不同减菌剂对鲜切芫荽的减菌效果

张 丽[1,2]，刘 璐[2]，张文韬[3]，陈周耀[2]，王 冕[2]，刘妍驿[2]，姜 丽[*2]
（1. 苏州市职业大学 教育与人文学院，江苏 苏州 215104；2. 南京农业大学 食品科技学院，江苏 南京 210095；
3. 苏州市吴中区果蔬园艺站，江苏 苏州 215107）

摘要：以新鲜芫荽为试验材料，比较了次氯酸钠、二氧化氯和过氧乙酸3种杀菌剂的杀菌效果，结果表明：二氧化氯对芫荽杀菌能力最强，减菌范围达(2.08~2.79) lg(CFU/g)；次氯酸钠次之，减菌范围达(1.43~2.29) lg(CFU/g)；过氧乙酸效果最差。单因素和正交试验确定适合鲜切芫荽的减菌方法是二氧化氯质量浓度60 mg/L、水菜体积质量比8 mL:1 g处理10 min。作者通过16S rDNA基因测序法从鲜切芫荽中分离鉴定出7株细菌，分别是欧文氏菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、不动杆菌属、拉恩氏菌属、根瘤菌属和肠杆菌属。二氧化氯处理可减少根瘤菌属、不动杆菌属和气单胞菌属。

关键词：芫荽；减菌剂；16S rDNA测序；细菌种类鉴定；二氧化氯
中图分类号：TS 255.3　**文章编号：**1673-1689(2021)04-0091-14　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.04.011

Effects of Disinfectant Agents on Microorganisms in Fresh-Cut Coriander

ZHANG Li[1]，*LIU Lu*[2]，*ZHANG Wentao*[3]，*CHEN Zhouyao*[2]，*WANG Mian*[2]，*LIU Yanyi*[2]，*JIANG Li*[*2]
(1. College of Education and Humanity, Suzhou Vocational University , Suzhou 215104, China; 2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095 China; 3. Fruit and Vegetable Horticulture Station, Wuzhong District, Suzhou 215107, China)

Abstract: The sterilizing effect of individual sodium hypochlorite (NaClO), chlorine dioxide (ClO_2) and peracetic acid (PA) on fresh-cut coriander were investigated. The results showed that the most effective disinfectant agent for fresh-cut coriander was ClO_2 with the aerobic plate count in the range of (2.08~2.79) lg(CFU/g). NaClO took second place with the range of (1.43~2.29) lg(CFU/g), and peracetic acid (PA) was the weakest disinfectant agent. The results based on single-factor and orthogonal experiments indicated that the optimum conditions for treating fresh-cut coriander with chlorine dioxide were concentration of 60 mg/L, time of 10 min and solution to fresh-cut product ratio of 8 mL : 1 g. Based on 16S rDNA high-throughput sequencing technology, seven bacterial species were isolated and identified from fresh-cut coriander, which were *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Rahnella*, *Rhizobium* and *Enterobacter*. ClO_2 could effectively reduce three bacterial species, which were *Rhizobium*, *Acinetobacter*, and *Aeromonas*.

收稿日期：2018-10-31
基金项目：江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)；苏州市职业大学青蓝工程专业带头人培养对象资助。
作者简介：张 丽(1986—)，女，博士，副教授，主要从事农产品加工和质量控制研究。E-mail：306860631@qq.com
*** 通信作者：**姜 丽(1982—)，女，博士，副教授，主要从事采后生物学研究。E-mail：jiangli@njau.edu.cn

Keywords: coriander, disinfectant agents, 16S rDNA sequence, bacteria identification, chlorine dioxide

芫荽为叶菜类,其表面微生物数量多,种类复杂。微生物的侵染不仅会影响芫荽的外观,实质上也降低了食用价值,减少货架期时间[1]。芫荽种植的土壤、气候等环境条件不同[2],随着种植技术的提高与范围的扩大,鲜切加工规模的不断扩大,从田间到餐桌的环节增多,这些都增加了鲜切芫荽微生物污染的风险,也增加了微生物控制的难度。

次氯酸钠、氯气、次氯酸钙等能在水中产生次氯酸的杀菌剂总称为含氯杀菌剂,其中次氯酸钠是目前应用最广泛的含氯杀菌剂[3]。此杀菌剂以氯为主,在水溶液中形成有强氧化性的次氯酸,次氯酸可穿透微生物的细胞膜进入细胞,与胞内蛋白质产生氯化反应从而凝固细胞液,可有效杀死细菌,效果明显且反应速度快[4]。目前,很多企业主要使用次氯酸钠作为杀菌剂,并主要监测菌落总数与大肠菌群的控制情况。由于次氯酸钠可能存在氯残留而对人体健康产生危害[5],因此需要扩充绿色安全的杀菌剂种类,不断挖掘新的杀菌剂并严格控制其使用浓度。

过氧乙酸是一种酸性强氧化剂,易溶于水、乙醇、乙醚、硫酸等溶剂,有强烈的刺激性酸味,对人的眼睛、皮肤、黏膜和上呼吸道有刺激作用,性质不稳定,遇热或有机物、金属离子、强碱等易分解。

过氧乙酸可杀灭细菌繁殖体、真菌、病毒、分枝杆菌、细菌芽孢等微生物,且在低温下仍有效,其杀菌效果受浓度、温度、相对湿度、有机物等因素影响[7]。过氧乙酸在质量浓度为 50 mg/L 下就能达到良好的杀菌效果,几乎对所有鲜切果蔬表面的腐败菌和致病菌有明显抑制效果,但因其穿透力不强,低浓度下虽对悬浮的微生物效果明显,而对紧紧吸附在鲜切产品表面的微生物作用不明显[8]。过氧乙酸反应的副产物是水和氧气,对人体和环境无毒无害,因此被认为是一种绿色环保的杀菌剂,FDA 已将其定为非冲洗食品接触表面消毒杀菌剂。过氧乙酸作为氯系杀菌剂的替代品,在鲜切果蔬加工中得到广泛研究与应用[7]。

与含氯制剂相比,二氧化氯不会与有机物反应生成致癌、致突变、致畸的物质,是目前国际上公认的最新一代高效、广谱、安全的杀菌保鲜剂[6]。它能迅速氧化病毒蛋白质衣壳中的酪氨酸,抑制病毒的特异性吸附,阻止其对宿主细胞的侵染,还能与细菌及其他微生物蛋白质中的部分氨基酸发生氧化还原反应,分解破坏氨基酸,抑制微生物蛋白质合成,从而导致微生物死亡。许多欧美国家有关组织已批准和推荐二氧化氯用于食品的消毒、防腐、保鲜等,世界卫生组织(WHO)已将二氧化氯列为 Al 级安全高效消毒剂,我国卫计委也已批准二氧化氯为消毒剂和新型食品添加剂[10]。

上述 3 种减菌剂在鲜切芫荽中的减菌效果还缺乏研究,因此作者采用次氯酸钠、二氧化氯和过氧乙酸处理鲜切芫荽,确定适合于鲜切芫荽的最佳减菌剂,通过 16S rDNA 全基因组测序技术鉴定鲜切芫荽表面细菌种类,分析主要致病与致腐细菌,以期更有效地提高鲜切芫荽产品的安全性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

芫荽:市售。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 次氯酸钠、二氧化氯、过氧乙酸、氯化钠、胰蛋白胨、酵母浸膏、葡萄糖、琼脂、乳糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、月桂酸硫酸钠、煌绿乳糖胆盐肉汤培养基、氢氧化钠、盐酸、乙醇、牛肉膏、蛋白胨、结晶紫、草酸铵、碘片、碘化钾、番红、松柏油、SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒等。

1.2.2 主要仪器 DJ300 精密电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司产品;YXQ-SG41-280 手提式压力蒸汽灭菌锅:上海华线医用核子仪器有限公司产品;SW-CJ-1FD 洁净工作台:苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产品;GRP-9160 型隔水式恒温培养箱:上海森信实验仪器有限公司产品;XW-80A 微型旋涡混合仪:上海沪西分析仪器厂有限公司产品;HH-6 数显恒温水浴锅:常州国华电器有限公司产品;SPX-320 型智能生化培养箱:宁波江南仪器厂产品;PCR 反应扩增仪:加拿大 BBI 公司产

品;3730 测序分析仪:美国ABI 公司产品;H6-1 微型电泳槽:上海精益有机玻璃制品仪器厂产品;凝胶成像系统:Gene Genius 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 样品及减菌剂的准备 挑选无黄叶、无机械伤、无病虫害、新鲜度基本一致的本地鲜切芫荽,去根,清水洗至可直接食用,晾干至无水渍,待用。

次氯酸钠(5.2 mg/L)配制成质量浓度为 0、50、100、150、200、250 mg/L 的溶液,测定 pH 分别为 6.32、10.33、11.37、11.70、11.90、12.07。

二氧化氯(8 mg/L)配制成质量浓度为 0、20、40、60、80、100 mg/L 的溶液,测定 pH 分别为 5.90、3.16、2.87、2.73、2.56、2.41。

过氧乙酸(15.7 mg/L),由 A 液(冰醋酸和硫酸)和 B 液(过氧化氢)以体积比 10:8 制得 1000 mg/L 溶液,反应 24 h 后稀释成 0、50、100、150、200、250 mg/L,测定 pH 分别为 6.93、4.79、4.03、3.78、3.60、3.52。

1.3.2 3 种减菌剂处理 比较 3 种减菌剂减菌效果,选择效果最佳的减菌剂,以优化减菌剂处理参数。3 种减菌剂处理条件见表 1。所有处理在室温下进行,每个处理重复 3 次。

表 1 3 种减菌剂处理鲜切芫荽的试验表

Table 1 Table of the tests of three different sterilization methods for fresh-cut coriander

减菌剂	质量浓度/(mg/L)	浸泡时间/min	水菜体积质量比/(mL:g)
次氯酸钠	0、50、100、150、200、250 (10 min、8 mL:1 g)	2、5、10、15 (150 mg/L、8 mL:1 g)	4:1、8:1、12:1 (150 mg/L、10 min)
二氧化氯	0、20、40、60、80、100 (10 min、8 mL:1 g)	2、5、10、15 (60 mg/L、8 mL:1 g)	4:1、8:1、12:1 (60 mg/L、10 min)
过氧乙酸	0、50、100、150、200、250 (10 min、8 mL:1 g)	2、5、10、15 (150 mg/L、8 mL:1 g)	4:1、8:1、12:1 (150 mg/L、2 min)

1.3.3 二氧化氯正交处理 按照 $L_9(3^4)$正交表,对处理浓度(20、40、60 mg/L)、处理时间(2、5、10 min)、水菜体积质量比(4 mL:1 g、8 mL:1 g、12 mL:1 g)三因素进行正交试验,对照组为清水洗前及清水洗后待用的样品。正交试验表见表 2。

表 2 二氧化氯处理芫荽的正交试验表

Table 2 Orthogonal table of the tests of treating coriander with chlorine dioxide

试验号	*A* 质量浓度/(mg/L)	*B* 时间/min	*C* 水菜体积质量比/(mL:g)
1	20	2	4:1
2	20	5	8:1
3	20	10	12:1
4	40	2	8:1
5	40	5	12:1
6	40	10	4:1
7	60	2	12:1
8	60	5	4:1
9	60	10	8:1
10	清水洗前对照组		
11	清水洗后对照组		

1.4 测定指标与方法

1.4.1 菌落总数 参照 GB/T 4789. 2—2016。

1.4.2 大肠菌群 参照 GB/T 4789.3—2016。

1.5 细菌的分离纯化与保藏

无菌环境下,称取 25 g 鲜切芫荽置盛有 225 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中,置于摇床 80 r/min,摇动 20 min,立即将样品液稀释至 1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5} 三个梯度,吸取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内,每个稀释度做 2 个重复。同时,分别吸取 1 mL 无菌生理盐水加入 2 个无菌平皿内作空白对照。及时将牛肉膏蛋白胨培养基倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。于(36±1) ℃倒置恒温培养(48±2) h。试验重复 3 次。观察细菌的生长情况及菌落的颜色和特征,并选取优势菌挑取单菌落,采用平板划线法于牛肉膏蛋白胨培养基划线纯化。于(36±1) ℃倒置恒温培养(48±2) h。连续纯化 5 代。

挑取纯化第 5 代的单菌落接种于牛肉膏蛋白胨斜面,于(36±1) ℃倒置恒温培养(24±2) h。置于 4 ℃冰箱中保藏。

1.6 细菌形态观察

1.6.1 菌落形态观察 观察纯化第 5 代平皿内菌落大小、菌落形态、菌落颜色、菌落表面特征(光滑与否、干燥与否、是否凸起、是否透明、是否存在同心环等)、边缘规则与否。

1.6.2 革兰氏染色 参照 GB/T 4789.28—2013。

1.7 16S rDNA 序列的分析及其系统发育树的建立

1.7.1 DNA 提取 参照上海生工 SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书操作。

1.7.2 PCR 扩增细菌的 16S rDNA 序列

1)引物序列 正向引物 27 F:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′;反向引物 1492R(1510):5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′。

2)PCR 反应体系建立(50 μL) 模板 DNA 10 pmol,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,dNTP Mix 1 μL,10×Taq reaction Buffer 5 μL,高保真聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL,无菌超纯水补足至 50 μL。

3)PCR 程序设定 98 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 35 s,55 ℃退火 35 s,72 ℃延伸 90 s,35 个循环;延伸 8 min。

1.8 种属鉴定

将 PCR 产物送到测序公司进行测序,将测序完成的 16S rDNA 序列在 GenBank (NCBI) 中进行 BLAST 检索,寻找相似序列并下载,用 MEGA 软件制作系统发育树确定细菌种属。

1.9 数据处理

数据取 3 次重复平均值,采用 Excel、SPSS 18.0、正交设计助手等软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 3 种减菌剂单因素处理对芫荽减菌效果的影响

2.1.1 次氯酸钠单因素处理对芫荽减菌效果的影响 图 1—图 3 分别为次氯酸钠不同质量浓度(水菜体积质量比 8 mL:1 g、10 min)、不同处理时间(质量浓度 150 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g)和不同水菜体积质量比(质量浓度 150 mg/L、10 min)对芫荽表面菌落总数减菌的效果。清水洗后的芫荽表面菌落总数都显著低于清水洗前(P<0.05),与对照(清水洗后)相比,0 mg/L 处理出现的略微上升与清洗及空气接触时间增加有关,其余处理菌落总数均显著降低(P<0.05)。图 1 表明随处理浓度升高,菌落总数呈先下降后上升再下降的趋势。其中 150 mg/L 处理组菌落总数最低,200 mg/L 的处理引起芫荽组织损伤,增加微生物污染,250 mg/L 处理可再次降低微生物数量,但浓度偏高已引起组织损伤且易发生氯残留,故宜选用 150 mg/L 处理浓度。图 2 和 3 表明随处理时间延长和用水量增加,菌落总数呈先下降后上升的趋势,其中 10 min 处理时间与 8 mL:1 g 水菜体积质量比减菌效果最优,15 min 处理时间偏长,引起芫荽组织损伤,增加微生物污染。

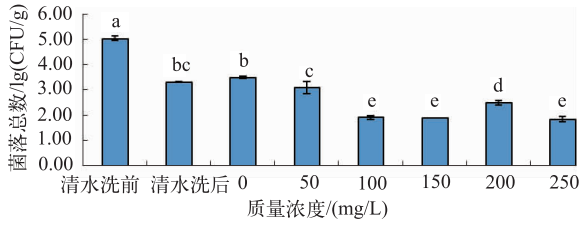


图 1 次氯酸钠不同质量浓度(10 min、8 mL:1 g)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations on aerobic plate count in coriander treated with sodium hypochlorite (10 min,8 mL:1 g)

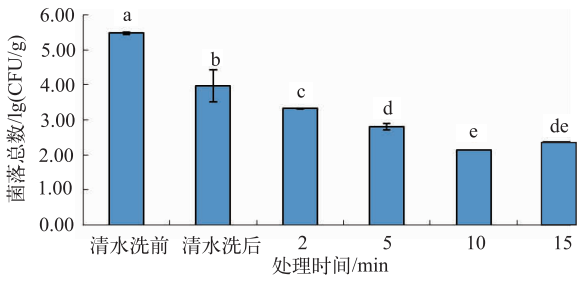


图 2 次氯酸钠不同处理时间(150 mg/L、8 mL:1 g)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 2 Effects of different processing time on aerobic plate count in coriander treated with sodium hypochlorite(150 mg/L,8 mL:1 g)

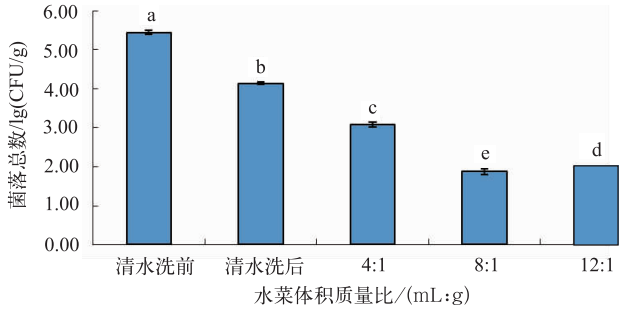


图 3 次氯酸钠处理时不同水菜体积质量比(150 mg/L、10 min)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 3 Effects of different ratio of solution to vegetable on aerobic plate count in coriander treated with sodium hypochlorite (150 mg/L,10 min)

表 3—表 5 分别为次氯酸钠不同质量浓度(水

菜体积质量比 8 mL:1 g、10 min)、不同处理时间(质量浓度150 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g)和不同水菜体积质量比(质量浓度 150 mg/L、10 min)对芫荽表面大肠菌群减菌的效果。芫荽经清水洗后大肠菌群数普遍降低 1~2 个数量级,与对照(清水洗后)相比,各处理组大肠菌群普遍下降约 1 个数量级,最大减菌组分别为150 mg/L、250 mg/L(表3),2 min(表 4)和 4 mL:1 g、8 mL:1 g(表 5),与同批次其余处理组相比,减菌量相差不大,说明次氯酸钠可一定程度上降低大肠菌群数,但效果并不明显。

表 3 次氯酸钠不同质量浓度(10 min、8 mL:1 g)对芫荽大肠菌群的影响

Table 3 Effects of different concentrations on enumeration of coliform in coriander treated with sodium hypochlorite (10 min, 8 mL:1 g)

处理步骤及次氯酸钠质量浓度/(mg/L)	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	2 583.33
清水洗后	25.56
0	63.89
50	25.56
100	8.33
150	<8.33
200	10.00
250	<8.33

表 4 次氯酸钠不同处理时间(150 mg/L、8 mL:1 g)对芫荽大肠菌群的影响

Table 4 Effects of different processing time on enumeration of coliform in coriander treated with sodium hypochlorite(150 mg/L, 8 mL:1 g)

处理步骤及次氯酸钠处理时间/min	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	127 777.78
清水洗后	6 666.67
2	119.44
5	666.67
10	416.67
15	258.33

表 5 次氯酸钠处理时不同水菜体积质量比 (150 mg/L、10 min)对芫荽大肠菌群的影响

Table 5 Effects of different ratio of solution to vegetable on enumeration of coliform in coriander treated with sodium hypochlorite (150 mg/L,10 min)

处理步骤及水菜体积质量比/(mL:g)	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	2 555.56
清水洗后	255.56
4:1	<8.33
8:1	<8.33
12:1	25.56

2.1.2 二氧化氯单因素处理对芫荽减菌效果的影响 图 4—图 6 分别为二氧化氯不同质量浓度(水菜体积质量比 8 mL:1 g、10 min)、不同处理时间(质量浓度 60 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g)和不同水菜体积质量比(质量浓度 60 mg/L、10 min)对芫荽表面菌落总数减菌的效果。清水洗后的芫荽表面菌落总数都显著低于清水洗前(P<0.05),与对照(清水洗后)相比,菌落总数除 0 mg/L 处理与对照相当,其余处理均显著降低(P<0.05)。图 4 表明随处理浓度升高,菌落总数呈先下降后上升的趋势,80 mg/L 处理为最大减菌组,100 mg/L 处理引起芫荽组织损伤,增加微生物污染,考虑质量浓度超过 80 mg/L 处理会使部分芫荽叶片出现变黄现象,60 mg/L 处理也可控制菌落总数在低水平,故实际应用更适宜选择质量浓度 60 mg/L。图 5–6 表明随处理时间延长和用水量增加,菌落总数呈先上升后下降的趋势,考虑二氧化氯处理时间过长易引起芫荽叶片变黄及组织损伤,增加微生物污染风险,故 10 min 处理时间适宜,水菜体积质量比 12 mL:1 g 减菌效果优于其余 2 组。

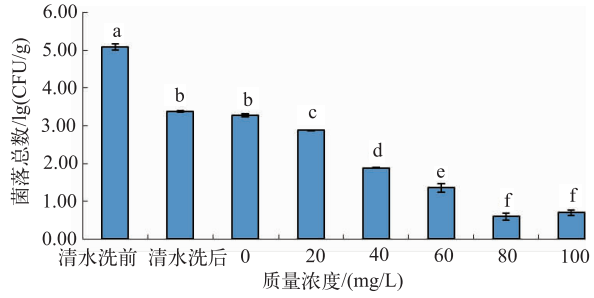


图 4 二氧化氯不同质量浓度(10 min、8 mL:1 g)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations on aerobic plate count in coriander treated with chlorine dioxide (10 min,8 mL:1 g)

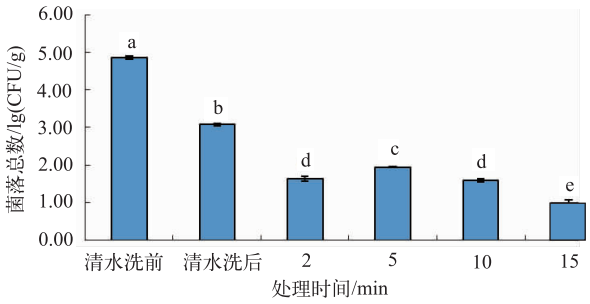


图 5　二氧化氯不同处理时间(60 mg/L、8 mL:1 g)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 5　Effects of different processing time on aerobic plate count in coriander treated with chlorine dioxide (60 mg/L,8 mL:1 g)

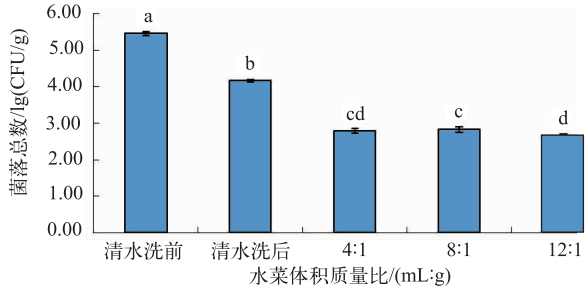


图 6　二氧化氯处理时不同水菜体积质量比 (60 mg/L、10 min)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 6　Effects of different ratio of solution to vegetable on aerobic plate count in coriander treated with chlorine dioxide (60 mg/L,10 min)

表 6—表 8 分别为二氧化氯不同质量浓度（水菜体积质量比 8 mL:1 g、10 min)、不同处理时间(质量浓度 60 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g)和不同水菜体积质量比(质量浓度 60 mg/L、10 min)对芫荽表面大肠菌群减菌的效果。芫荽经清水洗后大肠菌群数普遍降低 1~2 个数量级,与对照(清水洗后)相比,不同质量浓度(表 6)、不同水菜体积质量比(表 8)2 个处理组均将大肠菌群数控制在最低水平,不同处理时间(表 7)处理组由于原始大肠菌群数偏高而未能控制在最低水平,但仍可保持在较低水平。综上所述,二氧化氯可有效控制芫荽表面大肠菌群数在可接受的低水平。

2.1.3　过氧乙酸单因素处理对芫荽减菌效果的影响　图 7—图 9 分别为过氧乙酸不同质量浓度（水菜体积质量比 8 mL:1 g、10 min)、不同处理时间(质量浓度 150 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g)和不同水菜体积质量比(质量浓度 150 mg/L、2 min)对芫荽表面菌落总数减菌的效果。清水洗后的芫荽表面菌落总数都显著低于清水洗前(P<0.05)。图 7 表明随处理浓度升高，菌落总数呈先上升后下降再上升的趋

表 6　二氧化氯不同质量浓度(10 min、8 mL:1 g)对芫荽大肠菌群的影响

Table 6　Effects of different concentrations on enumeration of coliform in coriander treated with chlorine dioxide(10 min,8 mL:1 g)

处理步骤及二氧化氯质量浓度/(mg/L)	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	2 055.56
清水洗后	<83.33
0	<8.33
20	<8.33
40	<8.33
60	<8.33
80	<8.33
100	<8.33

表 7　二氧化氯不同处理时间(60 mg/L、8 mL:1 g)对芫荽大肠菌群的影响

Table 7　Effects of different processing time on enumeration of coliform in coriander treated with chlorine dioxide(60 mg/L,8 mL:1 g)

处理步骤及二氧化氯处理时间/min	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	4 166.67
清水洗后	583.33
2	38.89
5	25.56
10	119.44
15	10.00

表 8　二氧化氯处理时不同水菜体积质量比 (60 mg/L、10 min)对芫荽大肠菌群的影响

Table 8　Effects of different ratio of solution to vegetable on enumeration in coliform of coriander treated with chlorine dioxide(60 mg/L,10 min)

处理步骤及水菜体积质量比/(mL:g)	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	2 555.56
清水洗后	255.56
4:1	<8.33
8:1	<8.33
12:1	<8.33

势,150 mg/L 处理组为最大减菌组。与对照(清水洗后)相比,0、50 mg/L 和100 mg/L 处理组菌落总数高于对照组,表明低浓度过氧乙酸对芫荽表面减菌无效,反而因操作步骤增加引起微生物污染;高浓度过氧乙酸引起的芫荽组织损伤使其自身抵抗力下降,为微生物生长提供有利条件,使浓度高于150 mg/L 后减菌效果反而下降。图 8 表明随处理时间延长,菌落总数呈先上升后下降的趋势,2 min 处理组为最大减菌组,可见过氧乙酸的作用速度快。图 9 表明随用水量增加,菌落总数呈上升趋势,水菜体积质量比 4 mL:1 g 减菌效果最优。

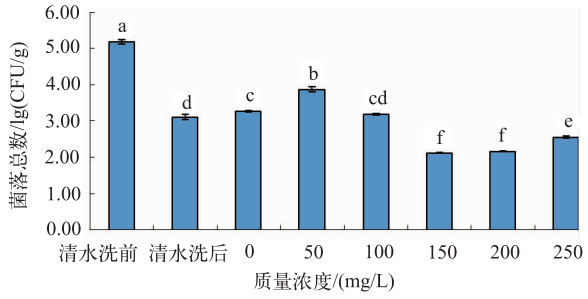


图 7 过氧乙酸不同质量浓度(10 min、8 mL:1 g)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations on aerobic plate count in coriander treated with peracetic acid (10 min, 8 mL:1 g)

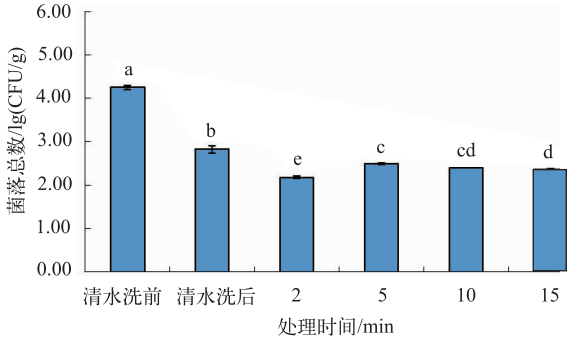


图 8 过氧乙酸不同处理时间(150 mg/L、8 mL:1 g)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 8 Effects of different processing time on aerobic plate count in coriander treated with peracetic acid (150 mg/L, 8 mL:1 g)

表 9—表 11 分别为过氧乙酸不同质量浓度(水菜体积质量比 8 mL:1 g、10 min)、不同处理时间(质量浓度150 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g)和不同水菜体积质量比(质量浓度 150 mg/L、2 min)对芫荽表面大肠菌群减菌的效果。芫荽经清水洗后大肠菌群数普遍降低 1~2 个数量级,与对照(清水洗后)相比,除 250 mg/L(表 9)处理组将大肠菌群数控制在最低水平,3 个批次的其余处理对大肠菌群的减菌效果均较差。过氧乙酸浓度越高对大肠菌群的减菌效果越好。与菌落总数指标相似,2 min(表 10)和 4 mL:1 g(表 11)处理组分别为批次内最大减菌组,可见过氧乙酸的处理速度越快、用水量越少,减菌效果越好。

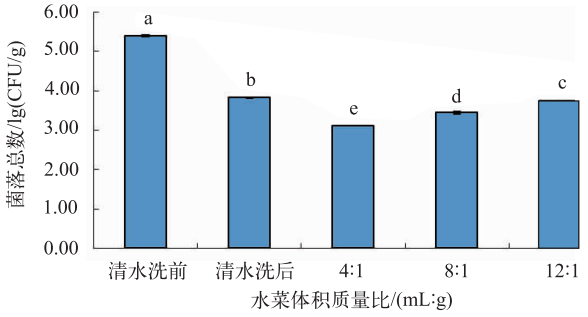


图 9 过氧乙酸处理时不同水菜体积质量比(150 mg/L、2 min)对芫荽菌落总数的影响

Fig. 9 Effects of different ratio of solution to vegetable on aerobic plate count in coriander treated with peracetic acid (150 mg/L, 2 min)

表 9 过氧乙酸不同质量浓度(10 min、8 mL:1 g)对芫荽大肠菌群的影响

Table 9 Effects of different concentrations on enumeration of coliform in coriander treated with peracetic acid (10 min, 8 mL:1 g)

处理步骤及过氧乙酸质量浓度/(mg/L)	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	2 555.56
清水洗后	<83.33
0	>3 055.56
50	>3 055.56
100	58.33
150	38.89
200	20.56
250	<8.33

2.1.4 3 种减菌剂处理对芫荽减菌效果的比较 3种减菌剂处理都能有效减少芫荽表面的菌落总数,但作用效果存在差异。次氯酸钠、二氧化氯、过氧乙酸处理的最大减菌组分别为 150 mg/L、8 mL:1 g 处理

表 10　过氧乙酸不同处理时间(150 mg/L、8 mL:1 g)对芫荽大肠菌群的影响

Table 10　Effects of different processing time on enumeration of coliform in coriander treated with peracetic acid(150 mg/L,8 mL:1 g)

处理步骤及过氧乙酸处理时间/min	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	2 555.56
清水洗后	<83.33
2	25.56
5	63.89
10	258.33
15	41.67

表 11　过氧乙酸处理时不同水菜体积质量比 (150 mg/L、2 min)对芫荽大肠菌群的影响

Table 11　Effects of different ratio of solution to vegetable on enumeration of coliform in coriander treated with peracetic acid(150 mg/L,2 min)

处理步骤及水菜体积质量比/(mL:g)	大肠菌群密度/(MPN/g)
清水洗前	305 555.56
清水洗后	12 777.78
4:1	666.67
8:1	>3 055.56
12:1	805.56

10 min (水菜体积质量比),80 mg/L、8 mL:1 g 处理 10 min (处理质量浓度),150 mg/L、8 mL:1 g 处理 10 min(处理质量浓度);最大减菌数量分别为 2.29 lg(CFU/g)、2.79 lg(CFU/g)、0.99 lg(CFU/g)。二氧化氯减菌效果最强,次氯酸钠次之,过氧乙酸最弱且减菌效果差。3 种减菌剂处理对芫荽大肠菌群的控制效果与菌落总数相似,减菌效果从强至弱依次为:二氧化氯、次氯酸钠、过氧乙酸。

实际生产中应综合考虑减菌效果、减菌剂成本、生产效率、用水情况、安全性等选择最适宜生产的减菌剂种类。本试验以最优减菌效果为标准,选择二氧化氯作为减菌剂进行正交试验以筛选其处理质量浓度、处理时间和水菜体积质量比的最优配方,进而使用二氧化氯最优配方处理芫荽后,进行不同贮藏温度对芫荽贮藏期间微生物的影响试验。

2.2　二氧化氯正交处理对芫荽减菌效果的优化

本试验采用三因素三水平的正交试验,以芫荽表面菌落总数和大肠菌群数作为评价减菌效果优劣的指标,以此得出最优的减菌剂使用方法。正交试验结果见表 12。

由直观分析的结果可知,三个因素对芫荽表面菌落总数和大肠菌群数的影响顺序为处理质量浓度>处理时间>水菜体积质量比。菌落总数和大肠菌群数越小,说明减菌效果越好。从表 12 可知,随二氧化氯质量浓度的增大,芫荽表面菌落总数和大肠菌群数都逐渐减少,随处理时间的延长,菌落总数先上升后下降,大肠菌群数逐渐下降。当二氧化氯质量浓度为 60 mg/L,处理时间为 10 min 时,菌落总数和大肠菌群数都出现最低值。二氧化氯质量浓度越高,溶液内起减菌作用的有效氯浓度越高,较大程度地减少了芫荽表面的菌落总数和大肠菌群;而处理的时间越长,芫荽与减菌剂的接触越充分,杀菌效果越好。水菜体积质量比 8 mL:1 g 处理的菌落总数和大肠菌群数都达到最低值,其原因在于:处理相同质量的芫荽,水菜体积质量比 4 mL:1 g 用水量少导致芫荽不能与减菌剂充分接触,水菜体积质量比 12 mL:1 g 用水量多增加了二氧化氯溶液内原始的微生物数,一定程度上削弱了减菌剂的减菌效果。

综上所述,从正交试验表可知,处理组第 9 组,即组合 $A_3B_3C_2$ 为最优组合。结合芫荽表面的菌落总数和大肠菌群数考虑,确定二氧化氯的最佳减菌参数是:质量浓度 60 mg/L、处理时间 10 min、水菜体积质量比 8 mL:1 g。

2.3　细菌形态观察结果

从鲜切芫荽中分离出 7 种不同的菌株,分别编号为 1、2、3、C11、Y4、C1、12。分离获得的 7 种菌株的菌体形态描述、菌落形态见表 13 和图 10。根据分离获得的 7 种菌株的菌体形态描述表及菌落形态图可知:菌株全部为革兰氏阴性菌,主要为白色或者黄色,均呈圆形。7 株菌表面特征明显,除 Y4 菌株外,其余菌落中心不透光,且表面光滑湿润。通过镜检发现,Y4 菌株菌体特征为球状,其他菌株菌体呈杆状或短杆状。

2.4　细菌 16S rDNA 序列的分析与鉴定结果

通过扩增获得不同菌株的 16S rDNA 片段,经序列比对,由 MEGA 软件构建的细菌系统发育树及序列距离见图 11—图 17,从而确定细菌种属。从鲜切芫荽中分离纯化得到的 7 株细菌,可分类为致腐菌、致病菌与普通菌。从图 11—图 17 依次鉴定为欧

表 12 二氧化氯正交处理对芫荽杀菌效果的影响

Table 12 Effects of orthogonal treatments by chlorine dioxide on aerobic plate count and enumeration of coliform in coriander

试验号		A 质量浓度/(mg/L)	B 时间/min	C 水菜体积质量比/(mL:g)	菌落总数/lg(CFU/g)	大肠菌群密度/(MPN/g)
1		1	1	1	4.02	3 055.56
2		1	2	2	3.70	1 277.78
3		1	3	3	3.38	666.67
4		2	1	2	3.13	416.67
5		2	2	3	3.78	1 277.78
6		2	3	1	2.45	119.44
7		3	1	3	2.03	119.44
8		3	2	1	2.27	63.89
9		3	3	2	1.81	25.56
10		清水洗前			4.44	305 555.56
11		清水洗后			3.91	30 555.56
菌落总数	K_1	3.700	3.060	2.913		
	K_2	3.120	3.250	2.880		
	K_3	2.037	2.547	3.063		
	R	1.663	0.703	0.183		
大肠菌群	K_1	1 667.670	1 197.223	1 079.630		
	K_2	604.630	873.150	573.337		
	K_3	69.630	270.557	687.963		
	R	1 597.040	926.666	506.293		
最优组合		$A_3B_3C_2$/$A_3B_3C_2$				
主次顺序		$RA > RB > RC$/$RA > RB > RC$				

表 13 分离获得 7 株菌的菌落形态与菌体形态描述

Table 13 Description of 7 isolated strains' colonial morphology and cell morphology

菌株	菌落形态					革兰氏染色结果	
	颜色	形状	大小/mm	表面特征	边缘特征	革兰氏性状	菌体形状
1	黄色	圆形	1~2	不透光,同心环,湿润	不规则	G^-	杆状
2	白色	圆形	1~2	中间不透光,外围透光,同心环,光滑	规则	G^-	杆状
3	黄色	圆形	1~2	不透光,同心环,湿润	不规则	G^-	短杆状
C11	白色	圆形	2~3	不透光,同心环,湿润	规则	G^-	短杆状
Y4	白色	圆形	1~2	透光,同心圆,光滑	不规则	G^-	球状
C1	白色	圆形	2~3	中间不透光,外围透光,同心环,光滑,湿润	规则	G^-	杆状
12	黄色	圆形	1~2	中间不透光,外围透光,光滑	不规则	G^-	杆状

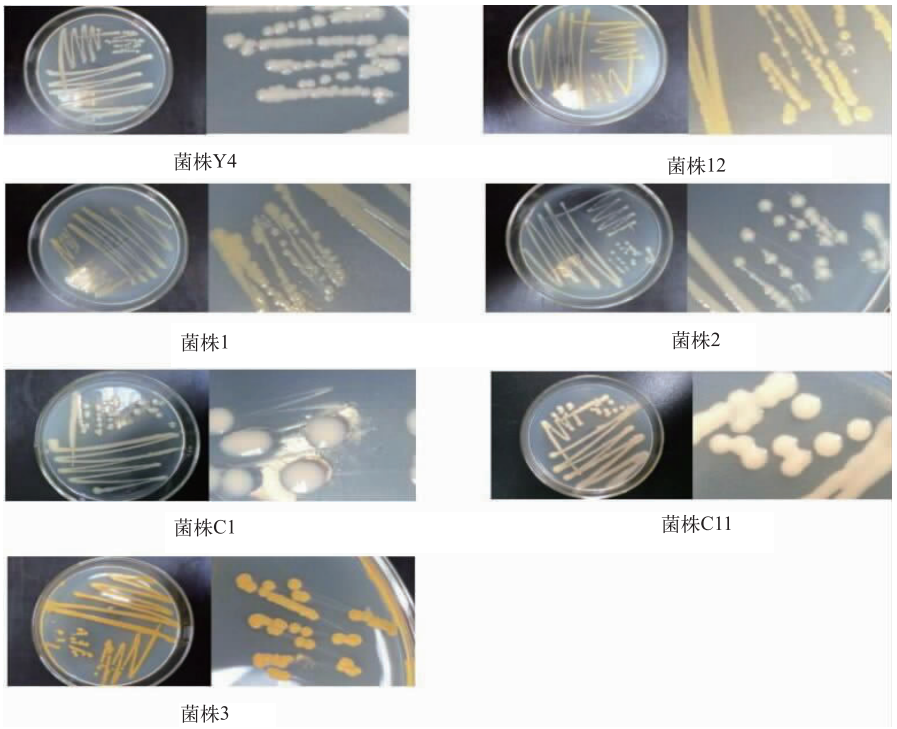


图 10　分离获得的 7 株菌的菌落形态

Fig. 10　Colonial morphology of 7 isolated strains

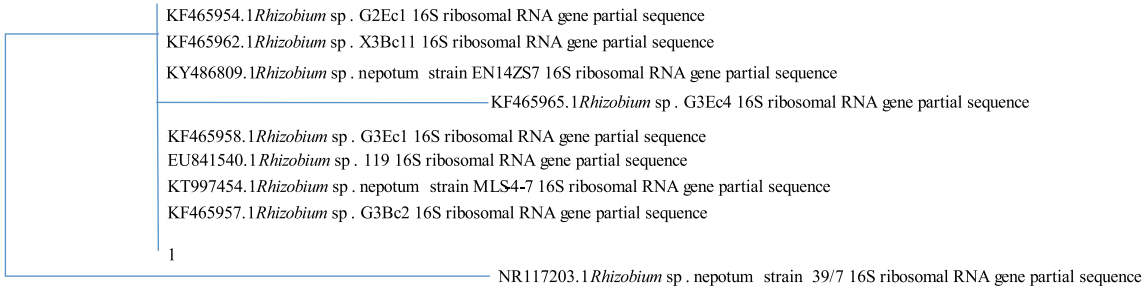


图 11　基于菌株 C11 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 11　Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of C11

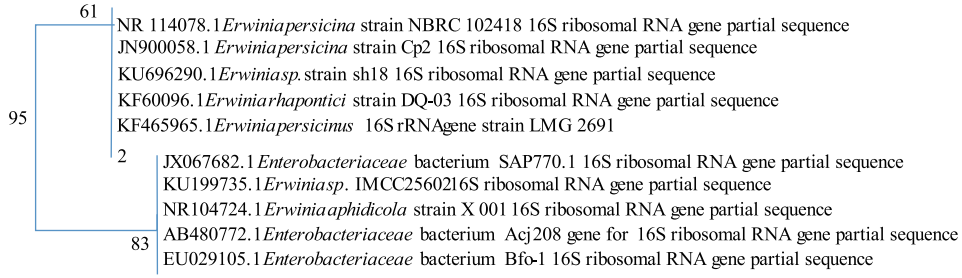


图 12　基于菌株 Y4 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 12　Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of Y4

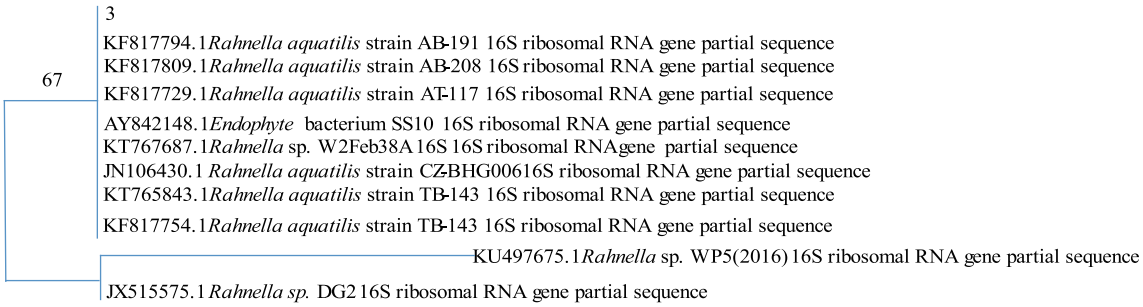


图 13 基于菌株 C1 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 13 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of C1

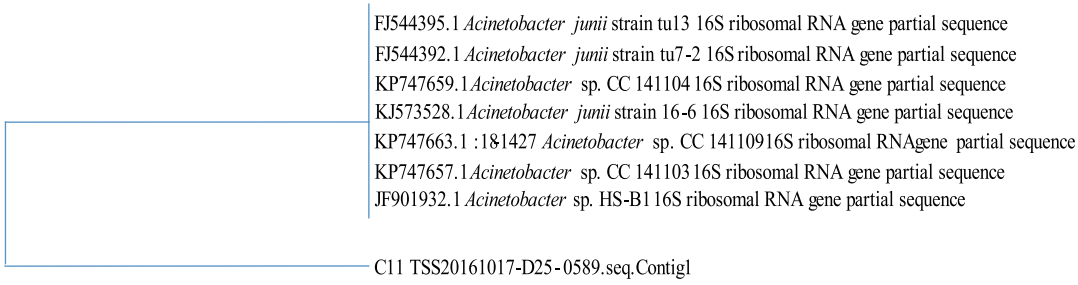


图 14 基于菌株 12 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 14 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of 12

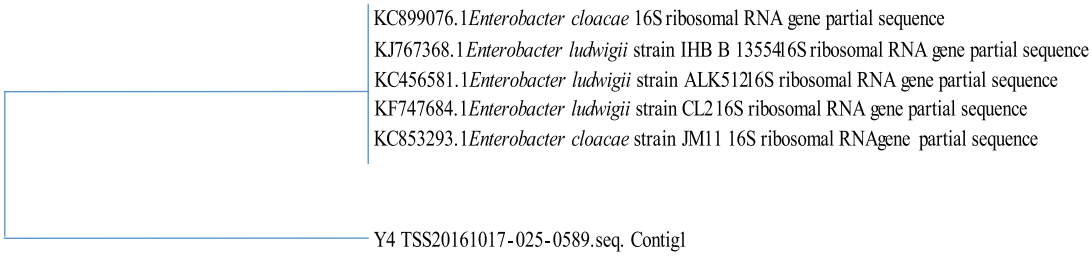


图 15 基于菌株 Y4 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 15 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of Y4

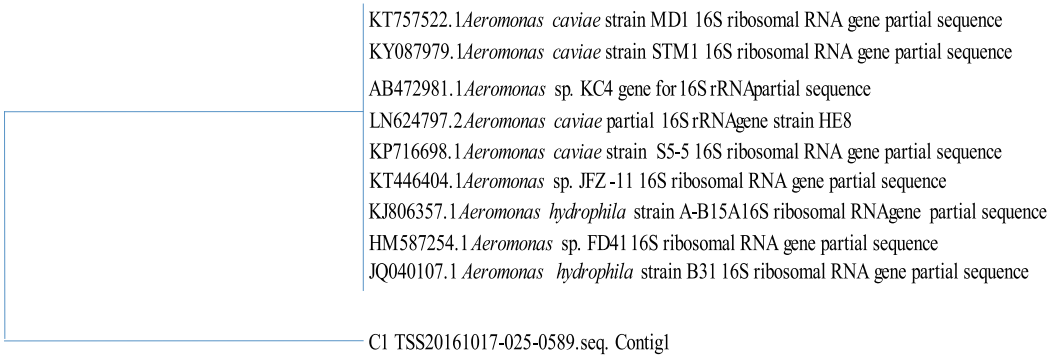


图 16 基于菌株 C1 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 16 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of C1

文氏菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、不动杆菌属、拉恩氏菌属、根瘤菌属和肠杆菌属。

2.5 二氧化氯处理对鲜切芫荽中菌属种类的影响

根据上述比较 3 种减菌剂对鲜切芫荽减菌效果的试验得知,二氧化氯在质量浓度 60 mg/L、处理时间 10 min、水菜体积质量比 8 mL:1 g 的条件下,减菌效果最好,因此采用二氧化氯来研究对鲜切芫荽中菌属种类的影响。不同处理方法下鲜切芫荽表面菌属的种类见表 14。实验表明,二氧化氯处理可减少根瘤菌属、不动杆菌属和气单胞菌属。

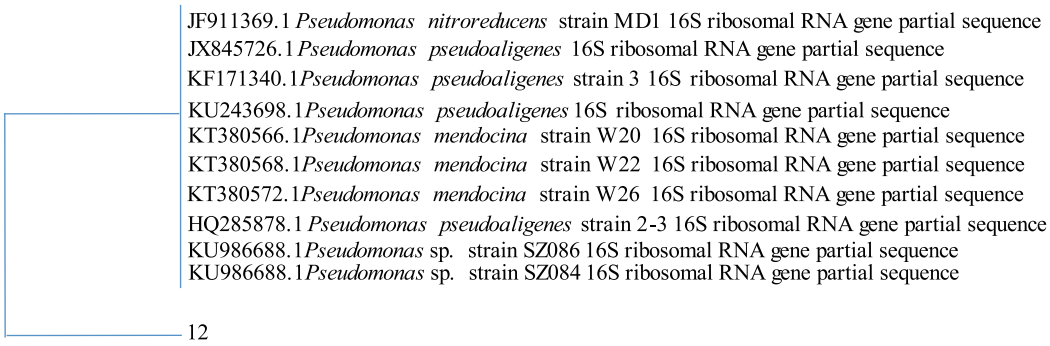


图 17 基于菌株 12 的 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 17 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of 12

表 14 不同处理方法下鲜切芫荽表面菌的种类

Table 14 Bacteria species of fresh-cut coriander treated by chlorine dioxide

未清水洗	已清水洗	二氧化氯处理 (60 mg/L、10 min、水菜体积质量比 8 mL:1 g)
根瘤菌(*Rhizobium*)	欧文氏菌属(*Erwinia*)	拉恩氏菌属(*Rahnella*)
欧文氏菌属(*Erwinia*)	拉恩氏菌属(*Rahnella*)	欧文氏菌属(*Erwinia*)
拉恩氏菌属(*Rahnella*)	不动杆菌属(*Acinetobacter*)	假单胞菌属(*Pseudomonas*)
不动杆菌属(*Acinetobacter*)	肠杆菌属(*Enterobacter*)	肠杆菌属(*Enterobacter*)
肠杆菌属(*Enterobacter*)	气单胞菌属(*Aeromonas*)	
气单胞菌属(*Aeromonas*)	假单胞菌属(*Pseudomonas*)	
假单胞菌属(*Pseudomonas*)		

3 讨 论

新鲜芫荽经自来水冲洗后的菌落总数均明显低于清水洗前的芫荽,水洗操作的减菌范围在(1.30~2.07) lg(CFU/g)。单因素试验中,所有处理均显著降低了芫荽表面的微生物数量($P<0.05$)。随处理质量浓度的增加,3 种杀菌剂的杀菌效果呈不同趋势:次氯酸钠呈先下降后上升再下降,二氧化氯呈先下降再上升,过氧乙酸呈先上升后下降再上升。3 种趋势中都存在一段随处理质量浓度增加,菌落总数先下降再上升的变化,表明各种杀菌剂都有最适杀菌浓度,而并非浓度越高杀菌效果越好,这与王玉丽等[11]、张丙云等[12]的研究结果相似:浓度过高会破坏芫荽的组织结构,降低芫荽自身的抵抗能力,并为微生物生长繁殖提供营养物质。过氧乙酸的杀菌速度较次氯酸钠和二氧化氯更快。3 种杀菌剂对大肠菌群的控制效果与对菌落总数的控制效果相似。次氯酸钠、二氧化氯、过氧乙酸 3 种杀菌剂的减菌范围分别为(1.43~2.29) lg (CFU/g)、(2.08~2.79) lg(CFU/g)、(0.64~0.99) lg(CFU/g),最大减菌率分别为 55.08%、82.69%、31.88%,杀菌效果由强至弱依次为:二氧化氯、次氯酸钠、过氧乙酸。二氧化氯减菌最彻底,对大肠菌群的杀菌效果明显;次氯酸钠也可显著降低菌落总数,但效果次于二氧化氯,对大肠菌群的抑制效果不明显;过氧乙酸的特点是作用速度快,用水量少,但杀菌效果较差,低浓度的过氧乙酸对菌落总数和大肠菌群均无作用效果。本试验结论与其他关于鲜切蔬菜减菌的报道相

符合[4,13],谭玉霞[14]用 75 mg/L 的次氯酸钠处理菠菜 10 min 和 15 min 后,菌落总数分别降低 1.4 lg(CFU/g)和 1.8 lg(CFU/g);梁冬妮[15]用 0.2 g/L 的次氯酸钠处理大白菜 3 min 后,降低菌落总数 0.6 lg(CFU/g);Allende 等[16]用 200 mg/L 次氯酸钠溶液对芫荽叶消毒 1 min 可使菌落总数下降(1~1.3) lg(CFU/g);徐斐燕[10]分别用 50、75 mg/L 和 100 mg/L 的二氧化氯处理西兰花 15 min,使菌落总数分别降低 2.00 lg(CFU/g)、2.52 lg(CFU/g)和 2.97 lg(CFU/g);Silveira 等[17]用质量浓度 68 mg/L 的过氧乙酸溶液处理鲜切甜瓜,能有效降低菌落总数 2 lg(CFU/g);王少丹[8]用 200 mg/L 的次氯酸钠、10 mg/L 的二氧化氯和 80 mg/L 的过氧乙酸处理青椒,菌落总数分别降低 2.4 lg(CFU/g)、2.6 lg(CFU/g)和 2.7 lg(CFU/g)。

二氧化氯正交试验中,最大减菌组为质量浓度 60 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g 处理 10 min,减菌量为 2.10 lg(CFU/g),减菌程度优于单因素实验中相同操作条件的处理组。二氧化氯对芫荽的杀菌效果与许多报道相似,Chen 等[18]用 100 mg/L 二氧化氯水溶液处理鲜切莴苣 6 天后,好氧菌、乳酸菌、酵母菌和霉菌这 3 个指标分别降低了 3.60 lg(CFU/g)、1.20 lg(CFU/g)和 1.40 lg(CFU/g)。

代小梅[4]研究不同质量浓度与处理时间的次氯酸钠、二氧化氯和过氧乙酸对香葱菌落总数的减菌效果。结果表明,次氯酸钠对香葱减菌能力最弱,所有处理质量浓度下菌落总数的减少均<1.00 lg(CFU/g);过氧乙酸和二氧化氯对香葱减菌能力相当,分别达(1.68~2.22) lg(CFU/g)和(0.99~2.85) lg(CFU/g)。与本试验对芫荽减菌效果相比,次氯酸钠对芫荽和香葱减菌效果差异较大,可能由于两种蔬菜微生物组成不同,使得次氯酸钠对芫荽的减菌效果好而对香葱的减菌效果差;过氧乙酸对香葱减菌范围较宽,表明过氧乙酸的减菌能力不稳定,对香葱的减菌效果好于芫荽是因为香葱外部光滑,不像芫荽具有繁茂的叶片,使微生物更易溶于溶液中,而过氧乙酸具有对悬浮的微生物效果明显,而对紧紧吸附在表面的微生物作用不明显[7]的特点;二氧化氯对芫荽与香葱减菌能力相当且效果显著,更说明二氧化氯是高效广谱的杀菌剂。

芫荽多以生食为主,为保障其安全性,微生物的控制尤为重要。本试验从鲜切芫荽中分离纯化得到的 7 株细菌可分类为致腐菌、致病菌与普通菌。欧文氏菌属和假单胞菌属是蔬菜中常见致腐菌,是新鲜叶菜类的主要微生物组成成分[19],在芫荽中分离得到不足为奇。这两类属内的菌种可引起芫荽叶片出现斑点、腐烂并产生不良气味,导致货架期缩短,商品价值降低。由于欧文氏菌属和假单胞菌属可在低温环境下生长,又增加了鲜切芫荽在低温贮藏期细菌控制的难度。气单胞菌属和不动杆菌属是致病菌,可引起人类腹泻等多种疾病,若带有气单胞菌属和不动杆菌属的鲜切芫荽产品未经高温加热而被人体食用,将产生严重后果。拉恩氏菌属、根瘤菌属、肠杆菌属未见致病报道,可将其归类为普通菌。其中肠杆菌属广泛存在于人和动物的肠道以及土壤、乳品和污水中,一般不致病或为条件致病菌,但是在机体免疫功能低下时,容易发生感染。因此,在严格控制致腐菌与致病菌的同时,应加强控制其他一般性菌属的数量,进而降低菌落总数,延长鲜切芫荽的货架期并增强食品的安全性。

4 结 语

室温条件下,次氯酸钠、二氧化氯、过氧乙酸对芫荽均有显著(P<0.05)的减菌效果,对大肠菌群也有一定作用。次氯酸钠对芫荽的最适减菌条件为质量浓度 150 mg/L、处理时间 10 min、水菜体积质量比 8 mL:1 g,菌落总数降低(1.43~2.29) lg(CFU/g),大肠菌群降低约 1 个数量级;二氧化氯对芫荽的最适减菌条件为质量浓度 60 mg/L、处理时间 10 min、水菜体积质量比 12 mL:1 g,菌落总数降低(2.08~2.79) lg(CFU/g),大肠菌群降低 1~2 个数量级;过氧乙酸对芫荽的最适减菌条件为质量浓度 150 mg/L、处理时间 2 min、水菜体积质量比 4 mL:1 g,菌落总数降低(0.64~0.99) lg(CFU/g),大肠菌群降低小于 1 个数量级。综合比较 3 种减菌剂的减菌效果,二氧化氯杀菌效果最好且安全无毒,过氧乙酸对芫荽减菌效果最弱。

作者从鲜切芫荽中分离纯化得到的 7 株细菌分别为欧文氏菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、不动杆菌属、拉恩氏菌属、根瘤菌属和肠杆菌属。二氧化氯处理可以减少根瘤菌属、不动杆菌属和气单胞菌属。

综上所述,适合芫荽鲜切加工的减菌方法是二氧化氯质量浓度 60 mg/L、水菜体积质量比 8 mL:1 g 处理 10 min。

参考文献:

[1] 钟巧玲. 鲜切小青菜微生物预测模型与品质控制技术研究[D]. 金华:浙江师范大学,2017.
[2] 詹文文. 栽培方式与养分调控对芫荽和罗勒生长及品质的影响[D]. 广州:华南农业大学,2016.
[3] 乔永祥,谢晶. 新鲜蔬菜清水洗技术研究进展[J]. 包装工程,2017,38(3):60-66.
[4] 代小梅. 香葱高效减灭菌剂筛选与适宜干制方法研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.
[5] 杨越. 清水洗方式对鲜切生菜和樱桃番茄处理效果的应用研究[D]. 石河子:石河子大学,2017.
[6] 胡双启,晋日亚. 气体二氧化氯对水果的杀菌作用及其应用前景展望[J]. 中国安全科学学报,2007(3):153-155.
[7] 曹聪,张土乔,张富标,等. 饮用水中的新型消毒剂——过氧乙酸的研究进展[J]. 中国给水排水,2018,34(4):36-40.
[8] 王少丹. 提高鲜切青椒微生物食用安全性的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2012.
[9] 江镇海. 固体二氧化氯市场发展前景看好[J]. 江苏氯碱,2007(3):25-27.
[10] 徐斐燕. 鲜切西兰花的保鲜技术研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.
[11] 王玉丽,张丙云,王永刚. 二氧化氯熏蒸对韭黄表面微生物的影响[J]. 食品工业科技,2008(11):211-212.
[12] 张丙云,郑艳霞,王永刚. 鲜切韭黄保鲜技术的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(4):336-338.
[13] 陈学玲,王晓芳,关健,等. 次氯酸钠和二氧化氯对莲藕杀菌效果的研究[J]. 长江蔬菜,2015(22):189-191.
[14] 谭玉霞. 菠菜联合干燥工艺及减菌作用研究[D]. 南京:南京农业大学,2010.
[15] 梁冬妮. 鲜切蔬菜清洗、护色和包装技术的研究[D]. 南京:南京农业大学,2003.
[16] ALLENDE A,MCEVOY J,TAO Y,et al. Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite,sodium chlorite,sodium hypochlorite,and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro[J]. **Food Control**,2009,20(3):230-234.
[17] SILVEIRA A C,AGUAYO E,ARTÉS F. Emerging sanitizers and Clean Room packaging for improving the microbial quality of fresh-cut 'Galia' melon[J]. **Food Control**,2010,21(6):863-871.
[18] CHEN Z,ZHU C H,ZHANG Y,et al. Effects of aqueous chlorine dioxide treatment on enzymatic browning and shelf-life of fresh-cut asparagus lettuce (*Lactuca sativa* L.)[J]. **Postharvest Biology and Technology**,2010,58(3):232-238.
[19] 郭婷婷,胡丹丹,付子琳,等. 基于 16s rDNA 高通量测序分析技术研究甘露寡糖对奶牛瘤胃菌群结构的影响[J]. 动物营养学报,2018,30(10):4048-4058.

科　技　信　息

澳新拟批准一种甜菊糖苷混合物作为强力甜味剂

据澳新食品标准局(FSANZ)消息,2021 年 2 月 9 日,澳新食品标准局发布 150-21 号通知,其中 A1222 号申请,拟批准使用一种来自解脂耶氏酵母的甜菊糖苷混合物(steviol glycoside)作为强力甜味剂。

[信息来源] 食品伙伴网. 澳新拟批准一种甜菊糖苷混合物作为强力甜味剂 [EB/OL]. (2021-2-9). http://news.foodmate.net/2021/02/585327.html