KJ507248.1



注: Bootstrap 验证次数为1000；树枝上的数值为验证可信度。

图7　基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Fig.7　Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence



注: Bootstrap验证次数为1000；树枝上的数值为验证可信度。

图8　基于26S rRNA的酵母菌系统发育树

Fig.8　Phylogenetic tree constructed based on 26S rRNA of yeast

3　讨论与结论

本研究利用高通量测序对信阳黑猪腊肉进行微生物多样性分析发现，自然发酵信阳黑猪腊肉中优势微生物以细菌为主，酵母为辅，两者数量上相差 2 个数量级，其中优势细菌以格氏乳球菌、清酒乳杆菌、养料嗜冷杆菌、广布肉毒杆菌和马胃葡萄球菌为主，5 种菌占腊肉中细菌丰度的 67.75%；优势真菌则以胶红酵母和隐球酵母为主。结合传统优势菌分离手段，从腊肉中分离得到格氏乳球菌、清酒乳杆菌、马胃葡萄球菌、广布肉毒杆菌、溶酪巨球菌、孤独四联球菌、胶红酵母和隐球酵母各 1 株，从而为后续进一步研究优势菌种在发酵过程中的具体作用和演替变化提供了可能，并为发酵肉行业的工业化、标准化生产提供理论依据和技术支撑。

发酵肉的特性和独特风味形成主要取决于发酵过程中的微生物种类及其产生的酶类和代谢产物，基于已有研究发现发酵肉均共有的优势菌为乳酸菌、凝固酶阴性葡萄球菌和酵母，其中乳酸菌主要以清酒乳杆菌和植物乳杆菌最常见；凝固酶阴性葡萄球菌主要以木糖葡萄球菌、马胃葡萄球菌和肉葡萄球菌最常见；酵母主要以汉逊德巴利酵母、涎沫假丝酵母、近平滑假丝酵母、胶红酵母最常见[33]。木糖葡萄球菌、马胃葡萄球菌和肉葡萄球菌由于具有较强的蛋白酶和脂肪酶活性，从而有助于发酵中形成多肽、游离氨基酸和游离脂肪酸，是产品质地软化和独特风味产生的关键过程[34]。清酒乳杆菌和植物乳杆菌则能在较低的 pH 和水分活度值下生长，赋予发酵产品适当的酸度，但产酸过多也可能对产品风味产生负面影响[35–36]。酵母菌同样是发酵肉中的主要微生物之一，能抑制脂质氧化并稳定产品色泽，形成产品的良好风味，但其平均数量在 4.0~6.0 lg cfu/g 之间低于细菌 1~2 个数量级。胶红酵母发酵中能够产生粉红色或红色色素并可以将棉子糖作为单一碳源，有利于红色发酵肉制品的色泽[37]。隐球酵母在发酵肉制品较少见，但在葡萄酒发酵中经常存在且占比较少，具体作用和功能有待进一步研究[38]。

参考文献

[1] 朱旱林, 徐宝才, 黄千里. 徽式腊肉刀板香中优势微生物的分离鉴定[J]. 肉类研究, 2022, 36(5): 7–13.
ZHU HL, XU BC, HUANG QL. Isolation and identification of dominant microorganisms in Daobanxiang cured meat [J]. Meat Res, 2022, 36(5): 7–13.

[2] 刘雨萱, 任冠洁, 鲁家璇, 等. 市售四川腊肉中微生物群落结构及生物胺的相关性研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(16): 163–168.
LIU YX, REN GJ, LU JX, *et al*. Microbial community structure and biogenic amine content incommercial Sichuan bacon [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(16): 163–168.

[3] 王正莉, 王卫, 陈林, 等. 传统腌腊肉制品中微生物多样性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 202–206.
WANG ZL, WANG W, CHEN L, *et al*. Advances in the study of microbial diversity in traditional cured meat products [J]. Food Res Dev, 2021, 42(8): 202–206.

[4] GUO X, HUANG F, ZHANG H, *et al*. Classification of traditional Chinese pork bacon based on physicochemical properties and chemometric techniques [J]. Meat Sci, 2016, 117(6): 182–186.

[5] ROCCHETTI G, REBECCHI A, DALLOLIO M, *et al*. Changes in the chemical and sensory profile of ripened Italian salami following the addition of different microbial starters [J]. Meat Sci, 2021, 180(10): 108584.

[6] HALAGARDA M, WOJCIAK KM. Health and safety aspects of traditional European meat products. A review [J]. Meat Sci, 2022, 184(2): 108623.

[7] BISCOLA V, ABRIOUEL H, TODOROV SD, *et al*. Effect of autochthonous bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* on bacterial population dynamics and growth of halotolerant bacteria in Brazilian charqui [J]. Food Microbiol, 2014, 44: 296–301.

[8] 徐荟, 邓洁莹, 李小敏, 等. 3 种干腌火腿中细菌群落结构和风味的差异及相关性分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(21): 14–22.
XU H, DENG JY, LI XM, *et al*. Comparative analysis of correlation between microbial community and flavor in three dry-cured hams [J]. Food Res Dev, 2022, 43(21): 14–22.

[9] YANG L, LI HJ, WU H, *et al*. Quality relationship between smoked and air-dried bacon of Sichuan-Chongqing in China: Free amino acids, volatile compounds, and microbial diversity [J]. Food Res Int, 2023, 168(2): 112174.

[10] ZHONG A, CHEN W, DUAN Y, *et al*. The potential correlation between microbial communities and flavors in traditional fermented sour meat [J]. LWT- Food Sci Technol, 2021, 149 (9): 111873.

[11] 李珊珊, 祝超智, 崔文明, 等. 发酵肉制品中微生物发酵剂分离筛选及应用研究进展[J]. 肉类研究, 2019, 33(7): 61–66.
LI SS, ZHU CZ, CUI WM, *et al*. Recent progress in separation, screening and application of starter cultures for fermented meat products [J]. Meat Res, 2019, 33(7): 61–66.

[12] FRANCIOSA I, FERROCINO I, CORVAGLIA MR, *et al*. Autochthonous starter culture selection for Salame Piemonte PGI production [J]. Food Res Int, 2022, 162A(12): 112007.

[13] OLIBEIRA M, FERREIRA V, MAGALHAES R, *et al*. Biocontrol strategies for Mediterranean-style fermented sausages [J]. Food Res Int, 2018, 103(1): 438–449.

[14] EDUARDO D, FUNCK GD, HAUBERT L, *et al*. Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: Application potential, safety aspects, and emerging technologies [J]. Food Res Int, 2019, 122(8): 371–382.

[15] MAINAR MS, XHAFERI R, SAMAPUNDO S, *et al*. Opportunities and limitations for the production of safe fermented meats without nitrate and nitrite using an antibacterial *Staphylococcus sciuri*starter culture [J]. Food Control, 2016, 69(11): 267–274.

[16] GARCIA-DIEZ J, ALHEIRO J, PINTO AL, *et al*. Behaviour of food-borne pathogens on dry cured sausage manufactured with herbs and spices essential oils and their sensorial acceptability [J]. Food Control, 2016, 59: 262–270.

[17] DIEZ JG, PATARATA L. Behavior of *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Chourio de Vinho, a dry fermented sausage made from wine-marinated meat [J]. J Food Prot, 2013, 76(4): 588.

[18] NIKODINOSK I, BAFFONI L, GIOIA DD, *et al*. Protective cultures against foodborne pathogens in a nitrite reduced fermented meat product [J]. LWT- Food Sci Technol, 2019, 101(3): 293–299.

[19] FUKA MM, TANUWIDJAJA I, MAKSIMOVIC AZ, *et al*. Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures [J]. LWT- Food Sci Technol, 2020, 118(1): 108782.

[20] ZHANG Q, SONG X, SUN W, *et al*. Evaluation and application of different cholesterol-lowering lactic acid bacteria as potential meat starters [J]. J Food Prot, 2021, 84(1): 63–72.

[21] MEFTAG S, ABID S, DIAS T, *et al*. Mechanisms underlying the effect of commercial starter cultures and a native yeast on ochratoxin A production in meat products [J]. LWT-Food Sci Technol, 2020, 117(1): 108611.

[22] 李福荣, 袁德峥, 宋淑红. 信阳传统发酵腊肉细菌的分离纯化及鉴定[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2009, 22(4): 590–592, 610.
LI FR, YUAN DZ, SONG SH. The separation, purification and identification of bacteria used for the traditional fermented bacon in xinyang area [J]. J Xinyang Teach Coll (Nat Sci Ed), 2009, 22(4): 590–592, 610.

[23] 赵改名, 李珊珊, 崔文明, 等. 不同来源腊肉中细菌菌群结构与风味相关性分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13): 246–253.
ZHAO GM, LI SS, CUI WM, *et al*. Correlation analysis of bacterial community structure and flavor in different Chinese bacon [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(13): 246–253.

[24] 赵睿, 邵长春, 高世功, 等. 高通量测序分析不同腌腊肉制品细菌多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 90–96.
ZHAO R, SHAO CC, GAO SG, *et al*. High-throughput sequencing analysis of bacterial diversity of different types of traditional Chinese bacon [J]. Food Sci, 2020, 41(20): 90–96.

[25] WEN R, LV Y, LI X, *et al*. High-throughput sequencing approach to

reveal the bacterial diversity of traditional yak jerky from the Tibetan regions [J]. Meat Sci, 2021, 172: 108348.

[26] WANG XH, ZHANG YL, REN HY, *et al*. Comparison of bacterial diversity profiles and microbial safety assessment of salami, Chinese dry-cured sausage and Chinese smoked-cured sausage by high-throughput sequencing [J]. LWT Food Sci Technol, 2018, 90: 108–115.

[27] AYYASH M, ABU-JDAYIL B, ITSARANUWAT P, *et al*. Exopolysaccharide produced by the potential probiotic *Lactococcus garvieae* C47: Structural characteristics, rheological properties, bioactivities and impact on fermented camel milk [J]. Food Chem, 2020, 333: 127418.

[28] TOSUKHOWONG A, ZENDO T, VISESSANGUAN W, *et al*. Garvieacin Q, a novel class II bacteriocin from *Lactococcus garvieae* BCC 43578 [J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 78(5): 1619–1623.

[29] HU YY, ZHANG L, LIU Q, *et al*. The potential correlation between bacterial diversity and the characteristic volatile flavour of traditional dry sausages from Northeast China [J]. Food Microbiol, 2020, 91(10): 103505.

[30] LI ZG, LI YH, XIAO CG, *et al*. Genomic and metabolic features of the *Lactobacillus sakei* JD10 revealed potential probiotic traits [J]. Microbiol Res, 2022, 256(3): 126954.

[31] 朱嘉敏, 么紫瑶, 李梦彤, 等. 不同接种量的清酒乳杆菌对低钠盐风干肠品质的改善作用研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 133–142.
ZHU JM, MO ZY, LI MT, *et al*. Study on different inoculation levels of *Lactobacillus sakei* on the improvement of quality characteristics of low-sodium dry sausages [J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(7): 133–142.

[32] 吴燕涛, 赵谋明, 孙为正, 等. 内源性发酵剂 *Macrococcus caseolyticus* 发酵广式腊肠的风味物质成分分析[J]. 食品工业科技, 2011, 32(7): 207–209, 213.
WU YT, ZHAO MM, SUN WZ, *et al*. A analysis of volatile compounds of cantonese sausage fermented by *Macrococcus caseolyticus* separated from cantonese sausage [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(7): 207–209, 213.

[33] LI X, DENG J, WU Y, *et al*. Insight into the correlation between microbial diversity and flavor profiles of traditional dry-cured duck from the metabolomic perspective [J]. Food Res Int, 2022, 156: 111349.

[34] FLORES M, PIORNOS JA. Fermented meat sausages and the challenge of their plant-based alternatives: A comparative review on aroma-related aspects [J]. Meat Sci, 2021, 182: 108636.

[35] BEHERA SS, EL-SHEIKHA AF, HAMMAMI R, *et al*. Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits? [J]. J Funct Foods, 2020, 70: 103971.

[36] 吴慧玲, 葛英亮, 仲瑞文, 等. 基于 Illumina PE300 高通量测序的海南糟粕醋微生物多样性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(9): 49–58.
WU HL, GE YL, ZHONG RW, *et al*. Microbial diversity analysis of Hainan dross vinegar based on Illumina PE300 high-throughput sequencing [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(9): 49–58.

[37] RAMOS CL, ALMEIDA EG, FREIRE AL, *et al*. Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians [J]. Food Microbiol, 2011, 28(7): 1380–1386.

[38] LI SS, CHENG C, LI Z, *et al*. Yeast species associated with wine grapes in China [J]. Int J Food Microbiol, 2010, 138(1–2): 85–90.

(责任编辑: 郑　丽　于梦娇)

作者简介

崔文明, 博士, 讲师, 主要研究方向为畜产品加工及品质控制。
E-mail: wenmingcui@126.com

柳艳霞, 博士, 副教授, 主要研究方向为肉制品加工与质量控制。
E-mail: Liuyanxia@henau.edu.cn