

传统发酵肉制品中乳酸菌的筛选及其在萨拉米中的初步应用

王淳玉¹, 徐宝才², 杨柳², 孙芸^{1*}

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211816)

(2. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要: 为筛选出具有优良发酵特性的乳酸菌菌株, 对具有代表性的传统发酵肉制品中的微生物进行选择分离, 并研究其在萨拉米发酵过程中的适应性。通过不同菌株发酵特性分析, 筛选出两株不产黏性和色素、不产 H₂O₂ 和 H₂S、发酵葡萄糖不产气、无氨基酸脱羧酶和溶血性、不分解精氨酸产氨、发酵性能优良的菌株 YR07 和 L.48。通过糖发酵试验和 16S rRNA 序列分析, 确定菌种 YR07 为植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*), L.48 为清酒乳杆菌 (*Latilactobacillus sakei*)。菌株 YR07 和 L.48 对质量分数 6.0% NaCl、150 mg/kg NaNO₂ 及 pH 值 4.0 的耐受性良好, 可有效抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌等食源性致病、致腐菌, 对红霉素、氯霉素等常用抗生素无耐药性。两菌株分别应用于萨拉米发酵阶段, 接菌组香肠 pH 值在 24 h 内可快速降至 4.71 和 4.82, 杂菌生长受到抑制, 产品质地、感官风味得到提升。综上, YR07 和 L.48 符合发酵剂特性, 生产适应性强、安全性高, 可用于肉制品发酵。

关键词: 传统发酵肉制品; 乳酸菌; 萨拉米; 植物乳杆菌; 清酒乳杆菌

文章编号: 1673-9078(2024)01-67-75

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.1.0181

Screening of Lactic Acid Bacteria in Traditional Fermented Meat Products and Their Application in Salami Fermentation

WANG Chunyu¹, XU Baocai², YANG Liu², SUN Yun^{1*}

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

(2. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: To screen for strains of lactic acid bacteria with excellent fermentation characteristics, the microorganisms in traditional fermented meat products were selectively isolated and their adaptability in salami fermentation was investigated. Through the analysis of the fermentation characteristics of different strains, two strains YR07 and L.48 with superior fermentation performance were selected on the basis of several criteria, including an absence of viscosity and pigment production, H₂O₂ and H₂S production, gas production during fermentation, amino acid decarboxylase and hemolysis, and arginine decomposition to produce ammonia. Based on the sugar fermentation test and 16S rRNA sequence analysis, the

引文格式:

王淳玉, 徐宝才, 杨柳, 等. 传统发酵肉制品中乳酸菌的筛选及其在萨拉米中的初步应用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(1): 67-75.

WANG Chunyu, XU Baocai, YANG Liu, et al. Screening of lactic acid bacteria in traditional fermented meat products and their application in salami fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(1):67-75.

收稿日期: 2023-02-20

基金项目: 安徽省科技重大专项项目 (2021d06050001)

作者简介: 王淳玉 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品发酵, E-mail: w8761869975@163.com

通讯作者: 孙芸 (1974-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工, E-mail: yunsunny012@163.com

strain YR07 was identified as *Lactiplantibacillus plantarum* and L.48 as *Latilactobacillus sakei*. Strains YR07 and L.48 showed good tolerance to 6.0% NaCl, 150 mg/kg NaNO₂, and pH 4.0. These strains were also able to effectively inhibit food-borne pathogenic and spoilage bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium*, and showed no resistance to common antibiotics, including erythromycin and chloramphenicol. The two strains were applied separately to salami fermentation. The pH of the salami in the inoculated group was rapidly reduced to 4.71 and 4.82, respectively, within 24 h; the growth of miscellaneous bacteria was inhibited; and the sensory scores for texture and flavor of the product were improved. In conclusion, YR07 and L.48 meet the requirements for starter cultures, exhibiting strong production adaptability and high safety, and hence can be used for meat fermentation.

Key words: traditional fermented meat products; lactic acid bacteria; salami; *Lactiplantibacillus plantarum*; *Latilactobacillus sakei*

发酵肉制品是以畜禽肉为主要原料，在自然或人工条件下经微生物发酵、加工制成的一类肉制品^[1,2]。与传统的自然发酵相比，香肠的现代化加工工艺利用一种或几种发酵微生物作为发酵剂来控制发酵过程，实现发酵生产标准化，可以显著提升产品的安全性^[3,4]。

发酵剂对发酵肉制品的品质及安全性起着至关重要的作用，常见的微生物发酵剂有细菌、霉菌及酵母菌，其中以乳酸菌（Lactic Acid Bacteria, LAB）居多，对保证产品品质极为重要。发酵肉制品中的乳酸菌可代谢碳水化合物产酸，抑制腐败、病原微生物的生长，提高产品安全性；乳酸菌在脂质和蛋白质代谢过程中产生多种酯类、醇类等物质，改善发酵肉制品的理化品质，并赋予产品一定的风味。肉制品中乳酸菌种类具有典型的区域特点，决定了产品的地方特色^[4,5]。我国传统的发酵肉制品风味独特，适口性强，有着丰富的本土乳酸菌资源。近年来从自然发酵肉制品中筛选性能优良的乳酸菌，提高发酵肉制品的安全和丰富产品的多样性成为研究热点^[1,6]。如高慢慢等^[7]以发酵性能和安全性为指标，自侗族传统发酵酸肉中分离得到具有良好生产耐受性和安全性的香肠乳杆菌、植物乳杆菌和乳酸片球菌。巩洋^[8]利用从四川香肠中分离的植物乳杆菌、戊糖片球菌制备低酸度川式萨拉米香肠，能显著改善香肠的感官品质。

萨拉米（Salami）是西式典型灌肠发酵肉制品之一，是将碎肉与香辛料混合后灌入肠衣，在一定的温度及湿度条件下经微生物发酵而成，其切面肥瘦均匀、酸味适中、风味独特、营养丰富、安全性高，在国内市场具有很大的发展潜力^[9,10]。萨拉米普遍采用人工接种法发酵生产，目前国内商业化生产所用的发酵剂为欧美菌种，如德国科汉森 BactofermTMF-1、意大利萨科 LyocarniTHM-17 等，

不仅成本较高，其风味及适口性与国内消费者的需求之间也存在差异，限制了产品的进一步发展，开发适合国内消费者食用的萨拉米成为新的发展方向。本研究从我国不同地区的传统肉制品中筛选出具有本土特色、性能优良的乳酸菌，并初步研究其在萨拉米生产中的应用，为萨拉米发酵菌种国产化提供理论依据，并拓宽国内发酵肉制品的多样化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料：分离乳酸菌的样品为来自全国 16 个省份具有典型传统肉制品特点的代表：黎平腌肉、恩施火腿、陇西腊肉、建瓯板鸭和藤桥熏鸡等样品共 68 份。猪后腿肉，合肥二十埠菜市场；辅料食盐、黑胡椒粉、大蒜粉、茴香粉、香肠香精，合肥永辉超市；胶原蛋白肠衣 23~24 mm，河北保定顺平县宇沐肠衣厂。

菌株：戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*）P.p，分离自意大利萨科（SACCO）发酵剂 LyocarniTHM-17；鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、单增李斯特氏菌 HBJZ089，青岛海博生物科技有限公司；大肠杆菌 Jm109、荧光假单胞菌 BNCC336632，北京北纳创联生物技术有限公司。

培养基与试剂：MRS 培养基、PCA 培养基、LB 培养基，青岛海博生物科技有限公司；血平板、乳酸菌生化鉴定管，广东环凯微生物科技有限公司；细菌基因组 DNA 抽提试剂盒，通用引物 27F、1492R，生工生物工程（上海）股份有限公司；革兰氏染色试剂盒，北京索莱宝生物有限公司；抗菌药物药敏试纸，常德比克曼生物科技有限公司；过氧化氢、碳酸钙、亚硝酸钠、氯化钠、溴甲酚紫（均

为分析纯)、奈氏试剂, 国药集团化学试剂有限公司; L-精氨酸、半胱氨酸, 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1FD 无菌操作台, 苏州安泰空气技术有限公司; BSD-250 振荡培养箱, 上海博迅实业有限公司; YM75L 立式压力蒸汽灭菌器, 上海三申医疗器械有限公司; DYY-6D 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; T100PCR 基因扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司; Fluor Chem E, 化学发光凝胶成像系统, 美国 Protein Simple 公司; UH5300 分光光度计, 日本 Hitachi 公司; CT14RD 高速冷冻离心机, 上海天美生化仪器设备工程有限公司; HHWS-II-150 恒温恒湿培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; Five Easy Plus pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 乳酸菌的初筛

称取 10.0 g 样品, 加入 90 mL 无菌生理盐水, 均质后进行梯度稀释, 取 1.0 mL 样品稀释液倾注至含质量分数 2.0% 轻质碳酸钙的 MRS 固体培养基中, 37 °C 培养 48 h。挑选具有溶钙圈的菌落进行纯化, 对纯化菌株进行革兰氏染色镜检、过氧化氢酶试验, 筛选出革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的菌株。

1.3.2 菌株复筛试验

对 1.3.1 获得的菌株进行产黏液、色素试验, 溶血试验, 葡萄糖产气试验, 产硫化氢试验, 精氨酸产氨试验、氨基酸脱羧酶试验^[11,12]。

1.3.3 糖发酵鉴定

将复筛菌株接种至乳酸菌生化鉴定管, 37 °C 培养 18~72 h, 记录实验结果。

1.3.4 16S rRNA 分子生物学鉴定

用 DNA 抽提试剂盒提取菌株 DNA, 步骤按试剂盒说明书操作。

PCR 扩增及测序: 以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 上下引物扩增提取 16S rDNA, PCR 反应条件为 95 °C 初始变性 20 min, 34 个循环 (95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 70 °C 70 s) 和 72 °C 10 min 最终链延伸。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 若通过凝胶成像仪在 1 500 bp 处观察到特异性条带, 将其送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行双向测序, 测序结果通过 BLAST 与已知细菌的 16S

rRNA 基因序列进行比较鉴定, 同时采用 Mega 7.0 软件构建系统发育树。

1.3.5 生产适应性

耐盐性能测定^[13]: 将菌株于 MRS 液体培养基中培养 12 h, 分别接种 0.1 mL 培养物至 NaCl 质量分数为 0、2.0%、4.0%、6.0% 的 10 mL MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 以相应未接种培养基为对照, 测各培养物 OD₆₀₀。

耐亚硝酸盐性能测定^[13]: 将菌株于 MRS 液体培养基中培养 12 h, 分别接种 0.1 mL 培养物至亚硝酸钠质量分数为 0、0.005%、0.01%、0.015% 的 10 mL MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 以相应未接种培养基为对照, 测各培养物 OD₆₀₀。

耐酸性能测定^[13]: 将菌株于 MRS 液体培养基中培养 12 h, 分别接种 0.1 mL 培养物至 pH 值 3.0、4.0、5.0、6.0 的 10 mL MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 以相应未接种培养基为对照, 测各培养物 OD₆₀₀。

1.3.6 乳酸菌安全性分析

药敏试验^[12]: 采用药敏纸片扩散法, 菌活化后接种至 MRS 液体培养基中培养 24 h, 用生理盐水调整菌落数为 1×10⁷ CFU/mL, 吸取 100 μL 菌液涂布到 MRS 培养基平板中, 风干 5 min, 用无菌镊子取药敏纸片贴于平板表面, 每个培养皿 3 张同种药物纸片, 每张纸片间隔不少于 24 mm, 纸片中心距培养皿边缘不少于 15 mm, 静置 5 min, 37 °C 倒置培养 24 h, 测量并记录抑菌圈的直径, 耐药性的判断标准如表 1 所示。

表 1 抗生素耐药判断标准

Table 1 Criteria for determination of antibiotic resistance

抗生素名称	纸片含药量/ (μg/片)	抑菌圈直径判断标准/mm		
		敏感	中介	耐药
红霉素	15	≥ 18	14~17	≤ 13
氯霉素	30	≥ 18	14~17	≤ 13
氨苄西林	10	≥ 16	13~15	≤ 12
四环素	30	≥ 19	15~18	≤ 14
万古霉素	30	≥ 17	15~16	≤ 14
链霉素	10	≥ 15	12~14	≤ 11

抑菌实验: 指示菌活化后接种到 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 24 h, 配制菌悬液备用。乳酸菌活化后接种到液体 MRS 中 37 °C 培养 24 h, 8 000 g 离心 5 min, 收集上清液。采用牛津杯琼脂扩散法, 以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、

单核细胞增生李斯特氏菌、荧光假单胞菌为指示菌进行平板涂布, 无菌水为空白对照, 每个平板均匀放置 3~4 个牛津杯, 每个牛津杯加入 200 μL 发酵上清液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。观察牛津杯底周围有无抑菌圈, 每次试验作 3 次平行, 测量抑菌圈直径, 取平均值。

1.3.7 萨拉米制备

菌悬液制备: 将乳酸菌活化后接种至 MRS 液体培养基培养 12 h, 8 000 g 离心 5 min, 弃上清液, 用无菌生理盐水调整菌体数量为 1×10^7 CFU/mL, 并清洗菌体两次, 待用。

萨拉米制备^[14]: 猪后腿肉按肥瘦比为 3:7 搅碎混匀, 辅料添加比例为: 2.5% 食盐, 0.7% 葡萄糖, 0.02% 亚硝酸盐, 0.015% 大蒜粉, 0.05% 茴香粉, 0.05% 黑胡椒粉, 0.225% 香肠香精, 1×10^7 CFU/g 菌悬液 (以肉总量百分比计)。搅拌均匀后灌肠。随后悬挂于恒温恒湿箱内, 30 $^{\circ}\text{C}$, 85.0% 湿度发酵 24 h。试验分组为 CK 组 (空白对照组)、P.p 组 (接种商业发酵剂戊糖片球菌 P.p)、L.p 组 (接种植物乳杆菌 YR07)、L.s 组 (接种清酒乳杆菌 L.48)。

1.3.8 菌相变化、pH值、感官评价分析

菌落总数 (Aerobic Plate Count, APC): 参照 GB 4789.2-2016 《食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定》^[15]。取样点为接种 0、24 h 的样品。

表 2 萨拉米感官评分标准表

项目	标准	评分/分
外观	肠衣干瘪, 与肉馅间有很多空隙	1~2
	肠衣部分褶皱, 肠衣与肉馅间空隙	2~4
	肠衣平滑, 紧贴肉馅	4~6
	肠衣平滑, 紧贴肉馅, 表面肥瘦颗粒分明	6~7
色泽	切面变色, 呈灰暗	1~2
	切面部分有光泽, 部分肌肉、脂肪颜色较暗	2~4
	切面有光泽, 部分脂肪颜色较暗	4~6
质地	切面有光泽, 颜色饱满呈诱人的红色	6~7
	切面肉馅松散、柔软, 不成形	1~2
	切面肉质不紧实	2~4
	部分切面肉质略松散, 无弹性	4~6
风味	切面肉质紧实, 有弹性	6~7
	平淡无味	1~2
	无香肠发酵香味, 有微弱辅料香味	2~4
	有香肠发酵味, 有辅料香味, 酸味较浓	4~6
	浓郁的香肠发酵香味, 略带酸味	6~7

乳酸菌数: 参照 GB 4789.35-2016 《食品安全国家标准食品微生物学检验乳酸菌检验》^[16]。取样点同菌落总数。

pH 值: 分别准确称取接种 0、12、24 h 的样品 10.0 g, 切碎, 加入 100 mL 蒸馏水与样品充分混匀, 8 000 g 进行匀浆 30 s, 过滤后取上清液, 用 pH 计测量, 重复三次取平均值。

感官评价: 参照 Chen 等^[17]的方法对接种 24 h 的样品进行感官评价, 评价小组由 8 名具有食品专业背景的人员组成, 随机将香肠样品切成 3 mm 厚的薄片, 从外观、色泽、质地和风味等 4 个方面, 分数从 1 分到 7 分进行评价, 具体评价标准见表 2。

1.3.9 数据分析

实验均重复 3 次, 数据用均值 \pm 标准差表示; 用 OriginPro 2021、Microsoft Excel 2021 软件绘制图表, 采用 SPSS 25.0 统计软件进行单因素分析, $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的初筛结果

从 68 份样品分离纯化出 90 株在含碳酸钙 MRS 平板上有明显溶钙圈的菌株, 其中革兰氏阳性和过氧化氢酶阴性的菌株 72 株, 符合乳酸菌基本特征要求, 编号 YR01-YR12 和 L.1-L.60。

2.2 乳酸菌的复筛结果

结合有益乳酸菌生化特性和发酵肉制品的感官品质要求, 应用于灌肠类发酵肉制品的乳酸菌要满足产酸不产气、不产黏液和色素、不产硫化氢、不分解精氨酸产氨和耐盐、耐亚硝酸盐等性质要求^[17-19]。同时为保证产品安全, 需对所分离菌株进行溶血和产生物胺能力评价, 结果见表 3。

表 3 72 株菌株复筛结果

Table 3 Results of rescreening of 72 strains

特性	菌株数目/株
不产黏液、色素	67
发酵葡萄糖不产气	52
不溶血	42
不产 H_2S	55
不产氨气	35
不产生物胺	32
耐氯化钠 (6.0%)	36
耐亚硝酸盐 (0.015%)	42

从表 2 可以看出, 72 株初筛菌株中, 有 67 株不产黏液和色素的菌株, 仅有 32 株不产生生物胺, 这说明多数菌株具有氨基酸脱羧酶活性, 促进氨基酸脱羧产生生物胺, 而生物胺积累过多会对人体造成危害^[20], 排除具有氨基酸脱羧酶活性是选择安全菌株的要求之一^[21]。52 株发酵葡萄糖不产气, 同型发酵占多数。氨气、硫化氢产生比例分别为 51.4%、23.6%, 其都具有刺激性气味, 会对产品的感官和风味品质造成不良影响。乳酸细菌的溶血试验主要应用于链球菌属和肠球菌属的鉴定, 本次不具备溶血性菌株占比 58.3%, 可以为乳酸菌菌株的筛选提供初步的安全性评价。亚硝酸盐有助于发酵香肠的色泽饱满, 国标要求其添加量不超过 150 mg/kg, 同时发酵肉制品的含盐量最高可达 6.5%, 对盐和亚硝酸盐有一定的耐受性是成为优良发酵剂的优势条件^[22]。综上, 根据复筛实验, 菌株 YR07 和 L.48 符合筛选要求, 进行后续研究。

可以看出, 在乳酸菌筛选过程中, 符合目标菌株基本特征的菌株有 72 株, 但通过生理生化试验发现满足发酵性能和安全性的菌株仅有两株, 这可能是受菌株的生长能力、代谢性质影响。虽然在发酵肉制品自然发酵过程中微生物存在多样性, 但其中真正发挥有益作用的安全菌株占比很少。

2.3 菌株 YR07 和 L.48 的鉴定

在 MRS 平板上, 菌株 YR07 和 L.48 的菌落隆起、均为乳白色, 边缘整齐, 表面光滑, 不透明, 如图 1 所示, 均为革兰氏阳性细菌, 呈单个、成对或短链的直杆状。不同的细菌可根据分解利用糖能力的差异表现出是否产酸产气作为鉴定菌种的依据, 表 4 为两株菌的糖发酵试验结果, 根据《常见细菌系统鉴定手册》^[23]和《乳酸菌分类鉴定及试验方法》^[24]可初步确定 YR07 为植物乳杆菌, L.48 为清酒乳杆菌。

将 PCR 扩增的 16S rDNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 如图 2, 得到条带在 1 500 bp 左右的特异性条带, 测序后获得序列结果, 在 BLAST 上进行比对, 构建系统发育树, 结果如图 3, 其中 YR07 与植物乳杆菌的亲缘关系最近, L.48 与清酒乳杆菌的关系最近, 这与糖发酵试验鉴定结果相一致, 故此可以确定 YR07 为植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*), 分离自贵州黎平腌肉, L.48 为清酒乳杆菌 (*Latilactobacillus sakei*), 分离自浙江藤桥熏鸡。

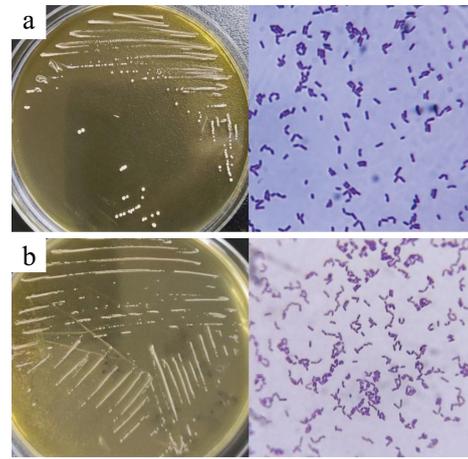


图 1 YR07 与 L.48 的菌落形态特征和革兰氏染色镜检图
Fig.1 Colony morphological characteristics and Gram stain microscopic images of YR07 and L.48

注: a 为 YR07, b 为 L.48。

表 4 菌株 YR07 与 L.48 的糖发酵能力

Table 4 Strain YR07 and L.48 sugar fermentation ability

鉴定项目	菌株	
	YR07	L.48
七叶苷	+	+
纤维二糖	+	+
麦芽糖	+	+
甘露醇	+	-
水杨苷	+	+
山梨醇	+	-
蔗糖	+	+
棉子糖	+	-

注: + 为阳性; - 为阴性。

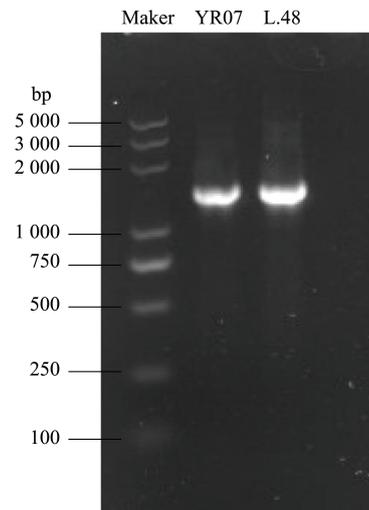


图 2 16S rDNA PCR 产物扩增电泳条带
Fig.2 Electrophoretic bands amplified from 16S rDNA PCR products

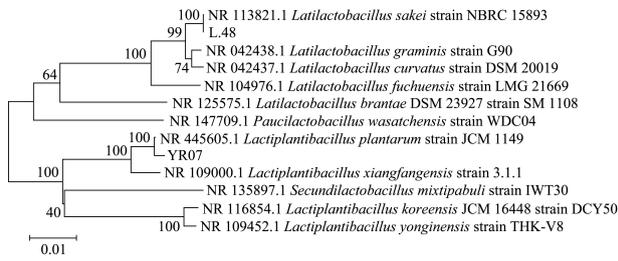


图3 菌株 YR07 与 L.48 系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain YR07 and L.48

2.4 菌株 YR07 与 L.48 生产适应性研究

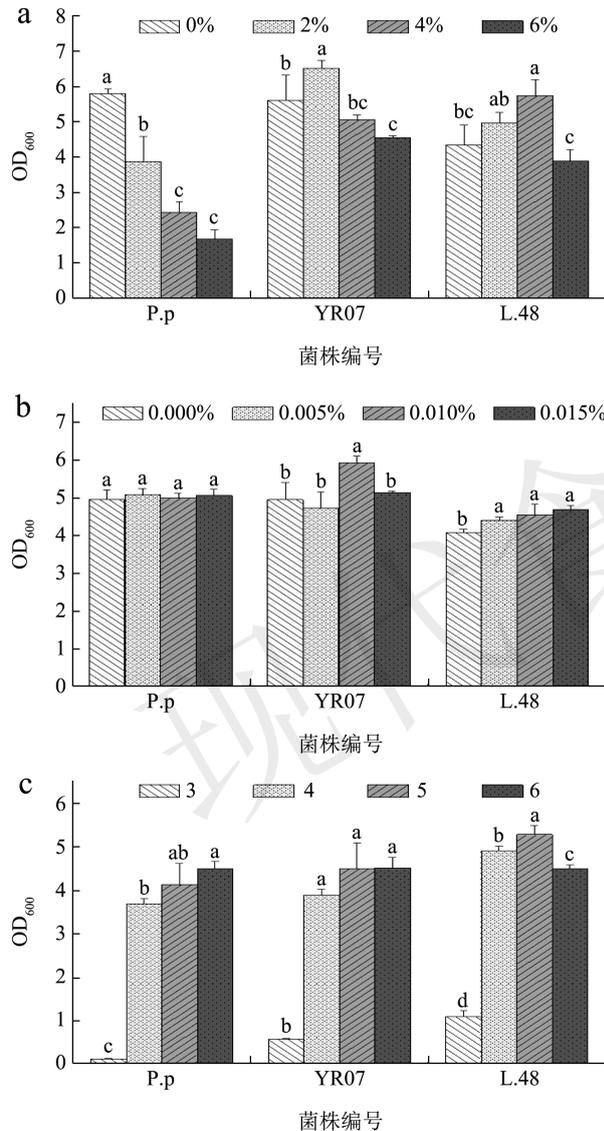


图4 菌株的生产适应性

Fig.4 Production adaptability

注: a 为 NaCl, b 为 NaNO₂, c 为 pH 值。不同小写字母表示同一菌株在不同梯度水平下具有显著差异 (P<0.05)。

菌株的生长易受发酵肉制品加工环境特别是产品中食盐、亚硝酸盐以及酸度的影响, 以商业

发酵剂菌株 P.p 为参照, NaCl 浓度、亚硝酸钠浓度及 pH 值对菌株 YR07 和 L.48 生长的影响如图 4 所示。

由图 4a 可知, 不同菌株受不同质量分数的 NaCl 影响差别很大。商品发酵剂菌株 P.p 生长抑制程度随着 NaCl 质量分数的增加而变大; 在 NaCl 质量分数 6.0% 时, 菌株 P.p 的生长量仅为 0% NaCl 的 27.0%。菌株 YR07 在 2.0% NaCl 时生物量最高, NaCl 为 4.0% 时, 生物量为最高值的 77.8%, NaCl 为 6.0% 时, 生物量降低不显著, 为最高值的 70.0%; 菌株 L.48 在 4.0% NaCl 时生物量最高, NaCl 质量分数为 6.0% 时, 生物量为最高值的 67.9%。由上可知, 菌株 YR07 和 L.48 对 NaCl 有着较好的耐受性, 这可能是与两株乳酸菌的分离源样品有关。

从图 4b 可知, 当亚硝酸钠质量分数为 0%~0.015% 时, 对菌株 P.p 和 L.48 生长无显著影响。菌株 YR07 在亚硝酸盐质量分数为 0.01% 时, 生长受到显著促进, 且 YR07 生长情况优于对照菌 P.p 和 L.48。

由图 4c 可知, 3 株菌株生长抑制程度随着 pH 值的降低而增加。pH 值 3.0 时菌株 P.p 生长微弱, 菌株 YR07 和 L.48 可生长。一般发酵肉制品的 pH 值为 4.0~5.5, 在该 pH 范围内, 3 株菌的生长都较好, 且菌株 L.48 的耐酸性稍优于菌株 YR07 和 P.p。

2.5 菌株 YR07 与 L.48 的药敏性评价

评估自然分离菌株的抗药性是一个重要的安全标准。通过药敏片法测定了菌株 YR07 和 L.48 对红霉素、氯霉素、氨苄西林、四环素、万古霉素和链霉素等 6 种常用抗生素的敏感性, 结果如表 5 所示。

红霉素、氯霉素、四环素是抑制蛋白质合成的抗生素, 氨苄西林为青霉素类抗生素。YR07 与 L.48 对这 4 种抗生素的敏感程度不一, YR07 均无抗性, L.48 对氨苄西林和四环素表现出不同程度的耐受性。从益生菌角度出发, 乳酸菌对常用抗生素表现出耐药性可能是有益的, 有助于它们在抗生素引起的腹泻现象中维持胃肠道平衡, 同时 Fraqueza^[25]认为只有通过突变或水平基因转移获得的耐药性才对公众健康构成风险, 因此还需要对乳酸菌产生抗性的过程及原因进一步进行研究。此外, YR07 和 L.48 对万古霉素和链霉素有耐药性, 这个结果可能是由于乳酸菌细胞中不存在该特定抗生素的靶位点^[26]。许女等^[27]对从传统发酵食品中分离到的 97 株乳酸菌进行耐药性研究, 其中对链霉素、万古霉素耐药

性较强，耐药率在 50.0% 以上，这与本研究中两株乳酸菌对链霉素和万古霉素的耐药性结果相一致。很多研究也表明乳酸菌对链霉素和万古霉素的耐药性属于固有耐药性^[25,28]。

表 5 菌株YR07与L.48的药敏性

Table 5 Drug susceptibility of strain YR07 and L.48

抗生素	菌株编号	抑菌圈直径/mm	敏感性
红霉素	YR07	19.53 ± 1.72	敏感
	L.48	14.37 ± 0.74	中介
氯霉素	YR07	21.17 ± 1.14	敏感
	L.48	16.50 ± 0.89	中介
氨苄西林	YR07	19.63 ± 1.75	敏感
	L.48	9.57 ± 0.42	耐药
四环素	YR07	14.53 ± 0.71	中介
	L.48	11.07 ± 0.93	耐药
万古霉素	YR07	6.00 ± 0.00	抗性
	L.48	6.00 ± 0.00	抗性
链霉素	YR07	6.00 ± 0.00	抗性
	L.48	6.00 ± 0.00	抗性

表 6 菌株YR07与L.48的抑菌性

Table 6 Antibacterial activity of strain YR07 and L.48

菌株	抑菌圈直径/mm				
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	单增李斯特氏菌	鼠伤寒沙门氏菌	荧光假单胞菌
YR07	14.63 ± 0.67	15.23 ± 0.61	15.60 ± 0.36	12.23 ± 0.31	13.53 ± 0.49
L.48	14.43 ± 0.42	13.63 ± 0.83	8.27 ± 0.21	12.23 ± 1.33	11.50 ± 0.40

2.7 单一接种萨拉米对微生物数量、发酵阶段pH与感官评价的影响

表 7 单一接种萨拉米发酵阶段菌落总数和乳酸菌数变化 (lg CFU/g)

Table 7 Changes in the total number of colonies and lactic acid bacteria in the fermentation stage of Salami single inoculation

组别	微生物种类	发酵前	发酵后
CK	APC	6.48	7.51
	LAB	\	7.12
P.p	APC	7.30	9.04
	LAB	6.69	7.98
L.p	APC	7.48	9.08
	LAB	7.18	9.04
L.s	APC	7.61	8.92
	LAB	7.59	8.72

注: APC 表示菌落总数, LAB 表示乳酸菌。

2.6 菌株YR07与L.48的抑菌性

发酵肉制品原料营养丰富,含水量高,易受金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和单增李斯特氏菌等致病菌的污染。乳酸菌可产生具有抑菌活性的代谢产物来抑制有害细菌的生长^[29]。通过牛津杯扩散平板法,测定了菌株 YR07 和 L.48 的发酵上清液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等 5 种菌的抑菌情况,结果如表 6 所示。

由表 6 可知, YR07 和 L.48 对 5 种致病、致腐菌都有不同程度的抑制能力。其中 YR07 对单增李斯特氏菌抑制性最大,抑菌圈直径为 15.60 mm, L.48 对金黄色葡萄球菌的抑制能力最大,抑菌圈直径为 14.43 mm。乳酸菌可产细菌素、H₂O₂ 等物质来发挥抑菌作用,在本试验中,将发酵上清液 pH 值调整至 6.5 进行抑菌试验,结果发现 pH 值 6.5 条件下, YR07 与 L.48 均无抑菌能力,由此可以推断两株菌是通过分泌有机酸来抑制有害菌生长。乳酸菌产生的有机酸使 pH 值降低,形成酸性环境来干扰细胞膜的维护,改变有害菌的细胞膜结构和功能,从而导致细胞死亡,抑制腐败和食源性病原体的生长^[30]。

利用营养琼脂和 MRS 琼脂对萨拉米发酵前和发酵后的菌落数进行计数,其中乳酸菌在营养琼脂平板中生长较弱,呈针尖状,包含在菌落总数中, MRS 平板中记录具有溶钙圈的乳酸菌数量。如表 7 所示,由于 P.p 组、L.p 组和 L.s 组添加了菌种,发酵前香肠内的菌落计数显著高于对照组。发酵结束后,与 CK 组相比较 L.p 组和 L.s 组的乳酸菌数量增加了 27.0% 和 22.5%, P.p 组增长 12.1%,可以看出在发酵阶段两株乳酸菌生长迅速,为优势生长菌。YR07 和 L.48 在发酵香肠中可以较好抑制其他杂菌的生长,减少有害微生物和腐败菌的数量,保证产品质量。

发酵肉制品的生产环境相对复杂,易有杂菌生长。Martgas 等^[31]研究表明意大利发酵香肠生产初期 48 h 内,控制加工环境低 pH 值对抑制病原菌的生长繁殖至关重要。Kumar 等^[32]报道,在 pH 值低

于 5.3、温度低于 18 °C 条件下,金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的生长会受到抑制。美国肉食品协会于 1982 年规定在发酵香肠的发酵温度为 30 °C 时, pH 值必须在 24 h 内降至 5.3 以下, 保证香肠的安全性^[33]。因此根据发酵肉制品本身的产品性质和安全要求, 乳酸菌需要在产品加工的初始发酵阶段具有快速产酸的能力。表 8 为单一接种萨拉米发酵阶段的 pH 值变化, 可以看出, 发酵 12 h 后, 接种发酵剂的产品与 CK 相比 pH 值显著降低。发酵 24 h 后, CK 组 pH 值前后变化不大, 实验组与商业组 pH 值进一步下降, L.s 组 pH 值为 4.82, 与 P.p 组 pH 值相近, L.p 组 pH 值为 4.71, 相对更低。由此可见, 在香肠发酵阶段, 菌株 L.48 产酸能力可以达到商业菌株产酸水平, 菌株 YR07 产酸速度优于商业菌株, 两者生长迅速, 均具备迅速产酸的能力。

表 8 单一接种萨拉米发酵阶段 pH 值变化

Table 8 Variation of pH value during the fermentation stage of Salami inoculated by single inoculation

组别	发酵 0 h	发酵 12 h	发酵 24 h
CK	5.77 ± 0.02 ^a	5.52 ± 0.04 ^a	5.59 ± 0.01 ^a
P.p	5.76 ± 0.04 ^a	5.02 ± 0.03 ^b	4.81 ± 0.02 ^b
L.p	5.77 ± 0.01 ^a	5.01 ± 0.01 ^b	4.71 ± 0.03 ^c
L.s	5.79 ± 0.04 ^a	5.04 ± 0.02 ^b	4.82 ± 0.02 ^b

注: 不同小写字母表示不同样品组在同一发酵时间的 pH 值具有显著差异 ($P < 0.05$)。

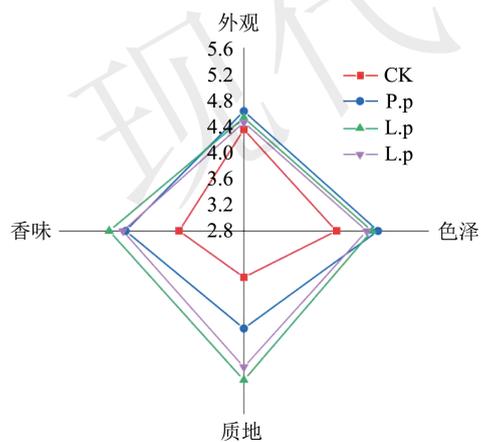


图 5 单一接种萨拉米发酵后的感官评分

Fig.5 Salami sensory score for single inoculation

萨拉米发酵 24 h 后的感官评价如图 5 所示, L.p 组和 L.s 组在外观、色泽、质地、风味 4 个感官指标得分均高于自然发酵的 CK 组, 与商业菌株发酵的 CS 组相比较, 在质地、风味方面存在优势。接种 YR07 菌株的 L.p 组质地评分最高, 这可能是由于 YR07 产酸迅速, 促进蛋白变性, 提高肌肉凝聚

性, 改善了产品的组织结构。在相同发酵时间内, 接种菌株的萨拉米在风味方面有明显的改善, 说明两株乳酸菌在萨拉米发酵阶段中能够促进良好风味物质的快速生成。整体来看, 接种乳酸菌对萨拉米发酵阶段的产品感官品质产生了积极的影响。

3 结论

本研究初步实现对本土乳酸菌的优选, 从全国各地具有地方特色发酵肉制品中分离得到的 72 株菌株, 通过进一步生理生化试验以及分子生物学鉴定, 确定两株不产色素和黏液、不产生物胺和氨气、无氨基酸脱羧酶和溶血性、不产 H₂S 和 H₂O₂、发酵葡萄糖不产气的乳酸菌, 分别为植物乳杆菌 YR07 和清酒乳杆菌 L.48。YR07 与 L.48 对质量分数 6.0% NaCl、150 mg/kg NaNO₂ 及 pH 值 4.0 耐受, 有良好的生产适应性和安全性, 在香肠加工过程中有较好的生长优势, 可适应不同的外部环境, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌等常见食源性致病、致腐菌有明显抑菌效果, 对红霉素、氯霉素等抗生素无耐药性。发酵实验结果表明接种 YR07、L.48 香肠 pH 值在发酵 24 h 后分别降至 4.71 和 4.82, 产酸迅速, 可有效抑制有害菌生长。接种 YR07 的香肠在质地、风味感官评分最高, 与自然发酵相比, 实验组对香肠的风味和质地方面有良好改进作用, 与商业发酵剂接种香肠品质相当。

本土菌群的优势在于其生长特性具有典型区域性, 可传承本土传统肉制品的风味特点和产生新的感官特性。本实验中传统肉制品里符合乳酸菌特征的微生物数量虽多, 但很多菌株本身存在安全性问题, 如产生物胺、氨气等, 具备抑制杂菌能力的菌株更少。对本土菌株的开发和应用有助于实现传统肉制品现代化、西式肉制品中国化的发展理念, 同时确保产品安全和质量标准化, 为消费者提供更多营养选择。为此, YR07 与 L.48 对萨拉米的风味形成及品质特征的影响等应用特性还有待进一步研究, 为开发肉制品发酵剂提供理论依据基础。

参考文献

- [1] 田文广, 张俊杰, 石亚萍, 等. 发酵肉制品的研究进展[J]. 肉类工业, 2022, 490(2): 54-57.
- [2] HUANG Z, SHEN Y, HUANG X, et al. Microbial diversity of representative traditional fermented sausages in different regions of China [J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(1): 133-141.
- [3] LARANJO M, POTES M E, ELIAS M. Role of starter

- cultures on the safety of fermented meat products [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 853.
- [4] PALAVECINO PRPICH N Z, CAMPRUBI G E, CAYRE M E, et al. Indigenous microbiota to leverage traditional dry sausage production [J]. *International Journal of Food Science*, 2021, 2021: 6696856.
- [5] 陈韵,胡萍,湛剑龙,等.我国传统发酵肉制品中乳酸菌生物多样性的研究进展[J].*食品科学*,2013,34(13):302-306.
- [6] 李思源,沙坤,孙宝忠,等.功能性微生物在发酵肉制品中的应用研究进展[J].*肉类研究*,2019,33(12):56-60.
- [7] 高慢慢,焦新雅,张志胜,等.侗族传统发酵酸肉中乳酸菌的筛选、发酵特性及安全性分析[J].*食品工业科技*, 2020,41(12):94-99,105.
- [8] 巩洋.低酸度川式萨拉米香肠的工艺优化及其品质变化研究[D].雅安:四川农业大学,2015.
- [9] ROCCHETTI G, REBECCHI A, DALLOLIO M, et al. Changes in the chemical and sensory profile of ripened Italian salami following the addition of different microbial starters [J]. *Meat Science*, 2021, 180: 108584.
- [10] 王振宇,乔美靓,刘海,等.中国部分市售萨拉米品质特性和卫生指标分析[C]//第八届中国肉类科技大会论文集.昆明,2010:232-237.
- [11] 路福平,李玉.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2020.
- [12] 郭兴华,凌代文.乳酸细菌现代研究实验技术[M].北京:科学出版社,2013.
- [13] 王畏畏.香肠发酵剂筛选及其在发酵香肠中的应用研究[D].扬州:扬州大学,2008.
- [14] 高菲.萨拉米生产过程中生物胺及亚硝胺的变化及控制[D].扬州:扬州大学, 2020.
- [15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局,GB 4789.2—2016,食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定[S].
- [16] 中华人民共和国卫生部,GB 4789.35—2016,食品安全国家标准食品微生物学检验乳酸菌检验[S].
- [17] CHEN X, LI J P, ZHOU T, et al. Two efficient nitrite-reducing *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented pork (Nanx Wudl) as competitive starter cultures for Chinese fermented dry sausage [J]. *Meat Science*, 2016, 121: 302-309.
- [18] CAPLICE E, FITZGERALD G F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 50(1-2): 131-149.
- [19] CRUXEN C E D, FUNCK G D, HAUBERT L, et al. Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: application potential, safety aspects, and emerging technologies [J]. *Food Research International*, 2019, 122: 371-382.
- [20] BARBIERI F, MONTANARI C, GARDINI F, et al. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: a review [J]. *Foods*, 2019, 8(1): 14.
- [21] PENG X, ED-DRAA A, YUE M. Whole genome sequencing for the risk assessment of probiotic lactic acid bacteria [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022,13: 2087174.
- [22] DOS SANTOS CRUXEN C E, FUNCK G D, HAUBERT L, et al. Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: application potential, safety aspects, and emerging technologies [J]. *Food Research International*, 2019, 122: 371-382.
- [23] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [24] 凌代文.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [25] FRAQUEZA M J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 212: 76-88.
- [26] ABUSHELAIBI A, AL-MAHADIN S, EL-TARABILY K, et al. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 79: 316-325.
- [27] 许女,李雅茹,王超宇,等.传统发酵食品中乳酸菌的抗生素耐药性评估及耐药基因分析[J].*中国食品学报*,2020, 20(7):160-171.
- [28] 万倩,李启明,吴华星,等.传统发酵食品中乳酸菌的安全性评估[J].*现代食品科技*,2021,37(6):276-286.
- [29] GOMEZ-SALA B, HERRANZ C, DIAZ-FREITAS B, et al. Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 223: 41-49.
- [30] GARCIA-DIEZ J, SARAIVA C. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(5): 2544.
- [31] MATARAGAS M, BELLIO A, ROVETTO F, et al. Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino [J]. *Meat Science*, 2015, 103: 39-45.
- [32] KUMAR P, CHATLI M K, VERMA A K, et al. Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(13): 2844-2856.
- [33] 陈美春,杨勇.发酵香肠安全性的研究进展[J].*肉类研究*, 2006,12:33-36.