

文章编号:1000-0615(2004)01-0106-06

· 综 述 ·

水产食品特定腐败菌与货架期的预测和延长

杨宪时, 许 钟, 肖琳琳

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

关键词: 水产食品; 特定腐败菌; 动态建模; 货架期预测; 靶向抑制

中图分类号: TS201.3; S983 文献标识码: A

Specific spoilage organisms from aquatic product and prediction & prolongation of the shelf life

YANG Xian-shi, XU Zhong, XIAO Lin-lin

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: Fresh fish and lightly preserved fish products are welcome by the global market, however, they are also among the most perishable food products. The research on specific spoilage organisms (SSO) reveals the spoilage process of aquatic product. This paper reviews the current knowledge (past ten years) on SSO of fresh fish and lightly preserved fish products with particular emphasis on characteristics of SSO and how to apply this concept to determine, predict and extend the shelf life of aquatic product. During storage, the microflora changes owing to different abilities of the microorganisms to tolerate the preservation conditions. SSO is defined as special microorganisms which can increase rapidly during preservation and has the ability to produce off-odours and off-flavours associated with spoilage, and spoilage metabolites. Identification of an SSO relies on comparison of the sensory and chemical characteristics of spoiled product with those of isolates from the spoilage microflora. Generally, the SSO of fresh fish may be a single species or genus, but the ones of lightly preserved fish products will be more complex. One exciting area for use of SSO aims to obtain quantitative knowledge about probable behavior of SSO and their function during the progression of spoilage. Thus mathematical models on the growth of SSO are established to evaluate the quality lost degree of product, which provide a sound information for the rational development of devices to monitor loss of products shelf life. Models for the growth of *Pseudomonas* spp, *S. putrefaciens*, *P. phosphoreum* have been established, and validated for shelf life prediction of seafood successfully. Another application field of SSO intends to develop the techniques to prolong the shelf life of food products by inhibiting SSO targetedly. Targeted inhibition of spoilage bacteria during preservation reduces their growth and results in a significant extension of shelf life in despite of the activity of non-spoilage organisms has not been influenced. Such techniques have been applied in perversion field of fresh fish and lightly preserved fish.

收稿日期: 2003-09-08

资助项目: 农业部 948 项目 (2001-478)

作者简介: 杨宪时 (1954-), 浙江奉化人, 副研究员, 主要从事水产品品质和安全保障技术的研究。Tel: 021-65678984, E-mail: yangxianshi@21cn.com

Key words: aquatic product; specific spoilage organisms; activity modeling; shelf life prediction; targeted inhibition

食品的微生物腐败是全球关切的领域,据估计,人们生产的食物中有 25% 在收获后因微生物的腐败而造成损失^[1]。国内外市场欢迎的水产鲜品和温和加工品是极易腐败的食物,其防腐保质成为该领域关注的热点。增加水产品中腐败微生物生长和活动的科学认知,对于研发加工保藏技术,减少鲜度损失,提高水产品质量,避免盲目使用防腐剂、保鲜剂、杀(抑)菌剂,是至关重要的。为了水产食品的保鲜防腐,国外对水产食品腐败微生物进行了长期研究,逐渐明确了在大多数情况下,水产食品所含微生物中只有部分微生物参与腐败过程^[2]。在此基础上,上世纪 90 年代中期 Dalgaard 明确提出了特定腐败菌(specific spoilage organism)的概念^[3],大大有助于人们对水产食品微生物腐败的认识,引起了许多策略和技术上的研发。我国水产品保鲜加工的基础性研究尚待系统开展,以适应产业现代化的需要。对于特定腐败菌(SSO)的概念我国水产加工业还是陌生的,对于 SSO 的研究需要从头开始。本文介绍国外近 10 多年来对水产鲜品和温和加工品 SSO 及其在评估、预测水产品质量,延长产品货架期领域的研究和应用,希望引起有关专业人员的注意,对我国开展水产品 SSO 的研究和保鲜加工技术的研发有所帮助。

1 水产鲜品和温和加工品微生物生态学

1.1 水产食品腐败和 SSO 的概念

早期对水产食品微生物学的研究已注意到,与致病菌动态响应相比,腐败菌由于产品特征和贮藏条件的不同,其动态响应复杂且变化大^[4]。研究者指出,水产食品腐败主要表现在某些微生物生长和代谢生成胺、硫化物、醇、醛、酮、有机酸等,产生不良气味和异味,使产品变得感官上不可接受^[5]。这种不可接受是对具体产品而言,例如氨味在有些干制品和发酵产品中是可接受的,但在大多数新鲜和温和加工品中是不可接受的,这种感官上的不可接受即被认为不适合人类食用,以此可以把水产食品划分成具有不同微生物生态的类群,即每种产品具有其自身独有的菌相,取决于所使用的原料、加工参数和产品的贮藏条件。在贮藏期间微生物菌相发生变化是由于产品中残存的微生物在这种保藏条件下具有不同的忍耐能力,那些适合生存和繁殖并产生腐败臭味和异味的代谢产物的微生物,就是该产品的特定腐败菌^[6]。如图 1 所示,SSO 在刚加工水产品微生物菌丛中的数量少,仅占非常小的一部分,但在贮藏中生长比其他微生物快,并且腐败活性强^[7]。

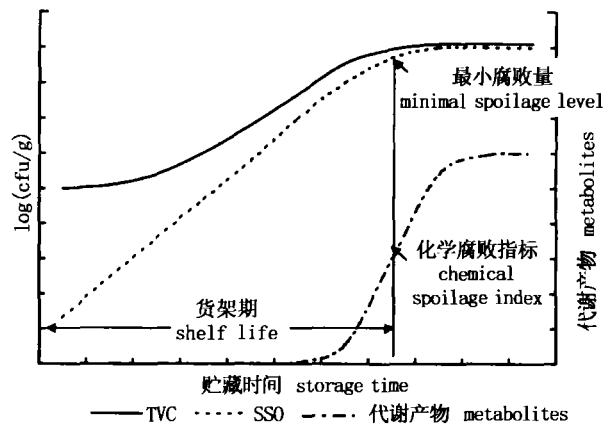


图 1 新鲜海产品贮藏过程中总活菌数(TVC)、特定腐败菌(SSO)及其代谢产物的变化
Fig.1 Typical changes in total viable counts (TVC), specific spoilage organisms (SSO) and metabolites produced by SSO during storage of fresh seafood

1.2 水产鲜品和温和加工品的 SSO

专家们对 SSO 进行的研究表明,要确定腐败水产食品中分离的细菌哪些导致腐败不是一件容易的事,需要广泛的感官、微生物和化学研究^[8]。SSO 的鉴定取决于对腐败产品的感官和化学特征与那些腐败微生物菌丛分离物的比较^[5]。在对一种 SSO 的鉴定上,产生异味的定性能力(腐败潜在性)和产生腐败代谢物的定量能力(腐败能力)的鉴定是必要的,而且仅能用于限定范围的 SSO 鉴定。腐败范围定义为在限定的条件下(pH、Aw、温度、氛围气体)SSO 能繁殖,并产生腐败代谢物^[3,9,10]。

众所周知,在鱼制品加工和包装过程中,只要少量的不同就导致腐败的不同发展及成分的巨大变化,甚至导致完全不同的腐败类型。即使是相同类型的产品,腐败的发展也可能不同,例如地理和同微生物相互作用的其他未知因素。专家指出,水产鲜品在相同的地理条件下,同类型产品中只有一种或几种微生物总是作为腐败菌出现,而且 SSO 可能只有一种^[8]。

已经查明,弧菌科(*Vibrionaceae*)等发酵型革兰氏阴性细菌是未加冷藏鲜鱼的 SSO,如果水产品是在受污染的水中捕获,主要腐败菌是肠细菌(*Enterobacteriaceae*)^[6]。而在冷藏中,耐冷的革兰氏阴性细菌假单胞菌(*Pseudomonas*)和希瓦氏菌(*Shewanella*)是特定腐败菌,这对于所有鱼、贝类和甲壳类都是适用的,无论是温带水域、亚热带水域和热带水域^[6]。真空或气调包装可抑制好氧菌,冷藏真空或气调包装水产品的 SSO 为磷发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)和乳酸菌(Lactic acid bacteria)^[2]。在低盐、略

降低水分活度、略酸化和真空包装的温和加工品例如冷熏鱼的冷藏过程中,SSO的情况较为复杂,通常乳酸菌如乳杆菌(*Lactobacillus*)、肉食杆菌(*Carnobacterium*),以及发酵型革兰氏阴性细菌如磷发光杆菌、适冷的肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)等居多^[11-13]。在半保藏产品如醋渍鱼或暴腌鱼中,通过酸化或低盐来增加保藏性,促使乳酸菌和酵母菌(Yeast)生长,抑制了其他微生物。近年来常用

相当于巴氏杀菌的轻度加热处理制作真空蒸煮袋产品(Sous vide),贮藏中芽孢杆菌(*Bacillus*)或梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)会生长起来^[14]。温和加工品的情况较为复杂,由于内在和外在条件的不同,诸如原材料和加工过程的复杂性,要弄清楚腐败微生物新陈代谢对产品可能变化的重要性,还须做更多的工作。

表 1 水产食品特定腐败菌及其计数方法举例

Tab.1 Examples of specific spoilage organisms (SSO) in different seafoods and of methods for their enumeration

产品类别 product	特定腐败菌 typical SSO	计数方法 enumeration method
空气中冷藏鲜鱼 fresh chilled fish stored in air	希瓦氏菌 <i>Shewanella putrefaciens</i> ¹	铁琼脂(20~25℃, 3d) ³ iron Agar
	假单胞菌 <i>Pseudomonas spp</i> ²	CFC 琼脂(25℃, 3d) ⁴ 或阻抗法 CFC agar or conductance method
真空或气调包装冷藏鲜鱼 fresh chilled fish stored in vacuum or MAP	磷发光杆菌 <i>Photobacterium phosphoreum</i> ¹	阻抗法(15℃, 10~50h) Malthus conductance method
	乳酸菌 Lactic acid bacteria ²	NAP 琼脂(ph 6.7, 25℃, 3d) ³ NAP agar
	热杀索氏菌 <i>Brochothrix thermosphacta</i> ²	STAA 琼脂(25℃, 2~3d) ⁴ STAA agar
空气中 > 10~15℃ 贮藏鲜鱼 fresh fish stored at > 10~15℃ in air	弧菌 <i>Vibrionaceae</i>	覆盖 VRBG 琼脂的 TSA 培养基 (30℃, 48 h) ³ TSA with overlay of VRBG agar
15~25℃ 贮藏气调包装熟盐渍虾或其他包装的轻微加工海产品 cooked and brined MAP shrimps and possibly several other packed lightly preserved seafoods stored at 15~25℃	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	S & B 琼脂(35/44℃, 48 h) ⁴ S & B agar

注:表中 1 为典型温水域海洋鱼类,2 为典型淡水鱼和热水域鱼类,3 为倾注平板,4 为涂布平板

Notes: 1. typical of marine, temperate-water fish, 2. typical of freshwater fish and fish from warmer waters, 3. pour plating, 4. spread plating

1.3 SSO 及其代谢产物作为产品的品质指标

在贮藏期间,SSO 的生长比其他微生物快,代谢产物造成变味,最终感官不可接受,产品被剔除(图 1),所以 SSO 菌数及其代谢产物的浓度可用来作为货架期测定的客观品质指标。由于是 SSO 造成腐败,所以 SSO 的对数值和产品剩余货架期存在密切关系,这就有可能依据 SSO 初始数和生长曲线来预测剩余货架期。例如欧盟项目“鱼类鲜度评定”中,确定 4 种不同 SSO,即腐败希瓦氏菌、磷发光杆菌、热杀索氏菌(*Brochothrix thermosphacta*)、乳杆菌的菌数与产品剩余货架期密切相关($0.90 < R^2 < 0.99$),而且常比总活菌数(TVC)的对数值与剩余货架期有更密切的相关性^[15]。需要指出的是,冷藏水产品 TVC 的计数往往须在预冷平板上涂抹 0.1mL 菌液接种,在 25℃ 以下温度培养 2~7d,如果是海产品,还要在培养基中加 1%~3% NaCl。SSO 的计数需要专门的培养方法^[16,17]。

图 2 表示 SSO 和 TVC 菌数与气调包装鳕鱼片剩余货架期关系的实例。每克一个 SSO($\log_{10} \text{cfu/g} = 0$)相当于 18~19 d 剩余货架期,而 TVC 的相似菌数相当于 >7 周剩余

货架期,后者的值因缺乏 TVC 与腐败之间的因果关系而不实际^[7]。

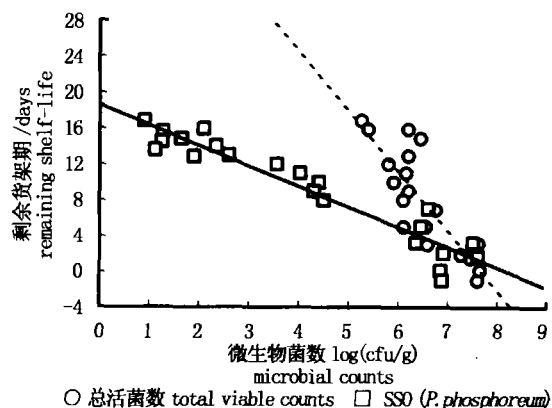


图 2 TVC、SSO(磷发光杆菌)与气调包装鳕鱼片剩余货架期的关系

Fig.2 Relationship between remaining shelf life of modified atmosphere packed cod fillets and log-numbers of TVC and of the SSO (*P. phosphoreum*)

水产品产生的许多微生物代谢与肉类和家禽类产品相似^[18,19],但水产品腐败产物特别是 TMAO 通过厌氧呼吸的一些细菌产生 TMA,会导致出现氨和鱼腥味特征的异味,这是由于水产品不同于肉、禽类的化学组成^[20,21]。

有些腐败产物可以用来作质量指标,与速度慢的微生物方法相比,化学分析要快得多,但是可测定浓度的有些化合物要到接近腐败才出现。常用的水产品传统的单一化合物质量指标总挥发性盐基氮(TVBN)就有这样的缺点。而表示 ATP 降解产物的 K 值,只能指示水产品的的新鲜程度,与微生物腐败无关。由统计方法鉴定出的混合几种代谢产物的多种化合物质量指标最近已被尝试采用,与几种产品的感官性质和货架期密切相关^[22,23]。将这种最新的化学分析、感官评估和多变统计结合是未来食物微生物腐败研究的一个重要领域^[24]。

2 SSO 生长动态模型和预测的产品剩余货架期

2.1 建立 SSO 生长动态模型

SSO 概念的现有应用领域之一是开发定量描述 SSO 生长的数学模型,来预测水产品的剩余货架期,这形成了预测微生物学(Predictive Microbiology)的一个分支^[25]。传统的方法不能很好地评价食品的剩余货架期,近 10 多年来,并没有一种新技术在腐败发生之前能很好地预测产品的剩余货架期^[4]。实际中行之有效的检测方法必须反应迅速,重复性好,而且重要的是能衡量食品变质的程度,而不是简单地断定感官上也很容易判断的腐败的发生。水产品货架期受许多因子的影响,差异相当大,所以过去几十年对产品直接法(微生物的、感官的、化学的)评估水产品品质进行广泛研究,但都受到时间和灵敏度的限制。研究者认为,目前可供直接评估产品品质的方法是预测微生物学^[26],Mcmeekin^[25]等综述了微生物预报技术在确保水产品质量和安全上的应用。

早期 SSO 动态模型的开发、验证和应用大都以预测冷链(chill chain)产品的货架期为目的,这带来了一些策略和技术的研发,诸如特定腐败水平、相对速率、时间-温度耐受性、变温影响等。对任何微生物预测模型的应用而言,其始点和终点都基于所积累的加工或贮藏过程的微生物学知识^[3]。

在考虑了早期微生物动态建模的不足之后,Dalgaard^[3,27]提出鱼类品质评价和预测的基本策略,认为对鱼类货架期预测的主要要求是收集信息:

(1) 腐败导致的种种反应(SR),产生令人不快的挥发性气味或产生粘液等。

(2) 特定腐败菌(SSO),导致各种腐败反应的优势腐败菌。

(3) 腐败范围(SD),在何种环境条件范围内 SSO 繁殖并导致系列腐败反应。

Dalgaard^[22]建议,应该经两大步骤进行剩余货架期预测模型的开发和验证。第一步,以产品为基础进行实验,确定 SR、SSO、SD 和最小腐败量(MSL)—产品遭感官拒绝时的 SSO 数量等,Dalgaard 认为还要考虑 SSO 的代谢活性,而不简单是数量在腐败过程中起决定作用。此步骤决定了所选择或开发的模型的具体组成结构,并限定了相应的实验设计。第二步,根据 SSO 在腐败范围内的生长建立模型。

已建立了磷发光杆菌、腐败希瓦氏菌和假单胞菌属的生长动态模型,并已经证实可以成功地用于预测有氧和真空、气调包装冷链水产鲜品的剩余货架期^[28-33],这些模型已开发出专家系统软件,可以提供给使用者,软件还在不断补充和完善。对温和加工水产品中腐败菌组合的形成加以确切阐述和建模,是今后水产食品预测微生物学的一个主要挑战^[34-36]。

2.2 假单胞菌的生长动态模型

假单胞菌是革兰氏阴性好氧杆菌,Shewan 等根据对葡萄糖分解的不同分成 I、II、III/IV 群,I、II 群有氧代谢葡萄糖产酸,III/IV 群不产酸。I、II 群是非好盐性陆生菌,两群的区别是有无产生荧光色素。III/IV 群中包括来自陆地的非好盐菌和来自海洋的好盐菌。假单胞菌各群大多数菌株能加水分解蛋白质和脂质,可在冷藏温度下生长,在 0℃ 附近也能很好增殖,尤其好盐性 III/IV 群中增殖速度非常快的菌株多。非好盐 III/IV 群中很多菌株生成强烈腐败臭味,例如有名的腐败假单胞菌(*P. putrefaciens*)。好盐 III/IV 群中腐败活性强的菌株也很多。I、II 群中有产生很强腐败臭味的菌株,但很多菌株产生水果或酸臭味等异味^[37]。所以假单胞菌是有氧冷链贮藏水产品的特定腐败菌,限制了水产品在国内流通的货架期,因此构建该菌的预测模型具有重要的现实意义。

预测模型和专家系统软件的研究开发步骤包括:(1)在实验室实验条件下得到假单胞菌的生长动态数据,用标准的统计学程序建立并验证温度对生长速率影响的模型。(2)在恒温或变温条件下观察自然污染或接种时产品的腐败情况,验证模型。(3)重复上述过程,改变盐浓度、水分活度、pH 等,整合到单一模型中。(4)以交互式电脑软件分析贮藏过程中电子登记器得到的数据,使之成为可应用的信息。(5)向业界提供登记器、软件、指令、意见和解释,以评估微生物预测系统在流通中的应用。(6)整合(5)中的各个部分,开发方便实用的应用软件,从实际出发不断完善该软件。

假单胞菌生长预测模型的应用范围:温度 -1.5 ~ 38℃,水分活度 0.950 ~ 0.997, pH 5.3 ~ 7.8。实际上没有必要把 pH 整合到模型中,因为 pH 在 5.3 ~ 7.8 范围内对微生物生长速率没有影响。模型的建立使用了大量数据,从恶臭假单胞菌(*P. putida*)1442 菌株 90 条生长曲线,6 株其他假单胞菌生长曲线(平均 56 条/株)和 2 种混合菌株

生长曲线,测得温度对模型的影响,每条曲线至少含15个测量点,总共用多于8000个数据建立了模型。在整合水分活度到模型中去时,除了从温度研究中得到的数据外,还测定了2株恶臭假单胞菌的44条生长曲线和其他适冷假单胞菌的45条生长曲线(菌体在含NaCl的肉汤中培养)。同样,验证模型也用了在应用中积累的包括水产食品在内的大量数据。

为了客观地评估该模型,应用了Ross^[36]导入的偏差因子(Bias)和准确因子(Accuracy factor),模型在实际条件下可达到20%以内的准确度。

2.3 预报水产品SSO生长动态和剩余货架期的应用软件

假单胞菌、腐败希瓦氏菌、磷发光杆菌的动态模型和预测相应水产品剩余货架期的模型已经开发,分别纳入称为FSP(food spoilage predictor)和SSP(seafood spoilage predictor)的应用软件内^[39,40],可用来预测和阐明恒温 and 波动温度对SSO的生长动态和水产食品剩余货架期的影响。把数学货架期模型纳入计算机软件,大大增加了模型的实际应用功能,但是还有许多数学模型尚待更多的工作才能开发出应用软件。假单胞菌模型的适用范围已如上述,腐败希瓦氏菌模型的适用范围是0~10℃,磷发光杆菌模型的适用范围是0~15℃和CO₂含量0~100%。

3 SSO的靶向抑制和延长产品货架期

对新鲜和温和加工水产品SSO的已有了解和完全了解,成为研究开发针对SSO的延长产品货架期新技术的有力基础。采用抑制或降低SSO生长的处理和加工方法,即使不影响其他微生物群落,也会延长产品货架期。这种SSO靶向抑制,已有成功的实例。

0~4℃冷藏气调包装(MAP)鳕鱼片,虽然好氧性的腐败菌假单胞菌和腐败希瓦氏菌受到抑制,但耐CO₂、降解氧化三甲氨(TMAO)的磷发光杆菌却生长起来,结果产品几乎与无CO₂包装的鱼片以同样的速度腐败。针对抑制磷发光杆菌采用冷冻一下再冷藏,或添加香料,都大大延长了货架期,冷冻后冷藏的2℃的MAP鳕鱼片货架期从11~12天延长到20天以上^[41,42]。

温和加工品的SSO靶向抑制,可以和栅栏技术(hurdle technology)结合起来^[43]。耐贮藏高水分扇贝调味干制品,是一种典型的高价值即食深加工产品,商品名“软烤扇贝”,水分含量50%左右,以其柔软可口,风味鲜美在国内外超级市场深受欢迎。其加工工艺成功地运用了栅栏技术,在经过一系列处理和热加工后制品真空包装,在常温贮藏流通中(<25℃)制品是以Aw值<0.93,pH值5.7~5.9抑制了可能残存的梭状芽孢杆菌,保证了制品的品质和安全^[44,45]。

4 结语

对水产鲜品腐败已经进行较多研究,特别是涉及只有

一种SSO的产品腐败。但许多具有较复杂微生物菌相的温和加工水产品的SSO还不十分清楚,这些产品的预测货架期模型是今后的研究领域。随着对温和加工和天然保藏法的兴趣增浓,研发SSO靶向抑制的各种方法势在必行,滥用防腐剂将不再受欢迎。关于水产食品SSO,通过结合微生物生长和代谢动力学、分子技术、分析化学、感官评定和数学建模的研究,我们看到,食品微生物动态是与微生物生态学的其他领域有着同样复杂而实用的研究领域。

参考文献:

- [1] Baird-Parker T C. The production of microbiologically safe and stable foods[A]. Edited by Lund B M, Baird-Parker T C, Gould G W. The Microbiological Safety and Quality of Food[M]. Gaithersburg Maryland USA: Aspen Publishers Inc, 2000, 3-18.
- [2] Dalgaard P. Fresh and lightly preserved seafood[A]. Man C M D, Jones A A. Shelf life evaluation of foods[M]. Gaithersburg Maryland USA: Aspen Publishers Inc, 2000, 110-139.
- [3] Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. Int J Food Microbiol, 1995, 26:319-333.
- [4] Thomas A, Meekin M, Thomas R. Shelf life prediction: status and future possibilities[J]. Int J Food Microbiol, 1996, 33: 65-83.
- [5] Gram L, Hans H H. Microbiological spoilage of fish and fish product[J]. Int J Food Microbiol, 1996, 33: 121-137.
- [6] Gram L, Huss H H. Fresh and processed fish and shellfish[A]. Edited by Lund B M, Baird-Parker T C, Gould G W. The microbiological safety and quality of food[M]. Gaithersburg Maryland USA: Aspen Publishers Inc, 2000, 472-506.
- [7] Dalgaard P. Freshness, quality and safety in seafoods[Z]. <http://www.exp.ie/flair.html>, 2000.
- [8] Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria-problems and solutions[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13: 262-266.
- [9] Jorgensen L V, Huss H H, Dalgaard P. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon[J]. J Appl Microbiol, 2000, 89:920-934.
- [10] Koutsoumanis K, Nychas G J E. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life prediction[J]. Int J Food Microbiol, 2000, 60:171-184.
- [11] Truelstrup H L, Gill T, Huss H H. Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon[J]. Food Res Int, 1995, 28:123-130.
- [12] Leroi F, Joffraud J J, Chevalier F, et al. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 39:111-121.
- [13] Tsukasa S, Kiyotaka T, Yasuyuki T, et al. Effects of water activity and storage temperature on the quality and microflora of smoked salmon[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1994, 60(5): 569-576. [島崎司, 三明清隆, 冢正泰之等. スモークサーモンの品質と菌相に及ぼす水分活性と貯蔵温度の影響[J]. 日本水産学会誌, 1994, 60(5): 569-576.]
- [14] Ben E K. Microbiological safety and spoilage of sous vide fish

- products[D]. PHD Thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark, 1994.
- [15] Gram L. Evaluation of the bacteriological quality of seafood[J]. *Int J Food Microbiol*, 1992, 16:25-39.
- [16] Dalgaard P, Mejholm O, Huss H H. Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products[J]. *J Appl Bacteriol*, 1996, 81:57-64.
- [17] Dainty R H, Mackey B M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes[J]. *J Appl Bacteriol*, 1992, 73:103-114.
- [18] Nychas G J E, Drosinos E H, Board R G. Chemical changes in stored meat[A]. Edited by Board R G, Davies A. *Microbiology of meat and poultry[M]*. London, England: Blackie Academic & Professional, 1998:288-326.
- [19] Shewan J M. The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action [A]. In proceedings of the conference on handling, processing and marketing of tropical fish [C]. London: Tropical Products Institute, 1977:51-66.
- [20] Chinivasagam H N, Bremner H A, Wood A F, et al. Volatile compounds associated with bacterial spoilage of tropical prawns [J]. *Int J Food Microbiol*, 1998, 42:45-55.
- [21] Ólafsdóttir G, Fleurence J. Evaluation of fish freshness using volatile compounds-classification of volatile compounds in fish [A]. Edited by Ólafsdóttir G et al. *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry[M]*. Paris, France: International Institute of Refrigeration, 1998:55-69.
- [22] Jorgensen L V, Huss H H, Dalgaard P. Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analysed by GC-MS and multivariate regression[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49:2376-2381.
- [23] Leroi F, Joffraud J J, Chevalier F, Cardinal M. Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters[J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90:578-587.
- [24] Jorgensen L V, Dalgaard P, Huss H H. Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:2448-2453.
- [25] Mcmeekin T A, Ross T, Olley J. Application of Predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products[J]. *Int J Food Microbiol*, 1992, 15:13-32.
- [26] Konstantinos K. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:1821-1829.
- [27] Dalgaard P. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life of packed fresh fish[J]. *Int J Food Microbiol*, 1995, 19:305-318.
- [28] Koutsoumanis K, Giannakourou M C, Taoukis P S, et al. Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality[J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 73:375-382.
- [29] Dalgaard P. Application of the iterative approach for development of a microbiological spoilage model for packed cod[J]. *Int J Food Microbiol*, 1997, 38:169-179.
- [30] Taoukis P S, Konstantinos K, Nychas G J E. Use of time-temperature integrators and Predictive Modeling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions[J]. *Int J Food Microbiol*, 1999, 53:21-31.
- [31] Rasmussen S K J, Ross T, Olley J, et al. A process risk model for the shelf life of Atlantic salmon fillets [J]. *Int J Food Microbiol*, 2002, 73:47-60.
- [32] Dalgaard P, Vancanneyt M, Euras V N, et al. Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmospheres at temperatures between 0°C and 25°C [J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 94:80-89.
- [33] Dalgaard P, Ross T, Kamperman L, et al. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data [J]. *Int J Food Microbiol*, 1994, 23:391-404.
- [34] Maria N G, Jose J S, Jesus A S, et al. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level [J]. *Int. J. Food Microbiol*, 2002, 77:161-168.
- [35] Van I J F, Nicolai B M, Schellekens M. Predictive microbiology in a dynamic environmental system theory approach [J]. *Int J Food Microbiol*, 1995, 25:227-249.
- [36] Leroi F, Joffraud J J, Chevalier F. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C [J]. *Int J Food Microbiol*, 1998, 39:111-121.
- [37] Xuyama M, Qusi X. *Fishery food science [M]*. Tokyo: Koseisha Koseikaku, 1987.111-118. [須山三千三, 鴻巢章二. 水産食品学[M]. 東京: 恒星社厚生閣, 1987. 111-118.]
- [38] Ross T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology[J]. *J Appl Bacteriol*, 1996.
- [39] Dalgaard P. Modelling and predicting the shelf-life of seafood [A]. Bremner H A. *Safety and quality issues in fish processing [M]*. Woodhead Publishing Ltd, 2002:191-219.
- [40] Dalgaard P, Mejholm O, Christiansen T J. Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of MAP fish products[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 24:373-378.
- [41] Guldager H S, Boknaes N, Osterberg C, et al. Thawed cod fillets spoil less rapidly than unfrozen fillets when stored under modified atmosphere at 2°C [J]. *J Food Prot*, 1998, 61:1129-1136.
- [42] Mejholm O, Dalgaard P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and in fish products[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 34:27-31.
- [43] Leistner L. Hurdle technology in the design of minimally processed [A]. *Minimally processed fruits and vegetables-fundamental applications [M]*. Gaithersburg Maryland USA: Aspen Publishers Inc, 2000, 13-27.
- [44] Yang X S, Yu Z. A model of quarantine quality hurdle and its strength designed for high-moisture seasoned dried scallop[J]. *J Fish China*, 2000, 24(1):67-71. [杨宪时, 许钟. 高水分扇贝调味干制品保质栅栏的模式及强度[J]. 水产学报, 2000, 24(1):67-71.]
- [45] Yang X S, Yu Z. Effects of increasing safe moisture on quality of scallop product[J]. *J Fish Sci China*, 2003, 10(3):258-261. [杨宪时, 许钟. 提高扇贝制品安全水分含量的研究[J]. 中国水产科学, 2003, 10(3):258-261.]