



复合乳酸菌发酵对风干牛肉细菌多样性及代谢物的影响

王俊钢^{1,2}, 李宇辉^{3*}, 刘钰³, 刘玥璋³, 郝奇奇¹, 刘雅宣¹

- 亳州学院生物与食品工程系, 安徽 亳州 236800
- 亳州市天然产物分离纯化工程技术研究中心, 安徽 亳州 236800
- 新疆农垦科学院农产品加工研究所, 新疆 石河子 832000

王俊钢, 李宇辉, 刘钰, 刘玥璋, 郝奇奇, 刘雅宣. 复合乳酸菌发酵对风干牛肉细菌多样性及代谢物的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2861-2881.

WANG Jungang, LI Yuhui, LIU Yu, LIU Yuezhang, HAO Qiqi, LIU Yaxuan. Effects of compound lactic acid bacteria on the bacterial diversity and metabolites in the fermentation of air-dried beef[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2861-2881.

摘要:【目的】探究接种复合乳酸菌对风干牛肉发酵过程中微生物多样性及代谢物的影响。【方法】以团队前期分离得到的不同乳酸菌为发酵剂, 采用 5 种复配方式将乳酸菌接种到牛肉中进行发酵。具体分组与复配比例如下: C 组为格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*) TC-6:戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*) TMR-WJG, 按 1:1 比例混合; D 组为格氏乳球菌:乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) TC-2 按 1:1 比例混合; G 组为戊糖片球菌:乳酸乳球菌按 1:1 比例混合; H 组为乳酸乳球菌:戊糖片球菌:格氏乳球菌按 1:1:1 比例混合; K 组自然发酵, 不接种乳酸菌。采用高通量测序技术和非靶向代谢组学技术对接种了不同复合乳酸菌的风干牛肉的细菌群落结构及其代谢产物进行研究。【结果】在所有接种了乳酸菌的风干牛肉中, 共检测到 19 门 223 属 304 种细菌, 其中以嗜冷杆菌为主要菌群, 平均相对丰度为 52.21%。非靶向代谢组学结果表明, 共发现了 1 782 个具有显著差异的代谢物, 这些代谢物包括生物碱、脂类、有机酸和其他与风味形成相关的化合物。微生物组和代谢组相关性分析表明, 接种不同发酵剂导致风干牛肉中细菌群落结构差异显著, 从而对其代谢产物产生影响, 特别是接种了戊糖片球菌和格氏乳球菌的风干牛肉(C 组)与自然发酵组(K 组)之间差异显著($P < 0.05$), 其中香豆素和鞣料云实素显著下调, 山茶苷 A、十八碳二烯酸酯和

资助项目: 国家自然科学基金(31860437); 安徽省高等学校科学研究项目重点项目(2022AH052410); 亳州学院科研启动资金(BYKQ2021Z09)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860437), the Key Foundation of Anhui Education Bureau (2022AH052410), and the Start Funding of Bozhou University (BYKQ2021Z09).

*Corresponding author. E-mail: liyuhui615@sina.com

Received: 2024-01-18; Accepted: 2024-04-22; Published online: 2024-04-29

脂质体II显著上调。【结论】本研究选用的复配乳酸菌对风干牛肉中菌群结构影响显著，风干牛肉品质形成可能与微生物菌群结构及微生物代谢物相关，选取的复配乳酸菌具有潜在的应用价值。

关键词：风干牛肉；复配乳酸菌；微生物多样性；高通量测序；非靶向代谢组学

Effects of compound lactic acid bacteria on the bacterial diversity and metabolites in the fermentation of air-dried beef

WANG Jungang^{1,2}, LI Yuhui^{3*}, LIU Yu³, LIU Yuezhong³, HAO Qiqi¹, LIU Yaxuan¹

1 Department of Biology and Food Engineering, Bozhou University, Bozhou 236800, Anhui, China

2 Bozhou Engineering Research Center for Separation and Purification of Natural Products, Bozhou 236800, Anhui, China

3 Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, Xinjiang, China

Abstract: [Objective] To explore the effects of compound lactic acid bacteria on the bacterial diversity and metabolites in the fermentation process of air-dried beef. [Methods] The lactic acid bacteria isolated in the early stage were inoculated into beef for fermentation with different strain combinations: C (*Lactococcus garvieae* TC-6:*Pediococcus pentosaceus* TMR-WJG, 1:1), D (*L. garvieae* TC-6:*L. lactis* TC-2, 1:1), G (*P. pentosaceus* TMR-WJG:*L. lactis* TC-2, 1:1), H (*L. garvieae* TC-6:*P. pentosaceus* TMR-WJG:*L. lactis* TC-2, 1:1:1), and K (without inoculation). High-throughput sequencing and non-targeted metabolomics were employed to study the bacterial community structure and metabolites, respectively, in air-dried beef inoculated with different combinations of lactic acid bacteria. [Results] A total of 304 species of bacteria belonging to 223 genera of 19 phyla were detected. *Psychrobacter* was predominant in the air-dried beef, with the average relative abundance of 52.21%. A total of 1 782 significantly differential metabolites were identified, including alkaloids, lipids, organic acids, and other metabolites related to flavor formation. The correlation analysis between microbiome and metabolome confirmed that the structures of bacterial communities differed significantly in the air-dried beef samples with different starters, which contributed to the differences of metabolites between groups, especially between groups C and K ($P < 0.05$). Specifically, the inoculation lowered the levels of coumarin and corilagin and elevated the levels of camellianin A, octadecadienoate, and lippioside II. [Conclusion] The compound lactic acid bacteria selected in this study had a significant effect on the microbial community structure in air-dried beef. The quality formation of air-dried beef may be related to the microbial community structure and microbial metabolites. The compound lactic acid bacteria selected in this study demonstrated a potential application value.

Keywords: air-dried beef; compound lactic acid bacteria; microbial diversity; high-throughput sequencing; non-targeted metabolomics

风干牛肉是我国传统的发酵肉制品之一。因其营养丰富、风味独特、携带方便、耐储存等特点,深受消费者的欢迎。风干牛肉由新鲜牛肉经分割、切条、修剪、腌渍后自然风干而成,传统风干牛肉一般采用自然发酵。然而,在传统风干牛肉工业化生产过程中,产品质量难以控制,造成企业“高成本、低产出”生产现状,因此亟须对风干牛肉的加工工艺进行改进,以提高我国传统发酵肉制品品质。

发酵过程中微生物菌群结构变化与产品质量、风味形成以及食用安全性都密切相关^[1-2]。然而,风干肉中微生物群落结构很容易受到生产环境、原材料种类、加工设备和人员操作等多种因素的影响,从而导致风干肉的品质难以保证^[3]。针对以上问题,许多研究人员通过接种外源发酵剂的方式来保证发酵肉制品质量,提高发酵肉制品的品质^[4-6]。其中,从当地传统发酵肉制品中分离优良微生物,并研究其发酵性能以及接种发酵后对肉制品品质形成机制为当前该领域的主要研究热点^[7]。这是因为发酵肉制品中的微生物在长期的演化过程中,适应了当地的环境,具有稳定且特殊的发酵性能^[8-9]。新疆传统风干肉发酵过程中发挥作用的主要微生物有乳酸菌、葡萄球菌和微球菌^[10]。乳酸菌对发酵肉制品的品质形成十分重要,并且作为发酵剂被广泛应用于发酵肉制品的研究^[11]。乳酸菌是一类革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、无孢子的细菌,根据其形态学可将乳酸菌分为乳杆菌属、链球菌属、单球菌属、片球菌属和双歧杆菌属^[11-12]。乳酸菌对风干牛肉中碳水化合物、蛋白质和脂质分解都有一定的促进作用,从而有利于产品风味的形成^[13]。Hu等^[3]研究发现,清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*) HRB10和希腊魏斯氏菌(*Weissella hellenica*) HRB6可以改善风干肠的风味特性,另外,还发现弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)和植物乳

杆菌(*Lactobacillus plantarum*)可作为潜在发酵剂提高风干低盐香肠的质地、颜色和风味。此外,乳酸菌在发酵过程中会产生乳酸和细菌素,能够有效抑制病原微生物和腐败微生物的生长,有助于提高食品的安全性^[14]。Diana等^[15]研究发现,*L. plantarum* PCS20可防止发酵猪肉中梭状芽孢杆菌的生长。

新疆传统风干牛肉通常采用自然发酵法,但在长期的发酵过程中往往会导致病原微生物的污染^[16-17]。为了适应工业化生产,亟须对生产工艺进行改进。鉴于前人研究成果,本研究通过接种特定的发酵剂来制作风干牛肉,保证食用品质的同时提高其安全性。前期从新疆巴里坤哈萨克自治县和塔城市传统干牛肉中得到了戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*) TMR-WJG、格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*) TC-6和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) TC-2这3株乳酸菌。研究发现,这3株乳酸菌具有不同的产蛋白酶性能,分别将3株菌接种到牛肉中进行发酵实验,发现3株菌单独使用可以降解风干牛肉肌原纤维蛋白,产生小肽分子,对风干牛肉品质有一定的提升作用^[18]。为了进一步提高风干牛肉的品质,研究混合菌种发酵过程中菌群变化对肉制品品质的影响机制,以及发酵过程中菌群结构对相关代谢产物的影响,本研究拟将上述3种乳酸菌以不同的方式进行复配后接种到风干牛肉中,以探讨复配发酵剂对风干牛肉不同发酵阶段微生物菌群结构和代谢物的影响,并对微生物种群结构与差异代谢物之间的相关性进行分析,以期阐明3种不同组合的乳酸菌复配发酵剂对风干牛肉产品品质的影响机制,并为风干牛肉的工业化生产提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜牛里脊肉,购自新疆石河子九鼎农产品

批发市场;食盐、白糖,购自新疆石河子友好超市。戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*, P.p) TMR-WJG、格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*, L.g) TC-6 和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, L.l) TC-2 分别为实验室前期从新疆巴里坤哈萨克自治县传统风干肉和新疆塔城市传统风干肉中分离获得。

MRS 培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;PCA 平板计数培养基、KOD One™ PCR Master Mix,北京百灵克生物科技有限责任公司;正向引物(forward primer) VnF (10 μmol/L)、反向引物(reverse primer) VnR (10 μmol/L),苏州泓迅生物科技股份有限公司;低分子量范围琼脂糖,北京诺驰源生物技术有限公司;Monarch DNA Gel Extraction,北京鸿跃创新科技有限公司;Tris-EDTA (TE)缓冲液(pH 8.0)、琼脂糖、Tris base、乙酸(冰醋酸)、EDTA 二钠,北京博美富鑫科技有限公司;EB (红色荧光核酸染料)、无水乙醇、Hyclone PBS 缓冲液 SH,青岛拓邦生物技术有限公司;去离子水,天根生化科技(北京)有限公司;VAHTSTM DNA Clean Beads,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;ExKubit dsDNA HS Assay Kit,上海吉泰依科赛生物技术有限公司;缓冲液 SC、缓冲液 SA,武汉百浩天生物技术有限公司;试验所用试剂均为分析纯或色谱纯。

瞬时离心机、涡旋振荡器,天根生化科技(北京)有限公司;四维旋转混匀仪,其林贝尔仪器制造有限公司;磁力架,赛默飞世尔科技(中国)

有限公司。

1.2 风干牛肉的加工工艺

1.2.1 乳酸菌活化及发酵剂制备

将 *Pediococcus pentosaceus* TMR-WJG、*Lactococcus garvieae* TC-6 和 *Lactococcus lactis* TC-2 分别接种于 MRS 液体培养基增菌培养基,活化并扩大培养,收集菌体,制备浓度为 10^8 CFU/mL 的发酵剂。按表 1 比例对乳酸菌进行复配。

1.2.2 风干牛肉的制备及取样

将新鲜牛里脊肉用无菌水淋洗修整,切割为长条状,每块约 200 g;腌制期(4 °C 腌制 24 h):添加糖 1%、盐 2.5% (均为质量分数)以及亚硝酸钠 100 mg/kg;发酵期(15 °C、65%的相对湿度发酵 24 h):将牛肉分为 5 组接种复配乳酸菌发酵剂(按牛肉质量的 0.2%接种浓度 1.0×10^8 CFU/mL 的乳酸菌);风干期:温度 10 °C,时间 7 d,空气流速 1.8–2.0 m/s;后熟期:温度 4 °C,后熟 7 d。每个采样点各取 3 份样品(200 g 左右),制成 5 组风干牛肉样,每组设置 5 个取样时点,每个采样点设置 3 个重复,共计 25 份试样,分别记作 C1–C5、D1–D5、G1–G5、H1–H5、K1–K5,分组见表 2。每组样品采集完成后分别放置于无菌采样袋中,–80 °C 保存,备用。

1.3 风干牛肉微生物多样性测定

1.3.1 风干牛肉微生物多样性的样品前处理

在 2 mL 离心管中加入样本 0.5 g,加入 500 μL 缓冲液 SA、100 μL 缓冲液 SC 和 0.25 g 研磨珠,

表 1 乳酸菌菌种复配比例表

Table 1 Mixing ratio of lactic acid bacteria strains

Group	Strain	Ratio
C	<i>Lactococcus garvieae</i> (L.g) TMR-WJG, <i>Pediococcus pentosaceus</i> (P.p) TC-6	1:1
D	<i>Lactococcus garvieae</i> (L.g) TC-6, <i>Lactococcus lactis</i> (L.l) TC-2	1:1
G	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (P.p) TMR-WJG, <i>Lactococcus lactis</i> (L.l) TC-2	1:1
H	<i>Lactococcus lactis</i> (L.l) TC-2, <i>Pediococcus pentosaceus</i> (P.p) TMR-WJG, <i>Lactococcus garvieae</i> (L.g) TC-6	1:1:1
K	No fermentation agent is added, natural curing	

表 2 风干牛肉样品分组

Table 2 Grouping of air-dried beef in different processing stages

Time	L.g+P.p	L.g+L.l	P.p+L.l	L.g+L.l+P.p	Control
Fermentation for 1 day	C1	D1	G1	H1	K1
Air-dried for 1 day	C2	D2	G2	H2	K2
Air-dried for 3 days	C3	D3	G3	H3	K3
Air-dried for 7 days	C4	D4	G4	H4	K4
Storage for 7 days	C5	D5	G5	H5	K5

加入 10 μL RNaseA, 去除肉中可能含有的 RNA, 涡旋振荡混匀后 70 $^{\circ}\text{C}$ 加热裂解 15 min 提高裂解效率。12 000 r/min 离心 1 min, 转移上清液(约 500 μL)至新的 2 mL 离心管。加入 200 μL 缓冲液 SH 混匀, 涡旋, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min。12 000 r/min 离心 3 min, 上清液转移至 2 mL 离心管, 加入 500 μL 缓冲液 GFA, 颠倒混匀。加入 10 μL 磁珠悬浮液, 振荡混匀 5 min。将离心管放置于磁力架上静置 30 s, 磁珠完全吸附后, 吸去液体。加入 700 μL 去蛋白液 RD, 振荡混匀 5 min。静置 30 min, 磁珠完全吸附后, 吸去液体。加入 700 μL 漂洗液 PWD, 振荡混匀 3 min。重复上一步骤, 之后室温晾 5–10 min。

离心管中加入 50 μL 洗脱缓冲液 TB, 振荡混匀, 于 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 期间振荡混匀 3 回, 每回 3 次。静置 2 min, 将 DNA 溶液转移至一个新离心管中, 并于适当条件保存。

1.3.2 微生物多样性的检测及测序

检测方法: 使用酶标仪对核酸浓度进行检测。根据 Wang 等^[19]方法对 16S rRNA 基因 V3–V4 可变区进行 PCR 扩增, 引物序列为 27F (5'-AGRGTTTGATYNTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TASGGHTACCTTGTTASGACTT-3')。扩增后产物使用浓度 1.8% 的琼脂糖进行电泳检测。

测序方法: 使用 PacBio Binding Kit 对上机文库进行上机前的结合, 使文库结合上 Primer 及 Polymerase; 将最终的反应产物进行 AMPure PB Beads 纯化后置于 Sequel II 测序仪上进行上

机测序。

1.4 风干牛肉中微生物非靶向代谢检测

1.4.1 非靶向代谢样品前处理

称取 500 mg 风干牛肉, 加入 1 000 μL 提取液(甲醇:乙腈:水=2:2:1, 内标浓度 2 mg/L), 旋涡搅拌 30 s; 加入陶瓷珠, 45 Hz 研磨仪处理 10 min 后, 冰水浴超声处理 10 min; 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 取出 500 μL 上清液于 EP 管中; 在真空浓缩器中干燥提取物; 向干燥后的代谢物加入 160 μL 提取液(乙腈与水的体积比为 1:1)复溶; 旋涡 30 s, 冰水浴超声 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 取出 120 μL 上清液至 2 mL 进样瓶, 每个样本各取 10 μL 混合成 QC 样本上机检测。

1.4.2 非靶向代谢检测条件

LC-MS 系统: Acquity I-Class PLUS 超高效液相色谱仪, 色谱柱选用 Acquity UPLC HSST3 (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm)。

正离子模式: 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈, 进样体积 1 μL 。

负离子模式: 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈, 进样体积 1 μL 。

质谱条件: 毛细管电压 2 000 V (正离子模式); 锥孔电压 30 V; 离子源温 150 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$; 反吹气流速 50 L/h; 脱溶剂气流速 800 L/h。

1.5 数据分析

微生物多样性使用 Trimmomatic 软件质控并过滤原始序列, 采用 FLASH 软件和 UCHIME

软件拼接和剔除嵌合体。使用 UPARSE 软件对序列进行分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类。非靶向代谢使用 MassLynxV4.2 采集的原始数据通过 Progenesis QI 软件做峰提取、峰对齐等数据处理操作, 基于 Progenesis QI 软件在线 METLIN 数据库及北京百迈客生物科技有限公司自建库进行鉴定, 质量数偏差均在 100 mg/L 以内。通过北京百迈客生物科技有限公司云平台进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同风干牛肉样品中细菌菌群构成

高通量测序结果显示, 25 个样品测序共获得 305 617 对有效的基因序列条带, 平均每个样

品产生 8 034 条。平均有效基因序列为 89.86% (表 3)。OTU 是在系统发生学研究或群体遗传学研究中, 为了便于进行分析, 人为给某一个分类单元(品系、种、属、分组等)设置的同一标志。根据不同的相似度水平, 对所有序列进行 OTU 划分, 每个 OTU 对应于一种代表序列。根据 97% 相似性水平下的 OTU 信息, 共获得 418 个 OTUs。另外, 原始特征序列中可能包含丰度小于 0.005% 的物种, 将低丰度特征序列过滤后, 得到最终的特征基因序列条带, 之后对这些基因序列条带进行分类, 25 个样品中基因序列条带属于 19 门 35 纲 69 目 119 科 223 属 304 种。其中, K 组 5 个取样点的物种丰富度最低, 平均为 59 种, C 组的物种丰度最高, 平均为 186 种(表 4)。

表 3 测序数据质量评估

Table 3 Sequencing data quality assessment

Sample	Raw CCS	Clean CCS	Effective CCS	Average length (bp)	Effective (%)
C1	10 627	9 877	9 617	1 454	90.50
C2	10 623	9 955	9 698	1 460	91.29
C3	12 996	12 016	11 603	1 464	89.28
C4	9 981	9 288	9 110	1 461	91.27
C5	12 102	10 637	10 142	1 461	83.80
D1	11 350	10 048	9 827	1 463	86.58
D2	9 437	8 737	8 526	1 463	90.35
D3	13 000	12 313	11 285	1 460	86.81
D4	13 031	12 376	12 249	1 464	94.00
D5	12 992	12 305	12 072	1 459	92.92
G1	13 042	12 264	11 783	1 466	90.35
G2	12 887	11 972	11 628	1 462	90.23
G3	12 958	12 109	11 731	1 466	90.53
G4	12 937	11 804	11 173	1 462	86.36
G5	12 587	11 450	11 164	1 467	88.69
H1	12 989	12 247	12 047	1 464	92.75
H2	13 088	12 178	11 801	1 464	90.17
H3	12 955	11 983	11 477	1 467	88.59
H4	12 971	12 357	12 196	1 464	94.03
H5	13 035	12 040	11 610	1 468	89.07
K1	12 888	12 124	11 850	1 466	91.95
K2	13 089	12 090	11 811	1 464	90.24
K3	8 034	7 382	7 257	1 450	90.33
K4	13 095	11 907	11 466	1 463	87.56
K5	12 923	11 797	11 486	1 468	88.88
Average	12 224	11 330	10 984	1 462	89.86

CCS: Circular consensus sequencing.

表 4 风干牛肉样品中细菌的种类注释

Table 4 Species annotation of bacteria in air-dried beef samples

Sample	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
C1	1	17	29	58	95	175	238
C2	1	14	25	54	82	123	159
C3	1	14	20	36	60	113	160
C4	1	14	19	37	62	116	167
C5	1	17	28	60	95	152	204
Average	1	15	24	49	78	135	186
D1	1	5	7	13	18	22	25
D2	1	11	15	33	45	60	77
D3	1	12	20	31	47	78	99
D4	1	13	19	43	66	96	129
D5	1	14	25	53	83	128	166
Average	1	11	17	34	51	76	99
G1	1	7	8	16	26	43	60
G2	1	4	4	9	17	27	37
G3	1	4	4	9	20	34	49
G4	1	10	17	36	46	64	76
G5	1	10	17	39	55	73	91
Average	1	7	10	21	32	48	62
H1	1	10	14	29	43	63	80
H2	1	7	8	13	23	35	48
H3	1	5	8	16	25	40	59
H4	1	11	14	34	50	80	98
H5	1	4	5	12	18	23	28
Average	1	7	9	20	31	48	62
K1	1	5	6	12	21	33	41
K2	1	8	9	22	30	38	43
K3	1	12	16	34	46	64	76
K4	1	5	5	9	16	23	28
K5	1	12	19	43	64	92	106
Average	1	8	11	24	35	50	59
Category	1	19	35	69	119	223	304

发酵结束后,不同组别样品中细菌群落在门和属水平上的相对丰度如图 1 所示。由图 1A 可知,接种乳酸菌发酵后的风干牛肉样品中主要菌门为变形菌门(*Proteobacteria*),其平均相对丰度为 72.26%,其次为厚壁菌门(*Firmicutes*),平均相对丰度为 22.30%;拟杆菌门(*Bacteroidota*),平均相对丰度为 3.87%。变形菌门是细菌中占比最大、最多样化的细菌门类,为革兰氏阴性菌,其外

膜结构主要由脂多糖组成。厚壁菌门可以产生能分解碳水化合物活性酶,促进碳水化合物的水解,有助于风干牛肉风味的形成^[20]。由图 1B 可以看出,在属水平上,鉴定出相对丰度大于 1.00%的优势菌属有 10 个,分别是嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*, 52.21%)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*, 6.65%)、巨大球菌属(*Macrococcus*, 4.67%)、索丝菌属(*Brochothrix*, 4.49%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*,

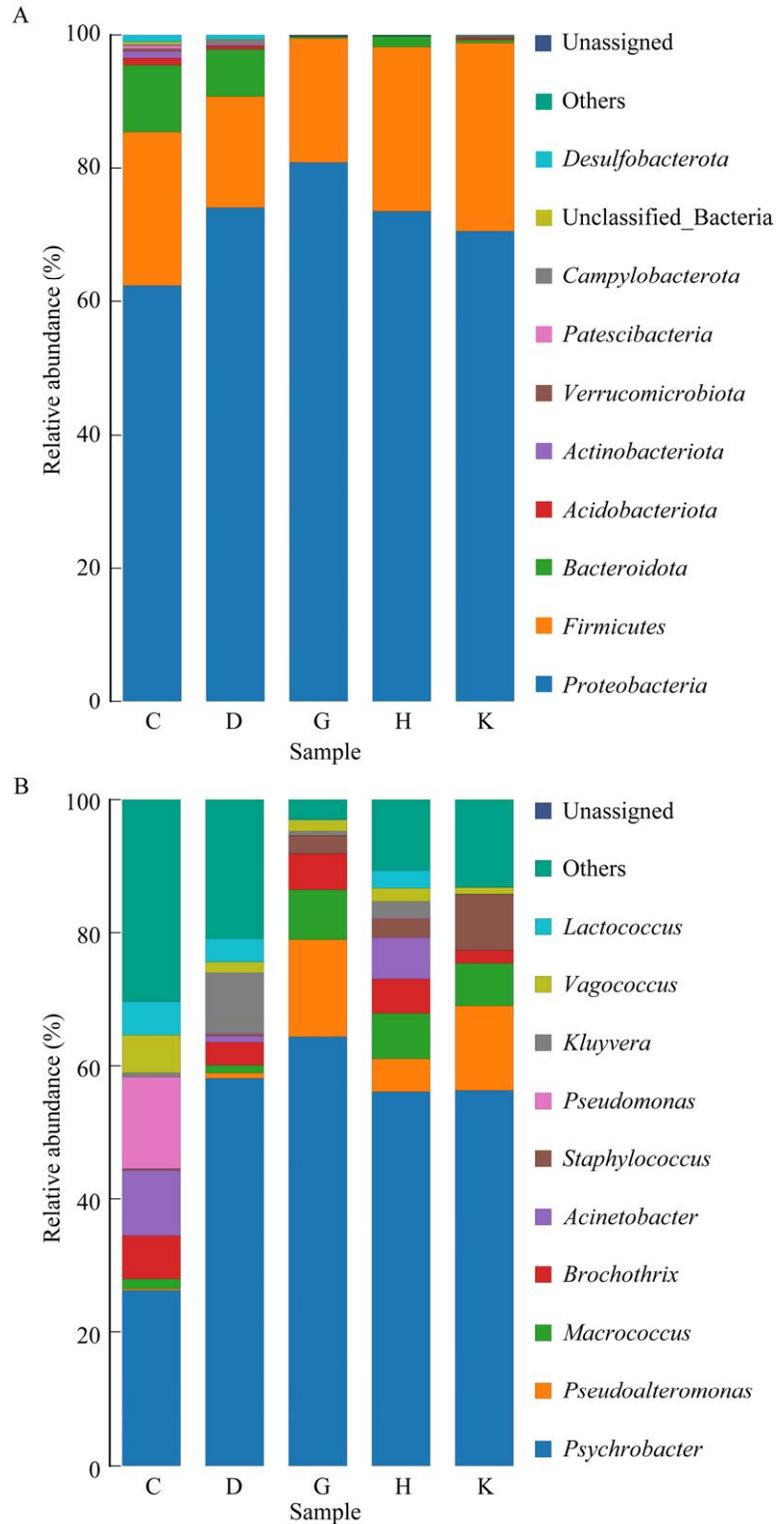


图 1 风干牛肉样品中细菌相对丰度

Figure 1 The relative abundance of bacteria in air-dried beef samples. A: The relative abundances of phyla of air-dried beef samples. B: The relative abundances of genera of air-dried beef samples.

3.42%)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*, 2.86%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 2.83%)、克吕沃尔氏菌属(*Kluyvera*, 2.60%)、漫游球菌属(*Vagococcus*, 2.38%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 2.26%)。其中微生物多样性最丰富的 C 组中占比前三的微生物菌属分别为嗜冷杆菌属、假单胞菌属和不动菌属。这 3 种微生物均属于嗜冷菌, 最佳生长温度为-15-20 °C, 本研究中, 牛肉的发酵温度为 15 °C, 比较适宜此类微生物的生长, 因此占比相对较大。其中嗜冷杆菌属中的部分菌株具有很好的产蛋白酶和脂肪酶的特性, 在低温条件下活性极高, 这些酶可能会对风干牛肉中的蛋白质和脂肪的降解产生影响, 假单胞菌属中也有部分菌株具有产蛋白酶能力, 这些酶的存在都可能影响风干肉的发酵过程。有研究认为, 发酵肉制品品质形成最重要的微生物有乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)和凝固酶阴性的葡萄球菌(coagulase-negative *Staphylococcus*, CNS)^[21-22], 乳酸菌产生的酸性物质可以导致肉制品酸化, 另外部分乳酸菌还有产脂肪酶和蛋白酶性质, 对肉制品品质形成有益。葡萄球菌则具备很强的产酶性能, 可以降解蛋白质和脂肪, 产生多肽、游离氨基酸及游离脂肪酸等小分子物质, 对发酵肉制品的质构和风味形成起主要作用^[23]。大部分的发酵肉制品的制作温度通常为 25-37 °C, 与本研究中的工艺上存在一定差异。

2.2 风干牛肉样品中微生物多样性分析

2.2.1 风干牛肉中微生物 α 多样性分析

为了评价不同发酵剂组合接种后对风干牛肉中微生物多样性的影响, 本研究对微生物进行 α 多样性分析(表 5)。其中, 覆盖率可以反映测序结果是否代表样本中微生物的真实情况。从表 5 可以看出, 所有覆盖值均大于 0.99, 说明测序结果可靠。从表 5 可以看出, C 组样品的 Chao1 指数显著高于其他组($P<0.05$), Shannon 指数和 Simpson 指数也显著高于其他组($P<0.05$), 这表明 C 组具有较高的细菌种类丰度, 但另外 3 组接种了发酵剂的风干牛肉 α 多样性指数与自然发酵的风干牛肉(K 组)无显著差异($P>0.05$)。

2.2.2 风干牛肉中微生物 β 多样性分析

采用基于 Binary-Jaccard 距离的主坐标分析法(principal coordinates analysis, PCoA) (图 2A) 和 PERMANOVA 分析法(以距离矩阵为对象的多元方差分析) (图 2B)进一步对 5 组风干牛肉样品中细菌群落结构进行差异性分析。PCoA 坐标图上距离越近的样品, 相似性越大。从图 2A 可以看出, 不同风干牛肉样品中的细菌种群存在一定的重叠, 但基于 Binary-Jaccard 距离的 PCoA 显示出明显的聚类趋势。C 组样品中微生物主要分布在 PCoA 图的左上方, 而其他组中的微生物主要分布在中下部。PERMANOVA 分析可以对不同分组样品之间的 β 多样性是否显著差异进

表 5 风干牛肉样品中细菌群落的 α 多样性分析

Table 5 Alpha diversity analysis of bacterial community in air-dried beef samples

Sample	OTUs	ACE index	Chao1 index	Simpson index	Shannon index	Coverage
C	221±53a	277.74±84.87a	267.52±65.20a	0.86±0.16a	4.59±1.27a	0.99
D	126±71b	176.55±64.14a	167.83±60.67b	0.62±0.26ab	2.89±1.73b	1.00
G	68±28b	194.36±152.34a	111.20±65.82b	0.65±0.05ab	2.14±0.40b	1.00
H	65±31b	164.08±95.20a	114.93±42.86b	0.66±0.13ab	2.53±0.60b	1.00
K	70±45b	140.86±100.21a	104.24±67.76b	0.54±0.21b	1.90±0.59b	1.00

Results are presented as mean±SD and the data are the mean of five replicates. Different letters in the same column are significantly different ($P<0.05$).

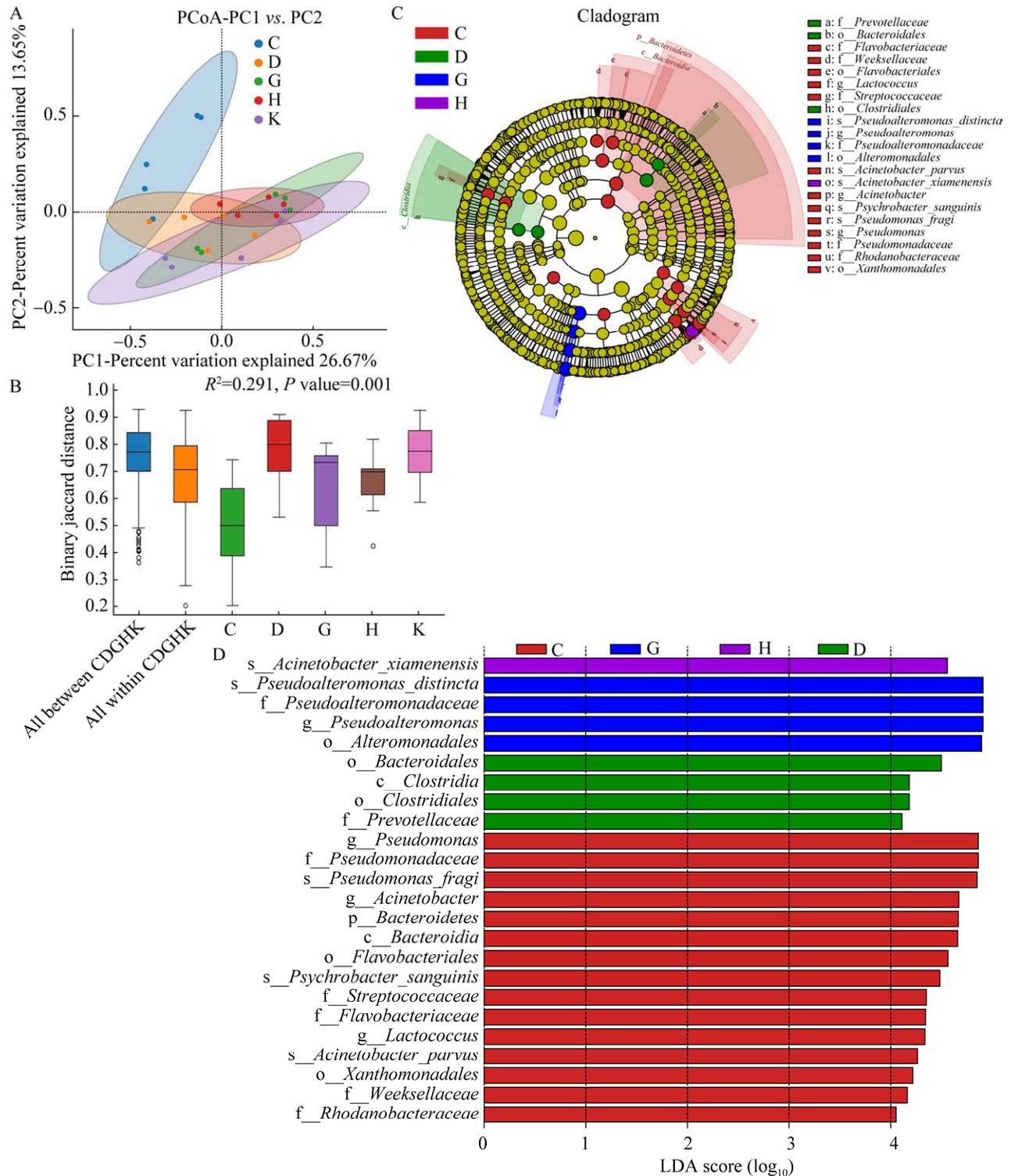


图2 风干牛肉中微生物 β 多样性分析

Figure 2 Analysis of microbial beta diversity in air-dried beef. A: PCoA score plots based on Binary-Jaccard distance. B: Boxplot of PERMANOVA based on Binary-Jaccard distance. The “o” indicates the discrete point. C: The evolutionary branching diagram of LefSe analysis. D: The evolutionary branching diagram of histograms of LDA analysis.

行检验, R^2 越大表示分组对差异的解释度越高, 即不同组别之间差异越大, P 值小于 0.05 说明检验的可信度高。由图 2B 可知, 不同复合乳酸菌发酵剂的使用导致了风干牛肉样品中微生物群落结构的差异。

综上所述, 在微生物菌群多样性方面, 接种了不同复合乳酸菌发酵剂的风干牛肉样品中微生物菌群结构存在一定差异。尤其是接种 1:1 的格氏乳球菌(L.g)和戊糖片球菌(P.p)风干牛肉样品(C组)的微生物多样性与其他组存在显著差异($P < 0.05$), 这与图 1A 和 1B 中的结果一致。Lv 等^[6]将酿酒酵母 LXPSC1 作为发酵剂来制作酸肉, 发现酿酒酵母 LXPSC1 的使用导致了酸肉中微生物多样性的变化。这与本研究的发现相似, 即在肉中接种不同的发酵剂对肉制品进行发酵, 可以导致发酵肉中微生物群落结构发生改变。

线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)效应大小(LDA effect size, LefSe)可以确定不同组间具有典型差异的微生物群落构成^[24-25]。图 2C 为 LefSe 分析进化分支图, 分支图中由内至外辐射的圆圈代表微生物由门至种的分类级别, 小圆圈的直径与物种相对丰度成正比。5 组风干牛肉样品具有显著差异的微生物群落共有 21 个类群。图 2D 为 LDA 得分大于 4 的微生物物种在不同组别中的分布柱状图。C、D、G 和 H 组中 LDA 得分超过 4 的典型微生物菌属有 26 种, 其中, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、拟杆菌属(*Bacteroidales*)和希米氏不动杆菌(*Acinetobacter xiamenensis*)是 C、D 和 H 组的典型细菌属; 识别假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas distincta*)、交替假单胞菌(*Pseudoalteromonadaceae*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)和交替单胞菌(*Alteromonadales*)是 G 组的典型微生物群落。风干肉中不同菌群结构可能会导致其代谢产物不同, 如部分交替假单胞杆菌属可以产生蛋白酶,

可能对风干牛肉中蛋白质降解起到积极作用。拟杆菌属微生物则能很好地利用肉中的糖原, 其代谢物可能会对其他微生物的生长繁殖产生影响。不动杆菌则属于条件致病菌, 其产生的代谢物更多的是对风干牛肉产品的质量安全带来负面影响。图 2 结果表明接种不同发酵剂导致了不同组别风干牛肉中微生物菌群结构的差异, 而这些微生物的差异则可能会影响风干牛肉发酵过程中代谢产物, 从而导致风干牛肉品质的差异。

2.3 接种不同发酵剂风干牛肉中化合物的代谢组学分析

发酵结束后, 在 5 组风干牛肉中共鉴定出 4 225 种代谢物, 其中包括脂类及类脂分子(1 517 种)、有机酸及衍生物(623 种)、有机杂环化合物(529 种)、有机含氧化合物(360 种)、苯丙素及聚酮类化合物(327 种)、苯环类化合物(196 种)、核苷、核苷酸及类似物(87 种)、生物碱及衍生物(38 种)、有机含氮化合物(37 种)、烃类化合物(15 种)、木脂素、新木脂素及相关化合物(12 种)、有机硫化合物(8 种)、均相非金属化合物(3 种)、有机聚合物(3 种)、烃类衍生物(1 种)、混合金属/非金属化合物(1 种)、有机卤素化合物(1 种)及其他类化合物(467 种)。图 3A 为接种不同复合乳酸菌发酵剂风干牛肉中代谢物热图。从图 3A 中可以看出, 根据每组样品中代谢物的丰度可以将这 5 组样品分成 2 大类, 即 C、D 和 G 组为第一类, 其中 D 组和 G 组代谢物丰度相似度更高; H 和 K 组为第二类。根据每组样品中代谢物的含量, 可以将样品分为 3 类。其中, 第 I 类中包含 6 类 2 233 种代谢物, 主要包括苯甲酸及其衍生物、苯丙烷类、脂肪酸及其衍生物、脂肪酰基糖苷类、脂肪酸酯类、甾体糖苷类、多肽类等。第 II 类中包含 5 类 640 种代谢物, 主要包括烷烃、环烷烃、嘧啶核苷酸糖、嘌呤和嘌呤衍生物。第 III 类中包含 7 类 1 352 种代谢物,

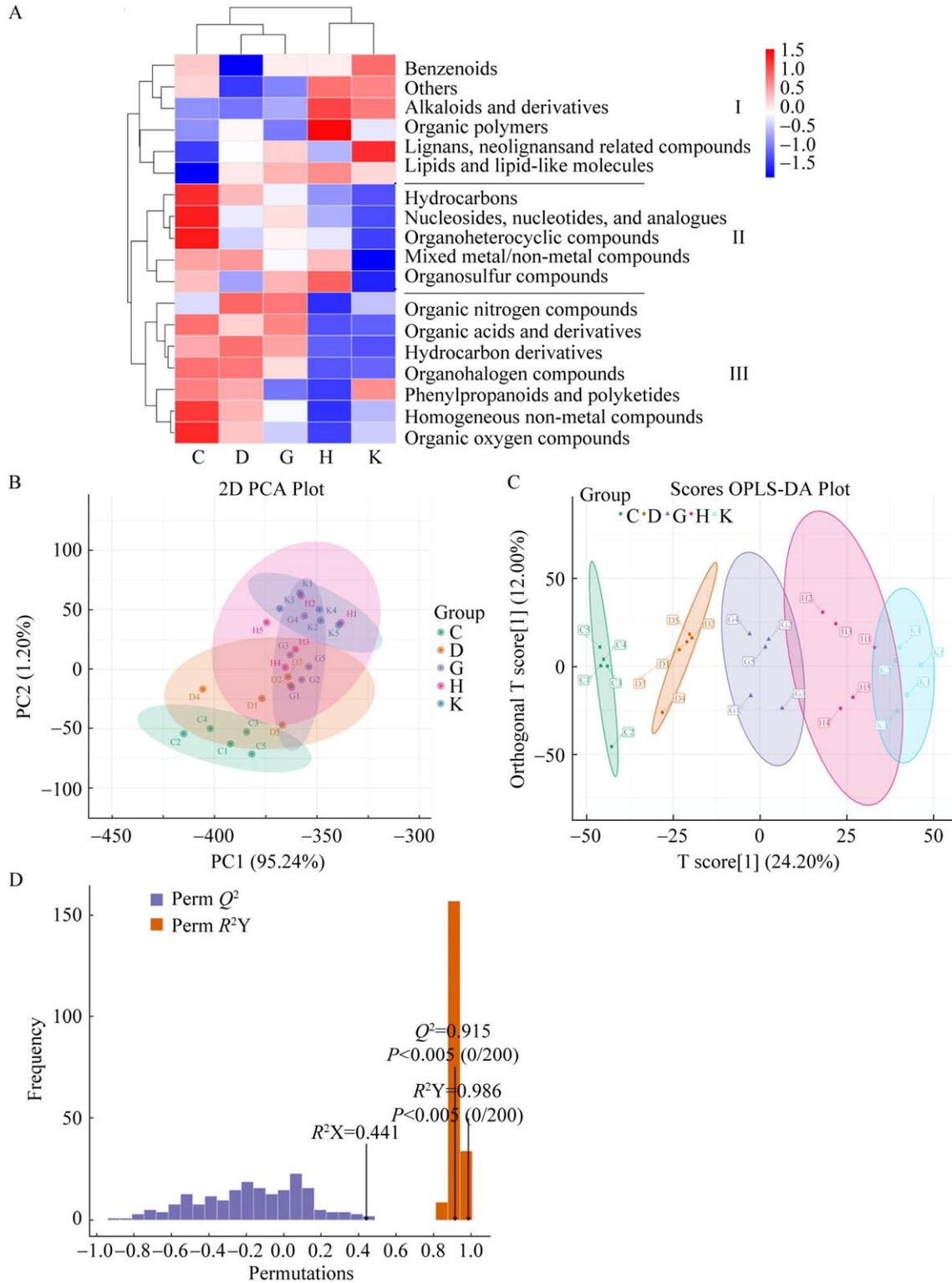


图 3 接种不同发酵剂风干牛肉中化合物的代谢组学分析

Figure 3 Metabolomics analysis of compounds in air-dried beef inoculated with different starter cultures. A: Heat map visualization and clustering results of the metabolites in air-dried beef samples. B: PCA of the metabolite profiles. C: OPLS-DA score plots of metabolites. D: Permutation test of OPLS-DA model.

主要有氨基酸类、肽类及其类似物、胺类、羰基化合物等。以上结果表明, 在添加了不同发酵剂后风干牛肉样品中的代谢物组成存在差异。

主成分分析(principal components analysis, PCA)不仅可以了解各组样品之间的总体代谢差异还能对组内样本之间的变异度大小进行分析^[26]。通过正交变换将一组可能存在相关性的变量转换为的一组线性不相关的变量, 转换后的这组变量我们称之为主成分。为了明确添加不同发酵剂对风干牛肉代谢物的影响, 依据 LC-MS 分析得到的样品中代谢物的具体信息, 对其进行主成分分析, 结果如图 3B 所示。从图 3B 可以看出, 第一主成分(95.24%)和第二主成分(1.20%)对样品差异的贡献占比为 96.44%, 表明这 2 个主成分能反映绝大部分信息。PCA 结果可以阐明风干牛肉样品代谢物谱之间的主要差异, 揭示发酵剂培养对风干牛肉代谢物的影响。从图 3B 可以看出, 不管单个样品之间是否发生重叠, 都可以通过微生物代谢物之间的差异将不同样品进行区分。尤其是接种了复合乳酸菌发酵剂的 C 组和 D 组, 其代谢物与对照组(K 组)之间存在明

显分离。另外, C 组样品和 G 组、H 组样品的微生物代谢物之间也存在明显分离(图 3B)。

主成分分析法虽然能够有效地提取细菌代谢物的主要信息, 但是对于相关性较小的变量不敏感, 而偏最小二乘判别分析(orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis, OPLS-DA)则可以弥补 PCA 法的不足^[27]。C、D、G、H 和 K 组的 OPLS-DA 得分图如图 3C 所示, 这与图 3B 的结果一致, 说明接种复合乳酸菌发酵剂的风干牛肉样品与自然发酵的风干牛肉样品的微生物代谢物之间存在明显差异。进一步通过 R^2Y 和 Q^2 对 OPLS-DA 模型进行验证, R^2Y 和 Q^2 的值分别为 0.986 和 0.915 (图 3D), 说明该模型的可靠性高, 可以用来筛选差异代谢物。通过 OPLS-DA 模型得到的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)既反映了每个代谢物在模型中的加载权重, 也反映了该代谢物解释响应的可变性, 可用于初步筛选不同组间的关键代谢物^[28]。同时结合差异倍数(fold change, FC)和 VIP 得分进一步筛选出不同样品中的差异代谢物(表 6)。表 6 为 5 组样品中

表 6 不同风干牛肉样品中 6 类重要代谢物的差异性比较

Table 6 Comparison of six types of important metabolites in different types of air-dried beef samples

Types		C vs. K	D vs. K	G vs. K	H vs. K	Most discriminant compounds (OPLS-DA)
Alkaloids and derivatives (n=18)	log ₁₀ FC (average)	3.349	-0.336	0.833	-0.272	Cuscohygrine (VIP=1.759)
	log ₁₀ FC (cumulative)	127.247	-140.917	31.653	-10.339	
Lipids and lipid-like molecules (n=1 517)	log ₁₀ FC (average)	1.845	0.860	-0.675	-0.714	Annoglaxin (VIP=1.918)
	log ₁₀ FC (cumulative)	2 798.609	1 304.775	-1 023.880	-1 083.407	
Nucleosides, nucleotides, and analogues (n=87)	log ₁₀ FC (average)	-0.468	-1.669	-2.384	-1.199	Uridine diphosphate galactose (VIP=1.835)
	log ₁₀ FC (cumulative)	-40.713	-145.187	-207.450	-104.288	
Organic acids and derivatives (n=623)	log ₁₀ FC (average)	3.778	1.300	-0.095	-0.427	Glutaminyl-lysine (VIP=1.858)
	log ₁₀ FC (cumulative)	2 353.481	809.941	-59.493	-266.264	
Alcohols and polyols (n=32)	log ₁₀ FC (average)	3.343	0.155	-1.904	-1.791	Shikimic acid (VIP=1.798)
	log ₁₀ FC (cumulative)	106.968	4.962	-60.939	-57.299	
Carbohydrates and carbohydrate conjugates (n=239)	log ₁₀ FC (average)	2.100	0.291	-0.614	-0.531	CMP-2-aminoethylphosphonate (VIP=1.768)
	log ₁₀ FC (cumulative)	501.995	69.459	-146.669	-127.009	

The average and cumulative log₁₀ (fold-change, FC) values for each comparison vs. the experimental control (i.e., air-dried beef not inoculated) are reported, together with the most discriminant compound (i.e., possessing the highest VIP score) for each class annotated.

与风干牛肉风味形成密切相关的 6 种类型的代谢物(生物碱及其衍生物, 脂类和类脂分子, 核苷、核苷酸及其类似物, 有机酸及其衍生物, 醇类和多元醇, 碳水化合物及其结合物)之间的差异性分析结果。从表 6 可以看出, 这 6 种与风干牛肉风味相关的代谢物中对对应代谢物对组间差异影响强度较大的分别为生物碱及其衍生物中的吡咯烷生物碱(VIP=1.759)、脂类和类脂分子中的脂肪醇苦杏仁苷(VIP=1.918)、核苷、核苷酸及其类似物中的嘧啶核苷酸糖尿苷二磷酸半乳糖(VIP=1.835)、有机酸及其衍生物中的二肽谷氨酰胺赖氨酸(VIP=1.858)、醇类和多元醇中的莽草酸(VIP=1.798)和碳水化合物及其结合物中的 CMP-2-氨基乙基磷酸(VIP=1.768), 这 6 种化合物分别在不同类型的代谢物中具有最高的鉴别潜力。

2.4 接种不同发酵剂风干牛肉中关键代谢物的鉴定

不同样品中显著差异化合物可以使用 VIP 得分结合 P 值进行筛选, 并使用火山图(volcano plot)进行可视化。接种不同发酵剂的 5 组风干牛肉代谢物谱两两比较得到的火山图如图 4 所示。当 $P < 0.05$ 且 $VIP > 1$ 时, 则认为这些化合物为显著差异代谢物; 当 $FC > 1$ 为上调的差异代谢物, 用红色圆点表示; $FC < 1$ 为下调的差异代谢物, 用蓝色圆点表示; 灰色圆点表示无明显差异的代谢物。如图 4A 所示, C 组和 K 组之间共有 1 435 种代谢物存在显著差异, 其中 728 种代谢物上调, 707 种代谢物下调, 这些差异代谢物中包括 493 种脂类及类脂分子, 211 种有机酸和衍生物, 73 种碳水化合物及其结合物, 31 种核苷、核苷酸及其类似物, 14 种生物碱及其衍生物, 12 种醇和多元醇。其中, 5 个代谢物差异最为显著, 香豆素和鞣料云实素显著下调, 山茶苷 A、十八碳二烯酸酯和脂质体 II 显著上调。这表明 C 组和 K 组

样品之间的代谢物之间存在显著差异, 这与之前的 PCA 结果和 OPLS-DA 结果一致。D 组和 K 组样品中有 1 177 个代谢物差异显著, 其中 542 个代谢物表达上调, 下调 635 个, 其中, 差异最显著的 5 种代谢物分别为三十烷酰甘氨酸和苏合香烷(显著下调), 炔诺酮、十八碳二烯酸和 15(s)-羟基二十碳四烯酸(显著上调)(图 4B)。G 组和 K 组样品中有 703 种代谢物差异显著, 其中 293 种上调, 410 种下调, 其中差异最显著的 5 种代谢物是棉素 8-硫酸 3-葡萄糖醛酸、磷脂酰乙醇胺(20:2/22:6)和磷脂酰胆碱(16:0/22:5)(显著下调), 天冬酰胺亮氨酸和 1,5-羟基柠檬酸二丁酯(显著上调)(图 4C)。H 组和 K 组样品中有 124 种代谢物差异显著, 其中 110 种上调, 14 种下调(图 4D)。其中, 4'-羟基苯乙酮、丝氨基脯氨酸和菠叶素显著上调, 己糖基神经酰胺(d18:1/20:0)和 PE (15:0/22:1)显著下调。

发酵肉制品中的挥发性风味化合物一般是由肉制品中的风味前体物质经过一系列的水解、氧化和降解反应形成。在肉制品中, 风味形成的机制非常复杂, 主要包括脂质水解和氧化、蛋白质降解以及美拉德反应等^[29]。此外, 微生物的发酵作用也会对肉制品的风味产生重要影响^[1]。肉制品中微生物代谢产生的蛋白酶、脂肪酶和酯酶等可以降解肉制品中的蛋白质、脂质和碳水化合物等大分子化合物, 形成小分子风味物质。与自然发酵组相比, 接种复合乳酸菌发酵剂的试验组样品中共鉴定出 1 782 种显著差异的代谢物, 其中生物碱及其衍生物类 16 种, 脂类和类脂分子类 636 种, 核苷、核苷酸及其类似物 43 种, 有机酸及其衍生物 254 种, 醇类及多元醇 14 种, 碳水化合物及其结合物 88 种。在有机酸及其衍生物中, 有 195 种氨基酸、肽及其类似物与对照组差异显著。C 组和 K 组样品间代谢物谱差异最大, 其次是 D 组和 G 组, H 组和 K 组差异最

小, 这与风干牛肉代谢物聚类热图结果相似(图 3A)。这也表明微生物菌群结构可能对发酵风干牛肉样品中代谢物种类产生显著影响, 从而导致接种不同发酵剂的风干牛肉样品间风味存在差异。

2.5 接种不同发酵剂风干牛肉中差异微生物与关键代谢物相关性分析

风干牛肉样品中微生物多样性和代谢物之间的关联分析通常采用普氏分析法(procrustes

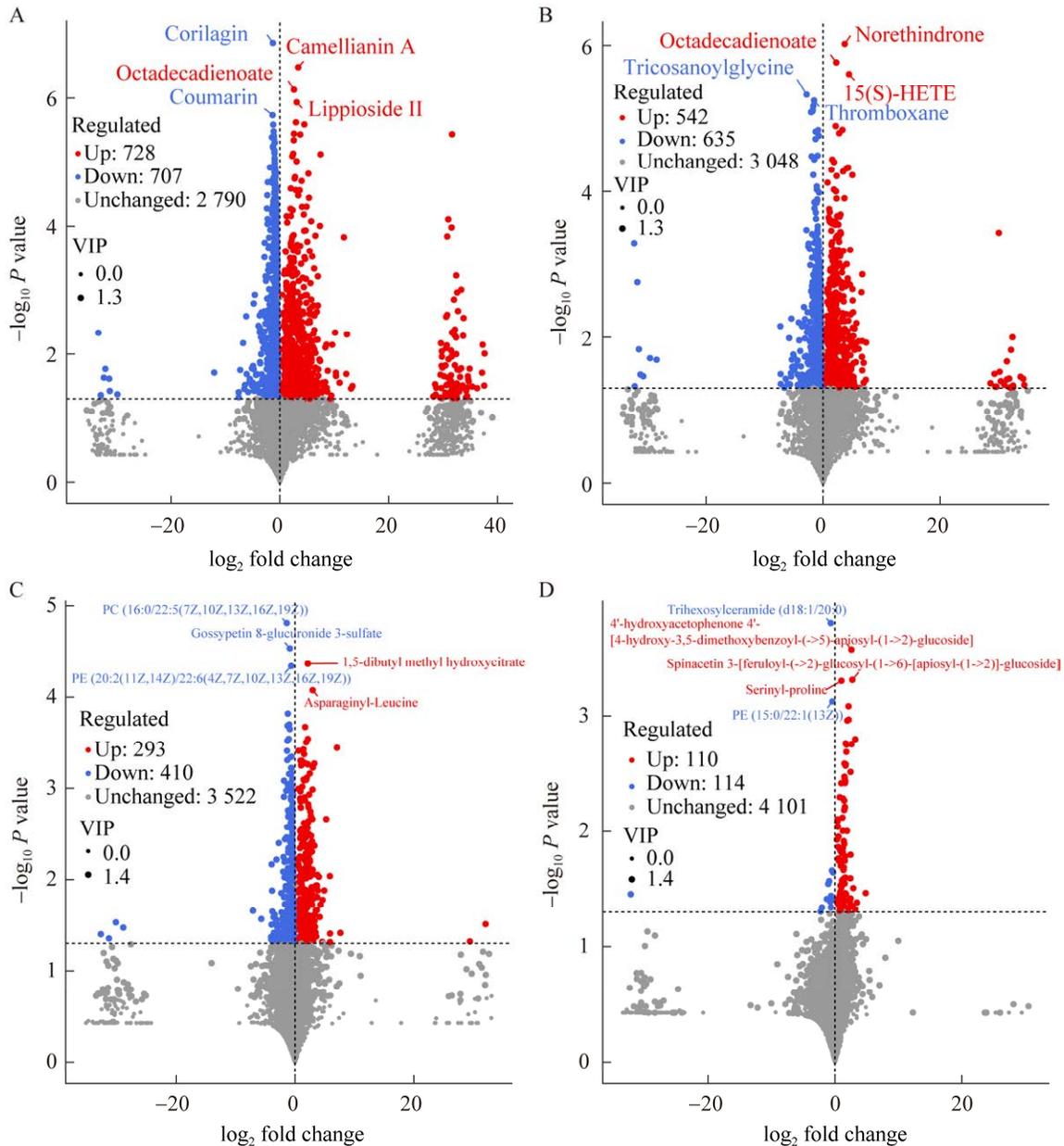


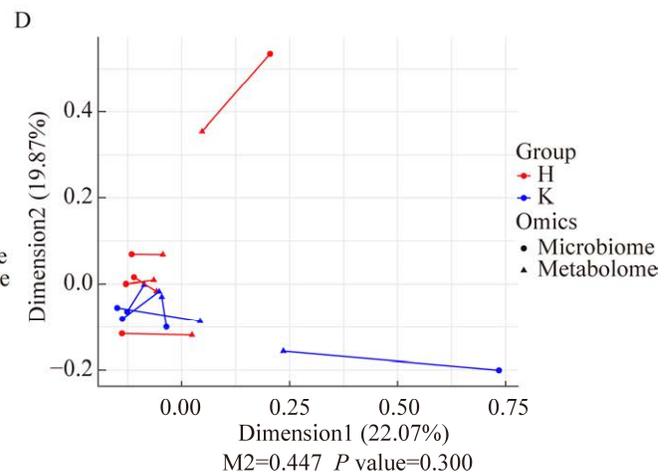
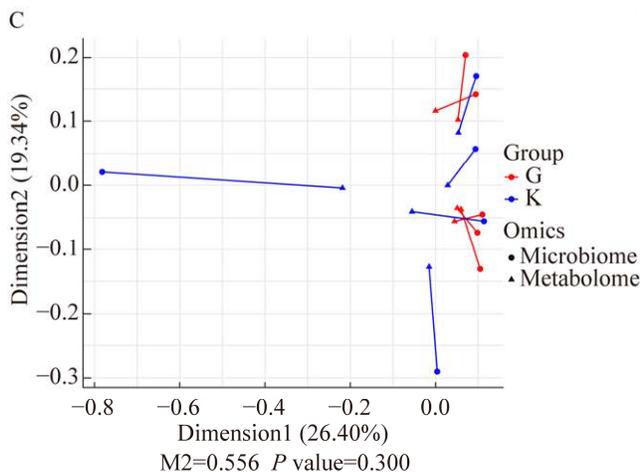
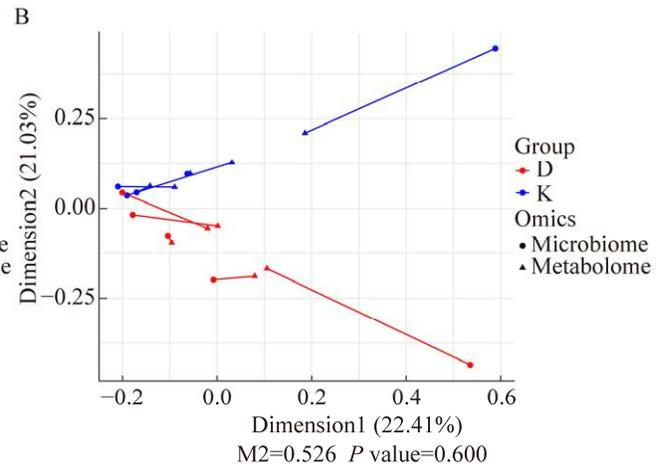
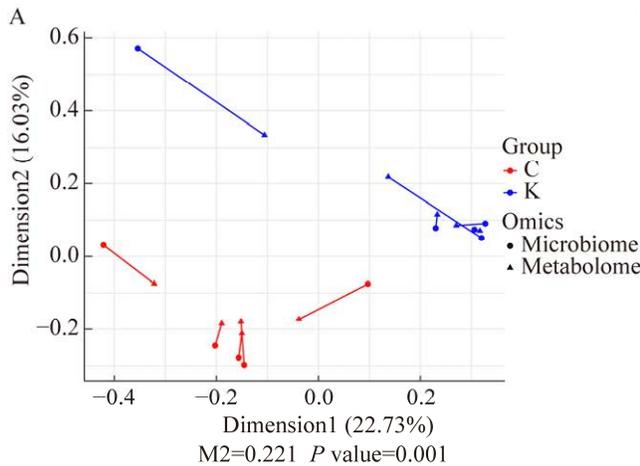
图 4 接种不同发酵剂风干牛肉与对照组之间代谢物火山图

Figure 4 Metabolite volcano plot between air-dried beef inoculated with different starters and the control group. A: Volcano plots of C vs. K. B: Volcano plots of D vs. K. C: Volcano plots of G vs. K. D: Volcano plots of H vs. K.

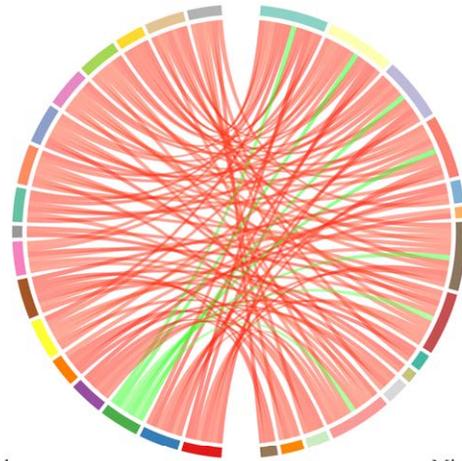
analysis), 该方法可以从整体或差异的层面对样品中微生物和代谢物的相关数据进行关联分析。普氏分析是一种多元统计学中的形状比较分析的方法,即通过分析形状分布来比较 2 组数据一致性。图 5A–5D 为试验组样品 C 组、D 组、G 组和 H 组分别与对照组 K 组之间的普氏分析结果。结果表明,只有 C 组样品和 K 组样品的微生物组数据丰度和代谢组表达趋势具有显著一致性($P=0.001$),其他试验组与对照组之间微生物数据丰度和代谢组表达趋势一致性不显著。

相关性分析(correlation analysis)是指对 2 个或多个具备相关性的变量元素进行分析,从而衡量 2 个变量因素的相关密切程度。基于皮尔逊相关系数(Pearson's correlation coefficient)对样品中微生物多样性(属水平)与代谢物之间的关联

程度进行分析(图 5E–5H)。弦图左半圈为代谢物,右半圈为微生物,每一条弦(圆上 2 点之间的连线)表示该代谢物与该微生物具有相关关系,红色弦代表具有正相关,绿色弦代表具有负相关。弦的宽度越宽,表示与这个代谢物或微生物相关的频数越多。从图 5E 可以看出,苯丙酰赖氨酸与不动杆菌(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、*Fluviicola*、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)呈负相关,其他代谢物与这些微生物呈正相关。D 组和 K 组样品中差异代谢物异羟基洋地黄毒苷配基双洋地黄毒糖苷(digoxigenin bisdigitoxoside)、胡卢巴甙(graecunin E)、磷脂酰肌醇(18:0/22:5)、磷脂酰胆碱(22:5/18:2)、谷胱甘肽(glutathione)与沙雷氏菌



E



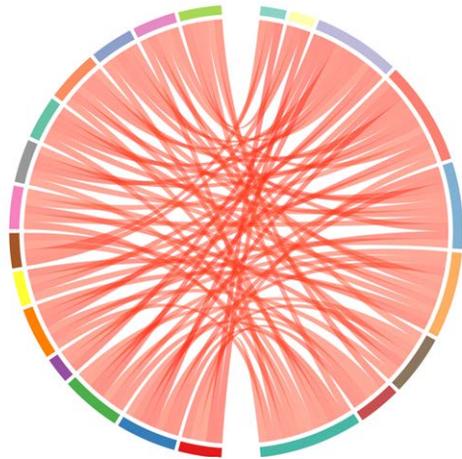
Metabolome

- 7-methylguanosine 5'-diphosphate
- Betavulgaroside X
- Phenylalanyl-lysine
- 2-C-methyl-1,4-erythrono-D-lactone
- Guanosine diphosphate adenosine
- 2'-hydroxygenistein 7-(6''-malonylglucoside)
- 6-mercaptapurine ribonucleoside 5'-diphosphate
- Glycerol 1-(5-hydroxydodecanoate)
- (E)-8-hydroxy-2-octene-4,6-dienoic acid
- 13'-carboxy-gamma-tocopherol
- 3-iodopropanoic acid
- Isodesmosine
- Emtricitabine
- Lamivudine sulfoxide
- Antibiotic X 14889C
- Epigallocatechin gallate
- 2-hydroxybenzaldehyde O-[xylosyl-(1->6)-glucoside]

Microbiome

- Acinetobacter*
- Aeromonas*
- Uncultured_bacterium_p_BRC1
- Shewanella*
- Kluyvera*
- Uncultured_bacterium_o_Elsterales
- Fluviicola*
- Brevundimonas*
- Pantoea*
- Morganella*
- Uncultured_bacterium_o_Subgroup_2
- Stenotrophomonas*
- Uncultured_bacterium_c_Subgroup_18
- Reyranella*
- Myroides*

F



Metabolome

- Digoxigenin bisdigitoxoside
- Graecunin E
- PI (18:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))
- Cyanidin 7-arabinoside
- PC (22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/18:2(9Z,12Z))
- Glutathione
- Glutamyl-Arginine
- Ethyl3-[(2-furanylmethyl)thio]propanoate
- Mytilin A
- Quillaic acid 3-[xylosyl-(1->3)-[galactosyl-(1->2)]-glucuronide]
- PC (18:2(9Z,12Z)/P-16:0)
- Heliespirone A
- PE (20:2(11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))
- Cyclocommunin

Microbiome

- Rikenellaceae_RC9_gut_group*
- Serratia*
- Morganella*
- Lactobacillus*
- Proteus*
- Kurthia*
- Myroides*
- Kluyvera*
- Pseudomonas*

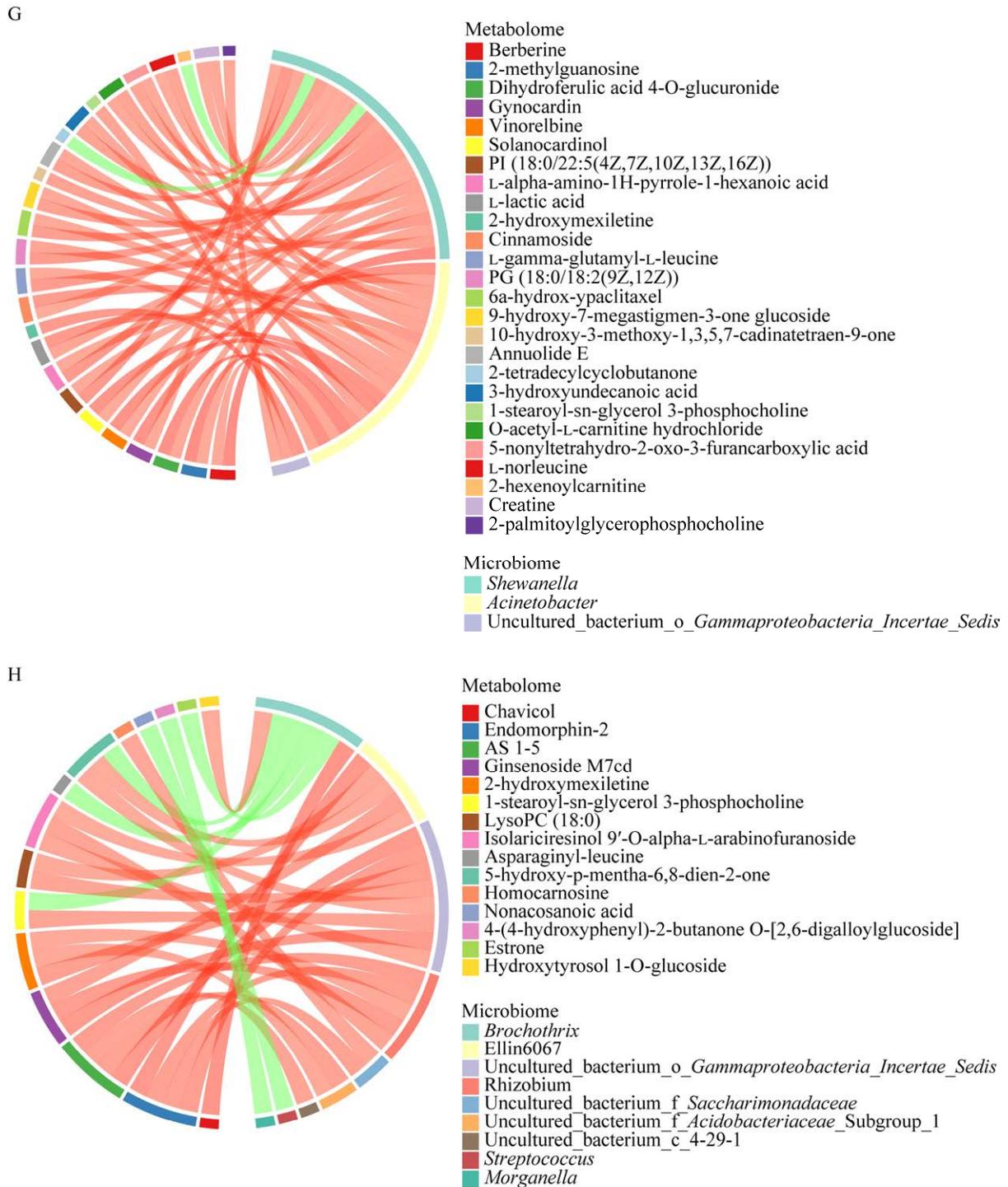


图 5 接种不同发酵剂风干牛肉与对照组中差异微生物和关键代谢物相关性分析图

Figure 5 Correlation analysis of differential microorganisms and key metabolites in air-dried beef inoculated with different starters and control group. A–D: Procrustes analysis of C vs. K (A), D vs. K (B), G vs. K (C), and H vs. K (D). E–H: Differential metabolites-differential bacteria correlation chord plots of C vs. K (E), D vs. K (F), G vs. K (G), and H vs. K (H).

属(*Serratia*)、摩根氏菌属(*Morganella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、变形菌属(*Proteus*)等呈负相关(图 5F)。图 5G 中, 26 种代谢物与 3 个细菌菌属具有相关关系, 图 5H 中的 15 种代谢物与 9 个细菌菌属具有相关关系。由此可以推测, 接种了不同复合乳酸菌的风干牛肉其品质也会有所差异。由此可见, 各类微生物的作用机制有所差异, 进而形成了不同风干牛肉制品代谢产物与营养物质的迥异。本研究揭示的微生物结构及代谢的关联, 为进一步基于假设的靶向研究与途径分析相结合提供了基础, 这将利于风干牛肉制品行业的产业化和标准化生产。

3 讨论与结论

采用高通量测序技术对风干牛肉的微生物多样性进行分析, 并确定了其微生物群落结构。结果发现, 接种不同复配乳酸菌发酵剂风干牛肉的微生物群落结构不同, 特别是接种 L.g+P.p 的 C 组, 风干牛肉中微生物种群结构最丰富。其中变形菌门中的嗜冷杆菌属、假单胞菌属和不动菌属是 C 组所有样品中的典型微生物。徽派腊肉低温晾晒期和成品中主要影响代谢特征的微生物为弧菌、葡萄球菌和盐弧菌, 这与本研究得出的典型微生物有区别, 原因可能是由于地域、环境等因素差异性导致的^[30]。此外, 研究发现嗜冷杆菌是所有样品中的优势菌种。C 组中占比前三的微生物菌属分别为嗜冷杆菌属、假单胞菌属和不动菌属。这 3 种微生物均属于嗜冷菌, 最佳生长温度为-15-20 °C, 本研究中, 牛肉的发酵温度为 15 °C, 比较适宜此类微生物生长, 因此占比相对较大。

代谢物簇-微生物相关性分析表明, 代谢物的差异与微生物菌群结构密切相关, 接种不同的复合乳酸菌发酵剂, 导致风干牛肉的微生物结构存在差异, 从而导致代谢物发生变化, 微生物与

代谢物之间具有明显的相关关系。C 组中下调代谢产物香豆素、鞣料云实素, 主要通过参与风干肉中乳酸菌的抗氧化途径和抗菌作用使得接种后风干肉能够抑制其他微生物生长。C 组中上调代谢产物山茶苷 A、十八碳二烯酸酯和脂质体 II, 山茶苷 A 是一种天然产物, 是一种黄酮类化合物, 可帮助乳酸菌对抗氧化应激, 提高细胞活性; 十八碳二烯酸酯、脂质体 II 主要是参与乳酸菌的脂质代谢和合成。C 组中微生物多样性分析中嗜冷杆菌属、假单胞菌属和不动菌属为主要优势菌种, 分泌的胞外酶水解肉中的脂质和蛋白, 产生小分子代谢物^[30-31], 提高风干肉中蛋白质降解和脂质代谢, 这与 C 组中代谢产物山茶苷 A、十八碳二烯酸酯和脂质体 II 上调具有一致性, 而 C 组中香豆素、鞣料云实素下调主要是乳酸菌发酵产酸后抑制其他菌群生长, 其代谢产物累积在一定程度上受到抑制, 研究结果与 Jin 等^[32]关于磷脂是脂质降解主体物质的研究结果相符合。

C 组风干牛肉的代谢物与其他组也存在显著差异, 特别是与风干牛肉风味形成相关的代谢物, 如脂类、碳水化合物、氨基酸等。接种 L.g+P.p 的 C 组样品中主要代谢产物脂肪酸及其衍生物、脂肪酰基糖苷类、脂肪酸酯类、甾体糖苷类、多肽类与风干肉中优势菌种正相关。醛类、醇类化合物一般来自脂质氧化, 是干腌肉制品中常见的主要挥发性风味物质^[17,33], 可能是因为冬季样品晾晒时间更长, 脂质氧化产物积累更多, Zhong 等^[34]在研究酸肉风味形成过程中也有类似的发现。本研究表明 C 组接种复合乳酸菌(L.g+P.p)发酵风干肉能够增强脂质代谢, 促进风干肉风味物质的形成。外源接种戊糖乳球菌(*Pediococcus pentosaceus*) TMR-WJG、格氏乳球菌乳(*Lactococcus garvieae*) TC-6 和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) TC-2 等会通过影响风干牛肉中菌群多样性变化从而影响产品品质。

参考文献

- [1] ROCCHETTI G, REBECCHI A, MARIA LOPEZ C, DALLOLIO M, DALLOLIO G, TREVISAN M, LUCINI L. Impact of axenic and mixed starter cultures on metabolomic and sensory profiles of ripened Italian salami[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134182.
- [2] ZHOU JY, YING YB, PENG JB, SU P, CHEN JC, HU YQ. Lactic acid bacteria and *Staphylococcus carnosus* fermentation as a means for eliminating 4-alkyl branched odour fatty acids of mutton jerky and its effect on other quality characteristics[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2022, 57(10): 6843-6851.
- [3] HU YY, LI YJ, LI XA, ZHANG HW, CHEN Q, KONG BH. Application of lactic acid bacteria for improving the quality of reduced-salt dry fermented sausage: texture, color, and flavor profiles[J]. *LWT*, 2022, 154: 112723.
- [4] HU YY, TIAN Y, ZHU JM, WEN RX, CHEN Q, KONG BH. Technological characterization and flavor-producing potential of lactic acid bacteria isolated from traditional dry fermented sausages in northeast China[J]. *Food Microbiology*, 2022, 106: 104059.
- [5] HU YY, WANG JW, LIU Q, WANG Y, REN J, CHEN Q, KONG BH. Unraveling the difference in flavor characteristics of dry sausages inoculated with different autochthonous lactic acid bacteria[J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101778.
- [6] LV J, LIN XP, LIU MY, YAN X, LIANG HP, JI CF, LI SJ, ZHANG SF, CHEN YX, ZHU BW. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* LXPSC1 on microorganisms and metabolites of sour meat during the fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134213.
- [7] 陈倩, 李永杰, 扈莹莹, 温荣欣, 孔保华. 传统发酵食品中微生物多样性与风味形成之间关系及机制的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(9): 412-419.
- CHEN Q, LI YJ, HU YY, WEN RX, KONG BH. Research progress on relationship and mechanism between microbial diversity and flavor development in traditional fermented foods[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(9): 412-419 (in Chinese).
- [8] 周洁, 李洪英, 朱秋劲, 万婧, 周颖, 胡可, 田志擎, 况于光, 李晴. 贵式肉品中乳酸菌的选育及其对发酵里脊火腿风味品质的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(8): 175-183.
- ZHOU J, LI HY, ZHU QJ, WAN J, ZHOU Y, HU K, TIAN ZQ, KUANG YG, LI Q. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Guizhou-style meat products and its effect on flavor and quality of fermented loin ham[J]. *Food Science*, 2022, 43(8): 175-183 (in Chinese).
- [9] 刘英丽, 万真, 杨梓妍, 于青林, 李磊, 王静. 乳酸菌对萨拉米香肠风味形成的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(23): 273-282.
- LIU YL, WAN Z, YANG ZY, YU QL, LI L, WANG J. Recent progress in understanding the contribution of lactic acid bacteria to flavor formation in salami: a review[J]. *Food Science*, 2020, 41(23): 273-282 (in Chinese).
- [10] 王俊钢, 李宇辉, 刘成江, 王刚, 蒲顺昌. 新疆哈萨克族传统风干肉中细菌多样性分析及安全评价[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(11): 209-218.
- WANG JG, LI YH, LIU CJ, WANG G, PU SC. Analysis and safety evaluation of bacterial diversity profiles in traditional air-dried meat of Xinjiang Kazakh[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(11): 209-218 (in Chinese).
- [11] BARCENILLA C, DUCIC M, LÓPEZ M, PRIETO M, ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ A. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: a systematic review[J]. *Meat Science*, 2022, 183: 108661.
- [12] ZAPAŚNIK A, SOKOŁOWSKA B, BRYŁA M. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety[J]. *Foods*, 2022, 11(9): 1283.
- [13] LV J, YANG ZX, XU WH, LI SJ, LIANG HP, JI CF, YU CX, ZHU BW, LIN XP. Relationships between bacterial community and metabolites of sour meat at different temperature during the fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 307: 108286.
- [14] FIDAN H, ESATBEYOGLU T, SIMAT V, TRIF M, TABANELLI G, KOSTKA T, MONTANARI C, IBRAHIM SA, ÖZOGUL F. Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: facts and gaps[J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101741.
- [15] DIANA DG, GIUSEPPE M, IVANA N, IRENE A, LANGERHOLC T, ROSSI M, RAIMONDI S, MELERO B, ROVIRA J. Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 235: 53-59.
- [16] GE QF, PEI HJ, LIU R, CHEN L, GAO XQ, GU YB, HOU Q, YIN YQ, YU H, WU MG, ZHANG WG, ZHOU GH. Effects of *Lactobacillus plantarum* NJAU-01 from Jinhua ham on the quality of dry-cured fermented sausage[J]. *LWT*, 2019, 101: 513-518.

- [17] WANG YB, LI F, CHEN J, SUN ZH, WANG FF, WANG C, FU LL. High-throughput sequencing-based characterization of the predominant microbial community associated with characteristic flavor formation in Jinhua ham[J]. *Food Microbiology*, 2021, 94: 103643.
- [18] 王俊钢, 李宇辉, 岳建平, 刘成江, 王刚, 刘世琳. 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉蛋白质降解的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(8): 117-123.
WANG JG, LI YH, YUE JP, LIU CJ, WANG G, LIU SL. Effects of different protease-producing lactic acid bacteria on the degradation of dried beef protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(8): 117-123 (in Chinese).
- [19] WANG PH, FENG ZH, SANG X, CHEN WZ, ZHANG XN, XIAO JB, CHEN YQ, CHEN Q, YANG MH, SU JQ. Kombucha ameliorates LPS-induced sepsis in a mouse model[J]. *Food & Function*, 2021, 12(20): 10263-10280.
- [20] LIN LJ, ZENG J, TIAN QM, DING XQ, ZHANG XY, GAO XY. Effect of the bacterial community on the volatile flavour profile of a Chinese fermented condiment—red sour soup—during fermentation[J]. *Food Research International*, 2022, 155: 111059.
- [21] ARO ARO JM, NYAM-OSOR P, TSUJI K, SHIMADA KI, FUKUSHIMA M, SEKIKAWA M. The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages[J]. *Food Chemistry*, 2010, 119(1): 279-285.
- [22] TABANELLI G, COLORETTI F, CHIAVARI C, GRAZIA L, LANCIOTTI R, GARDINI F. Effects of starter cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions[J]. *Food Control*, 2012, 26(2): 416-426.
- [23] BENITO MJ, RODRÍGUEZ M, CÓRDOBA MG, ANDRADE MJ, CÓRDOBA JJ. Effect of the fungal protease EPg222 on proteolysis and texture in the dry fermented sausage ‘salchichón’[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85(2): 273-280.
- [24] CAI WC, WANG YR, HOU QC, ZHANG ZD, TANG FX, SHAN CH, YANG XQ, GUO Z. Rice varieties affect bacterial diversity, flavor, and metabolites of Zha-chili[J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110556.
- [25] NIE S, LI LH, WU YY, XIANG H, LI CS, CHEN SJ, ZHAO YQ, CEN JW, YANG SL, WANG YQ. Exploring the roles of microorganisms and metabolites in the fermentation of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) based on high-throughput sequencing and untargeted metabolomics[J]. *LWT*, 2022, 167: 113795.
- [26] GUO X, SHI D, LIU CJ, HUANG YL, WANG QL, WANG JY, PEI LY, LU SL. UPLC-MS-MS-based lipidomics for the evaluation of changes in lipids during dry-cured mutton ham processing[J]. *Food Chemistry*, 2022, 377: 131977.
- [27] LIU Y, GUO X, WANG NN, LU SL, DONG J, QI ZL, ZHOU JR, WANG QL. Evaluation of changes in egg yolk lipids during storage based on lipidomics through UPLC-MS/MS[J]. *Food Chemistry*, 2023, 398: 133931.
- [28] LI XM, DENG JY, WU Y, NIE W, WANG ZM, ZHOU H, XU BC. Insight into the correlation between microbial diversity and flavor profiles of traditional dry-cured duck from the metabolomic perspective[J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111349.
- [29] PASINI F, SOGLIA F, PETRACCI M, CABONI MF, MARZIALI S, MONTANARI C, GARDINI F, GRAZIA L, TABANELLI G. Effect of fermentation with different lactic acid bacteria starter cultures on biogenic amine content and ripening patterns in dry fermented sausages[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1497.
- [30] 汪洋. 基于多组学技术的徽派腊肉风味品质形成机制研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2022.
WANG Y. Study on the flavor formation mechanism of Hui-style bacon based on multi-omics technology[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [31] 韩千慧, 岳琪琪, 吴忌, 艾有伟, 王宏勋, 侯温甫. 曲酸对冷鲜鸭肉腐败微生物致腐能力的影响研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(4): 344-350.
HAN QH, YUE QQ, WU J, AI YW, WANG HX, HOU WF. Effect of kojic acid on spoilage ability of spoilage bacteria in chilled duck meat[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(4): 344-350 (in Chinese).
- [32] JIN GF, ZHANG JH, YU X, ZHANG YP, LEI YX, WANG JM. Lipolysis and lipid oxidation in bacon during curing and drying-ripening[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(2): 465-471.
- [33] SHI YA, LI X, HUANG AX. A metabolomics-based approach investigates volatile flavor formation and characteristic compounds of the Dahe black pig dry-cured ham[J]. *Meat Science*, 2019, 158: 107904.
- [34] ZHONG AA, CHEN W, DUAN YF, LI K, TANG XY, TIAN X, WU ZQ, LI ZJ, WANG YL, WANG CH. The potential correlation between microbial communities and flavors in traditional fermented sour meat[J]. *LWT*, 2021, 149: 111873.