

鲜切莲藕冷藏过程中优势腐败菌的分离与鉴定

Isolation and identification of dominant spoilage bacteria from fresh-cut lotus root with cold storage

刘小芳^{1,2} 王发祥^{1,2} 俞 健^{1,2}

LIU Xiao-fang^{1,2} WANG Fa-xiang^{1,2} YU Jian^{1,2}

单世平³ 郭森林^{1,2} 刘永乐^{1,2}

SHAN Shi-ping³ GUO Sen-lin^{1,2} LIU Yong-le^{1,2}

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114; 2. 湖南省水生资源食品加工
工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114; 3. 湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009)

(1. College of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. Hunan Provincial Engineering Research Center for Food Processing of Aquatic Biotic Resources, Changsha, Hunan 410114, China; 3. Hunan Province Microbiology Insititue, Changsha, Hunan 410009, China)

摘要:特定腐败菌的生长繁殖是导致鲜切莲藕腐败变质的重要原因。分析了鲜切莲藕冷藏过程中微生物菌落总数的变化规律,通过稀释平板法对其冷藏 8 d 后的腐败微生物进行分离,并以细菌 16S rDNA 菌种鉴定的方法鉴定了 4 种优势腐败菌。结果表明:鲜切莲藕冷藏第 8 天时菌落总数达到 4.17×10^5 CFU/g,进入腐败初期;冷藏过程中的优势腐败菌主要为醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)、解鸟氨酸拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica*)和阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。

关键词:鲜切莲藕;冷藏;优势腐败菌;16S rDNA;鉴定

Abstract: Growth and reproduction of specific spoilage bacteria contribute significantly to the spoilage of fresh-cut fruits and vegetables. In this paper, the change regulation of total colony count of fresh-cut lotus root during cold storage period was firstly analyzed, then the spoilage bacteria were separated by dilution-plate method, and the dominant spoilage bacteria were identified using 16S ribosomal DNA based bacterial identification system. The results showed that when the fresh-cut lotus root was preserved at 4 °C for 8 days, and its total colony count increased to 4.17×10^5 CFU/g, which the early microbial spoilage was thought to be developed. Based on the homology analysis of 16S rDNA sequences, four dominant spoilage bacteria

were eventually identified as *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella* sp., *Raoultella ornithinolytica* and *Enterobacter cloacae*.

Keywords: fresh-cut lotus root; cold storage; dominant spoilage bacteria; 16S rDNA; identification

莲藕为睡莲科草本植物莲的根茎,是中国一种重要的水生蔬菜,其口感脆嫩味微甜,营养丰富,同时又具有消食止泻、开胃清热、滋补养性等药用价值^[1]。国内外市场对莲藕制品需求很大,尤其是清洁、卫生、新鲜和方便的鲜切莲藕制品最为畅销^[2]。然而,莲藕鲜切过程中由于去皮、切分等工序,使其细胞受损,汁液外渗(汁液中营养成分含量较高,有利于微生物的生长),导致其极易腐烂变质,严重影响到产品的销售和质量安全^[3]。鲜切蔬菜在贮藏期间褐变和微生物腐败是影响其质量最主要的原因,但是随着贮藏期的延长,微生物对组织的破坏成为引起组织腐烂最重要的因素^[4]。因此,开展鲜切莲藕冷藏条件下特定腐败菌的鉴别研究具有重要的实际应用价值。

由于鲜切蔬菜比一般蔬菜产品更容易滋生微生物而腐烂变质^[5],故分离鉴定出其冷藏过程中与腐败相关的微生物则意义重大,可为有效监控鲜切蔬菜品质变化、定向抑制产品腐败及开发相应保鲜技术提供重要依据。目前,关于鲜切莲藕制品保鲜技术的研究较多,基本集中在各种护色、保鲜剂或包装方法的筛选和应用效果方面^[5-6]。近年来,已有学者^[7]开始尝试非热杀菌钝酶的保鲜方法。目前,已有研究者开展了生菜、辣椒等蔬菜加工、贮藏和流通过程中的腐败菌研究^[8-9],但关于鲜切莲藕冷藏过程中优势腐败菌的分离鉴

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(编号:2012BAD31B08);
湖南省教育厅产业化培育项目(编号:2015CY001)

作者简介:刘小芳,女,长沙理工大学在读硕士研究生。

通讯作者:刘永乐(1962—),男,长沙理工大学教授,博士。

E-mail:lyle19@163.com

收稿日期:2016-01-07

定仍缺乏系统研究;夏天龙等^[10]研究了真空包装鲜切莲藕的组成及其变化趋势,但局限于选择性培养基分离和生化鉴定方法的缺陷,无法确定优势菌且仅能初步鉴定到属;李新楠等^[11]也采用类似方法分离鉴定了真空包装鲜切藕片的主要胀袋微生物,其研究结果也具有一定的局限性。本研究拟采用稀释平板法从冷藏条件下腐败的鲜切莲藕样品中分离优势菌株,并通过 16S rDNA 法鉴定其种类,旨为该类制品冷链流通中的品质检测、质量控制以及加工贮藏过程中的减菌和保鲜技术研究提供指导。

1 材料与方法

1.1 原料和试剂

新鲜莲藕:购自湖南省长沙县;
PCR 扩增用 *Taq* 酶、基因组 DNA 提取试剂盒及 DNA 回收试剂盒:天根生化科技北京有限公司;
其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2 主要仪器

显微镜:BH-2 型,日本 Olympus 公司;
梯度 PCR 仪:5331 型,德国 Eppendorf 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鲜切莲藕样品的制备 莲藕去皮后以无菌水清洗,置于滤纸上沥干,然后用灭菌的解剖刀将其切块(大小约 0.5 cm×0.5 cm×0.25 cm),准确称量(5.0 g/包)后以自封袋包装,置于 4℃ 条件下冷藏。

1.3.2 菌落总数测定 每隔 2 d 取出冷藏的鲜切莲藕样品(各 3 包),分别在无菌操作条件下将其加入 95 mL 无菌生理盐水中,震荡均匀,取 1.0 mL 悬液进行梯度稀释,参照《食品卫生微生物学检验 菌落总数测定》(GB/T 4789.2—2010)方法进行稀释平板法菌落(CFU)计数。

1.3.3 优势腐败菌的分离纯化 取冷藏 8 d 的鲜切莲藕样品 1 包,按 1.3.2 的方法进行梯度稀释,选择 3 个合适的稀释度倾注平板(为提高分辨率,选用 15 cm 的大平皿),每个稀释度重复 3 次,30℃ 培养 72 h,选取菌落总数合适的平板,借助放大镜凭肉眼根据形态特征对菌落初步分组并计数,以数量最多的 4~5 组菌为优势菌,挑取单菌落进行平板划线纯化;纯化的菌株进行结晶紫染色,用显微镜油镜观察其细胞个体形态、排列等。

1.3.4 优势腐败菌的鉴定 经纯化后的菌株采用细菌 16S rDNA 菌种鉴定方法进行鉴定。具体参考 Moore 等^[12]的方法略作修改:将纯化的 4 种优势腐败菌接种于 10 mL LB 培养基中 37℃ 振荡培养过夜,分别提取 1#~4# 腐败细菌的基因组 DNA,以通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'扩增其 16S rDNA,将 1 500 bp 左右的 PCR 产物回收,送至上海生工股份有限公司进行测序,以测序获得的基因序列与 GenBank 中的已知序列进行同源性比较,根据 16S rDNA 序列相似性,以 MEGA 6.0 软件构建系统发育树,判定细菌种类,将细菌划分到属或种。

2 结果与分析

2.1 鲜切莲藕冷藏过程中细菌总数变化

图 1 为鲜切莲藕在 4℃ 条件下冷藏了 12 d 的微生物菌落总数变化规律曲线。由图 1 可知,冷藏过程中,鲜切莲藕的微生物菌落总数呈增长趋势,但冷藏前 6 d,菌落总数增加缓慢。冷藏 6 d 后,菌落总数开始呈指数增长,第 8 天时增加至 4.17×10⁵ CFU/g(新鲜样品为 1.77×10³ CFU/g);冷藏至第 12 天时,菌落总数已达到 1.58×10⁷ CFU/g。一般认为蔬菜初期腐败时的总活菌数为 10⁶ CFU/g 左右,而日本最新的微生物管理标准认为新鲜净菜活菌数应控制在 10⁵ CFU/g 以下^[13],因此,可以认为本试验制备的鲜切莲藕样品在冷藏第 8 天时已开始腐败。

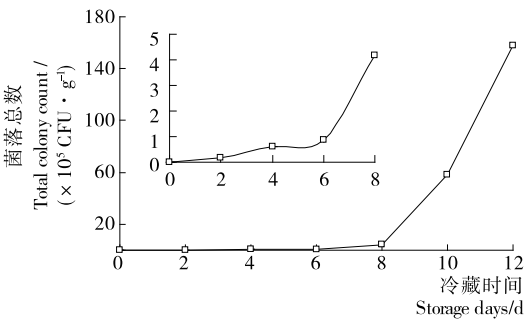
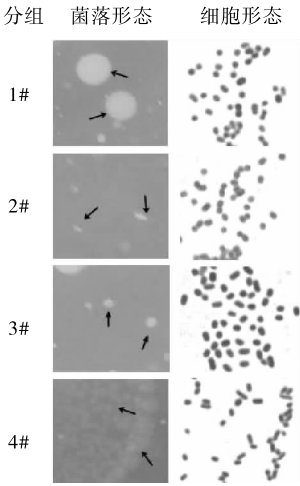


图 1 鲜切莲藕冷藏过程中菌落总数的变化
Figure 1 Change in the total colony count of fresh-cut lotus roots during cold storage period

2.2 腐败菌的分离及优势腐败菌的特征

采用稀释平板法分离冷藏第 8 天莲藕样品中的腐败菌,选择 10⁻³ 稀释度的平板计数,平均菌落总数为 598 CFU/平板;根据菌落形态特征可将所有菌落大致分为 14 组,分别编号为 1#~14#,其中 1#~4# 为数量较多,确定为优势腐败菌,其占总菌落数的比例及菌落和细胞形态特征见图 2。



所选平板中 1# 菌落 48 个,占比 8.03%;2# 菌落 91 个,占比 15.21%;3# 菌落 173 个,占比 28.93%;4# 菌落 149 个,占比 24.91%

图 2 4 种优势腐败菌的菌落和细胞形态特征
Figure 2 Colony and cell characteristics of four dominant spoilage bacteria

由图 2 可知,3[#]菌所占比例最大,为总菌落数的 28.93%,其菌落较小,圆形,直径约 0.5~2.0 mm,边缘整齐,表面无光泽;显微镜下观察为杆菌,细胞结晶紫染色较深,排列整齐。其次为 4[#]菌,占总菌落数的 24.91%,其菌苔较薄,菌落大小不一,形状不规则,易蔓延成片或簇;显微镜下观察为杆菌,易成对或排列成短链状;2[#]菌占总菌落数的 15.21%,其菌落为梭状,大小约(0.5~1.0) mm×(1.5~2.0) mm,表面光滑,边缘整齐,中间突起;显微镜下观察为短杆菌,细胞较小,单独、成双或短链状排列。1[#]菌占总菌落数的 8.03%,其菌落较大,圆形,直径为 4~6 mm,表面光滑,边缘整齐;显微镜下观察为短杆菌,细胞呈不规则排列。

2.3 优势腐败菌的 16S rDNA 鉴定

16S rDNA 基因具有高度的保守性与特异性,已被广泛应用于微生物的分类鉴定研究^[14]。采用 16S rDNA 系统发育分析方法对 4 株优势腐败菌进行鉴定,其 16S rDNA 的 PCR 扩增和系统发育树分析结果见图 3、4。

图 3 的琼脂糖电泳图结果显示在 1 500 bp 附近均出现较强的条带,且无明显拖尾现象,说明 4 株菌的 16S rDNA 均被成功 PCR 扩增;将上述条带回收后测序,序列在 NCBI 上进行 16S rDNA 序列同源性比较,采用 MEGA 6.0 软件对菌株的测序结果进行遗传分析。由图 4 可知,1[#]菌株与醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)亲缘关系最近,相似性为 99%;2[#]菌株与克雷伯氏菌(*klebsiella* sp.)亲缘关系最近,

相似性为 99%;3[#]菌株与解鸟氨酸拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica*)亲缘关系最近,相似性为 99%;4[#]菌株与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)亲缘关系最近,相似性为 99%。

夏天龙等^[10]分析了真空包装鲜切莲藕的菌相组成,发现其主要菌相为乳酸菌属、肠杆菌科、假单胞菌属、酵母菌属;李新楠等^[11]也分离了真空包装鲜切藕片的主要胀袋微生物,分别鉴定为阴沟肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、季也蒙假丝酵母、无名假丝酵母和葡萄芽假丝酵母。仅有肠杆菌科细菌与本试验结果一致,可能与鲜切莲藕样品的制备和腐败菌的分离和鉴定方法不同有关。

3 结论

鲜切果蔬表面微生物主要为腐败菌,其数量多少直接影响产品的货架寿命^[15]。本试验研究结果表明,鲜切莲藕在冷藏过程中,微生物菌落总数一直呈上升趋势,冷藏第 8 天时达到 4.17×10⁵ CFU/g,进入腐败初期,此后腐败加剧,菌落总数呈指数增加;冷藏过程中其优势腐败菌主要为醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)、解鸟氨酸拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica*)和阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。这一结果为鲜切莲藕冷藏过程中的微生物腐败进程和机制提供了生物学证据。后期在研究鲜切莲藕产品保鲜策略时,可针对优势腐败菌采取抑菌措施;同时,这些腐败微生物也可以成为鲜切莲藕产品质量安全系统评价的潜在指标。

参考文献

[1] 高哈, 孙俊良, 高愿军, 等. 气调包装对鲜切莲藕保鲜效果研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 612-614.

[2] Xing Ya-ge, Li Xi-hong, Xu Qian-lian, et al. Effects of chitosan-based coating and modied atmosphere packaging (MAP) on browning and shelf-life of fresh-cut lotus root (*Nelumbo nucifera Gaerth*) [J]. Innovative Food Sci. Emerg Technol., 2010, 11(4): 684-689.

[3] Lehto M, Kuisma R, Määttä J, et al. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants[J]. Food Control, 2011, 22(3): 469-475.

[4] 张立奎, 陆兆新, 汪宏喜. 鲜切生菜在贮藏期间的微生物生长模型[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 107-110.

[5] Jihye Son, Jeong-Eun Hyun, Jo-Won Lee, et al. Combined application of antibrowning, heat treatment and modified-atmosphere packaging to extend the shelf life of fresh-cut lotus root [J]. J. Food Sci., 2015, 80(6): 1 178-1 187.

[6] 金定樑, 夏文水. 柠檬酸亚锡二钠对鲜切莲藕护色作用的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(4): 130-132.

[7] 张华, 董月强, 李星科, 等. 高密度二氧化碳技术对鲜切莲藕酶活性的影响[J]. 食品与机械, 2013, 29(1): 170-172.

[8] 包英才, 王丹, 赵晓燕, 等. 鲜切青椒优势腐败菌的分离纯化及鉴定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 332-334, 338.

[9] 崔慧玲, 陈安均, 罗婵, 等. 鲜切生菜贮藏过程中优势腐败细菌的多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 223-229.

[10] 夏天龙, 易阳, 王宏勋, 等. 低温下鲜切莲藕菌相分析及货架期评价[J]. 中国酿造, 2014, 33(1): 86-90.

[11] 李新楠, 齐小保, 严守雷, 等. 5 种鲜切藕片胀袋微生物的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 151-154.

(下转第 186 页)

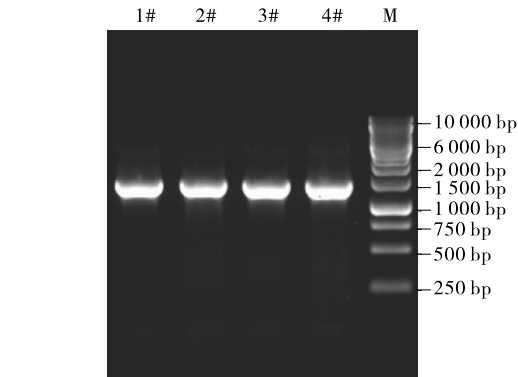


图 3 4 种优势腐败菌 16S rDNA 的 PCR 扩增结果
Figure 3 PCR amplification for 16S rDNA of four dominant spoilage bacteria

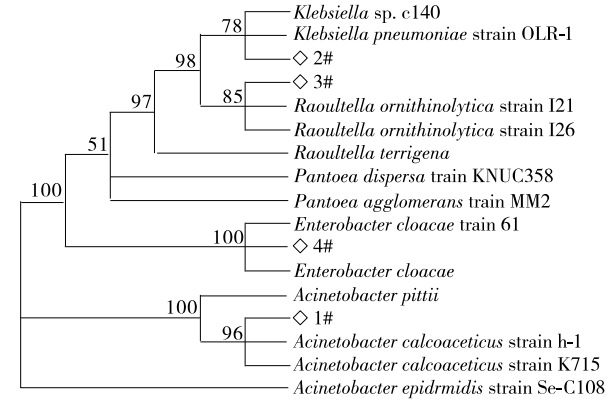


图 4 4 种优势腐败菌 16S rRNA 序列系统发育树
Figure 4 Phylogenic trees of four dominant spoilage bacteria based on their 16S rRNA sequences

参考文献

[1] 张润光,刁小琴,关海宁. 黑木耳营养保健功能及其产品开发[J]. 保鲜与加工, 2010, 1(1): 54-56.

[2] 刘雅静. 黑木耳化学成分及药理活性研究[D]. 山东: 山东轻工业学院, 2011: 1-10.

[3] Zhang Hua, Wang Zhen-yu, Yang Lin, et al. In vitro antioxidant activities of sulfated derivatives of polysaccharides extracted from *Auricularia auricular*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(5): 3 288-3 340.

[4] 王辰龙, 张子奇, 王曼, 等. 黑木耳多糖的提取分离及体外抗凝血作用研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 238-241.

[5] 刘美娜. 木耳多糖的提取[D]. 大连: 大连工业大学, 2009.

[6] 唐娟, 马永强. 超声波技术在黑木耳多糖提取中的应用[J]. 食品与机械, 2005, 21(1): 28-29.

[7] 朱磊, 王振宇, 周芳. 响应面法优化微波辅助提取黑木耳多糖工艺研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(2): 53-60.

[8] 王金凤. 木耳多糖提取工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 143-146.

[9] 樊梓鸾, 林秀芳, 王丽, 等. 响应面法优化高剪切分散乳化提取悬钩子多酚[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(4): 355-360.

[10] 孙术国, 麻成金, 黄群, 等. 高速剪切与微波辅助偶联提取鲜葛中葛根素[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 50-53.

[11] 李丽, 卜令娜, 刘晔玮, 等. 高速剪切技术提取油菜花粉总黄酮工艺[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 285-287,372.

[12] Xu Ya-qin, Zhang Ling, Yang Yu, et al. Optimization of ultrasound-assisted compound enzymatic extraction and characterization of polysaccharides from blackcurrant[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117(13): 895-902.

[13] 张立娟, 于国萍, 周国华. 黑木耳多糖酶法提取条件的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 89-91.

[14] 姜在祥, 张有林, 王洪新. 超声波协同酶法提取黑木耳多糖[J]. 食品工业, 2007(1): 29-32.

[15] 黄生权, 敖宏, 郭爱玲. 真菌保健食品中多糖含量测定方法的比较[J]. 现代食品科技, 2010, 26(7): 767-771.

[16] 姜红, 孙宏鑫, 李晶, 等. 酶法提取黑木耳多糖[J]. 食品与发酵工业, 2005, 6(2): 131-133.

[17] 鲜乔, 张拥军, 蒋家新, 等. 胞壁溶解酶用于黑木耳破壁提取工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(3): 96-103.

(上接第 150 页)

[12] John Moore, Yasunori Maeda, B Millar, et al. Employment of 16S rDNA gene sequencing techniques for improved identification of difficult-to-identify bacterial veterinary pathogens[J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2008, 24(7): 1 227-1 232.

[13] 何建军, 周明全, 胡中立, 等. 真空包装冷藏生鲜净菜莲藕的研制[J]. 湖北农业科学, 2002(6): 118-120.

[14] Woo P C, Ng K H, Lau S K, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles[J]. J. Clin. Microbiol., 2003, 41(5): 1 996-2 001.

[15] 樊振江, 郝亚勤, 张素君, 等. 鲜切莲藕微生物模型的建立及货架寿命预测[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 326-329.

(上接第 175 页)

[26] 董建瑞, 黄阿根, 梁文娟. 茶树花多酚提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 83-86.

[27] 刘红, 李元元, 龚晓武, 等. 不同提取方法对沙枣多酚清除自由基能力的比较研究[J]. 食品科技, 2010, 35(11): 227-230.

[28] 邓义书, 包海蓉, 齐知耕. 桑葚果渣中总多酚的不同提取方法比较研究[J]. 湖南农业科技, 2010(15): 106-108.

[29] Prior R L, Hoang H, Gu Li-wei, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity(ORAC)) of plasma and other biological and food samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(11): 3 273-3 279.

[30] 徐维盛, 李东, 刘静, 等. ORAC 法对 12 种水果总抗氧化能力评价研究[J]. 食品工业, 2014, 35(1): 247-250.

[31] 赵建, 宋亮楠, 刘薇, 等. ORAC 法测定保健食品抗氧化能力的体内外实验对比分析[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 103-108.

[32] 徐维盛, 张桂雨, 刘静, 等. ORAC 法评价 16 种茶叶的抗氧化能力[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 241-246.

(上接第 180 页)

[10] Rades, Thomas, Mcpowell, et al. Anti-ageing effects of *Sonchus oleraceus* L. (puha) leaf extracts on H₂O₂-induced cell senescence[J]. Molecular Plant, 2015, 20(4): 4 548-4 564.

[11] 石同同. 苦菜多酚、总黄酮提取工艺研究及其降解尼古丁作用初探[D]. 保定: 河北农业大学, 2014: 20-30.

[12] 蔡子龙, 潘颖, 聂政权, 等. 中心组合设计优化苦菜多酚类物质的提取工艺[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2012, 30(1): 67-69.

[13] 徐丹丹, 张文斌, 杨瑞金, 等. 大孔吸附树脂对葵仁多酚的分离富集[J]. 食品与机械, 2015, 31(5): 210-216.

[14] 李琼, 陈凯, 陈燕勤, 等. 大孔吸附树脂分离纯化核桃青皮总多酚[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 175-180.

[15] 马婷婷, 田呈瑞, 李龙柱, 等. 响应面优化黄参茎叶多酚的提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(11): 1 218-1 236.

[16] 熊建华, 汤凯洁, 罗秋水, 等. 大孔吸附树脂纯化金银花叶总多酚的工艺优化[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 52-55.

[17] 袁英姿, 曹清明, 钟海雁, 等. 大孔吸附树脂纯化油茶籽多酚的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(1): 61-63.

[18] 周平, 吕晓玲, 胡淳罡. 大孔吸附树脂分离纯化迷迭香酸的研究[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(4): 304-314.

[19] Xi Li-sha, Mu Tai-hua, Sun Hong-nan. Preparative purification of polyphenols from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves by AB-8 macroporous resins[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 166-174.

[20] 刁晶晶, 曹龙奎. 大孔吸附树脂吸附分离纯化软枣猕猴桃总黄酮[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 145-149.

[21] 冯进, 李敏, 曾晓雄, 等. 大孔树脂纯化蓝莓叶多酚及其组成分析[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 86-91.