

不同超高静压处理及贮藏过程中 杨梅果汁微生物多样性变化

林佳馨¹, 罗子阳¹, 黄少桐², 张珣珍², 段翰英¹, 王超^{1*}

(1. 暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632) (2. 广东新乐食品有限公司, 广东潮州 521000)

摘要: 为探讨杨梅果汁合适的超高静压 (High Hydrostatic Pressure, HHP) 加工与贮藏条件, 该研究以非浓缩还原 (Not From Concentrate, NFC) 杨梅果汁为试验对象, 对其进行 HHP 处理 (500 MPa/20 min、500 MPa/30 min、600 MPa/10 min、600 MPa/20 min), 再分别经过 4、25、37 °C 贮存后, 采用 16S rDNA 高通量测序技术对杨梅果汁中微生物多样性进行分析。结果表明: NFC 杨梅果汁中的细菌门主要为厚壁菌门 (Firmicutes), 随后为放线菌门 (Actinobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria)。主要菌属为双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、肠球菌属 (*Enterococcus*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter*); 经 25 °C 和 37 °C 贮藏 7 d 后, 对照组以醋杆菌属 (*Acetobacter*) 为主, HHP 组以葡萄糖杆菌属 (*Gluconobacter*) 为主; 4 °C 贮藏 28 d, 葡萄糖杆菌属占据绝对优势 (86.62%~98.42%)。将 600 MPa/20 min 杨梅汁经结合隔氧贮藏 7 d (37 °C) 后, 有效降低了葡萄糖杆菌属的丰度, 并经货架期加速试验预测其在 20 °C 的货架期为 133 d。该研究为 HHP 加工新技术的应用以及 NFC 果汁的安全性控制提供了相应理论依据。

关键词: NFC 杨梅果汁; 超高静压; 高通量测序; 微生物多样性; 货架期

文章编号: 1673-9078(2024)09-96-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0720

Changes in Microbial Diversity in Bayberry Juice under Different High Hydrostatic Pressure Treatments and Storage Conditions

LIN Jiaxin¹, LUO Ziyang¹, HUANG Shaotong², ZHANG Xunzhen², DUAN Hanying¹, WANG Chao^{1*}

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2. Guangdong Xinle Foods Co. Ltd., Chaozhou 521000, China)

Abstract: To explore the suitable high hydrostatic pressure (HHP) processing and storage conditions for bayberry juice, not-from-concentrate (NFC) bayberry juice was subjected to HHP treatments (500 MPa/20 min, 500 MPa/30 min, 600 MPa/10 min, and 600 MPa/20 min) and temperatures (4, 25, and 37 °C). The microbial diversity of the bayberry juice was analyzed using 16S rDNA high-throughput sequencing. Results revealed that NFC bayberry juice is dominated by Firmicutes, followed by Actinobacteria and Proteobacteria. *Bifidobacterium*, *enterococcus*, and *Enterobacter* were the dominant genera. After incubation at 25 °C or 37 °C for seven days, *acetobacter* became dominant in the control group, while *Gluconobacter* became

引文格式:

林佳馨, 罗子阳, 黄少桐, 等. 不同超高静压处理及贮藏过程中杨梅果汁微生物多样性变化[J]. 现代食品科技, 2024, 40(9):96-106.

LIN Jiaxin, LUO Ziyang, HUANG Shaotong, et al. Changes in microbial diversity in bayberry juice under different high hydrostatic pressure treatments and storage conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 96-106.

收稿日期: 2023-06-13

基金项目: 潮州市科技计划项目 (202202ZD03); 广东省高校教师特色创新研究项目 (2021JNHB11)

作者简介: 林佳馨 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与营养, E-mail: jxlinnn@163.com

通讯作者: 王超 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与营养, E-mail: chao_wang@jnu.edu.cn

dominant in the HHP group. After storage at 4 °C for 28 days, *gluconobacter* became the dominant genus, accounting for 86.62%~98.42% of the total population. After storing the HHP-treated (600 MPa/20 min) bayberry juice at 37 °C for seven days in an anaerobic conditions, the *gluconobacter* abundance was significantly reduced. The commercial shelf-life of bayberry juice at 20 °C was expected to be 133 days, based on the shelf-life acceleration test. This study provides a theoretical basis for further application of HHP and food safety control in NFC juices.

Key words: not from concentrate (NFC) bayberry juice; high hydrostatic pressure; high-throughput sequencing; microbial diversity; shelf life

随着国民经济的快速发展和居民生活水平不断提升, 优质、安全、便捷的果蔬产品需求日益增长。非浓缩还原汁 (Not From Concentrate, NFC) 是直接利用鲜果进行榨汁和杀菌等工艺制得的新型健康的原浆果汁, 不经过高温浓缩、还原等繁琐工序, 最大限度保留果汁天然风味及营养, 深受大众喜爱^[1]。

杨梅 (*Myrica rubra*) 富含多种氨基酸和抗氧化成分, 有健胃消食、御寒消暑、止泻利尿等药用价值^[2-4]。但杨梅采后呼吸剧烈, 极其不耐贮运, 常温下仅能保存 3~4 d^[5]。因此, 开发杨梅深加工产品对提高产品附加值、延长货架期富有重要意义。在众多深加工产品中, 杨梅果汁食用便捷、利于吸收, 且能有效保留风味和营养, 市场前景十分可观^[6]。热处理是果汁的传统加工方式, 但高温易损害果汁固有的营养、风味、色泽, 不可避免地导致抗坏血酸降解和异味产生^[7-9]。

随着科学技术的发展, 以超高静压 (High Hydrostatic Pressure, HHP) 为主的非热加工技术在食品加工领域兴起, 也开始被广泛应用于果汁加工中, 成为研究热点之一。众多研究表明 HHP 不仅对饮料灭菌有效, 还能在加工过程中显著降低风味和营养成分的损失。Yu 等^[10,11]发现 HHP 灭菌效果随着压力和处理时间的延长而增强, 用 600 MPa/15 min 处理使得牛奶总需氧菌由 4.19 lg CFU/mL 显著降低至 1.12 lg CFU/mL。Xu 等^[12]研究发现 HHP 处理 (500 MPa/10 min) 和高温短时处理 (110 °C /8.6 s) 均能灭活猕猴桃清汁中的总需氧菌、酵母菌和霉菌, 使菌落总数低于检出限 (1.00 CFU/mL)。经 HHP 处理后的猕猴桃清汁在 4 °C 和 25 °C 下储存 42 d 期间内, 酵母菌和霉菌仍未检出, 总需氧菌维持在 3 lg CFU/mL 以下。HHP 处理最大程度保留了抗坏血酸的含量, 4 °C 下贮藏 42 d 后清汁中抗坏血酸的保留量比高温短时处理高约 40 μg/mL。李靖等^[13]发现在等效杀菌的前提下, 相较于热杀菌, HHP 能更好地保留 4 °C、30 d 贮藏期内刺梨汁

原有颜色, 对总酚、维生素 C、抗氧化活性和 SOD 活性的保留率分别在 93.32%、52.80%、93.96%、64.49%, 均远高于热处理组。然而, 目前有关 HHP 在 NFC 杨梅果汁杀菌效果及其在贮藏期内的菌群结构变化的研究鲜见报道。林怡^[14]发现 500 MPa/5 min 能够有效实现对杨梅汁的灭菌, 使其微生物指标符合饮料卫生标准。Wang 等^[15]证实 HHP 对杨梅汁贮藏期间的保色效果、花色苷和抗坏血酸等热敏性成分的保留率均显著优于热处理。宣晓婷等^[16]比较了 HHP 杨梅汁不同加工环节的微生物群落多样性, 但只研究了单一的 HHP 压力条件, 并未对比不同超高静压处理间的差异。

针对 NFC 杨梅果汁加工、贮藏过程中微生物多样性的研究, 有助于更好地了解各个环节微生物菌群变化, 进而开发更加健康、营养、安全的 NFC 杨梅果汁产品。因此, 本研究将 NFC 杨梅果汁经 HHP 杀菌 (500 MPa/20 min、500 MPa/30 min、600 MPa/10 min、600 MPa/20 min) 后, 采用 16S rDNA 测序分析在不同贮藏条件 (4、25、37 °C) 下杨梅果汁微生物多样性的变化, 并以菌落总数为依据, 采用加速货架期实验法 (Accelerated Shelf Life Testing, ASLT) 快速预测商业储存温度 (20 °C) 下果汁的货架期, 旨在为 HHP 技术在 NFC 果汁精深加工的运用以及杨梅果汁贮藏期间的微生物控制提供理论依据, 为开发杨梅产品提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜东魁杨梅, 中国仙居; 聚乙烯食品级纹路真空包装袋, 石家庄喜龙包装有限公司; FM scientific2651-6003 厌氧管 (20 mL), 北京丰美天合科技有限公司; TGuide S96 磁珠法土壤 / 粪便基因组 DNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; KOD FX Neo (TOYOBO), 北京百灵克生物科

技有限责任公司; Phusion (NEB), 北京百灵克生物科技有限责任公司; TransStart FastPfu Fly DNA Polymerase, 北京全式金生物技术有限公司; 琼脂糖 (西班牙), 北京博美富鑫科技有限公司; OMEGA DNA 纯化试剂盒, 北京鸿跃创新科技有限公司; e.Z.N.A.TM Cycle-Pure Kit (omega), 北京鸿跃创新科技有限公司; Monarch DNA 胶回收试剂盒, 北京鸿跃创新科技有限公司。

CQC2-600 全液相超高静压食品灭菌机, 北京速原中天公司; HR2874 榨汁机, 荷兰飞利浦公司; SHZ-D 循环水式真空泵, 巩义市子华仪器有限责任公司; MASTER-M 刻度式手持糖度计, 日本 ATAGO 公司; 14886 真空包装机, 浙江宁波得力有限公司; LRH-150 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; YC-520L 医用冷藏箱, 中科美菱低温科技股份有限公司; veriti96well9902 梯度基因扩增仪, 美国 Appliedbiosystems 公司; Centrifuge5810R 离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 NFC 杨梅果汁制备

参照宣晓婷等^[16]的方法制备 NFC 杨梅果汁。首先, 将新鲜杨梅浸泡于冰水浴中去除杨梅果核, 榨汁获得粗杨梅果汁, 在 8 000 r/min 的转速下离心 10 min (4 °C), 对上清液用布氏漏斗抽滤, 得到杨梅清汁。进一步使用蔗糖将杨梅果汁的可溶性固形物调为 15 °Brix, 最后在超净工作台用聚乙烯真空包装袋对其进行无菌包装, 制备成类似于市面的风味、色泽俱佳的 NFC 杨梅果汁。

1.2.2 HHP 处理及贮藏

根据前期预实验确定 HHP 处理条件^[17], 将无菌包装的杨梅果汁分别进行对照 (无处理)、500 MPa/20 min、500 MPa/30 min、600 MPa/10 min、

600 MPa/20 min 处理 (a1-a5); 分别在 25 °C 贮藏 7 d (a6-a10), 4 °C 贮藏 28 d (b1-b10), 37 °C 贮藏 7 d (c1-c5), 另根据研究结果, 增加 37 °C 在厌氧管中充满氮气贮藏 7 d (c6-c10)。所有果汁样本均密闭避光贮藏。样本情况如表 1 所示。

1.2.3 微生物多样性分析

采用 16S rDNA 测序方法, 对不同 HHP 处理 (无处理、500 MPa/20 min、500 MPa/30 min、600 MPa/10 min、600 MPa/20 min) 和不同的贮藏条件下 (0 d、25 °C /7 d、4 °C /14 d、4 °C /28 d、37 °C /7 d、37 °C 隔氧 /7 d) 的样品进行测序。

1.2.3.1 样本总 DNA 提取

采用 TGuide S96 磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒对杨梅果汁样本微生物总 DNA 来进行提取。

1.2.3.2 PCR 扩增

选择 16S rDNA 基因的 V3-V4 区域作为模板进行 PCR 扩增, 引物序列如下: 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'; 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3', 由苏州泓迅生物科技股份有限公司提供。PCR 反应体系共 10 μL, 组成如下: 基因组 DNA: 5~50 ng, 正向引物 (10 μmol/L) 0.3 μL, 反向引物 (10 μmol/L) 0.3 μL, KOD FX Neo Buffer 5 μL, dNTP (2 μmol/L) 2 μL, KOD FX Neo 0.2 μL, 最后用 ddH₂O 补充至 10 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 /5 min, 95 °C 变性 /30 s, 50 °C 退火 /30 s, 72 °C 延伸 /40 s, 最后 72 °C 延伸 /7 min, 共 25 个循环, 最后于 4 °C 保存。利用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物质量进行检测。

1.2.3.3 文库构建及测序

对合格的 PCR 产物进行纯化、定量和均一化构建文库, 通过 Qsep-400 方法对其进行质检。质检合格后, 使用 Illumina HiSeq 2500 对样品进行测序, 该步骤由北京百迈客生物科技有限公司完成。

表 1 样本情况说明表

Table 1 Description of samples

处理条件	贮藏方式/(°C/d)					
	0 d	25 °C /7 d	4 °C /14 d	4 °C /28 d	37 °C /7 d	37 °C 隔氧 /7 d
对照组 (无处理)	a1	a6	b1	b6	c1	c6
500 MPa/20 min	a2	a7	b2	b7	c2	c7
500 MPa/30 min	a3	a8	b3	b8	c3	c8
600 MPa/10 min	a4	a9	b4	b9	c4	c9
600 MPa/20 min	a5	a10	b5	b10	c5	c10

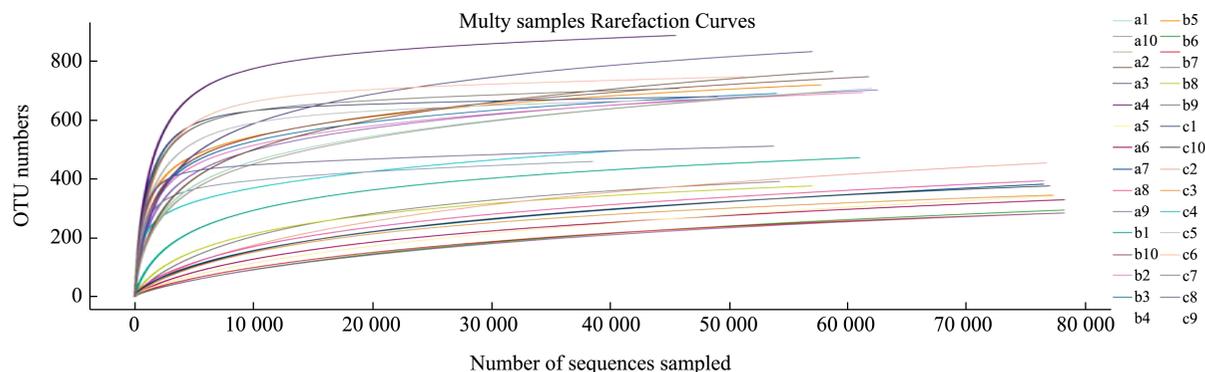


图 1 样本稀释曲线

Fig.1 Rarefaction of samples

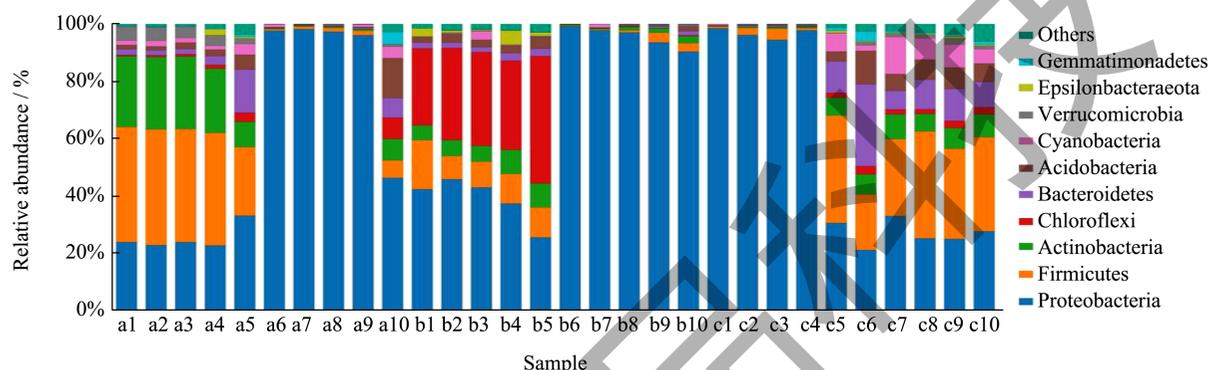


图 2 不同贮藏条件下 NFC 杨梅果汁物种相对丰度分布图 (门水平)

Fig.2 Distribution map of microbial relative abundance of NFC bayberry juice under various storage conditions (Phylum level)

1.2.3.4 测序信息分析

在数据分析上,首先运用 Trimmomatic v0.33 软件对 Raw Reads 作过滤处理。然后运用 cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除,获取不包括引物序列的高质量 Reads。再运用 FLASH v1.2.7 软件连接各样品的高质量 Reads,从而生成 Clean Reads。运用 UCHIME v4.2 软件鉴定、去除嵌合体的序列并获得 Effective Reads,运用 Usearch 软件以 97% 的相似度对其进行归并和可操作分类单元划分,将每个可操作分类单元中丰度最高的序列选作代表序列。将 SILVA 作为参考数据库,运用朴素贝叶斯分类器,对特征序列加以分类学注释,可得到每个特征对应的物种分类信息,然后统计不同分类水平上各样品的群落组成,用 QIIME 软件形成基于各个分类水平的物种丰度表,最终利用 R 语言制得相应的群落结构图。

1.2.4 NFC杨梅果汁货架期测定

1.2.4.1 NFC杨梅果汁菌落总数测定

参照 GB4789.2-2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[18],在贮藏过程中,

每 7 d 取样一次,并测定菌落总数。菌落总数可以作为判断货架期终点的特征指标^[19]。

1.2.4.2 ASLT货架期的计算

参照 Labuza 等^[20]、蔡燕芬等^[21]提出的 ASLT 方法快速确定杨梅果汁货架期。

$$f_2 = f_1 \cdot Q_{10}^{t/10} \quad (1)$$

式中:

f_1 ——在较高测试温度 T_1 环境下的测试时间,天或周;

f_2 ——在较低测试温度 T_2 环境下的测试时间,天或周;

t ——较高测试温度 T_1 与较低测试温度 T_2 的差值,℃;

Q_{10} ——温度差值为 10℃ 的两个任意温度下货架期的比值,本文 Q_{10} 值为 2.5。

2 结果与讨论

2.1 不同HHP处理和贮藏条件对NFC杨梅果汁微生物多样性的影响

2.1.1 稀释曲线

稀释曲线 (Rarefaction Curve),即随机从样本中抽取一些序列,以序列数与序列所代表的物种数

生成相应曲线。通过稀释曲线,我们可以判断测序数量能否较好地体现样品菌群多样性,同时间接了解样品中物种丰富度^[22]。根据图1的稀释曲线,30条样本曲线均达到平台期,这说明此时的测序数据量已经几乎涵盖了样本内所有的物种,因此,这些结果具有较高的科学性和可信性,可以进行后续数据分析。

2.1.2 物种相对丰度分布图(门水平、属水平)

得到物种的注释情况后,我们分别汇总每个分组在门水平(Phylum)和属水平(Genus)丰度Top10的物种,并将剩余的物种统一归为Others,生成不同贮藏条件下物种相对丰度分布图(图2、图3)。

由图2可知,NFC杨梅果汁样品(a1)中最占优势的细菌门为厚壁菌门(Firmicutes),占比高达40.43%,随后是放线菌门(Actinobacteria, 24.06%)和变形菌门(Proteobacteria, 23.37%),这三类也出现在NFC苹果汁检出排名前五的细菌门中^[23]。杜慧慧等^[24]发现,NFC柠檬汁中存在4类菌门:变形菌门(Proteobacteria, 50%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 18%)、厚壁菌门(Firmicutes, 16%)、以及放线菌门(Actinobacteria, 12%)。

在所有样品中,变形菌门(Proteobacteria)占据极大的比例,从柱状图可以看出变形菌门相对丰度的变化:500 MPa/30 min(a3)高于500 MPa/20 min(a2)、600 MPa/20 min(a5)高于600 MPa/10 min(a4),说明在相同压力下,保压时间的增加提升了变形菌门的占比。随着贮藏时间增加,变形菌门的占比也随之增加,这与宣晓婷等^[16]的实验结果相一致。

从图3a可知,加工贮藏前(a1),NFC杨梅果汁中的优势菌属为双歧杆菌属(*Bifidobacterium*, 21.37%)、肠球菌属(*Enterococcus*, 6.44%)和肠杆菌属(*Enterobacter*, 6.36%)。双歧杆菌是一种在人体肠道内数量占优势的重要益生菌,具有抗菌性、改善维生素代谢、增强免疫功能、调节肠道功能、延缓衰老等诸多生理功能^[25,26]。与对照样品(a1)相比,经过不同条件的HHP处理(a2-a5),前十优势菌属的丰度值均发生不同程度的降低,且随着压力升高、保压时间增长,丰度的降低程度也越大。其中,600 MPa/20 min HHP处理(a5)对前十优势菌属的相对丰度影响最大,由对照组的55.99%大幅下降到13.71%。

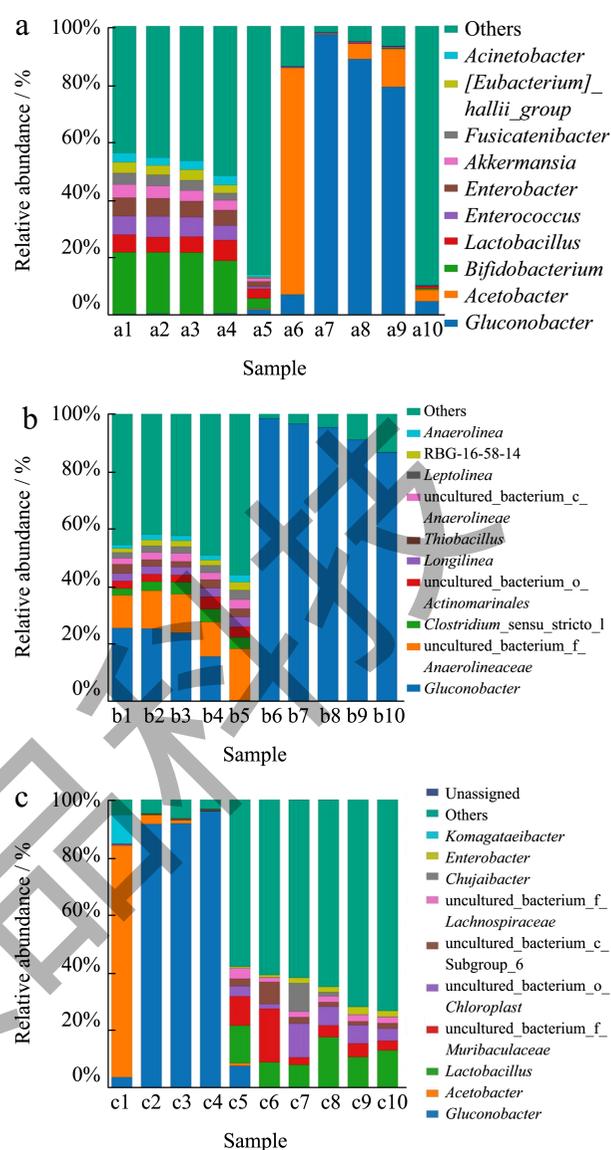


图3 不同贮藏条件下 NFC 杨梅果汁物种相对丰度分布图 (属水平)

Fig.3 Distribution map of microbial relative abundance of NFC bayberry juice under various storage conditions (Genus level)

注:图 a: 对照组、500 MPa/20 min、500 MPa/30 min、600 MPa/10 min、600 MPa/20 min 杨梅果汁贮藏 0 d(样品 a1-a5), 25 °C 贮藏 7 d(样品 a6-a10); 图 b: 4 °C 贮藏 14 d(样品 b1-b5)、28 d(样品 b6-b10); 图 c: 37 °C 贮藏 7 d(样品 c1-c5)、37 °C 隔氧贮藏 7 d(样品 c6-c10)。图 4 同。

研究发现,杨梅果汁样品在 25 °C 贮藏 7 d 后(a6-a10),属水平微生物多样性发生显著下降,优势菌属不再是原先的双歧杆菌属:醋杆菌属(*Acetobacter*, 78.66%)成为对照组(a6)新的优势菌属;葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)成为 HHP 组(a7-a10)新的优势菌属,这与不同微生物对环境的耐受能力不同有关,表明该贮藏环境不适

合原有优势菌属的生长与繁殖, 而具较强适应和繁殖能力的微生物成为优势微生物, 从而导致优势菌属发生变化^[27]。值得关注的是, 葡糖杆菌属在 25 °C 贮藏 7 d 的 600 MPa/20 min 样品中的比例仅占 4.48%, 明显低于 HHP 组其他样品 (78.90%~97.02%), 也许是相较于其他处理, 600 MPa/20 min 处凭借较高的压力和较长的保压时间影响了葡糖杆菌属的繁殖, 从而体现出极低的相对丰度。由图 3c (c1-c5) 可得杨梅果汁样品在 37 °C 贮藏 7 d 的物种分布情况, 其优势菌属的变化类似于 25 °C 贮藏 7 d 的结果。

由图 3b 可得, 杨梅果汁样品在 4 °C 贮藏第 14 天 (b1-b5), 葡糖杆菌属的丰度增加, 占比低于 30%; 在 4 °C 贮藏第 28 天 (b6-b10), 葡糖杆菌属的丰度发生突增, 并占据绝对优势 (86.62%~98.42%)。

经过微生物多样性研究发现, 葡糖杆菌属在不同温度贮藏时期的菌群构成中均处于一定的主导地位, 其次为醋杆菌属。葡糖杆菌属和醋杆菌属是醋酸菌科分支下的两个菌属, 均能高效氧化糖类和乙醇并产酸, 导致乙酸腐败, 二者的主要区别是葡糖杆菌属由于缺少关键酶, 不能进一步氧化乙酸和乙酸盐^[16,28,29]。葡糖杆菌属为革兰氏阴性专性好氧菌, 多遍布于鲜花、水果等富糖环境以及酒精、软饮料等环境中, 易破坏食品品质, 如引起水果腐烂霉变、食醋返混、出现酸臭味等, 最终导致食品腐败变质^[30,31]。

考虑到葡糖杆菌属在杨梅果汁中的广泛占比, 以及对食品潜在的不良影响, 有必要对这些微生物进行抑制。根据其好氧特性使用隔氧来优化果汁的贮藏方式, 对原始对照组和 HHP 组的杨梅果汁样本作充氮隔氧处理, 置于 37 °C 贮藏 7 d (c6-c10), 作为有氧贮藏的对照试验。图 3c 显示, 在厌氧环境进行贮藏后, 所有样品以乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 为主要优势菌属, 存活的葡糖杆菌属均不超过 0.5%, 和对照组 (37 °C 有氧贮藏 7 d, c1-c5) 相比达到了显著抑制葡糖杆菌属增殖的目的。

2.1.3 物种丰度聚类热图

热图是指将高、低丰度的物种进行分块聚类, 通过颜色梯度和不同色块之间的相似度来反映各个样品间菌群构成的异同点。热图分析结果见图 4。图 4a 的样品被聚为三类, 分别为 a1-a5 (0 d)、

a6-a9 (25 °C, 7 d) 和 a10, 图 4b 的样品被聚类为 b1-b5 (4 °C, 14 d) 和 b6-b10 (4 °C, 28 d), 表明随着贮藏时间延长, 微生物菌群发生了变化, 此外, 25 °C 贮藏 7 d 的 600 MPa/20 min 样品明显区别于同环境下其他样品, 与图 3a 结果相符。图 4c 的样品被聚类为 c1-c4 和 c5-c10, 体现了有氧和无氧环境下微生物群落结构的差异性, 以及 37 °C 有氧贮藏 7 d 的 600 MPa/20 min 样品和 37 °C 隔氧贮藏 7 d 的所有样品的相似性。

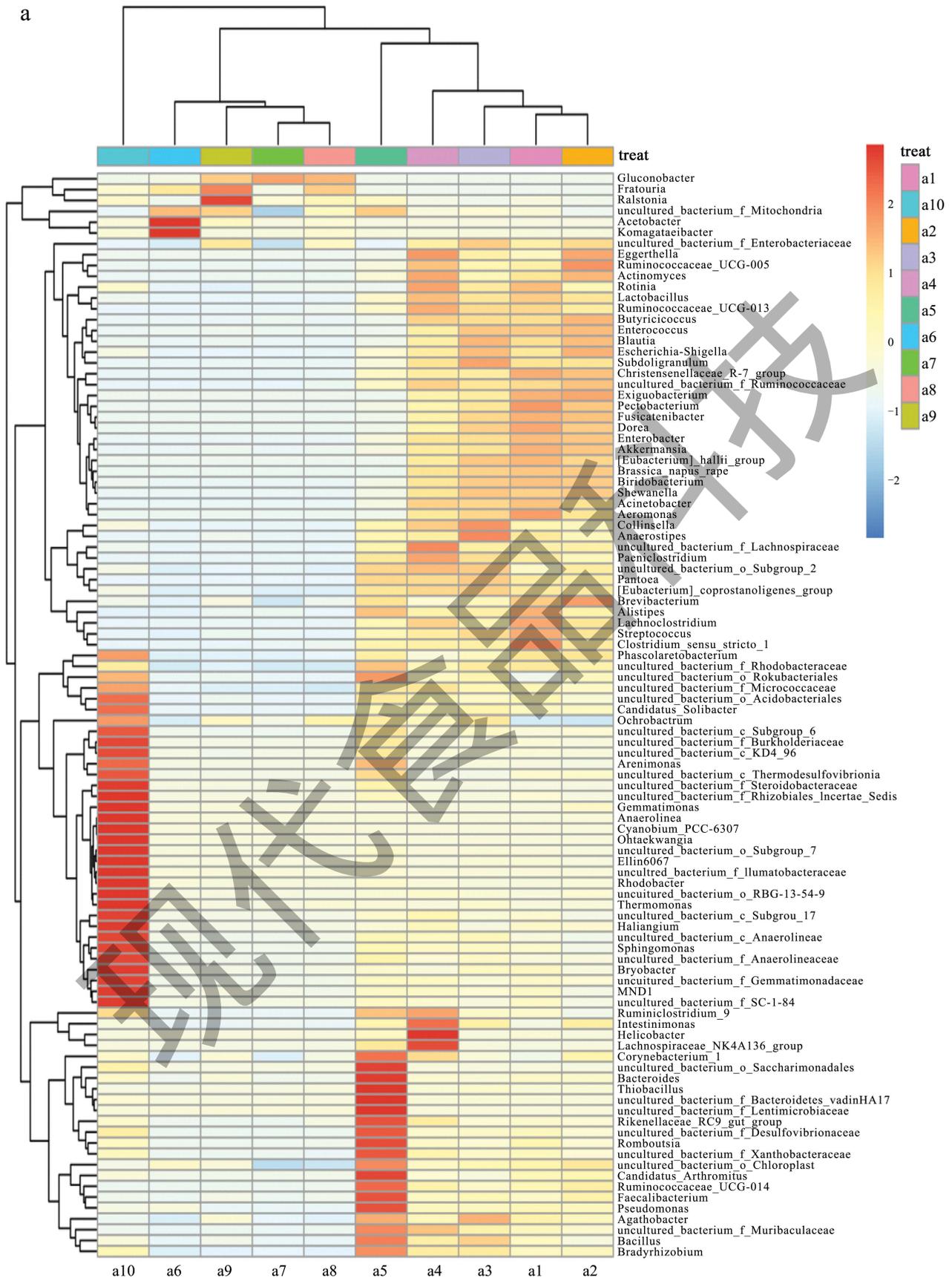
2.1.4 PCA 分析

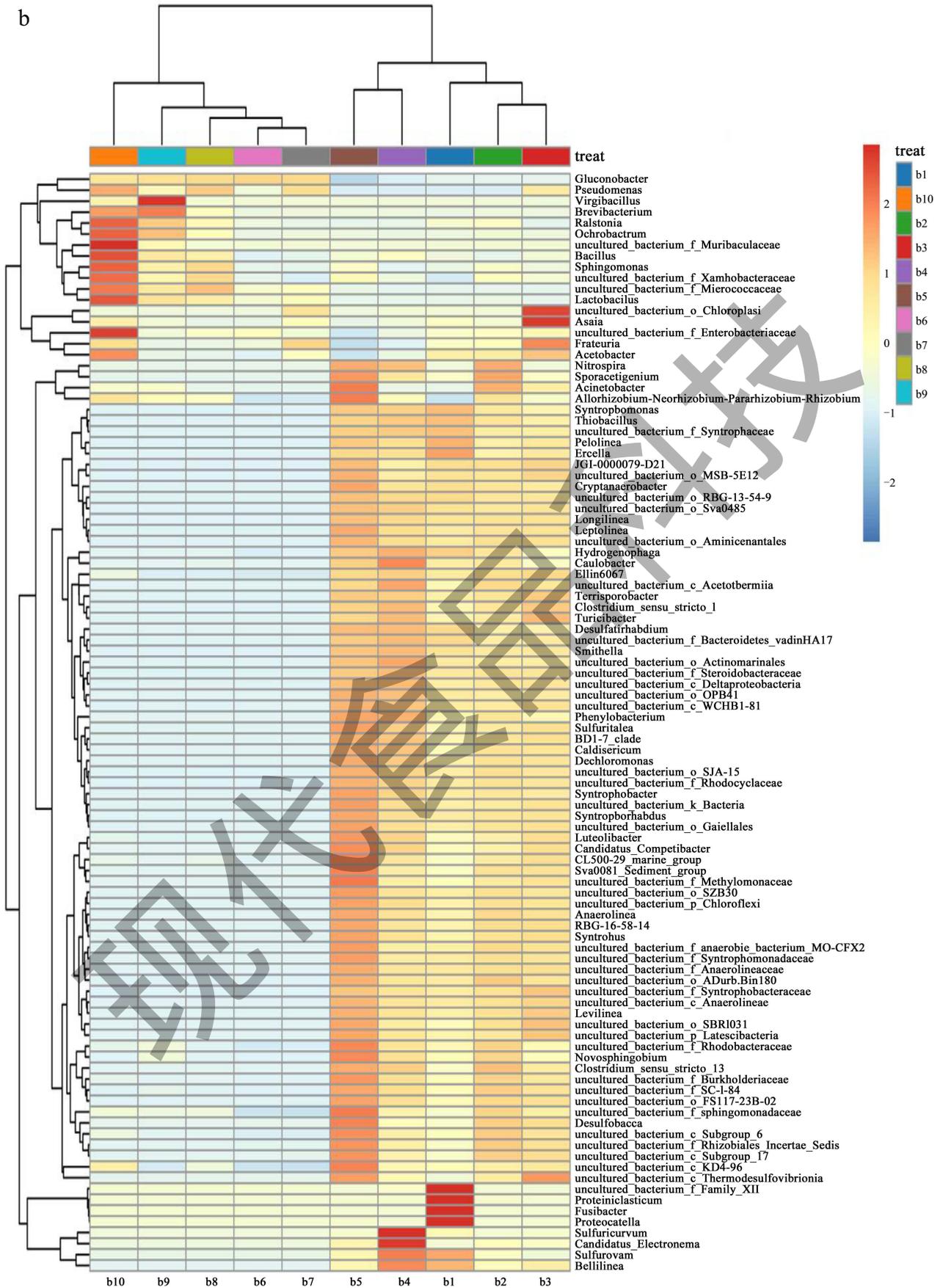
主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 是指运用一种对数据降维的思维, 选择包含最大数据差异性的主成分, 并将其映射至二维空间, 以便更加准确地得到数据间的相似性或差异性。若样本在图中的距离越小, 则说明他们的组成也越接近。

通过 PCA 图, 可以进一步得知各个杨梅果汁样本之间微生物群落结构的关联程度 (图 5)。本研究的主成分 PC1、PC2 累计贡献率为 93.73%, 基本包含样品的所有信息。从 a 圈看出 a1-a5 距离较近, 聚集性较好, 表明在 0 d 时, 不同压力和保压时间 HHP 处理的杨梅果汁微生物群落差异性较小。从 b 圈看出 c2-c4 距离较近, 表明经过 500 MPa/20 min、500 MPa/30 min、600 MPa/10 min 的 HHP 处理后的样品在 37 °C 贮藏 7 d 的微生物群落结构无显著差别。c5 明显分布于和 c2-c4 完全不同的区域, 表明 37 °C 贮藏 7 d 对 600 MPa/20 min 样品微生物组成的影响明显区别于 HHP 组其余样品。从 c 圈 (a6、c1) 看出无处理组分别在 25 °C 与 37 °C 贮藏 7 d 后无显著差异, 说明在短期贮藏中温度对果汁样品的微生物组成并无较大影响。c6 与 c1 间隔很远, 结合图 3c 体现了隔氧贮藏对果汁微生物的显著影响。

2.2 NFC 杨梅果汁货架期预测

前期对超高静压的研究表明^[17], 600 MPa, 20 min 及以上的 HHP 条件对 NFC 杨梅果汁 PPO、POD 的灭酶率分别大于 90% 和 80%, 而继续延长保压时间, 酶活性下降率不到 4%。综上, 600 MPa/20 min 的综合灭酶效果最优, 且经预实验验证其菌落总数小于 10 CFU/mL, 灭菌效果好。且根据 2.1.2 的研究结果, 隔氧贮藏能有效降低腐败菌的丰度。





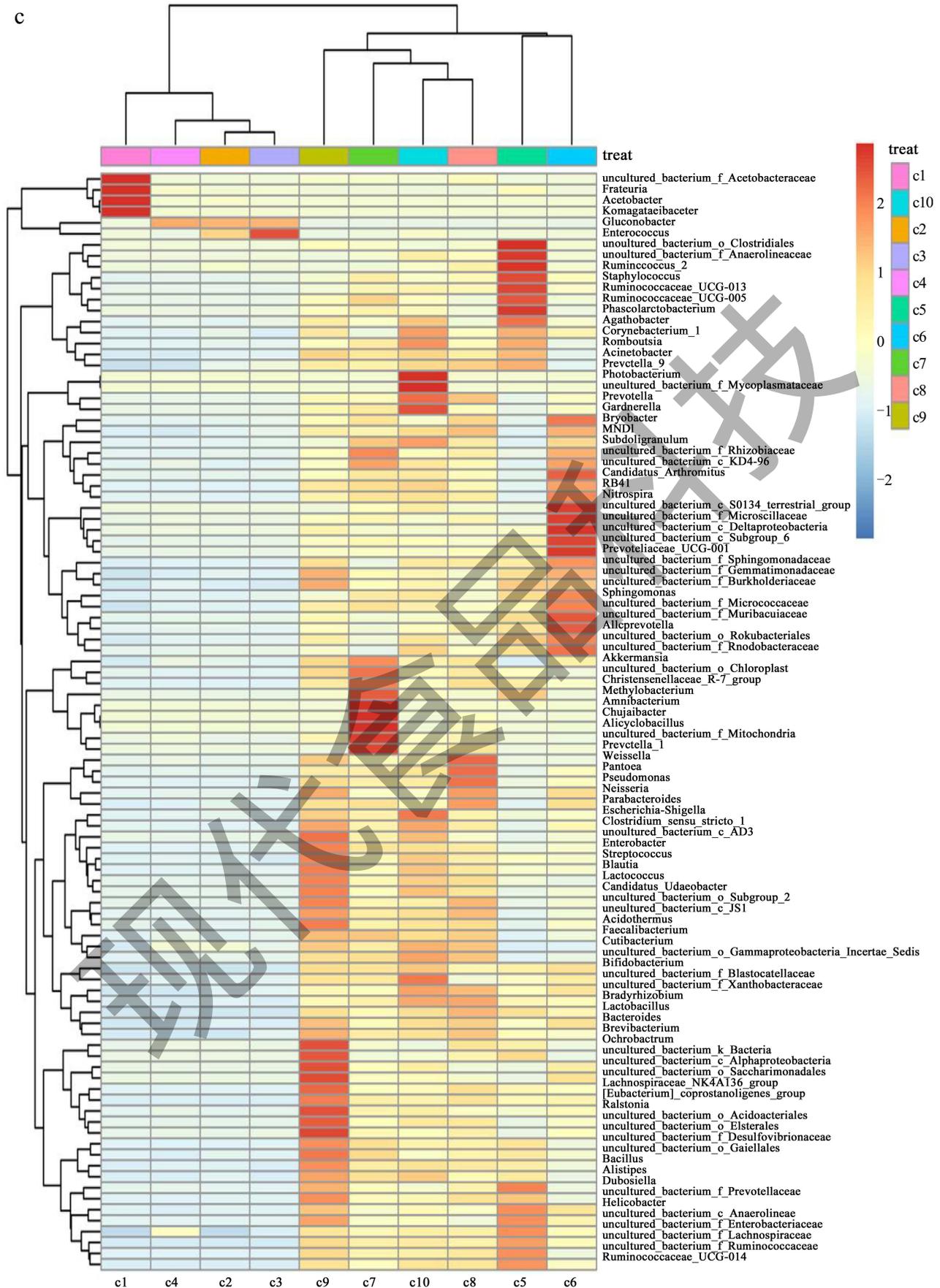


图 4 不同贮藏条件下 NFC 杨梅果汁物种丰度聚类热图

Fig.4 Heatmap of NFC bayberry juice under various storage conditions

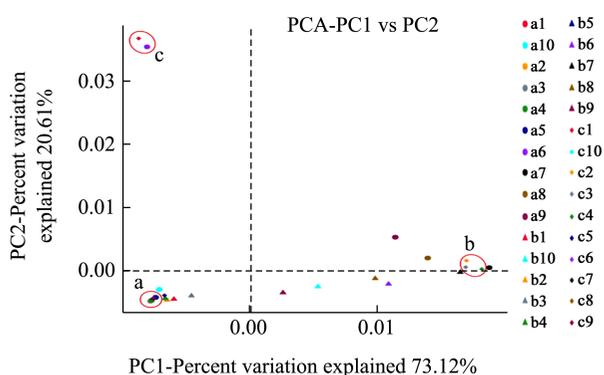


图 5 PCA 分析图

Fig.5 PCA analysis chart

综上,将杨梅果汁进行 HHP 处理(600 MPa/20 min),于 37 °C 隔氧贮藏,每 7 d 检测一次样品菌落总数,测定结果见表 2。结果表明,HHP 杨梅果汁在 37 °C 下贮藏 35 d,菌落总数大于 1×10^2 CFU/mL,已超出 GB7101-2022《食品国家安全标准 饮料》^[32]中规定的饮料微生物限量,而 28 d 未超过限量值。综上得到在 37 °C 隔氧条件下,HHP 杨梅果汁的货架期为 28 d。再结合 1.3.4.2 选取的 Q_{10} 一并代入公式计算,得到结果:在商业贮藏温度 20 °C 且隔氧的条件下,HHP 杨梅果汁的货架期在 133 d 左右。

表 2 NFC 杨梅果汁在贮藏期间菌落总数的变化情况

Table 2 Changes of total bacterial colony in NFC bayberry puree juice during storage

贮藏时间/d	菌落总数/(CFU/mL)
0	≤ 10
7	≤ 10
14	≤ 10
21	≤ 10
28	≤ 10
35	$\geq 1 \times 10^2$

3 结论

本研究利用 16S rDNA 测序技术研究了不同 HHP 处理及贮藏过程中 NFC 杨梅果汁微生物多样性的变化,并采用 ASLT 的 Q_{10} 模型预测果汁货架期。结果显示,在门水平上,NFC 杨梅果汁以厚壁菌门(Firmicutes)为主,随后为放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria),增加 HHP 保压或贮藏时间均能增加变形菌门的相对丰度。在属水平上,HHP 能有效降低杨梅果汁优势菌的相对丰度;贮藏前以双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)和肠

杆菌属(*Enterobacter*)为主;分别于 25 °C 和 37 °C 贮藏 7 d 后,对照组以醋杆菌属(*Acetobacter*)为主,HHP 组以葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)为主。葡糖杆菌属在不同贮藏温度下的菌群构成中均占主导地位,且丰度随贮藏时间的延长而升高,4 °C 贮藏 28 d 后高达 86.62%~98.42%。而隔氧贮藏能够有效将丰度降至 0.5% 以下,实现对杨梅果汁贮藏方法的改进。经 ASLT 预测 600 MPa/20 min 加工的杨梅果汁在 20 °C 隔氧贮藏的货架期为 133 d。因此,本研究为杨梅深加工提供了理论依据和实践参考,为 HHP 加工新技术的应用以及 NFC 果汁的微生物安全性控制奠定了相应基础。未来可以进一步探究 HHP 协同热处理的方式,结合适宜的数学模型优化,获得集高安全性、健康营养、优良风味于一体的新型果汁。

参考文献

- [1] 李笑颜,张宏康,曾晓房,等.NFC果汁生产新技术及其在柠檬汁加工中的应用[J].农产品加工,2018,10:60-62.
- [2] 朱奕凡,王妍,汪国云,等.不同杨梅品种果实游离氨基酸组成分析[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2021,47(6):736-742.
- [3] REN H Y, YU H Y, ZHANG S W, et al. Genome sequencing provides insights into the evolution and antioxidant activity of Chinese bayberry [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1-14.
- [4] 朱婷婷,梁森苗,张淑文,等.早鲜杨梅果实发育和品质形成规律的研究[J].浙江农业学报,2018,30(5):764-770.
- [5] WANG Y, ZHENG Y, SHANG J, et al. Pulsed light reduces postharvest losses of Chinese bayberries by affecting fungal microbiota during cold storage [J]. Food Control, 2023, 146: 109524.
- [6] 陈虹吉,陈亦欣,叶兴乾,等.微滤膜材质对杨梅果汁理化品质及抗氧化活性的影响[J].中国食品学报,2021,21(2): 152-160.
- [7] YUAN L, CHENG F Y, YI J J, et al. Effect of high-pressure processing and thermal treatments on color and *in vitro* bioaccessibility of anthocyanin and antioxidants in cloudy pomegranate juice [J]. Food Chemistry, 2022, 373(30): 131397.
- [8] WU W L, XIAO G S, YU Y S, et al. Effects of high pressure and thermal processing on quality properties and volatile compounds of pineapple fruit juice [J]. Food Control, 2021, 130: 108293.
- [9] DHENGE R, LANGIALONGA P, ALINOVI M, et al. Evaluation of quality parameters of orange juice stabilized by two thermal treatments (helical heat exchanger and ohmic heating) and non-thermal (high-pressure

- processing) [J]. Food Control, 2022, 141: 109150.
- [10] YU T T, ZHANG X J, FENG R Y, et al. Comparison of the effects of high hydrostatic pressure and pasteurization on quality of milk during storage [J]. Foods, 2022, 11(18): 19.
- [11] LIEPA M, ZAGORSKA J, GALO BURDA R, et al. Effect of high-pressure processing on microbial quality of skimmed milk [J]. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences, 2018, 72(2): 118-122.
- [12] XU X X, DENG J J, LUO D S, et al. Comparative study of high hydrostatic pressure and high temperature short time processing on quality of clear and cloudy Se-enriched kiwifruit juices [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2018, 49: 1-12.
- [13] 李靖,王嘉祥,陈欢,等.超高压与热杀菌对刺梨汁贮藏期品质影响的比较[J].食品科学,2022,43(15):101-108.
- [14] 林怡.超高压加工技术对杨梅汁品质的影响[D].杭州:浙江大学,2013.
- [15] WANG C, LIN Y, RAMASWAMY S H, et al. Storage stability of Chinese bayberry juice after high pressure or thermal treatment [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(6): 2259-2266.
- [16] 宣晓婷,崔燕,程焕,等.NFC杨梅果汁加工及贮藏环节微生物群落多样性分析[J].农产品加工,2022,20:66-72,77.
- [17] 吴新怡,孟梓怡,朱吟非,等.超高压对非浓缩还原杨梅果汁中氧化酶的钝化作用[J].现代食品科技,2022,38(4): 155-160.
- [18] GB4789.2-2022,食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
- [19] 史波林,赵镭,支瑞聪.基于品质衰变理论的食品货架期预测模型及其应用研究进展[J].食品科学,2012,33(21):345-350.
- [20] LABUZA T P, SCHMIDL M K. Accelerated shelf-life testing of foods [J]. Food Technology, 1985, 39(9): 57-64.
- [21] 蔡燕芬.食品储存期加速测试及其应用[J].食品科技,2004,1:80-82.
- [22] WANG Y, SHENG H F, HE Y, et al. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(23): 8264-8271.
- [23] 邓红,雷佳蕾,杨天歌,等.超高压和高温短时杀菌对NFC苹果汁贮藏期品质的影响[J].中国农业科学,2019,52(21):3903-3923.
- [24] 杜慧慧,汪开拓,王富敏,等.基于高通量测序分析不同品种柠檬NFC果汁的微生物多样性[J].食品科技,2021,46(3):302-307.
- [25] 朱俊晨,李世敏,魏小青.双歧杆菌对人体的生理作用及研究进展[J].中国微生态学杂志,2000,12(1):56-58.
- [26] 吕锡斌,何腊平,张汝娇,等.双歧杆菌生理功能研究进展[J].食品工业科技,2013,34(16):353-358.
- [27] DU G Q, GAI Y M, ZHOU H, et al. Assessment of spoilage microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during storage by 16S rDNA sequencing [J]. Journal of Food Quality, 2022, 1: 1-10.
- [28] DHO UHA M, MARIA G. Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation [J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(4): 377-384.
- [29] 聂志强,韩玥,郑宇,等.宏基因组学技术分析传统食醋发酵过程微生物多样性[J].食品科学,2013,34(15):198-203.
- [30] 王俊,卢红梅,崔云.杂菌污染对固态发酵食醋返混的影响[J].食品科学,2013,34(5):172-176.
- [31] 张大为,张洁,李猛.分离引起柑橘腐烂、霉变的微生物及生物防治[J].生物加工过程,2011,9(4):54-57.
- [32] GB7101-2022,食品国家安全标准 饮料[S].