

文章编号: 1673 1689(2010)05-0765-05

发酵香肠菌种的筛选及初步鉴定

李星云, 靳焱*

(内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 以发酵香肠发酵剂的选择标准为原则, 对分离自发酵香肠的 20 株乳酸菌进行了筛选。对筛选出的适合于发酵香肠生产的 5 株乳酸菌进行生化鉴定, 初步鉴定结果为: FG-1、ML-2 为植物乳杆菌(*L. plantarum*), GL-2、GX-2 为干酪乳杆菌(*L. casei*), F2-2 为鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)。

关键词: 发酵香肠; 乳酸菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: TQ 920. 1

文献标识码: A

Screening and Preliminary Identification of Fermented Sausage Strain

LI Xing-yun, JIN Ye*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: Total 20 lactic acid bacteria were isolated from the fermented sausage. 5 strains which suitable for fermented sausage production were identified on basis of their biochemical characteristics, the result shows that: 2 strains named FG-1, ML-2 were identified as *L. plantarum*, 2 strains named GL-2, GX-2 were identified as *L. casei*, 1 strain named F2-2 was identified as *L. rhamnosus*.

Key words: fermented sausage, lactic acid bacteria, screening, identification

发酵香肠是指将绞碎的肉(通常指猪肉或牛肉)、动物脂肪、盐、糖、发酵剂和香辛料等混合后灌进肠衣, 经过微生物发酵制成的具有稳定的微生物特性和典型发酵香味的肉制品^[1-2]。传统的发酵香肠加工工艺中, 发酵过程是完全依赖于原料肉中存在的乳酸菌进行的自然发酵。由于自然发酵过程存在着不可控制性和不可靠性, 难以保证产品的质量和安全, 人们开始倾向于在现代加工工艺中加入发酵剂来实现对发酵过程的有效控制, 并且通过对

发酵剂菌种的筛选和对混合发酵剂的研究以改善这些方面的不足, 保证产品的稳定性和安全性。发酵香肠目前所用发酵剂多为乳酸菌, 乳酸菌将香肠中的碳水化合物分解成乳酸, 降低了产品的 pH 值, 抑制腐败菌的繁殖, 并赋予产品特殊的风味和质地。通过对发酵香肠中优良菌株的分离、筛选和鉴定研究, 可克服传统肉制品发酵启动慢、发酵时间长的缺点, 使发酵时间大大缩短, 降低发酵肉制品的生产成本, 并改善发酵肉制品感观品质等, 使发

收稿日期: 2009-09-15

基金项目: 内蒙古自治区科技创新引导奖励基金项目。

* 通信作者: 靳焱(1964-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 工学博士, 教授, 博导, 主要从事畜产品加工方面的研究。

Email: jinyeyc@yahoo.com.cn

酵肉制品具有产品加工快速、安全和标准化的特点。因此,乳酸菌发酵剂的筛选研究对我国发酵肉制品的开发有着十分重要的意义。作者从分离自发酵香肠中的乳酸菌中筛选出适合发酵肉制品的优良菌种,为开发新型肉品发酵剂打下坚实的基础,为不同类型的发酵肉制品提供乳酸菌菌种资源。

1 材料与仪器

1.1 材料

菌株:实验室自行分离自发酵香肠的20株乳酸菌;标准菌株:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) CICC6238:购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 主要仪器

LRH-250生化培养箱;超净工作台;T6新悦可见分光光度计;Sartorius(PB-10)普及型pH计;YM50全自动不锈钢立式电热蒸汽消毒器等。

2 试验方法

2.1 菌株筛选试验

2.1.1 菌株耐盐能力的测定 将分离菌株分别接种于含0、2、4、6、8 g/dL NaCl的MRS液体培养基,30℃培养24 h,分别以含0、2、4、6、8 g/dL NaCl的MRS液体培养基为空白对照,用分光光度计于600 nm测定菌液的OD值。

2.1.2 菌株耐亚硝酸盐能力的测定 将分离菌株分别接种于含0、50、100、150 mg/kg NaNO₂的MRS液体培养基,30℃培养24 h,分别以含0、50、100、150 mg/kg NaNO₂的MRS液体培养基为空白对照,用分光光度计于600 nm测定菌液的OD值。

2.1.3 菌株产粘性的测定 将分离菌株接种于用5 g/dL蔗糖代替葡萄糖的MRS固体培养基,30℃培养24~48 h,用接种针挑起菌落直接观察其产粘性。

2.1.4 菌株蛋白质降解能力的测定 将1 mL菌液涂布于加入15%脱脂乳的MRS固体培养基,30℃培养24~48 h,观察菌落周围的透明圈,以此判定菌株的蛋白质降解能力。

2.1.5 菌株脂肪分解能力的测定 将1 mL菌液涂布于加入15%猪油和中性红指示剂的MRS固体培养基,30℃培养24~48 h,观察培养基上的红色斑点,以此判定菌株的脂肪分解能力。

2.1.6 菌株生长能力和产酸速度的测定 将分离菌株接种于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用分光光度计于600 nm测定菌液的OD值,同时用酸度计测定菌液的pH值。

2.1.7 菌株不同温度生长能力的测定 将分离菌株接种于MRS液体培养基,分别在10、15、20、30、35℃培养24 h,以MRS液体培养基为空白对照,用分光光度计于600 nm测定菌液的OD值。

2.1.8 菌株抑菌能力的测定 在不加乙酸钠的MRS固体平板培养基上涂布指示菌(大肠杆菌,葡萄球菌),等距放置4个牛津杯,每个牛津杯加入200 μL发酵上清液或菌体悬浊液,于4℃扩散6 h后再于30℃培养24~48 h,观察牛津杯周围的透明抑菌圈,以此判定该菌的代谢产物或其菌体的抑菌活性。用直尺测抑菌圈直径,抑菌圈的大小在一定程度上反映了抑菌能力大小。

2.2 筛选菌株的初步鉴定

2.2.1 菌株形态特征的鉴定

1) 菌落形态:观察培养基平板上单个菌落的形状、大小、边缘、表面粗糙度、凸起、色泽等特征并记录。

2) 菌体形态:将分离菌株革兰氏染色,于100倍油镜下观察菌体形态。

2.2.2 菌株生理生化鉴定 石蕊牛乳实验,过氧化氢酶实验,硝酸盐还原实验,吲哚实验,葡萄糖产酸产气实验,发育温度实验,不同pH值生长实验,明胶液化实验,油脂水解实验,V-P实验,柠檬酸盐利用实验,硫化氢实验,甲基红实验,运动性实验,淀粉水解实验,七叶苷水解实验,以及糖(醇)(阿拉伯糖,木糖,果糖,核糖,鼠李糖,麦芽糖,甘露糖,甘露醇,蔗糖,乳糖,半乳糖,山梨醇等)发酵实验。

3 结果与分析

3.1 菌株筛选试验结果

发酵香肠乳酸菌发酵剂一般要求在15~40℃良好生长;至少耐受6 g/dL的食盐浓度;至少耐受100 mg/kg的亚硝酸盐浓度;不产H₂S,不产粘液,不产生大量H₂O₂;不具有(或微弱的)蛋白质和脂肪降解能力;能够抑制致病菌和腐败菌的生长。根据以上筛选标准对分离纯化的20株菌进行筛选,其结果见表1。综合其结果共筛得5株适合于生产发酵香肠的菌株,对其进行生化鉴定。

表 1 菌株筛选试验结果

Tab. 1 Result of screen of strain

项目	菌株数目	
亚硝酸盐耐受质量浓度	50mg/ kg	20/20
	100 mg/kg	20/20
	150mg/ kg	18/20
食盐耐受质量浓度	6 g/dL	20/20
	8 g/dL	8/20
温度耐受值	40 °C	20/20
	35 °C	20/20
	20 °C	20/20
	15 °C	13/20
不产粘	12/20	
不分解蛋白质	19/20	
不分解脂肪	20/20	
抑制金黄色葡萄球菌	5/20	
抑制大肠杆菌	9/20	

3 2 筛选菌株的鉴定

3 2. 1 菌株的形态学特征 筛选得到的 5 株菌的菌落形态特征和菌体特征的描述见表 2, 部分菌株的菌体特征见图 1。从表 2 可以看出, 筛选得到的 5 株菌均为革兰氏阳性菌, 在 MRS + 3 g/dL CaCO₃ 固体培养基上生长均能形成明显的透明圈。

3 2. 2 菌株的生化鉴定试验及糖发酵试验 采用 CICC6238 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 为标准菌株, 对分离得到的 5 株菌进行生化特性鉴定和糖发酵试验, 实验结果见表 3、4。所筛选得到的 5 株无芽孢的杆菌, 革兰氏染色均为阳性, 接触酶试验、硝酸盐还原试验、明胶液化试验、吲哚试验、H₂S 产生试验均为阴性, 能发酵牛奶使其凝固, 其结果与对照菌株一致, 因此鉴定为乳杆菌属。再通过糖(醇)发酵试验进一步鉴定。

表 2 筛得 5 株菌的菌落特征和菌体特征

Tab. 2 Colony characteristics and morphology of 5 screen strain

菌株	菌落形态							菌体形态
	形状	大小/mm	边缘	凸起	颜色	粗糙度	溶钙	
FG-1	椭圆	0.8	整齐	中	乳白	光滑	溶钙	G ⁺ 短杆状, 成链
GL-2	椭圆	1.0	不整齐	高	乳白	粗糙	溶钙	G ⁺ 短杆状, 成对
ML-2	圆	1.0	整齐	高	白色	光滑	溶钙	G ⁺ 短杆状, 成对
GX-2	圆	0.5	整齐	高	乳黄	光滑	溶钙	G ⁺ 杆状, 成链
F2-2	椭圆	1.0	不整齐	低	乳白	光滑	溶钙	G ⁺ 椭球, 成短链

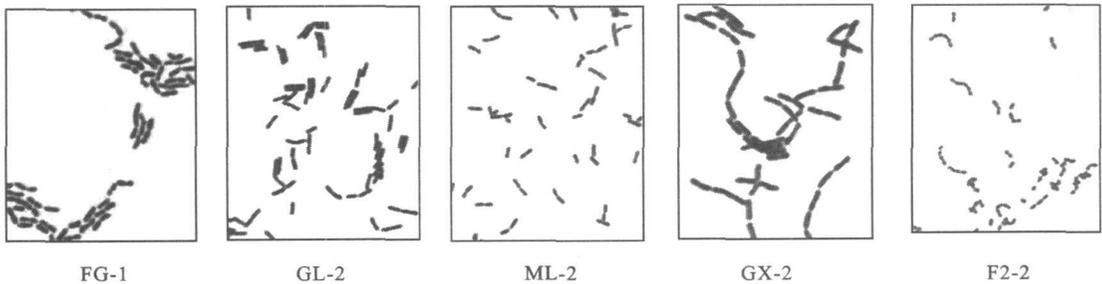


图 1 部分菌株菌体特征

Fig. 1 The morphological characteristics of some strains

表 3 筛得 5 株菌的生化鉴定结果

Tab. 3 Biochemical characteristics of 5 strains

生化鉴定试验项目	参考菌株	分离菌株				
	CICC6238	FG-1	GL-2	ML-2	GX-2	F2-2
接触酶	-	-	-	-	-	-
产 H ₂ S	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+
V-P	-	-	-	-	-	-

续表 1

生化鉴定试验项目	参考菌株		分离菌株			
	CICC6238	FG-1	GL-2	ML-2	GX-2	F2-2
吡啶	-	-	-	-	-	-
15 ℃ 生长	+	+	+	+	+	+
45 ℃ 生长	-	-	+	-	+	+
pH 9.6 生长	-	-	+	-	+	+
硝酸盐还原	-	-	-	-	-	-
柠檬酸利用	-	-	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-	-	-
石蕊牛乳	酸凝	酸凝	酸凝	产酸	酸凝	酸凝

注: +, 反应阳性或生长; -, 反应阴性或不生长

表 4 筛得 5 株菌的糖(醇)发酵试验结果

Tab. 4 The 5 strain grown on sugars or alcohols

糖发酵试验项目	参考菌株		分离菌株			
	CICC6238	FG-1	GL-2	ML-2	GX-2	F2-2
阿拉伯糖	+	+	-	+	-	+
木糖	+	+	-	+	-	-
果糖	+	+	+	+	+	+
核糖	+	+	+	+	+	+
鼠李糖	-	-	-	-	-	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	+
松三糖	+	+	+	+	+	+
蜜二糖	+	+	-	+	-	-
棉籽糖	+	+	+	+	+	-
半乳糖	+	+	+	+	+	+
山梨醇	+	+	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+	+
七叶苷	+	+	+	+	+	+

注: +, ≥90% 菌株为阳性; -, ≥90% 菌株为阴性;

3.3 筛选菌株生长曲线和产酸速度的测定

将筛选出的 5 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 用分光光度计于 600 nm 测定菌液的 OD 值, 绘制其生长曲线, 见图 2。

从图 2 中 5 株菌培养 24 h 的 OD 值变化曲线来看, ML-2, GL-2, GX-2 生长速度比较快, FG-1, F2-2 生长速度趋于一致, 生长都比较慢, 但 12 h 后所有菌株的生长变化趋于一致。

将分离菌株接种于 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 用酸度计测定菌液的 pH 值绘制其 pH 变化曲线, 见图 3。

从图 3 中 5 株菌培养 24 h 的 pH 值变化曲线来看, 所有菌株的 pH 值变化趋势基本一致。在培养初期 pH 值快速下降, 随着时间的延长, 下降趋势逐渐减弱, 在 10 h 后保持在 4.8 左右基本不变。

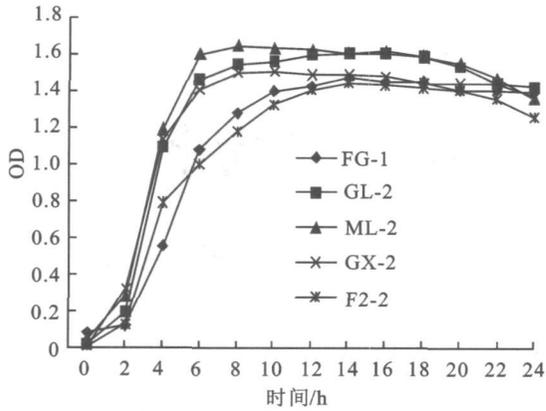


图2 24 h内乳酸菌菌体密度的变化

Fig.2 The growth curve of lactic acid bacterium during 24 h

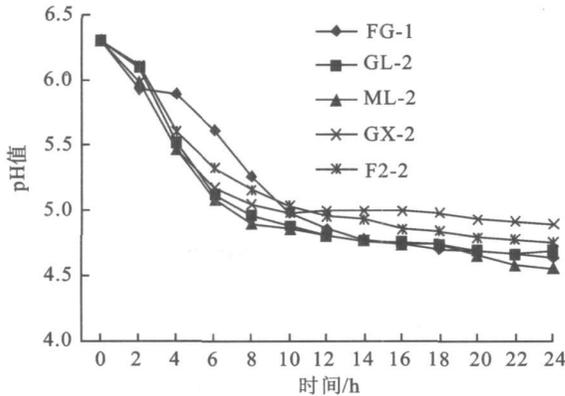


图3 24 h内乳酸菌产酸速度的变化

Fig.3 The acids production rate during 24 h

4 结 语

1) 从分离自发酵香肠的 20 株乳酸菌中筛得的 5 株菌均能耐受 4 g/dL 和 6 g/dL NaCl 和 150 mg/kg 亚硝酸盐, 不产粘液; 不分解蛋白质和脂肪, 能在适于发酵香肠生产的低温条件下生长良好, 发酵葡萄糖不产 CO_2 ; 不生成 H_2S ; 不产 H_2O_2 ; 能抑制大肠杆菌的生长, 并且具有很好的产酸能力。

2) 以 CICC6238 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 为标准菌株, 对筛选出的 5 株适合于发酵香肠生产的菌株采用细菌培养鉴定的常规生化试验以及糖(醇)发酵试验进行鉴定, 对照《乳酸细菌分类鉴定及试验方法》^[9] 和《伯杰氏系统细菌学手册》^[10] 初步鉴定为: FG-1, ML-2 为植物乳杆菌 (*L. plantarum*); GL-2, GX-2 为干酪乳杆菌 (*L. casei*); F2-2 为鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)。

3) 对筛出的 5 株菌, 测定其生长能力和产酸能力, 结果表明: 5 株菌均能在 8~10 h 达到对数生长期, 在 6~8 h 内产酸速度快, 能使 pH 值降低到 5.0 左右, 适合发酵香肠的生产。

参考文献(References):

- [1] 葛长荣, 马美湖. 肉与肉制品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [2] 南庆贤. 肉类工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
- [3] 林伟涛, 徐世明, 刘蓉宏. 中式发酵香肠菌种的分离筛选和初步鉴定[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2008, 21(2): 99-104.
LIN Wei tao, XU Shi ming, LIU Rong hong. Isolation and preliminary identification of Chinese fermented sausage strains [J]. *Journal of Yan tai University: Natural Science and Engineering Edition*, 2008, 21(2): 99-104. (in Chinese)
- [4] 司俊玲, 郑坚强. 发酵香肠发酵剂菌种筛选的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 35-38.
SI Jun ling, ZHENG Jia n qiang. Study on the sifting of bacteria from starter cultures of fermented sausages [J]. *Food Research and Development*, 2006, 27(4): 35-38. (in Chinese)
- [5] 刘书亮, 敖灵, 李雯昕. 传统腌腊肉制品中乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 14-16.
LIU Shu liang, AO Ling, LI Wen xin. Screening and identification of lactic acid bacteria from natural fermented meat products [J]. *Food & Machinery*, 2007, 23(5): 14-16. (in Chinese)
- [6] 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)
- [7] 王令建, 李开雄. 发酵香肠乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 24-27.
WANG Ling jian, LI Kai xiong. Screening and qualification of the fermented sausage strain [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22(2): 24-27. (in Chinese)
- [8] 内村泰, 冈田早苗. 乳酸菌实验手册—分离鉴定(日文版)[M]. 日本: 朝仓书店, 1992.
- [9] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及试验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [10] Buchanan R E. 伯杰氏系统细菌学手册[M]. 北京: 中国科学出版社, 1984.
- [11] N S Antara, I N Sujaya, A Yokota. Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of 'urutan', a Balinese indigenous fermented sausage [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18: 255-262.

(责任编辑:李春丽)