

蛋白质资源开发、种植，用于食品工业和饲料工业。

参考文献

〔1〕 中国医学科学院卫生研究所：食物成分表，第2

版，人民卫生出版社，1977：6—301。

〔2〕 武汉医学院主编：营养与食品卫生学，人民卫生出版社，北京，1985。

〔3〕 愿文盛：食品常用数据手册，中国食品出版社，北京，1987：466。

Nisin 及其在食品防腐方面的应用

中国科学院微生物研究所 陶 勇

一、Nisin——一种天然的食品防腐剂

Nisin即乳酸链球菌素，是某些乳酸链球菌(*Streptococcus Lactis*)合成的一种多肽抗菌素。1947年Mattick等制备出这种多肽，并命名为：Nisin(Group N inhibitory substance)，引起食品微生物学家的关注。1951年Hirsch等首先将Nisin用作食品防腐剂，成功地控制了肉毒梭菌引起的埃门塔尔奶酪(Emmental Cheese)的膨胀腐败，Nisin作为食品防腐剂很快为西欧国家接受。1969年FAO/WHO食品添加剂联合专家委员会给予了Nisin作为食品防腐剂的国际性承认，70年代至今东欧国家如波兰、苏联及许多第三世界国家印度、埃及等也纷纷利用Nisin作为食品防腐剂。

我国食品防腐剂品种少，与国外先进技术相差很大。Nisin作为天然的防腐剂，有许多优点，相信会成为我国食品防腐剂的一个成员，所以有必要对Nisin的性质和应用方面作一些介绍。

二、Nisin 的性质

1. 物理化学性质

Nisin是乳酸链球菌分泌的多肽抗菌素，由34个氨基酸残基组成，分子量3510道尔顿，活性分子常是二聚体或四聚体。Nisin中含有5个不同于其他蛋白质的二硫键(硫氨酸和甲基硫氨酸)，另外还含有脱氢丙氨酸等不饱和氨基酸。

Nisin的水溶性依赖于溶液的pH值。pH2.5时溶解度为12%，pH5.0时下降到4%，Ni-

sin在中性和碱性条件下几乎不溶解，应用时要用0.02N盐酸溶解，再加入食品中。

Nisin的热稳定性与其溶解性相关，在pH2.0或更低的稀盐酸中可以经115.6°C灭菌而不失活，但在pH5.0灭菌时失活40%，pH6.8时将丧失90%的活力。Nisin加入食品后，稳定性大大地提高。

2. 杀菌和防腐作用

Nisin是窄谱抗菌素，它只能杀死或抑制革兰氏阳性细菌，对阴性菌、酵母和霉菌均无作用。Nisin的抗菌效果很强，一般400Units/ml(为10ppm Nisin)可以杀死绝大多数革兰氏阳性细菌。

Nisin不能杀死细菌孢子，但当孢子发芽膨胀时Nisin敏感而被杀死。Nisin主要是作为阳离子表面活性剂影响细菌胞膜和抑制革兰氏阳性菌的胞壁质合成来杀死细菌的。

有许多因素影响Nisin的杀菌效果。包括腐败菌的种类、菌龄和菌数、周围介质以及Nisin最初溶解的溶液。一般来说，Nisin最好的溶剂为0.02N盐酸。乳制品、罐头食品及一些乙醇饮料中的腐败生物及致病菌大部分可被Nisin杀死或抑制。

乳制品中致病菌如金黄色葡萄球菌、溶血链球菌、肉毒梭菌等；啤酒中如乳杆菌、明串珠菌等，这些菌对Nisin都很敏感。罐头中的腐败微生物及对Nisin的敏感情况见附表。

从上表可以看出罐头食品的腐败微生物大部分可以用Nisin来抑制，但不能解决所有的微生物腐败问题，如酵母、霉菌引起的腐败只能依靠其他方法解决。

罐头食品中的腐败微生物

微 生 物 属	耐酸情形 (pH)	耐温情形 和孢子形成	腐败类型	Nisin
嗜热脂肪芽孢杆菌	≥ 5.6	高温孢子	平 酸	敏感
热解链梭菌	≥ 4.5	高温孢子	膨 罐	敏感
致黑梭菌	5.3	高温孢子	硫 臭	敏感
肉毒梭菌	≥ 4.8	中温孢子	产毒素腐烂	敏感
生孢梭菌	≥ 4.8	中温孢子	腐 烂	敏感
凝结芽孢杆菌	4.6	高温孢子	平 酸	敏感
多粘芽孢杆菌	< 4.6	中温孢子	膨 罐	敏感
软化芽孢杆菌	< 4.6	中温孢子	膨 罐	敏感
巴氏梭菌	4.0~4.6	中温孢子	膨 罐	敏感
乳杆菌属	3.7~4.5	中温非孢子	发 酵	敏感
明串珠菌属	3.7~4.5	中温非孢子	发 酵	敏感
酵母和霉菌	≤ 5.7		膨罐, 酸臭	不敏感

Nisin 与热处理杀菌作用是互相促进的, 加入少量 Nisin (0.25~10ppm) 可以大大提高腐败微生物的热敏感性。同样热处理也提高了细菌对 Nisin 的热敏感性。加入 Nisin 后进行食品的商业性杀菌已成为许多国家改善罐头食品及乳制品等营养价值和感官的一种手段。另外, 辐照处理和 Nisin 相结合, 山梨酸与 Nisin 配合使用等方法可弥补抗菌谱的缺点, 而发挥广泛的防腐作用。

三、Nisin 使用的安全性和合法性

1. 安全性

人们可能在开始食用乳制品时就无意识地摄取了 Nisin, 因为它是乳酸链球菌的天然产物, 在乳制品中含有产生 Nisin 的菌株, 但没有发生影响人类健康的事件。当然, 这并不能说明 Nisin 是完全无毒的, 尤其是在摄取的数量方面。

人们在利用 Nisin 的同时对其安全性进行了系统的研究。1959年, 英国食品防腐剂委员会证实了在牛奶和干酪中自然存在有不同数量的 Nisin。1962年日本的 Hara 等证实, Nisin 对鼠的半致死量 LD₅₀ 约为 7000mg/千克体重, 与

普通盐的 LD₅₀ 相近。同年, 英国的 Greer 等用大剂量(超过正常剂量1000倍以上)长期饲养的方法证实, 在正常剂量下, Nisin 的应用是安全的。英国和苏联的商业部门对其生产的 Nisin 进行了广泛的毒性和生物学研究, 其中包括致癌性、存活性、再生性、血液化学、肾功能、脑功能、应激反应及动物器官病理学等的研究, 结果表明 Nisin 是安全的。由于不同防腐剂结合使用可能引起更大的毒性, Shtenberg 等证明了 Nisin 与山梨酸配合使用也是安全的。

Nisin 是多肽物质, 食用后在消化道很快被蛋白水解酶消化成氨基酸, 因而不会改变肠道内的正常菌群的存活。抗菌素交叉抗性研究表明 Nisin 与其他医用抗菌素如青霉素、链霉素、红霉素等都无交叉抗性, Nisin 也不会诱导出细菌对这些抗菌素的抗性, Nisin 是目前世界上唯一允许使用在食品防腐方面的抗菌素。

2. 合法性:

1959年, 英国首先允许 Nisin 作为食品防腐剂使用, 以后制订出许多具体的规则, 如使用时不限制数量、不需在包装上标明, 但限制用于干酪、凝结乳酪、高酸罐头及杀死肉毒核菌的其他罐头。

1969年, FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会对 Nisin 作为食品添加剂给予了国际性承认, 认为 Nisin 应用应该被考虑为可以接受的, 其无条件平均日摄入量(ADI) 为 0~330,000 Units/千克体重, 即 ADI 为 0~0.825mg/千克体重(1 μ g 纯 Nisin 为 40 国际单位); 也即一名 70 千克体重的人一天食用含 10ppm 浓度(足以杀死细菌)的 5.8 千克食品才能达到这个标准。

目前有 30 多个国家制定了法律允许 Nisin 作为食品防腐剂使用, 这些法规主要在添加数量和所适用食品的范围有不同规定。有不少国家对数量没有限制(如英国、澳大利亚、法国等), 几乎所有国家允许 Nisin 用于干酪(联邦德国除外), 大多数国家允许在乳制品、罐头及饮料方面使用。

1954年美国有人用 Nisin 防止了干酪的肉毒梭菌引起的腐败, 1969年有人向美国食品及

药物管理局(FDA)申请Nisin的使用,遭拒绝,ADF1988年终于接受了,并确定为公认无毒产品(GRAS)。美国的Micrelife Technics公司正在用遗传学方法提高菌种产量,以弥补失去的时间和机会。

1987年我国台湾学者在美国用细菌结合转移方法成功地提高了Nisin产生菌的产量。

四、Nisin的应用

1. 乳制品:

Nisin首先用于干酪的防腐,以后又推广到牛奶和风味奶制品中。

a. 干酪:

干酪中,尤其是瑞士和荷兰式干酪中含盐少、酸性较低,梭菌孢子在此条件下容易发育引起膨胀腐败。在生产干酪过程中加入溶解盐的同时加入少量Nisin(1~10ppm)可以防止膨胀。

另一方面,波兰和苏联直接将Nisin产生菌(NR)作为干酪发酵剂,方法是先将普通发酵剂(U)在含Nisin培养基中训练它们的抗性,使其中一些菌株通过改变细胞结构和生理活动而成为Nisin抗性发酵剂(NR)。利用NR+NP同时作为发酵剂,使这些国家生产出高质量干酪。苏联用这种方法生产的干酪90%产品是高质量的,而常规方法生产中仅有41%为高质量。表二是波兰一次5000升批次的干酪生产中Nisin对干酪质量的影响。

a.

用NR+NP发酵剂,产品质量一级品40%,

二级品60%。用U发酵剂,一级品7.7%,

二级品53.8% 三级品30.8% 废品7.7%

表 2 Nisin对干酪质量的影响

b

Nisin(ppm)	占普通发酵剂的百分比(%)		
	低 质 量	同 等 质 量	高 质 量
0	19.0	53.0	28.0
0.025	16.0	42.0	42.0
>0.025	9.1	37.0	54.0

a.不同发酵剂对干酪质量的影响(在原料中人为加入菌)

b.Nisin含量对干酪质量的影响。

另外,干酪生产中发酵剂可能被噬菌体感染,引起酸化速度减慢导致产毒素的金黄色葡萄球菌生长。利用NR+NP发酵剂可以控制这个现象的发生。

b. 消毒牛奶和风味牛奶:

苏联利用2.5~5.0ppm的Nisin使蒸发奶的热处理消毒更加温和,从而改进了消毒奶的营养价值,并延长了贮藏时间。

Heinemann等报道:在普通牛奶和巧克力牛奶中加入2ppm Nisin,再用 $F_0 = 3$ 热处理,结果在试验的792听消毒牛奶中,37°C保存了6个月;55°C保存了21天尚未发生腐败,若不加Nisin,则需要 $F_0 = 9 \sim 11$ 热处理。这表明加入Nisin即节省了大量能源,又改善了消毒牛奶的营养。

c. 第三世界的乳制品:

1976年,埃及将低浓度Nisin用于野牛奶和巧克力奶消毒,节省了约80%的热量,消毒后的牛奶在37°C可以存放21天。印度用Nisin使仅能存放3~7天的消毒牛奶保存了60余天。

许多第三世界国家缺乏新鲜牛奶,只能利用进口乳粉来弥补食谱中的蛋白质类物质的不足。在乳粉再建成乳制品时,水源的不安全性会引起微生物污染。所以需要严格的消毒措施,利用Nisin的性质可以使这些贫穷国家节省开支,又充分利用了牛奶的营养价值。

2. 罐头食品:

罐头食品作为贮存和方便食品已成为世界各国日用食品中不可缺少的一员。罐头食品的安全问题也越来越为各国卫生部门所重视。由于Nisin的优越特点,将这种防腐剂用于罐头食品防腐可以保证罐头的安全性和良好的外观和质地等感官接受性,并能改善罐头食品的营养价值。表三例举了Nisin在一些罐头食品中应用的例子。

具体来说,水果罐头中梨和凤梨罐头很容易被巴氏梭菌及肉毒梭菌污染,2~2.5ppm的Nisin可以防止这种污染,在樱桃、苹果和桃子等罐头热处理过程中,条件过于强烈会引起

表 3 Nisin在食品热处理过程中作用

罐头食品	pH值	F ₀ 值	
		未加Nisin	加入Nisin
巧克力奶	6.6	9.3~9.6	2.6~3.4
浓 乳 酪	5.0	28.8~30	9.1~9.9
蔬 菜 汤	4.5~5.0	24.6~30	9.0~9.9
肉 汤	4.5~5.0	15.4~30	8.1~10.3
蔬 菜	4.6~6.0	15.4~40.7	7.9~12
豌 豆	5.5	6.0~7.2	4.1~5.1
蘑 菇	6.0	17.5~19.3	2.5~3.3
蕃 茄	4.5	0~0.3	0~0.3
水 果	3.8~4.5	0~0.8	0~0.4
肉 类	5.5	19.2~19.7	8.1~10.8
鱼 类	5.0	3.4~7.3	3.9~5.4
谷 物	5.0	30~40	9.0~9.9

*F₀值为食物(罐头)中央保持121°C的时间(以分计)

**加入的 Nisin 浓度在1~5ppm。

食品感官变化,加入2~2.5ppm的Nisin可以大大缓和杀菌条件。同样浓度的Nisin可以防止嗜热脂肪芽孢杆菌引起的蕃茄、青豆罐头的平酸腐败。苏联利用Nisin配合山梨酸使用,延长了蕃茄酱的贮存期,使之可以在炎热天长途运输。

零售熟食品中,布丁罐头可用1~2.5ppm的Nisin来减轻灭菌条件。2.5~5.0 ppm的Nisin可以控制鸡炒面、通心粉及玉米油等的平酸腐败。利用Nisin还可以延长多种菜汤、肉汤及蘑菇的保存时间。

在高蛋白食品如牛舌、火腿和鱼子酱等中,过份的热处理会明显改变其质地和外观。加入Nisin后仅需45%的热处理可以延长各种肉类及鱼类三明治的贮存期。

近几年来,有人开始了Nisin代替硝酸盐的研究,结果表明75ppm的Nisin相当于150ppm NO₂⁻的作用。有人提议用少量的NO₂⁻作为发色剂,配合Nisin的防腐作用,可以减少NO₂⁻的用量。

3. 乙醇饮料:

英国生产Nisin的AB公司(Alpin and Barrett Ltd)在致力于提高产量的同时,还不断地开拓Nisin的应用市场,1986年他们获得了Nisin用于饮料的专利。该专利说明了Nisin在

饮料中有以下几种用途:

首先,可以将Nisin直接加入发酵液中,它不影响酵母的生长,但可以控制杂菌的乳杆菌片球菌的生长。当发酵液中出现少量的乳酸菌时,Nisin可以作为治疗剂加入。实验表明,2.5ppm的Nisin可以有效地作用但对啤酒的风味和香味方面无任何改变。

其次,Nisin可用于成品饮料中,加入不杀菌的桶装及瓶装啤酒,可以延长其贮存时间。对于巴氏杀菌的成品,可以在灭菌前加入Nisin,使热处理的时间和温度减小。

再次,Nisin还可以用于葡萄酒、苹果汁和其他蒸馏饮料。在蒸馏饮料中,需要一些乳酸菌产生特有风味,因此调整Nisin用量或训练某些风味产生菌的Nisin抗性,将Nisin加入这些饮料中,既保持了原有风味,又抑制了其他不需要的乳酸菌(如在葡萄酒中抑制苹果酸转化成乳酸的菌)。

最后,Nisin可以作为发酵设备的清洗剂,常规的菌洗法会影响酵母的生命力或改变酵母的发酵力和凝聚性。

参考文献

- (1) A. Hurst, Nisin, *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 27:85 (1981).
- (2) 黄中平等, 罐头食品之安全——卫生、杀菌、卷封品管(台湾1980)
- (3) R.C. Eapen et al, The present status on the use of nisin in processed foods, *J. Fd. Sci. Technol.*, Vol 20:231-240 (1983).
- (4) B. Heinemann et al, Use of nisin in processing food products, *Food Technology*, 19 (4):160 (1965)
- (5) A.C. Frazer et al, The biological effects of food additives: I. Nisin, *J. Sci. Fd. Agric.*, 13:32 (1962).
- (6) B. Heinemann et al, Use of nisin in preparing beverage quality sterile chocolate flavoured milk, *J. Dairy Sci.*, 47:8 (1964).
- (7) Aplin & Barrett Ltd, Nisaplin in the preservation of processed cheese and processed cheese products Technical Information Sheet No. 10/88.
- (8) Aplin & Barrett Ltd, The use of nisaplin in the preservation of canned food, Technical Information-Sheet No. 13/88.
- (9) K. Ogden, Nisin: a bacteriocin with a potential use in brewing, *J. Inst. Brew.*, 92:379-383 (1986)

酶解法测定乳糖和半乳糖含量

一、应用范围

本方法可适合于各种乳和乳制品。

二、原理

在除去干扰成份(脂肪和蛋白质)的水相浸提液中,游离半乳糖在半乳糖脱氢酶的催化下由辅酶 I (NAD) 氧化成半乳糖酸。在这个反应中 NAD 还原成 NADH。用 340nm 光谱测量透光率,从而确定 NADH 的含量。NADH 与半乳糖的量相等。

在既含有半乳糖又含有乳糖的样品中加入 β -半乳糖氧化酶可使乳糖分解成葡萄糖和半乳糖。形成的半乳糖如同天然游离半乳糖用 NAD 进行转换。

两次测量的透光率之差与乳糖含量成正比。

三、药品

1. 亚铁氰化钾溶液: 将 15g $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ 用蒸馏水溶解至 100ml。

2. 硫酸锌溶液: 30g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 用蒸馏水溶解至 100ml。

3. 硫酸, 2mol/L。

4. 氢氧化钠溶液, 0.25mol/L。

5. 缓冲溶液 (注意, 在使用前将缓冲溶液加热至 20~22°C。)

(1) 柠檬酸盐缓冲液, pH6.6: 2.8g 柠檬酸钠 ($C_6H_5NaO_7 \cdot 2H_2O$), 625mg 硫酸镁 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 和 42mg 柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 溶解于 40ml 蒸馏水中。用几滴硫酸或氢氧化钠溶液调整 pH 值。加蒸馏水至 50ml。在 4°C 时此溶液可保存 3 个月。

(2) 磷酸盐缓冲溶液, pH8.6: 8.3g 焦磷酸

钾 ($K_4P_2O_7$) 溶解于 40ml 蒸馏水中, 用硫酸调整 pH 值。加蒸馏水至 50ml。在 4°C 条件下此溶液可保存 2 个月。

6. NAD 溶液: 35mg 辅酶 I (NAO) 溶解于 7ml 柠檬酸盐缓冲液中。在 4°C 条件下此溶液可保存 3 周。

7. β -半乳糖氧化酶悬浮液: 5mg/ml 酶悬浮液溶解于含 2.2 克分子硫酸铵的溶液中。30U/mg。

8. β -半乳糖脱氢酶悬浮液: 5mg/ml 酶悬浮液溶解于含 2.2 克分子硫酸铵的溶液中。5U/mg。

四、仪器和辅助材料

1. 分析天平, 分度值为 0.1mg。

2. 酶解分析法吸移管, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1 ml, 1.92ml 和 2ml。

3. 容量瓶, 100ml。

4. 折叠滤纸, 150mm ϕ , 中等过滤速度。

5. 分光光度计, 适合于 340nm 波长的测定。或汞灯滤光光度计, 适合于 334nm 或 365nm 波长的测定。

6. 比色皿, 光径为 10mm。

7. 搅拌棍, 用于搅拌比色皿内的溶液。

8. 三角烧瓶, 100ml。

6. 漏斗。

五、操作

1. 取样的多少应使样品中乳糖量不超过 0.1g。测定乳、乳清和融化干酪调制制品时, 称取样品约 10g 装入 100ml 的容量瓶中, 然后用 50ml 蒸馏水混合。如样品为固体或粥糊状, 可先在研钵中用水搅合, 然后再转入到容量瓶内, 同样使加入的水约为 50ml。