



波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌致腐性及 TorA还原酶差异比较

毕伟伟, 冯立芳, 石双妮*, 缪晨豪, 朱军莉*, 田迪英

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310018)

摘要: 为了研究冷藏海产品中腐败菌希瓦氏菌和气单胞菌的致腐性差异, 本实验比较分析了大黄鱼源波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌在28 °C和4 °C下的生长及三甲胺(TMA)、生物胺和挥发性盐基氮(TVB-N)的生成; 通过PCR技术扩增2种腐败菌的氧化三甲胺还原酶基因(*torA*), 利用生物信息学比较TorA蛋白的相似性、理化特性和蛋白空间结构。结果显示, 杀鲑气单胞菌在28 °C生长较快, 而波罗的海希瓦氏菌在4 °C生长更快。相对于杀鲑气单胞菌形成较高的尸胺, 波罗的海希瓦氏菌产生更多TMA和腐胺, 在冷藏鱼汁中积累更高TVB-N。同时在波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中分别扩增出2 490和1 959 bp的*torA*基因, 2种TorA蛋白与同属菌相似性高于97%, 而二者相似性仅为36.90%。波罗的海希瓦氏菌TorA蛋白的分子量和等电点分别为92.3 ku和6.52, 甘氨酸含量最高, 而杀鲑气单胞菌中TorA蛋白的分子量和等电点分别为90.6 ku和6.74, 丙氨酸含量最高, 蛋白结构差异明显。且希瓦氏菌中*torA*和鸟氨酸脱羧酶(DOC)基因表达量分别为气单胞菌的1.26和19.04倍。可见, 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌为海产品嗜冷腐败菌, 其中希瓦氏菌胺类代谢能力更强, 与其TorA特定理化特性和高表达量相关。本研究为揭示海产品微生物的致腐机制提供理论支持。

关键词: 希瓦氏菌; 气单胞菌; 致腐性; TorA

中图分类号: S 984.1

文献标志码: A

海产品肉质鲜美, 富含优质蛋白质、omega-脂肪酸、必需微量营养素和矿物质, 消费量逐年增加^[1]。由于含水量高、质地脆弱、捕获集中, 海产品在加工和冷链贮运中体内发生内源酶自溶、腐败微生物代谢及不饱和脂肪酸氧化等复杂的生化反应, 引起品质劣变, 腐败损失率很严重, 造成海洋资源的浪费^[2]。海产品体表和肠道内寄生着多种微生物, 随着体内的生化反应进程, 微生物逐步向鱼肉组织内部扩散, 分解蛋白质等营养物质生成胺、硫化物、醇、醛、酮和有机酸等, 产生不良气味, 使产品在感官上不可接受。据统计, 全球约30%捕捞鱼类的损失是由微生物单独活动引起^[3]。在食品复杂

的微生物菌相中, 只有一种或几种特定腐败菌(specific spoilage organism, SSO)起主导作用^[4]。波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)可产H₂S、生成三甲胺(TMA), 从而导致鱼体腐败并出现酸臭等异味, 是多种海产品在贮运过程中品质下降的特定腐败菌^[5]。杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)为气单胞菌属(*Aeromonas*)的革兰氏阴性直杆菌, 是水产养殖业重要的条件致病菌和生鲜鱼类贮藏中的腐败菌。孟玉霞等^[6]发现, 冷藏养殖大黄鱼(*Larimichthys crocea*)优势腐败菌有腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)、波罗的海希瓦氏菌、热死环丝菌(*B. thermosphacta*)和温和气单胞菌(*A. sobria*)。

收稿日期: 2019-01-24 修回日期: 2019-08-01

资助项目: 浙江省自然科学基金(Y19C200005); 浙江省教育厅项目(Y201839893); 浙江省分析测试项目(LGC19C200004)

通信作者: 石双妮, E-mail: 709622636@qq.com; 朱军莉, E-mail: junlizhu0305@163.com

海产品微生物的致腐性与内源酶活性密切相关,其中还原酶和脱羧酶是参与胺类形成的重要酶。氧化三甲胺(TMAO)广泛存在于海洋环境和海产品中,具有维持海产鱼类的渗透压、呈鲜成分及稳定蛋白质结构等功能^[7]。TMAO还原酶是一类存在微生物体内,能将TMAO还原为TMA的酶。TMA是一种高挥发性胺类,具有腥味,为海产品腐败中“腥臭味”的主要来源^[8]。研究表明,TMAO还原酶包括torCAD操纵子和torRTS调控序列,其中torA基因编码生成TMAO还原酶^[9]。Méjean等^[10]发现在大肠杆菌中TMAO呼吸(Tor)系统中的还原酶(TorA)含有辅助因子的双钼胍鸟嘌呤二核苷酸(bis-MGD)形式的钼酶和含有5个血红素的C-型细胞色素(TorC)。因此,TorA蛋白在腐败菌的胺类代谢中起重要作用。

目前,已报道希瓦氏菌和气单胞菌为海产品中重要的腐败菌,然而其致腐差异及其机制仍未深入研究。鉴于此,本研究比较分析大黄鱼分离株波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌在常温和冷藏条件下的生长和胺类代谢产物积累,从TMAO还原酶角度解析2种微生物的致腐差异,为阐明海产品微生物致腐机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌均为冷藏大黄鱼中分离的腐败菌,经生化和16S *rRNA*鉴定(16S *rRNA*的登录号分别为KT716389和KU870472),为本实验室保存。LB肉汤、胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)等培养基均购于青岛海博生物技术有限公司。酪胺、腐胺、鸟胺、组胺、尸胺和色胺等生物胺标准品购于美国Sigma公司。PCR扩增的试剂Taq酶、dNTP Mix等均购于TaKaRa公司,引物合成和4S Green Plus核酸染料购于生工生物工程(上海)股份有限公司。PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, TRIzol购于Thermo Fisher Scientific公司; GoScript™ Reverse Transcription试剂盒、RQ1 RNase-Free DNase购于Promega公司。

1.2 实验方法

生长曲线测定 将过夜活化的波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌以1%浓度接种于LB肉汤中,分别培养在4℃和28℃下,用稀释涂布平板法计数并统计不同培养时间菌液中所含菌体总数,并作出生长曲线。

三甲胺(TMA)测定 将过夜活化的波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌分别以1%浓度接种于含10 mmol/L TMAO的LB肉汤培养基中,分别置于4℃和28℃下培养。利用苦味酸法^[11],即1 mL上清液中分别加入3 mL蒸馏水、1 mL 10%甲醛、3 mL 25% KOH、5 mL 甲苯,强力振荡均匀后水浴5 min,取2 mL甲苯层与等量苦味酸混合,并于413 nm处测定吸光值,根据标准曲线计算TMA生成量,表示为mg/100 mL菌液。

生物胺测定 将波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌分别以1%浓度接种于LB培养基(含0.50% L-赖氨酸盐酸盐、0.25% L-鸟氨酸盐酸盐、含0.000 5%吡哆醛溶剂的0.25% L-络氨酸二钠盐),置于4℃和28℃下培养。参照Wang等^[12]和赵二科等^[13]的方法提取生物胺:1 mL样品菌液与4 mL 0.4 mol/L高氯酸充分混匀经离心后,取1 mL上清液于5 mL棕色容量瓶中,依次加入300 μL饱和NaHCO₃溶液、100 μL 2 mol/L NaOH溶液、2 mL 10 g/L丹酰氯并于4℃避光衍生40 min,加100 μL 25%浓氨水静置30 min,乙腈定容,混匀后过0.22 μm有机滤膜,并采用高效液相色谱法用C18柱测定样品中的生物胺,表示为mg/L菌液。

冷藏鱼汁中挥发性盐基总氮(TVB-N)测定 参照Dalgaard^[14]的方法,无菌均质袋中以1:2的比例加入新鲜大黄鱼脊背肉与无菌水,用均质机拍打成匀浆液后加热煮沸5 min,离心过滤后取上清液调节pH值为6.8,每100 mL上清液中加入1.6 g氧化三甲胺,40 mg L-甲硫氨酸和40 mg L-半胱氨酸,121℃高压灭菌后制备成新鲜大黄鱼灭菌鱼汁。将波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌分别以1%浓度接种于鱼汁中,置于4℃贮藏。参照GB/T 5009.44-2003方法^[15]中半微量定氮法测定在冷藏不同时间的TVB-N生成量,表示为mgN/100 mL鱼汁。

torA基因扩增 从NCBI数据库获得波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌的torA基因序列,利用Primer Premier 5.0软件在同源性较高的保守序列设计引物(表1)。采用Biospin细菌基因组DNA提取试剂盒抽提致腐菌的DNA,PCR反应体系为18.75 μL ddH₂O, 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture 2.0 μL, DNA模板、正反引物各0.5 μL, Taq酶为0.25 μL,共计25 μL。PCR后用1%琼脂糖凝胶电泳区分条带后,将产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,对测序后的DNA序列提交NCBI数据库,并分别获得登录号。

torA序列的生物信息学分析 采用

表 1 实验中所用的PCR和RT-PCR引物

Tab. 1 Primers of PCR and RT-PCR amplification used in this study

菌株 strains	基因 genes	序列 (5'-3') sequence	产物大小/bp product size
波罗的海希瓦氏菌 <i>S. baltica</i>	<i>torA</i>	F: CGGGTGCGAGGTATTGAG R: GCTGGCACAGAGGAAATCGT	2 590
杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	<i>torA</i>	F: GGTCCGGTGCAGGTATTG R: GCTGGCACAGAGGAAATCGT	2 136
波罗的海希瓦氏菌 <i>S. baltica</i>	<i>torA</i>	F: CCTGATGGACCGTATTGGGTTTGGGA R: CGCTTTGTTCGTGTAACGTGGGAC	86
	<i>ODC</i>	F: CAAGAGTGGCGAGCAGTCATTTCAT R: GCGATAATCCAACCTCGGCACCTA	156
杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	<i>torA</i>	F: GTGCGAGGTATTGAGCGACAG R: CCATCCCAAGTGGTATGAGCC	82
	<i>ODC</i>	F: CCTGCCATTGCGCCACAAC R: CACATAAGGCCCAACATAACG	189
	16S <i>rRNA</i>	F: GCCCCCTGGACAAAGACTGAC R: CATCGTTTACGGCGTGGACTACC	88

MEGA 7.0软件将波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌与其他波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中同系物进行多序列比对, 并使用ESPrnt 3.0 (<http://esprnt.ibcp.fr/ESPrnt/>)在线软件呈现。利用DNAMAN软件分析2种致腐菌TorA预测蛋白的相似性, 采用ProtParam程序预测TorA蛋白的基本理化性质, 采用SignalP程序预测TorA蛋白分泌蛋白以及其空间结构。

荧光定量PCR检测 应用Primer premier 5.0软件设计编码氧化三甲胺还原酶基因*torA*和鸟氨酸脱羧酶基因*ODC*的荧光定量PCR引物并对其进行特异性验证(表1)。2株致腐菌生长至24 h后, 采用TRIzol RNA提取试剂盒提取总RNA。利用反转录试剂盒反应体系合成cDNA第一链。采用Power SYBR Premix Ex Taq TM II试剂盒进行荧光定量PCR, 每个样本设3个重复3个平行, 以16S *rRNA*为内参基因, 以杀鲑气单胞菌野生株为

对照组, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目标基因的相对表达量, 即 $F=2^{-(\text{待测组目的基因平均}C_T\text{值}-\text{待测组内参基因平均}C_T\text{值})-(\text{对照组目的基因平均}C_T\text{值}-\text{对照组内参基因平均}C_T\text{值})}$ 。

数据处理 每组样品设3个重复组, 采用Microsoft Excel 2013、Origin 8.5和DNAMAN等软件进行数据分析处理并作图, 并采用SPSS 2.0软件的ANOVA进行方差分析, 采用Duncan氏法进行多重比较, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 两种致腐菌的生长差异

波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌在28 °C培养最初6 h生长缓慢, 之后快速繁殖, 18 h逐步到达稳定期, 细菌浓度分别为8.97和8.30 lgCFU/mL, 杀鲑气单胞菌生长趋势较快($P<0.05$)(图1)。2株致腐菌在4 °C冷藏下第4天逐步到达稳定期, 细菌浓度分别为8.92和8.56 lgCFU/mL, 其中波罗

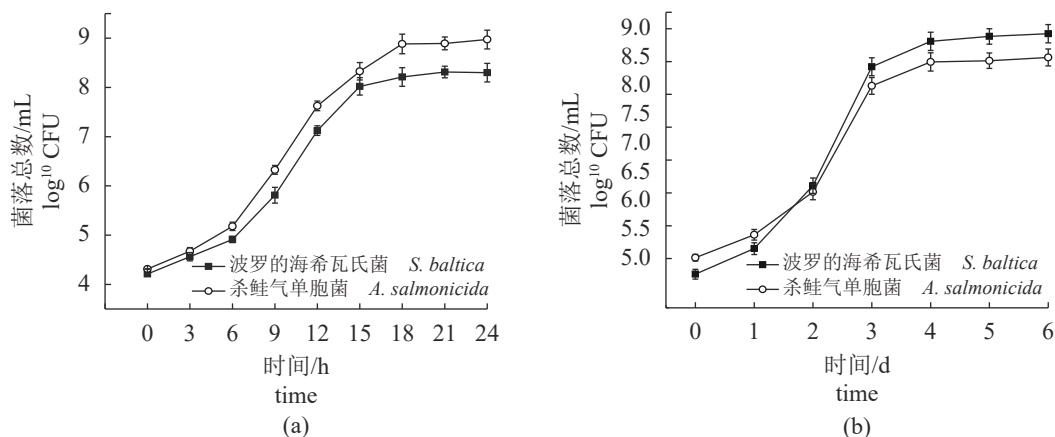


图 1 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌分别在28 °C(a)和4 °C(b)下的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *S. baltica* and *A. salmonicida* at 28 °C(a) and 4 °C(b)

的海希瓦氏菌生长略快($P<0.05$)。结果表明, 2株致腐菌在常温和低温条件下生长良好, 在冷藏环境下波罗的海希瓦氏菌具有更强的生长能力。

2.2 两种致腐菌的TMA的生成

硬骨鱼类的肌肉中富含TMAO, 鱼类在腐败过程中生成的TMAO还原酶可将其还原为具有腥臭味的三甲胺^[16], 因此TMA生成量是评价海产品腐败程度的重要指标。波罗的海希瓦氏菌和

杀鲑气单胞菌在28 °C培养6 h时TMA生成量均较少, 随着细菌进入对数生长期(6~18 h), TMA生成量呈现较大的增长, 之后逐步稳定, 最大值分别为43.99和18.96 mg/100 mL, 波罗的海希瓦氏菌约为杀鲑气单胞菌的2.3倍(图2)。2株致腐菌在4 °C下培养3 d TMA生成速率较快, 之后逐渐稳定, 最大生成量分别为49.97和30.67 mg/100 mL。结果显示, 波罗的海希瓦氏菌TMA的生成能力显著高于杀鲑气单胞菌($P<0.05$)。

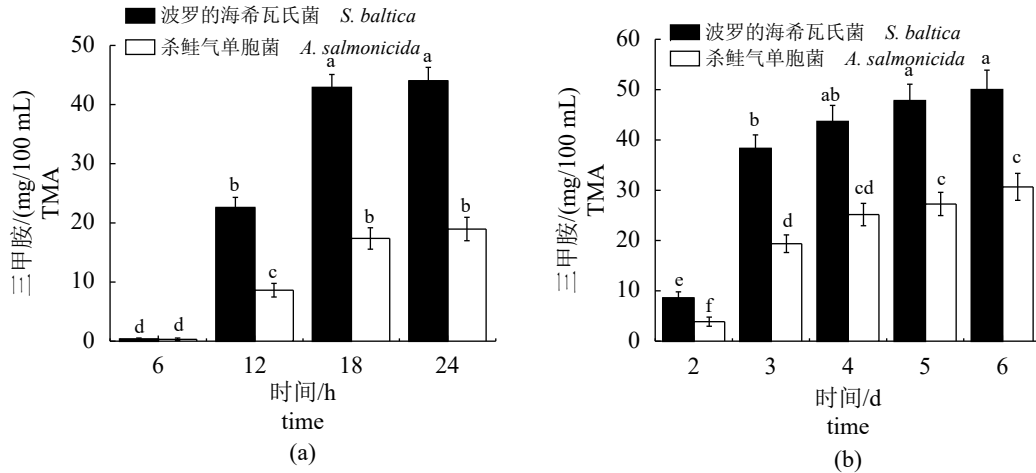


图2 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌在28 °C(a)和4 °C(b)下TMA生成量

图中标小写字母为所有时间点整体比较, 不同字母表示有显著性差异($P<0.05$); 下同

Fig. 2 Amount of TMA produced by *S. baltica* and *A. salmonicida* at 28 °C(a) and 4 °C(b)

The lowercase letters in the figures are the overall comparison of all time points; different letters mean significant difference ($P<0.05$); the the same below

2.3 两种致腐菌生物胺的生成

生物胺包含组胺、腐胺、尸胺、精胺和酪胺等, 是一类含氮的芳香族、脂肪族或者杂环类的有机化合物^[17], 也是评价水产品腐败程度的重要指标。波罗的海希瓦氏菌在28 °C培养18 h后腐胺形成量显著上升($P<0.05$), 在24 h时达到19.11 mg/L, 而尸胺生成量较低。杀鲑气单胞菌中主要产生尸胺, 在24 h时达到10.04 mg/L, 几乎无腐胺(表2)。在4 °C环境中, 2株致腐菌初期形成腐胺和尸胺的能力较弱, 在冷藏第4天生物胺快速生成, 第6天波罗的海希瓦氏菌中腐胺含量为22.38 mg/L, 杀鲑气单胞菌中尸胺含量最高为10.20 mg/L。结果显示, 在28 °C和4 °C条件下波罗的海希瓦氏菌的生物胺形成能力显著高于杀鲑气单胞菌($P<0.05$), 且波罗的海希瓦氏菌主要产生腐胺, 而杀鲑气单胞菌以产生尸胺为主。另外, 还发现波罗的海希瓦氏菌产生少量的组胺。

2.4 两种致腐菌TVB-N的生成

TVB-N包括蛋白质分解过程中产生的三甲

胺、二甲胺、氨类和其他含氮物质, 是水产品品质评价的重要指标之一。将波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌分别接种至4 °C灭菌鱼汁中, 2株菌在最初2 d的TVB-N积累速率缓慢, 至第3天TVB-N含量呈快速增长趋势, 冷藏到第6天产生最大TVB-N值, 分别为46.20和36.23 mg N/100 mL(图3)。在接种的冷藏鱼汁中波罗的海希瓦氏菌生长代谢中积累的TVB-N明显高于杀鲑气单胞菌($P<0.05$)。

2.5 TMAO还原酶基因torA的扩增和序列分析

在波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中扩增出特异性PCR条带, 与torA基因预期相符。产物纯化后测序, 获得片段大小分别为2 490 bp和1 959 bp的有完整开放阅读框的torA基因序列(登录号分别为MN226405和MN226406)。BLAST同源性比对发现, 波罗的海希瓦氏菌的torA基因和同种OS185、OS678和OS223相似度高达97%~98%, 而分离株杀鲑气单胞菌的torA基因与同种的A527、34me1和O23A相似度也达

表 2 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌在28 °C和4 °C下中生物胺的含量变化
Tab. 2 Changes in biogenic amine content of *S. baltica* and *A. salmonicida* at 28 °C and 4 °C mg/L

Table with 8 columns: Temperature (°C), Time (h), Biogenic amine, Putrescine, Cadaverine for S. baltica, and Biogenic amine, Putrescine, Cadaverine for A. salmonicida. Rows show data for 28°C and 4°C at various time points (6, 12, 18, 24, 48, 96, 144 hours).

注: 表格中标小写字母的为纵向比较, 不同字母表示有显著性差异(P<0.05)
Notes: the lowercase letters in the table are vertically compared, and different letters indicate significant differences (P<0.05)

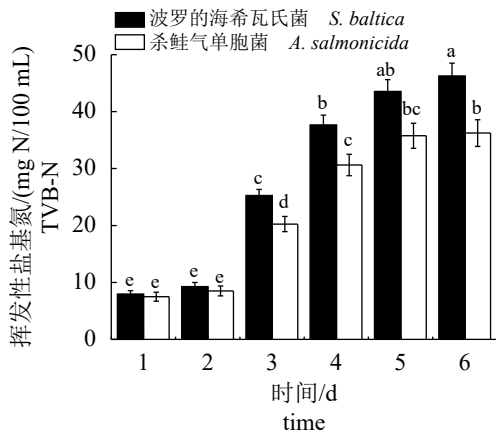


图 3 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌在4 °C灭菌鱼汁中TVB-N生成量

Fig. 3 Amount of TVB-N produced by of *S. baltica* and *A. salmonicida* in sterile fish juice at 4 °C

97%~98%。希瓦氏菌和气单胞菌标准菌株及2株分离菌株、大肠杆菌(Escherichia coli)、黏质沙雷菌(Serratia marcescens)的torA序列通过MEGA5.0软件构建进化树图谱(图4), 显示波罗的海希瓦氏菌和波罗的海希瓦氏菌(OS185)的亲缘关系较近, 同源率为80%; 而杀鲑气单胞菌和杀鲑气单胞菌(O23A)的亲缘关系较近, 同源率为72%, 二者均与黏质沙雷菌、大肠杆菌同源性较低。而波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中TorA氨基酸的相似性为63.15%, 一致性仅为11.22%(图5)。

2.6 TorA预测蛋白的理化性质和空间结构

采用Protparam程序来预测波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌TorA蛋白的基本理化性质,

结果显示, 波罗的海希瓦氏菌TorA蛋白由829个氨基酸组成, 分子量约为92.3 ku, 理论等电点为6.52, 含甘氨酸9.5%(最高)、丙氨酸和缬氨酸均7.0%, 总平均亲水性指数为-0.345。杀鲑气单胞菌TorA蛋白由653个氨基酸组成, 分子量约为90.6 ku, 理论等电点是6.74, 含丙氨酸11.5%(最高)、甘氨酸9.2%及缬氨酸5.4%, 总平均亲水性指数为-0.292(表3)。

在SWISS-MODEL网站上模拟波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中TorA蛋白的三维空间结构发现, 2株致腐菌的TorA蛋白在二级结构和空间结构上相似度很低, 其中波罗的海希瓦氏菌中蛋白由5个α-螺旋和9个β-折叠构成, 而杀鲑气单胞菌由6个α-螺旋和6个β-折叠构成(图6)。经SignalP程序分析发现, 2株菌的TorA蛋白序列均含有信号肽序列, 属于分泌蛋白。

2.7 两株致腐菌TMAO还原酶基因torA及鸟氨酸脱羧酶基因ODC表达差异

采用荧光定量PCR比较波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中TMAO还原酶基因torA和鸟氨酸脱羧酶基因ODC的表达量。结果显示, 2株菌在LB肉汤中培养24 h后均检测出torA和ODC基因表达, 以杀鲑气单胞菌为对照组, 波罗的海希瓦氏菌中torA基因表达量为对照组的1.26倍, ODC基因表达量为对照组的19.04倍(图7), 与波罗的海希瓦氏菌形成更多的三甲胺和腐胺一致。

3 讨论

研究表明, 海产品的品质劣变与嗜冷革兰

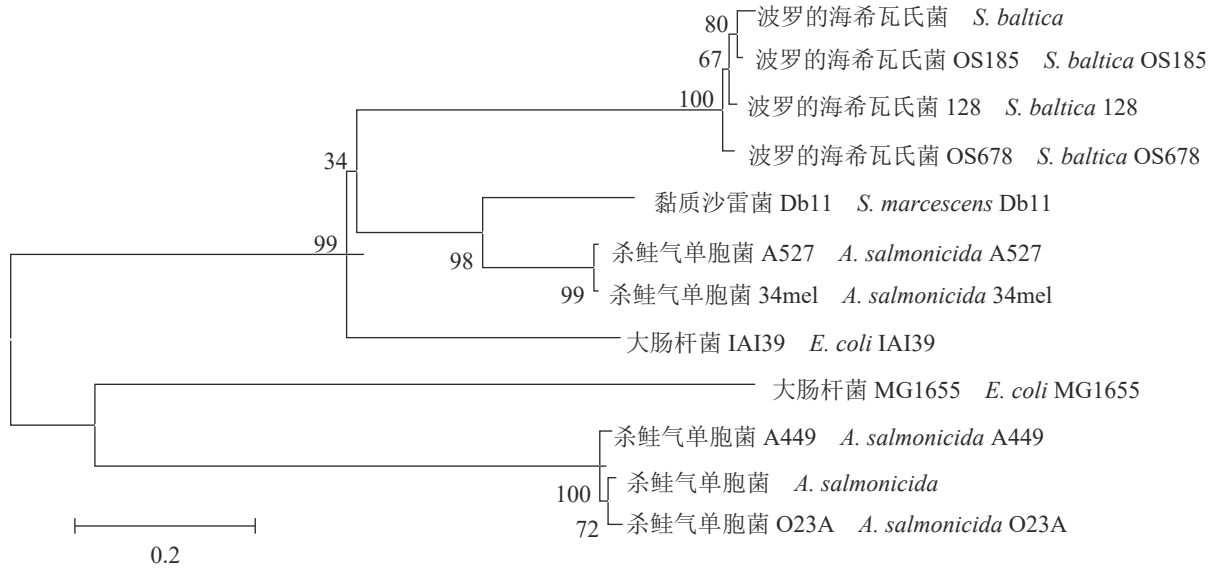


图 4 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌 *torA* 基因序列进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on *torA* gene sequence of *S. baltica* and *A. salmonicida*

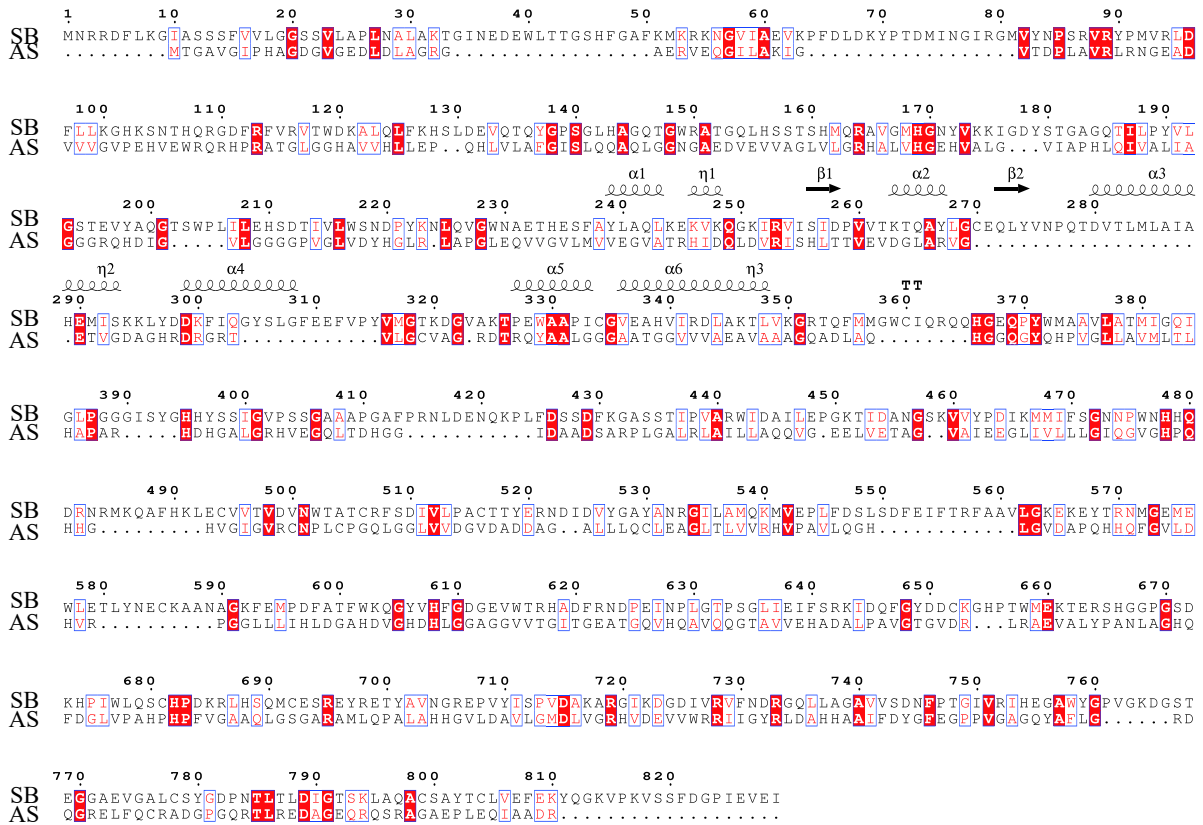


图 5 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中 *TorA* 氨基酸序列比较

序列和颜色相同表示同一种氨基酸，结构和功能相同；序列不同而颜色相同表示属于不同氨基酸，但结构和功能相似，可能不影响蛋白整体效果；没有标记表示不同种类的氨基酸

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences of *TorA* between *S. baltica* and *A. salmonicida*

The same sequence and color means the same amino acid with the same structure and function; different sequences with the same color indicate different amino acids with similar structure and function; there are no markers for different kinds of amino acids

表 3 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌TorA预测蛋白的理化性质

Tab. 3 Physicochemical properties of TorA predicted proteins in *S. baltica* and *A. salmonicida*

指标 index	波罗的海希 瓦氏菌 <i>S. baltica</i>	杀鲑气 单胞菌 <i>A. salmonicida</i>
分子式 formula	C ₄₁₃₆ H ₆₃₄₆ N ₁₁₂₄ O ₁₂₀₉ S ₃₇	C ₄₀₄₃ H ₆₂₃₅ N ₁₁₃₅ O ₁₁₇₂ S ₃₄
分子量 molecular weight	92 347.77	90 584.87
理论等电点 theoretical pI	6.52	6.74
不稳定数值 aliphatic index	27.8	28.24
甘氨酸/% Gly	9.5	9.2
丙氨酸/% Ala	7.0	11.5
缬氨酸/% Val	7.0	5.4
半胱氨酸/% Cys	1.6	1.1
总平均亲水性 grand average of hydrophobicity	-0.345	-0.292

氏阴性菌的生长密切相关。Mitchell等^[18]研究发现希瓦氏菌属是造成水产品腐败的主要原因。Yan等^[19]发现黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)在4℃保存12 d时希瓦氏菌的相对丰度从3.21%上升至45.96%，该菌是成为延长冷冻鱼的货架期的关键控制点。杀鲑气单胞菌不仅引起鲑和非鲑鱼类的细菌性鱼病，而且被发现是冰藏鱼微生物群的组成部分^[20]。本实验结果显示，大黄鱼分离株波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌是2种嗜冷菌，其中前者在低温条件下生长更快。2株菌均能形成TMA和生物胺，在鱼汁环境下积累较高

的TVB-N，是海产品贮藏过程中胺类形成主要生成者。相对于杀鲑气单胞菌，波罗的海希瓦氏菌产生的三甲胺和生物胺含量约高2倍，从而积累更高的TVB-N。并且波罗的海希瓦氏菌主要形成腐胺，而杀鲑气单胞菌生成尸胺。Qian等^[21]从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中分离出腐败希瓦氏菌、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)以及温和气单胞菌，发现希瓦氏菌生长、TVB-N以及生物胺的生成量均高于气单胞菌，其中希瓦氏菌主要产生腐胺，而气单胞菌几乎不产，与本研究结果一致。从家禽体表分离的11株气单胞菌均能产生低含量的腐胺(约为2.08~3.77 mg/L)，而5株能产生较高含量的尸胺(6.04~73.84 mg/L)^[22]。波罗的海希瓦氏菌还被发现能产生一定量的组胺，对人体具有潜在的毒害。研究表明^[23]，食品中生物胺的形成大多数是在微生物产生氨基酸脱羧酶的作用下，脱去游离氨基酸的羧基而生成，微生物中脱羧酶活性无明显的菌属特异性。鸟氨酸和赖氨酸脱羧后分别形成腐胺和尸胺，本研究发现，波罗的海希瓦氏菌具有高腐胺产生能力，而杀鲑气单胞菌尸胺产生量较强，其与2种脱羧酶活性差异有关。

水产品中特征性腐败产物TMA与TMAO还原酶活性密切相关。张晓静^[24]检测腐败希瓦氏菌代谢TMAO的能力发现，在对数生长期时对其代谢能力较强，体内TMAO还原酶活性极强，与本实验结果一致，而气单胞菌中TMAO还原酶活性的报道甚少。进一步采用生物信息学分析了2株菌TMAO还原酶基因*torA*进化关系及其预测蛋白

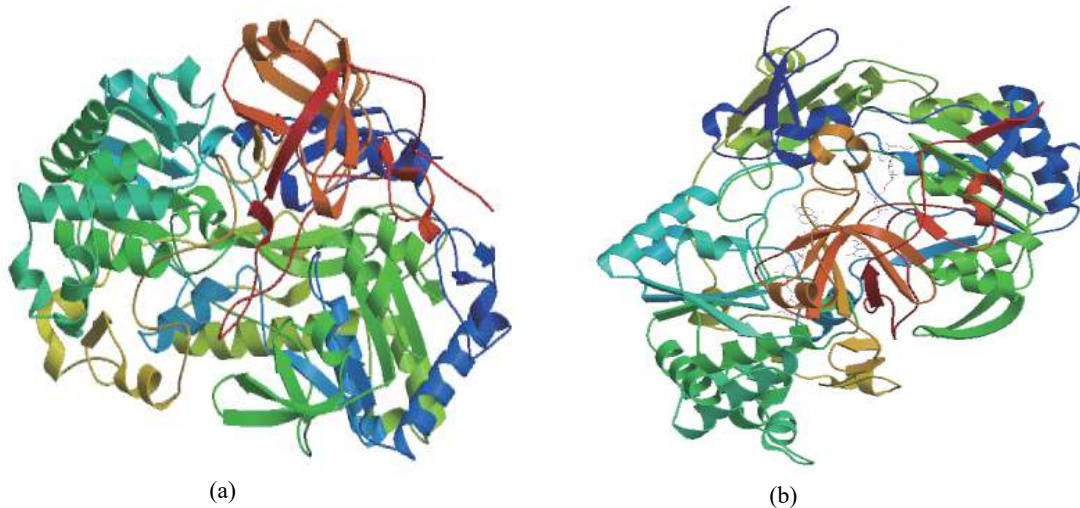


图 6 波罗的海希瓦氏菌(a)和杀鲑气单胞菌(b)中TorA蛋白的空间结构

Fig. 6 Protein spatial structure of TorA in *S. baltica* (a) and *A. salmonicida* (b)

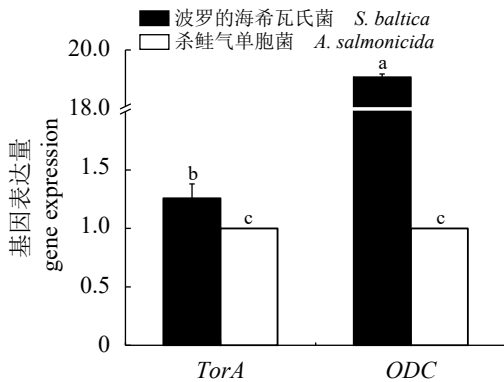


图7 波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌中2个腐败酶基因表达量差异

Fig. 7 Differences in expression of two spoilage related genes between *S. baltica* and *A. salmonicida*

的理化特性和空间结构。结果显示,波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌的TMAO还原酶编码的基因虽然在同属菌株间的相似性高达97%以上,而二者的TorA蛋白大小、氨基酸构成等理化性质和空间结构存在明显的差异,其中二者TorA氨基酸的相似性低于64%。Ertugrul等^[25]同样利用生物信息学方法分析发现,杨树和松树中角鲨烯合酶(SQS)基因及蛋白的结构和功能差异。

研究发现,波罗的海希瓦氏菌中2种胺类生成酶基因 $torA$ 和 ODC 的表达量显著高于杀鲑气单胞菌,特别是 ODC 基因,表明蛋白表达量与酶活性正相关。而且2种TorA蛋白氨基酸构成和空间结构显著的差异可能引起酶活性位点不同。由于TMAO还原酶的活性位点存在多样性^[26],波罗的海希瓦氏菌和杀鲑气单胞菌TMAO还原酶的不同结构,是导致酶催化能力差异的重要原因之一。研究还发现,22株希瓦氏菌的TMAO还原酶基因簇中19株含有 $torECAD$ 操纵子,1株拥有 $torCAD$ 操纵子,而2株无操纵子。在 $torECAD$ 操纵子中 $TorA$ 和 $TorC$ 基因分别编码TorA还原酶和TorC C型细胞色素,而TorD和TorE是TorA稳定的辅助蛋白^[27-28]。因此推测2种致腐菌TMAO还原酶不仅TorA蛋白有差异,而且还原酶基因簇的基因构成和调控也存在不同。另外,前期研究发现,波罗的海希瓦氏菌能产生AI-2和二酮哌嗪类信号,而杀鲑气单胞菌能够含有N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactone, AHLs)^[5, 29],提示可能具有不同群体感应系统调控着2种致腐菌的致腐能力,但仍有待于进一步研究。

本研究揭示了冷藏鱼体中腐败代谢产物积

累由多株细菌代谢产生,其中波罗的海希瓦氏菌为高TMA和腐胺生成菌,而杀鲑气单胞菌产高尸胺,TMA形成与TMAO还原酶结构和表达量有关,该研究为进一步探究食品体系复杂的微生物腐败机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Duan J Y, Su Y C. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays[J]. Journal of Food Science, 2010, 70(1): M58-M63.
- [2] 朱军莉,冯立芳,王彦波,等.基于细菌群体感应的生鲜食品腐败机制[J].中国食品学报,2017,17(3):225-234.
Zhu J L, Feng L F, Wang Y B, et al. Spoilage mechanism of fresh food based on bacterial quorum sensing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(3): 225-234(in Chinese).
- [3] Ghaly A E, Dave D, Budge S, et al. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review[J]. American Journal of Applied Sciences, 2010, 7(7): 859-877.
- [4] 罗庆华.水产品特定腐败菌研究进展[J].食品科学,2010,31(23):468-472.
Luo Q H. Research advances on specific spoilage organisms of aquatic products[J]. Food Science, 2010, 31(23): 468-472(in Chinese).
- [5] Zhu J L, Zhao A F, Feng L F, et al. Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) by *Shewanella baltica*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 146-155.
- [6] 孟玉霞,崔惠敬,赵前程,等.植物精油对冷藏大黄鱼优势腐败菌的抑制作用及其机制[J].水产学报,2018,42(7):1140-1153.
Meng Y X, Cui H J, Zhao Q C, et al. Antimicrobial effects and mechanism of action of essential oils against dominant spoilage bacteria isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) during chilled storage[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(7): 1140-1153(in Chinese).
- [7] Ma J Q, Pazos I M, Gai F. Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(23):
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 8476-8481.
- [8] Summers G, Wibisono R D, Hedderley D I, *et al.* Trimethylamine oxide content and spoilage potential of New Zealand commercial fish species[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2017, 51(3): 393-405.
- [9] Jourlin C, Ansaldi M, Méjean V. Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 267(4): 770-777.
- [10] Méjean V, Lobbi-Nivol C, Lepelletier M, *et al.* TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 11(6): 1169-1179.
- [11] 葛阳杨, 朱军莉, 刘丽, 等. 大黄鱼源气单胞菌的分离鉴定及致病表型[J]. *水产学报*, 2017, 41(6): 861-869.
Ge Y Y, Zhu J L, Liu L, *et al.* Spoilage phenotypic characterization and identification of *Aeromonas* isolated from spoiled *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(6): 861-869(in Chinese).
- [12] Wang H, Luo Y K, Huang H P, *et al.* Microbial succession of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) filets during storage at 4°C and its contribution to biogenic amines' formation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 190: 66-71.
- [13] 赵二科, 朱军莉, 冯立芳, 等. 冷藏大黄鱼SSO希瓦氏菌致病能力差异机制初探[J]. *水产学报*, 2015, 39(2): 256-264.
Zhao E K, Zhu J L, Feng L F, *et al.* Preliminary mechanism of different spoilage potential of specific spoilage organism, *Shewanella*, in refrigerated *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 256-264(in Chinese).
- [14] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 26(3): 319-333.
- [15] 王竹天, 兰真, 鲁杰, 等. GB/T 5009-2003《食品卫生检验方法》理化部分简介[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(3): 193-211.
Wang Z T, Lan Z, Lu J, *et al.* Introduction of GB/T 5009-2003 methods of food hygienic analysis-physical and chemical section[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2005, 17(3): 193-211(in Chinese).
- [16] 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.
- [17] Kim M K, Mah J H, Hwang H J. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish[J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1): 87-95.
- [18] Mitchell J G, Pearson L, Dillon S. Clustering of marine bacteria in seawater enrichments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(10): 3716-3721.
- [19] Yang Q, Yang R, Li M, *et al.* Effects of dietary fucoidan on the blood constituents, anti-oxidation and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 264-270.
- [20] Parlapani F F, Meziti A, Kormas K A, *et al.* Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S *rRNA* gene analysis[J]. *Food Microbiology*, 2013, 33(1): 85-89.
- [21] Qian Y F, Ye J X, Yang S P, *et al.* Evaluation of the spoilage potential of *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Aeromonas sobria* isolated from spoiled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cold storage[J]. *Journal of Food Safety*, 2018, 38(6): e12550.
- [22] Buňková L, Buňka F, Klčovská P, *et al.* Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 203-206.
- [23] Yin Q J, Zhang W J, Qing Q X, *et al.* High hydrostatic pressure inducible trimethylamine *N*-oxide reductase improves the pressure tolerance of piezosensitive bacteria *Vibrio fluvialis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 8: 2646.
- [24] 张晓静. 腐败希瓦氏菌代谢氧化三甲胺相关研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Zhang X J. The bacteria *Shewanella putrefaciens* involved in the metabolism of TMAO[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012(in Chinese).
- [25] Filiz E, Ozyigit I I, Vatanserver R. Comparative analyses of squalene synthase (SQS) proteins in poplar and pine by using bioinformatics tools[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2016, 12(2): 32.
- [26] Zhang L M, Nelson K J, Rajagopalan K V, *et al.*

- Structure of the molybdenum site of *Escherichia coli* trimethylamine *N*-oxide reductase[J]. *Inorganic Chemistry*, 2008, 47(3): 1074-1078.
- [27] Lemaire O N, Honoré F A, Jourlin-Castelli C, *et al.* Efficient respiration on TMAO requires TorD and TorE auxiliary proteins in *Shewanella oneidensis*[J]. *Research in Microbiology*, 2016, 167(8): 630-637.
- [28] Genest O, Ilbert M, Méjean V, *et al.* TorD, an essential chaperone for TorA molybdoenzyme maturation at high temperature[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(16): 15644-15648.
- [29] Liu L, Yan Y P, Feng L F, *et al.* Quorum sensing *asaI* mutants affect spoilage phenotypes, motility, and biofilm formation in a marine fish isolate of *Aeromonas salmonicida*[J]. *Food Microbiology*, 2018, 76: 40-51.

Comparison of spoilage potential and TorA protein between *Shewanella baltica* and *Aeromonas salmonicida*

BI Weiwei, FENG Lifang, SHI Shuangni*, MIAO Chenhao, ZHU Junli*, TIAN Diying

(Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To evaluate the differences of spoilage potential of *Shewanella* and *Aeromonas* in refrigerated seafood, growth curves and production of trimethylamine (TMA), biogenic amines and total volatile basic nitrogen (TVB-N) in *S. baltica* and *A. salmonicida* isolated from *Larimichthys crocea* were measured at 28 °C and 4 °C. And trimethylamine reductase (*torA*) gene in the two strains were amplified, and similarity, physicochemical properties and spatial structures of TorA protein were compared by bioinformatics. *A. salmonicida* grew faster at 28 °C, while *S. baltica* grew faster at 4 °C. Compared with more amount of cadaverine in *A. salmonicida*, *S. baltica* produced the higher levels of TMA, biogenic amines, and TVB-N in refrigerated fish juice. The *torA* genes of 2 490 bp and 1 959 bp were amplified from *S. baltica* and *A. salmonicida* respectively, and similarity of TorA protein in its same genus was higher than 97%, and similarity between the two strains was only 36.90%. The molecular weight and isoelectric point of TorA protein in *S. baltica* were about 92.3 ku and 6.52, while those were about 90.6 ku and 6.74 in *A. salmonicida*. The highest amino acid of the predicted protein was glycine and alanine in two strains respectively, resulting in the significant difference of protein spatial structure. The expression levels of *torA* and ornithine decarboxylase ODC genes in *S. baltica* were 1.26 and 19.04 times compared to *A. salmonicida*. Thus, *S. baltica* and *A. salmonicida* are psychrophilic spoilage strains in marine products, in which *S. baltica* has stronger ability to produce amine metabolites due to specific physicochemical properties of TorA protein and its high expression. The study provides theoretical support for revealing the mechanism of microbial spoilage in seafood.

Key words: *Shewanella*; *Aeromonas*; spoilage potential; TorA

Corresponding authors: SHI Shuangni. E-mail: 709622636@qq.com; ZHU Junli. E-mail: junlizhu0305@163.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y19C200005); Education Department Project of Zhejiang Province (Y201839893); Analysis and Test Project of Zhejiang Province (LGC19C200004)