

不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉品质影响及安全性评价

王俊钢¹, 李宇辉^{*2}, 蒲顺昌¹, 丁之恩¹

(1. 亳州学院 生物与食品工程系, 安徽 亳州 236800; 2. 新疆农垦科学院 农产品加工研究所, 新疆 石河子 832000)

摘要: 为提升风干牛肉的品质, 筛选具有优良特性的乳酸菌发酵剂进行风干牛肉的制作。分别将 3 种产蛋白酶乳酸菌(乳酸乳球菌(S-1)、戊糖片球菌(S-2)、格氏乳球菌(S-3))接种于牛肉, 研究牛肉腌制、发酵、风干、成熟等不同阶段的水分、pH、硫代巴比妥酸(TBARS)值、色泽、质构和微生物等品质指标变化。另外, 采用高效液相色谱法分析样品中生物胺质量分数变化, 并对添加的菌株安全性进行评价。结果表明, 3 种产蛋白酶乳酸菌均可以显著降低风干牛肉的 pH 和 TBARS 值($P<0.05$), 改善色泽和质构, 但对水分质量分数变化没有显著影响($P>0.05$); 3 种发酵剂均能有效抑制产品中大肠菌群的生长, 其中 S-2 抑菌作用最强; 3 种发酵剂均可以有效抑制风干牛肉中生物胺(腐胺、尸胺、组胺、酪胺)的形成, 其中 S-2、S-3 的抑制效果更好。因此, 3 株乳酸菌作为发酵剂应用于风干牛肉可以提升产品品质及安全性, 可以为产蛋白酶乳酸菌在风干牛肉中的应用提供理论依据。

关键词: 乳酸菌; 蛋白酶; 质构; 生物胺; 安全评价

中图分类号: TS 201.3 文章编号: 1673-1689(2023)12-0072-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20210716003

Effects of Different Protease-Producing Lactic Acid Bacteria on Quality and Safety of Dried Beef

WANG Jungang¹, LI Yuhui^{*2}, PU Shunchang¹, DING Zhi'en¹

(1. Biology and Food Engineering Department, Bozhou University, Bozhou 236800, China; 2. Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: In order to enhance the quality of air-dried beef, this study aimed to select the starter culture of lactic acid bacteria with excellent characteristics for its production. Three different protease-producing lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* S-1, *Pediococcus pentosaceus* S-2, *Lactococcus gasseri* S-3) were separately inoculated into beef. At different stages of curing, fermentation, air drying and maturation of the air-dried beef, the physical and chemical analysis techniques were used to detect its moisture content, pH value, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value, color, texture and microorganisms. In addition, high-performance liquid

收稿日期: 2021-07-16 修回日期: 2021-09-22

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31860437); 新疆科技创新人才计划“强企”科技创新骨干人才计划项目(2021CB004)。

* 通信作者: 李宇辉(1986—)女, 硕士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事传统畜产品加工及食品中乳酸菌研究。

E-mail: liyuhui615@sina.com

chromatography was employed to analyze the variations in the mass fraction of biogenic amines in air-dried beef, and safety assessment of the added strains was conducted. The results revealed that protease-producing lactic acid bacteria could significantly reduce the pH value and TBARS value ($P<0.05$), improve the color and texture of air-dried beef. However, there was no significant effect on the change of moisture mass fraction ($P>0.05$). All three starters could effectively inhibit the growth of *Enterobacter*, with S-2 demonstrating the strongest antibacterial effect. The three starters could efficiently inhibit the formation of biological amines (putrescine, cadaverine, histamine, and tyramine) in the air-dried beef, with S-2 and S-3 exhibiting the best inhibitory effects. Therefore, three strains of lactic acid bacteria used as the starters in air-dried beef can improve the quality and safety of products, thereby providing a theoretical basis for the application of protease-producing lactic acid bacteria in air-dried beef.

Keywords: lactic acid bacteria, protease, texture, biogenic amines, safety evaluation

新疆传统风干肉产品采用自然发酵方式,通过环境微生物以及成熟过程中微生物的生长影响最终产品的风味、颜色和质地。由于采用自然发酵,生产周期长、微生物来源复杂,因此导致风干肉制品质量不高。专用发酵剂可以通过快速基质酸化或产生抗菌素(例如细菌素)来提高发酵肉制品的安全性^[1]。乳酸菌是发酵肉制品中常用的发酵剂^[2],其产生乳酸能促进 pH 降低,赋予肉制品酸性风味并抑制其他微生物生长^[3]。研究发现,戊糖片球菌不仅能够有效抑制风干羊肉贮藏过程中的脂质氧化,还能提高产品品质^[4],并且具有一定的抑菌能力^[5]。另外,乳酸菌在发酵肉制品成熟过程中对降低产品的 pH 和 A_{520} ,提升产品色泽,控制产品的安全性等都起到关键作用^[6],与呈味氨基酸及挥发性风味物质的形成也密切相关^[7]。

发酵肉制品中生物胺主要是通过细菌的代谢作用形成。微生物发酵过程中产生了大量的酶,将蛋白质分解生成氨基酸^[7],而后氨基酸经氨基酸脱羧酶作用生成生物胺^[8]。研究发现在肉制品发酵过程中,高温低盐条件下,乳酸菌发酵产生的脱羧酶可以促进酪胺的形成^[9]。组胺则由乳酸链球菌和瑞士乳杆菌的脱羧酶作用产生^[10]。由于不同乳酸菌菌株的发酵特性和产酶特性不同,导致其在发酵过程中对肉制品里生物胺的影响存在差异^[9-10]。因此,有必要对所用的发酵剂做进一步研究。

作者所在实验室前期从新疆传统手工制作的哈萨克族风干肉中分离出具有较好产蛋白酶特性的乳酸菌菌株^[11],分别为乳酸乳球菌(S-1)、戊糖片

球菌(S-2)和格氏乳球菌(S-3)。为了进一步对这3株乳酸菌的发酵性能和安全性进行评价,分别用3株乳酸菌来制作风干牛肉,通过研究腌制、风干以及贮藏过程中牛肉理化性质的变化,并通过 HPLC 技术分析产品中生物胺质量分数变化,比较3株乳酸菌对风干牛肉品质的影响,以期乳酸菌的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜牛后腿肉:新疆石河子农贸市场;食盐、白糖:新疆石河子天扬美好生活超市;乳酸乳球菌(S-1)由传统新疆塔城风干肉中分离获取;戊糖片球菌(S-2)、格氏乳球菌(S-3)由传统新疆巴里坤风干肉中分离获取。

MRS 培养基、PCA 平板计数培养基、VRBA 培养基:青岛高科园海博生物技术有限公司;色胺(SER)、苯乙胺(PHE)、腐胺(PUT)、组胺(HIS)、酪胺(TYR)、尸胺(CAD)、精胺(SPM)、亚精胺(SPD)、丹磺酰氯:美国 Sigma 公司;乙腈、甲醇:天津福晨化学试剂厂;三氯乙酸、异丙醇、氨水、氢氧化钠、碳酸氢钠:天津永晟精细化工有限公司;高氯酸:天津政成化学制品有限公司;丙酮:济南源飞伟业化工有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯,其余为分析纯。

1.2 仪器与设备

YXQ-LS-75G 型立式压力蒸汽灭菌锅、SPX-250C 恒温恒湿箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂;BS223S 型分析天平:美国 Mettler Toledo 公司;

SW-cg-2F.100 级超净工作台;苏州安泰空气技术有限公司;101 型电热鼓风干燥箱;北京市永光明医疗仪器有限公司;Milli-Q 超纯水系统;Millipore 公司;5417R 型高速冷冻离心机;德国 eppendorf 仪器有限公司;CS-45C 冠亚快速水分测定仪;深圳冠亚水分仪科技有限公司;UB-7 pH 计;美国赛多利斯丹佛公司;3nh-NS800 便携式色差计;上海高致精密仪器有限公司;UV-1800 紫外可见分光光度计;北京世纪科信科学仪器有限公司;GelDoc 2000 凝胶成像仪;美国 BioRad 公司;LC-2010AHT 型高效液相色谱仪;日本岛津公司。

1.3 实验方法

1.3.1 风干牛肉样品制作与采样 前处理:选择新鲜的牛后腿肉,剔骨、去除筋腱,用冷水淋洗,切割修整为长条状(200 g);腌制期:加入质量分数为 1% 的糖和 2.5% 的盐,以及 100 mg/kg 亚硝酸钠,腌制温度 4 ℃,腌制时间 12 h;发酵期:在肉中接种不同产蛋白酶乳酸菌,根据各乳酸菌生长曲线,在对数期中止发酵,离心得到菌泥,加入生理盐水,使乳酸菌浓度为 1.0×10^7 CFU/g,发酵温度 15 ℃,相对湿度 70%,发酵时间 24 h;风干期:温度 40 ℃,时间 48 h;贮藏期:温度 4 ℃,贮藏 14 d。对照(CK)组除不添加发酵剂外,其余工艺参数均与实验组相同。分别在前处理结束,腌制结束,风干 0、1、2 d 以及贮藏 7、14 d 时取样,每个采样点各取 5 份样品(200 g 左右)。实验中共制作了 4 组风干牛肉,取样后立即检测样品菌落总数、乳酸菌数以及大肠菌群的变化,其余样品迅速真空包装并保存于 -20 ℃ 冰箱内,用于检测其 pH、水分质量分数、TBARS 值、色差、质构指标以及生物胺质量分数。

1.3.2 微生物测定 取不同阶段的样品,在无菌超净台中用刀切碎,取 5 g 用于后续菌落浓度、乳酸菌浓度、大肠菌群浓度的测定。检测方法参考国家标准 GB4789.2—2016,GB4789.35—2016,GB4789.3—2016。

1.3.3 水分的测定 水分质量分数采用水分测定仪检测。将水分测定仪开机预热,并使用专用砝码进行校准。随后,将样品剪碎,称取 5.00 g,放入水分测定仪中,设置温度为 105 ℃,干燥至质量恒定后水分测定仪自动停止,屏幕显示样品初始质量、干燥后的质量、水分质量分数。实验重复测定 3 次。

1.3.4 pH 测定 参照 GB/T9695.5—2008,将样品剪碎,称取 3.00 g,加入 27 mL 蒸馏水,利用匀浆器

10 000 g 均质 1 min,随后用 pH 计测定。测定前对 pH 计进行校准。记录 3 组平行数据。

1.3.5 TBARS 值测定 准确称取研磨均匀的风干牛肉样品 10 g,置于 100 mL 具塞三角瓶内,加入 50 mL 质量分数 7.5% 的三氯乙酸溶液(含质量分数 0.1% 的 EDTA),振摇 30 min,用双层滤纸过滤 2 次。准确移取上述滤液 5 mL 置于 25 mL 比色管内,加入 5 mL TBA 溶液(0.02 mol/L),混匀。加塞,置于 90 ℃ 水浴锅内保温 40 min,取出冷却 1 h,移入小试管内以 6 000 g 离心 5 min,上清液倾入 25 mL 比色管内,加入 5 mL 氯仿,摇匀,静置,分层,吸出上清液,分别测定波长 532、600 nm 处的吸光度(同时做空白实验),并用以下公式计算 TBARS 值。

$$S = (A_1 - A_2) \times 72.6 \times \frac{100}{m \times 155}$$

式中: S 为 TBARS 值,mg/kg; m 为样品质量,g;72.6 为换算系数; A_1 、 A_2 分别为波长 532、600 nm 处样品的吸光度。

1.3.6 色泽测定 色差计在使用前用白板进行校准,分别记录 L^* 、 a^* 、 b^* 值,每个样品重复操作 5 次,取平均值。

1.3.7 质构测定 采用质构仪进行测定。测定指标包括硬度、弹性、咀嚼性、内聚性。测试条件为:P36R 探头,测前速度 3.00 mm/s,测中速度 1.00 mm/s,测后速度 5.00 mm/s;位移 20.00 mm,时间 5.00 s;循环 2 次,触发点负载 5 g。重复操作 5 次取平均值。

1.3.8 生物胺测定 参照 Lu 等的方法^[12]进行样品制备。称取 5 g 样品在 20 mL 高氯酸水溶液(0.4 mol/L)中进行均质,并在 4 ℃ 下以 5 000 g 离心 10 min。收集上清液并重复提取 3 次,过滤并定容至 50 mL。取 1 mL 上述溶液进行衍生处理,加入 200 μ L NaOH 溶液(2 mol/L),然后加入 300 μ L 饱和 NaHCO₃ 溶液缓冲,再加入 2 mL 丹磺酰氯溶液(10 g/L),40 ℃ 避光反应 45 min,之后加入 100 μ L 的 NH₄OH 溶液终止反应。最后加入乙腈使终体积为 5 mL。衍生处理后用 0.22 μ m 滤膜过滤装入样品瓶,用于上机检测。采用高效液相色谱仪进行生物胺的测定,测试条件与李彬彬等的条件相同^[13]。

1.4 数据分析

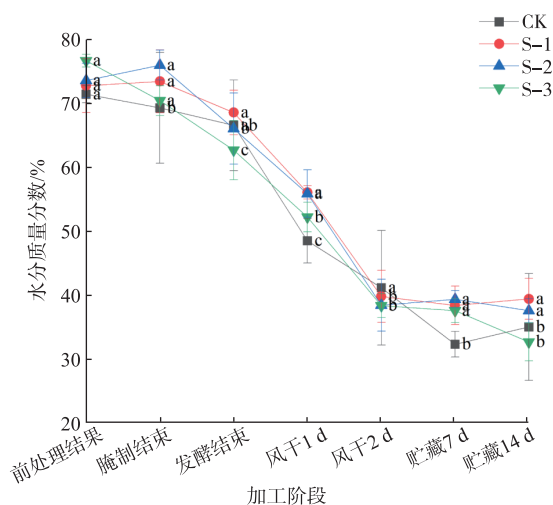
所有实验重复测定 3 次。使用 Excel 2010 建立数据库。采用 Origin Pro2020 绘图,并用 SPSS 20 进行显著性分析,结果采用均值 \pm 标准偏差形式表示,

数据差异性采用单因素方差分析中的最小显著差异法, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉水分的影响

由图 1 可知,在风干牛肉的加工过程中水分质量分数总体呈下降趋势。在腌制结束时,4 组样品的水分质量分数仍在 70% 左右,且实验组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。发酵结束阶段,水分质量分数下降趋势明显,这可能跟发酵环境有关。实验中采用的发酵温度为 15 °C,发酵时间 24 h,同等条件下,温度升高必然会导致水分蒸发增加。而在风干期,风干温度继续升高 (40 °C),在较高的风干温度和发酵的双重条件影响下,样品中水分质量分数持续降低,在风干 2 d 时,样品的水分质量分数明显低于 CK 组 ($P < 0.05$),这可能跟添加的乳酸菌发酵剂有关,微生物的发酵导致了肉中部分蛋白质变性,从而使其保水性下降。CK 组贮藏期间干燥曲线可分为两个阶段,在贮藏 7 d 大幅度下降,贮藏 7 d 后有所升高。相同条件下,S-1、S-2、S-3 组对风干牛肉的水分质量分数没有显著影响 ($P > 0.05$)。风干 1 d 和贮藏 7 d 时,CK 组和实验组之间水分质量分数差异显著 ($P < 0.05$)。



不同字母表示相同时间不同组别之间差异显著 ($P < 0.05$)。

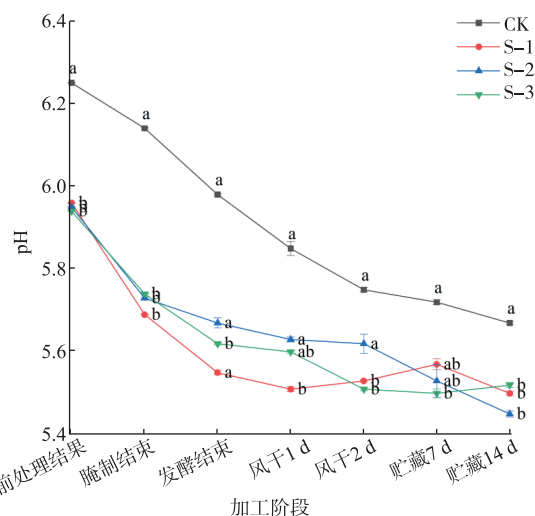
图 1 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉水分的影响

Fig. 1 Effects of different protease-producing lactic acid bacteria on the moisture of air-dried beef

2.2 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉 pH 的影响

pH 代表食品中的有效酸度,其变化情况可间接反映风干肉制品在微生物发酵过程中的产酸情

况。不同阶段风干牛肉的 pH 变化规律如图 2 所示。肉发酵的初始 pH 一般不应超过 6.2,较低的 pH 可以抑制有害微生物的繁殖,有利于乳酸菌等有益微生物的生长。样品接种乳酸菌后,实验组样品的 pH 分别降至 5.69、5.73、5.74。乳酸菌可以发酵碳水化合物,导致肉制品变酸,从而降低 pH^[14]。腌制过程中添加了质量分数 1% 的糖,乳酸菌可能会利用糖来生产更多的乳酸,从而降低肉的 pH。此外,在发酵以及风干过程中,实验组的 pH 与 CK 组相比,降低更为显著 ($P < 0.05$),而 3 个实验组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。在风干 1 d 至贮藏 7 d, S-1 组牛肉的 pH 呈一定程度的上升趋势,这可能与乳酸菌产生的蛋白酶分解蛋白质产生氨、三甲胺等碱性物质有关^[15]。



不同字母表示相同时间不同组别之间差异显著 ($P < 0.05$)。

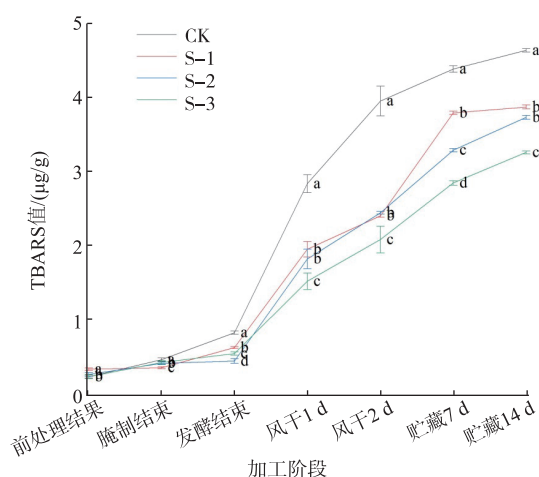
图 2 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉 pH 的影响

Fig. 2 Effects of different protease-producing lactic acid bacteria on the pH value of air-dried beef

2.3 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉 TBARS 值的影响

TBARS 值是评估发酵过程中脂质氧化程度的合适指示剂,其主要用于评估氧化二级产物(例如丙二醛、酮等)的形成。肉制品中 TBARS 值的增加,主要是由于脂质氧化^[16]。不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉 TBARS 值的影响见图 3。各组样品的 TBARS 值均随着加工时间的延长而增加。各实验组的 TBARS 值从风干阶段开始显著低于 CK 组 ($P < 0.05$),说明产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉脂质氧化具有一定程度的抑制作用。Bozkurt 等也发现添加微生物发酵剂的香肠样品在储藏后期, TBARS 值显著低于不

添加微生物的香肠样品 ($P<0.05$)^[17]。S-3 与 S-1、S-2 组的 TBARS 值差异显著 ($P<0.05$), 这可能与不同乳酸菌菌株产蛋白酶的能力有关。



不同字母表示相同时间不同组别之间差异显著 ($P<0.05$)。

图 3 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉 TBARS 值的影响
Fig. 3 Effects of different protease-producing lactic acid bacteria on TBARS of air-dried beef

2.4 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉色泽的影响

食品的色泽是衡量食品外观的重要指标之一^[18]。发酵牛肉干的色泽变化见表 1。在整个加工过程中, L^* 基本呈下降趋势, 这可能是由于随着发酵的进行, 肉干表面的水分流失, 表面变得干燥, 故 L^* 逐渐

降低, 这与杨明阳的结果相似^[19]。在前处理结束后, 4 组的 L^* 差异不显著 ($P>0.05$)。风干期间, 实验组的 L^* 高于 CK 组, 其中 S-1、S-2 组显著高于 CK 组 ($P<0.05$)。在风干 2 d 时, S-1 组的 L^* 显著高于 CK 组 ($P<0.05$), 但是与 S-2、S-3 组之间差异不显著 ($P>0.05$)。说明添加产蛋白酶乳酸菌能够增加风干牛肉的亮度。在贮藏结束后, 实验组的 L^* 与 CK 组有差异, 4 组的 L^* 有所不同, 可能与样品的水分质量分数有关^[20]。腌制结束后, S-1、S-2、S-3 组的 a^* 显著高于 CK 组 ($P<0.05$), 风干结束后呈现相同的趋势。有学者认为, 微生物发酵能够将高铁肌红蛋白转化为亚硝基肌红蛋白, 从而提高肉制品 a^* ^[21]。虽然 S-2、S-3 组的 a^* 显著高于 CK 组 ($P<0.05$), 但却显著低于 S-1 组 ($P<0.05$)。4 组中的 b^* 无明显差别, 说明添加发酵剂对 b^* 影响不明显。

2.5 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉质构的影响

由表 2 可知, 实验组的牛肉硬度均显著低于 CK 组 ($P<0.05$), 其中 S-1 组显著低于 S-2、S-3 组, 可能是乳酸菌发酵对蛋白质结构产生了影响, 从而改善了风干牛肉的硬度。CK 组、S-1 组的咀嚼性和弹性无显著差异 ($P>0.05$), 与 S-2、S-3 组有显著差异 ($P<0.05$)。咀嚼性排序为 S-3 组>CK 组>S-1 组>S-2 组, 弹性排序为 CK 组>S-1 组>S-3 组>S-2 组。4 组的内聚性无显著差异 ($P>0.05$)。实验组较 CK

表 1 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉色泽的影响

Table 1 Effects of different protease-producing lactic acid bacteria on the color of air-dried beef

加工阶段	L^*				a^*				b^*			
	CK	S-1	S-2	S-3	CK	S-1	S-2	S-3	CK	S-1	S-2	S-3
前处理	34.87±	34.73±	34.77±	34.82±	20.53±	20.03±	20.55±	20.57±	14.24±	14.29±	14.24±	14.28±
结束	3.63 ^a	2.73 ^a	3.30 ^a	1.55 ^a	3.11 ^a	3.11 ^b	2.81 ^a	3.02 ^a	2.30 ^a	2.58 ^a	1.68 ^a	2.97 ^a
腌制	38.49±	37.71±	33.32±	35.88±	18.07±	22.02±	26.46±	27.19±	16.32±	11.10±	12.92±	11.93±
结束	0.42 ^a	0.99 ^a	1.61 ^b	0.32 ^{ab}	3.92 ^c	0.16 ^b	3.07 ^a	2.26 ^a	5.18 ^a	1.09 ^a	1.91 ^a	0.90 ^a
发酵	39.70±	43.67±	45.96±	40.98±	11.97±	11.47±	10.09±	12.54±	11.56±	13.80±	12.40±	14.26±
结束	0.40 ^c	0.66 ^{ab}	1.63 ^a	1.14 ^{bc}	0.32 ^a	2.92 ^a	1.06 ^a	0.27 ^a	0.47 ^a	1.79 ^a	2.41 ^a	0.33 ^a
风干	25.54±	28.60±	31.15±	26.00±	10.10±	12.30±	14.18±	18.26±	16.43±	14.27±	16.02±	13.59±
1 d	1.65 ^b	2.72 ^{ab}	0.08 ^a	0.52 ^{ab}	0.43 ^b	3.49 ^{ab}	0.42 ^{ab}	0.63 ^a	2.02 ^a	1.39 ^a	0.24 ^a	0.31 ^a
风干	20.54±	27.99±	22.65±	25.24±	14.81±	19.42±	15.41±	17.80±	8.00±	20.54±	15.56±	12.16±
2 d	0.42 ^b	3.43 ^a	0.69 ^{ab}	0.55 ^{ab}	1.54 ^c	0.30 ^a	1.82 ^b	3.26 ^b	0.75 ^c	0.40 ^a	3.94 ^{ab}	0.75 ^{bc}
贮藏	17.83±	16.10±	17.89±	19.46±	10.25±	13.89±	10.54±	12.11±	4.92±	4.39±	4.06±	7.57±
7 d	1.98 ^a	0.51 ^a	0.63 ^a	0.96 ^a	1.43 ^a	1.47 ^a	2.78 ^a	1.65 ^a	0.57 ^{ab}	0.65 ^b	0.86 ^b	1.27 ^a
贮藏	18.42±	18.41±	16.89±	19.29±	5.30±	8.26±	6.11±	4.98±	4.92±	4.39±	4.06±	7.57±
14 d	1.39 ^a	0.58 ^a	0.33 ^b	0.89 ^a	1.31 ^b	0.34 ^a	0.25 ^{ab}	0.50 ^b	0.57 ^{ab}	0.65 ^b	0.86 ^b	1.27 ^a

注: 不同字母表示同一加工阶段不同组别之间差异显著 ($P<0.05$)。

组,硬度、弹性、咀嚼性基本均有所下降,且质构改善情况的排序为 S-2 组>S-1 组>S-3 组>CK 组。这与王新惠等的研究结果相似^[22],添加复合发酵剂可

以降低肉干硬度、内聚性和弹性,改善风干牛肉的咀嚼性。

表 2 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉质构的影响

Table 2 Effects of different protease-producing lactic acid bacteria on the texture of air-dried beef

组别	硬度/g	咀嚼性	弹性	内聚性
CK	7 526.47±301.64 ^a	2 521.99±209.46 ^b	0.58±0.03 ^a	0.68±0.05 ^{ba}
S-1	4 325.45±165.98 ^c	2 500.71±215.68 ^b	0.53±0.04 ^{ab}	0.70±0.08 ^a
S-2	5 109.07±421.48 ^b	1 731.84±83.57 ^c	0.42±0.08 ^c	0.64±0.08 ^a
S-3	5 490.01±253.19 ^b	2 895.56±254.29 ^a	0.49±0.06 ^b	0.70±0.06 ^a

注:不同字母表示同一质构特性不同组别之间差异显著($P < 0.05$)。

2.6 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉微生物的影响

表 3 为不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉菌落浓度、乳酸菌浓度和大肠菌群浓度的影响。CK 组和实验组的菌落浓度均呈现逐渐增加的趋势。在发酵及贮藏过程中,CK 组的菌落浓度均高于实验组。在风干 2 d 后 CK 组菌落浓度的对数值达 6.72,此时 S-1、S-2、S-3 组的 $\lg N$ 分别为 6.12、6.52、6.10。乳酸菌发酵产生的有机酸等物质能够有效抑制其他微生物的生长^[23]。在风干结束后,S-1、S-2、S-3 组风干牛肉中的菌落浓度显著低于 CK 组 ($P < 0.05$),而贮藏结束时 CK 组仍显著高于 S-1、S-2、S-3 组 ($P < 0.05$)。贮藏 7 d 至 14 d,CK 组、S-2 组的菌落浓度仍呈上升趋势,这可能是由于低温导致乳酸菌活性降低,对杂菌生长的抑制作用减弱,从而导致菌落浓度的升高。

由表 3 可知,CK 组初始乳酸菌浓度的对数值为 3.92,这是由于在屠宰、加工、运输过程中与空气及包装材料的接触使原料肉含有一定浓度的乳酸菌。在腌制过程中,乳酸菌浓度略有下降,可能是低温以及食盐的添加抑制了乳酸菌的生长。另外,外源发酵剂的添加也会对样品中的乳酸菌产生一定的竞争性抑制作用。在风干 2 d 时,乳酸菌浓度逐渐上升,但是实验组的乳酸菌浓度显著低于 CK 组 ($P < 0.05$),且 S-2、S-3 与 S-1 组之间有显著差异 ($P < 0.05$)。贮藏 7 d 时乳酸菌浓度继续上升,这是由于乳酸菌是兼性厌氧菌,真空贮藏对乳酸菌菌群浓度影响不大^[24],但在贮藏 14 d 时乳酸菌浓度有所下降,说明乳酸菌繁殖速度小于衰亡速度,牛肉进入后发酵时期。

肉制品中大肠菌群的浓度与其原料卫生和产

品的品质安全密切相关。由表 3 可知,随着加工时间延长,大肠菌群浓度呈逐渐下降趋势,说明产蛋白酶乳酸菌对大肠菌群的生长繁殖具有一定的抑制作用。此外,大肠菌群浓度的降低也可能与低 pH 和低水分质量分数有关^[25]。田星等研究发现,在肉制品中添加等比例的戊糖片球菌、木糖葡萄球菌复合发酵剂,可以有效减少肉制品发酵前期大肠菌群的浓度,但发酵结束后大肠菌群浓度有所上升^[26],这与本研究结果有所不同,可能跟添加的发酵剂种类有关。

2.7 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉中生物胺的影响

2.7.1 生物胺混标的分离与分析 由图 4 可知,运用 1.3.8 中的流动相以及不同梯度的洗脱程序,可以在 20 min 之前有效洗脱出试剂峰以及其他杂峰,8 种生物胺单体分离度良好,峰形对称并且色谱峰无拖尾现象,能够根据此方法对生物胺进行定性、定量分析。

2.7.2 风干牛肉的生物胺质量分数 肉制品中的生物胺主要由微生物分泌的外源酶(氨基酸脱羧酶)催化形成,尤其是在发酵肉制品中,生物胺含量的高低可以直接反映不良微生物菌群的多少。有研究表明,适当在发酵肉中接种优良发酵剂对减少肉制品中生物胺的积累具有重要作用^[27]。如表 4 所示,牛肉最初都含有较低的生物胺,总生物胺质量分数为 3.92~5.56 mg/kg。其中,CK 组样品中生物胺质量分数随加工时间延长而显著增加 ($P < 0.05$),腐胺和尸胺质量分数的快速增加是引起总生物胺质量分数显著上升的主要原因,且腐胺和尸胺是肉制品卫生的重要指标。S-1、S-2、S-3 组腐胺和尸胺的增加

表 3 牛肉中微生物在不同加工阶段的变化情况

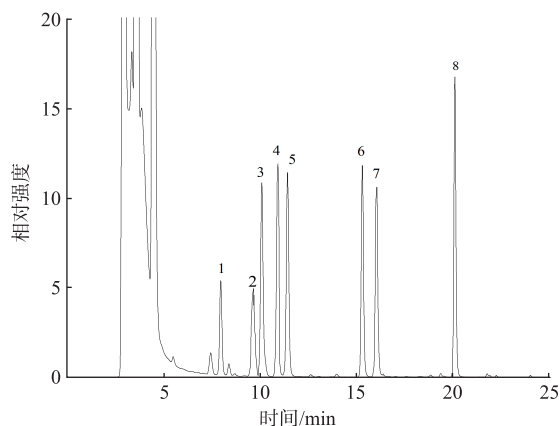
Table 3 Changes of microorganisms in beef during different processing stages

加工阶段	组别	菌落浓度的对数值	乳酸菌浓度的对数值	大肠菌群浓度的对数值
前处理结束	CK	4.76±0.05 ^a	3.92±0.07 ^a	3.78±0.06 ^a
	S-1	4.86±0.12 ^a	3.87±0.13 ^a	3.79±0.12 ^a
	S-2	4.83±0.08 ^a	3.94±0.11 ^a	3.82±0.19 ^a
	S-3	4.96±0.14 ^a	4.02±0.09 ^a	3.88±0.07 ^a
腌制结束	CK	5.73±0.11 ^a	3.69±0.19 ^b	3.80±0.12 ^b
	S-1	4.89±0.12 ^c	3.58±0.06 ^b	4.23±0.09 ^a
	S-2	5.12±0.09 ^b	3.49±0.07 ^b	4.11±0.12 ^a
	S-3	5.11±0.10 ^b	3.20±0.10 ^a	3.91±0.08 ^b
发酵结束	CK	5.89±0.05 ^a	4.92±0.07 ^a	3.32±0.06 ^a
	S-1	5.18±0.08 ^c	4.87±0.13 ^a	2.79±0.12 ^b
	S-2	5.16±0.08 ^c	4.94±0.11 ^a	2.84±0.09 ^b
	S-3	5.62±0.08 ^b	4.62±0.09 ^a	2.25±0.09 ^c
风干 1 d	CK	5.98±0.11 ^a	5.69±0.09 ^a	2.84±0.12 ^a
	S-1	4.81±0.12 ^d	5.20±0.10 ^b	2.23±0.09 ^b
	S-2	5.05±0.09 ^c	5.49±0.08 ^a	2.67±0.12 ^a
	S-3	5.32±0.10 ^b	5.58±0.10 ^a	2.65±0.08 ^a
风干 2 d	CK	6.72±0.08 ^a	6.46±0.12 ^a	2.15±0.13 ^b
	S-1	6.12±0.08 ^c	5.82±0.06 ^c	2.55±0.06 ^a
	S-2	6.52±0.09 ^b	6.18±0.07 ^b	2.24±0.10 ^b
	S-3	6.10±0.08 ^c	6.12±0.07 ^b	2.33±0.17 ^c
贮藏 7 d	CK	7.09±0.07 ^a	6.52±0.08 ^b	3.04±0.18 ^a
	S-1	6.29±0.10 ^b	7.19±0.11 ^a	2.17±0.04 ^c
	S-2	6.93±0.07 ^a	7.33±0.05 ^a	2.70±0.05 ^b
	S-3	6.98±0.08 ^a	7.25±0.08 ^a	2.43±0.13 ^c
贮藏 14 d	CK	7.13±0.08 ^a	6.22±0.24 ^a	3.07±0.10 ^a
	S-1	6.46±0.06 ^c	5.87±0.04 ^b	2.14±0.28 ^c
	S-2	6.97±0.10 ^b	5.89±0.05 ^b	2.42±0.09 ^b
	S-3	6.90±0.10 ^b	6.17±0.08 ^a	2.34±0.12 ^c

注:不同字母表示同一质构特性不同组别之间差异显著($P < 0.05$);微生物浓度的单位为 CFU/g。

明显低于 CK 组($P < 0.05$)。风干 2 d 后尸胺质量分数达到最高,分别为 58.05、16.19、10.53、15.82 mg/kg,之后质量分数逐渐下降,可能是因为低温条件下微生物产尸胺能力降低,这与陈颖的研究相似^[28]。腐胺质量分数在风干以及贮藏期间不断增加,贮藏结束后 CK 组、S-1 组和 S-2 组腐胺质量分数达到 24.49、20.20、8.62 mg/kg, S-3 组未检出,说明发酵剂的添加对腐胺的产生起到了一定抑制作用。

在加工过程中,各组苯乙胺质量分数呈现先上升后下降的变化趋势。在风干结束时 4 组样品中苯乙胺均未检出。精胺和亚精胺主要不是通过微生物脱羧产生,因此在发酵成熟过程中变化不大^[29]。贮藏结束后,不同组别中亚精胺质量分数基本稳定在 1.51~2.74 mg/kg。酪胺和组胺是发酵肉制品中毒性最强的生物胺,酪胺在加工过程中呈现先增加后降低的趋势,但总体质量分数始终保持在 19.08 mg/kg



1: 色胺 (TPY); 2: 苯乙胺 (FHE); 3: 腐胺 (FHE); 4: 尸胺 (CAD); 5: 组胺 (HIS); 6: 酪胺 (TYR); 7: 亚精胺 (SPD); 8: 精胺 (SPM)。

图 4 生物胺混合标准溶液 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatographic profiles of the biogenic amine mixed standard solution

以内。组胺质量分数在加工过程中逐渐增加,贮藏结束后为 9.32、22.93、8.94、0.82 mg/kg。S-3 组对酪胺和组胺的抑制作用明显 ($P<0.05$), 且对总生物胺质量分数影响最大。添加发酵剂可抑制腐胺、尸胺及组胺的大幅增加, 提高发酵肉干的卫生品质和安全性能, 这与 Baka 等的研究结果类似^[20]。

3 结 语

添加产蛋白酶乳酸菌制作风干牛肉可以显著降低产品的 pH、TBARS 值 ($P<0.05$), 但对水分质量分数影响不大 ($P>0.05$)。色泽方面, S-1、S-2、S-3 组均能提高风干牛肉的 L^* 和 a^* , 但对 b^* 影响不大。另外, 还可以降低风干牛肉的硬度、内聚性和弹性, 对改善风干牛肉咀嚼性有一定帮助。添加产蛋白酶乳酸菌能有效抑制风干牛肉加工过程中大肠菌群的生长。贮藏结束后, 在风干牛肉中共检测到 7 种生物胺, 其

表 4 不同产蛋白酶乳酸菌对风干牛肉中生物胺形成的影响

Table 4 Effects of different protease-producing lactic acid bacteria on the formation of biogenic amines in air-dried beef

阶段	组别	质量分数/(mg/kg)							
		苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总生物胺
前处理 结束	CK	0.84±0.01 ^a	—	0.27±0.01	0.43±0.01 ^a	0.10±0.00 ^a	0.60±0.01 ^a	3.33±0.01 ^a	5.56±0.08 ^a
	S-1	0.68±0.01 ^a	—	—	0.24±0.01 ^b	0.07±0.00 ^b	0.42±0.01 ^a	3.11±0.01 ^a	4.42±0.00 ^b
	S-2	0.74±0.01 ^a	—	—	0.12±0.01 ^c	0.03±0.01 ^c	0.21±0.01 ^c	2.81±0.01 ^a	3.92±0.08 ^b
	S-3	0.69±0.01 ^a	—	—	0.27±0.01 ^a	0.10±0.00 ^a	0.16±0.01 ^a	3.06±0.01 ^a	4.28±0.08 ^b
腌制 结束	CK	1.35±0.03 ^a	—	1.42±0.03 ^a	2.07±0.03 ^a	0.22±0.01 ^b	0.35±0.01 ^c	4.42±0.03 ^d	9.83±0.01 ^c
	S-1	1.35±0.03 ^b	—	0.65±0.01 ^b	1.89±0.03 ^b	0.17±0.01 ^c	0.32±0.02 ^c	5.76±0.06 ^c	9.94±0.02 ^{bc}
	S-2	1.17±0.01 ^c	—	0.28±0.01 ^d	1.48±0.01 ^c	0.21±0.01 ^b	1.48±0.03 ^b	6.38±0.05 ^b	10.41±0.05 ^b
	S-3	0.57±0.01 ^c	0.40±0.01	0.50±0.02 ^c	1.91±0.03 ^b	0.28±0.01 ^a	2.73±0.03 ^a	8.67±0.03 ^a	15.07±0.31 ^a
发酵 结束	CK	0.58±0.01 ^a	2.10±0.01 ^a	1.55±0.01 ^c	3.51±0.00 ^d	0.80±0.01 ^c	0.73±0.01 ^d	6.03±0.00 ^c	14.98±0.29 ^c
	S-1	0.38±0.00 ^b	1.44±0.02 ^a	3.31±0.05 ^a	1.63±0.01 ^c	1.39±0.04 ^b	1.63±0.01 ^c	7.03±0.30 ^b	16.82±0.09 ^b
	S-2	0.39±0.02 ^b	0.94±0.01 ^b	1.91±0.05 ^b	2.96±0.05 ^a	5.62±0.02 ^a	1.91±0.02 ^b	6.47±0.02 ^c	20.21±0.06 ^a
	S-3	0.59±0.01 ^a	0.87±0.00 ^b	0.58±0.01 ^d	2.75±0.04 ^b	0.22±0.03 ^d	2.74±0.03 ^a	7.61±0.12 ^a	15.37±0.15 ^b
风干 1 d	CK	1.86±0.01	10.47±0.32 ^a	18.79±0.14 ^a	3.72±0.02 ^b	10.38±0.46 ^a	3.39±0.03 ^b	8.51±0.04 ^c	57.21±0.04 ^a
	S-1	—	8.91±0.07 ^b	4.31±0.02 ^c	1.76±0.10 ^c	1.55±0.12 ^d	3.92±0.01 ^a	10.84±0.02 ^b	31.39±0.34 ^c
	S-2	—	6.01±0.13 ^c	10.34±0.16 ^a	1.76±0.16 ^c	7.69±0.17 ^c	2.53±0.01 ^c	8.27±0.04 ^c	36.61±0.67 ^b
	S-3	—	3.06±0.01 ^d	9.79±0.12 ^b	1.90±0.11 ^a	4.72±0.16 ^a	2.27±0.01 ^d	11.59±0.13 ^a	33.33±1.44 ^c
风干 2 d	CK	—	9.67±0.02 ^a	58.05±0.38 ^a	4.64±0.01 ^b	19.08±0.29 ^a	3.59±0.02 ^a	14.98±0.40 ^a	110.02±1.45 ^a
	S-1	—	7.80±0.05 ^b	16.19±0.23 ^b	6.21±0.00 ^a	15.38±0.07 ^b	1.90±0.00 ^c	8.72±0.02 ^c	56.20±0.63 ^b
	S-2	—	1.00±0.00 ^c	10.53±0.02 ^c	4.51±0.03 ^b	0.75±0.01 ^d	2.27±0.03 ^b	7.41±0.02 ^d	26.48±0.49 ^d
	S-3	—	0.99±0.01 ^c	15.82±0.28 ^b	3.01±0.00 ^c	6.73±0.10 ^c	1.72±0.01 ^c	11.00±0.01 ^b	39.27±1.15 ^c

续表 4

阶段	组别	质量分数/(mg/kg)							
		苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总生物胺
贮藏 7 d	CK	—	24.49±0.35 ^a	43.62±0.33 ^a	9.38±0.12 ^b	10.96±0.02 ^c	1.85±0.00 ^b	10.44±0.09 ^a	100.74±1.34 ^b
	S-1	—	20.20±0.34 ^b	15.22±0.37 ^b	12.93±0.18 ^a	17.77±0.76 ^a	1.83±0.01 ^b	9.09±0.07 ^b	113.04±1.89 ^a
	S-2	—	8.62±0.026 ^c	8.71±0.22 ^c	8.94±0.02 ^b	14.270±0.45 ^b	2.16±0.23 ^a	10.15±0.24 ^a	77.87±0.30 ^c
	S-3	—	—	8.73±0.28 ^d	0.61±0.02 ^c	0.23±0.03 ^d	0.74±0.01 ^c	3.56±0.06 ^c	6.25±0.18 ^d
贮藏 14 d	CK	—	24.38±0.35 ^a	43.42±0.33 ^a	9.32±0.12 ^b	10.96±0.04 ^c	1.51±0.01 ^c	10.52±0.09 ^a	100.30±1.34 ^a
	S-1	—	20.02±0.34 ^b	14.22±0.37 ^b	22.93±0.18 ^a	16.77±0.76 ^a	1.83±0.01 ^c	9.09±0.07 ^b	103.04±1.89 ^a
	S-2	—	8.62±0.03 ^c	3.71±0.22 ^c	8.94±0.04 ^b	14.27±0.45 ^b	2.16±0.23 ^b	10.25±0.24 ^a	77.87±0.30 ^b
	S-3	1.16±0.11	—	0.73±0.28 ^d	0.82±0.09 ^c	1.227±0.03 ^d	2.74±0.01 ^a	3.69±0.06 ^c	9.21±0.18 ^c

注:不同字母表示同一阶段不同组别之间差异显著($P < 0.05$)。

中产蛋白酶乳酸菌对腐胺、尸胺、组胺、酪胺的产生都有一定的抑制作用,但 S-2、S-3 的抑制效果更好。综合理化指标、微生物和生物胺检测结果,3 株产蛋白酶乳酸菌均可用于风干牛肉的制作。

参考文献:

- [1] WANG X H, REN H Y, LIU D Y, et al. Effects of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages[J]. **Food Control**, 2013, 32(2): 591-596.
- [2] FRAQUEZA M J, LARANJO M, ELIAS M, et al. Microbiological hazards associated with salt and nitrite reduction in cured meat products; control strategies based on antimicrobial effect of natural ingredients and protective microbiota[J]. **Current Opinion in Food Science**, 2021, 38: 32-39.
- [3] ISMAIL K S, MOJGANI N, KHAN A M. Characterization of partially purified bacteriocin like substance (BLIS) produced by probiotic *Lactobacillus* strains[J]. **International Journal of Enteric Pathogens**, 2014, 2(2): 1-6.
- [4] 张开屏, 张保军, 田建军. 一株戊糖片球菌对发酵羊肉干品质的影响[J]. **食品研究与开发**, 2018, 39(13): 99-104.
ZHANG K P, ZHANG B J, TIAN J J. Effect of an *Pediococcus pentosaceus* on quality of fermented semi-dry mutton[J]. **Food Research and Development**, 2018, 39(13): 99-104. (in Chinese)
- [5] DE AZEVEDO P O S, MENDONÇA C M N, SEIBERT L, et al. Bacteriocin-like inhibitory substance of *Pediococcus pentosaceus* as a biopreservative for *Listeria* sp. control in ready-to-eat pork ham[J]. **Publication of the Brazilian Society for Microbiology**, 2020, 51(3): 949-956.
- [6] JAWAN R, ABBASILIASI S, MUSTAFA S, et al. *In vitro* evaluation of potential probiotic strain *Lactococcus lactis* Gh1 and its bacteriocin-like inhibitory substances for potential use in the food industry[J]. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2021, 13(2): 422-440.
- [7] TRZASKOWSKA M, KOŁOZYŃ-KRAJEWSKA D, WÓJCIAK K, et al. Microbiological quality of raw-fermented sausages with *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain[J]. **Food Control**, 2014, 35(1): 184-191.
- [8] ZHANG H C, LI B B, ZHAO L L, et al. The effects of amine oxidase-producing starter culture on biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages[J]. **Journal of Food Safety**, 2019, 39(3): e12638.
- [9] 董春晖, 石硕, 钟强, 等. 发酵剂抑制发酵肉制品中酪胺形成机制及效果的研究进展[J]. **食品科学**, 2021, 42(19): 317-324.
DONG C H, SHI S, ZHONG Q, et al. Progress in the inhibitory effect and mechanism of starter cultures on the formation of tyramine in fermented meat products[J]. **Food Science**, 2021, 42(19): 317-324. (in Chinese)
- [10] LORENZO J M, MUNEKATA P E S, DOMÍNGUEZ R. Role of autochthonous starter cultures in the reduction of biogenic amines in traditional meat products[J]. **Current Opinion in Food Science**, 2017, 14: 61-65.
- [11] 李丹阳, 李宇辉, 高云云, 等. 新疆哈萨克族风干肉中产蛋白酶乳酸菌的筛选及酶学特性研究[J]. **食品与发酵工业**, 2020, 46

- (9):57-63.
- LI D Y, LI Y H, GAO Y Y, et al. Screening of protease-producing lactic acid bacteria from Xinjiang Kazakh air-dried meat and their enzymatic characteristics[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2020, 46(9): 57-63. (in Chinese)
- [12] LU S L, XU X L, ZHOU G H, et al. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage[J]. **Food Control**, 2010, 21(4): 444-449.
- [13] 李彬彬, 张雅晴, 赵利利, 等. 大蒜精油和发酵剂对熏马肠中生物胺及微生物分布的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 19-25.
- LI B B, ZHANG Y Q, ZHAO L L, et al. Effects of garlic essential oil and starter cultures on biogenic amine accumulation and microbial distribution in smoked horsemeat sausages[J]. **Food Science**, 2018, 39(9): 19-25. (in Chinese)
- [14] KUO C C, CHU C Y. Quality characteristics of Chinese sausages made from PSE pork[J]. **Meat Science**, 2003, 64(4): 441-449.
- [15] ÖZYURT G, KULEY E, ÖZKÜT ÜK S, et al. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice[J]. **Food Chemistry**, 2009, 114(2): 505-510.
- [17] BOZKURT H, ERKMEN O. Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk)[J]. **Meat Science**, 2002, 61(2): 149-156.
- [18] 王德宝. 混合发酵剂对发酵羊肉香肠理化品质及生物胺的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
- [19] 杨明阳. 发酵剂对发酵羊肉干感官品质与风味的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [20] 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.
- [21] 李思源, 沙坤, 孙宝忠, 等. 功能性微生物在发酵肉制品中的应用研究进展[J]. 肉类研究, 2019, 33(12): 56-60.
- LI S Y, SHA K, SUN B Z, et al. A review of application of functional microorganisms in fermented meat products[J]. **Meat Research**, 2019, 33(12): 56-60. (in Chinese)
- [22] 王新惠, 李俊霞, 谭茂玲, 等. 复合发酵剂对发酵猪肉干品质的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(17): 165-169.
- WANG X H, LI J X, TAN M L, et al. Effect of mixed starter cultures on quality of fermented pork jerky[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2015, 36(17): 165-169. (in Chinese)
- [23] REIS J A, PAULA A T, CASAROTTI S N, et al. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications[J]. **Food Engineering Reviews**, 2012, 4(2): 124-140.
- [24] MORAES P M, PERIN L M, JUNIOR A S, et al. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria[J]. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2013, 44(1): 109-112.
- [25] BASSANETTI I, CARCELLI M, BUSCHINI A, et al. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives[J]. **Food Control**, 2017, 73: 606-612.
- [26] 田星, 赵邯, 王浩东, 等. 传统发酵肉成熟过程中微生物菌群和理化性质变化[J]. 肉类研究, 2020, 34(1): 9-14.
- TIAN X, ZHAO H, WANG H D, et al. Changes in microbial flora and physicochemical properties of traditional fermented meat during ripening[J]. **Meat Research**, 2020, 34(1): 9-14. (in Chinese)
- [27] LU S L, JI H A, WANG Q L, et al. The effects of starter cultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages[J]. **Food Control**, 2015, 50: 869-875.
- [28] 陈颖. 传统中式香肠中生物胺生物控制技术的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2011.
- [29] RENES E, DIEZHANDINO I, FERNÁNDEZ D, et al. Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening[J]. **Food Microbiology**, 2014, 44: 271-277.