

## 天然复配香辛料对猪肉保鲜的影响

何 皎, 牛明福\*, 张改平, 郭赛楠

(河南科技大学食品与生物工程学院 河南科技大学微生物资源开发与利用校级重点实验室 河南洛阳 471023)

**摘要** 目的:香辛料黄芪、山黄皮和肉桂具有良好的抑菌活性,复配后可作为安全、高效的食品天然防腐剂。本研究探究其复配提取物在猪肉防腐上的应用。方法:以抑菌和抗氧化双活性为评价指标,结合菌落总数计数、TVBN 值、pH 值、感官评价研究香辛料黄芪、山黄皮和肉桂复配对猪肉的保鲜效果。采用 16S rRNA 测序技术分析鲜猪肉储存过程中复配香辛料组与对照组微生物组成及多样性变化,明确微生物丰度变化与猪肉保鲜时长的相关性。结果:复配香辛料可延长鲜猪肉货架存储期 5~6 d。基于 16SrRNA 基因测序分析 6 个样品共鉴定出 21 个属,假单胞菌属、不动杆菌属和类香味菌属是导致腐败的主要微生物。自然储存鲜猪肉主要代谢途径的变化与属水平优势微生物——库特氏菌、类香味菌属、假单胞菌属的变化相符。在复合天然防腐剂作用下,5 d 贮藏期的冷鲜猪肉的主要腐败属——不动杆菌属占比由 20.08%降到 1.64%,假单胞菌属由 21.10%降到 7.13%,库特氏菌仅增长 0.7%,类香味菌属由 13.02%降到 7.94%。结论:上述复配香辛料可作为猪肉的保鲜剂。研究结果为充分利用传统香辛料开发食品防腐剂提供了技术参考。

**关键词** 肉桂;复配;抑菌性;抗氧化;16SrRNA

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0409-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.038

目前社会食品防腐剂使用现状混乱,大多食品安全问题都是滥用和过度使用化学防腐剂导致的。随着人们经济水平提升,消费者越来越重视食品安全问题,因此安全、价廉、效用高的食品防腐剂的研发已成为当下重要课题。天然香辛料大多具有较好的抗微生物作用,通过筛选可作为高效、低毒的食品防腐剂,然而,单一香辛料制备的防腐剂抑菌谱较窄,并且低剂量时抑菌药效不理想,因此多种香辛料天然防腐剂开展协同抑菌是一种发展方向。石浩等<sup>[1]</sup>研究也表明低剂量的植物提取物协同抑菌活性高于单一提取物,协同抑菌具备较好理论支持。食品腐败的过程与微生物生长和活性酶等生物因素相关,同时也食品本身抗氧化性强弱有关。当前关于食品防腐剂抗氧化性的相关研究成果较少,因此开发具有抑菌与抗氧化双活性的食品防腐剂功能成分有极大研究价值。有研究表明黄芪、山黄皮对革兰氏阳性菌的抑制能力强,复配香料肉桂可增强对革兰氏阴性菌和真菌的抑制能力<sup>[2-3]</sup>。王朋朋等<sup>[4]</sup>通过线虫寿命测定和体内自由基清除试验,得出肉桂具有较好抗氧化性,

肉桂中天然亲脂性的萜烯类化合物,可起到抗氧化作用。因此肉桂与三黄复配可用作抑菌抗氧化双活性食品防腐剂。

我国是世界上最大的肉类生产国和消费国,猪肉年产量达 4 667 万 t,猪肉因营养成分丰富、肉质优良、口感上乘、营养价值高等特点,深受消费者的喜爱,然而猪肉在产销过程中常因储存不当而被微生物污染变质,食用变质猪肉会引起腹泻、呕吐等症状,甚至会引起菌血症,开发保鲜效果好的防腐剂用于猪肉保鲜具有非常大的意义<sup>[5-6]</sup>。肉类的腐败主要由多种微生物反应引起,随着分子生物学技术的不断发展,新的技术—高通量测序技术被广泛应用于研究食源性病原菌和腐败菌的检测等领域中,近年来逐步建立起来的 16SrRNA 基因序列分析法,通过提取样品中微生物总 DNA,直接从核酸水平对样品进行分析研究,较好地避免了样品中微生物的丢失<sup>[7-8]</sup>。目前基于 16SrRNA 测序分析防腐剂应用于鲜猪肉后腐败微生物多样性的研究较少,因此开展鲜猪肉微生物组学的研究将非常必要。本研究的目的是通过防腐体系处理猪肉组,采用分子生物学技术 16SrRNA 基因序列分析法对处理后鲜猪肉的微生物群落多样性和构成进行比较分析,获得样本中微生物的群落组成和微生物的动态变化情况,全面

收稿日期:2023-09-14

基金项目:河南省自然科学基金项目(202300410154)

第一作者:何皎,男,硕士

通信作者:牛明福 E-mail: mingfuniu@163.com

地展现防腐体系在微生物丰度的变化与猪肉保鲜的相关性,为猪肉高效防腐剂的研发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料与试剂 鲜猪里脊肉购自洛阳市大张超市,黄芪、山黄皮、肉桂、维生素C等购自洛阳市张仲景大药房。

E.Z.N.A.<sup>®</sup> Soil DNA Kit DNA 抽提试剂盒,美国Omega公司;FastPfu Polymerase,北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 菌种 肠炎肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*,CGMCC21510)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*,GIM1.443)、大肠杆菌(*E. coli* 299,GIM1.299)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,CGMCC29213)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*,BRCC-MP-RTP3-B033)、酵母菌(Y1-Y4)、意大利青霉、指状青霉等菌种为本实验室保藏。

1.1.3 主要仪器与设备 ABI GeneAmp<sup>®</sup>9700型PCR仪,美国ABI公司;DYY-6C电泳仪,北京六一生物科技有限公司;HiSeq 4000 SBS Kit (300cycles),Illumina;Illumina MiSeq/NovaSeq高通量测序,上海美吉生物医药科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 供试品的制备 精确称取粉末状黄芪154 g,山黄皮209 g 复配香辛料肉桂250 g。置于具塞锥形瓶中。以液料比16:1、提取温度65.4℃、乙醇提取液体积分数为45%,提取时间3.2 h。于80 W,40 kHz下超声提取后于4℃,10 000 r/min离心10 min,取上清液,过滤减压浓缩滤液至1 g/mL,冷冻干燥获得获得复配醇提物冻干粉样品(实验室前期优化最佳配比与提取工艺)。

#### 1.2.2 抑菌与抗氧化双活性检测

1.2.2.1 培养基制备与菌种活化 BPA培养基:蛋白胨5.0 g、牛肉浸膏3.0 g、酵母浸粉1.0 g、葡萄糖10 g、琼脂20 g(配制液体培养基不加琼脂)、1 000 mL蒸馏水。

LB培养基:蛋白胨10.0 g、酵母浸粉5.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂20 g(配制液体培养基不加琼

脂),1 000 mL蒸馏水。

PDA培养基:称取200 g 洁净去皮马铃薯加入1 000 mL蒸馏水于搪瓷缸中加热煮沸30 min,取洁净纱布过滤,取滤液。

称取葡萄糖20 mL、琼脂20 g(配制液体培养基不加琼脂)于滤液中玻璃棒搅拌加热直至完全溶解后,再次过滤后冷却至室温后调pH值为7.0,分装于250 mL锥形瓶,高压蒸汽灭菌。

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、肠炎沙门氏菌、绿脓杆菌、酵母菌、意大利青霉菌、指状青霉等分别用相应培养基复苏备用。

1.2.2.2 复配醇提物最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定 于保存菌种平板上挑取相应单个菌落,接种于相应培养液,细菌37℃培养12 h,真菌28℃培养24 h。调整OD<sub>600nm</sub>=0.5,用无菌培养液以1:1 000稀释备用。将醇提样品液稀释备用。MIC测定方法采用微孔法<sup>[9]</sup>进行。

#### 1.2.2.3 复配醇提物的抗氧化测定

1) 总抗氧化能力测定 总抗氧化能力测定具体步骤参照T-AOC检测试剂盒(微量法)说明书。活性计算公式:总抗氧化能力(U/mL) =  $x \times V_{反总} \div V_{样} = 34 \times x$ ,抗氧化率(%) =  $[A_{待测}/AVC] \times 100$

2) DPPH·清除能力测定 检测方法在Zhang等<sup>[10-11]</sup>基础上改进后,以1 mg/mL维生素C(VC)溶液作为阳性对照。每个样品做3次重复。活性计算公式:DPPH清除能力(%) =  $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$

3) 羟自由基清除能力测定 检测方法在韦会平等<sup>[12]</sup>的基础上修改,每个样品做3次重复,活性计算公式:羟自由基清除能力(%) =  $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$

1.2.3 天然复配香辛料在猪肉保鲜上的应用 在超净台中取出肉进行切割处理,将肉切成50 g的块状备用。

1) 用生理盐水将复合冻干粉配制成溶液稀释,质量浓度分别为:250,50,1 μg/mL;

2) 喷涂法处理鲜猪肉。将不同浓度的冻干粉溶液在猪肉表面进行喷涂处理,采用无菌喷雾瓶在猪肉表面喷洒;

3) 设置空白对照组(0 μg/mL即为生理盐水进行处理);

4) 将猪肉放置于无菌广口瓶后中,置于4℃避光保存;

5) 分别在第0,1,3,5,7,9天取样进行pH值、总挥发性盐基氮TVB-N和活菌计数TVC测定及感官评价。pH值检测,根据国家标准GB 5009.237-2016法对猪肉样品进行pH值检测。总挥发性碱性氮TVB-N检测,根据国家标准GB 5009.228-2016法对猪肉样品进行TVB-N检测。活菌计数TVC检测,根据国家标准GB 4798.2-2016法对猪肉样品进行TVC检测。感官评价,根据国家标准GB/T 4798.2-2016法对猪肉样品进行感官评价。

#### 1.2.4 天然复配香辛料在猪肉保鲜中的微生物多样性分析

##### 1.2.4.1 鲜猪肉微生物多样性测序前样品处理:

1) 用无菌水将SHF防腐体系冻干粉配制成溶液,稀释液质量浓度为50 μg/mL;

2) 将新冰鲜猪里脊肉,用无菌水去除表面血水后,在超净工作台中沥水分;

3) 在超净工作台内用无菌手术刀将猪里脊肉均匀切块,每块约3 g;

4) 浸泡处理鲜猪肉。挑选9块均匀的猪里脊肉用无菌喷雾瓶将稀释液在猪肉表面均匀喷洒;

5) 挑选9块均匀猪里脊肉再用无菌喷雾瓶将无菌水在猪肉表面均匀喷洒,作为空白对照;

6) 将猪肉放置于无菌锥形瓶后用透气封口膜密封,置于常温有氧(4℃)避光保存,试验组鲜猪肉编号为:Z1,Z1-2,Z1-3,Z2-1,Z2-2,Z2-3,Z3-1,Z3-2,Z3-3;对照组编号为:Z4-1,Z4-2,Z4-3,Z5-1,Z5-2,Z5-3,Z6-1,Z6-2,Z6-3;

7) 分别在第1,3,5天取样。(待上述对照组和试验组中处理过的鲜猪肉到达取样时间,将鲜猪肉组织置于已编号无菌的离心管中,通过液氮速冻30 min,-80℃保存备用)。

1.2.4.2 DNA抽提 根据E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA kit说明书进行样品总基因组DNA抽提,使用1%的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA的质量,使用NanoDrop2000测定DNA浓度和纯度。将样品在冰上融化后,充分混匀并离心,取适量样品进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA的质量,并测定DNA浓度和纯度。检测参数设置

(琼脂糖凝胶浓度:质量分数1%,琼脂糖胶电压:5 V/cm,时间:20 min)。

1.2.4.3 PCR扩增和测序文库构建 以上述提取的DNA为模板,使用携带Barcode序列的上游引物338 F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG)和下游引物806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)对16S rRNA基因V3-V4可变区进行PCR扩增,PCR反应体系为:

20 μL反应体系:5×FastPfu Buffer,4 μL。2.5 mmol/L dNTPs,2 μL。Forward Primer(5 μmol/L),0.8 μL。FastPfu Polymerase,0.4 μL。BSA0,2 μL。Template DNA,10 ng。补ddH<sub>2</sub>O,12.6 μL。

扩增程序如下:95℃预变性3 min,27个循环(95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s),然后72℃稳定延伸10 min,最后在10℃进行保存。每个样本3个重复。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 Gel Extraction Kit进行回收产物纯化,纯化后送上海美吉生物医药科技有限公司利用Miseq PE300平台进行测序。

1.2.4.4 高通量测序数据分析 使用fastp<sup>[13]</sup>(<https://github.com/OpenGene/fastp>,version 0.19.6)软件对双端原始测序序列进行质控,使用FLASH<sup>[14]</sup>(<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>,version 1.2.11)软件进行拼接:1)过滤reads尾部质量值20以下的碱基,设置50 bp的窗口,如果窗口内的平均质量值低于20,从窗口开始截去后端碱基,过滤质控后50 bp以下的reads,去除含N碱基的reads;2)根据PE reads之间的overlap关系,将成对reads拼接(merge)成一条序列,最小overlap长度为10 bp;3)拼接序列的overlap区允许的最大错配比率为0.2,筛选不符合序列;4)根据序列首尾两端的barcode和引物区分样品,并调整序列方向,barcode允许的错配数为0,最大引物错配数为2。使用UPARSE<sup>[15-16]</sup>(<http://drive5.com/uparse/version> 7.1),根据97%的相似度对质控拼接后的序列进行操作分类单元OTU(Operational taxonomic unit)聚类并剔除嵌合体。为了尽量减少测序深度对后续Alpha多样性和Beta多样性数据分析的影响,将所有样本序列数按最低样本抽平,抽平后,每个样本的平均序列覆盖度(Goods

coverage) 仍可达 99%, 利用 RDP classifier<sup>[90]</sup> ([http://rdp.cme.msu.edu/version\\_2.11](http://rdp.cme.msu.edu/version_2.11)) 比对 Silva 数据库(v138)进行 OTU 物种分类学注释,置信度阈值为 70%,并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成。使用 PICRUST2<sup>[17]</sup>(version 2.2.0) 软件进行 16S 功能预测分析。

1.2.4.5 统计分析 采用 mothur<sup>[18]</sup> 软件 (<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>) 计算 Alpha 多样性。Size<sup>[19]</sup>(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/LEfSe>) 确定不同组间从门到属水平丰度显著差异的细菌类群。

2 结果与讨论

2.1 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)

中药复配醇提物的 MIC 和 MBC 结果见表 1。复配醇提物对供试菌的抑菌活性均较好。由下表可知杀菌效果顺序为: 意大利青霉>酿酒酵母菌=金黄色葡萄球菌=大肠杆菌=蜡样芽孢杆菌=指状青霉>猪肠炎沙门氏菌=绿脓杆菌。复合天然防腐剂对细菌和真菌均有较好抑制作用,是作为猪肉防腐剂的良好来源。天然复合防腐剂对细菌和真菌均有较好抑制作用,是作为食品防腐剂的良好来源。

表 1 对供试菌株的 MIC 和 MBC

Table 1 MIC and MBC for the tested strains

供试菌株	MIC/(mg/mL)	MBC/(mg/mL)
大肠杆菌	1.25	1.25
金黄色葡萄球菌	0.625	1.25
蜡样芽孢杆菌	1.25	1.25
肠炎沙门氏菌	1.25	2.5
绿脓杆菌	2.5	2.5
酿酒酵母	0.625	1.25
酵母菌 Y1	0.625	1.25
酵母菌 Y2	1.25	1.25
酵母菌 Y3	0.625	1.25
酵母菌 Y4	1.25	2.5
意大利青霉	0.625	0.625
指状青霉	1.25	1.25

2.2 复配前后的抗氧化能力对比

由表 2 可得,黄芪、山黄皮、肉桂复配后的抗氧化性有较大提升,复配后和 VC 溶液对 DPPH 自由基清除率、总抗氧化能力分别为 95.3%和 73.1%,16 921.2 U/mL,与同浓度维生素 C 抗氧化能力接近,表明可作为猪肉的抗氧化剂使用。

表 2 抗氧化性能

Table 2 Antioxidant properties

	黄芪	山黄皮	肉桂	复配物	维生素 C
DPPH 清除率/%	62.1	78.6	82.1	95.3	97.55
羟自由基清除率/%	50.2	49.3	67.55	73.1	92.1
总抗氧化能力/(U/mL)	5 451.3	6 141.2	9 921.2	16 921.2	17 012.2

2.3 猪肉保鲜新鲜度评价

新鲜肉的活菌数小于 10<sup>4</sup> CFU/g、次鲜肉在 10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup> CFU/g、变质肉大于 10<sup>6</sup> CFU/g。TVB-N 值应小于 1.5 mg/10 g、次鲜肉小于 0.2 mg/10 g、变质肉大于 0.2 mg/10 g。pH 值在 5.8~6.2 之间,次鲜肉在 6.3~6.6 之间、变质肉大于 6.7<sup>[20]</sup>。通过天然复合防腐剂处理猪肉组与空白组进行菌落总数计数、TVBN 值评价、pH 值进行全面评测,得出空白组第 3 天在 TVC 层面判断为变质肉。被防腐体系作用的 3 组猪肉,在 TVC 层面 0~5 d 都处于新鲜肉状态,5 d 以后进入次鲜肉,在第 9 天 TVC 层面亦处于未变质状态,表明其有良好的抑菌活性,作为

食品防腐剂在 TVC 喷涂法处理的猪肉在 TVB-N 层面上,不同浓度的防腐体系表现接近,在猪肉储存的 9 d 中总挥发性盐基氮值虽有所增加,但增加缓慢,最终依旧保持新鲜肉的水平,而空白组在第 3 天 TVB-N 值达到变质肉水平,判断为变质。pH 值层面空白组在第 3 天判断为变质肉,处理组为新鲜肉状态,但 pH 值的变化不仅与新鲜度相关,也与所处环境有关,环境中某些菌会产生酸性代谢物也肯定影响猪肉 pH 值,当然也同样有产生碱性代谢物的微生物,使得比正常值偏高,所以单纯以 pH 值判断肉类的新鲜与否不准确。

单独的评价方法不能作为判断肉类新鲜与否

的依据。通过对存储时长从 0~9 d 的猪肉样本新鲜度评价的结果来看,防腐体系可延长猪肉存储期 5~6 d。随着存储时间的增加,肉的新鲜度不断下降,但是评价体系虽可初步判断肉类是否变质,但对临近变质期的肉无法准确区分。所以需要进

一步理化分析,建立起与存储时间显著相关的评价指标。不过单一的新鲜度指标不能涵盖猪肉中生物与化学成分复杂变化的综合信息。因此搭建多指标融合的评价体系来全面地评价猪肉的新鲜度具有重要研究意义。

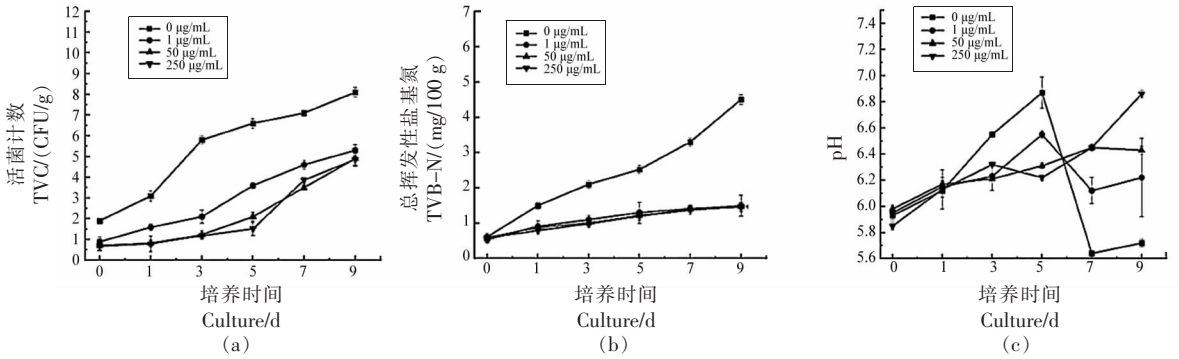


图 1 猪肉新鲜度检测  
Fig.1 Pork freshness test

2.4 DNA 提取与 PCR 扩增

3 个复配中药防腐体系处理后的冰鲜猪肉样本与 3 个无菌水处理样本所提 DNA 质量浓度为 17.1~68.02 ng/µL,OD<sub>260/280nm</sub> 为 1.58~1.89,OD<sub>260/280nm</sub>

为 0.74~1.63。PCR 扩增结果如图 2 所示,6 个样品 PCR 产物目的条带大小正确,浓度合适,达到进行下一步试验的标准。

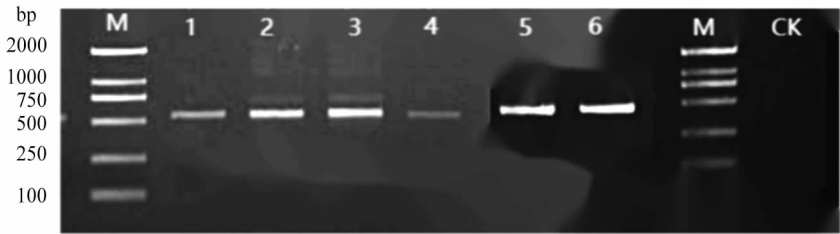


图 2 16S rRNA V3-V4 区 PCR 扩增产物  
Fig.2 PCR product of V3-V4 region of 16S rRNA

2.5 样本 Alpha 多样性及稀释曲线分析

利用 Illumina 高通量测序技术,共获得 232 082 条原始序列,碱基数 69 624 600 个。优化序列在双端序列质控拼接后在细菌 16S V3-V4 区共获得 210 190 条有效序列,序列的长度为 410~440 bp。将这些序列按 97% 的序列相似度进行聚类,并去除比对到叶绿体和线粒体序列的 OTU 和按最小样本序列进行抽平后,共保留有效序列 158 058 条。有效序列共聚类为 35 个 OTU,分类注释结果为 1 个域,1 个界,4 个门,4 个纲,8 个目,17 个科,21 个属,30 个种。

Alpha 多样性可以表示特定区域的微生物多样性和群落丰富度,本次分析使用 Chao 指数反映样本中物种丰富度;Shannon 结合 Simpson 指数反映群落的多样性。Alpha 多样性指数描述(表 3)数据显示所有样品的 coverage 值均≥99%,表明测序覆盖了样品序列,后续数据分析可靠。Chao1、ACE 的变化结果表明,Z1、Z2、Z3 样品中微生物的丰度变化不明显。Z1 与 Z4、Z5、Z6 相比微生物丰度变化明显。Shannon 和 Simpson 指数 Z1 至 Z7 变化结果表明样品中微生物的多样性产生了明显变化。以上 Alpha 多样性指数表明 SHF 防腐体系处

理后的冰鲜猪肉,随着时间的增加,鲜猪肉中微生物丰度和多样性变化远远低于4℃冷藏鲜猪肉<sup>[21]</sup>,证明 SHF 防腐体系在猪肉防腐上具备显著应用前景。

表 3 Alpha 多样性分析  
Table 3 Alpha diversity analysis

样本	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage/%
Z1	34	34	2.16184	0.144218	1
Z2	32.5	36.058603	2.112372	0.188115	0.999869
Z3	32	32	1.611376	0.335174	1
Z4	33	33.260395	1.484217	0.42621	0.999956
Z5	31.5	32.044563	1.991294	0.201764	0.999912
Z6	48	45.486764	1.852086	0.193659	0.999737

以多样性指数 sobs (表征实际观测到的物种数目)绘制稀释曲线,由图 3 结果可知,随着测序数据量的增加曲线趋向平坦,说明样本的测序数据量合理,更多的数据量只会产生少量新的物种,表明检验数据可进行下一步分析<sup>[22-23]</sup>。

2.6 物种组成分析

2.6.1 样品微生物群落组成分析 质控处理后,将这些序列按 97%的序列相似度进行聚类,并去除比对到叶绿体和线粒体序列的 OTU 和按最小样本序列进行抽平后,由 OTUs 序列信息对物种进行注释分析,获得样品中的微生物在不同分类水平上的群落组成。

Circos 样本与物种关系图,可以反映每个或组间样本的优势物种组成比例,同时也反映了各

优势物种的分布比例。由图 4 可知,样本 Z1 中排名前三的优势菌种为假单胞菌属、不动杆菌属、库特氏菌,占比分别为 21%,20%,16%。Z2 中排名前三的优势菌种为葡萄球菌属、库特氏菌、索丝菌属,占比分别为 36%,15%,13%。Z3 中排名前三的优势菌种为葡萄球菌属、库特氏菌、索丝菌属,占比分别为 55%,13%,7.9%。Z4 中排名前三的优势菌种为葡萄球菌属、库特氏菌、不动杆菌属,占比分别为 64%,9.3%,9%。

Z5 中排名前三的优势菌种为葡萄球菌属、类香味菌属、库特氏菌,占比分别为 35%,21%,17%。Z6 中排名前三的优势菌种为库特氏菌、假单胞菌属、类香味菌属,占比分别为 25%,20%,16%。由此样本与物种关系图表明库特氏菌为主

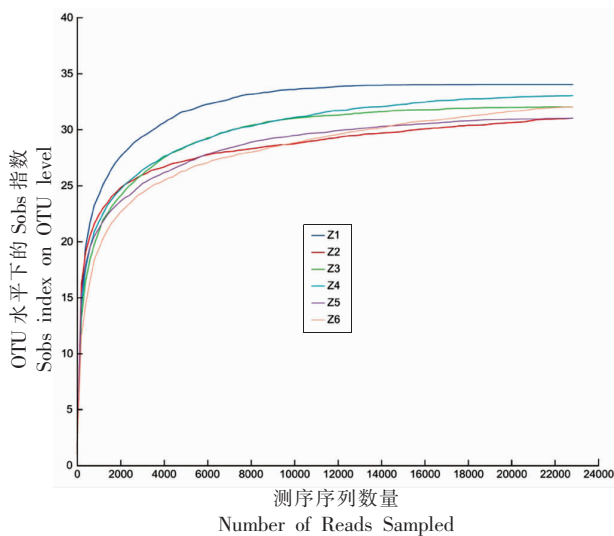


图 3 6 个样本的稀释曲线  
Fig.3 The rarefaction curve of 6 samples

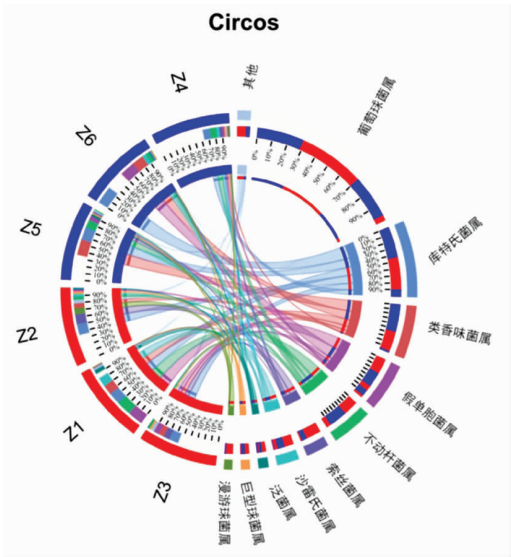


图 4 样本与物种关系图  
Fig.4 Sample and species diagram

要腐败菌属之一。

2.6.2 属水平群落组成分析 在属水平上, 通过高通量测序分析, 共鉴定出 21 个属。如图 5 所示, 试验组与对照组的微生物组成均随储存时间发生了改变。试验组在第 1 天时, 假单胞菌属、不动杆菌属为优势菌属 (所占比例接近分别为 21.1%, 20.08%); 第 3 天时葡萄球菌属为优势菌属 (所占比例为 31.53%); 第 5 天时葡萄球菌属为优势菌属 (所占比例为 54.59%)。对照组在第 1 天时, 葡萄球菌属为优势菌属 (所占比例为 63.38%); 第 3 天到第 5 天时, 葡萄球菌属开始降低到占比 24.45%, 不动杆菌属、类香味菌属、库特氏菌、假单胞菌属占比均有所增加; 第 5 天时库特氏菌为优势菌属 (占比为 24.68%), 与假单胞菌属和葡萄球菌属占比接近。由此可知, 试验组的腐败优势菌属为葡萄球菌属, 根据图 5 变化趋势可知对照组腐败优势菌属主要为库特氏菌属、类香味菌属、不动

杆菌属、假单胞菌属。由于假单胞菌具有嗜温、耐冷的特性, 因此假单胞菌多在食品基质中、各种环境条件下被检出<sup>[24-25]</sup>。对照组样品中类香味菌属第 1 天初始相对丰度为 1.58%, 第 5 天末期相对丰度为 16.46%, 增加量相对较大, 可知类香味菌属为腐败优势菌<sup>[26-27]</sup>。假单胞菌的初始相对丰度为 3.36%, 储存末期相对丰度增加至 20.5%, 成为优势微生物, 符合其特性。在复合天然防腐剂的作用下冷鲜猪肉 5 d 贮藏期中主要腐败属不动杆菌属占比由 20.08% 降到 1.64%, 假单胞菌属占比由 21.10% 降到 7.13%, 库特氏菌仅仅增长 0.7%, 类香味菌属由 13.02% 降到 7.94%, 起到了延长保鲜期的作用。综上可推测, 库特氏菌、假单胞菌属、不动杆菌属和类香味菌属是致使腐败的主要微生物, 而 SHF 防腐体系的防腐作用主要在于抑制了 3 种菌属的快速生长, 从而起到了延长保鲜期的作用。

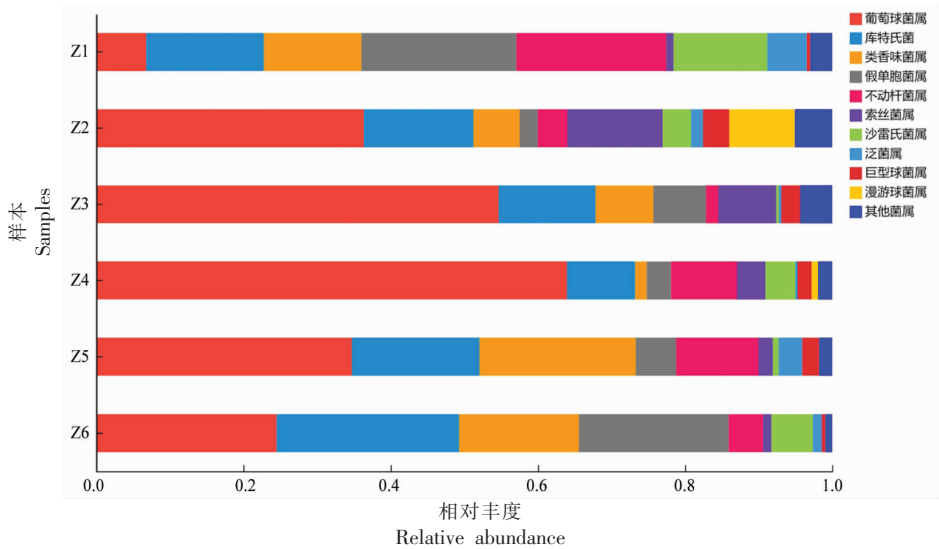


图 5 属水平群落 Bar 图

Fig.5 Community barplot analysis at Genus level

2.7 功能预测分析

食品的腐败状态由微生物的代谢途径决定, 对样品中微生物代谢途径的分析可以预测食品腐败的程度。文章首先通过 PICRUSt 去除 16S marker gene 在物种基因组中的 copy 数目的影响; 然后通过每个 OTU 对应的 greengene id, 获得 OTU 对应的 COG 家族信息和 KEGG Ortholog (KO) 信息, 进行同源蛋白簇 (COG) 和京都基因与

基因组百科全书 (KEGG) 功能注释。

本研究根据测序结果预测了试验组和对照组样品中微生物主要代谢途径随时间的变化情况。样品共有 43 种二级代谢通路, 284 种三级代谢通路。由表 4 可知。样品主要二级代谢通路为碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅料和维生素的代谢、能量代谢、膜运输、翻译、信号转导、核苷酸代谢、复制和修复。由表可知对照组碳水化合物代谢、氨基

酸代谢相关、辅料和维生素的代谢等主要代谢的功能基因的相对丰度呈下降趋势，与对照组样品中微生物的组成变化相比后，发现主要代谢途径的变化与属水平优势微生物库特氏菌、类香味菌属、假单胞菌属的变化之间规律性复合。而试验组除碳水化合物代谢丰度除碳水化合物代谢外,在第 3 天到第 5 天都维持在一个较为稳定的区间。

SHF 防腐体系或使得试验组代谢途径的变化与优势微生物的变化之间无规律性，这可能是由于 SHF 防腐体系使得代谢途径发生了变化，从而达到防腐效果。通过对比可知碳水化合物和氨基酸代谢是试验组和对照组主要代谢途径，表明猪肉腐败主要代谢途径为这两种代谢途径<sup>[28]</sup>。

表 4 KEGG 数据库主要代谢通路丰度值

Table 4 Abundance of main metabolic pathways in KEGG database						
二级代谢通路	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6
Global and overview maps	9 440 087.95	18 084 003.44	8 594 306.34	19 929 986.56	14 762 123.97	10 277 453.99
Carbohydrate metabolism	2 194 994.78	4 866 689.85	4 828 485.6	5 142 924.06	3 646 562.23	2 512 259.28
Amino acid metabolism	1 827 136.64	3 312 547.55	3 515 222.14	3 740 383.35	2 790 452.2	1 999 302.52
Metabolism of cofactors and vitamins	993 084.58	1 817 035.29	1 941 038.68	2 088 151.83	1 561 043.66	1 091 931.4
Energetabolism	986 388.69	1 820 594.07	1 897 801.87	2 061 579.81	1 550 143.67	1 070 266.69
Membrane transport	1 139 773.56	1 996 803.91	1 692 669.22	1 806 692.13	1 432 569.51	989 933.48
Translation	563 255.7	1 392 250.33	1 406 476.89	1 486 465.09	1 041 810.98	718 916.71
Signal transduction	787 456.76	1 230 108.83	1 170 806.35	1 246 639.54	1 013 674.75	738 494.67
Nucleotide metabolism	587 673.02	1 217 522.46	1 198 503.28	1 273 884.69	937 839.11	649 382.78
Replication and repair	527 577.72	1 200 097.5	1 200 290.02	1 264 441.24	910 192.5	630 932.78

Bugbas 功能预测分析显示对照组具有好氧型、形成生物膜、革兰氏阴性和潜在致病性、胁迫耐受 5 类表型相关细菌在对照组猪肉腐败过程中丰度增加，而兼性厌氧型和革兰氏阳性菌丰度降低,试验组革兰氏阳性菌和兼性厌氧丰度增加,其余均在逐步降低，表明这两类细菌在致腐能力上

或低于对照组优势丰度表现型相关菌属。当前对猪肉腐败相关的蛋白酶研究较少，经过 KEGG 注释,样本在酶水平上,共有 1 516 种酶,表 5 共展示了 6 个样品丰度均值较高的前 25 种酶类,如表 5 所示,可进一步分析猪肉腐败与蛋白酶的关系，为分析导致鲜猪肉腐败的酶提供方向<sup>[29]</sup>。

表 5 KEGG 数据库主要酶丰度值

Table 5 Abundance of main enzyme in KEGG database			
酶名称	丰度均值	酶名称	丰度均值
DNA 聚合酶	120 103	单糖转运 ATP 酶	120 117
DNA 解旋酶	120 104	过氧化物酶	120 118
组氨酸激酶	120 105	酒精脱氢酶	120 119
泛醌还原酶(H+跨膜转运)	120 106	十一碳烯酰基二磷酸磷酸酶	120 120
肽基脯氨酰异构酶	120 107	天冬酰胺酰-tRNA 合酶	120 121
糖磷酸转移酶	120 108	谷氨酰氨酰-tRNA 合酶	120 122
3-氧代酰基-[酰基载体-蛋白]还原酶	120 109	定点 DNA-甲基转移酶(腺嘌呤特异性)	120 123
RNA 聚合酶	120 110	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	120 124
RNA 解旋酶	120 111	核苷二磷酸还原酶	28 743
乙酰乳酸合酶	120 112	Serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	29 052
乙酰辅酶 a 羧化酶	120 113	H(+)-transporting two-sector ATPase	28 594
谷胱甘肽转移酶	120 114		
铁螯合物运输 ATP 酶	120 115		

### 3 结论

研究表明,用4种中药复配防腐体系处理过的猪肉保鲜时长可延长5~6 d,基于16S rRNA测序分析复配处理组在储存期间微生物多样性、差异性并不明显,同时物种的丰富度和OTU数目都低于对照组。表明SHF防腐体系处理后较好地抑制了某些菌的生长。Alpha多样性指数数据表明SHF防腐体系处理后的鲜猪肉,随着时间的增加,鲜猪肉中微生物丰度和多样性变化低于对照组,表明该防腐体系有较好的防腐作用。在属水平上,发现假单胞菌属、不动杆菌属和类香味菌属是致使腐败的主要微生物。发现防腐体系致使代谢途径发生了变化,从而达到了防腐效果,综上表明,复配防腐体系的处理对微生态环境确实起到了调控作用。本研究对猪肉腐败的微生物多样性进行分析为复方中药食品类防腐剂的研发应用和搭建食品多指标融合的评价体系来全面的评价食品的新鲜度有极大研究意义。后续可以结合蛋白组学技术进一步分析肉类腐败与蛋白酶的关系,明确导致鲜肉腐败的酶。

### 参 考 文 献

- [1] 石浩,王仁才,王芳芳,等. 基于响应面法对植物提取物协同抑菌活性的研究[J]. 保鲜与加工, 2020, 20(5): 27-33.  
SHI H, WANG R C, WANG F F, et al. Study on the synergistic antibacterial activity of plant extracts based on response surface method[J]. Preservation and Processing, 2020, 20(5): 27-33.
- [2] 张铁焕,吴玉霞,莫佐红,等. 19种常见中药材醇提物的体外抗菌活性筛选[J]. 广西植物, 2020, 40(12): 1712-1720.  
ZHANG T H, WU Y X, DIAN Z H, et al. *In vitro* antimicrobial activity screening of alcohol extracts of 19 common medicinal herbs[J]. Plants in Guangxi, 2020, 40(12): 1712-1720.
- [3] 周艺,李洪菲,郭建军,等. 25种黔产中药材提取物体外抑菌活性的筛选[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(9): 32-38.  
ZHOU Y, LI H F, GUO J J, et al. Screening of *in vitro* antibacterial activity of 25 Qian-produced TCM extracts[J]. Chinese Ethnic Folk Medicine, 2020, 29(9): 32-38.
- [4] 王朋朋,徐佳,张丽梅,等. 5种药食同源植物的抗氧化作用[J]. 吉林大学学报(理学版), 2018, 56(4): 1035-1039.  
WANG P P, XU J, ZHANG L M, et al. Antioxidative effects of five drug-food homologous[J]. Journal of Jilin University (Science edition), 2018, 56(4): 1035-1039.
- [5] 李苗云,田璐,黄现青,等. 不同包装冷却猪肉腐败特性的主成分分析和聚类分析[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(2): 37-41.  
LI M Y, TIAN L, HUANG X Q, et al. Principal component analysis and cluster analysis of spoiling characteristics of different packaging cooled pork[J]. Food and Fermentation Industry, 2014, 40(2): 37-41.
- [6] 高继业,李继祥,黄伟. 鲜猪肉在保藏中的主要腐败菌分析[J]. 食品科学, 2015, 36(22): 173-176.  
GAO J Y, LI J X, HUANG W. Analysis of the main spoilage bacteria in fresh pork[J]. Food Science, 2015, 36(22): 173-176.
- [7] 范力艺,范群艳,胡嘉森,等. 基于高通量测序技术的燕窝罐头腐败嗜热菌分析[J]. 农业工程学报, 2022, 38(3): 295-303.  
FAN L Y, FAN Q Y, HU J M, et al. Analysis of corrupt thermophilus bird's nest based on high-throughput sequencing technology[J]. Journal of Agricultural Engineering, 2022, 38(3): 295-303.
- [8] 蓝蔚青,孙雨晴,谢晶. 高通量测序技术在水产品加工贮藏中的应用[J]. 包装工程, 2020, 41(21): 11-17.  
LAN W Q, SUN Y Q, XIE J. Application of high-throughput sequencing technology in the processing and storage of aquatic products[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(21): 11-17.
- [9] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. Nat Protoc, 2008, 3(2): 163-175.
- [10] ZHANG Y F, XIAO C L, JIA X, et al. Study on extraction of natural black soya bean peptide and antioxidant activity[J]. Adv Mat Res, 2013, 2203(638): 1066-1070.
- [11] 葛水莲,陈建中,刘娜,等. 太行菊多糖抗氧化活性及稳定性研究[J]. 食品科技, 2020, 45(4): 175-180.

- GE S L, CHEN J Z, LIU N, et al. Study on the antioxidant activity and stability of Taihang chrysanthemum polysaccharide[J]. Food Technology, 2020, 45(4): 175–180.
- [12] 韦会平, 郑毅, 韩洪波. 芒果清除自由基活性成分及抗氧化作用研究[J]. 南方农业学报, 2020, 51(4): 922–928.
- WEI H P, ZHENG Y, HAN H B. Study on free radical scavenging active components and antioxidant effects of mango[J]. Southern Journal of Agriculture, 2020, 51(4): 922–928.
- [13] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884–i890.
- [14] MAGO T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [15] EDGAR, ROBERT C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996–998.
- [16] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: A place for DNA–DNA Reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(4): 846–849.
- [17] WANG Q. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 256–257.
- [18] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537.
- [19] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biology, 2011, 12(6): 60.
- [20] 袁宝多, 马坤瑛, 端肖楠, 等. 猪肉新鲜度快速检测方法及相关性分析[J]. 食品工业, 2021, 42(8): 270–274.
- YUAN B D, MA K Y, DUAN X N, et al. Rapid detection method and correlation analysis of pork freshness[J]. Food Industry, 2021, 42(8): 270–274.
- [21] 刘波, 王阶平, 陈倩倩, 等. 养猪发酵床微生物宏基因组基本分析方法[J]. 福建农业学报, 2016, 31(6): 630–648.
- LIU B, WANG J P, CHEN Q Q, et al. Basic analysis method for microbial metagenomes in pig fermentation bed[J]. Fujian Journal of Agriculture, 2016, 31(6): 630–648.
- [22] 张洁, 李娜, 郭婷婷, 等. ITS rDNA 高通量测序研究不同饲养方式对滩羊瘤胃真菌菌群的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2019, 54(5): 25–34.
- ZHANG J, LI N, GUO T T, et al. ITS rDNA High-throughput sequencing investigated the effects of different feeding methods on the rumen fungal flora of tan sheep[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2019, 54(5): 25–34.
- [23] 周美丽, 王立志, 闫天海, 等. 林麝粪便细菌多样性研究[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(2): 100–106.
- ZHOU M L, WANG L Z, YAN T H, et al. The fecal bacterial diversity of forest musk deer[J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(2): 100–106.
- [24] BEVILACQUA A, CORBO M R, SINIGAGLIA M. The microbiological quality of food: Foodborne spoilers[M]. Chapter 2 – *Pseudomonas* and related genera. Cambridge: Woodhead Publishing, 2017: 25–59.
- [25] GRAM L, HUSS H H. Microbiological spoilage of fish and fish products[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 121–137.
- [26] YANG C, CHE Y, QI Y, et al. High-throughput sequencing of viable microbial communities in raw pork subjected to a fast cooling process[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(1): 145–153.
- [27] SAMELIS J. Managing microbial spoilage in the meat industry[J]. Food Spoilage Microorganisms, 2006, 122(2): 213–286.
- [28] REIS M M, REIS M G, MILLS J, et al. Characterization of volatile metabolites associated with confinement odour during the shelf-life of vacuum packed lamb meat under different storage conditions[J]. Meat Science, 2015, 113(2016): 80–91.
- [29] REMENANT B, JAFFRES E, DOUSSET X, et al. Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties[J]. Food Microbiology, 2015, 45(Pt.A): 45–53.

## The Effects of Composite Spice Natural Preservatives on Pork Storage

He Jiao, Niu Mingfu\*, Zhang Gaiping, Guo Sainan

(School of Food and Bioengineering, Development and Utilization of Microbial Resources of Henan University of Science and Technology, University-level Key Laboratory, Luoyang 471023, Henan)

**Abstract** Objective: Astragalus, yellow and cassia bark have good antibacterial activity and can be used as safe and efficient natural preservatives after blending. This study aimed to explore the application effect of the compound extract on pork preservative. Methods: The experiment evaluated the effect of antibacterial and antioxidant activity, combining the evaluation of total colonies, TVBN value, pH value and sensory index, and tested the corrosion ability of the compound of spices. At the same time, the 16S rRNA sequencing technology analyzed the microbial composition and diversity changes of the adding group and the control group in the storage process of fresh pork, and comprehensively showed the correlation between the microbial abundance changes of the adding system and the pork preservation (storage time). Results: Compound natural preservative can prolong the shelf storage period of fresh pork by 5–6 days. Based on 16S rRNA gene sequencing analysis, 21 genera were identified. *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Myroides* were the main microorganisms causing spoilage. It is found that the changes in the main metabolic pathway of natural storage fresh pork are consistent with the changes of the dominant microorganism *Kurthia*, *Myroides* and *Pseudomonas*. During the 5 days storage period of cold pork with compound natural preservatives, the proportion of the main spoilage genus *Acinetobacter* decreased from 20.08% to 1.64%, *Pseudomonas* from 21.10% to 7.13%, *Kurthia* increased by 0.7%, and *Myroides* decreased from 13.02% to 7.94%. Conclusion: The research has proved the superiority of natural compound preservative as pork preservative, and laid a foundation for making full use of traditional spices to develop food preservative.

**Keywords** cinnamon; re-match; bacteria restraint; oxidation resistance; 16SrRNA