

## 肉品微生态系统与肉类发酵剂研究

李宗军 江汉湖

(南京农业大学食品科技学院,南京 210095)

**摘要** 论述了鲜肉、腌制、熏制及传统自然发酵肉制品中主要微生态菌群的构成与气调贮藏、冷链系统中肉品微生态系的变化。介绍了国外商业化肉类发酵剂中酵母菌、霉菌、乳酸菌、微球菌、链霉菌等微生物的生理生化与分子特性。可以认为,以 PCR 为基础的分子检测技术将是对食品微生态系进行研究的有效手段。

**关键词** 肉制品,微生态,肉品发酵剂,PCR

肉品微生态系统与肉品发酵剂是肉食加工中的 2 个重要课题。它们为提高肉食制品的安全性和开发新型肉制品提供了新的思路和方法。特别是对传统发酵肉制品中微生态系的研究,可以充分挖掘微生物的种质资源;利用微生物的生物多样性,为发酵肉制品基因工程菌及食品级克隆体系的构建提供丰富的材料。我国幅员辽阔,民族众多,各民族传统特色发酵制品丰富多彩,生产工艺独特。但生产技术落后,基础研究甚为薄弱。作者试图在描述肉品微生态系的前提下,对国外肉品发酵剂及其生态学进行阐述,旨在为我国发酵肉制品的开发与生产提供借鉴。

## 1 肉类微生物菌群

肉与肉制品微生物来自牲畜生前感染和宰后污染。健康动物对微生物的入侵有完善

的防御机制。因此,一般认为,健康动物的内部组织是无菌的。有些微生物偶尔能够越过这些屏障,而导致动物发生病变,并有可能传播给消费者。如动物的沙门氏菌、李斯特菌、大肠杆菌 O157-H7、结核杆菌等。病畜或是临床健康实则带菌的动物不能作为食用动物进行宰杀,否则,这些肌肉组织就充当了病原微生物的携带者和传播者。

由于微生物物种的多样性和来源的广泛性,导致了肉食的多相污染(表 1)<sup>[1-2]</sup>。

冷链系统可抑制大多数微生物的生长<sup>[3]</sup>。通过冷却降温制造 1 个选择性的环境,只有极少数的微生物在肉食的表面生长。这些微生物菌群主要是革兰氏阴性菌,如假单胞菌和无色杆菌。有时可以检测到酵母和霉菌,尤其是在牛肉的成熟过程中。这些嗜冷性微生物的大量生长会导致肉食表面发

表 1 鲜肉腐败微生物的主要类群及来源

好气性微生物	来源	兼性厌氧性微生物	来源
不动杆菌属( <i>Acinetobacter</i> )	土壤,水,皮肤	柠檬酸杆菌属( <i>Citrobacter</i> )	土壤,水,人,动物,污物
产碱杆菌属( <i>Alcaligenes</i> )	土壤,水	肠杆菌属( <i>Enterobacter</i> )	土壤,水,植物
黄杆菌属( <i>Flavobacterium</i> )	水	哈夫尼菌属( <i>Hafnia</i> )	土壤,水,动物
莫拉氏菌属( <i>Moraxella</i> )	动物粘膜表面	克雷伯氏菌属( <i>Klebsiella</i> )	土壤,草地,野生动物,家畜,人
假单胞菌属( <i>Pseudomonas</i> )	水,土壤,植物	变形杆菌属( <i>Proteus</i> )	人及动物的肠道,土壤,污水
嗜冷菌属( <i>Psychrobacter</i> )	水	普罗威登斯菌属( <i>Providencia</i> )	土壤,水
<i>Shewanella</i>	水	气单胞菌属( <i>Aeromonas</i> )	陆地环境
		弧菌属( <i>Vibrio</i> )	陆生及水生环境

第一作者:博士研究生。

收稿时间:2001-11-17

粘,出现异味,引起颜色的变化。这些都是好气性微生物在表面生长的初级效应,但代谢的终产物能渗透到内部组织。如果肉食得到恰当的冷却,深层组织的腐败一般不会发生。这种腐败通常是由厌气性芽孢细菌所引起的。

肉的气调包装(modified atmosphere Packed, MAP),由于巧妙地改变了贮藏的生态环境,可以抑制微生物的生长,延长鲜肉的货架期。通常  $\text{CO}_2$  浓度越高,对腐败微生物的抑制作用越强,100%  $\text{CO}_2$  可以获得较长的货架期。但高浓度的  $\text{CO}_2$  可能引发一些化学变化,而影响肉的品质,一般将  $\text{CO}_2$  的浓度控制在 10% ~ 40% 之间。MAP 肉的货架期反映在乳酸菌的消长变化上。而肠细菌与气单胞菌的生长则受制于 pH 值、贮藏温度、起始菌数、包装材料等因素<sup>[3]</sup>。

MAP 肉中高浓度的  $\text{CO}_2$  可以严格控制细菌的数量,特别是假单胞菌,而乳酸细菌如乳杆菌、明串珠菌、乳球菌、食肉杆菌等则可生长。乳酸细菌产生的乳酸可抑制肠细菌、环丝菌和 *Shewanella* 的生长。pH > 6.0 的肉中,肠细菌和其他兼性厌气性的微生物可以生长并形成优势菌群<sup>[1]</sup>。Erichsen & Molin (1981) 研究发现,MAP 肉中的微生物主要有乳酸菌、假单胞菌和环丝菌,而在 VR (vacuum packed) 瘦肉中,环丝菌占微生物菌群总数的 40%,带脂肪的 VP 肉微生物菌群较复杂,有 55% 的假单胞菌,23% 产碱杆菌,9% 乳酸菌和 9% 肠细菌;与 DFD 肉中肠细菌 41%,假单胞菌 36%,气单胞菌 9%,产碱杆菌 14% 的微生物生态构成有较大的差异。

腌制和熏制后肉食的微生物学特性与鲜肉完全不同。腌熏制品中腌制剂,如氯化钠、硝酸钠、亚硝酸钠等,及接下来的相关处理中,形成了肉食制品中的 1 个微生态环境,对起初污染鲜肉并导致其腐败的革兰氏阴性细菌的生长有抑制作用,而只有一些特殊的革兰氏阳性细菌可以生长。在腌熏过程中的这种微生物的转换抑制了鲜肉中的大多数微生

物菌群,从而达到延长货架期的目的。鲜肉的真空包装也是基于相同的原理,即由于缺少氧气,正常好气性的腐败微生物得到了应有的抑制,而延长了肉食制品货架期。

腌熏肉的微生物菌群中主要包括:微球菌、乳酸菌、链球菌、明串珠菌和微杆菌,还有部分酵母和霉菌<sup>[4]</sup>。腌熏肉食的腐败常见的有以下几种类型:①是表面发粘,主要是细菌在其表面大量生长所致;②是发酸,是由乳酸细菌等生酸菌类所引起;③是产气,是由异型乳酸发酵菌(如乳杆菌、明串珠菌等)和一些酵母发酵糖类所致;④是变绿,是由于肉中色素的化学氧化,各种乳酸细菌积累的过氧化氢和部分细菌的大量繁殖所致。

食盐和硝是有效的微生物抑制剂,许多病原微生物在腌熏肉食中都不能生长。此外,选择性的环境条件有利于乳酸菌的生长而成为微生态环境中的有力竞争者。乳酸细菌的生长通常伴随着酸性物质的形成,降低了产品的 pH 值,进一步抑制了食物病原微生物的生长。葡萄球菌在与乳酸细菌的生存竞争中,不会因为 pH 值的降低而受到影响;肉毒梭菌在腌熏制品中可以生长,但其毒素的形成受乳酸细菌的抑制。

微生物学研究发现,所有香肠肉制品的成功制作主要依赖于原材料和加工条件的控制。今天人们对环境生态因子的控制,主要是选择能有效地将糖转化为乳酸,并赋予产品特有的风味、稳定性和安全性的乳酸菌。虽然肉品发酵的理念来源于肉食的酸化腐败,但随着科学技术的不断进步,人们可以有效地控制其酸度,从而生产出性能稳定,营养丰富,风味独特,被广泛接受的发酵肉制品。

传统发酵肉制品的微生物来源于环境中随机感染。这些微生物菌群主要是微球菌、凝固酶阴性的葡萄球菌、链球菌和乳酸杆菌。在香肠加工过程中,上述微生物可分别来自特定的香肠配料和生产的各单元操作。食盐和其他腌制剂的加入有利于这些微生物的生长,而抑制原料肉中的微生物菌群。肉馅的

冷处理、肠衣包裹隔绝氧气和烟熏过程都有利于有益发酵型微生物的生长。笔者近年来对我国侗族传统发酵肉制品——酸肉(Nanx wudl)中的微生态系进行了研究,主要微生物菌群有乳酸菌、微球菌与凝固酶阴性的葡萄球菌和酵母菌,分别占48.29%,22.98%和28.73%,其中米酒乳杆菌(*Lactobacillus sake*)占乳酸细菌的37.18%<sup>[5]</sup>。

## 2 肉品发酵剂

欧洲商业化肉品发酵剂中的微生物涉及到细菌、酵母菌、霉菌和放线菌<sup>[6-7]</sup>。这些微生物具有各自的品性。

### 2.1 酵母

Leistner & Bem 对肉品发酵过程中酵母的行为进行了研究,他们认为汉氏德巴利酵母是发酵肉制品中最常见的微生物,并把它作为发酵剂使用。并发现,这类微生物可赋予肉制品酵母特有的风味,并能使肉品发色反应保持稳定。汉氏德巴利酵母和法吗塔(*famata*)假丝酵母作为肉品发酵剂,其添加到香肠中的浓度为 $10^6$ cfu/g。它们具有较高的食盐耐受能力、好气发酵和较弱的代谢性能。因此,这些酵母主要生长在香肠的表面和接近于表面的部分。它们不能降低产品中硝酸盐的含量,进一步的研究发现,此酵母菌在发酵香肠中对微球菌引起的硝酸盐还原有轻度抑制作用。汉氏德巴利酵母是单倍体,可通

过杂交的方法对其进行改良<sup>[8]</sup>。

### 2.2 霉菌

在亚洲,霉菌发酵食品主要是以植物为原料,而在欧洲,有许多动物原料的霉菌发酵食品,如奶酪、发酵香肠和火腿。在北欧烟熏香肠最为流行,而在地中海和东南欧国家霉菌发酵香肠是古老传统且品质上乘的发酵肉制品。霉菌发酵肉制品具有独特的表面特性和风味,其后期变化主要来自于霉菌引起的蛋白质和脂肪分解。霉菌生长对产品的进一步影响是阻止氧气的渗入,防止产品发酸和颜色变化。这更适合于干香肠的加工。传统的香肠生产,其微生物来自于周围环境,因此,其中可发现多种不同的微生物,优势菌是青霉,它们中的多数菌株都可能产生真菌毒素。Leistner & Eckardt 报道,香肠中80%的青霉在人工培养基上可产生真菌毒素,17株产毒素的菌株有11株存在于其它发酵肉制品中。因此,霉菌发酵剂开发必须经化学或生物学的测试,其不存在真菌毒素危害。经大量的实验研究,霉菌发酵剂必须具备以下特性<sup>9)</sup>(表2)(1)不产毒素,无潜在的原发性威胁(2)在产品表面竞争性地抑制其他微生物的生长(3)菌丝可使产品表面致密坚固,颜色为纯白,黄色或乌黑(3)良好均衡的蛋白质和脂肪降解活性(4)霉菌特有的芳香。

表2 食肉葡萄球菌的基因克隆

表型(phenotype)	分析的基因或基因产品	微生物
核糖降解	核糖激酶,核糖摄入蛋白	<i>Staphylococcus hyicus</i>
阿拉伯糖降解	5-P-阿拉伯糖 4-异构酶	木糖葡萄球菌
木糖降解	木糖异构酶,木糖激酶	木糖葡萄球菌
尿素水解	尿 酶	木糖葡萄球菌,金黄色葡萄球菌
三甘酯	酯 酶	木糖葡萄球菌,金黄色葡萄球菌
内肽酶	溶葡萄球菌素	溶葡萄球菌的葡萄球菌
DNA 水解	DNA 酶	食肉葡萄球菌
蔗糖水解	蔗糖运输	木糖葡萄球菌
葡萄糖吸收	酶 I	食肉葡萄球菌
淀粉水解	$\alpha$ -淀粉酶	嗜热芽孢杆菌
纤维素水解	纤维素酶	热解纤维梭菌

法国选育了产黄青霉菌株(*P. Chrysogenum*)应用于发酵肉制品,它能形成乌黑的产品外观,以替换绿色的野生型菌株。Hwang 分离到 2 个青霉菌株(*P. nalgiovense* 和 *P. chrysogenum*),它们不产毒素,竞争性抑制其他微生物的生长,在产品表面延续生长,赋予香肠良好的品质。他们还发现青霉和酿酒酵母一起使用,可大大改善产品的表观特性和菌丝的硬度。

### 2.3 微球菌

Ninivaara 认为微球菌 M53 作为细菌发酵剂的商业化应用,其作用首先是提高颜色的形成速度,降低 pH 值,在较短的时间内达到产品所要求的组织特性。其次,可降低生产成本,控制病原微生物和腐败微生物的生长。通常情况下微球菌和葡萄球菌共同存在于各种发酵剂中<sup>[9]</sup>。

这 2 种微生物具有硝酸盐还原酶活性,但没有亚硝酸盐还原酶活性。肉制品中的亚硝酸盐可来自于微生物对硝酸盐的还原,也可能是作为腌制剂直接添加到产品中。在发酵期间,亚硝酸盐参与的酸催化不可逆化学反应是非常重要的,其产物是一氧化氮( $\text{NO}$ )。一氧化氮与肌红蛋白结合形成一氧化氮肌红蛋白复合物,赋予腌制肉特有的红色。微球菌和葡萄球菌共同存在于发酵剂中,它们具有的过氧化氢酶、酯酶和蛋白酶活性,可确保产品良好的风味。过氧化氢酶主要是清除产品中因乳酸菌代谢所产生的过氧化氢,过氧化氢作为强氧化剂对香肠颜色、芳香和货架期都会产生影响。

变异微球菌(*Micrococcus varians*)和葡萄球菌不仅在种群发育上比较接近,而且具有一些相同的自然习性,如主要存在于人和动物的皮肤上和粘液中。微球菌发酵性较弱,只能在香肠深处厌气环境中微弱生长。微球菌在低于 15℃ 下还具有硝酸盐还原酶活性,但有食肉葡萄球菌存在时,在此温度下硝酸盐还原酶活性消失。变异微球菌的另一个优点是具有良好的嗜冷性。从生产历史来

考察,变异微球菌具有良好的安全性,没有任何潜在的毒素和致病威胁。食肉葡萄球菌是非乳酸菌发酵剂中的主要微生物。人们对这类  $G^+$  基因特性进行了深入研究,其基因工程菌得到了成功的应用,与食肉葡萄球菌有关的基因工程研究列于表 2。

### 2.4 乳酸菌

在发酵肉制品中乳酸菌的应用是发酵过程成功的重要因素,乳酸菌可用于各种发酵香肠,并对加工过程要求的众多目标有贡献。历史上,美国和欧洲对乳酸菌的商业化应用方法进行了介绍。啤酒片球菌(后来鉴定为嗜乳酸片球菌)于 1995 年首先在美国得到应用。随着这种微生物作为发酵剂的成功应用,开发出了夏季发酵香肠。啤酒片球菌的最适生长温度为 42℃,通过控制加工过程,添加亚硝酸盐,37℃ 发酵可缩短产品的成熟时间<sup>[10~12]</sup>。此外,戊糖片球菌的最适生长温度为 35℃,可作为低温条件下加速制品成熟的发酵剂。

在欧洲首先使用的植物乳杆菌。植物乳杆菌和片球菌一直是商业发酵剂中的必要成员。后来弯曲乳杆菌和米酒乳杆菌被共同作为肉品发酵剂。这两类微生物通常在未加控制的肉品发酵过程中成为优势的微生物类群。它们具有较高的竞争性和较好环境适应性,在作为肉品发酵剂使用时,从开始接种到产品消费时,它们都是优势微生物。我们对乳酸细菌,特别是米酒乳杆菌的加工、生态、生理及基因特性进行了研究<sup>[13~14]</sup>。

### 2.5 链霉菌

链霉菌(*Streptomyces griseus*)是唯一作为肉品发酵剂的放线菌,据说可提高发酵香肠的风味。在未经控制的天然发酵香肠中,链霉菌的数量甚微,因其不能在发酵肉品环境中良好生长。

## 3 肉品发酵工程

肉品发酵工程是以各种肉食为主要原料,通过调控环境生态因子对微生物进行混

合培养发酵,从而制备食用安全、营养丰富的食品。从本质上讲,属于固态混菌发酵。为了实现对肉制品发酵微生态系的有效控制,有必要建立一套方便、快捷、有效的技术体系,笔者认为在以下几个方面有待深入研究:(1)是在肉品发酵系统中,发酵、腐败与病原微生物同环境生态因子之间的预报预测微生物学模型的构建,它将从生物统计的角度为我们提示肉品发酵生态系中,生物量的动态变化。(2)是建立与完善肉品系统中微生物快速检测数据库,它将为肉食生产企业提供有效、快捷的检测与质控手段,确保产品的安全性。(3)是以 PCR 为基础的分子检测技术的确立与运用。随着 DNA 重组技术及基于对 rRNA 序列分析的生物分子系统进化理论的建立,使人们有可能在不进行培养的情况下研究微生物。人们采用从环境中直接分离并克隆 rRNA,分析其序列和在分子进化树上的位置等方法发现了大量不可培养微生物,且能利用特异性 rRNA 探针进行荧光原位杂交或进行原位 PCR,对环境中的不可培养微生物进行定位、计数和形态观察。将该以 PCR 为基础的技术体系运用于肉品发酵工程,可以对肉品发酵生态系中的微生物菌相的构成进行快速分析;也可对特定微生物进行活体定量与定性监测,这对研究微生物相互之间的生态关系及其在发酵肉制品物质转化过程中的作用具有重要意义,同时也为肉制品功能性成分的研究提供了新的方法;还可以对肉品发酵工程中的常见污染菌进行实时监控。(4)是传统发酵肉制品中微生物资源的开发与利用,尤其是传统自然发酵肉制品中,丰富的乳酸菌资源,将为食品级克隆体系的建立提供安全可靠的基因资源。

#### 4 肉品加工发酵剂的研究动态

未来发酵剂的研究将集中在提高乳酸的转化率,提供良好的风味组分,产生抗氧化剂和微生物抑制剂等功能性物质。利用基因工程手段将存在于其他微生物中有利于发酵肉

制品性状转移到发酵微生物中。其对肉品发酵剂的改造主要集中在以下几个方面:(1)增进对发酵微生物遗传特性的了解;(2)对发酵微生物自然特性的遗传修饰和表达调控;(3)基因工程菌的构建。虽然基因工程技术和基因工程菌主要在奶制品工业中应用,但在发酵肉制品中应用的有些微生物的基因工程正在日益受到人们的重视。

发酵肉制品发酵剂的基因工程主要集中在乳酸菌。目前,已将半乳糖苷酶基因、过氧化氢酶基因和细菌素基因克隆到相关的乳酸菌中<sup>[15]</sup>。例如,来自于葡萄球菌的溶葡萄球菌素基因转移到肉品发酵剂的乳酸菌中,在发酵肉制品的加工过程中可抑制金黄色葡萄球菌的生长,从而提高了产品的卫生品质。

展望乳酸菌发酵剂在肉品加工中的应用,除基因工程技术的运用外,还有几个崭新的领域为发酵剂的开发和应用提供了方法和途径。如保藏发酵剂的开发;副产品的综合利用;产品卫生质量的改善;食物病原菌传播途径的有效阻隔等等。这将激发发酵剂在世界范围内更广泛的应用。

#### 参 考 文 献

- 1 Andrew D, Ron B. *The Microbiology of Meat and Poultry*. Published by Blackie Academic and Professional, an Imprint of Thomson Science London 1997, 53 ~ 256
- 2 Al-Sheddy I A, Fung D Y C, Kastner C L. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1995 21(1) 31 ~ 52
- 3 Farkas J, Andrassy E. *Intl. Food Microbiol.*, 1993, 19, 145 ~ 152
- 4 Cassens R G. *Food Technol.*, 1995 49(7), 72 ~ 80, 115
- 5 李宗军. 江汉湖. *湖南农业大学学报*, 2002, 1, 61 ~ 63
- 6 Bacus J N, Brown W L. *Food Technol.*, 1981 35, 74 ~ 78, 83
- 7 Hammer W P, Knauf H J. *Meat Science*, 1994 36, 155 ~ 168
- 8 Harlander S K. *Genetic Improvement of Microbial*

- Starter Cultures. In Application of Biotechnology to Traditional Fermented Foods. 1992 20 ~ 26
- 9 Bacus J. Food Technol. , 1984b 38(6) 59 ~ 63
- 10 Batish B K , Grover S , Ram L. Cult. Dairy Prod. J. , 1989 24(2) 21 ~ 25
- 11 Gasson M J. FEMS Microbiol. Rev. , 1993 , 12 , 3 ~ 20
- 12 Hammers W P. Food Biotechnol. , 1990 4 383 ~ 397
- 13 Hammmer W P , Bantleon A , Min S. FEMS Microbiol. Rev. , 1990 87 165 ~ 174
- 14 Mckay L L , Baldwin K A. FEMS Microbiol. Rev. , 1990 87 3 ~ 14
- 15 Vogel R F , Ehrmann M. Biotechnol. Ann. Rev. , 1996 , 2 :123 ~ 150

## Study on Microbial Ecosystem and Starter of Meat Products

Li Zongjun Jiang Hanhu

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

**ABSTRACT** Microflora of meat products , such as fresh , cure/fumigate and traditional natural fermented meat and changes of microbial ecosystem of modified atmosphere packaged and/or chilling chain system meat were viewed in this paper. The physiological – biochemical and/or molecular characteristic of microorganism , such as yeast , mold , lactic acid bacterial , micrococci , Streptomyces etc from foreign commercial meat starter was introduced. It was thought that molecular test technology based on PCR must be efficient mean to study microbial ecosystem of food.

**Key words** meat products , microbial ecosystem , starter of meat products , PCR

## 日本果汁饮料新品竞相问世

### 伊藤园的果菜汁混合制品

伊藤园公司在市场上推出了水果和蔬菜汁的混合汁新产品——儿童用神清气爽的黄绿色水果蔬菜混合汁,该产品是含果汁 60%(苹果汁、菠萝汁、柠檬汁)和蔬菜汁 40%(萝卜汁、芹菜汁)的混合菜汁系列饮料。新产品与公司原有的蔬菜汁制品比,增加了果汁含量,让不喜欢蔬菜异味的儿童更愿饮用。

### 三得利推出乳性饮料

三得利公司在市场推出了乳性新饮料“白兰瓜美味”新产品。它是季节性供应商品,具有清爽利口的特点。它不仅有牛奶的特色味道,而且具有清爽、舒畅的后味。该产品还添加了能适当增加肠内双歧杆菌数量以及使肠道保持良好环境的木糖。

### 明治乳业 3 种新产品

明治乳业公司在市场上推出了送货上门的 3 种专用饮料新产品——“小球藻乳酸菌”、“洋李 100”、“卡高梅(公司)蔬菜生活 100 $\beta$ ”。其中“小球藻乳酸菌”每瓶饮料中添加了 25mg 小球藻提取物,还配合了绿茶多酚化合物和桑葚酮。“洋李 100”是 100% 的洋李汁,系采用最好的洋李品种加工制成。“卡高梅蔬菜生活 100 $\beta$ ”则是每瓶饮料含  $\beta$ -胡萝卜素 5.9mg,可换算成  $V_A$  4 500 国际单位,是成年男性  $V_A$  日必要摄取量的 2 倍以上。

### 混合果汁制品

龟甲万公司推出了含 10% 果汁的饮料新产品“丹尔蒙泰芒果混合果汁”和“丹尔蒙泰金黄色菠萝混合果汁”。前者采用菲律宾产芒果为原料,运用其良好的风味,再与橘汁混合,从而具有清爽舒快的风味,使人清晰地感受到芒果甜味和香气。后者采用丹尔泰公司的新技术开发的高级品种高尔丹菠萝和葡萄柚加工制成的混合汁饮料,饮料中添加了制成细丝的菠萝纤维。