

杀菌方式对年糕微生物多样性及品质的影响

孙同辉¹, 陈洁^{1*}, 李雪琴^{1*}, 陈玲²

(1.河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001;

2.华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文以年糕为研究对象, 通过贮藏期菌落总数变化趋势分析杀菌方式对年糕微生物的影响, 采用Illumina Miseq高通量测序技术对其16S rDNA V3-V4区域测序, 进一步研究杀菌方式对年糕菌群丰富度和多样性的影响, 通过品质物性测定和感官评价等方法分析杀菌方式对年糕品质的影响。结果表明: 年糕菌落总数随着贮藏时间的延长呈现上升趋势, 空白样品组、水浴处理组和乙醇喷涂组年糕的货架期分别为3d、15d和12d; 通过Alpha多样性分析可见, 杀菌方式对年糕菌群丰富度及多样性影响较大, 水浴处理方式下, 优势菌群主要是不动杆菌属(40.49%)、泛菌属(32.61%)、沙门氏菌属(12.33%); 乙醇喷涂组方式下, 泛菌属和沙门氏菌属相对丰度降低, 不动杆菌属(81.46%)和微小杆菌属(10.74%)成为主要优势菌群。年糕杨氏模量、坚实度、韧性和咀嚼功随贮藏时间延长逐渐上升, 弹性、粘性和感官评分呈现下降趋势, 乙醇喷涂组较水浴处理组变化趋势更显著。综合杀菌方式对年糕微生物菌群结构的影响及贮藏期间品质指标的变化规律, 水浴处理更适合年糕保鲜, 在贮藏过程中能更好的维持年糕品质。

关键词: 年糕; 水浴处理; 乙醇喷涂; 品质; 微生物多样性

中图分类号: TS213.3 文献标志码: A

DOI: 10.7506/spkx1002-6630-20191029-314

Effect of sterilization method on microbial diversity and quality of rice cake

SUN Tonghui¹, CHEN Jie^{1*}, LI Xueqin¹, CHEN Ling²

(1.School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001,China;

2.School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: In this study, rice cake was used as the research object. The influence of sterilization method on the microbial characteristics of rice cake was analyzed by the trend of the total number of colonies during storage. The 16S rDNA V3-V4 region was sequenced by Illumina Miseq high-throughput sequencing technology, further study the effects of sterilization methods on the richness and diversity of rice cake groups, and analyze the effects of sterilization methods on the quality of rice cakes by means of qualitative properties and sensory evaluation. The results showed that the total number of rice cake colonies with different sterilization methods increased with the storage time. The shelf life of the rice cakes in the water bath treatment group and the ethanol spray group was 15d and 12d respectively. It can be seen from the Alpha diversity analysis that sterilization methods are the richness and diversity of the rice cake group have great influence. Under the water bath treatment mode, the dominant bacteria are mainly *Acinetobacter* (40.49%), *Pantoea* (32.61%), *Salmonella* (12.33%); Under the genus *Pantoea* and *Salmonella*, the relative abundance decreased rapidly, and *Acinetobacter* (81.46%) and

收稿日期:

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD04012021)

第一作者简介: 孙同辉(1995-) (ORCID: 0000-0003-3338-0751), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品加工。E-mail: tonghui@163.com

*通讯作者简介: 陈洁(1963-) (ORCID: 0000-0003-1157-3237), 女, 教授, 硕士, 研究方向为食品加工与品质分析。E-mail: cjie06@163.com

*通讯作者简介: 李雪琴(1975-) (ORCID: 0000-0002-4832-3816), 女, 教授, 博士, 研究方向为面食品加工及品质控制。E-mail: xueqin1216@sina.cn

Microbacterium (10.74%) became the main dominant bacteria. The Young's modulus, firmness, toughness and masticatory power of the rice cake gradually increased with the storage time, and the elasticity, viscosity and sensory score showed a downward trend. The change trend of the ethanol spray group was more significant than that of the water bath treatment group. And the influence of the microbial flora structure diversity, water bath treatment is more suitable for fresh-keeping of rice cake, and can better maintain the quality of rice cake during storage.

Keywords: rice cake; water bath treatment; ethanol spraying; quality; microbial diversity

以大米为原料的加工制品中,年糕是一种具有悠久历史和浓郁地方特色的半方便性的传统小吃^[1],美味而醇香,口感爽滑,营养丰富,深受消费者喜爱。但在年糕加工制作过程中,原辅料、半成品和成品都能够直接与空气或水相接触,其水分含量高且富含营养,极易受到细菌侵袭而腐败变质^[2],不能适应市场流通销售的需要。近年来,随着年糕市场的不断扩大,开展年糕的贮藏保鲜研究尤为重要。沈庆霞^[3]、李共国^[4]等人研究了高温灭菌对年糕品质及微生物的影响,调控杀菌条件可以得到较好的货架期内保证良好的品质;蔡怀依^[5]等人研究了乙醇喷涂对年糕微生物及品质的影响,可以使年糕在贮藏中保持优良品质,且价廉易得,目前已在食品保鲜中得到应用。

高通量测序技术也称“下一代测序技术”,可对数百万个DNA分子同时测序,根据16S rRNA基因序列分析特定环境中微生物群落的构成情况或基因的组成以及功能特性^[6-7],近年来,已成为分析食品微生物多样性、评价食品发酵和贮藏过程中微生物群落结构变化、监测食源性病原菌动态特征以及控制食品质量等食品微生物分子生态学研究的首选方法^[8-10]。虽然俞科伟^[11]、胡庆松^[12]、陈挺^[13-14]等人通过传统分离培养方法或变形梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)等局限性分子生态学技术初步探索年糕中优势腐败菌,但只能检测极少数易培养或优势微生物的变化情况,难以反映体系内微生物的真实丰度与演替规律^[15-16],关于杀菌方式对年糕微生物菌群结构的影响还鲜有报道。本研究以年糕为对象,通过贮藏期菌落变化趋势分析杀菌方式对年糕微生物的影响,基于Illumina Miseq测序平台对其16S rDNA V3-V4区域扩增子测序分析,更深层次挖掘杀菌方式对菌群丰富度和多样性的影响,揭示不同杀菌方式下微生物的变化规律,同时通过品质物性测定结合感官评价等方法分析杀菌方式对年糕品质的影响,为保鲜技术的探索研究和靶向抑制腐败变质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1

原辅料:糯米:中粮米业(五常)有限公司;粳米:中粮米业(巢湖)有限公司;高温蒸煮袋:沧州华良包装装潢有限公司。

1.1.2

试剂:平板计数琼脂:北京奥博星生物技术有限公司;氯化钠:天津市天力化学试剂有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒(E.Z.N.A. Soil DNA Kit):美国OMEGA公司;Qubit3.0

DNA检测试剂盒:美国Life公司;2×Taq Master Mix: Vazyme公司; MagicPure Size Selection DNA

Beads: Transgen公司。

1.2 仪器与设备

MFD15多功能一步成型机:广东衡联食品机械有限公司;400型真空(充气)包装机:郑州星火包装机械有限公司;双哈牌YX280型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器:上海三三医疗器械有限公司;SW-CJ-1D型单人净化工作台:苏州净化设备有限公司;生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;Centrifuge 5418 R离心机:德国Eppendorf;DYY-6C型电泳仪:北京市六一仪器厂;凝胶成像系统:美国UVP公司;TC-300 PCR仪:英国Techne公司;TA-XTplus型物性测试仪: Stable Micro system。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

原料米（粳米、糯米）→淘洗→浸泡7h→挤压熟化→胶凝化

①乙醇喷涂→包装

②包装→水浴处理

- 1) 乙醇喷涂组样品处理参照文献^[5]中方法：将75%乙醇溶液置于手持喷雾器中，均匀喷涂于年糕表面，每个年糕样品约消耗0.2mL乙醇溶液，进行包装，每袋60g，于25℃恒温箱贮藏。
- 2) 水浴处理组：将样品进行包装，每袋60g，检查无漏气或包装破损等问题，95℃水浴30min，待样品冷却，于25℃恒温箱贮藏。
- 3) 空白样品组：由胶凝化后的样品进行包装即可，每袋60g，于25℃恒温箱贮藏。

1.3.2 菌落总数测定

参考GB4789.2-2016《食品微生物学检验

菌落总数测定》对年糕样品中菌落总数进行测定，每隔3天取样测定。

1.3.3 样品总DNA提取

取空白样品组第1天、乙醇喷涂组和水浴处理组第3天的样品各3袋，于无菌状态下剪碎混匀，每组随机取200mg，参照基因组DNA提取试剂盒提取样品中总基因组DNA并用1%琼脂糖凝胶电泳检测提取效果，置于-20℃备用。

1.3.4 PCR扩增及16S rDNA测序

以提取的基因组DNA为模板，对16S rDNA序列的V3-V4区域进行扩增，引物序列上加有接头序列和测序引物序列，以适应Miseq测序平台使用，正向引物上接有不同碱基的标签（barcode）序列以区分不同样品，对应引物如下：

341F引物：5'-CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTG CCTACGGGNGGCWGCAG-3'

805R引物：5'-GACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

通过两轮PCR扩增并完成接头序列的连接，PCR扩增体系与扩增条件参照张皖君^[6]等的方法，第一轮，30μL PCR反应体系：2×Taq Master Mix 15μL，10μmol/L引物各1μL，DNA模板10ng，加ddH₂O至30μL。PCR扩增条件为：94℃预变性3min，94℃变性30s，45℃退火20s，65℃延伸30s，5个循环；94℃变性20s，55℃退火20s，72℃延伸30s，20个循环，72℃延伸5min。第二轮扩增，引入Illumina桥式PCR兼容引物，DNA模板20ng，PCR扩增条件为：95℃预变性3min，95℃变性20s，55℃退火20s，72℃延伸30s，5个循环，72℃延伸5min。对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，选择合适的磁珠比例，用MagicPure Size Selection DNA Beads对DNA片段进行纯化回收，用Qubit

3.0检测试剂盒对回收的DNA精确定量，以便于后续实验按照体积比1:1混合后测序，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行Illumina Miseq高通量测序。

1.3.5 年糕品质指标测定（Two Deformation Test, TDT模式）

采用TDT模式对年糕杨氏模量、坚实度、弹性、粘性、韧性以及咀嚼功进行测量，TDT模式模拟样品进入口腔后两次咀嚼，第一次尝试性咀嚼，到第二次破坏性咀嚼的过程。将年糕切成9mm长的均匀小段，按最佳蒸煮时间煮制后捞出，用蒸馏水淋洗30s，擦干表面水分，放置在质构仪基台上，选用P/35探头。测定条件：测前、测中和测后速度均为1mm/s，触发力负载30g；第一次压缩，位移距离2mm，停留时间为10s；第二次位移距离为6mm（将年糕压至破损）；每组样品平行测试5次取平均值。

1.4 感官评价

由专业感官评定小组对年糕的色泽、弹性、口感、硬度和风味等指标进行综合评价，感官评价标准见表1。

表1 年糕感官评价标准

Table 1 Sensory evaluation criteria for rice cake

指标	评分
色泽 (20分)	色泽白亮 (16~20分); 色泽偏暗 (10~15分); 没有光泽 (<10分)
弹性 (20分)	有肉眼可见弹性 (16~20分), 肉眼可见细小弹性 (10~15分); 无肉眼可见弹性 (<10分)
口感 (20分)	口感细腻、柔韧 (16~20分), 口感略粗、坚韧 (10~15分); 口感略粗、坚硬 (<10分)
硬度 (20分)	软硬适中 (16~20分), 稍软或稍硬 (10~15分), 过硬或过软 (<10分)
风味 (20分)	米香味 (16~20分), 米香味略淡 (10~15分), 存在其它异味 (<10分)

1.5 数据处理

用Excel、IBM

SPSS

Statistics

24等统计软件进行数据处理与分析, 结果用平均值±标准偏差表示, 利用Origin 2017软件作图。对测序得到的数据在测序平台上分析。

2 结果与分析

2.1 杀菌方式对年糕贮藏过程中菌落总数的影响

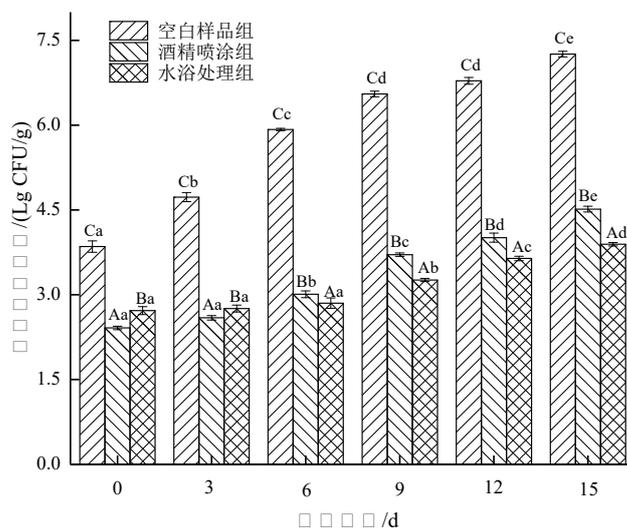


图2 年糕贮藏期间菌落总数变化趋势图

Fig.2 Trend pattern of total number of colonies during the storage of rice cakes

注: 大写字母不同表示同一贮藏时间各组间存在差异性 ($P < 0.05$); 小写字母不同表示不同贮藏时间同一组内存在差异性 ($P < 0.05$)

由图2年糕贮藏期间菌落总数变化趋势图可得, 年糕贮藏期间菌落总数随时间的延长逐渐增加, 在0~3d时, 菌落总数增长较为缓慢, 在3d之后, 样品中微生物适应新环境后迅速生长繁殖, 表现为菌落总数增长迅速。如图2所示, 空白样品组贮藏期间菌落总数增长迅速, 在第3d时菌落总数达到 5.37×10^4

CFU/g, 已超国标要求 (10^4

CFU/g), 失去食用价值; 乙醇喷涂组初始菌落数为 2.8×10^3

CFU/g, 在3d之后呈线性增长趋势, 12d时已接近 10^4

CFU/g, 在15d菌落总数达到了 4.5×10^3

CFU/g; 而水浴处理组0~6d菌落总数增长速度较慢, 在6d时年糕中菌落总数为 2.85×10^3

CFU/g, 与乙醇喷涂组初始菌落总数接近, 在6d后增长迅速, 在15d时菌落总数约为 3.8×10^3

CFU/g。在贮藏过程中, 水浴处理组样品的菌落总数均低于乙醇喷涂组, 原因可能是乙醇喷涂虽然有较好的杀菌效果, 但渗透作用较差, 对年糕内部微生物菌群作用较小, 在贮藏过程中微生物会逐渐适应环境而迅速生

长繁殖, 而水浴处理可以有效对年糕表面进行杀菌, 还可以通过热传递对年糕内部产生较好的杀菌效果^[18],

有效控制年糕体系中的初始菌落数, 延缓年糕腐败得到较好的货架期。

2.2 PCR扩增结果

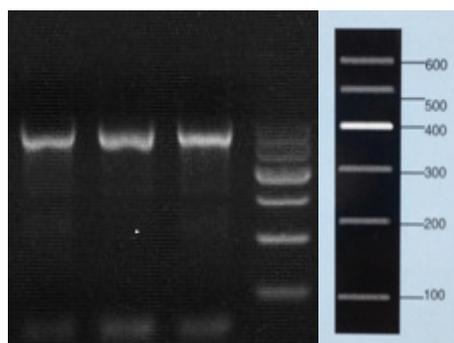


图3 PCR扩增产物电泳图

(从左往右依次为空白样品组、水浴处理组、乙醇喷涂组和Marker)

Fig.3 PCR amplification product electropherogram

以提取的基因组DNA作为模板，用16S rDNA V4区的通用引物扩增出目的片段（图3），条带清晰，可以满足后续测序实验要求^[19-20]。

V3-

2.3 样品中细菌菌落多样性分析

表2 年糕样品Alpha多样性

Table 2 The Alpha diversity of rice cake

分组	序列数	OTU	ACE指数	Chao 1指数	Shannon指数	Simpon指数	Coverage值
空白	73898	2995	228918.90	72876.63	1.95	0.28	0.96
水浴处理	80324	3252	169309.68	54934.22	2.08	0.27	0.96
乙醇喷涂	64555	2274	229453.44	78469.19	1.26	0.61	0.97

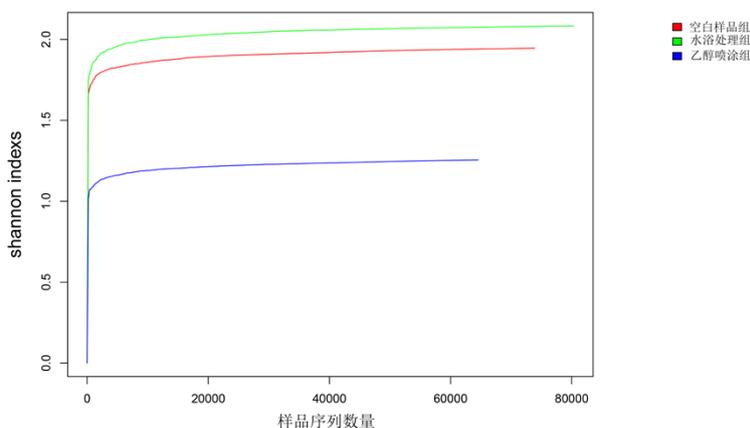


图4 shannon指数曲线分析

Fig.4 The curve analysis of shannon index

单样本多样性（Alpha多样性）分析可以反映微生物群落的丰度和多样性^[21]，对97%相似水平下的OUT进行生物信息统计，由表3可见，所有样本的测序覆盖率均在96%以上，表明测序对样本中序列的覆盖率较高，未被测到的概率较低，满足样品中细菌多样性分析的需要^[21]。

采用ACE、Chao

1、shannon和Simpon指数等多样性指标对样品微生物物种丰富度和多样性进行评估。空白样品组微生物主要来源是在年糕制作包装过程中原辅料、半成品和成品都直接与空气或水接触；乙醇喷涂组OUT数量减少，Simpon指数最高，Shannon指数最低，表明样品微生物多样性最低，主要原因可能75%乙醇的灭菌作用明显，对

菌群结构影响较大，其次在贮藏过程中，微生物间拮抗竞争关系筛选的优势菌群逐步成型，综合导致乙醇喷涂组菌群多样性降低，ACE和Chao

1指数值较高，表明组内菌群丰富度较高；水浴处理组OUT数量增加，Shannon指数值较高，Simpson指数值较低，说明水浴处理组在贮藏期内检测到新的菌种，菌群多样性增加，ACE和Chao

1指数值明显降低，表明菌群丰富度较低，两种杀菌方式对年糕菌群丰富度及多样性影响较大。

Shannon指数曲线可以反映在不同测序量时微生物多样性，当曲线趋于平坦时，说明测序数据量足够大，可以反映样品中绝大多数的微生物信息。由图4可以看出，所有样本的曲线都随着横坐标而逐渐稳定，说明测序数据量合理，所含菌种数较多^[19]。

2.4 基于OUT的Veen分析

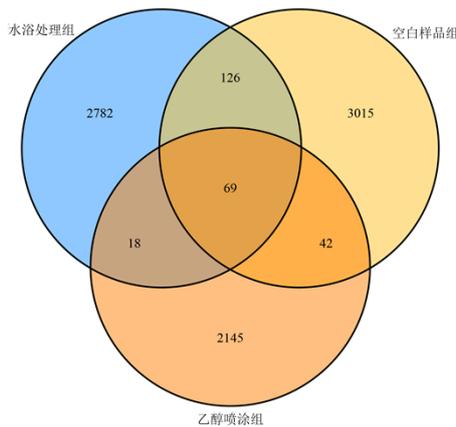


图5 不同杀菌方式样品中微生物物种间OUT分析图

Fig.5 OUT analysis of microbial species in different sterilization methods

基于样品总OUT数作Veen图，进行相似性分析（图5）。空白样品组与水浴处理组共有的OUT数195个，空白样品组与乙醇喷涂组共有的OUT数87个，水浴处理组与乙醇喷涂组共有的OUT数111个，三组样本共有的OUT数69个，占各样本OUT数比例较小，各样本特有的OUT数在2145-3015，各样本之间的菌群结构差异性较大，水浴处理和乙醇喷涂对年糕微生物群落结构影响较大。

2.5 杀菌方式对年糕中细菌群落结构的影响

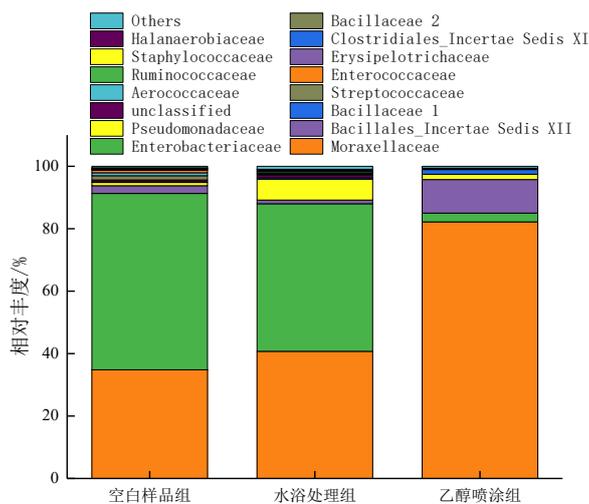


图6 不同杀菌方式样品在科水平上微生物群落结构组成差异

Fig.6 Differences in microbial community structure composition at different levels of bactericidal samples

选取各组在科水平上最大丰度排名前15的物种，生成物种相对丰度柱形累积图（图6）^[22]。由图6可以看

出, 空白样品、水浴处理组和乙醇喷涂组所含微生物种类和数量有明显差异, 水浴处理组和乙醇喷涂组微生物多样性低于空白样品组。

空白样品组肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 所占比例最大, 为56.47%, 其次为莫拉氏菌科 (*Moraxellaceae*), 所占比例为34.84%, 还有芽孢杆菌科 (*Bacillus*)、链球菌科 (*Streptococcaceae*) 和假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*) 等相对丰度较低的菌种, 在年糕制作包装过程中污染微生物的种类复杂, 导致样品菌落结构呈现多样性; 水浴处理组在科水平下主要有*Enterobacteriaceae* (47.27%)、*Moraxellaceae* (40.75%) 和*Pseudomonadaceae* (6.69%) 和*Bacillus*,

*Enterobacteriaceae*相对丰度降低, *Moraxellaceae*相对丰度升高, *Pseudomonadaceae*相对丰度升高。Enterobacteriaceae耐热性较低, 研究经验表明, 只能通过一些手段去减少它们的存在, 却不能完全杀灭^{[23-}

^{24]}, 表现为相对丰度降低; *Moraxellaceae*相对丰度升高, 因为其对环境有较好的适应能力, 在缺氧和高于最适温度培养时, 可以促进多形态产生^[25]。水浴处理使年糕内微生物丰富度和多样性大幅度降低, 尤其对温度敏感的微生物菌群, 年糕中微生物菌群总数量降低, 使对环境有较好的耐受力的菌群比例略有升高, 所以表现为*Moraxellaceae*和*Bacillus*相对丰度略有升高; 乙醇喷涂组的菌群在科水平下主要有*Moraxellaceae* (82.22%)、芽孢杆菌 (*Bacillus*, 10.74%) 和*Enterobacteriaceae* (2.8%)。 *Moraxellaceae*中有些菌属对消毒剂有一定的抗药性^{[26-}

^{29]}, 所以呈现较高的相对丰度; *Bacillus*环境耐受能力强, 可以形成孢子躲避有害环境, 适应环境后繁殖迅速, 表现为相对丰度略有升高, 可能会成为年糕后期腐败的优势菌。

2.6 物种丰度聚类分析 (Genus)

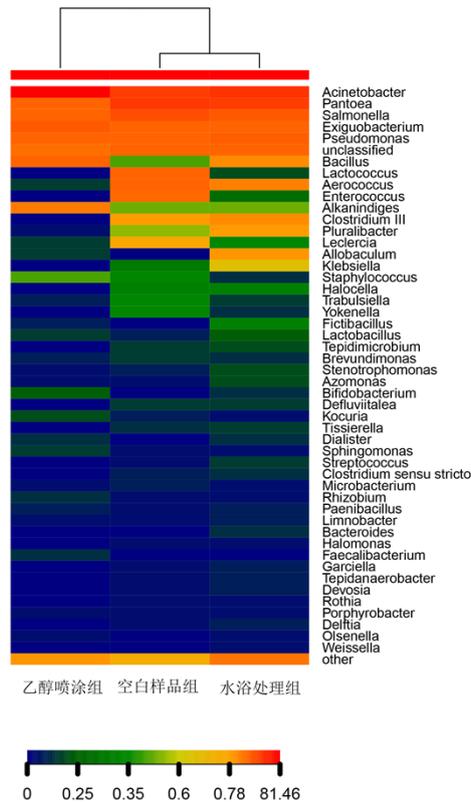


图7 不同杀菌方式微生物丰度聚类热图 (属水平)

Fig.7 Microbial abundance clustering heat map with different sterilization methods(Genus)

A、

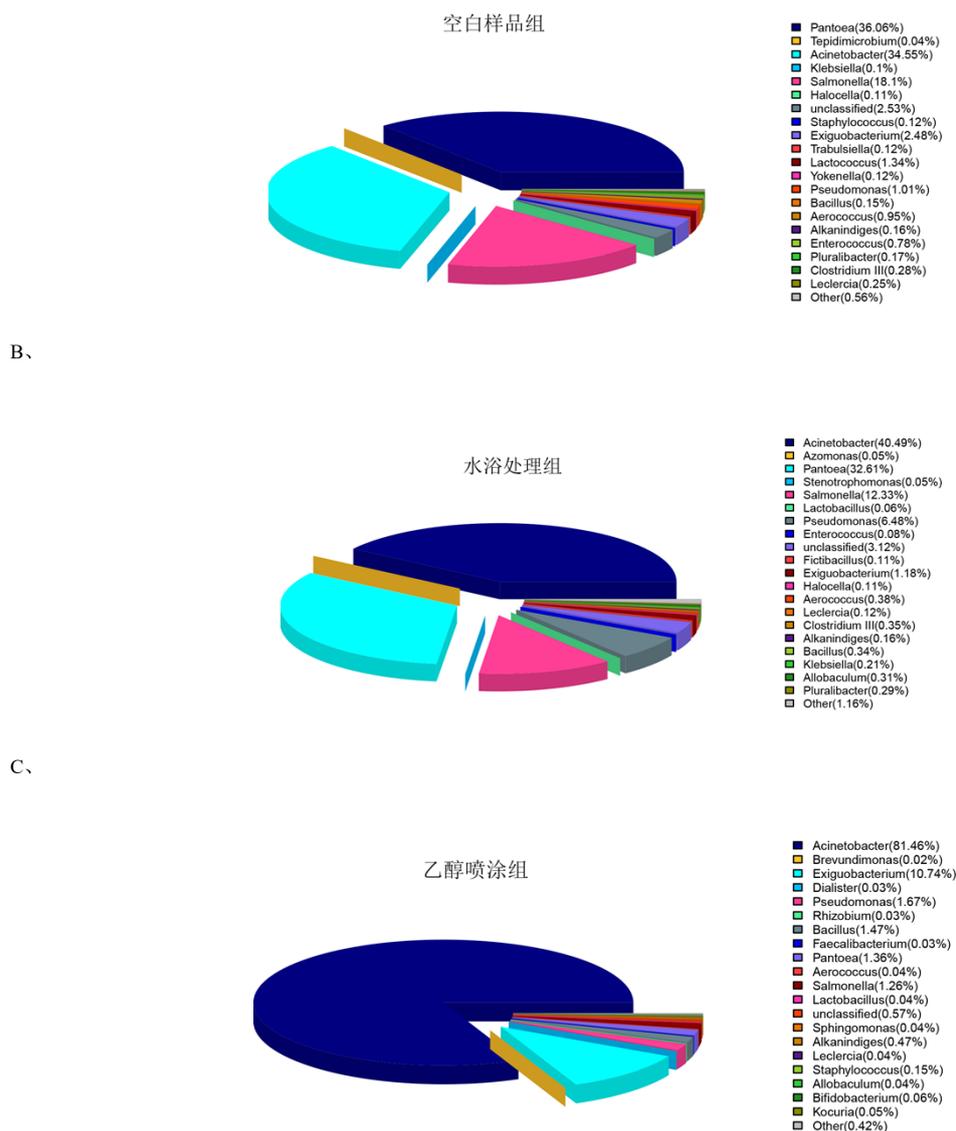


图8 不同杀菌方式样品中微生物组成比例（属水平，A、B、C）

Fig.8 Microbial composition ratio in different sterilization methods(Genus,A,B,C)

选取丰度排名前50的属，根据其在每个样品中的丰度信息聚类绘制成热图（图8），热图颜色变化可直观的反映出多个样本群落组成的相似性和差异性，更便于发现哪些物种在哪些样品中聚集较多或较少，颜色标尺中颜色越偏橙红色，样品中所含该物种比例越高，颜色越偏蓝色，比例越低。如图8所示，在属水平，水浴处理组和空白样品组聚为一类，乙醇喷涂单独聚为一类，水浴处理组和空白样品组菌群整体结构相似度较高，与乙醇喷涂组相似度较低，表明乙醇喷涂对样品菌群结构影响较大。

由图8各样品中微生物组成比例图可见，在属水平上，空白样品组优势菌群主要是Pantoea（36.06%）、Acinetobacter（34.55%）和Salmonella（18.1%），还有相对丰度较小的Exiguobacterium（2.48%）和Lactococcus（1.34%），空白样品中菌群分布较为均匀。在优势菌群中Pantoea所占比例最大，属于兼性厌氧，具有代谢和发酵类型的化能异养菌，是水稻内生细菌属^[30]

³¹⁾，主要来自于原料大米中；Acinetobacter广泛分布于外界环境中，水和土壤中居多，黏附力极强，易于随空气传播污染，在陈挺^[14]、俞科伟^[11]等人研究中也检测到；Salmonella是一种常见的食源性致病菌，广泛存在于自然界^[32]

³³⁾，传播途径广泛，空白样品组中微生物污染主要来源是原辅料本身携带和加工过程中与空气、水等接触，

且种类复杂^[22]。

水浴处理组优势菌群主要是 *Acinetobacter* (40.49%)、*Pantoea* (32.61%) 和 *Salmonella* (12.33%)，还有少量的 *Pseudomonas* (6.48%) 和 *unclassified* (3.12%)；水浴处理组样品中 *Acinetobacter* 和 *Pantoea* 菌群相对丰度依然较高，原因主要是空白样品携带 *Acinetobacter* 和 *Pantoea* 较多，其次水浴温度和时间不足以杀死体系中 *Acinetobacter* 和 *Pantoea* 菌群，有部分菌群存活下来，适应环境后迅速生长繁殖，成长为优势菌；由于 *Salmonella* 部分菌属对干燥、高盐、冷冻等恶劣环境具有极强的耐受能力，更有少数沙门氏菌具有较强的耐高温特性以及对其他不良环境（酸、消毒剂和辐射等）的耐受性^[34-35]，所以有相对丰度接近12.33%的 *Salmonella* 菌群存活下来。

乙醇喷涂组优势菌属主要是 *Acinetobacter* (81.46%) 和 *Exiguobacterium* (10.74%)，乙醇喷涂组中菌群结构变化较大，由图8

C图可得，*Pantoea* 和 *Salmonella* 菌属相对丰度迅速降低，*Acinetobacter* 和 *Exiguobacterium* 相对丰度升高，成为优势菌属，*Acinetobacter* 菌属生命力极强可长期存活，具有多重抗药性，极易对各种消毒剂和抗菌药物产生抗药性^[26,36]，原因可能在逐渐适应环境的过程中产生抗药性存活下来，表现为相对比例大幅度升高；*Exiguobacterium* 属于兼性厌氧菌，生境广阔，虽然不行成芽孢，多数菌种具有一定的环境耐受性，国内外研究者们从多种多样的环境中分离得到不同的微小杆菌属^{[37-}

^{40]}，*Acinetobacter* 和 *Exiguobacterium* 可能会成为乙醇喷涂组优势腐败菌。

2.7 杀菌方式对贮藏过程中年糕品质的影响

表3 年糕贮藏期间品质指标变化

Table 3 Changes in quality indicators during the storage of rice cakes

分组	贮藏时间 (d)	杨氏模量 (M Pa)	坚实度 (g)	弹性 (%)	粘性 (g·sec)	韧性 (g)	咀嚼功 (g·sec)
空白	0	0.117±0.00a	472±18.21a	73±1.12b	46±2.37a	7483±430.2a	13021±1280.2a
	3	0.152±0.05b	582±20.31b	72±0.98b	46±3.12a	8629±372.1b	15732±938.0a
	6	0.148±0.02b	593±27.49b	64±2.37a	47±2.89a	8321±522.3b	14798±1832.4a
水浴 处理组	0	0.118±0.02a	539±24.10a	76±1.73b	44±1.02b	7320±482.0a	14623±937.7a
	3	0.130±0.01b	620±18.03b	78±2.03b	43±3.20b	7839±602.1ab	17708±1402.8b
	6	0.125±0.04b	587±10.32b	72±1.73ab	44±2.78b	7521±323.2a	16456±1608.0b
	9	0.138±0.02c	752±26.74c	64±1.03a	41±1.98a	8182±422.9b	19550±1882.9c
	12	0.145±0.03d	936±30.27d	67±2.63a	40±2.89a	9330±502.6c	20831±1731.1d
乙醇 喷涂组	15	0.152±0.02e	890±34.94d	64±1.78a	42±2.05a	9204±384.7c	23941±1283.3d
	0	0.103a±0.02	568±23.23a	83±2.20e	47±3.21b	7492±202.3a	13723±1572.2a
	3	0.092±0.04a	520±17.80a	78±1.87d	52±4.08b	6701±350.0a	14382±1302.3a
	6	0.122±0.01b	640±20.09b	62±2.03c	43±2.31a	7829±391.8a	17239±729.8b
	9	0.143±0.00c	763±19.39c	57±2.53c	46±2.20b	9882±422.7c	18293±1332.9c
	12	0.151±0.01d	920±35.22d	52±1.90b	39±1.02a	11528±658.0d	23802±1478.6d
	15	0.148±0.04d	974±26.38e	49±2.39a	47±2.31b	9472±283.9c	19852±847.2c

注：同一列小写字母不同表示存在显著差异 ($P<0.05$)。

由年糕贮藏期间品质的变化表3可得，随着贮藏时间的延长，年糕杨氏模量、坚实度、韧性和咀嚼功等品质指标呈现上升趋势，弹性和粘性逐渐降低。在贮藏期内品质变化主要是年糕老化引起的，年糕属于淀粉质食品，淀粉回生是淀粉质食品老化的主要因素，淀粉回生主要是由淀粉的再结晶引起的^[41]。短期回生直链淀粉形成的晶核为支链淀粉回生提供了晶种源^[42]，随着贮藏时间的延长，支链淀粉外侧短链以双螺旋为基质，通过氢键堆积结晶，直链淀粉的存在加速了支链淀粉的重结晶，使得支链淀粉在重结晶后淀粉凝胶硬度增大^[43]，表现为杨氏模量、坚实度、韧性和咀嚼功逐渐增加，

贮藏期间微生物生长与化学反应引起的水分含量减少，导致年糕弹性和粘性降低。空白样品组在6d时，与0d

样品相比,粘性和咀嚼功无显著差异 ($P>0.05$),弹性下降12.3%,杨氏模量、坚实度和韧性显著增加 ($P<0.05$),各指标分别增幅26.5%、25.6%和11.2%;在0~3d,乙醇喷涂组样品品质指标变化与水浴处理无显著差异 ($P>0.05$),在3d之后,水浴处理组和乙醇喷涂组杨氏模量、坚实度和粘性无显著差异 ($P>0.05$),水浴处理组15d时较空白样品组新鲜样品弹性下降12.3%,韧性和咀嚼功上升23.0%、83.9%,乙醇喷涂组弹性下降32.9%,韧性和咀嚼功上升26.6%、52.5%,乙醇喷涂组弹性、韧性和咀嚼功变化幅度较大,原因可能是是贮藏后期微生物繁殖速度较快,导致样品品质逐渐劣变,失去食用价值。因此,从质构分析结果来看,水浴处理组品质保持更好。

2.8 杀菌方式对年糕贮藏过程中感官品质的影响

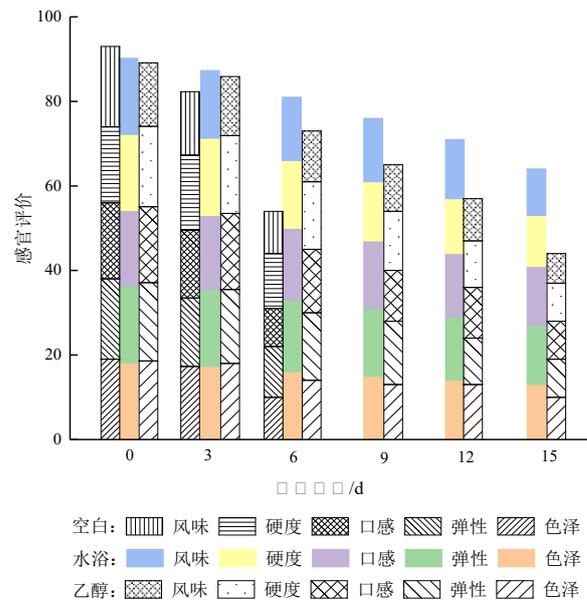


图9 年糕贮藏过程中感官评分的变化

Fig.9 Changes in sensory scores during storage of rice cakes

年糕贮藏过程中感官评分的变化见图9,年糕在色泽、弹性、口感、硬度和风味各项评分和总分均随着贮藏时间的延长而降低,随着贮藏时间的延长,年糕色泽逐渐暗淡,弹性口感变差,且特征米香味消失。贮藏前3d,空白样品组感官评分下降显著 ($P<0.05$),水浴处理组与乙醇喷涂组样品感官评分无显著性差异 ($P>0.05$),说明两种杀菌方式均能有效抑制微生物生长繁殖,延缓年糕腐败并保证年糕有较好的品质;在6d后,空白样品组有异味产生,部分样品已呈现腐败状,不具有食用价值;两组的感官评分变化趋势有显著差异 ($P<0.05$),水浴处理组在第12d时,品质保持较好,乙醇喷涂组感官评分下降速度较快,口感逐渐变差,在第12d时,略有异味产生。感官评分是判断货架期的主要指标^[44],水浴处理组较乙醇喷涂组的货架期延长,表明,年糕采用水浴处理较乙醇喷涂的感官品质保持较好,水浴处理可以有效抑制微生物繁殖和油脂酸败,依据以上分析结果可以初步预测,25℃条件下,乙醇喷涂和水浴处理的两种年糕货架期可达12、15d。

3 结论

(1) 在25℃贮藏条件下,空白样品组、乙醇喷涂组和水浴处理组货架期分别为3d、12d和15d,年糕菌落总数随着贮藏时间的延长均呈现上升趋势,水浴处理组杀菌抑菌效果较好。通过Alpha多样性和物种分类分析可得,两种杀菌方式对年糕菌群丰富度及多样性影响较大。空白样品组中优势菌属主要是泛菌属(36.06%)、不动杆菌属(34.55%)和沙门氏菌属(18.1%),乙醇喷涂组优势菌属主要是不动杆菌属(81.46%)和微小杆菌属(10.74%),水浴处理组优势菌属主要是不动杆菌属(40.49%)、泛菌属(32.61%)、沙门氏菌属(12.33%),两种杀菌方式下年糕菌群结构有较大差异,水浴处理组与空白样品组菌群相似度较高,乙醇喷涂组

与空白组、水浴处理组相似度较低。

(2) 在贮藏期内, 年糕杨氏模量、坚实度、韧性和咀嚼功逐渐上升, 弹性、粘性和感官评价等呈现下降趋势, 在0~3d, 乙醇喷涂组与水浴处理组品质指标变化无显著差异 ($P>0.05$), 3d~12d时, 乙醇喷涂组与水浴处理组相比较, 弹性显著降低 ($P<0.05$), 韧性和咀嚼功显著升高 ($P<0.05$), 综合各项测定指标的变化规律和微生物菌群结构多样性的影响, 水浴处理比乙醇喷涂更适合年糕保鲜, 在贮藏过程中能更好的维持年糕品质。本研究为后期靶向抑制其腐败变质和保鲜工艺的探索提供了参考。

参考文献:

- [1] 林晓岚, 郑晓玲, 黄玉慧. 软包装桔汁年糕的研制[J]. 福建轻纺, 2004(11):17-19. DOI:10.3969/j.issn.1007-550X.2004.11.005.
- [2] 李建飞, 周显青, 张鹏举. 年糕保鲜方法[J]. 现代食品, 2017(1):18-21. DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2017.01.007.
- [3] 沈庆霞, 路兴花, 庞林江, 等. 灭菌方式对甘薯水磨年糕品质特性的影响[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 76-80. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2017.05.016.
- [4] 李共国, 马子骏, 林瑛影. 高温杀菌对水磨年糕品质的影响[J]. 食品工业科技, 2002(05):43-44. DOI:CNKI:SUN:SPKJ.0.2002-05-023
- [5] 蔡怀依, 许翔, 袁爽, 等. 乙醇喷涂处理对年糕微生物及理化品质的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 291-295, 302. DOI:CNKI:SUN:SPKJ.0.2017-16-055.
- [6] 田建军, 张开屏, 杨明阳, 等. 应用Illumina MiSeq测序技术比较风干肉中细菌多样性和微生物安全性[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 33-40. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180504-043.
- [7] SOON W W, HARIHARAN M, SNYDER M P. High-throughput sequencing for biology and medicine[J]. Molecular Systems Biology, 2013, 9. DOI:10.1038/msb.2012.61.
- [8] 刘建利, 孙敏, 曹晓虹, 等. 利用高通量测序技术分析民间面引子中的真菌多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 186-194. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201822029.
- [9] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108 Suppl 1(Supplement_1):4516-4522. DOI:10.1073/pnas.1000080107.
- [10] YOUSSEF N, SHEIK C S, KRUMHOLZ L R, et al. Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rRNA Gene-Based Environmental Surveys[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16):5227-5236. DOI:10.1128/AEM.00592-09.
- [11] 俞科伟, 桑卫国. 年糕中微生物的分离纯化和鉴定[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 167-169. DOI :10.13386/j .issn1002-0306.2010.02.092.
- [12] 胡庆松. 年糕生产和贮藏期间微生物控制技术的研究[D]. [南京]: 南京农业大学, 2009:12-20.
- [13] 陈挺, 姜永江, 庞林江, 等. 水磨年糕中微生物的分离纯化与鉴定[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(19): 25-28. DOI:10.3969/j.issn.1007-7731.2015.19.010.
- [14] 陈挺. 真空年糕制品微生物菌群分析及贮藏过程中的品质变化[D]. [浙江]: 宁波大学, 2014:5-17.
- [15] 薛明, 何瑶瑶, 邱孟德, 等. 高通量测序分析凡纳滨对虾育苗期水体菌群结构特征[J]. 水产学报, 2017, 40(5): 785-794. DOI:CNKI:SUN:SCKX.0.2017-05-016.
- [16] 张皖君, 蓝蔚青, 段贤源, 等. 基于高通量测序分析不同保鲜冰处理对鲈鱼菌群组成与代谢功能的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 234-241. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180123-314.
- [17] 程敏, 刘保国, 刘彦旭. 低温对小麦麸皮拉伸力学特性参数的影响[J]. 农业工程学报, 2019, 35(13): 312-318. DOI:10.11975/j.issn.1002-6819.2019.13.038.
- [18] 孙同辉, 陈洁, 许飞, 等. 年糕贮藏期间保鲜及品质的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2019, 40(3): 71-77. DOI:10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2019.03.013.
- [19] 李成, 孔晓雪, 余炬波, 等. 基于高通量测序分析蟹糊微生物菌群多样性[J]. 食品科学, Epub ahead of print.
- [20] 江艳华, 王联珠, 许东勤, 等. 基于高通量测序分析虾夷扇贝柱菌群结构及腐败优势菌[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 140-145. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201820021.
- [21] 邓晓影, 张宾, 汤贺, 等. 基于高通量测序的南美白对虾中微生物群落分析[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 149-155. DOI:10.7506/spkx1002-6630-2018024023.

- [22] 吴海虹,孙芝兰,张新笑,等. 不同包装方式下冷鲜青虾的菌群多样性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(3): 251-258. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171027-318.
- [23] CORDIER J-L.. 17 - Enterobacteriaceae[Z]. Woodhead Publishing, 2006: 450-475.
- [24] JACK L.,READ B.. 5 - Raw material selection: fish[Z]. : Woodhead Publishing, 2008: 83-108.
- [25] 王江博. 一株莫拉氏菌新种的分离鉴定与特性研究[D]. [四川]: 四川农业大学, 2016:1-6.
- [26] 蔺飞,贾旭,凌保东. 鲍曼不动杆菌对消毒剂耐药机制的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(2): 81-89. DOI:10.3969/j.issn.1001-8689.2017.02.001.
- [27] POURNARAS S , KOUMAKI V , GENNIMATA V , et al. In Vitro Activity of Tigecycline Against *Acinetobacter baumannii*: Global Epidemiology and Resistance Mechanisms[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, 897:1-14. DOI:10.1007/5584_2015_5001.
- [28] ALEKSHUN M N , LEVY S B . Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance[J]. *Cell*, 2007, 128(6):0-1050. DOI:10.1016/j.cell.2007.03.004.
- [29] LUÍSA C.S. ANTUNES, VISCA P , TOWNER K J . *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen[J]. *Pathogens and Disease*, 2014, 71. DOI: 10.1111/2049-632X.12125.
- [30] 施小伟. 内生细菌 *Pantoea ananatis* Sd-1 降解水稻秸秆性能与漆酶催化性质的研究[D]. [湖南]: 湖南大学, 2015:II
- [31] 邹媛媛,刘琳,刘洋,等. 不同水稻品种种子固有细菌群落的多样性[J]. 植物生态学报, 2012, 36(8): 880-890. DOI:10.3724/SP.J.1258.2012.00880.
- [32] 陈丹霞,苏妙贞,梁颖思,等. 巧克力中沙门氏菌检测能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(23): 6095-6100. DOI:CNKI:SUN:SPAJ.0.2018-23-004.
- [33] 高晗,何娟,严礼. 3种沙门氏菌检测方法能力验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 10(7): 510-515. DOI: CNKI:SUN:SPAJ.0.2017-02-027.
- [34] 张宏梅,尹小慧,林育成,等. 沙门氏菌在不同环境下辣椒中的存活情况[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4): 236-240. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.036.
- [35] GRUZDEV NADIA,PINTO RIKY,(SALDINGER) SHLOMO-SELA. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage[J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(2): 415-422. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.003>.
- [36] 彭敬红. 鲍曼不动杆菌医院感染及耐药机制研究[D]. [湖北]: 华中科技大学, 2009:10-12.
- [37] YOON, J.-H. *Erythrobacter seohaensis* sp. nov. and *Erythrobacter gaetbuli* sp. nov. isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea[J]. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 2005, 55(1):71-75. DOI: 10.1099/ijs.0.63233-0.
- [38] MITEVA V I , SHERIDAN P P , BRENCHLEY J E . Phylogenetic and Physiological Diversity of Microorganisms Isolated from a Deep Greenland Glacier Ice Core[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1):202-213. DOI:10.1128/aem.70.1.202-213.2004.
- [39] 夏晓敏,汪建君,陈立奇,等. 厦门市10月份大气气溶胶中细菌群落结构的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2010,49(05):682-687. DOI: CNKI:SUN:XDZK.0.2010-05-020.
- [40] 张莹,石萍,马炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2013,19(5):898-904. DOI:10.3724/sp.j.1145.2013.00898.
- [41] 王丽. 米蛋糕开发与保鲜技术研究[D]. [湖北]: 华中农业大学, 2013:42-48.
- [42] 田耀旗. 淀粉回生及其控制研究[D]. [江苏]: 江南大学, 2011:1-12.
- [43] 刘钰馨,莫羨忠,李建鸣,等. 淀粉回生行为特性及机理研究进展[J]. 广西师范学院学报(自然科学版), 2014, 31(2): 45-47. DOI:10.3969/j.issn.1002-8743.2014.02.011.
- [44] 吴燕燕,赵志霞,李来好,等. 不同包装与贮藏条件对两种低盐腌制罗非鱼片的品质影响[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 241-247. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180423-305.