

# 真空包装酱卤鸭肉优势腐败菌的初步鉴定与精油抑菌作用的研究

张依洁, 程薇, 吴文锦, 丁安子, 李新, 乔宇, 廖李, 王俊, 汪兰

(湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北省农业科技创新中心农产品加工研究分中心, 湖北武汉 430064)

**摘要:** 本文以酱卤鸭肉为研究对象, 用选择性培养基对真空包装酱卤鸭肉在 4 °C 条件下贮藏过程中菌相和贮藏过程中的优势腐败菌进行初步鉴定, 根据香辛料精油的抑菌特性, 选取香辛料精油针对优势腐败菌开展抑菌试验, 将香辛料精油应用于酱卤制品保鲜中。酱卤鸭肉在 4 °C 贮藏条件下, 乳酸菌、假单胞菌、肠杆菌、微球菌和葡萄球菌是样品腐败终点的优势菌。在酱卤鸭肉腐败终点分出 4 株菌株, 进行分子生物初步鉴定, 分别为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、藤黄微球菌 (*Kocuria rhizophila*)。香辛料精油对样品中四种优势腐败菌均有抑制作用, 通过单因素和正交实验确定了最优复配精油比例, 10% 生姜精油、25% 青花椒油树脂、20% 八角茴香精油和 6.25% 肉桂油树脂 1:1:1:1 混合。

**关键词:** 酱卤鸭肉; 优势腐败菌; 精油; 抑菌

文章编号: 1673-9078(2017)6-142-149

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.021

## Preliminary Identification of Dominant Spoilage Bacteria in

## Vacuum-packed Bittern Duck and Their Sensitivity to Essential Oils

ZHANG Yi-jie, CHENG Wei, WU Wen-jin, DING An-zi, LI Xin, QIAO Yu, LIAO Li, WANG Jun, WANG Lan  
(Institute for Farm Products Processing and Nuclear-agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064, China)

**Abstract:** Selective media were used to study the microflora of vacuum-packed bittern ducks during storage at 4 °C and preliminarily identify the dominant spoilage bacteria present. Owing to their antibacterial characteristics, several spice essential oils were selected to perform bacteriostatic tests on the dominant spoilage bacteria, in order to apply essential oils to sauced meat products. The dominant spoilage bacteria in vacuum-packed bittern duck at the end of storage at 4 °C were lactic acid bacteria, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Micrococcus* spp., and *Staphylococcus* spp. At the end of the storage, four strains were isolated, preliminary identification using molecular biological methods was carried out, and the four dominant spoilage bacteria in vacuum-packed bittern duck were identified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Kocuria rhizophila*. The spice essential oils exhibited antibacterial activity against these four dominant spoilage bacteria. Through single factor and orthogonal experiments, the optimum proportions of the compound essential oil were determined as a mixture of 10% ginger essential oil, 25% *Zanthoxylum bungeanum* oleoresin, 20% star anise oil, and 6.25% cinnamon oleoresin with a ratio of 1:1:1:1.

**Key words:** bittern duck; dominant spoilage bacteria; essential oil; antibacterial

低温肉制品是指常压下通过蒸、煮、熏、烤等加工过程, 使肉制品的中心温度达到 75~85 °C, 并且产

收稿日期: 2016-02-16

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303083); 湖北省科技支撑计划项目公益性科技研究(2014BBB012)

作者简介: 张依洁(1991-), 女, 本科, 助理研究员, 研究方向: 农产品加工

通讯作者: 汪兰(1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 畜禽产品加工

品的运输、贮藏、销售原则上要求在低温 0~4 °C 条件下进行的一类肉制品<sup>[1]</sup>。酱卤制品作为一种典型中式低温熟肉制品, 在我国具有悠久的历史, 其口感好、风味佳和使用方便的优点, 使其深受广大消费者的喜爱。酱卤产品大部分带有卤汁, 营养丰富, 水分含量高, 比较适宜微生物生长和繁殖, 易引起腐败变质, 从而导致产品的货架期短, 不便于销售和长途运输, 研究其贮藏过程中的菌相变化和优势腐败菌可以为酱

卤制品的保鲜提供理论基础。由于卤汤是经过多种香辛料熬制而成, 酱卤制品也因其带有的香辛料的风味而备受喜爱, 因此, 本文采用安全低毒的香辛料精油作为酱卤制品的保鲜剂, 以期增加其风味和保鲜效果。

林慧珍等<sup>[2]</sup>的研究表明, 冰鲜鸭在冷藏期间, 假单胞菌大幅增长, 成为最重要的腐败菌, 占 67.81%, 与彭勇等<sup>[3]</sup>在冷却猪肉常见腐败微生物的研究和马含笑等<sup>[4]</sup>在冷却肉中特定腐败微生物的结果较为一致, 以上可以看出, 冷鲜肉中的优势腐败菌主要是假单胞菌。在熟肉制品的研究成果中, 林睿等<sup>[5]</sup>在裸装卤制全鸭 15 °C 条件下的菌相初步研究中发现, 裸装卤制全鸭中主要存在乳酸菌属、微球菌和葡萄球菌属、肠杆菌科、热杀索丝菌属、假单胞菌属的微生物菌株, 且乳酸菌为主要腐败菌。本文在前人的研究基础上做进一步的探究, 对真空包装酱卤鸭肉在贮藏过程中的菌相变化进行分析, 初步确定其主要的腐败菌, 并采用香辛料精油针对初步鉴定的菌株开展抑菌实验, 通过实验得出香辛料精油复配的最佳配比, 为进一步研究酱卤鸭肉防腐保鲜技术提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 原料和试剂

冷冻冰鲜鸭肉: 调料等均为市售; 平板计数琼脂、月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤、营养琼脂培养基、硫乙醇酸盐琼脂培养基、MRS 琼脂培养基、假单胞菌 CFC 选择性培养基、STAA 琼脂培养基、紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基、肠球菌胆汁七叶苷叠氮钠琼脂培养基及 MSA 琼脂培养基和孟加拉红培养基: 购自青岛高科园海博生物技术有限公司; 大蒜精油、生姜精油、姜油树脂、八角茴香精油、肉桂油树脂及青花椒油树脂: 安徽凯博生物科技有限公司; 丙二醇: 国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 仪器和设备

PL602-L 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)

有限公司; 双哈牌 YX 280 型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器, 上海三申医疗器械有限公司; PowerPac Basic 电泳仪、Universal Hood II 凝胶成像仪: BIO-RAD 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 酱卤鸭肉加工工艺

原料→清洗→腌制→焯水→卤制→覆保鲜膜后在 4 °C 冷却→真空包装→4 °C 贮藏。

#### 1.2.2 试验设计

将真空包装的酱卤鸭肉, 置于 4 °C 下贮藏, 贮藏期间在 0、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31、34 和 37 d 时对样品抽样, 进行菌相分析。

#### 1.2.3 腐败微生物检测方法

##### 1.2.3.1 菌落总数检测方法

参照 GB 4789.2-2010。

##### 1.2.3.2 大肠菌群检测方法

参照 GB 4789.3-2010。

##### 1.2.3.3 耐热菌检测方法<sup>[1]</sup>

将检样 25 g 加入到盛有 225 mL 无菌水的锥形瓶内, 沸水浴 15 min 以杀死细菌繁殖体及耐热性低的芽孢, 水浴后将锥形瓶迅速冷却。接种于营养琼脂, 在 50~55 °C 培养 48 h 计数。

##### 1.2.3.4 厌氧菌检测方法<sup>[1]</sup>

将检样稀释液 1 mL 注入无菌平皿中, 倒入溶化并晾至 46 °C 左右的硫乙醇酸盐琼脂培养基, 摇匀, 冷凝后, 在其上叠一层 3% 无菌琼脂, 凝固后, 37 °C 培养 96 h, 计数菌落。

##### 1.2.3.5 其它菌检测方法<sup>[1]</sup>

无菌条件下准确称取 25 g 样品, 用无菌剪刀剪碎, 放入含有 225 mL 无菌生理盐水的锥形瓶内, 充分震荡即成 1:10 的均匀稀释液, 然后依次 10 倍递增稀释成所需的浓度梯度。用移液管在每个平皿中接入 1 mL 菌悬液, 然后分别倒入不同菌相的选择性培养基, 混匀, 凝固后置恒温培养箱中倒置培养, 培养条件见表 1。计数菌落。

表 1 不同微生物菌相的培养条件

Table 1 Incubation conditions for different microflora

序号	菌相	选择性培养基	培养条件	操作方法
1	菌落总数	营养琼脂	37 °C/48 h	参见 GB4789.2-2010
2	大肠菌群	乳糖胆盐培养基	37 °C/48 h	参见 GB 4789.3-2010
3	耐热菌	营养琼脂	55 °C/48 h	参见 1.2.3.3
4	厌氧菌	硫乙醇酸盐琼脂	37 °C/48 h	参见 1.2.3.4
5	乳酸菌	MRS 琼脂	30 °C/48 h	参见 1.2.3.5

转下页

接上页

6	假单胞菌	CFC 琼脂	30 °C/48 h	参见 1.2.3.5
7	热杀索丝菌	STAA 琼脂	25 °C/48 h	参见 1.2.3.5
8	肠杆菌	VRBG 琼脂	37 °C/48 h	参见 1.2.3.5
9	肠球菌	AE 琼脂	37 °C/48 h	参见 1.2.3.5
10	葡萄球菌、微球菌	MSA 琼脂	30 °C/48 h	参见 1.2.3.5
11	霉菌	孟加拉红琼脂	25 °C/5 d	参见 1.2.3.5

### 1.2.4 优势腐败菌鉴定

将经初步分离的细菌接种于相应的液体培养基中,利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA,作为 PCR 反应的模板,细菌扩增所用的引物为通用引物 27f 和 1492r。上游引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3', 下游引物 1492r: 5'-GGTACCTTGTTA CGACTT-3'。

PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 2 min, 得到 PCR 产物。将 PCR 扩增产物委托武汉擎科创新生物科技有限公司进行测序。

### 1.2.5 菌悬液制备

挑取两环活化后的菌,接种于 100 mL NA 营养肉汤中, 37 °C 培养 24 h 到稳定期, 此时菌悬液的浓度约为  $10^8$  CFU/g。

### 1.2.6 滤纸片法评估精油抑菌效果

将冷却至 60 °C 左右的培养基倒平板, 待平板凝固后, 各取 0.2 mL 菌悬液用无菌玻璃棒涂布均匀, 将直径 8 mm 的无菌滤纸贴于培养基上, 在滤纸片上滴加精油, 每个做三个平行, 置培养箱中 37 °C 下培养 24 h, 选取抑菌圈比较明显的平板测定抑菌圈直径,

表 2 正交实验因素水平表

Table 2 Table of factors and levels of orthogonal experiment

水平	A	B	C	D
	生姜精油 (0301) /%	青花椒油树脂 (0402) /%	八角茴香精油 (0501) /%	肉桂油树脂 (0602) /%
1	10	20	20	5
2	12.5	25	25	6.25
3	15	30	30	7.5

### 1.2.9 数据处理

实验数据采用 Microsoft Excel 2010 进行统计处理, 同源性比较用 CLUSTAL X 软件; 系统发育树的构建用 MEGA 5.0 软件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酱卤鸭肉制品初始菌相构成

在贮藏过程的菌相构成结果中, 平板计数培养基

结果取 3 次重复实验的平均值。

### 1.2.7 最低抑菌浓度 (MIC) 的测定

取精油适量, 用 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤除菌, 并用丙二醇配制成等比浓度梯度的稀释液。精油的浓度表示为单位体积丙二醇中含有的精油体积, 用百分数 (V/V, %) 表示。吸取各稀释度的精油 1 mL 加入平板, 再将冷却至 46 °C 左右的培养基倒入平板中与精油混匀, 待培养基凝固后, 加入相应菌悬液 0.1 mL 于培养基上, 用无菌玻璃棒涂布均匀, 置于 37 °C 培养箱培养 24 h。以完全不生长菌的试验样品的最低浓度为精油的 MIC。

稀释液浓度如下: 生姜精油等比稀释成 50%、25%、12.5% 和 6.25%; 青花椒油树脂及八角茴香精油等比稀释成 50%、25%、12.5% 和 6.25%; 肉桂油树脂等比稀释成 50%、25%、12.5%、6.25%、3.125% 和 1.563%。

### 1.2.8 复配精油的抑菌效果

在单精油实验的基础上, 以生姜精油、青花椒油树脂、八角茴香精油和肉桂油精油为四个因素, 以抑菌圈直径为指标, 采用  $L_9(3^4)$  型正交试验, 确定香辛料精油复配的最佳比例。选择抑菌效果最好的复配配方, 用于下一步的肉制品保鲜试验。

培养得到的菌落总数结果与各种不同选择性培养基培养得到的各种细菌菌落总数之和相近, 其比例之和均在 0.9~1.2, 说明利用选择性培养基对样品的菌相进行分析具有一定的合理性。

从表 3 看出, 真空包装酱卤鸭肉初始菌相构成中, 优势腐败菌主要是乳酸菌、微球菌和葡萄球菌, 其次是假单胞菌、肠杆菌。酱卤鸭肉中乳酸菌所占的比例最大, 为 62.8%。结合林慧珍<sup>[3]</sup>对冷藏冰鲜鸭的菌相构成研究, 推测在冰鲜鸭肉原料和酱卤鸭肉初期, 乳

酸菌都是其优势菌。

表3 酱卤鸭肉制品初始菌相分析

序号	菌相	初始菌相/(CFU/g)	比例/%
1	菌落总数	1882	-
2	大肠菌群 (MPN/100 g)	0	-
3	耐热菌	0	0
4	厌氧菌	1152	-
5	乳酸菌	1182	62.8
6	假单胞菌	5	0.27
7	热杀索丝菌	0	0.00
8	肠杆菌	10	0.53
9	肠球菌	0	0
10	微球菌、葡萄球菌	982	52.17
11	霉菌	0	0.00

## 2.2 菌相分析

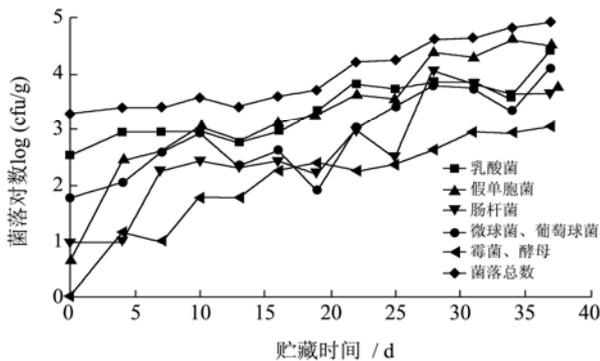


图1 4 °C贮藏条件下酱卤鸭肉中各菌的变化情况

Fig.1 Changes in the bacterial count of different strains in bittern duck under 4 °C storage conditions

4 °C贮藏下，真空包装酱卤鸭肉在37 d时菌落总数超标 (GB 2726-2005 熟肉制品卫生标准 (酱卤肉): 菌落总数 $\leq 80000$  CFU/g, 即 $\leq 4.903$  lgCFU/g), 达到4.915 lgCFU/g。在酱卤鸭肉贮藏过程中,除了耐热菌、肠球菌和热杀索丝菌一直未检测出外,乳酸菌、假单胞菌、肠杆菌、葡萄球菌和微球菌以及霉菌酵母均检测出,且随着贮藏时间的延长而明显变化,因此后文主要针对乳酸菌、假单胞菌、肠杆菌、葡萄球菌和微球菌以及霉菌酵母进行菌相分析<sup>[6]</sup>。

4 °C贮藏条件下,真空包装酱卤鸭肉中各菌的变化情况如图1所示。随着贮藏时间的延长,假单胞菌、肠杆菌、微球菌和葡萄球菌、霉菌和酵母的菌落对数均呈现明显的上升趋势,相比其他几类菌而言,假单胞菌的上升幅度最大。结合图2,假单胞菌在贮藏0 d至腐败终点时,其所占比例由0.27%上升至63.52%,在整个贮藏过程中菌相变化明显。据相关文献报道,

假单胞菌是冷鲜肉中重要的优势腐败菌之一,本研究中酱卤鸭肉初始菌相(0 d)中检出量较少,可能是因为加工过程中加热使其大部分被杀死。而假单胞菌能够在低温有氧环境下快速生长,具有很强的产生氨等腐败产物的能力<sup>[7,8]</sup>。

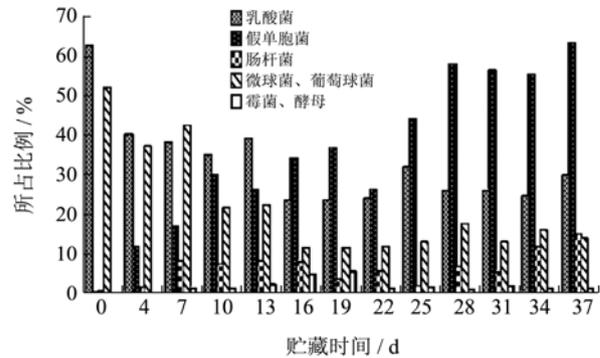


图2 4 °C贮藏条件下酱卤鸭肉中各菌所占比例的变化情况

Fig.2 Changes in microflora composition in bittern duck under 4 °C storage conditions

0 d时,假单胞菌所占比例为0.27%,乳酸菌所占比例为62.80%。低温条件下假单胞菌生长繁殖快速,乳酸菌和微球菌生长速率较为缓慢,以致于随着贮藏时间的延长,假单胞菌持续快速增长,受到竞争的乳酸菌和微球菌增长较慢,乳酸菌所占比例从62.80%下降至30%左右,微球菌所占比例从52.17%下降至15%。由于真空包装并非完全无氧,而是一个低氧压或缺氧的条件<sup>[9,10]</sup>,同时包装袋也具有一定的透氧性,因此,为低温环境下也能快速生长的假单胞菌提供了条件。乳酸菌和微球菌的优势生长温度往往超过20 °C<sup>[11-14]</sup>,在低温、低氧压或缺氧状态下生长较为缓慢。肠杆菌与霉菌酵母在储藏过程中处于稳定增长的状态,二者所占比例分别在10%和3%上下波动<sup>[15,16]</sup>。

腐败终点时优势腐败菌是指所占比例超过10%的菌株<sup>[17-19]</sup>,乳酸菌(30.11%)、假单胞菌(63.52%)、肠杆菌(15.27%)、微球菌和葡萄球菌(14.16%)是样品腐败终点的优势菌株。

## 2.3 优势菌株鉴定

在真空包装酱卤鸭肉的腐败终点,从中挑选出具有特异性形态的优势细菌进行形态学鉴定<sup>[20,21]</sup>,共挑选出4株,2株为革兰氏阳性菌,2株为革兰氏阴性菌,对其按照筛选时选用的选择性培养基缩写进行编号为CFC-1、VRBG-1、MSA-1和MRS-1,根据16S rDNA基因序列的相似性比对结果,选取最相似序列来构建系统发育树。

利用NCBI对测序所得16S rDNA序列与核酸序

列数据库中已知序列进行同源比对,以 CFC-1 菌株和 VRBG-1 菌株为例,从中选取同源性高达 98% 以上的 10 株左右菌株序列,使用 MEGA 5.0 软件,通过邻接法构建系统发育树进行相似性分析(见图 3 和图 4)。结合其菌落特征、革兰氏染色形态(图 5)和图 3、图 4 的系统发育树,CFC-1 初步鉴定为荧光假单胞菌,VRBG-1 初步鉴定为产气肠杆菌。

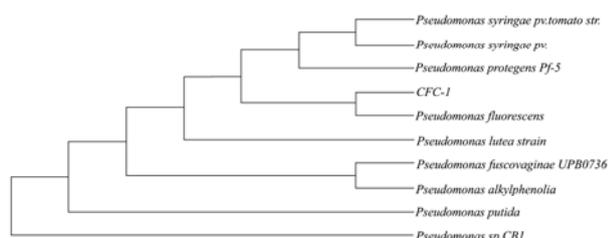


图 3 CFC-1 菌株系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain CFC-1

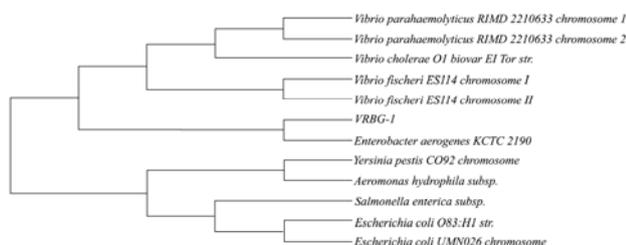


图 4 VRBG-1 菌株系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain VRBG-1

表 4 六种精油对四种酱卤鸭肉腐败菌的抑菌圈直径

Table 4 Zones of inhibition against dominant spoilage bacteria from bittern duck with six essential oils (mm)

精油种类	菌种			
	荧光假单胞菌	产气肠杆菌	表皮葡萄球菌	藤黄微球菌
大蒜精油 (0102)	0	12±1	16±1	49±1
大蒜精油 (0103)	11±1	11±1	17±1	29±1
生姜精油 (0301)	12±1	10±1	29±1	0
姜油树脂 (0305)	0	40±1	10±1	27±1
八角茴香精油 (0501)	12±1	11±1	20±1	8±1
肉桂油树脂 (0602)	38±1	29±1	47±1	41±1
青花椒油树脂 (0402)	13±1	13±1	49±1	13±1

七种精油对四种菌的抑菌圈测定结果如表 4 所示。由表 4 可知,七种精油对四种菌种都有不同程度的抑制作用。抑菌圈实验结果的判定标准:无抑菌圈者为不敏感,7~9 mm 时为低度敏感,10~15 mm 为中度敏感,抑菌圈直径大于 15 mm 位最敏感。根据表 4 中的结果,生姜精油与姜油树脂相比综合效果更佳,因而选择生姜精油进行下一步实验;两种大蒜精油,选择了综合效果较好的大蒜精油(0103)。综上,挑选大蒜精油(0103)、生姜精油(0301)、八角茴香精油(0501)、肉桂油树脂(0602)和青花椒油树脂(0402)五种精油做下一步的精油复配实验。

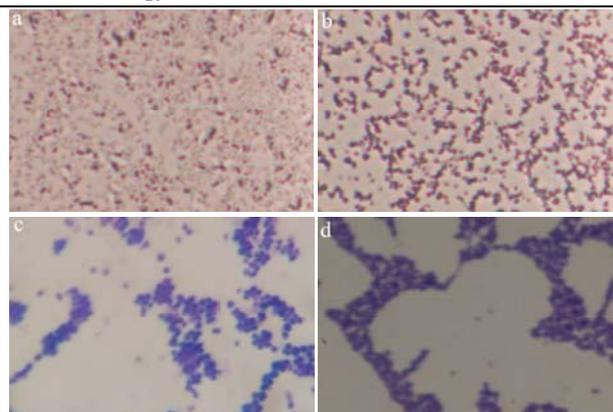


图 5 革兰氏染色形态图

Fig.5 Gram stain of isolates

注: a 表示荧光假单胞菌; b 表示产气肠杆菌; c 表示表皮葡萄球菌; d 表示藤黄微球菌。

对分离的 4 株菌进行相似性分析,CFC-1 与假单胞菌属的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)同源性最高,VRBG-1 与肠杆菌属的产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)同源性最高,MSA-1 与葡萄球菌属的表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)同源性最高,MRS-1 与微球菌属的藤黄微球菌(*Kocuria rhizophila*)同源性最高。

## 2.4 精油的抑菌活性测定

## 2.5 精油的 MIC

用平板法测试了大蒜精油(0103)、生姜精油(0301)、八角茴香精油(0501)、肉桂油树脂(0602)和青花椒油树脂(0402)五种精油对四种菌种的 MIC 值,如下表所示。

由于大蒜精油稀释浓度较高,气味浓郁,对复配后精油的综合气味影响较大,因此不选用。综合表 5 的结果,最后确定生姜精油(0301) MIC 值为 12.5%,八角茴香精油(0501) MIC 值为 25%,肉桂油树脂(0602) MIC 值为 6.25%,青花椒油树脂(0402) MIC

值为 25%。

表 5 五种精油的 MIC 值

Table 5 MIC values of five essential oils

精油	荧光假单胞菌/%	产气肠杆菌/%	表皮葡萄球菌/%	藤黄微球菌/%
大蒜精油 (0103)	50	25	50	50
生姜精油 (0301)	12.5	12.5	12.5	-
八角茴香精油 (0501)	12.5	25	25	-
肉桂油树脂 (0602)	3.125	6.25	3.125	3.125
青花椒油树脂 (0402)	25	25	12.5	25

注：“-”表示无抑菌效果。

香辛料精油可进入细胞壁，线粒体及细胞膜，因其疏水性的特点，可以破坏膜结构，增加膜的渗透性，导致细胞的内容物外漏，从而达到抑菌目的。引起肉类腐败变质的主要菌群通常可分为三大类：细菌，酵母和霉菌。其中假单胞菌和乳酸菌等是腐败变质过程中的优势菌种，在低温冷链中，酵母和霉菌的致病能力较低。多数文献报道精油的复配能大幅提升精油的抑菌效果，以上几种精油的抑菌成分主要有茴香脑、反式肉桂醛、肉桂醛、姜黄素和芳樟醇等，且在抑菌试验中对四种优势腐败菌体现出不同程度的抑菌效果，试验后期通过正交试验将其复配，以期得到更好的抑菌效果。

### 2.6 复配精油的抑菌效果研究

参照以上单因素实验结果，以 MIC 值为各因素中间水平，采用  $L_9(3^4)$ 型正交实验。由于实验针对四种菌种，所以根据酱卤鸭肉贮藏过程中菌相分析的腐败

后期时四种菌种各自所占的比例采取综合计算，公式如下：

$$\text{抑菌圈直径综合计算} = M1 \times 25\% + M2 \times 15\% + M3 \times 5\% + M4 \times 55\%$$

M1 表示表皮葡萄球菌；M2 表示藤黄微球菌；M3 表示产气肠杆菌；M4 表示荧光假单胞菌。

以抑菌圈直径综合计算为指标，对正交实验进行极差分析，得到香辛料精油最佳抑菌组合为  $A_1B_2C_1D_2$ ，即 10%生姜精油、25%青花椒油树脂、20%八角茴香精油和 6.25%肉桂油树脂 1:1:1:1 混合。四个因素对抑菌效果的影响存在差别，其重要性依次为  $A > C > B > D$ ，即生姜精油 > 八角茴香精油 > 青花椒油树脂 > 肉桂油树脂。经过验证试验，最佳组合的复配精油抑菌直径综合计算值能达到 28.650 mm，因此，复配精油的最佳组合为 10%生姜精油、25%青花椒油树脂、20%八角茴香精油和 6.25%肉桂油树脂 1:1:1:1 混合。

表 6 复配精油的正交实验结果

Table 6 Results of orthogonal experiment with compound essential oils

实验号	A	B	C	D	抑菌圈直径综合计算/mm
1	1	1	1	1	27.600
2	1	2	2	2	27.650
3	1	3	3	3	28.000
4	2	1	2	3	22.600
5	2	2	3	1	24.150
6	2	3	1	2	16.000
7	3	1	3	2	21.450
8	3	2	1	3	23.950
9	3	3	2	1	20.450
$\bar{k}_1$	27.750	23.883	25.850	24.100	
均值 $\bar{k}_2$	24.283	25.283	23.567	25.033	
$\bar{k}_3$	21.950	24.817	24.567	24.850	
极差 R	5.800	1.400	2.283	0.933	
主次因素	A>C>B>D				
最优方案	$A_1B_2C_1D_2$				

### 3 结论

真空包装酱卤鸭肉贮藏期间的主要优势腐败菌有假单胞菌、乳酸菌、肠杆菌、葡萄球菌和微球菌,从真空包装酱卤鸭肉腐败终点鉴定出4株优势腐败菌,经菌落特征、菌体形态以及16SrDNA序列分析,CFC-1、VRBG-1、MSA-1、MRS-1分别初步鉴定为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、藤黄微球菌(*Kocuria rhizophila*)。但前人在真空包装熟肉制品的菌相研究中,乳酸菌为主要的优势菌的结论居多,因为真空包装的厌氧环境有利于这些厌氧或兼性厌氧菌的生长,其他优势菌频繁检出的有假单胞菌、芽孢杆菌和热死环丝菌等,不同肉制品结果略有不同。本实验结果乳酸菌仅次于假单胞菌为第二优势菌,推测是由于真空包装熟肉制品的优势菌的种类受加工原料、加工环境、加工工艺以及包装材料的影响较大<sup>[22,23]</sup>,还需进一步探究。根据抑菌实验的结果,确定复配精油的最佳组合为:10%生姜精油、25%青花椒油树脂、20%八角茴香精油和6.25%肉桂油树脂1:1:1:1等体积混合,以香辛料精油代替传统化学防腐剂,不仅提高其安全性,还扩大了香辛料精油在食品领域的应用范围,具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] 殷雪.低温禽肉制品(卤鸭脖)综合保鲜技术研究[D].武汉:武汉工业学院,2008  
YIN Xue. Study on synthetical preservation technology in pasteurized poultry product (spiced duck neck) [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2008
- [2] 林慧珍.冰鲜鸭优势腐败菌的分析及控制技术的研究[D].福州:福建农林大学,2011  
LIN Hui-zhen. Analysis of dominant spoilage bacteria from chilling duck meat and research of the controlling technique [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2011
- [3] 彭勇.冷却猪肉常见腐败微生物致腐能力的研究[D].北京:中国农业大学,2005  
PENG Yong. Study on the putrefaction potential of putrescence microorganism in chilled pork [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005
- [4] 马含笑.真空包装熟肉制品中兼性厌氧污染微生物生物防腐技术的研究[D].石河子:石河子大学,2011  
MA Han-xiao. The antiseptic study on facultative anaerobic contamination microbes in vacuum-packed cooked meat products [D]. Shihezi: Shihezi University, 2011
- [5] 林睿,赵国娇,王宏勋.裸装卤制全鸭中菌相初步研究[J].中国酿造,2012,31(7):93-95  
LIN Rui, ZHAO Guo-jiao, WANG Hong-xun. Preliminary study on microflora of unpacked red-stewed duck [J]. China Brewing, 2012, 31(7): 93-95
- [6] 赵建兰,何丽,候温甫,等.气调包装鸭胸肉中假单胞菌生长预测模型的建立[J].肉类研究,2015,29(4):10-14  
ZHAO Jian-lan, HE Li, HOU Wen-fu, et al. Establishment of predictive model for the growth of *Pseudomonas spp.* in modified atmosphere packaged duck breast meat [J]. Meat Research, 2015, 29(4): 10-14
- [7] 邱静,董庆利,程飞,等.气调包装冷却猪肉中假单胞菌生长概率模型的构建[J].农业工程学报,2012,28(13):257-262  
QIU Jing, JIAN Qing-li, CHENG Fei, et al. Establishment of growth probability model for *Pseudomonas spp.* in chilled pork with modified atmosphere package [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transaction of the CSAE), 2012, 28(13): 257-262
- [8] Martinez L, Djenane D, Cilla I, et al. Effect of different concentrations of carbon dioxide and low concentration of carbon monoxide on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere [J]. Meat Science, 2005, 71(3): 563-570
- [9] Ercolini D, Russo F, Torrierie E, et al. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different pack-aging condition [J]. Applied and Environment Microbiology, 2006, 72(7): 463-467
- [10] Church I, Parsons A. Modified atmosphere packaging technology: a review [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1995, 67(2): 143-152
- [11] Parra V, Viguera J, Sanchez T, et al. Effect of exposure to light on physico-chemical quality attributes of sliced dry-cured iberian ham under different packaging systems [J]. Meat Science, 2012, 90(1): 236-243
- [12] 杨洪岩,王小芬,崔宗均,等.低温环境中乳酸菌的开发利用[J].微生物学报,2008,48(1):132-137  
YANG Hong-yan, WANG Xiao-fen, CUI Zong-jun, et al. Analysis on the development and utilization of the lactobacillus at low temperature environment [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(1): 132-137
- [13] 俞龙浩,贺旺林,李晶晶,等.真空包装哈尔滨红肠菌相分析及优势腐败菌的鉴定[J].现代食品科技,2015,31(3):66-70  
YU Long-hao, HE Wang-lin, LI Jing-jing, et al. Microflora

- analysis and preliminary identification of dominant spoilage bacteria vacuum-packed harbin red sausage [J]. *Morden Food Science and Technology*, 2015, 31(3): 66-70
- [14] Audenaert K, D'Haene K, Messens K, et al. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged, refrigerated, sliced cooked meat products at sell-by date assessed by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(1): 12-18
- [15] 沈嘉川. 延长丰都麻辣鸡块肉制品货架期的方法研究[D]. 重庆:西南大学,2012  
SHEN Jia-chuan. Study on preservation technology of the feng du spicy cooked chicken [D]. Chongqing: Southwest University, 2012
- [16] Jan Kabisch, Constanze Erl-Höning, Mareike Wenning, et al. Spoilage of vacuum-packed beef by the yeast *kazachstania psychrophila* [J]. *Food Microbiology*, 2016, 53: 15-23
- [17] Shalea K, Lues J F R, Venter P, et al. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms [J]. *Food Microbiology*, 2005, 22(5): 433-438
- [18] Zwietering M H, Jongenburger I, Rombouts F M, et al. Modeling of the bacterial growth curve [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56(6): 1875-1881
- [19] Denny C B, Sharpe L E, Bonere C W. Effects of tylosin and nisin on canned food spoilage bacterial [J]. *Appl. Microbiol.*, 1991, 9(2): 108-110
- [20] 叶可评,刘佳,刘梅,等.气调包装酱卤鸭翅贮藏过程中菌群结构分析[J].*食品科学*,2015,36(14):201-205  
YE Ke-ping, LIU Jia, LIU Mei, et al. Analysis of microbial communities of pot-stewed duck wings packaged in modified atmosphere during storage [J]. *Food Science*, 2015, 36(14): 201-205
- [21] 林睿,刘亮,王宏勋.卤制全鸭不同部位均相组成比较[J].*中国酿造*,2012,31(12):91-93  
LIN Rui, LIU Liang, WANG Hong-xun. Composition microflora on the different parts of red-stewed full duck products [J]. *China Brewing*, 2012, 31(12): 91-93
- [22] 高磊,谢晶,叶藻,等.冷鲜鸡腿肉中优势腐败菌的分离鉴定及腐败能力研究[J].*食品与发酵工业*,2015,41(8):48-53  
GAO Lei, XIE Jing, YE Zao, et al. Identification and spoilage capability of dominant spoilage bacteria isolate from leg of chilled chicken [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(8): 48-53
- [23] Dias F S, Ramoscl, Schwanrf. Characterization of spoilage bacteria in pork sausage by PCR-DGGE analysis [J]. *Food Science and Technology*, 2013, 33(3): 468-474