

大黄鱼中复合腐败菌腐败能力的分析

许振伟^{1,2}, 许 钟¹, 杨宪时^{1,*}, 郭全友¹, 李学英¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘 要: 通过分析接种腐败菌的大黄鱼无菌鱼块在贮藏中的感官、腐败代谢产物和腐败菌的变化, 以腐败菌生长动力学参数和腐败代谢产物产量因子($Y_{TVB-N/CFU}$ 和 $Y_{TMA/CFU}$)为指标, 探讨冷藏大黄鱼优势腐败菌(腐败希瓦氏菌、假单胞菌以及这两种菌的复合菌)的腐败能力。结果表明, 接种腐败希瓦氏菌、假单胞菌和复合菌的无菌鱼块的货架期分别为 168、174、168h, 说明接种假单胞菌的货架期较长。腐败希瓦氏菌、假单胞菌和复合菌的 $Y_{TVB-N/CFU}$ 基本一致, 腐败希瓦氏菌的 $Y_{TMA/CFU}$ 明显大于假单胞菌和复合菌, 腐败希瓦氏菌的腐败能力较假单胞菌和复合菌强。假单胞菌对腐败希瓦氏菌的生长有一定的拮抗作用, 但仅在较高数量时才有明显作用, 腐败希瓦氏菌是有氧冷藏养殖大黄鱼的特定腐败菌。

关键词: 大黄鱼; 优势腐败菌; 腐败能力; 腐败希瓦氏菌; 假单胞菌

Analysis of Spoilage Ability of Single and Mixed Spoilage Bacteria in *Pseudosciaena crocea*

XU Zhen-wei^{1,2}, XU Zhong¹, YANG Xian-shi^{1,*}, GUO Quan-you¹, LI Xue-ying¹

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

2. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Sensory quality, metabolic products of spoilage bacteria and change of spoilage bacteria were assayed on sterile *Pseudosciaena crocea* tissue blocks inoculated with spoilage bacteria, with $Y_{TVB-N/CFU}$ and $Y_{TMA/CFU}$, the growth kinetic parameters of the spoilage bacteria and the yield factor of microbial metabolites, respectively, used as the index. Spoilage ability of two spoilage bacteria *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas* spp., as well as the mixing of the two spoilage bacteria were analyzed on *Pseudosciaena crocea* stored aerobically at chilled condition. The results showed that shelf life was 168 h, 174 h, and 168 h, respectively, for sterile tissue blocks inoculated with *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp. and their mixture, while it was relatively longer with *Pseudomonas* spp. The $Y_{TVB-N/CFU}$ for *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp. and mixed bacteria was basically similar, meanwhile $Y_{TMA/CFU}$ for *Shewanella putrefaciens* was higher than for *Pseudomonas* spp. and mixed bacteria. The spoilage ability of *Shewanella putrefaciens* was more significant than *Pseudomonas* spp. and mixed bacteria. *Pseudomonas* spp. had inhibitory effect on the growth of *Shewanella putrefaciens* to some extent, however it was not significant until it reached high counts. *Shewanella putrefaciens* was specific spoilage organism in *Pseudosciaena crocea* stored at chilled temperature aerobically.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; dominant spoilage bacteria; spoilage ability; *Shewanella putrefaciens*; *Pseudomonas* spp.

中图分类号: S983

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0118-05

微生物活动是引起鲜鱼腐败变质的主要原因, 已有研究表明, 鱼体所含微生物中只有部分参与腐败过程, 这些适合生存和繁殖并产生强烈异臭味腐败代谢产物的微生物, 就是该鱼的特定腐败菌(specific spoilage

organisms, SSO)^[1]。特定腐败菌比其他微生物生长快, 并且腐败能力强^[2], 因此可采用抑制或降低特定腐败菌生长的处理和加工方法, 即使不影响其他微生物群落, 也会延长产品货架期^[3], 这为开发鱼类保鲜技术提供了

收稿日期: 2010-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771675); 科技部农业科技成果转化资金项目(2007GB23260281);

科技部中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2007M05)

作者简介: 许振伟(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事食品微生物安全与质量控制研究。E-mail: xuzhenweixu@163.com

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

新的思路。

郭全友等^[4]对冷藏东海暖水海域养殖大黄鱼进行研究,货架期终点时腐败希瓦氏菌比例达86%,其次是假单胞菌,表明腐败希瓦氏菌和假单胞菌是低温贮藏大黄鱼的优势腐败菌。李学英等^[5]对大黄鱼腐败希瓦氏菌腐败能力进行了初步分析,表明腐败希瓦氏菌具有很强的腐败潜力,但腐败活性低,需要较高浓度才能引起腐败。鱼类特定腐败菌的鉴别必须分析比较优势腐败菌的腐败能力。本实验将有氧冷藏大黄鱼在货架期终点分离、纯化、鉴定得到的优势腐败菌腐败希瓦氏菌和假单胞菌,分别接种到无菌鱼块中,比较这两种菌单一的腐败能力,并将这两种腐败菌按比例混合,分析对无菌鱼块的腐败能力,探讨两种优势腐败菌在参与腐败的过程中是拮抗、协同或是共生作用^[6],旨在分析复合菌大黄鱼优势腐败菌的腐败能力,为鱼类特定腐败菌的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

活大黄鱼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,用自来水冲洗鱼体,去头、去鳞、去内脏、去鳍,清洗干净,用于制备无菌鱼块。

半微量定氮仪 国药集团化学试剂有限公司;721型分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司;Sanyo MIR 553 低温培养箱 日本三洋电器集团;DS-1 高速组织捣碎机 上海精科实业有限公司;SEX-TJ 净化工作台 上海整新电子设备公司;L550/L530 低速台式离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 培养基

CM 559 假单胞菌专用培养基(supplemented with SR 103) 英国 OXOID Basingstoke 公司;铁琼脂培养基 上海中科昆虫生物技术开发有限公司。

1.3 无菌鱼块的制备

根据 Herbert 等^[7]的方法,无菌操作制备无菌鱼块。

1.4 纯菌液的制备与接种贮藏实验

1.4.1 接种纯菌液的制备

挑取实验室保存的有氧冷藏大黄鱼货架期终点分离、纯化、鉴定得到的腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)纯菌株,制备腐败希瓦氏菌和假单胞菌纯菌液^[5]。

1.4.2 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。其中复合菌以腐败希瓦氏菌和假单胞菌菌液体积比1:1接种。取浓度为 10^8 CFU/mL的各菌

液5mL,加入45mL灭菌生理盐水中,将该50mL菌液加入450mL灭菌生理盐水中,即稀释至 10^6 CFU/mL,将两种菌液以1:1比例混匀用于接种。

将接种后的鱼块置于灭菌的瓷盘中,覆盖有漏气孔保鲜膜,放于高精度低温培养箱中,控制贮藏温度(5 ± 0.1)℃。每隔6h或12h对接种的鱼块进行感官评价,挥发性盐基氮(total volatile base nitrogen, TVB-N)测定、三甲胺(trimethylamine, TMA)测定和腐败希瓦氏菌、假单胞菌和两者的复合菌菌落计数。

1.5 测定方法

1.5.1 感官评价

由6名经过训练的评价员组成感官评价小组,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,为高品质期(high quality life, HQL)终点;2分为明显出现异臭味,为货架期(shelf life, SL)终点即感官拒绝点^[8]。

1.5.2 TVB-N 测定

参照 GB/T 5009.44—2003《肉与肉制品卫生标准的分析方法》中半微量定氮法测定。

1.5.3 TMA 测定

参照 GB/T 5009.179—2003《火腿中三甲胺氮的测定》和许龙福等^[9]的修订方法,采用苦味酸法测定。

1.5.4 细菌计数与培养基

称取打碎鱼肉25g,加入225mL质量分数0.1%蛋白胨无菌生理盐水,高速振荡,以10倍梯度稀释后,取合适浓度稀释液0.1mL,涂布于培养基表面,每个稀释液做两个平行。

复合菌:营养琼脂培养基,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。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。

1.6 微生物生长动力学模型

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: $N(t)$ 为 t 时间的腐败菌数量/(CFU/g); N_0 、 N_{\max} 为初始菌数和最大菌落数/(CFU/g); μ_{\max} 为最大比生长速率/ h^{-1} ;Lag为延滞时间/h; t 为时间/h。

1.7 腐败能力的定量分析

以单位腐败菌产生的腐败代谢产物,作为腐败能力的定量指标,腐败代谢产物产量因子($Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ 和 $Y_{\text{TMA/CFU}}$)如下所示^[5]:

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

$$Y_{(TMA/CFU)} = \frac{(TMA)_s - (TMA)_0}{N_s - N_0} \quad (3)$$

式中：产量因子 $Y_{TVB-N/CFU}/(\text{mg TVB-N}/\text{CFU})$ ； $Y_{TMA/CFU}/(\text{mg TMA}/\text{CFU})$ ； N_0 为初始菌落数 $/(\text{CFU}/\text{g})$ ； N_s 为货架期终点时的腐败菌落数即最小腐败菌落数 $/(\text{CFU}/\text{g})$ ； $(TVB-N)_0$ 、 $(TVB-N)_s$ 为初始点和货架期终点时的 TVB-N 量 $/(\text{mg}/100\text{g})$ ； $(TMA)_0$ 、 $(TMA)_s$ 为初始点和货架期终点时的 TMA 量 $/(\text{mg}/100\text{g})$ 。

1.8 数据处理

感官评价和 TVB-N、TMA 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 贮藏中的感官变化

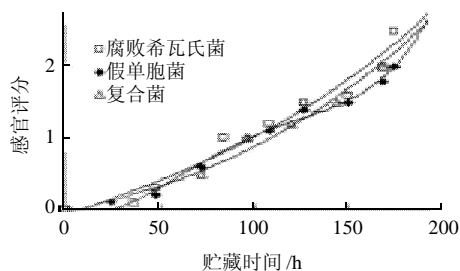


图1 接种腐败菌的无菌鱼块在 5℃ 贮藏的感官变化

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

由图 1 可知，接种腐败希瓦氏菌、假单胞菌、复合菌的鱼块分别在 84、96、96h 达到高品质期终点，分别在 168、174、168h 达到感官拒绝点。

2.2 贮藏中 TVB-N 的变化

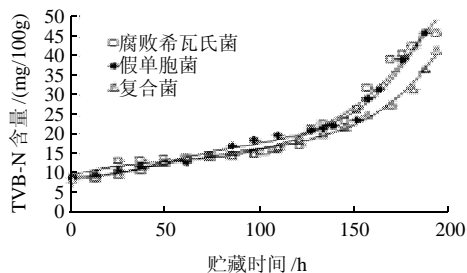


图2 接种腐败菌的无菌鱼块在 5℃ 贮藏 TVB-N 的变化

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

由图 2 可知，接种腐败希瓦氏菌、假单胞菌和复合菌的鱼块初始 TVB-N 值分别为 8.71、8.81、8.55mg/100g。贮藏初期 TVB-N 值变化不明显，随着贮藏时间的延长，TVB-N 值增加明显。在 120h 前，三者的 TVB-N 值较接近，曲线变化基本一致，150h 后接种腐败希瓦氏菌和假单胞菌鱼块的 TVB-N 值明显高于接种复合菌的 TVB-N 值。

2.3 贮藏中 TMA 的变化

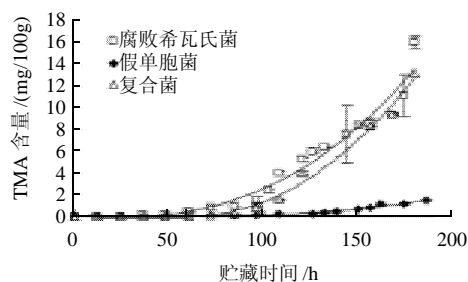


图3 接种腐败菌的无菌鱼块在 5℃ 贮藏 TMA 的变化

Fig.3 Trimethylamine change in sterile fish blocks inoculated with spoilage bacteria stored at 5 °C

由图 3 可知，在贮藏初期 TMA 值几乎接近于零，60h 后接种腐败希瓦氏菌和接种复合菌的鱼块 TMA 值随着贮藏时间开始快速增加，其中接种腐败希瓦氏菌鱼块的 TMA 值高于接种复合菌的 TMA 值；而接种假单胞菌鱼块的 TMA 值明显较低，腐败终点时 TMA 含量也很低。

2.4 贮藏中腐败菌菌落数的变化

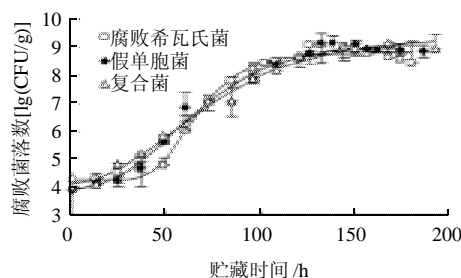


图4 接种腐败菌的无菌鱼块在 5℃ 贮藏腐败菌菌落数的变化

Fig. 4 Microbial counts change of sterile fish blocks inoculated with spoilage bacteria stored at 5 °C

采用修正 Gompertz 方程描述接种腐败希瓦氏菌、假单胞菌和复合菌的生长动态是典型的 S 型曲线，所得回归相关系数值均较高 (R^2 分别为 0.990、0.984、0.990)。由图 4 可知，假单胞菌和复合菌的延滞时间较接近，二者明显比腐败希瓦氏菌的延滞时间短，这与李学英等^[5]的研究相符。在贮藏初期鱼块营养物质丰富，腐败希

瓦氏菌和假单胞菌的生长互不影响, 此时属于微生物生长中的共生作用, 但随着贮藏时间的延长和鱼块营养物质的不断被消耗, 两种腐败菌的生长出现竞争作用, 假单胞菌对腐败希瓦氏菌有一定的抑制作用, 但抑制作用不明显。

2.5 腐败菌的生长动力学参数

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 of sterile fish blocks inoculated with spoilage bacteria stored at 5℃

腐败菌类型	μ_{\max}/h^{-1}	Lag/h	$\lg N_{\max}/[\lg(CFU/g)]$	$\lg N_s/[\lg(CFU/g)]$
腐败希瓦氏菌	0.0927	41.1	8.96	8.67
假单胞菌	0.0631	21.1	9.18	8.91
复合菌	0.0516	15.2	9.34	9.17

表1是腐败菌生长动力学参数。通过比较可知, 腐败希瓦氏菌、假单胞菌和复合菌的最大腐败菌数(N_{\max})都大于最小腐败菌数(N_s), 表明三者都能引起大黄鱼的腐败。三者的最大比生长速率(μ_{\max})分别为0.0927、0.0631 h^{-1} 和0.0516 h^{-1} , 其中腐败希瓦氏菌的最大比生长速率明显大于假单胞菌和复合菌, 假单胞菌与复合菌的最大比生长率基本相一致。三者的延滞时间分别为41.1、21.1、15.2h, 假单胞菌和复合菌的生长延滞时间明显较腐败希瓦氏菌短。

2.6 腐败菌腐败能力的定量分析

表2 接种腐败菌的无菌鱼块在5℃贮藏腐败菌的产量因子

Table 2 Yield factors of TVBN and TMA production of spoilage bacteria inoculated sterile fish blocks stored at 5℃

腐败菌类型	$Y_{TVB-N/CFU}/(mg\ TVB-N/CFU)$	$Y_{TMA/CFU}/(mg\ TMA/CFU)$
腐败希瓦氏菌	6.90×10^{-10}	2.12×10^{-10}
假单胞菌	6.05×10^{-10}	2.32×10^{-11}
复合菌	3.70×10^{-10}	1.84×10^{-10}

由表2可知, 三者的 $Y_{TVB-N/CFU}$ 基本一致, 腐败希瓦氏菌的 $Y_{TMA/CFU}$ 明显大于假单胞菌的。通过比较接种腐败菌的无菌鱼块贮藏初始点和出现明显腐臭味时的感官评价、TVB-N、TMA值和腐败菌数, 腐败菌的生长动力学参数、腐败代谢产物的产量因子($Y_{TVB-N/CFU}$ 和 $Y_{TMA/CFU}$), 大黄鱼有氧低温贮藏的两种优势腐败菌中腐败希瓦氏菌的腐败能力较假单胞菌强、复合菌强。

3 讨论

TMAO(trimethylamine oxide, 氧化三甲胺)广泛分布于海产硬骨鱼类的肌肉中, 是海产硬骨鱼类具有的一种

特殊鲜味物质。海水鱼每100g鱼肉组织中含1~100mg TMAO, 而淡水鱼肉一般仅含有5~20mg TMAO^[11]。腐败希瓦氏菌能将TMAO还原为TMA, 而假单胞菌不能或还原TMAO能力非常弱^[12]。Miller等^[13]将荧光假单胞菌接种到无菌美洲平鲈鱼块中, 腐败点时测得TMA含量仅为0.5mg/100g。本研究中接种假单胞菌的鱼块测定的TMA含量也很低, 腐败点时含量仅为1.16mg/100g。

无菌鱼块可作为腐败菌腐败能力研究的基质, 但无菌鱼块的无菌是相对而言的, 无菌鱼块制备后菌落总数应小于 $10^2 CFU/g$ ^[7]。Gram等^[14]研究尼罗河新鲜和腐败着的鲈鱼细菌学时, 将细菌接种到杀菌过的鲈鱼和杀菌过的鲈鱼肉汤中, 通过其腐败气味, 以确定其腐败能力, 用TMAO培养基来测试产生TMA和 H_2S 的能力。Dalgaard^[15]研究了包装鲈鱼的特定腐败菌, 得出磷发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)的产量因子($Y_{TMA/CFU}$)明显大于腐败希瓦氏菌的产量因子, 磷发光杆菌是包装鲈鱼的特定腐败菌。

郭全友等^[16]对养殖大黄鱼低温有氧贮藏货架期终点的腐败菌进行鉴定, 假单胞菌和腐败希瓦氏菌是有氧冷藏海水鱼的优势腐败菌。假单胞菌在海水鱼的腐败中没有很大的重要性, 这可能是由于其数量相对较少, 同高数量的腐败希瓦氏菌竞争能力低^[17]。Gram等^[18]研究了荧光假单胞菌和腐败希瓦氏菌在鲈鱼鱼块中的相互作用, 得出荧光假单胞菌会抑制腐败希瓦氏菌的生长, 但这一相互作用仅在含较高浓度时才会影响腐败希瓦氏菌生长。这与本研究的接种腐败希瓦氏菌和假单胞菌两种腐败菌的复合菌的生长相一致, 腐败希瓦氏菌是冷藏大黄鱼的特定腐败菌, 其腐败能力强。

参考文献:

- [1] JOS H J, HUIS I V. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(2): 1-18.
- [2] LUND B M, BAIRD-PARKER T C, GOULD G W. The microbiological safety and quality of food[M]. Gaithersburg Maryland USA: Aspen Publishers Inc, 2000: 472-506.
- [3] 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.
- [4] 郭全友, 许钟, 杨宪时. 冷藏养殖大黄鱼品质变化特征及细菌相分析[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(6): 216-221.
- [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] 胡国臣, 张清敏. 环境微生物学[M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 2002: 109-115.
- [7] 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.
- [8] 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: 21-31.
- [9] 许龙福, 俞飞兰, 胡振友, 等. 火腿中三甲胺氮测定方法的修订及验证[J]. *预防医学论坛*, 2001, 11(6): 641-643.
- [10] ZWIETERING M H, JONGENBURGER I, ROMBOUTS F M, et al. Modeling of the bacterial growth curve[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 1875-1881.
- [11] CIVERA T, TURI R M, PARISI E, et al. Further investigations on total volatile basic nitrogen and trimethylamine in some *Mediterranean teleosts* during cold storage[J]. *Sciences des Aliments*, 1995, 15(4): 179-186.
- [12] GRAM L, HANS H H. Microbiological spoilage of fish and fish product [J]. *Int J Food Microbiol*, 1996, 33(2): 121-137.
- [13] MILLER A, SCANLAN R A, III, LEE J S, et al. Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, and an *Achromobacter* species [J]. *Applied Microbiology*, 1973, 26(1): 18-21.
- [14] GRAM L, CHRISTINA W N, HANS 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.
- [15] DALGAARD P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish [J]. *Int J Food Microbiol*, 1995, 26(3): 319-333.
- [16] 郭全友, 杨宪时, 许钟, 等. 冷藏养殖大黄鱼细菌相组成和优势腐败菌鉴定[J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 824-830.
- [17] GRAM L. Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(5): 2197-2203.
- [18] GRAM L, MECHORSSEN J. Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* spp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1996, 80(15): 589-595.