

乳酸菌源亚硝化抑制剂对酱牛肉中 N-亚硝胺形成的影响

李佳怡¹, 葛渠锋¹, 李 珏², 梁汉锋¹, 唐靖仪¹, 许德智¹, 杨 华^{1,2,*}

(1.天津农学院动物科学与动物医学学院, 天津 300384; 2.和田职业技术学院农业科技系, 新疆 和田 848000)

摘要:为进一步明确微生物源亚硝化抑制剂 (microbial nitrosation inhibitor, MNI) 对酱牛肉中产生的N-亚硝胺的抑制效果, 将清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sake*, LS) 与商业复合菌WBL-45 (木糖葡萄球菌+肉葡萄球菌+清酒乳杆菌) 制备成MNI (LS-MNI与WBL-45-MNI), 以酱牛肉为研究对象, 进行感官评定, 测定pH值、硫代巴比妥酸反应物 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARs) 值、亚硝酸盐、生物胺及N-亚硝胺含量等指标。结果表明: 在酱牛肉中添加LS-MNI和WBL-45-MNI可显著改善其色泽和风味, WBL-45-MNI组总体感官评分显著高于LS-MNI组和对照组 ($P < 0.05$), 亚硝酸盐残留量和生物胺总量则显著低于LS-MNI组和对照组 ($P < 0.05$); 3组酱牛肉的TBARs值均未超过0.2 mg/kg; WBL-45-MNI组和LS-MNI组对N-二甲基亚硝胺的抑制率分别达70.94%和89.74%, 对N-亚硝胺总量的抑制率分别达46.79%和36.50%。以上结果表明, 清酒乳杆菌和商业复合菌WBL-45可以制备微生物源的亚硝化抑制剂来阻断肉中N-亚硝胺的形成, WBL-45对酱牛肉的整体效果更佳。

关键词: 清酒乳杆菌; 商业复合菌WBL-45; 微生物亚硝化抑制剂; N-亚硝胺; 酱牛肉; 亚硝酸盐

Effect of Nitrosation Inhibitors from Lactic Acid Bacteria on the Formation of N-Nitrosamines in Sauced Beef

LI Jiayi¹, GE Qufeng¹, LI Jue², LIANG Hanfeng¹, TANG Jingyi¹, XU Dezhi¹, YANG Hua^{1,2,*}

(1.College of Animal Science and Animal Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2.Department of Agricultural Science and Technology, Hetian Polytechnic, Hetian 848000, China)

Abstract: In order to further clarify the inhibitory effect of microbial nitrosation inhibitors (MNI) on the production of N-nitrosamines in sauced beef, the sensory evaluation, pH, thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) value, nitrite, biogenic amine and N-nitrosamine contents of sauced beef treated with LS-MNI from *Lactobacillus sake* (LS) or WBL-45-MNI from commercial starter culture WBL-45 (*Staphylococcus xylosus* + *Staphylococcus carnosus* + *Lactobacillus sake*) were measured. The results showed that adding LS-MNI or WBL-45-MNI to sauced beef significantly improved its color and flavor. The overall sensory score of the WBL-45-MNI group was significantly higher than that of the LS-MNI and control groups ($P < 0.05$). Furthermore, the nitrite residue and total biogenic amine content were significantly lower than those of LS-MNI and control groups ($P < 0.05$). None of TBARs values of the three groups exceeded 0.2 mg/kg. For the WBL-45-MNI and LS-MNI groups, the inhibition rates of NDMA were 70.94% and 89.74%, respectively, and the inhibition rates of total N-nitrosamine were 46.79% and 36.50%, respectively. The above results show that LS-MNI and WBL-45-MNI can block the formation of N-nitrosamines in meat products, the overall effect of WBL-45-MNI being more significant.

Keywords: *Lactobacillus sake*; commercial mixed-strain starter culture WBL-45; microbial nitrification inhibitor; N-nitrosamine; sauced beef; nitrite

DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20230517-044

中图分类号: TS251.61

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123 (2023) 08-0001-07

引文格式:

李佳怡, 葛渠锋, 李珏, 等. 乳酸菌源亚硝化抑制剂对酱牛肉中N-亚硝胺形成的影响[J]. 肉类研究, 2023, 37(8): 1-7.

DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20230517-044. <http://www.rlyj.net.cn>

收稿日期: 2023-05-17

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2022D01A11); 天津市高等学校大学生创新创业训练计划项目 (202110061075)

第一作者简介: 李佳怡 (1999—) (ORCID: 0009-0001-9333-1989), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物源性食品营养与安全。

E-mail: 863792894@qq.com

*通信作者简介: 杨华 (1979—) (ORCID: 0000-0003-2007-9994), 女, 教授, 博士, 研究方向为动物源性食品营养与安全。

E-mail: sxndyh111@163.com

LI Jiayi, GE Qufeng, LI Jue, et al. Effect of nitrosation inhibitors from lactic acid bacteria on the formation of *N*-nitrosamines in sauced beef[J]. Meat Research, 2023, 37(8): 1-7. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20230517-044. <http://www.rlyj.net.cn>

酱牛肉是传统酱卤肉制品，具有高蛋白、低脂肪的特点，食用方便，深受广大消费者喜爱^[1]。其加工工艺的关键在于卤汤，卤汤经过多次卤制会积累可溶性固体、多种氨基酸及游离脂肪酸等风味物质，可赋予酱牛肉特殊滋味^[2-3]，在此过程中卤汤中的各种有害物质也会不断富集。其中肉制品加工过程中常添加的具有发色、抑菌、抗氧化、提高风味效果的亚硝酸盐，会与肉中蛋白降解产生的二级胺类物质反应，生成具有致癌作用的*N*-亚硝胺类物质，会对人体产生潜在的危害^[4-6]。目前常用于控制肉制品中*N*-亚硝胺含量的方法有3种：物理降解、化学替代/添加及生物控制^[7]。董学文^[8]发现，酱牛肉中添加良姜、迷迭香、花椒和龙井茶对杂环胺形成有较强的抑制作用，抑制率为71.71%~90.59%。张文雨^[9]研究发现，酱肘子与酱肉中添加0.03 g/mL叶下珠乙醇萃取物对亚硝酸盐有一定的清除作用，清除率为74.11%，对亚硝胺有一定的抑制效果，抑制率为53.70%。李彦等^[10]研究发现，随着贮藏时间的延长，121 °C高温杀菌对于亚硝酸盐的清除率显著高于沸水杀菌，亚硝酸盐残留量下降至4.3 mg/kg。

近年来研究发现，乳酸菌具有较好的抗氧化活性和抑制腐败细菌生长的能力，并可以通过吸附或代谢直接降低食品中*N*-亚硝胺的含量^[11]。Nowak等^[12]发现，鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌和短乳杆菌的培养上清液和膜提取物均可降低*N*-二甲基亚硝胺（*N*-nitrosodimethylamine, NDMA）的含量，并且在后续的研究中发现戊糖乳杆菌R3对于NDMA和*N*-二乙基亚硝胺（*N*-nitrosodiethylamine, NDEA）具有较好的抑制率，分别为22.05%和23.31%。胡蝶等^[13]在泡菜中分离得到的3株菌（肠膜明串珠菌、清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌）均具备降解亚硝酸盐的作用。本课题组在针对红肠的研究^[14-18]中发现，8种分离的单菌株和7种商业复合菌能够有效抑制*N*-亚硝胺及其前体物形成，但是改变了红肠的风味，随后将其分别在MRS中培养，经过离心、溶菌酶作用、细胞破碎、再次离心得到的菌体碎片制备成微生物亚硝化抑制剂（microbial nitrosation inhibitor, MNI），所得MNI均能不同程度降低NDMA的含量（残留量为0.44~0.51 μg/kg），可以实现在非发酵肉制品中利用乳酸菌制备的MNI来阻断*N*-亚硝胺生成。课题组前期选用PRO-MIX5（木糖葡萄球菌+清酒乳杆菌+类植物乳杆菌）制

备的MNI称为PRO-MIX5-MNI，分别在红肠、传统培根、新型培根及风干肠中应用，均能不同程度降低亚硝酸盐（抑制率为15.21%~18.92%）、生物胺（0.02%~34.37%）、NDMA（26.60%~65.10%）及*N*-亚硝胺总量（26.19%~58.04%）。进一步证实了乳酸菌源的亚硝化抑制剂在非发酵肉制品中的实际应用效果。由于乳酸菌种类繁多，为了进一步明确和丰富乳酸菌制备的MNI在肉制品中的应用效果，本研究以清酒乳杆菌（*Lactobacillus sake*, LS）和WBL-45（木糖葡萄球菌+肉葡萄球菌+清酒乳杆菌）为乳酸菌源制备MNI，探究二者对酱牛肉感官品质、理化指标及阻断*N*-亚硝胺生成的效果，为乳酸菌源的亚硝化抑制剂的开发及其在非发酵肉制品中的应用提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛后腿部位肉购于天津红旗农贸市场，生姜、大葱、花椒、八角、米酒、酱牛肉老汤等，由可可溢香（江苏）味业有限公司提供。

清酒乳杆菌 东北农业大学教育部乳品科学重点实验室；木糖葡萄球菌+肉葡萄球菌+清酒乳杆菌（WBL-45）意大利萨科公司；MRS固体培养基 北京索莱宝科技有限公司；二氯甲烷、乙腈（均为色谱纯）、氯化钠、氢氧化钠、无水硫酸钠、硼酸、三氯乙酸、乙二胺四乙酸、2-硫代巴比妥酸（均为分析纯）天津市风船化学试剂科技有限公司；高氯酸、丙酮、丹磺酰氯（均为分析纯）国药集团化学试剂有限公司；8种生物胺（色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺、精胺）标准品、9种*N*-亚硝胺（表1）标准品（均为色谱纯）美国Sigma公司。

表1 9种*N*-亚硝胺
Table 1 Nine *N*-nitrosamines tested in this study

中文全称	英文全称	英文缩写
<i>N</i> -二甲基亚硝胺	<i>N</i> -nitrosodimethylamine	NDMA
<i>N</i> -亚硝基吗啉	<i>N</i> -nitrosomorpholine	NMOR
<i>N</i> -亚硝基吡咯烷	<i>N</i> -nitrosopyrrolidine	NPYR
<i>N</i> -二乙基亚硝胺	<i>N</i> -nitrosodiethylamine	NDEA
<i>N</i> -甲基乙基亚硝胺	<i>N</i> -nitrosomethylethylamine	NMEA
<i>N</i> -亚硝基哌啶	<i>N</i> -nitrosopiperidine	NPIP
<i>N</i> -二丙基亚硝胺	<i>N</i> -nitrosodipropylamine	NDPA
<i>N</i> -二丁基亚硝胺	<i>N</i> -nitrosodibutylamide	NDBA
<i>N</i> -亚硝基二苯胺	<i>N</i> -nitrosodiphenylamine	NDpheA

1.2 仪器与设备

ST40R离心机 美国Thermo公司；1260高效液相色谱仪（配备紫外吸收检测器） 美国安捷伦公司；PB-10酸度计 德国赛多利斯科学仪器有限公司；UV-800紫外分光光度计 日本Shimadzu公司；BVBJ-30J真空搅拌机 浙江嘉兴艾博实业有限公司；ZXSD-B109恒温培养箱 上海博讯仪器设备有限公司；旋转蒸发器、SHZ-III循环水真空泵 上海亚荣生化仪器厂；CCA-20低温冷却水循环泵 巩义市予华仪器有限责任公司；98-1-B电子调温电热套 天津市泰斯特仪器有限公司；CM-5色差仪 日本Konica Minoilta公司。

1.3 方法

1.3.1 MNI的提取

参照李秀明等^[15]方法，利用MRS肉汤培养基将商业复合菌WBL-45和单菌LS体外扩增培养（35℃培养至 $OD_{600\text{ nm}}=1.8\sim 2.4$ ），经离心（5 000×g、4℃、15 min）、冲洗（25 mmol/L、pH 6的磷酸盐缓冲液冲洗菌体2次）、溶菌酶作用（30℃、2 h）、破碎（超声波破碎仪超声2 s、停2 s，共5 min）、沉淀（10 000×g、4℃离心10 min）等操作后得到的菌体碎片记为WBL-45-MNI和LS-MNI。样品经冷冻干燥后于-80℃保存。

1.3.2 酱牛肉加工工艺流程

1) 原料的切分：将牛肉分切成质量300~400 g，长宽不超过12 cm，厚度2~4 cm的肉块；2) 注射腌制液：按照牛肉质量的20%配制腌制液，腌制液中按照牛肉质量的0.05%加入MNI，以腌制液质量为基数，添加亚硝酸盐0.06%、抗坏血酸钠0.275%、复合磷酸盐1.75%、葡萄糖2%、白糖4%、大豆分离蛋白粉5%、卡拉胶粉1%、酱牛肉汁25%，不足部分用水补齐；用盐水注射器将配制好的腌制液注入到牛肉块中；3) 真空滚揉：将注射后的牛肉块放入真空滚揉机中，转速为5~6 r/min，滚揉30 min，取出放入0~4℃冷库中静腌10~12 h；4) 氽烫：在水中加入生姜、大葱、花椒、八角、米酒，待水煮沸后，放入滚揉好的牛肉块，氽烫10 min，然后进行清洗，保证血沫冲洗干净；5) 煮制：煮制时，放入老汤调料包，大火煮制30 min，小火焖制20 min；6) 包装、贮藏：采用耐高温、柔韧性较好的铝箔袋进行真空包装，检查真空状态和封口的密封性，于-20℃冷冻保存。

1.3.3 实验设计方案

将提取到的2种MNI以牛肉质量的0.05%添加在腌制液中，腌制液注射量为牛肉质量的20%。按照1.3.2节加工工艺对牛肉进行腌制加工，以不添加MNI为对照（control check, CK）组，制备3组酱牛肉（CK组、WBL-45-MNI组和LS-MNI组），测定其感官、pH值、TBARs值、亚硝酸盐及常见的8种生物胺和9种N-亚硝胺含量。

1.3.4 指标测定

1.3.4.1 感官评定

对3组实验酱牛肉进行编号，由10名受培训人员组成的感官评定小组盲评分^[19]，对产品的色泽、滋味、香气、口感进行打分，每项指标满分10分，总分满分40分。最终结果取平均值。评分标准参照表2。

表2 酱牛肉感官评分标准

Table 2 Criteria for sensory evaluation of sauced beef

指标	评分标准	感官评分
色泽	较暗，无光泽	1~3
	较暗，略有光泽	4~6
	明亮，有光泽	7~10
滋味	味道不纯正、饱满度不足、没有余味或余味过浓、酸甜味过重	1~3
	味道较浓或较淡、余味较浓或较淡、酸味较淡	4~6
	味道纯正饱满、余味适中、无刺激性异味	7~10
香气	无酱牛肉特有的香气，有异味	1~3
	有酱牛肉的香气，不浓郁	4~6
	有酱牛肉的香气，香气浓郁	7~10
口感	牛肉不烂、柴、硬、干涩、黏性大	1~3
	弹性良好、略微柴感、干涩、轻微发黏	4~6
	牛肉软烂适中、肉质鲜嫩、入口爽滑	7~10

1.3.4.2 pH值测定

参照GB 5009.237—2016《食品安全国家标准 食品pH值的测定》^[20]中肉及肉制品pH值测定方法进行测定。每个处理组进行3次平行重复测定，结果取平均值。

1.3.4.3 TBARs值测定

参照Witte等^[21]方法测定。

1.3.4.4 亚硝酸盐含量测定

参照GB 5009.33—2016《食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定》^[22]。

1.3.4.5 生物胺含量测定

参照GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》^[23]测定样品中的8种生物胺含量。

1.3.4.6 N-亚硝胺含量测定

参照GB 5009.26—2016《食品安全国家标准 食品中N-亚硝胺类化合物的测定》^[24]。

1.4 数据处理

实验均重复3次，使用Microsoft Excel 2010软件计算平均值及标准差，采用Statistix 8.1软件中Tukey HSD程序对数据进行显著性分析（ $P<0.05$ ），采用OriginLab Origin 2019b软件绘图。

2 结果与分析

2.1 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉感官品质的影响

由表3可知，LS-MNI组和WBL-45-MNI组在色泽和滋味上较CK组评分更高，LS-MNI组色泽评分提高

7.8%，滋味评分提高13.8%，整体评分提高2.8%。WBL-45-MNI组优于LS-MNI组，色泽评分提高21.9%，滋味评分提高30.8%，整体评分提高12.6%；其原因在于复合菌WBL-45中含有的木糖葡萄球菌与肉葡萄球菌能够有效促进蛋白质和脂肪的水解，改善肉的颜色，使肉制品中风味快速形成^[25]。2种乳酸菌源的抑制剂有提高酱牛肉产品滋味的趋势，但并没有改变酱牛肉的口感。

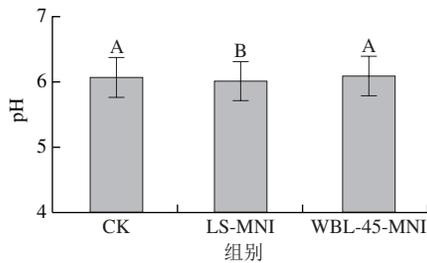
表3 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉感官评分的影响

Table 3 Effect of LS-MNI and WBL-45-MNI on sensory evaluation of sauced beef

组别	色泽评分	香气评分	滋味评分	口感评分	总体评分
LS-MNI	7.10±0.74 ^A	7.10±0.74 ^A	7.40±0.84 ^A	7.00±0.67 ^A	28.60±1.35 ^A
WBL-45-MNI	7.80±0.92 ^{AB}	7.90±0.57 ^B	8.50±0.71 ^B	7.10±0.74 ^A	31.30±1.57 ^B
CK	6.40±0.84 ^B	7.80±0.63 ^A	6.50±0.85 ^C	6.90±0.88 ^A	27.60±1.32 ^A

注：同列大写字母不同，表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。

2.2 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉pH值的影响



大写字母不同，表示差异显著（ $P < 0.05$ ）。图2~3同。

图1 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉pH值的影响

Fig. 1 Effects of LS-MNI and WBL-45-MNI on pH value of sauced beef

由图1可知，LS-MNI组酱牛肉pH值（6.01）显著低于WBL-45-MNI组（6.09）、CK组（6.07）（ $P < 0.05$ ），WBL-45-MNI组pH值与CK组差异不显著，但3组pH值相近，对酱牛肉基本没有影响。

2.3 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉TBARs值的影响

脂肪氧化不仅会加剧食品酸败，还会参与亚硝酸盐生成N-亚硝胺的过程^[26]。TBARs值能够反映脂肪的氧化程度。有研究^[25]表明，新鲜肉制品的TBARs值不超过1.0 mg/kg。由图2可知，复合菌WBL-45-MNI组酱牛肉的TBARs值显著高于CK组和LS组（ $P < 0.05$ ），这说明WBL-45-MNI一定程度上促进了脂肪的氧化。研究发现，木糖葡萄球菌能明显促进脂肪及脂肪酸氧化，脂肪酸氧化主要发生在多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFA），并且葡萄球菌会释放脂肪酶，加速脂肪水解为饱和脂肪酸，其中PUFA最容易被氧化^[27-28]。这可能是WBL-45-MNI的组分中有促进脂肪氧化的产物，但由于添加量仅为0.05%，酱牛肉的TBARs值未超过0.15 mg/kg，并未导致该产品的脂肪氧化。

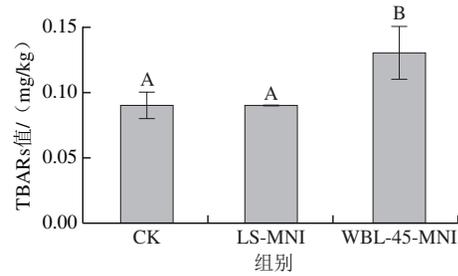


图2 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉TBARs值的影响

Fig. 2 Effects of LS-MNI and WBL-45-MNI on TBARs value of sauced beef

2.4 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉亚硝酸盐残留量的影响

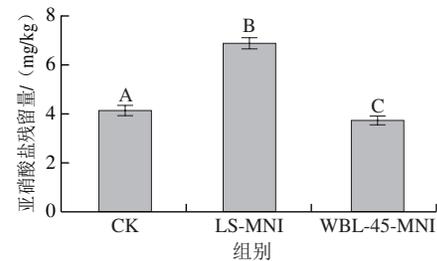


图3 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉亚硝酸盐残留量的影响

Fig. 3 Effects of LS-MNI and WBL-45-MNI on nitrite residue in sauced beef

MNI作为乳酸菌的细胞破碎物，主要成分为细胞壁碎片、细胞膜碎片、细胞器及包涵体等物质^[29]，乳酸菌破碎后失去活性，自身不会产生其他物质，由图3可知，三者的亚硝酸盐残留量分别为4.14、6.89、3.72 mg/kg，明显低于添加0.05% PRO-MIX5-MNI的其他肉制品的残留量，如红肠21.5 mg/kg、新型培根20.5 mg/kg、西式培根27.5 mg/kg，远低于GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定的30 mg/kg限量，这可能是由于亚硝酸盐用于酱牛肉产品的腌制中，在卤制中亚硝酸盐主要残留在卤汤中。本研究结果中，LS-MNI组的酱牛肉亚硝酸盐残留量显著高于CK组，WBL-45-MNI组酱牛肉亚硝酸盐残留量显著低于CK组（ $P < 0.05$ ），这可能是LS-MNI和WBL-45-MNI有提高酱牛肉产品汁液的趋势，产品渗透卤汤增多，导致亚硝酸盐残留量测定结果升高，遮掩了LS-MNI和WBL-45-MNI二者清除亚硝酸盐的作用。

2.5 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉生物胺含量的影响

生物胺广泛存在于食品中，是合成荷尔蒙、生物碱、核酸和蛋白质等生物大分子的氮来源和前体物，适量的生物胺有助于人体正常的生理功能^[30]。然而，过量摄入生物胺会导致出现一系列不良反应，其中组胺与酪胺对人体的影响排在各种生物胺前列^[31]。由表4可知，3组酱牛肉均未检测出苯乙胺，LS-MNI和WBL-45-MNI组中腐胺、尸胺、酪胺、精胺这4种生物胺含量较CK组均显著下降，它们均是生成N-亚硝胺的二级胺的

前体物质，这为乳酸菌源的亚硝化抑制剂降低*N*-亚硝胺提供了前提条件，且WBL-45-MNI的抑制效果更加显著 ($P < 0.05$)。LS-MNI组和WBL-45-MNI组酱牛肉组胺含量显著高于CK组 ($P < 0.05$)。众多研究发现，MNI中含有细胞壁碎片、细胞膜碎片、细胞器碎片及包涵体等外源携带物质，会使产品中部分生物胺含量增加^[32-33]。总体来讲，接种MNI可以显著降低生物胺总量 ($P < 0.05$)，LS-MNI组降低15.87%，WBL-45-MNI组降低30.08%。

表4 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉生物胺含量的影响
Table 4 Effects of LS-MNI and WBL-45-MNI on biogenic amine content in sauced beef

生物胺	LS-MNI组	WBL-45-MNI组	CK组
色胺	0.28 ± 0.00 ^A	1.22 ± 1.09 ^A	0.29 ± 0.25 ^A
苯乙胺	/	/	/
腐胺	0.02 ± 0.00 ^A	0.02 ± 0.02 ^A	0.25 ± 0.19 ^B
尸胺	0.08 ± 0.00 ^A	0.14 ± 0.04 ^B	1.48 ± 0.01 ^C
组胺	3.27 ± 0.02 ^A	2.09 ± 1.27 ^{AB}	0.67 ± 0.02 ^B
酪胺	0.31 ± 0.01 ^A	0.07 ± 0.06 ^B	0.95 ± 0.19 ^C
亚精胺	0.29 ± 0.01 ^A	0.23 ± 0.12 ^A	0.36 ± 0.00 ^A
精胺	0.83 ± 0.04 ^A	0.47 ± 0.46 ^A	1.68 ± 0.26 ^B
总量	5.09 ± 0.04 ^A	4.23 ± 0.48 ^B	6.05 ± 0.42 ^C

注：同行大写字母不同，表示差异显著 ($P < 0.05$)；/ 未检出。表5同。

2.6 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉*N*-亚硝胺含量的影响

表5 LS-MNI和WBL-45-MNI对酱牛肉*N*-亚硝胺含量的影响
Table 5 Effects of LS-MNI and WBL-45-MNI on *N*-nitrosamine content in sauced beef

<i>N</i> -亚硝胺	LS-MNI组	WBL-45-MNI组	CK组
NDMA	0.34 ± 0.00 ^A	0.12 ± 0.00 ^B	1.17 ± 0.04 ^C
NMOR	0.18 ± 0.00 ^A	0.19 ± 0.00 ^B	0.30 ± 0.01 ^C
NPYR	/	/	/
NDEA	1.43 ± 0.00 ^A	0.42 ± 0.01 ^B	1.18 ± 0.03 ^C
NMEA	0.05 ± 0.01 ^A	0.11 ± 0.00 ^B	0.69 ± 0.00 ^C
NPIP	0.74 ± 0.04 ^A	0.28 ± 0.00 ^B	0.28 ± 0.01 ^B
NDPA	0.08 ± 0.01 ^A	0.15 ± 0.00 ^B	1.43 ± 0.00 ^C
NDBA	/	/	0.84 ± 0.01
NDpHeA	2.13 ± 0.01 ^A	2.87 ± 0.00 ^B	1.88 ± 0.00 ^C
总量	4.94 ± 0.04 ^A	4.14 ± 0.01 ^B	7.78 ± 0.03 ^C

N-亚硝胺是肉制品加工过程中不可避免产生的一种有害物质，长期摄入可能会增加人体患癌的风险^[34]，其中毒性最强的是NDMA与NDEA，GB 2762—2022《食品安全国家标准 食品中污染物限量》中规定肉制品中NDMA的含量不超过3 μg/kg^[35]。由表5可知，3组酱牛肉中NDMA均未超过国标规定含量，并且WBL-45-MNI和LS-MNI显著抑制NDMA，抑制率分别为70.94%和89.74% ($P < 0.05$)。WBL-45-MNI组酱牛肉中对NDEA抑制显著（抑制率为64.41%），LS-MNI对于NDEA没有起到抑制作用。3组酱牛肉未检测到NPYR。WBL-45-MNI与LS-MNI对酱牛肉中*N*-亚硝胺总量有显著抑制作用，抑制率分别为46.79%和36.50% ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 乳酸菌源制备的亚硝化抑制剂在肉制品中的应用效果

课题组前期在红肠、传统培根、新型培根和风干肠中分别添加0.05% PRO-MIX5-MNI测得pH值分别为6.13、6.20、6.34和5.09。本研究中3组酱牛肉的pH值为6.01~6.09。其中部分产品分别和对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)，但pH在数值上微弱的差异对于各类产品的品质均无显著影响^[15-18]。闫丽娟^[16]发现，0.15% PRO-MIX5-MNI有效减缓西式培根的脂肪氧化作用，CK组和PRO-MIX5-MNI组TBARs值分别约为0.21、0.18 mg/kg。陈援援等^[18]在风干肠中测得CK组和0.05% PRO-MIX5-MNI组的TBARs值分别为0.21、0.20 mg/kg。熊凤娇等^[36]在10种市售鱼糜制品中测得TBARs值为0.2~0.8 mg/kg。上述产品的脂肪含量均约为30%，本研究由于酱牛肉产品的脂肪含量较低（2%左右），其TBARs值（CK组和LS-MNI组均为0.09 mg/kg，WBL-45-MNI组为0.13 mg/kg）均明显低于培根、风干肠及鱼糜产品，这说明肉制品的脂肪氧化与原料肉的脂肪含量及脂肪酸种类有关，而乳酸菌源的亚硝化抑制剂对脂肪氧化的抑制效果取决于其添加水平和乳酸菌的种类，但由于其最佳抑制*N*-亚硝胺的添加水平低（0.05%），对抑制肉制品脂肪氧化的效果影响并不大。课题组前期在红肠^[15]、培根^[16-17]及风干肠中^[18]应用PRO-MIX5-MNI对于*N*-亚硝胺及其前体物的抑制效果差异很大：红肠中亚硝酸盐的含量21.72 mg/kg（抑制率18.92%）、NDMA含量1.23 μg/kg（抑制率52.87%）、*N*-亚硝胺总量18.96 μg/kg（抑制率41.04%）；传统培根中亚硝酸盐的含量27.43 mg/kg（抑制率8.33%）、NDMA含量2.23 μg/kg（抑制率29.84%）、*N*-亚硝胺总量35.3 μg/kg（抑制率12.06%）；风干肠中亚硝酸盐的含量4.34 mg/kg（增幅98.17%）、NDMA含量0.69 μg/kg（抑制率26.60%）、*N*-亚硝胺总量6.39 μg/kg（抑制率51.31%）。本实验3组酱牛肉的亚硝酸盐残留量均未超过7 mg/kg，*N*-亚硝胺总量为4.14~7.78 μg/kg，这可能与酱牛肉产品的脂肪含量低、饱和脂肪酸含量高以及产品采用的传统工艺（老汤卤制）有关。研究发现，当脂肪含量由12%上升到25%时，腊肠（猪肉）中NDMA和NPYR的含量都有所上升^[37]。熊凤娇等^[36]发现，NMEA和NDEA的含量随鱼豆腐中脂肪含量的增加而增加，姜皓等^[26]将猪肉反复冻融制备了不同氧化程度的西式培根，结果发现，氧化程度高的样品NDMA含量增加30.56%。另一方面，烟熏是红肠、培根及风干肠均有的工艺，烟熏也是*N*-亚硝胺形成的重要因素之一。以上原因导致酱牛肉产品的亚硝酸盐和*N*-亚硝胺含量明显低于其他产品。综合本研究团队成果，乳酸菌源的亚硝化抑制剂对各类产品的感官评价及

各项指标的影响不会改变这些非发酵制品的产品特点, 并可以抑制产品中*N*-亚硝胺的产生, 但抑制效果受到多种因素的影响。

3.2 乳酸菌源亚硝化抑制剂应用前景分析

中式肉制品通常是经由盐或酱油及其他配料腌制处理得到的, 主要特点是色泽鲜艳、味美, 具有独特的风味, 深受我国消费者的喜爱, 但其加工方式、产品包装及贮藏条件均受到西式肉制品的冲击。随着我国中式肉制品规模化和标准化的发展, 尤其是卤味肉制品在市场的占比快速提高, 根据Frost & Sullivan数据估算, 佐餐卤肉制品和休闲卤肉制品的市场规模2018—2021年的复合年均增长率为8.55%和13.87%。目前常用的卤制工艺包括老卤循环煮制和定量卤制工艺。老卤的优势在于重复卤制的过程中风味物质的富集, 并且对机器设备要求较低; 定量卤制可以减少腌制液配料的消耗, 以及人力资源消耗, 适合工业化生产^[2]。无论哪种工艺, 为了稳定卤肉产品色泽、抑制微生物生长、抗氧化和提高风味的效果, 通常会将亚硝酸盐添加在腌制液中和卤制液中。但亚硝酸盐会在卤制液中随着卤制时间和卤制次数不断累积, 而定量卤制工艺也会像其他产品残留亚硝酸盐。研究^[3]发现, 随着卤煮时间的延长, 传统酱牛肉中亚硝酸盐的残留量逐渐升高, 3月陈汤的亚硝酸盐含量为0.64 mg/kg, 5年陈汤的含量为1.87 mg/kg。因此非常有必要提高产品的安全性。乳酸菌源的亚硝化抑制剂恰恰能满足非发酵肉制品的特点, 提高此类产品安全性的同时并没有改变该类产品的特点。然而乳酸菌源的亚硝化抑制剂对*N*-亚硝胺的形成受到多种因素的影响, 包括原料肉的种类和加工工艺以及形成的不同肉制品等。商业复合菌的抑制效果明显高于单菌。商业发酵剂通常由多种单菌复配得到, 与单菌相比, 商业复合菌制备的MNI对不同肉制品的降硝效果差异很大^[15-18]。总体来看, 与单菌碎片相比, 复合商业菌碎片抑制亚硝化反应的环境较为复杂, 如若进一步探索乳酸菌源制备的亚硝化抑制剂发挥的关键成分和具体作用机理需要研究组成商业复合菌的各种单菌, 并将抑制效果良好的菌种进一步复配, 优选出更加有效的乳酸菌源亚硝化抑制剂来提高肉制品安全性。

4 结论

在酱牛肉中添加LS-MNI和WBL-45-MNI可显著改善其色泽和风味, WBL-45-MNI对于改善酱牛肉的总体感官效果更好, 与对照组相比, 亚硝酸盐残留量和生物胺总量抑制率分别为10.14%和30.08%。LS-MNI组pH值在统计学上与其他2组虽有显著差异, 但数值差异不大, 对酱牛肉品质基本没有影响。3组酱牛肉的TBARs值均

未超过0.2 mg/kg, 但WBL-45-MNI组显著高于其他2组。WBL-45-MNI组和LS-MNI组对NDMA的抑制率分别达70.94%和89.74%, 对*N*-亚硝胺总量的抑制率达到46.79%和36.50%。乳酸菌制备的微生物源亚硝化抑制剂可以有效抑制酱牛肉中*N*-亚硝胺的生成, 商业复合菌WBL-45相比LS作为酱牛肉亚硝化抑制剂的效果更佳。本研究为乳酸菌源亚硝化抑制剂提高酱卤肉制品的安全性提供了数据支持。

参考文献:

- [1] 张瑞萍, 马佳慧, 朱效兵. 酱牛肉生产工艺优化研究[J]. 农产品加工, 2022(8): 26-29; 33. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2022.08.036.
- [2] 肖子涵. 卤制工艺的改良对酱卤牛肉品质影响的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2021. DOI:10.27345/d.cnki.gsnyu.2021.000622.
- [3] 史华利, 聂文, 朱星海, 等. 传统酱卤牛肉老汤成分分析研究[J]. 肉类工业, 2018(1): 19-24.
- [4] NIKLAS A A, PEDERSEN M, CHRISTENSEN T, et al. Simultaneous determination of heterocyclic aromatic amines and *N*-nitrosamines in fried bacon cubes and slices using LC-(ESI/APCI)-MS/MS[J]. Food Additives and Contaminants: Part A, 2023, 40(4): 493-507. DOI:10.1080/19440049.2023.2185082.
- [5] SHEN Qiyuan, ZENG Xiaoqun, KONG Lingyu, et al. Research progress of nitrite metabolism in fermented meat products[J]. Foods, 2023, 12(7): 1485. DOI:10.3390/foods12071485.
- [6] 吕光, 林肖惠. 药物中NDMA的健康危害及检测技术的研究进展[J]. 职业与健康, 2021, 37(12): 1720-1723; 1728. DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2021.0423.
- [7] 刘雨萱, 黄晓红, 徐晔, 等. 肉制品中*N*-亚硝胺的危害、形成机制及乳酸菌对其控制效果的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16): 283-289. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.023785.
- [8] 董学文. 酱牛肉中杂环胺的控制及其品质影响因素研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2020: 97-98.
- [9] 张文雨. 叶下珠乙醇萃取物的特性研究[D]. 北京: 北京农学院, 2021: 61-68.
- [10] 李彦, 符慧靖, 吴雪萍, 等. 不同方式二次杀菌的烧卤牛肉在贮藏期间的品质变化[J]. 现代食品科技, 2022, 38(12): 255-263. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0153.
- [11] SHAO Xuefei, XU Baocai, CHEN Conggui, et al. The function and mechanism of lactic acid bacteria in the reduction of toxic substances in food: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 62(21): 1-14. DOI:10.1080/10408398.2021.1895059.
- [12] NOWAK A, KUBERSKI S, LIBUDZISZ Z. Probiotic lactic acid bacteria detoxify *N*-nitrosodimethylamine[J]. Food Additives and Contaminants, 2014, 31(10): 1678-1687. DOI:10.1080/19440049.2014.943304.
- [13] 胡蝶, 赵鑫, 张素平, 等. 降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选鉴定及发酵特性研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(6): 1-4. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2022.06.001.
- [14] 李秀明, 周伟, 鲍佳彤, 等. 不同乳酸菌发酵剂对发酵红肠品质的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(7): 7-13. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20190520-110.
- [15] 李秀明, 常妮妮, 吴晨燕, 等. 微生物亚硝化抑制剂对红肠品质的影响[J]. 肉类研究, 2019, 33(2): 13-18. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20181217-233.
- [16] 闫利娟. 西式培根中*N*-亚硝胺形成的影响因素及其阻断效果研究[D]. 天津: 天津农学院, 2019: 18-20.

- [17] 刘璐璐, 李秀明, 陈援援, 等. 微生物亚硝化抑制剂对新型培根品质的影响[J]. 肉类研究, 2021, 35(2): 1-8. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-20201229-302.
- [18] 陈援援, 李彦, 吴雪萍, 等. 微生物亚硝化抑制剂对风干肠理化性质及安全品质的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(4): 201-213. DOI:10.16429/j.1009-7848.2023.04.020.
- [19] 农业部畜禽产品质量监督检验测试中心, 北京国农工贸发展中心. 肉与肉制品感官评定规范: GB/T 22210—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品pH值的测定: GB 5009.237—2016[S]. 北京: 中国标准出版社: 2016.
- [21] WITTE V C, KRAUSE G F, BAILEY M E. A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage[J]. Journal of Food Science, 2010, 35(5): 582-585. DOI:10.1111/j.1365-2621.1970.tb04815.x.
- [22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定: GB 5009.33—2016[S]. 北京: 中国标准出版社: 2016.
- [23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中生物胺的测定: GB 5009.208—2016[S]. 北京: 中国标准出版社: 2016.
- [24] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中N-亚硝胺类化合物的测定: GB 5009.26—2016[S]. 北京: 中国标准出版社: 2016.
- [25] 陈援援, 马凯华, 张雨婷, 等. 微生物亚硝化抑制剂对风干肠风味物质形成的影响[J]. 食品与机械, 2022, 38(7): 25-36. DOI:10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90146.
- [26] 姜皓. 脂肪对西式培根品质及N-亚硝胺形成的影响及其控制[D]. 天津: 天津农学院, 2020: 58-60.
- [27] 李林. 微生物在发酵酸鱼中对脂质变化和风味组成的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 34-47.
- [28] 韩云飞, 翟钰佳, 郭骏飞, 等. 复配发酵剂对羊肉发酵香肠脂肪氧化及脂肪酸组成的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(11): 99-105. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.019937.
- [29] 李秀明. 乳酸菌降低红肠中N-亚硝胺形成的工艺技术研究[D]. 天津: 天津农学院, 2019: 70-76.
- [30] WÓJCIK W, ŁUKASIEWICZ M, PUPPEL K. Biogenic amines: formation, action and toxicity: a review[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(7): 2634-2640. DOI:10.1002/jsfa.10928.
- [31] 何璇, 马堃, 哈斯, 等. 食品中生物胺形成与抑制的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 294-300. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026163.
- [32] XIAO Yaqing, LI Peijun, XU Mei, et al. Decrease of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine by *Lactobacillus pentosus* R3 is associated with surface-layer proteins[J]. Annals of Microbiology, 2017, 68(1): 27-34. DOI:10.1007/s13213-017-1314-y.
- [33] 王凯旋. 乳酸菌肽聚糖的制备、结构及其生理功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017: 18-28.
- [34] 冯媛美. 食管癌高发地区N-亚硝胺类化合物暴露水平特征分析[D]. 南京: 东南大学, 2017: 44-46.
- [35] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [36] 熊凤娇, 王洋, 马俪珍, 等. 鱼豆腐加工过程中N-亚硝胺含量的动态变化[J]. 肉类研究, 2017, 31(6): 13-18. DOI:10.7506/rlyj1001-8123-201706003.
- [37] HERRMANN S S, GRANBY K, DUEDAHL-OLESEN L. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages[J]. Food Chemistry, 2015, 174: 516-526. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.11.101.