

传统食醋中潜在污染微生物的分离鉴定

郑宇, 牛纪伟, 张祥龙, 宋佳, 夏婷, 王敏

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 我国传统食醋常采用开放式发酵工艺生产, 参与的微生物复杂多样, 生产过程控制不当易导致产品微生物污染。本论文比较分析了正常食醋(NV)和胀气食醋(ANV)样品的理化指标与活菌数等差异, 并分析了ANV中主要气体成分, 分离鉴定了食醋中潜在的污染微生物。结果表明, ANV中活菌数超标, 还原糖和总糖含量降低, 乳酸含量升高。ANV样品顶空部分二氧化碳浓度超过0.005, 导致胀气的主要成分是二氧化碳。从ANV食醋样品中分离到30株细菌, 其中16株具有耐热、产气及耐防腐剂等特性, 是导致食醋污染的潜在微生物。16S rDNA测序分析表明16株菌分别属于 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Clostridium*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Sphingobacterium*, *Delftia* 等8个属。其中菌株PMB-9和PMB-16发酵液中产生白色絮状物, 发酵液变粘稠, 是导致食醋粘稠的潜在污染微生物, 菌株PMB-3、PMB-4、PMB-7、PMB-8和PMB-14能够在食醋中生长并产生气体, 是导致食醋胀气的潜在污染微生物。

关键词: 食醋; 污染微生物; 产气; 粘稠

文章编号: 1673-9078(2016)11-334-339

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.050

Separation and Identification of Potential Microbial Contaminants in Traditional Vinegar

ZHENG Yu, NIU Ji-wei, ZHANG Xiang-long, SONG Jia, XIA Ting, WANG Min

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Chinese traditional vinegars are produced in open fermentation conditions involving various types of microorganisms, and improper control in the production process can lead to microbial contamination of the products. In this study, the differences in physicochemical properties and viable bacterial count between normal vinegar (NV) samples and abnormal vinegar (ANV) samples were compared. Additionally, the gas composition in ANV samples was analyzed, and the potential microbial contaminants were separated and identified. The results showed that in ANV samples the viable bacterial count exceeded the limit, the reducing sugar and total sugar contents decreased, and the lactic acid content increased. The main gas that resulted in the expansion of plastic bottles was CO₂, whose concentration was more than 0.005 in the headspace of the ANV samples. Thirty strains were separated from the ANV samples, and 16 of them were identified as heat-resistant, gas-producing, or preservative-resistant strains that belonged to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Clostridium*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Sphingobacterium*, and *Delftia*. Among them, strains PMB-9 and PMB-16 could produce white flocs that allowed the fermented liquid to become ropy, and these were the main potential microbial contaminants causing the ropy vinegar. Strains PMB-3, PMB-4, PMB-7, PMB-8, and PMB-14 could grow and produce gases in the vinegar, and were the main potential microbial contaminants causing the gas expansion.

Key words: vinegar; microbial contaminant; gas production; ropiness

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)课题(2013AA102106); 国家自然科学基金资助项目(31471722); 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(13JQNJC10000); 山西省科技攻关计划(20130311030-3)

作者简介: 郑宇(1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品发酵过程和微生物基因功能等

通讯作者: 王敏, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 传统发酵食品生产菌株的功能分析与发酵技术研究等

我国著名的传统食醋有山西老陈醋、镇江香醋、四川麸醋、永春老醋和独流老醋等, 分别以高粱、糯米与麦麸等谷物为主要原料, 以大曲、麸曲和红曲等作为起始发酵剂, 采用开放式发酵工艺生产^[1,2]。传统食醋发酵主要包括酒精发酵和醋酸发酵两个阶段, 发酵过程参与的微生物复杂多样, 目前已知的微生物超过40个属, 主要有酵母菌、霉菌、醋酸菌及乳酸菌等^[3]。种类丰富的微生物在发酵过程中不断演替, 不仅

完成了淀粉等大分子物质的降解转化,并且产生了大量的风味物质,形成了食醋特有的风味^[4]。同时,开放式的发酵过程也给产品的质量控制在带来挑战,环境中的污染微生物如果不能有效的去除或杀灭,易造成食醋产品的污染,甚至发生胀气现象^[5]。目前认为导致食醋生物污染的主要因素有以下几点:(1)传统食醋采用开放式酿造工艺,酿造过程中的微生物复杂多样性^[3,6],环境中的杂菌易进入发酵体系当中,并一直伴随于发酵过程^[7]。(2)生产过程中原料、容器和管道灭菌不彻底,灌装和存储过程中管理不善,特别是在夏季,极容易使产品感染杂菌,导致食醋污染。(3)食醋中含有较为丰富的还原糖及氨基酸等营养物质,同时传统食醋酿造过程中有多种芽孢杆菌等能够产生耐热芽孢的微生物参与,后续生产过程中常用的煮沸法和巴氏杀菌法不能杀灭全部的微生物,个别微生物存活下来利用食醋中营养物质进行生长繁殖,导致食醋污染。

食醋的生物污染具有不可预知性、随机性及普遍性等特点,常会导致污染食醋产品发生胀气和粘稠等现象,不仅影响产品质量安全,而且会损害企业的信誉和形象。目前,食醋生产中常用的杀菌或抑菌方法主要有添加防腐剂、煮沸灭菌与高温瞬时灭菌等^[8],但效果均不理想。本研究通过检测污染食醋样品和正常食醋样品理化指标,分析两者理化差异及产生原因;分离鉴定污染食醋中潜在污染微生物,研究其生理特征,为指导生产过程质量控制和潜在污染微生物有效防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品

山西某醋厂污染食醋样品(ANV-1, ANV-2, ANV-3, ANV-4)和正常食醋样品(NV),其中不合格样品均发生胀桶、醋液黏度增大和沉淀现象。

1.1.2 培养基

营养肉汤培养基^[9], YPD 培养基^[9], GYP 培养基^[9]、MRS 培养基^[9], 糖发酵培养基^[9], 食醋培养基(1 L 食醋中添加 5 g 葡萄糖和 5 g 蛋白胨, 115 °C 灭菌 30 min)。

1.1.3 仪器设备

精密 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司), 恒温培养箱(天津市实验仪器厂), 普通光学显微镜(OLYMPUS), 硫化氢检测管、氨气检测管、氮氧化物检测管、二氧化碳检测管与 YD-100 手泵(上海孟

良仪器技术有限公司), 电子天平, 超净工作台等。

1.2 实验方法

1.2.1 食醋基本理化性质的测定

根据 GB/T 13662-2008 方法测定食醋 pH; 采用称量法测定食醋密度, 根据公式 $\rho=m/V$ 进行计算; 根据 ZB X 66040-87 测定食醋中还原糖含量; 采用 3,5-二硝基水杨酸法测定食醋中总糖含量; 根据 GB 18187-2000 测定食醋中的可溶性总固形物的含量; 根据 GB 18187-2000, 采用硝酸银滴定法测定食醋中的氯化钠含量; 根据 GB/T 5009.41-2003 测定食醋中总酸含量(以乙酸计); 根据 GB 18186-2000 测定食醋中的氨基酸氮含量; 采用 HPLC 法^[10]测定食醋中的乙酸和乳酸含量; 根据 GB 5009.5-2010, 采用分光光度法测定食醋中蛋白质含量; 根据 GB 4789.2-2010《食品微生物检验 菌落总数测定》检测食醋中菌落总数。不合格样品气体成分采用气体检测管检测, 方法参照操作说明书。

1.2.2 污染食醋样品中微生物分离纯化

在超净工作台中, 将不同样品醋液逐次稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 不同浓度梯度, 吸取 0.1 mL 稀释液分别涂布营养肉汤培养基、YPD 培养基、GYP 培养基和 MRS 培养基分离平板, 正向放置 30 min 待液体被固体培养基吸收完全, 30 °C 培养箱培养, 定时观察。选择菌落数在 30 至 300 之间的平板进一步分离纯化, 直至分离平板上只有一种菌落形态, 记录菌落形态。显微镜观察菌体形态, 染色观察是否生成芽孢, 菌株于 -80 °C 冰箱保藏。

1.2.3 细菌 16S rDNA 测序

挑取单一菌落接种到相应培养基中, 30 °C 静置培养, 24 h 后收集菌体, 利用基因组提取试剂盒按照操作说明提取细菌基因组, 以基因组作为模板, 选用细菌通用上下游引物 27F 与 1492R^[11]扩增 16S rDNA 片段, 引物序列 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'), 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 然后经 30 个循环(95 °C、30 s, 56 °C、30 s, 72 °C、90 s), 最后 72 °C 延伸 8 min, 结束反应。1%琼脂糖凝胶 120 V 下电泳 30 min 检测 PCR 结果, 切胶纯化回收目的基因, 送华大基因公司测序, 测序序列利用 Genbank 进行 Blast 比对, 选择同源性最高的属作为鉴定结果^[10]。

1.2.4 污染微生物生长特性分析

1.2.4.1 产气特性

将斜面保藏分离株用糖发酵培养基活化培养 12 h, 按 1%接种量接种到含有杜氏发酵管的糖发培养基

中, 30 °C 静置培养, 定时观察杜氏发酵管中是否有气泡产生。将能够在糖发酵培养基中产气的分离菌株, 以 10% 接种量接种到食醋培养基试管 (18×180 mm), 使液面距管口 1~2 cm, 试管口套小号橡胶气球以观察产气现象, 同时以空白培养基作对照, 30 °C 静置培养, 观察气球是否膨胀。

1.2.4.2 耐热特性

表 1 样品理化性质分析

Table 1 Analysis of the physicochemical properties of the samples

理化指标	NV	ANV
pH	3.38±0.02	3.26±0.02
密度/(g/mL)	1.08±0.01	1.09±0.00
还原糖/(×10 ⁻² g/mL)	3.36±0.34	1.70±0.07
总糖/(×10 ⁻² g/mL)	4.80±0.13	2.77±0.13
氯化钠/(×10 ⁻² g/mL)	2.22±0.20	2.13±0.05
乙酸/(×10 ⁻² g/mL)	0.49±0.01	1.51±0.09
乳酸/(×10 ⁻² g/mL)	2.13±0.16	3.18±0.12
总酸/(×10 ⁻² g/mL, 以乙酸计)	6.17±0.06	7.08±0.28
氨基酸态氮/(×10 ⁻² mg/mL)	203.00±0.14	227.00±0.01
蛋白质/(mg/mL)	2.37±0.05	2.16±0.08
可溶性总固形物/(×10 ⁻² g/mL)	15.39±0.01	15.42±0.09

注: ANV 结果为 ANV-1、ANV-2、ANV-3 与 ANV-4 检测结果的平均值。

将斜面保藏污染微生物用糖发酵培养基活化培养 12 h, 按 5% 的接种量接入新的糖发酵培养基试管中, 30 °C 培养 10~12 h, 将菌液常压下沸水浴煮沸 30 min, 自然冷却后, 将煮沸的菌液按 5% 接种量接种到糖发酵培养基中, 30 °C 静置培养, 观察培养液浊度变化。

1.2.4.3 耐防腐剂特性

GB 2760-2014 规定, 食醋中允许添加一定量的防腐剂, 其中苯甲酸钠的最大添加量 (以苯甲酸计) 不高于 1.0 g/kg, 丙酸钙 (以丙酸计) 不高于 2.5 g/kg, 对羟基苯甲酸甲酯钠 (以对羟基苯甲酸计) 不高于 0.25 g/kg, 山梨酸钾 (以山梨酸计) 不高于 1.0 g/kg。分析潜在污染微生物耐受防腐剂特征, 检测其在 4 种防腐剂最高允许添加浓度条件下的生长情况, 主要操作步骤如下: 将污染微生物接入糖发酵培养基活化, 30 °C 培养 10~12 h, 按 1% 接种量分别接种到浓度为 1.0 g/kg 苯甲酸钠、2.5 g/kg 丙酸钙、0.25 g/kg 对羟基苯甲酸甲

酯钠、1.0 g/kg 山梨酸的糖发酵培养基中, 30 °C 静置培养, 观察培养液浊度变化。

1.2.5 数据统计分析

食醋样品理化指标及顶空气体组成分析等实验每个样品重复测定三次, 菌落计数设置三个平行, 利用 Excel 软件计算平均值及方差。

2 结果与讨论

2.1 食醋理化性质及胀桶气体成分分析

分析正常食醋样品和不合格样品的物理化学特征 (表 1) 发现, 两种样品的密度、氯化钠、氨基酸态氮、蛋白质和可溶性总固形物含量检测结果相近, 而还原糖、总糖、乳酸、乙酸和总酸含量均存在较明显差异。与正常醋样相比, 不合格醋样总酸 (以乙酸计) 含量提高了 14.7%, 其中乳酸含量提高了 49.3%, 乙酸含量提高了 2.1 倍, 还原糖含量下降了 49.4%, 总糖含量下降了 42.3%。本研究从不合格醋样中分离到了芽孢杆菌等多种微生物 (图 1), 微生物以食醋中的糖类为底物, 通过糖酵解、戊糖磷酸等途径将单糖转化为丙酮酸, 进而生成乙酸、丙酸、丁酸和乳酸等代谢产物^[12], 芽孢杆菌^[13,14]在生长代谢中会产生乳酸, 这导致了不合格醋中还原糖和总糖含量降低, 酸度升高。

微生物在生长代谢过程中, 可以通过糖酵解和三羧酸循环等代谢途径产生二氧化碳。分别用硫化氢检测管、氨气检测管、氮氧化物检测管和二氧化碳检测管检测了胀桶样品中硫化氢、氨气、氮氧化物及二氧化碳 4 种气体的浓度, 结果见 (表 2)。空气中二氧化碳浓度约为 0.0004, 胀桶食醋样品中二氧化碳浓度超过 0.005, 硫化氢、氨气和氮氧化物等其他气体未检出, 说明胀桶样品中主要气体成分为二氧化碳, 由微生物生长代谢产生。

表 2 胀桶食醋气体成分分析

Table 2 Analysis of gas composition in the contaminated vinegar

二氧化碳/×10 ⁻⁶	硫化氢/×10 ⁻⁶	氮氧化物/×10 ⁻⁶	氨气/×10 ⁻⁶
>5000	未检出	未检出	未检出

2.2 污染食醋样品主要微生物分离鉴定

表 3 食醋中活菌总数

Table 3 Total viable bacterial count in vinegar samples

样品	ANV-1	ANV-2	ANV-3	ANV-4	NV
活菌总数/(cfu/mL)	(186.2±8.9)×10 ⁴	(40.7±2.9)×10 ⁴	(138.0±11.2)×10 ⁴	(2344.2±187.7)×10 ⁴	239.9±22.2

对污染食醋样品 ANV-1、ANV-2、ANV-3、ANV-4 和正常醋样 NV 分别进行镜检, 污染食醋样品中观察到大量的微生物, 经活菌计数 (表 3) 可知, 4 个污染醋样中活菌总数均超出国家标准 (不大于 1×10^4 cfu/mL), 正常醋样活菌数约为 2.4×10^2 cfu/mL, 符合国家标准。

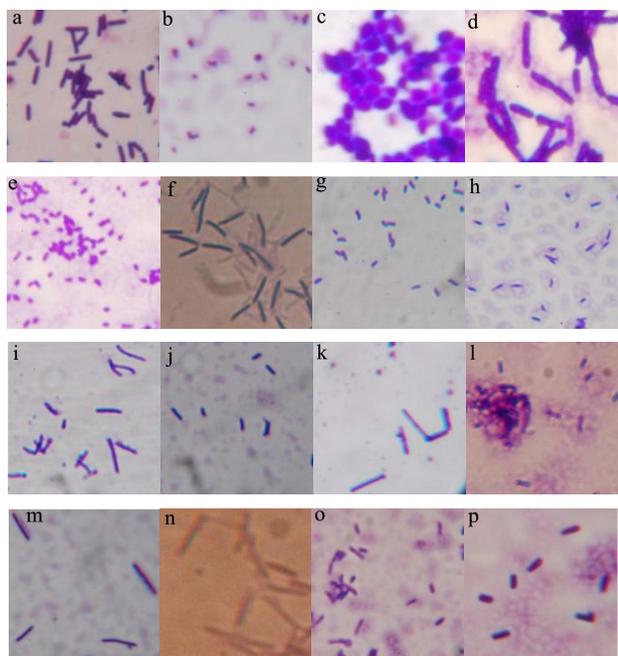


图 1 菌株革兰氏染色形态 (放大 16×100 倍)

Fig.1 Morphology of strains

注: a-p 分别依次是菌株 PMB-1~PMB-16。

选择营养肉汤培养基、YPD 培养基、GYP 培养基和 MRS 培养基分离污染醋中的微生物, 从分离平板上共挑取了菌落形态不同的 30 个单菌落, 对所有分离株进行初步发酵验证试验, 有 16 株菌能够在糖发酵培养基中产生气体或絮状沉淀, 是潜在的食醋污染微生物, 其显微镜下的菌体形态如图 1 所示, 其中有 11 个菌株属于革兰氏阳性菌, 并且 10 株菌能够生成芽孢, 进一步利用 16S rDNA 序列分析的方法对其种属进行鉴定, 结果见表 4。

2.3 潜在污染微生物生长特性分析

16S rDNA 测序分析表明 16 株菌分别属于 *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Clostridium*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Sphingobacterium*, *Delftia* 等 8 个属。其中, 菌株 PMB-9 和 PMB-16 属于鞘氨醇杆菌, 能够在葡萄糖发酵培养基的底部产生白色粘稠状絮凝物 (图 2a), 导致发酵液变粘稠, 利用食醋进行培养也得到了类似的结果。有研究报道, 鞘氨醇杆菌可以产生鞘氨醇胶 Ss, 具有增粘性^[16], 本论文对菌株 PMB-9 和 PMB-16 产生沉淀

物质的初步分析表明, 该沉淀属于多糖类化合物, 它是导致食醋沉淀、粘稠的原因之一。食醋发酵产气结果可知, 菌株 PMB-3 (噬线虫沙雷氏菌)、PMB-4 (芽孢杆菌)、PMB-7 (假单胞菌)、PMB-8 (窄食单胞菌) 和 PMB-14 (耐酸梭状芽孢杆菌) 能够在食醋培养基中生长并代谢产气 (图 2b), 此 5 株菌是导致食醋胀桶变质的主要潜在污染微生物。芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌存在于传统食醋大曲、酒精发酵和醋酸发酵过程^[2,3], 对食醋酿造过程有一定贡献, 比如, 芽孢杆菌还表达多种淀粉酶、蛋白酶等酶类, 有利于发酵过程大分子物质的降解转化, 同时芽孢杆菌还能够代谢产生具有奶油香气的乙偶姻等多种风味物质。梭状芽孢杆菌能够代谢产生丁酸等有机酸, 丰富食醋中有机酸组成, *Clostridium aciditolerans* 能在 pH 低于 4.0 的条件下生长。芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌具有产生耐热、抗逆芽孢的特性, 如果生产过程控制不当, 则可能导致产品污染, 引发食醋胀气粘稠等问题。16 株潜在污染微生物中, *Sphingobacterium*、*Clostridium*、*Serratia*、*Pseudomonas*、*Delftia*、*Stenotrophomonas* 等微生物是首次从污染食醋样品中分离得到, Nie^[3]利用宏基因组学技术分析老陈醋发酵阶段微生物多样性, 发现上述 6 种细菌在发酵阶段已经存在, 但其具体功能仍然未知。目前为止在对食醋酿造过程微生物群落组成的分析中还没有发现 *Delftia* 和 *Stenotrophomonas* 属的微生物, 它们很可能来源于酿造周围的空气和用水等外界环境。

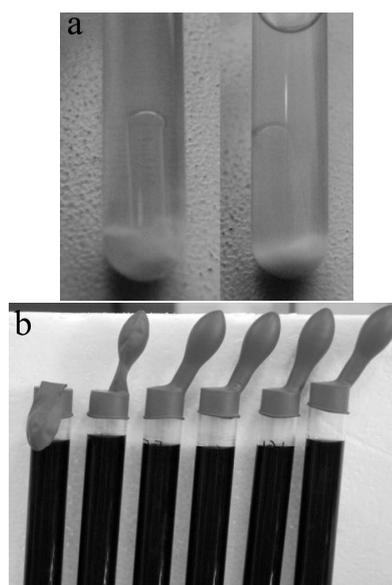


图 2 糖发酵产粘絮图 and 食醋发酵产气验证实验

Fig.2 Precipitate formation in sugar fermentation and gas production in vinegar fermentation

注: a, 糖发酵产粘絮状沉淀; 左: PMB-9; 右: PMB-16; b, 食醋发酵产气; 按照从左到右的顺序依次为空白、PMB-8、

PMB-14、PMB-3、PMB-7 和 PMB-4。

表 4 污染食醋分离株生长特性

Table 4 Characterizations of the isolates from contaminated vinegar samples

编号	16s rDNA 鉴定结果	Ident %	革兰氏染色	是否生成芽孢	糖发酵产生沉淀情况	食醋发酵生长情况	苯甲酸钠	丙酸钙	山梨酸	对羟基苯甲酸甲酯钠	煮沸处理
PMB-1	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> (解硫胺素硫胺素芽孢杆菌)	99	+	+	-	-	++	-	+	++	++
PMB-2	<i>Brevibacillus</i> spp. (芽孢杆菌)	99	+	+	-	-	++	-	-	++	++
PMB-3	<i>Serratia nematodiphila</i> (噬线虫沙雷氏菌)	100	+	-	-	+	+	-	-	+	++
PMB-4	<i>Bacillus</i> spp. (芽孢杆菌)	100	+	+	-	+	++	-	+	++	++
PMB-5	<i>Clostridium</i> spp. (梭状芽胞杆菌)	99	+	+	-	-	++	-	-	+	++
PMB-6	<i>Delftia</i> spp. (代尔夫特菌)	99	-	-	-	-	++	-	-	+	++
PMB-7	<i>Pseudomonas</i> spp. (假单胞菌)	99	-	-	-	+	++	-	-	+	++
PMB-8	<i>Stenotrophomonas</i> spp. (寡氧单胞菌)	99	-	-	-	+	++	+	-	++	++
PMB-9	<i>Sphingobacterium</i> spp. (鞘氨醇杆菌)	99	-	-	+	-	++	-	+	+	++
PMB-10	<i>Clostridium aciditolerans</i> (耐酸梭状芽胞杆菌)	100	+	+	-	-	++	-	+	+	++
PMB-11	<i>Clostridium</i> spp. (梭状芽胞杆菌)	99	+	+	-	-	+	+	+	+	++
PMB-12	<i>Bacillus subtilis</i> (枯草芽孢杆菌)	100	+	+	-	-	++	-	+	++	++
PMB-13	<i>Clostridium aciditolerans</i> (耐酸梭状芽胞杆菌)	100	+	+	-	-	+	-	+	+	++
PMB-14	<i>Clostridium aciditolerans</i> (耐酸梭状芽胞杆菌)	100	+	+	-	+	++	-	+	+	++
PMB-15	<i>Clostridium</i> spp. (梭状芽胞杆菌)	100	+	+	-	-	+	-	+	+	++
PMB-16	<i>Sphingobacterium</i> spp. (鞘氨醇杆菌)	99	-	-	+	-	++	-	+	+	++

食醋生产加工过程中,常添加苯甲酸钠等防腐剂抑制产品保藏和使用过程中污染微生物生长繁殖。为了进一步确定导致食醋胀桶变质的主要污染微生物,对16株潜在污染菌株进行了生长特性分析,包括耐防腐剂、耐热和产气等特性,结果见表4。结果表明,所有菌株均能在食品安全国家标准(GB 2760-2014食品添加剂使用标准)规定的苯甲酸钠和对羟基苯甲酸甲酯钠最大允许添加量条件下生长,说明食醋中添加苯甲酸钠不能起到完全的抑菌效果,1.0 g/kg山梨酸对部分细菌有抑制作用,2.5 g/kg丙酸钙能抑制除菌株PMB-8外所有细菌的生长。将4种防腐剂添加到食醋培养基中,得到类似的生长结果,这16株微生物对抑菌化合物的抗性与细胞膜结构、酶抗性与遗传适应性等因素有关^[15],但具体每一株菌对防腐剂的抗性机制还有待进一步分析。对所有菌株进行常压煮沸30 min,然后接种煮沸菌液到新鲜培养基培养,所有菌株均能生长。微生物的耐热特性与其能够产生耐热芽孢、热激蛋白、热稳定胞内凝胶等相关,马净丽^[9]将胀桶的食醋在90℃~100℃下煮沸40 min后,镜检发现仍有些杆菌活跃的运动,说明生产中一次煮沸不能达到完全杀菌的理想效果。

山西老陈醋采用开放式的固态发酵工艺,生产过程应保持环境的清洁卫生,防止外界环境中潜在污染微生物污染,同时应注意酿醋原料、用水等的质量控制。食醋灌装入库前需要除菌和灭菌处理,芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌等细菌在可产生芽孢,具有很强的耐热性,一次煮沸难以将其全部杀灭,可采用间歇式多次煮沸的方法进行杀菌,控制食醋中细菌数在较低水平。此外,本研究表明单一防腐剂很难抑制所有微生物的生长,开发复合防腐剂对食醋污染微生物进行控制也是我们下一步工作的重点。

3 结论

通过分析胀桶污染食醋样品,发现其中活菌数超标,污染微生物利用食醋中的糖类化合物进行生长代谢,使食醋中还原糖和总糖含量降低,产生有机酸使食醋酸度升高,过程中微生物生长代谢产生大量二氧化碳,导致食醋发生胀桶。利用分离培养法从污染食醋中分离到30株菌,其中16株能够在糖发酵培养基中产生气体或絮状沉淀,是潜在的食醋污染微生物,16S rDNA测序分析表明其分别属于*Aneurinibacillus*、*Brevibacillus*、*Serratia*、*Bacillus*、*Clostridium*、*Delftia*、*Pseudomonas*、*Stenotrophomonas*和*Sphingobacterium*。鞘氨醇杆菌PMB-9和PMB-16发酵液中产生白色絮状物,发酵液变粘稠,是导致食醋粘稠的主要潜在污染

微生物;菌株PMB-3(噬线虫沙雷氏菌)、PMB-4(芽孢杆菌)、PMB-7(假单胞菌)、PMB-8(窄食单胞菌)和PMB-14(耐酸梭状芽孢杆菌)能在食醋中生长产气,是导致食醋胀桶的主要潜在污染微生物。生产过程中保持环境的清洁卫生,注意酿醋原料和用水等的质量控制;采用多次煮沸的方法进行杀菌;开发使用复合防腐剂可能是预防传统食醋污染的主要措施。

参考文献

- [1] Zheng X W, Tabrizi M R, Nout M J, et al. Daqu-a traditional Chinese liquor fermentation starter [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90
- [2] Xu Y, Wang D, Fan W L, et al. Traditional Chinese biotechnology [M]. Biotechnology in China II. Springer Berlin Heidelberg, 2010: 189-233
- [3] Nie Z, Zheng Y, Du H, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar [J]. Food Microbiology, 2015, 47: 62-68
- [4] Chen T, Gui Q, Shi J J, et al. Analysis of variation of main components during aging process of Shanxi Aged Vinegar [J]. Acetic Acid Bacteria, 2013, 2(1s): 6
- [5] 李伟丽,赵超,车建途,等.腐败醋中微生物的分离鉴定及乳酸链球菌素对其抑制作用[J].食品科学,2015,1:174-178
LI Wei-li, ZHAO Chao, CHE Jian-tu, et al. Inhibitory effect of Nisin on microorganisms isolated and identified from spoiled vinegar [J]. Food Science, 2015, 1: 174-178
- [6] Wu J J, Ma Y K, Zhang F F, et al. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar [J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 289-297
- [7] Li P, Li S, Cheng L, et al. Analyzing the relation between the microbial diversity of DaQu and the turbidity spoilage of traditional Chinese vinegar [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(13): 6073-6084
- [8] 马净丽,钱锋.解决食醋胀桶问题的探讨[J].中国酿造, 2010,9:123-127
MA Jing-li, QIAN Feng. How to prevent barrel packed vinegar from barrel-swelling problem [J]. China Brewing, 2010, 9: 123-127
- [9] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2011
DU Lian-xiang, LU Fu-ping. Microbiology experiment technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011
- [10] 高年发,任雪.HPLC测定独流老醋陈酿过程中有机酸变化

- [J].中国酿造,2010,3:143-147
- GAO Nian-fa, REN Xue. Determination of organic acids change in the process of Tianjin Duliu ageing vinegar with HPLC [J]. China Brewing, 2010, 3: 143-147
- [11] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing [J]. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, 1991: 125-175
- [12] 许科伟.污泥厌氧消化过程中乙酸累积的微生物机理研究 [D].江南大学,2010
- XU Ke-wei. A microbial ecological study on the mechanism of acetate accumulation during anaerobic incubation of sewage sludge [D]. Jiangnan University, 2010
- [13] Ou M S, Awasthi D, Nieves I, et al. Sweet sorghum juice and Bagasse as feedstocks for the production of optically pure lactic acid by native and engineered *Bacillus coagulans* strains [J]. Bio. Energy Research, 2015,9(1): 1-9
- [14] Ye L, Zhou X, Hudari M S B, et al. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106 [J]. Bioresource Technology, 2013, 132(132): 38-44
- [15] Cloete T E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 51(4): 277-282
- [16] Wu M, Li G, Huang H, et al. The simultaneous production of sphingon Ss and poly (R-3-hydroxybutyrate) in *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 361-368