

文章编号: 1673-1689(2011)02-0239-06

肉用乳酸菌发酵剂菌株的分离筛选与鉴定

崔廷婷, 王洋, 戴瑞彤, 李平兰*
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 作者从4种自然发酵肉制品中分离出112株乳酸菌,通过考察菌株的发酵特性和耐受性,最终获得一株性能优良的菌株T1-1。该菌株在添加8 g/dL NaCl和150 mg/kg NaNO₂的MRS培养基中生长良好,并且能耐受80℃水浴10 min。通过生理生化鉴定和16S rRNA序列分析,该菌株为植物乳杆菌。

关键词: 肉品发酵剂; 乳酸菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Selection and Identification of Lactic Acid Bacteria Strains for Fermented Meat Starter Cultures

CUI Ting-ting, WANG Yang, DAI Rui-tong, LI Ping-lan*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this study, 112 lactic acid bacteria strains were isolated from four kinds of traditional fermented meats. Through the study of fermentation properties and strain tolerance, the strain T1-1 was selected which grown well in MRS broth with 8 g/dL NaCl and 150 mg/kg NaNO₂, and showed a high ability to survive at 80℃ water bath after 10 min. Then the strain was identified as *Lactobacillus plantarum* by using physiological/biochemical characteristics and 16S rRNA sequence.

Key words: fermented meat starter cultures, lactic acid bacteria, selection, identification

发酵肉制品是指盐渍肉在自然或人工控制条件下,借微生物发酵作用产生具有特殊风味、色泽和质地及具有较长保存期的肉制品^[1]。使用发酵剂生产发酵肉制品可以缩短生产周期、提高产品的质量稳定性,因此选育优良的微生物菌种作为发酵剂是发酵肉制品加工的关键。目前,欧美国家已利用发酵剂大规模生产发酵肉制品,它们色香浓郁、风味独特,为消费者所接受,市场潜力巨大^[2-3]。我

国是一个肉类产销大国,全国各地都有一些名优的发酵肉制品,如浙江金华火腿、哈尔滨风干肠等,但都属于自然发酵,其生产存在着加工周期长、产品质量不稳定等问题;而关于微生物定向接种的发酵肉制品的研究和开发还属于一个新型的领域,对发酵剂的开发研究、如何缩短发酵周期、开发更多种类的发酵肉制品等方面的研究还很少。作者从埃及色拉米香肠中分离筛选出一株优良的乳酸菌菌

收稿日期: 2010-03-02

基金项目: 国家863计划项目(2006AA10Z343); 公益性行业(农业)科研专项项目(200903012)

* 通信作者: 李平兰(1964-),女,山西忻州人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事乳酸菌及其代谢产物方面的研究。Email: lipinglan@cau.edu.cn

株 T F 1, 它具有良好的发酵特性和工艺耐受性, 将其用作发酵剂来制备发酵肉制品, 可能赋予产品特殊的风味, 为丰富我国的肉类消费市场打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

埃及色拉米香肠、哈尔滨风干肠、金华火腿、宣威火腿。

1.2 主要仪器设备

Bausch & Lomb 显微镜: 日本制造; SCL-1300 型垂直流洁净工作台: 北京赛伯乐实验仪器有限公司制造; SL-N 电子天平: 上海民桥精密科学仪器有限公司制造; DNP-9162 型电热恒温培养箱: 上海精宏实验设备有限公司制造; YSQ-LS-SII 全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅: 上海博逊实业有限公司医疗设备厂制造; pH-10 pH 计: 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司制造。

1.3 培养基

1) MRS 液体和固体培养基^[4]: 乳酸菌筛选时在 MRS 固体培养基中加入 0.3 g/dL 的 CaCO₃。

2) 耐盐培养基: MRS 液体培养基中分别添加 0、2、4、6、8 g/dL 的 NaCl。

3) 耐亚硝酸盐培养基: MRS 液体培养基中添加 0、100、150 mg/kg 的 NaNO₂。

4) 产黏培养基: MRS 固体培养基, 用 5 g/dL 蔗糖替代葡萄糖。

5) 生物胺检测培养基、葡萄糖产气培养基、产硫化氢培养基、蛋白酶检测培养基、脂肪酶检测培养基: 见文献[4-5]。

1.4 筛选标准

用于发酵肉制品的乳酸菌菌株, 应该具有不产生物胺、至少耐受 6 g/dL NaCl 和 100 mg/kg NaNO₂、不产黏液、发酵葡萄糖不产气、不产 H₂S、产酸速度快(40 h 左右把培养基的 pH 降至 5.0 以下)、能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等特点^[6-8]。

1.5 试验方法

1.5.1 样品处理 在无菌条件下分别取各样品 25 g, 切碎, 加入到 225 mL 的无菌生理盐水(含 0.85 g/dL NaCl)中, 振荡均匀。再取 1 mL 加入到 9 mL 0.85 g/dL 无菌生理盐水中, 即成 10⁻² 稀释度, 根据需要再依次制成不同的稀释度。

1.5.2 乳酸菌的分离 选取合适的稀释度, 取 1 mL 上清液放在无菌平板中, 倒入含 0.3 g/dL CaCO₃ 的 MRS 固体培养基约 15 mL, 混匀, 凝固后置

于 37 °C 培养 48 h。挑取产生碳酸钙溶解圈的单菌落反复划线, 直至获得纯的菌株。对纯菌株进行革兰氏染色、菌体形态观察、过氧化氢酶活性测定以及乳酸的定性检测(纸层析)实验^[9]。选择 G⁺、接触酶阴性、与标准乳酸具有相同的纸层析 R_f 值的菌株保藏, 置于 -20 °C 备用。

1.5.3 优良菌株的初筛

1) 生物胺检测试验: 将新鲜的菌株接种于生物胺检测液体培养基中, 每管分别加盖一层厚约 4~5 mm 的灭菌液体石蜡, 37 °C 培养 24~72 h。分别在 24、48、72 h 时观察试管中颜色的变化, 变紫红色者为阳性, 变黄色者为阴性。

2) 耐受性试验: 以 1% 的接种体积分数将菌株分别接种于耐盐培养基和耐亚硝酸盐培养基中, 通过活菌计数比较其生长情况。

3) 产黏试验: 将菌株在产黏培养基平板上划线培养, 37 °C、48 h 后挑取菌落直接观察。

4) 发酵葡萄糖产气试验、产 H₂S 试验、蛋白酶和脂肪酶检测试验: 见文献[4]。

5) 产酸特性: 以 1% 的接种体积分数将菌株接种在 MRS 液体培养基中, 37 °C 培养 24、48 h 后测定发酵液的 pH 值。

6) 抑菌试验: 将敏感指示菌(6 株金黄色葡萄球菌和 3 株大肠杆菌)在适宜的液体培养基上活化, 新鲜培养过夜, 梯度稀释; 取稀释至约 10⁶ cfu/mL 的新鲜培养的指示菌 1 mL 于平板中, 倾倒入融化并温热的固体培养基 10~15 mL 与指示菌液混匀。将平板打开盖, 使无菌空气流通约 10 min 左右。将牛津杯轻轻放置于平板上, 将菌悬液 150 μL 加入牛津杯后于 4 °C 冰箱中扩散过夜, 然后 37 °C 培养 24~48 h 观察抑菌圈的出现。

1.5.4 优良菌株的复筛 将初筛选出的菌株以 1% 的接种体积分数接入 MRS + 8 g/dL NaCl + 150 mg/kg NaNO₂ 中, 37 °C 培养 48 h, 每 4 h 测定菌液的 pH 值以及 48 h 时的活菌数, 比较各菌株的生长情况。由于生产后期需要通过喷雾干燥法将菌株制成发酵剂, 所以筛选出的菌株应具有一定的温度耐受性。将菌株以 1% 的接种体积分数接入到 MRS 培养基中, 37 °C 培养 24 h 后, 80 °C 水浴 10 min, 通过考察水浴前后的活菌数比较各菌株的温度耐受性。

1.5.5 优良菌株的鉴定

1) 菌株形态学观察、生理生化试验: 经过多次纯化, 在光学显微镜下观察菌体形态, 确定得到纯种后, 对筛选得到的菌株进行生理生化试验, 18~

72 h 后观察并记录现象,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[10]和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[4]中相应的指标进行初步比对鉴定。

2) 16S rRNA 分子生物学鉴定:细菌基因组 DNA 的提取用试剂盒(天根生化科技有限公司产品)进行。以抽提的 T1-1 细菌 DNA 组作为 PCR 扩增的模板,用于 16S rRNA PCR 扩增的引物为一对通用引物,正向引物: Lpw57 (5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3');反向引物: Lpw205 (5'-CTT GTT ACG ACT TCA CCG-3')^[11]。PCR 反应体系(25 μ L)为: 10 \times Buffer 2.5 μ L、模板 DNA 1 μ L、引物各 2.5 μ L、dNTP 2 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L、dd H₂O 14.25 μ L,混匀 5 min。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 43 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min^[12]。PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖电泳分析后由测序公司测序。所得序列根据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>,采用 BLAST 程序在 GenBank 基因库中进行比对,选取相似性较高的几株菌株的 16S rRNA 序列,用 MEGA 软件进行系

统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 优良菌株的初筛结果

从 4 种样品初步分离出的 112 株可疑乳酸菌中筛选出 21 株 G⁺、接触酶阴性的乳酸菌,其中菌株 T1-1、T1-3、T1-5、T1-9、T1-11、T1-13、T1-15、T1-18、T1-21 来源于埃及色拉米香肠, T2-2、T2-5、T2-6、T2-10、T2-17 来源于哈尔滨风干肠, T3-1、T3-4、T3-5 来源于浙江金华火腿, T4-2、T4-4、T4-8、T4-12 来源于云南宣威火腿。21 株菌均能耐受 100、150 mg/kg NaNO₂和 2、4 g/dL NaCl, 19 株菌能耐受 6、8 g/dL NaCl。在这 19 株菌中,有两株菌产组氨酸脱羧酶,其他 17 株均为阴性,它们均不产黏液、发酵葡萄糖产酸不产气、不产硫化氢,产酸速度快,40 h 内能把 pH 值降至 5.0 以下;而其中有 15 株菌都能很好地抑制 3 株大肠杆菌及 6 株金黄色葡萄球菌的生长。这 21 株乳酸菌的具体特性见表 1。

表 1 21 个分离菌株的发酵特性

Tab. 1 Fermented characteristics of twenty one isolated strains

	耐 100 mg/kg NO ₂ ⁻	耐 150 mg/kg NO ₂ ⁻	耐 2 g/dL NaCl	耐 4 g/dL NaCl	耐 6 g/dL NaCl	耐 8 g/dL NaCl	不具有氨基酸脱羧酶	不产黏液	不产气	不产硫化氢	产酸快	抑制金黄色葡萄球菌	抑制大肠杆菌
T1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1-11	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
T1-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
T1-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1-18	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
T1-21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
T2-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2-17	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
T3-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4-4	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
T4-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2.2 优良菌株的复筛结果

2.2.1 菌株在添加 8 g/dL NaCl 和 150 mg/kg NaNO₂ 的 MRS 液体培养基中的生长情况 发酵肉制品具有低 pH 值、低水分及高含盐量的特点。NaCl 在发酵香肠中的初始添加量通常为 2.5~3 g/dL, 在成熟后期可达到 15%^[7]; 在加工过程中, 起发色和抑菌作用的主要是亚硝酸钠, 添加质量浓度可达到 150 mg/kg^[6]。因此, 在 MRS 液体培养基中添加 8 g/dL NaCl 和 150 mg/kg NaNO₂ 简单模拟发酵肉制品, 以 1% (活菌数约 10³ cfu/mL) 的接种体积分数接入培养基中, 比较各菌株的生长情况。结果发现, 在初筛选出的 15 株菌中, 有 6 株菌在培养 48 h 后液体培养基变浑浊, 平板计数后测得的活菌数增加到 10⁸ cfu/mL, pH 值下降到 5.0 以下, 其余菌株都没有明显变化。这 6 株菌 48 h 的 pH 值变化见图 1。

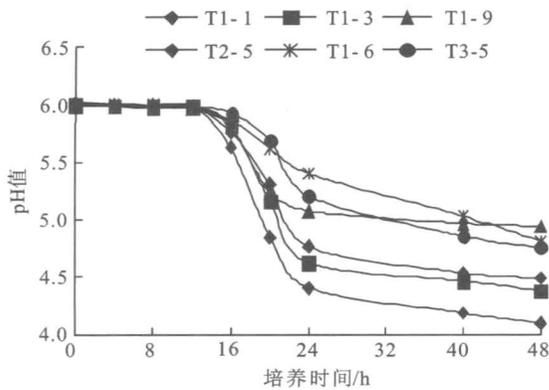


图 1 不同菌株在含有 8 g/dL NaCl, 150 mg/kg NaNO₂ 的 MRS 液体培养基中 pH 值的变化

Fig. 1 Changes of pH in MRS broth with 8 g/dL NaCl and 150 mg/kg NaNO₂

由图 1 可以看出, 这 6 株菌的产酸能力都较强, 培养至 48 h 时 pH 值均在 5.0 以下。但在培养过程中, 菌株 T1-1 下降的速度最快, 并且最终 pH 值达到 4.10, 显著低于其他 5 株菌的终 pH 值 ($p \leq 0.05$)。

2.2.2 菌株的短时耐高温能力 在后期发酵剂的制备过程中拟采用喷雾干燥法, 这就要求所筛选的菌株具有一定的温度耐受性。喷雾干燥法干燥速率快, 时间短, 所以菌株只需耐受较短时间的高温; 又由于干燥过程分恒速率干燥 (物料表面温度 45℃) 和降速率干燥 (粉末温度 80~100℃)^[13] 两个阶段。为此, 作者通过考察 6 株菌在 80℃ 水浴 10 min 前后的活菌数来比较它们的耐高温能力, 结果见图 2。

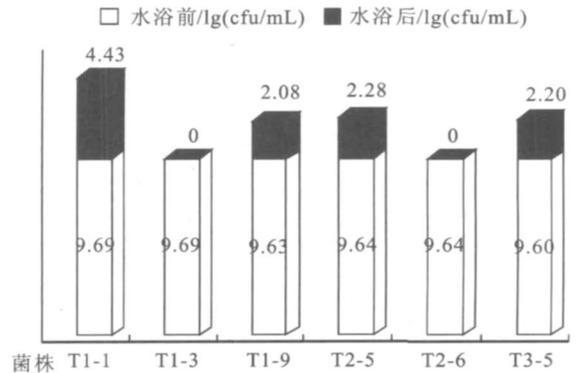


图 2 不同菌株在 80℃ 水浴 10 min 前后活菌数变化情况

Fig. 2 Changes of cfu in 80℃ water bath 10 min

由图 2 可以看出, 高温对菌株生长有着显著的影响, 不同菌株在经过 80℃ 水浴 10 min 后活菌数都明显降低, T1-3、T2-6 几乎检测不出活细胞, T1-9、T2-5、T3-5 的活菌数为 10² cfu/mL, T1-1 的耐高温能力最强, 活菌数为 10⁴ cfu/mL。统计结果表明, 6 株菌之间的差异显著 ($p \leq 0.05$)。

由此可见, 菌株 T1-1 (来自埃及色拉米香肠) 在模拟发酵肉制品的 MRS 液体培养基中生长良好, 并且具有短时耐高温能力, 可以选作发酵剂的微生物菌株。

2.3 优良菌株的鉴定

2.3.1 表型特征 菌株 T1-1 来自埃及色拉米香肠, 为革兰氏阳性菌。37℃ 培养 24 h 后, MRS 液体培养基变浑浊, 在 MRS 固体培养基中生长良好, 菌落斜嵌于培养基内的呈菱形, 生长在表面的呈规则的圆形, 白色扁平。在显微镜下观察发现, 该菌株粗短, 有时成对出现或成链状, 菌体形态特征见图 3。

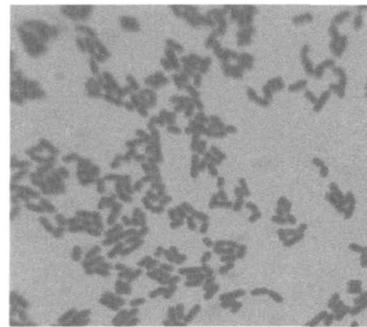


图 3 菌株 T1-1 的菌体形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of strain T1-1

2.3.2 生化特征 菌株 T1-1 的生理生化试验结果见表 2。

表 2 菌株 T1-1 的生理生化特征

Tab. 2 Physiological-biochemical characteristics of strain T1-1

项目	结果	项目	结果	项目	结果
山梨醇	+	乳糖	+	棉子糖	+
甘露醇	+	木糖	+	葡萄糖	+
葡糖酸盐	+	半乳糖	+	纤维二糖	+
水杨素	+	鼠李糖	-	麦芽糖	+
苦杏仁苷	+	松三糖	+	蔗糖	+
核糖	+	阿拉伯糖	+	甘露糖	+
果糖	+	蜜二糖	+		

注:“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

根据菌株 T1-1 的表型特征和生理生化特征,并参考《常见细菌系统鉴定手册》和《乳酸细菌分类

鉴定及实验方法》,初步鉴定该菌株可能为植物乳杆菌。

2.3.3 16S rRNA 序列分析 通过 16S rRNA 分析所得的菌株 T1-1 序列根据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 上的 BLAST 程序在 GenBank 基因库中比对为植物乳杆菌,相似度达 99%。选取相似性较高的几株菌的 16S rRNA 序列,用 MEGA 软件进行系统发育树的构建,结果见图 4。

由图 4 可知,菌株 T1-1 与植物乳杆菌和戊糖乳杆菌的同源关系最为接近。参照文献[14-15],目前发酵肉制品中常用的乳杆菌有植物乳杆菌、清酒乳杆菌、嗜酸乳杆菌、弯曲乳杆菌等,结合糖醇发酵试验结果,鉴定菌株 T1-1 为植物乳杆菌。

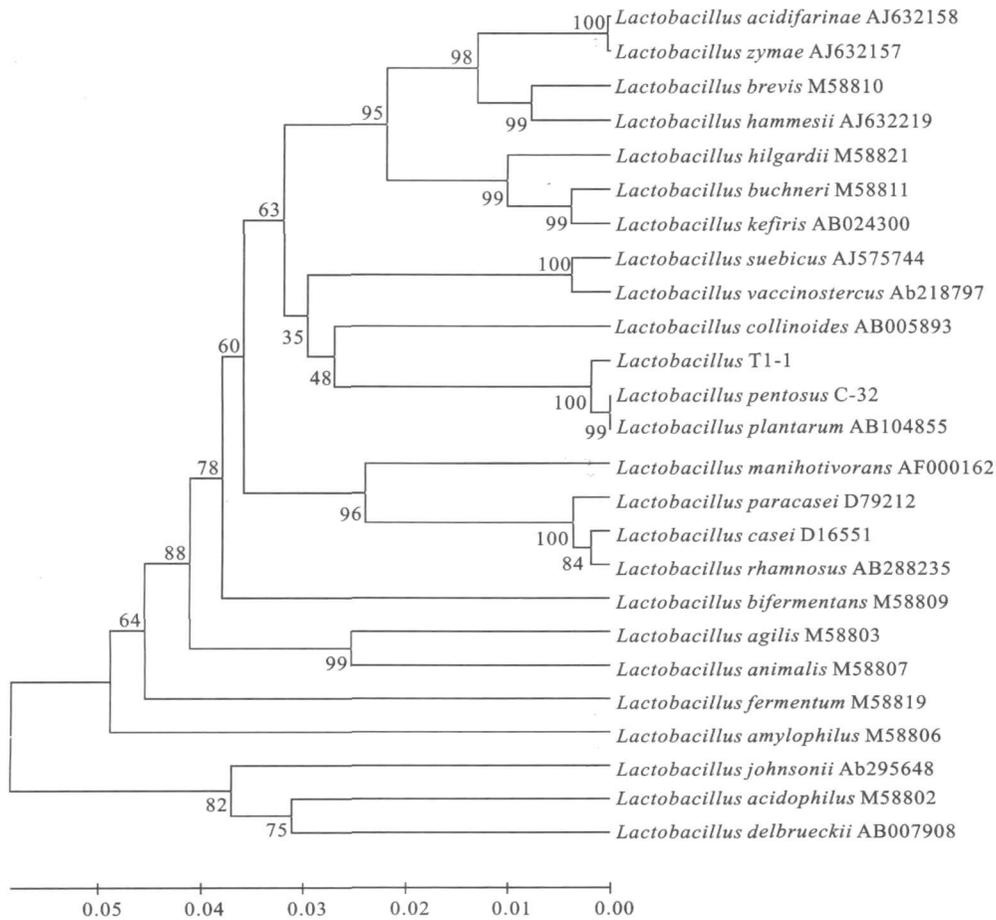


图 4 菌株 T1-1 的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain T1-1

3 结 语

一般耐高温菌株的筛选都是通过比较菌株在不同培养温度下的生长情况来进行的,例如崔国艳等^[16]从青贮玉米饲料等样品中筛选出一株耐高温的德氏乳杆菌,它的最适发酵温度为 60 ℃。而喷雾干燥法干燥速率快、时间短,所以菌株只需耐受较短时间的高温。为此,作者通过考察菌株在 80 ℃水浴 10 min 前后的活菌数来比较它们的耐高温能力,以减少高温对菌株的过多损害。

另外,我国的发酵肉制品大多属于自然发酵,而关于微生物定向接种生产发酵肉制品的研究也只有 20 年的时间^[2],并且大多数菌株的筛选来源为国内的自然发酵肉制品。例如,卢士玲等^[17]从发酵香肠、腊肉和金华火腿中分离筛选出 2 株德氏乳杆菌。而作者所筛选的菌株 T+1 分离自埃及色拉米香肠中,具有良好发酵特性和耐受性,将其用作肉品发酵剂,可能赋予我国传统发酵肉制品特殊的风味,具有潜在的开发价值。

参考文献(References):

- [1] 李先保, 李兴民, 南庆贤, 等. 乳酸菌发酵剂在肉制品中的应用[J]. 肉类研究, 1997, (1): 19- 22.
LI Xiarr bao, LI Xing min, NAN Qing xian, et al. The application of lactic acid bacteria starter culture in meat products [J]. **Meat Research**, 1997, (1): 19- 22. (in Chinese)
- [2] 刘树立, 王春艳, 王华, 等. 肉制品发酵剂的研究进展[J]. 中国调味品, 2007, (4): 31- 37.
LIU Shu li, WANG Churr yan, WANG Hua, et al. Research status on meat starter culture[J]. **China Condiment**, 2007, (4): 31- 38. (in Chinese)
- [3] 王艳梅, 马丽珍. 发酵肉制品的研究现状[J]. 肉类工业, 2004, (6): 41- 42.
WANG Yarr mei, MA Li zhen. Research situation on fermented meat products[J]. **Meat Industry**, 2004, (6): 41- 42. (in Chinese)
- [4] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [5] Bover Cid S, Holzapfel W H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1999, 53(1): 33- 41.
- [6] 李凤彩, 程文新, 谢华, 等. 发酵香肠菌种筛选标准探讨[J]. 食品科技, 2002, 23(6): 78- 79.
LI Feng cai, CHENG Werr xin, XIE Hua, et al. Selection criteria of bacteria used in the fermented sausages[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2002, 23(6): 78- 79. (in Chinese)
- [7] 马德功, 王成忠, 崔文文, 等. 发酵香肠乳酸菌发酵剂筛选标准[J]. 肉类研究, 2007, (12): 31- 33.
MA De gong, WANG Cheng zhong, CUI Werr wen, et al. Selection criteria of lactic acid bacteria used in the starter cultures of the fermented sausages[J]. **Meat Research**, 2007, (12): 31- 33. (in Chinese)
- [8] Ammor M S, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update[J]. **Meat Science**, 2007, 76(1): 138- 146.
- [9] 杜秉海. 微生物实验[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1994.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Woo P C Y, Fung A M Y, Lau S K P, et al. Identification by 16S rRNA gene sequencing of *Lactobacillus salivarius* bacteremic cholecystitis[J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002, 40(1): 265- 267.
- [12] Woo P C Y, Leung P K L, Leung K W, et al. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an *Enterobacteriaceae* species from a bone marrow transplant recipient[J]. **Molecular Pathology**, 2000, 53(4): 211- 215.
- [13] 曲微, 范俊华, 霍贵成. 益生菌喷雾干燥技术的研究进展[J]. 中国乳业, 2008, (4): 36- 38.
QU Wei, FAN Jur hua, HUO Guir cheng. Research status on spray drying of probiotics[J]. **China Dairy**, 2008, (4): 36- 38. (in Chinese)
- [14] 鄯晋晓, 盛占武. 发酵肉制品中微生物的作用[J]. 肉类工业, 2007, (2): 15- 18.
SHAN Jir xiao, SHENG Zharr wu. Function of microorganism in fermentative meat products[J]. **Meat Industry**, 2007, (2): 15- 18. (in Chinese)
- [15] Hugas M, Monfort J M. Bacterial starter cultures for meat fermentation[J]. **Food Chemistry**, 1997, 59(4): 547- 554.
- [16] 崔国艳, 陈五岭, 张雄鹰, 等. 耐高温乳酸菌的分离与鉴定[J]. 长治医学院学报, 2009, 23(2): 102- 104.
CUI Guo yan, CHEN Wu ling, ZHANG Xiong ying, et al. Isolation and identification of thermo tolerant lactic acid bacteria[J]. **Journal of Changzhi Medical College**, 2009, 23(2): 102- 104. (in Chinese)
- [17] 卢士玲, 吴桂春, 李开雄. 发酵肉制品中乳酸菌的分离、筛选和鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25 (3): 116- 121.
LU Shi ling, WU Gui chun, LI Kai xiong. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from fermented meat[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(3): 116- 121. (in Chinese)