

## 壳聚糖对带鱼冷藏期间微生物多样性的影响研究

蓝蔚青, 谢晶\*, 李健, 吴嘉慧

上海海洋大学食品学院 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

**摘要:** 本文研究了壳聚糖对冷藏( $4 \pm 1$  °C)带鱼贮藏期间微生物多样性的影响, 分别选取0、2、4、6、8、10、12 d, 以感官评分、pH值、菌落总数为测定指标, 同时进行微生物分离纯化, 提取细菌DNA与PCR扩增, 将扩增产物测序。结果表明, 10.0 g/L的壳聚糖溶液能明显延缓带鱼鲜度下降, 抑制细菌增长, 冷藏货架期较对照组延长了4~5 d。对照组样品在腐败末期(10 d)的菌相组成是: 草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*) (29.5%), 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) (33.4%), 腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*) (32.0%), 松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*) (5.1%); 处理组(12 d)有: 草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*) (38.2%), 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) (30.1%), 腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*) (29.0%), 热死环丝菌(*Brochothrix thermosphacta*) (2.7%)。经壳聚糖处理后的带鱼样品, 在其贮藏期间, 使腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*), 松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)与嗜冷杆菌(*Psychrobacter spp.*)的生长受到抑制。草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)与腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)为优势腐败菌。

关键词: 带鱼; 壳聚糖; 菌相; 冷藏

中图分类号: S983

文献标识码: A

Effects of Chitosan on Microbial Diversity of Cutlassfish (*Trichiurus haumela*) During Chilled Storage

LAN Wei-qing, XIE Jing\*, LI Jian, WU Jia-hui

College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing and Preservation, Shanghai 201306, China

**Abstract:** In this paper, the microbial diversity changes of cutlassfish (*Trichiurus haumela*) coated with chitosan during chilled storage ( $4 \pm 1$  °C) were investigated. The sensory evaluation, pH value and total viable counts (TVC) were measured in day 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12. The strains of samples from different days were separated, purified, DNA extraction and PCR amplification. The results showed that 10.0 g/L of chitosan significantly increased the fresh duration of cutlassfish and inhibited the growth of microorganism. The shelf-life of cutlassfish was prolonged for almost 4-5 days. At the end of spoilage period, the main changes of bacteria in controlled (10 d) were *Pseudomonas fragi* 29.5%, *Pseudomonas fluorescens* 33.4%, *Shewanella putrefaciens* 32.0%, *Staphylococcus sciuri* 5.1%, and the bacteria of samples (12 d) with chitosan were *Pseudomonas fragi* 38.2%, *Pseudomonas fluorescens* 30.1%, *Shewanella putrefaciens* 29.0%, *Brochothrix thermosphacta* 2.7%. Chitosan can inhibit the growth of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri* and *Psychrobacter spp.*, the dominant species were *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens* and *Shewanella putrefaciens*.

**Key words:** *Trichiurus haumela*; chitosan; microorganism flora; chilled storage

带鱼又名刀鱼、牙带鱼, 为鱼纲鲈形目带鱼科鱼类, 是东海海域最主要的渔获水产品对象之一, 其产量多年来保持在我国海洋捕捞鱼类产量的前五位, 在海洋渔业中占有重要地位。带鱼在贮藏与流通过

程中往往由于微生物与生化等多种因素的影响, 导致鲜度下降。因此, 采用合理的保鲜处理方式, 延缓带鱼的腐败变质, 延长产品的货架期具有重要意义。

近年来, 国内外学者对水产食品中腐败微生物开展了较为深入的研究, 目前已明确在多数情况下, 水产食品中仅有部分微生物参与腐败过程。水产品贮藏期间细菌种群会不断变化, 某些细菌适应此

收稿日期: 2013-10-09 接受日期: 2014-02-17

基金项目: “十二五”国家支撑计划项目(2012BAD38B09); 上海市科技兴农项目(2013, 3-4); 上海海洋大学科技发展专项基金项目(A2-0209-14-200061)

\* 通讯作者 E-mail: jxie@shou.edu.cn

贮藏条件逐渐占据优势地位,并产生腐败臭味和异味等代谢产物,这些细菌就是该产品的特定腐败菌(Specific Spoilage Organism, SSO)<sup>[1]</sup>。由于各种细菌的腐败能力及产生的代谢产物不同,造成对产品不同的腐败作用,因此研究其腐败过程需要掌握细菌数量与种类的变化。对此,国内也有少数相关报道。崔正翠<sup>[2]</sup>等采用定性与定量相结合的方式研究了大菱鲆在不同温度冷藏过程中的微生物多样性;刘寿春<sup>[3]</sup>等人对刚捕获淡水养殖罗非鱼体表不同部位和养殖池水的细菌组成进行分析。

壳聚糖(Chitosan, CS)是由大部分氨基葡萄糖和少量 N-乙酰氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接起来的支链多糖,是甲壳素经化学处理脱乙酰基后的产物,具有良好的光谱抗菌性和成膜性,其可食用且易于生物降解、不污染环境、高效、无毒、无害、无味、安全可靠<sup>[4]</sup>。课题组通过前一阶段不同浓度的壳聚糖溶液对带鱼保鲜效果的实验中,确定了 10.0 g/L 为最适的壳聚糖使用浓度。本文在此基础上再次分析了该浓度的壳聚糖溶液对鲜带鱼冷藏条件下指标变化的影响,同时进一步分离出主要腐败微生物,从而实现带鱼的货架期延长,促进鱼类加工、运输、贮藏等物流技术的发展,提升产品质量的最终目的。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

鲜带鱼(*Trichiurus haumela*):3 月购于上海市浦东新区芦潮港码头水产市场,条重 0.25 ~ 0.50 kg,捕获后立即在冰藏条件下 30 min 内运至实验室进行实验。

### 1.2 实验药品

革兰氏染液、芽孢染色液、微生物生理生化微量鉴定管(杭州天和生物制剂有限公司);NaCl、胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)(上海市疾病预防控制中心);dNTP Mixture、10 × PCR Buffer、TaqDNA 酶(日本 TaKaRa BIO 株式会社);引物 27f、1492r、TAE 电泳缓冲液(50 ×

TAE)、Biospin 细菌基因组 DNA 提取盒[生工生物工程(上海)有限公司];DNA 纯化试剂盒(北京天根生物工程有限公司);溴化乙锭染色液(EB)、6 × Loading Buffer、Marker:λDNA /Hind III、100bp DNA Ladder、琼脂糖等。

### 1.3 主要仪器与设备

THZ-82A 型气浴恒温振荡器(江苏金坛市环宇科学仪器厂);隔水式恒温培养箱、DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱、DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司);SANYO MLS-3750 高压灭菌锅(MADE IN JAPAN);LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);VS-1300L-U 型标准超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);BagMixer VW 拍打式均质器(Made in France);MiniSpan Plue 微型高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司);TC-24/H(b)型基因扩增仪(杭州博日科技有限公司);Disrupter genie(DNA 混匀器);UVP BioImaging Systems(凝胶成像系统);电子显微镜 ZEISS Scope A1. AXIO[蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司]等。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 原料处理

壳聚糖用 1.0% 乙酸溶解,使其最终浓度为 10.0 g/L,提前 30 min 配好后即放入冰箱中备用。将带鱼洗净,经去头、去尾、去内脏的“三去”处理,无菌操作切成 6 ~ 7 cm 长的鱼段,随机分组,作保鲜或对照用。处理时,将壳聚糖保鲜液涂膜于样品表面,稍作沥干后放入 PE 保鲜袋,在冰箱中贮藏,以无菌蒸馏水处理的带鱼段作为对照组。

#### 1.4.2 感官评定

参考 SC-T 3102-1984《鲜带鱼》标准<sup>[5]</sup>与 GB/T18108-2008<sup>[6]</sup>的方法,由受专门培训 7 人组成的感官评定小组,分别从色泽、气味、组织形态与组织弹性等对带鱼的感官品质进行综合评分,最后取其综合评分值。

表 1 带鱼感官评定表

Table 1 Sensory evaluation of *Trichiurus haumela*

指标内容 Assessment contents	好(10分) Best (10)	较好(8分) Better (8)	一般(6分) Normal (6)	较差(4分) Worse (4)	差(2分) Worst (2)
色泽 Color	色泽正常,肌肉切面富有光泽	色泽正常肌肉切面有光泽	色泽稍暗淡,肌肉切面稍有光泽	色泽较暗淡,肌肉切面无光泽	色泽暗淡,肌肉切面无光泽

气味 Odor	固有香味浓郁	固有香味较浓郁	固有香味清淡,略带异味	固有香味消失,有腥臭味或氨臭味	有强烈腥臭味或氨味
组织形态 Tissue morphology	肌肉组织致密完整,纹理很清晰	肌肉组织紧密,纹理较清晰	肌肉组织不紧密,但不松散	肌肉组织不紧密,局部松散	肌肉组织不紧密,松散
组织弹性 Tissue elasticity	坚实富有弹性,手指压后凹陷立即消失	坚实有弹性,手指压后凹陷较快消失	较有弹性,手指压后凹陷消失较慢	稍有弹性,手指压后凹陷消失很慢	无弹性,手指压后凹陷不消失

#### 1.4.3 pH 值

取绞碎的鱼肉 10.00 g 于烧杯中,加入新鲜煮沸后已冷却的蒸馏水,定容至 100 mL,搅拌均匀,静置 30 min 后过滤,滤液用精密数显酸度计进行测定。

#### 1.4.4 菌落总数

采用有氧平板菌落计数法,按 GBT 4789.2-2010 国标<sup>[7]</sup>规定,分别将对照组与壳聚糖处理组的样品进行处理。选 3 个合适的稀释度,每个稀释度 3 组平行。

#### 1.4.5 菌株分离鉴定

通过纯培养方法得到多个形态各异单菌落,根据菌落外观与菌体镜检形态对细菌作初步分类,计算同一种的菌落个数。

##### 1.4.5.1 菌落与细胞形态观察

对分离纯化得到的单菌落分别从菌落大小、形态、颜色、质地、菌落隆起度、边缘结构、表面形态、光泽度与透明度等方面进行形态观察与菌落计数,同时进行革兰氏与芽孢染色,观察细菌形状与胞间排列方式等,并予以初步分类,计算不同贮藏时间与处理方式的同类菌落数量。挑选含 30~300 个菌落的计数平板,随机挑取包含不同种类的 50 个典型单菌落,采用平板划线法分离纯化 3 次,得到的纯菌株保存于试管的斜面培养基上,以备鉴定。

##### 1.4.5.2 分类保存

根据菌落与形态学特征,将筛选出的纯菌株作标记,进行分组归类,再将各组菌株纯培养,重复比较。对菌落特征和形态学特征有差异的菌株重新标记分类,再进行纯培养,重复以上步骤 3 次,分离得到纯菌株,每一种纯菌株作 2 组平行,记录细菌的形态特征。

#### 1.4.6 单细菌 DNA 提取与纯化

将反复分离纯化与初步鉴定得到的纯菌株接种到 TSB 中。置于 37 °C,170 rpm 的摇床中培养 17 h,将处于对数生长期的菌液取 10 mL,4 °C,10000 rpm 离心 15 min,弃上清,沉淀物在-20 °C 保存,用于

DNA 提取。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取纯菌株 DNA,同时增加溶菌酶破壁,提取的 DNA 分别编号,存放于-20 °C 冰箱。

#### 1.4.7 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

以提取的细菌基因组 DNA 为模板,选用细菌通用引物,正向引物为 27f,反向引物为 1492r。

正向引物 27f: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'

反向引物 1492r: 5'-CTACGGCTACCTTGT-TACGA-3'

PCR 扩增采用 25.0 μL 体系,反应条件为 12.5 μL 2 × Taq PCR Master Mix;1.0 μL 正向引物;1.0 μL 反向引物;1.0 μL DNA 模板;9.5 μL ddH<sub>2</sub>O。反应步骤为:a. 94 °C 热启动 5 min;b. 94 °C 预变性 5 min;c. 94 °C 变性 1 min;d. 57 °C 退火 1 min;e. 72 °C 复性 2 min;f. 72 °C 延伸 10 min;重复步骤 c、d、e 25 次。使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 扩增产物,产物约为 1500 bp。使用北京天根生物工程有限公司的 DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化,获得的纯化产物送生工生物工程(上海)有限公司测序。

#### 1.4.8 16S rDNA 测序结果与生理生化鉴定比对

参照《伯杰手册》<sup>[8]</sup>与《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[9]</sup>对分类得到的纯菌株进行生理生化鉴定,主要包括:尿素、丙二酸盐与糖、醇类发酵实验等。

#### 1.4.9 系统发育树分析

将各菌株测序结果得到的核苷酸序列登录 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>),进行 Blast 与 GenBank 中的序列比对,选出相似性高的序列,应用 Chromas version1.62 和 DNAMAN version6.0 软件进行多重比较后构建系统发育树。

## 1.5 数据处理

实验数据采用平行实验的平均值,用绘图软件 origin(Pro)7.5 作绘图处理,数据间的差异通过统计软件 SPSS13.0 进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 感官评定

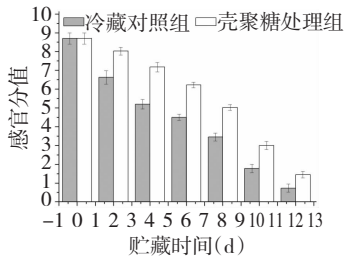


图1 壳聚糖对冷藏带鱼贮藏过程中感官分值变化的影响

Fig. 1 Effect of chitosan on sensory score of *T. haumela* during chilled storage

由图1可看出,带鱼在贮藏期间感官分值呈下降趋势。从贮藏2 d开始,对照组与处理组差异显著( $P < 0.05$ ),降低趋势明显快于处理组。贮藏6 d时,对照组带鱼开始腐烂,鱼体发黄,肉质松软,发出浓烈腥臭;而处理组样品,鱼体呈银白色,肉质相对紧密,略有异味。

### 2.2 pH值

由图2可知,带鱼的pH值在贮藏期间呈现出先降后升的趋势,主要由于鱼体死后,样品会经历死后

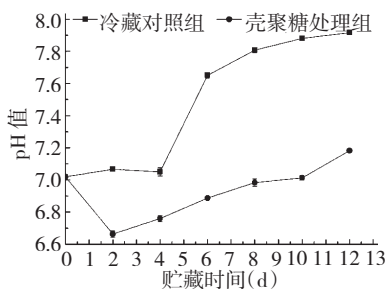


图2 壳聚糖对冷藏带鱼贮藏期间pH值变化的影响

Fig. 2 Effect of chitosan on pH value of *T. haumela* during chilled storage

僵硬与自溶腐败的过程,僵硬期的样品在僵直过程中,体内的糖类物质发生糖酵解反应产生乳酸、丙酮酸、磷酸等酸性物质,而后随着鱼体内蛋白酶的分解释放出氨及胺类碱性物质,pH值逐渐上升。pH值越高,表明样品的腐败程度相对越严重,鱼体鲜度也发生相应变化。贮藏期间,壳聚糖处理组的pH值均低于冷藏对照组。

### 2.3 菌落总数

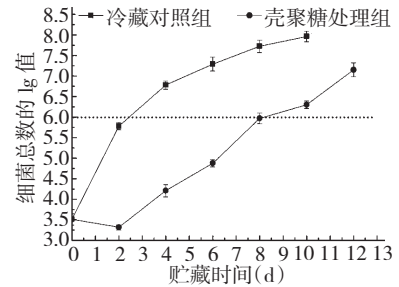


图3 壳聚糖对冷藏带鱼贮藏期间菌落总数变化的影响

Fig. 3 Effect of chitosan on TVC of *T. haumela* during chilled storage

根据我国农业部鲜带鱼的国标规定<sup>[6]</sup>,一级鲜度:细菌总数 $\leq 4 \lg \text{CFU/g}$ ;二级鲜度: $4 \lg \text{CFU/g} \leq$ 细菌总数 $\leq 6 \lg \text{CFU/g}$ 。由图3所示,从贮藏2 d起,对照组与壳聚糖处理组的菌落总数呈显著性差异( $P < 0.05$ );贮藏初期,壳聚糖处理组的细菌总数有所下降,其主要原因在于壳聚糖具有抑菌与杀菌作用。对照组样品在4 d时已超过二级鲜度,而壳聚糖处理组在贮藏10 d后才超过二级鲜度值。12 d后处理组样品菌落总数已达 $7.15 \lg \text{CFU/g}$ ,样品出现腐败,因此菌落总数的增长趋势符合腐败规律。

### 2.4 细菌菌落特征

采用平板梯度稀释与划线分离法,经过3次以上的比较分组与归类计数,共从两组样品中分离出11种典型菌,分别命名为 $X_1$ 、 $X_2$ …… $X_{11}$ ,其菌落与细菌特征见表2。

表2 不同处理方式冷藏带鱼贮藏期间的细菌特征分析

Table 2 Analysis of the characteristic properties of bacteria in *T. haumela* from different processing methods during chilled storage

编号 Stains No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$
形状 Shape	球状	球状	球状	球状	环状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状
革兰氏染色 Gram staining	$G^+$	$G^+$	$G^+$	$G^+$	$G^+$	$G^+$	$G^-$	$G^-$	$G^-$	$G^-$	$G^-$

芽孢 Spore	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无
菌落形态 Colony morphology	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形
菌落颜色 Colonial color	淡黄色	淡黄色	白色	黄色	淡黄色	棕黄色	橙黄色	淡黄色	淡黄色	淡黄色	棕黄色
菌落隆起度 Colonial degree of uplift	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起	凸起
菌落表面状态 Colonial surface state	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
菌落光泽 Colonial luster	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽	有光泽
菌落边缘状态 Colonial edge state	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
菌落干湿程度 Colonial degree of wet and dry	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润	湿润
菌落透明度 Colonial degree of transparency	不透明	半透明	半透明	不透明	半透明	不透明	半透明	不透明	半透明	半透明	不透明

2.5 单菌落 DNA 的提取

将 11 种未知菌株进行单细菌 DNA 提取,提取结果用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,发现样品 DNA 在 23 kb 左右显示出条带,表明已获得较完整的微生物基因组 DNA,结果如图 4 所示。

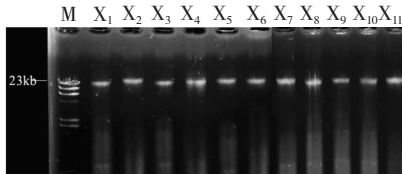


图 4 11 种菌株的 DNA 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretic analysis of DNA from eleven samples

2.6 菌株的 16S rDNA 基因序列

使用琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 扩增产物,通过产物电泳,均获得重复性好且稳定、清晰的特异性条带,片段长度在 1500 bp 左右,电泳图谱结果如图 5

所示。

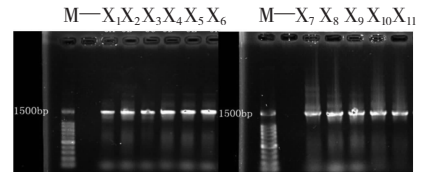


图 5 11 种菌株的 16S rDNA 电泳图谱

Fig. 5 Electrophoretic analysis of PCR amplification products of the 16S rDNA gene fragments from eleven samples

注:“-”为阴性对照

Note:“-” are negative control

2.7 生理生化鉴定分析

随着带鱼冷藏货架期的结束,其菌相逐渐趋于简单,贮藏期间的主要优势菌为 X<sub>9</sub>、X<sub>10</sub> 与 X<sub>11</sub> 三种,通过对带鱼贮藏期间的 11 种菌株进行生理生化鉴定,其反应结果如下:

表 3 不同处理方式冷藏带鱼贮藏期间主要优势菌的生理生化特征

Table 3 The physiology and biological test of *T. haumela* from different processing methods during chilled storage

编号 Strains No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>
棉籽糖 Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
淀粉 Starch	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
精氨酸 Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
纤维二糖 Cellobiose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
果糖 Fructose	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

半乳糖 Galactose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
鼠李糖 Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-乙酸 N-acetyl glucosamine	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-
葡萄糖胺 Melibiose	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-
蜜二糖 Xylitol	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-
硫化氢 H <sub>2</sub> S	-	+	-	NT	NT	NT	NT	-	-	-	+
松三糖 Melezitose	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-
D-核糖 D-nucleotide	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-
丙二酸盐 Malonate	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	-	-	-	NT
尿素 Carbamide	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	+	+	NT	-

注: + :大多数(≥90%)菌株为阳性; - :大多数(≥90%)菌株为阴性,NT为未实验。

Note: + :Most are (≥90%) positive; - :Most are (≥90%) negative,NT:No Test.

参照 GenBank 比对的结果作相应的生理生化实验(表3),并依据主要的生理生化反应与菌落特征,初步判断 X<sub>1</sub> 为考克氏菌属(*Kocuria* spp.)中的一种, X<sub>2</sub> 与 X<sub>3</sub> 分别为葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)细菌, X<sub>9</sub> 与 X<sub>10</sub> 分别为假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)中的一种, X<sub>11</sub> 为希瓦氏菌属(*Shewanella* spp.)细菌,其余5种菌均在PCR扩增测序结果比对的基础上,结合生理生化鉴定加以鉴别得出其各自属种。

## 2.8 系统发育树分析

将11种菌株的PCR扩增序列结果提交NCBI,获得其在GenBank数据库中的临时登录号。通过同源性比较分析,选取多数同源性为99%的7个菌株序列进行比较,并构建系统发育树,根据亲缘关系远近进一步判断细菌种类。对菌株构建系统进化树并结合生理生化反应分析,可得X<sub>1</sub>为考克氏菌

(*Kocuria* spp.), X<sub>2</sub> 为腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*), X<sub>3</sub> 为松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*), X<sub>4</sub> 为溶酪大肠菌(*Macrococcus caseolyticus*), X<sub>5</sub> 为热死环丝菌(*Brochothrix thermosphacta*), X<sub>6</sub> 为热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*), X<sub>7</sub> 为金黄杆菌(*Chryseobacterium indoltheticum*), X<sub>8</sub> 为嗜冷杆菌(*Psychrobacter* spp.), X<sub>9</sub> 为草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*), X<sub>10</sub> 为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*), X<sub>11</sub> 为腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)。

## 2.9 带鱼冷藏过程中的菌相组成及变化情况

对经过反复分离纯化、分类比较与鉴定的不同时间典型菌株进行计数,计算其各自所占比例,不同处理方式对带鱼冷藏过程中细菌变化与组成比例的影响状况见表4。

表4 不同处理方式对带鱼冷藏过程中细菌变化与组成比例的影响

Table 4 Effects on the proportion of bacteria changes and composition of *T. haumela* from different processing methods during chilled storage

细菌种类 Bacterial species	0 d		2 d		4 d		6 d		8 d		10 d		12 d
	CK	CK	CS	CK	CS	CK	CS	CK	CS	CK	CS	CS	
革兰氏阳性菌 Gram positive bacteria	90.6	62.2	0.7	86.7	0	12.7	0.2	26.5	0	5.1	0	2.7	
X <sub>1</sub> 考克氏菌 X <sub>1</sub> <i>Kocuria</i> spp.	31.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
X <sub>2</sub> 腐生葡萄球菌 X <sub>2</sub> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	41.5	1.3	0	57.8	0	0	0	15.2	0	0	0	0	
X <sub>3</sub> 松鼠葡萄球菌 X <sub>3</sub> <i>Staphylococcus sciuri</i>	17.8	56.9	0	28.9	0	10.0	0	11.3	0	5.1	0	0	
X <sub>4</sub> 溶酪大肠菌 X <sub>4</sub> <i>Macrococcus caseolyticus</i>	0	0	0.7	0	0	0	0.2	0	0	0	0	0	
X <sub>5</sub> 热死环丝菌 X <sub>5</sub> <i>Brochothrix thermosphacta</i>	0	4	0	0	0	2.7	0	0	0	0	0	2.7	

X <sub>6</sub> 热杀索丝菌 <i>X<sub>6</sub> Brochothrix thermosphacta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
革兰氏阴性菌 Gram negative bacteria	9.4	39.1	99.3	13.3	100.0	87.3	99.8	73.5	100.0	94.9	100	97.3
X <sub>7</sub> 金黄杆菌 <i>X<sub>7</sub> Chryseobacterium indoltheticum</i>	6.3	32.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X <sub>8</sub> 嗜冷杆菌 <i>X<sub>8</sub> Psychrobacter spp.</i>	3.1	0	0	13.3	0	0	0	0	0	0	0	0
X <sub>9</sub> 草莓假单胞菌 <i>X<sub>9</sub> Pseudomonas fragi</i>	0	1.3	86.9	0	80.4	14.7	21.0	3.0	43.9	29.5	50.2	38.2
X <sub>10</sub> 荧光假单胞菌 <i>X<sub>10</sub> Pseudomonas fluorescens</i>	0	5.3	12.4	0	14.3	24.6	19.6	35	21.1	33.4	22.2	30.1
X <sub>11</sub> 腐败希瓦氏菌 <i>X<sub>11</sub> Shewanella putrefaciens</i>	0	0	0	0	5.3	48.0	59.2	35.5	35.0	32.0	27.6	29.0

由表4可知,冷藏对照组与壳聚糖处理组的带鱼样品在货架期终点时都是革兰氏阴性菌占绝对优势。通过比较发现:带鱼样品在贮藏初期的细菌种类多达6种,随着贮藏时间的延长与壳聚糖保鲜液的杀菌抑菌作用,其菌相逐渐趋于单一。腐败末期对照组样品(10 d)的菌相有:草莓假单胞菌(29.5%),荧光假单胞菌(33.4%),腐败希瓦氏菌(32.0%),松鼠葡萄球菌(5.1%);处理组(12d)有:草莓假单胞菌(38.2%),荧光假单胞菌(30.1%),腐败希瓦氏菌(29.0%),热死环丝菌(2.7%)。其中草莓假单胞菌、荧光假单胞菌与腐败希瓦氏菌为带鱼冷藏期间的优势腐败菌。

### 3 结论

由结果分析可知,冷藏条件下的带鱼样品,经过壳聚糖涂膜处理后,其感官评分值下降缓慢,细菌总数、pH值均显著低于对照组,壳聚糖处理后,其冷藏保鲜效果明显,能将带鱼的二级鲜度货架期延长4-5d。草莓假单胞菌与荧光假单胞菌均为假单胞菌科假单胞菌,属阴性杆菌,不产芽孢,其广泛分布于自然界,如土壤、水、植物及动物活动环境中。在贮藏末期,其各自所占比例较高。腐败希瓦氏菌又名腐败交替假单胞菌,主要存在于水和土壤中,水产品携带较多。Gill<sup>[10]</sup>等人研究发现,希瓦氏菌属(*Shewanella spp.*)和假单胞菌属(*Pseudomonas spp.*)是冷链流通中高水分蛋白食品的特有腐败菌。其中,腐败希瓦氏菌会产生H<sub>2</sub>S和不良气味,也会导致肉的变色发粘,这可能就是导致带鱼样品腐败的原因之一。通过壳聚糖对冷藏带鱼贮藏期间微生物多样性影响的研究,进一步证实了壳聚糖优良的杀菌抑菌作用,能明显抑制水产品主要腐败菌的生长,从而

延长水产品的货架期。

### 参考文献

- 1 Taoukis PS, Koutsoumanis K, Nychas GJE. Use of time temperature integrators and predictive modeling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *Int J Food Microb*, 1999, 53: 21-31.
- 2 Xu LM(徐丽敏), Xue CH(薛长湖), Li ZJ(李兆杰), et al. Influence of water-soluble chitosan on the changes of quality and spoilage microflora of *Penaeus vannamei*. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2008, 29: 107-110.
- 3 Cui ZC(崔正翠), Xu Z(许钟), Yang XS(杨宪时), et al. Change of bacterial flora and predominant spoilage bacteria in *Scophthalmus maximus* during chilled storage. *Food Sci*(食品科学), 2011, 32: 184-187.
- 4 Liu SC(刘寿春), Zhou K(周康), Zhong SY(钟赛义), et al. Isolation and identification of pathogens and spoilage bacteria on cultured hybrid tilapia. *Food Sci*(食品科学), 2008, 5: 327-331.
- 5 Standard of Farming fisheries law at the People's Republic of China: fresh cutlassfish. SC128-84. 1984, (11).
- 6 Standard of Farming fisheries law at the People's Republic of China: fresh marine fish. GB/T 18108-2008. 2008, (8).
- 7 National food safety standard Food microbiological examination: Aerobic plate count. GB 4789. 2-2010. 2010, (3).
- 8 George M Garrity, Julia A Bell, Timothy G Lilburn. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2<sup>nd</sup> edition). New York Berlin Heidelberg: USA, 2004. 05.
- 9 Dong XZ(东秀珠), Cai MY(蔡妙英), Wang BL(王宝玲), et al. *Manual of common bacterial identification* (1<sup>st</sup> edition). Beijing: China Science Press, 2001.
- 10 Gill CO, Badoni M, Jones T. Hygienic effects of trimming and washing operations in a beef carcass dressing process. *J Food Protection*, 1996, 59: 666-669.