

文章编号:1673-1689(2009)04-0564-05

年糕腐败菌的鉴定和菌系分析

胡庆松^{1,3}, 刘青梅^{*2,3}, 杨性民³, 郁志芳¹, 袁勇军²

(1. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 浙江万里学院 生物与环境工程学院, 浙江 宁波 310035; 3. 浙江万里学院 宁波市农产品加工技术重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 作者采用 VITEK-32 自动化微生物分析仪鉴定系统、API 微生物鉴定系统和手工法鉴定年糕中的微生物。研究表明:引起年糕腐败的典型菌株有 6 株,所占比例分别为:波茨坦短芽胞杆菌(*Brevibacillus borstelensis*)为 1%、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)为 21%、乙酰短杆菌(*Brevibacterium acetylicum*)为 8%、希氏短杆菌(*Brevibacterium healii*)为 7%、曲霉菌属(*Aspergillus*)为 49%、茁芽丝孢酵母(*Trichosporon pullulans*)为 9%。在这些菌株中,曲霉菌是造成年糕腐败的优势菌株,在生产车间、摊凉板中污染较多。而巨大芽孢杆菌主要来源于原料粳米中,在年糕中主要以芽孢的形式存在,若控制不当,在贮藏后期很容易爆发。

关键词: 年糕;腐败菌株;鉴定分析

中图分类号:TS 261.15

文献标识码:A

Identification of Main Strains in the Rice Cake and Analysis on the Series of the Bacteria

HU Qing-song^{1,3}, LIU Qing-mei^{*2,3}, YANG Xing-min³,
YU Zhi-fang¹, YUAN Yong-jun²

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; 2. College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 3. Ningbo Key Lab of Agricultural Products Processing Technology, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: For the purpose of controlling the putrefactive strains and improving the shelf life of the rice cake, the test separate and identify the microorganism in putrescent rice cake with vitek-32, API coryne and ordinary biochemistry reactions. The result demonstrates that six different microorganism accounts for the proportion respectively: *Brevibacillus borstelensis* (1%), *Bacillus megaterium* (21%), *Brevibacterium acetylicum* (8%), *Brevibacterium healii* (7%), *Aspergillus* (49%) and *Trichosporon pullulans* (9%). In those microorganisms, *Aspergillus* was populated in the production workshop and cooling board and as the dominant strains inducing the decay of rice cake. *Bacillus megaterium* mainly comes from the material of rice, which subsists with gemma in the rice cake.

Key words: rice cake, spoiled strains, identification and analysis

收稿日期:2008-08-20

基金项目:浙江省科技厅农业攻关项目(2005SA96001)。

* 通讯作者:刘青梅(1960-),女,贵州赤水人,教授,硕士生导师,主要从事农产品加工方面的研究。Email: lqm2003@zwu.edu.cn

年糕(rice cake)是以粳米为原料,经浸泡、水磨、压榨、蒸煮、挤压成型等工序加工而成的一种传统食品,具有爽滑、香糯的优良品质,深受消费者欢迎。目前宁波年糕的消费主要作为冬季时令配餐食品,消费渠道较窄。究其原因是,虽然年糕营养丰富,水分含量较高,但很容易因细菌和霉菌污染引起酸败发霉。而目前尚无文献报道年糕中腐败菌的种类和来源,这限制了年糕保鲜技术的研究,从而限制了年糕产业的发展。

对年糕中的腐败菌进行了分离鉴定,并对各腐败菌的分布和来源进行分析,为进一步研究年糕保鲜技术提供明确的思路,使得研究年糕保鲜方法和控制微生物污染时能够有的放矢。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 实验原料 年糕由宁波慈城冯恒大食品有限公司提供。

1.1.2 培养基 营养琼脂培养基、马丁氏培养基、马铃薯-葡萄糖-琼脂培养基由杭州微生物试剂有限公司提供。

1.2 仪器与设备

超净工作台;高压蒸汽灭菌锅;SPX 智能生化培养箱;VITEK-32 自动化微生物分析仪,API 菌种鉴别试纸条,法国生物梅里埃公司产品;菌落计数器;BX50F4 高级系统生物显微镜;日本奥林巴斯公司制造;MD130 电子目镜;JEM-1011 透射电子显微镜,日本电子株式会社(JEOL LTD)制造;美国 Gatan 792. C CCD;Sony 数码显微照相机。

1.3 试验方法

1.3.1 腐败菌株的分离纯化 采用稀释平板分离法和划线分离法结合,取未杀菌的腐败年糕 25 g,剪碎后用均质机均质 10 min,取不同稀释倍数的菌悬液分别在营养琼脂培养基、马丁氏培养基和马铃薯-葡萄糖-琼脂培养基中进行稀释,平板分离、革兰氏染色后显微观察腐败菌株种类。对不同菌落进行平板划线,分离 5 代进行纯化^[1-3]。

1.3.2 菌落特征观察

1) 细菌菌落特征观察:牛肉膏蛋白胨培养基中 37 ℃ 培养 24 h,观察菌落形态。

2) 霉菌菌落特征观察:马丁氏培养基中 25 ℃ 培养 72 h,观察菌落形态。

3) 酵母菌落特征观察:PDA 培养基中 25 ℃ 培养 72 h,观察菌落形态。

1.3.3 腐败菌株的鉴定方法

1) VITEK-32 自动化微生物分析仪鉴定系统:菌株的鉴定采用 VITEK-32 自动化微生物分析仪,将 30 个对细菌鉴定必需的生化反应培养基固定到仪器的鉴定卡上,充填机把样本液注入鉴定卡中并封口,读取器、恒温箱自动恒定培养温度,并每小时读取每张卡内反应变化,电脑主机通过培养过程显色反应与菌种数据库进行比对得到鉴定结果。

2) API 微生物鉴定系统:API Coryne 试验条是由含糖发酵或酶活性测定的干燥底物的 20 个小管组成。将菌株制成浓的菌悬液,并用菌悬液重新水化酶底物。培养期间所产的代谢最终产物通过自发颜色或加试剂后颜色变化来显示,发酵的碳水化合物是以 pH 指示剂来显示。在使用时首先确定为无孢子的革兰氏阳性杆菌,然后通过接种、反应后将每组的阳性反应结果的相当数相加,得到一个 7 位数,根据 API Coryne 分析图索引得到确定的菌株。

3) 霉菌的鉴定:通过制备临时玻片法、点植培养法和载片培养法^[6],并结合 GB 4789. 16-94 执行。

4) 菌落总数测定方法:GB/T4789. 2 稀释涂布法。

2 结果与分析

2.1 典型菌株的分离

实验采用稀释平板分离法和划线分离法相结合,取 10 袋腐败年糕,共分离出 6 个典型菌株:X1、X2、X3、X4、M1、Y1,UK 为未知的菌株,在这 10 袋腐败年糕中,取菌落分离明显的 3 次实验,分别对各菌株进行计数,然后取平均值,得到每种年糕所占的百分比,菌系分布见图 1。

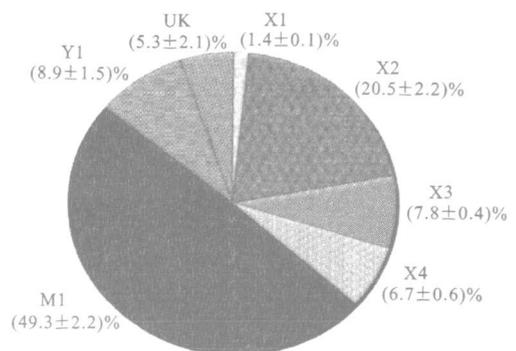


图 1 未杀菌年糕腐败菌系分布

2.1.1 菌落特征观察

由图 1 可见:M1 占 49%、X2 占 21%、Y1 占 9%、X3 占 8%、X4 占 7%、X1 占 1%、UK 占 5%。

将上述细菌在牛肉膏蛋白

胨培养基中 37 ℃ 培养 24 h; 霉菌在马丁氏培养基中 25 ℃ 培养 72 h; 酵母在 PDA 培养基中 25 ℃ 培养 72 h, 其菌落形态见表 1、图 2。

表 1 年糕腐败菌各菌株的菌落特征

Tab. 1 Colony characteristic of several microorganisms in rice cake

菌株	培养时间/h	形状	直径大小/mm	表面特征	边缘特征	氧利用特性	颜色
X1	24	太阳花状	10~15	光滑,湿润,有光泽,内部圆环透光、外侧不透光,有明显的同心圆环	规则齿状	好氧	乳白
X2	24	圆形	10~15	褶皱,干燥,无光泽,不透光,有明显同心圆环	齿状	好氧	白色
X3	24	圆形	5~10	褶皱,干燥,无光泽,不透光,无同心圆环	规则齿状	好氧	白色
X4	24	圆形	2~6	光滑,干燥,有光泽,不透光,无明显同心圆环	发射刺状	好氧	乳白
M1	72	圆形	18~25	絮状,青白色	圆形	好氧	青白
Y1	72	圆形	0.2~0.4	大而厚,光滑、湿润,有光泽,不透光,无同心圆环	光滑	好氧兼性厌氧	乳白

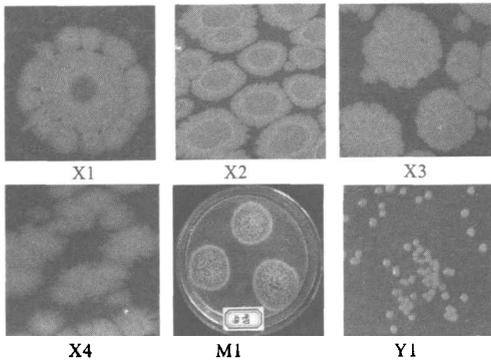


图 2 年糕腐败菌各菌株的菌落特征图

Fig. 2 Shape of colonial morphology of several microorganism in rice cake

2.1.2 细胞形态观察 将上述各细菌和 Y1 菌株制成菌悬液,用无菌毛细吸管吸取菌悬液滴在铜网膜上,用 1%醋酸铀染色、洗脱后放到 JEM-1011 透射电镜下观察,加速电压为 60 kV,用 Gatan 792. C CCD 成像,获得各菌株的超微结构。而 M1 培养 72 h,取样涂片,显微镜观察,结果见图 3。

从图 3 可见: X1、X3、X4 菌株长度均约为 1 μm,宽为 0.5 μm。而 X2 明显较大,长度约为 2~3 μm,宽为 1~1.5 μm。另外,革兰氏染色实验发现, X3、X4 为阳性棒状杆菌,并无芽孢存在。因此,可以采用 API Coryne 鉴定系统鉴定, M1 为霉菌可能性较大,但年糕中菌系复杂,故用手工法进行初步鉴定,其它可采用 VITEK -32 微生物鉴定系统鉴定。

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 VITEK -32 微生物鉴定系统对 X1、X2、Y1 万方数据

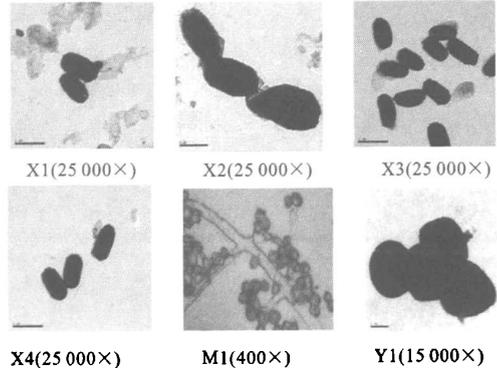


图 3 不同倍数下年糕腐败菌各菌株细胞形态

Fig. 3 Cell configuration of several microorganisms with different magnified multiple

的鉴定结果 各菌株平面培养 24 h,经革兰氏染色观察后, X1 和 X2 使用 VITEK-32 BAC 卡, Y1 使用 VITEK- 32 YBC 卡鉴定,结果见表 2。

表 2 梅里埃菌相鉴定报告

Tab. 2 Biomerieux vitec manual vitec lab report

反应	X1	X2	反应	Y1
革兰氏阴性 NEG	-	-	半乳糖 GAL	-
塔格糖 TAG	-	-	麦芽糖 MLT	+
半乳糖 GAL	-	-	木糖 XYL	+
甘露醇 MAN	-	+	松三糖 MLZ	+
乙酰谷氨酸 AGA	-	-	木糖醇 XLT	-
麦芽糖 MLT	-	+	古老糖 PAL	+
山梨醇 SOR	-	-	赤鲜醇 ERY	+

续表 2

反应	X1	X2	反应	Y1
氰化钾 KCN	-	+	葡萄糖 GLU	+
竹桃霉素 OLD	-	-	酮基葡萄糖 2KD	-
植病链菌素 PAS	+	+	乳糖 LAC	-
嗜热菌 THRM	-	-	纤维二糖 CEL	+
蔗糖 SUC	-	+	阿拉伯糖 ARA	+
葡萄糖 GLU	-	+	棉子糖 RAF	+
阿拉伯糖 ARA	-	-	卫矛醇 DUL	-
棉子糖 RAF	-	+	丙三醇 GLY	+
菊糖 INU	-	+	蜜二糖 MEL	-
海藻糖 TRE	-	+	肌醇 INO	-
N-乙酰葡萄糖胺 NAG	-	+	尿素 URE	-
氯化钠 NCL	-	+	蔗糖 SUC	+
乙酸钠 NAA	+	+	甲基葡萄糖甙 AMG	-
萘啶酸 NAE	-	-	海藻糖 TRE	+
红四氮坐 TZR	-	-	N-乙酰氨基葡萄糖 NAG	-
肌醇 INO	-	-	侧金盏花醇 ADO	-
木糖 XYL	-	+	山梨醇 SOR	+
水杨素 SAL	-	-	环乙糖胺 CYC	+
核糖 RIB	-	+	硝酸盐 NIT	+
苯丙氨酸解胺酶 PLA	-	+	48H	-
淀粉酶 AMY	-	+		
扁桃酸 MEN	-	+		
阿拉伯醇 ARB	-	-		
七叶灵 ESC	-	+		

通过上述反应,菌株鉴定结果见表 3。

表 3 X1、X2、Y1 菌株鉴定结果

Tab. 3 Results of X1、X2、Y1 identification

菌株	革兰氏染色	鉴定卡	鉴定耗时/h	菌株名称	置信区间
X1	G+	BAC	15	波茨坦短芽胞杆菌	>95%
X2	G+	BAC	15	巨大芽胞杆菌	>84%
Y1	-	YBC	24	茁芽丝孢酵母	>98%

由表 2~3 鉴定结果可见:X1 和 Y1 都有较高的置信区间,分别大于 95%和 98%,可见 X1 为波茨坦短芽胞杆菌,Y1 为茁芽丝孢酵母;X2 的报告置信区间 84%为巨大芽胞杆菌,13%为枯草芽胞杆

菌。进一步从细胞形态观察,X2 菌体直径大多在 1.5~3 μm,而枯草芽胞杆菌的菌体直径一般在 0.7~0.8 μm^[7-8]。由此,进一步确定 X2 为巨大芽胞杆菌。

2.2.2 API 微生物鉴定系统对 X3、X4 的鉴定结果 将分离纯化的 X3 和 X4 菌株进行革兰氏染色,经显微镜观察为革兰氏阳性杆菌,因此选用 API Conyne 条鉴定^[9],鉴定结果见表 4。

表 4 API conyne 条对 X3、X4 鉴别反应结果

Tab. 4 Results of X3、X4 identification by API Conyne

代码	反应编码	X3 反应结果	X3	X4 反应结果	X4
1	硝酸盐还原 NIT	+		+	
2	吡嗪胺酶 PYZ	-	5	-	5
4	吡咯烷酮基芳胺酶 PyrA	+		+	
1	碱性磷酸酶 PAL	+		+	
2	β-葡糖苷酸酶 β-GUR	-	5	-	1
4	β-半乳糖苷酶 β-GAL	+		-	
1	α-葡糖苷酶 α-GLU	+		+	
2	N-乙酰-β-葡萄糖胺酶 βNAG	-	5	-	5
4	七叶灵 ESC	+		+	
1	脲酶 URE	-		-	
2	明胶 GEL	+	2	+	2
4	对照 O	-		-	
1	葡萄糖 GLU	+		-	
2	核糖 RIB	-	1	-	0
4	木糖 XYL	-		-	
1	甘露醇 MAN	-		-	
2	丙二酸盐 MAL	+	2	-	0
4	乳糖 LAC	-		-	
1	蔗糖 SAC	+		-	
2	肝原 GLYG	-	5	-	4
4	触酶 CAT	+		+	

由表 4 可知:X3 和 X4 的编号分别为 5552125 和 5152004,对照编码字典,置信区间 X3 为 80.3%、X4 为 99.2%,因此,可以确定 X3 和 X4 分别为乙酰短杆菌和希氏短杆菌。

2.2.3 霉菌鉴定 由于年糕中霉菌形态多样,不同批次分离的菌株各异,作者对腐败年糕中的霉菌进行菌落形态观察和镜检,确定该类菌株为曲霉菌

属^[4,10]。

2.3 腐败菌来源分析

年糕中的主要优势菌巨大芽孢杆菌主要存在于土壤和粮食中,目前在年糕的生产过程中,由于工艺需求,采购的原料粳米并未进行清洗处理,而后期的高温蒸煮过程中虽能杀灭大多数微生物,但对芽孢的杀灭并不彻底,这是造成年糕腐败的主要根源。此外,乙酰短杆菌和希氏短杆菌原本是从酪制品中分离出来的,在淀粉制品中也较为常见^[9]。而茁芽丝孢酵母和曲霉主要在年糕摊凉过程中污染。目前国内年糕企业尚未形成工业化生产,生产仍以手工磨坊式为主,生产环境污染较严重,未杀菌的年糕因霉菌和酵母污染导致保质期难以超过7d^[15]。

3 结 语

导致年糕腐败的菌株非常复杂,经鉴定主要有6株典型菌株,即波茨坦短芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、乙酰短杆菌、希氏短杆菌、曲霉菌属和茁芽丝孢酵母。主要的优势菌曲霉主要存在于空气、年糕摊凉的器械表面,因清洗消毒不彻底导致污染。而巨大芽孢杆菌主要存在于原料粳米中,产生芽孢后不易杀灭,在年糕贮藏后期萌发,也是导致腐败的主要根源。

未杀菌年糕典型腐败菌株所占比例分别为:曲霉菌属49%、巨大芽孢杆菌为21%、茁芽丝孢酵母为9%、乙酰短杆菌为8%、希氏短杆菌为7%、波茨坦短芽孢杆菌为1%、未知菌为5%。

参考文献(References):

- [1] Ji Ying, Zhu Ke-xue, Qian Hai-feng, et al. Microbiological characteristics of cake prepared from rice flour and sticky rice flour[J]. *Food Control*, 2007, (18): 1507-1511.
- [2] 赵书欣,张春艳,宋美英,等.不同方法腌制渍菜过程中的菌相分析[J].吉林农业大学学报,1999,21(1):83-86.
ZHAO Shu-xin, ZHANG Chun-yan, SONG Mei-ying, et al. Analysis of bacterial varieties and quantity during the cabbage pre-fermentation in salt by different methods[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 1999, 21(1): 83-86. (in Chinese)
- [3] 卢士玲,吴桂春,李开雄.发酵肉制品中乳酸菌的分离、筛选和鉴定[J].食品与生物技术学报,2006,25(3):116-121.
LU Shi-ling, WU Gui-chun, LI Kai-xiong, et al. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from fermented meat [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(3): 116-121. (in Chinese)
- [4] 中国科学院微生物研究所.常见与常用真菌[M].北京:科学出版社,1973.
- [5] 娄永江,熊海维,张晶.方便年糕保鲜技术研究[J].食品研究与开发,2004,(25):139-141.
LOU Yong-jiang, XIONG Hai-wei, ZHANG Jing, et al. Study of the convenient rice cake refreshment[J]. *Food Research and Development*, 2004, (25): 139-141. (in Chinese)
- [6] 沈萍,范秀荣.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [7] 于雅琼,陈红艳,李平兰.不同生境中芽孢杆菌的分离鉴定及药敏性分析[J].食品科学,2007,28(7):324-330.
YU Ya-qiong, CHEN Hong-yan, LI Ping-lan, et al. Isolation, Identification and antibiotic susceptibility of bacillus from different stuffs[J]. *Food Science*, 2007, 28(7): 324-330. (in Chinese)
- [8] 希坎南 R E.伯杰氏细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1989.
- [9] 卢义伯,潘超.臭豆腐发酵菌种的筛选与鉴定[J].食品科学,2007,28(6):246-248.
LU Yi-bo; PAN Chao. Bacterium screening and identifying from Stinky Tofu[J]. *Food Science*, 2007, 28(6): 246-248. (in Chinese)
- [10] 周长海,孙琳,于洪海.粟米酱米曲霉菌的分离、筛选与鉴定[J].中国酿造,2006,154(1):30-34.
ZHOU Chang-hai, SUN Lin, YU Hong-han. Isolation, screening and identification of *Aspergillus oryzae* in millet catsup [J]. *China Brewing*, 2006, 154(1): 30-34. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)