

乳酸链球菌素在中式腊肠防腐保鲜中的应用

刘琨毅¹, 王琪^{1,*}, 郑佳², 袁华伟³, 周书来⁴

(1. 宜宾职业技术学院, 宜宾 644003; 2. 五粮液集团技术研究中心, 宜宾 644000;
3. 宜宾学院, 宜宾 644000; 4. 乐山职业技术学院, 乐山 614000)

摘要: 为确定乳酸链球菌素对中式腊肠原料肉减菌化处理的最佳工艺条件, 在单因素试验的基础上, 以菌落总数为指标, 响应面法优化其减菌化条件。结果表明, 乳酸链球菌素对中式腊肠原料肉减菌化处理的最佳工艺条件: 乳酸链球菌素溶液浓度 0.26‰、溶液 pH 3.89、处理温度 22℃、处理时间为 21 min, 在此条件下中式腊肠原料肉的菌落总数可降至 5.41 lg (cfu/g)。

关键词: 乳酸链球菌素; 中式腊肠; 响应面法

中图分类号: S482.2+94/TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513 (2018) 02-0144-06

Application of nisin in preservation of Chinese sausage

LIU Kun-yi¹, WANG Qi^{1,*}, ZHENG Jia², YUAN Hua-wei³, ZHOU Shu-lai⁴

(1. Yibin Vocational and Technical College, Yibin 644003; 2. Technical Research Center, Wuliangye Group Co. Ltd., Yibin 644000; 3. Yibin University, Yibin 644000; 4. Leshan Vocational and Technical College, Leshan 614000)

Abstract: Based on the single-factor test, and having total numbers of colony as the index, the bacteria-reduction conditions of nisin were optimized by response surface method. The results showed that the optimal bacteria-reduction conditions of nisin were: nisin concentration was 0.26 ‰, solution pH was 3.89, processing temperature was 22 °C and processing time was 118 min. Under the optimal conditions, the minimum total numbers of colony in raw meat for Chinese sausage was 5.41 lg (cfu/g).

Key words: nisin; Chinese sausage; response surface methodology

乳酸链球菌素 (Nisin) 是一种多肽类物质, 具有高效且安全的生物防腐功能^[1-4]。在乳制品、肉制品、果蔬和罐头食品中得到了广泛的应用^[5-7]。Nisin 在人体内很快被降解, 不会引起抗药性问题, 也不会改变人体内的正常菌群, 联合国粮食及农业组织/世界卫生组织 (FAO/WHO) 食品添加剂联合专家委员会确认乳酸链球菌素可

作为食品防腐剂^[8-11]。

中式腊肠是我国传统腌腊肉制品之一, 以其独特的风味深受广大消费者欢迎。传统中式腊肠历史悠久, 但因其存在着生产周期长、产品含盐量高、过于油腻、脂肪氧化严重和保质期较短等问题, 在一定程度上限制了传统中式腊肠的消费人群^[12-14]。所以, 开发安全性高且有利于健康

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 肉类加工四川省重点实验室开发基金 (17-R-06)。

作者简介: 刘琨毅 (1987-), 男, 硕士, 研究方向: 食品发酵; E-mail: liukunyi799@qq.com。

*通信作者: 王琪 (1989-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 分析检测技术; E-mail: rodmanben@foxmail.com。

的中式腊肠是传统中式肉制品的发展趋势^[15, 16]。为此, 在中式腊肠中添加 Nisin 来以期达到抑制中式腊肠加工过程中有害菌的活力及减少杀菌前有害菌数量的目的。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

乳酸链球菌素 (Nisin): 辽宁中科生物工程有限公司, 质量符合 GB 2760-2014^[17] 中乳酸链球菌素的相关要求; 鲜肉及香料: 购于宜宾新农村农贸市场, 符合卫生要求; 肠衣: 人造胶原蛋白肠衣 (口径: 38mm), 河北顺平肠衣基地。

1.2 仪器与设备

BS210S 型电子分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; PHs-3c 型精密 pH 计, 上海理达仪器厂; 101C-3B 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海市崇明试验仪器厂; XW-80A 漩涡混合器, 云南科仪化玻有限公司; RS-JR80A 型多功能灌肠机, 合肥荣事达小家电有限公司。

1.3 中式腊肠工艺流程

原料肉预处理 (Nisin 溶液处理) → 绞碎 → 混合拌料 → 腌制 → 灌肠 → 脱水 → 风干 → 真空包装 → 成品。

操作要点: 原料猪肉切成 8 ~ 10mm 的肉丁, 将其放入一定浓度的 Nisin 溶液中, 根据试验调整溶液的 pH 及温度后处理 6 ~ 24 min, 然后清洗待用; 按肥瘦质量比为 1 : 4 混匀后斩拌, 加入配料 (白糖 7.5%、盐 3%、生姜 0.15%、味精 0.2%、五香粉 0.1%); 按照单根肠长度 18 ~ 20cm、直径 4.2 ~ 4.5cm、灌注 100g 原料肉, 结扎后分别于 40℃ 条件下脱水 24h; 然后在 15℃ 晾挂自然风干 3d, 真空包装后即成为成品。

1.4 试验方法

1.4.1 平板计数

将经过 Nisin 溶液处理后的中式腊肠原料肉块浸入蒸馏水中并停留 1 min 以上, 按照 ISO 6887-1-2003^[18] 制备初悬液和进一步的 10 倍稀释液。根据 GB/T 4789.2-2010^[19], 选取合适稀释度的稀释液涂布于 PCA 平板上^[20], 30℃ 恒温培养 72 h, 然后进行菌落总数计数。

1.4.2 Nisin 溶液对中式腊肠原料肉减菌化处理的单因素试验

Nisin 溶液浓度对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响: 调整 Nisin 溶液 pH 为 4.0, 控制处理温度 28℃ 及处理时间 15 min, 考察中式腊肠原料肉经过 Nisin 溶液浓度分别为 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%、0.35% 处理后的菌落总数。

溶液 pH 对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响: 控制处理条件为 Nisin 溶液浓度 0.30%, 处理温度 28℃, 处理时间 15 min, 分别记录在 Nisin 溶液 pH 为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 及 5.5 时利用 Nisin 溶液处理中式腊肠原料肉后的菌落总数。

处理温度对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响: 使 Nisin 溶液浓度、溶液 pH 及处理时间分别稳定在 0.30%、pH 为 3.5、15 min, 记录处理温度分别为 19℃、22℃、25℃、28℃、31℃、34℃、37℃ 时利用 Nisin 溶液处理中式腊肠原料肉后的菌落总数。

处理时间对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响: 控制 Nisin 溶液浓度为 0.30%、溶液 pH 为 3.5 及处理温度为 25℃, 记录处理时间分别为 6 min、9 min、12 min、15 min、18 min、21 min 及 24 min 时利用 Nisin 溶液处理中式腊肠原料肉后的菌落总数。

1.4.3 响应面法优化中式腊肠原料肉减菌化处理的最佳工艺条件

在单因素试验的基础上, 根据 Box-Behnken^[21] 的中心组合实验设计原理, 进行四因素三水平的响应面分析实验, 确定 Nisin 溶液对中式腊肠原料肉减菌化处理的最佳工艺条件, 因素水平如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素水平

Table 1 Level and code of independent variable used for response surface analysis

水平	Nisin 溶液浓度 /%	溶液 pH	处理温度 /℃	处理时间 /min
-1	0.25	3.0	22	15
0	0.30	3.5	25	18
1	0.35	4.0	28	21

1.5 数据分析处理方法

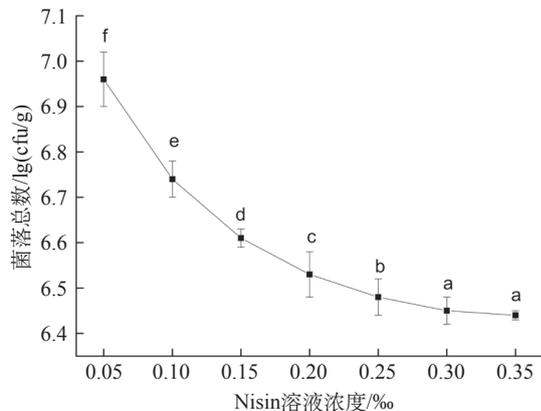
以上每个试验重复3次,结果取平均值。采用 OriginLab.OriginPro 9.1 软件进行数据制图和统计分析; Design Expert 8.0.6 软件进行响应面设计及结果分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 Nisin 溶液浓度对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响

控制处理条件为溶液 pH 4.0、处理温度 28 ℃、处理时间 15 min,考察在 Nisin 溶液浓度为 0.05‰ ~ 0.35‰ 时,利用 Nisin 溶液处理中式腊肠原料肉后的菌落总数。由图 1 可知,随着 Nisin 溶液浓度增加中式腊肠的菌落总数逐渐降低,当 Nisin 溶液浓度为 0.35‰ 时菌落总数达到最低,为 $6.44 \pm 0.02 \lg(\text{cfu/g})$ 。由于中式腊肠原料肉分别在 Nisin 溶液浓度为 0.30‰ 与 0.35‰ 处理后的菌落总数无显著性差异 ($P > 0.05$),因此选择 Nisin 溶液浓度为 0.25‰ ~ 0.35‰ 用于后续试验。



不相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。
Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), the same below.

图 1 Nisin 溶液浓度对菌落总数的影响

Fig. 1 Effect of Nisin concentration on the total number of bacteria colonies

2.1.2 溶液 pH 对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响

控制处理条件为 Nisin 溶液浓度 0.30‰、处理温度 28 ℃、处理时间 15 min,记录在 Nisin 溶

液 pH 为 2.5 ~ 5.5 时利用 Nisin 溶液处理中式腊肠原料肉后的菌落总数。由图 2 可知,当 Nisin 溶液 pH 在 2.5 ~ 3.5 范围内时,中式腊肠原料肉的菌落总数随着 pH 的升高而降低,最低时到达 $6.40 \pm 0.01 \lg(\text{cfu/g})$; 当 Nisin 溶液 pH 在 3.5 ~ 5.5 范围内时,中式腊肠原料肉的菌落总数随着 pH 的升高而升高。因此 Nisin 溶液减菌化处理中式腊肠原料肉的最适 pH 在 3.5 左右。

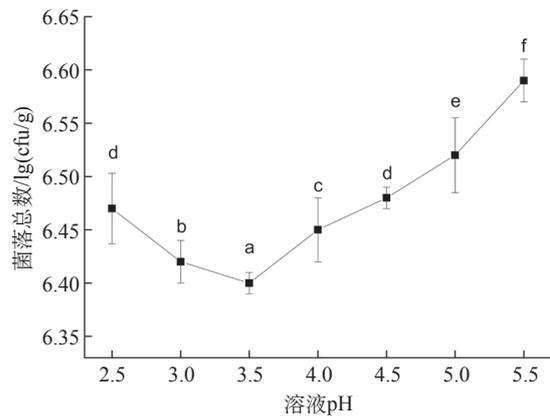


图 2 pH 对菌落总数的影响

Fig. 2 Effect of pH on the total number of bacteria colonies

2.1.3 处理温度对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响

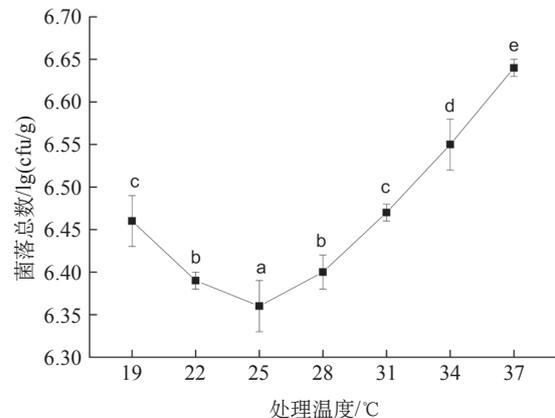


图 3 处理温度对菌落总数的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the total number of bacteria colonies

使 Nisin 溶液浓度、溶液 pH 及处理时间分别稳定在 0.30‰、pH 为 3.5、15 min,考察在 Nisin

溶液处理温度为 19 ~ 37 ℃ 时利用 Nisin 溶液处理中式腊肠原料肉后的菌落总数。由图 3 可知, Nisin 溶液减菌化处理中式腊肠原料肉的最适温度在 25 ℃ 左右, 处理温度低于或高于 25 ℃ 时, 利用 Nisin 溶液减菌化处理中式腊肠原料肉后的菌落总数均高于 6.35 lg (cfu/g)。

2.1.4 处理时间对中式腊肠原料肉减菌化处理的影响

控制处理条件为 Nisin 溶液浓度 0.30 ‰、溶液 pH 3.5、处理温度 25 ℃, 考察在 Nisin 溶液处理时间为 6 ~ 24 min 时利用 Nisin 溶液处理中式腊肠原料肉后的菌落总数。由图 4 可知, 当 Nisin 溶液处理时间在 18 min 以内变化时, 随着 Nisin 溶液处理时间的延长中式腊肠原料肉的菌落总数逐渐降低, 最低时达到了 6.32 ± 0.01 lg (cfu/g)。当 Nisin 溶液处理时间继续延长之后, 中式腊肠原料肉的菌落总数虽有变化但不显著 ($P > 0.05$)。因此选择 Nisin 溶液处理时间为 15 ~ 21 min 用于后续试验。

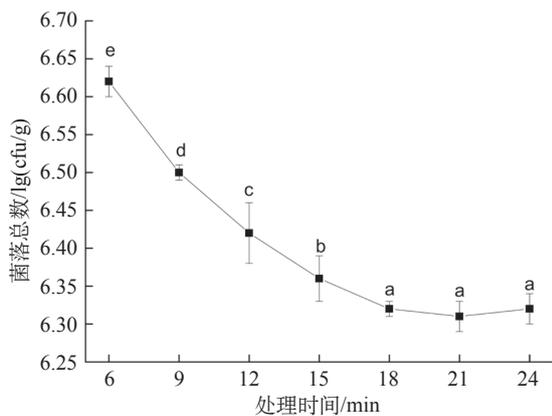


图 4 处理时间对菌落总数的影响

Fig. 4 Effect of time on the total number of bacteria colonies

2.2 响应面实验

通过响应面法对 Nisin 溶液浓度、溶液 pH、处理温度、处理时间 4 个因素分析得到以下试验方案及结果见表 2。

通过 Design-Expert 8.0 软件对表 2 的数据进行分析, 得到结果如表 3 所示。由表 3 可知: 处理时间 ($P < 0.01$) 和处理温度 ($P < 0.05$) 对菌落总数影响显著。以中式腊肠原料肉中菌落总

数为响应值, 经回归拟合后, 得到回归方程:

$$\begin{aligned} \text{菌落总数} = & 6.02 + 0.071A - 0.010B + 0.17C + 0.090D \\ & + 0.063AB + 0.015AC - 0.01AD - 0.018BC - 0.045BD \\ & + 0.055CD - 0.074A^2 - 0.11B^2 - 0.11C^2 - 0.19D^2 \end{aligned}$$

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

序号	A: Nisin 溶液浓度	B: 溶液 pH	C: 处理温度	D: 处理时间	菌落总数 / lg (cfu/g)
1	1	0	0	1	5.98
2	0	0	-1	-1	5.43
3	0	0	0	0	6.03
4	1	0	0	-1	5.64
5	0	0	1	1	6.02
6	0	0	0	0	6.03
7	1	-1	0	0	5.82
8	0	-1	0	-1	5.72
9	0	0	0	0	6.05
10	0	-1	1	0	6.10
11	-1	0	1	0	5.83
12	-1	-1	0	0	5.81
13	0	1	1	0	6.02
14	0	0	-1	1	5.57
15	1	1	0	0	5.90
16	-1	0	0	-1	5.59
17	0	1	0	1	5.68
18	1	0	-1	0	5.85
19	0	-1	0	1	5.74
20	0	0	1	-1	5.66
21	-1	1	0	0	5.64
22	0	1	-1	0	5.62
23	0	1	0	-1	5.84
24	-1	0	-1	0	5.62
25	0	0	0	0	5.99
26	0	0	0	0	6.04
27	1	0	1	0	6.12
28	0	-1	-1	0	5.63
29	-1	0	0	1	5.97

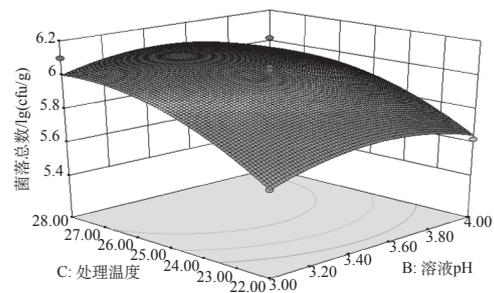
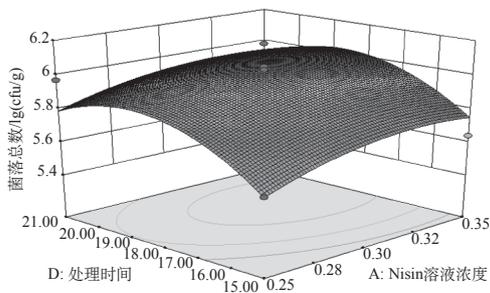
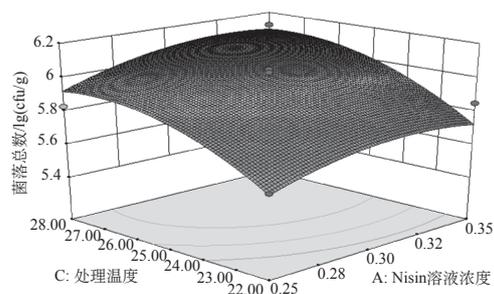
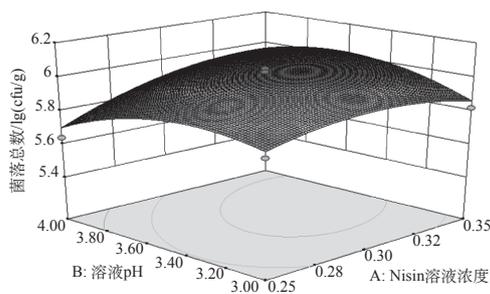
表3 方差分析
Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.84	14	0.060	4.09	0.0063	显著
A	0.060	1	0.060	4.11	0.0620	
B	0.0012	1	0.0012	0.082	0.7788	
C	0.34	1	0.34	23.46	0.0003	
D	0.097	1	0.097	6.64	0.0220	
AB	0.016	1	0.016	1.07	0.3191	
AC	0.0009	1	0.0009	0.061	0.8078	
AD	0.0004	1	0.0004	0.027	0.8711	
BC	0.0012	1	0.0012	0.084	0.7766	
BD	0.0081	1	0.0081	0.55	0.4693	
CD	0.012	1	0.012	0.83	0.3787	
A ²	0.036	1	0.036	2.43	0.1412	
B ²	0.072	1	0.072	4.92	0.0437	
C ²	0.081	1	0.081	5.52	0.0340	
D ²	0.23	1	0.23	16.05	0.0013	
残差	0.20	14	0.015			
失拟项	0.18	10	0.018	3.34	0.1282	不显著
纯误差	0.022	4	0.0055			
总离差	1.04	28				

根据表3中方差分析结果,菌落总数的回归方程描述与响应面值之间的关系模型显著 ($P < 0.05$),且失拟项检验不显著 ($P > 0.05$),表明该试验模型充分拟合试验数据,菌落总数的回归方程是菌落总数与减菌化工艺各参数的合适数学模型,即可以利用此回归方程确定 Nisin 减菌效果的最佳工艺。

响应面图形是响应值对各试验因子所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用^[22]。根据菌落总数回归方程得出不同因子的响应面分析图结果见图1。由图1可较直观地看出各因素交互作用对菌落总数的影响,若曲线越陡峭,则表明该因素对菌落总数的影响越大^[23]。从图5可以看出因子C(处理时间)对菌落总数的影响最大,因子D(处理温度)次之,与表3方差分析结果相吻合,处理时间和处理温度二者对应的P值均小于0.05,均达到了显著水平。

通过软件分析确定 Nisin 溶液对中式腊肠原料肉最佳减菌化工艺为 Nisin 溶液浓度 0.26%、溶液 pH 3.89、处理温度 22℃、处理时间为 21 min,此条件下由公式算出的理论值为 5.41 lg (cfu/g)。根据所得的分析数据进行三组验证实验,得菌落总数为 5.36 lg (cfu/g),测定结果稳定,偏差不大,证明该结果合理可靠。



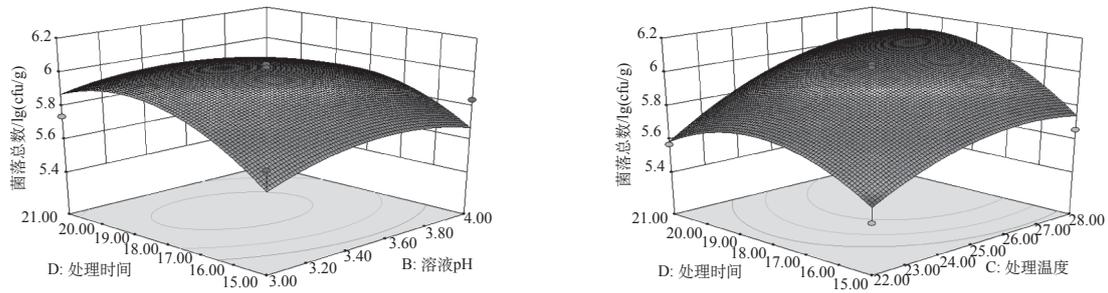


图 5 两因素交互作用对菌落总数的响应面图

Fig. 5 Response surface plots for the effect of operating parameters on the total number of bacteria colonies

与未经过 Nisin 溶液处理的中式腊肠原料肉的 6.91 lg (cfu/g) 菌落总数相比, 经 Nisin 溶液最佳减菌化工艺处理后中式腊肠原料肉的菌落总数下降了 22.4%, 且符合 GB/T 23493-2009^[24] 中式香肠原料肉菌落总数应低于 7.00 lg (cfu/g) 的相关要求。

3 结论

在单因素试验的基础上用响应面法对利用乳酸链球菌素 (Nisin) 来抑制中式腊肠原料肉中有害菌数量的工艺条件进行了优化, 并确定了其最优工艺条件为: Nisin 溶液浓度 0.26‰、溶液 pH 3.89、处理温度 22℃、处理时间为 21 min, 此条件下中式腊肠原料肉的菌落总数可降为 5.41 lg (cfu/g)。

参考文献:

- [1] 姜爱丽, 胡文忠, 崔晓亭, 等. 温度及乳酸链球菌素对单增李斯特菌的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2015, 36 (15): 157-160.
- [2] 鲁吉珂, 黎业娟, 吴霄, 等. 有机溶剂沉淀法提取乳酸链球菌素的效果 [J]. 食品科学, 2012, 33 (10): 84-86.
- [3] 李伟丽, 赵超, 车建途, 等. 腐败醋中微生物的分离鉴定及乳酸链球菌素对其抑制作用 [J]. 食品科学, 2015, 36 (1): 174-178.
- [4] 申军士, 刘壮, 陈亚迎, 等. 乳酸链球菌素对瘤胃体外发酵、甲烷生成及功能菌群数量的影响 [J]. 微生物学报, 2016, 56 (8): 1348-1357.
- [5] 王莉嫦. 乳酸链球菌素在鸡汁鲍鱼罐头中的应用 [J]. 食品与机械, 2013, 29 (4): 174-175.
- [6] 温斯颖, 韩衍青, 方东路, 等. 超高压协同乳酸链球菌素抑制低温火腿中的耐压腐败菌 [J]. 食品工业科技, 2012, 33 (1): 59-62.
- [7] 倪珊珊, 黄丽英. 乳酸链球菌素和乳酸乳球菌在食品工业中

- 的应用 [J]. 食品工业, 2015, 36 (11): 244-247.
- [8] 周斌, 陈立业, 王甜, 等. 响应面法优化乳酸链球菌素发酵培养基成分 [J]. 中国酿造, 2012, 31 (10): 150-152.
- [9] 杜琨. 乳酸链球菌素的稳定性及抑菌特性研究 [J]. 食品工业, 2012 (1): 99-101.
- [10] 汤凤霞, 蔡慧农. 微生物防腐剂 Nisin 的研究与应用 [J]. 食品科技, 2002 (11): 46-48.
- [11] 任璐雅, 杨艳艳, 章检明, 等. 乳酸菌抗菌肽 (细菌素) 抗菌机理的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2015 (1): 143-149.
- [12] 黄爱兰, 王志威, 玄夕龙, 等. 复合添加剂对中式腊肠品质的影响 [J]. 安徽科技学院学报, 2015, 29 (6): 87-93.
- [13] 郑琳, 孙梦涵, 赵丹阳, 等. 香肠加工技术的研究进展 [J]. 农产品加工, 2013 (9): 60-62, 65.
- [14] 章林, 黄明, 周光宏. 天然抗氧化剂在肉制品中的应用研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33 (7): 299-303.
- [15] 安攀宇. 低脂低钠传统中式香肠的研究 [D]. 昆明: 云南农业大学硕士论文, 2012.
- [16] 张景伟. 中式香肠发酵工艺及成熟技术研究 [D]. 天津: 商业大学硕士论文, 2010.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB2760-2014 食品安全国家标准. 食品添加剂使用标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [18] ISO 6887-1-2003 食品和动物饲料制品微生物学. 试样准备及用于微生物检验的初始悬浮液和十倍制稀释液. 初始悬浮液和十倍制稀释 [S]. 国际标准化组织, 2003.
- [19] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.2-2010 食品卫生微生物学检验. 菌落总数测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [20] 黄艳杰. 传统腊肉制品减菌化加工工艺和保鲜技术的研究 [D]. 南昌: 南昌大学硕士论文, 2014.
- [21] 侯学敏, 李林霞, 张直峰, 等. 响应面法优化薄荷叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2013, 34 (6): 124-128.
- [22] 姚笛, 马萍, 王颖, 等. 响应面法优化玉米芯中木聚糖的提取工艺 [J]. 食品科学, 2011, 32 (8): 111-115.
- [23] 贺寅, 王强, 钟葵. 响应面优化酶法提取龙眼多糖工艺 [J]. 食品科学, 2011, 32 (2): 79-83.
- [24] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23493-2009 中式香肠 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.