

食用菌发酵液对热干面中蜡样芽孢杆菌的抑制作用

潘昌¹, 范秀芝^{2,3}, 姚芬^{2,3}, 胡龙¹, 殷朝敏^{2,3}, 史德芳^{2,3}, 高虹^{2,3}, 胡中泽¹

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (2. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064) (3. 国家食用菌加工技术研发分中心, 湖北武汉 430064)

摘要: 为确定鲜湿热干面中主要腐败微生物, 本研究通过 16S rDNA 序列和生化鉴定对从热干面中分离的微生物进行鉴定, 确定从中分离出一株蜡样芽孢杆菌。为利用食用菌发酵液抑制蜡样芽孢杆菌生长, 以菌丝生长速度为筛选指标, 从香菇、黑木耳、血耳、猴头菇和蛹虫草 5 个品种 26 个菌株中各筛选 1 个菌株进行液体发酵, 并通过不同品种菌株发酵液对蜡样芽孢杆菌生长抑制效果评价, 筛选最佳食用菌品种及菌株, 最后, 利用微量二倍稀释法确定发酵液的最小抑菌浓度。结果表明, 5 个食用菌品种中, 血耳的麻城血耳菌株对所分离蜡样芽孢杆菌生长抑制效果最好, 在 300 min 检测周期内其抑制率始终保持在 95% 以上。通过微量二倍稀释法确定麻城血耳发酵液对蜡样芽孢杆菌的最小抑菌浓度为 31.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。本研究为血耳发酵液应用于鲜湿热干面的生产和保鲜提供参考, 并为食用菌发酵液应用于鲜湿面条营养和功效提升奠定基础。

关键词: 热干面; 蜡样芽孢杆菌; 食用菌发酵液; 最小抑菌浓度

文章编号: 1673-9078(2020)05-170-177

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.023

Inhibitory Effect of Edible Fungal Fermentation Broth on *Bacillus cereus* in Hot Dry Noodles

PAN Chang¹, FAN Xiu-zhi^{2,3}, YAO Fen^{2,3}, HU Long¹, YIN Chao-min^{2,3}, SHI De-fang^{2,3}, GAO Hong^{2,3}, HU ZHONG-ze¹

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China) (2. Institute of Agro-Products Processing and Nuclear-Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China) (3. National Research and Development Center for Edible Fungi Processing, Wuhan 430064, China)

Abstract: In order to determine the main spoilage microorganisms in fresh and hot dry noodles, this study identified the strains isolated from the hot dry noodles through 16S rDNA fragment sequence determination and biochemical analysis, and a strain of *Bacillus cereus* was identified. In order to screen the edible fungal fermentation broth with inhibitory effect on *Bacillus Cereus*, one strain was selected from 26 strains of 5 varieties of *Lentinula edodes*, *Tremella sanguinea*, *Auricularia auricula-judae*, *Hericium erinaceus* and *Cordyceps militaries* for submerged fermentation. The best edible fungus species and strains were screened via the evaluation of the inhibitory effects of different fermentation broths on the growth of *Bacillus cereus*. Finally, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the micro-double dilution method. The results showed that among the five species, the strain of *T. sanguinea*-Macheng exhibited the greatest inhibitory effect on the growth of the isolated *B. cereus* with the inhibitory rate remaining above 95% during the 300 min detection cycle. The MIC of *T. sanguinea*-Macheng against *B. cereus* was determined as 31.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. This study provides a reference for the production and preservation of fresh and hot dry noodles through using the fermentation broth of *T. sanguinea*, and lays a foundation for the application of edible fungus fermentation products to improve the nutrition and functionality of fresh and wet noodles.

引文格式:

潘昌, 范秀芝, 姚芬, 等. 食用菌发酵液对热干面中蜡样芽孢杆菌的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 170-177

PAN Chang, FAN Xiu-zhi, YAO Fen, et al. Inhibitory effect of edible fungal fermentation broth on *Bacillus cereus* in hot dry noodles [J].

Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 170-177

收稿日期: 2019-11-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31601806); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303080)

作者简介: 潘昌 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全; 共同第一作者: 范秀芝 (1984-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食用菌活性物质代谢调控及功能食品开发

通讯作者: 高虹 (1971-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工和功能食品开发; 共同通讯作者: 胡中泽 (1968-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 食品加工

Key words: hot dry noodles; *Bacillus cereus*; fermentation broth of edible fungi; minimum inhibitory concentration

面条作为我国一种传统主食一直深受人们的喜爱,近年来随着物质生活水平的提高、生活节奏的加快以及营养意识的增强,大众对面条的要求逐渐向方便化、高品质化和高档化方向发展^[1]。在此背景下,更健康、更美味的“第四代方便面”-鲜湿面应运而生^[2]。鲜湿面经和面、熟化、复合压延、切条等工艺加工而成。与挂面等干制面条相比,鲜湿面更加新鲜、爽口、耐嚼,风味也更好,且食用方法多样,是如今快节奏生活中的一种理想食品^[3,4]。热干面,作为一种鲜湿面,可以满足人们的以上需求,加上食用时其与芝麻酱的完美融合,吸引了无数人的关注,让其在多种面条制品中脱颖而出。

然而,鲜湿面中水分的含量和活度较高,在储藏过程中容易褐变、老化、断裂等,使其食用品质降低^[5,6]。此外,鲜湿面极易受到细菌、真菌的感染而腐败变质^[7-9]。因此,如何控制鲜湿热干面中微生物的生长成为热干面储藏和保鲜过程中急需解决的问题之一。

食药菌,作为一类可供人类食用的大型真菌,含有丰富的营养成分、风味物质以及多糖、多酚、三萜类和甾醇等多种功效成分,可以发挥抗肿瘤、抗氧化、抑菌、降血糖等多种生物活性,使其在功能食品中占有一席之地^[10-12]。但由于食药菌栽培周期较长,近年不少研究者借助发酵技术获得食药菌营养和活性物质,并将其应用于面制品的开发^[13]。而且,有研究指出发酵液中含有多种营养和活性成分^[14],甚至某些活性成分含量高于子实体中的^[15],且具有与子实体中成分相同的活性^[16]。窦会娟等^[17]和罗青等^[18]分别通过发酵液的抑菌效果研究发现,香菇、木耳、猴头等发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等具有良好的抑制效果。

因此,本文在对热干面中分离微生物进行鉴定的基础上,以菌丝生长速度为筛选指标对液体发酵用食用菌菌株进行筛选,最后通过食用菌发酵液对热干面中确定的致病菌抑制效果进行评价以筛选最佳食用菌菌株,并确定其最小抑菌浓度。本研究将为鲜湿热干面的生产、保鲜、防腐提供参考,并为食用菌发酵液应用于鲜湿面条提升其营养和功效奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和设备

JYN-L8 智能面条机,九阳股份有限公司;LRH-250 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;

ZWY-2102 恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;GL-21M 高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;SW-CJ-1CU 超净工作台,苏州智净净化设备有限公司;T100 PCR 仪,美国伯乐公司;DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳槽和 DYY-6C 电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Gel Doc XR+ 紫外分析仪,美国伯乐公司;Spark 多功能酶标仪,瑞士帝肯公司。

1.2 试验材料和试剂

食用菌 5 个品种 26 个菌株:香菇 *Lentinula edodes* (武香 1 号、香 808、秋栽 7 号、香 9608)、血耳 *Tremella sanguinea* (郑橡血耳、麻城血耳、华农 TS、血耳)、黑木耳 *Auricularia auricula-judae* (黑 793、单片 5 号、黑山 2 号、Au 916)、猴头菇 *Hericium erinaceus* (长刺猴头、林口猴头、猴杂 19、猴杰 2 号、猴 99、猴 91)、蛹虫草 *Cordyceps militaries* (全虫草、皖西虫草、虫草 5 号、北虫草、德立信蛹虫草、云虫草、蛹虫草 91025-1、沈农大虫草),购自华中农业大学菌种实验中心,保藏于湖北省农业科学院国家食用菌加工技术研发分中心。

金沙河富强高筋小麦粉,河北金沙河面业集团有限责任公司;2×PCR Mix,日本 TaKaRa 公司;其他生化试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 面条的制作

将高筋面粉、碱、水、盐按照 100:32:1:0.3 比例混合放入到面条机中,和面 10 min、醒发 30 min,点击手动出面制成面条,再将面条水煮至面条中白芯消失捞出,加入植物油拌匀,冷却后包装、封口。

1.3.2 菌相分离和纯培养

参照国标《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[19],梯度稀释,选择合适的浓度进行倾注 PCA 平板培养。挑取平板中具有代表性的单菌落,于 LB 液体培养基中培养,再进行划线分离。重复划线直至培养出纯单菌落,然后进行检测。

1.3.3 微生物的鉴定

参考 Queipo-Ortuño 等^[20]所述方法提取纯培养细菌的基因组 DNA,以细菌通用引物 27F (AgAgTTTgATCCTggCTCAg) 和 1492R

[TACgg(C/T)TACCTTgTTACgACTT]对 16S rDNA 基因片段进行扩增检测。PCR 扩增反应体系 (30 μ L) 包括 2 \times PCR Mix 15 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L 和 12 μ L 的 dd H₂O。PCR 扩增反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 末端延伸 5 min。扩增反应完成后, 取 5 μ L PCR 产物, 利用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

测序后序列在 NCBI 中进行 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 同源性比对分析, 并与 LPSN (<http://www.bacterio.net>) 网站上下下载的蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*) 以及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 模式菌株 16S rDNA 序列进行比对, 分别利用 MEGA 7.0 中 Neighbor-joining (NJ)、Minimum Evolution (ME) 和 Maximum likelihood (ML) 的统计方法构建系统发育树。序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中。

根据国标 GB 4789.14-2014 食品安全国家标准食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌中所述方法, 对分离单菌落进行革兰氏染色试验、动力试验、根状生长试验以及溶血试验等生化鉴定^[21]。

1.3.4 培养基配制

完全培养基 (CYM): 葡萄糖 20 g、蛋白胨 2.0 g、酵母膏 2.0 g、K₂HPO₄ 1.0 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KH₂PO₄ 0.46 g、琼脂 20 g, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min^[22]。用于香菇、木耳、黑木耳和猴头菇菌株的活化和培养。

土豆培养基 (PAD): 土豆 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1000 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min。用于蛹虫草菌株的活化和培养。

基础发酵培养基 (BFM): 葡萄糖 20 g、酵母膏 2.0 g、蛋白胨 2.0 g、KH₂PO₄ 2.0 g、MgSO₄·7H₂O 1.0 g。蒸馏水 1000 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min^[23]。

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g。蒸馏水 1000 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min。

1.3.5 食用菌菌株的筛选

将 4 $^{\circ}$ C 保存的菌种转接到 PDA 或 CYM 平板活化 5 d。用 8 mm 打孔器打孔后, 将菌块接种到 PDA 或 CYM 上进行筛选。以菌丝生长速度作为筛选指标, 通过测量一定时间内菌丝生长间距, 计算菌丝生长速度 (mm/d)^[24]。

1.3.6 食用菌发酵液制备

液体种子制备: 8 mm 打孔器在菌株活化的平皿

中打取 5 个菌块, 接入含 100 mL 种子培养基 (液体 PDA 或 CYM) 的 250 mL 三角瓶中, 26 $^{\circ}$ C、160 r/min 下的振荡培养 5 d, 即得液体摇瓶种子。

发酵培养: 种子液匀浆后按 10% 接种量接入含 100 mL 基础发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 26 $^{\circ}$ C、160 r/min 的振荡培养 6 d, 得到发酵液。

发酵液的收集: 无菌条件下, 将发酵液连同菌球一起转入 50 mL 离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 6000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 即得食用菌发酵液, 4 $^{\circ}$ C 保存^[25]。

1.3.7 食用菌发酵液抑菌试验

蜡样芽孢杆菌菌液的制备: 挑选蜡样芽孢杆菌单菌落于 1 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养, 使菌液 OD₆₀₀ 在 0.6 到 0.8 之间^[26]。

食用菌发酵液抑菌实验: 在无菌条件下, 分别取 1 mL 上述蜡样芽孢杆菌悬液和 2 mL 食用菌发酵液加入到 20 mL 液体 LB 培养基中, 混匀后测定其初始 OD₆₀₀ 值, 以不加食用菌发酵液为对照。在 37 $^{\circ}$ C 条件下 200 r/min 振荡培养 5 h, 每隔 30 min 测定一次吸光度。计算其 Δ OD₆₀₀ 和抑制率: Δ OD₆₀₀=A_t-A₀ (A 为测定时间为 t 时的吸光度值, A₀ 为初始吸光度值); 相对抑制率=[1-(B/C)] \times 100% (B 为添加食用菌发酵液的菌液 Δ OD₆₀₀, C 为不添加食用菌发酵液的菌液 Δ OD₆₀₀)^[26,27]。

1.3.8 最小抑菌浓度 (MIC) 测定

MIC 的测定采用微量二倍稀释法进行^[12]。利用 96 孔细胞培养板进行实验, 先在各试验孔中加入 100 μ L LB 液体培养基, 后在 A1 孔中加入 100 μ L 发酵液吸打混匀, 吸取 100 μ L 混合液加入到 A2 孔的 100 μ L LB 液体培养基中, 依次重复, 使 A1-A12 孔中发酵液浓度为 500~0.25 μ L/mL, 每个处理重复 3 次。向混合液中分别加入 100 μ L 蜡样芽孢杆菌 (约 10⁶ CFU/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。以不加菌液只加发酵液为空白, 以不加发酵液只加菌液为对照, 利用酶标仪进行吸光度值 OD₆₀₀ 测定并计算抑制率^[28], 并根据抑制率计算 MIC 值 (V:V)。

1.3.9 发酵液多糖含量测定

应用苯酚-硫酸法对木耳发酵液中的总糖含量进行测定, 并利用 DNS 法测定还原糖含量^[29]。胞外多糖含量=总糖含量-还原糖含量。

1.3.10 数据处理

每个实验重复 3 次, 试验数据采用 Excel 进行整理, 再使用 SPSS 17.0 软件对数据进行差异显著性分析, 以 $p<0.05$ 判断差异显著性程度。采用 Origin 8.5 软件进行数据分析作图。

2 结果与讨论

2.1 蜡样芽孢杆菌的确定

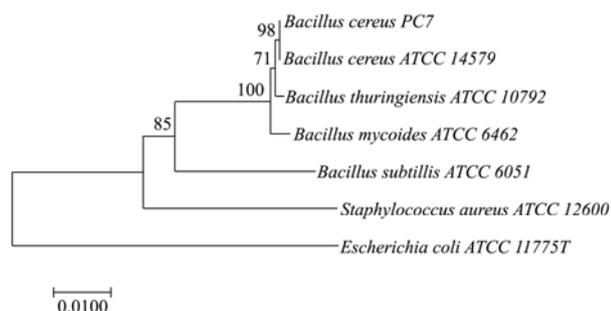


图1 基于 16S rDNA 构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree constructed with 16S rDNA gene sequence

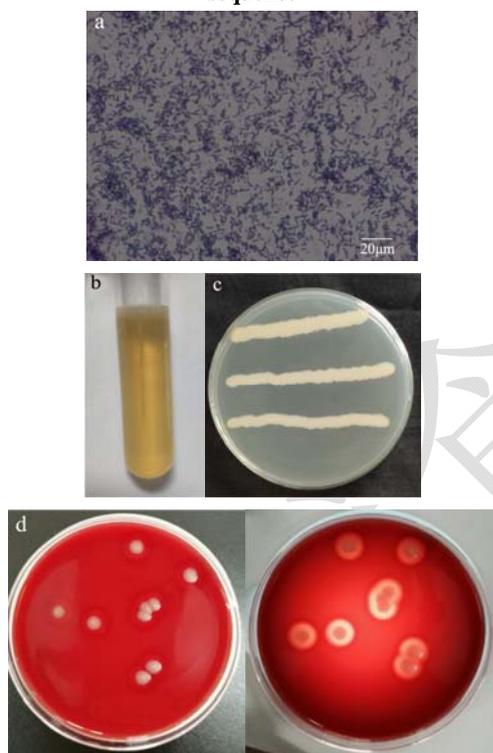


图2 蜡样芽孢杆菌生化鉴定

Fig.2 Biochemical identification result of *Bacillus cereus*

注: a.革兰氏染色试验; b.动力试验; c.根状生长试验; d.溶血试验。

本课题组在对鲜湿热干面进行 16S rDNA 高通量测序发现,在其贮藏期间芽孢杆菌属为优势腐败菌群,其中蜡样芽孢杆菌为优势菌(未公开发表)。提取纯培养菌株 DNA 后,利用 27F 和 1492R 对其 16S rDNA 基因进行扩增,得到大小为 1419 bp 的片段。经 NCBI-Blastn 同源性比对分析发现,PC7 的 16S rDNA 序列与数据库中蜡样芽孢杆菌相似度为 100%,表明热干面中分离 PC7 与蜡样芽孢杆菌同源性高。通过 3

种方法对热干面中分离菌株 PC7 与 7 个模式菌株构建的系统发育树一致,图 1 列出基于 16S rDNA 构建的 ME 树。图中可以看出,PC7 与 *B. cereus* ATCC 14579 聚为一支,bootstrap 支持率为 98%,且二者之间遗传距离为 0,证实热干面中分离 PC7 为蜡样芽孢杆菌。序列经整理后提交到 GenBank,登录号为 MN542359。

对热干面中分离的 PC7 菌株进行革兰氏染色,结果如图 2a 所示,染色镜检结果成蓝色,表明该菌为革兰氏阳性菌。在动力试验中,穿刺培养基的蜡样芽孢杆菌沿穿刺线呈扩散生长,而非呈“绒毛状”(图 2b)。参照 GB 4789.14-2014^[22]中根状生长试验方法,在含 LB 培养基平皿上划线培养后,菌株呈粗糙山谷状生长的特征(图 2c)。在胰酪胨大豆羊血(TSSB)琼脂培养基中培养 24 h 后菌株菌落为浅灰色,不透明,似白色毛玻璃状,且具有溶血环(图 2d)。综合 16S rDNA 序列和生化鉴定结果表明,热干面中分离的这一菌株为蜡样芽孢杆菌。

蜡样芽孢杆菌广泛分布于空气、灰尘、土壤和水中,是一种食源性病原菌和条件致病菌^[30]。2009 年,王军华等曾在一起因食用热干面而引起的食物中毒事件中,根据流行病学调查和实验室检验发现引起食物中毒的主要是热干面中的蜡样芽孢杆菌^[31]。本研究以 16S rDNA 序列和国标 GB 4789.14-2014 规定方法对从热干面中分离蜡样芽孢杆菌进行了鉴定和确定,但由于蜡样芽孢杆菌来源广泛,类型众多,仅通过生化鉴定不能完全确定本文所分离菌株类型,因此在后续研究中还要结合多位点序列分型、重复序列聚合酶链式反应分型、随机扩增多态性 DNA 分型、脉冲场凝胶电泳分型等分子分型方法^[30],对本文所得蜡样芽孢杆菌类型进行明确鉴定、追根溯源,为热干面品质的源头控制奠定基础。

2.2 食用菌菌株的筛选

许莹莹^[14]等通过对食用菌发酵液中功能性成分进行研究发现,发酵液中含有多种能够抑制微生物生长的活性物质,如多糖、糖蛋白、氨基酸等。在对微生物产生抑制作用的物质分析中发现,产生抑制作用的主要为多糖类物质,且有研究指出菌丝生长越快,产生的多糖类物质也就越多^[32,33]。因此,本研究以菌丝生长速度为指标对发酵用食用菌菌株进行筛选。

供试 5 个食用菌品种 26 个菌株的生长速度测定结果如图 3 所示。总体来看,本研究所用黑木耳菌株的菌丝生长速度普遍高于其他品种菌株。其中,黑 793 菌株的菌丝生长速度显著高于其他菌株($p < 0.05$),达到 6.06 mm/d。而所用香菇菌株的菌丝生长速度普遍

偏低,最快的为秋栽7号菌株,生长速度为3.68 mm/d,其次为香808菌株和香9608菌株。此外,血耳菌株中麻城血耳的生长速度最快,为4.30 mm/d,其次为华农TS菌株。猴头菇中长刺猴头菌株菌丝生长速度最快,达到4.79 mm/d,比猴杂19菌株2.08 mm/d要高出2倍多。蛹虫草中8个菌株的菌丝生长速度差异显著,其中沈农大虫草速度要优于其他菌株,为4.93 mm/d。通过以上食用菌品种内菌株间的菌丝生长速度比较,5个食用菌品种中分别选定秋栽7号、麻城血耳、黑793、长刺猴头和沈农大虫草菌株作为食用菌发酵液对蜡样芽胞杆菌抑制效果研究用菌株。

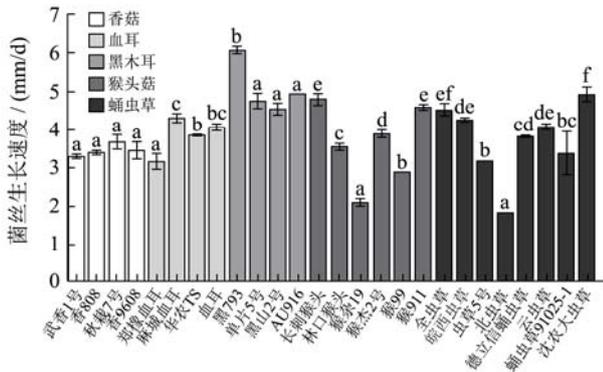


图3 不同食用菌菌株生长速度比较

Fig.3 Comparison of growth rates of different edible fungi strains

注:小写英文字母表示同一食用菌品种不同菌株间差异显著性, ($p < 0.05$)。

2.3 食用菌发酵液的抑菌效果

由图4可以看出,发酵培养基对食用菌发酵液的抑菌效果影响不大,发酵液对蜡样芽胞杆菌的抑制效果差异源自食用菌品种差异,也就是发酵产物的差异。图4a中,随着蜡样芽胞杆菌培养时间的延长,除血耳外,加入其他4种食用菌发酵液后,随着培养时间的增加,菌液的 ΔOD_{600} 逐渐上升,特别是在120 min以前,吸光度的增加十分迅速,且添加5种食用菌发酵液的 ΔOD_{600} 值基本都低于空白组,表明在120 min内5种发酵液对蜡样芽胞杆菌均有不同程度的抑制效果。图4a中,分析不同食用菌发酵液对蜡样芽胞杆菌在150 min之后的影响发现,添加香菇秋栽7号和猴头菇长刺猴头发酵液的 ΔOD_{600} 在150 min之后逐渐高于空白组,300 min时二者的 ΔOD_{600} 分别为1.483和1.406显著高于空白组1.146 ($p < 0.05$),表明秋栽7号和长刺猴头的发酵液对蜡样芽胞杆菌的抑制时间有限。同样,由图4b可以看出,秋栽7号和长刺猴头发酵液对蜡样芽胞杆菌的抑制率分别在120 min和180 min时变为负数,且随着时间的延长,抑制率越来越

低,在检测周期结束时二者的抑制率分别为-29.41%和-22.69%,推测可能是这2个菌株发酵代谢产物中具抑制活性的多糖或其他物质含量较低,不能有效抑制蜡样芽胞杆菌的生长。

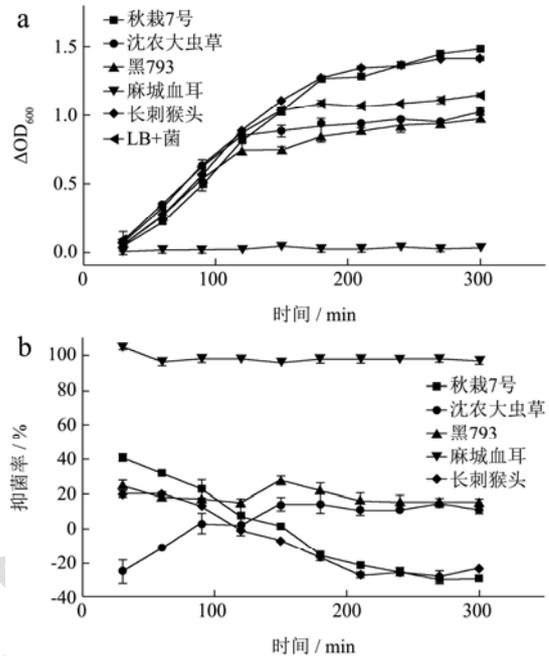


图4 不同食用菌发酵液对蜡样芽胞杆菌菌液吸光度的影响比较抑制效果

Fig.4 Inhibitory effects of different fermentation broth on *B. cereus*.

而添加沈农大虫草发酵液的菌液在60 min内 ΔOD_{600} 高于空白组,其对蜡样芽胞杆菌的抑制率为负,但随着时间增加,到抑制效果逐步上升,270 min时抑制最高,达14.61% (图4b)。此外,添加黑793发酵液的菌液 ΔOD_{600} 在300 min内均低于空白组的,且在300 min时的 ΔOD_{600} 为0.977,显著低于空白组的 ($p < 0.05$)。由图4b可以看出,300 min内黑793发酵液对蜡样芽胞杆菌抑制率维持在20%左右,其中150 min时抑制率最高,为27.78%,其后不断下降。以上结果表明,沈农大虫草和黑793的发酵液可以在一定程度上抑制蜡样芽胞杆菌的生长,但是效果不显著,推测可能是发酵液中活性物质浓度不够高所致。

不同的是,在添加麻城血耳发酵液的蜡样芽胞杆菌培养过程中发现,300 min内随培养时间的增加,菌液吸光度 ΔOD_{600} 几乎呈一条直线,其抑制率也一直保持较高的水平且比较稳定,300 min内的抑制率始终保持在95%以上 (图4b),300 min时 ΔOD_{600} 仅为0.029,说明血耳发酵液几乎可以完全抑制蜡样芽胞杆菌的生长,并且能够很好的维持其抑制效果。这与梁陶弘景《名医别录》、明李时珍《本草纲目》以及古代民间流传“血耳对医治各种痢疾亦有特效,服用一次

即可见效,连服 2~3 次可痊愈,对久痢诸药无效者,改用血耳验之如神”的论述一致^[34]。2019 年,王昭晶等^[35]在血耳多糖 TSP-II 抗炎作用研究中发现,在对诱导产生炎症的小鼠巨噬细胞中添加 TSP-II 后,炎症因子的 mRNA 表达量均明显降低,说明 TSP-II 具有良好的抗炎作用。鉴于此,本研究所得麻城血耳发酵液对蜡样芽孢杆菌显著抑制作用是否与多糖等活性物质含量或结构有关还需要进一步验证。

与本文不同的是,崔京春^[36]在榆耳 JX 2010 菌株发酵液的对 12 种致病菌抑制效果研究中发现,发酵液对蜡样芽孢杆菌和酵母菌无抑菌性,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌等革兰阳性菌的抑菌作用强于大肠杆菌、沙门杆菌和鼠伤寒沙门杆菌等革兰阴性菌。但 Ren et al.^[27]通过比较香菇、猴头菇、角质木耳、白灵菇、冬虫夏草等 8 个食药用品种多糖对枯草芽孢杆菌和表皮链球菌的抑制效果时发现,冬虫夏草和白灵菇对表皮链球菌表现出较好的抑制效果,表明不同食用菌品种对病原菌的抑制效果不同,与本研究结果一致。此外,解修超等^[29]在不同姬松茸菌株液体发酵胞外多糖对金黄色葡萄球菌抑制效果研究中发现,同一品种不同菌株间抑制效果也存在差异,由此推测本研究所选香菇和猴头菇对蜡样芽孢杆菌抑制效果较差的原因,可能是所选菌株发酵液中多糖等物质产量或活性较低,是否有更佳效果的食用菌品种或菌株还需要进一步研究。

2.4 最小抑菌浓度的确定

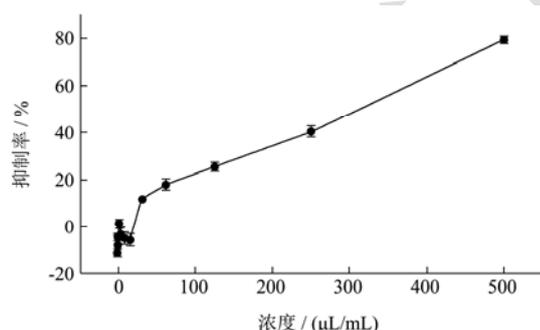


图5 不同浓度的麻城血耳发酵液对蜡样芽孢杆菌的抑制效果比较

Fig.5 Effect of the fermentation broth concentration of *Tremella sanguinea*-Macheng on the *B. cereus*

由图 5 可以看出,在麻城血耳发酵液浓度低于 31.25 $\mu\text{L/mL}$ 时,各浓度对蜡样芽孢杆菌的抑制率基本上全为负,说明当低于此浓度时,麻城血耳发酵液对蜡样芽孢杆菌没有抑制效果;而当浓度大于 31.25 $\mu\text{L/mL}$ 时,随着血耳发酵液的浓度的增加,抑制率得到明显的上升,因此,确定 31.25 $\mu\text{L/mL}$ 即为麻城血

耳发酵液对蜡样芽孢杆菌的最小抑菌浓度。

分析已有食用菌发酵液对致病菌抑制效果报道发现,研究者多采用牛津杯法,以食用菌发酵液,如榆耳发酵液^[36]、茯苓发酵液^[37]以及灵芝和猴头菇发酵液^[18]的抑菌圈来评价抑菌效果。且仅罗青等^[18]采用将发酵粗提液加入无菌水,配制成不同浓度稀释液,再在不同培养平板中加入菌液和不同浓度发酵液进行培养,以不长菌的最低浓度来判断最小抑菌浓度。而本研究结合微量二倍稀释法的测定方法原理^[12],直接以发酵液占发酵液和 LB 培养基总体积比作为抑菌浓度表示,并通过分光光度法可快速、准确测定抑菌率,证明该方法具有广泛适用性。

但由于食用菌发酵液是由多糖、蛋白质、核酸、酶、生物碱、萜类化合物、甾醇及维生素等多种化合物组成的混合物^[14],目前,对于食用菌发酵液抑菌活性的评价基本以发酵液混合物为主^[17,18,36,37]。关于发酵液成分抑菌的研究,目前仅有以发酵优化提高香菇胞外多糖产量,并对其胞外多糖抑菌活性评价的研究^[38]。研究者通过发酵优化将香菇胞外多糖产量提高到 1.02 mg/mL,并发现其在 pH 为 5~9 条件下都具有抑菌活性。通过测定本研究所用麻城血耳菌株发酵液中多糖含量为 2.82 \pm 0.08 mg/mL,显著高于已证实有抑菌活性的香菇胞外多糖含量,推测本研究血耳发酵液抑菌活性与其多糖含量有一定相关性,但具体发酵液中主要抑菌成分是什么还有待进一步深入研究。

3 结论

通过 16S rDNA 序列和生化鉴定,确定从鲜湿热干面中分离出一株蜡样芽孢杆菌。以香菇、黑木耳、血耳、猴头菇和蛹虫草 5 个品种 26 个菌株为出发菌株,通过菌丝生长速度比较、发酵液对蜡样芽孢杆菌生长抑制效果评价,筛选到对蜡样芽孢杆菌具有明显抑制效果的菌株-麻城血耳。利用微量二倍稀释法确定其最小抑菌浓度为 31.25 $\mu\text{L/mL}$ 。本研究为血耳发酵液应用于鲜湿热干面的生产和保鲜提供参考,并为食用菌发酵液应用于鲜湿面条营养和功效提升奠定基础。

参考文献

- [1] 林艳桃.国内外方便面行业发展现状及趋势[J].粮食科技与经济,2014,39(2):66-68
LIN Yan-tao. Current situation and trend of instant noodle industry at home and abroad [J]. Grain Science and Technology and Economy, 2014, 39(2): 66-68
- [2] 李冉冉,李洪军,李少博,等.生湿面的保鲜技术及应用研究进展[J].食品与发酵工业,2019,45(4):250-256

- LI Ran-ran, LI Hong-jun, LI Shao-bo, et al. Review of preservation techniques and analysis of application for raw wet noodles [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(4): 250-256
- [3] 任元元,孟资宽,王波,等.高品质鲜湿面加工工艺优化[J].食品与发酵科技,2019,55(4):46-51
- REN Yuan-yuan, MENG Zi-kuan, WANG Bo, et al. Process optimization of high quality fresh noodles [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2019, 55(4): 46-51
- [4] 王波,孟资宽,康建平,等.鲜湿面保鲜技术及护色技术的研究进展[J].食品与发酵科技,2017,53(6):85-89
- WANG Bo, MENG Zi-kuan, KANG Jian-ping, et al. Review of preservation technology and color protection technology for fresh noodles [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2017, 53(6): 85-89
- [5] Niu M, Hou GG, Li X, et al. Inhibitory effects of ultrasound combined with ascorbic acid or glutathione on enzymatic darkening of whole-wheat raw noodles [J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 59(2): 901-907
- [6] Li M, Ma M, Zhu KX, et al. Delineating the physico-chemical, structural, and water characteristic changes during the deterioration of fresh noodles [J]. Food Chemistry, 2016, 216: 374-381
- [7] Ren S, Ma R, Ning W. Microbial changes and fresh-keeping of fresh noodles under refrigerated condition [J]. Information Technology and Agricultural Engineering, 2012: 973-980
- [8] 肖付刚,孙军涛,王德国,等.生湿面中腐败菌分析[J].粮食与油脂,2016,29(5):76-78
- XIAO Fu-gang, SUN Jun-tao, WANG De-guo, et al. Study on spoilage microorganism in fresh-wet noodles [J]. Cereals & Oils, 2016, 29(5): 76-78
- [9] 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,2010,168(4):45-47
- ZHOU Wen-hua, ZHENG Shi-hong, TANG Bing. Analysis of main microorganisms and separation spoilage bacterium in mechanism wet-fresh noodle [J]. Cereals & Oils, 2010, 168(4): 45-47
- [10] Reis FS, Martins A, Helena Vasconcelos M, et al. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms [J]. Food Weekly News, 2017, 66: 48-62
- [11] Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C. The beneficial role of edible mushrooms in human health [J]. Current Opinion in Food Science, 2017, 14: 122-128
- [12] Bach F, Ferreira Zielinski Acá Antonio, Helm CV, et al. Bio compounds of edible mushrooms: *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities [J]. LWT - Food Science and Technology, 2019, 107: 214-220
- [13] 曾霖霖,江瑞荣,陈峰,等.液体深层发酵制备食用菌风味面条[J].中国食用菌,2013,32(2):47-50
- ZENG Lin-lin, JIANG Rui-rong, CHEN Feng, et al. Preparation of edible fungi flavor noodle by liquid deep fermentation [J]. Edible Fungi of China, 2013, 32(2): 47-50
- [14] 许莹莹,廖焯,李德海,等.食用菌发酵液中功能性成分研究及应用[J].包装与食品机械,2018,36(1):57-62
- XU Ying-ying, LIAO Ye, LI De-hai, et al. Research on functional ingredients in edible mushroom fermentation liquor [J]. Packaging and Food Machinery Pack Food Mach, 2018, 36(1): 57-62
- [15] Tang YJ, Liu RS, Li HM. Current progress on truffle submerged fermentation: A promising alternative to its fruiting bodies [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(5): 2041-2053
- [16] Yang S, Zhang H. Optimization of the fermentation process of *Cordyceps sobolifera* Se-CEPS and its anti-tumor activity *in vivo* [J]. Journal of Biological Engineering, 2016, 10(1): 8
- [17] 窦会娟,孙连海,郭文涛.食用菌发酵液对耐药菌的抑菌活性研究[J].中国酿造,2015,34(7):40-42
- DOU Hui-juan, SUN Lian-hai, GUO Wen-tao. Antibacterial activity of mushroom fermentation broth to drug-resistant bacteria [J]. China Brewing, 2015, 34(7): 40-42
- [18] 罗青,杨玉珍,王国霞.灵芝与猴头菇发酵液的抑菌性测定[J].现代牧业,2017,3:40-42
- LUO Qing, YANG Yu-zhen, WANG Guo-xia. Determination of antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* and *Hericium erinaceus* [J]. Modern Animal Husbandry, 2017, 3: 40-42
- [19] GB 4787.2-2016,食品微生物学检验 菌落总数测定[S].北京:中国标准出版社,2016:3-5
- [20] Queipo-Ortuno MI, De Dios Colmenero J, Macias M, et al. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2008, 15(2): 293-296
- [21] GB 4789.14-2014,食品微生物学检验 蜡样芽胞杆菌[S].北京:中国标准出版社,2014: 2-8
- [22] Horgen PA, Kokurewicz KF, Anderson JB. The germination of basidiospores from commercial and wild-collected isolates of *Agaricus bisporus* (= *A. brunnescens*) [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1989, 35(35): 492-498
- [23] Gang J, Liu H, Liu Y. Optimization of liquid fermentation

- conditions and protein nutrition evaluation of mycelium from the caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (ascomycetes) [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2016, 18(8): 745
- [24] 范秀芝,殷朝敏,姚芬,等.液体发酵黑木耳多糖的分离纯化及保湿性研究[J].现代食品科技,2018,34(10):55-63
FAN Xiu-zhi, YIN Chao-min, YAO Fen, et al. Research on purification and moisturization effect of polysaccharides from *Auricularia heimuer* under submerged fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 55-63
- [25] 窦会娟,张群芝,孙连海.香菇产抑菌活性物质液态发酵条件优化[J].中国酿造,2014,33(9):45-48
DOU Hui-juan, ZHANG Qun-zhi, SUN Lian-hai. Optimization of liquid cultivation conditions for antimicrobial active substances production by *Lentinula edodes* [J]. China Brewing, 2014, 33(9): 45-48
- [26] 孟俊龙,冯翠萍,常明昌,等.香菇多糖抑菌作用的研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2012,32(3):261-264
MENG Jun-long, FENG Cui-ping, CHANG Ming-chang, et al. Antimicrobial characteristics of polysaccharide from *Ganoderma lentinan* [J]. Shanxi Agric. Univ. (Natural Science Edition), 2012, 32(3): 261-264
- [27] Ren L, Hemar Y, Perera CO, et al. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2014, 3(2), 41
- [28] 王舒媛,王子元,张敏.不同抑菌剂对青稞鲜湿面中蜡样芽孢杆菌的抑制作用研究[J/OL].食品科学:1-10[2020-02-16].
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190909.1039.004.html>
WANG Shu-ai, WANG Zi-yuan, ZHANG Min. Study on the inhibitory effects of different bacteriostatic agents on bacillus cereus from highland barley fresh wet noodles [J/OL]. Food Science, 1-10[2020-02-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20190909.1039.004.html>
- [29] 解修超,刘军生,罗阳兰,等.4株姬松茸胞外多糖含量和生物活性的对比分析[J].食品研究与开发,2019,12:68-75
XIE Xiu-chao, LIU Jun-sheng, LUO Yang-lan, et al. Comparative analysis of extracellular polysaccharide content and bioactivity associated with 4 strains of *Agaricus blazei* [J]. Food Research and Development, 2019, 12: 68-75
- [30] 曹飞扬,王娉,江连洲,等.蜡样芽孢杆菌分型方法研究进展[J].食品科学,2017,38(17):286-290
CAO Fei-yang, WANG Ping, JIANG Lian-zhou, et al. Advances in methods for *Bacillus cereus* typing [J]. Food Science, 2017, 38(17): 286-290
- [31] 王军华,许晶,张青松,等.一起蜡样芽孢杆菌污染干面引起食物中毒的调查[J].公共卫生与预防医学,2009,20(5):85-85
WANG Jun-hua, XU Jin, ZHANG Qing-song, et al. Investigation of food poisoning caused by *Bacillus cereus* contaminated hot and dry noodles [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2009, 20(5): 85-85
- [32] Lv GY, Fan LF, Zhang ZF, et al. Development of research on lentinan [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2009: 183-188
- [33] Wu JY. Polysaccharide-protein complexes from edible fungi and applications [J]. Polysaccharides, 2014, 1-10
- [34] 陈士瑜.血耳及其人工栽培[J].中国食用菌,1992,3:10-11
CHEN Shi-yu. *Tremella sanguinea* and its artificial cultivation [J]. Edible Fungi of China, 1992, 3: 10-11
- [35] 王昭晶,曹森,曾亚威,等.血耳多糖的提取工艺/微观结构及其抗炎作用[J].中国食品学报,2019,19(1):102-108
WANG Zhao-jing, CAO Sen, ZENG Ya-wei, et al. Extraction optimization, microstructure and anti-inflammatory properties of a polysaccharide from *Tremella sanguinea* peng [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(1): 102-108
- [36] 崔京春,郭海勇,邢效瑞,等.榆耳发酵液抑菌谱及抑菌作用稳定性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2013,7:105-107
CUI Jing-chun, GUO Hai-yong, XING Xiao-rui, et al. Inhibitory spectrum and the stability of bacteriostatic effect of the fermented liquid of *Gloeostereum incarnatum* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2013, 7:105-107
- [37] 吴胜莲,邵晨霞,唐少军,等.茯苓发酵液的抑菌和抗肿瘤活性[J].食用菌学报,2016,23(1):63-66
WU Sheng-lian, SHAO Chen-xia, TANG Shao-jun, et al. Antibacterial and antitumor activities of *Wolfiporia cocos* spent culture fluid [J]. Edible Fungi, 2016, 23(1): 63-66
- [38] 胡雯.香菇胞外多糖高产菌株筛选、发酵条件优化及抗氧化性抑菌作用的研究[D].南京:南京农业大学,2014
HU Wen. The study on the souring cultivation of mushroom to select high-yielding strains of exopolysaccharide from *Lentinus edodes* and antioxidant, antimicrobial activity [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014