



食品与发酵工业

Food and Fermentation Industries

ISSN 0253-990X, CN 11-1802/TS

《食品与发酵工业》网络首发论文

题目：商城筒鲜鱼发酵过程中微生物多样性及品质特性分析
作者：郑雪珂，陈晖，朱静，陈亚蓝，夏南，徐恒昭，孔婉莹，邢淑婕
DOI：10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037017
收稿日期：2023-08-10
网络首发日期：2023-10-31
引用格式：郑雪珂，陈晖，朱静，陈亚蓝，夏南，徐恒昭，孔婉莹，邢淑婕. 商城筒鲜鱼发酵过程中微生物多样性及品质特性分析[J/OL]. 食品与发酵工业. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037017>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

商城筒鲜鱼发酵过程中微生物多样性及品质特性分析

郑雪珂^{1,2}, 陈晖^{1,2}, 朱静^{1,2}, 陈亚蓝^{1,2}, 夏南^{1,2}, 徐恒昭¹, 孔婉莹¹, 邢淑婕^{1,2}✉

1 (信阳农林学院 食品学院, 河南 信阳, 464000)

2 (河南省大别山特色食物资源综合利用工程技术研究中心, 河南 信阳, 464000)

*通信作者 邢淑婕, 教授, 为通信作者, E-mail: 284840451@qq.com

摘要 以高通量宏基因组测序技术为切入点, 探究商城筒鲜鱼发酵过程中的微生物群落组成及优势菌群的变化, 并对其理化性质、质构特性及微观结构进行测定。结果表明, 筒鲜鱼在发酵过程中微生物群落结构变化明显, 发酵 12 d 的物种丰度最高, 发酵 10 d 的物种生物多样性最高。在发酵过程中, 未发酵及发酵 1 d 的优势菌属为假单胞菌属和不动杆菌属; 发酵 3~5 d, 嗜冷杆菌属是唯一优势菌属; 发酵 7 d, 尤因氏菌属成为唯一优势菌属; 发酵 10~15 d, 假单胞菌属为优势菌属。发酵后筒鲜鱼的理化指标、质构特性及微观结构都发生显著变化, 鱼肉的水分、粗脂肪、粗蛋白、pH 值显著下降 ($P<0.05$), 灰分、挥发性盐基氮 (total volatile basic nitrogen, TVB-N) 含量显著上升 ($P<0.05$)。硬度、弹性、咀嚼性、内聚性先下降后持续上升, 而黏附性则是一直保持上升趋势。发酵后筒鲜鱼鱼肉表面呈现出明显的干枯、失水现象, 并呈现出褶皱和卷曲的特点, 肌肉纤维之间的距离也随之增大。相关性分析发现, 菌群的种类和丰度对筒鲜鱼发酵过程中的理化指标影响较大。

关键词 商城筒鲜鱼; 发酵; 宏基因组测序; 微生物多样性; 品质特性

DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037017

Microbial diversity and quality characteristics analysis of Shangcheng canned fresh fish during fermentation

ZHENG Xueke^{1,2}, CHEN Hui^{1,2}, ZHU Jing^{1,2}, CHEN Yalan^{1,2}, XIA Nan^{1,2}, XU Hengzhao¹, KONG Wanying¹, XING Shujie^{1,2}✉

(1. Food College, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, China; 2. Dabie Mountain Characteristic Food Resources Comprehensive Utilization Engineering Technology Research Center, Xinyang 464000, China)

Abstract The microbial community composition and dominant microorganisms succession of Tongxian fish in Shangcheng during fermentation were explored using metagenomic sequencing technology, and the physicochemical properties, texture properties and microstructure were evaluated. The results showed the microbial community structure of Tongxian fish changed significantly during the fermentation process. The sample had the highest biodiversity at the fermentation of 10 d and the abundance of species attained the maximum at the fermentation of 12 d. *Pseudomonas* and *Acinetobacter* were the dominant genera at the fermentation of 1 d or unfermented. *Psychrobacter* were the only dominant genus at the fermentation of 3-5 d. *Ewingella* became the only dominant genus at the fermentation of 7 d. *Pseudomonas* were the dominant genera at the fermentation of 10-15 d. The physicochemical indexes, texture characteristics and microstructure of Tongxian fish were significantly changed after fermentation. The indexes of water content, crude fat, crude protein, and pH value of fish were significantly decreased ($P<0.05$), while the indexes of ash content and TVB-N content were significantly increased ($P<0.05$). Besides, the indexes of hardness, elasticity, chewiness, and cohesion of samples were decreased at the beginning and then increased constantly, while the indexes of adhesion continued to increase. The surface of fish showed dryness and water loss with wrinkles and curls obviously, and the distance between muscle fibers also increased. The results of correlation analysis

收稿日期: 2023-08-10

基金项目: 豫南地区鱼糜制品的工艺优化及保鲜技术研究 (22B550016); 信阳农林学院南湾鱼制品开发与应用科技创新团队 (XNKJTD-002); 信阳农林学院河南大别山功能食品原料及功能因子开发与利用科技创新团队 (XNKJTD-001)

作者简介: 郑雪珂, 博士, 讲师

网络首发时间: 2023-10-31 12:14:42 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.1802.TS.20231031.1014.001>

showed the species and abundance of bacteria had a great influence on the physicochemical indexes of Tongxian fish during the fermentation.

Key words Shangcheng Tongxian fish; fermentation; metagenomics; microbial diversity; quality characteristics

筒鲜鱼是信阳商城风味独特的传统发酵食品,它是以新鲜花鲢为原料,加入盐、花椒、辣椒面、葱丝、姜丝、高度白酒,装入竹筒或砂罐自然条件下短期腌制而成,其鱼肉鲜嫩、芳香可口、味道独特、营养丰富,因此深受广大人民群众喜爱。目前,筒鲜鱼的加工生产主要采用传统自然发酵的方法,发酵过程的微生物来源主要是新鲜花鲢鱼和发酵环境,这些微生物相互混合、相互作用,参与不同的代谢活动,从而引发鱼肉质、风味的变化。但参与发酵的微生物群落结构未知且复杂,使得筒鲜鱼的发酵工艺不可控,产品质量稳定性差、安全性低,导致筒鲜鱼生产的产业化难上加难。发酵食品的关键是微生物^[1],因此对筒鲜鱼中的微生物菌群和功能性菌进行研究,有利于制备优良发酵剂进而提高筒鲜鱼的产量和品质、缩短发酵时间、提高其工业化生产的稳定性。

目前,高通量测序技术由于其通量高、准确率高的特点^[2],被广泛应用于研究发酵鱼制品中的生物多样性。吴永祥等^[3]通过高通量测序技术比较分析了臭鳃鱼发酵前后的生物多样性差异,发现发酵前后鳃鱼的菌群组成差异较大,菌群中优势细菌的种类也各不相同。张继辉等^[4]对臭鳃鱼发酵过程中的微生物群落变化进行 16S 高通量测序分析,发现不同发酵时期臭鳃鱼的细菌多样性具有明显差异,可能明显影响鱼风味的形成。在发酵过程中,各种微生物相互作用将发酵原料中的各种大分子物质代谢分解成易被身体消化吸收的小分子活性物质,从而使得发酵成品的发酵时间、质地、风味、营养含量、香气成分等均发生显著变化^[5]。

目前关于筒鲜鱼的报道均是关于其文化底蕴和历史内涵,而对其加工过程中的微生物多样性及品质特性的研究则是一片空白。基于此,本文采用以高通量测序技术为基础的宏基因组测序对筒鲜鱼发酵过程中的微生物菌群的多样性和演替规律进行分析,明确优势菌群,并对其理化性质、质构特性、微观结构进行测定,为明晰筒鲜鱼发酵过程中的生物群落组成及发酵品质变化提供一定理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

取新鲜花鲢 10 斤,切成均匀小块,与 100 g 盐、7.5 g 姜丝、25 g 粗辣椒面、50 g 花椒以及 25 g 料酒充分混合至鱼肉表面有黏液出现,放入陶罐中并用保鲜膜密封,于-4℃冰柜中发酵。分别取发酵 0、1、3、5、7、10、12、15 d 的鱼肉编号 T0、T1、T3、T5、T7、T10、T12、T15,然后真空密封包装,置于-80℃冰箱冷冻保存备用。E.Z.N.A®Mag-Bind® Stool DNA Kit 基因组 DNA 抽提试剂盒,Omega Engineering 公司。

氢氧化钠、硝酸、石油醚、乙酸锌,开封开化有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1D 单人单面垂直净化工作台,上海尚道仪器制造有限公司;DHP-260 生化培养箱,上海梅香有限公司;TDL-40B 高速离心机,上海安亭科学仪器厂;CFX Opus Duet PCR 扩增仪,美国伯乐公司;FDE40086FV ULTS -80℃冰箱,美国 Thermo scientific 公司;Regulus8100 场发射扫描电子显微镜,日立公司;TMS-PRO 质构仪,美国 FTC 公司;ST-04 半自动凯氏定氮仪,山东盛泰仪器有限公司;SX-500 全自动高压灭菌锅,日本 Tomy Digital Biology 公司;DYY-11 电泳仪,北京市六一生物技术有限公司;FR-980A 生物电泳图像分析系统,上海复日科技有限公司;S220 超声波 DNA 破碎仪,美国 Covaris 公司;Qubit 4.0 荧光定量仪,赛默飞世尔科技公司;Agilent 2100 生物分析仪,安捷伦科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 筒鲜鱼发酵过程中微生物 DNA 提取

在无菌超净工作台上操作,使用高温灭菌后的剪刀将不同发酵时期的筒鲜鱼样品剪碎后混合均

匀,分别称取 0.3 g 样品放入 2 mL 样品管中在组织破碎仪中进行破碎。按照 Omega 基因组 DNA 抽提试剂盒的操作说明书对发酵不同时期的筒鲜鱼中的微生物总 DNA 进行提取,并采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

1.3.2 宏基因组高通量测序

使用 DNA 破碎仪对基因组 DNA 进行片段化,借助 DNB-SEQ T7 平台完成宏基因组测序。通过 Fastp 对测序的原始数据进行质量评估,使用 megahit 进行多样本混合拼接,使用 Metawrap 组合套件进行分箱,采用 Prodigal 对拼接结果进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测,并将其翻译为氨基酸序列。使用 CD-HIT 与 bowtie2 软件对所有样本中预测出的基因进行非冗余基因集的构建并统计基因在对应样本中的丰度信息。最后使用 DIAMOND、hmmscan 软件对基因集代表序列与 NR、eggNOG、COG、CAZy、SEED 等数据库进行比对注释,同时得到各样本中物种的相对丰度。建库测序及数据分析由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3.3 筒鲜鱼发酵过程中理化指标的测定

水分含量的测定参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》;灰分含量的测定参照 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》;粗脂肪含量的测定参照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》;粗蛋白含量的测定参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白的测定》;挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)含量的测定参照 GB 5009.228—2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》;pH 值的测定参照 GB 5009.237—2016《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定》。

1.3.4 筒鲜鱼发酵过程中质构特性的测定

参考刘婧懿等^[6]的方法稍作修改。取大小为 2 cm×2 cm×2 cm 不同发酵时期的筒鲜鱼样品,在室温下采用 TPA 模式测定硬度,弹性,内聚性及咀嚼性。仪器参数为 P/50 探头,量程 500 N,弹性形变百分比 60%,压缩速率 60 mm/min,返回速率 60 mm/min,回到样品表面高度为 15 mm,压缩间隔时间为 2 s。

1.3.5 筒鲜鱼发酵过程中微观结构的测定

参考谢思芸等^[7]的方法稍作修改。取大小为 1 cm×1 cm×1 cm 不同发酵时期的筒鲜鱼样品,脱水冻干后喷金,然后用扫描电子显微镜观察并拍照(500、5 000 倍)。

1.3.6 数据处理

所有试验重复 3 次,结果均以平均值±标准差表示。使用 SPSS 26 统计分析软件对结果进行处理,采用单因素方差分析中的 Duncan 多重比较法进行显著性分析;采用 Pearson 法分析发酵过程中筒鲜鱼理化指标与微生物的相关性。

2 结果与分析

2.1 筒鲜鱼发酵样本的宏基因组测序数据质量评估及质量控制

采用宏基因组测序分析筒鲜鱼发酵过程中的微生物多样性,得到原始数据共 28.1 G,去除低质量数据后共获得 27.9 G 的有效数据用于后续分析。如表 1 所示,8 个样品的所有序列数目在 $4.28 \times 10^7 \sim 6.94 \times 10^7$ 条之间,碱基数目在 $6.08 \times 10^9 \sim 1.40 \times 10^{10}$ 之间,平均序列长度为 150 bp, Q₂₀ 比例均在 97% 以上, Q₃₀ 比例均在 91% 以上, GC 数量含量在 42%~46% 之间,说明宏基因组测序质量合格^[8]。

表1 宏基因组测序得到的有效数据的质量信息
Table 1 Quality information of effective data obtained from metagenomic sequencing

样品	所有序列数目/#	所有碱基数目/bp	平均序列长度/bp	Q ₂₀ 比例/%	Q ₃₀ 比例/%	GC 数量含量/%
T0	61 118 516	9 152 134 074	150	97.47	93.11	42.93
T1	69 418 068	10 398 262 362	150	97.47	93.26	43.95
T3	40 645 790	6 081 341 946	150	97.78	93.91	46.00
T5	46 177 544	6 916 186 484	150	97.52	93.30	45.94
T7	42 920 422	6 427 474 820	150	96.65	91.06	42.84
T10	49 062 224	7 348 092 470	150	97.11	91.75	43.74
T12	42 781 934	6 406 052 090	150	97.89	94.08	40.67
T15	45 307 722	6 781 306 502	150	97.98	94.33	42.20

2.2 筒鲜鱼发酵过程中微生物群落的 α 多样性分析

由表 2 可知,所有样本的覆盖率均大于 0.97,本次测序的覆盖率较高,测序结果真实有效^[9]。T12 的超 1 (Chao1) 指数和 ACE 指数高于其余发酵时期的样品,说明筒鲜鱼发酵第 12 天时,其中的物种丰富度最高^[10]。发酵第 10 天的筒鲜鱼中香农 (Shannon) 指数最高,说明筒鲜鱼发酵至第 10 天时,样品的生物多样性最高^[11]。筒鲜鱼发酵不同阶段的微生物多样性及群落丰度有一定差异,因此微生物菌落在发酵过程中处于动态平衡。

表2 筒鲜鱼发酵过程中微生物群落Alpha多样性分析
Table 2 Alpha diversity statistics of microbial community of Tongxian fish during the fermentation process

样品	Observed	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	覆盖率/%
T0	743 316	880 891.2	871 096.7	12.24	1.00	97.75
T1	782 372	931 724.3	923 339.5	12.417	1.00	97.04
T3	748 722	927 546.9	906 820.8	12.19	1.00	97.53
T5	833 407	972 305	955 322	12.35	1.00	98.32
T7	852 788	1 014 872	1 007 334	12.29	1.00	97.48
T10	995 209	1 127 585	1 117 850	12.68	1.00	98.29
T12	1 016 537	1 134 840	1 121 445	12.66	1.00	98.76
T15	914 899	1 073 102	1 054 505	12.49	1.00	98.04

2.3 筒鲜鱼发酵过程中微生物菌群落结构分析

2.3.1 基于门水平微生物群落结构分析

对所得序列进行物种分类注释,共注释得到 23 个门、47 个纲、100 个目、193 个科、443 个属、2 946 个种的微生物。如图 1 所示,基于门水平分析,不同发酵时期的筒鲜鱼菌群主要分布在变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 3 个门中,其中 Proteobacteria 在发酵过程中一直是优势菌门,其相对丰度均在 77% 以上。未发酵时样品中 Proteobacteria 及 Actinobacteria 是优势菌属,相对丰度分别为 89.53%、10.08%。随着发酵时间的延长,Actinobacteria 相对丰度呈下降趋势,在第 15 天降为 0.82%,Firmicutes 的相对丰度在第 5 天增长至 18.94%,然后飞降至平稳,在发酵第 15 天达到 4.14%。

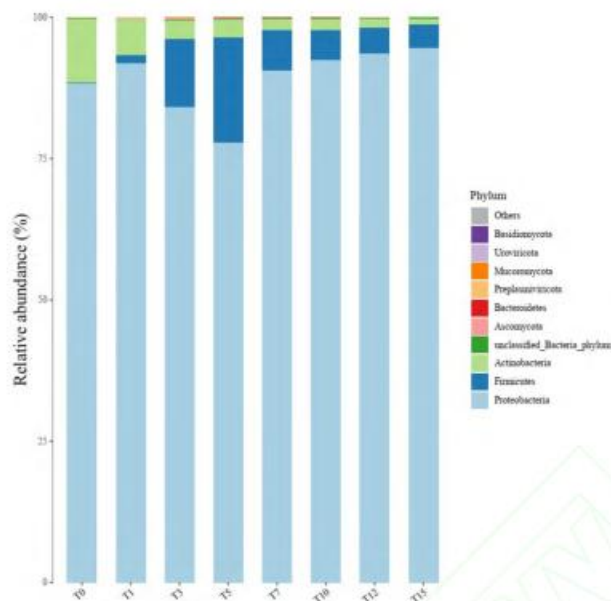


图 1 基于门分类水平上的不同发酵时期筒鲜鱼菌群分布图

Fig. 1 Distribution of Tongxian fish microorganisms at different fermentation stages based on the phylum level

2.3.2 基于属水平微生物群落结构分析

如图 2 所示, 基于属水平分析, 不同发酵时期筒鲜鱼的筒鲜鱼菌群主要分布在假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、尤因氏菌属 (*Ewingella*)、克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、拉恩氏菌属 (*Rahnella*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、泛菌属 (*Pantoea*) 10 个属中。

未发酵的样品中 *Acinetobacter* 及 *Pseudomonas* 是优势菌属, 分别占 41.01% 和 19.82%。发酵第 1 天, *Pseudomonas* 及 *Acinetobacter* 的相对丰度分别为 47.14%、29.04%, 是当前发酵时间的优势菌属。在发酵 3~5 d 时, *Pseudomonas* 相对丰度持续降低, 至第 5 天相对丰度已经降至 2.48%。*Psychrobacter* 的相对丰度则是持续增长, 并于发酵第 5 天达到 47.59%, 成为唯一的优势菌属。发酵第 7 天, 菌群相对丰度发生剧烈变化, *Ewingella* 相对丰度突增至 36.79%, 成为优势菌属。在接下来的发酵过程中, 原本相对丰度降低的 *Pseudomonas* 再次上升, 并于发酵第 15 天增至 46.68%, 成为唯一的优势菌属。推测在发酵开始后, 原本相对丰度占比较大的 *Pseudomonas* 迅速生长繁殖成为前期的优势菌属, *Acinetobacter* 作为弱致腐败菌而被强致腐败菌的 *Pseudomonas* 抑制, 相对丰度持续降低。而 *Psychrobacter* 则因为 *Pseudomonas* 进行生命活动产生的大量营养物质而迅速生长。在发酵中期, *Acinetobacter* 和 *Psychrobacter* 压制了 *Pseudomonas* 的生长, 使其相对丰度降至最低。而在失去了 *Pseudomonas* 的压制后, *Ewingella* 开始生长繁殖, 并在发酵第 7 天成为优势菌属。身为肠道细菌的 *Ewingella* 的生命活动产生了大量的营养物质^[12]。同时, 在发酵后期, *Pseudomonas* 不再受到 *Psychrobacter* 和 *Acinetobacter* 的抑制, 迅速生长繁殖成为优势菌群。在发酵后期, 发酵环境中氧气稀少, 只有 *Pseudomonas* 这种兼性厌氧型杆菌才能正常进行生命活动^[13], 这也是 *Pseudomonas* 能够在发酵后期保持优势菌属的原因之一。张继辉等^[14]研究发现臭鳊鱼发酵初期, *Psychrobacter* 和红球菌属 (*Rhodococcus*) 为优势菌属, *Psychrobacter* 在发酵的第 6 天比例大幅度上升, 与本研究结果类似。

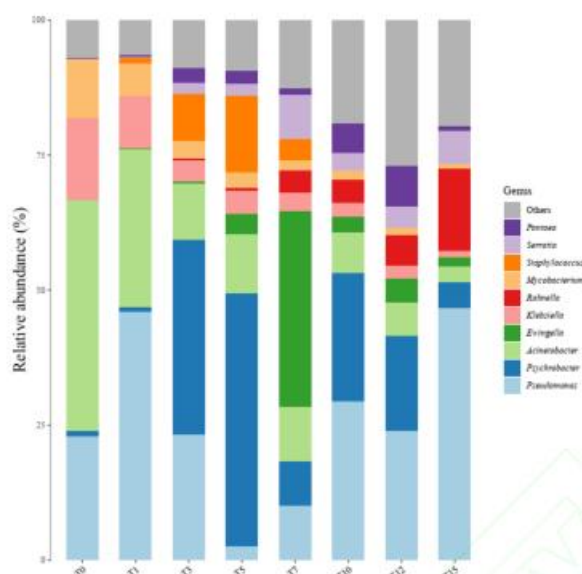


图 2 基于属分类水平上的不同发酵时期筒鲜鱼菌群分布图

Fig. 2 Distribution of Tongxian fish microorganisms at different fermentation stages based on the genus level

2.3.3 基于种水平微生物群落结构分析

如图 3 所示, 基于种水平分析, 不同发酵时期筒鲜鱼的筒鲜鱼菌群明显优势种为鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter_baumannii*)、美洲尤因氏菌 (*Ewingella_americana*)、克雷白杆菌 (*Klebsiella_pneumoniae*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium_tuberculosis*)、莓实假单胞菌 (*Pseudomonas_fragi*)、热杀索丝菌 (*Brochothrix_thermosphacta*)、霍氏肠杆菌 (*Enterobacter_hormaechei*)、成团泛菌 (*Pantoea_agglomerans*)。

与属水平类似的是, 未发酵样品中 *Acinetobacter_baumannii*、*Klebsiella_pneumoniae* 及 *Mycobacterium_tuberculosis* 为优势菌, 相对丰度分别为 42.15%、15.65%、9.72%。发酵过程中 *Acinetobacter_baumannii* 相对丰度持续降低, 发酵第 7 天, *Ewingella_americana* 相对丰度突增至 39.79%, 发酵中后期优势种数目更多且分布较均一。需要指出的是, 由于种水平上菌种遗传同源性高、差异小, 诸多种水平注释并不能与现有菌种库匹配, 因此完全无法分类的种亦占一定比例。

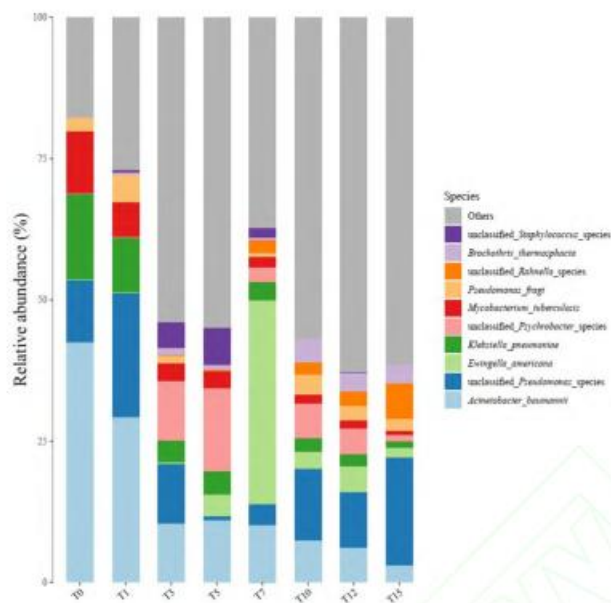


图 3 基于种分类水平上的不同发酵时期筒鲜鱼菌群分布图
Fig. 3 Distribution of Tongxian fish microorganisms at different fermentation stages based on species level

2.4 筒鲜鱼发酵过程中理化性质分析

2.4.1 理化特性分析

由表 3 可知，随着发酵时间的延长，鱼肉的水分含量、粗脂肪含量、粗蛋白含量、pH 值呈显著下降趋势 ($P<0.05$)。这可能是由于食盐的扩散渗透作用使得盐分不断渗入的同时水分不断渗出，因而水分含量降低。同时发酵中微生物产生的酶的作用使得脂肪和蛋白质分解为小分子物质导致其含量降低。鱼肉中的糖被微生物发酵后会分解成乳酸，造成酸碱度降低^[14]。

发酵过程中，鱼肉的灰分含量、TVB-N 含量呈显著上升趋势 ($P<0.05$)。筒鲜鱼发酵过程中伴随着盐含量的增长，导致其灰分含量增加。TVB-N 是衡量发酵鱼新鲜程度的一个指标，其含量高低代表鱼肉的品质好坏。随着发酵时间的延长，筒鲜鱼鱼肉中 TVB-N 含量整体呈上升趋势，新鲜花鲢的 TVB-N 含量 6.01 mg/100 g，发酵 15 d 后为 18.73 mg/100 g，显著增长 ($P<0.05$) 约 3 倍。这主要是因为微生物在发酵时加速了鱼肉蛋白质的分解，引起其含量升高，从而降低了产品的新鲜度^[15]。张子一^[15]研究臭鲈鱼和臭鳊鱼发酵 7 d 后鱼肉中挥发性盐基氮含量为 106.80、86.62 mg/100 g，显著高于筒鲜鱼中挥发性盐基氮含量 ($P<0.05$)，这可能是因为发酵方式不同和鱼类选择不同导致。参考《腌鱼》(T/MDSZ 006—2022) 中规定亚硝酸盐含量 ≤ 25 mg/100 g，建议筒鲜鱼发酵时间不宜过长。

表3 不同发酵时期筒鲜鱼理化性质统计
Table 3 Statistics of physicochemical properties of Tongxian fish at different fermentation periods

样本	水分含量/%	灰分含量/%	粗脂肪含量/%	粗蛋白含量/%	TVB-N 含量/(mg/100 g)	pH 值
T0	78.0±0.4 ^a	1.12±0.04 ^h	1.35±0.03 ^a	18.35±0.16 ^a	6.01±0.20 ^g	6.40±0.08 ^b
T1	76.8±0.3 ^b	1.74±0.05 ^g	1.21±0.04 ^b	17.81±0.14 ^b	10.52±0.34 ^f	6.57±0.10 ^a
T3	74.8±0.3 ^c	2.72±0.03 ^f	0.99±0.03 ^c	17.33±0.15 ^c	11.37±0.15 ^e	6.23±0.13 ^c
T5	72.8±0.2 ^d	3.51±0.04 ^e	0.85±0.02 ^d	16.82±0.16 ^d	12.24±0.23 ^d	6.18±0.15 ^d
T7	70.2±0.5 ^e	3.73±0.07 ^d	0.82±0.04 ^e	16.51±0.15 ^e	16.26±0.10 ^c	5.76±0.11 ^e
T10	69.1±0.2 ^f	3.92±0.05 ^c	0.78±0.05 ^f	16.28±0.14 ^f	17.52±0.27 ^b	5.53±0.17 ^f
T12	68.3±0.3 ^g	4.19±0.03 ^b	0.74±0.02 ^g	15.98±0.14 ^g	18.45±0.15 ^a	5.05±0.23 ^g
T15	67.9±0.4 ^h	4.31±0.05 ^a	0.71±0.03 ^h	15.72±0.13 ^h	18.73±0.21 ^a	4.98±0.15 ^g

注：表中小写字母不同表示在 0.05 水平上差异显著。

2.4.2 筒鲜鱼发酵过程中理化特性与微生物相关性分析

已有许多研究表明发酵食品微生物群落与其理化指标具有一定的相关性。孙海鑫等^[16]研究表明乳杆菌属、哈萨克斯坦酵母属与自然发酵酸鱼中的氨基酸态氮呈正相关，而与挥发性盐基氮、丙二醛、组胺和尸胺均呈负相关。吴永祥等^[3]研究发现，漫游球菌属与臭鳊鱼的 pH 值、粗蛋白含量呈显著负

相关 ($P < 0.05$)，假单胞菌属、肉杆菌属、沙雷氏菌属和乳杆菌属与 pH 值呈显著正相关 ($P < 0.05$)。漫游球菌属与可溶性多肽、可溶性总糖含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。本研究对筒鲜鱼发酵过程中的理化指标与微生物变化 (基于种水平) 进行 Pearson 法相关性分析，结果如表 4 所示。

Acinetobacter_baumannii、*Enterobacter_hormaechei*、*Klebsiella_pneumoniae* 和 *Mycobacterium_tuberculosis* 与灰分含量和 TVB-N 含量呈极显著负相关 ($P < 0.01$)，与水分含量、粗脂肪含量、粗蛋白含量呈极显著正相关 ($P < 0.01$)，与 pH 值呈显著正相关 ($P < 0.05$)。*Brochothrix_thermosphacta* 与水分含量、粗脂肪含量、粗蛋白含量、和 pH 值呈显著负相关 ($P < 0.05$)，与灰分含量、TVB-N 含量呈显著正相关 ($P < 0.05$)。推断在发酵过程中 *Brochothrix_thermosphacta* 能合成脂肪酶和蛋白酶等，促进了脂肪与蛋白的分解，致使发酵后粗脂肪含量和粗蛋白含量下降^[17]。结果揭示了筒鲜鱼发酵过程中理化指标与部分微细菌群落呈现显著相关性，而细菌群落代谢的复杂酶体系可能是引起筒鲜鱼发酵过程中理化性质发生变化的主要原因。

表4 理化指标和微生物相关性分析
Table 4 Correlation analysis between physicochemical indexes and bacterial genera in Tongxian fish

项目	<i>Acinetobacter_baumannii</i>	<i>Brochothrix_thermosphacta</i>	<i>Enterobacter_hormaechei</i>	<i>Ewingella_americana</i>	<i>Klebsiella_pneumoniae</i>	<i>Mycobacterium_tuberculosis</i>	<i>Pantoea_agglomerans</i>	<i>Pseudomonas_fragi</i>
水分含量	0.870**	-0.799*	0.864**	-0.307	0.877**	0.878**	-0.423	0.198
灰分含量	-0.947**	0.732*	-0.941**	0.302	-0.948**	-0.943**	0.516	-0.339
粗脂肪含量	0.963**	-0.720*	0.957**	-0.296	0.963**	0.956**	-0.538	0.357
粗蛋白含量	0.911**	-0.786*	0.913**	-0.249	0.917**	0.917**	-0.432	0.224
TVB-N含量	-0.877**	0.798*	-0.883**	0.299	-0.896**	-0.911**	0.418	-0.066
pH 值	0.730*	-0.827*	0.724*	-0.136	0.728*	0.719*	-0.332	0.095

注：*表示在 0.05 水平上具有显著性；**表示在 0.01 水平上具有显著性。

2.5 筒鲜鱼发酵过程中质构特性分析

筒鲜鱼在发酵过程中的质构变化如表 5 所示。随着发酵时间的延长，筒鲜鱼的硬度、弹性、咀嚼性、内聚性变化趋势基本一致，即先下降后持续上升，黏附性则是一直保持上升趋势，并具有显著性差异 ($P < 0.05$)。发酵至第 3 天，微生物初始活动导致蛋白质降解，细胞间组织密度松软，使得鱼肉的硬度、内聚性和咀嚼性的下降^[18]。而后随着食盐的进一步渗入而导致鱼肉水分流失，使得硬度开始持续上升。且筒鲜鱼样品鱼肉组织由于发酵过程中的微生物及酶的活动，组织重新变得紧密完整，弹性也开始持续增高。同时，鱼肉的肌球蛋白、肌动蛋白和肌动球蛋白等盐溶蛋白逐渐溶解，筒鲜鱼的内聚性持续增大，从而促进了咀嚼性的增大^[19]。而在发酵后期假单胞菌属再次成为优势菌属后，内聚性开始降低，硬度、弹性以及咀嚼性增幅降低。假单胞菌属这种嗜冷微生物拥有较强的生物黏附能力，同时，在整个发酵过程中，假单胞菌属都有不小的相对丰度，因此筒鲜鱼样品的黏附性持续上升。

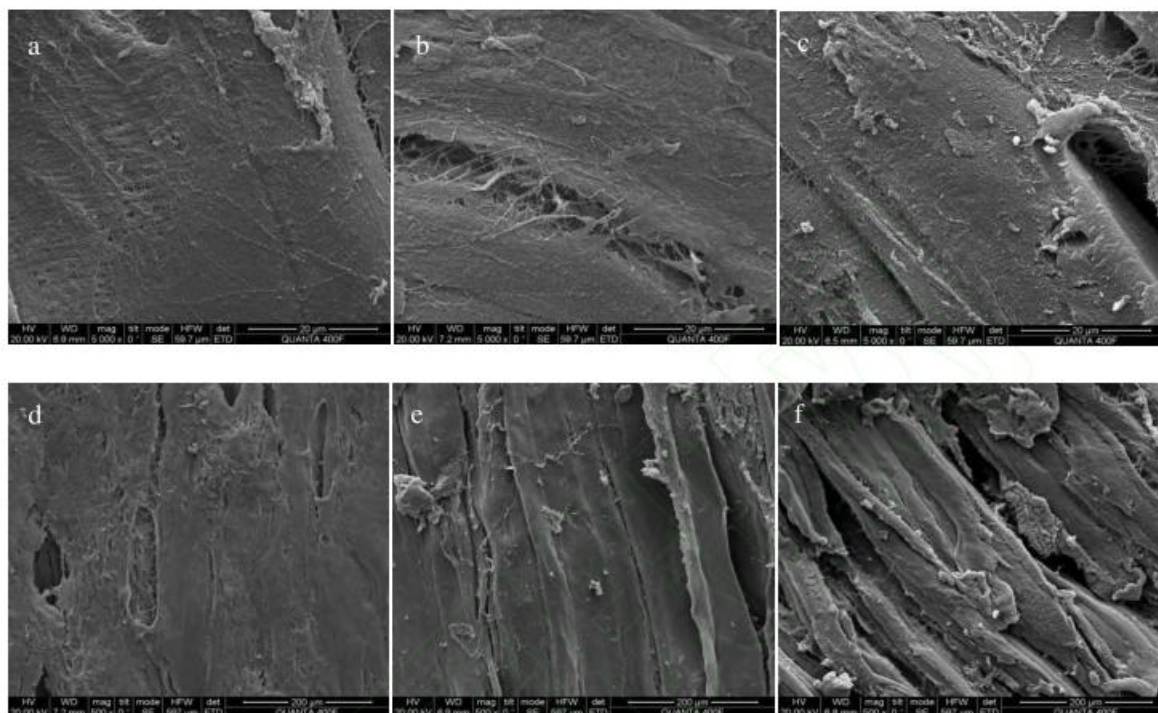
表5 不同发酵时期筒鲜鱼质构特性比较
Table 5 Comparison of texture characteristics of Tongxian fish at different fermentation periods

样本	硬度/N	弹性/mm	内聚性/Ratio	粘附性/mj	咀嚼性/mj
T0	7.5±0.1 ^c	10.02±0.23 ^c	0.48±0.03 ^a	0.412±0.051 ^b	34.16±0.33 ^f
T1	5.1±0.2 ^e	8.91±0.12 ^e	0.43±0.03 ^c	0.601±0.071 ^e	32.23±0.34 ^e
T3	3.5±0.1 ^h	7.32±0.13 ^h	0.36±0.02 ^d	0.651±0.042 ^f	29.44±0.51 ^h
T5	6.3±0.2 ^f	9.48±0.15 ^f	0.45±0.03 ^b	0.856±0.023 ^c	45.51±0.32 ^c
T7	8.5±0.1 ^d	11.56±0.21 ^d	0.47±0.02 ^{ab}	1.041±0.034 ^d	60.88±0.43 ^d
T10	10.2±0.1 ^c	11.96±0.13 ^c	0.48±0.02 ^a	1.159±0.023 ^c	68.74±0.23 ^c
T12	11.8±0.2 ^b	12.48±0.15 ^b	0.47±0.03 ^{ab}	1.296±0.032 ^b	75.45±0.54 ^b
T15	13.3±0.2 ^a	12.98±0.12 ^a	0.46±0.03 ^b	1.419±0.024 ^a	79.59±0.46 ^a

2.6 筒鲜鱼发酵过程中微观结构分析

通过扫描电镜对发酵 0、6、12 d 筒鲜鱼的微观结构进行观察，如图 4 所示。经发酵处理后，筒

鲜鱼的组织结构形态发生了明显变化。首先鱼体表面呈现出明显的干枯、失水现象,并呈现出褶皱和卷曲的特点。其次,肌肉纤维之间的距离也随着增加而增大。研究发现,在发酵过程中,鱼肉中的一些组分,如蛋白、脂肪等,都会产生一定程度的降解,进而影响鱼肉的质量。发酵前后扫描电镜观察结果和实验研究的水分含量,硬度具有一定的相关性,扫描电镜图像从微观角度进一步验证了发酵对筒鲜鱼质构特性的影响。



a- $\times 5\,000$ 第0天; b- $\times 5\,000$ 第6天; c- $\times 5\,000$ 第12天; d- $\times 500$ 第0天; e- $\times 500$ 第6天; f- $\times 500$ 第12天

图4 筒鲜鱼在发酵过程中的SEM($\times 500$ 、 $\times 5\,000$)图

Fig. 4 The SEM($\times 500$ 、 $\times 5\,000$) photograph of Tongxian fish at different fermentation periods

3 结论与讨论

本文通过高通量宏基因组测序技术对筒鲜鱼发酵过程中的微生物菌群组成及变化进行分析,明确优势菌群,并对其发酵过程中的理化指标、质构特性及微观结构进行表征。结果表明,发酵第10天微生物物种总数较多、生物多样性最高。在发酵过程中,*Pseudomonas* 和 *Acinetobacter* 在未发酵及发酵第1天属于优势菌属;发酵3~5 d, *Psychrobacter* 是唯一优势菌属;发酵第7天, *Ewingella* 成为唯一优势菌属;发酵第10~15天, *Pseudomonas* 为优势菌属。发酵后筒鲜鱼的理化指标、质构特性及微观结构都发生显著变化,鱼肉的水分含量、粗脂肪含量、粗蛋白含量、pH 值显著下降 ($P<0.05$),灰分含量、TVB-N 含量显著上升 ($P<0.05$)。硬度、弹性、咀嚼性、内聚性先下降后持续上升,而黏附性则是一直保持上升趋势。发酵后筒鲜鱼鱼肉表面呈现出明显的干枯、失水现象,并呈现出褶皱和卷曲的特点,肌肉纤维之间的距离也随着增加而增大。通过分析理化指标与微生物菌群相关性发现,菌群的种类和丰度与筒鲜鱼发酵过程中的理化指标有显著相关性,其中影响较为明显的是 *Acinetobacter_baumannii*、*Enterobacter_hormaechei*、*Klebsiella_pneumoniae*、*Brochothrix_thermosphacta* 和 *Mycobacterium_tuberculosis*。

本研究阐明了筒鲜鱼发酵过程中优势菌群的变化,以及筒鲜鱼理化指标、质构特性及微观结构的差异和微生物菌群的一定相关性,研究结果可为进一步认识筒鲜鱼的微生物群落结构组成和相应品质变化提供一定理论参考,同时也可对筒鲜鱼的深加工及综合开发利用提供可能性。

参考文献

- [1] 沈颖莹. 发酵鳊鱼食品加工工艺与品质控制技术研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2021.
SHEN Y Y. Study on food processing and quality control technology of fermented mandarin fish[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2021.
- [2] 张慧林, 王永胜, 李冲伟. 传统发酵豆酱的微生物群落结构和游离氨基酸组成及其相关性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 192-197.
ZHANG H L, WANG Y S, LI C W. Correlation between microbial community structure and free amino acid composition of traditional fermented soybean paste[J]. Food Science, 2019, 40(14): 192-197.
- [3] 吴永祥, 王婷婷, 张梦婷, 等. 徽州臭鳊鱼微生物多样性、品质特性及其酶解产物抗氧化能力分析[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 128-134.
WU Y X, WANG T T, ZHANG M T, et al. Microbial diversity and quality characteristics of Huizhou stinky mandarin fish and antioxidant activity of its enzymatic hydrolysates[J]. Food Science, 2021, 42(2): 128-134.
- [4] 张继辉, 赵丹丹, 张爽. 徽州臭鳊鱼发酵过程中微生物多样性分析[J]. 绵阳师范学院学报, 2023, 42(5): 61-67.
ZHANG J H, ZHAO D D, ZHANG S. Microbial diversity analysis of Huizhou stinky mandarin fish during fermentation[J]. Journal of Mianyang Normal University, 2023, 42(5): 61-67.
- [5] 吴燕燕, 陈茜, 王悦齐, 等. 传统发酵水产品微生物群落与品质相关性的研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(7): 1248-1258.
WU Y Y, CHEN Q, WANG Y Q, et al. Advances in research on the correlation between microbial community and quality of traditional fermented aquatic products[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(7): 1248-1258.
- [6] 刘婧懿, 赵前程, 程少峰, 等. 鱼肉质构的影响因素及测定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(9): 3035-3043.
LIU J Y, ZHAO Q C, DU S F, et al. Research progress on the influencing factors and determination methods of fish muscle texture[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(9): 3035-3043.
- [7] 谢思芸, 李怡菲, 罗丹妮, 等. 真空腌制过程中鱼肉水分迁移和组织结构变化规律研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(14): 1-7.
XIE S Y, LI Y F, LUO D X, et al. Studies of water migration and tissue structure changes in fish during the vacuum curing process[J]. Food Research and Development, 2021, 42(14): 1-7.
- [8] SANTOSH K, WAHENGAM R, GIASUDDIN A, et al. Quantifying the biases in metagenome mining for realistic assessment of microbial ecology of naturally fermented foods[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 34155.
- [9] 马肖肖. 高通量测序分析不同酒糟鱼中微生物菌群多样性及其功能预测[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2020.
MA X X. High throughput sequencing analysis of microbial flora diversity and functional prediction in different vinasse fishes[D]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Normal University, 2020.
- [10] WU L J, LI F, RAN L S, et al. Insight into the effects of nisin and cecropin on the oral microbial community of rats by high-throughput sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1082.
- [11] HU Y Y, WANG H, KONG B H, et al. The succession and correlation of the bacterial community and flavor characteristics of Harbin dry sausages during fermentation[J]. LWT, 2021, 138: 110689.
- [12] JIA S L, ZHUANG S, LEI Y T, et al. Application of Illumina-Miseq high throughput sequencing and culture-dependent techniques for the identification of microbiota of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) treated by tea polyphenols[J]. Food Microbiology, 2018, 12(76): 52-61.
- [13] 臧金红. 酸鱼发酵过程中特征风味形成与微生物的关系研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
ZANG J H. Study on the relationship between characteristic flavors formation and microorganisms in Suanyu fermentation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [14] 刘冬敏, 王建辉, 刘永乐, 等. 草鱼肌肉脂肪酸组成及其在冷藏中的含量变化[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 194-198.
LIU D M, WANG J H, LIU Y L, et al. Study on fatty acid composition in Grass carp muscle and their content changes during cooling preservation[J]. Food Science, 2013, 34(2): 194-198.
- [15] 张子一. “臭鲈鱼”发酵过程中肌肉品质的变化规律研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
ZHANG Z Y. Research of the change regularity of muscle quality during fermentation of stinky bass[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [16] 孙海鑫, 陈力, 石文琪, 等. 自然发酵酸鱼中微生物群落多样性与理化性质分析[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(12): 187-195.
SUN H X, CHEN L, SHI W Q, et al. Analysis of microbial community diversity and physicochemical properties of naturally fermented Suanyu[J]. Food Research and Development, 2023, 44(12): 187-195.
- [17] 贺永玲, 杨松, 闫晓明, 等. 鳊鱼发酵过程营养物质动态变化[J]. 食品工业, 2016, 37(2): 73-76.
HE Y L, YANG S, YAN X M, et al. Research on the dynamic change of nutrient during the mandarin fish fermentation process[J]. The Food Industry, 2016, 37(2): 73-76.
- [18] 武文玉, 丁丽丽, 白凤翎, 等. 鲛鱼香肠发酵过程中凝胶特性、微生物群落和风味物质的演替规律[C]. 中国食品科学技术学会第十九届年会论文摘要集. 北京: 中国食品学报, 2022.
WU W Y, DING L L, BAI F L, et al. The succession law of gel characteristics, microbial community and flavor substances during fermentation of Spanish mackerel sausage[C]. Abstracts of the 19th Annual Meeting of CIFST. Beijing: Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022.
- [19] TROND M, BIRGITTE M, EVEN H, et al. Contamination of salmon fillets and processing plants with spoilage bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 98-108.