

桂林米粉腐败菌分离鉴定及其抑菌剂筛选

严婉嘉, 梁韦武, 陆佳慧, 黄春霞, 李霞, 董新红, 李静

Isolation, Identification and Antibacterial Screening of Spoilage Organism in Guilin Rice Noodles

YAN Wanjia, LIANG Weiwu, LU Jiahui, HUANG Chunxia, LI Xia, DONG Xinhong, and LI Jing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060308>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

应用表型和基因型分析28℃鲜湿米粉中主要优势菌

Dominant bacteria in fresh wet rice noodle during storage at 28 °C by phenotype and genotype

食品工业科技. 2017(17): 99-104 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.020>

市售草莓腐败菌的分离鉴定及拮抗酵母的筛选

Isolation and Identification of Spoilage Organism in Strawberry and Screening of Antagonistic Yeast

食品工业科技. 2020, 41(1): 98-104 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.01.017>

三华李果坏发酵液中腐败真菌分离鉴定、相关抑菌剂效价评定及发酵工艺优化

Isolation and Identification of Spoilage Fungi in the Fermentation Broth of Sanhua Plum, Evaluation of the Potency of Related Antibacterial Agents and Optimization of Fermentation Technology

食品工业科技. 2021, 42(14): 113-120 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110278>

小龙虾(*Procambarus clarkii*)加工前后优势腐败菌的分离与鉴定

Isolation and Identification of Specific Spoilage Organisms in Crayfish(*Procambarus clarkii*)before and after Processing

食品工业科技. 2020, 41(18): 100-104 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.18.016>

腌韭菜根中腐败菌的分离鉴定及防腐剂对其抑制作用

Isolation and Identification of Spoilage Bacteria from Pickled Leek Root and Its Inhibition by Preservatives

食品工业科技. 2019, 40(17): 110-114,120 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.17.018>

冷藏鱼片中优势腐败菌的分离鉴定

Isolation and Identification of Dominant Spoilage Bacteria in Refrigerated Catfish Fillets

食品工业科技. 2020, 41(17): 104-108 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.017>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

严婉嘉, 梁韦武, 陆佳慧, 等. 桂林米粉腐败菌分离鉴定及其抑菌剂筛选 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(9): 140–146. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060308

YAN Wanjia, LIANG Weiwu, LU Jiahui, et al. Isolation, Identification and Antibacterial Screening of Spoilage Organism in Guilin Rice Noodles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(9): 140–146. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060308

· 生物工程 ·

桂林米粉腐败菌分离鉴定及其抑菌剂筛选

严婉嘉¹, 梁韦武¹, 陆佳慧¹, 黄春霞¹, 李霞^{1,2}, 董新红¹, 李静^{1,*}

(1. 桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西桂林 541006;

2. 广西电磁化学功能物质重点实验室, 广西桂林 541006)

摘要: 桂林米粉属于鲜湿米粉, 由于其水分含量高、易受微生物污染而不易保存, 因此分析其腐败菌及筛选抑菌剂对延长其货架期、保持其口感与营养价值十分重要。为了研究桂林米粉贮藏过程中微生物生长情况, 本文从室温贮藏 1~3 d 的桂林米粉中分离纯化得到 13 株腐败菌, 再通过反证试验得到 6 株主要腐败菌 MF1、MF2、MF3、MF4、MF6 和 MF12, 通过常规鉴定结合分子鉴定确定桂林米粉的主要腐败菌为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter* sp.) 和乙酰微小杆菌 (*Exiguobacterium acetylicum*)。通过平板培养从五种食品添加剂中筛选有效抑菌剂及最适抑菌浓度, 结果表明, 不同浓度的抗坏血酸和柠檬酸对 6 种腐败细菌均有良好的抑菌效果, 最适抑菌浓度分别为 90 和 120 mg/mL。这说明抗坏血酸和柠檬酸可作为桂林米粉的防腐剂, 在桂林米粉贮藏保鲜上有一定的应用前景。

关键词: 鲜湿米粉, 腐败菌, 生理生化, 分子鉴定, 抑菌

中图分类号: TS213.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)09-0140-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060308

本文网刊:



Isolation, Identification and Antibacterial Screening of Spoilage Organism in Guilin Rice Noodles

YAN Wanjia¹, LIANG Weiwu¹, LU Jiahui¹, HUANG Chunxia¹, LI Xia^{1,2}, DONG Xinhong¹, LI Jing^{1,*}

(1. College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541006, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Electrochemical and Magneto-chemical Functional Materials, Guilin 541006, China)

Abstract: Guilin rice noodles belong to fresh wet rice noodles, which are difficult to be preserved due to their high moisture content and susceptibility to microbial contamination. Therefore, it is very important to analyze its putrefactive bacteria and screen bacteriostatic agents for extending the shelf life, and maintain the taste and nutritional value. In order to study the microbial growth during the storage of Guilin rice noodles, 13 strains of spoilage organism were isolated and purified from Guilin rice noodles stored at room temperature for 1 to 3 days, and six main spoilage organism MF1, MF2, MF3, MF4, MF6 and MF12 were obtained through the counterfactual experiment. Then the main spoilage organism were identified as *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. velezensis*, *Citrobacter* sp. and *Exiguobacterium acetylicum* through routine identification combined with molecular identification. Furthermore, the effective antibacterial agents and optimal inhibitory concentrations were selected from five food additives through the plate culture. The results showed that different concentrations of ascorbic acid and citric acid had good antibacterial effects on six types of spoilage bacteria, with the optimal inhibitory concentrations being 90 and 120 mg/mL, respectively. This shows that ascorbic acid and citric acid can be used as preservatives of Guilin rice noodles and have a certain application prospect in the storage and fresh-keeping of

收稿日期: 2023-07-04

基金项目: 广西科技计划项目 (桂科 AD19245040); 国家自然科学基金 (31860251); 广西果实贮藏与加工新技术重点实验室开放课题 (GXKLFVSPT202202); 桂林理工大学科研启动基金 (GLUTQD2017002)。

作者简介: 严婉嘉 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: 15362938169@163.com。

* 通信作者: 李静 (1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: ruochenjl@163.com。

Guilin rice noodles.

Key words: fresh wet rice noodles; spoilage organism; physiological and biochemical; molecular identification; antibacterial

米粉是广泛流行于我国南方地区的传统主食,因其食用简便、口感爽滑劲道、营养丰富而广受人们欢迎。鲜湿米粉是一种以大米或糙米为原料,经过清洗、浸泡、磨浆、糊化成型及冷却等一系列工序制成的扁宽形或细条形的米制品^[1]。

鲜湿米粉水分含量较高,一般为 60%~80%,室温下通常只能保存 24 h 左右,且当环境温度较高时,微生物生长繁殖速度加快,其储藏期更短^[2]。由于制作米粉原料、辅料的不同和仪器设备的不同,导致制作出来的鲜湿米粉的质量良莠不齐^[3]。研究表明原料大米的品种、陈放时间、理化特性及其淀粉凝胶结构特性等因素对鲜湿米粉品质有较大影响^[4-8];鲜湿米粉的保鲜技术主要包括保鲜剂处理、酸浸洗丝、微波、水浴或复合处理^[9-14]。

鲜湿米粉营养丰富且含水量高,有利于微生物的生长繁殖,而微生物繁殖过程中可产生许多致使食品腐败变质的代谢产物及毒素,是引起米粉腐败变质的主要生物因素^[15]。因此深入研究鲜湿米粉的腐败菌及其生产工艺对米粉腐败的影响等问题,或有利于发现鲜湿米粉腐败变质的机理,为鲜湿米粉抑菌剂筛选、品质改善、货架期延长等提供依据。目前关于鲜湿米粉腐败菌方面的研究偏少。前人研究表明, γ -氨基丁酸、抗坏血酸、柠檬酸、乳糖酸和海藻酸钠作为廉价易得、安全性高且无色无味的食品添加剂,能够保持食品本身色香味不被破坏的基础上表现出良好的抗氧化、抗菌抑菌等性能,从而被广泛用于冷鲜肉、菠菜、甜樱桃和水蜜桃等多种食品防腐保鲜研究^[16-20],但还未见在米粉上的应用。桂林米粉作为鲜湿米粉的一种,具有较高的营养价值和浓郁的地方特色。因此,本研究以桂林米粉为研究对象,分离鉴定其主要腐败菌并从 γ -氨基丁酸、抗坏血酸、柠檬酸、乳糖酸和海藻酸钠这几种食品添加剂中筛选桂林米粉腐败菌的有效抑菌剂,旨在为桂林米粉贮藏保鲜提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜桂林米粉 桂林三养胶麦生态食疗产业有限责任公司;LB 肉汤培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基、琼脂粉 青岛海博生物技术有限公司;异丙醇分析纯,天津市富宇精细化工有限公司;巯基乙醇分析纯,上海吉至生化科技有限公司; γ -氨基丁酸、抗坏血酸、乳糖酸 食品级,河北玖宇生物科技有限公司;柠檬酸、海藻酸钠 食品级,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、通用引物((ITS1/ITS4)和(27F/1492R))、琼脂糖、0.5×TAE 缓

冲液、2X San Taq PCR Mix(含蓝染料) 上海生工生物工程股份有限公司;液氮 桂林鑫宏益气体有限责任公司。

ZHJH-C112C 超净工作台 上海智城分析仪器制造有限公司;BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂;2720 thermal cycler 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)仪 沐滕实验设备(上海)有限公司;JY5000 电泳仪 北京六一生物科技有限公司;Tanon-1600 全自动凝胶图像分析仪 广州誉维生物科技有限公司;VIS-7220N 可见分光光度计 北京瑞丽分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品稀释 参考王欢等^[21]的方法并略作修改,称取贮存 1~3 d 的湿米粉各 5 g,在无菌操作环境下置于已灭菌的研钵中,加入 45 mL 无菌水充分研磨,制得稀释度为 10^{-1} 的米粉匀浆。吸取 1 mL 上述米粉匀浆于新的已灭菌离心管中并加入 9 mL 无菌水,制得稀释度为 10^{-2} 的米粉匀浆,依此类推进行 10 倍梯度稀释制得稀释度为 10^{-3} ~ 10^{-7} 的米粉匀浆。

1.2.2 腐败菌分离纯化 采用稀释涂布平板法。用移液枪分别移取 50 μ L 稀释度为 10^{-3} ~ 10^{-7} 的米粉匀浆于 LB 肉汤琼脂培养基和马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上,用涂布器均匀涂开,每个稀释梯度设置 3 次平行试验并设置空白对照。涂布完成后,细菌置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h,真菌置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 3~5 d^[22]。培养完成后,用接种环挑取形态不同的菌落分别进行划线纯化培养,并将纯化后的菌接种在斜面培养基上保存。

1.2.3 主要腐败菌反证试验 参考陈志瑜^[23]的方法并略作修改,从每种菌的斜面培养基上挑取一环置于 10 mL 无菌水中制成菌悬液备用。将新鲜买回的鲜湿米粉每袋 20 g 分装于透明密封袋中,分装好的鲜湿米粉开袋置于无菌操作台上紫外灭菌 30 min。灭菌完成后用 1 mL 菌悬液污染无菌鲜湿米粉,以 1 mL 无菌水代替菌悬液作空白对照。将密封袋封口并存放于 25 $^{\circ}$ C 恒温箱中,分别在 1 d 和 2 d 后观察袋中米粉的变化,确定出导致米粉腐败变质的优势菌株。

1.2.4 腐败菌的鉴定

1.2.4.1 常规鉴定 首先用光学显微镜对从桂林米粉中筛选得到的腐败菌进行形态观察,描述其菌落形态,包括大小、颜色、质地及边缘、表面情况等,并对腐败菌进行革兰氏染色和芽孢染色后观察。然后参考《内生菌研究方法》^[24]及《常见细菌系统鉴定手

册》^[25],通过 V-P 实验、葡萄糖氧化发酵实验、淀粉水解实验、明胶液化、硝酸盐还原、接触酶实验对主要腐败菌进行生理生化鉴定。结合菌株形态特征及生理生化特征对腐败菌种类进行初步判定。

1.2.4.2 分子生物学鉴定 采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒对细菌基因组 DNA 进行提取。得到模板 DNA 后进行 PCR 扩增反应,反应体系包括:模板 DNA 10 μ L, 2X SanTaq PCR Mix(含蓝染料)25 μ L, 引物 27F(5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')各 2 μ L, 最后用 ddH₂O 补至 50 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

将扩增完成的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳条件为 80 V 电压下 1.5 h,在凝胶成像仪下获得电泳图。将扩增成功的样品送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因测序。得到的序列上传至 NCBI 数据库中进行 Blast 同源性比对,下载相似性较高的菌株序列,使用 MEGA 11.0 软件中邻接(Neighbor-Joining, NJ)法构建系统发育树。

1.2.5 抑菌剂离体筛选 参照 γ -氨基丁酸、抗坏血酸、柠檬酸、乳糖酸和海藻酸钠五种试剂用于食品保鲜技术的相关研究^[26-28],分别配制成浓度均为 50 mg/mL 的五种抑菌剂。采用打孔法,以等量无菌生理盐水代替抑菌剂作对照组,考察抑菌剂对桂林米粉主要腐败菌的抑制作用。

确定出有效抑菌剂后,参考夏飞等^[29]的方法并略作修改,设置有效抑菌剂浓度梯度为 30、60、90、120 和 150 mg/mL,每种有效抑菌剂的各浓度分别对 20 g 鲜湿桂林米粉作浸泡 5 min 后捞出沥干处理。处理后的米粉打成匀浆,分别移取 1 mL 匀浆注入 150 mL 的 LB 液体培养基中,以 1 mL 无菌水代替米粉匀浆作空白对照,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱摇床培养 22 h。培养过程中每隔 2 h 取样一次,以不加任何试剂的空白培养基作参比,测定 600 nm 处的 OD 值来表征米粉中菌群浓度变化,确定有效抑菌剂的最佳浓度。

1.3 数据处理

每组试验重复三次,试验数据采用 IBM SPSS Statistics 25 进行分析处理,采用邓肯(Duncan)检验法进行事后多重比较,采用 Origin 2023 进行统计及绘图。

2 结果与分析

2.1 主要腐败菌的分离筛选

通过初步的分离筛选,从鲜湿桂林米粉中一共分离纯化出 13 种腐败菌,均为细菌,将这些细菌分别命名为 MF1、MF2、MF3、MF4、MF5、MF6、MF7、MF8、MF9、MF10、MF11、MF12 和 MF13。在桂林米粉贮藏过程中,适宜温度下细菌繁殖速度快,能消耗较多米粉中的营养物质从而成为优势菌,

在一定程度上抑制了真菌的生长,与 Gram 等^[15]得到的结果大致相符。

鲜湿米粉的感官评定指标主要是条形、色泽、气味及口感等,当贮藏环境温度高于 20 $^{\circ}$ C 时米粉老化程度减小,同时会因微生物繁殖引起酸败变质问题^[30]。陈志瑜^[23]用菌悬液污染无菌米粉并常温贮藏 1 d 后根据米粉外观及气味变化确定了引起鲜湿米粉腐败变质的污染菌。祝红等^[31]发现在 25 $^{\circ}$ C 下米粉的各项感官指标随时间延长而得分降低且 18 h 后米粉呈现变黏、变黄、发臭等明显腐败变质的现象。由此可见感官评定虽易受主观因素与环境影响,但对只考察微生物因素的反证试验而言是较为直观简便的方法。因此本实验将从筛选出的 13 种细菌进行反证实验,记录分别接种 13 个菌株的米粉放置 2 d 后的结果。结果见表 1。

表 1 桂林米粉主要腐败菌反证试验结果
Table 1 Guilin rice noodles main spoilage bacteria disproof experimental results

菌株编号	感官评价
对照组	米粉颜色微黄,米粉条形保持较好,未有明显酸臭味
MF1	米粉颜色变化大,粉条模糊、断条,粘性增大,有明显酸臭味
MF2	米粉颜色变化不大,粘条严重、微糊,有明显酸臭味
MF3	米粉颜色变黄,糊条严重,呈碎条状,有明显酸臭味
MF4	米粉颜色变化不大,粘条、糊条严重,有酸臭味
MF5	米粉色泽变化不大,粉条轻微粘、糊,无明显酸臭味
MF6	米粉颜色明显变黄,粉条微糊、断裂,有酸臭味
MF7	米粉色泽变微黄,轻微糊条,有轻微酸臭味
MF8	米粉粉条变黄,轻微断条、糊条、无明显酸臭味
MF9	米粉色泽变化不大,条形保持较好,无酸臭味
MF10	米粉颜色稍微变暗,轻微糊条,无明显酸臭味
MF11	米粉色泽变化不大,轻微糊条、断条,有轻微酸味
MF12	米粉色泽变黄,粉条严重模糊,有明显酸臭味
MF13	米粉颜色变暗,粉条保持较好但有少许断条,无明显异味

由表 1 可知,接种 MF1、MF2、MF3、MF4、MF6、MF12 鲜湿米粉出现了变色、糊条、粘条的现象,且密封袋中的米粉有产生明显酸臭味,随着时间的增加,米粉的颜色会逐渐加深,米粉糊条、粘条更加严重。相比之下其他组别的米粉变化不明显,因此可以判定 MF1、MF2、MF3、MF4、MF6、MF12 是引起桂林米粉变质的主要腐败菌。

2.2 桂林米粉腐败菌鉴定

2.2.1 腐败菌常规鉴定 经反证试验筛选得到的 6 株主要腐败菌常规鉴定结果如下所示,菌株形态鉴定结果见表 2,生理生化鉴定结果见表 3。根据常规鉴定结果,结合《常见细菌系统鉴定手册》^[25]可以得出,菌株 MF1、MF2、MF3、MF12 为革兰氏阳性菌,产芽孢,产接触酶、明胶酶,初步鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)的细菌;菌株 MF4 为革兰氏阴性菌,产接触酶,不产芽孢,不产明胶酶,可发酵葡萄糖产酸产气,初步鉴定为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)的细菌;菌株 MF6 为革兰氏阳性菌,产接触酶,不产芽孢,不

表 2 主要腐败菌形态鉴定
Table 2 Morphological identification of main spoilage bacteria

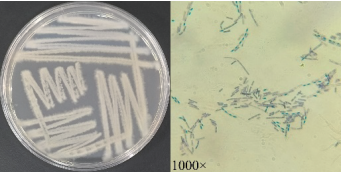
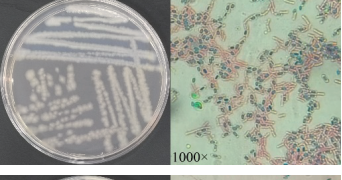
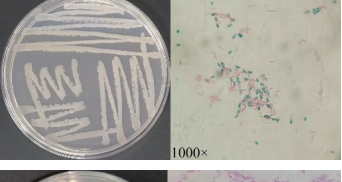
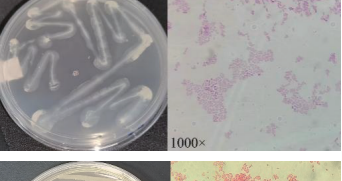
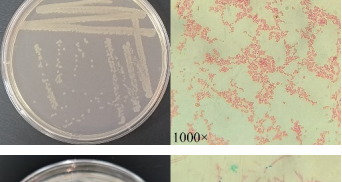
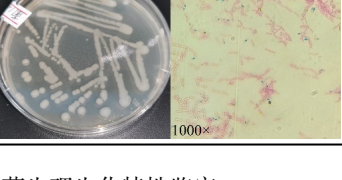
菌株编号	形态特征
MF1	菌落呈灰白色, 表面粗糙; 细胞呈直杆状、链状排列; 产芽孢, 芽孢为柱状; 革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌。 
MF2	菌落呈稍有光泽的淡黄色, 质地软; 细胞呈直杆状、链状排列; 产芽孢, 芽孢为卵圆形; 革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌。 
MF3	菌落呈米白色、边缘不规则, 表面粗糙; 细胞呈杆状; 产芽孢, 芽孢为卵圆形、孢囊膨大; 革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌。 
MF4	菌落呈半透明灰白色、表面有光泽、周围呈不规则毛状; 细胞呈短杆状; 革兰氏染色呈红色, 为革兰氏阴性菌。 
MF6	菌落平坦、呈淡橙色、色素不扩散; 细胞呈球状; 革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌。 
MF12	菌落呈白色、有光泽、圆形、质地软; 细胞呈杆状; 产芽孢, 芽孢为柱状; 革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌。 

表 3 主要腐败菌生理生化特性鉴定
Table 3 Identification of physiological and biochemical characteristics of main spoilage bacteria

生理生化实验	MF1	MF2	MF3	MF4	MF6	MF12
接触酶	+	+	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+	+	+
明胶水解	+	+	+	-	-	+
葡萄糖发酵产酸	+	+	+	+	+	+
葡萄糖发酵产气	-	-	-	+	-	-
V-P实验	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	-	+	+	+

注: +为阳性, -为阴性。

产明胶酶, 初步鉴定为微小杆菌属(*Exiguobacterium*) 的细菌。

主要腐败菌的腐蚀性与其生理生化特征有一定关系。有研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌在生长繁殖过程中会产生乙酸和丁酸等挥发性脂肪酸^[32]; 柠檬酸杆菌属是肠杆菌科中的一种肠道病菌, 其发酵产物为混合酸, 这些代谢产物均会加速桂林米粉的酸败变质。蜡

样芽孢杆菌可利用食品中的糖类及蛋白质, 并经代谢产生大量伯醇和酯类物质, 还会分解硫和支链氨基酸而使食品产生异味^[33]。此外在细菌生长代谢过程中, 苏云金芽孢杆菌会产生内毒素, 蜡样芽孢杆菌会产生肠毒素, 这都是导致桂林米粉变质甚至引起食品安全问题的重要因素^[34-35]。

2.2.2 主要腐败菌分子生物学鉴定 对筛选出的 6 种主要腐败菌进行 PCR 扩增并送检, 6 株细菌 PCR 电泳图显示其碱基对均在 1500 bp 附近, 扩增结果如图 1 所示。

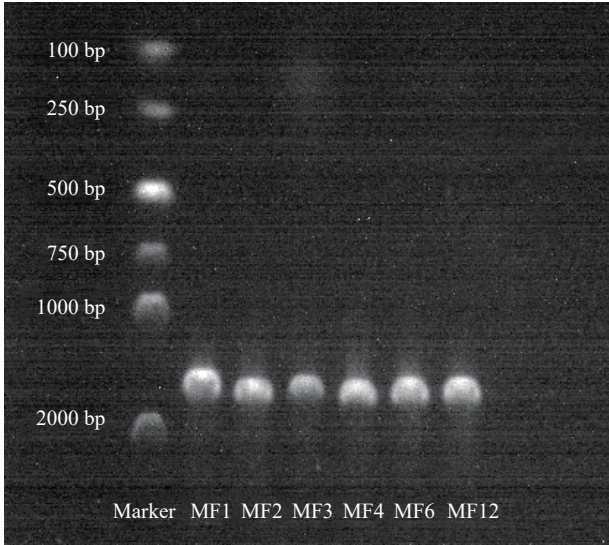


图 1 菌株 PCR 产物电泳图
Fig.1 PCR product electrophoresis map of strain

将测得的基因序列结果经 NCBI 网站 Blast 比对, 在 MEGA 11.0 上进行同源性分析及构建系统发育树, 见图 2。菌株 MF1 与苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 聚于一支, 亲缘关系最近; 菌株 MF2 与蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*) 聚于一支, 亲缘关系最近; 菌株 MF3 与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) 亲缘关系相近; 菌株 MF4 与柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.) 聚于一支, 亲缘关系最近; 菌株 MF6 与乙酰微小杆菌(*Exiguobacterium acetylicum*) 聚与一支, 亲缘关系最近; 菌株 MF12 与蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*) 聚于一支, 亲缘关系最近。

综合鉴定结果, 最终确定菌株 MF1 为苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*), 菌株 MF2、MF12 为蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*), 菌株 MF3 为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*), 菌株 MF4 为柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.), 菌株 MF6 为乙酰微小杆菌(*Exiguobacterium acetylicum*)。

2.3 有效抑菌剂及抑菌浓度筛选

采用打孔法得到的抑菌圈结果如图 3 所示。其中, 编号 1~6 分别对应柠檬酸、抗坏血酸、 γ -氨基丁酸、海藻酸钠、乳糖酸和无菌生理盐水。从图中可以看出, 编号 1 和编号 2 的抑菌圈较大, 且对 6 种细菌均有一定的抑制作用, 说明柠檬酸和抗坏血酸的抑菌

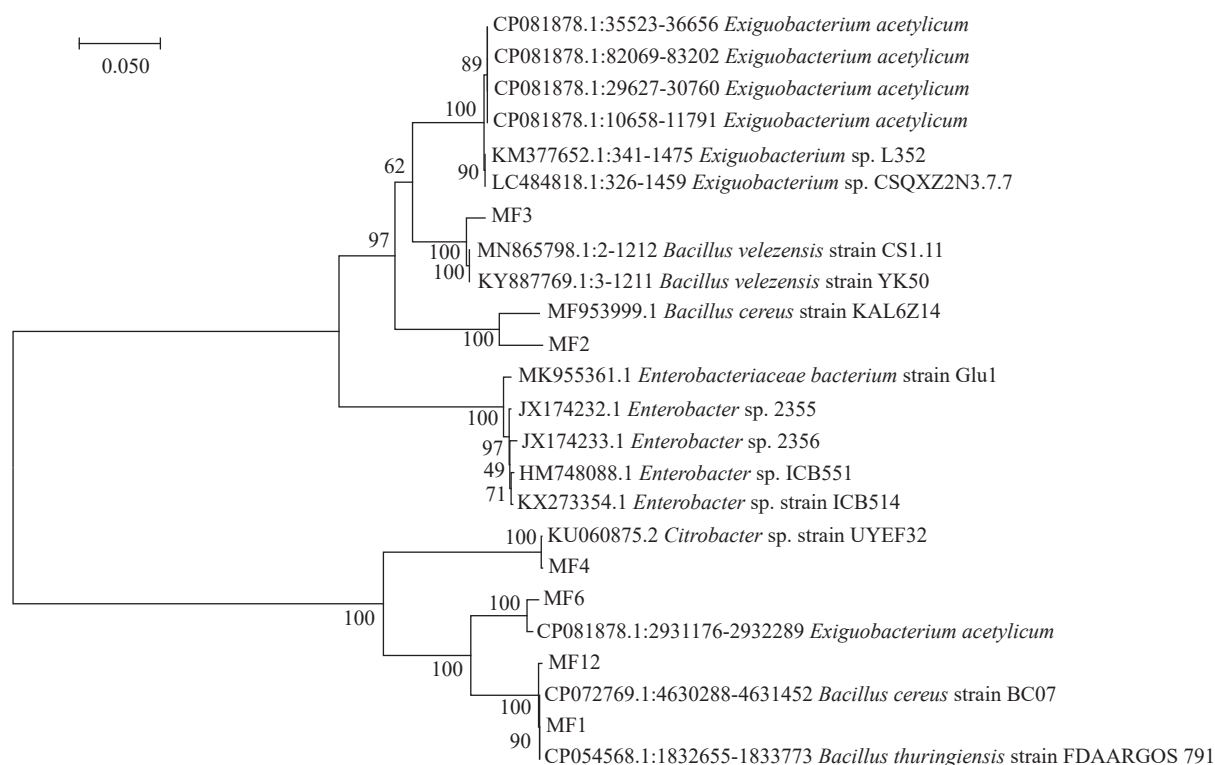


图2 菌株MF1、MF2、MF3、MF4、MF6及MF12基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of strain MF1, MF2, MF3, MF4, MF6 and MF12

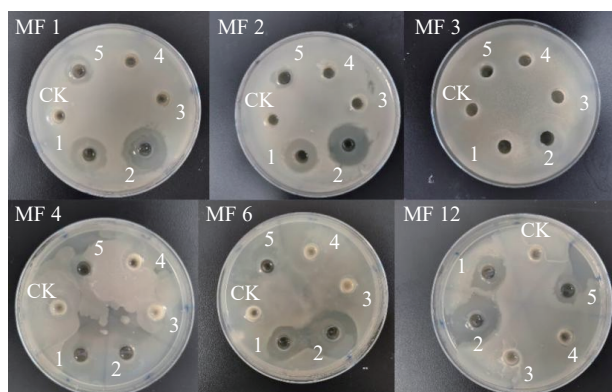


图3 打孔法抑菌圈效果图

Fig.3 Punching method bacteriostatic circle effect diagram

效果较好。因此,可将抗坏血酸和柠檬酸作为桂林米粉腐败菌的有效抑菌剂。

进一步研究不同浓度柠檬酸和抗坏血酸对米粉主要腐败菌的抑制作用,结果分别如图4和图5所示,由图可见处理组在细菌生长的对数期菌群浓度均有下降。由图4可以得出,与清水组相比,抗坏血酸浓度为30、60 mg/mL时,微生物的生长仍然较快。而另外三组浓度较高的抗坏血酸中微生物生长均相对较慢。培养22 h时,90 mg/mL的抗坏血酸处理的米粉中菌体浓度最低,综合考虑,90 mg/mL为抗坏血酸的最佳抑菌浓度。由图5可得出,与清水组相比,柠檬酸浓度 ≤ 90 mg/mL时,微生物仍有较快的生长速度,抑菌效果不明显。当柠檬酸浓度达120、150 mg/mL时,微生物的生长整体呈缓慢趋势,但两者之间无显著性差异($P>0.05$)。考虑经济成本与

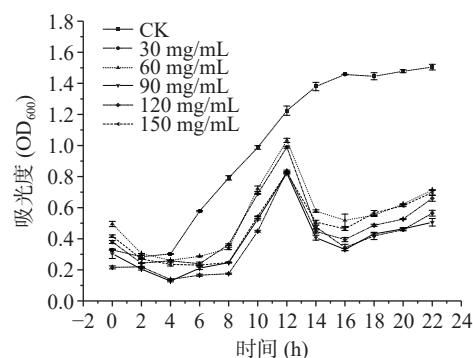


图4 抗坏血酸处理对腐败菌浓度的影响

Fig.4 Effect of ascorbic acid treatment on the concentration of spoilage bacteria

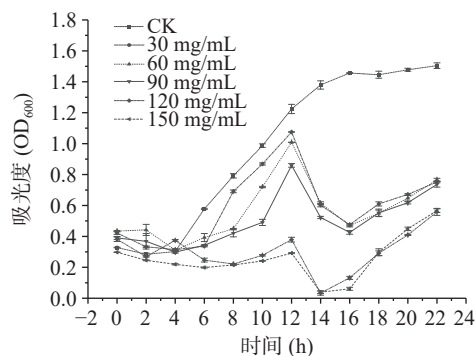


图5 柠檬酸处理对腐败菌浓度的影响

Fig.5 Effect of citric acid treatment on the concentration of spoilage bacteria

绿色环保因素,确定柠檬酸的最佳抑菌浓度为120 mg/mL。

有研究表明,酸浸可作为鲜湿米粉的有效灭菌

方式,工业生产上常用有机酸与弱酸盐复配成缓冲液后用于米粉灭菌处理,且比单一酸浸方式更能保持米粉的蒸煮品质^[36]。此外,酸浸灭菌较热力、微波等灭菌方式更简单易行且更节省时间及能耗,故实际生产上常将酸浸与其他灭菌处理相结合以达到经济环保的目的。邹仙果等^[37]研究发现酸浸与蒸煮相结合可使鲜米粉货架期延长一倍,卫攀杰等^[38]对比了鲜湿米粉不同灭菌处理的品质变化,发现酸浸与水浴相结合处理米粉可促进淀粉糊化,增强其凝胶结构从而改善米粉品质。本实验基于微生物层面为开发桂林米粉保鲜剂及高效保鲜方式提供一定数据支撑,后续尚可从酸处理时间及方式优化、筛选复配弱酸盐及浓度进行深入研究,以期在高效灭菌的基础上最大限度保持桂林米粉口感和品质。

3 结论

本研究从室温贮藏 1~3 d 的桂林米粉中分离纯化得到 13 株腐败菌,均为细菌,再通过反证试验确定 MF1、MF2、MF3、MF4、MF6 和 MF12 为主要腐败菌,这 6 株细菌能使桂林米粉在贮藏过程中会出现色泽变黄、断条、粘条、糊条及产生酸臭味等腐败变质现象。通过形态、生理生化等常规鉴定结合分子生物学鉴定,确定这 6 株腐败细菌为苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.)和乙酰微小杆菌(*Exiguobacterium acetylicum*)。通过平板培养从五种食品添加剂中筛选有效抑制上述 6 种腐败细菌的抑菌剂,发现抗坏血酸和柠檬酸有良好的抑菌效果;进一步通过测定菌密度的方法确定两者的最适抑菌浓度分别为 90 和 120 mg/mL。结果表明,一定浓度的抗坏血酸和柠檬酸对桂林米粉具有良好的杀菌防腐作用,为两者在桂林米粉贮藏保鲜上的应用提供了一定的参考。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] 周宁菱, 吴一明, 郭紫娟, 等. 鲜湿米粉贮藏过程中品质变化的考察[J]. 现代食品, 2022, 28(21): 166-169. [ZHOU N L, WU Y M, GUO Z J, et al. Investigation on the quality properties of fresh wet rice noodles during storage[J]. Modern Food, 2022, 28(21): 166-169.]

[2] 袁蕾蕾. 鲜湿米粉保鲜储藏的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014. [YUAN L L. Studies on the preservation of wet-fresh rice noodles[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.]

[3] LOW Y K, EFFARIZAH M E, CHENG L H. Factors influencing rice noodles qualities[J]. Food Reviews International, 2020, 36(8): 781-794.

[4] HUANG H, LI Y, ZENG J, et al. Comparative quality evaluation of physicochemical and amylose content profiling in rice noodles from diverse rice hybrids in China[J]. Agriculture-Basel, 2023, 13(1): 140.

[5] ZHANG M, LIU K. Lipid and protein oxidation of brown rice and selenium-rich brown rice during storage[J]. Foods, 2022, 11(23): 3878.

[6] TONG L T, GAO X, LIN L, et al. Effects of semidry flour milling on the quality attributes of rice flour and rice noodles in China[J]. Journal of Cereal Science, 2015, 62: 45-49.

[7] DALBHAGAT C G, MAHATO D K, MISHRA H N. Effect of extrusion processing on physicochemical, functional and nutritional characteristics of rice and rice-based products: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 85: 226-240.

[8] LI C, YOU Y, CHEN D, et al. A systematic review of rice noodles: Raw material, processing method and quality improvement[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 107: 389-400.

[9] 刘瑾瑾, 朱思明. 复合保鲜剂对鲜湿米粉防腐保鲜效果研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(10): 79-83. [LIU J J, ZHU S M. Study on the preservative and fresh-keeping effect of compound preservatives on fresh rice noodles[J]. Cereals & Oils, 2022, 35(10): 79-83.]

[10] 汤鹏宇, 孟繁博, 黄道梅, 等. 高品质鲜湿米粉加工及保鲜技术[J]. 农技服务, 2023, 40(5): 91-94. [TANG P Y, MENG F B, HUANG D M, et al. Processing and preservation technology of high quality fresh wet rice noodles[J]. Agricultural Technology Service, 2023, 40(5): 91-94.]

[11] ZHANG X, LIU X, KARIM R, et al. Preparation and microwave preservation of wheat rice blending wet noodle[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2018, 42(3): e13539.

[12] BAI N S, CHUENSUN T, WANGTUEAI S, et al. Antimicrobial activity of a crude peptide extract from lablab bean (*Dolichos lablab*) for semi-dried rice noodles shelf-life[J]. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2021, 13(2): 25-33.

[13] TANTALA J, MEETHONGCHAI S, SUETHONG W, et al. Mold-free shelf-life extension of fresh rice noodles by synergistic effects of chitosan and common food preservatives[J]. Food Control, 2022, 133: 108597.

[14] 周慧星, 高雪琴, 王连生. 复合生物酶对鲜湿米粉老化的影响及体外消化特性研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(3): 157-163. [ZHOU H X, GAO X Q, WANG L S. Effect of compound enzymes on aging of fresh wet rice noodles and its digestion characteristics in vitro[J]. China Food Additives, 2023, 34(3): 157-163.]

[15] GRAM L, RAVN L, RASCH M, et al. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(1-2): 79-97.

[16] 高立红, 钱冠林, 刘金忠, 等. 乳糖酸复合保鲜剂对冷鲜肉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 314-320. [GAO L H, QIAN G L, LIU J Z, et al. Effects of lactobionic acid compound preservative on the quality of chilled meat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 314-320.]

[17] 郁杰, 谢晶. ϵ -聚赖氨酸和 L-抗坏血酸处理对鲜切菠菜品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 277-283. [YU J, XIE J. Effects of ϵ -polylysine and L-ascorbic acid on the quality of fresh-cut spinach[J]. Food Science, 2019, 40(17): 277-283.]

[18] 刘影. 复合天然植物抑菌剂对凤凰水蜜桃高温下保鲜与贮藏效果研究[D]. 南京: 南京大学, 2019. [LIU Y. Study on fresh-keeping effect of compound natural plant antimicrobial agent on Phoenix peach storage at high temperature[D]. Nanjing: Nanjing University, 2019.]

[19] 钱红玫, 胡文忠, 李琳, 等. 乳酸链球菌素和柠檬酸对甜樱桃

- 中沙门氏菌的抑制[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 275-279. [QIAN H M, HU W Z, LI L, et al. Inhibitory effects of Nisin and citric acid on *Salmonella* on sweet cherry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(15): 275-279.]
- [20] PHILLIPS C A, DUGGAN J. The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture[J]. *Food Control*, 2002, 13(6-7): 463-468.
- [21] 王欢, 李刚凤, 夏欣欣, 等. 市售生鲜湿面中腐败菌的分离与鉴定[J]. 中国酿造, 2020, 39(9): 148-151. [WANG H, LI G F, XIA X X, et al. Isolation and identification of spoilage bacteria in commercial fresh wet noodles[J]. China Brewing, 2020, 39(9): 148-151.]
- [22] 刘绪, 郑运, 黄潇漪, 等. 紫薯腐败菌的分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5297-5304. [LIU X, ZHENG Y, HUANG X Y, et al. Isolation and identification of spoilage bacteria from *Solanum tuberosum*[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(16): 5297-5304.]
- [23] 陈志瑜. 鲜湿米粉保质保藏技术的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2013. [CHEN Z Y. The study of the quality preservation technology of the fresh wet rice noodles[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2013.]
- [24] 骆焱平, 王兰英. 内生菌研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2019: 52-67. [LUO Y P, WANG L Y. Research methods for endophytic bacteria[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2019: 52-67.]
- [25] 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: 370-398. [DONG X Z, CAI M Y. Handbook for identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-398.]
- [26] 曹珈荣. 乳糖酸对金黄色葡萄球菌抑菌作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019. [CAO J R. The antibacterial effect of lactobionic acid on *Staphylococcus aureus*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.]
- [27] 罗婵. Nisin、柠檬酸及双乙酸钠在鲜切生菜清洗过程中的应用研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014. [LUO C. Study on the application of Nisin, citric acid and sodium acetate in the washing process of fresh-cut lettuce[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2014.]
- [28] 张策. 抗坏血酸对大肠杆菌的杀菌效果研究[D]. 上海: 东华大学, 2010. [ZHANG C. The study of bactericidal effect of L-ascorbic acid against *Escherichia coli* cells[D]. Shanghai: Donghua University, 2010.]
- [29] 夏飞, 张处处, 武子宁, 等. 柠檬酸对食用菌腐败菌的抑制作用及其作用机制[J]. 陕西科技大学学报, 2023, 41(2): 40-45. [XIA F, ZHANG C C, WU Z N, et al. Antibacterial effect and mechanism of citric acid on spoilage bacteria of edible mushroom[J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2023, 41(2): 40-45.]
- [30] 董宏浩, 徐丽, 全珂, 等. 鲜湿米粉品质劣变机理及保鲜技术研究进展[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(3): 161-168. [DONG H H, XU L, QUAN K, et al. Research progress on quality deterioration mechanism and fresh-keeping technology of fresh wet rice noodles[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(3): 161-168.]
- [31] 祝红, 王芳, 易翠平. 贮藏温度和时间对鲜湿米粉品质的影响[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 132-136. [ZHU H, WANG F, YI C P. Effects of storage temperature and duration on quality properties of fresh rice noodles[J]. Food & Machinery, 2018, 34(3): 132-136.]
- [32] 李青洋, 邱胜男, 唐云梦, 等. 两种芽孢杆菌对谷类作物秸秆微贮效果的影响[J]. 土壤与作物, 2023, 12(2): 153-160. [LI Q Y, QIU S N, TANG Y M, et al. Effects of two *Bacillus* species on the micro-silage of cereal straw[J]. Soils and Crops, 2023, 12(2): 153-160.]
- [33] TECHER C, JAN S, THIERRY A, et al. Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts[J]. *Food Microbiology*, 2020, 86: 103317.
- [34] 崔哲雨, 黄念庭, 何鹏, 等. 苏云金芽孢杆菌在害虫防治领域的应用进展[J]. 现代面粉工业, 2023, 37(1): 13-18. [CUI Z Y, HUANG N T, HE P, et al. Progress in the application of *Bacillus thuringiensis* in pest control[J]. Modern Flour Milling Industry, 2023, 37(1): 13-18.]
- [35] WANG X, HUANG Q, HUANG R. Quantitative risk assessment of *Bacillus cereus* in wet rice noodles from raw material to marketing phase[J]. *Heliyon*, 2023, 9(3): e14354.
- [36] 刘超. 湿米粉加工工艺与保鲜技术研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2016. [LIU C. Study on processing techniques and preserving technology of wet rice noodle[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016.]
- [37] 邹仙果, 池韞, 费洁羽, 等. 不同保鲜技术和温度对鲜米粉品质的影响[J]. 浙江工业大学学报, 2023, 51(4): 439-447. [ZOU X G, CHI Y, FEI J Y, et al. Effects of different preservation technologies and temperatures on the quality of fresh rice noodle[J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2023, 51(4): 439-447.]
- [38] 卫攀杰, 陈洁, 许飞, 等. 保鲜方式对鲜湿米粉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 44-49. [WEI P J, CHEN J, XU F, et al. Effect of preservation methods on the quality of instant fresh rice noodles[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 44-49.]