

常德鲜湿米粉发酵过程中的菌群变化

佟立涛^{1,2}, 周素梅¹, 林利忠², 钟葵¹, 刘丽娅¹, 周闲容¹, 刘也嘉²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工重点实验室, 北京 100193)

(2. 湖南金健米业股份有限公司, 湖南常德 415001)

摘要: 为探讨常德鲜湿米粉发酵过程中的菌群变化, 本文对常德鲜湿米粉发酵过程中主要微生物的种类、组成变化及致病菌的安全威胁进行了研究。结果表明, 自然发酵过程中的优势菌为乳酸菌和酵母菌。发酵液的 pH 值随着发酵的进行从最初的 6.21 不断降低, 在发酵到 8~12 h 时达 3.69 后稍有回升, 发酵结束后回升到 4.20。大米的蛋白质、粗脂肪和灰分含量在发酵后分别降低了 24.92%、31.01%、81.37%, 而总淀粉含量在发酵前后无显著性变化。蜡样芽孢杆菌的注入对于发酵液的 pH 值变化无显著影响。发酵液中蜡样芽孢杆菌在 10^3 cfu/g 水平时, 随着发酵的进行其数量会逐步减少, 带来的安全风险可控。但是当达到 10^4 cfu/g 水平时, 尽管发酵后蜡样芽孢杆菌数量有所下降, 但是浓度仍在较高水平, 对米粉制品安全性存在威胁。

关键词: 常德鲜湿米粉; 发酵; 菌相; 蜡样芽孢杆菌

文章编号: 1673-9078(2013)11-2616-2620

Changes of Main Microflora in Changde Fresh Wet Rice Noodles

TONG Li-tao^{1,2}, ZHOU Su-mei¹, LIN Li-zhong², ZHONG Kui¹, LIU Li-ya¹, ZHOU Xian-rong¹, LIU Ye-jia²

(1. Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China) (2. Hunan Jinjian Cereals Industry Co., Ltd, Changde, Changde 415001, China)

Abstract: To explore the changes of microflora in the natural fermentation process of Changde fresh wet rice noodles, the main microbial species, variation and pathogen threats were studied. The results showed that the *Lactobacillus* and yeast were dominant bacteria during the natural fermentation. The pH of fermentation broth was decreased from 6.21 to 3.69 after 8~12 h fermentation, and then increased slightly to 4.20 at the ends of fermentation. Compared with unfermented rice, the contents of proteins, crude fat and ash in fermented rice were significantly decreased by 24.92%, 31.01%, and 81.37%, respectively. The starch content had no obvious change. The injection of *Bacillus cereus* presented less effect to pH of the fermentation broth. The risk of *Bacillus cereus* at 10^3 cfu/g level in fermentation broth was controllable for its number was gradually reduced with fermentation forward. However, when it reached 10^4 cfu/g, Changde fresh wet rice noodles had a security risk, although its number was decreased after fermentation.

Key words: Changde fresh wet rice noodles; pH; fermentation; microflora; *Bacillus cereus*

常德鲜湿米粉是我国湖南省具有地方特色的美食, 具有爽滑劲道、味道鲜美及食用快捷方便等优点, 是我国南方地区消费者最喜爱的主食之一^[1]。其以常德本地早籼米为原料, 经浸泡、发酵、清洗、磨浆、蒸片、挤片、保湿、挤丝成型、蒸粉、切断定量、洗散、酸浸、包装及杀菌等多道生产工艺制作而成。因加工过程中要经过发酵的工艺, 且最终产品70%左右的含水量有利于微生物繁殖, 因此无论从产品食品

收稿日期: 2013-07-26

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费资助(201303070)

作者简介: 佟立涛(1982-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事粮油加工与功能食品研究。

通讯作者: 刘也嘉(1973-), 女, 高级工程师, 主要从事鲜米粉产品的开发、加工和研究

质或安全质量角度考虑, 弄清楚发酵过程中微生物种类及微生物的特性都是尤为重要的。

发酵过程中微生物使大米的理化特性发生明显的改变, 从而使米粉获得良好的食用品质。有学者研究发酵过程中大米中总淀粉, 蛋白、脂肪及灰分等营养成分变化, 及其对米粉食用品质的影响^[2], 但常德鲜湿米粉发酵前后主要营养成分的变化尚未见报道。有学者从发酵米粉中分离纯化得到的发酵微生物是以胚芽乳杆菌、屎肠球菌、酿酒酵母为优势菌株的乳酸杆菌、乳酸链球菌、酵母菌三类^[3], 但关于发酵过程中微生物的变化情况尚不明确。柳鑫等人研究了湿米粉中菌相并建立了微生物生长预测模型, 该模型可以快速预测鲜米粉中微生物在运输, 保存和消费各个阶段的生长变化规律^[4]。由于他们研究的湿米粉是经清洗、

浸泡、磨浆、发酵、蒸煮、成型、冷却等生产工艺制的,特别是发酵工艺与常德鲜湿米粉存在显著区别,因此该模型在常德鲜湿米粉中应用受到一定的限制。此外,蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus Cereus*, 简称*B.cereus*) 为食源性条件致病菌,是引起米粉中毒的高风险微生物^[5],其代谢产生的呕吐毒素 (*Cereulide*) 及溶血素 BL (Hb1)、细胞毒素K (CytK) 等肠毒素可引起代谢性酸中毒和肝衰竭^[6]、新生儿急性脑部病变^[7]、出血性腹泻等疾病^[8],因此控制*B.cereus*污染对于保证米粉安全品质尤为重要。

本文从常德鲜湿米粉制作过程中发酵工艺入手,对发酵液中主要微生物菌相进行确定,观测发酵过程中微生物菌相、pH值及发酵前后营养成分的变化。并对本底*B.cereus*较高原料大米在发酵过程中其变化进行了研究,为进一步研究常德鲜湿米粉的品质形成机理及致病菌的防控提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 大米品种

试验选用湖南常德 2012 年产余赤米 (早籼米) 为制作发酵米粉的原料,由湖南金健米业股份有限公司提供。

1.1.2 发酵菌种

传统发酵米粉发酵液及纯乳酸菌种 (乳酸菌含量 2.11×10^8 个/g,由传统发酵液纯化获得) 由湖南金健米业股份有限公司提供。

1.1.3 其他材料与试剂

营养琼脂培养基 (PCA)、MRS 乳酸菌琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基、月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤 (LST)、葡萄糖酪胺琼脂培养基、琼脂、Tween-80、胆汁酸盐:北京鸿润宝顺科技有限公司;氯化钠、氯化钙、碳酸钠:北京化学试剂厂;碳酸氢钠、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾:国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

米粉生产成套设备,湖南金健米业股份有限公司;YP2001N 型天平上海精密科学仪器有限公司;T-214 型分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱:日本三菱公司;BSD-, 150 型全温震荡培养箱;北京东南一起实验室设备有限公司;pHS-3C 型 pH 计,上海雷磁仪器厂;WH-2 型微型漩涡混合仪,天津市泰斯特仪器有限公司;

BCD-212 型冰箱,博西华家用电器有限公司;SW-CJ-2F 型洁净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;YXQ-LS-50S11 型立式压力蒸汽杀菌锅,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 试验方法

1.3.1 大米发酵

洗净的大米原料以1:1.12的水米比常温浸泡24 h,在工厂发酵罐中45 °C发酵72 h。

1.3.2 发酵菌株的确定

生理盐水、稀释试管、培养皿及培养基于120 °C, 20 min高压灭菌,将灭菌好的营养琼脂培养基趁热倒平板,备用;发酵过程中用无菌玻璃烧杯从5个不同的发酵罐中分别取发酵液250 mL,取米粉发酵液1 mL,在超净工作台上逐次稀释于稀释管中,然后分别取1 mL 稀释液于平板培养基上,于37 °C恒温培养24 h,参照 GB/T 4789.2-2010的方法测定细菌总数;分别用选择性培养基分离乳酸菌、酵母、霉菌、*B.cereus*,并以平板划线分离形态不同的菌株分别培养,转接五次后获得单一菌株。乳酸菌、酵母、霉菌分别参照 GB/T 4789.35-2010、GB/T 4789.15-2010、GB/T 4789.15-2010 及 GB/T 4789.14-2003进行测定。

1.3.3 大米发酵液中不同菌及培养基的培养条件

测定大米发酵液中不同菌的培养基及培养条件,如表1所示。

表1 大米发酵液中各种菌的培养基及培养条件

Table 1 The culture media and culture conditions for rice fermentation liquid

种类	培养基	培养温度/°C
细菌总数	平板计数营养琼脂	37
乳酸菌	MRS 乳酸菌琼脂	37
酵母菌和霉菌	马铃薯葡萄糖琼脂	28
大肠杆菌	月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤	37
蜡样芽孢杆菌	葡萄糖酪胺琼脂	30

1.3.4 发酵液pH测定

按试验设定时间取发酵液,冷却至室温后,用pH计测定发酵液的pH值。

1.3.5 发酵过程中微生物的变化

按试验设定时间取发酵液,在选择性培养基上进行测定。

1.3.6 大米理化指标的测定

大米原料,参照 GB/T 21305-2007 测定含水量;参照 AOAC996.11 的方法测定总淀粉含量;按照 Foss 公司凯氏定氮仪标准方法测定蛋白质含量(N×5.95);

灰分参照 GB/T 22510-2008 进行测定；粗脂肪含量测定参照 GB/T 14772-2008；发酵后大米经冷冻干燥上述方法测定。

1.4 统计分析

采用 Microsoft Excel 进行数据整理，用 SAS 8.0 软件进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 发酵液中主要微生物的种类

表2 发酵液中主要微生物的种类

发酵罐编号	测定菌种/(cfu/g)			
	菌落总数	乳酸菌	酵母	霉菌
1	1.64×10 ⁸	5.57×10 ⁸	5.96×10 ³	80
2	3.02×10 ⁸	4.03×10 ⁸	2.54×10 ³	1.51×10 ²
3	9.11×10 ⁷	6.48×10 ⁷	5.19×10 ²	33
4	4.14×10 ⁷	2.02×10 ⁸	2.23×10 ³	30
5	9.68×10 ⁷	2.44×10 ⁸	2.92×10 ³	<10

本研究测定了大米发酵液中主要微生物的种类，如表 2 所示。结果表明，在自然发酵过程中，主要微生物品种为乳酸菌、酵母，霉菌在菌种中仅占小部分，这与前人的研究报道基本一致^[3,4]。

2.2 发酵过程中发酵液菌相和pH值的变化

表3 发酵过程中的主要微生物百分比

Table 3 The percentage of main microbes during the fermentation process

发酵时间/h	球菌/%	杆菌/%	酵母/%	细菌总数/(cfu/g)
0	54.96	28.01	17.03	2.91×10 ⁴
1	53.82	19.17	27.01	3.94×10 ⁶
2	59.33	14.41	26.26	9.01×10 ⁶
3	62.04	18.56	19.40	4.04×10 ⁶
4	55.03	27.96	17.01	8.02×10 ⁶
5	55.11	24.23	20.66	9.51×10 ⁶
6	51.02	25.01	23.97	7.27×10 ⁶
7	59.96	20.03	20.01	9.87×10 ⁶
8	50.01	23.02	26.97	2.13×10 ⁷
12	48.34	23.70	27.96	1.94×10 ⁷
24	58.77	20.62	20.61	1.82×10 ⁷
48	48.68	34.58	16.74	7.64×10 ⁷
72	49.96	36.01	14.03	2.03×10 ⁷

注：数据为 5 个发酵罐的平均值。

发酵过程中主要微生物的相对比例测定结果如表

3 所示，在初始发酵过程中以乳酸菌、酵母占优势菌，乳酸菌以球菌为主，其从 0 h 到 72 h 的发酵过程中均接近或超过半数。乳酸菌与酵母菌在发酵过程中存在共生关系，乳酸菌产酸为酵母菌的繁殖提供了一个酸性环境，另一方面酵母菌产生的维生素和氨基酸为乳酸菌提供了所需的营养^[1]。同样的，本实验中当发酵进行到 5~6 h，体系的 pH 值降低到 4.0 左右（图 1），进入到发酵的最高峰期；体系 pH 随着发酵进一步降低，但降低幅度较小，最低降到 3.7 左右，同时酵母的数量会明显呈下降趋势；当发酵进行了到 12 h 以后，优势菌进入了衰减期，细菌、酶菌等则呈上升趋势，同时 pH 也有小幅的上升。本文中常德鲜湿米粉发酵过程中 pH 的变化规律与前人报道的自然发酵米粉相一致^[2]。

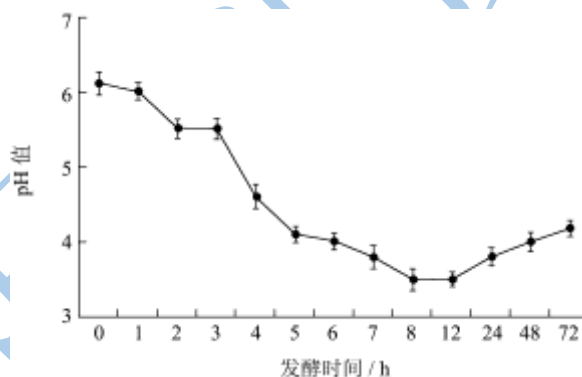


图1 发酵过程中发酵液pH的变化

Fig.1 Changes of fermented liquid pH during the fermentation process

注：数据表示为平均值±标准偏差。

2.3 发酵前后大米营养成分的变化

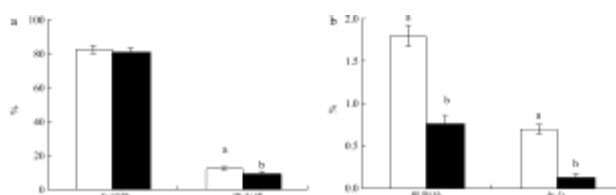


图2 发酵前后大米营养成分的变化

Fig.2 Changes of rice nutrients before and after fermentation

注：显著性差异在 p<0.05，数据表示为平均值±标准偏差，以干基计。

发酵前后主要营养成分含量的变化如图 2 所示。结果表明，经过自然发酵样品的总淀粉含量在发酵前后并没有显著性差异，表明常德鲜湿米粉发酵过程中的微生物对淀粉并无明显的降解作用。报道显示自然发酵大米过程中，发酵液的可溶性固形物含量与总固形物的相对含量随着发酵时间而增加，由于发酵起到了纯化淀粉的作用，因此相对含量升高，总含量不变

[2], 但是酸的存在也会对淀粉的结构发生改变^[9-10]。另一方面, 蛋白质、粗脂肪及灰分在发酵后含量明显降低 ($P < 0.05$)。作为优势菌群的乳酸菌所产生的蛋白酶和乳酸会导致发酵液 pH 降低, 这有利于蛋白质的溶出和分解。由于细菌和霉菌有较强的产生脂肪酶的能力, 因而在发酵过程中能够降解脂肪, 产生游离的脂肪酸。且脂肪酸再与直链淀粉结合成螺旋状的络合物, 从而抑制淀粉的膨胀^[10]。正因为蛋白和脂肪被降解从而改变了米粉的流变特性使得常德鲜湿发酵米粉具有优异的食用品质。此外, 发酵后灰分含量明显

降低, 其降低有利于米粉白度的增加^[11], 从而改善米粉的感官品质。

2.4 大米及发酵过程中致病菌的变化情况

2.4.1 原料大米中的蜡样芽孢杆菌的检测

B.cereus 是引起米粉中毒的高风险微生物^[5], 控制其对鲜湿米粉污染, 是保证产品安全品质的主要任务之一。因此本实验选用微生物本底相对较高的 12 个大米原料作为样品, 见表 4。

表 4 大米原料微生物检测结果

Table 4 Microbial test results of rice

大米原料	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
霉菌/(cfu/g)	100	<10	<10	100	<10	<10	<10	50	<10	<10	<10	100
<i>B.cereus</i> /(cfu/g)	100	无	无	无	无	100	200	无	无	100	100	100
细菌总数/(cfu/g)	700	1900	25100	62000	7500	400	38800	1200	61800	600	24100	2500

2.4.2 发酵过程中致病菌的变化情况

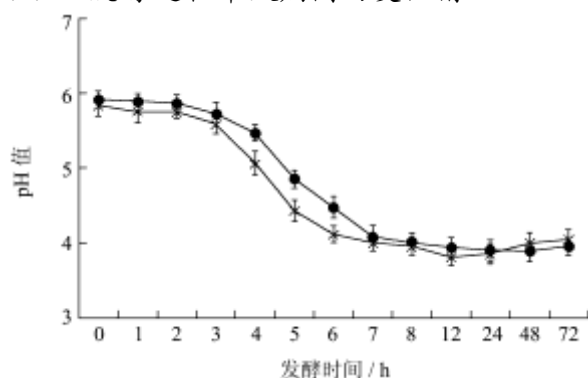


图 3 发酵过程中发酵液 pH 的变化

Fig.3 Changes of fermented liquid pH during the fermentation process

注: ×: 1000 水平; •: 10000 水平; 数据表示为平均值±

标准偏差。

市面上收集的大米样品均为合格产品, 一般蜡样芽孢杆菌的水平在百级以内。但加工米粉的过程中有较高的水分活度、营养成分和适宜的 pH 值, 蜡样芽孢杆菌能够迅速的增长繁殖, 容易超过疾病水平界限 ($\geq 10^5$ cfu/g)^[5]。鉴于鲜湿米粉中蜡样芽孢杆菌的可接受的安全限量为 $\leq 10^3$ cfu/g, 最高可接受的边缘限量值为 10^4 cfu/g^[5], 实验中将大米样品蜡样芽孢杆菌水平提高至 1000 级和 10000 级水平, 了解在提高污染的情况下对大米发酵过程或制品的影响。加入蜡样芽孢杆菌后发酵过程中菌落水平、pH 值见表 5 和图 3。从图 3 可以看出, 蜡样芽孢杆菌的加入对于 pH 的变化并无显著影响, 发酵到 6 h pH 仍能够降低到 4 左右, 表明其加入并不显著影响优势菌的繁殖。

表 5 加入 *B. cereus* 后监测结果

Table 5 Microbial test results after adding *B.cereus*

菌种	时间 1000/(cfu/g)						
	0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
乳酸菌	8.02×10^5	1.33×10^7	2.92×10^7	1.54×10^8	2.68×10^8	4.02×10^8	4.38×10^8
<i>B.cereus</i>	1000	400	300	300	200	200	100
乳酸菌	3.97×10^5	9.01×10^6	3.03×10^7	8.02×10^7	1.04×10^8	2.09×10^8	3.28×10^7
<i>B.cereus</i>	9900	10000	10000	10000	10000	3000	3000

如表 5 所示, 乳酸发酵过程可以起到明显的抑制或控制蜡样芽孢杆菌增长的效果。在 10^3 cfu/g 以内, 蜡样芽孢杆菌的数据随着 pH 值的降低而明显降低, 而以 10^4 cfu/g 的高浓度加入时, 乳酸发酵作用只能抑制其增殖而不能明显降低其数量; 而在后期的发酵过程中会因供氧不足等原因有所下降。表明蜡样芽孢杆菌污染水平在 10^3 cfu/g 以下时, 自然发酵过程中可以

达到抵制蜡样芽孢杆菌的目的, 从而不会对产品产生安全性方面的影响; 但是当污染水平达到 10^4 cfu/g 水平时米粉的安全品质受到威胁。我们对上述的两个实验的发酵产物进行了蜡样芽孢杆菌及其呕吐毒素的检测, 均未检出, 表明在发酵过程中即使出现蜡样芽孢杆菌达到 10^3 cfu/g, 其风险是比较低的。但是达到 10^4

cfu/g 水平时尽管没有产生呕吐毒素,但是后续工艺中

对米粉的污染情况需要引起注意。

3 结论

3.1 在自然发酵过程中,主要微生物品种为乳酸菌、酵母,霉菌在菌种中仅占小部分,且随着发酵的进行发酵液 pH 值不断降低后稍有回升。

3.2 经过自然发酵大米总淀粉含量在发酵前后并没有显著性差异,而蛋白、粗脂肪和灰分含量在发酵后均显著降低 ($P < 0.05$)。

3.3 发酵过程中出现蜡样芽孢杆菌达到 10^3 cfu/g 水平时,其风险较低。但是达到 10^4 cfu/g 时尽管没有产生毒素,但是后续工艺中对米粉的污染情况需足够重视。

参考文献

- [1] 鲁战会,彭荷花,李里特,等.常德发酵米粉中的微生物分离纯化与鉴定[J].中国粮油学报,2006,21(3):23-26
Lu Z H, Peng H H, Li L T, et al. Isolating and Identifying Microbes in Fermented Rice Noodles of Changde [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2006, 21(3): 23-26
- [2] 周显青,刘亚军,张玉荣.不同微生物发酵对于大米理化特性及米粉食味品质的影响[J].河南工业大学学报,2010,31(1):4-8
Zhou X Q, Liu Y J, Zhang Y R. Influences of Different Fermentation Microorganisms on Physicochemical Properties of Rice and Eating Quality of Rice Noodles [J]. Journal of Henan University of Technology, 2010, 31(1): 4-8
- [3] Lu Z H, Peng H H, Cao W, et al. Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria and yeasts from sour Mifen a traditional fermented rice noodle from China [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105: 893-903
- [4] 柳鑫,文丽,李莎,等.湿米粉中菌相分析与微生物生长预测模型的建立[J].中国酿造,2013,32(1):65-70
Liu X, Wen L, Li S, et al. Analysis of Main Microflora and Development of Predictive Models of Microbe in Wet Rice Noodle [J]. China Brewing, 2013, 32(1): 65-70
- [5] 周帼萍,梁天光,丁淑娟.1986~2007年中国299起蜡样芽孢杆菌食物中毒案例分析[J].中国食品卫生杂志,2009,21(5):450-453
Zhou G P, Liang T G, Ding S J. Analysis on 299 Bacillus Cereus Food Poisoning Cases in 1986-2007 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2009, 21(5): 450-453
- [6] Dierick K, van C E, Swiecicka I, et al. Fatal Family Outbreak of Bacillus Cereus-associated Food Poisoning [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(8): 4277-4279
- [7] Shiota A M, Saitou K, Mizumoto H, et al. Rapid detoxification of cereulide in Bacillus cereus food poisoning [J]. Pediatrics, 2010, 125(4): 951-955
- [8] Lund T, Buyser M L, Granum P E. A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis [J]. Molecular Microbiology, 2000, 38(2): 254-261
- [9] Ogunloyinbo F A. Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional gari production [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(10): 1425-1432
- [10] Olympia M, Fukuda H, Ono H, et al. Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, burong isda, and its amyolytic enzyme [J]. Journal of Fermentation & Bioengineering, 1995, 80(2): 124-130
- [11] 袁美兰,鲁战会,程永强,等.自然发酵对米粉 RVA 黏度性质及米粉拉伸性质的影响[J].中国粮油学报,2008,239(1):7-9
Yuan M L, Lu Z H, Cheng Y Q, et al. Effects of Natural Fermentation on RVA Properties of Rice Flour and Tensile Properties of Rice Noodles [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2008, 239(1): 7-9