

醉鱼糟制过程中酒糟液中的微生物群落

朱秀花¹, 林慧敏^{1*}, 董天嘉¹, 孔佳磊², 邓尚贵¹

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江海洋大学东海科学技术学院, 浙江 舟山 316000)

摘要: 为探讨醉鱼糟制过程中酒糟液微生物群落多样性, 本实验以大黄鱼为原料, 用传统糟制工艺制作醉鱼, 采用 Illumina HiSeq2500 高通量测序技术对醉鱼酒糟液菌群进行分析。结果显示, 糟制过程中不同用盐量(2%、5%和10%)大黄鱼 pH 值在糟制前 5 d 或 10 d 稍有上升后逐渐降低, 而 TVB-N 值在糟制期间逐渐下降, 糟制 30 d 后的 TVB-N 值均低于 30 mg/100 g, 其中 5% 用盐量组最低; 5% 用盐量组在不同鱼糟比(1:1、1:1.5 和 1:2)下, 大黄鱼 pH 和 TVB-N 值变化规律基本一致, 说明糟制过程中醉鱼品质较稳定。5% 用盐量组醉鱼酒糟液微生物高通量测序结果显示, 鱼糟比为 1:2 的酒糟液 Chao 指数最大(167), 表明物种丰度最高; 鱼糟比为 1:1 的酒糟液 Shannon 指数最大(2.75), Simpson 指数最小(0.109), 表明细菌多样性最高; 酒糟液涉及细菌 17 个门和 1 个未分类菌门, 143 个属, 变形菌门、蓝细菌门和厚壁菌门是优势菌门, 其中变形菌门占绝对优势; 弧菌属、*Chloroplast norank* 和肠杆菌属是优势菌属, 发酵前期弧菌属占绝对优势。研究结果为醉鱼酒糟液微生物群落多样性研究提供理论依据, 为控制糟制水产品卫生安全提供参考。

关键词: 大黄鱼; 酒糟液; 微生物群落; 高通量测序

中图分类号: TS 254.5

文献标志码: A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲈形目(Perciformes), 石首鱼科(Sciaenidae), 黄鱼属(*Larimichthys*), 是我国传统四大海产之一, 不仅肉质鲜美、营养价值高, 而且低脂肪、低胆固醇, 具有治疗失眠、贫血、头晕、食欲不振和滋补身体等功能^[1-3], 是深受消费者青睐的佳品。

醉鱼, 又名糟鱼, 不仅风味独特、醇香可口, 而且营养丰富、贮藏期长, 是我国南方沿海地区传统风味食品。国内对醉鱼的研究主要集中在加工工艺方面。律佳雪等^[4]和康怀彬等^[5], 优化了醉鱼的腌制工艺; 李改燕^[6]对醉鱼发酵过程中微生物菌群和风味进行了研究; 曹丽丽等^[7]采用主成分分析法和聚类分析法研究了醉鱼感官品质与理化指标的关系, 并建立了醉鱼品质评价体系; 赵品等^[8]研究了间歇真空糟制技术对

醉鱼品质的影响。目前国外并没有醉鱼方面的相关研究报道, 而关于发酵鱼腌制工艺方面的研究较多。Sannaveerappa 等^[9]研究了湿腌和干腌对遮目鱼(*Chanos chanos*)相关蛋白质化学变化的影响; Andrés 等^[10]研究了腌制工艺对咸鳕产品收率 and 产品特性的影响; Chaijan^[11]对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肉腌制过程中理化性质的变化进行了研究; Jónsdóttir 等^[12]对不同腌制方法生产下咸大西洋鳕(*Gadus morhua*)的风味与品质特征进行了研究。

目前国内外对酒糟有一些研究^[13-18], 但关于醉鱼糟制过程中酒糟液微生物群落多样性的文献报道非常少。本研究选择 2%、5% 和 10% 用盐量(以鱼重计)分别以传统糟制工艺制作糟醉大黄鱼, 以 pH 值和 TVB-N 值为指标, 筛选出最优用盐量组, 在此基础上采用 Illumina HiSeq2500 高通

收稿日期: 2018-09-12 修回日期: 2018-12-28

资助项目: 国家重点研发计划(2017YFD0400105-05); 浙江省团队特派员项目(2017T1106)

通信作者: 林慧敏, E-mail: linhuixiaomin@126.com

量测序技术研究该组不同糟用量(鱼糟比1:1、1:1.5和1:2)醉鱼的酒糟液在发酵前期(0d)、中期(15 d)和后期(30 d)的微生物菌群动态变化和多样性。本研究旨在为醉鱼酒糟液发酵液微生物群落多样性的研究提供相关理论依据,完善糟醉水产品的科学研究,进一步提高醉鱼产品的卫生质量,推动安全、高品质醉鱼食品的开发和生产。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

冰鲜大黄鱼(每尾长20~25 cm,体质量200~300 g)、老酒(半干型黄酒,总糖15.0~40.0 g/L,绍兴太和酒业有限公司)、加碘食盐(浙江绿海制盐有限责任公司)、白砂糖(上海上棠食品有限公司)均购自舟山临城华润万家超市;新鲜糯米,购自舟山丰茂菜市场。

1.2 仪器与amp;设备

D3024R型High Speed (Refrigerated) Mirco Centrifuge,美国SCIOLOGEX(赛洛捷克);新JY300C电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;FR-980A生物电泳图像分析系统,上海复日科技有限公司;HH420电泳恒温水浴(槽),上虞道墟茂祥仪器设备厂;Milli-Q Integral超纯水仪,默克密理博公司;TP-48P高通量组织研磨仪,上海万柏生物科技有限公司;GI100TW全自动灭菌锅,厦门致微仪器有限公司;SW-CJ-2FD双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;BS110S电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;VM0109搅拌机,VITA-MIX CORPORATION;高速低温离心机(A13010196),上海艾测电子科技公司;Kjeltec 8400全自动凯氏定氮仪,丹麦FOSS公司;PHS-3B精密pH计,上海精密科学仪器有限公司;UPT-11-60L优普超纯水机,杭州雷琪实验器材有限公司。其他试剂均为分析纯。

1.3 酒糟的制作amp;方法

购买回来的新鲜糯米在(20±5)℃温度下浸泡8 h,沥干后蒸煮40 min,室温下冷却至40℃以下,按每1 kg原料配1~1.5 kg的比例加入温开水(酒曲先溶解在40℃温开水中),最后入缸封口发酵48 h。发酵好的酒糟于-4℃冷藏备用。

1.4 醉鱼的制作amp;方法

半干鱼的制作amp;工艺 大黄鱼去鳞、去头、去尾、去鳍、去内脏,用解剖刀沿着脊椎骨将大黄鱼分成两半(小心剔除脊椎骨,尽量保持鱼形完整),切成60 mm×50 mm×50 mm的形状。用流水将黑膜、血液以及鱼体表面冲洗干净后,用3%的盐水充分洗净血污。洗净沥干后的鱼块用质量分数为15%的食盐水进行腌制,并用重物压制使其全部浸渍在盐水中。腌制48 h后取出鱼块置于清水中,使其表面稍微脱盐,并洗去表面的黏滞物,最后置于阳光下自然风干(避免曝晒,以免发生油耗)。

醉鱼的制作amp;工艺 分为3大组,即2%、5%和10%用盐量组(以酒糟重量计),每组再分为3小组(大黄鱼与酒糟重量的比例为1:1、1:1.5和1:2)进行糟醉。首先酒糟中加适量的白糖后搅拌均匀,糟醉时先在洗净干燥后的容器底部铺上一层较厚的酒糟,然后将鱼块整齐地排列在酒糟上,之后以层糟层鱼的形式摆放,并逐层压紧。最后在顶层铺上一层厚厚的酒糟,倒入适量的老酒。用食品级保鲜膜和密封性好的盖子进行封盖,先用两层保鲜膜封口,并用绳子扎紧,最后盖上盖子,在(20±5)℃温度下糟醉30 d(期间不能打开容器盖)。

1.5 pH和TVB-N值

分别在糟制0 d、5 d、10 d、20 d和30 d时进行取样。除去鱼块表面明显液体和酒糟后,取10 g鱼肉置于搅拌机中,加入去离子水90 mL并搅拌均匀,10 000 r/min离心5 min后,取滤液于100 mL烧杯中,测定pH值,另取1 mL滤液用凯氏定氮仪法^[19]测TVB-N值。

1.6 酒糟液发酵过程中微生物群落分析

样品采集与DNA抽提 在无菌环境下对不同糟制时间的醉鱼酒糟液随机抽样,时间段选取发酵前期(0 d)、中期(15 d)和后期(30 d)。取样时先轻轻摇晃酒糟液,取周边4个点和中间3个点混合均匀,放置于50 mL离心管中,于-80℃超低温冰箱中保存。采用TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit试剂盒提取DNA,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR扩增 采用引物对515F(5'-GTGCCA-

GCMGCCGCGG-3')和907R (5'-CCGTCAATTC-MTTTRAGTTT-3')进行PCR扩增。PCR采用TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 μ L反应体系: 5 \times FastPfu Buffer 4.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 5 μ mol/L正反向引物515F和907R各0.8 μ L, FastPfu Polymerase 0.4 μ L, Template DNA 10 ng, 补ddH₂O至20 μ L。根据预实验, 设置PCR反应参数: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s; 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 27个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。每个样品进行3次重复, 将同一样品PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用Axy Prep DNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)切胶回收PCR产物, 经Tris_HCl洗脱后用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

文库构建与测序 参照电泳初步检测结果, 用QuantiFluorTM-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)检测定量PCR产物。根据定量检测结果和测序量的要求, 构建Illumina PE250文库, PCR产物测序由上海元莘生物医药科技有限公司用ABI GeneAmp[®] 9700型PCR仪完成, 采用Illumina公司HiSeq2500测序平台。

1.7 数据处理

pH和TVB-N值数据 采用Excel 2010软件对pH和TVB-N数据进行统计分析, 所有实验均作3次重复, 其中TVB-N检测做2个平行, 测定结果都以平均值 \pm 标准差表示。

高通量测序数据 通过比对Silva核糖体数据库^[20], 以97%相似性水平为标准划分可操作分类单元(OTU), 并采用RDP classifier贝叶斯算法^[21]进行分类学分析, 在门(phylum)和属(genus)分类水平统计各样品的群落组成, 利用Mothur^[22]软件和R语言工具分别进行多样性分析、物种组成和结构分析等。

2 结果

2.1 不同用盐量下醉鱼pH值比较与分析

大黄鱼pH值的变化是醉鱼糟制过程中微生物代谢活动的重要参数, 这对于了解大黄鱼的腐败程度和微生物生长以及代谢产物有重要意义^[23]。从同一糟用量分析, 3组(2%、5%和10%)大黄鱼pH值在糟制前5 d或10 d稍有上升, 随后

表 1 不同用盐量下大黄鱼pH值变化

Tab. 1 Changes of pH value of *L. crocea* with different salt dosage

用盐量/% salt dosage	糟制时间/d time	鱼 : 糟 fish : vinasse		
		1 : 1	1 : 1.5	1 : 2
2	0	6.50 \pm 0.04	6.50 \pm 0.04	6.50 \pm 0.04
2	5	6.66 \pm 0.03	6.61 \pm 0.07	6.67 \pm 0.02
2	10	6.72 \pm 0.03	5.74 \pm 0.05	5.39 \pm 0.02
2	20	5.92 \pm 0.05	4.69 \pm 0.04	5.65 \pm 0.01
2	30	4.96 \pm 0.03	4.75 \pm 0.12	4.65 \pm 0.01
5	0	6.50 \pm 0.04	6.50 \pm 0.04	6.50 \pm 0.04
5	5	6.73 \pm 0.03	6.54 \pm 0.09	6.71 \pm 0.05
5	10	6.81 \pm 0.06	6.72 \pm 0.03	5.78 \pm 0.06
5	20	5.29 \pm 0.10	5.45 \pm 0.14	4.97 \pm 0.04
5	30	4.65 \pm 0.04	4.33 \pm 0.05	4.25 \pm 0.03
10	0	6.50 \pm 0.04	6.50 \pm 0.04	6.50 \pm 0.04
10	5	6.88 \pm 0.09	6.59 \pm 0.02	6.82 \pm 0.03
10	10	6.92 \pm 0.04	4.97 \pm 0.10	4.46 \pm 0.09
10	20	5.10 \pm 0.12	4.85 \pm 0.02	4.72 \pm 0.07
10	30	3.38 \pm 0.05	3.40 \pm 0.03	3.34 \pm 0.10

逐渐降低,且糟制30 d后,10%用盐量组的pH值最低,这主要是因为较高的盐浓度促使一些耐酸微生物大量繁殖^[24-25](表1)。pH值上升是因为在微生物和酶的作用下,鱼肉蛋白质分解生成碱性物质^[26];由于鱼肉中糖原经酵解产生乳酸,ATP和磷酸肌酸等分解产生磷酸等酸性物质^[27],pH值又逐渐下降。从同一用盐量分析,鱼糟比为1:2的大黄鱼pH值最低,鱼糟比为1:1的pH值最高,这是因为微生物利用较多酒糟中的淀粉作为碳源生成较多有机酸^[28]。与5%用盐量组相比,2%用盐量组糟制30 d后的pH值最高,分别为(4.96±0.03)(鱼糟比1:1)、(4.75±0.12)(鱼糟比1:1.5)和(4.65±0.01)(鱼糟比1:2);而10%用盐量组最低,分别为(3.38±0.05)(鱼糟比1:1)、(3.40±0.03)(鱼糟比1:1.5)和(3.34±0.10)(鱼糟比1:2)。在整个糟醉过程中,5%用盐量组的大黄鱼在不同鱼糟比下的pH值变化趋势和规律基本一致。

2.2 不同用盐量下醉鱼TVB-N值变化

挥发性盐基氮(TVB-N)是鱼类新鲜程度评

价的重要化学指标,其值越高表明鱼体腐败程度越大^[29]。在糟醉过程中,不同用盐量大黄鱼TVB-N值呈现整体降低的趋势(表2),这与陈学云^[28]的研究结果并不一致,这可能是因为鱼肉的pH值逐渐下降以及酒糟发酵所造成的酸性环境和糟醉时所加老酒的杀菌作用抑制了大黄鱼的酶活性和蛋白质分解。糟制0 d的大黄鱼TVB-N值为(32.52±0.52) mg/100 g,超过了国家标准对大黄鱼的卫生要求^[30],这是由于在大黄鱼腌制过程中,鱼体中的蛋白质会分解产生一些含氮的物质。糟醉过程中鱼肉蛋白质受到外界温度或微生物的影响而发生降解,导致大黄鱼TVB-N值在某一时间段增加,但基本上低于糟制0 d的TVB-N值。糟制30 d后的TVB-N值均低于30 mg/100 g,符合国家标准对大黄鱼的卫生要求,其中5%用盐量组的最低,分别为(20.70±3.31) mg/100 g(鱼糟比1:1)、(21.92±0.70) mg/100 g(鱼糟比1:1.5)和(21.35±0) mg/100 g(鱼糟比1:2),且在不同鱼糟比下大黄鱼TVB-N值变化趋势基本一致,说明5%用盐量组大黄鱼在糟醉过程中鲜度变化小,品质较稳定。

表2 不同用盐量下大黄鱼的TVB-N值变化
Tab. 2 Changes of TVB-N value of large yellow croaker with different salt dosage mg/100 g

用盐量/% salt dosage	糟制时间/d time	鱼:糟 fish:vinasse		
		1:1	1:1.5	1:2
2	0	32.52±0.52	32.52±0.52	32.52±0.52
2	5	29.05±0.17	30.96±0.35	26.79±5.92
2	10	24.00±0.00	21.57±1.05	24.52±4.35
2	20	19.31±1.57	22.78±0.52	24.78±0.30
2	30	22.96±0.35	23.72±0.63	23.90±1.20
5	0	32.52±0.52	32.52±0.52	32.52±0.52
5	5	28.52±2.09	31.13±0.87	32.87±0.17
5	10	23.46±1.24	30.26±1.39	27.13±1.04
5	20	21.22±3.13	25.74±0.35	26.96±2.96
5	30	20.70±3.31	21.92±0.70	21.35±0.00
10	0	32.52±0.52	32.52±0.52	32.52±0.52
10	5	32.52±0.52	28.18±0.35	24.31±0.48
10	10	30.26±0.35	28.70±0.18	27.83±1.05
10	20	27.13±4.17	22.61±1.39	25.04±3.13
10	30	23.66±0.70	24.52±0.52	22.96±0.69

2.3 酒糟液发酵过程中微生物群落的变化

综合上述大黄鱼pH和TVB-N值的数据分析, 5%用盐量组醉鱼在糟制过程中品质较稳定, 故以下酒糟液微生物群落结构和变化规律分析均以5%用盐量组的醉鱼酒糟液为对象, 时间段选取发酵前期(0 d)、中期(15 d)和后期(30 d)。文中group1指鱼糟比为1:1时发酵前期(quan1)、中期(quan2)和后期(quan3)的酒糟液, group2指鱼糟比为1:1.5时发酵前期(quan4)、中期(quan5)和后期(quan6)的酒糟液, group3指鱼糟比为1:2时发酵前期(quan7)、中期(quan8)和后期(quan9)的酒糟液。

酒糟液菌群丰度和Alpha多样性分析

按照97%相似性归类后共得到209个OTU (图1), group1、group2和group3分别有173、146和167个OTU。group1和group2之间共有的OTU为126个; group1和group3之间共有的OTU为135个; group2和group3之间共有的OTU为133个; 3组共有的OTU为117个, 占了总OTU数量的55.98%。结果显示, 3组微生物菌群相同OTU达到一半以上, 其中group1和group3共有的OTU数量最高, group1和group2共有的OTU数量最少, 说明受到酒糟用量的影响, 3组菌群种类有较大不同, group1与group3微生物种类相似度最高, 与group2微生物种类相似度最低。

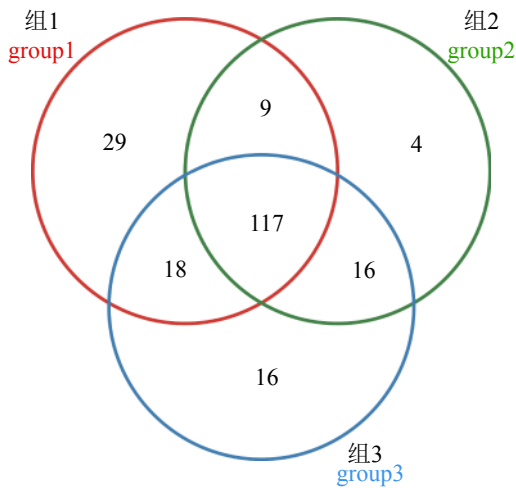


图1 样品OTU分布Venn图

Fig. 1 Venn analysis of OTU distribution of the samples

以随机抽到的序列数与它们所能代表的OTU数目绘制稀释性曲线^[31], 随着测序数量的增加, 酒糟液微生物菌群所有样品稀释性曲线逐渐上升(图2), 说明继续测序还可能产生较多新的OTU。

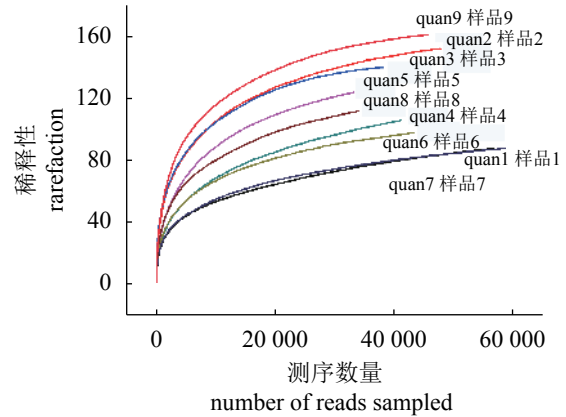


图2 样品稀释性曲线

Fig. 2 Rarefaction curves of the samples

当测序量超过55 000读长时, quan1和quan7仍有新的OTU被发现, 但曲线已趋于平缓, 说明增加测序深度不会产生太多的OTU。同一序列数下, 发酵后期酒糟液可观察到的OTU数量: quan9>quan3>quan6, 且quan9的Chao指数最高(167)(表3), 说明鱼糟比为1:2的酒糟液微生物群落丰度最高。从图3的酒糟液样品Shannon曲线^[32]可以看出, 当测序数大于2 000时, 曲线趋于平坦, 说明测序数据量足够大, 可以较完整地反映样品中绝大多数微生物菌群。随着测序深度的增加, quan3>quan9>quan6, 且quan3的Shannon指数最大(2.75), 而Simpson指数最小(0.109)(表3), 说明鱼糟比为1:1的酒糟液细菌多样性最高。

酒糟液菌群物种组成和结构分析

从9份酒糟液样品门水平聚类树与柱状图组合分析图可知, quan1与quan4、quan2与quan3、quan5与quan6、quan8与quan9之间群落结构相似度高, 说明在发酵中后期3组酒糟液菌群较稳定, 鱼糟比为1:1与1:1.5的酒糟液在发酵前期相似, 与1:2酒糟液在发酵中后期相似(图4)。酒糟液微生物主要是细菌域, 共涉及酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、深谷菌门(Bathyarchaeota)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、异常球菌—栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、广古菌门(Euryarchaeota)、厚壁菌门(Firmicutes)、Ignavibacteria(绿菌门下目)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、Omnitrophica(趋磁细菌新类群)、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体菌门(Spirochaetae)、软壁菌门(Tenericutes)、奇古菌门(Thaumarchaeota)17个菌门和1个未分类

表3 样品Alpha多样性指数

Tab. 3 Alpha diversity index of the samples

样品 sample	有效序列数 sequences	可操作分类单元 OTU	菌群丰度指数 Chao index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	覆盖率/% coverage
quan1	56 581	88	129	1.48	0.413	99.95
quan2	47 630	152	163	2.54	0.138	99.95
quan3	38 131	140	142	2.75	0.109	99.97
quan4	41 081	106	145	1.62	0.351	99.92
quan5	33 078	124	153	1.87	0.322	99.91
quan6	43 235	98	144	1.76	0.327	99.95
quan7	58 565	88	107	1.68	0.304	99.97
quan8	33 879	112	141	2.25	0.180	99.92
quan9	45 532	161	167	2.44	0.156	99.96

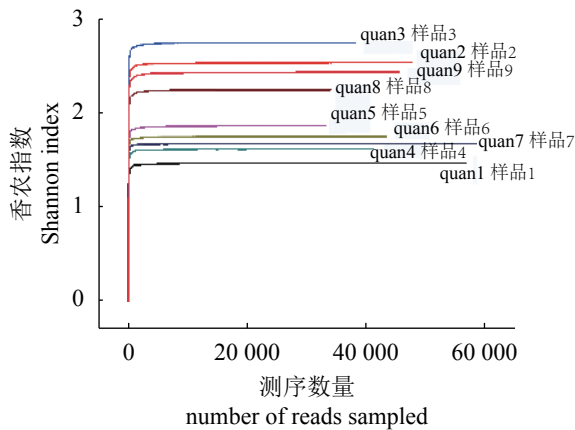


图3 样品Shannon指数曲线

Fig. 3 Shannon curves of the samples

菌门。在整个发酵过程中,变形菌门占绝对优势(64.44%~96.96%),其次是蓝细菌门(1.40%~29.43%) and 厚壁菌门(1.54%~11.18%)。

在属的分类水平上(图5),3组酒糟液样品共涉及143个属,其中group1、group2和group3分别涉及124、105和117个属,弧菌属(*Vibrio*)、*Chloroplast norank*(蓝细菌门下属)和肠杆菌属(*Enterobacter*)是3组酒糟液的优势菌属。在发酵前期,弧菌属占绝对优势(70.06%~83.28%),而在发酵中后期由于*Chloroplast norank*、肠杆菌属和交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)等其他菌属比例的增加,使其在3组中所占比例有不同程度的下降,其中group1下降幅度最大。在发酵中后期group1的弧菌属所占比例在3组样品中最小,而group2最大。弧菌是一类广泛分布于水产品中的食源性致病菌,隶属于弧菌属的副溶血性弧菌

(*V. parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnifices*)等均是食源性疾病的重要病原菌,可引起败血症、人体肠道疾病和伤口感染等病症^[33]。综合5%用盐量组大黄鱼的pH值(表1)和TVB-N值(表2),鱼糟比为1:1的大黄鱼pH值最高,为(4.65±0.04),TVB-N值最低,为(20.70±3.31) mg/100 g,而鱼糟比为1:1.5的大黄鱼TVB-N值最高,为(21.92±0.70) mg/100 g,说明鱼糟比为1:1大黄鱼的品质要优于其他2组,鱼糟比为1:1.5大黄鱼的品质相对较差。

3 讨论

目前醉鱼研究选用的原料大多是带鱼(*Trichiurus japonicus*)^[7, 28]、鲫(*Carassius auratus*)^[5]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[4, 13-14, 25]等,关于以大黄鱼为原料制作醉鱼方面的研究报道却很少^[3],而对于醉鱼酒糟液微生物方面的文献报道更少。本研究以大黄鱼为原料制作醉鱼,采用高通量测序技术对酒糟液微生物群落多样性进行了分析。研究结果为醉鱼酒糟液微生物研究提供相关理论依据,为进一步控制糟醉水产品卫生安全提供参考。

大黄鱼pH和TVB-N值的变化与酒糟液微生物有一定关系。在发酵前期,弧菌属与大黄鱼挥发性物质(醛类等)发生反应^[34-35],生成三甲胺等具有不良气味的物质,之后弧菌属所占比例逐渐下降,使鱼肉腐败在一定程度上受到抑制,这也是大黄鱼pH值先上升后下降和TVB-N值逐渐下降的重要原因。肠杆菌属是产组胺菌和水

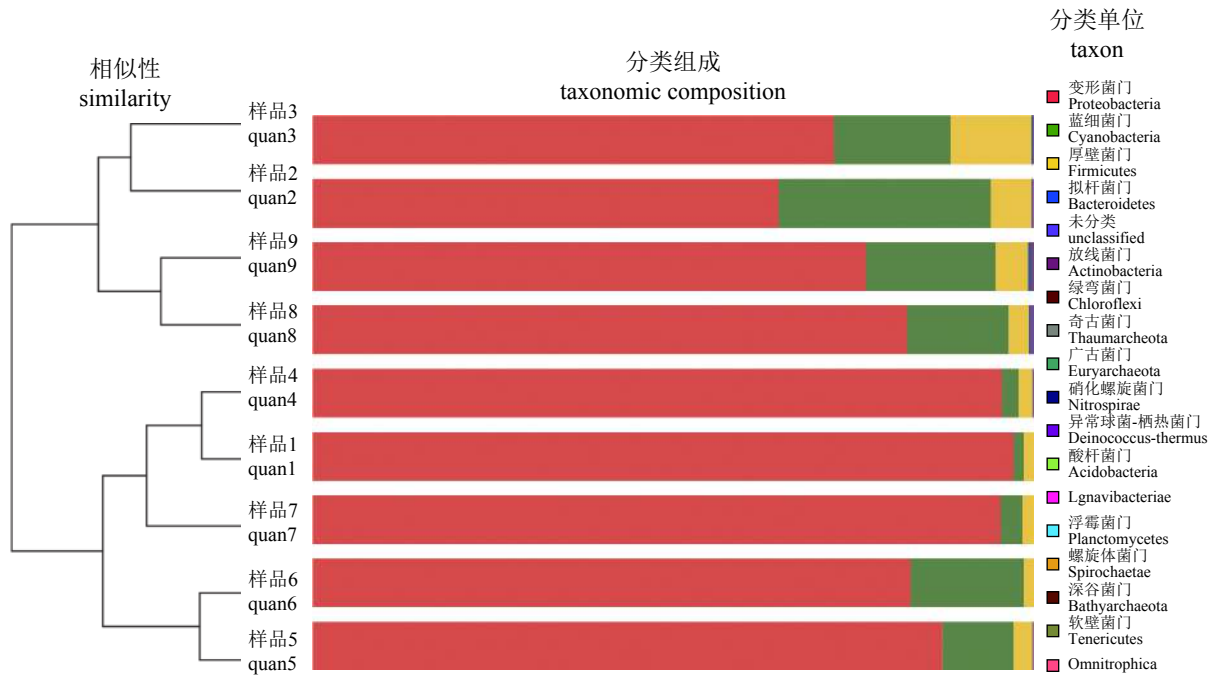


图 4 样品门水平聚类树与柱状图组合分析图

Fig. 4 Microbial community histogram with cluster tree at the phylum level

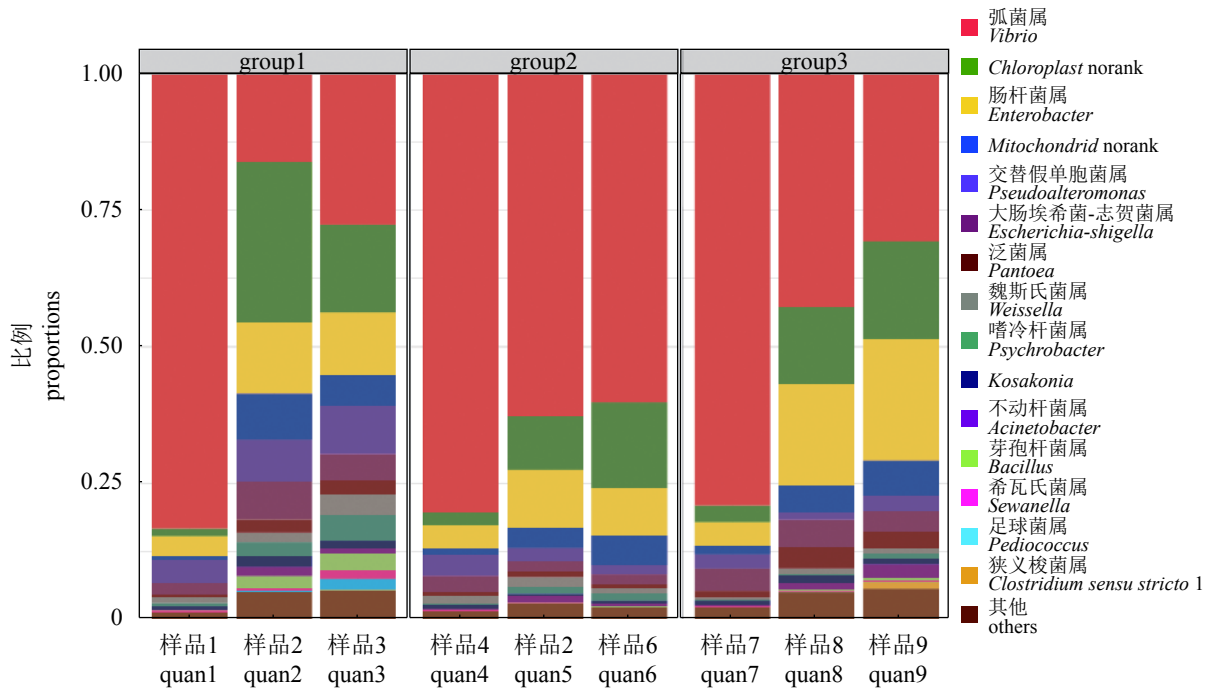


图 5 样品属水平微生物菌群结构及分布

norank指分类学系谱中没有这个层级的科学名称; others是合并了丰度低于1%的菌属

Fig. 5 Microbial communities and distribution of the samples at the genus level

norank means an uncertain scientific name of the taxonomic pedigree; others mean a fungus genus with a abundance of less than 1%

产品特定腐败菌^[36], 发酵中后期其生长和代谢在一定程度上抑制了弧菌属的生长, 同时产生了

乙酸等酸性物质, 使大黄鱼pH值下降。交替假单胞菌属^[37]是一类轻度嗜盐, 只能在海洋环境中

分离得到的海洋细菌,酒糟液中的交替假单胞菌属很可能是大黄鱼携带的。据报道,交替假单胞菌属对弧菌有抑制作用^[38-39],因此弧菌属比例下降与其有一定关系。交替假单胞菌属在鱼糟比为1:1的酒糟液中比例最高,其大黄鱼TVB-N值在整个发酵过程明显低于其他2组,这可能与此菌有一定关系。

本次高通量测序结果显示,变形菌门、蓝细菌门和厚壁菌门是优势菌门,弧菌属、*Chloroplast* norank和肠杆菌属是优势菌属。而袁帅^[40]发现变形菌门和厚壁菌门是贵州茅台和国台两种酒糟的优势菌门,假单胞菌属(*Pseudomonas*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)是优势菌属。研究结果的差异可能与酒糟的种类、酿造环境以及制作工艺等有较大的关系。有研究显示,糟制鱼中的微生物主要来自于酒糟,其对酒糟鱼风味品质的影响比酒糟更重要^[13]。由于目前并未有关于醉鱼酒糟液微生物的相关报道,本次实验采用的是传统糟制工艺制作醉鱼,故不同的鱼类种类、糟制方法和周围环境以及酒糟制备过程等多方面对醉鱼糟制过程中酒糟液微生物多样性的影响尚需考证,关于醉鱼酒糟液微生物菌群多样性的研究还需进一步探索。

此外,本次9份酒糟液样品中均检测出了蓝细菌门,且是优势菌门之一,这在其他酒糟微生物菌群^[40]的研究报道中并没有提到,而在鱼肠道^[41]中有过报道。这可能是由于大黄鱼的生长水域受到了污染^[42],糟醉过程中,蓝细菌由鱼肉带至酒糟中。

参考文献:

- [1] 朱振乐. 大黄鱼人工育苗技术[J]. *上海海洋大学学报*, 2000, 9(2): 163-165.
Zhu Z L. The artificial rearing technique of *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, 9(2): 163-165(in Chinese).
- [2] 翁丽萍. 养殖大黄鱼和野生大黄鱼风味的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012.
Weng L P. Research on flavor of breeding large yellow croaker and wild large yellow croaker[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2012(in Chinese).
- [3] 蔡瑞康, 吴佳佳, 马旭婷, 等. 糟鱼腌制过程中的营养成分分析与评价[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2): 172-177.
Cai R K, Wu J J, Ma X T, *et al.* Analysis and quality evaluation of nutritional components in fermented large yellow croaker fish[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(2): 172-177(in Chinese).
- [4] 律佳雪, 陈运中. 风味醉鱼生产过程中腌制条件的优化研究[J]. *食品科技*, 2007(7): 110-114.
Lv J X, Chen Y Z. Optimization of curing condition in production of flavor vinasse fish[J]. *Food Science and Technology*, 2007(7): 110-114(in Chinese).
- [5] 康怀彬, 吴丹, 肖枫, 等. 基于响应曲面法的糟鲫鱼腌制工艺优化[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(9): 119-121.
Kang H B, Wu D, Xiao F, *et al.* Optimization of curing conditions of vinasse crucian based on response surface methodology[J]. *Food Research and Development*, 2009, 30(9): 119-121(in Chinese).
- [6] 李改燕. 糟鱼发酵过程中微生物菌群和风味变化的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2009.
Li G Y. Study on the microorganism flora and flavor compounds from vinasse fish[D]. Ningbo: Ningbo University, 2009(in Chinese).
- [7] 曹丽丽, 徐大伦, 赵辉, 等. 糟醉带鱼感官品质与理化指标的相关性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(7): 116-121.
Cao L L, Xu D L, Zhao H, *et al.* Study on the correlations between sensory qualities and physicochemical properties of vinasse hairtail[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(7): 116-121(in Chinese).
- [8] 赵品, 林婉玲, 郝淑贤, 等. 酒糟罗非鱼间歇真空糟制工艺研究[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(3): 84-90.
Zhao P, Lin W L, Hao S X, *et al.* Intermittent vacuum wine lees pickling processing of drunk fish (*Oreochromis mossambicus*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 84-90(in Chinese).
- [9] Sannaveerappa T, Ammu K, Joseph J. Protein-related changes during salting of milkfish (*Chanos chanos*)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84(8): 863-869.
- [10] Andrés A, Rodríguez-Barona S, Barat J M, *et al.* Salted cod manufacturing: influence of salting procedure on process yield and product characteristics[J]. *Journal of Food Engineering*, 2005, 69(4): 467-471.
- [11] Chaijan M. Physicochemical changes of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle during salting[J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(3): 1201-1210.

- [12] Jónsdóttir R, Sveinsdóttir K, Magnússon H, *et al.* Flavor and quality characteristics of salted and desalted cod (*Gadus morhua*) produced by different salting methods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(8): 3893-3904.
- [13] 谭汝成, 熊善柏, 张晖. 酒糟鱼糟制方法的研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(7): 119-121, 188.
Tan R C, Xiong S B, Zhang H. Study on the technology of wine lees picking of drunk fish[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(7): 119-121, 188(in Chinese).
- [14] 谭汝成, 曾令彬, 熊善柏, 等. 调和和杀菌条件对酒糟鱼品质的影响[J]. *食品科技*, 2008, 33(5): 85-88.
Tan R C, Zeng L B, Xiong S B, *et al.* Effect of seasoning and sterilization conditions on quality of drunk fish[J]. *Food Science and Technology*, 2008, 33(5): 85-88(in Chinese).
- [15] 郑国锋, 钱和. 黄酒糟的成分分析和开发调味品可行性的研究[J]. *中国调味品*, 2007(4): 20-25.
Zheng G F, Qian H. Ingredients and flavor analysis of yellow wine lees and study of its feasibility of making condiments[J]. *China Condiment*, 2007(4): 20-25(in Chinese).
- [16] 李华, 施佳慧. 黄酒糟的氨基酸组成及脂类成分分析[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(34): 17142-17143.
Li H, Shi J H. Analysis on amino acid composition and lipid of yellow wine lees[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(34): 17142-17143(in Chinese).
- [17] Liu J G, Wang Q H, Wang S, *et al.* Effects of pretreatment on the microbial community and L-lactic acid production in vinasse fermentation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(2): 260-265.
- [18] Campos C R, Mesquita V A, Silva C F, *et al.* Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment[J]. *Waste Management*, 2014, 34(11): 2036-2046.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.228-2016食品安全国家标准食品中挥发性盐基氮的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission of PRC. GB 5009.228-2016 National Standard of the People's Republic of China, Determination of Total Volatile Base Nitrogen in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017(in Chinese).
- [20] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [21] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [22] Schloss P D, Gevers D, Westcott S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies[J]. *PloS One*, 2013, 6(12): e27310.
- [23] Doyle M E, Glass K A. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, 9(1): 44-56.
- [24] Østergaard A, Embarek P K B, Wedell-Neergaard C, *et al.* Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products[J]. *Food Microbiology*, 1998, 15(2): 223-233.
- [25] 唐思, 刘章武. 醉鱼中菌种的分离筛选与鉴定研究[J]. *中国酿造*, 2010(12): 120-123.
Tang S, Liu Z W. Isolation and identification of microbes from vinasse fish[J]. *China Brewing*, 2010(12): 120-123(in Chinese).
- [26] 梅灿辉, 李汴生, 吕梦莎, 等. 梅香黄鱼低盐腌制—发酵过程中的品质变化规律研究[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(11): 1185-1191.
Mei C H, Li B S, Lü M S, *et al.* Quality change of fermented yellow croaker in light salting process[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(11): 1185-1191(in Chinese).
- [27] Bahmani Z A, Rezaei M, Hosseini S V, *et al.* Chilled storage of golden gray mullet (*Liza aurata*)[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44(9): 1894-1900.
- [28] 陈学云. 糟制带鱼加工期间理化性质变化及其优势微生物分离鉴定[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2010.
Chen X Y. Study on physicochemical changes and isolation and identification of dominant microorganisms hairtail during pickled process[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2010(in Chinese).
- [29] 沈月新. 水产食品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
Shen Y X. Fishery Food[M]. Beijing: China Agriculture

- Press, 2001(in Chinese).
- [30] 中华人民共和国农业部. SC/T 3101-2010鲜大黄鱼、冻大黄鱼、鲜小黄鱼、冻小黄鱼[S]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. SC/T 3101-2010 Fresh and frozen large yellow croaker & fresh and frozen small yellow croaker[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2011(in Chinese).
- [31] Amato K R, Yeoman C J, Kent A, *et al.* Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(7): 1344-1353.
- [32] Wang Y, Sheng H F, He Y, *et al.* Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of Illumina tags[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(23): 8264-8271.
- [33] 桑燕娇, 宁喜斌. 水产品中弧菌的PCR技术检测研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(33): 11871-11874.
- Sang Y J, Ning X B. Research progress of PCR technology detection of *Vibrio* in aquatic products[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(33): 11871-11874(in Chinese).
- [34] 杨华, 寿颀峰, 陈祖满. 优势腐败微生物对养殖美国红鱼风味的影响[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(1): 80-90.
- Yang H, Shou J F, Chen Z M. The Effect of predominated spoilage microorganisms on the flavor of cultured *Sciaenops ocellatus*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(1): 80-90(in Chinese).
- [35] Refsgaard H H F, Haahr A M, Jensen B. Isolation and quantification of volatiles in fish by dynamic headspace sampling and mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(3): 1114-1118.
- [36] 翁佩芳, 李微微, 吴祖芳, 等. 水产品鲈鱼(*Pneumatophorus japonicus*)细菌多样性及优势微生物分析[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 788-795.
- Weng P F, Li W W, Wu Z F, *et al.* Analysis of bacteria diversity and predominant microorganism in aquatic products of mackerel[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 788-795(in Chinese).
- [37] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995, 45(4): 755-761.
- [38] Rungprom W, Siwu E R O, Lambert L K, *et al.* Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Digenea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*[J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(14): 3147-3152.
- [39] Sakata T, del Castillo C S, Yoshikawa T, *et al.* Chemical structures of quinolinol compounds produced by marine *Pseudoalteromonas* sp. A1-J11[J]. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 2008, 57: 29-35.
- [40] 袁帅. 用16S rDNA V4区高通量测序分析两种酒糟细菌多样性[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2014.
- Yuan S. Analysis of the bacterial diversity in two different distillers' grains by high throughput sequencing of 16S rDNA V4[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2014(in Chinese).
- [41] 魏娜, 王程程, 王勇忠, 等. 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)不同发育阶段肠道细菌群落组成及多样性分析[C]//2014年中国水产学会学术年会论文摘要集. 长沙: 中国水产学会, 2014.
- Wei N, Wang C C, Wang Y Z, *et al.* Analysis of bacterial community composition and diversity of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) at different developmental stages[C]//Summary of Papers at the Academic Annual Meeting of the Chinese Society of Fisheries in 2014. Changsha: China Society of Fisheries, 2014(in Chinese).
- [42] 祭仲石, 管卫兵, 苏孙国, 等. 鲢、鳙肠道微生物的研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(1): 22-26.
- Ji Z S, Guan W B, Su S G, *et al.* The intestinal microflora in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* and bighead carp *Aristichthys nobilis*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(1): 22-26(in Chinese).

Microbial community in vinasse liquid during processing of vinasse fish

ZHU Xiuhua¹, LIN Huimin^{1*}, DONG Tianjia¹, KONG Jialei², DENG Shanggui¹

(1. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Donghai Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: In order to discuss the microbial community diversity of vinasse liquid during processing of vinasse fish, the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) was chosen as a material to produce vinasse fish with traditional pickling technology, and the bacterial flora of vinasse liquid was measured by Illumina HiSeq2500 high-throughput sequencing technique. The results showed that the pH value slightly increased in the first 5 or 10 days and then gradually decreased with different salt dosage (2%, 5% and 10%). The TVB-N value was all lower than 30 mg/100 g after 30 days of processing and the lowest value was found in 5% salt group. The variation of the pH and TVB-N value in the 5% salt group were basically the same in different ratios of fish to vinasse (1 : 1, 1 : 1.5 and 1 : 2), which indicated that the quality of this vinasse fish was stable during processing. High-throughput sequencing results of 5% salt group showed that the Chao index of the vinasse liquid of 1 : 2 was the largest (167), which indicated the highest community richness. The Shannon index of the vinasse liquid of 1 : 1 was the largest (2.75) and the Simpson index was the lowest (0.109), which indicated the highest bacterial diversity. The main microbial domains of the vinasse liquid involve 17 phyla, 1 unclassified phylum and 143 genera. Proteobacteria, Cyanobacteria and Firmicutes were dominant, of which Proteobacteria was absolutely dominant. *Vibrio*, *Chloroplast* norank and *Enterobacter* were dominant, and *Vibrio* was absolutely dominant in the early fermentation. The results could provide theoretical basis for the study of microbial community diversity of vinasse fish liquid and references for the control of hygienic safety of drunk aquatic products.

Key words: *Larimichthys crocea*; vinasse liquid; microbial community; high-throughput sequencing

Corresponding author: LIN Huimin. E-mail: linhuixiaomin@126.com

Funding projects: National Key Research and Development Plan (2017YFD0400105-05); Team Member Project of Zhejiang Province (2017T1106)