

一株分离自广式腊肠的葡萄球菌的分离与鉴定*

吴燕涛, 赵谋明, 孙为正, 崔 春, 何 婷

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州, 510640)

摘 要 从肉制品——广式腊肠中分离得到葡萄球菌(*Staphylococcus condimentii*)。研究了从8个生产厂家的广式腊肠中分离得到64株葡萄球菌, 通过对分离菌株发酵剂适应性和发酵特性研究, 从分离菌株中筛选出1株适合于作为肉制品发酵剂的菌株L₂A₄, 对其进行形态特征观察和生理生化测试并结合16SrDNA测序表明, 为*Staphylococcus condimentii*。

关键词 广式腊肠, 葡萄球菌(*Staphylococcus condimentii*), 分离, 鉴定

广式腊肠是广东省三大传统特色食品之一。其发酵过程属自然发酵, 靠原料肉自身的微生物与环境微生物的竞争作用完成^[1]。欧美国家现在采用微生物定向接种发酵技术, 主要靠添加人工纯培养发酵剂发酵, 具有发酵启动快、发酵时间短、低pH值等优点, 极大地改善了肉制品的感官品质, 提高了食品的安全性^[2]。从广式腊肠中分离、筛选和构建具有优良生产性状的微生物发酵剂将对广式腊肠的生产和发展具有重要的意义。

葡萄球菌在发酵香肠成熟过程中对产品的颜色、风味和香气都有着重要的作用^[3], 另外还具有硝酸盐还原酶活性, 可以降低产品中亚硝酸盐残留量, 提高产品的安全性。最近几年在发酵肉制品中应用最广泛的葡萄球菌为肉葡萄球菌和木糖葡萄球菌^[4]。到目前为止, 仍未见有关广式腊肠中葡萄球菌的分离、纯化和鉴定的详细报道。鉴于此, 本文对广式腊肠中葡萄球菌进行分离、纯化、筛选和鉴定, 筛选得到一株适合作为肉制品发酵剂的葡萄球菌, 经鉴定为*Staphylococcus condimentii*, 该菌株首次在广式腊肠中分离得到, 对深入了解和研究广式腊肠中的有益菌群具有重要的科学价值和应用前景。

1 材料与方法

1.1 材 料

MSA培养基; 营养琼脂培养基; 营养肉汁培养基; 硝酸盐还原培养基; V-P反应培养基; 明胶蛋白胨培养基; 尿素生化管; 糖、醇发酵培养基; 卵磷脂酶实验用培养基; 吡啶实验用培养基; 甲基红培养基; 索恩

利Thornley培养基。上述各培养基配制参照文献[11]。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的分离纯化

采用倾注平板法和平板划线法对广式腊肠中的葡萄球菌进行分离。无菌操作条件下, 取25g样品绞碎, 移至225mL生理盐水中, 振荡混匀(振荡摇床200r/min, 振荡60min), 静置后吸取1mL样液做梯度稀释, 选适当的梯度倾注MSA平板, 30℃培养2d。在培养物上, 根据菌落的颜色、大小、光泽、透明度等, 挑取单菌落, 进行划线分离纯化。

在多次分离纯化过程中, 对单菌落进行革兰氏染色、细胞形态和触酶反应检验并记录结果。将革兰氏阳性和触酶阳性球菌的纯菌种保存并作进一步检验, 其中对吡啶唑酮和溶葡萄球菌素敏感的菌为葡萄球菌。

1.2.2 菌株筛选

1.2.2.1 筛选标准

根据发酵肉制品的特点及发酵剂本身特点, 应用于发酵肉制品的发酵剂培养物按照如下条件筛选: 能够耐受6%NaCl和150mg/kgNaNO₂、具有硝酸盐还原酶活性, 不产粘、发酵葡萄糖不产气、不产H₂S, 发酵碳水化合物产物主要是乳酸等。

1.2.2.2 基本发酵特性实验

(1)产粘性实验: 采用MSA培养基, 接种后, 30℃培养2d, 用接种针挑取菌落直接观察。

(2)耐盐性实验: 将分离菌种接种到添加有5%和10%NaCl的营养琼脂培养基上(葡萄球菌对营养要求不高, 在普通培养基上生长良好^[5]), 30℃培养2d, 与未接种平板进行对比, 目测生长情况。

(3)耐亚硝酸盐实验: 将分离菌种接种到添加有150mg/kg、200mg/kgNaNO₂的营养琼脂培养基

第一作者: 博士研究生(赵谋明教授为通讯作者)。

* 粤港关键领域重点突破项目(No. 2005A203002), 2006年省部产学研结合专项资金项目(No. 2006D90202001)

收稿日期: 2007-04-11, 改回日期: 2007-05-22

上,30℃培养2 d,与未接种平板进行对比,目测生长情况。

(4)硝酸盐还原实验:将测定用菌种接种于硝酸盐液体培养基中,30℃培养2 d,同时作空白对照。在对照培养基合格的前提下,把接种后的培养液也分成2管,其中一管加入格里斯氏试剂,如出现红色,则为阳性反应。如不出现红色,则在另一管中加入少量锌粉,并加热,再加入亚硝酸试剂,如出现红色,则证明硝酸盐仍存在,此为阴性反应。如不出现红色,则说明硝酸盐已被还原为氨和氮,应为阳性反应。

(5)蛋白酶和脂肪酶测定^[6]:将在MSA培养基上培养2 d的葡萄球菌以点种法接在蛋白酶和脂肪酶检测培养基上,30℃培养2 d,取出观察。蛋白酶检测:在菌落周围滴加10%的三氯乙酸,观察菌落周围的透明圈;脂肪酶检测:观察菌落周围黄色圈。

1.2.2.3 其他发酵适应性试验^[7]

采用MSA作为基础培养基,筛选条件:发酵葡萄糖不产气,不产H₂S,不具有氨基酸脱羧酶,不产氨,耐酸(pH5.0),凝固酶反应阴性。

1.2.3 菌种鉴定

1.2.3.1 形态学及生理生化鉴定

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

(2)菌株形态:将分离得到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)并记录观察结果。

(3)菌株的生理生化特征实验:参照参考文献[8]。

(4)各种碳源发酵情况^[8]:通过菌株的糖发酵实验,来检验菌株对各种糖醇类碳源的利用情况,并记录结果。

1.2.3.2 16SrDNA测序

16SrDNA序列PCR扩增的5'端引物:5'-AGAGTTTGATCC/ATGGCTCA-3',3'端引物:5'-AAGGAGGTGATTCCAGCC-3'。反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃延长3 min,反应进行30个循环。DNA连接、大肠杆菌转化等方法参照参考文献[9]和[10]。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离和筛选

采用MSA培养基,从8个样品中分离、纯化革兰氏阳性和触酶阳性球菌64株。对这些菌株按照上

述筛选标准进一步筛选,得到4株发酵适应性和发酵特性优良的葡萄球菌菌株。其中L₂A₄单菌株发酵广式腊肠实验和中试实验结果表明,其发酵的产品发色好,质构和风味均优于对照组和其他接菌组(实验结果另有文章报道)。因此,L₂A₄是1株可以应用于发酵肉制品的发酵剂。为了更好地利用该发酵剂,对其生长特性和发酵特性进行了一系列研究,研究发现该菌株不同于已有报道的其他发酵用葡萄球菌,进而对其进行了菌株鉴定,具体鉴定结果如下。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学特征

(1)固体培养特征:30℃培养2 d后,在MSA固体培养基上菌落呈白色,稍凸,表面光滑不透明,边缘整齐;在半固体培养基上观察不运动。

(2)液体培养特征:30℃静止培养,12 h左右细菌在培养基中迅速而均匀生长,达到最大浑浊度后,菌体逐渐沉淀到培养基底部,菌体呈乳白色。

(3)细胞形态特征:菌株革兰氏染色阳性,在光学显微镜下,用油镜观察菌体颜色及形态,观察发现菌体呈球状,2个、4个或堆状排列;革兰氏阳性。

2.2.2 生理生化特征

表1 分离菌株L₂A₄的生理生化特征

鉴定项目	L ₂ A ₄	鉴定项目	L ₂ A ₄
过氧化氢酶	+	卵磷脂酶	-
厌氧培养	+	明胶	-
好氧培养	+	甲基红(MR)	-
氧化酶	-	溶血	-
V-P	-	精氨酸双水解酶	+
明胶液化	-	D-葡萄糖	+
硝酸盐还原酶活性	+	甘露糖	+
脲酶	+	半乳糖	-
蛋白分解活性	±	甘露醇	-
脂肪分解活性	+	棉籽糖	-
耐盐性(10%)	+	海藻糖	-
耐亚硝酸盐(200 mg/kg)	+	果糖	+
耐酸性(pH 5.0)	+	D-核糖	-

依据表1结果并查《常见细菌系统鉴定手册》(2001)及《伯杰细菌鉴定手册》第九版可知,菌种L₂A₄与*S. condiment*i最相符合,初步鉴定为*S. condiment*i。

2.2.3 16SrDNA测序分析

对分离菌株L₂A₄的16SrDNA序列进行分析,将得到的碱基序列在GenBank等国际核酸序列数据库内进行同源序列搜索(blast search),找出该菌株与数据库中同源性最高的模式菌株保藏于ATCC和

DSM 等国际菌种保藏中心。比对结果显示:菌种 L_2A_4 的 16SrDNA 序列与 *S. condimentii* 具最高同源性,达 99.9%。从分子系统学角度进一步证实菌株为 *S. condimentii*。

3 讨论

S. condimentii 属于葡萄球菌属,最初是从酱醃中分离得到,1998 年 Andreas 通过对其生理生化性质、形态学特征以及 23S rRNA 和 16S rRNA 分析将其界定为一个新的种^[9]。本文首次从肉制品——广式腊肠中分离得到该菌种,对其发酵特性及发酵适应性的研究发现 *S. condimentii* 具有脂肪分解活性,这也从一个侧面提示该菌株可以通过分解脂肪,对香肠风味的形成作出贡献。

从广式腊肠中筛选出具有发酵特性和发酵适应性的优良菌种,是采用接种发酵生产广式腊肠的前提。筛选的菌种除要求有良好的生长特性、耐盐和耐亚硝酸盐能力外,还要求要有较好的发色及产香特性,以便使香肠的发酵有利于管理和控制。研究表明筛选得到的菌株具有良好的发酵特性,对于该菌株的

综合生产性能仍有待进一步研究。

参考文献

- 1 吕兵,张国农.分离自传统腊肠中的乳酸菌的特性研究[J].食品与发酵工业,2004,30(8):64~67
- 2 Marta M, Josep M. Bacteria starter cultures for meat fermentation [J]. Food Chemistry, 1997, 59: 457~554
- 3 王永霞,牛天贵,刘志强.发酵肉制品中的葡萄球菌和微球菌[J].肉品卫生,2005,(8):25~28
- 4 Montel M C, Masson F, Talon R. Bacterial role in flavor development [J]. Meat Science, 1998, 49: 111~123
- 5 刘慧.现代食品微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2004
- 6 王永霞,牛天贵,郝华昆.肉品发酵剂葡萄球菌和微球菌的筛选[J].食品与发酵工业,2004,30(9):5~10
- 7 于长青,任泊晓,张丽娜.传统发酵肉制品中葡萄球菌的分离、纯化和筛选[J].中国农学通报,2006,(11):343~346
- 8 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
- 9 吴乃虎.基因工程原理[M].北京:科学出版社,1998
- 10 黄培堂.分子克隆实验指导[M].北京:科学出版社,2002
- 11 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995

Isolation and Identification of Staphylococci—*Staphylococcus condimentii* from Cantonese Sausage

Wu Yantao, Zhao Mouming, Sun Weizheng, Cui Chun, He Ting

(College of Light and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT Isolated *Staphylococcus condimentii* from Cantonese sausage. 64 staphylococci strains were isolated and purified from 8 samples of Cantonese sausage from 8 different companies. According to the fermentation adaptation, a Strain named L_2A_4 with excellent characteristics in Cantonese sausage was selected. The morphology, physiological and biochemical characteristics of the strain were determined. The strain was identified as *Staphylococcus condimentii*, the 16SrDNA sequence of the isolate was also confirmed the result of identification. The present study is valuable for further exploration into the microbiological characteristics of Cantonese sausage and can be a good prospect.

Key words Cantonese sausage, staphylococci, *Staphylococcus condimentii*, isolation, identification

膨化食品被列入限制食用等级

2007年9月,卫生部首次披露了《中国儿童青少年零食消费指南》,这是我国首部针对儿童青少年零食消费出台的指南。《指南》把零食分为“可经常食用”、“适当食用”、“限制食用”三级,并针对3~17岁不同年龄段的儿童青少年,提出指导意见。其中,高糖、高盐、高脂肪类的棉花糖、炸鸡块、膨化食品、巧克力派、方便面、冰淇淋等,则被列入“限制食用”零食名单。

《指南》虽然公布了,但孩子过量食用膨化食品的现状却难以改变,这主要由3方面原因造成:首先,《指南》并无法律效力,仍旧只属于科学宣传,因而对厂商等没有强制力;其次,家长对“零食”的危害还没有深刻的认识,因此许多家长放纵孩子吃零食;最后,实际上,许多家长对《指南》的规定还并不是很了解。

要解决儿童营养问题还需要立法,零食最大的危害之一是高热量的问题,通过立法,让生产企业清楚地认识热量标识,这样家长和孩子就能够很清楚自己吃进去多少热量,从而进行控制。此外,对家长的教育和科普宣传也非常重要。