

大黄鱼优势腐败菌的致腐能力及对挥发性风味的影响

柴庭庭^{1,2}, 朱星瞳^{1,2}, 柴保臣³, 陈军辉⁴, 陈跃文^{1,2*}

¹浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018

²浙江工商大学东海食品台州研究院 杭州 310018

³深圳市市场监督管理局许可审查中心 广东深圳 518000

⁴浙江兴旺水产集团有限公司 浙江台州 317000

摘要 为评估冷藏大黄鱼优势腐败菌的致腐能力,从贮藏末期的鱼肉中分离出 7 种腐败菌,分析接种 7 种腐败菌的鱼肉样品的菌落总数值(TVC)、总挥发性盐基氮值(TNB-N)和挥发性成分组成。结果表明,接种不同菌株的鱼肉样品间的 TVC 值呈现显著性差异($P<0.05$),其中魏氏假单胞菌、波罗的海希瓦氏菌、麦芽糖肉食杆菌在贮藏末期增长缓慢;接种液化沙雷氏菌、软体气单胞菌、波罗的海希瓦氏菌的 TNB-N 值增幅较快,与初始时相比分别增加了 7.31%,4.92%,7.03%,而对照组仅增加 0.98%。产量因子结果显示:波罗的海希瓦氏菌是真空包装大黄鱼贮藏期间的优势腐败菌,其末期值高达 46.58×10^{-8} mg TVB-N/CFU,其次是液化沙雷氏菌和软体气单胞菌。通过气相色谱-离子迁移谱(GC-IMS)共鉴定出 81 种挥发性风味物质,其中对照组主要产生醚类、醇类、烯类、噻唑类物质。明显不同于对照组,在 7 种腐败菌作用下挥发性成分主要为酯类、醛酮类、烃类以及含氮含硫类化合物,接种不同菌种后鱼块的气味物质种类存在着较大的差异,不同接菌鱼块会产生其特有的风味物质。本研究为后期进一步探究贮藏大黄鱼的腐败机制提供参考。

关键词 大黄鱼; 16S rDNA 测序; 优势腐败菌; 挥发性成分

文章编号 1009-7848(2024)06-0329-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.029

大黄鱼是我国养殖年产量最高的海洋鱼类,也是我国主要的海洋经济鱼类。根据中国渔业统计结果显示,截止至 2021 年,我国大黄鱼总产量为 25.42 万 t, 占我国海洋养殖鱼类总产量的 13.79%^[1]。大黄鱼体内含水量高达 74%,具有高蛋白、低胆固醇的特点,使其在储存、加工和销售过程中很容易被微生物污染,从而发生腐败变质^[2]。

一般来说,鱼类质量的最初恶化主要是由自溶变化引起的,而后期的质量损失和变质取决于微生物活动^[3]。然而,Mansur 等^[4]报道称并非所有微生物都会引起变质,某些微生物不会产生令人不快的变化。值得注意的是,存在一种特定的微生物菌群,其种类和数量在贮藏初期不占明显优势,而有着很强的腐败潜力和很快的生长速度,其比例会随着贮藏时间的延长快速增加,决定着食物腐败过程,这种微生物群被定义为特定腐败菌或

优势腐败菌(SSOs)^[5]。研究表明优势腐败菌与鱼类中不理想的生物化学变化有关,严重影响鱼肉贮藏品质,如蛋白质氧化降解、核苷酸分解代谢、生物胺(BA)积累和挥发性有机化合物(VOC)产生等^[6-7]。Casaburi 等^[8]研究发现许多腐败挥发性化合物(通常包括醇类、醛类、酮类、含氮含硫类化合物和其它分子)是由细菌代谢产生,由于不同菌的代谢方式不一样,使其产生的腐败挥发性成分的种类和含量存有较大的不同^[9]。在腐败过程中显著变化的特定挥发性化合物可以作为鱼类的新鲜度或腐败标志物进行评估^[10-11]。目前有关东海大陈岛养殖的大黄鱼优势腐败菌的相关研究还较少,评估这些腐败菌的腐败潜力,并对其产生的挥发性成分进行区分鉴定,对大黄鱼进行针对性地质量保存和腐败抑制是必要的。

本文以真空包装冷藏腐败的大黄鱼为原料,通过培养基筛选、生理生化指标测定并结合 16S rDNA 测序探究其优势腐败菌种类。通过菌落总数值(TVC)、总挥发性盐基氮(TVB-N)和致腐因子指标测定评估冷藏大黄鱼优势腐败菌的致腐能力,并探究不同腐菌产生的挥发性化合物间的差

收稿日期: 2023-09-15

基金项目: 浙江省教育厅一般项目(Y201942135);浙江省自然科学基金项目(LQ21C200004)

第一作者: 柴庭庭,女,硕士生

通信作者: 陈跃文 E-mail: chenyw@zjgsu.edu.cn

异,以便深入了解大黄鱼冷藏过程中的腐败机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料鱼:大黄鱼购于大陈黄岛围栏养殖基地(浙江台州),以碎冰保鲜的方式置于泡沫箱2 h内运回实验室并速冻于 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

平板计数琼脂(PCA)、大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)、营养琼脂培养基、假单胞菌CFC选择培养基、大豆酪蛋白液体培养基(TSB)、VRBDA-肠道菌琼脂培养基、MRS琼脂培养基、铁琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;2-丁酮、2-戊酮、2-己酮、2-庚酮、2-辛酮、2-壬酮、硫酸铜、硼酸、乙醇、氧化镁、氯化钠(NaCl),上海麦克林生物试剂有限公司。

1.2 设备与仪器

SW-CJ-1D 无菌操作台,浙江苏净净化设备有限公司;BSC-250 恒温恒湿培养箱,上海双旭电子有限公司;LC-11L 均质拍打机,宁波立诚仪器有限公司;P290 真空包装机,东莞青叶包装机械有限公司;K9840 半自动凯氏定氮仪,山东海能技术仪器有限公司;XW-80A 旋涡振荡器,上海驰唐电子有限公司;Flavour Spec 气相色谱仪、Flavour Spec GC-IMS 仪,德国 G.A.S 公司;19091S-433UI-KEY 毛细管色谱柱(HP-5MS UI, $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$),美国 Agilent 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理 大黄鱼流水解冻后先用清水清洗表面黏液,去除鱼鳞、鱼头、鱼尾和内脏部分,再用蒸馏水清洗干净。取大黄鱼背部肌肉切成 $3\text{ cm} \times 3\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 鱼块,用无菌水清洗干净,沥水后用聚乙烯复合袋(20 丝厚,耐 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温)进行真空包装(-0.02 MPa),将包装好的样品放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行 8 d 贮藏。

1.3.2 细菌分离纯化 在超净台中取贮藏末期的大黄鱼肉样 5 g 置于均质袋中,加入无菌生理盐水 45 mL,进行均质拍打 1 min 后取上清液进行 10 倍梯度稀释,选择 3 个合适的稀释度,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 均匀涂布于 5 种不同选择培养基上,培养基选择及培养条件设置如下:CFC、MRS 培养基 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,铁琼脂培养基 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h,VRBGA

培养基、孟加拉红 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。从选择性培养基的平板中挑取形态典型的菌落,接种在 TSA 培养基上进行平板划线分离得到纯化单菌落。挑取单菌落,接种至 TSB 液态培养基中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至对数生长期,加入一定比例甘油进行低温保存。

1.3.3 优势腐败菌鉴定

1.3.3.1 菌体形态与菌落特征观察 在 TSA 培养基选取长势较好的单菌落,进行革兰氏染色、菌体形态和菌落特征观察。

1.3.3.2 传统生理生化试验 根据《常见细菌系统鉴定手册》^[12]与《伯杰细菌鉴定手册》^[13]对菌株进行氧化酶、产硫化氢、葡萄糖发酵、过氧化氢酶、明胶与山梨醇生理生化鉴定。

1.3.3.3 16S rDNA 分析 将筛选出的几种菌株进行送往浙江天科高新技术发展有限公司进行测序,测序结果通过 NCBI 软件进行同源性分析,选取同源性最高的菌株序列用 MEGA 5.1 软件进行多重菌株序列对比并构建系统发育树。

1.3.4 优势腐败菌致腐能力和挥发性风味物质测定

1.3.4.1 菌悬液的制备 将贮藏后期分离纯化的几种冻存菌株进行 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴活化 15 min,先接种于 TSA 培养基中划线培养复壮,再挑取单菌落接种于 TSB 液体培养基 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养至菌悬液浓度达到 10^8 CFU/mL ,用无菌生理盐水离心洗涤($5\text{ }000 \times g, 5\text{ min}$)菌体两次后调整菌体终浓度为 10^6 CFU/mL 备用。

1.3.4.2 无菌鱼肉的制备和接种 参照高天麒等^[14]的方法制备无菌鱼块。大黄鱼的前处理同 1.3.1 节,取用无菌水清洗干净的鱼块,用 75%乙醇擦拭鱼体表面,之后置于超净台中紫外照射 1 h,期间翻面一次。在超净台中将无菌鱼肉浸入不同菌悬液中浸泡 10 s 进行接种,沥水后进行真空包装并置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下冷藏,期间每隔 2 d 取出鱼样进行菌落总数(TVC)、挥发性盐基氮(TVB-N)指标测定,以未接种菌液的处理作为对照组(C组)。

1.3.4.3 TVC 含量的测定 参照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》^[15]中的方法进行测定。

1.3.4.4 TVB-N 值的测定 参照 GB 5009.288-2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的

测定》^[16]中的半微量定氮法进行测定。

1.3.4.5 致腐能力测定 参照赵宏强等^[17]的方法进行腐败能力的定量分析,以产量因子(YTVB-N/CFU)作为评价菌株腐败能力的指标,计算公式(1)如下:

$$Y_{\text{TVB-N/CFU}} = \frac{\text{TVB-N}_s - \text{TVB-N}_0}{N_s - N_0} \quad (1)$$

式中:TVB-N₀、TVB-N_s分别为鱼样贮藏初始点和终点的TVB-N含量,mg/100g;N₀、N_s分别为鱼样贮藏初始点和终点的菌落总数,CFU/g。

1.3.4.6 挥发性风味物质指纹图谱构建 参照郑文栋等^[18]的方法,取贮藏后期的样品鱼肉,准确称取2.0g肉样放入20mL的顶空小瓶中,每个样品作两组平行。将装有样品的小瓶在60℃条件下孵育15min以平衡系统,用85℃的顶空进样针自动顶空进样500μL,以高纯度N₂作为载气在60℃等温条件下以2,10,100mL/min和150mL/min的程序将样品送入气相毛细管柱进行初次分离,进样时间分别为2,8,10,5min。分离后的物质进入离子迁移管发生电离,产生的离子被迁移到达法拉第盘(长9.8cm),在45℃恒温 and 5kV电压下进行二次分离,此时N₂漂移速度为150mL/min,光

谱平均扫描次数为12。以N-酮-C4-C9标准品为外标^[19],通过匹配GC-IMS文库中标准物质的漂移时间和保留指数来鉴定挥发性组分。

1.4 数据处理

采用软件内置的NIST数据库和IMS数据库先对特征风味物质进行定性分析,用Gallery插件程序构建挥发性有机物的指纹图谱。采用SPSS和Origin软件进行数据分析,其中差异显著性检验采用ANOVA单因素方差分析,如无特殊说明实验最少3次重复,结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。

2 结果分析与讨论

2.1 优势腐败菌的分离

腐败菌在不同的选择性培养基上的生长情况如图1所示,孟加拉红培养基未有菌长出。根据菌落生长状况,选取生长良好、形态典型的菌落进行3次以上平板划线分离,共得到7种单菌落。其中VRBDA-肠道菌琼脂培养基2株(E1、E2),铁琼脂培养基1株(S1),假单胞菌CFC选择性培养基3株(P1、P2、P3),MRS琼脂培养基1株(L1)。

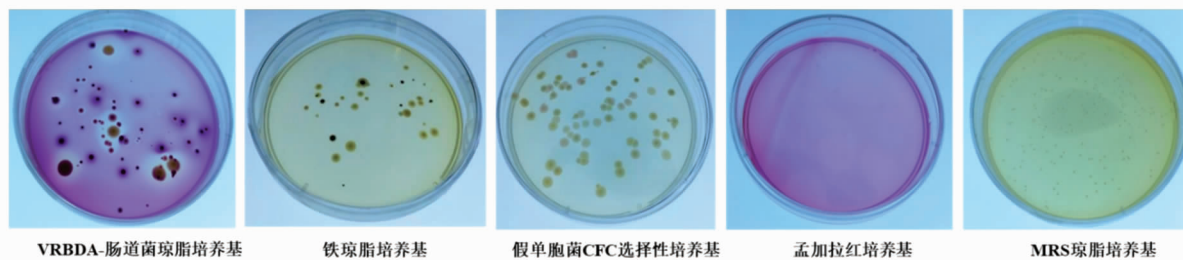


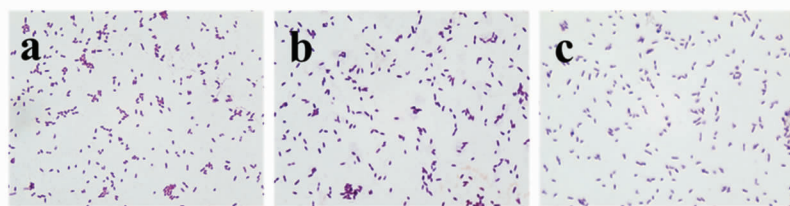
图1 腐败菌在不同选择性培养基上的生长情况

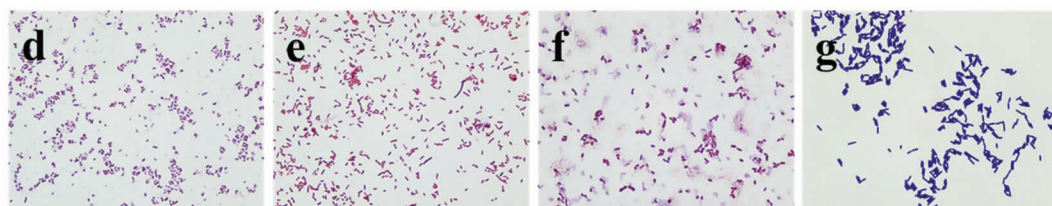
Fig.1 Growth of spoilage bacteria on different selective media

2.2 优势腐败菌的鉴定

2.2.1 细菌形态观察 对分离出的7种菌株进行

革兰氏染色、菌体形态和菌落特征观察,观察结果见图2和表1。





注:a-g依次为E1、E2、P1、P2、P3、S1、L1。

图2 7种菌株的革兰氏染色结果

Fig.2 Gram color results of 7 strains

表1 7种菌株的菌体形态和菌落特征观察结果

Table 1 Observation results of cell morphology and colony characteristics of 7 strains

编号	革兰氏染色	菌体形态	芽孢状态	菌落形状	菌落颜色	是否隆起	菌落边缘	菌落表面	是否有光泽	菌落质地	透明度
E1	阴性	短杆形	无	规则圆形	白色	凸起	整齐	光滑	是	湿润	不透明
E2	阴性	短杆形	无	规则圆形	浅粉色	凸起	不整齐	光滑	是	湿润	不透明
P1	阴性	短杆形	无	规则圆形	乳白	凸平	整齐	光滑	是	湿润	不透明
P2	阴性	短杆形	无	规则圆形	奶黄色	凸起	整齐	光滑	是	湿润	半透明
P3	阴性	杆形	无	规则圆形	粉白色	扁平	整齐	光滑	是	湿润	半透明
S1	阴性	短杆形	无	规则圆形	淡红色	凸起	整齐	光滑	是	湿润	不透明
L1	阳性	杆形	无	规则圆形	奶白色	否	整齐	不光滑	否	湿润	不透明

2.2.2 细菌生理生化特征 对7种菌株进行生理生化试验,鉴定结果如表2所示。根据镜检结果与生理生化特征综合评价,初步鉴定E1、E2为肠杆

菌属,P1、P2、P3为假单胞菌属,S1为希瓦氏菌属,L1为乳酸杆菌属。

表2 7种菌株的生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical identification results of 7 strains

编号	VP试验	硝酸盐还原试验	硫化氢试验	氧化酶试验	山梨醇试验	OF生化管(发酵型)	OF生化管(氧化型)	明胶试验
E1	-	+	-	-	+	+	+	+
E2	-	-	-	+	-	+	+	+
P1	-	-	-	+	-	+	+	+
P2	+	+	-	+	-	+	+	+
P3	-	-	-	+	-	+	+	+
S1	-	-	+	+	-	+	-	+
L1	+	+	-	-	-	+	+	-

注:“+”表示结果阳性;“-”表示结果阴性。

2.2.3 分子鉴定 由图3系统发育树并结合菌株形态及生理生化试验可知,菌株E1与液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)的同源性最高,相似度为99.84%;菌株E2与乡间布丘菌(*Buttiauxella agrestis*)的同源性最高,相似度为99.86%;菌株P1与热氏假单胞菌(*Pseudomonas gessardii*)的同源性最高,相似度为99.71%;菌株P2与软体气单胞菌(*Aeromonas molluscorum*)的同源性最高,相似

度为99.79%;菌株P3与魏氏假单胞菌(*Pseudomonas weihenstephanensis*)的同源性最高,相似度为99.85%;菌株S1与波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica strain*)的同源性最高,相似度为98.83%;菌株L1与麦芽糖肉食杆菌(*Carnobacterium maltaromaticum*)的同源性最高,相似度为98.68%。

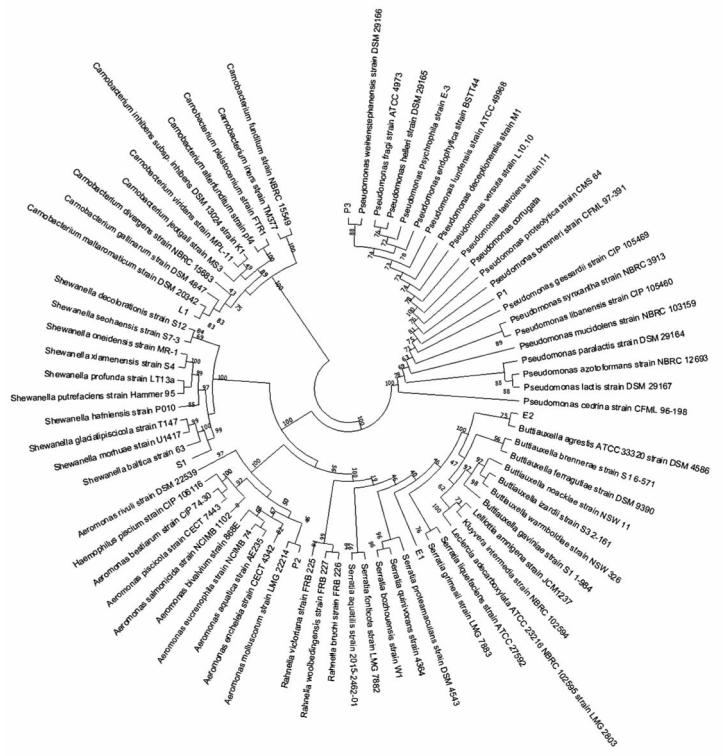


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性的 7 种菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 7 strains based on 16S rRNA sequence homology

2.3 腐败菌的致腐能力和挥发性风味分析

2.3.1 菌落总数 菌落总数是衡量食物腐败程度的重要指标, 接种不同菌株的鱼肉样品在 4℃贮藏期间的菌落总数变化如图 4 所示, 在贮藏初期, 各接种组的菌落总数增长缓慢, 可能是微生物适应新的环境基质需要缓冲时间。随着贮藏时间的延长, 各组均呈现相似的增长趋势, 但不同菌株间呈现显著性差异($P < 0.05$), 这可能与不同菌种的

生长特性与致腐机制有关。在贮藏末期, 出现部分接种样品组的菌落总数如 P3、S1、L1 增长缓慢, 这与营养基质的消耗、代谢产物的累计影响其生长有关^[20]。

2.3.2 TVB-N 值 挥发性盐基氮(TVB-N)与酶活性和微生物繁殖密切相关, 是评价水产品新鲜度的重要指标^[21]。无菌鱼肉分别接种 7 种腐败菌后贮藏期间的 TNB-N 值变化情况如图 5 所示。观

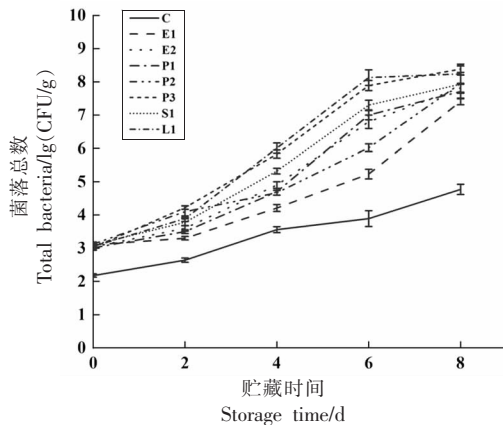


图 4 贮藏期间接种腐败菌的大黄鱼肉的 TVC 值变化
Fig.4 Changes of TVC value of rhuarb meat inoculated with spoilage bacteria during storage

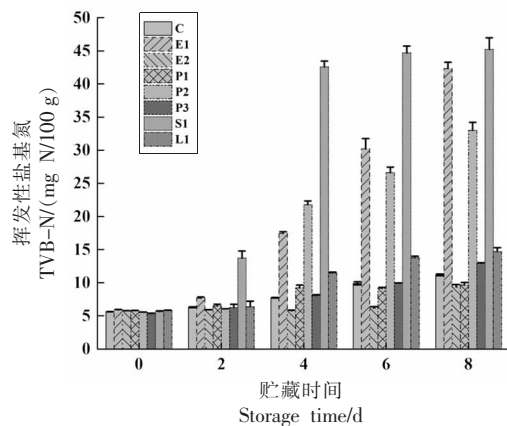


图 5 贮藏期间接种腐败菌的大黄鱼肉的 TVB-N 值变化
Fig.5 Changes of TVB-N value of rhuarb meat inoculated with spoilage bacteria during storage

察到各组间的 TNB-N 的生成量不同。贮藏初期,各样品中的 TNB-N 值变化不大,可能是细菌接种到新的环境基质,还未进行快速生长繁殖,这与上述 TVC 变化结果一致。随着贮藏时间的延长,特别是在贮藏第 4 天,各组间开始出现显著性差异,部分样品组的 TNB-N 值快速增加,表明样品腐败程度加快。在贮藏末期,E1、P2、S1 样品组的 TNB-N 值均超过国标上限 30 mg N/100 g^[22],说明这几种菌株均有较强的致腐能力。特别是 S1 样品组达到 54.22 mg N/100 g,处于完全腐败状态,表明 S1 菌种对鱼肉分解利用较快,产生小分子代谢产物的能力最强。郭全有等^[23]研究发现假单胞菌与希瓦氏菌是大黄鱼冷藏末期的优势腐败菌。

2.3.3 腐败能力分析 各腐败菌的致腐能力可通过计算挥发性盐基氮与菌落总数二者比值得出的产量因子 Y_{TVB-N/CFU} 进行定量表征。由表 3 可知,菌株 S1 的产量因子最高达 46.58×10^{-8} mg TVB-N/CFU,其次是菌株 E1 和 P2,说明波罗的海希瓦氏菌是真空包装大黄鱼贮藏期间的优势腐败菌,其致腐能力强于液化沙雷氏菌和软体气单胞菌,这是由于希瓦氏菌属为兼性厌氧型,其在无氧条件下的代谢活动活跃对鱼肉蛋白的利用较快^[24]。已有研究表明希瓦氏菌是水产中常见的优势腐败菌之一,在真空包装白虾^[25]、气调三文鱼^[26]中均作为优势腐败菌被发现。

表 3 各种腐败菌的 TVB-N 产量因子

Table 3 TVB-N production factors of various spoilage bacteria

编号	初始点菌落/ 10 ³ CFU	观察点菌落数/ 10 ⁸ CFU	初始点 TVB-N 值/ [mg N/(100 g)]	观察点 TVB-N 值/ [mg N/(100 g)]	$Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ / (10 ⁻⁸ mg TVB-N/CFU)
E1	1.32	0.92	5.90	42.32	39.59
E2	1.10	0.42	5.57	9.37	9.05
P1	1.27	0.51	5.77	9.64	7.59
P2	1.03	1.07	5.64	32.99	25.56
P3	1.05	1.02	5.36	12.94	7.43
S1	1.26	0.85	5.63	45.22	46.58
L1	1.13	1.72	5.84	14.71	5.16

2.3.4 接种不同菌株后腐败鱼肉样品的挥发性成分鉴定 表 4 显示对照鱼肉和接种几种菌后的腐败鱼肉样品的挥发性风味组成,包括化合物名称、CAS 号、分子式、保留指数、保留时间和漂移时间。从 GC × IMS 库中共鉴定出 81 个峰,73 个组分(15 种酯类、12 种酮类、9 种醇类、9 种醛类、9 种

烃类、6 种含硫含氮类、4 种酸类、4 种其它化合物及 4 种未知物)。其中 2-甲基-1-丁醇、丙酸、2-戊酮、 α -蒎烯、苯并噻唑、己腈、2-乙基咪唑、4-异丙基甲苯等 8 个化合物由于其二聚体的存在而出现双峰。

表 4 不同接菌鱼块产生的主要挥发性化合物

Table 4 The main volatile compounds produced by different inoculated fish pieces

序号	化合物名称	CAS 号	保留指数	保留时间/s	迁移时间/ms
1	十一烷	C1120214	1 117.4	638.405	1.3436
2	1,2-二甲氧基乙烷	C110714	650.7	172.588	1.28517
3	正戊烷	C110623	698	190.961	1.42703
4	(E)-2-癸烯	C3913813	1 257.1	1 023.314	1.46101
5	异松油烯	C586629	1 089.2	580.727	1.30214
6	蒎烯	C79925	957.6	381.217	1.64169
7	α -蒎烯(单体)	C80568	933.1	354.11	1.33062
8	α -蒎烯(二聚体)	C80568	933.7	354.693	1.19138
9	烯丙基腈	C109751	652.1	173.063	1.24728

(续表 4)

序号	化合物名称	CAS 号	保留指数	保留时间/s	迁移时间/ms
10	4-异丙基甲苯(单体)	C99876	1 030.4	479.049	1.32007
11	4-异丙基甲苯(二聚体)	C99876	1 025.5	471.55	1.16416
12	正戊酸-(Z)-3-己烯酯	C35852461	1 247.7	991.175	1.47953
13	丙位庚内酯	C105215	1 152.3	718.278	1.25915
14	乙酸 2-庚(醇)酯	C112061	1 117.5	638.739	1.44483
15	乙酸己酯	C142927	1 009.4	447.964	1.36025
16	5-甲基-2(3H)-咪喃酮	C108292	957.3	380.925	1.41653
17	3-甲基-1-丁醇乙酸酯	C123922	887.1	309.514	1.30988
18	丙烯酸-2-羟乙基酯	C97643	818.6	256.324	1.55489
19	乙酸丁酯	C123864	821.7	258.422	1.20107
20	甲基丙烯酸甲酯	C80626	714	197.966	1.38962
21	乙酸乙酯	C141786	595.3	154.935	1.33359
22	3-甲基-丁酸甲酯	C556241	776.1	229.753	1.53391
23	甲酸乙酯	C109944	604.9	157.709	1.20654
24	丁酸异丁酯	C539902	958.3	382.124	1.35991
25	3-巯基己基乙酸酯	C136954206	1 247.9	991.914	2.01336
26	(3-甲基丁氧基)乙酸丙酯	C67634008	1 243.8	978.244	1.94078
27	4-异丙基苯甲醛	C122032	1 243.6	977.713	1.33147
28	(E,E)-2,4-辛二烯醛	C30361285	1 117.5	638.739	1.79381
29	壬醛	C124196	1 103.9	610.104	1.47615
30	(E)-2-庚烯醛	C18829555	956.3	379.759	1.25063
31	糠醛	C98011	834.3	267.312	1.33949
32	2-甲基丁醛	C96173	649.2	172.036	1.40667
33	2-甲基丙醛	C78853	565	146.772	1.20654
34	(E,Z)-2,6-壬二烯醛	C28069729	1 160.4	738.18	1.17414
35	正戊醛	C110623	716	198.872	1.42637
36	2-乙酰基噻唑	C24295032	1 020.1	463.412	1.4432
37	4-甲基噻唑	C693958	819.1	256.623	1.35865
38	噻唑	C288471	737.5	209.117	1.26101
39	苯并噻唑(单体)	C95169	1 215.9	890.376	1.17135
40	苯并噻唑(二聚体)	C95169	1 216	890.687	1.59328
41	四氢噻吩	C110010	819.2	256.716	1.31344
42	2,3,5-三甲基吡嗪	C14667551	1 008.8	447.133	1.62495
43	正己酸	C142621	982.6	411.822	1.65354
44	正戊酸	C109524	886.7	309.223	1.21212
45	2-甲基丙酸	C79312	779.9	231.949	1.40466
46	丙酸(单体)	C79094	693.6	189.093	1.26541
47	丙酸(二聚体)	C79094	712.4	197.249	1.25551
48	3-辛醇	C589980	983.8	413.279	1.40765
49	2-甲基-1-丁醇(单体)	C137326	742.6	211.652	1.20848
50	2-甲基-1-丁醇(二聚体)	C137326	737.6	209.128	1.22809
51	3-甲基-3-丁烯-1-醇	C763326	734.7	207.703	1.44841
52	2-甲基-1-丙醇	C78831	647.6	171.488	1.36457
53	1-戊酸-3-醇	C616251	682.9	184.714	1.35391
54	1-丙醇	C71238	537.5	140.141	1.24403
55	2-丙醇	C67630	516.7	135.587	1.23693
56	4-松油醇	C562743	1 181.2	791.907	1.22745
57	β -苯乙醇	C60128	1 119.8	643.58	1.5083

(续表 4)

序号	化合物名称	CAS 号	保留指数	保留时间/s	迁移时间/ms
58	2-环己烯酮	C930687	932	352.944	1.39283
59	5-甲基-2(3H)-咪喃酮	C591128	884.1	306.891	1.37802
60	环戊酮	C120923	785.7	235.346	1.33027
61	3-羟基-2-丁酮	C513860	723.4	202.317	1.332
62	2-戊酮(单体)	C107879	682.3	184.458	1.3917
63	2-戊酮(二聚体)	C107879	693.7	189.141	1.36799
64	3-戊酮	C96220	693.7	189.141	1.34409
65	2,3-戊二酮	C600146	694.3	189.415	1.22917
66	2-丁酮	C78933	585.6	152.203	1.25159
67	2-环己烯酮	C930687	934.6	355.629	1.08624
68	3-辛酮	C106683	983.4	412.744	1.33253
69	2-甲基-3-羟基-4-吡喃酮	C118718	1 100.9	604.061	1.15276
70	2,3-戊二酮	C600146	710.6	196.435	1.22122
71	2,5-二甲基咪喃	C625865	710.8	196.515	1.35288
72	2-乙基咪喃(单体)	C3208160	736.8	208.754	1.30861
73	2-乙基咪喃(二聚体)	C3208160	718.9	200.218	1.28447
74	己腈(单体)	C628739	885.4	308.057	1.55578
75	己腈(二聚体)	C628739	882.8	305.725	1.28026
76	二甲基酰胺	C68122	777	230.251	1.24805
77	邻苯二甲醚	C91167	1 194.3	827.853	1.57688
78	/	*	734.9	207.8	1.38586
79	/	*	360	110.832	1.56732
80	/	*	482.8	128.902	1.24314
81	/	*	390.9	114.617	1.37359

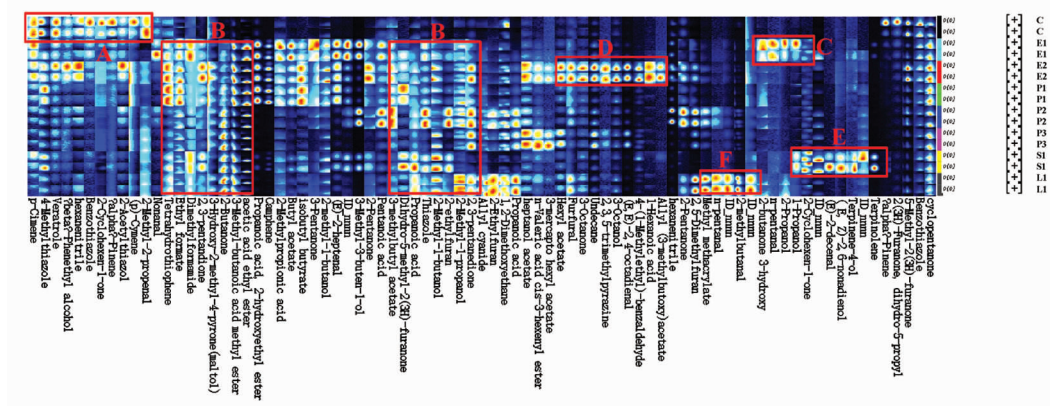


图 6 不同接菌鱼块的特征风味指纹图谱

Fig.6 Characteristic flavor fingerprint of different inoculated fish pieces

2.3.5 接种不同菌株后腐败鱼肉样品的特征风味物质指纹图谱分析 如图 6 所示, 将大黄鱼肉样的挥发性风味物质图谱分成 A~F 6 个区域。A 区域中为对照鱼肉(C 组)中含量较高的特征挥发性成分, 其明显不同于与接种菌株后腐败鱼肉样品的风味。主要是 4-异丙基甲苯、邻苯二甲醚、β-苯乙醇、2-环己烯酮、α-蒎烯、丙位庚内酯、4-甲基

噻唑、2-乙酰基噻唑、苯并噻唑等物质。其中噻唑类物质是含硫含氮类杂环化合物, 通常具有极低的气味阈值, 是腐臭味的主要来源。

B 区域为接种几种菌后的腐败鱼肉样品(E1-L1)共有的挥发性物质, 主要是甲酸乙酯、3-甲基-丁酸甲酯、乙酸乙酯、3-甲基-1-丁醇乙酸酯、γ-戊内酯、2,3-戊二酮、2-甲基-3-羟基-4-吡喃酮、

2-丁酮、正戊酸、丙酸、2-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丙醇、噻唑、四氢噻吩、二甲基酰胺、2-乙基呋喃。其中四氢噻吩、甲酸乙酯和 γ -戊内酯在P1组中含量最高,四氢噻吩具有强烈的不愉快气味,产生的臭味稳定、不易散发,是P1组的特征腐败气味。正戊酸、3-甲基-1-丁醇乙酸酯、噻唑、2-乙基呋喃和2,3-戊二酮在P2组中含量最高,噻唑具有腐败臭味,是P2组明显特征气味。接种P3菌后的腐败鱼肉样品的挥发性物质主要是乙酸2-庚(醇)酯、正戊酸-(Z)-3-己烯酯、3-巯基己基乙酸酯和乙酸己酯。Edwards等^[27]发现单菌接种肉类更易产生酯类化合物,且其含量占主导地位,而在自然腐败条件下产生的酯类相对较少。7种优势菌接种鱼块的挥发性成分中,酯类的种类最多,含量较高,但多数情况下其感官偏积极,对鱼肉贮藏后期的不良气味贡献度不大^[28]。

C区域内的挥发性化合物主要是3-羟基-2-丁酮、正戊醛、2-丙醇、1-丙醇,在E1组中较高,而在其他组中很少或几乎没有。其中3-羟基-2-丁酮具有辛辣和尖刺味^[29],其可由微生物分解糖原代谢产生^[30],是E1组的明显特征气味。D区域内的特征挥发性成分主要为十一烷、2,3,5-三甲基吡嗪、3-辛酮、(E,E)-2,4-辛二烯醛、正己酸、(3-甲基丁氧基)乙酸丙酯,是E2组的特征风味物质,(E,E)-2,4-辛二烯醛会产生不愉悦的青草味和脂肪味,主要由不饱和脂肪酸氧化生成^[31]。E区域内的挥发性化合物是S1组特有的风味物质,主要是2-环己烯酮、(E)-2-癸烯、(E,Z)-2,6-壬二烯醛、异松油烯和4-松油醇。F区域内的特征挥发性成分主要为2,5-二甲基呋喃、甲基丙烯酸甲酯、正戊烷、2-甲基丁醛,是L1组的特有风味物质,其中2-甲基丁醛呈强烈窒息性气味,主要来源于氨基酸如亮氨酸和异亮氨酸的生物降解^[32],可被视为鱼类的腐败标志物^[33]。醛类物质可以由脂质氧化和氨基酸的转氨作用产生^[34],大多数醛类物质的风味阈值较低,在低浓度时具有特征脂肪香气,但是当浓度高于某一临界值时,却会产生类似腐臭、酸败或其它异味^[35]。

综上,指纹图谱特征区域的挥发性化合物种类和含量的直观可视变化情况^[36]反映了接种不同菌种后鱼块的气味物质种类存在着较大的差异,

E1和E2接菌鱼块产生的挥发性风味物质的种类和含量最多,P3和S1较少,而挥发性有机化合物对鱼肉整体风味的影响取决于物质的组成、阈值及含量^[37]。不同接菌鱼块会产生其特有的风味物质,可将这些特征挥发物与菌种建立联系来判定大黄鱼贮藏过程中的染菌情况,这为后期建立靶向抑菌,延长鱼肉贮藏时间具有重要意义。

3 结论

对贮藏末期的真空包装大黄鱼通过鉴别培养基的筛选、菌落形态特征观察、基础生理生化指标测定及16S rDNA序列同源性测定分出7种腐败菌。对分离出的7种腐败菌的致腐能力进行分析,发现各菌株均呈现相似的增长趋势,但不同菌株间呈现显著性差异,P3、S1、L1在贮藏末期长缓慢;E1、P2、S1菌株的TNB-N增幅较快;产量因子结果显示致腐能力最强为菌株S1,其次是菌株E1和P2,即希瓦氏菌属是真空包装大黄鱼贮藏期间的优势腐败菌属,再者是液化沙雷氏菌属和软体气单胞菌属。接着观察了接菌鱼肉样品腐败后产生的风味物质,发现不同接菌鱼块会产生其特有的风味物质,而这些特征挥发物对鱼肉腐败的贡献度不同,为了解每种细菌的腐败机制,需要更详细的研究来确定它们间的相互作用,此研究为后期初步评估大黄鱼优势腐败菌的作用机制提供参考。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国农业农村部. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. China fisheries statistical yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2022.
- [2] ZONG L, GAO H, CHEN C W, et al. Effects of starch/polyvinyl alcohol active film containing cinnamaldehyde on the quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) proteins during frozen storage[J]. Food Chemistry, 2022, 389: 133065.
- [3] SHAO L T, CHEN S S, WANG H D, et al. Advances in understanding the predominance, pheno-

- types, and mechanisms of bacteria related to meat spoilage[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 118: 822–832.
- [4] MANSUR A R, 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*, 2019, 77: 166–172.
- [5] GRAM L, RAVN L, RASCH M, et al. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(1/2): 79–97.
- [6] YU D W, JING D T, YANG F, et al. The factors influencing the flavor characteristics of frozen obscure pufferfish (*Takifugu obscurus*) during storage: Ice crystals, endogenous proteolysis and oxidation[J]. *International Journal of Refrigeration*, 2021, 122: 147–155.
- [7] HUANG J Y, ZHOU Y Q, CHEN M Y, et al. Evaluation of negative behaviors for single specific spoilage microorganism on little yellow croaker under modified atmosphere packaging: Biochemical properties characterization and spoilage-related volatiles identification[J]. *LWT*, 2021, 140: 110741.
- [8] CASABURI A, PIOMBINO P, NYCHAS G J, et al. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage[J]. *Food Microbiology*, 2015, 45: 83–102.
- [9] 洪兆鹏, 邹小波, 石吉勇, 等. 接种不同优势腐败菌的冷藏猪肉中挥发性物质的研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(6): 111–115.
- HONG Z P, ZOU X B, SHI J Y, et al. Study on detection of volatile compounds of chilled pork inoculated by different dominating spoilage bacteria[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(6): 111–115.
- [10] JIA S L, LI Y, ZHUANG S, et al. Biochemical changes induced by dominant bacteria in chill-stored silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and GC-IMS identification of volatile organic compounds[J]. *Food Microbiology*, 2019, 84: 103248.
- [11] WIERDA R L, FLETCHER G, XU L, et al. Analysis of volatile compounds as spoilage indicators in fresh King salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during storage using SPME-GC-MS[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(22): 8480–8490.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 66–370.
- DONG X Z, CAI M Y. Handbook for identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 66–370.
- [13] 希坎南 R E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 274–533.
- XI K N R E. Berger's Handbook for bacterial identification[M]. Beijing: Science Press, 1984: 274–533.
- [14] 高天麒, 汪超, 汪兰, 等. 冷藏鲶鱼中腐败菌的分离鉴定及腐败能力测定[J]. *肉类研究*, 2023, 37(3): 1–6.
- GAO T Q, WANG C, WANG L, et al. Isolation identification and spoilage ability of dominant spoilage bacteria from channel catfish[J]. *Meat Research*, 2023, 37(3): 1–6.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3–5.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration December. National food safety standards – microbiological examination of food – determination of total colony count: GB 4789.2–2016[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2016: 3–5.
- [16] 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.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standards – determination of volatile base nitrogen in foods: GB 5009.228–2016[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2016: 3.
- [17] 赵宏强, 蓝蔚青, 孙晓红, 等. 冷藏鲈鱼片优势腐败菌的分离鉴定及致腐能力分析[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(8): 208–215.
- ZHAO H Q, LAN W Q, SUN X H, et al. Isolation and identification of dominant spoilage bacteria in lateolabrax japonicus fillets during chilled storage and their spoilage capability[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(8): 208–215.

- [18] 郑文栋, 楼倚洋, 安玥琦, 等. 臭氧漂洗及冷冻贮藏对鲢鱼糜蛋白氧化和风味的影响[J]. 华中农业大学学报(自然科学版), 2023, 42(1): 154-162.
ZHENG W D, LOU Y Y, AN Y Q, et al. The effect of ozone rinsing and frozen storage on the oxidation and flavor of silver carp mince protein[J]. Journal of Huazhong Agricultural University (Natural Science Edition), 2023, 42(1): 154-162.
- [19] JIN J Y, ZHAO M Y, ZHANG N, et al. Stable isotope signatures versus gas chromatography-ion mobility spectrometry to determine the geographical origin of Fujian Oolong tea (*Camellia sinensis*) samples[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246: 955-964.
- [20] 张璟晶, 唐劲松, 管远红, 等. 冰鲜银鲳鱼优势腐败菌的分离鉴定及其致腐能力分析[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 75-78, 101.
ZHANG J J, TANG J S, GUAN Y H, et al. Isolation, identification and spoilage capability of dominant spoilage bacteria in iced pomfret[J]. Food and Machinery, 2014, 30(6): 75-78, 101.
- [21] LI Y, HUANG J Q, YUAN C H, et al. Developing a new spoilage potential algorithm and identifying spoilage volatiles in small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) under vacuum packaging condition [J]. LWT, 2019, 106: 209-217.
- [22] 刘明爽, 李婷婷, 马艳, 等. 真空包装鲈鱼片在冷藏与微冻贮藏过程中的新鲜度评价[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 210-213.
LIU M S, LI T T, MA Y, et al. Freshness evaluation of vacuum packaged perch fillets during refrigeration and partial freezing[J]. Food Science, 2016, 37(2): 210-213.
- [23] 郭全友, 杨宪时, 许钟, 等. 冷藏养殖大黄鱼细菌相组成和优势腐败菌鉴定[J]. 水产学报, 2006(6): 824-830.
GUO Q Y, YANG X S, XU Z, et al. Bacterial flora identification of dominated spoilage organisms on cultured *Pseudosciaena crocea* at chilled storage [J]. Journal of Fisheries of China, 2006(6): 824-830.
- [24] LAURSEN B G, BAY L, CLEENWERCK I, et al. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2005, 28(2): 151-164.
- [25] WANG L, LIU Z Y, DONG S Y, et al. Effects of vacuum and modified atmosphere packaging on microbial flora and shelf-life of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during controlled freezing-point storage at -0.8 °C[J]. Food Science and Technology Research, 2014, 20(6): 1141-1152.
- [26] POWELL S M, TAMPLIN M L. Microbial communities on Australian modified atmosphere packaged Atlantic salmon[J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 226-232.
- [27] EDWARDS R A, DAINTY R H, HIBBARD C M. Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strains during growth on beef stored in air at chill temperatures[J]. Journal of Applied Microbiology, 1987, 62(5): 403-412.
- [28] 黄佳奇, 葛雨璐, 向迎春, 等. 冷藏小黄鱼优势腐败菌致腐能力评价及其对挥发性成分的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(16): 230-235, 242.
HUANG J Q, GE Y J, XIANG Y C, et al. Evaluation of spoilage potential of specific spoilage organisms of refrigerated little yellow croaker and its influence on volatile compound [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(16): 230-235, 242.
- [29] 杜颖琦, 范丽莉, 欧昌荣, 等. 鲭鱼发酵过程中挥发性风味成分与细菌种群演替的相关性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(20): 152-162.
DU Y Q, FAN L L, OU C R, et al. Correlation between volatile flavor components and bacterial population succession during mackerel fermentation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(20): 152-162.
- [30] JOFFRAUD J J, LEROI F, ROY C, et al. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 66(3): 175-184.
- [31] JIANG H, ZHANG M T, YE J J, et al. HS-SPME-GC-MS and OAV analyses of characteristic volatile flavour compounds in salt-baked drumstick [J]. LWT, 2022, 170: 114041.
- [32] GIRI A, OSAKO K, OHSHIMA T. Identification and characterisation of headspace volatiles of fish miso, a Japanese fish meat based fermented paste, with special emphasis on effect of fish species and

- meat washing[J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 621–631.
- [33] LEDUC F, KRZEWINSKI F, LE FUR B, et al. Differentiation of fresh and frozen/thawed fish, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*), using volatile compounds by SPME/GC/MS[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(12): 2560–2568.
- [34] MORETTI V M, MADONIA G, DIAFERIA C, et al. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions[J]. Meat Science, 2004, 66(4): 845–854.
- [35] 王芳, 杨晓玲, 席斌, 等. 滩羊不同部位肌肉脂肪酸分析及特征风味指纹图谱的构建[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 191–198.
- WANG F, YANG X L, XI B, et al. Analysis of fatty acid construction of characteristic flavor fingerprinting of muscles from different anatomical locations of Tan sheep[J]. Food Science, 2021, 42(24): 191–198.
- [36] 朱联旭, 李崇勇, 孟怡璠, 等. 基于气相色谱-离子迁移谱分析镇巴腊肉贮藏过程中挥发性风味成分变化[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(15): 4832–4839.
- ZHU L X, LI C Y, MENG Y F, et al. Analysis of the volatile flavor compound changes of Zhenba bacon during storage based on gas chromatography-ion mobility spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(15): 4832–4839.
- [37] WANG L, LIU T, LIU L, et al. Impacts of chitosan nanoemulsions with thymol or thyme essential oil on volatile compounds and microbial diversity of refrigerated pork meat[J]. Meat Science, 2022, 185: 108706.

The Spoilage Ability of Dominant Spoilage Bacteria in Large Yellow Croaker and Their Impact on Volatile Flavor

Chai Tingting^{1,2}, Zhu Xingtong^{1,2}, Chai Baochen³, Chen Junhui⁴, Chen Yuewen^{1,2*}

¹College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018

²Donghai Food Research Institute (Taizhou), Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018

³License Review Center of Shenzhen Municipal Administration for Market Regulation, Shenzhen 518000, Guangdong

⁴Zhejiang Xingwang Aquatic Products Group Co., Ltd., Taizhou 317000, Zhejiang)

Abstract To evaluate the putrefactive potential of dominant putrefactive bacteria in refrigerated large yellow croaker, seven putrefactive bacteria were isolated from fish meat at the end of storage, and analyzed the total bacterial count (TVC), total volatile base nitrogen value (TNB-N) and volatile component composition of fish meat samples inoculated with 7 types of spoilage bacteria. The results showed that there was a significant difference in the TVC values among the fish samples inoculated with different strains ($P < 0.05$). Among them, *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Shewanella baltica* strain and *Carnobacterium maltaromaticum* grew slowly at the end of storage; The TNB-N values increased rapidly after inoculation with *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas molluscorum* and *Shewanella baltica*, with increases of 7.31%, 4.92%, and 7.03% compared to the initial stage, respectively, while the control group only increased by 0.98%; The yield factor results showed that *Shewanella baltica* was the dominant spoilage bacterium during the storage period of vacuum packaged large yellow croaker, with a final value of 46.58×10^{-8} mg TVB-N/CFU, followed by *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas molluscorum*; A total of 81 volatile flavor compounds were identified by gas chromatography-ion migration spectrometry (GC-IMS), with the control group mainly producing ether, alcohol, ene, and thiazole compounds. Obviously different from the control group, The volatile components under the action of 7 types of spoilage bacteria were mainly esters, aldehydes and ketones, hydrocarbons, and nitrogen and sulfur compounds. After inoculation with different bacterial strains, the types of odor compounds in fish pieces showed significant differences and different inoculated fish pieces produced their unique flavor compounds. This study provides a reference for further exploring the spoilage mechanism of stored yellow croaker in the future.

Keywords large yellow croaker; 16s rDNA sequencing; specific spoilage organisms; volatile flavor components