

复配生物防腐剂延长海鲣鱼肉的贮藏时间

凌泽兴, 孙曼钰, 钟成, 贾士儒, 谭之磊

(天津科技大学工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要: 海产品由于其高营养价值所以极易腐败, 而微生物是引起海产品腐败的重要原因。本研究通过对腐败海鲣鱼中的腐败菌进行分离鉴定, 得到乙酰微小杆菌、约氏不动杆菌、考克氏菌属、节杆菌属、施氏假单胞菌、枯草芽孢杆菌、速生嗜冷杆菌和洛菲不动杆菌等菌株。采用三种不同的生物防腐剂(ϵ -聚赖氨酸、乳酸链球菌素和溶菌酶)对分离出的菌株进行最小抑菌浓度实验, 分析其抑菌效果。运用响应面法, 复配出最优组合的生物防腐剂, 其配比量为 ϵ -聚赖氨酸 367.5 mg/kg、乳酸链球菌素 375.0 mg/kg、溶菌酶 235.0 mg/kg。通过扫描电镜观察, 复配剂可以破坏枯草芽孢杆菌细胞膜的完整性, 增加细胞膜的通透性。将优化的复配剂应用于海鲣鱼肉保鲜, 通过测定菌落总数、pH值和TVB-N等指标, 对其防腐抑菌效果进行验证。实验结果表明, 在4℃储存条件下, 添加复配剂的鱼肉的货架期相比未添加的延长了一倍。

关键词: 海鲣鱼; 生物防腐剂; 响应面; 货架期

文章编号: 1673-9078(2017)10-192-200

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.028

Prolonging Shelf Life of Fish (*Sea catfish*) by the Additions of Combined Bio-preservatives

LING Ze-xing, SUN Man-yu, ZHONG Cheng, JIA Shi-ru, TAN Zhi-lei

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Seafood is susceptible to spoilage due to its high concentration of nutrition. Microorganisms play a key role in the spoilage of most seafood. Eight microbial strains were isolated from spoiled *Sea catfish* in this study, which were identified to be *Exiguobacterium acetylicum*, *Acinetobacter johnsonii*, *Kocuria* sp., *Arthrobacter creatinolyticus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus subtilis*, *Psychrobacter celer* and *Acinetobacter lwoffii*. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of 3 bio-preservatives (ϵ -polylysine, Nisin and lysozyme) on the isolated strains were determined. The inhibitory of total bacteria counts by combined bio-preservatives were optimized by response surface methodology. The optimized concentration of ϵ -polylysine, Nisin and lysozyme was 367.5, 375.0 and 235.0 mg/kg, respectively. The combined bio-preservatives damaged the bacterial cell membrane integrity and increased bacterial membrane permeability of *Bacillus subtilis*, evidenced by scanning electron microscopy. Total bacteria counts, pH value and TVB-N of *Sea catfish* with an optimized combined bio-preservative were determined to verify the antibacterial effect, which showed shelf life of *Sea catfish* with combined bio-preservatives was about twice as long as control both stored at 4℃.

Key words: *Sea catfish*; bio-preservatives; response surface methodology; shelf life

新鲜鱼类由于其高蛋白、高水分和近中性的 pH 值等条件, 极易腐败变质。捕获后的鱼类, 在腐败微生物及酶的作用下, 鱼类的鲜度大幅下降, 进而缩短其货架期。本文以海鲣鱼作为实验样品, 其蛋白质丰富, 肉质鲜美, 是较常见的经济鱼类, 主要分布于我国渤海和黄海等地。

收稿日期: 2017-04-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21276197); 国家科技支撑计划项目(2015BAD16B04)

作者简介: 凌泽兴(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物防腐剂在食品中的应用研究

通讯作者: 钟成(1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物反应工程

国渤海和黄海等地。

在特定条件下, 鱼体所含的微生物中只有部分参与腐败过程, 这些适合生存和繁殖并产生腐败臭味或异味代谢产物的微生物, 就是其特定腐败菌^[1](specific spoilage organisms, SSO)。沈萍^[2]等研究发现, 温水域鱼类优势菌群为假单胞菌属、嗜冷杆菌属和不动杆菌属等革兰氏阴性菌。

天然生物防腐剂由于其安全、高效, 得到人们的广泛认可。 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)是一种微生物合成的由 25~45 个赖氨酸残基通过 α -羧基和 ϵ -氨基连接而成的赖氨酸同聚物^[3]。 ϵ -PL 具有抗菌效力强、水溶性好、

适用 pH 值范围广以及在高温条件下稳定性高等特点^[4]。它能够抑制包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌以及霉菌在内的多种微生物的生长繁殖^[5]。溶菌酶又称胞壁质酶是由 129 个氨基酸组成的蛋白质,白色或微黄色结晶体或粉末,易溶于水,耐热性好^[6]。溶菌酶具有较强的溶菌作用,对革兰氏阳性菌、好气性孢子形成菌和芽孢杆菌等均有良好的抗菌效果^[7]。乳酸链球菌素(Nisin)是由 34 个氨基酸残基组成的抗菌多肽,其包含有羊毛硫氨酸和甲基羊毛硫氨酸基团^[8]。Nisin 对大多数革兰氏阳性菌具有较好的抑菌效果,包括金黄色葡萄球菌和李斯特氏菌,尤其对细菌芽孢具有明显的抗菌活性^[9,10]。Nisin 具有较好的耐酸性以及在较低 pH 下的热稳定性^[11]。目前, Nisin 已作为食品添加剂应用于乳制品、肉制品、罐头制品、酒精饮料以及酱菜制品中^[12]。

ϵ -PL 具有广谱抗菌性,但海产品复杂的成分极易影响其抑菌效果,且 ϵ -PL 在较高浓度下有一定的涩味,会带来负面的感官效果。Nisin 对革兰氏阳性菌,尤其是芽孢杆菌有很强的抑制作用,但它的抑菌谱较窄。溶菌酶的特异性较高,对革兰氏阴性菌多不起作用。本文首先对腐败海鲢鱼中的腐败菌进行分离纯化,对纯菌进行生理生化实验及 16s rDNA 鉴定实验,确定腐败菌。通过使用 ϵ -PL、Nisin 和溶菌酶对分离鉴定出的主要腐败菌进行抑菌实验,确定最小抑菌浓度。运用响应面优化的方法,探究了 ϵ -PL、Nisin 和溶菌酶分别对芽孢杆菌和样品中微生物的抑制效果的最优配比,并将最优复配剂添加于海鲢鱼肉中,测定菌落总数、pH 值和 TVB-N 以观察复配剂的应用效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜海鲢鱼,购自天津北塘海鲜市场。将海鲢鱼清洗干净,去除内脏,清洗血污,取其背脊鱼肉。

ϵ -PL 产品,浙江银象生物工程有限公司; Nisin,浙江银象生物工程有限公司; 溶菌酶购自 Solarbio 公司。16S rDNA 扩增引物,正向引物为 27F:5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物为 1492R:5'-TACCTTGTTACGACTT-3', 由金唯智公司合成。

SYNERGY TM⁴ 型多功能微孔酶标仪, Biotech S.P.A 意大利公司; DT-100A 型单盘天平, 唐山光学仪器有限公司; SC6010SCOUT 电子天平, 上海精科天平; YXQG01 型高压蒸汽灭菌锅, 山东新华医疗器械厂; LRH-250-A 型生化培养箱, 广东省医疗器械厂; WXG-1(A)型光学显微镜, 日本 OLYMPUS 公司;

pHSJ-4A 型数字 pH 计, 上海雷磁仪器厂; VZ-1300-U 超净工作台, 苏州安泰空气技术公司; PTC-225 型 PCR 仪, 美国伯乐公司; BILON-08 型无菌均质器, 上海比朗仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 腐败菌筛选纯化

冷藏 1 d 后的海鲢鱼样品, 采用 GB 4789.2-2010 《食品微生物学检验菌落总数测定》方法均质处理后, 取 1 mL 样品匀液加入到 9 mL 生理盐水溶液中, 采用平板涂布稀释法, 将稀释后的 0.1 mL 样品匀液(各稀释度 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3})涂布于营养琼脂平板培养基上, 30 °C 培养 48 h 后, 挑取单个典型生长的菌落, 进行平板三区划线, 得到纯化的单菌落。

1.2.2 菌落形态观察

根据《常见细菌系统鉴定手册》中的方法进行形态观察。

1.2.3 生理生化特性测定

采用接触酶、V-P 测定、甲基红、水解明胶、碳源利用(D-葡萄糖)、形成吡啶和柠檬酸利用等方法进行测定^[13]。

1.2.4 16S rDNA 序列测定

提取待测菌株的总 DNA, 并作为模板进行 PCR 扩增。扩增反应体系为: 上下游引物各 1 μ L, 模板 1.0 μ L, Mix 酶 12.5 μ L, 水 9.5 μ L。反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min (30 个循环), 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物由金唯智公司测序。

将 16S rDNA 测序结果提交 Gen-Bank 获得登录号, 并在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析。

1.2.5 菌落总数测定

菌落总数的测定参照 GB 4789.2-2010 《食品微生物学检验菌落总数测定》进行分析。

1.2.6 最小抑菌浓度(MIC 值)测定抑菌实验

通过 2 倍系列稀释生物防腐剂溶液后, 将其加入到 96 微孔板中, 每个孔中加入 200 μ L, 第一个孔中的生物防腐剂(ϵ -PL、Nisin 和溶菌酶)浓度为 1000 μ L/mL。每孔中加入 5 μ L OD₆₀₀ 值在 0.3~0.5 之间的菌悬液。用酶标仪测定 96 孔板 0 h 的 OD₆₀₀ 值, 然后将 96 孔板置于 37 °C 培养箱中, 培养 24 h, 再次测定 OD₆₀₀ 值。将实验组测定的 OD₆₀₀ 值与自然生长的对照组的 OD₆₀₀ 值进行对比, 来确定生物防腐剂是否有效。24 h 后样本浓度的 OD₆₀₀ 值小于对照组 OD₆₀₀ 值的 20% 确定为 MIC 值^[14]。

1.2.7 响应面实验

运用响应面法, 确定三种生物防腐剂对枯草芽孢杆菌的最佳复配抑菌浓度。利用中心组合实验方法进行实验设计^[15]。将 ϵ -PL、Nisin 和溶菌酶的添加量作为响应变量, 以单个菌株生长的 OD₆₀₀ 值为响应值。在 96 微孔板中加入 200 μ L 添加有生物防腐剂的 LB 培养基, 每孔中加入 5 μ L OD₆₀₀ 在 0.3~0.5 的菌液。使用酶标仪在波长 600 nm 下, 测定 96 微孔板在培养 0 h 和 24 h 的 OD₆₀₀ 值。实验因素水平设计见表 1。通过响应面分析, 对三种生物防腐剂的添加量进行优化。将无菌处理好的 5 g 鱼肉样品放入食品保鲜袋中, 其中添加 100 μ L 生物防腐剂的复配剂, 混匀。放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中冷藏 3 d 后, 进行菌落计数。将 ϵ -PL、Nisin 和溶菌酶的添加量作为响应变量, 以三天后样品的菌落总数作为响应值, 实验因素水平设计见表 1。

1.2.8 扫描电镜观察

取少量枯草芽孢杆菌过夜培养至对数期, 加入复配生物防腐剂, 使其终浓度为: ϵ -PL 367.5 mg/kg、Nisin 375.0 mg/kg、溶菌酶 235.0 mg/kg。在 37 $^{\circ}$ C, 160 r/min 摇床震荡培养 1 h。取菌液, 4000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀由 PBS 缓冲液洗两次, 菌体沉淀由 1 mL 2.5 (V/V) 戊二醛-PBS 溶液重悬, 于 4 $^{\circ}$ C 下固定反应 2 h 左右, 4000 r/min 离心 5 min, PBS 溶液洗 1 次, 依次使用 30%、50%、70%、80%、90%和 100%浓度乙醇梯度脱水 10 min, 最后取少量溶液于玻璃薄片上, 自然晾干。喷金, 观察。

1.2.9 复配剂应用实验

在无菌处理好的 5 g 鱼肉样品中, 分别添加复配生物防腐剂 (ϵ -PL 367.5 mg/kg、Nisin 375.0 mg/kg、溶菌酶 235.0 mg/kg)、500 mg/kg ϵ -PL、500 mg/kg Nisin 和 500 mg/kg 溶菌酶, 并设置不添加生物防腐剂的对照组, 每两天取一次样, 进行菌落计数。

1.2.10 pH 值测定实验

准确称取样品 5 g 置于烧杯中, 加入 45 mL 蒸馏水, 搅匀静置后, 用 pH 计进行测定。

1.2.11 挥发性盐基氮 (TVB-N) 的测定

参照国家标准 GB/T 5009.228-2016 进行测定。

1.2.12 数据处理与统计分析

实验均做三次平行, 数据以“平均值 \pm 标准差”表示, 用 SPSS Statistics 21 进行显著性差异分析 ($p < 0.05$)。用 Microsoft Excel 2010 软件和 Origin 8.0 软件进行数据处理和作图及分析。采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应曲面图的绘制。菌株序列使用 NCBI 数据库进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定

根据菌落形态特征(表 2)、生理生化实验结果(表 3)及菌种测序结果, 鉴定出主要的腐败菌株见表 4。

表 1 实验因素水平设计表

Table 1 Factors and levels in the combination design

因素	编码值	水平				
		-1.682	-1	0	1	1.682
ϵ -PL/(g/kg)	X1	0	0.125	0.25	0.375	0.5
Nisin/(g/kg)	X2	0	0.125	0.25	0.375	0.5
溶菌酶/(g/kg)	X3	0	0.125	0.25	0.375	0.5

表 2 细菌菌落特征

Table 2 The characteristics of colonies

菌落	菌落颜色	菌落形状	菌落隆起	菌落边缘	菌落表面	菌落光泽	菌落质地	透明度
I	橘黄色	不规则	不隆	整齐	光滑	有	湿润	不透明
II	白色	圆形	微隆	整齐	光滑	有	湿润	不透明
III	粉红色	圆形	微隆	整齐	光滑	有	湿润	不透明
IV	淡黄色	圆形	微隆	整齐	光滑	有	湿润	不透明
V	淡橘黄色	不规则	微隆	不整齐	不光滑	无	湿润	不透明
VI	白色	不规则	微隆	不整齐	光滑	有	湿润	不透明
VII	淡黄色	圆形	微隆	整齐	光滑	有	湿润	半透明
VIII	白色	圆形	微隆	整齐	光滑	无	半湿润	不透明

表 3 生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics

菌株	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
葡萄糖发酵实验	+	+	+	-	-	+	-	+
明胶液化实验	+	+	-	+	-	+	-	+
吲哚试验	-	-	-	-	-	-	-	-
产 H ₂ S 实验	-	-	-	-	-	+	-	-
接触酶实验	+	+	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐实验	-	-	-	-	-	-	-	-
MR 实验	-	-	+	-	-	-	-	-
VP 实验	+	+	-	+	+	+	+	+
硝酸盐还原实验	-	-	+	+	+	+	-	-

注：“+”表示结果为阳性；“-”表示结果为阴性。

表 4 菌株鉴定结果

Table 4 The result about the identification of strains

菌株编号	菌株名称	NCBI 登录号
I	乙酰微小杆菌 (<i>Exiguobacterium acetylicum</i>)	KP191982.1
II	约氏不动杆菌 (<i>Acinetobacter johnsonii</i>)	KC758141.1
III	考克氏菌属 (<i>Kocuria sp.</i>)	KM507647.1
IV	节杆菌属 (<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>)	KM871867.1
V	施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	KU601251.1
VI	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	KY621524.1
VII	速生嗜冷杆菌 (<i>Psychrobacter celer</i>)	JF711005.1
VIII	洛菲不动杆菌 (<i>Acinetobacter lwoffii</i>)	GU083586.1

表 5 单一生物防腐剂对各菌株的 MIC 值

Table 5 Minimum inhibition concentration values (MIC) of pure compounds for individual strains

菌种	抑菌剂			
	ϵ -PL/(μ g/mL)	Nisin/(μ g/mL)	溶菌酶/(μ g/mL)	
革兰氏阳性菌	节杆菌属 (<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>)	31.25	62.50	62.50
	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	1000.00	250.00	/
	乙酰微小杆菌 (<i>Exiguobacterium acetylicum</i>)	31.25	62.50	62.50
	考克氏菌属 (<i>Kocuria sp.</i>)	15.63	15.63	62.50
革兰氏阴性菌	施氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	62.50	1000.00	/
	洛菲不动杆菌 (<i>Acinetobacter lwoffii</i>)	62.50	250.00	/
	约氏不动杆菌 (<i>Acinetobacter johnsonii</i>)	62.50	250.00	/
	速生嗜冷杆菌 (<i>Psychrobacter celer</i>)	15.63	125.00	250.00

注：“/”表明该生物防腐剂对菌株的 MIC 值大于 1000 μ g/mL。

由表 4 可以看出，筛选出的菌株主要为微小杆菌属、不动杆菌属、考克氏菌属、节杆菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属和嗜冷杆菌属。芽孢杆菌为可产芽孢的革兰氏阳性杆菌，广泛存在于大自然，在土壤、空气、灰尘、水和许多未加工的食品中都可以生存，其在肉类食品中可以产生毒素^[16]。假单胞菌属和嗜冷杆菌属是引起冷藏鱼类腐败变质的特定腐败菌^[17]。

2.2 生物防腐剂对各菌株的 MIC 值

最小抑菌浓度 (MIC) 是衡量生物防腐剂抑菌效果的重要指标。

由 MIC 值可以看出， ϵ -PL 的抑菌效果较好，对大多数分离出的细菌有较好的抑菌效果，Nisin 次之。相较于筛选出的其他菌株， ϵ -PL 对枯草芽孢杆

菌的抑制效果较弱 (MIC 值为 1000.00 $\mu\text{g/mL}$)，而 Nisin 对枯草芽孢杆菌的抑制较 $\epsilon\text{-PL}$ 有着较大的优势。溶菌酶对革兰氏阳性菌的抑菌效果要优于革兰氏阴性菌。

2.3 响应面实验

表 6 为实验结果，分别以 OD_{600} 值和菌落数为响应值，对实验数据进行回归拟合。

表 6 响应面分析实验结果

Table 6 Results of response surface analysis

试验号	A $\epsilon\text{-PL}$	B Nisin	C 溶菌酶	OD_{600} 值	菌落数(10^4 CFU/g)
1	1	1	1	0.123	57.5
2	1	1	-1	0.118	112
3	1	-1	1	0.631	226
4	1	-1	-1	0.630	137
5	-1	1	1	0.102	200
6	-1	1	-1	0.099	159
7	-1	-1	1	0.633	145
8	-1	-1	-1	0.575	350
9	1.682	0	0	0.109	40.5
10	-1.682	0	0	0.427	240
11	0	1.682	0	0.118	50
12	0	-1.682	0	0.553	340
13	0	0	1.682	0.105	120
14	0	0	-1.682	0.096	273
15	0	0	0	0.104	140
16	0	0	0	0.097	116
17	0	0	0	0.098	40
18	0	0	0	0.095	66
19	0	0	0	0.300	71.5
20	0	0	0	0.106	80

表 7 以 OD_{600} 值为响应值的响应面回归模型的方差分析

Table 7 The variance analysis of regression model with OD_{600} value as response value

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.769	9	0.085	5.006	0.010	*
A	0.014	1	0.014	0.837	0.382	
B	0.557	1	0.557	32.646	0.000	**
C	0.000	1	0.000	0.029	0.868	
AB	0.000	1	0.000	0.001	0.973	
AC	0.000	1	0.000	0.022	0.885	
BC	0.000	1	0.000	0.019	0.893	
A ²	0.078	1	0.078	4.572	0.058	
B ²	0.137	1	0.137	8.018	0.018	
C ²	0.003	1	0.003	0.174	0.685	
残差	0.171	10	0.017			
失拟项	0.137	5	0.027	4.106	0.074	
纯误差	0.033	5	0.007			
总误差	0.940	19				
	$R^2=0.82$	$R^2_{\text{Adj}}=0.65$				

注: **表示影响极显著 ($p < 0.01$); *表示影响显著 ($p < 0.05$)。

由表 7 可以看出, 总模型方程显著 ($p < 0.05$), 相关系数 $R^2 = 82\%$, 表明模型相关度好; 失拟项的 $p < 0.05$, 表明模型与实验结果拟合度高, 该模型的预测结果可以进行一定的参考。

对所得数据进行多元回归分析, 以 OD 值为 Y_1 值, A 为 ϵ -PL 添加量, B 为 Nisin 添加量, C 为溶菌酶添加量。得出三种生物防腐剂的编码值为自变量的回归方程为: $Y_1 = 0.129360 - 0.032351A - 0.20199B + 0.00060C - 0.00016AB - 0.00068AC - 0.00063BC + 0.07358A^2 + 0.09744B^2 + 0.01436C^2$

图 1、2 和 3 可以看出三种生物防腐剂之间的交互作用不显著, 但不同的生物防腐剂的抑菌效果对枯草芽孢杆菌的抑制效果也不同。通过对响应面模型进行分析, 生物防腐剂抑制枯草芽孢杆菌的最佳配比浓度为 ϵ -PL 278.6 mg/kg、Nisin 375.0 mg/kg 和溶菌酶 250.0 mg/kg。

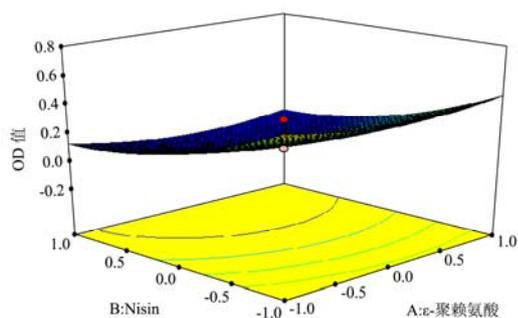


图 1 ϵ -PL 和 Nisin 的交互作用对枯草芽孢杆菌生长的影响
Fig.1 Effect of interaction between ϵ -PL and Nisin on the growth of bacillus subtilis

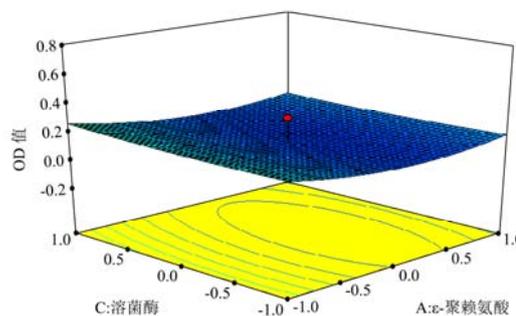


图 2 ϵ -PL 和溶菌酶的交互作用对枯草芽孢杆菌生长的影响
Fig.2 Effect of the interaction of ϵ -PL and lysozyme on the growth of bacillus subtilis

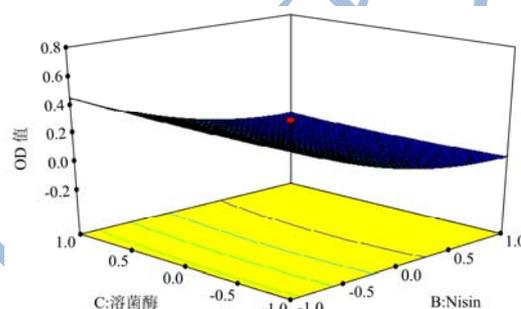


图 3 Nisin 和溶菌酶的交互作用对枯草芽孢杆菌生长的影响
Fig.3 Effect of the interaction of Nisin and lysozyme on the growth of bacillus subtilis

对所得数据进行多元回归分析, 以菌落数值为 Y_2 值, A 为 ϵ -PL 添加量, B 为 Nisin 添加量, C 为溶菌酶添加量。得出三种生物防腐剂的编码值为自变量的回归方程为: $Y_2 = 85.89001 - 48.10901A - 59.83954B - 28.32382C - 7.18750AB + 24.81250AC + 12.81250BC + 17.32328A^2 + 36.68032B^2 + 37.21065C^2$

表 8 以菌落总数为响应值的响应面回归模型方差分析

Table 8 The variance analysis of regression model with total number of bacteria as response value

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	135573.2	9	15063.68	4.115	0.019	*
A	31608.47	1	31608.47	8.635	0.015	*
B	48902.07	1	48902.07	13.359	0.004	**
C	10956.06	1	10956.06	2.993	0.114	
AB	413.28	1	413.2813	0.113	0.744	
AC	4925.28	1	4925.281	1.346	0.273	
BC	1313.28	1	1313.281	0.359	0.563	
A ²	4324.77	1	4324.769	1.18147	0.303	
B ²	19389.62	1	19389.62	5.297	0.044	*
C ²	19954.34	1	19954.34	5.451265	0.042	*
残差	36604.98	10	3660.498			
失拟项	30027.77	5	6005.554	4.565	0.060	

转下页

接上页

纯误差	6577.21	5	1315.442
总误差	172178.1	19	
	$R^2=0.78$	$R^2_{Adj}=0.60$	

注: **表示影响极显著 ($p<0.01$); *表示影响显著 ($p<0.05$)。

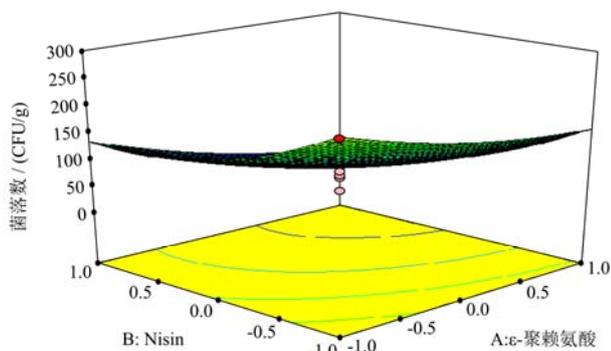


图4 ε-PL 和 Nisin 的交互作用对样品中菌落总数的影响
Fig.4 Effect of the interaction of ε-PL and Nisin on total number of bacteria in the sample

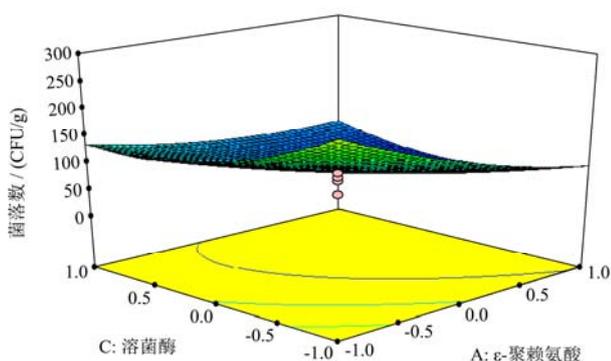


图5 ε-PL 和溶菌酶的交互作用对样品中菌落总数的影响
Fig.5 Effect of the interaction of ε-PL and lysozyme on total number of bacteria in the sample

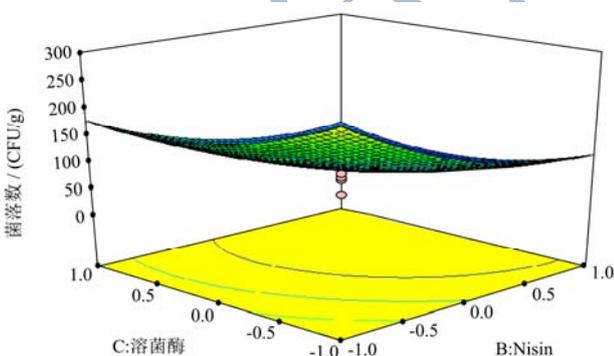


图6 溶菌酶和 Nisin 的交互作用对样品中菌落总数的影响
Fig.6 Effect of the interaction of lysozyme and Nisin on total number of bacteria in the sample

通过对响应面图 4、图 5 和图 6 进行分析, 三种生物防腐剂在应用于鱼肉样品中时, 其两两之间的交

互作用不显著。通过对响应面模型进行分析, 生物防腐剂添加到样品中的最佳配比浓度为 ε-PL 367.5 mg/kg、Nisin 375.0 mg/kg 和溶菌酶 235.0 mg/kg。

三种生物防腐剂对枯草芽孢杆菌的抑菌最佳浓度与应用于样品中的最佳配比浓度有一定差别。在以枯草芽孢杆菌为实验对象时, 其 Nisin 的复配浓度较高, 但以鱼肉样品为实验对象时, ε-PL 的含量较高。此现象与 ε-PL 主要对革兰氏阴性菌抑制作用较好, Nisin 对革兰氏阳性菌的尤其是枯草芽孢杆菌的抑制作用较好相吻合。李婷婷^[18]等研究表明 0℃ 冷藏三文鱼贮存后期, 假单胞菌数量占绝对优势。本实验也说明在低温条件下, 鱼肉腐败过程中假单胞菌逐渐成为优势菌株, ε-PL 对假单胞菌有较强的抑制作用, 故 ε-PL 在样品中的预测配比浓度较大。

2.4 扫描电镜观察

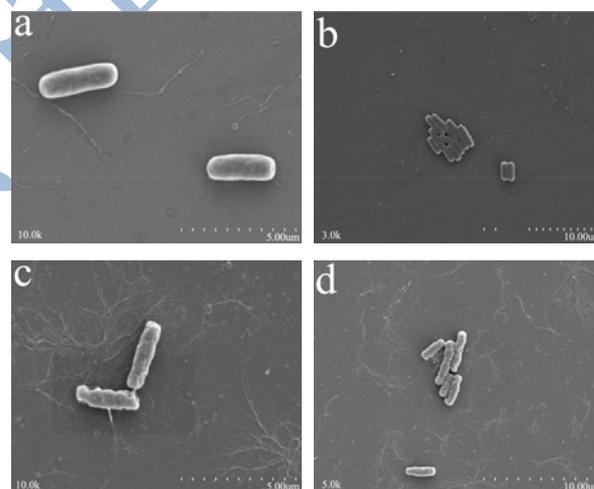


图7 经复配生物防腐剂处理的枯草芽孢杆菌扫描电镜图
Fig.7 SEM of *Bacillus subtilis* treated with combined bio-preservatives

注: a 和 b 未经处理; c 和 d 经复配生物防腐剂处理 1 h。

由图 7 可看出, 未经复配剂处理的枯草芽孢杆菌, 其菌体生长良好, 表面平滑, 菌体饱满; 经复合生物防腐剂的作用, 枯草芽孢杆菌的表面发生塌陷、皱缩, 形成孔洞。枯草芽孢杆菌的形态变化表明, 生物防腐剂可破坏细菌细胞膜结构, 引起细胞膜内小分子物质外泄^[19]。复配生物防腐剂对细菌有较强的抑制效果。

2.5 鱼肉样品在低温下贮存实验结果

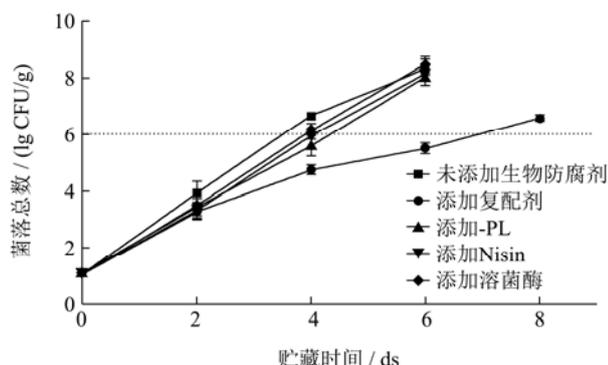


图8 海鲢鱼片在4℃储藏过程中菌落总数的变化

Fig.8 The changes of the total bacteria count of *Sea catfish fillets* stored at 4℃

由图8可以看出,添加复配生物防腐剂的样品较未添加的,其菌落总数增长较为缓慢。添加复配生物防腐剂样品的菌落数始终低于添加单个生物防腐剂的样品 ($p < 0.05$),说明复配剂的抑菌效果优于单个生物防腐剂。未添加生物防腐剂的对照组在第4d时,其菌落总数达到了6.67 lg (cfu/g)超过了6 lg (cfu/g)的国家限定标准,而添加复配生物防腐剂的样品,菌落总数在第8d达到6.58 lg (cfu/g),说明复配生物防腐剂有效抑制了微生物的生长。

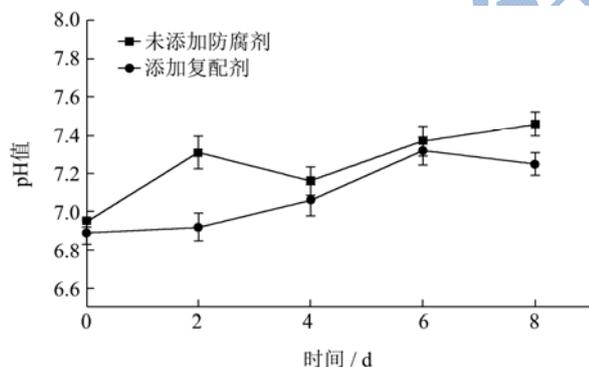


图9 海鲢鱼片在4℃储藏过程中pH值的变化

Fig.9 The changes of pH value of *Sea catfish fillets* stored at 4℃

由图9可以看出,添加复配生物保鲜剂对样品的起始pH值并无显著影响 ($p > 0.05$)。未添加生物防腐剂的样品出现了先上升后下降再上升的趋势,其第一个拐点出现在第2d,而添加生物防腐剂的样品的拐点出现在第6d。pH上升可能是由于此时微生物快速生长,新陈代谢产生了碱性含氮化合物如胺和三甲胺等^[20]。随后pH值出现下降,可能与脂肪酸化和细菌产酸发酵有关。从侧面说明,复配生物防腐剂的添加有效抑制了微生物的生长。

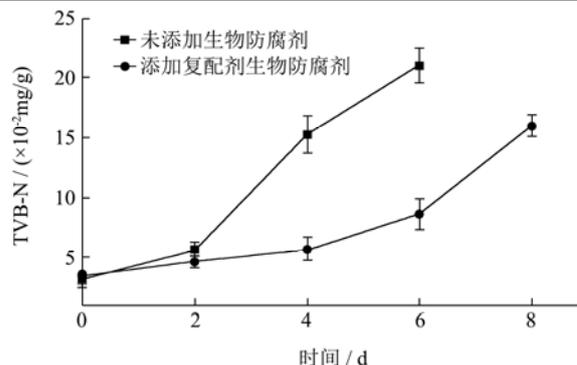


图10 海鲢鱼片在4℃储藏过程中TVB-N值的变化

Fig.10 The changes of total volatile basic nitrogen value of *Sea catfish fillets* stored at 4℃

由图10可以看出,从第2d开始,添加生物防腐剂的TVB-N值显著低于未添加生物防腐剂的对照组 ($p < 0.01$)。未添加生物防腐剂组的TVB-N值迅速增加,在第4d时就已经超过15 mg/100g,而添加复配生物防腐剂组的TVB-N值增加缓慢,在第8d时才达到15 mg/100g。表明复配生物防腐剂有效抑制了产胺类微生物的生长,降低了贮藏期内的TVB-N含量,延长了样品的货架期。菌落总数与TVB-N值的增长趋势基本一致,菌落总数增加,TVB-N值也在迅速增加,二者在数值上呈现出了一定程度的正相关性。Benjakul等^[21]的相关研究显示了相似的结论。这可能是因为微生物的生长促进了蛋白质等营养成分的降解,导致TVB-N值增大,制品的营养品质降低。

3 结论

3.1 通过对冷藏腐败海鲢鱼中的腐败菌进行分离鉴定,腐败菌主要为乙酰微小杆菌、约氏不动杆菌、考克氏菌属、节杆菌属、施氏假单胞菌、枯草芽孢杆菌、速生嗜冷杆菌和洛菲不动杆菌等。

3.2 三种生物防腐剂对枯草芽孢杆菌最佳抑菌效果的配比为ε-PL 278.6 mg/kg、Nisin 375.0 mg/kg、溶菌酶 250.0 mg/kg。采用响应面分析,三种生物防腐剂对鱼肉样品中微生物最佳抑制效果的配比为ε-聚赖氨酸 367.5 mg/kg、Nisin 375.0 mg/kg、溶菌酶 235.0 mg/kg。

3.3 复配生物防腐剂(ε-PL 367.5 mg/kg、Nisin 375.0 mg/kg、溶菌酶 235.0 mg/kg)能够显著抑制鱼肉样品的腐败菌,在4℃贮藏条件下,延长鱼肉样品的货架期3~4d。

参考文献

[1] Jos H J, Huis I V. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33(1): 1-18

- [2] 沈萍,李学英,扬宪时,等.低温贮藏过程中鱿鱼细菌组成的变化及优势腐败菌鉴定[J].现代食品科技, 2015,31(6): 236-242
SHEN Ping, LI Xue-ying, YANG Xian-shi, et al. Changes in bacterial flora and predominant spoilage bacteria in squid during low temperature storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(6): 236-24
- [3] 贾士儒.生物防腐剂[M].北京:中国轻工业出版社,2009
JIA Shi-ru. Biopreservatives [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009
- [4] Shih I L, Shen M H, Van Y T. Microbial synthesis of poly(epsilon-lysine) and its various applications [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(9): 1148-1159
- [5] Pandey A K, Kumar A. Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-1-lysine [J]. Process Biochemistry, 2013, 49(3): 496-505
- [6] Laurents D V, Baldwin R L. Characterization of the unfolding pathway of hen egg white lysozyme [J]. Biochemistry, 1997, 36(6): 1496-1504
- [7] 蓝蔚青,谢晶.溶菌酶对带鱼冷藏保鲜效果的影响[J].湖南农业科学,2010,2010(17):114-118
LAN Wei-qing, XIE Jing. The fresh-keeping effect of lysozyme on trichiurus haumela under cold storage [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010, 2010(17): 114-118
- [8] Chandrapati S, O'Sullivan D J. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1 [J]. Journal of Biotechnology, 1998, 63(3): 229-233
- [9] Cintas L M, Casaus M P, Herranz C, et al. Review: bacteriocins of *Lactic acid bacteria* [J]. Food Science & Technology International, 2001, 7(4): 281-305
- [10] Cintas L M, Casaus P, Fernandez M F, et al. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria [J]. Food Microbiology, 1998, 15(3): 289-298
- [11] De V L, Vandamme E J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations [J]. Journal of General Microbiology, 1992, 138(3): 571-578
- [12] 李有起.Nisin 在食品防腐作用中的研究进展[J].食品研究与开发,2012,33(4):233-235
LI You-qi. Application on food preservative effect of nisin [J]. Food Research and Development, 2012, 33(4): 233-235
- [13] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2009
DU Lian-xiang, LU Fu-ping. Experimental technique in microbiology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009
- [14] Hyldgaard M, Rikke L M, Min P, et al. Binary combination of epsilon-poly-l-lysine and isoeugenol affect progression of spoilage microbiota in fresh turkey meat, and delay onset of spoilage in *Pseudomonas putida* challenged meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 215: 131-142
- [15] 王钦德.食品试验设计与统计分析[M].北京:中国农业大学出版社,2010
WANG Qin-de. Food experiment design and statistical analysis [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2010
- [16] Andersson A, Ronner U, Granum P E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* [J]. International Journal of Food Microbiology, 1995, 28(2): 145-155
- [17] Ghaly A E, Dave D, Budge S, et al. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review [J]. American Journal of Applied Sciences, 2010, 7(7): 859-877
- [18] 李婷婷,丁婷,邹朝阳,等.0℃冷藏下三文鱼片菌相变化规律及特定腐败菌的分离鉴定[J].现代食品科技, 2015,31(4):36-41
LI Ting-ting, DING Ting, ZOU Zhao-yang, 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
- [19] Liu H, Pei H, Han Z, et al. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of epsilon-Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis* [J]. Food Control, 2015, 47(1): 444-450
- [20] Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage [J]. Food Chemistry, 2005, 93(4): 607-617
- [21] Benjakul S, Thomas A S, Michael T, et al. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage [J]. Journal of Food Science, 1997, 62(4): 729-733