

## 一株植物乳杆菌及其应用

### 技术领域

本发明属于微生物发酵食品技术领域，具体涉及一株植物乳杆菌及其应用。

### 背景技术

川味香肠是四川传统特色发酵肉制品之一，通常以辣椒、花椒、胡椒（“三椒”）作为辅料，普遍要经过发酵、烟熏，产品具有麻辣味重的特点，故又名“麻辣肠”，因其香气浓郁、滋味鲜美而深受消费者喜爱。

川味香肠的发酵过程主要是依赖环境和原料肉中微生物的作用，而这些微生物可能会产生生物胺(Biogenic amines, BAs)。BAs 是由氨基酸脱羧或醛和酮氨基化形成的具有生物活性的小分子量含氮有机化合物。在发酵香肠中，常见的 BAs 主要有组胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺、苯乙胺和亚精胺，其中组胺毒性最强，含量最高，对人体危害最大。BAs 是激素、生物碱、核酸和蛋白质合成的前体物质，对维持正常的内脏功能和免疫系统的代谢活性是不可缺少的。生物胺在生物活性细胞中发挥着重要作用，可以促进生长和增强代谢活力、增强肠道系统免疫活性，控制血压和消除自由基等生理功能，并在神经系统中发挥活性作用。然而，过量的生物胺不仅会对人体健康造成危害，导致血管、动脉和微血管的扩大，如高血压、头疼、腹部痉挛、腹泻和呕吐等，也会引起人体心脏和中枢神经系统等的损害，还会影响产品的风味。因此，有必要控制发酵香肠中生物胺含量。

### 发明内容

针对现有川味香肠发酵存在的上述问题，本发明提供一株可以高效降解生

物胺的植物乳杆菌及其应用，该植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）命名为：LPZN19，保藏于中国普通微生物菌种保藏中心，保藏编号为 CGMCC NO: 22770。将该植物乳杆菌应用于川味香肠的发酵中，对总生物胺的降解率能达到 28%以上。本发明的技术方案为：

第一个方面，本发明提供一株植物乳杆菌，命名为：LPZN19，保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC NO: 22770。

进一步地，所述植物乳杆菌具有降解生物胺的特性。

第二个方面，本发明提供一种食品发酵剂，包括上述植物乳杆菌、戊糖片球菌和葡萄球菌。

进一步地，所述食品发酵剂的制备方法包括：

（1）将植物乳杆菌、戊糖片球菌和葡萄球菌的菌株按照细胞数量为 1：1：1 混合均匀，于 37℃ 在液体培养基中活化 3-5 次，每次 8-12 h；

（2）活化完成的菌液于 4℃、4000-5000 rpm 条件下离心 10-15 min，用生理盐水洗涤后再离心，收集菌体，即得。

第三个方面，本发明提供上述发酵剂在制备发酵食品中的应用。

优选地，所述发酵食品为发酵肉食品。

进一步地，所述发酵肉食品包括川味香肠、腊肉、火腿。

进一步地，所述制作发酵肉食品的应用包括：将所述发酵剂加入至腌制好的原料中进行发酵。

优选地，所述川味香肠发酵的控制参数为：发酵温度 20-22 ℃，发酵相对湿度 74-78%，发酵时间 2-3 d；成熟温度 12-14 ℃，成熟相对湿度 60-70%，成熟时间 28-30 d。

第四个方面，本发明提供一种川味香肠，是采用上述应用方法获得。

与现有技术相比，本发明的有益效果总结如下，具体实施例中还有进一步地证明：

实验结果表明：本发明的植物乳杆菌能降解川味香肠中的生物胺，对发酵完成时（30d）总生物胺的降解率为 28.79%，其中对组胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺、苯乙胺和亚精胺的降解率分别达到了 41.95%、24.07%、54.19%、10.76%、24.90%、8.07%和 5.3%。由于该植物乳杆菌是从发酵香肠中筛选得到的，具有优良益生特性，因此，该植物乳杆菌尤其适合于腊肉和火腿等发酵肉制品的生产，对于功能性乳酸菌发酵剂的研发、建立乳酸菌菌种资源库以及一定程度解决食品安全问题具有重要的现实意义。

### 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本发明的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

图 1 是本发明实施例 1 中降生物胺乳酸菌分离纯化后的培养基显色结果，其中，图 1-1 为不产降生物胺乳酸菌的显色结果，图 1-2 为降生物胺乳酸菌的显色结果。

图 2 是本发明实施例 1 中生物胺混合标品 HPLC 色谱图。

图 3 是本发明实施例 1 中分离得到的菌株的 16S rDNA 的 PCR 产物电泳图。

图 4 是本发明实施例 1 中获得的植物乳杆菌的生长能力。

图 5 是本发明实施例 1 中获得的植物乳杆菌的产酸能力。

图 6 是本发明实施例 1 中获得的植物乳杆菌的耐食盐能力。

图 7 是本发明实施例 1 中获得的植物乳杆菌的耐亚硝酸盐能力。

图 8 是本发明实施例 1 中获得的植物乳杆菌的不同 pH 值下的生长能力。

图 9 是本发明实施例 1 中获得的植物乳杆菌的不同温度下的生长能力。

图 10 是本发明实施例 2 中植物乳杆菌对川味香肠加工过程中组胺含量的变化情况。

图 11 是本发明实施例 2 中植物乳杆菌对川味香肠加工过程中酪胺含量的变化情况。

图 12 是本发明实施例 2 中植物乳杆菌对川味香肠加工过程中尸胺含量的变化情况。

图 13 是本发明实施例 2 中植物乳杆菌对川味香肠加工过程中腐胺含量的变化情况。

图 14 是本发明实施例 2 中植物乳杆菌对川味香肠加工过程中色胺含量的变化情况。

图 15 是本发明实施例 2 中植物乳杆菌对川味香肠加工过程中苯乙胺含量的变化情况。

图 16 是本发明实施例 2 中植物乳杆菌对川味香肠加工过程中亚精胺含量的变化情况。

### 具体实施方式

本发明实施例采用的初始肉样购自四川雅安农贸市场。

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

#### 实施例 1:

##### 生物胺降解菌的筛选及鉴定

##### 1.1 降生物胺乳酸菌的分离纯化

取 25 g 肉样于 225 mL 无菌生理盐水中均质混匀，取 1 mL 加入至 MRS 肉汤培养基中进行富集培养，然后采用 0.8% 的生理盐水进行梯度稀释（从  $10^{-1}$  到

$10^{-7}$ ), 取稀释液 200  $\mu\text{L}$  涂布于含 0.8% 碳酸钙的 MRS 固体培养基上培养 24 h, 挑取具有溶钙圈的菌株于产生物胺显色培养基上进行显色, 每个适宜稀释度平行 3 次。如图 1 所示, 5 min 内显紫色的为产胺菌, 黄色为不产胺菌, 平行显色两次。将两次均显黄色菌株于 MRS 培养基上分离纯化 3 次后于 4  $^{\circ}\text{C}$  斜面保藏备用。

### 1.2 菌株初筛

能用做发酵肉制品发酵剂的乳酸菌应耐受 6% NaCl 和 150 mg/kg  $\text{NaNO}_2$ , 产酸能力较强, 发酵葡萄糖不产气, 不产  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{H}_2\text{S}$ 、氨和黏液等特点。由于蛋白质为生物胺的前体物质, 菌株还需对蛋白质无明显的分解作用, 此外具有氧化酶活性的菌株可以降解生物胺。据此, 进行以下筛选实验: 耐食盐试验、耐亚硝酸盐试验、产黏性试验、葡萄糖产气试验、产  $\text{H}_2\text{S}$  试验、 $\text{H}_2\text{O}_2$  试验、过氧化氢酶试验、产色素检测、精氨酸产氨试验、V-P 试验、石蕊牛乳试验、硝酸盐还原试验、蛋白质降解活性试验和氧化酶活性试验, 这些试验均为本领域常规试验, 本发明只给出初筛试验各种培养基与试剂配方如下:

MRS 液体培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母膏 5 g, 葡萄糖 20 g, 七水硫酸镁 2 g, 四水硫酸锰 0.05 g, 磷酸氢二钾 2 g, 柠檬酸铵 2 g, 乙酸钠 5 g, 吐温-80 1 mL, pH 6.2~6.4, 121  $^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 20 min。

#### (1) 耐食盐实验培养基

MRS 液体培养基分别添加 20、40 和 60 g/L 的 NaCl。

#### (2) 耐亚硝酸盐实验培养基

MRS 液体培养基分别添加 50、100、150 mg/kg 的  $\text{NaNO}_2$ 。

#### (3) 产粘液培养基

MRS 固体培养基, 以 5% 的蔗糖代替葡萄糖。

#### (4) 葡萄糖产气培养基

MRS 液体培养基, 以硫酸铵替代柠檬酸铵, 加入 1.6% 溴甲酚紫 1.4 mL 和

倒置的杜氏小管。

### (5) 产 $\text{H}_2\text{S}$ 培养基

蛋白胨 10 g，氯化钠 5 g，牛肉膏 10 g，10%氯化亚铁 5 mL，蒸馏水 1000 mL，pH 7.0~7.4。

### (6) $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生检测培养基

基础培养基：牛肉膏 0.5 g，酵母膏 0.5 g，吐温-80 0.05 mL， $\text{MnSO}_4$  0.01 g，琼脂 1.5 g，pH 6.5，121℃ 15 min。单独灭菌的无菌糖 1%，倾倒平板。上层倾倒薄层（1~2 mL）同样培养基，加入 4% $\text{MnO}_2$ 。新鲜培养物于  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生检测培养基划线，培养 5 天。观察菌落周围，变澄清者为  $\text{H}_2\text{O}_2$  阳性。

### (7) 过氧化氢酶实验

用接种环挑取固体培养基上菌落，置于洁净试管内，滴加 5%过氧化氢溶液 2 mL，观察结果。半分钟内产生气泡者为阳性，不产生气泡者为阴性。

### (8) 产色素的检测

在培养基中添加 30%灭菌全脂牛奶，接种新鲜培养菌株，37℃ 培养 24 h，然后在室温下培养 3 天，观察有无色素产生。

### (9) 精氨酸产氨培养基

MRS 培养基（不加牛肉膏，用 0.2%柠檬酸钠代替柠檬酸铵，葡萄糖浓度为 0.05%），加入 3%精氨酸，0.006%溴甲酚紫 1 mL，蒸馏水 1000 mL，pH 5.3。奈氏试剂 A 液：氢氧化钾 20 g，蒸馏水 50 mL；B 液：碘化钾 5 g，碘化汞 10 g，蒸馏水 50 mL。将 A 液、B 液混合后过滤，棕色瓶备用。

### (10) V-P 反应培养基

A 液： $\alpha$ -萘酚 5 g，95%乙醇 100 mL；B 液：氢氧化钾 80 g，肌酸 0.6 g，蒸馏水 200 mL。取 1 mL 培养液加入 0.6 mL A 液和 0.2 mL B 液振荡，显红色为阳性。

### (11) 石蕊牛奶培养基

## 说 明 书

2.5%石蕊乙醇溶液 4 mL，脱脂牛奶 100 mL。混合后为丁香花紫色为适度，分装试管，牛奶高度 4 cm，121℃灭菌 20~30 min。

### (12) 硝酸盐还原培养基

牛肉膏 10 g，蛋白胨 5 g，KNO<sub>3</sub> 1 g，pH 7.0~7.6，121℃灭菌 15~20 min。  
 格力斯氏试剂：A 液：对氨基苯磺酸 0.5 g，稀醋酸（10%）150 mL；B 液：α-萘酚 0.1 g，稀醋酸（10%）150 mL，蒸馏水 20 mL。二苯胺试剂：二苯胺 0.5 g，浓硫酸 100 mL，蒸馏水 20 mL。

### (13) 蛋白质降解活性试验培养基

在 MRS 固体培养基的基础上添加 15%脱脂牛乳或脱脂奶粉。

### (14) 氧化酶试验

对阴性菌进行氧化酶活性试验，实验方法为：取白色洁净滤纸沾取菌落，加 1%盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴，阳性呈现粉红色，并且逐渐加深，再加 1%α-萘酚乙醇溶液一滴，阳性于半分钟内呈现蓝色，阴性于 2 min 内不变色，得到初筛菌株，初筛结果如表 1 所示：

表 1 菌株主要发酵特性

菌株编号	2	4	19	25	33	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
耐食盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
耐亚硝酸盐	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
产粘	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
产 H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
产 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
过氧化氢酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
产色素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
精氨酸产氨	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP 反应	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 说 明 书

硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蛋白质分解	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氧化酶活性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：+：反应为阳性；-：反应为阴性。

由于水分的散失，香肠在成熟时食盐和亚硝酸盐的浓度能达到 60 g/L 和 0.015%左右。因此，能用作发酵剂的菌株应耐受 60 g/L 的食盐和 0.015%的亚硝酸盐。粘液会影响香肠的组织状态，产气会影响香肠结构的致密性， $H_2S$ 、 $H_2O_2$  和  $NH_3$  等不良气体会影响香肠的风味，色素会影响香肠感官。因此，发酵剂应该不产粘液、 $H_2S$ 、 $H_2O_2$ 、 $NH_3$  和色素等。另外，亚硝酸盐不仅具有发色作用，还能抑制肉毒梭状芽孢杆菌，因此菌株还应该具有还原硝酸盐的能力。由于蛋白质是生物胺的前体物质，发酵剂最好不具有蛋白质降解能力，同时具有氧化酶活性的菌株可以降解生物胺。

在分离得到的 256 株菌中，符合发酵肉制品发酵剂相关标准且具有氧化酶活性的菌株共 17 株，编号分别为 2、4、19、25、33、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 和 50，初筛结果如表 1 所示。其余菌株均在一定程度上不符合发酵剂的要求，也无氧化酶活性，不宜用作发酵剂，因此将这 17 株菌用于后续实验，进行组胺降解能力的测定。

### 1.3 菌株复筛

#### (1) 标准溶液配制与柱前衍生

分别准确称取生物胺（组胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺、苯乙胺和亚精胺）标品各 0.0100 g，用 0.1 mol/L 的盐酸定容至 10 mL，分别吸取 5、10、20、50、100、200、500、1000  $\mu$ L 的标准溶液定容至 10 mL，各取 1 mL 依次加入 200  $\mu$ L 2 mol/L NaOH，300  $\mu$ L 饱和  $NaHCO_3$  和 2 mL 10 mg/mL 丹磺酰氯丙酮溶液并混匀，40  $^{\circ}C$  暗反应 45 min 后加入 100  $\mu$ L 的  $NH_4OH$  去除残留的丹磺酰氯，加乙腈定容至 5 mL 后 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤，用于标曲绘制，如图 2 所示。



## 说明书

(2) 17 株待测样品的制备方法为：取初筛菌株分离纯化 3 次，并在 MRS 液体培养基中活化 3 次，用 0.05 mol/L pH 值为 7.0 的磷酸盐清洗 2 次收集菌体并接入含 300  $\mu\text{g/mL}$  生物胺（组胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺、苯乙胺和亚精胺）的 PBS 缓冲液（0.02M, Ph7.0）中，37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后，取 1 mL 样品，加入 0.1 mol/L 的盐酸 1 mL 后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中待测。取 1 mL 含 300  $\mu\text{g/mL}$  生物胺的 PBS 缓冲液作为空白对照。样品平行测定三次取平均值。柱前衍生步骤同(1)。

### (3) 色谱条件

色谱柱为  $\text{C}_{18}$ （4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ），流速为 1 mL/min，紫外检测波长为 254 nm，进样量 10  $\mu\text{L}$ ，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，流动相 A 为超纯水，流动相 B 为乙腈，采用梯度洗脱程序，洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

洗脱时间/min	流动相 A /%	流动相 B /%
0	35	65
5	30	70
20	0	100
24	0	100
25	35	65
30	35	65

表 3 和表 4 还提供了七种生物胺回归方程及决定系数以及回收率试验结果。

表 3 七种生物胺回归方程及决定系数

测试组分	回归方程( $y = ax + b$ )	$R^2$
色胺	$y = 1260.4x + 720.01$	$R^2 = 0.9994$
苯乙胺	$y = 1337.3x + 389.55$	$R^2 = 0.9998$
腐胺	$y = 3917.9x - 936.5$	$R^2 = 0.9999$

## 说 明 书

尸胺	$y = 3095.5x + 704.25$	$R^2 = 0.9997$
组胺	$y = 2347x + 911.6$	$R^2 = 0.9999$
酪胺	$y = 1913.2x + 156.48$	$R^2 = 0.9997$
亚精胺	$y = 3284.9x + 765.6$	$R^2 = 0.999$

表 4 回收率试验结果

生物胺	本底含量(mg/kg)	本底含量(mg/kg)	平均回收率(%)
色胺	20.31±2.70	20.31±2.70	94.62
苯乙胺	53.29± 2.53	53.29± 2.53	92.87
腐胺	57.11±2.08	57.11±2.08	97.06
尸胺	20.20± 0.94	20.20± 0.94	96.14
组胺	237.05±14.19	237.05±14.19	89.29
酪胺	22.42±1.05	22.42±1.05	97.68
亚精胺	8.38± 0.72	8.38± 0.72	98.66

表 5 提供了 17 种菌株对生物胺的降解结果。

表 5 菌株对生物胺的降解率

菌株	降解率(%)						
	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺
2	32.12	20.91	37.24	26.27	24.03	3.52	4.83
4	28.71	23.72	21.65	45.92	34.23	3.40	2.89
19	86.43	36.85	36.23	57.38	59.81	22.65	6.84
25	28.10	18.69	44.46	23.12	15.34	5.84	7.25

## 说 明 书

33	42.69	29.02	25.32	33.78	16.52	3.77	8.35
39	23.24	16.29	14.35	17.68	16.69	8.52	7.34
40	44.87	34.18	19.81	27.38	38.64	14.07	8.43
41	83.85	35.33	41.61	53.01	55.32	19.14	7.91
42	38.35	33.39	31.08	28.30	18.76	27.78	13.89
43	27.58	17.57	18.80	17.60	12.94	16.67	6.68
44	12.47	13.46	11.79	10.78	11.05	9.86	9.77
45	21.14	11.13	14.87	13.11	25.17	12.02	10.16
46	67.45	25.69	33.29	49.54	43.28	16.65	6.22
47	56.35	24.43	34.94	47.35	32.45	14.43	12.85
48	52.76	31.75	35.77	35.26	29.36	13.22	11.35
49	27.11	14.22	16.21	14.65	14.65	10.26	12.65
50	15.65	15.98	17.23	19.41	15.63	16.36	12.87

这 17 株菌经复筛后，选择总生物胺降解率排名前 5 的菌株（19、41、46、47、48）进行后续的菌种鉴定。

### 1.4 菌种鉴定

#### （1）形态特征鉴定

菌落形态：观察分离得到的菌落形态（形状、颜色等），并记录结果。

菌株形态：将分离得到的菌株进行革兰氏染色，于 100 倍油镜下观察菌体形态（大小、形状等），并记录观察结果。菌株和菌落的形态学鉴定结果如表 6 所示。

# 说明书

表 6 菌株形态和菌落形态鉴定表

菌株编号	菌落形态	菌株形态
19	中等大小，表面光滑，凸起，边缘整齐，形状为圆形，有光泽，质地细密，浅黄色，不透明	G <sup>+</sup> ，短杆状，成双
41	小菌落，表面光滑，凸起，边缘整齐，形状为圆形，有光泽，质地细密，乳白色，不透明	G <sup>+</sup> ，球状，成双或成团
46	小菌落，表面光滑，低凸起，边缘整齐，形状为圆形，有光泽，质地细密，乳白色，不透明	G <sup>+</sup> ，类球状或短杆状，成双
47	小菌落，表面光滑，凸起，边缘整齐，形状为圆形，有光泽，质地细密，乳白色，不透明	G <sup>+</sup> ，球状，成双或短链
48	小菌落，表面光滑，凸起，边缘整齐，形状为圆形，有光泽，质地细密，乳白色，不透明	G <sup>+</sup> ，球状，成双或短链

## (2) 生理生化特征鉴定

将筛选得到的 5 种菌株用微量发酵管进行生理生化鉴定，参考乳酸菌的鉴定标准，对菌株生理生化特征进行分析。结果如表 7 所示。

表 7 菌株生理生化鉴定结果

菌	阿	鼠	七	苦	纤	果	半	葡	乳	麦	甘	甘	核	松	蔗	海	麦	甘	山	棉	蜜
株	拉	李	叶	杏	维	糖	乳	萄	糖	芽	露	露	糖	三	糖	藻	芽	油	梨	子	二
编	作	糖	苷	仁	二		糖	糖		糖	糖	醇		糖		糖	三		醇	糖	糖

## 说 明 书

号	糖	苷 糖										糖									
19	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/
41	+	-	/	/	/	/	/	/	-	+	/	-	+	-	-	+	-	-	-	/	/
46	-	/	/	/	+	/	+	/	/	+	/	/	+	/	+	-	/	/	/	-	-
47	-	-	+	/	+	/	/	/	+	+	+	+	/	+	+	/	/	+	-	-	-
48	-	-	+	/	+	/	/	/	+	+	+	+	/	+	+	/	/	+	-	-	-

注：+：反应为阳性；-：反应为阴性；/：未检测。

### （3）16S rDNA 遗传学鉴定

将所分离得到的菌株在 MRS 液体培养基中 37 °C 培养 24 h，按照天根公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA，经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后进行 PCR 扩增。所选用的引物为通用引物：上游引物为 27f（5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'），下游引物为 1492r（5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'）。PCR 反应为 25 μL 体系：包括 1 μL 的模板 DNA，上游引物和下游引物各 1 μL，2×Taq Master MIX 12.5 μL，无菌双蒸水 9.5 μL。PCR 反应程序：95 °C 预变性 5 min，30 个循环（95 °C 变性 60 s；55 °C 退火 90 s；72 °C 延伸 2 min），最终 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，送成都擎科公司测序，并与 NCBI 数据库中已知序列进行对比。

采用试剂盒提取 5 种菌株的 DNA，用通用引物对 5 株菌的 16S rDNA 进行扩增，经 1% 琼脂糖凝胶电泳后得到 5 条长度约 1500 bp 的扩增产物，如图 3 所示。泳道 1 为 Marker DL 2000，泳道 2、3、4、5、6 依次为 19 号、41 号、46 号、47 号和 48 号菌株的 PCR 产物。将 PCR 测序结果与 NCBI 数据库中的已知序列进行对比，结果如表 8 所示。最终判定 19 号为植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*），41 号为戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*），46 号为混淆魏斯氏菌（*Weissella confusa*），47 号和 48 号为屎肠球菌（*Enterococcus faecium*），结果如表 8 所示。

## 说明书

表 8 菌株分子生物学鉴定结果

菌株编号	菌株名称	相似度	登录号
19	植物乳杆菌	99%	NR_115605.1
41	戊糖片球菌	99%	KX886792.1
46	混淆魏斯氏菌	99%	NR_113258.1
47	屎肠球菌	99%	LC096216.1
48	屎肠球菌	99%	LC096216.1

由于屎肠球菌可能具有耐药性，根据菌株鉴定结果，选择 19 号、41 号和 46 号三株较为安全的且为食源性的乳酸菌用于后续研究。

### 1.5 菌株的生物学特性

#### (1) 菌株生长能力和产酸能力测定

将 19、41 和 46 号菌株接种到 MRS 液体培养基中，37℃培养 24 h，每 2 小时用分光光度计和 pH 计测定 600 nm 处吸光值和 pH 值，以相应空白培养基作为对照，平行 3 次取平均值。能用做香肠发酵剂的菌株需要有较强的生长能力和产酸能力。由图 4 和图 5 可知，三株菌的生长能力和产酸能力为 19 号高于 41 号和 46 号，在培养 24 h 后培养基的 pH 值均低于 5.0，说明三株菌均具有较好的产酸能力，符合生产发酵香肠的基本要求。

#### (2) 菌株耐食盐能力和耐亚硝酸盐能力测定

将 19、41 和 46 号菌株接种到分别含 0、20、40、60、80 g/L 的 NaCl 和分别含 0、50、100、150 mg/kg NaNO<sub>2</sub> 的 MRS 液体培养基中，37℃培养 24 h，用分光光度计测定 600 nm 处吸光值，以空白培养基作为对照，平行 3 次取平均值。能用于香肠发酵剂的菌株需要能耐受浓度 60 g/L 的食盐和 150 mg/kg 的亚硝酸盐。由图 6 和图 7 可知，当食盐浓度低于 60 g/L 时三株菌均能生长，当浓度升高到 80 g/L 时，三株菌培养 24 h 后的 OD 值均低于 0.2，这是由于较高的食盐浓

度增加了渗透压从而抑制了菌株的生长活性；亚硝酸盐浓度在 0~200 mg/kg 范围内，三株菌均能较好地生长。该结果表明，三株菌能耐受一定浓度的食盐和亚硝酸盐，符合生产发酵香肠的发酵剂的基本要求。

### （3）菌株在不同温度和酸度下生长能力测定

将 19、41 和 46 号菌株接种到 MRS 液体培养基中，分别在 10、20、30、40、50℃ 条件下培养 24 h，用分光光度计测定 600 nm 处吸光值，以相应空白培养基作为对照，平行 3 次取平均值。将菌株接种到 pH 为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5 的 MRS 液体培养基中，37℃ 培养 24 h，用分光光度计测定 600 nm 处吸光值，以相应空白培养基作对照，平行 3 次取平均值。香肠的发酵和成熟温度通常在 10~20℃ 之间，香肠成熟时 pH 值通常在 5.2~5.6 之间。由图 8 和图 9 可知，三株菌均可在一定的低温和低 pH 值情况下生长，能满足香肠发酵的要求。

综上所述，19 号菌不仅具有较强的生物胺降解能力，其生长能力、产酸能力以及耐受食盐、亚硝酸钠的能力均强于其他两种菌，因此，选择 19 号菌制成菌剂，进行川味香肠的制作。该菌株即为命名为：LPZN19，保藏于中国普通微生物菌种保藏中心，保藏编号为 CGMCC NO: 22770 的植物乳杆菌。

## 实施例 2:

实施例 1 的 19 号植物乳杆菌在制作川味香肠中的应用，具体过程如下：

### 2.1 加工工艺配方

牛肉 8 kg、猪肥膘 2 kg、食盐 0.25 kg、白砂糖 0.1 kg、辣椒粉 0.1 kg、花椒粉 0.04 kg、十三香 0.005 kg、味精 0.015 kg、葡萄糖 0.01 kg、大蒜粉 0.005 kg、黑胡椒 0.002 kg、NaNO<sub>2</sub> 0.00075 kg、白酒 0.1 kg。

### 2.2 加工操作要点

原料肉：剔除牛肉皮、骨和结缔组织，用清水洗净；

绞制：4℃ 预冷原料肉，将牛肉和猪肥膘一起放入香肠切片机中切片；

腌制：加入盐腌制剂，4℃腌制 4 h；

搅拌：向腌好的肉中加入香辛料和辅料；

接种发酵剂：接种浓度为  $10^7$  CFU/g，发酵剂由植物乳杆菌、戊糖片球菌和葡萄球菌混合制成；

灌肠：将肉馅灌入直径约为 28 mm 的猪小肠肠衣中，10~12 cm 为一节，紧密饱满，排气针排气；

发酵：用干净的抹布擦净肠衣表面的油污，转移至发酵箱中均匀晾挂，在一定的温度、湿度条件下发酵；

成熟：在一定的温度、湿度条件下成熟；

干燥：将香肠转移至烘箱中在一定温度下干燥，取出即发酵香肠的成品。

### 2.3 发酵剂的制作

将植物乳杆菌、戊糖片球菌和葡萄球菌的菌株按照细胞数量为 1: 1: 1 混合均匀，在 37℃ 对应的液体培养基中活化 5 次，每次 12 h；活化完成的菌液于 4℃ 下 4000 rpm 离心 15 min，用生理盐水洗涤 1 次再离心，收集菌体并适量稀释即为发酵剂，运用血球计数法计数，发酵剂的接种量为  $10^7$  CFU/g。

### 2.4 样品的采集

实验分组：A 组为对照组（无发酵剂），B 组为接种组（有发酵剂）。取香肠发酵过程中的 10 个工艺点，即 0(原料肉)、2、5、8、12、15、18、21、24、27、30 d 进行采样。

### 2.5.生物胺含量测定

取 5 g 肉加入 20 mL 0.1 mol/L 的盐酸匀浆，4℃，4000 g 离心 10 min，沉淀部分如前的方法再提取一次。取 2 次的上清液用 0.1 mol/L 的盐酸定容到 50 mL，取 1 mL 样液进行柱前衍生并上机测定，衍生步骤同 1.3（1），色谱条件同 1.3（3）。

### 2.6.统计分析



试验数据通过 Excel 软件进行数据处理和作图。结果如图 10-16 所示。

$$\text{生物胺降解率 (\%)} = (W_0 - W_1) * 100 / W_0$$

( $W_0$  为对照中生物胺的含量,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $W_1$  为接种组中生物胺的含量,  $\mu\text{g/mL}$ )

## 2.7.结果与分析

### 2.7.1 植物乳杆菌对川味香肠中生物胺降解能力

#### 2.7.1.1 植物乳杆菌对川味香肠加工过程中组胺的影响

由图 10 可知, 在四川香肠在加工过程中 A 组和 B 组的组胺的含量随着成熟的进行呈升高的趋势。组胺是毒性最强的生物胺, 过量摄入会引起高血压、腹泻等。美国 FDA 对鱼中生物胺的限量标准为  $50\text{mg/kg}$ ; 上海市食品药品监督管理局暂定发酵肉制品中组胺限量为低于  $100\text{mg/kg}$ 。原料肉中组胺的含量非常低; 发酵 2d, A、B 两组香肠中组胺含量显著增加, 这可能是由于原料肉中的组氨酸在组氨酸脱羧酶的作用下形成组胺; A 组香肠中组胺含量显著低于 B 组, 这可能是由于 A 组接种的发酵剂抑制了产组胺微生物的生长, 从而抑制组胺的形成。在成熟过程中, A 组四川香肠组胺的增加量显著低于 B 组, 这说明接种的发酵剂具有较强的组胺代谢酶活性, 从而减少了组胺的积累; 成熟 30d, A 组香肠中组胺含量为  $93.50\text{mg/kg}$ , B 组为  $161.08\text{mg/kg}$ , A 组香肠中组胺含量低于  $100\text{mg/kg}$ , 在较安全的范围内, 成熟 30d, A 组显著低于 B 组, 降解率达到 41.95%, 说明发酵剂对组胺的降解效果显著。

#### 2.7.1.2 植物乳杆菌对川味香肠加工过程中酪胺的影响

由图 11 可知, 在川味香肠整个加工过程中酪胺含量呈升高的趋势。与组胺一样, 在原料肉中仅检测出少量酪胺; 发酵 2d, 两组香肠中酪胺含量显著增加, 这可能是由于原料肉中本身存在酪氨酸在酪氨酸脱羧酶的作用下形成酪胺。成熟前期(5~24d), A 组和 B 组的酪胺含量差异不显著, 这可能是由于 A 组接种的发酵剂对酪胺的降解能力较弱; 成熟后期(27~30d), B 组的酪胺含量显著增加, 可能是由于蛋白质降解产生了较多的酪氨酸, 导致了酪胺的积累。成熟 30d,

A 组香肠中酪胺含量为 95.18mg/kg, B 组为 125.35mg/kg, 降解率为 24.07%说明发酵剂对酪胺有一定的降解作用。

### 2.7.1.3 植物乳杆菌对川味香肠加工过程中尸胺的影响

由图 12 可知, 在四川香肠在加工过程中 A 组和 B 组尸胺含量呈增加的趋势。尸胺可以作为肉新鲜程度的评价指标, 原料肉中尸胺含量很低, 说明原料肉比较新鲜。发酵 2d, 两组香肠中尸胺含量显著增加, 这可能是由于蛋白质降解产生的氨基酸在较高的发酵温度下脱羧形成了尸胺。在成熟过程中, B 组香肠的尸胺含量呈显著的上升趋势, 这可能是由于成熟过程中蛋白质不断降解产生赖氨酸, 赖氨酸在赖氨酸脱羧酶的作用下形成尸胺, 导致尸胺的大量积累; A 组的增加趋势缓慢, 这是由于接种的发酵剂抑制了赖氨酸脱羧酶的活性, 从而抑制了尸胺的积累, 说明发酵剂对尸胺的降解效果显著。成熟 30d, A 组的尸胺含量(36.57mg/kg)显著低于 B 组(79.83mg/kg), 降解率达到 54.19%, 说明发酵剂对尸胺的降解效果显著。

### 2.7.1.4 植物乳杆菌对川味香肠加工过程中腐胺的影响

从图 13 可以看出, 在川味香肠在加工过程中 A 组和 B 组腐胺含量逐渐增加。发酵 2d, 两组香肠中腐胺含量增加不显著, 这可能是由于原料肉中含有腐胺的前体物质较少, 短时间内蛋白质降解产生的氨基酸也较少; 成熟前期(2~12d), A 组和 B 组腐胺含量呈缓慢增加, 这可能是由于蛋白质在前期的降解反应不显著; 成熟后期(12~30d), A 组和 B 组的腐胺含量逐渐增加较多, 可能是由于蛋白质降解产生的鸟氨酸和精氨酸增加。成熟 30d, A 组的腐胺含量(57.98mg/kg)低于 B 组(64.97mg/kg), 降解率为 10.76%, 说明发酵剂对腐胺有一定的降解作用。

### 2.7.1.5 植物乳杆菌对川味香肠加工过程中色胺的影响

从图 14 可以看出, 在川味香肠整个加工过程中 A 组和 B 组色胺含量逐渐增加。发酵 2d, A 组和 B 组四川香肠中色胺含量显著增加, 但两组差异不显著, 这可能是由于原料肉中本身存在大量的色氨酸, 并且较高的发酵温度有利于色氨酸脱羧酶使色氨酸脱羧形成大量色胺。在成熟前期(2~18d), A 组和 B 组四川

香肠中色胺含量呈缓慢增加趋势，这可能是由于成熟前期蛋白质降解产生的色氨酸较少；在成熟后期(18~30d)，A 组和 B 组四川香肠中色胺含量显著增加，这可能是色氨酸含量不断增加而微生物生长受到低水分的抑制，A 组含量低于 B 组，这可能是接种的发酵剂具有色胺氧化酶从而降解了色胺。成熟 30d，A 组色胺含量为 27.57mg/kg 显著低于 B 组(36.71mg/kg)，降解率为 24.90%，说明发酵剂对色胺有一定的降解作用。

### 2.7.1.6 植物乳杆菌对川味香肠加工过程中苯乙胺的影响

从图 15 可以看出，在四川香肠整个加工过程中 A 组和 B 组苯乙胺含量逐渐增多。发酵 2d，苯乙胺含量显著高于原料肉，这可能是由于原料肉中较多的苯丙氨酸在较高的发酵温度由苯丙氨酸脱羧酶脱羧导致苯乙胺大量积累。成熟前期(2~12d)，A 组和 B 组苯乙胺含量差异不显著，这可能是由于接种的发酵剂对苯乙胺降解效果不显著；成熟 15d，A 组苯乙胺含量(13.52mg/kg)显著低于 B 组(18.90mg/kg)，这可能是由于 B 组前期降解产生的苯丙氨酸在微生物的作用下产生苯乙胺，这与 A 组苯丙氨酸含量高于 B 组的结果相吻合；成熟后期(15~30d)，A 组和 B 组苯乙胺含量呈缓慢增加的趋势，这可能是由于成熟后期高盐的环境不利于微生物产生苯丙氨酸脱羧酶。成熟 30d，A 组比 B 组苯乙胺含量降低 8.07%，说明发酵剂对苯乙胺有一定的降解作用。

### 2.7.1.7 植物乳杆菌对川味香肠加工过程中亚精胺的影响

由图 16 可知，在川味香肠整个加工过程中亚精胺含量整体呈上升的趋势，亚精胺的含量在 2.0~6.0mg/kg，亚精胺的含量一直处于低水平。成熟 12d，A 组和 B 组的亚精胺含量显著增加，这可能是由于蛋白质降解产生了较多的精氨酸，精氨酸进一步脱羧形成亚精胺；成熟过程中，A 组和 B 组香肠中亚精胺含量差异不显著，这可能是由于亚精胺主要存在于原料肉中，在香肠成熟过程可以被利用。成熟 30d，A 组比 B 组苯乙胺含量降低 5.3%，说明发酵剂对亚精胺有一定的降解作用。

2.8 植物乳杆菌对川味香肠加工过程总胺的影响，如表 9 所示。

表 9 四川香肠加工过程中生物胺总量变化

# 说明书

时间(d)	生物胺总量(mg/kg)	
	A	B
0	15.06 <sup>n</sup>	15.06 <sup>n</sup>
2	57.81 <sup>m</sup>	63.08 <sup>m</sup> <sup>b *</sup>
5	88.72 <sup>k</sup>	105.09 <sup>k</sup> <sup>*</sup>
8	113.22 <sup>h</sup>	132.55 <sup>h</sup> <sup>*</sup>
12	153.19 <sup>g</sup>	180.87 <sup>g</sup> <sup>*</sup>
15	176.89 <sup>f</sup>	224.08 <sup>f</sup> <sup>*</sup>
18	206.43 <sup>e</sup>	256.67 <sup>e</sup> <sup>*</sup>
21	242.06 <sup>d</sup>	297.31 <sup>d</sup> <sup>*</sup>
24	264.46 <sup>c</sup>	345.45 <sup>c</sup> <sup>*</sup>
27	285.21 <sup>b</sup>	386.45 <sup>b</sup> <sup>*</sup>
30	300.60 <sup>a</sup>	422.13 <sup>a</sup> <sup>*</sup>

注：\* 表示同行数据间差异显著；不同小写字母表示同列数据间差异显著(  $P < 0.05$ )。

在川味香肠中整个加工过程中生物胺总量变化如表 9 所示。由表 9 可知，A 组和 B 组香肠生物胺总量在加工过程中均呈上升的趋势，B 组的增速高于 A 组。发酵 2d，A 组生物胺总量显著高于原料肉( $P < 0.05$ )，这可能是由于原料肉中存在较多的生物胺前体氨基酸；A 组生物胺总量显著低于 B 组，这可能是由于 A 组接种发酵剂对生物胺具有降解作用。在成熟过程中，A 组和 B 组香肠生物胺

总量均呈显著的增加趋势( $P < 0.05$ )。成熟 30d, A 组香肠中生物胺总量为 340.60mg/kg 显著低于 B 组(422.13mg/kg), 说明接种的发酵剂对生物胺总量具有显著的降解作用( $P < 0.05$ )。

综上所述, 本发明的植物乳杆菌能降解川味香肠中的生物胺, 对发酵完成时(30d)总生物胺的降解率为 28.79%, 其中对组胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺、苯乙胺和亚精胺的降解率分别达到了 41.95%、24.07%、54.19%、10.76%、24.90%、8.07%和 5.3%。由于该植物乳杆菌是从发酵香肠中筛选得到的, 具有优良益生特性, 因此, 该植物乳杆菌尤其适合于腊肉和火腿等发酵肉制品的生产, 对于功能性乳酸菌发酵剂的研发、建立乳酸菌菌种资源库以及一定程度解决食品安全问题具有重要的现实意义。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式, 其描述较为具体和详细, 但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都属于本发明的保护范围。因此, 本发明的保护范围应以所附权利要求为准。