

文章编号: 1000-0615(2019)03-0688-09

DOI: 10.11964/jfc.20171211077

## 复合生物保鲜剂结合冰温贮藏对红鳍东方鲀的保鲜效果

苏红<sup>1</sup>, 申亮<sup>2</sup>, 毕诗杰<sup>1</sup>, 张晓梅<sup>1</sup>, 郭芮<sup>1</sup>, 刘红英<sup>2\*</sup>

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000;

2. 河北农业大学海洋学院, 河北秦皇岛 066000)

**摘要:** 为了延长红鳍东方鲀鱼块的货架期, 利用响应面Box-Behnken原理设计柠檬酸、百里酚和海藻酸钠3因素3水平响应面分析实验, 建立以菌落总数为响应值的二次多项式回归模型。并通过pH、汁液流失率、挥发性盐基氮(TVB-N)、硫代巴比妥酸(TBA)、菌落总数及优势腐败菌假单胞菌等指标测定, 对最佳配比的复合生物保鲜剂的保鲜效果进行了验证。结果显示, 冰温下, 柠檬酸、百里酚、海藻酸钠的最优配比分别为0.68%、1.45%、1.94%, 贮藏30 d时菌落总数为最低值5.50 lg (CFU/g), 并且3种保鲜剂两两间均存在极显著的交互作用。经验证, 该复合生物保鲜剂可以显著抑制微生物的增长, 有效降低贮藏过程中的TVB-N含量、TBA含量, 显著减缓了鱼块的腐败变质发生, 货架期较对照组的15 d延长至30 d。

**关键词:** 红鳍东方鲀; 生物保鲜剂; 保鲜; 响应面法; 柠檬酸; 百里酚; 海藻酸钠

**中图分类号:** S 983

**文献标志码:** A

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、辐鳍亚纲(Actinopterygii)、鲀形总目(Percomorpha)、鲀形目(Tetrodontiformes), 因其味美而被誉为“天下第一鲜”<sup>[1]</sup>, 含有丰富的蛋白质、不饱和脂肪酸、胶原蛋白以及滋味成分等<sup>[2-3]</sup>, 深受消费者喜爱。我国的河鲀资源丰富, 是产销大国, 但因其含有河豚毒素在国内被禁食, 因此产品的70%~80%供出口, 主要销往日本和韩国<sup>[4]</sup>, 是日本传统美食<sup>[5]</sup>。河鲀在国内的市场刚刚打开, 简单的低温保藏将不能满足消费的需求, 因此, 有效的保鲜技术可以拓宽流通渠道, 有利于市场的进一步扩大。

生物保鲜剂是一种从动植物及微生物中提取的天然的或经分子生物技术改造获得的安全无毒的保鲜剂<sup>[6]</sup>, 因其安全高效而成为水产品保鲜技术的热点。不同生物保鲜剂的抑菌机理不同, 具有不同的抑菌谱, 目前还没有发现一种生物保鲜剂可以抑制所有的菌类, 因此根据栅

栏因子, 将不同抑菌谱的生物保鲜剂复配使用, 发挥协同效应, 可以扩大抑菌范围, 增强保鲜效果<sup>[7]</sup>。施建兵等<sup>[8]</sup>采用响应面优化了茶多酚、溶菌酶和壳聚糖复合生物保鲜剂对鲳鱼的保鲜配方, 可以显著抑制微生物的生长, 有效降低挥发性盐基氮(TVB-N)、硫代巴比妥酸(TBA)、三甲胺(TMA)的含量, 货架期延长至12 d。Li等<sup>[9]</sup>将复配的茶多酚和壳聚糖用于对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)的保鲜, 结果使其货架期较对照组延长了6~8 d。刘金昉等<sup>[10]</sup>将纳米TiO<sub>2</sub>(钛白粉)、壳聚糖、溶菌酶及蜂胶复配的生物保鲜剂结合冰温应用于凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 使其货架期延长至21 d。目前, 冷藏结合生物保鲜剂的研究较多, 冰温技术研究较少, 在红鳍东方鲀中的应用还未见报导。

关于河鲀的保鲜技术研究刚刚开始, 国内只有冷藏<sup>[11]</sup>、冷冻<sup>[12]</sup>、电解水<sup>[13]</sup>、羧甲基壳聚糖<sup>[14-15]</sup>等保鲜研究, 对其他保鲜技术的研究还未

收稿日期: 2017-12-10 修回日期: 2018-03-21

资助项目: 河北省食品科学与工程学科“双一流”建设资金(2016SPGCA18); 新型食品加工关键技术及包装材料开发(17227117D)

通信作者: 刘红英, E-mail: liu066000@sina.com

见报导。红鳍东方鲀是河鲀中的重要养殖品种,2016年还有条件开放了养殖红鳍东方鲀和暗纹东方鲀(*T. fasciatus*)的加工经营市场。本实验在单一生物保鲜剂对红鳍东方鲀保鲜效果研究的基础上,将柠檬酸、百里酚和海藻酸钠采用响应面的方法进行优化配比,通过菌落总数、假单胞菌数和理化指标对复合生物保鲜剂的保鲜效果进行验证,为复合生物保鲜剂应用在红鳍东方鲀的贮藏保鲜中提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜活红鳍东方鲀购自秦皇岛水产品市场;柠檬酸、百里酚、海藻酸钠,西安大丰收生物科技有限公司;氯化钠、硼酸、盐酸、三氯乙酸、碳酸钾、凡士林,天津市凯通化学试剂有限公司;平板计数琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司;2-硫代巴比妥酸,国药集团化学试剂有限公司;Pseudomonas Agar Base (OXOID)、CFC Supplement (SR0103E),赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;甲基红、次甲基蓝、无水氯化钙,天津市科密欧化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

FA2004分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;HH-6数显恒温水浴锅,上海梅香仪器有限公司;JJ-2组织捣碎机,江苏金坛市亿通电子有限公司;DHG-9076A,电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;721型可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;YLD-6000生化培养箱,江苏定坛市宏华仪器厂;PHS-3C型pH计,上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂;YX-280D灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限责任公司;SW-CJ-2F无菌操作台,苏州安泰空气技术有限公司。

### 1.3 实验方法

**材料预处理** 将百里酚溶解在水-醇比例为1:1的溶剂中,然后加入柠檬酸,制成复合生物保鲜剂。将鲜活的红鳍东方鲀去除内脏,冰水洗净后用吸水纸将其表面水分吸干,浸泡在复合生物保鲜剂中1 min,沥干后,在海藻酸钠溶液中浸泡5 min,2.0%氯化钙溶液中再胶化5 min,

取出于室温下沥干,分组装于自封袋内冰温下(-2~0 °C)贮藏,定时取样进行指标测定。

**响应面实验设计** 在单因素实验的基础上<sup>[16]</sup>,利用Box-Behnken实验设计,以柠檬酸、海藻酸钠和百里酚3种生物保鲜剂的质量分数为考察因子,以贮藏30 d时的菌落总数为响应值,建立响应值与考察因子之间的二次多项式模型。将方程求导,求得复合生物保鲜剂的最佳配比。最后将复合保鲜剂应用到红鳍东方鲀,同时做空白对照组(不添加保鲜剂)实验进行验证。参考单一生物保鲜剂的实验结果,实验因素水平设置如表1所示。

表1 Box-Behnken实验设计的因素和水平

Tab. 1 Factors and levels for Box-Behnken design

因素 factors	水平 levels		
	-1	0	1
柠檬酸质量分数/% mass fraction of citric acid	0.3	0.5	0.7
百里酚质量分数/% mass fraction of thymol	0.5	1	1.5
海藻酸钠质量分数/% mass fraction of sodium alginate	1	1.5	2

### 1.4 指标的测定

**pH的测定** 参考齐凤生等<sup>[17]</sup>的方法,将红鳍东方鲀肉捣碎,取5 g置于锥形瓶中,加入45 mL蒸馏水,均质,静置30 min,过滤,滤液pH值用精密pH计测定。

**汁液流失率的测定** 参考李敬等<sup>[18]</sup>的方法,称量带包装样品的质量( $M_1$ ),样品取出,将包装内和样品表面的汁液用滤纸吸干后称量二者的质量( $M_2$ ),包装单独称量( $M_3$ )。计算公式:

$$\text{汁液流失率} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_3} \times 100\%$$

**挥发性盐基氮的测定** 参照GB 5009.228—2016《食品安全国家标准-食品中挥发性盐基氮的测定<sup>[19]</sup>的微量扩散法进行测定。

**TBA的测定** 参照Li等<sup>[20]</sup>的方法,用分光光度计在532 nm处测吸光度值A,重复3次。结果TBA值=7.8 A (mg/100 g)。

**菌落总数(TBC)及假单胞菌的测定** 按照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<sup>[21]</sup>的方法进行测定。菌落总数及假单胞菌分别用平板计数琼脂和Pseudomonas Agar Base (OXOID)培养。

## 1.5 数据分析

采用Origin 9.1绘制曲线, Design-Expert 8.0.6进行响应面曲面的绘制, 应用SPSS 17.0进行方差分析,  $P < 0.05$ 为差异显著,  $P < 0.01$ 为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 二次多项回归模型的建立及显著性分析

使用Design-Expert 8.0.6对Box-Behnken实验设计方案及结果(表2)进行回归拟合, 得到各保鲜剂与响应值(菌落总数)的二次多项式回归方程:

$$Y = 1.27 + 6.73A + 3.83B + 5.03C - 1.73AB - 4.38AC - 0.98BC - 0.2A^2 - 1.30B^2 - 0.68C^2$$

式中 $Y$ 为菌落总数,  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 分别为柠檬酸、百里酚和海藻酸钠的质量分数。

为了验证模型的可靠性, 对二次多项式回归方程进行方差分析, 结果显示, 模型 $F$ 值为77.86, 差异极显著( $P < 0.01$ ), 说明此模型有意义<sup>[22-23]</sup>, 在99%置信水平上具有统计学意义<sup>[24]</sup>

(表3); 回归方程的决定系数 $R^2 = 0.9901$ , 修正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9774$ , 模型的拟合性高, 只有响应总变异的0.89%不能解释<sup>[25]</sup>; 方程的失拟项差异不显著( $P > 0.05$ ), 说明外在因素对实验数据的影响较小, 适合对红鳍东方鲀品质变化进行预测(表2)。因素A、B对菌落总数的影响极显著( $P < 0.01$ ), 因素C对菌落总数的影响显著( $P < 0.05$ ), 三因素间的交互作用均极显著( $P < 0.01$ ), 二次项 $B^2$ 、 $C^2$ 极显著,  $A^2$ 不显著(表3)。

### 2.2 响应曲面的分析及最佳配比的确定

响应面是各因素与响应值所构成的三维曲面图, 可直观地反映出因素对响应值的影响, 曲线越陡峭说明因素对响应值的影响越大, 等高线反映两因素交互作用的显著性程度, 圆形代表不显著, 椭圆代表显著<sup>[26]</sup>。三因素对响应值的影响程度大小顺序为百里酚>柠檬酸>海藻酸钠, 所有等高线均为椭圆, 因此柠檬酸、百里酚及海藻酸钠两两间的交互作用均极显著( $P < 0.01$ ), 与方差分析结果一致(图1)。百里酚和柠檬酸随

表2 Box-Behnken实验设计方案与结果

Tab. 2 Box-Behnken experimental design and result

实验号 experiment number	柠檬酸 citric acid	百里酚 thymol	海藻酸钠 sodium alginate	菌落总数/[lg(CFU/g)] total bacterial count	预测值/[lg(CFU/g)] predicted value
1	-1	-1	0	7.90	7.90
2	1	-1	0	7.47	7.54
3	-1	1	0	7.22	7.15
4	1	1	0	6.10	6.10
5	-1	0	-1	7.25	7.34
6	1	0	-1	7.49	7.51
7	-1	0	1	8.04	8.02
8	1	0	1	6.53	6.44
9	0	-1	1	7.50	7.41
10	0	1	-1	6.81	6.80
11	0	-1	-1	7.70	7.71
12	0	1	1	6.03	6.12
13	0	0	0	7.50	7.51
14	0	0	0	7.53	7.51
15	0	0	0	7.49	7.51
16	0	0	0	7.44	7.51
17	0	0	0	7.57	7.51

表3 响应面回归方程的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance of the fitted regression equation

参数 parameters	平方和 sum of square	自由度 degree of freedom	均方 mean square	F值 F value	P值 P value	显著性 significance
模型 model	5.22	9	0.58	77.86	<0.000 1	**
A	0.99	1	0.99	133.44	<0.000 1	**
B	2.43	1	2.43	326.34	<0.000 1	**
C	0.07	1	0.07	9.44	0.018 0	*
AB	0.12	1	0.12	15.98	0.005 2	**
AC	0.77	1	0.77	102.78	<0.000 1	**
BC	0.24	1	0.24	32.23	0.000 8	**
A <sup>2</sup>	2.695E-004	1	2.695E-004	0.036	0.854 6	
B <sup>2</sup>	0.45	1	0.45	59.89	0.000 1	**
C <sup>2</sup>	0.12	1	0.12	16.43	0.004 8	**
残差 residual	0.052	7	7.449E-003			
失拟项 lack of fit	0.043	3	0.014	6.13	0.056 2	
误差项 pure error	9.320E-003	4	2.330E-003			
总变异 cor total	5.27	16				

注: \*  $P < 0.05$ , 差异显著, \*\*  $P < 0.01$ , 差异极显著; 下同

Notes: \*  $P < 0.05$  means significant difference, \*\*  $P < 0.01$  means extremely significant difference; the same below

浓度的增大,菌落数均呈下降的趋势,说明百里酚和柠檬酸的杀菌作用显著。当柠檬酸在低浓度范围时,海藻酸钠随浓度的增大抑菌效果逐渐降低,可能是因为低浓度的柠檬酸抑菌效果较差,高浓度的厚膜恰巧为微生物提供了场所。而柠檬酸在高浓度范围时,海藻酸钠随浓度的增大抑菌效果呈上升趋势,可能是因为高浓度的柠檬酸抑菌效果显著,较厚的膜又很好地隔绝了外界微生物的进入。随百里酚浓度的变化,海藻酸钠对菌落总数的影响与柠檬酸和海藻酸钠对响应值的影响趋势一致。在海藻酸钠的变化范围内,百里酚随浓度的增大抑菌效果逐渐增强,因此验证了百里酚的抑菌效果显著。

通过Design-Expert 8.0.6软件对回归模型的分析得出,柠檬酸、百里酚、海藻酸钠最优配比分别为0.68%、1.45%、1.94%,此时菌落总数预测值最低为5.50 lg (CFU/g)。

### 2.3 复合生物保鲜剂对红鳍东方鲀保鲜效果的验证

**汁液流失率的变化** 2种处理方式的汁液流失率随着时间的延长都呈上升的趋势,这是

因为鱼肉不断的腐败变质,组织蛋白不断降解,氨基酸和游离的多肽残基不断增加,因此汁液流失率增加<sup>[27]</sup>,并且保鲜剂处理组较对照组汁液流失严重(图2)。在贮藏25 d时对照组和保鲜组的汁液流失率分别为1.48%、4.23%,在此之前,保鲜剂处理组的汁液流失率与对照组的汁液流失率差别不大,30 d时保鲜组的汁液流失率上升到6.78%,相比气调保藏汁液流失率的可接受程度(8.00%左右<sup>[18]</sup>),此时的汁液流失率可以接受。在贮藏30 d之后保鲜剂处理组汁液流失率的增长速率极显著( $P < 0.01$ )加快,35 d时已达20.38%,不可接受。由于对照组在25 d时已经严重腐败,不能在进行实验操作,故只显示0~25 d的数据。

**pH的变化** 对照组和保鲜组的pH初始值分别为6.75、5.91,复合生物保鲜剂可以降低肉质的pH(图3)。2组均出现先下降后上升的趋势,这是因为鱼体死后,体内糖原分解为乳酸,造成pH值的暂时下降,之后随着微生物的繁殖,鱼体逐渐腐败,体内蛋白不断分解为胺类等含氮物质,造成pH值的上升。保鲜组的pH值极显著( $P < 0.01$ )低于对照组,并且上升幅度不大,在贮藏25 d时2组的pH值分别为6.08、6.86,保鲜组35 d时pH值仅为6.13,说明复合生物保鲜剂可以



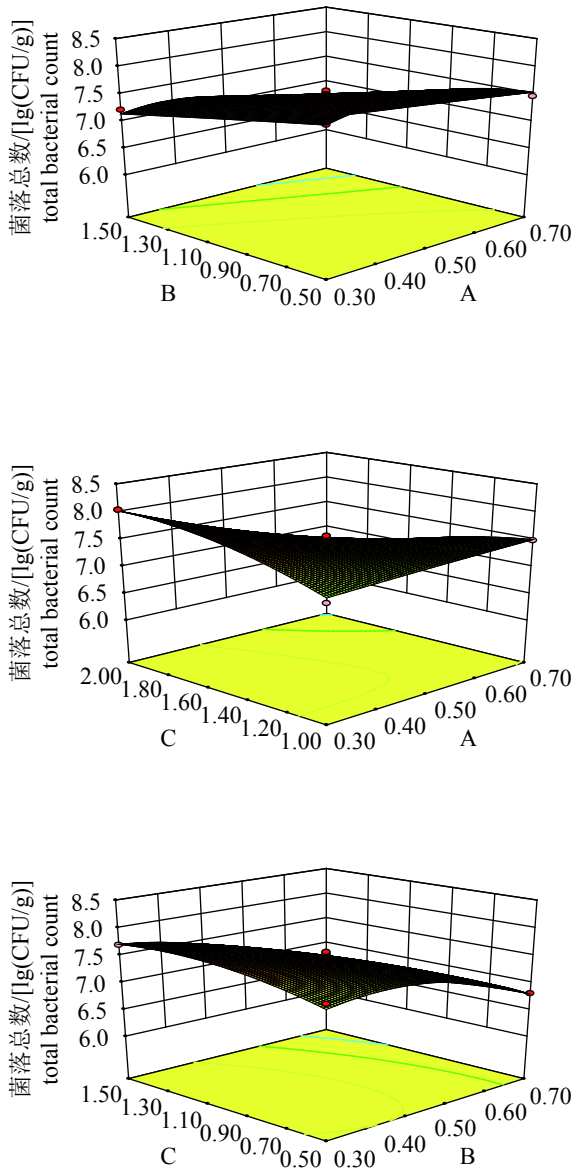


图 1 各因素交互作用对菌落总数影响的响应面及等高线

Fig. 1 Response surface and contour showing the effect of interactions among various factors on TBC

抑制微生物的作用，降低TVB-N值的生长，从而抑制pH的增长。

TVB-N的变化 TVB-N值是因为酶和微生物的作用，使肉制品的蛋白氮和非蛋白氮分解为氨类及低级胺类等含氮化合物。保鲜剂处理组的TVB-N极显著( $P < 0.01$ )低于对照组，说明复合生物保鲜剂可以显著抑制TVB-N的增长(图4)。对照组的TVB-N值随时间的延长不断增长，并且在第15天时，TVB-N值达12.47 mg/100 g，与马妍<sup>[14]</sup>等研究得出的暗纹东方鲀腐败点的TVB-N相似，之后增长速率加快。而保鲜剂处理组的TVB-N值

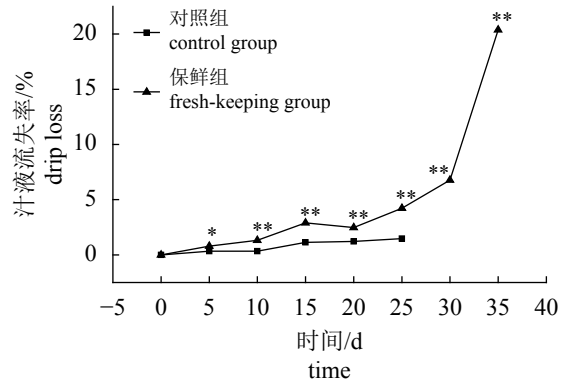


图 2 不同处理方式对红鳍东方鲀贮藏过程中汁液流失率的影响

Fig. 2 Changes in drip loss of *T. rubripes* with different treatments during chilled storage

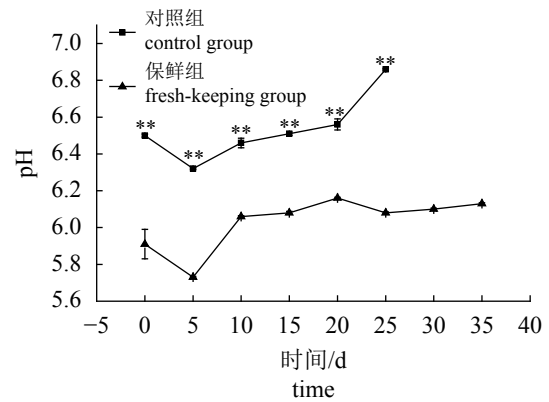


图 3 不同处理方式对红鳍东方鲀贮藏过程中pH的影响

Fig. 3 Changes in pH value of *T. rubripes* with different treatments during chilled storage

呈现先下降后上升的趋势，因为鱼的种类不同，鱼体内氨基酸种类和组成也不同，TVB-N增长的速率和数量也会不同<sup>[14]</sup>，所以可能是因为复合生物保鲜剂改变了氨基酸或胺类等的结构和组成，从而使TVB-N值呈现下降的趋势。

TBA值的变化 不饱和脂肪酸氧化的产物可以和TBA反应生成有色化合物，通过测定其吸光度可以判定脂肪氧化的程度<sup>[28]</sup>。新鲜红鳍东方鲀的TBA值为0.038 mg/100 g，说明新鲜的鱼块中脂肪酸氧化不显著(图5)。对照组的TBA值增长迅速，极显著高于保鲜组( $P < 0.01$ )，在第20天时TBA值达1.276 6 mg/100 g，25 d时降低到0.822 3 mg/100 g，可能是因为脂肪氧化生成的丙二醛和其他短链化合物的稳定时间较短，这些化合物进一步氧化为不能和TBA反应的有机酸和醇，因此

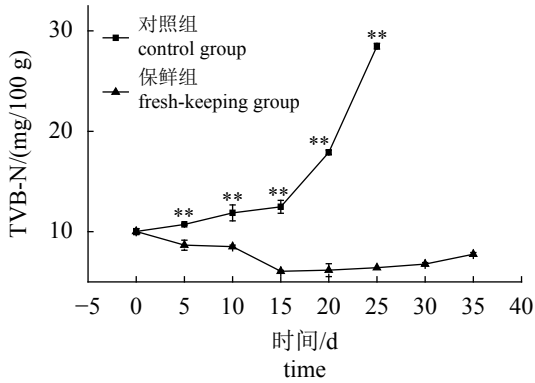


图4 不同处理方式对红鳍东方鲀贮藏过程中TVB-N的影响

Fig. 4 Changes in TVB-N value of *T. rubripes* with different treatments during chilled storage

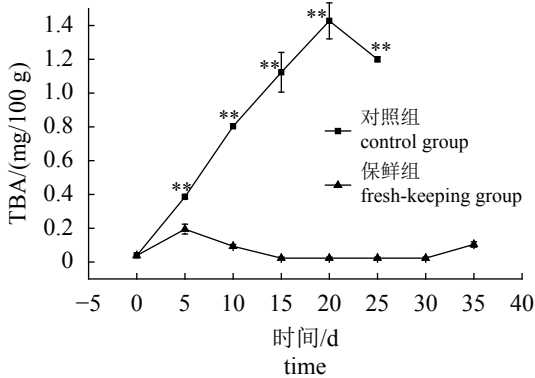


图5 不同处理方式对红鳍东方鲀贮藏过程中TBA的影响

Fig. 5 Changes in TBA of *T. rubripes* with different treatments during chilled storage

TBA值降低<sup>[29]</sup>。复合生物保鲜剂可以显著抑制脂肪酸的氧化,在贮藏35 d时TBA值仅为0.104 mg/100 g,在贮藏第5天时TBA值由上升转为下降趋势,可能是因为随着时间的延长,保鲜剂不断浸入到肉块内,从而进一步抑制了脂肪酸的氧化。

菌落总数及假单胞菌的变化 保鲜组的菌落总数和假单胞菌数极显著( $P<0.01$ )低于对照组,复合生物保鲜剂可以显著抑制微生物的增长(图6,图7)。在贮藏第5天时对照组和保鲜组的菌落总数和假单胞菌均出现了下降的趋势,说明冰温抑制了嗜冷菌的增长。随着时间的延长,微生物呈上升的趋势。在贮藏第15天时,对照组的菌落总数为5.20 lg(CFU/g),已超过食用上限[5.00 lg(CFU/g)]。而保鲜组的菌落总数在贮藏第30天时菌落总数才达5.24 lg(CFU/g),与预测值

5.50 lg(CFU/g)接近,复合生物保鲜剂可以显著延长红鳍东方鲀的货架期。无论是对照组还是保鲜组,假单胞菌均少于菌落总数,在贮藏第5天时保鲜组甚至没有检出假单胞菌,贮藏15 d时保鲜组的假单胞菌数[3.38 lg(CFU/g)]显著低于对照组[5.18 lg(CFU/g)]。在贮藏第30天时保鲜组的假单胞菌数仅为4.88 lg(CFU/g),而在贮藏25 d时对照组的假单胞菌数已达8.22 lg(CFU/g)。

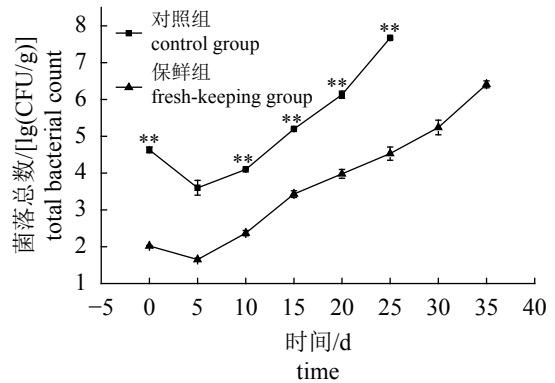


图6 不同处理方式对红鳍东方鲀贮藏过程中菌落总数的影响

Fig. 6 Changes in total bacterial count of *T. rubripes* with different treatments during chilled storage

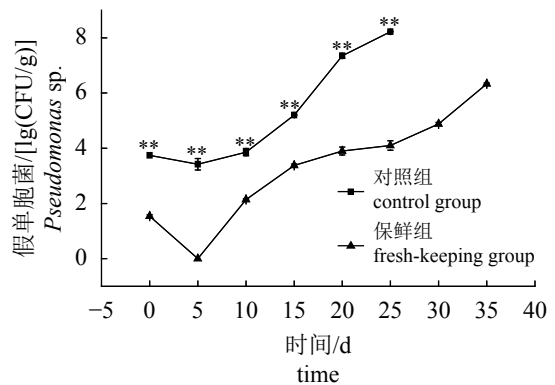


图7 不同处理方式对红鳍东方鲀贮藏过程中假单胞菌的影响

Fig. 7 Changes in *Pseudomonas* sp. of *T. rubripes* with different treatments during chilled storage

### 3 讨论

Box-Behnken实验设计响应面法可以准确优化复合生物保鲜剂中柠檬酸、百里酚和海藻酸钠三者的配比,二次多项式回归方程的相关系数 $R^2$ 为0.990 1,最优配比为0.68%柠檬酸、1.45%百里酚及1.94%的海藻酸钠。柠檬酸、百里酚及

海藻酸钠两两间的交互作用均极显著( $P < 0.01$ )。验证试验表明,该复合生物保鲜剂可以有效抑制微生物的生长,减缓TVB-N、TBA的产生速率,抑制pH的升高,减少汁液流失,比单因素<sup>[16]</sup>对红鳍东方鲀的保鲜效果更佳,可将冰温下红鳍东方鲀的货架期由15 d延长至30 d,是一种安全高效的保鲜剂。该复合生物保鲜剂克服了化学保鲜剂有害残留的缺点,增大了抑菌谱,具有很好的发展前景。为了探索更有效的保鲜技术,在今后的研究中期望通过和其他保鲜技术如气调、冷藏保鲜等的结合来提高对红鳍东方鲀的保鲜效果。

### 参考文献:

- [1] 吴容. 养殖暗纹东方鲀肉中特征性气味物质鉴定研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 13-14.  
Wu R. Identification of characteristic aroma-active compounds in meat of cultured puffer fish (*Takifugu obscurus*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 13-14(in Chinese).
- [2] 马妍, 谢晶, 周然, 等. 暗纹东方鲀在不同冻藏温度下品质变化的动力学研究[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 138-142.  
Ma Y, Xie J, Zhou R, et al. Quality degradation kinetics of *Takifugu obscurus* at different storage temperatures[J]. Journal of China Agricultural University, 2012, 17(1): 138-142(in Chinese).
- [3] 邓捷春, 王锡昌, 刘源. 暗纹东方鲀与红鳍东方鲀滋味成分差异研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 106-108.  
Deng J C, Wang X C, Liu Y. Study on difference of taste compounds between *Fugu obscurus* and *Fugu rubripes*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(3): 106-108(in Chinese).
- [4] 邓志科, 宫庆礼, 崔建洲, 等. 我国河豚鱼产业形势和发展战略[J]. 科学养鱼, 2006(3): 3-4.  
Den Z K, Gong Q L, Cui J Z, et al. Industrial situation and developing strategy of puffer in China[J]. Scientific Fish Farming, 2006(3): 3-4(in Chinese).
- [5] Honda S, Ichimaru S, Arakawa O, et al. Toxicity of puffer fish fins[J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2007, 48(5): 159-162.
- [6] 任西营. 生物保鲜剂在带鱼制品中的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014: 10-13.  
Ren X Y. Effects of bio-preservatives on the quality of hairtail product[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014: 10-13(in Chinese).
- [7] 张军宁. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)复合保鲜剂的研制及其抑菌机理初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 5-10.  
Zhang J N. Research on preparation and preliminary antibacterial mechanisms of compound preservative of *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012: 5-10(in Chinese).
- [8] 施建兵, 谢晶, 高志立, 等. 响应面法优化鲳鱼复合生物保鲜剂配方[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 37-42.  
Shi J B, Xie J, Gao Z L, et al. Optimization of complex biopreservatives to improve quality preservation of pomfret fillet by response surface methodology[J]. Food Science, 2014, 35(20): 37-42(in Chinese).
- [9] Li T T, Li J R, Hu W Z, et al. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3): 821-826.
- [10] 刘金昉, 刘红英, 齐凤生, 等. 复合生物保鲜剂结合冰温贮藏对南美白对虾的保鲜效果[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 286-290.  
Liu J F, Liu H Y, Qi F S, et al. Preservation effect of complex biological preservative combined with ice temperature storage on *Penaeus vannamei*[J]. Food Science, 2014, 35(20): 286-290(in Chinese).
- [11] 马妍, 谢晶, 周然, 等. 冷藏温度对河豚鱼微生物及品质特性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(6): 288-292.  
Ma Y, Xie J, Zhou R, et al. Effect of temperature on microbiological and quality properties of puffer fish during cold storage[J]. Food Science, 2012, 33(6): 288-292(in Chinese).
- [12] 马妍, 谢晶, 周然, 等. 冻藏温度对河豚鱼鱼肉微观结构及生化指标的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(5): 141-146.  
Ma Y, Xie J, Zhou R, et al. Effects of frozen storage temperature on ultrastructure and biochemical properties of *Takifugu obscurus*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2014, 42(5): 141-146(in Chinese).
- [13] 周然, 刘源, 谢晶, 等. 电解水对冷藏河豚鱼肉质构及品质变化的影响[J]. 农业工程学报, 2011, 27(10): 365-369.  
Zhou R, Liu Y, Xie J, et al. Effects of electrolyzed water

- on texture and quality of obscure puffer fish (*Takifugu obscurus*) during cold storage[J]. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(10): 365-369(in Chinese).
- [14] 马妍, 谢晶, 周然, 等. 不同取代羧甲基壳聚糖对冷藏河豚鱼品质的影响[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(15): 3131-3135.  
Ma Y, Xie J, Zhou R, *et al.* Effects of different substituent of carboxymethyl chitosan on cold stored puffer fish quality[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2011, 50(15): 3131-3135(in Chinese).
- [15] 周然, 刘源, 谢晶, 等. 羧甲基壳聚糖涂膜保鲜冷藏河豚鱼品质的机理[J]. *制冷学报*, 2011, 32(6): 64-68.  
Zhou R, Liu Y, Xie J, *et al.* Preservation mechanism of carboxymethyl chitosan coating on puffer fish quality during cold storage[J]. *Journal of Refrigeration*, 2011, 32(6): 64-68(in Chinese).
- [16] 苏红, 张晓梅, 郭芮, 等. 4种生物保鲜剂结合冰温贮藏对红鳍东方鲀的保鲜效果[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(3): 276-280.  
Su H, Zhang X M, Guo R, *et al.* Preservation effect of four kinds of biological preservatives combined with ice temperature storage on *Takifugu rubripes*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(3): 276-280(in Chinese).
- [17] 齐凤生, 刘红英, 吴雪丽, 等. 生物保鲜剂对冷藏海湾扇贝柱品质的影响[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(7): 73-79.  
Qi F S, Liu H Y, Wu X L, *et al.* Effect of biological preservatives on quality of *Argopecten irradians* during refrigeration[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(7): 73-79(in Chinese).
- [18] 李敬, 王小瑞, 刘红英, 等. 气调包装对大菱鲆的冷藏保鲜效果[J]. *食品科学*, 2016, 37(22): 313-317.  
Li J, Wang X R, Liu H Y, *et al.* Effect of modified atmosphere packaging on quality preservation of *Scophthalmus maximus* during cold storage[J]. *Food Science*, 2016, 37(22): 313-317(in Chinese).
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.228-2016食品安全国家标准-食品中挥发性盐基氮的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
National health and family planning commission of the People's Republic of China. GB 5009.228-2016 National food safety standard Determination of the total volatile basic nitrogen in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017(in Chinese).
- [20] Li J K, Hui T, Wang F L, *et al.* Chinese red pepper (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) leaf extract as natural antioxidants in salted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in dorsal and ventral muscles during processing[J]. *Food Control*, 2015, 56: 9-17.
- [21] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
National health and family planning commission of the People's Republic of China, National administration of food and drug. GB 4789.2-2016 National food safety standard Food microbiological examination Determination of the aerobic plate count[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017(in Chinese).
- [22] Guo X, Zou X, Sun M. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(2): 344-349.
- [23] 蒲立柠, 陈光静, 阚建全. 响应面试验优化青稞麸皮薏仁红曲霉发酵工艺[J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 264-270.  
Pu L N, Chen G J, Kan J Q. Optimization of fermentation process of a mixture of highland barley bran and coix seed by *Monascus purpureus* using response surface methodology[J]. *Food Science*, 2017, 38(2): 264-270(in Chinese).
- [24] Yu J L, He J L, Yu X, *et al.* Study on optimum combination of Nisin, tea polyphenols and chitosan in preservation of chilled mutton using response surface methodology[J]. *Food Science*, 2008, 29(12): 712-716.
- [25] Gisela G, Leonardo A E, Lucia P, *et al.* Enhancement of the viability of *Lactobacillus plantarum* during the preservation and storage process based on the response surface methodology[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5(18): 1746-1755.
- [26] 王大为, 张颖, 秦宇婷, 等. 响应面试验优化微波辅助制备玉米蛋白膜工艺及其形态结构分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(10): 28-33.  
Wang D W, Zhang Y, Qin Y T, *et al.* Optimization of microwave-assisted preparation of zein film using



- response surface methodology and its morphological structure[J]. *Food Science*, 2016, 37(10): 28-33(in Chinese).
- [27] 牛宝卫. 大菱鲆冰温气调保鲜技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 31-40.
- Niu B W. Research on preservation technology of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) with controlled freezing-point and modified atmosphere packaging[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009: 31-40(in Chinese).
- [28] 孙群. 肉制品脂类氧化: 硫代巴比妥酸试验测定醛类物质[J]. *食品科学*, 2002, 23(8): 331-334.
- Sun Q. Eview on lipid oxidation in meat by TBA test for aldehyde formation[J]. *Food Science*, 2002, 23(8): 331-334(in Chinese).
- [29] 吴雪丽. 生物保鲜剂对扇贝保鲜效果的研究及货架期模型的建立与评价[D]. 保定: 河北农业大学, 2014: 25-32.
- Wu X L. Study on freshness preservation of Biological preservatives and shelf-life model establishment and evaluation for scallop[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2014: 25-32(in Chinese).

## Preservation effect of complex biological preservative combined with ice temperature storage on *Takifugu rubripes*

SU Hong<sup>1</sup>, SHEN Liang<sup>2</sup>, BI Shijie<sup>1</sup>, ZHANG Xiaomei<sup>1</sup>, GUO Rui<sup>1</sup>, LIU Hongying<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China;

2. Ocean College of Hebei Agricultural University, Qinhuangdao 066000, China)

**Abstract:** The aim of this paper was to optimize complex biological preservatives consisting of citric acid, thymol and sodium alginate using three-variable, three-level Box-Behnken design to prolong the shelf life of *Takifugu rubripes*. A quadratic polynomial regression model was established with total plate counts as the response value. The preservation effects of complex biological preservatives were verified by measuring pH, drip loss, TVB-N, TBA, total plate counts and *Pseudomonas* sp.. The result showed that the optimal ratio of the complex biological preservatives at ice temperature is as follows: 0.68% citric acid, 1.45% thymol and 1.94% sodium alginate. In that condition, the lowest total plate count was 5.50 lg (CFU/g) on the 30th day. What's more, citric acid and thymol, citric acid and sodium alginate, as well as thymol and sodium alginate had a significant interactive effect. The optimal complex biological preservatives could significantly inhibit the growth of microorganisms, and reduce the contents of TVB-N and TBA. It was proved that the complex biological preservatives could effectively delay the deterioration of *T. rubripes*, prolonging the shelf life of 15 d to 30 d.

**Key words:** *Takifugu rubripes*; complex biological preservative; preservation; response surface methodology; citric acid; thymol; sodium alginate

**Corresponding author:** LIU Hongying. E-mail: liu066000@sina.com

**Funding projects:** "Two-class" Construction Funding Project of Food Science and Engineering in Hebei Province (2016SPGCA18); New Key Technologies for Food Processing and Packaging Materials Development (17227117D)