

甘薯叶绿原酸的抑菌作用及其复配型防腐剂对发酵香肠的影响

王世宽,谢仁有,洪玉程

(四川理工学院生物工程学院,四川 自贡 643000)

摘要:首先对甘薯叶绿原酸的抗菌活性进行研究,在此基础上将甘薯叶绿原酸、红曲色素、亚硝酸钠加入到发酵香肠中,采用正交实验 $L_9(3^4)$ 对储藏 30 d 的发酵香肠的挥发性盐基氮进行测定和感官分析,结果表明:甘薯叶绿原酸对植物乳杆菌、葡萄球菌、汉逊酵母、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有抑制作用,发酵剂生长产生的绿原酸浓度达到 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,复配型防腐剂的最佳添加量为:红曲色素 1200 mg/kg,亚硝酸钠 50 mg/kg,绿原酸 200 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

关键词:甘薯;绿原酸;抗菌;防腐剂

中图分类号:TS202

文献标识码:A

引言

甘薯(*Ipomoea batatas* Lam.)又名红薯、红苕、番薯、地瓜等,广泛种植于世界各国,其中我国是甘薯的种植大国之一,而甘薯叶中含有多种营养成分^[1-2],且富含多种活性多糖、黄酮类化合物和绿原酸,有报道绿原酸具有多种生物活性,如:抗氧化作用、抗菌、抗病毒^[3]、对心血管的保护作用^[4]、抑制突变和抗肿瘤^[5-6]等。

发酵香肠以其特有的风味深受消费者的喜爱。采用的发酵剂主要以嗜酸乳杆菌,植物乳杆菌或弯曲乳杆菌等为主^[7]。为了让香肠有鲜亮的色泽和较长的保质期,香肠中通常添加亚硝酸盐进行发色和防腐。而亚硝酸盐对人体健康有潜在危害,所以在发酵香肠中寻找如何取替亚硝酸盐、减少其添加量、或降低其残留^[8],以便降低饮食风险,是许多研究者需要解决的问题。红曲色素是一种天然食用色素,其广泛应用于食品着色、食品发酵及中医药等领域。除此之外红曲色素在肉制品中具有一定的防腐作用,对肉毒梭状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用,对大肠杆菌、灰色链霉菌的抑制作用较弱^[9-10]。红曲色素对蛋白质着

染性好;而绿原酸具有很强的抗菌作用且能与食品中的亚硝酸盐结合,能阻止亚硝酸盐与胺结合产生致癌的亚硝胺。因此本文将红曲色素和绿原酸作为发色剂和抑菌剂与亚硝酸盐结合用于发酵香肠,从而有效降低发酵香肠中亚硝酸盐的用量。

1 材料与方法

1.1 材料

甘薯叶、鲜猪肉(瘦肉 75%,肥肉 25%)、食盐、味精、白酒、葡萄糖、亚硝酸盐、辣椒、花椒、黑胡椒粉、桂皮粉、八角粉、小豆蔻等购买于自贡市超市;金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)来源于广州微生物保藏中心;大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源于四川理工学院微生物实验室;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)来源于广州微生物保藏中心;葡萄球菌属(*Staphylococcus* subsp.) (CI-CC1 01 45)来源于中国工业微生物保藏管理中心;汉逊酵母(*Debaryomyces hansenii*)四川理工学院微生物实验室。

1.2 试剂

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、 NaOH 、 HCl 、磷酸氢二钾、乙酸钠、柠檬酸

收稿日期:2012-05-23

基金项目:四川省教育厅自然科学基金项目(10ZA139)

作者简介:王世宽(1964-),男,重庆人,教授,硕士,主要从事农产品储藏与加工方面的研究,(E-mail) sclgws@ yahoo. com. cn

钠、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 、酚红、NaCl 等均为分析纯;蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、葡萄糖、琼脂等生化试剂。

1.3 培养基

MRS 培养基^[11]:蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母粉 5 g, K_2HPO_4 2 g,乙酸钠 5 g,柠檬酸钠 5 g(柠檬酸二铵 2 g),葡萄糖 20 g,吐温 80 1 mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL, pH6.2~6.8。

MSA 培养基:牛肉浸膏 1 g,胰蛋白胨 10 g,D-甘露醇 10 g,NaCl 75 g,酚红 0.025 g,琼脂粉 15 g,1000 mL 蒸馏水,调 pH 值至 7.2~7.6。

细菌培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1000 mL,固体培养基添加 20 g 的琼脂,调 pH 7.0。

1.4 仪器

SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州净化设备有限公司);MJ-250 生化培养箱(上海美谱达仪器有限公司);YX-280B 高压灭菌锅(江阴滨江医疗设备厂);JA2003 电子天平(上海衡平仪器仪表厂);CHN868pH 计(上海精密科学仪器有限公司);XSM 生物显微镜(上海拓精工业测定仪器有限公司)KD23B-DE 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);TDL-5C 型离心机(上海安亭科学仪器厂);GZX-DH.300-BS-II 电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂);T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);SHB-3 循环水式多用真空泵(西安禾谱生物科技有限公司)。

1.5 试验方法

1.5.1 绿原酸提取液的制备

新鲜甘薯叶→干燥→粉碎→乙醇浸泡 12 h→超声波辅助提取→抽滤→减压浓缩→冷沉离心→含量测定。

工艺条件为:乙醇浓度 60%,料液比 1:30,超声时间 50 min,超声温度 50 ℃。

1.5.2 绿原酸抑菌效果

取直径为 6 mm 的滤纸片干热灭菌,将浸提液用无菌水稀释至 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的绿原酸,滤纸片放入此浓度的绿原酸提取液中浸泡 16 h。将供试菌种的固体培养基在超净工作台制成平板并取 0.1 mL 菌液分别涂布于相应的平板上,取含提取液的滤纸片贴在含菌平板上,每皿贴 3 片,每菌做 3 次重复。金黄色葡萄球菌,大肠杆菌,植物乳杆菌置于 37 ℃、汉逊酵母置于 27 ℃ 的生化培养箱内培养 48 h。测定 24 h,48 h 后滤纸片的抑菌圈大小,比较抑菌效果。

1.5.3 绿原酸最低抑菌浓度(MIC)测定

配制上述菌种分别所需的液体培养基,准确量取

8.9 mL 分装试管,在 121.3 ℃ 下湿热灭菌 20 min。将浸提液用无菌水配置成 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列浓度液。将以上浓度系列液 1 mL 加入上述试管中,取 0.1 mL(菌液浓度 10⁷~10⁸ cfu/mL)菌液接种于相应的上述液体培养基中。每个系列做三次重复。金黄色葡萄球菌,大肠杆菌,植物乳杆菌置于 37 ℃、汉逊酵母置于 27 ℃ 的生化培养箱内培养 48 h。观察菌种生长情况,以完全没有菌生长的最低浓度为最低抑菌浓度。用紫外可见分光光度计测定在 650 nm 波长下细菌培养液的 OD 值,每个系列以不加菌液的试管为空白对照^[12]。培养液 OD 值与培养液内细菌繁殖速度呈正相关,OD 值升高越快,表示培养液内细菌繁殖速度越快。由于培养液中加入绿原酸提取液,有一定抑菌作用,可以延缓细菌培养液的 OD 值上升。若细菌培养液的吸光度与空白对照组一致,表明该培养液中完全没有细菌的生长繁殖,则该样液浓度即为绿原酸提取液的最低抑菌浓度。

1.5.4 绿原酸对发酵剂的驯化

由最小抑菌浓度测定的结果进行菌种的驯化,采用三个菌种均能生长的绿原酸浸提液浓度进行菌种驯化。目的让混合发酵剂植物乳杆菌,葡萄球菌,汉逊酵母在绿原酸存在的环境下正常生长繁殖。

配制植物乳杆菌,葡萄球菌,汉逊酵母的液体培养基,准确量取 8.9 mL 分装试管,在 121.3 ℃ 下湿热灭菌 20 min。取上述浓度的绿原酸浸提液 1 mL 加入上述试管中,取 0.1 mL 菌液接种于相应的上述液体培养基中,每个系列做三次重复。植物乳杆菌置于 37 ℃、葡萄球菌置于 30 ℃、汉逊酵母置于 27 ℃ 的生化培养箱内培养至 18 h。观察菌种生长情况,用紫外可见分光光度计在 650 nm 波长下测定细菌培养液的 OD 值。以不含绿原酸浸提液的试管得到的 OD 值做空白对照。重复上述试验,当试验组的 OD 值在 18 h 时与对照组相同,说明菌种已经适应绿原酸的环境,斜面冷藏保存。

1.5.5 发酵香肠的加工工艺

工艺流程^[13]:香辛料,调味料,红曲色素,绿原酸浸提液→原料肉→整理切块→绞肉→腌制→拌料→接种发酵剂→灌制→发酵→烘烤(高温 50 ℃ 烘烤 6 h)。

操作要点:发酵剂接种量为 2%,植物乳杆菌:葡萄球菌:汉逊酵母为 2:1:2,发酵温度为 30 ℃。

1.5.6 正交试验设计

根据相关资料选择红曲色素、亚硝酸钠、结合绿原酸,在预实验的基础上,分别选择三个水平进行四因素

三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,得到 9 组不同添加量组合的复配型防腐剂,同时做添加亚硝酸钠的对照组,添加量按照食品添加剂卫生标准进行,为 0.015%。储藏 30 d 后检测挥发性盐基氮含量、并做感官评定。

1.5.7 挥发性盐基氮的测定

按 GB5009.7-85 执行^[14],每组做三个平行,取平均值。

1.5.8 菌落统计

采用涂布平板菌落计数法。

1.5.9 感官评定

由 10 人组成感官评定小组,分别对肠的异味、酸败味、弹性、斑点等总体可接受性指标进行综合感官评定,满分 100 分。80~100 分:表示香肠无异味、无异物、无霉斑、有正常发酵香肠的香味、肠体弹性适中、与肠衣连接紧密,完全可以接受;60~80 分:表示香肠肠体弹性降低、有正常香味、但香味不明显;40~60 分表示肠体弹性低、发黏、与肠衣连接不紧密、无发酵香肠的正常香味甚至略有异味;0~40 分表示肠体组织松软、发黏、与肠衣连接松弛、发酵香肠异味强烈、部分甚至有霉斑,不可食用。

1.5.10 pH 值

准确称取样品 10 g,搅碎,用蒸馏水定容于 100 mL 容量瓶中均质,浸泡 30 min 后过滤,取滤液用酸度计测定 pH 值,同一样品设 3 个平行,取三次测定的平均值。

1.5.11 数据的统计处理

数据采用统计软件 SPSS13.0 进行统计分析,具体采用 GLM 过程进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 抑菌效果

甘薯叶中绿原酸的抑菌效果试验结果见表 1,由表 1 可以看出,甘薯叶中绿原酸对植物乳杆菌,葡萄球菌,汉逊酵母,大肠杆菌,金黄色葡萄球菌均有抑制作用,并且对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用较强。

表 1 抑菌效果试验结果

供试菌种	植物乳杆菌	葡萄球菌	汉逊酵母	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
抑菌圈直径 (mm)	10.9	11.0	12.0	19.0	22.5

注:抑菌圈直径数据包括滤纸片直径 6mm,系 3 个重复试验的平均值。

2.2 最低抑菌浓度试验

甘薯叶中绿原酸的最低抑菌浓度试验结果见表 2。

甘薯叶中绿原酸对植物乳杆菌,葡萄球菌,汉逊酵母,大肠杆菌,金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度分别为 1000 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 最低抑菌浓度试验结果

供试菌种	甘薯叶中绿原酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)						
	0	50	125	200	250	500	1000
植物乳杆菌	+	+	+	+	+	+	-
葡萄球菌	+	+	+	+	+	+	-
汉逊酵母	+	+	+	+	+	-	-
大肠杆菌	+	+	+	+	-	-	-
金黄色葡萄球菌	+	+	+	-	-	-	-

注:“-”表示无菌生长,“+”表示有菌生长。

由抑菌试验可知抑制有害菌又能使发酵剂生长的绿原酸提取液的浓度是 250 $\mu\text{g/mL}$ 。所以选取绿原酸的驯化浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 。驯化过程及结果见表 3。因此结合表 2、表 3 可得绿原酸浸提液应按 250 $\mu\text{g/g}$ 的加入量加入到发酵香肠中。

表 3 绿原酸浸提液对植物乳杆菌,葡萄球菌,汉逊酵母的驯化结果

组别	培养代数	OD 值		
		植物乳杆菌	葡萄球菌	汉逊酵母
对照组	-	1.530	0.290	0.723
	1	0.693	0.290	0.012
	2	0.925	0.089	0.167
试验组	3	1.345	0.190	0.200
	4	1.529	0.198	0.396
	5	1.529	0.220	0.570
	6	1.530	0.290	0.722
	7	1.530	0.290	0.723

2.3 正交试验结果

正交试验因素水平见表 4。

表 4 正交试验因素水平表

红曲色素 (mg/kg)	NaNO_2 (mg/kg)	绿原酸 ($\mu\text{g/g}$)
800	25	200
1000	50	225
1200	75	250

由表 5 可知,红曲色素的添加量影响发酵香肠的色泽,随着红曲色素添加量的增加,感官效果愈好。由 TVB_N 值的极差分可知,随着绿原酸添加量的增加,TVB_N 值越小,这正是绿原酸抑菌作用的结果。由表 6 方差分析可知,绿原酸的添加量对 TVB_N 值影响最为显著。由综合评分的极差分表 5 可知,影响发酵香肠的质量的因素主次为: $C > B > A$,最佳添加量为:红曲色素 1200 mg/kg ,亚硝酸钠 25 mg/kg ,绿原酸 200 $\mu\text{g/g}$ 。

表5 正交试验结果及综合评定的极差分析结果

试验号	红曲色素 A	亚硝酸盐 B	空白	绿原酸 C	感官评分	TVB_N (mg/kg)	综合评定
1	1	1	1	1	75	17	78.0
2	1	2	2	2	60	14	63.0
3	1	3	3	3	71	12	67.7
4	2	1	2	3	80	10	71.0
5	2	2	3	1	75	14	73.5
6	2	3	1	2	70	13	68.5
7	3	1	3	2	74	12	74.0
8	3	2	1	3	85	10	64.5
9	3	3	2	1	80	16	80.0
K ₁	208.7	223.0	211.0	231.5			
K ₂	213.0	201.0	214.0	201.3			
K ₃	214.3	216.2	211.0	203.2			
k ₁	69.6	74.3	70.3	77.2			
k ₂	71.0	67	71.3	67.1			
k ₃	71.4	72.1	70.3	67.7			
R	1.8	7.3	1.0	10.1			

因素主次(综合评定)

C > B > A

最优方案(综合评定)

A₃B₁C₁

注:综合评分 = 感官评分 × 70% + TVB_N 评分 × 30%; TVB_N 评分采用百分制,即 0-20 的数值乘以 5 的方法计分。

表6 三种防腐剂对 TVB_N 方差分析表

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
红曲色素	6.8890	2	4.4290	19.0000	
亚硝酸盐	0.8890	2	0.5710	19.0000	
绿原酸	37.5560	2	24.1430	19.0000	*
误差	1.5560	2			

注: * 表示 0.05 水平显著。

2.4 发酵过程 pH 值的变化

以未驯化的原始菌种作为发酵剂,亚硝酸钠加入量 100 mg/kg,不添加绿原酸与红曲色素的发酵香肠为对照组。试验组中红曲色素加入量 1200 mg/kg,亚硝酸钠 25 mg/kg,绿原酸 200 μg/g。pH 值变化如图 1 所示,由图可知对照组与试验组 pH 值变化不明显(P > 0.05),绿原酸浸提液及红曲色素的加入对发酵过程中 pH 值的变化影响不显著。

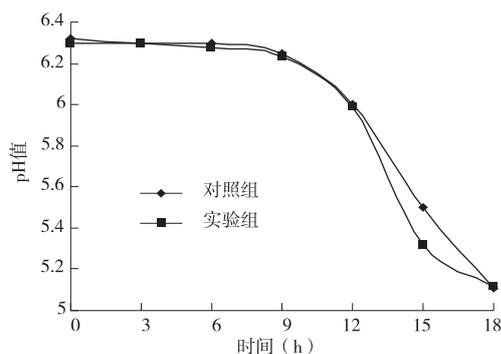


图1 发酵过程中 pH 值的变化

2.5 发酵过程中发酵剂的变化

由图 2 可知试验组与对照组的植物乳杆菌,葡萄球菌

菌,汉逊酵母在发酵过程中均无显著变化(P > 0.05)。说明经驯化过的菌种在加入红曲色素的情况下仍能正常繁殖,绿原酸浸提液,红曲色素对发酵剂生长影响不显著。

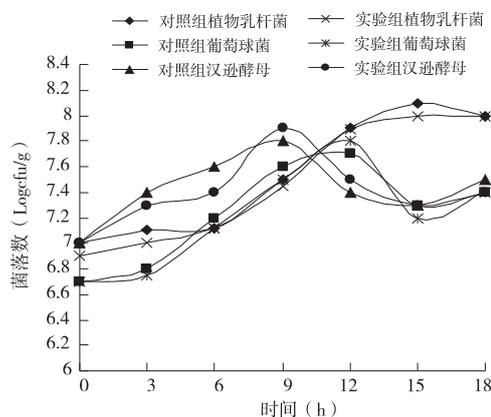


图2 发酵过程中试验组与对照组发酵剂菌落数的变化

3 结论

(1) 甘薯叶绿原酸对植物乳杆菌,葡萄球菌,汉逊酵母,大肠杆菌,金黄色葡萄球菌均有抑制作用,并且对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用较强。甘薯叶绿原酸对植物乳杆菌,葡萄球菌,汉逊酵母,大肠杆菌,金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度分别是:1000 μg/mL, 1000 μg/mL, 500 μg/mL, 250 μg/mL, 200 μg/mL。

(2) 试验选用绿原酸及红曲色素作为发酵香肠的防腐剂和发色剂,对发酵剂进行驯化,使其适应绿原酸的生长环境,通过几代驯化培养使得植物乳杆菌,汉逊酵母,葡萄球菌正常生长的绿原酸的浓度为 250 μg/mL。

(3) 以感官评定和挥发性盐基氮为考察指标进行四因素三水平 L₉(3⁴) 正交试验,通过统计分析及综合评定的极差分析可知,影响发酵香肠的质量的因素主次为:绿原酸 > 亚硝酸盐 > 红曲色素。且最佳添加量为:红曲色素 1200 mg/kg,亚硝酸钠 25 mg/kg,绿原酸 200 μg/g。

(4) 由三种防腐剂对 TVB_N 方差分析可得:绿原酸的添加量对 TVB_N 值影响最为显著。

(5) 通过对发酵过程中 pH 值及发酵剂菌落数变化的比较(P > 0.05),可知绿原酸不会影响发酵香肠菌种的正常生长繁殖。

参考文献:

- [1] 程道梅,韩珍珠.甘薯叶蛋白提取方法对提取率及营养成分的影响研究[J].食品科技,2010,35(11):208-210.

- [2] 王世宽,吴平,许艳丽.甘薯叶的营养成份与应用前景[J].四川理工学院学报:自然科学版,2009,22(6):57-59.
- [3] 张鞍灵,马琼,高锦明,等.绿原酸及其类似物与生物活性[J].中草药,2001,32(2):173-176.
- [4] 王辉,田呈瑞,马守磊,等.绿原酸的研究进展[J].食品工业科技,2009,5(30):341-345.
- [5] Federica Pellati, Stefania Benvenuti. Analysis of compounds and radical scavenging activity of Echinacea spp [J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004(35): 289-301.
- [6] 吴卫华,康楨,欧阳冬生,等.绿原酸的药理学研究进展[J].天然产物研究与开发,2006,18:691-694.
- [7] Hughes M C, Kenry J P. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages [J]. Meat Science, 2002, 62: 205-216.
- [8] 姚敬,杭义萍,钟志雄,等.在线渗析-离子色谱联用同时测定熟肉制品中的亚硝酸盐和硝酸盐[J].食品科学,2010,2(31):187-190.
- [9] 王柏琴,杨洁彬,刘克.红曲色素、乳酸链球菌素、山梨酸钾对肉毒梭状芽孢杆菌的抑制研究[J].食品与发酵工业,1995(6):29-32.
- [10] 童群义,高孔荣,周正宏.红曲色素抑菌作用的研究[J].食品工业科技,1997(5):5-6.
- [11] 刘慧.现代食品微生物学试验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2007.
- [12] Garcia-Varona M, Santos E M. Characterisation of *Micrococccaceae* isolated from different varieties of chorizo [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 54: 189-195.
- [13] 刘玺,宋照军,王树宁,等.富硒发酵香肠的工艺研究[J].食品科学,2009,20(30):471-474.
- [14] GB5009.7-85,挥发性盐基氮的测定[S].

Research on Antibacterial Efficiency of Chlorogenic Acid From Sweet Potato Leaf and Effect of Compound Preservatives on Fermented Sausages

WANG Shi-kuan, XIE Ren-you, HONG Yu-cheng

(School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: Based on the study of antibacterial activity of chlorogenic acid from sweet potato leaf and chlorogenic acid, monascus pigment and NaNO_2 are used to fermented sausages. The factors and levels are designed by $L_9(3^4)$ orthogonal test and fermented sausages stored for 30 days are studied by TVB_N and sense organs analysis. The results show that the chlorogenic acid from sweet potato leaf had the antibacterial efficiency on *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus*, *Hansenula* yeast, *E. coli* and *Staphylococcus aureus* the concentration of chlorogenic acid that can restrain harmful bacterium and can cause the yeast growth is 250 mg/mL, the optimal technology is that the used amount of chlorogenic acid, monascus pigment and NaNO_2 are 200 $\mu\text{g/g}$, 1200 mg/kg, 50 mg/kg, respectively.

Key words: sweet potato leaf; chlorogenic acid; antibacterial; preservatives