# 真空包装哈尔滨红肠菌相分析及优势腐败菌初步鉴定

俞龙浩，贺旺林，李晶晶，于红，马红艳
（黑龙江八一农垦大学食品学院，黑龙江大庆 163319）

**摘要：**为了有效监控红肠的腐败变质，本论文利用选择性培养基研究真空包装红肠在4 ℃条件下储藏过程中的菌相和储藏终点部分菌进行初步鉴定。红肠在4 ℃储藏过程中菌相变化明显：储藏初期（0~4 d）时，热杀索丝菌（0.00%）、乳酸菌（44.30%）、假单胞菌（23.40%）、球菌（32.30%）、芽孢杆菌（0.00%）、霉菌和酵母（0.00%）的菌落对数分别是0.01、2.27、2.11、2.36、0.01、0.01 (CFU/g)；腐败终点时热杀索丝菌（0.00%）、乳酸菌（60.00%）、假单胞菌（0.00%）、球菌（16.30%）、芽孢杆菌（23.70%）、霉菌和酵母（0.00%）的菌落对数分别2.30、6.74、0.01、6.52、6.66、3.00 (CFU/g)。腐败终点分出14株形态特异的菌株，进行分子生物学初步鉴定，其中6株芽孢杆菌分属芽孢杆菌（7.70%）和蜡样芽孢杆菌属（16.00%），5株葡萄球菌分属木糖葡萄球菌（3.80%）和马胃葡萄球菌（12.50%），1株热杀索丝菌（0.00%）和2株清酒乳酸菌（60.00%）。因此真空包装红肠中特定的优势腐败菌是清酒乳酸菌，蜡样芽孢杆菌和马胃葡萄球菌。

**关键词：**哈尔滨红肠；菌相分析；优势腐败菌；初步鉴定
**文章篇号：**1673-9078(2015)3-66-70 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.012

# Microflora Analysis and Preliminary Identification of Dominant Spoilage Bacteria in Vacuum-packed Harbin Red Sausage

**YU Long-hao, HE Wang-lin, LI Jing-jing, YU Hong, MA Hong-yan**
(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

**Abstract:** The aim of this study was to effectively monitor the spoilage of Harbin red sausage. Selective media were used to study the microflora of vacuum-packed Harbin red sausage stored at 4 ℃ and preliminarily identify bacteria causing spoilage at the end of the storage period. The microflora of Harbin red sausage varied significantly during storage period at 4 ℃: at the start of the storage period (0 to 4 d), logarithm values of the colony count of *Brochothrix thermosphacta* (0.00%), lactic acid bacteria (44.30%), *Pseudomonas* (23.40%), cocci (32.30%), *Bacillus subtilis* (0.00%), molds and yeasts (0.00%) were 0.01, 2.27, 2.11, 2.36, 0.01, and 0.01 log CFU/g, respectively. However, during spoilage, logarithm values of the colony count of *Brochothrix thermosphacta* (0.00%) lactic acid bacteria (60.0%), *Pseudomonas* (0.00%), cocci (16.30%), *Bacillus subtilis* (23.70%), molds and yeasts (0.00%) were 2.30, 6.74, 0.01, 6.52, 6.66, and 3.00 log CFU/g, respectively. At the end of the spoilage experiment, 14 strains were isolated, with specific morphological characteristics and preliminary identification was carried out using molecular biology methods. The isolates included six strains of genus *Bacillus* (7.70%) and *Bacillus cereus* (16.00%), five strains of *Staphylococcus xylosus* (3.80%) and *Staphylococcus equorum* (12.50%), one strain of *Brochothrix thermosphacta* (0.00%), and two strains of *Lactobacillus sake* (60.00%). Therefore, the dominant spoilage bacteria in vacuum-packed Harbin red sausage were identified as *Lactobacillus sake*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus equorum*.

**Key words:** Harbin red sausage; microflora analysis; dominant spoilage bacteria; preliminary identification

肉类制品由于含水量高，营养丰富，微生物极易大量繁殖，在贮藏销售的过程中极易发生腐败变质。因此，研究肉及其制品在贮藏过程中的菌相变化和优势腐败菌鉴定成为近年来的研究热点。

前人的研究发现冷鲜猪肉初始菌相中，假单胞菌一般25%~26%、乳酸菌20%~21%、微球菌和葡萄球菌12%~15%、热杀索丝菌12%~13%、肠杆菌19%~25%、酵母菌和霉菌5%~7%，初始菌相中假单胞菌为优势菌[1]。在冷却猪肉初始菌相研究的基础上，后来研究者研究发现冷却猪肉在储藏过程中假单胞菌一直处于优势地位，热杀索丝菌和肠杆菌次之[3]。于见亮等（2008）研究了塔城地区冷鲜羊肉中菌相，最终得出假单胞菌是该地区羊肉中的优势菌，其含量达到79.3%~82.7%[4]。综上所述，冷鲜肉中的优势腐败

收稿日期：2014-07-18
基金项目：黑龙江省科技厅攻关项目(WB09B201-2)；黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(Y51)
作者简介：俞龙浩（1962-），男，博士，教授，主要从事肉品科学研究

菌主要是假单胞菌。前人研究了低温熏煮香肠[5]、酱牛肉[6]、广式腊肠[7]、烤鸭[8]、冰鲜鸭[9]等肉制品在储藏过程中的菌相发现这些肉制品中乳酸菌所占的比重最高，肠球菌、芽孢杆菌、热杀索丝菌和酵母霉菌在各种产品中的变化规律各不相同，主要是由于原材料、加工工艺和加工环境以及产品种类差异所致。然而，纵观肉制品中的菌相分析研究，具有种类繁多的低温肉制品中有关菌相分析研究较少。红肠原名里道斯香肠，是一种典型的低温肉制品，原产于苏联，随着加工工艺的不断优化和完善，深受消费者喜爱，但是至今还未见红肠在储藏过程中的菌相分析报告。

因此，本论文为进一步研究红肠防腐保鲜技术和货架期预测技术提供理论基础，对真空包装红肠在4 ℃储藏过程中的菌相变化进行分析，并对腐败终点分离出来的优势菌相进行了分子生物学初步鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与设备

培养基：平板计数培养基、STAA 培养基、MRS 培养基、假单胞菌培养基、金黄色葡萄球菌培养基、VRBGA 培养基、孟加拉红培养基、甘露醇卵黄多粘菌素培养基购于北京奥博星生物技术有限责任公司。

仪器与设备：PCR 仪，AB applied biosystem (Veriti 96well Thermal lyder)；电热恒温培养箱，上海森信 DRP-9272 型；拍击式均质机，新芝科技 Scientz-04 等。

### 1.2 样品采集

购买回来的大庆市好日子新鲜出厂的真空包装红肠，将其置于 4±0.1 ℃的恒温箱储藏，隔 8、8、6、5、5 d 进行取样，分析其中的菌相。随机去大庆市好日子取 3 次不同批次的样品做为重复组。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌相分析

利用选择性培养基对红肠中的细菌总数、热杀索丝菌、乳酸菌、假单胞菌、葡萄球菌、肠杆菌、芽孢杆菌、霉菌酵母进行平板计数，具体的的使用培养基和培养条件见表 1。

#### 1.3.2 优势腐败菌鉴定

将经初步分类鉴定的细菌接种于相应的液体培养基上，按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明提取细菌 DNA，作为 PCR 反应的 DNA 模板，细菌扩增所用的引物为通用引物 27f 和 1492r（1）。上游引物 27f：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'，下游引物 1492r（1）：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

表 1 不同菌相的选择性培养基的培养条件

**Table 1 Incubation conditions and selective media for different microflora**

| 菌类型 | 培养基 | 培养温度/℃ | 培养时间/h |
|---|---|---|---|
| 细菌总数 | PCA | 37 | 48 |
| 热杀索丝菌 | STAA | 30 | 48 |
| 乳酸菌 | MRS | 37 | 48 |
| 假单胞菌 | 假单胞菌培养基 | 25 | 48 |
| 葡萄球菌 | MSA/BP | 37 | 48 |
| 肠杆菌 | VRBGA | 37 | 48 |
| 霉菌酵母 | 孟加拉红 | 25 | 120 |
| 芽孢杆菌 | 甘露醇卵黄多粘菌素琼脂 | 37 | 48 |

PCR 扩增条件：95 ℃预变性 5 min，然后 94 ℃变性 45 s，55 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 45 s，共 30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min，PCR 产物经电泳检测后送上海生工测序。将测序的拼接结果在 NCBI 网站上利用 Blast 软件在 GenBank 数据库中进行同源性分析，选取同源性较高的相关菌株的 16S rRNA 序列作为参比对象，用 Clustal X 软件按照最大同源性的原则进行多序列对比。采用 MEGA4.0 软件依据邻位相邻法对所有分离鉴定菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中序列进行分析比较，绘出系统进化树。

### 1.4 数据处理

利用 SAS 软件包（SAS Institute, 9.01，2000）和 Excel 对数据进行方差分析（$p<0.05$）。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌相分析

红肠是一种低温肉制品，为了保持其良好的品质，其热加工的温度较低，所以红肠中残存了较多的耐热微生物，这些微生物是引起红肠发生腐败的主要原因。红肠经热加工后，残存的微生物成了红肠储藏过程中的初始菌相。

平板计数培养基得到的菌落总数结果和各种选择性培养基得到各种细菌菌落数之和相近，其比例均在 0.9~1.1（见表 2），说明利用选择性培养基对样品中的菌相进行分析比较合理。储藏初期菌落总数达到了 $7.43\times10^2$ CFU/g（见图 1），与前人报道的低温肉制品的初始菌落数一般为 $10^2$~$10^3$ CFU/g 基本相符[10]。

红肠储藏初期 4 d 时，乳酸菌、球菌和假单胞菌

所占比重较大，分别达到 44.3%、32.3%和 23.4%，随着储藏时间延长，其菌相构成发生显著变化。乳酸菌在储藏第 12 d 时其比例达到 73.4%、20d 时 79.3%、26 d时 46.9%、31 d 时 53.9%和最终腐败终点时 60.0%；球菌在储藏过程中菌相的比例变化情况和乳酸菌基本相似，但其含量在整个储藏过程中均低于乳酸菌，在腐败终点时占有优势地位；假单胞菌在储藏初期（4 d）比重达到 23.4%，第 12 d 以后其含量甚微基本为 0（见表 2）。假单胞菌在红肠的储藏初期比重大，极有可能和原料肉中的优势菌相有关。前人研究发现冷鲜猪肉中占有优势地位的是假单胞菌[6~10]，但本研究中在后期阶段假单胞菌均未检出。这可能是由于本实验中红肠的亚硝酸盐残留量达到 4 mg/100 g，高浓度亚硝酸盐有效地抑制假单胞菌生长的结果。

表 2 红肠在储藏过程中各种菌落所占比例的变化情况

**Table 2 Changes in the proportion of each strain during storage**

| | 天数 | 4 | 12 | 20 | 26 | 31 | 36 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 菌落总数 | 0.978 | 0.935 | 1.008 | 0.963 | 0.958 | 0.920 |
| 2 | 热杀索丝菌 | 0.000 | 0.002 | 0.004 | 0.001 | 0.055 | 0.000 |
| 3 | 乳酸菌 | 0.443 | 0.734 | 0.793 | 0.469 | 0.539 | 0.600 |
| 4 | 假单胞菌 | 0.234 | 0.005 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 5 | 球菌 | 0.323 | 0.250 | 0.180 | 0.487 | 0.309 | 0.163 |
| 6 | 肠杆菌 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 7 | 霉菌酵母 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.022 | 0.000 |
| 8 | 蜡样芽孢杆菌 | 0.000 | 0.009 | 0.022 | 0.043 | 0.075 | 0.237 |

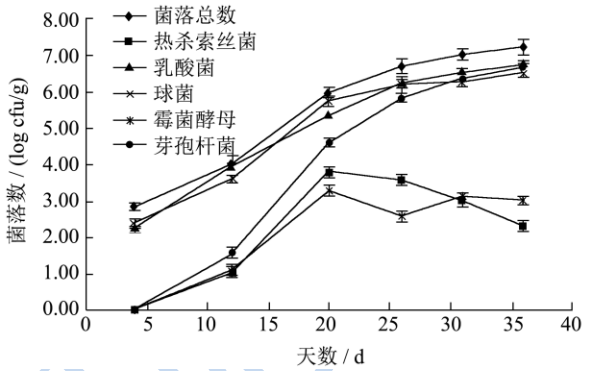



图 1 不同菌在储藏过程中的变化情况

**Fig.1 Changes in bacterial count of different strains during storage**

热杀索丝菌和霉菌酵母在整个菌相分析过程中，虽有检出但其比例较低，尤其是在腐败终点时，其含非常少（见表 2）。储藏后期热杀索丝菌和乳酸菌之间此消彼长的关系显著，在储藏 20 d 后，乳酸菌的大量繁殖明显地抑制了热杀索丝菌的生长（见图 1）。Strotmann 等（2008）研究肉制品中的菌相发现热杀索丝菌和乳酸菌处于相互竞争的地位[10]。由于本研究采用真空包装，提供一种低氧压或缺氧的条件，有利于兼性厌氧乳酸菌的生长，而不利于好氧热杀索丝菌的生长，所以乳酸菌大量繁殖，进一步使得热杀索丝菌的生长受到抑制。另一个方面，随着储藏过程中氧压的下降，霉菌和酵母的生长受到抑制，所以霉菌和酵母不能成为真空包装红肠中的优势腐败菌。此结果与前人研究的真空包装肉制品中极少大量检出霉菌和酵母菌的研究结果相一致。

本实验结果，芽孢杆菌储藏 4 d、12 d、20 d、26 d、31 d 和腐败终点时，其含量分别为 0.00%、0.9%、2.2%、4.3%、7.5%和 23.7%（见表 2），在整个储藏过程中菌相变化明显。芽孢杆菌属耐热菌，在热加工的过程中，极易形成芽孢，所以在储藏的初始菌相中并未检出，主要是由于芽孢杆菌经热处理后，在储藏的初期主要以芽孢的形式存在[11]，所以在储藏的初期其营养体的含量低于检出限（CFU/g<$10^2$）。随着储藏时间的延长，条件适宜芽孢大量繁殖，从图 1 可以看出，芽孢杆菌以 S 型曲线在增加。在腐败终点时，芽孢杆菌已成为优势腐败菌株之一。

腐败终点时优势腐败菌是指所占比例超过 10%的菌株，乳酸菌（60%）、芽孢杆菌（23.7%）和球菌（16.3%）（见表 2）是样品腐败终点的优势菌株。前人研究真空包装的熟肉制品中，其初始菌相中假单胞菌一般 30%~34%、环丝菌 24%~36%、微球菌 9%~20%和乳酸菌 10%~25%，经过一段时间的储藏，其中乳酸菌占主导，可达到 60%~70%[12]。而本实验结果基本符合前人的研究结果，但是先前的熟肉制品并未发现后阶段芽孢杆菌的大量繁殖，这可能是由于产品种类差异所致。前人研究对象主要是高温肉制品，而本实验对象红肠是一种典型的低温肉制品。

## 2.2 优势菌株鉴定

从真空包装红肠的腐败终点挑选出具有特异性形态的优势细菌进行形态学鉴定，总共挑选出 14 株菌，均为革兰氏阳性菌株，对其进行编号为 A01~A14。提取细菌基因组得到 PCR 的扩增产物利用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳，成功扩增出了 1500 bp 左右的目的条带。

利用 NCBI 对拼接序列进行比对。以 A06 菌株为例，A06 菌株拼接序列大小为 1455 bp（不包含上下游引物），选取同源性高达 98%以上的 14 株（一般选 15 株左右即可）菌株序列构建系统发育树进行相似性分析（见图 2）。结合菌落形态、革兰氏染色和图 2 的系统发育树，A06 菌株初步鉴定为蜡样芽孢杆菌。

对分离鉴定的 14 株菌进行菌株之间的相似性分析结果如图 3。在腐败终点时，挑选出来同源性高的

14 株特异性的菌株，经分子生物学鉴定结果分为 4 大菌属：芽孢杆菌属、乳酸菌属、索丝菌属和葡萄球菌属（见图 3），

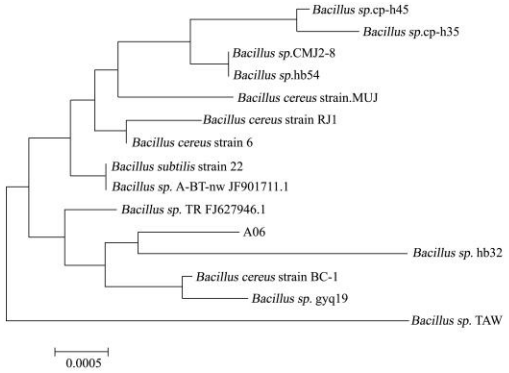



图 2 A06 菌株的系统发育树

**Fig.2 Phylogenic tree of stain A06**

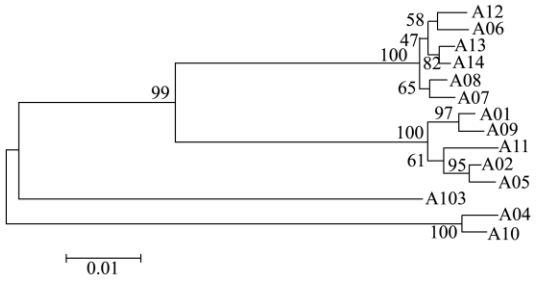



图 3 菌株间的系统发育树分析

**Fig.3 Phylogenic tree of the strains**

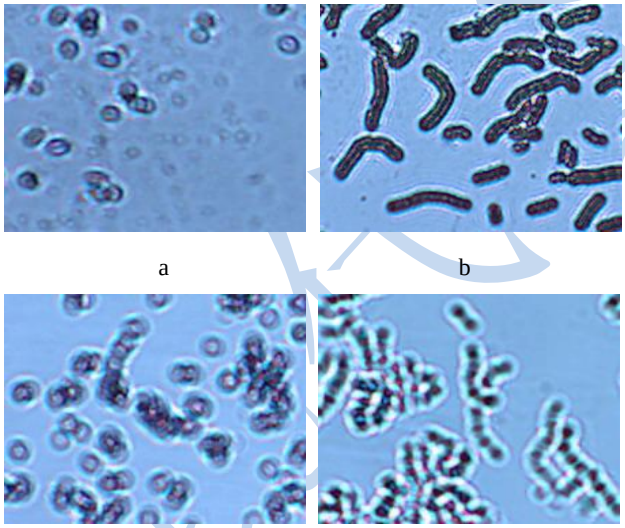



图 4 革兰氏染色形态图（10×40）

**Fig.4 Gram stain of isolates（10×40）**

注：a: 蜡样芽孢杆菌，b: 热杀索丝菌，c: 清酒乳杆菌，d: 马胃葡萄球菌。

4 大系菌属的革兰氏染色形态图见图 4。其中初步鉴定的 6 株芽孢杆菌，分别为 4 株芽孢杆菌（*Bacillus sp. gyq19*、*Bacillus sp. C44*、*Bacillus sp. TR* 和 *Bacillus sp. hb32*）；2 株蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus strain BC-1* 和 *Bacillus cereus strain CP1*）；5 株葡萄球菌，分别为 1 株木糖葡萄球菌（*Staphylococcus xylosus strain ALK 625*）、2 株葡萄球菌属（*Staphylococcus sp. P10* 和 *Staphylococcus sp. L-38*）、2 株马胃葡萄球菌（*Staphylococcus equorum strain +Y111* 和 *Staphylococcus equorum strain JH6*）；索丝菌 1 株为热杀索丝菌（*Brochothrix thermosphacta strain KSN1*）；乳酸菌 2 株，均为清酒乳杆菌（*Lactobacillus sakei*）。分离鉴定的蜡样芽孢杆菌、马胃葡萄球菌和清酒乳杆菌是真空包装红肠储藏过程中的优势腐败菌。然而，前人的研究总结出来真空包装的肉制品中异常频繁被检出来的菌主要有环丝菌、肉食杆菌、肠球菌、乳杆菌等[13]。说明真空包装肉制品的优势菌种类很大程度上受肉制品品种、加工工艺及环境的影响。

## 3 结论

真空包装哈尔滨红肠腐败终点鉴定出了 14 株特异性菌株，并确定其中清酒乳杆菌、蜡样芽孢杆菌和马胃葡萄球菌是腐败终点优势菌。此三种菌是否为真空包装哈尔滨红肠腐败的特定腐败菌需进一步研究。

## 参考文献

[1] 韩衍青,徐宝才,徐幸莲,等.真空包装熟肉制品中的特定腐败微生物及其控制[J].中国食品学报,2011,11(7): 148-156
HAN Yan-qing, XU Bao-cai, XU Xing-lian, et al. Control of specific spoilage organisms in vacuum-packaged cooked meat products [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(7): 148-159

[2] QIU Jing, DONG Qing-li, CHENG Fei. Establishment of growth probility model for Pseudomonas spp. in chilled pork with modified atmosphere package [J]. Transactions of the Chinese Society of Agriculture Engineering, 2012, 28(13): 257-262

[3] 刘超群,王宏勋,宫智勇.冷鲜猪肉内外细菌菌群分离鉴定及变化规律研究[J].食品科学,2011,32(23):240-243
LIU Chao-qun, WANG Hong-xun, GONG Zhi-yong. Isolation,identification and change pattern of internal and external bacteria floras in fresh chilled pork [J]. Food Science, 2011, 32(23): 240-243

[4] 于见亮,李开雄,蒲菊霜,等.新疆塔城地区冷却羊肉初始腐败菌相分析[J].食品科技,2008,3:111-114
YU Jian-liang, LI Kai-xiong, PU Ju-shuang, et al. Study on the initial microflora of chilled mutton made in

Tacheng area [J]. Food Science and Technology, 2008, 3: 111-114

[5] A M Baka, E J Papavergou, T Pragalaki, et al. Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages [J]. Food Science and Technology, 2010, 44(1): 54-61

[6] 刘勤华,黄明,潘润舒,等.真空包装酱牛肉中腐败细菌的分离、初步鉴定与菌相变化分析[J].食品科学,2009, 30(23):297-300
LIU Qin-hua, HUANG Ming, PAN Run-shu, et al. Isolation,identification and microflora comparisons of spoilage bacteria in vacuum-packaged beef [J]. Food Science, 2009, 30(23): 297-300

[7] 潘晓倩,赵冰,成晓瑜.“皇上皇”广式腊肠品质及风味成分分析[J].肉类研究,2013,27(9):15-18
PAN Xiao-qian, ZHAO Bing, CHENG Xiao-yu, et al. Quality characteristics and flavor components of “huangshanghuang” sausage [J]. Meat Research, 2013, 27(9): 15-18

[8] 任琳,赵冰,赵燕,等.北京烤鸭加工和过程中菌相变化规律及其特征[J].食品科学,2013,34(1):281-283
REN Lin, ZHAO Bing, ZHAO Yan, et al. Microflora variation and characteristics of beijing roast duck during processing [J]. Food Science, 2013, 34(1): 281-284

[9] 赵文红,林慧珍,陈海光,等.冰鲜鸭优势腐败菌的鉴定[J].现代食品科技,2012,28(7):728-732
ZHAO Wen-hong, LIN Hui-zhen, CHEN Hai-guang, et al. Identification of spoilage bacteria in chilled duck [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(7): 728-732

[10] Chenoll E, Macian MC, Elizaquivel P, et al. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage:population analysis by rDNA-based methods [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(2): 498-508

[11] Strotmann C, Von Mueffling T, Klein, et al. Effect of different concentrations of carbon dioxide and oxygen on the growth of pathogenic Yersinia enterocolitica 4/O:3 in ground pork packaged under modified atmospheres.[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(4): 845-849

[12] T D Girova, V K Gochev. Detection and enumeration of spoilage and pathogenic microorganisms in refrigeratory stored meat products [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2009, 23(1): 896-899

[13] Ingham Steven C, Borneman Darand L, Ané Cécile, et al. Predicting growth-no growth of Listeria monocytogenes on vacuum-packaged ready-to-eat meats [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(4): 708-714

[14] Borneman Darand L, Ingham Steven C, Ane Cecile. Predicting growth-no growth of Staphylococcus aureus on vacuum-packaged ready-to-eat meats [J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(3): 539-548