

表3 不同金属离子对P-99细胞生长与产乳链菌肽的影响

金属离子	无金属离子	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cu ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Fe ²⁺
OD ₆₀₀	0.716	0.699	0.687	0.061	0.824	0.455	0.526
效价(IU/ml)	1889	1941	1808	32	2025	1541	1763

示,第8~18h为菌体生长对数期,效价迅速增加;此后菌体生长和产物形成进入稳定期。由此可见,P-99菌株发酵呈现明显的初级代谢动力学特征,可用Logistic方程和Luedeking-Piret模型分别对菌体细胞生长(ODx)和产物(P)形成动力学进行模拟^[6],得菌体细胞生长动力学方程为 $\ln(ODx/(0.836-ODx))=0.464t-5.034$, $r=0.9499$ 产物乳链菌肽形成动力学方程为 $\ln((P+101.694)/(2107.87-P))=0.464t-5.034$, $r=0.9964$ 。

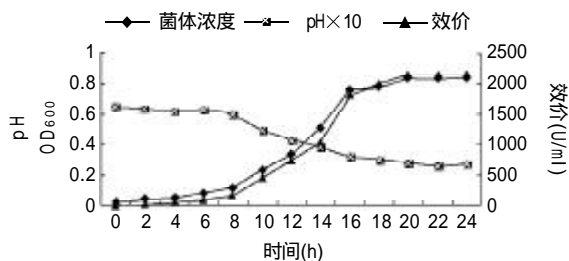


图3 培养时间对P-99菌株细胞生长与产乳链菌肽的影响

3 小 结

本文从鲜奶中筛选到一株乳链菌肽产生菌——乳链球菌P-99,该菌株在M17培养基、30℃、pH6.5条件

下发酵良好,通气量和Ca²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺等对金属离子对其细胞生长与乳链菌肽的产生无明显影响,但Mn²⁺对乳链菌肽的产生有促进作用,而Cu²⁺则有较强的抑制作用;在含1%蔗糖的M17培养基,该菌株产乳链菌肽表现出初级代谢动力学特征,其菌体生长动力学方程为:

$$\ln(ODx/(0.836-ODx))=0.464t-5.034, r=0.9499$$

产物生成动力学方程为:

$$\ln((P+101.694)/(2107.87-P))=0.464t-5.034, r=0.9964.$$

参考文献:

- [1] Delves-broughton J. Nisin and its uses as a food preservative [J]. Food Technol, 1990, 44: 100-117.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中国食品添加剂[M]. 1994. 36.
- [3] Terzaghi B E, Sandine W E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages[J]. Appl Microbiol, 1975, 29: 807-809.
- [4] 彭沈军, 李东, 孙健. 生物食品防腐剂乳酸链球菌素菌种筛选与鉴定[J]. 中国食品添加剂, 1995, (3): 6-9.
- [5] 吴琼. 乳链菌肽效价测定方法的研究[J]. 食品科学, 1996, (6): 56-59.
- [6] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001. 170-171.

红茶菌混合菌种的分离与鉴定

吴 薇, 盖宝川, 籍保平*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 本文对来自北京的某个红茶菌进行了菌种分离和鉴定, 作者从该红茶菌中分离得到了五个菌种, 经鉴定分别为巴斯德酵母(*Saccharomyces pastorianus* Hansen)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe* Lindner)、醋化醋杆菌木质亚种(*Acetobacter xylinum*)、甲醇酸单胞菌(*Acidomonas methanolica*)、乳杆菌科乳杆菌属(*Lactobacillus*)。
关键词: 红茶菌; 菌种分离; 菌种鉴定

Study on the Isolation and Identification of Microbes of Kombucha

WU Wei, GAI Bao-chuan, JI Bao-ping*

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

Abstract: This paper introduced the isolation and identification of microorganisms from a kind of Kombucha. There were five

收稿日期: 2003-10-15

* 通讯联系人

作者简介: 吴薇(1970-), 讲师, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。

strains been isolated and they separately were *Saccharomyces pastonianus* Hansen, *Schizosaccharomyces pombe* Lindner, *Acetobacter xylinum*, *Acidomonas methanolic* and *Lactobacillus*.

Key words: Kombucha strain isolation; strain identification

中图分类号 TS201.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)04-0055-04

红茶菌是有着悠久历史的一种民间传统酸性饮料。它是以糖茶水为原料,经醋酸菌、酵母菌和乳酸菌等多种微生物共同发酵而成的。用于发酵培养红茶菌的菌种主要是醋酸菌和酵母菌,有的红茶菌有少量乳酸菌。根据外国文献报道,到目前为止,人们从各种红茶菌中分离到的醋酸菌有:木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)、拟木醋杆菌(*Acetobacter xylinoides*)、葡萄糖酸杆菌(*Bacterium gluconicum*)、产酮醋杆菌(*Acetobacter ketogenum*)、弱氧化醋酸菌(*Acetobacter suboxydans*)、葡萄糖醋酸菌(*Gluconobacter liquefaciens*)、醋化醋杆菌(*Acetobacter aceti*)和巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*),其中最主要的是木醋杆菌。酵母菌有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、不显酵母(*Saccharomyces inconspicua*)、路德类酵母(*Saccharomycodes ludwigii*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、克鲁斯假丝酵母(*Candida crusei*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)、酒香酵母(*Brettanomyces*)、克勒克酵母(*Kloeckera*)、拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)等^[1,2]。乳酸菌在某些红茶菌中存在,但它不是培养红茶菌的必需菌种且含量很小,主要有保加利亚乳杆菌(*Lactobacterium bulgaricum*)等。

近十多年来,红茶菌在欧美一些国家和地区甚为流行,对红茶菌各种保健功能的研究也是方兴未艾,特别是它的解毒抗癌和增强机体免疫力等功能备受关注,越来越多的资料表明红茶菌是一种很有利用价值的天然微生物发酵产品^[3~5]。但是,自古至今,红茶菌一直是家庭培养为主,由于受到家庭中接种条件及培养温度等条件的影响,容易受到杂菌污染,很难控制产品的质量,从而影响了它的充分开发利用。而实现工业化生产不仅可以避免杂菌污染,还可有效地控制产品的质量。虽然红茶菌有多种保健作用,但古今中外,它都是以混合菌种家庭培养的方式被应用和流传的,而这样的方式存在种种不利因素,从而限制了它的应用和发展。首先是受到接种条件的影响,容易造成杂菌污染。其次还受到温度气候的影响,如室温过低不仅要延长培养时间,也容易造成污染。混合菌种的保存也存在问题,如保存时间短,菌种活力下降,杂菌污染等等。另外,不同菌种其各种代谢产物的含量不同,有不同需要的人如果都饮用同一种成分的红茶菌,往往会造成有的人效果很好,而有的人则收效不明显的结果。为避免以上不利因素的影响,应在深入研究的基

础上,实现工业化生产,生产出卫生优质,功能性成分含量高,适合各种人群需要的系列产品,充分发挥它的保健作用。

要研究开发功能性茶菌饮料,实现工业化生产,首先要从现有的红茶菌中分离得到各个纯菌种并了解菌种的分类地位,只有得到了纯菌种,才能解决菌种保存时间、接种量控制、杂菌控制、保持菌种活力和控制产品质量等多方面的问题,才有可能对每一个菌种以及它们的各种组合的各种代谢特征、培养条件、培养液成分和可能的功能效果等方面进行深入细致的研究。这是进一步研究和应用的基础。而目前国内尚未见到对红茶菌混合菌种进行分离且详细鉴定的报道,本文针对外购的红茶菌混合菌种进行分类鉴定,为进一步的研究和应用奠定基础。

1 菌种的分离

1.1 菌种分离用培养基

1.1.1 菌种 红茶菌混合菌种,购自北京某食品研究所。

1.1.2 分离用培养基

1.1.2.1 酵母菌培养基

Y1号:12Brix麦芽汁1000ml,琼脂15~20g。

Y2号:麦芽膏20g,琼脂20g,自来水1000ml。

1.1.2.2 醋酸菌培养基

A1号:葡萄糖100g,酵母浸出物10g,碳酸钙20g,琼脂15g,蒸馏水1000ml,pH6.8。

A2号:3Brix麦芽汁100ml,酵母浸出物0.5g,葡萄糖2g, K_2HPO_4 0.3g,琼脂2g,于113~115℃,20min灭菌后加入95%的乙醇,使培养基中乙醇的浓度为2%~3%。

1.1.2.3 乳酸菌培养基

L1号(番茄汁聚脲培养基,分离乳杆菌):聚蛋白脲5g,葡萄糖10g,酵母浸膏5g,罐头番茄汁150ml,溴甲酚绿0.03g,山梨酸1.2g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.12g,NaCl 0.12g, KH_2PO_4 0.5g,KCl 0.12g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.12g,琼脂15g,蒸馏水850ml,pH 5.0。

L2号(GYP培养基,分离芽孢乳杆菌):葡萄糖20g,酵母提取物5g,蛋白脲5g,琼脂15g,蒸馏水1L。

L3号(HP培养基,分离明串珠菌):植物蛋白脲20.0g,酵母提取物6.0g,肉浸膏10.0g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g,葡萄糖10g,吐温80 0.5g,

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, 柠檬酸铵 5.0g, 蒸馏水 1L。

L4号(MRS培养基, 分离乳杆菌): 蛋白胨 10.0g, 酵母提取物 5.0g, 肉浸膏 10.0g, 吐温 80 1ml, 葡萄糖 20.0g, K_2HPO_4 2.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.58g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, 乙酸钠 5.0g, 柠檬酸二铵 2.0g, 蒸馏水 1L, 调 pH6.2~6.4。

1.2 试验方法

菌种分离方法: 将已活化的红茶菌混合菌种振荡混匀, 吸 10ml 菌液并夹取一小块菌膜入带玻璃珠的 90ml 无菌水中, 充分振荡, 使溶液混匀。后吸取 5ml 入 45ml 无菌水中, 依次稀释成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 之后分别吸后 3 个稀释度的菌液各 0.1ml 到不同的分离培养基中, 用刮刀涂匀。每个稀释度重复 3 次。醋酸菌和乳酸菌培养基于 30°C 培养, 酵母菌培养基于 28°C 培养。观察生长情况, 镜检初筛。

产膜醋酸菌的分离: 将已活化的混合菌种适量接入茶糖水(红茶 3%+蔗糖 20%)中, 30°C 静止培养, 待其表面长出菌膜后, 在菌膜上放置一至两块无菌滤纸后继续培养, 2d 后取出滤纸, 接入醋酸菌培养基平板上, 30°C 培养。一周后, 平板上出现菌膜。将菌膜挑入有玻璃珠的无菌水中振荡破碎, 并逐级稀释, 后涂平板分离。 30°C 培养 6d 后, 将稀释平板上出现的透明区域(醋酸菌产生的乙酸与碳酸钙反应生成可溶性的乙酸钙)上的几种菌落分别挑单菌落入醋酸菌液体培养基中 30°C 培养, 3~4d 后观察, 表面出现白色菌膜的即为产膜醋酸菌。

1.3 试验结果

从混合菌种中共分离得到 5 株菌种, 它们分别是: 两株酵母菌, 代号分别为 Y11 和 Y13; 一株产膜的醋酸菌, 代号为 M; 一株不产膜的醋酸菌, 代号为 A22; 一株乳酸菌, 代号为 L11。

2 菌种的鉴定

2.1 菌种鉴定用培养基

2.1.1 菌种培养基 Y1 号培养基(Y11 和 Y13 用), A1 号培养基(M 和 A22 用), MRS 培养基(L11 用)。

2.1.2 醋酸钠培养基 葡萄糖 0.062g, 胰 0.25g, 醋酸钠(三结晶水) 0.5g, 琼脂 2.0g, 蒸馏水 100ml。

2.1.3 硝酸盐利用培养基 无氮合成培养基 100ml(葡萄糖 2%, 豆芽汁 0.5ml, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07%, 琼脂 2%), 硝酸钾 0.1%。

2.1.4 糖类发酵培养基 酵母浸粉 0.5%, 葡萄糖, 半乳糖, 乳糖, 麦芽糖, 蔗糖, 棉子糖各 10%。

2.1.5 乙醇氧化和乙酸氧化测定用培养基 酵母膏 1%, 碳酸钙 1%, 自来水 100ml, 琼脂 2%, 乙醇 2%。

2.1.6 碳源利用基础培养基 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.19, 蒸馏水 1000ml。

2.1.7 硫化氢测定用培养基 胰蛋白 10g, NaCl 5g, 牛肉膏 10g, 酵母提取物 5g, 半胱氨酸 0.4g, 葡萄糖 2g, 蒸馏水 1000ml。

2.1.8 乳酸测定用培养基 MRS 培养基。

2.2 试剂与试纸

氧化酶试纸(1% 盐酸二甲基对苯撑二胺); 2.3%~10% 的过氧化氢; 硫化氢测定用乙酸铅试纸(50~100g/L 的乙酸铅); 乳酸测定用展开剂: 水: 苯甲酸: 正丁醇以 1: 5: 5 的量相混合, 然后加 1% 的甲酸; 乳酸测定用显色剂: 0.04% 的溴酚蓝乙醇溶液, 用 0.1N 的 NaOH 调 pH 到 6.7。

2.3 测定与鉴定方法^[6~8]

革兰氏鉴别染色法; 酵母的子囊孢子观察方法; 硝酸盐利用情况的测定方法; 糖类发酵情况的测定方法; 氧化酶测定; 接触酶测定; 乙醇氧化和乙酸氧化测定; 乙醇为唯一碳源的测定; 从葡萄糖产乳酸测定(纸层析法); 产 H_2S 的测定。

2.4 鉴定结果

Y11 的形态及生理生化特征是: 典型酵母状的细胞, 子囊孢子不呈针形, 子囊含孢子 1~4 个。无性繁殖出芽式, 出芽多边发生, 不常形成假菌丝。孢子圆形或卵形, 发酵力强, 不能利用硝酸盐。发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和 2/3 棉子糖。以上特征根据《真菌鉴定手册》^[9], 将 Y11 鉴定为巴斯德酵母(*Saccharomyces pastorianus* Hansen)。

Y13 的形态及生理生化特征是: 圆柱状的营养细胞, $(6\sim16) \times (3\sim5) \mu\text{m}$ 。子囊孢子不呈针形, 子囊含孢子 1~4 个。子囊孢子圆形, 光滑, 直径 $2\sim2.5 \mu\text{m}$ 。无性繁殖裂殖式。以上特征根据《真菌鉴定手册》^[9], 将 Y13 鉴定为栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe* Lindner)。

M 的形态及生理生化特征是: 好氧革兰氏阴性杆菌, 从葡萄糖产酸, 从乙醇产乙酸, 能产生纤维素膜, 不能以乙醇作为唯一碳源生长, 以上特征根据《伯杰细菌鉴定手册》^[10], 将 M 鉴定为醋化醋杆菌木质亚种(*Acetobacter xylinum*)。

A22 的形态及生理生化特征是: 好氧革兰氏阴性杆菌, 从葡萄糖产酸, 能氧化乙醇到乙酸, 能氧化乙酸到二氧化碳和水, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, 以上特征根据《常用细菌系统鉴定手册》^[11], 将 A22 鉴定为甲醇酸单胞菌(*Acidomonas methanolic*)。

L11 的形态及生理生化特征是: 革兰氏阳性杆菌,

从葡萄糖产乳酸, 细胞杆状, 细胞内不形成内生芽孢, 兼性厌氧, 接触酶阴性, 不产生 H_2S , 在 pH4.5 生长。以上特征根据《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[8], L11 属于乳杆菌科乳杆菌属(*Lactobacillus*)。

3 讨 论

本实验的结果与国外文献报道的内容相一致, 红茶菌菌种都是由酵母菌、醋酸菌和乳酸菌三类组成, 只是在个别具体菌种上有所不同。

参考文献:

- [1] R L de Silva TV Saravanpavan. Tea Cider-A potential winner [J]. *Tea Quarterly*, 1968, 39(3): 37-41.
- [2] C H Liu, W H Hsu, et al. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation [J]. *Food Microbiology*, 1996, 13: 407-415.
- [3] Gunther W Frank. The Kombucha Journal, <http://www.kombu.de/index.htm>.
- [4] Michael R Roussin. Analyses of Kombucha ferments: report on growers, <http://persweb.direct.ca/chaugen/kombucha-research-mroussin2toc.html>.
- [5] Biljana Bauer-Petrovska, Lidi ja Petrushevska-Tozl. Mineral and water soluble vitamin content the Kombucha drink [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2000, 35: 201-205.
- [6] 陈思云, 萧熙佩. 酵线营长的生物化学 [M]. 山东科学技术出版社, 1990.
- [7] 葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册 [M]. 中国轻工业出版社, 1994.
- [8] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 中国轻工业出版社, 1999.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海科学技术出版社, 1979.
- [10] 王惠军. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版) [M]. 科学出版社, 1984.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 科学出版社, 2001.

微射流均质机的流体动力学行为分析

刘成梅, 刘 伟, 高荫榆, Roger Ruan, 林向阳, 陈 钢
(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 本文将射流均质机振荡头内部孔道分成六个部分: 进料管区、分流管区、撞击管区、射流管区、扩流管区和出料管区, 对其流场的动力学行为进行了分析, 这为讨论射流均质机的超微粉碎的作用机制提供理论基础。
关键词: 射流均质机; 振荡头; 流体动力学; 超微粉碎

Analysis on Fluid Dynamic Behavior in High Velocity Jet Homogenizer

LIU Cheng-mei, LIU Wei, GAO Yin-yu, Roger Ruan, LIN Xiang-yang, CHEN Gang
(The Key Laboratory of Food Science of MOE, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The microchannel of interaction chamber was divided into six areas: feeding zone, fluid separation zone, impinging zone, compel jet zone, outspreading zone and discharging zone. Fluid dynamics behaviour of high velocity jet homogenizer was analysed. It was useful to discuss the reaction mechanisms of ultramicro-pulverization in jet homogenizer.

Key words: jet homogenizer; interaction channel; fluid dynamics; ultramicro-pulverization

中图分类号 TS201.7

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)04-0058-05

收稿日期: 2003-10-08

作者简介: 刘成梅(1963-), 男, 教授, 研究方向为食品科学工程。