

“几种特殊食品产品开发及安全解决方案” 特约专栏文章之一

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.04.006

土豆烧牛肉方便菜肴胀袋微生物 分离鉴定及产气特性研究

李慧¹, 卢玉¹, 钟鸣¹, 李小燕¹, 张晨悦¹, 陈文波¹, 王乃娟², 陈辉²

(1. 中粮营养健康研究院, 营养健康与食品安全北京市重点实验室, 北京 102209;
2. 浙江舟富食品有限公司, 浙江 舟山 316200)

摘要: 为解决土豆烧牛肉方便菜肴产品的胀袋问题, 对胀袋微生物进行分离、纯化、鉴定和产气特性研究。分离、纯化得到7株优势微生物。结合形态学观察、16S rRNA序列分析及基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术鉴定分离微生物, 结果显示2株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 2株为表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*), 2株为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 1株为凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。将分离菌株接种到无菌土豆烧牛肉样品中, 发现枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)有明显产气现象, 是引起产品胀袋的主要原因。

关键词: 土豆烧牛肉; 胀袋微生物; 鉴定; 枯草芽孢杆菌; 地衣芽孢杆菌

中图分类号: TS207.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)04-0036-07

网络首发时间: 2020-06-17 12:00:09

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20200617.1013.004.html>

Isolation, identification and gas generation of spoilage microorganisms from swollen braised brisket with potato

LI Hui¹, LU Yu¹, ZHONG Ming¹, LI Xiao-yan¹, ZHANG Chen-yue¹,
CHEN Wen-bo¹, WANG Nai-juan², CHEN Hui²

(1. Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing Key Laboratory of Nutrition, Health & Food Safety, Beijing 102209, China;
2. Zhejiang Zhoufu Food Co., Ltd., Zhoushan, Zhejiang 316200, China)

Abstract: In order to solve the problem of bag expanding of braised brisket with potato, the microorganism of expanding bag was separated, purified, identified and gas production characteristics were studied. Seven dominant strains were obtained. Morphology observation, 16S rRNA sequence and MALDI-TOF MS were combined to identify the obtained strains. As a consequence, strain 001 and 002 were identified as *Bacillus subtilis*, strain 003 and 004 were *Staphylococcus epidermidis*, strain 005 and 006 were *Bacillus licheniformis*, strain 007 were the member from *Bacillus coagulans*. When those strains were inoculated into the braised brisket with potato, obvious gas generation was observed for strain 001, 002, 005, and 006 which was the main reason for the bag expansion of braised brisket with potato.

收稿日期: 2020-02-09

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0400500)

作者简介: 李慧, 女, 1972年出生, 博士, 高级工程师, 研究方向为粮食发酵和食品安全。

通讯作者: 陈文波, 男, 1980年出生, 博士, 高级工程师, 研究方向为食品安全和发酵工程。

Key words: braised brisket with potato; swelling related microorganisms; identification; *Bacillus subtilis*; *Bacillus licheniformis*

牛肉含有丰富的蛋白质、维生素以及矿物质,并且脂肪与胆固醇含量比其他肉类要低,味道鲜美、营养价值高^[1]。以牛肉为原料的菜肴数不胜数,其中土豆烧牛肉味道浓郁,肉菜结合,营养丰富,深受消费者喜爱。因此,实现土豆烧牛肉方便菜肴的工业化生产,可满足消费者对这一传统菜肴方便、快捷、营养、卫生的大量需求^[2]。但土豆烧牛肉产品含有丰富的淀粉、蛋白质、脂肪、氨基酸、维生素等营养成分^[3],另外生产所用原辅料种类繁多,来源复杂。如果原辅料控制不严,杀菌不彻底,在适宜的贮藏条件下,残留微生物极易大量繁殖,引起产品胀袋及腐败变质等问题,不仅影响食用的口感,更威胁人体健康,同时带来经济损失。因此分析土豆烧牛肉方便菜肴产品胀袋微生物,为更好的确认原辅料验收、杀菌等工艺参数,并保留产品原有色、香、味等奠定良好的基础。

有关食品胀袋微生物分离鉴定的报道较多,如谢婷婷等^[4]从胀袋鲍汁中分离出地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌;冯劲等^[5]从变质番茄沙司和烧烤汁中分离并鉴定了 4 株乳酸菌;李新楠等^[6]从胀袋真空包装鲜切藕片中分离鉴定出阴沟肠杆菌,蜡样芽孢杆菌和酵母菌。Xu^[7]等从胀罐浓缩牛奶中分离鉴定了 6 株嗜渗菌膜假丝酵母 (*Candida pelliculosa*)。但是对于引起土豆烧牛肉方便菜肴产品胀袋的特定污染微生物研究报道较少,且不同的食品胀袋微生物应有不同的针对性分离、鉴定和分析。

目前,微生物鉴定常用的方法有形态观察、生化鉴定和分子生物学鉴定^[8-9]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 MALDI-TOF MS 技术用于微生物鉴定是近几年发展起来的一门新技术,通过检测未知微生物的蛋白质指纹图谱,并与质谱图数据库中特征性谱图进行比对,从而对待测微生物进行快速鉴定。该方法具有检测成本低、检测时间短、易于操作等技术优势。嵇金如^[10]等利用 MALDI-TOF MS 技术,有效鉴定了 20 株生化法无法区分的医院不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 和皮特不动杆菌 (*Acinetobacter pittii*)。Höll 等^[11]利用

MALDI-TOF MS 技术鉴定气调包装禽肉腐败微生物的动态变化,证明该技术不仅鉴定通量高,鉴定准确率也高。

本研究以胀袋土豆烧牛肉方便菜肴试制产品为原料,通过选择分离得到纯化微生物菌种,并将 MALDI-TOF MS 技术与常用的微生物鉴定方法相结合对所分离纯化的微生物进行菌种鉴定,进一步把分离鉴定的微生物回接产品进行产气性能验证,旨在确定引起本研究产品胀袋的微生物种类,使得胀袋原因得到有效溯源,为方便菜肴生产企业采取有效控制措施,保障方便菜肴产品生产的质量与安全,避免生产经济损失提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品

正常及胀袋土豆烧牛肉方便菜肴:浙江舟富食品有限公司提供的试制产品。

1.1.2 培养基

孟加拉红培养基、麦芽浸膏(琼脂)培养基、营养肉汤(琼脂)培养基、MRS(琼脂)培养基、MC 琼脂培养基:购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.1.3 化学试剂

细菌革兰氏染液、细菌芽孢染液:北京陆桥技术有限责任公司;NaCl 分析纯:北京化工厂;细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物纯化试剂盒:天根生化科技有限公司;脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)、*Taq* 酶(5U/uL)及 Buffer:宝生物工程(大连)有限公司;引物:英潍捷基上海贸易有限公司合成;质谱样本预处理试剂盒、标本板:Autobio 安图生物工程股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

拍击式均质器 400 VW:法国 Interscience 公司;IPP260 低温培养箱:德国 Memmert 公司;生物安全柜:新加坡 ESCO;Autof MS1000 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪:安图实验仪器(郑州)有限公司;Scope A1 正置相差显微镜:

德国 ZEISS; Scan1200 自动菌落计数仪: 法国 Interscience 公司; SQ510C 立式压力蒸汽灭菌器: 日本 YAMATO; Bead Beater: 美国 Biospec 公司; Veriti 梯度 PCR 仪: 美国 Lifetechnologies; NanoDrop 2000 超微量分光光度计: 美国 ThermoFisher 公司; XR System 凝胶成像系统: 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胀袋微生物菌种的分离和纯化

从胀袋土豆烧牛肉方便菜肴产品中无菌操作称取 25 g 样品, 置盛有 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中, 拍击式均质器拍打 1~2 min, 制成 1:10 的样品匀液, 然后将此样品进行 10 倍梯度稀释至 10^{-6} [12]。取各梯度稀释样品匀液 1 mL 于无菌平板中, 将 15~20 mL 冷却至 46 °C 的孟加拉红培养基、麦芽浸膏琼脂培养基、营养肉汤琼脂培养基、MRS 琼脂培养基、MC 琼脂培养基倾注平皿, 并转动平皿使其混合均匀。

孟加拉红培养基平板、麦芽浸膏琼脂培养基平板倒置于 28 °C 恒温培养箱中培养 3~5 d; 营养肉汤琼脂平板、MRS 培养基平板、MC 培养基平板倒置于 36 °C 恒温培养箱中分别需氧和厌氧培养(厌氧罐) 2~3 d。根据菌落形态, 大小及颜色的不同, 挑选不同的单菌落接种于相应的固体培养基中至少纯化 3 次, 最后接种试管斜面于 4 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 形态学观察

将保藏菌株 001、002、003、004、005 和 006 在营养琼脂培养基上划线, 36 °C 培养 48 h, 将菌株 007 在 MRS 琼脂培养基上划线, 36 °C 厌氧培养 72 h, 观察菌落生长情况及菌落形态, 取单个菌落 1 环进行革兰氏染色和芽孢染色, 观察菌体形态。

1.3.3 分子生物学鉴定

挑取培养平板上的单菌落分别接种营养肉汤培养基或 MRS 液体培养, 36 °C 培养 24~72 h 至 OD_{600} 1.0 以上。取 1 mL 菌液 12 000 r/min 离心 10 min 后, 弃去上清, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组的说明书规定操作, 所得的基因组用超微量紫外分光光度计检测浓度和纯度。

16S rRNA 序列扩增所用引物, 正向引物为 27F: 5'-AGAGCCTGGCTCAGTTTGAT-3' 反向引物为 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'[13-14]。

PCR 反应体系: 30 μ L 反应体系, 依次加入无酶无菌水 19.2 μ L、10 \times Buffer 3 μ L、dNTPs 2.5 μ L、引物各 1.5 μ L、Taq 酶 0.3 μ L (5 U/ μ L)、所提取的基因组 2 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 进入循环程序, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 再 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 条件下暂时保存, -20 °C 条件下保存备用。PCR 完成后将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

将电泳检测后的 PCR 产物送至英潍捷基上海贸易有限公司进行测序, 获得 16S rRNA 基因序列。测序结果在美国国家生物技术信息中心 (national center of biotechnology information, NCBI) 的 GenBank 中进行基本局部比对搜索工具 (basic local alignment search tool, BLAST) 分析比对, 并进行同源序列搜索, 根据同源序列搜索结果, 导出同源性 $\geq 99\%$ 菌株的 16S rRNA 基因序列区。

1.3.4 MALDI-TOF MS 鉴定

用无菌枪头挑取待测单菌落, 均匀涂抹加样到金属靶板小圈内, 每个靶点加 1 μ L 基质液, 最后, 取 1 μ L 标准品滴加到靶板上作为质量控制。室温干燥后, 每个靶点加 1 μ L 基质, 室温干燥后将金属靶板放入仪器中进行检测。

微生物菌种鉴定采用 Autobio 公司推荐的方法, 质谱仪线性正性模式, 正离子采集分子量为 2 000~20 000 的蛋白质图谱。每个样本在不同位置击打 3 次, 每次 40 次激光点击, 采集得到的质谱通过软件进行校正, 然后与仪器内的已知微生物数据库图谱进行比对, 软件对每一组蛋白质的质谱比对和微生物鉴定给出相应的分数 (0~10), 最终给出鉴定结果。根据 Autobio 标准, 分数越高, 鉴定准确度的可信度越高。

1.3.5 胀袋微生物产气性能验证

将从胀袋土豆烧牛肉方便菜肴样品中分离纯化和鉴定的菌株 001~006 接种肉汤培养基 36 °C 培养 24 h, 菌株 007 接种 MRS 液体培养基 36 °C 厌氧培养 36 h。调整菌液浓度 OD_{600} 为 0.6 左右备用。无胀袋现象土豆烧牛肉方便菜肴产品 121 °C 灭菌 30 min, 无菌操作取 100 g 于无菌袋中并接种菌液, 接种量为 5%。菌株 001~007 接种样品无菌袋封口后 36 °C 培养观察产气胀袋现象, 菌株 007 接种样品同时置厌氧罐中 36 °C

培养观察产气胀袋现象, 以未接种的样品为空白对照。

1.3.6 数据处理

使用 MEGA 6.0 软件对分离微生物的 16S rRNA 基因序列和 GenBank 内 BLAST 同源性比对结果构建系统发育树。

质谱分析仪采集软件为 Autof Acquirer, 分析软件为 Autof Analyzer, 用标准品进行系统误差校正。微生物属及种判断标准: 9.5~10.0 为种水平置信, 可能的亚种; 9.0~9.5 为种水平置信; 6.0~9.0

为属水平置信; 0.0~6.0 为不可置信。本研究选取 ≥ 6.0 为待测菌株的鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 分离菌株菌落及菌体形态观察

通过对胀袋土豆烧牛肉中的微生物进行分离、纯化、简单形态学观察后得到 7 株不同形态的细菌, 未检出真菌类微生物。7 株细菌依次编号为 001、002、003、004、005、006 和 007, 菌落形态和细胞形态见图 1。

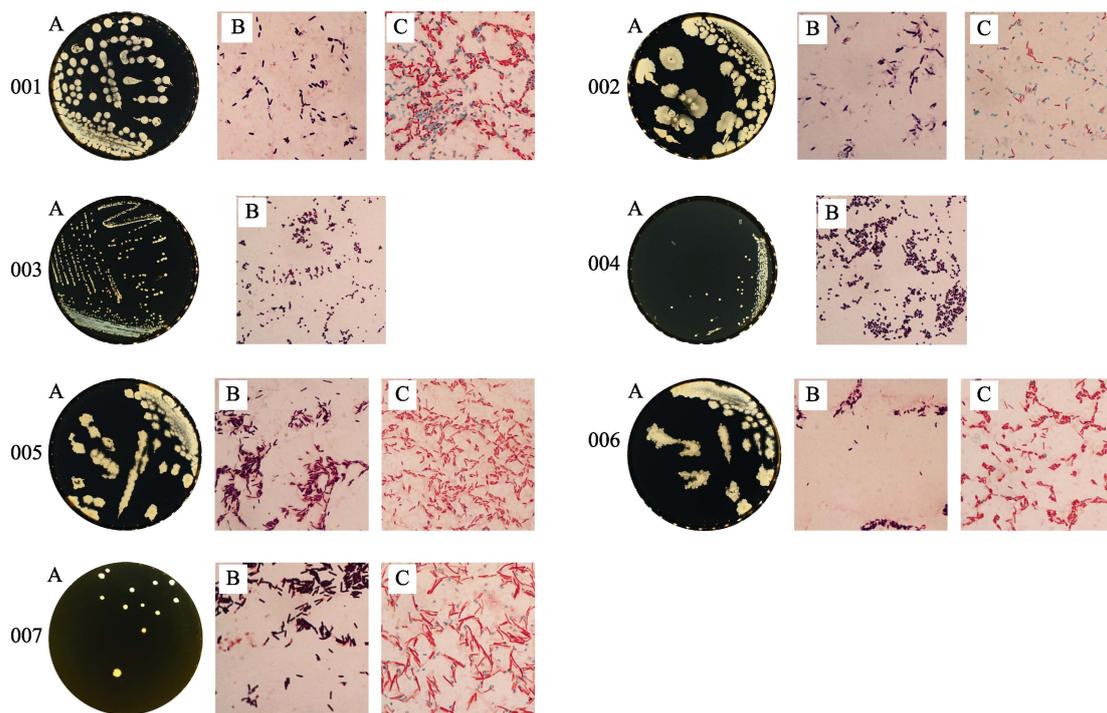


图 1 细菌的菌落及菌体形态

如图 1 所示, 菌株 001 菌落乳白色, 表面粗糙不透明 (A), 菌体杆状, 革兰氏染色阳性 (B), 芽孢椭圆形, 中生 (C)。菌株 002 菌落乳白色, 表面粗糙不透明 (A), 菌体杆状, 革兰氏染色阳性 (B), 芽孢椭圆形, 中生 (C)。菌株 003 菌落白色, 菌落较小, 圆形, 光滑, 凸起, 湿润, 不透明, 边缘整齐 (A), 菌体球状, 革兰氏染色阳性 (B)。菌株 004 菌落白色, 菌落较小, 圆形, 光滑, 凸起, 湿润, 不透明, 边缘整齐 (A), 菌体球状, 革兰氏染色阳性 (B)。菌株 005 菌落乳白色, 表面粗糙 (A), 菌体杆状, 革兰氏染色阳性 (B), 培养 48 h, 芽孢较少, 芽孢椭圆形, 中生 (C)。菌株 006 菌落乳白色, 表面粗糙 (A), 菌体杆状, 革兰氏染色阳性 (B), 培养 48 h, 芽

孢较少, 芽孢椭圆形, 中生 (C)。菌株 007 菌落乳白色, 圆形、表面光滑湿润, 边缘整齐 (A), 菌体长杆状, 革兰氏染色阳性 (B), 芽孢椭圆形 (C)。

2.2 细菌 16S rRNA 基因序列同源性比对与系统发育分析

将菌株 001~007 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 内已知菌株的相应序列进行比对, 通过同源性比对结果构建系统发育进化树, 见图 2。

如图 2 所示, 菌株 001、002 与多株枯草芽孢杆菌/枯草芽孢杆菌亚种 (*Bacillus subtilis*/*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*) 的同源性达 99% 以上, 菌株 001、002 与 *Bacillus subtilis* strain ASB-199 (MK515026.1:73-1271) 在同一分枝上, 且通过

Bootstrap 的验证表明它们具有较高的置信度, 支持度达到 61% (图 2a), 因此可以将分离菌株 001、002 鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。菌

株 001 和 002 聚为一枝的支持率为 99%, 显示这两株枯草芽孢杆菌具有很强的亲缘关系, 为同一来源的菌株。

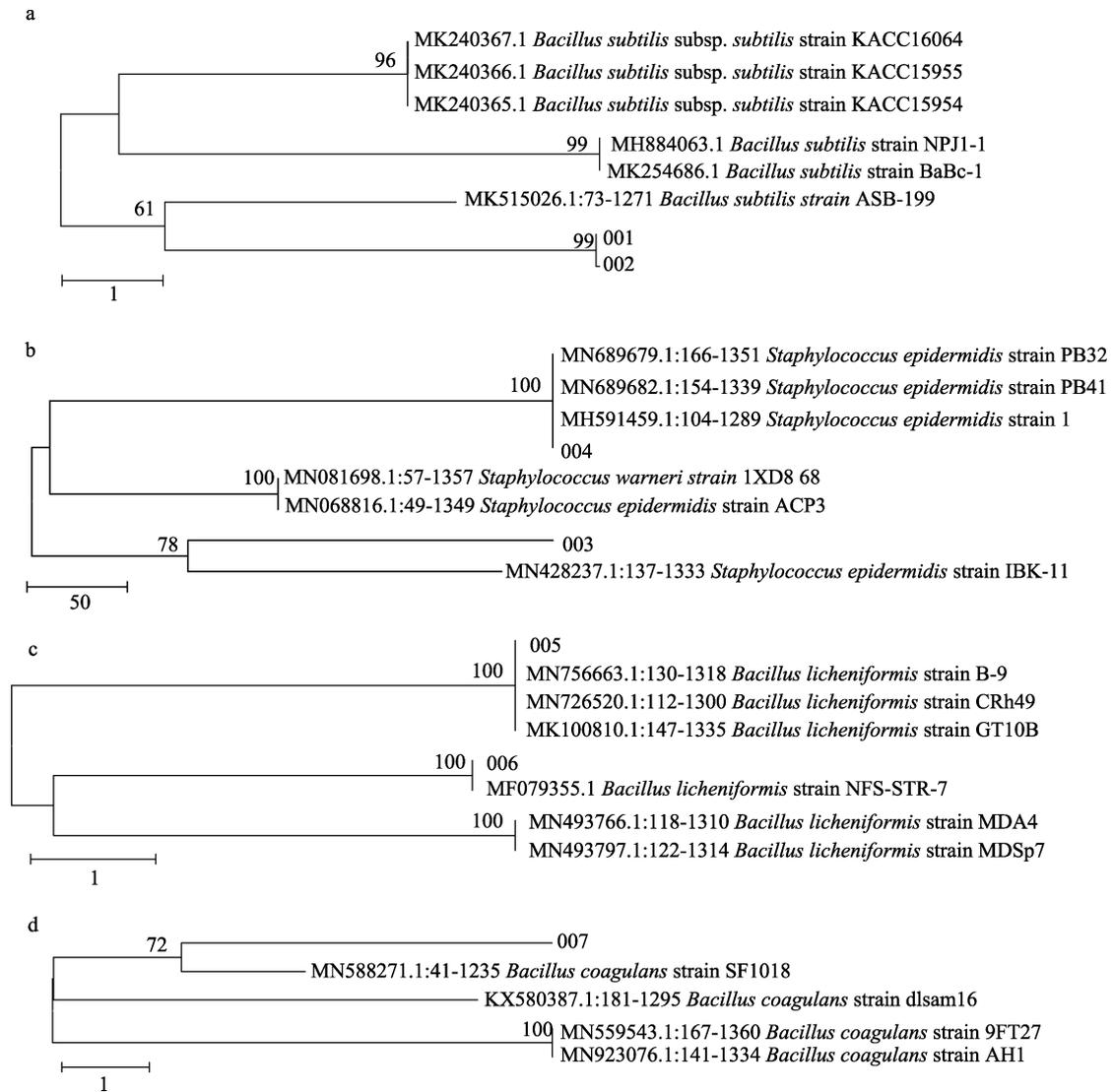


图 2 以 16S rRNA 基因序列为分子标记的 7 株细菌系统发育树

菌株 003 与表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) strain IBK-11 (MN428237.1:137-1333) 在同一分枝上, Bootstrap 验证表明支持度达到 78% (图 2b), 因此可以将分离菌株 003 鉴定为 *Staphylococcus epidermidis*。菌株 004 与表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) strain PB32 (MN689679.1:166-1351)、PB41 (MN689682.1:154-1339)、(MH591459.1:104-1289) 在同一分枝上, Bootstrap 验证表明支持度达到 100% (图 2b), 因此可以将 004 鉴定为 *Staphylococcus epidermidis*。菌株 003、004 在不同分枝上, 显示这两株表皮葡萄球菌为不同来源的菌株。

菌株 005 与地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) strain B-9 (MN756663.1:130-1318)、CRh49 (MN726520.1:112-1300)、GT10B (MK100810.1:147-1335) 在同一分枝上, Bootstrap 验证它们的支持度达到 100% (图 2b), 因此可以将分离菌株 005 鉴定为 *Bacillus licheniformis*。菌株 006 与 *Bacillus licheniformis* strain NFS-STR-7 (MF079355.1) 在同一分支上, Bootstrap 验证它们的支持度达到 100% (图 2c), 因此可以将分离菌株 006 鉴定为 *Bacillus licheniformis*。菌株 005、006 在不同一分枝上, 显示这两株地衣芽孢杆菌为不同来源的菌株。

菌株 007 与 *Bacillus coagulans* strain SF1018 (MN588271.1:41-1235) 在同一分枝上, Bootstrap 验证它们的支持度达到 100% (图 2d), 因此可以将分离菌株 007 鉴定为 *Bacillus coagulans*。

2.3 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

MALDI-TOF-MS 鉴定结果见表 1

表 1 分离菌株 Autof ms1 000 鉴定结果

菌种编号	显著离子峰/ (m/z)	鉴定结果	得分
001	6 936.814	枯草芽孢杆菌	9.281
002	6 939.841	枯草芽孢杆菌	9.200
003	6 673.727	表皮葡萄球菌	9.503
004	6 571.280	表皮葡萄球菌	9.445
005	7 077.045	地衣芽孢杆菌	9.298
006	4 304.582/5 870.483/7 078.656	地衣芽孢杆菌	9.377
007	5 294.411	凝结芽孢杆菌	7.425

如表 1 所示, 分离菌株 001、002 鉴定结果为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 003、004 鉴定结果为表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*), 005、006 鉴定结果为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 以上菌种鉴定结果得分 > 9.0, 为种水平置信。007 鉴定结果为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*), 鉴定结果得分为 7.425, 为属水平置信。MALDI-TOF-MS 鉴定结果进一步验证了 16S rRNA 基因序列同源性比对与系统发育分析结果。结合形态特征, 确定这 7 株菌中 001、002 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、003、004 为表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、005、006 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、007 为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)。其中, 两株枯草芽孢杆菌 (001、002) 为相同来源菌, 两株表皮葡萄球菌 (003、004) 为不同来源菌、两株地衣芽孢杆菌 (005、006) 为不同来源菌。

2.4 胀袋微生物产气性能验证结果

分离菌株 001~007 接种灭菌土豆烧牛肉方便菜肴样品, 36 °C 培养 3~7 d 后, 产气胀袋实验现象观察结果如表 2。

如表 2 所示, 产品接种 001、002 (枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*) 菌液和 005、006 (地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*) 菌液 3 d 后开始出

表 2 胀袋微生物产气胀袋验证实验结果

菌株编号	时间/d		
	3	5	7
001	++	+++	+++
002	++	+++	+++
003	-	-	-
004	-	-	-
005	++	+++	+++
006	++	+++	+++
007	-	-	-
007 (厌氧培养)	-	-	-
对照	-	-	-

注: “-” 没有产气胀袋现象; “+” 有产气胀袋现象, “+” 数量越多表示产气现象越明显

现产气胀袋现象, 继续培养至第 5 d 和第 7 d 后观察, 产气胀袋现象更加明显。接种 003、004 (表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis*) 和 007 (凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans*) 菌液的产品和空白对照在培养过程中没有观察到产气胀袋现象。说明枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 是引起土豆烧牛肉方便菜肴产品胀袋的主要原因。

3 讨论

方便菜肴是在传统中式菜肴的基础上, 选取特定的加工工艺进行生产和杀菌, 在保留原有香味和营养价值的基础上, 还能够一定程度上延长食品的储存期。方便菜肴凭借其方便、快捷、营养、卫生、工业化等优点, 吸引了越来越多的消费者, 其食品生产加工已成为产业发展趋势。但因为微生物污染, 在贮藏期间, 方便菜肴会出现胀袋和腐败等较严重的质量与安全问题。

MALDI-TOF MS 技术用于微生物菌种鉴定具有成本低、检测时间短、鉴定准确性高、易于操作等优点^[15-16]。本研究以胀袋土豆烧牛肉方便菜肴微生物的分离和鉴定作为确认产品胀袋原因分析的依据, 通过微生物分离、纯化和形态学观察得到 7 株菌, 进一步利用 MALDI-TOF-MS 技术, 验证了形态学观察和分子生物学技术的菌种鉴定结果, 确认胀袋微生物为 5 株芽孢杆菌属细菌和 2 株表皮葡萄球菌 (见表 1)。

芽孢杆菌属细菌, 是一类产芽孢的革兰氏阳性细菌, 好氧或兼性厌氧, 能形成芽孢, 存在于土壤、水、空气等处, 对高温、紫外线、干燥、电

离辐射和很多有毒的化学物质都有很强的耐受力,特别耐热。食品加工中的灭菌或加热工艺很难将其完全杀灭,该类菌是食品工业中较为重要的腐败微生物。如高鹏等^[17]从真空包装肘花胀袋产品中分离鉴定芽孢杆菌属和梭状芽孢杆菌属细菌是引起产品胀袋和腐败变质的主要原因。李靖等^[18]研究证明解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是引起红油豆瓣酱胀罐变质的主要因素。李慧等^[13]从胀桶番茄酱中分离出了厚壁类芽孢杆菌(*Paenibacillus cineris*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)。虽然这些产品与土豆烧牛肉方便菜肴生产工艺不尽相同,但相同的是丰富的营养成分给微生物提供了适宜的生长条件,导致这些微生物生长代谢产生气体,最终导致产品胀袋和腐败变质。本研究验证了引起本批次方便菜肴产品胀袋现象发生的是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

土豆烧牛肉方便菜肴产品生产原料较多,包括牛肉、土豆块、调味品和香辛料等,加工过程包括清洗、切块、炒制、包装和杀菌等过程,生产过程分区操作,包装和杀菌过程无菌控制。研究分离鉴定的 7 株菌中,两株枯草芽孢杆菌具有很强的亲缘关系,为同一来源的菌株,两株地衣芽孢杆菌为不同来源的菌株,还有 1 株凝结芽孢杆菌和 2 株不同来源的表皮葡萄球菌。其中 2 株枯草芽孢杆菌和 2 株地衣芽孢杆菌可引起明显的产气胀袋现象(见表 2)。因此,推断加工原料和杀菌参数设置不合理是导致本研究土豆烧牛肉产品胀袋的主要原因。通过分析土豆烧牛肉方便菜肴胀袋微生物,有助于污染溯源分析,确认生产关键控制点,加强对原料验收和生产加工过程关键环节的控制,并采用更科学的灭菌方法,避免经济损失和确保产品的质量与安全。

4 结论

本研究对胀袋土豆烧牛肉方便菜肴产品中的微生物进行分离、纯化和鉴定。结果表明 MALDI-TOF-MS 技术可与微生物形态学观察及分子生物学技术相结合用于胀袋食品污染微生物的快速及准确鉴定。从胀袋土豆烧牛肉方便菜肴产品中分离了 7 株菌,鉴定结果为 2 株枯草芽孢

杆菌(*Bacillus subtilis*),为同一来源菌;2 株表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*),为不同来源菌;2 株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),为不同来源菌;1 株菌为凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。产气性能验证实验证明枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌与样品的胀袋有直接关系。生产过程要加强原料验收和杀菌参数的合理设置。

参考文献:

- [1] 王佳佳,邓源喜,王丹丹,等.牛肉的营养价值及牛肉嫩化技术的研究进展[J].肉类工业,2019,(9):55-58.
- [2] 王文,孔建纲.土豆烧牛肉加工工艺,肉制品加工与新产品开发[J].肉类工业,2016,(4):6-7.
- [3] 陈珍,刘涛,顾千辉,等.奶公犍牛肉营养成分的分析[J].肉类研究,2016,30(4):21-24.
- [4] 谢婷婷,王应妮,陈秋骏,等.胀袋鲍汁中腐败菌的分离与鉴定[J].中国调味品,2015,40(5):27-29.
- [5] 冯劲,陶宏兵,孙廷丽,等.番茄沙司和烧烤汁中腐败菌的分离鉴定与性质研究[J].工业微生物,2015,45,(5):50-54.
- [6] 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.
- [7] XU X L, FENG G L, LIU W, et al. Isolation, identification and control of osmophilic spoilage yeasts in sweetened condensed milk[J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8,(10):1032-1039.
- [8] 李慧,陈历水,刘洋,等.坛装黄酒贮存过程中污染微生物的分离鉴定[J].中国酿造,2018,37,(5):81-85.
- [9] 稽金如,沈萍,应超群,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌鉴定及同源性分析中的应用[J].中国抗生素杂志,2017,42(2):134-138.
- [10] NASSIMA I, ALBERT R, ROMAIN C, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*[J]. Food Microbiology, 2019, 81(8):22-31.
- [11] LINDAH, JÜRGENB, RUDI F V, Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS[J]. Food Microbiology, 2016, 60(12):84-91
- [12] 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定:GB 4789.2—2016[S].
- [13] 李慧,李赫,陈历水,等.胀桶番茄酱中腐败微生物的分离及鉴定[J].食品工业科技,2019,40(8):90-96.
- [14] CHIN H S, FRED B, FLEMING H P, et al. Identifications of predominant bacterial isolates from the fermenting Kinchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses[J]. Microbiol, Biotechnol, 2001, 16(1):68-76.
- [15] MELANIE P, INGRID H REGINA K, et al. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria[J]. The Open Microbiology Journal, 2013, 7, 135-141.
- [16] MARLÈNE S, BENOÎT V, XAVIER B, et al. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria?[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(6):447-455.
- [17] 高鹏,伏毅,陈谦,等.真空包装肘花胀袋微生物的鉴定及验证[J].湖北农业科学,2016,55(13):3433-3438.
- [18] 李靖,马媛,徐丹,等.红油豆瓣酱中产气芽孢杆菌的分离、鉴定与抑制研究[J].中国酿造,2017,36(8):31-35. 

备注:本文的彩色图表可从本刊官网(<http://lyspkj.ijournal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。