

## 苹果原料中酵母菌的分离鉴定

王丽敏 李军 胡小松

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

**摘要** 利用酵母粉-葡萄糖琼脂培养基对 15 个批次苹果原料样本中的酵母菌进行分离,并用 API 20C AUX 菌种鉴定系统进行鉴定,得到的 25 株酵母菌分别属于假丝酵母菌属、酿酒酵母菌属和克勒克酵母菌属的 6 个种:克柔/平常假丝酵母菌(*Candida krusei*) 13 株,酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 5 株,克勒克酵母菌属酵母菌(*Kloeckera* spp.) 2 株,木蓝假丝酵母菌(*C. magnoliae*) 2 株,热带假丝酵母菌(*C. tropicalis*) 和乳酒假丝酵母菌(*C. kefyr*) 各 1 株,鉴定准确率均超过 95%,其中模式菌酿酒酵母的鉴定准确率为 98.7%,相似度 1.00;鉴定评价均为“好”。该系统能够快速、准确地鉴定苹果原料中的酵母菌。

**关键词** 苹果;酵母菌;API 菌种鉴定系统

**中图分类号** Q 939.5

**文章编号** 1007-4333(2004)04-0014-04

**文献标识码** A

## Isolation and identification of yeasts from apple

Wang Limin, Li Jun, Hu Xiaosong

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract** A study was done to isolate and identify yeasts from apple, which (15 samples) were collected from the North Andre Apple Juice Co.Ltd. The yeasts were isolated with unpasteurized samples in the media of glucose-yeast extract-tryptone media. The identification of yeasts were done with the physiological characteristics and the API 20C AUX system. The *Candida* spp., *Kloeckera* spp. and *Saccharomyces* spp. were found in most samples. And high level of *Candida* spp. was detected in most samples. The 6 genera were *Candida krusei* (13), *Saccharomyces cerevisiae* (5), *Kloeckera* spp. (2), *C. magnoliae* (2), *C. tropicalis* (1) and *C. kefyr* (1). The accuracy of identification was > 95%. The API 20C AUX system could rapidly identify the clones of yeasts isolated from apple.

**Key words** apple; yeasts; API 20C AUX system

酵母菌是果汁生产中常见的污染菌。某些酵母菌,如酿酒酵母菌,会导致果汁出现混浊和沉淀,有的还能产生酒精,释放大量二氧化碳气体。热带假丝酵母菌为条件致病性真菌,会导致继发感染和人体免疫功能下降<sup>[1]</sup>。在美国和加拿大等国家,假丝酵母菌属病菌致病率在常见致病菌中排列第四,其中克柔/平常假丝酵母菌具有一定的抗药性<sup>[2]</sup>。因此,酵母菌已成为果汁生产主要的控制指标。自 Ingram 于 1958 年首次报道了食品中酵母菌的生化特征后<sup>[3]</sup>, Thomas<sup>[4]</sup>, Tudor<sup>[5]</sup> 和 Deak<sup>[6]</sup> 相继以综述

的形式报道了引起浓缩果汁腐败的酵母菌种类, T. Sancho<sup>[7]</sup> 报道了菠萝浓缩汁、橙汁、桃汁和梨汁中导致腐败的酵母菌种类,但对于苹果原料中酵母菌的系统的分离与鉴定尚未见报道。

用于酵母菌鉴定的方法和系统不断推出,如 API 20C, ATB 32C, Auxacolor, Vitek YBC 和 API Candid 系统<sup>[8]</sup>, 克服了传统菌种鉴定费时、操作要求高的缺点,其中,API 菌种鉴定系统在世界范围内应用较广,其鉴定结果的准确性已被微生物学界所公认。在我国,该系统已广泛应用于临床医学微生物

收稿日期: 2004-02-14

基金项目: 国家“十五”重大科技专项(2001BA501A21)

作者简介: 王丽敏, 硕士研究生; 胡小松, 教授, 主要从事植物资源开发与利用的研究。

物检验。徐红等利用 API 20C AUX 系统鉴定了 120 株病原酵母菌, 鉴定结果与常规方法相比较符合率达 95 %<sup>[9]</sup>。

本实验旨在使用 API 20C AUX 菌种鉴定系统对果汁厂生产所用原料果中酵母菌进行鉴定, 拟为工业化生产中确定苹果汁杀菌处理工艺及有效控制微生物种类提供依据。

## 1 实验材料

苹果原料取自烟台安德利果汁有限公司苹果汁生产线, 采样方法参照文献[10], 稍有修改。每 2 d 取苹果 1 个批次, 共 15 个批次, 每个批次取 18 个苹果置于灭菌袋中。按 4 分法取对角 2 份放入经灭菌处理的搅拌器中, 在无菌条件下榨汁, 吸取 25 mL 果汁, 于 225 mL 质量分数为 0.85 % 的灭菌生理盐水中混合均匀, 待用。

## 2 实验方法

### 1) 菌落总数的测定<sup>[11]</sup>。

采用倾倒平板法。

### 2) 酵母菌的分离。

参照文献[12]稍有修改。分别取稀释度为  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  的菌液 1 mL 倾注于酵母粉-葡萄糖琼脂培养基, 28 °C 培养 2~3 d, 观察菌落形态, 选定可疑菌落反复进行平板划线和镜检, 挑取纯菌落接种于真菌选择性培养基(含有 2 mL 质量分数为 2 % 的去氧胆酸钠溶液和 0.33 mL  $10 \text{ ku} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素溶液的孟加拉红)中, 制作水浸片, 用高倍镜观察酵母菌细胞形态、大小及出芽生殖方式。

### 3) 酵母菌的鉴定及其生化特征。

a. 菌丝观察。用玉米粉琼脂平板法观察假菌丝的有无及形态。

b. 碳水化合物的利用。使用 API 20C AUX 酵母菌鉴定系统(Analysis Profile Index, BioMérieux, France), 选用葡萄糖苷、甘油、2-酮基-葡萄糖酸盐等 19 种不同碳水化合物为底物进行测定。

c. 酵母菌的鉴定使用 API Lab Plus V3.0 Version(bioMérieux, France) 菌种鉴定系统, 酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) CGMCC 2.604 作为模式菌株。

## 3 实验结果与分析

### 3.1 苹果原料菌落总数

在 30 d 内测定的 15 个批次的样品中, 苹果原料的菌落总数为  $10^5 \sim 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。菌落总数较高且波动幅度较大的原因主要是, 从果汁厂生产线上采集的原料果质量不均衡, 残次率 > 30 %。

法国、美国等果汁消费量较大的国家, 果汁加工厂拥有自己的原料基地, 且规定原料果残次率 < 30 %, 表面菌落总数 <  $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。由此说明稳定的原料来源和严格的管理能够在很大程度上减小果汁加工中微生物污染的可能性。

### 3.2 酵母菌的鉴定

#### 1) 菌体形态。

从苹果原料中分离出 25 株酵母菌, 28 °C 培养 48 h 后, 酵母粉-葡萄糖琼脂培养基平板上菌落呈圆形突起, 乳白色, 边缘整齐, 有光泽, 不透明, 湿润, 直径 1~2 mm; 孟加拉红琼脂平板上菌落呈圆形, 淡粉色, 随着培养时间的延长, 颜色逐渐加深。AUX-1 显微镜下观察, 菌株均为椭圆或卵圆形, 芽殖, 成株状连在一起或单独存在, AUX-4 有两端出芽的现象。

#### 2) 糖同化反应结果。

分离得到的 6 个种酵母菌的糖同化反应结果和菌丝观察结果见表 1。模式菌酿酒酵母菌不能利用海藻糖, 而分离到的 5 株 AUX-2 中有 2 株糖同化反应结果与模式菌相同, 其余 3 株则能够利用海藻糖。分离到 2 株 AUX-4, 其中 1 株能够利用 2-酮基-葡萄糖酸盐(2-KG); 13 株 AUX-3 和 2 株 AUX-5 糖同化反应结果相同。

#### 3) 酵母菌鉴定结果。

分离到 25 株菌酵母菌, 鉴定结果见表 2。从苹果中分离得到的酵母菌为 3 个属: 酿酒酵母菌属、克勒克酵母菌属和假丝酵母菌属, 其中绝大部分为假丝酵母菌属。假丝酵母菌属包括近 200 个种, 采用常规分类方法很难做出精确的鉴定。本实验中采用 API 20C AUX 菌种鉴定系统鉴定的假丝酵母菌, 鉴定准确率均超过 95 %, 相似度 > 0.90, 且不需要附加实验, 48 h 即可得出结果。由此可见, 该系统能够快速、准确地鉴定苹果原料中的酵母菌。

表1 从苹果原料中分离到的酵母菌的生化特性

Table 1 Biochemical characteristics of yeast strains isolated from apple

测定指标	菌名(代号)					
	酿酒酵母菌 (AUX-2)	热带假丝酵母菌 (AUX-1)	克柔/平常假丝酵母菌 (AUX-3)	克勒克酵母菌属 (AUX-4)	乳酒假丝酵母菌 (AUX-5)	木蓝假丝酵母菌 (AUX-6)
空白	-	-	-	-	-	-
葡萄糖苷	+	+	+	+	+	+
甘油	-	-	+	-	-	+
2-KG	-	+	-	- / +	-	-
L-阿拉伯糖	-	-	-	-	-	-
D-木糖	-	+	-	-	-	-
阿东醇	-	+	-	-	-	-
木糖醇	-	-	-	-	-	-
GAL	+	+	-	-	+	-
肌醇	-	-	-	-	-	-
山梨醇	-	+	-	-	-	-
-甲基-D-葡萄糖	-	+	-	-	-	-
N-乙酰-葡萄糖苷	-	+	+	-	-	-
纤维二糖	-	-	-	+	-	-
乳糖	-	-	-	-	+	-
麦芽糖	+	+	-	-	-	-
己糖	+	+	-	-	+	-
海藻糖	- *	+	+	-	-	-
松叁糖	-	+	-	-	-	-
绵子糖	+	+	-	-	+	-
HYPHE	-	+	+	-	+	-

注：“+”为反应阳性，“-”为反应阴性，“\*”为模式菌反应结果；“2-KG”为2-酮基-葡萄糖酸盐，HYPHE为菌丝观察反应。

表2 API 20C AUX菌株鉴定系统对苹果原料中酵母菌株的鉴定结果

Table 2 The identification results obtained with API 20C AUX system

代号	鉴定结果	菌株数	鉴定准确率/%	T相似度	鉴定结果评价	代号	鉴定结果	菌株数	鉴定准确率/%	T相似度	鉴定结果评价
AUX-1	热带假丝酵母菌	1	95.8	1.00	好	AUX-4	克勒克酵母菌属	1	99.3	1.00	很好
模式菌	酿酒酵母菌		98.7	1.00	极好	AUX-4	克勒克酵母菌属	1	99.0	1.00	极好
AUX-2	酿酒酵母菌	5	99.5	0.88	好	AUX-5	乳酒假丝酵母菌	1	99.8	0.92	极好
AUX-3	克柔/平常假丝酵母菌	13	98.9	0.91	好	AUX-6	木蓝假丝酵母菌	2	97.2	0.95	好

## 4 结 论

1) 从苹果原料中分离到 3 个属的酵母菌 25 株, 分别为假丝酵母菌属、酿酒酵母菌属和克勒克酵母菌属, 其中绝大部分为 17 株为假丝酵母菌属。

2) API 20C AUX 菌种鉴定系统能够快速、准确地鉴定苹果原料中的酵母菌, 鉴定准确率 > 95%, 且不需要附加实验。

## 参 考 文 献

- [1] 侯风伶, 申志新, 张淑红. 热带假丝酵母菌引起保健饮品变质的检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(6): 709
- [2] Borst A, Hall M, Verhoef J, et al. Detection of *Candida* spp. in blood cultures using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2001, 39: 155 ~ 160
- [3] Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. Spoilage yeasts in the wine industry[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86: 23 ~ 50
- [4] Thomas D S. Yeasts as spoilage organisms in beverages. The Yeasts[M]. London: Academic Press, 1993: 517 ~ 561
- [5] Tudor E, Board R. Food—spoilage yeasts. The Yeasts [M]. London: Academic Press, 1993: 435 ~ 516
- [6] Deak T, Beuchat L R. Handbook of food spoilage yeasts [M]. New York: CRC Press, 1996: 61 ~ 95
- [7] Sancho T, Gimenez-Jurado G, Malfeito-Ferreira M, et al. Zymological Indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates[J]. Food Microbiology, 2000, 17: 613 ~ 624
- [8] Bernal S, Mazuelos E M, Chavez M, et al. Evaluation of the new API Candida system for identification of the most clinically important yeast species [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1998, 30: 653 ~ 658
- [9] 谢小保, 欧阳友生, 陈仪本, 等. API 系统鉴定化妆品及一次性卫生用品微生物种类的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(1): 7 ~ 8
- [10] 吴平. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 11 ~ 13
- [11] 王绍树主编. 食品微生物实验[M]. 天津: 天津大学出版社, 1996. 120 ~ 125
- [12] 周德庆主编. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 197 ~ 227