

渝东北低硝腊肉中亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及工艺优化

刘奇¹, 赵婵娟², 谭显鑫¹, 陈沛西¹, 黄玲冬¹, 朱秋昊¹, 张继开¹, 刘举¹, 郑栋仁¹, 赵峰^{1*}

(1. 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 404100) (2. 重庆三峡职业学院动物科技学院, 重庆 404155)

摘要: 为了探究渝东北地区低硝腊肉中亚硝酸盐含量低的原因, 并筛选出高效亚硝酸盐降解菌株, 进而优化低硝腊肉加工工艺。该研究测定了渝东北四区县腊肉亚硝酸盐含量, 筛选低硝样品进行微生物分析, 分离优势乳酸菌; 通过降解实验评估菌株性能, 并研究盐添加量、腌制温度对亚硝酸盐含量的影响。结果显示, 渝东北低硝腊肉中亚硝酸盐含量低的关键在于乳酸菌的高效降解作用, 成功分离出清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*) FBG1-D33, 其 24 h 亚硝酸盐降解率达 95.20%, 显著高于现有报道水平。当接种量为 10^8 CFU·g⁻¹ 时, 腊肉的 pH 值为 5.0~5.2。优化工艺参数为: 盐添加量 3%、腌制温度 4 °C、腌制时间 7 d, 接种 FBG1-D33 (10^8 CFU·g⁻¹) 并于 37 °C 发酵 24 h, 最终腊肉亚硝酸盐含量低于 1 mg·kg⁻¹, 优于同类研究。清酒乳杆菌 FBG1-D33 的强降解能力与优化的工艺参数相结合, 为低硝腊肉生产提供了理论依据与技术支持。

关键词: 渝东北; 低硝腊肉; 亚硝酸盐; 清酒乳杆菌; 工艺优化

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0227

Isolation, Identification and Process Optimization of Nitrite-degrading Bacteria in Low-nitrite Cured Meat from Northeastern Chongqing

LIU Qi¹, ZHAO Chanjuan², TAN Xianxin¹, CHEN Ruixi¹, HUANG Lingdong¹, ZHU Qiuha¹, ZHANG Jikai¹, LIU Ju¹, ZHENG Dongren¹, ZHAO Feng^{1*}

(1. College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China)

(2. College of Animal Science and Technology Chongqing Three Gorges Vocational College, Chongqing 404155, China)

Abstract: To explore the reasons for the low nitrite content in low-nitrite cured meat from the northeastern part of Chongqing and to screen out efficient nitrite-degrading strains, and further optimize the processing technology of low-nitrite cured meat. This study determined the nitrite content of cured meat from four counties and districts in the northeastern part of Chongqing, selected low-nitrite samples for microbial analysis, and isolated dominant lactic acid bacteria; evaluated the performance of the strains through degradation experiments, and studied the effects of salt addition and curing temperature on nitrite content. The results showed that the key to the low nitrite content in low-nitrite cured meat from the northeastern part of Chongqing was the efficient degradation effect of lactic acid bacteria. *Lactobacillus sakei* FBG1-D33 was successfully isolated, and its nitrite degradation rate reached 95.20% within 24 hours, significantly higher than the existing reported levels. When the inoculation amount was 10^8 CFU·g⁻¹, the pH value of the cured meat was 5.0 to 5.2. The optimized process parameters were: salt addition of 3%, curing temperature of 4 °C, curing time of 7 days, inoculation of FBG1-D33 (10^8 CFU·g⁻¹), and fermentation at 37 °C for 24 hours. The final nitrite content of the cured meat was less than 1 mg·kg⁻¹, which was superior to similar studies. The strong degradation ability of *Lactobacillus sakei* FBG1-D33 combined with the optimized process parameters provided a theoretical basis and technical support for the production of low-nitrite cured meat.

Keywords: northeastern chongqing; low-nitrite cured meat; nitrite; *Lactobacillus sakei*; process optimization

收稿日期: 2025-02-20; 修回日期: 2025-04-11; 接受日期: 2025-04-15

基金项目: 重庆市开州区科技计划项目 (KZKJ-2023-J-7)

作者简介: 刘奇 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1011195174@qq.com; 共同第一作者: 赵婵娟 (1982-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 中兽 (医) 药学研究, E-mail: zhaochanjuan@qq.com

通讯作者: 赵峰 (1982-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品加工与质量控制, E-mail: zhaof_cn@163.com

川渝地区的香肠和腊肉不仅风味独特,还承载着丰富的文化内涵。春节期间,家家户户都会悬挂香肠和腊肉,寓意吉祥如意、幸福美满。此外,还有许多与之相关的民间习俗,如“杀年猪”、“灌香肠”、“熏腊肉”等,使得许多川渝人民在冬季几乎每日食用腊肉和香肠。然而,腊肉在制作过程中会自发产生亚硝酸盐,若制作工艺不规范,更容易导致其含量偏高。亚硝酸盐的摄入超出正常范围可能导致身体组织缺氧,从而导致严重的中毒^[1]。此外,亚硝酸盐和次级胺之间的相互作用会导致亚硝胺的形成,这种物质可引起癌症,因此成年人每天摄入的亚硝酸盐量应在每千克体重 0.07 mg 以内,特殊人群则更低^[2,3]。

减少食品中亚硝酸盐的途径主要包括物理、化学和生物三种方式^[4,5]。物理方式通过加热或低温处理,抑制硝酸盐还原酶的活性,从而控制亚硝酸盐的生成。例如,庞丽等^[6]的研究探讨了不同储存条件对香椿中亚硝酸盐含量的影响,结果表明,粉碎后的样品在室温、冷藏和冷冻条件下,亚硝酸盐的增长速度依次降低。其中,室温储存的增速最快,而冷冻储存的增速最慢。化学法的降解能力普遍较高,但化学降解法复杂、成本高,而且容易被氧化。在食品中添加茶多酚、维生素 C 等抗氧化剂也可以抑制亚硝酸盐含量的增加^[7]。生物法通过利用微生物的酶活性和代谢功能分解亚硝酸盐,其中乳酸菌凭借其高效的降解能力得到了广泛应用。在发酵蔬菜中,添加乳酸菌能有效抑制亚硝酸盐的积累^[8,9]。

本研究旨在从渝东北低硝腊肉中筛选出能够高效降解亚硝酸盐的菌株,并对其进行鉴定,明确其种属和特性。利用分离得到的菌株,结合传统腊肉加工工艺,开发出能够有效降低腊肉中亚硝酸盐含量的新型加工技术。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂及仪器

1.1.1 实验材料

腊肉样品分别采样于渝东北地区(开州、巫溪、奉节、城口),共 17 个样品(KMS1、KZG1、WTS1、WTS2、WTG1、WTG2、FLJ1、FJL2、FLJ3、FQB1、FQB2、FZG1、FBG1、CFY1、CPG1、CJG1、CGG1),KZG1、FBG1、CPG1 的制作过程中添加了 50 mg·kg⁻¹ 的亚硝酸盐,其余样品均未添加亚硝酸盐。

加工工艺使用的猪肉、腌制盐等均购于重庆市万州区超市。

1.1.2 主要试剂

亚铁氰化钾、乙酸锌、冰乙酸、十水四硼酸钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺,重庆川东化工集团有限公司;MRS 琼脂培养基、MRS 肉汤培养基、平板计数琼脂培养基,北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.3 主要设备

SW-CJ-1F 压力蒸汽灭菌器,山东博科生物产业有限公司;SP-576 紫外可见分光光度计,上海菁华科技有限公司;pHS-25 pH 计,成都世纪方舟科技有限公司;SW-CJ-2F 洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;SPX-250 生化培养箱,上海龙跃仪器设备有限公司;AG 冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;HSY-24 恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司;Biometra TOne Thermal Cycler PCR 仪,德国 Biometra GmbH 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 亚硝酸盐含量的测定

根据 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》的规定,采用分光光度法,对渝东北腊肉样品进行亚硝酸盐含量的测定^[10]。

1.2.2 腊肉微生物宏基因组测序

将外源添加亚硝酸盐的三份腊肉样品和亚硝酸盐含量最高、最低的两份腊肉样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行宏基因组的测定。

1.2.3 乳酸菌的分离纯化

在无菌环境下切取亚硝酸盐含量最低的两份腊肉样品各 5 g,分别置于 45 mL 灭菌生理盐水中,置于振荡器中震荡 1 h,选适宜稀释梯度的稀释液在添加 2.5% CaCO₃ 的 MRS 固体培养基上涂布,在 37 °C 下培养 24 h,选取有明显溶钙圈且具有乳酸菌菌落特征的菌落,在 MRS 固体培养基上纯化培养^[11]。

1.2.4 乳酸菌的初步筛选

接种环挑取纯化后的菌落,涂于载玻片并滴加 1~2 滴无菌水,外焰固定 3~4 次后,进行革兰氏染色,油镜下观察细菌形态与颜色,筛选出革兰氏阳性菌。确认无杂菌后,挑取单菌落接种至液体培养基培养,并于 50%甘油中-80℃冻存储备用^[12]。

1.2.5 乳酸菌降亚硝酸盐能力的测定

将活化后的菌株以 1%接种量接入含 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚硝酸钠的 MRS 液体培养基,37℃培养 24 h 后取样,测定亚硝酸盐含量,并根据公式(1)计算菌株对亚硝酸盐的降解率。

$$D = \frac{m_0}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——菌株对亚硝酸盐的降解率, %;

m_0 ——培养基初始亚硝酸盐含量, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;

m ——24 h 后培养基亚硝酸盐含量, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.6 菌株生理生化鉴定

1.2.6.1 过氧化氢酶试验

将 1 至 2 滴新鲜配制的过氧化氢溶液(浓度为 3%)滴加到单个菌落上,静置 1 分钟后观察是否产生气泡。若出现气泡,则判定为阳性反应;若无气泡产生,则为阴性反应^[13]。

1.2.6.2 硫化氢试验

用接种环将纯培养物穿刺接种至硫化氢微量生化鉴定管,密封后于 37℃恒温培养 48 h。观察培养基颜色变化,参照乳酸菌生化鉴定管说明书进行结果判定。

1.2.6.3 葡萄糖发酵试验

将纯培养物接种至葡萄糖发酵微量生化鉴定管,37℃培养 48 h 后观察颜色变化,并与乳酸菌生化鉴定管说明书对比,判定结果。

1.2.6.4 葡萄糖产气试验

将纯培养物接种至葡萄糖产气微量生化鉴定管,封口后于 37℃培养 48 h,观察小倒管中是否产生气泡^[14]。

1.2.7 耐酸菌株的筛选

将活化好的菌株接种至 pH 值为 6、5、4 的 MRS 液体培养基中,37℃培养 24 h,进行 OD_{600} 的测定,筛选 OD_{600} 较低的菌。

1.2.8 耐盐菌株的筛选

将经过活化的菌株分别接种至含有不同浓度氯化钠(质量分数分别为 2%、4%、6%、8%)的 MRS 液体培养基中,随后置于 37℃恒温环境中培养 24 h。培养完成后,通过测定各培养基在 600 纳米波长下的光密度值(OD_{600}),筛选并剔除光密度值较低的菌株。

1.2.9 乳酸菌的分子生物学鉴定

通过 16S rDNA 分子生物学技术对纯化菌株进行鉴定。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)提取菌株 DNA,随后进行 16S rDNA PCR 扩增,并将产物送至上海生工公司测序。测序结果经 BLAST 比对,确定与筛选菌株同源性最高的已分类菌株。

1.2.10 菌株生长曲线和产酸能力测定

将菌株在 MRS 固体培养基上 37℃划线培养 24 h,挑取单菌落接种至 10 mL MRS 液体培养基中培养 12 h。用培养基稀释菌液至 OD_{600} 值约为 1,以 1%接种量接入 MRS 液体培养基,37℃培养。每 2 h 测定一次 OD_{600} 值和 pH 值,持续 24 h,绘制生长曲线和产酸曲线^[15]。

1.2.11 确定乳酸菌接种量

将分割后的原料肉分 5 组,每组重量约 250 g,乳酸菌接种量: 10^7 、 5×10^7 、 10^8 、 5×10^8 、 10^9 $\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$,其他工艺保持一致。制作工艺为本实验室模拟低硝腊肉工艺得出:

添加 2.5%的盐→4℃腌制 7 d(第三天进行翻面,并倒掉腌制出的水)→接种乳酸菌→在 40℃烘箱培养 24 h→使用烟熏机 60℃烟熏 6 h→40℃烘干 24 h→成熟。

测定 pH 值、亚硝酸盐含量，并进行感官评价。

1.2.12 亚硝酸盐与盐添加量的关系

制作盐添加量分别为质量分数 1%、3%、5%、7%、9%的腊肉（除盐添加量不同，其他制作工艺完全相同）。成熟后测定五组腊肉中的亚硝酸盐含量、菌落总数、乳酸菌数、pH 值，选定专业的 20 名感官评定人员进行感官评价，感官评价表参照宋忠祥等^[16]，如表 1。制作工艺参照样品 FBG1 的制作方法略有修改：

添加不同含量的盐→4 ℃腌制 7 d(第三天进行翻面，并倒掉腌制出的水)→在温度为 10 ℃的通风处晾晒 1 d→使用烟熏机 60 ℃烟熏 6 h→在温度为 10 ℃的通风处晾晒 1 d→4 ℃保存。

表 1 感官评分表		
Table 1 Sensory scoring table		
指标	评分标准	感官评分
色泽 (25 分)	色泽正常、自然柔和，能引起食欲	19~25
	色泽稍淡或稍深，但仍能引起食欲	12~18
	色泽不太自然、褪色	5~11
	色泽不正常，不能接受	0~4
组织结构 (25 分)	软硬适中，组织紧密，有弹性，有嚼劲	19~25
	软硬较适中，组织较紧密，较有弹性，有嚼劲	12~18
	组织稍软或稍硬，组织较松软，稍有弹性	5~11
	组织很软、松散，无嚼劲	0~4
香味 (25 分)	香味自然纯正、浓郁，能引起食欲	19~25
	香味稍淡或稍浓，但仍能引起食欲	12~18
	香味不自然，或无明显香味	5~11
	有令人不愉快的气味，或无香味	0~4
口味 (25 分)	咸淡适中，味道容易接受，美味	19~25
	稍咸或稍淡，味道比较容易接受，比较美味	12~18
	太咸或太淡，味道一般	5~11
	味道不容易接受	0~4

1.2.13 腌制温度对亚硝酸盐生成的影响

制作 3 组腌制温度分别为 4、20、37 ℃的腊肉（除温度以外，其他工艺完全相同），从腌制阶段开始，每天测定肉中的亚硝酸盐含量。制作工艺参照样品 FBG1 的制作方法略有修改：

加盐量为 7%，腌制时间为 7 d→在通风处晾晒 1 d→使用烟熏机 60 ℃烟熏 6 h→在通风处晾晒 1 d→4 ℃保存。

1.2.14 低硝腊肉的制作

按照结论 2.12 中的低硝腊肉工艺制作腊肉，并将腊肉送至华测检测技术有限公司，根据 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》的规定，采用分光光度法检测其亚硝酸盐含量。

1.2.15 数据处理

采用 GraphPad Prism 9.0.0 进行绘图和差异显著性分析；SPSS 27.0.1 进行组间差异性比较；MEGA-X 进行 DNA 进化树的制作；Origin 2024 进行感官雷达图的绘制。

2 结果与分析

2.1 渝东北腊肉中的亚硝酸盐含量

如图 1 所示检测结果中，腊肉 FLJ1 中的亚硝酸盐含量最高为 10.55 mg·kg⁻¹，腊肉 WTG2 中的亚硝酸盐含量最低为 3.94 mg·kg⁻¹；在外源添加了亚硝酸盐的三款腊肉（KZG1、FBG1、CPG1）中，腊肉 CPG1 中的亚硝酸盐含量最高为 9.10 mg·kg⁻¹，腊肉 FBG1 中的亚硝酸盐含量最低为 5.16 mg·kg⁻¹。有学者认为，腊肉中的亚硝酸盐在成熟的半个月內快速下降，成熟期半个月后缓慢下降^[17]，本次采集的腊肉样品储藏期均在三个月以上，其亚硝酸盐含量已经降低到较低水平。为探究亚硝酸盐与微生物之间的关系，故将外源添加亚硝酸盐的三款腊肉（KZG1、

FBG1、CPG1) 和亚硝酸盐含量最高 (FLJ1)、最低 (WTG2) 的两款腊肉进行微生物宏全基因组测序。

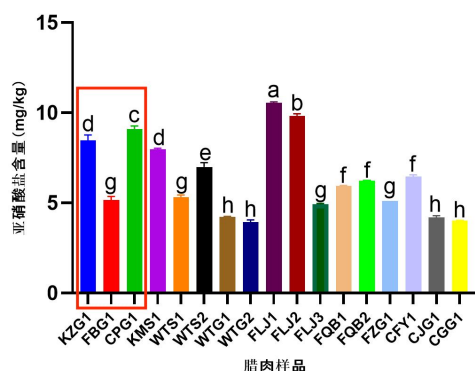


图1 渝东北腊肉亚硝酸盐含量

Fig.1 Nitrite content of Northeast Chongqing bacon

注：以 K 开头的样品采样于开州，以 W 开头的样品采样于巫溪，以 F 开头的样品采样于奉节，以 C 开头的样品采样于城口。样品 KZG1、FBG1、CPG1 为外源添加了 50 mg·kg⁻¹ 亚硝酸盐的腊肉。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，下图同。

2.2 腊肉微生物宏全基因组测序结果

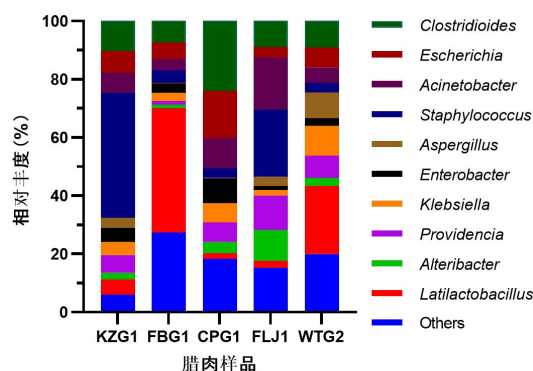


图2 微生物物种相对丰度图

Fig.2 Relative abundance map of microbial species

注：颜色对应此分类学水平下各物种名称，不同色块宽度表示不同物种相对丰度比例。挑选所有样本丰度之和最高的前 10 个物种进行作图，Others 代表其余物种的丰度总和。

图 2 为五款腊肉样品的微生物物种相对丰度图，样品 KZG1 的优势菌为葡萄球菌，占比为 42.89%；样品 FBG1 的优势菌为乳酸杆菌，占比为 42.67%；样品 CPG1 的优势菌为梭菌，占比为 24.01%；样品 FLJ1 的优势菌为葡萄球菌，占比为 22.98%；样品 WTG2 的优势菌为乳酸杆菌，占比 23.31%。三款外源添加亚硝酸盐的腊肉中，FBG1 的亚硝酸盐含量最低，且乳酸杆菌为优势菌；17 款渝东北腊肉中，WTG2 的亚硝酸盐含量最低，且乳酸杆菌为优势菌。数据显示，腊肉中的亚硝酸盐含量可能与乳酸菌的分布有关，检测结果与此方向研究成果相符。乳酸菌不仅能够通过降低环境 pH 值来抑制有害微生物的生长，从而起到防腐效果，同时还能增强食品的营养价值，赋予产品独特的香气、口感和健康益处。此外，乳酸菌还具有一项重要功能，即显著减少食品中亚硝酸盐的含量^[18]。

研究发现，乳酸菌对亚硝酸盐的降解分为两部分，一是酸降解途径，该途径中 H⁺与亚硝酸盐直接反应，同时酸性环境抑制硝酸还原酶活性，减少亚硝酸盐的产生；二是酶降解途径，乳酸菌能产生对亚硝酸盐有降解作用的亚硝酸盐还原酶，此途径一般在 pH>4.5 时起主导作用^[19,20]。左瑶^[21]从腌制时期的镇巴腊肉样品中分离出格氏乳球菌，乳酸乳球菌，粪肠球菌以及绿色魏斯氏菌共 16 株乳酸菌，都有一定程度的抑菌能力、亚硝酸盐降解能力。杜斌等^[22]筛选到 2 株降亚硝酸盐能力优良且适于肉制品发酵的乳酸菌菌株，经鉴定 2 株菌分别为植物乳杆菌和发酵乳杆菌。高星宇^[23]从内蒙古传统发酵食品中分离、筛选出 7 株具有良好发酵特性的菌株，其中 R1-1-1、YBP-2 菌株能有效地降解亚硝酸盐，经鉴定得出均为植物乳植杆菌。胡蝶等^[24]分离得到 5 株产酸菌，经鉴定有 3 株是乳酸菌，分别为肠膜明串珠菌、清酒乳杆菌、弯曲乳杆菌，都具有降亚硝酸盐能力。

为探究这两款低硝腊肉中，发挥降解亚硝酸盐作用的菌，故从样品 WTG2、FBG1 中分离、鉴定降解亚硝酸

2.3 乳酸菌的降亚硝酸盐能力

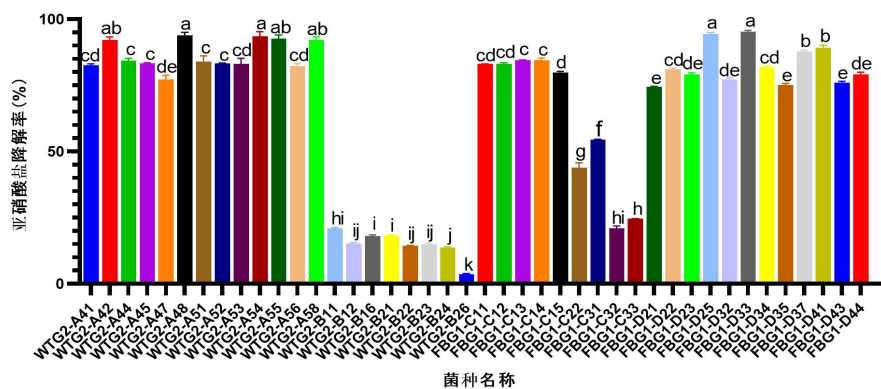


图3 乳酸菌对亚硝酸盐的降解率

Fig.3 Degradation rate of nitrite by lactic acid bacteria

注：WTG2-A 的菌株分离自腊肉 WTG2 的上端，WTG2-B 的菌株分离自腊肉 WTG2 的下端，FBG1-C 的菌株分离自腊肉 FBG1 的上端，FBG1-D 的菌株分离自腊肉 FBG1 的下端。字母后的第一位数字代表腊肉样品的稀释次数，第二位数字代表菌株的编号，后图同。

经检测，符合乳酸菌外观，且革兰氏染色结果为阳性的菌株，对亚硝酸盐都有或多或少的降解能力，如图3所示。其中，对亚硝酸盐降解率最高的菌株为FBG1-D33，降解率为95.20%；对亚硝酸盐降解率最低的菌株为WTG2-B26，降解率为3.55%。分离出的42株乳酸菌中，有30株对亚硝酸盐的降解率大于70%。乳酸菌是食品中常用的发酵剂，微生物发酵剂在食品中的应用起源于19世纪后期发酵乳品领域，20世纪30年代开始将微生物发酵剂应用于腌腊发酵肉制品的研究^[25-27]。高星宇^[23]分离出的乳酸菌对亚硝酸盐的降解率为87%左右，罗皓等^[5]分离出的乳酸菌对亚硝酸盐的降解率最高可达95%，王蜀^[28]分离出的乳酸菌在24 h对亚硝酸盐的降解率可达90%以上。选择亚硝酸盐降解率大于80%的菌种进行生理生化鉴定。

2.4 乳酸菌生理生化鉴定结果

表2 菌株生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical identification results of strains

菌落名	过氧化氢酶试验	硫化氢试验	葡萄糖发酵试验	葡萄糖产气试验
WTG2-A41	-	-	+	-
WTG2-A42	-	-	+	-
WTG2-A44	-	+	+	+
WTG2-A45	-	-	+	-
WTG2-A48	-	-	+	-
WTG2-A51	-	-	+	+
WTG2-A52	-	+	-	-
WTG2-A53	-	-	+	-
WTG2-A54	-	-	+	-
WTG2-A55	-	-	+	-
WTG2-A56	-	-	+	-
WTG2-A58	-	-	+	-
FBG1-C11	-	+	-	-
FBG1-C12	-	-	+	-

FBG1-C13	-	-	+	-
FBG1-C14	-	-	+	-
FBG1-C15	-	-	+	-
FBG1-D22	-	-	+	+
FBG1-D25	-	-	+	-
FBG1-D33	-	-	+	-
FBG1-D34	-	+	+	-
FBG1-D37	-	-	+	-
FBG1-D41	-	-	+	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

乳酸菌的代谢分为同型发酵和异型发酵。同型发酵将 1 分子葡萄糖完全转化为 2 分子乳酸，而异型发酵则生成乳酸、醋酸、CO₂等多种产物。由于异型发酵产气可能影响产品质地，因此作为发酵剂的菌株需具备同型发酵能力，且不产气。筛选时选择过氧化氢酶阴性、硫化氢阴性、葡萄糖发酵阳性且不产气的菌株，共获得 17 株耐酸菌株，结果如表 2 所示。

2.5 耐酸菌株的筛选

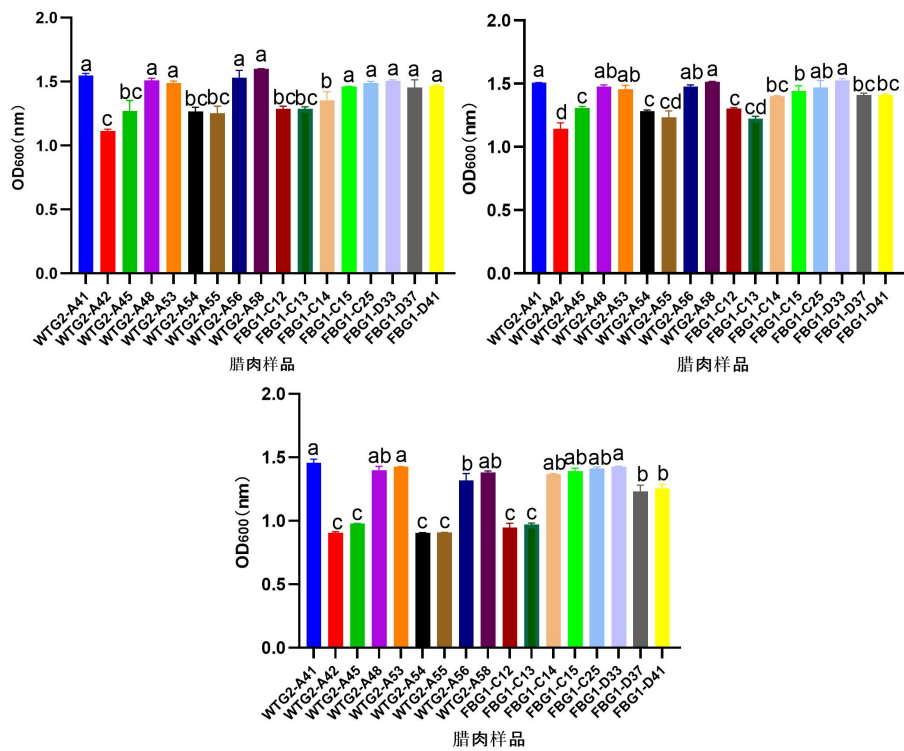


图 4 菌株分别在 pH=6、5、4 时的生长能力

Fig.4 Growth capacity of strains at pH=6, 5, and 4, respectively

注：第一图为菌株在 pH 值为 6 时培养 24 h 后的 OD 值，第二图为菌株在 pH 值为 5 时培养 24 h 后的 OD 值，第三图为菌株在 pH 值为 4 时培养 24 h 后的 OD 值。

乳酸菌在 24 h 产酸能力是衡量乳酸菌菌株品质优劣的一个重要指标，在发酵过程中，乳酸菌产生的乳酸会降低环境 pH 值。耐酸性强的菌株能在高酸环境中保持活性，确保发酵顺利完成。耐酸性强的乳酸菌能稳定发酵，确保产品风味和质地一致，提升食品质量。耐酸性强的乳酸菌能抑制有害微生物生长，延长食品保质期^[29]。故选择图 4 在酸性条件下培养 24 h 后生长能力较强的 11 株菌株，进行耐盐菌株的筛选。

2.6 耐盐菌株的筛选

腊肉制作过程中会使用大量盐进行腌制，以抑制有害微生物生长并延长保质期。耐盐能力强的乳酸菌能在高

盐环境中存活并发挥作用^[30]。乳酸菌在腊肉发酵过程中产生乳酸，降低 pH 值，抑制病原菌生长。耐盐能力强的菌株能在高盐条件下正常发酵，保证产品质量和安全。乳酸菌的代谢活动影响腊肉的风味和质地。耐盐能力强的菌株能在高盐环境中稳定代谢，确保腊肉的风味和质地符合预期。故选择图 5 中在高 NaCl 含量时耐盐能力最强的 3 株菌株：FBG1-C14、FBG1-C15、FBG1-D33 进行分子生物学鉴定。

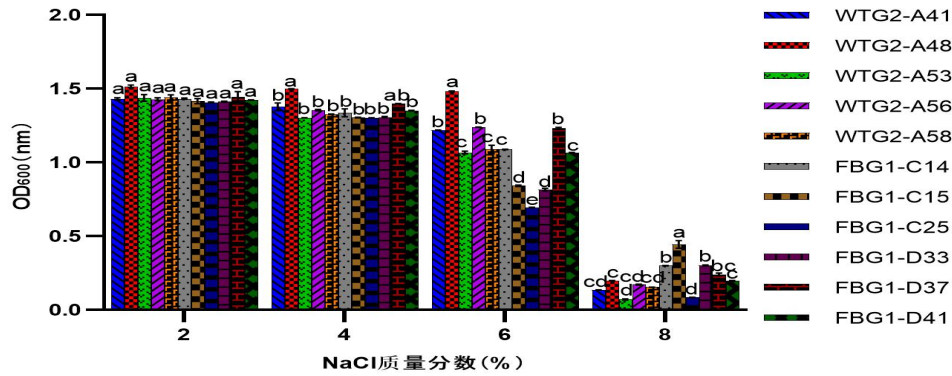


图 5 菌株在不同 NaCl 含量下的生长能力

Fig.5 Growth ability of strains with different NaCl contents

注：横坐标为液体培养基的 NaCl 含量，纵坐标为培养 24 h 后的 OD 值。

2.7 分子生物学鉴定

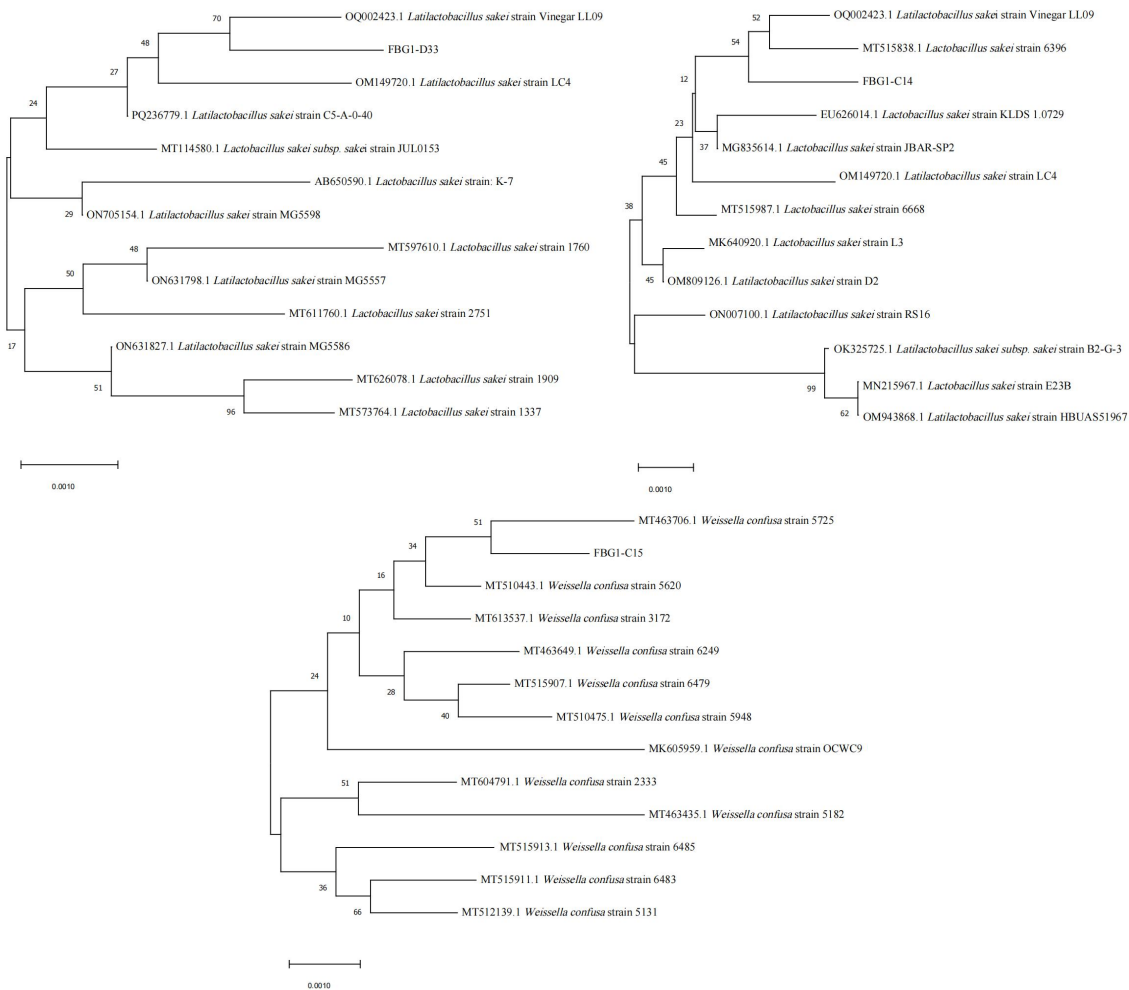


图 6 微生物 DNA 进化树

Fig.6 Microbial DNA evolutionary tree

经 DNA 序列分析, 菌株 FBG1-D33 的 16S rDNA 序列比对长度为 1 400 bp, 在 NCBI 中进行 Blast 序列同源性对比, 结果显示 FBG1-D33 与 *Lactobacillus sakei* strain 1760 (MT597610.1)、*Lactobacillus sakei* strain 1337 (MT573764.1)、*Lactobacillus sakei* strain 1909 (MT626078.1)、*Lactobacillus sakei* strain JUL0153 (MT114580.1)、*Lactobacillus sakei* strain 2751 (MT611760.1)、*Lactobacillus sakei* strain MG5598 (ON705154.1)、*Lactobacillus sakei* strain MG5557 (ON631798.1)、*Lactobacillus sakei* strain MG5586 (ON631827.1) 和 *Lactobacillus sakei* strain C5-A-0-40 (PQ236779.1) 的同一性均达到 100%, 故确定菌株 FBG1-D33 为清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*)。

经 DNA 序列分析, 菌株 FBG1-D33 的 16S rDNA 序列比对长度为 1400 bp, 在 NCBI 中进行 Blast 序列同源性对比, 结果显示 FBG1-C14 与 *Lactobacillus sakei* strain HBUAS51967 (OM943868.1)、*Lactobacillus sakei* strain B2-G-3 (OK325725.1)、*Lactobacillus sakei* strain E23B (MN215967.1)、*Lactobacillus sakei* strain JBAR -SP2 (MG835614.1)、*Lactobacillus sakei* strain D2 (OM809126.1)、*Lactobacillus sakei* strain LC4 (OM149720.1)、*Lactobacillus sakei* strain 6396 (MT515838.1)、*Lactobacillus sakei* strain RS16 (ON007100.1)、*Lactobacillus sakei* strain 6668 (MT515987.1) 和 *Lactobacillus sakei* strain KL .DS 1.0729 (EU626014.1) 同一性均达到 99% 以上, 故确定 FBG1-C14 为清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*)。

经 DNA 序列分析, 菌株 FBG1-D33 的 16S rDNA 序列比对长度为 1 400 bp, 在 NCBI 中进行 Blast 序列同源性对比, 结果显示 FBG1-C15 与 *Weissella confusa* strain OCWC9 (MK605959.1) 的同一性达到 100%, 与 *Weissella confusa* strain 5182 (MT463435.1)、*Weissella confusa* strain 6249 (MT463649.1)、*Weissella confusa* strain 5725 (MT463706.1)、*Weissella confusa* strain 5620 (MT510443.1)、*Weissella confusa* strain 5948 (MT510475.1)、*Weissella confusa* strain 5131 (MT512139.1)、*Weissella confusa* strain 6479 (MT515907.1)、*Weissella confusa* strain 6483 (MT515911.1) 和 *Weissella confusa* strain 6485 (MT515913.1) 同一性均达到 99% 以上, 故确定 FBG1-C15 为融合魏斯氏菌。

图 6 所示结果中, 由于 FBG1-C14、FBG1-D33 均为清酒乳杆菌, 所以选择降解亚硝酸盐能力最强的清酒乳杆菌 FBG1-D33, 与融合魏斯氏菌 FBG1-C15 进行生长曲线和产酸能力的测定。

2.8 乳酸菌生长能力和产酸能力结果

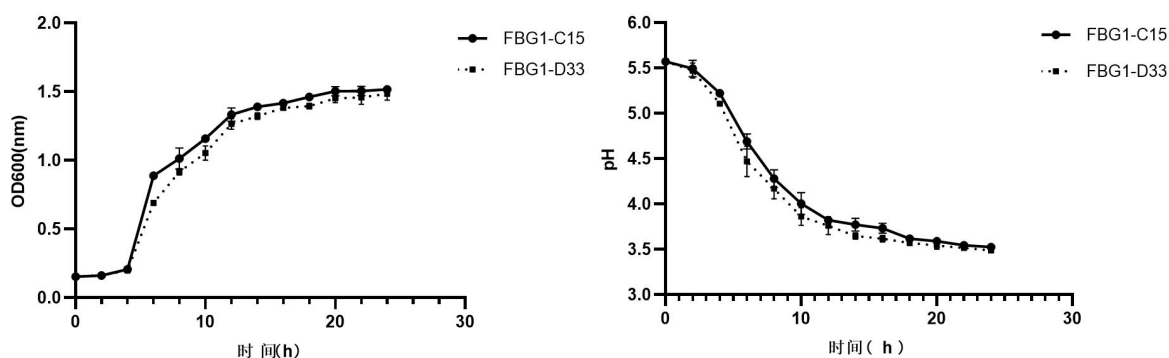


图 7 乳酸菌生长、产酸能力

Fig.7 Lactic acid bacteria growth and acid-producing capacity

图 7 所示结果为两株乳酸菌的生长曲线相似, FBG1-C15 的生长能力要优于 FBG1-D33。它们在 0~4 h 时几乎不生长, 在 4~6 h 时生长能力最迅速, 在 12~14 h 时生长速率变得缓慢, 14 h 后进入生长稳定期, 活菌总数达到最高。所以在使用菌株实验时, 应选择培养 12 h 的菌, 此时菌株数量多, 而且生长能力较为旺盛。

两株乳酸菌的产酸能力相似, FBG1-D33 的产酸能力要优于 FBG1-C15。在 0~2 h 时液体培养基 pH 值下降缓慢, 与乳酸菌在这个时间段不生长有关; 在 2~12 h 时, pH 值下降速度最快, 与乳酸菌在这个时间段生长迅速有关; 12 h 过后, pH 值缓慢降低, 最终稳定在 3.5 左右。

鉴于 FBG1-D33 清酒乳杆菌的 24 h 亚硝酸盐降解率最高, 为 95.20%, 而 FBG1-C15 融合魏斯氏菌对亚硝酸盐的降解率只有 80%, 故选择清酒乳杆菌 FBG1-D33 为制作低硝腊肉的发酵剂。

2.9 乳酸菌接种量对腊肉品质的影响

根据表 3 所示结果，乳酸菌接种量对猪肉的 pH 值、亚硝酸盐含量以及感官评分均有显著影响。随着乳酸菌接种量的增加，猪肉的 pH 值逐渐降低，这主要是由于乳酸菌代谢产生乳酸，增强了猪肉的酸性环境。同时，较高的乳酸菌接种量也能有效降低猪肉中亚硝酸盐的含量，这是因为乳酸菌通过代谢作用促进了亚硝酸盐的降解，从而减少了其在猪肉中的残留量，进一步提升了产品的安全性。当接种量大于 $5\times10^8\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 时，感官评分逐渐降低，消费者难以接受。大多数食品的 pH 值在 5~6.5 之间无酸味感；当 pH 值在 3~5 时能感觉酸味；而当 $\text{pH}<3$ 时则酸味难以适口。因此发酵肉制品的 pH 值一般控制在 5.0~5.2 之间^[31]。经实验得出，清酒乳杆菌 FBG1-D33 的接种量为 $10^8\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 时，猪肉的 pH 值在 5.0~5.2 之间。

表 3 乳酸菌接种量对腊肉品质的影响

Table 3 Effects of Lactobacillus inoculum amount on cured meat quality			
接种量/(CFU·g ⁻¹)	pH 值	亚硝酸盐含量/(mg·kg ⁻¹)	感官评分
10 ⁷	5.47±0.12 ^a	1.859±0.073 ^a	77.84±1.92 ^a
5×10 ⁷	5.46±0.08 ^a	1.514±0.091 ^b	78.11±0.72 ^a
10 ⁸	5.13±0.11 ^b	1.301±0.062 ^c	78.71±0.53 ^a
5×10 ⁸	4.89±0.09 ^c	1.281±0.060 ^c	70.62±0.95 ^b
10 ⁹	4.70±0.08 ^d	未检出 (<1) ^d	62.50±1.65 ^c

注：上述结果表示方式为均值±标准差，同一列中的不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

2.10 盐的添加量对腊肉亚硝酸盐含量的影响

表 4 不同盐添加量的腊肉检测表

Table 4 Inspection table of cured meat with different salt additions						
组别	腊肉中盐的添加量/%	亚硝酸盐含量/(mg·kg ⁻¹)	菌落总数/(CFU·g ⁻¹)	乳酸菌数/(CFU·g ⁻¹)	pH 值	感官
A	1	3.41±0.14 ^c	(9.58±0.39)×10 ^{6b}	(8.23±0.33)×10 ^{5a}	5.33±0.20 ^b	60.39±2.39 ^c
B	3	3.35±0.30 ^c	(2.83±0.24)×10 ^{7a}	(8.55±0.41)×10 ^{5a}	5.42±0.21 ^b	79.12±3.64 ^a
C	5	4.61±0.62 ^b	(5.79±0.14)×10 ^{5c}	(6.09±0.28)×10 ^{3b}	5.89±0.62 ^a	77.99±3.14 ^a
D	7	6.64±0.20 ^a	(1.24±0.07)×10 ^{5d}	0 ^c	5.92±0.47 ^a	72.89±3.17 ^b
E	9	6.64±0.33 ^a	(6.17±0.42)×10 ^{4e}	0 ^c	5.89±0.21 ^a	69.35±3.26 ^d

注：上述结果表示方式为均值±标准差，同一列中的不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

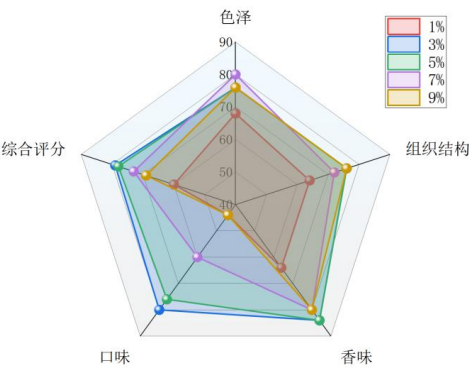


图 8 腊肉感官评价雷达图

Fig.8 Radar chart of sensory evaluation of bacon

表 4 结果显示：随着盐的添加量增高，其亚硝酸盐含量也增高，但 D 组和 E 组盐添加量差异 2%，亚硝酸盐含量几乎没有差异，说明当盐添加量大于 7%后，盐添加量对亚硝酸盐含量影响程度可能达到最大值。

菌落总数随着盐的添加量的增大而降低，说明盐能抑制微生物的生长，盐的添加量越多，对微生物的抑制能力越强。

增加盐的添加量会降低乳酸菌数量，当盐添加量为 7%、9%时，均检测不到乳酸菌的存在，说明乳酸菌在高盐环境中无法生存，此时猪肉的亚硝酸盐含量没有继续降低，猜测腊肉中盐含量影响亚硝酸盐含量的情况与微生物有关，尤其是乳酸菌。

五组腊肉中 pH 值最高的为 D 组，但与 C 组、E 组差异不大；pH 值最低的为 B 组，但与 A 组差异不大。总体来说高盐腊肉的 pH 值大于低盐腊肉的 pH 值，这可能与乳酸菌的产酸能力有关。

五组腊肉中综合感官评分排序为 3%组>5%组>7%组>9%组>1%组。如图 8，影响综合评分的主要因素是口味，影响口味的主要因素是咸淡程度，口味得分排序为 3%组>5%组>7%组>9%组>1%组。1%组因为盐的添加量太低，口味淡，品尝起来有些许异味，可能是微生物太多，腊肉在制作过程中发生了变质；9%组因为盐的添加量太高，口味太咸以至于大多数人接受不了。盐的添加量在 3%~5%时，口味最佳。

综合五组腊肉亚硝酸盐含量与感官评价，制作低硝腊肉时，盐的最佳添加量为 3%。

2.11 腌制温度对腊肉亚硝酸盐含量的影响

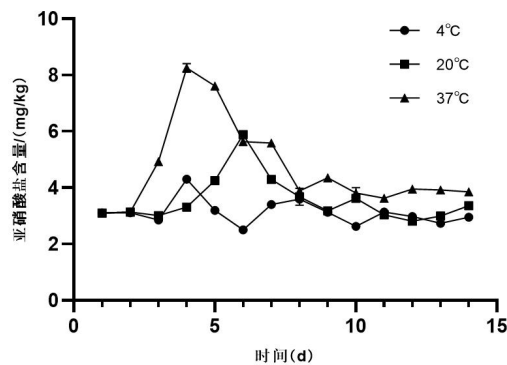


图 9 不同腌制温度下亚硝酸盐含量随时间的变化

Fig.9 Change of nitrite content with time at different curing temperatures

图 9 显示三组腊肉在制作过程中的亚硝酸盐含量都呈现出先上升后下降最终平稳的趋势，而成熟后的腊肉呈现出腌制温度越低，其亚硝酸盐含量越低的趋势，但差异不大。在高温 37℃ 环境下腌制腊肉，亚硝酸盐含量在第 4 天出现峰值，峰值最高，为 8.26 mg·kg⁻¹，成熟后亚硝酸盐含量处于最大值；在常温 20℃ 下，亚硝酸盐含量在第 6 天出现峰值，峰值为 5.89 mg·kg⁻¹，成熟后亚硝酸盐含量位居第二；在低温 4℃ 下，亚硝酸盐含量在第 4 天出现峰值，峰值为 4.31 mg·kg⁻¹，成熟后亚硝酸盐含量最低。综上，在 4℃ 环境下腌制腊肉，可以使肉中亚硝酸盐的峰值降到相对最低的水平，最早出现峰值，并且使成熟的腊肉中的亚硝酸盐含量最低。所以，在制作低硝腊肉时，腌制温度应选择低温 4℃。

2.12 低硝腊肉的加工技术

综合以上研究内容，整理出低硝腊肉的具体工艺指标如图 10，华测检测技术有限公司对成品腊肉的亚硝酸盐含量检测结果为未检出，检出限为 1 mg·kg⁻¹，与图 1 渝东北腊肉中亚硝酸盐含量对比，大大降低了腊肉中的亚硝酸盐含量，现有研究成果中罗皓等^[5]等制作的低硝腊肉亚硝酸盐含量最低为 1.157±0.097 mg·kg⁻¹，也证明了低硝工艺的可行性。

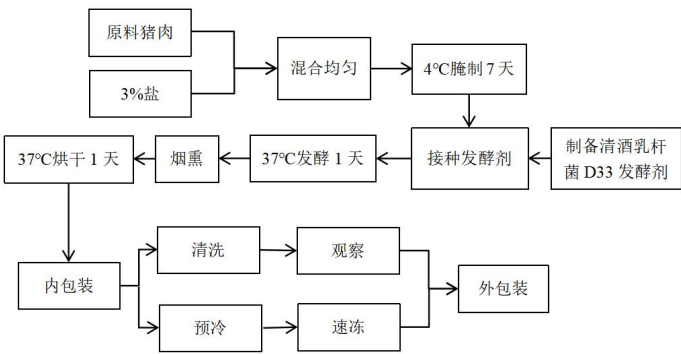


图 10 低硝腊肉的加工技术

Fig.10 Processing technology of low-nitrate bacon

3 结论

本研究聚焦于降低渝东北腊肉中亚硝酸盐含量的微生物,发现乳酸菌是降解亚硝酸盐的关键菌种。从样品WTG2和FBG1中分离出的42株乳酸菌均表现出一定的亚硝酸盐降解能力,其中菌株FBG1-D33表现出优异的降解能力,降解率达95.20%,并具备良好的耐盐、耐酸、产酸和生长特性。经鉴定,FBG1-D33为清酒乳杆菌,当其接种量为 10^8 CFU·g⁻¹时,适直接种到腊肉中。通过研究不同盐添加量和腌制温度对腊肉中亚硝酸盐含量的影响,发现当盐添加量为3%时,亚硝酸盐含量较低,同时乳酸菌数量保持在适宜水平,有助于抑制亚硝酸盐的生成。此外,腌制温度对亚硝酸盐含量也有显著影响,4℃下腌制的腊肉亚硝酸盐峰值最低,且峰值出现时间较早。

基于以上研究结果,本研究设计了一种低硝腊肉的制作工艺,能够将成品腊肉的亚硝酸盐含量控制在1 mg·kg⁻¹以下。这一工艺不仅有效降低了亚硝酸盐含量,还为腊肉的安全性和品质提升提供了科学依据。总体而言,本研究为腊肉生产中的亚硝酸盐控制提供了重要的理论和实践指导。

参考文献

- [1] 宁家文,赵银峰,王蜀,等.发酵肉制品中亚硝酸盐调控措施研究进展[J].农产品加工,2023,13:68-71.
- [2] 李宜平,彭燕.食品中的亚硝酸盐及其对人体健康的影响[J].中国食品工业,2024,6:140-142.
- [3] CARLOS C G ,VIRGINIA R C D G ,ANTONIA M G M .Suicidal poisoning by sodium nitrite: a dangerous mode from Internet. In regard of a case [J]. Spanish Journal of Legal Medicine, 2023, 49(1): 37-40.
- [4] WEI W, HU X Y, YANG S, et al. Denitrifying halophilic archaea derived from salt dominate the degradation of nitrite in salted radish during pickling [J]. Food Research International, 2022, 152: 110906.
- [5] 罗皓,付伟阳,曹敏,等.高效降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选及其在腊肉中的应用[J].中国调味品,2024,49(6):91-96.
- [6] 庞丽,李颖,李鹏,等.存储条件对香椿中亚硝酸盐含量检测的影响[J].食品安全导刊,2021,29:84-86.
- [7] 常云鹤,陈曦,郑舒文,等.天然抗氧化剂对红酸汤发酵过程中亚硝酸盐含量及品质的影响[J].食品安全质量检测学报,2022,13(6):1935-1941.
- [8] DA L, CHI K T, HA P H, et al. Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aromatic starters in fermented vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 350(prepublish): 109242.
- [9] LIN M, YAO B Q, ZHANG R H, et al. Impact of different lactic acid bacteria on nitrite degradation and quality of fermented carrot [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2024, 59(9): 6501-6512.
- [10] 国家食品药品监督管理总局,国家卫生和计划生育委员会.GB 5009.33-2016 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[s].北京:中国标准出版社,2016.
- [11] HEENU S, JASVEEN B. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Food of North-West Himalayas [J]. Journal of Pure and Applied Microbiolo, 2021, 15(3): 1567-1572.
- [12] LIU G D, SHU G W, WANG J S, et al. Purification and identification of EPS produced by five lactic acid bacteria and evaluation of their effects on the texture of fermented goat milk [J]. Fermentation, 2023, 9(6): 527.
- [13] MA W J, ZHAO M N, LU Z X, et al. Isolation of lactic acid bacteria from yogurt and the effect on the intestinal microflora in mice [J]. Biology Bulletin, 2022, 49(Suppl 1): S83-S94.
- [14] HOU X Y, ZHANG B, LI C Z, et al. Effect of brine fermentation on nitrogen metabolism and microbial community of Allium chinense bulbs and identification of lactic acid bacteria with nitrite degradation function [J]. Food Bioscience, 2023, 56: 13.
- [15] EVDOXIOS P, IOANNIS S, EVRIDIKI B, et al. Indigenous lactic acid bacteria isolated from raw graviera cheese and evaluation of their most important technological properties [J]. Foods, 2023, 12(2): 370.
- [16] 宋忠祥,樊少飞,付浩华,等.低盐液熏腊肉加工工艺优化及品质分析[J].肉类研究,2020,34(7):46-52.
- [17] 陈艳,雷圆圆,李蓓佳,等.四川腊肉在不同包装储存条件下理化指标的变化研究[J].肉类工业,2019,4:29-31+35.
- [18] CHEN Y Q, WU C L, XU W Y, et al. Evaluation of degradation capability of nitrite and biogenic amines of lactic acid bacteria isolated from pickles and potential in sausage fermentation [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 46(1): e16141.
- [19] CAO J, YANG J, HOU Q, et al. Assessment of bacterial profiles in aged, home-made Sichuan paocai brine with varying titratable acidity by PacBio SMRT sequencing technology [J]. Food Control, 2017, 78: 14-23.

- [20] YU M S, ZHANG Y. Effects of lactic acid bacteria on nitrite degradation during pickle fermentation [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 2606(781-784): 1656-1660.
- [21] 左瑶.镇巴腊肉腌熏过程中微生物多样性变化及乳酸菌的分离鉴定[D].汉中:陕西理工大学,2023.
- [22] 杜斌,韦曾传,汪肖,等.侗族传统酸鱼中降亚硝酸盐乳酸菌的筛选、鉴定及其在发酵香肠中的应用[J].*食品科技*,2020,45(1):23-28.
- [23] 高星宇.降解亚硝酸盐乳酸菌的筛选及其在发酵羊肉香肠中的应用[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2023.
- [24] 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+9.
- [25] LARANJO M, ELIAS M, FRAQUEZA J M. The use of starter cultures in traditional meat products [J]. *Journal of Food Quality*, 2017, 2017: 1-18.
- [26] XIA L Y, QIAN M, CEHNG F, et al. The effect of lactic acid bacteria on lipid metabolism and flavor of fermented sausages [J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 10.
- [27] ZHANG Q H, SHEN J L, MENG G G, et al. Selection of yeast strains in naturally fermented cured meat as promising starter cultures for fermented cured beef, a traditional fermented meat product of northern China [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023, 104(2): 883-891.
- [28] 王蜀.香肠中具有降亚硝酸盐效果微生物的筛选及其机理研究[D].成都:成都大学,2024.
- [29] RODRIGUEZ GOMEZ F, ROMERO GIL V, ARROYO LOPEZ N F, et al. Assessing the challenges in the application of potential probiotic lactic acid bacteria in the Large-Scale fermentation of Spanish-Style table olives [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 6: 8915.
- [30] HAN D, BAO X Y, WANG Y F, et al. The impact of lactic acid bacteria inoculation on the fermentation and metabolomic dynamics of indigenous Beijing douzhi microbial communities [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1435834.
- [31] KAVEH S, HASHEMI B M S, ABEDI E, et al. Bio-Preservation of meat and fermented meat products by lactic acid bacteria strains and their antibacterial metabolites [J]. *Sustainability*,2023,15(13): 10154.