

基于电子鼻和 HPLC 分析蜂房哈夫尼菌对海参腐败的影响

姚巧丽, 张公亮, 毕景然, 高美玲, 侯红漫

(大连工业大学 食品学院, 辽宁 大连 116034)

摘要: 为研究蜂房哈夫尼菌对即食海参腐败的影响,采用微生物菌落计数、电子鼻分析和 HPLC 等方法,对接菌前后海参品质变化进行了分析。结果表明,蜂房哈夫尼菌可在海参基质中生长,接菌 4 h 进入稳定期,12 h 后趋于下降,12 h 的菌落数达到最高,为 6.67×10^6 CFU/mL。海参基质的挥发性盐基氮在接菌后 120 h 质量分数为 (175.3 ± 2.9) mg/kg。接菌后的 1~5 d 内,海参产生了多种挥发性气体, H_2S 和氮氧化合物较为明显。蜂房哈夫尼菌可代谢 7 种氨基酸,生成对应的胺类物质,初步判定 25 °C 是生物胺产生的最适温度,在 24 h 产生的腐胺量最多,为 (45.85 ± 2.9) mg/kg。研究结果表明蜂房哈夫尼菌可导致海参的腐败变质,造成品质下降,影响食用价值。

关键词: 海参;蜂房哈夫尼菌;腐败;生物胺;挥发性盐基氮

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-1404(2020)05-0313-05

Effect of *Hafnia alvei* H4 on the spoilage of sea cucumber detected by electronic nose and HPLC

YAO Qiaoli, ZHANG Gongliang, BI Jingran, GAO Meiling, HOU Hongman

(School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: To study the effect of *Hafnia alvei* H4 on instant sea cucumber, the methods of microbial colony counting, electronic nose analysis and HPLC were used to analyze the quality of sea cucumber before and after inoculation. The results showed that *Hafnia alvei* H4 could grow in the sea cucumber substrate. It entered the stable period after inoculation for 4 h, and tended to decrease after 12 h. The colony numbers reached the highest at 12 h, which was 6.67×10^6 CFU/mL. The content of TVB-N in sea cucumber medium was (175.3 ± 2.9) mg/kg after cultured 120 h. After inoculation for 1 to 5 d, it produced a variety of volatile gases, especially H_2S and nitrogen oxides. *Hafnia alvei* H4 could metabolize 7 kinds of amino acids and produce corresponding amines. It was preliminarily determined that 25 °C was the optimum temperature for biogenic amines production. The maximum putrescine production was (45.85 ± 2.9) mg/kg in 24 h. The results showed that *Hafnia alvei* H4 could lead to spoilage of sea cucumber, reducing the quality and edible value.

Key words: sea cucumber; *Hafnia alvei*; spoilage; biogenic amine; TVB-N

0 引言

近年来,即食海参越来越受到消费者的欢迎,

其需求量增加的同时,问题也随之而来,主要集中于即食海参的腐败变质现象^[1]。加工过程中灭菌

收稿日期: 2019-03-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871895).

作者简介: 姚巧丽(1993-),女,硕士研究生;通信作者:侯红漫(1964-),女,教授.

不够彻底、耐冷嗜冷腐败细菌的入侵是导致即食海参腐败变质的主要原因^[2]。即食海参受微生物侵染后,不但影响感官品质,降低食用价值,甚至可能严重影响人类健康。

蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)是一种革兰氏阴性菌,存在于自然界,可从乳制品、肉制品和水产品中分离得到^[4]。蜂房哈夫尼菌能够在低温环境中生长,是导致冷藏食品变质的主要腐败菌之一^[5]。Nychas等^[6]研究发现一些耐冷的肠杆菌,如蜂房哈夫尼菌、成团肠杆菌和变形斑沙雷菌等,能够引起肉及肉类制品腐败变质。李婷婷等^[7]研究了希瓦氏菌和蜂房哈夫尼菌共生培养对冷藏大菱鲆的致腐能力,发现两者共同作用时腐败效果更为显著。

本实验室从腐败即食海参多种优势腐败菌,通过对其生理生化特性的鉴定分析,认定其中一株为蜂房哈夫尼菌属。由于目前关于蜂房哈夫尼菌对即食海参致腐能力的研究不多,故本实验通过蜂房哈夫尼菌的回接实验,观察海参源蜂房哈夫尼菌致腐特性,研究了该菌的生长情况,接菌前后海参气味变化和海参产生生物胺的情况,初步探索蜂房哈夫尼菌对即食海参的腐败作用,以期为后续的研究提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

即食海参,冷冻保藏;蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei* H4),实验室保藏,分离自腐败即食海参。

L-赖氨酸盐酸盐、L-组氨酸单盐酸盐-水合物、L-酪氨酸二钠盐-水合物、L-鸟氨酸盐酸盐、L-精氨酸盐酸盐、L-苯丙氨酸盐酸盐和 L-色氨酸盐酸盐、丹磺酰氯,北京索莱宝科技有限公司;胰蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、氧化镁,均为国产分析纯,1 mL 无菌注射器、0.22 μm 有机滤膜、0.22 μm 有机过滤器、色谱级乙腈。

1.2 仪器与设备

PEN3.5 便携式电子鼻,德国 Airsense 公司;1260 高效液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司;Sorvall ST 16R 高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;海能 K9840 自动凯氏定氮仪,济南海能仪器股份有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 菌落总数的测定

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸粉 5.0,NaCl 10.0,pH (7.0±0.2),121 °C、15 min

高温湿热灭菌备用。

海参基质培养基:将解冻后的即食海参与超纯水按照质量比 1:19 匀浆,110 °C、15 min 高温湿热灭菌,备用。

挑取单菌落于 100 mL 液体 LB 培养基中,30 °C、150 r/min 摇床过夜培养,作为种子菌液(浓度 1×10^9 CFU/mL)。采用平板计数法,根据 GB 4789.2—2016《食品微生物学检验:菌落总数测定》进行菌落总数的测定。

1.3.2 挥发性盐基氮的测定

将解冻后的海参加入适量的超纯水(质量比 2:1)绞碎处理,每 50 g 分装到 250 mL 锥形瓶中,110 °C、15 min 湿热灭菌处理,待冷却后,接种 1 mL 种子菌液,置于恒温恒湿培养箱(30 °C,湿度 60%)中培养。每隔 24 h 用无菌钥匙称取(3.00±0.10) g,参照国家标准 GB 5009.228—2016 中的自动凯氏定氮法,对样品进行挥发性盐基氮(TVB-N)的测定。

1.3.3 挥发性风味物质的检测

将冷冻即食海参解冻,切成小块,每块质量(3.00±0.10) g,置于小平板中,110 °C、15 min 湿热灭菌处理,待冷却后,均匀淋洒 100 μL 菌液,置于恒温恒湿(30 °C,湿度 60%)培养箱中静置培养,每隔 1 d 进行一次电子鼻检测,共 5 d。采用 Winmuster 软件进行数据的采集与处理,主要分析方法有主成分分析(principal component analysis,PCA)、线性判别式分析(linear discriminant analysis,LDA)和负荷加载分析(Loadings)。

1.3.4 生物胺的定性和定量分析

1.3.4.1 脱羧酶实验

根据 Chang 等^[8]方法稍有改动,以氨基酸脱羧酶培养基和普通 LB 培养基同时作为实验组,氨基酸脱羧酶培养基作为空白对照,将菌液按 1:100 接种到培养基中,30 °C、150 r/min 摇床培养,每隔 24 h 观察颜色变化。

1.3.4.2 HPLC 测定生物胺质量分数

样品制备方法根据夏秀东等^[9]的方法稍有改动:挑取单菌落于 5 mL 液体 LB 培养基中,30 °C、150 r/min 摇床培养,待培养基混浊,吸取 100 μL 菌液转接于 5 mL 海参基质培养基中,分别置于 10、15、20、25、30 和 35 °C 下摇床培养,每隔 24 h 进行一次生物胺提取,提取液过 3 次 0.22 μm 滤膜,除去杂质,即可进行 HPLC 分析。

HPLC 条件:安捷伦 ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),体积流量 1.0 mL/min,

进样量 25 μL , 时长 35 min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254 nm, 流动相为乙腈和水。0~5 min, 乙腈体积分数 45%; 5~20 min, 乙腈体积分数由 45% 提升至 90%; 20~30 min, 乙腈体积分数保持 90% 不变; 30~33 min, 乙腈体积分数由 90% 降到 45%; 33~35 min, 保持乙腈体积分数 45% 不变。

1.4 数据分析

每个实验平行重复 3 次, 实验结果使用 SPSS 18.0 软件进行数据方差分析及多重比较, 使用 Origin 9.0 进行图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 野生型蜂房哈夫尼菌在海参基质中的生长

细菌的生长繁殖和代谢活动是引起水产品腐败变质的主要原因。如图 1 所示, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下, 蜂房哈夫尼菌在海参基质培养基生长迅速, 4 h 菌落数可达 6.27×10^6 CFU/mL, 此后生长趋于稳定, 12 h 达到最高, 为 6.67×10^6 CFU/mL, 16 h 开始降低, 菌落数为 6.42×10^6 CFU/mL。说明蜂房哈夫尼菌能够利用海参的营养物质进行生长繁殖。

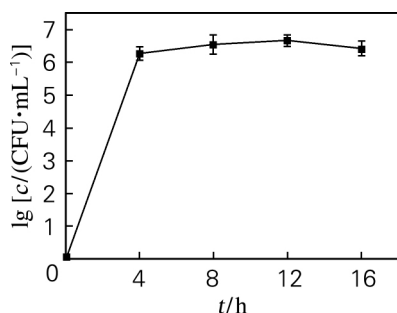


图 1 海参基质培养基中菌落数的变化

Fig. 1 Changes of colony number in sea cucumber medium

2.2 TVB-N 质量分数变化

TVB-N 是评判水产品品质的重要指标, 能在一定程度上说明水产品的腐败进程。图 2 是海参基质接种蜂房哈夫尼菌后, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养条件下 TVB-N 质量分数的变化情况。由图 2 可知, TVB-N 质量分数随时间延长而增加, 在 120 h 的质量分数为 (175.3 ± 2.9) mg/kg, 说明蜂房哈夫尼菌能够引起海参的腐败变质。

2.3 挥发性物质的电子鼻分析

2.3.1 PCA 方法分析

主成分分析是将多个指标化为较少的几个综合指标的一种统计方法^[10]。图 3 是采用 PCA 方法分析不同时间下海参块的电子鼻响应信息。由

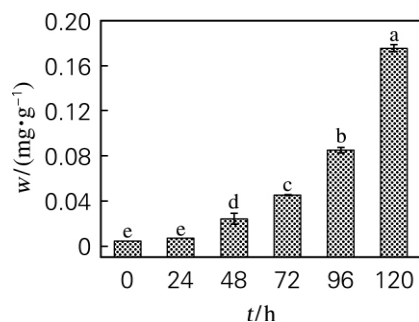


图 2 30 $^{\circ}\text{C}$ 下挥发性盐氮质量分数的变化

Fig. 2 Change of TVB-N content at 30 $^{\circ}\text{C}$

图 3 可知, 第 1 主成分贡献率为 96.25%, 第 2 主成分贡献率为 2.88%, 总贡献率为 99.13%。从图 3 中可以看出, 海参产生的挥发气味随时间变化而变化, 且没有重叠, 区分度较好。1~2 d 信号响应值比较接近, 说明海参挥发气味较为接近, 变化不明显; 3~5 d 较前两天信号响应值区分明显, 说明挥发性气味变化较大。PCA 结果说明菌能够在海参块上生长作用, 并且其代谢活动能够引起海参品质变化, 产生多种挥发性物质。

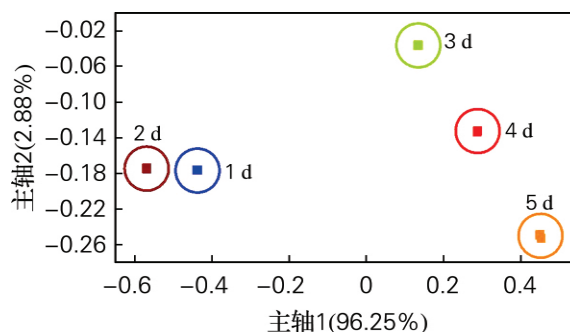


图 3 不同时间下海参块的 PCA 分析

Fig. 3 PCA analysis of sea cucumber blocks at different time

2.3.2 LDA 方法分析

线性判别式分析更加注重样品在空间中的分布状态及彼此之间的距离分析^[9]。图 4 是不同时间下海参块电子鼻的 LDA 分析。图 4 中判别式 1 (横轴) 贡献率为 97.01%, 判别式 2 (纵轴) 贡献率为 2.61%, 两个判别式总贡献率为 99.62%。从 LDA 分析看出, 不同时间下海参块之间存在差异, 可由此区分不同新鲜程度的海参。

2.3.3 Loadings 方法分析

负荷加载分析表现的是 10 个传感器响应值的信息。若某一传感器的响应值接近于零 (横、纵坐标对应值接近于零), 则该传感器的识别作用可

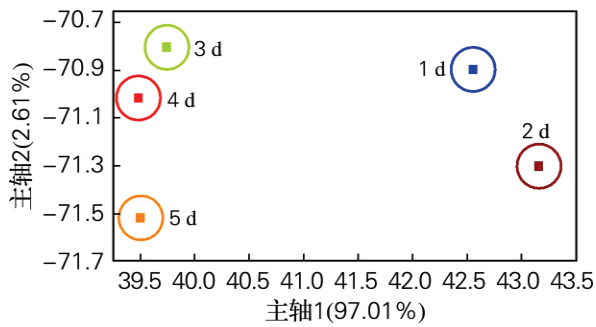


图 4 不同时间下海参块的 LDA 分析

Fig. 4 LDA analysis of sea cucumber blocks at different time

以忽略;若某一传感器的响应值越偏离于零,则说明该传感器的识别能力越强^[15]。如图 5 所示,主轴 1 贡献率 70.78%,主轴 2 贡献率 18.41%。1~10 号传感器分别代表 10 种挥发性物质,其中 2、6、7、8 和 9 号信号响应较强,分别对应氮氧化物、甲烷、硫化氢、乙醇和有机硫化物,这几类物质是水产品腐败过程中的常见挥发性成分,由此可以说明蜂房哈夫尼菌能够引起海参的腐败变质,影响其新鲜程度。

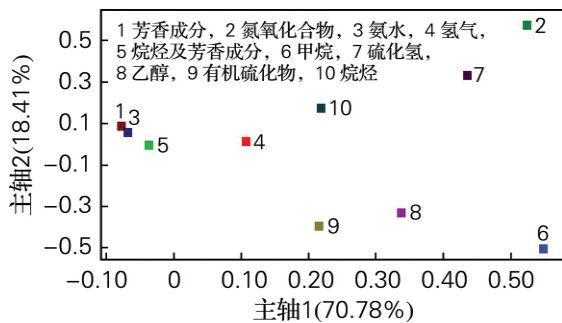


图 5 不同时间下海参块的 Loadings 分析

Fig. 5 Loadings analysis of sea cucumber blocks at different time

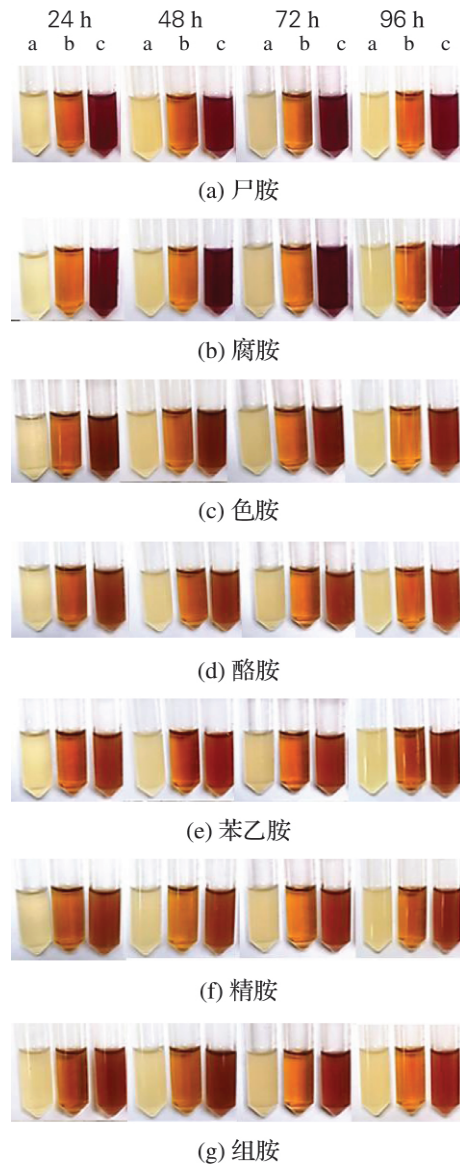
2.4 生物胺的定性和定量分析

2.4.1 脱羧酶实验

由图 6 可知,添加了各氨基酸前体的培养基在接种蜂房哈夫尼菌种子液之后,腐胺和尸胺在 24 h 之内产生阳性反应(紫色),说明该菌具备代谢鸟氨酸和赖氨酸的能力;另外几种氨基酸在 96 h 内也相继产生阳性反应,但较腐胺和尸胺稍弱。

2.4.2 HPLC 定量测定海参基质中的生物胺

表 1 为 HPLC 测定蜂房哈夫尼菌在海参基质中分别在培养温度 10、15、20、25、30、35 °C 和培养时间 24、48、72、96 h 下产生生物胺的种类和质量分数。由表 1 可知,在 24 h 各个温度下和 48 h



a, LB 培养基; b, 脱羧酶培养基对照; c, 脱羧酶培养基

图 6 脱羧酶实验

Fig. 6 Experiments of decarboxylase

的 10、15 和 20 °C 下均未检出色胺,此后 48 h 在 25、30 和 35 °C,以及 72 和 96 h 的各个温度下均有色胺检出,且各温度下色胺质量分数随时间延长而增加。

10 °C 下腐胺产量随时间延长稍有增加,96 h 产量最高;25 °C 下,24 h 产生腐胺质量分数最高,随时间延长略有降低;其他各温度下,腐胺质量分数在 72 h 达到顶峰。低温下蜂房哈夫尼菌的生长速度受到影响,故在 10 °C 下生物胺产量较少,仅为同时间内生物胺总量的 13% 左右;25 °C 下生物胺产量较高,占同时间内生物胺总量的 23% 左右。由此可初步认定 25 °C 是蜂房哈夫尼菌在海参基质中产生生物胺的最适温度。

表1 HPLC 分析海参基质中生物胺的质量分数

Tab.1 Analysis of biogenic amines in sea cucumber medium by HPLC

t/h	$\theta/^\circ\text{C}$	$w/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	
		色胺	腐胺
24	10	ND	19.77±1.60
	15	ND	21.05±1.40
	20	ND	28.85±1.90
	25	ND	45.85±2.90
	30	ND	24.70±2.10
	35	ND	19.67±1.30
48	10	ND	20.95±1.80
	15	ND	28.75±2.10
	20	ND	40.00±2.90
	25	0.72±0.12	44.92±3.10
	30	0.56±0.09	34.82±2.40
	35	0.34±0.05	24.75±1.30
72	10	0.57±0.08	25.17±1.50
	15	1.20±0.18	40.43±2.60
	20	1.23±0.15	45.01±3.40
	25	1.11±0.12	40.01±2.80
	30	0.73±0.10	44.24±2.80
	35	0.72±0.09	44.92±3.20
96	10	1.10±0.14	35.19±2.10
	15	1.17±0.16	26.06±1.50
	20	1.26±0.15	32.48±1.90
	25	1.24±0.11	41.84±3.10
	30	1.31±0.12	24.83±1.80
	35	1.32±0.11	36.85±2.10

注:ND代表未检测到。

3 结 论

蜂房哈夫尼菌在 30 °C 下能够利用海参基质中的营养成分进行生长繁殖,12 h 菌落总数最高可达 6.67×10^6 CFU/mL。在电子鼻分析中,接种该菌之后的 5 d 时间内,其生长代谢产生了硫化氢和氮氧化物等挥发性物质,第 5 天 TVB-N 质量分数为 (175.3 ± 2.9) mg/kg,质量分数随时间延长而增加。脱羧酶实验表明,在添加各氨基酸前体物质的前提下,蜂房哈夫尼菌可代谢 7 种氨基酸,生成相应的胺类物质,其中以腐胺和尸胺

最为显著。HPLC 分析可知,该菌在海参基质中代谢可产生较多的腐胺。脱羧酶实验和 HPLC 定量实验中,由于培养基不同,产生的生物胺种类略有不同,但两者都说明蜂房哈夫尼菌能够代谢鸟氨酸,生成腐胺。结果表明,蜂房哈夫尼菌具有一定的致腐作用,会造成水产品的营养流失和腐败变质,不利于人类健康和食用。

参考文献:

- [1] HOU H M, ZHU Y L, WANG J Y, et al. Characteristics of N-acylhomoserine lactones produced by *Hafnia alvei* H4 isolated from spoiled instant sea cucumber[J]. Sensors, 2017, 17(4): 772-783.
- [2] 李新林,段续,张愨. 纳米银对海参腐败中优势菌种的抑制作用[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(3): 359-364.
- [3] VIANA E S, CAMPOS M E M, PONCE A R, et al. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk[J]. Biological Research, 2009, 42(4): 427-436.
- [4] HOU H M, JIANG F, ZHANG G L. Inhibition of *Hafnia alvei* H4 biofilm formation by the food additive dihydrocoumarin[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(5): 842-847.
- [5] 刘丽,牛彤鑫,张公亮,等. C6-HSL 对蜂房哈夫尼菌生物学特性的影响[J]. 现代食品, 2018(5): 80-85.
- [6] NYCHAS G J E, SKANDAMIS P N, TASSOU C C, et al. Meat spoilage during distribution[J]. Meat Science, 2008, 78(1): 77-89.
- [7] 李婷婷,马艳,李学鹏,等. 腐败希瓦氏菌及其与蜂房哈夫尼亚菌共培养对冷藏大菱鲆的致腐能力[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 29-34.
- [8] CHANG M, CHANG H C. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(3): 269-274.
- [9] 夏秀东,单成俊,李莹,等. 白鱼腐败菌产生物胺能力分析[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 196-204.
- [10] 赵梦醒,丁晓敏,曹荣,等. 基于电子鼻技术的鲈鱼新鲜度评价[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 143-147.

(责任编辑:郝森闻)