

## 冷链与断链流通对冰藏大黄鱼品质与微生物多样性的影响

王倩<sup>1</sup> 蓝蔚青<sup>1,2\*</sup> 张墨言<sup>1</sup> 孙晓红<sup>1,2</sup> 杨晓慧<sup>1</sup> 谢晶<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>上海海洋大学食品学院 上海 201306

<sup>2</sup>上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心 上海冷链装备性能与节能评价专业技术服务平台  
食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学) 上海 201306)

**摘要** 研究了冷链和断链流通对冰藏大黄鱼品质及微生物多样性的影响。模拟了冰藏大黄鱼冷链与断链两种流通方式,采用多点温度采集仪实时监测不同流通过程中的温度变化,以感官评定、总挥发性盐基氮(TVB-N)、菌落总数(TVC)与嗜冷菌数(PBC)等指标来评价两种流通方式对大黄鱼品质及微生物数量变化的影响,并应用聚合酶链式反应(PCR)-变性梯度凝胶电泳(DGGE)指纹技术对冰藏大黄鱼冷链与断链流通中的微生物种群多样性进行研究。结果表明,温度波动加速大黄鱼的品质劣变,流通时间与其感官分值、TVB-N 值、微生物数正相关,冷链组与断链组样品分别在 347 h 与 275 h 时超出货架期终点,货架期分别为 275~347 h 与 203~275 h。样品经 PCR-DGGE 割胶回收测序,腐生葡萄球菌、假交替单胞菌和副溶血性弧菌在大黄鱼流通后期逐渐减少,假单胞菌与嗜冷杆菌开始出现并逐渐增多,同时还有不动杆菌与希瓦氏菌。经综合评价,假单胞菌与嗜冷杆菌为冰藏大黄鱼冷链与断链流通过程中贮藏末期的主要优势菌。

**关键词** 大黄鱼;冰藏;流通;聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE);微生物多样性

文章编号 1009-7848(2019)09-0221-09 doi: 10.16429/j.1009-7848.2019.09.026

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)又名石首鱼、黄瓜鱼、大鲜,为石首鱼科黄鱼属暖温性近海中下层集群洄游鱼类,广泛分布于黄海、东海、台湾海峡等地,是我国重要的经济鱼类,为传统“四大海产”之一。大黄鱼体内蛋白质、微量元素与维生素含量丰富,具有很好的食疗效果,在东南亚有较好的消费市场<sup>[1-2]</sup>。此外,大黄鱼中还含有丰富的微量元素硒,能清除人体代谢产生的自由基,延缓衰老,对各种癌症的预防有良好效果。水产品由于其水分含量高、营养物质丰富,极易发生腐败变质。低温保鲜是目前应用最为广泛的水产品保鲜方法。冰藏保鲜是低温保鲜方法之一,是指在水产品周围放置冰,以此降低鱼体温度,使其接近冰点而不冻结,从而维持鱼体新鲜度的方法<sup>[3]</sup>。

目前,我国 90%以上大黄鱼的流通销售多以冰鲜形式进行<sup>[4]</sup>,在实现长途运输时,使原料保持相对较高的新鲜度。冷链物流泛指冷藏冷冻类食品在生产、加工、贮藏、运输和销售等环节始终处于规定的低温环境下,以保障食品质量的特殊供应链系统<sup>[5]</sup>。多数情况下,由于运输条件与成本的限制,所以水产品在整个流通期间的温度达不到规定要求,样品易受外界环境的影响而发生温度波动,从而影响水产品品质。

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, PCR-DGGE)技术是目前用于分析微生物群落多样性与监视种群动态的分子指纹技术手段<sup>[6]</sup>。相较于传统微生物学方法,该技术不通过培养,直接从样品中提取细菌总 DNA,能检测到难以培养或不能培养的微生物,且能同时对多个样品进行分析,具有快速、高效等优点<sup>[7-8]</sup>。本研究主要模拟大黄鱼的冷链与断链两种流通方式,以感官评分、菌落总数与嗜冷菌数、TVB-N 值等指标来综合评价流通期间的温度变化对大黄鱼品质的影响,并通过 PCR-DGGE 技术分析两种流通

收稿日期:2018-09-08

基金项目:农业部海水鱼产业体系(CARS-47);上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心能力提升项目(19DZ2284000);上海市科委公共服务平台建设项目(17DZ2293400)

作者简介:王倩,女,1990 年出生,硕士生

通讯作者:蓝蔚青 E-mail: wqlan@shou.edu.cn

过程中冰藏大黄鱼的菌相变化,探究大黄鱼流通过程中的腐败菌,以期为大黄鱼的流通运输与保鲜加工提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

冰鲜大黄鱼 2016 年 1 月购自上海芦潮港海鲜市场,样品体态匀称,鳞片完整且紧贴,鱼鳃鲜红清晰、眼球饱满,具固有清新气味,质量(500 ± 50) g,30 min 内运至实验室,层冰层鱼装入泡沫箱内。

### 1.2 主要药品试剂

平板计数琼脂培养基、胰蛋白胨、氯化钠,国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组提取试剂盒,溶菌酶,天根生化科技(北京)有限公司;Premix Ex Taq 酶、100 bp DNA Ladder Marker,大连宝生物工程公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、TEMED,美国 Sunshine 公司;所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

### 1.3 主要仪器设备

FOSS Kjelttec8400 凯式定氮仪,丹麦 FOSS 中国上海有限公司;Testo-176T4 型德国电子温度记录仪,德国仪器国际贸易(上海)有限公司;Appendorf PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;Dcode system 变性凝胶梯度电泳仪、Gel-Doc2000 型凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司;Centrifuge 5810R 冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;BCD-256KF 冰箱,青岛海尔股份有限公司;生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;MLS-3750 灭菌锅,日本 SANYO 公司等。

### 1.4 原料处理

将大黄鱼样品分成两组,其中冷链组( $T_1$ ):从试验开始至结束,样品始终处于 4 °C;断链组( $T_2$ ):模拟流通过程,样品在搬运、运输、配送和销售环节于 20 °C 分别放置 2,24,8,1 h,其余环节温度均为 4 °C。模拟冷链与断链物流试验中温度要求及相关操作标准参照《食品冷链物流技术与管理规范》<sup>[9-10]</sup>进行。冷链流通过程各环节试验设计如图 1 所示,各环节完成后两组样品均置于 4 °C 条件下贮藏。

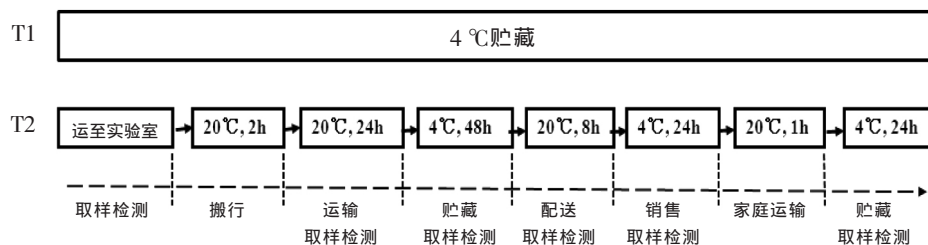


图 1 冰鲜大黄鱼流通过程模拟示意图

Fig.1 Simulated situations of cold chain logistics process of large yellow croaker with ice

### 1.5 试验方法

1.5.1 温度监测 将多点温度采集仪温度探头分别置于鱼肉、泡沫箱内冰层与箱盖间和冷藏箱内,分别监测鱼体中心、泡沫箱内和泡沫箱外环境温度。每隔 15 min 采集 1 次数据,对大黄鱼流通期间的温度波动进行实时监测。

#### 1.5.2 品质评价

1.5.2.1 感官分析 由 6 名经专业训练的人员组成感官小组对样品进行感官评价。评价指标参考《SC/T 3101-2010 鲜大黄鱼、冻大黄鱼、鲜小黄鱼、冻小黄鱼》<sup>[11]</sup>与杨宪时等<sup>[12]</sup>法,分别在 0 h(贮藏初期)、26 h(运输)、74 h(贮藏中期)、82 h(配送)、

106 h(销售后期)、131 h(贮藏中后期)、203 h、275 h、347 h、395 h(贮藏末期)对鱼样的眼球、鱼鳃、质地、气味等 4 个方面采用 4 分法进行感官评分。其中,0 分为最佳品质,1 分为高品质终点,2 分为可接受终点,>2 分视为感官拒绝。

1.5.2.2 TVB-N 值 用凯氏定氮仪测定如上时间内样品的 TVB-N 值,每个样品 3 个平行。

1.5.2.3 菌落总数(TVC)与嗜冷菌数(PBC) 分别在如上时间内对两组样品取样进行菌落总数的测定。参考 GB/T 4789.2-2010<sup>[13]</sup>操作。采用平板计数法测定 TVC 值与 PBC 值。在(30 ± 1) °C 生化培养箱内培养(48 ± 3) h 计数为菌落总数,在(7 ±

1)℃生化培养箱培养10 d 计数为嗜冷菌数。选取的每个稀释度做3个平行。

### 1.5.3 微生物多样性分析

1.5.3.1 细菌总DNA提取 分别在0 h(贮藏初期)、26 h(运输)、74 h(贮藏中期)、106 h(销售后期)、131 h(贮藏中后期)、395 h(贮藏末期)对两组样品取样并进行细菌总DNA提取。参考周琰冰等<sup>[14]</sup>法,稍作调整,采用细菌基因组提取试剂盒提取细菌总DNA。提取前增加溶菌酶破壁处理,然后进行DNA提取,并于1%琼脂糖凝胶电泳检测,样品在-20℃冰箱贮藏。

1.5.3.2 PCR扩增 以样品细菌总DNA为模板,进行16S rDNA V3区段的PCR扩增<sup>[15]</sup>。参考Muyzer等<sup>[16]</sup>法,分别选取上游引物为GC 341f (5'-CGCCGCGCGCGCGCGCGGGCGGGCGGCGGGCACGGGGGCGCTACGGGAGGCAGCAG-3'),下游引物选518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),扩增片段约200 bp。PCR反应体系参考Muyzer等<sup>[16]</sup>法,稍作调整,采用50.0 μL反应体系,具体为Premix Taq 25.0 μL、上游引物1.0 μL、下游引物1.0 μL、模板2.0 μL、ddH<sub>2</sub>O 21.0 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min,35个循环(95℃变性45 s,56℃退火45 s,72℃延伸1 min),72℃延伸8 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后置4℃贮藏备用。

1.5.3.3 DGGE分析 参考Du等<sup>[17]</sup>法对PCR产物进行DGGE凝胶电泳。用8%聚丙烯酰胺凝胶(质量比为丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=37.5:1),变性梯度范围为35%~50%。在1×TAE缓冲溶液中,

60℃恒温条件下,100V电压电泳10 h。电泳完毕后采用SYBR green (1:10 000)染色,重复两次,每次染15 min。清水冲洗后使用凝胶成像系统成像。

1.5.3.4 优势条带的回收、纯化与测序 将染色后的DGGE凝胶置于紫外灯下,用经酒精灯灼烧并冷却的刀片切下不同位置、分离明显且亮度较高的条带。捣碎后分别装入1.5 mL灭菌离心管中,加入40 μL无菌水。常温放置24 h,取2 μL回收产物作为模板DNA,用不含GC夹子的341f和518r作为引物进行PCR扩增。PCR反应体系和扩增程序同1.5.3.2节。PCR扩增后,用1%琼脂糖凝胶电泳检测。出现特异性条带后用PCR产物纯化试剂盒对扩增产物进行纯化。将纯化后产物送至上海迈浦生物科技有限公司测序,登录NCBI网站,将测得的序列与数据库中已知序列进行相似性比对。

1.5.4 数据处理 数据处理:用软件origin(Pro)8.5绘制曲线,数据间的差异通过统计软件SPSS13.0中的Duncan新复极差法进行方差分析与多重比较,结果以平均值±标准偏差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 温度监测

温度是冷链物流过程中最主要的影响因素,水产品的冷藏链要求是水产品被捕捞后,在其加工、运输、贮藏到销售各环节都处在低温环境下<sup>[18]</sup>。冰鲜大黄鱼流通期间的温度数据如图2所示。

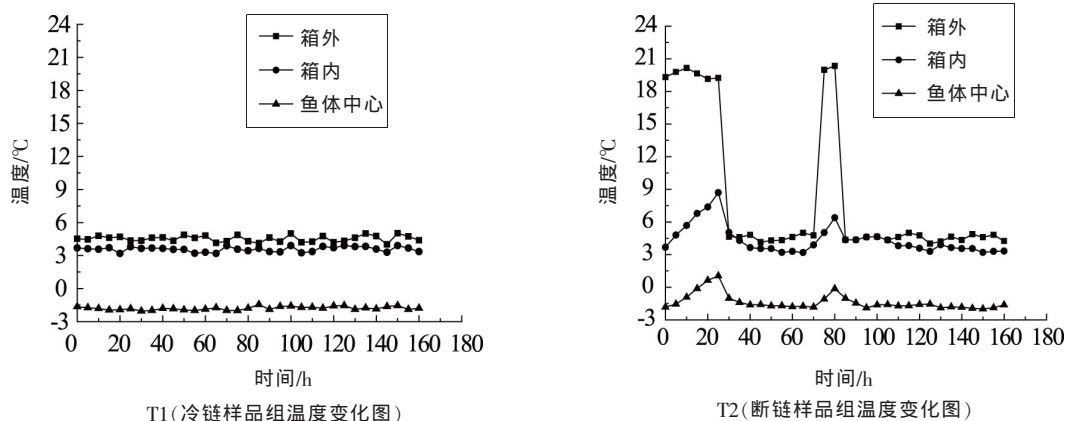


图2 流通过程中温度实时监测图

Fig.2 Real-time temperature monitoring during cold chain logistic process

由图2可知,冷链流通组中,大黄鱼鱼体中心温度 $-1.5\sim-2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,泡沫箱内温度 $3\sim4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,泡沫箱外温度 $4\sim5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,整体波动幅度小。而在断链流通组中,当环境温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,泡沫箱内温度和鱼体中心温度均有较大波动,鱼体中心温度最高为 $1.05\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,泡沫箱内温度达 $8.69\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.2 感官评价

感官评价是通过人的视觉、味觉、嗅觉、听觉和触觉等五官对事物的感觉来鉴别食品质量的评定方法。由于其可直接在实验室或现场评价,因此能实现产品品质的快速评定,是消费者选购水产品时评判其鲜度的主要方式,现已被世界各国研究人员广泛采用。感官评定人员对大黄鱼的眼球、

鱼鳃、质地与气味等方面进行综合评价,如图3所示。

大黄鱼初始感官分值为 $0.53\pm0.15$ ,新鲜度较好,体表呈金黄色,眼球清澈、角膜透明,鱼鳃鲜红、黏液少且透明,肌肉坚实富有弹性。随着贮藏时间的延长,样品体表色泽逐渐暗淡,切面光泽度降低,肉质相对松散,固有色泽随之消失,异味产生。由图3可见,随着流通时间的延长,大黄鱼的感官分值逐渐上升,品质逐渐劣变。在流通至275 h时,断链组感官分值为 $2.35\pm0.13$ ,超出可接受终点,而冷链组此时的感官分值为 $1.85\pm0.13$ ,第347小时才达到 $2.27\pm0.12$ 。可见,温度波动加速了样品的腐败进程。

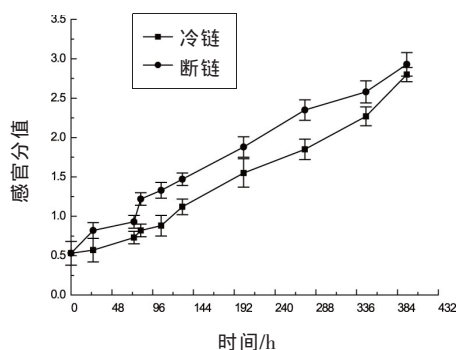


图3 冰鲜大黄鱼流通过程中感官分值的变化

Fig.3 Change of sensory scores in large yellow croaker with ice during logistics process

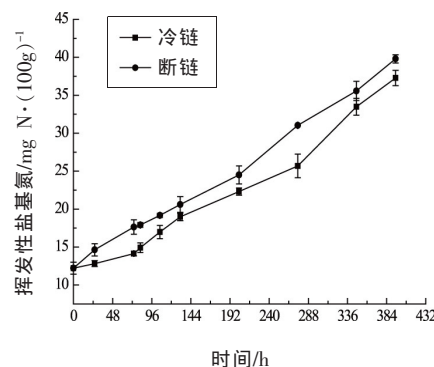


图4 冰鲜大黄鱼流通过程中TVB-N值的变化

Fig.4 Change of TVB-N value in large yellow croaker with ice during logistics process

## 2.3 TVB-N值

鱼肉贮藏过程中,由于微生物及鱼体内源酶的共同作用,鱼肉蛋白质发生降解,产生胺类物质,导致TVB-N值升高,因此,TVB-N值是指示水产品腐败程度的重要指标<sup>[19]</sup>。根据SC/T 3101-2010<sup>[11]</sup>可知,TVB-N值 $\leq 13\text{ mgN}/100\text{ g}$ 为一级品, $13\text{ mgN}/100\text{ g}<\text{TVB-N值}\leq 30\text{ mgN}/100\text{ g}$ 为合格品,TVB-N值 $>30\text{ mgN}/100\text{ g}$ 为不可接受范围。

相关研究表明,鱼类TVB-N值的变化与样品种类、生活地域、捕捞季节、鱼龄和性别有关,这也是导致其TVB-N值存在差异的主因<sup>[20-21]</sup>。冰鲜大黄鱼流通过程中TVB-N的变化如图4所示,大黄鱼的初始TVB-N值为 $(12.22\pm0.78)\text{ mgN}/100\text{ g}$ ,符合一级品的品质要求。随着流通时间的延长,两组样品的微生物活动加剧,使TVB-N值逐渐上升。

第275小时,断链组TVB-N值达到 $(31.04\pm0.06)\text{ mgN}/100\text{ g}$ ,超出可接受范围,而冷链组TVB-N值仅为 $(25.68\pm1.56)\text{ mgN}/100\text{ g}$ 。贮藏终点时冷链组和断链组的TVB-N值均较高,达 $(37.27\pm1.00)\text{ mgN}/100\text{ g}$ 与 $(39.79\pm0.54)\text{ mgN}/100\text{ g}$ 。结合菌落总数的结果可知,冷链组货架期为275~347 h,断链组货架期为203~275 h。

## 2.4 菌落总数与嗜冷菌数

菌落总数是水产品最重要的品质评价指标之一,其对水产品贮藏过程中品质的影响特别明显,由微生物的生长和新陈代谢所造成的水产品损失可达30%<sup>[22-23]</sup>。根据大黄鱼国标,TVC值 $<4\text{ lgCFU/g}$ 时为新鲜鱼, $4\text{ lgCFU/g}<\text{TVC值}<5\text{ lgCFU/g}$ 为二级鲜度,TVC值 $>6\text{ lgCFU/g}$ 时表明鱼体腐败<sup>[24]</sup>。



初始菌落数在水产品保藏中不仅是指示其初始新鲜度的重要指标,还是影响鲜鱼在冰藏期间腐败进程的重要因素<sup>[25]</sup>。如图 5a 所示,大黄鱼的初始菌落总数为 $(3.84 \pm 0.07) \lg(\text{CFU/g})$ ,符合一级品的品质要求,与包玉龙等<sup>[26]</sup>研究得到的冰藏鲫鱼初始菌落数 $3.78 \lg(\text{CFU/g})$ 结果一致。大黄鱼样品流通至 275 h 时,断链组菌落总数达 $(6.50 \pm 0.07) \lg(\text{CFU/g})$ ,超出可接受范围。而冷链组此时的菌落总数仅为 $(5.69 \pm 0.05) \lg(\text{CFU/g})$ 。贮藏末期,冷链组的菌落总数为 $(7.56 \pm 0.03) \lg(\text{CFU/g})$ ,低于断链组的 $(7.76 \pm 0.01) \lg(\text{CFU/g})$ 。

大黄鱼在断链流通时,其鱼体中心温度和鱼体外部环境温度有所波动,且嗜冷菌的较适生长温度范围为 $0 \sim 20^\circ\text{C}$ ,对大黄鱼进行嗜冷菌数测定,

以此评估两种流通方式对嗜冷菌正常生长的影响。由图 5b 可知,两组样品的初始嗜冷菌菌落数为 $(3.64 \pm 0.08) \lg(\text{CFU/g})$ 。其中断链组样品在流通至 131h 时,嗜冷菌数达 $(5.66 \pm 0.09) \lg(\text{CFU/g})$ ,而冷链组嗜冷菌数为 $(4.90 \pm 0.10) \lg(\text{CFU/g})$ ,断链组嗜冷菌数增长速率大于冷链组。在流通末期,冷链组和断链组的嗜冷菌数分别为 $(7.79 \pm 0.13) \lg(\text{CFU/g})$ 与 $(7.84 \pm 0.10) \lg(\text{CFU/g})$ ,断链组样品的嗜冷菌数高于冷链组样品。断链流通时,其温度环境为嗜冷菌提供有利的生长条件。与菌落总数相比,两组样品的嗜冷菌数大于菌落总数,可能由于流通过程中大黄鱼所处温度环境更适于嗜冷菌的生长繁殖。

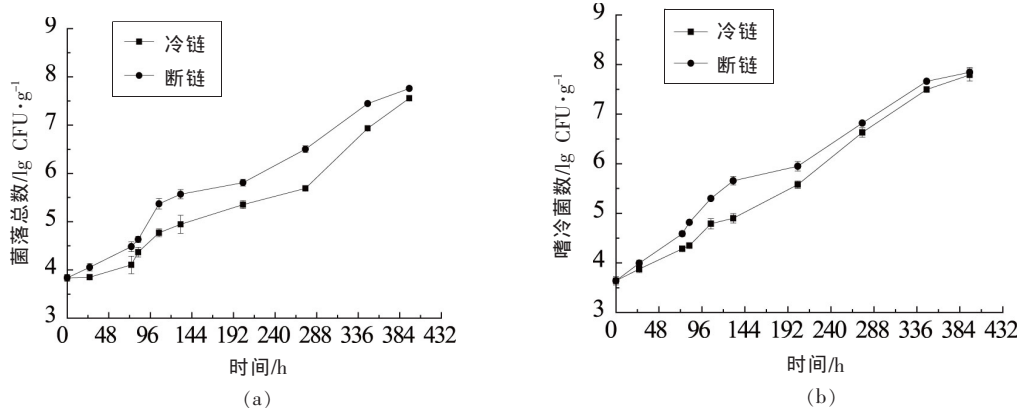


图 5 冰鲜大黄鱼流通过程中菌落总数与嗜冷菌数的变化

Fig.5 Change of TVC and PBC in large yellow croaker with ice during logistics process

## 2.5 细菌 16S rDNA 的 V3 区 PCR 扩增结果

以细菌总 DNA 为模板,用引物 GC341f 和 518r 对细菌的 16S rDNA V3 区进行 PCR 扩增,以不加模板 DNA 为阴性对照,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,11 组样品均有较亮的特异性扩增条带,且不加 DNA 模板的样品,即阴性对照无条带,说明引物和  $\text{ddH}_2\text{O}$  未被污染。通过与 Marker 对比发现,特异性扩增条带分子质量均在 200 bp 左右,说明 PCR 扩增体系与反应程序合适,可用于 DGGE 分析。

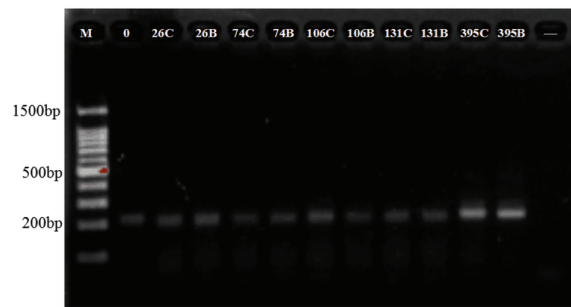
## 2.6 DGGE 图谱分析

PCR-DGGE 可用于评价冰鲜大黄鱼在流通期间的微生物生态多样性。冰鲜大黄鱼流通过程

中细菌 16S rDNA V3 区 PCR 产物的 DGGE 图谱如图 7 所示。同一泳道上不同位置的条带代表不同的细菌,条带亮度反映细菌相对量的多少,不同的条带数体现样品微生物的丰度<sup>[8,27]</sup>。

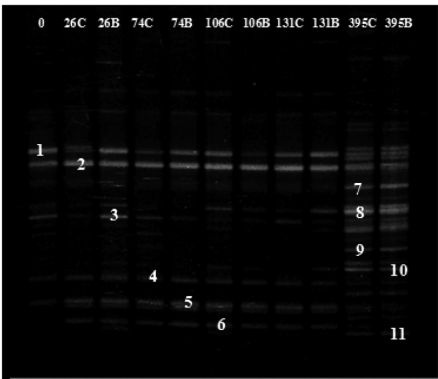
从图 7 可看出,冷链处理组与断链处理组中每个泳道上均有较多条带。其中,26 h 时,断链组样品条带数多于冷链组,其它时间点两组样品的条带分布较相似。随着流通时间的延长,到末期 395h 时,冷链与断链组泳道的条带数明显多余其它泳道,且多数条带较亮,表明贮藏末期,样品中的微生物种类与数量明显增加。此时,1~6 条带均变弱,可能是由于低温贮藏使细菌的生长速度减弱或优势菌群在竞争中占有优势,抑制了其它细

菌的生长<sup>[6,15]</sup>。7、8、10 条带变亮,9、11 条带出现。在流通过程中微生物多样性的演变过程。这些条带亮度深浅与条带数变化反映冰鲜大黄鱼



注:M. DNA Marker (100bp); C.冷链组样品; B.断链组样品;“-”. 阴性对照。

图 6 细菌 16S rDNA V3 区 PCR 产物电泳图  
Fig.6 Electrophoresis profile of PCR products from bacterial 16S rDNA V3 region



注: C. 冷链组样品; B. 断链组样品。

图 7 大黄鱼流通过程中的细菌 DGGE 图谱  
Fig.7 DGGE fingerprinting of PCR products of large yellow croaker with ice during logistics process

2.7 主要条带切胶回收后 PCR 扩增及测序结果  
根据 DGGE 图谱,选取条带 1~11 进行切胶回收。以回收的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析得知条带均在 200 bp 左右,可知,切胶回收的 11 个条带均扩增成功,其中 8

号、9 号条带较浅,可能由于 DGGE 胶较薄,切胶过程中造成条带损失或回收 DNA 量较少<sup>[15]</sup>。将 PCR 产物纯化后送检测序,测序结果与 GenBank 数据库中已知序列进行相似性比对,结果如表 1 所示。

表 1 DGGE 条带分离的细菌 16S rDNA 序列比较

Table 1 Comparison of dominant microbe similarity by partial 16S rDNA sequencing fragments from DGGE bands

对应条带	最相似已知菌	相似性/%	登录号
1	不动杆菌( <i>Acinetobacter</i> sp.)	97	HQ841073.1
2	不可培养细菌( <i>Uncultured bacterium</i> )	100	EU697160.1
3	腐生葡萄球菌( <i>Staphylococcus saprophyticus</i> )	98	KP236361.1
5	假交替单胞菌( <i>Pseudoalteromonas</i> sp.)	96	KC178993.1
6	副溶血性弧菌( <i>Vibrio Parahemolyticus</i> )	89	KM505115.1
7	假单胞菌( <i>Pseudomonas</i> sp.)	96	GU814629.1
8	嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter</i> sp.)	94	KP745589.1
9	荧光假单胞菌( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	95	KT982468.1
10	嗜冷杆菌( <i>Psychrobacter</i> sp.)	100	KT991074.1
11	希瓦氏菌( <i>Shewanella</i> sp.)	99	KX262881.1

测序结果中,条带 4 浓度不高,PCR 产物测序不成功,无法进行比对。由表 1 可知,冰鲜大黄鱼在两种流通方式下,通过 PCR-DGGE 法测序比

对后得到的微生物主要有不动杆菌、腐生葡萄球菌、假交替单胞菌、副溶血性弧菌、假单胞菌、嗜冷杆菌、荧光假单胞菌与希瓦氏菌。结合图 6 的 DGGE 图谱和表 1 测序结果可知,冰鲜大黄鱼在流通末期,腐生葡萄球菌、假交替单胞菌和副溶血性弧菌逐渐减少,尤其是副溶血性弧菌在贮藏末期不再出现;假单胞菌、嗜冷杆菌与荧光假单胞菌在流通

后期亦有出现,并占有较高比例,希瓦氏菌在流通末期中也有出现。嗜冷杆菌所占比例较高的结论也与前期嗜冷菌数测定结果相吻合,可见低温流通对其生长有利。同时,不动杆菌与不可培养细菌在样品流通过程中均存在综上所述,冰鲜大黄鱼在冷链和断链两种流通方式下贮藏末期的主要优势菌是假单胞菌与嗜冷杆菌,同时也有不动杆菌与希瓦氏菌。这与郭全友等<sup>[28]</sup>研究养殖大黄鱼冷藏过程中的优势菌群为腐败希瓦氏菌和假单胞菌属结果相似。

假单胞菌为革兰氏阴性杆菌,单鞭毛,具运动性,是水产品中一类常见的需氧型腐败菌<sup>[15,29]</sup>。许钟等<sup>[30]</sup>研究表明,假单胞菌是冷藏养殖罗非鱼在 0.5℃和 10℃贮藏货架期终点的特定腐败菌;朱天祥等<sup>[31]</sup>报道其为冰鲜大黄鱼 4℃冷藏 5 d 后的优势腐败菌。希瓦氏菌为革兰氏阴性杆菌,郭红等<sup>[32]</sup>研究发现,南美白对虾达一级鲜度时,在冰温(-1.4±0.1)℃条件下的特定腐败菌为希瓦氏菌。不动杆菌存在于鱼体表面的黏液、鱼鳃及消化道中,也为常见的腐败细菌<sup>[33]</sup>。

### 3 结论

本文研究了冰鲜大黄鱼在冷链与断链流通中品质及微生物演替规律。得出结果:随着流通时间的延长,大黄鱼感官分值呈上升趋势,品质相应劣变,微生物数明显升高,且断链组增长速率大于冷链组。断链组样品在流通至 275 h 时,感官分值和菌落总数分别达到  $(2.35 \pm 0.13) \lg$  (CFU/g) 和  $(6.50 \pm 0.07) \lg$  (CFU/g),超出可接受范围。冷链组货架期为 275~347 h,而断链组货架期仅为 203~275 h。通过直接提取不同流通阶段样品中的细菌 DNA,PCR 扩增后进行 DGGE 电泳分析,并对 DGGE 图谱上分离较好且较亮条带的切胶回收并测序,可获得冰鲜大黄鱼在两种流通期间微生物的种类变化及优势菌。结果表明:冰鲜大黄鱼在流通期间贮藏末期的主要优势菌为假单胞菌与嗜冷杆菌,也有不动杆菌与希瓦氏菌。

### 参 考 文 献

[1] 杨华,陆森超,刘丽君,等.超高压处理对养殖大

黄鱼保鲜效果的影响[J].食品科学,2014,35(24):331-336.

- [2] ZHAO J, LV W J, WANG J L, et al. Effects of tea polyphenols on the post-mortem integrity of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) fillet proteins [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2666-2674.
- [3] 徐慧文,谢晶,汤元睿,等.冰藏和冷藏条件下金枪鱼品质变化的研究[J].食品工业科技,2014,30(7):218-223.
- [4] 廖媛媛,欧昌荣,汤海清,等.三种冻结方式对大黄鱼品质的影响[J].现代食品科技,2014,30(7):218-223.
- [5] 金盛楠,肖更生,张友胜,等.冷链物流分析及其在食品中的应用现状[J].现代食品科技,2008,24(10):1031-1035.
- [6] 仪淑敏,王雪琦,励建荣,等.鱼糜制品细菌菌群多样性的 PCR-DGGE 方法建立[J].中国食品学报,2014,14(7):192-197.
- [7] 翁丽华,江芸,徐幸莲,等.PCR-DGGE 研究热鲜肉贮藏过程中的菌相变化[J].食品科学,2012,33(23):199-203.
- [8] 王建辉,杨晶,刘永乐,等.基于 PCR-DGGE 技术对冷藏过程中草鱼肌肉的细菌群落结构分析[J].中国食品学报,2014,14(10):203-208.
- [9] 上海市质量技术监督局.食品冷链物流技术与管理规范:DB31/T 388-2007[S].上海:上海市质量技术监督局,2007.
- [10] 河北省质量技术监督局.食品冷链物流技术与管理规范:DB13/T 117-2010[S].石家庄:河北省质量技术监督局,2010.
- [11] 中华人民共和国农业部.SC/T 3101-2010 鲜大黄鱼、冻大黄鱼、鲜小黄鱼、冻小黄鱼[S].北京:中华人民共和国农业部,2010.
- [12] 杨宪时,姜兴为,李学英,等.伽马辐照对冰藏大黄鱼品质和货架期的影响[J].农业工程学报,2011,27(2):376-380.
- [13] 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[S].国家食品药品监督管理总局,国家卫生和计划生育委员会.
- [14] 周琰冰,艾启俊,张德权.应用 PCR-DGGE 技术研究贮藏期内冷鲜羊肉表面的优势菌[J].食品科学,2015,36(16):236-240.
- [15] MENG W, JING J W, XIAO H S, et al. Preliminary mechanism of acidic electrolyzed water ice on improving the quality and safety of shrimp[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 333-341.

- [16] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [17] DU S, ZHANG Z, XIAO L, LOU Y, et al. Acidic electrolyzed water as a novel transmitting medium for high hydrostatic pressure reduction of bacterial loads on shelled fresh shrimp[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 305.
- [18] 杨胜平, 谢晶, 高志立, 等. 冷链物流过程中温度和时间对冰鲜带鱼品质的影响[J]. 农业工程学报, 2013, 29(24): 302-310.
- [19] 李念文, 汤元睿, 谢晶, 等. 物流过程中大眼金枪鱼 (*Thunnus obesus*) 的品质变化[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 319-323.
- [20] ÖZYURT G, KULEY E, ÖZKÜTÜK S, et al. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and gold-band goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 505-510.
- [21] 靳春秋, 迟海, 杨宪时, 等. 冰藏三文鱼品质变化及菌相分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(4): 220-225.
- [22] CHOUHAN A, KAUR B P, RAO P S. Effect of high pressure processing and thermal treatment on quality of hilsa (*Tenualosa ilisha*) fillets during refrigerated storage[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 29: 151-160.
- [23] 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.
- [24] 郭儒岳, 凌建刚, 叶宇飞, 等. 流化冰超冷却对养殖大黄鱼贮藏保鲜效果的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 307-311.
- [25] 姜兴为, 许钟, 杨宪时, 等. 延迟加冰对冰藏大黄鱼品质变化的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 270-274.
- [26] 包玉龙, 汪之颖, 李凯风, 等. 冷藏和冰藏条件下鲫鱼生物胺及相关品质变化的研究[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(3): 157-162.
- [27] ERCOLINI D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 297-314.
- [28] 郭全友, 杨宪时, 许钟, 等. 养殖大黄鱼冷藏过程中细菌菌相的变化[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 301-307.
- [29] 罗庆华. 水产品特定腐败菌研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 468-471.
- [30] 许钟, 肖琳琳, 杨宪时. 罗非鱼特定腐败菌生长动力学模型和货架期预测[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 540-546.
- [31] 朱天祥, 许钟, 蔡述秋, 等. 冰鲜大黄鱼加工过程中的细菌学分析及关键控制点[J]. 海洋渔业, 2007, 29(1): 68-72.
- [32] 郭红, 董士远, 刘尊英, 等. 南美白对虾冰温下菌相变化[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(6): 77-80.
- [33] 章超桦, 薛长湖. 水产食品学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2010.

### Effects of Cold Chain and Broken-off Cold Chain on the Quality and Microbial Diversity of Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*) Stored in Ice

Wang Qian<sup>1</sup> Lan Weiqing<sup>1,2\*</sup> Zhang Moyan<sup>1</sup> Sun Xiaohong<sup>1,2</sup> Yang Xiaohui<sup>1</sup> Xie Jing<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Shanghai Ocean University, College of Food Sciences and Technology, Shanghai 201306

<sup>2</sup>Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai Professional Technology Service Platform on Cold Chain Equipment Performance and Energy Saving Evaluation, National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering (Shanghai Ocean University), Shanghai 201306

**Abstract** Effects of different circulation methods (cold chain and broken-off cold chain) on the quality and microbial diversity of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) with ice were researched in this paper. Low temperature preservation is one of the most widely used methods and cold chain logistics is a system engineering, which based on



freezing technology and artificial refrigeration technology so as to guarantee the freshness of aquatic products in the periods of production, storage, transportation, sale and consumption in the prescriptive low temperature environment (0–4 °C) all the time. But it is difficult to maintain the specified temperature in storage and transportation process for the limited conditions and high cost, so the samples were easy to be exposed at room temperature, which was represented by broken-off cold chain. Cold chain and broken-off cold chain of large yellow croaker with ice were simulated in the period of logistic process; samples in cold chain group (T1) were stored at 4 °C all the time, while samples in broken-off cold chain group (T2) were simulated the actual logistics process, stored at 20 °C when moving, transportation, distribution and sale for 2 h, 24 h, 8 h and 1 h respectively, then stored at 4 °C until the end of storage. The real-time temperature of samples in cold chain group and broken-off cold chain group were monitored respectively by multi-point temperature acquisition instrument. Sensory, physicochemical and microorganism indicators as Total Volatile Base Nitrogen (TVB-N), Total Viable Counts (TVC) and Psychrophilic Bacteria Counts (PBC) were evaluated for the quality changes of large yellow croaker with ice during logistics process. The number and species changes of microorganism in samples of two different circulations were analyzed by Polymerase Chain Reaction–Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR–DGGE) fingerprint technology. It was found that the fluctuation of temperature between outer space and inside of box in T1 has little difference, and temperature in the center of fish body has no obvious change. However, there were great changes in temperature between outer space and inside of box in T2, when moving, transportation, distribution and sale were under the condition of 20 °C, and the temperature of fish body in center has apparent fluctuation during the logistics process. The results showed that the deterioration of samples could be accelerated for temperature fluctuation. Circulation time was positively correlated with sensory score, microbial number and TVB–N value. Samples in cold chain and broken-off cold chain exceeded the end of shelf–life at 347 h and 275 h, TVC were  $(6.93 \pm 0.03) \lg(\text{CFU/g})$  and  $(6.50 \pm 0.07) \lg(\text{CFU/g})$ , PBC were  $(7.50 \pm 0.05) \lg(\text{CFU/g})$  and  $(6.82 \pm 0.04) \lg(\text{CFU/g})$ , TVB–N value were  $(33.47 \pm 1.12) \text{mgN/100g}$  and  $(31.04 \pm 0.06) \text{mgN/100g}$  respectively. The results of PCR–DGGE demonstrated that the number of *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas* sp., *Vibrio Parahemolyticus* decreased, but the number of *Pseudomonas* sp. and *Psychrobacter* sp. increased gradually in later circulation, *Acinetobacter* sp. and *Shewanella* sp. were also occupied a certain proportion. In conclusion, the shelf–life of large yellow croaker in cold chain and broken-off cold chain were 275–347 h and 203–275 h respectively. *Pseudomonas* sp. and *Psychrobacter* sp. were the special spoilage organism of large yellow croaker in the later of cold–chain and broken-off cold chain process.

**Keywords** *Pseudosciaena crocea*; ice storage; logistic process; polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis (PCR–DGGE); microbial diversity

## 信息窗

### 中国首次成智利最大肉类出口国

作为第一个与中国签订自由贸易升级协定的拉美国家,智利肉类等对华产品出口数据再创新高。

9月1日,由智利前总统、亚太特权全权大使爱德华多·弗雷带队的智利访华团来到上海开启一年一度的“智利周”活动。

智利猪肉协会执行主席胡安·卡洛斯·多明戈斯介绍,今年上半年,中国首次在出口数量和金额上成为智利猪肉的第一大目的国。上半年,智利猪肉对中国的出口额约9 000万美元,同比去年增加了87.5%,增幅近9成;全年猪肉出口额预计达2.2亿美元,为2018年的2倍以上。

在他看来,随着人均收入水平的上升,中国等消费者对于猪肉、鸡肉、牛肉、三文鱼等肉类的消费需求都会增强,其中猪肉增长最为明显,而且品质变得比数量更为重要。(消息来源:第一财经)