

嗜酸乳杆菌冻干保护剂及其直投式复合发酵剂的开发

张风华^{1,2}, 黄俊逸¹, 李新福^{2,3}, 李聪^{2,3}, 徐宝才^{2,4}

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 201900) (2. 肉品加工与质量控制国家重点实验室, 江苏南京 211806) (3. 江苏雨润肉食品有限公司, 江苏南京 211806) (4. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230036)

摘要: 为提高嗜酸乳杆菌冻干存活率和研发以嗜酸乳杆菌冻干菌粉为基础的直投式复合发酵剂, 本研究以嗜酸乳杆菌为试验菌株, 在单因素实验、析因实验和最陡爬坡实验的基础上采用响应面分析优化了嗜酸乳杆菌真空冷冻干燥的保护剂配方。优化后将嗜酸乳杆菌冻干菌粉与肉糖葡萄球菌冻干菌粉以一定质量比复合应用于萨拉米香肠的制备中。结果表明, 嗜酸乳杆菌最佳冻干保护剂(以11%脱脂乳为基础)配方为: 海藻糖 3.03 g/100 mL、甘油 9.50 g/100 mL、谷氨酸钠 3.50 g/100 mL, 此条件下, 嗜酸乳杆菌冻干存活率高达 81.24%; 嗜酸乳杆菌与肉糖葡萄球菌的冻干菌粉最佳比例为 1:2, 直投式复合发酵剂最佳接种量为 10^8 cfu/g。与对照组相比, 该直投式复合发酵剂生产的萨拉米香肠酸味柔和, 色泽、硬度、弹性良好, 总体接受度最高。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 肉糖葡萄球菌; 冻干保护剂; 直投式复合发酵剂; 萨拉米香肠

文章编号: 1673-9078(2019)09-248-257

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.032

The Development of Lyoprotectant for *Lactobacillus acidophilus* and Derived Direct-Vat-Set Composite Culture

ZHANG Feng-hua^{1,2}, HUANG Jun-yi¹, LI Xin-fu^{2,3}, LI Cong^{2,3}, XU Bao-cai^{2,4}

(1. College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 201900, China) (2. State Key Laboratory of Meat Processing & Quality Control, Nanjing 211806, China) (3. Jiangsu Yurun Meat Industry Co. Ltd., Nanjing 211806, China) (4. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to improve the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus acidophilus* and develop a freeze-dried *Lactobacillus acidophilus*-based direct-vat-set composite culture, this study used *Lactobacillus acidophilus* as the experimental strain. On the basis of single factor experiment, factorial experiment and steepest ascent experiment, the lyoprotectant formula for *Lactobacillus acidophilus* subjected to vacuum freeze-drying was optimized by response surface methodology. After optimization, freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* and *Staphylococcus aureus* powders were compounded in a certain mass ratio and applied to the preparation of salami. The obtained results indicated that the optimal lyoprotectant formula for *Lactobacillus acidophilus* (based on 11% skim milk) was: trehalose 3.03 g/100 mL, glycerol 9.50 g/100 mL, sodium glutamate 3.50 g/100 mL. Under these conditions, the freeze-drying survival rate of *Lactobacillus acidophilus* was 81.24%. The optimal ratio of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* and *Staphylococcus aureus* powders was 1:2, and the optimal inoculum quantity for the direct-vat-set composite culture was 10^8 cfu/g. Compared with the control group, the salami produced using the direct-vat-set composite culture had a mild sour taste, and good color, hardness and elasticity, with the highest overall acceptance.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; *Staphylococcus carnosus*; lyoprotectant; direct-vat-set composite culture; salami

嗜酸乳杆菌作为第三代酸乳发酵剂菌种, 广泛应用于食品中^[1], 它的主要作用是降低产品 pH 值, 保证产品安全性和延长货架期。嗜酸乳杆菌作为益生菌,

收稿日期: 2019-04-23

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2016YFD0400700, 03)

作者简介: 张风华 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 徐宝才 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 肉品加工与质量控制

对人体有多种保健功能, 有研究^[2]表明, 嗜酸乳杆菌在胃肠道内的存活率达 59%, 远远超过目前市场上常用的存活率只有 0.65%~0.01% 的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌。由于胃酸和胆汁的作用, 嗜酸乳杆菌能较好地通过胃并在肠道内存活, 它能定植于人体肠道内, 通过产生乳酸、抗菌素、杀菌素等^[3,4]抑制肠道内的有害菌, 保护胃肠道, 具有整肠作用; 它还对便秘、腹泻等肠道疾病有一定疗效^[5,6]; Ying 等^[7]发现嗜酸乳杆

菌可降低血液中胆固醇含量和抑制某些癌细胞生长^[8]等。多种益生性和保健功能,使嗜酸乳杆菌成为活菌制剂的研究热点^[9],而制备高活性菌粉的关键则是如何提高冻干存活率,真空冷冻干燥技术制备冻干菌粉虽较为理想,但冷冻和干燥过程会造成细胞损伤、死亡及某些酶的钝化,所以添加保护剂是解决该问题的关键^[10]。

随着第三代乳酸菌与微球菌混合菌种发酵剂的诞生,产酸菌与产香菌的结合成为一大研究热点,两菌混合不仅可弥补单菌种发酵的单调性,使产品的风味物质更丰富,质量更优,还可增加产品的营养与保健功能的多样性^[11]。嗜酸乳杆菌能快速降低原料肉的 pH 值,低 pH 能抑制病原菌和腐败菌的生长,还能降低蛋白质的保水性有利于干燥过程,对发酵香肠的安全性和延长货架期具有重要作用。另外,虽然肉糖葡萄球菌产酸能力弱,但它具有将硝酸盐还原成亚硝酸盐的能力,具有分解脂肪和蛋白质的能力,对促进发色、清除过氧化物和形成特有风味非常重要。

萨拉米香肠是一种营养丰富、色泽诱人、保质期长的西式即食保健发酵香肠,深受欧洲民众喜爱,但传入中国后,由于口感偏酸,很难被我国消费者接受。其次,我国发酵剂多从国外进口,成本较高,所以本研究旨在研发具有自主知识产权的直投式复合发酵剂和适合国人口味的萨拉米香肠。由于实验室前期已研究了嗜酸乳杆菌和肉糖葡萄球菌的生理特性和混合使用的拮抗性、酶学特性等^[12],所以本研究首先优化了嗜酸乳杆菌的保护剂配方,然后将冻干菌粉与肉糖葡萄球菌冻干菌粉^[13]进行复合制成直投式复合发酵剂,应用于萨拉米香肠的制备中,以探讨其质量优劣和应用前景。目前将这两种冻干菌粉复合制成直投式复合发酵剂并应用于萨拉米香肠的研究还未曾见到相关报道。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

菌种:嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (*China Center of Industrial Culture Collection, CICC*); 肉糖葡萄球菌 (*Staphylococcus carnosus*) 由扬州大学食品学院微生物实验室提供; 两菌种已经过安全性评价,保存于-80℃冰箱中。

培养基:嗜酸乳杆菌培养用 MRS 肉汤培养基,活菌计数用 MRS 琼脂培养基; 肉糖葡萄球菌培养用 BHI 肉汤培养基,活菌计数用 PCA 琼脂培养基,

121℃灭菌 15 min。

主要试剂:脱脂乳,购于迈高乳业有限公司;氯化钠、海藻糖、乳糖、半乳糖、蔗糖、甘露醇、侧金盏花醇、甘油、谷氨酸钠、硫酸锰、乙酸钠、氯化钙、脯氨酸、精氨酸、甘氨酸,均购于国药集团化学试剂有限公司; 105℃灭菌 20 min 备用。

萨拉米香肠原辅料:4号猪肉、牛肉、猪背膘;亚硝酸钠、食盐、D-异抗坏血酸钠、葡萄糖、黑胡椒粉、小茴香籽粉、大蒜粉等均为食品级,由肉品加工与质量控制国家重点实验室提供。

1.2 主要仪器设备

MJ-78A 型高压蒸汽灭菌锅,施都凯仪器设备(上海)有限公司; FD-1C-50 型真空冷冻干燥剂,北京博医康仪器有限公司; CM-14 型斩拌机,荥阳市成远食品机械厂; MB-22S 型台式绞肉机,北京南常肉食机械有限公司; VF-620 型真空灌肠机德国汉德曼公司,CTHI-250B 型恒温恒湿箱施都凯仪器设备(上海)有限公司,FE28 型 METTLER 酸度计,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试验工艺流程

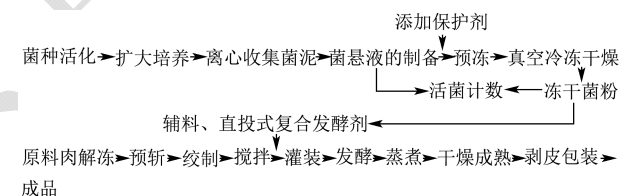


图1 本试验的主要工艺流程

Fig.1 The main technological process of experiment

1.3.2 菌体培养及菌悬液的制备

在无菌条件下,挑取平板划线分离出的单菌落至装有 10 mL 肉汤培养基的试管中,37℃培养 24 h,用移液枪吸取 1% 的菌液至三角瓶肉汤培养基中,37℃恒温震荡扩大培养 24 h,然后将菌液分装于 50 mL 无菌离心管中离心^[13,14]后,弃去上清液,收集菌泥加入等量的无菌生理盐水 (0.85%),漩涡振荡,制得菌体悬浮液。

1.3.3 菌体冻干及活菌计数

在无菌条件下,用移液枪吸取一定体积的菌悬液和保护剂于已灭菌的真空冷冻干燥瓶内,充分混匀后封膜,将干燥瓶放于-80℃冰箱预冻 3 h,然后置于已经预冷的真空冷冻干燥机内,开启真空泵,干燥 24 h 得冻干菌粉。

向离心后收集的菌泥和冻干后的菌粉样品中分别

加入与冻干前等体积的 0.85%生理盐水复水 15 min 后,采用平板计数法,根据公式(1)计算活菌数,以菌落数在 30~300 cfu 的为有效菌落数。试验重复三次,取其平均值。

$$\text{冻干存活率}/\% = \text{冻干后活菌数}/\text{冻干前活菌数} \times 100\% \quad (1)$$

注:活菌数单位:cfu/mL。

1.3.4 制备冻干菌粉的试验设计

以嗜酸乳杆菌冻干存活率为指标,采用三步法进行优化。首先,以脱脂乳为基础保护剂研究其浓度及与菌悬液的体积比;然后,通过单因素试验和二水平部分因子析因设计(试验设计见表3)从15种物质中筛选最佳保护剂组分;最后,通过最陡爬坡试验和响应面(试验设计见表7)分析^[15]确定保护剂的最佳配比。

1.3.5 直投式复合保护剂制备及应用

在1.3.4的基础上,以pH值和感官评价为指标,将制好的嗜酸乳杆菌冻干菌粉与肉糖葡萄糖菌冻干菌粉,按照不同比例、不同接种量复合,应用于萨拉米

香肠的制作,进而筛选出最佳比例和最佳接种量的直投式复合发酵剂。

1.3.6 理化指标测定

萨拉米香肠失重率/ $\% = \text{萨拉米香肠发酵前和发酵结束后的重量差}/\text{发酵前的重量} \times 100\%$;

pH值:根据GB 5009.237-2016,称取10.00 g绞碎的样品于三角瓶中,加入0.1 mol/L的氯化钾溶液100 mL,震荡30 min后过滤,用酸度计测定滤液的pH;

蛋白质的测定:采用GB 5009.5-2016的凯氏定氮法;

脂肪的测定:采用GB 5009.6-2016的酸水解法;

亚硝酸盐含量:采用GB 5009.33-2016。

以上指标重复测定三次,取平均值。

1.3.7 感官评价

按照邹冰青等^[16]人的方法,稍作修改:将经发酵成熟后的萨拉米香肠切成薄片进行感官评价。邀请10名专业人士组成评定小组,评定标准见表1。

表1 萨拉米感官评价表

Table 1 The sensory evaluation form of salami

指标	8~10分	5~7分	1~4分
色泽	瘦肉鲜红(枣红或者玫瑰红色),有光泽	肌肉呈暗红色或者咖啡红色,色泽稍淡	肌肉灰暗无色,暗淡无光
组织形态	肠体干燥,表面有自然皱纹,断面组织紧密;无肉眼可见杂质	肠体略有松软感,断面组织偶有开裂或气孔;无肉眼可见杂质	肠体松软无弹性,断组织有水粘液;有肉眼可见杂质
滋味	口感细腻,咀嚼弹性好,酸味均匀	口感略粘,咀嚼弹性不足,酸味能接受	口感很黏,咀嚼性差,过酸或酸味不明显
气味	醇香浓郁而不腻,无异臭、无酸败和哈喇味等	酸味稍淡或刺鼻,无异臭、无酸败和哈喇味等	肠体切片有轻度异臭、酸败和哈喇味等
总体接受度	食欲高	食欲一般	基本无食欲

1.3.8 色差测定

采用色差计进行色差的测定,利用标准白板进行校正。将萨拉米香肠切成薄片,在切片的不同位置测定其L*值(亮度值)、a*值(红度值)、b*值(黄度值),平行测定6次,取其平均值。

1.3.9 质构测定

采用质构剖面分析法(Texture profile analyze,简写TPA)进行萨拉米香肠的硬度、弹性、咀嚼性等指标的测定。将萨拉米香肠切成2 cm×2 cm×2 cm的立方体,探头P/50,测定参数:测前速度2 mm/s,测中速度5 mm/s,测后速度2 mm/s,间隔时间5 s,压缩比50%,触发力5 g,每个样品测6次,取其平均值。

1.3.10 致病菌的测定

按照奚秀秀等^[17]人的方法,利用微生物快速检测

仪BacTrac 4300的直接电阻法检测萨拉米香肠中的多种致病菌,如大肠杆菌、沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌。

1.3.11 统计分析

利用Microsoft Excel 2010建立数据库,采用Origin 8.0软件作图,采用SPSS 17.0统计软件进行方差分析,采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)和Duncan's法进行显著性分析,以 $p < 0.05$ 为显著性差异判断标准,数据以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 脱脂乳对嗜酸乳杆菌冻干存活率的影响

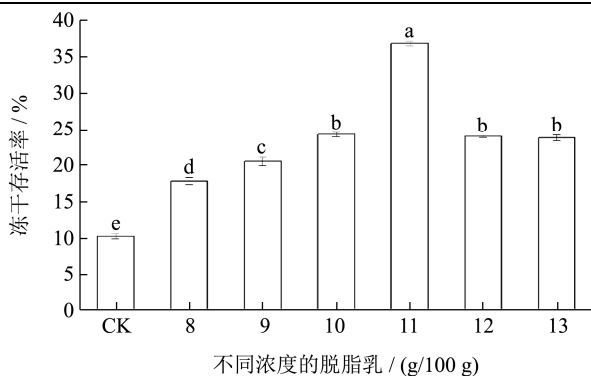


图2 不同浓度的脱脂乳对嗜酸乳杆菌冻干存活率的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of skimmed milk on freeze-dried survival rate of *Lactobacillus acidophilus*

注: 字母 a~e 表示平均数大小间的差异显著, 各平均数凡有一个相同字母的即为差异不显著, 凡无相同字母的即为差异显著 ($p < 0.05$).

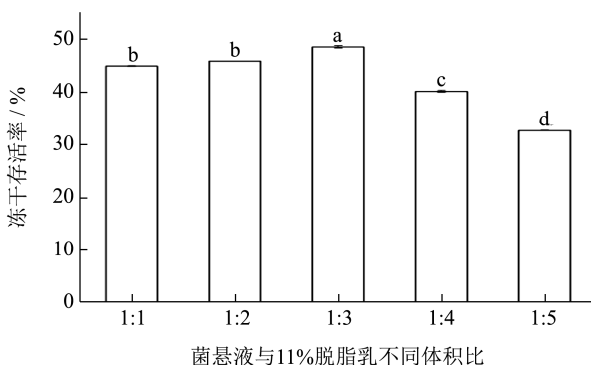


图3 菌悬液和11%脱脂乳不同体积比对嗜酸乳杆菌冻干存活率的影响

Fig.3 Effect of different volume ratios of bacterial suspension and 11% skimmed milk on freeze-drying survival rate of *Lactobacillus acidophilus*

注: 字母 a~d 表示平均数大小间的差异显著, 各平均数凡有一个相同字母的即为差异不显著, 凡无相同字母的即为差异显著 ($p < 0.05$).

由图2可知, 嗜酸乳杆菌冻干存活率随脱脂乳浓度的增加呈先增大后减小的趋势, 这说明添加脱脂乳并增加浓度, 可提高嗜酸乳杆菌的冻干存活率, 因为脱脂乳可作为一种赋形剂和复合型保护剂, 固定冻干酶类, 为菌体提供多孔无定形结构和保护性外膜^[18], 提高了菌体复水性和冻干存活率^[19]; 在11%之后, 脱脂乳浓度过高, 引起的高渗透压导致菌体细胞膜破坏、胞内物质外漏、蛋白质降解等^[20]。因此, 选取11%的脱脂乳为最佳浓度值。

由图3可知, 嗜酸乳杆菌的冻干存活率随脱脂乳体积的增加呈现先后减小的趋势, 这说明增加脱脂乳的量可使脱脂乳充分扩散到菌体中, 在菌体表面形成蛋白膜, 减少菌体暴露在外界的面积, 起到一定得保

护作用; 在1:3之后, 由于菌体表面被脱脂乳完全覆盖, 溶液过于黏稠, 冻干过程中水分挥发较慢^[21], 通过无定型结构加速了菌体细胞内的蛋白质聚集, 破坏了细胞膜等^[22]。因此, 选取菌悬液与脱脂乳1:3时为最佳体积比。

2.2 单一保护剂对嗜酸乳杆菌冻干存活率的影响

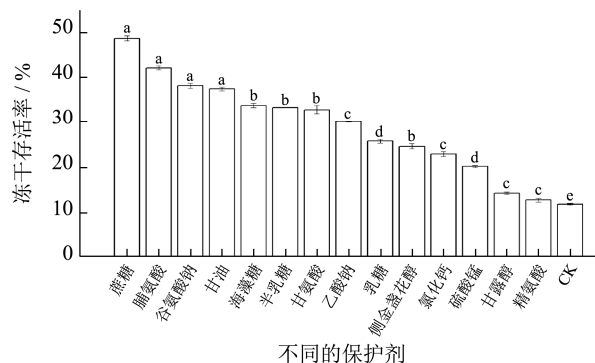


图4 不同保护剂对嗜酸乳杆菌冻干存活率的影响

Fig.4 Effect of different protective agents on freeze-drying survival rate of *Lactobacillus acidophilus*

注: 以上保护剂均以11%脱脂乳为基础保护剂。字母 a~e 表示平均数大小间的差异显著, 各平均数凡有一个相同字母的即为差异不显著, 凡无相同字母的即为差异显著 ($p < 0.05$).

由图4可知, 与对照组11.82%的冻干存活率相比, 一些无机盐类如硫酸锰, 醇类如甘露醇, 氨基酸类如精氨酸等, 菌体冻干存活率与对照组水平相当, 甚至更低, 这可能是因为它们与脱脂乳结合聚团, 造成细胞膜渗透压过高, 引起细胞脱水, 影响了亲水性大分子的性能^[23]。而蔗糖、脯氨酸保护效果极显著, 冻干存活率提高了4倍; 谷氨酸钠、甘油、海藻糖等保护效果较显著, 冻干存活率提高了3倍, 因此可进入下一步复合保护剂的筛选; 因此, 初筛出海藻糖、半乳糖、蔗糖、脯氨酸、甘油和谷氨酸钠六种物质进入下一步的优化试验。

初筛出的六种不同浓度的保护剂对冻干存活率的单因素试验结果如表4所示, 由表2可知, 每种因素对菌体的保护效果均呈现先增加后减少的趋势。只有当复配保护剂中各组分比例和浓度达到协调时, 才会加速水分挥发, 提高冻干存活率, 达到最佳保护效果。通过显著性分析发现, 各保护剂的最佳添加量分别为: 海藻糖 4 g/100 mL, 半乳糖 4 g/100 mL, 蔗糖 12 g/100 mL, 脯氨酸 2 g/100 mL, 甘油 4 g/100 mL, 谷氨酸钠 4 g/100 mL。

表 2 六种保护剂的单因素试验结果

Table 2 Single factor experiment results of six protective agents

因素	添加量/(g/100 mL)	冻干存活率/%
海藻糖	0	45.82±1.06 ^e
	4	69.06±0.23 ^a
	8	57.32±0.40 ^b
	12	55.73±0.59 ^c
	16	54.06±0.57 ^d
	20	30.64±0.59 ^f
蔗糖	0	45.82±1.06 ^d
	4	50.79±0.53 ^b
	8	51.28±1.22 ^b
	12	69.83±1.15 ^a
	16	48.04±0.46 ^c
	20	46.62±1.27 ^{cd}
甘油	0	45.82±1.06 ^f
	2	50.35±1.59 ^e
	4	56.09±1.61 ^b
	6	52.56±0.87 ^d
	8	56.26±1.07 ^a
	10	54.64±1.33 ^c
半乳糖	0	45.82±1.06 ^d
	2	51.30±1.23 ^b
	4	59.35±0.88 ^a
	6	50.26±0.83 ^{bc}
	8	49.11±0.24 ^c
	10	46.59±0.63 ^d
脯氨酸	0	45.82±1.06 ⁱ
	2	67.94±0.88 ^a
	4	58.52±0.67 ^b
	6	49.23±0.54 ^c
	8	48.58±0.66 ^c
	10	48.33±0.75 ^c
谷氨酸钠	0	45.82±1.06 ^e
	2	52.19±0.91 ^d
	4	64.45±0.59 ^a
	6	61.39±0.69 ^b
	8	60.81±0.86 ^b
	10	58.69±1.05 ^c

注：以上保护剂均以 11%脱脂乳为基础保护剂。字母 a~f 表示平均数大小间的差异显著，各平均数凡有一个相同字母的即为差异不显著，凡无相同字母的即为差异显著 ($p<0.05$)。

2.3 六因素二水平试验

根据 2.2 的试验结果，以嗜酸乳杆菌冻干存活率

R/%为指标，对六因素分别设置高、低两个水平，因素水平见表 3，共进行 16 次试验，以确定每个因素的贡献率，试验结果见表 4。

表 3 六种物质的因素水平表 (g/100 mL)

Table 3 Factor levels of six substances (g/100 mL)

水平	海藻糖 A	半乳糖 B	蔗糖 C	脯氨酸 D	甘油 E	谷氨酸钠 F
-1	2	2	10	1	8	2
+1	6	6	14	4	12	6

表 4 六因素二水平试验结果

Table 4 Six factors and two levels experiment results (N=16)

序号	A	B	C	D	E	F	R/%
1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	70.39±0.44
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1	49.41±0.53
3	-1	+1	+1	+1	-1	+1	57.27±0.41
4	-1	+1	+1	-1	-1	-1	48.43±0.58
5	-1	+1	-1	+1	+1	-1	47.02±0.11
6	-1	-1	+1	-1	+1	+1	51.37±0.63
7	+1	+1	-1	-1	-1	+1	54.52±0.57
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	46.93±0.12
9	+1	+1	-1	+1	-1	-1	47.68±0.75
10	-1	-1	+1	+1	+1	-1	46.05±0.80
11	+1	+1	+1	+1	+1	+1	53.39±0.57
12	+1	-1	-1	+1	+1	+1	45.34±0.57
13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	65.54±0.83
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	48.46±0.70
15	+1	-1	+1	-1	-1	+1	59.69±0.51
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	52.33±0.62

注：以上保护剂均以 11%脱脂乳为基础保护剂，数据表示形式为平均值±标准差。

表 5 偏回归系数及影响因子的显著性分析

Table 5 Significant analysis of partial regression coefficient and its influencing factors

因素	偏回归系数	影响水平	贡献率/%	显著性
截距	52.83125		/	*
A 海藻糖	2.184962	4.37	9.62	*
B 半乳糖	-0.224897	-0.45	0.10	
C 蔗糖	-1.364829	-2.73	3.75	
D 脯氨酸	-0.619436	-1.24	0.78	
E 甘油	2.060128	4.12	8.57	*
F 谷氨酸钠	4.448623	8.90	39.98	*

注：*差异显著 ($p<0.05$)。

六因素二水平试验结果如表 4 所示，通过 Design Expert 8.0.6 对试验结果进行分析，得到各因素对试验

结果影响的显著性、偏回归系数和贡献率(表5)。

由表5可知,该试验模型显著;由贡献率大小可知,谷氨酸钠的贡献率最大,达到40%,这说明谷氨酸钠添加量的改变可引起冻干存活率较大的变化,这可能是因为谷氨酸钠与水的结合能力极强,可使冻干菌粉保留适量水分,满足菌体生命的最低需求^[24],它还可抑制三酰甘油的氧化和自由基的形成,对细胞膜起到保护作用^[25];其次是海藻糖,海藻糖易与细胞膜蛋白质的亲水基团结合,保持蛋白质结构稳定,抑制冰晶形成,避免了细胞膜损伤、蛋白质失活^[26,27];最后是甘油,甘油可渗透到菌体内部,增强菌体与水的结合能力,减少游离水的含量^[21],增加溶液粘性,形成较细小的冰晶带,达到保护菌体的目的。

根据表5偏回归系数正负相关可知,半乳糖、蔗糖、脯氨酸三种物质对菌体冻干存活率存在负效应,因此,选取海藻糖、甘油、谷氨酸钠进一步优化。

2.4 最陡爬坡试验

在2.3的基础上,选定合适方向和步长,优化复合保护剂的精确点,最陡爬坡试验结果见表6。

表6 最陡爬坡试验设计表及结果(g/100 mL)

Table 6 Steepest ascent experiment design table and results

(g/100 mL)				
组别	海藻糖	甘油	谷氨酸钠	冻干存活率/%
1	2	8	2	57.44±0.81 ^d
2	3	9	3	76.01±0.84 ^a
3	4	10	4	70.49±0.71 ^b
4	5	11	5	62.65±1.11 ^c
5	6	12	6	61.19±1.41 ^c

注:以上保护剂均以11%脱脂乳为基础保护剂。字母a~d表示平均数大小间的差异显著,各平均数凡有一个相同字母的即为差异不显著,凡无相同字母的即为差异显著($p<0.05$)。

由表6可以看出,当三种物质浓度逐渐增大时,嗜酸乳杆菌的冻干存活率呈现先增大后减小的趋势,在第2组冻干存活率最大,可达到76.01%,所以选取第2组的添加量作为下一步响应面试验的中心点,即选取海藻糖3 g/100 mL,甘油9 g/100 mL,谷氨酸钠3 g/100 mL为试验点,进行下步试验。

2.5 响应面优化冻干复合保护剂

在2.4的基础上,利用中心组合设计原理进行响应面分析,变量及因素水平见表7,响应面试验设计表及结果见表8,试验结果方差分析见表9。

根据表8,以冻干存活率R为因变量,以海藻糖A,甘油B、谷氨酸钠C为自变量,通过Design Expert

8.0.6 软件得二次多项回归方程为:

$$R=73.50-0.84\times A-1.84\times B+4.48\times C+5.07\times A\times B-3.71\times A\times C+6.71\times B\times C-4.34\times A^2-0.82\times B^2-0.80\times C^2。$$

表7 响应面试验变量及其水平表(g/100 mL)

Table 7 Table of variables and levels in response surface

methodology (g/100 mL)			
水平	海藻糖	甘油	谷氨酸钠
-1	2.5	8.5	2.5
0	3	9	3
+1	3.5	9.5	3.5

表8 响应面试验设计表及结果(g/100 mL)

Table 8 The design form and results of response surface

methodology (g/100 mL)				
序号	海藻糖	甘油	谷氨酸钠	冻干存活率/%
1	0	-1	+1	71.27
2	+1	0	+1	66.93
3	0	0	0	73.12
4	+1	-1	0	65.84
5	-1	+1	0	60.69
6	-1	-1	0	75.25
7	-1	0	-1	62.37
8	0	0	0	74.49
9	0	+1	-1	59.06
10	0	0	0	73.82
11	0	+1	+1	81.75
12	+1	+1	0	71.56
13	0	0	0	71.48
14	+1	0	-1	65.71
15	-1	0	+1	78.42
16	0	-1	-1	75.43
17	0	0	0	74.61

注:以上保护剂均以11%脱脂乳为基础保护剂。

由表9可知,模型的 $p<0.05$,表明该模型显著,即试验方案具有可靠性;失拟项 $p=0.1879>0.05$,表明不存在失拟因素,回归方程具有较好的拟合性。其中,在一次项中,B和C对冻干存活率的影响达显著水平;在交互项中,BC达到极显著水平;在二次项中, A^2 对冻干存活率的影响达显著水平;又由于三因素的p值分别为 $p_1=0.1980$, $p_2=0.0166$, $p_3=0.0001$,所以,各因素对冻干存活率的影响程度依次为:谷氨酸钠>甘油>海藻糖。模型的 $R^2\text{Adj}=0.9308$,说明该模型能较好地描述93.08%的响应值结果,可较好地描述各因素对冻干存活率的影响。

根据软件分析可知,当海藻糖为3.03 g/100 mL,甘油为9.50 g/100 mL,谷氨酸钠为3.50 g/100 mL时,

嗜酸乳杆菌冻干存活率高达 81.24%，在此条件下重复 3 次实验，嗜酸乳杆菌冻干存活率为 81.24%±0.04%，

与理论预测值基本一致(相差百分比不超过 1%)，说明模型的预测值能较好地反映冻干存活率的实际值。

表 9 响应面试验结果及方差分析

Table 9 The results of response surface experiment and variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	620.13	9	68.90	24.90	0.0002	显著
A-海藻糖	5.59	1	5.59	2.02	0.1980	
B-甘油	27.12	1	27.12	9.80	0.0166	*
C-谷氨酸钠	160.20	1	160.20	57.90	0.0001	*
AB	102.82	1	102.82	37.16	0.0005	*
AC	54.98	1	54.98	19.87	0.0029	*
BC	180.23	1	180.23	65.13	<0.0001	**
A ²	79.47	1	79.47	28.72	0.0011	*
B ²	2.86	1	2.86	1.03	0.3430	
C ²	2.71	1	2.71	0.98	0.3555	
残差	42.68	1	2.77			
失拟项	19.37	1	4.28	2.62	0.1879	不显著
纯误差	12.83	1	1.63			
所有项	639.50	16				
相关系数 (R ²)	0.9697					
校正系数 (R ² Adj)	0.9308					

注: **差异极显著 (p<0.01); *差异显著 (0.01<p<0.05)。

2.6 直投式复合发酵剂的优化

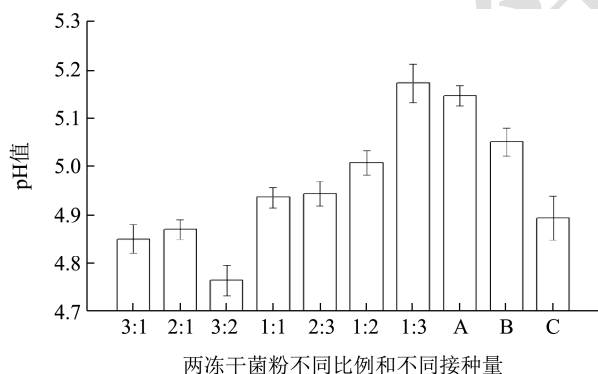


图 5 两冻干菌粉不同比例和不同接种量对 pH 值的影响

Fig.5 Effect of different proportion and inoculation amount of two freeze-dried fungal powder on pH value

注: A: 10⁷ cfu/g; B: 10⁸ cfu/g; C: 10⁹ cfu/g。

当产酸菌嗜酸乳杆菌与产香菌肉糖葡萄球菌以不同比例复合时，产生的 pH 值有所不同，有文献^[28]指出，大多数人能接受的 pH 为≥5.0；不同接种量的发酵香肠产酸速度也不同，接种量越大，产酸速度越快，接种量越小，产酸速度越慢；虽 pH 都能降到 5.3 以下，但产酸速度过快，香肠口感较酸，不易被接受；产酸速度过慢，香肠的安全性得不到保证，两冻干菌粉不同比例和不同接种量对 pH 值的影响如图 5，两冻干菌

粉不同比例和不同接种量的感官评价如图 6。

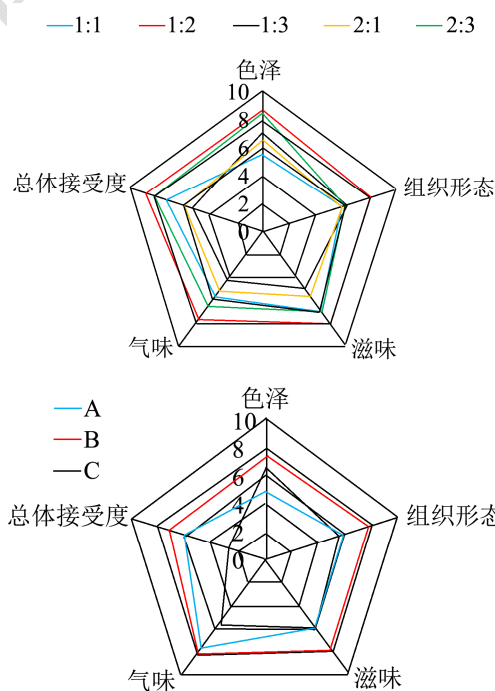


图 6 两冻干菌粉不同比例和不同接种量的感官评价

Fig.6 The sensory evaluation of different proportion and inoculation amount of two freeze-dried fungal powder

注: A: 10⁷ cfu/g; B: 10⁸ cfu/g; C: 10⁹ cfu/g。

由图 5 可知，当嗜酸乳杆菌与肉糖葡萄球菌的冻

干菌粉比例为1:2和1:3;接种量为 10^7 cfu/g和 10^8 cfu/g时, pH值均 ≥ 5.0 ,均符合标准,1:1和2:1酸味较淡或没有酸味,比例为3:1和3:2、接种量为 10^9 cfu/g组酸味刺鼻,比较不能引起人们的食欲;综上,选取以下比例1:2和1:3,接种量 10^7 cfu/g和 10^8 cfu/g组,作下一步感官评价。

由图6可以看出,当比例为1:2时,萨拉米的色泽、组织形态、滋味和总体接受度的得分均高于1:3组,所以选取1:2为两冻干菌粉最佳复合比例;当接种量为 10^8 cfu/g时,萨拉米的色泽、组织形态、滋味和总体接受度的得分均高于 10^7 cfu/g组,所以选取 10^8 cfu/g为直投式复合发酵剂的最佳接种量。

2.7 直投式复合发酵剂的应用

将嗜酸乳杆菌与肉糖葡萄球菌的冻干菌粉以1:2的比例复合,并按 10^8 cfu/g的接种量应用于萨拉米中,以不加发酵剂为对照组,按照相同的生产工艺和配方制作萨拉米,14 d以后测定相关指标,结果见表10。

表10 萨拉米相关指标的测定结果

Table 10 The determination results of salami related indicators

分类	指标	对照组	试验组
理化指标	失重率/%	34.20±0.19	34.48±0.44
	蛋白质/%	22.49±0.71	21.92±0.54
	脂肪/%	33.80±1.11	32.84±0.93
	亚硝酸盐 (mg/kg)	9.930±0.77	9.112±0.59
色差	L*	42.55±0.48	41.31±0.36
	a*	12.96±0.09	14.08±0.11
	b*	8.183±0.042	8.040±0.06
质构	硬度	11252.30±64.32	10197.19±182.12
	弹性	0.673±0.02	0.607±0.02
	内聚性	0.657±0.02	0.545±0.02
	咀嚼性	4943.28±66.19	4277.46±97.66
安全指标	致病菌	未检出	未检出

注:数据以平均值±标准差表示。

由表10可知,两组萨拉米失重率均在35%以下,此时萨拉米的生产周期缩短至14 d,相较于传统工艺,大大提高了生产效率;蛋白质和脂肪的试验组均低于对照组,这表明添加了发酵剂的萨拉米在发酵过程中,经过微生物作用,蛋白质、脂肪等生成了相关的产物,如醇类、酸类、酯类等,因为它们才使得萨拉米呈现独特风味,引起人们的食欲;亮度值L*和黄度值b*均低于对照组,亮度值L*下降可能由于在干燥成熟过程中水分含量减少^[29];黄度值b*下降可能由于发酵剂中微生物的生长繁殖代谢过程中产生的抗氧化活性物

质对脂质的氧化起到了一定的抑制作用^[30];红度值a*高于对照组,可能由于嗜酸乳杆菌产生的亚硝酸盐还原酶和乳酸,肉糖葡萄球菌产硝酸还原酶协同作用的结果^[31];硬度、凝聚性和弹性等值越高,萨拉米越难咀嚼,本试验可能是肉糖葡萄球菌的产蛋白酶能力强,提高了萨拉米的嫩度和口感;亚硝酸盐均低于国标30 mg/kg,致病菌未检出,这表明两组萨拉米均符合食品安全卫生标准。

3 结论

3.1 嗜酸乳杆菌最佳冻干保护剂(以11%脱脂乳为基础)配方为:海藻糖3.03 g、甘油9.50 g、谷氨酸钠3.50 g、水100 mL;嗜酸乳杆菌冻干菌粉活菌数达 2.83×10^{10} cfu/g,与其他研究^[1,2,8]相比,本研究制备的嗜酸乳杆菌冻干菌粉成本低、活菌数高。

3.2 嗜酸乳杆菌冻干菌粉与肉糖葡萄球菌冻干菌粉的最佳比例为1:2,直投式发酵剂最佳接种量为 10^8 cfu/g;与对照组相比,生产的萨拉米酸味柔和,色泽、硬度、弹性良好,总接受度最高。

参考文献

- [1] 陈合,王娟,季丽媛,等.接种量对嗜酸乳杆菌和长双歧杆菌发酵羊乳的影响[J].食品科技,2013,38(5):14-17
CHEN He, WANG Juan, JI Li-yuan, et al. Effects of inoculation amount on sheep milk fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* [J]. Food Science and Technology, 2013, 38(5): 14-17
- [2] 郑坚强,司俊玲.提高嗜酸乳杆菌酸乳菌活力的研究[J].食品工业科技,2006,3:86-89
ZHENG Jian-qiang, SI Jun-ling. Research on Improving the activity of *Lactobacillus acidophilus* in *Lactobacillus acidophilus* [J]. Food Industry Science and Technology, 2006, 3: 86-89
- [3] Zhao R, Duan G, Yang T, et al. Purification, characterization and antibacterial mechanism of bacteriocin from *Lactobacillus Acidophilus* XH1 [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 14(6): 989-995
- [4] 杨天佑,段改丽,赵瑞香,等.嗜酸乳杆菌细菌素 Lactobacillin XH1 的生物学特性[J].食品科学,2013,34(17):197-200
YANG Tian-you, DUAN Gai-li, ZHAO Rui-xiang, et al. Biological characteristics of bacteriocin lactobacillin XH1 in *Lactobacillus acidophilus* [J]. Food Science, 2013, 34(17): 197-200
- [5] Affhan S, Dachang W, Xin Y, et al. Lactic acid bacteria orotect human intestinal epithelial cells from *Staphylococcus*

- aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2015, 14(4): 17044-17058
- [6] Bassyouni R H, Nassar M W, Ibrahim Z A, et al. The antimicrobial potential of *Lactobacillus acidophilus* on pathogenic bacteria causing diarrhea [J]. The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents, 2015, 5(1): 1-9
- [7] Ying H, Zheng Y C. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of niemann-pick C1-like 1 in Caco-2 cells [J]. British Journal of Nutrition, 2010, 103(4): 473-478
- [8] 代海兵,王茜,代海平,徐波.嗜酸乳杆菌活菌制剂保护剂及其工艺的研究[J].中国微生态学杂志,2012,24(9):843-847, 849
DAI Hai-bing, WANG Han, DAI Hai-ping, et al. Study on protective agent of *Lactobacillus acidophilus* viable bacteria preparation and its technology [J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(9): 843-847, 849
- [9] 张娜娜,刘洋,俞漪,等.乳酸菌饮料中嗜酸乳杆菌的实时荧光定量 PCR 检测方法[J].食品科学,2019,40(8):27-32
ZHANG Na-na, LIU Yang, YU Yi, et al. Real-time fluorescence quantitative PCR detection method for *Lactobacillus acidophilus* in lactic acid bacteria beverage [J]. Food Science, 2019, 40(8): 27-32
- [10] 何亚婷,曾小群,彭刘杨,等.热休克预处理结合保护剂对嗜酸乳杆菌的冻干保护作用[J].中国食品学报,2018,18(7): 122-128
HE Ya-ting, ZENG Xiao-qun, PENG Liu-yang, et al. Freeze-drying protective effect of heat shock pretreatment combined with protective agent on *Lactobacillus acidophilus* [J]. Chinese Journal of Food, 2018, 18(7): 122-128
- [11] 黄金枝.发酵广式腊肠加工菌种优选及品质变化研究[D].江西农业大学,2015
HUANG Jin-zhi. Study on the optimization of fermented cantonese sausage processing strains and quality changes [D]. Jiangxi Agricultural University, 2015
- [12] 徐宝才,王凤娜,黄俊逸,等.一种复合微生物发酵剂的制备方法及其在发酵肠中的应用[P].江苏:CN108531419A,申请日期:2018-09-14
XU Bao-cai, WANG Feng-na, HUANG Jun-yi, et al. Preparation of a compound microbial starter and its application in fermented intestines [P]. Jiangsu: CN108531419A, application date: 2018-09-14
- [13] 郝倩男,万嗣宝,王凤娜,等.萨拉米香肠发酵菌株肉糖葡萄球菌冻干保护剂的筛选[J].食品科技,2018,43(7):243-249
HAO Qian-nan, WAN Si-bao, WANG Feng-na, et al. Screening of freeze-dried protective agent for *Staphylococcus botrytis* from Salami sausage fermentation strain [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(7): 243-249
- [14] 刘建丽,郭丽娜,张充,等.嗜酸乳杆菌 NX2-6 冻干发酵剂的研究[J].食品工业科技,2014,35(23):154-157
LIU Jian-li, GUO Li-na, ZHANG Chong, et al. Study on *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 lyophilized starter [J]. Food Industry Science and Technology, 2014, 35(23): 154-157
- [15] Baş D, Boyacı I H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 18: 156-158
- [16] 邹冰青,徐宝才,王赞,等.海藻酸钠钙作为猪背膘替代物在萨拉米发酵香肠中的应用[J].食品工业科技,2013,34(1): 290-295,299
ZOU Bing-qing, XU Bao-cai, WANG Yun, et al. Application of calcium alginate as a substitute for pig back fat in salami fermented sausage [J]. Food Industry Science and Technology, 2013, 34(1): 290-295, 299
- [17] 奚秀秀,徐宝才,黄俊逸,等.一种复合发酵剂及其在发酵香肠制品中的应用[P].江苏:CN107083341A,2017-08-22
XI Xiu-xiu, XU Bao-cai, HUANG Jun-yi, et al. A compound starter and its application in fermented sausage products [P]. Jiangsu: CN107083341A, 2017-08-22
- [18] Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, et al. Effect of freeze drying and protectant sonviability of the biocontrol yeast candidasake [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 65(3): 173-182
- [19] 徐致远,刘荣,郭本恒,等.保护剂在乳酸菌冻干过程中的应用[J].乳业科学与技术,2006,4:155-157
XU Zhi-yuan, LIU Rong, GUO Ben-heng, et al. Application of protective agent in freeze-drying of lactic acid bacteria [J]. Dairy Science and Technology, 2006, 4: 155-157
- [20] Huang L J, LU Z, Yuan Y, et al. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. bulgaricus based on response surface methodology [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(1): 55-61
- [21] Lone K, Charlotte U c, Jens R, et al. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate [J]. Cryobiology, 2008, 58(2): 175-180
- [22] Wu S, Leung D, Teonid L, et al. The Formation and mechanism of multimerization in a freeze-dried peptide [J]. International Journal Pharmaceutics, 2000, 200(1): 1-16
- [23] Palmfeldt J, Rådström P, Hahn-Hägerdal B. Optimisation of

- initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis* [J]. *Cryobiology*, 2003, 47(1): 21-29
- [24] Morichi T, Irie R, Yano N. Protective Effect of glutamic acid and related compounds on bacterial cells subjected to freeze-drying [J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2006, 9(2): 149-161
- [25] Połomska X, Wojtatowicz M, Zarowska B, et al. Freeze-drying preservation of yeast adjunct cultures for cheese production [J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2012, 62(3): 143-150
- [26] Patist A, Zoerb H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems [J]. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, 2005, 40(2): 107-113
- [27] Gómez Z, Tymczyszyn E, Antoni G, et al. Action of trehalose on the Preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(6): 1315-1320
- [28] 马汉军. 乳酸发酵中式香肠的菌种及工艺研究[J]. 食品科学, 1997, 8: 25-28
- MA Han-jun. Study on strains and technology of lactic acid fermentation of sausage [J]. *Food Science*, 1997, 8: 25-28
- [29] 潘晓倩, 成晓瑜, 张顺亮, 等. 不同发酵剂对北方风干香肠色泽和风味品质的改良作用[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 81-86
- PAN Xiao-qian, CHENG Xiao-yu, ZHANG Shun-liang, et al. Effects of different fermenters on color and flavor quality of northern dry sausage [J]. *Food Science*, 2015, 36(14): 81-86
- [30] 黄露, 郇延军. 抗氧化型发酵剂对香肠发酵过程中脂肪氧化的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(12): 38-44
- HUANG Lu, XUN Yan-jun. Effect of antioxidant starter on lipid oxidation during sausage fermentation [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2016, 42(12): 38-44
- [31] 王新惠, 李俊霞, 谭茂玲, 等. 复合发酵剂对发酵猪肉干品质的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 165-169
- WANG Xin-hui, LI Jun-xia, TAN Mao-ling, et al. Effect of compound starter on the quality of fermented dried pork [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2015, 36(17): 165-169

(上接第 80 页)

- [23] Wu L, Li X, Hu W, et al. 5-Methoxyl aesculetin abrogates lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing MAPK and AP-1 pathways in RAW 264.7 cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(3): 315-342

(上接第 209 页)

- [24] Tai A, Iomori A, Ito H. Structural evidence for the DPPH radical-scavenging mechanism of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017: S0968089617313020
- 中药材, 2003, 26(4): 301-305
- ZHONG Xiu-ying. Advances in the preparation and determination of pharmaceutical inclusion complex of β -cyclodextrin [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2003, 26 (4): 301-305
- [25] 王瑞红, 张跃进. 维生素 A 包合物的制备与表征观察[J]. 动物医学进展, 2014, 35(4): 93-96
- WANG Rui-hong, ZHANG Yue-jin. Preparation and characterization of Vitamin A inclusion complex [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(4): 93-96
- [26] 冯强, 洪中山, 王晓敏, 等. β -环糊精维生素 E 包合物的制备及光谱学特性的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016, 12: 181-185
- FENG Qiang, HONG Zhong-shan, WANG Xiao-min, et al. Preparation and spectroscopic characterization of vitamin E inclusion compound of β -cyclodextrin [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016, 12: 181-185
- [27] 钟秀英. 药用 β -环糊精包合物制备、检验技术研究进展[J]. 西南军医, 2005, 7(3): 1-3
- SUN Wei-zhang, ZENG Ren-jie, YONG Xiao-lan, et al. Study on preparation and stability of inclusion compound of vitamin E- β -cyclodextrin [J]. *Journal of Military Surgeon in Southwest China*, 2005, 7(3): 1-3
- [29] 杨欣, 姜子涛, 李荣. 柠檬草精油与 β -环糊精及其衍生物包结行为的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 96-100
- YANG Xin, JIANG Zi-tao, LI Rong. Study on the inclusion behavior of lemon grass essential oil with β -cyclodextrin and its derivatives [J]. *Food Science*, 2009, 30(23): 96-100