

# 冷藏秋刀鱼的菌相分析及其优势腐败菌的分离鉴定

董文霞, 王欣

(上海理工大学食品质量与安全研究所, 上海 200093)

**摘要:** 冷藏秋刀鱼优势腐败菌的研究可为靶向抑菌, 延长货架期提供一定的参考。论文利用传统培养的方法研究了冷藏(4℃)秋刀鱼的菌相变化、分离与鉴定优势腐败菌并验证了其腐败能力。结果表明, 秋刀鱼冷藏6 d后达到其货架期终点, 冷藏过程中共分离、鉴定出13株细菌, 革兰氏阳性菌7株, 革兰氏阴性菌6株, 分属7个菌属。根据各菌株在菌相中的比例变化及对灭菌鱼汁TVB-N值的影响, 可以确定菌株13(肠杆菌), 12(希瓦氏菌), 7、9(不动杆菌)为冷藏秋刀鱼的优势腐败菌。各株优势腐败菌对秋刀鱼挥发性盐基氮(total volatile base nitrogen, TVB-N)、三甲胺(trimethylamine, TMA)、硫代巴比妥酸(the 2-2-thiobarbituric acid, TBA)的影响不同, 12号菌株(希瓦氏菌)会加速样品TMA的产生, 13号菌株(肠杆菌)对样品的TVB-N值影响最大, 7号菌株(不动杆菌)则会促使样品的TBA值显著增大, 9号菌株(不动杆菌)对以上各指标也均具有一定的影响, 证明所确定的4株菌对冷藏秋刀鱼具有较强的腐败能力。

**关键词:** 秋刀鱼; 冷藏; 菌相分析; 优势腐败菌; 腐败能力

文章编号: 1673-9078(2016)8-139-145

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.022

## Microflora Analysis and Preliminary Identification of Dominant Spoilage Bacteria in Refrigerated *Cololabis saira*

DONG Wen-xia, WANG Xin

(Institute of Food Safety and Quality, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** A deeper understanding of the dominant spoilage bacteria during storage will help develop methods to inhibit target bacteria, thus extending the shelf life of *Cololabis saira*. Changes in the bacterial phase of the bacteria causing spoilage of *Cololabis saira* stored at 4°C were investigated, the dominant spoilage bacteria were isolated and identified, and their spoilage potential was verified. The results showed that the shelf life of refrigerated *Cololabis saira* was six days. A total of 13 strains that belonged to seven genera, were isolated during refrigerated storage, including seven gram-positive and six gram-negative bacteria. Furthermore, according to the change in the proportion of each strain in the bacterial phase and their effects on the total volatile basic nitrogen (TVB-N) value of sterilized fish juice, Strains 13 (*Enterobacter* sp.), 12 (*Shewanella* sp.), 7, and 9 (*Acinetobacter* sp.) were identified. These bacteria had different influences on the TVB-N, trimethylamine (TMA) and 2-2-thiobarbituric acid (TBA) content of *Cololabis saira*. Strain 12 (*Shewanella* sp.) accelerated TMA generation, Strain 13 (*Enterobacter* sp.) showed significant influence on TVB-N value, Strain 7 (*Acinetobacter* sp.) significantly increased TBA content, while Strain 9 (*Acinetobacter* sp.) affected all three indicators. The results demonstrated that the four identified strains showed strong spoilage potential for *Cololabis saira* during refrigerated storage.

**Key words:** *Cololabis saira*; refrigerated storage; analysis of bacterial phase; dominant spoilage bacteria; spoilage potential

秋刀鱼(*Cololabis saira*)又称作竹刀鱼, 主要洄游于西北太平洋中上层海域, 是一种重要的经济鱼类。秋刀鱼肉质肥腻、味道鲜美, 蛋白质和脂肪含量高于许多经济鱼类, 其中二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD13B00)

作者简介: 董文霞(1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品安全控制与检测

通讯作者: 王欣(1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全控制与检测

Acid, EPA)、二十二碳六烯酸(DryDocosahexaenoic Acid, DHA)、必需氨基酸和单不饱和脂肪酸含量丰富<sup>[1]</sup>, 是补充人体营养物质的理想食物来源, 近年来正越来越受到消费者的青睐。但作为一种远洋捕捞鱼类, 秋刀鱼从捕捞到加工或直接销售都需要经过一段时间的贮藏, 在此过程中其品质易受到温度、微生物、酶、机械损伤与化学污染等多种因素的影响, 使鲜度显著下降甚至发生腐败变质。

有研究表明, 在冻结温度以上, 不同水产品的特定腐败菌(specific spoilage organisms, SSO)的活动是

其品质劣变的主要原因之一<sup>[2]</sup>。如 Zhang 和 YM 等<sup>[3]</sup>的研究发现, 4 °C 条件下真空包装的鲤鱼的优势腐败菌为假单胞菌, 而气调包装后优势腐败菌则转变为肉食杆菌和不动杆菌。Parlapani FF 等<sup>[4]</sup>借助 16S rRNA 分析了鲷鱼片经气调包装后在冷藏条件下的菌相变化, 发现莓实假单胞菌和铜绿假单胞菌是其优势腐败菌。Mace S 等<sup>[5]</sup>研究了冷藏条件下对虾的菌相变化, 发现对虾的 SSO 主要是希瓦氏菌和栖鱼肉杆菌。Parlapani FF 等<sup>[6]</sup>研究了熟制鲈鱼经空气和气调包装后在 2 °C 冷藏时的菌相变化及挥发性物质的产生情况, 发现假单胞菌属和 H<sub>2</sub>S 产生菌是两种储藏方式中的 SSO。这些研究均说明, 分析水产品在特定贮藏条件下的菌相组成, 确定其 SSO, 可为采取针对性的保藏措施, 有效减缓其品质劣变, 延长其货架期提供一定的参考。

文献调研表明, 目前对于冷藏过程中秋刀鱼菌相变化的研究相对较少。因此, 本文拟就 4 °C 冷藏条件下秋刀鱼的菌相变化规律进行研究, 并对其优势腐败菌进行分离与鉴定, 为靶向抑制秋刀鱼的细菌性腐败变质, 延长货架期提供一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

秋刀鱼捕获于西北太平洋, 体质量(98.01±9.00) g, 体长(24.97±0.96) cm。船上冻结后经-18 °C 冷冻运输至实验室备用。取 50 条秋刀鱼至 4 °C 下自然解冻后去头、去尾和去内脏, 所有实验用秋刀鱼取背部肌肉, 随机分装在保鲜袋中, 每袋约 20 g。

#### 1.1.1 培养基与试剂

营养琼脂、铁琼脂、血琼脂、LB 培养基、克氏双糖铁琼脂(KIA)、革兰氏染液与氧化酶试纸, 购自青岛海博生物技术有限公司; 高氯酸、氢氧化钠、硼酸、硅油消泡剂、磷酸缓冲液、三氯乙酸、苦味酸、盐酸三甲胺、氧化镁、硼酸和硫代硫酸钠均为分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司; 氧化三甲胺、Z-半胱氨酸及 Z-甲硫氨酸均为分析纯, 购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

GHP-9080 型隔水式恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; HRLM-80 立式蒸汽灭菌锅, 青岛海尔有限公司; VD-850 型桌上式洁净工作台, 苏州沪净净化有限公司; XW-80A 微型旋涡混合仪, 沪西分析仪器有限公司; KA-1000 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; TC-24/H(b) 型基因扩增仪, 杭州博日科技有

限公司; DYY-7C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; BCD-251WBSV 型立式冰箱, 青岛海尔股份有限公司; XSP-BM-2CA 型电子显微镜, 上海上光实业有限公司; UD 9100D 型紫外分光光度计, 北京莱伯泰科仪器股份有限公司; KDH-CD 型凯氏定氮仪, 上海新家仪器有限公司; HHS 21-8 恒温槽, 金坛市科析仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 试验设计

首先, 分析 4 °C 贮藏过程中秋刀鱼的感官评分和菌落总数, 获知其冷藏期间的感官变化和货架期信息。冷藏过程中每 2 d (共 8 d) 进行菌株的分离纯化, 并计算同类型的菌落数占当天的比重; 对分离出的细菌进行革兰氏染色、氧化酶等基本的生理生化实验后再进行 16S rRNA 鉴定; 另外, 根据菌相中各菌株的比例变化, 及各株细菌对冷藏灭菌鱼汁 TVB-N 值的影响, 初步确定秋刀鱼的特定腐败菌。进一步将确定的几株 SSO 回接至无菌鱼块, 测定冷藏条件下样品的 TVB-N、TMA 和 TBA 值的变化情况, 比较细菌对鱼肉的腐败能力。

各细菌对冷藏灭菌鱼汁 TVB-N 值的影响: 参照许振伟<sup>[7]</sup>等的方法制备秋刀鱼灭菌鱼汁。将秋刀鱼先用无菌水清洗, 沥干后取背部鱼肉搅碎。称取 1000 g 鱼肉加入 500 mL 蒸馏水, 煮沸 5 min 后过滤, 滤液备用。将所得滤液 4000 r/min 离心 30 min, 再次过滤, 向滤液中加入 0.044 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.056 mol/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液和 0.1 mol/L 磷酸盐, 调节 pH 值至 6.6。每升鱼汁中加入 1.6 g 氧化三甲胺(TMAO)、40 mg Z-半胱氨酸和 40 mg 的 Z-甲硫氨酸, 121 °C 灭菌 15 min 后存放于 4 °C 条件下备用。无菌吸取 0.05 mL 各菌株菌液(浓度 10<sup>6</sup> CFU/mL) 加入到 100 mL 灭菌鱼汁中, 4 °C 冷藏, 在 48、96 h 测定其 TVB-N 值, 以灭菌鱼汁为对照。

秋刀鱼 SSO 腐败能力的验证: 秋刀鱼解冻后立即用 75% 的酒精进行表面杀菌, 去尾、头及内脏, 取 20 g 背部肌肉, 并将其在浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL 的各确定的优势腐败菌的菌液中浸泡 10 s, 在无菌环境中沥干并分装在保鲜袋中。所有样品 4 °C 冷藏, 分别在 48、96 h 测定其 TVB-N、TMA 和 TBA 值。对照组为经表面杀菌后的鱼块。

### 1.2.2 分析方法

#### 1.2.2.1 感官评分

以 GB/T 18109-2011 冻鱼<sup>[8]</sup>及 GB/T 18108-2008 鲜海水鱼标准<sup>[9]</sup>为参照, 综合考虑建立如表 1 所示的秋刀鱼的感官评定方法, 由 10 名感官评定人员从肌肉形态、

色泽、组织与气味等4个方面进行评分,并根据各指标在秋刀鱼感官评价中的作用,确定其权重分别为,形态0.20,色泽0.25,组织0.25,气味0.30,总和为1,即权重集 $X=\{a_1,a_2,a_3,a_4\}$ ,秋刀鱼感官评分指标综合评判集 $Y=XR$ ,其中 $X$ 为权重集, $R$ 为模糊矩阵。将评价结果

的等级好、较好、一般和较差依次赋予分值10、8、6和4,分别乘以模糊变换后综合评判结果的各个量,并进行加和,以此得出每个样品的总得分。其中,总得分:8~10分为一级鲜度;6~8分为二级鲜度,6分以下为不新鲜。

表1 秋刀鱼感官评分方法

Table 1 Sensory evaluation of *Cololabis saira*

指标评价	好/10分	较好/8分	一般/6分	较差/4分
形态	肌肉切面微干,有光泽	肌肉切面稍湿,略有光泽	肌肉切面无光泽,较湿	肌肉切面无光泽,很湿
色泽	色泽鲜亮,秋刀鱼固有色,微红	色泽变暗,从微红变成暗红	色泽暗红,周围有黄色汁液	鱼块边缘部分肉质变黄
组织	致密完整,富有弹性	致密完整,弹性略差	不紧密,但不松散	肉质松散,弹性基本消失
气味	鱼肉固有香味	固有香味清淡	出现轻微氨味	腥臭味严重

1.2.2.2 菌落总数测定

参照 GB/T 4789.2-2010《食品微生物学检验:菌落总数测定》标准进行。先称取 10 g 秋刀鱼样品置于 90 mL 无菌生理盐水中,匀浆 3 min,制成 1:10 的样品匀液,继续以 10 倍梯度稀释,根据前期预实验选择 3 个适宜稀释度的样品匀液,吸取 0.1 mL 涂布于营养琼脂中,3 个平行 35 °C 培养 2 d 后计数。

1.2.2.3 菌相分析

在冷藏过程中,每隔 2 d 选取菌落数在 30~300 的平板,并观察菌落形态和镜检形态,挑取单菌落平板划线,同时对细菌进行分组和归类计数,计算所分离细菌所占当天菌落总数的比例。对分离出的细菌进行革兰氏染色、氧化酶、接触酶、葡萄糖氧化发酵试验。

1.2.2.4 16S rRNA 序列测定

将分离纯化的细菌,用基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA,细菌扩增的通用引物为 27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 5 min 后持续变性 30 s, 45 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 30 s。纯化后的 16S rDNA 序列由上海美吉生物医药科技有限公司进行测序,登陆 NCBI 网站进行同源性分析,用 MEGA 6.0 构建系统发育树。

1.2.2.5 挥发性盐基氮(total volatile base nitrogen, TVB-N)的测定

参照 GB/T 5009.44-2003《肉与肉制品卫生标准的分析方法》中半微量定氮法测定。结果表示为 $\times 10^{-2}$  mg/mL 鱼汁或 $\times 10^{-2}$  mg/g 鱼肉。

1.2.2.6 三甲胺(trimethylamine, TMA)的测定

参照 GB/T 5009.179-2003《火腿中三甲胺氮的测

定》。结果表示为 $\times 10^{-2}$  mg/g 鱼肉。

1.2.2.7 硫代巴比妥酸值(the 2-2-thiobarbituric acid, TBA)的测定

参照谢晶等<sup>[10]</sup>的方法。称取 5.00 g 秋刀鱼背部肉切碎于离心管中,加入质量分数为 20%的三氯乙酸溶液 25 mL 和 20 mL 蒸馏水,匀浆后静置 1 h。4000 r/min 离心 10 min 后过滤,双蒸水定容至 50 mL 混匀。取 5 mL 滤液加入同体积的硫代巴比妥酸溶液(0.02 mol/L),水浴 20 min 后流动水冷却,再使用紫外分光光度计在 532 nm 处测吸光度值 A。空白样为蒸馏水,  $TBA \text{ 值} = A \times 7.8 \times 10^2 \text{ mg/g}$ 。

1.2.3 数据处理与分析

应用 SPSS 16.0 软件进行数据处理,其中显著性分析分别用 t 检验和新复极差法检验( $p < 0.05, p < 0.01$ )。用 Origin 8.0 软件进行图形绘制,应用 MEGA 6.0 进行细菌系统发育树的构建。

2 结果与讨论

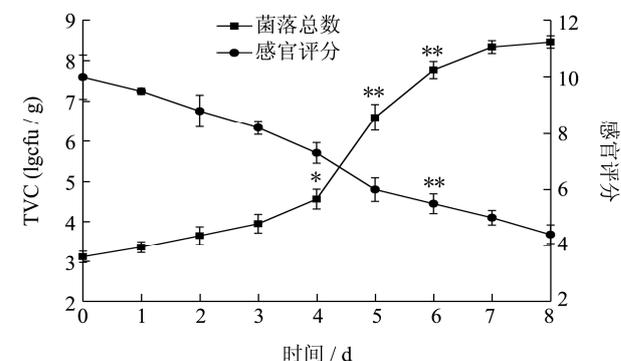


图1 秋刀鱼冷藏条件下感官评分和菌落总数的变化(4 °C)

Fig.1 Sensory evaluation and aerobic bacterial count of *Cololabis saira* during refrigerated storage at 4 °C

注：图中\*表示差异显著 ( $p < 0.05$ )；\*\*表示差异极显著 ( $p < 0.01$ )。

## 2.1 秋刀鱼冷藏过程中感官评分和菌落总数的变化

菌落总数和感官评分是评价秋刀鱼鲜度的重要指标。秋刀鱼在冷藏过程中感官评分和菌落总数的变化如图1所示。

由图1可知，秋刀鱼的感官评分总体呈下降趋势，而菌落总数呈升高趋势，说明在冷藏过程中样品的新鲜度不断下降。具体而言，秋刀鱼的初始菌落总数为3.15 lg (CFU/g)，在冷藏的前4 d，秋刀鱼的菌落总数

缓慢增长，冷藏第3 d样品的菌落总数为3.89 lg (CFU/g)，此时对应的感官评分为8.20，相对较高，按照鲜海水鱼标准<sup>[9]</sup>，当菌落总数 $< 4.00$  lg (CFU/g)时，鱼肉为一级鲜度，因此，可认为冷藏第三天样品仍可达一级鲜度。此后菌落总数显著增加 ( $p < 0.05$ )，感官品质劣变亦明显加快，冷藏第6 d时，其菌落总数高达7.77 lg (CFU/g)，感官评分为5.50 ( $p < 0.01$ )，可认为此时样品已达到货架期终点。这与郭全友等<sup>[11]</sup>研究中发现的大黄鱼在冷藏条件下货架期终点时菌落总数为7.60 lg (CFU/g)的结果相似。

## 2.2 菌相分析

### 2.2.1 初步分离及鉴定

表2 秋刀鱼中所分离的各菌株的基本特征

Table 2 Properties of the bacterial strains isolated from *Cololabis saira*

菌种编号	菌落形态	菌落颜色	细菌形态	革兰氏染色	氧化酶	接触酶	葡萄糖
1	梭状	土黄	短杆	-	+	+	+
2	圆形,平滑	淡黄	球状	+	-	+	-
3	圆形	奶白	细杆	+	-	+	-
4	圆形	奶白	球状	+	-	-	-
5	圆形,凸起	土黄色	球状	+	-	+	-
6	圆形	微黄	球状	+	-	+	-
7	扁平	奶白	细杆	-	-	+	-
8	圆形	奶白	球状	+	-	+	-
9	圆形	微红	杆状	-	-	+	+
10	圆形,凸起	浅黄	球状	+	-	-	-
11	圆形	浅黄色	短杆	-	+	+	+
12	圆形,湿润	灰白色	短杆	-	+	+	-
13	圆形	奶白色	杆状	-	-	+	+

在秋刀鱼的冷藏过程中，各类微生物会表现出不同的生长特点。在本研究0~8 d的冷藏过程中，共从样品中分离出120株细菌，根据菌落形态和显微镜检查结果可将其归为13种，其具体的菌落形态及生理、生化检测结果见表2。

由表2可知，所获得的13株菌株中，7株为球菌（菌株编号分别2、4、5、6、8和10号），其余均为杆菌；革兰氏染色结果表明，7株为革兰氏阳性菌（2、3、4、5、6、8和10号），其余6株为革兰氏阴性菌（1、7、9、11、12及13号）。此外，1、11和12号菌株氧化酶实验阳性，其他均为阴性。而除4和10号菌外，其他菌株接触酶实验阳性，说明这些菌株中均存在过氧化氢酶。1、9、11和13号为葡萄糖试验阳性，说明其具备利用葡萄糖的能力。

### 2.2.2 16S rRNA 鉴定结果

将13株细菌的基因序列与NCBI中的基因总库进行比对，选取其中最相似的序列构建系统发育树进行相似性分析，结果如图2所示。

由图2可知，所有序列与已知菌株序列的相似度均 $\geq 98\%$ ，说明鉴定结果可靠。经分子生物学鉴定后13株菌株归属7大菌属：分别为，不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp, 菌株7和9)，葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp, 菌株5、6和10)，罗氏菌属 (*Rothia* sp, 菌株2、4和8)，希瓦氏菌属 (*Shewanella* sp, 菌株12和11)，假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp, 菌株1)，芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp, 菌株3)和肠杆菌属 (*Enterobacter* sp, 菌株13)。有研究表明，低温冷藏鱼类的主要菌相有不动杆菌、腐败希瓦氏菌、假单胞菌、肠杆菌、芽孢杆菌和乳酸菌等<sup>[12]</sup>，本研究结果与该结论相符。

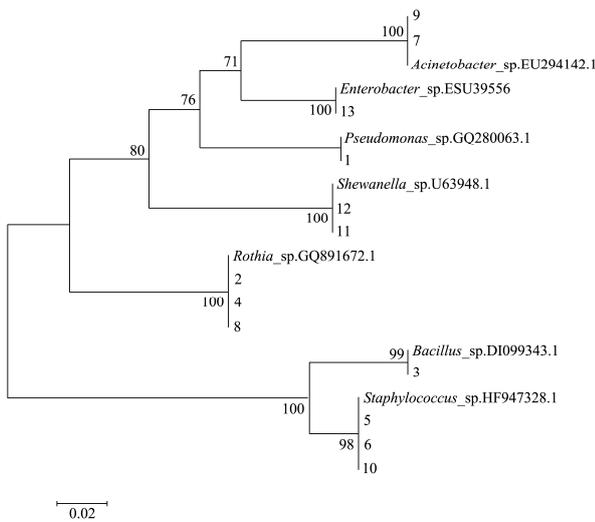


图2 13株细菌的16S rRNA序列系统发育分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of 13 bacterial strains, based on 16S-rRNA sequence

### 2.3 冷藏过程中秋刀鱼的菌相变化及SSO的确定

#### 2.3.1 冷藏过程中秋刀鱼的菌相变化

在秋刀鱼的冷藏过程中，分别对细菌进行分组归类，并计算得到特定菌株占菌落总数的比例，具体菌相组成和变化情况如图3所示。

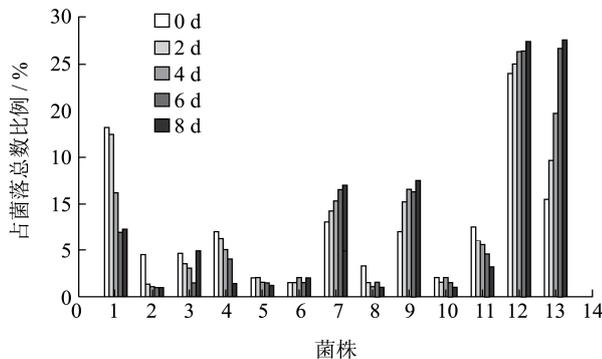


图3 冷藏过程中秋刀鱼菌相的变化(4 °C)

Fig.3 Changes in bacterial composition of *Cololabis saira* during refrigerated storage at 4 °C

由图3可知，冷藏初期革兰氏阴性菌占75.10%，革兰氏阳性菌占24.90%，此时比例相对较大的菌株为12(希瓦氏菌属，24.00%)和1(假单胞菌属，18.12%)，次优势菌株为13(肠杆菌属，10.53%)、11(希瓦氏菌属，7.52%)和7(不动杆菌属，8.00%)；随冷藏时间的延长，菌相组成逐渐发生改变，菌株12、13、7、9的比例逐渐上升，而其余菌株的比例均逐渐下降；至货架期终点(第6d)时，革兰氏阴性菌比例升高至87.70%，而革兰氏阳性菌则显著降低至12.30%

( $p < 0.05$ )，菌相中比例较高的菌株分别为12(希瓦氏菌属，26.40%)，13(肠杆菌属，26.70%)及不动杆菌属的7号(11.50%)和9号(11.30%)菌株。总体来看，在秋刀鱼的冷藏过程中，革兰氏阴性菌对样品的腐败变质的影响相对较大。12号菌株(希瓦氏菌属)在秋刀鱼整个冷藏过程中的菌相中比例相对较高，而13号菌株(肠杆菌属)的比例则在冷藏过程中的增幅最大，说明这两株菌均为秋刀鱼冷藏过程中的优势腐败菌，而菌株7、9可称之为次优势腐败菌。虽然有研究表明，在有氧冷藏中，寒带和温带海域捕获的鱼类优势腐败菌多为革兰氏阴性菌，包括假单胞菌、希瓦氏菌或肠杆菌等<sup>[12]</sup>，但在本研究中，假单胞菌属(菌株1)在菌相中的比例却随着冷藏时间的延长而减少，这说明假单胞菌不是导致冷藏秋刀鱼腐败的优势腐败菌。

#### 2.3.2 不同菌株对冷藏灭菌鱼汁TVB-N的影响

TVB-N是评价水产品新鲜度的重要指标，为了进一步比较各菌株的致腐能力，将获得的13株细菌分别接种至灭菌鱼汁中，其在不同冷藏时间的TVB-N结果如图4所示。

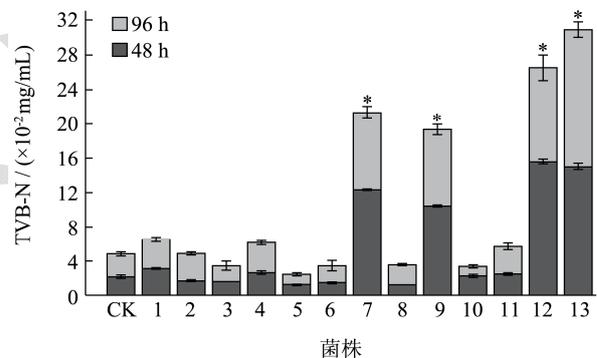


图4 不同菌株对冷藏灭菌鱼汁TVB-N的影响(4 °C)

Fig.4 Changes in TVB-N value of sterilized fish juice during storage at 4 °C

注：图中\*表示差异显著( $p < 0.05$ )。

由图4可知，不同菌株对灭菌鱼汁TVB-N值的影响有一定差异，具体而言，冷藏48h时，对照组(灭菌鱼汁)的TVB-N值仅为2.17 mg/100 mL，接种7、9(不动杆菌)、12(希瓦氏菌)和13号(肠杆菌)菌株的样品的TVB-N值则分别显著升高至 $12.36 \times 10^{-2}$ 、 $10.47 \times 10^{-2}$ 、 $15.59 \times 10^{-2}$ 、 $14.94 \times 10^{-2}$  mg/mL ( $p < 0.05$ )，而接种其余菌株的样品的TVB-N值与对照组无显著差异( $p > 0.05$ )；冷藏96h后，对照组的TVB-N值达 $4.83 \times 10^{-2}$  mg/mL，接种13号(肠杆菌)菌株的样品的TVB-N值已高达 $30.92 \times 10^{-2}$  mg/mL，其次为12号(希瓦氏菌)菌株，其相应的TVB-N值为 $26.45 \times 10^{-2}$

mg/mL, 接种7、9(不动杆菌)的样品的TVB-N值也显著增大至 $21.33 \times 10^{-2}$ 、 $19.38 \times 10^{-2}$  mg/mL, 均与对照组差异显著( $p < 0.05$ )。这与2.3.1中菌相变化情况相符, 说明对冷藏秋刀鱼而言, 13(肠杆菌)和12(希瓦氏菌)号菌株生长活跃且具有较强的腐败能力, 7、9(不动杆菌)号菌株腐败能力次之。

## 2.4 秋刀鱼SSO腐败能力验证

### 2.4.1 优势腐败菌对冷藏鱼肉TVB-N的影响

进一步分析冷藏秋刀鱼的优势腐败菌株(13、12、7和9号菌株)对冷藏秋刀鱼肉TVB-N值的影响, 结果如图5所示。

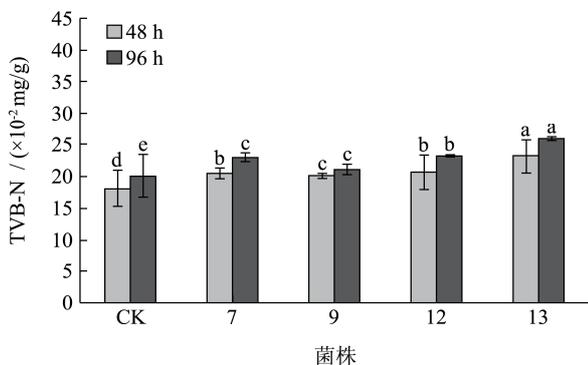


图5 各优势腐败菌对冷藏鱼肉TVB-N值的影响(4 °C)

Fig.5 Effect of the dominant spoilage bacteria on TVB-N value of *Cololabis saira* during storage at 4°C

注: 图中不同字母间表示差异显著( $p < 0.05$ )。

图5表明, 4株优势腐败菌均对冷藏秋刀鱼肉的TVB-N值有一定影响, 具体而言, 冷藏48 h时, 接种4株优势腐败菌的样品的TVB-N值均较对照组( $18.06 \times 10^{-2}$  mg/g)显著增大( $p < 0.05$ ), 其中接种13号菌株(肠杆菌)的样品的TVB-N值最高, 为 $23.13 \times 10^{-2}$  mg/g, 而7号菌株(不动杆菌)与12号菌株(希瓦氏菌)对样品的TVB-N值影响无显著区别( $p > 0.05$ ), 接种9号菌株(不动杆菌)对样品的TVB-N值影响小, 为 $20.10 \times 10^{-2}$  mg/g; 冷藏至96 h时, 各组样品的TVB-N值均相对升高, 规律与48 h时类似, 仍以13号菌株对样品的TVB-N值影响最大, 达到 $25.83 \times 10^{-2}$  mg/g, 7及12号菌株次之。TVB-N值是由于水产品在微生物作用下, 导致蛋白质分解产生的氨及胺类等碱性含氮挥发性物质, 能够指示细菌对水产品中营养物质的代谢能力。如MACE S等<sup>[5]</sup>的研究发现, 希瓦氏菌和栖鱼肉杆菌均可使冷藏对虾的TVB-N值显著升高。本文中, 4株优势腐败菌均能促使鱼肉中蛋白质的分解, 使其TVB-N值升高, 且肠杆菌(13号)对样品TVB-N值的影响最大, 7(不动杆菌)和12(希瓦氏菌)号次之, 9号(不动杆菌)菌株的影响相对较弱。

### 2.4.2 优势腐败菌对冷藏鱼肉TMA的影响

某些特定微生物会将鱼肉中的氧化三甲胺(Trimethylaminoxide, TMAO)还原成为TMA, 使鱼肉产生腐臭味。TMA值亦可指示鱼肉的新鲜程度。4株优势腐败菌对冷藏秋刀鱼肉TMA值的影响如图6所示。

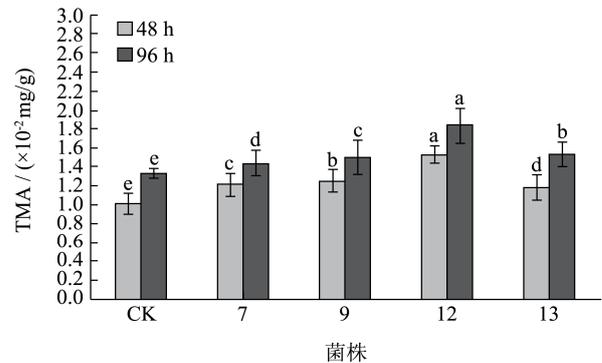


图6 各优势腐败菌对冷藏鱼肉TMA值的影响(4 °C)

Fig.6 Effect of the dominant spoilage bacteria on TMA content of *Cololabis saira* during storage at 4°C

注: 图中不同字母间表示差异显著( $p < 0.05$ )。

由图6可知, 与对照组相比, 随时间延长, 4种优势腐败菌均使冷藏秋刀鱼肉的TMA值有一定升高( $p < 0.05$ )。例如, 冷藏至48 h时, 对照组的TMA值为 $1.01 \times 10^{-2}$  mg/g, 而接种12号菌株(希瓦氏菌)的样品的TMA值则已升至 $1.52 \times 10^{-2}$  mg/g, 其次是7和9号菌株(不动杆菌), 相对而言, 13号菌株(肠杆菌)对样品TMA的影响最小, 为 $1.18 \times 10^{-2}$  mg/g; 冷藏至96 h时, 各组样品的TMA值继续增大, 希瓦氏菌(12号)使秋刀鱼肉TMA值的增加最大, 结果说明这4株细菌均对鱼肉中TMAO还原成TMA有显著影响, 会加速鱼肉腐臭味的产生, 且12号菌株(希瓦氏菌)在此过程中作用最大。钱韻芳等<sup>[13]</sup>的研究亦发现腐败希瓦氏菌能促进凡纳滨对虾中TMA的产生, 加快其腐败变质。

### 2.4.3 优势腐败菌对冷藏鱼肉TBA的影响

秋刀鱼为高脂鱼类, 其中不饱和脂肪酸含量较高<sup>[1]</sup>, 极易被氧化。TBA是水产品中不饱和脂肪酸氧化降解产物丙二醛与硫代巴比妥酸试剂反应生成的稳定红色化合物, 可以反映脂肪氧化的程度。4株优势腐败菌对冷藏秋刀鱼肉TBA值的影响如图7所示。

由图7可知, 4种优势腐败菌均使冷藏秋刀鱼肉的TBA值相对增大。具体而言, 冷藏48 h时, 接种12号菌株(希瓦氏菌)的样品的TBA值最大, 为 $3.79 \times 10^{-2}$  mg/g, 与对照组( $1.45 \times 10^{-2}$  mg/g)差异显著( $p < 0.05$ ), 7号(不动杆菌)和13号(肠杆菌)的影响次之, 而9号菌的影响较小; 冷藏至96 h时, 接种7号菌株(不动杆菌)样品的TBA值则与对照组差异最显著( $p < 0.05$ ),

达到了 $5.50 \times 10^{-2}$  mg/g, 接种12号菌株(希瓦氏菌)的样品的TBA值仍相对较高, 为 $4.30 \times 10^{-2}$  mg/g, 另外两种菌株与48 h时的规律类似。综合而言, 7号(不动杆菌)及12号细菌(希瓦氏菌)对冷藏秋刀鱼肉中脂肪氧化的影响相对较大。

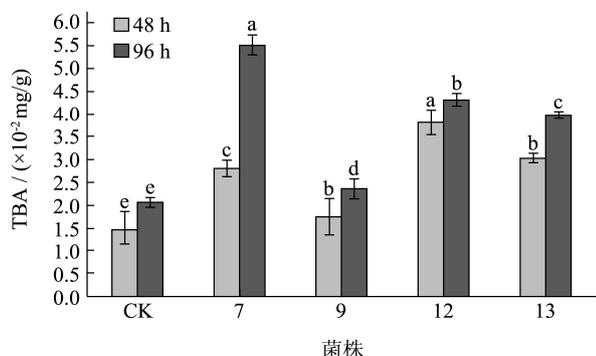


图7 各优势腐败菌对冷藏鱼肉TBA值的影响(4 °C)

Fig.7 Effect of the dominant spoilage bacteria on TBA content of *Cololabis saira* during storage at 4 °C

注: 图中不同字母间表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

### 3 结论

本文分析了冷藏条件下秋刀鱼感官变化和菌落总数变化, 分离并鉴定了冷藏过程各菌株, 分析了冷藏过程中菌相的变化及各菌株对灭菌鱼汁 TVB-N 值的影响, 确定了优势腐败菌; 进而比较了各优势腐败菌对秋刀鱼肉的腐败能力, 具体结论如下:

3.1 4 °C 冷藏条件下, 秋刀鱼的菌落总数逐渐增大而感官评分显著降低, 冷藏第 5 d 时, 菌落总数为 6.60 Lg (CFU/g), 感官评分为 6 分, 而冷藏第 6 d 时, 秋刀鱼菌落总数为 7.77 Lg (CFU/g), 感官评分为 5.5 分, 可认为 4 °C 冷藏秋刀鱼在第 6 d 时达到货架期终点。

3.2 冷藏过程中共分离、鉴定出 13 种细菌, 革兰氏阳性菌 7 株, 革兰氏阴性菌 6 株; 分属 7 个菌属, 不动杆菌属 2 株 (*Acinetobacter* sp, 菌株 7 和 9), 葡萄球菌属 3 株 (*Staphylococcus* sp, 菌株 5、6 和 10), 罗氏菌属 3 株 (*Rothia* sp, 菌株 2、4 和 8); 希瓦氏菌属 2 株 (*Shewanella* sp, 菌株 12 和 11), 假单胞菌属 1 株 (*Pseudomonas* sp, 菌株 1)、芽孢杆菌属 1 株 (*Bacillus* sp, 菌株 3) 和肠杆菌属 1 株 (*Enterobacter* sp, 菌株 13)。

3.3 在秋刀鱼冷藏期间, 菌株 13 (肠杆菌), 12 (希瓦氏菌), 7 和 9 (不动杆菌) 在微生物菌相中的比例逐渐增大, 且接种这四株菌可使灭菌鱼汁的 TVB-N 值显著增大, 说明这几个菌株生长活跃且具有较强的腐败能力, 是冷藏秋刀鱼的优势腐败菌。

3.4 从 4 株优势腐败菌对秋刀鱼 TVB-N 值、TMA 值、

TBA 值的影响来看, 12 号菌株(希瓦氏菌)对样品 TMA 的影响最大, 13 号菌株(肠杆菌)对样品的 TVB-N 值影响最大, 7 号菌株(不动杆菌)对样品的 TBA 值影响最大, 9 号菌株(不动杆菌)对以上各指标的影响稍小。证明这 4 株菌是冷藏秋刀鱼的特定优势腐败菌。

3.5 研究为后期靶向抑制冷藏秋刀鱼的优势腐败菌, 延长货架期可提供一定的理论基础。

### 参考文献

- [1] 叶彬清,陶宁萍,王锡昌.秋刀鱼肌肉营养成分分析及评价[J].营养学报,2014,36(4):406-408  
YE Bin-qing, TAO Ning-ping, WANG Xi-chang. Analysis and evaluation of nutritional composition of *cololabis saira* muscle [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2014, 36(4): 406-408
- [2] Mace S, Cornet J, Chevalier F, et al. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR-TTGE [J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 164-172
- [3] Zhang Y M, Li Q, Li D P, et al. Changes in the microbial communities of air-packaged and vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4 °C [J]. Food Microbiology, 2015, 52(5): 197-204
- [4] Parlapani F F, Kormas K A, Boziaris I S. Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis [J]. J. Sci. Food Agr., 2015, 95(12): 2386-2394
- [5] Mace S, Cardinal M, Jaffres E, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled cooked whole tropical shrimp (*Penaeus vannamei*) stored under modified atmosphere packaging [J]. Food Microbiology, 2014, 40(4): 9-17
- [6] Parlapani F F, Haroutounian S A, Nychas G J, et al. Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C [J]. Food Microbiology, 2015, 50(7): 44-53
- [7] 许振伟,李学英,杨宪时,等.冷藏鲤鱼和罗非鱼优势腐败菌腐败能力分析[J].食品科学, 2012,33(4):243-246  
XU Zhen-wei, LI Xue-ying, YANG Xian-shi, et al. Analysis of spoilage ability of dominant spoilage bacteria from stored chilled *cyprinus carpio* and *oreochromis niloticus* [J]. Food Science, 2012, 33(4): 243-246

- [8] GBT 18109-2011, 冻鱼标准[S]  
GB/T 18109-2011, The Criteria of Frozen Fish [S]
- [9] GB/T 18108-2008, 鲜海水鱼标准[S]  
GB/T 18108-2008, The Criteria of Fresh Marine Fish [S]
- [10] 谢晶, 杨胜平. 生物保鲜剂结合气调包装对带鱼冷藏货架期的影响[J]. 农业工程学报, 2011, 27(1): 376-382  
XIE Jing, YANG Sheng-ping. Effects of biopreservative combined with modified atmosphere packaging on shelf-life of *trichiurus haumela* [J]. Transactions of the CSAE, 2011, 27(1): 376-382
- [11] 郭全友, 王锡昌, 杨宪时. 不同贮藏温度下养殖大黄鱼货架期预测模型的构建[J]. 农业工程学报, 2012, 28(10): 269-271  
GUO Quan-you, WANG Xi-chang, YANG Xian-shi. Predictive model construction of shelf life for cultured *Pseudosciaena crocea* stored at different temperatures [J]. Transactions of the CSAE, 2012, 28(10): 269-271
- [12] Doulgeraki A I, Ercolini D, Villani F, et al. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(2): 130-141
- [13] 钱韻芳, 杨胜平, 谢晶, 等. 气调包装凡纳滨对虾特定腐败菌致腐败能力研究[J]. 中国食品学报, 2015, 15(1): 85-91  
QIAN Yun-fang, YANG Sheng-ping, XIE Jing, et al. Studies on the putrefaction potential of the specific spoilage organisms from modified atmosphere packaged *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(1): 85-91