

胀罐酱油中耐渗透压酵母菌分离及鉴定*

欧阳友生 谢小保 陈娇娣 薛 花 陈仪本

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘要: 从广东某调味食品厂的 3 批次的胀罐酱油中分离到 3 株引起胀罐的耐渗透压的酵母菌, 这些酵母菌在含有 50% ~ 60% 葡萄糖和 15% NaCl 的培养基上生长较快, 在普通酵母培养基上生长缓慢。通过对其进行形态特征观察和生理生化的测定, 初步鉴定这 3 株酵母菌为埃切毕赤酵母 (*Pichia etchellsii*)。

关键词: 胀罐酱油, 耐渗透压酵母, 分离鉴定

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0120-04

Isolation and Identification of Osmotolerant Yeast from “Swollen Can” Soy Sauce *

OUYANY You-Sheng XIE Xiao-Bao CHEN Jiao-Di XUE Hua CHEN Yi-Ben

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory
of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

Abstract: Three osmotolerant yeasts were isolated from three batches of “swollen can” soy sauce produced by a Guangdong condiment plant. These strains grew faster in the media containing 50% ~ 60% glucose or 15% NaCl than in common yeast media. The three yeasts were identified as *Pichia etchellsii* by using morphological characteristics, physiological and biochemical tests.

Key words: “Swollen can” soy sauce, Osmotolerant yeast, Isolation and identification

酵母菌在酱油发酵过程中对酱油特有风味的形成起着重要作用, 是酱油生产中一类主要有益菌种, 但是如果酱油在消毒灌装后的贮存或货架期还存在酵母菌二次发酵或生长现象, 则该酵母菌成为有害菌。广东某调味食品厂 2004 年 1 月生产的 3 批次的酱油在贮存过程中出现产气胀罐现象, 这不但破坏产品外观, 也会降低产品的质量, 包括营养成分的破坏、pH 值的改变等, 给生产企业带来巨大的经济损失, 同时胀罐爆裂还有可能危及人身安全。作者从这 3 批次产气胀罐酱油中分离到 3 株耐高渗透压的酵母菌, 并对其进行了形态特征和生化特性的研究, 确认这 3 株酵母菌为同一菌种, 并初步证实该酵母菌是导致酱油产气胀罐的原因 (有关报道将另文发表)。本文主要报道该菌的分离方法、形态特征及其生理生化特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 广东某调味食品厂的胀罐酱油和正常酱油。

* 广东省科技攻关项目 (No. 2003C32109)

通讯作者 Tel: 020-87688142, E-mail: fmfoy@21cn.com

收稿日期: 2004-10-21, 修回日期: 2005-01-08

1.1.2 培养基: 营养琼脂培养基: 每升蒸馏水中含蛋白胨 10g, 牛肉膏 3g, NaCl 5g, 琼脂 15~20g, pH7.2~7.4。马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 每升蒸馏水中含马铃薯 (去皮切块) 300g, 葡萄糖 20g, 氯霉素 0.1g, 琼脂 20g, 将马铃薯去皮切块, 加 1,000mL 蒸馏水, 水煮 10~20min, 用纱布过滤, 补加蒸馏水至 1,000mL。高糖培养基: 每升蒸馏水中含酵母粉 10g, 葡萄糖 500~600g, NaCl 5g, 氯霉素 0.1g, 琼脂 20g。麦氏 (McClary) 培养基: 每升蒸馏水中含葡萄糖 1g, 酵母汁 2.5g, KCl 1.8g, 乙酸钠 8.2g, 为液体培养基, 若加入 15g 琼脂即为麦氏固体培养基。

1.2 方法

1.2.1 分离培养: 无菌吸取 10mL 样品, 放入盛 90mL 无菌生理盐水并带有玻璃珠的三角烧瓶中振摇 20min 制成菌悬液。将菌悬液连续 10 倍稀释配制成系列浓度的菌液。准确吸取 0.1mL 菌液分别放入营养琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 及高糖培养基中用无菌玻璃棒在培养基表面轻轻涂布均匀。将接种好的营养琼脂平板置 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 2d, 计数得到细菌菌落总数^[1], PDA 和高糖培养基平板置于 $25^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养 5~14d, 计数得到酵母总数。

1.2.2 酵母菌鉴定: 参照文献 [2, 3]。

1.2.3 大肠菌群数和致病菌检验: 参照文献 [1], 致病菌包括沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌。

2 结果与讨论

2.1 分离结果和酵母菌的形态培养特征

3 批胀罐酱油分离到的酵母菌数量均达到 10^5 cfu/mL , 不胀罐的正常酱油未分离到酵母菌, 其它菌的分离结果见表 1。从这 3 批次的胀罐酱油中分离的 3 株酵母菌分别编号为 Y1、Y2、Y3, 分别重新接种酱油能够产气; 这 3 株酵母均呈卵圆形, 其大小为 $(5.0 \sim 8.0) \mu\text{m} \times (4.0 \sim 5.0) \mu\text{m}$; 出芽生殖; 在马铃薯培养基和其它非高渗透压培养基上生长缓慢, 培养 7d 菌落直径 0.5mm~1.2mm; 麦氏液体培养基中生长具环状醭膜, 在麦氏固体培养基上菌落呈乳白色, 无光泽, 边缘略呈波状, 中心凸起, 每个子囊可产生 1~4 个光滑圆形子囊孢子, 直径约 $2.0 \mu\text{m}$; 在高渗透压培养基上生长迅速, 培养 2d~3d 菌落直径达 1.5mm~2.0mm; 在加盖玻片玉米淀粉培养基上有假菌丝形成。

表 1 主要污染菌的数量分析结果

项目	酱油			
	胀罐 (1月2日)	胀罐 (1月15日)	胀罐 (1月22日)	不胀罐
酵母菌数 (cfu/mL)	6.4×10^5	5.6×10^5	9.2×10^5	<1
细菌数 (cfu/mL)	2.1×10^2	3.6×10^2	3.0×10^2	1.8×10^2
大肠菌群 (cfu/100mL)	<30	<30	<30	<30
致病菌	未检出	未检出	未检出	未检出

2.2 糖发酵试验结果

糖发酵试验结果见表 2。

表 2 糖类发酵试验

试验项目	试验结果			试验项目	试验结果		
	Y1	Y2	Y3		Y1	Y2	Y3
葡萄糖	+	+	+	D-半乳糖	-	-	-
麦芽糖	+	+	+	甲基 α -D-吡喃葡萄糖苷	-	-	-
蔗糖	+	+	+	α - α -海藻糖	-	-	-
蜜二糖	-	-	-	乳糖	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	松三糖	-	-	-
棉子糖	-	-	-	菊糖	-	-	-
淀粉	-	-	-				

注：+ 发酵，- 不发酵

2.3 碳源同化试验

碳源同化试验结果见表 3。

表 3 碳源同化试验

试验项目	试验结果			试验项目	试验结果		
	Y1	Y2	Y3		Y1	Y2	Y3
D-半乳糖	+	+	+	L-山梨糖	+	+	+
D-葡糖胺	-	-	-	淀粉	-	-	-
D-木糖	+	+	+	L-阿拉伯糖	-	-	-
D-阿拉伯糖	-	-	-	L-鼠李糖	-	-	-
蔗糖	+	+	+	甲醇	-	-	-
松三糖	+	+	+	柠檬酸	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	水杨苷	+	+	+
熊果苷	+	+	+	蜜二糖	-	-	-
麦芽糖	+	+	+	棉子糖	-	-	-
乳糖	-	-	-	琥珀酸	+	+	+
D-核糖	-	-	-	甘油	+	+	+
赤藓糖醇	-	-	-	核糖醇	+	+	+
木糖醇	+	+	+	D-甘露醇	+	+	+
肌醇	-	-	-	乙醇	+	+	+
D-葡糖醛酸	-	-	-	DL-乳酸	+	+	+
菊糖	-	-	-	D-葡萄糖酸	-	-	-
α - α -海藻糖	+	+	+	甲基 α -D-吡喃葡萄糖苷	+	+	+

注：+ 阳性，- 阴性

2.4 同化氮源试验

酵母菌株 Y1、Y2、Y3 能同化硫酸铵，不能同化硝酸钾。

2.5 高渗透压生长试验

在含 50% 或 60% D-葡萄糖酵母汁琼脂平皿中, 酵母菌生长速度比在其它培养基中的生长速度快, 菌落乳白色, 无光泽, 边缘呈波状, 中心凸起, 凸起部分呈淡红色。在含 10% ~15% NaCl 的培养基上也能生长。

2.6 其它生化试验

酵母菌 Y1、Y2、Y3 在无维生素培养基上不生长“-”; 牛奶反应阳性“+”; 尿素分解试验为阴性“-”; 明胶液化试验阳性“+”; 在 30℃、37℃ 能生长, 42℃ 不生长。其它结果见表 4。

表 4 其它生化特征

试验项目	试验结果			试验项目	试验结果		
	Y1	Y2	Y3		Y1	Y2	Y3
明胶液化	+	+	+	0.01% 放线菌酮生长	-	-	-
0.1% 放线菌酮生长	-	-	-	类淀粉化合物形成	-	-	-
尿素试验	-	-	-	牛奶反应	+	+	+
重氮基蓝 B (DBB)	-	-	-	30℃ 生长	+	+	+
37℃ 生长	+	+	+	42℃ 生长	-	-	-
无维生素生长	-	-	-				

注: + 生长, - 不生长

根据上述的形态特征和生化实验结果, 参考《酵母菌的特征与鉴定手册》^[3] 中的有关描述, 将这 3 株酵母菌鉴定为埃切毕赤酵母 (*Pichia etchellsii*)。

这 3 批次的胀罐酱油中菌落总数、大肠菌群 MPN 值均未超过国家标准^[4], 也未检出致病菌 (见表 1), 但酵母菌数达到 10⁵ cfu/mL 数量级; 引起这几批酱油胀罐的毕氏酵母菌耐高渗透压, 广泛分布于酱油、酱、果汁及果脯等高渗基质中, 在美国, 日本等发达国家进出口食品卫生标准中, 均有酵母菌指标^[5], 由于酵母菌对人类健康的危害不如致病性细菌那么严重, 因而并未引起食品卫生监督机构及相关管理和技术人员的普遍重视, 我国大部分食品 (包括酱油) 卫生标准中尚没有酵母菌指标, 因此, 我国的食品卫生检测中应增加酵母菌指标, 以控制酵母菌污染, 保证食品卫生质量, 保护广大消费者健康。

参 考 文 献

[1] 中国国家标准化管理委员会, 中华人民共和国卫生部联合发布. 食品卫生微生物学检验. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[2] Kregervan N J W, Grohingen R J. The Yeasts a Taxonomic Study, Amsterdam: The Netherlands Elsevier Science Publishers, 1984.

[3] J. A 巴尼特. 酵母菌的特征与鉴定手册. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.

[4] 卫生部卫生监督中心卫生标准处编. 食品卫生国家标准汇编 (6). 北京: 中国标准出版社, 2004.

[5] 李连洁, 徐迪诚, 纪舒萍, 等. 中国卫生检验杂志, 1996, 6 (2): 76 ~ 77.