

# 蒸蛋糕中微生物菌群结构鉴定及其抑制方法的探究

何艳霞<sup>1</sup>, 王凤<sup>2</sup>, 杨文丹<sup>1</sup>, 陈佳芳<sup>1</sup>, 徐岩<sup>3</sup>, 黄卫宁<sup>1\*</sup>, 小川晃弘<sup>4</sup>

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122; 2. 无锡麦吉贝可生物食品有限公司, 江苏无锡 214131; 3. 江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122; 4. 三菱化学食品株式会社, 日本东京 100-8251)

**摘要** [目的] 研究蒸蛋糕在贮藏过程中的微生物变化, 探索延长其保质期的方法。[方法] 采用基因测序的方法对蒸蛋糕贮藏过程中的微生物多样性和主要微生物菌群进行了分析, 并研究了脱氢乙酸钠、丙酸钙和山梨酸钾 3 种防腐剂对蒸蛋糕保质期的影响。[结果] 蒸蛋糕在贮藏过程中主要的腐败是表皮霉变, 在蒸蛋糕的贮藏过程中主要的细菌为 *Staphylococcus* 和 *Kocuria*; 主要的霉菌为 *Penicillium*、*Cladosporium* 和 *Aspergillus*; 3 种防腐剂都可以抑制微生物的繁殖速度, 防腐变的能力大小依次为脱氢乙酸钠、丙酸钙、山梨酸钾。[结论] 研究可为延长蒸蛋糕的保质期提供理论依据和技术参考。

**关键词** 蒸蛋糕; 防腐保鲜; 微生物菌群; 分子生物学分析

**中图分类号** TS201.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)18-0091-06

## Primary Analysis on the Microorganism in the Storage of Steamed Cake and Its Inhibition Method

HE Yan-xia<sup>1</sup>, WANG Feng<sup>2</sup>, YANG Wen-dan<sup>1</sup>, HUANG Wei-ning<sup>1\*</sup> et al (1. State Key Lab of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangnan 214122; 2. Wuxi Magibake Biological Food Co. Ltd., Wuxi, Jiangsu 214131)

**Abstract** [Objective] The changes of microorganism were investigated for steamed cakes during storage, the method to extend the shelf life was explored. [Method] The diversity and major strains of microbial community were analyzed using gene sequencing biological methodology, and the effects of three kinds of antiseptic on shelf life of steamed cake, such as dehydrogenation sodium acetate, calcium propionate and potassium sorbate, were studied. [Result] The spoilage of steamed cake mainly occurred in skin or outer surface of steamed cake product. The main strains of bacteria were found to be *Staphylococcus* and *Kocuria*. The main mold strains included *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*, which were found to be predominate in steamed cake during storage. Three kinds of preservatives used could extend the shelf life of steamed cake, and the effect of dehydrogenation sodium acetic acid was best, then propionic acid calcium, potassium sorbate had the least effect. [Conclusion] This research can provide theoretical basis and technical reference for extending the shelf life of steamed cake.

**Key words** Steamed cake; Preservation; Microbial colony; Molecular biological analysis

蛋糕是一种传统的西点, 其质地柔软、富有弹性、具浓郁香味、易消化, 深受消费者的喜爱<sup>[1]</sup>。随着人们生活水平的提高, 消费市场对于蛋糕提出了更高的要求, 因此蛋糕的研究在国内外也已成热点, 且主要集中在蛋糕配方<sup>[2-6]</sup>、品质<sup>[7-9]</sup>和保质期<sup>[9-12]</sup>等方面。

为了满足消费者的需求, 近年来在我国市场上出现了具有我国传统特色的蛋糕——蒸蛋糕, 因其组织细腻、弹性好、口感绵软、入口即化且采用蒸制工艺, 所以广受现代人的追捧。但是蒸蛋糕含水量高达 28%~30%, 几乎是烤制蛋糕的 2 倍<sup>[13]</sup>, 是糕点中最难贮存的品种之一, 因此蒸蛋糕的防腐保鲜值得重视和深入研究。目前, 国内外对于蒸蛋糕领域的研究报道极少<sup>[13-14]</sup>, 对蒸蛋糕的微生物菌群进行分析, 提高蒸蛋糕安全性的研究还鲜见报道。

笔者通过 PCR 分子生物学的方法探索蒸蛋糕中微生物的生长及菌群变化, 通过添加丙酸钙、山梨酸钾和脱氢乙酸钠, 寻找最适合蒸蛋糕防腐保鲜的添加剂, 从而为蒸蛋糕保质期的研究提供理论依据, 延长蒸蛋糕的保质期。

**基金项目** 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA022207C); 江苏省产学研联合创新基金——前瞻性联合研究项目(BY2014023-16); 国家自然科学基金面上项目(31071595, 31571877); 苏州市科技支撑计划项目(SNG201401)。

**作者简介** 何艳霞(1991—), 女, 甘肃定西人, 硕士研究生, 研究方向: 烘焙科学、加工配料与食品添加剂。\* 通讯作者, 教授, 博士, 从事烘焙科学与发酵技术、谷物食品化学研究。

**鸣谢** 感谢日本三菱化学食品有限公司的国际合作项目并感谢小川晃弘博士及其团队积极参与学术交流和指导。

**收稿日期** 2017-04-07

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 原材料与主要试剂。** 低筋粉, 江苏省南顺食品有限公司; 白砂糖和奶粉, 福临门食品有限公司; 鸡蛋和盐, 均为市售食品级; 植物油, 金龙鱼葵花籽油; 菱友™ MFC-68, 三菱化学食品有限公司; 糖醇和丙三醇, 珠海市宏泰生物科技有限公司; 泡打粉, 焙乐道公司; 丙酸钙、山梨酸钾和脱氢乙酸钠, 泰州市荣昌食品添加剂有限公司; 菌落总数计数培养基、孟加拉红培养基、甘油、无水乙醇、异丙醇、琼脂、氯化钠、琼脂糖, 国药集团化学有限公司; 快捷型植物基因组 DNA 提取系统、PCR 试剂, 天根生化科技(北京)有限公司; 16S rDNA 的通用引物 27F 和 1492R、2616S rDNA 的通用引物 NL1A 和 NL4B, 上海桑尼公司合成。

**1.1.2 主要仪器设备。** KitchenAid 打蛋器; 美的中式电蒸锅; SM-25 搅拌机; 苏州安泰净化工作台 SW-CJ-2F, 苏州安泰净化公司; APX-150C 型恒温恒湿培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; JY20002 型电子天平, 上海良平仪器仪表有限公司; NanoDrop2000 分光光度计、Legend Micro17 型离心机, Thermo 公司; PCR 仪(T100 Thermal Cycler)、Power pac 核酸电泳仪、Geldoc 2000 凝胶成像仪, Bio-Rad。

### 1.2 方法

**1.2.1 蒸蛋糕的制作。** 根据表 1 中的配方准确称取各种原料, 首先将除低筋粉、奶粉和植物油的所有原料搅拌均匀, 然后加入低筋粉和奶粉高速打发, 最后加入植物油搅拌均匀。将搅拌好的面糊分装到模具中在蒸锅中蒸熟即可。室温冷

却2 h后装入塑封袋中,放置在恒温保湿箱中(温度30℃,湿度70%)贮藏待用<sup>[15]</sup>。

表1 蒸蛋糕配方

Table 1 Formula of steamed cake g

原料 Crude material	添加量 Additive amount	原料 Crude material	添加量 Additive amount
低筋粉 Low gluten flour	100	山梨糖醇 Sorbitol	5
白砂糖 White sugar	75	丙三醇 Propanetriol	3
鸡蛋 Egg	100	奶粉 Milk powder	5
植物油 Vegetable oil	25	盐 Salt	2
MFC-68	10	泡打粉 Baking powder	2
麦芽糖醇 Maltol	5		

**1.2.2 菌落总数和霉菌计数。**菌落总数的测定按GB/T4789.2—2010《食品微生物学检验菌落总数测定》<sup>[16]</sup>。无菌操作下取25 g蒸蛋糕,加入225 mL无菌水中,振荡器振荡30 min,再取1 mL稀释液加入9 mL无菌水中,依次稀释成 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 倍稀释液,分别取0.1 mL稀释液接种到菌落总数培养基和营养琼脂培养基上,每个处理3次重复,置于恒温培养箱中37℃培养48 h,计数并挑取不同形态的单菌落。无菌操作下取不同形态的细菌单菌落于营养琼脂培养基上划线纯化<sup>[17]</sup>,纯化后的单菌落用于显微镜镜检和分子鉴定。依据GB7099—2003《糕点、面包卫生标准》,对于热加工蛋糕,菌落总数 $\leq 1\ 500$  CFU/g<sup>[18]</sup>。

霉菌的计数按GB/T4789.15—2010《食品微生物学检验霉菌和酵母计数》<sup>[19]</sup>。无菌操作下取25 g蒸蛋糕,加入225 mL无菌水中,振荡器振荡30 min,再取1 mL稀释液加入9 mL无菌水中,依次稀释成 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 倍稀释液,分别取0.1 mL稀释液接种到YPD和孟加拉红培养基上,每个处理3次重复,置于恒温培养箱中28℃培养5 d,计数并挑取不同形态的单菌落。无菌操作下取不同形态的真菌单菌落于YPD和孟加拉红培养基上划线纯化<sup>[20]</sup>,纯化后的单菌落用于显微镜镜检和分子鉴定。依据GB7099—2003《糕点、面包卫生标准》,对于热加工蛋糕,霉菌总数 $\leq 100$  CFU/g<sup>[18]</sup>。

**1.2.3 菌株的分离、纯化和保藏。**根据菌落形态和镜检结果,挑选出的不同形态的纯单菌落,接种到相应的液体培养基中,先在28℃下振荡培养24 h后,再与60%的甘油以1:1进行保存,放置于-80℃的冰箱中保藏<sup>[20]</sup>。

**1.2.4 菌株的鉴定。**

**1.2.4.1 细菌的鉴定。**将之前保存的菌株进行活化,经过24 h的活化后,取5  $\mu$ L上述菌液作为PCR扩增的模板,反应体系为50  $\mu$ L:5  $\mu$ L 10  $\times$  Buffer(含 $Mg^{2+}$ ),4  $\mu$ L dNTPs,0.5  $\mu$ L Easy Taq DNA酶(2.5 U/ $\mu$ L),引物27F、1492R(序列详见表2)各1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O补足至50  $\mu$ L。

细菌16S rRNA基因扩增条件为95℃预变性3 min后进入30个循环:95℃30 s,50℃30 s,72℃1.5 min,72℃延伸5 min,12℃5 min。

用1%琼脂糖凝胶电泳检测上述得到PCR产物的纯度。纯度达到要求的PCR扩增产物寄至测序公司测序。然后采

用DNAsar软件对得到的序列进行拼接,将拼接好的序列与GenBank中已知16S rRNA序列进行同源性比对,同源性达到99%及以上的菌株可直接鉴定至种。

根据试验所得的比对结果,将相应菌株的模式菌株的序列下载,然后用MEGA 5.05软件构建分离菌株的系统发育树,对分离出的细菌与模式菌株的亲缘关系进行分析。

**1.2.4.2 真菌的鉴定。**真菌采用玻璃珠法破壁<sup>[21]</sup>,并用真菌基因组试剂盒提取分离自蒸蛋糕中的酵母菌和霉菌DNA。用微量紫外分光光度计检测上述真菌的DNA原液的OD比值( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ )及浓度,将合格者的DNA原液于-20℃保存待用。

取200~500 ng/ $\mu$ L上述真菌DNA原液作为PCR扩增的模板,反应体系为50.0  $\mu$ L:5.0  $\mu$ L 10  $\times$  Buffer(含 $Mg^{2+}$ ),4.0  $\mu$ L dNTPs,0.5  $\mu$ L Easy Taq DNA酶(2.5 U/ $\mu$ L),引物NL1A、NL4B(序列详见表2)各1.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O补足至50.0  $\mu$ L。

真菌26S rDNA基因扩增条件为94℃预变性1 min后进入30个循环:94℃1 min,55℃45 s,72℃1 min,72℃延伸7 min,12℃保持5 min。

用1%琼脂糖凝胶电泳检测上述得到PCR产物的纯度,纯度达到要求的PCR扩增产物寄至测序公司测序。然后采用DNAsar软件对得到的序列进行拼接,将拼接好的序列与GenBank中已知序列进行同源性比对,同源性达到99%及以上的菌株可直接鉴定至种。

根据试验所得的比对结果,将相应菌株的模式菌株的序列下载,然后用MEGA 5.05软件构建分离菌株的系统发育树<sup>[22]</sup>,对分离出的细菌与模式菌株的亲缘关系进行分析。

表2 研究所用引物序列

Table 2 PCR primers used in this study

引物名称 Primers	序列 Sequence(5'-3')
27F	5' - AGCGGATCACTTCACACAGACTACGGCTACCTT-GTACGA - 3'
1492R	5' - GCAGAGTTCTCGGAGTCACGAAGAGTTTGATCCT-GGCTCAG - 3'
NL1A	5' - GCAGAGTTCTCGGAGTCACGAGCATATCAATAAG-CGGAGAAAAG - 3'
NL4B	5' - AGCGGATCACTTCACACAGAGGTCCTGTTTCA-AGACGG - 3'

**1.2.5 防腐剂对蒸蛋糕的影响。**蒸蛋糕的制作如前所述,丙酸钙按照推荐用量2.5 g/kg进行添加;脱氢乙酸钠按照推荐用量0.5 g/kg进行添加;山梨酸钾按照推荐用量1.0 g/kg进行添加,添加量都以低筋粉的量计算。添加方法是在调制面糊时,将添加剂直接添加到面粉中<sup>[23]</sup>。

**1.3 数据分析** 采用Excel 2010、MEGA 5.05软件和DNAsar软件对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

**2.1 蒸蛋糕贮藏过程中的微生物变化** 在不添加防腐剂的情况下,蒸蛋糕贮藏过程中微生物的变化见表3。

从表3的数据分析可知,蒸蛋糕采用保鲜袋密封包装,在温度为30℃、湿度为70%条件下贮存时,蒸蛋糕的细菌数

目和霉菌数目呈快速增长趋势,蒸蛋糕的细菌数目贮存第 3 天测定为 25 700 CFU/g,超过 GB7099—2003 中规定的热加工食品时细菌计数 (< 1 500 CFU/g) 的标准;霉菌计数为 100 CFU/g,达到 GB7099—2003 中规定的热加工食品时霉菌计数 ( $\leq 100$  CFU/g) 的标准上限,蛋糕表面有霉点出现,但是蒸蛋糕内部并无霉菌或菌丝出现。由此可知,蒸蛋糕的主要腐败是发生在表皮,且以发霉变质为主。这与丘德生<sup>[24]</sup>报道的糕点中主要腐败是发霉变质的结果一致。

表 3 菌落总数和霉菌数的测量结果

Table 3 The total number of colonies and moulds CFU/g

时间 Time	菌落总数 Total number of bacterial colony	霉菌 Mould
第 1 天 The 1 <sup>st</sup> day	990	< 10
第 3 天 The 3 <sup>rd</sup> day	25 700	100
第 5 天 The 5 <sup>th</sup> day	1 190 000	10 800

## 2.2 菌种鉴定

**2.2.1 细菌的鉴定。**将分离的细菌进行 16S rDNA 特异性扩增,扩增所用引物为 27F、1492R,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度,检测的部分结果见图 1。由图 1 可见,泳道约 1 500 bp 的位置均出现 1 条亮带,且无弥散、拖尾和非特异性现象,符合下一步的测序要求。

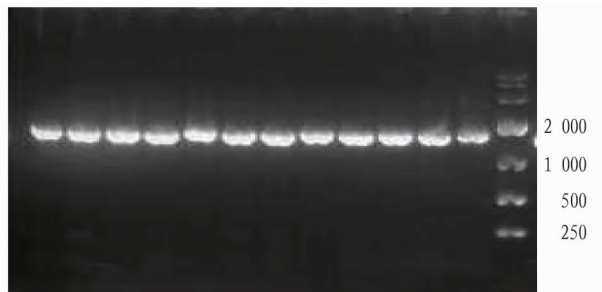


图 1 部分 16S rRNA 扩增产物凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis results of the amplified products of 16S rRNA domain sequences

将符合要求的扩增产物寄往测序公司进行测序,将测序结果拼接后,与基因库中序列进行同源性对比,对比得到与待测菌株同源性最为接近的已知种属的序列,同源性达到 99% 及以上的菌株可直接鉴定至种。其对比结果见表 4。

由表 4 的数据分析可知,从蒸蛋糕中总共分离出 7 种细菌,依次为 *Staphylococcus warneri*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus haemolyticus*、*Kocuriarhizophila*、*Bacillus tequilensis*、*Lactobacillus plantarum* 和 *Gluconobacter japonicas*。其中 *Staphylococcus warneri* 和 *Staphylococcus epidermidis* 是蒸蛋糕在贮藏过程中的优势菌群,*Kocuriarhizophila* 次之,其他的几种菌株都非常少。在蒸蛋糕的贮藏过程中,刚开始的优势细菌是 *Staphylococcus warneri* 和 *Staphylococcus epidermidis*,后期主要的细菌为 *Kocuriarhizophila*,这与 Ji 等<sup>[25]</sup>对米糕的微生物特性的研究中,米糕在贮藏过程中刚开始的优势菌群是球菌,而后转化为杆菌的研究结果相一致。

表 4 蒸蛋糕在贮藏过程中细菌 16S rRNA 序列对比结果

Table 4 Blast results of 16S rRNA sequences of the isolated bacteria in steamed cake

菌株编号 Strain No.	菌株对比结果 Comparative results of strains	序列号 Sequence No.	同源性 Homology %
B7	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	100
B8	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	100
B9	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	100
B16	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	100
Y11	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	100
Y13	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	100
Y9	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	99.44
Y10	<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	99.93
Y	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	99.00
W	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	99.00
B21	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC 29970	99.79
B14	<i>Kocuriarhizophila</i>	DSM 11926	99.93
B15	<i>Kocuriarhizophila</i>	DSM 11926	99.93
B17	<i>Kocuriarhizophila</i>	DSM 11926	100
B22	<i>Kocuriarhizophila</i>	DSM 11926	99.28
Y2	<i>Kocuriarhizophila</i>	DSM 11926	100
B2	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC 13622	99.79
Y3	<i>Gluconobacter japonicus</i>	NBRC 3271	99.93
Y5	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>	ATCC 14917	99.93

根据 NCBI 同源性比对结果,下载相应模式菌株的序列,从每个分离自蒸蛋糕的菌种中随机选取 1 株,用软件 MEGA 5.05 构建系统发育树(图 2),对分离菌株和模式菌株之间的亲缘关系进行研究。

从图 2 中的系统发育树可以看出共检测到 5 个属:*Staphylococcus*、*Kocuria*、*Bacillus*、*Gluconobacter* 和 *Lactobacillus*。因此,Y9、Y10、Y11、Y13、B7、B8、B9、B16、W、Y 和 B21 形成了第 1 个类群;Y3、B2 和 Y5 各单独形成一个类群;Y2、B14、B15、B17 和 B22 形成了一个类群。以上分离菌株与相对应的模式菌都聚在一起,且同源性都在 99% 以上,说明细菌 16S rRNA 基因序列分析结果具有非常高的可信性。

**2.2.2 真菌的鉴定。**将分离的酵母菌和霉菌进行 26S rDNA 特异性扩增,扩增所用引物为 NL1A、NL4B,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度,检测的部分结果见图 3。由图 3 可见,泳道约 600 bp 的位置均出现 1 条亮带,且无弥散、拖尾和非特异性现象,符合下一步的测序要求。

将符合要求的扩增产物寄往测序公司进行测序,将测序结果拼接后,与基因库中序列进行同源性对比,对比得到与待测菌株同源性最为接近的已知种属的序列,同源性达到 99% 及以上的菌株可直接鉴定至种。其对比结果见表 5。

由表 5 数据分析可知,从蒸蛋糕中总共分离出 11 种真菌:1 种酵母,为 *Saccharomyces cerevisiae*;10 种霉菌,依次为 *Penicilliumcorylophilum*、*Penicilliumchrysogenum*、*Penicilliumbrevico-m pactum*、*Penicilliumoxalicum* strain、*Alternariaalternata*、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus niger*、*Cladosporiumphaeospermum*、*Aspergillus sydowii* 和 *Aspergillus versicolor*。其中 *Penicillium* 和 *Aspergillus* 是蒸蛋糕在贮藏过程中的优势菌群。Legan 等<sup>[26]</sup>发现,面包中的霉菌主要有 *Aspergillus*、*Eurotium*、

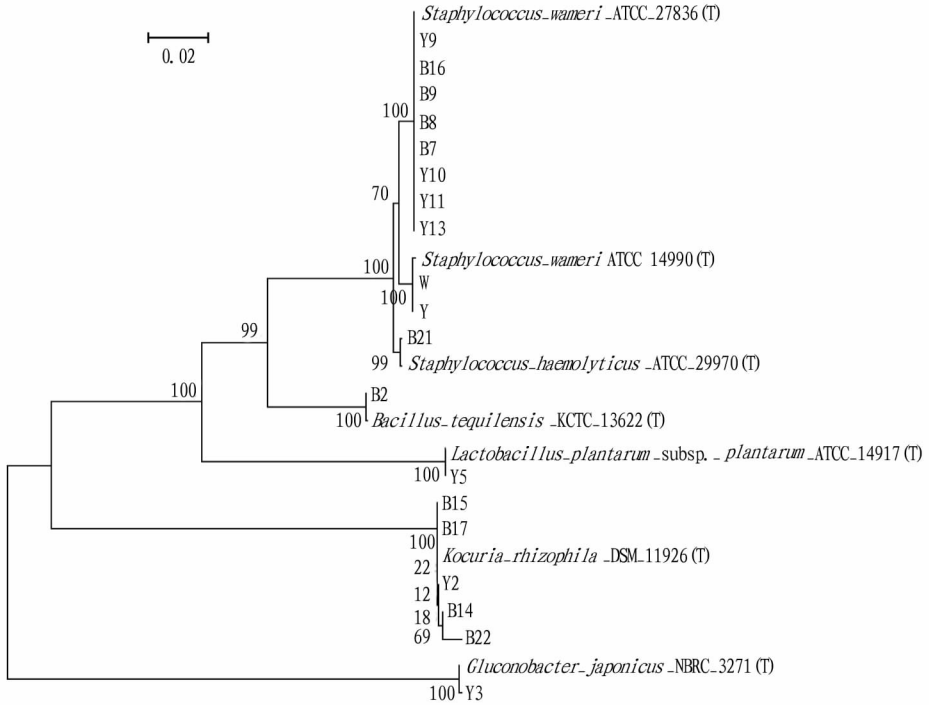


图 2 分离自蒸蛋糕中的细菌的 16S rRNA 序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the isolated bacteria in steamed cake based on 16S rRNA gene sequences



图 3 部分 26S rRNA 扩增产物凝胶电泳

Fig.3 Electrophoresis results of the amplified products of 26S rDNA domain sequences

*Penicillium*、*Cladosporium*; Baek 等<sup>[27]</sup>发现, *Cladosporium*、*Neurospora* 和 *Penicillium* 是烘焙和米制品中的主要霉菌,这与笔者研究的结果基本吻合,说明烘焙食品中的主要腐败霉菌是大致相同的。Ji 等<sup>[25]</sup>报道, *P. citreoviride* 和 *P. citrinum* 是我国传统的米糕中主要的霉菌; Ryan 等<sup>[28]</sup>发现,青霉是面包霉变的主要霉菌。这些都与该试验的研究结果相一致,说明糕点类食品的主要霉变霉菌为青霉属。

根据 NCBI 同源性比对结果,下载相应模式菌株的序列,从每个分离自蒸蛋糕的菌种中随机选取 1 株,用软件 MEGA 5.05 构建系统发育树(图 4、5),对分离菌株和模式菌株之间的亲缘关系进行研究。

从图 4 中的系统发育树可以看出,共检测到 1 个属: *Saccharomyces cerevisiae*,因此 Y6 和 Y18 形成了一个类群。以上分离菌株与相对应的模式菌都聚在一起,且同源性都在 99% 以上,说明真菌 26S rDNA 基因序列分析结果具有非常高的可信性。

表 5 蒸蛋糕在贮藏过程中真菌 26S rDNA 序列对比结果

Table 5 Blast results of 26S rDNA sequences of the isolated fungal in steamed cake

菌株编号 Strain No.	菌株对比结果 Comparative results of strains	同源性 Homology %
Y6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJM1592	99
Y18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain IMAU4Y119(QH39-2)	99
SG	<i>Penicilliumchrysogenum</i> strain B-090	99
Y	<i>Aspergillus flavus</i> strain DAOM 225949	99
H	<i>Aspergillus niger</i> strain SF-6354	99
B	<i>Cladosporiumphaeospermum</i> strain DAOM 144726	99
D	<i>Penicilliumbrevicompactum</i> strain PP21	99
S6	<i>Penicilliumcorylophilum</i> strain DAOM 221130	99
S3	<i>Penicilliumoxalicum</i> strain 114-2	99
XH	<i>Alternariaalternata</i> strain ACCC 36244	100
S01	<i>Alternariaalternata</i> strain ACCC 36244	99
S5	<i>Aspergillus sydowii</i> strain DAOM 213727	100
S17	<i>Aspergillus versicolor</i> strain DAOM 222010	99

从图 5 中的系统发育树可以看出,共检测到 4 个属: *Penicillium*、*Alternaria*、*Aspergillus* 和 *Cladosporium*。因此, D、SG 和 S6 形成了一个类群; Y、S6、S17 和 H 形成一个类群; B 单独形成一个类群; S01 和 XH 形成了一个类群; S3 单独形成一个类群。以上分离菌株与相对应的模式菌都聚在一起,且同源性都在 99% 以上,说明真菌 26S rDNA 基因序列分析结果具有非常高的可信性。

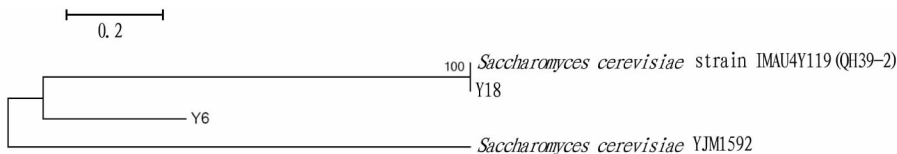


图 4 分离自蒸蛋糕中的酵母的 26S rRNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the isolated yeast in steamed cake based on 26S rRNA gene sequences

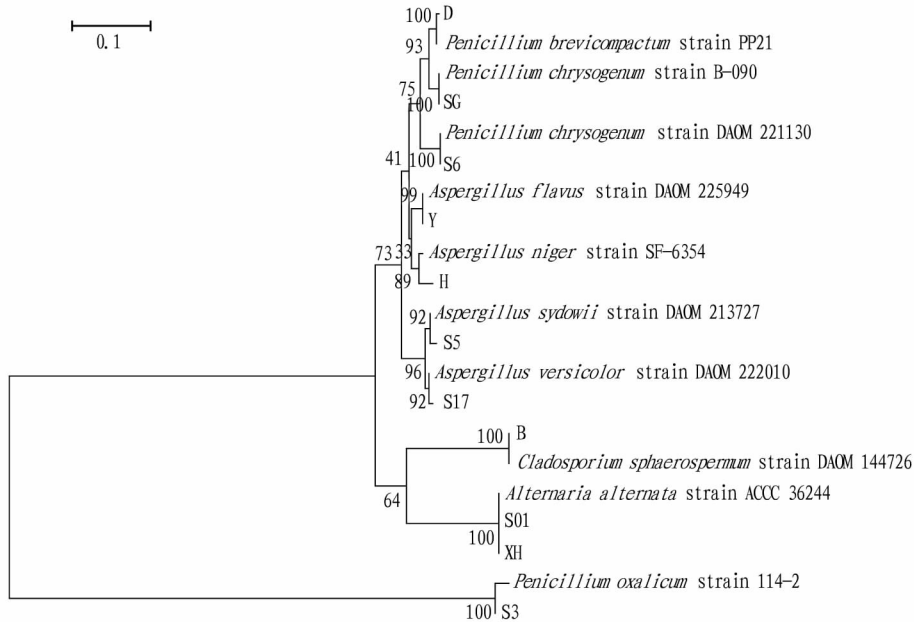


图 5 分离自蒸蛋糕中的霉菌的 26S rRNA 序列系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the isolated bacteria in steamed cake based on 26S rRNA gene sequences

2.3 防腐剂对蒸蛋糕的影响

2.3.1 细菌数的变化。从表 6 的数据分析可知,第 3 天时空白和添加防腐剂的蒸蛋糕的菌落总数虽都已超过 GB7099—2003 中规定的热加工食品时细菌计数 (< 1 500 CFU/g) 的标准,但添加防腐剂的蒸蛋糕的细菌数都小于空白,说明防腐剂可以抑制蒸蛋糕中微生物的生长。第 5 天时添加防腐剂的蒸蛋糕的细菌数均大于空白,原因可能是由于空白的蒸蛋糕的霉菌的生长抑制了细菌的生长。

表 6 细菌数和霉菌数的测定结果

Table 6 The number of bacteria and mould CFU/g

时间 Time	菌落总数 Total number of bacterial colony			
	空白 Blank	丙酸钙 Calcium propionate	山梨酸钾 Potassium sorbate	脱氢乙酸钠 Sodium dehydroacetate
第 1 天 The 1 <sup>st</sup> day	1 090	980	720	830
第 3 天 The 3 <sup>rd</sup> day	28 900	9 120	9 860	12 800
第 5 天 The 5 <sup>th</sup> day	1 360 000	2 010 000	3 720 000	3 760 000

2.3.2 霉菌数的变化。从表 7 的数据分析可知,添加防腐剂的蒸蛋糕的霉菌数都小于空白。第 3 天时空白的霉菌数超过 GB7099—2003 中规定的热加工食品时霉菌计数 ( $\leq 100$  CFU/g) 的标准,而添加防腐剂的蒸蛋糕的霉菌均小于国标值。由此可见,3 种防腐剂对蒸蛋糕的霉菌都有抑制作用,且 3 种防腐剂对蒸蛋糕霉变的影响大小依次为脱氢乙酸钠、丙酸钙、山梨酸钾。说明脱氢乙酸钠对蒸蛋糕的防腐

变效果最好,这与林真等<sup>[29]</sup>对千层蛋糕的研究结果相一致。

表 7 细菌数和霉菌数的测定结果

Table 7 The number of bacteria and mould CFU/g

时间 Time	霉菌总数 Total number of mould			
	空白 Blank	丙酸钙 Calcium propionate	山梨酸钾 Potassium sorbate	脱氢乙酸钠 Sodium dehydroacetate
第 1 天 The 1 <sup>st</sup> day	< 10	< 10	< 10	< 10
第 3 天 The 3 <sup>rd</sup> day	108	50	50	< 10
第 5 天 The 5 <sup>th</sup> day	11 200	2 950	9 600	1 800

3 结论

(1) 该研究结果表明,蒸蛋糕主要是由于表皮霉变造成腐败的,初期主要的腐败霉菌是青霉菌和球孢枝孢,后期主要的腐败霉菌是黑曲霉和黄曲霉。

(2) 应用分子测序技术对蒸蛋糕中的腐败微生物构成进行了初步分析,从蒸蛋糕中总共分析到细菌 7 种,真菌 11 种。

(3) 分析结果表明, *Staphylococcus* 和 *Kocuriarhizophila* 是蒸蛋糕腐败中的优势细菌, *Penicillium*、*Aspergillus* 和 *Cladosporium* 是蒸蛋糕腐败中的优势霉菌。

(4) 研究结果表明,脱氢乙酸钠对蒸蛋糕的防腐效果优于丙酸钙和山梨酸钾。

参考文献

[1] 陈佩,赵冰,庞雨辰,等. 直链低聚糖对蛋糕品质的影响[J]. 食品科技,

- 2015(3):178-181.
- [2] 范会平,王娜,邵建峰,等. 紫薯低糖清蛋糕的研究[J]. 粮食与饲料工业,2014(2):23-27.
- [3] 吴存兵,李红涛,李西腾,等. 无糖淮山药蛋糕的研制[J]. 食品工业科技,2014(19):242-246.
- [4] 项雷文,刘秋雅,贺丹妮,等. 木槿花蛋糕的配方及其抗氧化性研究[J]. 食品工业,2014(10):68-72.
- [5] ZHANG Y Y,SONG Y,HU X S,et al. Effects of sugars in batter formula and baking conditions on 5-hydroxymethylfurfural and furfural formation in sponge cake models[J]. Food research international,2012,49(1):439-445.
- [6] HAO Y H,WANG F,HUANG W N,et al. Sucrose substitution by polyols in sponge cake and their effects on the foaming and thermal properties of egg protein[J]. Food hydrocolloids,2016,57:153-159.
- [7] 郝月慧,贾春利,王凤,等. 三种糖醇对海绵蛋糕面糊流变学、热力学及烘焙学特性影响的比较研究[J]. 食品工业科技,2014,35(6):298-302.
- [8] DÍAZ-RAMÍREZ M, CALDERÓN-DOMÍNGUEZ G, GARCÍA-GARIBAY M,et al. Effect of whey protein isolate addition on physical, structural and sensory properties of sponge cake[J]. Food hydrocolloids,2016,61:633-639.
- [9] 汤晓娟,王凤,贾春利,等. 含 Olestra 低脂休闲蛋糕体系的流变学、微结构与烘焙特性[J]. 食品科学,2013,34(1):1-7.
- [10] JANJARASSKUL T,TANANUWONG K,KONGPENSOOK V,et al. Shelf life extension of sponge cake by active packaging as an alternative to direct addition of chemical preservatives[J]. LWT-Food Science and Technology,2016,72:166-174.
- [11] SAMAPUNDO S,DEVLIEGHERE F,VROMAN A,et al. Antifungal properties of fermentates and their potential to replace sorbate and propionate in pound cake[J]. International journal of food microbiology,2016,237(21):157-163.
- [12] 李娟. 蛋糕货架寿命试验研究与理论预测[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2010.
- [13] 吴思泗,李红光,姚争鸣,等. 蒸蛋糕脱氧保鲜实验[J]. 食品科学,1987(11):32-34.
- [14] 霍雨霞,韩文凤,吕银德,等. 复配胶体对蒸蛋糕品质的影响[J]. 食品研究与开发,2016,37(5):29-31.
- [15] 豆康宁,王飞. 对面包中微生物生长变化及其抑制方法的探讨[J]. 粮食与油脂,2015,28(4):30-32.
- [16] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 菌落总数测定:GB/T 4789.2—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [17] 程晓燕. 酸面团乳酸菌优势菌群及发酵馒头品质与风味特性研究[D]. 无锡:江南大学,2015:10-11.
- [18] 中华人民共和国卫生部. 糕点、面包卫生标准:GB 7099—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [19] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数:GB 4789.15—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [20] 孙银凤,徐岩,黄卫宁,等. 不同发酵基质的酸面团对酵母面团体系面包烘焙及老化特性的影响[J]. 食品科学,2015,36(13):37-42.
- [21] VOGELMANN S A,SEITTER M,SINGER U,et al. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals,pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters[J]. International journal of food microbiology,2009,130(3):205-212.
- [22] TAMURA K,DUDLEY J,NEI M,et al. MEGA4:Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 1.0[J]. Molecular biology and evolution,2007,24(8):1596-1599.
- [23] 豆康宁,王飞,程谦伟. 对面包防腐剂防腐效果的研究[J]. 食品工业,2014(4):57-58.
- [24] 邱德生. 延长蛋糕保质期的科学措施[J]. 农产品加工(创新版),2011(3):38-39.
- [25] JI Y,ZHU K X,QIAN H F,et al. Microbiological characteristics of cake prepared from rice flour and sticky rice flour[J]. Food control,2007,18(12):1507-1511.
- [26] LEGAN J D. Mould spoilage of bread: The problem and some solutions[J]. International biodeterioration & biodegradation,1993,32(1/2/3):33-53.
- [27] BAEK E,KIM H. Antifungal activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa* in rice cakes[J]. Microbiology,2012,50(5):842-848.
- [28] RYAN L A,DAL B F,ARENDDT E K. The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread[J]. International journal of food microbiology,2008,125(3):274-278.
- [29] 林真,张温玲,陈怡,等. 千层蛋糕防腐配方实验及保质期预测研究[J]. 食品工业科技,2016,37(11):269-272.

(上接第82页)

- [2] 方平,张晓力. 烟叶三段式烘烤工艺中温湿度自动控制的实现[J]. 北京工商大学学报(自然科学版),2004,22(4):51-53.
- [3] 张杰瑜,李汉玲. 烟叶烘烤过程中呼吸速率及脱水速率的研究[J]. 安徽农学通报,1998(2):24-26.
- [4] 师会勤,艾复清,李红友. 烘烤变黄环境对烤后烟叶化学组分的影响[J]. 江西农业大学学报,2004,26(5):749-753.
- [5] 梁斌,蔚应俊,周应兵. 烤烟上部叶滞销的原因及农业生产对策[J]. 安徽农业科学,2002,30(2):285-286.
- [6] 纪成灿,王胜雷,许锡祥. 提高上部叶可用性和降低上部叶比例的农业措施[J]. 中国烟草科学,2001,22(4):19-22.
- [7] 官长荣,李富强,陈红华,等. 烤烟上部6片叶一次采收对顶部3片叶烘烤质量的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2008,43(6):94-98.
- [8] 余金恒,代丽,刘霞,等. 采收方式对烤烟上部叶烘烤过程生理特性及品质的影响[J]. 云南农业大学学报,2009,24(2):210-215.
- [9] 滕永忠,胡从光,徐建平,等. 带茎烘烤的烤烟上部叶的水分散失[J]. 烟草科技,2007(2):53-57.
- [10] 王彦亭,谢剑平,李志宏. 中国烟草种植区划[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [11] 国家烟草质量监督检验中心. 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法:YC/T 159—2002[S]. 北京:中国标准出版社,2002.
- [12] 全国烟草标准化技术委员会. 烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动法:YC/T 160—2002[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [13] 全国烟草标准化技术委员会. 烟草及烟草制品 总氮的测定 连续流动法:YC/T 161—2002[S]. 2002.
- [14] 全国烟草标准化技术委员会. 烟草及烟草制品 氯的测定 连续流动法:YC/T 162—2002[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [15] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 钾的测定 连续流动法:YC/T 217—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [16] 郑州烟草研究院,国家烟草质量监督检验中心. 烟草及烟草制品 淀粉的测定 连续流动法:YC/T 216—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [17] 国家烟草专卖局科技教育司,郑州烟草研究院. 烟草及烟草制品 感官评价方法:YC/T 138—1998[S]. 北京:中国标准出版社,1998.

## 科技论文写作规范——工作单位

在圆括号内书写作者的工作单位(用全称)、城市名及邮政编码。若为外国的工作单位,则加国名。多个作者不同工作单位时,在名字的右上角分别加注“1”“2”,和地址前注“1.”“2.”。