

广式月饼腐败霉菌的分离与控制

黄恺婷, 许喜林, 麻云璐, 石美芬, 阮征, 任娇艳

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 广式月饼丰富的营养使其容易因滋生微生物而发霉变质, 研究表明导致广式月饼发霉变质的最主要微生物是霉菌。本文先从广东生产的已发霉的广式月饼中进行霉菌的分离纯化, 从而得到在广东一带导致广式月饼霉变的主要霉菌种类。然后通过试用多种不同类型的防霉剂, 以期找出效果最佳的防霉剂。最终得出效果最佳的防霉剂共五种, 分别为脱氢醋酸钠、纳他霉素、尼泊金复合酯钠、肉桂精油和大蒜精油。本研究通过抑制目标霉菌的方法控制广式月饼的霉腐变质, 研究成功后对广东广式月饼的生产是有重要的意义。

关键词: 广式月饼; 霉菌; 分离鉴定; 抑菌

文章编号: 1673-9078(2012)2-142-146

Research of Separation and Inhibition of the Spoilage Moulds in Cantonese-style Moon Cake

HUANG Kai-ting, XU Xi-lin, MA Yun-lu, SHI Mei-fen, RUAN Zheng, REN Jiao-yan

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Cantonese-style moon cakes are rich in nutrients, being suitable for the growth of microorganisms. Previous researches confirmed that the spoilage of Cantonese-style moon cakes was mainly due to moulds. In this paper, the separation and identification of moulds from Cantonese-style moon cake were studied, and the main fungal species which cause Cantonese-style moon cake mildew in Guangdong were obtained. A variety of different types of fungicide were studied, and the best fungicide was found. Sodium dehydroacetate, Natamycin, sodium paraben complex, cinnamon essential oil and garlic essential oil were chosen for their inhibition effect on the moulds. It was very important to the Cantonese-style moon cake production in Guangdong by inhibiting the mould to control the spoilage.

Key words: cantonese-style moon cake; moulds; isolation and identification; inhibition

月饼是使用面粉等谷物粉、油、糖或不加糖调制饼皮, 包裹各种馅料, 经加工而成在中秋节食用为主的传统节日食品 (GB 19855-2005)。由于广式月饼高糖高油, 丰富的营养使之容易因滋生微生物而导致发霉变质, 研究证明致广式月饼发霉变质的最主要微生物是霉菌^[1,2]。

由于季节、生产存放地点和产品类型等的不同, 引起广式月饼霉变的霉菌类型亦会有所不同。因此, 本文先从广东生产的已发霉的广式月饼中进行霉菌的分离纯化及初步鉴定, 从而得到在华南地区导致广式月饼霉变的主要霉菌种类。然后通过试用多种不同类型可应用于月饼的防霉试剂, 以期找出效果最佳的防

收稿日期: 2011-09-02

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目 (2009A020700007); 中山市产学研结合项目 (2009CX004)

作者简介: 黄恺婷 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学
通讯作者: 许喜林 (1964-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为食品微生物/食品安全

霉剂。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 广式月饼 (已发霉的红莲蓉蛋黄月饼和白莲蓉蛋黄月饼)

来自广东某烘焙坊连锁店。

1.1.2 培养基

琼脂粉和孟加拉红培养基等均购自广东环凯公司; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基/PDA 培养基为自制。

1.1.3 抑菌剂^[3-5]

山梨酸钾 (食品级), 宁波王龙集团有限公司; 苯甲酸钠 (分析纯), 天津市福晨化学试剂厂; 3106 丙酸钙-耐高温 (食品级), 广东阳东县化工工业公司; R-多糖/克霉王 (食品级), 北京星标智生物技术有限公司; 脱氢醋酸钠 (食品级), 上海崇明生化制品厂; 双乙酸钠 (食品级), 郑州慧泽生化科技有限公司; 纳他霉素 (食品级), 兰州伟日生物工程有限公司; 食用

酒精, 购自广州市芊芸化玻仪器有限公司; 尼泊金复合酯钠(食品级), 无锡江大百泰科技有限公司; 肉桂精油 ZXX1005(食品级), 大蒜精油 ZXX1008(食品级), 辣椒精油 ZXX1006(食品级), 均购于郑州雪麦龙食品香料有限公司。

1.1.4 主要试剂

丙酮(分析纯), 广州化学试剂厂。

1.2 仪器及器皿

电子天平; 超净工作台; 电热恒温培养干燥两用箱; 电热恒温培养箱; 手提式压力蒸汽消毒器; 电热恒温水浴锅; 移液器; 移液枪头; 电热恒温鼓风干燥箱; XW-80A 微型旋涡混合仪; 单目生物显微镜; 功率调节电炉; 冰箱(0~4℃); 牛津杯(内径 6.0±0.1 mm, 外径 7.8±0.1 mm, 高 10.0±0.1 mm); 培养皿(内径 90 mm, 高 16~17 mm); 涂布棒及常用玻璃仪器等。

表 1 广式月饼腐败霉菌菌落和细胞形态

Table 1 Colony and cell morphology of the spoilage moulds in Cantonese-style moon cakes

霉菌编号	菌株菌落形态(PDA 培养基上单菌落培养 5 d)	细胞形态	菌株初步鉴定结果
1	圆形, 直径约 15~20.1 mm, 凸面。孢子绿色, 菌丝白色绒毛质。随着生长时间的延长会出现规则的同心轮纹。	菌丝细长无隔膜。分生孢子梗末端有膨大的椭圆形膨胀体。分生孢子为链状体排列成辐射状。	曲霉属霉菌
2	圆形, 直径约 63~82 mm, 凸面。菌丝白色疏松棉絮状, 孢子青绿色散点状。随着生长时间的延长会出现规则的同心轮纹。	菌丝细长无隔膜。分生孢子梗末端有膨大的球形膨胀体。分生孢子为链状体排列成辐射状。	曲霉属霉菌
3	近圆形, 直径约 12~15 mm, 不规则突起。有少量棕褐色绒毛状菌丝。孢子墨绿色。	菌丝细长分隔。分生孢子为分枝状, 产生刷子状分生孢子头。	青霉属霉菌
5G	近圆形, 大小约 2~2.5 mm, 不规则突起。孢子墨绿色, 表面有少量灰白菌丝。	菌丝细长, 孢子椭圆形。	未能鉴定菌株种属
6	圆形, 直径约 15~21 mm, 瘤形。孢子绿色, 菌丝白色浓密棉絮状。	菌丝细长无隔膜。分生孢子梗末端有膨大的椭圆形膨胀体。分生孢子为链状体排列成辐射状。	曲霉属霉菌
9	圆形, 直径约 17~22.6 mm, 扁平。孢子深绿色, 菌丝白色浓密绒毛质。	菌丝细长无隔膜。分生孢子梗末端有膨大的椭圆形膨胀体。分生孢子为链状体排列成辐射状。	曲霉属霉菌
W1	圆形, 直径约 17~19.4 mm, 扁平。孢子深绿色, 菌丝白色浓密绒毛质。随着生长时间的延长会出现规则的同心轮纹。菌落及其周围培养基略变棕褐色。	菌丝细长无隔膜。分生孢子梗末端有膨大的椭圆形膨胀体。分生孢子为链状体排列成辐射状。	曲霉属霉菌
W2	圆形, 直径约 12.2~14.8 mm, 凸形。中央处棕黄色, 其外圈为绿色孢子。菌丝白色棉絮状。菌落周围培养基变亮黄色。	菌丝细长有隔膜。分生孢子梗末端有膨大的半球形或球形膨胀体。分生孢子为链状体排列成辐射状。	曲霉属霉菌
R1	菌落形状较不规则, 大小约在 1.3~3.9 mm 之间, 中凹台状。硬质灰褐色菌落及孢子。	菌丝较短, 孢子圆形。	未能鉴定菌株种属

2.2 抑菌剂对广式月饼腐败霉菌的抑制效果研究

2.2.1 菌悬液制备与抑菌剂稀释

将各株霉菌活化后, 培养至生长良好。在超净工作台中用接种环取菌置入灭菌生理盐水中, 摇匀, 稀释成约 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ CFU/mL 的菌悬液^[7]。

量取一定量的抑菌剂, 加入到 100 mL 无菌水中

2 实验方法

2.1 菌株的分离、纯化与初步鉴定

稀释平板法: 把月饼的皮和馅分别用 GB 4789.15 的方法分离得到纯化的菌株。

直接点植法^[6]: 在无菌条件下, 用无菌勺子挑取发霉广式月饼上约 2 mm×2 mm×2 mm 大小具有特征菌落的月饼块, 轻放在培养基表面, 倒置于 28℃ 恒温霉菌培养箱中培养 5~10 d, 得到单菌落纯化的菌株, 必要时可以反复进行平板划线, 直到获得单菌落纯化的菌株。

从发霉的月饼中分离所得的 9 株霉菌, 以肉眼观察, 记录霉菌的菌落特征, 并在显微镜下观察个体特征, 进行初步鉴定。

(精油加入到 100 mL 丙酮中, 丙酮经测试无抑菌作用), 振荡摇匀成一定浓度的溶液或悬浊液。

2.2.2 抑菌试验

用牛津杯抑菌圈法对各种抑菌剂进行定性试验, 初步筛选出有抑菌效果的抑菌剂。然后用最小抑制浓度法(MIC)^[7]对抑菌剂进行定量试验。

向各无菌培养皿中倒入 12~15 mL 溶化状无菌的 PDA 培养基, 自然冷却, 凝固后待用。取制备好的菌悬液 0.2 mL, 滴入已经倒有相应固体培养基的平皿表面, 用涂布棒使其均匀分布在培养基的表面, 用无菌镊子夹取无菌牛津杯放入含菌平皿中, 每皿 1~4 个(根据预计抑菌圈大小而定。精油及酒精因有挥发性, 每皿一个), 将 200 μ L 一定浓度的抑菌剂加入牛津杯中, 28 $^{\circ}$ C 下培养 1~3 d (R1 号菌因生长速度较慢, 培养 6-8 d), 观察牛津杯底周围的霉菌生长情况, 每种菌作 3 个重复实验, 测量抑菌圈直径, 取平均值^[7-9]。

3 结果与讨论

3.1 广式月饼腐败霉菌的分离、纯化与初步鉴定

经过分离、纯化, 得到了 9 株霉菌, 分别标记为 No.1、No.2、No.3、No.5G、No.6、No.9、No.W1、No.W2、No.R1。所获的 9 株霉菌各自用 PDA 培养基平板单菌落培养 5 d, 然后分别用肉眼和显微镜观察^[10-12], 其形态分别如表 1 所述, 鉴定根据 GB/T 4789.16-2003。

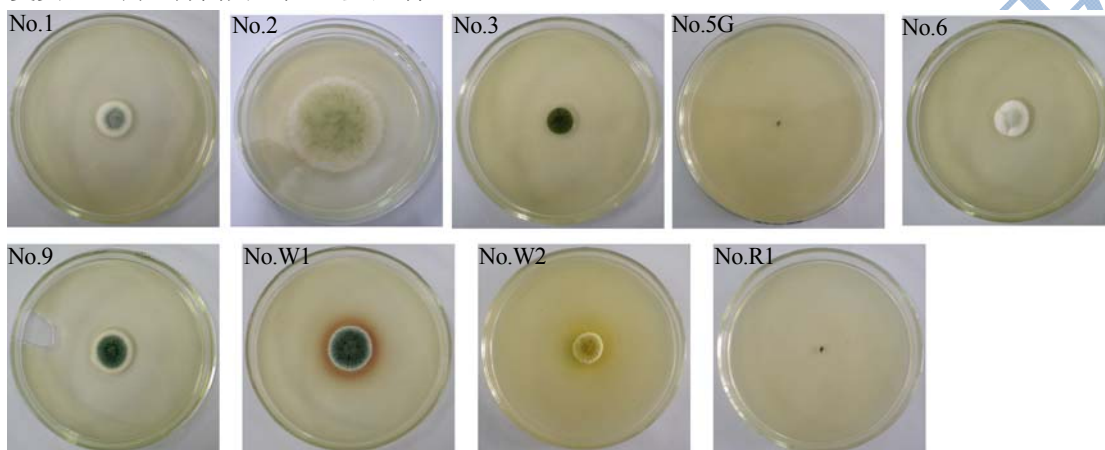


图 1 广式月饼腐败霉菌菌落照片

Fig.1 Colony of the spoilage moulds in Cantonese-style moon cakes

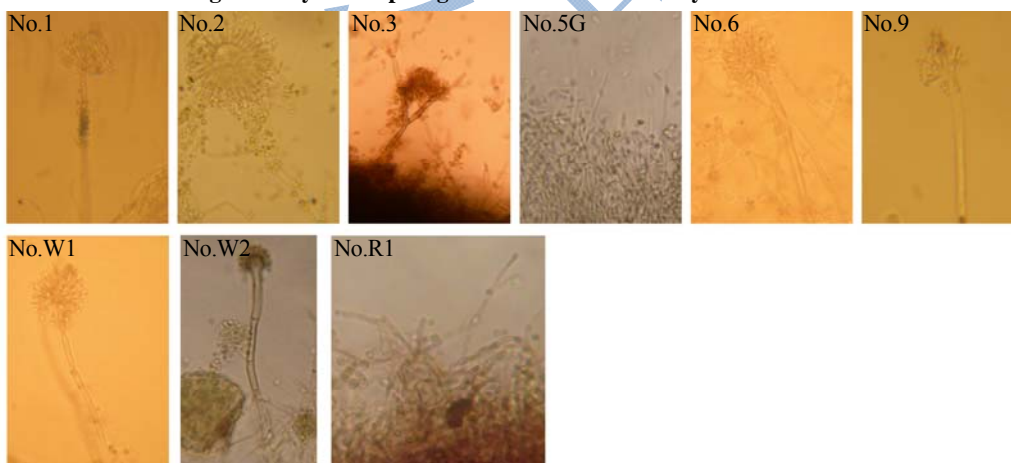


图 2 广式月饼腐败霉菌细胞形态(400 \times)

Fig.2 Cell morphology of the spoilage moulds in Cantonese-style moon cakes (400 \times)

3.2 广式月饼腐败霉菌控制的初步研究

3.2.1 不同抑菌剂对广式月饼腐败霉菌抑制的研究

由表 2 初步筛选出对 5 种广式月饼腐败霉菌有较佳抑制作用的抑菌剂是: 脱氢醋酸钠、纳他霉素、尼泊金复合酯钠、肉桂精油、大蒜精油。最终选用这五种抑菌剂, 是由于他们按表 2 所示的浓度对 9 株霉菌都能产生较大的抑菌圈。图 3 为添加抑菌剂的初筛效果图。

3.2.2 抑菌剂浓度对广式月饼腐败霉菌的影响研究

表 3 结果表明, 脱氢醋酸钠对各种广式月饼腐败霉菌的抑制作用差异不大, 最小抑制浓度普遍在 0.5 mg/mL; 纳他霉素除了对 No.5G 菌的最小抑制浓度为 0.08 μ g/mL 高于另外八种菌 10 倍以外, 对其余八种菌的最小抑制浓度值平均分布在 0.008 μ g/mL 和 0.012 μ g/mL; 尼泊金复合酯钠对九种菌的最小抑制浓度平均分布在 0.6 mg/mL 和 0.8 mg/mL; 大蒜精油则平均分布在 0.10%和 0.15%; 而肉桂精油对普遍菌的最小抑制浓度为 0.01%。

就焙烤食品而言, 根据 GB2760, 脱氢醋酸钠的最高使用量为 0.5 g/kg (0.5 mg/mL), 纳他霉素为 0.3 g/kg (0.3 μg/mL), 尼泊金复合酯钠为 0.5 g/kg (0.5 mg/mL); 肉桂精油和大蒜精油的最高使用量未在 GB 2760 中规定, 但属允许使用的食用天然香料。

纳他霉素的最小抑菌浓度远低于最高允许使用量, 在五种抑菌剂中浓度亦最低, 证明抑菌效果较好。然而, 脱氢醋酸钠和尼泊金复合酯钠的最小抑菌浓度则接近甚至高于允许使用量, 因此不宜采用或应结合其他抑菌剂同时使用。大蒜精油在浓度较高时, 抑菌效果比肉桂精油好; 但当浓度降低时, 肉桂精油的抑菌能力以平稳的速度下降, 大蒜精油的抑菌能力则随浓度降低而迅速下降; 因此, 5%大蒜精油的抑菌效果较肉桂精油好, 但大蒜精油的最小抑菌浓度较高。另外, 精油具有的特有气味对食品风味影响较大, 尤其

是大蒜精油, 因而亦应结合其他抑菌剂同时使用, 以降低使用量。



图3 初筛效果 (No. W1, 添加抑菌剂)

Fig.3 Screening effect (No.W1, added with inhibitors)

注: 初筛, No.W1 菌, 抑菌剂从最上方沿顺时针方向依次是 10 mg/mL 苯甲酸钠、10 mg/mL 尼泊金复合酯钠、100% 丙酮。另外, %指体积分数, 下同。初筛时要筛选的抑菌剂共十二种, 如表 2 所示, 因篇幅所限图 3 只选用了其中三种需筛选的抑菌剂来显示初选结果。

表 2 抑菌剂的初步筛选结果

Table 2 The result of Preliminary screening of inhibitors

腐败霉菌	抑菌圈直径/mm											
	山梨酸钾	苯甲酸钠	丙酸钙	1% R-多糖	脱氢醋酸钠	双乙酸钠	1 μg/mL 纳他霉素	75%食用酒精	尼泊金复合酯钠	5%肉桂精油	5%大蒜精油	5%辣椒精油
1	19.17±6.79	0	0	0	48.83±0.76	0	25.33±0.58	0	33.00±0.71	72.00±7.21	90.00±0.00	0
2	0	0	0	0	35.97±2.05	0	17.33±0.58	0	25.75±0.35	50.50±12.28	90.00±0.00	0
3	42.47±7.33	11.00±1.00	0	0	57.50±0.87	0	30.00±1.00	0	35.67±3.79	83.33±7.02	90.00±0.00	0
5G	27.50±3.50	0	16.87±3.78	0	45.67±4.04	0	24.33±1.15	0	46.50±7.21	90.00±0.00	90.00±0.00	0
6	24.33±4.04	0	0	0	48.67±1.26	0	26.60±0.53	0	35.67±1.53	60.50±3.04	90.00±0.00	0
9	18.17±2.93	0	0	0	45.67±1.53	0	28.00±0.65	0	33.67±1.53	58.73±12.90	90.00±0.00	0
W1	0	0	0	0	46.50±2.65	0	27.20±0.87	0	34.33±3.82	61.33±4.73	90.00±0.00	0
W2	26.50±3.35	0	18.25±5.74	0	45.67±1.60	0	33.33±1.15	0	45.17±1.44	90.00±0.00	90.00±0.00	0
R1	43.33±1.15	0	17.00±1.73	0	90.00±0.00	0	38.33±1.53	13.33±1.15	54.50±0.71	90.00±0.00	90.00±0.00	0

注: 除表中标记的浓度外, 其他浓度均为 1×10⁻² g/mL。

表 3 抑菌剂的最小抑制浓度研究结果

Table 3 The Minimum inhibitory concentration (MIC) result of selected inhibitors

腐败霉菌	脱氢醋酸钠		纳他霉素		尼泊金复合酯钠		肉桂精油		大蒜精油	
	MIC/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm	MIC/(μg·mL ⁻¹)	抑菌圈直径/mm	MIC/(mg/mL)	抑菌圈直径/mm	MIC/%	抑菌圈直径/mm	MIC/%	抑菌圈直径/mm
No.1	0.60 a**	10.33±1.15*	0.012 b	9.50±0.71	0.80 a	8.00±0.00	0.01 c	8.00±0.00	0.15 a	9.00±0.00
No.2	0.40 c	8.00±0.00	0.012 b	8.00±0.00	0.80 a	8.25±0.35	0.02 a	9.50±2.12	0.15 a	11.50±0.00
No.3	0.50 b	8.00±0.00	0.008 c	10.50±0.71	0.60 b	8.00±0.00	0.01 c	8.50±0.71	0.10 b	8.00±0.00
No.5G	0.50 b	8.00±0.00	0.08 a	8.00±0.00	0.60 b	8.00±0.00	0.01 c	8.00±0.00	0.10 b	8.00±0.00
No.6	0.50 b	8.00±0.00	0.012 b	8.75±1.06	0.80 a	8.00±0.00	0.01 c	8.00±0.00	0.15 a	8.00±0.00
No.9	0.50 b	8.00±0.00	0.012 b	9.50±0.71	0.80 a	9.00±0.00	0.02 a	9.50±2.12	0.10 b	8.00±0.00
No.W1	0.40 c	8.00±0.00	0.008 c	9.75±0.35	0.80 a	8.50±0.71	0.01 c	8.00±0.00	0.15 a	9.00±0.00
No.W2	0.50 b	8.00±0.00	0.008 c	10.50±0.71	0.60 b	8.00±0.00	0.015 b	8.00±0.00	0.10 b	8.00±0.00
No.R1	0.40 c	12.00±4.24	0.008 c	11.50±0.71	0.60 b	11.50±4.95	0.015 b	8.25±0.35	0.10 b	8.00±0.00

注: *重复 3 次平均值±标准差; **由于同种抑菌剂对不同腐败霉菌的最小抑菌浓度不同, 表中不同的小写字母表示同种抑菌剂对不同腐败霉菌的最小抑菌浓度经检验有显著差异(P<0.05, n=3), 其中 a 表示最小抑菌浓度值最高、b 次之、c 则表最小抑菌浓度值最

小。下同。

4 结论

4.1 本研究从广东发霉月饼中分离出9株不同霉菌,初步鉴定表明多数为曲霉菌和青霉菌。通过试用多种不同类型的防霉剂,以期找出效果最佳者。

4.2 结果表明,纳他霉素抑制霉菌作用较佳,比尼泊金复合酯钠和脱氢醋酸钠有更好的效果,而且纳他霉素不影响食品风味,使用方便,因而有广阔的应用前景。肉桂精油亦有良好的抑菌效果,大蒜精油则相对较弱,但两种精油都是天然防腐剂。未来研究将进一步结合多种不同使用方式的抑菌剂,如把纳他霉素、尼泊金复合酯钠和脱氢醋酸钠与食品原料混合使用^[13],而把肉桂精油和大蒜精油以包装或气调等形式使用^[14],从而有效增强抗菌功效,延长广式月饼货架期。

参考文献

- [1] 许小苗. 焙烤制品腐败霉菌及其抑制研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2009
- [2] 姚卫蓉, 许小苗. 焙烤食品腐败霉菌的分离、鉴定与抑制研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(11): 148-150
- [3] Philippe Dantigny, Audrey Guilmar, Florentina Radoi, et al. Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 98: 261-269
- [4] M E Guynot, A J Ramos, V Sanchis, et al. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 101: 161-168
- [5] Luiz C Trugo, Paul M Finglas. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition [M]. USA: ACADEMIC PRESS, 2003
- [6] 周彦良. 霉豆渣发酵的研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2009
- [7] 朱玲. 耐高渗透压腐败酵母的分离与控制研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2010
- [8] 李喜宏, 邱松山, 胡云峰, 张静. 柑桔贮藏期纳米二氧化钛抑制霉菌性能研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 86-89
- [9] 钟瑞敏, 肖仔君, 刘健南, 罗亦姬. 二种可食用精油的抗菌活性研究[J]. 现代食品科技, 2010, 27(3): 250-253
- [10] 哈瑞根. 食品微生物实验室手册[M]. 第三版. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 32-33, 254-264
- [11] 牛天贵. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 36-40
- [12] Daiana Garcia, Antonio J. Ramos, Vicente Sanchis, et al. Predicting mycotoxins in foods: A review [J]. Food Microbiology, 2009, 26: 757-769
- [13] David A Mann, Larry R Beuchat. Combinations of antimicrobials to inhibit the growth of molds capable of producing 1, 3-pentadiene [J]. Food Microbiology, 2008, 25: 144-153
- [14] Laura Gutiérrez, Cristina Sánchez, Ramón Batlle, et al. New antimicrobial active package for bakery products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20: 92-99