

小龙虾微冻贮藏过程中特定腐败菌的 分离鉴定及致腐产胺能力分析

廖 鄂^{1,2,3}, 武雨鑫¹, 李 倩¹, 张 莹^{1,2,3}, 陈季旺^{1,2,3*}

[1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 农产品加工与转化湖北省重点实验室(武汉轻工大学), 武汉 430023; 3. 国家小龙虾加工技术研发分中心(潜江), 潜江 433100]

摘 要: **目的** 探究小龙虾微冻贮藏过程中特定腐败菌(specific spoilage organisms, SSOs)种类及其致腐产胺能力。**方法** 本研究利用选择性培养基从微冻至腐败小龙虾中分离、纯化优势腐败菌, 通过 16S rDNA 技术结合细菌生化鉴定法进行鉴定; 将鉴定出的 SSOs 接种至无菌虾肉中, 通过监测 pH、挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)、菌落总数等指标的变化, 计算腐败代谢产物产量因子($Y_{\text{TVB-N/CFU}}$)以评价各 SSOs 的致腐能力, 并比较各 SSOs 接种组的产生物胺能力。**结果** 小龙虾微冻过程中的 SSOs 为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)和蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*); 在贮藏 15 d 后, *P. fluorescens*、*S. putrefaciens*、*A. sobria* 和 *H. alvei* 接种组 TVB-N 含量分别为 205.88、54.01、60.60、24.24 mg/100 g, 菌落总数分别为 9.33、8.92、9.02、9.11 log₁₀ CFU/g, $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ 大小顺序为 *P. fluorescens*>*A. sobria*>*S. putrefaciens*>*H. alvei*; 小龙虾腐败过程主要生物胺为腐胺和尸胺, 各 SSOs 产胺能力为 *P. fluorescens*>*S. putrefaciens*≈*A. sobria*>*H. alvei*。**结论** 本研究明确了小龙虾微冻贮藏过程中的特定腐败菌种类及其致腐产胺能力, 为针对性地筛选小龙虾高效抑菌保鲜剂提供了理论基础。**关键词:** 小龙虾; 微冻贮藏; 特定腐败菌; 致腐能力; 产胺能力

Isolation and identification of specific spoilage organisms and analysis of saprogenic amine production capacity during micro-frozen storage of *Procambarus clarkii*

LIAO E^{1,2,3}, WU Yu-Xin¹, LI Qian¹, ZHANG Ying^{1,2,3}, CHEN Ji-Wang^{1,2,3*}

[1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products (Wuhan Polytechnic University), Wuhan 430023, China; 3. National Research & Development Branch Center for *Procambarus clarkii* Processing (Qianjiang), Qianjiang 433100, China]

ABSTRACT: Objective To explore the types of specific spoilage organisms (SSOs) during micro-frozen storage of *Procambarus clarkii* and study their saprogenic amine production capacity. **Methods** Dominant spoilage organisms were isolated and purified from spoilage *Procambarus clarkii* under micro-frozen storage by using selective culture medium, and were identified by 16S rDNA technique combined with bacterial biochemical

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1606004)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1606004)

*通信作者: 陈季旺, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工及贮藏工程。E-mail: jiwangchen@whpu.edu.cn

*Corresponding author: CHEN Ji-Wang, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China. E-mail: jiwangchen@whpu.edu.cn

identification. Then, the identified SSOs were inoculated into sterile *Procambarus clarkii* meat, and the pH, total volatile basic nitrogen (TVB-N) and total colonies counts were monitored. According to the results of TVB-N and total colonies count, the spoilage metabolite yield factor ($Y_{\text{TVB-N/CFU}}$) was calculated to evaluate the spoilage potential of each SSOs, and the amine production capacity were compared among each SSOs by determining biogenic amine concentration. **Results** The SSOs of spoilage *Procambarus clarkii* under micro-frozen storage were identified as *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas sobria* and *Hafnia alvei*. After 15 days storage, the TVB-N content and total colonies counts in samples inoculated with *P. fluorescens*, *S. putrefaciens*, *A. sobria* and *H. alvei* were 205.88, 54.01, 60.60 and 24.24 mg/100 g and 9.33, 8.92, 9.02, 9.11 $\log_{10}$ CFU/g, respectively. The order of $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ was *P. fluorescens*>*A. sobria*>*S. putrefaciens*>*H. alvei*. The main amine during the spoilage process of *Procambarus clarkii* were putrescine and cadaverine, and the order of amine production capacity was *P. fluorescens*>*S. putrefaciens*≈*A. sobria*>*H. alvei*. **Conclusion** This study clarifies the species, spoilage potential and amine production capacity of SSOs, and provides a theoretical basis for the targeted screening of efficient bacterial preservatives for *Procambarus clarkii*.

KEY WORDS: *Procambarus clarkii*; micro-frozen storage; specific spoilage organisms; spoilage potential; amine production capacity

0 引 言

小龙虾, 又名克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*), 隶属于节肢动物门、甲壳纲、十足目、螯虾科, 是我国重要的淡水经济虾类^[1]。小龙虾具有高蛋白、低脂肪、低胆固醇等特点, 且必需氨基酸种类齐全, 富含多种不饱和脂肪酸, 微量元素配比合理, 具有较高的营养价值^[2]。根据《2022 年中国小龙虾发展产业报告》统计, 2021 年小龙虾养殖产量达到 263.36 万 t, 位列我国淡水养殖品种第 6 位(前 5 位为草、鲢、鳙、鲤、鲫)^[3]。然而, 小龙虾因其较高的蛋白质、水分含量, 在捕捞、运输、加工及贮藏过程中易受到微生物的污染, 造成腐败变质, 需对其进行低温贮藏保鲜。

微冻贮藏是一种高效的低温贮藏技术, 将产品贮藏在其冰点以下 1~2℃的环境中, 使产品中水分部分冻结^[4]。微冻温度介于冷藏和冻藏之间, 与传统冷藏相比可显著延长产品货架期 1.4~5 倍^[5]; 与冷冻相比对蛋白质冷冻变性影响较小^[6]。目前, 微冻贮藏技术已广泛应用于多种水产品的保鲜, QIN 等^[7]对比了冷藏(3.5℃±0.5℃)、冰温(0℃±0.5℃)和微冻(-3.0℃±1.0℃)贮藏对克氏原螯虾品质影响的差异, 发现微冻贮藏有效降低了虾肉中挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)、三甲胺、菌落总数和嗜冷菌数, 并显著($P<0.05$)抑制了腐胺(putrescine, PUT)、尸胺(cadaverine, CAD)和酪胺(tyrosine, TYR)的积累; 刘欢等^[8]对比了微冻贮藏和冰温贮藏对大鲈肌肉品质的影响, 发现微冻贮藏在抑制微生物生长、减少 TVB-N 积累、保持组织结构完整性等方面具有更好的效果; 李卫东等^[9]在研究微冻对南美白对虾品质的影响时发现样品在微冻第 18 d 时仍能维持原有的口感、风味和鲜度。然而, 现有相关研究主要聚焦于微冻贮藏对水产品感官和理化品质指标

的影响, 针对该过程腐败微生物的分离鉴定及动态变化研究还鲜见报道。

小龙虾在低温贮藏过程中仍会因微生物的污染而发生腐败变质, 其中部分微生物在小龙虾腐败过程中占据主导地位并加速其腐败变质的进程, 这类微生物称为特定腐败菌(specific spoilage organisms, SSOs)^[10]。SSOs 通常具有很强的致腐性, 会导致虾肉组织结构分解, 加快氧化酸败的速度, 产生硫化物、醛、胺、有机酸等物质, 严重破坏虾肉的品质, 缩短产品货架期^[11]。赵宏强等^[12]对鲈鱼冷藏末期的 SSOs 进行分离鉴定, 筛选出假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) 3 株、腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*) 2 株; 进一步对各菌株致腐能力进行分析, 发现 *S. putrefaciens* 的致腐能力最强; 刘洋帆等^[13]从冷藏的鲢鱼中分离鉴定出 3 株 SSOs, 分别为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*), 对其进行致腐能力分析, 发现 *A. sobria* 的致腐产胺能力最强; 黄佳奇等^[14]探究了冷藏条件下小黄鱼中 SSOs 的致腐能力, 发现变形杆菌属(*Proteus* spp.)与希瓦氏菌属(*Shewanella* spp.)致腐能力最强。目前, 相关报道主要集中于水产品冷藏过程中 SSOs 的分离鉴定及致腐能力分析, 针对微冻条件下小龙虾中 SSOs 的致腐产胺能力研究还未见报道。

因此, 本研究通过对小龙虾微冻贮藏过程中腐败微生物菌落形态特征观察、生理生化实验分析, 结合 16S rDNA 分子生物学鉴定, 明确小龙虾微冻贮藏过程中的 SSOs 种类; 再将 SSOs 接种到无菌虾肉上, 通过对 pH、TVB-N、菌落总数等指标的测定, 计算腐败代谢产物产量因子($Y_{\text{TVB-N/CFU}}$)以评价各 SSOs 的致腐能力, 并分析各 SSOs 接种组的生物胺(biogenic amine, BAs)含量水平, 进

一步验证其防腐能力,为后续针对性地筛选小龙虾高效抑菌保鲜剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用的小龙虾(重 19.8~25.5 g,长 9.5~11.5 cm)购于湖北省武汉市武商量贩超市(2021 年 10 月)。

平板计数琼脂、假单胞菌 CFC 选择性培养基、MRS 培养基、结晶紫中性红胆盐琼脂、脑心浸出液肉汤、LB 琼脂、RS 培养基、铁琼脂培养基(青岛海博生物有限公司);琼脂、 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、Tris[赛国生物科技(BioFroxx 公司)];氯化钠、无水乙醇、醋酸、高氯酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);福尔马林(分析纯,甲醛含量 40.0%,辽宁泉瑞试剂有限公司); NaHCO_3 溶液、 NaOH 溶液(分析纯,成都金山化学试剂有限公司); HCl (分析纯,重庆川东化工有限公司);丙酮、乙腈(色谱纯)、丹磺酰氯(天津市科密欧化学试剂有限公司);组胺(histamine, HIS)、2-苯乙胺(phenylethylamine, PHE)、色胺(tryptamine, TRY)、精胺(spermine, SPE)、亚精胺(spermidine, SPD)(纯度 $\geq 98\%$,德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司);琼脂糖、6 $\times$ loading buffer、DNA 分子量标准 Maker、27F DNA 上引物、1492R DNA 下引物、Goldview 核酸染料、Taq PCR Master Mix (2 $\times$, blue dye)(上海生工生物工程有限公司)。

1.2 仪器与设备

GI54DS 型灭菌锅[致微(厦门)仪器有限公司];MQT-60HR 型振荡培养箱(上海旻泉仪器有限公司);LRHS-150-II 型恒温恒湿培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);梯度 PCR 仪、HX-10F 型恒温金属浴(上海沪析实业有限公司);PowerPace Basic 型电泳仪、ChemiDoc MP 型成像(美国伯乐公司);GL-20G-II 型冷冻离心机、TGL-16C 型 24 孔离心机(上海安亭科学仪器厂);AX224ZH/E 型电子天平(精度 0.01 mg,奥豪斯仪器有限公司);色谱柱 ZORBAX (SB-C₁₈, pH-St, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)(美国安捷伦科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 SSOs 的分离与鉴定

(1)小龙虾预处理

从超市挑选完整、鲜活、无病态的小龙虾放入有碎冰的泡沫箱中当天运至实验室,用自来水超声清洗 30 min 后保存在冰中冷至休克(不超过 3 h)。将休克的小龙虾去除虾头,抽离虾线,剥去虾壳,取出完整虾仁,放在干净自封袋中,于微冻条件下贮藏,微冻($-3^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$)使用 1.5%的冰盐水混合物控制。微冻贮藏的虾仁样品放入装有冰盐水混合物的塑料泡沫箱中,并将泡沫箱放入 4°C 冰箱中。在贮

藏过程中,每 48 h 更换冰盐水混合物,确保贮藏温度在预设范围内。微冻贮藏 5 周后完全腐败,取出样品进行后续实验。

(2)单菌落的分离和纯化

取 5 g 冷藏至腐败的小龙虾肉,加入 45 mL 0.85% 无菌生理盐水,均匀拍打 1~2 min 获得菌悬液,进行梯度稀释,选取合适的稀释度(10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7})吸取 100 μL 菌悬液于多种选择性培养基平板上均匀涂布(培养基已提前灭菌倒平板凝固),放置于 30°C 恒温恒湿培养箱中培养 24~48 h。选取有一定菌落且不互相重叠的平板,挑选各培养基中典型菌落并记录其形态、颜色、大小等;反复进行平板划线,得到纯化的单菌落与 50% 的甘油按 1:1 混合装于冻存管中,在 -80°C 冰箱中保存^[15]。

(3) DNA 的提取与 PCR 扩增

取冻存菌悬液按 1% 比例活化,高速离心(8000 r/min, 2 min)取菌种沉淀。根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒步骤说明提取保存菌株 DNA,提取的 DNA 密封于已提前灭菌的小离心管中冷冻(-20°C)保存,作为 16S rDNA 序列扩增反应模板。将提取得到的 DNA 模板以 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 与 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 为 PCR 引物;反应体系为 30 μL ^[16]: 15 μL Taq PCR Master Mix (2 $\times$, blue dye), 两种引物各 1 μL , DNA 模板 2 μL , 11 μL 双蒸水;PCR 反应程序为: 94°C 预变性 4 min, 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 30 s, 循环 35 次后,再在 72°C 下彻底延伸 10 min, 4°C 下保存。

PCR 产物采用 1.5% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测。电泳步骤为:称取 0.75 g 琼脂糖电泳凝胶,用量筒量取 50 mL 50 $\times$ TAE 缓冲液,于微波炉中加热,观察微波炉内部液体是否沸腾,开始沸腾即关闭微波炉,重复操作至液体完全澄清透明,冷却至 $50\sim 60^\circ\text{C}$,在液体中加入一滴(蘸取一点即可)Goldview 核酸染料,混匀倒入铺好梳子的电泳板上,冷却 30 min,拔掉梳子,放入加有 1 $\times$ TAE 电泳液的电泳槽中,取 5 μL 的 PCR 扩增产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,其中, DNA 分子量标准 Maker 需取 10 μL 。调整电泳仪的电压为 120 V,时间为 20~40 min。样品孔靠近电泳槽的负极端。条带跑到凝胶托盘中部位置时停止电泳,可适当延长或减短时间和电压。

50 $\times$ TAE 溶液:称取 Tris 272 g, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 g, 加入约 800 mL 去离子水,充分搅拌溶解后加入 57.1 mL 醋酸,充分搅拌后定容至 1000 mL,室温存放。

(4)测序鉴定

将凝胶电泳中条带清晰,无明显拖尾的 PCR 扩增产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序。使用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中的 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih>。

gov/BLAST/)对各菌株序列分析比对, 选取同源性在 98% 以上的序列, 确定所筛选小龙虾的 SSOs 种类。用 MEGA 11.0 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining)构建菌株的系统发育树, 从而获得菌群结构和功能信息。

(5) 腐败菌的表面特征和生理生化实验鉴定

对腐败菌的单菌落的颜色、光泽、透明度等形态观察和生理生化特征进行鉴定, 参考《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》中关于细菌的鉴定, 生化实验具体方法参考《现代细菌学培养基和生化实验手册》。

1.3.2 样品的前处理

(1) 菌悬液的制备

取出冻存菌液 50 μ L 接种于含 5 mL 脑心浸出液肉汤液体培养基的试管中, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 摇床过夜活化, 按照 1% 的比例将活化后的菌悬液接种于含 100 mL 脑心浸出液肉汤液体培养基的锥形瓶中, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 摇床培养 8 h 后冷冻离心(4 $^{\circ}$ C、6000 r/min)取沉淀, 沉淀冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

(2) 无菌虾肉的制备

购买鲜活的小龙虾运送至实验室, 自来水超声清洗后保存在冰中冷至休克(不超过 3 h)。休克的小龙虾去除虾头, 抽离虾线, 剥去虾壳, 取出完整虾肉, 75% 的酒精擦拭虾肉表面后自然晾干, 于 0.5% 福尔马林溶液中浸泡 40 s, 取出后无菌水冲洗 3 次以洗去福尔马林(无菌处理过程在超净台中进行)。

(3) SSOs 的接种

使用已提前灭菌完成的 0.85% NaCl(或 PBS)将 1.3.2(1) 所冻存的菌体沉淀重悬至接种浓度为 6 log₁₀ CFU/mL。已完成无菌处理的虾肉分别浸泡于菌悬液中 10 min, 取出沥干后分装于无菌袋中, 封口冷藏。每隔 3 d 取出一袋测定其理化指标。分组设置: Control(对照组)、*P. fluorescens* 接种组、*A. sobria* 接种组、*S. putrefaciens* 接种组、*H. alvei* 接种组。

1.3.3 相关指标的测定

参考 GB 5009.23—2016《食品安全国家标准 食品 pH 的测定》进行 pH 测定; 参照 GB 5009.228—2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》测定 TVB-N 值; 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》进行菌落总数测定。

1.3.4 腐败代谢产物产量因子计算

腐败菌的致腐败能力定量分析以在货架期终点时单位数量的腐败菌产生的腐败代谢产物 TVB-N 为指标^[17]。腐败代谢产物产量因子($Y_{\text{TVB-N/CFU}}$)的计算公式为式(1):

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

式中, $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ 为单位腐败菌产生的 TVB-N 值(mg TVB-N/CFU); N_0 为初始腐败菌数(log₁₀ CFU/g); N_s 为货架期终点时的腐败菌数(log₁₀ CFU/g); $(\text{TVB-N})_0$ 为初始点的 TVB-N 值; $(\text{TVB-N})_s$ 为货架期终点时的 TVB-N 值。

1.3.5 BAs 测定

参考 LIAO 等^[18]的方法并进行部分修改。采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测 BAs 含量。将 5 g 绞碎的虾肉与 15 mL 0.6 mol/L 高氯酸溶液均质 1 min, 然后在 4 $^{\circ}$ C 以 6000 r/min 离心 15 min。向沉淀物中加入 15 mL 0.6 mol/L 高氯酸再次离心。合并两次上清液并用 0.6 mol/L 高氯酸溶液将其稀释至 50 mL。于 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

取 1 mL 稀释的上清液, 分别用 200 μ L 2 mol/L NaOH 溶液、3 mL 饱和 NaHCO₃ 溶液和 1 mL 1%(即 10 mg/mL) 丹磺酰氯溶液(色谱级丙酮溶解)进行碱化、中和及衍生。将上述体系置于 40 $^{\circ}$ C 避光孵育 45 min 后, 加入 100 μ L 氨水静置 30 min 以终止反应。然后, 用乙腈将混合液稀释至 5 mL, 并通过 0.22 μ m 膜滤器进行过滤。最后, 取 2 mL 滤液加入样品瓶待测。

将 HIS、PHE、TYR、PUT、CAD、TRY、SPE 和 SPD 标准品分别溶于 0.1 mol/L HCl 来制备标准储备溶液(1 mg/mL)。每种 BAs 的定量标准曲线的质量浓度范围均为 0~20 μ g/mL (0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 μ g/mL)。

检测条件: 色谱柱 ZORBAX (SB-C₁₈, pH-St, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 温度设为 30 $^{\circ}$ C, 流速设为 0.8 mL/min, 进样量为 20 μ L。流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为水。梯度洗脱程序: 0~35 min (50% $\rightarrow$ 90% A), 35~45 min (90% $\rightarrow$ 50% A)。在 254 nm 处观察色谱图。

1.4 数据处理

实验数据用平均值 $\pm$ 标准偏差表示, 使用 Origin 9.0 作图, SPSS 25.0 进行单因素方差分析, Duncan 法进行多重比较, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 菌落形态分析

采用涂布平板分离法和平板划线分离法, 从平板计数琼脂平板和筛选培养基平板上挑取颜色、形态较为明显、典型的单菌落, 随机分离筛选出 6 株菌, 将筛选出的菌株分别编号为 W1、W2、W3、W4、W5 和 W6, 在实验进行过程中完整记录所选菌株的形态、颜色、大小等特征, 利用光学显微镜观察细菌形态菌体形态。各菌株的划线平板菌落形态、光学显微镜观察结果如图 1、2 所示。

在涂布、平板划线等操作过程中对所选菌落肉眼可观察到的表面形态进行了简单记录, 形态特征如表 1 所示。挑选的所有菌落形状均为圆点状; 革兰氏染色处理结果表明所选细菌均为革兰氏阴性菌; 光学显微镜观察结果表明细菌状态均为杆状; 在颜色、菌落光泽、表面状态、菌落透明度、质地和菌落隆起度等特征上不同菌落略有差异。其中, W1 和 W2 颜色相近, W4 和 W5 均表现淡黄色, 而 W3 和 W6 较为特殊; W1、W2、W6 菌落的

表面状态均为光滑, 另外 3 株菌落表面较为粗糙; 除 W1 菌落被观察到透明外, 其他菌落均表现出不透明的菌落特征; 据肉眼观察, 除 W1 和 W6 外, 其他菌落质地均较为黏稠; 此外, W1 和 W6 菌落表现出扁平状态, 其余菌株有略微隆起的形态。

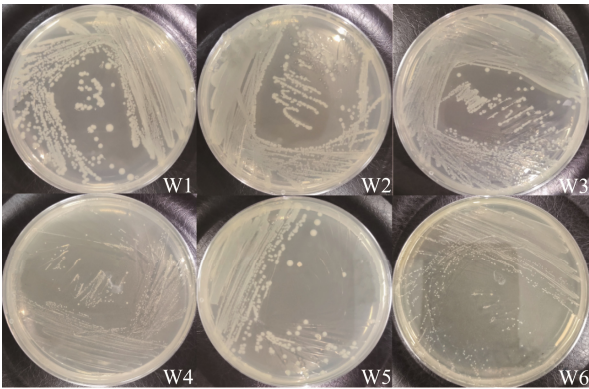


图 1 平板划线分离菌落形态
Fig.1 Morphology of plate streak isolation colonies

2.2 16S rDNA 分析结果

将提取到的细菌组 DNA 片段经 PCR 扩增后, 利用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 16S rDNA 扩增产物, 电泳图谱见图 3。由图 3 可知, 扩增后的 6 株菌在 1500 bp 出现清晰明亮的荧光条带, 无其他杂质, 并且无拖尾现象, 说明 PCR 样品纯度合格, 符合送检要求。

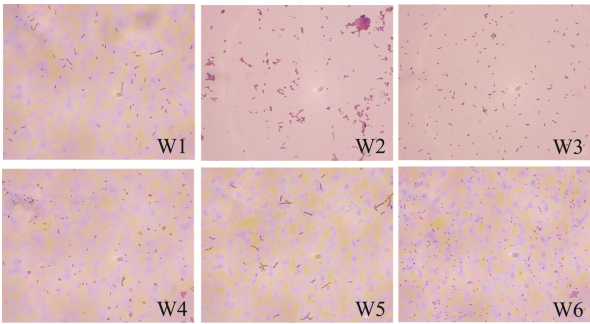
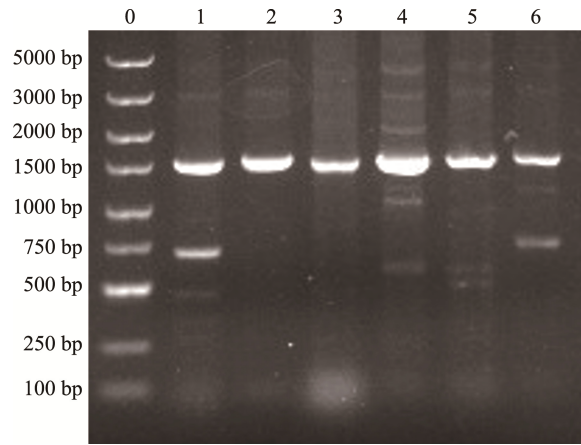


图 2 革兰氏染色结果
Fig.2 Gram staining results

表 1 小龙虾中细菌的形态、生理生化特征
Table 1 Morphological, physiological and biochemical characteristics of bacteria in *Procambarus clarkii*

特征	W1	W2	W3	W4	W5	W6
菌落颜色	白	乳白	黄	淡黄	淡黄	淡绿
菌落光泽	无	无	无	有	有	无
菌落形状	圆点状	圆点状	圆点状	圆点状	圆点状	圆点状
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻
表面状态	光滑	光滑	粗糙	粗糙	粗糙	光滑
菌落透明度	透明	不透明	不透明	不透明	不透明	不透明
质地是否黏稠	否	是	是	是	是	否
菌落隆起度	扁平	隆起	隆起	隆起	隆起	扁平
细菌形状	短杆状	短杆状	短杆状	杆状	杆状	短杆状



注: 第 0 条泳道代表 DNA 分子量标准 Maker; 1~6 分别代表 W1~W6。
图 3 各菌株的 16S rDNA PCR 扩增电泳图谱
Fig.3 16S rDNA PCR amplification electrophoresis profiles of each strain of bacteria

2.3 SSOs 的鉴定和系统发育树的构建

将 W1 等菌株的 16S rDNA 碱基序列于 NCBI 网站上使用 BLASTN 程序在 GeneBank 基因库上进行同源性检索, 然后选取同源性较高的 16S rDNA 序列进行多序列比较后, 用 MEGA 11.0 软件以邻位连接法进行 1000 次的相似度重复计算, 构建系统发育树^[19], 结果如图 4 所示。据系统发育树结果可知: W1、W6 与菌株 *P. fluorescens* 相似度最高; W2 与菌株 *S. putrefaciens* 相似度最高; W3 与菌株 *A. sobria* 相似度最高; W4、W5 与菌株 *H. alvei* 相似度最高。

经鉴定和系统发育树同源性分析表明, 从腐败的虾肉中筛选出的 SSOs 分别为 *P. fluorescens*、*S. putrefaciens*、*A. sobria* 和 *H. alvei*。其中, *P. fluorescens* 和 *A. sobria* 是水产品中常见的 SSOs, 具有较强的降解蛋白质和产 PUT 能力^[20]。LI 等^[21]研究发现 *P. fluorescens* 和 *A. sobria* 是冷藏

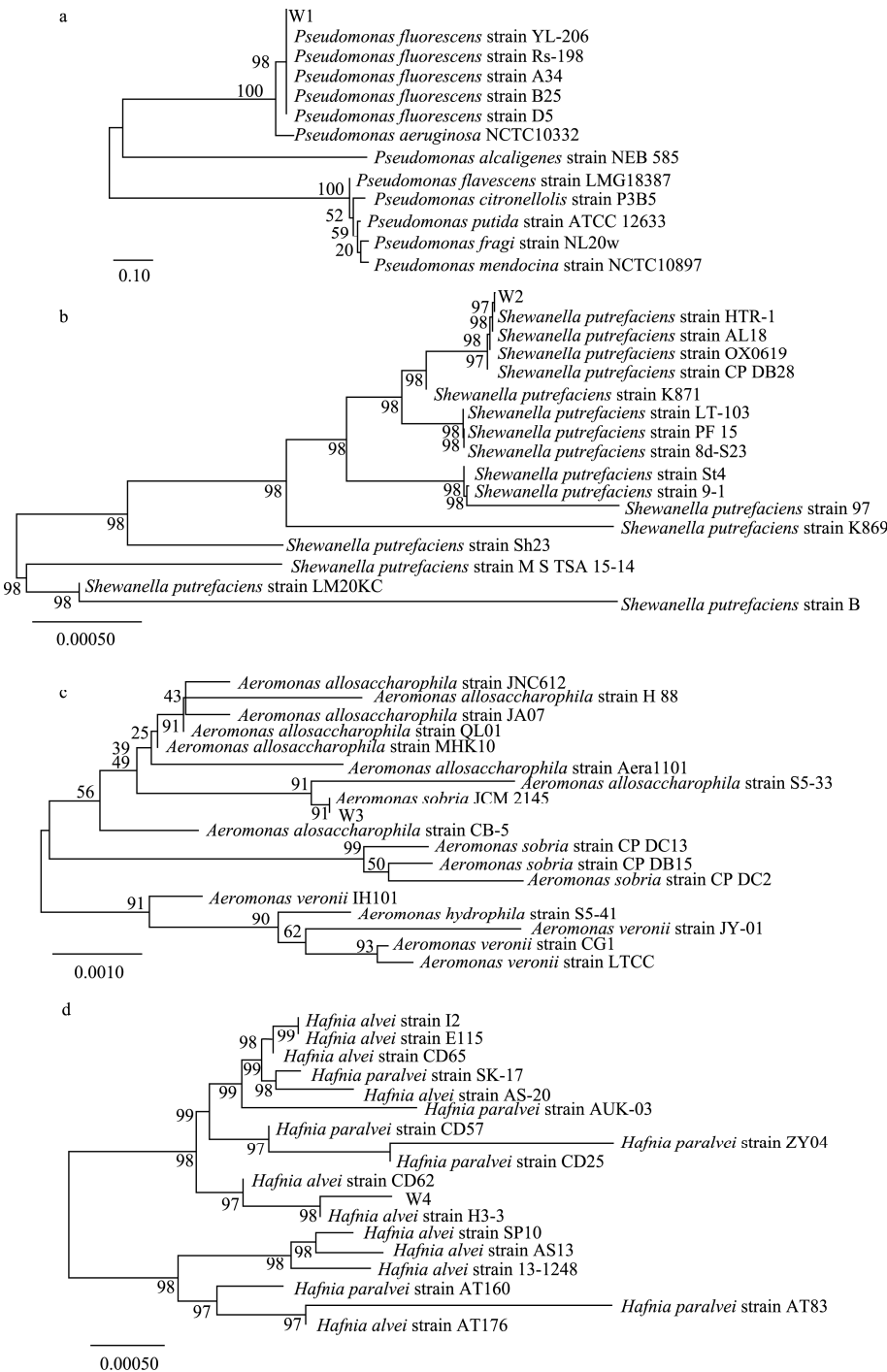


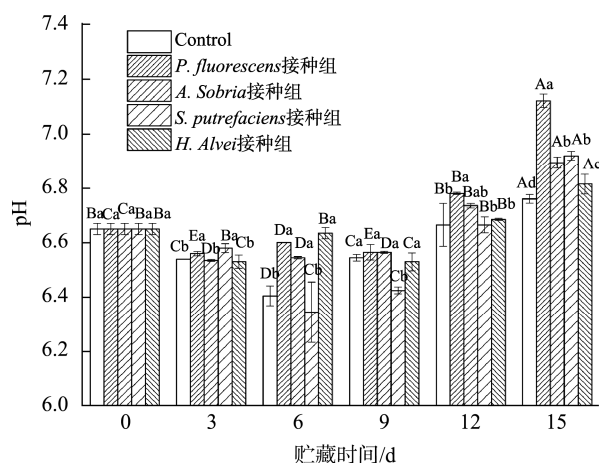
图 4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

乌鳢(*Channa argus*)中的 SSOs, 且其具有较强的降解蛋白质和产 PUT 能力; LI 等^[22]也报道了冷藏鲤鱼(*Cyprinus carpio*)片中的 SSOs 为 *P. fluorescens* 和 *A. sobria*; 也有研究表明, *S. putrefaciens* 是冷藏草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)中的 SSOs^[23]; 但以上菌株在微冻小龙虾中的致腐能力大小还未见报道。此外, *H. alvei* 作为 SSOs 还鲜见报道, 其致腐特性还需进一步分析研究。

2.4 pH 变化分析

不同 SSOs 接种组的小龙虾 pH 变化如图 5 所示。经无菌处理的小龙虾初始 pH 为 6.64, 在贮藏过程中各组 pH 均呈先下降后上升的趋势。在贮藏初期(0~6 d), 各 SSOs 接种组的 pH 均略有下降, 这可能与糖酵解过程中乳酸的积累和 ATP 分解释放的磷酸有关^[23]; 随后, 各 SSOs 接种

组的 pH 均显著($P<0.05$)上升,可能是由于微生物的生长繁殖促使蛋白质被降解为 BAs、三甲胺等碱性物质。此外,各 SSOs 接种组贮藏末期的 pH 分别为 7.12、6.90、6.92 和 6.82。以上结果表明,小龙虾冷藏过程中 SSOs 产生碱性物质能力的强弱顺序为: *P. fluorescens*>*S. putrefaciens*≈*A. sobria*>*H. alvei*。



注: 不同大写字母表示不同贮藏时间同一处理组内存在显著差异($P<0.05$), 不同小写字母表示同一贮藏时间不同组间存在显著差异($P<0.05$), 图 6、7 同。

图 5 特定腐败菌接种小龙虾贮藏期间 pH 的变化

Fig.5 Changes in pH during storage of *Procambarus clarkii* inoculated with specific spoilage organisms

2.5 TVB-N 值变化分析

如图 6 所示,经无菌处理的虾肉初始 TVB-N 值为 2.80 mg/100 g。在整个贮藏过程中,各 SSOs 接种组的 TVB-N 值均持续增加,但不同组间增长速率各不相同。其中,*P. fluorescens* 接种组在贮藏第 9 d 即超过规定的可接受极限值(20 mg/100 g)^[24],而其他 SSOs 接种组在贮藏第 9 d

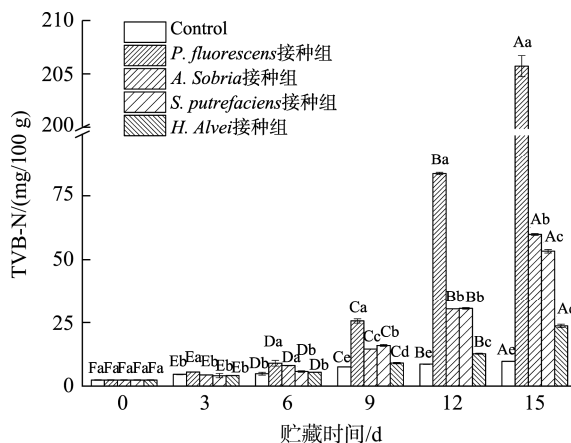


图 6 特定腐败菌接种小龙虾贮藏期间 TVB-N 值的变化

Fig.6 Changes in TVB-N values during storage of *Procambarus clarkii* inoculated with specific spoilage organisms

时均未超过限量值,该结果表明 *P. fluorescens* 相对于其他 3 种 SSOs 具有更强的产 TVB-N 能力,可能是 *P. fluorescens* 分解蛋白质的能力相较于其他 SSOs 更强,此结果与 ZHUANG 等^[25]对冷藏草鱼的研究结果相似。在贮藏第 12 d 时,各 SSOs 接种组的 TVB-N 值均超过限量值;在贮藏 15 d 后,*P. fluorescens*、*S. putrefaciens*、*A. sobria* 和 *H. alvei* 接种组 TVB-N 含量分别为 205.88、54.01、60.60、24.24 mg/100 g,推测各 SSOs 降解蛋白质产生碱性含氮物质的能力强弱结果同 pH 相似,为 *P. fluorescens*>*A. sobria*>*S. putrefaciens*>*H. alvei*。

2.6 菌落总数变化分析

如图 7 所示,各接种组菌落总数随着贮藏时间的延长均显著增加。经无菌处理和 SSOs 接种操作后,各组的初始菌落总数值分别为 2.26、3.38、3.05、2.89、4.00 log₁₀ CFU/g。在贮藏前期(≤3 d),各处理组的菌落总数基本维持在同一个水平,这可能是无菌处理时福尔马林(或 75%乙醇)在虾仁样品表面的残留抑制了腐败菌的生长,也有可能是微生物处于停滞期^[26],需要时间来适应环境温度和营养介质。贮藏 3 d 以后,菌落总数开始显著($P<0.05$)增长,并在贮藏末期分别达到 9.33、9.02、8.92、9.11 log₁₀ CFU/g,均超过了规定的上限值(7 log₁₀ CFU/g)^[27]。其中,9~15 d 时,*P. fluorescens* 接种组和 *H. alvei* 接种组显著($P<0.05$)高于 *A. sobria* 接种组和 *S. putrefaciens* 接种组,此数据表明小龙虾 SSOs 中 *P. fluorescens* 和 *H. alvei* 生长繁殖较快,而 *A. sobria* 和 *S. putrefaciens* 生长速度相对较慢。

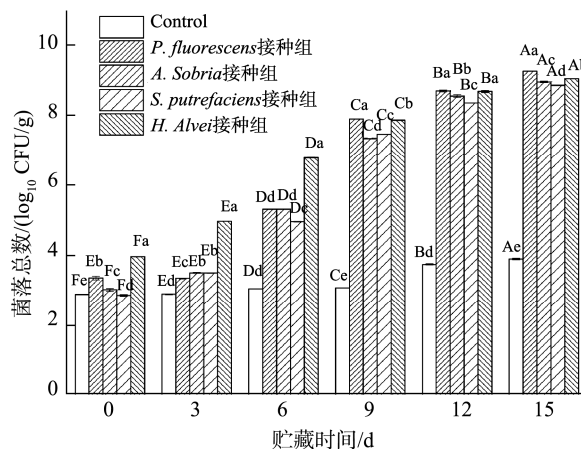


图 7 特定腐败菌接种小龙虾贮藏期间菌落总数的变化

Fig.7 Changes in the total viable counts during storage of *Procambarus clarkii* inoculated with specific spoilage organisms

2.7 腐败代谢产物产量因子分析

由于不同 SSOs 所需营养物质不同,即生长代谢存在一定差异,因此将菌落总数与 TVB-N 值相结合,通过产量因子 $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ 定量表征各 SSOs 的致腐能力,计算结果如表 2 所示。*P. fluorescens* 接种组的 $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$ 最高(33.55),其

次是 *A. sobria* 接种组(10.15)、*S. putrefaciens* 接种组(9.17)和 *H. alvei* 接种组(4.78)。*P. fluorescen* 接种组 $Y_{TVB-N/CFU}$ 值分别为 *A. sobria* 接种组、*S. putrefaciens* 接种组和 *H. alvei* 接种组的 3.31 倍、3.66 倍和 7.02 倍, 由表 2 中计算结果可知小龙虾中 SSOs 致腐能力大小为: *P. fluorescens*>*A. sobria*>*S. putrefaciens*>*H. alvei*。说明引起微冻小龙虾腐败的首要 SSOs 为 *P. fluorescen*; *A. sobria* 和 *S. putrefaciens* 的致腐能力相当; 而 *H. alvei* 的致腐能力相对较弱。

表 2 接种特定腐败菌的小龙虾在冷藏条件下的致腐因子比较
Table 2 Comparison in yield factors of inoculated *Procambarus clarkii* with SSOs during refrigeration

特定腐败菌(SSOs)	$Y_{TVB-N/CFU}$
<i>P. fluorescens</i>	33.55
<i>A. sobria</i>	10.15
<i>S. putrefaciens</i>	9.17
<i>H. alvei</i>	4.78

2.8 BAs 含量变化分析

BAs 主要由微生物的氨基酸脱羧和醛酮类物质的转氨基作用形成^[28]。各 SSOs 接种组虾肉中 BAs 含量的变化情况如表 3 所示。接种前虾肉样品中未检测到 BAs, 表明本研究选用虾仁样品新鲜度良好; *P. fluorescens* 组在贮藏第 3 d 检测到 PUT、CAD 和 TRY, 而 SPD 和 TYR 在贮藏第 9 d 初次检出, HIS 在贮藏第 12 d 才被检出。贮藏结束时, *P. fluorescens* 组的 HIS 含量达到最大值(12.14 mg/kg), 而其他腐败菌接种组的 HIS 在整个贮藏期间不超过 5.11 mg/kg, 均远低于 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生

物胺的测定》限量水平(50 mg/kg), 表明 HIS 不是小龙虾腐败过程产生的主要 BAs。此外, TYR、SPD 和 TRY 的增加量均显著($P<0.05$)低于 PUT、CAD 和 HIS, 且最大值均在 11 mg/kg 以下, 表明小龙虾腐败过程中 TYR、SPD、TRY 污染风险较低。

据报道, PUT 和 CAD 是腐败水产品中主要的腥臭味成分^[29]。在贮藏末期, PUT 是含量相对最高的 BAs, 最大值达到 36.04 mg/kg (*P. fluorescens* 接种组), 分别是 HIS、TRY、TYR、SPD 可检出最大值的 2.99 倍、3.33 倍、6.74 倍和 6.44 倍; CAD 的最大值(35.20 mg/kg)也出现在 *P. fluorescens* 接种组中, 分别是 HIS、TRY、TYR、SPD 的 2.90 倍、3.25 倍、6.58 倍和 6.29 倍。相对而言, *A. sobria* 产 SPD 能力最强, *S. putrefaciens* 产 TYR 和 TRY 能力最强。胺类物质的积累是由于 SSOs 对蛋白质等物质的降解产生^[30], 实验结果表明, 小龙虾肌肉腐败过程中 PUT 和 CAD 的积累主要来自 *Pseudomonas*、*Shewanella* 两种菌属, 这与 WANG 等^[31]对冷藏变质草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的研究结果一致。

综上所述, 小龙虾腐败过程中的主要 BAs 为 PUT 和 CAD, 为主导小龙虾腐败过程的典型 BAs。此外, 小龙虾中 *P. fluorescens* 具有较强的分解蛋白质能力, 能产生相对较多的典型 BAs (PUT 和 CAD), 其他 SSOs 的产胺能力相对较弱, 其中, *H. alvei* 产胺能力最弱, *A. sobria* 和 *S. putrefaciens* 产胺能力没有显著差异($P>0.05$)。通常认为, 水产品腐败程度越高, 其 BAs 含量越高, 这表明 SSOs 的致腐能力与产胺能力密切相关, 上述产 BAs 能力结果进一步验证了小龙虾中各 SSOs 致腐能力的分析结论。

表 3 各特定腐败菌接种小龙虾贮藏期间 BAs 含量的变化(mg/kg)
Table 3 Changes in BAs content during storage of *Procambarus clarkii* inoculated with various specific spoilage organisms (mg/kg)

BAs	处理组	贮藏时间/d					
		0	3	6	9	12	15
PUT	Control	-	-	-	-	-	2.64±0.10 ^{Ad}
	<i>P. fluorescens</i>	-	3.97±0.07 ^{Ea}	6.99±0.21 ^{Da}	10.42±0.53 ^{Ca}	17.47±0.43 ^{Ba}	36.04±1.33 ^{Aa}
	<i>A. sobria</i>	-	-	1.73±0.35 ^{Cb}	4.95±0.12 ^{Bb}	5.64±0.64 ^{Bb}	7.60±0.76 ^{Ac}
	<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-	-	6.52±0.52 ^{Bb}	12.31±0.80 ^{Ab}
	<i>H. alvei</i>	-	-	-	-	1.12±0.09 ^{Bc}	3.22±0.15 ^{Ad}
	Control	-	-	-	0.79±0.02 ^{Cd}	1.24±0.01 ^{Bd}	1.56±0.12 ^{Ad}
CAD	<i>P. fluorescens</i>	-	0.60±0.01 ^{Da}	1.19±0.03 ^{Da}	11.65±0.18 ^{Ca}	19.64±0.64 ^{Ba}	35.20±0.70 ^{Aa}
	<i>A. sobria</i>	-	-	-	4.85±0.17 ^{Cb}	10.51±0.31 ^{Bb}	13.35±0.13 ^{Ab}
	<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-	2.51±0.29 ^{Cc}	3.69±0.33 ^{Bc}	6.31±0.33 ^{Ac}
	<i>H. alvei</i>	-	-	-	0.40±0.23 ^{Bd}	0.66±0.01 ^{Bd}	1.24±0.01 ^{Ad}
HIS	Control	-	-	-	-	0.08±0.00 ^{Bc}	0.09±0.00 ^{Ad}
	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-	1.73±0.06 ^{Ba}	12.14±0.41 ^{Aa}
	<i>A. sobria</i>	-	-	-	-	0.08±0.00 ^{Bc}	1.16±0.01 ^{Ac}
	<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-	-	0.67±0.00 ^{Bb}	5.11±0.00 ^{Ab}
	<i>H. alvei</i>	-	-	-	-	0.14±0.00 ^{Bc}	1.02±0.18 ^{Ac}

表 3(续)

BAs	处理组	贮藏时间/d					
		0	3	6	9	12	15
TRY	Control	-	-	-	2.37±0.04 ^{Cb}	3.36±0.02 ^{Bc}	4.07±0.27 ^{Ac}
	<i>P. fluorescens</i>	-	0.35±0.00 ^{Ea}	0.73±0.18 ^{Db}	2.99±0.20 ^{Ca}	3.87±0.00 ^{Bb}	4.32±0.11 ^{Ac}
	<i>A. sobria</i>	-	-	0.24±0.00 ^{Dc}	1.22±0.00 ^{Cc}	4.77±0.03 ^{Ba}	6.12±0.44 ^{Ab}
	<i>S. putrefaciens</i>	-	-	0.26±0.00 ^{Dc}	0.47±0.10 ^{Cd}	3.40±0.03 ^{Bc}	10.82±0.14 ^{Aa}
	<i>H. alvei</i>	-	-	1.81±0.01 ^{Ca}	2.93±0.05 ^{Ba}	2.86±0.18 ^{Bd}	6.34±0.18 ^{Ab}
TYR	Control	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	0.24±0.00 ^{Cb}	0.52±0.02 ^{Bc}	4.49±0.14 ^{Ab}
	<i>A. sobria</i>	-	-	-	0.18±0.00 ^{Cc}	0.52±0.01 ^{Bc}	3.24±0.19 ^{Ac}
	<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-	0.40±0.03 ^{Ca}	1.24±0.02 ^{Bb}	5.35±0.03 ^{Aa}
	<i>H. alvei</i>	-	-	-	-	1.36±0.02 ^{Ba}	1.22±0.01 ^{Ad}
SPD	Control	-	-	-	-	-	0.03±0.01 ^{Ac}
	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	0.12±0.00 ^{Ca}	0.29±0.01 ^{Bb}	1.68±0.03 ^{Ac}
	<i>A. sobria</i>	-	-	-	-	-	5.60±0.04 ^{Aa}
	<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-	-	1.22±0.03 ^{Ba}	5.26±0.62 ^{Ab}
	<i>H. alvei</i>	-	-	-	0.04±0.02 ^{Cb}	0.20±0.01 ^{Bc}	0.30±0.00 ^{Ad}

注: -: 表示无此项; 不同大写字母表示不同贮藏时间同一处理组内存在显著差异($P<0.05$), 不同小写字母表示同一贮藏时间不同组间存在显著差异($P<0.05$)。Control: 无菌对照样品; *P. fluorescens*: 荧光假单胞菌接种组; *S. putrefaciens*: 腐败希瓦氏菌接种组; *A. sobria*: 温和气单胞菌接种组; *H. alvei*: 蜂房哈夫尼亚菌接种组。腐胺(putrescine, PUT); 尸胺(cadaverine, CAD); 组胺(histamine, HIS); 色胺(tryptamine, Try); 酪胺(tyramine, TYR); 亚精胺(spermidine, SPD)。

3 结 论

本研究利用传统培养基法对微冻(-3℃±1℃)贮藏至腐败的小龙虾中腐败菌进行分离纯化, 共筛选出 6 株菌株, 经 16S rDNA 技术结合细菌生化鉴定法鉴定为 *P. fluorescens* (2 株)、*S. putrefaciens* (1 株)、*A. sobria* (1 株) 和 *H. alvei* (2 株)。将筛选到的 4 种 SSOs 接种到无菌虾肉中, 对比自然腐败样品与各接种组样品理化指标的差异, 发现在贮藏过程中各 SSOs 接种组样品中的 pH、TVB-N、菌落总数等指标均比自然腐败样品劣化更为严重, 说明 SSOs 接种均可显著($P<0.05$)加速小龙虾腐败进程。对比各 SSOs 接种组的 $Y_{\text{TVB-N/CFU}}$, 发现 *P. fluorescens* (33.55)>*A. sobria* (10.15)>*S. putrefaciens* (9.17)>*H. alvei* (4.78), 说明小龙虾中 *P. fluorescens* 致腐能力显著($P<0.05$)高于其他 SSOs。PUT 和 CAD 为该过程产生的主要 BAs, 且含量水平大小为 *P. fluorescens*>*S. putrefaciens*≈*A. sobria*>*H. alvei*, 与致腐能力结论基本一致。本研究有助于阐明微冻条件下导致小龙虾腐败变质的主要因素, 为后续针对性地开发高效抑菌保鲜剂提供科学指导。

参考文献

[1] 陈文飞. 抗冻剂与冻结方式对冻煮小龙虾虾仁品质的影响研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
CHEN WF. Effect of antifreeze and freezing methods on quality of frozen cooked crawfish tail meat [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.

[2] 秦乐蓉. 微冻贮藏过程中小龙虾品质变化规律及机制研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2022.
QIN LR. Study on the law and mechanism of quality change for crayfish during superchilling storage [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2022.
[3] 中国水产流通与加工学会. 2022 中国小龙虾产业发展报告[J]. 中国渔业报, 2022, (4): 1–10.
China Aquatic Products Processing and Marketing Alliance. 2022 China crayfish industry development report [J]. China Fish News, 2022, (4): 1–10.
[4] 韩吉平. 反复冻融对熟制小龙虾感官品质与保水性的影响及改善方法研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
HAN JP. Effect of repeated freeze-thaw cycles on sensory quality and water retention of cooked crayfish and its improvement methods [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2022.
[5] MAGNUSSEN OM, HAUGLAND A, HEMMINGSEN AKT, et al. Advances in superchilling of food-process characteristics and product quality [J]. Trend Food Sci Technol, 2008, 19(8): 418–424.
[6] 孙康婷, 潘创, 陈胜军, 等. 水产品微冻贮藏过程中冰晶形成与品质特性研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(6): 147–152.
SUN KT, PAN C, CHEN SJ, et al. Research progress on formation and properties of ice crystals during partial freezing storage of aquatic products [J]. J Guangdong Ocean Univ, 2021, 41(6): 147–152.
[7] QIN LR, WU YX, CHEN JW, et al. Effects of superchilling on quality of crayfish (*Procambarus clarkii*): Water migration, biogenic amines accumulation, and nucleotides catabolism [J]. Int J Food Sci Technol, 2022, 56(12): 506–515.
[8] 刘欢, 马翼飞, 单钱艺, 等. 冰藏和微冻贮藏对大鲢肌肉品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 199–204.
LIU H, MA YF, SHAN QY, et al. Effects of ice and micro-frozen storage on the quality of *Andrias davidianus* [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(23): 199–204.
[9] 李卫东, 陶妍, 袁骐, 等. 南美白对虾在微冻保藏期间的鲜度变化[J].

- 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 48–52.
- LI WD, TAO Y, YUAN Q, *et al.* Changes in freshness of *Penaeus vannamei* during partial freezing storage [J]. Food Ferment Ind, 2008, 34(11): 48–52.
- [10] 杨溢, 王欣. 冷藏菲律宾蛤仔活体中优势菌的分离鉴定、生长特性与致腐能力分析[J]. 工业微生物, 2022, 52(4): 14–22.
- YANG Y, WANG X. Isolation, identification, growth characteristics and spoilage ability of dominant bacteria from refrigerated live *Ruditapes philippinarum* [J]. Ind Microbiol, 2022, 52(4): 14–22.
- [11] 曾鹭, 刘淑集, 陈晓婷, 等. 基于 Illumina MiSeq 测序技术探究冷藏菊黄东方鲀菌群演替规律[J/OL]. 食品科学: 1–12. [2023-07-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221230.0919.021.html>
- ZENG L, LIU SJ, CHEN XT, *et al.* Succession of microbial community in *Takifugu flavidus* during cold storage based on Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology [J/OL]. Food Sci: 1–12. [2023-07-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20221230.0919.021.html>
- [12] 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 HQ, LAN WQ, SUN XH, *et al.* Isolation and identification of dominant spoilage bacteria in *Lateolabrax japonicus* fillets during chilled storage and their spoilage capability [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2019, 19(8): 208–215.
- [13] 刘洋帆, 王迪, 李春生, 等. 冷藏鲤鱼优势腐败产胺菌分离鉴定及其致腐产胺能力分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 168–175.
- LIU YF, WANG D, LI CS, *et al.* Isolation and identification of dominant spoilage biogenic amine producing bacteria from refrigerated skipjack tuna and analysis of their production ability [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(23): 168–175.
- [14] 黄佳奇, 葛雨珊, 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 JQ, GE YJ, XIANG YC, *et al.* Evaluation of spoilage potential of specific spoilage organisms of refrigerated little yellow croaker and its influence on the volatile compound [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(16): 230–235, 242.
- [15] 廖新浴, 陈信贤, 刘东红, 等. 不同种类腐乳产品中优势菌种的分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3755–3759.
- LIAO XY, CHEN XX, LIU DH, *et al.* Isolation and identification of dominant bacteria in different types of Sufu products [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3755–3759.
- [16] 倪荣, 齐懿涵, 马晓璐, 等. 冷藏中国对虾优势腐败菌的分离鉴定及致腐能力分析[J]. 食品工业, 2022, 43(7): 162–167.
- NI R, QI YH, MA XL, *et al.* Isolation and identification of dominant spoilage bacteria of *penaeus chinensis* in cold storage and analysis of their spoilage ability [J]. Food Ind, 2022, 43(7): 162–167.
- [17] 许振伟, 李学英, 杨宪时, 等. 冷藏鲤鱼和罗非鱼优势腐败菌腐败能力分析[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 243–246.
- XU ZW, LI XY, YANG XS, *et al.* Analysis of spoilage ability of dominant spoilage bacteria from stored chilled *Cyprinus carpio* and *Oreochromis niloticus* [J]. Food Sci, 2012, 33(4): 243–246.
- [18] LIAO E, XU YS, JIANG QX, *et al.* Effects of inoculating autochthonous starter cultures on biogenic amines accumulation of Chinese traditional fermented fish [J]. J Food Proc Preserv, 2018, 42(8): 1–12.
- [19] 孟凌云, 戴泽川, 李娇, 等. 冷藏小龙虾优势腐败菌的筛选鉴定及细菌群落结构和多样性分析[J]. 肉类研究, 2022, 36(6): 16–22.
- MENG LY, DAI ZC, LI J, *et al.* Screening and identification of dominant spoilage organisms and analysis of bacterial community structure and diversity in refrigerated crayfish [J]. Meat Res, 2022, 36(6): 16–22.
- [20] HUANG QX, JIAO XD, YAN BW, *et al.* Changes in physicochemical properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi during chilled storage: The roles of spoilage bacteria [J]. Food Chem, 2022, 387: 132847.
- [21] LI Y, ZHUANG S, LIU YY, *et al.* Effect of grape seed extract on quality and microbiota community of container-cultured snakehead (*Channa argus*) fillets during chilled storage [J]. Food Microbiol, 2020, 91: 103492.
- [22] LI DP, ZHANG LT, SONG SJ, *et al.* The role of microorganisms in the degradation of adenosine triphosphate (ATP) in chill-stored common carp (*Cyprinus carpio*) fillets [J]. Food Chem, 2017, 224: 347–352.
- [23] YU DW, REGENSTEIN JM, ZANG JH, *et al.* Inhibition of microbial spoilage of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets with a chitosan-based coating during refrigerated storage [J]. Int J Food Microbiol, 2018, 285: 61–68.
- [24] HUANG SY, XIONG YB, ZOU Y, *et al.* A novel colorimetric indicator based on agar incorporated with *Arnebina euchroma* root extracts for monitoring fish freshness [J]. Food Hydrocolloid, 2019, 90: 198–205.
- [25] ZHUANG S, TAN YQ, HONG H, *et al.* Exploration of the roles of spoilage bacteria in degrading grass carp proteins during chilled storage: A combined metagenomic and metabolomic approach [J]. Food Res Int, 2022, 152: 110926.
- [26] 黄佳奇. 小黄鱼优势腐败菌的分离鉴定及其与品质的相关性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- HUANG JQ. Identification of specific spoilage organisms and their effects on the physicochemical properties of little yellow croaker [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.
- [27] NA SY, KIM JH, JANG HJ, *et al.* Shelf life extension of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using chitosan and epsilon-polylysine during cold storage [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 115: 1103–1108.
- [28] 邓斯予, 曹立民, 隋建新. 发酵食品加工与贮藏过程中生物胺的控制研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(1): 156–164.
- DENG SY, CAO LM, SUI JX. Research progress on the control of biogenic amines in the processing and storage of fermented foods [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(1): 156–164.
- [29] ZHUANG S, LIU XC, LI Y, *et al.* Biochemical changes and amino acid deamination and decarboxylation activities of spoilage microbiota in chill-stored grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets [J]. Food Chem, 2021, 336: 127683.
- [30] HU Y, HUANG ZY, CHEN X. Histamine-producing bacteria in blue scad (*Decapterus maruadsi*) and their abilities to produce histamine and other biogenic amines [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(8): 13–21.
- [31] WANG H, LIU XC, ZHANG YM, *et al.* Spoilage potential of three different bacteria isolated from spoiled grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during storage at 4°C [J]. LWT-Food Sci Technol, 2017, 81: 10–17.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



廖 鄂, 博士, 讲师, 主要研究方向为水产品加工及贮藏工程。
E-mail: Leoneason@126.com



陈季旺, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工及贮藏工程。
E-mail: jiwangchen@whpu.edu.cn