

牛肉源假单胞菌的分离鉴定及菌株致腐能力差异比较

张若煜¹, 罗欣¹, 朱立贤¹, 刘昀阁¹, 陈雪¹, 郝剑刚², 黄鑫³, 张一敏^{1*}

(1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东泰安 271018) (2. 国家肉牛牦牛产业技术体系乌拉盖站, 内蒙古乌拉盖管区 026321) (3. 国家肉牛牦牛产业技术体系延边站, 吉林延边 133000)

摘要: 为探究蛋白酶及脂肪酶活性存在差异的牛肉源假单胞菌对冷鲜牛肉的致腐能力, 该研究首先通过酶活性的测定共筛出 7 株产酶能力差异较大的假单胞菌株, 其中荧光假单胞菌 (PP3413、PP754、PL1415) 3 株、恶臭假单胞菌 (P011) 1 株、草假单胞菌 (PL347) 1 株、*Pseudomonas salomonii* (PP1438) 1 株、*Pseudomonas libanensis* (PL1459) 1 株。在无菌冷鲜牛肉中回归污染以上菌株, 发现贮藏末期 (8 d) 接种荧光假单胞菌 (PP3413、PP754 和 PL1415) 的样品中假单胞菌数和挥发性盐基氮 (total volatile base-nitrogen, TVB-N) 值均较高 (分别为 8.97~9.65 log CFU/g、20.35~25.02 mg/100 g)。而接种 PL347 (脂肪酶活性最强) 的样品其假单胞菌数 (6.25 log CFU/g) 和 TVB-N 值 (13.95 mg/100 g) 均显著低于其他处理组 ($p < 0.05$)。此外, 产蛋白酶能力较强的 PP754 (25.02 mg/100 g)、PP3413 (22.06 mg/100 g) 的 TVB-N 值高于产脂肪酶能力较强的 PL1459 (21.80 mg/100 g)、PL1415 (20.35 mg/100 g)。综上所述, 荧光假单胞菌的产酶能力和腐败能力较强, 且产蛋白酶能力较强的假单胞菌其腐败能力可能优于产脂肪酶能力较强的菌株, 但假单胞菌对冷鲜牛肉的致腐能力与其产酶能力的具体关系有待进一步确证。

关键词: 牛肉; 假单胞菌; 蛋白酶; 脂肪酶; 致腐能力

文章编号: 1673-9078(2022)03-115-124

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.3.0523

Isolation and Identification of Beef-derived *Pseudomonas* and Comparison of Their Decay-causing Ability

ZHANG Ruoyu¹, LUO Xin¹, ZHU Lixian¹, LIU Yunge¹, CHEN Xue¹, HAO Jiangang², HUANG Xin³, ZHANG Yimin^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

(2. National Beef Cattle Industrial Technology System, Wulagai Station, Wulagai 026321, China)

(3. National Beef Cattle Industrial Technology System, Yanbian Station, Yanbian 133000, China)

Abstract: In order to explore the decay-causing abilities of beef-derived *Pseudomonas* strains with varying protease activities and lipase activities towards chilled beef, seven *Pseudomonas* strains with greatly different enzyme-producing abilities were screened based on enzymatic activities. The isolated strains included three strains of *Pseudomonas fluorescens* (PP3413, PP754, PL1415), one strain of *P. putida* (P011), one strain of *P. poae* (PL347), one strain of *P. salomonii* (PP1438), and one strain of *Pseudomonas libanensis* (PL1459). Then, the stains were used to re-contaminate the surface of sterile chilled fresh beef. At the end of storage (8 d), the number of *Pseudomonas* and TVB-N values for the samples inoculated with *Pseudomonas fluorescens* (PP3413, PP754 and PL1415) were relatively high (8.97~9.65 log CFU/g, and 20.35~25.02 mg/100 g, respectively). However, the number of *Pseudomonas* and TVB-N values of the beef samples inoculated with PL347 (which had the

引文格式:

张若煜, 罗欣, 朱立贤, 等. 牛肉源假单胞菌的分离鉴定及菌株致腐能力差异比较[J]. 现代食品科技, 2022, 38(3): 115-124

ZHANG Ruoyu, LUO Xin, ZHU Lixian, et al. Isolation and identification of beef-derived *Pseudomonas* and comparison of their decay-causing ability [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 115-124

收稿日期: 2021-05-18

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-37); 山东省现代农业产业技术体系牛产业创新团队项目 (SDAIT-09-09)

作者简介: 张若煜 (1996年-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肉品科学、肉品微生物, E-mail: 1300264073@qq.com

通讯作者: 张一敏 (1985年-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 动物性食品加工及品质、微生物控制, E-mail: ymzhang@sdau.edu.cn

highest lipase activity) were 6.25 log CFU/g and 13.95 mg/100 g, respectively, which were significantly lower than those of other treatment groups ($p < 0.05$). In addition, the TVB-N values of the samples contaminated by the strains with stronger protease-producing abilities, PP754 (25.02 mg/100 g) and PP3413 (22.06 mg/100 g) were higher than those of the strains with stronger lipase-producing abilities, PL1459 (21.80 mg/100 g) and PL1415 (20.35 mg/100 g). In summary, *P. fluorescens* had relatively high enzymes-producing ability and decay-causing ability, with the strains with stronger protease-producing abilities likely having higher decay-causing abilities towards beef than those with stronger lipase-producing abilities. However, the specific relationship between the decay-causing ability of *Pseudomonas* towards chilled fresh beef and its enzyme-producing ability needs to be further confirmed.

Key words: beef; *Pseudomonas*; protease; lipase; spoilage ability

牛肉因其较高的营养价值, 广受消费者的青睐。牛肉的腐败主要是由于微生物的增长及其胞外酶分解代谢引起的。其中假单胞菌属为有氧包装条件下的冷鲜牛肉中的优势腐败菌^[1,2], 该菌属多具有较强的产胞外蛋白酶与脂肪酶能力, 能够分解利用肉品中的蛋白质、脂质等为自身的生命活动提供能量来源^[3]。在此过程中, 假单胞菌通过分泌胞外蛋白酶分解肌原纤维及肌浆蛋白^[4], 并通过脱氨作用分解氨基酸并产生二甲基硫等具有腐臭气味的硫化物等^[5], 同时分泌脂肪酶催化脂肪等分解为脂肪酸、甘油等^[6], 产生多种代谢产物, 使牛肉变粘、变色, 产生异味。

假单胞菌株对肉品的腐败能力较强, 其蛋白酶与脂肪酶活性较高。顾春涛等^[7]发现冷鲜牛肉中致腐能力较强的假单胞菌株具有较强的胞外蛋白酶活性, 主要作用于肌原纤维; Wang 等^[8]研究发现在鸡肉中致腐能力较强的假单胞菌也具有强的蛋白酶活性, 使肌球蛋白、肌动蛋白、肌钙蛋白发生了不同程度的降解; 葛阳杨等^[9]发现大黄鱼中腐败能力较强的菌株除具有较强的蛋白酶活性外, 也具有强的脂肪酶活性。目前具有较强致腐能力的菌株其胞外酶活性较强已得到证实, 但具有较强酶活性的菌株是否对肉品具有较强致腐能力尚未得到明确的定论, 因此为了明晰假单胞菌的产酶能力对牛肉的腐败作用, 本试验筛选了产酶能力存在差异(3株强蛋白酶活性、3株强脂肪酶活性、1株弱蛋白酶及弱脂肪酶活性)的7株假单胞菌, 研究7株菌回归污染后牛肉样品的假单胞菌数量、TVB-N值及感官品质的变化, 旨在确定假单胞菌的产酶能力与牛肉腐败的关系, 为防控牛肉的腐败提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

经检疫合格的新鲜牛背最长肌, 山东某肉牛屠宰企业; 碱性蛋白酶活性测定试剂盒、脂肪酶活性测定试剂盒, 索桥生物公司; 假单胞菌基础培养基、假单

胞菌 CFC 添加剂, 北京陆桥技术股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, BioFlux 公司; PCR 全套试剂, Takara 公司; 生理生化鉴定全套试剂, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 所用引物由上海生物工程股份有限公司合成, 辐照技术由蓝孚医疗科技(山东)有限公司完成。

1.2 仪器与设备

1300 SERIES A2 生物安全柜, 美国 Thermo Scientific 公司; DHP 系列智能型生化培养箱, 上海一恒公司; CFX 96、PCR 仪 PTC-200 实时 PCR 检测系统, 美国 Bio-Rad 公司; SpectraMax M5 微孔板检测系统, 美国 Molecular Devices 公司; GeneQuant 100 微量核酸蛋白测定仪, 英国 Biochrom 公司; G15DWS 蒸汽压力灭菌锅, 厦门致微公司; 5804R 离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 牛肉源假单胞菌的分离与纯化

将宰后 48 h 的牛背最长肌分割成 9 块 3 cm 厚的牛排, 随机分配到托盘包装中, TQBC-0775 包装托盘盒[23 °C、0%相对湿度下, 透氧率为 10 cm³/(m² 24 h), 38 °C、90%相对湿度下, 水蒸气透过率为 15 g/(m² 24 h)]; Lid 1050/550 密封阻隔膜[23 °C、0%相对湿度下, 透氧率为 25 cm³/(m² 24 h), 4 °C、100%相对湿度下, 水蒸气透过率: 10 g/(m² 24 h)], 参考 Yang 等^[10]的方法对 4 °C 有氧贮藏 0、3、7、14 和 21 d 的牛肉进行假单胞菌计数, 并随机挑取最高稀释度可计数平板的 10% 的菌株划线纯化两次, 纯化后的单菌落于 -80 °C 保存。

1.3.2 假单胞菌产蛋白酶能力的研究

将分离纯化的假单胞菌株点样于脱脂乳平板(脱脂乳粉 5%、琼脂 2%)上, 28 °C 培养 48 h 后, 测量菌落直径与透明圈直径^[11], 通过比较 H/C(透明圈直径与菌落直径之比)来初步测定菌株产蛋白酶能力的强弱。筛选 H/C 较大的菌株参照碱性蛋白酶活性测定

试剂盒的方法对菌株进行碱性蛋白酶活性的测定^[12]。

1.3.3 假单胞菌产脂肪酶能力的研究

将分离纯化的假单胞菌株点样于 Tween-80 琼脂平板(蛋白胨 1%、酵母膏 0.5%、NaCl 0.5%、CaCl₂ 0.01%、Tween-80 0.1%、琼脂 2%)，28 °C 培养 48 h 后，测量 D/C (沉淀圈与菌落直径之比)^[13]，通过 D/C 值来初步测定菌株产脂肪酶能力的强弱。筛选沉淀圈与菌落直径的比值较大的菌株参照脂肪酶活性测定试剂盒的方法对菌株进行脂肪酶活性的测定^[14]。

1.3.4 假单胞菌的生理生化鉴定

通过蛋白酶活性与脂肪酶活性的实验筛选出 3 株强蛋白酶菌株、3 株强脂肪酶菌株、1 株弱蛋白酶弱脂肪酶菌株作为对照进行后续实验。

对 7 株菌进行糖醇类发酵实验，氧化酶反应，淀粉水解，硝酸盐产气，明胶液化，42 °C 生长实验等生理生化实验^[15,16]。

1.3.5 假单胞菌的分子生物学鉴定及系统发育树的构建

细菌基因组 DNA 的提取: 参照 BioFlux 公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取。

16S rDNA 的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增: PCR 扩增引物采用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')，1492R (5'-TACGGYTACCTTGTAYGACTT-3') 进行扩增。反应条件为: 94 °C 预变性 30 s，98 °C 变性 10 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min。将测定的 16S rDNA 序列登陆 NCBI 进行 BLAST 比对，使用 MEGA 7 软件绘制系统发育树。

1.3.6 7 株菌的回归污染

将培养至稳定期的菌液稀释至 10⁵ CFU/mL，将经过辐照灭菌制备的无菌牛肉 (3 cm×3 cm×3 cm) 在菌液中浸渍 2 s，之后托盘包装于 4 °C 贮藏，在贮藏的第 0、2、4、6 和 8 d 时测定假单胞菌数量、挥发性盐基氮，并进行感官评价。

1.3.6.1 假单胞菌数

假单胞菌数参照 1.3.1 假单胞菌数的计数方法。

1.3.6.2 TVB-N 测定

挥发性盐基氮的测定方法参照 GB 5009.228-2016 方法中的自动凯氏定氮仪法^[17]。

1.3.6.3 感官品质

参照 Zhang 等^[18]的方法对冷藏期间的生鲜牛肉按照 1-9 分值进行感官评定，评定小组由 10 名经过培训的小组成员组成，从样品的色泽、气味、嫩度、黏性等方面综合评定其整体可接受性，9 分为最好，1 分为最差，低于 6 分时被判定为不可接受。

1.4 数据统计分析

采用 Microsoft Excel 2007 和 SigmaPlot 12 进行数据处理和作图，假单胞菌数、TVB-N 值、感官品质利用 SAS 软件 (Version 9.0) 的混合模型交互作用进行数据分析，*p*<0.05 表示有统计学意义。

2 结果与讨论

在有氧贮藏条件下的冷鲜牛肉中，于 0、3、7、14 和 21 d 共筛出 216 株假单胞菌，用于后续实验。贮藏前期 (0~3 d) 分离的假单胞菌数较少，共计 31 株，贮藏中后期 (7~21 d) 分离假单胞菌数较多，共计 185 株。

2.1 产酶较高菌株的酶活性的测定

2.1.1 产蛋白酶较高菌株的蛋白酶活性的测定

表 1 产蛋白酶能力较强菌株的 H/C

Table 1 H/C of the strain with strong protease production ability

菌株	H/C	菌株	H/C
PP3413	3.38±0.09	PP1466	3.08±0.05
PP754	3.30±0.03	PP2145	3.06±0.05
PP2142	3.29±0.02	PP710	3.06±0.06
PP1438	3.26±0.03	PP741	3.05±0.04
PP7410	3.23±0.02	PP052	3.05±0.07
PP1413	3.18±0.03	PP1465	3.05±0.09
PP2134	3.15±0.07	PP1444	3.03±0.04
PP345	3.11±0.04	PP2132	3.01±0.02

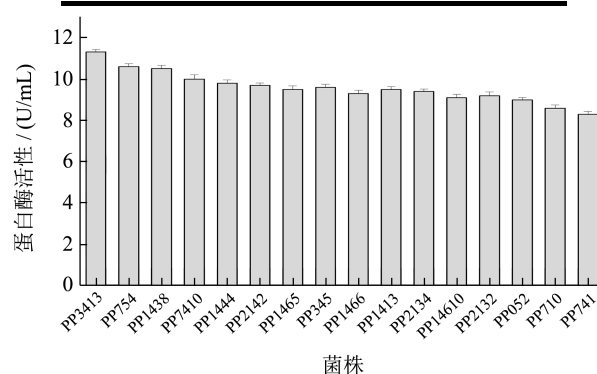


图 1 16 株菌的碱性蛋白酶活性

Fig.1 Alkaline protease activity of 16 strains

通过脱脂乳平板实验，从分离纯化的菌株中初步筛选出了 16 株 H/C 较大的菌株，结果如表 1 所示，筛选的 16 株菌的 H/C 均大于 3.00，其中 PP3413、PP754、PP2142、PP1438 和 PP7410 的 H/C 大于 3.2，分别为 3.38、3.30、3.29、3.26 和 3.23，产蛋白酶能力高于其他产蛋白酶菌株。PP3413 的 H/C 最大。16 株

产蛋白酶能力强的菌株大多分离于冷鲜牛肉贮藏后期,表明在贮藏中后期,假单胞菌能够利用肉品中的蛋白质等营养物质,产蛋白酶能力强的菌株逐渐占据优势地位。Casaburi 等^[19]认为葡萄糖是假单胞菌优先利用的能量物质,当牛肉中游离的葡萄糖、乳酸盐等物质不足以为假单胞菌的生长提供充足的能量时,假单胞菌开始分解蛋白质利用氨基酸等物质生成含硫化物、酯、酸等异味物质,产蛋白酶能力较强的假单胞菌在贮藏后期通过蛋白水解能力深入肉中利用新的营养物质^[20]。

Andreani 等^[21]认为假单胞菌于低温环境下分泌的蛋白酶主要为 AprX 碱性金属蛋白酶家族,在多数荧光假单胞菌中, AprX 碱性金属蛋白酶家族被认为是参与食品腐败的唯一蛋白酶家族。利用福林酚显色法测定了以上 16 株菌株粗酶液碱性蛋白酶的活性,按碱性蛋白酶活性从大到小的排序方式排序,结果如图 1 所示。16 株菌在 24 h 时的碱性蛋白酶活性均在 8.00 U/mL~12.00 U/mL 之间, PP3413、PP754 和 PP1438 的碱性蛋白酶活性大于 10 U/mL,分别为 11.3 U/mL、10.06 U/mL 和 10.05 U/mL,其中 PP3413 的碱性蛋白酶活性最高。同样,顾春涛等^[7]研究发现在贮藏 15 d 的冷鲜牛肉汁中,有 3 株优势腐败假单胞菌具有较高的蛋白酶活性,均高于 10.62 U/mL。因此筛选产蛋白酶能力较强,碱性蛋白酶活性较大的 PP3413、PP754、PP1438 用于后续实验。

2.1.2 产脂肪酶能力较高菌株的脂肪酶活性测定

表 2 产脂肪酶能力较强菌株的 D/C

Table 2 D/C of the strains with higher lipase production ability

菌株	D/C	菌株	D/C
PL341	1.32±0.14	PL2115	1.44±0.01
PL2135	1.39±0.05	PL7110	1.30±0.31
PL051	1.36±0.02	PL2133	1.62±0.06
PL1413	1.35±0.03	PL1459	1.75±0.14
PL1415	1.41±0.02	PL2136	1.48±0.07
PL1424	1.34±0.12	PL2141	1.34±0.02
PL1442	1.33±0.21	PL347	1.53±0.13
PL1444	1.32±0.03	PL378	1.33±0.06
PL1452	1.34±0.07	PL365	1.35±0.02
PL1453	1.39±0.04	PL723	1.35±0.04

通过 Tween-80 琼脂平板实验,从分离纯化的菌株中初步筛选出了 20 株产脂肪酶能力较强的菌株,结果如表 2 所示,20 株菌的 D/C 值均在 1.30 以上,PL2115、PL2133、PL1459、PL1415、PL2136 和 PL347 的 D/C 值均大于 1.40,分别为 1.44、1.62、1.75、1.41、1.48

和 1.53,其中 PL1459 的 D/C 值高于其他 5 株菌。20 株产脂肪酶能力强的菌株也多分离于牛肉贮藏后期,表明随着肉品的腐败,菌株亦通过对脂肪的分解利用为自身生长代谢提供能量,产脂肪酶能力强的菌株比例呈上升趋势。

利用铜皂法测定各菌株粗酶液中脂肪酶的活性,按脂肪酶活性从大到小的排序方式排序,结果如图 2 所示。20 株菌在 24 h 时的脂肪酶活性均在 0.6~1.2 U/mL 之间,PL347、PL1415、PL1459 和 PL2133 的脂肪酶活性大于 1.1 U/mL,分别为 1.19、1.15、1.14、1.10 U/mL,其中 PL347 的脂肪酶活性最高。而戴金岳等^[22]测得冷鲜猪肉中的特定腐败假单胞菌 (*P. koreensis*) 的脂肪酶在 3 d 时活性最强,达到 51.85 U/g,不同来源的假单胞菌其脂肪酶活性存在较大差异可能与假单胞菌的菌种及其利用的脂肪种类密切相关。假单胞菌的分泌的脂肪酶属于 α/β 型水解酶超家族^[23],Ramani 等^[24]认为假单胞菌的脂肪酶对牛脂底物利用能力较强。因此筛选产脂肪酶能力较强,脂肪酶活性较大的 PL347、PL1415、PL1459 用于后续实验。

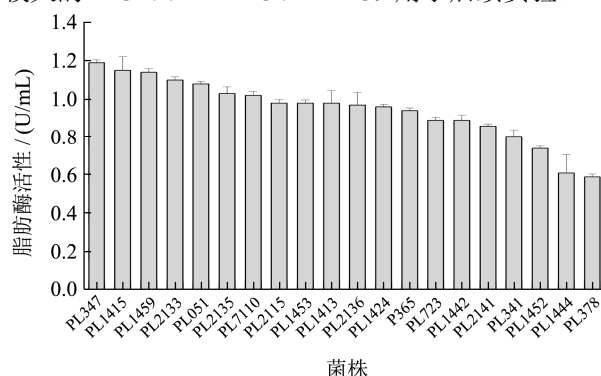


图 2 20 株菌的脂肪酶活性

Fig.2 Lipase activity of 20 strains

2.2 假单胞菌种水平的鉴定

通过蛋白酶与脂肪酶实验筛选出 1 株产蛋白酶及脂肪酶能力都较弱的菌株,命名为 P011,将 P011 与产蛋白酶能力强的菌株 PP3413、PP754、PP1438 及产脂肪酶能力强的菌株 PL347、PL1415、PL1459 用于后续实验。

2.2.1 生理生化鉴定结果

参考《伯杰细菌手册》和《常见细菌系统鉴定手册》,结合表 3 结果,初步鉴定分离菌株 P011 不液化明胶,42 °C 不生长,不能利用阿拉伯糖等与恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 鉴定特征接近,分离菌株 PP3413、PP754、PL1415 能利用葡萄糖、果糖、蔗糖,不能利用麦芽糖为唯一碳源等与荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 鉴定特征相接近,PP1438 硝酸盐产气等

与 *P. salomonii* 鉴定特征相近, PL347 利用葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖醇等与草假单胞菌 (*P. poae*) 与其生理

生化特征相似, PL1459 不利用果糖、蔗糖等与 *P. libanensis* 生理生化特征相近。

表 3 7 株菌的生理生化鉴定结果

Table 3 Physiological and biochemical identification results of 7 strains

特征	菌株						
	P011	PP3413	PP754	PP1438	PL347	PL1415	PL1459
氧化酶反应	+	+	+	+	+	+	+
接触酶反应	+	+	+	+	+	+	+
L-精氨酸产氨反应	+	+	+	+	+	+	+
4 °C 生长	+	+	+	+	+	+	+
42 °C 生长	-	+	+	-	-	-	+
明胶液化	-	+	+	-	+	+	+
硝酸盐产气	-	-	-	+	+	-	-
产脂肪酶	-	+	+	+	+	+	+
产淀粉酶	+	+	+	+	+	+	+
丙二酸盐	+	+	+	+	+	+	+
粘液酸	+	-	-	-	+	-	-
甘露醇	+	-	+	+	-	+	+
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖醇	-	-	+	-	+	+	+
麦芽糖	+	-	-	+	-	-	+
蔗糖	+	+	+	-	+	+	-
鼠李糖	+	-	+	+	-	-	-
阿拉伯糖	-	+	+	-	-	+	+
果糖	+	+	+	-	-	+	-

2.2.2 系统发育树的构建

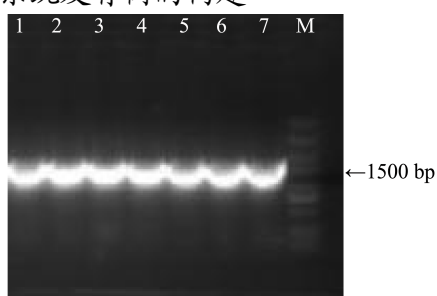


图 3 16S rDNA 扩增结果

Fig.3 16S rDNA PCR amplification

注: 1~7: PCR 扩增产物; M: Marker。

由图 3 可知, 将筛选的 7 株菌以总 DNA 为模板 PCR 扩增后经电泳检测, 均得到了 1500 bp 左右的条带, 将 PCR 产物进行测序, 测序结果登录 NCBI 网站, 进行 Blast 序列比对, 发现 PP3413、PP754、PL1415 与荧光假单胞菌的 16S rDNA 同源性达 99% 以上, 结合生理生化试验的结果, 可判定 PP3413、PP754、PL1415 为荧光假单胞菌。此外, 结合 16S rDNA 与生理生化结果将 P011、PL347、PP1438、L1459 分别判定为恶臭假单胞菌、草假单胞菌、*P. salomonii*、*P.*

libanensis。

有学者研究表明在冷藏肉中, 荧光假单胞菌占初始假单胞菌数量的 60% 以上, 腐败时占细菌总数的 90%^[25,26], 恶臭假单胞菌是有氧冷藏牛肉腐败初期中常见的假单胞菌种之一^[27], 而草假单胞菌、*P. salomonii*、*P. libanensis* 在牛肉中分离较少, 草假单胞菌曾在羊奶中被检出^[28], *P. salomonii*、*P. libanensis* 多分离于土壤、植物、水源等。因此 PL347、PP1438、PL1459 的来源可能是牛饲养过程中的土壤、饲料以及水源等。

值得注意的是, 肉品中常被检出的荧光假单胞菌与恶臭假单胞菌分离时期不同, 恶臭假单胞菌多分离于贮藏初期^[29]而荧光假单胞菌在腐败末期也常被检出^[4,7]。且两种菌的蛋白酶与脂肪酶活性差异较大, 本试验中, 荧光假单胞菌 PP754、PP3413 具有较强的蛋白酶活性, 荧光假单胞菌 PL1415 具有较强的脂肪酶活性, 而恶臭假单胞菌 P011 不具有蛋白酶活性及脂肪酶活性。Reichler 等^[30]测定不同假单胞菌种的蛋白酶及脂肪酶活性, 结果表明荧光假单胞菌部分菌株具有蛋白酶活性与脂肪酶活性, 而恶臭假单胞菌不具有

蛋白酶活性,因此假单胞菌蛋白酶与脂肪酶的分泌可能与假单胞菌的菌种相关。恶臭假单胞菌在肉品贮藏后期检出较少,可能与其较弱的蛋白酶、脂肪酶活性,

从而无法较好的利用肉品中的蛋白质、氨基酸脂肪等密切相关,荧光假单胞菌则因其较强的蛋白酶与脂肪酶活性使其成为肉品中的优势腐败菌。

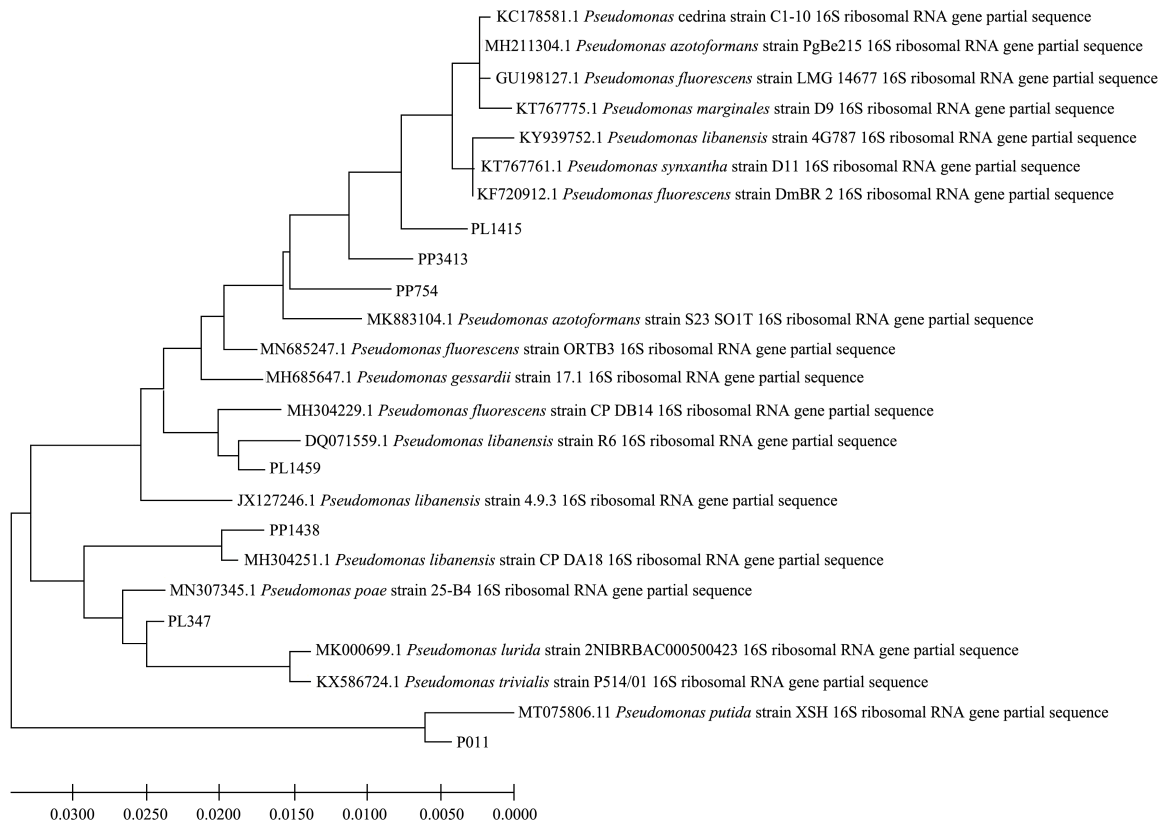


图4 7株菌株基于16S rDNA序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic trees of 7 strains were constructed based on 16S rDNA sequences

2.3 假单胞菌的回归污染

2.3.1 假单胞菌计数

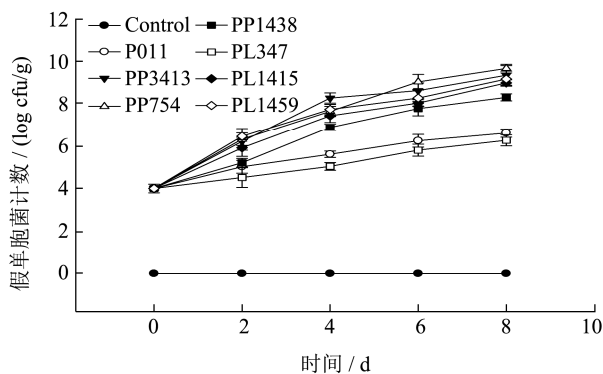


图5 7株菌回归污染后假单胞菌的计数

Fig.5 Number of *Pseudomonas* after 7 strains of bacteria return to contamination

菌株种类和贮藏时间的交互作用显著影响牛肉中假单胞菌数 ($p < 0.05$)。随着贮藏时间的延长,各处理组中假单胞菌落数均呈现上升趋势,而对照组中未检出假单胞菌(检出限为 10.00 CFU/g),表明回归接种前的牛肉样品未受到假单胞菌的污染。接种 P011、

PL347 的牛肉样品中假单胞菌落数从第四天时开始显著低于其他处理组 ($p < 0.05$),分别为 5.60 log CFU/g、5.03 log CFU/g,在贮藏第八天时分别达到 6.59 log CFU/g 和 6.25 log CFU/g。而其他处理组中假单胞菌的生长较快,在贮藏第四天时就已超过 6.80 log CFU/g,PP754、PP3413、PP1438、PL1415 及 PL1459 分别为 7.63、8.26、6.87、7.42、7.72 log CFU/g;贮藏至第八天时,分别达到了 9.65、9.33、8.29、8.97、9.15 log CFU/g,能较好的利用牛肉的营养物质来满足自身生长需求。其中接种 PP754 的样品在第八天时假单胞菌数最高,生长能力最强。值得注意的是,有学者发现在冷鲜鸡肉中具有较强蛋白酶活性的莓实假单胞菌其数量在第七天时已经达到了 10.20 log CFU/g^[4];在冷鲜牛肉中具有较强蛋白酶活性的假单胞菌其数量在第六天时已经超过了 7.23 log CFU/g^[7],本实验中发现产蛋白酶能力较强的两株菌 PP754、PP3413 处理组的假单胞菌数在第八天时高于其他假单胞菌处理组,因此蛋白酶活性强的假单胞菌在牛肉中的生长能力可能强于脂肪酶活性强的假单胞菌。

假单胞菌在冷鲜牛肉上的生长能力与其腐败能力

存在一定的相关性,除 PL347(第八天时,假单胞菌数量为 6.25 log CFU/g)外,其他 5 株产酶能力较强的菌株在冷鲜牛肉中具有较强的生长能力(第八天时,假单胞菌数量均高于 8.20 log CFU/g)。底物可能是影响假单胞菌脂肪酶分解能力的关键因素之一^[31]。而产脂肪酶能力较强的 PL347 在牛肉中生长能力较弱,可能是由于 PL347 分泌的脂肪酶对牛脂的分解能力较差。刘武^[32]认为假单胞菌分泌的脂肪酶对不同底物的分解能力有较大差异,在 p-NP 辛酸酯与 p-NP 葵酸酯不同底物中的脂肪酶活性分别为 100.00%与 71.30%。Borch 等^[33]认为与细菌生长相关的营养物质利用情况会影响食品的腐败速度,这 5 株产酶能力较强的菌株在牛肉中具有较强的生长能力可能是由于能较好地利用牛肉中的营养物质。因此,产酶能力较强的菌株在牛肉中的生长能力不一定较强,能否较好的利用相应类别的底物与其生长繁殖密切相关。

2.3.2 TVB-N 值

TVB-N 是评价肉质新鲜度的重要指标之一。菌株和贮藏时间的交互作用显著影响 TVB-N 值($p < 0.05$)。所有样品的初始 TVB-N 值在 10.64 mg/100 g 左右,随着贮藏时间的延长,均呈现上升的趋势,其中接种 PP754、PP3413、PL1459、PL1415 的牛肉样品其 TVB-N 值增长速率最快,贮藏第八天时显著高于其他处理组($p < 0.05$,图 6),分别为 25.02、22.06、21.80、20.35 mg/100 g。在第六天时,接种 PP754、PP3413、PL1415、PL1459 的牛肉样品就已超过 GB 2707-2016 限量标准(15 mg/100 g),分别为 20.63、19.04、15.28、15.23 mg/100 g。其中接种 PP754 牛肉样品的 TVB-N 值从第四天时显著高于其他处理组($p < 0.05$),为 14.99 mg/100 g;在腐败末期(第八天)达到了 25.02 mg/100 g。对照组在整个贮藏期间 TVB-N 值增长较小(9.67~12.68 mg/100 g)。

本研究结果表明,接种产酶能力较强的菌株如 PP754、PP3413(在体外蛋白酶活性较强)和 PL1459、PL1415(在体外脂肪酶活性较强)使牛肉中的 TVB-N 值显著升高,该结果与上述假单胞菌数结果相一致。黄林等^[34]也发现在冷鲜猪肉中,TVB-N 值与假单胞菌数量也存在正相关性^[35],当假单胞菌达到 8.30 log CFU/g 时,其 TVB-N 值已超过 25.00 mg/100 g。然而,具有较强脂肪酶活性的 PL347 使接种后牛肉在贮藏第八天时的 TVB-N 值为 13.95 mg/100 g,显著低于其他产酶活性较强的假单胞菌($p < 0.05$)。同样,PP1438(具有强蛋白酶活性)处理组在贮藏第八天时的 TVB-N 也处于较低水平为 15.82 mg/100 g。与该结果相类似,Wang 等^[8]研究发现在冷鲜鸡肉中具有较强蛋

白酶活性、可降解肌钙蛋白与肌动蛋白的杀鲑气单胞菌因在肉中生长能力较低而样品中对应的 TVB-N 值也显著低于其他菌株(第七天时达到 30 mg/100 g),而不同的是本实验分离菌株的 TVB-N 值与 Wang 等^[8]实验分离菌株的 TVB-N 值差异较大,可能是与菌种、肉的种类相关。进而说明,并不是所有产酶能力较强的菌株在肉品中的腐败能力均比较强,这与其菌种及在肉品中的生长能力也有一定的关系。同时本研究发现,产蛋白酶能力较强的菌株 PP754、PP3413 其 TVB-N 值分别高于产脂肪酶能力较强的菌株 PL1459、PL1415,这意味着产蛋白酶活性较强的假单胞菌其腐败能力可能优于产脂肪酶较强的菌株。

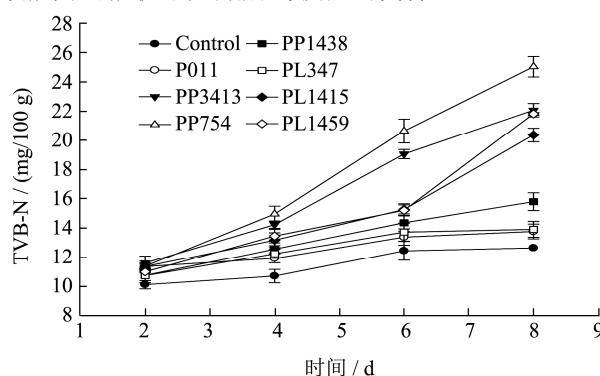


图 6 7 株菌回归污染后 TVB-N 值的变化

Fig.6 Changes of TVB-N values of 7 strains after return contamination

2.3.3 感官品质

接种 7 株腐败假单胞菌的牛肉样品的感官品质变化如图 7 所示。菌株和贮藏时间的交互作用显著影响感官品质评分($p < 0.05$),所有处理组的牛肉样品随贮藏时间的延长,感官评分均逐渐降低。贮藏第四天时,PP754、PP3413、PP1438、PL347、PL1415 和 PL1459 处理组的感官评分就已低于 6.00,分别为 4.33、4.92、5.71、5.64、5.53 和 4.42,被判定为不可接受。在第六天时,接种 PP754 的牛肉样品的感官评分为 2.41,显著低于其它处理组($p < 0.05$),其在贮藏期间腐败速率最快,在贮藏末期(第八天)肉色发绿,产生强烈的腐臭味,感官评分为 1.20,被判定为完全不可接受。

肉品感官品质的下降主要是由于肉品中蛋白质、脂肪等物质的降解造成的^[36,37]。在本研究中,接种产酶能力较强菌株的牛肉样品,其感官评分显著低于接种产酶能力较弱菌株 P011 的牛肉样品及对照组($p < 0.05$),Stanborough 等^[38]研究发现,假单胞菌能够分泌与肉品腐败相关的蛋白酶及脂肪酶,当假单胞菌达到较高种群数量时,分泌的胞外酶活性会导致肉类品质下降并产生不良气味。Ahm 等^[39]也研究发现在假单胞菌占据主导地位的低温有氧贮藏的牛肉中,

含有 3-甲基丁酮-1-醇、乙酸乙酯、丙酮、2-丁酮和二乙酰等代谢产物,造成了肉品的感官品质下降,同时感官品质与 TVB-N 值存在一定的相关性; Benjamin 等^[40]研究发现,在真空包装的冷鲜牛肉中,TVB-N 值主要与 a^* 值、 b^* 值呈负相关性 ($r=0.43$ 、 $r=-0.34$)。本研究结果与之相似,TVB-N 值上升较快的假单胞菌株其气味更加难以接受,并具有较差的肉色。因此具有较强的产酶能力且能利用牛肉中的营养物质的假单胞菌株致腐能力更强,感官品质更差。同时,感官品质被认为是评价肉品品质最直接的方式^[41],在第 8 d 时接种蛋白酶活性较强的 PP754 (1.20)、PP3413 (3.22) 牛肉的感官品质分别低于接种脂肪酶活性较强的 PL1459 (2.59)、PL1415 (3.41) 牛肉的感官品质,这表明产蛋白酶能力较强的菌株与产脂肪酶能力较强的菌株相比可能会带来更难以接受的品质劣变。

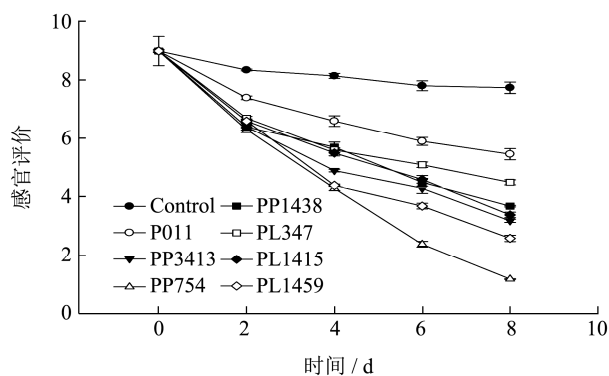


图 7 7 菌株回归污染感官评价的变化

Fig.7 Changes in sensory evaluation of 7 strains of recurrent contamination

3 结论

荧光假单胞菌是冷鲜牛肉中的优势腐败菌,在筛选的 7 株假单胞菌中,3 株荧光假单胞菌的产酶能力较强,同时其腐败能力也处于较高水平,感官评价较差。假单胞菌的产酶能力与其致腐能力并不存在必然联系,部分产酶能力较强的菌株可能因其无法以牛肉为底物进行生长代谢或在牛肉中生长能力较弱而导致在牛肉中的致腐能力较差。此外,本研究发现产蛋白酶活性较强的菌株可能比产脂肪酶能力较强菌株的腐败能力更强。因此,具有较强的酶活性且能利用牛肉中的营养物质大量生长繁殖,并产生代谢产物的假单胞菌具有更强的致腐能力。在后续研究中可进一步探究假单胞菌酶活影响牛肉品质劣变的具体机制,探究降低假单胞菌的酶活性、减弱假单胞菌对牛肉的利用能力以及控制假单胞菌数量的方法,以遏制假单胞菌对冷鲜牛肉的腐败能力,从而有效延长牛肉的货架期。

参考文献

- [1] Nychas G, Skandamis P N, Tassou C C, et al. Meat spoilage during distribution [J]. Meat Science, 2008, 78(1-2): 77-89
- [2] Ahmad R M, Eun-Ji S, Yong-Sun C, et al. Comparative evaluation of spoilage-related bacterial diversity and metabolite profiles in chilled beef stored under air and vacuum packaging [J]. Food Microbiology, 2018, 77(2): 166-172
- [3] 尹德凤,张莉,张大文,等.生鲜肉类产品中腐败细菌研究[J].农产品质量与安全,2018,93(3):23-31
YIN Defeng, ZHANG Li, ZHANG Dawen, et al. Spoilage bacteria in fresh meat products: a review [J]. Quality and Safety of Agro-Products, 2018, 93(3): 23-31
- [4] 王光宇.气调包装对冷鲜鸡肉中霉实假单胞菌致腐效应的抑制机制[D].南京:南京农业大学,2018
WANG Guangyu. Inhibition mechanisms of MAP against chilled chicken spoilage associated with *Pseudomonas fragi* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018
- [5] Yu W, Li Y, Yang J, et al. Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff [J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2016, 78(1): 1-16
- [6] 查代明,闫云君.细菌脂肪酶基因表达调控的研究进展[J].微生物学报,2015,55(11):1378-1384
CHA Daiming, YAN Yunjun. Progress in expression regulation of bacterial lipase genes-a review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(11): 1378-1384
- [7] 顾春涛,毕伟伟,朱军莉.冷鲜牛肉贮藏中菌群结构及优势菌致腐性的分析[J].食品科学,2019,40(18):76-82
GU Chuntao, BI Weiwei, ZHU Junli. Bacterial community structure and spoilage potential of dominant bacteria in chilled beef [J]. Food Science, 2019, 40(18): 76-82
- [8] Wang G Y, Wang H H, Han Y W, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken *in vitro* and *in situ* [J]. Food Microbiology, 2017, 63(MAY): 139-146
- [9] 葛阳杨,朱军莉,刘丽,等.大黄鱼源气单胞菌的分离鉴定及致腐表型[J].水产学报,2017,41(6):861-869
GE Yangyang, ZHU Junli, LIU Li, et al. Spoilage phenotypic characterization and identification of *Aeromonas* isolated from spoiled *Larimichthys crocea* [J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(6): 861-869
- [10] Yang H B, Hopkins D L, Zhang Y M, et al. Preliminary investigation of the use of Raman spectroscopy to predict beef spoilage in different types of packaging [J]. Meat Science, 2020, 165(July): 108136

- [11] 陈龙.产蛋白酶菌株的筛选及酶学性质的研究[D].南昌:南昌大学,2020
CHEN Long. Screening of protease-producing strains and study on their enzymatic properties [D]. Nanchang: Nanchang University, 2020
- [12] 王虹懿,吴海虹,张新笑,等.绿原酸对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败特性的抑制作用[J].食品工业科技,2020,41(7):95-101
WANG Hongyi, WU Haihong, ZHANG Xinxiao, et al. Inhibitory activity of chlorogenic acid on the quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* and its spoilage activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(7): 95-101
- [13] 杜萍萍,张莹莹,申培立,等.一株产耐高温碱性脂肪酶菌株的筛选及产酶条件优化[J].食品工业科技,2015,36(9):188-193
DU Pingping, ZHANG Yingying, SHEN Peili, et al. Screening of a thermostable alkaline lipase producing strain and optimization of fermentation condition for Lipase production [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(9): 188-193
- [14] 刘兰.产脂肪酶抑制剂菌株的筛选、鉴定及活性物质的研究[D].南宁:广西大学,2012
LIU Lan. Screening and identification of the lipase inhibitor-producing strains and the research of active substances [D]. Nanning: Guangxi University, 2012
- [15] 东秀珠,蔡妙璞.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001
DONG Xiuzhu, CAI Miao-ying. Manual for Systematic Identification of Common Bacteria [M]. Beijing: Science Press, 2001
- [16] Buchana Re, Gibbons Ne, 等.伯杰细菌鉴定手册第八版中译本[M].北京:科学出版社,1984
Buchana Re, Gibbons Ne, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1984
- [17] 陈雪,罗欣,梁荣蓉,等.不同冰温条件对长期贮藏牛肉品质和货架期的影响[J].农业工程学报,2019,35(23):305-311
CHEN Xue, LUO Xin, LANG Rongrong, et al. Effects of super-chilled conditions on quality and shelf life of beef during long term storage [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2019, 35(23): 305-311
- [18] Zhang X, Wang H, Li N, et al. High CO₂-modified atmosphere packaging for extension of shelf-life of chilled yellow-feather broiler meat: a special breed in Asia [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2): 1123-1129
- [19] Casaburi A, Piombino P, Nychas G J, et al. Bacterial populations and the volatolome associated to meat spoilage [J]. Food Microbiology, 2015, 45(feb.pt.a): 83-102
- [20] 张一敏,朱立贤,张万刚,等.生鲜牛肉中的腐败微生物概述[J].食品科学,2018,39(13):289-296
ZHANG Yimin, ZHU Lixian, ZHANG Wangang, et al. An overview of spoilage microorganisms in fresh beef [J]. Food Science, 2018, 39(13): 289-296
- [21] Andreani N A, CarrarO L, Fasolato L, et al. Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: preliminary results [J]. Italian Journal of Food Safety, 2016, 5(4): 239-244
- [22] 戴金岳,曾宪文,方利敏,等.特定致腐菌对冷却猪肉的致病作用机制[J].肉类研究,2019,33(12):50-55
DAI Jinyue, ZENG Xianwen, FANG Limin, et al. Mechanism by which inoculation with specific spoilage organisms caused spoilage in chilled pork [J]. Meat Research, 2019, 33(12): 50-55
- [23] Mccarthy C N, Woods R G, Beacham I R. Regulation of the aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by ompR-envZ [J]. Fems Microbiology Letters, 2004, 241(2): 243-248
- [24] Ramani K, Kennedy L J, Ramakrishnan M, et al. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(10): 1683-1691
- [25] Lambert A D, Smith J P, Dodds K L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat - a review [J]. Food Microbiology, 1991, 8(4): 267-297
- [26] Gustavsson P, Borch E. Contamination of beef carcasses by psychrotrophic *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* at different stages along the processing line [J]. International Journal of Food Microbiology, 1993, 20(2): 67-83
- [27] Mohareb F, Iriondo M, Doulgeraki A I, et al. Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling [J]. Food Control, 2015, 57: 152-160
- [28] Meng L, Liu H M, Dong L. et al. Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different raw milks at storage temperatures [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(4): 2897-2905
- [29] Hyldgaard M, Meyer R L, Pen M, et al. Binary combination of epsilon-poly-L-lysine and isoeugenol affect progression of

- spoilage microbiota in fresh turkey meat, and delay onset of spoilage in *Pseudomonas putida* challenged meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015
- [30] Reichler S J, Murphy S I, Martin N H, et al. Identification, subtyping, and tracking of dairy spoilage-associated *Pseudomonas* by sequencing the *ileS* gene [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(3): 2668-2683
- [31] 黄璜,李宗军,王远亮,等.各类微生物脂肪酶酶学性质及应用的研究进展[J].粮油食品科技,2014,22(1):109-118
HUANG Huang, LI Zongjun, WANG Yuanliang, et al. Progress in enzymatic properties of microbial lipase and applications [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2014, 22(1): 109-118
- [32] 刘武.假单胞菌脂肪酶的表达及调控机制研究[D].武汉:华中科技大学,2019
LIU Wu. Study on overexpression and regulation mechanism of *Pseudomonas* lipases [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2019
- [33] Borch E, Kantmuermans M L, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 103
- [34] 黄林,陈全胜,张燕华,等.冷却猪肉优势腐败菌分离鉴定及致腐能力测定[J].食品科学,2013,34(1):205-209
HUANG Lin, CHEN Quansheng, ZHANG Yanhua, et al. Isolation, identification and spoilage capability of dominant spoilage bacteria in chilled pork [J]. Food Science, 2013, 34(1): 205-209
- [35] 刘亚兵,何腊平,高泽鑫,等.基于假单胞菌生长模型预测冷却牛肉的货架期[J].中国酿造,2017,36(8):114-119
LIU Yabing, HE Laping, GAO Zexin, et al. Prediction of shelf life of chilled beef base on *Pseudomonas* spp. growth model [J]. China Brewing, 2017, 36(8): 114-119
- [36] Nowak A, Rygala A, Oltuszek-walczak E, et al. The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2012, 92(6): 1304-1310
- [37] Nychas G J E, Tassou C C. Spoilage processes and proteolysis in chicken as detected by HPLC [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 74(2): 199-208
- [38] Stanborough T, Fegan N, Powell S M, et al. Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 268: 61-72
- [39] Mansur A D, Song E J, Cho Y S, et al. Comparative evaluation of spoilage-related bacterial diversity and metabolite profiles in chilled beef stored under air and vacuum packaging [J]. Food Microbiology, 2018, 77(6): 166-172
- [40] Benjamin W B, Holman A, Alaa E A, et al. The association between total volatile basic nitrogen (TVB-N) concentration and other biomarkers of quality and spoilage for vacuum packaged beef [J]. Meat Science, 2021, 179:108551
- [41] Yang L, Shang Y, Ying S, et al. Changes in the quality of superchilled rabbit meat stored at different temperatures [J]. Meat Science, 2016, 39: 173-181

(上接第 62 页)

- [29] 陈燕.16S rDNA 技术在乳粉阪崎肠杆菌监测中的应用[J].中国乳品工业,2016,44(7):20-22
CHEN Yan. *Enterobacter sakazakii* monitoring in milk production environment using 16S rDNA [J]. China Dairy Industry, 2016, 44(7): 20-22
- [30] 刘艳艳,柳增善,卢士英,等.灭菌乳中活阪崎肠杆菌 PMA-PCR 检测方法的建立[J].中国畜牧兽医,2014,41(2): 65-69
LIU Yanyan, LIU Zengshan, LU Shiyong, et al. Development of PMA-PCR method for detection of viable *Enterobacter sakazakii* in pasteurized milk [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(2): 65-69
- [31] Jameelah M, Dewanti-hariyadi R, Nurjanah S. Expression of *rpoS*, *ompA* and *hfq* genes of *Cronobacter sakazakii* strain Yrt2a during stress and viable but nonculturable state [J]. Food Sci Biotechnol, 2018, 27(3): 915-920
- [32] 杨一冲,蔡丹.保加利亚乳杆菌发酵特性的研究[J].吉林农业科学,2012,37(5):71-74
YANG Yichong, CAI Dan. Studies on the fermentation characteristics of *Lactobacillus bulgaricus* [J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2012, 37(5): 71-74