

冷冻调理小龙虾生物保鲜剂的筛选及复配

孙英杰^{1,2}, 孙荣雪², 王成², 马艳弘^{1,2}, 熊令明², 刘钱媛², 江宁^{1,2*}

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要: 为解决冷冻调理小龙虾贮藏期间氧化反应和微生物活动引起的品质劣变, 该研究通过体外抑菌和抗氧化试验, 从7种常规生物保鲜剂中筛选出3种(聚赖氨酸盐酸盐、茶多酚、迷迭香提取物), 并对这3种生物保鲜剂进行复配优化。利用单因素试验确定各保鲜剂最佳添加量, 并采用Box-Behnken设计模型, 以挥发性盐基氮值、硫代巴比妥酸值为响应值, 得到复合生物保鲜剂最佳组合方案为聚赖氨酸盐酸盐0.20 g/L、迷迭香提取物0.23 g/L、茶多酚0.20 g/L。结果表明, 该复合生物保鲜剂对冷冻调理小龙虾具有抑菌抗氧化作用, 并在-18℃下显著减缓冷冻调理小龙虾脂质和蛋白质的氧化反应。

关键词: 复合生物保鲜剂; 冷冻调理小龙虾; 配方优化; 抑菌活性; 抗氧化活性

Screening and Compounding of Bio-preservatives for Frozen Conditioned Crayfish

SUN Yingjie^{1,2}, SUN Rongxue², WANG Cheng², MA Yanhong^{1,2}, XIONG Lingming², LIU Qianyuan², JIANG Ning^{1,2*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China;
2. Agricultural Products Processing Research Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

Abstract: Oxidation and microbial activities cause quality deterioration of frozen conditioned crayfish during storage. The *in vitro* antibacterial and antioxidant tests were carried out to screen three bio-preservatives (polylysine hydrochloride, tea polyphenols, and rosemary extract) out from seven conventional bio-preservatives for compounding. Single factor tests were carried out to determine the optimal concentrations of the three bio-preservatives, and then Box-Behnken design was employed to determine the optimal combination with total volatile basic nitrogen and thiobarbituric acid reactive substances as the response values. The optimal combination was determined as 0.20 g/L polylysine hydrochloride, 0.23 g/L rosemary extract, and 0.20 g/L tea polyphenols. The results showed that the complex bio-preservative had antibacterial and antioxidant effects on frozen conditioned crayfish and significantly slowed down the oxidation of lipids and proteins at -18 °C.

Key words: complex bio-preservative; frozen conditioned crayfish; formula optimization; antibacterial activity; antioxidant activity

引文格式:

孙英杰, 孙荣雪, 王成, 等. 冷冻调理小龙虾生物保鲜剂的筛选及复配[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(6): 128-135.

SUN Yingjie, SUN Rongxue, WANG Cheng, et al. Screening and Compounding of Bio-preservatives for Frozen Conditioned Crayfish[J]. Food Research and Development, 2024, 45(6): 128-135.

小龙虾原名克氏原螯虾, 甲壳纲、十足目, 因其独特的风味、高蛋白和低脂肪含量等优点深受广大消费者喜爱, 是我国畅销的淡水虾类^[1-2]。随着小龙虾消费

量的迅速增长, 小龙虾加工品类日益多样化、特色化, 主要包括生鲜食品、冷冻初加工或低温熟食制品等^[3]。其中, 冷冻调理小龙虾因经简单加工后便可食用而具

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(SCX(21)2070)

作者简介: 孙英杰(1997—), 女(汉), 硕士, 研究方向: 水产品加工与保鲜。

*通信作者: 江宁(1983—), 男(汉), 副研究员, 博士, 研究方向: 水产品加工与保鲜。

有广阔的发展前景。但冷冻处理只是抑制微生物繁殖及酶的活性,贮运过程的温度波动、贮运时间等都会对小龙虾产品品质造成不同程度的影响^[4]。除此之外,冷冻调理小龙虾在加工过程中使用大量油脂,产品在冻藏过程中易氧化加剧,最终引起产品劣变。

生物保鲜剂是一种绿色、安全且高效的新型保鲜剂,其主要从动物、植物和微生物中获得^[5],具有绿色安全、残留量低和保鲜能力强等特点,是现代食品保鲜的研究热点。聚赖氨酸盐酸盐是链霉菌属发酵过程中的代谢产物,经提取分离精制获得,是一种具有广谱抑菌性和热稳定性的新型生物保鲜剂^[6]。刘文浩等^[7]研究发现, ϵ -聚赖氨酸盐酸盐使用量在 0.1~0.3 g/kg 范围内,对弗氏柠檬酸杆菌属的抑菌率达到 100%。于晓慧等^[8]选用茶多酚为主的生物保鲜剂处理小龙虾后发现,样品微生物数量和挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)值的生长速率均有所降低,且在(25±1)°C贮藏条件下,货架期由 6 d 延长至 15 d。迷迭香提取物具有高抗氧化活性,并且有相关研究表明,经含迷迭香提取物处理的鸡肉饼保质期延长了 4 d^[9]。相关研究发现,将生物保鲜剂组合后应用于肉制品,能够有效抑制其微生物生长和脂质氧化^[10-11]。

本研究对 7 种生物保鲜剂进行筛选,通过响应面法对筛选得到的生物保鲜剂进行复配,并对优化得到的复合保鲜剂保鲜能力进行验证,以期复合生物保鲜剂在延缓冷冻调理小龙虾脂质氧化和品质劣变等方面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活小龙虾:淮安洪泽湖渔夫有限公司;腐败希瓦氏菌:江苏省农业科学院农产品加工研究所;聚赖氨酸盐酸盐(polylysine hydrochloride, PL)、茶多酚(tea polyphenols, TP)、迷迭香提取物(rosemary extracts, RE)、乳酸链球菌素(Nisin)、葡萄籽提取物、苹果多酚、褐藻寡糖(M_w=2 800 Da)(均为食品级);无水乙醇、醋酸钠、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐[diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS]、1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、过硫酸钾、氯化钠(均为分析纯);国药集团化学试剂有限公司;总抗氧化能力测定试剂盒:南京建成海浩生物科技有限公司

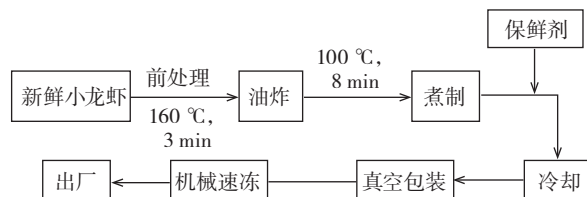
1.2 仪器与设备

M4PC 型紫外可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司;XO-6D 无菌均质器:南京先欧仪器制造有限公司;SPARK 酶标仪:帝肯奥地利有限责任公司;5424R 高速冷冻离心机:湖南湘仪有限公司;SW-CJ-1F 超净工作台:苏州净化有限公司;HZQ-F100 全温度振

荡培养箱:太仓市华美生化仪器厂;SN-HWS-250B 恒温恒湿箱:上海尚普仪器设备有限公司;LDZM-80L-I 立式高压蒸汽灭菌锅:上海申安医疗器械厂。

1.3 方法

1.3.1 冷冻调理小龙虾的制备工艺



将新鲜小龙虾刷洗干净后置于碎冰中猝死,并于室温下静置 1 h 以沥干水分,随后置于 160 °C 油炸锅中炸制 2~3 min。将油炸后的小龙虾加入卤汁中煮制 8 min。待小龙虾卤汁冷却到 80 °C,加入不同浓度的保鲜剂并浸渍 1 h,最后对小龙虾进行真空包装,经机械速冻后于-18 °C 冰柜中贮藏,备用。

1.3.2 生物保鲜剂体外抗氧化能力测定

经文献查阅和前期预试验发现,聚赖氨酸盐酸盐、乳酸链球菌素两种抑菌剂的抗氧化能力极其微弱,因此不参与体外抗氧化能力的测定,仅对迷迭香提取物、茶多酚、苹果多酚、葡萄籽提取物、褐藻寡糖 5 种生物保鲜剂进行抗氧化试验。

1.3.2.1 DPPH·清除活性

参考马剑等^[12]的方法,并略作修改。取 50 μL 生物保鲜剂与 150 μL 0.1 mmol/L DPPH 溶液混合均匀,室温下避光放置 30 min 后,测定其在 517 nm 处的吸光度,以无水乙醇做空白对照。DPPH·清除率(X,%)计算公式如下。

$$X = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100$$

式中: A_i 为试验组吸光度; A_j 为对照组吸光度; A_0 为空白组吸光度。

1.3.2.2 ABTS⁺自由基清除活性

参考 Feng 等^[13]的方法,并略作修改。20 μL 生物保鲜剂与 180 μL ABTS⁺工作液,室温避光反应 60 min。以蒸馏水为空白对照,在 734 nm 处测吸光度。ABTS⁺自由基清除率(Y,%)计算公式如下。

$$Y = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为试验组吸光度; A_1 为空白组吸光度。

1.3.2.3 总抗氧化能力

总抗氧化能力参考总抗氧化能力测定试剂盒说明书的方法进行测定。

1.3.3 抑菌能力测试

参考 Tian 等^[14]的方法,取典型腐败菌菌悬液 0.1 mL

涂布,使用打孔器在培养基上等距打孔,每孔中加入50 μL 生物保鲜剂进行抑菌能力测定,以无菌水为对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,测量抑菌圈直径。

1.3.4 单因素试验

挑选鲜活、肢体无残缺且大小均匀(18 \pm 2) g 的小龙虾按照 1.3.1 加工工艺进行处理。其中,单因素试验使用的保鲜剂为经过抑菌能力和体外抗氧化试验筛选所得(PL、RE、TP),处理组则不添加任何生物保鲜剂。各生物保鲜剂的最大限量标准参考 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[15]。单因素试验以为硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid-reactive substances, TBARS) 值为指标,检测方法参考 GB 5009.181—2016《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》^[16]中第二法测定。样品每 5 d 测定一次,15 d 为检测终点。试验重复 3 次,结果取平均值。

1.3.5 响应面优化试验设计

为进一步优化复合生物保鲜剂中各组分的添加量,在单因素试验的基础上,综合选取作用效果最为明显的 3 个添加量为考察因素,根据 Box-Behnken 试验设计原理,设计三因素三水平试验。检测指标为贮藏 15 d 后的 TBARS 值、TVB-N 值,具体因素及水平如表 1 所示。

表 1 因素及水平编码

Table 1 Coded levels for factors in Box-Behnken design

| 水平 | 因素 | | |
|----|--------------------|-------------------|----------------|
| | A 聚赖氨酸盐酸盐添加量/(g/L) | B 迷迭香提取物添加量/(g/L) | C 茶多酚添加量/(g/L) |
| -1 | 0.15 | 0.150 | 0.15 |
| 0 | 0.20 | 0.225 | 0.20 |
| 1 | 0.25 | 0.300 | 0.25 |

1.4 冷冻调理小龙虾贮藏期间理化指标测定

TVB-N 值:参考 GB 5009.228—2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》^[17]中第三法进行测定。

TBARS 值:参考 GB 5009.181—2016《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》^[16]中第二法测定。

菌落总数:参考 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》^[18]测定。

1.5 数据处理

所有试验均重复 3 次,试验结果取平均值,数据采用 Origin 2021 与 Design Expert V8 进行数据分析和图表绘制。采用 SPSS 26 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 抗氧化剂能力测定

2.1.1 DPPH 自由基清除率

在有生物保鲜剂存在时,DPPH 的孤对电子被配

对,使其吸收值透射率弱或者消失,从而量化其抗氧化能力^[19]。不同生物保鲜剂 DPPH·清除率见图 1。

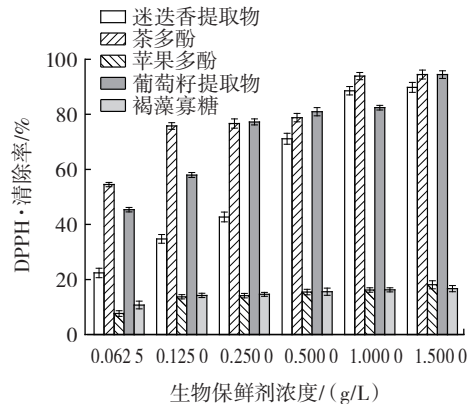


图 1 不同生物保鲜剂 DPPH·清除率

Fig.1 Different bio-preservative of DPPH·radical scavenging rate

由图 1 可知,茶多酚、葡萄籽提取物表现出较强 DPPH 自由基能力,添加量为 0.0625 g/L 时,自由基清除率分别达 54% 和 43%,高于其它生物保鲜剂的 DPPH 自由基能力;迷迭香提取物 DPPH 自由基清除效果受添加量影响较大,当添加量为 1.5 g/L 时,茶多酚、葡萄籽提取物对 DPPH 自由基清除率作用效果相当;而苹果多酚与褐藻寡糖 DPPH 自由基清除率较低且浓度依赖性较弱,与古绍彬等^[20]所测苹果多酚具有较强抗氧化作用有所差异,可能是由于苹果多酚纯度不同引起的差异。

2.1.2 ABTS⁺自由基清除率

ABTS 法测定生物保鲜剂的抗氧化作用主要是基于氢电子转移机制,即抗氧化剂为自由基底物提供一个氢原子,产生非自由基底物和抗氧化剂自由基^[21-22]。不同生物保鲜剂 ABTS⁺自由基清除率见图 2。

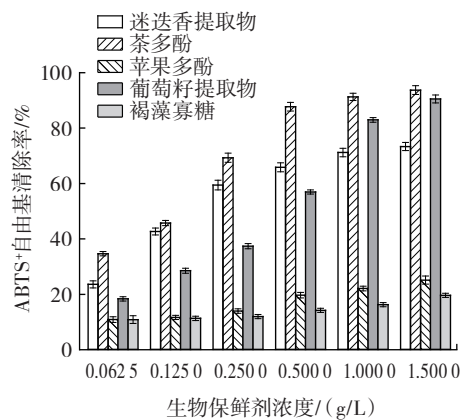


图 2 不同生物保鲜剂 ABTS⁺自由基清除率

Fig.2 Different bio-preservative of ABTS⁺ radical scavenging rate

由图 2 可知,保鲜剂添加量为 1.0 g/L 时,茶多酚和迷迭香提取物 ABTS⁺自由基清除率较高,可达到 91.03% 和 70.96%,这可能由于茶多酚和迷迭香提取

物中的酚类物质能提供较多的氢原子。葡萄籽提取物 ABTS⁺ 自由基清除活性受添加量影响较大,当生物保鲜剂浓度高于 0.5 g/L 时,清除率大于迷迭香提取物。

2.1.3 总抗氧化能力

不同生物保鲜剂总抗氧化能力见图 3。

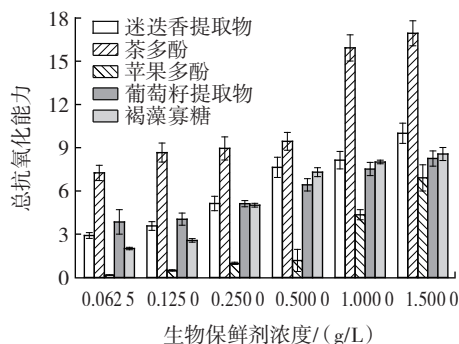


图 3 总抗氧化能力

Fig.3 Total antioxidant capacity

由图 3 可知,茶多酚总抗氧化能力较强,高于其它生物保鲜剂。同时,其它 4 种物质具有剂量依赖性,总抗氧化能力均随添加量升高而增强。褐藻寡糖与迷迭香提取物总抗氧化能力差异不大,且添加量超过 0.5 g/L 时,这两种对总抗氧化能力影响较小。当葡萄籽提取物添加量小于 1.0 g/L 时,其总抗氧化能力随添加量增加而增强。

综上所述,茶多酚和迷迭香提取物在低于最大允许添加量时,其 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺ 自由基清除能力、总抗氧化能力优于其它生物保鲜剂。因此,选择这两种生物保鲜剂作为抗氧化剂进行复合生物保鲜剂的复配。

2.2 抑菌能力测定结果

单一保鲜剂对腐败希瓦氏菌的抑菌圈直径见表 2。

由表 2 可知,当乳酸链球菌素添加量低于 4.00 g/L

表 2 单一保鲜剂对腐败希瓦氏菌的抑菌圈直径

Table 2 Diameter of inhibition zone of preservatives against *Shewanella putrefaciens*

| 添加量/(g/L) | 抑菌圈直径/mm | | | | | | |
|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------|--------|------|
| | 聚赖氨酸盐酸盐 | 乳酸链球菌素 | 迷迭香提取物 | 茶多酚 | 苹果多酚 | 葡萄籽提取物 | 褐藻寡糖 |
| 4.00 | 13.91±0.19 ^a | 10.22±0.26 ^a | 10.60±0.23 ^a | 11.00±0.17 ^a | - | - | - |
| 2.00 | 12.36±0.22 ^b | 10.36±0.33 ^a | 9.94±0.31 ^b | 10.45±0.10 ^b | - | - | - |
| 1.00 | 10.85±0.36 ^c | 10.03±0.12 ^a | 8.63±0.29 ^c | 10.43±0.25 ^b | - | - | - |
| 0.50 | - | - | - | - | - | - | - |
| 0.25 | - | - | - | - | - | - | - |

注: -表示没有明显抑菌圈。同列不同小写字母表示差异显著, P<0.05。

时,其对腐败希瓦氏菌的抑菌效果不显著且低于茶多酚,因而不作为抑菌剂参与单因素试验;聚赖氨酸盐酸盐添加量为 4.00 g/L 时,其抑菌圈直径高达 13.91 mm,相较于其它生物保鲜剂,对小龙虾典型腐败菌腐败希瓦氏菌生长繁殖表现出最佳抑制效果。可能是由于聚赖氨酸盐酸盐改变了腐败希瓦氏菌细胞膜通透性并破坏细胞壁,从而产生较大抑菌圈^[6]。同时,茶多酚、迷迭香提取物所含有的酚类和黄酮类物质损伤通过腐败希瓦氏菌的细胞膜,干扰菌体正常生命活动,达到优于苹果多酚、葡萄籽提取物、褐藻寡糖的抑菌效果。结合抗氧化试验结果,茶多酚、迷迭香提取物可与聚赖氨酸盐酸盐进行复配优化,可用于延长冷冻调理小龙虾货架期。

2.3 单因素试验

丙二醛是脂质氧化的最终产物,丙二醛含量常用来反映机体氧化受损程度,其含量可用硫代巴比妥酸值表示。生物保鲜剂通过与脂质氧化过程中产生的金属离子及自由基结合,抑制原料自氧化反应的进行^[23]。因此,选用 TBARS 值作为生物保鲜剂对冷冻调理小龙虾脂质变化试验的测定指标。

图 4 为不同 PL 添加量对贮藏期间冷冻调理小

虾 TBARS 值的影响。

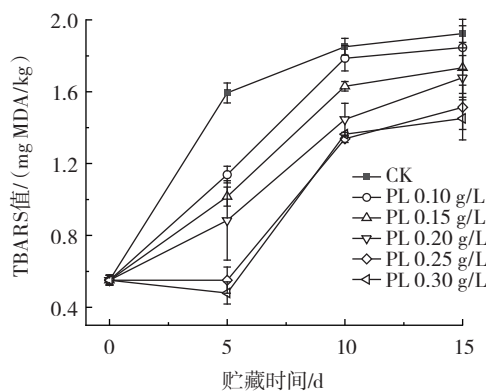


图 4 不同 PL 添加量对贮藏期间小龙虾 TBARS 值的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of polylysine hydrochloride on TBARS value of crayfish during storage

由图 4 可知,贮藏第 15 天,各试验组 TBARS 值均低于对照组(1.733±0.142) mg MDA/kg。在相同贮藏时间下,TBARS 值随 PL 添加量的增加而减少,表明冷冻调理小龙虾脂质氧化速率与 PL 添加量呈正相关。但添加量为 0.25 g/L 与 0.30 g/L 差异不明显,因而选择 PL 添加量 0.15、0.20、0.25 g/L 进行响应面优化试验。

不同 TP 添加量对贮藏期间小龙虾 TBARS 值的影响见图 5。

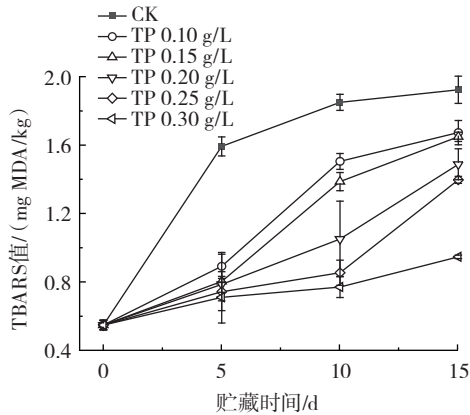


图 5 不同 TP 添加量对贮藏期间小龙虾 TBARS 值的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of tea polyphenols on TBARS value of crayfish during storage

由图 5 可知,随贮藏时间的延长,TBARS 值逐渐增加,但经保鲜剂处理后的冷冻调理小龙虾 TBARS 值始终低于 CK 组。这可能是由于不饱和脂肪酸产生的自由基被 TP 提供的氢原子猝灭,自由基链式反应中断,最终抑制 MDA 生成^[24]。TP 添加量为 0.30 g/L 时,小龙虾贮藏第 15 天时 MDA 含量最低。而添加量为 0.1 g/L 时对氧化作用的抑制效果略低于 0.15 g/L,为使响应面结果更加精准,选用 0.15 g/L 作为 TP 添加量的最低值。TP 添加量为 0.3 g/L 虽具有最好的延缓脂质氧化效果,但由于其在食品中的最大添加量为 0.3 g/L,因此,综合食品安全和生产成本考虑,选择 TP 添加量 0.15、0.20、0.25 g/L 进行响应面优化试验。

不同 RE 添加量对贮藏期间小龙虾 TBARS 值的影响见图 6。

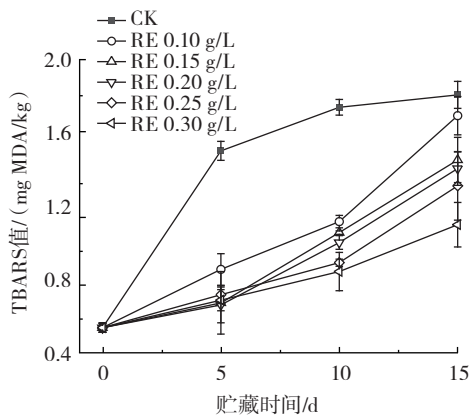


图 6 不同添加量 RE 对贮藏期间小龙虾 TBARS 值的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of rosemary extract on TBARS value of crayfish during storage

由图 6 可知,RE 能明显减缓小龙虾贮藏期间 TBARS 值的增加。RE 添加量为 0.10 g/L 时,TBARS 含量高于添加量为 0.15 g/L 处理组,可能是 RE 添加量

较低,且冷冻贮藏过程中氧化反应较慢。添加量为 0.3 g/L 时,TBARS 值最低,这可能是由于 RE 中含有的迷迭香酸、鼠尾草酸等酚酸类物质在较高添加量下增强了对脂质氧化的抑制作用。因而选择迷迭香提取物添加量 0.150、0.225、0.300 g/L 进行响应面优化试验。

2.4 响应面法优化保鲜剂复配比

2.4.1 响应面试验方案及结果

在单因素试验的基础上,选取 PL 添加量、TP 添加量、RE 添加量为因素,以 TBARS 值、TVB-N 值为响应值,进行三因素三水平的响应面优化试验,测定结果如表 3。

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Response surface design and results

| 试验号 | A 聚赖氨酸盐添加量/(g/L) | B 迷迭香提取物添加量/(g/L) | C 茶多酚添加量/(g/L) | TVB-N 值/(mg/100 g) | TBARS 值/(mg MDA/kg) |
|-----|------------------|-------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| 1 | 0.15 | 0.150 | 0.20 | 7.400 | 0.796 |
| 2 | 0.25 | 0.150 | 0.20 | 7.279 | 0.732 |
| 3 | 0.15 | 0.300 | 0.20 | 7.101 | 0.779 |
| 4 | 0.25 | 0.300 | 0.20 | 6.420 | 0.677 |
| 5 | 0.15 | 0.225 | 0.15 | 6.933 | 0.716 |
| 6 | 0.25 | 0.225 | 0.15 | 6.275 | 0.651 |
| 7 | 0.15 | 0.225 | 0.25 | 6.351 | 0.684 |
| 8 | 0.25 | 0.225 | 0.25 | 6.301 | 0.532 |
| 9 | 0.20 | 0.150 | 0.15 | 6.102 | 0.573 |
| 10 | 0.20 | 0.300 | 0.15 | 5.430 | 0.452 |
| 11 | 0.20 | 0.150 | 0.25 | 5.719 | 0.480 |
| 12 | 0.20 | 0.300 | 0.25 | 5.290 | 0.467 |
| 13 | 0.20 | 0.225 | 0.20 | 5.266 | 0.382 |
| 14 | 0.20 | 0.225 | 0.20 | 5.256 | 0.366 |
| 15 | 0.20 | 0.225 | 0.20 | 5.275 | 0.391 |
| 16 | 0.20 | 0.225 | 0.20 | 5.133 | 0.371 |
| 17 | 0.20 | 0.225 | 0.20 | 5.183 | 0.352 |

2.4.2 响应面数学模型建立与显著性检验

使用 Design-Expert V8 统计分析软件对表 3 中的试验结果进行线性二次多项式回归拟合,得出 TVB-N 值(Y_1)和 TBARS 值(Y_2)对 PL(A)、RE(B)、TP(C)的二元多次回归方程分别为 $Y_1=5.22-0.188 8A-0.282 5B-0.134 9C-0.139 8AB+0.152 0AC+0.060 7BC+1.33A^2+0.499 0B^2-0.086 3C^2$; $Y_2=0.372 4-0.056 9A-0.035 0B-0.028 6C+0.035 0AB-0.021 8AC+0.027 0BC+0.274 9A^2+0.122 2B^2-0.001 6C^2$ 。

以 TVB-N 值和 TBARS 值为响应值的响应面数学模型结果见表 4。

由表 4 可知,以 TVB-N 值为响应值时,该模型与 TVB-N 值间的线性关系极显著,真实可靠($P<0.000 1$)。同时,TVB-N 模型失拟项 F 值为 0.146 6, P 值为 0.926 7 ($P>0.05$),说明试验数据无异常点,误差较小。对 TVB-N 值模型的 F 值进行排序可知,各保鲜剂对冷冻调理小龙虾贮藏过程中影响顺序为 RE(B)>PL(A)>TP(C)。以 TBARS 值为响应值时,该模型与 TBARS 值间的线

表4 模型和回归系数显著性检验

Table 4 Model and regression coefficient significance test

| 方差来源 | TVB-N 值 | | | TBARS 值 | | |
|------------------|----------|----------|-----|----------|----------|-----|
| | F 值 | P 值 | 显著性 | F 值 | P 值 | 显著性 |
| 模型 | 459.35 | <0.000 1 | ** | 168.91 | <0.000 1 | ** |
| A 聚赖氨酸盐 酸盐添加量 | 117.29 | <0.000 1 | ** | 71.37 | <0.000 1 | ** |
| B 迷迭香提取 物添加量 | 262.53 | <0.000 1 | ** | 22.70 | 0.002 0 | ** |
| C 茶多酚添加量 | 59.84 | 0.000 1 | ** | 22.79 | 0.001 2 | ** |
| AB | 32.14 | 0.000 8 | ** | 1.41 | 0.274 5 | |
| AC | 37.99 | 0.000 5 | ** | 7.37 | 0.030 0 | * |
| BC | 6.06 | 0.043 3 | * | 9.35 | 0.018 4 | * |
| A ² | 3 056.03 | <0.000 1 | ** | 1 127.76 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 431.02 | <0.000 1 | ** | 187.89 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 12.90 | 0.008 8 | ** | 0.76 | 0.411 2 | |
| 失拟项 | 0.146 6 | 0.926 7 | | 5.95 | 0.058 8 | |

注: *表示影响显著, $P < 0.05$; **表示影响极显著, $P < 0.01$ 。

性关系极显著($P < 0.000 1$)。同时, TBARS 模型失拟项 F 值为 5.95, P 值为 0.058 8 ($P > 0.05$), 说明该数学模型试验值与预测值有高度的相关性, 可用于贮藏过程中冷冻调理小龙虾 TBARS 值变化的理论预测。由 F 值可知, 各保鲜剂对冷冻调理小龙虾贮藏过程中 TBARS 值的影响顺序为 $PL(A) > TP(C) > RE(B)$ 。综上所述, A 、 B 、 C 、 AB 、 AC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对 TVB-N 值的影响极显著, 表明 PL 与 RE、TP 之间交互作用显著。 A 、 B 、 C 、 A^2 、 B^2 对 TBARS 值的影响极显著, AC 、 BC 对 TBARS 值影响显著, 表明 PL 和 TP、RE 和 TP 在抑制 TBARS 产生方面交互作用显著。

2.4.3 响应面分析

3D 图可直观地反映复合保鲜剂对冷冻贮藏过程中小龙虾 TVB-N 值、TBARS 值的抑制效果。结合表 4 可知, 以 TVB-N 为响应值时 PL 与 RE、PL 与 TP 交互作用显著; 以 TBARS 为响应值时, PL 与 TP、RE 与 TP 之间交互作用显著。3 种生物保鲜剂添加量之间的具体交互作用见图 7。

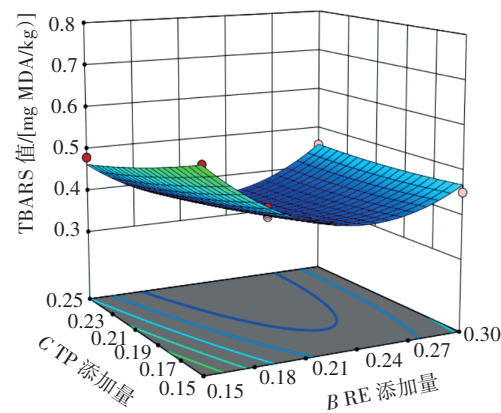
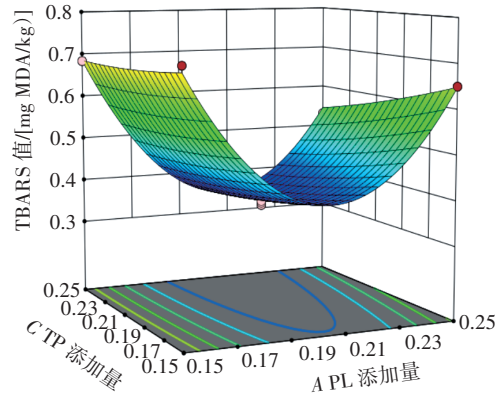
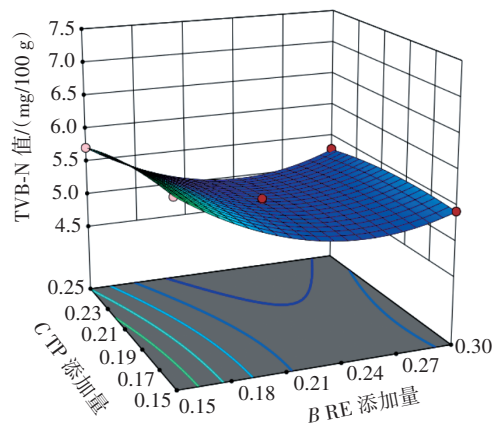
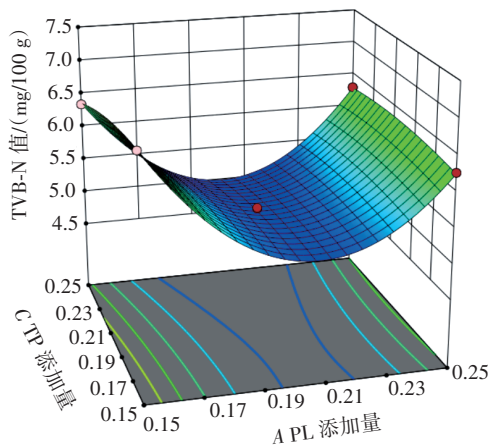
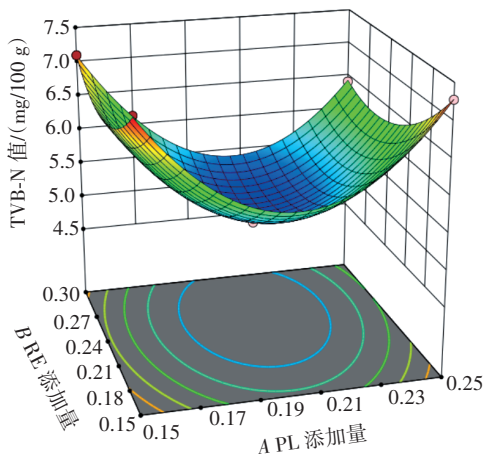


图7 因素交互作用图

Fig.7 Effects of factor interactions on the quality of crayfish during storage

经响应面分析得到,复合保鲜剂最佳添加量为 PL0.207 g/L、RE0.237 g/L、TP0.205 g/L,此条件下贮藏 15 d 后,冷冻调理小龙虾 TVB-N 值、TBARS 值分别为 5.133 mg/100 g 和 0.352 mg MDA/kg。考虑实际操作,将试验条件修正为聚赖氨酸盐酸盐添加量 0.20 g/L、迷迭香提取物添加量 0.23 g/L、茶多酚添加量 0.20 g/L,此条件下进行 3 次平行试验,小龙虾冻藏 15 d 后测得

TVB - N 值为 (5.258±0.289) mg/100g, TBARS 值为 (0.409±0.035) mg MDA/kg,与理论值无明显差异,说明该模型真实可靠。

2.5 冷冻调理小龙虾贮藏期间理化指标

在响应面试验得出的最佳生物保鲜剂添加量下,对冷冻调理小龙虾贮藏期间理化指标进行测定,结果见表 5。

表 5 验证试验
Table 5 Validation tests

| 贮藏时间/d | 空白组 | | | 试验组 | | |
|--------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | TVB-N 值/ (mg/100 g) | TBARS 值/ (mg MDA/kg) | 菌落总数/ [lg(CFU/g)] | TVB-N 值/ (mg/100 g) | TBARS 值/ (mg MDA/kg) | 菌落总数/ [lg(CFU/g)] |
| 0 | 5.036±0.783 ^a | 0.322±0.026 ^a | 3.014±0.081 ^a | 4.911±0.609 ^a | 0.317±0.040 ^a | 2.871±0.968 ^a |
| 15 | 6.103±0.507 ^b | 0.425±0.040 ^b | 3.258±0.396 ^{ab} | 5.258±0.489 ^b | 0.409±0.035 ^b | 2.963±0.315 ^a |
| 30 | 7.358±0.904 ^c | 0.535±0.073 ^c | 3.560±1.022 ^b | 6.093±1.020 ^c | 0.458±0.061 ^c | 2.579±0.156 ^{ab} |
| 60 | 8.903±0.329 ^d | 0.669±0.065 ^d | 3.750±0.732 ^b | 7.187±0.539 ^d | 0.602±0.076 ^d | 3.280±0.777 ^c |

注:同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

TVB-N 值是监测肉制品新鲜度和货架期的重要指标之一,与内源酶活性和微生物生长呈正相关^[25],新鲜肉中 TVB-N 值应小于 20 mg/100 g,随着新鲜度的下降,其值会逐渐增加。由表 5 可知,经复合生物保鲜剂处理的小龙虾贮藏 60 d 后 TVB-N 值增加至 7.187 mg/100 g,较空白组低 19%,表明复合生物保鲜剂减缓了蛋白质的降解速度。这种差异可能是由于复合生物保鲜剂对细菌种群和蛋白质的抑制作用^[9]。冷冻调理小龙虾贮藏 60 d 后,空白组和生物保鲜剂组 TBARS 值分别为 0.669 mg MDA/kg 和 0.602 mg MDA/kg。由于复合生物保鲜剂含有的酚酸、黄酮类物质可与氧化过程中产生的自由基、金属离子进行结合,从而阻碍了 MDA 的产生和积累。两种处理方式下,菌落总数变化趋势较为平缓,可能是由于熟制过程杀死部分微生物,冻藏环境使得微生物生长缓慢。小龙虾贮藏 60 d 后,生物保鲜剂处理组 TBARS 值、TVB-N 值、菌落总数均低于空白组,表明复合生物保鲜剂可在一定程度抑制贮藏期间冷冻调理小龙虾氧化反应和微生物活动,阻碍其腐败变质。

3 结论

本研究通过体外抗氧化试验和抑菌试验筛选出 PL、RE、TP 3 种具有良好抑菌抗氧化活性的生物保鲜剂,通过单因素试验确定各保鲜剂最佳添加量范围,利用响应面法确定复合生物保鲜剂的最佳添加量为聚赖氨酸盐酸盐添加量 0.20 g/L、迷迭香提取物添加量 0.23 g/L、茶多酚添加量 0.20 g/L。对复合生物保鲜剂的作用效果进行测定,发现复合生物保鲜剂能在一定程度抑制小龙虾贮藏过程的氧化反应和微生物生长,在改善食品品质的同时,弥补了实际生产过程中单一

保鲜剂保鲜效力不足的现状,对实际生产具有一定的指导意义。

参考文献:

- 杨冰,张艳凌,姜绍通,等.不同地区稻田小龙虾的营养品质比较研究[J].肉类研究,2021,35(12):7-12.
YANG Bing, ZHANG Yanling, JIANG Shaotong, et al. Comparative study on nutritional quality of rice-field male crayfishes from different areas[J]. Meat Research, 2021, 35(12): 7-12.
- 李楚君,涂宗财,温平威,等.中国小龙虾产业发展现状和未来发展趋势[J].食品工业科技,2022,43(8):463-470.
LI Chujun, TU Zongcai, WEN Pingwei, et al. Present situation and future development trend of crayfish processing in China[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 463-470.
- 任妮,戴红君,张铮铮,等.我国克氏原螯虾产业调查分析与发展对策建议[J].江苏农业科学,2021,49(19):241-246.
REN Ni, DAI Hongjun, ZHANG Chengcheng, et al. Investigation and analysis of China's crayfish industry and suggestions for development[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(19): 241-246.
- JIA G L, CHEN Y M, SUN A D, et al. Control of ice crystal nucleation and growth during the food freezing process[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(3): 2433-2454.
- 单珂,郭全友,姜朝军,等.生物保鲜剂在水产品保鲜中的应用[J].食品与发酵科技,2018,54(3):4-8.
SHAN Ke, GUO Quanyou, JIANG Chaojun, et al. The application of biopreservatives in preservation of aquatic products[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2018, 54(3): 4-8.
- LI Q Y, ZHOU W X, ZHANG J Y, et al. Synergistic effects of ϵ -polylysine hydrochloride and Gallic acid on *Shewanella putrefaciens* and quality of refrigerated sea bass fillets[J]. Food Control, 2022, 139: 109070.
- 刘文浩,徐晓云,吴婷,等. ϵ -聚赖氨酸盐酸盐对气调包装即食小龙虾的保鲜效果研究[J].中国调味品,2021,46(8):12-16.
LIU Wenhao, XU Xiaoyun, WU Ting, et al. Effect of ϵ -polylysine hydrochloride on preservation of ready-to-eat crayfish by modified atmosphere packaging[J]. China Condiment, 2021, 46(8): 12-16.

- [8] 于晓慧, 林琳, 姜绍通, 等. 即食小龙虾复合生物保鲜剂的优选及保鲜效果研究[J]. 肉类工业, 2017(3): 24-32.
YU Xiaohui, LIN Lin, JIANG Shaotong, et al. Study on the optimization and preservation effect of the compounded biological preservatives of instant crayfish[J]. Meat Industry, 2017(3): 24-32.
- [9] QIU L Q, ZHANG M, CHITRAKAR B, et al. Effects of nanoemulsion-based chicken bone gelatin-chitosan coatings with cinnamon essential oil and rosemary extract on the storage quality of ready-to-eat chicken patties[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2022, 34: 100933.
- [10] XIONG Y, CHEN M, WARNER R D, et al. Incorporating nisin and grape seed extract in chitosan-gelatin edible coating and its effect on cold storage of fresh pork[J]. Food Control, 2020, 110: 107018.
- [11] SUN K K, WANG S L, GE Q F, et al. Antimicrobial and preservative effects of the combinations of nisin, tea polyphenols, rosemary extract, and chitosan on pasteurized chicken sausage[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(2): 233-239.
- [12] 马剑, 路高勇, 陈智玲, 等. 复合酶法制备杨梅汁工艺优化及品质分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(7): 82-88.
MA Jian, LU Gaoyong, CHEN Zhiling, et al. Optimization of enzymatic preparation technology for bayberry juice production[J]. Food Research and Development, 2022, 43(7): 82-88.
- [13] FENG L, TANG N C, LIU R J, et al. Effects of different processing methods on bioactive substances and antioxidation properties of *Lycium barbarum* (goji berry) from China[J]. Food Bioscience, 2021, 42: 101048.
- [14] TIAN L, FU J P, WU M, et al. Evaluation of Gallic acid on membrane damage of *Yersinia enterocolitica* and its application as a food preservative in pork[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 374: 109720.
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
National Health Commission of the People's Republic of China. National Food Safety Standard Food Additive Usage Standard: GB 2760—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定: GB 5009.181—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health Commission of the People's Republic of China. Determination of propyl dialdehyde in lard: GB 5009.181—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health Commission of the People's Republic of China. Method for analysis of hygienic standard of fish and other aquatic products: GB 5009.228—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [18] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health Commission of the People's Republic of China, National Medical Products Administration. National food safety standard Food microbiological examination Aerobic plate count: GB 4789.2—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [19] GAO X Q, XIA L Y, FAN Y Q, et al. Evaluation of coloration, nitrite residue and antioxidant capacity of theaflavins, tea polyphenols in cured sausage[J]. Meat Science, 2022, 192: 108877.
- [20] 古绍彬, 吴影, 董红敏, 等. 苹果多酚抗氧化作用及其清除自由基能力的研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(4): 58-61, 128.
GU Shaobin, WU Ying, DONG Hongmin, et al. Study on the antioxidant and free radical scavenging ability of apple polyphenol[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(4): 58-61, 128.
- [21] GIRI L, BELWAL T, BAHUKHANDI A, et al. Oxidative DNA damage protective activity and antioxidant potential of Ashtvarga species growing in the Indian Himalayan Region[J]. Industrial Crops and Products, 2017, 102: 173-179.
- [22] ZEB A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(9): e13394.
- [23] CHOULJENKO A, CHOTIKO A, BONILLA F, et al. Effects of vacuum tumbling with chitosan nanoparticles on the quality characteristics of cryogenically frozen shrimp[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 75: 114-123.
- [24] 樊凤娇, 谢宏凯, 罗谢琪, 等. 茶多酚处理方式对于干贝脂质氧化稳定性和货架期的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 83-89.
FAN Fengjiao, XIE Hongkai, LUO Xieqi, et al. Effects of different treatments of tea polyphenols on oxidation stability and shelf life of dried scallop[J]. Food Science, 2022, 43(18): 83-89.
- [25] DU H Y, LIU C, UNSALAN O, et al. Development and characterization of fish myofibrillar protein/chitosan/rosemary extract composite edible films and the improvement of lipid oxidation stability during the grass carp fillets storage[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 184: 463-475.

责任编辑:张璐

收稿日期:2023-02-15