

## 冷藏大黄鱼 SSO 希瓦氏菌致腐能力差异机制初探

赵二科<sup>1</sup>, 朱军莉<sup>1\*</sup>, 冯立芳<sup>1</sup>, 施永清<sup>1</sup>, 励建荣<sup>2</sup>

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018;

2. 辽宁省食品安全重点实验室, 渤海大学, 辽宁 锦州 121013)

**摘要:**为探讨特定腐败菌(SSO)希瓦氏菌致腐能力的差异机制,采用生化和 16S rDNA 鉴定冷藏大黄鱼货架期终点的产 H<sub>2</sub>S 菌,在灭菌鱼汁和无菌鱼块中筛选 4 株致腐差异的希瓦氏菌,扩增氧化三甲胺(TMAO)还原酶基因及分析其表达量,并预测其蛋白质的理化性质。结果显示,22 株产 H<sub>2</sub>S 菌均为希瓦氏菌属,其中 *S. baltica* 占 54.5%, *S. putrefaciens* 占 40.9%, *S. hafniensis* 占 4.5%。希瓦氏菌在灭菌鱼汁中致腐能力存在显著差异,其中 *S. baltica* XH2 和 XH8 的缺点评分和 TVB-N 最高, *S. putrefaciens* XH14 和 XH17 菌最低。接种无菌鱼块的 4 株希瓦氏菌中, XH2 的样品在 72 h 出现腐臭味, 48 h 细菌总数高于 10<sup>7</sup> cfu/g, 产生较高的 TMA、TVB-N、尸胺和腐胺, XH8 菌次之, XH14 和 XH17 菌最慢。4 株希瓦氏菌都扩增出 2 490 bp 的 *torA* 基因,其表达量与致腐能力密切相关, *S. baltica* XH2 最高。预测的 TorA 蛋白中 *S. baltica* XH2 的分子量和不稳定指数最大,理论等电点和总平均疏水性最小。可见, *S. baltica* XH2 为冷藏大黄鱼的 SSO,其强致腐能力与 *torA* 基因高表达量和 TorA 蛋白理化性质有关。研究为阐明希瓦氏菌致腐机制奠定了良好的基础。

**关键词:**大黄鱼; 希瓦氏菌; 氧化三甲胺还原酶; *torA* 基因; 致腐能力

**中图分类号:** S 983

**文献标志码:** A

鱼类腐败是个复杂过程,而微生物是导致腐败的主要因素。从 19 世纪中期开始,国外学者对捕获和贮藏流通过程中鱼类腐败进行了大量研究<sup>[1-3]</sup>,提出特定腐败菌(specific spoilage organism, SSO)的概念,即少数腐败微生物能适合生存和繁殖,并产生腐败臭味或异味代谢产物。研究表明,希瓦氏菌属(*Shewanella*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)等嗜冷革兰氏阴性细菌的生长引起冷藏鲜鱼的腐败<sup>[1-2]</sup>。在有氧冷藏条件下,腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)多为海洋鱼类的 SSO,假单胞菌多为淡水鱼的 SSO<sup>[4]</sup>。

希瓦氏菌是革兰氏阴性菌,运动杆菌,嗜冷性,是水生动物的富含蛋白质食品相关的典型腐败菌,腐败活性强,在冷藏过程中适应低温环境,并逐渐占优势生长,能把氧化三甲胺

(trimethylamine oxide, TMAO)还原为三甲胺(trimethylamine, TMA),产生硫化氢<sup>[3]</sup>。1985 年 *Shewanella* 被命名为一个新的属,该属为交替单胞菌科(Alteromonadeae)<sup>[4]</sup>。希瓦氏菌广泛分布于环境中,特别是水产动物及富含蛋白质的食品中,包括耐冷菌,如腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)和波罗的海希瓦氏菌(*S. baltica*),嗜中温菌,如海藻希瓦氏菌(*S. alga*)和奥奈达希瓦氏菌(*S. onedensis*)及嗜冷菌等。*S. baltica* 和 *S. putrefaciens* 在水产品腐败中占有主导作用<sup>[5-6]</sup>。目前, *Shewanella* 致腐能力差异及机制方面的研究鲜为报道,鉴于此,本研究从 4℃ 冷藏养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)中分离得到 22 株产 H<sub>2</sub>S 菌,经生化分析和 16S rDNA 鉴定,接种无菌鱼块初步分析致腐能力后,进一步评价致腐能力有差

收稿日期:2014-09-07 修回日期:2014-11-19

资助项目:国家自然科学基金(31271954, 31301566);浙江省科技厅(2012C22049);“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD29B06);高等学校博士学科点专项科研基金(20133326120008);浙江省自然科学基金(LQ12C20005)

通信作者:朱军莉, E-mail: junlizhu0305@163.com

异的四株 *Shewanella* 在无茵鱼块中腐败的动态变化过程,并克隆和分析编码 TMAO 还原酶 *torA* 基因及表达量的变化,预测该还原酶蛋白的物理性质和疏水性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜大黄鱼购自杭州市某菜市场,加冰块立即运送到实验室,用于制备灭菌鱼汁和无茵鱼块。

### 1.2 试剂

组胺、 $\beta$ -苯乙胺、酪胺、腐胺、尸胺、色胺、亚精胺、精胺、L-甲硫氨酸、L-半胱氨酸、丹磺酰氯、三甲胺、氧化三甲胺, sigma 公司;乙腈、丙酮、甲醇、盐酸、甲苯、苦味酸等为色谱纯,上海化学试剂公司;铁琼脂(IA)、营养肉汤(NB),青岛海博生物技术有限公司;葡萄糖、氧化酶、过氧化氢酶等细菌微量生化反应管,杭州微生物试剂有限公司;Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,杭州昊天生物科技有限公司;Taq 酶、dNTP、Marker DL2000、TRIzol Reagent RNA 提取试剂、反转录

试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II,宝生物工程有限公司;RNase-Free DNase I, MBI(Fermentas)公司。

### 1.3 实验仪器与设备

紫外可见光光度计 UV-2550,日本岛津公司;高效液相色谱仪 1100A,美国安捷伦科技公司;全自动凯氏定氮仪:KJELTEC2300,丹麦 FOSS 公司;洁净工作台,SW-CJ-2FD,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;凝胶成像系统,Quantity One system, Bio-Rad 公司;基因扩增仪,杭州博日科技有限公司;实时荧光定量 PCR 仪, iQTM5, 美国 Bio-Rad 公司。

### 1.4 实验方法

生化鉴定和 16S rDNA PCR 将甘油菌接种 LB 培养基活化后,分别接种氧化酶、过氧化氢酶、H<sub>2</sub>S、D-核糖、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐生化管,在 30 °C 培养 24 h 后观察。活化的细菌采用 Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒抽提 DNA, 16S rDNA PCR 扩增引物(表 1)和分析参考 Fonnesbech 等<sup>[3]</sup>。

表 1 PCR 扩增引物  
Tab.1 Primers of PCR amplification

靶基因 target gene	引物序列(5'-3') primer sequence	退火温度/°C annealing temperature	产物长度/bp product length
16S rRNA	F1:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R1:AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	52	1 490
<i>torA</i>	F2:TACCATGAACAGAAGAGACTTTTAA R2:TTAAGGTTAGATTTTCTACTTCGA	48	2 490
<i>torA</i> -RT	F3:ACAAACGCTTACACTCGCAAATG R3:TGCGTCGACAGGGCTGATA	63	99
16S rRNA-RT	F4:CGGCGGACG GGTGAGTAAT R4:CCGTAGGGCGTATGCGGTATTA	64	89

灭菌鱼汁和无茵鱼块的制备 参照 Dalgaard<sup>[7]</sup> 和 Herbert 等<sup>[8]</sup> 方法分别制备大黄鱼灭菌鱼汁和无茵鱼块。

灭菌鱼汁和无茵鱼块的接种 希瓦氏菌接种在灭菌鱼汁和无茵鱼块中的方法参照李学英等<sup>[4]</sup>。具体为将过夜培养的菌液(约 10<sup>8</sup> cfu/mL)离心,去上清液,用生理盐水稀释至 10<sup>6</sup> cfu/mL,以 1% 接种量添加到灭菌鱼汁中。将无茵鱼块分别浸入 *S. baltica* XH2 和 XH8, *S. putrefaciens* XH14 和 XH17 的生理盐水稀释的菌液,10 s 后捞出沥干,普通包装。将接种的无茵鱼块和灭菌鱼汁冷藏于(4 ± 0.1) °C,每隔 48 h 取出样品测定菌

落总数、挥发性盐基氮(TVB-N)、生物胺和三甲胺含量并感官评价。

感官评价 由 6 名专业的评价员进行评价,鱼块与鱼汁感官评价参照李学英等<sup>[4]</sup>。

菌落总数 采用 GB 4789.2 - 2010 方法<sup>[9]</sup> 平板倾注计数,用铁琼脂作为计数培养基。

TMA 测定 采用苦味酸法测定,参照 GB/T 5009.179 - 2003 方法<sup>[10]</sup> 和许龙福等<sup>[11]</sup> 方法略作修改,表示为 mg/100 g 鱼肉。

TVB-N 测定 参照 GB/T 5009.44 - 2003 方法<sup>[12]</sup> 中半微量定氮法测定,表示为 mg/100 g 鱼肉或 mg/100 mL 鱼汁。

生物胺测定 采用高效液相色谱法,提取、衍生、检测方法参照丁卓平等<sup>[13]</sup>。

*torA* 基因扩增和分析 根据 NCBI 中 *torA* 基因序列,采用 Primer Premier 6.0 软件设计特异性引物(表 1)。过夜培养 4 株细菌抽提 DNA 后,进行 PCR 扩增:94 °C 预变性 5 min;94 °C 40 s,48 °C 60 s,72 °C 100 s,30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。引物合成和 PCR 产物测序均由海铂尚生物有限公司完成。序列经 DNA Star 软件中的 editseq 和 seqman 进行编辑和拼接后,用 BLASTN 和 X 程序在 GenBank 中进行核苷酸和氨基酸序列的相似性分析。采用 MEGA 5.0 软件构建 *torA* 基因的进化树,采用 Protparam 程序分别预测氨基酸序列的物理参数及疏水性,用重复 1 000 次的自展(Bootstrap)检验计算各分支的置信值。

RT-PCR 测定 *torA* 基因表达量 用 Primer 6.0 设计 *torA* 基因 RT-PCR 的引物,以 16S rRNA 作为内参(表 1)。4 株希瓦氏菌生长 12 h 后,采用 TRIzol Reagent 和 RNase-Free DNase I 试剂盒提取总 RNA。利用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit 和 gDNA Eraser 合成 cDNA 第一链。采用 Power SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行荧光定量 PCR,每个样本设 3 个重复。RT-PCR 检测参照 Ansaldi 等<sup>[14]</sup>方法。

### 1.5 数据处理

每组样品设 3 个重复,采用 Microsoft Excel 和 Origin 8.0 进行数据处理和作图,并利用 SPSS 17.0 的 ANOVA 进行方差分析,采用 Duncan's 法进行多重比较, $P < 0.05$  表示有统计学显著性差异,结果为平均值  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)。

## 2 结果与分析

### 2.1 产 H<sub>2</sub>S 菌株的分离和鉴定

挑取 22 株产 H<sub>2</sub>S 菌经分离纯化后,生化实验结果显示,分离株均为 G-短杆菌,还原 TMAO,产 H<sub>2</sub>S,氧化酶和过氧化氢酶为阳性,不利用 D-核糖、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐。其生化特性与希瓦氏菌属相似,该属细菌能还原 TMAO,产生 H<sub>2</sub>S,大部分不发酵葡萄糖,而不同希瓦氏菌种生化特性略有差异<sup>[3]</sup>。扩增细菌 16S rDNA,测序获得 1 490 bp 片段,BLASTN 比较发现分离菌株均为 *Shewanella*。在 22 株希瓦氏菌中,*S. baltica* 占

54.5%,包括 XH1、XH2、XH4、XH5、XH8、XH9、XH11、XH19、XH39、XH40 和 XH41,与 *S. baltica* OS155 相似性高;*S. putrefaciens* 占 40.9%,包括 XH3、XH6、XH7、XH10、XH12、XH14、XH17、XH18 和 XH20,与 *S. putrefaciens* CN-32 亲缘关系较近,哈夫尼希瓦氏菌(*S. hafniensis*)占 4.5%,为 XH13 和 XH15 分离株。22 株 16S rDNA 序列获得了 NCBI 登录号(KJ922520-922537 和 KJ755968-755971)。结合生化和 16S rDNA 鉴定表明,大黄鱼源产 H<sub>2</sub>S 菌为希瓦氏菌,其中主要为 *S. baltica* 和 *S. putrefaciens*。

### 2.2 希瓦氏菌在鱼汁中致腐能力的初步分析

感官评定和 TVB-N 是评价水产品品质的重要指标,其中 TVB-N 主要包括鱼体在腐败过程中分解蛋白质形成的三甲胺、二甲胺、氨类和其他含氮物质<sup>[15]</sup>。*Shewanella* 在鱼汁冷藏条件下的致腐能力存在显著差异( $P < 0.05$ ),其中感官评价和 TVB-N 含量表现出相似的趋势,鱼汁在冷藏 96 h 后感官和 TVB-N 含量显著高于 48 h,在冷藏 96 h 后,*Shewanella* 分离株 XH1、XH2、XH3、XH4、XH5、XH6 和 XH8 感官评分高于 7,TVB-N 值大于 35 mg/100 mL,致腐能力较强,XH7、XH9、XH10、XH11、XH12、XH13、XH15、XH18 和 XH41 号感官评分在 5~7 之间,TVB-N 值大于 25 mg/100 mL,致腐能力中等,其余菌株评分皆在 5 之下,致腐能力较弱(图 1)。结果表明,希瓦氏菌在灭菌鱼汁中表现出不同的致腐能力,其中 *S. baltica* XH2 和 XH8 为强致腐菌,*S. putrefaciens* XH14 和 XH17 弱致腐菌。许振伟等<sup>[16]</sup>研究表明接种腐败希瓦氏菌的灭菌鱼汁达到感官拒绝点时,TVB-N 值是 29.64 mg/100 mL,与本研究结果一致。

### 2.3 4 株希瓦氏菌在无菌鱼块中致腐能力的评价

感官变化 接种希瓦氏菌的无菌鱼块在冷藏条件下,感官评分逐步增加( $P < 0.05$ ),并出现明显的腥臭味,上升趋势显著快于对照组( $P < 0.05$ )(图 2-a)。接种 XH2、XH8、XH14 和 XH17 细菌之间缺点评分有明显的差别( $P < 0.05$ ),在冷藏的 108 h 感官评分分别为 4.6、4.0、3.5 和 3.2,其中 XH2 感官评分最高,XH8 菌次之,XH14 和 XH17 菌较慢。因此,感官评分发现 XH2 菌株最早出现腐败味和酸败味,XH17 菌表现最慢。

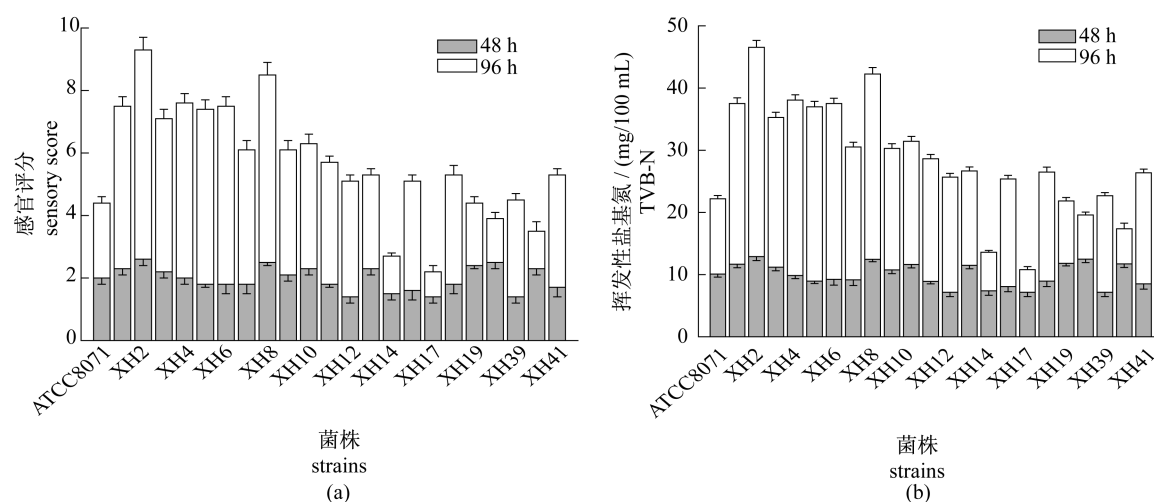


图 1 接种于无菌鱼汁中的 22 株产  $H_2S$  菌株在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  时感官评分和 TVB-N 的变化

Fig. 1 Changes in TVB-N and sensor evaluation of sterilized fish juice during storage at  $4\text{ }^\circ\text{C}$

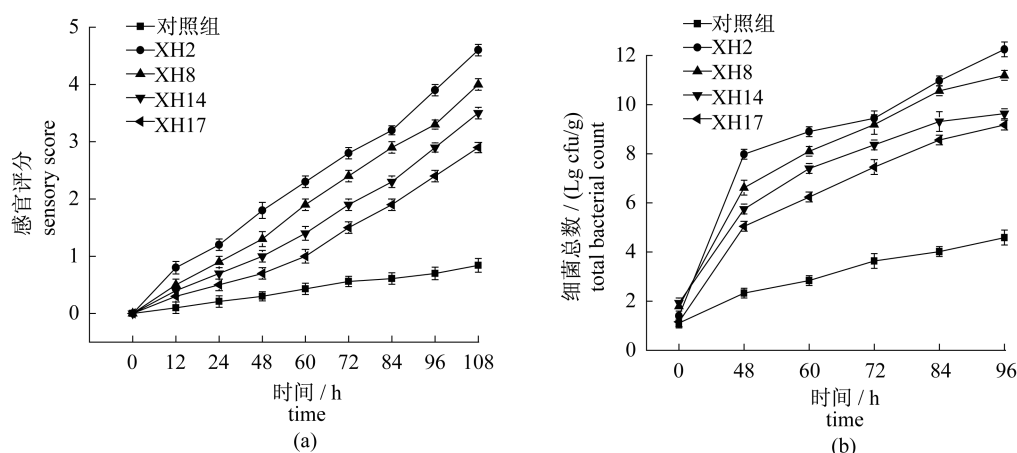


图 2 无菌鱼块在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冷藏过程中感官评分和细菌总数的变化

Fig. 2 Changes in sensory evaluation and TVC of sterile fish block during storage at  $4\text{ }^\circ\text{C}$

**细菌总数** 无菌鱼块的初始菌落总数 (TVC) 为  $1.11\text{ Lg cfu/g}$ , 接种细菌鱼块初期的菌落总数为  $1.16\sim 1.93\text{ Lg cfu/g}$  (图 2-b)。在冷藏过程中, 无菌鱼块细菌增长缓慢, 而接种 XH2、XH8、XH14 和 XH17 细菌的灭菌鱼块在 48 h 内繁殖迅速 ( $P < 0.05$ ), 其中 XH2 菌增长最快, 在 48 h 时菌落总数接近  $8\text{ Lg cfu/g}$ , 96 h 达到  $12\text{ Lg cfu/g}$ , 接种 XH8 菌的鱼块次之, 而 XH14 和 XH17 菌株鱼块细菌增长显著慢于 XH2 和 XH8 菌 ( $P < 0.05$ ), 在 96 h 接种 2 种菌的鱼块的菌落总数仅为  $9\text{ Lg cfu/g}$ 。

**TMA** TMAO 广泛分布于海产硬骨鱼类的肌肉中, 是一种鲜味物质。鱼体内氧化三甲胺还原酶具有还原 TMAO 为 TMA 的作用, TMA 含

量随着鱼体品质下降而逐渐增加<sup>[17]</sup>。与对照组相比, 接种细菌的鱼块随着冷藏时间的延长, TMA 含量显著性增加 ( $P < 0.05$ ) (图 3-a)。细菌间 TMA 的增加存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其中 XH2 菌增加最快。在冷藏 108 h 后, 接种 XH2、XH8、XH14 和 XH17 菌的 TMA 含量分别为  $21.93$ 、 $17.48$ 、 $14.53$  和  $12.47\text{ mg/100 g}$ 。

**TVB-N** 作为水产品评价指标, TVB-N 在  $30\sim 35\text{ mg/100 g}$  被认为是可接受范围。灭菌鱼块在初期的 TVB-N 值低于  $10\text{ mg/100 g}$ , 在冷藏过程中增长缓慢。而接种 4 株细菌的鱼块在前 60 h 缓慢增加, 之后增长迅速 ( $P < 0.05$ ), 其含量显著高于对照组, 且 4 组样品中 TVB-N 变化存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。接种 XH2 菌的鱼块 TVB-N

N 值积累最快,其中在 70 h 时 TVB-N 值超过了 30 mg/100 g, XH8 和 XH14 菌次之, XH17 菌最慢。鱼块在冷藏 108 h 后, XH2、XH8、XH14 和

XH17 菌的 TVB-N 分别为 51.52、44.24、38.15 和 29.26 mg/100 g(图 3-b)。

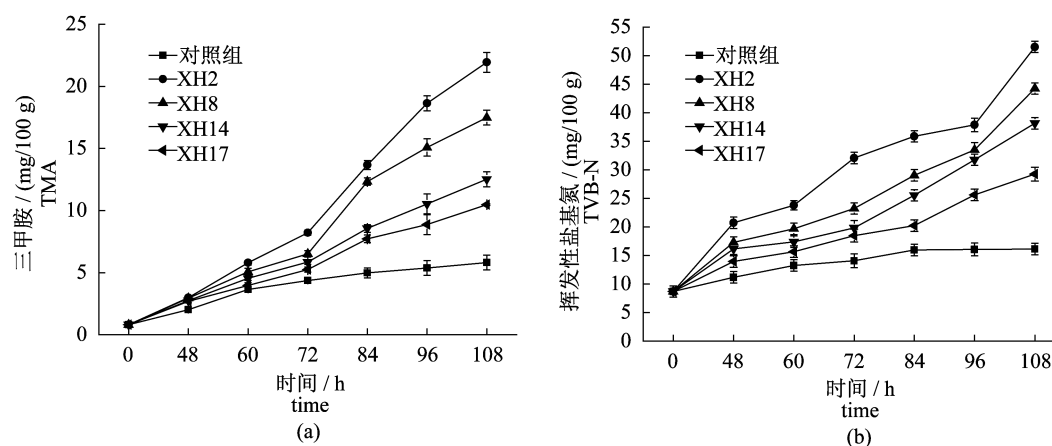


图 3 鱼块在 4 °C 冷藏过程中 TMA 和 TVB-N 含量的变化

Fig. 3 Changes in TMA and TVB-N of sterile fish block during storage at 4 °C

表 2 无菌鱼块在 4 °C 冷藏过程中生物胺含量的变化

Tab. 2 Changes in biogenic amines of sterile fish block during storage at 4 °C

菌株 strains	生物胺含量/(mg/kg) biogenic amine content							
	72 h				108 h			
	色胺 tryptamine	腐胺 putrescine	尸胺 cadaverine	酪胺 tyramine	色胺 tryptamine	腐胺 putrescine	尸胺 cadaverine	酪胺 tyramine
对照组	332.5 ± 9.22 <sup>c</sup>	697.3 ± 5.00 <sup>a</sup>	1 093.2 ± 5.92 <sup>a</sup>	170.8 ± 4.02 <sup>a</sup>	599.2 ± 20.73 <sup>c</sup>	1 491.2 ± 13.27 <sup>a</sup>	1 694.1 ± 18.41 <sup>a</sup>	300.4 ± 10.55 <sup>a</sup>
XH2	250.17 ± 4.28 <sup>a</sup>	1 891.32 ± 16.37 <sup>e</sup>	2 307.45 ± 7.39 <sup>d</sup>	203.11 ± 5.76 <sup>b</sup>	501.2 ± 11.03 <sup>a</sup>	2 721.2 ± 9.75 <sup>e</sup>	3 046.7 ± 18.07 <sup>e</sup>	360.0 ± 8.23 <sup>b</sup>
XH8	290.43 ± 6.67 <sup>b</sup>	1 334.68 ± 8.87 <sup>d</sup>	2 289.73 ± 5.41 <sup>d</sup>	231.43 ± 3.73 <sup>c</sup>	541.0 ± 17.69 <sup>b</sup>	1 841.0 ± 7.39 <sup>d</sup>	2 823.1 ± 15.99 <sup>d</sup>	488.7 ± 8.21 <sup>c</sup>
XH14	679.36 ± 12.82 <sup>d</sup>	1 188.15 ± 6.93 <sup>c</sup>	2 066.56 ± 5.73 <sup>c</sup>	376.96 ± 6.55 <sup>d</sup>	1 361.0 ± 18.12 <sup>d</sup>	1 623.8 ± 13.70 <sup>c</sup>	2 729.8 ± 17.01 <sup>c</sup>	728.4 ± 11.52 <sup>d</sup>
XH17	884.43 ± 6.86 <sup>e</sup>	980.67 ± 12.09 <sup>b</sup>	1 299.43 ± 9.62 <sup>b</sup>	499.67 ± 5.81 <sup>e</sup>	1 453.5 ± 17.14 <sup>e</sup>	1 528.9 ± 9.80 <sup>b</sup>	1 754.3 ± 13.36 <sup>b</sup>	858.8 ± 13.17 <sup>e</sup>

注:表格中同列不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Notes: different letters within the same column mean significant difference ( $P < 0.05$ )

生物胺 接种 4 株菌的无菌鱼块随着 4 °C 冷藏时间的延长,生物胺含量逐步增加。在 108 h 后,样品中尸胺含量最高,腐胺和色胺次之,酪胺最低,并且接种 4 个细菌的样品中生物胺的形成具有显著差异( $P < 0.05$ ),XH2 菌尸胺和腐胺含量明显高于 XH8、XH14 和 XH17 ( $P < 0.05$ ),XH17 菌生成的色胺和酪胺含量较高( $P < 0.05$ ) (表 2)。Baixas 等<sup>[18]</sup>采用生物胺指标评价冷藏鳕鱼新鲜度时,发现尸胺是与腐败希瓦氏菌关系最密切的胺类。

#### 2.4 4 株希瓦氏菌 *torA* 基因序列扩增和分析

在 *S. baltica* XH2、XH8 和 *S. putrefaciens* XH14、XH17 菌株中均扩增出 *torA* 基因全长特异性片段,将 PCR 扩增产物纯化测序后,得到 4 株

菌长度为 2 490 bp 的 *torA* 基因序列。将序列用 BLASTx 比较后发现,4 株细菌与已知 *S. baltica* OS185 的 *torA* 相似性高于 94%,与 *S. putrefaciens* 的 *torA* 相似性为 85% (图 4-a)。采用 MEGA 5.0 建立了 4 株菌的 *torA* 基因序列和 NCBI 中 *S. baltica* OS185、*S. putrefaciens* MR-1、费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) ES114、宋内志贺氏菌 (*Shigella sonnei*) Ss046、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) O157 的 *torA* 序列的进化树图谱,发现 *S. baltica* XH2 和 XH8 与 *S. baltica* OS185 的亲缘关系较近,同源性均为 98%,XH14 和 XH17 与 *S. putrefaciens* 的同源性为 85%。而与费氏弧菌 ES114、大肠杆菌 O157 和宋内志贺氏菌 Ss046 的同源性较低,分别为 64%、56% 和 53% (图 4-b)。

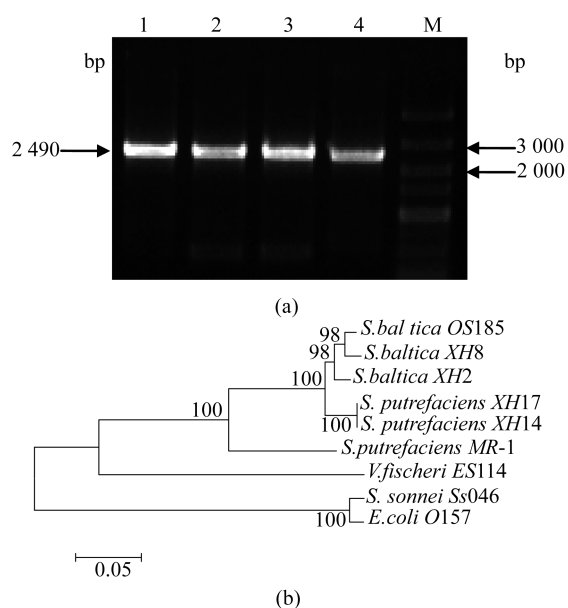


图 4 4 株希瓦氏菌 *torA* 基因扩增和进化树分析

1. XH2, 2. XH8, 3. XH14, 4. XH17, M. Marker DL5000

Fig. 4 Amplification and phylogenetic tree of *torA* gene from four *Shewanella* strains

1. XH2, 2. XH8, 3. XH14, 4. XH17, M. Marker DL5000

## 2.5 4 株希瓦氏菌 *torA* 基因表达量

采用 RT-PCR 比较 4 株致腐能力差异希瓦氏菌 *torA* 基因表达量,在 LB-TMAO 肉汤中培养 12 h 后,4 株希瓦氏菌都检测出 *torA* 基因表达,其表达量存在显著差异 ( $P < 0.05$ ),其中 *S. baltica* XH2 表达量最高,XH8 次之,XH14 和 XH17 较低(图 5)。

## 2.6 4 株希瓦氏菌 TorA 预测蛋白分析

采用 ProtParam 程序和 Kyte & Doolittle 法预测 4 株菌 TorA 蛋白的物理参数、分子式、分子

量、理论等电点、不稳定指数和疏水性(表 3)。4 株希瓦氏菌 TorA 蛋白的氨基酸个数都是 829,分子总量分别为 12 828 ~ 12 849 u。发现该蛋白质性质稳定,均为亲水性蛋白质,其中甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)和缬氨酸(Val)含量较高,半胱氨酸(Cys)含量低。*S. baltica* XH2 TorA 蛋白的分子量和不稳定指数最大,而 *S. putrefaciens* XH17 最小;*S. baltica* XH2 TorA 蛋白理论等电点、总平均疏水性及甘氨酸、丙氨酸含量最小,而 *S. putrefaciens* XH17 最大。结果显示,致腐能力差异的希瓦氏菌在 TorA 蛋白的理化特性存在差异,可能导致蛋白质的高级结构和酶活性位点不同,从而影响酶催化能力。

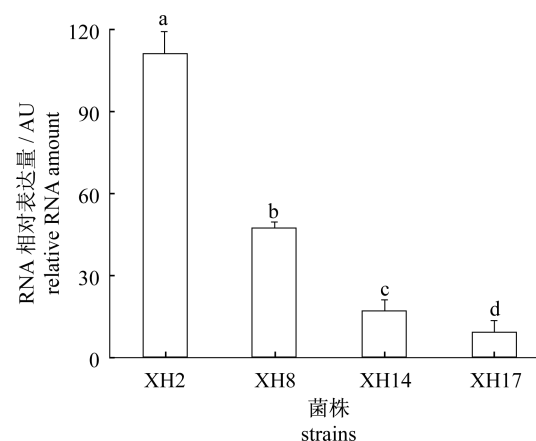


图 5 4 株希瓦氏菌 *torA* 基因的表达差异

柱状图上不同字母表示显著差异 ( $P < 0.05$ )

Fig. 5 The difference of *torA* genes expression in four *Shewanella* strains

Different letters in the each column mean significantly differences ( $P < 0.05$ )

表 3 4 株希瓦氏菌 TorA 预测蛋白的理化性质  
Tab. 3 The physicochemical properties of TorA protein in four *Shewanella* strains

	XH2	XH8	XH14	XH17
分子式 formula	$C_{4131}H_{6343}N_{1125}O_{1213}S_{37}$	$C_{4128}H_{6337}N_{1125}O_{1212}S_{37}$	$C_{4122}H_{6337}N_{1125}O_{1207}S_{37}$	$C_{4124}H_{6341}N_{1125}O_{1207}S_{37}$
分子量/ku molecular weight	92.36	92.3	92.15	92.18
理论等电点 theoretical pI	6.52	6.52	6.71	6.71
不稳定指数 aliphatic index	27.62	27.38	27.19	27.08
甘氨酸/% Gly	9.5	9.5	9.7	9.7
丙氨酸/% Ala	7.0	7.1	7.4	7.2
缬氨酸/% Val	7.0	7.0	6.9	7.0
半胱氨酸/% Cys	1.6	1.6	1.6	1.6
总平均疏水性 grand average of hydrophobicity	-0.357	-0.350	-0.341	-0.338

### 3 讨论

研究表明,海产品的腐败进程与产  $H_2S$  的革兰氏阴性细菌存在较大关联<sup>[1]</sup>。Dalgaard<sup>[7]</sup>研究低温鳕鱼块腐败时发现分离株约 99% 是希瓦氏菌属。本研究发现,冷藏大黄鱼货架期终点优势腐败菌主要是产  $H_2S$  菌株,采用生理生化和 16S rDNA 鉴定,发现产  $H_2S$  菌株均为希瓦氏菌,其中主要为 *S. baltica* (54.5%) 和 *S. putrefaciens* (40.9%)。Fonnesbech 等<sup>[3]</sup>在 3 种冷藏海水鱼中分离的 500 多株产  $H_2S$  菌,表型鉴定都为希瓦氏菌属,其中大多数希瓦氏菌为 *S. baltica*。通过感官评分和 TVB-N 指标分析了希瓦氏菌在灭菌鱼汁中致腐能力,发现具有显著差异,其中 *S. baltica* XH2 和 XH8 菌为强致腐菌,而 *S. putrefaciens* XH14 和 XH17 菌为弱致腐菌。进一步采用感官、细菌总数结合腐败产物(TMA、TVB-N 和生物胺)分析接种评价 4 株希瓦氏菌无菌鱼块致腐能力,发现 *S. baltica* XH2 和 XH8 能较快产生腐败的感官特征,细菌增殖快速,具有较强还原 TMAO 成 TMA 的能力,形成较高含量 TVB-N、尸胺和腐胺。无菌鱼块是天然培养基,尽管本身含有一定数量的微生物,但制备后鱼块菌落总数小于  $10^2$  cfu/g<sup>[19]</sup>,研究采用无菌鱼块进一步分析了致腐能力差异的希瓦氏菌,证实了希瓦氏菌是冷藏大黄鱼中主要腐败菌,其中 *S. baltica* XH2 菌为 SSO。

在冷藏海水鱼中希瓦氏菌的腐败特性主要与嗜冷性、形成具有腥臭味的 TMA 有关。TMAO 还原酶是一类存在于微生物体内,能够将 TMAO 还原为 TMA 的酶,编码 TMAO 还原酶的基因是 *torCAD* 操纵子和 *torRTS* 调控序列,其中 *torA* 基因编码生成 TMAO 还原酶<sup>[14,20-22]</sup>。本研究表明,*S. baltica* XH2 和 XH8、*S. putrefaciens* XH14 和 XH17 菌都存在 *torA* 基因,序列具有很高的同源性,并且与弧菌、肠杆菌科的 *torA* 基因有一定亲源关系。RT-PCR 发现 4 株希瓦氏菌 *torA* 基因表达量与致腐能力存在正相关,*S. baltica* XH2 表达量明显高于其他 3 株菌,导致 *S. baltica* XH2 产生的高活性 TMAO 还原酶,催化大黄鱼体内 TMAO 形成大量的 TMA。TorA 蛋白的理化性质及氨基酸预测发现,4 株菌 TorA 蛋白的空间结构、理论等电点、不稳定指数及氨基酸组成存在差

异,其中强致腐菌 XH2 和 XH8 相似,弱致腐菌 XH14 和 XH17 相似。因此,特定腐败菌 *S. baltica* XH2 较强致腐能力还与特定蛋白的空间结构和性质有关。本研究从 TMAO 还原酶角度初步探讨希瓦氏菌致腐差异机制,为后续希瓦氏菌致腐机理阐明和调控研究奠定了良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria-problems and solutions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 262-266.
- [2] Gram L, Huss H H. Fresh and processed fish and shellfish[M] // Lund B M, Baird P A, Gould G W, et al. Microbiological safety and quality of food. New York: Aspen Publishers Inc., 2000: 472-506.
- [3] Fonnesbech V B, Venkateswaran K, Satomi M, et al. Identification of *Shewanella baltica* as the most important  $H_2S$ -producing species during iced storage of Danish marine fish [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6689-6697.
- [4] Li X Y, Yang X S, Guo Q Y, et al. Preliminary analysis on the ability to spoilage of *Pseudosciaena crocea* spoilage bacteria [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(6): 316-319. [李学英, 杨宪时, 郭全友, 等. 大黄鱼腐败菌腐败能力的初步分析. 食品工业科技, 2009(6): 316-319.]
- [5] Li X Y, Xu Z, Yang X S, et al. Analysis of microbial spoilage ability and characterization of specific spoilage organism for *Pseudosciaena crocea* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(4): 547-552. [李学英, 许钟, 杨宪时, 等. 大黄鱼腐败菌腐败能力分析 with 特定腐败菌鉴别. 上海海洋大学学报, 2010, 19(4): 547-552.]
- [6] Lan W Q, Xie J. Effect of complex biological fresh-keeping agents for the main bacteria composition on cutlassfish *Trichiurus haumela* under the cold storage by PCR and physiology-biochemistry technology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(10): 330-335. [蓝蔚青, 谢晶. 传统生理生化鉴定技术结合 PCR 法分析复合保鲜剂对冷藏带鱼贮藏期间菌相变化的影响. 食品工业科技, 2012, 33(10): 330-335.]
- [7] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish [J]. International Journal of Food Microbiology, <http://www.sexuebao.cn>

- 1995,26(3):319-333.
- [ 8 ] Herbert R A, Hendrie M S, Gibson D M, *et al.* Bacteria active in the spoilage of certain sea foods [ J ]. *Journal of Applied Microbiology*, 1971, 34 ( 3 ) : 41 - 50.
- [ 9 ] GB/T 4789. 2 - 2010. Food microbiological examination: Aerobic plate count [ S ]. Beijing: Standards Press of China. [ GB/T 4789. 2 - 2010. 食品微生物学检验 - 菌落总数测定. 北京: 中国标准出版社, 2010. ]
- [ 10 ] GB/T 5009. 179 - 2003. Methods of food hygienic analysis-physical and chemical section [ S ]. Beijing: Standards Press of China. [ GB/T 5009. 179 - 2003. 食品卫生检验方法理化部分. 北京: 中国标准出版社, 2003. ]
- [ 11 ] Xu F L, Yu F L, Hu Z Y, *et al.* Amendment of method for determination of trimethylamine nitrogen in ham [ J ]. *Preventive Medicine Tribune*, 2006, 11 ( 6 ) : 641 - 643. [ 许龙福, 俞飞兰, 胡振友, 等. 火腿中三甲胺氮测定方法的修订及验证. 预防医学论坛, 2006, 11 ( 6 ) : 641 - 643. ]
- [ 12 ] GB/T 5009. 44 - 2003. Methods of food hygienic analysis-physical and chemical section [ S ]. Beijing: Standards Press of China. [ GB/T 5009. 44 - 2003. 食品卫生检验方法理化部分. 北京: 中国标准出版社, 2003. ]
- [ 13 ] Ding Z P, Liu C Q, Chen D. Determination of ten biogenic amines in fishery products by high performance liquid chromatography [ J ]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2006, 25 ( 4 ) : 59 - 62. [ 丁卓平, 刘辰麒, 陈迪, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中 10 种生物胺的研究. 分析测试学报, 2006, 25 ( 4 ) : 59 - 62. ]
- [ 14 ] Ansaldi M, Théraulaz L, Baraquet C, *et al.* Aerobic TMAO respiration in *Escherichia coli* [ J ]. *Molecular Microbiology*, 2007, 66 ( 2 ) : 484 - 494.
- [ 15 ] Man C M D, Jones A A. Shelf life evaluation of foods [ M ]. London: Blackie Academic & Professional, 1994.
- [ 16 ] Xu Z W, Xu Z, Yang X S, *et al.* Comparative evaluation of two methods for determining spoilage ability of fish spoilage bacterium *Shewanella putrefaciens* [ J ]. *Food Science*, 2010, 31 ( 20 ) : 355 - 359. [ 许振伟, 许钟, 杨宪时, 等. 鱼类腐败菌腐败能力测定方法. 食品科学, 2010, 31 ( 20 ) : 355 - 359. ]
- [ 17 ] Jaffrès E, Sohier D, Leroi F, *et al.* Study of the bacterial ecosystem in tropical cooked and peeled shrimps using a polyphasic approach [ J ]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 131 ( 1 ) : 20 - 29.
- [ 18 ] Baixas N S, Bover C S, Veciana N M T, *et al.* Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) [ J ]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68 ( 11 ) : 2433 - 2438.
- [ 19 ] Guo Q Y, Xu Z, Yang X S. Research on quality change characteristics and bacteria flora of chilling cultured *Pseudosciaena crocea* [ J ]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15 ( 2 ) : 216 - 221. [ 郭全友, 许钟, 杨宪时. 冷藏养殖大黄鱼品质变化特征及细菌相分析. 上海水产大学学报, 2006, 15 ( 2 ) : 216 - 221. ]
- [ 20 ] Dos Santos J P, Iobbi N C, Couillault C, *et al.* Molecular analysis of the trimethylamine *N*-oxide ( TMAO ) reductase respiratory system from a *Shewanella* species [ J ]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 284 ( 2 ) : 421 - 433.
- [ 21 ] Silvestro A, Pommier J, Pascal M C, *et al.* The inducible trimethylamine *N*-oxide reductase of *Escherichia coli* K12: Its localization and inducers [ J ]. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1989, 999 ( 2 ) : 208 - 216.
- [ 22 ] Ansaldi M, Bordi C, Lepelletier M, *et al.* TorC apocytochrome negatively autoregulates the trimethylamine *N*-oxide ( TMAO ) reductase operon in *Escherichia coli* [ J ]. *Molecular Microbiology*, 1999, 33 ( 2 ) : 284 - 295.



## Preliminary mechanism of different spoilage potential of specific spoilage organism, *Shewanella*, in refrigerated *Larimichthys crocea*

ZHAO Erke<sup>1</sup>, ZHU Junli<sup>1\*</sup>, FENG Lifang<sup>1</sup>, SHI Yongqing<sup>1</sup>, LI Jianrong<sup>2</sup>

(1. College of Food Science & Biotechnology of Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China;

2. Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

**Abstract:** To evaluate the mechanism of different spoilage potential of the specific spoilage organism (SSO), *Shewanella*, H<sub>2</sub>S-producing bacteria isolated from the refrigerated *Larimichthys crocea* were identified using the physicochemical reactions and 16S rDNA. Four strains with different spoilage potential were selected in the sterile fish juice and fish block. The gene and expression of trimethylamine oxidation (TMAO) reductase in four strains were amplified and determined, and physicochemical properties of the protein were predicted. The results showed that all H<sub>2</sub>S-producing bacteria were identified as *Shewanella*, in which *S. baltica*, *S. putrefaciens* and *S. hafniensis* accounted for 54.5%, 40.9% and 4.5%, respectively. Significant differences of the spoilage potential were in fish juice among *Shewanella* observed. The sensory score and TVB-N content of isolates *S. baltica* XH2 and XH8 were significantly higher than those of the other strains ( $P < 0.05$ ), whereas the indicators of isolates *S. putrefaciens* XH14 and XH17 were the lowest. The sample inoculated *S. baltica* XH2 was found to produce off-odors after 72 h, higher than 10<sup>7</sup> cfu/g of TVC after 48 h, strong reduction ability of TMAO to TMA, high accumulation of TVB-N, cadaverine and putrescin, followed by *S. baltica* XH8, *S. putrefaciens* XH14 and XH17. The 2 490 bp fragment of *torA* gene were amplified in four *Shewanella* isolates. Expression of *torA* gene of four isolates was correlated with the spoilage potential. Furthermore, the highest molecular weight and aliphatic index of predicted TorA protein were observed, whereas theoretical pI and gravity were the lowest in *S. baltica* XH2. Thus, SSO in chilled *L. crocea* was *S. baltica* XH2, and the high spoilage potential in the isolate was associated with high level of *torA* expression and some physicochemical properties of TorA protein. It provides a good foundation to clarify the mechanism of spoilage in *Shewanella*.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; *Shewanella*; TMAO reductase; *torA* gene; spoilage ability

**Corresponding author:** ZHU Junli. E-mail: junlizhu0305@163.com