

发酵蔬菜浆水中优势好氧微生物的 分离及鉴定

孟宪刚,周鸽鸽,张丽珂

(兰州交通大学化学与生物工程学院,甘肃兰州 730070)

摘要:采用两种培养基,利用传统微生物学分离鉴定方法对浆水中的优势好氧微生物进行分离纯化,得到8株酵母菌和1株细菌,并对其从形态学和生理生化鉴定两方面进行属的鉴定,初步将酵母菌归入3个属,分别是酒香酵母属、瓶形酵母属和假丝酵母属;将细菌初步归为醋酸杆菌属。

关键词:发酵蔬菜,浆水,好氧微生物,分离,鉴定

Study on the isolation and identification of dominant aerobic microorganisms of fermentative vegetable serofluid

MENG Xian-gang, ZHOU Ge-ge, ZHANG Li-ke

(School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The analysis of dominant aerobic microbes in fermentative vegetable-Jiangshui produced by natural fermentation was investigated using two medium and the traditional methods of isolation and identification of microbiology in the present study, eight strain yeasts and one strain bacteria were isolated from Jiangshui. Generic identification was conducted through morphology and biochemistry. All these strain yeasts were included in three categories such as *Pityrosporum*, *Sandida* and *Brettanomyces*. The strain bacteria was characterized as *Acetobacter*.

Key words: fermentative vegetable; Jiangshui; aerobic microorganisms; isolation; identification

中图分类号: TS255.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)03-0222-03

发酵蔬菜是以各种蔬菜为原料,利用有益微生物的活动及控制其一定的生长条件,对蔬菜进行发酵加工后制成的食品。发酵蔬菜主要有泡菜、酸菜、酱菜和腌菜等^[1-2]。酸菜是我国甘肃、陕西等地民间广泛流传的一种传统发酵蔬菜,它是以苦菜、蒲公英、苜蓿、芥菜等山中野菜为主要原料,并加入面汤或米汤和老浆水发酵而成,其汤汁熟后略呈乳白色,具有口味酸醇、清香等特点,民间称其汤汁为浆水。浆水味道至酸,能够与原料加热后食用,也可直接饮用,营养丰富,有清热解暑之功效,而且可用浆水做浆水鱼、浆水面等,风味独特,是深受欢迎的夏令风味食品。目前有关浆水的研究只有微生物区系的初步研究及亚硝酸盐的研究,而关于浆水的现代加工工艺、加工过程中微生物的菌相变化规律、专用发酵剂、发酵过程中营养物质的变化规律、影响发酵浆水的因素、发酵作用机理、产品成熟机理的研究及发酵浆水的作用尚未见报道,从而限制了其工业化

生产。本研究以发酵蔬菜浆水为研究对象,深入了解自然发酵浆水中优势好氧微生物区系,并以此为基础,进一步探讨筛选优良菌种用于浆水直投式发酵剂的开发及其在加工中的应用,旨在研究出科学的发酵工艺及参数,并对其加工过程进行有效控制,为浆水饮料的开发及我国西北浆水标准化生产提供理论依据和实验参数。

1 材料与方法

1.1 实验材料

秦安酸菜(浆水) 甘肃省;新鲜浆水 市售;分离培养基 马铃薯琼脂培养基:马铃薯 200g、葡萄糖 20g、琼脂 20g、水 1000mL, pH 自然(马铃薯去皮,切块煮沸 30min,然后用纱布过滤,再加入糖及琼脂,溶化后补足水至 1000mL, 0.1MPa、121℃ 下灭菌 20min);醋酸菌筛选培养基:葡萄糖 1g、酵母膏 1g、碳酸钙 2g、琼脂 2g、蒸馏水 100mL, pH 自然,在 0.1MPa、121℃ 下灭菌 20min,使用前加入 4mL 无水乙醇;鉴定培养基^[3-5,7-8] 麦芽汁琼脂培养基、麦氏培养基(Mcclary)、酵母菌糖发酵基础培养基、同化氮源基础培养基、产类淀粉培养基、尿素水解培养基、细菌糖发酵培养基、明胶培养基、淀粉水解培养基、甘油生酮培养基、葡萄糖蛋白胨水培养基、醋酸菌产酸实验

收稿日期:2009-06-30

作者简介:孟宪刚,男,副教授,研究方向:食品发酵工程。

基金项目:2009年甘肃省农业生物技术专项基金(GNSW-2009-11);

兰州交通大学“青蓝人才工程基金”(QL-05-15A)。

表1 浆水中酵母菌菌落形态和细胞形态鉴定结果

菌株	培养基	菌落形态特征	细胞形态特征
Y1	马铃薯琼脂培养基	白色,圆形,边缘整齐,中心隆起呈突脐状,表面光滑无光泽,不透明,直径1~2mm左右	菌体椭圆形,多边芽殖
Y2	马铃薯琼脂培养基	乳白色,圆形,边缘整齐,高隆起,表面湿润,不透明,直径1mm左右	菌体椭圆形,一端芽殖
Y3	马铃薯琼脂培养基	白色,菌落规则,边缘呈扇边状,隆起,表面干燥有折皱,不透明,直径3~4mm左右	菌体卵圆形,多边芽殖
Y4	葡萄糖碳酸钙培养基	白色,圆形,边缘整齐,表面隆起呈突脐状,干燥无光泽,不透明,直径1mm左右	菌体卵圆形,多边芽殖
Y5	葡萄糖碳酸钙培养基	白色,圆形,边缘整齐,中心隆起呈突脐状,表面干燥,不透明,直径1~2mm左右	菌体椭圆形,一端芽殖
Y6	葡萄糖碳酸钙培养基	白色,圆形,边缘整齐,隆起,表面湿润,有光泽,不透明,直径2~3mm左右	菌体卵圆形,多边芽殖
Y7	葡萄糖碳酸钙培养基	白色,菌落规则,边缘扇边状,高隆起,表面干燥有折皱,不透明,直径3~4mm左右	菌体椭圆形,多边芽殖
Y8	葡萄糖碳酸钙培养基	白色,菌落规则,边缘扇边状,中心隆起呈脐状,表面湿润,有光泽,有折皱,不透明,直径4~5mm左右	菌体卵圆形,多边芽殖

表3 浆水中细菌菌落形态和细胞形态鉴定结果

菌株	培养基	菌落形态特征	细胞形态特征
Ab1	醋酸菌筛选培养基	乳白色,圆形,边缘整齐,隆起,表明湿润,有光泽,直径0.5mm左右,不透明,有溶钙圈	菌体呈杆状, G ⁺

培养基、产葡萄糖酸培养基、产5-酮葡萄糖酸培养基、乙醇氧化培养基、乙酸氧化培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 浆水中好氧微生物的分离纯化 取新鲜浆水少许划线接种于马铃薯琼脂培养基和醋酸菌筛选培养基上,25℃培养48h后,挑取不同形态的单菌落划线纯化,纯化重复三次,镜检观察细胞形态确定为纯培养物,并初步将分离到的菌株进行归类,然后将所得菌株接种于马铃薯琼脂斜面培养基和醋酸菌筛选培养基上,培养后于4℃冰箱中保存,备用。

1.2.2 菌种的鉴定

1.2.2.1 酵母菌的鉴定^[3-5,8] 包括细胞形态学和菌落特征观察;假菌丝形成;子囊孢子的形成;掷孢子的形成;葡萄糖发酵实验;产生类淀粉化合物实验;脲酶实验;氮源同化。

1.2.2.2 浆水中细菌的鉴定^[3-7] 包括细胞形态学和菌落特征的观察;糖发酵实验;乙醇氧化实验;乙酸氧化实验;甘油生酮实验;产葡萄糖酸实验;产5-酮葡萄糖酸实验;明胶液化实验;淀粉水解实验;伏-普实验。

2 结果与分析

本实验从浆水中分离得到的好氧微生物,通过菌落特征和细胞形态学特征的观察及接触酶实验和产醋酸定性实验,初步确定为9株菌株,其中酵母菌8株,醋酸菌1株。酵母菌编号为Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8,醋酸菌编号为Ab1。

2.1 浆水中酵母菌鉴定结果

2.1.1 酵母菌细胞显微形态 酵母菌细胞显微形态见图1所示。

2.1.2 浆水中酵母菌菌落及细胞形态 酵母菌菌落及细胞形态描述如表1所示。

2.1.3 浆水中酵母菌繁殖方式和生理生化实验鉴定

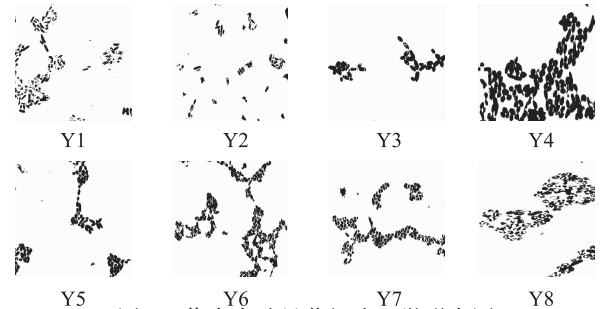


图1 浆水中酵母菌细胞显微形态图

结果 酵母菌繁殖方式和生理生化实验结果见表2。

表2 繁殖方式和生化鉴定结果

菌株	菌丝	子囊孢子	掷孢子	硝酸钾的同化	类淀粉物质的生成	葡萄糖发酵	脲酶实验
Y1	无	无	无	—	—	+	—
Y2	有	无	无	—	—	+	—
Y3	有	无	无	—	—	+	—
Y4	有	无	无	—	—	+	—
Y5	有	无	无	—	—	+	—
Y6	有	无	无	—	—	+	—
Y7	无	无	无	—	—	+	—
Y8	无	无	无	—	—	+	—

注:“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应,表4、表5同。

根据上述结果,依据《酵母菌特性及鉴定手册》^[9]和《真菌鉴定手册》^[10],初步鉴定出从浆水中分离到的8株酵母菌分别为Y1、Y7、Y8为酒香酵母属,Y2、Y5为瓶形酵母属,Y3、Y4、Y6为假丝酵母属。

2.2 浆水中细菌鉴定结果

2.2.1 浆水中细菌细胞显微形态 细菌细胞显微形态如图2所示。

2.2.2 浆水中细菌菌落及细胞形态 细菌菌落形态及细胞形态如表3所示。

2.2.3 浆水中细菌生理生化实验结果 见表4和表5。

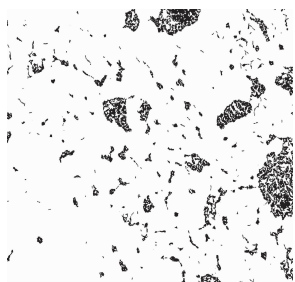


图2 浆水中细菌 Ab1 细胞显微形态图

表4 浆水中细菌的部分生理生化鉴定结果

菌株	接触酶	明胶 液化	淀粉 水解	V-P 实验	乙酸 氧化	甘油 生酮
Ab1	+	-	-	-	+	-

表5 浆水中细菌的部分生理生化鉴定结果

菌株	产葡萄 糖酸	产5-酮 葡萄糖酸	乙醇 氧化	葡萄糖 发酵	乳糖 发酵
Ab1	+	-	+	+	-

根据上述鉴定结果,依据《伯杰细菌鉴定手册》^[11](第8版)及《常见细菌系统鉴定手册》^[12],将菌株 Ab1 鉴定为醋酸杆菌属。

3 讨论

通过对发酵蔬菜浆水中的优势好氧微生物进行初步分离与鉴定,共得到8株优势酵母菌和1株优势醋酸菌。其中酵母菌归入三个属,分别为酒香酵母属、瓶形酵母属和假丝酵母属;醋酸菌鉴定为醋酸杆菌属。由于实验条件有限,酵母菌和醋酸菌均未鉴定到总的水平。

从实验结果可以看出,浆水中的优势好氧微生物主要是酵母菌群和醋酸菌群,这与前人的研究结果基本一致^[13]。其中酵母菌发酵所生成的乙醇对发酵制品在后成熟阶段发生酯化反应和生成芳香物质至关重要,其它醇类的产生对风味也有一定的影响。

醋酸菌发酵产生的醋酸除本身具有独特风味外,还可与乙醇形成乙酸乙酯,对产品风味形成有益,给蔬菜制品增加芳香气味。

参考文献

- [1] 施安辉,周波.蔬菜传统腌制发酵工艺过程中微生物生态学的意义[J].中国调味品,2002(5):11-15.
- [2] 杨荣玲,肖更生,等.我国蔬菜发酵加工研究进展[J].2006(2):15-18.
- [3] 郝林.食品微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2001:78-85.
- [4] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:12.
- [5] 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992:43-138.
- [6] 胡会萍,郝林.山西老陈醋优势醋酸菌的分离鉴定[J].山西农业大学学报,2004(3):283-285.
- [7] 臧晋,刘凤霞,李永祥,等.高产醋酸菌的分离选育[J].中国酿造,1999(5):20-22.
- [8] 张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990:384-398.
- [9] 巴尼特,佩恩,亚罗.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛海洋大学出版社,1991:18-31.
- [10] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:101-117.
- [11] 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译.伯杰细菌鉴定手册[M].第八版.北京:科学出版社,1984,12:362-366.
- [12] 东秀珠,蔡妙营.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:135-137.
- [13] 张宗舟.酸菜及其汤汁的营养价值评析[J].中国酿造,1996(5):18-25.

(上接第221页)

参考文献

- [1] 戚荣,梁达奉.抗葡聚糖单克隆抗体制备的研究[J].甘蔗糖业,2006(3):40.
- [2] Donal F.Versatility of the Antibody Dextran Test Method [D]. Audubon Sugar Institute, LAES, 2003.
- [3] 陈春锋,杨晓彤.药用真菌 β -(1,3)-D-葡聚糖功效关系及检测方法研究进展[J].微生物学通报,2006,33(5):150.
- [4] 曹佐武.糖蛋白PAGE分离后的糖基显色法[J].生物技术通报,2006(5):87.
- [5] Shavej Ahmad, Richard F Tester, Alistair Corbett. Dextran and 5-aminosalicylic acid (5-ASA) conjugates: synthesis, characterization and enzymic hydrolysis [J]. Carbohydrate

Research, 2006, 341:2694.

- [6] Walaisiri Muangsiri, Lee E Kirsch. The protein-binding and drug release properties of macromolecular conjugates containing daptomycin and dextran [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 315:30.
- [7] Manuel Fuentes, Cesar Mateo, Jose M Guisan. Aldehyde-dextran-protein conjugates to immobilize amino-hapten: avoiding cross-reactions in the immunodetection [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 36:510.
- [8] Christophe A Marquette, Pauline Hezard, Agnes Degiuli. Macro-molecular chemiluminescent complex for enhanced immuno-detection onto microtiter plate and protein biochip [J]. Sensors and Actuators, 2006, 113:664.