

枯草芽孢杆菌在鱼片保鲜中的应用

张雯, 陈淑俣, 游佳鸿, 倪莉*

(福州大学 食品科学技术研究所 福建省食品生物技术创新工程技术研究中心 福州 350108)

摘要 目的:为以生物膜形成能力为筛选依据的枯草芽孢杆菌生物保鲜剂开发提供新思路。方法:测定枯草芽孢杆菌的疏水能力、自凝聚率、共凝聚率及生物膜形成能力,并利用枯草芽孢杆菌对冰鲜罗非鱼片进行保鲜,测定罗非鱼片的鲜度和挥发性风味物质。结果:枯草芽孢杆菌的生物膜形成能力越强,对罗非鱼肉的保鲜效果最佳。枯草芽孢杆菌可显著降低鱼肉中的挥发性盐基氮含量,使鱼肉在贮藏第 3 天的 TVB-N 含量为 24.43 mg/100 g,低于对照组的 34.58 mg/100 g;并且显著抑制鱼肉中醇类、酚类、酯类和酸类,如异戊醇、苯酚、吡嗪、乙酸等挥发性风味成分的产生。同时,较生物膜形成能力而言,枯草芽孢杆菌的抑菌能力并未体现出与保鲜能力的相关性。结论:枯草芽孢杆菌的自凝聚和生物膜形成能力与其对罗非鱼片的保鲜能力最为相关,可作为保鲜用枯草芽孢杆菌筛选的快速指标。

关键词 枯草芽孢杆菌; 罗非鱼片; 生物保鲜

文章编号 1009-7848(2023)10-0229-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.023

水产品是蛋白质和其它必需营养物质的重要来源,深受消费者的喜爱。然而,水产品中蛋白质含量丰富,易引起微生物的大量滋生,导致产品腐败变质。常用的水产品保鲜方式主要是低温保鲜和化学保鲜^[1],而生物保鲜逐渐成为趋势^[2]。采用生态保鲜剂进行保鲜,成本低,极具发展前景^[3]。枯草芽孢杆菌对鱼肉、农产品具有防腐保鲜的效果。刘奎等^[4]发现枯草芽孢杆菌发酵液可提高猕猴桃采后果实品质并延长果实货架期。经过枯草芽孢杆菌抗菌物质处理的虾肉,能够延长 2~3 d 的冷藏货架期,减缓腐败细菌对虾肉蛋白质等含氮物质的分解^[5]。目前,主要针对枯草芽孢杆菌抗菌肽的研究,如枯草芽孢杆菌可通过产生表面活性素、细菌素等多种抑菌物质拮抗细菌或病原菌生长^[6]。而课题组前期研究^[7]发现,将枯草芽孢杆菌作为饲料添加剂喂养罗非鱼,可延缓冰鲜罗非鱼腐败,其主要机理是枯草芽孢杆菌可通过与黏膜上皮细胞黏附成膜,从而在机体内定植^[8],调节肠道微生物群组成,以防止致病微生物定植于上皮细胞而导致宿主感染^[9]。以上说明利用益生菌的生物膜形成特性来抑制腐败菌定植,是研究鱼体保鲜的一个

新途径^[10]。本研究探讨枯草芽孢杆菌的生物膜形成能力对鱼片保鲜的影响,为枯草芽孢杆菌作为微生态保鲜剂提供新思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与菌株

试验所用枯草芽孢杆菌分离于罗非鱼体或鱼池,经过 16S rRNA 和生理生化鉴定^[11-12],筛选得到 16 株枯草芽孢杆菌用于后续试验。腐败菌为假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)L1、L2、L3,为福州大学食品科学技术研究所前期从罗非鱼体中分离并鉴定,4℃保藏于牛肉膏蛋白胨斜面培养基。试验所用鲜活罗非鱼购自福州超市。

试剂及微生物培养基:NaCl、KCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、Na₂CO₃、NaHCO₃、乙醇、琼脂粉、牛肉浸膏、十二烷基硫酸钠(SDS),国药试剂公司;异硫氰酸荧光素(FITC),吉至生化公司;胰蛋白胨、细菌学蛋白胨、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基,海博生物公司;结晶紫,西陇化工公司。以上试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

试验仪器及设备见表 1。

1.3 试验方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌特性表征

1) 枯草芽孢杆菌生物膜形成能力测定 参考张雯等^[13]对细菌生物膜的检测,并做适当修改。

收稿日期:2022-10-03

基金项目:福建省自然科学基金面上项目(2020J01487);
福州市科技局科技计划项目(2020-GX-13)

第一作者:张雯,女,博士,副教授

通信作者:倪莉 E-mail: nili@fzu.edu.cn

表1 试验仪器和设备

Table 1 Test instruments and equipment

仪器/设备名称	型号	厂家
超纯水机	QYSW-10B	前沿科技公司
电子天平	JJ2000B	双杰测试仪器厂
单道、多道可调式移液器	LabServ Junior	赛默飞世尔科技公司
pH计	FE28	梅特勒-托利多仪器公司
冷藏冰箱	SC-390	海尔特种电冰柜公司
低温保存冰箱	DW-86L486	海尔生物医疗公司
电磁炉	MC-SY1913	美的电器公司
微波炉	MZ-2070MGZ	海尔微波制品公司
压力蒸汽灭菌锅	YXO-LS-70A	博迅公司医疗设备厂
高速冷冻离心机	CF16RXII	日本日立公司
涡旋混合器	XW-80A	其林贝尔仪器公司
恒温加热磁力搅拌器	DF-101D	予华仪器公司
电热鼓风干燥箱	DHG-9123A	精宏实验设备公司
超净工作台	ZHJH-C1112B	智诚分析仪器公司
生化培养箱	SHP-150	精其仪器公司
恒温培养振荡器	ZWY-2102C	智城分析仪器公司
紫外分光光度计	752N	仪电分析仪器公司
多功能酶标仪	SpectraMax i3+MiniMax	美谷分子仪器公司
荧光显微镜	BX53	日本 OLYMPUS 公司
超声波清洗器	KQ-100DE	昆山市超声仪器公司
气相色谱质谱联用仪	7890B-5977A	安捷伦科技公司
固相萃取纤维	57348-U	美国 SUPELCO 公司
自动凯氏定氮仪	K9840	山东海能科学仪器公司

取过夜培养的枯草芽孢杆菌培养物经 8 000 r/min 离心沉淀 10 min, 将沉淀物用生理盐水重悬 3 次后制备 OD_{600nm} 值为 1.0 ± 0.05 的菌悬液。在无菌操作台将上述菌悬液与灭菌后的新鲜牛肉膏蛋白胨液态培养基按照体积比 1:10 混匀, 然后取 200 μL 至酶标板中, 在 37 °C 条件下静置培养 24 h。

培养结束后弃菌液并添加 200 μL 无菌 PBS 冲洗, 重复 2 次。在室温环境下晾干, 然后加入 200 μL 0.1% 的结晶紫染色液染色 15 min, 弃染色液并用无菌去离子水冲洗 4 次后, 充分晾干, 再加入 95% 的乙醇, 将染色后的枯草芽孢杆菌充分溶解, 从溶解液中取 150 μL 放入新的 96 孔酶标板中, 空白组为空的酶标板, 通过多功能酶标仪检测各孔的 OD_{590nm}。

2) 枯草芽孢杆菌表面疏水性测定 参考张雯等^[13]对细菌表面疏水性的测定。枯草芽孢杆菌的表面疏水率计算公式:

$$\text{细菌表面疏水率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100 \quad (1)$$

式中, A_0 ——与二甲苯混匀前水相吸光度; A_1 ——与二甲苯混匀后水相吸光度。

3) 枯草芽孢杆菌自凝聚率测定 参考 Rahman 等^[14]对细菌自凝聚率的测定。枯草芽孢杆菌的自凝聚率计算公式:

$$SR = (1 - A_t/A_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中, SR——静置 t 小时枯草芽孢杆菌的自凝聚率(%); A_0 ——枯草芽孢杆菌初始的 OD_{600nm}; A_t ——枯草芽孢杆菌静置 t 小时的 OD_{600nm}。

4) 枯草芽孢杆菌与假单胞菌的共凝聚率测定 取过夜培养的枯草芽孢杆菌培养物经 8 000 r/min 离心沉淀 10 min, 将沉淀物用生理盐水重悬, 并调 OD_{600nm} 值为 0.5 ± 0.02。枯草芽孢杆菌和假单胞菌各取 150 μL 菌悬液在 96 孔酶标板的同一个孔中, 30 °C 孵育 4 h 后, 用酶标仪测定混合菌液的 OD_{600nm} 值。每组 3 个平行, 以 300 μL 单种菌

液为对照。

共凝聚率计算公式：

$$X=[(SC+LC)/2-(S+L)]/[(SC+LC)/2] \times 100\% \quad (3)$$

式中, X ——枯草芽孢杆菌的共凝聚率 (%) ;
 SC ——假单胞菌单独孵育 4 h 的 OD_{600nm} 值 ;
 LC ——枯草芽孢杆菌单独孵育 4 h 的 OD_{600nm} 值 ;
 $S+L$ ——混合菌孵育 4 h 后的 OD_{600nm} 值。

1.3.2 枯草芽孢杆菌抑菌能力测定

1) 枯草芽孢杆菌对假单胞菌的对峙抑菌率测定 将枯草芽孢杆菌接种于牛肉膏蛋白胨培养皿中央, 30 °C 培养 12 h, 以枯草芽孢杆菌为中心画十字, 周边间隔 1 cm 点种腐败菌继续培养 36 h, 记录最外层 (A_1) 和最内层 (A_2) 腐败菌的直径均值。所用的指示腐败菌为假单胞菌 L1、L2、L3。对峙抑菌率的计算公式为：

$$\text{对峙抑菌率}(\%)=(A_1-A_2)/A_1 \times 100 \quad (4)$$

2) 枯草芽孢杆菌上清液对假单胞菌的抑菌率测定 取过夜培养后的培养液 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.25 μm 的滤膜制成无菌上清液。将 OD_{600nm} 值为 0.7 ± 0.02 的腐败菌 10 μL 分别加于 1 mL 牛肉膏蛋白胨液态培养基中, 试验组加入 80 μL 的枯草芽孢杆菌上清液, 对照组不加上述清液, 并在 30 °C 下培养 16 h, 酶标仪测定 OD_{600nm} 。所用的指示腐败菌为假单胞菌 L1、L2、L3。计算公式：

$$\text{上清液抑菌率}(\%)=(C_1-C_2)/C_1 \times 100 \quad (5)$$

式中, C_1 ——对照组的 OD_{600nm} ; C_2 ——试验组的 OD_{600nm} 。

1.3.3 枯草芽孢杆菌对罗非鱼片的保鲜能力

1) 无菌鱼片及菌悬液的制备 将新鲜罗非鱼去除内脏并用无菌水冲洗干净, 在无菌操作间用吸水纸去除鱼体表面的水分, 用无菌解剖刀取背部鱼肉并均匀切成厚薄均匀、质量约为 (2.0 ± 0.02) g 的鱼片, 在无菌操作室紫外照射消毒 20 min 后得到无菌鱼片, 备用。

分别从营养琼脂斜面培养基中挑取已活化的枯草芽孢杆菌和假单胞菌, 划线接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 °C, 200 r/min 摇床培养 12 h, 得到细菌种子液。将枯草芽孢杆菌和假单胞菌种子液以 5% 接种量接种于新鲜的牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 °C, 200 r/min 摇床培养 24 h 得

到发酵液, 离心去除上清后, 用生理盐水调整菌液浓度调至 10^8 CFU/mL, 得到细菌菌悬液。在 20 mL 假单胞菌菌悬液中加入 10 mL 的枯草芽孢杆菌菌悬液, 供试验组鱼片用。在 20 mL 假单胞菌发酵液中加入 10 mL 生理盐水, 供空白组鱼片用。将制备好的鱼片放入上述 30 mL 菌悬液中浸泡 20 s, 取出沥干 30 s, 置于无菌均质袋中密封, 4 °C 贮藏, 每 24 h 取样, 均质备用。

2) 挥发性盐基氮测定 参考《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》(GB 5009.228-2016)^[15]中的方法。称取均质后的鱼肉样品 (10.00 ± 0.01) g 于蒸馏管中, 加入 75 mL 蒸馏水, 振荡混匀, 浸渍 30 min。自动凯氏定氮仪参数设置: 硼酸接收液 30 mL, 蒸馏时间 3 min。往蒸馏管中加入 1 g 氧化镁轻质粉末, 连接凯氏定氮仪, 开始蒸馏。蒸馏结束, 用 0.0100 mol/L 盐酸标准溶液滴定硼酸接收液, 混合指示液的终点颜色为紫红色。TVB-N 计算公式：

$$Y=(L_1-L_2) \times a \times 14 / m \times 100 \quad (6)$$

式中, Y ——样品的 TVB-N 含量 (mg/100g); V_1 ——实验组样品消耗的盐酸体积 (mL); V_2 ——空白组消耗的盐酸体积 (mL); c ——标准盐酸溶液的浓度 (mol/L); m ——样品的质量 (g)。

3) 挥发性物质测定 参考王雪峰等^[16]的方法并适当修改, 称取 (2 ± 0.02) g 鱼肉放入 15 mL 萃取瓶中, 加入搅拌子和 5 mL 饱和 NaCl 溶液, 加入 200 μL 原始质量浓度为 2 mg/L 的内标 2,4,6-三甲基吡啶, 拧紧瓶盖, 置于 60 °C 水浴中平衡 5 min, 将萃取针插入样品瓶中进行顶空吸附, 萃取 30 min。萃取结束后, 将萃取针插入 GC 进样口, 解吸 3 min 后拔针。在优化的内标物浓度下, 结合内标物与风味物质积峰面积的比例, 计算化合物的浓度, 计算公式如下：

$$\text{挥发性组分质量浓度}(\text{mg/L})=(A_i/A) \times C \quad (7)$$

式中, A_i ——挥发性组分 i 的峰面积; A ——内标物的峰面积; C ——内标质量浓度 (mg/L)。

1.4 数据处理

结果均以“平均值 \pm 标准差”表示, 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行制图, SPSS 32.0 软件中的 Duncan 检验进行差异显著性分析。

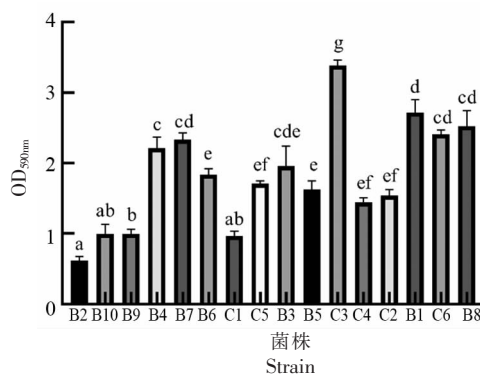
2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌生物膜形成能力分析

研究表明益生菌黏附定植于机体上皮细胞表面形成膜菌群,发挥生物屏障作用,抑制有害菌的黏附^[17],因此益生菌的生物膜形成能力越强,其抵御能力越强。各枯草芽孢杆菌菌株的生物膜形成能力如图1所示,根据生物膜形成能力差异,将16株枯草芽孢杆菌分类为:低成膜性枯草芽孢杆菌 B10、B2、B5、B9、C2, 中成膜性枯草芽孢杆菌 C4、B6、C5、B3、C1、B7、B4 和高成膜性枯草芽孢杆菌 C3、B1、B8、C6, 并进一步选取高成膜性菌株 C6、B8, 中成膜性菌株 B3、C5, 低成膜性菌株 B2 和 B10 进行鱼片的保鲜能力研究。

2.2 枯草芽孢杆菌对鱼片的保鲜作用

将6株枯草芽孢杆菌接入被假单胞菌 L1 污染的罗非鱼片中,评估不同成膜效果枯草芽孢杆菌在鱼片低温贮藏期间的保鲜能力。采用挥发性盐基氮(TVB-N)为鲜度指标,并使用GC-MS分析了鱼片挥发性气味的变化。



注:不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)。

图1 枯草芽孢杆菌的生物膜形成能力

Fig.1 Biofilm formation ability of *Bacillus subtilis*

2.2.1 枯草芽孢杆菌对罗非鱼片中挥发性盐基氮的影响 以鱼肉的挥发性盐基氮(TVB-N)为保鲜指标,鱼肉的保鲜终点为30 mg/100 g^[18]。由表2可知,相比假单胞菌组(L1),枯草芽孢杆菌降低了鱼片中TVB-N的含量,且高成膜性枯草芽孢杆菌 C6、B8 效果最为显著。

表2 罗非鱼片中挥发性盐基氮的含量

Table 2 Content of the TVB-N in tilapia fillets

时间/d	TVB-N 含量/mg·(100g) ⁻¹							空白
	C6+L1	B8+L1	C5+L1	B3+L1	B2+L1	B10+L1	L1	
1	18.76 ± 0.19 ^{ab}	17.5 ± 0.79 ^a	20.16 ± 0.59 ^{bc}	19.25 ± 0.29 ^{abc}	21.07 ± 1.68 ^c	21.35 ± 0.49 ^c	24.92 ± 0.39 ^d	19.67 ± 1.48 ^{abc}
2	23.73 ± 0.29 ^{bc}	20.23 ± 1.08 ^a	25.83 ± 1.88 ^{cd}	26.67 ± 1.28 ^d	25.90 ± 0.79 ^{cd}	27.37 ± 1.08 ^d	26.67 ± 0.29 ^d	21.49 ± 0.89 ^{ab}
3	27.30 ± 0.59 ^{ab}	24.43 ± 1.08 ^a	30.59 ± 0.89 ^{bc}	34.79 ± 3.46 ^{cd}	38.78 ± 2.17 ^{de}	39.76 ± 1.97 ^e	34.58 ± 1.78 ^{cd}	27.23 ± 0.69 ^{ab}
4	61.53 ± 2.47 ^a	66.08 ± 1.18 ^{ab}	69.64 ± 1.89 ^{bc}	68.32 ± 0.98 ^{bc}	72.03 ± 2.27 ^{cd}	76.16 ± 2.96 ^d	88.62 ± 2.37 ^e	67.27 ± 2.87 ^{bc}
5	100.94 ± 0.39 ^b	86.03 ± 2.67 ^a	114.66 ± 2.37 ^d	111.23 ± 3.46 ^{cd}	111.44 ± 1.18 ^{cd}	117.88 ± 3.76 ^d	105.42 ± 5.14 ^{bc}	93.10 ± 4.55 ^a

注:L1为浸泡于假单胞菌L1的发酵液中,空白为浸泡于无菌培养液。C6+L1为浸泡于含有该枯草芽孢杆菌与假单胞菌L1的混合发酵液中,依次类推。不同小写字母代表组间差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 枯草芽孢杆菌对罗非鱼片中挥发性气味的影响 鱼体腐败风味化合物是贮藏过程中腐败细菌作用和其发生化学反应产生的代谢产物。对比不同枯草芽孢杆菌处理后的鱼片挥发性风味物质的变化情况,进一步分析鱼肉的鲜度变化。根据TVB-N指标确定第3天为低温贮藏罗非鱼片的鲜度终点,采用GC-MS测定第3天鱼肉的挥发性

成分。如表3所示,假单胞菌L1处理后的鱼片主要产生醇类、杂环类、酚类和酸类等风味化合物,加入枯草芽孢杆菌后,这些化合物产生的种类及数量均下降。高成膜性的枯草芽孢杆菌C6和B8作用效果最为明显,显著抑制了鱼肉中醇类、酸类、酯类和酚类等挥发性气味的产生。进一步采用PCA分析,如图2所示,贮藏3d后,不同处理组

挥发性风味物质具有差异, 且与枯草芽孢杆菌的成膜性密切相关: 高成膜性菌株 C6、B8 位于第 4 象限, 中成膜性菌株 B3、C5 位于第 3 象限, 低成膜性菌株 B2 和 B10 位于第 1, 2 象限, 且成膜性最低的 B2 与假单胞菌 L1 组共同位于第 1 象限。位于第 1 象限的 B2 和 L1 组特征风味为苯酚、吡啶、异戊醇、乙醇、苜醇、乙酸、N-二乙基二硫代氨基甲酸甲酯、棕榈酸甲酯等挥发性风味化合物。其中, 苯酚具有典型的塑料橡胶味^[9], 吡啶具有浓郁的粪臭味, 是腐败鱼主要腥臭味的来源^[20]。乙醇、苜醇和异戊醇等具有辛辣刺激味, 而乙酸带有刺

激性的酸臭味^[21]。N-二乙基二硫代氨基甲酸甲酯和棕榈酸甲酯等酯类则带脂肪油蜡味, 也是酸败味的重要组成成分^[22]。高成膜的枯草芽孢杆菌 C6 组主要风味特征为葵醛、十四烷和 2-十三烷酮。葵醛稀释后具有橙子的香气^[23], 而饱和烃类, 如十四烷、2-十三烷酮的气味温和不明显。由此可见, 假单胞菌主要导致了腐败气味, 而随着枯草芽孢杆菌的加入, 风味特征开始转变为温和的气味, 且效果随着生物膜形成能力的增强而逐步提高, C6 处理组效果尤为显著。

表 3 不同枯草芽孢杆菌对鱼肉保鲜的挥发性气味含量 (mg/L)

Table 3 The volatile odor content of different *Bacillus subtilis* for fish preservation (mg/L)

种类	B2+L1	B10+L1	C5+L1	B3+L1	C6+L1	B8+L1	L1
醇类	2.695782	2.358113	2.063225	2.259535	1.485629	1.776722	2.109203
烷烯烃类	0.341073	0.387829	0.582212	0.313424	0.278353	0.230055	0.084584
醛类	0.061615	0.04007	0.024639	0.019272	0.046706	0.013415	0.030039
酸类	0.30203	0.137733	0.25375	0.15703	0.045259	0.160037	0.203533
酯类	0.064186	0	0	0.031824	0.023306	0.042727	0.061056
酚类	0.565242	0.252876	0	0.279252	0.316988	0.379794	0.403182
酮类	0.204964	0.295686	0.133798	0.191376	0.197584	0.058981	0.173518
杂环类	4.439206	3.839904	6.339537	3.239246	2.099269	1.734437	2.688695
合计	8.674098	7.312211	9.397161	6.490959	4.493094	4.396168	5.75381

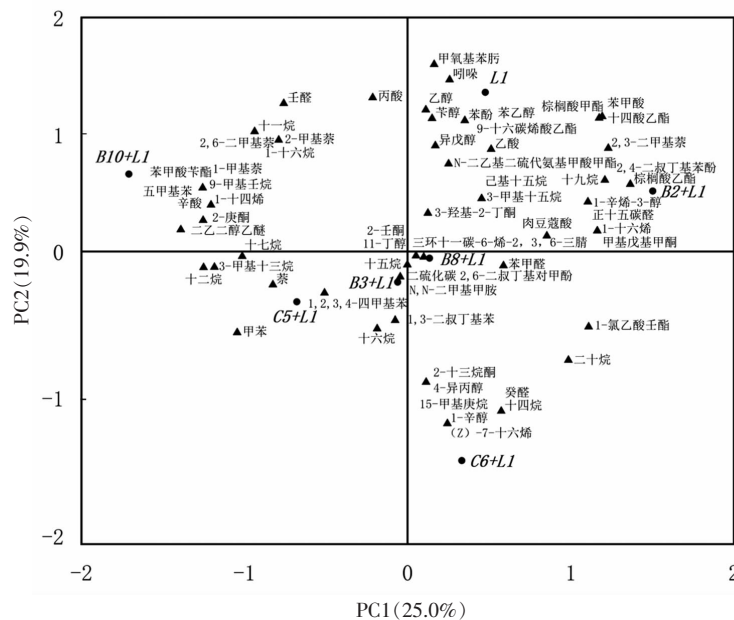


图 2 枯草芽孢杆菌对罗非鱼片贮藏期间挥发性成分的作用主成分分析图

Fig.2 Principal component analysis (PCA) biplot plot of the effect of *Bacillus subtilis* on volatile compounds in tilapia fillets during storage

2.3 枯草芽孢杆菌生物膜形成能力和抑菌能力对保鲜能力的影响

由于许多枯草芽孢杆菌菌株都能产生抑菌活性物质,因此将其抑菌能力、成膜能力与保鲜能力进行相关性分析,判断枯草芽孢杆菌发挥保鲜作用的主要途径。结果如表4所示,生物膜形成能力与保鲜能力最为相关,对假单胞菌 L1 的对峙抑菌率的相关性次之,而枯草芽孢杆菌上清液抑菌能力则与保鲜能力呈线性负相关。结果表明生物膜形成能力是影响枯草芽孢杆菌保鲜能力的关键指标。众多研究表明,成膜能力较强的益生菌占据定植位点进而抑制了病原菌对宿主的入侵、定植与破坏^[24]。本研究说明,枯草芽孢杆菌的成膜能力同样也对腐败菌发挥了类似作用,从而延长了鱼肉的保鲜期。生物膜形成能力同时受到群体感应系

统的影响^[25],对水产品腐败起到重要的调控作用^[26]。例如,具有群体感应抑制效果的香芹酚与常规抑菌剂鱼精蛋白复合,其可有效延缓大菱鲆鱼片品质的劣变,可起到协同保鲜作用^[27]。研究表明枯草芽孢杆菌具有群体感应信号淬灭的作用,从而减少腐败菌生物膜的形成^[28]。同时,枯草芽孢杆菌对假单胞菌对峙生长的抑制与发酵液抑菌的区别在于对峙试验同时反映了对生物被膜形成的抑制,而发酵液抑菌更多体现对菌体的杀灭和生长破坏作用。因此,枯草芽孢杆菌对假单胞菌的对峙生长抑制能力与保鲜作用也存在较高相关性,也进一步推测成膜能力高的枯草芽孢杆菌通过占据黏附位点、产生更多淬灭信号等机制抑制了假单胞菌在鱼片上的滋生。

表4 枯草芽孢杆菌生物膜形成能力、抑菌能力与保鲜能力的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of biofilm formation, bacteriostasis and preservation ability of *Bacillus subtilis*

		对峙抑菌率			上清液抑菌率			生物膜形成能力	保鲜能力
		L1	L2	L3	L1	L2	L3		
对峙抑菌率	L1	1	0.228	0.401	0.824	-0.086	-0.584	0.813	0.827
	L2	-	1	0.153	0.594	0.292	0.073	0.333	0.449
	L3	-	-	1	0.499	-0.050	0.259	0.742	0.636
上清液抑菌率	L1	-	-	-	1	0.139	-0.210	0.754	0.7088
	L2	-	-	-	-	1	0.628	-0.358	-0.108
	L3	-	-	-	-	-	1	-0.408	-0.381
生物膜形成能力	-	-	-	-	-	-	1	0.913	

注:保鲜能力的计算方法为第 n 天鱼片中 TVB-N 的含量与其保鲜终点 TVB-N 含量的比值,比值越小,其保鲜能力越强。

2.4 枯草芽孢杆菌生物膜形成能力相关指标

生物膜形成的第一步是细菌的黏附,细菌黏附的过程会受到范德华力、疏水作用、自凝聚率等菌体表面物理性质的影响,从而影响细菌生物膜的形成。为了能快速筛选得到保鲜用菌,本研究对枯草芽孢杆菌的疏水能力、自凝聚力、生物膜形成能力和共凝聚力进行测定,并与成膜能力进行相关性分析,找出最显著相关的因素。

由表5可知,枯草芽孢杆菌的自凝聚率与生物膜形成能力最为相关,可作为筛选枯草芽孢杆菌生物膜形成能力的重要指标。同时,表面疏水性与自凝聚率相关性极其显著,研究表面,一般疏水性越强的益生菌,其自凝聚能力越好^[29],而疏水能力越强的细菌对宿主黏膜的定植效果也越强^[30],这些物理相互作用在菌株成膜定植的过程中发挥重要作用。

表5 枯草芽孢杆菌各成膜指标间的相关性分析

Table 5 Correlation analysis of film forming indexes of *Bacillus subtilis*

成膜指标	疏水性	5 h 自凝聚率	共凝聚率	生物膜形成能力
疏水性	1	0.898	0.057	0.485
5 h 自凝聚率	-	1	-0.316	0.737
共凝聚率	-	-	1	-0.443

3 结论

本研究利用枯草芽孢杆菌对罗非鱼肉片进行保鲜。试验结果表明,枯草芽孢杆菌的生物膜形成能力越强,对罗非鱼肉的保鲜效果越强。生物膜形成能力强的枯草芽孢杆菌可显著降低鱼肉中的挥发性盐基氮含量,且能显著抑制鱼肉中醇类、杂环类、酚类和酸类等挥发性风味成分的产生,保持鱼片良好的水产鲜味。同时,自凝聚能力与生物膜的相关性较高,而抑菌能力和保鲜能力没有显著的相关性。枯草芽孢杆菌的自凝聚能力和生物膜形成能力是筛选其作为生物保鲜剂的重要指标。本研究为枯草芽孢杆菌作为生物保鲜剂提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] 杨焕彬, 曾庆培, 林光明, 等. 生物保鲜剂在禽肉保鲜中的应用研究进展[J]. 轻工学报, 2021, 36(6): 9.
YANG H B, ZENG Q P, LIN G M, et al. Research progress in the application of biological preservatives in poultry preservation[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(6): 9.
- [2] 彭娜, 赵鹏, 柴新义. 食(药)用真菌的抑菌效果及其在食品防腐和保鲜中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 1-12.
PENG N, ZHAO P, CHAI X Y. The antibacterial effect of edible (medicinal) fungi and its research progress in food anticorrosion and preservation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 1-12.
- [3] 廖乙露, 刘翰吉, 李明帅, 等. 微生态制剂在水产养殖中研究现状[J]. 饲料工业, 2021, 42(2): 48-54.
LIAO Y L, LIU H J, LI M S, et al. Research status of microecological preparation in aquaculture[J]. Feed Industry, 2021, 42(2): 48-54.
- [4] 刘奎, 赵焕兰, 宗宁, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-1 菌株对猕猴桃采后软腐病的抑制和保鲜效果评价[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(10): 40-49.
LIU K, ZHAO H L, ZONG N, et al. Evaluation of *Bacillus subtilis* BS-1 strain's inhibition and fresh-keeping effect on kiwifruit postharvest soft rot[J]. Storage and Process, 2021, 21(10): 40-49.
- [5] 隋晓日. 枯草芽孢杆菌抗菌物质的制备及其在水产保鲜上的应用[D]. 烟台: 烟台大学, 2021.
SUI X R. Preparation of antibacterial substances of *Bacillus subtilis* and its application in aquatic preservation[D]. Yantai: Yantai University, 2021.
- [6] KAVITHA M, RAJA M, PERUNAL P. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus spp.* isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822)[J]. Aquaculture Reports 2018, 7(11): 59-69.
- [7] 张雯, 王芳婷, 倪莉. 枯草芽孢杆菌对冰鲜罗非鱼肠道菌群的调节及保鲜作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 7.
ZHANG W, WANG F T, NI L. Effects of *Bacillus subtilis* on intestinal flora and freshness of tilapia during ice storage[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(9): 7.
- [8] GIRI S S, RYU E C, SUKUMARAN V, et al. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus strains*[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132: 66-72.
- [9] LI Y J L, FOOK Y C. Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments[J]. Food Control, 2018, 91: 237-247.
- [10] ENES D, MAYER M J, NARBAD A. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in FI9785[J]. BMC Microbiology, 2015, 15(8): 42-47.
- [11] BUCHANAN R E T, GIBBONS N E. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Eighth Edition. American: Journal of Public Health, 1975: 315.
- [12] LARSEN M, H LARSEN J L, OLSEN J E. Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: Role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 38(1): 77-80.
- [13] 张雯, 卞丹, 阮成旭, 等. 大黄鱼源腐败菌的黏附特性与生物膜特性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(14): 7.
ZHANG W, BIAN D, RUAN C X, et al. Adhesive properties and biofilm characteristics of *Pseudosciaena crocea* spoilage bacteria[J]. Food Science, 2019, 40(14): 7.
- [14] RAHMAN M M, KIM W-S, KUMURA H, et al. Auto aggregation and surface hydrophobicity of bifi-

- dobacterial [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 24(8): 1593–1598.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228–2016[S].北京: 中国标准出版社, 2016: 3–5.
National Health and Family Planning Commission of People's Republic of China. National standards for food safety. Determination of TVB–N in food: GB 5009.228–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 3–5.
- [16] 王雪峰, 李春萍, 吴佳佳, 等. 臭鳊鱼发酵中滋味成分的鉴定与分析[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(1): 222–229.
WANG X F, LI C P, WU J J, et al. Identification and analysis of flavor components in fermentation of smelly Mandarin fish[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(1): 222–229.
- [17] 斯大勇, 张日俊. 乳酸菌粘附机制研究进展[C/OL]. 第三届第八次全国学术研讨会暨动物微生态企业发展战略论坛论文集, 2006. [2022–04–10] https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=KaAwsYWd1tJahE_Ojb8yxOndXz_g3m2s_Lb5f9ayUrvYyzbBmgNlmF34pNbBoSnuwsBDIcRnHwzUkyBUEg4yur8irkFsMkA3wQbvg-9cWKMVwDzyW5beJBW2CvxaxJ-F8QWBMg1ds10=&uniplatform=NZKPT&language=CHS.
SI D Y, ZHANG R J. Research progress on adhesion mechanism of lactic acid bacteria [C/OL]. The third eighth National Academic Symposium and animal Micro-ecological Enterprise Development Strategy Forum proceedings, 2006. [2022–04–10] https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=KaAwsYWd1tJahE_Ojb8yxOndXz_g3m2s_Lb5f9ayUrvYyzbBmgNlmF34pNbBoSnuwsBDIcRnHwzUkyBUEg4yur8irkFsMkA3wQbvg-9cWKMVwDzyW5beJBW2CvxaxJ-F8QWBMg1ds10=&uniplatform=NZKPT&language=CHS.
- [18] 郭大钧, 奚印慈. 测定鱼类鲜度指标之一——挥发性盐基氮[J]. *中国水产*, 1983(10): 2.
GUO D J, XI Y C. Volatile base nitrogen, one of the index of fish freshness[J]. *China Fisheries*, 1983(10): 2.
- [19] 周蓓蓓, 吴向骏, 张雷, 等. 后熟过程对封鳊鱼风味物质及氨基酸, 脂肪酸组成的影响[J]. *食品科技*, 2021, 46(8): 10.
ZHOU B B, WU X J, ZHANG L, et al. Effects of postripeness process on flavor components, amino acids and fatty acids of sealed bream[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(8): 10.
- [20] 李春萍, 吴佳佳, 李燕, 等. 臭鳊鱼的风味物质及风味活性物质分析[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(7): 7.
LI C P, WU J J, LI Y, et al. Study of volatile compounds and odor-active compounds in stinky mandarin fish[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(7): 7.
- [21] 郝卓莉, 杨萌, 刘亚敏, 等. 不同酶处理对鳊鱼挥发性风味物质影响的主成分分析[J]. *中国调味品*, 2021, 46(8): 3.
HAO Z L, YANG M, LIU Y M, et al. Principal component analysis of the effects of different enzymatic treatments on volatile flavor components of cod [J]. *China Condiment*, 2021, 46(8): 3.
- [22] 林剑军, 赵文红, 刘巧瑜, 等. 脂质水解氧化对干腌鱼制品风味影响的研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(9): 5.
LIN J J, ZHAO W H, LIU Q Y, et al. Research progress on the effect of lipid hydrolysis and oxidation on the flavor of dry-cured fish[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(9): 5.
- [23] 张彩霞, 奚印慈, 柳泽琢也, 等. 电子鼻结合 GC–MS 检测沙拉酱对挪威三文鱼风味的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(17): 42.
ZHANG C X, XI Y C, YANAGISAWA T, et al. Effect of mayonnaise on norwegian salmon flavor by electronic nose combined with GC–MS[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(17): 42.
- [24] JAEA B, EMB A. Potential spoilage of extended shelf-life (ESL) milk by *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis*[J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2021, 3(153): 11–14.
- [25] 朱耀磊, 侯红漫, 张公亮, 等. 蜂房哈夫尼菌群体感应对其生物膜及泳动性的调控作用[J]. *食品科学*, 2020, 41(14): 6.
ZHU Y L, HOU H M, ZHANG G L, et al. Regulation of quorum sensing on biofilm formation and swimming motility in *Hafnia alvei*[J]. *Food Science*, 2020, 41(14): 6.
- [26] 李香澳, 温荣欣, 吕懿超, 等. 基于细菌群体感应淬灭机制的食品保鲜应用研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(1): 8.

- LI X A, WEN R X, LÜ Y C, et al. Progress in food preservation based on bacterial quorum quenching[J]. Food Science, 2022, 43(1): 8.
- [27] 李婷婷, 刘楠, 马堃, 等. 基于群体感应抑制剂的香芹酚与鱼精蛋白复合对冷藏大菱鲆的保鲜作用[J]. 中国食品学报, 2020, 20(10): 10.
- LI T T, LIU N, MA K, et al. The preservation effect of carvacrol combined with protamine on quality of chilled turbot fillets based on the inhibition of quorum sensing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(10): 10.
- [28] SERRA C R. *Bacillus spp.* inhibit *edwardsiella tarda* quorum-sensing and fish infection[J]. Marine Drugs 2021, 19(11): 602.
- [29] 杨振泉, 靳彩娟, 张咪, 等. 高粘附性戊糖片球菌的筛选、标记及其表面疏水与自凝聚性特征[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(9): 9.
- YANG Z Q, JIN C J, ZHANG M, et al. Screening and molecular marking of highly adhesive *Pediococcus pentosaceus* and the characteristics of their surface hydrophobicities and autoaggregation abilities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(9): 9.
- [30] JONES D S, GORMAN S P, MACCAFFERTY D F, et al. The effects of three non-antibiotic, antimicrobial agents on the surface hydrophobicity of certain micro-organisms evaluated by different methods [J]. Journal of Applied Bacteriology, 2010, 71(3): 218-227.

Application of *Bacillus subtilis* in Fish Fillets Preservation

Zhang Wen, Chen Shuyu, You Jiahong, Ni Li*

(Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fujian Center of Excellence for Food Biotechnology, Fuzhou 350108)

Abstract Objective: To provide a new idea for the development of *Bacillus subtilis* bio-preservative based on biofilm forming ability. Methods: The hydrophobic ability, self-agglutination rate, co-agglutination rate and biofilm forming ability of *Bacillus subtilis* were measured. The freshness and volatile flavor of tilapia fillets were measured by *Bacillus subtilis*. Results: The stronger the biofilm forming ability of *Bacillus subtilis*, the best preservation effect of tilapia fish. *Bacillus subtilis* can significantly reduce the content of volatile basic nitrogen in fish meat, so that the TVB-N content of fish was 24.43 mg/100 g on the third day of storage, which was lower than the control group (34.58 mg/100 g). Moreover, the production of alcohol, phenols, esters and acids, such as isoamyl alcohol, phenol, indole, acetic acid and other volatile flavor components in fish was significantly inhibited. At the same time, compared with the biofilm forming ability, the bacteriostatic ability of *Bacillus subtilis* was not correlated with the fresh-keeping ability. The results showed that the autoagglutination and biofilm forming ability of *Bacillus subtilis* were most correlated with the preservation ability of tilapia fillets, and could be used as a rapid index for screening *Bacillus subtilis* for preservation.

Keywords *Bacillus subtilis*; tilapia fillets; biopreservation