

研究报告

冷鲜猪肉供应链主要环节中微生物多样性宏基因组分析

王宇¹, 王婷², 曲天铭², 梁丽姣², 赵晓美², 陈颖², 张万刚¹

(1. 南京农业大学食品科技学院, 南京 210095; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

摘要:目的 利用宏基因组学技术探究不同阶段冷鲜猪肉表面微生物群落结构及多样性变化, 分析风险菌的组成及变化, 为冷鲜肉中风险细菌的控制提供参考。方法 采用宏基因组学技术, 对预冷后、排酸后及市售3个阶段的30份冷鲜猪肉样本进行测序, 并进行微生物多样性变化和菌群代谢通路的分析。结果 不同阶段冷鲜猪肉菌群结构差异有显著性。从预冷到排酸再到市售, 根瘤菌丰度变化导致了变形菌门相对丰度呈现先增后减趋势; 索丝菌属丰度提升造成了厚壁菌门丰度占比的逐步提高。PCoA分析发现排酸肉与市售肉部分重叠, 说明排酸肉细菌与市售肉中菌群相似。排酸后到市售肉样中, 优势致腐菌热杀索丝菌(0.3%~14.5%)、莓实假单胞菌(0.02%~3.6%)和鲍曼不动杆菌(0.5%~3.3%)的相对丰度显著提升。代谢通路分析表明排酸肉样本中注释到的细菌有关代谢的编码基因丰度在3个阶段样本中最高, 3组样本中部分协调糖代谢和氨基酸代谢的蛋白质和酶丰度呈上升的趋势, 并且与索丝菌和假单胞菌变化趋势存在一致性。结论 排酸肉样本中的细菌种群与市售肉样本中相似, 生产中应加强排酸过程中菌群的控制, 同时采取适当措施控制嗜冷菌的繁殖, 保障供应链中肉品质量安全。

关键词:冷鲜猪肉; 宏基因组学; 微生物多样性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2024)09-1000-10

DOI: 10.13590/j.cjfh.2024.09.002

Macrogenomic analysis of microbial diversity in the main links of the chilled pork supply chain

WANG Yu¹, WANG Ping², QU Tianming², LIANG Lijiao², ZHAO Xiaomei²,
CHEN Ying², ZHANG Wangang¹(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. China Academy of Inspection and Quarantine Science, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective Macro-genomics technology was applied to explore the changes in microbial community structure and diversity on the surface of chilled pork at different stages and to analyze the composition and changes of risky bacteria, to provide a reference for the control of risky bacteria in chilled meat. **Methods** Macro-genomics technology was used to perform sequencing on 30 chilled pork samples at three stages: pre-cooling, post-mortem ageing, and marketing, and to analyze changes in microbial diversity and metabolic pathways of the flora. **Results** There were significant differences in the flora structure of chilled pork at different stages. From pre-cooling to acid excretion to marketing, the relative abundance of Rhizobium caused an increase and then a decrease in the relative abundance of Proteobacteria. The increase in the abundance of *Brochothrix* caused a gradual increase in the abundance of Firmicutes. The PCoA analysis showed that the acid-drainage pork partially overlapped with the commercially available pork, suggesting that the bacteria were similar. The relative abundance of the dominant spoilage bacteria, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas fragi*, and *Acinetobacter baumannii*, was significantly increased in the samples from acid-expelled to commercially available meat. Metabolic pathway analyses indicated that the abundance of genes encoding bacteria related to metabolism annotated in the acid-expelled meat samples was the highest among the three stages of samples, the abundance of some of the proteins and enzymes that coordinate sugar metabolism and amino acid metabolism showed an increasing trend in the three groups of samples, and there was consistency with the trend of changes in *Brochothrix* and *Pseudomonas*. **Conclusion** The bacterial populations in the

收稿日期: 2024-03-28

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF1100704); 市场总局科技计划项目(2022MK196)

作者简介: 王宇 男 硕士研究生 研究方向为食品微生物 E-mail: 371949860@qq.com

通信作者: 张万刚 教授 研究方向为肉品加工与质量安全控制 E-mail: wangang.zhang@njau.edu.cn

陈颖 研究员 研究方向为食品微生物分子检测与生物特征识别研究 E-mail: chenyingcai@163.com

张万刚和陈颖为共同通信作者

samples of aged meat were similar to those in the samples of saled meat, and the control of bacterial populations during post-mortem ageing should be strengthened during production, while appropriate measures should be taken to control the propagation of spoilage bacteria, to guarantee the quality and safety of meat in the process of supply chain.

Key words: Chilled pork; metagenomics; bacteria diversity

冷鲜肉因其独特的储运条件,能在一定程度上抑制微生物的生长繁殖,从而延缓肉品变质,延长其货架期,保障消费者食用安全^[1-2]。但冷鲜肉供应链过程涉及较多的复杂环节,这些环境因素的变化可能造成微生物菌群结构的改变^[3-4],且冷链并不能杀灭所有微生物,如单核细胞增生李斯特菌、假单胞菌等嗜冷菌在 0~4 °C 仍能保持活性^[5-6]。以往研究表明,猪肉腐败状态与特定储存条件和食品基质中微生物的类型和数量有关^[7]。因此,研究冷鲜肉中微生物群落结构对于识别主要的腐败菌及致病菌、防止肉类变质和延长保质期具有重要意义。

高通量测序技术能够在短时间内测定大量物种的核酸序列,从而全面地了解样品中的微生物信息,解决了基于传统培养方法和变性梯度凝胶电泳(Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)方法分析样本量少、所得数据量少、物种分类精度低的缺点^[8]。其中,宏基因组测序能够获得微生物整个基因组的信息,且能够提供更加精准的物种分类,同时还能通过基因注释等研究直接反映微生物的生物功能。伍亚龙等^[9]的研究表明宏基因组学可以精准地发掘微生物功能及代谢通路等信息,基于这些信息更便于挖掘菌群的生物多样性、群落结构、功能特性及相互关系。李俊峰^[10]基于 16S rRNA 和宏基因组高通量测序的微生物多样性研究,结果表明在特定生物环境下,利用宏基因组学进行微生物多样性研究具有更高的准确性。

现有研究侧重于冷鲜肉特定腐败细菌的研究,如实验室建立假单胞菌^[11]和热杀索丝菌^[12]生长动力学模型等,但对冷鲜猪肉供应链中微生物实际分布情况及致腐菌生长规律的研究仍然匮乏,不能解决实际生产中细菌防控问题。基于此,本研究通过宏基因组测序对北京市某品牌冷鲜猪肉供应链中 3 个不同阶段冷鲜猪肉样本进行测序,阐述供应链不同阶段猪肉表面微生物多样性,分析菌群结构变化规律,以期为进一步加强冷鲜肉供应链安全生产、靶向控制微生物风险、延长冷鲜肉货架期和保障肉品质量安全提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

选取北京市某大型品牌冷鲜猪肉供应商供应

链中冷鲜猪肉进行采样,选择预冷后的猪肉胴体、冷库排酸 12 h 后的猪肉胴体、市售柜台出售的冷鲜猪肉 3 个阶段的样本进行采集。对于预冷后肉样,在品牌经营屠宰场进行采样,选取预冷后进入冷库前的猪肉胴体,在生产中传送带上进行采样,使用无菌手术刀对猪肉胴体表面腹横肌部位进行切割采样,每隔 10 头进行一次采样。对于排酸肉样,在品牌经营分销冷库进行采样,选取冷库中存放 12 h 以上的猪肉胴体进行切割采样,采样部位同上;样品选择冷库 8 个不同方位的 8 头猪肉胴体以及冷库中间部位的 2 头猪肉胴体。对于市售阶段的冷鲜肉,在品牌直营门店进行采样,使用无菌手术刀对 10 块来自不同胴体的冷鲜猪肉进行切割采样,选取暴露于环境中的猪肉胴体表面约 10 cm×10 cm 大小的区域进行切割采样。样品采集后立即置于无菌密封袋中,储存在预冷至 0~4 °C 的无菌采样箱中,2 h 内运抵实验室进行下一步处理。

1.2 材料与试剂

磷酸缓冲盐溶液(10×)购自北京 Solarbio 公司;密封袋购自北京超速树懒科技有限公司;均质袋购自法国 Interscience 公司,E. Z. N. A.® 粪便 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司。TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 试剂和 Truseq SBS Kit(300 cycles)试剂由上海凌恩科技有限公司提供。

1.3 仪器与设备

BagMixer 400 W 拍击式均质器(法国 Interscience 公司),Centrifuge 5910 Ri 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 样品前处理

将预冷后、排酸后以及市售 3 个不同阶段采集的样本分别标记为 H 组、P 组和 S 组。参考 PARLAPANI 和 BOZIARIS 等^[13]的研究方法对猪肉进行前处理提取细菌,具体操作如下:在无菌条件下分割表面积大小一致的 25 g 猪肉样本,加入 225 mL 1×PBS 缓冲液,充分均质 5 min 后 8 000×g 离心 10 min,离心结束后去掉上清液,取沉淀暂存于-80 °C 冰箱中至 DNA 提取。

1.4.2 DNA 提取和宏基因组测序

使用 E. Z. N. A.® 粪便 DNA 提取试剂盒从 30 份样品中提取微生物 DNA,具体操作按照产品说明书

进行。完成基因组 DNA 提取后,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA 完整性,并使用 NanoDrop 2000 及 Qubit 检测 DNA 纯度和完整性。对于样品浓度 ≥ 10 ng/ μ L,主带在 8 kb 以上,DNA 无蛋白、色素、RNA 等污染,总量 ≥ 2 μ g 的基因组 DNA 交由上海凌恩科技有限公司构建宏基因组文库和测序。简而言之,对每个样品,使用 Covaris S220 聚焦超声仪(Woburn,美国)剪切 1 μ g 基因组 DNA,并建立片段长度约为 450 bp 的测序文库。所有样品在 Illumina NovaSeq 6000(Illumina,美国)仪器中测序,双端 150 bp(PE150)模式。下机后的原始序列处理步骤如下:使用 Trimmomatic (version 0.39)去除低质量序列和接头污染,随后使用 BWA (version 0.7.17)将过滤后的序列比对到人类和猪参考基因组,从而有效去除宿主来源基因。

1.4.3 物种注释和功能注释

质控后的高质量序列使用 Kraken2 进行分类和注释。所有的序列被分类为 7 个系统发育水平(域、门、纲、目、科、属、种)或未分类,并通过 Bracken 估算分类丰度。使用 MegaHit (version 1.1.1-2-g02102e1)生成每个样本的一组 contig 的高质量序列。使用 METAProdigal (v2.6.3)软件预测组装组的开放阅读框,使用 CD-HIT 聚类后生成所有的开放阅读框为一组独特的基因。使用 BWA-MEM (version 0.7.17)将每个样本的高质量序列与独特的基因集比对,并以每百万转录本(TPM)计算基因的丰度谱(比对长度 ≥ 50 bp,序列一致性 $>95\%$),并对每个样本的基因长度和定位序列的变化进行校正。使用 kofam (version 1.2.0)在 KEGG 数据库中检索该独特的基因集,以识别蛋白质并检索其功能注释。物种丰度信息表用于计算 α 多样性指标, β 多样性通过 Bray-Curtis 方法计算。

1.4.4 统计学分析

使用 Microsoft Excel 工具进行基本数据统计和处理。使用 SPSS 26.0 软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 R 4.2.2 (<https://www.r-project.org>) 计算相关性系数。使用 Origin 24 绘制代谢通路注释结果图。使用在线网站 (<http://www.cloud.biomicroclass.com/CloudPlatform/home>) 绘制 PCoA 图、物种丰度柱形图、韦恩图及热图。

2 结果

2.1 宏基因组测序结果统计和多样性分析

预冷后、排酸后和市售 3 个阶段共 30 份样品的原始序列过去接头、质量剪切以及去除污染等

优化处理后,有效数据率均为 99%,Q20 均高于 95%,Q30 均高于 87%,表明所有样本中均有超过 87% 的碱基准确度达到 Q30,高于 Illumina 官方保证的 80%,说明本次测序数据具有较高的可靠性(表 1)。

表 1 冷鲜猪肉样本宏基因组测序数据

Table 1 Metagenome sequencing data of chilled pork samples

样本	Raw reads	Clean reads	有效数据率/%	Q20/%	Q30/%	GC/%
H1	54417028	53973832	99	98.52	95.36	43.93
H2	53748596	53365800	99	98.6	95.61	42.98
H3	49678582	49302950	99	98.55	95.45	43.39
H4	30541530	30294716	99	98.54	95.42	43.79
H5	46009622	45663036	99	98.47	95.19	43.04
H6	52093326	51503886	99	97.78	92.45	42.41
H7	88197878	87476536	99	98.25	94.05	42.69
H8	55950478	55599160	99	98.84	96.36	43.81
H9	39116168	38842814	99	98.61	95.63	43.59
H10	43934452	43636268	99	98.66	95.78	43.15
P1	59627066	58988514	99	97.7	92.19	42.95
P2	57352882	56742860	99	97.84	92.7	42.31
P3	54999818	54452548	99	97.53	91.64	42.18
P4	65675948	65022862	99	98.02	93.22	43.24
P5	60761718	60335536	99	98.52	95.36	44.41
P6	40642236	40339896	99	98.6	95.62	43.82
P7	40848046	40543092	99	98.49	95.24	44.02
P8	40683386	40430956	99	98.58	95.51	44.06
P9	58179136	57574682	99	97.99	93.04	42.37
P10	51090396	50481214	99	97.7	92.13	42.09
S1	57351348	56770278	99	97.98	93.08	42.14
S2	95380494	94519166	99	98.36	94.44	42.48
S3	82004810	81284126	99	98.14	93.7	42.94
S4	92222036	91508370	99	98.24	94.00	42.91
S5	75765412	75030246	99	98.07	93.46	42.12
S6	68203842	67552810	99	98.08	93.49	42.59
S7	53817318	53194362	99	95.99	87.57	42.39
S8	54058968	53538882	99	98.03	93.33	41.93
S9	69123658	68442438	99	98.06	93.41	42.06
S10	69948210	69329734	99	98.03	93.24	41.69

注:H、P、S 分别代表预冷肉、排酸肉以及市售肉样本,1-10 代表样本序号;Q20(%):质控后碱基质量值达到 Q20(碱基检测错误的概率为 1%)以上的碱基数目及占 Raw read 的百分比;Q30(%):质控后碱基质量值达到 Q30(碱基检测错误的概率为 0.1%)以上的碱基数目及占 Raw read 的百分比;GC(%):碱基 G 和 C 占总碱基的百分比

3 组冷鲜猪肉样本 Alpha 多样性统计结果见表 2。从 H 组到 S 组,物种数、Chao1 指数和 Shannon 指数均呈现出先增加后减小的趋势。

表 2 样品多样性指数表

Table 2 Diversity indexes of samples

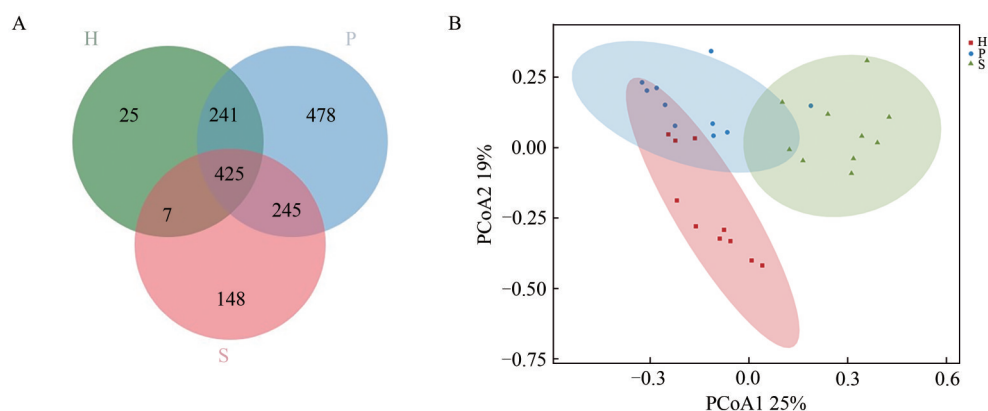
样本	物种数	Chao 1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
H	1 884 \pm 315 ^a	2 219 \pm 261 ^a	6.40 \pm 0.28 ^a	0.96 \pm 0.01 ^a
P	2 491 \pm 144 ^a	2 803 \pm 124 ^a	6.42 \pm 0.69 ^a	0.94 \pm 0.07 ^a
S	2 263 \pm 299 ^a	2 644 \pm 221 ^a	6.02 \pm 0.69 ^a	0.92 \pm 0.06 ^a

注:同列肩标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)

如图 1A 所示,3 组样本的共有细菌种类为 425 个,分别占 H、P、S 3 组样本细菌总数的 60.89%、30.60% 和 51.52%。P 组样本独有细菌数

最多,说明菌群种类最为丰富。PCoA 分析结果显示(图 1B),H 和 S 组样本间区域分离,距离较远,表明这

两组间细菌群落存在较大差异;而 P 组样本和 S 组样本间存在重叠,表明两组菌群存在部分相似性。



注:H、P、S分别代表H组(预冷后)、P组(排酸后)、S组(市售)样本

图1 三组不同阶段的样品韦恩图(A)和细菌主坐标分析(B)

Figure 1 Venn plots (A) and analysis of bacterial principal coordinates (B) for three different groups

2.2 不同阶段冷鲜猪肉样品微生物群落结构及变化规律分析

宏基因组测序序列注释结果显示,共有 98.8% 的序列被分类为细菌,在细菌分类上共鉴定出 41 个门,81 个纲,186 个目,436 个科,1 266 个属,3 687 个种的微生物。

在门分类水平上,冷鲜猪肉样本细菌群落组成见图 2A。宏基因组检测样本中共有 41 个菌门,3 组样本中细菌分布结构存在差异。预冷肉样本中,检测出 38 个菌门,其中变形菌门(Proteobacteria)是明显优势菌门,所占比例为 77.6%,其次为放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)及厚壁菌门(Firmicutes),所占比例分别为 16.5%、3.1% 及 1.0%。四大菌门相对丰度占比之和为 97.6%。排酸肉样本中共检测出 41 个菌门,变形菌门是明显优势菌门,所占比例为 79.6%,其次为放线菌门、拟杆菌门及厚壁菌门,所占比例分别为 11.0%、4.5% 及 3.5%。四大菌门所占比例之和为 98.5%。市售肉样本中变形菌门仍为优势菌门,所占比例为 70.7%,其次为厚壁菌门、放线菌门及拟杆菌门,所占比例分别为 14.2%、8.6% 及 4.8%。从 H 组到 S 组变形菌门相对丰度呈现出先上升后下降的趋势,而厚壁菌门相对丰度占比逐渐上升。

在属分类水平上共检测出 1 266 类细菌属,选取属水平上相对丰度大于 1% 的微生物绘制柱状图,由图 2B 可见,在供应链不同阶段猪肉样本中菌群结构存在差异。H 组样本中共检测到 1 126 个细菌属,相对丰度前 5 的微生物分别为慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、贪噬菌属(*Variovorax*)和假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*),相对丰度占比分

别为 12.9%、11.4%、10.6%、6.7% 和 5.2%。P 组样本中共检测到 1 180 个细菌属,相对丰度前 5 的微生物分别为慢生根瘤菌属、贪噬菌属、中慢生根瘤菌属、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),相对丰度占比分别为 21.5%、10.2%、8.5%、5.0% 和 3.0%。S 组样本中共检测到 1 195 个细菌属,相对丰度前 5 的微生物分别为假单胞菌属、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、索丝菌属(*Brochothrix*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和慢生根瘤菌属,相对丰度占比分别为 18.3%、13.6%、10.0%、8.2% 和 7.5%。慢生根瘤菌、中慢生根瘤菌、贪噬菌等菌属相对丰度呈现出先增加后减少的趋势,不动杆菌、假单胞菌、索丝菌等菌属相对丰度则呈现出上升的趋势,并且 P 组与 S 组相比,这种变化更为明显。

在种水平上,宏基因组共检测到 3 687 种细菌,选取种水平上丰度占比大于 1% 的微生物绘制柱状图,不同组优势菌存在差异(图 2C)。其中 H 组样本共有 3 042 种细菌,相对丰度较高的微生物包括 *Variovorax paradoxus* (6.9%) 和 *Pseudonocardia* sp. ALO41005-10 (5.7%),并且相对丰度较高的细菌大多为植物固氮细菌。P 组样本中物种数较 H 组有所增加,共检测到 3 417 种细菌,其中丰度较高的包括 *Variovorax paradoxus* (6.8%) 和 *Variovorax* sp. PMC12 (5.5%),菌群结构较 H 组有所变化,优势菌仍为植物固氮细菌。S 组菌群结构较前两组表现出显著变化,共检测到 3 451 种细菌,其中丰度较高的细菌包括热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)和食树脂假单胞菌(*Pseudomonas resinovorans*),相对丰度占比分别为 14.8% 和 12.6%。值得注意的是,在 S 组中莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)及鲍曼不

动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 也具有较高的丰度。种水平变化趋势与属水平呈现出一致性,植物固氮细菌相对丰度呈现出先增加后减小的趋势,而索丝

菌属细菌(热杀索丝菌)、假单胞菌属(莓实假单胞菌)和不动杆菌属细菌(鲍曼不动杆菌)相对丰度上升,表明腐败菌随冷链时间的增加逐步成为优势菌群。

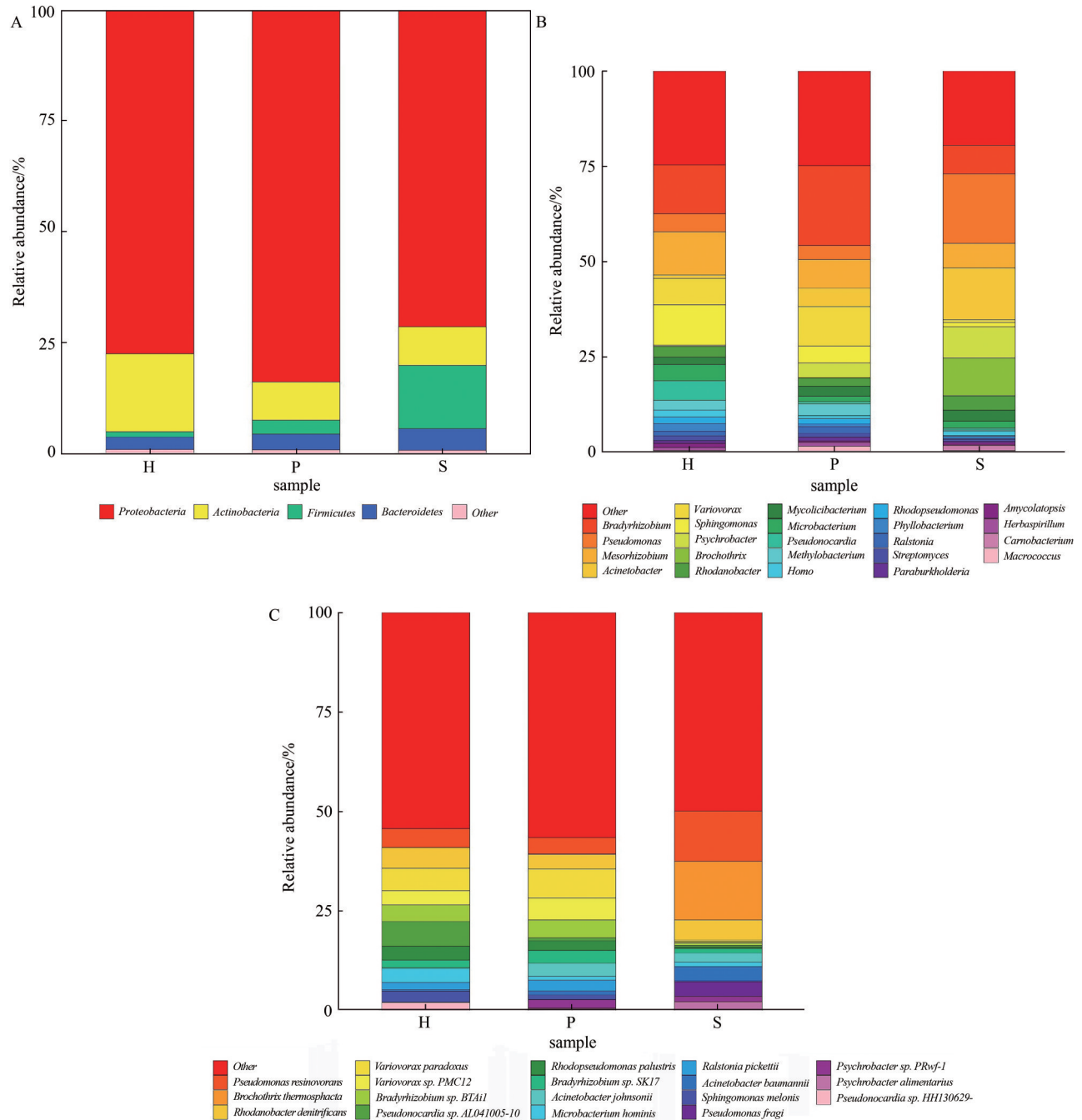


图2 门(A)、属(B)、种(C)分类水平各组样本相对丰度大于1%微生物分布图

Figure 2 Distribution of microorganisms with relative abundance greater than 1% in each group of samples at the phylum level (A), genus level (B) and species level (C)

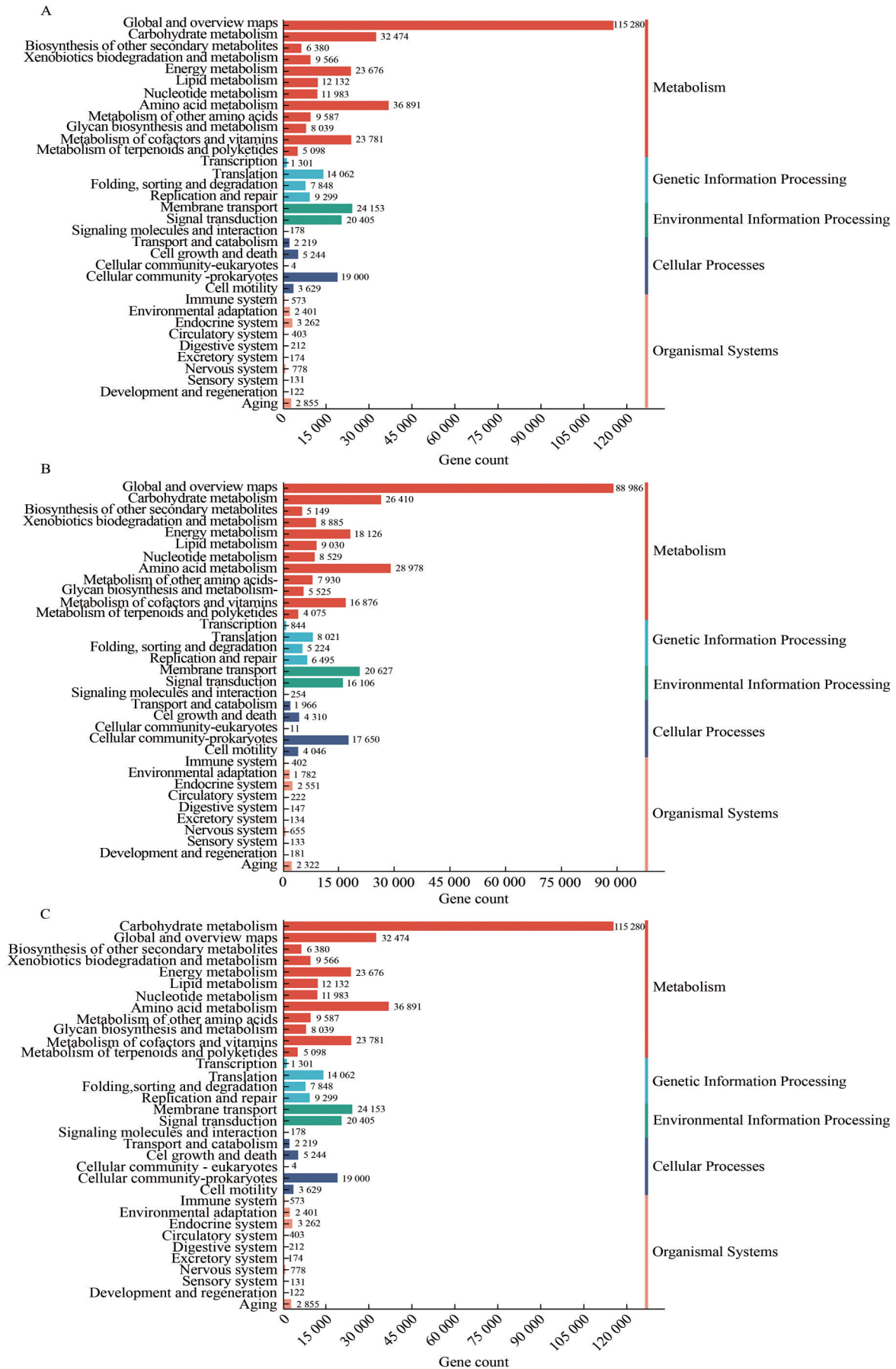
2.3 不同阶段冷鲜猪肉样品的代谢通路分析

经 KEGG 数据库注释分析后,3 组样品功能基因主要归属于 5 大类代谢通路,34 类二级代谢途径,300 类三级代谢途径。由图 3 可知,3 组样品中注释基因数目最多的代谢通路包括全局和概述图谱、氨基酸代谢和碳水化合物代谢。

所有样本中基因丰度最高的 10 个代谢通路分

别是代谢途径、次生代谢物的生物合成、不同环境中的微生物代谢、抗生素的生物合成、ABC 转运蛋白、双组分系统、群体感应、氨基酸的生物合成、碳代谢和嘌呤代谢(图 4)。P 组注释到各代谢通路中基因数目均高于 H 组和 S 组。

此外,对 3 组样本中丰度呈增长趋势蛋白质和酶注释情况进行统计分析(图 5A),结果表明从 H 组到



注: A为H组样本; B为P组样本; C为S组样本

图3 三组样本KEGG注释统计图

Figure 3 Statistical graph of KEGG annotation for three groups

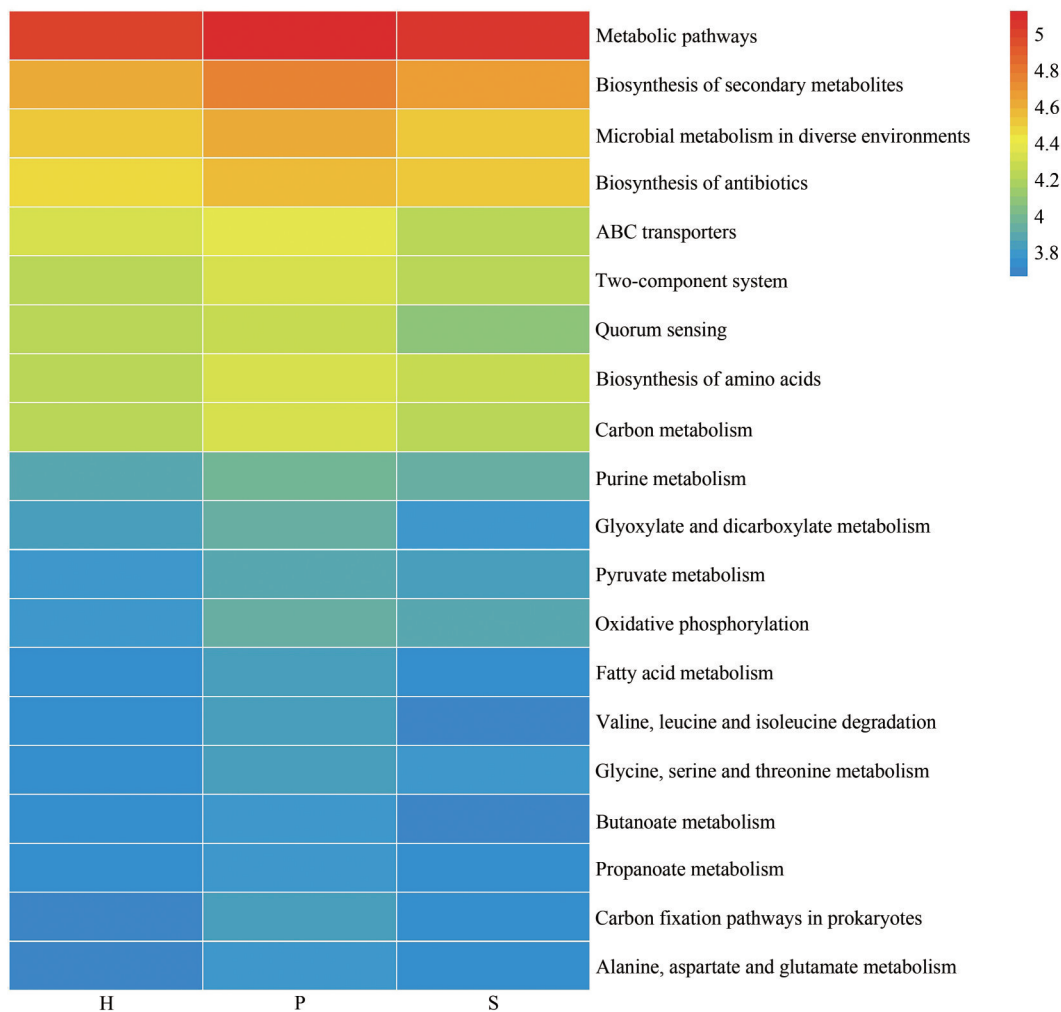


图4 三组样本前20代谢通路分析图

Figure 4 Analysis of the top 20 metabolic pathways for three groups

P组,与氨基酸代谢有关的蛋白(如组氨酸转运系统渗透酶蛋白 HisQ、HisM,甘氨酸裂解系统转录激活剂 GcvA,D-蛋氨酸转运系统底物结合蛋白 MetQ)和碳代谢有关酶编码基因(如 β -葡萄糖苷酶 *bglX* 基因,)相对丰度呈上升的趋势,证明S组细菌降解氨基酸和葡萄糖的功能较前两组中有所提高。对S组中高丰度的细菌(索丝菌、不动杆菌和假单胞菌)蛋白质和酶注释结果进行统计分析(图5B),结果表明假单胞菌、索丝菌中存在着高丰度的氨基酸降解蛋白,如D-蛋氨酸转运系统底物结合蛋白 MetQ,甘氨酸裂解系统转录激活剂 GcvA等,并且这两种细菌中高丰度的蛋白质和酶与上述结果中增长的蛋白质和酶表现出一致性。

3 讨论

在本研究中不同阶段冷鲜猪肉表面优势菌各不相同。在供应链的推进过程中,预冷肉样本中的优势菌如慢生根瘤菌、贪噬菌等植物固氮细菌相对丰度逐渐减小,而假单胞菌、索丝菌和不动杆菌等

细菌相对丰度逐渐增加。这些优势菌的变化是不同阶段样本门水平上细菌相对丰度变化的主要原因。PCoA分析结果发现,预冷后和市售肉样菌群结构存在明显的区分,而两者都与排酸后肉样菌群结构存在相似性。结合菌群测序结果表明,猪肉初始样本中丰度较高的植物固氮细菌随着相对丰度逐渐降低,假单胞菌和索丝菌在排酸后引入,其相对丰度逐渐增加,并且在市售样本中大量富集。

有效控制猪肉中腐败细菌的生长及致病细菌的污染一直是防止肉品腐败,保障猪肉质量安全研究的主题。在肉类储藏环境中,温度、pH和包装等条件塑造了微生物群落^[14]。微生物群落的变化可能引起猪肉品质的变化,进而对猪肉货架期产生影响^[15]。先前研究表明索丝菌和假单胞菌在肉及肉制品的腐败过程中起到了关键的作用^[16-17]。热杀索丝菌是导致冷鲜肉类腐败的优势嗜冷菌之一,其特点是使冷鲜肉产生具有异味的挥发性有机化合物,如乙偶姻、二乙酰,使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

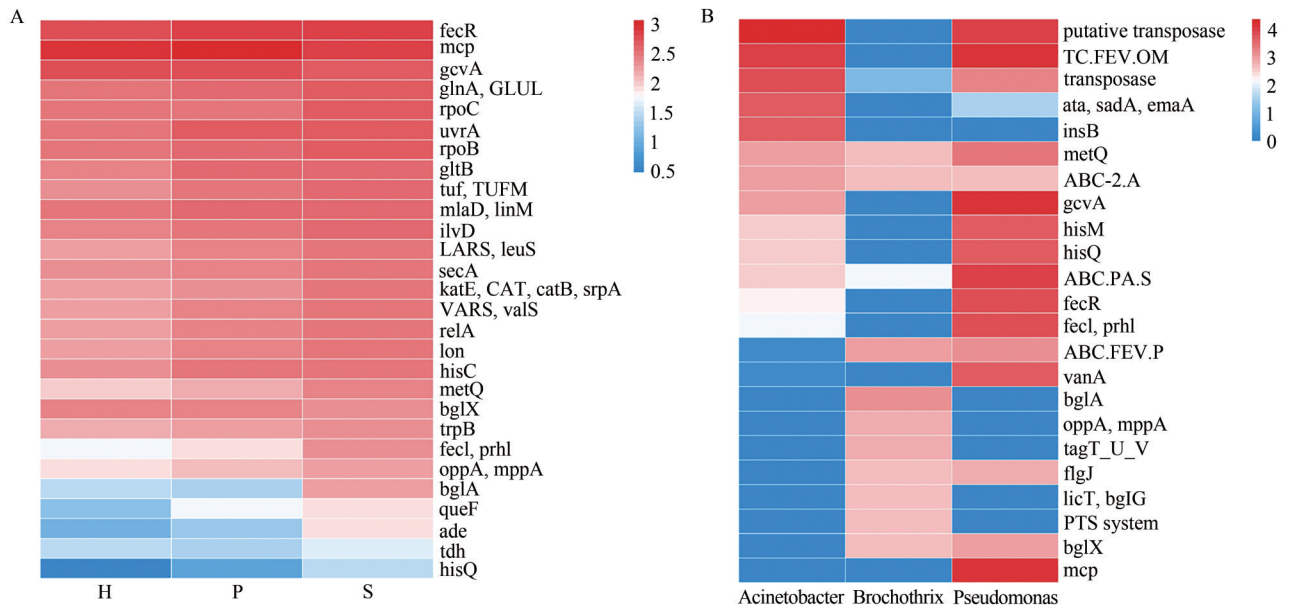


图5 三组样本(A)以及不动杆菌、索丝菌和假单胞菌(B)蛋白质和酶分类热图

Figure 5 Heatmap for the classification of proteins and enzymes of three groups (A) and *Acinetobacter*, *Brochothrix* and *Pseudomonas* (B)

生绿变并伴随绿色液体产生^[18]。莓实假单胞菌则能代谢产生醇类、酮类、硫类化合物等,进而导致肉类产生品质变化和感官质量下降^[19-20]。这两种细菌都具有较强的低温适应能力,在低温条件下能够快速繁殖,逐渐演变为优势菌群,并通过降解葡萄糖、脂肪和蛋白质产生有毒有害物质,引起猪肉腐败变质^[21]。在冷鲜猪肉供应链的环境下,低温为这些细菌的生长提供了相较于其他细菌更有利的条件,使其更容易大量生长繁殖。菌群变化规律结果表明热杀索丝菌、莓实假单胞菌在屠宰结束的预冷肉中以及冷库存放 12 h 的排酸肉中均具有较低的丰度,而在市售肉中丰度较高,表明这些细菌的生长繁殖更可能发生在供应链冷链运输环节中。李润雪等^[22]的研究发现,冷链过程中不同距离运输的销售猪肉中广泛存在丰度较高的不动杆菌属、嗜冷菌属、假单胞菌属、黄杆菌属、索丝菌属、莫拉氏菌属等腐败菌,而随着运输距离的增长,不动杆菌属、假单胞菌属和索丝菌属丰度逐渐增加,这些结果表明假单胞菌的丰度与冷处理的时长有着密切的关联。根据上述分析,在冷鲜猪肉供应链过程中,应在冷链运输环节对假单胞菌和热杀索丝菌等嗜冷致腐菌加以针对性检测和控制。

以往的研究表明,嘌呤代谢和组氨酸代谢是与冷鲜肉变质密切相关的代谢途径^[23],几种支链脂肪酸,如异戊酸和异丁酸,分别由消耗的亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸降解产生^[24-25],与腐败相关的差异代谢物通常富集于氨基酸和碳水化合物代谢通路^[26]。而核苷酸降解产生的次黄嘌呤和鸟嘌呤被用作肉类新鲜度的标志^[27]。本研究结果表明氨基酸代谢

途径和糖代谢途径编码基因丰度呈上升趋势,进一步分析结果表明与腐败相关的蛋白质和酶随着冷鲜猪肉在供应链中时间的延长同样表现出上升的趋势,对这些细菌参与代谢的酶和蛋白进行注释,结果表明假单胞菌中包含丰度较高的氨基酸代谢调控蛋白,如 *GcvA*、*HisQ* 等^[28-29],索丝菌中包含丰度较高的糖代谢基因,如葡萄糖苷酶 *bglA*、*bglX* 等^[30],这些蛋白质和酶编码基因的存在表明细菌将肉中氨基酸和葡萄糖作为碳源和氮源输入并分解代谢,生成导致冷鲜肉品质恶化的次级代谢物。ZHOU 等^[31]通过代谢组学分析了莓实假单胞菌和热杀索丝菌之间的相互作用和代谢机制,结果表明两种细菌共同存在时通过影响组氨酸和核苷酸代谢途径从而加剧了冷鲜肉的腐败。本研究结果显示,索丝菌和假单胞菌在组氨酸代谢通路中注释到的编码基因也具有较高的丰度,表明这两种细菌在市售冷鲜猪肉中的存在有致腐的风险。

此外,有研究报道猪肠道不同部位间菌群结构存在差异。张友华^[32]对冷鲜猪肉供应链中微生物多样性分析结果表明,分割过程中刀具和操作工人带来的污染可能会导致精分割猪肉菌群间存在差异。本研究中仅对市售中精分割的猪肉进行采样,对于整个猪肉胴体进行销售的模式缺乏调研,并且对于精分割后市售猪肉不同部位间菌群结构差异也缺乏数据。随后将进一步采样调研,完善冷鲜猪肉供应链菌群结构变化数据。

4 结论

本研究统计了北京市一家大型冷鲜猪肉供应

商在供应链中3个不同阶段的30份猪肉样本表面菌群结构的情况。结果发现不同阶段样本菌群结构间存在着差异。预冷后样本中优势菌为慢生根瘤菌、贪噬菌等植物固氮细菌,而热杀索丝菌、莓实假单胞菌等致腐菌在排酸后至市售阶段丰度逐渐增加,并在终产品市售冷鲜猪肉中富集。细菌代谢通路的注释结果表明莓实假单胞菌和热杀索丝菌两种细菌中包含高丰度的氨基酸代谢调控蛋白和糖代谢基因。这些结果表明在冷鲜猪肉供应链中存在导致猪肉腐败的风险微生物,其在排酸后至市售阶段表现出较强的生长趋势。这些结果对我们控制冷鲜猪肉中腐败菌的生长,延长冷鲜猪肉货架期具有一定的指导意义。

本研究的不足之处在于,仅对来自同一批次同一时间的冷鲜猪肉样本进行宏基因组分析,对于其他地域、季节以及其他处理方式的冷鲜猪肉菌群变化仍值得研究。今后将进一步补充冷鲜猪肉供应链中菌群结构变化的数据,探索冷鲜猪肉供应链中微生物多样性,为科学控制风险微生物提供数据支撑。

参考文献

- [1] BASSEY AP, CHEN Y, ZHU Z, et al. Assessment of quality characteristics and bacterial community of modified atmosphere packaged chilled pork loins using 16S rRNA amplicon sequencing analysis[J]. *Food Research International*, 2021, 145: 110412.
- [2] 江琦, 王焯, 刘英, 等. 冷鲜肉的研究进展[J]. *农产品加工*, 2015, 01: 69-71.
JIANG Q, WANG Y, LIU Y, et al. Advanced on chilled meat [J]. *Farm Products Processing*, 2015(1): 69-71.
- [3] ZHAO F, ZHOU G, YE K, et al. Microbial changes in vacuum-packed chilled pork during storage [J]. *Meat Science*, 2015, 100: 145-149.
- [4] ZHANG Q Q, HAN Y Q, CAO J X, et al. The spoilage of air-packaged broiler meat during storage at normal and fluctuating storage temperatures[J]. *Poultry Science*, 2012, 91(1): 208-214.
- [5] 李琳, 冷凝, 杜明, 等. 嗜冷菌快速检测方法研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2013, 41(01): 25-31.
LI L, LENG N, DU M, et al. Research progress on rapid methods for detecting psychrophilic bacteria [J]. *China Dairy Industry*, 2013, 41(1): 25-31.
- [6] CHEN X, ZHANG Y, YANG X, et al. Shelf-life and microbial community dynamics of super-chilled beef imported from Australia to China[J]. *Food Research International*, 2019, 120: 784-792.
- [7] ZHANG Y, WEI J, YUAN Y, et al. Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 290: 86-95.
- [8] BOKULICH N A, MILLS D A. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations [J]. *Biochemistry & Molecular Biology*, 2012, 45: 377-389.
- [9] 伍亚龙, 杨珊, 陈功, 等. 基于宏基因组学技术解析工业发酵蔬菜中亚硝酸盐形成及降解机理[J]. *食品与发酵工业*, 2024: 1-9.
WU Y L, YANG S, CHEN G, et al. Metagenomic analysis of formation and degradation mechanism of nitrite in industrially fermented vegetables [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024: 1-9.
- [10] 李俊锋. 基于16S rRNA和宏基因组高通量测序的微生物多样性研究[D]. 北京: 清华大学, 2016.
LI J F. *Microbial Diversity Research Based on High-throughput Sequencing Data of 16S rRNA and Metagenome* [D]. Beijing: Tsinghua University, 2016.
- [11] 傅鹏, 李平兰, 周康等. 冷却肉中假单胞菌温度预测模型的建立与验证[J]. *农业工程学报*, 2008(04): 229-234.
FU P, LI P L, ZHOU K, et al. Development of models to predict the growth of *Pseudomonas* isolated from chilling pork [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2008(4): 229-234.
- [12] 傅鹏, 马昕, 周康等. 热死环丝菌生长预测模型的建立[J]. *食品科学*, 2007(09): 433-437.
FU P, MA X, ZHOU K, et al. Development of Models to Predict Growth of *Brochothrix thermosphacta* [J]. *Food Science*, 2007(09): 433-437.
- [13] PARLAPANI F F, BOZIARIS I S. Monitoring of spoilage and determination of microbial communities based on 16S rRNA gene sequence analysis of whole sea bream stored at various temperatures [J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2016, 66: 553-559.
- [14] ZHOU C, WANG J, LI R, et al. High-throughput sequencing analysis of the bacterial community for assessing the differences in extraction methods of bacteria separation from chilled pork [J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2020, 134: 110213.
- [15] JÄÄSKELÄINEN E, HULTMAN J, PARSHINTSEV J, et al. Development of spoilage bacterial community and volatile compounds in chilled beef under vacuum or high oxygen atmospheres [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 223: 25-32.
- [16] WU Y, MA F, PANG X, et al. Involvement of AprD in regulating biofilm structure, matrix secretion, and cell metabolism of meat-borne *Pseudomonas fragi* during chilled storage [J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111400.
- [17] ZHANG Q, CHEN X, DING Y, et al. Diversity and succession of the microbial community and its correlation with lipid oxidation in dry-cured black carp (*Mylopharyngodon piceus*) during storage [J]. *Food Microbiology*, 2021, 98: 103686.
- [18] 张一敏, 朱立贤, 张万刚, 等. 生鲜牛肉中的腐败微生物概述[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 289-296.
ZHANG Y M, ZHU L X, ZHANG W G, et al. An overview of spoilage microorganism in fresh beef [J]. *Food Science*, 2018, 39(13): 289-296.
- [19] LIU S L, CHEN S S, SHAO L T, et al. Spoilage bacteria growth reduction and microbial community variation of chilled chicken packaged in PA/PE treated with pulsed light [J]. *Food Control*, 2024, 157: 110196.
- [20] WICKRAMASINGHE NN, RAVENSDALE J, COOREY R, et al.

- The predominance of *Psychrotrophic pseudomonads* on aerobically stored chilled red meat [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(5): 1622-1635.
- [21] MOHAREB F, IRIONDO M, DOULGERAKI A I, et al. Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling[J]. *Food Control*, 2015, 57: 152-160.
- [22] 李润雪, 李春保, 贾晓楠, 等. 猪胴体不同冷链运输条件下微生物变化[J]. *南京农业大学学报*, 2020, 43(05): 959-968. LI R X, LI C B, JIA X N, et al. Micro-bial Changes in Pig Carcass under Different Cold Chain Transportation Conditions [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2020, 43(5): 959—968.
- [23] WEN D, LIU Y, YU Q. Metabolomic approach to measuring quality of chilled chicken meat during storage [J]. *Poultry Science*, 2020, 99(5): 2543-2554.
- [24] FANG J, FENG L, LU H, et al. Metabolomics reveals spoilage characteristics and interaction of *Pseudomonas lundensis* and *Brochothrix thermosphacta* in refrigerated beef[J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111139.
- [25] RUSSO F, ERCOLINI D, MAURIELLO G, et al. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups[J]. *Food Microbiol*, 2006, 23(8): 797-802.
- [26] ZHANG T, DING H, CHEN L, et al. Characterization of chilled chicken spoilage using an integrated microbiome and metabolomics analysis[J]. *Food Research International*, 2021, 144: 110328.
- [27] AVAN AN, KARAKAS Ö, DEMIRCI-CEKIC S, et al. Enzymatic determination of hypoxanthine in fish samples as a freshness indicator using the CUPRAC colorimetric sensor [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, 162: 110137.
- [28] KERPPOLA RE, SHYAMALA VK, KLEBBA P, et al. The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. Identification of the histidine permease HisQMP complex [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(15): 9857-9865.
- [29] MIYAKOSHI M. Multilayered regulation of amino acid metabolism in *Escherichia coli*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2024, 77: 102406.
- [30] XIAO Y, DONG S, LIU Y J, et al. Key roles of β -glucosidase BglA for the catabolism of both laminaribiose and cellobiose in the lignocellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 250: 126226.
- [31] ZHOU Z, REN F, HUANG Q, et al. Characterization and interactions of spoilage of *Pseudomonas fragi* C6 and *Brochothrix thermosphacta* S5 in chilled pork based on LC-MS/MS and screening of potential spoilage biomarkers[J]. *Food Chemistry*, 2024: 138562.
- [32] 张友华. 冷鲜猪肉供应链微生物调查分析[D]. 成都: 西华大学, 2016.
- ZHANG Y H. The Investigation and Analysis of Microorganisms from chilled pork supply chain[D]. Chengdu: Xihua University, 2016.