

重组 Cystatin 对冷藏鲢鱼的抑菌效果

钟海霞, 李冉, 李树红*, 杨娟, 胡强,
柯勤勤, 林灵, 白稚子, 李美良

(四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 分离鉴定 4 ℃ 有氧冷藏鲢鱼去皮肉片货架期终点腐败相关优势假单胞菌, 并研究鲢鱼重组 Cystatin(家族 II) 对优势腐败假单胞菌的抑菌效果。首先利用 CFC 培养基从 4 ℃ 有氧冷藏鲢鱼去皮肉片货架期终点, 分离筛选出腐败相关假单胞菌, 并采用生理生化和 16 SrDNA 法对其进行鉴定, 其次将腐败菌株进行回接试验, 通过测定各腐败菌回接组的挥发性盐基氮(TVB-N)值、菌落数、感官评分判断其致腐能力。最后, 采用滤纸片扩散法和营养肉汤法鉴定重组鲢鱼 Cystatin (家族 II) 对优势腐败假单胞菌的抑菌效果。结果表明, 荧光假单胞菌(*pseudomonas fluorescens*)和草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)为主要致腐菌, 所占比例分别为 63.3%、26.7%, 且荧光假单胞菌致腐能力强于草莓假单胞菌。重组 Cystatin 对两种菌均有明显的抑菌效果, 且呈剂量依赖关系。

关键词: 鲢鱼; 4 ℃ 有氧冷藏; 优势假单胞菌; 分离鉴定; Cystatin; 抑菌作用

中图分类号: TS 254.4 文章编号: 1673-1689(2019)05-0111-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.05.016

Study on Bacteriostasis of the Cystatin from Chilled Silver Carp

ZHONG Haixia, LI Ran, LI Shuhong*, YANG Juan, HU Qiang,
KE Qinqin, LIN Ling, BAI Zhizi, LI Meiliang

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Investigation on the dominant spoilage *pseudomonas* from the chilled silver carp filets at the end of shelf life was carried out and then antibacterial experiment were conducted to determine the antibacterial activities of cystatin to the identified dominant spoilage *pseudomonas*. Firstly, the dominant spoilage *pseudomonas* were isolated at the end of shelf life from the chilled silver carp fillets stored at 4 ℃. Subsequently, physiological and biochemical method combined with 16S rRNA genes were conducted to identify these spoilage *pseudomonas*. After that, these strains were inoculated back to chilled silver carp filets at 4 ℃ and aerobic condition. TVB-N, the total number of bacterial colony combined with sensory evaluation were measured to evaluate the putrefying ability

收稿日期: 2016-10-19

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014NZ0003); 四川省教育厅自然科学基金重点项目(10ZA052)。

* 通信作者: 李树红(1975—), 女, 博士, 副教授, 主要从事水产品加工研究。E-mail: lish@sicau.edu.cn

引用本文: 钟海霞, 李冉, 李树红, 等. 重组 Cystatin 对冷藏鲢鱼的抑菌效果[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(05): 111-118.

of these strains. Moreover, the experiments of filter paper diffusion and nutrient broth was both conducted to determine the antibacterial activities of cystatin to the identified dominant spoilage *pseudomonas*. The results in the present study demonstrated that the main putrefying strains were *pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* corresponding to the percent of 63.3% and 26.7% respectively. *pseudomonas fluorescens* owned the stronger putrefying ability than *Pseudomonas fragi*. The antibacterial activity of the cystatin to the two dominant putrefying *pseudomonas* was dose-dependent.

Keywords: silver carp, 4 °C chilled fillet, spoilage *pseudomonas*, isolation and identification, Cystatin, antibacterial activity

鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 是我国主要的淡水养殖品种之一,产量位居我国淡水鱼养殖第二^[1]。鲢鱼肉质鲜美、营养丰富,其小包装生鲜制品食用方便,需求量大,深受广大消费者的喜爱。然而影响淡水鱼初级加工生鲜制品品质的因素,除原料的新鲜度外,主要还包括加工方式、贮藏条件及销售方式等。由于鱼肉具有明显的易腐性,淡水鱼生鲜制品的贮藏条件就显得尤为重要。Gennari M 等^[2]研究表明在高于冻结温度的条件下,鱼肉随着细菌的生长繁殖易于腐败变质。通常在特定条件下,鱼体所含微生物只有部分参与腐败过程,这些适宜生存且大量繁殖并产生异味代谢产物的微生物,被称作特定腐败菌 (specific spoilage organisms, SSO)^[3-4]。而鱼肉片在有氧低温贮藏时,同样是有利于少数特定优势菌群生存繁殖并产生腐败相关代谢产物。

假单胞菌是典型的低温腐败菌,被认为是有氧冷藏水产品的特定腐败菌^[5]。例如,4 °C 有氧冷藏草鱼肉片^[6]以及 0~15 °C 有氧冷藏鲤鱼^[7]的优势腐败菌均为假单胞菌。同时,有学者研究发现有氧冷藏罗非鱼^[8]、鲳鱼^[9]、鲟鱼^[10]的优势腐败菌均为假单胞菌中且以荧光假单胞菌最为优势。此外,草莓假单胞菌也被发现是冷藏鲳鱼中,仅次于荧光假单胞菌的较优势腐败菌^[9]。

目前尚未见对鲢鱼肉片低温有氧冷藏中优势腐败菌的检测。基于上述大量相关文献,作者利用假单胞菌的选择性培养基,针对性的筛选并分析了鲢鱼肉片 4 °C 有氧冷藏过程中,与致腐最可能相关的假单胞菌的变化趋势。并且采用生理生化鉴定与 16 S rDNA 分子鉴定相结合的方法,对货架期终点假单胞菌中的优势种群进行了分离鉴定。

另一方面,半胱氨酸蛋白酶抑制因子 (Cysteine

Proteinase Inhibitors, CPIs) 可专一性地抑制半胱氨酸蛋白酶,广泛分布于动植物组织、体液以及分泌液。已知动物源 CPIs 类群中最主要的 Cystatins 超家族,包括 3 个家族,即低分子的 Stefin (家族 I)、Cystatin (家族 II) 和高分子的 Kininogen (家族 III)^[11]。目前已经从鱼类卵^[12-15]、垂体^[16-17]、血清^[18]以及皮^[19]等多个组织中分离纯化了 Cystatins。同时,相关研究表明,某些陆生动物及植物来源的 Cystatin (家族 II) 如人类唾液^[20]、小鼠^[21]、鸡蛋白^[22]、长春花^[23]来源的 Cystatin 等均表现了抑菌活性。但目前鱼源 Cystatin (家族 II) 抑菌活性的研究鲜有报道,作者所在实验室前期研究发现鲢鱼重组 Cystatin (家族 II) 能抑制铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的生长^[24]。而关于鱼源 Cystatins 对水产品腐败相关微生物的抑制作用研究,尚未见报道。

为此,作者首先在 4 °C 有氧冷藏鲢鱼肉片货架期终点,通过选择性培养基对假单胞菌进行了分离、鉴定。并在此基础上,利用鲢鱼重组 Cystatin (家族 II) 的抑菌特性,研究了其对优势假单胞菌的抑菌情况。该结果对于进一步探讨将鱼源 Cystatin 开发为食品防腐剂并针对性地应用于水产品抑菌保鲜的可行性,提供了必要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料、培养基与试剂

1.1.1 主要原料 鲢鱼,购于四川省雅安市农贸市场,每尾约 1.5 kg。鲢鱼重组 Cystatin (家族 II): 四川农业大学食品学院水产品加工理论与技术实验室制备并保存;鲢鱼 Cystatin (家族 II) cDNA 序列: 作者所在实验室前期在 genbank 中获取的登录号 (KF181446)^[24]。

1.1.2 培养基 PCA 培养基、假单胞菌选择性培养基 CFC;青岛海博生物科技有限公司产品。

1.1.3 试剂 Taq DNA 聚合酶、DNA Marker III、Taq buffer、dNTP、细菌基因组 DNA 提取试剂盒-离心柱型:天根生化科技北京有限公司产品;16S rDNA 细菌通用引物:上海英潍捷基生物技术有限公司产品。

注:*16S rDNA 细菌通用引物序列如下:正向引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物 1492R:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。

1.2 主要仪器与设备

MyCycler TM Thermal Cycler PCR 仪:美国 Bio-Rad 产品;水平电泳槽及电泳电源、Dio-Gel-2000 凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 产品;CX21FS1 显微镜:日本 Olympus 产品。

1.3 方法

1.3.1 鲢鱼肉片的加工及低温有氧冷藏 将鲜活鲢鱼经宰杀去头去内脏后,用流动冷却自来水洗去鱼体表面的黏液、杂质、腹腔内血污,随后去皮,去脊骨,取鱼片,整形,所得每块鱼片质量为 60~70 g。加工完成的鱼肉片,置于 PP 一次性冷鲜肉塑料托盘,然后用食品级保鲜膜封口包装,置于 4℃ 下冷藏。

1.3.2 鲢鱼肉片 4℃ 低温有氧冷藏期间的感官分析 由 6 名经过训练的专业人员组成感官评价小组,对鲢鱼肉片进行感官评分,以确定其货架期终点。以色泽、气味、组织形态、组织弹性为指标,采用 5 分法评定^[25]。

1.3.3 鲢鱼肉片低温有氧冷藏期间细菌总数及假单胞菌的变化 在鲢鱼肉片有氧冷藏期间,从冷藏初期到货架期终点,每隔 24 h 从鲢鱼肉片中取样。取样微生物计数参照 GB/T 4789.20-2003:食品卫生微生物学检验水产食品检验方法^[26]。

在无污染的环境中用经高温灭菌并冷却后的手术刀剪取腐败鲢鱼鱼肉 25 g,放入已灭菌的研钵内用无菌剪刀剪碎,而后加入无菌玻璃砂后研磨,再放入盛有 225 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中,震荡摇匀,梯度稀释后,采用 PCA 培养基及 CFC 培养基对 4℃ 冷藏过程中鲢鱼肉片中的细菌总数(37℃,48 h)、假单胞菌(30℃,48 h)进行培养及计数,每个实验做 3 个重复。

1.3.4 菌株的纯培养 用无菌接种环挑取若干货

架期终点 CFC 培养基上具有典型菌落形态的单菌落,连续进行 3 次划线纯化培养。

1.3.5 菌株的鉴定

1)形态特征鉴定 观察单菌落的形态,并挑取培养 16~18 h 长势好的单菌落,通过革兰氏染色后观察记录细菌形态、颜色质地及有无芽孢等^[27]。

2)生理生化特征鉴定 参照《伯杰细菌鉴定手册》^[28]和《常见细菌系统鉴定手册》^[29]对分离纯化的细菌进行生理生化实验。

3)分子生物学鉴定 将分离纯化的菌株活化 2 次,30℃ 180 r/min 震荡培养 16 h,参照说明书方法采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA 以通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492R:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'进行扩增。

PCR 扩增反应体系包括:2 μL DNA 模板,引物 27F 0.5 μL,引物 1492R 0.5 μL,Taq DNA Polymerase 0.4 μL,ddH₂O 12.6 μL,Super Pure dNTP 4 μL,Taq Buffer(10×)5 μL。

PCR 扩增程序为:95℃ 变性 5 min,接着 30 个循环(94℃ 变性 45 s、56℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 1.5 min)。最终 72℃ 延伸 10 min,取适量 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,而后将扩增产物送至上海立菲生物技术有限公司进行测序,将测得的 16S rDNA 序列提交至 GeneBank 获取登录号,并在 NCBI ((National Center for Biotechnology Information)数据库中进行在线 BLAST 同源性比对,选取同源性较高的菌株序列使用 MEGA 6.0 软件采用邻近法构建系统发育树。

1.3.6 菌株致腐能力鉴定

1)TVB-N 值的测定 用无菌水将分离纯化的假单胞菌中的优势菌株分别制成菌悬液,菌体浓度 10⁵ CFU/mL。根据 Herber 等的方法^[30],制备无菌鱼块,在表面回接菌悬液。4℃ 贮藏,并进行挥发性盐基氮(TVB-N)的测定,具体方法参照 SC/T3032-2007:水产品中挥发性盐基氮的测定^[31]。

2)感官评分 将分离纯化的假单胞菌优势菌株回接到鲢鱼肉片表面,对其进行感官评分^[25]。

1.3.7 鲢鱼重组 Cystatin 的抑菌活性检测

1)滤纸片法 将筛选的优势腐败菌置入无菌水中制成菌悬液,浓度为 10⁵ CFU/mL,取 0.1 mL 菌液涂布于牛肉膏琼脂糖凝胶平板上^[22]。将滤纸片(直

径 6 mm)放置于上述已涂布细菌的平板上,在滤纸片上分别滴加经无菌处理的 15、20、25、30 μ l 的 Cystatin;同时以等体积的无菌生理盐水(质量分数 0.85%NaCl)做空白对照。在 4 $^{\circ}$ C 下静置 3 h,37 $^{\circ}$ C 恒温培养 16~18 h,测定抑菌圈的大小以判断鲢鱼重组 Cystatin 的抑菌效果。

2) 营养肉汤法 将分离的优势腐败菌株接种于营养肉汤培养基中于 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 18~24 h,使其在 600 nm 的吸光值达到 0.6 左右,此时菌悬液的浓度约 1×10^8 CFU/mL。将鲢鱼重组 Cystatin 分别稀释至 80、105、135 μ g/mL 后添加到含 1×10^8 CFU/mL 优势菌的菌悬液的营养肉汤培养基中于 30 $^{\circ}$ C 振荡培养,对照组不添加 Cystatin,空白对照添加 Cystatin 不加菌。每个浓度分别在 0、1、2、3、4、5、6、20 h 于 600 nm 测其菌悬液的吸光值。最终以采样时间为横坐标,600 nm 吸光值为纵坐标,绘制曲线。

2 结果与讨论

2.1 鲢鱼肉片 4 $^{\circ}$ C 低温有氧冷藏期间的感官分析

对 4 $^{\circ}$ C 有氧冷藏期间鲢鱼肉片进行感官分析,结果见图 1。在冷藏 0~3 d 内,鲢鱼肉片的感官评分均大于 4 分,冷藏至第 6 d 时评分为 2.6 分,鱼肉片品质尚可接受。但第 7 d 时评分为 2 分,说明鱼片开始腐败变质,其感官不可被接受。由此判断 4 $^{\circ}$ C 有氧冷藏鲢鱼肉片的货架期终点为 7 d。

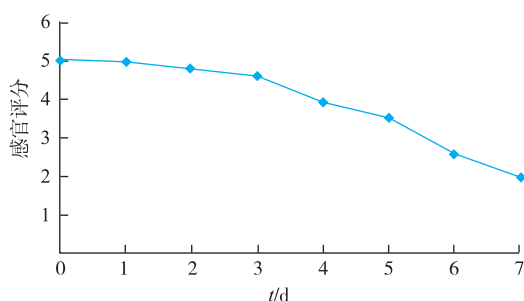


图 1 鲢鱼肉片在 4 $^{\circ}$ C 冷藏过程中的感官评定

Fig. 1 Change in sensory score during chilled storage of Silver carp fillets

2.2 鲢鱼肉片 4 $^{\circ}$ C 有氧冷藏期间细菌总数及假单胞菌的变化

由图 2 可知,鲢鱼肉片在 4 $^{\circ}$ C 冷藏 0~7 d 期间,细菌总数对数值由初始的 3.57 上升至 7.29,超出了淡水鱼细菌总数对数值可接受的最大限度 7.0^[6],说明冷藏 7 d 时鱼片进入初期腐败,达到货架期终点,

此结果与感官分析结果一致。假单胞菌数对数值在整个冷藏期间,一直呈明显的上升趋势,货架期终点时达到 6.77,接近细菌总数值。说明该类低温腐败菌在冷藏鲢鱼肉片货架期终点时占有绝对的种群优势。

有学者研究表明,4 $^{\circ}$ C 有氧冷藏草鱼肉片^[6]、0~15 $^{\circ}$ C 有氧冷藏鲤鱼^[7]以及有氧冷藏罗非鱼^[8]、鲮鱼^[9]、鲟鱼^[10]的优势腐败菌均为假单胞菌。

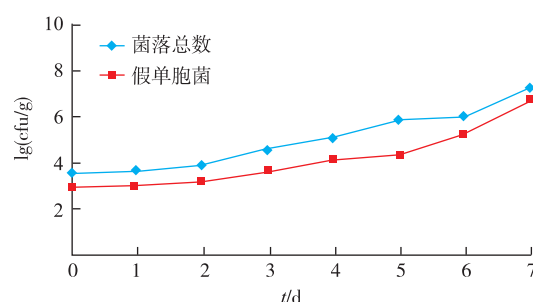


图 2 鲢鱼肉片 4 $^{\circ}$ C 冷藏期间细菌总数及假单胞菌数变化
Fig. 2 Changes in total number of bacteria and Pseudomonas chilled storage of Silver carp fillets

2.3 货架期终点腐败相关假单胞菌及其菌落的形态特征

从冷藏 7 d 的 CFC 培养基上,挑取 30 个具有典型、一致的菌落特征的单菌落,经多次划线纯化后得到 30 株菌株,依次将其命名为 J-1~J-30 进行菌落及菌株形态观察。发现这 30 株菌菌落及菌株形态相似,主要表现为在 CFC 培养基上生长呈圆形、乳白色、边缘整齐、菌落隆起、半透明的光滑型菌落,经革兰氏染色后发现,其为 G- 的直或稍弯杆菌,无芽孢。

2.4 货架期终点腐败相关假单胞菌株的生理生化鉴定

对 J-1~J-30 进行生理生化鉴定,其中 19 株菌(J1-J19)生理生化特征一致,且可以产荧光素,占分离菌株数的 63.3%。其余 8 株菌(J20-J27)特征一致占分离菌株数的 26.7%。另有 3 株(J28-J30)未得到鉴定 占分离菌株数的 10%。因此分别选取 J-4 和 J-22 为代表,进行后续实验。

2.5 腐败菌的分子生物学鉴定

经 BLAST 同源性匹配之后,选取同源性较高的菌株序列构建发育树。

根据构建的系统发育树,如图 3 所示,J-4(登录号 KF056821) 与 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas*

fluorescens) 聚集在同一分支,与 *Pseudomonas fluorescens* G27(KT767924.1) 相似度在 99% 以上, J-22 (登录号 KX923798) 和草莓假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*) 属于同一类群,与 *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 (NR_024946.1) 相似度为 99%。选择相似度最高的几种假单胞菌和希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* ATCC 8071 (NR_119141.1)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 (NR_115606.1) 序列,构建该菌株的系统进化树,进一步证明 J-4、J-22 菌株属假单胞菌属。因此进一步结合形态学及理化实验结果,确定分离纯化得到的 2 类优势假单胞菌分别为荧光假单胞菌 (*pseudomonas fluorescens*) 和草莓假单胞菌 (*Pseudomonas fragi*)。

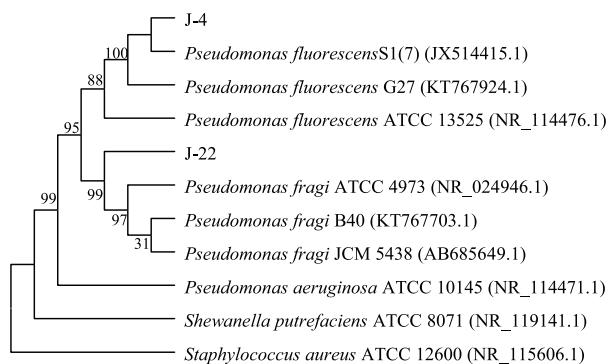


图 3 优势假单胞菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of dominant putrefying pseudomonas

2.6 腐败菌致腐能力的初步分析

由图 4 可知,回接两种假单胞菌的鲢鱼肉片在 4 °C 冷藏过程中,TVB-N 值一直呈明显的上升趋势,对回接荧光假单胞菌的鲢鱼肉片冷藏至第 4 d 品质开始劣变,5 d 时 TVB-N 值超过 25 mg/hg 进入初期腐败状态,冷藏第 6 d 鲢鱼肉片 TVB-N 值高达 34.62 mg/hg,已经彻底进入腐败状态,对其进行感官分析发现回接该菌的鲢鱼肉片在冷藏第 5 d 色泽暗淡,产生明显异味,弹性损失严重,评分为 2,而回接草莓假单胞菌的鲢鱼肉片冷藏至第 4 d 时 TVB-N 值为 17.76 mg/hg 品质开始下降,第 6 d 时 TVB-N 值达到 26.95 mg/hg,鲢鱼肉片开始腐败,结合感官分析发现接有草莓假单胞菌组直到第 6 d,才开始产生异味,评分达到 2。由此可见,感官评定结果与 TVB-N 值的变化结果基本吻合。

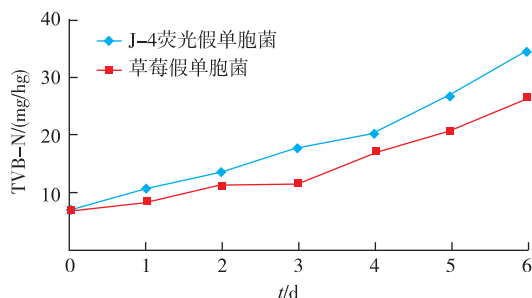


图 4 回接优势假单胞菌对 TVB-N 值的影响

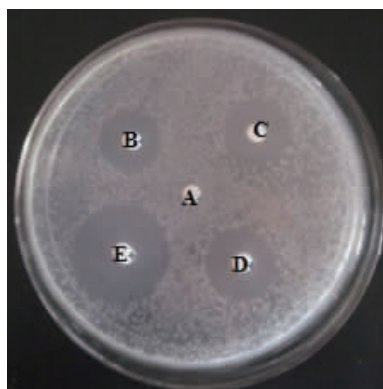
Fig. 4 Effect of dominant Pseudomonas on TVB-N Value

由上述结果可知,分离得到 J-4 荧光假单胞菌和 J-22 草莓假单胞菌都是引起冷藏鲢鱼肉片腐败的相关菌,回接后均不同程度的加快了鲢鱼肉片的腐败速度,且回接荧光假单胞菌的去皮鲢鱼肉片腐败速度明显快于回接草莓假单胞菌组。由此,可初步断定对于 4 °C 冷藏鲢鱼肉片,荧光假单胞菌的致腐能力优于草莓假单胞菌。同时,货架期终点分离的各类腐败相关假单胞菌株的比例数(荧光假单胞菌 63.3%,草莓假单胞菌 26.7%),因此,说明货架期终点时,腐败相关假单胞菌中优势菌次序为荧光假单胞菌、草莓假单胞菌。

假单胞菌是典型的低温腐败菌,被认为是有氧冷藏水产品的特定腐败菌^[5]。相关研究也表明,荧光假单胞菌、草莓假单胞菌分别是 0 °C 冷藏三文鱼^[32]、冷藏海鲈鱼^[33]的优势腐败菌。此外,0~10 °C 冷藏罗非鱼^[8]、冷藏鲳鱼^[9]的优势腐败菌均为假单胞菌,且荧光假单胞菌均为最优势种群,其中货架期终点的冷藏鲳鱼中荧光假单胞菌明显多于草莓假单胞菌^[9]。

2.7 抑菌活性的测定

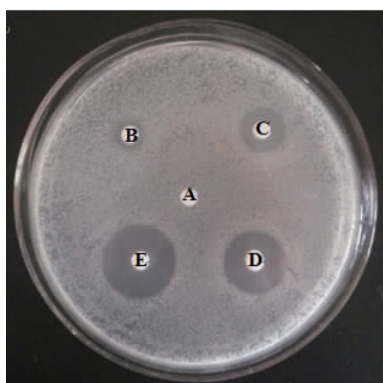
2.7.1 滤纸片法鉴定 Cystatin 的抑菌作用 重组鲢鱼 Cystatin 对荧光假单胞菌、草莓假单胞菌均具有明显抑菌效果,当 Cystatin 的添加量为 15、20、25、30 μg/片时,对荧光假单胞菌抑菌圈直径分别为 18、21、23、33 mm (如图 5),对草莓假单胞菌抑菌圈直径分别为 10、15、21、27 mm (如图 6)。Tumenoto^[21]发现鼠 Cystatin S 能有效抑制牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*),当添加量为 75 μg/片时,抑菌圈直径为 14 mm;Wesierska^[22]等研究发现鸡蛋白 Cystatin 对铜绿假单胞菌抑菌效果明显,当 Cystatin 添加量为 120 μg/片时抑菌圈直径为 16 mm,150 μg/片时抑菌圈直径达到 18 mm。



A. 生理盐水对照; B. Cystatin 15 $\mu\text{g}/\text{片}$; C. Cystatin 20 $\mu\text{g}/\text{片}$; D. Cystatin 25 $\mu\text{g}/\text{片}$; E. Cystatin 30 $\mu\text{g}/\text{片}$

图 5 Cystatin 对荧光假单胞菌的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect from Cystatin to *Pseudomonas fluorescens*



A. 生理盐水对照; B. Cystatin 15 $\mu\text{g}/\text{片}$; C. Cystatin 20 $\mu\text{g}/\text{片}$; D. Cystatin 25 $\mu\text{g}/\text{片}$; E. Cystatin 30 $\mu\text{g}/\text{片}$

图 6 Cystatin 对草莓假单胞菌的抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effect from Cystatin to *Pseudomonas fragi*

2.7.2 营养肉汤法鉴定 Cystatin 的抑菌作用 将不同浓度的 Cystatin 分别与荧光假单胞菌、草莓假单胞菌于 30 $^{\circ}\text{C}$ 共同培养后, 并分别测定 $A_{600\text{nm}}$ 值, 结果如图 7、图 8 所示。由图可知, 随着 Cystatin 加量的增加, $A_{600\text{nm}}$ 值逐渐降低。当 Cystatin 加量一致时, 添加荧光假单胞菌的组 $A_{600\text{nm}}$ 值始终低于添加草莓假单胞菌的组。以上结果表明, Cystatin 加量越大对荧光假单胞菌和草莓假单胞菌的抑制作用越明显, 并且 Cystatin 对荧光假单胞菌的抑制效果较草莓假单胞菌好。

有研究发现, 重组芋头球茎 Cystatin 在 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下能抑制齐整小核菌 (*Sclerotium rolfsii*) 的菌丝生长, 150~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度能完全抑制菌

丝体生长^[34]。鸡蛋白 Cystatin 对鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、寡源杆菌属 (*Oligella*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 具有抗菌活性, 当鸡蛋白 Cystatin 的质量浓度在 100~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间时, 能彻底抑制上述菌株的生长^[22]。

Cystatin 作为一种分泌型抑制剂, 其抑制假单胞菌的机制, 一方面可能是通过抑制细菌本身分泌的胞外半胱氨酸蛋白酶而发挥抑菌作用。有研究发现, 向能够分泌胞外半胱氨酸蛋白酶的细菌培养液中加入鸡蛋白 Cystatin 后细菌的生长受到大幅度的抑制^[22]。另一方面, Cystatin N 端和半胱氨酸蛋白酶相互作用的保守序列与细菌微生物膜上的负电荷相结合发挥抑菌作用^[35]。此外, Cystatin 还可能穿透细菌细胞膜, 进入细菌内部, 抑制胞内半胱氨酸蛋白酶。其具体抑菌机制有待进一步研究。

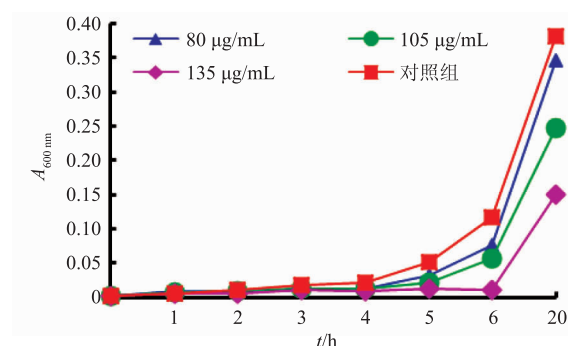


图 7 Cystatin 抑制荧光假单胞菌曲线

Fig. 7 Curve of Cystatin inhibition on *Pseudomonas fluorescens*

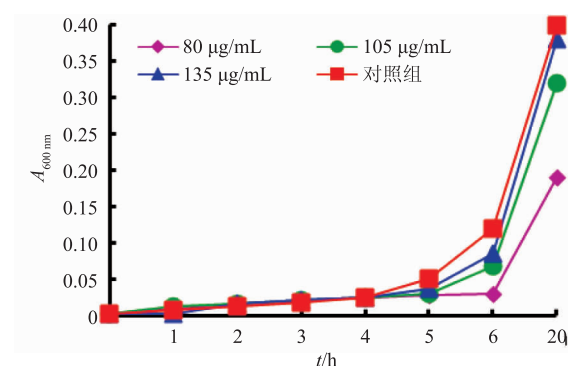


图 8 Cystatin 抑制草莓假单胞菌曲线

Fig. 8 Curve of Cystatin inhibition on *Pseudomonas fragi*

3 结 语

对 4 ℃ 有氧冷藏鲢鱼肉片货架期终点的腐败假单胞菌进行了分离鉴定,并且研究了鲢鱼重组 Cystatin 对其抑菌作用。初步确定了典型低温腐败菌——假单胞菌为 4 ℃ 有氧冷藏鲢鱼肉片货架期终点的优势菌群,并且荧光假单胞菌(*pseudomonas*

fluorescens) 在数量比例和致腐能力方面均优于草莓假单胞菌(*Pseudomonas fragi*),该结果可为靶向抑制鲢鱼腐败相关菌,确定目标。抑菌研究证实了鲢鱼重组 cystatin 对 4 ℃ 有氧冷藏鲢鱼肉片货架期终点的两种相关腐败假单胞菌均具有明显的抑制效果,且呈剂量依赖关系,有望为开发天然安全的水产品抑菌剂提供理论依据。

参考文献

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2015.
- [2] GENNARI M, TOMASELL S, COTRONA V. The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic(Mediterranean) Sea and stored in ice[J]. **Food Microbiology**, 1999, 16(1):15-28.
- [3] XU Zhong, YANG Xianshi, XIAO Linlin. Studies on the microbiological quality change and storage time of tilapia at different cold storage temperatures[J]. **Periodical of Ocean University of China**, 2005, 34(4):621-625. (in Chinese)
- [4] GRAM L, HUSS H. Microbiological spoilage of fish and fish products [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1996, 33(1):121-137.
- [5] YANG Xianshi, XU Zhong, XIAO Linlin. Specific spoilage organisms from aquatic product and prediction & prolongation of shelf life[J]. **Journal of Fisheries of China**, 2004, 28(1):106-111. (in Chinese)
- [6] WANG H, LUO Y, HUANG H, et al. Microbial succession of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) filets during storage at 4 ℃ and its contribution to biogenic amines' formation[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2014, 190(1):66-71.
- [7] LI Xueying, YANG Xianshi, GUO Quanyou. Microbial growth kinetics model of *Pseudomonas* and shelf life prediction for cyprinus carpio[J]. **Food & Machinery**, 2011, 27(1):56-59. (in Chinese)
- [8] YANG Xianshi, GUO Quanyou, XU Zhong. Bacterial species changes in cultured tilapia during chilled storage [J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, 2008, 15(6):1050-1055. (in Chinese)
- [9] LAN Weiqing, XIE Jing, SHI Jianbing, et al. Bacterial species changes in *Pampus argenteus* during chilled storage[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(11):1141-1148. (in Chinese)
- [10] ZHANG Zhichao, GUI Meng, PENG Chaohui, et al. Predictive modeling of *Pseudomonas fluorescens* growth and shelf life prediction of sturgeon[J]. **Food Chemistry**, 2014, 35(10):278-283. (in Chinese)
- [11] OCHIENG J, CHAUDHURI G. Cystatin superfamily. [J]. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, 2010, 21(1):51-70.
- [12] LI D K, LIN H, KIM S M. Purification and characterization of a cysteine protease inhibitor from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) plasma[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2008, 56(1):106-111.
- [13] OKAMOTO. Purification and characterization of two novel cysteine protease inhibitors, Eel-CPI-2 and Eel-CPI-3, in the skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*[J]. **Fish Sci**, 2009, 2(75):463-471.
- [14] USTADI U, KIM K Y, KIM S M. Comparative study on the protease inhibitors from fish eggs [J]. **Journal of Ocean University of China**, 2005, 4(3):198-204.
- [15] SONG Chuan, LI Yanfang, REN Yangyang, et al. Purification and characterization of high molecular weight caspase inhibitor CPI-I from silver carp eggs[J]. **Food Chemistry**, 2012, 33(13):100-103. (in Chinese)
- [16] MICHIAKI Y, SHIRO K. A comparison of cystatin activity in the various tissues of chum salmon *Oncorhynchus keta* between feeding and spawning migrations[J]. **Comparative Biochemistry & Physiology Part A Physiology**, 1991, 100(3):749-751.
- [17] KOIDE Y, NOSO T. The complete amino acid sequence of pituitary cystatin from chum salmon[J]. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, 1994, 58(1):164-169.

- [18] 李德昆. 蛋白酶抑制剂的制备及其抑制狭鳕鱼糜凝胶劣化的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2008.
- [19] USTADI U, KIM K Y, KIM S M. Purification and identification of a protease inhibitor from glassfish (*Liparis tanakai*) eggs[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 2005, 53(20):7667-7672.
- [20] NAITO Y, SASAKI M, UMEMOTO T, et al. Bactericidal effect of rat cystatin S on an oral bacterium *Porphyromonas gingivalis* [J]. **Comparative Biochemistry & Physiology Part C Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, 1995, 110(1):71-75.
- [21] UMEMOTO T, NAITO Y, LI M, et al. Growth inhibition of a human oral bacterium *prophyromonas gingivalis* by rat cysteine proteinase inhibitor cystatin S[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 1996, 23(3):151-153.
- [22] WESIERSKA E, SALEH Y, Triszka T, et al. Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. [J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2005, 21(21):59-64.
- [23] SHARMA G, KUMAR M, SHARMA S. Studies on antibacterial activity and biochemical/biophysical properties of phytocystatin purified from *Catharanthus roseus* (*Madagascar periwinkle*): an evergreen subshrub commonly found in district bijnor (U.P)[J]. **Advances in Bioscience & Biotechnology**, 2011. 2(6):391-396.
- [24] CHEN Hai, JIANG Haiyang, WU Rui, et al. Prokaryotic expression and identification of recombinant cystatin of *Hypophthalmichthys molitrix* and the antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* [J]. **Food Chemistry**, 2014, 35(21):133-137. (in Chinese)
- [25] HOU Wenfu, WEN Li, WANG Yanan, et al. Freshness changes and microbial growth in fresh grass carp fillets during chilled storage[J]. **Meat Research**, 2013, 27(3):5-8. (in Chinese)
- [26] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.20-2003 食品卫生微生物学检验 - 水产食品检验 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [27] HONG Jun, BAI Yuzhen, MA Xiaomeng, et al. Screening, identification and properties of one antagonistic strain against *Aeromonas hydrophila* from *Hypophthalmichthys molitrix* intestinal tract [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(12):1287. (in Chinese)
- [28] BERGEY D H, HARRISON F C, BREED R S, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. Williams & Wilkins, 1994.
- [29] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [30] HERBERT R A, HENDRIE M S, GIBSON D M, et al. Bacteria active in the spoilage of certain sea foods[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2008, 34(1):41-50.
- [31] 中华人民共和国农业部. SC/T3032-2007 中华人民共和国水产行业标准 - 水产品中挥发性氮值的测定[S]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [32] LI Tingting, DING Ting, ZOU Chaoyang, et al. Differential prevalence of spoilage bacteria in salmon fillets during refrigerated storage and identification of predominant spoilage bacterial species [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2015, 31(4):36-41. (in Chinese)
- [33] TANG Wenjing, WANG Chuwen, LIU Yunlong, et al. Isolation and identification of specific spoilage organisms in chilled sea bass[J]. **Food Chemistry**, 2016, 37(3):170-174. (in Chinese)
- [34] YANG A, YE H K. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. *Kaosiung no. 1*) [J]. **Planta**, 2005, 221(4):493-501.
- [35] BJORK I, POL E, RAUBSEGALL E, et al. Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes[J]. **Biochemical Journal**, 1994, 299(1):219-225.