

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.01.024

不同细菌胞外产物对腐败希瓦氏菌低温下生长代谢的影响

Effects of extracellular products of several bacterial on the growth and metabolism of *Shewanella putrefaciens* at low temperature

谢晶^{1,2} 叶晶鑫^{1,2} 杨胜平^{1,2} 丁靖宇^{1,2} 钱韻芳^{1,2}

XIE Jing^{1,2} YIE Jing-xin^{1,2} YANG Sheng-ping^{1,2} DING Jing-yu^{1,2} QIAN Yun-fang^{1,2}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Processing and Preservation, Shanghai 201306, China)

摘要:为研究荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, *P. fluorescens*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, *A. hydrophila*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*, *A. sobria*)的胞外产物对腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*, *S. putrefaciens*)低温下生长的影响,提取这 3 株菌株的胞外产物与无菌脑心浸肉汤(Brain Heart Infusion, BHI)培养基混合,再将 *S. putrefaciens* 分别接种至混合培养液中,于(4±1)℃下培养 12 d,测定培养液中 *S. putrefaciens* 的菌落总数及胞外蛋白酶、生物膜、挥发性盐基氮(TVB-N)、总氨基酸和腐胺的变化。结果表明:*P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 的胞外产物对 *S. putrefaciens* 的延滞期和对数期几乎没有影响,但是 *A. sobria* 的胞外产物可以抑制 *S. putrefaciens* 稳定期的生长,而且随着贮藏时间的延长,相比于 *P. fluorescens*、*A. hydrophila*、*A. sobria* 的胞外产物对 *S. putrefaciens* 的生物膜、胞外蛋白酶形成以及致腐败能力的抑制作用更强。

关键词:腐败希瓦氏菌;荧光假单胞菌;嗜水气单胞菌;温和气单胞菌;胞外产物;生长代谢

Abstract: The object of this study was to *in vitro* evaluate the effect of extracellular products of *P. fluorescens*, *A. hydrophila* and *A. sobria* on the growth and metabolism of *S. putrefaciens*

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 31501551); 国家自然科学基金面上项目(编号: 31571914); 上海市科技兴农重点攻关项目(编号: 沪农科攻字〔2016〕第 1-1 号)

作者简介: 谢晶,女,上海海洋大学教授,博士。

通信作者: 钱韻芳(1985—),女,上海海洋大学讲师,博士。

E-mail: yfqian@shou.edu.cn

收稿日期: 2018-09-10

at low temperature. The extracellular products of these three strains were mixed with sterilized brain heart infusion broth (BHI), and *S. putrefaciens* were inoculated into the mixed culture, and the quality indicators including microbiological, extracellular protease, biofilm, TVB-N, amino acid and putrescine changed during 12 days at 4 °C. The results showed that extracellular products of *P. fluorescens*, *A. hydrophila* and *A. sobria* had little effect on the lag phase and exponential phase of *S. putrefaciens*, but extracellular products of *A. sobria* could inhibit the growth of *S. putrefaciens* during the stationary phase. In addition, compared to the extracellular products of *P. fluorescens* and *A. hydrophila*, the extracellular products of *A. sobria* had the strongest inhibitory effect on the biofilm and extracellular protease formation and spoilage potential of *S. putrefaciens*.

Keywords: *Shewanella putrefaciens*; *Pseudomonas fluorescens*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; extracellular products; growth and metabolism

水产品在生产过程中鲜度极易降低,随着流通时间的延长发生不可逆转的腐败变质,主要是因为酶自溶,化学氧化和微生物等多种因素的作用^[1]。其中,微生物的生长活性是影响水产品腐败变质的主要原因。低温冷藏是延长水产品货架期最常用的方法,但仍有部分微生物在特定条件下能代谢产生腐败产物,迅速生长繁殖成为优势菌群,即特定腐败菌(specific spoilage organism, SSO)^[2]。这些特定腐败菌会降解蛋白质产生生物胺、三甲胺等挥发性散发腐败臭味的物质,而且研究^[3-5]发现冷藏条件下微生物的生长和对食品的致腐败能力与微生物之间的相互作用息息相关。微生物之间的相互作用主要是依靠细菌胞外产物即无菌上清液(cell-free superna-

tant, CFS)中的群体感应系统(quorum sensing, QS)的调控,微生物的群体感应系统中含有群体感应信号分子,这些信号分子可以调控自身和环境中其他微生物生物膜的生长、胞外蛋白酶的合成和活性以及产生腐败产物的能力等^[6-9]。例如 Zhu 等^[8]发现在 25, 4 °C 条件下,荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)无菌上清液可以抑制波罗的海希瓦氏菌(*S. baltica*)的生长和致病能力。水产品在冷藏条件下,常见的腐败菌属有希瓦氏菌、假单胞菌和气单胞菌等。本课题组^[10]前期研究发现冷藏凡纳滨对虾中的特定腐败菌是腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)、*P. fluorescens* 和气单胞菌属(*Aeromonas* sp.),它们都是革兰氏阴性嗜冷菌。

本试验主要研究在 4 °C 冷藏条件下,*P. fluorescens*、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, *A. hydrophila*)和温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*, *A. sobria*)的胞外产物提取液对 *S. putrefaciens* 的生长、生物膜的形成、胞外蛋白酶的合成以及致病能力的影响,以便为开发新型凡纳滨对虾等水产品的保鲜技术提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试菌株

P. fluorescens、*A. hydrophila*、*A. sobria*、*S. putrefaciens*;本课题组前期筛选鉴定所得,菌种于灭菌甘油中-80 °C 保藏。

1.1.2 试剂

铁琼脂培养基、脑心浸肉汤(Brain Heart Infusion, BHI)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB);青岛海博生物技术有限公司;

轻质氧化镁、硼酸、盐酸、柠檬酸钠、高氯酸、氢氧化钠、碳酸氢钠、丹酰氯、浓氨水、乙腈等;国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

低速离心机:TDL-5-型,上海隆拓仪器设备有限公司;

灭菌锅:HVE-50 型,日本 Hi-rayama 公司;

超净工作台:VS-1300L-U 型,上海康福特环境科技有限公司;

恒温培养摇床:THZ-100 型,上海圣科仪器设备有限公司;

低温培养箱:DHP-9162 型,日本三洋电器集团有限公司;

凯氏定氮仪:Kjeltec2300 型,丹麦 Foss 公司;

氨基酸分析仪:835 型,日本日立公司;

高效液相色谱系统:Waters 2695 型,Waters 2996 二极管阵列检测器及 Empower 色谱管理软件,美国 Waters

公司。

1.3 菌株的活化和培养

P. fluorescens 活化和培养参照 Parlapani 等^[11]的方法略有修改:取 1 mL 冻存的 *P. fluorescens* 菌液于灭菌的 9 mL 脑心浸肉汤中活化,30 °C 培养 24 h 左右使菌液浓度达 1.0×10^8 CFU/mL 后,用于提取无菌上清液。*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 菌悬液的制备方法同 *P. fluorescens*。

1.4 无菌上清液的提取

将 *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 的菌液培养至菌浓度达到 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL 后,取培养液在 4 °C、 $10\ 000 \times g$ 离心 15 min,取上清液,再用 0.22 μm 的醋酸纤维过滤膜过滤,得到的溶液即为无菌上清液(CFS)^[12]。

1.5 接种与培养

1.5.1 空白对照组(CK 组) 取 100 μL 的 *S. putrefaciens* 接种至 100 mL 的无菌 BHI 培养基中,置于 4 °C 低温恒温箱中培养^[13]。

1.5.2 试验组

(1) SP 组:取 100 μL 的 *S. putrefaciens* 接种至 100 mL 含有 50 mL/100 mL *P. fluorescens* CFS 的 BHI 培养基中,置于 4 °C 恒温箱中培养^[13]。

(2) SH 组:取 100 μL 的 *S. putrefaciens* 接种至 100 mL 含有 50 mL/100 mL *A. hydrophila* CFS 的 BHI 培养基中,置于 4 °C 恒温箱中培养^[13]。

(3) SW 组:取 100 μL 的 *S. putrefaciens* 接种至 100 mL 含有 50 mL/100 mL *A. sobria* CFS 的 BHI 培养基中,置于 4 °C 恒温箱中培养^[13]。

1.6 CFS 对 *S. putrefaciens* 生长情况的影响

1.6.1 微生物指标的测定 参考 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》中的平板计数法测定,修改如下:先制成 1:10 的样品稀释液,并梯度稀释到适当浓度,取 2~3 个适宜稀释度的样品菌液 1 mL,与 15~20 mL 已灭菌的铁琼脂培养基混匀。待培养基凝固后置于 30 °C 培养 48~72 h,计黑色菌落总数,每个样品做 3 次重复。

1.6.2 胞外蛋白酶的测定 参照 Zhu 等^[8]的方法,修改如下:将培养液在 4 °C、 $10\ 000 \times g$ 离心 5 min,采用 BCA 法测定上清液中胞外蛋白酶的浓度;将离心后的上清液与偶氮酪蛋白底物等体积混合于 30 °C 反应 30 min;再加入等体积的 0.5 mol/L 三氯乙酸室温下反应 30 min;反应液在 $10\ 000 \times g$ 离心 5 min 后,与 1.0 mol/L 的 NaOH 等体积混合在 366 nm 处测吸光度。

$$U = (a - b) \div 0.01, \quad (1)$$

式中:

U ——蛋白酶活力, U/mL ;

a ——样品吸光度;

b ——空白组吸光度。

1.6.3 生物膜的测定 将 TSB 中过夜培养(160 r/min, 30 °C)的 *S. putrefaciens* 用无菌的 TSB 稀释(1 : 1 000),将稀释后的液体放入 48 孔板中,试验组分为 3 组,分别加入 50 mL/100 mL 的 *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* CFS,置于 4 °C 下培养,每隔 24 h 用结晶紫结合法进行测定。首先吸去平板孔中的培养物,并用无菌蛋白胨水(8.5 g/L NaCl, 1 g/L 蛋白胨)洗涤除去松散贴壁的细胞。干燥后,用 0.1 g/L 结晶紫对表面附着的生物膜染色 15 min。用无菌蒸馏水洗涤孔板,然后加入 95%乙醇重新溶解结晶紫染色的生物膜。使用酶标仪在 600 nm 处测吸光度^[8]。

1.6.4 挥发性盐基氮(TVB-N)的测定 参照 Dabad 等^[14]的方法,修改如下:取 3.00 mL 培养液,加入少量的蒸馏水,用凯氏定氮仪测定培养液中挥发性盐基氮。每组样品做 2 个平行。

1.6.5 总氨基酸的测定 按 GB 5009.124—2016《食品安全标准 食品中氨基酸的测定》执行。

1.6.6 腐胺的测定 *S. putrefaciens* 培养液中腐胺的提取参照 Ikonic 等^[15]的方法,然后参照 Fan 等^[16]的方法使用 HPLC 进行鉴定和定量分析腐胺,每组样品做 3 次平行。

1.7 数据处理

利用 Origin 8.6 绘制曲线;采用 SPSS 19 进行显著性分析。数据结果均采用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 菌落总数变化

图 1 为 4 °C 条件下,分别添加 50 mL/100 mL *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 无菌培养液对 *S. putrefaciens* 生长的影响。初始接菌量大约在 5.20 lg (CFU/mL)。从图 1 中可以看出,4 °C 贮藏 4 d 之前,添加 50 mL/100 mL *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 无菌培养液对 *S. putrefaciens* 的生长几乎没有影响;但是贮藏 8 d 后达到菌落生长稳定期时,添加 50 mL/100 mL *A. sobria* 无菌培养液组的 *S. putrefaciens* 菌落总数明显低于空白组,而添加 50 mL/100 mL *P. fluorescens* 或 *A. hydrophila* 无菌培养液的 *S. putrefaciens* 菌落总数与空白组没有显著性差异;贮藏 10 d 后各组中 *S. putrefaciens* 菌落数基本一致;到达贮藏终点时,添加了 50 mL/100 mL *A. sobria* 无菌培养液组中 *S. putrefaciens* 的菌落数明显呈下降趋势。研究结果表明添加 50 mL/100 mL 的 *P. fluorescens* 或 *A. hydrophila* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 的生长几乎没有影响,而

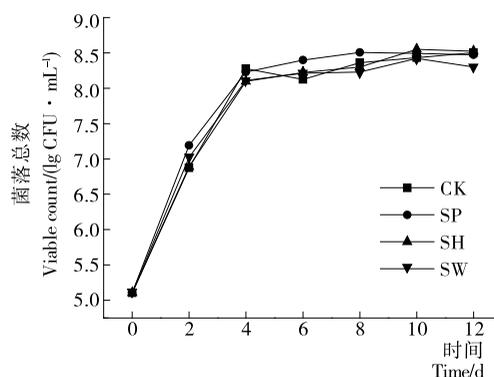


图 1 BHI 培养液中添加无菌上清液对 *S. putrefaciens* 在 4 °C 贮藏中菌落总数变化的影响

Figure 1 Effect of CFS on the growth of *S. putrefaciens* cultured in BHI broth at 4 °C

且添加 50 mL/100mL *A. sobria* 无菌培养液对 *S. putrefaciens* 的生长延滞期和对数期几乎没有影响,但是从稳定期初期开始就会抑制 *S. putrefaciens* 的生长,与 Zhu 等^[13]研究的 *P. fluorescens* 只在稳定期抑制 *S. baltica* 生长和 Wang 等^[17]研究发现的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的无菌上清液在稳定期提高了肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)死亡率的结果一致。*S. putrefaciens* 是具有群体感应机制的细菌,它可以通过感知环境中的信号分子来调控菌体密度,并在信号分子达到阈值时启动相关基因表达,从而调控细菌的生理行为,以适应环境的变化,可能是 *S. putrefaciens* 可以感知 *A. sobria* 无菌上清液中的群体感应信号分子去调控自身的微环境、物质代谢和必要的细胞分裂^[12]。

2.2 胞外蛋白酶变化

细菌可以通过无菌上清液中的群体感应信号分子去调控菌体之间的群体行为,特别是对胞外产物的分泌,例如毒力因子、胞外蛋白酶和生物膜基质^[18-19]。图 2 为在 4 °C 贮藏下,分别添加 50 mL/100 mL *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 形成胞外蛋白酶活性和浓度的影响。从图 2 可以看出,不同的贮藏时间段,各试验组的胞外蛋白酶活性和浓度变化趋势并不完全相同,是因为 *S. putrefaciens* 的胞外蛋白酶活性与浓度之间没有密切的关系,但总体趋势可以看出贮藏 8 d 后各组的胞外蛋白酶活性和浓度显著提高,但贮藏 12 d 后,胞外蛋白酶活性和浓度明显降低。与对照组相比,贮藏 8 d 后的 *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 的无菌上清液明显降低了 *S. putrefaciens* 胞外蛋白酶的活性,而且 SP 组、SH 组和 SW 组中 *S. putrefaciens* 胞外蛋白酶活性分别为 8.8, 9.8, 8.1 U/mL, 比对照组活性分别低 21.42%, 12.50%, 27.68%, 说明 *A. sobria* 的无菌上清液对 *S. putrefaciens* 胞外蛋白酶形成的

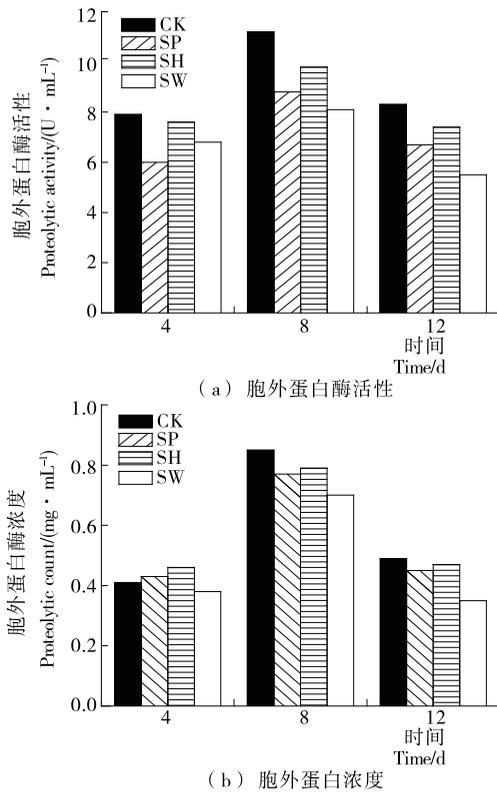


图2 BHI培养液中添加无菌上清液对 *S. putrefaciens* 在4 °C 贮藏中胞外蛋白酶活性和浓度的影响

Figure 2 Effect of CFS on extracellular proteolytic activity and protein content of *S. putrefaciens* cultured in BHI broth at 4 °C

抑制作用最强,从图 2(b)中可以看出,贮藏 8 d 后,与空白组相比,添加 3 种无菌上清液对胞外蛋白酶的浓度都有抑制作用,而且添加 *A. sobria* 的无菌上清液组(SW 组)抑制作用最强,贮藏 12 d 后,添加 *A. hydrophila* 无菌上清液组(SH 组)对胞外蛋白酶的浓度几乎没有抑制作用,添加 *P. fluorescens* 和 *A. sobria* 的无菌上清液组对胞外蛋白酶的浓度都有抑制作用,而且 SW 组的抑制作用最强。这与 Zhu 等^[8]研究添加不同的外源 AHLs 会抑制 *S. baltica* 胞外蛋白酶活力以及 Liu 等^[20]研究发现 *P. fluorescens* 的蛋白酶基因活性受到以 AHLs 为基础的群体感应系统调控的结果一致。

2.3 生物膜变化

S. putrefaciens 具有形成生物膜的能力,并能依靠生物膜附着在容器表面,增加清洁难度并易导致交叉污染。外界营养条件不会影响其在食品加工中形成生物膜的能力,但是外源菌会影响 *S. putrefaciens* 形成生物膜的能力和黏附力^[21]。图 3 为在 4 °C 贮藏下,分别添加 50 mL/100 mL *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 生物膜形成的影响。贮藏 8 d

后 *S. putrefaciens* 形成生物膜的能力增强,但随着贮藏时间的延长到达 12 d 后,*S. putrefaciens* 形成生物膜的能力显著降低($P < 0.05$)。与对照组相比,*P. fluorescens* 和 *A. hydrophila* 都提高了 *S. putrefaciens* 形成生物膜的能力,分别比对照组提高 23.33% 和 56.66%,而 *A. sobria* 无菌上清液抑制了 *S. putrefaciens* 形成生物膜的能力,抑制率约为 18.88%。Wang 等^[17]研究发现 *P. aeruginosa* 的无菌上清液也会抑制 *S. enterica* 形成生物膜的能力;Chorianopoulos 等^[22]发现哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)的无菌上清液也能降低 *S. enterica* 形成生物膜的能力;Zhang 等^[23]研究发现通过添加外源群体感应信号分子 AHL 会抑制 *P. aeruginosa* 形成生物膜的能力,而且许多 AHL 调控的基因会在细菌生长的对数后期和稳定期前期表达^[24],所以出现上述现象是因为在 *S. putrefaciens* 中控制形成生物膜的基因受到了外源无菌上清液中群体感应信号分子的调控,例如控制胞外物质形成和膜流动性的基因。

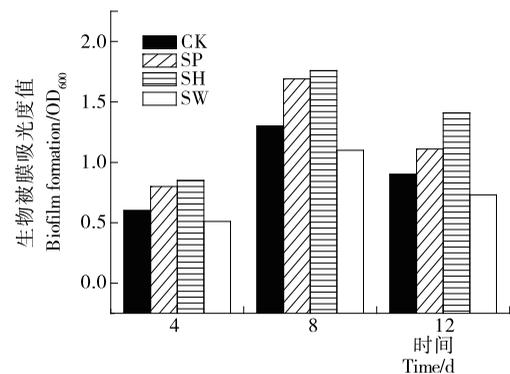


图3 BHI培养液中添加无菌上清液对 *S. putrefaciens* 在4 °C 贮藏中生物膜形成的影响

Figure 3 Effect of CFS on biofilm development of *S. putrefaciens* cultured in BHI broth at 4 °C

2.4 TVB-N 值变化

图 4 为在 4 °C 贮藏下,分别添加 50 mL/100 mL *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 形成 TVB-N 能力的影响。从图 4 中可以看出,第 0~6 天各组的 TVB-N 值显著上升,当贮藏 6 d 之后,各个试验组 TVB-N 值上升缓慢,与菌落总数研究结果一致,说明当贮藏到细菌生长的稳定期初期时,*S. putrefaciens* 产 TVB-N 的能力受到各组外源细菌无菌上清液的影响而下降。与对照组相比,*P. fluorescens* 和 *A. hydrophila* 的无菌上清液对 *S. putrefaciens* 形成 TVB-N 能力没有显著性的影响,*A. sobria* 无菌上清液显著降低了 *S. putrefaciens* 产 TVB-N 的能力,说明 *A. sobria* 无菌上清液降低了 *S. putrefaciens* 产生代谢产物的能力。很多腐败菌的腐败过程都会受到无菌上清液中群

体感应信号分子的调控,例如蛋白酶、脂肪酶、纤维素和果胶酶的分泌^[25]。Zhang 等^[23]研究发现含有 AHLs 的培养液会降低 *P. aeruginosa* 的脂肪酶活性,提高蛋白酶活性,从而影响 *P. aeruginosa* 产生腐败产物的量。所以 *A. sobria* 无菌上清液显著降低了 *S. putrefaciens* 产 TVB-N 的能力可能是 *A. sobria* 无菌上清液中的 AHLs 化合物抑制了与 *S. putrefaciens* 产 TVB-N 相关的蛋白酶的分泌。

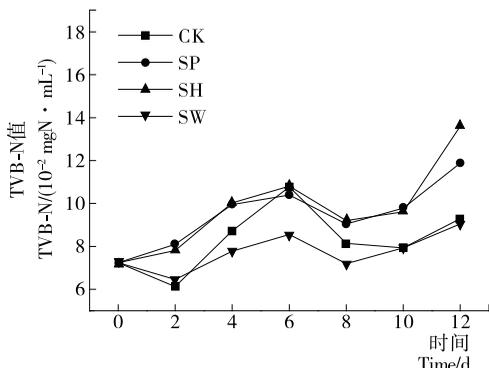


图 4 BHI 培养液中添加无菌上清液对 *S. putrefaciens* 在 4 °C 贮藏中 TVB-N 形成的影响

Figure 4 Effect of CFS on total volatile basic nitrogen contents of *S. putrefaciens* cultured in BHI broth at 4 °C

2.5 总氨基酸变化

表 1 列出了在 4 °C 贮藏下,分别添加 50 mL/100 mL 的 *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 氨基酸的影响。有机体蛋白质组织的基本成分是氨基酸,其在生物体的生命活动中发挥着非常重要的作用^[26]。结果表明,SP 组、SH 组和 SW 组中 Lys 含量由初始值的 342.88,290.14,344.71 μg/mL 分别降低到 243.47,260.09,285.43 μg/mL,降低率分别为 28.99%,10.36%,17.20%,Glu 由初始值的 777.70,650.47,786.67 μg/mL 分别降低到 528.53,567.44,626.02 μg/mL,降低率分别为 32.04%,12.76%,20.42%。氨基酸为腐败菌的生长提供碳源和氮源,同时也是腐败产物生物胺的前提物质。对比 SP 组、SH 组和 SW 组贮藏终点时氨基酸含量变化发现,SH 组和 SW 组中氨基酸总量、Glu、Gly、Ala、Lys 和 Leu 的降低率都低于 CK 组和 SP 组。从表 1 中还可以看出,与 0 d 相比,贮藏 12 d 后 CK 组、SP 组、SH 组和 SW 组中总氨基酸的含量分别降低了 17.76%,28.41%,13.55%,14.84%。贮藏 12 d 后,与对照组相比,*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 的无菌上清液均能抑制 *S. putrefaciens* 对氨基酸的降解能力,而 *P. fluorescens* 无菌上清液则起促进作用。

2.6 腐败变化

S. putrefaciens 可以使高蛋白的水产品中鸟氨酸、赖

表 1 BHI 培养液中添加无菌上清液对 *S. putrefaciens* 在 4 °C 贮藏中氨基酸的影响[†]

Table 1 Effect of CFS on total amino acid contents of *S. putrefaciens* cultured in BHI broth at 4 °C (n=3)

氨基酸	0 d				12 d			
	CK 组	SP 组	SH 组	SW 组	CK 组	SP 组	SH 组	SW 组
Asp	472.36±0.74	393.17±0.04	312.72±0.20	364.69±0.26	381.52±0.26	266.01±0.14	252.21±0.23	284.18±0.36
Thr	174.96±0.20	148.16±0.32	117.84±0.23	133.00±0.29	142.60±0.19	91.65±0.20	80.75±0.81	91.57±0.25
Ser	287.46±0.28	234.15±0.37	188.65±0.27	209.48±0.48	175.00±0.23	123.51±0.20	126.91±0.16	139.56±0.14
Glu	936.47±0.81	777.70±0.39	650.47±0.23	786.67±0.78	770.28±0.34	528.53±0.17	567.44±0.10	626.02±0.14
Gly	1 104.27±0.24	921.65±0.73	752.94±0.31	920.01±0.41	952.95±0.57	725.68±0.36	744.58±0.23	826.21±0.48
Ala	658.46±0.31	527.12±0.38	452.62±0.35	515.37±0.48	599.69±0.23	448.63±0.81	470.73±0.48	521.41±0.20
Val	316.78±0.31	262.43±0.17	204.86±0.45	239.47±0.20	238.40±0.49	186.44±0.48	185.83±0.57	209.45±0.39
Met	178.93±0.30	158.08±0.19	145.89±0.24	109.56±0.41	96.63±0.57	95.28±0.24	100.80±0.25	91.69±0.36
Ile	157.28±0.31	137.99±0.24	116.58±0.16	131.94±0.20	127.11±0.48	97.15±0.38	102.27±0.31	114.48±0.04
Leu	496.26±0.19	414.80±0.16	323.39±0.49	385.53±0.10	428.89±0.26	324.85±0.41	319.45±0.16	362.73±0.48
Tyr	142.49±0.17	122.46±0.16	107.94±0.57	127.79±0.20	154.19±0.48	104.73±0.28	133.64±0.82	146.26±0.32
Phe	328.85±0.48	292.39±0.36	297.52±0.26	291.36±0.04	252.25±0.27	191.54±0.23	192.24±0.14	209.01±0.51
Lys	395.34±0.57	342.88±0.45	290.14±0.39	344.71±0.48	332.21±0.32	243.47±0.76	260.09±0.32	285.43±0.20
His	136.99±0.14	120.67±0.31	110.48±0.57	127.28±0.14	91.35±0.39	65.43±0.82	89.74±0.51	77.16±0.67
Arg	460.72±0.10	320.04±0.48	228.66±0.76	266.76±0.81	394.52±0.32	210.59±0.24	90.57±0.14	232.91±0.76
总量	6 247.61	5 173.71	4 300.77	4 953.67	5 137.63	3 703.50	3 717.28	4 218.10

† Cys、Pro、Asn、Gln 和 Trp 在样品处理时被破坏。

氨酸和组氨酸发生脱羧作用生成腐胺、尸胺和少量组胺^[13,27],随着贮藏时间的延长,微生物产生的腐胺含量增加,产生有害物质导致水产品腐败。在低温贮藏下,腐胺是 *S. putrefaciens* 代谢产生的最主要的生物胺^[28]。图 5 是在 4 °C 贮藏下,分别添加 50 mL/100 mL *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 产生腐胺能力的影响。从图 5 可以看出,随着贮藏时间的延长,腐胺含量在逐渐上升,贮藏 4 d 后各组无菌上清液对 *S. putrefaciens* 产生腐胺的抑制率较低。但与对照组相比,贮藏 8 d 后,*P. fluorescens* 和 *A. sobria* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 产生腐胺的抑制率分别为 7.54%,33.96%,贮藏 12 d 后,*P. fluorescens* 和 *A. sobria* 无菌上清液对 *S. putrefaciens* 产生腐胺的抑制率分别为 2.66%,29.33%。表明当 *S. putrefaciens* 生长至稳定期后,*A. sobria* 无菌上清液对腐胺产生的抑制率最高,可能是 *A. sobria* 无菌上清液可以抑制 *S. putrefaciens* 代谢产生脱羧酶,抑制其生成腐胺。

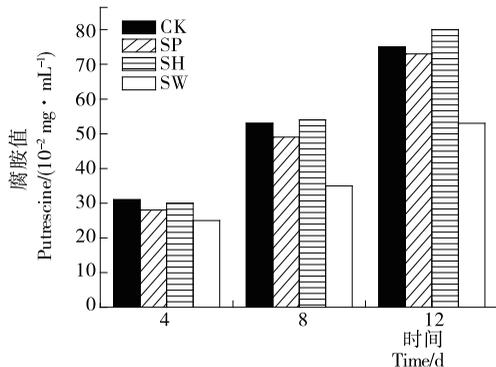


图 5 BHI 培养液中添加无菌上清液对 *S. putrefaciens* 在 4 °C 贮藏中腐胺形成的影响

Figure 5 Effect of CFS on putrescine content of *S. putrefaciens* cultured in BHI broth at 4 °C

3 结论

本试验主要研究了 *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 和 *A. sobria* 的胞外产物在 4 °C 下对 *S. putrefaciens* 的生长和致腐败能力的影响。通过菌落总数、胞外蛋白酶和生物膜的分析发现只有 *A. sobria* 的无菌上清液对 *S. putrefaciens* 的生长有抑制作用。通过分析 *S. putrefaciens* 的腐败产物,发现 *P. fluorescens*、*A. hydrophila* 的无菌上清液对 *S. putrefaciens* 的抑制作用较小,*A. sobria* 能显著抑制 *S. putrefaciens* 的致腐败能力,说明 *A. sobria* 的胞外产物中含有抑制 *S. putrefaciens* 生长的群体感应信号分子,但是具体起作用的化合物是哪些仍需要进一步研究确认。

参考文献

[1] 蓝蔚青,谢晶,周会,等.不同时期鲳鱼冷藏期间优势腐败

菌的多样性变化[J].食品科学,2015(2):226-231.

- [2] GINSON J, PANDA S K, BINDU J, et al. Effect of high pressure treatment on microbiological quality of Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*) during chilled storage[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 596.
- [3] 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: 9-17.
- [4] MEJLHOLM O, BOKNAES N, DALGAARD P. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(1): 66-76.
- [5] LAURSEN B G, LEISNER J J, DALGAARD P. Carnobacterium species: Effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(10): 3 604-3 611.
- [6] LU L G, HUME M E, PILLAI S D. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(7): 1 457-1 462.
- [7] BLANA V A, NYCHAS G-J E. Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 173: 1-8.
- [8] ZHU Su-qin, WU Hao-hao, ZENG Ming-yong, et al. The involvement of bacterial quorum sensing in the spoilage of refrigerated *Litopenaeus vannamei*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 192: 26-33.
- [9] ZHU Su-qin, ZHANG Cai-li, WU Hao-hao, et al. Spoilage of refrigerated (4 °C) *Litopenaeus vannamei*: cooperation between *Shewanella* species and contribution of cyclo-(L-Pro-L-Leu)-dependent quorum sensing [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2017, 52(6): 1 517-1 526.
- [10] YANG Sheng-ping, XIE Jing, QIAN Yun-fang. Determination of spoilage microbiota of pacific white shrimp during ambient and cold storage using next-generation sequencing and culture-dependent method[J]. Journal of Food Science, 2017, 82(5): 1 178-1 183.
- [11] PARLAPANI F F, MALLOUCHOS A, HAROUTOUIAN S A, et al. Volatile organic compounds of microbial and non-microbial origin produced on model fish substrate un-inoculated and inoculated with gilt-head sea bream spoilage bacteria[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 78: 54-62.
- [12] DOUROU D, AMMOR M S, SKANDAMIS P N, et al. Growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhi*

murium in the presence of quorum sensing signalling compounds produced by spoilage and pathogenic bacteria[J]. Food Microbiology, 2011, 28(5): 1 011-1 018.

[13] ZHAO Ai-fei, ZHU Jun-li, YE Xiao-feng, et al. Inhibition of biofilm development and spoilage potential of *Shewanella baltica* by quorum sensing signal in cell-free supernatant from *Pseudomonas fluorescens*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 230: 73-80.

[14] DABADE D S, DEN BESTEN H M W, AZOKPOTA P, et al. Spoilage evaluation, shelf-life prediction, and potential spoilage organisms of tropical brackish water shrimp (*Penaeus notialis*) at different storage temperatures[J]. Food Microbiology, 2015, 48: 8-16.

[15] IKONIC P, TASIC T, PETROVIC L, et al. Proteolysis and biogenic amines formation during the ripening of Petrovska klobasa, traditional dry-fermented sausage from Northern Serbia[J]. Food Control, 2013, 30(1): 69-75.

[16] FAN Hong-bing, LUO Yong-kang, YIN Xiao-fei, et al. Biogenic amine and quality changes in lightly salt-and sugar-salted black carp (*Mylopharyngodon piceus*) fillets stored at 4 °C[J]. Food Chemistry, 2014, 159: 20-28.

[17] WANG Hu-hu, YE Ke-ping, ZHANG Qiu-qin, et al. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Food Control, 2013, 32(2): 650-658.

[18] KALIA V C, PUROHIT H J. Quenching the quorum sensing system; potential antibacterial drug targets[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2011, 37(2): 121-140.

[19] NATRAH F M I, ALAM M I, PAWAR S, et al. The impact of quorum sensing on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* towards burbot (*Lota lota L.*) larvae[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(1/2): 77-82.

[20] LIU M, WANG H, GRIFFITHS M W. Regulation of alkaline metalloprotease promoter by *N*-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2 174-2 184.

[21] BAGGE D, HJELM M, JOHANSEN C, et al. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2 319-2 325.

[22] CHORIANOPOULOS N G, GIAOURIS E D, KOURKOUTAS Y, et al. Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 2 018-2 022.

[23] ZHANG Qiu-qin, YE Ke-ping, WANG Hu-hu, et al. Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by an acylated homoserine lactones-containing culture extract[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 57(1): 230-235.

[24] YARWOOD J M, BARTELS D J, VOLPER E M, et al. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(6): 1 838-1 850.

[25] BAI J A, VITTAL R R. Quorum sensing regulation and inhibition of exoenzyme production and biofilm formation in the food spoilage bacteria *Pseudomonas psychrophila* PSPF19[J]. Food Biotechnology, 2014, 28(4): 293-308.

[26] DENG Yun, LUO Ya-li, WANG Yue-gang, et al. Effect of different drying methods on the myosin structure, amino acid composition, protein digestibility and volatile profile of squid fillets[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 168-176.

[27] BENNER R A, STARUSZKIEWICZ W F, OTWELL W S. Putrescine, cadaverine, and indole production by bacteria isolated from wild and aquacultured penaeid shrimp stored at 0, 12, 24, and 36 °C[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(1): 124-133.

[28] OZYURT G, KULEY E, OZKUTUK S, et al. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 505-510.

(上接第 96 页)

[8] GLAVAC N K, STOJILKOVSKI K, KREFT S, et al. Determination of fagopyrins, rutin, and quercetin in Tartary buckwheat products[J]. Lwt-Food Science and Technology, 2017, 79: 423-427.

[9] ATTIA T Z. Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid mixture in their pure forms and combined dosage form[J]. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 169: 82-86.

[10] WILSON I D. The state of the art in thin-layer chromatography-mass spectrometry: a critical appraisal[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 856(1/2): 429-442.

[11] AGATONOVIC-KUSTRIN S, MORTON D W, YUSOF A P. Development and validation of a simple high performance thin layer chromatography method combined with direct 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay to quantify free radical scavenging activity in wine[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 285-290.

[12] ALAM P, ALAJMI M F, ARBAB A H, et al. Comparative study of antioxidant activity and validated RP-HPTLC analysis of rutin in the leaves of different Acacia species grown in Saudi Arabia[J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2017, 25 (5): 715-723.