

基于Illumina MiSeq技术比较二种多脂鱼 在腌干过程中的菌相变化

蔡秋杏^{1,2}, 吴燕燕¹, 李来好^{1*}, 杨贤庆¹,
赵永强¹, 杨少玲¹, 王悦齐^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 北部湾大学食品工程学院, 广西高校北部湾特色海产品资源开发与
高值化利用重点实验室, 广西 钦州 535099;

3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266000)

摘要: 通过比较研究多脂红肉鱼(蓝圆鲹)和白肉鱼(带鱼)腌干加工中菌相的变化规律, 以探讨加工过程对菌相的影响并寻找具有抗氧化作用的优势菌。在腌干加工过程中采用Illumina平台的MiSeq技术比较分析了两种多脂鱼的菌相变化情况。结果显示, 两种鱼的菌相主要分布在拟杆菌门、变形菌门; 在科水平上, 初始原料的蓝圆鲹和带鱼分别含7个和15个科的细菌, 带鱼包括了蓝圆鲹的所有菌群, 肠杆菌科作为共同的优势菌, 在蓝圆鲹和带鱼中分别占47%和26%。从腌制开始, 两种鱼的菌群数都大量减少, 弧菌和芽孢杆菌科作为共同优势菌, 前者平均占蓝圆鲹和带鱼的40.3%和42.2%, 后者则平均占16.7%和13.3%。原料中, 蓝圆鲹和带鱼都包含了肠杆菌科、假单胞菌、弧菌科和希瓦氏菌科这4种腐败菌, 加工阶段, 两种鱼的优势腐败菌都为弧菌科。乳酸菌包括链球菌科和乳杆菌科, 仅出现在带鱼中。研究表明, 在腌干加工中, 带鱼的细菌减少程度大于蓝圆鲹, 总体上均呈现下降趋势, 两种鱼含共同的菌群和优势菌, 却表现出明显的差异。腌干后两种鱼的腐败菌大大减少, 说明腌干加工有利于降低鱼类腐败的可能性。可选择带鱼作乳酸菌的分离以进行后续的抗氧化研究。

关键词: 多脂鱼类; 腌干加工; 菌相分析; Illumina MiSeq技术; 优势菌

中图分类号: S 984.1; TS 254.4

文献标志码: A

传统腌干鱼由于本身包含丰富的微生物群落, 在加工过程中产生自然发酵, 因此会发生理化性质和微生物种类的变化, 一方面形成腌干鱼特有的风味^[1], 另一方面则因腐败微生物分解的脂肪氧化酶(LOX), 导致其发生脂质氧化反应生成过氧化物, 然后生成导致强烈哈喇味的醛酮类物质^[2]。目前防止腌干鱼加工过程中产生脂质氧化主要通过添加丁基羟基茴香醚(BHA)、没食子酸丙酯(PG)、特丁基对苯二酚(TBHQ)和维生素E等抗氧化剂, 但这些外源物质的引入会

影响产品的风味等感官特性^[3], 而腌干鱼本身分离的微生物, 有些也存在抗氧化作用, 研究并进一步应用其特性是解决产品过度氧化的另一途径^[4]。大量研究表明, 乳酸菌能从众多天然发酵食品中筛选出具有较强抗氧化活性的优良菌株^[5-7]。因此应用乳酸菌等有益微生物来实现对发酵过程的有效控制, 并对微生物群落结构进行有效调控, 也可改善腌干鱼加工过程中氧化产生的品质变化, 保证产品的食用安全性^[8]。腌干鱼加工中, 脂肪氧化在多脂鱼(鱼肉脂肪含量

收稿日期: 2018-04-03 修回日期: 2018-05-28

资助项目: 国家自然科学基金(31571869); 现代农业产业技术体系专项(CARS-47)

通信作者: 李来好, E-mail: laihaoli@163.com

大于5.0%的鱼类)中较为常见,研究分别选用以白色肉和红色肉为主的多脂海水鱼代表:带鱼(*Trichurus lepturus*)以及蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)为对象,这两种鱼在连续3年(2015—2017年)的全国渔获量中分别排名第1和第3位,也是腌干鱼中常用的鱼类^[9]。

利用微生物首先要研究腌干鱼本身的菌相组成,多年来,国内外学者对臭鳊鱼^[10]、咸鱼^[11]、老挝pasom^[12]等传统鱼制品进行优势菌群分析,发现多为肠球菌、乳酸菌、芽孢杆菌和微球菌。而长期以来,菌相分析主要还是采用传统的纯培养结合繁琐的生理生化鉴定进行,但自然界中可用于培养的微生物还不到1%^[13]。目前流行采用分子生物学手段进行菌相分析,Handelsman等^[14]首次提出宏基因组(metagenome)的概念:即在特定环境样品中基因组的总和,包含真菌基因组和细菌基因组。2013年出现的Illumina MiSeq测序平台为宏基因组学开拓了新的技术手段,此技术可以直接对样品中微生物总基因组进行测序,不需要对微生物进行分离培养,其测序通量高且数据完整性好。谢萍等^[15]采用宏基因组MiSeq测序技术分析散装酱卤鸭肉在4和25℃贮藏过程中的微生物群落多样性,结果清晰地揭示了贮藏过程中的优势细菌和真菌,证明了酱卤鸭这一传统发酵食品中丰富的微生物多样性,但目前利用该方法对腌干鱼中的菌相组成分析还较少。

本研究从蓝圆鲹和带鱼的腌干加工过程中的几个关键环节取样,应用宏基因组MiSeq测序技术分析样品中的菌相变化,掌握优势菌的情况,以期筛选出符合腌干鱼发酵的抗氧化乳酸菌,为进一步控制腌干鱼制品过度脂质氧化,优化腌干鱼的加工工艺提供理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

蓝圆鲹体长30~40 cm,体质量250~350 g;带鱼体长70~110 cm,体质量500~700 g;两种鱼均购自广州华润万家超市,为捕捞后冰鲜品,死后48~72 h购至实验室,运回实验室后立即处理,部分实验鱼的鱼肉直接被取出冷藏,次日提取细菌DNA,另一部分鱼进行腌干加工,采用同样方法提取细菌DNA。

细菌基因组DNA提取试剂盒(D3350),美国Omega bio-tek公司;正相引物515F(5'-GTGCCA-GCMGCCGCGGTAA-3')和反相引物806R(5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')由深圳华大基因有限公司合成;Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix,英国Biolabs公司;GeneJET胶回收试剂盒,美国Thermo Scientific公司;MRS培养基,广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

MiSeq PE250测序仪,美国Illumina公司;PCR仪,美国BIO-RAD公司;SQ510C全自动高压灭菌锅,日本Yamato公司;Sigma-3K30高速冷冻离心机,美国Sigma公司;SA-900-1JZ超净工作台,上海稼丰有限公司;HH-4数显水浴锅,常州澳华仪器;SHP-150生化培养箱,上海精宏公司。

1.3 实验方法

腌干鱼加工取样方法 按照传统广东咸鱼的制作方法腌干加工^[16-17],主要包括去内脏清洗、置盐腌制(室温16~18℃,2~3 d)、漂洗过夜后沥干、恒温烘干[(30±2)℃,2~4 d]等步骤,粗盐用量为鱼体总质量的20%,还要加入饱和粗盐水淹没鱼体。在整个腌干加工过程中取样,对于蓝圆鲹,分别为原料(L);腌制阶段:腌制1 d(L1)和腌制2 d(L2);漂洗阶段(L3);干燥阶段:干燥1 d(L4)和干燥2 d(L5),这6种蓝圆鲹样品在宏基因组建库中样品分组归为Group 1。对于带鱼,分别为原料(D);腌制阶段:腌制1 d(D1)和腌制2 d(D2);漂洗阶段(D3);干燥阶段:干燥1 d(D4)、干燥2 d(D5)和干燥3 d(D6),这7种带鱼样品在宏基因组建库中样品分组归为Group 2。每种鱼在每个阶段分别取5尾,取其背部肌肉作为试材,置于无菌自封袋中,立即取用或置于-20℃冰箱备用。

细菌总DNA的提取 无菌剪取25 g鱼肉,用无菌生理盐水配制成1:10的混合液,振荡混匀,取1 mL混合液置于9 mL灭菌LB肉汤培养基中培养24 h。采用美国Omega科技有限公司的细菌基因组DNA提取试剂盒(D3350)进行DNA的提取,提取步骤参照试剂盒说明书。

16S rDNA V4片段的PCR扩增及琼脂糖凝胶电泳 设计细菌的16S rDNA序列V4片段扩增的通用引物^[18],正反向引物分别选用515F和

806R。PCR反应体系包括DNA: 2 μ L (含30 ng); PCR引物(正反向): 各2 μ L; Phusion[®] PCR高保真酶(PCR Master Mix)^[19]: 25 μ L; 双蒸水ddH₂O: 19 μ L; 整个体系50 μ L。PCR反应程序: 98 °C预变性+变性(3 min+45 s), 55 °C退火(45 s), 72 °C延伸(45 s), 共30个循环; 最后72 °C终止反应7 min。使用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物, 使用Thermo Scientific公司的GeneJET胶回收试剂盒回收产物。

1.4 宏基因组MiSeq测序及数据分析

将PCR扩增产物送至深圳华大基因有限公司进行宏基因组建库(NEB Next[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina), 并于Illumina MiSeq PE250 (PE251+8+251)上机测序。样品通过barcode合并建库, 建库的样品分组为Group 1和Group 2, 为了去除原始数据中的干扰数据, 下机数据(raw data)经过Qiime软件过滤得到Clean Data后, 使用软件FLASH^[20](Fast Length Adjustment of Short reads, v1.2.11)进行序列拼接, UCHIME Algorithm (v4.2.40)^[21]软件去除嵌合体后, 将对reads组装成一条序列, 利用重叠关系得到高变区的Tags^[22], 先后利用软件USEARCH (v7.0.1090)^[21]和RDP classifier (v2.2)将拼接好的Tags进行97%水平上聚类, 形成操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),

并将有代表性的OTU与Greengene数据库比对, 在置信度阈值为0.8下进行物种注释^[23], 并用R (v3.1.1)软件绘制主成分分析(PCA)图。同时利用赵氏指数(Chao index)、艾斯指数(ACE index)、香农指数(Shannon index)及辛普森指数(Simpson index)来计算Alpha多样性(Alpha diversity), 为了评价测序深度^[24], 利用Mothur软件做稀释曲线(rarefaction curve), 最后通过对OTUs进行丰度和多样性分析, 得到菌相结构组成^[25-26]。

2 结果

2.1 腌干鱼制品菌群多样性分析

采用Illumina Miseq测序平台, 经拼接、过滤, 蓝圆鲹和带鱼在腌干加工过程中的13个样品一共得到341 355条、平均长度为252 bp的序列(tags), 平均每个样品26 258条, 其中蓝圆鲹获得157 238条序列, 带鱼获得184 117条序列, 带鱼微生物多样性略高于蓝圆鲹, 利用赵氏指数、艾斯指数、香农指数及辛普森指数对单个样品的物种进行Alpha多样性的分析^[27], 假如赵氏指数、艾斯指数、香农指数越大, 而辛普森指数越小, 则说明样品中的微生物物种越丰富。不同加工阶段的样品Alpha多样性指数如表1所示, 蓝圆鲹和带鱼都在原料阶段微生物种类最丰富,

表1 蓝圆鲹和带鱼腌干加工过程中Alpha多样性

Tab. 1 Alpha diversity measurement in *D. Maruadsi* and *T. lepturus* during dried- salted processing

样品 samples	OTUs	赵氏指数 Chao index	艾斯指数 ACE index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index
L	24	29.00	29.02	1.46	0.31
L1	18	21.00	22.23	0.03	0.99
L2	23	24.20	29.85	1.04	0.48
L3	23	28.00	27.31	1.09	0.42
L4	17	22.00	32.75	0.69	0.53
L5	10	10.50	12.61	0.80	0.49
D	42	43.00	43.24	2.56	0.13
D1	30	33.75	35.07	1.58	0.28
D2	29	39.00	32.90	1.42	0.36
D3	28	29.00	33.36	1.19	0.41
D4	28	28.00	28.63	1.46	0.35
D5	22	22.33	23.47	1.44	0.34
D6	16	16.20	17.31	1.05	0.41

腌制阶段微生物多样性则都呈下降趋势, 可能由于大部分微生物不耐盐, 蓝圆鲹在漂洗阶段微生物多样性略有回升, 可能是由于脱盐处理, 另外还可能因为鱼肉充分暴露在空气中使得细菌多样性增加, 带鱼则不明显, 最后的干燥阶段两种鱼的微生物多样性都明显减少, 可能是水分活度明显降低导致; 原料阶段, 带鱼的微生物多样性明显高于蓝圆鲹, 但到了最后的烘干阶段, 两种鱼则差别不大, 说明带鱼的微生物多样性的减少程度大于蓝圆鲹。总体上微生物多样性均呈现下降趋势。图1为Alpha多样性各项指标的稀释曲线, 由图可表明测试数据是比较合理的, 因为各样品曲线均已达到平坦期, 测序深度已基本覆盖样品中所有微生物。

通过Group 1和Group 2组间Alpha多样性盒形图, 按分析指数分组的结果, 可更直观显示组

间Alpha多样性差异。Group 2中的赵氏指数、艾斯指数、香农指数都明显大于Group 1, 而辛普森指数则比Group 1的小, 说明整体而言, 带鱼的微生物种类比蓝圆鲹丰富(图2)。

2.2 OUT PCA分析

图3显示两组样品(Group 1和Group 2)基于OUT丰度的PCA分析结果, 两组样品聚类在一起, PCA获得主成分PC1的方差贡献率为35.32%, 主成分PC2的方差贡献率为20.08%, 从图中可以看出, Group 1和Group 2分别有3个和4个样品距离较近, 表明这些样品的微生物群落组成较相似, 其中Group 2有2个样品几乎没有距离, 说明在微生物组成上几乎一致。

2.3 腌干鱼制品菌群结构变化分析

两种鱼在加工过程中的细菌多样性十分丰富,

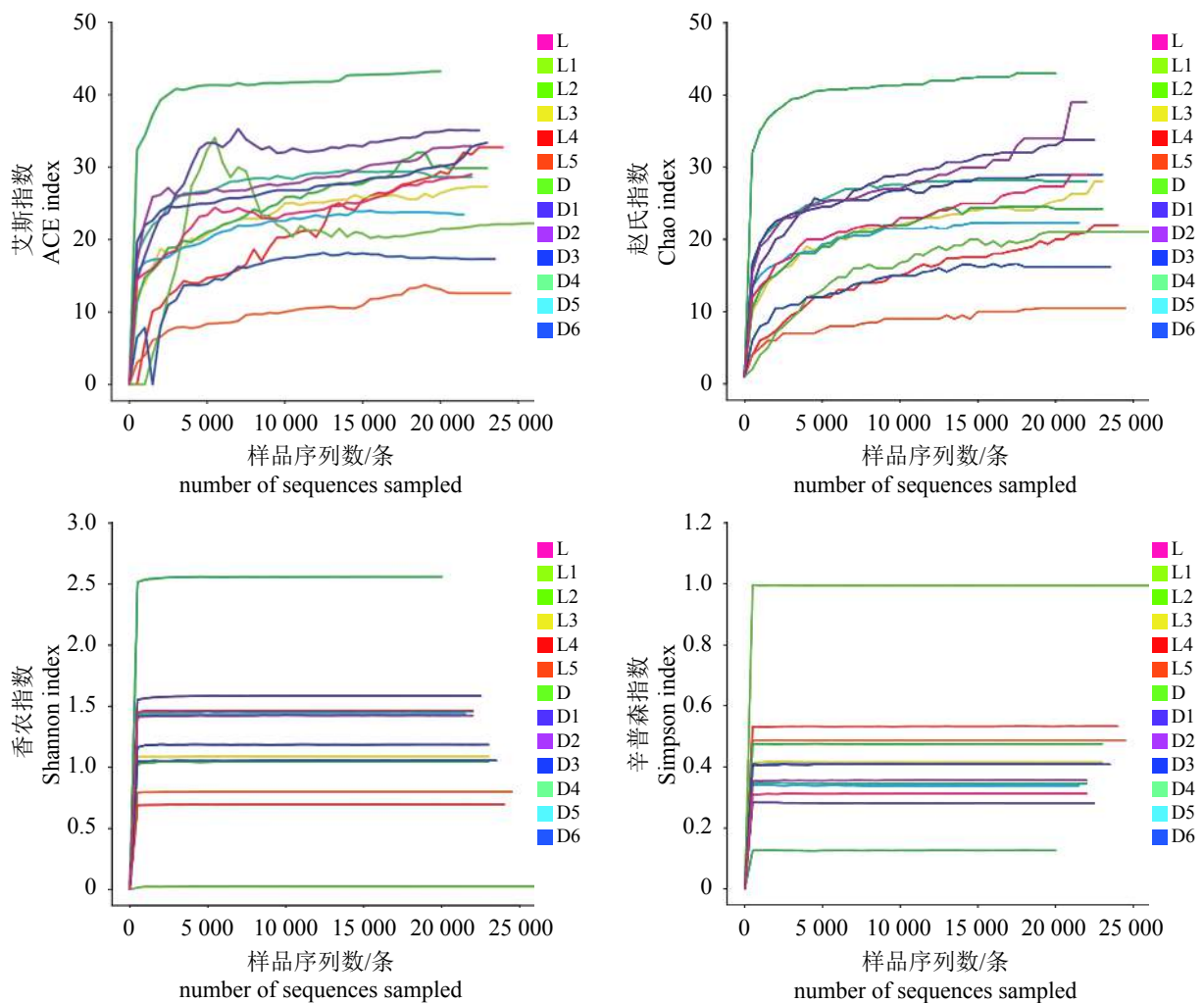


图1 表示样品中微生物Alpha多样性的指数稀释曲线图

Fig. 1 The Alpha diversity indices' rarefaction curve of samples

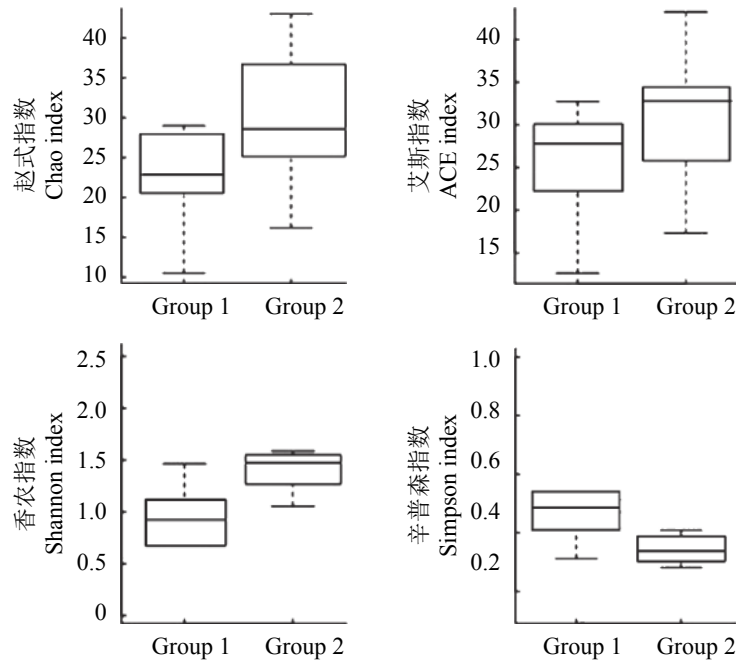


图2 组间Alpha多样性盒形图

Fig. 2 Alpha diversity indices boxplot among groups

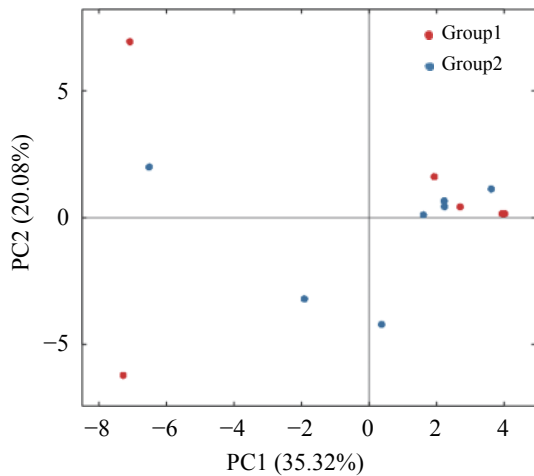


图3 基于OTU丰度的PCA分析

Fig. 3 PCA based on OTU abundance

通过与数据库进行比对,对OTU进行物种分类并在门(Phylum)和科(Family)这两个分类等级对各个样品作物种profiling面积图和柱状图(图4,图5),从图中可以直观看出不同物种在每个样品中所占的比例,将所有样品中丰度均低于0.5%的物种全部合并成Others,一般定义相对丰度 $\geq 20\%$ 的菌群为优势菌群。

蓝圆鲈和带鱼的菌相都主要分布在变形菌门(Proteobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes),这两种门类的细菌在蓝圆鲈的6个样品中平均占57.4%

和42.6%,而在带鱼的7个样品中平均占52.2%和46.2%,另外带鱼还存在少量拟杆菌门(Bacteroidetes),平均占比为1.6%(图4)。

图5从科水平(Family)描述蓝圆鲈及带鱼在腌干加工过程中微生物菌群结构变化。在科水平上,带鱼的细菌群落多样性明显强于蓝圆鲈,这与前面的Alpha多样性分析结果一致。根据优势菌群的定义,蓝圆鲈原料(L)初始菌相中优势细菌为肠杆菌科(Enterbacteriaceae)、肠球菌科(Enterococcactae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae),分别占47%、29%和20%,此外还包括芽孢杆菌科(Bacillaceae)、莫拉菌科(Moraxellaceae)、希瓦氏菌科(Shewanellaceae)和弧菌科(Vibrionaceae)等,总共含7个科的细菌。而腌制初始(L1)样品中仅含芽孢杆菌科(Bacillaceae),这和杨培周等^[28]研究的臭鳊鱼发酵阶段,芽孢杆菌占比90.8%有些类似,因为芽孢杆菌为耐盐菌,可耐受10%以上的盐浓度,其他菌种都几乎被抑制了;而到了腌制后期(L2)菌群又有所恢复,可能部分微生物适应了高盐的环境,此时优势菌群为弧菌科和动球菌科(Planococcaceae),分别约占64%和25%;到了干燥阶段,蓝圆鲈中的菌相明显变得单一,只含弧菌科和葡萄球菌科(Staphylococcaceae),而且占绝对优势,在L4中分别占62%和38%,而在L5中则分别占58%和42%。带

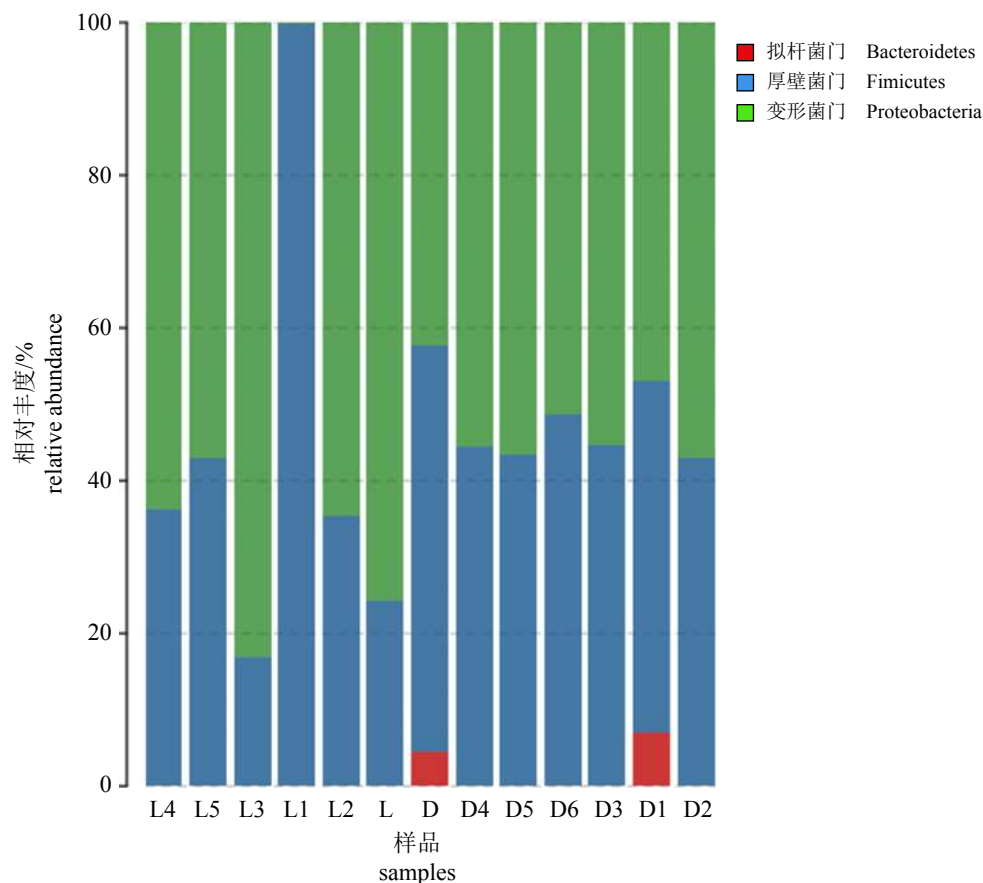


图 4 基于门水平腌干鱼加工过程中细菌群落结构

Fig. 4 Phylum-level community structure of bacteria during the curing processing of dried-salted fish

鱼原料(D)初始菌相中优势菌群为肠杆菌科和动球菌科(Planococcaceae), 分别约占26%和23%, 此外还包括非优势菌的莫拉菌科、弧菌科、梭菌科(Clostridiaceae)、葡萄球菌科、希瓦氏菌科、假单胞菌科、乳杆菌科(Lactobacillaceae)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、肠球菌科(Enterococcaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)、链球菌科(Streptococcaceae)、芽孢杆菌科和气单胞菌科(Aeromonadaceae), 总共15种菌群, 两种鱼原料都以肠杆菌科为优势菌, 说明卫生状况都不佳, 蓝圆鲹原料中的菌群全部出现在带鱼原料中, 而带鱼却另外包含蓝圆鲹不具有的8种初始菌, 带鱼原料的菌群多样性远超出蓝圆鲹。带鱼从腌制阶段(D1和D2)开始, 菌群减少了一半以上, 烘干的最后阶段(D6)菌群最少, 只有3种, 其中弧菌和芽孢杆菌为优势菌, 分别占50%和37%。在带鱼的整个腌干阶段, 弧菌都作为优势菌, 占比50%~57%, 另一种作为优势菌的链球菌出现在D2、D3、D4和D5中, 分别占22%、35%、33%和20%, D1和D6则以芽孢杆菌为优势

菌, 都约占38%。在腌干加工过程中, 蓝圆鲹出现过的优势菌有弧菌科、芽孢杆菌科和葡萄球菌科, 也是在蓝圆鲹6个样品中平均含量最高的, 分别占40.3%、16.7%和16.7%, 而带鱼出现过的优势菌则包括弧菌科、链球菌科和芽孢杆菌科, 同样平均含量最高, 分别占42.2%、17.1%和13.3%。乳酸菌中, 仅有带鱼检测出链球菌科为优势菌, 乳杆菌科出现在D、D2和D5中, 但相对丰度<20%, 不能作为优势菌。

3 讨论

3.1 蓝圆鲹和带鱼腌干过程中微生物多样性差异

通过宏基因组MiSeq测序平台对腌干鱼加工过程中微生物群落的多样性进行分析, 结果显示, 蓝圆鲹和带鱼在腌干加工过程中的13个样品共获得341 355条细菌序列, 其中蓝圆鲹获得157 238条序列, 带鱼获得184 117条序列, 带鱼腌干加工过程中的细菌多样性略高于蓝圆鲹。Alpha多样性分析表明, 在初始原料中, 带鱼的

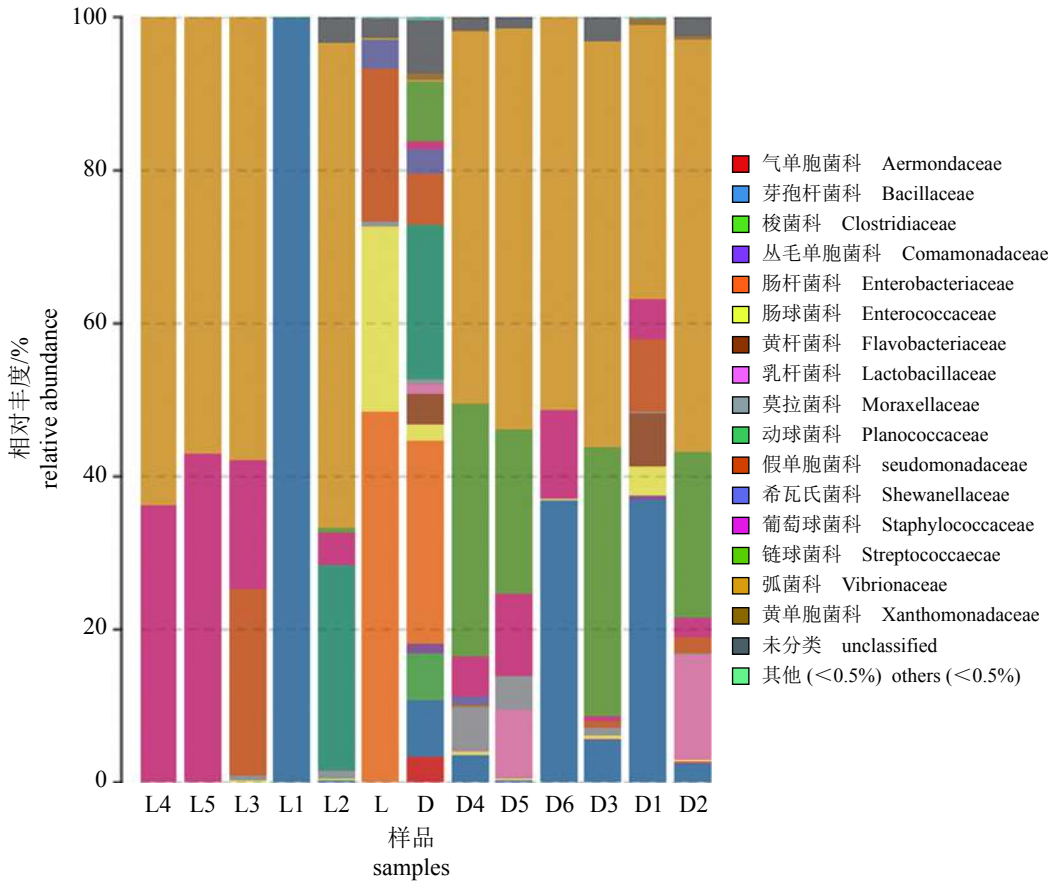


图 5 基于科水平腌干鱼加工过程中细菌群落结构

Fig. 5 Family-level community structure of bacteria during the curing processing of dried-salted fish

物种多样性明显多于蓝圆鲈，但到了最后的烘干阶段，两种鱼则差别不大，说明带鱼的物种多样性的减少程度大于蓝圆鲈，总体上两种鱼的细菌物种多样性均呈现下降趋势。PCA分析表明，每组共有7个样品的微生物群落组成较相似。

3.2 蓝圆鲈和带鱼在腌干加工过程中菌相组成差异

本研究从门和科水平上探讨了蓝圆鲈及带鱼在腌干加工过程中微生物菌群结构变化及差异，门水平上，蓝圆鲈和带鱼的菌相都主要分布在变形菌门和厚壁菌门，此外带鱼还存在少量拟杆菌门，平均占比为1.6%。

科水平上，初始原料中蓝圆鲈的菌群数只含7个科的细菌，远远少于带鱼的15个科，带鱼中含有而蓝圆鲈中没有的菌群包括动球菌科、梭菌科、葡萄球菌科、乳杆菌科、黄杆菌科、丛毛单胞菌科、链球菌科和气单胞菌科。其中肠杆菌科作为共同的优势菌，在蓝圆鲈和带鱼中分别占47%和26%。此外，蓝圆鲈还包括肠球

菌科、假单胞菌科作为优势菌，分别占29%和20%，而带鱼则包括动球菌科，占25%。在腌干加工过程中，两种鱼的菌群数都大量减少，弧菌科和芽孢杆菌科作为共有的优势菌，前者平均占蓝圆鲈和带鱼的40.3%和42.2%，后者则平均占比16.7%和13.3%。此外，蓝圆鲈的其他优势菌包括葡萄球菌科，平均占比16.7%，带鱼的其他优势菌则是链球菌科，平均占比17.1%。

3.3 蓝圆鲈和带鱼在腌干加工过程中腐败菌的变化

蓝圆鲈和带鱼都属于多脂鱼类，其脂肪含量>5%，二者的差异在于前者为红肉鱼，后者为白肉鱼。一般而言，红肉鱼的肌肉含有含氧量丰富的红色蛋白质^[29]，能够随时从周边的血管中摄取新鲜的氧，因此耐力极好，适合在深海中生存，新鲜的鱼类其肌肉中是无菌的，但其黏液、鳃和肠道中存在大量的微生物，是导致鱼体容易腐败及产生组胺等有毒物质的原因，尤其是红肉鱼的组胺含量通常较高，而引起腐败

的微生物, 包括假单胞菌和希瓦氏菌等嗜冷菌以及肠杆菌科、弧菌属(*Vibrio*)和气单胞菌属(*Aeromonas*)等嗜温菌^[30]。

初始原料D和L的微生物群落中都包括了肠杆菌科、假单胞菌科、希瓦氏菌科和弧菌科, 带鱼中还含有气单胞菌科。其中蓝圆鲈中肠杆菌科和假单胞菌科为优势菌, 带鱼中则只有前者为优势菌, 两种鱼原料的腐败菌种类很相似, 也有共同的优势腐败菌。但随着腌干加工的进行, 两种鱼都从腌制阶段开始腐败菌明显减少, 从L2和D1开始, 优势腐败菌都只有弧菌科, 不仅优势菌减少较明显, 而且腐败菌几乎被抑制, 说明腌干加工有利于降低鱼类腐败发生的可能性, 从而便于贮藏, 而且两种鱼的腐败菌从原料到整个腌干加工过程中的变化基本一致。

3.4 蓝圆鲈和带鱼在腌干加工过程中乳酸菌的变化

本研究的目的在于筛选具有抗氧化功能的乳酸菌, 在腌干加工过程中, 蓝圆鲈几乎不含乳酸菌, 链球菌科和乳杆菌科在蓝圆鲈中的平均含量仅为0.1%和0%, 但是在带鱼中平均含量则为17.1%和3.5%, 除了D、D1和D6, 链球菌科在带鱼中都作为优势菌出现, 含量特别高的阶段为D3和D4, 分别占35%和33%。乳杆菌科虽不是优势菌, 但在D2和D5中含量较高, 约占15%和10%。故后续研究若要筛选乳酸菌, 则可选择带鱼的漂洗(D3)和干燥(D4)以及带鱼的腌制(D2)和干燥(D5)后期的样品作乳杆菌科的分离。宏基因组Illumina平台的Mi-Seq技术为精准地筛选某类菌群提供了可靠的方法和手段。

参考文献:

- [1] 曾令彬, 熊善柏, 王莉. 腊鱼加工过程中微生物及理化特性的变化[J]. *食品科学*, 2009, 30(3): 54-57.
Zeng L B, Xiong S B, Wang L. Changes in microbe quantity and physico-chemical properties during processing of cured silver carp[J]. *Food Science*, 2009, 30(3): 54-57(in Chinese).
- [2] Sampaio G R, Saldanha T, Soares R A M, *et al.* Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1383-1390.
- [3] Sanches-silva A, Costa D, Albuquerque T G, *et al.* Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review[J]. *Food Additives & Contaminants-Part A: Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2014, 31(3): 374-395.
- [4] 曾雪峰. 淡水鱼发酵对酸鱼品质影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 13-21.
Zeng X F. Study on the effect of Suan Yu property of fermented freshwater fish[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013: 13-21(in Chinese).
- [5] Matamoros S, Pilet M F, Gigot F, *et al.* Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(6): 638-644.
- [6] Kuda T, Kawahara M, Nemoto M, *et al.* *In vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku Satoumi region in Japan[J]. *Food Research International*, 2014, 64: 248-255.
- [7] 王悦齐, 李来好, 蔡秋杏, 等. 分离自腌干鱼的抗氧化发酵菌株的筛选及鉴定[J]. *南方水产科学*, 2016, 12(3): 74-83.
Wang Y Q, Li L H, Cai Q X, *et al.* Screening and identification of antioxidant starter culture strains from salted dried fish[J]. *South China Fisheries Science*, 2016, 12(3): 74-83(in Chinese).
- [8] 游刚, 吴燕燕, 李来好, 等. 添加复合乳酸菌再发酵对腌干鱼肉微生物、亚硝酸盐和亚硝胺的影响[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(4): 109-115.
You G, Wu Y Y, Li L H, *et al.* Effect of inoculating compound lactic acid bacteria on microbial, nitrites and nitrosamines of salted fish[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 109-115(in Chinese).
- [9] 农业农村部渔业渔政管理局. 2018中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. 2018 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China agriculture press, 2018(in Chinese).
- [10] 李燕, 吴佳佳, 张井, 等. PCR-DGGE技术分析传统臭鳊鱼发酵过程中细菌群落结构[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 29-34.
Li Y, Wu J J, Zhang J, *et al.* PCR-DGGE analysis of bacterial community structure in stinky mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Food Science*, 2017, 38(18): 29-

- 34(in Chinese).
- [11] Kouakou A C, N'Guessan K F, Durand N, *et al.* Molecular bacterial characterization and free amino acids composition in Ivorian traditional fermented fish produced by two methods[J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(5): 1125-1136.
- [12] Marui J, Boulom S, Panthavee W, *et al.* Culture-independent analysis of the bacterial community during fermentation of *pa-som*, a traditional fermented fish product in Laos[J]. *Fisheries Science*, 2014, 80(5): 1109-1115.
- [13] 张家松, 段亚飞, 张真真, 等. 对虾肠道微生物菌群的研究进展[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(6): 114-119.
Zhang J S, Duan Y F, Zhang Z Z, *et al.* Research progress of intestinal microbial flora in shrimp[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(6): 114-119(in Chinese).
- [14] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, *et al.* Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products[J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): R245-R249.
- [15] 谢萍, 徐明生, 尹忠平, 等. MiSeq测序研究散装酱卤鸭肉贮藏期间微生物群落多样性[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(11): 120-126.
Xie P, Xu M S, Yun Z P, *et al.* MiSeq sequencing to study the diversity of Microflora in Bulk-marinated duck meat during storage[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(11): 120-126(in Chinese).
- [16] 蔡秋杏, 吴燕燕, 李来好, 等. 厦门白姑鱼腌制加工过程中的脂肪酸变化分析[J]. *食品科学*, 2015, 36(12): 76-81.
Cai Q X, Wu Y Y, Li L H, *et al.* Changes in fatty acids during salting and drying of white croaker (*Argyrosomus amoyensis*)[J]. *Food Science*, 2015, 36(12): 76-81(in Chinese).
- [17] 陈胜军, 杨贤庆, 樊丽琴, 等. 蓝圆鲈在不同腌制条件下三甲胺和二甲胺含量变化规律[J]. *食品科学*, 2012, 33(13): 58-61.
Chen S J, Yang X Q, Fan L Q, *et al.* Change regularity of trimethylamine and dimethylamine contents in *Decapterus maruadsi* during salting under varying conditions[J]. *Food Science*, 2012, 33(13): 58-61(in Chinese).
- [18] 陈泽斌, 李冰, 王定康, 等. Illumina MiSeq高通量测序分析核桃内生细菌多样性[J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(5): 1129-1133.
Chen Z B, Li B, Wang D K, *et al.* Diversity of endophytic bacteria in walnut analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 31(5): 1129-1133(in Chinese).
- [19] 陈泽斌, 李冰, 王定康, 等. 应用Illumina MiSeq高通量测序技术分析玉米内生细菌多样性[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(2): 113-120.
Chen Z B, Li B, Wang D K, *et al.* Study on the diversity of endophytic bacteria in maize using Illumina MiSeq high-throughput sequencing system[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(2): 113-120(in Chinese).
- [20] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [21] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2194-2200.
- [22] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 57-59.
- [23] DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [24] 曾燕, 简平, 倪学勤, 等. Illumina MiSeq测序平台测定蒙古羊瘤胃液相和固相菌群多样性[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(10): 3256-3262.
Zeng Y, Jian P, Ni X Q, *et al.* Bacteria community diversity of liquid and solid phases of ruminal contents of Mongolian sheep analyzed by Illumina MiSeq platform[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(10): 3256-3262(in Chinese).
- [25] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, *et al.* Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [26] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, *et al.* Microbial

- diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2006, 103(32): 12115-12120.
- [27] Hayat K, Zhang X M, Farooq U, *et al.* Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace[J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(2): 423-429.
- [28] 杨培周, 钱静, 姜绍通, 等. 臭鳊鱼的质构特性、特征气味及发酵微生物的分离鉴定[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(4): 55-62.
- Yang P Z, Qian J, Jiang S T, *et al.* Texture properties, characteristic smell, microbial isolation and identification of smelly mandarin fish[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(4): 55-62(in Chinese).
- [29] 刘书臣, 廖明涛, 赵巧灵, 等. 不同贮藏温度下大目金枪鱼鲜度及组胺变化[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(5): 213-218.
- Liu S C, Liao M T, Zhao Q L, *et al.* Study on the freshness and histamine variation of big eye tuna during storage temperatures[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(5): 213-218(in Chinese).
- [30] 蒋倩倩, 戴志远, 赵巧灵, 等. 冰藏鲈鱼中组胺的产生及腐败微生物的变化[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(8): 219-224.
- Jiang Q Q, Dai Z Y, Zhao Q L, *et al.* Histamine production and spoilage microorganisms variation of the ice-stored mackerel[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(8): 219-224(in Chinese).

Comparative analysis of microflora during salt-dried processing of two fatty fishes based on Illumina MiSeq technology

CAI Qiuxing^{1,2}, WU Yanyan¹, LI Laihao^{1*}, YANG Xianqing¹,
ZHAO Yongqiang¹, YANG Shaoling¹, WANG Yueqi^{1,3}

(1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
South China Sea Fisheries Research Institute,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Development and High-value Utilization of Beibu Gulf Seafood Resources,
College of Food Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou 535099, China;

3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China)

Abstract: By comparing the changes of the microflora during salted-dried processing of the red-fleshed fish (*Decapterus maruadsi*) and the white-fleshed fish (*Trichiurus lepturus*), the dominant bacterium with antioxidant activity was also studied. In this paper, MiSeq sequencing technology was utilized in two kinds of fish in different processing phases. The results showed that the microflora of the two fishes was mainly distributed in Bacteroidetes and Proteobacteria. At the family level of the initial material, there were 7 and 15 colonies in *D. maruadsi* and *T. lepturus*, respectively. All the species in round scad were totally in *T. lepturus* and Enterbacteriaceae was as common dominant bacteria, accounted for 47% and 26% in *D. maruadsi* and *T. lepturus* respectively. From the start of salting, the number of bacteria in both fishes was greatly reduced. Vibrionaceae and Bacillaceae were the common dominant bacteria, the former accounted for an average of 40.3% and 42.2% of *D. maruadsi* and *T. lepturus*, and the latter accounted for an average of 16.7% and 13.3%. Among the raw materials, four spoilage bacteria of Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Vibrionaceae, and Shewanellaceae were showed in both fishes. The dominant spoilage bacteria in both fishes during salt-dried processing was Vibrionaceae. Lactic acid bacteria (LAB), including Streptococcaceae and Lactobacillaceae, only appeared in *T. lepturus*. Therefore, during salt-dried processing, the degree of reduction of bacteria in hairtail was greater than that of round scad, and they all showed a decrease. The two fishes contained common bacteria and dominant bacteria, but showed significant differences. The spoilage bacteria of both fishes have been greatly reduced, suggesting that salt-dried processing is beneficial to reducing the possibility of fish corruption. *T. lepturus* could be selected for LAB isolation for subsequent antioxidant studies.

Key words: fatty fishes; salt-dried processing; microflora; Illumina MiSeq technology; dominant bacterium

Corresponding author: LI Laihao. E-mail: laihaoli@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31571869); China Agriculture Research System (CARS-47)