

文章编号: 1000-0615(2019)04-1220-14

DOI: 10.11964/jfc.20180111163

## 采用Illumina MiSeq测序技术比较日本鲭和大黄鱼 冷藏期间的腐败特性

张梦思<sup>1</sup>, 汤海青<sup>2</sup>, 欧昌荣<sup>1\*</sup>, 程三红<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211;

2. 浙江医药高等专科学校食品学院, 浙江宁波 315100)

**摘要:** 为比较日本鲭和大黄鱼肌肉中微生物和代谢功能的变化及其与鱼肉腐败特性之间的关系, 本研究检测了2种鱼在冷藏过程中的理化指标和菌落总数的变化, 利用Illumina MiSeq测序技术分析细菌群落变化, 并利用皮尔森相关性分析检验微生物与鱼肉腐败及组胺产生相关性, 结合功能预测分析细菌群落组成与代谢功能之间的关系。结果显示, 冷藏期间日本鲭和大黄鱼的pH、挥发性盐基氮、组胺、菌落总数等均呈上升趋势, 且日本鲭上升较快; 冷藏末期2种鱼TVB-N值和组胺含量分别达到76.34、59.98和59.92、3.11 mg/100 g; 日本鲭肌肉中细菌丰富度和多样性先增加后减少, 大黄鱼则整体呈下降趋势; 2种鱼肌肉中的优势腐败菌均为希瓦氏菌属; 日本鲭体内与TVB-N产生相关的菌共12种, 其中10种与组胺产生具有显著相关性; 大黄鱼体内与TVB-N产生相关的菌共7种, 但未检测出与组胺产生具有相关性的细菌; 冷藏过程中氨基酸代谢和碳水化合物代谢为最主要的代谢通路, 日本鲭样品组氨酸、精氨酸、脯氨酸等氨基酸代谢相关基因和丁酸丁酯代谢、丙酸酯代谢及丙酮酸代谢丰度均显著高于同一时期的大黄鱼, 本实验从微生物代谢水平解释了日本鲭比大黄鱼更易腐败的原因, 为不同水产品腐败特性的研究提供新思路。

**关键词:** 日本鲭; 大黄鱼; 细菌群落; 腐败; Illumina MiSeq测序; 代谢功能基因

**中图分类号:** S 984.1; TS 254.4

**文献标志码:** A

海产鱼类由于味道鲜美, 蛋白质、水分含量丰富, 脂肪含量低, 深受消费者喜爱, 但在流通过程中极易腐败。影响鱼类腐败最主要的因素是微生物活动<sup>[1]</sup>, 某些微生物能迅速适应鱼肉环境, 成为优势菌群, 参与鱼体的腐败过程, 此类细菌被称为特定腐败菌(specific spoilage organism, SSO)<sup>[2]</sup>, 它们能利用鱼肉中的营养物进行繁殖和代谢, 引起肌肉腐败, 产生氨、胺类、硫化物和挥发性脂肪酸等物质和风味变化, 使鱼体失去食用价值。部分水产品游离氨基酸含量丰富, 极易产生组胺等生物胺, 影响人体健康。

微生物导致的水产品腐败变质及组胺中毒等问题使我国渔业造成很大的经济损失, 影响了渔业经济的发展。因此, 分析鱼类肌肉中微生物组成及变化, 对鱼类贮藏保鲜, 延长货架期等相关研究有重要意义。

关于微生物多样性的研究, 一般采用传统培养法, 但是这种方法耗时久、操作繁琐、准确性低, 无法筛选出复杂环境下无法培养的微生物<sup>[3]</sup>。随着分子生物学的发展, 实时荧光定量PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophor-

收稿日期: 2018-01-29 修回日期: 2018-04-24

资助项目: 国家自然科学基金(31271890, 31501519); 浙江省公益研究项目(GN18C200033); 宁波市科学技术局农业重大择优委托项目(2012C10024); 宁波市科学技术局富民项目(2017C10029); 宁波大学科研基金(xkzsc1524)

通信作者: 欧昌荣, E-mail: ouchangrong@nbu.edu.cn

esis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)等免培养方法逐渐被应用,克服了传统培养方法的缺陷,但这些方法费用高且获得的信息有限,不能全面地反映微生物的变化<sup>[4]</sup>。近年来,Illumina Miseq测序技术<sup>[5]</sup>以通量高、成本低、速度快等优点被广泛应用于环境<sup>[6]</sup>、生态<sup>[7]</sup>、疾病<sup>[8]</sup>等微生物群落的研究,也有学者通过高通量测序技术分析不同食品中的微生物群落变化<sup>[9-11]</sup>,但在水产品中的研究尚不多见。PICRUST是一项基于rRNA序列预测细菌群落功能的软件,通过微生物群落的丰富度与数据库进行对比,在不可观测的情况下推测出生物群落的功能信息<sup>[12]</sup>。将细菌群落变化与其代谢功能相结合,能更好地阐述食品加工贮藏过程中细菌群落组成、代谢功能和腐败变质之间的关系,目前此类研究尚未见报道。

日本鲭(*Scomber japonicus*)属于暖水性海洋洄游性中上层鱼类,含有丰富的蛋白质、脂肪、维生素、微量元素等,其蛋白质组织松软,是典型青皮红肉鱼<sup>[13]</sup>;大黄鱼(*Larimichthys crocea*)肉质细腻、味道鲜美,是我国浙江、福建海域养殖量比较大的海水经济鱼类,属于典型白肉鱼。一般的,红肉鱼类较普通的白肉鱼类肌肉中游离氨基酸含量丰富,更容易受微生物影响,使鱼体腐败,并产生生物胺。目前已有文献从理化性质和微生物群落变化等方面分析2种鱼的腐败变化<sup>[14-15]</sup>,但从微生物代谢功能变化角度解释它们不同腐败特性的研究尚未见报道。本研究通过Illumina Miseq测序比较2种鱼冷藏过程中肌肉的细菌群落变化,并通过PICRUST进行功能预测,旨在揭示日本鲭和大黄鱼冷藏期间肌肉腐败变质、组胺的产生与细菌群落组成及其代谢功能之间的关系,从微生物代谢功能的角度解释不同的腐败特性,为水产品的腐败研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

日本鲭和大黄鱼均由宁波梦婕食品有限公司提供。日本鲭(体质量为400~500 g,体长为30~40 cm)捕获于中国象山港海域;大黄鱼(体质量300~350 g,体长25~30 cm)为宁波象山港海域深水网箱养殖鱼。

日本鲭和大黄鱼捕获后,立即用无菌袋包装,置于冰盒中,12 h内运送至实验室,随机分为4组,置于(4±1) °C冰箱中贮藏,于0、4、8、12 d在无菌操作台中分别取2种鱼背部肌肉进行分析。(日本鲭样品记为J0、J4、J8、J12,大黄鱼样品记为Y0、Y4、Y8、Y12)。每个取样点随机各取6尾进行平行实验,每尾取50.0 g,置于-80 °C冰箱保存供后续分析。

细菌DNA提取试剂盒(美国OMEGA公司); Gelview(北京百泰克生物技术有限公司); λ DNA/*Hind* III(北京天根生化科技有限公司); 6×Load buffer、Agerose(北京全式金生物技术有限公司); 50×TAE。其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验仪器与设备

MiSeq测序仪(美国Illumina公司); 电泳仪、JY-SPCT电泳槽、JY300C凝胶成像系统(北京君意东方电泳设备有限公司); H1850R高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Nano-Drop-1000分光光度计(美国Thermo Fisher公司)。

### 1.3 实验方法

**理化分析** pH的测定采用GB 5009.237-2016<sup>[16]</sup>的方法进行。取2.0 g搅碎的肉加入20.0 mL蒸馏水,浸置30 min后过滤,取滤液进行pH测定。参照GB 5009.228-2016<sup>[17]</sup>测定日本鲭和大黄鱼TVB-N含量。称取2.0 g绞碎的肉加入10.0 mL三氯乙酸,充分振摇1 min,静置15 min后过滤,取5.0 mL滤液通过凯氏定氮仪进行分析。组胺含量的测定参考Patange等<sup>[18]</sup>的方法。准确称取5.0 g鱼肉于离心管中,加入20 mL生理盐水,均质2 min,4 °C、12 000 r/min离心10 min,取上清液,用生理盐水定容至25 mL;在具塞试管中,加入1 mL鱼肉提取液、1 mL生理盐水、0.5 g盐混合物(6.25 g无水硫酸钠,1.00 g—水磷酸钠混合研磨),混匀后加入2 mL正丁醇,5 000 r/min离心10 min,取1 mL上清液于干燥试管中,氮吹至干;残渣用1 mL水溶解,加入5 mL 1.1%碳酸钠和2 mL显色剂,5 min后在λ=496 nm处比色测定。用100 μg/mL的组胺标准溶液分别配置成0、20、40、60、80、100 μg/mL的标准工作液按上述方法制作标准曲线。

**菌落总数分析** 菌落总数按照GB 4789.2-2016<sup>[19]</sup>稀释平板计数法测定。称取2.5 g鱼肉样品放入盛有22.5 mL无菌生理盐水的无菌均质袋中,

均质2 min, 按照梯度稀释法稀释一定倍数, 选取3个合适的稀释度, 倒入PCA培养基进行培养计数, 每个稀释度3组平行。

**鱼肉细菌DNA提取** 在无菌条件下, 利用剪刀和手术刀剥开鱼皮, 注意避免接触鱼肉部分。取鱼肉10.0 g, 剪碎, 加入10 mL无菌生理盐水, 高速涡旋2 min, 4 °C、2 000 r/min离心5 min, 取上清液, 使用100 μm纱绢过滤, 收集菌悬液。4 °C 12 000 r/min离心20 min, 收集细菌沉淀用于DNA提取。按照细菌基因组DNA试剂盒说明书进行后续DNA提取, 1%琼脂糖凝胶电泳检测提取结果, 用NanoDrop-1000测DNA浓度和纯度。DNA样本于-80 °C保存备用。

**PCR扩增和测序** 以日本鲭和大黄鱼体内提取的DNA为模板, 使用细菌通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3')和1 492R (5'-TCAGGCTACCTTGTTACGACTT-3')扩增样品中16S *rRNA*基因。PCR反应条件: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s; 55 °C退火30 s; 72 °C延伸45 s; 72 °C延伸5 min, 共33个循环。每个样品设计3个平行进行PCR扩增, 以减少扩增造成的偏差。通过1.0%的琼脂糖凝胶电泳检验PCR扩增产物, 使用DNA纯化试剂盒对PCR产物进行纯化后, 每个平行取等量的产物混合, 送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司测序。

**数据处理** 将下机之后的原始数据用FLASH软件(version 1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)进行拼接, 然后用Qiime(version 1.9.0, <http://qiime.org/>)进行分析, 包括质控和去除嵌合体<sup>[20]</sup>。在97%相似性水平上, 用Uclust将序列聚类成操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)<sup>[21]</sup>; 选取丰度和覆盖度最高的序列作为每个OTU的代表序列, 用PyNAST在Greengenes数据库中比对进行物种注释<sup>[22]</sup>; 去除古菌、叶绿体和非细菌序列及仅有1条序列的OTUs。对每个样品随机选取51 900条(最低测序深度)序列用于后续分析, 以消除样品间由于测序深度不同造成的偏差。最后利用PICRUST(<http://picrust.github.io/picrust/>)将标记基因与KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库比对进行功能预测分析<sup>[12]</sup>。

**统计分析** 用Qiime软件计算细菌多样性和丰度(Chao 1指数、物种多样性、香农指数和

系统发育多样性); 利用R软件(v.3.1.1)中vegan软件作非度量尺度分析NMDs二维图; 利用皮尔森(Pearson)相关性分析筛选组胺相关细菌属; 通过斯皮尔曼等级相关性(Spearman rank correlation)计算分析细菌群落和代谢通路之间的相关性, 并用热图展示相关系数。使用SAS进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和独立样本*t*检验。

## 2 结果

### 2.1 理化指标、菌落总数分析

冷藏过程中日本鲭和大黄鱼初始pH值分别为6.98和6.81, 冷藏前期pH变化不明显, 后期缓慢增加。鱼类死亡后, 僵直期肌肉中糖原降解产生乳酸, 导致pH下降, 随后在酶和微生物作用下, 氨基酸和蛋白质降解产生氨及胺类等碱性物质使pH上升。但在本实验中并未出现pH先降后升的趋势, 这可能是由于鱼类死亡后僵直期较短, 在初次取样时已过僵直期, 进入解僵或自溶状态, 从而使2种鱼都只出现pH上升趋势(表1)。

TVB-N是水产品在细菌和酶作用下, 分解蛋白质产生的氨及胺类含氮物质, 可作为反映鱼类腐败最重要的指标之一。日本鲭和大黄鱼初始TVB-N水平分别为13.85和7.43 mg/100 g, 且整个冷藏过程中, 日本鲭肌肉中的TVB-N值均高于同一时间点大黄鱼的值。随着冷藏时间的延长, 2种鱼TVB-N含量逐渐增加, 第8天时, 分别达到39.28和38.60 mg/100 g, 均超出我国海水鱼类TVB-N二级标准限制(30 mg/100 g)<sup>[23]</sup>。新捕获的鱼类TVB-N水平通常为5~20 mg/100 g<sup>[24]</sup>, 一般的, 日本鲭肌肉中氨基酸、蛋白质含量更丰富, 故肌肉中TVB-N含量比大黄鱼高。Shakila等<sup>[25]</sup>通过研究常温储藏过程中6种海洋鱼类的TVB-N含量变化, 也发现日本鲭初始TVB-N含量高于其他鱼类。

日本鲭初始组胺含量较低, 冷藏前期增长缓慢, 第8天后开始迅速上升。整个冷藏期间大黄鱼组胺含量变化缓慢且始终低于3.30 mg/100 g。GB 2033-2015<sup>[23]</sup>中规定日本鲭组胺含量应不高于40 mg/100 g, 其他海水鱼类小于20 mg/100 g。冷藏至第8天时日本鲭组胺含量已超出国家标准限值, 而大黄鱼始终处于国家标准限值内。胡月等<sup>[26]</sup>测定不同储藏温度下不同鱼的生物胺变化, 也发现4 °C条件下大黄鱼体内组胺含量始终

表1 日本鲭和大黄鱼冷藏期间pH、TVB-N、组胺和菌落总数的变化

Tab. 1 pH, TVB-N, histamine, total number of colonies in *S. japonicus* and *L. crocea* during cold storage

时间/d time	pH		挥发性盐基氮/(mg/100 g)		TVB-N		组胺/(mg/100 g)		histamine		菌落总数/[lg (CFU/g)]		APC
	J	Y	J	Y	J	Y	J	Y	J	Y	J	Y	
0	6.98±0.10 <sup>B</sup>	6.81±0.02 <sup>B</sup>	13.85±1.61 <sup>D</sup>	7.43±1.15 <sup>C</sup>	5.60±1.19 <sup>A</sup>	2.88±1.05 <sup>A</sup>	4.99±0.48 <sup>C</sup>	3.70±0.76 <sup>D</sup>					
4	6.98±0.00 <sup>B</sup>	6.82±0.09 <sup>B</sup>	27.87±3.23 <sup>C</sup>	12.72±1.50 <sup>C</sup>	8.05±0.94 <sup>B</sup>	3.04±0.79 <sup>A</sup>	6.92±0.58 <sup>B</sup>	5.44±0.50 <sup>C</sup>					
8	7.03±0.07 <sup>B</sup>	7.08±0.04 <sup>A</sup>	39.28±4.12 <sup>B</sup>	38.60±6.21 <sup>B</sup>	10.35±3.04 <sup>BC</sup>	3.24±2.39 <sup>A</sup>	7.33±0.12 <sup>B</sup>	6.43±0.36 <sup>B</sup>					
12	7.39±0.09 <sup>A</sup>	7.16±0.07 <sup>A</sup>	76.34±4.53 <sup>A</sup>	59.98±7.08 <sup>A</sup>	59.92±5.70 <sup>C</sup>	3.11±1.37 <sup>A</sup>	8.60±0.36 <sup>A</sup>	7.50±0.55 <sup>A</sup>					

注: 同种鱼同行不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ); “J”表示日本鲭, “Y”表示大黄鱼; 下同

Notes: different letters in the same row represent significant differences ( $P<0.05$ ) in *S. japonicus* or *L. crocea*; “J” stands for *S. japonicus*, “Y” stands for *L. crocea*; the same below. APC. total number of colonies

处于较低水平。

日本鲭和大黄鱼初始菌落总数分别为4.9 lg (CFU/g)和3.7 lg(CFU/g)(表1), 随着冷藏时间的延长, 2种鱼菌落总数整体呈上升趋势, 日本鲭在第8天时超过7 lg(CFU/g), 大黄鱼冷藏至末期才达到7.5 lg(CFU/g)。可见, 日本鲭比大黄鱼细菌增长更快, 意味着优势腐败菌增长更快, 导致日本鲭腐败更加迅速。

## 2.2 细菌群落多样性分析

对48个样本的DNA进行测序。对数据进行拼接、过滤处理后, 每个样品随机选取51 900条序列计算日本鲭和大黄鱼冷藏期间肌肉中细菌群落多样性和丰度。日本鲭在冷藏过程中Chao 1指数、物种多样性、香农指数和系统发育多样性总体上随着冷藏时间的延长先增加后减少; 大黄鱼冷藏期间肌肉中微生物多样性和丰度变化均不显著(表2)。

利用韦恩图展示日本鲭和大黄鱼冷藏过程中OTU的变化。日本鲭肌肉中OUT总数先增加后减少; 0 d时, 大黄鱼肌肉中OTU总数高达3 293个, 显著高于其他冷藏时间点; 2种鱼中OUT总

数的变化与其多样性变化具有一致性。日本鲭冷藏各个时期始终存在286个OUT(图1-a), 而大黄鱼存在147个(图1-b), 说明日本鲭在腐败过程中固定存在的微生物群落比大黄鱼多。韦恩图变化说明这2种鱼在不同的冷藏时期, 菌群组成既有相似之处又有各自特征。

## 2.3 细菌群落结构组成分析

在门水平上, 日本鲭和大黄鱼样品细菌主要隶属于5大门类(图2-a), 分别为变形菌门(Proteobacteria, 76.8%~76.8%)、厚壁菌门(Firmicutes, 0.9%~19.3%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 0.1%~8.2%)、梭杆菌门(Fusobacteria, 0.6%~7.5%)和放线菌门(Actinobacteria, 0.1%~1.1%)。变形菌门是其中的主要优势菌群, 在日本鲭样品冷藏前期稳定, 冷藏末期下降, 但在大黄鱼样品中呈先上升后下降趋势。厚壁菌门是这2种鱼中的次要优势菌, 其相对丰度在日本鲭样品中整体呈上升趋势, 但在大黄鱼样品中丰度较低, 且呈先下降后上升趋势。此外, 冷藏0 d时, 拟杆菌门在日本鲭和大黄鱼样品中都有较高的丰度, 但在冷藏后期逐渐消失。梭杆菌门在日本鲭冷藏

表2 日本鲭和大黄鱼冷藏过程中细菌群落多样性指数

Tab. 2 Diversity indices of bacterial community of *S. japonicus* and *L. crocea* during refrigerated storage

时间/d time	Chao 1指数		物种多样性		香农指数		系统发育多样性	
	index of Chao 1		index of species diversity		index of Shannon		phylogenetic diversity	
	J	Y	J	Y	J	Y	J	Y
0	2 384.7±90.7 <sup>B</sup>	2 246.6±132.3 <sup>A</sup>	1 215±57.5 <sup>B</sup>	1 200.2±57.6 <sup>A</sup>	3.2±0.1 <sup>A</sup>	3.7±0.5 <sup>A</sup>	44.2±3.3 <sup>A</sup>	50.5±4.8 <sup>A</sup>
4	2 556.4±179.4 <sup>B</sup>	2 169.8±70.9 <sup>A</sup>	1 249.8±98.6 <sup>AB</sup>	1 032.7±34.6 <sup>A</sup>	3.2±0.3 <sup>A</sup>	2.3±0.1 <sup>C</sup>	40.4±4.3 <sup>A</sup>	33.0±1.6 <sup>B</sup>
8	3 100.8±104.2 <sup>A</sup>	2 310.9±58.2 <sup>A</sup>	1 496.5±64.9 <sup>A</sup>	1 099.3±70.5 <sup>A</sup>	3.3±0.2 <sup>A</sup>	2.7±0.3 <sup>BC</sup>	46.1±3.3 <sup>A</sup>	34.2±4.7 <sup>B</sup>
12	2 628±194.3 <sup>B</sup>	2 157.1±82.6 <sup>A</sup>	1 265.7±102.6 <sup>AB</sup>	1 153.9±70.1 <sup>A</sup>	2.9±0.6 <sup>A</sup>	3.0±0.3 <sup>B</sup>	45.4±6.3 <sup>A</sup>	37.2±3.4 <sup>B</sup>

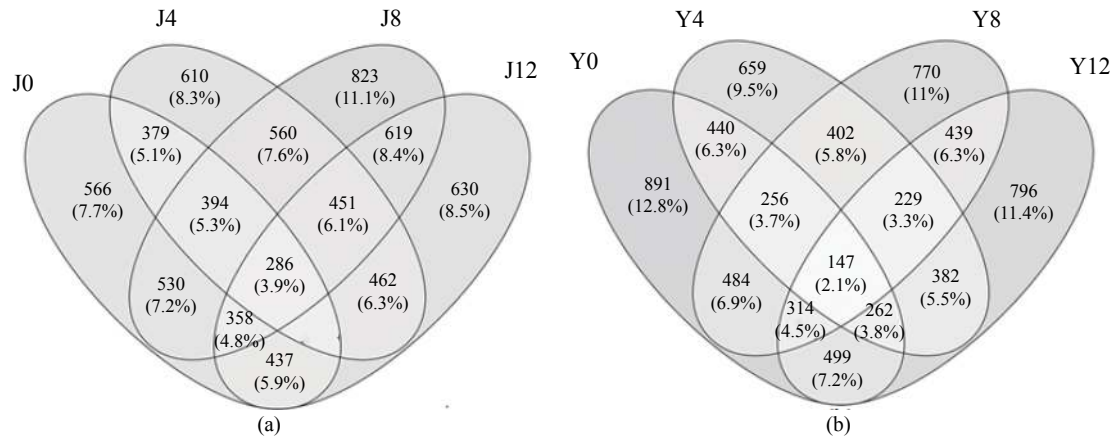


图 1 日本鲭(a)和大黄鱼(b)冷藏期间细菌多样性韦恩图

J0、J4、J8、J12.分别冷藏0、4、8、12 d的日本鲭，Y0、Y4、Y8、Y12.分别冷藏0、4、8、12 d的大黄鱼；下同。不同隔中的数字表示特定于或共同于存储时间的序列的数量，括号中的数字表示其所占比例；椭圆中的数字之和是某一时刻序列的总数

Fig. 1 Venn plot for bacterial diversity of *S. japonicus*(a) and *L. crocea*(b) during refrigerated storage

J0. fresh *S. japonicus*; J4, J8, J12. *S. japonicus* refrigerated storage for 4, 8, 12 days, respectively; Y0. fresh *L. crocea*; Y4, Y8, Y12. *L. crocea* refrigerated storage for 4, 8, 12 days, respectively; the same below. The figures in different compartments mean the numbers of OTUs specific for or common to storage time; the numbers in brackets indicate their proportion in the total; the sum of the figures in an ellipse was the total number of OTUs at a certain time

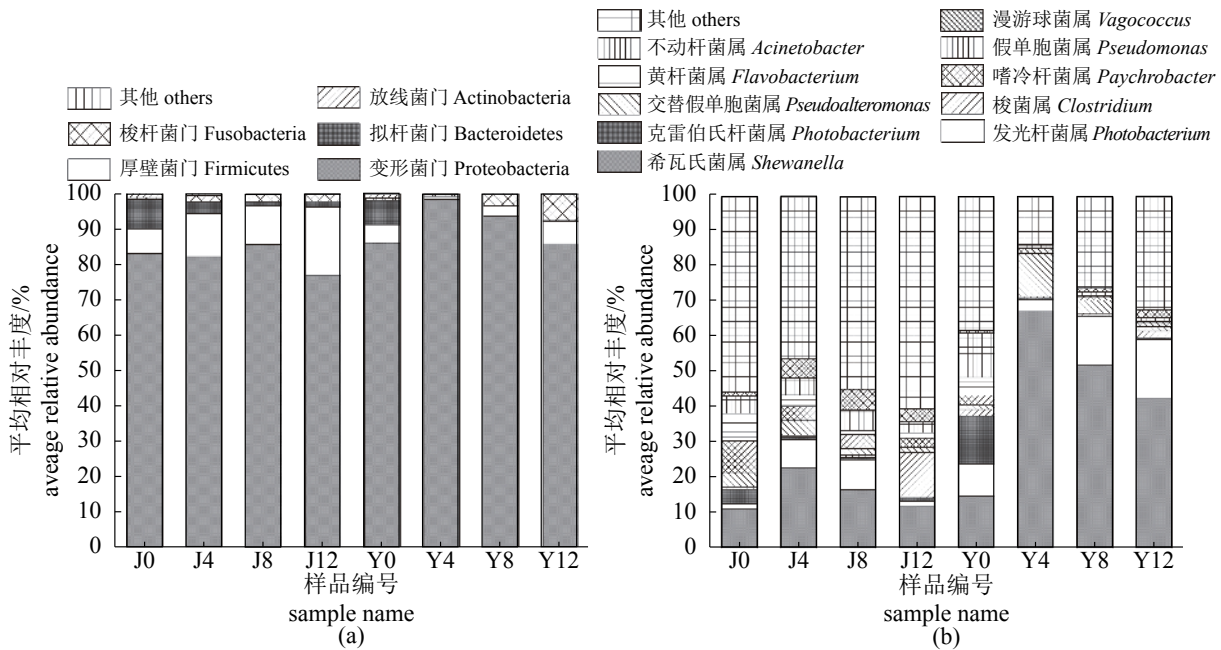


图 2 日本鲭和大黄鱼冷藏期间肌肉细菌在门(纲)(a)和属(b)水平上的平均相对丰度

Fig. 2 Average relative abundance at the phylum or class level (a) and the genus level (b) of bacterial community of *S. japonicus* and *L. crocea* during refrigerated storage

过程中相对丰度变化较小，但在大黄鱼样品中呈上升趋势，冷藏末期高达7.5%。

在属水平上，挑选相对丰度>5%的细菌属进行分析(图2-b)。总体上，日本鲭和大黄鱼中的优势腐败菌均为希瓦氏菌属(*Shewanella*)，且在冷

藏过程中一直处于优势地位。发光杆菌属(*Photobacterium*)在日本鲭冷藏中期丰度较高，在大黄鱼冷藏中后期丰度较高，是2种鱼冷藏过程中的次要优势菌。嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)在日本鲭样品中丰度较高，但在大黄鱼样品中却处于较

低水平。假单胞菌属(*Pseudomonas*)在日本鲭样品中丰度保持在2.3%~5.3%, 在大黄鱼冷藏初期丰度较高, 后期则逐渐减少。其他细菌属相对丰度始终处于较低水平(相对丰度<5%)。

## 2.4 菌群结构差异分析

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) 主要用于比较组间或组内样品的差异性, 图中2点之间距离越近表示生物学重复性越高, 完全一致的生物学样品, 理论上应聚在同一点。除冷藏12 d日本鲭样品和冷藏0 d的大黄鱼样品, 其他样品6个生物学重复样本菌群结构组成差异性较小(图3), 说明这6个平行菌群结构组成相似, 实验样本重复性较高。冷藏初期日本鲭细菌群落组成较相似, 随着冷藏时间的延长, 鱼体腐败加深, 细菌菌相差异逐渐增大。大黄鱼样品冷藏0 d时与冷藏中后期差异较大, 这与细菌多样性和菌群结构的变化具有一致性。图3亦表明日本鲭和大黄鱼样品菌群组成也具有较大差异。

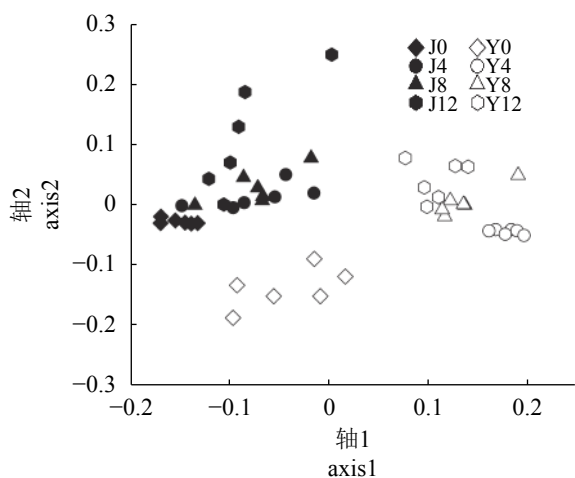


图3 日本鲭和大黄鱼冷藏过程中细菌群落组成的非度量尺度分析NMDS二维图

Fig. 3 Two-dimensional NMDS of bacterial community compositions of *S. japonicus* and *L. crocea* during refrigerated storage

将日本鲭和大黄鱼TVB-N含量与组胺含量分别与细菌群落之间进行皮尔森相关性分析, 在属水平上, 挑选相对丰度>1%,  $r>0.4$ ,  $P<0.05$ 的相关细菌。皮尔森分析检测到日本鲭中与TVB-N产生的相关菌共11种, 其中呈正相关的主要来源于 $\gamma$ -变形菌纲( $\gamma$ - Proteobacteria)和梭菌纲(Clostridia), 呈负相关的主要源自 $\gamma$ -变形菌纲; 这11株

菌中, 有9种与组胺产生具有相关性; 大黄鱼中TVB-N产生相关菌共7种, 主要有伦茨氏菌属(*Lentzea*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)等, 但未检测出具有组胺相关性的细菌(表3)。

## 2.5 KGEE功能预测

利用细菌群落功能预测工具PICRUST对日本鲭和大黄鱼肌肉中细菌群落进行功能预测, 预测到的基因功能中, 代谢功能所占比例最大, 分别为48.59%和46.19%; 与代谢相关的基因主要是氨基酸代谢、碳水化合物代谢、能量代谢、辅酶因子及维生素代谢、脂质代谢和核酸代谢等(图4)。实验发现, 2种鱼在整个冷藏过程中均有大量代谢相关基因分布, 其中氨基酸代谢显著高于其他代谢通路。随着冷藏时间的延长, 日本鲭中代谢基因丰度不断降低, 而在大黄鱼中, 冷藏初期基因丰度显著降低, 到冷藏后期逐渐趋于稳定。整个冷藏过程中日本鲭样品各个代谢相关基因丰度均显著高于大黄鱼( $P<0.05$ ), 说明日本鲭肌肉中能够进行蛋白质、碳水化合物、脂类等物质代谢的微生物比大黄鱼丰富。

将日本鲭和大黄鱼中的氨基酸、碳水化合物和脂类的代谢相关基因相对丰度分布特征用热图展示(图5)。除Y0和J12样品外, 2种鱼肌肉中代谢相关基因均能基本按照鱼种进行聚类, 冷藏0 d时聚合在一起, 表明日本鲭冷藏0和12 d与大黄鱼冷藏0和4 d时肌肉细菌代谢相关基因相对丰度类似。在氨基酸代谢通路中, 氨基酸相关酶代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢为最主要的代谢类别。其中, 日本鲭与大黄鱼肌肉中精氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸等氨基酸代谢基因相对丰度均随着冷藏时间的延长而降低。另外, 日本鲭肌肉中参与组氨酸代谢、精氨酸代谢及脯氨酸代谢的基因相对丰度整体上极显著高于大黄鱼( $P<0.01$ )。碳水化合物代谢通路中, 主要以丁酸丁酯代谢、丙酸酯代谢及丙酮酸代谢等为主, 且随着冷藏时间的延长, 2种鱼中的微生物代谢基因丰度均不断降低。

## 3 讨论

鱼肌肉中内源酶和微生物能够分解蛋白质和氨基酸等营养物质, 导致微生物数量增加, 碱性胺类物质积累, 鱼体腐败加深<sup>[27]</sup>。日本鲭为

表3 皮尔森分析挑选日本鲭和大黄鱼冷藏过程中TVB-N及组胺产生相关菌

Tab. 3 Pearson analysis selected TVB-N and histamine production related bacteria of *S. japonicus* and *L. crocea* during refrigerated storage

物种 species	与组胺产生相关 associated with histamine				与TVB-N产生相关 associated with TVB-N			
	细菌种类 bacteria name	<i>r</i>	<i>P</i>	细菌种类 bacteria name	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	
日本鲭 <i>S. japonicus</i>	弧菌科 Vibronaceae	0.61	<0.01	弧菌科 Vibronaceae	0.61	<0.01		
	梭状芽孢杆菌 Clostridium	0.55	<0.01	梭状芽孢杆菌 Clostridium	0.43	0.04		
	莫拉氏菌属 Moraxellaceae	-0.55	0.005	莫拉氏菌属 Moraxellaceae	-0.63	<0.01		
	黄杆菌属 Flavobacterium	-0.42	0.04	黄杆菌属 Flavobacterium	-0.69	<0.01		
	嗜冷杆菌属 Psychrobacter	-0.57	<0.01	嗜冷杆菌属 Psychrobacter	-0.78	<0.01		
	假交替单胞菌属 Pseudoalteromonas	-0.47	0.02	假交替单胞菌属 Pseudoalteromonas	-0.62	0.001		
	肉食杆菌属 Carnobacterium	-0.59	<0.01	肉食杆菌属 Carnobacterium	-0.67	<0.01		
	<i>Aliivibrio</i>	0.65	0.04	克雷伯氏菌属 Klebsiella	-0.56	0.04		
	梭菌属 Fusobacteria	0.49	0.04	不动杆菌属 Acinetobacter	-0.44	0.03		
	节杆菌属 Arthrobacter	-0.46	0.02	梭菌属 Fusobacteria	0.43	0.04		
大黄鱼 <i>L. crocea</i>				节杆菌属 Arthrobacter	-0.72	<0.01		
				伦茨氏菌属 Lentzea	0.61	0.01		
				短杆菌属 Brevibacterium	-0.52	<0.01		
				棒状杆菌属 Corynebacterium	-0.62	0.01		
				嗜皮菌属 Dermatophilus	0.69	<0.01		
				迪茨氏菌属 Dietzia	-0.51	0.01		
				戈登氏菌属 Gordonic	0.78	<0.01		
				土壤球菌属 Agrococcus	0.71	<0.01		

注：“*r*”表示样本相关系数，“*P*”表示整体相关系数

Notes: "*r*" denotes the correlation coefficient of the sample, and "*P*" represents the overall correlation coefficient

典型青皮红肉鱼，在冷藏过程中更易受微生物污染而引起腐败。本研究中，日本鲭的pH、TVB-N、组胺、菌落总数等均比大黄鱼高，表明日本鲭的腐败速率高于大黄鱼。且在储藏过程中，2种鱼的这些指标均先缓慢上升，后期上升速率增加，表明日本鲭和大黄鱼在储藏后期腐败加剧。

冷藏过程中2种鱼细菌多样性变化差异较大，日本鲭肌肉中多样性变化比大黄鱼更复杂。冷藏初期，日本鲭肌肉中营养物质丰富，微生物快速繁殖，多样性增加；随着冷藏时间的延长，由于微生物菌群间的竞争和抑制作用<sup>[27]</sup>，在竞争中优势菌占主导，抑制其他微生物的增长，导致微生物多样性降低。大黄鱼肌肉中微生物菌群丰度与多样性相对稳定，多样性变化不显著。Silbande等<sup>[28]</sup>对有氧冰藏的热带黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)片多样性进行研究，发现

鱼片多样性整体呈先下降后上升再下降的趋势。谢萍等<sup>[29]</sup>通过研究散装卤鸭在4℃贮藏期间的微生物变化规律，发现冷藏过程中细菌多样性整体呈下降趋势。Xiao等<sup>[30]</sup>对浙江肴肉中微生物多样性进行研究，发现冷藏过程中细菌多样性持续增加。不同学者研究发现不同食品冷藏期间的细菌多样性有所差异，主要受原料特性、包装条件、冷藏周期等因素影响。本研究中日本鲭与大黄鱼的原料特性不同可能是导致多样性差异的主要原因。

从门水平分析，冷藏过程中2种鱼肌肉优势菌均为变形菌门和厚壁菌门，在细菌群落组成的优势种群也比较相似，但相对丰度存在差异。薛静<sup>[31]</sup>对章鱼贮藏过程中的细菌群落进行研究，同样发现变形菌门、厚壁菌门为优势微生物菌群。曹荣等<sup>[32]</sup>对牡蛎冷藏过程中菌相变化研究亦

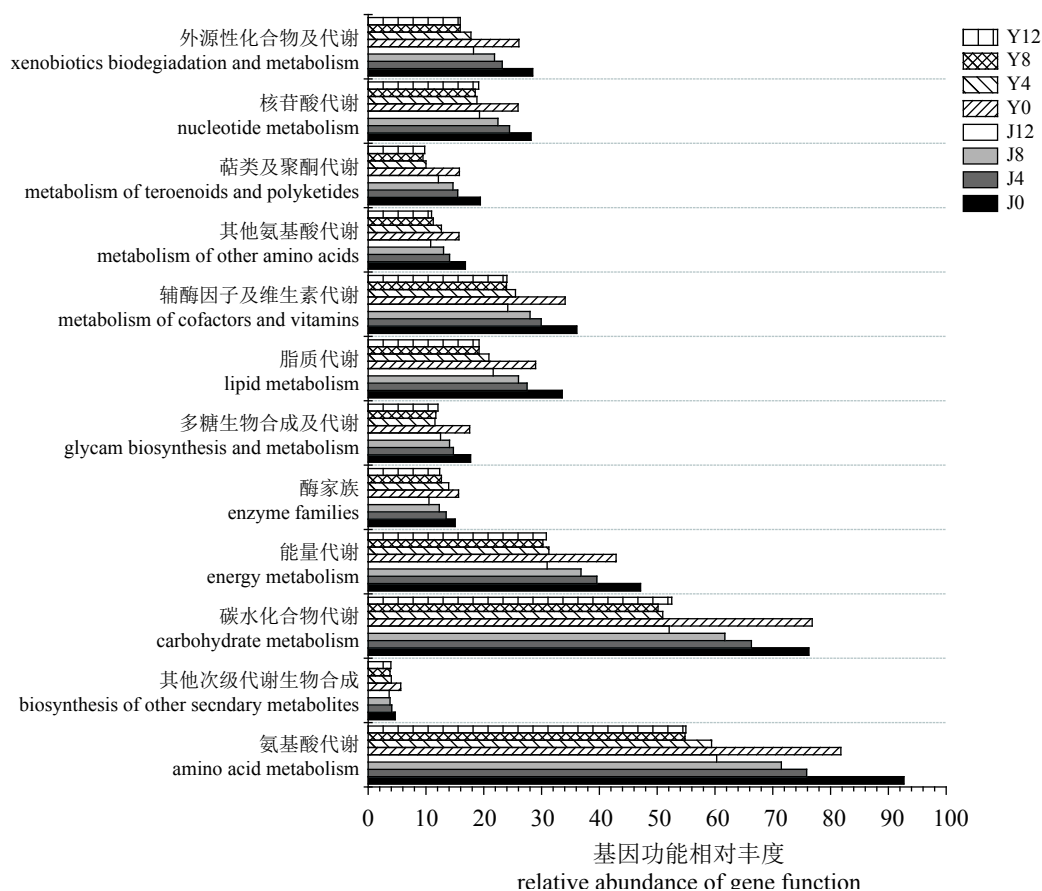


图 4 日本鲭和大黄鱼冷藏过程中细菌群落代谢分类功能预测

Fig. 4 Categories of functions related to metabolism of bacterial community in *S. japonicus* and *L. crocea* during refrigerated storage

得到同样结果。变形菌门和厚壁菌门可能是海产品腐败过程中的主要细菌门类, 对其品质变化具有重要作用。在属水平上, 冷藏期间, 日本鲭与大黄鱼肌肉中的优势菌群均为希瓦氏菌属, 是有氧冷藏海水鱼类的主要腐败菌, 能够将氧化三甲胺(TMAO)还原为三甲胺(TMA), 使鱼体产生异味。郑振霄等<sup>[15]</sup>研究冷海水保存下日本鲭菌相变化时, 发现希瓦氏菌是该条件下的优势腐败菌。Li等<sup>[24]</sup>对大黄鱼微生物群落进行分析时, 同样发现希瓦氏菌在储藏过程中处于优势地位。由此推测希瓦氏菌属是日本鲭和大黄鱼冷藏过程中的特定腐败菌。本研究发现, 发光杆菌属、嗜冷杆菌属、假单胞菌属均为在日本鲭和大黄鱼冷藏过程中起主要作用的腐败菌。发光杆菌具有较强的CO<sub>2</sub>耐受性, 冷藏中后期, O<sub>2</sub>大量消耗, 形成缺氧环境, 部分需氧菌逐渐消亡, 导致发光杆菌属快速繁殖。在2种鱼冷藏中后期, 发光杆菌相对丰度分布较高, 可作为2种鱼中的

次要优势腐败菌。嗜冷杆菌是典型的耐寒性好氧菌, 产生脂肪水解酶<sup>[33]</sup>, 导致油脂水解, 使鱼体产生腥臭味和霉味。假单胞菌属是水产品贮藏过程中常见的腐败菌, 由许多易引起食品腐败的嗜冷菌组成, 能产生蛋白水解酶, 使海产品快速腐败, 从而影响货架期<sup>[32, 34]</sup>。因此, 除了低温保藏以外, 还可以通过抑制鱼肉中优势细菌生长的方法进行水产品保鲜。如蓝麴青等<sup>[35]</sup>利用壳聚糖、茶多酚、溶菌酶制成复配保鲜剂抑制水产品中希瓦氏菌的生长。

本研究中, 假单胞菌的相对丰度变化与2种鱼TVB-N和组胺变化具有一致性。且通过皮尔森相关性分析, 结果表明嗜冷杆菌属与假单胞菌属均与日本鲭TVB-N和组胺变化具有显著相关性。此外, 日本鲭肌肉中, 弧菌科、梭菌属等12种细菌与TVB-N的产生呈显著正相关。弧菌科相对丰度处于较低水平, 但在冷藏后期不断累积。这是因为弧菌种类较多, 分解蛋白能力较强<sup>[32]</sup>,



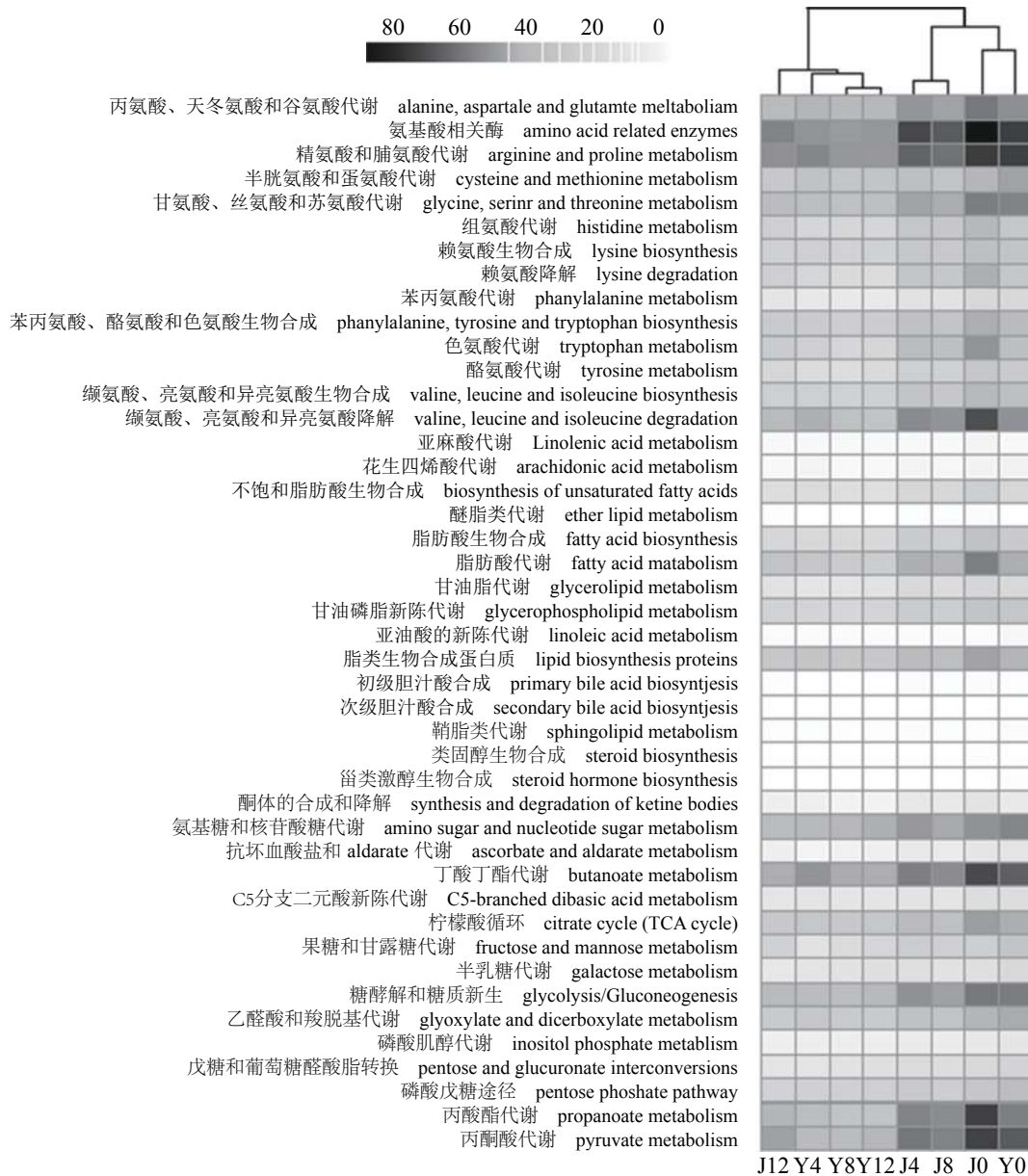


图 5 日本鲭和大黄鱼冷藏过程中细菌氨基酸、碳水化合物和脂类代谢分类功能预测

Fig. 5 Functional prediction of bacterial community of amino acids, carbohydrates and lipid metabolism in *S. japonicus* and *L. crocea* during refrigerated storage

易分解鱼肉蛋白，与TVB-N产生相关性；且其属于嗜温菌，冷藏前期低温能够抑制它的生长，少数细菌适应低温环境，后期丰度增加。除克雷伯氏菌属和不动杆菌属外，本研究中另外10种TVB-N相关菌均与组胺的产生具有显著相关性，其中弧菌、梭菌等也是文献报道的水产品中常见的组胺产生菌<sup>[36-37]</sup>。大黄鱼冷藏过程中，与TVB-N产生相关的细菌有7种，但未筛选到组胺相关菌，可能是因为大黄鱼这一类白肉鱼肌肉中游离氨基酸含量较低，具有组氨酸脱羧酶活

性的微生物的相对丰度较低，这与冷藏过程中大黄鱼组胺含量较低的结果一致。本研究中，包括莫拉氏杆菌属、假单胞菌在内的6种细菌均与组胺的产生呈显著负相关，说明鱼肉中不仅存在组胺产生菌，还存在组胺降解菌，目前已有学者对其进行研究<sup>[38-39]</sup>。

鱼肉的腐败过程，随着氨基酸和蛋白质分解，常伴随着大量代谢产物的生成。细菌作用下，鱼肌肉中氨基酸分解产生TVB-N、组胺等代谢物。2种鱼中均有大量代谢相关基因的分布，

其中丰度最高的代谢途径为氨基酸代谢。Stellato等<sup>[40]</sup>和Ge等<sup>[41]</sup>对猪肉、牛肉和火腿细菌功能进行预测,亦发现各个代谢功能中氨基酸代谢比例最大,由此推测鱼类、肉类等高脂、高蛋白食品中,氨基酸代谢基因丰度占据优势。与大黄鱼相比,日本鲭属于典型的青皮红肉鱼,鱼体富含游离氨基酸,冷藏过程中极易受弧菌、梭菌属等微生物污染而产生大量代谢产物。随着冷藏时间的延长,代谢相关基因相对丰度随之降低,2种鱼肌肉中细菌氨基酸代谢能力也逐渐降低。可能原因是,在冷藏过程中,2种鱼肌肉中的优势细菌增加,冷藏中后期,细菌多样性下降,群落结构趋于简单,导致氨基酸代谢相关菌减少,故相关基因相对丰度降低。在整个冷藏过程中,日本鲭肌肉中组氨酸代谢功能基因丰度极显著高于大黄鱼( $P<0.01$ ),细菌群落组氨酸代谢活力较强,极易利用鱼肉中的组氨酸进行代谢产生组胺等有毒物质,对食品的食用安全造成威胁。以丁酸丁酯代谢、丙酸酯代谢及丙酮酸代谢等为主的碳水化合物代谢也组成了2种鱼肌肉中微生物代谢功能的一部分,这说明鱼肌肉中微生物也具有分解碳水化合物的能力,但随着冷藏时间的延长,细菌多样性降低,碳水化合物代谢的能力随之下降。除对2种鱼类肌肉的研究外,程三红等<sup>[42]</sup>采用相同的研究手段比较了日本鲭与大黄鱼冷藏过程中体表微生物群落和代谢功能的变化。肌肉中微生物多样性变化比体表中复杂,这与肌肉营养成分比体表更加丰富,为微生物生长繁殖提供更多底物有关。同时,在门水平,二者具有相似的菌群,但鱼肌肉与体表具有不同的腐败特性,因此在相对丰度上存在差异。在属水平,2种鱼优势腐败微生物存在差异,日本鲭肌肉中主要腐败微生物为希瓦氏菌,体表中主要为嗜冷杆菌。在代谢水平,肌肉中微生物代谢更为迅速,且筛选出更多组胺和TVB-N相关菌。鱼类体表微生物在鱼体腐败过程中起着至关重要的作用,而肌肉微生物的变化反映腐败进程。本研究从水产品腐败进程的角度,比较2种鱼冷藏过程中微生物群落变化及代谢差异,为针对水产品特定部位的优势腐败微生物开发相应的保鲜技术提供参考。

综上所述,冷藏过程中,日本鲭的腐败速率较同一时刻大黄鱼快;2种鱼肌肉中优势腐败菌均为希瓦氏菌属,但日本鲭的细菌群落变化

比大黄鱼更复杂,且日本鲭冷藏过程中肌肉部分微生物具有组胺产生相关性。2种鱼冷藏过程中,氨基酸为最主要的代谢通路,且日本鲭肌肉中氨基酸代谢和碳水化合物代谢相关基因丰度均高于大黄鱼,这从微生物代谢水平解释了日本鲭比大黄鱼更易腐败的原因。水产品腐败与微生物群落变化及相应功能变化密切相关,本实验为水产品加工贮藏过程中的腐败特性及其变化方面的研究提供了新思路。

#### 参考文献:

- [1] Parlapani F F, Kormas K A, Boziaris I S. Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(12): 2386-2394.
- [2] 夏秀东,刘小莉,王英,等. 常温条件下白鱼中特定腐败菌的鉴定[J]. *食品科学*, 2016, 37(19): 183-189.  
Xia X D, Liu X L, Wang Y, *et al.* Identification of specific spoilage organisms in whitefish at room temperature[J]. *Food Science*, 2016, 37(19): 183-189(in Chinese).
- [3] 叶雷,闫亚丽,陈庆森,等. 高通量测序技术在肠道微生物宏基因组学研究中的应用[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(7): 216-223.  
Ye L, Yan Y L, Chen Q S, *et al.* Application of high-throughput sequencing technology in studying matagenomics of intestinal microbiota[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(7): 216-223(in Chinese).
- [4] You J, Wu G, Ren F P, *et al.* Microbial community dynamics in baolige oilfield during MEOR treatment, revealed by Illumina MiSeq sequencing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(3): 1469-1478.
- [5] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. *Isme Journal Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2012, 6(8): 1621-1624.
- [6] 戴文芳,郭永豪,郁维娜,等. 三门湾近海有机污染对浮游细菌群落的影响[J]. *环境科学*, 2017, 38(4): 1414-1422.

- Dai W F, Guo Y H, Yu W N, *et al.* Effects of coastal organic pollution on bacterioplankton community in Sanmen bay[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(4): 1414-1422(in Chinese).
- [7] Zhu J Y, Dai W F, Qiu Q F, *et al.* Contrasting ecological processes and functional compositions between intestinal bacterial community in healthy and diseased shrimp[J]. *Microbial Ecology*, 2016, 72(4): 975-985.
- [8] Johnston D, Earley B, Cormican P, *et al.* Illumina MiSeq 16S amplicon sequence analysis of bovine respiratory disease associated bacteria in lung and mediastinal lymph node tissue[J]. *Bmc Veterinary Research*, 2017, 13: 118-135.
- [9] 焦晶凯, 莫蓓红. Illumina MiSeq平台高覆盖率测定干酪中的细菌微生物多样性[J]. *中国酿造*, 2014, 33(5): 34-38.
- Jiao J K, Mo B H. Bacteria diversity of cheeses with high coverage by Illumina MiSeq platform[J]. *China Brewing*, 2014, 33(5): 34-38(in Chinese).
- [10] 谢萍, 徐明生, 尹忠平, 等. MiSeq测序研究散装酱卤鸭肉贮藏期间微生物群落多样性[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(11): 120-126.
- Xie P, Xu M S, Yin Z P, *et al.* MiSeq sequencing to study the diversity of microflora in bulk-marinated duck meat during storage[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(11): 120-126(in Chinese).
- [11] 智楠楠, 宗凯, 杨捷琳, 等. Illumina MiSeq平台深度测定酸奶中微生物多样性[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(24): 78-82.
- Zhi N N, Zong K, Yang J L, *et al.* Microbial diversity of yogurt depth detected by Illumina MiSeq platform[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(24): 78-82(in Chinese).
- [12] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 814-821.
- [13] 蒋倩倩. 不同贮藏温度下鲈鱼组胺及产组胺菌的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012: 12-22.
- Jiang Q Q. Study on histamine and histamine-producing bacteria in mackerel during different storage temperatures[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2012: 12-22(in Chinese).
- [14] 李学英, 许钟, 杨宪时, 等. 大黄鱼腐败菌腐败能力分析与特定腐败菌鉴别[J]. *上海海洋大学学报*, 2010, 19(4): 547-552.
- Li X Y, Xu Z, Yang X S, *et al.* Analysis of microbial spoilage ability and characterization of specific spoilage organism for *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2010, 19(4): 547-552(in Chinese).
- [15] 郑振霄, 周聃, 冯俊丽, 等. 冷海水保藏下鲈鱼(*Pneumatophorus japonicus*)菌相变化规律及优势腐败菌的分离鉴定[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(4): 81-86.
- Zheng Z X, Zhou D, Feng J L, *et al.* Microflora composition variation in mackerel (*Pneumatophorus japonicas*) stored in refrigerated seawater, and isolation and identification of the dominant spoilage bacteria[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(4): 81-86(in Chinese).
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009. 237-2016食品安全国家标准食品中pH值的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of PRC. GB 5009. 237-2016 Determination of pH in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2017(in Chinese).
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009. 228-2016食品安全国家标准食品中挥发性盐基氮的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of PRC. GB 5009. 228-2016 Determination of the volatile base nitrogen in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2017(in Chinese).
- [18] Patange S B, Mukundan M K, Kumar K A. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh[J]. *Food Control*, 2005, 16(5): 465-472.
- [19] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 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]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission, State Administration of food and Drug Administration. GB 4789. 2-2016. National food safety standard food microbiological examination: Aerobic plate count[S]. Beijing: China Standards Press, 2017(in Chinese).
- [20] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.

- [21] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, *et al.* PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(2): 266-267.
- [22] McDonald D, Price M N, Goodrich J, *et al.* An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea[J]. *ISME Journal*, 2012, 6(3): 610-618.
- [23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2733-2015食品安全国家标准鲜、冻动物性水产品[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.  
National Health and Family Planning Commission of PRC. GB 2733-2015 National food safety standard food-fresh and frozen animal aquatic products[S]. Beijing: China Standards Press, 2016(in Chinese).
- [24] Li T T, Li J R, Hu W Z. Changes in microbiological, physicochemical and muscle proteins of post mortem large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. *Food Control*, 2013, 34(2): 514-520.
- [25] Shakila R J, Vijayalakshmi K, Jeyasekaran G. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature[J]. *Food Chemistry*, 2003, 82(3): 347-352.
- [26] 胡月, 黄志勇. 柱前衍生HPLC同时测定鱼中多种生物胺及其变化规律[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(11): 142-147.  
Hu Y, Huang Z Y. Biogenic amines in fish determined by HPLC with pre-column dansylation[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(11): 142-147(in Chinese).
- [27] Zhao F, Zhou G H, Ye K P, *et al.* Microbial changes in vacuum-packed chilled pork during storage[J]. *Meat Science*, 2015, 100: 145-149.
- [28] Silbände A, Adenet S, Smith-Ravin J, *et al.* Quality assessment of ice-stored tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and influence of vacuum and modified atmosphere packaging[J]. *Food Microbiology*, 2016, 60: 62-72.
- [29] 谢萍, 徐明生, 尹忠平, 等. MiSeq测序研究散装酱卤鸭肉贮藏期间微生物群落多样性[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(11): 120-127.  
Xie P, Xu M S, Yin Z P, *et al.* MiSeq sequencing to study the diversity of microflora in bulk-marinated duck meat during storage[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(11): 120-127(in Chinese).
- [30] Xiao X, Dong Y, Zhu Y, *et al.* Bacterial diversity analysis of zhenjiang yao meat during refrigerated and vacuum-packed storage by 454 pyrosequencing[J]. *Current Microbiology*, 2013, 66(4): 398-405.
- [31] 薛静. 不同贮藏温度下即食生制章鱼品质变化及其菌相分析[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2016: 50-67.  
Xue J. Changes of quality and microflora of instant octopus products at different storage temperatures[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2016: 50-67(in Chinese).
- [32] 曹荣, 张井, 孟辉辉, 等. 高通量测序与传统纯培养方法在牡蛎微生物群落分析中的应用对比[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 137-141.  
Cao R, Zhang J, Meng H H, *et al.* Microbial flora analysis of oyster: a comparison between traditional plate culture method and high throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 137-141(in Chinese).
- [33] Wu G B, Zhang X N, Wei L, *et al.* A cold-adapted, solvent and salt tolerant esterase from marine bacterium *Psychrobacter pacificensis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 81: 180-187.
- [34] von Neubeck M, Baur C, Krewinkel M, *et al.* Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 211: 57-65.
- [35] 蓝蔚青, 谢晶, 侯伟峰, 等. 复合生物保鲜剂对腐败希瓦氏菌的抑菌机理[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(1): 186-192.  
Lan W Q, Xie J, Hou W F, *et al.* Anti-bacterial mechanism of composite biological preservative against *Shewanella putrefaciens*[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 28(1): 186-192(in Chinese).
- [36] 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.
- [37] Middlebrooks B L, Toom P M, Douglas W L, *et al.* Effects of storage time and temperature on the microflora and amine-development in spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*)[J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53(4): 1024-1029.
- [38] Sato T, Fujii T, Masuda T, *et al.* Changes in numbers of histamine-metabolic bacteria and histamine content

- during storage of common mackerel[J]. *Fisheries Science*, 1994, 60(3): 299-302.
- [39] Sato T, Okuzumi M, Masuda T, *et al.* Distribution and genus/species composition of histamine-decomposing bacteria during storage of common *Mackerel*[J]. *Fisheries Science*, 1995, 61(1): 83-85.
- [40] Stellato G, Stora A L, Filippis F D, *et al.* Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 4045-4054.
- [41] Ge Q F, Gu Y B, Zhang W G, *et al.* Comparison of microbial communities from different Jinhua ham factories[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 37-45.
- [42] 程三红, 汤海青, 欧昌荣, 等. 鲈鱼和大黄鱼冷藏期间体表细菌群落组成和代谢功能的比较分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(19):225-232.
- Cheng S H, Tang H Q, Ou C R, *et al.* Comparison of composition and function related to metabolism of the skin bacterial community between mackerel and large yellow croaker during refrigerated storage[J]. *Food Science*, 2018, 39(19):225-232(in Chinese).

## Comparative analysis of the spoilage characteristics of *Scomber japonicus* and *Larimichthys crocea* during refrigerated storage by Illumina Miseq sequencing technology

ZHANG Mengsi<sup>1</sup>, TANG Haiqing<sup>2</sup>, OU Changrong<sup>1\*</sup>, CHENG Sanhong<sup>1</sup>

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Faculty of Food Science, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

**Abstract:** To compare microbial community structure, diversity and metabolic potential, and analyze their relationships with the spoilage characteristic between *Scomber japonicus* and *Larimichthys crocea*, Illumina MiSeq sequencing technology was used to sequence the 16S *rRNA* V3-V4 hypervariable region of bacteria, and the physicochemical and microbiological indices including pH, total volatile basic nitrogen (TVB-N), histamine and aerobic plate count (APC) were detected. The correlation between microbes and fish spoilage and histamine producing was investigated by Pearson analysis, and the relationship between bacterial community composition and metabolic function was also predicted by phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states (PICRUST). The results showed that the pH, TVB-N, histamine content and APC in both fish fillets increased with the storage time extension, however their values in *S. japonicus* fillet increased faster and kept higher than those in *L. crocea* throughout storage. TVB-N and histamine content reached 76.34 mg/100 g, 59.92 mg/100 g in *S. japonicus*, while 59.98 mg/100 g, 3.11 mg/100 g in *L. crocea* at the end of storage, respectively. An increase tendency was observed in richness and diversity of bacteria in *S. japonicus* muscle and then followed by a decrease during the storage, while a sustained increase tendency was observed in that of *L. crocea*. *Shewanella* was the dominant bacteria in fillets of both *S. japonicus* and *L. crocea*. Twelve types of bacteria in *S. japonicus* were screened as TVB-N correlation bacteria, ten of which also showed significant correlation with the histamine producing, meanwhile seven types of bacteria in *L. crocea* were screened as TVB-N correlation bacteria, however, no bacterium showed correlation with histamine producing. Amino acid metabolism and carbohydrate metabolism were higher than other metabolism during the storage. The abundance of function genes related to amino acids metabolism and carbohydrate metabolism in *S. japonicus* was enormously higher than that in *L. crocea* throughout the storage period such as histidine, arginine and proline metabolism and butanoate metabolism, propanoate metabolism and pyruvate metabolism, respectively. This may partially explain why *S. japonicus* was more perishable than *L. crocea* from the level of metabolism of the bacterial community. Our study provided a new method to understand the spoilage characteristics of different aquatic products from the perspective of bacterial community and their metabolism related function genes.

**Key words:** *Scomber japonicus*; *Larimichthys crocea*; bacterial community; spoilage; Illumina Miseq sequencing; metabolism related function gene

**Corresponding author:** OU Changrong. E-mail: ouchangrong@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China(31271890, 31501519); Zhejiang Public Welfare Research Project (GN18C200033); Ningbo City Science and Technology Bureau of Agriculture Major Preferential Commissioned Projects (2012C10024); Ningbo Science and Technology Bureau Fumin Project (2017C10029); Ningbo University Research Fund (xkzsc1524)