

秋刀鱼肉中产胺菌的分离、鉴定及产胺能力分析

刘红, 田鑫, 梁一巍, 张凌晶, 曹敏杰, 刘光明

(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为了探究秋刀鱼(*Cololabis saira*)肉中生物胺产生菌的产胺特性, 有效控制生物胺含量, 采用改良的 Niven's 生物胺筛选培养基, 通过 16S rDNA 序列分析和 VITEK 2 Compact System, 对秋刀鱼肉中产胺菌进行分离鉴定, 分析不同温度(4、25 ℃)条件下产胺菌的产胺能力及生物胺含量变化。结果显示, 从秋刀鱼肉中分离鉴定的 14 株产胺菌分别为摩氏摩根菌、产酸克雷伯菌、阿氏肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、植生拉乌尔菌、抗坏血酸克吕沃尔菌、粘质沙雷菌、日沟维肠杆菌、肠杆菌属、变性杆菌属、中间克吕沃尔菌、彭氏变形杆菌、拉氏普罗威登斯菌、蜂窝哈夫尼亚菌; 在 4 ℃ 条件下, 所有产胺菌产胺能力均较弱(11.55 ~ 244.75 mg/L); 在 25 ℃ 条件下, 产酸克雷伯菌、肠杆菌属的产组胺能力较强, 分别为 9 889.75, 2 891.15 mg/L。结果提示, 可通过抑制产酸克雷伯菌、肠杆菌属生长控制秋刀鱼肉中组胺等生物胺的含量。

[关键词] 秋刀鱼; 生物胺; 产胺菌; 分离鉴定; 产胺能力

[中图分类号] TS 254.4

Isolation, Identification and Biogenic Amine Producing Ability Analysis of Biogenic Amine-forming Bacteria from *Cololabis saira*

LIU Hong, TIAN Xin, LIANG Yiwei, ZHANG Lingjing, CAO Minjie, LIU Guangming

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to find an effective way to control the content of biogenic amines in *Cololabis saira*, biogenic amine-forming bacteria were isolated and identified by the biogenic amine-forming bacteria screening medium (modified Niven's agar medium), 16S rDNA sequence and VITEK 2 Compact System. Their abilities of producing biogenic amine at different temperatures (4, 25 ℃) were measured, and the changes of the content of the biogenic amine in the *C. saira* at different temperatures (4, 25 ℃) were investigated. The results showed that a total of 14 strains of biogenic amine-forming bacteria were isolated and purified from *C. saira*, they were identified as *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter asburiaede*, *Citrobacter freundii*, *Raoultella planticola*, *Kluyvera ascorbata*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Kluyvera intermedia*, *Proteus penneri*, *Providencia rustigianii*, *Hafnia alvei*, respectively. All of the biogenic amines-forming bacteria had a weak biogenic amine producing ability (11.55 – 244.75 mg/L) at 4 ℃, while *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter* sp. had a strong ability to produce histamine (9 889.75 and 2 891.15 mg/L) at 25 ℃. The results indicated that the content of biogenic amines such as histamine in *C. saira* might be controlled by inhibiting the growth of *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter* sp.

[收稿日期] 2019-10-08

[基金项目] 海洋公益性行业科研专项课题项目(201505026-3); 福建省科技厅软科学项目(2018R0071); 国家自然科学基金项目(31871720); 福建省科技厅高校产学研合作项目(2018N5009)

[作者简介] 刘红(1989—), 女, 助理实验师, 硕士, 从事水产品质量安全检测研究。

Keywords: *Cololabis saira*; biogenic amines; biogenic amines-forming bacteria; separation identification; biogenic amine producing ability

0 引言

秋刀鱼 (*Cololabis saira*) 属颌针鱼亚目、竹刀鱼科、竹刀鱼属, 又称竹刀鱼, 是广泛分布于西北太平洋公海及其沿岸海域的中上层洄游性鱼类^[1]。秋刀鱼是一种高蛋白质、高脂肪的食用鱼类, 并且还含有丰富的二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)、二十碳六烯酸 (docosahexenoic acid, DHA) 以及维生素、矿物质、氨基酸等^[2], 深受广大消费者的喜爱。研究发现, 秋刀鱼可以延缓衰老, 预防高血压、心肌梗死、动脉硬化、夜盲症及贫血等疾病^[3]。但秋刀鱼属于青皮红肉鱼类, 在贮藏加工过程中易受产胺微生物侵染而产生大量生物胺^[4]。当生物胺总量超过 1000 mg/kg 时就会严重危害人类健康, 或当食用鱼类中组胺含量超过 100 mg/kg、酪胺含量超过 100 mg/kg、苯乙胺含量超过 30 mg/kg 时, 均会引起食用中毒现象, 出现呼吸、血压等生理机能紊乱, 严重时可导致死亡^[5]。即使人类摄入低中等组胺或含有酪胺的鱼, 也会导致食物的不耐受症^[6]。

海水鱼类生物胺的形成与产胺菌的存在有关, 这类产胺菌具有氨基酸脱羧酶的活性, 普遍存在于鱼的体表、鳃和内脏中, 鱼体存活时并不会对其造成危害, 一旦死亡, 鱼体自身蛋白质分解后的肽类和氨基酸为生物胺的形成提供了前体物质, 加上鱼肉营养丰富, 极适于产胺菌的生长繁殖并产生大量生物胺^[7]。研究表明, 鱼类原料中产胺菌的种类和数量是影响其生物胺含量的直接原因^[8]。因此, 分离鉴定鱼类原料中产生物胺的菌株, 研究产胺菌的生物学特性, 从而抑制这类细菌的生长, 是减少秋刀鱼等水产品中生物胺含量的有效方法。为探究秋刀鱼中生物胺产生菌的菌相和产胺特性, 本文采用改良后的 Niven's 培养基从秋刀鱼肉中分离产生物胺的细菌^[8], 通过 16S rDNA 序列分析、系统发育树的构建及 VITEK 2 Compact System 进行菌种鉴定^[9], 测定产胺菌在不同温度条件下的产胺能力及生物胺含量变化, 以期对秋刀鱼肉中生物胺的控制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料

秋刀鱼, 质量 90 ~ 150 g, 体长 20 ~ 30 cm, 购自厦门市集美菜市场。

1.2 主要试剂

丹磺酰氯, 纯度 $\geq 99.0\%$ (德国 Sigma); 2-苯乙胺, 纯度 $\geq 99.5\%$; 酪胺盐酸盐, 纯度 $\geq 99.5\%$; 精胺四盐酸盐, 纯度 $\geq 99.0\%$; 腐胺二盐酸盐, 纯度 $\geq 99.0\%$; 组胺二盐酸盐, 纯度 $\geq 99.0\%$; 色胺二盐酸盐, 纯度 $\geq 99.0\%$; 亚精胺三盐酸盐, 纯度 $\geq 99.0\%$; 尸胺, 纯度 $\geq 98.0\%$ (色谱纯, 德国 Dr. Ehrenstorfer); 乙腈、甲醇 (色谱纯, 美国 Tedia); 丙酮、碳酸氢钠、三氯乙酸、碳酸钙、溴甲酚紫 (分析纯, 西陇科学); 盐酸、氨水、氢氧化钠、L-组氨酸、精氨酸、色氨酸、酪氨酸、赖氨酸、氯化钠 (分析纯, 国药集团); L-鸟氨酸盐酸盐、L-苯丙氨酸 (分析纯, 上海麦克林); 营养肉汤培养基、革兰氏染色试剂盒 (广东环凯); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京百泰克); 酵母粉、蛋白胨 (英国 OXOID)。

改良的 Niven's 生物胺筛选培养基 (1 L): 准确称取 5 g 蛋白胨、5 g 酵母粉、质量分数 0.2% 游离氨基酸 (L-组氨酸、色氨酸、酪氨酸、精氨酸、L-鸟氨酸盐酸盐、L-苯丙氨酸和赖氨酸)、5 g 氯化钠、1 g 碳酸钙、20 g 琼脂、0.06 g 溴甲酚紫, 使用 1 mol/L 盐酸调 pH 值至 5.3 ± 0.2 , 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却, 4 °C 保存。

营养肉汤培养基 (1 L): 准确称取 40 g 营养肉汤培养基干粉, 加入蒸馏水或去离子水 1 L, 搅拌加热煮沸至完全溶解, 121 °C 高压灭菌 20 min, 4 °C 保存。

生物胺鉴定培养基 (1 L): 准确称取 18 g 营养肉汤培养基干粉, 质量分数 0.2% 游离氨基酸

(*L*-组氨酸、色氨酸、酪氨酸、精氨酸、*L*-鸟氨酸盐酸盐、*L*-苯丙氨酸和赖氨酸),加入蒸馏水或去离子水 1 L,搅拌加热煮沸至完全溶解,121 ℃ 高压灭菌 20 min,4 ℃ 保存。

1.3 仪器设备

Waters 1525 高效液相色谱仪(美国 Waters);Agilent Zorbax SB-C18 色谱柱(4.6 mm I.D. × 150 mm × 5 μm,美国 Agilent);1-15K 中型高速冷冻离心机(德国 Sigma);5417R 小型高速离心机(德国 Eppendorf);PT-2100 组织捣碎机(瑞士 Kinematica);MS1 涡旋振荡器(美国 IKA);WB-10L1 恒温水浴锅(德国 Memmert);RIOS 8 超纯水系统(美国 Millipore);FA2004 电子天平(上海精科);KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山超声);YXQ-LS-30STI 高压灭菌锅(上海博讯);SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州净化);SPH-150 生化培养箱(上海精宏);FORMA420 恒温摇床(美国 Thermo);UB-7 pH 计(德国 Sartorius);BA200 数码显微镜(中国 Motic);Lambda 35 紫外可见分光光度计(美国 Perkin Elmer)。

1.4 实验方法

1.4.1 产胺菌株的分离与纯化

试验采用改良后的 Niven's 培养基分离筛选秋刀鱼肉中可能产生物胺的细菌。将冷冻秋刀鱼取出后置于室温 25 ℃ 存放 1 d,称取背部肌肉 25 g 并加入 225 mL 无菌生理盐水进行组织捣碎,依次稀释 10^2 、 10^3 、 10^4 倍。分别移取 0.4 mL 上述不同浓度的样品稀释液涂布于生物胺筛选培养基上,于 30 ℃ 培养 3 d,观察菌落的生长情况。挑取使培养基表面呈现蓝色或蓝紫色的单菌落,在筛选培养基上纯化至镜检时呈单一形态,挑取单菌落并保存菌种。

1.4.2 产胺菌的鉴定

1.4.2.1 菌株形态革兰氏染色

采用革兰氏染色试剂盒(广东环凯)对分离得到的产胺菌进行革兰氏染色鉴定。

1.4.2.2 16S rDNA 序列分析与系统发育树的构建

利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克)分离得到产胺菌的基因组 DNA,然后以产胺菌基因组 DNA 为模板,选用 16S rDNA 通用引物扩增产胺菌的 16S rDNA 全长;将 PCR 产物送至上海英骏技术有限公司进行测序,并将所得测序结果与 NCBI-Blast 数据库进行序列比对分析,选取数株同源性较高的菌株,利用 MEGA5.exe 软件构建产胺菌的系统发育树。

1.4.2.3 VITEK 2 Compact System 鉴定

根据革兰氏染色结果选取 VITEK 2 细菌鉴定卡。挑取纯化后的产胺菌菌落接种于 3 mL 的质量分数 0.45% 无菌生理盐水中,混匀后配制成相当于 0.5 麦氏浊度的菌悬液,滴加到 VITEK 2 细菌鉴定卡中,最后用 VITEK 2 Compact System 进行菌种鉴定。

1.4.3 产胺菌在不同温度培养下的产胺能力分析

纯化菌株接种于生物胺鉴定培养基中,分别在 4、25 ℃ 条件下振荡培养 24 h,取 1 mL 菌悬液于 4 ℃、10000 r/min 的条件下离心 5 min,移取 300 μL 上清液与 1.2 mL 质量分数 5% TCA 混匀,取 300 μL 混匀液,加入 600 μL 10 g/L DNS-Cl 溶液,40 ℃ 水浴 45 min;加入 50 μL 浓氨水,振荡摇匀,暗处静置 30 min;用甲醇定容至 1.5 mL,混匀后经 0.22 μm 针式滤膜过滤,-30 ℃ 保存,留待测定各产胺菌产生生物胺的种类及其含量,参考田鑫等^[10]建立的测定方法。

1.4.4 秋刀鱼在不同温度贮藏下生物胺含量的变化

将冰鲜秋刀鱼用流动蒸馏水清洗后,取其背部肌肉,剁碎混匀,随机分装,每袋 30 g 左右;分装完成后立即置于 4、25 ℃ 条件下贮藏不同时间后每隔 2 d 取样(0,2,4 d),对其含有的生物胺种类和含量进行检测分析,每组平行测定 3 次,参考田鑫等^[10]建立的测定方法。

1.5 数据处理

实验结果表示为平均值 ± 标准偏差($\bar{x} \pm s$),绘图使用 Microsoft Office Excel 2007 软件。

2 结果与分析

2.1 产胺菌的分离

经过初步的分离与纯化，从秋刀鱼肉中共分离得到 39 株能使生物胺筛选培养基由黄色变成蓝色或蓝紫色的菌株（标记为 S1 ~ S39），如图 1 所示。图 1a 为未接种细菌的培养基，图 1b 为首次从秋刀鱼样品中筛选出的蓝色菌株，图 1c 为接种分离后的蓝色菌株之产胺菌 S2。结果发现，培养时间越长，培养基呈现的蓝紫色越深，说明随着培养时间的延长，细菌大量繁殖并产生大量的生物胺使培养基的颜色加深。

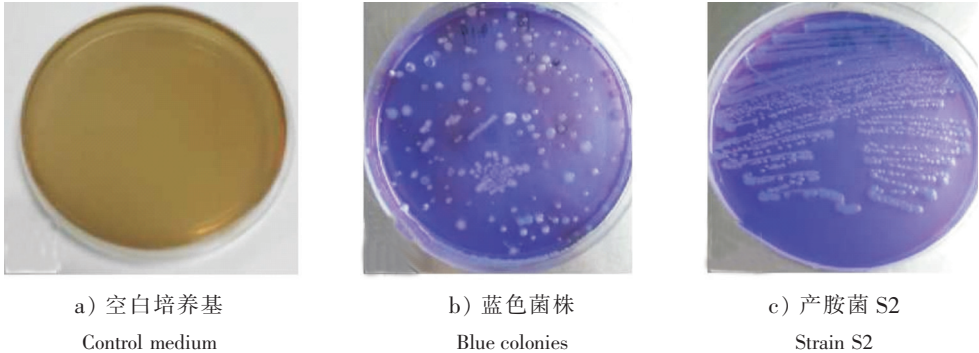


图 1 空白培养基、秋刀鱼肉中筛选出的蓝色菌株及分离后的产胺菌 S2
Fig.1 The control medium, blue colonies and strain S2 isolated from *Cololabis saira*

由图 1 可知，菌株在琼脂平板上，菌落形态为圆形，表面光滑，不透明，乳白色，边缘整齐。由图 2 可知，分离得到的 39 株菌株革兰氏染色试验呈红色，均属于革兰氏阴性菌，可缩小鉴定范围，以利于后续进一步鉴定。

2.2 产胺菌的鉴定

2.2.1 16S rDNA 序列分析与系统发育树的构建

采用 16S rDNA 序列分析法对分离得到的 39 株产胺菌进行初步鉴定分析，39 株菌株的 DNA 经 PCR 扩增测序后，将所有菌株的 16S rDNA 序列与 NCBI-Blast 数据库中的序列进行在线比对分析，结果如表 1 所示。由表 1 可见，39 株产胺菌与同源性菌株的核酸序列相似度均达 99% 以上，分别选取菌株 S2、S3、S6、S8、S9、S11、S12、S13、S14、S16、S18、S30、S32、S33 共 14 株产胺菌为代表菌株。其中，菌株 S2、S3、S6、S8、S9、S11、S12、S13、S18、S30、S33 分别与摩氏摩根菌、产酸克雷伯菌、阿氏肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、植生拉乌尔菌、抗坏血酸克吕沃尔菌、粘质沙雷氏菌、肠杆菌属、中间克吕沃尔菌、彭氏变形杆菌、蜂窝哈夫尼亚菌的核酸序列相似度高达 99%，而菌株 S14 同时与肠杆菌属、河生肠杆菌生物的核酸序列相似度高达 99%；菌株 S16 同时与普通变形杆菌、奇异变形杆菌的核酸序列相似度高达 99%；菌株 S32 同时与产碱普罗威登斯菌、拉氏普罗威登斯菌的核酸序列相似度高达 99%。说明菌株 S14、S16、S32 的同源性菌株菌种间差异小，单独依靠 16S rDNA 鉴定不能鉴定到种，需要其他鉴定方法补充^[11]。

为了进一步确认各菌株的种属及其之间的亲属关系，选取数株与各代表菌株同源性较高的菌株，利用 MEGA. exe 软件建立产胺菌的 16S rDNA 序列的系统发育树，结果如图 3 所示。由图 3 可知，菌株 S2、S3、S6、S9、S11、S12、S18、S30、S32、S33 分别与摩氏摩根菌、产酸克雷伯菌、阿氏肠杆菌、植生拉乌尔菌、抗坏血酸克吕沃尔菌、粘质沙雷菌、中间克吕沃尔菌、彭氏变形杆菌、拉氏普罗威登斯菌、蜂窝哈夫尼亚菌聚成一支；而 S8 菌株则同时与弗氏柠檬酸杆菌、啮齿类柠檬酸杆菌聚成一支；菌株 S16 菌株同时与普通变形杆菌、奇异变形杆菌聚成一支；菌株 S13 和 S14 菌株均属于肠杆菌属，但亲缘关系距离较远。菌株 S8、S13、S14 和 S16 需要进一步进行鉴定分析。

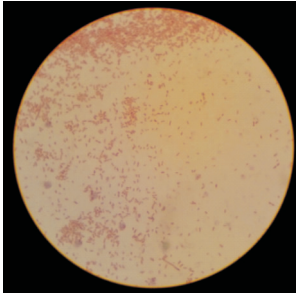


图 2 菌株 S2 的革兰氏染色结果
Fig.2 Gram staining results of strain S2

表 1 菌株 S1 ~ S39 的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库中的序列同源性比对

Tab. 1 Homology analysis of 16S rDNA sequences between strains S1 ~ S39 and other species in NCBI database

菌株 Strains	同源性菌株 Homologous strains	同源性 Homology/%	代表菌株 Representative strain	登录号 Accession number
S1, S4, S8, S20, S26, S36, S38	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	99	S8	NR_028894
S2, S22, S24, S31, S41	摩氏摩根菌 <i>Morganella morganii</i>	99	S2	NR_028938
S3, S17	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	99	S3	NR_041749
S5, S7, S12, S19, S23	粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	99	S12	NR_036886
S6, S10, S21, S25, S34	阿氏肠杆菌 <i>Enterobacter asburiae</i>	99	S6	NR_145647
S9, S29, S39	植生拉乌尔菌 <i>Raoultella planticola</i>	99	S9	NR_024996
S11	抗坏血酸克吕沃尔菌 <i>Kluyvera ascorbata</i>	99	S11	NR_028677
S13, S15, S27, S28	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> sp.	99	S13	—
S14	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> sp.	99	S14	—
	河生肠杆菌生物 <i>Lelliottia amnigena</i>			NR_024642
S16	普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	99	S16	NR_115878
	奇异变形杆菌 <i>Proteus hauseri</i>			NR_104767
S18	中间克吕沃尔菌 <i>Kluyvera intermedia</i>	99	S18	NR_028802
S30	彭氏变形杆菌 <i>Proteus penneri</i>	99	S30	NR_043998
S32	产碱普罗威登斯菌 <i>Providencia alcalifaciens</i>	99	S32	NR_042053
	拉氏普罗威登斯菌 <i>Providencia rustigianii</i>			NR_042411
S33, S37	蜂窝哈夫尼亚菌 <i>Hafnia alvei</i>	99	S33	NR_044729

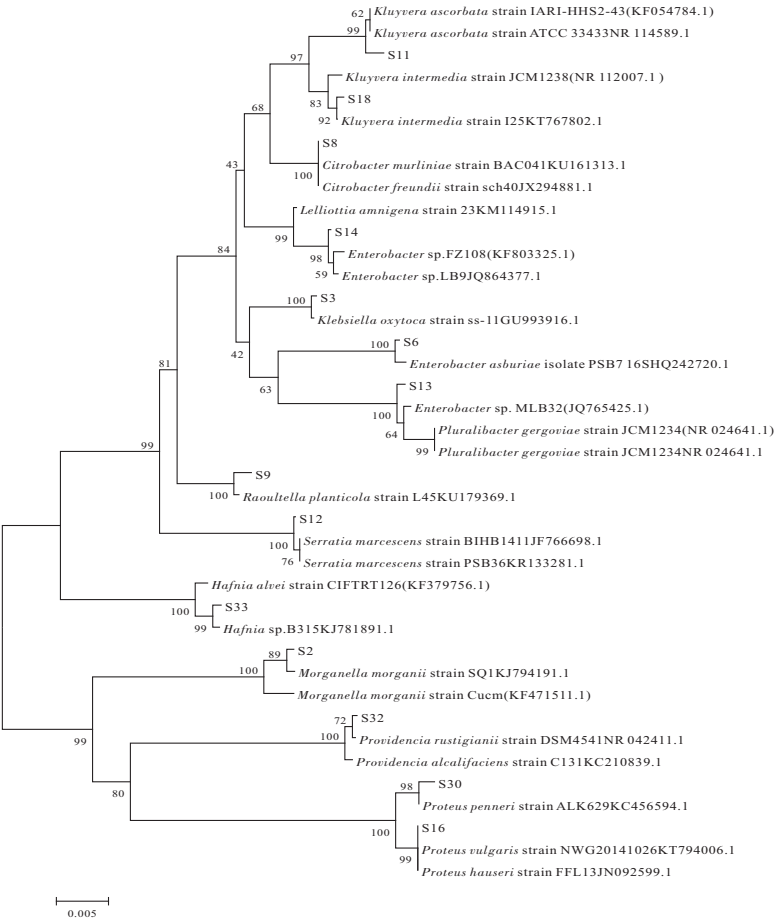


图 3 14 株产胺菌 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences from 14 strains of biogenic amine-forming bacteria

2.2.2 VITEK 2 Compact System 鉴定

进一步采用 VITEK 2 Compact System，选用革兰氏阴性鉴定卡，根据菌株的生理生化反应特性对其进行鉴定分析，鉴定结果如表 2 所示。由表 2 可见，菌株 S2 是摩氏摩根菌的可能性为 99%；菌株 S3 是产酸克雷伯菌的可能性为 98%；菌株 S6 是阴沟肠杆菌的可能性为 95%；菌株 S8 是弗氏柠檬酸杆菌的可能性为 93%；菌株 S11 是抗坏血酸克吕沃尔菌的可能性为 96%；菌株 S12 是弗氏柠檬酸杆菌的可能性为 93%；菌株 S13 是日沟维肠杆菌的可能性为 95%；菌株 S18 是中间克吕沃尔菌的可能性为 97%；S32 是拉氏普罗威登斯菌的可能性为 95%；菌株 S33 是蜂窝哈夫尼亚菌的可能性为 97%。而菌株 S16 属于变形杆菌属，菌株 S9 和 S14 用 VITEK 2 Compact System 未鉴定出其科属。

表 2 14 株产胺菌的 VITEK 2 Compact System 鉴定结果

Tab. 2 VITEK 2 Compact System identification results of 14 strains of biogenic amine-forming bacteria				
菌株 Strains	鉴定名称 Identification name	可能性 Possibility/%	微生物学分类 Microbiological classification	
			科 Family	属 Genus
S2	摩氏摩根菌 <i>Morganella morganii</i>	99	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	摩根菌属 <i>Morganella</i> sp.
S3	产酸克雷伯菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	98	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	克雷伯菌属 <i>Klebsiella</i> sp.
S6	阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	95	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> sp.
S8	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	93	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i> sp.
S9	Low discrimination	—	—	—
S11	抗坏血酸克吕沃尔菌 <i>Kluyvera ascorbata</i>	96	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	克吕沃尔菌属 <i>Kluyvera</i> sp.
S12	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	93	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i> sp.
S13	日沟维肠杆菌 <i>Enterobacter gergoviae</i>	95	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> sp.
S14	Unidentified	—	—	—
S16	彭氏变形杆菌 <i>Proteus penneri</i> 普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	—	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	变形杆菌属 <i>Proteus</i> sp.
S18	中间克吕沃尔菌 <i>Kluyvera intermedia</i>	97	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	克吕沃尔菌属 <i>Kluyvera</i> sp.
S30	彭氏变形杆菌 <i>Proteus penneri</i> 普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	—	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	变形杆菌属 <i>Proteus</i> sp.
S32	拉氏普罗威登斯菌 <i>Providencia rustigianii</i>	95	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	普罗威登斯菌属 <i>Providencia</i> sp.
S33	蜂窝哈夫尼亚菌 <i>Hafnia alvei</i>	97	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	哈夫尼亚菌属 <i>Hafnia</i> sp.

VITEK 2 Compact System 是依据细菌生化反应结果进行鉴定，16S rDNA 利用细菌 16S rDNA 序列测序的方法对细菌进行种属鉴定，既能体现不同菌属之间的差异，又能利用测序技术较容易地得到其序列，可以准确地对细菌进行分类鉴定。一般 16S rDNA 同源性大于 97% 可认为属于同一菌种^[11]。叶乃芳^[12]对 90 株临床少见或疑难细菌进行鉴定时，指出 16S rDNA 序列分析是细菌鉴定的金标准，对于 MALDI-TOFMS 及 VITEK 2 系统鉴定结果有异议或者无法鉴定的细菌，则使用 16S rDNA 序列分析证实菌种。因此，本实验以 16S rDNA 序列比对、系统发育树为主，以 VITEK 2 Compact System 鉴定结果为辅，得到菌株 S2、S3、S6、S8、S9、S11、S12、S13、S14、S16、S18、S30、S32、S33 分别是摩氏摩根菌、产酸克雷伯菌、阿氏肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、植生拉乌尔菌、抗坏血酸克吕沃尔菌、粘质沙雷菌、日沟维肠杆菌、肠杆菌属、变性杆菌属、中间克吕沃尔菌、彭氏变形杆菌、拉氏普罗威登斯菌、蜂窝哈夫尼亚菌。

2.3 产胺菌在不同温度培养下的产胺能力分析

选取 4、25 ℃ 分别培养分离的 14 株产胺菌，其产胺能力测定结果如表 3。结果显示，14 株产胺菌产生物胺种类和浓度存在一定的差异，同种菌株在不同温度下其产胺的种类与含量有所不同。在低温 4 ℃ 条件下培养，所有的菌株产胺能力极弱，14 株产胺菌产生物胺的量为 11.55 ~ 244.75 mg/L。常温 25 ℃ 培养条件则会促使产胺微生物的生长繁殖，从而增加菌液中生物胺含量，产生物胺的量为 38.80 ~ 10 048.70 mg/L。钱茜茜等^[13]指出，通常情况下，25 ~ 35℃ 的温度范围对产胺菌的生长最有

表3 从秋刀鱼中分离菌株的产胺能力测定结果

Tab.3 Biogenic amines-producing activities of bacterial strains isolated from *Cololabis saira*

菌株 Strains	温度 Temperature /℃	生物胺 Biogenic amines/(mg · L ⁻¹)								
		色胺 Tryptamine	苯乙胺 2-Phenylet hylamine	腐胺 Putrescine	尸胺 Cadaverine	组胺 Histamme	酪胺 Tyramine	亚精胺 Spermidine	精胺 Spermine	总量 Total
摩氏摩根菌	4	1.80	2.90	1.80	—	26.95	—	—	—	33.45
<i>Morganella morganii</i>	25	1.75	147.70	9.50	—	9 889.75	—	—	—	10 048.70
产酸克雷伯菌	4	1.15	—	1.00	41.60	—	—	—	—	43.75
<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	4.25	10.70	1.95	46.85	—	—	—	—	63.75
阿氏肠杆菌	4	0.75	—	25.45	27.95	2.50	—	—	—	56.65
<i>Enterobacter asburiae</i>	25	—	16.40	145.15	—	151.45	—	—	—	313.00
弗氏柠檬酸杆菌	4	0.75	—	21.75	43.75	11.80	3.50	—	—	81.55
<i>Citrobacter freundii</i>	25	—	—	18.00	6.45	14.35	—	—	—	38.80
植生拉乌尔菌	4	—	—	9.20	77.50	—	—	21.20	—	107.90
<i>Raoultella planticola</i>	25	—	1.20	37.75	152.95	—	—	—	—	191.90
抗坏血酸克吕沃尔菌	4	—	—	5.80	28.30	—	—	—	—	34.10
<i>Kluyvera ascorbata</i>	25	—	—	14.85	249.80	13.25	—	—	—	277.90
粘质沙雷菌	4	—	3.10	—	—	—	5.35	3.10	—	11.55
<i>Serratia marcescens</i>	25	—	2.40	68.05	48.55	14.60	—	—	—	133.60
日沟维肠杆菌	4	1.90	—	—	15.80	—	—	0.10	—	17.80
<i>Enterobacter gergoviae</i>	25	1.90	—	22.15	185.80	68.60	—	—	—	278.45
肠杆菌属	4	7.70	—	30.75	181.15	0.80	0.35	24.00	—	244.75
<i>Enterobacter</i> sp.	25	—	12.20	237.70	—	2 891.15	—	—	—	3141.05
变性杆菌属	4	6.40	—	6.00	114.90	—	—	—	—	127.30
<i>Proteus</i> sp.	25	—	2.90	55.80	—	0.20	1.50	4.85	—	65.25
中间克吕沃尔菌	4	5.10	—	11.20	146.55	—	—	21.20	—	184.05
<i>Kluyvera intermedia</i>	25	—	25.20	233.05	99.30	—	—	—	—	357.55
彭氏变形杆菌	4	6.30	—	1.20	143.65	6.75	—	—	—	157.90
<i>Proteus penneri</i>	25	—	39.85	240.20	117.10	—	—	—	—	397.15
拉氏普罗威登斯菌	4	4.15	1.00	15.85	101.85	—	—	—	—	122.85
<i>Providencia rustigianii</i>	25	—	—	264.90	1.50	—	—	—	—	266.40
蜂窝哈夫尼亚菌	4	—	—	9.35	75.05	—	—	21.90	—	106.30
<i>Hafnia alvei</i>	25	0.45	—	31.55	132.60	10.40	7.50	0.35	—	182.85

说明: “—” 表示未检出。

Notes: “—” indicated no detection.

利, 且在该温度范围内产胺量也最大; 而在低温条件下, 产胺菌生长缓慢, 氨基酸脱羧酶活性较低, 产胺能力会受到抑制, 这与本研究的结论一致。在常温 25℃ 条件下培养, 摩氏摩根菌、肠杆菌属产组胺能力较强, 产组胺的量分别为 9 889.75, 2 891.15 mg/L; 阿氏肠杆菌、肠杆菌属、中间克吕沃尔菌、彭氏变形杆菌、拉氏普罗威登斯菌产腐胺能力均大于 100 mg/L; 植生拉乌尔菌、抗坏血酸克吕沃尔菌、日沟维肠杆、拉氏普罗威登斯菌、蜂窝哈夫尼亚菌产尸胺能力均大于 100 mg/L。HU 等^[14]报道, 肠杆菌科是鱼类中能够产生组胺的主要细菌种类之一, 其中, 摩氏摩根菌、植生拉乌尔菌是高产组胺菌, 而蜂窝哈夫尼亚菌是弱产组胺菌。Bjornsdottir 等^[15]测定了鱼类中摩氏摩根菌的产组胺能力为 4466 mg/L, 将其分类为高产组胺菌; 产酸克雷伯菌、粘质沙雷菌的产组胺的量均小于 125 mg/L, 分类为弱产组胺菌或非产组胺菌, 与本实验的研究结果相似。Karima 等^[8]从沙丁鱼中分离出具有组氨酸、鸟氨酸和赖氨酸脱羧酶活性的中间克吕沃尔菌和阿氏肠杆菌, 与本实验分离培养的粘质沙雷菌、中间克吕沃尔菌同时具有产组胺、尸胺、腐胺等生物胺的能力相一致。因此, 生物胺的种类、含量与秋刀鱼产生菌的种属与数量有密切关系^[16-18], 温度也是影响产胺菌产胺能力的关键因素。

2.4 秋刀鱼在不同温度贮藏下生物胺含量的变化

生物胺的种类、含量与秋刀鱼产生菌的种属与数量有密切关系，还与贮藏温度和时间有紧密关系。如表 4 所示，秋刀鱼肉在 25 ℃贮藏过程中，随着贮藏时间的延长，秋刀鱼中蛋白质水解，游离氨基酸含量逐渐增多，产胺微生物不断进行脱羧作用，生物胺含量相应升高。其中，亚精胺和精胺含量有少量增加，可能是由于微生物代谢过程中产生了可降解亚精胺和精胺的酶，也可能是发生了生物胺之间的相互转化作用，其他 6 种生物胺的含量及总生物胺含量随着贮藏时间的延长而明显增多。在贮藏 2 d 后，组胺含量就已超过 100 mg/kg，低于 Prester 等^[19]将鲭鱼在 22 ℃放置 24 h 后的组胺含量 1090 mg/kg；但在贮藏第 4 天，秋刀鱼中组胺含量达到 3 329.76 mg/kg，远远超过国家规定的水产品中组胺限量标准（< 300 mg/kg）^[20]，生物胺总量为 3 680.40 mg/kg，已超过鱼类产品中生物胺总量的限量标准 1000 mg/kg^[6]。而秋刀鱼在 4 ℃贮藏过程中，各生物胺的含量均随着贮藏时间的延长有少量增加；色胺和酪胺未检出，可能是含量较低还未到达该检测方法的检测限^[10]。在贮藏末期，总生物胺含量未超过 90 mg/kg，远低于国家限量标准 300 mg/kg^[20]。因此，将秋刀鱼置于 4 ℃条件下贮藏，生物胺含量较缓慢增长，可以有效抑制生物胺的形成^[21]。这一试验结果表明，通过控制温度来降低秋刀鱼中生物胺的含量是可行有效的。

表 4 秋刀鱼分别在 4 ℃与 25 ℃贮藏过程中生物胺的变化情况
Tab. 4 Changes of biogenic amines in *Cololabis saira* during storage at 4 ℃ and 25 ℃

时间 Time /d	温度 Temper- ature /℃	生物胺 Biogenic amines/(mg · L ⁻¹)								总量 Total
		色胺 Tryptamine	苯乙胺 2-Phenylet hylamine	腐胺 Putrescine	尸胺 Cadaverine	组胺 Histamme	酪胺 Tyramine	亚精胺 Spermidine	精胺 Spermine	
0	4	—	1.87±0.81	6.55±1.20	2.87±0.67	3.53±0.35	—	1.03±0.03	4.42±0.85	20.27±0.72
	25	5.94±1.51	0.88±0.12	4.45±0.33	3.33±0.54	2.35±0.82	—	1.14±0.10	9.66±1.02	27.76±0.74
2	4	—	1.42±0.52	10.95±1.43	2.15±0.35	4.95±0.73	—	2.07±0.16	4.77±0.41	26.31±1.39
	25	16.30±1.77	2.14±0.43	22.86±0.97	19.76±1.44	171.87±1.95	66.33±1.21	1.98±0.09	6.45±0.68	305.71±1.16
4	4	—	2.94±0.14	9.26±0.92	5.74±0.16	9.36±0.66	—	3.03±0.12	4.63±1.40	34.96±1.88
	25	70.53±0.68	17.97±1.75	66.14±0.89	66.69±1.88	3 329.76±2.30	117.98±1.69	2.99±0.17	11.33±0.83	3 680.40±3.79

说明：“—”表示未检出。
Notes: “—” indicated no detection.

3 结论

本研究采用改良后的 Niven’s 生物胺筛选培养基从秋刀鱼肉中分离得到 14 株产胺菌，革兰氏染色试验结果显示，这 14 株产胺菌均为革兰氏阴性菌；通过 16S rDNA 基因序列法对产胺菌进行测序分析并建立系统发育树，同时采用 VITEK 2 Compact System 鉴定系统对其进行生理生化分析鉴定，这 14 株产胺菌分别是摩氏摩根菌、产酸克雷伯菌、阿氏肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、植生拉乌尔菌、抗坏血酸克吕沃尔菌、粘质沙雷菌、日沟维肠杆菌、肠杆菌属、变性杆菌属、中间克吕沃尔菌、彭氏变形杆菌、拉氏普罗威登斯菌、蜂窝哈夫尼亚菌。

这些产胺菌在 25 ℃条件下培养产生物胺能力较强(38.80 ~ 10 048.70 mg/L)，其中摩氏摩根菌、肠杆菌属产组胺能力较强，产组胺的量分别为 9 889.75，2 891.15 mg/L；而 4 ℃条件下所有产胺菌产生物胺能力较弱(11.55 ~ 244.75 mg/L)，并且秋刀鱼置于 4 ℃条件下贮藏，生物胺含量增长缓慢。可见，生物胺的种类、含量与产胺菌有密切关系，温度也是影响产胺菌产胺能力的关键因素。今后可通过抑制摩氏摩根菌、肠杆菌属的生长实现控制组胺等生物胺的含量，并结合低温贮藏减少秋刀鱼等水产品中生物胺含量，从而提高水产品的品质和安全性。

[参考文献]

- [1] SUYAMA S. Age structure of pacific saury *Cololabis saira* based on observations of the hyaline zones in the otolith and length frequency distributions [J]. Fisheries Science, 2010, 72(4): 742-749. DOI:10.1111/j.1444-2906.2006.01213.x.
- [2] 罗海波, 陈伟, 王锦富, 等. 秋刀鱼营养价值及其开发利用研究进展 [J]. 水产科学, 2016, 35(2): 179-184.
- [3] 陈建文, 高建华, 钟海明, 等. 秋刀鱼蛋白酶解物的制备及氨基酸评价 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(9): 53-55.
- [4] 刘光明, 刘红, 闵娟, 等. 海产食品中生物胺的分析评价及控制策略 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(8): 1-11.
- [5] BULUSHI I A, POOLE S, DEETH H C, et al. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation: a review [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2009, 49(4): 369-377. DOI:10.1080/10408390802067514.
- [6] PRESTER L. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review [J]. Food Additives & Contaminants, 2011, 28(11): 1547-1560. DOI:10.1080/19440049.2011.600728.
- [7] 刘光明, 梁一巍, 李传勇, 等. 海洋中上层鱼类产品汇总生物胺的调查与控制 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(8): 1-12.
- [8] KARIMA F, CUIEL JA, LANDETA G, et al. Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel [J]. Food Control, 2012, 25(1): 89-95. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.10.032.
- [9] 曹利瑞, 熊智强, 朱松, 等. 黄酒酿造过程中产生物胺菌株的筛选及其特性研究 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 68-75.
- [10] 田鑫, 刘红, 李传勇, 等. 反相高效液相色谱法同时检测海产品中 8 种生物胺 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 95-102. DOI:10.3969/j.issn.2095-0381.2017.04.016.
- [11] 周贤轩, 杨波, 陈新华. 几种分子生物学方法在菌种鉴定中的应用 [J]. 生物技术, 2004, 14(6): 37-40.
- [12] 叶乃芳. MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 序列分析在快速鉴定临床细菌中的应用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [13] 钱茜茜, 吴燕燕, 魏涯, 等. 海鲈鱼腌制过程中产胺菌的分离筛选与生物学特性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 70-75. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201601013.
- [14] HU J W, CAO M J, GUOS C, et al. Identification and inhibition of histamine-forming bacteria in blue scad (*Decapterus maruadsi*) and chub mackerel (*Scomber japonicus*) [J]. Journal of Food Protection, 2015, 78(2): 383-389. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-14-296.
- [15] BJORNSDOTTIR K, BOLTON G E, MCCLELLAN-GREEN P D, et al. Detection of gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study [J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(9): 1987-1991.
- [16] 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. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.02.010.
- [17] BJORNSDOTTIR-BUTLER K, ABRAHAM A, HARPER A, et al. Biogenic amine production by and phylogenetic analysis of 23 photobacterium species [J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(8): 1264-1274. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-18-022.
- [18] WALEED S S, RAAFAT M S, LAILA A M. Laboratory screening of biogenic amines producing bacteria potentially threatens human health in some egyptian fish and fish products [J]. Journal of Fisheries and Aquatic Science, 2017, 12(3): 134-140. DOI:10.3923/jfas.2017.134.140.
- [19] PRESTER L, MACAN J, VARNAI V, et al. Endotoxin and biogenic amine levels in atlantic mackerel (*Acomber scombrus*), sardine (*Sardina pilchardus*) and mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) stored at 22 °C [J]. Food Additives and Contaminants, 2009, 26(3): 355-362. DOI:10.1080/02652030802520878.
- [20] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 鲜、冻动物性水产品卫生标准: GB 2733—2005 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [21] CHONG C Y, BAKAR F A, RAHMAN R A, et al. Biogenic amines, amino acids and microflora changes in Indian mackerel (*Rastrellinger kanagurta*) stored at ambient (25 - 29 °C) and icing (0 °C) temperature [J]. Journal of Food Science & Technology-Mysore, 2014, 51(6): 1118-1125. DOI:10.1007/s13197-012-0621-3.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)