

不同抑菌方法在食品防腐剂效果 评价方面的比较*

曾维才, 谭敏, 张佳琪

(四川大学食品科学与技术四川省重点实验室 成都 610065)

摘要: 为研究不同抑菌方法对食品防腐剂效果评价的影响, 本实验以山梨酸钾和苯甲酸钠为代表, 通过包埋、涂布两种接菌方式同打孔法、滤纸片法及牛津杯法的两两组合, 比较不同抑菌方法对抑菌圈实验结果的影响。结果显示, 不同抑菌方法对食品防腐剂效果的评价有明显影响。当指示菌为细菌时, 采用包埋法和牛津杯法相结合的实验技术能较好地体现防腐剂的防腐作用; 当指示菌为真菌及酵母时, 采用涂布接菌与打孔法相结合的技术能较为准确地评价其抑菌效果。

关键词: 抑菌方法; 食品防腐剂; 防腐效果

Effect of different inhibitory methods on the antimicrobial activity of preservative

Zeng Weicai, Tan Min, Zhang Jiaqi

(The Key Laboratory of Food Science and Technology of Sichuan Province,
Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: To investigate the effect of different inhibitory methods on the determination of antimicrobial activity of preservative, different experimental methods such as embedding, spreading, burrow, filter paper and Oxford cup were used. The obvious differences were observed. From all the results in the experiments, the inhibitory methods of embedding and Oxford cup were suitable for bacteria, spreading and burrow were better for fungi.

Key words: inhibitory method; preservative; antimicrobial activity

1 引言

食品是一种含有大量水分及丰富营养的物质^[1]。在长时间的贮存、运输和销售过程中, 食品容易出现长毛、产气、变酸、变臭等腐败现象^[2], 微生物的生长是导致食品腐败的主要原因^[3]。食品的腐败变质不仅影响了食品的安全性, 也阻碍了食品工业的发展^[4]。

食品防腐剂是一种应食品防腐的需要而产生, 并能有效防止由微生物引起的食品腐败变质、延长食品保藏期的食品添加剂^[5]。通过与冷藏、罐藏、腌渍等多种方法的配合使用, 食品防腐剂能有效地抑制食品中微生物的生长, 显著地防止食品的腐败^[6]。此外, 食品防腐剂还有助于提高食品的食用价值^[7-8]。因此, 作为一种重要的食品添加剂, 食品防腐剂在食品生产中有广泛的应用。

* 项目基金: 国家自然科学基金(31071489); 四川大学创新实验计划支持项目(2010-460)

抗菌能力是评价食品防腐剂效果的一项重要指标,不同的抑菌实验方法又对食品防腐剂抗菌能力的评价有较大影响。因此,本文以常见的食品防腐剂山梨酸钾及苯甲酸钠^[9]为代表,研究不同抑菌实验方法对食品防腐剂效果评价的影响,为其效果的准确评价提供一种科学、合理的实验技术。

2 材料与方法

2.1 供试菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922),变形杆菌(*Proteus vulgaris* ATCC49132),沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* ATCC14028),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC21216),蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* ATCC10231),侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus* Laubach ATCC64),黄曲霉(*Aspergillus flavus* ATCC204304),黑曲霉(*Aspergillus niger* ATCC16404),根霉(*Rhizopus oryzae* ATCC9363),青霉(*Penicillium citrinum* ATCC14994),啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763)等菌种由四川大学食品科学与技术四川省重点实验室提供。

2.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基,供被试细菌生长;土豆培养基,供被试真菌和酵母生长^[10]。

2.3 试剂与仪器

0.5%山梨酸钾溶液:0.5 g山梨酸钾溶于100 mL纯水,并用1 mol/L HCl调节至最适pH值4.50,0.22 μm细菌过滤器过滤除菌备用。

0.5%苯甲酸钠溶液:0.5 g苯甲酸钠溶于100 mL纯水,并用1 mol/L HCl调节至最适pH值3.50,0.22 μm细菌过滤器过滤除菌备用。

电子分析天平,酸度计,高压灭菌锅,超净工作台,恒温培养箱等。

2.4 实验方法

2.4.1 包埋法含菌双碟平板的制备^[11]

先将各供试菌种在培养基上进行活化,然后挑取菌苔用无菌水进行稀释,配制成含菌数为 10^8 /mL左右的菌悬液,于30℃,200 r/min的摇

床振荡混匀30 min。待预先准备好,并经高温高压(牛肉膏蛋白胨培养基:121℃,20 min;土豆培养基:115℃,30 min)灭菌的培养基温度降到50~60℃时,将制备好的菌悬液倒入培养基中(菌悬液和培养基的体积比取1:10),充分混合均匀,制成包埋法含菌双碟平板,冷却备用。

2.4.2 涂布法含菌双碟平板的制备

菌悬液的准备及培养基的灭菌同2.4.1,将高温高压灭菌后的培养基制成不含菌的平板。待平板冷却后,吸取准备好的菌悬液200 μL注入平板,用细菌涂布棒将其均匀涂布于培养基表面,制成涂布法含菌双碟平板。

2.4.3 打孔法抑菌实验^[12]

直径6 mm的培养基打孔器121℃高压灭菌备用。取制备好的含菌双碟平板,于超净工作台内用打孔器在平板中央位置打孔。孔内注入0.5%山梨酸钾溶液(或0.5%苯甲酸钠溶液)200 μL,然后放入各菌种适宜的温度下培养(细菌于37℃培养24 h,霉菌于37℃培养72 h,酵母菌于37℃培养24 h),观察各平板抑菌圈直径大小。每组4个平板,抑菌圈直径取平均值。

2.4.4 滤纸片扩散法抑菌实验^[13]

滤纸用打孔器制作成直径为6 mm的圆形滤纸片,121℃高压灭菌后干燥备用。于超净工作台内将双层滤纸片放置于含菌双碟平板中央,吸取0.5%山梨酸钾溶液(或0.5%苯甲酸钠溶液)200 μL缓慢滴于滤纸片上,待样品液被滤纸片吸收完全后,将平板按2.4.3所述,放入培养箱培养,观察各平板抑菌圈直径大小。

2.4.5 牛津杯法抑菌实验^[14]

直径6 mm牛津杯分别用自来水、纯水、无水乙醇清洗,121℃高压灭菌后干燥备用。于超净工作台内将已冷却的牛津杯放置于含菌双碟平板表面,吸取0.5%山梨酸钾溶液(或0.5%苯甲酸钠溶液)200 μL注入牛津杯杯体内。按2.4.3所述实验操作进行培养,观察各平板抑菌圈直径大小。

2.4.6 统计学分析

每组实验重复操作三次,使用SPSS12.0对实验结果进行统计学分析,显著性差异 $p < 0.05$ 。实验结果采用平均值+标准差的形式表示。

3 结果与分析

3.1 不同抑菌实验方法对山梨酸钾防腐效果的影响

表 1 和表 2 显示了不同抑菌实验方法对山梨酸钾防腐效果的影响。分析抑菌圈实验结果可知,山梨酸钾对细菌的抑制作用强于真菌及酵母。由表 1 可以看出,通过将微生物包埋入培养基,山梨酸钾在不同抑菌方法条件下对微生物抑制作用的强弱顺序为:牛津杯法 > 打孔法 > 滤纸片法(细菌);打孔法 > 滤纸片法 > 牛津杯法(真菌及酵母)。表 2 为涂布法条件下,不同抑菌方法对山梨酸钾防腐效果的影响,其强弱顺序为:牛津杯法 > 滤纸片法 > 打孔法(细菌);打孔法 > 滤纸片法 > 牛津杯法(真菌及酵母)。可见,在包埋和涂布两种接菌方式下,牛津杯法和打孔法能分别使山梨酸钾对细菌、真菌及酵母的抑制效果明显化,利于其防腐作用的准确分析。

3.2 不同抑菌实验方法对苯甲酸钠防腐效果的影响

不同抑菌实验方法对苯甲酸钠防腐效果的影响见表 3 及表 4。由表 3 可见,在包埋法条件下,不同抑菌方法对苯甲酸钠抑菌效果影响的强弱顺序为:牛津杯法 > 滤纸片法 > 打孔法(细菌);打孔法 > 滤纸片法 > 牛津杯法(真菌及酵母)。表 4 数据显示,采用涂布接菌的方式,不同方法抑菌效果的强弱顺序为:牛津杯法 > 滤纸片法 > 打孔法(细菌);打孔法 > 滤纸片法 > 牛津杯法(真菌及酵母)。

不同的接菌方式使菌体在培养基内分布的均匀程度不同。同涂布法相比,包埋法能较好地使细菌在培养基内均匀分布,而涂布法有利于真菌的基内菌丝及气生菌丝的形成,能较好地促进真菌及酵母的生长。

与打孔法和滤纸片法相比,牛津杯可使目标物均匀缓慢地分布渗透到平板中,有助于微生物与防腐剂地良好作用,使得形成的抑菌圈外形规则,便于数据的测量,利于对防腐剂效果的准确评价。

表 1 0.5% 山梨酸钾溶液包埋法抑菌圈实验结果

Table 1 Antimicrobial activity of potassium sorbate (0.5%) determined by embedding method

供试菌株	包埋法		
	打孔法	滤纸片法	牛津杯法
细菌			
革兰氏阴性菌			
大肠杆菌	21.07 ± 0.46	17.40 ± 0.22	23.07 ± 0.69
变形杆菌	20.43 ± 0.74	17.27 ± 0.39	22.67 ± 0.52
沙门氏菌	20.23 ± 0.27	16.47 ± 0.27	22.70 ± 0.50
革兰氏阳性菌			
金黄色葡萄球菌	21.27 ± 0.49	17.33 ± 0.21	24.17 ± 0.58
枯草芽孢杆菌	19.70 ± 0.49	17.03 ± 0.58	21.03 ± 0.58
蜡状芽孢杆菌	20.33 ± 0.74	17.00 ± 0.62	21.70 ± 0.75
侧孢芽孢杆菌	19.83 ± 0.65	17.27 ± 0.62	21.37 ± 0.69
真菌			
黄曲霉	8.87 ± 0.49	8.17 ± 0.12	6.93 ± 0.45
黑曲霉	8.80 ± 0.75	7.40 ± 0.37	6.80 ± 0.33
根霉	8.60 ± 0.24	8.00 ± 0.16	6.83 ± 0.34
青霉	8.93 ± 0.33	7.63 ± 0.29	6.90 ± 0.45
酵母			
啤酒酵母	8.77 ± 0.33	7.70 ± 0.41	7.07 ± 0.48

表2 0.5%山梨酸钾溶液涂布法抑菌圈实验结果

Table 2 Antimicrobial activity of potassium sorbate (0.5%) determined by coating method

供试菌株	涂布法		
	打孔法	滤纸片法	牛津杯法
细菌			
革兰氏阴性菌			
大肠杆菌	13.33 + 0.31	16.63 + 0.25	18.17 + 0.26
变形杆菌	13.37 + 0.45	16.40 + 0.37	17.70 + 0.43
沙门氏菌	12.70 + 0.41	15.97 + 0.33	17.87 + 0.73
革兰氏阳性菌			
金黄色葡萄球菌	13.03 + 0.42	16.13 + 0.52	18.23 + 0.21
枯草芽孢杆菌	12.87 + 0.58	15.87 + 0.45	18.27 + 0.41
蜡状芽孢杆菌	12.80 + 0.29	15.73 + 0.33	17.90 + 0.16
侧孢芽孢杆菌	13.17 + 0.50	16.13 + 0.68	18.37 + 0.45
真菌			
黄曲霉	8.87 + 0.46	8.13 + 0.33	6.73 + 0.31
黑曲霉	9.00 + 0.59	7.27 + 0.25	6.87 + 0.39
根霉	8.77 + 0.21	8.03 + 0.45	7.20 + 0.51
青霉	9.10 + 0.24	7.57 + 0.25	6.77 + 0.33
酵母			
啤酒酵母	9.73 + 0.34	8.27 + 0.25	6.77 + 0.21

表3 0.5%苯甲酸钠溶液包埋法抑菌圈实验结果

Table 3 Antimicrobial activity of sodium benzoate (0.5%) determined by embedding method

供试菌株	包埋法		
	打孔法	滤纸片法	牛津杯法
细菌			
革兰氏阴性菌			
大肠杆菌	19.90 + 0.49	16.90 + 0.33	20.87 + 0.21
变形杆菌	19.40 + 0.14	16.90 + 0.43	21.03 + 0.45
沙门氏菌	19.80 + 0.57	17.00 + 0.59	20.77 + 0.21
革兰氏阳性菌			
金黄色葡萄球菌	19.67 + 0.12	17.07 + 0.34	21.13 + 0.41
枯草芽孢杆菌	19.50 + 0.36	16.77 + 0.21	21.00 + 0.33
蜡状芽孢杆菌	19.73 + 0.45	17.07 + 0.29	21.13 + 0.21
侧孢芽孢杆菌	19.67 + 0.29	16.97 + 0.41	20.90 + 0.24
真菌			
黄曲霉	8.17 + 0.29	8.40 + 0.36	6.70 + 0.24
黑曲霉	8.21 + 0.41	7.83 + 0.21	6.67 + 0.24
根霉	8.35 + 0.29	7.60 + 0.29	6.60 + 0.29
青霉	8.27 + 0.62	7.73 + 0.25	7.07 + 0.33
酵母			
啤酒酵母	8.70 + 0.16	7.70 + 0.29	7.07 + 0.29

表 4 0.5% 苯甲酸钠溶液涂布法抑菌圈实验结果

Table 4 Antimicrobial activity of sodium benzoate (0.5%) determined by coating method

供试菌株	涂布法		
	打孔法	滤纸片法	牛津杯法
细菌			
革兰氏阴性菌			
大肠杆菌	13.40 + 0.41	14.93 + 0.34	17.90 + 0.57
变形杆菌	12.50 + 0.37	15.53 + 0.33	17.97 + 0.52
沙门氏菌	13.07 + 0.27	15.10 + 0.67	17.89 + 0.50
革兰氏阳性菌			
金黄色葡萄球菌	12.47 + 0.33	15.10 + 0.65	18.03 + 0.21
枯草芽孢杆菌	12.87 + 0.52	15.27 + 0.29	17.47 + 0.24
蜡状芽孢杆菌	12.70 + 0.37	15.13 + 0.65	18.17 + 0.49
侧孢芽孢杆菌	12.73 + 0.50	15.03 + 0.52	17.77 + 0.33
真菌			
黄曲霉	8.97 + 0.21	7.37 + 0.41	6.70 + 0.33
黑曲霉	8.50 + 0.16	7.17 + 0.37	6.70 + 0.57
根霉	8.70 + 0.49	7.33 + 0.25	6.93 + 0.54
青霉	8.80 + 0.33	7.23 + 0.31	6.63 + 0.17
酵母			
啤酒酵母	9.47 + 0.21	6.77 + 0.41	6.43 + 0.21

4 结 论

不同的抑菌实验方法对食品防腐剂效果的评价有明显影响,当指示菌为细菌时,采用包埋法和牛津杯法相结合的实验技术能较好地体现防腐剂的防腐作用;当指示菌为真菌及酵母时,采用涂布接菌与打孔法相结合的技术能较为准确地评价其抑菌效果。

L-HYP 含量的需求。实验所购 5 个明胶样品中 L-羟脯氨酸的含量在 13.5 ~ 15.2% 之间,含量相差较小。在制定允许添加明胶,而同时又有蛋白质指标要求的食品中的含氮量标准时,利用该方法测定明胶中的 L-羟脯氨酸能够为其标准提供依据。

参考文献

[1] 林科. 食品防腐剂的种类及其研究进展[J]. 广西轻工业, 2009, 10: 9-11.

LIN K. The types of food preservatives and research progress [J]. Guangxi Journal of Light Industry, 2009, 10: 9-11.

[2] 王燕, 车振明. 食品防腐剂的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(5): 167-170.

WANG Y, CHE ZH M. The progress of antiseptic research [J]. Food Research and Development, 2005, 26(5): 167-170.

[3] 王若峰, 宁正祥, 谭龙飞. 食品防腐剂研究进展述评[J]. 广州食品工业科技, 1995, 1: 72-75.

WANG R F, NING ZH X, TAN L F. Development of the studies on food preservatives [J]. Guangzhou Food Science and Technology, 1995, 1: 72-75.

[4] 杨楠, 陈洪仪. 三种食品防腐剂的抑菌效果研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(1): 189-192.

YANG N, CHEN H Y. Antibacterial activity of three food preservatives [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(1): 189-192.

[5] 万素英, 李琳, 王慧君. 食品防腐与食品防腐剂(第一版) [M]. 北京, 中国轻工业出版社, 1998: 25-43.

- WAN S Y, LI L, WANG H J. Food preservation and food preservatives (1st edition) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 25-43.
- [6] 郭新竹, 宁正祥, 胡新宇, 等. 食品防腐剂作用机理的研究进展[J]. 食品科技, 2001, 5: 40-42.
- GUO X ZH, NING ZH X, HU X Y, et al. Some research advance in action mechanism of preservatives [J]. Food Science and Technology, 2001, 5: 40-42.
- [7] 肖素荣, 李京东. 天然食品防腐剂及其发展前景[J]. 中国食物与营养, 2007, 6: 30-33.
- XIAO S R, LI J D. The development of natural food preservatives [J]. Chinese Food and Nutrition, 2007, 6: 30-33.
- [8] 王绍美, 卿晓红, 黄美霞. 天然抗氧化剂控制草莓加工中 VC 损失效应研究[J]. 食品科学, 2001, 22(1): 56-59.
- WANG SH M, QING X H, HUANG M X. Study on natural antioxidant control of Vc loss in strawberry processing [J]. Food Science, 2001, 22 (1): 56-59.
- [9] 石立三, 吴清平, 吴慧清, 等. 我国食品防腐剂应用状况及未来发展趋势[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3), 157-161.
- SHI L S, WU Q P, WU H Q, et al. Present situation and trend of development on food preservations in china [J]. Food Research and Development, 2008, 29(3), 157-161.
- [10] 杨洁彬, 李淑高, 周维新, 等. 食品微生物学(第二版)[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 2004, 97-115.
- YANG J B, LI S G, ZHOU W X, et al. Food microbiology (2nd Edition) [M]. Beijing: Beijing Agriculture University Press, 2004: 97-115.
- [11] 曾维才, 贾利蓉. 松针提取物抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 87-90.
- ZENG W C, JIA L R. Antimicrobial activities of pine needle extracts [J]. Food Science, 2009, 30 (7): 87-90.
- [12] 王世强. 打孔法测定抗生素的效价[J]. 生物学通报, 2005, 40(3): 2.
- WANG S Q. Determination the activity of antibiotics by burrow method [J]. Bulletin of Biology, 2005, 40(3): 2.
- [13] 张佳, 王莹, 张峰, 等. 滤纸片法测定黄花蒿提取物对霉菌的抑制活性[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1153-1154.
- ZHANG J, WANG Y, ZHANG F, et al. Measuring the antiseptic activity of extracts from Artemisia Annu. L. to mold with the filter paper method [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2009, 48 (5): 1153-1154.
- [14] 刘健, 王海雁, 赵淑江. 牛津杯法测定五倍子对大黄鱼病原弧菌的体外抑菌活力[J]. 海洋科学, 2009, 33(11): 44-47.
- LIU J, WANG H Y, ZHAO SH J. Determination of the antibacterial activity of Galla chinensis on pathogen vibrio of Pseudosciaena crocea by Oxford plate [J]. Marine Sciences, 2009, 33(11): 44-47.

作者简介

曾维才, (1986-), 男, 四川大学轻纺与食品学院硕士研究生, 研究方向: 食品中生物活性物质的研究、食品微生物技术。

E-mail: weicaizeng@126.com



Zeng Weicai, male, master of Sichuan University, and he is engaged in the work of active substance in food and food microorganism.