

香辣蟹中特征性腐败菌的分离鉴定以及香料的抑制作用研究

图尔荪阿依·图尔贡^{1,2}, 葛达娥¹, 潘建林³, 付龙龙³, 王 荣⁴,
努尔古丽·热合曼², 刘小莉^{1*}

(1. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 南京 210014; 2. 新疆师范大学, 乌鲁木齐 830054;
3. 江苏省淡水水产研究所, 南京 210017; 4. 泰兴市江之韵科技发展有限公司, 泰州 225400)

摘要: **目的** 分析香辣蟹产品的特征性腐败菌, 用于指导筛选特定的香辛料配方, 以延长产品保质期。**方法** 从自然腐败的市售香辣蟹产品中分离纯化出特征性腐败菌, 通过生理生化实验和 16S rRNA 序列比对法对腐败细菌进行鉴定, 选取不同属的腐败菌进行常用香辛料提取物的抑菌效果评价。通过进一步测定香辣蟹在储藏过程中菌落总数和挥发性盐基氮值, 评估不同香辛料提取物对香辣蟹的保鲜效果。**结果** 分离所得的 15 株腐败菌中 10 株为革兰氏阳性细菌, 其余均为革兰氏阴性细菌, 3 株属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*. sp), 6 株属于白色杆菌属(*Leucobacter*. sp), 3 株属于变形杆菌属(*Proteus*. sp), 2 株属于普罗威登斯菌(*Providencia vermicola*), 1 株属于节杆菌属(*Arthrobacter*. sp)。不同品种的香辛料对腐败菌生长的抑制作用差异较大, 公丁香、八角、香砂、千里香、梔子、草寇对 5 种指示腐败菌均有体外抑菌作用, 研究采用的香辛料配方降低香辣蟹储藏过程中菌落总数和挥发性盐基氮值的增加速度。**结论** 合适的香辛料能延长香辣蟹储藏时间, 可以作为香辣蟹天然保鲜剂。

关键词: 香辣蟹; 腐败菌; 分离鉴定; 香辛料; 抑菌作用

Isolation and identification of specific spoilage bacteria in spicy crab and antibacterial evaluation of spices

TURSUNAY Turgun^{1,2}, GE Da-E¹, PAN Jian-Lin³, FU Long-Long³, WANG Rong⁴,
NURGUL Rahman², LIU Xiao-Li^{1*}

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China;
2. Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China; 3. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China; 4. Taixing Jiangzhiyun Science & Technology Development Co., Ltd., Taizhou 225400, China)

ABSTRACT: Objective To isolate and purify specific spoilage bacteria in spicy crabs, and screen a formula of spices to prolong the shelf life of spicy crabs. **Methods** Specific spoilage bacteria were isolated and purified from natural spoiled commercial spicy crabs, and identified by physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis. The bacteriostatic effects of extracts of common spices were evaluated by selecting spoilage

基金项目: 江苏省现代渔业产业技术体系(JFRS-01)、江苏省渔业科技类项目(Y2018-18)、江苏省科技项目(BE2018377)

Fund: Supported by the Modern Fisheries Industry Technology System Project of Jiangsu Province (JFRS-01), Jiangsu Fishery Science and Technology Project (Y2018-18) and Jiangsu Science and Technology Project (BE2018377)

*通讯作者: 刘小莉, 研究员, 博士, 主要研究方向为水产品加工。E-mail: liuxljaas@hotmail.com

*Corresponding author: LIU Xiao-Li, Professor, Ph.D, Jiangsu Academy of Agricultural Science, No. 50, Zhongling Street, Xuanwu District, Nanjing 210014, China. E-mail: liuxljaas@hotmail.com

bacteria from different genera. By further determining the total colony-forming units and volatile base nitrogen values during the storage of the spicy crab, the preservative effects of the spices were evaluated. **Results** Totally 15 strains of spoilage bacteria were isolated, including 10 strains of gram-positive bacteria, and the others of gram-negative bacteria, which were 3 *Staphylococcus* sp. strains, 6 *Leucobacter* sp. strains, 3 *Proteus* sp. strains, 2 *Providencia vermicola* strains, and 1 *Arthrobacter* sp. strain. The inhibitory effects of different varieties of spices on the growth of spoilage bacteria were different, *Eugenia caryophyllata* Thunb, *Illicium verum* Hook, *Amomi Semen*, *Murraya paniculata*, *Gardenia jasminoides* Ellis, and *Alpinia hainanensis* K. Schum had antibacterial activities against the 5 tested bacteria. The formula used in this study could reduce the total number of colonies and the volatile base nitrogen contents during the storage of spicy crab. **Conclusion** Suitable spices can prolong the storage time of spicy crab and can be used as a natural preservative for spicy crab.

KEY WORDS: spicy crab; spoilage bacteria; isolation and identification; spice extract; antibacterial activity

1 引言

螃蟹营养丰富,味道鲜美,深受广大人民群众喜爱,含有丰富的脂肪与蛋白质,可用于制作各种美味菜肴。香辣蟹是一道经典的传统名菜,属川菜系,因为口感香、辣、鲜、脆,深受消费者喜爱,近年来即食香辣蟹产品在市场走红,发展成为一种休闲食品风靡各地,特别是电商渠道销售量日益增多,市场潜力巨大。但如今生产即食香辣蟹以手工作坊居多,大规模工厂化生产较少,大多通过电商渠道冷藏运输和销售。由于螃蟹原料营养丰富,香辣蟹产品在常温条件下非常容易腐败,很快涨罐、涨袋,腐败变质,限制了产品的销售范围。为了保证产品安全,近年来人们纷纷致力于食品保鲜技术研究,天然来源的保鲜剂因安全、高效等优点得到了广泛的应用^[1]。常见的化学防腐剂如苯甲酸钠、山梨酸钾等,以及生物保鲜剂 nisin 在食品工业有广泛的应用,但是由于香辣蟹等水产品中特殊的腐败菌菌相,这些保鲜剂在香辣蟹产品中应用的效果并不尽如人意^[2],因此香辣蟹即食产品的保鲜一直是生产领域的一个难题。

香辛料是天然保鲜剂之一,具有安全、无毒、易降解等优点^[3],除了赋予食品在感官上特殊的风味外,它还具有抑菌防腐、抗氧化等活性^[4]。研究发现,许多香料对食物腐败细菌,如枯草芽孢杆菌、荧光假单胞菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌等,都具有显著的抑制活性。陈文学等^[5]以 16 种香辛料为原料,测试其醇提取物对细菌和霉菌的抑制作用,发现各种香辛料对细菌、霉菌都有一定的抑制作用,但抑制效果各不相同。Aydin^[6]研究发现,鼠尾草、百里香、丁香、芫荽、甘草根、茴香及姜等香辛料能抑制细菌生长,其提取液可用于食品保藏。Beceril 等^[7]发现新型的含有肉桂或牛至活性包装能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长。因此筛选特殊的能抑制香辣蟹特征性腐败菌的香辛料用于生产,是一种解决香辣蟹保鲜问题的方法。

本文以市售香辣蟹即食产品为材料,放置至自然腐

败后,分离和鉴定其中的特征性腐败菌,选取 5 种腐败菌作为指示菌用于检测 30 种常用香辛料的热水浸提和乙醇提取物的抑菌作用,利用 8 种香辛料复配制作香辣蟹,通过测定腐败微生物菌落总数含量和挥发性盐基氮(total volatile basic nitrogen, TVB-N)值评估香辛料对香辣蟹的保鲜效果,研究结果为靶向筛选适用于香辣蟹的高效天然保鲜剂提供依据。

2 材料和方法

2.1 材料、试剂与仪器

营养肉汤培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司);革兰氏染色液试剂盒(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司);细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)。

30 种市售香辛料:香叶、白芷、陈皮、荜拔、香砂、香茅草、良姜、母丁香、干姜、辛夷、南姜、山楂、孜然、千里香、槟榔、白蔻、桂皮、草果、小茴香、香菜籽、甘草、陈皮丝、公丁香、八角、刺砂仁、肉蔻、栀子、山奈、红蔻、草寇;市售香辣蟹产品。

E200MW 型显微镜(日本 Nikon 公司);GIS-3500 成像仪(上海天能科技有限公司);JY300C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 腐败菌的分离

购买市售香辣蟹产品若干,置于 37 °C 培养箱中直至涨罐或涨袋,从包装中取出,用事先灭菌的剪刀剪碎,称取 25 g 于灭菌的匀浆杯中,加入 225 mL 7.5 g/L 无菌生理盐水,匀浆后转移到无菌的 500 mL 锥形瓶中,20 °C、100 r/min 条件下振摇 10 min 后静置 5 min。取上清液用无菌生理盐水 10 倍梯度稀释,最终选 3 个合适的梯度液,各取 1 mL 梯度液倾注在营养肉汤培养基上培养 48 h。对特征性腐败菌进行初步的菌落形态观察,包括菌落的形状、大小、颜色、

边缘、表面状态、隆起状况、透明度等。挑取单菌落反复进行平板划线分离, 直到得到纯化的单菌落, 于 20%甘油管-20 °C保存备用。

2.2.2 细菌形态显微观察

通过革兰氏染色后镜检, 观察各菌体的显微形态特性及其在固体培养基上的菌落特征并记录结果。

2.2.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

将分离纯化的细菌, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。提取的 DNA, 取 9 μ L 经过 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 放入-20 °C保存待用。采用细菌扩增通用引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积 50 μ L, 包括模板 DNA 1.0 μ L, 正反向引物各 1.0 μ L, Premix Tap 25 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 扩增条件: 98 °C预变性 5 min 后持续变性 30 s, 55 °C退火 30 s, 72 °C延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C延伸 30 s。反应结束后 PCR 产物经过 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。符合测序要求的扩增产物由南京擎科生物科技有限公司进行测序。

2.2.4 香辛料提取物的制备

市售香辛料 30 种, 参考艾有伟等^[8]方法分别用热水和乙醇浸提法得到提取物。(1)热水浸提法: 香辛料样品 10 g 于具塞三角瓶中, 加入蒸馏水 50 mL 煮沸后保温 30 min, 冷却后取上清液, 定容至 100 mL, 备用。(2)乙醇抽提法: 香辛料样品 10 g 于具塞三角瓶中, 加入 10%乙醇溶液 50 mL, 80 °C水浴中 80 r/min 振荡 30 min, 冷却后取上清液, 定容至 100 mL, 备用。

2.2.5 体外抑菌试验

将甘油管保存的腐败菌于室温下融化, 吸取 50 μ L 接种于 5 mL 液体营养肉汤培养基中, 于 37 °C、150 r/min 摇床振荡培养 24 h 进行活化^[9]。将活化好的腐败菌用冷却的营养肉汤培养基稀释至 10⁶ CFU/mL 以上, 倒平板。待培养基冷凝后, 用直径为 7 mm 的打孔器于平板上均匀打出三个孔, 吸取 10 μ L 融化的培养基封底以防止培养基与平皿底出现裂隙。分别吸取浸提好的香料提取物 100 μ L 注入孔中, 37 °C下培养 48 h 后测量抑菌圈大小, 计算平均值。

2.2.6 香辣蟹的制作

市售鲜活螃蟹若干, 清水暂养洗净, 放入沸水中 5~10 s 热烫致死, 备用。倒入适当大豆油于油炸锅中(螃蟹与大豆油的比例为 1 kg:4 L, *m:V*)加热至 120 °C, 油炸螃蟹 90 s, 按照螃蟹原料重量百分比称取香辛料, 再按原料质量体积比 0.6 kg:1 L(*m:V*)加水用于卤煮。油炸过的螃蟹在卤煮液中煮制 25 min 后冷却装入无菌包装盒。制作好的香辣蟹放置于 20 °C培养箱, 每天取样测定菌落总数的量和挥发性盐基氮(TVB-N)值。

2.2.7 菌落总数测定

根据国家标准 GB 4789. 2—2016^[10]《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》进行香辣蟹样品中菌落总数的测定, 结果以 CFU/g 表示。

2.2.8 腐败菌挥发性盐基氮测定

根据国家标准 GB 5009. 228—2016^[11]《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》中第三法微量扩散法测定香辣蟹样品中挥发性盐基氮值, 结果以每 100 g 肌肉中所含氮的毫克数(mg/100 g)表示。

2.3 数据分析

实验结果以重复性条件下获得的 3 次独立测定结果的算术平均值表示, 结果以平均值 \pm 标准差表示, 实验数据用 Excel 2018 软件处理。

3 结果与分析

3.1 腐败菌的分离

从自然腐败的香辣蟹样品中分离得到 15 株细菌, 菌株编号为 XLX 1~15。表 1 为 15 株细菌的菌落形态和菌体形态基本特征结果, 其中 3 株为球菌, 其余均为杆菌; 革兰氏染色结果表明 10 株为革兰氏阳性菌, 其余 5 株为革兰氏阴性菌。

表 1 分离得到的 15 株腐败菌的基本特征

Table 1 Basic characteristics of 15 strains of spoilage bacteria

| 菌株编号 | 菌落形态 | 细菌形态 | 革兰氏染色 |
|--------|-------------------|------|-------|
| XLX-1 | 圆形粗糙, 白色 | 杆状 | + |
| XLX-2 | 圆形, 光滑湿润, 乳白色 | 球状 | + |
| XLX-3 | 圆形扁平, 边缘整齐, 乳白色 | 杆状 | - |
| XLX-4 | 圆形凸起, 边缘整齐, 白色 | 球状 | + |
| XLX-5 | 圆形, 光滑, 不透明乳白色 | 杆状 | - |
| XLX-6 | 圆形, 边缘整齐, 扁平, 乳白色 | 杆状 | - |
| XLX-7 | 圆形, 边缘整齐, 扁平, 白色 | 杆状 | - |
| XLX-8 | 圆形粗糙, 白色 | 长杆状 | + |
| XLX-9 | 圆形粗糙, 白色 | 杆状 | + |
| XLX-10 | 圆形粗糙, 白色 | 长杆状 | + |
| XLX-11 | 圆形, 边缘整齐, 乳白色 | 杆状 | - |
| XLX-12 | 圆形, 表面光滑湿润, 微黄 | 球状 | + |
| XLX-13 | 圆形粗糙, 白色 | 杆状 | + |
| XLX-14 | 边缘整齐, 光滑湿润, 黄色 | 短杆状 | + |
| XLX-15 | 圆形粗糙, 白色 | 长杆状 | + |

注: “+”表示革兰氏阳性菌, “-”表示革兰氏阴性菌。

3.2 16S rRNA 序列比对

测定菌株 16S rRNA 基因序列, 登陆 NCBI 网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) 进行序列同源性分析, 根据 Genbank 数据库核苷酸序列比对结果, 同时结合细菌形态特征, 进行菌株的鉴定, 结果如表 2 所示。确定 XLX-2、XLX-4 和 XLX-12 属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*. sp), XLX-1、XLX-8、XLX-9、XLX-10、XLX-13 和 XLX-15 属于白色杆菌属(*Leucobacter*. sp), XLX-3、XLX-6 和 XLX-7 属于变形杆菌属(*Proteus*. sp), XLX-5 和 XLX-11 属于普罗威登斯菌(*Providencia vermicola*), XLX-14 属于节杆菌属(*Arthrobacter*. sp)。已有研究表明葡萄球菌(*Staphylococcus*. sp)和变形杆菌(*Proteus*. sp) 是常见的水产品腐败菌^[12-14]。黄佳奇等^[15]在冷藏小黄鱼优势腐败菌研究中明确表明普罗威登斯菌(*Providencia vermicola*)为优势腐败菌; 赵文红等^[16]在冰鲜鸭优势腐败菌的鉴定研究中分离出节杆菌属(*Arthrobacter*. sp); 黄现恩^[17]在研究中发现白色杆菌属(*Leucobacter*. sp)。

3.3 常用香辛料提取物对腐败菌的抑制实验

本研究选择香辣蟹腐败菌中不同属的 5 种腐败菌作为抑菌实验指示菌, 其中 XLX-4(*Staphylococcus*. sp)、XLX-10(*Leucobacter*. sp)、XLX-14(*Arthrobacter*. sp)为革兰氏阳性腐败菌, XLX-5(*Providencia vermicola*)、XLX-6(*Proteus*. sp)为革兰氏阴性腐败菌, 分别用热水、低浓度乙醇溶液 2 种提取方式模拟传统香辣蟹生产工艺中的

卤煮或料酒糟制的模式制备香辛料提取物, 考察其抑菌特性。表 3、4 为香辛料提取物对 5 种腐败菌抑菌作用结果, 结果显示不同香辛料提取物对不同细菌抑菌效果差异较大, 所选用的 30 种香辛料中分别有 8 种热水浸提物、7 种乙醇提取物对 5 种指示菌有不同程度的抑制作用, 且同一种香料用不同方法所得的提取物的抑菌活性也有显著差异, 因此针对食品中不同的微生物, 应选择合适的天然香辛料进行抑菌才能达到预期效果^[8]。8 种香辛料的热热水浸提物中, 公丁香抑菌活性最强, 对 5 种腐败菌里除了葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp. XLX4)外的其他 4 种均具有抑菌效果, 其他香辛料只对 1~3 种腐败菌起到抑菌作用, 抑菌圈范围为 9.5~18.9 mm。热水浸提公丁香、八角、香砂、千里香、梔子、草寇以及乙醇浸提公丁香均对革兰氏阴性菌变形杆菌属(*Proteus* sp. XLX6)和普罗威登斯菌(*Providencia vermicola* XLX5)具有抑制作用。乙醇浸提物的抑菌活性显著低于热水浸提物, 葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp. XLX4)对乙醇浸提物最敏感, 公丁香对其抑菌圈可达(23.5±2.46) mm, 其它 6 种乙醇提取物也对葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp. XLX4)有不同程度的抑制作用。常见的天然生物防腐剂如茶多酚、百里酚、乳酸链球菌素(nisin)、ε-聚赖氨酸、曲酸、壳聚糖等, 在食品工业中有广泛的研究和应用^[17], 但大部分防腐剂对革兰氏阴性腐败菌抑菌效果很差, 如 nisin^[18]。本研究中筛选到的天然香辛料提取物对革兰氏阳性及阴性腐败菌均有一定的抑菌作用, 在水产食品保存方面有很大的潜在应用价值。

表 2 15 株腐败菌分子生物学鉴定结果
Table 2 Molecular biological identification results of 15 strains of spoilage bacteria

| 菌株编号 | 最具有亲缘关系的菌株 | Accession No. | 最大相似度/% |
|--|---|---------------|---------|
| XLX-1、XLX-8、XLX-9、XLX-10、XLX-13、XLX-15 | <i>Leucobacter tardus</i> R1-6A | HQ154561 | 99 |
| XLX-2、XLX-4、XLX-12 | <i>Staphylococcus sciuri</i> ZLynn1000-43 | KY316479 | 99 |
| XLX-3、XLX-6、XLX-7 | <i>Proteus penneri</i> ALK515 | KC456568 | 99 |
| XLX-5、XLX-11 | <i>Providencia vermicola</i> ALK619 | KC456588 | 99 |
| XLX-14 | <i>Arthrobacter nicotianae</i> BS12 | KR063192 | 99 |

表 3 不同香辛料的热热水提取物的抑菌效果(n=3)
Table 3 Antibacterial effects of different spices extracts in hot water (n=3)

| 菌株编号 | 抑菌圈直径/mm | | | | | | | |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 公丁香 | 八角 | 母丁香 | 梔子 | 香砂 | 千里香 | 草寇 | 良姜 |
| XLX4 | - | - | 14.3±1.03 | 13.9±1.56 | - | - | - | - |
| XLX14 | 23.1±2.04 | 12.9±1.12 | 16.7±1.04 | - | - | - | - | 17.8±1.26 |
| XLX10 | 16.8±2.35 | 12.2±1.25 | - | - | 11.3±2.12 | - | 15.0±2.13 | - |
| XLX5 | 23.7±2.13 | 14.6±1.05 | - | - | 14.3±1.46 | 12.0±2.46 | - | - |
| XLX6 | 23.8±2.56 | 11.1±2.12 | - | 18.8±2.56 | - | - | 12.5±2.43 | - |

注: 表中数据为抑菌圈直径(mm), “-”表示无抑菌效果。下表同。

表 4 不同香辛料的乙醇提取物的抑菌效果(n=3)
Table 4 Antibacterial effects of different spices extracts in ethonal(n=3)

| 菌株编号 | 抑菌圈直径/mm | | | | | | |
|-------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | 公丁香 | 红寇 | 八角 | 甘草 | 陈皮 | 辛夷 | 良姜 |
| XLX4 | 23.5±2.46 | 12.2±1.86 | 15.5±2.03 | 11.0±1.36 | 9.5±2.03 | 11.5±2.04 | - |
| XLX14 | 18.0±2.08- | - | - | - | - | - | - |
| XLX10 | 18.7±2.16 | - | - | - | - | 11.1±1.86 | 13.8±2.24 |
| XLX5 | - | - | - | - | - | - | - |

3.4 香辣蟹的保鲜

根据上述体外抑菌实验结果, 结合香辛料熬煮液的风味和感官评定, 选择卤煮液中香辛料的配方为: 公丁香 10 g, 八角 5 g, 母丁香 1 g, 草寇 0.5 g, 香砂 2 g, 栀子 2 g, 千里香 2 g, 良姜 20 g, 水 3 L; 对照为市售某品牌香辣蟹调味料液, 进行香辣蟹的制作。通过测定产品中的菌落总数初步判断腐败程度^[19,20]。图 1 所示为对照组和实验组在储藏期内的微生物菌落总数, 整个储藏过程中对照组和实验组的菌落数量都呈上升趋势, 实验组菌落总数的增加速度明显低于对照组, 香辛料对香辣蟹腐败微生物的生长具有抑制作用。

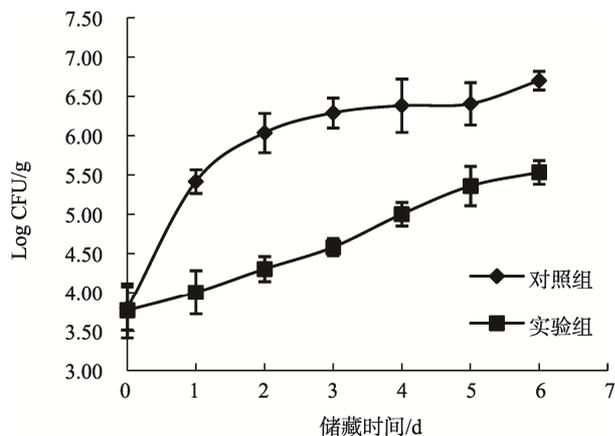


图 1 香辛料对香辣蟹菌落总数的影响(n=3)
Fig.1 Effect of spices on the CFU of spicy crabs (n=3)

挥发性盐基氮的含量一定程度上反映着微生物的生长情况及酶的作用, 蛋白质在酶和微生物的作用下分解产生了氨及含氮碱性物质, 其含量越高, 表明氨基酸被破坏得越多, 特别是蛋氨酸和酪氨酸, 营养价值大受影响, 是判断食品品质的指标, 可以用来鉴定食品的新鲜度^[21]。从图 2 可见, 实验组和对照组 TVB-N 值变化差异明显。储藏过程中对照组 TVB-N 含量迅速增加, 储藏 4 d 后达 32.58 mg/100 g, 而实验组 TBA 值变化幅度不大, 仅从初始 8.29 mg/100 g 的升至 19.28 mg/100g, 5 d 开始超过 20 mg/100 g。本研究选用的香辛料配方明显降低了香辣蟹 TVB-N 值的产生速度, 延长货架期, 保持食品新鲜度。

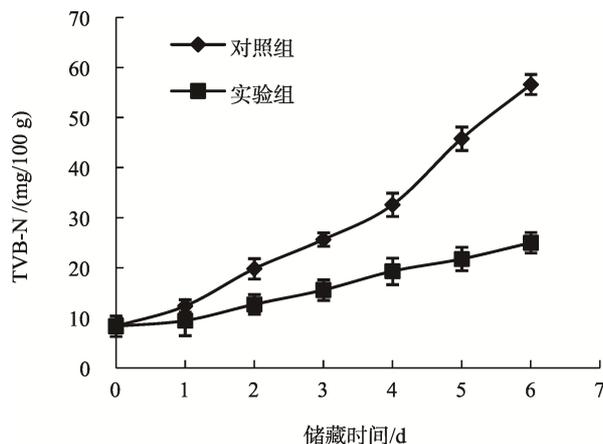


图 2 香辛料对香辣蟹 TVB-N 值的影响(n=3)
Fig.2 Effect of spices on TVB-N value of spicy crabs (n=3)

4 结 论

本文将市售香辣蟹放置腐败后从中分离得到 15 种细菌, 通过菌株形态观察、革兰氏染色、镜检发现 3 株为球菌, 其余均为杆菌, 10 株为革兰氏阳性细菌, 其余为革兰氏阴性细菌。16S rRNA 分子鉴定得到, 3 株属于葡萄球菌属(*Staphylococcus. sp.*), 5 株属于白色杆菌属(*Leucobacter. sp.*), 3 株属于变形杆菌属(*Proteus. sp.*), 2 株属于普罗威登斯菌(*Providencia vermicola*), 1 株属于节杆菌属(*Arthrobacter. sp.*)。采用 2 种不同方法浸提的 30 种香辛料对 5 种不同属指示菌生长的抑制作用差异较大, 其公丁香和八角抑菌效果最强。根据体外抑菌实验结果, 结合香辛料熬煮液的风味和感官评定, 确定了卤煮液中香辛料的配方, 在此基础上通过进一步测定菌落总数和挥发性盐基氮(TVB-N)含量, 表明香辛料不仅对香辣蟹具有增强风味作用, 更重要的是具有抑菌效果, 安全有效的延长食品的保质期。

参考文献

[1] 周道志, 曾凤仙. 关于生物保鲜剂在水产品保鲜中的应用分析[J]. 江西水产科技, 2018, (3): 47-49.
Zhou DZ, Zeng FX. Analysis on the application of biological preservatives in the preservation of aquatic products [J]. Jiangxi Fisher Sci Technol, 2018, (3): 47-49.

- [2] 刘晨. 生物防腐剂及其在食品防腐中的应用[J]. 食品安全导刊, 2017, (15): 130.
Liu C. Biological preservatives and their application in food preservation [J]. China Food Saf Magaz, 2017, (15): 130.
- [3] 单珂, 郭全友, 姜朝军, 等. 生物保鲜剂在水产品保鲜中的应用[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(3): 4-8.
Shan K, Guo QY, Jiang CJ, *et al.* Application of biological preservatives in the preservation of aquatic products [J]. Food Ferment Technol, 2018, 54(3): 4-8.
- [4] 刘蒙佳, 周强, 林海虹. 三种天然香辛料液对冷却肉保鲜效果的研究[J]. 肉类工业, 2013, (11): 43-48.
Liu MJ, Zhou Q, Lin HH. Study on the fresh-keeping effect of three natural spice liquids on cooling meat [J]. Meat Ind, 2013, (11): 43-48.
- [5] 陈文学, 李婷, 侯晓东, 等. 香辛料提取物抑菌作用的研究[J]. 中国酿造, 2007, (9): 12-14.
Chen WX, Li T, Hou XD, *et al.* Study on the antibacterial activity of spice extracts [J]. China Brew, 2007, (9): 12-14.
- [6] Aydin BD. Investigation of antibacterial effects of some medicinal plants and spices on food pathogens [J]. Kafkas Univ Veter Fakult Derg, 2008, 14(1): 83-87.
- [7] Beceril R, Gomez-Lus R, Goni P, *et al.* Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E coli* and *S aureus* [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 388(5-6): 1003-1011.
- [8] 艾有伟, 王丽梅, 闫虎山. 常用香辛料提取物抑菌活性研究[J]. 食品工业, 2018, 39(9): 167-170.
Ai YW, Wang LM, Yan HS. Study on antibacterial activity of common spice extracts [J]. Food Ind, 2018, 39(9): 167-170.
- [9] 刘小莉, 贾洋洋, 夏秀东, 等. 调味料和保鲜剂协同对淡水鱼特征性腐败菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 389-391.
Liu XL, Jia YY, Xia XD, *et al.* Inhibition of seasonings and preservatives on the characteristic spoilage bacteria of freshwater fish [J]. Jiangsu Agric Sci, 2016, 44(8): 389-391.
- [10] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standards-Food microbiology testing-Total number of colonies [S].
- [11] GB 5009.228-2016 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定[S].
GB 5009.228-2016 National food safety standard-Determination of volatile base nitrogen in food [S].
- [12] 于晓慧, 葛孟甜, 林琳, 等. 一株常温保藏即食小龙虾优势腐败菌的分离及鉴定[J]. 肉类工业, 2018, (5): 33-38.
Yu XH, Ge MT, Lin L, *et al.* Isolation and identification of a dominant spoilage bacteria from ready-to-eat crayfish at room temperature [J]. Meat Ind, 2018, (5): 33-38.
- [13] 夏秀东, 刘小莉, 王英, 等. 常温条件下白鱼中特定腐败菌的鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 183-189.
Xia XD, Liu XL, Wang Y, *et al.* Identification of specific spoilage bacteria in whitefish under normal temperature conditions [J]. Food Sci, 2016, 37(19): 183-189.
- [14] 高磊, 谢晶, 叶藻, 等. 冷藏鸡腿肉中优势腐败菌的分离鉴定及腐败能力研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(8): 48-53.
Gao L, Xie J, Ye Z, *et al.* Isolation, identification and spoilage ability of dominant spoilage bacteria in cold fresh chicken legs [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(8): 48-53.
- [15] 黄佳奇, 葛雨琪, 向迎春, 等. 冷藏小黄鱼优势腐败菌致腐能力评价及其对挥发性成分的影响[J]. 食品工业科技, 2018, , 39(16): 230-235, 242.
Huang JQ, Ge YJ, Xiang YC, *et al.* Evaluation of the rotogenic ability of the dominant spoilage bacteria of small yellow croaker and its effect on volatile components [J]. Food Ind Sci Technol, 2018, 39(16): 230-235, 242.
- [16] 赵文红, 林慧珍, 陈海光, 等. 冰鲜鸭优势腐败菌的鉴定[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 728-732.
Zhao WH, Lin HZ, Chen HG, *et al.* Identification of dominant spoilage bacteria in chilled ducks [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(7): 728-732.
- [17] 黄现恩. 几株微囊藻毒素降解菌和溶藻菌的分离鉴定及作用效果[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
Huang XE. Isolation, identification and effect of several microcystins-degrading bacteria and algae-lysing bacteria [D]. Suzhou: Suzhou University, 2015.
- [18] 高乾坤, 杜贺超, 赵云飞, 等. 不同生物保鲜剂对带鱼冷藏保鲜效果的比较[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 270-275.
Gao QK, Du HC, Zhao YF, *et al.* Comparison of different biological preservatives on the cold preservation effect of squid [J]. Food Ind Sci Technol, 2018, 39(22): 270-275.
- [19] 刘晓雪, 葛菁萍, 宋刚, 等. Nisin 的防腐特性及其在食品工业中的应用[J]. 黑龙江医药, 2016, 29(2): 195-199.
Liu XX, Ge JP, Song G, *et al.* Antiseptic properties of Nisin and its application in food industry [J]. Heilongjiang Med, 2016, 29(2): 195-199.
- [20] 蔡路昀, 马帅, 曹爱玲, 等. 香辛料在水产品保鲜应用中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 3935-3940.
Cai LZ, Ma S, Cao AL, *et al.* Research progress of spices in the application of aquatic products preservation [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 3935-3940.
- [21] 董文霞, 王欣. 冷藏秋刀鱼的菌相分析及其优势腐败菌的分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 139-145, 221.
Dong WX, Wang X. Analysis of the bacterial phase of refrigerated saury and its isolation and identification of dominant spoilage bacteria [J]. Mod Food Sci Technol, 2016, 32(11): 139-145, 221.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



图尔荪阿依·图尔贡, 硕士研究生, 主要研究方向为应用微生物。

E-mail: 1577075279@qq.com



刘小莉, 博士, 研究员, 主要研究方向为水产品加工。

E-mail: liuxljaas@hotmail.com