

中国传统酸肉发酵过程中微生物的消长变化*

李宗军^{1**} 江汉湖²

(中国科学院生物物理研究所草原兴发博士后工作站 北京 100101)¹

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)²

摘要: 对我国传统发酵酸肉中的微生物种群进行了研究, 从中分离到大量的米酒乳杆菌、戊糖片球菌、乳酸片球菌、明串珠菌等多种乳酸细菌和德巴利氏酵母、球拟酵母等微生物, 这些微生物在发酵过程中有一个动态的变化。发酵全过程中优势微生物种群是乳酸细菌、微球菌、德巴利氏酵母和球拟酵母, 为高效天然肉品发酵剂的研究与开发提供了生物资源。

关键词: 发酵肉制品, 乳酸细菌, 生态关系

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0009-05

Alteration of Microbes Flora of Chinese Traditional Sour Meat During Fermentation

LI Zong-Jun^{1**} JIANG Han-Hu²

(Caoyuanxingfa Postdoctoral Scientific Research Station, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101)¹

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

Abstract: Microbes flora of Chinese traditional sour meat has been researched in this paper. Large quality of *Lactobacillus sake* was isolated firstly from fermented sour meat. Meanwhile other lactic acid bacteria, such as *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc*, and *Debaryomyces*, *Torulopsis* were also identified. All of them show a dynamic variation during fermentation. During whole fermentation, majority microorganism flora were lactic acid bacteria, *Micrococcus*, *Debaryomyces*, and *Torulopsis*. This investigation will provide bio-resource for studying and exploiting natural meat starters.

Key words: Fermented meat products, Lactic acid bacteria, Eco-relationship

中国传统酸肉, 古时称作“鲊”, 俗称“腌肉”, 是一类有两千多年历史的乳酸细菌型发酵肉制品。目前主要流行于我国湖南、广西、贵州、四川等地, 是侗、苗等少数民族居民生活中的重要肉食产品, 有着丰富的饮食文化内涵。因为是自然发酵的肉制品, 其中含有多钟有益微生物^[1], 是肉类专用发酵剂的重要生物资源, 具有巨大的开发潜力。对中国传统酸肉中的微生物种群及生态关系进行研究, 不仅可以揭示不同微生物对传统酸肉品质的影响, 为传统酸肉的工业化生产控制提供依据, 而且了解发酵肉制品中微生物之间的生态关系, 是构建肉类专用发酵的基础, 对提高发酵肉制品的安全性和品质大有裨益, 同时为高效天然肉品发酵剂的研究与开发提供了可靠的生物资源。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2002AA248041)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA248041)

** 联系人 Tel: 010-64850213, E-mail: lizongjun@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-08-19, 修回日期: 2003-11-08

1 材料与方法

1.1 酸肉的制备

分别在湖南通道、新晃, 广西三江, 贵州黎平以当地地方猪种的鲜肉为原料, 切成 250 g 左右的小块, 用 8% (w/w) 的食盐干腌 2 d, 沥干, 按一定比例拌入炒米及调味料, 揉制均匀后装坛 (1.5 kg/坛), 10℃ ~ 20℃ 密封发酵进行样品的制备, 分别记为 A, B, C, D 4 个处理组。每个处理样品总量为 15 kg (1.5 × 10 坛)。从入坛发酵开始, 发酵 60 d 内每隔 10 d 和成熟 180 d、360 d 时分别从 4 个处理组中随机抽出 1 坛, 进行微生物分析。

1.2 微生物分析

微生物的分离与计数采用稀释平板法, 称取 25.0 g 样品, 加入 225 mL 0.1% 的无菌蛋白胨溶液中, 经组织捣碎机, 低速和高速各均质 30 s, 进行适当稀释备用。用 PCA (Plate Count Agar) 平板 30℃, 72 h 测定菌落总数; MRS (de Man, Rogosa, Sharpe Agar) 30℃, 72 h 测定乳酸细菌; MRS⁺ (改进型 MRS) 即在 MRS 培养基中添加 0.2% (w/v) 的无菌山梨酸钾, 30℃, 72 h 测定乳酸杆菌; VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar) 37℃, 24 h 测定肠菌落总数; SBA (Slanetz and Bartley Agar) 37℃, 24 h 测定肠球菌; MSA (Mannitol Salt Agar) 30℃, 72 h 测定微球菌和葡萄球菌; Baird-Parker Agar 30℃, 48 h 测定病原性葡萄球菌; 改良 PDA (Potato Dextrose Agar) 即加入 0.2% (v/v) 浓度为 10% 的无菌酒石酸, 28℃, 72 h 测定酵母菌及丝状真菌。以上培养基均按 Oxoid 培养基手册 (1990 年版) 进行配制。在 0、20、40、60、180、360 d 的采样日中, 从最高稀释度的 MRS 和 PDA 培养基上随机挑取 10 个菌落, 移接斜面纯化后进行生理生化鉴定, 以观察发酵过程中乳酸细菌和酵母菌在发酵过程中的分布规律。

2 结果与分析

2.1 酸肉发酵过程各主要微生物数量的变化

在发酵前期, 4 个处理组的 PCA 平板上有一定比例的芽孢细菌; 40 d 后, 芽孢细菌明显下降; 60 d 后, 检测不到芽孢细菌。发酵进行到 30 d 时, 4 个处理组中乳酸细菌数量达到最高值, 均在 10⁸ cfu/g 以上, 之后, 其数量有所下降。这可能与微生物生态系中

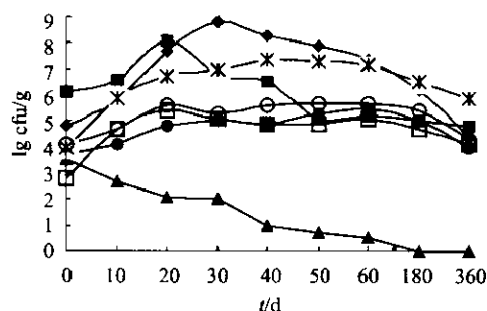


图 1 中国传统酸肉发酵过程中微生物数量的变化趋势

各种群之间的生态效应有关, 如乳酸细菌产生的细菌素可以自行对乳酸菌群数量的消长变化进行调节。而对产品风味和品质改善有重要作用的微球菌和酵母菌的数量, 在发酵过程中一直呈上升趋势, cfu/g 的对数值最终都达到 5.0 以上, 只有在发酵 60 d 后的成熟过程中, 其数量才因营养物质供应不足而呈下降趋势。肠细菌菌落数在发酵 60 d 后, cfu/g 的对数值小于 2.0。

总体来看, 以 4 个不同产地的传统酸肉在发酵的同一时期内各主要微生物数量的平均值

为纵坐标, 发酵时间为横坐标作图 (图 1)。结

果表明：除肠细菌在发酵的全过程中呈下降的趋势外（食盐对其生长有抑制作用），所有的微生物菌群在发酵的前 20d 内均有一个生长繁殖的过程。乳酸细菌在酸肉制品中有重要作用，发酵开始之前，原料中菌落总数要高于其他微生物菌系的数量。当乳酸细菌数量达到最高点时，各类微生物均受到一定程度的影响。其中对菌落总数的影响最为明显，在发酵 22 d 前后，乳酸细菌数量超过其他微生物，之后高浓度的乳酸细菌使菌落总数急剧下降到 5.0 左右，才趋于平衡。乳酸细菌还可在短期内（发酵 20 ~ 30 d）影响微球菌、肠球菌和酵母菌的生长，也影响了芽孢杆菌的生长。酵母菌总数在发酵的全过程中无显著变化。

2.2 酸肉发酵过程中微生物的种群的构成

表 1 综合了传统酸肉发酵过程中主要微生物种群的构成，从表中看出，我国传统酸肉制品中微生物菌系主要由乳酸杆菌、片球菌、葡萄球菌和德巴利氏酵母等构成。发酵 60 d 内自 MRS 培养基上分离的 280 个菌株中，G⁺，H₂O₂ 的菌株 269 个，占 96.1%。其中米酒乳杆菌 101 株，占乳酸细菌的 37.5%；片球菌为 58 株，占乳酸细菌的 21.6%。自 MSA 培养基上得到的 128 个分离物中，葡萄球菌为 101 个，占 78.9%。自 PDA 培养基上获得的 160 个分离物中，德巴利氏酵母和球拟酵母分别为 77 株和 39 株，分别占酵母菌总数的 48.1% 和 24.4%。

表 1 中国传统酸肉中的主要微生物种群及分布

微 生 物	分 布	微 生 物	分 布
乳酸细菌 (LAB)	269	乳酸片球菌 (<i>P. acidilactici</i>)	23/269
乳杆菌	150	链球菌/肠球菌 (<i>Streptococcus</i> and <i>Enterococci</i>)	24/269
米酒乳杆菌 (<i>L. sake</i>)	101/269	MSA 分离物	128
卷曲乳杆菌 (<i>L. crispatus</i>)	11/269	微球菌 (<i>Micrococci</i>)	27/128
弯曲乳杆菌 (<i>L. curvatus</i>)	4/269	葡萄球菌 (<i>S. saprophyticus</i>)	101/128
植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i>)	12/269	酵母菌 (Yeast)	160
双发酵乳杆菌 (<i>L. bifementas</i>)	8/269	德巴利氏酵母 (<i>Debaryomyces</i>)	77/160
耐酸乳杆菌 (<i>L. acetotolerans</i>)	6/269	毕赤酵母 (<i>Pichia</i>)	19/160
干酪乳杆菌 (<i>L. casei</i>)	8/269	假丝酵母 (<i>Candida</i>)	18/160
明串珠菌 (<i>Leuconostoc</i>)	37/269	隐球酵母 (<i>Cryptococcus</i>)	5/160
片球菌 (<i>Pediococci</i>)	58/269	球拟酵母 (<i>Torulopsis</i>)	39/160
小片球菌 (<i>P. parvulus</i>)	4/269	丝孢酵母 (<i>Trichosporon</i>)	2/160
戊糖片球菌 (<i>P. pentosaceus</i>)	31/269		

2.3 酸肉发酵期间乳酸菌系之间的消长变化

在我国传统酸肉发酵过程中，MRS 培养基上非乳酸细菌主要出现在发酵的前 40 d，占非乳酸细菌总数的 85.7%（表 2），说明发酵前期微生物构成复杂，从环境中污染的各类微生物都有一定的适应能力，随着发酵的进行微生物的构成发生了重要的变化；乳酸杆菌、片球菌、明串珠菌和链球菌分别占乳酸细菌总数的 60.0%、17.2%、14.2% 和 8.6%，其中米酒乳杆菌占乳酸细菌总数的 41.6%，是传统酸肉发酵过程中的第一优势菌，在采样日上，其最高峰出现在发酵 60 d 时，且在发酵的全过程中都可以找到它的踪迹（表 2）。在西班牙的“chorizo”，希腊的传统沙拉米（salami）和意大利自然发酵香肠中 *L. sake* 分别占乳酸菌总数的 68.8%^[2]，30.3%^[3] 和 15.6%^[4]。它是发酵香肠中最普通的乳酸细菌。*L. sake* 在适宜的条件下可产生蛋白酶、氨肽酶、二肽酶、三肽酶

及酯酶等多种酶类，它们的综合作用可以赋予发酵香肠良好的风味和质地^[5~7]。

表 2 中国传统酸肉发酵期间乳酸菌群的消长变化

微生物类群	发酵时间 (d)						合计
	0	20	40	60	180	360	
米酒乳杆菌 (<i>L. sake</i>)	3	11	17	26	21	19	97
其他乳杆菌	9	10	7	6	4	7	43
片球菌 (<i>Pediococci</i>)	4	2	5	5	13	11	40
明串珠菌 (<i>Leuconostoc</i>)	14	16	2	0	0	1	33
链球菌 (<i>Streptococcus</i>)	7	0	7	3	1	2	20
合计	37	39	38	40	39	40	233

明串珠菌主要存在于发酵期的前 20 d，其好氧生长，不仅消耗了环境中的氧气；同时因产酸，降低了 pH 值，抑制了好氧和不耐酸微生物的生长，为其它乳酸细菌的生长提供了优良的生存环境，在发酵到第 60 和 180 d 时，明串珠菌已经不存在了，米酒乳杆菌和片球菌占有绝对优势；在我国传统酸肉发酵过程中，乳酸细菌的变化有其自身的变化规律，即发酵前期以明串珠菌为主，发酵后期与成熟期以米酒乳杆菌和片球菌为主，而链球菌在发酵全过程中无显著的变化，其它乳酸杆菌在总量上基本保持稳定。

2.4 酸肉发酵与成熟期间酵母菌的消长变化

我国传统酸肉发酵与成熟过程中，在 PDA 培养基上，没有分离到丝状真菌，酵母菌主要包括德巴利氏酵母、假丝酵母、球拟酵母、毕赤酵母、隐球酵母和丝孢酵母等种属，在发酵与成熟的全过程中酵母菌总数变化相对于其它菌系的微生物而言，变化不大。从 PDA 培养基上随机挑取的菌落中，德巴利氏酵母和球拟酵母是优势菌群，分别占酵母菌总数的 40.0% 和 24.6%，丝孢酵母和隐球酵母数量较少，仅占酵母菌总数的 3.0% 和 12.5% (表 3)。

表 3 中国传统酸肉发酵期间酵母菌的消化变化

微生物类群	发酵时间 (d)						合计
	0	20	40	60	180	360	
德巴利氏酵母	13	18	29	28	3	5	96
假丝酵母	1	2	1	4	19	6	33
球拟酵母	1	1	7	8	15	27	59
毕赤酵母	12	15	3	0	2	1	33
隐球酵母	7	3	0	0	1	1	12
丝孢酵母	6	1	0	0	0	0	7
合计	40	40	40	40	40	40	240

表 3 的结果表明：我国传统酸肉发酵与成熟过程中，德巴利氏酵母与毕赤酵母主要分布在发酵前期。发酵前 60d，德巴利氏酵母占酵母菌总数的 36.7%，占发酵与成熟过程中德巴利氏酵母总数的 91.7%。球拟酵母和假丝酵母则主要出现在侗族发酵酸肉的成熟期内，在成熟的后 180d 内，球拟酵母和假丝酵母占酵母菌总数的 28.0%，球拟酵母和假丝酵母分别占各自总数的 54.2% 和 75.8%。在我国传统酸肉的成熟期内出现大量球拟酵母，为产品酱香的形成找到了有力的证据。

3 讨论

随着发酵进程的推进,各优势菌也在交替出现,它们之间互为关联(图2)。发酵20 d内,环境中营养丰富,条件适宜,各种微生物都能得到生长繁殖的机会,明串珠菌生长迅速,环境中的pH急剧下降,微生物的竞争生长,氧气消耗殆尽,之后,厌气性和兼性厌气性微生物成为优势菌。随着pH值的下降,不耐酸的微生物得到抑制,乳酸杆菌迅速崛起,肠细菌及其它一些革兰氏阴性的腐败和病原微生物得到抑制。微球菌分解蛋白质,产生游离氨基酸,为乳酸细菌的生长提供了营养因子,乳酸细菌生长积累的有机酸可以成为多种酵母菌(如德巴利氏酵母)生长的碳源和能源物质,从而在一定时期内将pH值维持在稳定的范围内,为乳酸菌和微球菌的生长提供比较稳定的生存环境。此时,微生物由种群之间的生存竞争,逐步过渡到种群内部,乳酸细菌中米酒乳杆菌和乳酸片球菌能产生广谱细菌素,从竞争中取得有利地位,在中国传统酸肉后期发酵与成熟过程中成为优势菌群,腐败、病原微生物好氧微生物米酒乳杆菌始终保持优势菌的较高水平,为pH主发酵菌。德巴利氏酵母和球拟酵母可以以有机酸为生长的碳源和能源,并具有较高的食盐耐受能力,当环境中可发酵性糖缺乏时,它们从竞争中脱颖而出,成为优势菌群。在中国传统酸肉发酵过程中,微球菌、乳酸细菌和酵母菌之间形成了良好的互惠共生生态关系,这也正是优质生物发酵剂所应具备的条件之一。

图2 中国传统酸肉中微生物之间的生态关系

4 结论

中国传统酸肉发酵过程中的优势微生物是明串珠菌、葡萄球菌、米酒乳杆菌和球拟酵母,主发酵菌前期是明串珠菌,中后期是米酒乳杆菌,球拟酵母和德巴利氏酵母,它们之间存在一个动态关系。揭示我国传统酸肉发酵过程中微生物的生态关系,为高效肉类专用发酵剂的筛选提供了依据,对提高我国发酵肉制品的生产技术,丰富肉类食品市场有重大意义。

参考文献

- [1] 李宗军, 江汉湖, 李罗明. 中国微生物生态学杂志, 2002, 14 (1), 19~22.
- [2] Santos E, Jaime I, Rovira J. Int J Food Microbiology, 1998, 39 (5), 123~128.
- [3] Samelis J, Metaxopoulos J, Vlasi M. Int J Food Microbiology, 1998, 44 (10), 69~82.
- [4] Farber J, Daley E, Holley R. Food Microbiol, 1993, 45 (10), 123~132.
- [5] Sanz Y, Toldra F. J Agri Food and Chem, 1997, 45 (6), 1552~1558.
- [6] Fadda S, Sanz Y, Vignal G. Applied and Environment Microbiology, 1999, 65 (2), 578~584.
- [7] Hagen B, Berdague J, Holck A. J Food Sci, 1996, 61 (3), 1024~1028.