

抗菌性海藻酸钠涂膜在罗非鱼片保鲜中的应用

张杰² 王跃军¹ 刘均忠¹ 郑媛¹ 王伟¹ 孙谧^{1*}

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学食品学院, 201306)

摘要 采用测定涂膜抑菌性能、缓释效果来探讨抗菌性海藻酸钠涂膜的抑菌机理并将其应用在罗非鱼片的涂膜保鲜中。实验结果表明, 抗菌膜是一种具有缓释效果的保鲜膜, 对大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* 及鱼片表面其他杂菌均有较好的抑制效果, 保鲜剂在 40 h 内可从涂膜中完全释放; 与未经涂膜处理的对照组相比, 抗菌膜可以明显控制鱼片细菌总数的增长、维持较低的挥发性盐基氮值和改善鱼片的感官质量, 综合考虑鲜度指标并本着以感官评分为基础的原则, 抗菌涂膜处理可以将罗非鱼片的保鲜期延长约 5.5 d。

关键词 海藻酸钠涂膜 抗菌性 缓释 罗非鱼片 保鲜

中图分类号 S983 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)02-0102-07

Study on application of antimicrobial sodium alginate films in Tilapia fillet preservation

ZHANG Jie² WANG Yue-jun¹ LIU Jun-zhong¹

ZHENG Yuan¹ WANG Wei¹ SUN Mi^{1*}

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT This study focused on inhibition mechanism of antimicrobial films and its application in Tilapia fillet preservation. The antimicrobial films were obtained by incorporating preservatives into alginate films through calcium cross-linking process. Results showed that antimicrobial film was sustained-release film which had strong inhibiting capability against such strains of bacteria as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shewanella putrefaciens* as well as miscellaneous microbes on fish epidermis. Preservatives could be completely released from the films and maintain high concentration on the surface of aquatic products. Coated fillet were stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ under aerobic conditions and the microbiological, biochemical and sensory changes were periodically evaluated. The antimicrobial films could restrain the growth of bacteria, keep the TVB-N value at relatively low level and improve the sensory quality of fil-

国家 863 计划项目(2006AA10Z349)资助

* 通讯作者。E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn, Tel: 13687654668

收稿日期: 2008-12-26; 接受日期: 2009-08-31

作者简介: 张杰(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物保鲜研究。E-mail: zj2002353@sohu.com, Tel: (0532)85833961

let, thus the shelf-life of Tilapia fillet was extended for about 5.5 days.

KEY WORDS Sodium alginate films Anti-microbial activity Sustained-release
Tilapia fillet Preservation

水产品口味鲜美、营养丰富,但在加工、贮藏和销售过程中容易发生腐败变质,因而降低或失去营养和食用价值。常见的保鲜方法主要有冷冻和冰藏保鲜(王四维等 2007),前者虽然保鲜时间长,但蛋白质在冷冻过程中易变性、解冻时易失水,影响产品的口感和外观;后者虽能较大程度保持产品原有特性和独特风味,但又具有保鲜期短的缺点。

抗菌性海藻酸钠涂膜是指在海藻酸钠中添加保鲜剂,通过保鲜剂的释放而达到抗菌、延长保鲜效果的一种功能性涂膜(刘 坤等 2005;胡永茂等 2005)。当前,对抗菌性涂膜研究的兴趣正与日俱增,一方面是由于对可再生资源的需求,另一方面是因为抗菌性涂膜对食品的保鲜功能。在水产品贮藏过程中,控制腐败微生物的生长和延缓脂肪氧化是延长水产品货架期的关键所在,而抗菌性涂膜是延长其货架期比较有效的方法之一。其主要优点如下:容易被生物降解,无任何环境污染;可作为食品风味剂、抗氧化剂和抗微生物制剂等的载体;应用于塑料包装的内层,减少和防止塑料中有害残留物向食品迁移;具有不同的阻隔性能,可适合各种不同需求的包装(汪学荣等 2003)。

本研究以新鲜的罗非鱼片为试样,将抗菌性海藻酸钠涂膜应用于水产品保鲜中,研究抗菌膜的抑菌作用机理及其保鲜效果,为开发抗菌膜在食品中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料和试剂

海洋溶菌酶由中国水产科学研究院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室提供,酶活力为 25 000 U/mg(张 琇等 2007);茶多酚、山梨酸钾、海藻酸钠和无水氯化钙等均为食品级。

罗非鱼每尾约重 500 g,购于青岛家乐福超市。

1.2 供试菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* 均由黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室提供,鱼片表面杂菌分离自市售罗非鱼。

1.3 仪器与设备

LDZX-40B 型立式自控电热压力蒸汽灭菌器、SPX-160B 生化培养箱、组织捣碎匀浆机、海尔冰柜、真空包装机、pH 计、恒温水浴、Markhan 氏半微量定氮装置、SW-GJ-IB 标准超净工作台。

1.4 抗菌膜制备工艺

用钙盐交联法(曾庆祝等 1996)。将 20 g 的海藻酸钠溶解于 1L 50 °C 灭菌水中,恒温搅拌 2h 至形成黏度较大的溶液,添加 4 g/L 的甘油作为增塑剂,4 000 r/min 离心 15 min,在 0.1 Mpa 真空下使溶液脱气 1~2 h,添加保鲜剂,加入 5%CaCl₂ 胶化成膜。

1.5 实验方法

1.5.1 抗菌膜抑菌作用机理

1.5.1.1 抑菌实验

参照 1.4 工艺制备抗菌膜,保鲜剂的添加量为海洋溶菌酶 400 mg/L、茶多酚 1 500 mg/L、山梨酸钾 800

mg/L,并以不添加保鲜剂的海藻酸钠涂膜作空白对照。首先将抗菌膜和空白膜剪成直径为20 mm的圆片,分别置于10 ml的磷酸盐缓冲液(pH 6.8,0.01 mol/L)中,20 ℃下保温48 h,即得到空白膜和抗菌膜的浸提液。然后将厚度为2.0 mm的滤纸用打孔器打成直径为5 mm的圆片,干热灭菌后在浸提液中浸5 min,取出后轻贴于含菌平板上,将平皿倒置于恒温箱中。最后按照各自菌种最适培养温度培养24 h后,根据抑菌圈大小确定抑菌效果。

1.5.1.2 缓释效果

将直径为20 mm的抗菌膜置于含有10 ml磷酸盐缓冲溶液(pH6.8)的试管中,然后在37 ℃条件下在恒温摇床上缓慢振动,每隔8 h取样并测定保鲜剂的浓度,同时补充等量的空白缓冲液,最后绘制保鲜剂累计释放率-时间曲线。考虑到本实验在制膜过程中保鲜剂的损失,90%载药量的保鲜剂释放被认为保鲜剂完全从涂膜中释放(王令充 2008)。

1.5.1.3 保鲜剂的测定方法(陈毓荃 2002)

海洋溶菌酶浓度的测定:Folin-酚法测定;茶多酚浓度的测定:540nm处紫外分光光度法;山梨酸钾浓度测定:252 nm处紫外分光光度法。

1.5.2 抗菌膜保鲜效果研究

1.5.2.1 保鲜方法

将新鲜的罗非鱼用清水洗净后,经放血、剖片、冲洗的工艺后将鱼片随机分为3组,分别标记为A、B和C。其中,A为对照组,不做任何保鲜处理;B组采用海藻酸钠涂膜处理;C组采用抗菌膜涂膜处理。3组样品均放于盛冰的泡沫盒中,置于4±1℃冰箱中,定时取一定量样品进行鲜度指标测定。

1.5.2.2 鲜度指标测定方法(魏广东 2005)

细菌总数:采用平板培养计数法。评价标准按GB 21290-2007-T罗非鱼片中的规定,即:一级鲜度,菌落总数 $\leq 1.0 \times 10^4$ CFU/g;二级鲜度,菌落总数 $\leq 1.0 \times 10^6$ CFU/g。

总挥发性盐基氮:采用微量扩散法。评价标准按GB 21290-2007-T罗非鱼片中的规定,即:一级鲜度,TVB-N<13 mg/100g;二级鲜度,TVB-N<20 mg/100g。

水产品的pH值:称取10 g已打成肉糜状的待测样,加入蒸馏水100 ml,搅拌过滤,用pH计检测滤液的pH值,pH值7.0时为不可食用状态。

食品感官评定:以色泽、气味、弹性和黏度品质等4项感官指标进行综合评定,每项指标评定结果均采用5段记分,评价标准见表1(曾明勇等 2003),综合得分取各项得分平均值。综合得分在10分(极新鲜)和4分(已腐败)之间,6分以下表明样品已不可食用。

表1 水产品感官评定评分标准
Table 1 Sensory assessment grading standard for aquatic product

项目 Item	分值 Score				
	10分	8分	6分	4分	2分
色泽 Color	色泽洁白 White	灰白色 Offwhite	灰色 Gray	表面微褐色 Light brown	出现褐色 Brown
气味 Odor	正常 Normal	有轻微异味 Slight Odor	有明显异味 Significant Odor	有腐败味 Corruption smell	有臭味 Frowzy
弹性 Elasticity	好 Excellent	较好 Good	差 Bad	无弹性 Nonelastic	无弹性 Nonelastic
黏度 Viscosity	外表微湿润,不黏手 Slightly moist surface Non-sticky	外表湿润,切面微湿润 Moist surface, slightly moist section	外表黏手,切面微湿润 Sticky surface, slightly moist section	外表黏手,切面微黏手 Sticky surface, slightly sticky section	外表和切面都黏手 Sticky surface and section

2 结果与分析

2.1 抗菌膜抑菌作用机理

2.1.1 抗菌膜的抑菌效果

以涂膜浸提液的抑菌圈直径为检测指标,研究了抗菌膜对水产品中常见菌的抑菌效果,实验结果见表 2。本实验中供试菌种为大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、腐败希瓦氏菌及鱼片表面杂菌,这些微生物是水产品生产、贮藏和销售过程中最易污染的微生物。实验结果表明,海藻酸钠涂膜对供试菌无抑制作用,抑菌圈直径均为 5.0 mm,而抗菌膜对常见的污染菌有较好的抑制效果,抑菌效果依菌种不同而有差异,抑菌圈直径在 11.0~14.0 mm 之间。

表 2 抗菌膜对供试菌种的抑菌效果
Table 2 The antimicrobial effect of antimicrobial films

菌株 Strain of microbial	空白膜 Sodium alginate film	抗菌膜 Anti-microbial film
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	5	13.5±0.06
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	5	14.0±0.08
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	5	12.5±0.04
腐败希瓦氏菌 <i>S. putrefaciens</i>	5	11.5±0.06
鱼片表面杂菌 Miscellaneous microbes on fish epidermis	5	12±0.02

注:滤纸片直径为 5 mm;抑菌圈直径为 3 个平行值的平均数±SD。*t* 检验证明,抗菌膜抑菌效果显著

2.1.2 抗菌膜的缓释效果

图 1 反映的是保鲜剂在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液条件下从涂膜中的释放情况。结果表明,3 种保鲜剂在浓度为 20g/L 的海藻酸钠涂膜中完全释放所需时间如下:山梨酸钾(24 h)>茶多酚(32 h)>海洋溶菌酶(40 h)。可以看出不同种类的保鲜剂在涂膜中完全释放的时间不同,但均可在 40 h 之前完全释放出来,因此对于水产品保鲜而言,该抗菌膜保鲜剂的释放率是较为适宜的。

2.2 涂膜的保鲜效果

2.2.1 保鲜过程中细菌总数的变化

水产品的腐败变质很大程度上是由微生物的作用引起的,在运输和销售过程中都会被微生物污染。微生物在其生长繁殖过程中分泌各种酶和毒性物质,使水产品组织发生分解,使其质量下降进而发生腐败变质。水产品中的微生物耐低温性较强,即使在低温下贮藏,其体表的细菌总数仍在不断增加。因此,测定细菌总数可以判断水产品的鲜度(邱春江等 2003)。A、B 和 C 3 组细菌总数变化如图 2 所示。

从图 2 可以看出,随着时间的延长各组细菌总数都在逐渐增加,在整个贮藏过程中,B 和 C 两组的细菌总数都明显低于对照组。其中,对照组 A 细菌总数增长最快,到第 3 天已达到 9.6×10^5 CFU/g,接近二级鲜度的上限;而 B 组和 C 组的细菌总数分别在第 5 天和第 10 天才超过二级鲜度。

海藻酸钠能在鱼片表面形成一层薄膜,有效的阻止鱼片和空气接触,从而抑制需氧微生物的生长。因此,B 和 C 两组细菌总数在前期差距不大,C 组中的保鲜剂能在一定时间内逐渐完全释放出来,因而可以在鱼片表面这个微生物最容易急剧增长的地方持久的发挥抗菌活性,从而减缓了鱼片细菌总数的增长,使鱼片货架期延长了 6.5 d。

2.2.2 保鲜过程中 TVB-N 值的变化

挥发性盐基氮是水产品在腐败过程中由于酶和细菌作用使组织中蛋白质分解产生的氨以及低级胺类,胺

类物质与在腐败过程中产生的有机酸结合,形成盐基态氮(NH·R)而沉积于肉中,所以,肉中所含 TVB-N 的量与其腐败程度有明确的对应关系(王秀娟等 2007)。因此,评价水产品鲜度的时候通常要测 TVB-N 值, A、B 和 C 3 组 TVB-N 变化如图 3 所示。

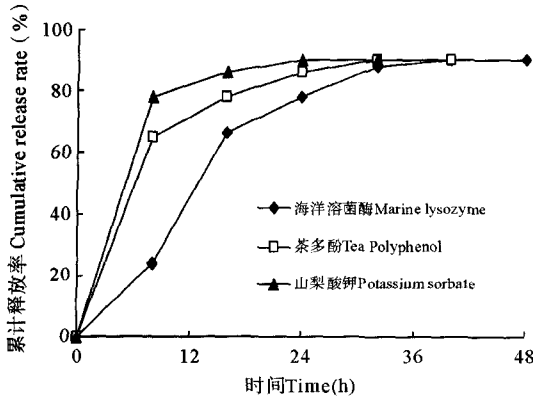


图 1 保鲜剂累计释放曲线

Fig. 1 The release curves of the preservative from the films

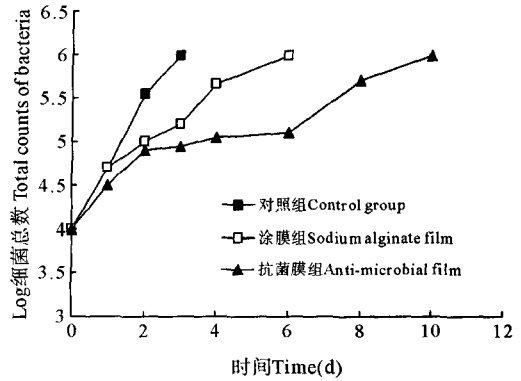


图 2 贮藏期间细菌总数的变化

Fig. 2 Variation of total counts of bacteria during storage

由图 3 可知:经过 4 d 后, A 组鱼片的挥发性盐基氮为 22.4 mg/100g, 已超过国家标准规定的 20.0 mg/100g,可以看出,鱼片在冷藏条件下的货架期不到 4 d。只有当细菌大量繁殖时,TVB-N 值的含量才会快速增长,鱼片开始迅速腐败。B 组中的海藻酸钠在鱼片表面形成的涂膜均匀致密,因而具有较好的阻湿和隔氧作用,所以较好地抑制细菌生长、减缓鱼片的蛋白质分解速度,将其货架期延长了 2 d 左右。而 C 组中涂膜具有抗菌和防腐特性,贮藏期间在抑制细菌增长的同时也很好控制了蛋白质的分解,到第 12 天抗菌膜保鲜的鱼片挥发性盐基氮为 20.8 mg/100g,刚超过二级鲜度范围。表明抗菌膜在一定程度上能够较好地控制罗非鱼片挥发性盐基氮的产生,使其货架期延长了 7.5 d。

2.2.3 保鲜过程中 pH 值的变化

罗非鱼死后由于血液循环和体内氧气的供应停止,糖原随糖酵解过程生成乳酸在肌体内蓄积使肌体 pH 值下降,到达最低点后,由于细菌和酶分解蛋白质产生碱性物质,pH 值又逐步上升,表明鱼片进入自溶阶段,鲜度已开始下降。pH 值可以作为水产品鲜度变化的一项重要参考指标,通常采用酸度计直接测量。A、B 和 C 3 组 pH 变化如图 4 所示。

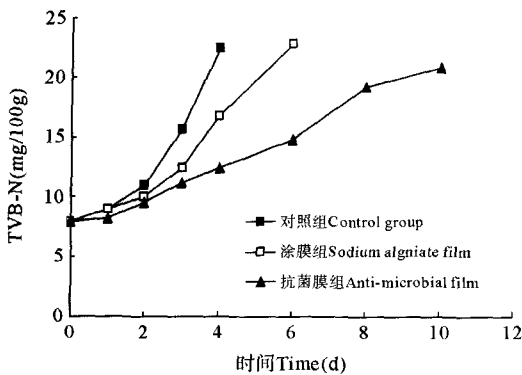


图 3 贮藏期间 TVB-N 值的变化

Fig. 3 Variation of TVB-N value during storage

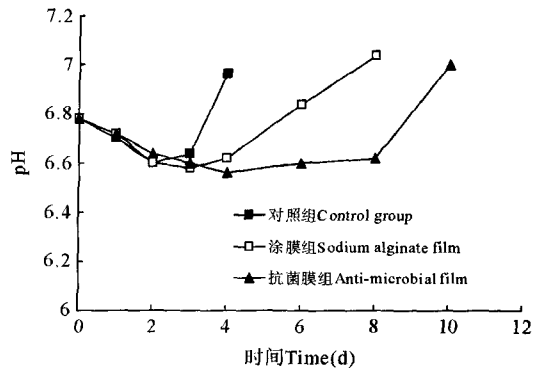


图 4 贮藏期间 pH 值的变化

Fig. 4 Variation of pH value during storage

由图4可知,A、B和C3组鱼片的pH值都经历了一个先降后升的过程,对照组的鱼片贮藏2.5d后,pH开始上升,进入自溶期;海藻酸钠涂膜将B组的鱼片自溶期延长了1.5d左右,到第4天其变化趋势已与对照组相似,C组鱼片的pH值在整个贮藏过程中均低于A、B两组,到7d后鱼片的pH才开始逐渐升高。

这说明经过海藻酸钠涂膜处理的鱼片仅在贮藏的前期控制了细菌总数的增长,因涂膜无抗菌性,所以细菌总数很快就会大幅度增长。而鱼片经过抗菌涂膜处理后,鱼片表面的细菌总数可被抑制,因而大大减缓了蛋白质的分解速度,延缓了鱼片自溶的时间,达到了延长鱼片货架期的目的。以pH值为检测指标,抗菌膜延长罗非鱼片的货架期5.5d。

2.2.4 保鲜过程中感官评分的变化

由感官人员对色泽、气味、弹性和黏度品质等4项感官指标进行综合评定,鱼片的感官特征很大程度上会影响消费者的接受程度,虽然存在费时和一定主观性等缺点,但能够快速提供产品质量的信息,因此是一项非常重要的鲜度评价指标(岑剑伟等 2008)。鲜度良好的罗非鱼片应该色泽洁白、气味正常、弹性良好、外表微湿润和不黏手,3组鱼片在贮藏期间感官综合评分变化见图5。

分析图5数据可知,样品贮藏1d后3组鱼片的感官评分差异不大,可看出低温在较短时间内可以维持罗非鱼片的新鲜度,然而随着保鲜期的延长,各组鱼片之间感官评分值的差别逐步加大。水产品感官评定、评分标准中规定6分以下的样品已不可食用,A、B和C3组鱼片分别在第3天、第6天和第9天时评分标准接近6分,此时鱼片色泽呈灰色、有明显异味、弹性较差和外表比较黏手。感官评分所反映的结果是鱼片细菌总数、TVB-N值和pH变化的外在表现,因此其分值变化趋势和图2、图3、图4变化趋势有很好的—致性。

曾庆祝等(1996)曾报道海藻酸钠涂膜可用于水产品保鲜,然而由于包装内部空气湿度较大,容易造成包装内部腐败微生物的生长繁殖,因而被包装的水产品易受到微生物污染。C组中抗菌膜以其高效的抑菌性和良好的持水性使鱼片的货架期延长了5.5d。

3 讨论

通过对抗菌膜抑菌作用的研究,可知抗菌膜是通过膜内保鲜剂的释放达到抑菌作用的,且抑菌效果随保鲜剂的种类和用量的变化而改变。海藻酸钠涂膜不仅可以阻止鱼片和空气接触,而且是保鲜剂的有效载体,它可以在鱼片表面细菌大幅度增长之前将保鲜剂完全释放出来,添加了海洋溶菌酶的复合保鲜剂可以抑制水产品中常见腐败微生物,使抗菌膜达到延长水产品货架期的效果。

通过对水产品鲜度指标的测定和对比保鲜实验:发现经过涂膜处理过的鱼片要比对照组样品的保鲜效果好,而抗菌膜中的海洋溶菌酶复合保鲜剂可以在短时间内完全释放出来,并有效控制细菌总数的增长幅度,因此,抗菌膜组的鱼片保鲜效果最好。从细菌总数和TVB-N值来看,抗菌膜分别将罗非鱼片的货架期延长了6.5和7.5d;从pH和感官评分值来看,抗菌涂膜将罗非鱼片的货架期延长了5.5d,综合考虑4项指标并本着以感官评分为基础的原则,抗菌涂膜处理可以将罗非鱼片的保鲜期延长约5.5d。

总之,抗菌性海藻酸钠涂膜不仅可改善鱼片的感官品质,而且可延长其货架期。涂膜操作工艺简单、成本低廉,性价比较高;且生成的降解物对环境无污染,适用于鱼片的长距离运输和销售,可应用于工业化的批量生产。

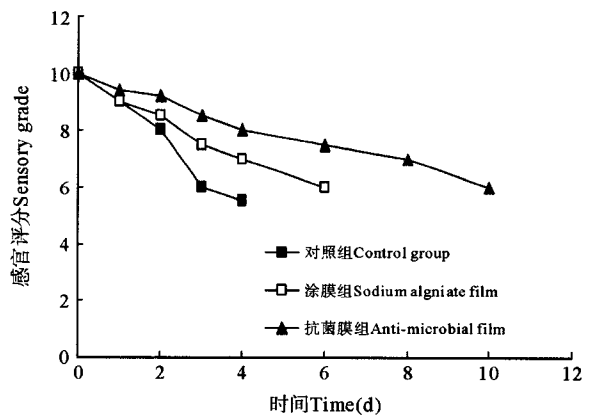


图5 贮藏期间感官评分的变化
Fig. 5 Variation of sensory grade during storage

参 考 文 献

- 王秀娟,张坤生,任云霞. 2007. 壳聚糖涂膜保鲜虾的研究. 食品科学,28(7):519~522
- 王令充. 2008. 羧甲基壳聚糖局部医用膜材料的研制及性能评价. 见:中国海洋大学博士学位论文
- 王四维,蒋蕴珍,过世东. 2007. 山梨酸和涂膜联合作用延长青虾货架期的效果. 食品工业科技,28(10):211~214
- 刘 坤,高 华. 2005. 新型鱼类涂膜保鲜技术的研究. 海洋水产研究,26(4):70~74
- 汪学荣. 2003. 可食用膜在肉类保鲜中的应用的研究进展. 肉类工业,3:23~25
- 陈毓荃. 2002. 生物化学实验方法与技术. 北京:科学出版社,102~104
- 张 琇,王跃军,孙 溢. 2007. 海洋细菌 S-12-86 的产溶菌酶条件. 中国水产科学, 14(3): 425~429
- 邱春江,薛长湖,舒留泉. 2003. 复合生物保鲜剂在贻贝保鲜中的试验研究. 食品科学,7:53~57
- 岑剑伟,王剑河,李来好. 2008. 不同养殖模式的凡纳滨对虾品质的比较. 水产学报, 32(1):39~44
- 胡永茂,项金钟,张学清. 2005. 抗菌食品保鲜膜的研究与进展. 大理学院学报,4(1):92~96
- 曾庆祝,许庆陵. 1996. 褐藻酸钠涂膜剂的特性研究. 大连水产学院学报,11(1):65~69
- 曾庆祝,许庆陵. 1996. 鱼、虾、贝可食性涂膜保鲜技术的研究. 大连水产学院学报,12(2):37~42
- 曾名勇,黄海,李八方. 2003. 鳙肌肉蛋白质生化特性在冻藏过程中的变化. 水产学报, 27(5):480~485
- 魏广东. 2005. 水产品质量安全检测手册. 北京:中国标准出版社,146~148

—————

《海洋水产研究》期刊于 2009 年 1 月起更名为《渔业科学进展》

各有关单位、各位读者:

经国家新闻出版署 2008 年 11 月 13 日(新出报刊[2008]1324 号文)和山东省新闻出版局 2008 年 12 月 11 日(鲁新出批字[2008]325 号文)批准,从 2009 年 1 月起,《海洋水产研究》期刊更名为《渔业科学进展》(英文名:Progress in Fishery Sciences),ISSN 1000-7075,国内统一刊号:CN 37-1466/S,国内邮发代号:24-153,国外发行代号:4578Q。刊期仍为双月刊。

更名后,本刊栏目包括研究论文、研究综述和研究简报等,内容涵盖各类水域渔业科学研究最新成果,涉及与渔业科技有关的各学科门类的研究进展。本刊主要报道渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术、水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。希望各位领导、各位专家,一如既往地关心和支持我们的工作,踊跃为《渔业科学进展》刊物投稿。

祝愿各位领导、各位专家工作顺利、万事如意!

《渔业科学进展》编辑部

2010 年 4 月 30 日