

四株发酵豆乳酵母菌的分离与鉴定

张智维,刘玉婷,缙敬轩

(陕西科技大学生命科学与工程学院,西安 710021)

摘要 以发酵豆乳为材料,分离出四种酵母菌,并对其进行了初步的分离鉴定和发酵性能试验。结果表明:四种酵母菌在豆乳的发酵过程中,菌体生长代谢旺盛,具有互补性,用其制作的豆乳既有大豆的香味,也有酒精的醇香味,口感易被接受。与乳酸菌发酵豆乳相比,口感有明显的区别。

关键词 豆乳;发酵;酵母菌;分离;鉴定

中图分类号 Q815 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)05-0791-04

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF FOUR STRAINS OF YEAST FROM FERMENTED SOY-BEANMILK

ZHANG Zhi-wei, LIU Yu-ting, GOU Jing-xuan

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021)

Abstract Four strains of yeast were separated from fermented soybean milk, and the fermentation characters of the separated strains were carried out. The results showed that during fermentation, the yeasts grow well and complementary to each other. The fermented soybean milk had the aroma of both soybean and alcohol, thus it could be accepted easily. It had significant difference compared with the lactic acid bacteria fermented soybean milk.

Key words Soybean milk; Fermentation; Yeast; Separation; Identification

以牛羊乳为原料加工的酸乳制品,经历了长期的自然接菌的发酵阶段后,发展成为人为接入发酵菌种的定向发酵过程^[1,2],其加工中应用的菌种主要有^[3~5]乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)中的德氏乳杆菌(*Lactobacillus Delbruckii*)、植质乳杆菌(*L. plantarum*)、乳酸乳杆菌(*L. lactis*)、保加利亚杆菌(*L. bulgaricus*)和链球菌属(*Streptococcus*)中的乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)、乳酪链球菌(*Streptococcus cremoris*)、乳质链球菌(*Streptococcus laealts*)和醋酸乳酸双重链球菌(*Streptococcus diacetylactis*)。

20 世纪 80 年代初至目前,以畜乳(10% ~

30%)与豆乳液为原料,进行的发酵豆乳开发研究中,据 2002 年检索资料表明^[6],发酵豆乳的应用菌已经扩大到乳酸菌与单株酵母菌,乳酸菌与酵母菌和双歧杆菌,单株酵母菌进行发酵的专利和报道,而采用多种酵母菌进行混合发酵的报道尚未查出。在酵母菌中,使用较多的是葡萄汁酵母(*Saccharomycea uvarum*)、粟酒裂殖酵母(*Sacchizosaccharomyces pombe*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)等。采用数种酵母菌进行混合发酵豆乳制品的工作尚未见诸报道。该研究就是要分离出适合于豆乳发酵的酵母菌,增

加豆乳制品的花色品种。

1 材料与仪器

1.1 材料

麦芽汁液体培养基,麦芽汁固体培养基,无菌生理盐水,豆乳等。

1.2 药品

葡萄糖,蔗糖,麦芽糖,半乳糖,乳糖,棉子糖,蜜二糖,纤维糖,D-木糖,可溶性淀粉,D-阿拉伯糖,L-阿拉伯糖,乙醇,杨梅苷,硝酸钾,硫酸氨,琼脂,氯化钠等。

1.3 仪器

无菌操作台,光学显微镜,恒温培养箱,高压灭菌锅,干燥箱,培养皿,试管,涂布器,移液管等。

2 试验方法

2.1 原料发酵豆乳的制备

将新鲜豆乳放置入 25 ~ 28℃ 的恒温培养箱中,培养 24 ~ 48 h 后,就可以进行酵母菌的分离。

2.2 发酵豆乳中酵母菌的分离

2.2.1 发酵豆乳的稀释^[7] 取 25 mL 发酵豆乳,加入盛有 225 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,充分混匀,其浓度为 10⁻¹;从以上三角瓶中吸取 1 mL 稀释液,加入 9 mL 无菌生理盐水的试管中,充分混匀,其浓度为 10⁻²;再从 10⁻²的试管中取1 mL稀释液,加入 9 mL 无菌生理盐水的试管中,充分混匀,其浓度为 10⁻³;依次将溶液稀释到 10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷,备用。

2.2.2 酵母菌的分离培养^[8] 将加热溶化的麦芽汁固体培养基,在无菌条件下倒入无菌培养皿中,每皿培养基的用量控制在 15 ~ 20 mL,室温下冷却凝固,备用。分别取 10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷稀释液各0.1 mL 加入以上培养皿中,用无菌涂布器涂抹均匀,置 25 ~ 28℃ 的恒温培养箱中培养 24 ~ 48 h。取出培养皿,对长出的菌落进行观察。挑选不同形态的酵母菌菌落,镜检。对纯的菌种进行保存;如果不纯,再划线分离,直到分纯为止并保存。对所保存的菌种进行液体培养,观察培养特征;固体培养观察菌落特

征;然后进行糖发酵、碳源同化及氮源同化试验。

2.3 分离菌株发酵豆乳性能测定及品尝

在新鲜的豆乳中加入一定量的糖,灭菌后待冷却到 35℃ 左右时,接入分离出的四种菌,28 ~ 30℃ 发酵 48 h,然后 4 ~ 5℃ 后熟菌 24 h,制成发酵豆乳制品。随机选 30 人,对发酵豆乳进行品尝打分。

2.4 分离菌株的安全性(动物急毒试验)检查

做了急毒性试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验和 Aems 试验。做法见参考文献[9]。

3 结果与讨论

3.1 分离菌株的培养特征和形态学特征

以发酵豆乳为原料,用麦芽汁固体培养基进行分离,从培养平板上分离出了不同特征的 4 株酵母菌,分别记作 Y1、Y2、Y3 和 Y4,它们的培养特征和形态学特征见表 1。

3.2 分离菌株的生理生化特性

对分离菌株进行鉴定,就要对其做生理生化实验,然后根据生理生化实验结果,参考相关资料^[10,11],判断分离菌株具体属于哪一类酵母菌。生理生化实验包括以下两个内容:生理与碳源发酵特性实验以及碳源、氮源同化实验。

3.2.1 分离菌株的生理与碳源发酵特性结果 菌株的生理与碳源发酵特性是菌种鉴定的一项重要内容。试验中对分离菌株的生理特征(培养的最适温度、pH 值,培养时间以及对氧的需求)都进行了试验,同时还对 9 种碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、蜜二糖、蜜三糖、水苏糖以及果糖)进行了发酵试验,结果见表 2。

3.2.2 分离菌株的碳源、氮源同化实验结果 菌株的碳源、氮源同化试验也同样是菌种鉴定必不可少的内容之一,试验结果对菌株的鉴定起着决定性作用。在碳源同化试验中,选取葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等 14 种碳源,氮源同化试验中,选择硝酸钾和硫酸氨,结果见表 3。

表 1 分离菌株的培养特征和形态学特征

Table 1 Culture character and morphologic character of separated strains

	培 养 特 性 Culture character										形态学特性与 染色反应 Morphologic characteristic and coloration reaction
	固 体 培 养 特 性 Solid cultural characteristics					液 体 培 养 特 性 Liquid cultural characteristics					
	菌落形态 Form of colony	直径大小 Diameter /μm	颜色 Colour	凸凹 Protruding or concave	边缘 Brim	质地 Character	菌液清混 Liquid turbidity	沉淀 Deposition	菌膜 Velum	菌环 Fungus loop	
Y1	圆形	3 ~4	乳白	凸起	整齐	半透明 油滴状	微混	少许	无	无	圆形、椭圆形、有出芽
Y2	圆形椭圆形	3 ~5	乳白	微凸	整齐	半透明 油滴状	上清 下混	有沉淀呈 颗粒状	无	少量	卵圆形、两端钝圆、微 曲、粗肠形、1 ~ 2 个 出芽
Y3	椭圆形	2 ~4. 5	微黄或 乳白色	微凸	整齐	半透明 油滴状	清	有沉淀	无	无	卵形或长卵形 3. 5 ×8 μm、 2. 5 ~7. 0 × 4. 5 ~11. 0 μm
Y4	圆形或 椭圆形	3 ~4	奶油或 淡黄色	平滑	整齐	半透明 油滴状	微混	沉淀呈 烟丝状	无	无	卵形或长卵形 9 ×6 ~4 μm

表 2 分离菌株的生理与碳源发酵特性

Table 2 Physiology character and carbon source fermentation character of separated strains

	生理特性 Physiology character				碳源发酵特性 Carbon fountain fermentation character								
	培养最 宜温度 Optimum temperature	生长最 宜 pH 值 Optimum pH	生长培 养时间 Culture time/h	对氧需求 Oxygen demand	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	麦芽糖 Maltose	乳糖 Lactose	半乳糖 Galactose	蜜二糖 Melibiose	蜜三糖 Taffinose	水苏糖 Stachyose	果糖 Fructose
Y1	25 ~28	6. 0 ~6. 5	48	好氧或 兼性	+	+	±	-	+	±	±	±	+
Y2	25 ~28	6. 0 ~6. 5	48	好氧或 兼性	+	+	±	-	+	±	±	-	+
Y3	28	6. 0 ~6. 5	48	好氧或 兼性	+	+	-	+	+	-	±	-	+
Y4	28	6. 0 ~6. 5	48	好氧或 兼性	+	-	-	+	+	-	+	±	+

表 3 分离菌株的碳源、氮源同化结果

Table 3 The result of separated strains's carbon and nitrogen assimilation

	碳 源 同 化 Carbon													氮源同化 Nitrogen		
	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	麦芽糖 Maltose	半乳糖 Galact- ose	乳糖 Lactose	棉子糖 Raffin- ose	蜜二糖 Melibi- ose	纤维糖 Fiber	D-	可溶性 淀粉 Solubi- lity starch	D-阿	L-阿	乙醇 Ethanol	杨梅苷 Myric- itrin	硝酸钾 Potass- ium nitrate	硫酸氨 Ammo- nium sulfate
									木糖		拉伯糖	拉伯糖				
									D- xylose		D-ara- binose	L-ara- binose				
Y1	+	+	+	+	±	+	±	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Y2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	±	-	-	+
Y3	+	+	-	+	+	+	-	±	-	-	-	+	±	-	-	+
Y4	+	+	±	±	+	+	±	-	-	-	-	-	+	±	-	+

3.3 发酵豆乳品尝结果

随机选 30 人,对发酵好的豆乳进行品尝打分,该产品既有大豆的香味,还有淡淡的酒精味,其口感得到了大家的普遍认可,只是发酵豆乳的色泽不是很令人满意,这也是今后这项研究工作要解决的一个重点。

3.5 分离菌株的安全性(动物急毒试验)检查结果

急毒性试验、小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验、Aems 试验结果表明,选育菌株安全可靠,符合食品安全性要求。选育菌的安全性试验结果和对豆乳的发酵的试验结果另文报道。

4 结论

4.1 发酵豆乳性能测定及品尝试验表明,用四种酵母菌混合制作口感良好的发酵豆乳是可行的。

4.2 综合分离出的菌株的培养特征与形态学特征和生物化学实验结果,初步判定这四种酵母菌分别为 Y1:酵母科酵母菌属的葡萄汁酵母;Y2:酵母科酵母菌属的酿酒酵母;Y3:乳酒假丝酵母;Y4:乳糖酵母。

4.3 安全性试验结果表明,分离出的四种菌是安全的,符合食品安全性要求,可用于发酵豆乳的制作。

4.4 豆乳经过酵母发酵后,大分子的糖类和蛋白类

得到了充分的降解,更有利于消化吸收,有利于人们健康水平的提高。

参 考 文 献

[1] 王福源. 现代食品发酵技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999,32-37.

[2] 许本发,李宏建,柴金贞. 酸奶和乳酸菌饮料加工[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994,21-32.

[3] 郑建仙. 功能食品[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995,551-543.

[4] 王文仲. 应用微生物学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1996,324-336.

[5] 康明官. 中外著名发酵食品生产手册[M]. 北京:化学工业出版社,1997,69-72.

[6] 杜同胜. 豆奶生产技术[M]. 北京:中国食品出版社,1989, 113-118.

[7] 徐浩,洪俊华,陈国强,等. 工业微生物基础及应用[M]. 北京:科学出版社,1991,262-270.

[8] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 天津:天津科学出版社,1992,290-301.

[9] 食品卫生学编写组. 食品卫生学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999,68-97.

[10] 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,1978,89-96.

[11] 方心芳. 应用微生物学实验法[M]. 北京:中国轻工业出版社,1993,38-45.

欢迎订阅 2008 年《植物营养与肥料学报》

《植物营养与肥料学报》为中国植物营养与肥料学会主办,国内外公开发行的专业性学术刊物。属中国科技核心期刊;中文核心期刊;中国农业核心期刊。为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”以及《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科学引文数据库》和《美国化学文摘》来源期刊。主要报道本学科具有创见性的学术论文、新技术和新方法、研究报告、简报、文献评述和问题讨论等。其主要包括土壤、肥料和作物间的关系,养分变化和平衡;各种肥料在土壤中的变化规律和配施原理;农作物遗传种质特性对养分反应;作物根际营养;施肥与环境;施肥与农产品品质;农业生物学和生物化学应用;肥料的新剂型新品种的研制、应用及作用机理;本学科领域中新手段、新方法的研究以及与本学科相关联的边缘学科等。

2008 年的《植物营养与肥料学报》,为双月刊,大 16 开本,页码增至 200 页,单月 25 日出版,定价 28 元,全年 168 元。邮发代号:82-169。可通过全国各地邮局订阅,也可直接汇款到编辑部办理订阅。

本刊网站(<http://www.plantnutrifert.org>)已经开通,欢迎作者进行在线投稿,查阅稿件处理情况及了解本刊的更多信息。

地 址:100081 北京市中关村南大街 12 号

中国农科院资源区划所《植物营养与肥料学报》编辑部

电 话:010-68918653

E-mail:zwylf@caas.ac.cn zwylf@chinajournal.net.cn