

臭鳊鱼的质构特性、特征气味及发酵微生物的分离鉴定

杨培周^{1,2}, 钱静^{1,2}, 姜绍通^{1,2}, 潘丽军^{1,2}, 王建强¹, 张丹峰¹, 操新民¹

(1. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

(2. 合肥工业大学农产品加工研究院, 安徽省农产品精深加工重点实验室, 安徽合肥 230009)

摘要: 臭鳊鱼是徽式风味名菜的代表菜品, 具有徽菜“轻度腐败、盐重好色”的典型特点。为探究徽菜臭鳊鱼发酵过程的关键影响因素, 比较分析臭鳊鱼的鱼肉质构特性和氨基酸成分, 确定臭鳊鱼挥发性特征气味的组分, 分离和鉴定鳊鱼发酵过程中的关键微生物, 结果表明: 发酵8 d的鳊鱼鱼肉无明显鱼腥味, 有淡臭味, 臭鳊鱼的鱼肉硬度为3000.37 N, 为新鲜鱼肉的2.72倍, 粗蛋白和粗脂肪含量分别为19.2%和10.54%, 必需氨基酸组氨酸(3.44%)和甲硫氨酸(5.01%)分别为新鲜鱼肉的4.32倍和3.09倍; 通过DHS-GC-MS技术测定臭鳊鱼挥发性特征气味的主要成分为丙酸和异丙胺, 丙酸和异丙胺分别占总气体成分的20.91%和41.17%, 具有强烈臭味的丙酸是形成鳊鱼臭味的主要组成成分; 筛选鳊鱼发酵微生物, 根据微生物的细胞形态、生理生化指标, 采用16S rDNA技术进行分子鉴定以及进化树分析, 鳊鱼发酵主要微生物为蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

关键词: 鳊鱼; 发酵; 微生物; 蜡样芽孢杆菌; 苏云金芽孢杆菌

文章编号: 1673-9078(2014)4-55-62

Texture Properties, Characteristic Smell, Microbial Isolation and Identification of Smelly Mandarin Fish

YANG Pei-zhou^{1,2}, QIAN Jing^{1,2}, JIANG Shao-tong^{1,2}, PAN Li-jun^{1,2}, WANG Jian-qiang¹, ZHANG Dan-feng¹, CAO Xin-min¹

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 20009, China) (2. Key Laboratory for Agriculture Processing of Anhui Province, Institute of Agricultural Products Processing Technology; Hefei University of Technology, Hefei 20009, China)

Abstract: Smelly Mandarin fish is a representative flavor dish of Anhui. The traditional food possesses the representative characteristic of Anhui cuisine, such as mild rot, high concentration salt and bright color. To explore the key influence factors during fermentation for smelly Mandarin fish, the determination of texture properties and amino acids ingredients, distinction of characteristic smell components and identification of the key microorganism species during fermentation were carried out. The results showed that Mandarin fish reached optimum quality through eight days fermentation. The processed meat exhibited light smell without the fishlike smell. And the hardness of the processed meat was 3000.37 N, 1.72-fold higher than that of the fresh one. The content of crude protein and crude fat were 19.2% and 10.54%, respectively. Both histidine (3.44%) and methionine (5.01%) were 3.32-fold and 2.09-fold higher compared with those of the fresh. The volatile components of smelly Mandarin fish were mainly composed of 41.17% isopropyl amine and 20.91% propionic acid by DHS-GC-MS, and the major composition of characteristic smell was defined by propionic acid. Using the techniques of cell morphology, physiology, biochemistry, 16S rDNA molecular identification and evolutionary tree analysis, the microorganisms related to the fermentation of Mandarin fish were mainly *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.

Key words: mandarin fish; fermentation; microbe; *Bacillus cereus*; *Bacillus thuringiensis*

中国传统发酵食品具有悠久的历史, 是我国现代

收稿日期: 2013-11-04

基金项目: 广东省省部产学研合作专项资金 (2012B091100377)

作者简介: 杨培周 (1976-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为食品发酵微生物及酶工程

食品重要组成部分, 研究传统发酵食品是振兴传统食品产业的客观需求^[1]。鳊鱼是经济价值很高的名贵鱼类, 具有生长快、肉嫩、味美、营养价值高等特点^[2]。臭鳊鱼属于安徽徽州代表菜之一, 已有200多年的历史, 据传新安江附近的铜陵渔民将鳊鱼装进木桶, 运

到徽州山区售卖,为防止变质腐烂,在每层鱼的表面洒一层淡盐水,经过 7~8 d 抵达屯溪等徽州地区时,鱼表皮散发出一种淡臭味,经油煎烹调后,制备出的臭鳊鱼具有香臭混合的特点,受到美食家以及顾客的赞誉,作为典型的徽菜延续下来。由于传统的臭鳊鱼制备的前期时间长和成本高,严重限制臭鳊鱼的市场化和产业化生产。根据笔者调查,目前大部分饭店加工出的臭鳊鱼都采用臭豆腐熏制而成的,并不是传统意义上的臭鳊鱼,加工出的臭鳊鱼的臭味来自臭豆腐,并不是源自鳊鱼肉自身发酵产生的臭味,市场上真正采用传统工艺加工的臭鳊鱼极少。对臭鳊鱼加工过程的基础研究缺乏也是限制传统臭鳊鱼产业工业化的重要因素,深入研究臭鳊鱼是认识和开发臭鳊鱼食品亟待解决的现实需要。

目前国内外鱼加工产品的研究主要侧重于鱼肉的精深加工,如鱼油^[3]和鱼露^[4]等。已经确定的鱼的挥发性气味主要包括鱼腥味、碘类异味、氧化味、硫化物味和土霉味^[5]等,而对传统食品臭鳊鱼的特征性气味研究也未有相关报道。对徽菜臭鳊鱼的报道内容主要为加工工艺、文化底蕴和历史内涵,而对加工过程中的基础研究基本处于空白阶段。本研究根据传统工艺加工处理臭鳊鱼,考察发酵过程中鳊鱼肉的质构特性和营养成分变化,分析挥发性特征气味组分,分离鉴定发酵过程中的关键微生物,为深入研究臭鳊鱼发酵以及利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试的鳊鱼来自长江流域铜陵段水域,体长 20~25 cm,去内脏,清水冲洗干净,沥干,置于木桶内,将食盐均匀涂抹于鳊鱼内外表面,压实。为防止水份过快散失,用食品保鲜膜将盆口包裹,25 °C 培养。DNA 快速抽提盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、Taq 酶和 dNTP 等分子生物学药品均购置于上海生工有限公司,食盐为食品级,NaOH 等试剂均为化学纯级;丙酸、1,2-丙二胺标品为 AccuStandard 标准品;异丙胺为日本 TCI 标准品;乙酸为德国 DR 标准品。

1.2 主要仪器设备

SER-148 索氏抽提仪和 KDN-130F 凯氏定氮仪购自北京恒奥德公司;HSS-86.50 质谱分析仪、GC-MS-QP2010 气相色谱仪、JWXL 物性仪购自深圳市华康公司;日立 L-8900 氨基酸分析仪购自天美公司;PCR 仪和凝胶成像系统购自伯乐公司。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 质构特性与营养成分测定

采用物性仪测定硬度、粘着性、弹性、粘聚性和咀嚼性等指标^[6],根据称量蒸煮前后的鱼重的变化,计算熟肉率,熟肉率/%=(蒸煮后肉样质量/蒸煮前肉样质量)×100%;通过凯氏定氮法测定粗蛋白含量^[7],采用索氏抽提法测定粗脂肪含量^[8],通过氨基酸分析仪测定游离氨基酸含量^[9]。

1.3.2 特征气味测定

采用顶空进样方法,GC-MS 联用仪检测分析鱼肉的挥发性气体^[10],气相色谱条件:HP-5MS 弹性毛细管柱,解析时间 10 min,进样口温度 230 °C,柱初温 30 °C,2 min,以 10 °C/min 程序升温到 250 °C,30 min,载气 He 流量 0.8 mL/min,分流比为 50:1;质谱条件:传输线温度 280 °C,离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,扫描范围 35~350 m/z,电离电压 70 eV。

1.3.3 鱼肉常规表象分析^[11]

鱼肉可闻气味:无臭鳊鱼特殊气味,只有鱼腥味 1 分,臭鳊鱼特殊气味淡,鱼腥味淡 2 分,浓烈臭鳊鱼特殊气味,鱼腥味淡不可闻 9 分;表观色泽分析:亮白色 2 分,灰白色 3 分,暗白色带点淡黄色 9 分;鱼肉表观嫩度:较嫩 1 分,适中 2 分,较粗糙 9 分。

1.3.4 微生物分离与鉴定

通过富集培养,划线分离,在显微镜下观察微生物的细胞形态,通过细菌鉴定指标分析发酵微生物的理化性质;以提取的基因组 DNA 为模板,针对细菌 16S rDNA 的 V3 区具有特异性的引物对 16S(F)和 16S(R)进行扩增^[12],引物 16S(F)序列为 5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3';16S(R)序列为 5'-GGTT ACCTTGTTACGACTT-3',扩增程序为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 100 s, 35 cycles; 72 °C 7 min。将扩增获得的 DNA 片段连接在 T-easy 载体上,蓝白斑筛选,重组质粒送上海生工测序,将获得的序列与 NCBI 上相关序列进行比对。

1.4 数据分析

数据分析处理采用 Microsoft excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行分析,进化树分析是通过将 16S rDNA 核苷酸序列 NCBI 数据库比对后的结果,再进行在线 “distance tree of results” 后生成的。

2 结果与分析

2.1 鱼肉质构特性

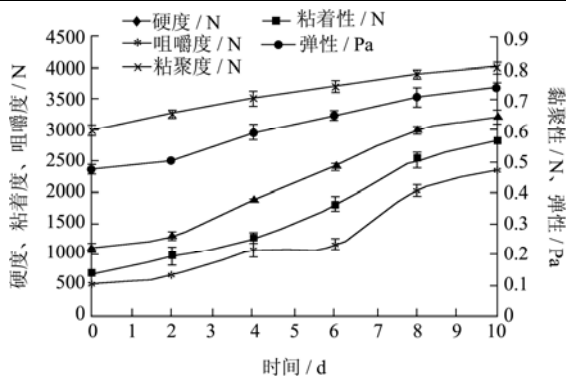


图1 在发酵过程中鳊鱼的质构特性变化

Fig.1 Texture properties variation of Mandarin fish during fermentation

利用物性仪每隔 1 d 检测鱼肉硬度、粘着性、弹性、粘聚性和咀嚼度 (图 1), 结果表明, 鳊鱼在处理过程中鱼肉的硬度逐渐增大, 8 d 后的鱼肉硬度为 3211.56 N, 为新鲜鱼肉的 2.72 倍。鱼肉的硬度和鱼肉食用过程中的咀嚼性有关, 适当提高鳊鱼肉的硬度有利于提高鳊鱼肉质结构稳定性。所有测定的指标参数随腌制时间的延长逐渐增大, 在 0~8 d, 各参数增加明显; 而在 8~9 d 时, 增大趋势趋于平缓。在处理过程中, 各指标参数的特点也存在较大的差异, 发酵 8 d 后的鱼肉硬度、粘着性和咀嚼度提高的比例高于弹性和粘聚性; 发酵前 4 d 各指标的变化较小, 而在 4~8 d 内, 各参数的变化较显著, 其主要原因是腌制前期是鱼肉出水阶段, 腌制后期主要是微生物发酵阶段, 在微生物作用下, 鱼腥味逐渐减小, 而臭味逐渐增加。综合鳊鱼质构特性的各参数变化, 鳊鱼发酵较合适的时间为处理 8 d。

2.2 熟肉率

鱼肉的熟肉率是鱼肉物性的重要参数之一, 是鱼肉蒸熟之后占蒸前鱼肉质量的比例 (图 2)。测定处理过程中熟肉率变化, 结果表明, 新鲜的鳊鱼肉以及发酵 8 d 后的熟肉率分别为 4.35% 和 34.56%。随着时间的延长熟肉率逐渐增加, 在发酵起始 5 d 内, 熟肉率的增大趋势较小; 发酵 5~8 d, 熟肉率的增长速率明显, 而在发酵 8 d 后, 熟肉率趋于稳定。

2.3 感官分析

感官性状是决定食品可食用的重要因素, 决定消费者对产品质量的评价效果。本研究对腌制过程中的鳊鱼的肉质颜色和气味进行感官分析, 新鲜鱼肉呈亮白色, 鱼腥味强烈; 在腌制 3 d 后鱼肉呈灰白色, 散发较浓鱼腥味; 在 4~6 d 鱼肉逐渐呈淡臭味; 在第 8 d 时, 鱼肉为灰白色, 鱼腥味消失, 出现淡臭味; 而到

9 d 时, 鱼肉颜色呈淡黄色, 外表面干燥, 脱水严重。因此, 发酵臭鳊鱼较合适的时间为发酵 8 d。同时, 根据鱼肉可见色泽、可触嫩度和可闻气味的特征, 对臭鳊鱼发酵过程进行等级分类, 结果表明, 发酵前 2 d, 鳊鱼的各项指标评分都较低; 在 3~7 d, 各指标都保持稳定, 特别是可闻气味都维持一定浓度的腥味, 评分较低; 在发酵 8 d 后, 可闻气味的评分等级急剧升高 (图 3)。按照安徽徽菜鳊鱼的烹饪工艺进行加工, 腌制 8 d 的鳊鱼鱼肉较板结, 肉块间纹路清晰, 嚼劲大, 臭味较浓, 臭中带香, 味道鲜美, 具有徽菜“轻度腐败、盐重好色”的典型特点。

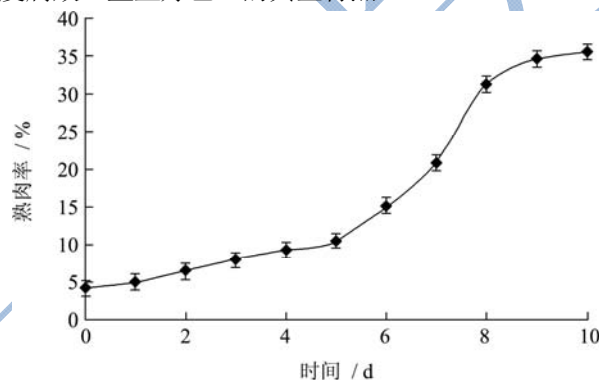


图2 发酵时间对鳊鱼熟肉率的影响

Fig.2 The effect of fermentation time on the ratio of cooked meat for Mandarin fish

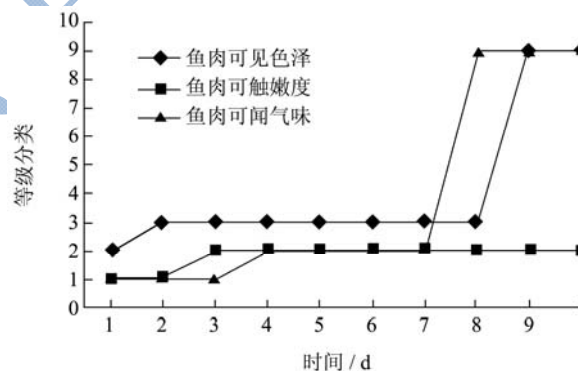


图3 鱼肉常规表象随时间的变化曲线

Fig.3 Variation curves of fish conventional representation with time

2.4 营养成分测定

2.4.1 粗蛋白和脂肪

采用凯氏定氮法测定粗蛋白含量, 新鲜鱼肉和腌制 8 d 的鳊鱼的粗蛋白含量分别为 21.00% 和 19.20%, 粗脂肪含量分别为 14.45% 和 10.54%。鳊鱼腌制后粗蛋白和粗脂肪含量减小的主要原因可能是鱼肉在发酵过程中, 微生物产生的蛋白酶和脂肪酶分解了鱼肉中的蛋白质和脂肪, 此外微生物在生长过程中也会消耗部分蛋白质和脂肪。

2.4.2 游离氨基酸

鱼肉的游离氨基酸种类和含量是营养成分的重要组成部分。测定新鲜鳊鱼与发酵 8 d 后鱼肉中游离氨基酸 (表 1), 结果表明, 腌制后鱼肉的部分蛋白质分解为游离氨基酸, 提高了游离氨基酸含量, 其中必需氨基酸如苏氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、异亮氨酸和组氨酸的含量分别为 3.45%、3.44%、4.01%、4.51%、3.18%和 5.01%, 是新鲜鱼肉的 2.06 倍、2.13 倍、3.09 倍、2.8 倍、1.75 倍和 4.32 倍。

表 1 发酵后与新鲜鳊鱼中游离氨基酸的含量

Table 1 The contents of free amino acid for Mandarin fish of the fresh and the fermented

氨基酸种类	发酵后的 臭鳊鱼/%	新鲜鳊鱼 鱼肉/%
Asp(天冬氨酸)	3.58±0.12	3.86±0.26
Thr(苏氨酸)	3.45±0.23	1.67±0.06
Ser(丝氨酸)	3.44±0.11	1.61±0.07
Glu(谷氨酸)	3.43±0.51	2.78±0.23
Gly(甘氨酸)	3.66±0.32	5.63±0.14
Ala(丙氨酸)	3.67±0.05	2.94±0.04
Cys(半胱氨酸)	1.58±0.09	0.59±0.03
Val(缬氨酸)	3.58±0.36	2.02±0.08
Met(甲硫氨酸)	4.01±0.33	1.30±0.06
Ile(异亮氨酸)	3.18±0.23	1.82±0.07
Leu(亮氨酸)	3.63±0.41	3.26±0.06
Tyr(酪氨酸)	4.51±0.21	1.61±0.04
Phe(苯丙氨酸)	3.82±0.08	1.59±0.06
Orn(鸟氨酸)	5.02±0.15	2.99±0.08
Lys(赖氨酸)	4.71±0.26	3.14±0.08
His(组氨酸)	5.01±0.39	1.16±0.07
Pro(脯氨酸)	3.01±0.07	1.16±0.09
Arg(精氨酸)	3.43±0.32	2.89±0.07

2.5 挥发性气体

臭鳊鱼的挥发性气体具有鲜明特色。通过动态顶空 DHS-GC-MS 法测定各组分成分 (图 4), 获得各成分质谱出峰的起始时间、终止时间、峰面积和峰面积占百分数, 通过与高纯度标准品比较, 确定各气体准确成分 (表 2)。结果表明, 臭鳊鱼挥发性气体的主要成分为小分子有机酸 (乙酸、丙酸)、胺类化合物 (1, 2-丙二胺、异丙胺) 等。根据峰面积的大小, 分析各挥发性气体成分, 其中鱼肉的混合气味中第 4 峰的气体分子式 C_3H_9N (异丙胺), 峰面积 41.17%, 表明臭鳊鱼腌制后的主要成分为异丙胺, 在整个气味中占的比

例最大, 异丙胺有氨气味, 沸点 33~34 °C, 在常温下容易从鱼肉体中挥发出来; 第 10 峰的气体成分为 $C_3H_6O_2$ (丙酸), 峰面积占总面积的 20.91%, 丙酸带有刺鼻的恶臭味, 是形成臭鳊鱼臭味的主要物质; 第 2 峰的分子式为 $C_3H_{10}N_2$ (1,2-丙二胺), 峰面积占总面积的 11.54%, 1,2-丙二胺具有氨的气味, 微量具有一定的香味。

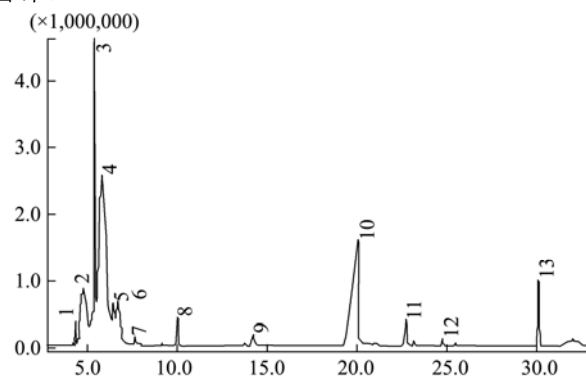


图 4 臭鳊鱼挥发性气味质谱图

Fig.4 Mass spectrogram of volatile smell of smelly Mandarin fish

表 2 鱼肉气味质谱分析

Table 2 Mass spectrometry analysis of the smelly Mandarin fish

峰号	Start time	End time	Area/%	成分	气味
1	4.242	4.417	0.55	/	/
2	4.417	5.100	11.54	1,2-丙二胺	氨气味
3	5.367	5.492	9.36	/	/
4	5.492	6.358	41.17	异丙胺	氨气味
5	6.358	6.583	3.59	/	/
6	6.583	7.100	5.15	/	/
7	7.625	7.850	0.30	/	/
8	9.867	10.192	1.20	/	/
9	13.983	14.308	0.81	乙酸	酸味
10	19.208	20.600	20.91	丙酸	强烈臭味
11	22.45	23.075	1.68	/	/
12	24.625	25.000	0.37	/	/
13	29.975	30.550	3.37	/	/

2.6 发酵微生物鉴定

将鱼肉中的微生物进行富集培养, 稀释后通过显微镜观察, 计算出酵母菌的数量和占总微生物的比例; 通过平板划线分离, 根据固体 PDA 培养基生长的形态特征, 结合革兰氏染色方法, 计算出大肠杆菌与芽孢杆菌的数量和比例。结果表明, 发酵 8 d 的臭鳊鱼中酵母菌、大肠杆菌、芽孢杆菌和其他未知微生物分别占 5.2%、2.3%、90.8%和 1.7%。

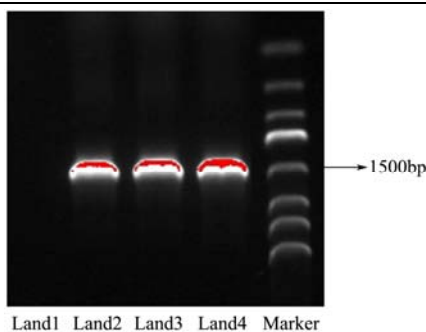


图5 分离微生物的16S rDNA 扩增电泳

Fig.5 Electrophoresis of amplifying microbial 16S rDNA

注: Land1: 空白; Land 2、3: B-1; Land 4: B-8。

GTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCC
 ACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAAAGTTACCCACCGAC
 TTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGCGGTGT
 GTACAAGCCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGAT
 CCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTG
 CAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGATTA
 GCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATT
 GTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGA
 TTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGTTTGTACCGGCA
 GTCACCTTAGAGTGCCAACTAAATGATGGCAACTAAGA
 TCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
 CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCA
 CTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTC
 AGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
 CGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC
 GTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCC
 AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGG
 CGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGT
 GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTT
 TCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCTTT
 CGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCT
 ACACATGGAATCCACTTTCCTCTCTGCACTCAAGTCTC
 CCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTT
 TCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACG
 CCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACC
 GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTA
 GGTACCCTCAAGGTGCCAGTTATTCAACTAGCACTTGTT
 CTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCA
 TCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTG
 CGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGG
 CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGG
 TCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACC
 AACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAG

CCGAAGCCGCTTCAATTTCGAACCATGCGGTTCAAAT
 ATTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAG
 TCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGC
 CGCTAACTCATAAGAGCAAGCTCTCAATCCATTGCTCG
 ACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAG
 CCAGGATCAAACCTCT

图6 鳊鱼发酵微生物B-1的16S rDNA 核苷酸序列

Fig.6 Nucleotide sequences of B-1 16S rDNA from fermentation microorganism of Mandarin fish

随机挑取 10 个芽孢杆菌单菌落, 然后对各单菌落进行鉴定, 其中 7 个单菌落属于蜡样芽孢杆菌, 剩下 3 个单菌落属于苏云金芽孢杆菌。以 B-1 和 B-8 为例, 鉴定结果如下: B-1 细胞形态为杆状, 1.1~1.5 μm×3.5~4.2 μm, 革兰氏阳性, 粗糙表面, 在琼脂培养基上呈稍有光泽的白色菌落, 菌落直径 1~3 mm, 菌以接种环挑起来呈丝状, 与蜡样芽孢杆菌的细胞形态相近。对 B-1 的理化性质进行测定, B-1 发酵甘露醇和木糖不产酸, 不产气; 具有还原硝酸盐和蛋白酶活性; 具有水解淀粉和明胶活性。抽提两种微生物的总基因组 DNA, 以设计合成的引物进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳, 扩增片段大小约为 1500 bp (图 5)。通过片段回收, 克隆载体连接, 测序, 获得核苷酸序列大小 1510 bp (图 6)。将该序列与数据库 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> 序列进行比对, 与 *Bacillus cereus* 的 RNA-16S ribosomal 序列的同源性为 99%。16S rDNA 核苷酸序列进化树分析表明微生物 B-1 与 *B. cereus* 的同源性较近 (图 7), 结合细胞形态学观察、理化性质及分子鉴定, 进一步确定该菌属于蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*)。

微生物 B-8 在马铃薯琼脂培养基上形成白色, 圆形菌落, 边缘光滑, 显微观察呈杆状, (1.5~1.9) μm×(2.5~4.5) μm, 椭圆形芽孢, 近中生。对 B-8 进行理化性质分析, B-8 为革兰氏阳性菌, 过氧化氢酶和 V.P 反应均为阳性; 能够水解明胶、淀粉和酪素; 无水解酪氨酸、卵磷脂以及苯丙氨酸氧化脱氨能力; 具有脲酶活性; 无二羟丙酮和吡嗪生成; 能够利用柠檬酸盐; 发酵葡萄糖产酸。基于 16S rDNA 原理, 采用基因组 PCR 扩增, 测序获得核苷酸序列 (图 8)。将序列与 NCBI 数据库中序列比对, 与苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) rRNA-16S ribosomal 序列的同源性为 96%。16S rDNA 核苷酸序列进化树分析表明微生物 B-8 与 *B. thuringiensis* 的同源性较近 (图 9), 该菌的细胞学形态观察与苏云金芽孢杆菌的形态相似, 进一步确认 B-8 属于苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。

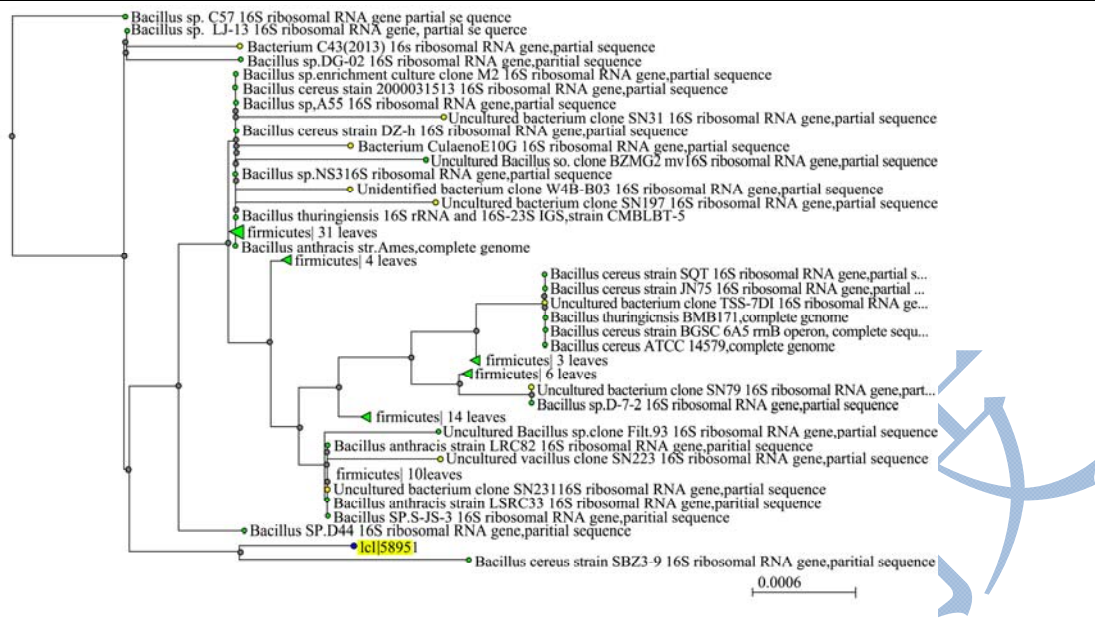


图7 微生物B-1的16S rDNA核苷酸序列的NCBI在线进化树分析(|cl|58951为B-1 16S rDNA核苷酸序列)

Fig.7 Evolutionary tree analysis of the NCBI distance tree of microbe B-1 16S rDNA nucleotide blast on line

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGG
 GTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGC
 TTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
 GTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
 ACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCATGGTT
 CGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTATGGATGG
 ACCCGCTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
 CCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
 GGCCACACTGGGACTGAGGCACGGCCCAGACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
 TCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCG
 GGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAG
 TTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTA
 GGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
 GCGCAGGTGGTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCACGG
 CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGA
 GTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGG
 CGACTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGC
 GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACG
 CCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCTTCGGACC
 TTGGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGG
 AGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGG
 GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
 CAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC
 CACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGACAAAGTGA
 CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGAT

GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTT
 AGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCC
 GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
 ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCA
 AATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCA
 ACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA
 TCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACA
 CACCGCCCCTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAA
 GTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGT
 GGGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

图8 鳊鱼发酵微生物B-8的16S rDNA序列

Fig.8 Nucleotide sequences of B-8 16S rDNA from fermentation microorganism of Mandarin fish

3 结果与讨论

臭鳊鱼是徽菜具有代表性的菜肴，具有丰富的文化内涵。通过对臭鳊鱼发酵过程中的鱼肉品质、营养成分变化以及微生物等进行基础性研究，结果表明：经过8d的处理，鱼肉品质达到最优，鱼肉的硬度、弹性、粘着性、粘聚性和咀嚼度得到显著提高，加工后的鱼肉的熟肉率由4.35%提高到34.56%；加工后鱼肉的游离氨基酸含量增加，其中苏氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、异亮氨酸和组氨酸的含量分别是新鲜鱼肉的2.06倍、2.13倍、3.09倍、2.8倍、1.75倍和4.32倍；臭鳊鱼挥发性气体的成分主要为含胺化合物及小分子有机酸，其中异丙胺、丙酸和1,2-丙二胺含量分别占41.17%、20.91%和11.54%，臭鳊鱼发酵

的主要微生物为蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

物杀虫剂，可能具有防止寄生虫的繁殖和鱼肉过快腐烂的作用，但是具体机制有待于进一步研究。

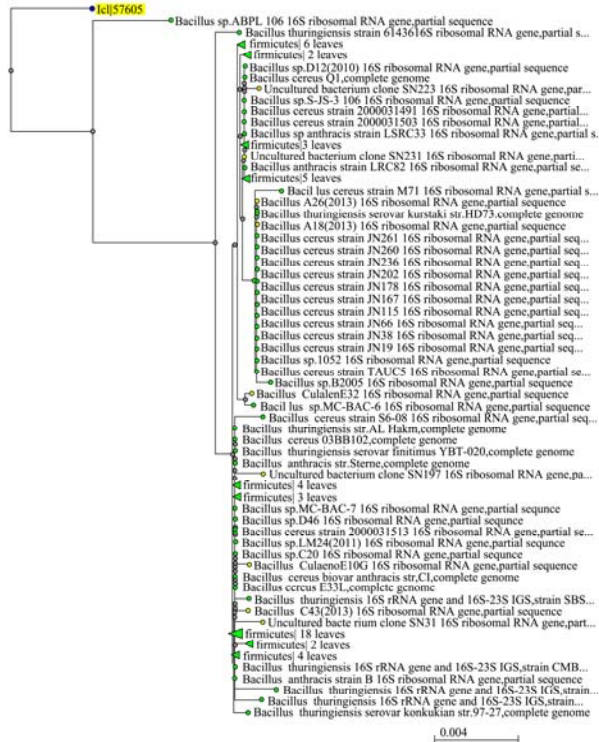


图9 微生物B-8的16S rDNA核苷酸序列的NCBI在线进化树分析 (Ic| | 57605为B-8 16S rDNA核苷酸序列)

Fig.9 Evolutionary tree analysis of the NCBI distance tree of microbe B-8 16S rDNA nucleotide blast on line (Ic| | 57605 stands for B-8 16S rDNA nucleotide sequences)

臭鳊鱼由于具有鲜明的特色风味受到消费者的喜爱，而这种特色风味来源于发酵微生物的发酵。发酵鱼肉的微生物存在多样性，传统鱼露发酵的微生物主要为酵母菌^[13]和乳酸菌^[14]，与本研究的微生物不同，其主要原因在于：在30%高盐浓度和偏酸性的环境里，芽孢杆菌生长繁殖受到严重抑制，因此芽孢杆菌不是鱼露发酵的主要微生物；而在鳊鱼发酵体系里，盐浓度较低，适合蜡样芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的繁殖。两种微生物可能在发酵过程中分泌大量的蛋白酶将鳊鱼肉中蛋白分解成多肽和氨基酸等小分子化合物，从而造成发酵后鱼肉中游离氨基酸含量增加。本研究发

参考文献

[1] 李里特.新时代我国食品工业的目标与研究重点[J].北京工商大学学报(自然科学版),2010,28(4):1-8
 LI Li-te. Objective and major research fields of China food industry in new age [J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2010, 28(4): 1-8

[2] Zhang G Q, Chu W Y, Hu S N, et al. Identification and analysis of muscle-related protein isoforms expressed in the white muscle of the Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Marine biotechnology, 2011, 13(2): 151-162

[3] Patra A K, Yu Z. Effects of coconut and fish oils on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations in vitro [J]. Journal of dairy science, 2013, 96(3): 1782-1792

[4] Montriwong A, Kaewphrak S, Rodtong S, et al. Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation [J]. Process biochemistry, 2012, 47(12): 2379-2387

[5] Ganeko N, Shoda M, Hirohara I, et al. Analysis of volatile flavor compounds of sardine (*Sardinops melanosticta*) by solid phase micro extraction [J]. J. Food Sci., 2008, 73(1): 83-88

[6] 吴薇,陶宁萍,顾赛麒.鱼肉特征性气味物质研究进展[J].食品科学,2013,34(11):381-384
 WU Wei, TAO Ning-ping, GU Sai-qi. Research progress in characteristic odor compounds of fish meats [J]. Food Science, 2013, 34(11): 381-384

[7] 陈杰,马美湖.风味蛋白酶水解蛋清工艺条件的研究[J].现代食品科技,2007,23(7):43-44
 CHEN Jie, MA Mei-hu. Hydrolysis of egg white catalyzed by flavourzyme [J]. Modern Food Science and Technology, 2007,23 (7):43-44

[8] 陈瑜珠,陶红丽,曾庆孝,等.利用罗非鱼加工下脚料发酵鱼露的研究[J].现代食品科技,2008,24(5):441-444
 CHEN Yu-zhu, TAO Hong-li, ZENG Qing-xiao, et al. Study of fish sauce production via fermentation of processed tilapia by-products [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(5): 441-444

[9] 高建华,宁正祥.禽畜皮和鱼鳞的基本成分及氨基酸组成分析[J].现代食品科技,2007,23(12):77-79
 GAO Jian-hua, NING Zheng-xiang. Analysis of basic

- composition and amino acid composition of livestock skin and fish scale [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 23(12):77-79
- [10] Reboredo R P, Gonzalez B C, Cancho G B. Effects of sedimentation plus racking process in the extra virgin olive oil aroma fingerprint obtained by DHS-TD/GC-MS [J]. *Food and bioprocess technology*, 2013, 6(5): 1290-1301
- [11] 张秋会,赵改名,李苗云,等.肉制品的食用品质及其评价[J].*肉类研究*,2011,25(5):58-61
ZHANG Qiu-hui, ZHAO Gai-ming, LI Miao-yun, et al. Quality characteristics of meat products and their evaluation [J]. *Meat Research*, 2011,25(5):58-61
- [12] Benitez P A, Alvarez M , Belda FP, et al. Detection of transient bacteraemia following dental extractions by 16S rDNA pyrosequencing: A Pilot Study [J]. *Plos One*, 2013, 8(3): 1-8
- [13] 黄紫燕,朱志伟,曾庆孝,等.传统鱼露发酵的微生物动态分析[J].*食品与发酵工业*,2010,36(7):18-22
HUANG Zi-yan, ZHU Zhi-wei, ZENG Qing-xiao, et al. Study on the trends of microorganisms in traditional fermentation fish sauce [J]. *Food and fermentation industries*, 2010, 36(7): 18-22
- [14] Udomsil N, Tanasupawat S. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141(3): 186-194
- [15] Czmy M, Christlbauer M, Fischer A, et al. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions [J]. *Eur Food Res Technol.*, 2008, 228(2): 265-273