

腊鱼加工中的乳酸菌及其特性*

谢静^{1,2},熊善柏^{1,2},曾令彬^{1,2},赵思明^{1,2}

1(华中农业大学食品科技学院,湖北 武汉,430070) 2(湖北省水产品加工工程技术中心,湖北 武汉,430070)

摘要 以白鲢为原料,对腊鱼加工过程的乳酸菌进行分离鉴定,并分析了其特性,为腊鱼加工及其品质控制提供实验数据。结果表明,腊鱼加工中存在植物乳杆菌、弯曲乳杆菌、食品乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌,且不同加工阶段乳酸菌菌种分布不同。原料鱼、腌制结束时鱼体和成品中杆菌分别占乳酸菌的88%、56%和94%,是腊鱼加工中的优势乳酸菌。所有分离的乳酸菌都具有一定的耐盐、耐低温能力和蛋白酶活性,其中弯曲乳杆菌、乳酸片球菌的耐盐和耐低温能力较高;乳酸片球菌的蛋白酶活性最高。

关键词 腊鱼,乳酸菌,分离鉴定,特性

乳酸菌(Lactic acid bacteria)是一类能利用可发酵性糖产生大量乳酸的细菌通称,主要包括乳酸球菌属、链球菌属、明串珠菌属、漫游球菌属、片球菌属、乳杆菌属、双歧杆菌属、肉食杆菌属和孢子乳杆菌属9个属^[1-2]。乳酸菌能赋予食品柔和的酸味和香气,改善产品的风味,促进乳制品、发酵香肠、泡菜等发酵食品的成熟^[3],在西式火腿^[4-7]、干香肠^[8]、侗族酸肉^[9]和发酵鱼肉^[10-11]等肉制品风味形成中发挥了重要作用。

腊鱼主要以淡水鱼为原料经食盐腌制和干燥加工而成,是我国一种颇具特色的传统水产加工食品,长江流域的居民每到冬天大多有制作腊鱼的习俗,其自然发酵是在较低的温度和较高的食盐浓度下进行。微生物在腌制品中生长时,可分泌一些酶,使腌腊制品形成特殊的风味^[12]。本研究室先前对腌腊鱼成品中的乳酸菌进行了分离和鉴定^[13],但成品中的乳酸菌与原料及加工过程的控制有关。本文对腊鱼在自然发酵过程中的乳酸菌进行分离鉴定,研究所分离的乳酸菌的特性,为腊鱼加工及其品质控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*):鲜活、尾重1 kg左右,购于华中农业大学集贸市场。

1.1.2 培养基

第一作者:学士(赵思明教授为通讯作者)。

*国家科技支撑计划(2006BAD05A18),华中农业大学大学生科技创新基金资助

收稿日期:2008-11-03,改回日期:2009-02-16

MRS培养基、PCA培养基、硝酸盐还原培养基、明胶液化培养基、吲哚反应和H₂S试验培养基参照文献^[1,14]中的方法配制。

1.1.3 主要仪器

超净工作台(DL-CJ-1N型),哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;分光光度计(722S型),上海精密科学仪器有限公司;不锈钢电热培养箱(HN303型),南通沪南科学仪器有限公司

1.2 主要实验方法

1.2.1 腊鱼制作方法

参照文献^[12],5%食盐5-10℃腌制4d,10-15℃自然风干至合适水分含量。

1.2.2 微生物培养方法

于原料、腌制结束、成品3个加工阶段取样分析。无菌操作,从容器上层、中层和下层不同位置的中间和外沿分别取约25 g的背部肌肉,用无菌手术剪剪成小颗粒,混合均匀,再取其中的25.0 g放入灭菌乳钵内,加入少量无菌水,用无菌砂磨碎后转移到225 mL 0.9%无菌生理盐水中,混匀后10倍梯度稀释至适当浓度。细菌总数采用PCA培养基,30℃培养48 h;乳酸菌采用MRS培养基,30℃培养48 h。

1.2.3 乳酸菌分离与纯化方法

从原料鱼、腌制结束时鱼体和成品的MRS培养物中分别挑取20株疑似乳酸菌,反复平板划线分离,直到得到纯的菌落后,转接到MRS琼脂斜面上。原料中的菌株编号为R1-R20,腌制结束的为S1-S20,成品的为D1-D20。

1.2.4 革兰氏染色及显微观察^[1]

1.2.5 生理生化鉴定

过氧化氢酶试验采用文献^[1]的方法,硝酸盐还

原试验、明胶液化试验、吲哚试验和 H₂S 试验采用文献^[1,14]的方法,糖醇类发酵试验采用文献^[1]的方法。

1.2.6 耐盐性实验

将培养 18 h 的菌悬液分别转接于 9 mL 含 0、2%、5%、8%、11% 食盐的 MRS 液体培养基中,30℃ 培养 48 h,以不接种的 MRS 液体培养基为空白,于 600 nm 测定培养物的吸光值 OD₆₀₀ nm。

1.2.7 温度实验

将培养 18h 的菌悬液接种于 9 mL 的 MRS 液体培养基中,分别于 5℃、15℃ 和 30℃ 下培养 48h,以不接种的 MRS 液体培养基为空白,于 600 nm 测定培养物的吸光值 OD₆₀₀ nm。

1.2.8 蛋白酶活性的测定

将脱脂牛乳制成 10% 的溶液,分装入试管中,每管 10 mL,115℃ 高压下灭菌 20 min。脱脂牛乳溶液现配现用,使用时再与灭菌的 MRS 培养基混合成 10% 的脱脂牛乳 MRS 培养基,然后倒入培养皿。冷却凝固后,用灭菌的牙签接种。30℃ 培养 48 h 后,有蛋白酶活性的菌株在菌落周围产生清晰可见的透明圈。蛋白酶活性用透明圈的直径 *D* 与菌落直径 *d* 的比值来表示^[15]。

2 结果与分析

2.1 腊鱼加工中乳酸菌的分布

腊鱼加工中细菌总数与乳酸菌数量的变化趋势如图 1 所示。从图 1 可见,腊鱼加工过程中细菌总数与乳酸菌数量均呈现增加趋势。不同加工阶段乳酸菌数量与细菌总数均相差约 1 个对数单位。可见乳酸菌是腊鱼加工过程中的主要的微生物类群之一。

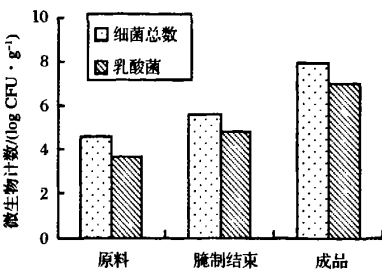


图 1 细菌总数及乳酸菌数量计数

通过革兰氏染色、发酵葡萄糖产酸、过氧化氢酶试验可知,不同加工阶段分离的 60 株乳酸疑似菌株中有 43 株为乳酸菌,腊鱼加工过程中杆状乳酸菌是优势乳酸菌,其中,杆状乳酸菌和球状乳酸菌的比例有所不同(见图 2),腌制前和成品中杆状乳酸菌分别占乳酸菌的 88% 和 94%,而腌制结束时占 56%,球菌在腌制结束时数量较多。腊鱼加工中的不同阶段的菌相存在明显差异。

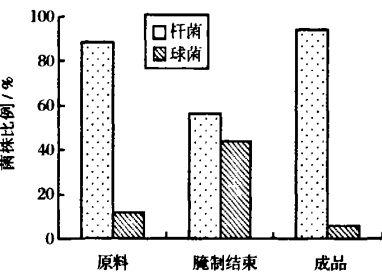


图 2 杆状与球状乳酸菌的相对比例

2.2 分离乳酸菌属的鉴定

在腊鱼加工的过程中,分别从原料鱼、腌制结束时鱼体和成品中分离出具有乳酸菌典型特征菌株 8、18 和 17 株,并分别以 R、S 和 D 进行编号。

表 1 原料中分离乳酸菌菌株一般生理生化鉴定结果

试验项目	杆菌							球菌
	R1	R6	R9	R10	R12	R15	R18	R5
明胶液化试验	+	-	-	+	-	-	-	-
发酵葡萄糖产气	-	-	-	-	-	-	-	-
硫化氢试验	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸还原试验	-	-	-	-	-	-	-	-
吲哚试验	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 4.5 培养试验	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.4 乙酸盐琼脂	+	+	+	+	+	+	+	+
运动性试验	-	-	-	-	-	-	-	-

注: +: 阳性反应, -: 阴性反应。

原料中乳酸菌菌株的一般生理生化鉴定结果见表 1。根据表 1 中各菌株的生理生化特性,按《伯杰系统细菌分类手册》^[16] 进行检索,可判定菌株 R6、

R9、R12、R15 和 R18 为乳杆菌属,R5 为片球菌属,R1 和 R10 还需进一步鉴定。

表 2 腌制结束鱼体中分离乳酸菌菌株一般生理生化鉴定

试验项目	杆菌											球菌							
	S1	S5	S6	S7	S8	S10	S11	S12	S13	S20	S2	S3	S4	S9	S15	S16	S18	S19	
明胶液化试验	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
发酵葡萄糖产气	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
硫化氢试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸还原试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
吲哚试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pH 4.5 培养试验	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
pH5.4 乙酸盐琼脂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
运动性试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注：+：阳性反应，-：阴性反应。

腌制结束时,鱼肉中乳酸菌菌株的一般生理生化鉴定结果见表 2,按《伯杰系统细菌分类手册》^[16] 进行检索,可判定菌株 S5、S6、S7、S10 和 S12 为乳杆菌属,S3、S4、S9 为链球菌属,S2、S15、S16、S18 和 S19 为片球菌属。

表 3 成品中分离乳酸菌菌株一般生理生化鉴定

试验项目	杆菌																	球菌
	D1	D2	D3	D5	D6	D7	D8	D10	D11	D13	D14	D15	D16	D17	D19	D20	D4	
明胶液化试验	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	
硫化氢试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
发酵葡萄糖产气	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
硝酸还原试验	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
吲哚试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pH 4.5 培养试验	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
pH 5.4 乙酸盐琼脂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
运动性试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注：+：阳性反应，-：阴性反应。

腊鱼成品中乳酸菌菌株的一般生理生化鉴定结果见表 3,按《伯杰系统细菌分类手册》^[16] 进行检索,可判定菌株 D2、D5、D6、D8、D11、D13、D16、D19 和 D20 为乳杆菌属,D4 为片球菌属。

2.3 分离乳酸菌种间鉴定

根据分离乳酸菌分属鉴定结果,将腊鱼制作 3 个阶段的乳杆菌属、片球菌属分别进行种间鉴定。

表 4 分离乳杆菌属种间鉴定结果

试验项目	R6	R9	R12	R15	R18	S5	S6	S7	S10	S12	D2	D5	D6	D8	D11	D13	D16	D19	D20
15℃ 生长	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45℃ 生长	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
糖发酵																			
阿拉伯糖	d	d	-	d	d	d	d	-	d	d	d	-	d	-	-	d	-	-	-
纤维二糖	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
七叶灵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
果糖	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蜜二糖	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
棉子糖	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
鼠李糖	+	d	-	+	+	d	+	d	+	+	+	-	+	d	d	+	d	+	d
核糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水杨素	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+	+	d	+	d	+	+	+	+	-
蔗糖	+	+	-	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	-	-
海藻糖	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
木糖	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

注：+：阳性反应，-：阴性反应，d：弱阳性反应。

分离乳酸杆菌种间鉴定结果见表 4,按《伯杰系统细菌分类手册》^[16] 进行检索,可判定菌株 R6、R9、

R15、S6、S10、S12、D2、D6 和 D13 为植物乳杆菌,R12 和 D20 为弯曲乳杆菌,S5、D8、D11 和 D16 为食品乳杆菌,R18 和 D19 还需做进一步鉴定。

分离片球菌种间鉴定结果见表 5,按《伯杰系统细菌分类手册》^[16]检索,可判定菌株 R5、S2、S15、S18 和 S19 为乳酸片球菌,S16、D4 为戊糖片球菌。

表 5 分离片球菌属种间鉴定结果

试验项目	R5	S2	S15	S16	S18	S19	D4	试验项目	R5	S2	S15	S16	S18	S19	D4
15℃生长	+	+	+	+	+	+	+	乳糖	-	-	-	+	-	-	+
45℃生长	+	+	+	+	+	+	+	麦芽糖	+	-	-	+	-	-	+
10% NaCl 生长	-	-	-	-	-	-	-	蔗糖	-	-	-	-	-	-	-
糖发酵								海藻糖	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖	d	d	d	+	d	d	+	甘油	-	-	-	-	-	-	-
核糖	-	+	+	+	+	+	+	甘露醇	-	-	-	-	-	-	-
木糖	+	+	+	+	+	+	+	山梨醇	-	-	-	-	-	-	-
鼠李糖	-	-	-	+	-	-	+								

注: +: 阳性反应, -: 阴性反应, d: 弱阳性反应。

从鉴定的乳杆菌和片球菌来看,腊鱼加工中主要存在植物乳杆菌、弯曲乳杆菌、食品乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌,但在不同的加工阶段这些菌株的分布不同。原料中共分离到 3 株植物乳杆菌和 1 株弯曲乳杆菌,腌制结束时鱼体中分离到 3 株植物乳杆菌、1 株食品乳杆菌、4 株乳酸片球菌和 1 株戊糖片球菌,成品中分离到 3 株植物乳杆菌、1 株弯曲乳杆菌、3 株食品乳杆菌和 1 株戊糖片球菌。植物乳杆菌是在整个加工过程中的数量较多,原料、腌制结束和成品中分别含有 3 株。而曾令彬等鉴定出香肠乳杆菌是腌腊鱼中的优势乳酸菌^[13],Hugas 等人对西班牙香肠中的乳酸杆菌的研究表明清酒乳杆菌是优势菌株,占分离菌株总量的 55%,弯曲乳杆菌占 26%,植物乳杆菌只占 8%^[7]。但是曾令彬等人是在腌腊鱼的成品中分离出 16 株乳酸菌,鉴定结果只有 3 个菌种;本实验则鉴定出 22 株乳酸菌,存在 5 个种;Hugas 等人从西班牙香肠中分离鉴定了 254 种乳酸菌^[7]。可见不同的原料、不同的腌制时期、不同的工艺和产品,存在的主要乳酸菌群不同。

为阐明乳酸菌的特性,从已鉴定的 5 种乳酸菌中随机分别选取一株进行耐盐性研究、温度试验和蛋白酶活性的测定。

2.4 分离乳酸菌的耐盐性

从图 3 可知,当食盐的用量不超过 5% 时,各种菌株生长良好,食盐浓度对微生物的生长无明显影响,除戊糖片球菌外,所有分离菌株的 OD 值都在 2.0 以上;8% 时各菌株的生长受到较明显的抑制,但仍能观测到生长现象,弯曲乳杆菌和乳酸片球菌在此食盐浓度下的生长状况优于其它菌株;11% 时所有菌株基本不生长。结果表明,分离的乳酸菌对食盐具有较高的耐受性,适合腊鱼的加工条件。

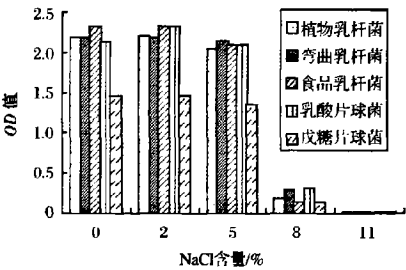


图 3 分离乳酸菌菌株的耐盐性 (30℃, 48h)

2.5 温度对分离乳酸菌菌株的生长的影响

从图 4 可以看出,分离的菌株在 30℃ 时均生长旺盛,戊糖片球菌的 OD 值明显低于其它菌株;15℃ 时各菌株的生长受到明显抑制,OD 值不到 30℃ 时的 50%;5℃ 时所有菌株的生长都受到抑制,弯曲乳杆菌和乳酸片球菌的 OD 值稍高于其它菌株。

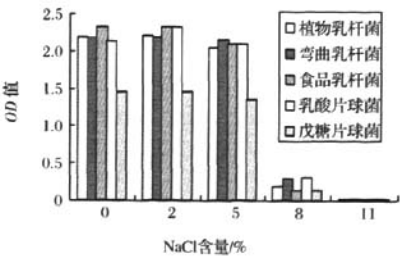


图 4 分离乳酸菌菌株的温度实验 (48h)

2.6 分离乳酸菌菌株的蛋白酶活性的测定

蛋白酶可以水解鱼肉中的肌原纤维蛋白和肌浆蛋白,促进腊鱼风味的形成,因此要求腊鱼发酵中的微生物具有一定的蛋白酶活性。蛋白酶活性用各乳酸菌的菌落直径与其所产生的透明圈的直径之比 D/d 表示,从图 5 的 D/d 值可以看出,被检测的 5 株乳酸菌均具有较高的蛋白酶活力,其中乳酸片球菌的蛋

白酶活性最高。

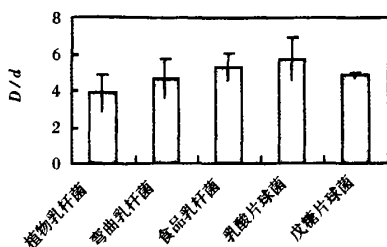


图5 分离乳酸菌菌株的产蛋白酶活性
($n=3$, 平均值 \pm 标准差)

3 结论

乳酸菌是腊鱼加工过程中的主要微生物菌群之一。杆状乳酸菌和球状乳酸菌在腊鱼加工中的比例不同,杆菌是优势乳酸菌,原料鱼、腌制结束时鱼体和成品中杆菌分别占乳酸菌的88%、56%和94%。腊鱼加工过程中主要存在植物乳杆菌、弯曲乳杆菌、食品乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌5种乳酸菌,但在不同加工阶段的各种菌株的分布不同。分离乳酸菌对食盐和低温都有一定的耐受性,并有蛋白酶活性,其中乳酸片球菌对低温和高盐的耐受性、粗蛋白酶活力较其它种菌株有优势,最适合腊鱼的加工制作。

参 考 文 献

- [1] 凌代文. 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.
- [2] 杨洁彬,郭兴华,张麓. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996.
- [3] 闫波,刘宁. 乳酸菌及其在食品工业中的应用与展望[J]. 食品研究与开发,2004,25(4):22-25.

- [4] Hammers W P, Bantleon A, Min S. Lactic acid bacteria in meat fermentation [J]. Microbiology Review Journal, 1990, 8(7): 165-171.
- [5] Barbara M, Anne B, Nicole R. Microbiological events during commercial meat fermentation [J]. Apply Bacterial Journal, 1992, 7(3): 203-209.
- [6] Hammes W P, Kanuf H J. Starters in the processing of meat products [J]. Meat Science, 1994, 36:155-168.
- [7] Marta H, Josep M. Bacteria starter cultures for meat fermentation [J]. Food Chemistry, 1997, 59: 547-554.
- [8] 张兰威,王静,郑冬梅,等. 接种乳酸菌风干香肠脂肪及游离脂肪酸变化规律[J]. 东北农业大学学报,2001,32(2):188-191.
- [9] 李宗军,李罗明. 侗族传统发酵肉的微生物特性[J]. 中国微生物学杂志,2002,14(1):19-22.
- [10] Ringo E, Gatesoupe F J. Lactic acid bacteria in fish: A review [J]. Aquaculture, 1998, 160: 177-203.
- [11] Sanni A I, Asiedu M, Ayernor G S. Microflora and chemical composition of Momoni, a Ghanaian fermented fish condiment [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2002, (15): 577-583.
- [12] 谭汝成,曾令彬,熊善柏,等. 外源脂肪酶对腌腊鱼品质的影响[J]. 食品与发酵工业,2007,33(5):68-71.
- [13] 曾令彬,谭汝成,熊善柏,等. 腊鱼加工中优势乳酸菌的分离与鉴定[J]. 食品工业科技,2007,28(1):115-116,119.
- [14] 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.
- [15] Harrigan W F. 食品微生物实验室手册(第三版)[M]. 北京:中国轻工业出版社,2004.
- [16] R E 布坎南. 伯杰系统细菌学手册(第八版)[M]. 北京:科学出版社,1984.

Lactic Acid Bacteria in Cured Fish and Its Growth Properties

Xie Jing^{1,2}, Xiong Shanbai^{1,2}, Zeng Lingbin^{1,2}, Zhao Siming^{1,2}

1(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

2(Aquatic Product Engineering and Technology Research Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT With silver carp as raw materials, Lactic acid bacteria (LAB) during processing cured fish was isolated and identified, whose properties were also studied, aiming at providing experimental data for cured fish processing and quality control. The results shows that *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acididuricus* exist in cured fish. And the distribution of LAB was different in different stages. Bacilli were dominant LAB during processing cured fish, ratio of bacilli to LAB from fresh fish, pickled fish and cured fish was 88%, 56% and 94%, respectively. All of isolations have the ability of salt tolerance, low-temperature resistance and protease activity. *Lactobacillus curvatus* and *Pediococcus acididuricus* have higher ability of salt tolerance and low-temperature resistance. Protease activity of *Pediococcus acididuricus* is the highest.

Key words cured fish, LAB, identification, properties