

添加葡萄球菌和微球菌对广式腊肠亚硝酸盐残留量和色泽研究

张大磊¹, 吴兰芳², 程伟伟¹, 范萌萌¹, 蒋爱民¹

(1. 华南农业大学畜产加工与质量安全控制实验室, 广东广州 510640) (2. 河北中医学院, 河北石家庄 050000)

摘要: 本文旨在研究葡萄球菌和微球菌对广式腊肠亚硝酸盐残留量和色泽的影响及其机制。首先将分离筛选自广式腊肠的两株优良特性菌株(葡萄球菌 H33B 和微球菌 X142B)接种至腊肠测定相关指标, 然后通过紫外扫描图谱来确定菌株是否具有转化高铁肌红蛋白能力。结果表明, 接种单菌和混合菌株都能够降低腊肠中的高铁肌红蛋白含量和亚硝酸盐残留量, 并且能够增加亚硝基肌红蛋白含量, 其中以接种葡萄球菌和微球菌 2:1 时效果最好, 与对照组差异明显 ($p < 0.05$); 紫外扫描图谱显示接种葡萄球菌的培养基中溶液出现了亚硝基肌红蛋白的特征吸收峰, 并且溶液中的亚硝酸盐含量最低。这些结果表明葡萄球菌 H33B 具有转化高铁肌红蛋白的能力。因此添加葡萄球菌 H33B 的腊肠, 由于其具有转化高铁肌红蛋白的能力, 会形成更多的还原性肌红蛋白与亚硝酸盐反应, 不仅进一步减少了亚硝酸盐含量还改善了色泽。

关键词: 菌株; 色泽; 亚硝酸盐; 紫外扫描

文章编号: 1673-9078(2015)7-258-264

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.041

Effect of *Staphylococcus* and *Micrococcus* on Residual Nitrite and Color of Cantonese Sausages

ZHANG Da-lei¹, WU Lan-fang², CHEN Wei-wei¹, FAN Meng-meng¹, JIANG Ai-min¹

(1. South China Agricultural University Livestock processing and the quality and safety control laboratories, Guangzhou 510642, China) (2. Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Two beneficial bacterial strains (*Staphylococcus* H33B and *Micrococcus* X142B) were isolated from Cantonese sausage and inoculated into fresh sausages to investigate the effects of the starter culture on residual nitrite and meat color, as well as nitrosomyoglobin and metmyoglobin content. Ultraviolet (UV)-visible (Vis) spectroscopy was then used to determine if the starter culture could convert metmyoglobin into nitrosomyoglobin (NO-Mb). The results indicated that inoculation with single or multiple-strain starter culture increased the amount of NO-Mb in Cantonese sausages. Lower residual nitrite and metmyoglobin content was also observed as compared to that for the control and the optimal effect was observed when the *Staphylococcus:Micrococcus* ratio was 2:1. UV-Vis spectroscopy showed that *Staphylococcus* reduced metmyoglobin to NO-Mb, indicated by an absorption spectrum characteristic of NO-Mb, while the nitrite content was also at a minimum. Thus, *Staphylococcus* H33B caused greater reduction of myoglobin, which subsequently reacted with nitrite to produce more nitric oxide, further reducing nitrite concentration and improving the color of the Cantonese sausages.

Key words: starter culture; color; nitrite; ultraviolet spectra

腊肉腊肠等腌制食品常使用亚硝酸盐作为发色剂, 因其兼具防腐抑制肉毒梭状芽孢杆菌等, 在腌制食品中发挥着不可或缺的作用。然而亚硝酸盐在人体内残留是十分有害的, 会与蛋白分解生成的仲胺类反应生成强致癌物亚硝胺。此外, 亚硝酸盐还会将血红

收稿日期: 2014-10-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303082); 广东省重大科技专项(2011A020102001)

作者简介: 张大磊(1990-), 男, 硕士, 研究方向为畜产品加工与安全控制

通讯作者: 蒋爱民(1957-), 男, 教授, 研究方向为畜产品加工与安全控制

蛋白中的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 使其失去携氧功能。目前降低腌制食品中亚硝酸盐含量的方法主要有化学方法和生物方法, 生物方法主要是利用微生物作为发酵剂降低腌制食品中的 pH 值^[1]或是产生的亚硝酸还原酶^[2]来降解亚硝酸盐, 使亚硝酸盐残留量控制在较低的水平。

另一方面肉制品的颜色是影响消费者接受与否的最重要指标, 腌腊肉制品的色泽主要取决于血红素色素的浓度, 血红素色素中铁离子的价态以及与血红素结合的配位体。葡萄球菌具有亚硝酸盐还原酶、过

氧化氢酶的活性,对腊肠成熟过程中的亚硝酸盐残留量和色泽形成会起到重要作用^[3]。此外据报道一些球菌属具有转化高铁肌红蛋白的能力,如 Arihara^[4]报道一些肠球菌可以在含高铁肌红蛋白的培养基中通过高铁肌红蛋白还原酶将其还原为氧合肌红蛋白, Li^[5]报道木糖葡萄球菌具有将高铁肌红蛋白还原成亚硝基肌红蛋白的能力。

尽管对分离自广式腊肠中的微生物在广式腊肠亚硝酸盐降解和色泽改善方面有过一些前期研究^[3,6],但都未系统研究影响机制。因此本文将分离筛选自广式腊肠中的两株优良特性菌株(葡萄球菌 H33B 和微球菌 X142B)接种至广式腊肠,一方面探究葡萄球菌和微球菌的最佳接种比例,另一方面探讨菌株降低亚硝酸盐残留量和改善色泽的内在机制,以期为广式腊肠内源微生物在广式腊肠的工业化生产提供理论指导和实践依据。

1 材料与方 法

1.1 原料与试剂

1.1.1 原料

鲜猪肉:来源于广州肉联厂;味精、鸡精、白砂糖等购于当地超市。马心肌肌红蛋白冻干粉和甲基紫精购于 Sigma 公司,丙酮、酵母提取物等均购置广州成硕试剂公司,亚硝酸钠、葡萄糖等试剂为分析纯。

1.1.2 供试菌株

葡萄球菌 H33B,微球菌 X142B,均是由华南农业大学食品学院肉品加工与质量安全控制实验室从广式腊肠中分离获得和保存。

1.1.3 培养基

MRS 培养基:丙酮(10 g/L),酵母提取物(10 g/L),葡萄糖(2 g/L),磷酸氢二钾(2 g/L),柠檬酸三胺(2 g/L),乙酸钠(5 g/L),硫酸镁(0.2 g/L),硫酸锰(0.2 g/L),吐温 80(1 g/L),最后将 pH 调至 6.5±0.2。

1.2 仪器与设备

UV-1800 型紫外可见分光光度计:岛津仪器有限公司;X-Rite SP62 型色差计:爱色丽亚太有限公司;DHG-9073BS-III 型电热恒温鼓风干燥箱:上海新苗医疗器械制造有限公司;MM12 型绞肉机:广东省韶关市食品机械厂;电热恒温水浴锅 HH-4:常州澳华仪器有限公司;PHS-3 精密 pH 计:上海精密科学仪器有限公司;BPC-250F 生化培养箱:上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程

1.3.1.1 流程图

微生物接种 辅料
↓ ↓
选料修整→肥肉切膘丁、绞肉绞碎→拌料→灌肠→打针
→扎草、束绳→烘烤→成品整理→包装

此过程中原料肉的样品配料在微生物接种之前都须统一处理,然后在分组接种微生物,以保证试验指标测定的准确性。

1.3.1.2 工艺要点

配方:瘦肉:肥肉=7:3,食盐 3%,汾酒 2%,味精 0.15%,鸡精 0.15%,白砂糖 13%,亚硝酸盐 0.015%,水 15%(均为质量比)。烘烤参数:前 3 h: 50 °C,后 69 h: 40 °C。

1.3.2 实验设计

预实验中,分别接种葡萄球菌和微球菌于广式腊肠中,接种量 10⁵ CFU/g、10⁶ CFU/g、10⁷ CFU/g,结果均显示接种量为 10⁷ CFU/g 风味最好,因此本研究中以 10⁷ CFU/g 作为接种量。另外通过预实验,将葡萄球菌:微球菌=1:1、1:2、1:4、1:6、2:1、4:1、6:1,接种至广式腊肠中,通过感官评定与对照组和单菌组产品的风味进行比较,由于葡萄球菌:微球菌=2:1 的处理组风味最佳,且 1:4、1:6、4:1、6:1 的处理组的产品风味都不及葡萄球菌和微球菌单独处理组,因此本实验最终确定为以下 6 组:第 1 组为未添加菌种的对照组,第 2 组为单独加入葡萄球菌 10⁷ CFU/g,第 3 组为单独加入微球菌 10⁷ CFU/g,第 4 组为接入葡萄球菌和微球菌(质量比 1:1)复合菌种 10⁷ CFU/g,第 5 组为接入葡萄球菌和微球菌(质量比 1:2)复合菌种 10⁷ CFU/g,第 6 组为接入葡萄球菌和微球菌(质量比 2:1)复合菌种 10⁷ CFU/g。取腊肠烘烤 72 h 后的成品进行相关指标测定。

1.3.3 发酵剂的制备

葡萄球菌 H33B 和微球菌 X142B 先在 MRS 琼脂固体培养基上于生化培养箱中 30 °C 培养 48 h,然后挑取单个菌落于 100 mL MRS 液体培养基扩大培养 36 h,离心(9000 r/min, 10 min, 4 °C)收集菌体,用无菌生理盐水洗涤菌体两次后重新溶解于灭菌生理盐水中,最后根据事先用平板计数法做好的菌株的 OD 值和其菌落总数的曲线关系图将菌体浓度调整到 10⁷ CFU/mL^[6]。

1.3.4 测定方法

1.3.4.1 亚硝酸盐还原酶酶活测定

参考罗岩的测定方法^[7]。酶活定义为每分钟所还原 1nmol 亚硝酸盐所需要的酶量定义为一个酶活力单位[nmol/(min mL)]。

1.3.4.2 广式腊肠色泽的测定

将 10 g 广式腊肠绞碎后,放入皿中,铺平皿底,采用爱色丽 X-Rite SP62 型色差计测定腊肠明度值(L^* 值)、红度值(a^* 值)和黄度值(b^* 值),每个样品重复 3 次,每次从三个不同的方位进行测定,取平均值。色差计采用 D65 光源,2°视角,30 mm 聚光镜测定。

1.3.4.3 广式腊肠高铁肌红蛋白含量的测定

参考 Krzywicki 方法^[8]。称取 5 g 广式腊肠于 25 mL 浓度为 40 mmol/L 的冷磷酸盐缓冲液中(pH 6.8),用高压均质机均质 10 s,4 °C 下放置 1 h,然后于 5804R 型冷冻离心机离心(10000×g, 4 °C, 30 min),上清液用 Whatman No.1 滤纸过滤,然后用紫外分光光度计在 525,545、565,572 nm 波长下进行测定,高铁肌红蛋白含量如下式计算得出:

$$\text{MetMb}(\%) = (-2.541R_1 + 0.777R_2 + 0.800R_3 + 1.098) \times 100 \quad (1)$$

式(1)中 $R_1 = A_{572}/A_{525}$, $R_2 = A_{565}/A_{525}$, $R_3 = A_{545}/A_{525}$ 。

1.3.4.4 广式腊肠中亚硝基肌红蛋白分析

参考 Gao 的测定^[9],略加修改如下:称取 10 g 广式腊肠,绞碎后放入磷酸盐(pH 6.0, 0.02 mol/L)缓冲液中,于 FJ-200 型均质机 4000 r/min 均质 1 min,然后放在 4 °C 的黑暗环境中 1 h,离心(4000 r/min, 1 min)取上清液,用 0.22 μm 的硝酸纤维素膜膜过滤,然后快速用紫外分光光度计在 350 nm 到 600 nm 波长范围进行紫外扫描,每 1 nm 一个间隔。以亚硝基肌红蛋白特征吸收峰处对应的吸光值大小表征亚硝基肌红蛋白含量的高低。

1.3.4.5 广式腊肠中亚硝酸盐含量的测定

参照中华人民共和国国家标准 GB/T5009.33-2010 食品中亚硝酸盐的测定方法中的分光光度法进行测定。每个样品平行测定 3 次,取平均值。

1.3.4.6 广式腊肠 pH 值的测定

参照中华人民共和国国家标准 GB/T9695.5-2008,肉与肉制品 pH 值测定。

1.3.4.7 菌株转化高铁肌红蛋白能力测定

参照 Gøtterup 的测定方法^[2],稍加修改。将 20 mg/mL 的肌红蛋白冻干粉末溶解在 50 mM (pH 6.0) 的磷酸钠缓冲液中,于 50 °C 水浴锅中加热 30 min 使高铁肌红蛋白还原酶失活。然后离心(10000 g, 5 min, 4 °C)收集上清液,上清液中大约含 80% 以上的高铁肌红蛋白,将溶液通过 0.22 μm 的灭菌微孔滤膜注入

MRS 培养基中(含 0.2 mM 的 NaNO_2),使得最后的高铁肌红蛋白浓度大约为 2 mg/mL,此浓度与肉中的高铁肌红蛋白含量相当。根据事先用平板计数法做好的菌株的 OD 值和其菌落总数的曲线关系图将培养一夜收集到的葡萄球菌 H33B 和微球菌 X142B 分别约 100 μL 和 80 μL 加入到 3 mL 含高铁肌红蛋白的 MRS 培养基中使得最后菌体浓度达到 10^7 CFU/mL。然后立即在培养基上涂一层灭菌的石蜡油隔绝氧气。于 40 °C 恒温培养箱中培育 20 h 后,将培养基进行离心(10000 g, 5 min, 4 °C),收集上清液。取 1.5 mL 上清液与石英比色皿中,用不含高铁肌红蛋白的 MRS 培养基作为空白进行紫外扫描测定。紫外扫描的波长范围为 400 nm 到 700 nm,间隔为 1 nm。

模型中亚硝酸盐残留量和色泽的测定:参考 McClure 的模型^[14]稍加修改。MRS 培养基中包含 2 mg/ml 的高铁肌红蛋白,亚硝酸钠(100 mg/kg)以及处于对数生长期的菌株(10^7 CFU/mL)。亚硝酸盐残留量与腊肠中亚硝酸盐测定类似,取培养 8、14、20 h 的培养液分别进行测定。

模型中液体色泽的测定参考 Li 的方法^[5]。首先离心(10000 g, 5 min, 4 °C)去除菌体,然后将液体倒入石英比色杯中,用色差计(透射模式)进行测量,每个样品平行测定 6 次,取平均值。

1.4 数据处理

结果以均数±标准差(mean±SD)表示;数据使用 spss 17.0 和 Origin 8.0 软件对数据进行方差分析和作图,并进行 Duncans 差异做显著性分析(P<0.05 表示差异显著,P>0.05 表示差异不显著)。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐还原酶活力测定

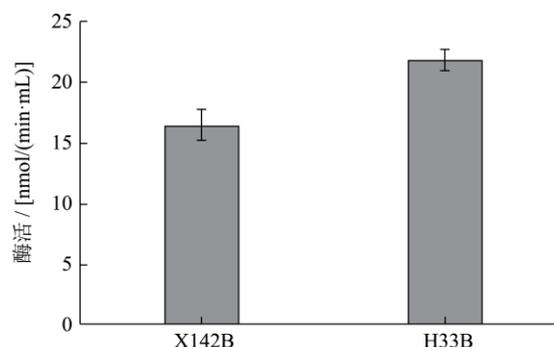


图 1 广式腊肠中葡萄球菌和微球菌亚硝酸盐还原酶活力测定

Fig.1 Nitrite reductase activity was determined for H33B and X142B, isolated from Cantonese sausages

亚硝酸盐还原酶对于腌腊肉制品的色泽形成至关重要, 因为亚硝酸盐还原为 NO 是形成腌肉制品色素亚硝基肌红蛋白的一个关键步骤, 此外 NO 还具有抑制微生物生长和抗氧化的能力^[10]。由图 1 所见, 葡萄球菌和微球菌的亚硝酸盐还原酶活力分别为 22.34 nmol/(min mL)、16.89 nmol/(min mL), 与 G α terup 报道的葡萄球菌酶活力基本相当^[21]。

2.2 接种分离菌株对腊肠亚硝基肌红蛋白含量的影响

由图 2 所见, 不同处理组的腊肠色素提取物紫外扫描曲线轮廓基本相同, 只是峰值有所差异。葡萄球菌和微球菌单独接种或者混合接种都能提高腊肠中亚硝基肌红蛋白含量, 且混合接种相比于单菌接种效果更明显, 其中以添加葡萄球菌: 微球菌=2:1 的腊肠中亚硝基肌红蛋白含量最高, 其含量显著高于对照组 ($p<0.05$)。

添加菌株的腊肠中亚硝基肌红蛋白含量高于对照组, 这与所分离菌株具有亚硝酸盐还原酶有关, 由于亚硝酸盐还原酶的作用, 亚硝酸盐会被还原成 NO, 从而与肌红蛋白反应生成更多的亚硝基肌红蛋白, 这一结果与 Gao 结果类似^[9]。

表 1 接种组和对照组广式腊肠中亚硝酸盐残留量、pH 和色泽的测定

Table 1 Residual sodium nitrite, pH, and color were determined for Cantonese sausages with or without addition of starter

	NaNO ₂ /(mg/kg)	pH	L*	a*	b*
对照	27.53±1.14 ^c	6.09±0.07 ^a	42.19±0.60 ^a	12.01±0.39 ^a	12.26±0.37 ^a
葡萄球菌	19.18±1.16 ^d	5.97±0.12 ^a	42.66±0.57 ^a	12.45±0.31 ^{ab}	11.86±0.19 ^{ab}
微球菌	22.14±1.09 ^b	6.00±0.07 ^a	42.30±0.73 ^a	12.13±0.29 ^{ab}	12.06±0.24 ^b
葡:微=1:1	17.77±1.03 ^a	5.96±0.08 ^a	43.24±0.55 ^a	12.73±0.29 ^b	11.64±0.22 ^b
葡:微=1:2	18.12±0.78 ^a	5.94±0.03 ^a	43.41±0.32 ^a	12.58±0.21 ^{ab}	11.89±0.19 ^{ab}
葡:微=2:1	14.25±0.59 ^d	5.89±0.04 ^b	43.48±0.24 ^{ab}	13.39±0.18 ^c	11.61±0.11 ^b

注:同一列数字上不同字母标识代表差异显著 ($p<0.05$)。

由表 1 所见, 接种单菌和混合菌株都能够显著降低腊肠亚硝酸盐残留量 ($p<0.05$), 其中添加葡萄球菌的腊肠亚硝酸盐残留量低于添加微球菌组, 这与葡萄球菌具有更高的亚硝酸盐还原酶活力有关。混合菌株组与单菌组比较具有更低的亚硝酸盐残留量, 当接种葡萄球菌:微球菌=2:1 时, 亚硝酸盐残留量仅为 14.25 mg/kg, 显著低于其它各处理组 ($p<0.05$)。

张庆芳等人^[11]研究发现乳酸菌在发酵前期 ($pH>4.5$ 时) 对亚硝酸盐的降解主要以酶降解为主, 发酵后期 ($pH<4.5$ 时) 以酸降解为主。表 1 中各处理组之间 pH 无显著差异 ($p>0.05$), 都在 5.8 以上, 因此本研究中接种菌株后亚硝酸盐含量降低主要是由于

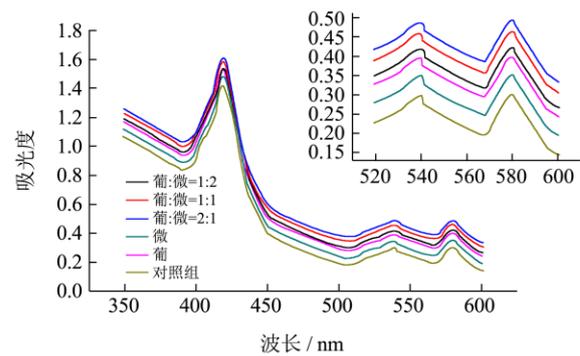


图 2 接种组与对照组中广式腊肠色素提取物的紫外扫描吸收光谱

Fig.2 UV-Vis absorbance spectra of pigment extracts from Cantonese sausages with or without addition of starter cultures

肉制品中肌红蛋白的存在形式主要是脱氧肌红蛋白、氧合肌红蛋白、高铁肌红蛋白和亚硝基肌红蛋白。每种肌红蛋白都有其典型的吸收峰, 其中 421 nm、540 nm 和 579 nm 是亚硝基肌红蛋白的典型吸收峰, 因此可以通过峰值来表征亚硝基肌红蛋白含量的高低^[9]。

2.3 接种分离菌株对腊肠中亚硝酸盐残留量、pH 和色泽的影响

亚硝酸盐还原酶引起的。孙为正、符小燕等人接种菌株于广式腊肠中同样发现能够显著减少亚硝酸盐残留量^[3,6]。

L* 值为腊肠的亮度值, a* 值为腊肠的红色度值, b* 值代表腊肠的黄色度值。表 1 显示添加单菌组和混合菌组均能增加腊肠的红色度和亮度值, 降低腊肠的黄色度值。由于接种组腊肠中亚硝基肌红蛋白含量高于对照组, 另外接种菌株具有 H₂O₂ 酶, 可以清除氧化过程中产生的 H₂O₂, H₂O₂ 作为强氧化剂对香肠的颜色会产生不利的影响, 这两方面使得接种组腊肠中红色度值高于对照组, 其中以添加葡萄球菌: 微球菌=2:1 时红色度值最高, 显著高于其它各组 ($p<0.05$), 而对于

L^* 值和 b^* 值, 各组之间差异不大。

2.4 接种分离菌株对腊肠中高铁肌红蛋白含量的影响

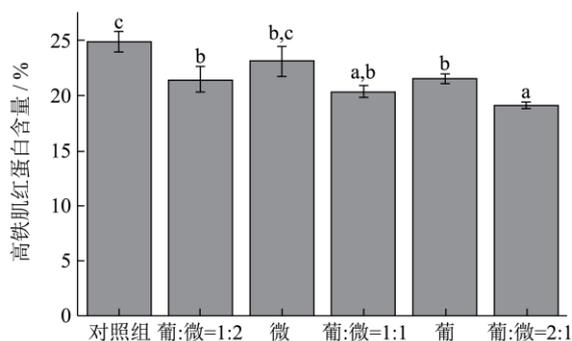


图3 接种菌组和对照组广式腊肠中高铁肌红蛋白含量的测定
Fig.3 Metmyoglobin content in Cantonese sausages with or without addition of starter culture

肉品色泽对于消费者是否购买而言是一个至关重要的因素, 消费者常常将其作为肉品质劣变的一个标志。因此保持肉制品的色泽稳定性是一个很关键的问题, 而其中最关键的是减少高铁肌红蛋白的含量, 高铁肌红蛋白在肉制品表面的积累被认为是影响色泽劣变的一个主要因素。

由图3所见, 接种葡萄球菌和接种混合菌株的腊肠中高铁肌红蛋白含量都显著低于对照组 ($p < 0.05$), 当添加葡萄球菌: 微球菌=2:1时, 高铁肌红蛋白含量最低, 显著低于其它各组 ($p < 0.05$), 与对照组相比大约下降了20.8%。

细菌对肉品颜色的作用一直归咎于细菌的氧化呼吸作用和肉表面的氧分压作用。理论上说, 初期细菌消耗氧气, 不同程度降低了氧分压, 这就导致了高铁肌红蛋白的形成; 而进一步的氧气消耗使得氧分压很低, 促使高铁肌红蛋白降解^[12]。因此接种菌株后高铁肌红蛋白含量降低或许与它们消耗了肠体内部大量氧气有关。

另外据报道一些葡萄球菌属的微生物可以将高铁肌红蛋白转化成红色的肌红蛋白衍生物, 抑制肉制品中色泽劣变, 这与它们具有NADH-细胞色素b5还原酶有关^[13] (包括高铁肌红蛋白还原酶和硝酸盐还原酶)。在本研究中高铁肌红蛋白含量随着葡萄球菌H33B比重的增加而减少, 这或许与葡萄球菌能够转化高铁肌红蛋白有关。

2.5 接种分离菌株对无硝腊肠中色泽的影响

为了解所分离菌株是否具有转化高铁肌红蛋白

的能力, 将葡萄球菌和微球菌分别接种到不添加亚硝酸盐的腊肠中, 通过与添加亚硝酸盐的腊肠进行色泽的比较来初步判定所分离菌株是否具有转化高铁肌红蛋白的能力。结果由表2所见, 尽管接种葡萄球菌的腊肠处理组红度值与添加亚硝酸盐的处理组比较还存在差异 ($p < 0.05$), 但是其红度值显著高于添加微球菌和无菌且无亚硝酸盐的腊肠处理组 ($p < 0.05$), 这表明葡萄球菌H33B可能将高铁肌红蛋白转化成了红色的肌红蛋白衍生物, 从而使腊肠的红度较为接近亚硝酸盐处理组。对于亮度值 (L^*), 无亚硝酸盐处理组低于亚硝酸盐处理组, 而对于黄度值 (b^*), 各处理组之间基本相同, 无明显差异 ($p > 0.05$)。

表2 添加亚硝酸盐和不添加亚硝酸盐但接种微生物的广式腊肠中色泽的测定

Table 2 Reflectance colorimetry for Cantonese sausages prepared with 150 mg/kg nitrite or inoculated either with H33B or X142B

	L^*	a^*	b^*
亚硝酸盐组	43.02±1.50 ^a	12.15±0.45 ^a	12.47±0.91 ^a
葡萄球菌(无亚硝酸盐)	42.59±0.83 ^{ab}	11.36±0.44 ^b	12.30±1.10 ^b
微球菌(无亚硝酸盐)	40.98±0.70 ^b	9.83±0.37 ^c	11.86±0.72 ^a
无菌组(无亚硝酸盐)	41.26±0.82 ^b	9.36±0.49 ^c	11.72±0.74 ^a

注: 同一列数字上不同字母标识代表差异显著 ($p < 0.05$)。

2.6 模型体系中色泽形成能力及形成速度研究

究

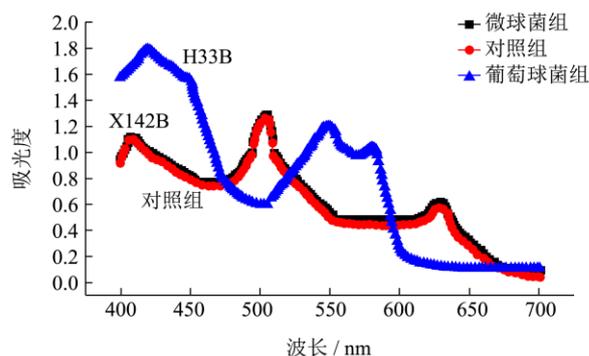


图4 葡萄球菌和微球菌在含高铁肌红蛋白和亚硝酸盐的MRS培养基中培养20 h后(40 °C)的紫外扫描图谱

Fig.4 Absorption spectra of metmyoglobin-containing MRS broth inoculated either with H33B or X142B and incubated at 40 °C for 20 h, after removing the cells by centrifugation

为进一步确定所分离菌株是否具有转化高铁肌红蛋白的能力, 将含菌株及高铁肌红蛋白的MRS培养基在40 °C (模拟腊肠烘烤温度) 培养20 h后离心收集上清液, 于400~700 nm波长范围内进行紫外全波长扫描, 通过紫外图谱分析来确定所分离菌株是否

具有转化高铁肌红蛋白的能力。

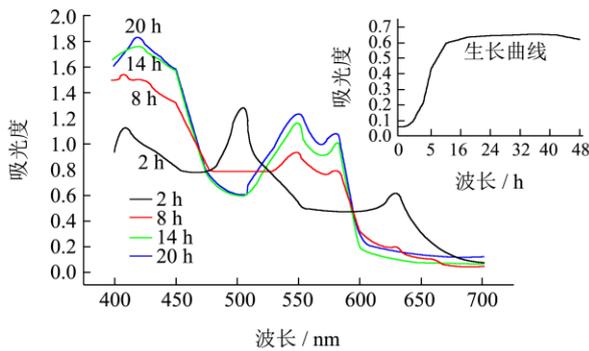


图5 葡萄球菌 H33B 在含高铁肌红蛋白和亚硝酸盐的 MRS 培养基中亚硝基肌红蛋白的形成情况

Fig.5 Nitrosylmyoglobin (MbFe^{II}NO) formation during incubation of H33B in MRS broth with metmyoglobin (2 mg/ml) and nitrite at 40 °C.

由图 4 所见，添加葡萄球菌 H33B 的 MRS 培养基中离心获得的上清液于 421 nm, 540 nm 和 579 nm 处出现了吸收峰，这是亚硝基肌红蛋白的典型吸收峰。但对于添加微球菌 X142B 和不添加菌株的培养基紫外扫描图谱，其峰值出现在 410、505 和 634 nm，这是高铁肌红蛋白的典型吸收峰。这表明葡萄球菌

H33B 具有将高铁肌红蛋白转化成脱氧肌红蛋白的能力，亚硝酸盐分解产生的 NO 会与肌红蛋白结合形成亚硝基肌红蛋白。

图 5 则显示了添加葡萄球菌 H33B 的 MRS 培养基中离心获得的上清液在 0~20h 内紫外图谱(400-700 nm)的变化。由图 5 明显看出 540 nm 和 579 nm 两处的峰随着时间的推移越来越大。2 h 的时候，只有 505 和 634 nm 两处存在吸收峰，表明高铁肌红蛋白还未被还原，到 8 h 的时候，尽管在 634 nm 处还存在高铁肌红蛋白的吸收峰，但亚硝基肌红蛋白的吸收峰也同时出现了，14 h 后，高铁肌红蛋白的吸收峰已经完全消失。图 5 中插入的小图是该葡萄球菌的生长曲线，生长曲线显示葡萄球菌在 4 h 后开始进入对数生长期，这与亚硝基肌红蛋白的形成速度是一致的。当葡萄球菌刚加入培养基中，由于还处于适应期，因此 2 h 时高铁肌红蛋白未被还原，随着对环境的适应进入对数生长期后，菌体的数目和酶急剧增多，从而将高铁肌红蛋白逐渐还原，最后全部形成亚硝基肌红蛋白。

2.7 模型体系中亚硝酸盐残留量和色泽分析

表 3 不同反应物体系中 40°C 培养 20h 后亚硝酸盐残留量和红度值的测定

Table 3 Residual nitrite and a* value resulting from different reaction components during 20-h incubation at 40 °C in a model system

MMb	Nitrite	H33B	X142B	亚硝酸盐残留量(mg/kg)			a*
				8	14	20	
+	+	+	-	93.4±0.08 ^a	85.8±0.28 ^a	75.1±0.11 ^a	4.69±0.11 ^a
+	+	-	+	95.3±0.33 ^b	89.4±0.15 ^b	80.5±0.26 ^b	2.35±0.05 ^b
-	+	+	-	95.1±0.11 ^b	88.9±0.41 ^b	79.5±0.18 ^b	2.27±0.04 ^b
-	+	-	+	95.6±0.27 ^b	89.6±0.19 ^b	80.6±0.21 ^b	2.31±0.08 ^b
+	+	-	-	99.5±0.14 ^c	99.3±0.22 ^c	99.4±0.41 ^c	2.38±0.09 ^b

注：同一列数字上不同字母标识代表差异显著 (p<0.05) +：反应体系中含有该物质-：反应体系中无该物质。

由表 3 所见 20 h 后，不添加菌株的反应体系中亚硝酸盐几乎无任何变化，而添加了菌株的体系中亚硝酸盐含量均显著低于无菌体系组 (p<0.05)，这是因为菌株具有亚硝酸盐还原酶，将亚硝酸盐还原使其含量降低。另外由表 3 可以发现，对于添加微球菌的反应体系中，高铁肌红蛋白添加与否对亚硝酸盐残留量几乎无任何影响；但添加葡萄球菌的反应体系中，高铁肌红蛋白加入体系后会使亚硝酸盐含量降低，最后含量为 75.1 mg/kg，与其它反应体系亚硝酸盐残留量相比差异显著 (p<0.05)，且其体系红度值也显著高于其它反应体系 (p<0.05)，这些现象进一步证实了所分离的葡萄球菌具有还原高铁肌红蛋白的能力。对于含高铁肌红蛋白和葡萄球菌的体系中，除了葡萄球菌的亚硝酸盐还原酶作用引起亚硝酸盐含量减少，葡萄球

菌还会将高铁肌红蛋白还原为脱氧肌红蛋白，其会与亚硝酸盐直接反应生成 NO，NO 反过来与脱氧肌红蛋白结合生成亚硝基肌红蛋白，引起体系颜色发生变化，红度值增加，亚硝酸盐的含量也因此进一步减少，这与 McClure 在研究乳酸对含有高铁肌红蛋白和亚硝酸盐的反应体系中亚硝酸盐残留量的影响时所得出的结论一样^[14]。

3 结论

3.1 接种单菌与混合菌株于广式腊肠中都能降低亚硝酸盐残留量，并改善色泽，混合接菌组效果优于单菌组，其中以接种葡萄球菌 H33B: 微球菌 X142B=2:1 时亚硝酸盐残留量最低，红度值最高。

3.2 在 MRS 培养基中，通过紫外图谱得出葡萄球菌

H33B 具备转化高铁肌红蛋白的能力。

3.3 混合接菌组腊肠中随着葡萄球菌比重的增加,亚硝酸盐残留量及高铁肌红蛋白含量降低,亚硝基肌红蛋白含量增加,这与葡萄球菌 H33B 具有转化高铁肌红蛋白特性有关。随着葡萄球菌的添加,会有更多的还原性肌红蛋白形成,从而与亚硝酸盐反应形成亚硝基肌红蛋白,因此不仅减少了亚硝酸盐含量和高铁肌红蛋白含量,还提高了色泽。

参考文献

- [1] Wang X H, Ren H Y, Wang W, et al. Effects of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages [J]. *Food Control*, 2013, 32(2): 591-596
- [2] Gøtterup J, Olsen K, Møller J K S, et al. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 120(3): 303-310
- [3] 孙为正,吴燕涛,赵谋明,等.接种葡萄球菌和巨球菌降低广式腊肠亚硝酸盐残留量及对色泽形成的影响[J].*食品与发酵工业*,2009, 35(10): 147-151
SUN Wei-zheng, WU Yan-tao, ZHAO Mou-ming, et al. Effects of *Staphylococcus condimentii* and *Macrocooccus caseolyticus* on Residual Nitrite Contents and Colour Formation of Cantonese Sausage [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(10): 147-151
- [4] Arihara K, Cassens R G, Luchansky J B. Metmyoglobin reduction activity of Enterococci [J]. *Fleischwirtschaft*, 1994, 74(11): 1249-1250
- [5] Li P J, Kong B H, Chen Q, et al. Formation and identification of nitrosylmyoglobin by *Staphylococcus xylosum* in raw meat batters: A potential solution for nitrite substitution in meat products [J]. *Meat Science*, 2013, 93(1): 67-72
- [6] 符小燕,郭善广,蒋爱民等.葡萄球菌和乳酸菌对广式腊肠亚硝酸盐的降解研究[J].*食品科学*,2009,30: 54-58
FU Xiao-yan, GUO Shan-guan, JIANG Ai-min, et al. The Effect of *Staphylococcus* and *Lactobacillus* on the Degradation of Nitrite in Cantonese Sausage [J]. *Food Science*, 2009, 30: 54-58
- [7] 罗岩,孙君社,刘萍,等.巨大芽孢杆菌产亚硝酸还原酶活性测定条件优化[J].*中国酿造*,2011,6:27-31
LUO Yan, SUN Junshe, LIU Ping, et al. Optimization of Determination Conditions of Nitrite Reductase Activity Produced by *Bacillus megaterium* [J]. *China Brewing*, 2011, 6: 27-31
- [8] Krzywicki K. The determination of ham pigment in meat [J]. *Meat Science*, 1982, 7(1): 29-36
- [9] Gao Y R, Li D P, Liu X Y. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages [J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 1-6
- [10] Skibsted L H. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods [J]. *Nitrite Oxide*, 2011, 24(4): 176-183
- [11] 张庆芳,迟乃玉,郑燕,等.乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究 [J].*食品与发酵工业*,2002,8(28):27-31
ZHANG Qing-fang, CHI Nai-yu, ZHENG Yan, et al. The Study on Mechanism of Nitrite Degradation by Lactic Acid Bacteria [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2002, 8(28): 27-31
- [12] 李沛军,孔保华,郑冬梅,等.微生物发酵法替代肉制品中亚硝酸盐呈色作用的研究进展 [J].*食品科学*,2010,31(17): 388-391
LI Pei-jun, KONG Bao-hua, ZHENG Dong-mei, et al. Microbial Fermentation as an Alternative to Nitrite Addition for Colorizing Cured Meat Products: a Review [J]. *Food Science*, 2010, 31(17): 388-391
- [13] Guo H L, Liu D C, Chen M T, et al. Color stability of Chinese-style sausage inoculated with *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosum* [J]. *Asian-australasian journal of animal science*, 2003, 16(4): 570-574
- [14] McClure B N, Sebranek J G, Kim Y H, et al. The effects of lactate on nitrosylmyoglobin formation from nitrite and metmyoglobin in a cured meat system [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(3): 1072-1079