

芳樟醇协同 Surfactin 优化休闲豆干保鲜工艺及品质分析

袁驰^{1,2,3} 王榆颉^{1,2,3} 黄展锐^{1,2,3} 胡连花^{1,2,3} 何婉莹^{1,2,3} 陈浩^{1,2,3}

(1. 邵阳学院食品与化学工程学院,湖南 邵阳 422000; 2. 豆制品加工与安全控制湖南省重点实验室,湖南 邵阳 422000; 3. 湖南特色食品绿色加工与装备湖南省工程研究中心,湖南 邵阳 422000)

摘要:[目的]为替代化学防腐剂,开发基于天然抑菌剂 Surfactin 与芳樟醇的休闲豆干保鲜工艺。[方法]以枯草芽孢杆菌为指示菌,测定 Surfactin 与芳樟醇的最小抑菌浓度(MIC),以菌落总数、感官评分为评价指标进行单因素和响应面试验优化芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干的最佳保鲜工艺参数,并分析贮藏期内休闲豆干品质变化。[结果]芳樟醇的最小抑菌体积分数为 1.95 μL/mL, Surfactin 的最小抑菌质量浓度为 125 μg/mL, 芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干最优保鲜工艺参数为 Surfactin 质量浓度 187.5 μg/mL、芳樟醇体积分数 2.2 μL/mL、处理时间 30 min、料液比 1:3 (g/mL), 该条件下休闲豆干在 25 °C 下的货架期由 2 周延长至 4 周, 4 °C 下可实现 4 周内菌落总数低于检测限, 显著减缓了蛋白质(降幅减少 4.09%)和脂肪(降幅减少 6.97%)的降解, 抑制了丙二醛生成(较对照组减少 19.9%)。[结论]芳樟醇协同 Surfactin 能高效抑菌并延缓休闲豆干品质劣变。

关键词:芳樟醇;Surfactin;休闲豆干;保鲜;品质特性

Optimization of preservation process and quality analysis of leisure dried tofu by linalool synergized with Surfactin

YUAN Chi^{1,2,3} WANG Yujie^{1,2,3} HUANG Zhanrui^{1,2,3} HU Lianhua^{1,2,3} HE Wanying^{1,2,3} CHEN Hao^{1,2,3}

(1. College of Food and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory of Soybean Products Processing and Safety Control, Shaoyang, Hunan 422000, China; 3. Hunan Engineering Research Center of Green Processing and Equipment of Hunan-style Food, Shaoyang, Hunan 422000, China)

Abstract: [Objective] This study developed a preservation process for leisure dried tofu (LD-tofu) by using natural antimicrobial agents, Surfactin and linalool, to replace chemical preservatives. [Methods] The minimum inhibitory concentration (MIC) of Surfactin and linalool was determined with *Bacillus subtilis* as the indicator bacteria, and aerobic plate count and sensory score were used as the evaluation indicators to optimize the optimal preservation process parameters of linalool and Surfactin for LD-tofu through single-factor and response surface experiments, and the quality changes of LD-tofu during storage were analyzed. [Results] The minimum inhibitory volume fraction of linalool was 1.95 μL/mL, and the MIC of Surfactin was 125 μg/mL, respectively. The optimal preservation process parameters of linalool and Surfactin for LD-tofu were Surfactin concentration of 187.5 μg/mL, linalool volume fraction of 2.2 μL/mL, treatment time of 30 min, and material-liquid ratios of 1:3 (g/mL). Under these conditions, the shelf life of LD-tofu at 25 °C could be extended from 2 to 4 weeks. The aerobic plate count within 4 weeks at 4 °C could be lower than the detection limit, significantly slowing down the degradation of protein (decrease by 4.09%) and fat (decrease by 6.97%) and inhibiting the production of malondialdehyde (decrease by 19.9% compared with the control group). [Conclusion] Linalool combined with Surfactin can effectively inhibit bacteria and delay the quality deterioration of LD-

基金项目:湖南省研究生科研创新项目(编号:CX20240992);湖南省自然科学基金区域联合基金项目(编号:2024JJ7485);湖南省教育厅科学项目(编号:23A0542)

通信作者:黄展锐(1992—),男,邵阳学院副教授,博士。E-mail: zhanrui_huang@163.com

收稿日期:2025-06-13 **改回日期:**2025-10-21

引用格式:袁驰,王榆颉,黄展锐,等.芳樟醇协同 Surfactin 优化休闲豆干保鲜工艺及品质分析[J].食品与机械,2025,41(11):91-100.

Citation:YUAN Chi, WANG Yujie, HUANG Zhanrui, et al. Optimization of preservation process and quality analysis of leisure dried tofu by linalool synergized with Surfactin[J]. Food & Machinery, 2025, 41(11): 91-100.

tofu.

Keywords: linalool; Surfactin; leisure dried tofu; preservation; quality characteristic

豆制品是中国的传统食品,是蛋白质、维生素和矿物质的优良来源^[1]。休闲豆干是将豆干进行卤制、调味、包装、杀菌等工艺制成的风味独特的即食豆制产品^[2]。目前大多数的豆干生产企业还是以原始的手工作坊模式进行初级生产,容易导致大豆原料清洗不净、相关工艺参数不稳定、产品易腐败等问题,难以适应连续化生产及市场需求^[3]。由于其蛋白质含量及水分活度较高,适合微生物生长繁殖,货架期内微生物容易迅速增长,降低了产品品质与安全性。

长期以来,食品工业一直在使用各种化学防腐剂来抑制有害微生物生长^[4]。研究发现,化学食品防腐剂如硝酸盐、苯甲酸盐、亚硫酸盐和山梨酸盐对人体具有过敏或致癌作用^[5],使用化学防腐剂的健康风险提高了消费者对含有天然来源成分的防腐剂食品和清洁标签的需求^[6]。因此,使用天然抑菌成分完全或部分替代化学防腐剂,成为食品行业亟待突破的技术瓶颈。

Surfactin 是解淀粉芽孢杆菌产生的一种抗菌肽^[7],可以通过破坏细胞膜形成孔洞^[8]、引起渗透压失衡^[9]、穿透细胞膜直接靶向 DNA、破坏细胞代谢物质,进而抑制次生代谢物的合成等途径直接或间接导致微生物死亡^[10-11]。研究^[12]表明, Surfactin 对革兰氏阳性菌、阴性菌及部分真菌均表现出广谱抑菌活性,且具有很高的安全性。芳樟醇是一种无色精油,它是芫荽、藤椒、花椒等植物的主要挥发性成分^[13],可以通过降低细菌细胞内膜电位、导致细胞内大分子(DNA、RNA 和蛋白质)的泄漏、抑制能量合成,导致代谢功能障碍并抑制关键酶的活性,进而导致细菌细胞结构异常,最终实现对食源性致病菌的高效抑制^[14-16]。尽管芳樟醇表现出可观的抑菌活性,但低水溶性和稳定性限制了其在食品体系中的应用。芳樟醇因其疏水性难以稳定分散在水相体系中,而 Surfactin 作为表面活性剂能有效降低油水界面张力,降低油相液滴粒径,并提升其稳定性^[17]。此外,单一抑菌剂常因作用靶点单一、抑菌谱有限,Surfactin 与芳樟醇复配可通过多重机制提升抑菌效果。

研究拟选用 Surfactin 和芳樟醇进行复配,研究其对休闲豆干的保鲜效果,以菌落总数和感官评分作为评价指标,通过响应面优化得出其最佳工艺,并分析芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干品质特性的影响,以期为休闲豆干天然保鲜剂的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

休闲豆干:实验室自制;

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* KZ2780-3):邵阳学院微生物实验室保留;

Surfactin: 纯度>99%, 上海源叶生物科技有限公司;

芳樟醇: 纯度>98%, 北京索莱宝生物技术有限公司;

硫酸、乙醇、石油醚: 分析纯, 成都金山化学试剂有限公司;

三氯乙酸、乙二胺四乙酸二钠、硫代巴比妥酸: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

熟浆集成机: SJJ-20 型, 康得利智能科技(浙江)有限公司;

电子分析天平: FA124X 型, 天津市德安特传感技术有限公司;

电子天平: NV622ZH 型, 奥豪斯仪器(常州)有限公司;

电热鼓风干燥箱: 101-2AB 型, 北京中兴伟业世纪有限公司;

微生物均质机: Scientz-04 型, 宁波新芝生物科技股份有限公司;

恒温培养箱: B01-250 型, 上海三腾仪器有限公司;

立式高温高压蒸汽灭菌锅: GI54DWS 型, 致微(厦门)仪器有限公司;

超净工作台: SW-CJ-2FD 型, 江苏通净净化设备有限公司;

质构仪: TA1H 型, 英国劳埃德仪器公司;

色差仪: CR-400 型, 日本 Konica Minolta 公司;

超纯水仪: DAY-20 型, 科尔顿(中国)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种活化与菌悬液制备 将冻存的休闲豆干优势腐败菌枯草芽孢杆菌室温融化后,以 1% 的接种量接种到 NA 培养基中,置于摇床上,37 °C, 120 r/min 振荡培养 24 h。

挑取典型菌落传代活化。用无菌生理盐水洗脱,于 6 000 r/min、4 °C 离心 15 min 后,所得菌体用无菌生理盐水洗涤 2 次并重悬,紫外—可见分光光度计测定菌液 OD_{600 nm} 为 1.0, 将菌液稀释成 10⁻⁷ CFU/mL 菌悬液备用。

1.3.2 芳樟醇和 Surfactin 对供试菌的最小抑菌浓度(MIC) 测定 采用微量肉汤稀释法测定芳樟醇和 Surfactin 的最小抑菌浓度,于 96 孔板中无菌分装 100 μL NB 培养基至每排第 11 孔,再吸取 100 μL 稀释后的 2 种药液至第 1 孔,以第 1 孔芳樟醇体积分数为 500 μL/mL、Surfactin 质量浓

度为 500 mg/mL 作为起始浓度然后对其进行二倍稀释,使药液在前 10 孔的质量浓度分别为 500.00, 250.00, 125.00, 62.50, 31.30, 15.60, 7.80, 3.90, 1.95, 0.97 μg/mL, 第 10 孔中吸取 100 μL 弃去, 吸取 100 μL 配制好的菌悬液依次加入第 1~11 孔中, 充分混匀。将 96 孔板置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 观察试验菌生长情况, 以无菌生长的最低质量浓度为最小抑菌浓度。空白培养基为阳性对照; 不添加药液添加菌液的培养基为阴性对照。每个浓度设 3 平行。

1.3.3 单因素试验设计 按照伍涛等^[18]的方法制备休闲豆干, 将浸泡过保鲜剂的休闲豆干自然风干, 于 25 °C 恒温环境中放置 12 h, 再进行相关检测。以浸泡无菌水的休闲豆干作为对照。固定 Surfactin 质量浓度为 125 μg/mL, 芳樟醇体积分数为 1.95 μL/mL, 处理时间为 30 min, 料液比为 1:2 (g/mL), 分别测定 Surfactin 质量浓度 (25.0, 62.5, 125.0, 250.0, 375.0 μg/mL)、芳樟醇体积分数 (0.390, 0.975, 1.950, 3.900, 5.850 μL/mL)、处理时间 (10, 20, 30, 40, 50 min) 及料液比 [1:1.0, 1:1.5, 1:2.0, 1:2.5, 1:3.0 (g/mL)] 对休闲豆干抑菌率和感官评分的影响。每组试验重复 3 次。

1.3.4 响应面试验设计 在单因素试验结果的基础上, 进一步优化 Surfactin 质量浓度、芳樟醇体积分数、处理时间、料液比, 以抑菌率、感官评分为响应值, 利用 Design-Expert 13.0 软件优化保鲜工艺。

1.3.5 菌落总数测定 按 GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》执行。

1.3.6 抑菌率计算 将休闲豆干置于 25 °C 恒温培养箱中培养 12 h 后, 按式(1)计算抑菌率。

$$Y = \frac{N_{\text{对}} - N_{\text{样}}}{N_{\text{对}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y —保鲜剂处理对休闲豆干菌落总数的抑菌率, %;

$N_{\text{对}}$ —对照组休闲豆干的菌落数, CFU/g;

$N_{\text{样}}$ —处理后休闲豆干的菌落数, CFU/g。

1.3.7 感官评价 评定小组由 10 名经过专业培训的豆制品感官鉴定人员组成, 依照表 1 的评分标准分别从色泽、气味、滋味、组织状态 4 个方面对样品进行感官评定。

1.3.8 保鲜剂在休闲豆干保鲜中的应用

(1) 休闲豆干处理及试验分组: 休闲豆干经保鲜剂浸渍处理, 置于室温(约 20 °C)风干 5 min, 将休闲豆干独立分装于真空袋中抽真空热封, 进行反压杀菌(80 °C、0.1 kPa, 30 min), 分别在 4, 25 °C 条件下保存 4 周。设置浸渍无菌水的休闲豆干作为对照组。每隔 1 周测定休闲豆干的理化指标。

(2) 休闲豆干蛋白质含量测定: 按 GB 5009.5—2025

表 1 感官评分标准

Table 1 Sensory scoring criteria

评价指标	评价标准	分值
色泽 (20 分)	颜色呈黄褐色, 表面油光明显	16~20
	颜色呈深褐色, 能看到表面油光	11~15
	颜色呈黑褐色, 四周发黑	1~10
气味 (30 分)	休闲豆干香味明显, 精油味道宜人	26~30
	休闲豆干香味较淡, 精油味突出	11~25
	无休闲豆干香味, 精油味刺激	6~10
滋味 (30 分)	无休闲豆干香味, 酸异味明显	1~5
	豆香味和卤香味明显, 精油味道宜人	26~30
	豆香味和卤香味较明显, 精油味突出	11~25
组织状态 (20 分)	无豆香味, 没有异味	6~10
	无豆香味, 有酸味或异味	1~5
	质地松散或组织变硬, 无霉变及黏液产生	11~15
	质地松散或组织变硬, 有霉变或黏液产生	1~10

《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》执行。

(3) 休闲豆干脂肪含量测定: 按 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》执行。

(4) 质构特性测定: 选用 P35 圆柱型平底探头测定休闲豆干, 压缩速度 60 mm/min、提升速度 60 mm/min、按压时间 5 s、压缩速度 60 mm/min, 压缩比 50%。每个样品取休闲豆干上、中、下 3 个不同区域。

(5) 丙二醛测定: 按 GB 5009.181—2016《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》执行。

1.4 数据处理

每个试验指标做 3 个平行, 结果以平均值±标准差表示。采用 Origin 2024 软件对试验数据进行分析和作图, 通过 SPSS 进行显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 芳樟醇和 Surfactin 对供试菌的最小抑菌浓度测定

如表 2 所示, 随着芳樟醇和 Surfactin 质量浓度升高, 其对枯草芽孢杆菌的抑菌效果逐渐增强。芳樟醇对枯草芽孢杆菌的抑制效果与 Surfactin 相比更强, 1.95 μL/mL 时生长即被抑制; Surfactin 质量浓度为 125 μg/mL 时枯草芽孢杆菌生长被抑制。即芳樟醇对休闲豆干优势腐败菌枯草芽孢杆菌的最小抑菌体积分数为 1.95 μL/mL, Surfactin 对枯草芽孢杆菌的最小抑菌质量浓度为 125 μg/mL。研究发现, 芳樟醇对单核细胞增生李斯特菌^[19]、金黄色葡萄球菌^[20]、铜绿假单胞菌^[20]和腐败希瓦氏菌^[13]的最小抑菌质量浓度分别为 1.25, 5, 7, 1.5 μg/mL。10 mg/mL 的 Surfactin 对范耐药的鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、大肠

杆菌和肺炎双球菌菌株具有抗菌活性(100%)^[21],对大肠杆菌、荧光假单胞菌、蜡样芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度分别为235.78,235.78,117.89,58.95,58.95 mg/L^[22]。此外,Surfactin对革兰氏阳性菌的MIC较革兰氏阴性菌更低,说明Surfactin抑制革兰氏阳性菌的能力更强,与试验结果基本一致。

表2 芳樟醇和Surfactin对供试菌的最小抑菌浓度[†]

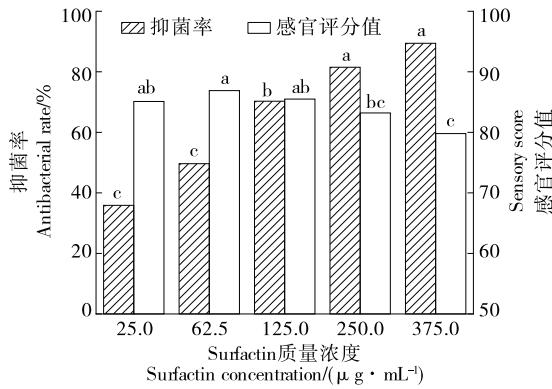
Table 2 MICs of linalool and Surfactin on test bacteria

芳樟醇		Surfactin	
体积分数/ ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	菌株生长情况	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	菌株生长情况
0.97	+	31.3	+
1.95	-	62.5	+
3.9	-	125	-
7.8	-	250	-
15.6	-	500	-

† +表示有菌生长;-表示无菌生长。

2.2 单因素试验

2.2.1 Surfactin质量浓度对休闲豆干抑菌率和感官评分的影响 如图1所示,Surfactin质量浓度对休闲豆干抑菌率具有显著影响($P<0.05$),其抑菌效果随质量浓度升高而增强。随着质量浓度从25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增至375 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑菌率由35.87%提升至89.42%,Surfactin质量浓度 $>125 \mu\text{g}/\text{mL}$ 后抑菌率增幅趋缓,可能是Surfactin质量浓度超出临界胶束浓度(CMC)后,多余的分子往往会自发地聚集形成多聚体,而不是以单体或低聚体状态插入膜^[23]。一些学者^[23]认为表面活性素二聚化到双层磷脂分子中是膜不稳定和泄漏的必要步骤。继续增加质量浓度,实际在膜上



小写字母不同表示各组间差异显著($P<0.05$)

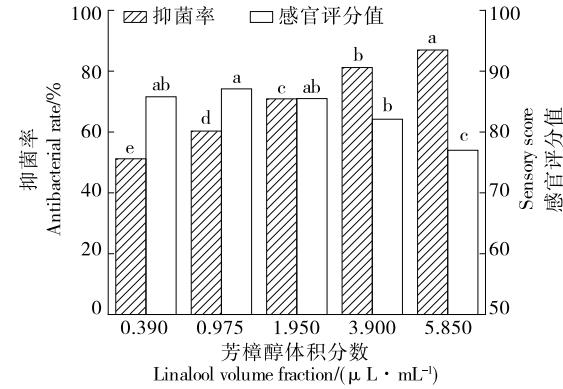
图1 Surfactin质量浓度对休闲豆干抑菌率
和感官评分的影响

Figure 1 Effect of Surfactin concentration on bacterial inhibition rate and sensory score of LD-tofu

起作用的有效浓度并没有继续增加,导致对生物膜的破坏作用不再继续增强^[24]。高质量浓度Surfactin感官评分显著低于其他组($P<0.05$),可能是Surfactin可以通过降低油水界面张力,有效乳化芳樟醇,形成更小、更均一的油滴^[17],更好地渗透进豆干体系中,导致休闲豆干中芳樟醇气味更浓烈。Surfactin质量浓度为125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,休闲豆干的感官评分为85.5,保持休闲豆干的风味的同时,保鲜剂具有较好的抑菌效果。综上所述,选择62.5,125,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Surfactin质量浓度用于响应面试验的进一步优化。

2.2.2 芳樟醇体积分数对休闲豆干抑菌率和感官评分的影响 芳樟醇已经被证明对污染食物的微生物有活性,包括弯曲杆菌属、沙门氏菌属、大肠杆菌以及单核细胞增生李斯特菌等^[13]。适当浓度的芳樟醇能有效抑制微生物的生长,且有助于赋予类似藤椒的独特风味,但浓度过高会使休闲豆干具有浓烈的精油气味,掩盖住样品原有的气味。如图2所示,在芳樟醇体积分数为0.390~5.850 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,抑菌率随着体积分数升高显著($P<0.05$)升高,当芳樟醇体积分数5.850 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,抑菌率达到最大值86.97%。Wang等^[25]研究表明,芳樟醇的抑菌效果与其体积分数呈正相关,低体积分数(1~2 $\mu\text{L}/\text{mL}$)时即能抑制细菌增殖和生物膜的形成,但当芳樟醇体积分数超过0.975 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 后,休闲豆干感官评分呈下降趋势,在芳樟醇体积分数为3.900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,休闲豆干感官评分 <85 ,这是由于该浓度下休闲豆干具有浓烈的精油气味,其品质和消费者可接受程度有所下降。综上所述,选择0.975,1.950,3.900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的芳樟醇用于响应面试验的进一步优化。

2.2.3 处理时间对休闲豆干抑菌率和感官评分的影响



小写字母不同表示各组间差异显著($P<0.05$)

图2 芳樟醇体积分数对休闲豆干抑菌率
和感官评分的影响

Figure 2 Effect of linalool volume fraction on bacterial inhibition rate and sensory score of LD-tofu

如图3所示,处理时间对抑菌率的影响呈先升后降趋势。在40 min时抑菌率达峰值82.28%,而50 min时降至52.54%($P<0.05$)。Wang等^[25]研究了芳樟醇对生物膜形成过程中细菌生长的影响,2 μL/mL芳樟醇在24 h内的抑菌率超过了90%,随后,抑制率降低,但在72 h时再次激增。细菌生物膜的发育经历附着、生长、成熟和扩散阶段。最低生物膜清除浓度(MBIC)可以减少生物膜发育的成熟和分散阶段的细菌数量,而低浓度芳樟醇的抑制作用在生物膜生长期最明显,并随着生物膜质量的增加而减弱。50 min处理时间抑菌率下降,可能是长时间处理导致活性成分降解^[26],进而对细胞生物膜成熟阶段的微生物抑制效果减弱。感官评分在30 min时达到最高87.5,40 min下降至83.0。综上所述,选择30,40,50 min的处理时间用于响应面试验进一步优化。

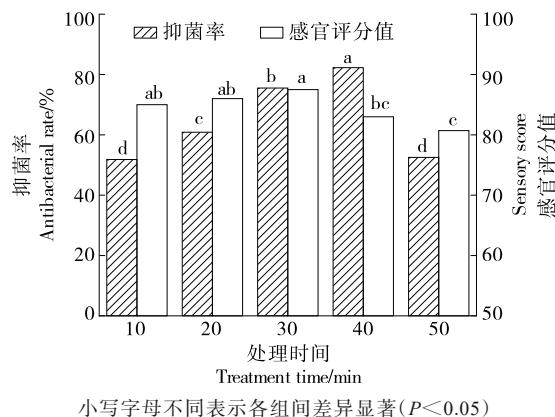


图3 处理时间对休闲豆干抑菌率和感官评分的影响
Figure 3 Effect of treatment time on bacterial inhibition rate and sensory score of LD-tofu

2.2.4 料液比对休闲豆干抑菌率和感官评分的影响 如图4所示,料液比对抑菌率影响显著($P<0.05$)。从1:1(g/mL)增至1:3(g/mL)时,抑菌率由39.7%升至91.2%,表明高料液比可提升保鲜剂抑菌率,这可能是由于较高的料液比增加了芳樟醇、Surfactin与休闲豆干的接触面积,从而加速活性成分扩散并促进其充分结合。感官评分则从86.6降至79.8,可能是高料液比导致芳樟醇残留量升高,引发刺激性气味。综上所述,选择1:2,1:2.5,1:3(g/mL)的料液比用于响应面试验进一步优化。

2.3 响应面优化休闲豆干保鲜工艺

2.3.1 响应模型的建立与分析 响应面试验因素及水平见表3,试验设计和结果见表4。

利用Design-Expert 13.0软件对结果进行二次多元回归拟合后,菌落总数、感官评分对Surfactin质量浓度、芳樟醇体积分数、处理时间和料液比的二次多元回归拟合

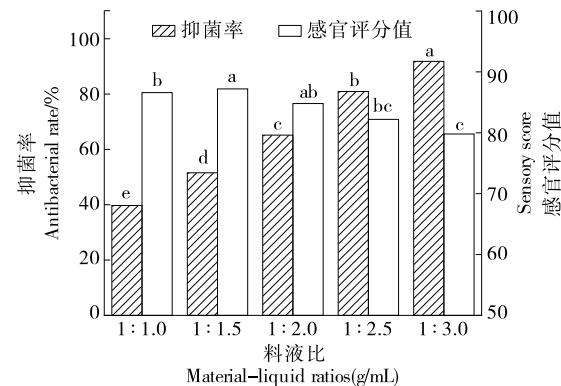


图4 料液比对休闲豆干抑菌率和感官评分的影响
Figure 4 Effect of material-liquid ratios on bacterial inhibition rate and sensory score of LD-tofu

表3 响应面试验因素及水平
Table 3 Response surface test factors and levels

水平	A Surfactin 质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	B 芳樟醇体积分数/(μL·mL ⁻¹)	C 处理时间/min	D 料液比(g/mL)
-1	62.5	0.975	30	1:2.0
0	125.0	1.950	40	1:2.5
1	250.0	3.900	50	1:3.0

方程:

$$Y_1 = 2.7 - 0.1416A - 0.1108B + 0.0173C - 0.0952D - 0.0702AB + 0.0108AC + 0.0308AD - 0.0073BC - 0.0535BD - 0.0112CD - 0.0363A^2 + 0.0951B^2 - 0.052C^2 - 0.0642D^2, \quad (2)$$

$$Y_2 = 82.16 - 1.4A - 6.98B - 1.68C - 1.11D + 1.22AB + 0.1982AC - 0.5036AD - 0.2518BC - 0.3536BD + 1.92A^2 - 0.9094B^2 + 1.17C^2 + 0.5475D^2. \quad (3)$$

2.3.2 响应面结果分析 由表5和表6可知,各试验模型 $P<0.0001$,极显著,说明模型能有效解释变量与响应值间的关系,模型预测能力优异,试验结果可靠。菌落总数模型中失拟项不显著($P>0.05$),A、B、D、B²对休闲豆干菌落总数影响极显著($P<0.01$),AB、C²、D²对休闲豆干菌落总数影响显著($P<0.05$)。各单因素对菌落总数的影响顺序为Surfactin质量浓度>芳樟醇体积分数>料液比>处理时间。感官评分模型中失拟项不显著($P>0.05$),A、B、C、D、A²、C²对休闲豆干感官评分影响极显著($P<0.01$),且AB对感官评分影响显著($P<0.05$)。各因素对感官评分的影响顺序为芳樟醇体积分数>处理时间>Surfactin质量浓度>料液比。

如图5所示,随着Surfactin质量浓度和芳樟醇体积分数的逐渐升高,菌落总数呈下降趋势;Surfactin质量浓度

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A	B	C	D	菌落总数/ lg(CFU·g ⁻¹)	感官评分
1	-1	-1	0	0	2.90±0.02	93.00±1.73
2	1	-1	0	0	2.76±0.09	87.00±3.61
3	-1	1	0	0	2.83±0.04	77.33±5.50
4	1	1	0	0	2.41±0.07	75.33±6.43
5	0	0	-1	-1	2.71±0.10	89.33±3.78
6	0	0	1	-1	2.75±0.07	86.00±3.00
7	0	0	-1	1	2.54±0.04	88.00±4.00
8	0	0	1	1	2.53±0.12	85.00±4.58
9	-1	0	0	-1	2.94±0.05	88.33±6.35
10	1	0	0	-1	2.53±0.03	86.00±2.65
11	-1	0	0	1	2.68±0.12	87.67±2.51
12	1	0	0	1	2.41±0.16	82.67±4.51
13	0	-1	-1	0	2.82±0.01	90.67±5.51
14	0	1	-1	0	2.70±0.09	78.00±3.00
15	0	-1	1	0	2.89±0.01	88.00±3.46
16	0	1	1	0	2.72±0.07	74.67±4.51
17	-1	0	-1	0	2.74±0.06	91.33±2.08
18	1	0	-1	0	2.58±0.08	88.00±4.00
19	-1	0	1	0	2.76±0.07	86.67±6.51
20	1	0	1	0	2.64±0.06	85.00±5.00
21	0	-1	0	-1	2.92±0.06	91.67±1.52
22	0	1	0	-1	2.83±0.03	75.67±5.51
23	0	-1	0	1	2.89±0.07	89.67±4.51
24	0	1	0	1	2.54±0.01	73.00±4.00
25	0	0	0	0	2.79±0.06	84.00±4.00
26	0	0	0	0	2.73±0.02	84.67±4.51
27	0	0	0	0	2.81±0.04	84.67±3.21
28	0	0	0	0	2.84±0.06	85.67±2.51
29	0	0	0	0	2.72±0.07	86.00±4.00

与芳樟醇体积分数的等高线沿着菌落总数轴密集且呈椭圆形,说明交互作用显著,芳樟醇体积分数和料液比的3D曲面的坡度陡峭,说明两因素的交互作用显著,这与方差分析的结果相吻合。随着芳樟醇体积分数的增加,感官评分逐渐降低。Surfactin质量浓度与芳樟醇体积分数的3D曲面的坡度陡峭,说明两因素的交互作用极显著($P<0.05$)。芳樟醇体积分数和处理时间、芳樟醇体积分数和料液比的3D曲面陡峭,表明它们之间的交互效应对感官评分影响明显,与方差分析结果相吻合。

2.3.3 最优条件及验证实验 确保芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干保鲜处理后感官评分 >85 , 菌落总数尽可能

表 5 菌落总数方差分析[†]

Table 5 ANOVA of aerobic plate count

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.54	14	0.038 7	10.36	<0.000 1**
A	0.21	1	0.213 1	57.02	<0.000 1**
B	0.13	1	0.130 6	34.94	<0.000 1**
C	0.00	1	0.002 8	0.75	0.401 2
D	0.08	1	0.084 7	22.66	0.000 3**
AB	0.02	1	0.022 7	6.08	0.027 2*
AC	0.00	1	0.000 5	0.13	0.720 0
AD	0.00	1	0.004 1	1.09	0.313 6
BC	0.00	1	0.000 2	0.06	0.808 3
BD	0.01	1	0.012 3	3.28	0.091 5
CD	0.00	1	0.000 5	0.13	0.719 7
A ²	0.01	1	0.006 4	1.71	0.212 7
B ²	0.04	1	0.043 7	11.71	0.004 1**
C ²	0.02	1	0.017 5	4.69	0.048 0*
D ²	0.03	1	0.026 7	7.16	0.018 1*
残差	0.05	14	0.003 7		
失拟项	0.04	10	0.004 1	1.49	0.372 2
纯误差	0.01	4	0.002 8		
总和	0.59	28			

† *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$);
 $R^2=0.912\ 0$; $R_{Adj}^2=0.823\ 9$ 。

表 6 感官评分方差分析[†]

Table 6 ANOVA of sensory scores

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	822.78	14	58.77	67.50	<0.000 1**
A	20.73	1	20.73	23.80	0.000 2**
B	517.96	1	517.96	594.91	<0.000 1**
C	26.30	1	26.30	30.20	<0.000 1**
D	11.44	1	11.44	13.14	0.002 8**
AB	6.83	1	6.83	7.85	0.014 2*
AC	0.17	1	0.17	0.19	0.666 6
AD	1.09	1	1.09	1.25	0.282 4
BC	0.27	1	0.27	0.31	0.585 0
BD	0.54	1	0.54	0.62	0.445 6
CD	0.00	1	0.00	0.00	1.000 0
A ²	17.80	1	17.80	20.44	0.000 5**
B ²	4.00	1	4.00	4.59	0.050 2
C ²	8.91	1	8.91	10.24	0.006 4**
D ²	1.94	1	1.94	2.23	0.157 3
残差	12.19	14	0.87		
失拟项	9.39	10	0.94	1.34	0.417 3
纯误差	2.80	4	0.70		
总和	834.97	28			

† *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$);
 $R^2=0.985\ 4$; $R_{Adj}^2=0.970\ 8$ 。

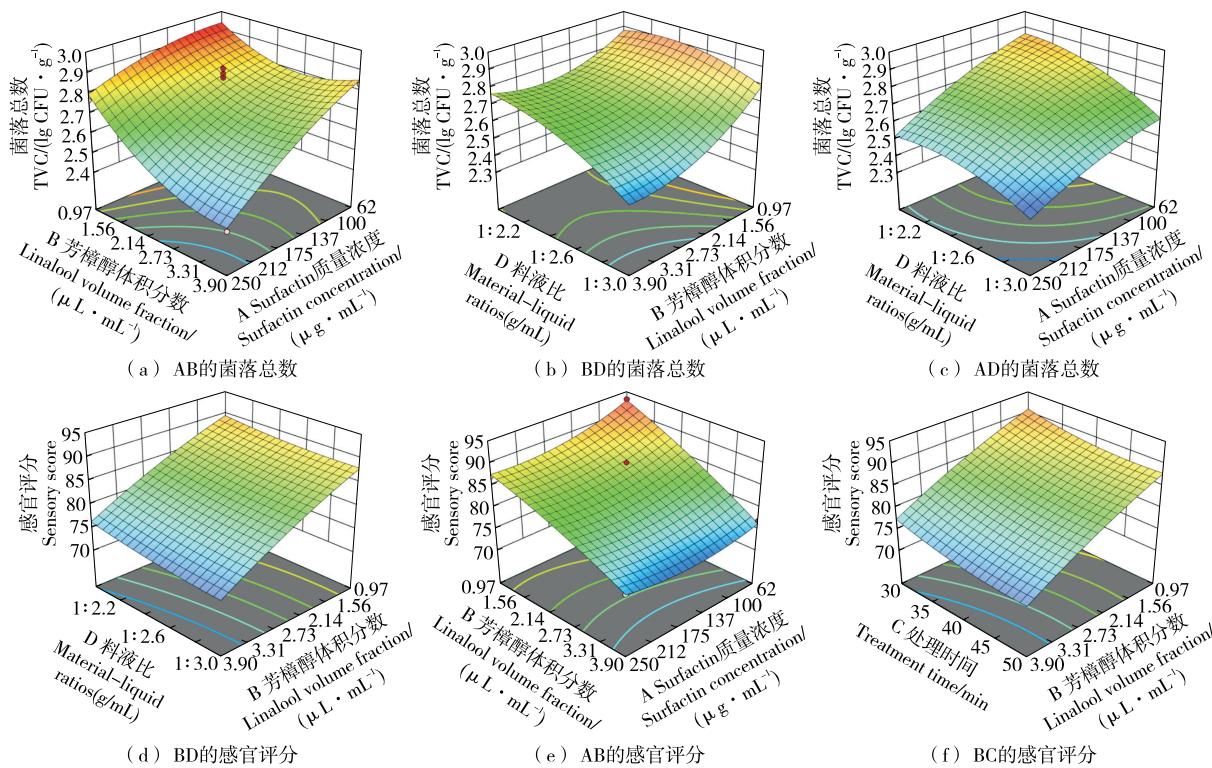


图 5 两因素交互作用对菌落总数和感官评分的影响

Figure 5 Effect of each two-factor interaction on aerobic plate count and sensory score

小的情况下,根据 Design-Expert 13.0 得到芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干保鲜工艺优化最佳工艺参数为: Surfactin 质量浓度 187.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芳樟醇体积分数 2.207 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、处理时间 30.001 min、料液比 1:2.998 (g/mL), 将工艺条件进行微调: Surfactin 质量浓度 187.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芳樟醇体积分数 2.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、处理时间 30 min、料液比 1:3 (g/mL)。采用最佳工艺参数处理休闲豆干(浸泡保鲜剂的休闲豆干自然风干,未经杀菌、真空包装处理,于 25 °C 恒温环境中放置 12 h),得到休闲豆干贮藏 12 h 时菌落总数(TVC)为(2.48±0.05) lg(CFU/g),对照组休闲豆干菌落总数为(3.04±0.07) lg(CFU/g),感官评分为 85.66±0.47,与预测值相近,模型可靠。

2.4 芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干菌落总数的影响

如表 7 所示,第 0 天所有样品均未检出菌落,表明此时微生物并未繁殖。4 °C 下贮藏 4 周时,对照组为(1.58±0.07) lg(CFU/g),保鲜剂组仍低于检测限。这表明在 4 °C 低温环境下,无论是对照组还是保鲜剂组,微生物生长均受到显著抑制,保鲜剂组芳樟醇协同 Surfactin 对微生物抑制效果极佳,在 4 周内几乎完全抑制了微生物生长。25 °C 条件下,对照组菌落总数随贮藏时间迅速上升,贮藏第 1 周即检出(1.40±0.04) lg(CFU/g),第 2 周达到(2.68±0.06) lg(CFU/g),在第 3 周时已经超过 DB33/ 529—

2005《散装及预包装豆制品质量安全要求》规定的菌落总数最大限值[5.0 lg (CFU/g)],表明其货架期为 2 周。保鲜剂组在贮藏前期菌落总数低于检测限,之后逐渐上升,第 4 周时达到(4.86±0.04) lg(CFU/g)。说明 25 °C 利于微生物生长,微生物增殖快,保鲜剂组虽不能完全抑制微生物生长,但能显著延缓其增长速度,将休闲豆干在 25 °C 的货架期由 2 周延长至 4 周。

2.5 芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干品质特性的影响

2.5.1 对休闲豆干蛋白质和脂肪含量的影响 休闲豆干在 25 °C 下贮藏 4 周,蛋白质和脂肪含量变化如图 6 所示。

表 7 休闲豆干贮藏期菌落总数的变化[†]

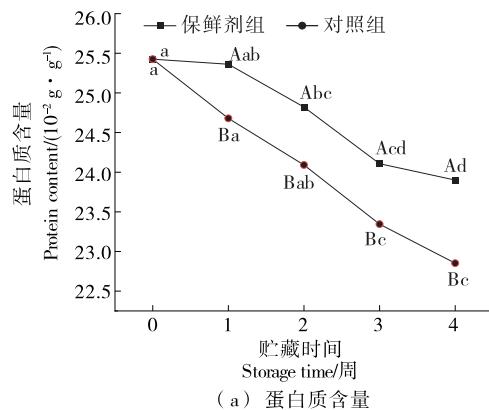
Table 7 Changes of aerobic plate count during storage period of LD-tofu

贮藏时间/周	4 °C 贮藏菌落总数/(lg CFU·g⁻¹)		25 °C 贮藏菌落总数/(lg CFU·g⁻¹)	
	对照组		保鲜剂组	
	ND	ND	ND	ND
0	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	1.40±0.04	<1
2	<1	<1	2.68±0.06	1.96±0.12
3	<1	<1	5.07±0.04	3.26±0.05
4	1.58±0.07	<1	7.52±0.05	4.86±0.04

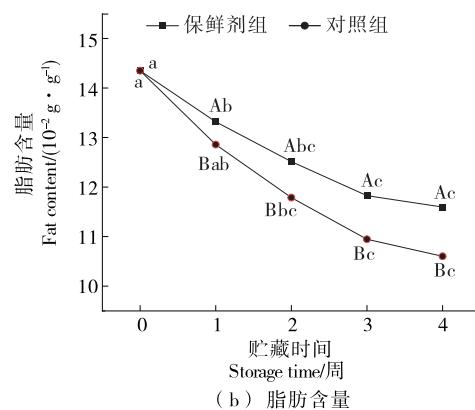
[†] ND 表示未检出。

保鲜剂组与对照组休闲豆干蛋白质含量随着贮藏时间的延长显著降低($P<0.05$)，由 25.43 g/100 g 分别下降到 23.90, 22.85 g/100 g，与对照组相比，保鲜剂组蛋白质含量下降幅度显著低于对照组($P<0.05$)。休闲豆干的脂肪含量随贮藏时间延长而下降，保鲜剂处理显著延缓了脂肪降解速率($P<0.05$)。休闲豆干初始脂肪含量为 14.35 g/100 g，贮藏 4 周时保鲜剂组和对照组分别为 11.6, 10.6 g/100 g。芳樟醇协同 Surfactin 可显著减缓休闲豆干

体系中蛋白质和脂肪含量的下降，可能是由 Surfactin 可抑制假单胞菌属等^[7]产蛋白酶和脂肪酶的微生物生长。蛋白酶可水解蛋白质中的肽键，将其分解为多肽或氨基酸，通过与裂解中间体的羧基—羧酸盐相互作用促进进行性蛋白水解^[27]，脂肪酶能够将油脂分解为甘油和脂肪酸。芳樟醇和 Surfactin 对微生物与代谢通路活性的抑制作用降低了微生物对氨基酸、脂肪酸等小分子营养物质的消耗。



(a) 蛋白质含量



(b) 脂肪含量

小写字母不同表示同一样品在不同贮藏期差异显著($P<0.05$)；大写字母不同表示同一贮藏期不同样品差异显著($P<0.05$)

图 6 芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干蛋白质含量的影响

Figure 6 Effect of linalool and Surfactin on protein content of LD-tofu

2.5.2 对休闲豆干质构的影响 如图 7 所示，休闲豆干的弹性和硬度随着贮藏时间的延长而降低，与 Huang 等^[28]的研究结果基本一致，这可能是休闲豆干贮藏期蛋白质含量下降，蛋白质分子间凝胶强度减小而导致豆干硬度和弹性降低。贮藏周期内保鲜剂组变化幅度小于对照组，同一贮藏期保鲜剂组与对照组无显著差异，说明贮藏时间是影响休闲豆干弹性和硬度的主要因素，同时也表明芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干的质构特性不会产生

不良影响。

2.5.3 对休闲豆干丙二醛含量的影响 25 °C 条件下保鲜剂组和对照组休闲豆干丙二醛含量变化如图 8 所示。起初丙二醛含量为 0.126 7 mg/kg，随贮藏时间延长，MDA 含量均呈上升趋势，贮藏 4 周时保鲜剂组和对照组的 MDA 含量为 0.321 7, 0.402 2 mg/kg。贮藏 1 周之后对照组 MDA 含量始终显著高于保鲜剂组($P<0.05$)，保鲜剂组 MDA 含量增幅较缓(7~14 d 增幅约 22.7%，14~21 d 增幅

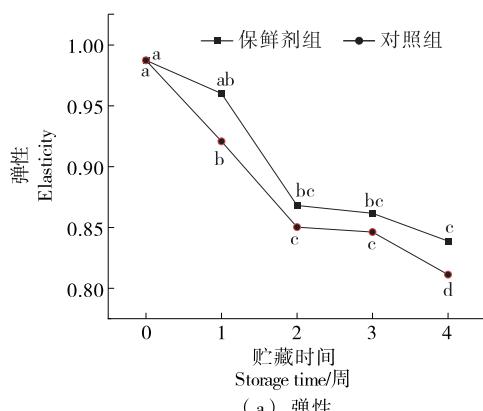
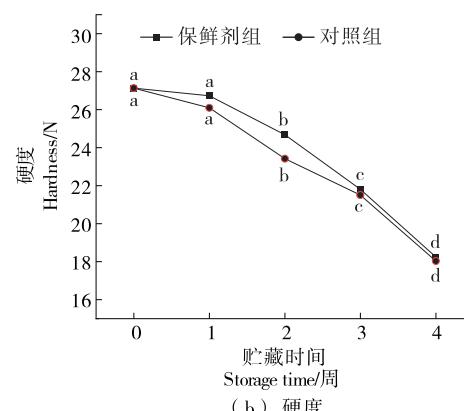
小写字母不同表示同一样品在不同贮藏期差异显著($P<0.05$)

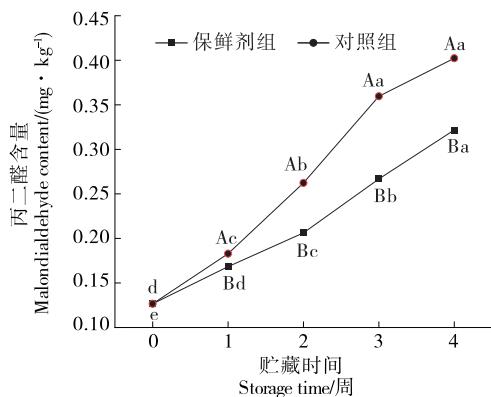
图 7 芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干质构的影响

Figure 7 Effect of linalool and Surfactin on texture of LD-tofu



(b) 硬度

约 29.1%), 这可能与芳樟醇的抗氧化活性有关。研究表明, 芳樟醇能与底物发生共氧化, 与可氧化底物相比, 它们的自终止和交叉终止速率更高, 从而增加了总体链终止并降低了自动氧化的效率。而 Surfactin 可破坏腐败菌细胞膜完整性, 抑制能量代谢关键酶, 从而减少甘油三酯的水解及其参与的脂质代谢过程^[11], 最终延缓脂肪氧化, 延长休闲豆干的贮藏期。



小写字母不同表示同一样品在不同贮藏期差异显著($P<0.05$);大写字母不同表示同一贮藏期不同样品差异显著($P<0.05$)

图 8 芳樟醇协同 Surfactin 对休闲豆干丙二醛含量的影响
Figure 8 Effect of linalool and Surfactin on malondialdehyde content of LD-tofu

3 结论

该研究采用天然抑菌物质 Surfactin 和芳樟醇处理休闲豆干, 以枯草芽孢杆菌为指示菌, 确定 Surfactin 的最小抑菌质量浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 芳樟醇的最小抑菌体积分数为 1.95 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。通过单因素及响应面试验确定 Surfactin 协同芳樟醇最佳保鲜工艺为 Surfactin 质量浓度 187.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芳樟醇体积分数 2.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、处理时间 30 min、料液比 1:3 (g/mL)。此条件可使休闲豆干在 25 °C 下的货架期由 2 周延长至 4 周, 4 °C 下可实现 28 d 菌落总数低于检测限, 不仅确保了休闲豆干在贮藏过程中的微生物安全性, 而且显著减缓了蛋白质和脂肪降解, 抑制了丙二醛生成且对休闲豆干的质构无不良影响。天然成分复配保鲜剂符合清洁标签食品需求, 在休闲豆干工业化生产中具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] PAL M, DEVRANI M, AYELE Y. Tofu: a popular food with high nutritional and health benefits[J]. Food & Beverages Processing, 2019, 5(4): 54-55.
- [2] LI Y B, LIN L D, HUANG Z R, et al. An assessment of the occupational environment contributing to the microbial contamination and diversity of leisure dried tofu[J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 209: 116790.
- [3] 彭鑫, 李冰鑫, 马芳, 等. 湘味卤豆干中腐败微生物的分离鉴定及控制[J]. 食品与机械, 2024, 40(4): 172-178.
- [4] PENG X, LI B X, MA F, et al. Isolation, identification and control of spoilage microorganisms in Xiangwei stewed bean[J]. Food & Machinery, 2024, 40(4): 172-178.
- [5] DAVIDSON P M, TAYLOR T M, SCHMIDT S E. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds[J]. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2012: 765-801.
- [6] PINTO L, TAPIA-RODRÍGUEZ M R, BARUZZI F, et al. Plant antimicrobials for food quality and safety: recent views and future challenges[J]. Foods, 2023, 12(12): 2 315.
- [7] LUCERA A, COSTA C, CONTE A, et al. Food applications of natural antimicrobial compounds[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 287.
- [8] BAINDARA P, MANDAL S M, CHAWLA N, et al. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample[J]. AMB Express, 2013, 3(1): 2.
- [9] SHAN M Y, MENG F Q, ZHOU L B, et al. Surfactin inhibits the growth of *Propionibacterium acnes* by destroying the cell wall and membrane[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(6): 684-693.
- [10] DELEU M, LORENT J, LINS L, et al. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2013, 1828(2): 801-815.
- [11] GUEGUEN Y, BERNARD R, JULIE F, et al. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin[J]. Molecular Immunology, 2009, 46(4): 516-522.
- [12] 刘唤明, 孙力军, 王雅玲, 等. 纳豆菌抗菌肽对副溶血弧菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 201-205.
- [13] LIU H M, SUN L J, WANG Y L, et al. Antibacterial mechanism of lipopeptide from *Bacillus natto* against *Vibrio parahemolyticus*[J]. Food Science, 2012, 33(15): 201-205.
- [14] HUANG K C, LIN C M, TSAO H K, et al. The interactions between surfactants and vesicles: dissipative particle dynamics [J]. Journal of Chemical Physics, 2009, 130(24): 245101.
- [15] MACZKA W, DUDA-MADEJ A, GRABARCZYK M, et al. Natural compounds in the battle against microorganisms-linalool[J]. Molecules, 2022, 27(20): 6 928.
- [16] PRAKASH A, VADIVEL V, RUBINI D, et al. Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella Typhimurium*[J]. Food Bioscience, 2019, 28: 57-65.
- [17] GUO F Y, LIANG Q, ZHANG M, et al. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *shewanella putrefaciens*[J]. Molecules, 2021, 26(1): 245.
- [18] XIAO Z F, ZHANG B H, WANG Y B, et al. Transcriptomic

- analysis reveals that exogenous indole-3-butyric acid affects the rooting process during stem segment culturing of cinnamomum camphora linalool type[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2022, 40(4): 661-673.
- [17] HOFFMANN M, MÜCK D, GROSSMANN L, et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays promising characteristics as O/W-emulsifier for food formulations[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 203: 111749.
- [18] 伍涛, 彭希林, 赵良忠, 等. 湘派豆干及卤汁在卤制过程中的变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 146-154.
WU T, PENG X L, ZHAO L Z, et al. Variation law of Xiangpai dried tofu and brine during marinating process[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(19): 146-154.
- [19] PRAKASH A, VADIVEL V. Citral and linalool nanoemulsions: impact of synergism and ripening inhibitors on the stability and antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(4): 1495-1504.
- [20] SOKOVIĆ M, GLAMOČLIJA J, MARIN P D, et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model[J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 7532-7546.
- [21] HAVENGA B, NDLOVU T, CLEMENTS T, et al. Exploring the antimicrobial resistance profiles of WHO critical priority list bacterial strains[J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 1-16.
- [22] 章栋梁. Surfactin 工业分离纯化工艺及其对肉品的防腐保鲜效果[D]. 南京: 南京农业大学, 2013: 82.
ZHANG D L. Study of the industrial process for the separation and purification of surfactin and its effect on meat preservation [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013: 82.
- [23] CARRILLO C, TERUEL J A, ARANDA F J, et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003, 1611(1/2): 91-97.
- [24] SHEPPARD J D, JUMARIE C, COOPER D G, et al. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1991, 1064(1): 13-23.
- [25] WANG L, WANG J M, ZHANG K, et al. Linalool as a potential agent for inhibiting *Escherichia coli* biofilm formation and exopolysaccharide production[J]. *BMC Veterinary Research*, 2025, 21(1): 235.
- [26] KARIMIRAD R, BEHNAMIAN M, DEZHSETAN S. Bitter orange oil incorporated into chitosan nanoparticles: preparation, characterization and their potential application on antioxidant and antimicrobial characteristics of white button mushroom[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105387.
- [27] LI S S, HSIEH K Y, KUO C I, et al. Processive cleavage of substrate at individual proteolytic active sites of the Lon protease complex[J]. *Science Advances*, 2021, 7(46): eabj9537
- [28] HUANG Z R, ZHOU H P, JIANG Q H, et al. Study on the quality change and deterioration mechanism of leisure dried tofu under different storage temperature conditions[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 172: 114257.
- [29] BASCHIERI A, AJVAZI M D, TONFACK J L F, et al. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils[J]. *Food Chemistry*, 2017, 232: 656-663.