

文章编号:2095-7386(2022)02-0001-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2022.02.001

辣条中腐败真菌的菌相分析及鉴定

向宸成^{1,2},柯媛¹,增佐凤¹,郑嘉怡¹,丁贝贝^{1,2},王学东^{1,2},肖甚圣^{1,2}

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023;

2. 武汉轻工大学 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023)

摘要:辣条是一种即食预包装调味面制品。为追求更好的感官品质,部分生产商向辣条中过度添加香精、色素和防腐剂等,同时由于霉菌生长导致辣条品质的变化,其对人的健康和安全造成不良影响的问题受到消费者越来越多的关注。本研究采用高通量测序手段对辣条中微生物菌群结构多样性进行解析,并鉴定辣条中腐败真菌的菌相。结果显示:辣条样品中优势腐败真菌菌门为子囊菌门,以曲霉属为主;其次是担子菌门,在送检样品中担子菌门达到了50%以上。这为如何延长辣条货架期的产品品质的改进提供了理论基础和应用参考。

关键词:辣条;高通量测序;腐败真菌

中图分类号:TS 254.4

文献标识码:A

Analysis and identification of spoilage fungi in spicy strips

XIANG Chen-cheng^{1,2}, KE Yuan¹, ZENG Zuo-feng¹, ZHENG Jia-yi¹,
DING Bei-bei^{1,2}, WANG Xue-dong^{1,2}, XIAO Shen-sheng^{1,2}

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, 430023 China;

2. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil Ministry of Education,
Wuhan Polytechnic University, Wuhan, 430023 China)

Abstract: Spicy strip is a ready-to-eat prepackaged seasoned noodle product. In order to form the peculiar organoleptic properties, over-addition of flavors, pigments, and preservatives in the spicy strips was employed by some manufacturers. Meanwhile, consumers are paying more and more attention to the health and safety problems caused by mold growth. Herein, the structural diversity of microbial flora in spicy strips was analyzed by high-throughput sequencing, and the phase of spoilage fungi in spicy strips was investigated and identified. The results showed that the dominant spoilage fungi in spicy strip samples were Ascomycetes, mainly *Aspergillus*, followed by Basidiomycetes, which reached more than 50% in the samples submitted for inspection. This work provided a theoretical basis and application reference for prolonging the shelf life of spicy strip.

Key words: spicy strips; high-throughput sequencing; spoilage fungus

收稿日期:2022-02-17.

作者简介:向宸成(1996-),男,硕士,E-mail:2378119985@qq.com.

通信作者:肖甚圣(1987-),女,中级实验师,硕士,E-mail:xsswhpu730@163.com.

基金项目:武汉轻工大学校立项目(编号:2021Y09).

1 引言

辣条是一种挤压膨化类产品,是通过水分、热能、机械剪切和压力等综合作用形成的一种淀粉类食品^[1]。制作辣条的主要原料是小麦粉,其中辅料有食盐、水和单甘酯等,再经过打粉、挤压、膨化、冷却、切分等工艺加工而成^[2]。随着生活水平的逐渐提高,人们对食品营养的需求也日益增强,因此在本实验的前期工作中,对低盐辣条产品进行了研究,实验数据表明,辣条中氯化钠的添加量高于 6% 时不利于面团中面筋网络的形成,但氯化钠的添加量低于 6% 时,辣条中微生物又无法得到很好的控制^[3]。市场上有很多品牌的辣条均因微生物超标出现过食品卫生问题,因此低盐型辣条产品微生物检验不合格的问题亟待解决。而辣条中富含碳水化合物、蛋白质,且水分含量高,给微生物繁殖提供了良好的环境^[4]。

目前,国内对于面制品中微生物的研究,主要是通过菌落总数、霉菌数、致病菌和理化指标等的检测来评价产品质量,因此相关研究均大致分析了污染面制品的微生物种类,并且发现污染面制品的微生物主要有两大类:细菌和霉菌^[5]。在面制品微生物相关研究中,关于面包、蛋糕和月饼等面制品的研究较多^[6-11]。周文化^[12]等研究发现生鲜湿面产品中的腐败菌相是霉菌属,主要是毛霉属和青霉属。Jensen^[13]等报道冷藏湿面中腐败细菌主要有大肠菌群、乳酸菌、酵母菌和霉菌。半干面中优势腐败菌群主要是芽孢杆菌属和葡萄球菌属,分离鉴定的霉菌主要有白曲霉、杂色曲霉和圆弧青霉^[14]。

辣条行业的发展时间短,近年来的相关调研分析主要集中于它的质量安全现状。有研究者对 2011 年—2014 年湘式挤压糕点 957 份样品进行了抽检分析,检测出不合格样品为 191 份,不合格率约为 20%,其中微生物指标不合格产品占比为 3.1%^[15]。此外,还有调研分析 300 批次调味面制品中,有 28 批次检出蜡样芽孢杆菌,检出率为 9.33%^[16]。2017 年河南省食品质量监督管理部门抽检了 104 批次辣条产品,经统计分析结果发现辣条产品出现不合格主要是因其微生物检验不合格,主要不合格项目为菌落总数和霉菌,不合格率分别占比 14.42%、0.96%^[17]。

目前,对辣条微生物菌群多样性的分析方法主要以传统分离技术和高通量测序技术为主。由于自然界中大量的微生物无法通过周期较长的传统培养

方式进行分离纯化,且微生物菌群结构中低丰度菌种不易被筛选得到。因此,传统分离技术无法全面地解析辣条微生物菌群结构特征。近年来,随着分子生物学技术的不断发展,高通量测序技术逐渐成为微生物菌群结构多样性的重要分析手段^[18-19]。本研究采用高通量测序手段,全面的对辣条中微生物菌群结构多样性进行解析,利用 Illumina MiSeq 平台,并通过多元统计学分析,进一步明确辣条中微生物菌群种类,为延长辣条货架期的产品品质提供理论基础和应用参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

六月春小麦粉(水分含量为 12.47%,灰分含量为 0.79%,粗蛋白含量为 10.80%),河南莲花面粉有限公司;单双甘油脂肪酸酯,佳力士添加剂有限公司;氯化钠(食品级),湖北盐业集团有限公司。

2.2 仪器与设备

HY-YTDFJ-60 圆桶打粉机、HY-WSXFJ-1050 卧式下粉机、HY-SXPHJ 挤压机,平江弘宇机械制造有限公司;FLx800 荧光分析仪酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;ABL2720PCR 扩增仪,美国赛默飞世尔公司;Nanodrop2000 超微量分光光度计,美国赛默飞世尔公司。

2.3 辣条样品的制备

A1、B1、C1 样品是从湖南省玉峰食品实业有限公司获得的长菌变质辣条样品;K1、K2、K3 是本实验室生产的辣条,密封放置 3 个月后长菌变质的样品。

辣条坯体制作原料:辣条专用小麦粉、氯化钠(占小麦粉质量分数 10%,以小麦粉的质量计,下同)、单甘脂(占小麦粉质量分数 0.48%)、水(占小麦粉质量分数 30%)。

辣条坯体制作工艺:制作工艺参考本实验室前期的研究工作^[20-23],分别称取氯化钠、单甘脂加入水中,搅拌至氯化钠全部溶解。将小麦粉倒入打粉机中,同时快速倒入上述混合液,启动打粉机,高速搅打约 30 s,接取物料。将接取的面絮状物料倒入单螺杆挤压膨化机中,启动机器,初始下粉速度为 500 g/min,缓慢调到 1800 g/min 后稳定不变。挤出辣条坯体先通过传送带(传送带速度与出料速度匹配)冷却一段时间,最后在传送带末端切断。接取切断物料,在室温下冷却 2 min,然后装入 PE 自封袋,保持在 25℃ 下储藏 3 个月。

2.4 菌相鉴定

2.4.1 微生物组总 DNA 提取

优化总 DNA 提取方法参数,同时采用 Nanodrop 对 DNA 进行定量,并通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。

2.4.2 目标片段 PCR 扩增

通常以微生物核糖体 RNA 或特定基因片段等能够反映菌群组成和多样性的目标序列为靶点,根据序列中的保守区域设计相应引物,并添加样本特异性 Barcode 序列,进而对 rRNA 基因可变区(单个或连续的多个)或特定基因片段进行 PCR 扩增。本实验选用长度约为 250bp 的真菌 ITS1 rRNA 来测序。PCR 扩增选用真菌 ITS1 rDNA 特异性引物:ITS5F(5' - barcode + GGAAGTAAAAGTCGT AACCAAGG - 3'), ITS1R (5' - GCTGCGTTCTTCATCGATGC - 3')。

2.4.3 ITS rDNA 高通量测序

(1)将 Illumina 公司 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备的测序文库在 Agilent Bioanalyzer 上进行质检,采用 Agilent High Sensitivity DNA Kit 测序手段。合格的文库有且只有单一的峰,且无接头;(2)采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统对文库进行定

量,合格的文库浓度应在 2nM 以上;(3)将合格的各上机测序文库(Index 序列不可重复)梯度稀释后,根据所需测序量按相应比例混合,并经 NaOH 变性为单链进行上机测序;(4)使用 Illumina MiSeq 测序仪进行2×300bp的双端测序,相应试剂为 MiSeq Reagent Kit V3(600 cycles)。

2.4.4 生物学信息分析及流程

根据 Illumina Miseq 高通量测序得到辣条微生物的序列数据,然后用 DADA2 方法进行去引物,质量过滤,去噪,拼接和去嵌合体等步骤。用 QIIME2 软件对样本的测序量进行统计,对高质量序列提取后进行生物学信息分析,包括:菌群多样性分析、菌群群落种类和丰度分析,全面了解辣条中的菌群。

3 结果与分析

3.1 辣条中微生物测序数据结果

经 QIIME2 软件对样本的测序量进行统计,数据处理过程中各步骤得到的统计结果见表 1。辣条样品真菌测序获得的序列有效率除 K3 样品为 77.70%,其他样品达到 80% 以上,A1、B1、C1、K1、K2 辣条样品真菌测序获得的序列有效率分别为 92.10%、95.17%、82.45%、80.86%、80.14%,由此结果可知本次测序结果合理。

表 1 辣条试样高通量测序的序列基本信息

样本名	原始数据量	去除低质量序列 后数据量	有效数据量	拼接后数据量	高质量序列量	有效率/%
A1	373 15	354 44	353 90	351 78	343 67	92.10
B1	427 15	408 36	407 94	406 51	406 50	95.17
C1	386 98	354 49	353 31	351 59	319 07	82.45
K1	919 50	853 27	850 61	841 43	743 50	80.86
K2	944 48	884 24	880 55	871 32	756 89	80.14
K3	955 81	883 34	880 38	873 57	742 64	77.70

3.2 Alpha 多样性指数分析

为了进一步探究辣条微生物菌群结构多样性,研究采用高通量测序手段通过 Chao1 和 Shannon 指数以初步表征辣条真菌菌群结构多样性。对辣条样品在 95% 一致性阈值下的菌群多样性进行统计,结果如表 2 所示。物种数(Observed species)指数和超(chao1)指数反映了单个样品中物种的数量,表征丰富度,指数越大,表明群落的丰富度越高。菌群覆盖度(Good's coverage)指数表征覆盖度,反映了测序深度,当测序深度覆盖到样品中所有的物种时,其值为 1,指数越高,则样本中未被检测出的物种所占的比例越少。香农(Shannon)指数的大小可表示菌群

多样性,相同丰富度时,值越大,均匀度越高,群落的多样性越大。

从表 2 可看出:6 个样品的 Good's coverage 指数都在 0.9997 以上,说明覆盖度大,未被检测出的物种所占比例少,几乎所有序列都被测出,本次多样性分析结果能反映样品菌群组成的真实情况,检测结果具有参考意义。K2 样品的 Chao1 指数、Shannon 指数和 Observed species 指数最高,B1 样品最低,其他样品相近。说明 K2 样品中的物种复杂度最大,真菌菌群多样性最丰富,B1 样品的物种丰富度和群落多样性均为最低。

表 2 辣条试样微生物菌群的 α 多样性分析

样品	超指数	香农指数	物种数	菌群覆盖度指数
A1	51.222 9	3.266 42	49.5	0.999 767
B1	24.284 3	0.121 281	23.1	0.999 791
C1	84.043 3	3.386 96	84	0.999 964
K1	62.663 3	2.706 03	61	0.999 773
K2	106.355	4.422 46	103.5	0.999 701
K3	65.394 3	3.905 31	64.2	0.999 796

3.3 物种相对丰度聚类热图物种组成和聚类分析

为进一步比较样本间的物种组成差异,实现对各样本的物种相对丰度分布趋势的展示。根据菌群 ASV 聚类分析,选取丰度较大菌属,从物种层面上进行聚类,绘制成热图,可以看出哪些物种在样本中聚集较多或含量较低。由图 1 可知,不同的辣条样品在丰度较大真菌(属)的分布上有差异,形成的菌群结构也不尽相同。C1 样品中丰度较大的真菌菌群数量明显多于其他 5 个辣条样品,说明 C1 样品真菌菌群丰富度较高,且这 6 种辣条样品在菌属分布上存在差异。

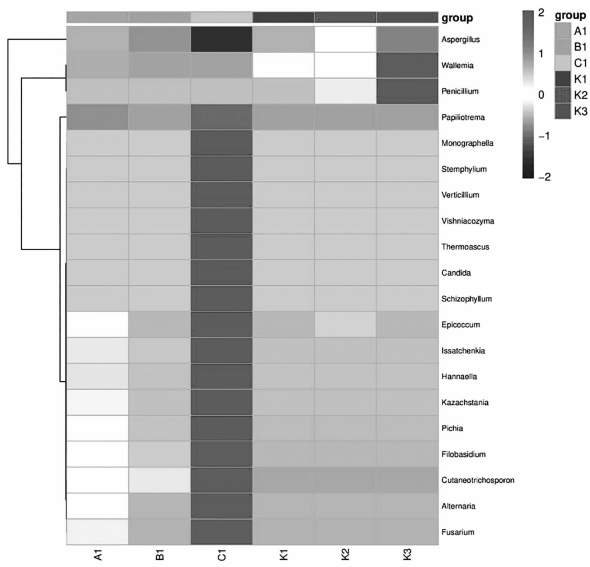


图 1 不同辣条试样物种聚类的属水平物种组成热图

3.4 主成分分析(PCA)

PCA 是应用方差分解,对多维数据进行降解进而将差异反映在二维坐标图上,显示出更为简单明了的规律。如果样本的菌群结构组成相似,那么在 PCA 图上的距离也就越近。PCA 分析结果展示如图 2。由图 2 可知,横纵坐标分别为 PC1 与 PC2,其贡献率分别为 71% 和 26.9%,说明这两个主成分是样品菌群结构组成差异的主要因子。其中在 PC1 和 PC2 方向上,A1 样品、B1 样品、K1 样品与 K2 样

品距离最近,说明这 4 种样品的真菌菌群组成最相似;C1 样品和 K3 样品与其他 4 个样品距离较远,说明与其他 4 个样品真菌菌群组成差异较大。综上,C1 样品和 K3 样品与其他 4 个样品的菌群组成有较大差异。

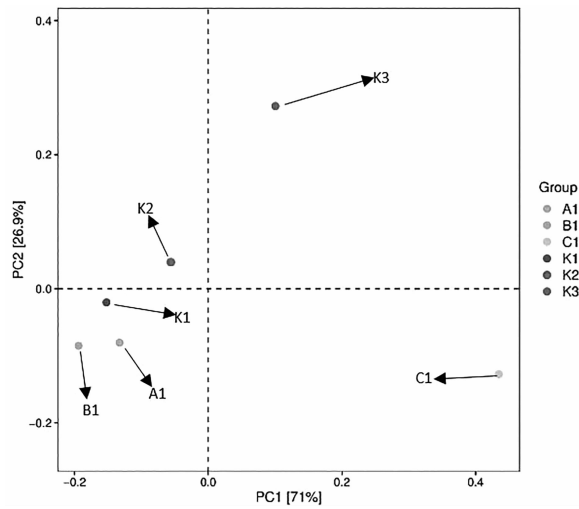


图 2 不同辣条试样基于属水平的 PCA 分析图

3.5 物种分类学注释

为展示物种注释情况,对鉴定结果进行统计,根据物种注释结果,选取每个样本在门(Phylum)和属(Genus)水平上相对丰度排名靠前的物种,生成物种相对丰度柱状堆积图。由图 3 可知,这些辣条样品中优势真菌菌门主要是子囊菌门(Ascomycota),所占比例除 K3 样品为 69.74%,其他都达到了 93% 以上,甚至 A1、B1、C1 都达到了 98% 以上。另外,这 6 种辣条样品中担子菌门(Basidiomycota)存在差异,K1、K2、K3 样品中担子菌门所占比例分别为 5.82%、6.97%、30.26%,其他样品(A1、B1 和 C1)所占比例依次为 0.78%、0.01% 和 0.99%。

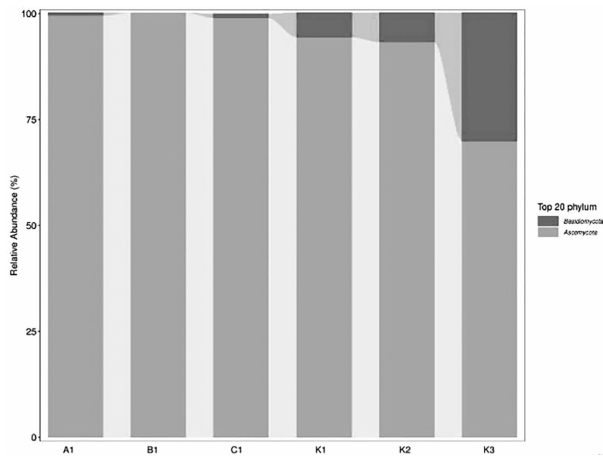


图 3 不同辣条样品门水平上的物种相对丰度柱状图

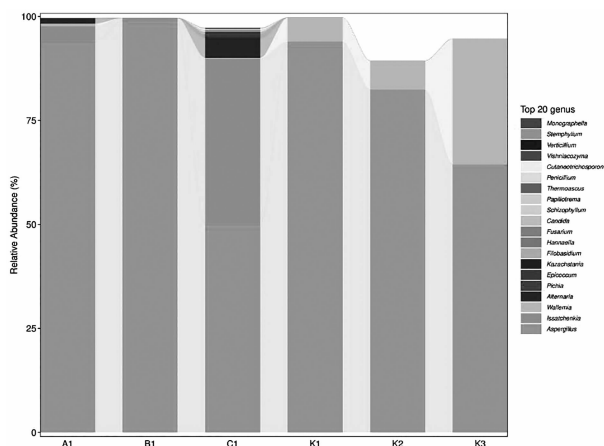


图4 不同辣条样品属水平上的物种相对丰度柱状图

由图4可知,从真菌的属水平看,这6种辣条样品菌群组成存在差异,但是6种样品(A1、B1、C1、K1、K2、K3)都以曲霉菌属(*Aspergillus*)为主,所占比例分别为93.94%、99.11%、50.12%、93.92%、82.38%、64.41%。其他菌群组成也存在明显差异,其中,A1、B1、C1样品中占比较大的是伊萨酵母属(*Issatchenkia*),所占比例分别为3.68%、0.54%、39.76%;K1、K2、K3样品中占比较大的是节担菌属(*Wallemia*),所占比例分别为5.82%、6.97%、30.26%。此外,还有一定量的未确定的散子囊菌目(*Eurotiales*)等。面制品中主要的腐败真菌是霉菌,周文化^[12]、Jensen^[13]在面条中发现主要腐败菌为霉菌属;胡庆松^[8]发现年糕中的腐败菌是曲霉菌属。

4 结论

辣条样品中优势腐败真菌菌门为子囊菌门(*Ascomycota*),其次是担子菌门(*Basidiomycota*)。辣条样品的主要腐败真菌为曲霉菌属(*Aspergillus*),所占比例分别为93.94%、99.11%、50.12%、93.92%、82.38%、64.41%。其他菌群组成也存在明显差异,其中,湖南省玉峰食品实业有限公司提供的长菌变质辣条样品中占比较大的是伊萨酵母属(*Issatchenkia*);本实验室生产的密封放置3个月后长菌变质的辣条样品中占比较大的是节担菌属(*Wallemia*),还有一定量未确定的散子囊菌目(*Eurotiales*)等。这些结果为如何延长辣条货架期的产品品质的改进提供了理论基础和应用参考。

参考文献:

[1] 马文静,张瑞,周荣雪,等.膨化技术及其在谷

物淀粉制品中的应用研究进展[J].食品工业,2018,39(11):226-230.

[2] 安虹,谭炜.调味面制品产品质量现状调研及分析[J].安徽农业科学,2016,44(3):88-89.

[3] 付朝煦.氯化钠对辣条坯品质的作用机制探究[D].武汉:武汉轻工大学,2019.

[4] 刘芳岑,王欣婷,姜晓野.麻辣面制品的质量控制[J].品牌与标准化,2015(6):51-52.

[5] 何莲,吴洁,王璐,等.市售辣条食品相关指标的调查分析[J].农业与技术,2019,39(17):41-44.

[6] 陈盼.广式月饼中微生物区系的研究[D].重庆:西南大学,2009.

[7] Ji Y, Zhu K, Qian H, et al. Microbiological characteristics of cake prepared from rice flour and sticky rice flour [J]. Food Control, 2007, 18(12):1507-1511.

[8] 胡庆松,刘青梅,杨性民,等.年糕腐败菌的鉴定和菌系分析[J].食品与生物技术学报,2009,28(04):564-568.

[9] 程红党.传统发酵面制品中腐败微生物及其天然抑菌剂研究[D].保定:河北农业大学,2014.

[10] J Vytřasová, P P řibáňová, L Marvanová. Occurrence of xerophilic fungi in bakery gingerbread production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 72(1-2):91-96.

[11] 王勃,刘昕,马涛,等.响应面法优化脉冲强光对面包表面细菌的杀菌工艺[J].食品科学,2014,35(18):74-77.

[12] 周文化,郑仕宏,唐冰.生鲜湿面菌相分析及腐败菌分离[J].粮食与油脂,2010(4):45-47.

[13] Jensen N, Hocking A D, Miskelly D, et al. Microbiological safety of high moisture noodles. 1. Marketplace survey of noodles sold in Australia [J]. Food Australia, 2004, 56(3):71-74, 78.

[14] 李洁,孙妹,朱科学,等.半干面腐败菌的分离与鉴定[J].食品科学,2012,33(5):183-187.

[15] 颜睿康.湖南省湘式挤压糕点质量现状调查及提质对策研究[D].长沙:湖南农业大学,2016.

(下转第12页)

- [6] Rodriguez G J, Sahi S S, Hernando I. Functionality of lipase and emulsifiers in low-fat cakes with inulin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 58(1):173-182.
- [7] 潘珣璠, 张方东, 卜鑫, 等. 改性壳寡糖中羧基含量对其吸湿保湿和抗氧化性能的影响[J]. 日用化学工业, 2020, 50(10):687-692.
- [8] 尹国友, 孙婕, 孔敏雪, 等. 大豆油体蛋糕的制作及品质分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14):5808-5814.
- [9] 孙辉, Macritchie F. 利用图像分析技术评价发酵面食品品质的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2011, 32(04):59-62+67.
- [10] Liu Y, Guan E, Li M, et al. Improvement of cake quality by superheated steam treatment of wheat [J]. Journal of Cereal Science, 2020, 95:103046.
- [11] 曹征南, 刘建福, 马亚茹, 等. 豌豆膳食纤维粒径对面包面团及面包品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19):8-12.
- [12] Niu H, Han Q, Cao C, et al. Short-term retrogradation behavior of corn starch is inhibited by the addition of porcine plasma protein hydrolysates[J]. International journal of biological macromolecules, 2018, 115:393-400.

(上接第 5 页)

- [16] 季小荣, 刘钦钰, 陈晓蔚. 调味面制品中蜡样芽胞杆菌污染状况调查分析[J]. 检验检疫学刊, 2019, 29(2):36-38.
- [17] 郭旭光, 郑子栋, 郭毅. 2017 年河南省调味面制品安全监督抽检不合格项目及危害分析[J]. 河南预防医学杂志, 2019, 30(2):80-82, 85.
- [18] 曹荣, 刘淇, 赵玲, 等. 基于高通量测序的牡蛎冷藏过程中微生物群落分析[J]. 农业工程学报, 2016, 32(20):275-280.
- [19] 李晓然, 龚福明, 李洁, 等. 基于混合培养和高通量测序分析云南传统发酵豆豉中活性细菌群落[J]. 食品科学, 2014, 35(7):90-94.
- [20] 杨恒, 王学东, 丁贝贝, 等. 不同糖醇对辣条坯体品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13):8.
- [21] Ke Y, Ding B, Zhang M, et al. Study on inhibitory activity and mechanism of chitosan oligosaccharides on *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Fumigatus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 275:118673.
- [22] Ke Y, Ding B, Fu Y, et al. Effects of chitosan oligosaccharide and hyriopsis cumingii polysaccharide on the quality of wheat flour and extruded flour products[J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(7):911-919.
- [23] Yang H, Fu Y, Zhang Y, et al. Evaluation of mannitol and xylitol on the quality of wheat flour and extruded flour products[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2021, 56(8):4119-4128.