

浆水中微生物的分离与鉴定

李雪萍, 李建宏, 孟宪刚*, 郑楠, 谢佳佳

(兰州交通大学化学与生物工程学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以浆水为实验材料,在多种培养基平板上分离纯化其中的微生物,共得到24株菌,其中细菌20株,丝状真菌3株,酵母菌1株。对纯化后的各菌株进行菌落形态观察、革兰氏染色、生化特性研究以及分子生物学鉴定,结果表明:浆水中存在多种微生物,其细菌以乳杆菌属或双歧杆菌属等益生菌为主,酵母菌为酿酒酵母,丝状真菌为变灰青霉和橘青霉。结果说明浆水微生物组成优良,具有开发利用潜力,但其中还存在杂菌和有害菌,应在生产中引起进一步重视。

关键词:浆水;微生物;分离;鉴定

Isolation and Identification of Microorganisms from Jiangshui, a Traditional Chinese Fermented Vegetable Product

LI Xue-ping, LI Jian-hong, MENG Xian-gang*, ZHENG Nan, XIE Jia-jia

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

Abstract: In this study, 24 strains were isolated from Jiangshui, a traditional Chinese fermented celery product, and purified by various culture medium plates, including 20 strains of bacteria, 3 strains of filamentous fungi, and 1 strain of yeast. The purified strains were analyzed through morphological, Gram staining, biochemical characteristics and molecular biology identification. The results showed that various microorganisms existed in Jiangshui, and the bacteria mainly belonged to the genera *Lactobacillus* or *Bifidobacterium*. The yeast was *Saccharomyces cerevisiae*, and the filamentous fungi were *Penicillium canescens* and *Penicillium citrinum*. These results illustrate that the composition of microorganisms is excellent, with a good potential for development and utilization. But there are also some miscellaneous bacteria and harmful bacteria, which should be taken seriously in production.

Key words: Jiangshui; microorganism; isolation; identification

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)23-0204-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201423040

近30年来,我国国民经济实现了飞跃式发展,人民生活水平得到了极大的提高,饮食结构也相应发生了变化,富含脂肪、胆固醇等物质高营养、高热量的食物越来越多的被人们食用,与之相随,动脉粥样硬化、高血压、冠心病等心血管疾病的发病率也在逐年增高,有统计显示其已成为我国引起死亡的主要疾病。而有研究发现^[1],发酵蔬菜制品在降低胆固醇,预防心脑血管疾病方面有卓越的性能。因此,传统发酵蔬菜受到了人们的重视,其中一些种类实现了工业化、标准化的生产,如韩国泡菜、日本泡菜等。近年来,我国在这一领域也有了突飞猛进的发展,据中国调味品协会的统计,目前我国发酵蔬菜的年产值已超过150亿元,且连续三年保持了20%~30%的增长率^[2]。在此趋势带动之下,一些富于我国地方特色的发酵蔬菜被越来越多的学者所关注,如在

西北地区的广受欢迎的发酵食品浆水,近年来就有学者对其进行了研究,吕嘉彬等^[3]研究了浆水的发酵工艺,张培等^[4]研究了浆水中有机酸的含量,这些研究为浆水的进一步深入研究乃至实现工业化的生产奠定了理论基础。但是,相对于其他发酵蔬菜,浆水的研究及开发仍显落后,尤其作为基础性的微生物分离鉴定工作,前人研究的较少且较粗造,成为了浆水研究工作中的薄弱环节,也是实现标准化生产进程中的瓶颈因素。因此,对浆水中可培养微生物进行分离鉴定就是一项非常必要而迫切的工作,其不仅对于浆水的开发有重要作用,而且对丰富我国发酵蔬菜种类、丰富人民餐桌具有积极意义。

本研究选择以甘肃庆阳环县为采样地点,该地区食用浆水的历史悠久,制作工艺较为成熟,且该地区气候特征为西北典型的温带大陆性半干旱气候,因此,采样

收稿日期: 2014-01-05

基金项目: 2012甘肃省财政厅生物专项(213001); 2011甘肃省财政厅高等学校基本科研业务费项目(211135)

作者简介: 李雪萍(1989—),女,硕士研究生,研究方向为食品微生物学。E-mail: lixueping0322@126.com

*通信作者: 孟宪刚(1974—),男,教授,博士,研究方向为食品发酵工程。E-mail: mengxg@mail.lzjtu.cn

地点具有代表性。分离纯化浆水中的微生物,并结合生理生化法和分子生物学方法鉴定其种属,旨在为进一步选育优良益生菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

浆水:采自甘肃省庆阳市环县木钵镇吴家墩村,取样时参考当地食用习惯,在芹菜浆水处于风味最佳的阶段(无泡沫、味酸、浆水清澈、口感清爽^[5])时取样,取得样品后,贮存于无菌容器,低温运输至实验室,立即分离。

细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型) 北京百泰克生物技术有限公司;HP Fungal DNA Kit(离心柱型) 美国Omega公司;2 000 bp DNA Ladder 美国Biomiga公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、Tris-饱和酚 美国Sigma公司;琼脂糖、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂 生工生物工程(上海)股份有限公司; β -巯基乙醇(分析纯) 天津市精细化工研究所;异戊醇(分析纯) 上海中秦化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Nano Drop 2000紫外分光光度计 美国赛默飞世尔科技公司;2500凝胶成像仪、HE-120电泳仪 上海天能科技有限公司;Sorvall legend RT离心机 美国Kendro公司;MyCycler PCR仪 美国伯乐公司;Centrifuge 5418R台式离心机、各型加样枪 德国艾本德公司。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基、YPD培养基、醋酸菌筛选培养基、查氏培养基、MRS培养基、M17培养基、TYC培养基。

1.4 方法

1.4.1 菌株分离

将浆水在无菌条件下分别稀释至合适浓度(稀释度以平板表面出现单菌落为度),在1.3节所示7种培养基上用平板涂布法分离单菌落,恒温培养(细菌37℃培养,酵母菌30℃培养,丝状真菌25℃培养),细菌和酵母菌用平板划线法纯化,丝状真菌用单孢子分离法纯化。镜检,挑选在平板上菌落形态一致、在显微镜下细胞形态一致的菌株作为实验菌株;兼性厌氧菌采用改良的焦性没食子酸法培养^[6]。

1.4.2 菌落形态及细胞形态的观察

将已纯化的菌株活化后,接种在相应的培养基上进

行培养,培养至24~48 h时观察并记录菌落形状、色泽、隆起、表面平整度、边缘形状等;细菌采用涂片法,培养至24~36 h时取样涂片,用三步法做革兰氏染色,并在油镜下观察菌体形状和颜色(分别用*Staphylococcus aureus*和*Escherichia coli*做阳性和阴性对照);酵母菌用水浸片法观察;丝状真菌采用插片法在40倍显微镜下取样观察,并根据《真菌鉴定手册》^[7]、《常见与常用真菌》^[8]、《酵母菌的特征与鉴定手册》^[9]查询各真菌的分类地位。

1.4.3 生化特性的研究

将已纯化的各细菌活化后分别进行如下实验:接触酶反应实验、淀粉水解实验、明胶液化实验、石蕊牛奶实验、糖发酵实验、硫化氢产生实验、吲哚产生实验、乙酰甲基甲醇(V-P)实验,准确观察并记录实验结果。根据菌落形态、革兰氏染色结果及生化特性研究结果,参照《伯杰细菌鉴定手册》^[10]、《常见细菌系统鉴定手册》^[11]查询各细菌的分类地位。

1.4.4 细菌及酵母的分子鉴定

1.4.4.1 DNA的提取

细菌用细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)提取;酵母菌的基因组DNA用HP Fungal DNA Kit提取。

1.4.4.2 DNA纯度及浓度检测

采用琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度法检测。

1.4.4.3 引物设计与合成

细菌:扩增引物为细菌16S rDNA扩增通用引物27F-1492R,序列分别为:27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',由北京华大基因研究中心合成。

酵母菌:扩增引物为真核生物18S rDNA扩增通用引物NS7和NS8,引物序列分别为:NS7:5'-GCAATAACAGGTCTGTGATGC-3',NS8:5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3',由北京华大基因研究中心合成。

1.4.5 扩增反应

扩增反应在梯度PCR仪上进行PCR反应,细菌PCR扩增反应体系为(25 μ L):10 $\times$ Buffer缓冲液2.5 μ L,10 mmol/L Mg^{2+} 1.5 μ L,25 mmol/L dNTP 0.5 μ L,20 μ mol/L PCR引物各0.5 μ L,5 U/ μ L的*Taq* DNA聚合酶0.25 μ L,25 ng/ μ L的模板DNA各2 μ L,无菌双蒸水稀释至25 μ L。PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s、55℃退火60 s、72℃延伸30 s,重复扩增40个循环,72℃延伸10 min,4℃保存。

酵母菌PCR扩增反应体系(20 μ L):超纯水13.4 μ L,10 $\times$ PCR缓冲液2 μ L,dNTP 0.3 μ L,引物各1 μ L,*Taq*酶0.3 μ L,模板DNA 2 μ L。反应条件分别为94℃预变性5 min,94℃变性45 s、51℃退火1 min、

72 ℃延伸2 min，共30 个循环，最后72 ℃延伸10 min；4 ℃保存。

1.4.6 扩增产物的检测与测序

反应产物检测通过琼脂糖凝胶电泳法完成，DNA Marker为2 000 bp DNA Ladder，将扩增出的产物的测序直接交华大基因公司完成。

1.4.7 序列分析

使用软件DNAMAN 4.0进行序列分析；利用CLUSTALX（1.83）对序列分别进行比对；在CLUSTAL中实现“掐头去尾”；在BLAST获得相似序列。

1.4.8 系统进化树的构建

在GenBank获得与实验菌株亲缘较近的菌株16S rDNA序列作为参比，用Clustalx1.83进行序列比对，使用MEGA 5.1.2构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株分离

从浆水中共分离出24 株菌，其中细菌20 株，真菌4 株。

2.2 各菌株菌落形态及显微形态

表1 细菌菌落形态及革兰氏染色结果

序号	菌名	菌落形态	革兰氏染色
1	Q4	圆形，乳白色，隆起，闪光，半透明，边缘整齐，表面湿润，光滑	G ⁺ ，杆菌
2	Q5	圆形，白色，表面干燥，褶皱，无光泽，扩展，不透明，边缘缺刻，易被挑起	G ⁺ ，杆菌
3	Q10	圆形，米白色，表面湿润，粗糙，易挑起，隆起低，无光泽，不透明，边缘整齐	G ⁺ ，杆菌
4	Q1	圆形，淡黄色，隆起，闪光，透明，边缘整齐，表面光滑，湿润	G ⁺ ，球菌
5	Q11	圆形，米白色，表面湿润，粗糙，易挑起，隆起低，无光泽，不透明，边缘整齐	G ⁺ ，杆菌
6	Q9	圆形，米白色，表面光滑，湿润，闪光，半透明，隆起，边缘整齐	G ⁺ ，杆菌
7	Q13	圆形，米白色，表面光滑，较湿润，无光泽，不透明，边缘整齐，隆起	G ⁺ ，球菌
8	Q6	圆形，米白色，边缘波状，凸起，表面有褶皱，较湿润，无光泽，不透明，易挑起	G ⁺ ，杆菌
9	Q12	圆形，米白色，边缘波状，凸起，有褶皱，较湿润，无光泽，不透明，易挑起	G ⁺ ，杆菌
10	Q14	圆形，白色，表面光滑，湿润，低凸，半透明，有光泽，边缘整齐	G ⁺ ，杆菌
11	Q15	圆形，白色，表面光滑，湿润，低凸，半透明，有光泽，边缘整齐	G ⁺ ，杆菌
12	Q2	圆形，淡黄色，隆起，闪光，透明，边缘整齐，表面光滑，湿润	G ⁺ ，球菌
13	Q16	圆形，白色，表面光滑，湿润，低凸，半透明，有光泽，边缘整齐	G ⁺ ，杆菌
14	Q17	圆形，淡黄色，半透明，表面光滑，湿润，闪光，隆起，边缘整齐	G ⁺ ，杆菌
15	Q3	圆形，淡黄色，隆起，闪光，透明，边缘整齐，表面光滑，湿润	G ⁺ ，球菌
16	Q8	圆形，乳白色，表面光滑，湿润，闪光，半透明，边缘整齐，隆起	G ⁺ ，杆菌
17	Q7	圆形，米白色，表面粗糙，较干燥，有褶皱，边缘缺刻，无光泽，不透明	G ⁺ ，球菌
18	Q18	圆形，米白色，表面光滑，湿润，不闪光，半透明，边缘整齐，菌落小	G ⁺ ，杆菌
19	Q19	圆形，乳白色，表面光滑，湿润，闪光，半透明，边缘整齐，隆起低	G ⁺ ，杆菌
20	Q20	圆形，乳白色，表面光滑，湿润，闪光，不透明，边缘整齐，隆起	G ⁺ ，杆菌

细菌菌落形态观察结果（表1）显示，本研究所分离的细菌菌落均为圆形，白色至淡黄色，大多表面光滑，呈现典型的细菌菌落特征。革兰氏染色显微观察结果显示所分离菌大多为杆菌，少数为球菌。

2.3 生化特性研究

表2 细菌及酵母菌的生化特性

Table 2 Biochemical characteristics of the bacteria and the yeast												
菌名	接触酶反应	淀粉水解	明胶液化	石蕊牛奶	V-P 实验	糖发酵					吲哚产生	硫化氢产生
						葡萄糖	半乳糖	蔗糖	麦芽糖	乳糖		
Q1	-	-	-	SD	-	+	-	-	+	+	-	-
Q4	-	-	-	SD	-	+	+	+	+	+	-	-
Q5	-	-	-	SD	-	+	+	+	+	+	-	-
Q10	-	-	-	SD	+	+	+	+	-	-	-	-
Q14	-	-	-	SD	-	+	+	+	+	+	-	-
Q11	-	-	-	SD	+	+	+	+	-	-	-	-
Q9	-	-	-	SD	+	+	+	+	+	+	-	-
Q15	-	-	-	SD	-	+	+	+	+	+	-	-
Q13	-	-	-	-	+	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-
Q6	-	-	-	SD	+	+	-	+	+	-	-	-
Q12	-	-	-	SD	+	+	+	+	-	-	-	-
Q2	-	-	-	SD	-	+	-	-	+	+	-	-
Q16	-	-	-	SD	-	+	+	+	+	+	-	-
Q17	-	-	-	SD	-	⊕	-	-	-	-	+	-
Q8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Q7	-	-	-	SD	+	+	-	-	-	+	-	-
Q3	-	-	-	SD	-	+	-	-	+	+	-	-
Q18	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Q19	-	-	-	SD	+	+	+	+	+	+	-	-
Q20	-	-	-	酸凝	-	+	+	+	+	-	-	-
FQ4	+	-	-	酶凝	+	+	-	+	-	-	-	-

注：SD. 产酸产气；+ . 反应呈阳性，- . 反应呈阴性或无变化，⊕. 反应呈产酸产气。

由表2可知，以接触酶反应，淀粉水解反应等10 项指标对所分离微生物进行鉴定，其结果和《伯杰细菌鉴定手册》、《常见细菌系统鉴定手册》及《酵母菌的特征与鉴定手册》中的描述符合性良好，说明了本研究实验准确，从而保证了鉴定结果的可靠性。

2.4 基因组DNA浓度和纯度分析

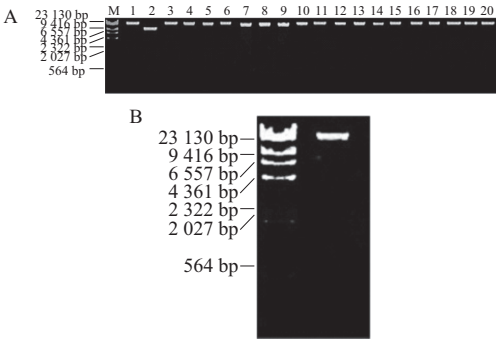


图1 供试细菌（A）和酵母菌（B）菌株基因组DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis of genomic DNA from the experimented strains of bacteria (A) and yeast (B)

如图1所示，所提取的基因组DNA经0.8%的琼脂糖电泳、凝胶成像系统下观察，可以清晰地看到基因组

DNA大小约为23 kb, 且加样口无亮光, 带型完整, 无拖尾现象。通过紫外分光光度计测定 $OD_{260\text{ nm}}$ 、 $OD_{280\text{ nm}}$ 并计算出 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 的值在1.8~2.0, 计算得DNA质量浓度为40~80 ng/L, 并结合电泳图谱得出所提DNA纯度较高, RNA和蛋白质含量较少, 无降解。综上, 表明所提DNA完整性好, 纯度高, 符合后续研究要求。

2.5 扩增产物电泳检测

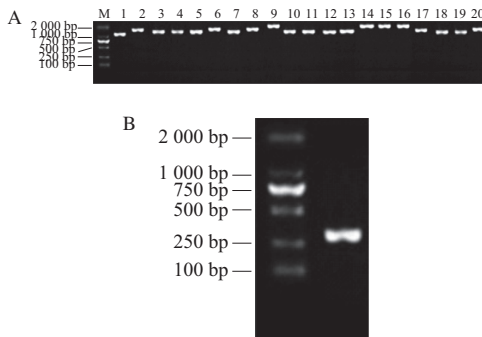


图2 供试细菌(A)和酵母菌(B) 16S rDNA/18S rDNA区扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA/18S rDNA of the experimented strains of bacteria (A) and yeast (B)

由图2可知, 通过选用原核生物通用引物进行各细菌DNA PCR扩增反应, 扩增出了菌株的16S rDNA区序列, 目的片段在1 000~2 000 bp之间, 与预期在1 400 bp左右相一致; 用真核生物通用引物进行酵母DNA PCR扩增反应, 扩增出了菌株的18S rDNA区序列, 目的片段在250~500 bp之间, 与预期在350 bp左右相一致; 条带清晰明亮, 没有出现弥散带和其他杂带, 完整性较好。

2.6 各菌株的鉴定结果

2.6.1 丝状真菌的鉴定结果

表3 真菌的形态特征及鉴定结果

Table 3 Morphological characteristics and identifications of the fungi

菌名	菌落形态	细胞形态	鉴定结果
FQ1	菌落近圆形, 边缘形状较为规则, 气生菌丝发达, 表面呈绒毛状, 致密, 生长初期菌丝呈白色, 产孢子后菌落呈蓝色	产分生孢子, 分生孢子呈帚状、球形, 着生于次级菌丝顶端, 菌丝以出芽形式增长, 次级菌丝与初级菌丝呈小于45°的夹角, 部分有隔	橘青霉 (<i>Penicillium citrinum</i>)
FQ2、FQ3	菌落近圆形, 边缘形状较为规则, 气生菌丝发达, 表面呈绒毛状, 致密, 生长初期菌丝呈白色, 产孢子后菌落呈灰蓝色或暗灰色	产分生孢子, 分生孢子呈帚状、球形, 着生于次级菌丝顶端, 菌丝以出芽形式增长, 次级菌丝与初级菌丝呈45°~90°的夹角, 无明显横隔	变灰青霉 (<i>Penicillium canescens</i>)

如表3所示, 本研究分离出的丝状真菌种类较少, 只有橘青霉和变灰青霉两种, 这两种菌都常见于一些腐烂的食品, 如粮食、肉类、水果、蔬菜等, 另外也是纺织物和皮革霉烂的主要微生物, 是工业、农业生产中的主要病害真菌。但近些年来, 这两种菌也逐渐成为工业生产中的重要菌种, 例如用于核酸酶P1^[12]、醛酮氧合酶^[13]、脂肪酶^[14]、果糖氧化酶^[15]的生产等。然而在浆水中出现这两种菌, 会加速浆水的腐败变质, 是一种有害

菌, 分析其原因可能是菜品选择不严格造成的, 从一个侧面反映了作坊式生产方式的弊端。

2.6.2 酵母菌的鉴定结果

结合形态鉴定、生理生化鉴定以及分子生物学鉴定等结果, 菌株FQ4鉴定为酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*, 和前人研究得出的结果类似^[5,16-17]。酿酒酵母是人类应用最早的微生物资源, 安全性和其他优良特性得到了充分的验证和肯定^[18]。浆水中的酿酒酵母可以起到改善浆水风味的作用。

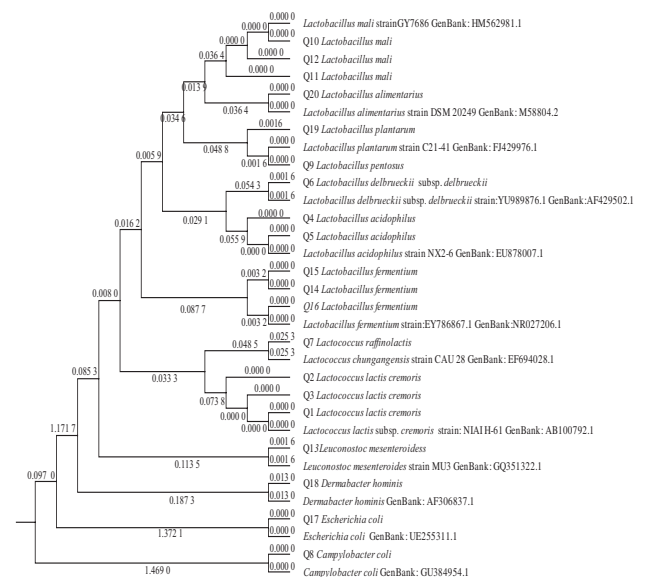
2.6.3 细菌的鉴定结果

细菌的生理生化和分子生物学实验鉴定结果见表4。

表4 细菌的生理生化和分子生物学鉴定结果

Table 4 Identification of the bacteria

菌名	生理生化鉴定结果	分子生物学鉴定结果	分子鉴定相似性/%
Q1	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	乳酸乳球菌脂亚种 <i>L. lactis cremoris</i>	99
Q4	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	100
Q5	嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	100
Q2	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	乳酸乳球菌脂亚种 <i>L. lactis cremoris</i>	100
Q3	乳球菌属 <i>Lactococcus</i>	乳酸乳球菌脂亚种 <i>L. lactis cremoris</i>	99
Q17	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	100
Q9	戊糖乳杆菌 <i>Lactobacillus pentosus</i>	戊糖乳杆菌 <i>L. pentosus</i>	100
Q10	马乳杆菌 <i>Lactobacillus mali</i>	马乳杆菌 <i>L. mali</i>	100
Q11	马乳杆菌 <i>Lactobacillus mali</i>	马乳杆菌 <i>L. mali</i>	100
Q12	马乳杆菌 <i>Lactobacillus mali</i>	马乳杆菌 <i>L. mali</i>	99
Q6	德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	德氏乳杆菌德氏亚种 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	100
Q15	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	100
Q16	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	100
Q14	发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i>	发酵乳杆菌 <i>L. fermentum</i>	99
Q13	明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i> spp.	肠膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
Q7	棉子糖乳杆菌 <i>Lactococcus raffinolactis</i>	棉子糖乳杆菌 <i>L. raffinolactis</i>	100
Q8	大肠弯曲杆菌 <i>Campylobacter coli</i>	大肠弯曲杆菌 <i>C. coli</i>	99
Q18	人皮肤杆菌 <i>Dermabacter hominis</i>	人皮肤杆菌 <i>D. hominis</i>	98
Q19	植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i>	植物乳杆菌 <i>L. plantarum</i>	100
Q20	消化乳杆菌 <i>Lactobacillus alimentarius</i>	消化乳杆菌 <i>L. alimentarius</i>	100



图中节点数值表示差异度。

图3 细菌系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of the bacteria

由鉴定结果(表4)可知,本研究所采用的两种鉴定方法其鉴定结果吻合良好,二者互相印证,说明了鉴定结果的准确。如图3所示,从系统发育学的角度,本研究分离出的16株细菌的16S rDNA序列与GenBank中序列的自展支持率在98%以上,可以确定为10个属。分离到的微生物中,大多都是乳酸菌,如乳酸乳球菌、嗜酸乳杆菌、明串珠菌属、戊糖乳杆菌、马乳杆菌、德氏乳杆菌、发酵乳杆菌、植物乳杆菌、消化乳杆菌等,大量的研究证据都显示这些菌的某些株系在发酵蔬菜中具有两个方面的优良性能,一是具有益生功效^[19],如促进胃肠道健康、促进胆固醇降解、增强免疫力延缓衰老等。二是改善了蔬菜品质,如改善蔬菜风味^[20]、提高蔬菜安全^[21-22]、提高蔬菜营养价值^[23]等。另一方面,例如戊糖乳杆菌等除了上述两个方面的作用外,在一定条件下更能产生戊糖乳杆菌素等细菌素是良好的生物保鲜剂,其具有抗菌保鲜作用且对人体无毒副作用,可以防止浆水的霉变腐败,可改善食品质量和食品安全的天然化合物,具有作为食品生物防腐剂的潜在应用价值^[24-25]。综上,由鉴定结果可以从微生物学的角度说明浆水确实是一种非常具有开发利用前景的优良发酵蔬菜类食品。

但同时,由鉴定结果还可以发现除益生菌外,浆水中还含有一些有害菌,如霉菌、大肠弯曲杆菌等,这些菌或者影响浆水的贮存,或者危害人类的健康,因此,本课题组应该努力避免杂菌的存在。另外,还说明浆水在生产过程中还存在比较严重的问题,也反映出传统的生产方式不利于浆水的产业化。

3 讨论

本研究的结果在说明浆水具有巨大开发利用前景的同时,也从一个侧面反应了浆水生产过程中存在许多问题,而这些问题归结起来就是生产方式粗放、管理模式落后造成的,而要将浆水做成一个产业,则必须要很好的解决这些问题,这就要求科研工作者认真探索浆水生产的每一个环节,例如优良菌种、最佳菜品、最佳工艺等,以菜品选择为例,传统浆水发酵的主要蔬菜是芹菜和圆根菜,然而有研究表明,这两种菜品并不利于乳杆菌等一些益生菌的生长,而白萝卜、黄瓜、山药、胡萝卜等一些蔬菜对益生菌的生长却有很好的促进作用^[26-27]。因此,这就要求在研究是要革新传统生产方式,这样才能真正将浆水做大做强。

本研究分离到的细菌中,有戊糖乳杆菌等产细菌素的菌株,而近些年来的研究提示,细菌素可以作为生物保鲜剂^[28-29],这一特性正好弥补了化学防腐剂会引起食品安全问题的缺点。产细菌素的益生菌可以制成生物保鲜剂,将之运用于蔬菜的加工,可以有效提高原材料、

生产过程及产品的安全性,延长发酵蔬菜产品的货架期,同时还避免了化学添加剂。符合人民群众对健康食品的需求。是改善发酵食品质量、提高安全性的重要手段和研究方向^[30]。

另外,在浆水生产工艺方面,还可以借鉴其他发酵蔬菜制品的先进经验以提高其质量,例如近年来发展的低温发酵技术^[31]、原材料超高压灭菌技术^[32-33]、产品热处理技术^[34]等,唯有广泛吸收先进经验的基础上,用于实践和探索,浆水才能真正走出西北、走向全国乃至全世界,形成产业优势。

4 结论

由研究结果可以看出,实验所用浆水样本中存在多种微生物,囊括细菌、酵母以及丝状真菌,相对而言以细菌为主体,且其大多为乳杆菌属或乳球菌属,另外还含有能改善发酵风味的酿酒酵母。从微生物学的角度是一种非常具有开发利用潜力的优良发酵蔬菜类食品;但另一方面,研究发现浆水中还存在霉菌和肠道菌等有害菌的污染,不利于浆水的发酵和保存,分析其原因主要是由浆水制作中的不规范造成的,也说明进行标准化、规范化生产的必要性。

参考文献:

- [1] MAN G V, SPOERRY A. Study of surfactant and cholesteremia in the Maasai[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1974, 27: 464-469.
- [2] 中国调味品协会. 中国泡菜产值已超150亿元[J]. 中国酿造, 2013, 32(1): 164.
- [3] 吕嘉彬, 李良凤. 传统浆水菜发酵工艺条件的研究[J]. 陕西科技大学学报, 2013, 31(3): 89-92.
- [4] 张培, 李昕, 刘芸, 等. HPLC法测定浆水中有机的含量[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(3): 183-186.
- [5] 张宗舟, 陈志梅, 巩晓芳. 浆水生产过程中微生物分析[J]. 中国酿造, 2009, 28(10): 29-31.
- [6] 袁桂秀, 林晨, 江振友, 等. 改良的焦性没食子酸法培养厌氧菌[J]. 济南大学学报, 1999, 20(4): 24-25.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [8] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1973: 31-247.
- [9] 巴尼特, 佩恩, 亚罗. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 192-425.
- [10] 布坎南R E, 吉本斯E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 274-888.
- [11] 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: 9-314.
- [12] 廖明义, 陈雯莉. 桔青霉发酵制备核酮酶P1的发酵动力学研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 180-182.
- [13] ASAKO H, SHIMIZU M, ITOH N. Engineering of NADPH-dependent aldoketo reductase from *Penicillium citrinum* by directed evolution to improve thermostability and enantioselectivity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(4): 805-812.
- [14] de AZEREDO L A I, GOMES P M, SANT'ANNA G L Jr, et al.

- Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations[J]. *Current Microbiology*, 2007, 54(5): 361-365.
- [15] LIM J S, LEE J H, KANG S W, et al. Studies on production and physical properties of neo-FOS produced by co-immobilized *Penicillium citrinum* and neo-fructosyltransferase[J]. *European Food Research and Technology*, 2007, 225(3): 457-462.
- [16] 张丽珂, 周鸽鸽, 孟宪刚. 传统发酵食品浆水中厌氧微生物分离鉴定初探[J]. *食品科技*, 2010, 35(4): 39-41.
- [17] 张轶, 王玉丽, 陈晓前, 等. 传统发酵食品-浆水中微生物的分离与初步鉴定[J]. *食品科学*, 2007, 28(1): 219-222.
- [18] 熊子书. 中国酿酒酵母的研究[J]. *酿酒科技*, 2002(4): 23-27.
- [19] 赵红霞, 詹勇. 乳酸菌的研究及其应用[J]. *江西饲料*, 2003(1): 9-12.
- [20] 马霞, 韩迪, 张吉, 等. 乳酸菌在发酵果蔬中的应用[J]. *中国乳品工业*, 2013, 41(1): 40-42.
- [21] 蒋欣茵, 李晓晖, 张伯生, 等. 腌制食品中降解亚硝酸盐的乳酸菌分离与鉴定[J]. *中国酿造*, 2008, 27(1): 13-16.
- [22] YAN Pingmei, XUE Wentong, TAN Szesze, et al. Effect of inoculating lactic acid bacteria starter cultures on the nitrite concentration of fermenting Chinese Paocai[J]. *Food Control*, 2008, 19(1): 50-55.
- [23] YOON K Y, WOODAMS E E, HANG Y D. Production of probiotics cabbage juice by lactic acid bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(12): 1427-1430.
- [24] 田晓乐, 孟庆繁, 周杰, 等. 微生物防腐剂-细菌素的研究与应用[J]. *食品工业科技*, 2004, 25(1): 120-123.
- [25] COTTER P D, HILL C, ROSS R P. Bacteriocins: developing innate immunity for food[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(10): 777-788.
- [26] 康婕, 吕嘉彬, 刘洋. 不同蔬菜对保加利亚乳杆菌生长的影响[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(11): 156-159.
- [27] SEYIS F, FRIEDT W, LUHS W. Development of resynthesized rapeseed (*Brassica napus* L.) forms with low erucic acid content through in ovulum culture[J]. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2005, 4(1): 6-10.
- [28] BESHKOVA D, FRENGOVA G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2012, 12(4): 419-432.
- [29] LAUKOVÁ A, SIMONOVÁ M, STROMPFOVÁ V. *Staphylococcus xylosus* S03/1M/1/2, bacteriocin-producing meat starter culture or additive[J]. *Food Control*, 2010, 21(7): 970-973.
- [30] 饶瑜, 常伟, 唐洁. 产细菌素乳酸菌在蔬菜发酵制品生物保鲜中的应用[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(16): 392-400.
- [31] 刘崇万, 董英, 肖香, 等. *Lactobacillus plantarum* (L. p) 直接发酵剂低温发酵菊芋泡菜[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(4): 106-113.
- [32] HARTMAMN C, MATHMAMN K, DELGADO A. Mechanical stresses in cellular structures under high hydrostatic pressure[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2006, 7(1): 1-12.
- [33] PENAS E, FRIAS J, GOMEZ R, et al. High hydrostatic pressure can improve the microbial quality of sauerkraut during storage[J]. *Food Control*, 2010, 21(4): 524-528.
- [34] 赵冬, 黎雪梅, 陈安均, 等. 超高压与热处理泡萝卜贮藏过程中品质变化的比较[J]. *食品科学*, 2013, 34(8): 269-273.