

低温熏煮香肠中腐败菌的分离及鉴定

钱昆, 周涛*

(南京师范大学食品系, 江苏南京 210097)

摘要: 研究低温熏煮香肠中腐败菌相, 分离出一株主要腐败菌, 命名为 NO.1A。利用生理生化检验和 16S rDNA 序列分析对该菌进行鉴定, 结合生理生化检验结果和系统进化树分析结果, 确定该菌为枯草芽孢杆菌。

关键词: 低温熏煮香肠, 腐败菌, 16S rDNA, 枯草芽孢杆菌

Identification of spoilage bacteria isolated from sausage

QIAN Kun, ZHOU Tao*

(Food Department, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The spoilage bacteria isolated from rotted sausage was studied. One strain dominating the spoilage microbial association of sausage was named NO. 1A. Identification of microorganism strain was also performed by using the physiological and biological test and the 16S rDNA sequence analysis. The results showed that the strain was *Bacillus subtilis*.

Key words: sausage; spoilage bacteria; 16S rDNA; *Bacillus subtilis*

中图分类号: TS251.6*5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)04-0124-04

低温肉制品在加工过程中, 蛋白质适度变性, 肉质结实, 富有弹性, 有咀嚼感, 鲜嫩、脆软、多汁, 最大限度地保持了原有营养价值和固有的风味, 是我国肉制品发展的方向和总趋势。但是, 低温肉制品蛋白质、脂肪含量丰富, 水分活度较高, 本身利于腐败微生物生长和繁殖; 加工原、辅料种类繁多、来源复杂, 从原料肉、辅料、香辛料等添加物一直到成品, 源头污染和二次污染难以彻底控制、熟制热加工的温度杀菌不彻底, 仍有一部分耐热微生物残存, 导致低温肉制品极易发生微生物性腐败。因此, 研究低温熏煮香肠腐败菌相为生产过程中采取针对性措施控制微生物污染提供参考。目前已经报道了 10000 种以上的细菌 16S rDNA 序列。通过对 16S rDNA 的序列分析, 可以将细菌划分到属或种。16S rDNA 的前 500bp 序列变化较大, 包含有丰富的细菌种属的特异性信息, 如果前 500bp 序列不足以反应细菌的种属信息时, 则可以进行 16S rDNA 的全序列 PCR 扩增及 DNA 测序, 得到较为全面的 16S rDNA 序列信息。本实验结果生理生化检验及 16S rDNA 测序的方法鉴定低温肉制品中的腐败菌的种属, 为针对低温肉制品的防腐剂的开发提供参考。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-09-07 * 通讯联系人

作者简介: 钱昆(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 南京师范大学“研究生培养创新工程”项目; 亚联董项目(211040B461); 南京师范大学科研启动资金项目(2006031XGQ0089)。

1.1 实验材料

田园早肠、烤肠、熟香肠等 购于宁海路苏果超市; 平板计数培养基(PCA) 南京赛吉科技有限公司; 乳酸菌培养基(MRS), 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA), 明胶液化培养基, 含铁牛奶培养基, 淀粉培养基, 硫酸亚铁琼脂, 苯丙氨酸培养基, 西蒙氏柠檬酸盐培养基, 硝酸盐培养基。

1.2 腐败菌分离

将不同品种的低温熏煮香肠分别放在 35℃ 和 7℃ 条件下贮藏, 直到有明显腐败现象如香肠包装袋内液体增多, 肠体变软, 失去弹性等现象, 采用涂抹法分离样品中的微生物。

1.3 培养及形态特征

1.3.1 菌落特征 包括菌落表面呈的形状(崎岖、褶皱、平滑), 菌落表面(干燥、湿润), 菌落大小, 边缘形状(光滑、缺刻状、波状、树枝状等), 菌落颜色。

1.3.2 菌体形态 包括芽孢位置(中间、极端), 芽孢是否膨大, 芽孢形状(杆状、椭圆、球状)。

1.4 生理生化特征

包括明胶液化实验, 牛奶凝固与胨化, 淀粉水解实验, H₂S 实验, 接触酶实验, 葡萄糖产气实验, 苯丙氨酸脱氨酶实验, 硝酸盐还原实验, 溶血实验等。

1.5 16S rDNA 目标片断的 PCR 扩增

1.5.1 引物的设计 根据细菌的 16S rDNA 两端的保守序列, 设计引物: 上游引物(Forward Primer) 5'-AGATTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物(Reverse Primer) 5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3'。

1.5.2 目标片断 PCR 扩增 使用灭菌牙签挑取活化

的单菌落,置于装有 30 μ L ddH₂O 的 Microtube 中 95 $^{\circ}$ C 热变性 5min,然后迅速加入 PCR 反应体系: 5 μ L 10 \times PCR buffer; 4 μ L Dntp; 4 μ L MgCl₂; 0.5 μ L 上游引物; 0.5 μ L 下游引物; 1 μ L TagTM DNA 聚合酶。PCR 反应步骤: a.95 $^{\circ}$ C 热启动 5min; b.94 $^{\circ}$ C 变性 30s; c.57 $^{\circ}$ C 退火 40s; d.72 $^{\circ}$ C 延伸 90s; e.重复步骤 b、c、d, 29 次; f.72 $^{\circ}$ C 延伸 5min,使扩增产物完整。使用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,检验扩增产物。

1.5.3 PCR 产物的回收 使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver .2.0 切胶回收目的片断,取 1 μ L 进行琼脂糖凝胶进行电泳,检验回收片断。回收的目的片断直接用于 DNA 碱基测序。

1.5.4 16S rDNA 序列的测序 回收 16S rDNA 序列测序由 TaKaRa 公司使用 ABI PRISMTM 3730XL DNA Sequencer 完成。

1.6 16S rDNA 序列的比对

使用 NCBI 网站对 NO.1A 菌的 16S rDNA 与数据库中各种菌的 16S rDNA 序列进行比对。登录 NCBI 网站(美国国立生物技术信息中心),使用 BLASTN 在 GeneBank、EMBL、DDBJ、PDB 基因库中进行同源性搜索。从 Genbank 中选择了近缘菌株的 16S rRNA 基因序列,应用 MEGA 3.1 软件进行多重比较后构建系统发育树(Bootstrap = 1000)。

2 结果与分析

2.1 不同低温熏煮香肠分离出的菌种

菌种	NO.1A	NO.1B	NO.2A
形态特征	菌落表面光滑,边缘树枝状,湿润乳白色,生长速度快	菌落表面光滑,乳白色,边缘波浪状	菌落表面、边缘光滑,淡黄色,呈圆形
菌体形态	菌体短杆状,可产生芽孢,芽孢位于菌体中间,芽孢体未膨大,杆状	长链杆状,较 A 菌长,可产生芽孢,芽孢在菌体极端,芽胞体呈椭圆形	菌体呈球状,多个菌体聚合在一起
革兰氏染色	+	+	+
需氧	兼性	兼性	兼性
产气	-	-	-
7 $^{\circ}$ C	不能生长	不能生长	不能生长
10 $^{\circ}$ C	可生长	不能生长	不能生长
45 $^{\circ}$ C	生长良好	可生长	可生长
7% NaCl	生长良好	可生长	不能生长
pH9.6	生长良好	可生长	可生长

注:“+”阳性;“-”阴性。表 3 同。

表 2 三株分离菌种株的基本特性

表 3 NO.1A 生理生化特征

生化反应	NO.1A	生化反应	NO.1A
接触酶实验	+	精氨酸分解实验	-
葡萄糖产气实验	-	乳糖利用实验	-
牛奶胨化实验	+	甘露醇利用实验	+
牛奶凝固实验	-	棉籽糖利用实验	-
淀粉水解实验	-	山梨醇利用实验	+
柠檬酸盐利用实验	+	水杨素利用实验	-
苯丙氨酸脱氨酶实验	+	蔗糖利用实验	+
H ₂ S 实验	-	海藻糖利用实验	+
硝酸盐还原反应	+	丙酮酸利用实验	-
溶血	-	菊糖利用实验	-
明胶液化实验	+	木糖利用实验	-
尿素分解实验	-	阿拉伯糖利用实验	-
七叶灵分解实验	+	纤维素二糖利用实验	+

不同品种低温熏煮香肠在 35、7 $^{\circ}$ C 贮藏条件下分离出的细菌基本数据见表 1。35 $^{\circ}$ C 和 7 $^{\circ}$ C 贮藏条件下,从三个品种的低温熏煮香肠中均分离出 NO.1A,并且其占总菌落数的百分比最大。因此,可以判断 NO.1A 为三种低温熏煮香肠产品中的主要腐败菌。NO. 1B、NO. 2A 占总菌落数含量较小,同时霉菌和酵母菌未检出。

表 1 三种产品不同贮藏下分离出的菌种

	35 $^{\circ}$ C 贮藏		7 $^{\circ}$ C 贮藏	
	菌株	菌相比例 (%)	菌株	菌相比例 (%)
田园早肠	NO.1A	98.4	NO.1A	100
	NO.1B	1.6	—	—
烤肠	NO.1A	96.8	NO.1A	100
	NO.1B	3.1	—	—
	NO.2A	0.1	—	—
熟香肠	NO.1A	100	NO.1A	100

将三种分离出的细菌进行革兰氏染色实验和初步分析,确定三株细菌皆为革兰氏阳性菌,结果见表 2。从表 2 中可以看出,三株细菌在有氧或无氧条件下均能生长,7 $^{\circ}$ C 条件下生长受到抑制。

但是根据表 1 的结果,NO.1A 菌株为优势菌株,所以将 NO.1A 菌作为腐败菌进行鉴定实验。

2.2 NO.1A 的生化检验

NO.1A 的主要生理生化特征见表 3。结合菌落特征和生化实验,根据伯杰氏菌种鉴定手册^[3],初步

表4 NO.1A 菌 16S rDNA 序列同 GeneBank 中的细菌菌株同源性比较

菌种名	菌株名	登陆号	分值	相似性(%)
<i>Bacillus subtilis</i>	CICC10160	DQ012095.1	2645	100
<i>Bacillus subtilis</i>	CICC10163	DQ005496.1	2645	100
<i>Bacillus subtilis</i>	—	AB195282.1	2645	99
<i>Bacillus subtilis</i>	P40	AY962473.1	2645	99
<i>Bacillus subtilis</i>	HYDM-11	EF428240.1	2641	99
<i>Bacillus subtilis</i>	Jinran 14	DQ676957.1	2641	99
<i>Bacillus subtilis</i>	E9	DQ474759.1	2641	99
<i>Bacillus subtilis</i>	BFAS	AY775778.1	2641	99
<i>Bacillus subtilis</i>	B1144	AB232386.1	2641	99
<i>Bacillus subtilis</i>	CICC10210	DQ057581.1	2628	99

鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.3 NO.1A 16S rDNA 序列的测定

细菌的 16S rDNA PCR 扩增后 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统下显示的图像如图 1 所示。由图 1(a) 可以看出,PCR 扩增出的一条明亮的条带在 2000bp 和 1000bp 之间,而 16S rDNA 的长度大约为 1500bp。将目标片段回收后电泳出现单一条带,结果见图 1(b)。测序结果表明,扩增的 DNA 序列全长为 1469bp,这个序列在 NCBI 上的注册号为:EU014131。

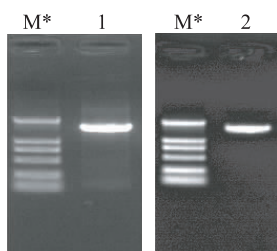


图1 1% 琼脂糖电泳结果

* M 泳道为 DNA marker; TaKaRa DL2000 DNA Marker

片段分别为 2000、1000、750、500、250、100bp;

1 泳道为 PCR 产物; 2 泳道为 PCR 产物割胶回收片段

碱基序列在 NCBI 数据库中使用 BLASTN 进行同源性搜索,16S rDNA 相似性达到 99% 以上的有 23 株菌种,所得结果中相似性最高的 10 个菌株的比较结果见表 4。从表 4 中可以看出,通过 16S rDNA 同源性比较,NO.1A 菌株与 GenBank 中 10 株枯草芽孢杆菌的 16S rDNA 相似性达到 99% 以上。根据同源性比较结果,可以初步确定 NO.1A 为枯草芽孢杆菌。

从 GenBank 中选取 9 个菌株的 16S rRNA 序列,应用 MEGA3.1 构建的系统发育树如图 2。其中 NO.1A 与枯草芽孢杆菌 CICC10160 和 CICC10163 的亲缘关系最近,且 NO.1A 与枯草芽孢杆菌在同一分支中。因此,可以证明 NO.1A 为枯草芽孢杆菌。

3 讨论

低温肉制品为保持其风味和口感,采用 75~90℃ 蒸煮加工,4~7℃ 的储藏条件,在蒸煮加工中,中心温度最高达 76℃,此温度下富含蛋白质和油脂的介质中,细菌不能被彻底杀死,残存菌或污染菌在环境适宜时,能迅速繁殖。当温度等条件变化时,生长最快的种类成为导致肉类腐败的优势菌。在有氧条件下^[4],温度接近 20℃ 时,适合于嗜中温菌的生长。因而,不动杆菌(*Acinetobacter*) 和肠杆菌(*Enterobacteriaceae*) 取代假

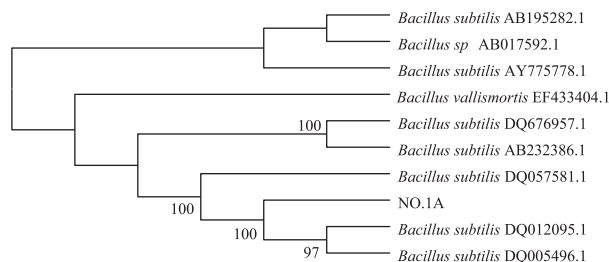


图2 系统发育树状

单胞杆菌(*Pseudomonas*) 而成为优势菌。在无氧的条件下,当温度低于 20℃ 时,嗜冷的乳酸杆菌(*Lactobacillus SP*) 成为优势菌;当温度达到 30℃ 时,嗜中温的乳酸杆菌(*Lactobacilli*) 和梭状杆菌(*Clostridia*) 占主导地位,若在起初有产气荚膜杆菌(*C.perfringens*) 存在,则其将成为优势菌。在真空包装的肉制品中,酵母菌和霉菌的生长受到限制,并且其致病力较低,所以作为主要腐败菌存在的可能性较小。

不同的低温肉制品会采用不同的加工工艺,主要腐败菌相也有所不同。有报道乳酸菌是肉制品中的重要腐败菌之一^[5,6],乳酸菌主要是乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、肉杆菌属(*Carnobacterium*) 和明串珠菌属(*Louconostoc*)。张春江^[7]、罗欣等人从低温熏煮香肠中分离出四株细菌,初步确定其中一株主要的腐败菌为耐酸乳杆菌。乳酸菌多易出现在发酵低温肉制品中,而在其它不采用发酵工艺的低温肉制品中乳酸菌则不一定为主要腐败菌相,因为微生物污染会受到加工工艺、原料、包装等各个环节的影响。本研究中从三种低温肉制品中分离出的枯草芽孢杆菌便是食品工业中的常见污染菌^[8]。

大多数的芽孢杆菌广泛存在于自然界中,因此在食品的加工过程中很容易污染食品。芽孢杆菌能利用糖类、蛋白质等营养成分生长,能形成内生孢子,具有较强耐受力,特别是耐热力。食品加工中灭菌或熟制工艺难以将芽孢杆菌完全杀灭,使得该属细菌成为食品工业中较为重要的微生物研究对象。香肠加工中会添加香辛料来改善风味,但是香辛料中含有大量的微生物,特别是芽孢杆菌属的细菌^[9]。李宗军^[10] 等人研究香辛料中的微生物污染情况发现,不同种香辛料都有不同程度的微生物污染。Riha 和 Solberg^[11] 在研究盐包装肠衣中发现,分离出的菌 60% 以上都是芽孢杆菌,其次是梭状芽孢杆菌和假

(下转第 130 页)

WSDF 浓度为 10%, 温度为 25℃ 的条件下, 加盐量 (盐占干基 WSDF 的百分比) 对 WSDF 溶液表观粘度的影响如图 8 所示。在 WSDF 加盐量少于 5% 时, 盐对 WSDF 的粘度影响不大, 当盐的添加量大于 5% 以后, 其粘度随盐的增加有微小的上升, 大于 15% 后, 粘度基本不变。这说明即使在较高加盐量情况下, WSDF 对体系的稠度改变也很小。

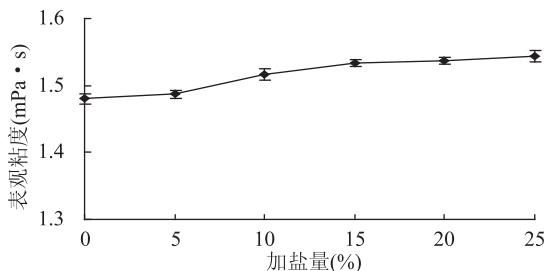


图 8 不同加盐量时 WSDF 溶液的表观粘度

3 结论

用纤维素酶水解麦麸膳食纤维, 制备可溶性膳食纤维, 其得率较高, 在 40% 以上。小麦麸皮中含有丰富的膳食纤维, 其含量高达 45.10% (干基), 是人体很好的膳食纤维补充剂。利用酶法对此天然膳食纤维进行功能转化, 工艺简单, 条件温和, 重复性强并可连续操作, 制备的可溶性膳食纤维产品溶解性高, 粘度较低, 是一种不可多得的多功能转化方法。随着生活水平的发展和人们健康意识的提高, 对可溶性麦麸膳食纤维的开发必将使其成为功能性食品中的一个极具潜力的配料和添加剂, 为人类的健康提供保证。

(上接第 126 页)

单胞菌。由此可以看出, 除乳酸菌以外, 其它的微生物也可通过各种途径污染低温肉制品, 成为主要腐败菌。

肉制品中是不允许致病性芽孢杆菌存在的, 如肉毒芽孢杆菌, 而非致病性的芽孢杆菌虽对消费者不会造成重大的安全威胁, 但是其对肉制品的食用品质造成的影响却不容忽视, 如导致产品变色、变味、发粘。本研究从腐败低温熏煮肠中发现的枯草芽孢杆菌正是一种容易污染食品的微生物, 并且在肉制品的熟制加工后仍有残存, 最终大量繁殖, 导致低温熏煮香肠感官质量恶化。加工过程中, 枯草芽孢杆菌如何污染低温熏煮香肠还需要进一步研究, 但本研究为加工过程采取针对性的措施控制微生物污染提供参考。

参考文献:

- [1] Fuller N J, Marie D, Partensky F, et al. Clade-Specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine synechococcus clade throughout a stratified water column in the red sea [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(5): 2430~2433.
- [2] Hugenholtz P, Huber T. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,

参考文献:

- [1] Dietary reference intakes proposed definition of dietary fibre [M]. Washington DC, National Academy Press, 2001. 1~64.
- [2] 王萍, 张蕾, 尹明姬. 小麦麸皮中水溶性膳食纤维的提取 [J]. *粮食加工*, 2006(1): 51~55.
- [3] 侯汉学, 张锦丽, 董海洲, 等. 麦麸膳食纤维的挤压改性及其在面包中的应用研究 [J]. *粮食与饲料工业*, 2003(5): 36~39.
- [4] 刘伟, 刘成梅, 黎冬明, 等. 瞬时高压作用对麦麸膳食纤维改性的研究 [J]. *食品科学*, 2006, 27(11): 82~86.
- [5] Dong-Ho W, Kim, Jin-Keun. Method for preparing soluble dietary fiber from corn hull [P]. United States Patent, 168644, 2003-2-2.
- [6] 刘忠萍. 大豆可溶性膳食纤维的提取和功能研究 [D]. 无锡: 江南大学, 38~42.
- [7] Whistler R L. Chemistry of the carbohydrates [J]. *Ann Rev Biochemistry*, 1954, 23: 79.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化技术研究 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 22~26.
- [9] Nandini C, Salimath P V. Structural features of arabinoxylans from sorghum having good roti-making quality [J]. *Food Chemistry*, 2001, 74: 417~422.
- [10] Dobhl M P, Hasan A M, Sharma M C, et al. Ferulic acid ester from *Plumeria bicolor* [J]. *Food Chemistry*, 1999, 51: 319~321.
- [11] 陈宗其. 胶体化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1985. 143~160.
- [12] 2003, 53: 289~293.
- [13] R E Buchanan. 伯杰氏菌种鉴定手册 (第八版) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [14] K G Newton, C O Gill. The microbiology of DFD fresh meats: A review [J]. *Meat Science*, 1981(5): 223~232.
- [15] John Samelis, et al. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4℃ [J]. *Food Microbiology*, 2000, 17: 329~340.
- [16] Korkeala H, Bjrkroth J. Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages [J]. *Food Prot*, 1997, 60: 724~731.
- [17] 张春江, 罗欣, 王海燕. 低温熏煮香肠的菌相分析及腐败菌的分离 [J]. *肉类工业*, 2004, 27(6): 25~28.
- [18] 何国庆, 贾英氏. 食品微生物学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [19] Juan P Encinas, Javier Sanz-Gomez, et al. Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from Spanish fermented sausages [J]. *Meat science*, 1996, 42: 127~131.
- [10] 李宗军, 杨雨平, 宋亚娟. 中式肉制品加工中常用香辛料的微生物学研究 [J]. *食品科学*, 2005, 26(2): 46~50.
- [11] Riha W E, Solberg M. Microflora of fresh pork sausage casings 2. Natural casings [J]. *Food Sci*, 1970, 35: 860~863.