

乳酸菌细菌素和超高压联合处理对低温切片火腿的防腐保鲜效果

刘国荣^{1,3}, 孙 勇², 王成涛¹, 郑海涛³, 李平兰^{3,*}, 王 洋³

(1.北京工商大学 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 食品风味化学北京重点实验室, 北京 100048;

2.北京市食品研究所, 北京 100162; 3.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 为了揭示乳酸菌细菌素和超高压联合处理对低温切片火腿的防腐保鲜效果, 并探讨乳酸菌细菌素和超高压联合处理在低温肉制品防腐保鲜应用中的可行性, 在不添加任何化学防腐剂的情况下, 分别以乳酸菌细菌素(enterocin LM-2)添加量 320AU/g、600MPa 超高压处理 5min 以及两者联合处理低温切片火腿, 考察联合处理对样品中微生物数量、理化指标以及感官特性的影响。结果表明: enterocin LM-2 和超高压技术的联合使用可明显延长低温切片火腿的货架期, 有效减少贮藏过程中挥发性盐基氮的生成及脂肪氧化, 并保持产品原有色泽、气味、质构等感官特性。综合微生物和理化特性分析结果, 联合处理组的防腐效果最好, 可将低温切片火腿的货架期延长至 100d。

关键词: 乳酸菌细菌素; 超高压; 切片火腿; 防腐保鲜

Combinatorial Preservative Effect of Bacteriocin and High Hydrostatic Pressure on Refrigerated Sliced Vacuum-packaged Cooked Ham

LIU Guo-rong^{1,3}, SUN Yong², WANG Cheng-tao¹, ZHENG Hai-tao³, LI Ping-lan^{3,*}, WANG Yang³

(1. Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Beijing Food Research Institute, Beijing 100162, China; 3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to evaluate technological feasibility of combinatorial treatment using bacteriocin and high hydrostatic pressure as the preservative in refrigerated sliced vacuum-packaged cooked ham, the combinatorial effect of high hydrostatic pressure (600 MPa for 5 min) and enterocin LM-2 (320 AU/g) on microorganism amount, and physicochemical and sensory properties of sliced cooked ham was analyzed during the storage at 4 °C. Results indicated that the combinatorial treatment could substantially suppress the growth of microflora, inhibit the accumulation of TVB-N and decelerate lipid oxidation, and keep a better sensory profile during the storage period of refrigerated sliced cooked ham. The combinatorial treatment revealed the most effective preservation, which could extend the shelf life of sliced cooked ham up to 100 days. These results suggested the combinatorial application of enterocin LM-2 and high hydrostatic pressure has a great potential as a bio-preservative during the storage of refrigerated sliced cooked ham.

Key words: bacteriocin; high hydrostatic pressure; sliced cooked ham; preservative

中图分类号: TS251.6.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)06-0256-08

乳酸菌及其活性代谢产物与人类的健康密切相关, 常常被有意识地引进食品产品或自然地发生在食品中,

从而使食品拥有人们渴望的风味、结构、营养及安全性。乳酸菌细菌素是乳酸菌在代谢过程中通过核糖体机

收稿日期: 2011-10-12

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903012); 国家自然科学基金项目(31071591);

北京工商大学青年教师科研启动基金项目(QNJ2011-042)

作者简介: 刘国荣(1983—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: liuguorong@th.btbu.edu.cn

*通信作者: 李平兰(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为乳酸菌及其活性代谢产物的理论与应用。E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

制合成并分泌到环境中的一类具有抑菌活性的多肽或蛋白类物质,它在人体内可被降解,具有无毒、无残留,高效、耐酸、耐高温、无抗药性等特点,目前已成为天然防腐剂研究与开发的热点^[1-2]。

栅栏技术是将许多不同的保藏技术联合应用以提高各种防腐剂的抑菌效果。已有研究报道,两种不同的细菌素或者细菌素和其他防腐技术联合使用都可以作为栅栏技术应用于食品加工和贮藏过程中来有效抑制有微生物引起的食品腐败^[3-4]。其中,乳酸菌细菌素和其他防腐措施(物理或化学防腐措施)的配合使用,不但可以提高细菌素的抑菌活性、减少细菌素耐受菌株的出现,还可以减少化学防腐剂的添加量或减弱物理防腐措施的使用强度。通过它们的有效组合,既可以保证食品的质量安全,又能最大程度的减少防腐措施对食品感官或理化特性的不良影响^[5]。

目前,已报道的可与乳酸菌细菌素联合使用的其他防腐技术主要包括:化学防腐剂,如柠檬酸钠、乳酸钠、双乙酸钠等;物理杀菌技术,如热处理、冷处理以及非热力杀菌技术,如高压脉冲电场(pulsed electric field, PEF)、超高压(high hydrostatic pressure, HHP)、真空包装等;酶制剂,如溶菌酶等;金属螯合剂,如乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、三磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP);其他,如月桂酸甘油酯等。乳酸菌细菌素与这些技术的联合使用可以增加细胞膜的通透性从而增强乳酸菌细菌素的抑菌效果。通常,革兰氏阴性菌对一些乳酸菌细菌素不敏感,而当这些乳酸菌细菌素与金属螯合剂或物理杀菌技术联合使用时,却可以破坏革兰氏阴性菌的细胞膜,使细菌素更容易进入细胞并发挥其抑菌作用^[6-7]。

HHP是依靠强大的外部作用力来实现对微生物的致伤(致死)效应,属于单纯的物理作用,是目前比较流行的非热力杀菌技术^[8]。相比传统的食品热处理技术,HHP可以最大程度的保持食品原有的营养及感官特性。然而近来有部分研究却发现,高于600MPa的超高压处理压力会一定程度上引起产品质构、色泽变化以及加速脂肪氧化,而且会加快增加超高压设备的制作成本、加速超高压设备磨损,制约HHP的商业应用推广^[9-11]。

为了在取得较理想的杀菌效果的同时,弥补乳酸菌细菌素 enterocin LM-2 对革兰氏阴性菌抑菌活性较弱以及600MPa以上超高压处理导致食品感官品质下降、加快超高压设备磨损、增加设备制作和使用成本的缺点,本研究在不添加任何化学防腐剂的情况下,将联合应用乳酸菌细菌素 enterocin LM-2 和超高压技术进行

低温贮藏切片火腿保鲜,考察此联合处理对低温贮藏切片火腿中微生物、理化及感官特性的影响,并探讨乳酸菌细菌素和超高压联合处理在低温肉制品防腐保鲜应用中的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳酸菌细菌素 enterocin LM-2 产生菌株屎肠球菌 *Enterococcus faecium* LM-2, 分离自内蒙古传统干酪;单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)NICPBP 54002(1/2a 血清型) 中国食品药品检定研究院;肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)ATCC 13076, 获赠于加拿大食品安全研究所。

培养基(表1) 北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 仪器与设备

DNP 型电热恒温培养箱 上海精宏实验设备公司; SCL-1300 型垂直直流洁净工作台 北京赛伯乐实验仪器有限公司; TGL-20M 台式高速冷冻离心机 长沙平凡仪器仪表有限公司; HHP-650 型超高压设备 内蒙古包头科发高新技术食品机械公司; pH523C 型精密 pH 仪 上海雷磁仪器厂; Kjeltac 2300 型凯氏定氮仪 福斯(中国)有限公司; CR-400 型全自动色差分析仪 日本 Minolta 公司; TH200 型水分活度测定仪 瑞士 Novasina 公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌素样品制备及活性分析

参考刘国荣^[6]和 Liu 等^[12]方法,采用硫酸铵沉淀、凝胶过滤柱层析及阳离子交换树脂层析的三步纯化程序从 *E. faecium* LM-2 发酵上清液中纯化 enterocin LM-2, 并采用管碟法结合二倍稀释法,以 *L. monocytogenes* 54002 为指示菌,测定细菌素效价。

1.3.2 切片火腿的制备及处理

制作与加工:切片火腿的制作和加工过程在北京市第五肉类联合加工厂第一生产车间实施,制作工艺按照企业商业产品西式切片火腿配方进行,其中,除正常添加亚硝酸盐外,不添加任何防腐剂;细菌素处理:在此基础上,分别制作两批切片火腿,①不添加 enterocin LM-2 批次,②添加 enterocin LM-2320AU/g 批次;切片及包装:切片按车间正常工序进行,每片厚度 0.5cm,质量 20~25g,每4片装一包进行抽真空包装(每袋 100g);超高压处理:从上述两批样品中,分别抽取一半进行 600MPa 超高压处理 5min。

试验分组:对照组:不添加细菌素 enterocin LM-2 且未经 600MPa 超高压处理;处理组 1:在火腿中按

照 320AU/g 添加 enterocin LM-2, 未经 600MPa 超高压处理; 处理组 2: 不添加 enterocin LM-2, 经 600MPa 超高压处理 5min; 处理组 3: enterocin LM-2 添加量 320AU/g 且经 600MPa 超高压处理 5min。

1.3.3 贮藏与取样

处理后的样品冷藏于 4℃ 冰箱, 根据试验要求取样, 首先分别在处理前(第 0 天)、处理后(贮藏第 1 天)随机抽样检测, 之后每隔 10d 取样。各指标测定均取自同一袋产品, 每个处理组取 3 袋进行测定。

1.3.4 微生物分析

包装切片火腿经击碎、混匀(袋内完成), 无菌取样 25g, 稀释于 225mL 蛋白胨缓冲溶液中, 三角烧瓶内预置灭菌玻璃珠, 280r/min 摇床 2min, 10 倍系列稀释。根据预试验结果, 每期试验选择适当 3 个稀释度进行倾注法平板计数操作, 每个稀释度做 3 个平行, 菌落计数操作按 GB 4789.2—2010《食品微生物学检验: 菌落总数测定》^[13]进行, 不同的菌群分别采用不同的选择性培养基和培养条件进行分离和计数, 详见表 1。本试验中各微生物检测方法检测极限均为 10CFU/g。

1.3.5 微生物挑战性分析

肉制品加工过程中, 在蒸煮等首次杀菌后, 真空包装前, 很可能发生二次污染, 如单增李斯特氏菌、沙门氏菌等, 这些都是严重危害人类健康的食品源致病菌。为了增加食品安全性, 此部分采用挑战性试验分析研究细菌素与超高压协同处理对二次污染切片火腿的灭菌效果。具体为: 从每个试验组中抽出部分样品, 分别接种约 4.8×10^4 CFU/g 的单增李斯特氏菌 NICPBP 54002 和肠炎沙门氏菌 ATCC 13076, 并用聚酰胺/聚乙烯包装袋抽真空二次包装, 以上操作在无菌室中进行。包装好的处理样品置于 4℃ 冰箱内, 每隔 10d 用选择性培养基(表 1)分别测定样品中的单增李斯特氏菌和肠炎沙门氏菌菌落数^[19]。

1.3.6 理化分析

pH 值和 a_w 值测定: 将 10g 碎肉样中加入 90mL 蒸馏水, 混合摇匀, 静置 2min 后, 采用 Satroris PB-10 型 pH 计直接测定样品 pH 值, 每袋设平行, 并采用水分活度自动分析仪测定样品 a_w 值, 每个样品设 2 个平行; 总挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)测定: 按照 GB/T 5009.44—2003《肉与肉制品卫生标准的分析方法》^[20], 采取半微量定氮法测定切片火腿中的 TVB-N 含量; 脂肪氧化硫代巴比妥酸还原值(thiobarbituric acid reactive substances, TBA-RS)测定: 参考 GB/T 5009.181—2003《猪油中丙二醛的测定》^[21]和 Salih 等^[22]的研究方法, 并稍作调整。具体为: 取 10g 样品绞碎, 加入 50mL, 7.5% 三氯乙酸(含 0.1% EDTA-Na₂)振摇 30min, 双层滤纸过滤两次, 取 5mL 上清液加入 5mL、0.02mol/L 硫代巴比妥酸溶液, 90℃ 水浴保温 40min, 取出冷却至室温, 1600r/min 离心 5min 取上清液。加入 5mL 氯仿振摇, 静置分层后取上清液, 在 532nm 波长处测定吸光度。每个处理设置 2 个平行, 按下式计算 TBARS 值:

$$TBARS = A_{532/155} \times 1/10 \times 72.6 \times 100$$

式中: TBARS 值以 1kg 样品中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的毫克数计, 单位为 mg/kg。

1.3.7 感官评定

采用定量描述分析(quantitative descriptive analysis, QDA)对处理组样品进行感官评定^[23]。评定小组由 10 位具有 3 年以上专业经验的本研究室人员组成, 试验中分别提供两片以上不同贮藏阶段、不同处理组样品给感官评定者进行感官评定。参考 Kotzekidou 等^[24]制定的切片火腿评定标准, 分别对样品的色泽、质构、气味、口感、出汁及总体可接受性等指标进行评分, 评分分 5 级: 5(优)、4(良)、3(中)、2(差)、1(劣), 具体评分标准如表 2。评定时以贮藏第 0 天的对照组样品为参考, 设定其各项指标均为 5.0 分。

表 1 切片火腿中不同微生物的培养条件
Table 1 Cultivation conditions of microorganisms in sliced cooked ham

微生物种类	培养基	培养条件	参考标准
菌落总数	平板计数(PCA)琼脂	(36 ± 1)℃、48h	GB 4789.2—2010《食品微生物学检验: 菌落总数测定》 ^[13]
乳酸菌	MRS 琼脂	(36 ± 1)℃、48h	GB 4789.35—2010《食品微生物学检验: 乳酸菌检验》 ^[14]
耐冷菌	平板计数(PCA)琼脂	(6.5 ± 0.5)℃、10d	NY/T 1331—2007《乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定》 ^[15]
大肠菌群	结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)	(36 ± 1)℃、18~24h	GB 4789.3—2008《食品微生物学检验: 大肠菌群计数》 ^[16]
单增李斯特氏菌	Palcam 李斯特氏菌选择性培养基	(36 ± 1)℃、24~48h	GB 4789.30—2010《食品卫生微生物学检验: 单核细胞增生李斯特氏菌检验》 ^[17]
肠炎沙门氏菌	亚硫酸铋(BS)琼脂	(36 ± 1)℃、40~48h	GB 4789.4—2008《食品微生物学检验: 沙门氏菌检验》 ^[18]

1.3.8 细菌素活性分析

依据细菌素的疏水特性,参考 Coffey 等^[25]的方法,对切片火腿中的残留细菌素抑菌活性进行测定。具体为:称取约 20g 样品,绞碎搅匀,置于锥形瓶中,加 20mL 70% 异丙醇溶液,混合摇匀,静置分层后取上清液,参照 1.3.1 节方法,测定上清液抑菌活性。

1.3.9 数据统计学分析

所有试验重复测定 3 次,数据统计分析采用 SPSS 13.0 和 ANOVA 方差分析处理,结果以“平均值±标准误差”表示,并用 Duncan 法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 微生物分析

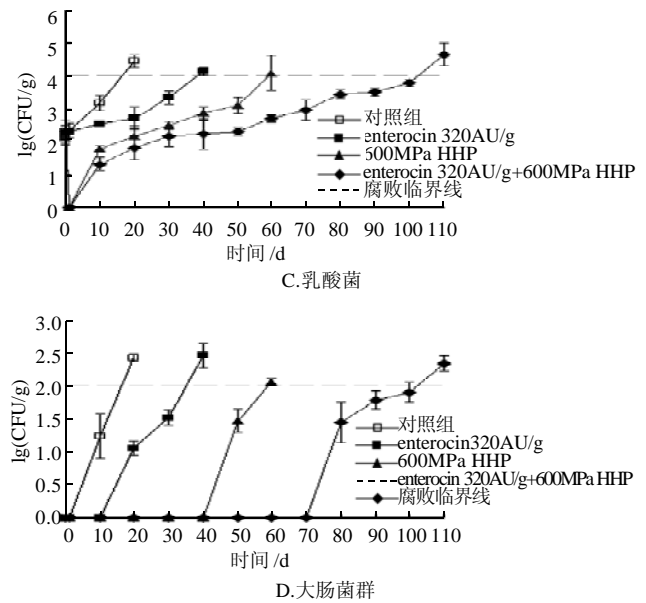
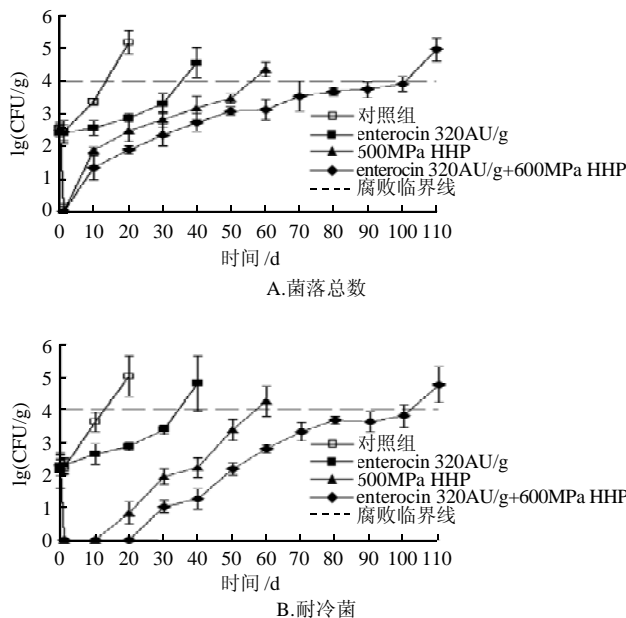


图 1 不同处理切片火腿中细菌总数(A)、耐冷菌(B)、乳酸菌(C)及大肠菌群(D)的数量变化

Fig.1 Change in counts of total bacteria, psychrotrophic bacteria, lactic acid bacteria and enterobacteriaceae in sliced cooked ham during storage at 4 °C

由图 1 可知,细菌素和超高压处理对所考察的微生物均有不同程度的抑制效果,与对照相比,其他处理组中的各微生物在贮藏前期都表现出长时间的迟滞生长。

在肉制品腐败研究中,多数学者认为,蒸煮类肉制品(cooked meat products)的微生物腐败标准应规定在 6 (lg(CFU/g))^[23,25],也有学者将其规定在 7(lg(CFU/g))^[26],然而按照 GB2726—2005《熟肉制品卫生标准》^[27]规定,微生物菌落总数必须低于 3×10^4 CFU/g,大肠菌群必须低于 90CFU/g。基于此,本研究以 10^4 CFU/g 的菌落总数或 10^2 CFU/g 的大肠菌群为产品的微生物腐败极限,不

表 2 感官评价评分标准
Table 2 Sensory evaluation criteria

评定项目	评分标准				
	5	4	3	2	1
色泽	光泽均匀, 呈产品固有的粉红色	光泽均匀, 呈粉红色	光泽均匀, 略显白色	光泽均匀, 呈淡白色	光泽不均匀, 呈灰白色
质构	切片平整, 有红白相间的大理石纹路, 紧密有弹性	切片平整, 不够致密	切片平整, 松散	切片不平整, 松散	切片不平整, 松散
气味	呈产品固有风味, 无不良气味	呈产品固有风味, 无不良气味	呈产品固有风味, 无不良气味	略有异味	有异味
滋味	呈产品固有滋味	呈产品固有滋味	呈产品固有滋味	略有酸败味	有酸败味
表面黏度	无汁液流出, 不粘手	无汁液流出, 不粘手	无汁液流出, 略粘手	无汁液流出, 较粘手	有汁液流出, 粘手
总体可接受性	非常容易接受	容易接受	可以接受	略不能接受	不能接受

同处理组产品中各微生物数量一旦超出此限即被认定出现腐败。

综合微生物分析结果可以看出, 对照组在贮藏 20d 就超过腐败极限, 而其他处理组都可以不同程度的延长低温切片火腿产品的货架期, 其中, 联合处理组 (enterocin LM-2 添加量 320AU/g, 且经 600MPa 超高压处理 5 min) 的抑制效果最明显, 可将货架期延长到 100d。此外, 所有处理组样品中均未检测到单增李斯特氏菌和肠炎沙门氏菌存在, 说明试验制备的切片火腿样品符合国家卫生标准。

2.2 挑战性微生物分析

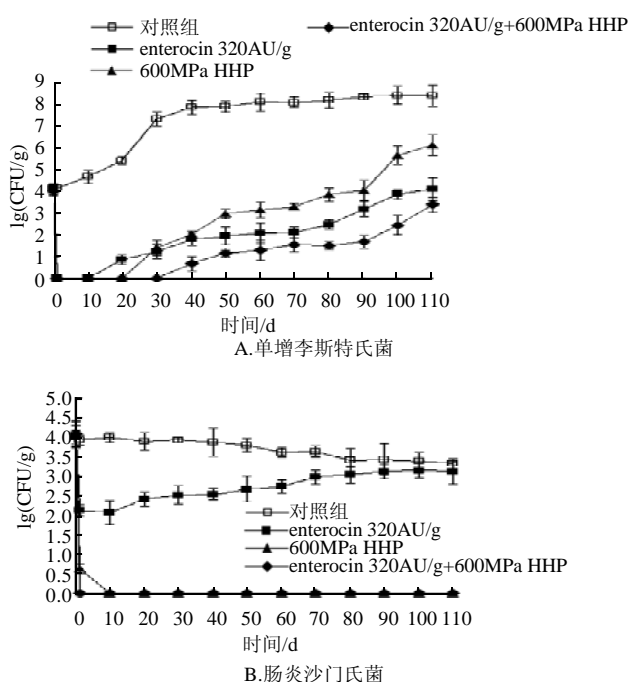


图2 不同处理切片火腿中单增李斯特氏菌及肠炎沙门氏菌的数量变化

Fig.2 Change in counts of *L. monocytogenes* ATCC 35152 and *S. enteritidis* ATCC 13076 in sliced cooked ham during storage at 4 °C

从图 2A 可以看出, 处理后即贮藏第 1 天, 与对照组相比, 其他各处理组样品中均未检测到单增李斯特氏菌, 而且之后整个贮藏过程中, 这些处理都可明显抑制单增李斯特氏菌的生长繁殖 ($P < 0.05$), 其中联合处理组的抑制效果最为显著, 贮藏末期数量仅为 3.39 (lg(CFU/g)), 比其他处理组降低了 2.74~5.02 (lg(CFU/g))。

从图 2B 可以看出, 处理后即贮藏第 1 天, 与对照和细菌素单独处理组相比, 联合处理组和超高压单独处理组样品中的肠炎沙门氏菌数量对数值下降幅度最大; 而且之后整个贮藏过程中, 它们都对肠炎沙门氏菌表现出明显的

抑制作用 ($P < 0.05$), 其中联合处理组的抑制效果最明显, 在整个贮藏 110d 内均未检测到肠炎沙门氏菌的存在。

2.3 pH 值和 a_w 的变化

与对照和细菌素单独处理组相比, 联合处理和超高压单独处理后低温切片火腿的 pH 值在贮藏第 1 天明显升高 ($P < 0.05$), 这可能是由于超高压处理对切片火腿中蛋白质酸性基团的影响造成的。随后的贮藏过程中, 由于乳酸菌大量繁殖, pH 值总体呈下降趋势 (图 3)。其中, 对照组 pH 值在第 10 天急剧下降; 而其他处理组中, 由于乳酸菌的生长受到抑制, 其 pH 值下降较为缓慢。其中, 细菌素单独处理组在第 40 天开始明显下降 ($P < 0.05$), 超高压单独处理组在第 60 天开始明显下降 ($P < 0.05$), 而联合处理组在贮藏末期最后 10d 才开始骤然下降, 这些结果都与图 1 中乳酸菌的生长繁殖情况相吻合。另外, 与对照组相比, 其他处理组对 a_w 的影响都不显著 ($P > 0.05$)。

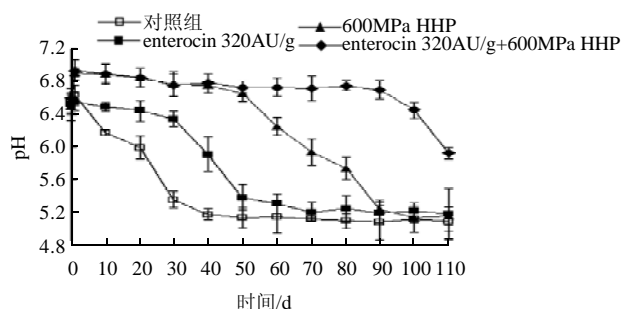


图3 不同处理切片火腿 pH 值的变化
Fig.3 Change in pH of sliced cooked ham during storage at 4 °C

2.4 TVB-N 和 TBARS 值的变化

按照 GB2726—2005《熟肉制品卫生标准》规定, 产品 TVB-N 值必须低于 20mg/100g, TBARS 值必须低于 1mg/kg。基于此, 本研究以 TVB-N 值 20mg/100g 或 TBARS 值 1mg/kg 为产品的理化腐败极限, 各处理组样品的理化指标一旦超出此限即被认定出现腐败。

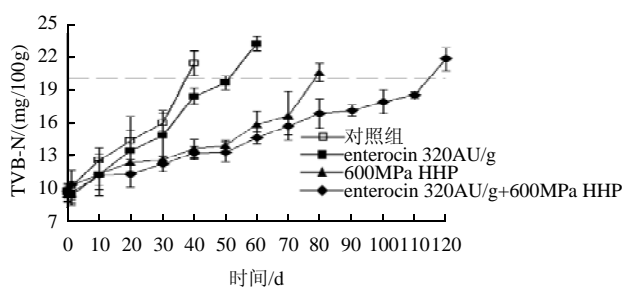


图4 不同处理切片火腿 TVB-N 含量的变化
Fig.4 Change in TVB-N value of sliced cooked ham during storage at 4 °C

图4显示,与对照组相比,细菌素或超高压处理前后切片火腿TVB-N值无明显变化($P > 0.05$),之后随着贮藏时间的延长,各处理组样品TVB-N值不断增高。对照组在贮藏第50天TVB-N值达到21.4mg/100g,超过了腐败限定值;细菌素和超高压单独处理组TVB-N值分别在贮藏第60天和第80天超过腐败极限,而联合处理组样品TVB-N值在110d的贮藏期内都可保持低于20mg/100g(腐败限定值)的水平,这些结果说明联合处理可明显减少切片火腿中挥发性盐基氮的积累。

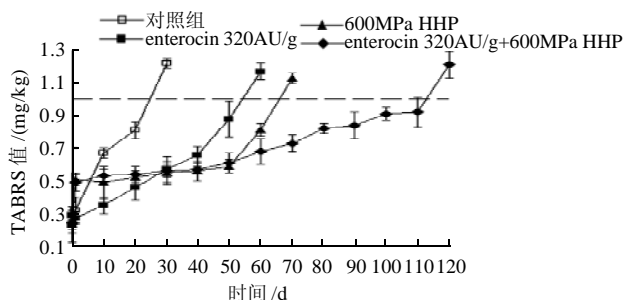


图5 不同处理切片火腿TBARS值的变化

Fig. 5 Change in TBA-RS value of sliced cooked ham during storage at 4 °C

图5显示,与对照组相比,联合处理和超高压单独处理后(贮藏第1天)切片火腿样品的TBARS值轻微升高($P < 0.05$),而细菌素单独处理组没有明显变化($P > 0.05$)。贮藏前期30d内,联合处理和超高压单独处理组样品的TBARS值明显高于细菌素单独处理组,但是从第40天开始,细菌素单独处理组的TBARS值急剧上升,且明显高于联合处理和超高压单独处理组。对照组在贮藏第30天TBARS值已达到1.22mg/kg并超过了腐败限定值;细菌素和超高压单独处理组的TBARS值分别在贮藏第60天和第70天超过腐败极限,而联合处理组的TBARS值在110d的贮藏期内都可保持低于1mg/kg(腐败限定值)的水平,这些结果说明联合处理可明显减慢切片火腿的脂肪氧化程度。

综合以上理化特性分析结果可知,与对照组相比较,其他各处理组都可以不同程度得延长低温切片火腿产品的货架期至50~100d以上,其中,细菌素和超高压联合处理组的抑制效果最明显,可将货架期延长至100d。

2.5 感官特性变化

低温切片火腿贮藏过程中,随着储藏时间的延长,各处理组样品感官品质不断降低。与联合处理组相比,其他各处理组的产品在贮藏100d之前就相继出现了腐败特征:产黏、涨袋、酸腐味等。由图6可知,与标

准产品相比,贮藏第100天联合处理组样品在滋味、表面黏度、质构、色泽及总体可接受性上仍能保持比较高的感官特性分值(均高于4分),这说明联合处理可以最大程度的减少防腐处理对产品感官特性的影响。

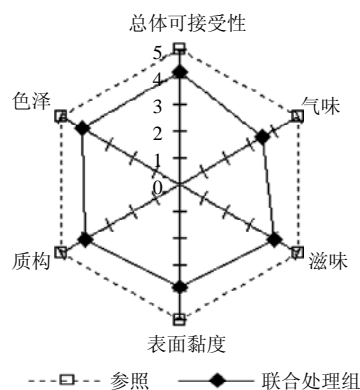


图6 低温切片火腿感官特性的变化

Fig. 6 Sensory quality analysis of sliced cooked ham during storage at 4 °C

2.6 细菌素活性变化

对照组和超高压单独处理组在处理前和整个贮藏过程中均为检测到细菌素抑菌活性;贮藏第1天,联合处理组和细菌素单独处理组样品中均检测到160AU/g的细菌素含量,这说明切片火腿制作过程中细菌素活性有50%的损失,但是超高压处理对切片火腿中细菌素的抑菌活性几乎无影响。随着贮藏时间的延长,联合处理组和细菌素单独处理组样品中的检测到的细菌素活性不断下降。其中,联合处理组样品在110d贮藏过程中均可检测到细菌素活性,且贮藏末期仍保持40AU/g的抑菌效价。

3 讨论

栅栏技术是将许多不同的防腐保鲜技术联合应用以抑制微生物的生长,它在食品工业中已开始广泛应用。近年来,乳酸菌细菌素和超高压作为栅栏技术的一部分引起了许多学者的广泛关注。为了在较低超高压压力下仍获得较强的杀菌效果并增强乳酸菌细菌素对革兰氏阴性细菌的抑菌作用,我们将细菌素和超高压技术联合使用并考察其对低温切片火腿的防腐保鲜效果。通过此方法,一方面可以降低超高压的施压压力、减少设备磨损,另一方面可以通过HHP增加革兰氏阴性菌的细胞膜渗透性,从而增强细菌素对其的抑制效果。

目前,在食品中广泛应用的乳酸菌细菌素是乳酸链球菌素nisin,但是许多研究发现,nisin的抑菌谱仅限于革兰氏阳性细菌,而对革兰氏阴性菌、酵母菌和霉

菌等没有抑菌作用；同时由于 nisin 在肉制品的加工环境 pH 值下溶解度非常低，使得 nisin 在肉制品中的应用受到限制^[28]。本实验选用了乳酸菌细菌素 enterocin LM-2，该细菌素有较宽 pH 值溶解和活性发挥范围，其活性在 pH2~9 之间基本无变化；同时它的抑菌谱很广，不仅对李斯特氏菌、葡萄球菌、芽胞杆菌等革兰氏阳性菌有明显抑制作用，而且对大肠杆菌、假单胞菌、沙门氏菌等阴性菌以及真菌白色念珠菌也表现抑菌活性^[6-7]。

本研究选取低温切片火腿为研究对象，与培养基、缓冲液以及各种食品模拟环境体系相比较而言，真实肉制品的研究结果对食品工业更具有指导意义^[10,26]。研究结果发现，乳酸菌细菌素和超高压联合处理可以大幅度延长低温切片火腿的货架期，但是从微生物角度和理化、感官特性角度分析所推断的货架期却略有不同。从微生物角度分析，协同处理可延长低温切片火腿产品的货架期至 100d，而从理化及感官特性角度分析，协同处理可延长低温切片火腿产品的货架期至 110d。通常认为，理化特性角度分析的货架期应稍长于微生物角度分析的货架期，本研究所得结果与其保持一致。此外，从货架期分析结果，从本实验还可以看出，细菌素和超高压联合处理组的货架期明显长于两者单独处理后的货架期之和，这说明细菌素和超高压处理之间存在明显的协同作用，Alpas 等^[9]在研究中也发现了类似现象，对此目前仅有的认识是 HHP 可以破坏革兰氏阴性菌的细胞膜，使细菌素更容易进入细胞并发挥其抑菌作用^[7]，但是对于两者之间的更为详细的协同作用机制还有待于进一步的分析探讨。

在协同处理组切片火腿的制作中，本实验按照 320 AU/g 添加了 enterocin LM-2，但是所制备产品中细菌素活性却损失了 50%，Garriga 等^[10]和 Zhang 等^[29]在研究中也发现了类似现象。分析其原因可能是由于：切片火腿肉原料中蛋白酶对细菌素的降解作用；细菌素对肉原料中脂肪或蛋白质的吸附作用^[5,30]。鉴于此，未来有待进一步系统地研究食品基质和理化环境，微生物菌群以及其他添加物质等对细菌素抑菌活性发挥的影响，为乳酸菌细菌素作为新型生物防腐剂广泛用于食品防腐保鲜奠定基础。

本研究中，enterocin LM-2 添加量 320AU/g 且经 600MPa 超高压处理 5min 的联合处理组的抑菌效果最好，可将切片火腿货架期延长至 100d。而目前市售的低温切片火腿的货架期一般在 2~3 个月。虽然与其相比，细菌素和超高压联合处理并没有明显延长货架期，但是本研究所生产的低温切片火腿中不添加任何化学防腐剂（除了亚硝酸盐成分），大大减少化学防腐剂的使用，避免了化学防腐剂可能给人体及自然环境带来的各种潜在隐患。

综上所述，在不添加任何化学防腐剂的情况下，乳酸菌细菌素 enterocin LM-2 和超高压技术的联合使用可明显延长低温切片火腿的货架期，有效减少贮藏过程中挥发性盐基氮的生成及脂肪氧化，并保持产品原有色泽、气味、质构等感官特性，显示出乳酸菌细菌素和超高压联合防腐技术在低温肉制品防腐保鲜中的巨大应用前景。

参考文献：

- [1] HOOVER D G, STEENSON L R. Bacteriocins of lactic acid bacteria [M]. New York: Academic Press, 1993: 63-91.
- [2] 郭兴华. 益生乳酸细菌 / 分子生物学及生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 219-385.
- [3] LEISTNER L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(1): 181-186.
- [4] CHAWLA S P, CHANDER R. Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology[J]. Food Control, 2004, 15(7): 559-563.
- [5] DEEGAN L H, COTTER P D, HILL C, et al. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1058-1071.
- [6] 刘国荣. 一种 II a 肠球菌素的分离纯化、异源高效分泌表达及应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2011.
- [7] MARCOS B, AYMERICH T, MONFORT J M, et al. High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham[J]. Food Microbiology, 2008, 25(2): 177-182.
- [8] HAYMAN M M, BAXTER I, ORIORDAN P J. Effects of high-pressure processing on the safety, quality, and shelf life of ready-to-eat meats[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(8): 1709-1718.
- [9] ALPAS H, BOZOGLU F. The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(4): 387-392.
- [10] GARRIGA M, AYMERICH M T, COSTA S, et al. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage[J]. Food Microbiology, 2002, 19(5): 509-518.
- [11] MORGAN S M, ROSS R P, BERESFORD T, et al. Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(3): 414-420.
- [12] LIU G., GRIFFITHS M W, WU P, et al. *Enterococcus faecium* LM-2, a multi-bacteriocinogenic strain naturally occurring in "Byaslag", a traditional cheese of Inner Mongolia in China[J]. Food Control, 2010, 22(2): 283-289.
- [13] 卫生部. GB 4789.2—2010 食品微生物学检验: 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [14] 卫生部. GB 4789.35—2010 食品微生物学检验: 乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [15] 农业部. NY/T 1331—2007 乳与乳制品中嗜冷菌、需氧芽孢及嗜热需氧芽孢数的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] 卫生部. GB 4789.3—2010 食品微生物学检验: 大肠菌群计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [17] 卫生部. GB 4789.30—2010 食品微生物学检验: 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [18] 卫生部. GB 4789.4—2010 食品微生物学检验: 沙门氏菌检验[S].

- 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [19] AYMERICH M T, JOFRE A, GARRIGA M, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(1): 173-177.
- [20] 卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.44 — 2003 肉与肉制品卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [21] 卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.181 — 2003 猪油中丙二醛的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [22] SALIH A M, SMITH D M, PRICE J F, et al. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry[J]. *Poultry Science*, 1987, 66(4): 1483-1489.
- [23] ZAPELENA M J, ASTIASARAN I, BELLO J. Dry fermented sausage made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or a starter culture[J]. *Meat Science*, 1999, 52(4): 403-409.
- [24] KOTZEKIDOU P, BLOUKAS J G. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-packed cooked ham[J]. *Meat Science*, 1996, 42(3): 333-345.
- [25] COFFEY A, RYAN M, ROSS R P, et al. Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 43(3): 231-235.
- [26] 韩衍青, 张秋勤, 徐幸莲, 等. 超高压处理对烟熏切片火腿保质期的影响[J]. *农业工程学报*, 2009, 25(8): 305-311.
- [27] 国家质量监督检验检疫总局. GB 2726 — 2005 熟肉制品卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [28] LEMAY M, CHOQUETTE J, DELAQUIS P J, et al. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(3): 217-226.
- [29] ZHANG Jinlan, LIU Guorong, LI Pinglan, et al. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat[J]. *Food Control*, 2010, 21(2): 198-202.
- [30] JUNG D S, BODYFELT F W, DAESHEL M A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 1992, 75(2): 387-393.