

冷藏鲤鱼和罗非鱼优势腐败菌腐败能力分析

许振伟^{1,2}, 李学英¹, 杨宪时^{1,*}, 郭全友¹, 姜朝军¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海德诺产品检测有限公司, 上海 200436)

摘要: 通过分析接种腐败菌的鲤鱼和罗非鱼无菌鱼块贮藏中感官、腐败代谢产物和腐败菌的变化, 以腐败菌的生长动力学参数和腐败代谢产物的产量因子($Y_{\text{TVBN/CFU}}$)为指标, 探讨冷藏鲤鱼和罗非鱼优势腐败菌假单胞菌和腐败希瓦氏菌的腐败能力。结果表明: 接种腐败希瓦氏菌和恶臭假单胞菌的鲤鱼无菌鱼块的货架期分别为 132h 和 162h, 此时的 TVBN 值为 27.12mg/100g 和 22.51mg/100g, 腐败希瓦氏菌和恶臭假单胞菌菌数为 8.96 lg(CFU/g) 和 9.07 lg(CFU/g), 产量因子 $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ 为 9.28×10^{-9} mg TVBN/CFU 和 1.81×10^{-8} mg TVBN/CFU。接种荧光假单胞菌和腐败希瓦氏菌的罗非鱼无菌鱼块的货架期分别为 132h 和 144h, 此时的 TVBN 值为 23.46mg/100g 和 24.30mg/100g, 荧光假单胞菌和腐败希瓦氏菌菌数为 8.83 lg(CFU/g) 和 9.12 lg(CFU/g), 产量因子 $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ 为 1.67×10^{-8} mg TVBN/CFU 和 9.10×10^{-9} mg TVBN/CFU。结合两种养殖鱼冷藏过程中的菌相变化和腐败菌在腐败过程中的作用, 初步得出冷藏罗非鱼和鲤鱼的特定腐败菌是假单胞菌, 两种腐败菌都具有较强的腐败能力。

关键词: 腐败能力; 假单胞菌; 腐败希瓦氏菌; 鲤鱼; 罗非鱼; 大黄鱼

Analysis of Spoilage Ability of Dominant Spoilage Bacteria from Stored Chilled *Cyprinus carpio* and *Oreochromis niloticus*

XU Zhen-wei^{1,2}, LI Xue-ying¹, YANG Xian-shi^{1,*}, GUO Quan-you¹, JIANG Chao-jun¹

(1. East China Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. Dts China Co. Ltd., Shanghai 200436, China)

Abstract: Sensory quality, the growth kinetic parameters of spoilage bacteria and the yield factor of metabolic products, $Y_{\text{TVBN/CFU}}$, were assayed on sterile *Cyprinus carpio* and *Oreochromis niloticus* tissue blocks inoculated with spoilage bacteria during chilled storage. The spoilage ability of two dominant spoilage bacteria, *Pseudomonas* spp. and *Shewanella putrefaciens*, were analyzed on *Cyprinus carpio* and *Oreochromis niloticus* stored aerobically under chilled conditions. The post-inoculation shelf-lives of sterile *Cyprinus carpio* tissue blocks inoculated with *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas putida* were 132 h and 162 h, respectively, the TVBNs 27.12 mg/100 g and 22.51 mg/100 g, the bacterial counts 8.96 lg(CFU/g) and 9.07 lg(CFU/g) and the $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ values 9.28×10^{-9} mg TVBN/CFU and 1.81×10^{-8} mg TVBN/CFU. The post-inoculation shelf-lives of sterile *Oreochromis niloticus* tissue blocks inoculated with *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens* were 132 h and 144 h, respectively, the TVBNs 23.46 mg/100 g and 24.30 mg/100 g, the bacterial counts 8.83 lg(CFU/g) and 9.12 lg(CFU/g) and the $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ values 1.67×10^{-8} mg TVBN/CFU and 9.10×10^{-9} mg TVBN/CFU. Based on the microflora changes and the role of the spoilage bacteria during chilled storage of the two species of cultured fish, it can be preliminarily concluded that the special spoilage organisms of stored chilled *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* was *Pseudomonas* spp and that the spoilage ability of *Pseudomonas* spp and *Shewanella putrefaciens* is strong.

Key words: spoilage ability; *Pseudomonas* spp.; *Shewanella putrefaciens*; *Cyprinus carpio*; *Oreochromis niloticus*; *Pseudosciaena crocea*

中图分类号: S983

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0243-04

我国是世界上水产品产量最大的国家, 也是世界上唯一养殖量超过捕捞量的国家, 鲤鱼和罗非鱼是我国重要

的淡水养殖鱼类, 大力发展高品质养殖鱼的冷却链鲜鱼物流产业, 是解决淡水鱼过分依赖活鱼流通的有效途径^[1]。

收稿日期: 2011-01-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30771675); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金项目(2011M04)

作者简介: 许振伟(1986—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品微生物安全与质量控制。E-mail: xuzhenweixu@163.com

* 通信作者: 杨宪时(1954—), 男, 研究员, 本科, 研究方向为水产品贮藏加工与品质控制。E-mail: xianshiyang@126.com

现有的研究已表明特定腐败菌是造成腐败的主要因素,而特定腐败菌的鉴别,分析腐败菌产生异味的定性能力(腐败潜在性)和产生腐败代谢物的定量能力(腐败能力)是必要的^[2]。目前国外已有对磷发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)^[3]、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)^[4]等腐败菌腐败能力的报道,国内曾对大黄鱼腐败希瓦氏菌腐败能力做初步分析^[5]。本实验通过将养殖鲤鱼和罗非鱼优势腐败菌假单胞菌和腐败希瓦氏菌,分别接种到相应的无菌鱼块中,分析腐败菌的腐败能力,并将其与海水养殖大黄鱼进行比较研究,旨在研究两种优势腐败菌的腐败能力和腐败特性,为开发鱼类保鲜技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

淡水养殖鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和海水养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)购于上海铜川路水产批发市场。个体大小 600~700g/尾,充氧保活运送到实验室,立即冰水休克致死,用于制备无菌鱼块。

鲤鱼鱼块接种的腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)来自有氧冷藏鲤鱼货架期终点分离、纯化、鉴定得到的纯菌株,罗非鱼鱼块接种的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)来自有氧冷藏罗非鱼货架期终点分离、纯化、鉴定得到的纯菌株;大黄鱼鱼块接种的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌来自有氧冷藏大黄鱼货架期终点分离、纯化、鉴定得到的纯菌株。

营养琼脂培养基、铁琼脂培养基 上海中科昆虫生物技术开发有限公司;假单胞菌专用培养基 英国 Oxoid 公司。

高精度低温培养箱、微波炉。

1.2 方法

1.2.1 无菌鱼块的制备

依据 Herbert 等^[6]的方法,无菌操作制备无菌鱼块。鲤鱼、罗非鱼和大黄鱼清洗后,去鳞、去鱼鳍、去内脏、去头、清洗干净。在无菌工作台上把鱼放在铺有保鲜膜的砧板上,用吸水纸把鱼体上的水吸干后,用 75% 酒精擦拭鱼体,用灭菌解剖刀切取背脊部无污染鱼肉,不能切至腹腔,去掉鱼皮,用灭菌剪刀修剪鱼块至大小形状一致,每条鱼制备两片无菌鱼块(25~35g/块)。测定制备好的无菌鱼块的菌落总数小于 10² CFU/g,符合实验要求。

1.2.2 接种纯菌液的制备

挑取实验室保存的有氧冷藏鲤鱼、罗非鱼和大黄鱼

货架期终点分离、纯化、鉴定得到的腐败希瓦氏菌、荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌的纯菌株,营养琼脂培养基划线,25℃有氧培养。其余操作参照文献^[5]方法,制备腐败希瓦氏菌和假单胞菌的纯菌液。

1.2.3 接种与贮藏实验

参照文献^[5]中的接种方法,进行纯菌液的接种与接种后的贮藏实验。其中罗非鱼鱼块分别接种来自冷藏罗非鱼货架期终点的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌,鲤鱼鱼块分别接种冷藏鲤鱼货架期终点的腐败希瓦氏菌和恶臭假单胞菌,大黄鱼鱼块分别接种冷藏大黄鱼货架期终点的腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌。

选取制备好的无菌鱼块,平铺在灭菌不锈钢网篮中,分别浸入 10⁶CFU/mL 菌液中,10s 后捞出沥干。将接种后的鱼块放在灭菌的搪瓷盘中,盖上有漏气孔薄膜,放入高精度低温培养箱中,控制贮藏温度(5±0.1)℃。每隔 6h 或 12h 取出接种的鱼块进行感官评价、挥发性盐基氮(total volatile base nitrogen, TVBN)、腐败希瓦氏菌和假单胞菌计数。

1.3 测定方法

1.3.1 感官评价

由 6 名经过训练的评价员组成感官评价小组,以生鱼的气味和蒸熟后鱼的气味和味道为依据。采用 3 分法对贮藏过程的接种鱼块进行感官评价,0 分为最好品质,1 分为鱼块的鲜香味消失,即高品质期终点;2 分为出现异臭味时的货架期终点即感官拒绝点^[7]。蒸熟时将接种鱼块放入微波炉中用 600W 功率档微波 3min 后立刻进行感官评价。

1.3.2 TVBN 测定

参照 GB/T 5009.44—2003《肉与肉制品卫生标准的分析方法》^[8],采用半微量定氮法进行测定。

1.3.3 微生物计数

参照 GB 4789.2—2010《食品卫生微生物学检验菌落总数测定》^[9]。假单胞菌:假单胞菌专用培养基,25℃有氧培养 24h,全部菌落计数。腐败希瓦氏菌:铁琼脂培养基,25℃有氧培养 24h,黑色菌落计数。

1.3.4 腐败菌生长动力学模型

用修正的 Gompertz 方程^[10]描述微生物的生长动态。修正的 Gompertz 方程如下所示:

$$\lg N(t) = \lg N_0 + \lg \frac{N_{\max}}{N_0} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} \times 2.718}{\lg(N_{\max}/N_0)} \times (\text{Lag} - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

式中:lgN(t)为t时间的腐败菌数量/(CFU/g),lgN₀、lgN_{max}为初始菌数和最大菌数/(CFU/g),μ_{max}为最大比生长速率/h⁻¹,Lag为延滞时间/h。

1.3.5 腐败能力的定量分析

参照文献[5]把产生异味时单位腐败菌产生的腐败代谢产物的量, 作为腐败能力的定量指标, 腐败代谢产物产量因子($Y_{\text{TVBN/CFU}}$, mg TVBN/CFU)如下所示:

$$Y_{\text{TVBN/CFU}} = \frac{(\text{TVBN})_s - (\text{TVBN})_0}{N_s - N_0} \quad (2)$$

式中: N_0 为初始菌数/(CFU/g); N_s 为货架期终点时的腐败菌数即最小腐败菌数/(CFU/g); $(\text{TVBN})_0$ 、 $(\text{TVBN})_s$ 为初始点和货架期终点时的 TVBN 量/(mg/100g)。

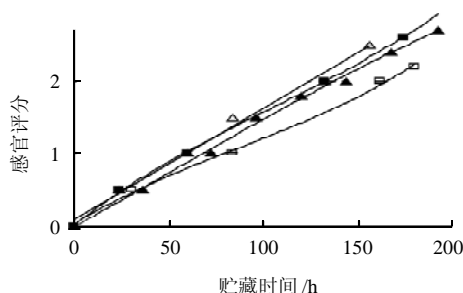
1.4 数据处理

感官和 TVBN 的变化用 Microsoft Excel 进行多项式回归分析, 腐败菌生长采用修正的 Gompertz 方程描述, 用 Statistica 6.5 进行非线性回归分析。

2 结果与分析

2.1 贮藏中感官变化

由 6 名经过训练的评价员组成感官评价小组, 采用 3 分法进行感官评价。由图 1 可见, 接种腐败希瓦氏菌和恶臭假单胞菌的鲤鱼鱼块分别在 60h 和 84h 达到高品质期终点, 在 132h 和 162h 达到感官拒绝点。接种腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的罗非鱼鱼块分别在 72h 和 60h 达到高品质期终点, 在 144h 和 132h 达到货架期终点。



□ 鲤鱼无菌鱼块接种恶臭假单胞菌 ■ 鲤鱼无菌鱼块接种腐败希瓦氏菌
△ 罗非鱼无菌鱼块接种荧光假单胞菌 ▲ 罗非鱼无菌鱼块接种腐败希瓦氏菌

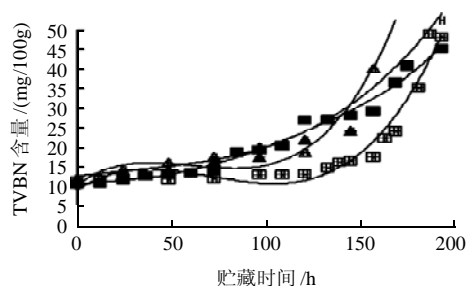
图1 接种腐败菌的无菌鱼块在5℃贮藏的感官变化

Fig.1 Sensory quality changes of sterile fish blocks inoculated spoilage bacteria and stored at 5 °C

2.2 贮藏中 TVBN 值的变化

TVBN 是腐败微生物降解蛋白质和非蛋白质的含氮物质产生的, 被广泛用于判断水产品的新鲜程度。由图 2 可见, 在贮藏初期 TVBN 值变化不明显, 随着贮藏时间的延长, TVBN 值明显增加。接种腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的罗非鱼鱼块达到感官拒绝点时 TVBN 含量为 24.30mg/100g 和 23.46mg/100g。接种腐败希瓦氏菌

和恶臭假单胞菌的鲤鱼鱼块达到感官拒绝点时 TVBN 含量为 27.12mg/100g 和 22.51mg/100g。



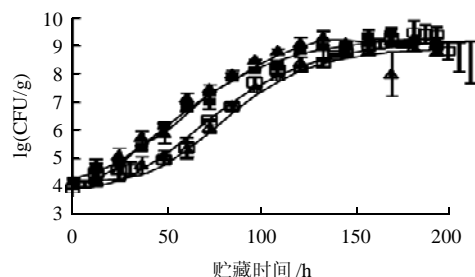
□ 鲤鱼无菌鱼块接种恶臭假单胞菌 ■ 鲤鱼无菌鱼块接种腐败希瓦氏菌
△ 罗非鱼无菌鱼块接种荧光假单胞菌 ▲ 罗非鱼无菌鱼块接种腐败希瓦氏菌

图2 接种腐败菌的无菌鱼块在5℃贮藏TVBN的变化

Fig.2 Total volatile base nitrogen changes of sterile fish blocks inoculated spoilage bacteria and stored at 5 °C

2.3 贮藏中微生物的变化

微生物的生长动态可用修正的 Gompertz 方程描述。由图 3 可见, 腐败希瓦氏菌生长变化较假单胞菌快, 罗非鱼鱼块接种腐败菌的生长变化较鲤鱼鱼块中腐败菌的变化快。



□ 鲤鱼无菌鱼块接种恶臭假单胞菌 ■ 鲤鱼无菌鱼块接种腐败希瓦氏菌
△ 罗非鱼无菌鱼块接种荧光假单胞菌 ▲ 罗非鱼无菌鱼块接种腐败希瓦氏菌

图3 接种腐败菌的无菌鱼块在5℃贮藏腐败菌数的变化

Fig.3 Microbial count change of sterile fish blocks inoculated spoilage bacteria and stored at 5 °C

2.4 腐败菌生长动力学参数

根据修正的 Gompertz 方程, 微生物生长动力学参数可由 Statistica 6.5 进行非线性回归分析得到。表 1 是腐败菌的生长动力学参数。通过鲤鱼、罗非鱼和大黄鱼鱼块接种腐败菌的生长动力学参数比较可知, 腐败希瓦氏菌和假单胞菌的最大腐败菌数(N_{max})都大于最小腐败菌数(N_s), 表明二者都能引起接种鱼块的腐败。鲤鱼和罗非鱼鱼块中腐败希瓦氏菌和假单胞菌的最大比生长速率(μ_{max})基本相一致, 分别为 0.0538、0.0544、0.0629h⁻¹ 和 0.0602h⁻¹, 大黄鱼鱼块中腐败希瓦氏菌的最大比生长速

率明显大于假单胞菌,分别为 0.0927h^{-1} 和 0.0631h^{-1} 。罗非鱼鱼块中假单胞菌的生长延滞时间(Lag)明显较腐败希瓦氏菌长,分别为37.3h和15.4h,鲤鱼鱼块中假单胞菌的生长延滞时间明显较腐败希瓦氏菌长,分别为26.5h和13.0h。而大黄鱼鱼块中腐败希瓦氏菌生长延滞时间明显较假单胞菌长,分别为41.1h和21.1h。

表1 无菌鱼块5℃贮藏腐败菌生长动力学参数

Table 1 Microbial growth kinetic parameters for sterile fish blocks inoculated spoilage bacteria and stored at 5℃

鱼块种类	腐败菌类型	生长动力学参数				
		μ_{\max}/h^{-1}	Lag/h	$\lg N_{\max}(\lg \text{CFU/g})$	$\lg N_s(\lg \text{CFU/g})$	$\lg N_0(\lg \text{CFU/g})$
鲤鱼	腐败希瓦氏菌	0.0538	13.0	9.34	8.96	4.18
	恶臭假单胞菌	0.0544	26.5	9.47	9.07	3.92
罗非鱼	腐败希瓦氏菌	0.0629	15.4	9.34	9.12	4.24
	荧光假单胞菌	0.0602	37.3	8.94	8.83	4.21
大黄鱼	腐败希瓦氏菌	0.0927	41.1	8.96	8.71	4.28
	荧光假单胞菌	0.0631	21.1	9.18	8.91	3.92

2.5 腐败菌腐败能力的定量分析

以产生异臭味时单位腐败菌产生的腐败代谢产物的量,作为腐败菌腐败能力的定量指标。由表2可知,罗非鱼鱼块接种假单胞菌的产量因子 $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ 略大于腐败希瓦氏菌,鲤鱼鱼块接种假单胞菌的产量因子 $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ 略大于腐败希瓦氏菌,大黄鱼鱼块接种腐败希瓦氏菌的产量因子 $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ 略大于假单胞菌。

表2 接种腐败菌的无菌鱼块5℃贮藏腐败代谢产物的产量因子

Table 2 Yield factors of microbial metabolites for sterile fish blocks inoculated spoilage bacteria and stored at 5℃

鱼块种类	腐败菌类型	产量因子
		$Y_{\text{TVBN/CFU}}/(\text{mg TVBN/CFU})$
鲤鱼	腐败希瓦氏菌	9.28×10^{-9}
	恶臭假单胞菌	1.81×10^{-8}
罗非鱼	腐败希瓦氏菌	9.10×10^{-9}
	荧光假单胞菌	1.67×10^{-8}
大黄鱼	腐败希瓦氏菌	4.49×10^{-8}
	荧光假单胞菌	3.72×10^{-8}

3 讨论与结论

Gram等^[11]在研究尼罗河新鲜和腐败着的鲈鱼细菌学时,将腐败菌接种到杀菌过的鲈鱼和杀菌过的肉汤中,通过其腐败气味,以确定其腐败能力。Dalgaard^[4]在利用无菌鳕鱼块研究包装鳕鱼腐败菌腐败能力时,得出磷发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)的产量因子($Y_{\text{TMA/CFU}}$)明显大于腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)的产量因子,初步得出磷发光杆菌是包装鳕鱼的特定腐败菌。

其他鱼类腐败菌及其腐败能力的研究基质和方法有待于进一步研究^[12]。

李学英等^[5]对大黄鱼腐败菌腐败能力进行了初步分析,接种腐败希瓦氏菌的大黄鱼无菌鱼块在5℃贮藏,在157h达到货架期终点,此时的TVBN值、TMA值和腐败希瓦氏菌菌数分别为27.82mg/100g、18.02mg/100g和 $3.09 \times 10^9\text{CFU/g}$ 。而关于鲤鱼和罗非鱼腐败菌腐败能力的研究鲜有报道。

杨宪时等^[13]对罗非鱼冷藏过程细菌种群的变化进行研究,得出养殖罗非鱼0~10℃冷藏过程中,假单胞菌为优势腐败菌,荧光假单胞菌为最优势种群。张小伟等^[14-15]的研究表明有氧冷藏鲤鱼的优势腐败菌是假单胞菌。淡水鱼腐败过程中,假单胞菌占统治地位,而腐败希瓦氏菌次之。从本研究来看,罗非鱼鱼块接种假单胞菌的产量因子 $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ 略大于腐败希瓦氏菌,鲤鱼鱼块接种假单胞菌的产量因子 $Y_{\text{TVBN/CFU}}$ 略大于腐败希瓦氏菌。结合两种养殖鱼冷藏过程中的菌相变化和两种优势腐败菌在腐败过程中的作用^[13-15],可初步得出有氧冷藏罗非鱼的特定腐败菌是假单胞菌,有氧冷藏鲤鱼的特定腐败菌是假单胞菌。

参考文献:

- [1] 杨宪时,许钟. 养殖鱼冷却链鲜鱼物流产业的基本技术[J]. 渔业现代化, 2004(3): 38-39.
- [2] 杨宪时,许钟,肖琳琳. 水产食品特定腐败菌与货架期的预测和延长[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 106-111.
- [3] TRUDELSTRUP H L, HUSS H H. Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses[J]. Food Research International, 1998, 31(10): 703-711.
- [4] DALGAARD P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. Int J Food Microbiol, 1995, 26(3): 319-333.
- [5] 李学英,杨宪时,郭全友,等. 大黄鱼腐败菌腐败能力的初步分析[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 316-319.
- [6] HERBERT R A, HENDRIE M S, GIBSON D M, et al. Bacteria active in the spoilage of certain sea foods[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1971, 34(3): 41-50.
- [7] TAOUKIS P S, KOUTSOUMANIS K, NYCHAS G J E. Use of time temperature integrators and predictive modeling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions[J]. Int J Food Microbiol, 1999, 53(2): 21-31.
- [8] 上海市食品卫生监督检验所. GB/T 5009.44—2003 肉与肉制品卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.2—2010 食品卫生微生物学检验菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [10] ZWIETERING M H, JONGENOURGER I, ROMBOUTS F M, et al. Modeling of the bacterial growth curve[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(13): 1875-1881.
- [11] GRAM L, CHRISTINA W N, HUSS H H. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch(*Lates niloticus*)[J]. International Journal of Food Microbiology, 1990, 10(4): 303-316.
- [12] 许振伟,许钟,杨宪时,等. 鱼类腐败菌腐败能力测定方法[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 355-359.
- [13] 杨宪时,郭全友,许钟. 罗非鱼冷藏过程细菌种群的变化[J]. 中国水产科学, 2008, 15(6): 1050-1055.
- [14] 张小伟,许钟,杨宪时,等. 鲤鱼冷藏中的鲜度变化与货架期[J]. 海洋渔业, 2010, 32(2): 211-217.
- [15] 张小伟,许钟,郭全友,等. 去除内脏对冰藏鲤感官、化学和微生物变化的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 37-42.