

大菱鲆复合生物保鲜剂的优化及保鲜效果研究

方士元^{1,2,3} 梅俊^{1,2,3,4,*} 谢晶^{1,2,3,4,*} 励建荣⁵

(¹上海海洋大学食品学院,上海 201306;²上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,上海 201306;

³上海冷链装备性能与节能评价专业技术服务平台,上海 201306;⁴食品科学与工程国家级实验

教学示范中心(上海海洋大学),上海 201306;⁵渤海大学食品科学与工程学院,辽宁 锦州 121013)

摘要:为了延长大菱鲆的货架期,选取乳酸链球菌素(Nisin)、乳酸钠和海藻酸钠进行单因素试验,利用响应面 Box-Behnken 试验设计对复合生物保鲜剂进行复配优化,建立以第 9 天的鱼肉挥发性盐基氮(TVB-N)含量为响应值的二次多项式回归模型,并通过测定大菱鲆肌肉菌落总数、pH 值、TVB-N 含量、巯基含量、持水力,以及用低场核磁技术测定水分迁移和光学显微镜观测肌肉组织结构变化,验证最优配比复合保鲜剂的保鲜效果。结果表明,经方差分析和回归拟合,得到 3 种生物保鲜剂的最佳添加量为 Nisin 0.04%、乳酸钠 5.92%、海藻酸钠 1.06%,经保存 9 d 的大菱鲆 TVB-N 有最小值(18.37 mg·100g⁻¹),且 Nisin 与乳酸钠对大菱鲆的保鲜具有显著的交互作用($P < 0.05$),响应面模型与实际情况拟合较好。经复合保鲜剂处理过的 4℃ 冷藏大菱鲆,货架期可延长至 14 d。本研究为制备高品质水产品可食性涂膜提供了理论依据和技术支持。

关键词:大菱鲆;复合生物保鲜剂;响应面优化;货架期

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.09.2011

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 为 鲽 形 目 (Pleuronectoidei) 鲆 科 (Bothidae) 菱 鲆 属 (*Scophthalmus*) 高蛋白低脂肪的优质鱼类,是我国北方海水养殖的主要鱼种之一^[1]。大菱鲆捕捞后易腐败变质,通常采用保鲜剂或气调包装结合冷藏或冻藏来减缓其变质进程^[2]。

随着消费者对水产品安全问题日益重视,以及环保概念深入人心,使得研究人员对生物可降解保鲜剂的兴趣不断增加。复合生物保鲜剂由可食用和可再生资源制成,易降解,有助于减少环境污染,已得到广泛应用。然而,单一生物保鲜剂的保鲜效果有限,将多种不同功能的保鲜剂结合使用保鲜效果更好^[3-4]。Nie 等^[5]以茶多酚和海藻酸钠为复合保鲜剂对日本鲈鱼进行保鲜,发现此复合保鲜剂可显著降低鲈鱼脂质氧化和蛋白质分解水平。Thaker 等^[6]研究添加壳聚

糖、大蒜提取物和柠檬汁的鱼明胶涂布液对印度大马哈鱼鱼片品质和货架期的影响发现,大马哈鱼片货架期较对照组延长了 6 d。而针对大菱鲆复合生物保鲜剂的研究相对较少。

乳酸链球菌素(Nisin)能显著抑制革兰氏阳性菌,乳酸钠对革兰氏阴性菌有抑制效果^[7],海藻酸钠作为食品涂膜基材时,有一定抗氧化作用,也是一些抑菌抗氧化物质的有效载体^[8]。本研究选用 Nisin、乳酸钠和海藻酸钠进行复合保鲜研究,以挥发性盐基氮(volatile base nitrogen, TVB-N)为响应值,采用响应面 Box-Behnken 设计优化保鲜剂最佳复配条件,并对复合保鲜剂的保鲜效果进行验证,旨在延长商品化包装大菱鲆整鱼的货架期,为大菱鲆生物保鲜剂的复配优化提供理论参考。

收稿日期:2019-03-26 接受日期:2019-07-18

基金项目:农业部海水鱼产业体系(CARS-47),2016年上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2016)第1-1号],上海市科委平台能力建设项(16DZ2280300),上海市科委公共服务平台建设项目(17DZ2293400)

作者简介:方士元,男,主要从事水产品保鲜研究。E-mail:b15850777@163.com

* 通讯作者:梅俊,男,讲师,主要从事水产品低温储藏与加工研究。E-mail:delightmay@hotmail.com;

谢晶,女,教授,主要从事水产品加工及低温保藏品质控制研究。E-mail:jxie@shou.edu.cn。同为通讯作者。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鲜活大菱鲆,上海市浦东新区芦潮港水产批发市场,充氧保活,30 min 内运到实验室;乳酸钠(色谱纯)、三氯乙酸(分析纯)、氧化镁(分析纯)、甲基红(分析纯)、溴甲酚绿(分析纯)、硫代巴比妥酸(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、二甲苯(分析纯)、福尔马林(分析纯),生工生物工程(上海)股份有限公司;平板计数琼脂(plate count agar, PCA),杭州微生物试剂有限公司;Nisin($\geq 1\ 000\ \text{IU}\cdot\text{mg}^{-1}$),阿拉丁生物试剂有限公司;海藻酸钠(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;总巯基试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 主要仪器与设备

BPS-100CB 恒温恒湿箱,上海一恒科学仪器有限公司;H-2050R 型台式高速低温离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;NMI20-060H-I 低场核磁共振成像分析仪,上海纽迈电子科技有限公司;Kjeltec 8400 凯氏定氮仪,瑞典 FOSS 公司;WFZ UV-2100 型紫外可见分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;LDZM-40KCS-III 立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;Nikon-E200 光学显微镜,日本 Nikon 公司;RM2235 冷冻切片机,德国 Leica 公司;BIO-RAD iMark 酶标仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 响应面试验设计

鲜活大菱鲆冰水致死,去鳃和内脏,洗净沥干后去皮,切片(3 cm×1 cm×1 cm),将 3 种保鲜剂配制成为不同浓度梯度的溶液,浸泡鱼体 1 min,取出室温下沥干 30 min,将其分装到无菌自封袋中于 4℃ 冰箱保藏,定时取样测定 TVB-N 值。根据前期单因素试验结果,确定 Nisin、乳酸钠、海藻酸钠的最佳浓度分别为 0.04%、6.00% 和 1.50%。

在单因素试验基础上,利用 Box-Behnken 设计三因素三水平试验。将 Nisin(A)、乳酸钠(B)、海藻酸钠(C)作为考察因素,以第 9 天鱼样中 TVB-N 值(通过预试验已确定贮藏期)作为响应值,通过响应面分析确定该复合生物保鲜剂的最佳配比,并与对照组(未添加保鲜剂)进行比较验证,试验因素水平设置见表 1。为贴合实际采用整鱼进行复合保鲜浸渍处理。

表 1 响应面因素水平表

Table 1 Factors and levels used in RSM design

水平 Level	Nisin A/%	乳酸钠 B Sodium lactate/%	海藻酸钠 C Sodium alginate/%
-1	0.03	5.00	1.00
0	0.04	6.00	1.50
1	0.05	7.00	2.00

1.4 指标测定

按照 1.3 中的方法,使用响应面法优化的最佳配方处理大菱鲆,定时取样测定各项指标,并与对照组进行比较。

1.4.1 TVB-N 值测定 根据 GB 5009.228-2016^[9],利用半微量定氮法测定大菱鲆的 TVB-N 值,3 次平行。

1.4.2 菌落总数测定 参照 GB 4789.2-2016^[10]测定大菱鲆贮藏过程中的菌落总数。

1.4.3 pH 值测定 参照 GB 5009.237-2016^[11]测定大菱鲆贮藏过程中的 pH 值。

1.4.4 巯基测定 根据巯基测定试剂盒进行测定,采用酶标仪测定 412 nm 波长处的吸光度值。

1.4.5 持水力(water-holding capacity, WHC)测定 参照王丽丽等^[12]的方法。精确称取 3 g 左右鱼肉样品(W_1),滤纸拭干样品表面水分后置于干燥离心管,4℃、3 000 r·min⁻¹离心 15 min,再精确称重(W_2),按照公式计算 WHC:

$$\text{WHC} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.6 光镜观察 参照李婷婷^[13]的方法,将鱼块(5 mm×5 mm×5 mm)用 5%福尔马林溶液固定 24 h,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明处理、石蜡包埋和切片染色后,在光学显微镜下(×100)观察切片组织。

1.4.7 低场核磁测定 参考 Li 等^[14]的方法。取鱼样(2 cm×2 cm×1 cm)用保鲜膜包裹,放入直径为 70 mm 的核磁检测管中。使用 CPMG 序列,设置 T_2 测量参数。根据 CPMG 指数衰减曲线图,用分析软件进行迭代反演得到横向弛豫时间 T_2 图谱。用核磁共振成像仪对相同鱼样进行成像,得到质子密度图后对图像统一映射、伪彩分析。

1.5 数据处理

所有试验均重复 3 次,利用 SPSS 19.0 和 Origin 9.0 软件进行统计学分析和绘制曲线,利用 Design-Expert 8.0.6 绘制响应面曲面。

2 结果与分析

2.1 Box-Behnken 试验结果

根据前期单因素试验结果, Nisin、乳酸钠、海藻酸钠单独作用的最佳浓度分别为 0.04%、6.00% 和 1.50%, 在此浓度下既能保证大菱鲆贮藏过程中 TVB-N 值较低, 又能减少保鲜剂的使用。由表 2 可知, 响应面共设 15 个试验点, 中心试验重复 3 次, 以评估试验误差, 所得中心试验误差较小, 符合试验设计的要求。通过 Design-Expert 8.0.6 对数据进行回归拟合, 得到各保鲜剂与响应值(TVB-N)的二次多项式回归方程:

$$Y = 20.63 + 3.08A - 2.74B + 1.54C - 2.19AB + 2.29AC - 4.13BC + 3.31A^2 + 9.71B^2 - 1.06C^2$$

式中, Y 为 TVB-N 值; A 、 B 、 C 分别为 Nisin、乳酸钠和海藻酸钠的质量分数。

2.2 模型显著性检验及响应面分析

由表 3 可知, 模型 P 值 < 0.01 , 表明该模型极显著。模型失拟项 P 值 $= 0.1854 > 0.05$, 不显著, 模型选择合适, 可以正确反映 TVB-N 值与三因素之间的关系。相关系数 $R^2 = 0.9971$, 模型拟合程度很好。变异系数(coefficient of variation, CV)越低模型的置信度越高, 本试验的 CV 值为 2.29%, 说明模型方程能反映真

实试验值, 可基于此模型对 3 种保鲜剂的最佳配比进行预测。

表 2 Box-Behnken 试验设计及其试验结果

Table 2 Box-Behnken experiments design matrix and results

序号 Number	Nisin A /%	乳酸钠 B Sodium lactate/%	海藻酸钠 C Sodium alginate/%	TVB-N 值 Y TVB-N value /(mg·100g ⁻¹)
1	-1	-1	0	31.25
2	-1	0	-1	41.42
3	-1	0	1	30.26
4	-1	1	0	31.68
5	0	-1	-1	19.96
6	0	-1	1	21.90
7	0	1	-1	19.29
8	0	1	1	30.40
9	1	-1	0	26.82
10	1	0	-1	29.50
11	1	0	1	37.33
12	1	1	0	23.49
13	0	0	0	20.94
14	0	0	0	20.25
15	0	0	0	20.70

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

方差来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	650.47	9	72.27	188.11	<0.000 1
A	75.89	1	75.89	197.52	<0.000 1
B	59.90	1	59.90	155.89	<0.000 1
C	19.00	1	19.00	49.46	0.000 9
AB	19.14	1	19.14	49.82	0.000 9
AC	21.02	1	21.02	54.71	0.000 7
BC	68.23	1	68.23	177.58	<0.000 1
A ²	40.51	1	40.51	105.45	0.000 2
B ²	348.13	1	348.13	906.07	<0.000 1
C ²	4.11	1	4.11	10.70	0.022 2
残差 Residual error	1.92	5	0.38		
失拟项 Lack of fit	1.68	3	0.56	4.55	0.185 4
纯误差 Pure error	0.25	2	0.12		
总误差 Sum	652.39	14			

由图 1 可知,等高线呈椭圆形,表示两因素交互作用显著,AB、AC、BC 的 P 值 <0.01 (表 3),说明 2 种保鲜剂之间具有协同作用。当 Nisin 和乳酸钠分别在低浓度范围时,海藻酸钠随浓度的增大抑菌效果逐渐降低,可能是因为高浓度的海藻酸钠包裹了 Nisin 和乳酸钠,使其不能完全溶解分散,在鱼体表面分布不均^[15]。此外,海藻酸钠浓度达到一定水平时,Nisin 和乳酸钠能与海藻酸钠交联形成网状结构,延长保鲜剂作用时间,提高拟菌效果。数据分析得到鱼肉 TVB-N 值最小时的保鲜剂配比为 Nisin 0.04%、乳酸钠 5.92%和海藻酸钠 1.06%,该条件下的 TVB-N 值为 $18.37 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ 。

2.3 复合保鲜剂对大菱鲆保鲜效果验证

2.3.1 TVB-N 值变化 由图 2 可知,贮藏 8、10 d 保鲜组大菱鲆肌肉 TVB-N 值显著低于对照组,贮藏 12 和 14 d 时保鲜组 TVB-N 值极显著低于对照组。说明复合保鲜剂具有良好的抑菌效果,可减缓细菌繁殖。

2.3.2 菌落总数变化 由图 3 可知,贮藏 10 d 时保鲜组大菱鲆肌肉菌落总数显著低于对照组,贮藏 0 d 时,大菱鲆肌肉菌落总数为 $3.74 \text{ lg}(\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})$,此时鱼肉处于新鲜状态^[3]。贮藏 10 d 后,对照组大菱鲆肌肉的菌落总数超过 $7 \text{ lg}(\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})$,表明此时大菱鲆已经处于不可食用状态^[16],而保鲜组在贮藏 12 d 时菌落总数超过 $7 \text{ lg}(\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1})$ 。对比标准,就菌落总数而言,保鲜组较对照组延长约 2 d 货架期。说明复合生物保鲜剂可以显著抑制微生物的增长。

2.3.3 pH 值变化 由图 4 可知,对照组和保鲜组大菱鲆肌肉的 pH 值变化趋势大体一致,这是由于贮藏初期糖原分解产生乳酸,导致 pH 值下降,之后随着贮藏时间的延长,鱼体内蛋白不断分解为胺类等含氮物质,致使 pH 值上升。贮藏第 4 天,对照组和保鲜组的大菱鲆肌肉 pH 值分别为 5.41 和 6.53,且保鲜组的 pH 值极显著高于对照组。贮藏后期保鲜组大菱鲆肌肉 pH 值上升幅度较小,总体变化平缓,说明复合生物保鲜剂可以延缓糖原的分解,从而抑制大菱鲆肌肉 pH 值的下降。由于乳酸钠和海藻酸钠水溶液为弱碱性,造成贮藏第 14 天大菱鲆肌肉 pH 值偏高。

2.3.4 巯基含量变化 由图 5 可知,对照组和保鲜组大菱鲆肌肉的巯基含量均随贮藏时间的延长而降低,这与于林等^[16]的研究结果类似。Ko 等^[17]研究指出,肌原纤维降解会导致蛋白结构改变,暴露出的内部巯基被氧化成二硫键。保鲜组大菱鲆肌肉的巯基含量与对照组差异不显著,海藻酸钠和乳酸钠对巯基氧化抑制效果不佳,效果差于路钰希等^[18]用乳酸钠、海藻糖

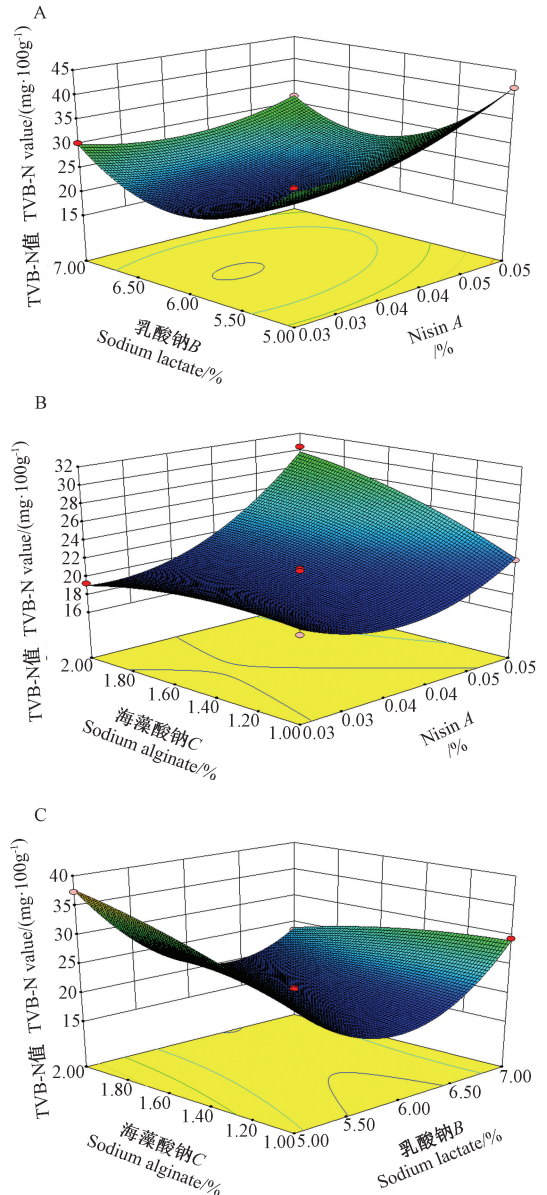
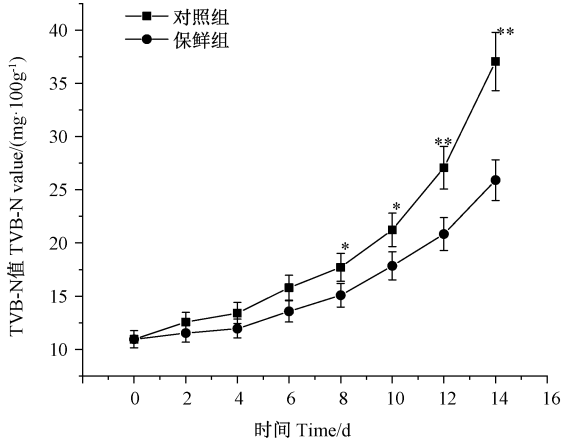


图 1 Nisin、乳酸钠和海藻酸钠交互影响 TVB-N 值的曲面图
Fig.1 Response surface plot of the effects of Nisin, sodium lactate and sodium alginate concentration on TVB-N

处理的 -20°C 贮藏的鱿鱼。这可能是由于乳酸钠、海藻糖主要通过抑制冰晶的形成对鱼肉肌原纤维结构产生的破坏来抑制巯基变化,且高浓度的乳酸钠会增大蛋白质的疏水性,促进蛋白质变性。

2.3.5 WHC 变化 WHC 反映鱼肉保持水分的能力,其对鱼肉的色泽、质地等食用品质具有较大影响^[19]。由图 6 可知,冷藏初期大菱鲆肌肉的 WHC 下降较快,随着贮藏时间的延长,保鲜组和对照组的 WHC 均逐渐降低。大菱鲆冷藏过程中 WHC 的下降可能是由于大分子网状结构被破坏^[20]。保鲜组 WHC 一直高于对照组,这可能是由于保鲜剂减缓了大菱鲆肌肉的自溶



注:在同一贮藏时间,*表示与对照组相比差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: At the same storage time, * and ** indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level compared with the control group, respectively. The same as following.

图2 大菱鲆在冷藏过程中TVB-N值的变化
Fig.2 Changes in TVB-N value of turbot during refrigeration storage

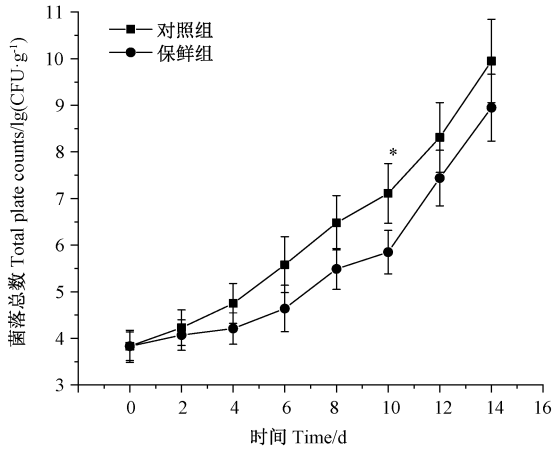


图3 大菱鲆在冷藏过程中菌落总数的变化

Fig.3 Changes in total plate counts of turbot during refrigeration storage

和劣变,从而较好地维持了其持水能力。

2.3.6 肌肉组织变化 在低温贮藏条件下,对鱼肉组织结构损伤最大的影响因素是酶的作用和机械损伤^[21]。由图7可知,对照组和保鲜组大菱鲆肌肉在贮藏第6天细胞间隙略有增大,而在贮藏第10天,两组的肌细胞均出现较大变形,肌肉组织结构破坏较为严重,在贮藏第14天,对照组细胞间隙巨大,肌肉纤维扭曲变形、皱缩,间隙不均匀。然而,保鲜组肌肉结构略优于对照组,说明复合保鲜剂对蛋白的降解变性影响较小。

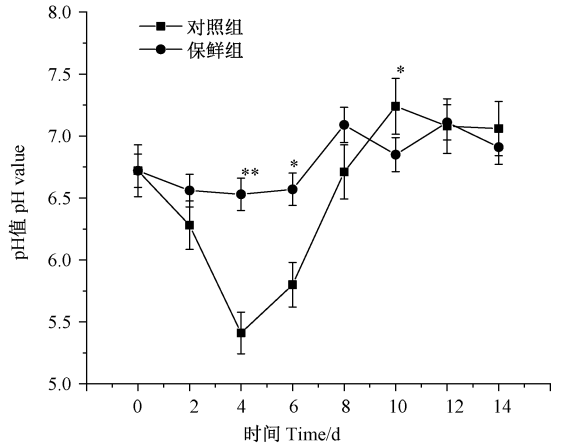


图4 大菱鲆在冷藏过程中pH值的变化
Fig.4 Changes in pH of turbot during refrigeration storage

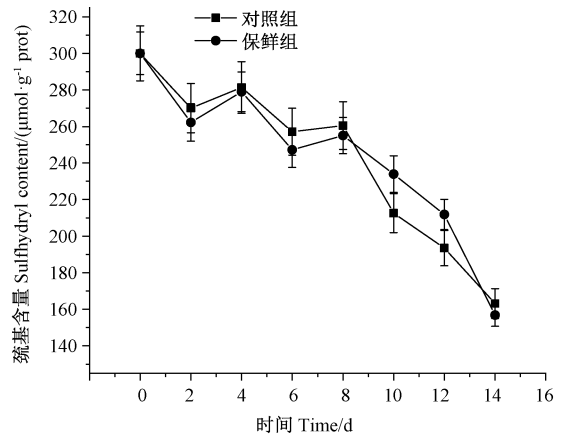


图5 大菱鲆在冷藏过程中巯基含量的变化

Fig.5 Changes in sulfhydryl content of turbot during refrigeration storage

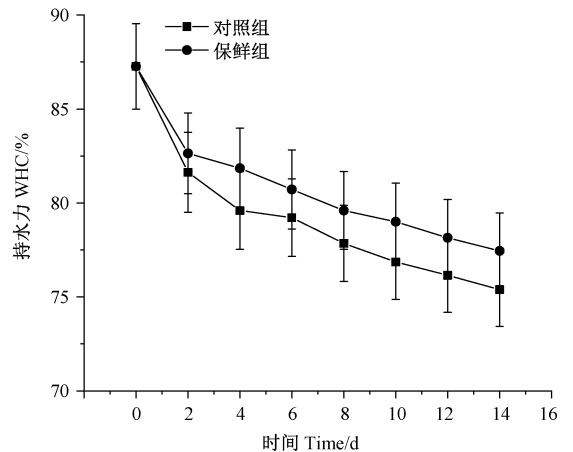
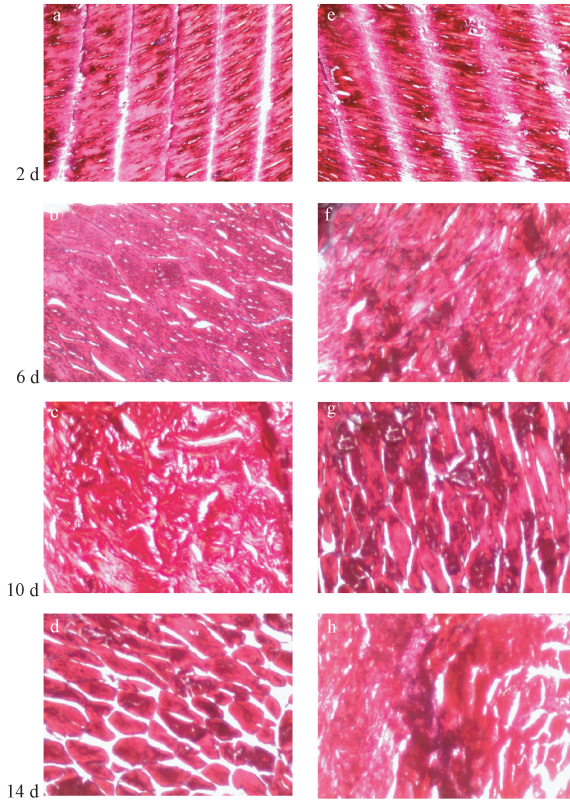


图6 大菱鲆在冷藏过程中持水力的变化

Fig.6 Changes in WHC of turbot during refrigeration storage



注:a,b,c,d为对照组;e,f,g,h为保鲜组。

Note:a, b, c, d are the control group. e, f, g, h are the preservation group.

图7 大菱鲆在冷藏过程中肌肉组织微观结构的变化($\times 100$)

Fig.7 Changes in muscle microstructure of turbot during refrigeration storage($\times 100$)

2.3.7 低场核磁变化 弛豫时间 T_2 可以作为评估大菱鲆肌肉中水分分布及其迁移变化的重要指标。结合表4发现,弛豫时间 T_{21} 指与蛋白质等羰基、氢键结合的水,这部分水波动较小,弛豫时间 T_{23} 指自由水,变化趋势没有很强的规律性。而肌肉中的水主要以不易流动水(T_{22})的形式存在,和对照组相比,保鲜组弛豫时间下降更缓慢,而弛豫时间越短,表明水的流动性越差^[22],说明对照组大菱鲆的水分与肌肉结合的更紧密,而保鲜组的水分更易变成其他形式的水,但结合峰面积比例来看,对照组 T_{21} 、 T_{22} 和 T_{23} 3种形式的水分子总和下降,说明胞内水转化为胞外自由流动水,保鲜组中不易流动水含量下降,结合水和自由水含量上升,这可能是由于海藻酸钠可以使表面水分子排列规整,形成稳定的结构。

图8为大菱鲆在贮藏第2、第8、第14天的核磁共振成像图,用于分析保鲜剂对水分迁移的影响。贮藏第2天大菱鲆肌肉内部的信号较强,主要呈现红色和亮黄色,此时肌肉中水分含量较高。随着贮藏时间的增加,肌肉水分降低,图像中表现为黄色部分增加,甚至出现蓝绿色。而在贮藏第14天,对照组图像呈蓝绿色,而保鲜组仍然以红色和亮黄色居多,说明即使是贮藏末期,保鲜组大菱鲆肌肉内部仍有较高的水分含量。

3 讨论

Nisin 和乳酸钠具有较好抑菌能力,海藻酸钠是可食膜的常用基材。本研究根据单因素预试验结果确定

表4 大菱鲆在冷藏过程中弛豫时间(T_2)及其振幅变化

Table 4 Changes in relaxation time distributions (T_2) and amplitude during refrigeration storage

时间 Time/d	样品 Samples	弛豫时间 Relaxation time/ms	高峰期 Peak time/ms	峰面积 Peak area	总面积 Total area	峰面积比例 Peak area ratio/%
0	对照组	T_{21}	1.38	97.49	3 960.47	2.46
		T_{22}	58.73	3 842.15	97.01	
		T_{23}	1 534.37	15.69	0.40	
2	对照组	T_{21}	1.20	47.86	2 586.44	1.85
		T_{22}	58.73	2 470.79	95.53	
		T_{23}	2 673.84	7.77	0.30	
	保鲜组	T_{21}	1.12	98.21	3 074.89	3.19
		T_{22}	58.73	2 969.97	96.59	
		T_{23}	2 171.12	6.70	0.22	
4	对照组	T_{21}	1.20	119.44	3 755.73	3.18
		T_{22}	58.73	3 624.72	96.51	
		T_{23}	1 431.46	11.068	0.29	

表 4(续)

样品 Samples	弛豫时间 Relaxation time/ms	高峰期 Peak time/ms	峰面积 Peak area	总面积 Total area	峰面积比例 Peak area ratio/%		
6	保鲜组	T ₂₁	1.12	92.06	3 770.99	2.44	
		T ₂₂	54.79	3649.79		96.79	
		T ₂₃	943.79	29.13		0.77	
	对照组	T ₂₁	1.48	59.15	2 553.14	2.32	
		T ₂₂	58.73	2 468.39		96.68	
		T ₂₃	1 762.91	7.78		0.30	
	8	保鲜组	T ₂₁	1.48	65.48	3 593.19	1.82
			T ₂₂	58.73	3 421.06		95.20
			T ₂₃	1 889.65	9.11		0.25
对照组		T ₂₁	1.2	1 17.27	3 564.62	3.29	
		T ₂₂	57.33	3 437.36		96.43	
		T ₂₃	1 867.31	9.98		0.28	
10		保鲜组	T ₂₁	1.29	77.31	3 644.49	2.12
			T ₂₂	54.79	3 556.13		97.58
			T ₂₃	1 245.88	11.05		0.30
	对照组	T ₂₁	1.3	80.57	2 768.57	2.53	
		T ₂₂	53.25	2 679.70		96.79	
		T ₂₃	2 098.76	8.31		0.3	
	12	保鲜组	T ₂₁	1.20	71.96	2 507.37	2.09
			T ₂₂	51.11	2 426.93		96.79
			T ₂₃	1 534.37	8.35		0.33
对照组		T ₂₁	1.2	124.46	3 476.56	2.63	
		T ₂₂	52.46	3 342.71		96.15	
		T ₂₃	1 649.03	9.39		0.27	
14		保鲜组	T ₂₁	1.20	77.34	3 381.50	2.29
			T ₂₂	54.79	3 295.57		97.46
			T ₂₃	1 762.91	8.58		0.25
	对照组	T ₂₁	1.38	74.10	3 115.75	2.38	
		T ₂₂	51.11	3 033.76		97.37	
		T ₂₃	2 171.12	7.89		0.25	
	保鲜组	T ₂₁	1.20	64.98	2 254.19	2.88	
		T ₂₂	54.79	2 178.75		96.65	
		T ₂₃	1 162.32	10.46		0.46	

Nisin、乳酸钠和海藻酸钠的最佳浓度分别为 0.04%、6.00% 和 1.50%，在此基础上，利用 Box-Behnken 法设计响应面优化试验。将 Nisin、乳酸钠和海藻酸钠作为考察因素，确定该复合生物保鲜剂的最佳配比为 0.04% Nisin、5.92% 乳酸钠和 1.06% 海藻酸钠。

Nisin 是一种微生物源的生物保鲜剂，可以在细胞

膜上产生细孔，通过结合类脂 II 阻碍细胞壁的合成来显著抑制革兰氏阳性菌^[23]。有研究人员使用 Nisin 作为保鲜剂处理大菱鲆鱼片，可使大菱鲆鱼肉的货架期延长 6~9 d^[24]，但 Nisin 抑菌谱较窄，主要对革兰氏阳性菌有抑制作用，而乳酸钠能抑制链球菌属 (*Streptococcus*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 属生长，且

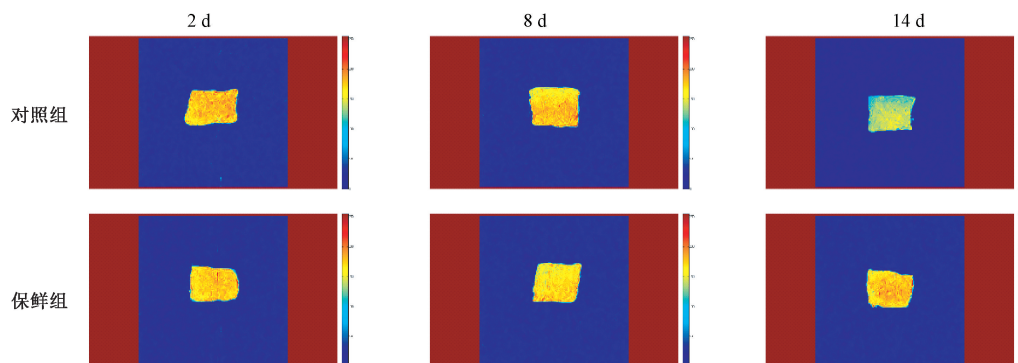


图 8 大菱鲆在冷藏过程中核磁共振成像图的变化

Fig.8 Changes in magnetic resonance imaging of turbot during refrigeration storage

与 Nisin 有显著的交互效应和互补效应^[25]。鱼肉内微生物的生长得到抑制,减缓了碱性产物的积累,有效地控制了 pH 值的变化。Behnam 等^[26]也观察到 Nisin 处理过的虹鳟鱼肉 pH 值较对照组上升较慢。此外,乳酸钠与海藻酸钠溶液(弱碱性)具有一定缓冲作用,可缓解 pH 值下降。

肌肉中的结构蛋白决定了肌肉的 WHC,蛋白质氧化会使 WHC 下降。保鲜组和对照组大菱鲆在贮藏过程中 WHC 不断下降,其中保鲜组下降更为缓慢,这可能是由于乳酸钠能降低鱼体的水分活度^[15],使水分与蛋白质结合更紧密,减缓鱼肉 WHC 下降。海藻酸钠是具有保湿效果的亲水性多糖,能在鱼肉表面形成大分子网状结构^[27-28],也起到了减缓肌肉水分流失的作用。Khanal 等^[29]研究也表明海藻酸钠有较高持水能力。

鱼肉贮藏后期,蛋白质氧化变性以及蛋白酶的降解作用,导致肌原纤维内部的汁液严重流失,肌肉出现明显缝隙^[30]。而乳酸钠和海藻酸钠具有一定的抗氧化作用,保鲜组大菱鲆肌肉缝隙更小,这与 WHC 的结论一致,此外,巯基是蛋白质中最易被氧化的基团之一,冷藏期间易被氧化成二硫键,而海藻酸钠能形成共轭烯酸结构^[31],与自由基电子结合形成稳定的自由基中间体结构,防止巯基氧化。但高浓度的乳酸钠会增大蛋白质疏水性,促进蛋白质变性,使内部巯基暴露易被氧化,或使蛋白聚集,导致检测到的巯基含量下降^[32]。结果表明,适量的乳酸钠结合海藻酸钠对冷藏大菱鲆肌肉蛋白有保护作用,能延缓蛋白质的降解和变性。

4 结论

Box-Behnken 试验设计响应面法优化复合生物保

鲜剂最优配比为 Nisin 0.04%、乳酸钠 5.92%、海藻酸钠 1.06%。该复合生物保鲜剂可以有效抑制大菱鲆整鱼商品化包装中微生物的生长,减缓 TVB-N 的产生速率,抑制 pH 值的变化,提高鱼肉 WHC,保持鱼肉的水分含量,减缓蛋白质结构的变化,对鱼肉脂类和蛋白质氧化也能起到一定的抑制作用。复合保鲜剂可将大菱鲆整鱼的货架期较常规 4℃ 冷藏延长 2~3 d。

参考文献:

- [1] Lv X R, Ma H H, Sun M T, Lin Y, Bai F L, Li J R, Zhang B. A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets [J]. Food Control, 2018, 89: 22-31
- [2] Sampels S. The effects of storage and preservation technologies on the quality of fish products; A review [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(6): 1206-1215
- [3] 官爱艳, 谭贝贝, 卢佳芳, 杨文鸽, 周伟, 周必聪, 周颖. 生物保鲜剂对海鲈鱼冰藏保鲜效果的影响 [J]. 核农学报, 2017, 31(8): 1528-1536
- [4] 谢晶, 蓝蔚青. 水产品流通过程中保鲜技术研究进展 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(7): 1-8
- [5] Nie X B, Wang L H, Wang Q, Lei J L, Hong W S, Huang B S, Zhang C F. Effect of a sodium alginate coating infused with tea polyphenols on the quality of fresh Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets [J]. Journal of Food Science, 2018, 83(6): 1695-1700
- [6] Thaker M, Hanjabam M D, Gudipati V, Kannuchamy N. Protective effect of fish gelatin-based natural antimicrobial coatings on quality of Indian salmon fillets during refrigerated storage [J]. Journal of Food Process Engineering, 2017, 40(1): e12270
- [7] Na L I, Jun W U. Study on prefabricated diced chicken compound preservatives formula optimization and preservation effect [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 210-215
- [8] Raesi M, Tabaraei A, Hashemi M, Bansal N. Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*,

- and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 238: 139-145
- [9] 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, 2016
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 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, 2016
- [11] 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 pH 值的测定[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016
- [12] 王丽丽, 杨文鸽, 徐大伦, 楼乔明, 周星宇. 不同淀粉对带鱼鱼糜凝胶品质的影响[J]. *核农学报*, 2016, 30(7): 1379-1385
- [13] 李婷婷. 大黄鱼生物保鲜技术及新鲜度指示蛋白研究[D]. 浙江: 浙江工商大学, 2013
- [14] Li N, Shen Y, Liu W R, Mei J, Xie J. Low-Field NMR and MRI to analyze the effect of edible coating incorporated with MAP on qualities of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus Semilaevis Günther*) fillets during refrigerated storage [J]. *Applied Sciences*, 2018, 8(8):1391
- [15] Antonia da Silva L V, Prinyawitkul W, King J M, Hong K N, Bankston Jr J D B, Ge B. Effect of preservatives on microbial safety and quality of smoked blue catfish (*Ictalurus furcatus*) steaks during room-temperature storage [J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(8): 958-963
- [16] 于林, 陈舜胜, 王娟娟, 王倩. 茶多酚改性胶原蛋白-壳聚糖复合膜对冷藏斜带石斑鱼的保鲜效果 [J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 220-226
- [17] Ko W C, Yu C C, Hsu K C. Changes in conformation and sulfhydryl groups of tilapia actomyosin by thermal treatment [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2007, 40(8): 1316-1320
- [18] 路钰希, 沈萍, 李学英, 杨宪时, 迟海. 保鲜剂对冻藏鲈鱼品质变化的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(19): 274-279, 288
- [19] Zhong S Y, Liu S C, Qin X M, Wang W M, Lin H J, Chen S H. Effect of protein decomposition on the quality of vacuum-packed tilapia during low temperature storage [J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(6):141-146
- [20] 张文敏, 董庆利, 宋筱瑜, 刘箐. 乳酸钠对肉及肉制品防腐保鲜作用的研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 235-240
- [21] 阙婷婷, 郑家闻, 陈士国, 姜晴晴, 刘文娟, 叶兴乾, 胡亚芹. 微冻保鲜与冻藏保鲜对乌鳢品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(6): 136-147
- [22] 朱丹实, 王立娜, 吴晓菲, 徐永霞, 励建荣. 冰温及冷藏对鲤鱼水分迁移及质构的影响[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(10): 157-164
- [23] Shin J M, Ji W G, Kamarajan P, Fenno J C, Rickard A H, Kapila Y L. Biomedical applications of nisin [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 120(6): 1449-1465
- [24] 聂小宝, 杜明溪, 陈东杰, 林丽珍, 徐新光, 许振琨, 张长峰. 复合保鲜剂结合冰温对大菱鲆鱼片品质的影响[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(21): 203-210
- [25] 姚远, 董庆利. 乳酸钠对肉及肉类食品中腐败菌和致病菌的抑制作用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(7): 378-383
- [26] Behnam S, Anvari M, Rezaei M, Soltanian S, Safari R. Effect of nisin as a biopreservative agent on quality and shelf life of vacuum packaged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored at 4°C [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(4): 2184-2192
- [27] Bazargani-Gilani B. Activating sodium alginate-based edible coating using a dietary supplement for increasing the shelf life of rainbow trout fillet during refrigerated storage (4±1°C) [J]. *Journal of Food Safety*, 2017, 38(1): e12395
- [28] Yao J, Zhou Y, Chen X, Ma F, Li P J, Chen C G. Effect of sodium alginate with three molecular weight forms on the water holding capacity of chicken breast myosin gel [J]. *Food Chemistry*, 2017, 239:1134-1142
- [29] Khanal B K S, Bhandari B, Prakash S, Bansal N. Effect of sodium alginate addition on physical properties of rennet milk gels [J]. *Food Biophysics*, 2017, 12(2): 141-150
- [30] 刘彩华, 朱新荣, 张建. 羟自由基氧化对冷藏高白鲑品质及微观结构的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(23): 238-244
- [31] Falkeborg M, Cheong L Z, Glanfico C, Sztukiel K M, Kristensen K, Glasius M, Xu X, Guo Z. Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation [J]. *Food Chemistry*, 2014, 164(20): 185-194
- [32] 董庆利, 姚远, 张岩, Ihekweba A E C. 乳酸钠对猪背最长肌中蛋白质表达的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(7): 199-204

Optimization of Composite Biological Preservative and Freshness-Keeping Effect for Turbot (*Scophthalmus maximus*)

FANG Shiyuan^{1,2,3} MEI Jun^{1,2,3,4,*} XIE Jing^{1,2,3,4,*} LI Jianrong⁵

(¹College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ²Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306; ³Shanghai Professional Technology Service Platform on Cold Chain Equipment Performance and Energy Saving Evaluation, Shanghai 201306; ⁴National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering(Shanghai Ocean University), Shanghai 201306; ⁵College of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou, Liaoning 121013)

Abstract: To prolong the shelf life of turbot, Nisin, sodium lactate and sodium alginate were selected for single factor experiments. The compounded biological preservatives were optimized through response surface Box-Behnken experiment design. A quadratic polynomial regression model was established using the total volatile basis nitrogen of turbot which had been cold stored for 9 days as evaluation index. And the preservation effect of the optimal proportion compounded biological preservatives was verified by determining the indexes including of aerobic bacterial count, pH value, TVB-N, sulfhydryl content, water-holding capacity, water transport and muscle structure. Through variance analysis and regression fitting, the results showed that the optimal amount of composite biological preservative was composed of 0.04% nisin, 5.92% sodium lactate and 1.06% sodium alginate, and The TVB-N of turbot cold stored for 9 days had a minimum value of 18.37 mg·100g⁻¹. Moreover, Nisin and sodium lactate had significant interaction on the preservation of turbot (p < 0.05) and the response surface model was well fitted with the actual situation. The shelf life of turbot treated with the chosen composite biological preservatives at 4°C could be prolonged to 14 days. This study provided a theoretical basis and technical support for using edible coatings to obtain high quality aquatic products.

Keywords: turbot, composite biological preservative, response surface optimization, shelf life