

甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片保鲜效果的研究

吴燕燕¹, 张 岩^{1,2}, 李来好¹, 杨贤庆¹, 王 晶^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 国家水产品加工技术研发中心, 农业部水产品加工重点实验室, 广东广州 510300;
2. 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要:研究了甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片的防腐保鲜效果。将罗非鱼片经过甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽处理之后检测罗非鱼片的菌落总数、感官品质和理化指标的变化并与空白组对照。结果表明, 甲基营养型芽孢杆菌 F35 抗菌肽处理组可使罗非鱼片的保质期延长 4d 以上, 其最佳保鲜浓度为 1.5%~2.0%。说明甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽作为冷却肉的生物保鲜剂, 具有广阔的应用前景。

关键词:甲基营养型芽孢杆菌, 抗菌肽, 罗非鱼片, 保鲜, 生物防腐剂

Study on fresh-keeping effect of antimicrobial peptides from *Bacillus methylotrophilus* in Tilapia fillet preservation

WU Yan-yan¹, ZHANG Yan^{1,2}, LI Lai-hao¹, YANG Xian-qing¹, WANG Jin^{1,2}

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National Research and Development Center for Aquatic Product Processing, Key Lab of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China;
2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: This study focused on fresh-keeping effect of antimicrobial peptides from *Bacillus methylotrophilus* in Tilapia fillet preservation. The total plate count, sensory quality, physical and chemical indicators of Tilapia fillets which were soaked in antimicrobial peptides from *Bacillus methylotrophilus* were detected in the experiment. The results showed that the shelf life of the samples test group could be prolonged at least 4d and the optimum concentration was 1.5 to 2.0 percent. As a biological preservative of chilled meat the antimicrobial peptides from *Bacillus methylotrophilus* F35 had broad application prospects.

Key words: *Bacillus methylotrophilus*; antimicrobial peptides; Tilapia fillet; fresh-keeping; biological preservative

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)02-0315-04

罗非鱼肉质细嫩、营养丰富素有“白肉三文鱼”、“21世纪的鱼”之称^[1-2], 是世界上第三大养殖品种, 也是我国重要的淡水养殖对象^[3]。由于罗非鱼含有较高水分和蛋白质, 所以在加工、贮藏和销售过程中容易发生腐败变质^[4-5], 从而降低营养和食用价值, 如何延长罗非鱼的货架期已经成为一个亟待解决的问题。传统的物理、化学保鲜方法存在使用范围、操作技术、安全性等问题从而限制其广泛推广^[6], 一方面虽然低温保藏技术对延长罗非鱼货架期起到了一定作

用, 但由于存在冷冻过程中蛋白易变性、解冻易失水等原因, 从而对鱼肉品质造成不同程度影响, 且保鲜过程中仍需辅以防腐剂; 另一方面化学合成防腐剂在罗非鱼保鲜中扮演着十分重要的角色, 但这些化学合成的食品防腐剂的超标使用, 容易对人体产生毒副作用, 在人们对食品安全的认识和要求逐步提高的背景下, 化学防腐剂的使用也越来越受到严峻的挑战。因此, 安全、高效和低成本生物防腐剂将成为防腐的发展趋势。抗菌肽是一类具有抗菌活性肽类的总称^[7-8], 微生物代谢产生的抗菌肽具有合成效率高、成本低、抗菌谱广、安全无毒副作用等特点^[9], 已经成为21世纪新型食品防腐剂的重点开发对象。本研究就从合浦珠母贝中分离得到甲基营养型芽孢杆菌 F35, 用其代谢产生的抗菌肽粗品进行罗非鱼片保鲜, 通过考察冷藏过程中细菌总数、理化指标以及感官评定来评价其保鲜效果^[10-12], 旨在为延长罗非鱼片的保质期提供一种切实可行的生物防腐方法, 也

收稿日期: 2012-09-06

作者简介: 吴燕燕(1969-), 女, 博士, 研究员, 主要从事水产品加工与质量安全控制。

基金项目: 国家科技支撑项目(2012BAD28B05); 广东省科技计划项目(2011B031200009); 公益性行业(农业)科研专项(201303086); 国家现代农业产业技术体系(CARS-49); 广西科学研究与技术开发计划项目(11107005-2)。

为甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽的防腐效果提供理论依据,为其在食品保鲜中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甲基营养型芽孢杆菌F35 为本实验室分离于合浦珠母贝粘液中,产生的抗菌肽对多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌都有较强的抑菌作用;鲜活罗非鱼 购于大江宛菜市场,重量约500g/条;营养琼脂 广东环凯微生物科技有限公司;硫酸铵、氯仿 广州光华化学有限公司;乳酸链球菌素 浙江银象生物工程技术有限公司。

BOXUN洁净工作台 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;PHS-3C酸度计 YAMEI杭州梵隆仪器有限公司;T15A34高速冷冻离心机 日本日立公司;SMY-2000色差仪 北京盛名扬科技开发有限责任公司;自动凯氏定氮仪 瑞典FOSS公司出品。

1.2 抗菌肽粗品的制备

将活化后的甲基营养型芽孢杆菌F35,以3%接种量接种于液体发酵培养基(葡萄糖20.0g,酵母膏1.0g,蛋白陈5g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g,蒸馏水500mL,陈海水500mL, pH7.2~7.4)中,于28℃,180r/min,振荡培养48h,经12000r/min离心15min,收集上清液,上清液用60%硫酸铵处理,将产生的沉淀溶解于1%缓冲液,经氯仿萃取脱盐后冷冻干燥,干燥物即为甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽粗提物,4℃冰箱中冷藏待用。

1.3 样品处理

将鲜活罗非鱼剖杀取鱼片,每片鱼片约重120g。将罗非鱼肉片分成4组:随机取3组肉块,分别浸入1.0%、1.5%、2.0%甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽溶液中浸泡30min,取出沥水,用保鲜膜包好放入保鲜盒内;剩余1组为空白对照组,放入等温等容的蒸馏水中浸泡30min,取出沥水,用保鲜膜包好放入保鲜盒内。将以上处理后的样品放入4℃冰箱中,每两天各取一组样品进行指标的测定。

1.4 肉样指标测定

1.4.1 感官质量评定 感官特征是影响消费者选择的重要指标之一,能够在一定程度上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^[13]。罗非鱼片感官值的测定方法:将罗非鱼片取出后放置至常温,感官评定人员即时对其进行评测,评定人员由经过专门培训的6名人员组成,分别对罗非鱼片的色泽、气味和质地方面进行测评,最后给出各自的综合评分值。评定标准参见表1。水产品感官评定、评分标准中规定6分以下的样品已处于不可食用状态。

1.4.2 细菌总数的测定 取两组25g样品,绞碎,与225mL无菌生理盐水混合在不同保藏时期用选择培养基来测定细菌总数。评价标准根据GB 21290-2007罗非鱼片中的规定:一级鲜度的细菌总数 $\leq 10^4$ cfu/g,二级鲜度的细菌总数在 $10^4 \sim 10^6$ cfu/g之间,腐败肉的细菌总数 $> 10^6$ cfu/g。

1.4.3 理化指标的测定

1.4.3.1 pH测定^[14] 称取研磨后的碎鱼肉10g,加入100mL蒸馏水,用磁力搅拌器搅拌30min后过滤,取滤液用酸度计测定。根据GB 21290-2007罗非鱼片标准规定,pH超过7.0时为不可食用状态。

1.4.3.2 挥发性盐基氮(TVB-N)^[14-15] 按GB/T 5009.44-2003肉与肉制品卫生标准的分析方法,微量扩散法半微量定氮法^[16]进行测定。根据GB 21290-2007罗非鱼片标准规定,一级鲜度TVB-N值 ≤ 13 mg/100g,TVB-N值 ≤ 20 mg/100g为二级鲜度,TVB-N值 > 20 mg/100g为变质肉。

1.4.3.3 硫代巴比妥酸反应物值(TBARS)检测

TBARS值是检测脂肪氧化次级产物的指标,随着氧化程度的加深,次级产物不断增多,TBARS值不断增大。其测定方法:称取肉样0.3g,加3滴抗氧化剂,然后加入3mL 1% TBA溶液,混匀,加入17mL TCA-HCl溶液,沸水浴中保持30min,取出自然冷却,再取4mL上述溶液,加入4mL氯仿,3000r/min下离心10min,532nm下测吸光值。

$$TBARS (mg/kg) = (A_{532}/w) \times 9.48$$

式中, A_{532} : 溶液的吸光值; w: 样品的重量(g); 9.48: 常数。

一般参考标准为:TBARS为0.202~0.664mg/kg时为良质肉;大于1mg/kg时为次质肉。

1.5 数据处理与作图

所得数据均为3次重复的平均值,采用Excel 2007进行作图。

2 结果与分析

2.1 感官评价

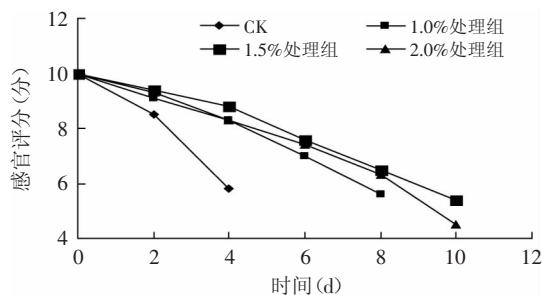


图1 贮藏期间感官评分的变化

Fig.1 Variation of sensory grade during storage

表1 罗非鱼生鱼片感官评定评分标准

Table 1 Sensory assessment grading standard for tilapia fillet

指标	分值(分)			
	9~10	6~8	3~5	0~2
色泽	肉色半透明,有光泽	光泽消失	略带褐色	褐色或绿色等
气味	鱼特有的新鲜气味	无明显气味	轻微酸臭味	臭味明显
质地	鱼肉紧实,按压立即复原	鱼肉紧实,按压后复原缓慢	鱼肉轻度软烂,压痕不易复原	鱼肉软烂,表面有黏液

由图1可以看出处理组在4d内感官评分变化不大,总体评分在9分左右,而空白对照组(CK)第4d评分已经达到6分以下,达到不可食用水平。随着贮藏时间的延长,处理组鱼片之间感官评分值逐步降低,其中1.0%处理组下降较快,在第8d感官评分达到6分以下,不可食用,而1.5%和2.0%处理组在第8d感官评分仍在6分以上,但第10d达到不可食用水平,总体呈现随着贮藏天数的增加,感官综合评分越低的趋势。综上可知处理组明显优于对照组,可使罗非鱼片保质期延长4d以上。三个不同浓度的抗菌肽处理液,1.5%和2.0%处理组得分相差不大,但均优于1.0%。说明罗非鱼片经抗菌肽溶液处理后能在一定程度上延长货架期,其最适浓度在1.5%~2.0%。

2.2 细菌总数的分析

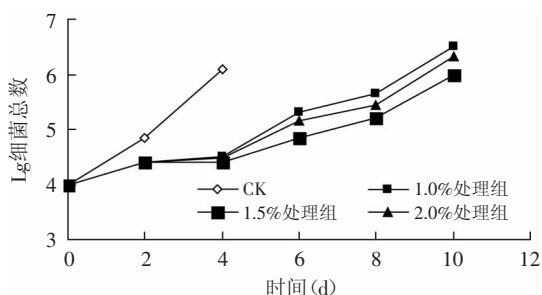


图2 贮藏期间细菌总数的变化

Fig.2 Changes of microbial flora counts during storage

由图2可见,随着储藏时间的延长,对照组(CK)在第4d时细菌总数已超过 10^6 cfu/g,按GB 21290-2007罗非鱼片中的规定,对照组(CK)在第4d时接近成为腐败肉。三个处理组在第8d时细菌总数均低于 10^6 cfu/g,都还属于二级鲜肉标准,但10d时均超过 10^6 cfu/g为腐败肉。三个不同浓度的抗菌肽处理液中1.5%处理组对细菌的抑菌效果要优于1.0%和2.0%处理组。由此可见甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽可以使罗非鱼片保质期延长4d以上,且1.5%的甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽保鲜效果略好。

2.3 冷藏过程罗非鱼肉理化性质的变化分析

2.3.1 pH的变化 从图3可看出,4个不同处理的肉样品,在贮藏过程中pH均呈现出先降低后升高的走势,产生这种趋势的原因可能由于在贮藏初期,由于肉样自身组织细胞呼吸作用而产生酸性物质致使肉样pH逐渐降低,随着时间的延长,腐败微生物大量增殖,以氨基酸、葡萄糖、乳酸等为底物,代谢产生了分子胺类物质、硫化物、挥发性脂肪酸、酯类、氨等成分以及乳酸被代谢和胺类物质的产生导致肉样pH的升高。三个处理组与对照组(CK)相比,在相同时期,pH变化幅度相对较低。第2d后对照组(CK)的pH迅速升高,第4d pH已经超过7.0,而三个处理组在第2d后pH上升缓慢,直到第8d时1.0%处理组pH才超过7.0;而1.5%和2.0%处理组仍然处于可食用状态,直到第10d 2.0%处理组才超出可食用范围;且1.5%处理组效果相对较好,直到第12d,1.5%处理组才超出可食用范围。由此可见甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽

可以使罗非鱼片保质期延长4d以上,且1.5%的甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽保鲜效果略好。

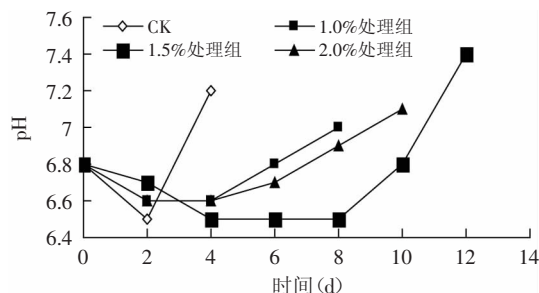


图3 贮藏期间pH变化

Fig.3 Changes of pH during storage

2.3.2 挥发性盐基氮(TVB-N)的变化 由图4可见,随着冷却肉贮藏时间的延长,各处理组挥发性盐基氮(TVB-N)不断增加。对照组(CK)在第4d时挥发性盐基氮(TVB-N)已超过20mg/100g,根据GB 21290-2007罗非鱼片中的规定已经属于变质肉。三组处理组在第8~12d变质。对于三个不同浓度的抗菌肽处理液,1.5%处理组对罗非鱼片的保鲜效果要优于1.0%和2.0%处理组。综上可知,甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片在抑制挥发性盐基氮(TVB-N)方面有明显效果,具有防腐保鲜功能可使罗非鱼片保质期延长4d以上,且1.5%的甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽保鲜效果较好。

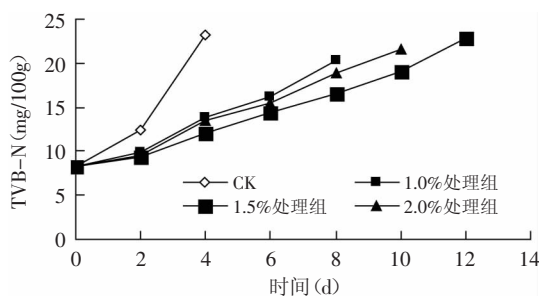


图4 贮藏期间挥发性盐基氮(TVB-N)的变化

Fig.4 Changes of TVB-N during storage

2.3.3 TBARS值的变化 从图5中可以看出,随贮藏时间的延长,各处理组罗非鱼片的TBARS值呈上升趋势,其中对照组TBARS值迅速上升,在第4d时TBARS值已达到0.91,已接近次质肉,而处理组缓慢上升,各处理组在第12d时仍保持较低状态,仍处于良质肉水平。前两天时各处理组与对照组TBARS值

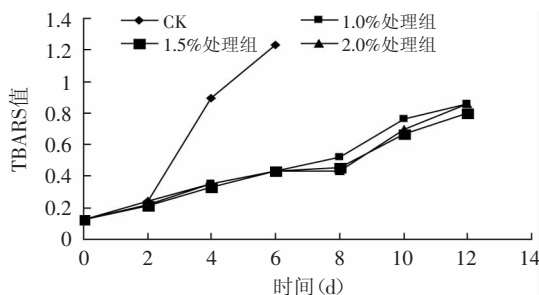


图5 贮藏期间TBARS值的变化

Fig.5 Changes of TBARS during storage

与对照组差异不大,这是由于在此期间主要是氧化初级产物的生成阶段,其分解速度相对较慢,因此,次级产物含量之间没有显著性差异。到第2d后时,初级产物的生成速度减慢,分解速度加快,次级产物含量增大,处理组与对照组TBARS值出现明显差异。综上所述可知,甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片在抑制硫代巴比妥酸产生方面具有明显效果。

3 结论

3.1 甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片具有明显的保鲜作用,可使罗非鱼肉冷藏保质期延长4d以上,其最佳保鲜浓度为1.5%~2.0%。

3.2 甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片防腐保鲜效果明显,但是由于不同的防腐保鲜及作用对象不同,对微生物的作用机理和作用部位也不同,所以在将来生产中考虑到与其他天然防腐剂配合使用,也可以使单一防腐剂的作用得以互补,发挥增效作用,可以使鱼制品达到更好的防腐效果^[7]。

3.3 虽然甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片具有良好的保鲜效果,但要想作为一种新型的食品防腐剂用于开发,其毒理学研究和在食品中的应用研究还有待于深入进行。

参考文献

- [1] 巩育军,郭先霞. 罗非鱼营养成分研究进展[J]. 中国食物与营养,2009,6:50-52.
- [2] 吴燕燕,李来好,林洪,等. 罗非鱼骨制备CMC活性钙的工艺及生物利用的研究[J]. 食品科学,2005,26(2):114-117.
- [3] 段志刚,吴金英,李文笙,等. 低温对罗非鱼类影响的相关研究进展[J]. 南方水产科学,2011,7(6):77-82.
- [4] 蔡慧农,陈发河,吴光斌,等. 罗非鱼冷藏期间新鲜度变化及其控制的研究[J]. 中国食品学报,2003,12:46-49.
- [5] 陈胜军,李来好,杨贤庆,等. 罗非鱼综合加工利用与质量安全控制技术研究进展[J]. 南方水产科学,2011,7(4):85-90.
- [6] 熊涛,乐易林. 生物保鲜技术的研究进展[J]. 食品与发酵工业,2004,30(2):111-114.
- [7] 向军,张金虎,柴海云,等. 甲基营养型芽孢杆菌产氨肽酶的发酵优化[J]. 中国酿造,2012,31(5):45-50.
- [8] 宫晓静,吴燕燕. 海洋无脊椎动物抗菌肽研究进展及其在食品保鲜中的应用[J]. 生物技术通报,2011(3):27-32.
- [9] Jenssen H, Hamill P, Hancock R E, et al. Peptide Antimicrobial Agents[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3):491-511.
- [10] 刁石强,李来好,岑剑伟,等. 冰温臭氧水对鲢保鲜效果的研究[J]. 南方水产科学,2011,7(3):8-13.
- [11] INGADOTTIR B, KRISTINSSON H G. Gelation of protein isolates extracted from tilapia light muscle by pH shift processing [J]. Food Chem, 2010, 118(3):789-798.
- [12] 洪惠,朱思潮,罗永康,等. 鳙在冷藏和微冻贮藏下品质变化规律的研究[J]. 南方水产科学,2011,7(6):7-12.
- [13] 刁石强,吴燕燕,王剑河,等. 臭氧冰在罗非鱼片保鲜中的应用研究[J]. 食品科学,2007,28(8):501-504.
- [14] 魏广东. 水产品质量安全检测手册[M]. 北京:中国标准出版社,2005:146-148.
- [15] 曾名勇,黄海,李八方. 鳙肌肉蛋白质生化特性在冻藏过程中的变化[J]. 水产学报,2003,27(5):480-485.
- [16] GB/T 5009.44-2003. 肉与肉制品卫生标准的分析方法[S]. 中华人民共和国国家标准出版社,2003.
- [17] 施海峰,高键,应杰,等. 水溶性壳聚糖对鱼糜制品保鲜效果的影响[J]. 南方水产科学,2011,7(4):49-54.
- [18] 刘琳,张德权,贺雅非. 调理肉制品保鲜技术研究进展[J]. 肉类研究,2008(5):3-4.
- [19] Sallam K I, Ishioroshi M, Samejima K, et al. Effects of garlic in chicken sausage[J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 2004, 37:849-855.
- [20] 孙承峰. 传统肉制品(酱牛肉)中菌相变化及综合保鲜技术的研究[M]. 中国农业大学,2001.
- [21] 兰凤英,李全福,李育峰. 壳聚糖涂膜对酱牛肉贮藏性能的影响[J]. 食品研究与开发,2006,27(9):133-135.
- [22] SEKAR A, DUSHYANTHAN K, RADHAKRISHNAN K T, et al. Effect of modified atmosphere packaging on structural and physical changes in buffalo meat[J]. Meat Science, 2006, 72(2):211-215.
- [23] BINGOL E B, ERGUN O. Effects of modified atmosphere packaging (MAP) on the microbiological quality and shelf life of ostrich meat[J]. Meat Science, 2011, 88(4):774-785.
- [24] SRoy, RC Anantheswaran, RB Beelman. Fresh Mushroom Quality as Affected by Modified Atmosphere Packaging[J]. Journal of Food Science, 1995, 60(2):334-340.
- [25] 段静芸,徐幸莲,周光宏. 壳聚糖和气调包装在冷却肉保鲜中的应用[J]. 食品科学,2002(2):139-141.
- [26] 章建浩,秦芸桦. 超市生鲜猪肉高氧MAP气调保鲜包装研究[J]. 食品科学,2005(7):234-238.
- [27] 赵素芬,刘晓艳. 高氧气调包装对冷鲜肉的保鲜研究[J]. 包装工程,2010(5):15-17.
- [28] 王宁. 冷却羊肉腐败菌菌相变化及其控制技术研究[D]. 武汉:华中农业大学,2006.
- [29] 周光宏. 畜产品加工学[J]. 北京:中国农业出版社,2002:60.
- [30] 褚益可,雷桥,欧杰. 不同塑料包装材料对气调包装牛肉品质的影响[J]. 湖南农业科学,2010(15):93-96,99.
- [31] 张嫚,周光宏,徐幸莲. 冷却牛肉的气调保鲜包装[J]. 2004, 25(2):179-183.
- [32] 张英华. 肉的品质及其相关质量指标[J]. 食品研究与开发,2005,26(2):39-42.

(上接第314页)

com/payreport/article/24895.html.