

云南牛干巴加工过程产生物胺的微生物消长规律

孙 灿¹, 肖 蓉¹, 尹 丰¹, 龚 娜¹, 代佳和², 廖国周^{1,*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘 要: 目的: 分析云南牛干巴加工过程中产生物胺的微生物的消长规律。方法: 采用传统工艺加工牛干巴, 并于腌制前、腌制中期、腌制后期、成熟1个月、成熟2个月及成熟3个月取样, 用选择性培养基对菌落总数和产生物胺微生物: 乳酸菌、假单胞菌属和肠杆菌科细菌进行菌落计数。结果: 菌落总数在加工过程中先增加后减少, 在成熟1个月时达到最大值; 乳酸菌、假单胞菌属和肠杆菌科细菌的数量在加工过程中先增加后减少; 其中假单胞菌属和肠杆菌科细菌的数量在腌制后期达到最大值, 乳酸菌的数量在成熟1个月达到最大值。结论: 从数量上来说, 乳酸菌是牛干巴加工中的优势菌。

关键词: 云南牛干巴; 传统工艺; 产生物胺微生物; 消长规律

Changes in Biogenic Amine-Producing Microorganisms during the Manufacture of Yunnan Dry Cured Beef

SUN Can¹, XIAO Rong¹, YIN Feng¹, GONG Na¹, DAI Jiahe², LIAO Guozhou^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Objective: To understand the patterns of growth and decline of the major biogenic amine-producing microorganisms in the processing of Yunnan dry-cured beef. Method: In the traditional production process, five samples were collected before curing, mid-curing, post-curing, and after one, two and three months of fermentation and ripening, respectively. The numbers of total microorganisms and biogenic amine-producing microorganisms including lactic acid bacteria, *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* were measured by using selective medium. Results: The aerobic plate count first increased to reach the maximum level as observed in the 1-month² fermented sample and then decreased, and the same trend was observed for the counts of lactic acid bacteria, *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae*. The growth of *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* reached their peaks at the later stage of curing, whereas the maximum count of lactic acid bacteria was observed after 1 month of fermentation. Conclusion: Lactic acid bacteria were the dominant bacteria during the processing of dry-cured beef.

Key words: Yunnan dry-cured beef; traditional process; biogenic amine-producing microorganisms; growth and decline

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123 (2015) 04-0006-04

doi: 10.7506/rlyj1001-8123-201504002

云南是一个多民族省份, 多年来各民族由于地域、文化、宗教和传统饮食习惯不同, 逐渐形成了具有典型民族特色的牛肉、牛乳及牛副产品加工产品^[1]。云南牛干巴是以黄牛后腿肉经腌制、晾晒、风干发酵而成的块状自然发酵肉制品。传统的云南牛干巴加工依赖环境中的微生物自然生长来进行发酵, 产品质量不稳定, 腌制发酵过程形成复杂的微生物菌群会产生一些对人体有害的有机化合物, 主要的化合物为生物胺 (biogenic amine, BA)。国内外研究表明, 生物胺普遍存在于蛋白质含量丰富的发酵食品中^[2], 主要由微生物产生的氨基酸脱羧酶脱羧产

生^[3], 一些食品中生物胺的含量还超过美国食品药品监督管理局规定的标准^[4], 已经成为世界范围内潜在的食品安全问题, 引起广泛的关注。

肖蓉等^[5]研究发现, 牛干巴加工过程中成熟中期具有较多的微生物数量, 其中需氧菌 (3×10^5 个/g)、厌氧菌 (1.6×10^5 个/g), 对检出的优势微生物进行分离鉴定, 分属5个属, 分别是微球菌属、假单胞菌属、乳杆菌属、片球菌属与埃希氏菌属, 其中假单胞菌属、片球菌属、肠杆菌属是腌制过程中的自然污染菌。

本研究对产生物胺微生物: 乳酸菌、假单胞菌属以

收稿日期: 2015-01-11

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31360394)

作者简介: 孙灿 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与质量控制。E-mail: 1164175840@qq.com

*通信作者: 廖国周 (1978—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全、肉品加工与质量控制。E-mail: 563321294@qq.com

及肠杆菌科细菌进行了菌落计数。希望通过研究牛干巴加工过程中各工艺点产生物胺微生物的消长情况,进一步阐明云南牛干巴中生物胺形成和累积机制,解决云南牛干巴中生物胺的潜在安全性问题,旨在为云南牛干巴的品质控制提供科学参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

经兽医卫生检验合格的新鲜黄牛后腿肉(剔除筋膜)5块,总质量为25.3 kg,购于云南省昆明市威远街农贸市场。

食盐 市售;PCA琼脂培养基、MRS琼脂培养基、琼脂培养基、VRBGA培养基 北京陆桥有限公司;Pseudomonades琼脂培养基(蛋白胨20 g、无水氯化镁1.4 g、无水硫酸钾1.0 g、琼脂13.6 g、甘油10 mL、蒸馏水1 000 mL) 实验室自制;硝酸钠(0.4 g/kg)、VC(0.01 g/kg)均为食品级。

1.2 仪器与设备

BS110S分析天平 北京赛多利斯天平有限公司;SHP-250生化培养箱 金坛市晶玻实验仪器厂;SPX-150B-Z生化培养箱 常州诺基仪器有限公司;HWS-80智能恒温恒湿箱 上海百典仪器设备有限公司;BPN-80CH CO₂培养箱 上海沪粤明科学仪器有限公司;101-2A电热恒温鼓风干燥箱 上海典颖精密仪器设备有限公司;DSX-280B蒸汽灭菌器 上海申安仪器厂;SW-CF-IFD 单人洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;SW-CJ-2D 双人单面净化工作台 上海博迅实业公司。

1.3 方法

1.3.1 加工工艺^[6]

黄牛后腿肉→冷凉→称质量→擦腌制剂→入坛压实,密封腌制→晾晒→堆码挤压→风干→成品→切片→真空包装

1.3.2 腌制温度与时间

鲜牛肉经冷凉后应及时腌制,按比例称出腌制料,具体方法是用双手在案板上将肉块经揉搓滚动1~2 min,使肉块由硬变软后,撒上腌料,再进行揉搓,重复2~3次(肉源处要多撒腌制料,使之充分腌透)搓揉到肉表面湿润,腌制料基本用完渗入肉块为止。最后在肉缝、刀口和外面再敷上一些腌制料,装入坛子。

腌制牛干巴的温度一般在0~10℃之间,控制在8℃以下。每年寒露节令至立春这段时间,最适合腌制。在此温度条件下,牛肉在坛内腌制为15 d最佳^[7]。

1.3.3 生物胺微生物的测定

对牛干巴在腌制发酵的不同时期即腌制前(腌制第0天)、腌制中期(腌制第7天)、腌制后期(腌制第15天)、成熟1个月、成熟2个月和成熟3个月进行取样,依表1测定方法对菌落总数、乳酸菌、假单胞菌属和肠杆菌科细菌进行培养计数。菌落总数、假单胞菌属、肠杆菌科细菌采用稀释平板法进行计数,而乳酸菌则采用涂布平板法进行计数。结果以lg(CFU/g)表示。根据每次菌落数情况相应的调整稀释度。主要微生物培养分类和条件如表1所示。

表1 产生物胺微生物培养分类和条件
Table 1 Culture conditions for different bacteria

微生物	选择性培养基	温度/℃	时间/h	参考标准
菌落总数	PCA培养基	37	48	GB 47892—2010
乳酸菌	MRS琼脂培养基	37	48	GB 478935—2010
假单胞菌属	Pseudomonades琼脂培养基	25	48	ISO 13720—2010
肠杆菌科	VRBGA琼脂培养基	37	48	SNT 0738—1997

1.4 数据处理

采用SPSS 19.0统计软件进行方差分析,所得数据均为 $\bar{x} \pm s$ 。

2 结果与分析

2.1 云南牛干巴加工过程菌落总数变化

表2 云南牛干巴加工过程的菌落总数
Table 2 Aerobic plate counts in dry-cured beef during processing
lg(CFU/g)

指标	腌制前	腌制中期	腌制后期	成熟1个月	成熟2个月	成熟3个月
菌落总数	4.65±0.46 ^a	5.71±0.21 ^b	6.70±0.12 ^{c*}	6.82±0.25 ^{c*}	5.98±0.36 ^b	4.92±0.49 ^a

注:同行字母不同,表示差异显著($P<0.05$);*.与腌制前相比,差异极显著($P<0.01$)。下同。

由表2可知,从腌制前到成熟1个月,菌落总数呈上升趋势,成熟1个月时达到最大值,为6.82(lg(CFU/g))。这主要与腌制前期原料肉水分含量较高,酸度适中,细菌在适宜的环境下大量生长繁殖有关。从成熟1个月到成熟3个月菌落总数呈下降趋势,主要由于水分蒸发、水分活度下降、乳酸菌产酸、pH值降低以及腌制过程的相对厌氧和高浓度氯离子的毒性等抑制了细菌的生长繁殖^[8]。与腌制前的菌落总数相比,腌制中期和成熟2个月显著升高了22.80%、28.60% ($P<0.05$)。在腌制中期,由于牛肉中含有丰富的适合微生物生长的营养物质,水分含量高,适宜菌的生长,因此在牛肉中的各菌都处于增长的形势^[9];而在成熟2个月,由于干燥失水后牛干巴中缓冲物质(蛋白质)的浓度相应提高,尽管这时电解质的解离会出现一定程度的提高,但最终还是使产品的pH值略微升高,加上乳酸的分解导致pH值回升,水分含量趋于

平衡和稳定，最终导致细菌的大量繁殖。腌制后期和成熟1个月显著升高了44.09%、46.67% ($P < 0.01$)，这说明微生物已经适应了腌制过程的环境，利用牛肉中的营养物质进行自我生长和繁殖，同时一部分微生物进入对数生长期，表现为菌落总数的迅速上升；成熟3个月差异不显著 ($P > 0.05$)，随着贮藏期的延长，牛肉中水分减少，油脂大量析出，pH值和水分活度下降，酸价和过氧化值明显升高，盐浓度增加，不仅抑制了需要高水分活度、不耐酸细菌的生长，游离脂肪酸和过氧化物等也阻碍了细菌的生长，表现为细菌的增长速度减慢，直到菌落总数下降^[10]。

2.2 云南牛干巴加工过程乳酸菌数量变化

表3 云南牛干巴加工过程的乳酸菌数量

Table 3 Lactic acid bacteria counts in dry-cured beef during processing
lg (CFU/g)

指标	腌制前	腌制中期	腌制后期	成熟1个月	成熟2个月	成熟3个月
乳酸菌	4.58±0.19 ^a	5.47±0.10 ^b	6.34±0.17 ^{*c}	6.40±0.06 ^{*c}	5.78±0.18 ^b	4.72±0.17 ^a

由表3可知，从腌制前到成熟1个月，乳酸菌的数量逐渐增加，成熟1个月达到最大值，为6.40 (lg (CFU/g))。腌制过程相对厌氧，为乳酸菌这类异养厌氧菌创造了适宜的生长环境，促其大量生长。乳酸菌在此过程中主要进行同型乳酸发酵，对牛肉中的葡萄糖、糖原等糖类物质进行发酵，最终只产生乳酸；部分进行异型发酵，产生乙醇、乙酸和CO₂。乳酸菌的发酵不断降低牛肉的pH值和氧化还原电位，从而抑制腐败菌和致病菌生长，防止了牛肉的腐败变质，保证产品的食用安全。从成熟1个月开始，乳酸菌呈下降趋势。葛长荣等^[11]研究发现，乳酸菌在肉制品发酵过程中数量达到最大值后趋于下降，这与本实验结果相一致。这可能是由于腌制料中添加的硝酸盐被硝酸盐还原微生物还原为亚硝酸盐，随着亚硝酸盐浓度的不断升高，明显抑制对产生风味化合物或其前体物质有益的微生物的活力。与腌制前的乳酸菌数量相比，腌制中期、成熟2个月显著升高了46.65%、26.20% ($P < 0.05$)，腌制后期、成熟1个月显著升高了38.43%、39.74% ($P < 0.01$)。乳酸菌普遍存在于原料肉中，初始数量很低，在腌制的中期和后期，相对厌氧的腌制环境有利于乳酸菌的生长，一般发酵2~5 d后其菌落数量即可达到10⁶~10⁸ CFU/g；腌制结束后对乳酸菌的生长并未产生影响，风干过程虽然是将牛干巴晾晒于外界空气中，但风吹日晒使牛干巴表面变得坚硬、干燥、致密，阻挡了内部和外界环境的接触，其内部环境仍是相对厌氧的，这对于牛干巴中乳酸菌的生长仍有利。乳酸菌在成熟时可利用碳水化合物产生乳酸，降低肉制品中的pH值，有利于NO₂⁻分解为NO，而NO可与肌红蛋白结合生成亚硝基肌红蛋白，从而最终使肉品具有特有的腌

制颜色。此外在酸性条件下，病原菌和腐败菌的生长得以抑制，大大提高了肉品的安全性。

2.3 云南牛干巴加工过程假单胞菌属数量变化

表4 云南牛干巴加工过程的假单胞菌属数量

Table 4 Pseudomonas count in dry-cured beef during processing

指标	腌制前	腌制中期	腌制后期	成熟1个月	成熟2个月	成熟3个月
假单胞菌属	2.56±0.21 ^a	4.72±0.19 ^{*b}	4.89±0.10 ^{*b}	4.76±0.10 ^{*b}	4.68±0.18 ^{*b}	3.50±0.12 ^a

由表4可知，从腌制前到腌制后期，假单胞菌的数量呈上升趋势，腌制后期达到最大值，为4.89 (lg (CFU/g))。假单胞菌属虽然专性需氧，但是只要1%的氧气就能繁殖，每个假单胞菌生长需要的氧气为9.7×10⁻⁸ L/(细胞·d)，即使周围环境相对厌氧，假单胞菌也能生长，从腌制后期开始，牛干巴进入到干燥成熟阶段，许多情况下，干燥是在相对较早的阶段完成的，而成熟则一直持续到消费阶段。从腌制后期到成熟2个月，假单胞菌的数量明显减少，原因可能是晾晒使温度升高，加之空气流速加快，水分蒸发加快，水分活度下降，氯化钠浓度相应增加，对假单胞菌的生长产生了抑制作用。与腌制前的假单胞菌数量相比，腌制中期、腌制后期、成熟1个月及成熟2个月显著升高了84.38%、91.02%、85.94%、82.81% ($P < 0.01$)，成熟3个月显著升高了36.72% ($P < 0.05$)。由于腌制期正处于寒露节令至立春这段时间，较低温度以及初始成熟阶段的高氧浓度都为假单胞菌属这种需氧嗜冷菌提供了生长动力；而与成熟3个月差异不显著 ($P > 0.05$)，此时昆明的气温已经达到20℃左右，高温会抑制假单胞菌的生长和存活。

2.4 云南牛干巴加工过程产生物胺微生物菌相变化

表5 不同时期产生物胺微生物菌相构成

Table 5 Comparison of the microflora composition at different processing stages

指标	腌制前	腌制中期	腌制后期	成熟1个月	成熟2个月	成熟3个月
乳酸菌	47.66	39.58	41.33	42.50	40.91	44.49
假单胞菌属	26.64	34.15	31.88	31.60	33.12	32.98
肠杆菌科	25.70	26.27	26.79	25.90	25.97	22.53

由表5可知，不同时期产生物胺微生物的构成不同，但乳酸菌在不同时期菌相构成中均占有最高比例，若从数量上来说是云南牛干巴加工过程中的优势菌群。Lvcke^[12]、Hammes^[13]等的研究表明，通常在未加控制的肉制品发酵过程中，乳酸菌是优势的微生物类群，它们具有较高的竞争性和较好的环境适应性。马德功等^[14]研究也表明乳酸菌是自然发酵香肠中的优势菌群，在香肠的发酵、保存、风味形成中发挥了至关重要的作用。肖蓉等^[5]分离了云南牛干巴(腊牛肉)及其卤水中的细菌，得到17株乳杆菌属，占总优势细菌的29.3%。

2.5 云南牛干巴加工过程肠杆菌科细菌数量变化

表 6 不同时期肠杆菌科细菌数量

Table 6 Enterobacteriaceae count in dry-cured beef during processing
lg (CFU/g)

指标	腌制前	腌制中期	腌制后期	成熟1个月	成熟2个月	成熟3个月
肠杆菌科	2.47±0.18 ^a	3.63±0.06 ^b	4.11±0.04 ^{a*}	3.90±0.08 ^{a*}	3.67±0.05 ^b	2.39±0.12 ^a

由表6可知,从腌制前到腌制后期,肠杆菌科细菌的数量增加较为明显,腌制后期达到最大值,为4.11 (lg (CFU/g))。与腌制前的肠杆菌科细菌数相比,腌制中期、成熟2个月显著升高了46.96%、48.58% ($P < 0.05$);腌制后期、成熟1个月显著升高了66.40%、57.89% ($P < 0.01$),从成熟开始,肠杆菌科细菌数量逐渐减少。

牛肉中的初始肠杆菌来自于屠宰和分割以及所使用的器具的污染,腌制过程中丰富的营养物质、充足的水分以及适宜的pH值非常适合肠杆菌科细菌的生长繁殖,从而使得肠杆菌科细菌数量不断增加。随着牛肉风干成熟的开始,乳酸菌大量繁殖,消耗环境中的营养物质,产生大量的乳酸和少量的醋酸,这些有机酸对肠杆菌具有非常重要的抑制作用,另外,低氧、水分含量下降、渗透压(氯化钠)升高、防腐剂(硝酸盐和亚硝酸盐)等栅栏因子的作用最终使肠杆菌在风干成熟过程一直下降^[15]。

肠杆菌科微生物为革兰氏阴性无芽孢杆菌,需氧或兼性厌氧,广泛分布于环境中,即使腌制环境中的氧气浓度较低,肠杆菌科细菌也能生长和繁殖,而进入有氧的成熟阶段,将会更有利于该类细菌的增殖,尤其在较高的温度条件下,其优势地位将更加明显^[16]。腌制前的肠杆菌科细菌数与成熟3个月差异不显著 ($P > 0.05$),原因可能是以下几点:硝酸盐已被还原为亚硝酸盐,而亚硝酸盐会抑制厌氧菌的生长;作为不同时期菌相中优势菌的假单胞菌与肠杆菌科细菌之间也存在一定的竞争关系,阻碍了肠杆菌科细菌的生长;乳酸菌产乳酸使pH值快速下降从而加速了肠杆菌的消亡;乳酸菌产生细菌素,从而抑制肠杆菌的生长^[17]。

3 结论

在云南牛干巴加工过程中,菌落总数先增加,后减少,在成熟1个月达到最大值,最大对数值为6.82;乳酸菌、假单胞菌属和肠杆菌科细菌的数量表现出先增加后减少。假单胞菌和肠杆菌科的细菌数量在腌制后期达到最大值,假单胞菌的最大对数值为4.89,肠杆菌科的最大对数值为4.11;乳酸菌的数量在成熟1个月达到最大值,最大对数值为6.40;乳酸菌为牛干巴加工过程中的优势菌群。

参考文献:

- [1] 葛长荣,田允波,陈韬,等.云南地方民族特色牛系列产品加工[J].黄牛杂志,1998,24(2):71-73.
- [2] 李志军,吴永宁,薛长湖.生物胺与食品安全[J].食品与发酵工业,2004,30(10):84-91.
- [3] HALÁSZ A, BARÁTH Á, SIMON-SARKADI L. Biogenic amines and their production by microorganisms in food[J]. Trends in Food Science and Technology, 1994, 5(2): 42-49.
- [4] KALÁČ P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: a review[J]. Meat Science, 2006, 73(1): 1-11.
- [5] 肖蓉,徐昆龙,刘旭川.云南黄牛干巴(腊牛肉)中细菌的分离与鉴定[J].黄牛杂志,1998,24(3):21-22.
- [6] 肖蓉,徐昆龙,施忠芬,等.辐照牛干巴在贮藏过程中微生物变化的研究[J].食品工业科技,2009(1):286-292.
- [7] 李苗云.冷却猪肉中微生物生态分析及货架期预测模型的研究[D].南京:南京农业大学,2006.
- [8] 徐昆龙,肖蓉.腊牛肉加工中微生物消长规律性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2005(4):73-74.
- [9] 廖倩,卢士玲,李开雄.不同发酵剂发酵香肠中微生物变化和理化变化的研究[J].肉类工业,2007(10):23-26.
- [10] 李燕利.腊肉和香肠贮藏期间品质变化研究[D].重庆:西南大学,2012.
- [11] 葛长荣,马美湖,马长伟,等.肉与肉制品工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2002.
- [12] GEISEN R, LÜCKE F K, KRÖCKEL L. Starter and protective cultures for meat and meat products[J]. Fleischwirtschaft, 1992, 72(6): 894-898.
- [13] HAMMES W, KNAUF H J. Starters in the processing of meat products[J]. Meat Science, 1994, 36(12): 155-168.
- [14] 马德功,王成忠.发酵香肠乳酸菌发酵剂筛选标准[J].肉类研究,2007,21(12):31-33.
- [15] 沈清武.发酵干香肠成熟过程中的菌相变化及发酵剂对产品质量的影响[D].北京:中国农业大学,2004.
- [16] 陈雯钰,卢立新,唐亚丽,等.包装内O₂对冷却肉微生物生长的影响[J].食品与发酵工业,2013,39(5):224-228.
- [17] AYMERICH T, GARRIGA M, MONFORT M J, et al. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins[J]. Food Microbiology, 2000, 17(1): 33-45.