

槟榔干果贮藏中优势腐败霉菌的分离及鉴定

张容鹄¹, 邓浩¹, 邢福能¹, 庄光辉¹, 冯建成², 刘建卓², 张婵¹

(1. 海南省农业科学院农产品加工设计研究所, 海南省热带果蔬冷链研究重点实验室, 海南海口 571100)

(2. 海南大学理学院, 海南海口 570228)

摘要: 槟榔干果贮藏中霉菌污染直接影响干果的贮藏品质。为明确槟榔干果贮藏中优势腐败霉菌的种类, 本实验对海南万宁产5个批次的槟榔干果在高温高湿贮藏环境下贮存3个月后的腐败霉菌进行分离纯化, 得到11株腐败霉菌; 将纯化后的11株腐败霉菌的孢子悬液分别喷洒至新鲜制备已灭菌的槟榔干果上进行回接侵染验证实验, 得到2株优势腐败霉菌S1023和W3。通过传统的菌落形态特征和菌丝、孢子显微结构观察; 结合PCR扩增, 得到序列长度分别为529 bp和571 bp的ITS序列, 经rDNA-ITS序列分析, 并构建系统发育树, 最终将2株优势霉菌分别鉴定为灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)和泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)。本研究结果可为槟榔干果中腐败霉菌的分离鉴定提供可靠的方法, 也可为后续槟榔干果杀菌方法的选择, 贮藏条件的优化提供依据。

关键词: 槟榔干果; 腐败霉菌; 分离纯化; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2020)09-26-33

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0223

Isolation and Identification of Predominant Decaying Molds from Dried Betelnut during Storage

ZHANG Rong-hu¹, DENG Hao¹, XING Fu-neng¹, ZHUANG Guang-hui¹, FENG Jian-cheng², LIU Jian-zhuo², ZHANG Chan¹

(1. Institute of Processing & Design of Agroproducts, Hainan Academy of Agricultural Science, Hainan Tropical Fruit and Vegetable Cold Chain Key Laboratory, Haikou 571100, China)

(2. College of Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The quality of dried betelnut during the storage was directly affected by microbial contamination. The separation and identification of predominant decaying molds were key steps in the safe storage of dried betelnut. In order to determine the species of dominant decaying molds in the storage of betelnut, 11 molds were isolated and purified from 5 batches of betelnut produced in Wanning, Hainan after 3 months of storage under high temperature and high humidity. Two mold strains were verified as preponderant decaying molds through the return infection experiments. By traditional morphological characteristics and microscopic structure observation, a preliminary identification was obtained. The ITS regions of the strains were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The ITS gene sequences of 529 bp and 571 bp in length were obtained. Through comparison and analysis of those sequences, the phylogenetic trees were constructed. The strains were identified as *Aspergillus glaucus* and *Aspergillus awamori*, respectively. It provided a simple and reliable method for quick identification of spoilage mold in areca nut, and laid a good foundation for the optimization of storage conditions and the choice of the method for dried betelnut sterilization.

Key words: dried betelnut; decaying molds; separation and purification; identification

引文格式:

张容鹄, 邓浩, 邢福能, 等. 槟榔干果贮藏中优势腐败霉菌的分离及鉴定[J]. 现代食品科技, 2020, 36(9): 26-33

ZHANG Rong-hu, DENG Hao, XING Fu-neng, et al. Isolation and identification of predominant decaying molds from dried betelnut during storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 26-33

收稿日期: 2020-03-11

基金项目: 海南省重点研发计划专项 (ZDYF2016099)

作者简介: 张容鹄(1970-), 女, 研究员, 研究方向: 农产品加工与贮藏

通讯作者: 庄光辉((1975-), 男, 高级农艺师, 研究方向: 植物营养及安全; 共同通讯作者: 冯建成((1972-), 男, 教授, 研究方向: 生物化学与分子生物学

槟榔 (*Areca catechu* L.) 是棕榈科槟榔属常绿乔木, 主要分布在中非和东南亚地区。槟榔果有杀虫、抗炎、镇痛、调血脂等多种药理学功效, 是四大南药之首^[1,2]。海南是我国槟榔的主产区, 其产量占全国的99%; 而槟榔主要消费市场在湖南, 已形成海南“垄断”原料供应、湖南“垄断”消费市场的格局, 槟榔业已成为海南和湖南两省的支柱产业之一^[3,4]。

槟榔干果由槟榔鲜果经蒸汽或热泵干燥初加工而成, 是食用槟榔生产的主要原料^[5]。目前, 食用槟榔产品合格率整体偏低, 主要原因是微生物指标超标^[4,6]。槟榔干果原料存放中发霉腐烂是影响食用槟榔品质的主要因素之一。霉菌污染主要产生两方面的危害, 一方面引起食品变质, 带来巨大的经济损失。另一方面产生的毒素易引起人与动物中毒, 威胁人类身体健康^[7]。据世界粮农组织 (FAO) 统计, 全世界每年有约 10 亿 t 食品由于存贮中霉菌及其所产毒素污染而腐败变质。在热带和亚热带地区, 由于高温高湿, 情况尤为严重^[8]。因而防止槟榔干果贮藏期微生物污染是亟待解决的问题。

目前有关槟榔鲜果和食用槟榔中霉菌分析及控制的研究已经开展, 余凤玉等^[2]对易侵染槟榔鲜果的炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 的生物学特性及其对 6 种杀菌剂的敏感性进行了测定; 邓峥华等^[9]对市售食用槟榔微生物污染状况调查, 总合格率 89.8%, 其中菌落总数超标 24 份 (5.4%), 霉菌超标 22 份 (5.0%); 文大缀等^[10]研究表明炮制阶段槟榔中以霉菌为主要菌群, 数量为总菌落数的 30% 左右, 且青霉为优势霉菌。而对槟榔干果贮藏中腐败霉菌的研究较少, 仅银波等^[3]对原料槟榔中微生物菌群的基本构相进行了分析, 但并未对高温高湿贮藏环境下的优势腐败霉菌开展深入研究。对槟榔干果中存在的优势腐败霉菌进行分离鉴定, 是实现槟榔干果安全贮藏的关键一步。

本文以槟榔干果为研究对象, 对其高温高湿贮藏环境下的腐败霉菌进行分离纯化, 将腐败霉菌回接进行侵染验证, 比对菌落形态特征和微观结构, 结合 PCR 扩增, rDNA-ITS 序列分析, 并构建系统发育树, 对其中优势腐败霉菌进行鉴定。以期为槟榔干果中霉菌的分离鉴定提供可靠的方法, 也为后续杀菌方法的选择, 贮藏条件的优化提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

槟榔干果购于海南省万宁市槟榔初加工厂, 共 5 个批次; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato Dextrose Agar, PDA)、孟加拉红培养基 (Rose Bengal Agar)、高盐查氏培养基 (Salt Czapek Dox Agar) 购于上海广锐生物科技有限公司; Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式胶回收试剂盒等分子生物学试剂购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。其余试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

HF-200A 型高速多功能粉碎机, 辰禾盛丰工贸有限公司; 5810R 型台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; MJ-150 霉菌培养箱, 苏州威尔实验用品有限公司; SW-CJ-2D 净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SPH-2008 恒温培养摇床, 上海世平实验设备有限公司; 9700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 美国 Alpha imager 5500 型凝胶成像系统、日本奥林巴斯正置荧光显微镜 BX51, 体视镜 SZ51。

1.2 方法

1.2.1 槟榔干果贮藏中霉菌的分离与纯化

取室温贮藏 3 个月后霉腐的槟榔干果, 无菌条件下用无菌接种针刮取病斑, 置盛有生理盐水的无菌均质杯中, 8000 r/min 均质 5 min, 依次制备 10 倍系列稀释样品匀液, 取 200 μ L 最高稀释的匀液, 涂布于 PDA 培养基和孟加拉红培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d; 待有菌落长出后, 挑取形态各异的霉菌菌落转接至 PDA 培养基和孟加拉红培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d^[11]。纯化采用单孢分离直接挑取法^[12], 即将分离获得的霉菌培养产孢, 在体视镜下, 用接种针挑取少许孢子在高盐察氏培养基上 28 $^{\circ}$ C 连续进行划线培养, 3 d 后挑取单菌落进行纯化并保存于斜面上, 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。

1.2.2 优势腐败霉菌的筛选

以新鲜制备的槟榔干果为原料, 采用间歇式微波杀菌处理干果^[13], 后用 10% NaClO 消毒 10 min, 再用无菌蒸馏水漂洗 5 次, 置于超净工作台上晾干备用。取 100 μ L 第 5 次漂洗水涂 PDA 平板, 培养 5 d, 若无菌落出现, 表明槟榔干果无菌^[12]。将分离的霉菌分别接种至 PDA 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 5~7 d。用 0.9% 的生理盐水将孢子洗至无菌三角瓶中 (内装灭菌玻璃珠), 摇匀、过滤除菌丝体, 血球计数板计数, 调节孢子悬液的浓度至 10^7 个/mL。在超净工作台上, 按 1:10 (V/m) 比例将孢子悬液喷洒至新鲜制备已灭菌的槟榔干果上, 搅匀, 以无菌水喷洒的新鲜制备的槟榔干

果为对照。回接后的槟榔干果置于灭菌的密实袋中, 常温贮藏, 每天观察霉菌生长情况。以霉菌最快干果接种的菌株作为潜在优势腐败菌, 通过回接侵染实验验证, 确定优势腐败霉菌^[14]。

1.2.3 优势腐败霉菌形态特征观察

将分离的优势霉菌接种于高盐查氏培养基上, 在 28 °C 条件下培养 3~7 d, 观察并记录霉菌在培养基上的形态特征, 包括菌落颜色、气味、边缘特征以及菌落大小, 菌丝体生长状况等。

1.2.4 优势腐败霉菌显微结构观察

优势霉菌显微结构观察采用载玻片观察法^[15], 先用低倍镜观察, 必要时可换高倍镜观察。重点观察霉菌有无孢子, 孢子形状, 孢子梗形态结构; 菌丝体的颜色、有无横隔膜等。根据观察到的形态特征、显微结构, 参照真菌鉴定手册^[16], 食品微生物学检验: 常见产毒霉菌的形态学鉴定 (GB 4789.16-2016)^[17]等相关资料, 初步鉴定出霉菌优势菌种。

1.2.5 rDNA-ITS 序列分析

1.2.5.1 基因组 DNA 的提取

采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取优势霉菌总 DNA。提取得到的总 DNA 样品, 5 μ L 上样量, 采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色, 紫外检测总 DNA 样品的质量, -20 °C 冰箱中保存。

1.2.5.2 ITS 基因序列的 PCR 扩增^[18]

ITS 区域的扩增选择真核生物 ITS 通用扩增引物, ITS1 为 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 为 5'-TCCTCCGCTTATTGATAATGC-3', 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。PCR 扩增采用的 25 μ L 反应体系, 包括 0.5 μ L 上游引物, 0.5 μ L 下游引物, 0.5 μ L 基因组模板, 2 μ L dNTP (各 2.5 mmol/L), 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶, 10 $\times$ Taq reaction buffer 2.5 μ L, 灭菌 ddH₂O 定容至 25 μ L。PCR 的扩增条件为 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳 (150 V, 100 mA) 检测, 溴化乙锭 (EB) 染色后, 于 4 °C 保存备用。

1.2.5.3 PCR 扩增序列的测定和系统发育学分析

采用 San Prep 柱式胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 产物送生工生物工程 (上海) 服务有限公司测序。测序结果在 NCBI GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中采用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 进行序列相似性比对。根据比对结果, 选取同源性较高的已知菌株的 ITS 序列和所测菌株的 ITS 全序列一起建立系统发育树。采用 MEGA 6.06 软

件在 Kimura-2-parameter 模型的基础上, 用 Neighbor-joining 法 (NJ 法) 构建分子进化树, 自举分析 (Bootstrap) 1000 次重复检测进化树的置信度。根据菌株的形态特征, 显微结构结合系统发育学结果, 进而确定菌株的种属类别^[19,20]。

2 结果与讨论

2.1 槟榔干果贮藏中优势腐败霉菌的分离

槟榔干果在高温高湿环境中贮藏 3 个月后, 霉菌肉眼清晰可见 (图 1)。腐败霉菌孳生严重降低槟榔的食用品质, 且危害食用者的身体健康。



图 1 槟榔干果中生长的霉菌

Fig.1 Culture of the fungus on areca nuts

注: a: 为新鲜制备的槟榔干果 (对照); b: 为常温贮藏 90 d 后的槟榔干果。

经 PDA 培养基和孟加拉红培养基上培养, 可分离纯化出形态各异的霉菌 (图 2)。经肉眼观察, 挑取具有典型特征的腐败霉菌 11 株, 经纯化后保存。

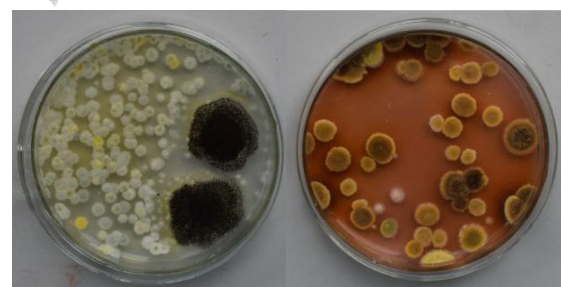


图 2 槟榔干果中霉菌的分离

Fig.2 The separation of molds from areca nuts

2.2 优势腐败霉菌的筛选

将纯化后的 11 株腐败霉菌的孢子悬液分别喷洒至新鲜制备已灭菌的槟榔干果上, 发现喷洒过菌株 S1023 和 W3 孢子悬液的槟榔干果, 常温贮藏 5~7 d 表面即出现霉斑, 14 d 后干果已明显腐败。将 2 种潜在优势腐败霉菌孢子悬液混合后进行回接侵染实验, 结果见图 3。从图 3 可知, 将菌株 S1023 和 W3 的孢子悬液喷洒至新鲜制备的槟榔干果, 与对照相比, 贮藏 7 d 后, 可见回接霉菌孢子的干果表面出现霉斑; 贮藏 14 d, 被侵染的干果数量增加明显, 干果表面已长出黄绿色霉层; 贮藏 21 d 后可见干果被厚厚的黄绿

色或者黑色孢子霉层包裹,与贮藏3个月的槟榔干果霉层完全一致。通过回接侵染验证实验,确定菌株S1023和W3是引起槟榔干果常温储藏中霉变的优势腐败霉菌。



图3 回接侵染实验结果

Fig.3 The result of return inoculation treatment

注: a 为对照组(无菌水喷洒的新鲜制备的槟榔干果); b、c、d 分别为优势霉菌回接后贮藏7 d、14 d、21 d。

2.3 优势菌株 S1023 和 W3 的鉴定

2.3.1 菌株 S1023 的形态特征和显微结构

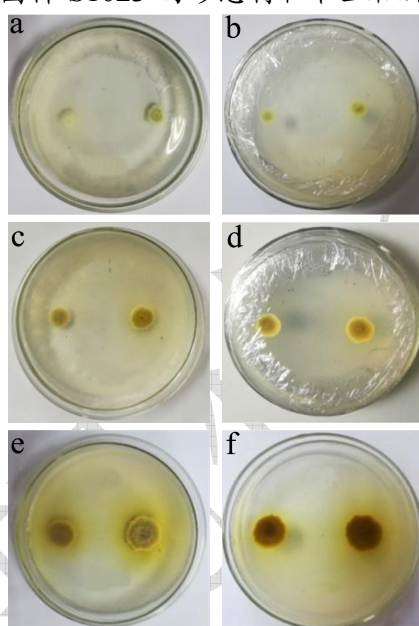


图4 S1023 在高盐查氏培养基上的菌落形态

Fig.4 The colony morphology of the strain S1023 on Salt

Czapek Dox Agar

注: a: 3 d 正面; b: 3 d 反面; c: 5 d 正面; d: 5 d 反面; e: 7 d 正面; f: 7 d 反面。

菌株 S1023 菌落形态特征见图4。在高盐查氏培养基上生长缓慢,28℃培养3 d后,菌落直径5~8 mm,菌落正面中间显灰绿色,边缘波状;菌落反面周围为白色,中间为黄绿色,颜色加深。培养5 d后,菌落

直径12~15 mm,菌落正面中间灰绿色,边缘白色,波状;菌落反面中间为黄绿色加深。培养7 d后,菌落直径17~20 mm,菌落正面中间灰绿色,形成突起,边缘菌丝白色,波纹状;菌落反面中间为黄褐色,加深。

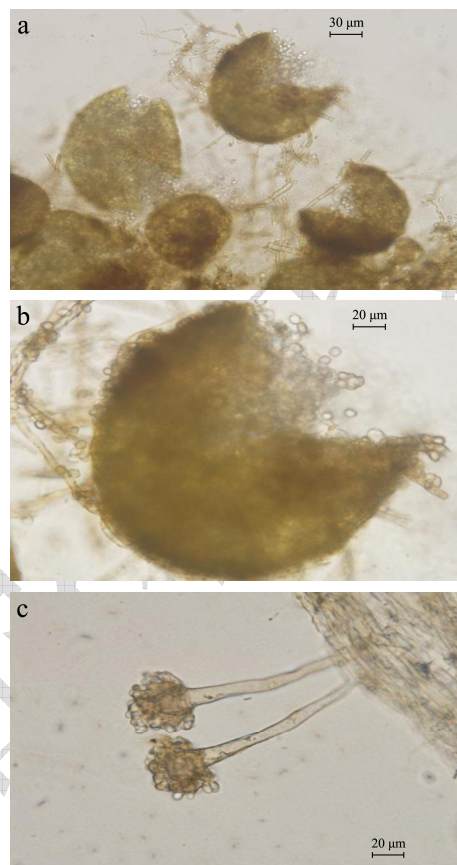


图5 菌株 S1023 在显微镜下的形态

Fig.5 The microscopic inspection of the strain S1023

注: a: 闭囊壳及子囊孢子,标尺为30 μm; b: 闭囊壳及子囊,标尺为20 μm; c: 分生孢子梗及分生孢子,标尺为20 μm。

S1023 菌株采用载玻片观察法,其微观结构见图5。闭囊壳球形或扁球形,黄色,50~80 μm×80~120 μm;子囊近扁球形,9~12 μm;子囊孢子双凸镜形,光滑,4.0~5.2 μm×2.5~4.0 μm;分生孢子头辐射形,灰绿色,35~55 μm;顶囊半球形至烧瓶形,直径16~25 μm;分生孢梗茎褐色,光滑,210~270 μm×5~7 μm;产孢结构单层,瓶梗4.5~6.7 μm×1.5~2 μm;分生孢子椭圆形或梨形,3.5~6.0 μm×2.5~3.5 μm,粗糙。综合该菌的菌落形态和显微结构,参照真菌鉴定手册,食品微生物学检验等相关资料,初步确定其为灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)。

2.3.2 菌株 W3 的形态特征和显微结构

菌株 W3 菌落形态特征见图6。在高盐查氏培养基上菌落生长迅速,28℃培养2 d后,菌落直径16~20 mm,菌落正面边缘为白色,有少量分生孢子呈黑褐

色,质地绒状;菌落反面中间为淡黄色;培养4 d后,菌落直径24~30 mm,菌落正面中间颜色加深,有大量黑褐色孢子,边缘白色菌丝;菌落反面中间为不同程度黄褐色,具辐射状沟纹,无渗液。培养6 d后,菌落直径42~50 mm,菌落正面中间颜色进一步加深,有大量黑褐色孢子,边缘少量白色菌丝;菌落反面中间为不同程度淡黄色,具明显辐射状沟纹,无渗液,菌落质地呈绒状,菌落扁平,菌落不易挑起,边缘纤毛状。

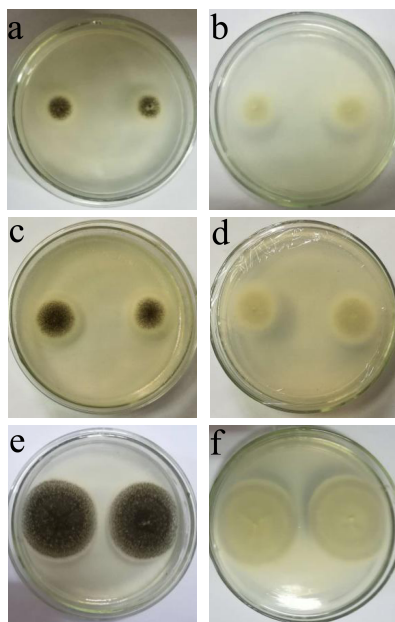


图6 W3 在高盐查氏培养基上的菌落形态

Fig.6 The colony morphology of the strain W3 on Salt Czapek

Dox Agar

注: a: 2 d 正面; b: 2 d 反面; c: 4 d 正面; d: 4 d 反面; e: 6 d 正面; f: 6 d 反面。

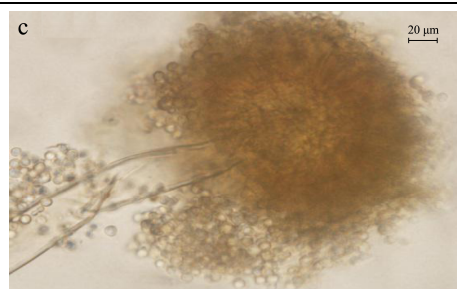
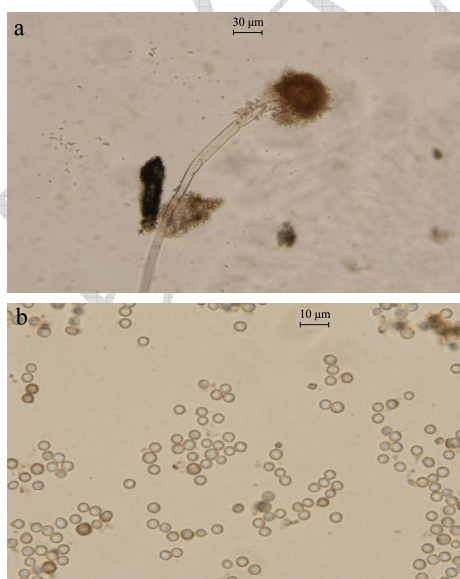


图7 菌株 W3 在显微镜下的形态

Fig.7 The microscopic inspection of the strain W3

W3 菌株采用载玻片观察法,其显微结构见图7。分生孢子梗发生于基质,分生孢梗茎中空,无隔膜,壁平滑,孢梗茎350~800 μm×9~15 μm,近顶囊稍收缩;分生孢子梗顶端膨大成为球形,褐色,直径30~60 μm;孢子头球形,产孢结构双层;梗基15~20 μm×3.2~5 μm;瓶梗7~9.2 μm×2.2~3.4 μm;分生孢子近球形,暗褐黑色,表面粗糙,直径3.5~4.5 μm。综合该菌的菌落形态和显微结构,参照真菌鉴定手册,食品微生物学检验:常见产毒霉菌的形态学鉴定(GB 4789.16-2016)等相关资料,初步确定其为泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)。

2.3.3 菌株 S1023 和 W3 的 ITS 序列分析

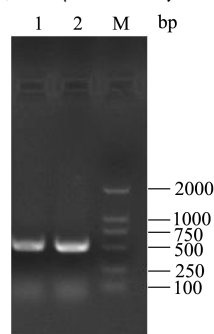


图8 菌株 W3 和 S1023 ITS 序列电泳图

Fig.8 Agarose gel electrophoresis of ITS gene sequences of strain S1023 and W3

注: M: DL 2000 Marker; 1 为菌株 W3, 2 为菌株 S1023 的 ITS 序列扩增带。

分别以菌株 S1023 和 W3 基因组 DNA 为模板,采用真核生物 ITS 通用扩增引物进行特异性扩增,获得 529 bp 和 571 bp 的 ITS 片段的 PCR 产物,如图 8。

将得到的序列在 GenBank 中进行序列相似性对比;选取同源性较高的已知菌株的 ITS 序列和所测菌株的 ITS 全序列,采用 MEGA6.06 软件在 Kimura-2-parameter 模型的基础上,用 Neighbor-joining 法构建分子进化树,结果见图 9 和图 10。依据真菌分子分类鉴定原则,通过对 ITS 区域核苷酸序列进行比

对, 序列相似性大于 99% 的菌株为同种, 序列相似性小于 99% 大于 95% 的为相同属^[18]。图 9 表明菌株 S1023 与灰绿曲霉 *Aspergillus glaucus* strain NRRL116 (AY373887.1) ITS 的序列同源性为 100%, 在一个分

支上, 表明它们的亲缘关系最近。综合 S1023 菌株的形态特征、显微结构和序列同源性以及系统发育树分析结果, 鉴定菌株 S1023 为灰绿曲霉 (*Aspergillus glaucus*)。

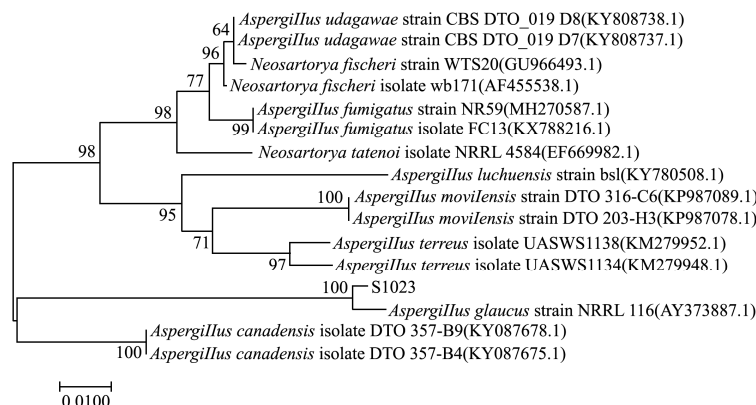


图 9 菌株 S1023 系统进化树构建

Fig.9 Phylogenetic tree of strain S1023

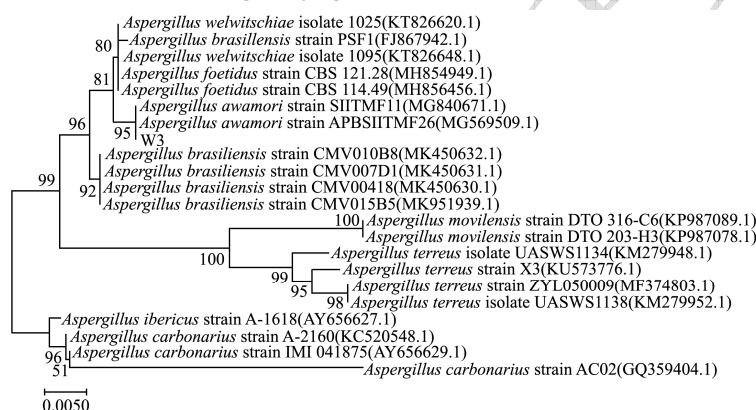


图 10 菌株 W3 系统进化树构建

Fig.10 Phylogenetic tree of strain W3

图 10 表明菌株 W3 与泡盛曲霉 *Aspergillus awamori* (MG840671.1、MG569509.1) ITS 的序列同源性为 100%, 在一个分支上, 表明它们的亲缘关系最近。综合 W3 菌株的形态特征、显微结构和序列同源性以及系统发育树分析结果, 鉴定菌株 W3 为泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*)。

传统的霉菌分类主要根据霉菌菌株的形态特征, 生长特性与生理生化指标^[15,18]。rDNA-ITS 是指核糖体 RNA 基因(rDNA)的内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS), 真菌 ITS 的长度一般在 500~750 bp 之间。由于 ITS 序列能从分子水平为真菌的分类与鉴定提供科学依据, 研究越来越被广泛应用^[18-20]。本研究比对形态特征和显微结构, 结合 rDNA-ITS 序列分析进行菌属的鉴定, 可极大提升真菌分类鉴定的可靠性。

槟榔干果是食用槟榔的初级原料, 如何在高温高湿的地区储藏槟榔干果, 有效控制微生物滋长, 防止霉变减少损失是一个亟待解决的关键问题^[1-4]。对槟榔

干果中存在的优势腐败或病原霉菌进行分离鉴定, 是实现槟榔干果安全贮藏, 保证食品安全的关键一步。

对于农副产品贮藏中优势腐败霉菌筛选, 目前方法各异。银波等^[3]按照菌种生物量在总菌落中的优势性确定槟榔原料的优势霉菌为毛霉。文大缀等^[10]在槟榔炮制阶段优势霉菌—青霉的筛选方法是选取长势良好、形态各异的单菌落。岳晓禹等^[20]在筛选贮藏玉米中优势腐败霉菌时, 以肉眼明显可见, 占生长优势的霉菌作为分离纯化对象分离到优势菌米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)。黄林等^[14]则采用致腐实验对冷却猪肉优势腐败菌进行分离鉴定。本研究也采用致腐性实验来确定优势腐败菌, 即首先分离纯化腐败菌, 然后分别侵染灭菌的新鲜槟榔干果, 根据侵染快慢, 初步确定优势腐败菌; 再通过回接侵染实验验证的方式最终确定优势腐败菌。对于回接侵染实验, 务必选取新鲜制备的槟榔干果, 并采用微波杀菌和表面消毒的方法, 确保侵染前干果无菌, 排除槟榔干果因加工贮

运中环境条件或包装材料等原因导致被侵染的可能性。相较于简单的以霉菌的生长优势为标准,本研究提供的回接侵染实验方法可极大提高实验结果的可信度,可为后续槟榔干果贮藏中腐败微生物的防治提供可靠基础。

目前已有学者对引起谷物、坚果、玉米、水果、蔬菜等腐败变质的霉菌及其霉菌毒素开展研究,发现曲霉是引起食品腐败的最常见的霉菌之一^[21]。Barron GL 等对导致储粮劣变的真菌进行了研究,发现灰绿曲霉是引起储粮劣变主要真菌之一^[21]。玉米储藏危害真菌以灰绿曲霉和白曲霉为主,在水分 16% 下,以灰绿曲霉生长为主, 16% 以上以白曲霉为主^[22]。Karthikeyan V 等^[23]发现泡盛曲霉 KM434331 引起了南美白对虾黑鳃,对虾的呼吸系统造成损伤,黑化作用将最终导致虾的死亡。Al-Hindi R R 等^[24]研究表明曲霉是引起鲜摘水果腐烂的主要霉菌,其中泡盛曲霉易于侵染柠檬。本实验的研究表明,在高温高湿条件下,槟榔干果(含水量低于 16%)易于受到灰绿曲霉和泡盛曲霉的侵染,二者为优势霉菌,之所以与银波等的研究结果不同,推测可能主要是受到槟榔干果贮藏地域和气候的影响,因此在选择适宜的槟榔干果灭菌方法和贮藏方式时,弄清其贮藏中优势腐败霉菌尤为关键,可做到“对症下药”。

3 结论

3.1 对于槟榔干果贮藏中优势腐败霉菌筛选,易采用致腐性实验和回接侵染实验验证相结合的方式进行,即首先分离纯化腐败菌,然后分别侵染灭菌的新鲜槟榔干果,根据侵染快慢,初步确定优势腐败菌;再通过回接侵染实验验证的方式最终确定优势腐败菌。相较于简单的以霉菌的生长优势为标准,本研究提供的回接侵染实验方法可极大提高实验结果的可信度,可为后续槟榔干果贮藏中腐败微生物的防治提供可靠基础。

3.2 对于回接侵染实验,务必选取新鲜制备的槟榔干果,并采用微波杀菌和表面消毒的方法,确保侵染前干果无菌,排除槟榔干果因加工贮运中环境条件或包装材料等原因导致被侵染的可能性。

3.3 霉菌分类鉴定应将传统霉菌菌株形态特征和菌丝、孢子显微结构观察与现代分子生物学中 rDNA-ITS 序列分析进行菌属的鉴定相结合,以提升真菌分类鉴定的可靠性。

3.4 在选择适宜的槟榔干果灭菌方法和贮藏方式时,弄清其贮藏中优势腐败霉菌尤为关键,在高温高湿条件下,槟榔干果(含水量低于 16%)易于受到灰绿曲

霉(*Aspergillus glaucus*)和泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)的侵染,二者为优势霉菌。

致谢:感谢海南万宁海锋农业开发有限公司及时提供的原料及贮藏信息,特此表示感谢!

参考文献

- [1] PENG Wei, LIU Yu-jie, WU Na, et al. *Areca catechu* L. (*Areaceae*): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 164: 340-356
- [2] 余凤玉,朱辉,牛晓庆,等. 槟榔炭疽菌生物学特性及 6 种杀菌剂对其抑制作用研究[J]. *中国南方果树*, 2015, 44(2): 77-80
- [3] YU Feng-yu, ZHU Hui, NIU Xiao-qin, et al. Biological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibitory effects of six fungicides [J]. *South China Fruits*, 2015, 44(2): 77-80
- [3] 银波,俞健,盛灿梅,等. 槟榔原料优势霉菌分析及防霉剂的研制[J]. *食品与机械*, 2008, 24(5): 24-28
- [4] YIN Bo, YU Jian, SHENG Can-mei, et al. Betel nut mold of the advantages of raw materials and the development of fungicide [J]. *Food & Machinery*, 2008, 24(5): 24-28
- [4] 王友水,蒋小平,刘亮,等. 食用槟榔加工污染控制对策研究[J]. *实用预防医学*, 2008, 15(6): 1873-1875
- [5] WANG You-shui, JIANG Xiao-ping, LIU Liang, et al. The study of the controlling pollution in processing of edible areca nut [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2008, 15(6): 1873-1875
- [5] 张容鹄,高元能,冯建成,等. 热泵干燥槟榔中试工艺参数优化[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(9): 241-247
- [6] ZHANG Rong-hu, GAO Yuan-neng, FENG Jian-cheng, et al. Technologic parameter optimization in pilot-scale process of heat pump drying of *Areca catechu* L [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(9): 241-247
- [6] 徐远芳,邓钢桥,彭玲,等. 辐照对食用槟榔的杀菌效果及品质的影响[J]. *核农学报*, 2014, 28(2): 240-244
- [7] XU Yuan-fang, DENG Gang-qiao, PENG Ling, et al. Effect of irradiation treatment on microbial inactivation and quality of edible areca nut [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(2): 240-244
- [7] 刘凌平,和肖营,都立辉,等. 傅里叶变换衰减全反射红外光谱技术对稻谷中常见有害霉菌的快速鉴别[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(19): 298-301
- [7] LIU Ling-ping, HE Xiao-ying, DU Li-hui, et al. Application of attenuated total reflection-fourier transform infrared

- spectroscopy for rapid identification of fungi strains on grain [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(19): 298-301
- [8] Prakash B, Kedia A, Mishra P K, et al. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-potentials and challenges [J]. Food Control, 2015, 47: 381-391
- [9] 邓峥华,邓春明,李帮锐.市售食用槟榔微生物污染状况调查分析[J].海峡预防医学杂志,2015,21(3):66-67
DENG Zheng-hua, DENG Chun-ming, LI Bang-rui. Investigation and analysis of microbial contamination of edible areca nut [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2015, 21(3): 66-67
- [10] 文大缀,蒋雪薇,盛灿梅,等.槟榔炮制阶段优势霉菌分析及其防霉剂的研制[J].食品与机械,2008,6:36-40
WEN Da-zhui, JIANG Xue-wei, SHENG Can-mei, et al. Analysis of dominant mould in betel nut processing and development of mould inhibitor [J]. Food & Machinery, 2008, 6: 36-40
- [11] GB 4789.15-2010 食品微生物学检验霉菌和酵母计数[S].
GB 4789.15-2010 .Food Microbiology Detect Moulds and Yeasts Count [S]
- [12] 杨忆,武海燕,李朋华,等.新郑灰枣枣果内生真菌的分离和鉴定[J].菌物学报,2015,34(1):164-168
YANG Yi, WU Hai-yan, LI Peng-hua, et al. Endophytic fungi associated with fruits of *Ziziphus jujuba* 'Huizao' in Xin-zheng, Henan Province [J]. Mycosystema, 2015, 34(1): 164-168
- [13] 庄光辉,邓浩,冯建成,等.微波对槟榔干果杀菌效果及其品质的影响[J].热带作物学报,2018,39(1):162-167
ZHUANG Guang-hui, DENG Hao, FENG Jian-cheng, et al. Effect of microwave on sterilization and quality properties of dried betelnut [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(1): 162-167
- [14] 黄林,陈全胜,张燕华,等.冷却猪肉优势腐败菌分离鉴定及致腐能力测定[J].食品科学,2013,34(1):205-209
HUANG Lin, CHEN Quan-sheng, ZHANG Yan-hua, et al. Isolation, identification and spoilage capability of dominant spoilage bacteria in chilled pork [J]. Food Science, 2013, 34(1): 205-209
- [15] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,1999
SHEN Ping, FAN Xiu-rong, LI Guang-wu. Microbiology Experiment (Third Edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999
- [16] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:科学技术出版社,1979
WEI Jing-chao. Manual of Fungi Identification [M]. Shanghai: Science and Technology of China Press, 1979
- [17] GB 4789.16-2016.食品微生物学检验.常见产毒霉菌的形态学鉴定[S]
GB 4789.16-2016. Food Microbiology Detection: The Morphological Identification of Common Mycotoxin-producing Fungi [S]
- [18] 姜雨萌,牛永春,邓晖.rDNA ITS 序列在 ACCC 真菌鉴定中的应用[J].微生物学通报,2016,43(5):942-947
JIANG Yu-meng, NIU Yong-chun, DENE Hui. Applying rDNA internal transcribed spacer sequences to identify fungal strains preserved at agricultural culture collection of China [J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 942-947
- [19] 和肖营,刘凌平,都立辉,等.储藏稻谷中一株优势腐败霉菌的分离与鉴定[J].粮食与饲料工业,2016,6:12-16
HE Xiao-ying, LIU Ling-ping, DU Li-hui, et al. Isolation and identification of a predominant spoilage mold strain from stored rice [J]. Cereal & Feed Industry, 2016, 6: 12-16
- [20] 岳晓禹,徐军,张恒业,等.贮藏玉米中优势腐败霉菌 M13 的分离与鉴定[J].食品工业科技,2011,32(11):183-186,190
YUE Xiao-yu, XU Jun, ZHANG Heng-ye, et al. Isolation and identification of predominant spoiling strain M13 of mold in the stored maize [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(11): 183-186, 190
- [21] ZHAI Huan-chen, ZHANG Shuai-bing, HUANG Shu-xia, et al. Prevention of toxigenic fungal growth in stored grains by carbon dioxide detection [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2015, 32(4): 596-603
- [22] Shukla R, Kumar A, Singh P, et al. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135: 65-170
- [23] Karthikeyan V, Selvakumar P, Gopalakrishnan A. A novel report of fungal pathogen *Aspergillus awamori*, causing black gill infection on *Litopenaeus vannamei*, (pacific white shrimp) [J]. Aquaculture, 2015, 444: 36-40
- [24] Al-Hindi R R, Al-Najada A R, Mohamed S A. Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: Screening of plant cell wall degrading enzymes [J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(4): 443-448