

牛肉源热杀索丝菌的致腐差异和比较基因组学研究

方金玉, 张俊, 吴诗媛, 施永清, 石双妮*, 朱军莉
(浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品安全重点实验室 杭州 310018)

摘要 为探究牛肉中热杀索丝菌的致腐能力和致腐基因分布特点,经分离纯化、形态观察和 PCR 鉴定,获得 29 株热杀索丝菌。将其接种于 4℃牛肉汁中,测定挥发性盐基氮(TVB-N)值和乙偶姻指标,评价分离菌株的致腐能力。采用比较基因组学技术分析热杀索丝菌强、弱腐败株基因特点。结果表明,29 株热杀索丝菌分离株的 TVB-N 含量形成较慢,仅有 2 株菌在第 9 天超过 11.5 mg N/100 g,而产乙偶姻能力强,且有明显差异,其中菌株 BT27 和 BT25 含量分别为 139.3 μg/mL 和 59.5 μg/mL。测定强、弱致腐菌株 BT27 和 BT25 的全基因组序列,结果发现,热杀索丝菌基因组中存在大量参与碳水化合物代谢的基因,其中编码糖苷水解酶的基因数量最多,糖基转移酶基因次之。比较基因组学显示,强致腐株 BT27 被注释到碳水化合物代谢和相应酶的编码基因数量均多于弱致腐株 BT25,而两者在编码氨基酸代谢的基因数量相近。研究表明,热杀索丝菌致腐性强、弱与编码碳水化合物代谢基因数量密切相关,研究从基因层面为阐明肉源微生物的致腐机理奠定了良好的基础。

关键词 牛肉;比较基因组学;热杀索丝菌;致腐能力

文章编号 1009-7848(2024)01-0012-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.01.002

牛肉作为我国主要消费的肉类,营养价值高,是肉类消费市场的重要组成部分。国家统计局数据显示,2021 年全国牛肉产量 698 万 t,同比增长 3.7%^[1]。随着冷藏保鲜技术的发展,牛肉的消费市场进一步扩大。然而在冷链运输过程中,由于嗜冷微生物的新陈代谢活动,产生大量的醛、酮、有机酸和挥发性物质,导致牛肉品质下降^[2]。在冷鲜牛肉基质中,主导腐败活动的微生物只有 1 种或几种^[3],包括假单胞菌和热杀索丝菌。

热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)为环丝菌属,革兰氏阳性,需氧兼性厌氧型嗜冷菌,短链状或长丝状链状。热杀索丝菌在 0~30℃环境下生存,最佳生长温度范围 20~25℃,能够在 pH 值 5~9 的范围内生长^[4]。该菌自 1951 年首次从猪肉香肠中分离得到,广泛存在于猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉等多种生鲜肉及肉制品中^[5]。从牛肉胴体、动物皮肤和瘤胃到屠宰场设备及最终销售产品,热杀索丝菌在牛肉生产链中分布广泛^[6]。因其普遍存在且具有耐低温的特性,故热杀索丝菌是低温贮藏肉类以及海产品中的优势腐败菌。刘爱芳等^[7]研究

表明,4℃冷藏金枪鱼中热杀索丝菌能够产生大量挥发性盐基氮。除有氧包装外,热杀索丝菌还是气调包装和真空包装产品中的优势微生物^[8-9]。

随着高通量测序技术的发展,越来越多的菌株完成了全基因组测序。比较基因组学可以基于比较对象进行基因组元件的预测,以及功能蛋白注释,能够更加全面地了解不同菌株的发育特点,解释表型差异。目前,比较基因组学技术逐渐被应用于食品科学和安全领域研究。例如:彭明芳等^[10]对 3 株乳杆菌的比较基因组学研究发现,其具有丰富的碳水化合物酶谱。Li 等^[11]从冷藏虾中分离得到波罗的海希瓦氏菌,发现其基因组中 8.26% 的编码基因被注释到氨基酸转运和代谢功能,表明波罗的海希瓦氏菌具有良好的降解蛋白质的能力。Stanborough 等^[12]分析比较不同来源的 13 株莓实假单胞菌和 7 株隆德假单胞菌,发现其具有高度的遗传多样性,且不同菌株的挥发性成分产生能力存在差异。目前,从比较基因组学角度对热杀索丝菌的致腐能力的研究鲜有报道。本研究以冷鲜牛肉热杀索丝菌分离株为研究对象,以挥发性盐基氮(TVB-N)和乙偶姻为指标,筛选致腐差异的菌株,借助全基因组测序技术,分析预测致腐基因的分布,对深入探究该菌的致腐机制具有重要意义。

收稿日期: 2023-01-24

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGN20C200007)

第一作者: 方金玉,女,硕士生

通信作者: 石双妮 E-mail: 709622636@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

从杭州市某菜市场购买的冷鲜牛肉冰运至实验室,无菌条件下分割成片状(长 10 cm×宽 8 cm×厚 1.5 cm),放置于聚乙烯透氧托盘包装,在 4 °C 贮藏。

热杀索丝菌分离培养基(Steptomycin thallos acetate agar, STAA), 青岛海博生物技术有限公司;琼脂糖、缓冲液、引物、DNA Marker, 上海生工有限公司;氧化镁、硼酸、甲醇、乙腈, 国药集团化学试剂有限公司;盐酸、乙偶姻、萘酚、肌酸等, 阿拉丁公司;Dneasy Blood & Tissue Kit 试剂盒, 美国 Kapa Biosciences 公司。

1.2 仪器与设备

3-18K 型台式高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司;LRH-250A 型生化培养箱, 上海一恒科技有限公司;BHC-1300 型生物安全柜, 苏州市金净净化设备科技有限公司;FE20 型数显 pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UV-1800 型分光光度计, 日本 Kyoto 公司;KDN-103F 型凯氏定氮仪, 上海华焯公司;Agilent 2100 型生物分析仪, 美国 Agilent 公司;NovaSeq 6000 型测序仪, 美国 Illumina 公司;Vanquish 型电泳仪、Qubit@2.0 型荧光计, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 方法

1.3.1 热杀索丝菌的分离纯化及鉴定 牛肉在 4 °C 贮藏初期和贮藏末期 5 d 取样 25 g, 于 225 mL 生理盐水中, 稀释涂布于 STAA 培养基培养, 挑取典型形态的菌落经纯化培养后, 革兰氏染色。参考 Illikoud 等^[13]方法对分离得到的革兰氏阳性菌, 通过 *rpoB* 特异性引物 (Fw1:5'-GCGTGCATTAGG TTTCAGTACA -3', Rev1:5' -TCCAAGACCAGA CTCTAATTGCT-3') 扩增, 目的片段大小为 396 bp, 以李斯特菌及金黄色葡萄球菌为阴性对照。琼脂糖凝胶电泳观察分离菌株扩增出特定目的片段, 以此鉴定。

1.3.2 热杀索丝菌的腐败能力测定

1) 无菌牛肉汁的接种 根据顾春涛等^[14]的方法稍作修改, 将牛肉经无菌绞肉机绞碎后取 25 g 在 100 mL 无菌水中均质 1 min, 在 4 °C 离心 (6 000×g, 20 min)。然后将上清液过 0.45 μm 和

0.22 μm 无菌滤膜得到无菌牛肉汁。将分离株以 1% 接种于牛肉汁中, 4 °C 培养 5 d 和 9 d 取样分析。

2) 挥发性盐基氮 TVB-N 测定 参考 GB 5009.228-2016 中半微量定氮法检测 TVB-N 值。取 10 mL 牛肉汁, 加入饱和氧化镁溶液和 2% 硼酸溶液, 以甲基红-溴甲酚绿指示剂, 放置于半自动凯氏定氮仪中反应, 用 0.01 mol/L HCl 滴定。结果表示为 mg N/100 g 牛肉。

3) 产乙偶姻能力测定 根据 Illikoud 等^[15]的方法, 取样品离心的上清液, 分别按顺序添加 0.05 g/L 肌酸、0.5 g/L 萘酚、95% 乙醇、0.5 g/L KOH, 在波长 560 nm 处测吸光值。同时以不同浓度的乙偶姻标准品绘制标准曲线, 由标准曲线计算样品乙偶姻浓度。

1.3.3 热杀索丝菌强弱腐败株全基因组测序

1) 基因组 DNA 的提取 将分离菌株 BT25 和 BT27 划线至 STAA 培养基, 经 30 °C 培养 24 h, 挑取单个菌落接种于 5 mL TSB, 过夜培养。采用 Dneasy Blood&Tissue Kit 试剂盒提取 2 株分离菌株基因组 DNA。琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA, 并通过 Qubit® 2.0 荧光计(Thermo Scientific)进行定量。

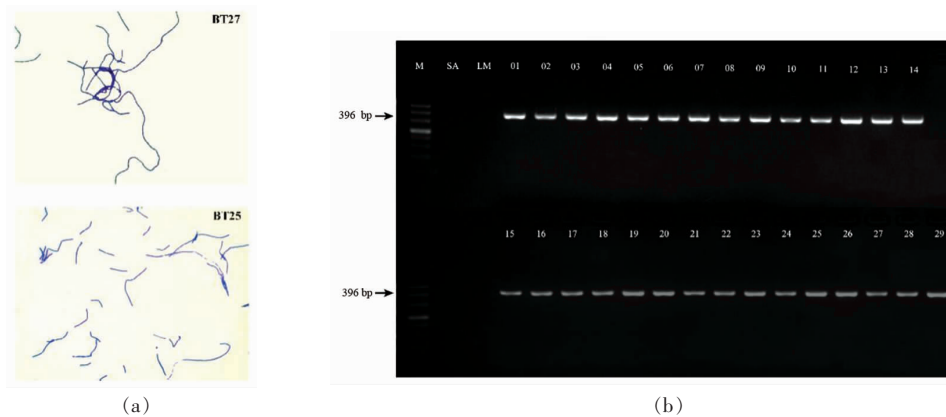
2) 文库构建 使用 NEBNext®UltraTM DNA Library Prep Kit for Illumina(NEB, 美国)生成测序文库。将 DNA 样品通过超声处理片段化为 350 bp, 然后将 DNA 片段末端抛光、加 A 尾, 并与全长接头连接, 用于 Illumina 测序。经 AMPure XP 系统纯化后的 PCR 产物通过 Agilent2100 生物分析仪分析文库的大小, 并使用实时 PCR 进行定量。

3) 基因测序及组装 全基因组测序由北京诺源生物信息技术有限公司完成。使用 Clean Data、SOAP denovo 和 SPAdes 软件进行基因组组装, 将初步组装结果与 CISA 软件进行整合, 选出支架最少的组装结果; 使用 gapclose 软件填补空白, 通过过滤低测序深度(小于平均深度的 0.35)的 reads 去除相同的 lane 污染, 得到最终组装结果, 随后过滤掉 500 bp 以下的片段。

4) 基因预测与功能注释 采用 geneMarkS 对测序基因组进行编码基因预测, 并通过 tRNAscan-SE、Rfam、RNAmmer 分析全基因组特征。

预测的蛋白序列通过 Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG)、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)、Carbohydrate-Active enzymes (CAZy) 数据库进行功能注释。

1.3.4 数据处理与统计分析 热杀索丝菌在牛肉汁中腐败试验重复3次,每组样品设立3组平行,结果取平均值。采用 GraphPad Prism 8.0 版本进行数据处理及绘图。显著性差异通过 GraphPad Prism 8.0 的 two-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示有统计学显著性差异。



注:a. 革兰氏染色观察;b. 1~29 为热杀索丝菌分离株,SA 为金黄色葡萄球菌,LM 为李斯特菌,M 为 Marker DL2000。

图 1 牛肉中热杀索丝菌的分离和鉴定

Fig.1 Isolation and identification of *B. thermosphacta* strains isolated from beef

2.2 热杀索丝菌分离株的致腐能力评价

热杀索丝菌 29 株分离株接种于灭菌牛肉汁中,以 TVB-N 和乙偶姻为指标评价致腐能力。如图 2 所示,所有分离株的 TVB-N 生成缓慢,经 9 d 冷藏下含量为 7.0~12.6 mg N/100 g,均未超过国家标准,其中 BT23 和 BT30 最高,含量增长至 11.5,12.6 mg N/100 g。TVB-N 是评价肉质新鲜度的重要指标,国家标准规定新鲜肉中 TVB-N 含量应不超过 15 mg N/100 g^[7]。另外,29 株分离株在牛肉汁中的乙偶姻增加明显,在第 5 天 BT27、BT01、BT2、BT14、BT17、BT24 从高到低的乙偶姻产量为 94.0~81.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 超过 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 BT16、BT25 较低。牛肉汁冷藏至第 9 天,BT06、BT09、BT20、BT21、BT26、BT27 的乙偶姻产量为 101.7~139.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并且 BT27 的产量最高,达到 139.3 $\mu\text{g}/$

2 结果与分析

2.1 热杀索丝菌的分离和鉴定

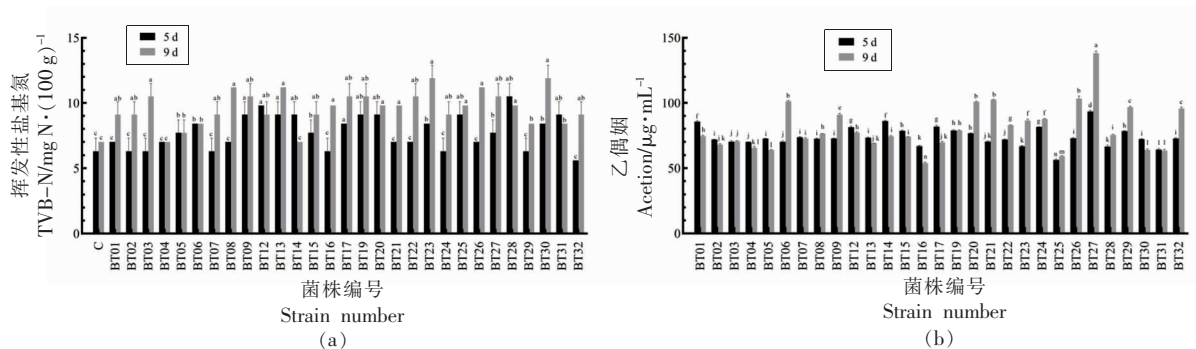
通过 STAA 分离培养得到 29 株分离株,经革兰氏染色后形态为蓝色,细杆状。采用 *rpoB* 特异性基因鉴定热杀索丝菌分离菌株。如图 1 所示,有 29 株分离株成功扩增出 396 pb 的目的条带,鉴定为热杀索丝菌,以单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌作为阴性对照,发现未扩增出条带。Adékambi 等^[6]发现编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 管家基因可以针对一系列密切相关的细菌物种,如乳酸菌和李斯特菌的 DNA,进行细菌鉴定和系统发育研究。

mL,而 BT16、BT25 仍较低。乙偶姻为热杀索丝菌在牛肉中的重要腐败代谢产物,29 株分离株在牛肉汁中的腐败能力存在差异,BT25 产乙偶姻能力最低,而 BT27 最高,因此选择 BT25 和 BT27 强弱菌株进行比较基因组学分析。

热杀索丝菌是导致冷鲜肉类腐败的优势嗜冷菌之一,使冷却肉产生具有异味的挥发性有机化合物,如乙偶姻、二乙酰,使腐败肉产生令人不适的奶酪或奶制品风味特征,多数情况下还会导致冷鲜肉表面发生绿变并伴随绿色液体产生^[7]。本研究表明,热杀索丝菌对蛋白质和非蛋白质含氮化合物的降解能力较弱,所有分离株的 TVB-N 积累量低,与假单胞菌、希瓦氏菌和气单胞菌等腐败菌致腐表型不同^[8]。课题组前期研究已发现^[9],热杀索丝菌能快速降解猪肉和牛肉中的葡萄糖,导

致 pH 值下降, 积累大量的乙偶姻。分离株在牛肉汁中产乙偶姻能力较强, 且不同菌株间具有差异,

其中菌株 BT27 最高, BT25 最弱, 这与其分解代谢葡萄糖产生乙偶姻有关^[20]。



注: 不同小写字母表示具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 2 热杀索丝菌分离株在 4 °C 牛肉汁中 TVB-N(a) 和乙偶姻(b) 的变化

Fig.2 Changes of TVB-N (a) and acetoin (b) of *B. thermosphacta* inoculated in sterile beef juice stored at 4 °C

2.3 热杀索丝菌强弱腐败株比较基因组学分析

2.3.1 两株菌基因组特点 利用 Illumina NovaSeq PE150 测序平台测定两株强、弱致病性的热杀索丝菌的全基因组序列。经组装拼接后, 其基因组特征如表 1 所示。BT27 基因全长为 3 028 989 bp, 86 个基因组重叠群, GC 含量为 36.10%, 其中包含了 2 980 个编码基因, 预测出 rRNA 和 tRNA 数量分别为 6 个和 51 个; BT25 基因全长为 2 617 130 bp, 9 个基因组重叠群, GC 含量为 36.18%, 其中包含了 2 526 个编码基因, 预测出 rRNA 和 tRNA 数量分别为 4 个和 20 个。

2.3.2 泛基因组分析 泛基因组 (Pan genome) 是某一物种全部基因的总称, 包括核心基因 (Core genome)、附属基因 (Accessory gene) 和特异性基因 (Unique gene)^[21]。核心基因组是所有菌株中都存在的一组基因, 主要参与基础生物学过程^[22]; 而附属基因则是指存在于生物体子集或单个生物体中编码次级代谢途径相关的基因; 特异性基因指仅在某一菌株中独特存在的基因。如图 3 显示, 热杀索丝菌 BT27 和 BT25 菌株一共预测出 3 887 个基因, 其中核心基因有 1 491 个, 占预测总基因数的 38.4%, 而独特基因分别为 1 419 个和 977 个, 占预测总基因数的 36.5% 和 25.1%。

2.3.3 基因功能注释

2.3.3.1 COG 注释 COG (Cluster of orthologous groups of protein) 蛋白数据库根据细菌、藻类和真核生物完整基因组的编码蛋白系统进化关系分类

表 1 两株热杀索丝菌基因组特点

Table 1 Genome features of two *B. thermosphacta* isolates

特征	BT27	BT25
基因组长度/bp	3 028 989	2 617 130
GC 含量/%	36.1	36.18
重叠群数量	86	9
编码基因	2 980	2 526
rRNA 数量	6	4
tRNA 数量	51	20

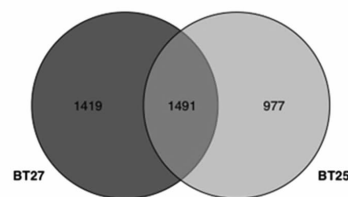


图 3 两株热杀索丝菌泛基因组分析

Fig.3 Pan genome of two *B. thermosphacta* isolates

构建而成。两株热杀索丝菌的 COG 注释如图 4 所示。BT27 和 BT25 的基因组上分别有 2 319 个和 1 966 个编码基因被注释到 22 个 COG 功能分类上, 两株热杀索丝菌的 COG 功能注释结果相似, 其中蛋白编码基因主要集中在氨基酸转运代谢 (255, 203 个基因)、碳水化合物转运代谢 (245, 175 个基因)、翻译、核糖体结构与生物合成 (185, 197 个基因)、转录 (209, 166 个基因) 等功能分类上; 而分布在细胞运动、胞外结构的编码基因数量

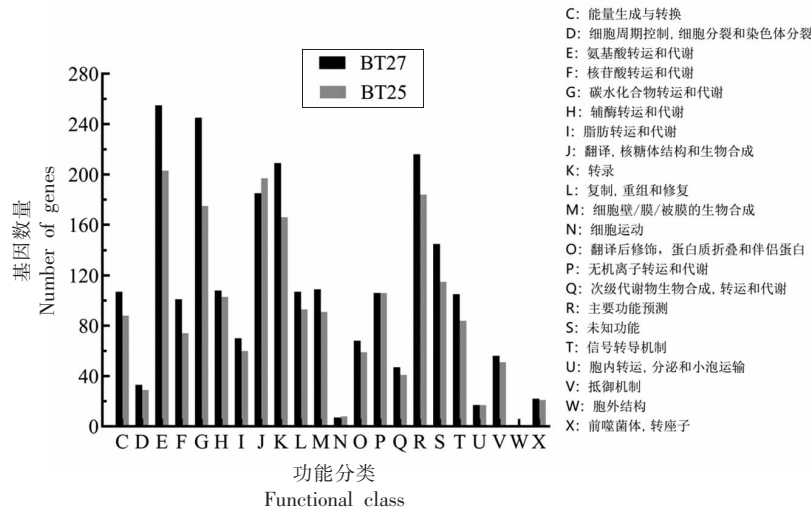


图4 两株热杀索丝菌 COG 功能注释

Fig.4 COG functions prediction of two *B. thermosphacta* isolates

较少。且在大部分 COG 功能分类中, BT27 的基因数量均多于 BT25。

2.3.3.2 KEGG 注释 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genome)是一个整合了基因组、化学分子和生化系统等方面的数据库, 能够系统分析基因产物和化合物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物的功能^[23]。图5为热杀索丝菌代谢相关通路注释结果, BT27 和 BT25 分离菌株分别有 1 460 个和 1 175 个编码基因被注释到代谢功能

中的 12 个功能分类。除全局和概览通路外, 2 株热杀索丝菌基因涉及最多的通路为碳水化合物代谢, 其中 BT27 有 240 个基因, BT25 有 175 个基因, 其次是氨基酸代谢, 两者均超过 140 个基因。

2.3.3.3 碳水化合物酶 碳水化合物活性酶(Carbohydrate-activeenzymes, CAZymes)为能催化碳水化合物降解、修饰、以及生物合成的相关酶系家族^[24]。其包含 6 个主要分类, 在 BT25 中发现 1 个编码 AAs 的基因。

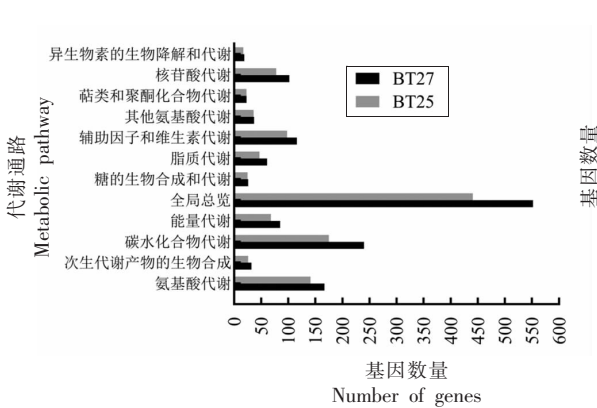


图5 两株热杀索丝菌 KEGG 代谢功能注释

Fig.5 KEGG functions prediction of two *B. thermosphacta* isolates

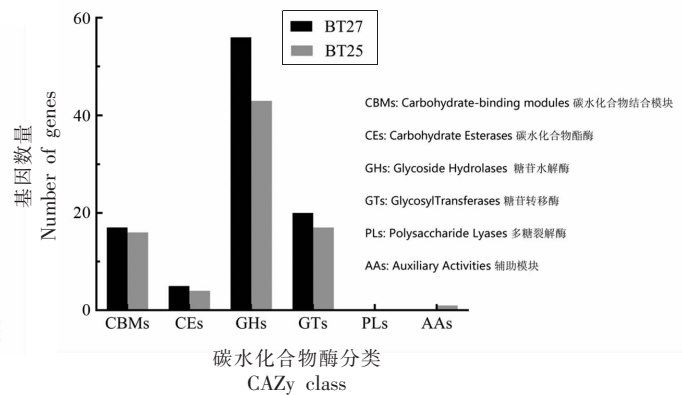


图6 两株热杀索丝菌碳水化合物酶的功能预测

Fig.6 CAZymes functions prediction of two *B. thermosphacta* isolates

两株腐败强、弱菌株的全基因组测序发现, BT27 和 BT25 的核心基因组比例达到 38.4%, 表明两菌株同源性较高。CAZy 注释显示热杀索丝菌

的基因组中存在大量参与碳水化合物代谢的编码基因和编码 GHs 基因, GHs 家族基因编码的糖苷水解酶具备催化塔格糖苷、阿拉伯呋喃糖苷、甘露

糖苷等糖类的功能^[25]。BT27 的基因组中还有相关的基因为 *lacC*(BT27_02234), *araQ*(BT27_00424), *manA*(BT27_00736)。Alexandrakis 等^[20]研究显示葡萄糖、核糖、甘油、甘油-3 磷酸和肌苷是热杀索丝菌在肉中生长的底物, 其中葡萄糖是首先被利用的碳源。另一方面, COG 注释显示两株菌也有编码氨基酸代谢的基因, 然而数量较少, 如 *sdhA* 基因(BT27_00143)编码的 *L*-丝氨酸脱水酶, *oppB* 基因(BT27_00600)编码寡肽转运系统渗透蛋白。然而, 它们可利用的氨基酸范围非常窄。Illikoud 等^[27]发现热杀索丝菌基因组仅存在编码降解亮氨酸以产生异戊酸盐和 3-甲基丁醇所需酶的基因。基于两株强、弱腐败株的比较基因组学发现, 腐败能力较强的 BT27 被注释到碳水化合物代谢和碳水化合物酶的编码基因数量均多于腐败能力较弱的 BT25, 提示热杀索丝菌的腐败潜力取决于碳水化合物的代谢能力。相似地, 猪肉来源热杀索丝菌基因中也有大量磷酸烯醇式丙酮酸依赖型磷酸转移酶系统(PTS)的底物特异性基因, 同时还存在编码核糖、麦芽糖和肌醇转运体的基因^[28], 提示热杀索丝菌的碳源利用能力极强。

PTS 可以将多种糖类及其衍生物进行磷酸化, 然后运输到细胞内。绝大多数细菌 PTS 的基本组成几乎都包含 2 个磷酸转移酶: 酶 I(EI)和组氨酸磷酸载体蛋白(HPr), 以及依赖于不同种类糖的特异性酶 II 复合物(EIIA, EIIB, EIIC, EIID)^[29]。编码 EI 和 HPr 蛋白的基因通常在同一个操纵子上, 即 *ptsHI* 操纵子。EI(约 570 个残基)由 *ptsI* 基因(BT27_00962)编码, HPr(约 90 个残基)由 *ptsH*(BT27_00963)基因编码^[30]。BT27 和 BT25 中涉及编码 PTS 的基因多达 17 种, *bglF*、*celA*、*crr*、*dhaK*、*dhaL*、*dhaM*、*fruA*、*gmuC*、*malX*、*manX*、*manY*、*manZ*、*mtlA*、*nagP*、*ptsG*、*treP*、*ulaA*, 而致腐能力更强的 BT27 中的基因数量更多。它们编码的蛋白质主要用于能量运输过程中碳水化合物(如葡萄糖、果糖、甘露糖、乳糖、海藻糖和纤维二糖等)的吸收, 并将糖类物质催化转化为相应的磷酸酯。

此外, BT27 中还存在多种糖类的转运系统, 如 *malG*(BT27_01417)编码麦芽糖转运系统渗透蛋白, 在麦芽糖进入细胞内后由 *malP*(BT27_00184)编码的麦芽糖羧化酶催化进入相应

代谢途径。*rbsA*(BT27_02029)、*rbsB*(BT27_02027)和 *rbsC*(BT27_02028)基因分别调节核糖与 ATP 的结合以及细胞膜渗透。阿拉伯糖的降解需要 *araB*、*araA* 和 *araD* 3 个基因, 分别编码核酮糖激酶、阿拉伯糖异构酶和核酮糖-5-磷酸差向异构酶^[31], 在 BT27 相应的基因为 BT27_01643、BT27_00421 和 BT27_00424。

3 结论

热杀索丝菌是冷鲜肉中常见的腐败菌, 近期研究发现猪肉、牛肉、羊肉及腌制肉中均有存在^[32], 表现出很强的代谢多样性和广泛的定殖环境, 然而, 对热杀索丝菌致腐机制的研究仍较少。本研究从冷鲜肉样品中共分离得到 29 株热杀索丝菌, 分离株的 TVB-N 形成较弱, 而产乙偶姻能力较强, 且基于乙偶姻差异获得强、弱腐败菌 BT27 和 BT25。通过比较基因组学解析了冷鲜肉分离的热杀索丝菌降解碳水化合物分解酶的基因。2 株热杀索丝菌核心基因组中涉及调控基因比例较高, 其致腐能力与碳水化合物基因编码的酶和蛋白质相关, 从基因层面上阐明 BT27 菌株的强致腐能力的分子基础。研究为热杀索丝菌分离株的基因组结构中差异性研究提供了线索, 为后续热杀索丝菌代谢特征、致腐机理和调控通路研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 农业农村部畜牧兽医局, 全国畜牧总站, 农业农村部畜牧业监测预警专家组. 2021 年肉牛产业发展形势及 2022 年展望[J]. 中国畜牧业, 2022(4): 34-35. Animal Husbandry and Veterinary Bureau Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National General Station of Animal Husbandry, Animal Husbandry Monitoring and Early Warning Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Development situation of beef cattle industry in 2021 and prospect in 2022 [J]. China Animal Industry, 2022(4): 34-35.
- [2] PELLISSERY A J, VINAYAMOHAN P G, A-MALARADJOU M, et al. Spoilage bacteria and meat quality[M]//Meat Quality Analysis, New York: Academic Press, 2020: 307-334.

- [3] KATIYO W, DE KOCK H L, COOREY R, et al. Sensory implications of chicken meat spoilage in relation to microbial and physicochemical characteristics during refrigerated storage[J]. *LWT- Food Science and Technology* 2020, 128: 109468.
- [4] STACKEBRANDT E, JONES D. The genus *Brochothrix*[M]//The Prokaryotes, New York: Springer, 2006: 477-491.
- [5] MCLEAN R A, SULZBACHER W L. *Microbacterium thermosphactum*, spec nov; a nonheat resistant bacterium from fresh pork sausage [J]. *Journal of Bacteriology*, 1953, 65(4): 428-433.
- [6] NYCHAS G J E, SKANDAMIS P N, TASSOU C C, et al. Meat spoilage during distribution[J]. *Meat Science*, 2008, 78(1/2): 77-89.
- [7] 刘爱芳, 谢晶, 钱韻芳. 冷藏金枪鱼优势腐败菌致腐败能力[J]. *食品科学*, 2018, 39(3): 7-14.
- LIU A F, XIE J, QIAN Y F. Spoilage potential of dominant spoilage bacteria from chilled tuna (*Thunnus obesus*)[J]. *Food Science*, 2018, 39(3): 7-14.
- [8] GRIBBLE A, BRIGHTWELL G. Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR[J]. *Meat Science*, 2013, 94(3): 361-368.
- [9] NOWAK A, RYGALA A, OLTUSZAK-WALCZAK E, et al. The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(6): 1304-1310.
- [10] 彭明芳, 李培骏, 单杨, 等. 比较基因组揭示广西酸菜乳杆菌碳水化合物活性酶谱[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(4): 68-73.
- PENG M F, LI P J, SHAN Y, et al. Comparative genome analysis of carbohydrate activity enzymes zymogram of *Lactobacillus* from Guangxi pickle [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(4): 68-73.
- [11] LI J, YU H, YANG X. Complete genome sequence provides insights into the quorum sensing-related spoilage potential of *Shewanella baltica* 128 isolated from spoiled shrimp[J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 736-748.
- [12] STANBOROUGH T, FEGAN N, POWELL S M, et al. Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 268: 61-72.
- [13] ILLIKOUD N, ROSSERO A, CHAUVET R, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*[J]. *Food Microbiology*, 2019, 81: 22-31.
- [14] 顾春涛, 毕伟伟, 朱军莉. 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.
- GU C T, BI W W, ZHU J L. Bacterial community structure and spoilage potential of dominant bacteria in chilled beef[J]. *Food Science*, 2019, 40(18): 76-82.
- [15] ILLIKOUD N, ROSSERO A, CHAUVET R, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*[J]. *Food Microbiology*, 2019, 81: 22-31.
- [16] ADÉKAMBI T, DRANCOURT M, RAOULT D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(1): 37-45.
- [17] GRIBBLE A, MILLS J, BRIGHTWELL G. The spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and two psychrotolerant Enterobacteriaceae in vacuum packed lamb and the comparison between high and low pH cuts[J]. *Meat Science*, 2014, 97(1): 83-92.
- [18] 毕伟伟, 冯立芳, 石双妮, 等. 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌致腐性及 TorA 还原酶差异比较[J]. *水产学报*, 2020, 44(3): 495-504.
- BI W W, FENG L F, SHI S N, et al. Comparison of spoilage potential and TorA protein between *Shewanella baltica* and *Aeromonas salmonicida*[J]. *Journal of Fisheries*, 2020, 44(3): 495-504.
- [19] FANG J Y, FENG L F, LU H X, et al. Metabolomics reveals spoilage characteristics and interaction of *Pseudomonas lundensis* and *Brochothrix thermosphacta* in refrigerated beef[J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111139.
- [20] CASABURI A, DE FILIPPIS F, VILLANI F, et al. Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat[J]. *Food Research International*, 2014, 62: 366-374.
- [21] 关海霞. 细菌的泛基因组分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(1): 111-115, 120.
- GUAN H X. Pan-genomic analysis of bacteria[J].

- Chinese Journal of Biologicals, 2021, 34(1): 111–115, 120.
- [22] 朱丽萍, 张文成, 颜世敢, 等. 细菌核心基因组多位点序列分型(cgMLST)与溯源评价[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(6): 140–146.
- ZHU L P, ZHANG W C, YAN S G, et al. Evaluation of core genome multilocus sequence typing and traceability of bacteria [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021, 53(6): 140–146.
- [23] 张璟, 陈倩, 顾丽红, 等. 一株耐受蛋清蛋白的鸡蛋腐败菌 S 菌株的分离鉴定及其 De novo 测序分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(3): 58–64.
- ZHANG J, CHEN Q, GU L H, et al. Identification of a spoilage *Bacterium* S from eggs with tolerance to egg white protein and De novo sequencing analysis of the strain[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(3): 58–64.
- [24] 王光宇, 邱伟芬, 徐幸莲, 等. 冷鲜鸡肉中莓实假单胞菌 NMC25 的全基因组测序及分析[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 233–238.
- WANG G Y, QIU W F, XU X L, et al. Whole genome sequencing and analysis of *Pseudomonas fragi* NMC25 from chilled chicken[J]. Food Science, 2021, 42(16): 233–238.
- [25] 李兵, 刘柳, 单婷婷, 等. 蜜环菌糖苷水解酶家族基因在菌索与菌丝间的差异表达分析[J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1369–1379.
- LI B, LIU L, SHAN T T, et al. Analyses of the glycoside hydrolase family genes and their differential expressions between rhizomorphs and hypha in *Armillaria mellea*[J]. Mycosystema, 2021, 40(6): 1369–1379.
- [26] ALEXANDRAKIS D, DOWNEY G, SCANNELL A G M. Rapid Non-destructive detection of spoilage of intact chicken breast muscle using near-infrared and fourier transform mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 338–347.
- [27] ILLIKOUD N, KLOPP C, ROULET A, et al. One complete and three draft genome sequences of four *Brochothrix thermosphacta* strains, CD 337, TAP 175, BSAS1 3 and EBP 3070[J]. Standards in Genomic Sciences, 2018, 13: 22.
- [28] ILLIKOUD N, GOHIER R, WERNER D, et al. Transcriptome and volatilome analysis during growth of *Brochothrix thermosphacta* in food: Role of food substrate and strain specificity for the expression of spoilage functions[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2527.
- [29] 刘倩钰, 吴丽雯, 牛建军, 等. 细菌磷酸转移酶系统(PTS)的组成与功能研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2266–2277.
- LIU Q Y, WU L W, NIU J J, et al. Research progress of the composition and function of bacterial phosphotransferase system[J]. Microbiology, 2020, 47(7): 2266–2277.
- [30] 张怀, 于立涛. 大肠杆菌 *ptsHI-crr* 基因的敲除及其对苯丙氨酸生产的影响[J]. 生物技术通报, 2010(11): 177–181.
- ZHANG H, YU L T. Knockout of *ptsG* gene of *Escherichia coli* w3110 and its impact on production of phenylalanine [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(11): 177–181.
- [31] 崔志刚, 卢昕, 徐嘉良, 等. 利用比较基因组学研究河弧菌和霍乱弧菌在阿拉伯糖代谢试验中不同表型的分子遗传基础[J]. 实用预防医学, 2014, 21(4): 408–411.
- CUI Z G, LU X, XU J L, et al. Comparative genomic analysis on molecular genetic basis of different phenotypes of *Vibrio fluvialis* and *Vibrio cholerae* in L-arabinose experiment[J]. Practical Preventive Medicine, 2014, 21(4): 408–411.
- [32] PENNACCHIA C, ERCOLINI D, VILLANI F. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 84–93.

Spoilage Difference and Comparative Genomics Studies on the *Brochothrix thermosphacta* from Beef

Fang Jinyu, Zhang Jun, Wu Shiyuan, Shi Yongqing, Shi Shuangni*, Zhu Junli
(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018)

Abstract In order to explore the spoilage ability and gene characteristics of *Brochothrix thermosphacta* in beef, 29

strains were obtained by purification, morphological observation and PCR identification from chilled beef. The spoilage potential of these isolates was evaluated by the production of total volatile basic nitrogen (TVB-N) and acetoin index in beef juice at 4 °C. The whole genome sequences of strong and weak spoilers were compared. The results showed that the TVB-N values increased slowly, and only two strains exceeded 11.5 mg N/100 g on the 9th day. In contrast, these isolates strongly produced acetoin, and their producing abilities differed. The acetoin contents of strain BT27 and BT25 were 139.3 µg/mL and 59.5 µg/mL, respectively. The whole genome sequencing of BT27 and BT25 showed a large number of genes involved in carbohydrate metabolism, the largest number of genes was encoding glycoside hydrolase, followed by glycosyltransferase genes. Comparative genomics showed that the number of genes encoding carbohydrate metabolism and corresponding enzymes of strong spoiler BT27 was more than that of weak spoiler BT25, while the number of genes encoding amino acid metabolism was similar between them. This study indicated that the spoilage ability of *B. thermosphacta* was correlated to the number of genes encoding carbohydrate metabolism, which provided the genetic point of view for elucidating the spoilage mechanism of meat microbiology.

Keywords beef; comparative genomics; *B. thermosphacta*; spoilage ability