

# 蒸煮贻贝冰温贮藏保鲜剂的筛选、优化及评价

吕艳霞<sup>1</sup>, 吴越<sup>1</sup>, 王汉<sup>1</sup>, 张泽坤<sup>1</sup>, 王坤美<sup>1</sup>, 罗红宇<sup>1\*</sup>, 杨涛<sup>2\*</sup>

(1. 浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江省海产品健康危害因素关键技术重点实验室, 舟山 316022;  
2. 烟台市海洋经济研究院, 烟台 264003)

**摘要:** **目的** 筛选用于改善冰温贮藏蒸煮贻贝品质、延长蒸煮贻贝保质期的生物保鲜剂, 对复合保鲜剂的配方及保鲜工艺进行优化, 并评价其保鲜效果。**方法** 通过测定保鲜剂作用于贻贝优势腐败菌的抑菌圈大小, 筛选出抑菌效果较强的保鲜剂, 运用响应面法优化复合保鲜剂配方, 采用肉汤稀释法测定最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC); 利用正交实验确定复合保鲜剂用于蒸煮贻贝保鲜的最佳工艺; 通过测定蒸煮贻贝冰温贮藏 8 d 后的感官评分、pH、挥发性盐基氮 (total volatile basic nitrogen, TVB-N) 含量、菌落总数、汁液流失率来评价复合保鲜剂的效果。**结果** 筛选出的 3 种保鲜剂分别为溶酶菌、乳酸链球菌素和丁香酚, 复合保鲜剂对枯草芽孢杆菌和假单胞菌的 MIC 分别为 16、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 复合保鲜剂的优化配方 (质量分数) 为溶酶菌 4%、乳酸链球菌素 2% 和丁香酚 0.75%, 最佳保鲜工艺为保鲜剂溶液 pH 5.5、料液比 1:2.5 (*m*:*V*)、浸泡时间 60 min, 采用优化的配方和工艺用于蒸煮贻贝的冰温贮藏, 贻贝品质的综合评分为空白样品的 2 倍。**结论** 复合保鲜剂可以有效改善蒸煮贻贝在冰温贮藏条件下的鲜度和品质, 延长保质期, 从而拓宽物流范围。

**关键词:** 蒸煮贻贝; 复合保鲜剂; 配方优化; 综合评分

## Screening, optimization and evaluation of ice temperature preservation agents for steamed mussels

LV Yan-Xia<sup>1</sup>, WU Yue<sup>1</sup>, WANG Han<sup>1</sup>, ZHANG Ze-Kun<sup>1</sup>, WANG Kun-Mei<sup>1</sup>,  
LUO Hong-Yu<sup>1\*</sup>, YANG Tao<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Key Technology Research on Health Risk Factors of Seafood in Zhejiang Province, College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Yantai Marine Economic Research Institute, Yantai 264003, China)

**ABSTRACT: Objective** To screen the biological preservatives used to improve the quality of steamed mussels stored in ice temperature and prolong the shelf life of steamed mussels, optimize the formulation and preservation technology of the compound preservatives, and evaluate the preservation effect. **Methods** By measuring the bacteriostatic circle size of the preservative acting on the dominant spoilage bacteria of mussel, the preservative with strong bacteriostatic effect was selected, the formulation of the compound preservative was optimized by response

**基金项目:** 浙江舟山群岛新区“5313”行动计划科技创业领军人才项目、国家海洋公益性行业科研项目(201305016)

**Fund:** Supported by the Zhejiang Zhoushan Archipelago New Area “5313” Plan Science and Technology Entrepreneurship Leading Talent Project, and the Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (201305016)

**\*通信作者:** 罗红宇, 教授, 主要研究方向为水产品贮藏与加工。E-mail: lisa8919@163.com

杨涛, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为海洋生物资源开发与利用。E-mail: yt286983209@126.com

**\*Corresponding author:** LUO Hong-Yu, Professor, College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, No.1, Haida South Road, Lincheng Street, Dinghai District City, Zhoushan 316022, China. E-mail: lisa8919@163.com

YANG Tao, Master, Senior Engineer, Yantai Marine Economic Research Institute, No.32-2, Yin Hai Road, Laishan District City, Yantai 264003, China. E-mail: yt286983209@126.com

surface methodology, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth dilution method; orthogonal experiment was used to determine the best technology of compound preservative for cooking mussel; the effect of the compound preservative was evaluated by measuring the sensory score, pH, total volatile basic nitrogen (TVB-N) content, total number of colonies, and juice loss rate of steamed mussels after 8 d of ice temperature storage. **Results** The 3 selected preservatives were lysozyme, nisin and eugenol, and the MIC of the compound preservative against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas* was 16, 8  $\mu\text{g/mL}$ , the optimal formulation (mass fraction) of the composite preservative was lysozyme 4%, nisin 2% and eugenol 0.75%. The optimal preservative process was the preservative solution pH 5.5, the ratio of material to liquid 1:2.5 (*m:V*), and the soaking time was 60 min. The optimized formulation and process were used for the ice temperature storage of steamed mussels. The comprehensive score of mussel quality was twice that of the blank sample. **Conclusion** The compound preservative can effectively improve the freshness and quality of steamed mussels under ice temperature storage, extend the shelf life, and expand the logistics scope.

**KEY WORDS:** steamed mussels; compound preservative; formula optimization; comprehensive score

## 0 引言

贻贝亦称海虹,是一种富含水分和蛋白质的双壳软体贝类,其必需氨基酸含量远高于鸡蛋、鸡、鸭、鱼、虾和肉类<sup>[1]</sup>,市场上的贻贝以鲜销为主,具有季节性和区域性,贮运过程中汁液渗出情况下易腐败变质,严重制约了贻贝的运输和销售。2020年我国出口的贻贝中,除鲜活贻贝、淡菜及盐腌、盐渍或熏制的产品外,35%为冻贻贝,64%为需经烤、煎、炸等加工处理的半成品,其中大部分贻贝经蒸煮后进行冻藏<sup>[2]</sup>,对贻贝进行蒸煮处理,可以在预脱水的同时灭酶、减菌、改善贻贝风味<sup>[3]</sup>。因为蒸煮贻贝在国内外市场上有巨大的需求量,故其贮运中的保鲜工作至关重要。冰温贮藏可以抑制微生物的生长,延缓水产品pH、挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)的升高,有效延长货架期<sup>[4]</sup>,可将蒸煮贻贝贮藏于冰温条件下,但流通过程中的温度波动会引起水产品营养成分的流失,因此需另外寻找一种绿色、高效的保鲜技术对蒸煮贻贝进行组合保鲜,提高产品质量。

我国水产品常用的保鲜技术有辐照保鲜、化学保鲜、气调保鲜等,都有各自的优势和局限性。化学保鲜剂的使用可以分散微生物细胞内的电荷,使其代谢紊乱直至死亡,具有良好的防腐效果,但也存在一定的安全隐患<sup>[5]</sup>。近几年,生物保鲜剂凭借其天然、无毒的优势备受关注,主要包括植物提取物、动物源蛋白、酶类和微生物保鲜剂<sup>[6]</sup>,可以有效抑制产品腐败菌的活性<sup>[7]</sup>,其中应用较为广泛的是壳聚糖、茶多酚、溶菌酶等。壳聚糖多应用于水产品中,KIM等<sup>[8]</sup>将含海藻酸钠的壳聚糖涂层应用于对虾保鲜,可有效抑制微生物生长和TVB-N的形成;茶多酚可抑制脂肪氧化变质及大肠杆菌、假单胞菌、金黄色葡萄球菌的生长繁殖,防止水产品腐坏<sup>[9]</sup>;溶菌酶专一性强,但抑菌谱窄,且低温下抑菌效果会减弱,限制了其在水产品中的应用<sup>[10]</sup>;

乳酸链球菌素(nisin from streptococcus lactis, Nisin)对革兰氏阳性菌抑菌效果较强,多用于鱼类保鲜<sup>[9]</sup>;丁香酚对细菌和真菌有很强的抑制作用,经丁香酚处理过的河蟹肉优势腐败菌增殖减慢,菌落总数及TVB-N的增长速率显著降低<sup>[11]</sup>。单一保鲜剂的作用效果容易受到抑菌谱、贮藏环境和理化性质的限制,若能将栅栏技术应用于食品保鲜中,多种保鲜剂协同使用,则可以充分发挥各自优势,提高保鲜效果<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13-14]</sup>显示,Nisin与溶菌酶联合使用时对单增李斯特菌的抑制能力更强,溶菌酶与丁香酚协同使用可以增强其对革兰氏阴性菌细胞外膜的破坏能力。目前已有的研究表明,采用复合保鲜剂对贝类进行保鲜,产品品质有显著提升。杨丽娜等<sup>[15]</sup>将Nisin和纳他霉素溶于大豆种皮多糖中,对烘烤贻贝进行涂膜保鲜,能显著抑制微生物和蛋白质分解,将TVB-N值保持在较低水平,使贻贝货架期延长5d。

目前我国水产品生物保鲜技术的研究仍处于起步阶段,针对贻贝保鲜方面的研究较少,且单一保鲜剂保鲜效果有限。为了改善冰温贮藏条件下蒸煮贻贝的品质,本研究以贻贝的优势腐败菌(枯草芽孢杆菌和假单胞菌)为指示菌,通过测定12种保鲜剂的抑菌圈大小筛选出抑菌效果较好的保鲜剂并对配方进行优化,之后在冰温贮藏条件下用优化后的配方对蒸煮贻贝进行保鲜,确定最佳的保鲜工艺,通过贻贝各项指标的综合评分来评价其对蒸煮贻贝的保鲜效果,以期为复合生物保鲜剂在贻贝保鲜方面的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜贻贝购买于浙江省舟山市丰茂菜场。贻贝采收后当日凌晨运送至码头,全程冷链运输至菜场,无冻结现象。

枯草芽孢杆菌 CMCC(B)63501、假单胞菌 ATCC13867

(上海保藏生物技术中心); 营养肉汤琼脂培养基、营养肉汤培养基(青岛海博生物技术有限公司); 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2~7.4, 上海麦克林生化科技有限公司); Nisin (900 IU/mg, 浙江银象生物工程有限公司); 溶菌酶(20000 U/mg)、抗坏血酸、百里香酚、没食子酸、95%乙醇、纳他霉素(分析纯)、山梨酸钾、海藻酸钠、柠檬酸钠、壳聚糖、双乙酸钠(化学纯)(国药集团化学试剂有限公司); 丁香酚(分析纯, 上海士锋生物科技有限公司); 实验用水为蒸馏水。

## 1.2 仪器与设备

BSA124S 电子天平(精度 0.1 mg, 北京赛多利斯科学仪器有限公司); RC-4HC 温度记录仪(江苏精创电气股份有限公司); 明鉴 SPX 型智能生化培养箱(宁波江南仪器厂); SW-CJ-1B 净化工作台(海力辰邦西仪器科技有限公司); FJ200-SH 高速分散均质机(上海沪析实业有限公司); VORTEX-5 涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 雷磁 PHS-3C 数显台式 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); 海能 K9840 凯氏定氮仪(山东海能科学仪器有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 样品处理

将 5 kg 新鲜贻贝清洗干净, 吐沙 24 h, 于 100°C 沸水中煮 15 min, 在无菌工作台内采集贻贝肉, 用 75%乙醇喷涂透明聚乙烯袋, 待乙醇自然挥发完全后, 将贝肉装袋密封, 于冰箱中冰温(-1°C)保存, 待用。

### 1.3.2 菌悬液的制备

将枯草芽孢杆菌、假单胞菌分别接种于营养肉汤培养基中, 置于 30°C 摇床, 转速为 180 r/min, 培养 12 h, 然后将 1% 的菌悬液接种于新的营养肉汤培养基中, 在 30°C、180 r/min 条件下继续培养至其吸光度(absorbance, OD)值为 0.5~0.6, 即制得浓度为  $10^7$  CFU/mL 左右的菌悬液, 待用。

### 1.3.3 保鲜剂的制备

在查阅文献[16-19]的基础上, 根据 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》的规定, 本研究选择抑菌效果较好的 8 种生物保鲜剂和 4 种常用的食品防腐剂(山梨酸钾、抗坏血酸、苯甲酸钠、双乙酸钠)作为待筛样品, 生物保鲜剂指植物源系(丁香酚、海藻酸钠、没食子酸、百里香酚)、动物源系(壳聚糖)、微生物源系(Nisin、纳他霉素)和酶类(溶菌酶)8 个品种。12 种待筛保鲜剂均用无菌水配制成 0.5% 的溶液, 用滤膜过滤除菌后置于 4°C 冰箱中备用。

### 1.3.4 保鲜剂的筛选

采用打孔法<sup>[20]</sup>测定待筛保鲜剂对两种指示菌的抑菌圈, 平板菌悬液加入量为 200  $\mu$ L, 保鲜剂加入量为 100  $\mu$ L, 圆孔直径为 3 mm。

### 1.3.5 最小抑菌浓度的测定

采用肉汤稀释法, 综合文献[21-23]的方法稍加修改测定最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC):

取无菌试管 9 支并编号, 1 号管加入 2 mL 营养肉汤(Luria-bertani, LB)做空白对照, 2 号管加入 1.5 mL LB, 其余各管分别加入 1 mL LB, 2 号管中加入 0.5 mL 保鲜剂, 使其质量浓度为 2048  $\mu$ g/mL, 混匀后吸取 1 mL 加入 3 号管中, 依次进行此操作, 使 2~9 号管保鲜剂质量浓度分别为 512、256、128、64、32、16、8、4  $\mu$ g/mL。向 96 孔板中分别加入 100  $\mu$ L 不同质量浓度的保鲜剂和 100  $\mu$ L 受试菌悬液, 于 37°C 恒温培养箱培养 24 h, 肉眼看不到菌丝生长时对应的最低保鲜剂浓度即为受试菌的 MIC。

## 1.4 复合保鲜剂配方优化的响应面实验

在预实验基础上, 运用 Box-Behnken 实验设计方法<sup>[24]</sup>, 以溶菌酶、Nisin、丁香酚的质量分数为自变量, 抑菌圈大小为响应值, 建立响应值与考察因子之间的二次多项式回归模型, 对回归方程求导分析得到复合保鲜剂的最佳配方, 并进行抑菌效果的验证实验。实验设计如表 1 所示。

表 1 响应面实验设计因素及水平  
Table 1 Design factors and levels of response surface experiment

水平编码	影响因素		
	A 溶菌酶/%	B Nisin/%	C 丁香酚/%
-1	2	2	0.50
0	3	3	0.75
1	4	4	1.00

## 1.5 保鲜工艺优化的正交实验

采用优化的复合保鲜剂配方, 在室温下, 按表 2 的正交实验  $L_9(3^3)$  方案处理蒸煮贻贝, 之后将贻贝放入 -1°C 的冰箱贮藏, 到第 8 d 结束取样测定 TVB-N 值, 空白样品为不经保鲜剂处理、仅冰温贮藏的蒸煮贻贝。

表 2 正交实验的因素水平及编码  
Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平编码	影响因素		
	D 浸泡时间/min	E pH	G 料液比(m:V)
1	30	3.5	1:2.0
2	60	4.5	1:2.5
3	90	5.5	1:3.0

## 1.6 复合保鲜剂对蒸煮贻贝冰温贮藏的保鲜效果评价

参照吴越等<sup>[25]</sup>的方法对贻贝进行处理、贮藏和指标测定。保鲜剂组用优化后的复合保鲜剂配方及工艺进行处理。将所有样品置于 -1°C 冰箱贮藏, 于第 8 d 结束后取样评定感官指标, 测定 pH、TVB-N、菌落总数、汁液流失率, 按表 3 评分标准得到的分数总和即为贻贝的感官评分, 然后采用变异系数权重法<sup>[25]</sup>确定各项指标的权重系数, 将标准化数据加权平均后得到综合评分。

表 3 蒸煮贻贝感官评分标准  
Table 3 Criteria for sensory evaluation of steamed mussels

感官描述	分数/分	评价准则
色泽	7~10	橘红、杏黄或黄色, 呈贻贝固有光泽
	4~6	黄色, 略显贻贝光泽
	0~3	黄褐色, 光泽暗淡
组织形态	7~10	体型饱满, 肉质紧密厚实, 个体均匀, 无足丝
	4~6	体型较饱满, 肉质略瘦, 个体较均匀, 有些许足丝
	0~3	体型瘪, 肉质不厚实, 个体较均匀, 允许有少量破碎个体和足丝存在
气味	7~10	具有贻贝固有的气味, 香味清淡, 无异味
	4~6	具有贻贝的气味, 无香味, 有些许异味
	0~3	无贻贝的气味, 有异味
滋味	7~10	口感醇厚清香, 鲜味明显
	4~6	口感一般醇厚, 清香味、鲜味较淡
	0~3	无醇厚感, 无清香感, 无鲜味

## 1.7 数据统计

每组实验平行测定 3 次, 数据以平均值表示。采用 SPSS 22.0 统计分析软件对实验数据进行分析, 采用单因素方差分析法评价数据间的差异显著性, 当  $P < 0.05$  时, 差异显著, 反之, 则不显著。采用 Design-Expert 8.0.6 实验设计软件进行响应面数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 保鲜剂的筛选

按抑菌圈直径大于 7 mm 作为具有抑菌活性的判断标准<sup>[26]</sup>, 待筛的 12 种保鲜剂的抑菌效果见表 4。最小显著差数(least significant difference, LSD)法单因素方差分析结果显示, 针对枯草芽孢杆菌抑菌圈直径, 溶菌酶、Nisin、丁香酚 3 种保鲜剂均存在显著性差异; 针对假单胞菌抑菌圈直径, Nisin 和溶菌酶间无显著性差异( $P > 0.05$ ), 丁香酚与前两者存在显著性差异( $P < 0.05$ )。从表 4 可知, Nisin 对枯草芽孢杆菌的抑菌效果优于假单胞菌, 可能是由于 Nisin 无法正常通过革兰氏阴性细菌细胞壁, 故对革兰氏阴性菌的抑制效果较弱<sup>[27]</sup>; 溶菌酶对假单胞菌的抑菌效果优于枯草芽孢杆菌, 可能与溶菌酶对不同细菌的抑制机制不同有关, 对革兰氏阳性菌的抑制主要是通过破坏细胞壁使其裂解死亡, 而对革兰氏阴性菌则是先破坏细菌外膜后抑制其内膜活性致死<sup>[28]</sup>; 丁香酚则是利用其游离羟基穿透细胞壁和细胞膜, 增大细胞膜通透性, 使内容物流出致死<sup>[29-30]</sup>, 对枯草芽孢杆菌的抑菌效果更好, 与郑正等<sup>[31]</sup>的研究结果一致。其他 9 种保鲜剂对枯草芽孢杆菌和假单胞菌的抑菌圈直径均小于 7 mm, 无抑菌效果。

此外, 表 4 数据显示溶菌酶、Nisin、丁香酚对枯草芽孢杆菌和假单胞菌的抑菌效果优于其他保鲜剂, 是因为每

种保鲜剂的抑菌谱各不相同, 不同微生物对于同种保鲜剂的敏感程度也不同。例如没食子酸对大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌的抑菌效果较好<sup>[32]</sup>; 双乙酸钠对毛霉菌抑菌效果好, 对革兰氏阳性菌抑制较弱; 山梨酸钾可抑制霉菌、酵母菌和好氧性细菌生长, 但对乳酸菌等革兰氏阳性菌无抑菌效果<sup>[33]</sup>。

表 4 12 种保鲜剂的抑菌效果  
Table 4 Antibacterial effects of 12 kinds of preservatives

生物保鲜剂	枯草芽孢杆菌抑菌圈直径/mm	假单胞菌抑菌圈直径/mm
Nisin	10.87 <sup>a</sup>	9.54 <sup>a</sup>
溶菌酶	9.25 <sup>b</sup>	9.89 <sup>a</sup>
丁香酚	7.21 <sup>c</sup>	5.21 <sup>b</sup>
百里香酚		
壳聚糖		
山梨酸钾		
抗坏血酸		
纳他霉素	≤ 5 mm 无抑菌效果	
没食子酸		
双乙酸钠		
海藻酸钠		
柠檬酸钠		

注: 同列相同字母表示无显著性差异( $P > 0.05$ ), 不同字母表示存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 2.2 复合保鲜剂配方的优化

本研究对筛选出的 3 种保鲜剂进行了复合配方的研究, 响应面优化配方的实验结果及方差分析见表 5、6。

表 5 响应面实验结果

Table 5 Results of the response surface experiment

实验号	A	B	C	抑菌圈大小/cm
1	2	2	0.75	1.25
2	4	2	0.75	1.81
3	2	4	0.75	1.43
4	4	4	0.75	1.58
5	2	3	0.50	1.20
6	4	3	0.50	1.68
7	2	3	1.00	1.32
8	4	3	1.00	1.69
9	3	2	1.00	1.70
10	3	4	0.50	1.48
11	3	2	0.50	1.54
12	3	4	1.00	1.61
13	3	3	0.75	1.54
14	3	3	0.75	1.57
15	3	3	0.75	1.45
16	3	3	0.75	1.41
17	3	3	0.75	1.40

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 6 的数据进行拟合得到抑菌圈直径与 3 种保鲜剂浓度之间的回归方程:

$$Y=1.09862+0.77995A-0.4020B-1.2432C-0.10125AB-0.105AC+0.283BC-0.033825A^2+0.078175B^2+0.5068C^2$$

由表 6 可知, 模型的  $P<0.05$ , 失拟项  $P>0.05$ , 说明该模型可信度高; 决定系数  $R^2=0.9306$ , 校正系数  $R_j^2=0.8415$ , 两者都大于 80%, 表明该模型拟合效果较好, 能保证实验结果的可靠性<sup>[34]</sup>; 根据  $F$  大小可知 3 个因素对抑菌圈大小影响的主次顺序为溶菌酶浓度>Nisin 浓度>丁香酚浓度, 且溶菌酶浓度的影响显著, Nisin 和丁香酚浓度的影响不显著; 交互项  $AB$  和二次项  $B^2$  对结果影响显著。

根据拟合的回归方程预测复合保鲜剂的优化配方为 4%溶菌酶、2% Nisin、0.75%丁香酚。验证实验结果显示受试菌的抑菌圈大小平均值为(1.98±0.02) cm, 而预测值为 1.84 cm, 相对误差为 7.61%, 符合预期结果, 说明建立的数学模型准确可行。配方优化后, 复合保鲜剂对受试菌的抑菌圈直径是单一保鲜剂的 2~3 倍, 抑菌效果明显。

### 2.3 保鲜剂的最小抑菌浓度

表 7 显示了不同浓度保鲜剂作用下枯草芽孢杆菌和假单胞菌的生长情况, 由此可确定溶菌酶、Nisin、丁香酚对枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 64、64、32 μg/mL, 对假单胞菌的 MIC 分别为 64、32、16 μg/mL, 表明丁香酚抑菌能力强于其他两种保鲜剂, 配方优化的复合保鲜剂对枯草芽孢杆菌和假单胞菌的最小抑菌浓度分别为 16 和 8 μg/mL。可见复合保鲜剂比单一保鲜剂的抑菌效果更好, 且对革兰氏阴性菌的抑制效果优于革兰氏阳性菌, 很好地发挥了栅栏效应的优势。

表 6 响应面实验结果的方差分析

Table 6 Variance analysis of response surface experimental results

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著度
模型	0.410	9	0.045	10.44	0.0027	*
A	0.300	1	0.300	69.85	<0.0001	**
B	4.802E-003	1	4.802E-003	1.11	0.3274	
C	1.300E-003	1	1.300E-003	0.30	0.6008	
AB	0.041	1	0.041	9.46	0.0179	*
AC	2.756E-003	1	2.756E-003	0.64	0.4513	
BC	0.020	1	0.020	4.62	0.0686	
A <sup>2</sup>	4.847E-003	1	4.817E-003	1.11	0.3267	
B <sup>2</sup>	0.026	1	0.026	5.94	0.0450	*
C <sup>2</sup>	4.224E-003	1	4.224E-003	0.98	0.3563	
残差	0.030	7	4.333E-003			
失拟项	7.177E-003	3	2.392E-003	0.41	0.7531	不显著
误差项	0.023	4	5.788E-003			
总和	0.440	16				
		$R^2=0.9306$		$R_j^2=0.8415$		

注: \*表示  $P<0.05$ , \*\*表示  $P<0.01$ , 下同。

表 7 受试菌的生长情况  
Table 7 Growth of the test bacteria

受试菌	保鲜剂	质量浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )							
		512	256	128	64	32	16	8	4
枯草芽 孢杆菌	溶菌酶	-	-	-	-	+	+	+	+
	Nisin	-	-	-	-	+	+	+	+
	丁香酚	-	-	-	-	-	+	+	+
	复合保 鲜剂	-	-	-	-	-	-	+	+
假单 胞菌	溶菌酶	-	-	-	-	+	+	+	+
	Nisin	-	-	-	-	-	+	+	+
	丁香酚	-	-	-	-	-	-	+	+
	复合保 鲜剂	-	-	-	-	-	-	-	+

注: +表示观察到有菌生长, -表示观察到无菌生长。

## 2.4 保鲜工艺的优化

将复合保鲜剂应用于蒸煮贻贝冰温贮藏的保鲜处理中, 按表 2 的设计对保鲜工艺进行正交优化, 结果见表 8、9。由此确定优化的保鲜工艺为  $D_2E_3G_2$ , 即浸泡时间 60 min、pH 5.5、料液比 1:2.5 ( $m:V$ ); 3 个因素对 TVB-N 值的影响程度由大到小的顺序为: 料液比( $m:V$ )>pH>浸泡时间。由表 9 可知, 3 个因子对 TVB-N 值的影响作用均显著。经最佳保鲜工艺处理后的蒸煮贻贝冰温贮藏至第 8 d 结束时的 TVB-N 值为(7.80±0.14) mg/100 g, 符合 GB 2733—2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》对冷冻贝类的规定值( $\leq 15$  mg/100 g)。

## 2.5 复合保鲜剂对蒸煮贻贝冰温贮藏品质的影响

用单一指标很难全面科学地评价贻贝贮藏期间的品质, 故本研究采用变异系数权重法对贮藏 8 d 后的贻贝的各项鲜度和质地指标进行综合评价, 结果见表 10。从表 10 中可以看出, TVB-N 值的权重系数最大, pH 的权重系数最小。贮藏期间, 贻贝中微生物生长, 蛋白质、氨基酸等含氮化合物被分解后产生碱性氨和挥发性胺类物质<sup>[35]</sup>, pH 升高, 最终保鲜剂组贻贝 pH 低于空白组; 保鲜剂组贻贝的 TVB-N 值和菌落总数符合 GB 2733—2015 (TVB-N $\leq 15$  mg/100 g) 和 GB 10136—2015《食品安全国家标准 动物性水产制品》[菌落总数 $\leq 6.1$  lg(CFU/g)]的要求, 而空白组贻贝的

TVB-N 值为 16.70 mg/100 g, 菌落总数为 6.54 lg(CFU/g), 均已超标; 保鲜剂组的汁液流失率略高于空白组, 可能是由于贻贝经过保鲜剂浸泡处理, 分装时有部分溶液残留。产品感官特性会受鲜度指标变化的影响, 不同阶段感官特性有一定差异<sup>[36]</sup>, 且消费者大多通过产品外观判断其质量, 因此对产品进行感官评分是衡量其品质最直接的方法<sup>[37]</sup>。结果显示, 保鲜剂组的感官评分显著高于空白组, 与综合评价结果一致, 最终保鲜剂组的综合评价总分是空白组的 2 倍。由此可见, 复合保鲜剂可以显著抑制贻贝优势腐败菌的生长, 延长蒸煮贻贝的保质期, 具有良好的保鲜效果。

表 8 正交实验结果  
Table 8 Results of orthogonal experiment

实验号	D	E	G	TVB-N/(mg/100 g)
1	1	1	1	11.55
2	2	2	2	10.15
3	3	3	3	9.31
4	1	3	2	8.75
5	2	1	3	9.45
6	3	2	1	7.91
7	1	2	3	9.24
8	2	3	1	9.73
9	3	1	2	14.70
$K_1$	29.54	29.19	35.70	
$K_2$	29.33	33.67	27.30	
$K_3$	31.92	28.49	27.79	
R	2.59	5.11	8.40	
因素主次			$G>E>D$	
最佳工艺			$D_2E_3G_2$	

表 9 正交实验结果的方差分析  
Table 9 Variance analysis of orthogonal experimental results

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著度
D	10.198	2	0.099	0.015	*
E	6.760	2	3.380	0.041	*
G	3.489	2	1.745	0.026	*
误差	176.284	2	6.529		
总计	2027.782	9			
校正的总计	187.515	7			

$R^2=0.06$ (调整后  $R^2=0.219$ )

表 10 蒸煮贻贝贮藏 8 d 品质综合评分表  
Table 10 Comprehensive score table for quality of steamed mussels stored for 8 d

指标	权重系数	平均值		标准化数据		综合评分	
		空白组	保鲜剂组	空白组	保鲜剂组	空白组	保鲜剂组
感官评分	0.146	19.61 <sup>b</sup>	23.10 <sup>a</sup>	-1.000	0.994	-0.146	0.145
pH	0.018	5.97	5.85	1.000	-1.000	0.018	-0.018
TVB-N 值	0.436	16.70	10.15	-0.997	1.000	-0.435	0.436
菌落总数	0.102	6.54	5.84	-1.000	1.000	-0.102	0.102
汁液流失率	0.298	2.69	3.77	1.000	-1.000	0.298	-0.298
综合评价总分						-0.367	0.367

注: 同行不同字母表示存在显著性差异( $P<0.05$ ); TVB-N 值、菌落总数、汁液流失率为逆指标, 标准化后需将正负号对调。

### 3 结 论

本研究对冰温条件下贮藏的蒸煮贻贝保鲜剂进行了筛选、优化和评价,与单一保鲜剂相比,复合保鲜剂对枯草芽孢杆菌和假单胞菌的抑菌效果更好。将优化后的配方(溶菌酶 4%、Nisin 2%和丁香酚 0.75%)和工艺[复合保鲜剂溶液 pH 5.5、料液比 1:2.5 (*m:V*),浸泡时间 60 min]用于蒸煮贻贝的冰温贮藏,对感官及各项理化指标进行综合评分,最终保鲜剂组贻贝品质的综合评价总分是空白组的 2 倍,保鲜效果更好。

本研究在一定程度上扩大了溶菌酶、Nisin 和丁香酚在水产品保鲜方面的应用范围,为市场上生物保鲜剂在贻贝保鲜中的应用提供了理论支持。该复合生物保鲜剂的应用可以有效改善蒸煮贻贝在冰温贮藏条件下的鲜度和品质,延长保质期;不仅可以拓宽物流范围,还可以减少贻贝贮运过程中因品质下降造成的经济损失,有益于提高产品的市场竞争力。

### 参考文献

- [1] MCCARTNEY MA. Structure, function and parallel evolution of the bivalve byssus, with insights from proteomes and the zebra mussel genome [J]. *Philos Soc B*, 2021, (376): 1825.
- [2] 金晶. 中国贻贝出口现状及发展对策研究[J]. *对外经贸实务*, 2022, (1): 60–64.  
JIN J. Study on the present situation and development countermeasures of Chinese mussel export [J]. *Pract Fore Econ Relat Trade*, 2022, (1): 60–64.
- [3] 盛利臻. 预处理和品质改良技术对干制丁香鱼品质和贮藏稳定性的影响研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014.  
SHENG LY. Effects of pretreatment and quality improvement techniques on the quality and storage stability of dried clove fish [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2014.
- [4] 秦求思, 李思敏, 孟粉, 等. 冰温贮藏对鹰爪虾鲜度及蛋白质特性的影响[J]. *包装工程*, 2020, 41(17): 46–54.  
QIN QS, LI SM, MENG F, *et al.* Effects of ice temperature storage on freshness and protein characteristics of crawfish [J]. *Packag Eng*, 2020, 41(17): 46–54.
- [5] EBERT A, GOSS KU. Predicting uncoupling toxicity of organic acids based on their molecular structure using a biophysical model [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(7): 1835–1844.
- [6] PENG J, ZHANG FX, WEI L, *et al.* Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) quality enhancement using complex bio-preservative during cold storage [J]. *J Food Meas Charact*, 2018, 12(1): 78–86.
- [7] 张楨. 水产品生物保鲜专利技术分析综述[J]. *食品安全导刊*, 2020, (24): 174.  
ZHANG Z. Analysis and summary of biological preservation patent technology for aquatic products [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2020, (24): 174.
- [8] KIM JH, HONG WS, OH SW. Effect of layer-by-layer antimicrobial edible coating of alginate and chitosan with grapefruit seed extract for shelf-life extension of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) stored at 4 °C [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 1468–1473.
- [9] 陈文慧, 徐莉, 梁振纲. 生物保鲜剂在水产品保鲜中的应用研究[J]. *食品工业*, 2017, 38(5): 52–57.  
CHEN WH, XU L, LIANG ZG. Study on the application of biological preservatives in the preservation of aquatic products [J]. *Food Ind*, 2017, 38(5): 52–57.
- [10] 王硕, 谢晶, 刘爱芳. 生物保鲜技术在海产品中的应用及展望[J]. *包装工程*, 2017, 38(1): 137–142.  
WNAG S, XIE J, LIU AIF. Application and prospect of biological preservation technology in seafood [J]. *Packag Eng*, 2017, 38(1): 137–142.
- [11] 王帆, 张亚新, 杨计林, 等. 高功率脉冲微波协同丁香酚对河蟹肉的保鲜作用[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(6): 251–258.  
WANG F, ZHANG YX, YANG JL, *et al.* Effect of high power pulse microwave and eugenol on fresh keeping of crab meat [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2022, 22(6): 251–258.
- [12] ROCCHETTI G, FALASCONI I, DALLOLIO G, *et al.* Impact of hurdle technologies and low temperatures during ripening on the production of nitrate-free pork salami: A microbiological and metabolomic comparison [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2021, 141(2): 141.
- [13] SUNIL M, INYEE H, JAMES R, *et al.* Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey Bologna [J]. *J Food Protect*, 2007, 70(11): 2503–2511.
- [14] 王明, 张家涛, 孙彤, 等. 丁香酚复合保鲜剂对腐败希瓦氏菌的抗菌作用机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(13): 10–16.  
WANG M, ZHANG JT, SUN T, *et al.* Antibacterial mechanism of eugenol compound fresh-keeping agent against shiva putrescence [J]. *Food Sci*, 2021, 42(13): 10–16.
- [15] 杨立娜, 王子义, 康馨, 等. 大豆种皮多糖复配保鲜剂涂膜对调理贻贝肉的保鲜效果研究[J]. *渤海大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(1): 14–21.  
YANG LN, WANG ZY, KANG X, *et al.* Study on the preservation effect of soybean seed coat polysaccharide compound preservative film on conditioned mussel meat [J]. *J Bohai Univ (Nat Sci Ed)*, 2021, 42(1): 14–21.
- [16] 李会鹏, 庞道睿, 廖森泰, 等. 水产品保鲜技术的应用研究进展[C]. 现代食品工程与营养健康学术研讨会暨 2020 年广东省食品学会年会, 2020.  
LI HP, PANG DR, LIAO ST, *et al.* Research progress in application of fresh-keeping technology for aquatic products [C]. Modern Food Engineering and Nutrition and Health Academic Seminar and 2020 Guangdong Food Society Annual Meeting, 2020.
- [17] 陈海椋. 浅谈水产品生物保鲜技术的应用及展望[C]. “健康食品与功能性食品配料”学术研讨会暨 2016 年广东省食品学会年会, 2016.  
CHEN HB. Application and prospect of biological preservation technology for aquatic products [C]. “Healthy Food and Functional Food Ingredients” Academic Seminar and 2016 Annual Meeting of Guangdong Food Society, 2016.
- [18] SALEHI B, MISHRA AP, SHUKLA I, *et al.* Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses [J]. *Hytother Res*, 2018, 32: 1–19.
- [19] 张雅丽, 李建科, 刘柳. 没食子酸的体外抑菌作用研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(11): 81–84.  
ZHANG YL, LI JK, LIU L. Study on the bacteriostatic effect of gallic acid *in vitro* [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(11): 81–84.

- [20] 安宁, 黄瑾妍, 江炜. 伤口药水的体外抗菌活性研究[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(3): 357-360.  
AN N, HUANG JY, JIANG W. Study on antibacterial activity of wound medicine *in vitro* [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2020, 36(3): 357-360.
- [21] JAYACHANDRAN AL, KATRAGADDA R, RAVINDER T, *et al.* Antifungal susceptibility pattern among *Candida* species: An evaluation of disc diffusion and micro broth dilution method [J]. J Microbiol Infect Dis, 2018, (3): 97-101.
- [22] 孙长花, 丁娟芳, 王君, 等. 迷迭香提取液的抑菌作用及稳定性研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(11): 42-45.  
SUN CH, DING JF, WANG J, *et al.* Study on the bacteriostasis and stability of rosemary extract [J]. China Cond, 2020, 45(11): 42-45.
- [23] 苏梦茹, 马培培, 李鑫鑫, 等. 9种抗菌药物对大肠埃希菌最小抑菌浓度的测定[J]. 动物医学进展, 2020, 41(3): 52-56.  
SU MR, MA PP, LI XX, *et al.* Determination of minimum inhibitory concentration of 9 kinds of antibacterial drugs against *Escherichia coli* [J]. Pro Vet Med, 2020, 41(3): 52-56.
- [24] LONG XY, YAN Q, CAI LJ, *et al.* Box-Behnken design-based optimization for deproteinization of crude polysaccharides in *Lycium barbarum* berry residue using the Sevag method [J]. Heliyon, 2020, 6(5): 1-8.
- [25] 吴越, 易冲, 沈俊, 等. 低压变频电场对蒸煮贻贝冰温保鲜效果的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3075-3082.  
WU Y, YI C, SHEN J, *et al.* Effect of low voltage frequency conversion electric field on ice temperature preservation of steamed mussels [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(10): 3075-3082.
- [26] 单孔荣, 王红丽, 姚乃捷, 等. 薰衣草精油与罗勒精油对痤疮致病菌的体外抑菌作用研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 677-680.  
SHAN KR, WANG HL, YAO NJ, *et al.* Study on the antibacterial effect of lavender essential oil and basil *Essential oil* on acne pathogenic bacteria [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2017, 33(5): 677-680.
- [27] 吕淑霞, 白泽朴, 黄益, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究[J]. 中国酿造, 2008, (9): 87-91.  
LV SX, BAI ZP, HUANG Y, *et al.* Study on the bacteriostatic effect and mechanism of Nisin [J]. China Brew, 2008, (9): 87-91.
- [28] 汪乐川, 李丽莎, 李真顺, 等. 基于生物膜模型分析溶菌酶抑菌机制的研究进展[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 28-32.  
WANG LC, LI LS, LI ZS, *et al.* Research progress on bacteriostatic mechanism of lysozyme based on biofilm model [J]. Food Sci Technol, 2019, 44(10): 28-32.
- [29] 赵昕. 丁香酚对鼠伤寒沙门氏菌的抗菌作用及机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.  
ZHAO X. Antibacterial effect and mechanism of eugenol on *Salmonella typhimurium* [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2022.
- [30] 周倩倩, 方士元, 梅俊, 等. 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 1-6.  
ZHOU QQ, FANG SY, MEI J, *et al.* Inhibitory mechanism of eugenol on *Shiva putrescens* and *Pseudomonas fluorescens* [J]. Food Sci, 2020, 41(9): 1-6.
- [31] 郑正, 王芳彬, 赵迪. 负载壳聚糖和丁香酚的二维 MoS<sub>2</sub> 的制备及其抑菌活性研究[J]. 中南药学, 2020, 18(5): 776-780.  
ZHENG Z, WANG FB, ZHAO D. Preparation of two-dimensional MoS<sub>2</sub> loaded with chitosan and eugenol and its antibacterial activity [J]. Cent South Pharm, 2020, 18(5): 776-780.
- [32] ZHANG XW, ZHOU DG, CAO YF. Synergistic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* by gallic acid and thymol and its potential application on fresh-cut tomatoes [J]. Food Microbiol, 2022, 102: 103925.
- [33] 任杰, 邱春强, 朱伟, 等. 几种主要防腐剂抑菌性和肉品保鲜的作用研究[J]. 肉类工业, 2016, (7): 52-56.  
REN J, QIU CQ, ZHU W, *et al.* Study on the bacteriostasis of several major preservatives and the effect of meat preservation [J]. Meat Ind, 2016, (7): 52-56.
- [34] LI Y, CUI FJ, LIU ZQ, *et al.* Improvement of xylanase production by *Penicillium moxalicum* ZH-30 using response surface methodology [J]. Enzyme Microbiol Technol, 2007, 40(5): 1381-1388.
- [35] 邓文静, 钱磊, 张军, 等. 复合生物保鲜剂在南美白对虾保鲜中的应用[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(9): 205-211.  
DENG WJ, QIAN L, ZHANG J, *et al.* Application of compound biological preservative in preservation of *Penaeus vannamei* [J]. Food Res Dev, 2021, 42(9): 205-211.
- [36] SAITO K, YOSHINARI M, ISHIKAWA S. Effects of low-temperature long-time sous-vide cooking on the physicochemical and sensory characteristics of beef and pork shank [J]. J Culin Sci Technol, 2022, 20(2): 165-179.
- [37] LIU XL, ZHANG CH, LIU SC, *et al.* Coating white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with edible fully deacetylated chitosan incorporated with clove essential oil and kojic acid improves preservation during cold storage [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 162: 1276-1282.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

## 作者简介



吕艳霞, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。  
E-mail: lvyanxia0205@163.com



罗红宇, 教授, 主要研究方向为水产品贮藏与加工。  
E-mail: lisa8919@163.com



杨涛, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为海洋生物资源开发与利用。  
E-mail: yt286983209@126.com