

臭氧水对鲜湿面表面金黄色葡萄球菌的 杀菌效果及其储藏安全控制研究

索 标^{1,2,3}, 侯金会¹, 常玉婷¹, 王 瑞¹, 马静一², 李 真², 黄忠民³, 艾志录^{1,2,3*}

(1. 河南农业大学食品科学技术学院, 郑州 450002; 2. 农业部大宗粮食加工重点实验室, 郑州 450002;
3. 速冻面米及调制食品河南省工程实验室, 郑州 450002)

摘要: 目的 研究臭氧水对鲜湿面中金黄色葡萄球菌的杀菌作用, 及天然抑菌剂对鲜湿面储藏过程中金黄色葡萄球菌的抑制效果。**方法** 臭氧水浓度为 0~20 mg/mL, 处理温度为 20~60 °C, 处理时间为 0~20 min, 分析不同条件下臭氧水对鲜湿面表面金黄色葡萄球菌的杀菌效果, 后结合 ϵ -聚赖氨酸的添加量范围为 0%~0.03% 储藏, 研究抑菌剂对鲜湿面中金黄色葡萄球菌的抑制效果。**结果** 臭氧水浓度为 20 mg/mL, 处理温度为 60 °C, 处理时间为 15 min 时, 能对金黄色葡萄球菌产生良好的杀菌效果, 该条件下预处理能降低鲜湿面表面的金黄色葡萄球菌至 4.3 lgCFU/g, ϵ -聚赖氨酸的添加量为 0.03% 时对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好。**结论** 降低鲜湿面表面金黄色葡萄球菌的起始值和储藏中添加抑菌剂结合冷链条件能有效的控制金黄色葡萄球菌的数量, 在鲜湿面加工业中对金黄色葡萄球菌的控制具有一定的指导意义。

关键词: 鲜湿面; 臭氧水; 金黄色葡萄球菌; 杀菌; 天然抑菌剂; 抑菌

Study on the bactericidal effect of ozone water on *Staphylococcus aureus* on fresh wet surface and its storage safety control

SUO Biao^{1,2,3}, HOU Jin-Hui¹, CHANG Yu-Ting¹, WANG Rui¹, MA Jing-Yi², LI Zhen²,
HUANG Zhong-Min³, AI Zhi-Lu^{1,2,3*}

(1. College Of Food Science And Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Key Laboratory Of Bulk Grain Processing, Ministry Of Agriculture, Zhengzhou 450002, China;
3. Henan Engineering Laboratory, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: Objective To study the bactericidal effect of ozone water on *Staphylococcus aureus* in fresh-wet surface and the inhibitory effect of natural bacteriostatic agent on *Staphylococcus aureus* in fresh-wet surface storage. **Methods** The concentration of ozone water was 0–20 mg/mL, the treatment temperature was 20–60 °C, and the treatment time was 0–20 min. The bactericidal effect of ozone water on *Staphylococcus aureus* on fresh and wet surface was analyzed under different conditions. Then, the inhibition effect of the bacteriostatic agent on staphylococcus aureus on fresh and wet surface was studied by combining with ϵ -poly-lysine in the range of 0% to 0.03% during storage. **Results** The concentration of ozone water was 20mg/mL, the treatment temperature was 60°C, and the treatment time was 15min, which could produce a good bactericidal effect on staphylococcus.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601572)、河南省重点研发与推广专项(182102110025)

Fund: Support by the National Natural Science Foundation of China (31601572), the Key Project of Research and Promotion of Henan Province (182102110025)

*通讯作者: 艾志录, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工与品质安全。E-mail: zhilafod@sina.com

*Corresponding author: AI Zhi-Lu, Ph.D, Professor, College of Food Science and Technology, Henan Engineering Research Center for Cold-Chain Food, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China. E-mail: zhilafod@sina.com

Pretreatment under this condition could reduce *Staphylococcus aureus* to 4.3 lgCFU/g on the surface of fresh and wet surfaces, and the best inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* was when the addition of ϵ -polylysine was 0.03%.

Conclusion Reducing the initial value of *Staphylococcus aureus* on the surface of fresh and wet noodles and adding bacteriostatic agents in storage combined with cold chain conditions can effectively control the amount of *Staphylococcus aureus*. The control of *Staphylococcus aureus* in the fresh and wet noodle processing industry has certain guiding significance.

KEY WORDS: fresh noodles; ozone water; *Staphylococcus aureus*; bactericidal; natural bacteriostatic agent; bacteriostatic

1 引言

鲜湿面条具有新鲜, 口感好, 生产成本低等优势^[1], 但鲜湿面水分含量较高, 成分复杂, 贮藏过程中特别是夏天气温较高的环境下很容易发生褐变, 甚至腐败变质, 严重者变酸和发霉^[2], 所以鲜湿面包装材料与贮存环境需要严格控制, 增加了成本, 也影响了市场的进一步开拓^[3]。同时, 由于鲜湿面属于方便食品, 致病菌污染的问题一直被人们广泛关注^[4]。有研究表明, 在冷藏鲜湿面中, 金黄色葡萄球菌等致病菌的检出率高达 66.7%^[5]。目前国内外主要采用添加酒精、有机酸等化学方法对鲜湿面进行减菌化处理, 然而, 这些方法处理后产生的酸味使一部分消费者难以接受^[6]。因此, 高效安全保鲜及致病菌安全控制技术目前仍是制约鲜湿面产业快速发展的关键因素, 如何抑制产品在储藏期间微生物的繁殖, 延长产品的保质期, 保证鲜湿面的食用品质与安全, 实现远距离销售, 这也是近几年鲜湿面行业研究的重点之一^[7]。

臭氧水作为一种强氧化剂, 能在菌体细胞内产生较强的氧化应激, 致使其死亡, 因此是一种极具潜力的杀菌剂^[8]。1997 年, 臭氧被美国食品药品监督管理局规定为公认安全的物质用作食品工业中的杀菌剂^[9]。臭氧水的最大优点之一就是其最终可以分解为分子氧, 消除了潜在的有害化学物质残留的可能性, 安全可靠。因此, 臭氧可以以气体或水溶液的形式作为食品预处理、贮存和加工中的安全杀菌剂, 特别是对于鲜湿面制品的保鲜及安全控制具有重要意义^[10]。

在追求产量与延长产品货架期的同时, 绿色、天然食品的要求也愈来愈强烈, 因此, 近几年, 食品领域的研究者开始致力于寻找天然、广谱、高效、低毒的天然保鲜剂, 从动植物中寻找、提取天然食品添加剂成为当前食品添加剂研究的热点和主流^[11]。目前已经研究开发出许多种天然防腐剂, 根据来源不同, 大致可分为动物源、植物源、微生物防腐剂, 还有一些天然防腐剂, 例如 ϵ -聚赖氨酸、单辛酸甘油酯等^[12], ϵ -聚赖氨酸具有热稳定性好、抗菌能力强、抗菌谱广等优点^[13]。

目前, 有关臭氧处理在小麦粉为原料的鲜湿面中应用的研究, 国内外鲜有报道^[14]。本研究以鲜湿面为载体, 研究不同臭氧水浓度、水浴温度和处理时间等处理条件对

鲜湿面表面金黄色葡萄球菌的杀菌作用, 然后结合 ϵ -聚赖氨酸贮藏, 研究在储藏过程中不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 前期杀菌和后期抑菌相结合, 为鲜湿面的品质安全控制提供指导。

2 材料与方法

2.1 材料

金苑特一粉(郑州金苑面业有限公司); ϵ -聚赖氨酸(郑州天海生物科技有限公司); 胰蛋白胍大豆肉汤培养基、胰蛋白胍大豆琼脂培养基、Baird-Parker 琼脂培养基、酵母浸粉、平板计数琼脂(北京陆桥技术有限责任公司); 氯化钠(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 金黄色葡萄球菌(NCTC8325, 美国菌种保存中心)。

2.2 主要仪器与设备

SX-500 型高压蒸汽灭菌锅(日本 Tomy 公司); LHP-250 型智能恒温恒湿培养箱(上海鸿都电子科技有限公司); DHG-9143B5 型电热恒温鼓风干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); THZ-100 型恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司); SW-CJ-1FD 无菌操作台(苏州净化设备有限公司); SCIENTZ-11 无菌均质机(宁波新芝生物科技股份有限公司); SZCL-4A 智能磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司); DMT-5 电动家用面条机(龙口市复兴机械有限公司); 臭氧水机(武汉威蒙环保科技有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 菌液制备

在无菌条件下, 用接种环将金黄色葡萄球菌 NCTC8325 划线至加有 0.6% 酵母浸粉的胰蛋白胍大豆琼脂培养基上, 在 37 °C 条件下培养 24 h, 用接种环挑取单菌落至加有 0.6% 酵母浸粉的胰蛋白胍大豆肉汤中, 在 37 °C、150 r/min 条件下振荡培养 8 h, 至指数后期(约 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL)。

2.3.2 面条的制作及金黄色葡萄球菌人工污染

称取一定量面粉, 紫外灯照射处理 20 min 备用。后加入 35 mL 无菌水和面, (另外一份加入用无菌水配制添加量分别为 0%、0.0075%、0.015%、0.03% 的 ϵ -聚赖氨酸 35 mL 和面) 经过搅拌机搅拌 6 min 左右, 熟化之后进行压片、切条, 煮熟。将指数后期的金黄色葡萄球菌用磷酸缓冲盐溶

液 10 倍梯度稀释至浓度为 10^8 lgCFU/mL, 用移液枪吸 100 μ L 菌液缓慢滴至面条表面, 使其均匀分布, 在无菌操作台中放置 25 min 直至面条表面干燥, 在 25 $^{\circ}$ C 温度下无菌放置 2 h, 使金黄色葡萄球菌附着在面条表面, 备用。

2.4 臭氧水处理

将 2.3.2 未加 ϵ -聚赖氨酸面条用浓度分别为 0、5、10、15、20 mg/mL 的臭氧水于 20、30、40、50、60 $^{\circ}$ C 水浴处理 0、5、10、15、20 min, 后对处理后的面条中的金黄色葡萄球菌活细胞数量测定。

2.5 天然抑菌剂的处理

将 2.3.2 加入用无菌水配制添加量分别为 0%、0.0075%、0.015%、0.03% 的 ϵ -聚赖氨酸 35 mL 和面的面条, 煮熟, 臭氧水浓度为 20 mg/mL, 温度为 60 $^{\circ}$ C, 处理 15 min (此条件为 2.4 中臭氧水杀菌的最优条件), 晾干表面水分后于 25 $^{\circ}$ C 储藏 6 d、4 $^{\circ}$ C 储藏 18 d, 定期测量储藏过程中金黄色葡萄球菌的菌落数。

2.6 黄色葡萄球菌活细胞数量测定

面条样品处理后, 在无菌环境中, 将 4 g 面条放入盛有 36 mL 的无菌生理盐水(0.85%)的均质袋中, 在拍打式均质机中以 12 T/sec 的速度拍打 3 min, 移取均质液的上清液进行梯度稀释, 选取 100 μ L 适宜梯度稀释液涂布在金黄色葡萄球菌选择性培养基中, 放置于 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养(18 \pm 24) h 后计数, 以空白组做阴性对照。

2.7 统计分析

每组试验平行 3 组, 取平均值, 标准差由 Microsoft Excel 2016 中的 STDEV 计算得出, 使用 Microsoft Excel 2016 制作图表。

3 结果与分析

3.1 不同浓度的臭氧水对金黄色葡萄球菌的杀菌效果

为了研究臭氧水浓度对金黄色葡萄球菌的杀菌效果, 选取臭氧水浓度 0~20 mg/mL, 固定温度 40 $^{\circ}$ C 条件对金黄色葡萄球菌进行处理。从图 1 中可以看出, 随着臭氧水浓度的增加, 金黄色葡萄球菌的存活量逐渐降低。处理至 20 min, 金黄色葡萄球菌较初始值依次降低了 1.79、2.48、3.04、3.25、3.72 lgCFU/g, 说明臭氧水对金黄色葡萄球菌具有很好的杀菌效果。这是因为臭氧水直接与金黄色葡萄球菌的细胞壁中的脂蛋白或细胞膜中的磷脂质、蛋白质发生化学反应, 从而使细菌的细胞壁和细胞受到破坏, 细胞膜的通透性增加, 细胞内物质外流, 使其失去活性^[15]。

3.2 不同温度下臭氧水对金黄色葡萄球菌的杀菌效果

为了研究温度对金黄色葡萄球菌的杀菌效果, 选取

温度 20~60 $^{\circ}$ C, 固定臭氧水浓度 10 mg/mL 条件对金黄色葡萄球菌进行处理。从图 2 中可以看出, 随着温度的增加, 金黄色葡萄球菌的存活量逐渐降低。金黄色葡萄球菌较初始值依次降低了 0.77、1.66、2.13、2.82、3.08 lgCFU/g, 说明升高温度促进臭氧水对金黄色葡萄球菌的杀菌效果。这是因为热胁迫能破坏金黄色葡萄球菌细胞内的稳态, 降低细胞活力, 致使细胞畸变, 抑制细胞的分裂生长, 造成细胞膜和线粒体膜不完整, 引起质膜流动性变化, 破坏细胞骨架, 阻断细胞代谢, 抑制蛋白质合成, 致使蛋白质发生聚集沉淀、染色体结构发生损坏等, 最终导致细胞死亡^[16]。

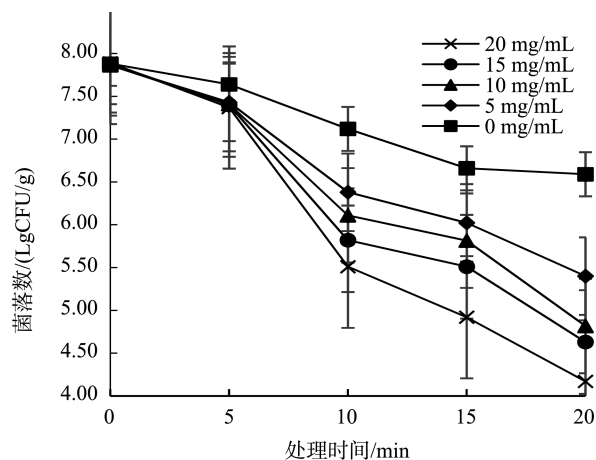


图 1 臭氧水对金黄色葡萄球菌的杀菌作用
Fig.1 Bactericidal effect of ozone water on *Staphylococcus aureus*

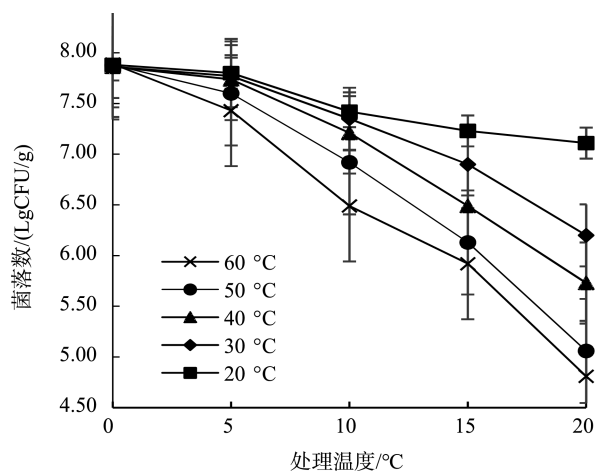


图 2 温度对金黄色葡萄球菌的杀菌效果
Fig.2 Bactericidal effect of temperature on *Staphylococcus aureus*

对实验结果进行正交实验, 见表 1 和表 2, 由表 2 可知: K_1 、 K_2 、 K_3 分别表示在各因素水平的影响下金黄色葡萄球菌菌落数的总和, k_1 、 k_2 、 k_3 分别表示在各因素水平的影响下金黄色葡萄球菌菌落数的平均值。对正交实验中的极差(R)进行比较可得出影响金黄色葡萄球菌菌落数的因素顺序为 $A>B>C$, 以金黄色葡萄球菌菌落数为指标得到的

最佳指标为 $A_3B_3C_2$, 即臭氧水浓度为 20 mg/mL、处理温度为 60 °C、处理时间为 15 min, 能对金黄色葡萄球菌产生良好的杀菌效果。故确定对金黄色葡萄球菌的最佳杀菌条件为:臭氧水浓度为 20 mg/mL、处理温度为 60 °C、处理时间为 15 min。

表 1 正交实验的因素水平
Table 1 Factor level of orthogonal experiment

因素	水平		
	1	2	3
臭氧水浓度(A)	10	15	20
处理温度(B)	40	50	60
处理时间(C)	10	15	20

表 2 正交实验表
Table 2 Orthogonal experiment table

因素	A	B	C	金黄色葡萄球菌数
实验号	臭氧水浓度/(mg/mL)	处理温度/°C	处理时间/min	菌落数/(lgCFU/g)
1	10(1)	40(1)	10(1)	4.83
2	10(1)	50(2)	15(2)	4.65
3	10(1)	60(3)	20(3)	4.61
4	15(2)	40(1)	15(2)	4.28
5	15(2)	50(2)	20(3)	3.88
6	15(2)	60(3)	10(1)	3.70
7	20(3)	40(1)	20(3)	3.59
8	20(3)	50(2)	10(1)	3.63
9	20(3)	60(3)	15(2)	3.51
K1	14.09	12.7	12.16	
K2	11.86	12.16	12.44	
K3	10.73	11.82	12.08	
k_1	4.7	4.23	4.05	
k_2	3.95	4.05	4.15	
k_3	3.58	3.94	4.03	
R	1.12	0.29	0.12	
最佳配比	$A_3B_3C_2$			

3.3 添加不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸对鲜湿面在 25 °C 储藏过程中金黄色葡萄球菌的抑制作用

从图 3 中可以看出, 鲜湿面在 25 °C 下储藏, 随着 ϵ -聚赖氨酸浓度增大, 金黄色葡萄球菌增长越缓慢, 储藏至 6d, ϵ -聚赖氨酸添加量分别为 0%、0.0075%、0.015%、0.03%,

金黄色葡萄球菌菌落分别为 5.22、5.13、4.87、4.21 lgCFU/g, 说明随着 ϵ -聚赖氨酸浓度的增大, 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果也逐渐增强。 ϵ -聚赖氨酸可抑制细胞能量的摄取, 对微生物造成饥饿胁迫, 减缓微生物的生化代谢活动和繁殖^[17]。

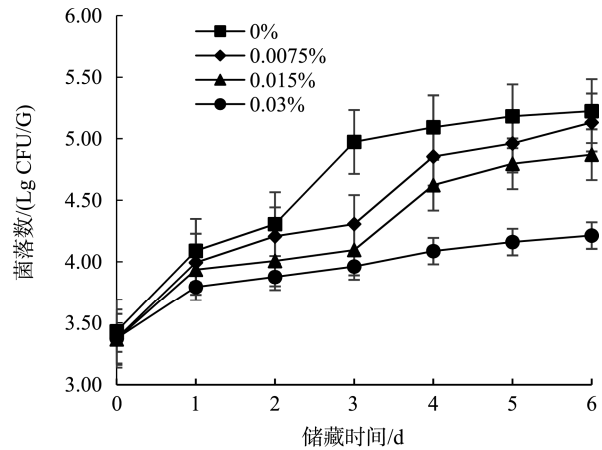


图 3 金黄色葡萄球菌在 25 °C 储藏过程中的数量变化
Fig.3 changes in the quantity of *Staphylococcus aureus* during storage at 25 °C

3.4 添加不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸对鲜湿面在 4 °C 储藏过程中金黄色葡萄球菌的抑制作用

从图 4 中可以看出, 鲜湿面在 4 °C 下储藏, 金黄色葡萄球菌呈缓慢降低的趋势, 储藏至 18 d, ϵ -聚赖氨酸添加量分别为 0%、0.0075%、0.015%、0.03%金黄色葡萄球菌菌落分别为 2.66、2.52、2.41、2.06 lgCFU/g, 说明随着 ϵ -聚赖氨酸浓度的增大, 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果也逐渐增强, 可能由于低温胁迫影响微生物酶活性, 致使代谢缓慢^[18]。

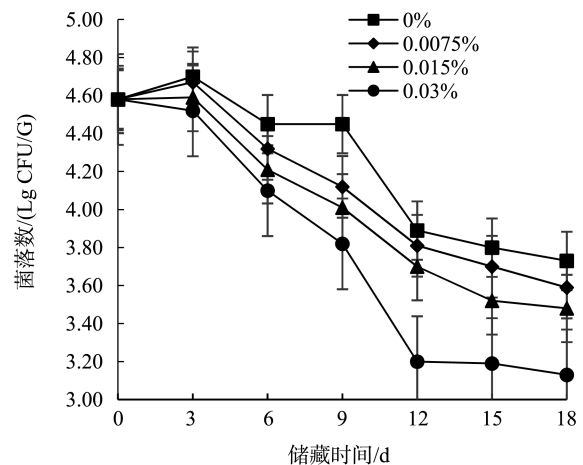


图 4 金黄色葡萄球菌在 4 °C 储藏过程中的数量变化
Fig.4 Changes in the quantity of *Staphylococcus aureus* during storage at 4 °C

4 结 论

本研究分析了臭氧水对金黄色葡萄球菌的杀菌作用, 当臭氧水浓度为 20 mg/mL、处理温度为 60 °C、处理时间为 15 min 时, 能对金黄色葡萄球菌产生良好的杀菌效果, 金黄色葡萄球菌活细胞数目降低 4.3 lgCFU/g; 当聚赖氨酸的添加量为 0.03% 时, 能对面条储藏过程中金黄色葡萄球菌产生良好的抑制效果。本研究初步证明了臭氧水和 ϵ -聚赖氨酸在面条主食产业中的应用效果, 为主食食品工业中臭氧水和在食源性致病菌安全控制领域的应用提供了参考。

参考文献

- [1] 李运通, 陈野, 李书红, 等. 生鲜面常温贮藏过程中的品质变化规律 [J]. 食品科学, 2017, 1(38): 259–261.
Li YT, Chen Y, Li SH, *et al.* Quality variation of fresh face during normal temperature storage [J]. Food Sci, 2017, 1(38): 259–261.
- [2] Huang J, Huang C, Huang Y, *et al.* Shelf-life of fresh noodles as affected by chitosan and its Maillard reaction products [J]. LWT–Food Sci Technol, 2007, 40(7): 1287–1291.
- [3] 周明, 黎冬明, 沈勇根, 等. 西芹生鲜面工艺优化及其质构特性的研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 5(37): 217–221.
Zhou M, Li DM, Sheng YG, *et al.* Study on fresh surface technology optimization and texture characteristics of parsley [J]. Food Ind Sci Technol, 2016, 5(37): 217–221.
- [4] Li QQ, Fan YL, Song MH, *et al.* Research advances on foodborne *Staphylococcal* enterotoxins and its detection methods [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(2): 555–560.
- [5] Fang TJ, Wei QK, Liao CW, *et al.* Microbiological quality of 18 °C ready-to-eat food products sold in Taiwan [J]. Int J Food Microbiol, 2003, 80: 241–250.
- [6] 刘晓婷, 屈凌波, 许旭. 生鲜湿面保鲜技术与品质的研究进展 [J]. 粮食科技与经济, 2015, 40: 56–62.
Liu XT, Qu LB, Xu X. Research progress of fresh and wet surface preservation technology and quality [J]. Grain Technol Econ, 2015, 40: 56–62.
- [7] Brijesh K, Tiwari VP, Valdra MP. Donnell application of natural antimicrobials for food preservation [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(14): 5987–6000.
- [8] Li JP, Zhu KX, Guo XN. Delineating the microbial and physical-chemical changes during storage of ozone treated wheat flour [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2013, 20(5): 223–229.
- [9] Zhang LK, Lu ZX, Yu ZF. Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water [J]. Food Control, 2005, 16(14): 279–283.
- [10] Bülent Z, Feyza KZ, Serdar Ö. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B₁ in dried figs [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(2): 3593–3597.
- [11] Guzel–Seydim ZB, Greene AK, Seydim AC. Use of ozone in the food industry [J]. LWT–Food Sci Technol, 2004, 37: 453–460.
- [12] Jill KBr. Enhancement of Nissan, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by EDTA and lactoferrin [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 1(1): 63–74.
- [13] Jun H, Taka F, Ichik W. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -poly lysine as a preservative in food [J]. Regul Toxicol Pharm, 2003, 37(2): 328–340.
- [14] Bai YP, Guo XN, Zhu KX. Shelf-life extension of semi-dried buckwheat noodles by the combination of aqueous ozone treatment and modified atmosphere packaging [J]. Food Chem, 2017, 237(6): 553–560.
- [15] Li M, Zhu KX, Wang BW, *et al.* Evaluation of the quality characteristics of wheat flour and shelf-life of fresh noodles as affected by ozone treatment [J]. Food Chem, 2012, 135(4): 2163–2169.
- [16] Wu JG, Luan TG, Lan CY. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water [J]. Food Control, 2007, 18: 466–472.
- [17] Li YQ, Han Q, Feng JL. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2014, 43: 22–27.
- [18] Wang Y, Liu L, Zhou J, *et al.* Effect of chitosan nanoparticle coatings on the quality changes of postharvest whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during storage at 4 °C [J]. Food Bioprocess Technol, 2015, 8: 907–915.

(责任编辑: 王欣)

作者简介



索标, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品加工与品质安全。
E-mail: suobiao1982@126.com



艾志录, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工与品质安全。
E-mail: zhilafu@sina.com