

简易气调贮藏绿芦笋表面微生物的初步检测与鉴定

高文庚¹, 畅晓渊², 于雅琼², 李平兰^{2,*}

(1.运城学院生命科学系, 山西 运城 044000; 2.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 对简易气调(MA)贮藏过程中不同部位绿芦笋表面菌落总数随贮藏时间的变化规律进行研究, 并对从绿芦笋表面分离到的菌株进行初步鉴定。结果表明: 经简易气调贮藏的绿芦笋前 10d 表面微生物数量增长较缓慢, 之后其数量骤然增加, 贮藏到第 14 天时达到 7.40×10^7 CFU/g, 其后随着贮藏时间延长微生物数量略有减少。在绿芦笋贮藏后期, 从其表面共分离到细菌 24 株, 分属于埃希氏菌属、假单胞菌属、欧文氏菌属和微球菌属等 10 个属; 真菌 8 株分属于青霉属、交链孢霉属、腐霉属、酵母属。

关键词: 绿芦笋; 简易气调(MA)贮藏; 微生物; 分离鉴定

Preliminary Detection and Identification of Microorganisms on the Surface of Green Asparagus during Modified Atmosphere Storage

GAO Wen-geng¹, CHANG Xiao-yuan², YU Ya-qiong², LI Ping-lan^{2,*}

(1. Department of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China;

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

Abstract: This paper reports the observation of changes in total count of bacteria colonies on the surface of scale leaves and on the root cross-section of green asparagus during modified atmosphere (MA) storage and the preliminary isolation and identification of isolated microorganisms. There was a very slow increase in microbial population during the first 10 days of MA storage, followed by a sudden increase, reaching up to 7.40×10^7 CFU/g on the 14th day. Subsequently, microbial population decreased slightly with prolonged length of storage time. A total of 24 bacterial strains 8 fungal strains were isolated from the surface of green asparagus that began to decay, which were identified to belong to *Pediococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Sporosarcina*, *Alcaligenes* or *Acetobacter* and to belong to *Penicillium*, *Alternaria*, *Pythium* or *Saccharomyces*.

Key words: green asparagus; MA storage; microorganisms; separation and identification

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)11-0209-05

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)又名石刁柏、龙须菜, 百合科天门冬属多年生宿根草本植物。其嫩茎味道鲜美、脆嫩爽口, 具有丰富的营养价值和药用价值^[1], 被列为世界十大名菜, 深受许多国家和地区消费者的欢迎, 是收益颇高的创汇农产品。近几年, 由于绿芦笋的营养价值逐渐被人们所认识, 年消费量在逐年上升。

芦笋采收后生理代谢活跃、呼吸旺盛, 致使营养物质大量损耗, 极易变质腐烂。研究表明, 简易气调贮藏(modified atmosphere, MA)时, 用塑料薄膜袋包装的绿芦笋在 8~11℃ 时可保鲜 7~10d, 在 0~1℃ 时为

30d^[2], 是适合绿芦笋贮藏保鲜的一种最佳方法。芦笋采收时因切割部位营养物质外流, 致使微生物生长繁殖加速, 从而影响其品质和货架期。研究绿芦笋简易气调贮藏过程中微生物菌群的变化规律, 可以为绿芦笋贮藏期间微生物生长模型的建立以及预测鲜芦笋的货架期提供有效的依据, 同时可以为控制绿芦笋表面微生物数量和有针对性地杀灭有害菌, 排除食品安全隐患提供依据。

目前对于芦笋的保鲜研究主要集中在采后生理^[3]及贮藏保鲜技术的研究, 如气调^[4-5]、贮前热处理^[6]、冷

收稿日期: 2010-04-27

作者简介: 高文庚(1968—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: gw_g_jhy@163.com

* 通信作者: 李平兰(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学和发酵工程。E-mail: lipinglan420@126.com

藏^[7-8]、减压贮藏^[9]等,而对其采后表面微生物菌群变化^[7]及采后致病菌的系统研究报道很少,主要是对部分地区贮藏芦笋致病真菌的分离鉴定。其中上海市场销售芦笋检出主要病原真菌为链格孢、灰霉菌、层出镰刀菌和胶孢镰孢菌,以镰刀菌占较大比重^[10],而河北省容城市 and 雄县所产绿芦笋检出病原真菌为天门冬拟茎点霉和串珠镰孢菌^[11]。本实验选用山西运城市芦笋生产基地的绿芦笋为材料,研究简易气调贮藏过程中其不同部位表面菌落总数随贮藏时间的变化规律,并对贮藏后期绿芦笋表面微生物进行分离和初步鉴定,以期绿芦笋贮藏中特定腐败菌的确立及有效防腐措施的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜绿芦笋分别采自夏县水头镇、永济市芦笋生产基地,采后预冷并尽快送达实验室。选长23cm左右,直径1.2~1.5cm,整株鲜绿、顶部鳞片紧密、茎干直立的绿芦笋,经整理称质量成捆分装于0.05mm聚乙烯保鲜袋,袋口密封。顶部打直径0.5~0.8cm的小孔2~3个,直立于冰箱中4~6℃冷藏。

1.2 培养基

营养琼脂培养基(添加部分绿芦笋嫩茎鲜榨汁)用于分离细菌及测定细菌菌落总数;麦康凯培养基、伊红美蓝琼脂培养基、MRS培养基、孟加拉红培养基、PDA培养基、麦芽汁琼脂平皿培养基等按GB/T 4789.28—2003《食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂》相关规定配制。

1.3 仪器与设备

BCD-227B冰箱 中国青岛海尔电冰箱公司;YXQ-SG41.280高压锅 上海医用核子仪器厂;DG/20-00Z干燥箱 重庆试验设备厂;HPG-280B恒温培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发公司;HHS恒温水浴锅 天津市华北实验仪器有限公司;手动菌落计数器 西班牙IUL有限公司;SZX-10130超净工作台 上海浦东荣丰科学仪器有限公司;BagMixer拍击式均质器 法国Interscience公司;BM-3型显微镜 上海精密仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 微生物学指标测定

按中华人民共和国国家标准GB/T 4789.2—2008《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》测定菌落总数;GB/T 4789.10—2008《食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》检验金黄色葡萄球菌。

1.4.2 简易气调贮藏后期绿芦笋表面微生物的采集与分离

在超净工作台上称取检样25g,置于225mL已灭菌的生理盐水(含体积分数0.2%的吐温-80)中,均质器拍打1min,供稀释检测用。

采用平板稀释分离法进行菌种分离计数,挑取单个菌落,传代分离两次,然后纯培养,斜面保存以便鉴定。

1.4.3 分离菌的鉴定

对分离到的细菌菌种进行菌体形态特征观察,并利用生理生化特征实验来鉴定。生理生化特征实验主要进行接触酶实验、糖分解实验、液化明胶实验、耐盐性实验、对氧需求实验等,根据《伯杰细菌鉴定手册》^[12]和《常见细菌系统鉴定手册》^[13]进行鉴定。

霉菌通过肉眼观察分离菌落形态特征,显微镜观察菌丝、孢子及产孢结构特征,然后参照《真菌鉴定手册》^[14]、《植物病原真菌学》^[15]进行鉴定。酵母菌主要通过观察形态特征,结合硝酸盐还原实验、脲酶实验和葡萄糖发酵实验,参照《真菌鉴定手册》^[14]和《酵母菌的特征与鉴定手册》^[16]进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 简易气调贮藏绿芦笋表面微生物数量测定

绿芦笋在4~6℃简易气调贮藏过程中,前10d笋尖深绿、茎直立,品质良好,风味较好,第11天开始有部分笋尖部位出现轻微腐烂,并伴有轻度异味,下部切口处变化不明显;14d后部分笋尖出现软烂,切口部位有约1cm高度呈水渍状;贮藏至22d时个别笋头鳞片部彻底软烂,失去外形,有恶臭气味。对贮藏过程中不同时间段不同部位取样进行微生物菌落总数检测,结果见图1。

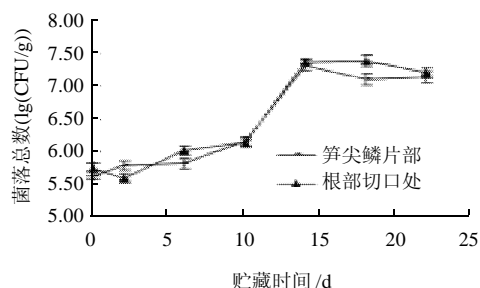


图1 简易气调贮藏绿芦笋表面菌落总数变化情况

Fig.1 Changes in total count of bacteria colonies on the surface of scale leaves and on the root cross-section of green asparagus during MA storage

由图1可以看出,笋尖部位与切口处微生物数量的变化趋势大致相同。前10d微生物数量增长较缓慢,保持在 10^6 CFU/g以内,10d后数量骤然增加,到第14天达到 7.40×10^7 CFU/g,其后随着贮藏时间延长微生物数

量略有减少。分析两部位微生物数量变化规律一致的原因,可能与绿芦笋头部组织幼嫩,呼吸旺盛,贮藏袋中湿度较大,水分易渗入头部鳞片缝隙并在表面形成水膜,为微生物的生长繁殖提供了较好的生存环境,而根部切口处有营养物质外流,为微生物生长提供条件。在贮藏初期由于绿芦笋嫩茎呼吸作用强烈,保鲜袋中的O₂体积分数迅速降低,CO₂体积分数升高,并且环境温度降低到5℃左右,环境条件的改变起到了一定的抑菌效果。经过一段缓慢期后,微生物数量开始快速增加,直至后期呈现出绿芦笋腐烂迹象,环境pH值发生变化,微生物数量达到一个相对稳定状态。

2.2 简易气调贮藏绿芦笋表面微生物的分离检测结果

2.2.1 细菌

当贮藏绿芦笋表面出现腐烂时,从其表面分阶段取样,经培养基分离、纯化培养,共分离出优势细菌24株。对特殊菌落(如菌落大而扁平,边缘有缺刻形状不太规则的等)进一步分离做穿刺培养或特殊染色,判断其运动性或特殊结构。典型细菌菌落、菌体形态特征以及各菌株的生理生化特征观察结果分别见表1~3。

表2 细菌菌体形态特征

Table 2 Mycelial morphology of separated bacterial strains

菌株代号	形状	运动性	革兰氏染色
G3	球状、成对或四联、无芽孢	—	+
G2、G4、Y4、Y10	直杆状、单个、无芽孢	+	—
G5、Y12	球状、成对或堆状、无芽孢	—	+
G6、G8、G9、Y2、Y3	直杆状、单个、无芽孢	+	—
G10	球状、成对或链状、无芽孢	—	+
G11	成对、四联、少数规则的四方形排列、中生芽孢	+	+
Y1、Y9	单个、成对或形成不规则的群	—	+
Y5、Y7、G1	杆状、单个、成对、无芽孢	+	—
Y6、Y8	直杆状、两端钝圆、单个、无芽孢	+	—
Y11、G7	球杆或球状、单个	+	—
Y13	杆状、单个、成对或成短链、无芽孢	—	—

注: +. 阳性; —. 阴性。

根据表1~3结果,结合菌落形态和菌体形态特征分析,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常用细菌鉴定手册》对各菌株进行初步鉴定,结果如下:G3为马脲片球菌(*Pediococcus urinaeequi*)、G2、G4、Y4、

表1 分离的单个菌落形态特征

Table 1 Colonial morphology of separated bacterial strains

菌株代号	单菌落形态
G3	直径2mm、边缘整齐、圆形、湿润光滑、半透明、奶油白、易挑起
G2、G4、Y4、Y10	3mm×4mm、扁平、边缘不整齐、块状、较湿润不光滑、半透明、有淡黄绿色、易挑起
G5、Y12	直径小于0.5mm、边缘整齐、小而圆、湿润光滑、略突起,半透明、黄色、易挑起
G6、G8、G9、Y2、Y3	直径3mm、边缘圆形齿状、圆形、湿润光滑、半透明、灰白色、易挑起
G10	直径为0.5~1mm、圆形、边缘整齐、有光泽、质地光滑、发黏、灰白色、易挑起
G11	直径为3mm、圆形、边缘略粗糙、乳白色、不透明、易挑起
Y1、Y9	直径为2mm、圆形、边缘整齐、有光泽、黄色、不透明、易挑起
Y5、Y7、G1	直径为3mm、边缘不整齐、无光泽、不透明、表面干燥、微黄色、易挑起
Y6、Y8	直径为3mm、扁平、边缘不整齐、湿润不光滑、半透明、略带绿色、易挑起
Y11、G7	直径小于2mm、圆形、边缘整齐、有光泽、质地光滑、珍珠状、半透明、易挑起
Y13	边缘整齐、边缘整齐、有光泽、质地光滑、淡灰色、半透明、易挑起

表3 分离菌的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical properties of separated bacterial strains

菌株代号	接触酶	氧化酶	乳糖		蔗糖		葡萄糖		明胶水解	淀粉水解	NaCl添加量/(g/100mL)(耐盐性)				对氧需求
			产酸	产气	产酸	产气	产酸	产气			3	5	7	10	
G3	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	+	+	+	兼性厌氧
G2、G4、Y4、Y10	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	(+)	—	—	好氧
G5、Y12	+	(+)	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—	好氧
G6、G8、G9、Y2、Y3	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	兼性厌氧
G10	—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	兼性厌氧
G11	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	好氧
Y1、Y9	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+	+	兼性厌氧
Y5、Y7、G1	+	—	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	兼性厌氧
Y6、Y8	+	+	—	—	+	—	+	—	+	—	+	(+)	—	—	好氧
Y11、G7	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	(+)	—	—	严格好氧
Y13	+	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	严格好氧

注: +. 阳性; —. 阴性; (+). 弱阳性。

表4 真菌的形态特征
Table 4 Colonial morphology of separated fungal strains

菌株代号	菌落形态特征	菌体形态特征
ZF1、ZF3、ZF4、YF3	菌丝生长较缓慢，只在接种处周围生长，菌落略突起，呈细小绒毛状，较紧密。最初呈淡黄色，随着菌丝生长正面为蓝绿色，背面为褐黄色，菌落边缘有白色绒毛装菌丝，并出现较为规则的同心轮纹。	菌丝细长无色，有隔膜，无足细胞，有典型的扫帚状分生孢子头，分枝2~3次，不对称，小梗顶端生有分生孢子，链状排列，不分枝，分生孢子为长球形。
ZF2、YF1	生长速度快，菌落呈绒毛状，较疏松，呈墨绿色或黑色，有明显轮纹感，气生菌丝灰色，近似圆形，中间发达。	菌丝分枝，有隔膜，分生孢子梗不分枝，深色，顶端形成分生孢子，卵形或倒棍棒形，常形成链，有1~6个横膈，顶端有喙状的附属丝，未观察到有性孢子。
YF2	菌丝生长较快，气生菌丝发达，菌落呈疏松的绒毛状。初期菌落呈白色，后渐变为粉色，背面中心为褐色，边缘菌丝为淡粉色，菌落近似圆形，有轮纹感，气生菌丝白色，中间较发达。	菌丝有不规则分枝，孢囊顶生或间生，近球形，孢子呈纺锤形或长球形。刺激培养时可形成有性菌态，同宗配合，藏卵器球形，间生；雄器多为1个，异丝生，卵孢子球形。

Y10 为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、G5、Y12 为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、G6、G8、G9、Y2、Y3 为大肠埃希氏菌(*Escherichia coil*)、G10 为明串珠菌属(*Leuconostoc*)、G11 为脉芽孢八叠球菌(*Sporosarcina ureae*)、Y1、Y9 为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、Y5、Y7、G1 为欧文氏菌属(*Erwinia*)、Y6、Y8 在 42℃ 不能生长，故判断其可能为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescent*)、Y11、G7 进行石蕊牛奶反应产碱变蓝色，基本确定为粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、Y13 为醋杆菌属(*Acetobacter*)。其中 Y13 贮藏中期可检测到，后期无检出，说明随着绿芦笋腐烂程度加大，pH 值增高，醋酸杆菌生长受到抑制。

2.2.2 真菌

从绿芦笋表面分离纯化出酵母菌较少，只有 1 株，其菌落呈乳白色、圆形、中心凸起，表面湿润，边缘整齐，菌体为圆形，单极芽殖，偶有假菌丝，可产圆形或卵圆形囊孢子，硝酸盐和脲酶实验为阴性，经葡萄糖发酵培养两周有气体产生，初步判断其属于酵母属(*Saccharomyces*)。

分离到霉菌 7 株，典型霉菌菌株的生物学特性见表 4。根据真菌的菌落特征和菌体形态特征，初步判断 ZF1、ZF3、ZF4、YF3 属于半知菌亚门(*Fungi Imperfecti*) 丛梗孢目(*Moniliales*)的丛梗孢科(*Moniliaceae*)青霉属(*Penicillium*)；ZF2、YF1 属于暗梗孢科(*Dematiaceae*)交链孢霉属(*Aternaria*)；YF2 属于卵菌纲(*Oomycetes*)霜霉目(*Perenosporales*)腐霉科(*Pythiaceae*)腐霉属(*Pythium*)。

3 结 论

3.1 绿芦笋采用 4~6℃ 简易气调贮藏，其贮藏品质与

微生物数量变化关系密切。笋尖部位与切口处微生物数量的变化趋势大致相同，前 10d 增长较缓慢，此后细菌数量骤然增加，到第 14 天达到 7.40×10^7 CFU/g，贮藏后期微生物数量略有减少。由此看出，加强绿芦笋采收规范操作，合理进行预处理，控制微生物污染种类及数量是减缓绿芦笋腐烂、延长贮藏期的重要措施。

3.2 从贮藏后期绿芦笋的表面分离到细菌 24 株，真菌 8 株。经形态学和生理生化特征分析，初步鉴定结果如下：细菌主要有马脲片球菌(*Pediococcus urinaeequi*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coil*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、脉芽孢八叠球菌(*Sporosarcina ureae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescent*)、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)。真菌属于青霉属(*Penicillium*)、交链孢霉属(*Aternaria*)、腐霉属(*Pythium*)和酵母属(*Saccharomyces*)。绿芦笋表面微生物主要来源于土壤及采收、贮藏包装等环节的污染，其种类复杂，且有些可能为绿芦笋的病原微生物，有待后期进一步研究。

参考文献：

- [1] RAMPERSAUD G C, KAUWELL G P, BAILEY L B. Folate: a key to optimizing health and reducing disease risk in the elderly[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2003, 22(1): 1-8.
- [2] 蒋振晖, 顾振新. 芦笋嫩茎采后生理和品质变化及保鲜技术[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(5): 80-85.
- [3] 刘尊英, 姜微波. 绿芦笋木质化过程中细胞壁多糖与酚类物质变化研究[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 95-97.

- [4] 安建申, 张慇, 郭杰, 等. 6- 苄氨基嘌呤对气调包装芦笋贮藏的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 10-13.
- [5] GARIEPY Y, RAGHAVAN G S V, CASTAIGNE F, et al. Precooling and modified atmosphere storage of green asparagus[J]. J Food Process Preserve, 1991, 15: 215-224.
- [6] PAULL R E, CHEN N J. Heat treatment prevents postharvest geotropic curvature of asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.)(J). Postharvest Biol Technol, 1999, 16(1): 37-41.
- [7] GARCÍA-GIMENO R M, CASTILLEJO-RODRÍGUEZ A M, BARCO-ALCALÁE, et al. Determination of packaged green asparagus shelf-life [J]. Food Microbiology, 1998, 15(2): 191-198.
- [8] ALBANESE D, RUSSO L, CINQUANTA L, et al. Physical and chemical changes in minimally processed green asparagus during cold-storage [J]. Food Chemistry, 2007, 101: 274-280.
- [9] CUPPETT S, DELEON A, PARKHURST A, et al. Effect of three-stage hypobaric storage on cell wall components, texture and cell structure of green asparagus[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77: 112-118.
- [10] 王奕文, 马腾飞, 吴文英. 上海市市售芦笋采后病原真菌的分离鉴定[C]// 彭有良, 王振中. 中国植物病理学会 2008 年学术年会会议论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 216.
- [11] 朱志强. 绿芦笋光合气调保鲜机理及技术研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2009.
- [12] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] 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.
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [15] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [16] 巴尼特 J A, 佩恩 R W, 亚罗 D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1992.