

黄鳝片冷藏期间肌肉品质和菌群结构变化

杨丽凤^{1,2}, 李旭海^{1,2}, 汪兰¹, 周志², 吴文锦¹, 李平³, 熊光权^{1*}, 石柳^{1*}

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室, 湖北武汉 430064) (2. 湖北民族大学生物与食品工程学院, 湖北恩施 445000)

(3. 荆州市集创机电科技股份有限公司, 湖北荆州 434020)

摘要: 研究了4℃冷藏7d过程中黄鳝片肌肉品质变化和菌群结构的变化, 测定了黄鳝片色差, 微观结构, pH值, 挥发性盐基氮(Total Volatile Base Nitrogen, TVB-N), 菌落总数(Total Viable Count, TVC)等理化指标及挥发性物质和游离氨基酸等风味物质含量, 并以细菌属与特征化学指标、色差相关指标以及关键氨基酸进行相关性分析。结果发现: 随着冷藏时间延长, 黄鳝片颜色逐渐发黄最终呈棕褐色, 肌肉细胞间隙逐渐增大, TVB-N含量, TVC和H^{*}值逐渐上升, R630/580、必需氨基酸含量逐渐下降, 其中pH值第1天从7.02降至6.19 ($P<0.05$), TVC和TVB-N含量分别在第3天和第7天超过限值; 冷藏期间黄鳝片对传感器W5S的响应度最高, 3d后鳝鱼片气味发生较大改变, 亮氨酸含量降低。黄鳝片冷藏过程中生物多样性逐渐降低, 冷藏前期(3d)优势菌属为巨球菌属和不动杆菌, 3d后为环丝菌属和假单胞菌、肉杆菌属。相关性分析结果表明, 冷藏期间R630/580, H^{*}值, pH值, TVC, TVB-N以及丝氨酸、甘氨酸和亮氨酸含量均与群落结构具有极显著相关性, 而微生物生长是冷藏期间黄鳝片新鲜度、色度和风味变化的主要原因。该研究为黄鳝冷鲜加工提供理论依据。

关键词: 黄鳝; 理化性质; 微观结构; 游离氨基酸; 菌群结构; 相关性分析

文章编号: 1673-9078(2024)12-143-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.12.1277

Changes in Muscle Quality and Microbial Community Structure of Eel Slices during Cold Storage

YANG Lifeng^{1,2}, LI Xuhai^{1,2}, WANG Lan¹, ZHOU Zhi², WU Wenjin¹, LI Ping³, XIONG Guangquan^{1*}, SHI Liu^{1*}

(1. Key Laboratory of Agricultural Products Cold Chain Logistics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Agro-Products Processing and Nuclear Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China) (2. College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China)

(3. Jingzhou Jichuang Electromechanical Technology Co. Ltd., Jingzhou 434020, China)

Abstract: The changes in muscle quality and microbial community structure of eel (Asian swamp eel, *Monopterus albus*) slices during 7 days of cold storage at 4℃ were assessed by measuring physicochemical indexes, such as color difference, microstructure, pH value, total volatile base nitrogen (TVB-N), and total viable count (TVC), as well as flavor-related

引文格式:

杨丽凤,李旭海,汪兰,等.黄鳝片冷藏期间肌肉品质和菌群结构变化[J].现代食品科技,2024,40(12):143-153.

YANG Lifeng, LI Xuhai, WANG Lan, et al. Changes in muscle quality and microbial community structure of eel slices during cold storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(12): 143-153.

收稿日期: 2023-10-23

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-46); 荆州市科技计划项目(2023BB25)

作者简介: 杨丽凤(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品加工, E-mail: ylifeng2022@163.com

通讯作者: 熊光权(1965-), 男, 研究员, 研究方向: 淡水水产品加工, E-mail: Xionguangquan@163.com; 共同通讯作者: 石柳(1988-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 水产品加工与综合利用, E-mail: shiliu@hbaas.com

substances, such as volatile compounds and free amino acids. Furthermore, associations of bacterial genera with characteristic chemical indexes, color difference indexes, and key amino acids were examined. The results showed, that with the prolongation of cold storage, the color of eel slices gradually became yellow and finally turned brown, and the muscle cell gap, TVB-N content, TVC, and H^* value all gradually increased, whereas the R630/580 ratio and the levels of essential amino acids gradually decreased. Specifically, the pH value diminished from 7.02 to 6.19 on day 1 ($P<0.05$), while the TVC and TVB-N contents exceeded the corresponding limits on days 3 and 7, respectively. The response of eel slices to the sensor WSS was the highest during the cold storage period. After day 3, the odors of the eel slices changed considerably, and the leucine contents decreased. The microbial diversity of eel slices gradually decreased during cold storage, and the dominant genera were *Macrococcus* and *Acinetobacter* in the early cold storage period (first three days) and *Brochothrix*, *Pseudomonas*, and *Carnobacterium* after day 3. The results of correlation analysis showed that R630/580, H^* , pH, TVC, and TVB-N values as well as the serine, glycine, and leucine contents significantly correlated with the microbial community structure during cold storage; furthermore, microbial growth was the main reason for the changes in freshness, color, and flavor of eel slices during cold storage. This study provides a theoretical basis for cold processing of Asian swamp eels.

Key words: Asian swamp eel (*Monopterus albus*); physicochemical property; microstructure; free amino acid; microbial community structure; relation analysis

黄鳝 (*Monopterus albus*) 俗称鳝鱼, 属硬骨鱼纲, 合鳃目, 合鳃科, 黄鳝属^[1], 黄鳝是重要的经济鱼类, 在我国主要产区为湖北、江西、安徽和湖南等^[2]。近年来黄鳝养殖产量每年已接近 40 万 t, 产值超过 200 亿元^[3]。黄鳝肉质细嫩, 味道鲜美, 富含人体所需的不饱和脂肪酸、矿物质等营养素, 具有极高的营养价值和药用价值, 深受消费者的喜爱。近年来, 市场上出现了少量的黄鳝冷藏预制菜, 但是黄鳝在加工贮藏过程中受微生物影响较大, 极易发生腐败变质, 降低了黄鳝的营养品质和商业价值。因此, 有必要研究其在贮藏加工过程中的品质变化和微生物群落结果变化。

目前有关黄鳝加工贮藏的研究主要集中在冷冻、冷藏条件下的理化性质变化。王智能等^[4]研究了在 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冻藏下黄鳝肉质特性的变化, 发现 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下更能保持其水分, 并且失水率较低, 其质构特性研究指出 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下品质劣变较慢。赵海洋等^[5]研究了在 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷藏保鲜过程中黄鳝片的品质变化, 发现在 $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下, 黄鳝片的最佳食用期为 2 d, 保质期为 8 d。高通量测序技术常用于研究水产品贮藏期间微生物菌群的变化, 可以鉴定在贮藏过程中的优势菌群, 对水产品的保鲜加工具有指导意义。Huang 等^[6]发现 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏期间石斑鱼的优势腐败菌为假单胞菌, 尚雪娇^[7]研究指出白斑狗鱼在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏期间的优势细菌属假单胞菌, 并且对鱼肉质量起着关键作用。冯豪杰^[8]通过高通量分析指出伯克霍尔德菌属和假单胞菌属是新鲜暗纹东方鲀中主要的微生物属, 假单胞菌属为暗

纹东方鲀贮藏末期的主要微生物。然而关于黄鳝冷藏过程中微生物菌群动态变化规律, 菌群组成与黄鳝品质的内在关系未见研究报道。

因此, 本研究以黄鳝为原料, 研究其在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏时色差、pH 值, 挥发性盐基氮 (TVB-N), 菌落总数 (TVC), 游离氨基酸等理化性质变化, 进一步通过高通量测序分析了黄鳝片冷藏期间菌群结构的变化, 并对微生物和理化性质之间进行了相关性分析。本研究为延长黄鳝冷藏货架期和保鲜技术提供参考依据, 为黄鳝产业深加工提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄鳝, 湖北省武汉市白沙洲水产品批发市场; A01S02 型黄鳝宰杀机, 荆州市集创机电科技股份有限公司; FG2-B 便携式 pH 计, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 分光测色计 CM-2500c, 柯尼卡美能达 (中国) 投资有限公司; KQ5200DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; T18 高速分散均质机, 德国 IKA 公司; K-15 高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司等。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理

50 kg 鲜活的黄鳝 [每条 (200 ± 50) g] 运送至实验室, 经过黄鳝宰杀机宰杀后, 去头、去尾、去骨和去内脏, 洗干净后选择黄鳝中间厚度均匀

部位切片 (4 cm×5 cm), 于聚乙烯袋中真空包装, (4±1)℃条件下保鲜贮藏。

1.2.2 微观结构

参考蔡文强等^[9]的方法略加修改, 沿肌纤维方向切成 1 cm×1 cm×1 cm 的鱼块, 用通用型固定组织液溶液中固定 24 h, 乙醇脱水, 石蜡透蜡, 包埋后, 进行修片, 切片, 染色以及封片, 使用显微镜和摄像系统在 10×40 倍下进行观察拍照。

1.2.3 色差测定

采用分光测色计 CM-2500c 测定鳙鱼背部肉片的亮度 L^* , 红绿度 a^* , 黄蓝度 b^* , 色度值 C^* , 色度角 H^* , $R630/580$ 值以及 360 nm~740 nm 下波长变化。平行测定 6 次。 C^* 值表示肉样的红色强度, H^* 值为色度角^[10]。 $R630/580$ 表示颜色的稳定性, $R630/580$ 值越大颜色越稳定^[11]。

1.2.4 游离氨基酸

参考 Lu 等^[12]的方法并加以修改进行游离氨基酸含量的测定。称取 10 g 剁碎的黄鳙肉样品, 加入 20 mL 0.1 mol/L HCl 超声 30 min, 然后离心 (5 000 r/min, 10 min) 取上清, 沉淀加入 20 mL 0.1 mol/L HCl 超声 30 min, 再次离心 (5 000 r/min, 10 min) 取上清, 并用 0.45 μm 滤膜过滤, 所得滤液用氨基酸分析仪进行检测。

1.2.5 电子鼻

参考 Wang 等^[13]的方法并加以修改进行电子鼻的测定。称取 3 g 剁碎的黄鳙样品, 装入 20 mL 的顶空瓶中, 40℃水浴加热 30 min, 然后上机检测。其中, 电子鼻相关参数条件为: 清洗时间 100 s, 测定时间 120 s, 每 1 s 采集一次数据, 选取第 120 秒的数据为测量数据。

1.2.6 pH值的测定

pH 值根据 GB 5009.237-2016《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定规定方法》测定。采取 2 g 黄鳙肉样, 加入 18 mL 纯水, 经过 4 000 r/min 离心 10 min, 提取上清液, 用便携式 pH 计进行测量。每组平行样测定 3 次。

1.2.7 挥发性盐基氮 (TVB-N) 含量测定

根据 GB 5009.228-2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》。采用半微量凯氏定氮法, 取鳙鱼背部肉样品进行测定。每组 3 个平行, 并做空白对照。每组平行样测定 3 次。

1.2.8 菌落总数 (TVC) 测定

根据 GB 4789.2-2022《食品微生物学检验 菌落

总数测定》。取 3 g 鱼肉 (精确到 0.01 g), 使用组织剪剪碎, 加入 27 mL 无菌生理盐水, 震荡混匀, 取上清之后进行 10 倍的梯度稀释, 选择适合的梯度条件, 取 1 mL 稀释液加入到无菌平皿中, 每个梯度 3 个平行, 用灭菌 PCA 对其进行培养, 培养条件为 30℃, 48 h, 计算菌落总数。

1.2.9 微生物多样性

DNA 提取将黄鳙肉样在冰上融化后, 充分混匀并离心, 取适量样品进行检测。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测鳙鱼肌肉基因组 DNA 质量, 质量检测合格后进行 PCR 扩增。

PCR 预实验

(1) 引物设计

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence information

测序区域	引物名称	引物序列
338F-806R	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

(2) PCR 扩增条件

PCR 正式试验采用 TransGen AP221-02: TransStart Fastpfu DNA Polymerase, 20 μL 反应体系: 5xFastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, Forward Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, Reverse Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, BSA 0.2 μL, Template DNA 10 ng, 补 ddH₂O 至 20 μL。

PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型

PCR 反应参数: 95℃ 3 min; 循环数 X (95℃ 30 s, 退火温度 30 s, 72℃ 45 s); 72℃ 10 min。

文库构建与上机测序

以 Tris-HCl 洗脱后连接“Y”接头, 使用磁珠筛选去除接头自连片段, 按照每个样品测一万条序列加入 1 ng PCR 产物的标准富集 PCR 产物, 然后用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液变性, 获得单链 DNA 片段, 构建测序文库后在上海美吉生物医药科技有限公司 16s~338F~806R Miseq 平台进行高通量测序。

生物信息学分析对获得的测序数据, 用 MOTHUR、EXCEL 和 SPSS 软件进行数据统计分析。

1.3 数据处理

采用 Excel 和 SPSS 进行数据处理, 采用 GraphPad Prism 5.0 软件作图, 使用 Origin 2021 进行 PCA 主成分分析及雷达图绘制, 使用 SPSS 进行 spearman 相关性分析。

表 2 黄鳝片冷藏期间色差变化

Table 2 Color change of eel slices during cold storage

贮藏时间/d	L^*	a^*	b^*	C^*	H^*	$R630/580$
0	41.23 ± 1.96 ^c	1.42 ± 0.27 ^f	5.72 ± 1.37 ^c	9.36 ± 0.52 ^d	71.53 ± 5.89 ^d	1.91 ± 0.32 ^a
1	50.49 ± 1.44 ^{cd}	2.81 ± 0.56 ^b	12.27 ± 0.55 ^c	14.07 ± 0.79 ^a	73.19 ± 1.94 ^{cd}	1.87 ± 0.13 ^a
2	49.22 ± 2.27 ^d	1.99 ± 0.77 ^d	10.01 ± 1.38 ^d	12.25 ± 0.55 ^b	82.18 ± 2.42 ^b	1.83 ± 0.08 ^a
3	53.06 ± 3.64 ^{bc}	4.23 ± 1.42 ^a	16.37 ± 0.72 ^a	12.60 ± 1.21 ^b	75.90 ± 1.50 ^c	1.55 ± 0.01 ^b
4	54.34 ± 2.52 ^b	1.58 ± 0.47 ^c	12.84 ± 0.77 ^{bc}	12.08 ± 0.39 ^b	84.68 ± 1.76 ^{ab}	1.52 ± 0.08 ^b
5	56.02 ± 2.83 ^a	2.01 ± 0.79 ^d	15.70 ± 1.44 ^a	12.16 ± 2.44 ^b	83.90 ± 2.80 ^{ab}	1.61 ± 0.06 ^b
6	52.78 ± 1.80 ^{bc}	2.27 ± 0.95 ^c	13.81 ± 1.42 ^b	10.96 ± 1.97 ^c	85.15 ± 7.39 ^{ab}	1.54 ± 0.12 ^b
7	52.68 ± 2.58 ^{bc}	2.02 ± 0.59 ^c	13.31 ± 1.51 ^{bc}	9.86 ± 0.67 ^d	87.57 ± 2.60 ^a	1.53 ± 0.04 ^b

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 颜色变化

如表 2 所示, 随时间延长 L^* 、 a^* 值和 b^* 值均在第 4 天显著下降; C^* 值和 $R630/580$ 值呈下降趋势, H^* 值逐渐升高, 表明在贮藏期间鳝鱼片肉色红色强度降低, 逐渐变为黄色, 肉色稳定性下降。实验结果与图 2a 结果相一致。黄鳝片贮藏期间颜色变化如图 2a 所示, 在 7 d 贮藏过程中颜色逐渐发黄呈现棕褐色, 分析可能是在冷藏后期, 鳝鱼鱼肉腐败变质, 从而导致肉色发黄逐渐呈棕褐色, 而研究表明鱼肉在贮藏期间化学变化和微生物活动引起的肉色逐渐变为淡黄色或棕色^[14]。

可见光光谱不同的波长区间表征不同感知的颜色变化^[15]。如图 1 所示, 从整体上来看, 在 350~750 nm 波段范围内, 贮藏期间鳝鱼肉的光谱值呈现一个相似的变化趋势。贮藏 0 d 的样品的光谱反射值较低, 随着储藏时间的延长, 对应的光谱反射值也不断升高, 而研究表明光谱信息波动的变化原因可能与微生物腐败和内源酶活动共同作用引起的化学成分和物理特性的变化有关^[16]。贮藏期间在 550 nm 附近出现波谷, 在 507 nm 附近的出现波峰, 而研究表明在 550 nm 附近处的波谷是由于血红蛋白和肌红蛋白分子上血红素的吸收, 在 507 nm 附近的波峰是由于高铁血红蛋白和高铁肌红蛋白分子上氧化血红素的吸收^[17]。鱼死后体内血红蛋白和肌红蛋白逐渐被氧化为高铁血红蛋白和高铁肌红蛋白, 所以 547 nm 处和 507 nm 的吸收呈负相关。如图 2 所示, 贮藏期间在 450、500、550、600 和

650 nm 特征波长附近出现波峰与波谷, 而研究表明 440、500、560、600 和 650 nm 等特征波长与鱼肉的色素吸收有关, 还可能与脂质氧化产物、蛋白质和蛋白质降解产物、水等物质有关^[18-20]。

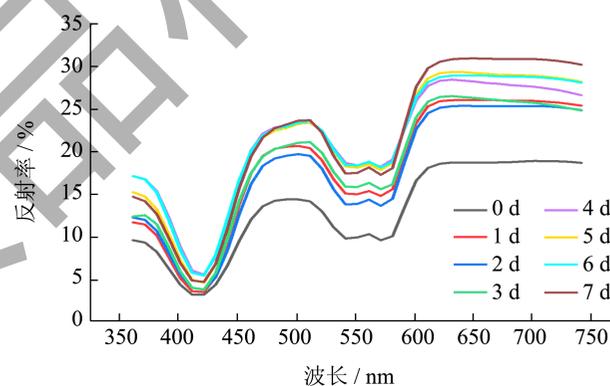


图 1 黄鳝片冷藏期间波长变化

Fig.1 Changes in wavelength of eel slices during cold storage

2.2 微观结构

鱼肉的嫩度与内部的肌肉组织结构密切相关, 通过微观结构可以直观地观察到鱼肉内部肌肉组织结构的变化^[21]。由图 2b 可见, 新鲜黄鳝片肌肉细胞间隙较小, 肌纤维排列紧密度较高, 随着贮藏时间延长, 组织间隙明显变大, 肌纤维逐渐与结缔组织分离, 在贮藏 7 d 后, 从图中可以明显看出细胞间隙显著增大。可能是因为在冷藏过程中肌原纤维结缔组织降解, 导致肌纤维断裂, 鱼肉的组细胞组织间隙大。Daniel 等^[22]研究指出石脂鲤鱼肉冷藏期间新鲜肉片肌纤维结构紧凑, 肌内膜分离少, 随着冷藏时间延长肌纤维逐渐分离。

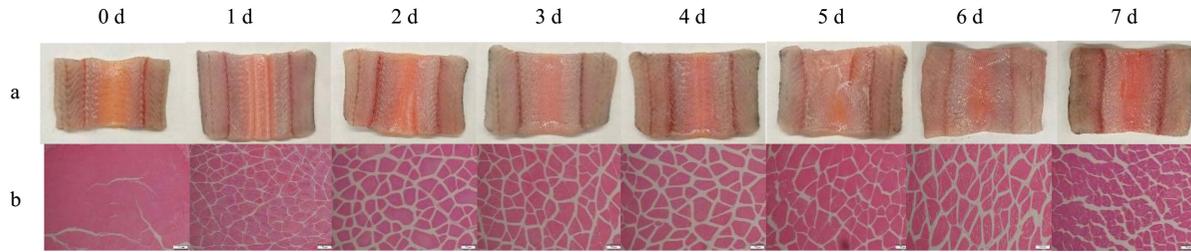


图2 黄鳝片冷藏期间肉色变化及其微观结构

Fig.2 Changes in meat color and its microstructure of eel slices during cold storage

表3 黄鳝片冷藏期间游离氨基酸变化(%)

Table 3 Changes in free amino of eel slices during cold storage (%)

氨基酸	贮藏时间/d				
	0	1	3	5	7
天冬氨酸	2.73 ± 0.17 ^d	4.24 ± 1.42 ^c	6.02 ± 3.65 ^b	6.94 ± 2.39 ^b	8.34 ± 3.22 ^a
谷氨酸	1.23 ± 0.13 ^d	3.41 ± 2.45 ^c	5.63 ± 1.27 ^a	4.60 ± 0.47 ^b	4.58 ± 1.23 ^b
丝氨酸	13.06 ± 0.48 ^b	12.84 ± 5.13 ^c	15.50 ± 3.52 ^a	13.89 ± 1.62 ^b	12.55 ± 3.15 ^c
甘氨酸	14.24 ± 0.55 ^c	14.42 ± 3.01 ^c	14.54 ± 3.73 ^c	16.92 ± 1.51 ^a	15.43 ± 4.11 ^b
组氨酸	7.77 ± 0.62 ^a	6.00 ± 0.77 ^b	5.34 ± 1.31 ^c	4.78 ± 0.50 ^{bc}	4.18 ± 1.12 ^d
精氨酸	5.75 ± 0.63 ^c	14.57 ± 1.99 ^a	7.67 ± 1.98 ^b	6.24 ± 0.62 ^{bc}	7.67 ± 2.71 ^b
苏氨酸	3.01 ± 0.28 ^a	3.11 ± 0.51 ^a	3.00 ± 0.69 ^a	2.81 ± 0.29 ^{ab}	2.13 ± 0.41 ^b
丙氨酸	4.86 ± 0.38 ^c	4.96 ± 0.70 ^c	6.32 ± 1.54 ^b	6.70 ± 0.60 ^a	6.26 ± 1.64 ^b
脯氨酸	5.19 ± 0.47 ^c	5.76 ± 0.67 ^{bc}	6.23 ± 1.92 ^b	5.85 ± 0.60 ^c	7.21 ± 2.28 ^a
酪氨酸	—	0.06 ± 0.02 ^b	0.23 ± 0.09 ^a	0.30 ± 0.03 ^a	0.29 ± 0.14 ^a
缬氨酸	3.23 ± 0.07 ^a	3.14 ± 0.19 ^a	2.22 ± 0.84 ^b	3.26 ± 0.39 ^a	3.41 ± 0.87 ^a
甲硫氨酸	9.02 ± 0.81 ^a	1.17 ± 0.20 ^d	3.34 ± 1.10 ^b	1.53 ± 0.16 ^{dc}	2.39 ± 0.56 ^c
半胱氨酸	—	—	0.27 ± 0.03 ^a	0.33 ± 0.11 ^a	0.10 ± 0.08 ^b
异亮氨酸	6.96 ± 0.15 ^a	6.38 ± 0.42 ^{ab}	4.80 ± 0.05 ^c	6.04 ± 0.73 ^b	5.93 ± 1.43 ^b
亮氨酸	20.16 ± 1.02 ^a	17.45 ± 1.99 ^b	16.69 ± 4.99 ^c	16.03 ± 2.31 ^{dc}	15.41 ± 5.19 ^d
苯丙氨酸	—	—	—	0.46 ± 0.08 ^b	1.09 ± 0.55 ^a
赖氨酸	2.79 ± 0.23 ^c	2.49 ± 0.21 ^c	5.67 ± 1.14 ^a	3.34 ± 0.47 ^b	3.02 ± 0.85 ^b
必需氨基酸	45.17 ± 6.68 ^a	33.74 ± 6.04 ^c	35.72 ± 5.41 ^b	33.41 ± 5.26 ^c	33.38 ± 4.93 ^c
总游离氨基酸	100.00 ± 5.37 ^{ab}	100.00 ± 5.44 ^{ab}	103.47 ± 5.00 ^a	99.93 ± 5.17 ^b	99.99 ± 4.81 ^{ab}

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$); —表示未检出。

2.3 游离氨基酸

鱼肉中游离氨基酸的含量影响其风味和营养^[23]。如表3所示, 鳝鱼片在整个贮藏期总游离氨基酸含量变化无明显差异, 必需氨基酸含量随贮藏时间延长逐渐下降。新鲜黄鳝片中没有检测到酪氨酸, 半胱氨酸和苯丙氨酸。鳝鱼片中含量最丰富的必需氨基酸是亮氨酸, 随贮藏时间延长其含量降低。其次为甘氨酸和丝氨酸。赖氨酸和缬氨酸在贮藏过程中含量略有升高。而研究表明游离必需氨基酸的增加可能导致鱼类营养质量的损失^[24]。

因此, 随着冷藏时间延长, 鳝鱼肉品质下降。其余必需氨基酸随贮藏时间延长含量均降低。冷藏过程中甘氨酸和丝氨酸为含量最多的非必需氨基酸, 甘氨酸和丝氨酸含量波动变化。Moutinho等^[25]研究表明鱼肉中的游离氨基酸谱会因加工和贮藏条件等而发生变化, 因此, 黄鳝片在冷藏过程中氨基酸含量发生波动变化。

2.4 电子鼻

鱼死亡后新鲜度开始下降, 其新鲜度可以通

过产生的香气来确定^[26]。如图 3a 为电子鼻雷达图, 贮藏期间 10 个传感器对鱼片气味物质均有响应, 但响应值存在较大差异。前 2 d, 雷达图轮廓基本相似, 但随着贮藏时间的延长, 雷达图的轮廓发生明显变化, 这说明在冷藏过程中, 鱼肉的整体气味发生了变化。在贮藏期间传感器 W5S (对氮氧化物敏感) 的响应度最高, 且响应值均随贮藏时间的延长而增加。传感器 W1W (对有机硫化物, 萜类物质灵敏)、W2W (对有机硫化物灵敏)、W1S (对甲烷类灵敏) 和 W2S (对醇类, 醛酮类灵敏) 与 W5S 变化趋势一致。传感器 W3S (对烷烃类物质灵敏) 的响应值在前 3 d 增加, 随后降低, 传感器 W1C (对芳香类物质灵敏) 的响应值不断降低, 传感器 W3C (对氨类物质敏感)、W6S (对氢化物有选择性) 和 W5C (对短链烷烃芳香成分) 的响应值在贮藏期间无明显差异。表明在贮藏后期, 鱼肉中氮氧化物, 有机硫化物的含量逐渐增多, 烷烃类物质含量下降。Mirzaee 等^[27]研究指出鱼肉贮藏后期微生物活性增长和氨的形成导致鱼产生难闻气味, 在贮藏后期鱼肉氮氧化物增多。

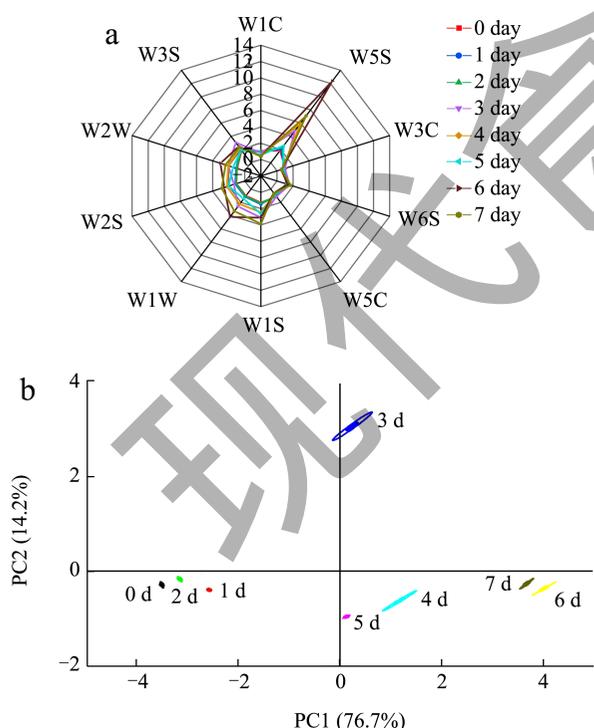


图 3 黄鳝片在冷藏期间电子鼻响应雷达图 (a) 和响应值 PCA 分析图 (b)

Fig.3 Radar map (a) and PCA analysis map of response value (b) of the electronic nasal response of eel slices during cold storage

如图 3b 所示, PC1 贡献率为 76.7%, PC2 贡献率为 14.2%。在贮藏期间, 黄鳝肌肉的风味物质成分区域没有完全重叠在一起, 0~2 d 样品分布在 PC1 和 PC2 的同一区域, 说明在前 2 d 鱼肉中的挥发性物质接近, 3 d 样品分布在 PC2 的正方向且与其他距离较远, 说明在 3 d 鳝鱼肌肉气味发生较大改变。4~7 d 样品由左侧下半部分移动至 PC1 的正方向, 4~5 d 相离较近, 6~7 d 相离较近, 与 0~2 d 方向相反, 说明贮藏后期样品中的挥发性风味物质发生了较大的变化。

2.5 pH值

鱼体肌肉 pH 值在冷藏保鲜期间会因脂肪氧化及微生物作用发生变化, 其值变化可评定水产品品质和新颖度^[28]。如图 4 所示, pH 值在第 1 天显著下降, 从 7.02 降至 6.19 ($P < 0.05$), 随后随时间延长 pH 值在 6.20 左右波动变化。鳝鱼死后, 血液循环和防御机制停止, 导致氧气供应中断, 糖原开始厌氧降解, 产生乳酸, 从而导致 pH 值降低。后期由于内源酶和鱼肉表面细菌分解蛋白质等含氮化合物, 产生碱性物质, 导致鱼肉 pH 值逐渐升高^[29,30]。王红丽等^[31]研究指出草鱼死后在 4 °C 条件下, pH 值在 23 h 时达到最低值 6.74, 之后开始升高, 与本研究的结果基本一致。

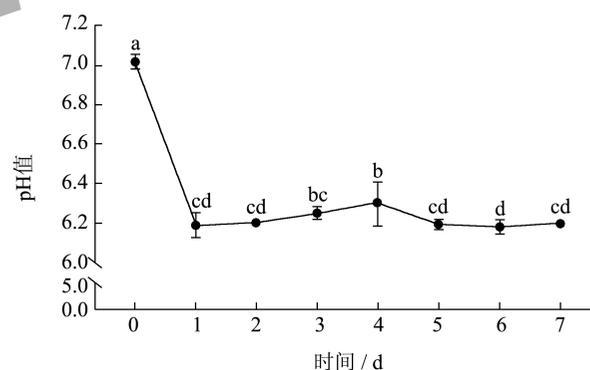


图 4 黄鳝片在冷藏期间 pH 值变化

Fig.4 Changes in pH values of the eel slices during cold storage

注: 图中不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。下同。

2.6 TVB-N

TVB-N 含量可以反映蛋白质的分解程度, 是用来评价鱼肉初期腐败的重要指标^[32]。我国国标规定贮藏期间淡水鱼的 TVB-N 限值为 20 mg/100 g。由图 5 所示, 4 °C 贮藏期间鳝鱼 TVB-N 含量显著增加, 在第 7 天超二级鲜度标准限值 20 mg/100 mL。

鱼肉贮藏期间,肌肉在微生物和酶的作用下,蛋白质分解产生胺类及碱性含氮物^[33,34],导致TVB-N含量在贮藏期逐渐升高,腐败程度越高^[35]。郑红等^[36]实验指出鳢鱼在冷藏过程中随时间延长TVB-N增加,且在第6 d超过二级鲜度标准限值。周娇娇等^[37]研究指出不同处理组黄鳢肌肉在冷藏后期TVB-N值变化趋势与本实验结果相似。

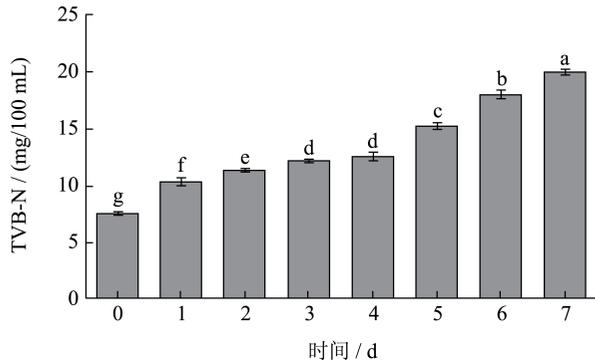


图5 黄鳢片冷藏期间TVB-N值变化

Fig.5 Changes in TVB-N values of the eel slices during cold storage

2.7 TVC

菌落总数常用于衡量水产品新鲜度,腐败生物的负荷超过约 10^7 CFU/g,表明已发生腐败^[38]。如图6所示,4℃贮藏条件下鳢鱼肌肉TVC变化呈上升趋势,在前2 d TVC增长缓慢,在第3天TVC显著上升($P < 0.05$)超过了水产品中微生物可接受限量值7.00 lg CFU/g。赵海洋等^[5]研究了黄鳢片在3℃贮藏期间TVC在8 d超限量值7.00 lg CFU/g,可能是因为贮藏温度不同,冷藏条件下抑制了部分微生物生长,其TVC变化低于本实验。Yan等^[39]研究指出乌鳢贮藏期间在第7天TVC达到7.2 lg CFU/g,超过限量值7.00 lg CFU/g。

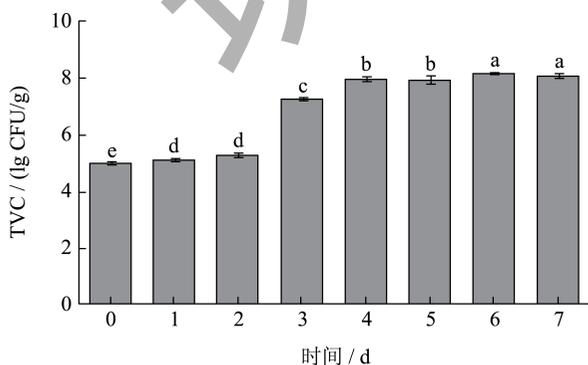


图6 黄鳢片冷藏期间TVC值变化

Fig.6 TVC value changes in eel slices during cold storage

2.8 微生物多样性

鉴定鱼肉贮藏过程中的菌群结构变化能够揭示鱼肉的腐败模式和腐败进程,对生鲜鱼肉贮藏保鲜控制技术的开发具有重要参考价值。OTU样本分布韦恩图见图7,高通量测序结果显示,在各组鱼片贮藏过程中,贮藏期间鳢鱼样品的OTUs共有数为16,新鲜样品的OTUs独有数最大,随着贮藏时间的延长,鳢鱼样品的OTUs独有数逐渐渐少。

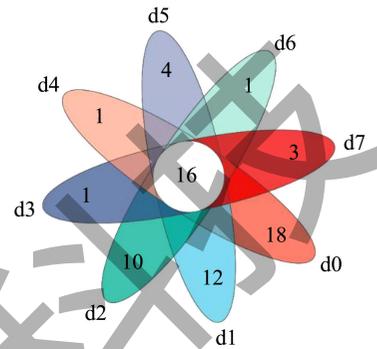


图7 冷藏期间黄鳢片细菌多样性韦恩图

Fig.7 Wayne diagram of bacterial diversity of eel slices during cold storage

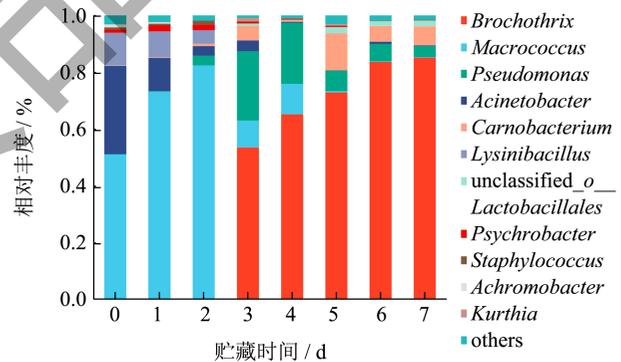


图8 冷藏期间黄鳢片属水平上微生物物种组成图

Fig.8 Diagram of microbial species composition at the genus level of eel slices during cold storage

如图8所示,在属分类水平上,4℃贮藏7 d黄鳢肌肉中菌落微生物物种主要有10个共同的属,分别是环丝菌属、巨球菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、肉食杆菌属、赖氨酸芽孢杆菌属、乳杆菌属、嗜冷杆菌属、葡萄球菌属、无色杆菌属等(图8)。在前3 d,优势菌属占比最高的为巨球菌属,其次为不动杆菌属。在前3 d鳢鱼片中巨球菌属丰度占比呈逐渐上升的趋势,不动杆菌属占比呈下降趋势。3 d后环丝菌属为主要优势菌群,且随着贮藏时间延长丰度占比逐渐上升,其次为假单胞菌属和肉食杆菌属,随时间延长丰度占比逐渐下降。研究表明,

假单胞菌属是典型的低温腐败菌，与鱼肉腐败直接相关，具有很强的蛋白质和脂肪分解能力，肉杆菌属通常存在于真空包装的肉制品或相关制品中^[40]。随着冷藏时间的延长，鱼肉发生腐败，在3 d后检出假单胞菌属和肉食杆菌属。

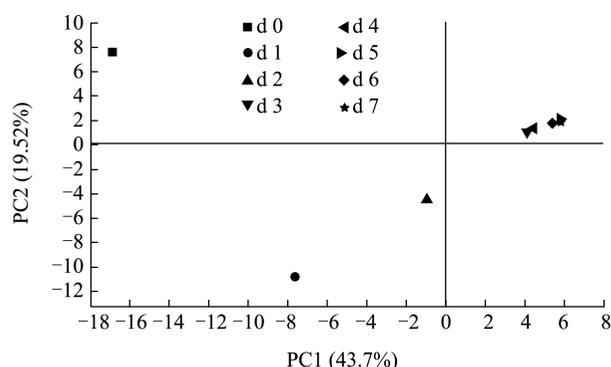


图9 冷藏期间黄鳝片微生物物种水平 PCA 分析

Fig.9 PCA analysis of microbial species levels in eel slices during cold storage

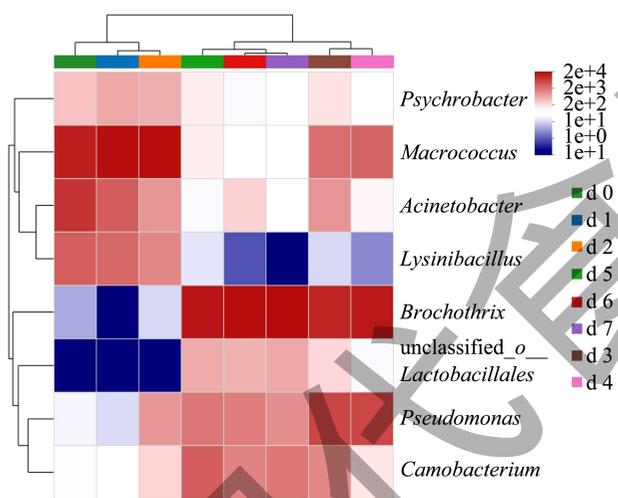


图10 冷藏期间黄鳝片微生物属水平群落热图

Fig.10 Heat map of microbial genus-level communities in eel slices during cold storage

如图9所示，第一主成分的贡献率为43.70%，第二主成分的贡献率为19.52%，累计贡献率约为66.22%。新鲜样品位于PC1的负端区域及PC2的正端区域，1~2 d位于同一区域，3 d后鱼肉样品均分布于PC1和PC2的正端区域，表明在贮藏后期（3 d）黄鳝肉样品细菌群落结构相似，与贮藏前期样品细菌群落结构差异较大。为了分析和比较不同样品在贮藏期间的微生物群落组成，构建了代表所有样品在不同贮藏时间前8个属的相对丰度的热图。根据图10聚类分析，d1和d2主要聚在一起，然后与d0聚在一起。d3和d4聚在一起，d6和d7

主要聚在一起，然后与d5聚在一起。此外，第3天后的微生物组成与其初始的细菌群落明显不同。这些结果表明细菌群落在贮藏3 d后发生了变化，而菌落总数在第3天超限值，说明鳝鱼片在超过新鲜度时其组织中的菌群结构发生改变。

2.9 相关性分析

微生物菌群与其环境化学指标之间存在一定的潜在关系^[41,42]。选取了丰度排名前8的细菌属与特征化学指标（pH、TVB-N和TVC）以及色差变化和主要游离氨基酸进行spearman相关性分析。如图11所示，环丝菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、赖氨酸芽孢杆菌和嗜冷杆菌属与特征化学指标、色差和主要游离氨基酸有显著相关性。环丝菌属与TVB-N含量变化呈现极显著正相关（ $P < 0.01$ ），与TVC变化呈显著正相关（ $P < 0.05$ ），与R630/580呈极显著负相关，与 H^* 值呈显著正相关。Pennacchia等^[43]研究表明环丝菌通常是低温下致使肉制品腐败的革兰氏阳性兼性厌氧菌，在贮藏过程中鱼肉逐渐发生腐败变质，TVB-N和TVC增加，R630/580降低，因此环丝菌属与其呈现相关性。不动杆菌属与pH值变化呈现极显著正相关，与TVC变化呈极显著负相关，与TVB-N含量变化呈显著负相关，与R630/580呈显著正相关，与 H^* 值呈显著负相关，与贮藏过程中亮氨酸含量变化呈极显著正相关。假单胞菌属与贮藏过程中丝氨酸含量变化呈显著正相关，肉杆菌属与贮藏过程中甘氨酸含量变化呈显著正相关。假单胞菌和不动杆菌是鱼类低温冷藏过程中常见的革兰氏阴性腐败菌，可利用氨基酸作为生长基质，产生的酯、酸等物质，并且假单胞菌具有极强的降解蛋白质和脂肪的能力^[44]，因此假单胞菌和不动杆菌与氨基酸含量变化呈现正相关。鱼肉在贮藏过程中大量蛋白质、游离氨基酸及各小肽分子继续被降解，进一步促进腐败菌的生长繁殖，氧化三甲胺在假单胞菌代谢产生的三甲胺氧化酶的作用下反应生成三甲胺假单胞菌，因此，假单胞菌属与黄鳝片电子鼻W5S传感器有显著相关性。赖氨酸芽孢杆菌与TVC变化呈极显著负相关，与TVB-N含量变化呈显著负相关，与R630/580值呈显著正相关，与 H^* 值呈显著负相关，与贮藏过程中亮氨酸含量变化呈显著正相关。嗜冷杆菌属是引起冷藏鱼类腐败变质的特定腐败菌，贮藏后期鱼肉发生腐败变质，致使R630/580发生变化，因此嗜冷杆菌与R630/580呈现相关性。

综上所述,黄鳝片在贮藏过程中 pH 值, TVB-N 含量变化和 TVC 变化能够影响样品中部分优势菌群,部分优势细菌与这 3 种化学指标具有极显著的正相关或负相关。TVB-N 对于样品菌群多样性的影响显著。因此,贮藏时间较长部分腐败菌可能会影响其食用安全性。

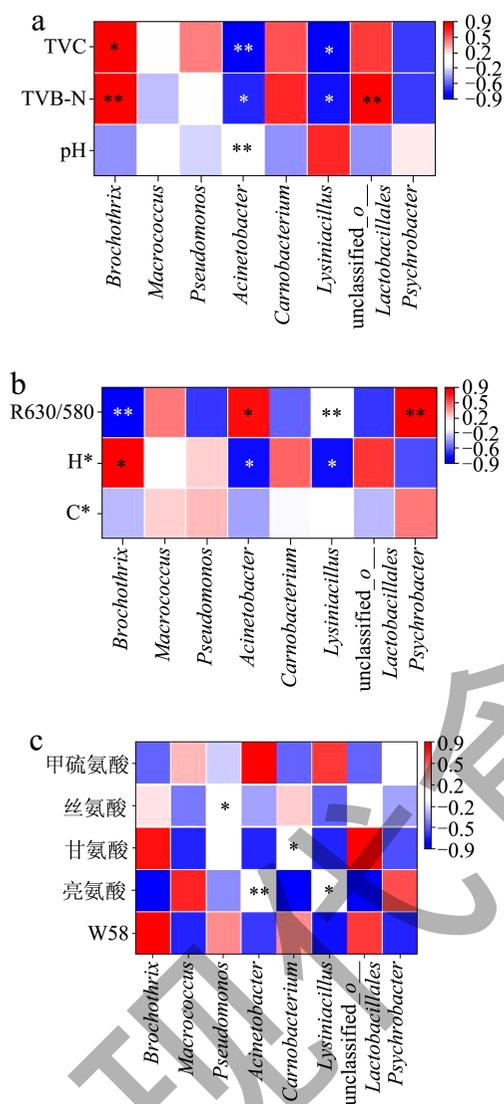


图 11 不同菌群与特征化学指标的相关性分析

Fig.11 Correlation analysis of different groups and characteristic characteristics

3 结论

鳝鱼片在整个冷藏过程中随着时间延长,肌肉细胞组织间隙明显变大;肉色越不稳定。鳝鱼肌肉中含量最丰富的氨基酸是亮氨酸,贮藏后期其含量降低。贮藏期间鳝鱼片对传感器 W5S 的响应度最高,在贮藏后期(3 d)鳝鱼片气味发生较大改变。TVB-N 在第 7 天超二级鲜度标准限值。TVC 在第 3

天超水产品中微生物可接受限量值。从鳝鱼片中分离鉴定出巨球菌属和不动杆菌属为冷藏前期的优势菌群,3 d 后环丝菌属为主要优势菌群。贮藏期理化性质与群落结构具有极显著相关性,确定了微生物生长是影响冷藏黄鳝片新鲜度、色度和风味变化的主要原因。后期将进一步研究抑菌剂对冷鲜黄鳝片品质改善的影响。本研究为黄鳝冷鲜加工提供理论依据。

参考文献

- [1] 岳华梅,符鹏,邓海超,等.微量元素锌、硒及维生素E对雌性黄鳝生长及抗氧化能力的影响[J].中国水产科学,2023,30(3):352-360.
- [2] 符鹏.南极磷虾粉替代鱼粉对雌性黄鳝生长繁殖的影响[D].上海:上海海洋大学,2022.
- [3] 张涛,周运涛,喻亚丽,等.境外黄鳝进入国内市场流通状况调研与分析[J].中国渔业质量与标准,2021,11(5):36-43.
- [4] 王智能,高立琼,崔文利,等.黄鳝片冷冻保藏的质构变化与控制[J].食品工业,2019,40(5):214-219.
- [5] 赵海洋,高立琼,崔文利,等.黄鳝片冷藏保鲜过程中的品质变化[J].食品工业科技,2018,39(21):293-298.
- [6] HUANG W, XIE J. Characterization of the volatiles and quality of hybrid grouper and their relationship to changes of microbial community during storage at 4 °C [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(4): 818.
- [7] 尚雪娇.白斑狗鱼4 °C贮藏过程中微生物多样性变化和品质变化关系的分析研究[D].新疆:石河子大学,2023.
- [8] 冯豪杰.减菌化结合生物保鲜剂对冷藏暗纹东方鲀品质变化影响及优势腐败菌作用机制[D].上海:上海海洋大学,2023.
- [9] 蔡文强,陈跃文,董秀萍,等.真空干燥对鲟鱼肉质理化品质及微观结构的影响[J].食品研究与开发,2020,41(13):24-30.
- [10] WU S, LUO X, YANG X, et al. Understanding the development of color and color stability of dark cutting beef based on mitochondrial proteomics [J]. Meat Science, 2020, 163: 108046.
- [11] ALVARENGA T I R C, HOPKINS D L, RAMOS E M, et al. Ageing-freezing/thaw process affects blooming time and myoglobin forms of lamb meat during retail display [J]. Meat Science, 2019, 153: 19-25.
- [12] LU Y, ZHANG P, LI W, et al. Comparison of gut microbial communities, free amino acids or fatty acids contents in the muscle of wild aristicthys nobilis from xinlicheng reservoir and chagan lake [J]. BMC microbiology, 2022, 22(1): 32.
- [13] WANG Y, LI J, WU Y, et al. Analysis of volatile

- compounds in sea bass (*Lateolabrax japonicus*) resulting from different slaughter methods using electronic-nose (E-Nose) and gas chromatography-Ion mobility spectrometry [J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 5889.
- [14] SINGH A, MITTAL A, BENJAKUL S. Undesirable discoloration in edible fish muscle: Impact of indigenous pigments, chemical reactions, processing, and its prevention [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21(1): 580-603.
- [15] 朱逢乐. 基于光谱和高光谱成像技术的海水鱼品质快速无损检测[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [16] SVEINSDOTTIR K, MARTINSDOTTIR E, HYLDIG G, et al. Application of quality index method (QIM) scheme in shelf-life study of farmed atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(4): 1570-1579.
- [17] CHENG J H, DAI Q, SUN D W, et al. Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 34(1): 18-31.
- [18] KHOSHNOUDI-NIA S, MOOSAVI-NASAB M. Prediction of various freshness indicators in fish fillets by one multispectral imaging system [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 14704.
- [19] 李红月, 王金厢, 李学鹏, 等. 多光谱成像技术在鱼肉新鲜度评价中的应用研究进展[J]. *渤海大学学报(自然科学版)*, 2022, 43(2): 126-139.
- [20] 王一杰, 杨智慧, 成军虎. 多光谱成像技术在食品营养品质检测方面的应用进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(4): 339-347.
- [21] 吕美雯. β -环状糊精/卵白蛋白复合抗冻剂对鲈鱼的抗冻保护作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- [22] DANIEL C, JOSÉ M L, HÉCTOR S. Microstructural changes and the effect on myofibril proteins in yamu (*Brycon amazonicus*) fish meat during cold storage [J]. *Agronomía Colombiana*, 2016, 34(3): 403.
- [23] ĐORĐEVIĆ Đ, BUCHTOVÁ H, BORKOVCOVÁ I. Estimation of amino acids profile and escolar fish consumption risks due to biogenic amines content fluctuations in vacuum skin packaging/VSP during cold storage [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 66: 657-663.
- [24] RAM R, CHAND R V, FORREST A, et al. Effect of processing method on quality, texture, collagen and amino acid composition of sandfish (*Holothuria scabra*) [J]. *LWT*, 2017, 86: 261-269.
- [25] MOUTINHO S, MARTÍNEZ-LLORENS S, TOMÁS-VIDAL A, et al. Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency [J]. *Aquaculture*, 2017, 468: 271-277.
- [26] ASTUTI S D, ISYROFIE A I F A, NASHICHAH R, et al. Gas array sensors based on electronic nose for detection of tuna (*Euthynnus Affinis*) contaminated by pseudomonas aeruginosa [J]. *Journal of Medical Signals and Sensors*, 2022, 12(4): 306-316.
- [27] MIRZAEI-GHALEH E, TAHERI-GARAVAND A, AYARI F, et al. Identification of fresh-chilled and frozen-thawed chicken meat and estimation of their shelf life using an e-nose machine coupled fuzzy KNN [J]. *Food Analytical Methods*, 2020, 13(3): 678-689.
- [28] AHMED Z, DONKOR O N, STREET W A, et al. Activity of endogenous muscle proteases from 4 australian underutilized fish species as affected by ionic strength, pH, and temperature: activity of fish muscle proteases [J]. *Journal of Food Science*, 2013, 78(12): C1858-C1864.
- [29] 刘晓畅, 蒋妍, 申松, 等. 4 °C 冷藏条件下长丰鲢尸僵过程中的品质变化规律[J]. *肉类研究*, 2016, 30(5): 20-24.
- [30] XIAOLIN A, JUNLING Y, CENG C, et al. Isolation and identification of the spoilage microorganisms in Sichuan homemade Paocai and their impact on quality and safety [J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(9): 2939-2947.
- [31] 王红丽, 施文正, 邱伟强, 等. 草鱼死后常温贮藏过程中的品质变化[J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 97-105.
- [32] GUI M, BIN Z, SONG J Y, et al. Biogenic amines formation, nucleotide degradation and TVB-N accumulation of vacuum-packed minced sturgeon (*Acipenser schrencki*) stored at 4 °C and their relation to microbiological attributes [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(10): 2057-2063.
- [33] SENAPATI M, SAHU P P. Onsite fish quality monitoring using ultra-sensitive patch electrode capacitive sensor at room temperature [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 168: 112570.
- [34] HUANG Y R, HUANG W Y, JEN H C, et al. Comparative variations of extractive nitrogenous components and quality in fresh muscle and dried product of rabbitfish (*Siganus fuscescens*) in Taiwan [J]. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2020, 29(7): 693-706.
- [35] KENAR M, ÖZOGUL F, KULEY E. Effects of rosemary and sage tea extracts on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets: Effects of natural antioxidant on sardine [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45(11): 2366-2372.
- [36] 郑红, 苏现波, 马良, 等. 货架期冷藏过程中鳙鱼肉理化指标及蛋白质变化规律[J]. *食品科学*, 2018, 39(7): 215-220.

- [37] 周娇娇,郭丹婧,尤娟,等.不同致死方式对鳙鱼肌肉鲜度及生物胺含量的影响[J].华中农业大学学报,2016,35(6): 129-135.
- [38] ESTEVES E, ANÍBAL J. Sensory evaluation of seafood freshness using the quality index method: A meta-analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 337: 108934.
- [39] LI Y, ZHUANG S, LIU Y, et al. Effect of grape seed extract on quality and microbiota community of container-cultured snakehead (*Channa argus*) fillets during chilled storage [J]. Food Microbiology, 2020, 91: 103492.
- [40] 李婷婷,陈思,李欢,等.冷藏鲢鱼优势腐败菌致腐能力的初步分析[J].食品与发酵工业,2017,43(6):140-145.
- [41] CAI H, ZHANG T, ZHANG Q, et al. Microbial diversity and chemical analysis of the starters used in traditional Chinese sweet rice wine [J]. Food Microbiology, 2018, 73: 319-326.
- [42] ZHANG Z, HAN Z, WU Y, et al. Metagenomics assembled genome scale analysis revealed the microbial diversity and genetic polymorphism of *Lactiplantibacillus plantarum* in traditional fermented foods of Hainan, China [J]. Food Research International, 2021, 150: 110785.
- [43] PENNACCHIA C, ERCOLINI D, VILLANI F. Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of brochothrix thermosphacta in fresh and spoiled raw meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 134(3): 230-236.
- [44] RICHTER E R, AL-SHEDDY I. Microbiological quality and safety of zoo food [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(4): 877-880.

现代食品科技