

食品中常见微生物对氧化三甲胺代谢差异的研究

吴翔, 韩伟伟, 王世平*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 分析6种食品中常见微生物(金黄色葡萄球菌、产气肠杆菌、粪肠球菌、大肠杆菌、单增李斯特菌、肠炎沙门氏菌)对含有氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO)培养基理化性质的影响, 并根据微生物对TMAO的代谢利用情况, 对这6种微生物进行分类; 利用非抑制型离子色谱分析TMAO的分解产物, 发现微生物可将TMAO分解为三甲胺(trimethylamine, TMA); 最后通过绘制培养基不同理化指标(pH值、电导率、浊度、TMA质量浓度)随培养时间的变化曲线, 证明TMA的生成会对培养基电导率和pH值产生影响, 且不同类型的微生物对这种影响的作用差异显著。

关键词: 氧化三甲胺; 离子色谱; 电化学分析; 微生物; 快检技术

Difference in Trimethylamine Oxide Metabolism by Common Microorganisms in Food Products

WU Xiang, HAN Wei-wei, WANG Shi-ping*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Based on the metabolic utilization of trimethylamine oxide (TMAO), six common food spoilage microorganisms (*S. aureus*, *E. aerogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis*) were classified by analyzing their effects on physicochemical properties of PCA medium containing TMAO. Subsequently, TMAO metabolites were analyzed by using non-suppressed ion chromatography and identified mainly as trimethylamine. Finally, different physical and chemical indicators (pH, conductivity, turbidity and TMA content) of the culture medium were plotted against culture time. The generation of TMA can affect the conductivity and pH of the medium, and this effect has a significant difference depending on the bacterial species.

Key words: trimethylamine oxide (TMAO); ion chromatography; electrochemical analysis; microorganism; rapid detection technology
中图分类号: TS207.4 文献标志码: A 文章编号: 1002-6630(2014)01-0189-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201401037

微生物污染是所有食品从业人员都需要重视的问题。平板计数、革兰氏染色等传统微生物检测方法通常过程繁琐、检测时间长、需要大型实验室的专业人员操作^[1]。阻抗分析法作为一种新兴的微生物快检方法, 具有快速、经济、操作简单、使用广泛等诸多优点^[2], 能一定程度上弥补传统方法的不足, 具有良好的商业应用前景^[3-4]。阻抗分析法依靠检测培养基因微生物生长而逐渐改变的电化学参量, 实现对微生物的快速测定^[5]。微生物因生活环境不同, 对同一种物质的代谢能力会存在差异^[6], 因此如果添加一种电活性有机物, 经特定种类微生物利用后, 转化为电解质, 提高培养基的导电性^[7], 就能实现对特定类群微生物的检测。

氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide,

TMAO), 化学结构式为 $(CH_3)_3NO$, 是一种非电解质渗透调节物质^[8], 其分解产物三甲胺(trimethylamine, TMA)和二甲胺(dimethylamine, DMA)则是弱电解质^[9], 当TMAO被微生物降解代谢后, 培养基的电导性将大幅提高, 通过对培养基的电学特性进行检测, 即可间接实现对微生物的检测。目前已有针对TMAO代谢相关菌的相关研究^[6,10-11], 但将TMAO用于微生物快速检测的研究尚未见报道。本实验通过对比研究6种常见食品腐败微生物对TMAO的代谢能力及培养基电导、pH值和浊度等指标的影响, 揭示不同微生物代谢TMAO对培养基理化性质的影响, 期望能为TMAO用于微生物阻抗分析法提供依据。

收稿日期: 2013-01-16

基金项目: 北京朝阳区食品安全监管体系构建及关键技术研究与应用项目(Z121100000312080)

作者简介: 吴翔(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: 791961508@qq.com

*通信作者: 王世平(1959—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: wang744447@126.com

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*)，中国农业大学食品科学与营养工程学院常规微生物检测实验室提供。

TMAO·2H₂O (分析纯) 天科生物科技有限公司；TMAO·2H₂O标品、TMA-HCl标品、DMA-HCl标品美国Sigma公司；苦味酸、甲苯、氢氧化钾、甲醛、三氯醋酸、葡萄糖、无水硫酸钠 北京化工厂；胰蛋白酶、酵母浸粉、牛肉膏、琼脂粉 北京奥博星生物技术责任有限公司。

1.2 培养基

PCA液体培养基：胰蛋白酶5 g/L、酵母浸粉2.5 g/L、葡萄糖1 g/L，pH 7.0，121 °C灭菌15 min。PCA固体培养基：在PCA液体培养基中添加琼脂15 g/L，灭菌。检测培养基：向已灭菌的PCA液体培养基中添加过滤除菌的TMAO溶液，使其最终质量浓度达到2 g/L。

1.3 仪器与设备

FE20 pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司；ICS-2000离子色谱仪 美国戴安公司；Synergy HT酶标仪 美国柏腾仪器有限公司；MP522型精密pH/电导率测量仪(2401-M电导电极) 上海三信仪表厂；UV-5200紫外分光光度计 北京恺欣世纪科技发展有限公司；TGL18M台式高速冷冻离心机 盐城市凯特实验仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 菌种活化

取斜面上保存的菌种，于PCA固体培养基平板上划线活化分离2次，从平板上挑取单菌落，接种在装有10 mL PCA液体培养基的试管中，37 °C培养24 h，制成菌悬液。

1.4.2 分解TMAO菌种的筛选

分别吸取已活化的6种菌悬液各200 μL，按无菌操作分别接种到40 mL检测培养基和PCA培养基中，每个处理3个重复，分别另取3瓶40 mL无菌培养基为空白。置于37 °C培养箱中培养，分别在培养24 h后取样，进行培养基pH值、电导率检测。通过比较微生物生长引起的2种培养基理化性质变化情况和变化幅度差异，筛选获得阳性菌株进行后续实验。

$$\text{变化幅度}/\% = \left(\frac{A}{B} - 1 \right) \times 100$$

式中：A为微生物培养后培养基电导率或pH值平均值；B为空白培养基电导率或pH值平均值。

1.4.3 样品前处理

取PCA液体培养基培养的菌悬液6 mL测量电导率和pH值后，在4 °C、9 000 r/min离心10 min。移取4 mL上清液于另一离心管中，加入等体积7.5%三氯乙酸溶液后，再次在4 °C、9 000 r/min离心10 min，取上清经0.45 μm纤维素膜过滤，取25 μL进样于ICS-2000离子色谱仪。

1.4.4 非抑制型离子色谱定性分析水解产物^[12]

分离柱：Dionex Ionpac CS17 (4 mm×250 mm)，柱温：30 °C；保护柱：Dionex Ionpac GS17 (4 mm×50 mm)；电导检测器，电导池温：35 °C；流动相及流速：3 mmol/L的甲磺酸溶液，0.8 mL/min；程序时间及数据采集速率：20 min，5.0 Hz；柱压设置：最低200 psi，最高3 000 psi；分析时间为20 min。

1.4.5 分解TMAO菌种生长曲线的检测

按照1.4.1节活化具有分解TMAO能力的菌种，分别吸取已活化的菌悬液各1 mL，接种到500 mL检测培养基中，取无菌检测培养基为空白，静置于37 °C，从接菌后0.5 h开始，每隔1 h在无菌条件下移取菌悬液6 mL，进行电导率、pH值、浊度(OD_{600 nm})的检测，并按1.4.3节中所述方法离心取上清，保存于4 °C冰箱中，检测培养基中TMA的质量浓度。

1.4.6 TMA的定量测定

参照苦味酸比色法并略作修改^[13]，移取一定量上清液于10 mL比色管中，空白为无菌检测培养基，去离子水定容至2 mL，依次加入0.5 mL 10%甲醛溶液、2.5 mL无水甲苯、1.5 mL 25 g/100 mL KOH溶液，盖上塞子，漩涡混合器混合3次。静置分层后，将甲苯层移至干燥小试管，每管加入约0.2 g无水硫酸钠。准确移取100 μL苦味酸工作液于96孔酶标板，依次加入上述用无水硫酸钠脱水后的甲苯层100 μL，每个质量浓度3个重复，15 min后在酶标仪上用410 nm波长处检测吸光度。根据标准曲线计算TMA质量浓度。

1.4.7 数据处理

除定性的离子色谱实验外，每个处理均做3次重复，每次实验平行测定3次，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用SPSS V12软件进行统计分析，采用多重比较和配对t检验的方法。

2 结果与分析

2.1 微生物生长24 h对培养基导电性和pH值的影响

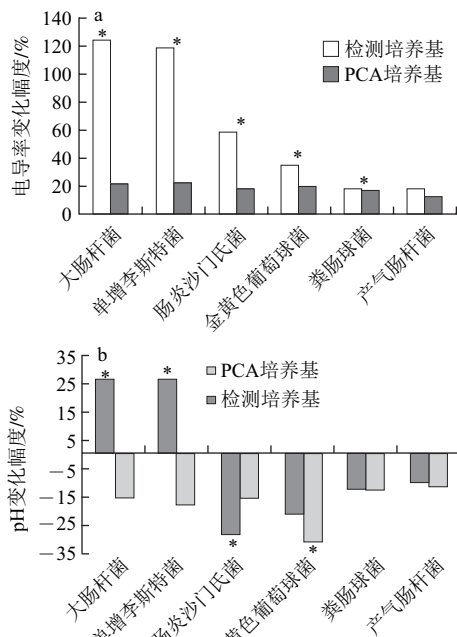
由表1可知，检测培养基在经过微生物24 h的生长后，与空白培养基相比电导率和pH值，均发生显著变化($P < 0.05$)，培养基的电导率在6种菌生长后均增加，而pH值则表现出多样性变化，除大肠杆菌和单增李斯特菌外，其余4种菌均使检测培养基pH值降低。PCA培养基的电导率和pH值则较空白组差异不大，但均表现出电导率升高和pH值的降低。以上结果说明，微生物可以将培

培养基中的非电解质转化为具有导电能力的物质, 改变培养基溶液的导电性, 且这种变化与培养基溶液pH值的变化之间没有相关性。

表 1 两种培养基在微生物生长24h后的电导率和pH值变化
Table 1 Conductivity and pH after microorganisms were grown for 24 h in the assay medium and PCA medium

菌种	电导率/($\mu\text{S}/\text{cm}$)		pH	
	检测培养基	PCA培养基	检测培养基	PCA培养基
大肠杆菌	3 037.75 $\pm$ 50.96 ^a	1 707.54 $\pm$ 6.59 ^a	8.29 $\pm$ 0.04 ^a	5.63 $\pm$ 0.06 ^a
单增李斯特菌	3 012.58 $\pm$ 84.59 ^a	1 714.02 $\pm$ 14.75 ^a	8.28 $\pm$ 0.04 ^a	5.46 $\pm$ 0.06 ^a
肠炎沙门氏菌	2 147.11 $\pm$ 14.36 ^b	1 656.30 $\pm$ 30.08 ^{ab}	4.69 $\pm$ 0.10 ^c	5.61 $\pm$ 0.23 ^a
金黄色葡萄球菌	1 829.62 $\pm$ 23.21 ^c	1 681.71 $\pm$ 12.01 ^a	5.18 $\pm$ 0.12 ^d	4.58 $\pm$ 0.01 ^{ab}
粪肠球菌	1 599.86 $\pm$ 11.19 ^c	1 641.85 $\pm$ 5.76 ^{ab}	5.75 $\pm$ 0.12 ^c	6.00 $\pm$ 0.34 ^a
产气肠杆菌	1 601.61 $\pm$ 9.71 ^d	1 575.16 $\pm$ 9.21 ^b	5.89 $\pm$ 0.10 ^c	5.88 $\pm$ 0.02 ^a
空白	1 324.06 $\pm$ 46.63 ^f	1 511.25 $\pm$ 148.17 ^b	6.56 $\pm$ 0.03 ^b	6.64 $\pm$ 0.18 ^a

注: 同列字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。



*. 同一菌种在两种培养基上的电导率或者pH值变化幅度存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

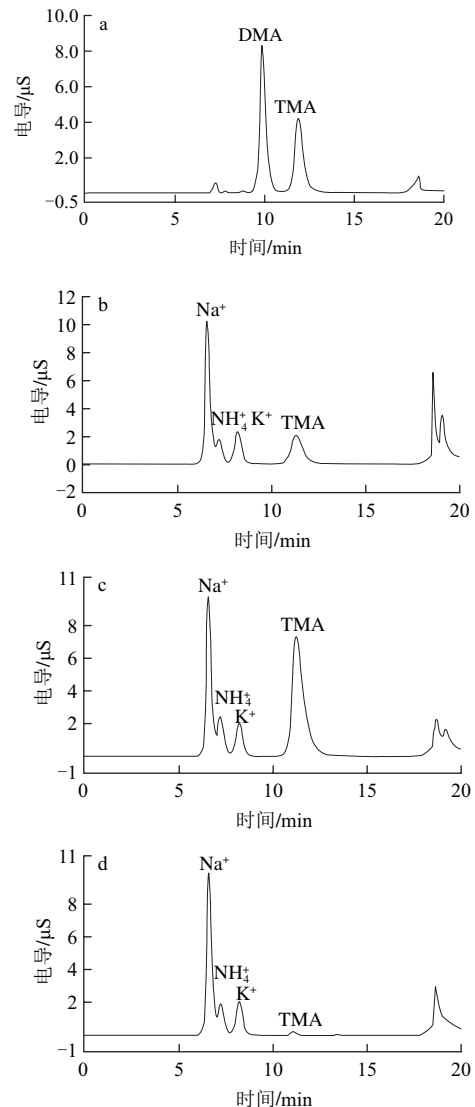
图 1 6种微生物生长24h后培养基的电导率和pH值变化

Fig.1 Changes in conductivity and pH after microorganisms were grown for 24 h

如图1a所示, 微生物在含有TMAO的检测培养基中生长引起电导率的变化幅度均高于PCA培养基。其中, 大肠杆菌和单增李斯特菌引起的增加幅度达120%, 肠炎沙门氏菌的电导率也有较大增长, 增加率为60%, 除产气肠杆菌外, 其余几种菌在两种培养基中引起的电导率变化均存在显著性差异。除产气肠杆菌和粪肠球菌外, 其他微生物在两种培养基中生长引起的pH值变化均存在显著性差异, 如图1b所示, 大肠杆菌和单增李斯特菌使检测培养基pH值升高, 而肠炎沙门氏菌在检测培养基中引起的pH值降低幅度高于PCA培养基。

根据以上结果, 可将上述6种微生物分为3类: 1) 大肠杆菌和单增李斯特菌, 这两种菌可能具有迅速分解TMAO产生导电性强小分子的能力, 造成检测培养基电导率和pH值的显著升高; 2) 肠炎沙门氏菌, 推测TMAO或其分解产物能促进其生长, 导致培养基pH值下降幅度增加; 3) 金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和产气肠杆菌, 该类菌生长引起的检测培养基的电导率变化幅度小于50%, 且其生长和代谢不受TMAO的影响。选择大肠杆菌、单增李斯特菌和肠炎沙门氏菌进行后续实验。

2.2 非抑制型离子色谱对TMAO分解产物的定性结果



a. TMA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和DMA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 样品; b、c、d分别为大肠杆菌、单增李斯特菌、肠炎沙门氏菌生长24h后的检测培养基。

图 2 TMAO分解产物离子色谱图

Fig.2 Ion chromatogram of degraded products from TMAO

图2为2.1节中可能利用TMAO的3种微生物(大肠杆菌、单增李斯特菌和肠炎沙门氏菌)在检测培养基培养后的离子色谱检测结果, 根据文献[14], TMAO的可

能分解产物包括TMA、DMA、甲醛、甲烷等小分子, 其中是弱电解质的物质只有TMA ($pK_b=4.2$) 和DMA ($pK_b=3.23$)^[9]。参照图2a中TMAO的两种分解产物TMA (11.843 min) 和DMA (9.857 min) 的保留时间, 结果表明这3种微生物分解TMAO后的产物均为TMA, 没有DMA, 与国外文献[15-17]报道相符。其中沙门氏杆菌的分解能力最弱(图2d), 与2.1节中培养基电导率结果相符。

2.3 电导率、pH值、浊度、TMA质量浓度随微生物生长在检测培养基中的变化

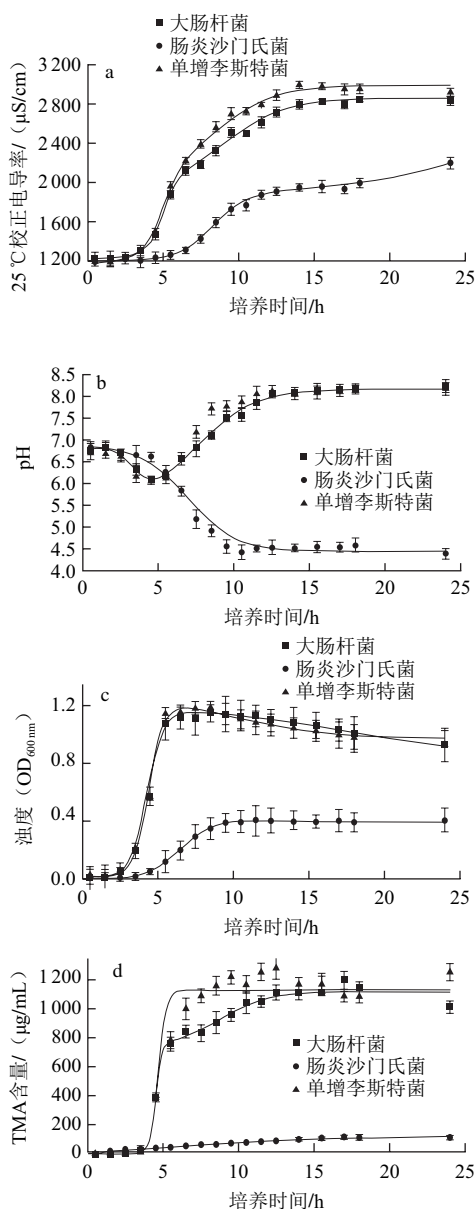


图3 3种微生物生长引起的培养基理化指标变化

Fig.3 Changes in physiochemical properties of the medium during cultivation of three bacterial species

如图3所示, 大肠杆菌和单增李斯特菌的各指标随

培养时间的变化曲线较为相似, 大致都可分为4个阶段。阶段1 (0~1.5 h), 此阶段为微生物的适应期, 各指标均无明显变化, TMA产量在该阶段表现出滞后性, 约延续到3.5 h, 说明这两种微生物代谢TMAO的酶是诱导酶。阶段2 (1.5~5.5 h), 表示微生物数量的浊度曲线在该阶段具有最大斜率, 同时培养基的pH值曲线出现下降趋势, 该阶段结束时这两种菌的浊度达到最大值, pH值达到最低点, 最低点处pH值为6.0, 在此期间, 微生物大量繁殖代谢培养基中的可溶性碳水化合物, 导致培养基pH值下降。与之相应, 培养基中TMA质量浓度在3~5.5 h起快速增高, 由于TMA和培养基中酸性物质的增加, 导致该阶段培养基的电导率亦在整个培养阶段具有最大斜率。第3阶段 (5.5~11.5 h), 培养5.5 h以后, 这两种微生物进入稳定期, 培养基浊度不再增加, 菌体的产酸能力下降, 并且随着培养基中TMA质量浓度的继续缓慢增加, 培养基的pH值逐渐升高, 此阶段中培养基的导电能力的增加仅依靠TMA的生成, 因而较第2阶段电导率曲线的斜率减小。第4阶段 (11.5~24.5 h), 此时微生物已进入衰亡期, 培养基的浊度逐渐减小, 而培养基pH值、电导率和TMA质量浓度均无显著变化。由于肠炎沙门氏菌对TMAO的代谢能力不强, 但具有较强的产酸能力, 因此也能检测到培养基电导率的较大变化, 其培养基浊度、pH值和电导率的变化曲线可简单分为3个阶段 (0~3.5 h, 3.5~10.5 h, 10.5~24.5 h), 在整个培养过程中, 肠炎沙门氏菌培养基中的TMA质量浓度, 持续地缓慢变化, 因此, 推测肠炎沙门氏菌的TMAO代谢酶为一种组成酶类, Arguello等^[18]的研究结果表明, 肠炎沙门氏菌在厌氧条件下才将TMAO作为呼吸链上的电子受体加以利用, 这可能是本实验中肠炎沙门氏菌未能大量产生TMA的原因。

3 结论

本实验发现6种常见食品腐败微生物对TMAO的代谢具有选择性, TMAO的添加对微生物生长后培养基的电导率与pH值影响很大, 根据电导率和pH值的变化, 可将这6种菌分成3类: 1) 能分解TMAO的大肠杆菌和单增李斯特菌; 2) TMAO促进产酸的肠炎沙门氏菌; 3) 添加TMAO后不受影响的金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和产气肠杆菌。这3类菌对添加TMAO培养基的电导率和pH值影响的差异显著。通过离子色谱对TMAO降解产物分析后发现, 引起培养基电导率和pH值变化的是TMA。而通过对第1、2类菌分别以电导率、pH值、浊度和TMA质量浓度为指标绘制的生长曲线, 验证TMA的生成对培养基电导率和pH值产生影响, 并且这种影响对与不同类型的菌种差异显著。本研究证明TMAO是一种可用于阻抗法微生物检测的指示物质, 为微生物阻抗法快速检测提供理论基础。

参考文献:

- [1] 卢智远, 牛中奇, 刘启, 等. 一种微生物检测的生物电化学方法研究[J]. 传感技术学报, 2005, 18(3): 481-483; 487.
- [2] 胡珂文, 王剑平, 盖铃, 等. 电化学方法在微生物快速检测中的应用[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 526-530.
- [3] RAMALHO R, CUNHA J, TEIXEIRA P, et al. Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(2): 97-103.
- [4] FELICE C J, MADRID R E, OLIVERA J M, et al. Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 35(1): 37-42.
- [5] 张爱萍, 唐佳妮, 刘东红. 阻抗法检测食品中微生物的研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(2): 436-439.
- [6] BARRETT E L, KWAN H S. Bacterial reduction of trimethylamineoxide[J]. Microbiology, 1985, 39: 131-149.
- [7] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 11-27.
- [8] GIBB S W, HATTON A D. The occurrence and distribution of trimethylamine-N-oxide in Antarctic coastal waters[J]. Marine Chemistry, 2004, 91: 65-75.
- [9] 揭念云. 基础化学 I [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 517-518.
- [10] ANSALDI M, BORDI C, LEPELLETIER M, et al. Torcapocytocrome negatively autoregulates the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase operon in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 1999, 33: 284-295.
- [11] 郭修娟. 氧化三甲胺代谢相关菌的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [12] LI Feng, LIU Hongying, XUE Changhu, et al. Simultaneous determination of dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in aquatic products extracts by ion chromatography with non-suppressed conductivity detection[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(31): 5924-5926.
- [13] DYER W J, MOUNSEY Y A. Amines in fish muscle II. Development of trimethylamine and other amines[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1945, 30: 91-98.
- [14] WZOREK B, MOCHALSKI P, SLIWKA I. Application of GC-MS with a SPME and thermal desorption technique for determination of dimethylamine and trimethylamine in gaseous samples for medical diagnostic purposes[J]. Journal of Breath Research, 2010, 4: 1-6.
- [15] TIMM M, JORGENSEN B M. Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection[J]. Food Chemistry, 2002, 76: 509-518.
- [16] SIMEONIDOU S, GOVARIS A, VARELTZIS K. Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and Mediterranean hake (*Merluccius mediterraneus*)[J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A, 1997, 204: 405-410.
- [17] 宋丹阳, 周德庆, 杜永芳, 等. 氧化三甲胺酶研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 350-353.
- [18] ARGUELLO Y M, PAIVA J B, PENHA R A, et al. Participation of genes involved in the process of anaerobic respiration of infection in chickens by *Salmonella* Typhimurium[J]. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, 2010, 3(1): 2-8.