

文章编号:1673-1689(2006)03-0116-06

发酵肉制品中乳酸菌的分离、筛选和鉴定

卢士玲, 吴桂春, 李开雄

(新疆石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 对发酵肉制品中乳酸菌的分离、纯化以及鉴定技术进行了研究,结果从发酵香肠、腊肠、火腿中分离筛选得到 2 株德氏乳杆菌,并建立了一套发酵肉制品中乳酸菌的分离鉴定方法。

关键词: 发酵肉制品;乳酸菌;分离鉴定技术

中图分类号:TQ 920

文献标识码:A

Isolation and Identification of the Lactic Acid Bacteria from Fermented Meat

LU Shi-ling, WU Gui-chun, LI Kai-xiong

(School of Food Science and Engineering, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: The method of isolation and identification lactic acid bacteria from fermented meat was investigated. In this study, two kinds of *L. delbruecki* were isolated from fermented sausage, sausage and ham. The method of isolation and identification of the preponderant microorganism from fermented meat was proposed.

Key words: fermented meat; lactic acid bacteria; the technology of isolation and identification

我国传统肉制品的生产具有非常悠久的历史,如中外闻名的金华火腿、宣威火腿、品质优良的中式香肠以及民间传统发酵型肉制品,由于其具有良好的风味,深受国内外消费者的青睐。国内现有的发酵肉制品资源丰富,且肉的品质风味都比较好,而且其微生物结构比较复杂,广泛存在着优良的乳酸菌,可以作为分离、筛选优良菌株的来源。

通过对发酵肉制品中乳酸菌的分离、筛选和鉴定的研究,可克服传统肉制品发酵启动慢、发酵时间长的缺点,使肉制品生产和发酵时间大大缩短,降低发酵肉制品生产的成本,并改善发酵肉制品感官品质等,使发酵菌种具有产品加工快速、安全和标准化的特点^[1]。总之,筛选优良性状的微生物菌种对我国优质发酵肉制品的生产起到一定的促进

作用。

1 材料与方法

1.1 分离样品及来源

发酵香肠:石河子大学食品工程学院畜产品实验室提供;腊肠:石河子大学食品工程学院畜产品实验室提供;金华火腿:浙江省金华市金磐开发区金华火腿有限公司提供。

1.2 培养基

1.2.1 MRS 培养基 MRS 液体培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母提取物 5 g, K_2HPO_4 2 g,柠檬酸二铵 2 g,乙酸钠 5 g,葡萄糖 20 g,吐温-80 1 mL, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $MnSO_4$ 0.25 g,蒸馏

收稿日期:2005-07-02; 修回日期:2005-10-08.

作者简介:卢士玲(1976-),女,吉林德惠人,研究实习员,工学硕士。

水1 000 mL, pH 6.2~6.4, 121 °C 灭菌 20 min。(MRS 固体培养基:在液体培养基的基础上添加 1.8 g/dL 的琼脂,半固体 MRS 培养基琼脂的添加量为 0.8 g/dL,筛选时在 MRS 固体培养基中加 3 g/dL 的 CaCO_3)^[1-4]

1.2.2 葡萄糖培养基 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 葡萄糖 1 g, 蒸馏水 100 mL, pH 7.4。配制时将蛋白胨先加热溶解,调 pH 之后,加入溴甲酚紫溶液(1.6 g/dL 水溶液),待呈紫色,再加入葡萄糖,使之溶解,分装试管,最后将杜氏小管倒置放入试管中,0.05 MPa 灭菌 30 min。

1.2.3 产 H_2S 培养基 FeCl_2 培养基:牛肉膏 7.5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 明胶 5 g, 10% FeCl_2 (培养基灭菌后无菌加入) 5 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 112 °C 灭菌 20 min。

培养基灭菌后,在明胶尚未凝固时,加入新制备的过滤除菌的 FeCl_2 ,用无菌试管分装培养基,高度为 4~5 cm,立即置于冷水中冷却凝固,供穿刺接种用(本实验用 FeSO_4 代替 FeCl_2)。

1.2.4 产氨培养基 脱脂牛奶 100 mL, NaCl 0.5 g, 精氨酸 0.5 g, 0.05 MPa 灭菌 15 min。

1.2.5 产 H_2O_2 检测用培养基 下层基础培养基:蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母提取物 5 g, 吐温-80 1 mL, MnSO_4 0.25 g, 琼脂 8 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 6.2~6.4, 121 °C 灭菌 20 min。单独灭菌的葡萄糖按 1 g/dL 的量添加。

上层培养基:在下层培养基的基础上,加入 4 g/dL 的 MnO_2 。

1.2.6 氨基酸脱羧酶培养基 蛋白胨 5 g, 酵母提取物 3 g, 葡萄糖 1 g, 蒸馏水 1000 mL, 1.6 g/dL 溴甲酚紫乙醇溶液 1 mL, L-氨基酸 5 g 或 DL-氨基酸 10 g, pH 6.8。

1.2.7 石蕊牛乳培养基 脱脂牛奶 100 mL, 1% 石蕊乙醇溶液。将脱脂牛奶的 pH 调至中性,用 1% 石蕊溶液将牛奶调至淡紫色偏蓝为止,分装试管,牛奶高度 4 cm 为宜,0.05 MPa 灭菌 30 min。

1.2.8 硝酸盐还原培养基 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, KNO_3 0.1~0.2 g, pH 值 7.4, 121 °C 灭菌 15~20 min。

1.2.9 V-P 反应培养基 葡萄糖 5 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2, 0.05 MPa 灭菌 30 min。

1.2.10 营养肉汤培养基 牛肉膏 20 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 10 g, NaCl 30 g, NaNO_2 0.15 g, 调节 pH 6.5, 0.05 MPa 灭菌 20 min。

1.2.11 糖或醇发酵培养基 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 葡萄糖(或其他糖或醇)1 g, 蒸馏水 100 mL, pH 7.4。配制时将蛋白胨先加热溶解,调 pH 值,加入溴甲酚紫溶液(1.6% 水溶液),呈紫色,再加入葡萄糖(或其他糖),使之溶解,分装试管,最后将杜氏小管倒置放入试管中,0.5 MPa 灭菌 30 min。

1.3 乳酸纸层析试剂

1) 展开剂:水、苯甲醇、正丁醇以 1:5:5 混合,然后加 1% 的甲酸。

2) 显色剂:0.04% 的溴酚蓝酒精溶液,用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 6.7^[3]。

1.4 筛选标准

在发酵肉制品的生产中,乳酸菌应该能够耐受 6% NaCl 和 150 mg/kg NaNO_2 、不产粘液、发酵葡萄糖不产气、不产 H_2S 、不产氨、不产 H_2O_2 、不具有氨基酸脱羧酶活性、产酸速度快、发酵碳水化合物产物主要为乳酸、能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌^[5]。

1.5 实验方法

1.5.1 样品处理 在无菌操作的条件下,每种样品取 20 g 切碎,分别转移至 180 mL 无菌蛋白胨水中,振荡混匀(200 r/min 振荡 60 min),静置数分钟,取上层清液进行镜检^[6]。

1.5.2 活化培养 根据镜检结果,取样品上清液 1 mL,接入 MRS 液体试管培养基中进行扩培增殖,培养温度为 30 °C,培养时间为 24 h。

1.5.3 分离纯化 将上面 MRS 增殖培养液通过稀释倾倒平板法分别接种于 MRS 固体培养基上,30 °C 培养 24 h。根据菌落的颜色、大小、光泽、透明程度等,挑取单菌落,进行划线分离纯化。在多次的分离纯化过程中,对单菌落进行革兰氏染色、镜检并记录结果,将革兰氏阳性纯种菌进行斜面保藏^[7]。

1.5.4 筛选方法

1) 产粘性实验:采用 MRS 固体培养基,用蔗糖代替葡萄糖。接种后于 30 °C 培养 24 h,用接种针挑取菌落直接观察^[8-9]。

2) 耐盐性实验:将分离的菌种接种到添加有 4 g/dL 和 6 g/dL NaCl 的 MRS 液体培养基中,于 30 °C 培养 24 h,分别以 4 g/dL 和 6 g/dL NaCl 的 MRS 培养基作空白对照,用 722 型分光光度计 650 nm 测定 OD 值,比较其生长情况。

3) 耐亚硝酸盐性实验:将分离的菌种接种到添加有 150 mg/kg NaNO_2 的 MRS 液体培养基中,30 °C 培养 24 h,用 722 型分光光度计于 650 nm 测定

OD值,以MRS培养基作空白对照,比较其生长情况。

4) 产生 H_2O_2 实验:将新培养的菌液用划线法接种于下层培养基(H_2O_2 产生检测基础培养基)上面,然后在基础培养基上面倾注一层上层培养基(添加有4 g/dL的 MnO_2 的基础培养基),30℃培养5 d,连续观察菌落周围 MnO_2 黑色的变化,黑色溶解者为 H_2O_2 阳性,该菌产生 H_2O_2 。

5) 产氨实验:接种待测菌于产氨培养基中,另取不接种的空白做对照,37℃培养24 h,在培养液中加入3~5滴氨试剂,如有黄色或棕红色的阳性沉淀为阳性,反应无黄色或棕红色沉淀为阴性。

6) 葡萄糖产气实验:将分离的菌接种到带有倒置杜氏小管的葡萄糖产气培养基中,30℃培养24 h。观察杜氏小管内是否有气泡产生,同时还可以通过观察培养液的颜色确定菌类是否产酸。

7) 产 H_2S 实验:采用醋酸铅纸条、 $FeCl_2$ 穿刺两种方法,通过实验对比,发现用 $FeCl_2$ 穿刺法效果比较好。在醋酸铅纸条法实验中,由于半胱氨酸在培养基的配制中分解产生 H_2S ,实验结果不可靠,故采用 $FeCl_2$ 穿刺法。

8) 石蕊牛乳实验:将分离的菌种接种到石蕊牛乳培养基中,37℃培养7 d,连续观察,并记录结果。

9) 硝酸盐还原能力实验:将分离的待检菌接种于硝酸盐还原液体培养基中,37℃培养48 h。另外,留一个空白(不接菌种)做对照。观察结果时,将接种过的培养液和空白分别分成两管,按培养基检验方法加入格里斯氏试剂,和空白比较,如出现红色,则为阳性反应,如不出现红色,则需在另一管中先加入少量锌粉,摇动,37℃培养30 min或水浴加热15 min,加入格里斯氏试剂。如出现红色,则证明培养液中硝酸盐仍然存在,为阴性反应;如不出现红色,则说明硝酸盐已被进一步还原成氨和氮,为阳性反应^[10]。

10) 氨基酸脱羧酶实验:将分离的菌种分别接种到添加DL-苏氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸等的培养基试管和未加氨基酸的空白对照培养基试管中,37℃恒温箱中培养18~24 h,培养基呈紫色者为氨基酸脱羧酶试验阳性;培养基呈黄色者为该项试验阴性。

11) 抑菌实验:在不加乙酸钠的MRS固体平板培养基上用涂布法接种新培养的指示菌(大肠杆菌和葡萄球菌)后,点植乳酸菌,30℃培养24 h,观察乳酸菌的抑菌圈。

12) 产酸能力实验:将分离的菌种接种于MRS

液体培养,30℃培养24 h,以空白培养基为对照,用酸度计测定pH值。

13) 乳酸的纸层析分析:取大小合适的滤纸条,在距底边3 cm处划一条线,用干净的毛细玻璃管蘸取少量样液,每隔2~2.5 cm点一个样(其中包括2%乳酸、空白培养液和含菌培养液样),每点一次样立即用电风吹干;将纸放入层析缸内,用展开剂饱和一段时间,再添加展开剂并开始层析。一般上行25 cm即可,取出晾干或用电风吹干,喷显色剂,观察样品上是否出现黄色斑点,并与2%乳酸样比较,并计算 R_f 值,以确定细菌培养液是否含有乳酸^[1]。

14) 生长曲线和产酸能力的测定:将筛选得到的12株菌接种于MRS液体培养基,30℃培养24 h,以MRS液体培养基为空白对照,每2 h用722分光光度计于650 nm测定菌液的OD值,用酸度计测定pH值。记录数据并绘制生长曲线^[12]。

15) 乳酸菌在不同温度下的生长情况:将12株菌接种于MRS液体培养基,分别在10、15、25、30℃连续培养20 h,以MRS液体培养基为空白对照,于650 nm测定OD值,并测pH值。

16) V-P试验:分别接种待测菌于葡萄糖蛋白胨培养基试管中,连同空白对照置37℃培养24 h。

在培养液中加入40%KOH溶液10~20滴,再加入等量的5% α -萘酚溶液,拔去棉塞,用力振荡,再放入在沸水中加热1~2 min。如培养液出现红色为V-P试验阳性,不呈红色者为阴性^[13]。

2 结果与分析

2.1 主要发酵特性

通过发酵特性实验,从发酵香肠、金华火腿、腊肠共筛选得到RFx1、RH33、RF261、RL32,4株乳酸菌,基本情况及主要发酵特性见表1。

表1 筛选的乳酸菌主要发酵特性

Tab. 1 The fermentation characteristics of selected lactic acid bacteria

菌株特性	RFx1	RH33	RF261	RL32
来源	发酵香肠	金华火腿	发酵香肠	腊肠
菌体形态	短杆 有二联	链杆	短杆 较粗	短杆 二联
24 h 酸度(MRS液体)	3.95	3.97	4.01	3.97
产粘性物质	—	—	—	—
耐4%NaCl	+	+	+	+
耐6%NaCl	+	+	+	+
耐硝酸盐	+	+	+	+

续表 1

菌株特性	RFx1	RH33	RF261	RL32
产气	—	—	—	—
产氨	—	—	—	—
产 H ₂ O ₂	—	—	—	—
产 H ₂ S	—	—	—	—
石蕊牛乳酸凝	+	+	+	+
V-P 反应	—	—	—	—
氨基酸脱羧酶	—	—	—	—
抑制大肠杆菌	+	+	+	+
抑制葡萄球菌	+	+	+	+
乳酸层析产物	乳酸	乳酸	乳酸	乳酸

2.1.1 乳酸菌的生长和 pH 值变化情况 根据 4 种乳酸菌 30 °C 24 h OD 值实验数据, RFx1 等 4 种乳酸菌作生长曲线见图 1。

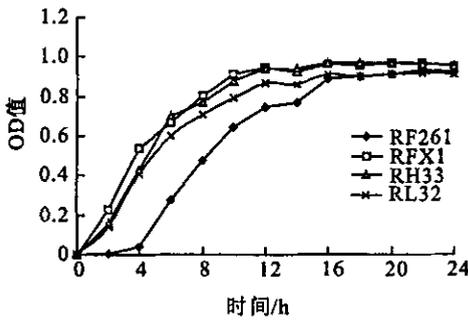
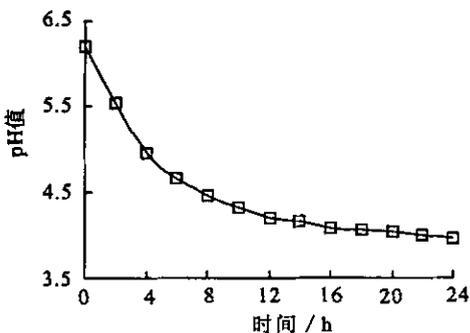


图 1 24 h 内乳酸菌菌体密度变化

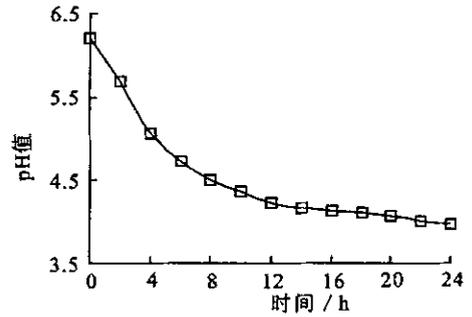
Fig. 1 OD changes of selected LAB during 24 hours

可以看出, RFx1、RH33、RF32 培养 10~12 h 后进入稳定生长期, RFx1、RH33、RF32 生长特点比较接近; RF261 生长比较缓慢, 在 16~18 h 后进入稳定生长期, 4 种乳酸菌的生长速度差异不显著 ($P>0.05$)。

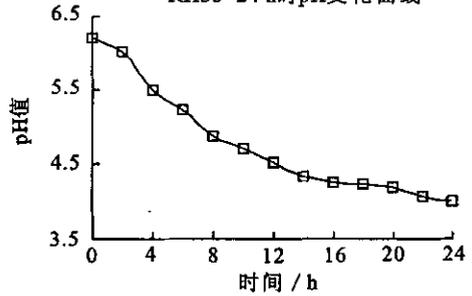
24 h 内不同乳酸菌 pH 值变化见图 2。从 4 株菌 24 h pH 值曲线变化看, 在培养初期 pH 值不断下降, 随着时间的延长, 这种下降趋势逐渐变缓, RFx1、RH33、RL32 的生长曲线大体一致。RF261 下降比较平缓。到 24 h 时 4 株菌的 pH 值均能达到 4.0。



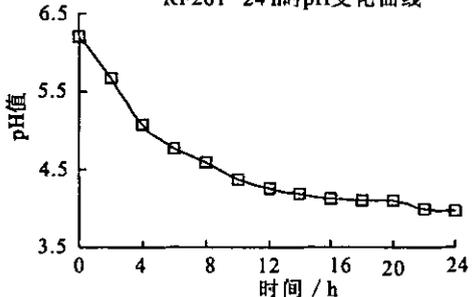
RFx1 24 h 时 pH 变化曲线



RH33 24 h 时 pH 变化曲线



RF261 24 h 时 pH 变化曲线



RL32 24 h 时 pH 变化曲线

图 2 24 h 内不同乳酸菌 pH 值变化

Fig. 2 The changes of pH with different LAB during 24 hours

2.1.2 不同温度菌株的生长情况和产酸能力 由图 3 可以看出, 不同温度对每种菌株影响不同, 12 株菌最适生长温度都为 25 °C, 其中有 10 株的生长状况要比 30 °C 好。大部分菌株在不同温度下的生长速度差异极显著 ($P<0.01$), 温度从 15~25 °C 上升的过程中, 随着温度的上升, 生长速度加快, 温度继续上升, 生长速度反而下降。

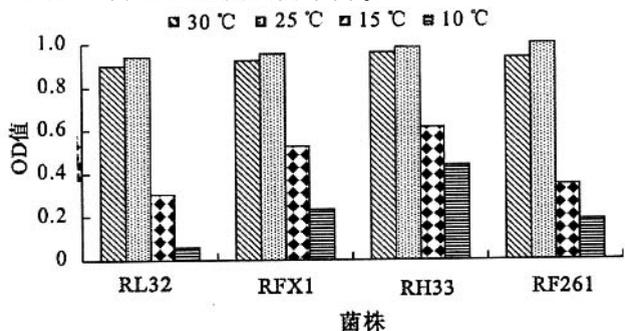


图 3 不同温度下 24 h 时 4 株乳酸菌菌体密度

Fig. 3 OD of four LABs at different temperature and 24 hours culture

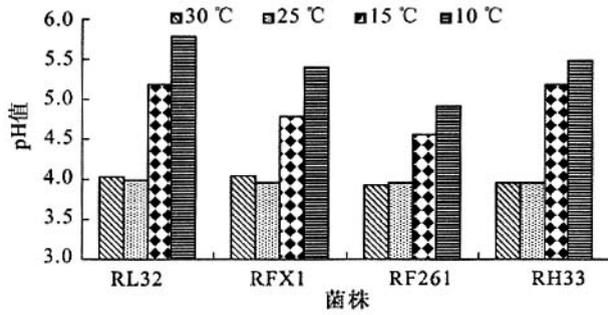


图4 不同温度下4株乳酸菌 pH 值

Fig. 4 The pH of four LABs at different temperature

结合图3,4分析,4株菌在30 °C和25 °C的最终pH值相差不大,从10~15~25 °C,所有菌株的pH值都有很大幅度的变化。RL32、RH33在低温条件下产酸和生长能力不如RFX1、RF261。

3 肉制品中微生物的鉴定

3.1 鉴定方法

3.1.1 形态特征鉴定

1) 菌落形态: 观察分离培养基平板上菌落的形态(形状、色泽、大小等),并记录结果。

2) 菌体形态: 将所分离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),结果见图5。

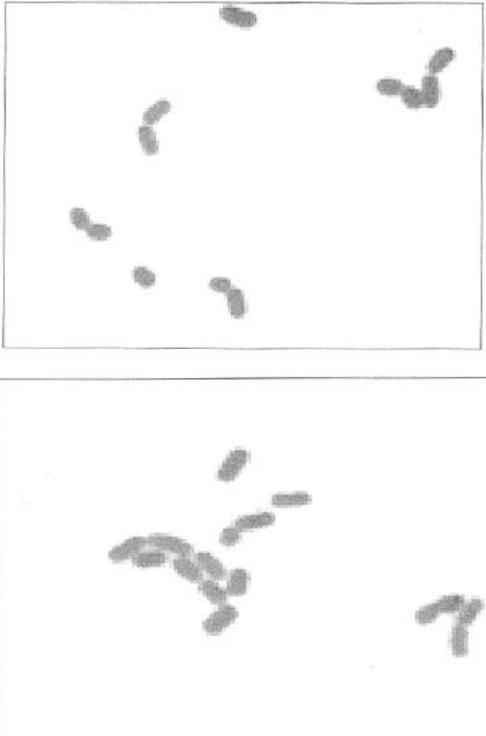


图5 乳酸菌菌体形态

Fig. 5 Morphology of LAB

3.1.2 生理生化特征鉴定 通过菌株的糖醇发酵实验来检验菌株对各种糖醇类碳源的利用情况,并记录结果。

3.2 鉴定结果

根据菌株在常温、低温条件下的生长状况分析,选择RFx1、RF261作为筛选鉴定对象。

3.2.1 乳酸菌的鉴定

1) 固体培养特征: 30 °C培养24 h,在MRS + 3%CaCO₃固体培养基上形成明显的透明圈,表面光滑湿润。

2) 液体培养特征: 经过24 h培养,细菌达到最大浑浊度后,菌体逐渐沉淀到培养基底部。

根据RFx1、RF261表型特征和生理生化特征,参考《常见细菌系统鉴定手册》,初步鉴定RFx1、RF261为德氏乳杆菌,具体特征如下表2。

表2 所选乳酸菌的生理生化特征

Tab. 2 Biochemical characterization of the selected LAB

项目	菌株		项目	菌株	
	RFx1	RF261		RFx1	RF261
蔗糖	+	+	半乳糖	+	+
乳糖	-	-	甘露醇	-	-
木糖	-	-	肌醇	-	-
麦芽糖	+	+	海藻糖	+	+
甘露糖	+	+	纤维二糖	-	-
果糖	+	+	阿拉伯糖	-	-
鼠李糖	-	-	蜜二糖	-	-
棉子糖	-	-	松三糖	-	-
核糖	+	+	葡萄糖	+	+

4 结论

从MRS培养基中分离、纯化得到64株菌,经筛选鉴定得到2株德氏乳杆菌。所筛选菌株具有很好的发酵特性,符合发酵肉制品生产要求。

参考文献:

- [1] 徐光域. 发酵香肠加工中的发酵剂及其应用进展[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 306-310.
- [2] 南庆贤. 肉类工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
- [3] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 5.
- [5] 江汉湖. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [6] 罗欣. 发酵香肠中的菌种分离及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(3): 5-8.
- [7] 李宗军, 江汉湖. 侗族传统发酵肉的微生物特性[J]. 中国微生态学杂志, 2002, 14(2): 19-22.
- [8] 王永霞, 牛天贵. 肉品混合发酵剂的筛选及应用研究[J]. 食品科技, 2004, (8): 34-38.
- [9] 吴祖兴, 张华. 发酵肉制品乳酸菌菌种筛选研究[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 47-49.
- [10] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [11] 李凤彩, 程文新. 发酵香肠菌种筛选标准探讨[J]. 食品科技, 2002, (6): 78-79.
- [12] 朱燕, 罗欣. 肉类发酵剂及其发酵方式[J]. 肉类研究, 2003, (1): 13-15.
- [13] John GHolt, Noel R Krieg, Peter H A Sneath, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Ninth Edition) [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 175-201.

(责任编辑: 李春丽)

《冷饮与速冻食品工业》征稿启事

《冷饮与速冻食品工业》杂志 是经国家新闻出版总署批准出版, 教育部主管, 江南大学(原无锡轻工大学)等单位主办, 面向国内外公开发行的国家级专业性技术指导类刊物, 是冷饮与速冻食品行业广大基层决策者、科研人员、生产者、经营者, 研究开发新品、寻求商业机会、开拓产品市场的良师益友。

《冷饮与速冻食品工业》杂志 通过国家邮政在全国各地发行, 影响广泛, 及时报道国内外冷饮与速冻食品领域及其相关行业的科研成果、生产技术及市场动态, 竭诚为我国冷饮与速冻食品行业的广大企业提供广告服务。广告内容涉及冷饮与速冻食品行业的新产品, 各种速冻、冷藏机械设备, 食品添加剂及原辅料等。

地 址: 江苏无锡市蠡湖大道 1800 号, 江南大学蠡湖校区 32 信箱

部 门: 《冷饮与速冻食品工业》杂志编辑部

电 话: 0510-85913521, 85913529; 传 真: 0510-85913521

邮 编: 214122; 电子邮件地址: csbfj@sytu.edu.cn