

贵州传统自然发酵牛干巴中风味品质与 细菌群落多样性分析

刘涵玉¹, 何腊平^{1,2,*}, 李翠芹³, 陈翠翠¹, 郑佳¹, 朱秋劲^{1,2}, 陶茵^{1,2}

(1. 贵州大学 酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省农畜产品贮藏与加工重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州大学 化学与化工学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 分析贵州传统自然发酵牛干巴中风味品质与细菌群落的多样性。为分析贵州牛干巴中风味组成, 用顶空固相微萃取-气相色谱质谱联用方法结合保留指数对其挥发性风味成分进行定性定量。运用高通量测序技术对采集的3种传统发酵牛干巴的细菌菌落进行检测。结果表明: 3组贵州牛干巴共鉴定出67种烃、醛、醇、酮等挥发性风味成分, 以醇类和烃类化合物较多。通过对不同风味形成途径分析发现: 香辛料自身风味、牛肉中氨基酸的strecker反应和脂肪氧化是贵州牛干巴风味的主要来源。传统发酵牛干巴中主要优势菌是变形菌门和厚壁菌门(葡萄球菌属、乳酸菌属和嗜冷杆菌属), 3号牛干巴还存在科贝特氏菌属优势菌, 这是贵州牛干巴特有的。不同种类牛干巴中细菌菌属结构存在一定差异。进一步分析发现牛干巴中风味品质与细菌群落多样性之间的有一定关系, 微生物对风味有贡献, 但贵州牛干巴的特征风味却主要来源于香辛料。

关键词: 牛干巴; 挥发性物质; 主成分分析; 高通量测序; 优势菌

Analysis of Volatile Components and Bacterial Community Diversity in Guizhou Niuganba

LIU Han-yu¹, HE La-ping^{1,2,*}, LI Cui-qin³, CHEN Cui-cui¹, ZHENG Jia¹, ZHU Qiu-jin^{1,2}, TAO Han^{1,2}

(1. School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Store & Processing of Guizhou Province, Guiyang

550025, Guizhou, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University,

Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: The flavor quality and bacterial community diversity of Guizhou traditional natural dry-cured beef named as Niuganba were analyzed in this paper. In order to analyze the flavor composition of Guizhou Niuganba, the volatile flavor components were qualitatively quantified by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry combined with retention index. And high-throughput sequencing technology was used to detect the bacterial colonies of the Niuganba. The results showed that a total of 67 kinds of volatile substances such as hydrocarbons, aldehydes, alcohols and ketones were identified in the three groups of Guizhou Niuganba, with more alcohols and hydrocarbons. Through the flavor formation pathway and principal component analysis, it was found that the spice, the strecker reaction of amino acids and fat oxidation contributed to the unique flavor of Guizhou Niuganba. The traditional fermented Niuganba was rich in bacterial diversity. The main dominant phylum are proteobacteria and finnucutes, and staphylococcus, staphylococcus and psychrobacter were the dominant genus. No. 3 Niuganba also had the dominant genus of cobetia, which was unique to Guizhou Niuganba. There were some differences in the structure of bacteria in different types of

基金项目: 国家自然科学基金(31870002, 31660010); 贵州省农业攻关项目(黔科合支撑[2019]2382、黔科合支撑[2016]2580); 黔科合平台人才项目([2017]5788-11、[2018]5781)

作者简介: 刘涵玉(1992—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程。

* 通信作者: 何腊平(1972—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 食品发酵工程、生物催化与生物转化。

Niuganba. Further analysis found that there was a certain relationship between the flavor quality of the Niuganba and the diversity of the bacterial community. Microorganisms contribute to the flavor, but the characteristic flavor of Guizhou Niuganba was mainly derived from spices.

Key words: Niuganba; volatile substances; principal component analysis; high-throughput sequencing; dominant bacteria

引文格式:

刘涵玉,何腊平,李翠芹,等. 贵州传统自然发酵牛干巴中风味品质与细菌群落多样性分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(16):80-88

LIU Hanyu, HE Laping, LI Cuiqin, et al. Analysis of Volatile Components and Bacterial Community Diversity in Guizhou Niuganba[J]. Food Research and Development, 2019, 40(16):80-88

牛干巴属于干腌牛肉这一大类产品,是我国云南、贵州、新疆等地特色腊牛肉制品,具有风味独特、味道鲜美、食而不腻等特点^[1]。风味决定了消费者对产品的可接受程度。不同地区的牛干巴因其加工工艺、制作原料、气候等因素的不同,形成了不同的风味特征。已有学者对云南、新疆等地的牛干巴挥发性风味成分进行研究^[2-3]。沙坤等^[2]指出云南黄牛和牦牛干巴分别由 50 种和 42 种挥发性风味成分,并且确定了新疆不同地区的风干牛肉样品特征性香气成分:己烷、2-戊基-咪喃、1-辛烯-3-醇和部分醛类。Kaban 等^[4]报道了土耳其干腌牛肉中检测出 48 种挥发性风味成分,芳樟烃类是含量最丰富的化合物。但针对贵州牛干巴研究还未见报道。因此有必要对贵州牛干巴挥发性风味成分进行研究。

目前对牛干巴菌群结构的研究还是最传统的分离方法,由于传统培养方法的局限性,使其不能全面真实反应牛干巴中微生物的群落组成。因此有必要采用当前较先进成熟,价格适当的 illumina MiSeq 第二代高通量测序平台。

本试验以贵州省售牛干巴为材料,采用固相微萃取-气相色谱-质谱联用仪对其挥发性成分进行分析并结合主成分分析,找到贵州牛干巴的风味成分的组成,同时结合 illumina MiSeq 第二代高通量测序平台,评估牛干巴中细菌群落结构和多样性;在此基础上进一步分析牛干巴中风味品质与细菌群落多样性之间的关系,为牛干巴产品的风味品质评价,加深对牛干巴发酵机制的认识,以及生产工艺的优化提供科学依据。

1 方法与材料

1.1 材料与试剂

试验所用 3 组贵州干巴(真空包装)购于贵州兴义

农贸市场,样品编号分别为:牛干巴 1、2、3 号。样品购买后切成小块,真空包装,并储存于于 -80 °C 冷冻冰箱中备用。

正构烷烃(色谱纯):北京百灵威科技有限公司。

1.2 仪器与设备

7890A-7000B 气-质联用仪:美国安捷伦科技有限公司;DB-WAX 型色谱柱(250 μm × 0.25 μm, 30 m):美国 J&W Scientific 公司;固相微萃取装置(50/30 μm CAR/DVB/PMDS 固相微萃取头):美国 Supelco 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 感官评定

感官评定参照高月娥等^[5]的方法。由 10 位专家组成的评价小组分别从色泽、口感、气味、滋味和组织状态 5 个方面对牛干巴进行感官分析。

1.3.2 挥发性风味成分的测定

顶空固相微萃取条件:称取 3 g 肉样切碎成肉末,放入 20 mL 萃取瓶,密封,50 °C 条件下平衡 20 min。插入 50/30 μm CAR/DVB/PMDS 固相微萃取头进行吸附 40 min。转移插入气相色谱质谱仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)进样口,在 250 °C 温度下解析 7 min,同时启动仪器采集数。

气谱条件:毛细管柱为 DB-WAX 柱(250 μm × 0.25 μm, 30 m),程序升温:起始温度 40 °C,保持 3 min;然后 5 °C/min 的速度升温到 150 °C,保持 1 min;再以 3 °C/min 的速度升温到 200 °C,保持 1 min;最后以 5 °C/min 的速度升温到 230 °C,保持 3 min。气化室温度 250 °C;载气为 N₂,流速 6 mL/min,分流比 5:1。

质谱条件:电子电离源,电子能量 70 eV,接口温度 250 °C,离子源温度为 230 °C,四极杆温度 150 °C,传输线温度 280 °C。

定性定量分析:对总离子流图中的各峰采用

Nist2005 和 Wiley275 普库检索,取匹配度 70 % 以上,初步确定牛干巴的挥发性成分,再结合标准系列烷烃($C_7\sim C_{40}$)在相同气质条件下,根据保留时间,分别计算不同物质的保留指数(retention indices, RI),再结合网站 www.odour.org.uk 上的 RI 值进行化合物的鉴定。计算公式如下:

$$RI=100Z+100[TR(x)-TR(z)]/[TR(z+1)-TR(z)]$$

式中: $TR(x)$ 为待测组分保留时间, min; $TR(z+1)$ 为碳数为 $Z, Z+1$ 正构烷的保留时间, min; 且 $TR(z) < TR(x) < TR(z+1)$ 。

定量分析:采用峰面积归一化法确定各化学成分的相对含量。

主成分分析:对 3 种牛干巴样品相对含量大于

0.05 的挥发性成分借助 SPSS 20.0 进行主成分分析。

1.3.3 高通量测序

3 种牛干巴样品送北京百迈克生物科技有限公司,提取 DNA 后,进行扩增细菌 16S V3-V4 区并对其产物进行处理形成测序文库,质检合格后,可用 Illumina HiSeq 2500 进行测序。

1.4 数据处理

采用 SPSS 20.0 软件对相关数据进行方差分析(Duncan 法)。

2 结果与分析

2.1 感官评价

贵州牛干巴感官评价结果见表 1。

表 1 贵州牛干巴感官评价得分

Table 1 Sensory evaluation score of Guizhou Niuganba

样品	色泽	口感	气味	滋味	组织状态	感官评分
牛干巴 1 号	17.94±0.22 ^a	16.71±0.48 ^a	14.59±0.18 ^b	14.19±0.17 ^c	17.65±0.13 ^c	81.09±0.73 ^b
牛干巴 2 号	14.31±0.26 ^b	13.76±0.39 ^b	18.80±0.14 ^a	19.32±0.34 ^a	18.04±0.13 ^a	84.57±0.99 ^a
牛干巴 3 号	17.90±0.10 ^a	16.87±0.19 ^a	14.55±0.08 ^b	15.75±0.08 ^b	17.08±0.19 ^b	82.14±0.53 ^b

注:同一行数据标有不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

1 号和 3 号牛干巴色泽最好,切面呈玫瑰红,有光泽,感官评分显著高于 2 号牛干巴($P < 0.05$),2 号牛干巴切面脂肪偏黄,色泽深暗,并且口感方面较为绵软,咀嚼缺乏韧劲,因此口感感官评分也较低。但是 2 号牛干巴气味、滋味和组织形态得分均高于 1 号和 3 号牛干巴($P < 0.05$),拥有牛干巴专有香气,气味浓郁,香

味纯正,整体风味比例恰当,切面均匀光滑,组织纹理清晰。而 1 号和 2 号牛干巴中辛香料味道过重,掩盖了原本牛干巴的特有香气,整体风味不协调。

2.2 贵州牛干巴挥发性风味物质研究

贵州牛干巴挥发性风味成分的定性和定量分析结果见表 2。

表 2 贵州牛干巴挥发性风味成分的定性和定量分析

Table 2 Qualitative and quantitative analyses of volatile compounds detected in Guizhou Niuganba

编号	CAS 号	化合物	文献 RI 值	计算 RI 值	牛干巴 1 号/%	牛干巴 2 号/%	牛干巴 3 号/%
烃类							
V1	110-54-3	己烷				25.60	
V2	111-65-9	辛烷				1.53	
V3	13475-82-6	2,2,4,6,6-五甲基庚烷		860	0.13	11.16	
V4	124-18-5	癸烷 Decane	943	900		1.54	0.16
V5	2867-05-2	2-甲基-5-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]-2-己烯		925	0.15		
V6	7785-70-8	α -蒎烯	1 019	975		3.94	
V7	555-10-2	β -水芹烯	1 115	1 088	1.19		1.63
V8	17302-23-7	2,6-二甲基壬烷		1 109		0.55	
V9	123-35-3	β -月桂烯	1 145	1 139	1.03	1.26	2.02
V10	1002-43-3	3-甲基十一烷		1 152	0.06		0.11
V11	99-86-5	α -松油烯	1 156	1 160	0.11		0.26
V12	554-61-0	3-萜烯	1 162	1 160	0.11		0.26
V13	5989-27-5	右旋柠檬烯	1 175	1 175	3.12	3.58	

续表 2 贵州牛干巴挥发性风味成分的定性和定量分析

Continue table 2 Qualitative and quantitative analyses of volatile compounds detected in Guizhou Niuganba

编号	CAS号	化合物	文献 <i>RI</i> 值	计算 <i>RI</i> 值	牛干巴 1号/%	牛干巴 2号/%	牛干巴 3号/%
V14	138-86-3	柠檬烯	1 187	1 187			5.20
V15	3387-41-5	桉烯	1 192	1 200	0.48		
V16	28634-89-1	2-崖柏烯	1 171	1 199			0.75
V17	3779-61-1	反- β -罗勒烯	1 240	1 230	0.08		0.27
V18	99-85-4	γ -松油烯	1 250	1 240	0.24		0.67
V19	13877-91-3	罗勒烯	1 242	1 242	0.24		0.46
V20	99-87-6	对-伞花烃	1 268	1 264	0.12		0.32
V21	629-50-5	正十三烷	1 300	1 299	0.22		
V22	629-59-4	十四烷	1 400	1 400	0.10	0.41	0.16
V23	539-52-6	紫苏烯		1 413			0.07
V24	629-62-9	十五烷	1 500	1 501	0.18	1.04	0.08
V25	644-30-4	α -姜黄烯	1 781	1 781	0.07	0.19	0.21
		总计			7.62	50.80	12.63
		醛类					
V26	590-86-3	3-甲基丁醛	918	815		6.01	
V27	66-25-1	己醛	1 064	1 038	0.39		0.51
V28	111-71-7	庚醛	1 183	1 181	0.78		0.56
V29	124-13-0	辛醛	1 289	1 282	0.37		0.34
V30	57266-86-1	(E)-2-庚烯醛	1 319	1 318	0.14		
V31	124-19-6	壬醛	1 395	1 388	0.82	1.08	0.76
V32	2548-87-0	反-2-辛烯醛	1 425	1 425	0.08		
V33	4313-3-5	反,反-2,4-庚二烯醛	1 471	1 489	0.15		
V34	112-31-2	癸醛	1 494	1 494	0.28		0.07
V35	100-52-7	苯甲醛	1 530	1 520	0.42	0.69	0.22
V36	564-94-3	桃金娘烯醛		1 630	0.06		
V37	122-78-1	苯乙醛	1 614	1 637		3.74	
V38	2497-25-8	(E)-2-癸烯醛	1 632	1 639	0.19		
V39	2463-77-6	2-十一烯醛		1 748	0.04		
		总计			3.70	11.52	2.46
		醇类					
V40	470-82-6	桉叶油醇	1 211	1 203			3.26
V41	123-51-3	异戊醇	1 211	1 203		7.45	
V42	111-27-3	1-己醇	1 355	1 348	0.20	0.33	
V43	3391-86-4	1-辛烯-3-醇	1 450	1 445	0.12	0.60	0.12
V44	111-70-6	庚醇	1 455	1 451	0.15		0.07
V45	7299-41-4	1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己醇			0.75		1.36
V46	5989-33-3	顺- α,α -5-三甲基-5-乙烯基四氢化呋喃-2-甲醇		1 469	0.25		
V47	78-70-6	芳樟醇	1 547	1 544	71.41	1.73	66.57
V48	7299-41-4	1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己醇		1 548	0.78		0.91
V49	513-85-9	2,3-丁二醇	1 453	1 571	0.08	1.23	
V50	562-74-3	4-萜烯醇	1 601	1 601	0.83		1.40
V51	98-55-5	α -松油醇	1 670	1 678	0.65		1.52
V52	515033	顺-香桉醇		1 699	0.09		
V53	14049-11-7	2,2,6-三甲基-6-乙烯基四氢-2H-呋喃-3-醇		1 758	0.08		0.05

续表 2 贵州牛干巴挥发性风味成分的定性和定量分析

Continue table 2 Qualitative and quantitative analyses of volatile compounds detected in Guizhou Niuganba

编号	CAS 号	化合物	文献 RI 值	计算 RI 值	牛干巴 1 号/%	牛干巴 2 号/%	牛干巴 3 号/%
V54	99-48-9	顺-香茅醇	1 820	1 837	0.12	0.23	0.16
V55	100-51-6	苜醇	1 857	1 885	0.08		0.11
V56	60-12-8	苯乙醇	1 896	1 916	0.12	4.35	0.32
		总计			75.72	15.93	75.84
		酮类					
V57	513-86-0	乙偶姻	1 278	1 278	1.95	12.46	1.22
V58	1125-12-8	崖柏酮		1 420	0.66		0.81
V59	546-80-5	侧柏酮		1 440	0.64		0.95
V60	2244-16-8	右旋香芹酮		1 734			0.20
V61	90-24-4	花椒素			0.26	1.09	0.55
		总计			3.51	13.55	3.73
		其他					
V62	141-78-6	乙酸乙酯	884	901	2.17	1.58	1.02
V63	64-19-7	乙酸		1 472	1.91	3.43	1.24
V64	1124-11-4	2,3,5,6-四甲基吡嗪		1 474	0.20	0.21	0.08
V65	2179-57-9	二烯丙基二硫	1 483	1 477	0.06		
V66	78-36-4	丁酸芳樟酯		1 554	2.21		
V67	104-46-1	茴香脑	1 830	1 827	0.06		
		总计			6.60	5.22	2.34

烃类是 3 组牛干巴中检测种类最多的化学类别, 共有 25 种, 1 号牛干巴有 17 种 (7.62%), 2 号牛干巴 11 种 (50.8%), 3 号牛干巴 (12.62%)。烯烃类化合物种类相对较多, 原因可能与加入的辛香料有关。这类烯烃气味强烈, 阈值较低^[6], 对贵州牛干巴的风味有重要贡献。如 α -姜黄烯则存在于干姜等植物中^[7] 气味浓郁芳香。辛香料物质香气柔和, 风味醇香, 可同其他挥发性成分一起赋予牛干巴清香独特的风味^[8]。可见辛香料添加的种类和含量对贵州牛干巴挥发性风味成分有比较大的影响。

本试验共鉴定出 14 种醛类化合物, 它是牛肉主要挥发性风味物质。1 号牛干巴含有 12 种醛类 (3.7%), 3 号牛干巴含有 6 种 2.46%), 2 号牛干巴含有 4 种, 虽然数量最少, 但是含量都高于另外两组。醛类主要来自于脂肪氧化和斯特雷克尔 (strecker) 氨基酸反应^[9]。这些醛类当中, 直链脂肪醛、烯醛是典型的脂肪氧化的产物^[10], 检测到的戊醛、己醛、(E)-2-庚烯醛可能源于不饱和脂肪酸的氧化作用^[11]。而氨基酸的 strecker 降解可以形成支链醛, 如苯甲醛、苯乙醛等^[12-13]。醛类由于香气阈值一般较低, 且具有薄荷味^[14]、清香和油脂香气味特征, 对干腌肉制品的风味形成有重要贡献, 是肉类风味品质的重要评价标准之一^[15], 常被认为对不同种肉的特征香气有贡献^[16-17]。

醇类一般来源于微生物代谢 (苯乙醇等支链醇)、脂肪氧化或者是羰基化合物还原生成, 还有一部分来自辛香料中^[18], 比如, 桉叶油醇、芳樟醇、4-松油烯醇。此外, 3 组牛干巴中均检测出芳樟醇, 1 号和 3 号样品中的含量分别高达 75.72% 和 75.84%, 是含量最高的挥发性风味成分, 但 2 号含量只有 15.931%, 而这 1、3 号感官得分相近, 说明芳樟醇对 1、3 贵州牛干巴的风味成分具有较大贡献。

鉴定醇酮类 5 种, 在 3 组牛干巴中均含有乙偶姻、花椒素, 除乙偶姻来源于美拉德反应中糖降解反应外, 其他 4 种均来源于辛香料的添加。

另外还检测出 6 种其他类化合物。3 种牛干巴中均检测出乙酸乙酯、乙酸和 2,3,5,6-四甲基吡嗪, 乳酸菌通过糖代谢生成乙酰磷酸, 在乙酸激酶作用下可产生乙酸^[19]。而微生物的酯化作用, 可以使羧酸与醇类反应生成酯类, 酯类化合物对于食品风味的贡献很大。3 组样品中检测到了乙酸乙酯和丁酸芳樟酯。具有特殊香味的杂环化合物和硫醚类化合物, 分别来源于美拉德反应和硫醇类化合物反应^[20]。

通过这 3 组贵州牛干巴样品的挥发性风味成分进行分析, 与其他地区牛干巴产品比较, 发现其挥发性成分在种类与含量组成方面是有差异的。Weśnierska 等^[21], Kaban 等^[14] 发现, 微生物代谢作用也会形成干腌

牛肉风味,例如:3-甲基-1-丁醇,乙酸乙酯,己酸乙酯等。然而通过分析贵州牛干巴风味物质的来源,推测可知,辛香料的添加、氨基酸的 strecker 反应、脂肪氧化和微生物代谢作用是形成贵州牛干巴独特风味物质的重要途径。其风味成分以萜烯类、醇类和醛类为主,其中烃类物质种类最多,醇类物质含量最高(除 2 号样品)。这样的成分组成明显区别于其他地区牛干巴:伊犁风干牛肉以酚类物质为主,其次是烃类和醇类;塔城风干牛肉中,则是醛类物质含量最高,再以醇类和烃类为其次风味物质;在阿勒泰风干牛肉中,烃类物质含量高于醛类和醇类物质^[2]。云南牦牛干巴的风味组成中含量最高的是烃类,而醛类则是黄牛干巴的组成中含量最高的风味成分^[2]。其中阿勒泰牛干巴与云南牦牛干巴中的烃类物质主要是长链脂肪烃与含苯芳香烃类,这类烃类物质主要来源于原料肉中动物饲料的沉淀,区别于贵州牛干巴中主要来源于香辛料的萜烯类物质。

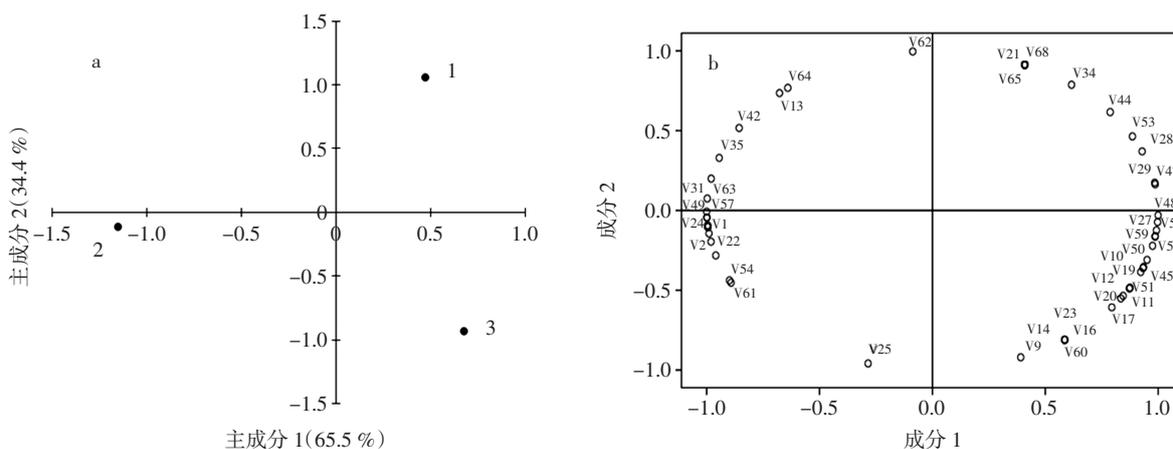
对比国外的干腌牛肉制品,土耳其 Pastirma 由于加工周期(1 个月左右)比较短,鉴定的挥发性化合物种类较少,总共有 48 种挥发性成分被鉴定,而芳香烃

类(甲苯)是成品中最丰富的成分。Weşierska 等^[21]的研究发现:不同部位的牛肉制成的干腌牛肉的挥发性成分的组成是不同的,而脂肪氧化和微生物代谢是形成风味物质的重要途径。通过对比国内外干腌牛肉制品可知:原料肉的性质差异、加工工艺的不同及配料使用的不同可能是导致各类产品风味组成差异的原因。

贵州牛干巴制作历时约 1 个月。较长的制作周期,给了脂肪足够的时间氧化分解,形成了多种醛类,同时氨基酸的 strecker 降解或微生物的代谢产生了醇类和其余风味物质,但通过感官评价发现,没有感受到明显油脂香气。而花椒、五香调料等辛香料,也就是烃类物质风味较为明显。出现这样的情况是因为贵州地区天气潮湿,肉制品易腐败变质。传统牛干巴中大量使用辛香料,可以达到抑菌、延长保质期的效果,同时这也导致牛干巴中辛香料风味过重,掩盖了其余风味,造成整体风味不协调,缺乏牛肉香味的情况。

2.3 主成分分析

为了进一步直观反映出不同牛干巴与其挥发性物质之间的关联性,对相对含量大于 0.5 的挥发性代谢物进行主成分分析,结果见图 1。



a. 得分散点图; b. 因子载荷图。

图 1 牛干巴风味成分主成分分析的得分散点图和因子载荷图

Fig.1 Score and corresponding loadings plots from principal component analysis of volatile aroma compounds

主成分 1 的方差贡献率为 65.5%,主成分 2 的方差贡献率为 34.4%,二者累计贡献率已覆盖风味品质信息。主成分 1 与(V48)1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己醇、(V47)芳樟醇、(V58)崖柏酮、(V55)苜醇、(V27)己醛等风味物质高度正相关,乙酸乙酯(V62)、2,3,5,6-四甲基吡嗪(V64)、二烯丙基二硫(V65)与主成分 2 高度正相关。说明 1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己醇、芳樟醇、崖柏酮、苜醇、己醛、乙酸乙酯等化合物是贵州牛干巴挥发性风味物质的主要特征化合物。由图 1a 可

知,3 种牛干巴样品根据其挥发性风味成分明显分为 3 个区域,并且相距都比较远,说明差异大,但 1、3 号感官评分却相近,这说明虽然差异大但也可得到类似的感官评分效果,不过其主体风味肯定不同。而且 1、3 号风味成分都显著多于 2 号,但感官评分低于 2 号,这说明不能仅靠添加更多的香辛料来提升牛干巴品质。改进牛干巴品质除了添加适当协调的香辛料外,还得通过改进其它工艺条件来完成。

图 1b 为香气物质载荷图,载荷系数反映了牛干巴

中各挥发性化合物对各主成分的影响。牛干巴 1 号在第一象限,正十三烷(V21)、癸醛(V34)、花椒素(V61)、乙酸乙酯(V62)对其影响显著,为其特征性成分,牛干巴 2 号在第三象限,与烃类(己烷(V1)、辛烷(V2))和顺-香茅醇(V54)、花椒素(V61)高度正相关,为其特征性成分,牛干巴 3 号在第四象限,与反- β -罗勒烯(V17)、3-甲基十一烷(V10)、 α -松油烯(V11)、 β 醇

(V55)、 α -松油醇(V51)等化合物呈正相关。综上所述,不同牛干巴与挥发性物质之间的相关性主要集中在来源于辛香料的烃类和醇类化合物。

2.4 不同牛干巴中细菌群落多样性分析

2.4.1 测序数据质量分析

为了得到有效数据,对下机原始数据进行处理,相关质量分析及统计结果如表 2 所示。

表 2 原始数据与有效数据统计

Table 2 The original data and effective statistics

样品	双端序列数	原始序列数	优化序列数	ET	A/bp	GC/%	Q20/%	Q30/%	E/%
1 号	76 752	73 897	68 813	68 649	429	51.07	97	94.36	89.44
2 号	60 178	58 123	54 562	51 401	429	51.44	97.16	94.63	85.41
3 号	79 590	77 401	72 733	70 394	430	52	97.04	94.46	88.45

注:ET 为优化序列数过滤嵌合体后的有效序列数;A 表示样品平均序列长度;GC 为样品 G 和 C 类型的碱基占总碱基的百分比;Q20 为质量值大于等于 20 的碱基占总碱基的百分比;Q30 为质量值大于等于 30 的碱基占总碱基的百分比;E:有效序列数的百分比。

由表 2 可以看到,对低质量和无用序列进行过滤后,3 个样品的 Q20 和 Q30 碱基百分比有所提高,分别达到 97%和 99%以上,有效降低了 Illumina 平台测序的错误率。

2.4.2 细菌群落的丰度分析

3 种贵州牛干巴的物种相对丰度分布(属水平)如表 3 所示。

表 3 贵州牛干巴优势细菌菌属及其丰度

Table 3 Abundance of predominant bacteria in samples Guizhou Niuganba

属	牛干巴 1 号/%	牛干巴 2 号/%	牛干巴 3 号/%
葡萄球菌属	26.40	50.00	26.20
乳杆菌属	46.80	31.50	12.30
嗜冷杆菌属	12.77	0.15	28.44
科贝特氏菌属	2.04	0.05	17.12
魏斯氏菌	2.32	4.49	1.23
明串珠菌属	1.16	0.09	5.58
弧菌属	0.38	0.01	5.11
环丝菌属	0.73	2.28	0.74
沙雷菌属	0.27	2.23	0.04
假单胞菌	0.44	1.06	0.14
其它	5.73	2.49	2.94
未分类	0.96	5.65	0.16

3 种牛干巴样品中,在门水平上主要是软壁菌门、拟杆菌门、蓝藻菌门、变形菌门、互养菌门、绿屈挠菌门、放线菌门、热袍菌门、厚壁菌门等。3 种牛干巴所含物种基本相似,主要优势菌是变形菌门和厚壁菌门。进一步对细菌群落中主要优势菌属进行分析。不同种类牛干巴中细菌菌属结构存在一定差异。在 3 种牛干巴中,乳杆菌属、葡萄球菌属和嗜冷杆菌属为优势菌,

但比例差别较大;另外 3 号牛干巴科贝特氏菌属也为优势菌,这是贵州牛干巴特有的,其它地方牛干巴未见报道。不少学者对其他地区的牛干巴研究较多,肖蓉等^[23]在牛干巴加工过程中,使用传统分离筛选方法筛选到优势菌:埃希氏菌、微球菌、乳杆菌、假单胞菌和片球菌;吕彩霞^[24]利用传统分离筛选方法从云南牛干巴中筛选出 4 株优势发酵菌,包括 2 株肉糖葡萄球菌和 2 株乳酸菌。刘姝韵等^[25]利用变性梯度凝胶电泳技术对云南牛干巴加工过程中的细菌菌落多样性进行分析,发现葡萄球菌属、嗜冷杆菌及明串珠菌属为优势菌种;此外,牛干巴加工过程中还存在着不可培养的菌群。以上研究结果均与本研究有相似之处,也就是乳酸菌、葡萄球菌和嗜冷杆菌属都为牛干巴优势菌属。尤其是乳酸菌和葡萄球菌的代谢作用分解蛋白质为肽和氨基酸,不仅形成了大量风味物质,还对营养价值做出贡献。其次是嗜冷杆菌属,牛干巴 1 号和牛干巴 3 号样品中相对丰度较高,分别为 12.77%和 28.44%,远高于牛干巴 1 号。嗜冷菌属能够分解脂类和水解蛋白质,从而引起轻微腥味和发霉的气味^[26]。但更有不同之处:首先 3 号牛干巴含有特有的优势菌科贝特氏菌属,这在其它地方牛干巴未见报道;再者环丝菌属、明串珠菌属、沙雷菌属、弧菌属、假单胞菌的相对丰度都低于 5.6%,其中,嗜冷杆菌、弧菌属、假单胞菌属等在诸多肉制品腐败变质过程中都被发现,它们被认为会对肉制品的安全和品质造成损害,所以贵州牛干巴安全性较好,这可能主要得益于香辛料对腐败菌的抑制作用和气候条件也有关系。

2.4.3 牛干巴聚类分析

牛干巴聚类分析结果见图 2。

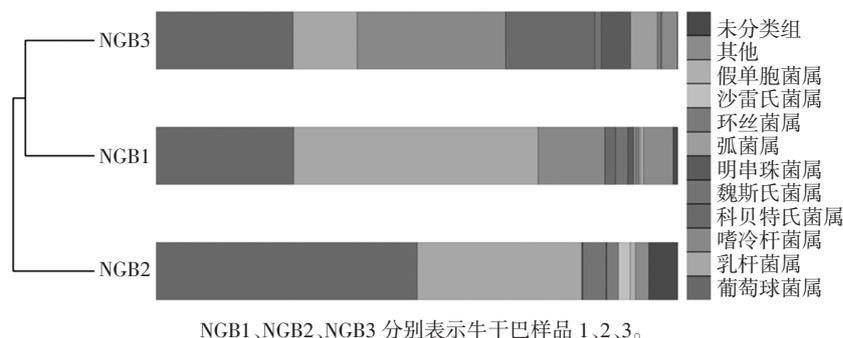


图2 牛干巴聚类分析

Fig.2 Similarity coefficient based dendrogram constructed among samples

由图2可知,牛干巴1号(NGB1)和牛干巴2号(NGB2)距离最近,其微生物种类和数量最为相似,这可能与它们的工艺较为相似有关。通过上述各水平的分析以及微生物群落结构的聚类分析已初步表明不同牛干巴的微生物群落结构有较大差异:虽然贵州牛干巴与云南牛干巴都以葡萄球菌属和乳杆菌属为优势菌,但是贵州牛干巴同时也以魏斯氏菌和嗜冷杆菌属为优势菌,具体的,其中牛干巴1号优势菌为乳杆菌,2号为葡萄球菌属,3号为嗜冷杆菌属。而云南牛干巴还以明串珠菌属菌为优势菌属。

2.5 牛干巴挥发性风味物质与微生物的关系

3种牛干巴样品中的主要酸类物质都是乙酸。作为优势微生物的乳酸菌(乳杆菌、魏斯氏菌等)对发酵肉制品风味的贡献,主要是通过分解代谢碳水化合物、氨基酸等产生有机酸。细菌对碳水化合物的代谢和脂质氧化可产生并不断积累醇类物质,例如异型发酵的乳酸菌可产生乙醇,而苯乙醇等支链醇也可能是来源于微生物作用。有研究表明乳酸菌也会影响发酵香肠的脂肪氧化速率,脂肪氧化形成醛类、酮类物质,对于腌肉制品风味有重要贡献。所有牛干巴样品中均含有乙酸乙酯,酯类物质的形成主要与发酵相关。乳杆菌在牛干巴中占绝对优势地位,其代谢产物乙酸是形成乙酸乙酯及其他香味成分的重要物质基础;明串珠菌可利用碳水化合物进行异型发酵产生乙酸,也可作为乙酸乙酯的前体物。

而且,3种牛干巴虽然菌群丰富,但是由主成分分析知这3种牛干巴的特征风味成分基本上都不是微生物代谢产生的而是来源于香料成分,微生物发酵对风味物质有所贡献但不突出,这从牛干巴1号和牛干巴2号的微生物种类和数量最为相似但其感官评分和风味成分却差别较大也能看出:微生物相似代谢物也应类似,但感官评分差别较大,这也说明微生物代谢产生的风味在其中不占主要作用,这可能是添加过多的

香辛料抑制了微生物的代谢发酵作用。因此,为发挥微生物发酵代谢的优异性能,后续需要加以改进发酵工艺。

3 结论

1)对贵州牛干巴进行了挥发性风味成分的种类与含量的分析。共检测到67种化合物,包括烃类(25)、醛类(14)、醇类(17)、酮类(5),其他类(6),其中共有成分有16种。3组牛干巴的挥发性风味成分在种类和含量上有差异,原因可能是原料肉、腌制方法、制作工艺等因素的不同。根据主成分分析可知:丰富多样的辛香料为其风味做出了重要贡献,但是过重的辛香料风味覆盖了牛干巴该有的肉香。

2)运用高通量测序技术对采集的3种传统发酵牛干巴的细菌群落进行检测。结果表明传统发酵牛干巴中细菌多样性丰富,主要优势菌是变形菌门和厚壁菌门,而乳杆菌属和葡萄球菌属占绝对优势。不同种类牛干巴中细菌属结构存在一定差异,而且3号牛干巴还存在科贝特氏菌属优势菌,这是贵州牛干巴特有的。另外利用高通量测序发现存在部分不可培养菌种。

3)3种牛干巴虽然菌群丰富,但是由多种分析知这3种牛干巴的特征风味成分基本上都不是微生物代谢产生的而是来源于香料成分,微生物发酵对风味物质有所贡献但不突出,添加过多的香辛料抑制了微生物的代谢发酵作用。后续需要加以改进发酵工艺发挥微生物发酵代谢的优异性能。

4)对贵州牛干巴中挥发性风味成分的形成过程还需进一步研究:可探究其风味形成途径、风味协调性与不可培养菌株的种类,为贵州牛干巴风味品质协调、生产工艺的调控、延长保质期等提供理论依据。开展贵州牛干巴货架期的研究,增强牛干巴的商业性推广。

参考文献:

- [1] 李丽, 伍永霞, 吴小堂, 等. 牛干巴加工工艺及产业发展现状[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(8): 130-131
- [2] 沙坤, 郭江南, 郎玉苗, 等. 牦牛干巴和黄牛干巴挥发性风味特征与差异分析[J]. 农业机械学报, 2015, 46(12): 233-239
- [3] 沙坤, 张泽俊, 张松山, 等. 不同类型新疆风干牛肉挥发性风味成分差异分析[J]. 肉类研究, 2018, 32(4): 33-38
- [4] Kaban Güzin. Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastirma processing[J]. Meat Science, 2009, 82(1): 17-23
- [5] 高月娥, 杨凯, 王喆, 等. 云南牛干巴肉质特性与食用品质相关性分析[J]. 肉类研究, 2018, 32(3): 12-17
- [6] Forss D A. Odor and flavor compounds from lipids[J]. Progress in the Chemistry of Fats & Other Lipids, 1973, 13(4): 177-258
- [7] Kubra, I Rahath, Rao L Jagan Mohan. An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*)[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52(8): 651-688
- [8] Jagella T, Grosch W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.)II. Odour activity values of desirable and undesirable odorants of black pepper[J]. European Food Research and Technology, 1999, 209(1): 22-26
- [9] 蒲丹丹, 孙杰, 陈海涛, 等. SDE-GC-MS 结合 GC-O 对比熟湖南腊肉和熟广东腊肉的挥发性风味成分[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 131-136
- [10] Marušić N, Petrović M, Vidaček, et al. Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analyses and volatile compounds[J]. Meat Science, 2011, 88(4): 786-790
- [11] Muriel E, Antequera T, Petró M J, et al. Volatile compounds in Iberian dry-cured loin[J]. Meat Science, 2004, 68(3): 391-400
- [12] Lotfy S N, Fadel H H M, El-Ghorab A H, et al. Stability of encapsulated beef-like flavourings prepared from enzymatically hydrolysed mushroom proteins with other precursors under conventional and microwave heating[J]. Food Chemistry, 2015, 187: 7-13
- [13] Ai-Nong Y, Bao-Guo S. Flavour substances of Chinese traditional smoke-cured Bacon[J]. Food Chemistry, 2005, 89(2): 227-233
- [14] 刘廷竹, 黄明泉, 邹青青, 等. GC-O 与 GC-MS 结合分析竹荪牛肉香精中的挥发性成分[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 92-98
- [15] Biller E, Boselli E, Obiedziński M, et al. The profile of volatile compounds in the outer and inner parts of broiled pork neck is strongly influenced by the acetic-acid marination conditions[J]. Meat Science, 2016, 121: 292-301
- [16] 齐银霞, 许彩虹. 脂肪氧化对热反应产物香气的影响[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 17-20
- [17] 孔宇, 李娜, 薛丽丽, 等. HS-SMPE-GC-MS 分析不同烧鸡中的挥发性风味物质[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(14): 164-168
- [18] Ma Q L, Hamid N, Bekhit A E D, et al. Evaluation of pre-rigor injection of beef with proteases on cooked meat volatile profile after 1 day and 21 days post-mortem storage[J]. Meat Science, 2012, 92(4): 430-439
- [19] 颜炳坤. 联合葡萄糖激酶与乙酸激酶催化的 ATP 再生系统酶法合成葡萄糖-6-磷酸[D]. 上海: 华东理工大学, 2014
- [20] Damar S, Balaban M O. Review of Dense Phase CO₂ Technology: Microbial and Enzyme Inactivation, and Effects on Food Quality [J]. Journal of Food Science, 2010, 71(1): 1-11
- [21] Weśnierska E, Szołtyśik M, Migdał W. The properties of fermented beef products ripened as entire primal cuts of m. semitendinosus, m. semimembranosus and mm. psoas major and minor[J]. Annals of Animal Science, 2014, 14(1): 197-212
- [22] 沙坤. 新疆风干牛肉质量特征及风味形成机制的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015
- [23] 肖蓉, 徐昆龙, 刘旭川. 云南黄牛干巴(腊牛肉)中细菌的分离与鉴定[J]. 黄牛杂志, 1998, 12(3): 24-25
- [24] 吕彩霞. 牛干巴中发酵剂的筛选及其在发酵香肠中作用机理的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008
- [25] 刘姝韵, 尚思奇, 孙灿, 等. 基于 PCR-DGGE 分析云南牛干巴的细菌群落结构[J]. 肉类研究, 2017, 31(9): 44-50
- [26] Broekaert K, Heyndrickx M, Herman L, et al. Molecular identification of the *Microbiota* of peeled and unpeeled Brown shrimp (*Crangon crangon*) during storage on ice and at 7.5 °C[J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 123-134

收稿日期: 2019-04-21