

大黄鱼腐败细菌鉴定及 PLFAs 初级模型的建立

郭全友¹, 何木^{1,2}, 李保国², 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. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 为研究既定工艺条件下大黄鱼腐败状况, 对大黄鱼腐败细菌进行分离、鉴定及加工过程中 PLFAs 初级动力学模型的建立, 结果表明: 14 株分离的细菌中共确认 3 种主要腐败菌, 分别为彭氏变形杆菌(*Proteus penneri*)、克雷伯菌(*Klebsiella*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*), 均属肠杆菌科, 能较好利用含氮物质。其 NaCl 浓度敏感区间为 0~4%, 最适生理活性浓度为 1%。三种细菌的 PLFAs 比例稳定, 其中 16:0、16:1 ω 6c 和 16:1 ω 7c 比例显著高于其他的 PLFAs。通过修正 Gompertz 和修正 Logistic 两种模型对大黄鱼加工过程中三种 PLFAs 变化进行拟合比较, 16:0 的修正 Logistic 模型拟合度最优, 方程为: $y=5.151+2.322/[1+\exp(3.831-0.090t)]$, 校验参数 R^2 、RMSE、 A_f 、 B_f 分别为 0.9781、0.0948、1.1994、0.9909。其响应值与 TVBN 值显著相关 ($p<0.01$), 证明该模型具有实际价值。确定腐败细菌最大比生长速率时间点为 $t=42.57h$, 因此可在此处建立腐败细菌的 HACCP。

关键词: 大黄鱼; 腐败细菌; 磷脂脂肪酸; 初级模型

文章编号: 1673-9078(2015)12-227-234

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.034

Identification of Spoilage Bacteria in *Pseudosciaena crocea* and Primary Model Establishment for PLFAs

GUO Quan-you¹, HE Mu^{1,2}, LI Bao-guo², JIANG Chao-jun¹

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China) (2. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: Spoilage bacteria from *Pseudosciaena crocea* were isolated and identified, and a primary kinetic model for the presence of specific Phospholipid Fatty Acids (PLFAs) was established. The results showed that three main spoilage bacteria, which were good at utilizing nitrogenous substances, were identified from a total of 14 isolated strains, and belonged to the family *Enterobacteriaceae*. These three major spoilage bacteria were identified as *Proteus penneri*, *Klebsiella II*, and *Enterobacter aerogenes*. The range of NaCl concentration, to which these bacteria were sensitive, was between 0-4%, with the most suitable physiological concentration being 1%. The proportions of PLFAs in the three bacteria were stable, and the proportions of 16:0, 16:1 ω 6c, and 16:1 ω 7c were significantly higher than those of other PLFAs. The response value curves for the three selected PLFAs were fitted by modified Gompertz and Logistic models, and the subsequent comparison was performed. The modified Logistic model for 16:0 showed the best fit. The equation was $y=5.151+2.322/[1+\exp(3.831-0.090t)]$, and the model evaluated parameters, such as coefficient of determination (R^2), root mean square error (RMSE), accuracy factor (A_f), and bias factor (B_f) as 0.9781, 0.0948, 1.1994, and 0.9909, respectively. The model proved to have practical value due to a strong correlation between the response value of 16:0 and the value of the total volatile basic nitrogen (TVBN) ($p < 0.01$). The corresponding time point for the maximum specific growth rate of the spoilage bacteria was determined to be $t = 42.57 h$, which can be used to establish the hazard analysis and critical control point (HACCP) of spoilage bacteria.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; spoilage bacteria; phospholipid fatty acid; primary model;

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 作为我国传统海产品, 产区集中在浙江及闽东沿线的近海海域, 历来

收稿日期: 2015-05-18

基金项目: 国家自然科学基金(31371867); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2011M04, 2014G02)

作者简介: 郭全友(1974-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 水产品加工与安全保障

通讯作者: 李保国(1961-), 男, 博士, 教授, 博士生导师

销路较广, 是重要的经济鱼类。大黄鱼味道鲜美, 肉质蛋白丰富, 极容易在加工过程中引起腐败细菌的大量繁殖。因此, 国内大黄鱼研究者致力于研究大黄鱼鱼体中的腐败细菌, 通过研究菌相变化对大黄鱼的腐败程度进行预测^[1-2]。而研究者在研究一些类似的水产品防腐机理时也进行了理化指标与微生物的测定, 通过建立起动力学模型, 对大黄鱼的腐败特征进行描述^[3]。这表明, 预测模型的建立已成为国内的水产品防

腐机理研究的重要趋势。

为保证风味、色泽等感官品质的一致性,大黄鱼加工过程中的环境温度等工艺参数通常不变。因此,在既定条件下(加工温度、空气湿度因生产环节要求相对固定)的微生物预测模型,仅研究腐败菌随时间的变化,即初级模型。以菌落总数、细菌浊度等指标建立的初级动力学模型往往不能准确地反映活细菌的整体水平。因此,选取能够反映腐败活菌水平的指标是提高预测模型准确性的关键。磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFAs)是细菌细胞膜的主要成分,随细菌细胞死亡而迅速裂解,可以作为活菌的生物标记物^[4],近年来被国外研究者多用于环境及土壤中细菌群落分析。Anne-Gret Seifert^[5]等在黑板岩中碳素的微生物体外降解实验中证实了 PLFAs 的生物标记异质性。Soumia Amir^[6]等研究工业污泥中的微生物群落组成时以特定的 PLFAs 对整个群落进行了系统地描述。这表明,选取特定的 PLFAs 可以利用其生物标记异质性对于一些内环境某一类菌群进行定量分析。

基于这一原理,本文尝试在大黄鱼的加工过程中建立以选定的生物标记物 PLFAs 为腐败指标的初级动力学模型,首先结合三种微生物鉴定手段(16srDNA、BIOLOG、MIDI Sherlock Microbial Identification),对大黄鱼加工过程的腐败菌进行鉴定及 PLFAs 分析;然后,确定其生物标记物;建立标记物响应值的预测模型;最终,通过模型分析大黄鱼加工过程中腐败菌的变化,确定大黄鱼加工过程腐败菌的最大比生长速率对应的时间点,为建立大黄鱼的微生物腐败危害分析与关键控制点(Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP)和延长大黄鱼货架期提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验设备

BIOLOG 微生物半自动鉴定仪,美国 BIOLOG 公司; Gel Doc XR+凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 安捷伦 7890A 气相色谱仪(内置 Sherlock MIS 微生物鉴定系统,美国 MIDI 公司), Agilent 公司。

1.2 原料取样方法

福建省宁德市某水产厂的大黄鱼加工周期为 60 h,以大黄鱼冷藏入库为加工过程初始点,即 0 h,其加工流程时间如表 1 所示。在加工周期的 60 h,每隔 3 h 取样检测,取样规格:300~400 g/条,每 2 条为 1

组,共取 21 组。

表 1 大黄鱼加工过程

时间段	0~12 h	13~14 h	15~36 h	37~60 h
流程	冻藏入库 (-18 °C)	剔除内脏 (3 °C)	(0.5% NaCl) 腌渍(15 °C)	风干,成 品(4 °C)

1.3 腐败细菌的分离纯化、代谢及敏感性实验

细菌培养参照 GB/T4789.2-2010,将平板中表型特征(菌落大小、形态、颜色、透明与否)不同的细菌进行分类、计数和编号,并将每一种细菌分离纯化两代以上,挑选出数量上具有优势且产生较强的酸败、腐臭等不良气味的细菌,并进行分离纯化。参照 BIOLOG 使用手册,将分离纯化的腐败细菌接种至 BUG 培养基,(33.0±0.5) °C 培养(16.0±0.5) h。校准菌悬液 IF-A 透光率为 100%,将 BUG 培养基上的菌落接种至 IF-A 中,至透光率为 95~98%为适接种量。接种后的菌悬液倒入 V 型槽,用移液枪加入到 GEN-III 鉴定板中,每孔接种量为 100 μL 菌悬液,(33.0±0.5) °C 培养 24 h 后,采用 BIOLOG 微生物半自动鉴定仪,分别在 590 nm 和 750 nm 波长处测量,显示代谢及敏感性实验状况。

1.4 腐败细菌的分子鉴定

菌种鉴定过程采用 16srDNA,对腐败细菌进行 DNA 的提取,以 PCR 扩增 DNA 模板,引物为 7F(5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')和 1540R(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR 的反应体系为: Template (基因组 DNA 20~50 ng/μL) ×0.5 μL; 10×Buffer (含 Mg²⁺)×2.5 μL; dNTP(10 mmol/L)×1.0 μL; Taq 聚合酶(酶活:50000 U/mg)×0.2 μL; F(10 μM)×0.5 μL, R(20 μM)×0.5 μL; ddH₂O×25.0 μL。PCR 循环条件:预变性(94 °C 4 min); 30 cycle(94 °C 45 s; 55 °C 45 s; 72 °C 1 min); 修复延伸(72 °C 10 min); 终止反应(4 °C ∞)。

1.5 总挥发性盐基氮(Total volatile basic nitrogen, TVBN)测定

参照《SC/T3216-2006 半干淡盐黄鱼》,按半微量定氮法测定 TVBN,每个样品做 3 个平行。

1.6 腐败细菌 PLFAs 的生物标记物确定

参照 MIDI Sherlock Microbial Identification 使用手册,将腐败菌的菌落进行破壁、皂化、脂肪酸甲基

化、萃取,最后置于安捷伦 7890A 气相色谱仪,打开 MIDI 系统进行 PLFAs 分析。色谱条件:气路设置 H₂ 30 mL/min,空气 400 mL/min, N₂ 25 mL/min;毛细管柱 Agilent 19091B-102(25 m×200 μm×0.33 μm),柱温 250 °C,流量 4 mL/min;进样 1 μL,分流比 10:1;检测器为 FID,温度为 250 °C。以比例最高、含量显著、利于分析的 PLFAs 为腐败细菌的特定生物标记物。

1.7 标记物响应值测定

选取大黄鱼样品,剪取准确质量的肉质,进行前处理,用气相色谱进行响应值(Response, RP)分析,以单位质量大黄鱼中选定的标记 PLFAs 的 RP 对数值为测量结果。

1.8 数据分析

1.8.1 RP 初级模型的建立

采用 SPSS Statistics18 对已标记的 PLFAs 响应值进行初级模型拟合,通过模型验证参数来评价拟合优度,通过分析斜率及 RP 随时间的二阶导数来确定活菌增长速率的最大值。

1.8.2 模型及验证参数

(1)修正 Gompertz 模型及简化式:

$$\lg(RP_t) = \lg(RP_0) + \lg\left(\frac{RP_{max}}{RP_0}\right) \cdot \exp\left[-\exp\left\{-\frac{e \times \mu_{max}}{RP_0} \cdot (\lambda - t) + 1\right\}\right]$$

$$y = a + b \cdot \exp[-\exp(c - d \cdot t)]$$

(2)修正 Logistic 模型及简化式:

$$\lg(RP_t) = \lg(RP_0) + \frac{\lg\left(\frac{RP_{max}}{RP_0}\right)}{1 + \exp[-\mu_{max}(t - t_i)]}$$

$$y = e + \frac{f}{1 + \exp(g - h \cdot t)}$$

(3)均方根误差(Root Mean Square Error, RMSE)、偏差度(Bias Factor, Bf)、准确度(Accuracy Factor, Af):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum [\lg(RP_p) - \lg(RP_d)]^2}{n}}$$

$$Bf = 10 \frac{\sum \lg\left(\frac{RP_p}{RP_d}\right)}{n}$$

$$Af = 10 \frac{\sum \left|\lg\left(\frac{RP_p}{RP_d}\right)\right|}{n}$$

上述式中: RP_t-特定 PLFAs 气相色谱响应值随时间的变化; RP₀-特定 PLFAs 气相色谱初始时刻响应值; RP_{max}-特定 PLFAs 气相色谱最大响应值; μ_{max}-RP 最大比增长速率; t_i-最大比生长速率对应加工时刻; RP_p-特定 PLFAs 气相色谱响应值经模型拟合后的预测值; RP_d-特定 PLFAs 气相色谱响应值的实际值。

2 结果与讨论

2.1 腐败细菌鉴定

2.1.1 菌种鉴定

表 2 大黄鱼中细菌的分类及初步鉴定

Table 2 Classification and preliminary identification of bacteria in *Pseudosciaena crocea*

平板编号	MIDI 微生物鉴定系统鉴定菌名	腐臭气味	比例/%	镜检		
				革兰氏染色	荚膜	运动性
A	产气肠杆菌(<i>Enterobacter aerogene</i>)	较强	32.72	-	有	不运动
B	克雷伯菌(<i>Klebsiella</i>)	较强	16.96	-	有	不运动
C	彭氏变形杆菌(<i>Proteus penneri</i>)	较强	8.48	-	有	不运动
D	冷解糖芽孢杆菌(<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>)	无	10.91	+	无	不运动
E	静止嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter immobilis</i>)	无	7.27	-	无	不运动
F	类芽孢杆菌(<i>Paenibacillus validus</i>)	较弱	5.45	-	有	不运动
G	气味沙雷菌(<i>Aeromonas ichthiosmia</i>)	较弱	1.82	-	无	不运动
H	黏膜炎布兰汉球菌(<i>Psychrobacter immobilis</i>)	较弱	1.82	+	无	不运动
I	美人鱼发光杆菌(<i>Photobacterium damsela</i>)	无	1.81	-	有	不运动
J	腐败希瓦氏菌(<i>Shewanella putrefaciens</i>)	较强	1.81	-	无	不运动
K	巨大芽孢杆菌(<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>)	无	1.81	+	无	不运动
L	普通变形杆菌(<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)	无	1.81	-	无	不运动
M	蜂房哈弗尼菌(<i>Hafnia alvei</i>)	较弱	1.81	-	无	不运动
N	霍利斯格里蒙菌(<i>Grimontia hollisae</i>)	无	1.81	-	有	不运动

从处在货架期终点的大黄鱼样品中共分离出 14

株细菌,分别在空白的琼脂平板上纯化两代以上。纯

化的细菌经染色镜检后,采用 MIDI 微生物鉴定系统进行初步鉴定,鉴定结果如表 2 所示。其中,平板编号为 A、B、C 的产气肠杆菌、克雷伯菌和彭氏变形杆菌具有特殊腐臭气味,数量占比具有优势,因此可认为是大黄鱼的主要腐败细菌。

为了进一步确认三种腐败细菌的菌种,采用 16 srDNA 的方法,提取三种细菌的 DNA 并使用引物 7F/1540R 分别对其进行 PCR 扩增,电泳结果见图 1,三种细菌扩增片段大小为 1500 bp 左右,这与 7F/1540R 的目标序列吻合。再通过对扩增产物进行测序,在 NCBI 数据库进行核酸搜索,获取同源细菌的序列,确定 A、B、C 分别为彭氏变形杆菌(*Proteus penneri*)、克雷伯菌(*Klebsiella*)、产气肠杆菌(*Enterobacter-aerogenes*),均属肠杆菌科,与 MIDI 微生物鉴定系统的结果一致。

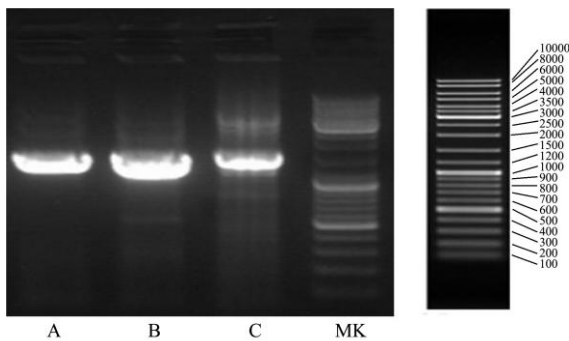


图 1 腐败细菌基因组 PCR 产物电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis patterns of PCR products based on spoilage

bacterial genomes

Note: MK: marker.

2.1.2 底物反应实验

大黄鱼加工过程中腐败细菌生长与营养物质的含量密切相关,腌渍及风干过程中,盐分也在不断变化,因此敏感性实验主要针对 NaCl、短链碳源(单糖、寡糖)和氮源(氨基酸)三种底物,采用内含四唑氮紫显色剂的 GEN-III 鉴定板进行^[7],以显色反应的剧烈程度(OD 值和阴性/阳性值)表示腐败细菌对该底物的敏感程度。

NaCl 敏感实验采用双波长法相互佐证,如图 2 所示,三种细菌的 OD 值随着 NaCl 浓度的增大均先增后减,在 NaCl 为 1% 时达到最大。当 NaCl 浓度大于 4% 时,OD 值的变化趋于平缓,这说明 0~4% 为三种细菌的渗透压敏感区间,并且在敏感区间内存在着耐渗透压的最适生理活性点,即 NaCl 浓度为 1%。徐忠义^[8]等在产气肠杆菌发酵乳酸实验中,选用浓度为 0.2% 的 NaCl 调配最佳发酵培养基,与本实验的结论相差较大,原因是此培养基中除 NaCl 外还加入了

0.4% 的 CaCO₃,而本实验只有 1% 的 NaCl,因此两种环境的渗透压可能等效。三种细菌在盐分敏感方面所表现的高度一致性说明腌渍、风干过程引起的盐分变化的内环境可能适合此类肠杆菌科细菌的繁殖与腐败。

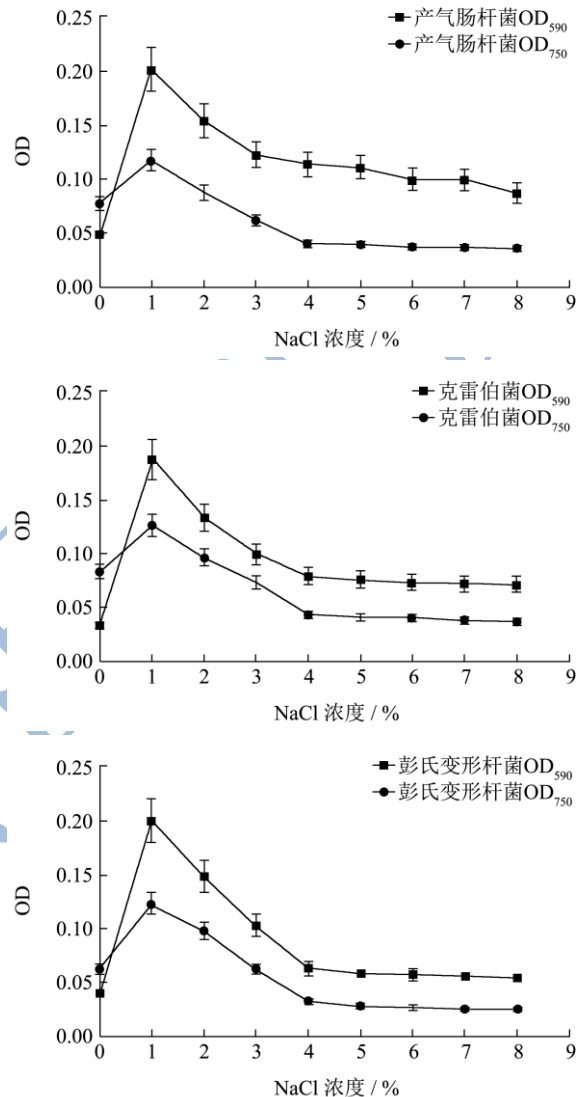


图 2 三种细菌的 OD 值随 NaCl 浓度的变化 (n=3)

Fig.2 Changes in the optical density (OD) for three bacteria as a function of NaCl concentrations (n = 3)

能源代谢实验中同一种细菌对于不同种类的单糖、寡糖和氨基酸的反应值都较为接近,因此采用阴性/阳性值的均值来表示这一类碳源的整体反应状况。三种细菌的单糖、寡糖和氨基酸利用结果如图 3 所示,阴性/阳性值均高于阴性对照值 188,表明三种细菌对于三种碳源的反应值为阳性。单糖和寡糖的反应差异较小,说明三种细菌对于糖类的利用因链长的差异并不显著。氨基酸利用状况显示,三种细菌的阴性/阳性值显著高于阴性对照并高于糖类,这表明三种细菌对于氮源的利用能力高于碳源。李彬^[9]等发现发酵香肠

中的肠杆菌科细菌具有较强的产尸胺能力, 张全国^[10]等发现有机氮源对产气肠杆菌的生长有着重要的影响, 都说明肠杆菌科细菌对于氮源具有较高的利用能力。这与本实验的结论一致。

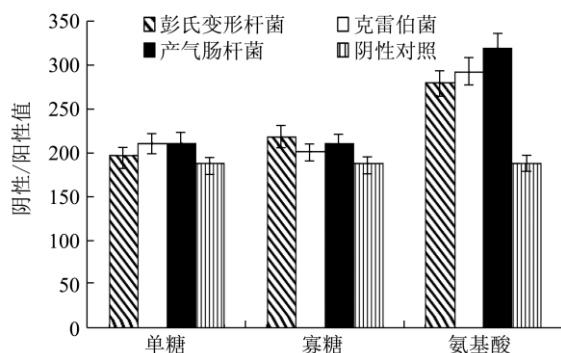


图3 三种细菌的底物利用状况 (n=3)

Fig.3 Substrate utilization by the three bacteria (n = 3)

2.2 腐败细菌 PLFAs 初级模型的建立

2.2.1 腐败细菌的生物标记 PLFAs 的选取

对不同加工阶段的大黄鱼进行抽样, 并对分离纯化的彭氏变形杆菌、克雷伯菌和产气肠杆菌进行 PLFAs 分析, 结果如表 3 所示。由表 3 可知, 不同阶段的三种腐败细菌 PLFAs 差异不显著($p>0.05$), 说明三种细菌在加工过程中 PLFAs 组成相对稳定。因此, 选定特殊的 PLFAs 作为标记可以反映腐败活细菌的整体水平。三种细菌中, 12:0 和 13:0 所占的比例较小, 分别在 0.06%~0.21% 和 0.25%~0.45% 区间变化, 因此不能作为生物标记。16:0、16:1 ω 6c 和 16:1 ω 7c 的比例分别在 32.76%~40.58%、14.54%~17.89% 和 17.56%~18.22% 区间变化, 均显著高于其他 PLFAs($p<0.05$)。因此, 三种 PLFAs 理论上均可作为大黄鱼加工过程中腐败活细菌的生物标记。

表 3 加工过程中三种腐败细菌的 PLFAs 比例变化 (n=3)

Table 3 Changes in the proportions of PLFAs in the spoilage bacteria during processing (n = 3)

PLFAs 种类	加工过程中 PLFAs 比例/%			
	冻藏入库(0~12 h)	剔除内脏(13~14 h)	腌渍(15~36 h)	风干(37~60 h)
10:00	1.21 \pm 0.13	1.05 \pm 0.45	1.35 \pm 0.56	1.41 \pm 0.18
11:00	1.87 \pm 0.24	1.96 \pm 0.25	1.57 \pm 0.25	1.64 \pm 0.19
12:00	0.06 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.10 \pm 0.03	0.21 \pm 0.05
13:00	0.25 \pm 0.13	0.36 \pm 0.11	0.40 \pm 0.12	0.45 \pm 0.15
14:00	11.88 \pm 0.55	11.47 \pm 0.41	10.98 \pm 0.17	10.87 \pm 0.14
15:00	2.35 \pm 0.32	2.14 \pm 0.42	2.22 \pm 0.10	2.41 \pm 0.08
16:00	32.76 \pm 0.44	40.58 \pm 1.25	38.96 \pm 0.24	39.78 \pm 1.88
16:1 ω 6c	17.89 \pm 0.56	14.54 \pm 0.86	14.76 \pm 0.45	15.13 \pm 0.24
16:1 ω 7c	17.89 \pm 0.59	17.56 \pm 0.83	18.21 \pm 0.78	18.22 \pm 0.89
17:00	1.22 \pm 0.34	2.31 \pm 0.36	1.56 \pm 0.26	1.98 \pm 0.11
18:1 ω 7c	2.66 \pm 0.56	2.14 \pm 0.47	2.28 \pm 0.16	2.41 \pm 0.14
19:0cyclo ω 8c	1.54 \pm 0.35	1.87 \pm 0.18	1.79 \pm 0.15	1.75 \pm 0.25

注: 有色区域表示选定为生物标记的 PLFAs。

2.2.2 初级模型的建立

对加工过程的大黄鱼每 3 h 取样, 并立刻对选定的三种 PLFAs 的响应值进行分析, 响应值单位为 1, 物理意义为色谱峰在基线上的积分。横坐标为加工时长, 纵坐标为每 g 大黄鱼肉中 16:0、16:1 ω 6c 和 16:1 ω 7c 响应值的对数, 单位为 $\lg(g^{-1})$, 其数值大小与单位质量大黄鱼中的产气肠杆菌数成正相关。

图 4 中的实际值显示, 由于加工过程中腐败细菌的大量繁殖, 三种 PLFAs 均呈总体上升趋势。其中 16:1 ω 6c 和 16:1 ω 7c 的离散程度较大, 模型拟合度较差。原因可能是 16:1 ω 6c 和 16:1 ω 7c 的极性十分接近^[11], 响应值的积分受到干扰, 测量值偏离实际值较大。

而 16:0 的响应值离散程度小, 变化趋势符合微生物生长曲线的规律 (S 型), 能够准确地反映大黄鱼中腐败细菌的活菌数量。

由图 4 (a) 和 (b) 可知, 大黄鱼加工过程的前 30 h 内 16:0 的响应值变化平缓, 由初始值 5.021 $\lg(g^{-1})$, 升高到 5.565 $\lg(g^{-1})$, 无显著差异($p>0.05$)。这期间对应的过程为冻藏、剔除内脏和腌渍, 此时的腐败细菌处在延滞期, 繁殖缓慢^[12], 因此 16:0 变化不显著。36 h 至 54 h 为风干过程, 腐败细菌大量繁殖, 因而细胞膜的合成量增大, 16:0 的响应值显著上升至 6.932 $\lg(g^{-1})$ 。54 h 后进入稳定期, 16:0 的变化又趋于平缓, 60 h 时为 7.121 $\lg(g^{-1})$, 之后至货架期终点则一直处在

稳定期。

选择修正 Gompertz 模型和 Logistic 模型对其进行拟合度比较^[13]。模型拟合采用 SPSS 进行, 分别得到三种 PLFAs 的修正 Gompertz 模型、Logistic 模型及其校验参数。表 4 中通过相互比较, 可知以 16:0 建立的修正 Logistic 模型的 R^2 、 $RMSE$ 、 A_f 、 B_f 均优于其余方程, 其 A_f 为 1.1994, 处在 0.75~1.25 范围内^[14], 因此可认为该模型拟合度最优。

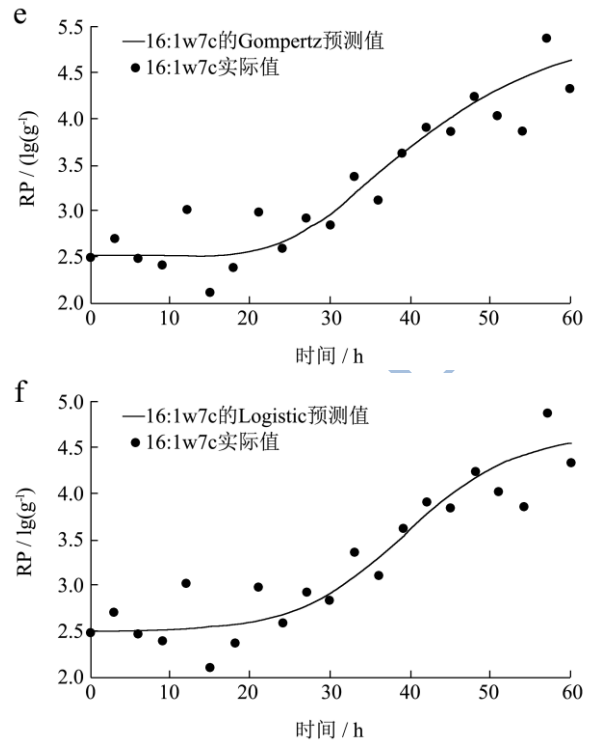
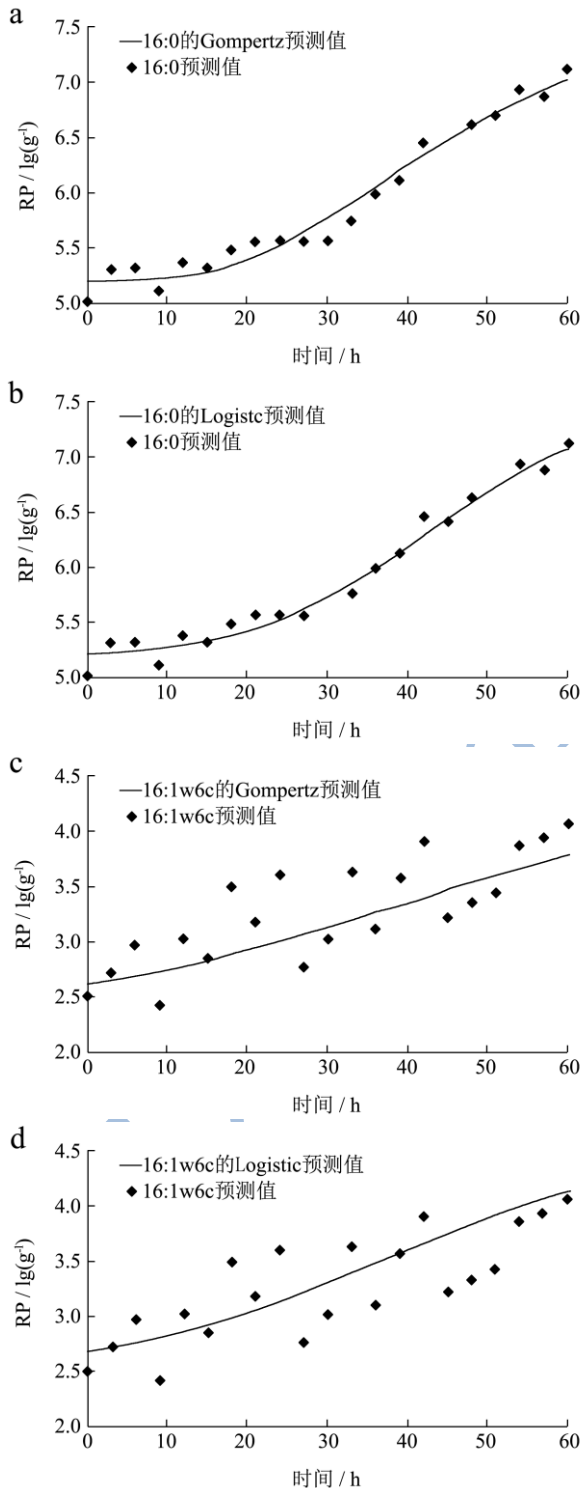


图 4 大黄鱼加工过程中腐败细菌的三种 PLFAs 响应值变化
Fig.4 Changes in the response value of three PLFAs in *Pseudosciaena crocea* during processing

由该模型的数学推导可确定, 腐败细菌的延滞期为大黄鱼加工时段的 0~30 h, 对数期为 31~54 h, 加工阶段末期开始进入稳定期, 最大比生长速率点为 42.57 h。这表明, 整个大黄鱼加工过程是腐败细菌大量繁殖的主要时期。

2.2.3 模型验证

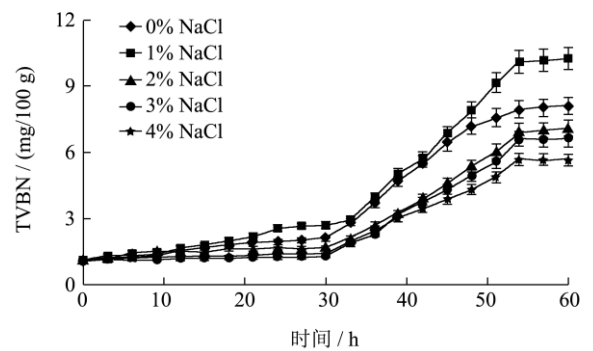


图 5 大黄鱼加工过程中 TVBN 变化 (n=3)
Fig.5 Changes of TVBN in *Pseudosciaena crocea* during processing (n=3)

由于 2.1.2 中证明大黄鱼的三种腐败细菌对于氮源具有较强的利用能力, 可认为大黄鱼中的降解氮(胺类或铵盐)的含量能够反映这三种腐败细菌的数量水平。因此在验证模型的实际价值时选取了 TVBN 为指标进行实时监测, 并且考虑到腐败细菌对 NaCl 浓度

的敏感性,以五种不同浓度 NaCl 的腌渍条件分别进行抽样。图 5 显示,相同的加工时间点,不同 NaCl 浓度的腌渍液会引起 TVBN 值的差异。随着盐分浓度的升高,TVBN 值呈现总体的先升高后降低趋势,在 NaCl 浓度为 1%,加工阶段末期(贮藏初始),即 60 h 时最大,为 10.25 mg/100 g,与别春彦^[15]等测量的贮

藏初始时大黄鱼 TVBN 值接近,因此测量结果较准确。并且,相同时间下 TVBN 随盐分的变化与 2.1.2 中三种腐败细菌的 NaCl 敏感区间相符,表明本实验中 TVBN 值能够在一定程度上反映三种腐败细菌的活菌数量。

表 4 模型的参数比较

Table 4 Comparison of model indexes

模型类型	PLFAs	方程式	R^2	RMSE	Af	Bf
修正 Gompertz	16:0	$y=5.20+2.36 \exp[-\exp(2.031-0.056t)]$	0.9708	0.1096	1.2526	0.9975
	16:1ω6c	$y=2.45+2.36 \exp[-\exp(1.0116-0.026t)]$	0.6243	0.3076	1.8391	0.7644
	16:1ω7c	$y=2.51+2.42 \exp[-\exp(3.0007-0.0828t)]$	0.8872	0.2630	1.6192	1.0543
修正 Logistic	16:0	$y=5.151+2.322/[1+\exp(3.831-0.090t)]$	0.9782	0.0948	1.1994	0.9909
	16:1ω6c	$y=2.388+2.322/[1+\exp(1.974-0.051t)]$	0.6190	0.4104	2.1893	1.8902
	16:1ω7c	$y=2.496+2.123/[1+\exp(5.922-0.151t)]$	0.8843	0.2602	1.6244	1.0208

注:有色区域表示最优模型。

由图 5 可知,不同腌渍浓度组分间的 TVBN 值变化具有一致性,这表明大黄鱼中 TVBN 随时间的变化规律受腐败细菌盐分敏感性的影响较小。在加工的前 30 h 内,TVBN 值增长较平稳,31~54 h 内迅速上升,54 h 后再次趋于平稳。这与由 16:0 建立的 Logistic 模型划分的延滞期、对数期和稳定期一致。通过对不同 NaCl 浓度的 TVBN 值与 16:0 响应值进行相关性分析,两者间相关性为极显著 ($p<0.01$),这说明 2.2.2 中以修正 Logistic 模型拟合的 16:0 的初级动力学方程具有一定的实际价值。根据该模型以及 TVBN 变化曲线,可考虑在最大比生长速率点,即 $t=42.57$ h 处建立腐败微生物的 HACCP。

3 结论

3.1 共分离出 14 种细菌,其中主要腐败细菌有 3 种,分别为彭氏变形杆菌、克雷伯菌、产气肠杆菌,均属肠杆菌科。其 NaCl 浓度敏感区间为 0~4%,最适生长浓度为 1%,对于含氮类物质的利用率高于糖类。

3.2 菌的 PLFAs 组成较稳定,其中 16:0、16:1ω6c 和 16:1ω7c 比例显著高于其他的 PLFAs,因此可选作为腐败细菌的生物标记。通过修正 Gompertz 和修正 Logistic 两种模型对大黄鱼加工过程中三种 PLFAs 变化进行拟合比较,16:0 的修正 Logistic 模型拟合度最优,方程为: $y=5.151+2.322/[1+\exp(3.831-0.090t)]$,校验参数 R^2 、RMSE、Af、Bf 分别为 0.9781、0.0948、1.1994、0.9909。16:0 的响应值与 TVBN 值显著相关 ($p<0.01$),证明该模型具有实际价值。确定腐败细菌最大比生长速率时间点为 $t=42.57$ h,因此可在对应加工阶段建立腐败细菌的 HACCP。

参考文献

- [1] 郭全友,杨宪时,许钟,等.养殖大黄鱼冷藏过程中细菌相变化的研究[J].中国水产科学,2007,14(2):301-308
GUO Quan-you, YANG Xian-shi, XU Zhong, et al. Bacterial flora changes on cultured *pseudosciaena crocea* during chilled storage [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 301-308
- [2] 戴志远,翁丽萍.气调保鲜养殖大黄鱼特定腐败菌动态变化初步研究[J].中国食品学报,2010,1:122-126
DAI Zhi-yuan, WENG Li-ping. The Preliminary Study on microbial growth kinetics change of specific spoilage organisms for cultured large yellow croaker under modified atmosphere packaging [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 1: 122-126
- [3] 孙亚军,雷晓凌,钟敏,等.冷鲜虾仁中一株优势腐败菌的腐败品质动力学研究[J].食品与机械,2014,1:155-158
SUN Ya-jun, LEI Xiao-lin, ZHONG Min, et al. Study on dynamic kinetics of a dominant spoilage bacteria in froze shrimp [J]. Food and Machinery, 2014, 1: 155-158
- [4] Hill TCJ, Mcpherson EF, Harris J A, et al. Microbial biomass estimated by phospholipid phosphate in soils with diverse microbial communities [J]. Soil. Biol. Biochem., 1993: 25(12): 1779-1786
- [5] Anne-Gret, Seifert Susan, Trumbore Xu, et al. Variable effects of plant colonization on black slate uptake into microbial PLFAs [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2013, 106: 391-403
- [6] Soumia Amir. PLFAs of the microbial communities in

- composting mixtures of agro-industry sludge with different proportions of household waste [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2010, 7: 614-621
- [7] Yan Gu, Xuhu Mao, Lagabaiyila Zha, et al. Development of a candidate method for forensic microbial genotyping using multiplex pyrosequencing combined with a universal biotinylated primer [J]. Forensic Science International, 2015, (246): e1-e6
- [8] 徐忠义,王新磊,闫巧娟,等.产气肠杆菌发酵蔗糖产乳酸条件的优化[J].中国酿造,2011,1:78-81
XU Zhong-yi, WANG Xin-lei, YAN Qiao-juan, et al. Optimization of fermentation conditions on lactic acid production from sucrose by *Enterobacter aerogenes* [J]. China Brewing, 2011, 1: 78-81
- [9] 李彬,舒蕊华,徐幸莲,等.液体培养条件下产气肠杆菌与阴沟肠杆菌产生物胺交互作用研究[J].食品科学,2012,5: 160-164
LI Bin, SHU Rui-hua, XU Xing-lian, et al. Effect of Cross-interaction between *enterobacter aerogenes* and *enterobacter cloacae* on the production of biologic amine [J]. Food Science, 2012, 5: 160-164
- [10] 张全国,赫倚风,胡建军,等.产气肠杆菌厌氧发酵产氢工艺实验[J].农业机械学报,2014,2:176-181
ZHANG Quan-guo, HE Yi-feng, HU Jian-jun, et al. Bio-hydrogen production by anaerobic fermentation of *enterobacter aerogenes* in pure culture [J]. Journal of Agricultural Machinery, 2014, 2: 176-181
- [11] Huang YD, Ryll M, Walker C, et al. Fatty acid composition of *Yersinia ruckeri* isolates from aquaculture ponds in north-western Germany [J]. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift, 2014, 127(3-4): 123-128
- [12] Jiemin Zhou, Jianmin Xing. Effect of electron donors on the performance of haloalkaliphilic sulfate-reducing bioreactors for flue gas treatment and microbial degradation patterns related to sulfate reduction of different electron donors [J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 96: 14-22
- [13] Tanaya Chatterjee, Barun K Chatterjee, Dipanwita Majumdar, et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model [J]. Biochimicaet Biophysica Acta - General Subjects, 2015, 2: 299-306
- [14] ROSS T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology [J]. Journal of Applied Microbiology, 1996, 81(5): 501-508
- [15] 别春彦,杨宪时.淡腌黄鱼微生物生长动力学参数的初步研究[J].现代食品科技,2006,3:1-5
BIE Chun-yan, YANG Xian-shi. Primary studies on microbial growth kinetics parameters of lighted salted *pesudosciacna crocer* [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 3: 1-5