

ϵ -聚赖氨酸复配防腐剂在酱腌菜中的应用

宋 萌, 付 强, 时艺翡, 程雅文, 郑佐兴, 谭之磊*, 贾士儒*

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 为延长酱腌菜保质期, 研究 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)与其他防腐剂和抗氧化剂复配对酱腌菜的防腐效果。结果表明, 生物防腐剂乳酸链球菌素(Nisin)、纳他霉素和抗氧化剂茶多酚对酱腌菜中的腐败微生物有很好的抑制作用, 并且同时使用具有协同增效的作用。通过响应面法复配防腐剂各成分配比为: ϵ -PL 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Nisin 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、纳他霉素0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和茶多酚0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。经验证在酱腌菜拌料时添加复配防腐剂比在干制萝卜复水时添加防腐剂效果更好, 可以延长其保质期至21 d, 品质较好, 总菌落数、大肠菌群数、总酸及氨基酸态氮含量符合国家标准, 为 ϵ -PL在酱腌菜中的应用提供了理论支持。

关键词: ϵ -聚赖氨酸; 纳他霉素; Nisin; 酱腌菜; 防腐

Application of Combination of ϵ -Ploy-L-lysine with Other Preservatives in Pickles

SONG Meng, FU Qiang, SHI Yifei, CHENG Yawen, ZHENG Zuoxing, TAN Zhilei*, JIA Shiru*
(College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To extend the shelf-life pickled vegetables, in this study, we examined the preservative effect of ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) when combined with other preservatives and antioxidant (nisin, natamycin and tea polyphenols) on pickles. The results showed that the biopreservatives nisin and natamycin as well as the antioxidant tea polyphenols potently inhibited the growth of spoilage bacteria, and their effects were synergistic in combination. The optimal combination determined using response surface methodology was ϵ -PL 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nisin 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, natamycin 0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and tea polyphenols 0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In addition, this combination was more effective when added during seasoning that during rehydration of dried radish and increased the shelf-life to 21 days. The pickle maintained good quality during its shelf-life, and the total number of colonies, the number of coliforms, total acid and amino nitrogen content were in line with the national standard. This study can provide an experimental basis for the application of ϵ -PL in pickled vegetables.

Keywords: ϵ -poly-L-lysine; natamycin; nisin; pickles; preservative effect

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810042

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 10-0276-07

引文格式:

宋萌, 付强, 时艺翡, 等. ϵ -聚赖氨酸复配防腐剂在酱腌菜中的应用[J]. 食品科学, 2018, 39(10): 276-282. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810042. <http://www.spkx.net.cn>

SONG Meng, FU Qiang, SHI Yifei, et al. Application of combination of ϵ -poly-L-lysine with other preservatives in pickles[J]. Food Science, 2018, 39(10): 276-282. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810042. <http://www.spkx.net.cn>

酱腌菜是深受我国人民喜爱的一种佐餐小菜, 具有悠久的历史, 因其美味、脆爽而受到广大消费者的青睐^[1]。美中不足的是酱腌菜中的食盐含量较高, 如果长期食用含盐量高的食品会对身体造成负面影响^[2]。如今, 饮食

健康和食品安全引起了人们的重视, 全世界都在提倡低盐饮食^[3-4]。利用盐渍方法来延长保质期已经不再符合人们的饮食观念, 因此引发酱腌菜的防腐保鲜问题^[5-6]。近几年在各地的酱腌菜抽查报告中, 不合格样品屡屡被

收稿日期: 2017-03-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21276197); 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2013AA102106); “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD16B04)

第一作者简介: 宋萌(1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物防腐剂的应用。E-mail: songmeng1991@126.com

*通信作者简介: 谭之磊(1977—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为发酵工程与食品生物技术。E-mail: tanzhilei@tust.edu.cn
贾士儒(1954—), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: jiashiru@tust.edu.cn

检出, 为了防止微生物超标而超剂量使用防腐剂是其主要原因^[7]。因此, 在保证低盐酱腌菜品质的同时, 如何安全、规范地使用防腐剂来延长其保质期成为了酱腌菜行业中亟待解决的问题^[8-9]。目前, 生物防腐剂如 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -poly-L-lysine, ϵ -PL)、乳酸链球菌素(Nisin)、纳他霉素等已经成为国内外食品安全领域的研究热点^[10]。 ϵ -PL是一种具阳离子赖氨酸同聚物, 并且具有抑菌谱广、抑菌pH值范围宽、水溶性好、安全性和热稳定性高^[11-12]等特点, 可作为食品防腐剂广泛使用^[13-14]。Nisin是一种天然抗菌肽, 是目前研究最广泛的细菌素^[15], 可有效地抑制革兰氏阳性细菌以及产芽孢的枯草芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌的生长^[16-17]。纳他霉素是一种多烯大环内酯类抗真菌剂, 对霉菌、酵母菌、某些原生动物和某些藻类有抑制作用, 但是它没有抗细菌活性^[18], 可以和Nisin抑菌谱互补, 在奶酪、腊肠和饲料等食品中的应用广泛^[19], 是为数不多的被美国食品药品监督管理局推荐的生物防腐剂; 茶多酚是茶叶中酚类物质和其衍生物的总称, 具有良好的抗氧化、抗衰老、抗癌变、抗辐射、防腐保鲜、抑菌除臭等功能^[20], 往往用于食品的保鲜、保色剂, 抑菌除臭剂等^[21-23]。目前, 茶多酚在食品贮藏保鲜中往往和其他添加剂复配使用, 以延长食品货架期^[24-25]。

本研究以 ϵ -PL、Nisin、纳他霉素和茶多酚进行复配, 利用响应面法优化防腐剂配比, 旨在有效延长酱腌菜的存储时间。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种

供试菌株由市售酱腌菜中筛选出的腐败细菌、腐败酵母菌(经分子生物学方法鉴定分别为*Bacillus subtilis*、*B. thuringiensis*、*Candida parapsilosis*、*Fusarium oxysporum*、*Trichosporon montevideense*)。

1.1.2 试剂

ϵ -聚赖氨酸盐酸盐、Nisin、纳他霉素 浙江新银象生物工程有限公司; 茶多酚 北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB培养基: 胰蛋白胨10.0 g/L, 酵母提取物5.0 g/L, 氯化钠10.0 g/L, pH 7.4 \pm 0.1, 121 $^{\circ}$ C、0.1 MPa灭菌20 min; 固体培养基加20.0 g/L琼脂。YPD培养基: 酵母膏10.0 g/L, 葡萄糖20.0 g/L, 蛋白胨20.0 g/L, pH 6.0 \pm 0.1, 121 $^{\circ}$ C、0.1 MPa灭菌20 min; 固体培养基加20.0 g/L琼脂。PCA培养基: 胰蛋白胨5.0 g/L, 酵母浸膏2.5 g/L, 葡萄糖1.0 g/L, 琼脂15 g/L。

pH 7.0 \pm 0.1, 121 $^{\circ}$ C、0.1 MPa灭菌20 min。煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤: 蛋白胨10.0 g/L, 乳糖10.0 g/L, 牛胆粉溶液200 mL, 0.1 g/100 mL煌绿溶液13.3 mL, pH 7.2 \pm 0.1, 121 $^{\circ}$ C、0.1 MPa灭菌15 min。

1.2 仪器与设备

卡盒式SpectraMax Paradigm多功能酶标仪 美谷分子仪器上海有限公司; Uvmini-1240型紫外分光光度计 苏州岛津仪器有限公司; CRH-250-S型恒温培养箱 广东省医疗器械厂; FE20型pH计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备

将从酱腌菜中分离出的腐败细菌挑取一环至无菌LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min培养至OD_{600 nm} 0.2~0.5备用; 挑取一环腐败酵母菌, 接种至无菌YPD培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min培养至OD_{600 nm} 0.3~0.4备用。

1.3.2 混合微生物的制备

为模拟食品中的微生物环境, 将分离出的腐败微生物混合制成混合腐败微生物。方法如下: 将每种细菌分别接种到5 mL无菌LB培养基中37 $^{\circ}$ C培养12 h; 腐败酵母菌接种到5 mL无菌YPD培养基中, 30 $^{\circ}$ C培养48 h后, 每管取1 mL菌悬液9 000 \times g离心10 min, 再用无菌生理盐水(9 g/L)洗涤沉淀, 然后用0.5 mL的无菌生理盐水重悬浮沉淀, 分别得到10⁷ CFU/mL的腐败细菌和腐败酵母菌^[26]。将细菌和酵母菌的重悬液分别等比例混合, 得到腐败细菌和腐败酵母菌混合微生物样品备用。

1.3.3 单一防腐剂抑菌效果实验

不同质量浓度的单一防腐剂制备: 参照GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》中食品添加剂最大允许使用范围, 分别制备含不同质量浓度的 ϵ -PL(0、15、30、60、100、150、250、500 μ g/mL)、Nisin(0、15、30、60、100、150、250、500 μ g/mL)、茶多酚(0、15、30、60、150、300、400、500 μ g/mL)、山梨酸钾(0、50、100、200、400、500、1 000、2 000 μ g/mL)、苯甲酸钠(0、50、100、200、400、500、1 000、2 000 μ g/mL)的LB培养基, 以及含有不同质量浓度纳他霉素(0、10、25、40、50、60、80、100 μ g/mL)、山梨酸钾(0、50、100、200、400、500、1 000、2 000 μ g/mL)、苯甲酸钠(0、50、100、200、400、500、1 000、2 000 μ g/mL)的YPD培养基。向每组培养基中接入腐败微生物后, 细菌在37 $^{\circ}$ C、180 r/min条件下培养12 h, 酵母菌在28 $^{\circ}$ C、180 r/min条件下培养24 h后, 分别测定OD_{600 nm}。每组实验3次平行, 并设置未添加防腐剂的空白对照组。

1.3.4 防腐剂协同抑菌效果评价

采用棋盘式微量液体稀释法(棋盘法)^[27]测试同时

使用两种防腐剂 (ϵ -PL+Nisin; ϵ -PL+茶多酚, Nisin+茶多酚) 时对腐败菌的抑制效果。其原理是根据分数抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) 判断两种物质是否存在协同作用。具体评价标准为: $FICI \leq 0.5$, 表示协同作用; $0.5 < FICI \leq 1$, 表示相加作用; $1 < FICI \leq 2$, 表示无关作用; $FICI \geq 2$, 表示拮抗作用。FICI的计算公式如下:

$$FICI = \frac{OIC_a}{MIC_a} + \frac{OIC_b}{MIC_b}$$

式中: OIC为同时使用两种防腐剂时, 有抑制效果的实验组中最小的防腐剂浓度; MIC为防腐剂最小抑菌浓度。

1.3.5 ϵ -PL复配防腐剂的响应面试验设计

根据单一防腐剂的抑菌效果实验结果, 设计4因素3水平响应面, 根据其水平设计, 采用不同 ϵ -PL (A)、Nisin (B)、纳他霉素 (C) 与茶多酚 (D) 用量, 如表1所示。

表1 Box-Behnken试验设计因素与水平
Table 1 Code and level of independent variables used in Box-Behnken design

水平	因素			
	A ϵ -PL用量/ ($\mu\text{g/mL}$)	B Nisin用量/ ($\mu\text{g/mL}$)	C 纳他霉素用量/ ($\mu\text{g/mL}$)	D 茶多酚用量/ ($\mu\text{g/mL}$)
-1	40	40	25	350
0	60	60	35	400
1	80	80	45	450

根据Design-Expert 8.0.6 trial软件进行Box-Behnken设计得到29组试验, 其中每组试验设3组平行, 以菌落总数为响应值 (Y), 试验结果经Design-Expert 8.0.6 trial软件分析得到响应值与4因素的回归方程, Y极值即为预期菌落总数值, 所对应的4因素取值即为复配防腐剂中各组最佳配比。

1.3.6 酱腌菜的制作工艺

加入辣椒油和调味料
↓

工艺1: 干制萝卜→加入水和复配防腐剂浸泡2h→纱布沥干→切丁→拌料(搅拌均匀)→
分装→成品常温保存

加入辣椒油和调味料
↓

工艺2: 干制萝卜→放入水中浸泡2h→纱布沥干→切丁→拌料同时加入复配防腐剂(搅拌均匀)→
分装→成品常温保存

干制萝卜浸泡时, 萝卜要完全浸没水中 (萝卜-水质量比1:10); 调味料与复水萝卜之间比例 (质量分数): 白糖1%、食盐4%、鸡精0.3%、辣椒油6%~8%。同时设置未添加复配防腐剂的空白对照组, 并按照

GB 2760—2014最大允许使用量同时添加山梨酸钾和苯甲酸钠的化学防腐剂对照组。

1.3.7 保质期的确定

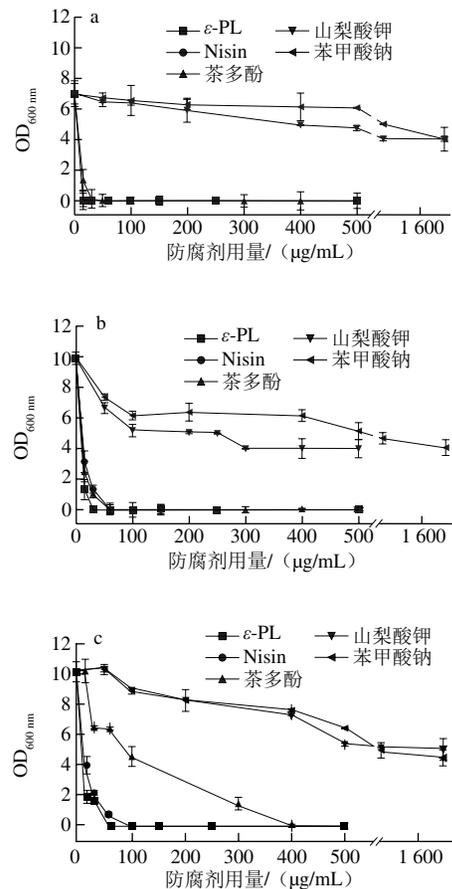
按照1.3.6节的方法将制作好的酱腌菜样品用无菌包装袋进行分装, 扎紧袋口, 每份样品25 g, 置于37 °C培养箱进行加速实验。每隔3 d对酱腌菜样品进行取样, 检测微生物菌落总数、大肠菌群数、总酸含量以及氨基酸态氮含量, 最后进行感官评价。取样时若发现样品出现褐变, 发霉或者有异味则说明样品已经变质。

1.3.8 指标检测

细菌总数检测: 参照GB 4789—2010《食品微生物学检验 菌落总数测定》^[28]方法; 大肠菌群数量检测: 参照GB 4789.3—2010《食品微生物学检验 大肠菌群计数》^[29]方法; 总酸含量检测: 参照谭权浚^[30]方法; 氨基酸态氮含量检测: 按GB/T 5009.39—2003《酱油卫生的标准分析方法》^[31]中4.2节方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 单一防腐剂抑菌效果



a. *B. subtilis*; b. *B. thuringiensis*; c. 混合腐败细菌。

图1 各防腐剂对腐败细菌的抑菌效果

Fig. 1 Inhibitory effects of preservatives on bacteria

从图1可以看出,生物防腐剂比化学防腐剂抑菌效果显著。苯甲酸钠和山梨酸钾是酱腌菜中使用最多的防腐剂,随着化学防腐剂质量浓度的上升,腐败菌的生长虽然受到了一定的影响,但是并不能被完全抑制。而单独添加生物防腐剂 ϵ -PL、Nisin 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可以完全抑制腐败细菌*B. subtilis*和*B. thuringiensis*生长,提高用量至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可以完全抑制混合腐败菌的生长;添加茶多酚30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可以分别抑制*B. subtilis*和*B. thuringiensis*生长,提高用量至400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可以完全抑制混合腐败菌。因此选择生物防腐剂不仅安全、高效,而且用量少、更经济。

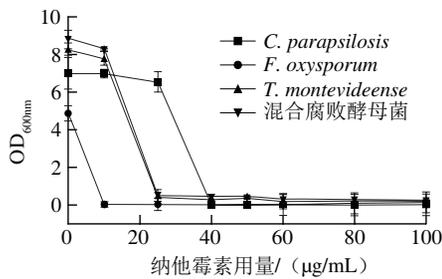


图2 纳他霉素对腐败酵母菌的抑菌效果

Fig. 2 Inhibitory effect of natamycin on spoilage yeasts

纳他霉素是一种低剂量、安全性高的食品防腐剂,可以广泛抑制霉菌和酵母菌的生长,从图2可以看出,在使用纳他霉素进行抑菌实验时,随着纳他霉素质量浓度的增加,腐败酵母菌OD_{600nm}出现了明显的下降趋势,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纳他霉素可以抑制*F. oxysporum*的生长,纳他霉素用量为400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,所有腐败酵母菌OD_{600nm}几乎接近于0,对腐败酵母菌的抑制效果最佳。

2.2 防腐剂协同抑菌效果评价

由于酱腌菜的腐败主要是由细菌引起,因此考察除纳他霉素外,其他3种防腐剂共同使用时的抑菌效果。将防腐剂两两组合进行抑菌实验,对其协同抑菌效果进行评价,结果见表2。

表2 OIC测定结果

Table 2 Determination of OIC

菌株	mg/kg					
	ϵ -PL+Nisin	ϵ -PL+茶多酚	Nisin+茶多酚			
<i>B. subtilis</i>	15.6	15.6	3.9	62.5	15.6	62.5
<i>B. thuringiensis</i>	15.6	62.5	7.8	62.5	15.6	62.5
混合腐败细菌	15.6	31.3	15.6	125	31.3	62.5

表3 FICI指数测定结果

Table 3 FICI values of preservative combinations

菌株	ϵ -PL+Nisin	ϵ -PL+茶多酚	Nisin+茶多酚
<i>B. subtilis</i>	0.563	0.187	0.125
<i>B. thuringiensis</i>	0.75	0.047	0.093 8
混合腐败细菌	0.625	0.093 7	0.156

根据防腐剂对两种腐败细菌的FICI指数测定结果(表3)可以看出, ϵ -PL和Nisin同时使用时, $0.5 < \text{FICI} \leq 1$,两种防腐剂存在相加作用, ϵ -PL和茶多酚同时使用以及Nisin和茶多酚同时使用时, $\text{FICI} \leq 0.5$,表明茶多酚和 ϵ -PL或者Nisin同时使用时会有协同增效的结果。因此3种防腐剂之间存在协同作用,同时使用会增强抑菌效果,减少用量,降低成本。

2.3 响应面法优化复配防腐剂各成分配比

2.3.1 响应面试验设计及结果

表4 Box-Behnken设计与结果

Table 4 Box-Behnken design with response variable

试验号	A ϵ -PL用量	B Nisin用量	C纳他霉素用量	D茶多酚用量	菌落总数/ (10^3 CFU/g)
1	-1	-1	0	0	5.10
2	1	-1	0	0	3.00
3	-1	1	0	0	6.60
4	1	1	0	0	1.90
5	0	0	-1	-1	7.90
6	0	0	1	-1	6.88
7	0	0	-1	1	6.40
8	0	0	1	1	4.30
9	-1	0	0	-1	5.50
10	1	0	0	-1	2.90
11	-1	0	0	1	5.30
12	1	0	0	1	3.30
13	0	-1	-1	0	3.70
14	0	1	-1	0	4.50
15	0	-1	1	0	4.70
16	0	1	1	0	2.55
17	-1	0	-1	0	0.91
18	1	0	-1	0	480
19	-1	0	1	0	6.20
20	1	0	1	0	5.10
21	0	-1	0	-1	5.08
22	0	1	0	-1	402
23	0	-1	0	1	4.50
24	0	1	0	1	1.80
25	0	0	0	0	3.40
26	0	0	0	0	3.31
27	0	0	0	0	3.54
28	0	0	0	0	4.41
29	0	0	0	0	3.21

响应面试验设计与结果见表4。利用Design-Expert 8.0.6 trial软件对所得数据进行回归分析,其回归方程模型如下所示:

$$Y = 7.252.687.50 - 12.737.50A + 36.927.08B - 48.775.00C - 31.683.33D + 0.000.625AB - 0.125.00AC + 0.015.000AD - 0.368.75BC - 0.015.500BD - 0.054.000CD + 0.036.354A^2 - 0.155.21B^2 + 1.399.17C^2 + 0.040.817D^2$$

再进行二次多元回归拟合,得到回归方程模型的方差分析与回归方程系数估计值,如表5所示。此响应面模型为极显著,失拟项不显著,可见回归方程可靠,可进一步分析。

表5 回归方程的方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	4 931.00	14	4 931.00	19.97	<0.000 1**
A ϵ -PL用量	19.51	1	19.51	30.43	0.003 7*
B Nisin用量	8.84	1	8.84	12.23	0.818 2
C 纳他霉素用量	50.84	1	50.84	0.560	0.583 3
D 茶多酚用量	27.07	1	27.070	4.180	0.215 9
AB	25.00	1	25.00	2.370	0.969 1
AC	25.00	1	25.00	19.20	0.697 7
AD	9.00	1	9.00	0.960	0.024 8*
BC	21.75	1	21.75	81.29	0.264 8
BD	9.61	1	9.61	5.830	0.032 1*
CD	29.16	1	29.16	0.013	0.677 1
A ²	13.71	1	13.71	35.17	0.774 8
B ²	25.00	1	25.00	1.020	0.233 4
C ²	12.70	1	12.70	89.56	0.014 0*
D ²	67.54	1	67.54	1.470	0.049 9*
剩余	22.57	14	16.12		
失拟	21.68	10	21.68	3.03	0.209 5
误差	8.88	4	2.22		
总和	6 219.74	28			

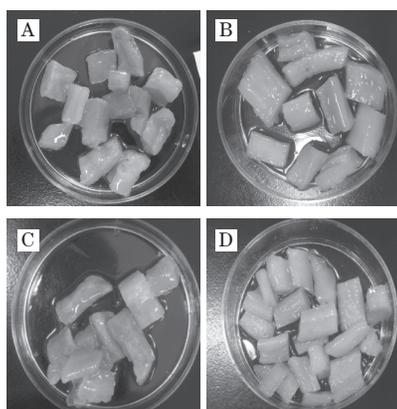
注: *. $P < 0.05$, 影响显著; **. $P < 0.01$, 影响极显著。

2.3.2 复配防腐剂各组分配比的确定

根据Box-Behnken试验所得的结果与回归方程, 利用Design-Expert 8.0.6 trial软件分析当复配防腐剂中各组分配比为 ϵ -PL 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Nisin 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、纳他霉素 0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和茶多酚0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 菌落总数达到理论最小值 1.43×10^5 CFU/100 g, 酱腌菜制品卫生标准规定菌落总数小于 $1 \sim 3 \times 10^6$ CFU/100 g, 可见该预期值有效, 符合国标水平。

2.3.3 复配防腐剂验证结果

为验证响应面设计配方的可行性, 将制作好的酱腌菜进行分装后, 置于室温条件下, 每隔3 d取样, 检测贮存21 d后的样品感官质量、微生物菌落总数、大肠菌群数、总酸、氨基酸态氮含量的变化。



A.空白对照; B.化学防腐剂; C.工艺1; D.工艺2。

图3 酱腌菜经过不同处理方法后保存21 d的表现结构

Fig. 3 Visual appearance of pickles with different treatments after being stored for 21 days

由图3可知, 酱腌菜放置21 d后空白对照、化学防腐剂、工艺1三组萝卜颜色变暗、褐变现象明显, 质地软烂已变质, 无鲜香气味, 异味明显, 而工艺2实验组的酱腌菜具有萝卜固有的微黄色, 无发暗变色现象, 无褐变具有咸菜的鲜香气, 无异味, 与存放前无差异, 味美, 质地脆嫩, 有效延长了其保质期。

表6 酱腌菜在贮存过程中菌落总数的变化

Table 6 Changes in total colony count of pickled radish during storage

处理方法	时间/d							
	0	3	6	9	12	15	18	21
空白对照	32	6.5×10^3	2.6×10^4	—	—	—	—	—
化学防腐剂	20	3.2×10^3	1.2×10^4	3.96×10^5	—	—	—	—
工艺1	31	2.9×10^3	0.5×10^4	1.6×10^4	—	—	—	—
工艺2	22	5.5×10^2	0.6×10^3	1.1×10^3	1.5×10^3	2.9×10^3	3.6×10^3	4.4×10^3

注: 一.样品变质, 本次未取样。下同。

表7 酱腌菜在贮存过程中大肠菌群数的变化

Table 7 Changes in coliform count of pickled radish during storage

处理方法	时间/d							
	0	3	6	9	12	15	18	21
空白对照	26	340	601	—	—	—	—	—
化学防腐剂	17	77	157	456	—	—	—	—
工艺1	14	56	98	188	—	—	—	—
工艺2	5	43	78	107	156	166	175	204

由表6、7可知, 未添加防腐剂的空白对照组在存放6 d后已经变质, 按照国标范围内最大量添加化学防腐剂和复水时添加复配防腐剂的实验组在存放9 d后变质, 只有在拌料时添加复配防腐剂的实验组(工艺2)菌落总数和大肠杆菌群数量符合国家标准GB 2714—2015《酱腌菜》规定, 有效抑制了微生物的增殖。

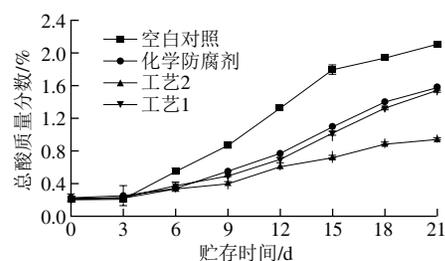


图4 酱腌菜在贮存过程中总酸含量的变化

Fig. 4 Changes in total acid content of pickled radish during storage

从图4可以看出, 所有实验组的酱腌菜总酸含量都随着存放时间延长逐渐增加, 由于空白对照组未添加任何防腐剂, 其总酸含量增加最快。添加化学防腐剂和萝卜复水时添加防腐剂的实验组(工艺1)总酸相比存放前分别增加了58%和55%, 增幅较大。酱腌菜中总酸含量增加主要是因为乳酸菌发酵产生乳酸, 此外, 还可能还有一些酵母菌发酵产生了丁酸等一些酸性物质, 使酱腌菜pH

值降低。从图4可以看出,拌料时添加复配防腐剂可以有效减缓产品中总酸含量的增加,保证酱腌菜的口感。

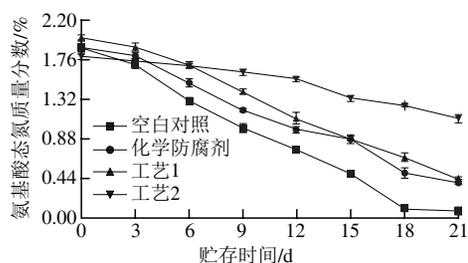


图5 酱腌菜在贮存过程中氨基酸态氮(以氮计)含量的变化

Fig. 5 Changes in amino acid nitrogen content of pickled radish during storage

从图5可以看出,氨基酸态氮(以氮计)随着酱腌菜存放时间的延长总体呈现下降的趋势。其中只有在拌料时加复配防腐剂的实验组(工艺2)氨基酸态氮含量下降缓慢,其他3组在存放过程中氨基酸态氮含量下降明显。氨基酸态氮是由酱腌菜中微生物发酵消耗酱腌菜本身蛋白质所产生的,为微生物的生长代谢提供能量,微生物过度繁殖会导致氨基酸态氮含量降低,破坏酱腌菜的营养价值,生成的代谢副产物也会影响酱腌菜的风味,由图5可知,拌料时添加复配防腐剂可以有效抑制氨基酸态氮消耗,保证酱腌菜品质。

3 结论

和酱腌菜中常用的化学防腐剂山梨酸钾和苯甲酸钠相比,生物防腐剂 ϵ -PL、Nisin、纳他霉素和抗氧化剂茶多酚对酱腌菜中腐败微生物抑制作用更加显著,且它们之间存在协同抗菌效果,同时使用可以提高抑菌性能,减少用量。通过响应面法优化出复配防腐剂各成分量为 ϵ -PL 0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、Nisin 0.06 $\mu\text{g/mL}$ 、纳他霉素0.035 $\mu\text{g/mL}$ 和茶多酚0.40 $\mu\text{g/mL}$ 。和在干制萝卜复水时添加复配防腐剂相比,在酱腌菜拌料时添加复配防腐剂可以在加速实验(37 $^{\circ}\text{C}$)条件下延长其保质期至21 d,品质良好,菌落总数、大肠菌群数、总酸以及氨基酸态氮含量均符合国家规定。

参考文献:

[1] VIANDER B, MÄKI M, PALVA A. Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation[J]. Food Microbiology, 2003, 20(4): 391-395. DOI:10.1016/S0740-0020(02)00150-8.

[2] ZHAO C J, SCHIEBER A, GÄNZLE M G. Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations: a review[J]. Food Research International, 2016, 89: 39-47. DOI:10.1016/j.foodres.2016.08.042.

[3] OLIVEIRA T L C D, RAMOS A L S, RAMOS E M, et al. Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(2): 1297-1308. DOI:10.1016/j.lwt.2015.06.011.

[4] 曹宝忠. 影响酱腌菜质量的因素及防腐应注意的问题探讨[J]. 中国酿造, 2011, 30(3): 145-149. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2011.03.045.

[5] 余毅, 王晶, 叶传发, 等. 肉桂酸复配型天然防腐剂在酱腌菜中的应用研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 314-316; 323. DOI:10.3969/j.issn.1673-9078.2009.03.026.

[6] 张爽. 酱腌菜防腐保鲜技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(11): 6538-6539. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2011.11.095.

[7] 唐春红, 孙瑾. 食品防腐剂和抗氧化剂在酱菜行业的使用技术及法规标准[J]. 中国食品添加剂, 2010(4): 213-217. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2010.04.034.

[8] HYLDGAARD M, MYGIND T, VAD B S, et al. The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7758-7770. DOI:10.1128/AEM.02204-14.

[9] YING Q L, QING H, JIAN L F, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2014, 43: 22-27. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.02.023.

[10] 姜松法, 陈学威, 董健康, 等. 小包装酱腌菜防腐方法探讨[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(8): 998. DOI:10.11847/zgggws2005-21-08-58.

[11] WANG X Y, JIANG L J. Study on the effects of inhibition on putrefying microbes in vacuum-packed pickled radish[J]. China Condiment, 2009: 68-72. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2009.07.014.

[12] 汤凤霞, 乔长晟. 天然生物食品防腐剂的研究与应用[J]. 世界农业, 2002(2): 34-36. DOI:10.3969/j.issn.1088-1631.2008.10.027.

[13] HAMANO Y. Amino-acid homopolymers occurring in nature[J]. Microbiology Monographs, 2010, 15: 24. DOI:10.1007/978-3-642-12453-2.

[14] 刘蔚, 周涛. ϵ -聚赖氨酸抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 15-20. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.09.002.

[15] ARAUZ L J D, JOZALA A F, MAZZOLA P G, et al. Nisin biotechnological production and application: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20(3/4): 146-154. DOI:10.1016/j.tifs.2009.01.056.

[16] WANG S, FEI L, HOU Z, et al. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus*, by chromosomal integration of the *Vitreoscilla*, hemoglobin gene (*vgb*)[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(4): 1369-1376. DOI:10.1007/s11274-013-1561-4.

[17] BADAOUI N M, KASHTANOV D, CHIKINDAS M L. ϵ -Poly-L-lysine and nisin A act synergistically against Gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 45: 13-18. DOI:10.1111/j.1472-765X.2007.02157.x.

[18] TURE H, EROGLU E, OZEN B, et al. Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(1): 154-160. DOI:10.1111/j.1365-2621.2010.02465.x.

[19] 贾士儒. 生物防腐剂[M]. 北京: 中国工业出版社, 2009: 74.

[20] LIN H T, XI Y F, CHEN S J. Postharvest softening physiological mechanism of Huanghua pear fruit[J]. Science Agricultural, 2003, 36: 349-352. DOI:10.3321/j.issn: 0578-1752.2003.03.020.

- [21] SAKANAKA S, JUNEJA L R, TANIGUCHI M. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2000, 90(1): 81-85. DOI:10.1263/jbb.90.81.
- [22] ALMAJANO M P, CARBÓ R, JIMÉNEZ J A L, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions[J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 55-63. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.10.040.
- [23] HADI A, POURMASOUMI M, KAFESHANI M, et al. The effect of green tea and sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.) supplementation on oxidative stress and muscle damage in athletes[J]. Journal of Dietary Supplements, 2016: 1-12. DOI:10.1080/19390211.2016.1237400.
- [24] CROFT K D. Dietary polyphenols: antioxidants or not?[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2016, 595: 120-124. DOI:10.1016/j.abb.2015.11.014.
- [25] HARRIS L J, FLEMING H P, KLAENHAMMER T R. Developments in nisin research[J]. Food Research International, 1992, 25(1): 57-66. DOI:10.1016/0963-9969(92)90026-2.
- [26] ROMERO-GIL V, GARCÍA-GARCÍA P, GARRIDO-FERNÁNDEZ A, et al. Susceptibility and resistance of lactic acid bacteria and yeasts against preservatives with potential application in table olives[J]. Food Microbiology, 2016, 54: 72-79. DOI:10.1016/j.mimet.2011.09.009.
- [27] BRANDT A L, CASTILLO A, HARRIS K B, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(9): 557-563. DOI:10.1111/j.1750-3841.2010.01843.x.
- [28] 卫生部食品卫生监督检验所. 食品卫生微生物学检验: GB 4789.2—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 2-3.
- [29] 卫生部. 食品微生物学检验 大肠菌群计数: GB 4789.3—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 2-7.
- [30] 谭权涪. 酱腌菜中食盐和总酸含量的一种快速测定方法[J]. 食品与机械, 2002, 18(6): 39-40. DOI:10.3969/j.issn.1003-5788.2002.06.017.
- [31] 卫生部. 酱油卫生标准的分析方法: GB/T 5009.39—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 319-321.