

减菌处理对鸭蛋壳内外菌群组成及功能的影响

孙静¹, 彭旭¹, 杨雪¹, 杨华², 卢立志², 胡天平³, 向俊⁴, 曾涛², 皮劲松¹, 杜金平^{1*}

(1. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北武汉 430064) (2. 浙江省农业科学院, 浙江杭州 310009)
(3. 湖北天湖蛋禽股份有限公司, 湖北监利 433300) (4. 湖北神丹健康食品有限公司, 湖北武汉 430200)

摘要: 该文探索了减菌处理对鸭蛋壳内外菌落组成及咸蛋黑黄率的影响。对鸭蛋使用不同熏蒸清洗剂进行熏蒸、清洗及不同温度下临储, 比较减菌前后鸭蛋壳内外菌落总数变化, 基于 16S rRNA 基因测序和 *PICRUSt* 基因功能预测研究减菌处理对鸭蛋壳外菌群的影响, 在 35 °C 下泥包法腌制咸蛋, 统计咸蛋黑黄率。结果表明, 熏蒸处理可以显著抑制壳外菌落向壳内迁移, 有效控制壳内菌落总数, 熏蒸两次效果优于一次; 清洗处理可将壳外菌落总数降低至检测限以下; 低温储藏可在 7 d 内控制壳内外菌落总数增殖。联合熏蒸-清洗-低温的减菌处理可以显著降低壳内外菌落总数, 抑制其迁移, 控制壳内菌落总数。16S rRNA 基因测序发现减菌处理可以显著减少壳外变形菌门和嗜冷杆菌属比例, *PICRUSt* 基因功能预测发现减菌处理后微生物在脂质氧化通路、氨基酸转运和代谢通路上的活跃度显著降低。减菌后咸蛋蛋黄黑化率显著降低, 证明了减菌处理能有效减少壳外菌群数以及抑制蛋黄黑黄的发生, 表明鸭蛋加工前减菌的重要性和必要性。

关键词: 鸭蛋; 减菌处理; 高通量测序; 功能预测; 黑黄率

文章编号: 1673-9078(2024)05-53-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0606

Effects of Sterilization Treatments on the Compositions and Functions of Microflora on Duck Eggshell Inner and Outer Surfaces

SUN Jing¹, PENG Xu¹, YANG Xue¹, YANG Hua², LU Lizhi², HU Tianping³, XIANG Jun⁴, ZENG Tao²,
PI Jinsong¹, DU Jinping^{1*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China) (2. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310009, China) (3. Hubei Tianhu Egg Poultry Co. Ltd., Jianli 433300, China) (4. Hubei Shendan Healthy Food Co. Ltd., Wuhan 430200, China)

Abstract: The effects of sterilization treatments on the microbial compositions on both the inner and outer surfaces of duck eggshells and the ratio of black to yellow salted egg yolks were investigated in this study. Duck eggs were fumigated and cleaned with different fumigants and cleaning agents, and then stored at different temperatures. Changes in the total number of bacteria on duck eggshell inner and outer surfaces before and after treatments were subsequently compared. The effects of sterilization on the microflora on duck eggshell outer surfaces were evaluated using 16S rRNA gene sequencing and

引文格式:

孙静, 彭旭, 杨雪, 等. 减菌处理对鸭蛋壳内外菌群组成及功能的影响[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 53-63.

SUN Jing, PENG Xu, YANG Xue, et al. Effects of sterilization treatments on the compositions and functions of microflora on duck eggshell inner and outer surfaces [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 53-63.

收稿日期: 2023-05-22

基金项目: 国家现代农业技术体系资助 (CARS-42-26; CARS-40-S15); 湖北省动物胚胎工程与分子育种重点实验室项目 (2023ZD108); 湖北省农业科学院“青年拔尖人才培养计划”项目 (2022)

作者简介: 孙静 (1986-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 蛋品加工研究, E-mail: sammi8866@sina.com

通讯作者: 杜金平 (1963-), 男, 本科, 研究员, 研究方向: 家禽育种与产品加工研究, E-mail: ddjinpin@163.com

PICRUSt gene function prediction. Salted duck eggs were prepared using the mud-packing method at 35 °C, and the ratio of black to yellow salted egg yolks was calculated. The results show that fumigation significantly inhibits the migration of bacterial colonies from the outer to inner surfaces of the eggshells, effectively controlling the total number of bacteria inside the shell. Two fumigation treatments increase efficacy relative to one. Total bacteria on the outer surface can be reduced to below the detection limit by cleaning. Low-temperature storage can limit bacterial proliferation on both inner and outer eggshell surfaces over 7 days. Total bacteria numbers on both inner and outer surfaces can be significantly reduced by combining fumigation, cleaning, and low-temperature storage. These processes also inhibit bacterial migration, tightly controlling the total bacteria inside the eggshell. 16S rRNA gene sequencing demonstrates a notable reduction in the proportion of *Proteobacteria* and *Psychrobacter* on the outer surface of the shell following sterilization treatments. Additionally, *PICRUSt* gene function prediction indicates a significant decrease in microbial activity within pathways associated with lipid oxidation, amino acid transport, and metabolism after sterilization treatments. Sterilization also significantly reduces the ratio of black to yellow salted egg yolks. These studies illustrate that sterilization treatment effectively decreases total bacteria count on the outer surfaces of duck eggshells and inhibits the occurrence of black salted egg yolks. These findings demonstrate the importance and necessity of sterilization before duck egg processing.

Key words: duck eggs; sterilization; high-throughput sequencing; function prediction; ratio of black to yellow salted egg yolks

我国是禽蛋生产和消费的大国，总产值超过 1 000 亿元^[1]，在蛋制品消费中，鸡蛋和鸭蛋占主要地位。鸭蛋含有丰富的营养元素，营养成分全面而均衡，综合营养价值高，是“人类最理想的营养库”^[2]。在鸭蛋的实际生产中，限于我国以地面平养、网养为主的蛋鸭养殖现状，鸭蛋常沾有羽毛、泥粪污等，脏蛋多，很难满足加工高品质咸蛋的需求^[3]。鸭蛋壳表面细菌来源广泛，研究表明，禽蛋在产出，贮藏，销售等环节都会受到微生物污染，除此之外，蛋鸭的饲养方式以及饲养环境（如土壤、粪便、垫草、饲料、空气等）也是造成鸭蛋载菌的重要原因^[2,4]；同时，鸭蛋上附着的污物风干后难以清洗，加大了生产难度，使产品质量下降，影响成品风味。咸蛋的“黑圈”是指在接近蛋清的蛋黄部位有部分颜色变为暗黄绿色甚至变为黑色的现象，李秋雨等^[5]研究发现硫离子、铁离子和蛋白质之间的共同作用是蛋黄黑圈形成的原因，但国内对原料蛋载菌对黑黄蛋的影响研究较少，而原料鸭蛋的清洁程度即载菌量与加工效果关系密切。

国内外研究鸡蛋高效清洁的报道很多，如 ClO_2 、中性电解水^[6,7]、过氧化氢^[8]、表面活性剂^[9]、新洁尔灭、紫外线^[10]等方式对鸡蛋进行清洗消毒；针对鸭蛋清洁的少数报道中，介绍了如油茶籽粕去菌剂、质量分数 17% 盐水和质量分数 0.2% 对羟基苯甲酸甲酯等，并研究了清洗消毒后鸭蛋各项指标（如感官、微生物数量等）的变化^[11,12]。还有些减少鸭蛋表面微生物方法的相关研究，运用的是含氯清

洁剂、消毒药水等，同时对比了减菌前后鸭蛋孵化率等指标^[13]。笔者前期研究了微酸电解水、 ClO_2 、盐水、紫外线等不同方式处理鸭蛋可以杀灭蛋壳外细菌，得出灭菌后再加工的效果优于未灭菌^[3]，本试验采用臭氧水、甲醛等熏蒸消毒、蛋壳清洗结合低温临储结合的方式处理鸭蛋，对比未减菌处理的鸭蛋，比较减菌处理对鸭蛋壳内、外微生物总量、菌落组成与加工咸蛋黑黄率的影响，分析减菌前后鸭蛋壳外所带微生物的表型分析与功能预测，为鸭蛋在加工前进行减菌处理的重要性和必要性提供理论依据，为寻找最佳的鸭蛋清洁工艺打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

鸭蛋来自湖北省畜牧兽医研究所金水养殖基地，农湖 2 号青壳系蛋鸭相同日龄相同养殖条件下所产鸭蛋。

1.1.2 试剂

胰蛋白胨大豆琼脂培养基、胰蛋白胨大豆肉汤培养基，青岛海博生物技术有限公司；聚合酶链式反应扩增试剂盒，北京全式金生物技术有限公司；二氧化氯、臭氧、次氯酸钠，国药集团化学试剂有限公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒，北京天根生

化科技有限公司；无菌采样袋，北京士博瑞科技有限公司。

1.1.3 仪器

DKZ-450A/B 水浴恒温振荡器，常州诺基仪器有限公司；PYL-125 电热恒温培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；GCQJ-1-3 电解式高浓度臭氧发生器，武汉威蒙环保科技有限公司；MiSeq 高通量测序平台，美国 Illumina 公司；FJ-200 均质机，上海标本模型厂。

1.2 方法

1.2.1 实验设计与分组

随机选取 2 100 枚严重脏污鸭蛋 (Dirty Eggs, 记作 DE 组)，样品分为以下 5 个操作，其中 1~4 操作称为鸭蛋加工前的减菌处理：

第 1 部分进行熏蒸操作：采用烟威宝 (烟熏) 和臭氧 (喷雾) 熏蒸，分别设置 1 g/m^3 60 min、 2 g/m^3 60 min、 3 g/m^3 60 min、 3 g/m^3 10 min、 3 g/m^3 30 min、 3 g/m^3 90 min，以不熏蒸作为对照，共 7 组，每组设 3 个重复，每组 100 枚鸭蛋，共计 2 100 枚，分别测定蛋壳外及蛋壳内 (蛋壳内与壳膜间) 菌落总数，臭氧熏蒸组和对照组鸭蛋分别在常温 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下贮藏 0、4、7 d 后的壳外和壳内菌落总数。

第 2 部分进行二次熏蒸操作：以第一部分得到的优选熏蒸工艺熏蒸鸭蛋两次为二次熏蒸组，只进行一次熏蒸和完全不熏蒸作为对照，共 3 组，每组设 3 重复，每组 100 枚鸭蛋，共计 900 枚，分别测定蛋壳外及壳内菌落总数。

第 3 部分进行临储操作：鸭蛋经二次熏蒸后分别在 4、10、20、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 不同温度临储，共 4 组，每组 3 次重复，每组 100 枚，共计 1 200 枚，临储 7 d 后测定壳外、壳内菌落总数。

第 4 部分用于清洗操作：鸭蛋分别采用微酸性电解水、二氧化氯、臭氧水、次氯酸钠、盐水清洗，以不清洗作为对照，共 6 组，每组 3 次重复，每组 100 枚，共计 1 800 枚，在 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 临储，0 d 和 7 d 分别测定壳外、壳内菌落总数。

第 5 部分用于咸蛋腌制：经过熏蒸清洗的 DE 组鸭蛋编号严重脏污蛋减菌组 (Bacterial Reduction Treatment Treated Dirty Eggs, 记作 TDE)，分别在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 下盐泥腌制成咸蛋，每组 200 枚鸭蛋，共计 400 枚，30 d 后统计黑黄率。

DE 组鸭蛋经 1~4 步骤操作，每步均测定处理和处理后菌落总数；DE、TDE 分别比较蛋壳外菌落多样性。

1.2.2 菌液样品采集

壳外菌液采集：各组鸭蛋整蛋分别加入 200 mL 无菌生理盐水，常温条件下置于超声波清洗器中处理 60 s，收集洗蛋水混合液；壳内菌落总数采集：在无菌环境下剥开蛋壳，分离蛋壳与壳膜，用 200 mL 无菌生理盐水浸泡壳膜并蘸取擦拭蛋壳内表面，收集该混合液即为壳内菌液样本；上述壳外、壳内、内容物样本均分为 2 份，分别装入无菌袋，用来测定菌落总数和 MiSeq 高通量测序分析菌落多样性。

1.2.3 熏蒸操作

鸭蛋收集装箱后码放在密闭空间 (蛋库或塑料膜搭建的简易封闭罩覆盖)，采用助燃剂无火引燃烟威宝 (三氯异氰尿酸) 烟雾状熏蒸或臭氧发生器制臭氧后雾状熏蒸。一次熏蒸指鸭蛋刚出鸭舍时在附近厂房即时熏蒸，二次熏蒸指鸭蛋刚出鸭舍时在附近厂房熏蒸，经过运输后加工前再次进行熏蒸的操作。

1.2.4 清洗操作

用配置好的清洗剂浸泡刷洗鲜蛋 60 min。清洗剂浓度分别为：臭氧水，10~15 mg/L 臭氧水现配现用，隔日需重新制备；二氧化氯，50 mg/L 二氧化氯溶液；次氯酸钠，质量分数 0.1% 次氯酸钠溶液；微酸性电解水，有效氯 (ACC) 质量浓度为 120 mg/L 微酸性电解水；盐水，质量分数 25% 氯化钠溶液。

1.2.5 氯残留量测定

参照《GB/T 5750.11-2006 生活饮用水标准检验方法 消毒剂指标》^[14] 中比色法测定氯的操作，以及《GB 14934-2016 食品安全国家标准 消毒餐 (饮) 具》^[15] 中对氯的限量 $0.03 \text{ mg}/100 \text{ cm}^2$ 。

1.2.6 菌落总数测定

参照《GB/T 4789.19-2003 食品卫生微生物学检验 蛋与蛋制品检验》^[16] 的操作进行，微生物限量标准参照《GB 2749-2015 食品安全国家标准 蛋与蛋制品》^[17]。

1.2.7 Illumina MiSeq 测序

PCR 序列扩增和 Illumina MiSeq 测序：过滤总序列中不合格的 DNA 模板，对合格的文库根

据 Illumina MiSeq 测序区域 (V4+V5), 采用合成带有 barcode 的特异引物进行细菌 16S rDNA PCR 扩增, 引物分别为 Primer 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 Primer 806R (5'-GGA CTACHV GGGTWTCTAAT-3')。

1.2.8 表型预测与功能预测

利用 Bugbase 软件预测细菌组表型, 并按氧化胁迫耐受性和致病性等对鉴定到的微生物进行组间差异分类。

将蛋壳表面微生物差异基因富集到 COG 数据库, 进行 Pathway 分析, 得出各个处理组微生物代谢通路情况, 并得到各个通路微生物相对丰度图, 通过对比代谢通路相对丰度和微生物相对丰度, 预测对不同代谢通路有影响的微生物。

1.2.9 黑黄率统计

生咸蛋剥壳后置于蛋品测定台, 整个蛋黄发黑发臭, 即记为有黑黄, 黑黄个数占全部蛋黄个数的比例记为黑黄率。

1.2.10 数据分析

每组实验重复 3 次, 采用 Excel 2016 进行数据处理, GraphPad Prism 7.00 和 Origin 2018 软件进行作图, 采用 IBM SPSS Statistics 25 软件对数据进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 熏蒸处理对鸭蛋菌落总数的影响

2.1.1 熏蒸次数对鸭蛋菌落的影响

臭氧是氧气的同素异形体, 它的强氧化性具有一定的消毒灭菌能力, 从而使鸭蛋初始菌落减少^[18]。并且安全性有保证^[19]。烟威宝主要成分是三氯异氰尿酸 (TCCA), 它是一种高效的消毒漂白剂, 对大部分的真菌、细菌、病毒等都有杀灭作用^[20]。本实验选取臭氧和烟威宝对新鲜鸭蛋熏蒸处理, 结果如图 1、2 所示, 熏蒸能有效抑制蛋壳表面的菌落总数, 壳外灭菌效果好于壳内, 可能是蛋壳及壳膜对熏蒸剂的阻拦作用导致的。不管是壳内还是壳外, 都不能完全杀灭细菌, 推测是部分菌群对两种熏蒸剂有较强的抗性。在正常温度下保存 4 d 后, 蛋壳外的微生物数量没有显著增加, 蛋壳内微生物数量增长十分缓慢。保存 7 d 后壳内外微生物总数明显增多, 达到未熏蒸组的水平。由此可见, 将产后鸭蛋立即

进行一次熏蒸能够在 4 d 内有效抑制其壳内外微生物的生长繁殖。

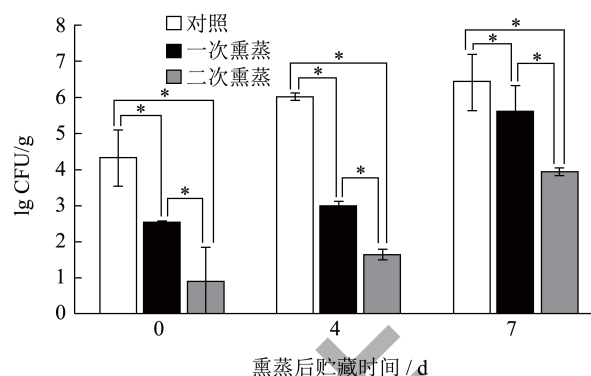


图 1 鸭蛋一次熏蒸和二次熏蒸壳外菌落总数变化

Fig.1 Changes in the total number of bacteria outside the shell of duck eggs after primary and secondary fumigation

注: *表示 $P < 0.05$, 图 2、7、8 同。

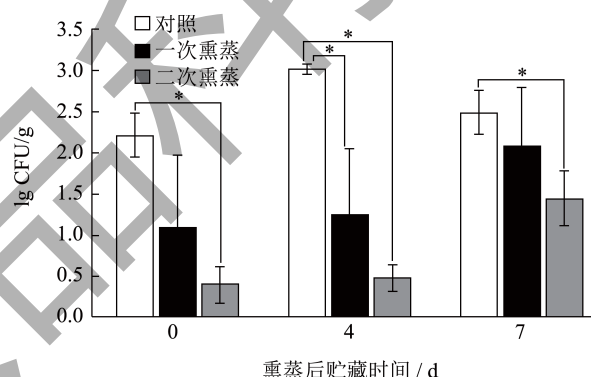


图 2 鸭蛋一次熏蒸和二次熏蒸壳内菌落总数变化

Fig.2 Changes of the total number of colonies in the shell of duck eggs after primary and secondary fumigation

鸭蛋在加工前, 需要临时储藏, 在此之前需对运输过程感染的微生物进行二次熏蒸以达到灭菌效果, 结合一次熏蒸的减菌效果, 选择臭氧作为熏蒸剂。除菌效果如图 1、2 所示。鸭蛋经一次熏蒸后, 壳外菌落总数从 4.32 lg CFU/g 降低到 2.53 lg CFU/g, 二次熏蒸后降低到 0.91 lg CFU/g, 壳内菌落总数从 2.20 lg CFU/g 分别降低到 1.08 lg CFU/g 和 0.4 lg CFU/g, 对蛋壳外菌落减菌效果优于壳内, 二次熏蒸的减菌效果优于一次熏蒸, 在一次熏蒸的基础上, 对鸭蛋进行二次熏蒸可以进一步杀灭鸭蛋蛋壳及壳内的微生物。一次熏蒸和二次熏蒸后的鸭蛋在正常温度下保存 4 d 时, 壳内外微生物数量没有显著变化, 壳内外菌落总数比不熏蒸显著减少; 放置 7 d 后, 一次熏蒸壳外菌落总数显著高于二次熏蒸, 且二者菌落总数均出现大幅上升, 一次熏蒸壳内微生物总数均值也显著高于二次熏蒸。说明一

次熏蒸和二次熏蒸均可在常温贮藏 7 d 内有效抑制鸭蛋壳外微生物数量的增加以及向蛋壳内侵染,且二次熏蒸减菌效果显著高于一次熏蒸,其中,4 d 内对微生物的抑制作用十分明显,当贮藏时间达到 7 d 时,对微生物的抑制作用会出现衰退。

2.1.2 熏蒸剂对鸭蛋菌落的影响

如表 1 所示,分别考察了烟威宝、臭氧以不同浓度 1、2、3 g/m³ 熏蒸鸭蛋不同时长 10、30、60、90 min 的除菌效果。两种熏蒸剂除菌效果相近,在对微生物的清除效率方面与使用剂量表现出明显的正相关:在单一变量的条件下,蛋壳内微生物数量会随着两种熏蒸剂的熏蒸使用浓度的升高和熏蒸时间的延长而减少,这种趋势具有剂量饱和的现象,如烟威宝在浓度达到 3 g/m³、熏蒸时间达到 60 min 后对微生物的清除效果不再显著,臭氧则在浓度达到 2 g/m³、熏蒸时间达到 60 min 时同样如此。

2.2 清洗处理对鸭蛋菌落的影响

鸭蛋加工前用微酸性电解水、二氧化氯、臭

氯水、次氯酸钠、盐水清洗鲜鸭蛋,菌落总数结果如图 3、4 所示。清洗后蛋外菌落总数显著减少,说明清洗能够有效清除壳内、壳外微生物。清洗后壳外菌落总数分别为:未检出(微酸性电解水)、2.16 lg CFU/g(二氧化氯)、2.08 lg CFU/g(臭氧水)、未检出(次氯酸钠)、2.35 lg CFU/g(盐水),壳内菌落总数分别为:2.92 lg CFU/g(微酸性电解水)、3.27 lg CFU/g(二氧化氯)、3.10 lg CFU/g(臭氧水)、2.73 lg CFU/g(次氯酸钠)、3.32 lg CFU/g(盐水)。由此可以看出,微酸性电解水和次氯酸钠即时灭菌效果最好^[12],二氧化氯、臭氧水及盐水的减菌效果无明显差异。在 pH 值为 5.0~6.5 时,SAEW 中氯化物的有效形式几乎是具有强抗菌活性的次氯酸,Liu 等^[21]发现 SAEW 的可用氯浓度越高,其抗菌活性越强,因此可以推测微酸性电解水对鸭蛋的强灭菌作用与其次氯酸含量有关^[22],SAEW 的 pH 值接近中性,相比酸性电解水(AEW)和次氯酸钠溶液,对带壳鸡蛋表现出相当或更高的杀菌活性^[23]。

表 1 不同熏蒸处理下鸭蛋壳内外菌落总数的测定结果

Table 1 Determination of the total number of bacteria inside and outside duck eggshell under different fumigation treatments

熏蒸剂	浓度/时间	菌落总数/(lg CFU/g)	
		壳外菌落总数	壳内菌落总数
对照	—	4.32 ± 0.77 ^a	2.2 ± 0.35 ^a
烟威宝	1 g/m ³ 60 min	3.46 ± 0.22 ^b	1.52 ± 0.15 ^b
	2 g/m ³ 60 min	2.97 ± 0.18 ^b	1.14 ± 0.24 ^b
	3 g/m ³ 60 min	2.10 ± 0.16 ^c	0.42 ± 0.11 ^c
	4 g/m ³ 60 min	1.92 ± 0.24 ^c	0.39 ± 0.21 ^c
	5 g/m ³ 60 min	1.75 ± 0.21 ^c	0.32 ± 0.26 ^c
	3 g/m ³ 10 min	3.01 ± 0.19 ^b	1.27 ± 0.28 ^b
	3 g/m ³ 30 min	2.95 ± 0.15 ^b	0.97 ± 0.22 ^b
	3 g/m ³ 90 min	1.98 ± 0.23 ^c	0.39 ± 0.28 ^c
	臭氧	1 g/m ³ 60 min	3.29 ± 0.28 ^b
2 g/m ³ 60 min		2.36 ± 0.41 ^c	0.35 ± 0.22 ^c
3 g/m ³ 60 min		2.07 ± 0.26 ^c	0.29 ± 0.19 ^c
2 g/m ³ 10 min		3.17 ± 0.07 ^b	1.10 ± 0.06 ^b
2 g/m ³ 30 min		2.87 ± 0.30 ^b	0.94 ± 0.10 ^b
2 g/m ³ 90 min		2.11 ± 0.12 ^c	0.27 ± 0.13 ^c

注:同一列中不同的上标字母表示存在显著性差异($P < 0.05$)。

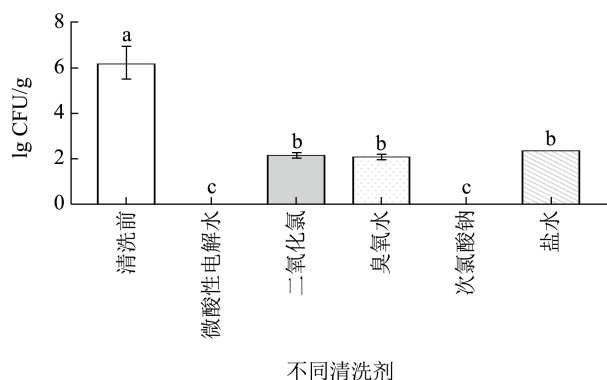


图3 不同清洗剂组鸭蛋蛋外菌落总数

Fig.3 Total number of bacteria outside eggs of ducks with different cleaning agents.

注: 不同字母表示 $P < 0.05$ 。图 4~6、15 同。

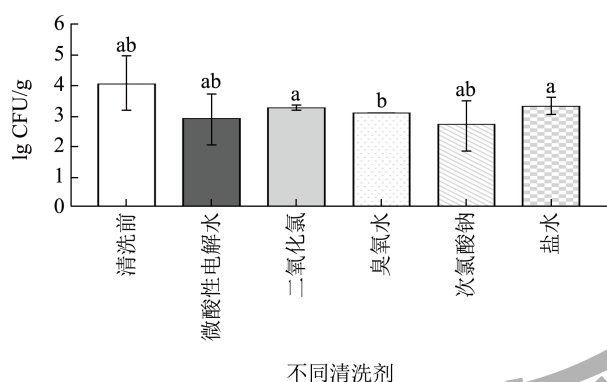


图4 不同清洗剂鸭蛋蛋内菌落总数

Fig.4 Total number of bacteria in duck eggs with different cleaning agents

2.3 低温储藏对鸭蛋菌落的影响

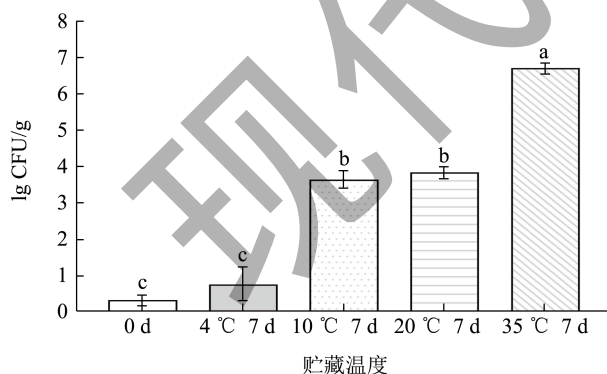


图5 不同贮藏温度鸭蛋壳外菌落总数图

Fig.5 Total number of bacterial colonies outside eggshell of ducks at different storage temperatures

熏蒸后鸭蛋在4个不同温度下贮藏7d后的壳内外微生物数量如图5、图6所示。不同温度下贮藏熏蒸后鸭蛋,7d后壳外菌落总数分别为0.74、3.63、3.83、6.70 lg CFU/g,壳内1.58、1.99、1.73、

3.16 lg CFU/g。4、10、20 °C的贮藏温度的壳内外菌落总数与35 °C下有显著差异,贮藏温度越低、菌落总数越少,贮藏温度不超过20 °C时蛋壳内外微生物数量并没有显著增加;当温度达到35 °C时,壳内外微生物数量有了明显的变化。说明降低鸭蛋贮藏温度可有效抑制鸭蛋壳内外微生物生长繁殖。即低温贮藏可抑菌,贮藏温度高细菌增殖快^[24]。

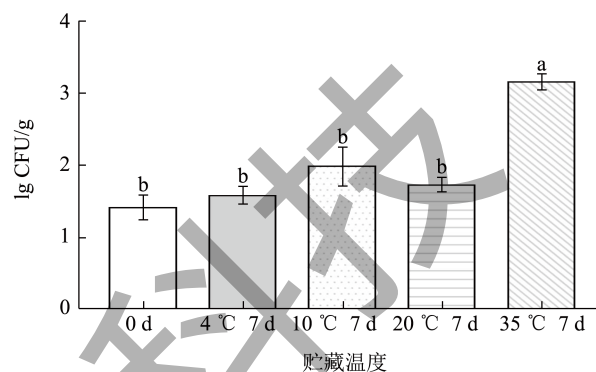


图6 不同贮藏温度鸭蛋壳内菌落总数图

Fig.6 Total number of bacterial colonies in eggshell of ducks at different storage temperatures

2.4 集成减菌处理的减菌效果

2.4.1 减菌处理前后菌落总数变化

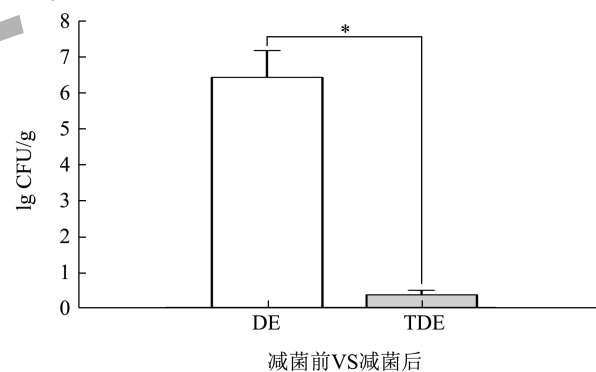


图7 减菌前后壳外菌落总数

Fig.7 Total number of extra-shell colonies before and after bacteria reduction

如图7和8所示,DE组壳外菌落总数显著高于TDE组,壳内外菌落总数差异显著,且减菌处理后壳外菌落总数有更大程度的下降,由此可以看出,通过前面减菌处理操作,可以有效减少严重脏污蛋壳内外的菌落总数,并且对蛋壳表面微生物的清除效果更为明显。

因此,在加工前对脏污蛋进行集成减菌处理(二次熏蒸、微酸性电解水清洗、低温储藏)能够

有效减少鸭蛋壳内外的菌落总数，但为探究减菌处理对鸭蛋菌落组成的影响以及对厌氧菌、致病菌是否能够有效减少其菌落相对丰度，以及减菌处理会对鸭蛋部分生理活动造成影响，进行了后续试验。

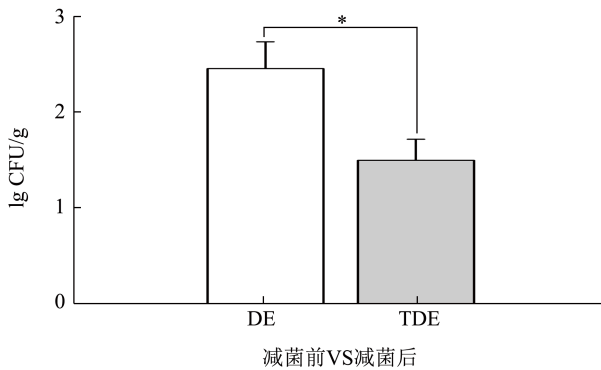


图 8 减菌前后壳内菌落总数

Fig.8 The total number of colonies in the shell before and after bacteria reduction

2.4.2 减菌前后菌落种群结构和组成变化及表型分析

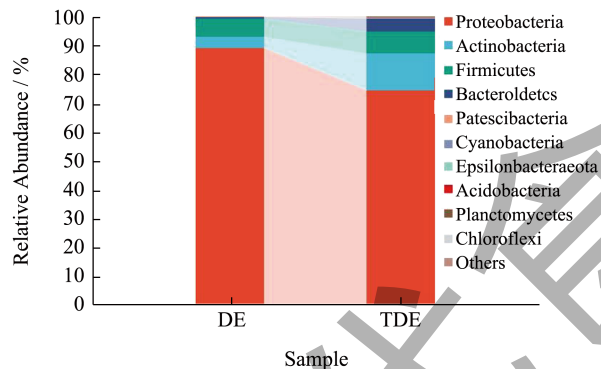


图 9 DE 与 TDE 组门水平微生物相对丰度

Fig.9 Relative abundance of phylum level microorganisms in DE and TDE

图 9 为各组相对丰度前 10 菌门。DE 优势菌为变形菌门 (Proteobacteria) 占到 89.01%，而厚壁菌门 (Firmicutes) 与放线菌门 (Actinobacteria) 占比不到 10%，分别为 6.16% 和 3.98%；TDE 组优势菌为变形菌门 (Proteobacteria) 占 74.38%，放线菌门 (Actinobacteria) 则达到占 12.89%，厚壁菌门 (Firmicutes) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 占比也不到 10%^[12]，为 7.61% 和 4.22%。从丰度占比中可以看出，TDE 组相对 DE 组变形菌门 (Proteobacteria) 相对丰度有所下降，于此相对的是放线菌门 (Actinobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 相对丰度均上升^[12]，由于总体菌落总数差距过大，因此可以看出清洗能有效降低 DE

组蛋壳表面微生物总数和丰度，可以说明清洗能够有效减少 CE 组蛋壳表面微生物的数量，而造成黑臭的重要菌门——变形菌门^[25] (Proteobacteria) 受到减菌处理的影响尤为明显。

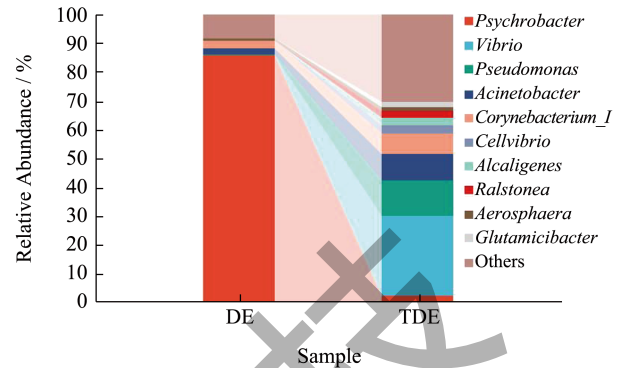


图 10 DE 与 TDE 组属水平相对丰度

Fig.10 Relative abundance of genus level between DE and TDE

图 10 为各组相对丰度前 10 菌属。DE 组优势菌属为嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 占 86.01%，不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 占 2.20%；TDE 组优势菌群为弧菌属 (*Vibrio*) 占 27.57%、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 占 12.20%、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 占 9.17%、棒杆菌属_1 (*Corynebacterium_1*) 占 7.11、纤维弧菌属 (*Cellvibrio*) 占 2.87%、产碱菌属 (*Alcaligenes*) 占 2.62%、嗜冷杆菌 (*Psychrobacter*) 占 2.60%、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia*) 占 2.32%。在 DE 组中丰度占比仅 2.21% 的不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 则在 TDE 组中升至 9.22%。DE 中的优势菌属的嗜冷杆菌 (*Psychrobacter*)，在经过减菌处理后在 TDE 中的占比仅为 2.60%^[12]，由此可见对蛋壳表面进行减菌处理能够有效抑制嗜冷杆菌属，从而降低由该菌属导致的蛋白质降解现象^[26]。对蛋清劣化的色度^[27]、疏水性^[28]、凝胶性^[29]均有不良影响的罗尔斯通氏菌属^[30]未被完全清除，丰度为 2.32%，这减菌处理后腌制咸蛋仍有“黑黄”蛋出现的现象一致^[12]。

值得注意的是，原本 DE 组中丰度不到 1% 的弧菌属 (*Vibrio*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 则在 TDE 组中成为优势菌属，丰度占比分别为 27.54% 和 12.19%，均具有较高的丰度。弧菌属具有较好的耐盐碱性^[31]，在加工咸蛋和皮蛋时受高盐或高碱的抑制作用较弱，易引发产品品质劣变问题。假单胞菌属能抑制变形杆菌产生致黑现象^[32]，可以推测其对咸蛋加工过程中能够起到抑制“黑黄”产生的效果^[12]。

通过 BugBase 预测得到的细菌群落表型分析示

例，图 11 中展示了样本细菌群落在氧化胁迫耐受性和致病性等表型上的相对丰度差异。

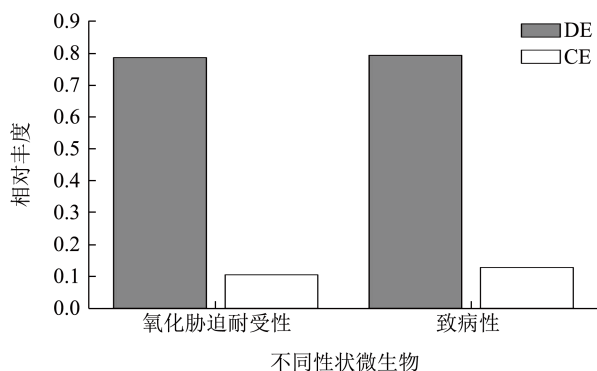


图 11 DE 和 TDE 组微生物表型预测

Fig.11 Prediction of microbial phenotype in DE and TDE groups

由图 11 可以看出，TDE 组氧化胁迫耐受性菌和致病性菌的相对丰度对比 DE 组显著减少，说明减菌处理能有效清除鸭蛋蛋壳表面的厌氧菌群和致病性菌群，进而在后续加工过程中降低鸭蛋因这些微生物影响而导致的品质劣变（如黑黄、黑圈等）等情况。鸭蛋具致病性的微生物在清洗后脏污蛋相对丰度显著降低；由图 11 可知清洗后脏污蛋氧化胁迫耐受性菌群相对丰度显著低于清洗前脏污蛋蛋，说明鲜鸭蛋上承载的厌氧菌群和致病性菌群可采用

具有一定氧化性的清洗剂去除。

2.4.3 减菌处理前后鸭蛋菌群功能分析

图 12、13 分别展示了干净蛋和脏污蛋清洗前后微生物涉及的功能通路，其中新陈代谢（Metabolism）部分所含通路 C、E、F、G、H、I、P、Q 分别代表能源生产和转换、氨基酸转运和代谢、核苷酸转运和代谢、碳水化合物运输和代谢、辅酶运输和代谢、脂质运输和代谢、无机离子转运和代谢、次级代谢物生物合成^[12]。图 12、13 中，DE 组与 TDE 组在氨基酸转运和代谢通路上相对丰度基本一致，说明清洗操作并不会影响鸭蛋内氨基酸正常的转运和代谢^[33]；综合图 12、13 发现微生物在脂质运输和代谢通路上的微生物相对丰度 DE>>TDE，次级代谢物生物合成、转运和分解代谢通路上微生物相对丰度 DE>TDE，对比发现脏污蛋微生物致脂质氧化分解成次级代谢物的能力强，推测 DE 组微生物在脂质代谢通路的活跃度要明显高于 TDE 组^[34]，脂质氧化形成次级代谢物的能力也强于 TDE 组。在氨基酸转运和代谢通路上微生物丰度：DE=TDE，无机离子转运和代谢通路上微生物丰度 4 组差异并不明显。辅酶运输和代谢通路上微生物丰度也呈现 DE>CE=TCE=TDE 的规律，也说明了 DE 中辅酶参与的生化反应更为活跃^[12,35]。

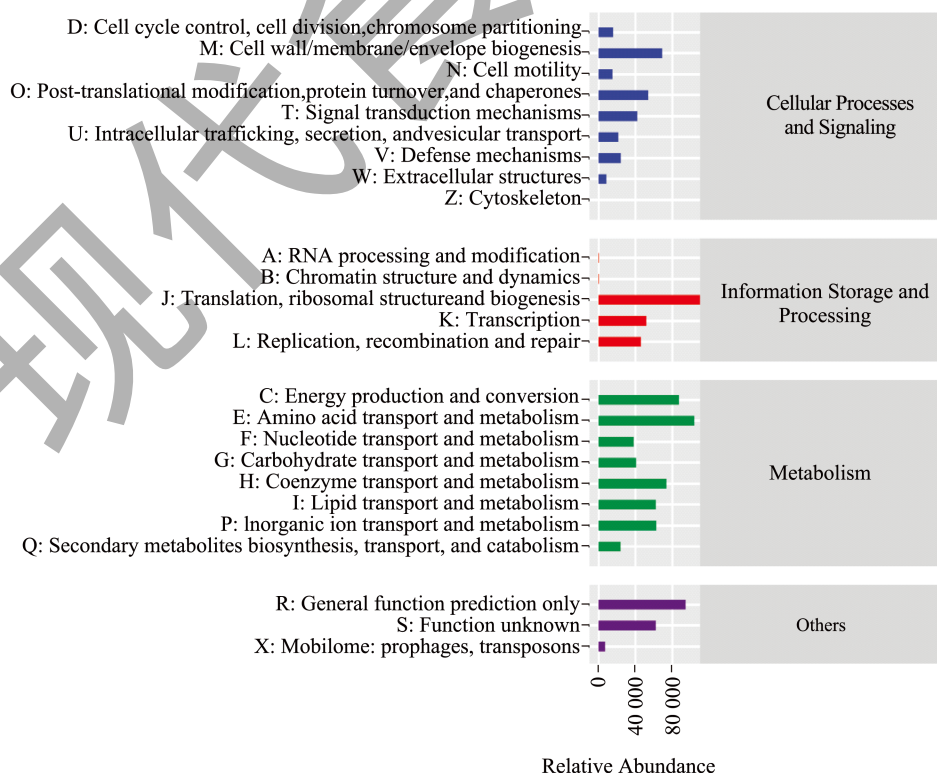


图 12 DE 微生物代谢通路情况

Fig.12 Metabolic pathways of DE microorganisms

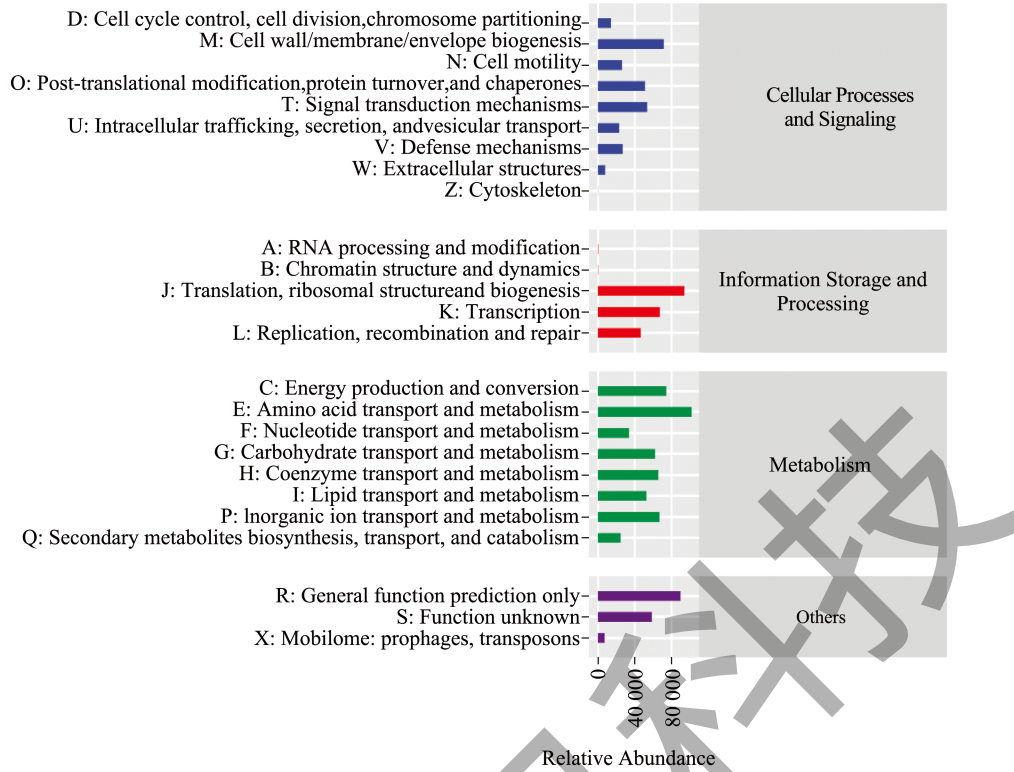


图 13 TDE 微生物代谢通路情况

Fig.13 Metabolic pathways of TDE microorganisms

图 14 反映了各组代谢通路物种组成情况，DE 组主要微生物为 *Psychrobacter*（嗜冷菌属）、*Acinetobacter*（不动杆菌属）等，TDE 组的主要微生物为 *Pseudomonas*（假单胞菌属）、*Acinetobacter*（不动杆菌属）、*Vibrio*（弧菌属）等^[12]。

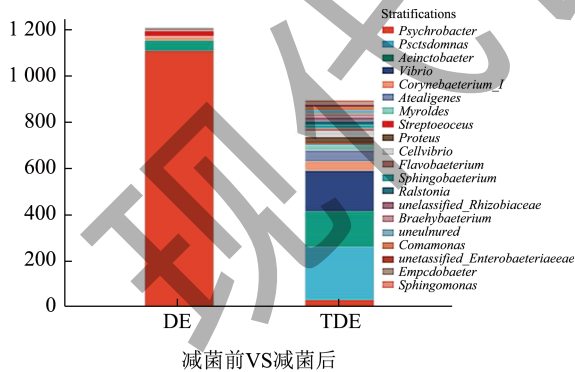


图 14 各组代谢通路物种组成情况

Fig.14 Species composition of each metabolic pathway

2.5 减菌处理对盐腌鸭蛋黑黄率和残留氯的影响

DE、TDE 组鸭蛋制作成咸蛋的黑黄率统计结果见图 15。严重脏污蛋 DE 加工 BSE 占 7.5%~8.0%，

减菌处理后“黑黄”率显著降低至 2%，减菌处理能有效降低盐腌鸭蛋黑黄的发生率。因此，若原料鸭蛋表面脏污严重，则必须进行减菌处理后加工^[36]。

GB 2749 蛋与蛋制品中未涉及残留氯的检测，参照 GB 14934 消毒餐（饮）具的卫生标准检测去壳后蛋白表面残留氯，结果表明以上各组清洗剂清洗熏蒸后残留氯均 < 0.03 mg/100 cm² 的标准，合格。

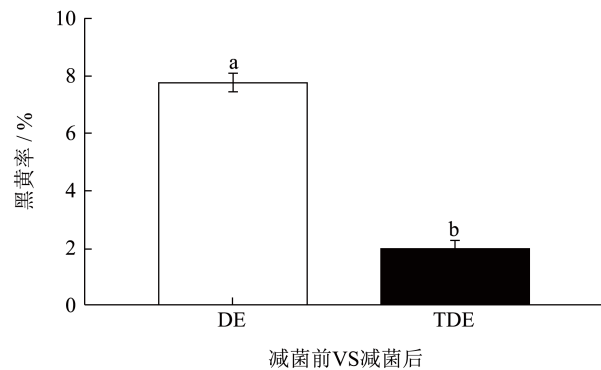


图 15 减菌处理前后鸭蛋加工咸蛋黑黄率统计结果

Fig.15 Statistical results of black and yellow rate of duck eggs processed with salted eggs before and after sterilization treatment

3 结论

蛋壳表面的微生物总数和微生物种类经过减菌处理后均显著减少,绝大部分微生物可经过减菌处理而降至检出限以下,但不同微生物对减菌处理的敏感程度具有一定差异:DE 经过减菌处理,变形杆菌丰度由 89.01% 显著降至 7.61%,嗜冷杆菌属由 86.01% 降至 2.60%,表现出对减菌处理的高敏感度,弧菌属、不动杆菌属和假单胞菌属等对减菌处理敏感度低,减菌后仍占 27.57%;CE 减菌后,厚壁菌门丰度由 27.25% 降至 5.14%,放线菌门由 17.28% 降低到 4.64%,7.91% 的弯曲杆菌属则被完全清除。

微生物表型分析表明,厌氧的厚壁菌门是革兰氏阴性菌,有一定的氧化胁迫耐受力,使其对减菌处理敏感度降低而成为减菌后蛋壳上的优势菌;鸭蛋壳上具致病性的微生物主要为变形杆菌门,是需氧菌,其氧化胁迫耐受力较低、可采用具氧化性的清洗剂去除。

微生物功能预测表明,嗜冷菌属、不动杆菌属等微生物影响蛋黄的代谢活动的主要途径是脂质运输和代谢、无机离子与氨基酸转运、脂质代谢和次级代谢物生物合成等;微生物在上述通路的丰度和活跃度均为 DE>CE,DE 减菌后微生物在脂质氧化、氨基酸转运和代谢、辅酶运输代谢通路上的活跃度显著降低。

参考文献

- [1] 沈贵银,郑微微.我国鸭蛋市场与产业调查分析报告[J].农产品市场,2021,10:50-52.
- [2] 王云浩,郑玉才,李志雄,等.不同种类禽蛋的蛋品质和蛋内营养成分的比较分析[J].畜牧与兽医,2022,54(5):40-44.
- [3] 孙静,杜金平,卢立志,等.鸭蛋菌落数及洁蛋加工[J].食品安全导刊,2018(31):28-29.
- [4] ZHAO Y, LI K, LUO Q, et al. Comparison of the intestinal microbial community in ducks reared differently through high-throughput sequencing [J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 9015054.
- [5] 李秋雨,刘红梅,李彦,等.真空熟制咸鸭蛋“黑圈”产生的原因分析[J].现代食品科技,2021,37(9):234-241,215.
- [6] JOCELYN M G, ANDRES R G, LILIANA S F, et al. Analysis of neutral electrolyzed water anti-bacterial activity on contaminated eggshells with salmonella enterica or Escherichia coli [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 320(C): 108538.
- [7] CHUNG H, HYOB I K, MYEONG D, et al. Effect of chlorine dioxide gas application to egg surface: microbial reduction effect, quality of eggs, and hatchability [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(3): 487-497.
- [8] 迟玉杰,迟媛,弓敏,等.一种基于超声协同微纳米气泡技术的鸡蛋清洗及消毒方法:中国,CN110393159B[P] 2021-10-26[2023-05-29].
- [9] LIAN Z X, QIAO L S, ZHU G H, et al. Use of sodium dodecyl sulfate pretreatment and 2-stage curing for improved quality of salted duck eggs [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(3): 354-361.
- [10] 安静,杨曙明,曾勇,等.新疆规模化蛋鸡场清洁消毒剂使用及质量安全问题调查[J].中国畜牧杂志,2020,56(8): 238-240.
- [11] 陈欢,胡传珍,张立钊,等.油茶籽粕鸭蛋去污除菌清洗剂应用效果的研究[J].食品安全质量检测学报,2019, 10(20):6975-6980.
- [12] 孙静,杜金平,皮劲松,等.一种降低咸鸭蛋黑黄率的加工方法:中国,CN115399364A[P].2022-11-29[2023-05-29].
- [13] 梁国雄,李健,和俊,等.番鸭种蛋孵化前清洗用药物浓度的研究[J].中国家禽,2017,39(4):66-67.
- [14] GB/T 5750.11-2006,生活饮用水标准检验方法 消毒剂指标[S].
- [15] GB 14934-2016,食品安全国家标准 消毒餐(饮)具[S].
- [16] GB/T 4789.19-2003,食品卫生微生物学检验 蛋与蛋制品检验[S].
- [17] GB 2749-2005,食品安全国家标准 蛋与蛋制品[S].
- [18] 刘玉兰,郑婷婷,马宇翔,等.臭氧熏蒸对玉米胚中真菌毒素的降解消除作用[J].食品科学,2022,43(3):77-82.
- [19] 姚尧.臭氧处理结合气调包装对冷鲜鸡肉贮藏品质的影响[D].天津:天津农学院,2019.
- [20] 王旭峰,靳鹏,张遵.三氯异氰尿酸生产合成及应用进展[J].中国氯碱,2018(6):19-23.
- [21] LIU L, LAN W Q, WANG Y B, et al. Antibacterial activity and mechanism of slightly acidic electrolyzed water against *Shewanella putrefaciens* and *Staphylococcus saprophytic* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 592: 44-50.
- [22] YANG G Q, SHI Y Q, ZHAO Z Y, et al. Comparison of inactivation effect of slightly acidic electrolyzed water and sodium hypochlorite on *Bacillus cereus* spores [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(3): 192-201.
- [23] CAO W, ZHU Z W, SHI Z X, et al. Efficiency of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of *Salmonella enteritidis* and its contaminated shell eggs [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009 Mar 31;130(2):88-93.
- [24] 江琦,伍志航,何海彤,等.贮藏温度对鸭蛋品质的影响及鸭蛋涂膜保鲜剂的保鲜效果研究[J].食品工程,2018, 2:40-46.
- [25] 谢雨衡.黑臭水体形成过程及致臭物质产生条件的研究[D].南宁:广西大学,2020.
- [26] ZHANG C Y, CHEN W H, ZHANG Y, et al. Influence of microorganisms on the variation of raw and oxidatively torrefied microalgal biomass properties [J]. Energy, 2023: 127612.

- [27] YE Y, LIA J, ZHANG Z Y, et al. Effect of starch on the gel properties and protein conformation of egg white subjected to alkali-heat treatment [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2023, 58(4): 1879-1890.
- [28] FAN H, AI M M, CAO Y Y, et al. Understanding the hydration of alkali-induced duck egg white gel at high temperature [J]. *LWT*, 2021, 142: 110976.
- [29] YAO X J, XU J C, BENU A, et al. Mooncake production waste: nutritional value and comprehensive utilization of salted duck egg white [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(8): e16772.
- [30] WEN C L, LI Q L, LAN F R, et al. Microbiota continuum along the chicken oviduct and its association with host genetics and egg formation [J]. *Poultry Science*, 2021, 100(7): 101104.
- [31] 胡志恒,李玉梅,李强,等.海洋贝类肠道弧菌21Z1碱性蛋白酶分离纯化及酶学性质[J].*济南大学学报(自然科学版)*,2018,32(1):77-82.
- [32] JANE P, JAKUB G, JOANNA K P, et al. The effect of fluoroquinolones and antioxidants on biofilm formation by *Proteus mirabilis* strains [J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2022, 21(1): 1-10.
- [33] AKANKSHA T, CHEN X Q, UMAIR S, et al. Effect of slightly acidic electrolyzed water on amino acid and phenolic profiling of germinated brown rice sprouts and their antioxidant potential [J]. *LWT*, 2022, 157: 113119.
- [34] FENG L, TANG N C, LIU R J, et al. The relationship between flavor formation, lipid metabolism, and microorganisms in fermented fish products [J]. *Food & Function*, 2021, 12(13): 5685-5702.
- [35] FABIEN P, ARTHUR B, JIN-HO L, et al. Recent advances in the metabolic pathways and microbial production of coenzyme Q [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38(4): 58.
- [36] ZHANG D, YANG H L, LAN S H, et al. Evolution of urban black and odorous water: The characteristics of microbial community and driving-factors [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2022, 112: 94-105.

现代食品科技