

# 淡腌青鱼中木糖葡萄糖球菌碳源代谢能力研究

郭全友<sup>1</sup> 董艺伟<sup>1,2</sup> 李保国<sup>2</sup> 王磊<sup>1</sup> 姜朝军<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

**摘要:** 为探究淡腌青鱼的腐败与其微生物代谢能力的关系, 利用 Biolog GEN III 微孔板对淡腌青鱼货架期终点的特定腐败菌(木糖葡萄糖球菌)在 5、15、25、33℃ 4 种温度下的碳源利用情况进行研究, 采用修正的 Gompertz 模型对代谢曲线进行拟合, 并以平均颜色变化率(AWCD)为指标研究其代谢速率, 分析木糖葡萄糖球菌利用碳源能力的动力学特征。结果表明: 木糖葡萄糖球菌能利用糖、氨基酸和羧酸类等碳源; 相同温度下木糖葡萄糖球菌对碳源的代谢能力由大到小依次为糖、羧酸、氨基酸, 其中单糖(葡萄糖、甘露糖)、双糖(蔗糖、海藻糖)、多糖及其糖类衍生物(N-乙酰-β-D-甘露糖胺、β-甲酰-D-葡萄糖)、氨基酸(谷氨酸、丝氨酸)和羧酸(L-乳酸)的代谢较强。木糖葡萄糖球菌在 25℃ 下的延滞期最短, 进入指数期最快。通过对木糖葡萄糖球菌在不同温度下各种碳源代谢能力的分析, 为优化产品配方有效抑制微生物的活动、延长产品货架期提供理论依据。

**关键词:** 淡腌青鱼; 碳源代谢; 葡萄糖球菌; 动力学模型

中图分类号: TS254.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2016)10-0258-09

## Potential of *Staphylococcus xylosus* Isolated from Lightly Salted *Mylopharyngodon piceus* to Utilize Carbon Sources

Guo Quanyou<sup>1</sup> Dong Yiwei<sup>1,2</sup> Li Baoguo<sup>2</sup> Wang Lei<sup>1</sup> Jiang Chaojun<sup>1</sup>

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

2. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** With the purpose to investigate the relationship between spoilage and bacterial metabolism in lightly salted *Mylopharyngodon piceus*, Biolog GEN III microplate was used to understand the carbon metabolism of predominant spoilage bacteria, *Staphylococcus xylosus*, at 5°C, 15°C, 25°C and 33°C, respectively, and the growth curve of *Staphylococcus xylosus* was fitted with the modified Gompertz model. In addition, the metabolic rate was measured by using average well color development (AWCD) as indicator to describe its dynamic properties of carbon utilization. The results showed that saccharides, carboxylic acids and amino acids were utilized by *Staphylococcus xylosus* with degressive utilization ratio at the same temperature. Among carbon substrates, monosaccharides (e.g., glucose and mannose), disaccharides (e.g., sucrose and trehalose), polysaccharides and sugar derivatives (e.g., N-Acetyl-β-D-Mannose amine and β-Methyl-D-Glucoside), amino acids (e.g., glutamate and serine) and carboxylic acids (e.g., L-lactate) were dramatically metabolized. The lag phase of *Staphylococcus xylosus* was the shortest at 25°C, thus the exponential phase was reached fast. Overall, the present study focused on carbon utilization and metabolism of *Staphylococcus xylosus* at different temperatures to provide a theoretical basis for inhibition of microbial activity by optimizing formula and extension of shelf life of lightly salted *Mylopharyngodon piceus*. It was proposed that Biolog GEN III microplate could be applied to

收稿日期: 2016-07-25 修回日期: 2016-08-28

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31371867)、上海市自然科学基金项目(16ZR1444900)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2011M04)

**作者简介:** 郭全友(1974—),男,副研究员,主要从事水产品加工与安全保障研究,E-mail: dhsguoqy@163.com

**通信作者:** 李保国(1961—),男,教授,主要从事食品和农产品加工技术研究,E-mail: lbaoguo@usst.edu.cn

establishment of bacterial predictive model combining simultaneous investigation on microbial activity of carbon sources utilization and metabolism.

**Key words:** lightly salted *Mylopharyngodon piceus*; carbon metabolism; *Staphylococcus xylosum*; dynamic modeling

## 引言

水产品在腐败过程中会受到微生物、脂肪氧化、环境等因素的影响,其中微生物的活动是导致水产品腐败的主要原因。水产类食品品质不稳定,内源蛋白酶较活跃,容易招致微生物的污染,表现为微生物的代谢过程能够分解糖类、蛋白质和脂肪等物质,产生挥发性异臭味物质,导致产品品质下降,货架期缩短。20 世纪 90 年代, DALGAARD<sup>[1]</sup> 提出了特定腐败菌 (Specific spoilage organisms, SSO) 的概念,这是一类在食品腐败过程中占有优势腐败地位的致腐细菌。由于受到环境因素、贮藏条件的影响,不同的水产品具有不同的特定腐败菌,郑振霄等<sup>[2]</sup> 通过选择性培养基和 16S rDNA 序列分析法,探究鲑鱼在冷海水保鲜过程中的菌相变化,确定了鲑鱼在冷海水保鲜条件下的特定腐败菌为希瓦氏菌;唐文静等<sup>[3]</sup> 对冷藏海鲈鱼特定腐败菌进行了鉴定,确定了海鲈鱼在 4℃ 冷藏条件下代谢能力最强的菌株是草莓假单胞菌。微生物在生长过程会受到 pH 值、温度和水分活度等因子影响,同时也会受相溶性溶质的反向作用,需要消耗能量来维持内部平衡。细菌在实现内部平衡过程中,当能量耗尽时,其生长将得到有效抑制甚至死亡,因此,对不同温度下碳源利用能力和动力学分析,将为优化产品配方有效抑制细菌活动提供理论支持。

微生物代谢能力的分析方法有多种,其中中间产物检测以及关键酶活力测定法虽直接、准确,但操作复杂,实验条件要求较高。代谢通量分析法是根据代谢路径中各种反应的计量关系,以参与反应的某些底物、产物的通量及细胞组成等确定整个代谢网络的通量分布<sup>[4]</sup>。Biolog 检测系统是根据微生物对碳源的利用程度,描述微生物群体水平的生理功能及其多样性 (Community-level physiological profiling, CLPP) 的一种分析方法,是研究微生物代谢功能多样性的有效方法之一<sup>[5-6]</sup>。其原理是通过直接在微平板中进行针对微生物群体的培养,并实时监测吸光度变化来表征其生理特征。通常经过对一系列读数时间的平均颜色变化率 (Average well color development, AWCD)<sup>[7]</sup> 的差异来分析样品间微生物群落的不同。一般认为变化幅度较大的样品具有较高的碳源利用能力,同时具有较高的微生物

丰度。ZAK 等<sup>[8]</sup> 提出基于 Biolog 微平板的功能多样性指数的计算方法。研究者进而扩展出均匀度的概念,用以表征微生物对碳源的利用程度和利用模式。另外,其他基于整个培养过程动力学的比较也有应用。所有基于动力学的过程都需要连续的培养及吸光度读取,然后利用数学模型对代谢动力学曲线进行拟合,以有效预测结果的变化趋势<sup>[9]</sup>。

在国内外预测微生物学的研究中,模型拟合的目标一般为菌落数<sup>[10-12]</sup>。然而,以此建立的模型通常只能反映细菌种群数量的变化,不能够准确地反映出细菌能够利用的底物种类以及对于某种底物的利用、代谢水平。本文对不同温度下淡腌青鱼特定腐败菌木糖葡萄球菌的碳源代谢能力进行研究,运用 Biolog GEN III 微孔板分析木糖葡萄球菌对不同碳源的利用情况,采用预测模型对不同时间点的 OD 值进行拟合,通过拟合动力学模型和拟合优度评价,分析不同温度木糖葡萄球菌代谢力的差异性,为靶向抑制特定腐败菌导致的产品腐败提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

本实验所用菌株葡萄球菌 (DHS1) 分离自淡腌青鱼,经 16S rRNA 测序鉴定,与木糖葡萄球菌的相似指数大于 0.99,可认为是木糖葡萄球菌。菌株用甘油封存, -20℃ 冻干保藏,用前活化待用。

### 1.2 实验仪器

Biolog 微生物半自动鉴定仪,美国 Biolog 公司,其自动分析系统包括:浊度仪、读数仪、数据库软件、菌落放大灯和八通道电动移液器等配件。

### 1.3 实验方法

实验根据 Biolog GEN III 板操作说明 (美国 Biolog 公司),将培养好的菌株挑取单一菌落,调配菌悬液浓度 (占 Biolog 浊度仪透光率的百分比) 至 90% ~ 98%,用八通道电动移液器,将菌悬液按顺序加入微孔板中,在不同温度下进行培养。采用 OmniLog 读数仪读取数据,将结果与数据库进行比较鉴定。

#### 1.3.1 Biolog GEN III 板的底物信息

Biolog GEN III 板不需要预先测定菌株的革兰氏阴、阳性,可对微生物进行 94 种表型测试,包括 71

种碳源利用程度和 23 种化学敏感性测试。依据 Biolog GEN III 中给定的信息并结合文献[13]将 71 种碳源分为 6 大类,即:糖类 31 种,氨基酸类 10 种,己糖磷酸类 8 种,羧酸类 15 种,酯类 3 种,其他类 4 种。

### 1.3.2 显色反应的判断方法

BRADLEY 等<sup>[13]</sup>研究了应用孔数与多样性指数敏感度的关系,发现只有较少的孔数具有较高的敏感度,并建议在计算时只考虑阳性孔。以 A1 为阴性对照孔对 GEN III 微孔板 1~9 列中的碳源利用情况进行测试。依据 Biolog GEN III 板操作说明,当所有视觉上与 A1 孔的反应类似则定义为“阴性”反应,呈现较 A1 颜色深的紫色定为“阳性”反应,孔中较 A1 颜色较浅或者有紫色小色斑及其他杂物,则判定为“边界值”,由仪器系统进行自动辨别。

### 1.3.3 测定不同温度下每个碳源孔的 OD 值

淡腌青鱼在 5、15、25℃ 的贮藏温度下,货架期终点的特定腐败菌均为木糖葡萄球菌,所以实验选用木糖葡萄球菌为研究对象,选择实验温度为 5、15、25℃ 和测定菌株的标准温度 33℃。在所实验温度条件下,每隔 2 h 测一次吸光度(OD 值),共培养 64 h。

### 1.3.4 微生物对不同碳源利用情况

(1)通过曲线拟合法分析 Biolog 数据的原理来分析微生物对不同碳源的利用情况,拟合结果用积分面积  $S$  表示,计算公式<sup>[14]</sup>为

$$S = \sum_{i=1}^n \frac{v_i + v_{i-1}}{2} (t_i - t_{i-1})$$

式中  $v_i$ —— $t_i$ 时刻对应的光密度

$v_{i-1}$ —— $t_{i-1}$ 时刻对应的光密度

(2)平均颜色变化率计算公式为

$$N_{AWCD} = \sum (C - R) / n$$

式中  $N_{AWCD}$ ——平均颜色变化率

$C$ ——每个测试孔的吸光度

$R$ ——对照孔的吸光度

$n$ ——底物数量(GEN III 板, $n=71$ )

## 1.4 模型的构建

(1)生长动力学一级模型

对不同温度、不同培养时间的 OD 值采用修正的 Gompertz 模型进行拟合,计算公式为

$$\ln N_t = A + C' \exp(-\exp(\mu_{\max} e(\lambda - t) / C + 1)) \quad (1)$$

式中  $N_t$ —— $t$  时的 OD 值

$A$ ——最小 OD 值

$t$ ——时间, h

$C'$ ——评估得到的最大 OD 值与最小 OD 值

之差以  $e$  为底的对数值

$\mu_{\max}$ ——最大比生长速率,  $h^{-1}$

$\lambda$ ——延滞期, h

(2)生长动力学二级模型

温度对木糖葡萄球菌代谢影响的动力学模型由 Belehradck 平方根方程描述<sup>[13-14]</sup>。Behradck 方程是描述微生物在 0~40℃ 温度下,生长速率或延滞期倒数的平方根与温度之间线性关系的经验模型,关系式为

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b(T - T_{\min}) \quad (2)$$

$$\sqrt{1/\lambda} = b'(T - T'_{\min}) \quad (3)$$

式中  $b, b'$ ——方程常数

$T$ ——培养温度, °C

$T_{\min}, T'_{\min}$ ——微生物没有代谢活动时的温度<sup>[15]</sup>, °C

(3)模型验证

采用决定系数  $R^2$ 、均方误差  $M_{SE}$ 、准确度  $A_f$ 、精确度  $B_f$  进行评价。其中,  $R^2$  值越高( $0 < R^2 < 1$ ),预测模型越准确<sup>[16]</sup>。 $B_f < 1$ ,且数值越接近 1,准确性越好; $A_f > 1$ ,且数值越接近 1,准确性越好。

$$M_{SE} = \frac{\sum (u_A - u_B)^2}{n'} \quad (4)$$

$$B_f = 10^{\frac{\sum \lg \left| \frac{u_A}{u_B} \right|}{n'}} \quad (5)$$

$$A_f = 10^{\frac{\sum \lg \left| \frac{u_B}{u_A} \right|}{n'}} \quad (6)$$

式中  $u_A$ ——实测 OD 值

$u_B$ ——预测 OD 值

$n'$ ——测量个数

## 1.5 数据处理

使用软件 SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 对数据进行处理,模型拟合采用迭代法,差异显著性采用 one-way Duncan's ANOVA 程序执行,显著水平为  $p < 0.05$ ,极显著水平为  $p < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

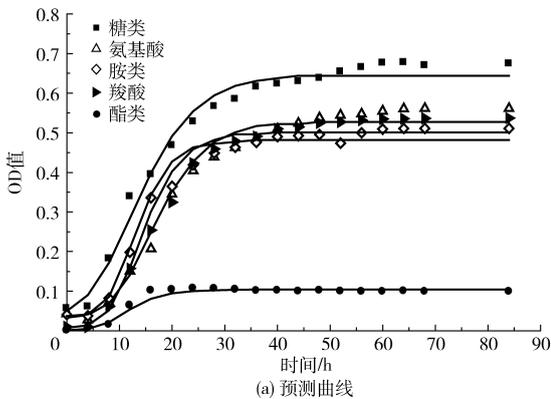
### 2.1 预测与实测碳源代谢强度的比较

Biolog GEN III 不同碳源孔内的吸光度变化曲线反映了微生物对相应碳源的代谢程度和利用过程<sup>[17]</sup>。33℃ 条件下,不同碳源孔内的吸光度随培养时间变化的曲线如图 1 所示。图 1a 和图 1b 分别是依据 Biolog 数据库中木糖葡萄球菌的碳源利用信息及实测情况绘制的木糖葡萄球菌预测的和实测的碳源代谢曲线。根据图 1a 可知,木糖葡萄球菌对碳源的利用情况:①对糖类的利用快,在培养开始后反应就以较快的速度进行,延滞期为 2.109 h,然后以指数形式增长,最大比生长速度为

0.413 h<sup>-1</sup>。44 h 后达到平衡,最大值为 0.644。

② 对氨基酸、胺类和羧酸的利用趋势近似,延滞期分别为 3.752、3.582、3.413 h,然后以较快的速度生长代谢,最大比生长速度为 0.181、0.246、0.166 h<sup>-1</sup>;分别在第 40、34、38 小时达到各自的最大值 0.522、0.482、0.502。③ 对酯类的利用程度较低,延滞期为 2.548 h,培养 16 h 后就达到了平衡。相比其他碳源的利用,木糖葡萄球菌对酯类的利用程度较小,且很快达到平衡。

培养时间的不同,微生物对碳源利用程度也不同。刘颖等<sup>[17]</sup>通过研究生物过滤器中微生物群落的代谢特性,发现微生物对 6 大类碳源的利用差异



较大,但并未表现出对某一类碳源的偏好。例如羧酸类中的衣康酸、D-半乳糖醛酸能很好地被微生物利用,而  $\gamma$ -羟丁酸则完全不能被利用。由图 1b 可以看出,木糖葡萄球菌对糖类利用的延滞期为 1.187 h;与预测状态下的利用情况相差不大。氨基酸和羧酸的延滞期分别为 12 h 和 14 h,然后以较快的速度增长 30 h 和 24 h 达到最大值分别为 0.440 和 0.549,达到平衡状态。胺类的利用较低,而对酯类一直处于不利用的状态,与预测状态下的利用存在一定的差异。研究结果与宋佳宇等<sup>[18]</sup>研究的土壤微生物群落代谢特征相似,存在较明的延滞期、指数期和稳定期。

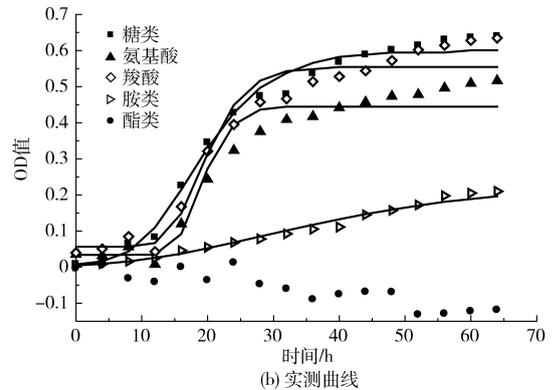


图 1 OD 值随培养时间的变化情况

Fig. 1 OD value changes during incubation of microbial

## 2.2 木糖葡萄球菌对三类碳源的代谢强度

从图 2 中可看出,木糖葡萄球菌对碳源利用强弱顺序依次为糖类、羧酸类、氨基酸。随着温度的升高对各种碳源的利用程度大体上均呈增加趋势。当温度升高到 25℃ 时,对糖类的代谢达到了最高,显著高于其他温度 ( $p < 0.05$ )。而木糖葡萄球菌对羧酸和氨基酸的整体代谢能力在不同温度下差异并不显著 ( $p > 0.05$ )。

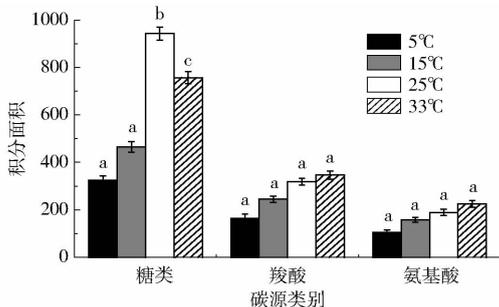


图 2 木糖葡萄球菌对不同碳源的利用情况 ( $n = 3$ )

Fig. 2 Utilization of *Staphylococcus xylosus* in different carbon sources ( $n = 3$ )

## 2.3 木糖葡萄球菌利用碳源能力的动力学特征

图 3 为不同温度下木糖葡萄球菌 AWCD 值随培养时间的变化。AWCD 是反应孔的平均吸光度,其随培养时间的变化是微生物碳源利用强度的反

映,反应孔的颜色变化越大说明对碳源代谢的越强烈,同时也是微生物活性的一个有效指标<sup>[19]</sup>。由图 3 可见,木糖葡萄球菌利用碳源的能力 (AWCD 值) 随培养时间的延长而增大,最大 OD 值区间为 0.27 ~ 0.39。5 ~ 33℃ 内,5℃ 的延滞期最长,  $\lambda = 6.12$  h;15℃ 次之,  $\lambda = 5.326$  h;33℃ 时  $\lambda = 4.280$  h;25℃ 时最短为 3.218 h,快速进入指数期,最大 OD 值为 0.389,表明温度对木糖葡萄球菌利用整体碳源能力有较显著影响 ( $p < 0.05$ )。

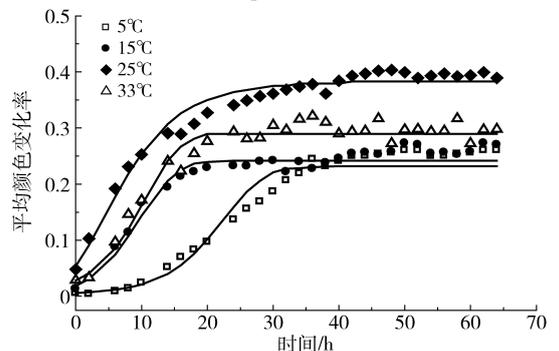


图 3 不同温度下木糖葡萄球菌平均颜色变化率随培养时间的变化

Fig. 3 AWCD changes during incubation of microbial community at different temperatures

## 2.4 温度对木糖葡萄糖球菌代谢能力动力学参数的影响

由表1可知,决定系数 $R^2$ 均在0.9以上,表明修正的Gompertz模型能很好地拟合不同温度下木糖葡萄糖球菌对碳源的代谢。温度对微生物的生长动力学影响需要用平方根模型来进行描述。公式

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0.0033(T + 11.21) \quad (7)$$

是利用平方根模型来描述温度与木糖葡萄糖球菌碳源代谢能力 $\mu_{\max}$ 的关系。该模型 $R^2 = 0.964$ ,表明在5~33℃范围内, $\sqrt{\mu_{\max}}$ 与 $T$ 呈良好的线性关系。

描述温度与木糖葡萄糖球菌碳源代谢能力 $\sqrt{1/\lambda}$ 关系的平方根模型为

$$\sqrt{1/\lambda} = 0.0028(T + 53.102) \quad (8)$$

该模型 $R^2 = 0.910$ ,表明在5~33℃范围内, $\sqrt{1/\lambda}$ 与 $T$ 呈良好的线性关系。

表1 不同温度下微生物生长代谢动力学模型的分析

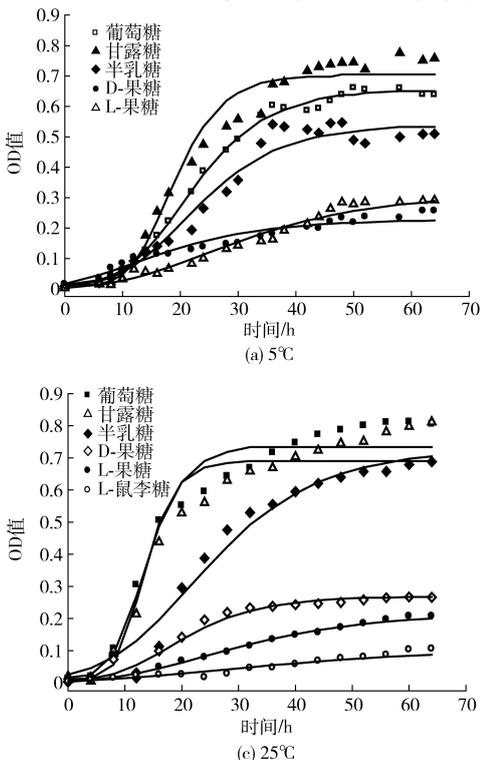
Tab.1 Analysis of microbial growth and metabolism kinetics model at different temperatures

温度/℃	$R^2$	$M_{SE}$	$B_f$	$A_f$
5	0.992	$3.960 \times 10^{-4}$	$0.998 \pm 0.022$	$1.002 \pm 0.040$
15	0.984	$3.960 \times 10^{-4}$	$0.998 \pm 0.012$	$1.002 \pm 0.035$
25	0.991	$2.550 \times 10^{-4}$	$0.998 \pm 0.010$	$1.002 \pm 0.038$
33	0.993	$1.508 \times 10^{-7}$	$0.986 \pm 0.009$	$1.012 \pm 0.036$

## 2.5 温度对木糖葡萄糖球菌碳源代谢能力的影响

### 2.5.1 不同温度下木糖葡萄糖球菌对单糖的代谢能力

图4为5、15、25、33℃温度条件下木糖葡萄糖球



菌对单糖的代谢随时间的变化情况。木糖葡萄糖球菌对单糖的利用整体上呈现“S”型曲线,且温度越高,代谢反应越强烈,到达平稳期的时间越短。5、15、25、33℃的平均延滞期 $\bar{\lambda}$ 和平均最大比生长速率 $\bar{\mu}_{\max}$ 分别为 $(5.536 \pm 0.382)$  h、 $(5.123 \pm 0.153)$  h、 $(4.031 \pm 0.81)$  h和 $(3.430 \pm 0.069)$  h以及0.247、0.287、0.346、0.392 h<sup>-1</sup>,不同温度下木糖葡萄糖球菌对单糖代谢的平均延滞期和平均最大比生长速率没有显著差异( $p > 0.05$ )。5℃温度下木糖葡萄糖球菌对不同单糖的代谢顺序依次为甘露糖、葡萄糖、半乳糖、L-果糖、D-果糖;15℃温度下的代谢顺序依次为甘露糖、葡萄糖、半乳糖、D-果糖、L-果糖、L-鼠李糖;25℃和33℃温度下的代谢顺序依次为葡萄糖、甘露糖、半乳糖、D-果糖、L-果糖、L-鼠李糖。说明木糖葡萄糖球菌对单糖的代谢能力受培养温度的影响较小。

### 2.5.2 不同温度下木糖葡萄糖球菌对双糖的代谢能力

由图5可知,温度越高代谢的趋势越平稳,呈明显的“S”型,有明显的延滞期,指数期和平稳期,且到达平稳期的时间越短。图5a显示,5℃条件下的 $\bar{\lambda} = (14.231 \pm 0.583)$  h,之后麦芽糖、海藻糖、乳糖、棉籽糖和蔗糖的代谢呈指数增长, $\mu_{\max}$ 分别为 $(0.178 \pm 0.030)$  h<sup>-1</sup>、 $(0.162 \pm 0.014)$  h<sup>-1</sup>、 $(0.270 \pm 0.023)$  h<sup>-1</sup>、 $(0.125 \pm 0.007)$  h<sup>-1</sup>和 $(0.194 \pm 0.013)$  h<sup>-1</sup>。乳糖和蔗糖的利用达到最大值后反应进入了平稳期,而麦芽糖、海藻糖和棉籽糖继续以指数形式增长。图5b显示,15℃条件下的 $\bar{\lambda} =$

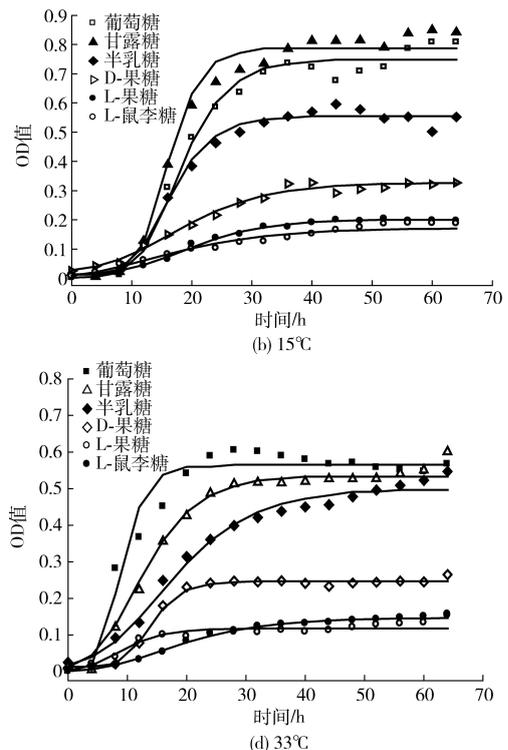


图4 不同温度条件下单糖的OD值随时间的变化曲线

Fig.4 Changes of OD value of monosaccharides with time at different temperatures

( $8.314 \pm 0.653$ ) h, 之后蔗糖、麦芽糖、乳糖、海藻糖和 D-松二糖的代谢呈指数增长, 棉籽糖和蜜二糖的增长较为缓慢,  $5^{\circ}\text{C}$  和  $15^{\circ}\text{C}$  的温度下木糖葡萄球菌对纤维二糖的代谢始终处于减低的水平。图 5c 显示,  $25^{\circ}\text{C}$  温度下的  $\bar{\lambda} = (6.344 \pm 0.257)$  h, 之后整体呈指数增长, 除纤维二糖较快的(第 20 小时)达到

了平衡, 其他双糖基本同步达到了代谢的最大值, 进入代谢的平稳阶段, 且  $\bar{\mu}_{\max} = (0.231 \pm 0.011)$   $\text{h}^{-1}$  (除纤维二糖)。图 5d 显示,  $33^{\circ}\text{C}$  温度下的  $\bar{\lambda} = (6.052 \pm 0.203)$  h,  $\bar{\mu}_{\max} = (0.191 \pm 0.008)$   $\text{h}^{-1}$ 。虽然整体代谢趋势下,  $33^{\circ}\text{C}$  下  $\bar{\mu}_{\max}$  小于  $25^{\circ}\text{C}$ , 但是温度越高, 对各双糖代谢的差异性越小。

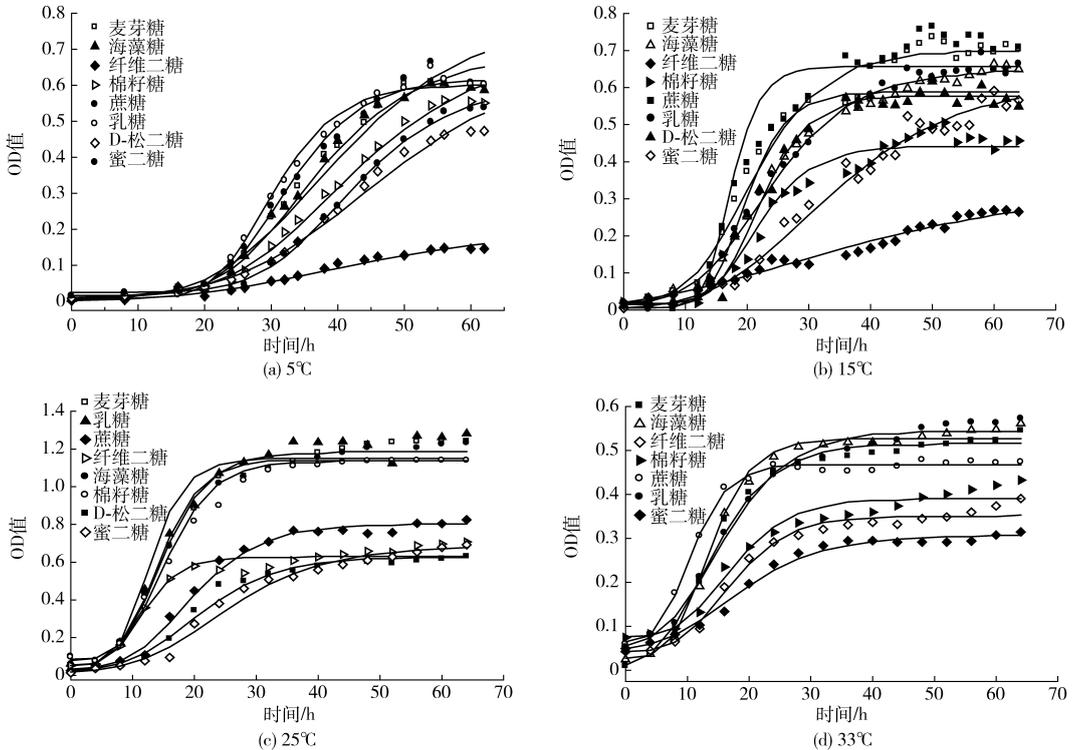


图 5 不同温度条件下双糖的 OD 值随时间的变化曲线

Fig. 5 Changes of OD value of disaccharides with time at different temperatures

### 2.5.3 不同温度下木糖葡萄球菌对多糖及糖类衍生物的代谢能力

图 6 是  $5^{\circ}\text{C}$ 、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $33^{\circ}\text{C}$  温度下木糖葡萄球菌对多糖及糖类衍生物的代谢情况。从图 6 中可以看出, 不同温度下木糖葡萄球菌对多糖和糖类衍生物的代谢规律与单糖和双糖的相似。 $5^{\circ}\text{C}$ 、 $15^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $33^{\circ}\text{C}$  温度下的  $\bar{\lambda}$  为 ( $11.531 \pm 0.472$ ) h、( $7.389 \pm 0.368$ ) h、( $3.959 \pm 0.178$ ) h 和 ( $2.717 \pm 0.103$ ) h;  $\bar{\mu}_{\max}$  为 ( $0.254 \pm 0.024$ )  $\text{h}^{-1}$ 、( $0.158 \pm 0.011$ )  $\text{h}^{-1}$ 、( $0.207 \pm 0.017$ )  $\text{h}^{-1}$  和 ( $0.195 \pm 0.007$ )  $\text{h}^{-1}$ 。 $5^{\circ}\text{C}$  温度下, 对 D-甘露醇和 N-乙酰- $\beta$ -D-甘露糖胺的代谢经过指数期后分别在第 56 小时和第 62 小时进入平稳期, 对  $\beta$ -甲酰-D-葡萄糖、D-水杨苷、N-乙酰-D-葡萄糖、D-阿拉伯糖、水苏糖和果胶的代谢一直呈增长趋势。 $15^{\circ}\text{C}$  温度下, 对 D-甘露醇、N-乙酰- $\beta$ -D-甘露糖胺和 D-水杨苷的代谢经过延滞期便进入指数期, 分别第 38、46、52 小时进入平稳期。对其他多糖及糖类衍生物的代谢呈平稳的上升趋势且代谢的强弱顺序依次为果胶、水苏糖、D-阿拉伯糖、 $\beta$ -甲酰-D-葡

糖。 $25^{\circ}\text{C}$  和  $33^{\circ}\text{C}$  温度下, 整体趋势是延滞期、指数期和平稳期, 对各种糖的代谢顺序依次为 N-乙酰- $\beta$ -D-甘露糖胺、D-水杨苷、N-乙酰-D-葡萄糖、D-阿拉伯糖、水苏糖、D-甘露醇和 N-乙酰- $\beta$ -D-甘露糖胺、 $\beta$ -甲酰-D-葡萄糖、D-水杨苷、D-阿拉伯糖、D-甘露醇、果胶、D-山梨醇、水苏糖。木糖葡萄球菌对多糖及糖类衍生物的代谢存在一定的差异性, 主要与培养的温度有关, 温度高代谢快, 食品腐败得也相对较快。

### 2.5.4 不同温度下木糖葡萄球菌对氨基酸的代谢能力

图 7 为不同温度下木糖葡萄球菌对氨基酸的代谢情况。 $15^{\circ}\text{C}$  温度下,  $0 \sim 15$  h 内 OD 值基本稳定, 代谢处于延滞期, 除 L-丙氨酸的其他氨基酸在第 20 ~ 44 小时缓慢上升,  $\mu_{\max} = 0.218$   $\text{h}^{-1}$  最终趋于稳定。 $5 \sim 33^{\circ}\text{C}$  内, 温度越高延滞期越短,  $25^{\circ}\text{C}$  和  $33^{\circ}\text{C}$  平均延滞期  $\bar{\lambda}$  为 ( $7.312 \pm 0.197$ ) h 和 ( $4.315 \pm 0.164$ ) h;  $\bar{\mu}_{\max}$  为 ( $0.307 \pm 0.01$ )  $\text{h}^{-1}$  和 ( $0.335 \pm 0.007$ )  $\text{h}^{-1}$ , 反应越剧烈达到平衡所需要的时间越短。

Biolog GEN III 微孔板有 10 种氨基酸, 其中 4

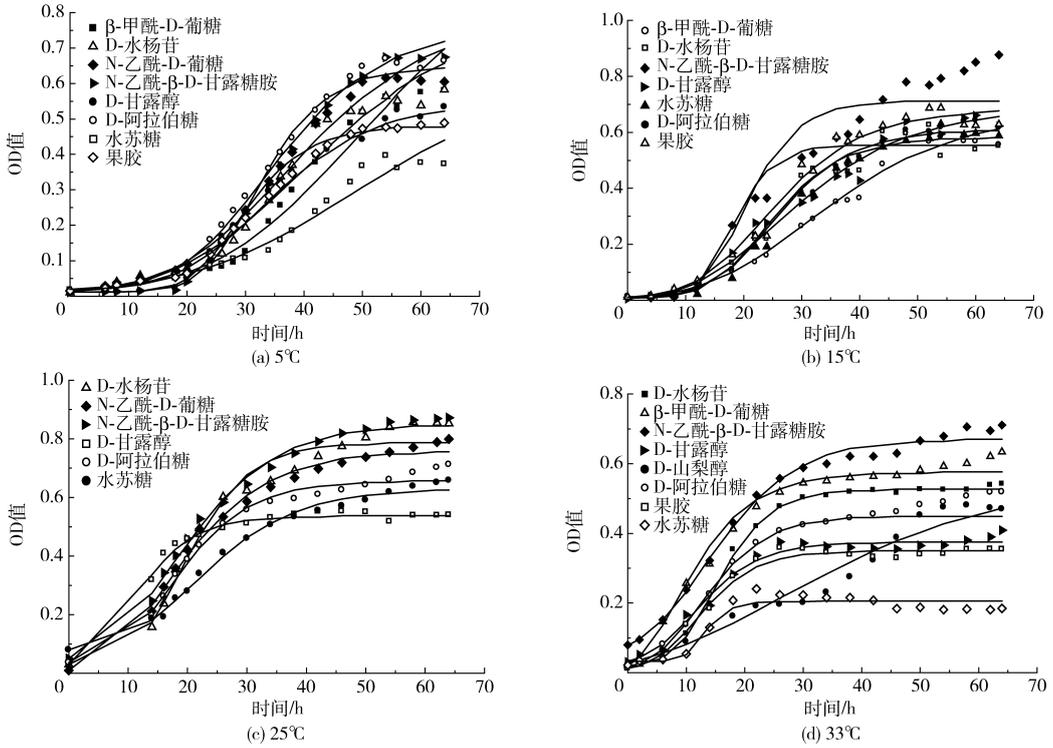


图6 不同温度下多糖及糖类衍生物的 OD 值随时间的变化曲线

Fig. 6 Changes of OD value of other polysaccharides and sugar derivatives with time at different temperatures

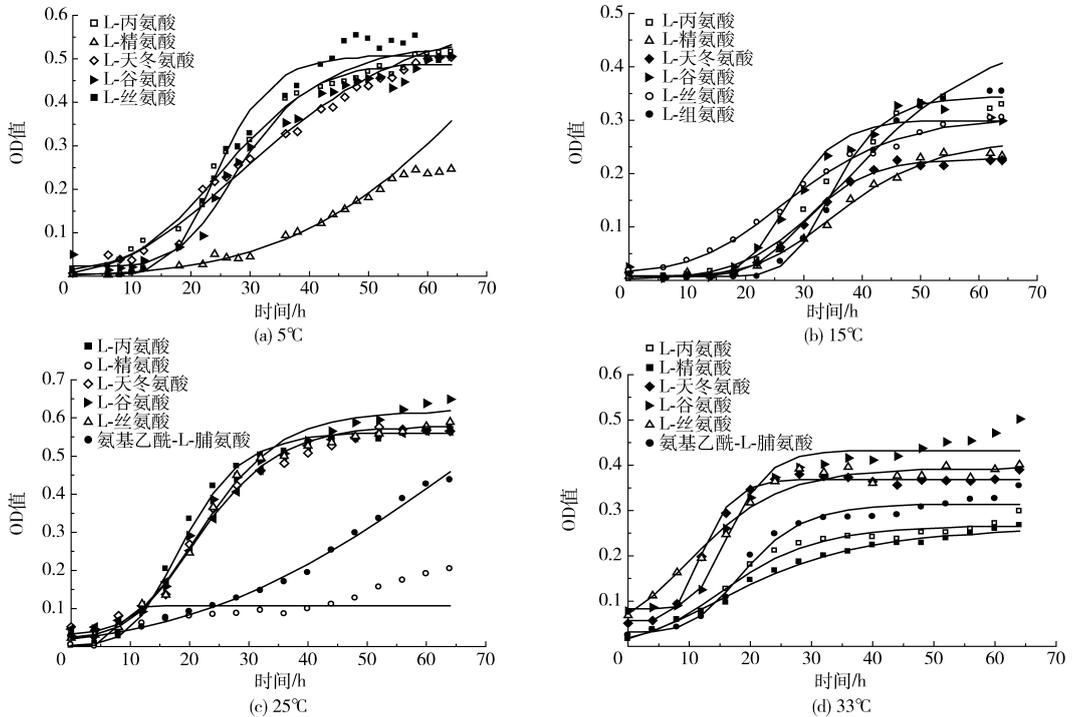


图7 不同温度下木糖葡萄糖菌对氨基酸的利用情况

Fig. 7 Utilization of *Staphylococcus xylosus* in amino acids at different temperatures

种氨基酸(L-丙氨酸、L-天冬氨酸、L-丝氨酸和L-谷氨酸)能很好地被木糖葡萄糖菌利用,L-精氨酸的利用程度较其他4种低,L-组氨酸在15°C的温度下可以被木糖葡萄糖菌利用,氨基乙酰-L-脯氨酸在25°C和33°C温度下可以被利用。其中L-丙氨酸属于脂肪族氨基酸,L-天冬氨酸和L-谷氨酸属于酸性氨基酸,L-丝氨酸属于含羟基的氨基酸,L-精氨酸

是碱性氨基酸。与李志裴等<sup>[6]</sup>对草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢的分析,刘颖等<sup>[17]</sup>对循环水养鳃系统生物过滤器中微生物群落的代谢特性分析时发现的微生物对氨基酸的利用基本一致。

### 2.5.5 不同温度下木糖葡萄糖菌对羧酸的代谢能力

图8为4种温度下木糖葡萄糖菌对羧酸的利用

情况。5、15、25、33℃的平均最大比生长速率 $\bar{\mu}_{\max}$ 分别为0.215、0.334、0.346、0.356 h<sup>-1</sup>,平均延滞期 $\bar{\lambda}$ 分别为9.868、13.465、4.943、1.152 h。5℃温度下木糖葡萄球菌对羧酸利用率从大到小依次为:L-乳酸(24.274%)、L-苹果酸(20.339%)、乙酰乙酸(14.494%)、D-葡萄糖醛酸(13.777%)、 $\alpha$ -酮-丁酸(10.794%)、 $\gamma$ -氨基-丁酸(10.111%)、 $\alpha$ -酮-戊二酸(6.211%)。15℃下的利用率依次为:L-乳酸(18.161%)、D-葡萄糖醛酸(16.093%)、L-苹果酸(15.145%)、乙酰乙酸(14.204%)、 $\gamma$ -氨基-丁酸

(13.826%)、 $\alpha$ -酮-丁酸(12.859%)、 $\alpha$ -酮-戊二酸(9.712%)。25℃温度下的利用率依次为:L-乳酸(19.298%)、D-葡萄糖醛酸(18.213%)、 $\gamma$ -氨基-丁酸(17.470%)、乙酰乙酸(14.126%)、 $\alpha$ -酮-丁酸(7.102%)、 $\alpha$ -酮-戊二酸(6.894%)。33℃的整体代谢情况与25℃的相似。每个温度下均对L-乳酸有较高的利用率。不同温度下每种羧酸的利用率没有一定的规律且不随温度的升高呈显现增长或下降的趋势。但是,木糖葡萄球菌对羧酸的整体利用率随温度的升高而增加。

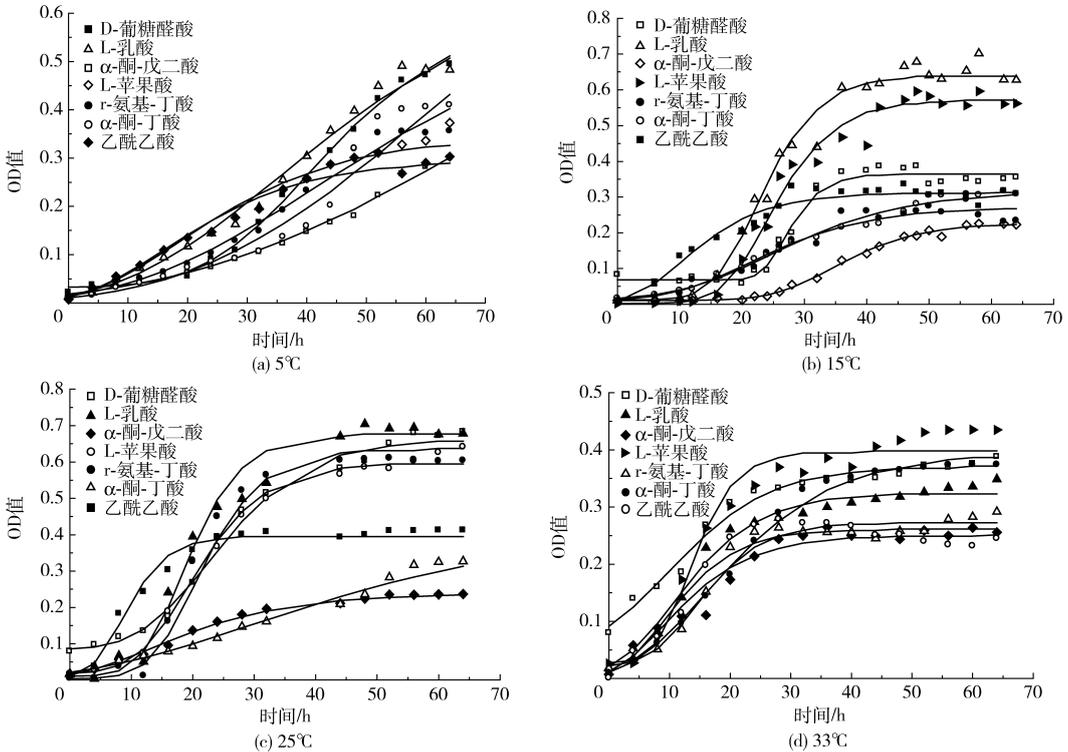


图 8 不同温度下木糖葡萄球菌对羧酸的利用情况

Fig. 8 Utilization of *Staphylococcus xylosus* in carboxylic acids at different temperatures

### 3 结论

(1)通过微孔板中颜色的变化选取木糖葡萄球菌能利用的碳源孔即颜色变化明显的孔,对选定孔的数据进行曲线拟合求面积。结果发现:4种温度下木糖葡萄球菌主要利用的碳源为糖类、氨基酸和羧酸3种,代谢强弱依次为为糖类、羧酸、氨基酸。

(2)通过对所有碳源孔进行平均吸光度的分析可知,温度对木糖葡萄球菌代谢强度的影响较大。25℃时其微生物的碳源代谢强度最大,延滞期短,进入指数期快。微生物代谢强度越大,产品腐败的速度就越大。

(3)对不同碳源的代谢数据进行模型拟合,木糖葡萄球菌对糖类碳源代谢能力强弱的顺序依次为5℃温度时甘露糖、葡萄糖、半乳糖、L-果糖、D-果糖;15℃温度时甘露糖、葡萄糖、半乳糖、D-果糖、L-果糖、L-鼠李糖;25℃和33℃温度条件下依次为葡萄糖、甘露糖、半乳糖、D-果糖、L-果糖、L-鼠李糖。随着温度的升高,对碳源利用的趋势基本保持不变,对糖类的代谢逐渐增强,对其他种类碳源代谢的最大值基本保持稳定(除25℃温度下,木糖葡萄球菌对双糖的代谢强度较其他温度较强),差异性不大。不同温度下对碳源的代谢情况随时间呈“S”型曲线,且温度越高,到达平稳期的时间越短,代谢反应越强烈。

### 参 考 文 献

- 1 DALGAARD P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 26(3): 319 - 333.

- 2 郑振霄,周聃,冯俊丽,等. 冷海水保藏下鲈鱼(*Pneumatophorus japonicus*)菌相变化规律及特定腐败菌的分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(4):81-86.  
ZHENG Zhenxiao, ZHOU Dan, FENG Junli, et al. Microflora composition variation in mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) 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)
- 3 唐文静,王楚文,柳云龙,等. 冷藏海鲈鱼特定腐败菌的筛选和鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(3):170-174.  
TANG Wenjing, WANG Chuwen, LIU Yunlong, et al. Isolation and identification of specific spoilage organisms in chilled seabass [J]. Food Science, 2016, 37(3):170-174. (in Chinese)
- 4 柏中中,许婷婷,何小丹,等. 利用 Biolog 系统进行乳酸生产菌代谢能力的快速分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3):347-351.  
BO Zhongzhong, XU Tingting, HE Xiaodan, et al. Fast analysis of metabolic abilities of lactate-producing bacteria by Biolog system [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(3):347-351. (in Chinese)
- 5 GROVE J A, KAUTOLA H, JAVADPOUR S, et al. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter [J]. Journal of Biochemical Engineering, 2004, 18(2):111-114.
- 6 李志斐,王广军,谢骏,等. 草鱼养殖池塘生物膜固着微生物群落碳代谢 Biolog 分析[J]. 水产学报, 2014, 38(12):1985-1995.  
LI Zhifei, WANG Guangjun, XIE Jun, et al. Microbial carbon metabolic characteristics of biofilm communities in the grass carp culture pond based on Biolog-ECO plates [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12):1985-1995. (in Chinese)
- 7 YU C, HU X M, DENG W, et al. Changes in soil microbial community structure and functional diversity in the rhizosphere surrounding mulberry subjected to long-term fertilization [J]. Applied Soil Ecology, 2015, 86:30-40.
- 8 ZAK J C, WILLING M R, MOORHEAD D L, et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26(9):1101-1108.
- 9 LUPWAYI N Z, ARSHAD M A, RICE W A, et al. Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management [J]. Applied Soil Ecology, 2001, 16(3):251-261.
- 10 BRIONES Lorena S, REYES Juan E, TABILO-MUNIZAGA Gipsy E, et al. Microbial shelf-life extension of chilled coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and abalone (*Haliotis rufescens*) by high hydrostatic pressure treatment [J]. Food Control, 2010, 21(11):1530-1535.
- 11 MYRSINI Kakagianni, MARIA Gougouli, KONSTANTIONS P Koutsoumanis. Development and application of geobacillus stearothermophilus growth model for predicting spoilage of evaporated milk [J]. Food Microbiology, 2016, 57:28-35.
- 12 修艳辉,郭全友,姜朝军. pH、水活度和 NaCl 对腐败希瓦氏菌生长/非生长界限及生长动力学参数的影响 [J]. 现代食品科技, 2016, 32(6):1-9.  
XIU Yanhui, GUO Quanyou, JIANG Chaojun. Effect of different environmental factors on *Shewanella putrefaciens*' growth under two counting methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6):1-9. (in Chinese)
- 13 BRADLEY R L, SHIPLEY B, BEAULIEU C. Refining numerical approaches for analyzing soil microbial community catabolic profiles based on carbon source utilization patterns [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(3):629-632.
- 14 董秀黄. 结合 BIOLOG 碳源筛选研究新疆两盐湖可培养嗜盐菌多样性 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2013.  
DONG Xiuhuang. Diversity of *Halophilic bacteria* in Xinjiang two salt lakes using an integrated approach of BIOLOG carbon source screening and culture-dependent methods [D]. Urumqi: Xinjiang University, 2013. (in Chinese)
- 15 贾夏,董岁明,周春娟. 微生物生态研究中 Biolog Eco 微平板培养时间对分析结果的影响 [J]. 应用基础与工程科学学报, 2013(1):10-19.  
JIA Xia, DONG Suiming, ZHOU Chunjuan. Effects of Biolog Eco-plates incubation time on analysis results in microbial ecology researches [J]. Journal of Basic Science and Engineering, 2013(1):10-19. (in Chinese)
- 16 邢少华,张小栓,马常阳,等. 波动温度下罗非鱼微生物生长动力学模型 [J]. 农业机械学报, 2013, 44(7):194-198.  
XING Shaohua, ZHANG Xiaoshuan, MA Changyang, et al. Microbial growth kinetics model of tilapia under variable temperatures [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(7):194-198. (in Chinese)
- 17 刘颖,李丽,孙大川,等. 循环水养鳗系统生物过滤器中微生物群落的代谢特性 [J]. 水产学报, 2015, 39(10):1539-1548.  
LIU Ying, LI Li, SUN Dachuan, et al. Carbon metabolism of microbial communities in biofilters of recirculating aquaculture system cultured with *Anguilla marmorata* [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(10):1539-1548. (in Chinese)
- 18 宋佳宇,陈梅梅,张海涛,等. 石油污染土壤微生物群落代谢特征分析 [J]. 环境科学与技术, 2013, 36(10):63-66, 136.  
SONG Jiayu, CHEN Meimei, ZHANG Haitao, et al. Metabolic characteristics of oil contaminated soil microbial communities [J]. Environmental Science and Technology, 2013, 36(10):63-66, 136. (in Chinese)
- 19 陈琳,谷洁,胡婷,等. 生物有机肥对板栗土壤微生物群落代谢活性的影响 [J]. 应用生态学报, 2013, 24(6):1627-1632.  
CHEN Lin, GU Jie, HU Ting, et al. Effects of biological organic fertilizer on microbial community's metabolic activity in a soil planted with chestnut (*Castanea mollissima*) [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(6):1627-1632. (in Chinese)