

复合保鲜剂联合低压变频电场对蒸煮贻贝冰温保鲜的增效作用

王 汉, 吴 越, 吕艳霞, 王坤美, 张泽坤, 罗红宇*

(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研究重点实验室 浙江舟山 316022)

摘要 目的:研究复合保鲜剂联合低压变频电场对蒸煮贻贝冰温贮藏的保鲜作用。方法:采用变异系数权重法计算不同保鲜方式下冰温贮藏蒸煮贻贝的综合评分,测定贻贝样品的总巯基含量和蛋白质表面疏水性以及两种优势腐败菌(枯草芽孢杆菌和假单胞菌)的生长曲线和菌体细胞膜的膜电位、电导率、核酸泄露量,并扫描电镜观察两株菌的形态。结果:与单独的保鲜剂组、低压变频电场组相比,复合保鲜剂联合电场组的综合评分最高,即保鲜效果最佳。与空白组相比,联合组的总巯基含量下降速率最慢,分别为 19.46%,44.92%,蛋白质表面疏水性仅升高 5.67%,持水性最佳,说明联合组样品的蛋白劣变最少。联合组的抑菌机理为抑制贻贝两株优势腐败菌(枯草芽孢杆菌、假单胞菌)的生长,破坏细胞膜结构的完整性,改变细胞形态。结论:复合保鲜剂联合低压变频电场能有效延缓蒸煮贻贝的腐败变质,延长其贮藏期。

关键词 复合保鲜剂; 低压变频电场; 枯草芽孢杆菌; 假单胞菌; 蒸煮贻贝

文章编号 1009-7848(2024)06-0319-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.06.028

贻贝是我国沿海常见的经济和营养价值都很高的一种双壳类食用贝类。贻贝具有高水分、高蛋白的特点,若捕捞后贮藏或加工不当,则极易腐败变质。目前贻贝除鲜销外,主要采用加工成蒸煮冷冻半成品或干制品进行贮藏。如能很好地保持蒸煮贻贝的贮藏品质,不仅可使贻贝加工原料不受采收季节的限制,而且为开发丰富的贻贝加工制品提供了原料保障。贻贝保鲜技术对突破贻贝产业瓶颈至关重要。

近几年,通过对电磁学的深入研究,国内外专家开展了电场在食品工业生产中的应用。低压变频电场不同于直流电场,它是以频率 50 Hz 改变电场方向且电场强度不超过 3 000 V 的空间电场^[1]。低压变频电场通过周期性改变电场方向,使食品内部所受电场力均衡,从而发生强烈振动^[2],在一定程度上提高食品通过最大冰晶生成带时间,提升食品冻结速率。低压变频电场在食品保鲜、加速冻结解冻过程、冷冻保鲜、食品杀菌等方面有诸多应用。同时,低压变频电场对生物体内酶活性、生物效应等方面也有影响。Mousakhani 等^[3]利用电场解冻金枪鱼,不仅提高解冻的速率,而且

能够降低挥发性盐基氮的水平,在弹性和咀嚼性等质构指标上与鲜鱼无明显差异。张珊等^[4]研究表明在-7℃环境下低压静电场能保持凡纳滨对虾的品质并有效延长其贮藏期。沈俊等^[5]利用低压变频电场结合微冻保鲜鲈鱼,不仅能降低 TVB-N 含量,而且能降低菌落总数,对肌肉组织也有保护作用。Zituni 等^[6]将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)暴露于强度为 4~10 V/m 的电场培养时,发现该细菌的活性明显受到抑制。

将一种保鲜剂用于食品的贮藏保鲜时,可能受到其自身抑菌谱、理化性质等因素的限制。根据栅栏技术原理,同时运用不同来源的保鲜剂能够发挥协同效应,增强保鲜效果,延长货架期。朱士臣等^[7]研究表明,茶多酚-姜黄素复配液能有效延缓贻贝肉脂质氧化及菌落总数的增长,从而改善贻贝肉冻藏品质,延长贮藏期。有文献报道枯草芽孢杆菌和假单胞菌是导致贻贝腐败的主要优势菌^[8-9]。根据栅栏技术原理,课题组前期研究发现由溶菌酶(lysozyme)、乳酸链球菌素(Nisin)、丁香酚复配的生物保鲜剂对这两种菌都有良好抑菌效果,同时还探究了低压变频电场对蒸煮贻贝冰温贮藏期间品质的影响。然而,低压变频电场联合复合保鲜剂对蒸煮贻贝冰温保鲜效果和延迟蛋白劣变程度以及抑菌机理尚不清楚。本文研究低压变频电场联合复合保鲜剂对蒸煮贻贝冰温贮藏末期的 pH 值、TVB-N、菌落总数和感官评价的影响,

收稿日期: 2023-06-22

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201305016)

第一作者: 王汉,男,硕士

通信作者: 罗红宇 E-mail: lisa8919@163.com

同时测定贻贝蛋白劣变的特征指标,研究对两种优势菌细胞膜结构特性的影响。通过与空白组、单因素作用组比较,探究联合保鲜方式的防腐抑菌机理。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

新鲜贻贝为舟山市嵊泗县养殖的厚壳贻贝,采购于舟山市丰茂菜场,全程冷链保存运输。

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;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, CMCC (B)63501)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp., ATCC13867),上海保藏生物技术中心;溶菌酶、溴酚蓝,国药集团化学试剂有限公司;乳酸链球菌素,浙江银象生物工程有限公司;丁香酚,上海士锋生物科技有限公司;总巯基(-SH)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;考马斯亮蓝G250染料试剂、考马斯亮蓝脱色液,武汉赛维尔生物科技有限公司;1×PBS缓冲液,北京索莱宝科技有限公司;DiBAC4(3)荧光探针,北京偶合科技有限公司。

1.2 设备与仪器

CA21G高速冷冻离心机、U2800紫外可见分光光度计,JAPAN-HITACHI公司;HZQ-B控温控速培养摇床,金坛市华城开元实验仪器厂;DY-CZ-24DN电泳仪,苏州江东精密仪器有限公司;FE38-Meter电导率仪,METTLER TOLEDO公司;FLUOROSKAN ASCENT FL/MK3 Thermo多功能酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;BX-2000鲜霸商用型空间电场发生器,浙江驰力科技股份有限公司;PHS-3C雷磁台式pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;K9840海能凯氏定氮仪,山东海能科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 贻贝保鲜试验的样品处理及分组 贻贝处理:新鲜贻贝清洗、吐沙,于沸水中蒸煮15 min,取出后立即在无菌工作台中挑选贝肉。参考何雪莹等^[10]的方法并适当修改确定蒸煮贻贝肉的冰温保藏温度为-1℃。

为了考察保鲜剂、低压变频电场及联合处理对蒸煮贻贝冰温保鲜效果的影响,试验设置了空

白组、保鲜剂组、电场组和保鲜剂+电场组,空白组不做任何处理,各试验组的处理条件如下:

保鲜剂组:依据前期蒸煮贻贝复合保鲜剂配方优化结果,将样品按料液比为1:2.5浸泡于复合保鲜液(4%溶菌酶+2%乳酸链球菌素+0.75%丁香酚)中60 min后,样品取出密封于聚乙烯袋中,冰箱(-1±0.2)℃保存。

电场组:将样品用聚乙烯袋密封放置于安装有放电板的冰箱中,样品距离放电板15 cm,电场强度3 000 V,电场频率50 Hz,冰箱温度调至(-1±0.2)℃。

保鲜剂+电场组:先将样品浸泡在复合保鲜液中,然后进行电场处理,处理条件均与保鲜剂组和电场组相同。

参照吴越等^[11]的方法每24 h测定样品pH值、菌落总数、TVB-N值及感官评分,选取第8天样品数据采用权重系数法计算各组样品的平均值、标准化值及权重系数,对各组样品的品质进行综合评分^[11]。

1.3.2 蛋白质劣变指标的测定 各组样品处理同1.3.1节,分别在0,2,4,6,8 d取各组样品测定总巯基含量及蛋白质表面疏水性^[12]。

1.3.3 抑菌机理的探究

1) 菌悬液的制备 将试验指示菌株枯草芽孢杆菌、假单胞菌分别接种于营养肉汤培养基中,置于30℃摇床、180 r培养12 h后,按1%的接种量接种于新的营养肉汤中继续培养,直至其OD值在0.5~0.6,即得到终浓度为10⁷ CFU/mL左右的菌悬液。

2) 菌体生长曲线的测定 参考吴学友等^[13]的方法并做适当修改。为探究复合保鲜剂联合低压变频电场对枯草芽孢杆菌和假单胞菌生长的影响,本试验测定了菌种在不同条件(表1)的生长曲线。各组样品均培养24 h,每隔1 h使用酶标仪在600 nm波长下测定菌种吸光度,并以此绘制生长曲线。

3) 菌体细胞膜结构测定 为探究低压变频电场和复合保鲜剂对菌体细胞的抑制机理,本文参考黎晓茜等^[14]、Chao等^[15]、Li等^[16]分别对菌体细胞膜的通透性、膜电位及膜完整性进行考察。

表1 菌体生长曲线测定试验的分组情况

Table 1 Grouping of thallus growth curves

空白对照组	枯草芽孢杆菌/假单胞菌 阴性对照组	枯草芽孢杆菌/假单胞菌 MIC 组	枯草芽孢杆菌/假单胞菌电场组
200 μ L 蒸馏水	190 μ L 菌悬液和 10 μ L LB 肉汤	190 μ L 菌悬液 10 μ L 浓度为 MIC 的复合保鲜剂	190 μ L 菌悬液 10 μ L LB 肉汤
		培养温度 37 $^{\circ}$ C	电场参数: 3 000 V、50 Hz 培养温度 37 $^{\circ}$ C

注: MIC(minimum inhibitory concentration, 最小抑菌浓度); 枯草芽孢杆菌和假单胞菌的 MIC 分别为 16 μ g/mL 和 8 μ g/mL。

表2 不同保鲜处理对菌体细胞膜结构的影响

Table 2 Somatic cell membrane related experiments

项目	空白组	MIC 保鲜剂组	电场组	电场+保鲜剂组	测定方法
细胞膜 通透性	5 mL 菌 悬液	4 mL 菌悬液和 1 mL 复合保 鲜剂	5 mL 菌悬液, 置 于装有放电板 的培养箱中	4 mL 菌悬液和 1 mL 复 合保鲜剂, 置于装有放 电板的培养箱中	37 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 每隔 1 h 测定培养液 的电导率
细胞膜 电位	200 μ L 菌悬液	100 μ L 菌悬液 和 100 μ L 保 鲜剂	200 μ L 菌悬液, 置于电场培 养箱中	100 μ L 菌悬液和 100 μ L 保鲜剂溶液, 置于电 场培养箱中	各组在特定条件下先培养 2 h 后, 加入 1 μ mol/L DiBAC4(3) 混匀, 再 置于无电板 37 $^{\circ}$ C 培养箱内避光孵 育 30~60 min 后, 检测荧光强度
细胞核 酸泄露 量	200 μ L 菌悬液	190 μ L 菌悬液 和 10 μ L 保 鲜剂	200 μ L 菌悬液, 置于电场培 养箱中	190 μ L 菌悬液和 10 μ L 保鲜剂液, 置于电场培 养箱中	37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后, 在 260 nm 处检测 吸光度

4) 扫描电镜测定 参考蔡瑾等^[7]的方法并进行适当修改。将培养好的枯草芽孢杆菌和假单胞菌贴壁于盖玻片上制成爬片, 用盖玻片轻轻覆盖在菌落上, 保鲜剂组加入 1 mL 复合保鲜剂溶液, 分别置于有电场装置和无电场装置的环境中, 以未经任何处理的菌体作为空白对照, 在培养箱培养 12 h, 随后放入固定液中 4 $^{\circ}$ C 下固定 2 h。用 PBS 缓冲液将固定的菌体洗涤 3 次。将处理完的样本放置于固定液中进行扫描电镜观察。

1.4 数据处理

每组试验平行测定 3 次, 数据以平均值 \pm 标准偏差表示; 采用 Origin 2022 软件绘图, 单因素方差分析(LSD 法)评价各组间差异的显著性, $P < 0.05$ 为有显著差异, $P > 0.05$ 差异不显著; SPSS 21.0 统计分析软件对试验数据进行处理。

2 结果与讨论

2.1 保鲜方法对蒸煮贻贝冰温贮藏品质的综合评分的影响

表征样品的鲜度和品质的指标很多, 采用单

一指标难以对保鲜效果做出客观科学的评价。因此, 本文采用变异系数权重法分析不同指标对产品鲜度和品质的贡献, 以确定各指标的权重系数及相应的标准化值, 最后计算综合评分, 结果见表 3。

根据表 3 可知, TVB-N 权重系数最大, pH 值权重系数最小, 说明保鲜方法对冰温贮藏贻贝的 TVB-N 的影响最大, 而对 pH 值的影响最小。根据各组综合评价总分可知, 复合保鲜剂联合低压变频电场对蒸煮贻贝冰温保鲜的品质保持效果最好。

2.2 低压变频电场联合复合保鲜剂对贻贝总巯基含量的影响

巯基是蛋白质中最具功能性的基团之一, 不仅能够影响蛋白质内部的酶活性, 而且也与蛋白质的变性联系紧密^[18]。当总巯基含量减少则二硫键增多^[19], 其能使肌原纤维蛋白发生交联聚集并破坏蛋白质的结构^[20]。故本文测定了蒸煮贻贝在不同保鲜条件下总巯基含量随贮藏时间的变化, 结果如图 1 所示。随贮藏时间延长各组总巯基含

表3 蒸煮贻贝冰温贮藏品质的综合评分

Table 3 Comprehensive score of ice-temperature storage quality of cooked mussels

指标	权重系数	数据	样品			
			空白组	保鲜剂组	电场组	电场+保鲜剂组
pH 值	0.026	平均值	5.97 ± 0.01	5.85 ± 0.015	5.81 ± 0.014	5.79 ± 0.05
		标准化值	-1.375	0.125	0.625	0.875
		综合评分	-0.035	0.003	0.016	0.022
TVB-N	0.682	平均值	16.7 ± 1.10	10.15 ± 0.35	8.73 ± 0.26	7.91 ± 0.21
		标准化值	-1.461	0.18	0.536	0.742
		综合评分	-0.996	0.123	0.366	0.506
菌落总数	0.119	平均值	6.54 ± 0.06	5.84 ± 0.06	5.78 ± 0.04	5.72 ± 0.03
		标准化值	-1.500	0.342	0.500	0.658
		综合评分	-0.179	0.041	0.060	0.078
感官评分	0.174	平均值	19.61 ± 0.15	23.10 ± 0.17	23.83 ± 0.15	24.30 ± 0.25
		标准化值	-1.462	0.184	0.528	0.750
		综合评分	-0.254	0.032	0.092	0.130
综合评价总分			-1.464	0.199	0.533	0.737
排序			4	3	2	1

量各组均下降,并且组间差异显著($P<0.05$),其中空白组的下降速度最快,其次为保鲜剂组,而经过电场处理的两组贻贝的巯基含量下降较为缓慢,且电场+保鲜剂组贻贝的巯基含量下降速率最慢,该组贮藏末期含量为 5.79×10^{-3} mmol/g,整个贮藏期降幅仅为19.46%。与其它组相比,贮藏同期的联合保鲜组贻贝的巯基含量最高。造成这个结果的原因可能是保鲜剂及低压变频电场减少巯基的酶偶联反应,延缓巯基的氧化分解速率,与吴玉婷等^[21]的结果相似。说明电场联合保鲜剂在一定程度上能抑制贻贝的总巯基氧化和蛋白质变性。

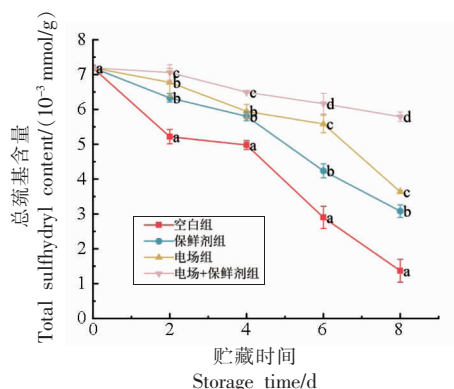
2.3 低压变频电场联合复合保鲜剂对贻贝蛋白质表面疏水性的影响

蛋白质分子的表面疏水性通常可用于反映蛋白质变性的程度,故本文采用溴酚蓝(BPB)法测定蛋白质分子的表面疏水性,其原理是通过蛋白质中疏水性氨基酸与溴酚蓝结合量的多少来表征表面疏水性的大小^[23]。冰温贮藏的蒸煮贻贝通过不同保鲜方式处理下蛋白质表面疏水性随贮藏时间的变化如图2所示。随贮藏时间延长各组贻贝蛋白质表面疏水性增加,组间差异显著($P<0.05$),其中空白组上升速率最快,其次为电场组和保鲜剂组,两者上升趋势一致,且前6天组间无显著性

差异($P>0.05$);电场+保鲜剂组上升趋势最低,在贮藏末期为150.66 μg ,比0 d时仅上升了5.67%。造成此现象的原因可能是复合保鲜剂及低压变频电场能有效延缓蛋白质变性及三维结构破坏,使得蛋白质内的疏水基团暴露较少^[24]。此结果说明低压变频电场联合复合保鲜剂能够在一定程度上阻止贻贝内部的蛋白质分子被破坏。本文结合总巯基含量的测定结果,认为低压变频电场联合复合保鲜剂能延缓蛋白质氧化速率,维持蛋白质的空间结构,从而达到保鲜效果,与熊宇飞^[25]的研究结论一致。

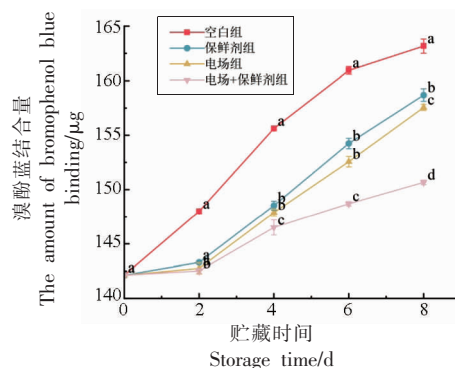
2.4 细菌生长曲线

为了了解不同保鲜方式对菌种增殖的影响,本文测定了在低压变频电场和复合保鲜剂作用下,枯草芽孢杆菌和假单胞菌的生长曲线,结果如图3。复合保鲜剂的浓度为MIC时,枯草芽孢杆菌和假单胞菌在稳定期的吸光度值相对于各自的阴性对照组分别下降了30.16%,44.58%,说明其对两种菌的生长都有抑制作用且对假单胞菌抑制作用更有效,可能是因为革兰氏阴性菌的细胞壁更薄,复合保鲜剂能更容易穿透细胞壁的肽聚糖层,造成细菌死亡。邓文静等^[26]的研究表明,银耳多糖、乳酸链球菌素和溶菌酶复配的保鲜剂能够抑



注:同一贮藏时间下,不同小写字母表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。

图 1 保鲜方式对于贻贝总巯基含量的影响
Fig.1 Effect of preservation methods on total sulfhydryl content of mussels



注:同一贮藏时间下,不同小写字母表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。

图 2 保鲜方式对于贻贝蛋白表面疏水性含量的影响
Fig.2 Effect of preservation methods on hydrophobicity of mussel protein surface

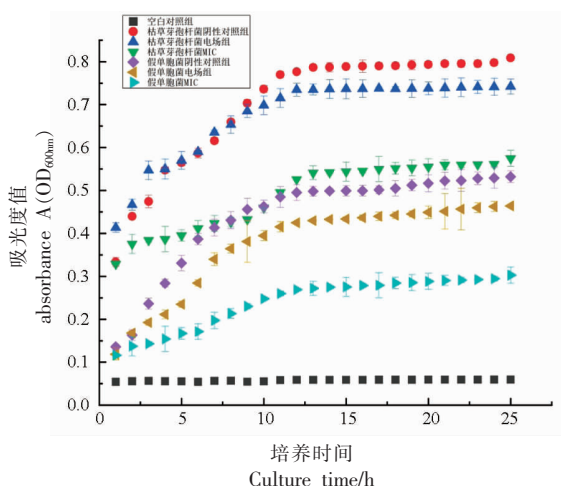


图 3 不同条件下菌体在 OD_{600nm} 的吸光度值
Fig.3 The absorbance value of thallus in OD_{600nm} under different conditions

制芽孢杆菌目、假单胞菌目和李斯特氏菌科的生长,从而改善南美白对虾冷藏保鲜的效果,与本文研究的结果相似。

此外在低压变频电场的环境下,两株细菌的生长受到明显的抑制,枯草芽孢杆菌和假单胞菌对数生长期为 4~8 h,而在阴性对照组中两菌株对数生长期为 4~12 h,说明低压变频电场缩短了菌株对数期的生长时间;枯草芽孢杆菌和假单胞菌在稳定期的吸光度值相对于各自的阴性对照组分别下降了 9.18%,10.25%,表明低压变频电场对假单胞菌的抑制作用同样强于枯草芽孢杆菌。

2.5 低压变频电场联合复合保鲜剂对菌体细胞膜结构的影响

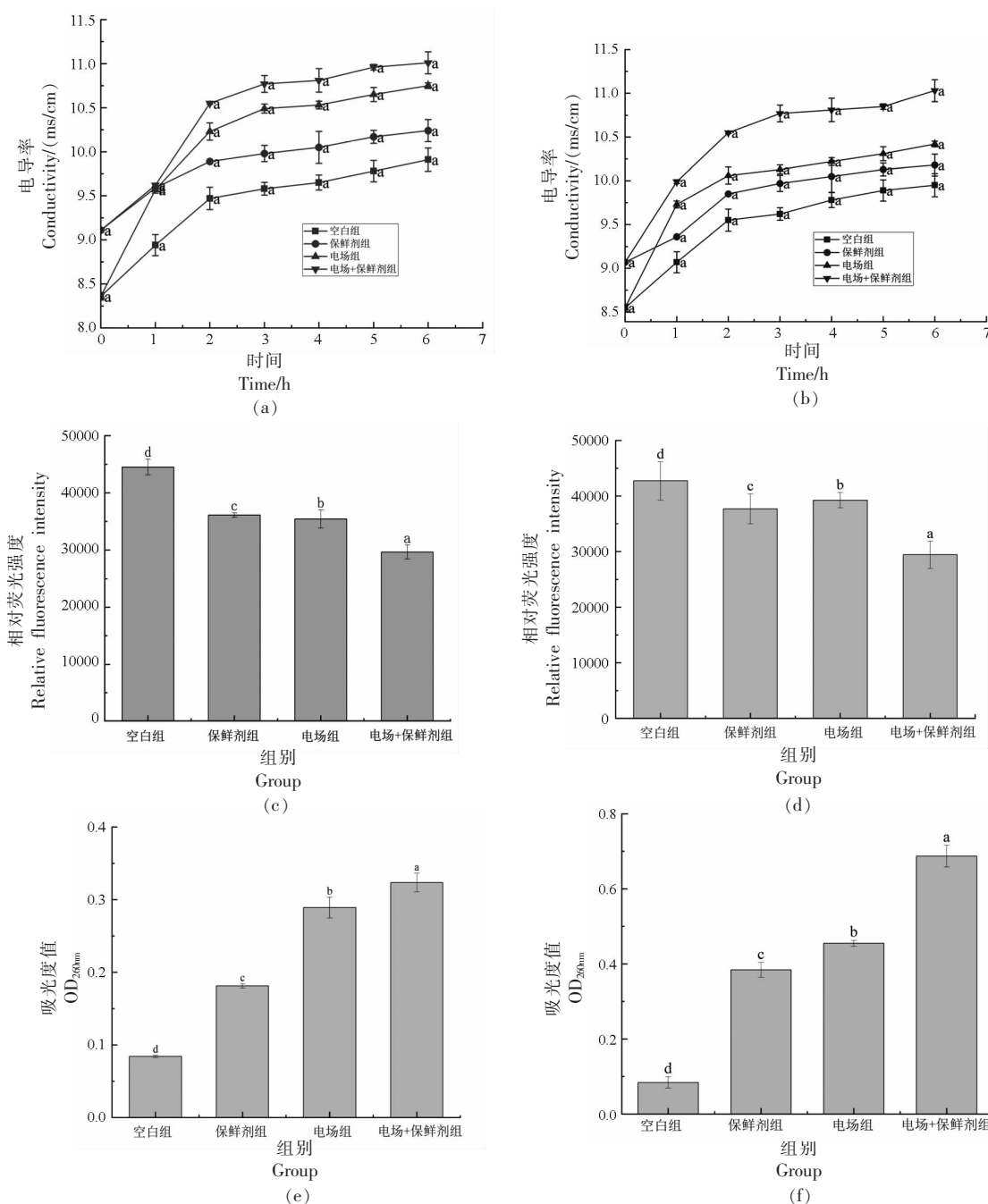
细胞膜是细菌的屏障,当细胞膜被破坏时,细胞内部的 K^+ , Ca^{2+} 和 Na^+ 等小分子离子会渗透到膜外,导致菌悬液电导率增强^[27],反映了细菌细胞膜通透性的变化^[28];同时胞内核酸泄露,核酸结构上的共轭双键 ($-C=C-C=C-$) 在 260 nm 处的吸光值能反映核酸的泄露情况^[29],与细胞膜的完整性相关。DiBAC4(3)是一种有效的敏感探针,能产生微弱的荧光,当细胞膜发生去极化,染料可进入细胞并与细胞质蛋白结合导致荧光强度的改变,即膜电位的变化,从而反映了膜损伤的类型和程度^[30]。综上,菌悬液的电导率、核酸泄露量及膜电位是从不同角度反映细胞膜结构的完整性。故本文通过考察菌体细胞膜结构的完整性来探究低压变频电场和复合保鲜剂对枯草芽孢杆菌和假单胞菌的抑菌机理,结果见图 4。

图 4a、4b 中可以看出随着时间延长,各组电导率都不断的上升,且电场组的电导率始终高于保鲜剂组和空白组。据文献报道超极化是一种重要的膜损伤类型,当细胞膜发生超极化或去极化时,荧光染料会在细胞内外重新分布,膜电位发生改变;当超极化时,相对荧光强度减少,而去极化则增加。图 4c、4d 中可以看出经处理的各组荧光度值均有所下降,分析原因可能是细胞膜内的 K^+ 经膜上蛋白质通道流出,使胞内负电荷增多,电势差增加^[32],进而细胞膜的跨膜电压升高,导致微孔

形成,超出膜本身的绝缘强度。当跨膜电压超过阈值时,微孔会变大,膜的渗透性会增加,导致细胞内的电解质渗漏而死亡;这也是各组电导率上升的原因。图 5e、5f 中可以看出电场组的 OD_{260nm} 值均高于空白组和保鲜剂组,说明菌体细胞膜的破坏程度大,菌体细胞核酸泄漏多,验证了低压变频

电场对细胞膜造成穿孔效应。该结果与上述细胞膜通透性及膜电位试验结果相一致。

在图 4 中也可看出保鲜剂组对细胞膜结构同样影响显著。经过复合保鲜剂处理的菌悬液的电导率比空白组高,这可能是由于复合保鲜剂中的各成分与细菌的细胞结构组分相互作用所致,有



注:a、c、e为枯草芽孢杆菌;b、d、f为假单胞菌;不同小写字母表示组间差异显著, $P < 0.05$ 。

图 4 保鲜方式对菌体细胞膜结构的影响

Fig.4 Effects of different preservation methods on the cell membrane of bacteria

研究表明,丁香酚能破坏细菌脂多糖层细胞壁,暴露肽聚糖并打开离子通道;溶菌酶可水解细菌细胞壁中肽聚糖的 β -1,4-糖苷键^[27];乳酸链球菌素通过自由扩散由细胞外膜进入菌体内,释放质子,干扰细菌正常代谢,加速了细胞内电解质的流失速度,三者具有协同增效作用。因此,细胞内的带电离子通过通道流失,导致细胞膜内外电荷不平衡,膜电位发生变化,胞内核酸泄漏,解释了保鲜剂组 OD_{260nm} 值高于空白组的原因。

综上,电场+保鲜剂组对菌体细胞膜的作用最显著,说明低压变频电场和复合保鲜剂具有协同作用,更容易使菌体细胞膜发生超极化现象,菌体代谢途径受抑制,破坏细胞膜结构致电解质和核酸泄漏,最终导致死亡。

2.6 低压变频电场集成复合保鲜剂对细菌形态的影响

通过扫描电镜观察低压变频电场和复合保鲜剂对枯草芽孢杆菌和假单胞菌形态的影响,结果如图 5、图 6 所示。未经过任何处理的空白组受试菌保持正常菌体形态,即菌体呈杆状,表面光滑平整,并且菌体生长状态良好,菌体饱满,无皱缩现象。经过不同保鲜方式处理的两种菌体表面变得粗糙,出现皱缩、破碎以及泄露的絮状物等现象。相对于保鲜剂组,电场组对两种菌的细胞结构破坏程度更强。显然,电场+保鲜剂组对两种菌的细胞膜破坏程度最强,特别是假单胞菌,甚至出现了部分细胞溶胀破裂的现象,再次证明低压变频电场联合保鲜剂的处理对假单胞菌的抑制作用强于枯草芽孢杆菌。

3 结论

本研究表明,与单独的保鲜或低压变频电场处理相比,复合保鲜剂联合低压变频电场对蒸煮贻贝冰温贮藏期间的品质保持最佳,能延缓其在贮藏期间蛋白质劣变的速率。从菌株生长曲线、细胞膜结构及电镜扫描检测的结果可以推测联合保鲜的抑菌机理为抑制枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)的生长速率和破坏菌株细胞膜结构。课题组前期的试验结果表明空白组的贻贝在第 5 天时其 TVB-N 值已经超标

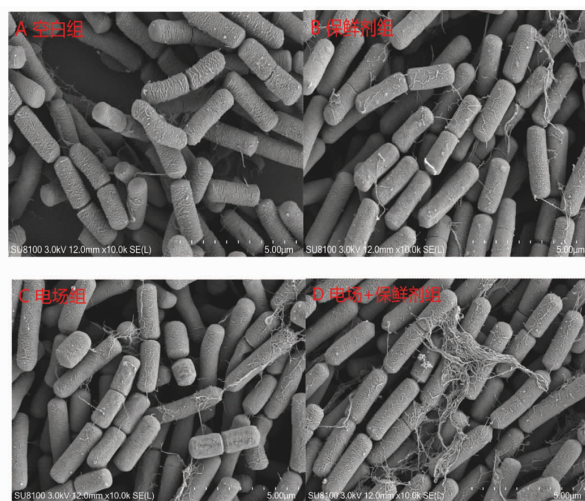


图 5 保鲜方式对枯草芽孢杆菌形态的影响

Fig.5 Effect of preservation methods on the morphology of *B. subtilis*

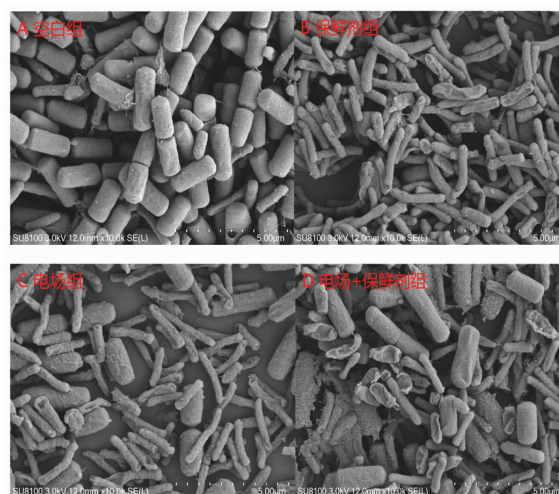


图 6 保鲜方式对假单胞菌形态的影响

Fig.6 Effect of preservation methods on morphology of *Pseudomonas Sp*

达到不可食状态,而联合组的样品在第 7 天仍未超标,说明复合保鲜剂联合低压变频电场能延长蒸煮贻贝的冰温贮藏期。通过观察不同组贻贝样品的细菌生长和细胞膜结构变化,并比较总硫基含量和蛋白质表面疏水性,我们推断联合组可以最大限度地延长贻贝的保质期,保持蒸煮贻贝的品质。因此本文为复合保鲜剂联合低压变频电场在食品保鲜中的推广应用奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 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 variable frequency electric field on ice temperature preservation of mussels[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(10): 3075-3082.
- [2] HE G, YAN X, WANG X, et al. et al. Extraction and structural characterization of collagen from fishbone by high intensity pulsed electric fields[J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(6): n/a-n/a.
- [3] MOUSAKHAN -GANJEH A, HAMDAMI N, SOLTANIZADEH N. Impact of high voltage electric field thawing on the quality of frozen tuna fish (*Thunnus albacares*) [J]. Journal of Food Engineering, 2015, 156: 39-44.
- [4] 张珊, 林慧敏, 邓尚贵. 低压静电场对凡纳滨对虾保鲜效果的研究[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 141-147.
ZHANG S, LIN H M, DENG S G. Study on preservation effect of *Litopenaeus vannamei* by low voltage electrostatic field[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(10): 141-147.
- [5] 沈俊, 吴越, 尚子寒, 等. 低压变频电场结合微冻对鲈鱼保鲜效果的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(8): 9-15.
SHEN J, WU Y, SHANG Z H, et al. Effect of low voltage frequency conversion electric field combined with micro freezing on the preservation effect of mackerel [J]. Food Research and Development, 2022, 43(8): 9-15.
- [6] DUNYA Z, HEIDI S, MARION K, et al. The growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in low-direct current electric fields[J]. International Journal of Oral Science, 2014, 6(1): 7-14.
- [7] 朱士臣, 曾曦, 龙官誉, 等. 茶多酚-姜黄素复配液对冻藏贻贝肉品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(15): 198-205.
ZHU S C, ZENG X, LONG G Y, et al. Effects of tea polyphenol - curcumin compound on meat quality of frozen mussels[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(15): 198-205.
- [8] 李仁伟, 霍健聪. 嵊泗贻贝冷藏过程中特定腐败菌研究及货架期模型预测[J]. 食品工业, 2013, 34(3): 134-136.
LI R W, HUO J C. study on specific spoilage bacteria and shelf life model prediction of Shengsi mussels during refrigeration[J]. The Food Industry, 2013, 34(3): 134-136.
- [9] 赵金丽, 魏婉莹, 张宾, 等. 基于高通量测序的紫贻贝中微生物群落分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(2): 253-258, 278.
ZHAO J L, WEI W Y, ZHANG B, et al. Analysis of microbial communities in mussel purple based on high-throughput sequencing[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(2): 253-258, 278.
- [10] 何雪莹, 孔保华, 刘骞, 等. 冰温结合冰点调节剂保鲜对鲤鱼肉糜贮存期间品质特性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 309-312.
HE X Y, KONG B H, LIU Q, et al. Effects of freezing temperature combined with freezing point regulator on quality characteristics of Carps mince during storage[J]. Food Science, 2012, 33(12): 309-312.
- [11] 牛改改, 游刚, 王培, 等. 基于变异系数权重法评价三种干燥方法对牡蛎干品质的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 68-73, 77.
NIU G G, YOU G, WANG P, et al. The effects of three drying methods on dry quality of oyster were evaluated based on coefficient of variation weighting method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 68-73, 77.
- [12] LIU Z Y, QIN L. Research on turbidity and surface hydrophobicity of milk protein at different conditions [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2021, 1893(1): 012009.
- [13] 吴学友, 朱悦, 陈正行, 等. 乳酸菌细菌素 Durancin GL 对单增李斯特菌的抗菌活性及机制[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 73-78.
WU X Y, ZHU Y, CHEN Z X, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Lactobacillus* bacteriocin Durancin GL against *Listeria monocytogenes* [J]. Food Science, 2019, 40(23): 73-78.
- [14] 黎晓茜, 龙友华, 尹显慧, 等. 茉莉酸甲酯处理对猕猴桃软腐病菌作用机制及果实品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 239-248.
LI X Q, LONG Y H, YIN X H, et al. Effect of methyl jasmonate treatment on mechanism of action

- and fruit quality of Kiwifruit soft rot pathogen[J]. Food Science, 2019, 40(15): 239–248.
- [15] SHI C, SUN Y, ZHENG Z, et al. Antimicrobial activity of syringic acid against *Cronobactersakazakii* and its effect on cell membrane[J]. Food Chemistry, 2016, 197(PA): 100–106.
- [16] SIWEN L, SISI C, DEYAN Y, et al. Dual antibacterial activities of a chitosan–modified upconversion photodynamic therapy system against drug-resistant bacteria in deep tissue[J]. Nanoscale, 2017, 9(11): 3912–3924.
- [17] 蔡瑾, 闫然, 王梦亮, 等. 二氢槲皮素对大肠杆菌的抑菌作用机理[J/OL]. 食品科学, 2023, 44(19): 18–26.
- CAI J, YAN R, WANG M L, et al. Inhibition mechanism of dihydroquercetin on *Escherichia coli* [J/OL]. Food Science, 2023, 44(19): 18–26.
- [18] YANG X, GREENHAW J, SHI Q, et al. Mouse liver protein sulfhydryl depletion after acetaminophen exposure[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2013, 344(1): 286–294.
- [19] JIA D, YOU J, HU Y, et al. Effect of CaCl_2 on denaturation and aggregation of silver carp myosin during setting[J]. Food Chemistry, 2015, 185: 212–218.
- [20] SHI Y, LI R Y, TU Z C, et al. Effect of γ -irradiation on the physicochemical properties and structure of fish myofibrillar proteins[J]. Radiation Physics & Chemistry, 2015, 109: 70–72.
- [21] 吴玉婷, 郑炜, 邱意忠, 等. 空间电场–微冻贮藏过程中红虾蛋白质特性的变化[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(20): 6569–6576.
- WU Y T, ZHENG W, QIU Y Z, et al. Changes of protein properties of red shrimp during spatial electric field–microfreezing storage[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(20): 6569–6576.
- [22] CHENG L, SUN D W, ZHU Z, et al. Effects of high pressure freezing (HPF) on denaturation of natural actomyosin extracted from prawn (*Metapenaeus*) [J]. Food Chemistry, 2017, 229(3): 252–259.
- [23] 贾娜, 林世文, 王乐田, 等. 没食子酸诱导肌原纤维蛋白巯基含量和表面疏水性变化对蛋白凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 1–7.
- JIA N, LIN S W, WANG L T, et al. Effects of gallic acid induced changes of mercapto content and surface hydrophobicity on gel properties of myofibrillar protein[J]. Food Science, 2020, 41(22): 1–7.
- [24] 李甜, 张珊, 李孟华, 等. 低压静电场对凡纳滨对虾多酚氧化酶性质影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(19): 52–58.
- LI T, ZHANG S, LI M H, et al. Effects of low pressure electrostatic field on polyphenol oxidase properties of *Litopenaeus Vannamei* [J]. Food Research and Development, 2022, 43(19): 52–58.
- [25] 熊宇飞. 高压静电场结合制冷对刀额新对虾品质和作用机理的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- XIONG Y F. Study on the quality and mechanism of prawn with high voltage electrostatic field combined with refrigeration[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.
- [26] 邓文静, 王菲, 张军. 复合生物保鲜剂对4℃冷藏南美白对虾的品质与微生物区系的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(4): 160–167.
- DENG W J, WANG F, ZHANG J. Effects of compound biological preservative on quality and microflora of *Penaeus chinensis* refrigerated at 4 °C[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(4): 160–167.
- [27] 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 J T, SUN T, et al. Mechanism of antibacterial activity of eugenol compound preservative against *Shivella purensis* [J]. Food Science, 2021, 42(13): 10–16.
- [28] 张楠楠. 复合生物保鲜剂结合真空包装对冰鲜大黄鱼品质及腐败菌作用机制的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- ZHANG N N. Effects of compound biological preservative combined with vacuum packaging on quality and mechanism of spoilage bacteria of frozen large yellow croaker[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [29] ZHANG H M, HE X Q, LI X Q, et al. Permeability–controllable potentiometric fluorescent probes enable visually discriminating near-zero and normal situations of cell membrane potential[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(5): 2728–2732.
- [30] 何天夫. 肉桂醛对大肠杆菌抑菌机理及与脉冲电场协同灭菌效果研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- HE T F. Study on the bacteriostatic mechanism of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and its syn-

- ergistic effect with pulsed electric field[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [31] DIKEN G S, BAKHSHPOUR M, BERELI N, et al. Antibacterial effect against both gram-positive and gram-negative bacteria via lysozyme imprinted cryogel membranes [J]. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 2021, 32(8): 11–16.
- [32] SÁNCHEZ E, GARCÍA S, HEREDIA N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(20): 6888–6894.
- [33] SUN K K, WANG S L, XIONG G Y, 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.
- [34] KAUR T, PUTATUNDA C, VYAS A, et al. Zinc oxide nanoparticles inhibit bacterial biofilm formation via altering cell membrane permeability [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(4): 309–319.

The Synergic Effect of Compound Preservative Combined with Low Voltage Frequency Conversion Electric Field on the Preservation of Cooked Mussels at the Ice-temperature

Wang Han, Wu Yue, Lü Yanxia, Wang Kunmei, Zhang Zekun, Luo Hongyu*

(*Zhejiang Provincial Key Laboratory of Key Technologies for Health Hazard Factors of Seafood, College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang*)

Abstract Objective: To study the preservation effect and preservation mechanism of mussels in ice temperature storage with compound preservative combined with low voltage frequency conversion electric field. Methods: The coefficient of variation weighting method was used to calculate the comprehensive score of steamed mussels stored at ice temperature under different preservation methods. The total sulfhydryl content and surface hydrophobicity of the samples, as well as the growth curves of two dominant bacteria of mussels (*Bacillus subtilis* and *Pseudomonas*), the membrane potential, conductivity and nucleic acid leakage of the cell membrane of the bacteria were determined. The morphology of the two strains was observed by scanning electron microscopy. Results: Compared with the single preservative group and the low voltage variable frequency electric field group, the composite preservative combined electric field group had the highest comprehensive score, that is, the best preservation effect. Compared with the blank group, the total sulfhydryl group content in the combined group had the slowest decline rate, which was 19.46% and 44.92%, respectively, and the protein surface hydrophobicity only increased by 5.67%, indicating the best water holding capacity. The results indicated that the protein degradation of the combined group was minimal.

Keywords compound preservatives; low voltage variable frequency electric field; *Bacillus subtilis*; *Pseudomonas*; steamed mussels