



秦善,曾宪明,石洁,等. 不同发酵温度下 *Lactiplantibacillus plantarum* JB1 对发酵香肠的控胺效果[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):539-550.
QIN Shan,ZENG Xianming,SHI Jie, et al. Amine-reducing effect of *Lactiplantibacillus plantarum* JB1 inoculated in fermented sausage at different temperatures[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(3):539-550.

不同发酵温度下 *Lactiplantibacillus plantarum* JB1 对发酵香肠的控胺效果

秦善^{1,2},曾宪明^{1,2},石洁^{1,2},芮昕^{1,2},姜梅^{1,2},张秋勤^{1,2*}

(1.南京农业大学三亚研究院,海南 三亚 572025;2.南京农业大学食品科学技术学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]*Lactiplantibacillus plantarum* JB1 源自发酵香肠,具有降解生物胺的潜力,本试验旨在评价该菌株在发酵香肠中的实际应用效果。[方法]将 *L. plantarum* JB1 接种至香肠中,在不同的温度系统(20 °C 和 35 °C)中进行发酵,以不接种菌株自然发酵组为对照组,测定接种、发酵、干燥及贮藏阶段发酵香肠的理化指标、感官品质及生物胺含量。[结果]接种 *L. plantarum* JB1 能快速降低香肠 pH 值至 4.60 左右,有效抑制肠杆菌生长达 10^3 CFU·g⁻¹ 以上,促进蛋白质降解,增加小肽和氨基酸氮含量,有利于产品干燥后形成良好的质构。主发酵温度从 20 °C 提高至 35 °C 有利于发酵香肠蛋白降解与质构提升,但也增加了生物胺含量,对照组总胺含量在干燥和贮藏阶段分别增加 14.45 和 57.01 mg·kg⁻¹。与对照组相比,接种 *L. plantarum* JB1 对香肠中 8 种生物胺含量均有抑制作用,生物胺总量最高降解 98.26 mg·kg⁻¹,降解率超过 30%。[结论]*L. plantarum* JB1 具有稳定持续的降胺能力,尤其在高温发酵时既能提升产品品质又能有效控制生物胺的含量,可应用于低胺食品的发酵与生产。

关键词:生物胺;发酵香肠;植物乳杆菌;降解

中图分类号:TS251.65

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)03-0539-12

Amine-reducing effect of *Lactiplantibacillus plantarum* JB1 inoculated in fermented sausage at different temperatures

QIN Shan^{1,2}, ZENG Xianming^{1,2}, SHI Jie^{1,2}, RUI Xin^{1,2}, JIANG Mei^{1,2}, ZHANG Qiuqin^{1,2*}

(1.Sanya Institute of Nanjing Agricultural University,Sanya 572025,China;

2.College of Food Science and Technology,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract:[Objectives]*Lactiplantibacillus plantarum* JB1 derived from fermented sausage. It could degrade biogenic amines *in vitro* and the practical application effect of *L. plantarum* JB1 in fermented sausage was further evaluated in this experiment. [Methods]*L. plantarum* JB1 was inoculated into sausages and fermented under different temperature(20 °C and 35 °C),with the spontaneous fermentation group without inoculating strains as a control group. The physicochemical parameters, sensory quality and biogenic amines contents of fermented sausages during inoculation, fermentation, drying and storage stages were measured. [Results] Inoculating *L. plantarum* JB1 could rapidly reduce the pH value of sausage to around 4.60, and effectively inhibit the number of Enterobacteriaceae by more than 10^3 CFU·g⁻¹. In addition,*L. plantarum* JB1 could enhance the degradation of protein,increase the content of small peptide and amino acid nitrogen, and promote the texture formation of products. Increasing the main fermentation temperature from 20 °C to 35 °C was conducive to protein degradation and texture improvement in fermented sausages, but also increased the biogenic amines content. In the control group, the total amines content increased 14.45 and 57.01 mg·kg⁻¹ after drying and storage stages, respectively. Compared with the control group, inoculating *L. plantarum* JB1 inhibited the contents of eight biogenic amines in sausages, and the maximum degradation amount of total biogenic amines was 98.26 mg·kg⁻¹, with a degradation rate of more than 30%. [Conclusions]*L. plantarum* JB1 had stable and continuous amine-decreasing ability, and was less affected by fermentation temperature, which could be used in the fermentation and production of low amine food.

Keywords:biogenic amine; fermented sausage; *Lactiplantibacillus plantarum*; degradation

收稿日期:2023-05-08

基金项目:国家自然科学基金项目(32272350);三亚崖洲湾科技城科技专项资助项目(SCKJ-JYRC-2022-69);江苏省农业科技自主创新资金[CX(22)3189]

*通信作者:张秋勤,副教授,研究方向为食品微生物与生物技术,E-mail:zqq@njau.edu.cn。

生物胺是一类脂肪族、芳香族或杂环类含氮有机化合物。高浓度的生物胺不仅会严重影响食品风味,还会对人体有毒害作用,可以诱发消化系统、循环系统和呼吸系统的多种中毒症状^[1-2]。在食品发酵过程中,蛋白质在酸化和蛋白酶的作用下降解产生丰富的游离氨基酸,后经微生物氨基酸脱羧酶的作用生成生物胺。发酵香肠由于前体物丰富容易积累高水平的生物胺,从而产生安全隐患,危害人体健康,因此控制发酵香肠中生物胺的积累,保障产品安全性已经成了一大行业问题。生物胺一旦产生很难通过物理加工技术去除,目前常采用强化接种产胺阴性或具有降胺能力的菌株的方法从源头上控制生物胺形成,因此,开发和利用生物胺降解菌已成为世界范围内食品安全的研究热点。

一些降胺菌株如乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)和凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase negative staphylococcus, CNS)已被应用在发酵肉制品中^[3]。事实上,降胺菌降低生物胺的效果不仅取决于内源性微生物的存在以及发酵剂的竞争能力,也会受到原料卫生、加工条件等因素的影响^[4],尤其是加工温度对发酵剂降解香肠中生物胺的种类与能力有很大的影响。Gucükoğlu等^[5]在土耳其发酵香肠试验中设置了2个温度(26℃与22℃),发现在较高的成熟温度(26℃)下不同发酵剂对腐胺的降解作用增强,然而,对酪胺的降解没有显著影响。Casquete等^[6]研究了温度(12℃和7℃)对由乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)与卵黄葡萄球菌(*Staphylococcus vitellus*)组成的本地发酵剂的生长和活性的影响,发现较高的发酵温度(12℃)获得了最佳的生物胺降解效果。此外,有些发酵剂也会影响香肠的其他品质,如酸化影响质构特性或产生特殊挥发性物质影响风味^[7-8],因此有必要结合实际加工条件对降胺菌的功能进行综合评价。

本课题组前期已经挖掘到一株具有体外降胺能力且符合肉制品发酵剂要求的乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum* JB1),并从基因与酶学角度探究了其降胺机制。为进一步探究该降胺菌株的实际应用情况,本研究通过模拟现代低温发酵(20℃)和传统的常温发酵(35℃),评估*L. plantarum* JB1在发酵香肠中的降胺效果,旨在为开发应用降胺菌株提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lactiplantibacillus plantarum JB1分离自发酵香肠,保存于南京农业大学食品微生物实验室。发酵香肠猪肉原料购自南京本地菜市场,辅料(盐、蔗糖、白酒、味精)均购自南京某苏果超市。

MRS培养基、结晶紫胆盐琼脂(VRBA)培养基、平板计数琼脂(PCA)培养基均购自青岛海博生物公司。生物胺(组胺、尸胺、酪胺、腐胺、苯乙胺、精胺、亚精胺)标准品购自上海源叶生物科技有限公司,分析纯购自上海麦克林生化科技有限公司。四硼酸钠、十二烷基硫酸钠、邻苯二甲醛、 β -巯基乙醇、甲醛均购自阿拉丁试剂公司。氢氧化钠、氯化钾、磷酸钾、氯化钙、乙二胺四乙酸、酚酞指示剂均购自Adamas公司。

1.2 仪器与设备

PB100手持式匀浆机购自英国Prima公司;Waters-2988高效液相色谱仪购自美国Waters公司;手持式pH计购自上海雷磁仪器有限公司;BSC-250恒温恒湿发酵箱购自上海昂尼仪器仪表有限公司;DHG-9420A干燥箱购自上海和成呈有限公司;EZ TEST质构仪购自日本岛津公司;CR-10便携式色差仪购自日本Konicaminolta公司;SuperNose-14电子鼻购自美国ISENSO公司。

1.3 试验方法

1.3.1 *L. plantarum* JB1基因组分析 *L. plantarum* JB1全基因组测序由武汉贝纳基因公司完成,全基因组序列及注释等相关信息已提交NCBI数据库,其染色体和质粒的序列号为CP097175和CP097180。以通用的16S rRNA序列作为亲缘关系判断,与已知的乳酸菌标准株进行比对,利用MAGA 7.0软件构建系统发育树,采用最大似然法绘制发育树。选择已完成全基因组测序的植物乳杆菌模式菌株WCFS1(NCBI登录号:AL935263)与JDM1(登录号:CP001617)作为参考菌株,利用Orthoven平台(<https://orthoven2.bioinfotoolkits.net/home>)对3株植物乳杆菌进行基因家族聚类,阈值设置为 1×10^{-5} ,通过GO数据库对同源基因进行注释分类。

1.3.2 发酵香肠配方 1)基本配方:原料肉(肥瘦比为2:8)表面涂抹乙醇,灼烧,再将表面部分去除。将其中肥膘温水漂洗后切丁,瘦肉绞碎,与其他调味料(20 g·L⁻¹盐,20 g·L⁻¹蔗糖,0.1 g·L⁻¹亚硝酸钠,2 g·L⁻¹D-异抗坏血酸钠,10 g·L⁻¹白酒,1 g·L⁻¹味精)混合均匀后腌制2 h。2)发酵剂制备:按50 g·L⁻¹接种量活

化 *L. plantarum* JB1, 37 °C、静置培养 24 h, MRS 菌液 (10^8 CFU·mL⁻¹以上) 8 000 r min⁻¹离心 10 min, 将菌液与原料肉按 1:100 比例收集菌体, 生理盐水洗涤 2 次后重悬菌体, 将菌悬液接种至腌制后的原料肉以保证活菌数最低为 10^6 CFU·g⁻¹, 同时以不接菌自然发酵组为对照。

1.3.3 发酵香肠工艺流程 按照表 1 加工条件制备香肠, 在发酵灌肠后的 0、2、4、7、30 d (对应原料、初发酵完成、变温发酵完成、干燥完成成品以及贮藏后各阶段) 分别取样, 预处理后进行相关指标检测。

表 1 发酵香肠的工艺阶段与加工条件

Table 1 The stages and processing conditions of fermented sausage

阶段 Stage	加工条件 Processing conditions	时间/d Time	分组 Groups
接种 Inoculation	$\geq 10^6$ CFU·g ⁻¹	0	0 d-CK 0 d-LP
预发酵 Primary fermentation	20 °C, RH 85%~90%, 2 d	2	2 d-CK 2 d-LP
主发酵 Main fermentation	20 °C/35 °C, RH 85%~90%, 2 d	4	4 d-CK-20 °C 4 d-LP-20 °C 4 d-CK-35 °C 4 d-LP-35 °C
干燥 Drying	50 °C, RH 90%, 3 h; 55 °C, RH 80%, 3 h; 55 °C, RH 60%, 6 h; 50 °C, RH 60%, 18 h; 45 °C, RH 60%, 3 h	7	7 d-CK-20 °C 7 d-LP-20 °C 7 d-CK-35 °C 7 d-LP-35 °C
贮藏 Storage	真空包装, 4 °C 避光 Vacuum packing, 4 °C storage from light	30	30 d-CK-20 °C 30 d-LP-20 °C 30 d-CK-35 °C 30 d-LP-35 °C

注: RH: 相对湿度 Relative humidity; CK: 对照组 Control; LP: 接菌组 Inoculating group. 下同 The same as follows.

1.3.4 发酵香肠含水量与 pH 值测定 1) 含水量: 采用常压干燥法^[9], 取 5 g 样品置于 101~105 °C 干燥箱中加热 2 h, 取出盖好, 置干燥器内冷却 0.5 h, 称量, 重复干燥至前后 2 次质量差不超过 2 mg, 即为恒重。2) pH 值测定: 取 10 g 样品, 90 mL 生理盐水研钵内研碎, 4 °C、20 min 摇匀过滤后用 pH 计测定。

1.3.5 发酵香肠微生物数测定 无菌条件下除去肠衣, 取 20 g 样品剪碎于 180 mL 无菌生理盐水中, 剧烈振荡混匀, 梯度稀释后制成菌悬液, 吸取菌悬液于 PCA 固体培养基上, 30 °C 条件下培养 48 h 后统计细菌总数。吸取菌悬液于 MRS 固体培养基上, 37 °C 条件下培养 48 h 后统计乳酸细菌数。吸取菌悬液于 VRBA 固体培养基上, 30 °C 条件下培养 48 h 后统计肠杆菌数。

1.3.6 发酵香肠可溶性蛋白含量与 SDS-PAGE 测定 参考 Toldrá 等^[10] 的提取方法获得香肠蛋白提取液。1) 可溶性蛋白含量测定: 取上述蛋白提取液与考马斯亮蓝 G-250 染色工作液混合均匀, 室温放置 2 min, 置于分光光度计中测定 D_{595} 值, 以不同浓度的牛血清蛋白为标准物质绘制标准曲线, 计算可溶性蛋白含量 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。2) SDS-PAGE 测定: 蛋白提取液离心后, 取上清液与蛋白电泳缓冲液混合沸水浴 5 min, 在分离胶浓度为 $120\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、浓缩胶浓度为 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、电压 100 V 条件下电泳, 结束后用考马斯亮蓝染色。

1.3.7 发酵香肠小肽与氨基酸态氮含量测定 1) 小肽含量: 取 1.3.6 节中蛋白提取液, 于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 将上清液转移至 Millipore 超滤管中 (相对分子质量 10×10^3 以下), 4 °C、5 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集滤液。收集 50 μL 滤液加入 2 mL 反应液 (100 mmol·L⁻¹ 四硼酸钠, 100 mg·mL⁻¹ 十二烷基硫酸钠, 40 mg·mL⁻¹ 邻苯二甲醛甲醇溶液, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ β -巯基乙醇) 中, 室温下反应 2 min, 在 340 nm 波长条件下测定吸光值, 以不同浓度的胰酪蛋白胨为标准物质绘制标准曲线, 计算肽含量 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。2) 氨基酸态氮含量: 吸取 20 mL 蛋白提取液于 200 mL 烧杯中, 加去离子水 60 mL, 磁力搅拌后加入 10 mL 甲醛溶液, 再用 0.05 mol·L⁻¹ 氢氧化钠标准溶液滴定至 pH9.1~9.3, 记录消耗标准溶液体积; 取 80 mL 去离子水, 同样条件下记录空白消耗体积, 计算氨基酸态氮的含量 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

1.3.8 发酵香肠生物胺含量测定 参考孙霞^[11] 的提取方法并稍作修改, 取 5 g 香肠加入 20 mL 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸, 匀浆后 4 °C、4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 沉淀部分再重新提取一次。取 2 次的上清液用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸定容至 50 mL。样品衍生与测定参考朱霞^[12] 的方法。

1.3.9 发酵香肠色差、质构、电子鼻风味物质测定 1) 色差:将香肠样品切片后切面覆盖聚乙烯薄膜压平,立即用色差计测定样品的 L^* 、 a^* 、 b^* ,重复5次。2) 质构:参考 Herrero 等^[13]的方法有所改动。将香肠样品切成2 cm高的圆柱状,采用 TPA 全质构测定模式。测定参数如下:测前速度 $2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$;测试速度 $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$;测试后速度 $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$;2次下压时间间隔 5.0 s;下压距离为样品高度的 50%;探头类型为 P/50 柱型探头。3) 电子鼻测定:参考 Eklöv 等^[14]的方法,取 5 g 发酵香肠样品于顶空瓶内,用双层保鲜膜密封后在室温放置一段时间,用于电子鼻测定。电子鼻检测参数:样品间隔时间 5 s,采样时间 60 s,清洗时间 100 s,气体流速 $400 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样流速 $200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 *Lactiplantibacillus plantarum* JB1 基因组比较分析

利用益生乳杆菌各菌属中所有模式菌株的 16S rRNA 序列构建系统发育树以对 JB1 的进化关系进行总体分析(图 1-A)。12 个菌属中,JB1 与 *L. plantarum* WCFS1 和 *L. plantarum* JDM1 进化距离最近,16S rRNA 序列相似度分别达到 99.91% 和 99.87%,*L. plantarum* WCFS1 是从人类唾液中分离出来第一个基因组测序较为完备的乳杆菌^[15],*L. plantarum* JDM1 是从商业发酵剂中分离出来具有良好益生特性与发酵特性的乳杆菌^[16],因此这 2 株菌株可以作为基因组比较的参考菌株。

通过 Orthoven 平台对同源基因组氨基酸序列进行同源比对(图 1-B),发现 3 株植物乳杆菌共有基因有 2 533 个,共聚类成 2 523 个家族(Cluster)。通过 GO 数据库对这些 Cluster 进行功能分类(共注释 63.9%),再选取每个分类下数量前七的条目进行分析,结果如图 1-C 所示。植物乳杆菌核心基因组编码蛋白主要定位在质膜上,分子功能包括结合金属离子能力、转录因子调控活性、水解 ATP 与氧化还原活性及膜转运能力等;生化过程涉及翻译、转录、转运、糖代谢、细胞形状调控及抗生素应对等;同时,在 3 株乳酸菌基因组中均发现了一个典型的与 IIb 类细菌素相关的基因簇(JB1:01635-01740;JDM1:0348-0361;WCFS1:0403-0431)。另外,*L. plantarum* JB1 基因组中不含编码生物胺前体氨基酸脱羧酶相关基因,不含经典的入侵型毒力因子与可转移的抗性基因,基因组中还鉴定出与生物胺转运相关基因簇 *PotABCD* (M3L79_01280-01300)、生物胺氧化酶基因 *SufI* (M3L79_01475) 以及与抗逆耐受相关的 13 对双组分系统基因和 1 个响应蛋白单基因。除了与其他 2 株菌共有的基因外,*L. plantarum* JB1 还具有 18 个特异基因,这些基因主要包括一些功能未知的假设蛋白,转录调控因子以及转座元件等。通过基因组比较分析预测出 *L. plantarum* JB1 具有生物胺降解等多种功能基因,这可能是其发挥特性的分子基础。

2.2 发酵香肠水分与 pH 值变化

由图 2-A 可见:香肠 pH 值呈先下降后升高的趋势,整个过程中 LP 组 pH 值始终显著低于 CK 组($P < 0.05$),且发酵温度越高,香肠酸度越大,LP 组 pH 值最低达 4.6 左右。由图 2-B 可见:所有样品的含水量均逐渐下降,干燥阶段和贮藏阶段尤为显著。相同发酵温度下 LP 组样品的含水量低于 CK 组,其中 LP-35 °C 组的含水量最低,干燥阶段和贮藏后含水量分别为 33.26% 与 29.89%。这可能是由于低 pH 值下蛋白质部分发生变性与降解,发酵香肠的保水性因而下降^[11]。由此可见,接种 *L. plantarum* JB1 能快速产生足量的乳酸,降低水分含量,从而有利于产品的品质安全。

2.3 发酵香肠微生物数量变化

发酵香肠制作与贮藏过程中细菌总数、乳酸菌数、肠杆菌数的变化如图 3 所示,结果表明三者变化主要受环境条件影响,在发酵过程中三者数量均上升,干燥后急剧下降,贮藏一段时间后又恢复。不同的是 LP 组中肠杆菌数在香肠制备过程中持续下降,特别是发酵阶段,与 CK 组相比,肠杆菌数显著降低 $10^2 \sim 10^3 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 。此外,LP 组菌落总数与乳酸菌数也显著高于 CK 组,发酵 4 d 后乳酸菌数最高,增加 $10^3 \text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 。因此,接种 *L. plantarum* JB1 能有效增加乳酸菌数而抑制肠杆菌数量,这可能与 *L. plantarum* JB1 快速降低香肠 pH 值以及产生潜在的抑菌物质如细菌素有关^[3]。不仅如此,35 °C 发酵温度可促进发酵过程中乳酸菌和肠杆菌的生长,并且提高二者干燥和贮藏阶段的数量。

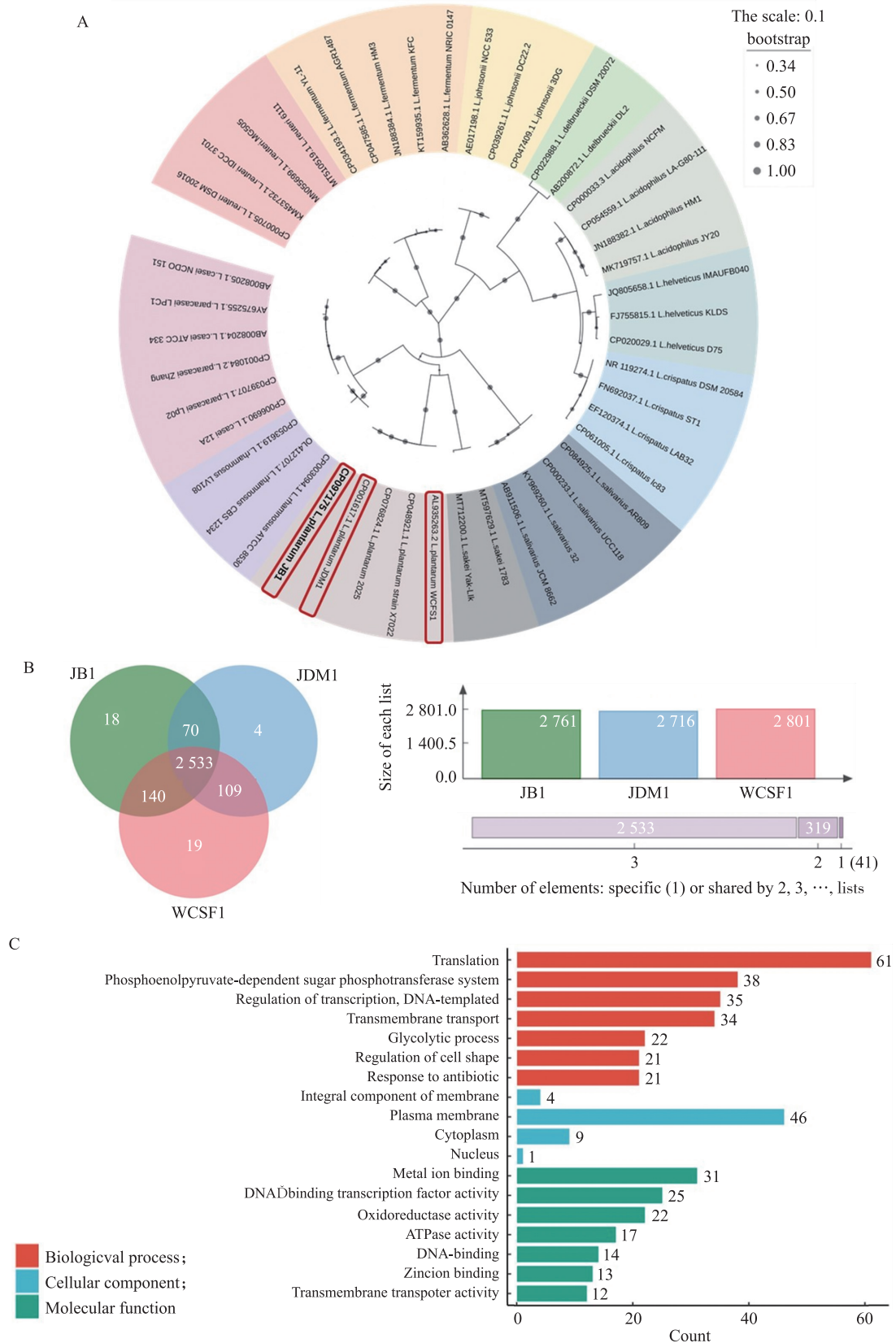


图 1 *Lactiplantibacillus plantarum* JB1 基因组比较分析

Fig. 1 Comparative analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* JB1 genome

A. *L. plantarum* JB1 16S rRNA 系统发育树 (菌株前编号为 NCBI 登录号); B. *L. plantarum* JB1 与 *L. plantarum* JDM1、WCSF1 基因家族聚类; C. 3 株 *L. plantarum* 同源基因 GO 数据库注释分类。

A. 16S rRNA phylogenetic tree of *L. plantarum* JB1 (The number of relevant strains is NCBI accession number.); B. Gene family clustering among *L. plantarum* JB1, JDM1 and WCSF1; C. Annotation classification of homologous genes of three *L. plantarum* in GO database.

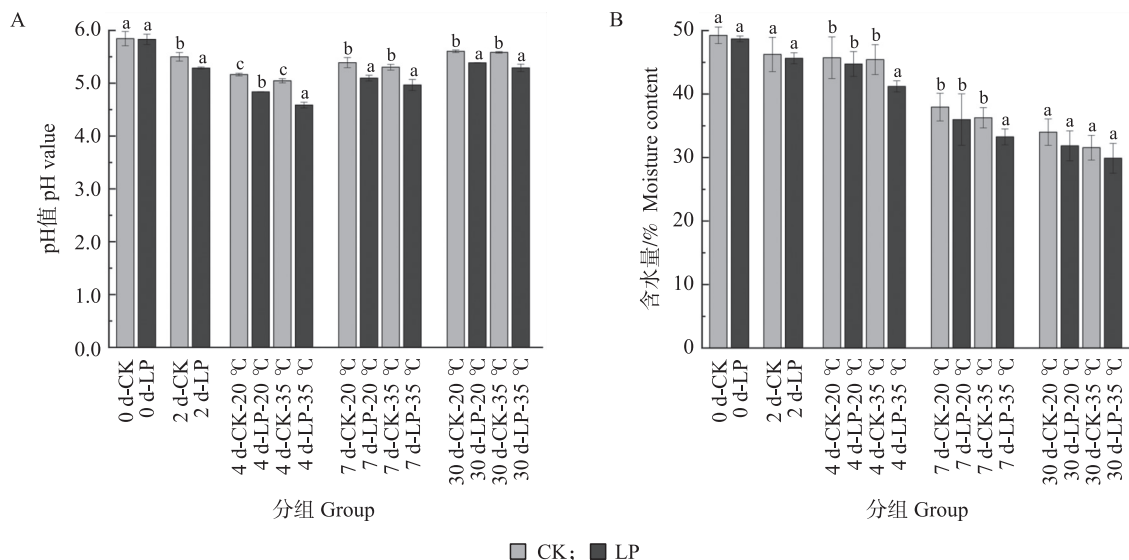


图 2 不同取样阶段发酵香肠 pH 值(A)及含水量(B)变化

Fig. 2 Changes of pH value(A) and moisture content(B) of fermented sausage at different sampling stages

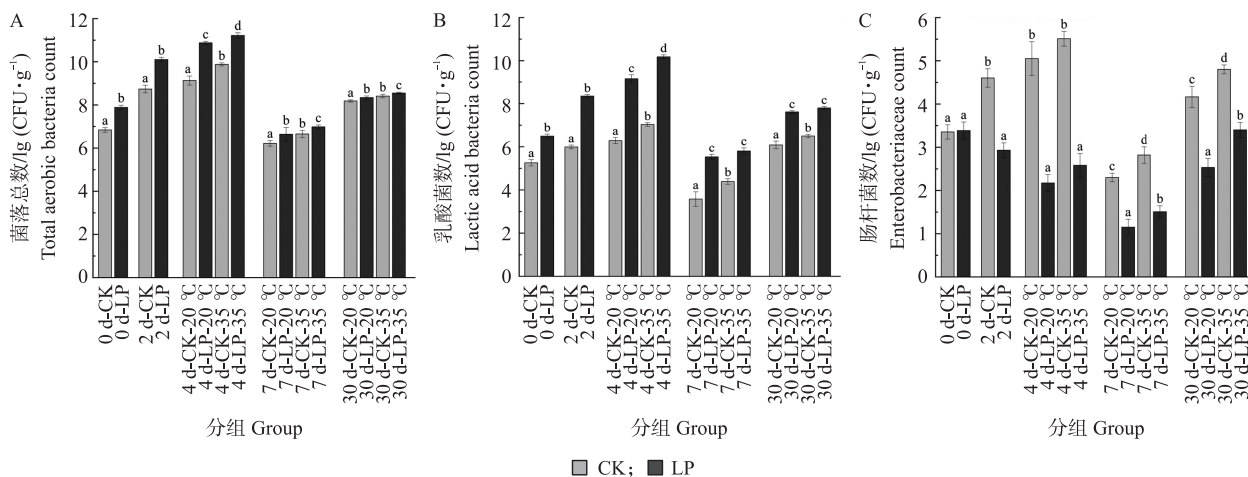


图 3 不同取样阶段发酵香肠微生物数量变化

Fig. 3 Changes of microbial quantity in fermented sausage at different sampling stages

A. 发酵香肠中菌落总数 Total aerobic bacteria counts in fermented sausage; B. 乳酸菌数 Lactic acid bacteria counts; C. 肠杆菌数 Enterobacteriaceae counts.

不同字母表示同一阶段不同组别差异显著($P < 0.05$), 下同。Different letters represent significant difference of different groups at the same stage ($P < 0.05$). The same as follows.

2.4 发酵香肠含氮物质变化

2.4.1 可溶性蛋白含量和蛋白分布 如图 4-A 所示: 发酵香肠中可溶性蛋白含量呈先上升后下降的趋势, 并且受温度影响较大, 20 °C 主发酵温度下可溶性蛋白含量变化不明显, 35 °C 条件下可溶性蛋白含量显著下降。由于 LP 组香肠酸度较低, 蛋白质变性分解更快, LP 组的可溶性蛋白含量显著低于 CK 组。

由图 4-B 可见: 发酵过程中大分子质量蛋白条带强度明显减少且降解为 $(63 \sim 100) \times 10^3$ 以及 $(11 \sim 25) \times 10^3$ 范围内的多条条带, 可能对应相对分子质量为 200×10^3 的肌球蛋白与 45×10^3 的肌动蛋白降解产物^[17]。干燥后 75×10^3 以上以及 $(17 \sim 25) \times 10^3$ 的蛋白条带消失, 肌球蛋白降解为 $(63 \sim 75) \times 10^3$ 的条带, 肌动蛋白降解为 $(35 \sim 48) \times 10^3$ 的条带。贮藏阶段, 蛋白基本降解稳定, 3 条明显条带分布在 $(63 \sim 75) \times 10^3$ 与 $(35 \sim 48) \times 10^3$ 范围内。与 CK 组相比, LP 组蛋白条带变化更明显, 发酵期间大分子条带降解更多, 小分子条带强度更大, 干燥和贮藏阶段蛋白条带更浅, 说明添加 *L. plantarum* JB1 对于发酵香肠中肌肉蛋白与肌球蛋白的降解有显著增强作用。

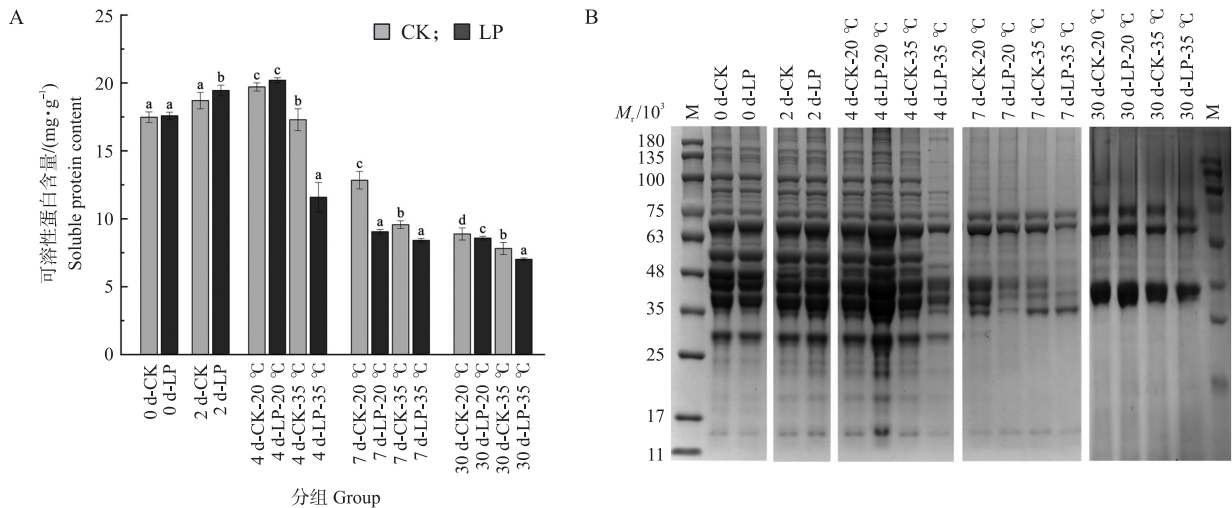


图4 不同取样阶段发酵香肠可溶性蛋白含量及分布变化

Fig. 4 Changes of soluble protein content and distribution in fermented sausage at different sampling stages

A. 发酵香肠中可溶性蛋白含量; B. 发酵香肠中可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳 (M. 蛋白质标准品)。

A. Soluble protein content in fermented sausage; B. SDS-PAGE electrophoresis of soluble protein (M. Protein marker).

2.4.2 小肽和氨基酸态氮含量 如图5所示:小肽(相对分子质量 10×10^3 以下)含量在香肠加工过程中不断升高,贮藏后显著降低,而氨基酸态氮含量在整个过程中持续上升。主发酵温度的提高对于小肽和氨基酸态氮的影响较小,但接种 *L. plantarum* JB1 显著增加了小肽和氨基酸态氮含量,干燥阶段,LP 组小肽含量约为 CK 组 1.4 倍,贮藏阶段,LP 组中氨基酸态氮含量约为 CK 组 1.2 倍。

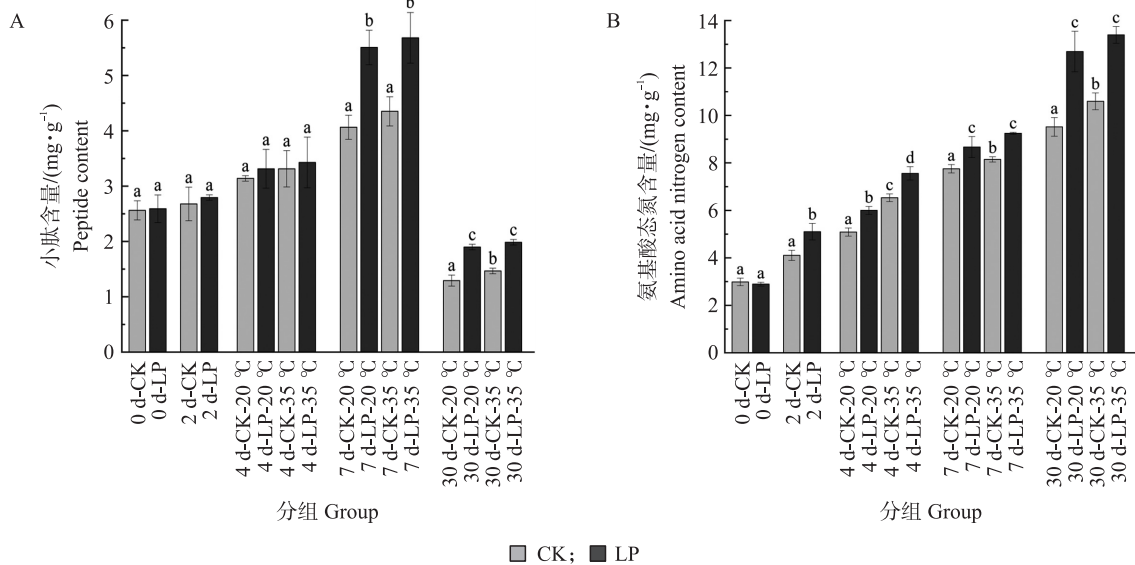


图5 不同取样阶段发酵香肠小肽含量(A)及氨基酸态氮含量(B)变化

Fig. 5 Changes of peptide content (A) and amino acid nitrogen content (B) in fermented sausage at different sampling stages

2.4.3 生物胺含量 由图6-A可见:发酵香肠中生物胺总量随着时间的延长不断上升,随发酵温度提高而增加。0 d 所有样品中总胺含量初始值为 $37.70 \sim 40.83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,在常范围内^[18],经过长时间的贮藏后,总胺含量激增,均超过 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。另外,LP 组生物胺总量始终显著低于 CK 组,干燥后和贮藏后总量分别减少 $39.66 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (20°C)、 $50.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (35°C) 和 $84.88 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (20°C)、 $98.26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (35°C),降解率为 $30.57\% \sim 37.31\%$,表明添加 *L. plantarum* JB1 确实抑制了发酵过程中生物胺的产生,并在货架期贮藏中进一步阻止了生物胺的积累。

图6-B为不同阶段香肠中不同种类生物胺含量变化的热图。由于良好的加工工艺,各生物胺含量最高均不超过 $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。其中酪胺和腐胺含量最高,为香肠中主要的生物胺,两者初始含量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右,30 d 对照组(CK 组)中酪胺含量增加到 $58.49 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (20°C)与 $64.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (35°C),腐胺含量增

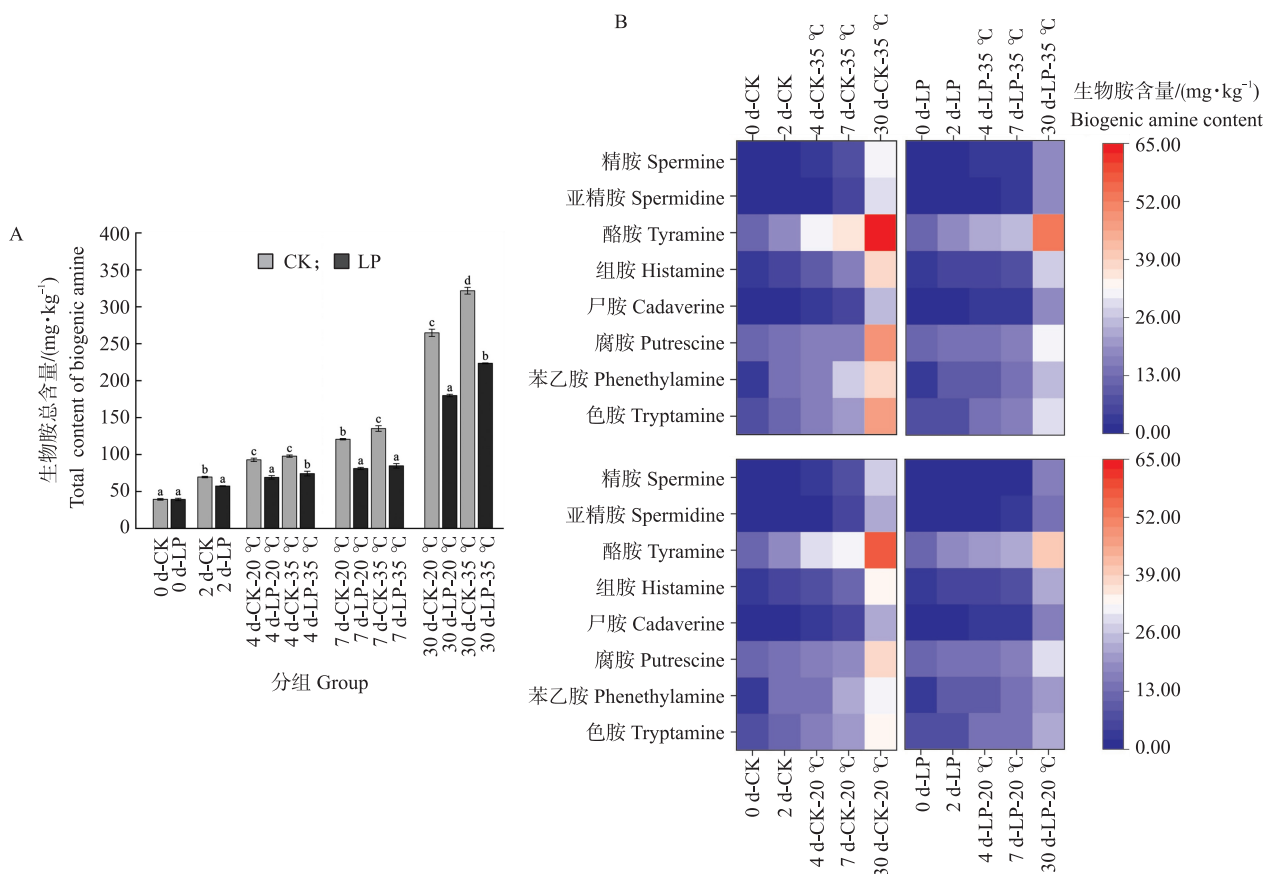


图6 不同取样阶段发酵香肠生物胺含量变化

Fig. 6 Changes of biogenic amine content in fermented sausage at different sampling stages

A. 发酵香肠中生物胺总含量; B. 发酵香肠中各生物胺含量。

A. The total content of biogenic amine in fermented sausage; B. Each biogenic amines content in fermented sausage.

加到 $38.21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 与 $48.72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($35 \text{ }^{\circ}\text{C}$)。发酵香肠中高酪胺和腐胺的生成与许多研究结果一致,并且这一点可归因于发酵香肠中具有高酪氨酸和鸟氨酸脱羧酶活性的微生物,如肠杆菌^[19-20]。色胺、苯乙胺和组胺含量次之,30 d 含量为 $31.63 \sim 46.79 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。作为香肠中最常见的芳香胺,组胺是所有生物胺中毒性最大的,WHO(2013 年)规定其在鱼中的限量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[21],所有发酵香肠中的组胺在各个阶段含量均低于此限。尸胺、精胺和亚精胺的含量最少,初始含量均低于 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,7 d 时 CK 组中含量均低于 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而 30 d 时含量均低于 $31.89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

与 CK 组相比,LP 组在 7 和 30 d 各生物胺含量均显著低于 CK 组,其中,*L. plantarum* JB1 使香肠中酪胺的降解量最多($17.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),使尸胺的降解量最少($6.37 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。另外,35 $^{\circ}\text{C}$ 发酵温度能够促进生物胺的产生与积累,但在 LP 组中变化不显著($P > 0.05$)。由此可见,*L. plantarum* JB1 的降胺能力较为稳定,受食品品质与工艺条件影响较小。

2.5 发酵香肠感官品质变化

2.5.1 发酵香肠色差变化

图 7 为发酵香肠色差可视化热图。随着时间的延长,香肠的 L^* 值不断降低,相同发酵温度下,LP 组 L^* 值显著低于 CK 组,并且发酵温度越高, L^* 值越低,这可能与水分散失相关^[22]。 a^* 值在香肠制备过程中不断增加,贮藏后又降低,这可能与香肠中亚硝酸盐降解产生二氧化氮而发色有关^[23]。 b^* 值在发酵阶段逐渐增加,贮藏后降低,可能是与脂肪的氧化与蛋白变性有关。CK 组与 LP 组 a^* 值与 b^* 值差异不显著,但发酵温度提高使 LP 组香肠的 a^* 值显著升高。

2.5.2 发酵香肠质构特性变化

从图 8 可见:不同阶段发酵香肠 4 个基本质构特性指标硬度、弹性和咀嚼性变化趋势一致,在香肠加工过程中逐渐升高,贮藏后均有不同程度的下降,而黏附性随着时间延长而下降。同温度下 LP 组的硬度、弹性、咀嚼性均显著高于 CK 组,黏附性则显著低于 CK 组,主要是因为 LP 组中的含水量更低,pH 值更低,香肠中的蛋白质发生变性及凝胶化,赋予产品较好的质构特性^[24]。感官上来看,LP 组香肠切面表现得更为紧密一点,并且发酵温度越高,香肠的质构特性越好。

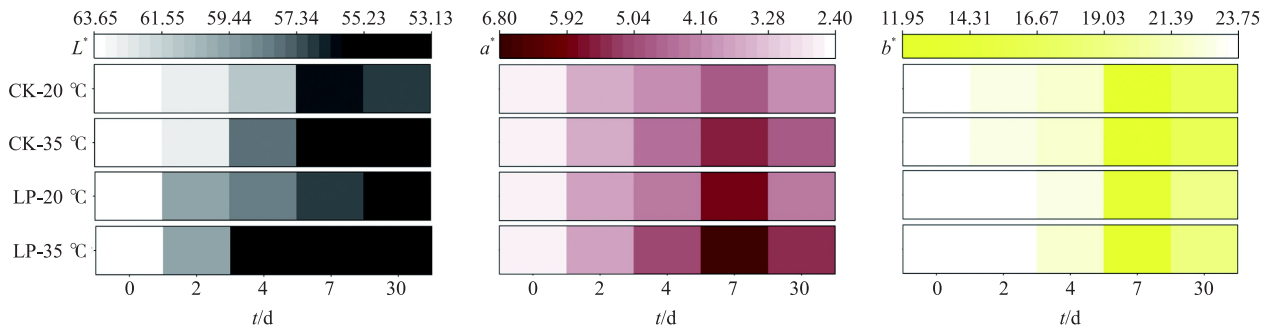


图 7 不同取样阶段发酵香肠色差变化

Fig. 7 Color changes in fermented sausage at different sampling stages

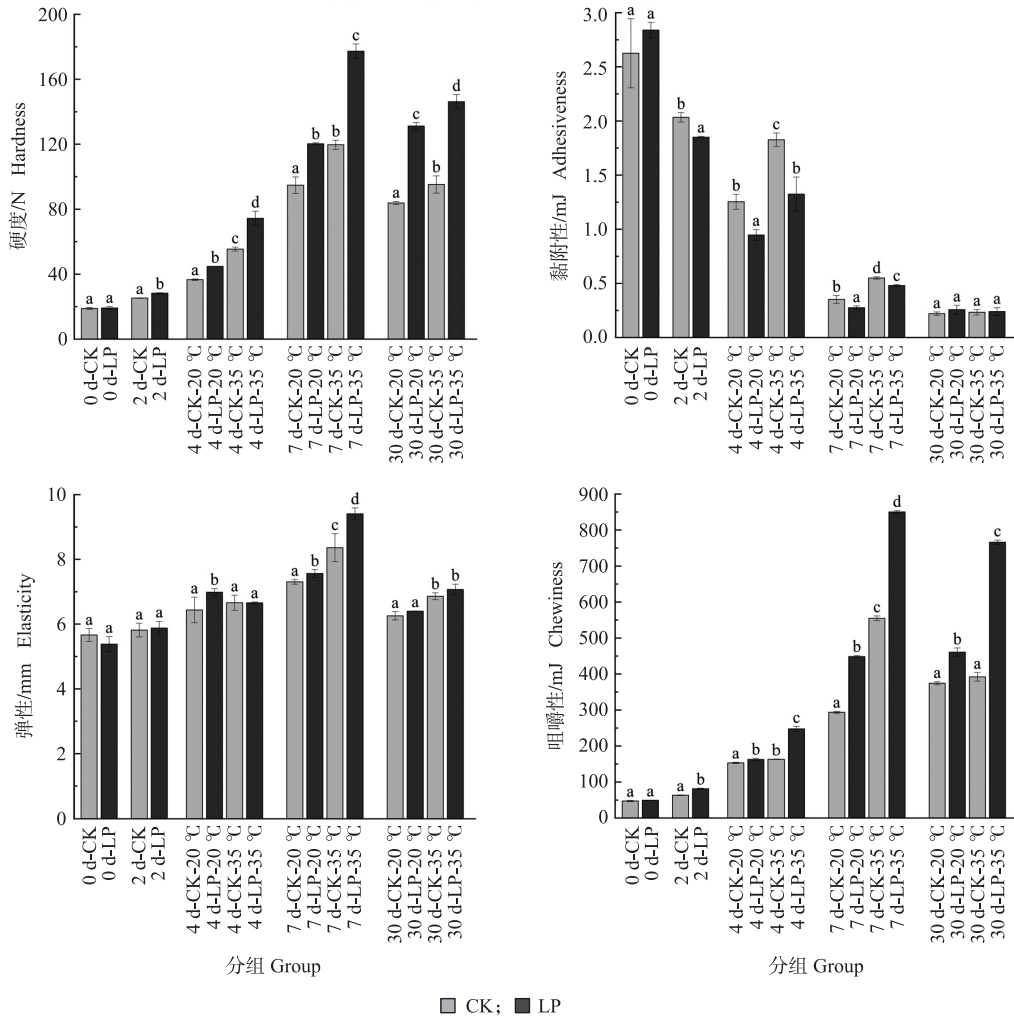


图 8 不同取样阶段发酵香肠质构变化

Fig. 8 Texture changes of fermented sausage at different sampling stages

2.5.3 发酵香肠电子鼻挥发性成分变化 图 9-A 显示了香肠对 10 个电极的响应值与聚类关系。生肉中一般来说没有特殊的味道,但一些含硫成分如硫胺素可能在检测过程中受热挥发出来而被电极捕捉到^[25],因此初始时,LP 组与 CK 组仅 W1W 和 W2W (无机硫化物与有机硫化物)响应值较高。随着发酵的进行,LP 与 CK 各组样品分别聚类,LP 组 W1S (甲基类似物)、W2W、W2S (醇醛类物质)的响应值增加, W1W、W3C (氨基芳香化合物)响应值降低,CK 组 W1W、W2W、W2S 的响应值增加,LP 组与 CK 组的差异性主要表现在 CK 组中产生较高水平的无机硫化物,这可能是由于香肠中肠杆菌分解有机硫化物产生大量的 H₂S^[26]。经过干燥后,LP 组与 CK 组风味类似,W1S、W2W 及 W2S 响应值增加,受该阶段热加工条件影响,含硫蛋白进一步降解,同时脂质的氧化产生甲基类物质,以及还原糖代谢产生醇醛类等^[27]。此外,LP 组中还存在 W1C (芳香化合物)挥发性成分,这说明 *L. plantarum* JB1 可能为产品带来多层次的风

可显著抑制肠杆菌的数量,发酵后与对照相比,数量最高降低了 10^3 CFU·g⁻¹。这一结果与其他植物乳杆菌在香肠中作用类似,植物乳杆菌 LP ZY-40 在 30 °C 下发酵 48 h 对鲢鱼香肠中肠杆菌数量抑制达 10^2 CFU·g⁻¹左右^[30]。由 *L. plantarum* JB1 所引起的香肠酸化还对蛋白质变性降解起到强化作用,这与 Fadda^[17] 等和 Sriphochanart 等^[31] 的研究结果相一致。*L. plantarum* JB1 主要在干燥和贮藏阶段对香肠中生物胺含量降解显著,研究发现其他乳酸菌在发酵香肠中也有降低生物胺的作用,如植物乳杆菌 (*L. plantarum* 7423) 在希腊发酵肠中仅对尸胺降解了 27%^[32];片球菌亚种 (*Pediococcus* subsp. P22) 发酵法式香肠对酪胺、尸胺、腐胺分别降解了 92%、67%、93%^[33];清酒乳杆菌 (*Lactobacillus sake* CTC49) 在意式香肠中降低了 39% 酪胺、29% 组胺、14% 尸胺、57% 腐胺^[34]。由此可见,不同菌株的降胺效果不同,这与菌株自身性质及香肠原料质量、内源性微生物数量、加工工艺和贮藏条件有很大的关系。

发酵香肠的发酵工艺根据地区和产品种类的不同具有很大差异,发酵温度也千差万别。匈牙利生产的萨拉米香肠,发酵温度不到 10 °C;而美国生产的低 pH 值半干香肠发酵温度却高达 40 °C^[35],一些中式香肠也会采用 35 °C 以上的发酵温度^[36-37],并且 35 °C 为 *L. plantarum* JB1 菌株最适生长温度,降胺效果最佳。因此本试验设置了现代低温发酵温度(20 °C)与传统常温发酵温度(35 °C),结果发现提高发酵温度可以促进乳酸菌与肠杆菌等微生物生长,使蛋白质降解与氨基酸游离速率增加,一定程度上提高了感官品质,如质构特性增强、颜色加深;但是适宜的温度(35 °C)也促进生物胺的产生,一方面加快氨基酸前体物质的释放,另一方面促进产胺微生物生长以及氨基酸脱羧酶活性增强^[3,38-39]。接种 *L. plantarum* JB1 的香肠生物胺含量增加幅度较小,并且对于部分生物胺的降解量提高,如腐胺和色胺的降解量从 9.07~10.34 mg·kg⁻¹ 提高到 16 mg·kg⁻¹ 左右。

综上所述,香肠在较高温度发酵能塑造更好的营养及风味,但会产生较高的生物胺,降低产品安全性。*L. plantarum* JB1 在低温(20 °C)和高温(35 °C)都能够有效抑制香肠中生物胺的产生与积累。该菌作为肉制品发酵剂应用于低胺产品的发酵与生产时能对产品的品质和安全提供双重保障。

参考文献 References:

- [1] Ruiz-Capillas C, Jiménez-Colmenero F. Biogenic amines in meat and meat products[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2004, 44(7/8): 489-499.
- [2] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. Food Research International, 1996, 29(7): 675-690.
- [3] Suzzi G, Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(1): 41-54.
- [4] 罗欣,朱燕. 发酵剂微生物及其代谢与发酵香肠的工艺控制[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(3): 67-71.
Luo X, Zhu Y. Metabolism of starter cultures and technological control of fermented sausages[J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(3): 67-71 (in Chinese with English abstract).
- [5] Gücüköglü A, Küplülü Ö. The effect of different starter cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages[J]. European Food Research and Technology, 2010, 230(6): 875-884.
- [6] Casquete R, Benito M J, Martín A, et al. Effect of autochthonous starter cultures in the production of "salchichón", a traditional Iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes[J]. LWT: Food Science and Technology, 2011, 44(7): 1562-1571.
- [7] Ammor M S, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update[J]. Meat Science, 2007, 76(1): 138-146.
- [8] Hammes W P, Hertel C. New developments in meat starter cultures[J]. Meat Science, 1998, 49(S1): S125-S138.
- [9] 中国国家标准化管理委员会. 食品中水分的测定: GB 5009.3—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of water content in food: GB 5009.3-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [10] Toldrá F, Rico E, Flores J. Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems[J]. Biochimie, 1992, 74(3): 291-296.
- [11] 孙霞. 四川香肠中生物胺降解菌的筛选鉴定及其初步应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
Sun X. Screening, identification and preliminary application of biogenic amines degrading bacterium in Sichuan-style sausage[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [12] 朱霞. 黑曲霉胺氧化酶的酶学性质及对生物胺降解特性研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2015.
Zhu X. Enzymatic properties and biodegradation of amine oxidase from *Aspergillus niger*[D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [13] Herrero A M, Ordóñez J A, de Avila R, et al. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics[J]. Meat Science, 2007, 77(3): 331-338.
- [14] Eklöv T, Johansson G, Winqvist F, et al. Monitoring sausage fermentation using an electronic nose[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, 76(4): 525-532.
- [15] Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Proc Natl Acad Sci

- USA,2003,100(4):1990-1995.
- [16] Zhang Z Y,Liu C,Zhu Y Z,et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1[J]. Journal of Bacteriology,2009,191(15):5020-5021.
- [17] Fadda S,Oliver G,Vignolo G. Protein degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a sausage model system[J]. Journal of Food Science,2002,67(3):1179-1183.
- [18] Hernández-Jover T,Izquierdo-Pulido M,Veciana-Nogués M T,et al. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1996,44(9):2710-2715.
- [19] Bover-Cid S,Hugas M,Izquierdo-Pulido M,et al. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages[J]. International Journal of Food Microbiology,2001,66(3):185-189.
- [20] Komprda T,Smělá D,Pechová P,et al. Effect of starter culture,spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages[J]. Meat Science,2004,67(4):607-616.
- [21] World Health Organization. Meeting report:Joint FAO/WHO expert meeting on the public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products[EB/OL]. (2013-11-08)[2023-05-01]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240691919>.
- [22] 谢翀. 应用植物乳杆菌降低发酵香肠中生物胺含量的研究[D]. 南京:南京农业大学,2015.
- Xie C. Study on using *Lactobacillus plantarum* to reduce the content of biogenic amines in the fermented sausage[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University,2015(in Chinese with English abstract).
- [23] Hu Y Y,Li Y J,Li X A,et al. Application of lactic acid bacteria for improving the quality of reduced-salt dry fermented sausage:Texture,color, and flavor profiles[J]. LWT:Food Science and Technology,2022,154:112723.
- [24] 郝红涛,赵改名,柳艳霞,等. 肉类制品的质构特性及其研究进展[J]. 食品与机械,2009,25(3):125-128.
- Hao H T,Zhao G M,Liu Y X,et al. The texture characteristics and advances of meat products[J]. Food and Machinery,2009,25(3):125-128(in Chinese with English abstract).
- [25] Corral S,Leitner E,Siegmund B,et al. Determination of sulfur and nitrogen compounds during the processing of dry fermented sausages and their relation to amino acid generation[J]. Food Chemistry,2016,190:657-664.
- [26] Garriga M,Hugas M,Gou P,et al. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages[J]. International Journal of Food Microbiology,1996,32(1/2):173-183.
- [27] Mottram D S. Flavour formation in meat and meat products:a review[J]. Food Chemistry,1998,62(4):415-424.
- [28] Fu Y H,Cao S Y,Yang L,et al. Flavor formation based on lipid in meat and meat products:a review[J]. Journal of Food Biochemistry,2022,46(12):e14439.
- [29] Sirini N,Munekata P E S,Lorenzo J M,et al. Development of healthier and functional dry fermented sausages:present and future[J]. Foods,2022,11(8):1128.
- [30] Zhang Q L,Lin S L,Nie X H. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum*[J]. Food Control,2013,32(2):496-500.
- [31] Sripichanart W,Skolpap W. Characterization of proteolytic effect of lactic acid bacteria starter cultures on Thai fermented sausages[J]. Food Biotechnology,2010,24(4):293-311.
- [32] Baka A M,Papavergou E J,Pragalaki T,et al. Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages[J]. LWT:Food Science and Technology,2011,44(1):54-61.
- [33] González-Fernández C,Santos E M,Jaime I,et al. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage[J]. Food Microbiology,2003,20(3):275-284.
- [34] Komprda T,Smělá D,Pechová P,et al. Effect of starter culture,spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages[J]. Meat Science,2004,67(4):607-616.
- [35] 马德功,王成忠,于功明. 发酵香肠的研究现状及展望[J]. 山东轻工学院学报(自然科学版),2008,22(1):87-90.
- Ma D G,Wang C Z,Yu G M. The actuality and prospect of studies on fermented sausage[J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry (Natural Science Edition),2008,22(1):87-90(in Chinese with English abstract).
- [36] 田呈瑞,张富新. 中式发酵香肠发酵特性的研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2001,29(2):77-80.
- Tian C R,Zhang F X. On fermenting property for Chinese fermented sausage[J]. Journal of Shaanxi Normal University(Natural Science Edition),2001,29(2):77-80(in Chinese with English abstract).
- [37] 马汉军,杨国堂,周光宏. 不同种类的糖对中式香肠发酵的影响[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):39-41.
- Ma H J,Yang G T,Zhou G H. The effect of different sugars on the fermentation of Chinese-style sausage[J]. Food Research and Development,2006,27(3):39-41(in Chinese with English abstract).
- [38] 孔婧,李梦洋,权鑫,等. 植物乳杆菌 L3 对发酵乳贮藏品质的影响[J]. 东北农业大学学报,2022,53(10):56-66.
- Kong J,Li M Y,Quan X,et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* L3 on storage quality of fermented milk[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2022,53(10):56-66(in Chinese with English abstract).
- [39] Bover-Cid S,Hugas M,Izquierdo-Pulido M,et al. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages[J]. International Journal of Food Microbiology,2001,66(3):185-189.