

# 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 测定干制米粉中霉菌和酵母菌

黄玲玲, 杨俊业\*, 严家俊

(广东产品质量监督检验研究院, 佛山 528000)

**摘要: 目的** 建立基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法快速测定干制米粉中霉菌、酵母菌的分析方法。**方法** 采用 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数》对实验室 2021 年至 2022 年所抽检干制米粉进行霉菌、酵母菌检测并分析, 得到 10 株野生菌株, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定。**结果** 经统计, 实验室 2021 年至 2022 年所抽检干制米粉存在真菌污染, 其中霉菌、酵母菌总检出率约为 45.45%。通过 MALDI-TOF MS 鉴定, 10 株野生菌株里, 霉菌占 80%, 酵母菌占 20%。**结论** MALDI-TOF MS 作为一种快速、灵敏、准确、高通量的微生物鉴定技术, 实现了对干制米粉中霉菌酵母菌的特异性快速鉴定, 能够为干制米粉中霉菌酵母菌的检测提供科学依据。

**关键词:** 干制米粉; 霉菌; 酵母菌; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法

## Determination of molds and yeasts in dried rice noodles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

HUANG Ling-Ling, YAN Jia-Jun\*, YANG Jun-Ye

(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an analytical method for the rapid determination of mold and yeast in dried rice noodles based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Methods** GB 4789.15—2016 "National Food Safety Standard Food Microbiological Inspection Mold and Yeast Enumeration" was used to detect and analyze the molds and yeasts of dried rice flour in the laboratory from 2021 to 2022, and 10 wild strains were obtained, and identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Results** According to statistics, the dried rice noodles sampled by the laboratory from 2021 to 2022 are contaminated by fungi, of which the total detection rate of mold and yeast is about 45.45%. Through MALDI-TOF MS identification, among the 10 wild strains, mold accounts for 80% and yeast accounts for 20%. **Conclusion** MALDI-TOF MS, as a rapid, sensitive, accurate and high-throughput microbial identification technology, has realized the rapid and specific identification of mold yeast in dried rice noodles, and can provide scientific basis for the detection of mold yeast in dried rice noodles.

**KEY WORDS:** dried rice noodles; mold; yeast; matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry

\*通信作者: 杨俊业, 工程师, 研究方向为食品及食品相关产品质量安全检测与风险评估。E-mail:353580716@qq.com

\*Corresponding author: YANG Junye, Engineer, Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision, Foshan 528300, China. E-mail:353580716@qq.com

## 0 引言

米粉又称米线、米面条或米粉丝,是一种以大米为主要原料,经过清洗、浸泡、粉碎、熟化与挤压成型等工序加工制成的条状、丝状米制品<sup>[1-2]</sup>。我国以米粉为主食的区域主要为长江流域、珠江流域、东南沿海等地的广大稻米产区,且因地域差异形成了各具特色的地方风味小吃<sup>[3]</sup>。米粉按水分可区分为干米粉和湿米粉<sup>[4]</sup>,其中干米粉具有水分含量低、保质期较长、方便储存运输、口感好等特点,受到大众青睐。干制米粉以大米为主要原料(占比量 $\geq$ 比量粉),选择性添加一种或多种食用淀粉类原料,包括薯类、粮食谷物类原粉,食用淀粉等<sup>[5]</sup>。由于干制米粉的机械化与自动化程度较低,生产过程中部分工序为手工操作,干燥工序所用的温度多控制在 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ <sup>[2,6]</sup>,因此不能有效抑制真菌的繁殖,如果干燥不充分或使用有真菌污染的制作原料,就会出现发霉变质等微生物污染问题,严重影响干制米粉的质量与口感,存在一定的食品安全隐患。

目前对干制米粉有微生物限量标准的只有地方标准 DBS 45/051—2018《食品安全地方标准 干制米粉》,标准规定卫生指示菌指标项目只检霉菌(CFU/g),限量 $\leq 1000$ 。真菌包括霉菌、酵母。干制米粉若被真菌污染,有可能也会长酵母菌。针对霉菌、酵母菌,采用国标 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》<sup>[7]</sup>对实验室 2021 年至 2022 年所抽检干制米粉样品进行检测,得到 10 株野生菌株,进行形态特征鉴定和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析鉴定。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS),是近年发展起来的一种高分辨检测技术,其原理是菌株样本与基质形成共结晶,在激光照射下,基质从激光中吸收能量,传递给菌株样本,使其瞬间汽化,并将质子转移到样品分子使其离子化,分子量不同,到达飞行时间质量分析器的时间也不同,由此生成不同的蛋白图谱,通过检测微生物自身独特的蛋白质指纹图谱来鉴定微生物<sup>[8-10]</sup>。

目前,传统的微生物法鉴定真菌是采用肉眼观察菌株在培养基上和镜检下的形态特征,对实验人员的要求较高,且耗费时间较长。MALDI-TOF MS 作为一种灵敏度高、准确性高、通量高、操作简便、鉴定快速的微生物检测技术,已成熟应用于食品中微生物检测。种婷等利用 MALDI-TOF MS 检测副溶血性弧菌<sup>[11]</sup>。杨纯佳等利用 MALDI-TOF MS 检测婴幼儿食品中蜡样芽孢杆菌<sup>[12]</sup>。史方等采用致病菌快速检测管联合 MALDI-TOF MS 技术鉴定即食食品中的

大肠埃希氏菌 O157:H7<sup>[8]</sup>。但是尚未有利用 MALDI-TOF MS 检测真菌的相关报道。本研究选用丝状真菌处理流程对干制米粉样品中的霉菌、酵母菌进行前处理,利用 MALDI-TOF MS 鉴定,以期快速准确鉴定干制米粉中霉菌、酵母菌的检测方法提供科学依据,缩短检验周期、降低检验难度。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

(1) 样品来源:2021 年至 2022 年本实验室所抽检干制米粉,包括政府的监督抽检及企业的委托任务。

(2) 培养基及试剂:孟加拉红琼脂培养基(购自北京陆桥技术股份有限公司);质谱样本预处理试剂(购自安图生物工程股份有限公司);微生物质谱鉴定校准品(购自安图生物工程股份有限公司);质谱样品处理基质溶液(购自安图生物工程股份有限公司)。

(3) 仪器:Ba01Eb149Q 生物显微镜(型号 XSZ-H, 购自重庆光电仪器有限公司);B01E1094 微生物质谱仪(型号 Autof ms600, 购自安图生物工程股份有限公司);各种规格移液器(购自德国 Eppendorf 股份公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 干制米粉中霉菌、酵母菌的分离<sup>[7]</sup>

取干制米粉样品 10 倍梯度稀释,选择 2~3 个适宜稀释度的样品匀液体,每个平皿加入 1 mL 稀释度,每个稀释度做 2 个平行,倾注孟加拉红琼脂培养基, $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。

#### 1.2.2 霉菌、酵母菌的鉴定

(1) 形态特征鉴定:参照鉴定手册<sup>[13-14]</sup>先对菌株进行肉眼观察,包括菌落颜色、大小、质地、气味等;再制成玻片标本使用普通光学显微镜观察,包括菌落形态、菌丝、孢子形态等。

(2) 菌株鉴定:采用微生物质谱仪对菌株进行鉴定,准备已培养好的菌株,向 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 75%的乙醇。在生物安全柜中,用 Tip 头(移液器吸头)或牙签从培养基表面刮取

适量菌丝或孢子(应避免取到培养基)放入上述离心管中洗涤,用移液枪反复吹打,或涡旋振荡 1 min。13 000 r/min 离心 2 min,小心除去上清液。再次 13 000 r/min 离心 2 min,尽可能地除去上清液。37~40 $^{\circ}\text{C}$ 干燥菌体 2~5 min。根据菌体量加入 30~50  $\mu\text{L}$  70%甲酸溶液,静置 5~10 min,用移液枪轻轻吹打,直至菌丝裂解。取 1  $\mu\text{L}$  液体点于靶板上,自然晾干。加 1  $\mu\text{L}$  液基质溶液覆盖在上述样品点上,自然

晾干后,将样品靶放入质谱仪进行鉴定。

本实验室 2021—2022 年抽检的干制米粉中霉菌、酵母检测结果见表 1,鉴定结果见表 2。

## 2 结果与分析

表 1 2021—2022 年抽检的干制米粉中霉菌、酵母检测结果  
Table 1 Detection results of mold and yeast in dried rice noodles sampled from 2021—2022

编号	生产厂家	样本名称	霉菌/(CFU/g)	酵母/(CFU/g)	编号	生产厂家	样本名称	霉菌/(CFU/g)	酵母/(CFU/g)
1	A	柳州螺蛳粉(菌菇)	< 10	< 10	12	H	柳州螺蛳粉(水煮型)	< 10	< 10
2	A	柳州螺蛳粉(原味)	< 10	< 10	13	I	柳州螺蛳粉	< 10	< 10
3	B	柳州螺蛳粉	< 10	< 10	14	I	柳州螺蛳粉	$3.0 \times 10^4$	< 10
4	B	柳州螺蛳粉	< 10	< 10	15	J	柳州螺蛳粉	11 000	< 10
5	C	螺蛳粉	< 10	< 10	16	J	麻辣味柳州螺蛳粉	< 10	< 10
6	D	柳州螺蛳粉	< 10	< 10	17	K	螺蛳粉	20	< 10
7	E	柳州螺蛳粉	< 10	30	18	K	柳州螺蛳粉	30	< 10
8	E	麻酱米线	< 10	4 000	19	K	柳州螺蛳粉	30	< 10
9	F	螺蛳粉	< 10	< 10	20	L	柳州螺蛳粉	560	< 10
10	G	柳州螺蛳粉	< 10	< 10	21	L	柳州螺蛳粉	130	< 10
11	H	柳州螺蛳粉(水煮型)	< 10	< 10	22	M	柳州螺蛳粉	14 000	< 10

表 1 显示,本实验室 2021—2022 年所抽的 22 份干制米粉中检出 10 份霉菌、酵母菌污染样品,总检出率约为 45.45%,其中检测出霉菌的阳性样品 8 份,检出率约为 36.36%。根据 DBS 45/051—2018《食品安全地方标准 干制米粉》霉菌(CFU/g)限值 $\leq 1\ 000$ 判断,有 3 份霉菌数量不合格,不合格率约为 13.64%;检测出酵母菌的阳性样品 2 份,检出率约为 9.09%,因

没有酵母菌限值标准,不做合格判定。在检出的阳性菌中,霉菌占总检出率的 80%,酵母菌占 20%;干制米粉中存在真菌污染,包括霉菌、酵母菌,检出的主要为霉菌。由于霉菌和酵母菌能抵抗热、冷冻,以及抗菌素和辐照等贮藏及保藏技术,因此能在低 pH 值、低湿度、高盐和高糖的食品(例如干制米粉)中生长<sup>[15]</sup>。

表 2 2021—2022 年抽检的干制米粉中霉菌、酵母鉴定结果  
Table 2 Identification results of mold and yeast in dried rice noodles sampled from 2021 to 2022

编号	菌落形态及镜检结果	微生物质谱仪鉴定	得分
7、8	菌落呈粉色,表面隆起,褶皱,边缘整齐,边缘有菌丝,直径 0.5~1.5 cm,关节孢子丰富,末端呈圆形,有芽生孢子	阿萨西毛孢子菌	9.365、9.032
14	菌落为白色棉絮状,生长迅速,分生孢子呈串珠状排列,无厚壁孢子	串珠镰刀菌	9.315
15	在孟加拉红琼脂培养基上生长速度较快,菌丝初为白色,后变为灰色,反面无色。菌丝无隔,有分枝,与孢囊梗相对生出假根,孢囊孢子球形	微小根毛霉	9.055
17、18、19	菌体为粉色,表面菌丝为棉絮状,开始为白色,继续培养变为灰色,中央缀有灰黑色孢子囊颗粒,直径 2~3 cm;孢子囊为球形,有囊托、囊轴、假根,囊轴近球形	小孢根霉(科恩根霉)	9.095、9.315、9.502
20	菌落呈绒毛状,开始为白色,继续培养变成灰色,有匍匐枝和直立枝,有假根,有球形孢子囊	黑根霉	9.246
21	菌丝初为棉绒状,继续培养有放射状沟纹,灰绿色,直径 3~4 cm,边缘为绒毛状,有分生孢子,分生孢子近球形,分生孢子梗为帚状枝	橘青霉	9.043
22	菌体为粉色,表面菌丝为棉絮状,开始为白色,继续培养变为灰色,中央缀有灰黑色孢子囊颗粒,直径 2~3 cm;孢子囊为球形,有囊托、囊轴、假根	小孢根霉	9.312

表2显示,2021—2022年本实验室所抽干制米粉中检出的霉菌、酵母菌,通过菌落形态观察,无法轻易判断其属于霉菌还是酵母菌,但是按照标准<sup>[5]</sup>,只有检出霉菌,且霉菌数量 $\geq 1000$ ,才能判定为不合格,因此对霉菌还是酵母菌的判定尤为重要。

微生物质谱仪采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术鉴定病原菌,鉴定分数为10分制,鉴定分数在9.5~10.0区间内,表明该匹配结果种水平置信,即可能的亚种;分数在9.0~9.5区间内,表明该匹配结果种水平置信;分数在6.0~9.0区间内,表明该匹配结果属水平置信;鉴定分数在0.0~6.0区间内,表明该匹配结果不可置信。表2显示,通过MALDI-TOF MS鉴定,得分均在9.0以上,鉴定分值均达到种水平置信以上,结果可靠。

传统的真菌鉴定主要以其形态特征为依据,但真菌的形态较复杂,不同的观察者对病原真菌的各种形态有不同的认定<sup>[13]</sup>,因此传统的鉴定方法对技术人员要求较高,需要技术人员对霉菌和酵母菌的鉴定有较为丰富的经验,且耗费时间较长。相比传统的鉴定方法,MALDI-TOF MS鉴定菌株快速且准确,准确度高达0.1%~0.01%<sup>[16-17]</sup>。

### 3 结论

食品安全关乎公众健康,是世界共同关注的问题。本研究发上市售干制米粉中存在真菌包括霉菌、酵母菌污染,对公众的健康构成威胁,为保障干制米粉的食品安全,建议干制米粉生产企业采取控制措施,相关部门应加强监督管理。此外,在干制米粉检出的阳性菌中,霉菌占总检出率的80%,酵母菌占20%,但是目前相关标准中只规定了霉菌限值,没有检测酵母菌,建议标准制定相关部门增加干制米粉中酵母菌的检测及限量标准,保障消费者的食品安全健康。

简单、快捷、准确的检测技术在保障食品安全方面具有重大意义,在实际检测过程中发现MALDI-TOF MS作为一种快速、灵敏、准确、高通量的微生物鉴定技术,实现了对干制米粉中霉菌、酵母菌的特异性快速鉴定,相对于传统检测方法,MALDI-TOF MS技术成本低廉,操作简单,能够缩短检验周期、降低检验难度,为干制米粉中霉菌、酵母菌的检测提供强有力的鉴定手段。

### 参考文献

[1] 刘嘉,吕都,唐健波,等.马铃薯米粉与纯米粉品质的分析

比较[J].现代食品科技,2018,34(1):45-51.

- [2] 黄维安,蒙毅,陈磊,等.干米粉加工中常见问题原因分析与对策[J].粮油食品科技,2020,28(6):158-165.
- [3] 罗婧,闫冰华.“米粉”称谓的历史探源[J].广西师范大学学报:哲学社会科学版,2015,51(2):155-158.
- [4] 何胜军,付赖鹏,张志明,等.我国干湿米粉的标准探讨[J].粮食与饲料工业,2019,(2):1-4,7.
- [5] 食品安全地方标准干制米粉:DBS 45/051 1-分析[S/OL].(2020-10-11).[http://wsjkw.gxzf.gov.cn/spaqyyyzs\\_49672/spaqdfbz/P020201011862500903982.pdf](http://wsjkw.gxzf.gov.cn/spaqyyyzs_49672/spaqdfbz/P020201011862500903982.pdf).
- [6] 吕莹果,高静丹,陈洁,等.米粉干燥工艺的研究[J].粮食与饲料工业,2012,(6):25-27.
- [7] 食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数:GB 4789.15—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [8] 史方,李苛,阴甜甜,等.致病菌快速检测管联合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法鉴定即食食品中的大肠埃希氏菌 O157:H7[J].食品安全质量检测学报,2023,14(1):253-260.
- [9] 周月霞,胡成进,陈英剑.MALDI.学报基质辅助微生物鉴定数据库应用研究进展[J].临床检验杂志,2016,34(6):447-450.
- [10] 王晓青,陈栓虎.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在聚合物表征中的应用[J].质谱学报,2008,29(1):51-59.
- [11] 种婷,董慧明,刘竟,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法检测副溶血性弧菌[J].食品安全质量检测学报,2022,13(6):1866-1871.
- [12] 杨纯佳,蒋轩,张娟,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法在婴幼儿食品蜡样芽胞杆菌检测中的应用[J].中国乳业,2022,(11):81-84.
- [13] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M].胡瑞卿,译.青岛:青岛海洋大学出版社,1991:159-162.
- [14] Harrigan W F 食品微生物实验室手册[M].李卫华,等译.北京:中国财政经济出版社,2004:248-264.
- [15] 李雨哲,王君.东北地区市售干酪中霉菌、酵母情况调查及标准探讨[J].中国乳品工业,2017,45(9):45-49.
- [16] 黄丽群.一种新型凝胶电泳技术 05SAR-PAGE 的建立、应用及机制研究[D].北京:中国科学院大学,2021.
- [17] 张海玲.高效液相色谱技术在红曲中细菌分离、分析中的应用[D].福州:福州大学,2016.

(责任编辑:吴华)

### 作者简介



黄玲玲,工程师,主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail:345805309@qq.com



杨俊业,工程师,研究方向为食品及食品相关产品质量安全检测与风险评估。

E-mail:353580716@qq.com