

充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼鲜度、微生物菌群及挥发性风味物质的影响

王菊元¹, 张毅¹, 刘婷婷¹, 艾有伟¹, 韩娅红¹, 侯温甫^{1,2,*}

(1.武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023; 2.湖北省荆楚特色食品产业技术研究院, 湖北 荆州 434000)

摘要:为延长黄颡鱼货架期,对黄颡鱼分别进行非充氮包装和充氮包装,测定其在4℃冷藏期间鲜度指标、微生物菌群及挥发性风味物质的变化。结果表明,充氮包装减缓了黄颡鱼冷藏期间的菌落总数、总挥发性盐基氮、pH值的生长速率,有效维持鱼肉的色度、硬度及感官品质,将黄颡鱼的货架期延长2 d左右。在冷藏期间,充氮包装影响了黄颡鱼的菌群结构变化,减缓了假单胞菌成为优势腐败菌的速度,特别是对冷藏第3天不动杆菌有极显著的抑制作用($P < 0.01$)。与非充氮组相比,充氮包装减少了黄颡鱼在冷藏过程中醇、醛、酮和酯的种类和含量。结合微生物群落与挥发性风味物质的冗余分析结果,假单胞菌和不动杆菌在风味变化中起着重要作用,与正辛醛、3-羟基-2-丁酮、3-甲基丁醇、1-辛醇等腐败标志物的产生呈正相关。因此,充氮包装能短期减缓优势腐败菌生长,从而延缓鲜度及风味劣变,是延长黄颡鱼货架期的一种简单有效方法。

关键词:充氮包装;黄颡鱼;鲜度;微生物群落;挥发性风味物质

Effects of Nitrogen Gas Packaging on Freshness, Microbial Flora and Volatile Flavor Compounds of *Pelteobagrus fulvidraco* during Cold Storage

WANG Juyuan¹, ZHANG Yi¹, LIU Tingting¹, AI Youwei¹, HAN Yahong¹, HOU Wenfu^{1,2,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Hubei Jingchu Specialty Food Industry Technology Research Institute, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Air-packaged and nitrogen-packaged *Pelteobagrus fulvidraco* were evaluated for changes in freshness indices, microbial flora and volatile flavor substances during cold storage at 4 °C. The results showed that nitrogen gas packaging slowed down the growth rate of total bacterial count (TBC), total volatile basic nitrogen (TVB-N) value and pH, effectively maintained the color, hardness and sensory quality, and prolonged the shelf-life of *P. fulvidraco* by two days. Nitrogen gas packaging affected the changes in the microfloral structure of *P. fulvidraco* during cold storage, and prevented *Pseudomonas* from becoming the dominant spoilage bacteria. Notably, it had a significant inhibitory effect on *Acinetobacter* on the 3rd day of cold storage ($P < 0.01$). Compared with the non-nitrogen group, nitrogen gas packaging reduced the types and contents of alcohols, aldehydes, ketones and esters in *P. fulvidraco* during the refrigeration process. The results of redundancy analysis (RDA) performed on microbial communities and volatile flavor substances showed that *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus immobilis* played an important role in the flavor changes, and were positively correlated with the production of spoilage markers such as *n*-octanal, 3-hydroxy-2-butanone, 3-methylbutanol and 1-octanol. Therefore, nitrogen gas packaging could slow down the growth of dominant spoilage bacteria for a short period, thus delaying the deterioration of the freshness and flavor of *P. fulvidraco*, which could be a simple and effective method to prolong the shelf-life of *P. fulvidraco*.

Keywords: nitrogen gas packaging; *Pelteobagrus fulvidraco*; freshness; microbial community; volatile flavor compounds

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230331-319

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)08-0238-10

收稿日期: 2023-03-31

基金项目: 湖北省科技计划项目(2021BED006);“十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0701001)

第一作者简介: 王菊元(2000—)(ORCID: 0000-0003-1314-1649),女,硕士研究生,研究方向为水产品贮藏与保鲜。

E-mail: 1724696138@qq.com

*通信作者简介: 侯温甫(1979—)(ORCID: 0000-0002-8084-3037),女,教授,博士,研究方向为畜禽水产质量控制。

E-mail: hwf407@163.com

引文格式:

王菊元, 张毅, 刘婷婷, 等. 充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼鲜度、微生物菌群及挥发性风味物质的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(8): 238-247. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230331-319. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Juyuan, ZHANG Yi, LIU Tingting, et al. Effects of nitrogen gas packaging on freshness, microbial flora and volatile flavor compounds of *Pelteobagrus fulvidraco* during cold storage[J]. Food Science, 2024, 45(8): 238-247. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230331-319. <http://www.spkx.net.cn>

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 俗称嘎牙子、黄姑、黄腊丁、黄鳍鱼等, 广泛分布于长江、黄河、珠江等流域, 因其肉质细嫩、无肌间刺、味道鲜美、无鳞片且营养丰富、药用价值高而备受消费者欢迎^[1]。然而黄颡鱼极易品质下降和腐败变质^[2], 从而造成经济损失。因此, 有必要开发一种保鲜技术保障黄颡鱼品质并延长其货架期。气调包装是一种通过调节包装中气体的成分和比例^[3], 最大程度保障食品品质的新型保鲜技术, 能避免低温保藏的保鲜时效短和化学保鲜易危害人体健康的缺点, 具有操作简便、保鲜时效长和绿色高效的优点, 在水产品保鲜领域具有广阔的应用前景^[4]。虽然气调包装应用于水产品的保鲜与包装方面的研究较多, 但主要侧重于三文鱼^[5]、带鱼^[6]和大黄鱼^[7]等海水鱼, 而关于淡水鱼的研究相对较少, 对于黄颡鱼是否起到类似效果有待于研究。此外, 黄颡鱼是一种肉质细嫩、无肌间刺和鳞片的淡水鱼, 其基质蛋白含量少, 将气调包装应用于黄颡鱼的保鲜与包装具有良好的实践价值, 此方面尚鲜见报道。

N₂是气调包装中最常用的气体, 价格低廉, 使用安全^[8], 已被用于延长三文鱼^[9]和金枪鱼^[10]等货架期。目前研究主要侧重于气调包装对水产品鲜度的影响, 而水产品鲜度变化与挥发性风味物质以及微生物菌群息息相关, 探讨充氮包装对黄颡鱼冷藏过程中微生物菌群和风味物质的影响, 有利于明晰充氮包装在冷鲜鱼肉中应用的价值以及可以进一步明晰其保鲜机理, 目前鲜有相关研究报道。

近年来, 新兴的高通量测序技术因其高效性和准确性常被用于研究鱼类贮藏期间微生物菌群的变化。Zheng Ruihang等^[11]发现在0℃冷链物流运输环境下马鲛鱼的优势腐败菌 (specific spoilage organism, SSO) 为假单胞菌属。Cao Rong等^[12]利用高通量测序技术发现嗜冷杆菌在经高压处理后的腐败牡蛎中比例较高, 而交替假单胞菌和希瓦氏菌在未经高压处理过的腐败牡蛎中占据主导地位。Huang Wenbo等^[13]发现在4℃贮藏期环境下杂交石斑鱼的优势腐败菌为假单胞菌, 而且假单胞菌的生长和繁殖会产生2-乙基-1-己醇、3-甲基-1-丁醇等物质, 从而导致鱼类的异味^[14]。此外, 其余微生物也会在鱼类腐败过程中产生具有特殊气味的含氮化合物、醛、酮和酯等化合物^[14-16]。因此, 研究充氮包装对黄颡鱼冷藏过程中挥发性风味物质和微生物菌群的内在联系, 有利于阐明充

氮包装的作用机制。此外, 气相色谱-离子迁移谱 (gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS) 是检测挥发性有机化合物的一种新兴的分析方法, 具有快速、灵敏和便捷等优势, 已被用于分析大菱鲆^[17]、鲢鱼^[18]、海参肽^[19]和鲟鱼^[20]贮藏过程中挥发性成分的变化。利用GC-IMS技术探究充氮包装对黄颡鱼冷藏过程中挥发性风味物质的影响具有重要意义, 尚鲜见相关研究报道。

综上所述, 本实验选用黄颡鱼作为研究对象, 现场宰杀后放入碎冰中, 在30 min内运回实验室。以白度、pH值、总挥发性盐基氮 (total volatile basic nitrogen, TVB-N) 值、菌落总数、代谢酶活力、感官评价来表征黄颡鱼的鲜度品质, 通过高通量测序分析了充氮包装对黄颡鱼冷藏期间细菌群落结构的影响, 同时利用GC-IMS技术分析充氮包装对黄颡鱼挥发性风味物质的影响, 并对微生物和挥发性风味物质之间的相关性进行分析。本研究结果可为充氮包装延长黄颡鱼货架期提供参考依据和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄颡鱼购自湖北省武汉市东西湖区常青花园商量贩超市。

平板计数琼脂 青岛海博生物技术有限公司; 糖原、乳酸、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 测定试剂盒 南京建成试剂有限公司; 其余试剂均为分析纯 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

立式压力蒸汽灭菌器、HRP-9082MBE型电热恒温箱 上海博迅公司; SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台 苏州净化公司; HBM-400D系列样品均质器 天津恒奥公司; XHF-D高速分散器 (内切式匀浆机) 宁波新芝生物科技公司; ST2100型实验室pH计、CP214 (C) 型电子天平 奥康斯仪器 (常州) 有限公司; LRH-100C型低温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; FlavourSpec[®]型GC-IMS仪 德国G.A.S.公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

购买49条质量约300 g、体长约25 cm的黄颡鱼，现场宰杀后放入装有碎冰泡沫箱中，在30 min内运回实验室。在无菌切割室将黄颡鱼用清水冲洗干净，沥干水分，随机分成两组。第1组为非充氮组，将黄颡鱼放置在包装盒上覆上保鲜膜进行包装；第2组为充氮组，将黄颡鱼放置在包装盒中充入100%氮气进行包装。所有样品包装完成后置于4℃环境下冷藏9 d，其中冷藏第0天的黄颡鱼样品编号为F_0；冷藏第3、5、7、9天的非充氮包装组的黄颡鱼样品分别命名为P_3、P_5、P_7、P_9；冷藏第3、5、7、9天的充氮包装组的黄颡鱼样品分别命名为M_3、M_5、M_7和M_9。

1.3.2 指标测定

1.3.2.1 白度

使用CR-400色差计分别测定样品的亮度（ L^* 值）、红度（ a^* 值）和黄度（ b^* 值），每个样品至少测定5个位点，取平均值。按下式计算白度：

$$\text{白度} = \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

1.3.2.2 pH值

参照GB 5009.237—2016《食品pH值的测定》方法测定pH值。

1.3.2.3 TVB-N值

按GB 5009.228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》中的半微量定氮法测定TVB-N值。

1.3.2.4 菌落总数

参考GB/T 4789.2—2016《食品微生物学检验 菌落总数测定》测定菌落总数。

1.3.2.5 代谢酶水平

采用相应试剂盒并根据其说明测定PK、LDH和CK 3种代谢酶的活力。

1.3.2.6 感官评价

参考Ozogul等^[21]的方法并略作修改。由5名受过专业培训的感官评定人员对黄颡鱼的气味、颜色、黏液、肌肉组织和弹性进行评分，其中10分为最优品质，分数越高表明黄颡鱼品质越好。

1.3.2.7 质构特性

鱼肉切成1 cm×2 cm×2 cm的长方块状，探头类型为P 100，测试前探头下降速率2 mm/s，测试速率1 mm/s，测试后探头回程速率5 mm/s。选用与鱼肉质构相关的硬度、咀嚼性、弹性及回复力4个参数进行研究。每组平行3次，取平均值。

1.3.2.8 挥发性风味物质

顶空进样条件：孵化温度60℃；孵化时间15 min；进样方式为顶空进样；加热方式为振荡加热；进样针温度60℃。

GC-IMS条件：色谱柱温度40℃；载气为高纯度N₂；载气流速程序：初始流速5.0 mL/min，保持3 min，8 min内线性升至50.0 mL/min，5 min内线性升至150.0 mL/min，保持3 min；总运行时间为19 min。漂移管温度45℃；漂移气为高纯度N₂；漂移气流速150 mL/min。

取3.0 g样品，放入20.0 mL顶空进样瓶中，经顶空进样，用FlavourSpec® GC-IMS仪进行测试。

1.3.2.9 微生物群落检测

每组样品在每个取样点取3份平行样品。在无菌超净工作台中，用无菌棉签蘸取无菌生理盐水将鱼的体表全部擦拭一遍，将棉签装入10 mL灭菌离心管后液氮速冻，-80℃保存备用。后续送至生物公司，基于二代测序平台，采用338F和806R引物对16S功能基因V3~V4区段聚合酶链式反应产物进行高通量测序。测序数据经过生物云平台进行分析。

1.4 数据分析与统计

所有指标重复测定3次，记录数据后采用SPSS 18.0统计分析软件进行数据分析，利用单因素方差分析中的Duncan多重比较法进行差异性比较，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示， $P < 0.05$ ，差异显著。

2 结果与分析

2.1 充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼理化指标的影响

白度可以量化色泽变化，主要与肌肉的组织结构、亚铁血红素和结合水含量有关^[22]。鱼肉的白度变化会影响水产品的感官品质及鲜度，影响消费者对鱼肉的接受度^[23-24]。由表1可以看出，在冷藏过程中，两组样品的白度值均有上升趋势。充氮包装组白度上升趋势缓慢，且在冷藏第7天和第9天白度显著低于非充氮组，说明充氮包装能减缓白度的变化，对贮藏过程中黄颡鱼的白度有维持作用。鱼肉的白度与鱼体内的水分和脂肪氧化程度有关^[25]。充氮包装对黄颡鱼的白度有维持作用可能是因为充入的氮气形成的低氧环境抑制了微生物生长繁殖和脂肪氧化。

表1 黄颡鱼在冷藏过程中白度、pH值、TVB-N值和菌落总数的变化
Table 1 Changes in whiteness, pH, TVB-N and TBC of *P. fulvidraco* during cold storage

冷藏 时间/d	白度		pH		TVB-N值/(mg/100g)		菌落总数 (lg (CFU/g))	
	非充氮组	充氮组	非充氮组	充氮组	非充氮组	充氮组	非充氮组	充氮组
0	47.84±0.98 ^a	47.84±0.98 ^a	7.01±0.08 ^b	7.01±0.08 ^b	10.43±0.30 ^{ab}	10.43±0.30 ^{ab}	3.29±0.30 ^c	3.29±0.30 ^c
1	53.79±0.83 ^b	51.84±1.39 ^b	7.11±0.09 ^{bc}	6.89±0.03 ^a	9.10±0.99 ^b	10.92±0.99 ^b	3.86±0.31 ^b	3.56±0.30 ^b
3	53.95±0.67 ^b	53.64±0.40 ^c	7.14±0.03 ^c	7.08±0.00 ^{bc}	10.03±0.58 ^b	8.63±0.40 ^a	5.10±0.31 ^d	4.54±0.08 ^c
5	55.25±0.23 ^d	55.46±0.36 ^d	7.03±0.07 ^b	7.03±0.07 ^b	9.80±1.40 ^b	10.92±0.40 ^b	6.80±0.10 ^e	6.51±0.10 ^f
7	57.43±0.76 ^e	54.27±0.27 ^c	7.08±0.07 ^{bc}	7.00±0.06 ^c	13.30±0.99 ^c	15.59±0.32 ^d	7.79±0.18 ^f	7.11±0.23 ^f
9	58.81±0.22 ^f	56.82±0.80 ^c	7.18±0.08 ^c	7.02±0.02 ^c	28.00±1.98 ^d	16.31±0.30 ^d	8.48±0.14 ^g	7.99±0.09 ^g

注：相同指标小写字母不同表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。表2同。

pH值的变化也可以在一定程度上反映水产品的新鲜度。由表1可知,充氮组在冷藏期间pH值基本保持稳定,且在贮藏期间pH值均低于非充氮组,这可能是因为充入氮气形成的低氧环境,有助于乳酸的积累。乳酸菌产生的乳酸对pH值的降低有一定的贡献。此外,鱼死后肌肉组织进行糖酵解生产乳酸,也会导致黄颡鱼的pH值下降。

TVB-N值是评价水产品鲜度的理化指标之一^[26],三甲胺、二甲胺、氨和其他挥发性碱性含氮化合物是TVB-N的主要成分^[27]。在贮藏前5 d,两组黄颡鱼的TVB-N值变化不大。在贮藏7 d后,两组黄颡鱼TVB-N值均开始急剧上升,并且非充氮组增长速度比充氮组快。非充氮组样品在贮藏第9天的TVB-N值为28.00 mg/100 g,远超出GB 2733—2015《鲜、冻动物性水产品》规定淡水鱼虾的TVB-N值不大于20 mg/100 g的要求。而在贮藏第9天时充氮组的TVB-N值仅为16.31 mg/100 g,未超国家限定标准。这表明高氮环境能够抑制TVB-N的产生,保障黄颡鱼的品质,延长保质期。

菌落总数是判断鱼肉新鲜度的重要指标。黄颡鱼的初始菌落总数为3.29 (lg (CFU/g)),两组黄颡鱼菌落总数均随着贮藏时间的延长而增加。充氮组在整个贮藏期间黄颡鱼的菌落总数始终低于非充氮组,贮藏第9天时,充氮组黄颡鱼的菌落总数为7.99 (lg (CFU/g)),低于非充氮组(8.48 (lg (CFU/g))),说明充氮包装能抑制微生物的生长,有利于延长黄颡鱼的货架期。

2.2 充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼代谢酶活力的影响

LDH活力变化可作为检测鱼肉变质,尤其是早期变质程度的重要指标^[28]。已有研究表明LDH是能量代谢中参与糖酵解的一种关键酶,在淡水鱼中具有较高活力,其活力变化将直接影响机体的能量代谢,而且与淡水鱼剪切力、白度等加工品质密切相关^[29-30]。因此,本研究测定了充氮包装对LDH以及其他两种糖酵解相关的限速酶的影响。如图1所示,随着贮藏时间的延长,充氮组和非充氮组黄颡鱼中PK、LDH和CK活力的变化趋势基本一致,CK活力先上升后下降,LDH和PK活力呈波动式下降。值得注意的是,非充氮组和充氮组CK活力在整个贮藏期间均没有显著差异。两组黄颡鱼PK活力在第1天和第3天出现显著差异,LDH活力在第1天和第5天出现显著差异,但这并不足以说明充氮包装会对酶的活力造成影响。LDH和CK是与能量代谢有关的重要酶,其较高活力有助于糖酵解的顺利进行和延缓pH值的下降^[31],其波动变化可能与糖及乳酸等能量物质的波动变化有关。曹丽^[32]研究也表明,牛宰后里脊部位的糖原显著下降后轻微上升然后趋于稳定,这可能是由于微生物的生长所致。综上所述,充氮包装没有对冷藏过程中黄颡鱼代谢酶活力产生影响,酶活力在冷藏期间的变化和两组之间的差异可能与微生物的生长以及代谢密切相关。

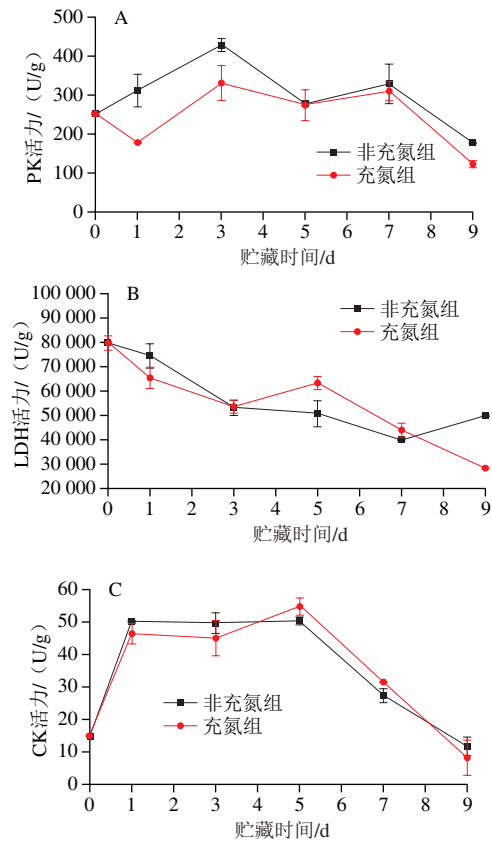
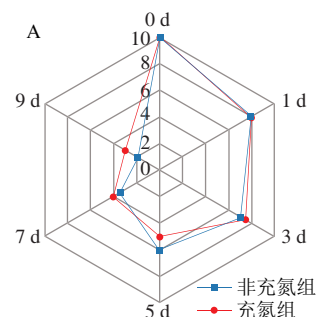


图1 黄颡鱼在冷藏过程中PK (A)、LDH (B) 和CK (C) 活力的变化

Fig. 1 Changes in activities of PK (A), LDH (B) and CK (C) in *P. fulvidraco* during cold storage

2.3 充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼感官评价的影响

冷藏期间黄颡鱼的感官评价结果见图2所示。第0天,两组黄颡鱼均表现出优异的感官品质,获得较高的感官评分。整个冷藏过程中,充氮组的黄颡鱼在颜色、黏液、弹性和肌肉组织方面的得分均高于非充氮组。在冷藏第5天时非充氮组黄颡鱼的颜色、黏液和弹性评分低于6分的限值,已经视为感官“不可接受”,而充氮组在第7天黏液、弹性的评分才超过限值。这说明充氮包装能在一定程度上延缓黄颡鱼感官品质劣变。基于感官评价指标可判断,非充氮组和充氮组黄颡鱼的货架期分别为3 d和5 d,充氮处理将冷鲜黄颡鱼的货架期延长了2 d左右。



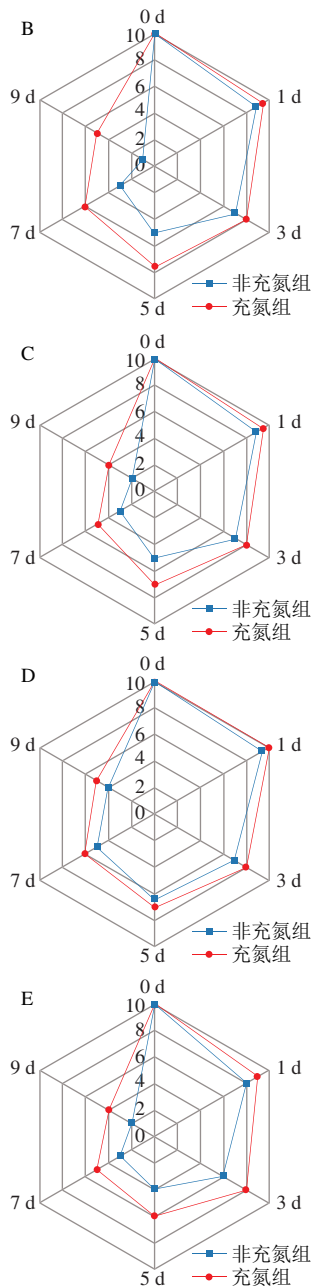


图2 黄颡鱼在冷藏过程中气味(A)、颜色(B)、黏液(C)、肌肉组织(D)和弹性(E)的感官评分变化

Fig. 2 Sensory scoring changes in smell (A), color (B), mucus (C), muscle tissue (D), and elasticity (E) of *P. fulvidraco* during cold storage

综合考虑感官、微生物和TVB-N指标,非充氮包装黄颡鱼货架期为3 d左右,充氮包装能减缓黄颡鱼的品质劣变,将货架期延长至5 d。

2.4 充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼质构特性的影响

如表2所示,在4℃贮藏条件下,充氮组的鱼肉硬度高于非充氮组,这可能是由于在微生物和酶的作用下,鱼体肌肉组织不断分解,导致鱼肉变软,硬度降低,而充氮组包装盒中没有氧气,会抑制微生物和酶的活性。此外,在贮藏期间,两组黄颡鱼肉的咀嚼性、弹性和回

复性均出现不同程度的下降,这可能是鱼肉中的蛋白质发生腐败使肌肉组织被破坏造成的。上述分析表明,在4℃贮藏过程中,充氮包装能在一定程度上延缓黄颡鱼的腐败变质。

表2 黄颡鱼在冷藏过程中质构特性的变化
Table 2 Changes in texture characteristics of *P. fulvidraco* during cold storage

指标	贮藏时间/d	充氮组	非充氮组
硬度/g	0	9 225.00±243.525 ^a	9 225.00±243.525 ^a
	3	9 465.86±633.10 ^b	7 327.47±947.17 ^b
	5	5 391.17±645.96 ^c	4 721.37±363.75 ^c
	7	7 223.90±569.81 ^b	5 652.83±332.27 ^c
	9	6 653.55±686.13 ^{bc}	4 823.08±255.69 ^c
弹性	0	0.45±0.14 ^a	0.45±0.14 ^a
	3	0.52±0.12 ^a	0.46±0.11 ^a
	5	0.39±0.14 ^a	0.39±0.04 ^a
	7	0.43±0.06 ^a	0.43±0.01 ^a
	9	0.34±0.11 ^a	0.50±0.09 ^a
咀嚼性/g	0	2 623.68±587.04 ^a	2 623.68±587.04 ^a
	3	841.45±117.50 ^b	900.25±197.99 ^b
	5	349.89±68.39 ^b	315.73±63.07 ^b
	7	700.64±187.47 ^b	538.86±65.33 ^b
	9	500.43±61.17 ^b	532.58±84.16 ^b
回复性	0	0.07±0.02 ^a	0.07±0.02 ^a
	3	0.05±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a
	5	0.06±0.02 ^a	0.05±0.02 ^a
	7	0.08±0.05 ^a	0.07±0.03 ^a
	9	0.05±0.01 ^a	0.06±0.02 ^a

2.5 充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼微生物菌群的影响

充氮组和非充氮组的黄颡鱼微生物在门水平上的群落分布如图3A所示。新鲜黄颡鱼中最主要的微生物是变形菌门(Proteobacteria, 21.3%)、拟杆菌门(Bacteroidota, 26.0%)和厚壁菌门(Firmicutes, 20.3%)。与初始黄颡鱼样品相比,在冷藏第3天,非充氮组和充氮组样品中变形菌门和拟杆菌门比例有所上升。在冷藏的过程中,变形菌门迅速发展成为绝对优势菌群,在冷藏第9天,充氮组和非充氮组样品中变形菌门分别占到细菌总数的90.6%和93.0%。

在属分类水平上分析充氮组和非充氮组的黄颡鱼微生物群落结构差异,其中主要优势菌的丰度差异如图3B所示。黄颡鱼贮藏第0天主要优势菌是黄杆菌属(*Flavobacterium*, 11.3%)、未分类的绒毛杆菌科(Muribaculaceae, 5.9%)、红育菌属(*Rhodoferrax*, 3.3%)和乳杆菌属(*Lactobacillus*, 3.0%)。冷藏第3天,充氮组黄颡鱼样品的主要优势菌是黄杆菌属(45.4%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*, 14.7%)和气单胞菌属(*Aeromonas*, 22.7%),非充氮组黄颡鱼样品的主要优势菌是黄杆菌属(40.0%)、不动杆菌属

(35.7%)和假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 5.9%), 充氮组中假单胞菌和不动杆菌的占比明显低于非充氮组。冷藏第9天, 充氮组和非充氮组黄颡鱼样品的主要优势菌均为假单胞菌属(分别为36.4%和43.2%)和不动杆菌属(分别为41.7%和37.9%)。从菌落组成结果可以看出, 充氮组在冷藏第3天对黄颡鱼样品中的微生物组成产生了很大影响, 随后不动杆菌属和假单胞菌属的比例随贮藏时间的延长而增加。值得注意的是, 黄杆菌属虽然在贮藏第3天成为两组样品中的优势菌, 但是在腐败样品中的比例大幅下降, 表明其在冷藏过程中不如假单胞菌和不动杆菌有竞争力。

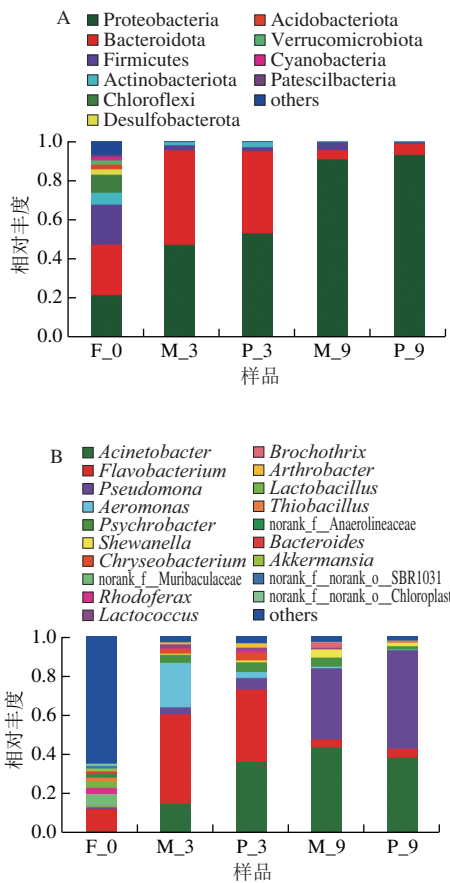


图3 黄颡鱼在门水平(A)和属水平(B)上微生物群落组成
 Fig. 3 Microbial community composition in *P. fulvidraco* at phylum (A) and genus (B) levels

图4显示了聚类热图分析的结果, 类间距离为0.5。选取丰度前25的细菌属的操作分类单元、数据绘制热图。根据聚类热图可以将样品分为4类: 1) 0 d样品; 2) 充氮组3 d样品; 3) 非充氮组3 d样品; 4) 充氮组和非充氮组第9天样品。充氮组和非充氮组在贮藏第9天的样品可聚为一类, 而充氮组和非充氮组在贮藏第3天的样品可聚为两类。这一结果表明, 充氮包装对冷藏3 d的黄颡鱼菌群结构影响更为显著。

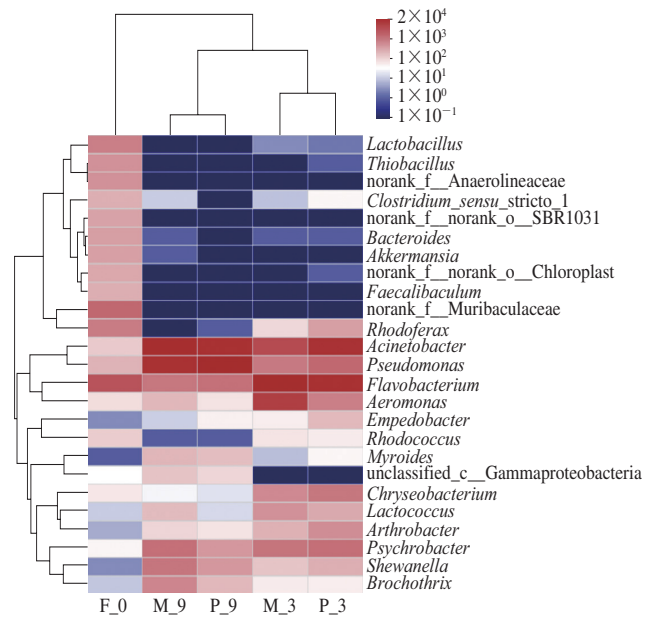


图4 黄颡鱼在冷藏过程中微生物群落组成聚类热图
 Fig. 4 Heatmap of microbial community composition in *P. fulvidraco* during cold storage

采用t检验分析第3天充氮组和非充氮组微生物群落的显著性变化(图5)。结果表明, 高浓度氮气对黄颡鱼中的不动杆菌属有极显著抑制作用 ($P < 0.01$), 对气单胞菌属和红育菌属也有显著影响 ($P < 0.05$)。

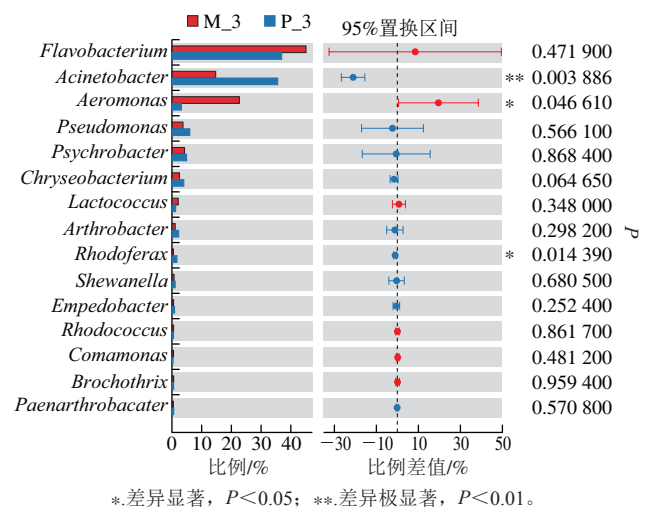


图5 黄颡鱼中微生物群落的t检验分析
 Fig. 5 t-Test analysis of microbial community in *P. fulvidraco*

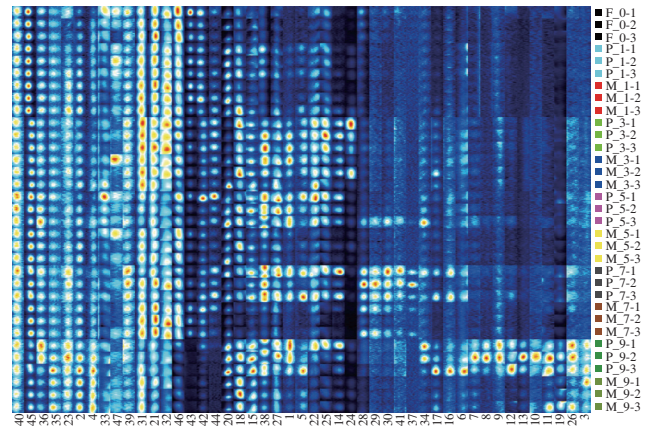
2.6 充氮包装对冷藏过程中黄颡鱼挥发性风味物质的影响
 黄颡鱼在冷藏过程中共检测出47种挥发性风味物质, 包含7类挥发性风味物质: 醇类10种、醛类5种、酸类7种、酯类8种、酮类8种、芳香族化合物1种以及杂环化合物8种(表3)。为进一步比较氮气对黄颡鱼贮藏过程中挥发性有机化合物的影响, 用G.A.S.公司开发的LAV软件的Gallery Plot插件选取图中待分析区域, 自动

生成指纹图谱(图6)。图6纵坐标代表黄颡鱼样品,横坐标为黄颡鱼样品中全部挥发性风味物质(与表3中的挥发性组分编号对应),红色越深,表明该挥发性风味物质含量越多,蓝色越深,说明该挥发性风味物质含量越少。如图6所示,充氮包装组在贮藏后期挥发性风味物质含量明显低于非充氮包装组,说明充氮包装可以抑制部分挥发性物质的产生。

表3 黄颡鱼挥发性组分的定性

Table 3 Volatile components in <i>P. fulvidraco</i> identified by GC-IMS						
类别	编号	中文名称	英文名称	保留指数	保留时间/s	漂移时间/ms
醇	7	2-辛醇	2-octanol	1 004.2	218.086	1.453 5
	11	2-糠基硫醇	2-furfurylthiol	893.5	100.288	1.357 1
	12	4-甲基-1-戊醇	4-methyl-1-pentanol	873.6	86.049	1.348 3
	14	3-甲基丁醇	3-methylbutanol	739.7	34.269	1.495 1
	15	3-甲基-3-丁烯-1-醇	3-methyl-3-buten-1-ol	739.8	34.304	1.274 8
	19	3-甲基-1-丁醇	3-methyl-1-butanol	682	22.996	1.229 2
	29	2-苯乙醇	2-phenylethanol	1 108.8	329.660	1.517 0
	31	1-苯乙醇	1-phenylethanol	1 066.8	285.955	1.181 5
	38	1-辛醇	1-octanol	1 038.8	256.215	1.453 4
	40	松油烯-4-醇	terpinen-4-ol	1 161.4	384.453	1.216 7
醛	6	正辛醛	octanal	1 034.6	251.743	1.390 0
	18	3-甲基丁醛	3-methyl-butanal	619.0	16.426	1.207 1
	21	戊醛	pentanal	703.6	26.500	1.187 6
	25	丁醛	butanal	628.0	17.162	1.287 1
	37	壬醛	nonanal	1 110.3	331.322	1.944 6
酸	2	庚酸	heptanoic acid	1 094.8	315.173	1.361 5
	5	己酸	hexanoic acid	1 031.7	248.507	1.293 5
	13	丁酸	butyric acid	852.5	73.751	1.379 0
	26	丙基丁酸	propyl butanoate	893.3	100.124	1.261 5
	35	辛酸	octanoic acid	1 191.7	415.954	1.891 0
	41	烯丙基乙酸	allylacetic acid	899.6	105.351	1.434 0
42	2-甲基丁酸	2-methylbutyric acid	824.3	60.788	1.475 1	
酯	4	2-羟基-4-甲基戊酸乙酯	ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate	1 068.7	287.988	1.317 6
	8	丙酸乙酯	ethyl propanoate	956.6	163.071	1.446 9
	20	丁酸甲酯	methyl butanoate	732.0	32.413	1.156 4
	23	丙酮酸乙酯	ethyl pyruvate	792.3	49.344	1.439 4
	24	乙酸乙酯	ethyl ethanoate	635.4	17.789	1.336 2
	36	苯甲酸甲酯(D)	methyl benzoate	1 093.8	314.156	1.604 2
	44	乙酸异丁酯	isobutyl acetate	740.0	34.352	1.601 3
	45	苯甲酸甲酯(M)	methyl benzoate	1 094.7	315.021	1.213 6
酮	1	2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮	2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone	1 041.9	259.538	1.597 3
	3	2-甲基-3-庚酮(M)	2-methyl-3-heptanone	1 098.6	319.056	1.280 4
	9	2-辛酮	2-octanone	955.4	161.776	1.341 8
	22	2-戊酮	2-pentanone	720.8	29.910	1.390 3
	27	3-羟基-2-丁酮	3-hydroxy-2-butanone	745.6	35.761	1.320 5
	32	2-己酮	2-hexanone	780.1	45.517	1.186 0
	33	2,3-戊二酮	2,3-pentanedione	709.3	27.564	1.209 6
	34	2-甲基-3-庚酮(D)	2-methyl-3-heptanone	1 096.3	316.674	1.694 2
	10	2,5-二甲基呋喃	2,5-dimethylfuran	938.4	143.006	1.365 9
	16	2-糠基甲基二硫化物	2-furfuryl methyl disulfide	1 192.3	416.559	1.214 7
杂环化合物	28	二丙基二硫化物	dipropyl disulfide	1 109.1	330.037	1.480 2
	30	2-甲酰基-5-甲基噻吩	2-formyl-5-methylthiophene	1 108.6	329.471	1.569 1
	39	2-乙酰吡啶	2-acetylpyridine	1 001.6	215.108	1.502 2
	43	二甲基硫醚	dimethyl sulfide	748.9	36.634	0.960 4
	46	烯丙基甲基硫醚	allyl methyl sulfide	693.7	24.778	1.045 1
	47	β -罗勒烯	β -ocimene	1 050.3	268.504	1.212 4
	芳香族	17	2,6-二甲氧基苯酚	2,6-dimethoxyphenol	1 360.3	591.249

注: M表示单体, D表示二聚体。



图中编号所代表的物质同表3。

图6 黄颡鱼冷藏过程中挥发性风味物质的指纹图谱

Fig. 6 Fingerprints of volatile components in *P. fulvidraco* during cold storage

由表3可知,黄颡鱼中主要挥发性化合物为醇类、醛类、酯类和酮类。2-辛醇、3-甲基-1-丁醇、2-糠基硫醇、4-甲基-1-戊醇主要出现在非充氮组冷藏第9天,充氮组中仅有微量检出。其中,3-甲基-1-丁醇是微生物来源的挥发性有机化合物,与变质肉和鸡胴体中的假单胞菌、希瓦氏菌和环丝菌代谢有关^[33]。在去内脏海鲈中也检测到了3-甲基-1-丁醇,其含量在贮藏过程中增加,有作为化学腐败标志物的潜力^[34],充氮包装可以一定程度抑制与腐败相关的醇类物质产生。醛类主要是由各种微生物分解代谢氨基酸形成的,非充氮组中3-甲基丁醛、丁醛、壬醛的含量明显高于充氮组。3-甲基丁醛是以亮氨酸为前体物质产生的,是一种奶酪和辛辣的苹果味^[33]。据报道,3-甲基丁醛与冰藏虾中交替假单胞菌的作用有关^[32],并且被认为是海鲷鱼片和熏鲑鱼的潜在腐败标志物^[34-35]。充氮包装延缓了与腐败相关的醛类物质产生。海鲜中酮的存在主要与假单胞菌、交替假单胞菌和嗜冷杆菌的作用有关^[35-36]。2-辛酮、2-戊酮、2-甲基-3-庚酮、3-羟基-2-丁酮在非充氮组的含量高于充氮组。有研究表明,3-羟基-2-丁酮与各种腐败菌的代谢活性有关,其形成来自肉杆菌属和乳酸杆菌属的葡萄糖分解代谢^[33]。这说明充氮包装可以有效抑制与腐败相关的酮类物质产生。酯是鱼肉中最主要的化合物之一,其形成与醇和羧酸的酯化以及微生物酯酶活性有关^[33]。乙酸乙酯是鱼类中最常见的酯,交替假单胞菌属和假单胞菌能够在许多底物中产生这种化合物^[36]。其中,假单胞菌被认为是酯生产的重要贡献者,并在感官评价中发挥重要作用^[37]。乙酸乙酯、丙酸乙酯、乙酸异丁酯在非充氮组的含量高于充氮组,充氮包装也能抑制与腐败相关的酯类的产生。综上所述,充氮包装可以抑制黄颡鱼在冷藏过程中与腐败相关的醇、醛、酮和酯的产生。

2.7 微生物群落与挥发性化合物的内在联系

偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)是一种有监督的统计分

析方法,对数据降维的同时建立回归模型,并对回归结果进行判别分析。相比于主成分分析法,PLS-DA法更能量化特征化合物造成组分差异的程度^[38-39]。利用黄颡鱼挥发性风味组分的信号峰强度进行PLS-DA建模,如图7所示, R_x^2 为0.906, Q^2 为0.389,说明该模型对不同黄颡鱼样品具有良好的稳定性和较好的预测能力。从样本的聚集、离散程度可知,当冷藏时间在3 d以内,黄颡鱼样本分布很聚集,表明在相同冷藏时间内非充氮组和充氮组黄颡鱼样本整体风味比较相近。当冷藏时间超过3 d时,非充氮组和充氮组黄颡鱼样本存在明显的区间分布,表明这些样品中所含有的化合物的组成和含量开始出现较大差异,这与图6所示的结果完全一致。

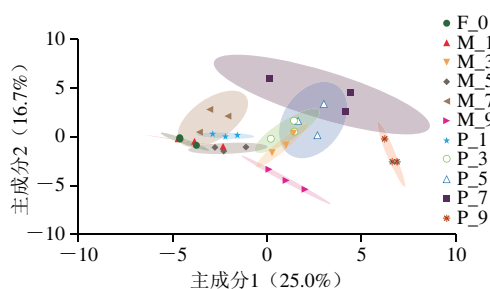


图7 不同黄颡鱼样品的PLS-DA得分图

Fig. 7 PLS-DA score plot of different *P. fulvidraco* samples

基于PLS-DA模型分析结果的变量重要性投影(variable important for the projection, VIP)值可以量化PLS-DA的每个变量对分类的贡献,以VIP值大于1表示该变量在判别过程中起到重要作用。VIP值越大,变量在不同黄颡鱼样品间的差异越显著^[35]。其中,以VIP大于1为潜在的挥发性特征标志物,共筛选出14个潜在的挥发性特征标志物(表4),分别为2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮、正辛醛、4-甲基-1-戊醇、3-甲基丁醇、戊醛、3-羟

基-2-丁酮、1-苯乙醇、2-己酮、1-辛醇、松油烯-4-醇、二甲基硫醚、苯甲酸甲酯(M)、烯丙基甲基硫醚和β-罗勒烯。

从表4可知,以峰强度值代表各挥发性化合物含量的高低,其中戊醛、松油烯-4-醇和苯甲酸甲酯(M)等物质的VIP值大于1.6,是影响不同贮藏期间黄颡鱼风味差异的重要成分。充氮组中1-辛醇、2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮的含量在整个冷藏期间均显著低于非充氮组($P<0.05$)。3-甲基丁醇、正辛醛、3-羟基-2-丁酮含量从第5天开始在充氮组中显著低于非充氮组($P<0.05$)。松油烯-4-醇、苯甲酸甲酯(M)、4-甲基-1-戊醇含量从第7天开始在充氮组中显著低于非充氮组($P<0.05$)。综上,充氮包装可以减少黄颡鱼在冷藏过程中部分风味特征标记物的形成。此外,相同贮藏时间的戊醛、2-己酮和β-罗勒烯在两组样品之间基本没有显著差异($P>0.05$),特别是β-罗勒烯在整个冷藏期间含量也相对稳定,这说明该物质的形成与腐败微生物的生长和代谢无关。

冷藏期间挥发性物质的多样性以及微生物的多样性增加了相关性分析的复杂性,需要进一步研究不同微生物对气味变化的影响。对属水平上丰富度前5的细菌和关键挥发性风味成分(VIP值>1)进行了冗余分析(redundancy analysis, RDA),结果如图8所示。第1和第2主成分贡献率累计达到62.53%。说明RDA可以有效表征不同微生物对气味变化的影响。与第0天的样品相比,充氮组和非充氮组冷藏第9天的样品腐败程度最严重,其中假单胞菌和不动杆菌为优势菌。此外,在腐败样品周围发现正辛醛、3-羟基-2-丁酮、3-甲基丁醇、1-辛醇、2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮5种挥发性化合物,这些化合物均与假单胞菌和不动杆菌呈正相关。据报道,假单胞菌和不动杆菌在水产腐败风味的形成中起着重要作用。综上所述,假单胞菌和不动杆菌与挥发性化合物的形成具有较强的相关性,在黄颡鱼腐败风味的形成中起着重要作用。

表4 黄颡鱼在冷藏过程在风味特征标记物峰强度值

Table 4 Peak intensities of characteristic markers for flavor substances of *P. fulvidraco* during cold storage

风味物质	VIP值	峰强度值/mV								
		F_0	P_3	P_5	P_7	P_9	M_3	M_5	M_7	M_9
戊醛	1.75	349.47±21.03 ^a	351.71±36.69 ^a	262.82±21.70 ^{cd}	256.17±14.38 ^{cd}	220.98±3.74 ^d	325.53±40.18 ^{ab}	299.35±30.41 ^{bc}	373.79±18.75 ^a	232.87±29.05 ^d
松油烯-4-醇	1.68	122.81±6.16 ^a	101.95±2.13 ^{bcd}	113.55±6.07 ^{abc}	120.21±13.11 ^a	114.19±4.52 ^{ab}	100.51±7.07 ^{cd}	113.25±11.67 ^{abc}	99.79±1.48 ^d	93.90±2.42 ^d
苯甲酸甲酯(M)	1.68	689.32±22.69 ^{ab}	606.04±14.21 ^c	710.66±58.70 ^{ab}	732.93±31.76 ^a	441.15±49.34 ^f	595.74±11.29 ^c	678.34±4.94 ^b	614.46±25.28 ^c	515.22±23.23 ^d
烯丙基甲基硫醚	1.68	1067.87±61.03 ^a	798.15±1.80 ^{bc}	637.68±8.69 ^d	596.27±25.40 ^d	254.66±46.16 ^f	777.69±20.16 ^{bc}	839.08±7.43 ^b	739.45±23.19 ^c	355.99±40.28 ^e
二甲基硫醚	1.60	369.82±27.11 ^a	264.13±26.83 ^b	188.69±28.13 ^e	233.85±25.27 ^{bc}	90.72±5.65 ^d	216.24±17.98 ^c	229.89±40.06 ^{bc}	346.86±23.01 ^a	104.57±13.42 ^d
1-辛醇	1.55	328.70±7.07 ^{cd}	1223.12±151.68 ^a	1242.66±49.90 ^a	1138.48±46.87 ^a	826.00±86.00 ^b	864.80±43.11 ^b	407.79±66.61 ^{cd}	315.78±13.80 ^d	464.33±8.73 ^c
1-苯乙醇	1.55	512.00±36.73 ^e	712.73±14.59 ^a	448.77±39.57 ^d	537.64±39.16 ^c	357.49±40.56 ^e	659.33±58.53 ^b	506.41±9.48 ^{cd}	633.09±22.53 ^b	528.09±31.25 ^c
2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮	1.55	154.30±15.27 ^f	531.39±56.15 ^a	532.65±43.33 ^a	528.19±51.24 ^a	606.08±37.89 ^a	296.45±103.87 ^b	201.56±39.82 ^e	163.84±3.93 ^e	189.54±3.99 ^e
2-己酮	1.45	444.62±79.40 ^{abc}	480.78±23.51 ^{ab}	347.64±26.93 ^d	357.04±4.85 ^{cd}	337.32±44.29 ^{bc}	442.67±16.04 ^{abc}	407.79±41.45 ^{bcd}	521.19±72.25 ^a	258.97±12.37 ^e
3-甲基丁醇	1.44	74.87±21.40 ^f	432.61±75.58 ^b	324.75±20.48 ^{cd}	546.69±7.07 ^a	304.32±42.26 ^c	393.77±69.54 ^{bc}	109.61±21.62 ^e	103.86±45.83 ^e	156.30±43.26 ^c
β-罗勒烯	1.30	61.05±24.81 ^a	36.52±4.11 ^f	46.60±10.07 ^e	36.04±9.61 ^a	27.82±4.98 ^f	56.59±38.16 ^d	58.44±22.87 ^a	40.64±7.63 ^e	45.89±4.49 ^f
4-甲基-1-戊醇	1.26	34.84±10.14 ^c	38.70±5.67 ^{bc}	35.49±12.82 ^{bc}	50.00±13.60 ^b	91.14±5.39 ^a	30.69±1.72 ^e	27.86±1.76 ^e	31.20±4.40 ^f	32.64±5.74 ^c
正辛醛	1.22	118.48±9.24 ^f	194.63±45.21 ^{ab}	212.84±15.74 ^a	224.84±50.84 ^a	210.28±27.93 ^a	198.62±35.72 ^{ab}	129.56±2.47 ^e	120.63±7.83 ^e	154.69±13.43 ^{bc}
3-羟基-2-丁酮	1.21	138.97±16.57 ^d	285.70±51.39 ^f	431.34±54.43 ^{ab}	460.46±25.87 ^a	413.28±56.20 ^{ab}	375.31±37.34 ^b	241.17±42.38 ^e	207.78±37.25 ^{cd}	274.67±47.13 ^b

注:同行肩标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

- [24] CHERET R, DE LBARRE-LADRAT C, MD LAMBALLERIE-ANTON, et al. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1474-1479. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.04.023.
- [25] 张芸, 章蔚, 汪兰, 等. 木糖醇部分代替食盐腌制对大口黑鲈鱼品质的影响[J]. 食品工业, 2020, 41(12): 82-86.
- [26] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [27] OTERO L, PÉREZ-MATEOS M, LÓPEZ-CABALLERO M E. Hyperbaric cold storage versus conventional refrigeration for extending the shelf-life of hake loins[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 41: 19-25. DOI:10.1016/j.ifset.2017.01.003.
- [28] 胡佳慧, 熊光权, 乔宇, 等. 微冻贮藏过程中能量代谢酶活性和蛋白质氧化降解对鲈鱼质构特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 227-234. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823034.
- [29] 章蔚, 石柳, 熊光权, 等. 不同预冷时间下鲷鱼能量代谢和加工品质的相关性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(3): 55-61. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190128-362.
- [30] ZHANG B, DENG S G, LIN H M. Changes in the physicochemical and volatile flavor characteristics of *scomberomorus niphonius* during chilled and frozen storage[J]. Food Science and Technology Research, 2012, 18(5): 747-754. DOI:10.3136/fstr.18.747.
- [31] LI X, YANG X, SHAN B, et al. Meat quality is associated with muscle metabolic status but not contractile myofiber type composition in premature pigs[J]. Meat Science, 2009, 81(1): 218-223. DOI:10.1016/j.meatsci.2008.07.022.
- [32] 曹丽. 不同部位和温度处理对牛宰后AMPK活性、能量代谢和肉品质的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- [33] CASABURI A, PIOMBINO P, NYCHAS G J, et al. Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage[J]. Food Microbiology, 2015, 45: 83-102. DOI:10.1016/j.fm.2014.02.002.
- [34] PARLAPANI F F, HAROUTOUNIAN S A, NYCHAS G J E, et al. Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 °C[J]. Food Microbiology, 2015, 50: 44-53. DOI:10.1016/j.fm.2015.03.006.
- [35] RIZVI S, GUPTA Y, YOUSUF S. Identification of the volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas fragi*[J]. Applied Microbiology, 1973, 26(1): 18-21. DOI:10.1097/IOP.0b013e3182a74f44.
- [36] BROEKAERT K, NOSEDA B, HEYNDRICKX M, et al. Volatile compounds associated with *Psychrobacter* spp. and *Pseudoalteromonas* spp. the dominant microbiota of brown shrimp (*Crangon crangon*) during aerobic storage[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(3): 487-493. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.013.
- [37] ZHANG Y X, WEI J P, YUAN Y H, et al. Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 290: 86-95. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.026.
- [38] 刘盼盼, 郑鹏程, 龚自明, 等. 不同产地珠形绿茶色泽与滋味成分的差异分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(20): 267-274. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.020194.
- [39] 尹洪旭, 杨艳芹, 姚月凤, 等. 基于气相色谱-质谱技术与多元统计分析对不同栗香特征绿茶判别分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 192-198. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180120-276.