

## 研究报告

## 防腐剂复配对苏云金芽孢杆菌抑菌效果研究

黄现青<sup>1,2</sup>, 张建威<sup>1</sup>, 高晓平<sup>1</sup>, 柳艳霞<sup>1</sup>, 孙灵霞<sup>1</sup>, 李苗云<sup>1</sup>, 张秋会<sup>1</sup>, 赵改名<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学食品科学技术学院/河南省肉制品加工与质量安全控制重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 双汇集团技术中心, 河南 漯河 462003)

**摘要:**目的 获得最佳的复配防腐剂抑制苏云金芽孢杆菌效果。方法 选择不同的防腐剂,通过药敏纸片法、最小抑菌浓度(MIC)法测定苏云金芽孢杆菌对其敏感性,利用正交设计筛选最佳防腐剂组合,并对获得的最佳防腐剂组合抑菌效果进行验证。结果 苏云金芽孢杆菌对乳酸链球菌素、聚赖氨酸、尼泊金乙酯较为敏感,其MIC分别为0.01、0.078和0.039 mg/ml,但是对乳酸钠、山梨酸钾不敏感。正交试验结果表明,当乳酸链球菌素、聚赖氨酸和尼泊金乙酯浓度分别为0.313、0.039和0.25 mg/ml时效果最佳,可使基质中苏云金芽孢杆菌降低2.35个数量级。结论 选择这一最佳组合在室温(25℃)条件下,猕猴桃汁、里脊肉糜、牛乳中细菌数在4d时分别增长1.61、2.95、2.16个数量级;在0~4℃贮藏5d时分别增长1.24、0.94、0.14个数量级。

**关键词:**防腐剂;苏云金芽孢杆菌;抑菌;食品安全

中图分类号:TS202.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)05-0419-03

**Inhibitive effect of mixed preservatives on *Bacillus thuringiensis***Huang Xianqing, Zhang Jianwei, Gao Xiaoping, Liu Yanxia, Sun Lingxia,  
Li Miaoyun, Zhang Qiuhui, Zhao Gaiming(Henan Key Laboratory of Meat Processing and Quality Safety Control/College of Food Science and  
Technology, Henan Agricultural University, Henan Zhengzhou 450002, China)

**Abstract: Objective** To acquire the optimum preservatives compounding to inhibit *Bacillus thuringiensis*. **Methods** The inhibitive effect of preservatives on *Bacillus thuringiensis* was examined by susceptibility test paper and minimum inhibitory concentration (MIC) methods; the optimized combination of preservatives was screened by orthogonal design, and the inhibitive effect of the best combination of preservatives was also checked. **Results** The results showed that *Bacillus thuringiensis* were not sensitive to sodium lactate and potassium sorbate, but are sensitive to nisin, polylysine and ethylparaben with a MIC of 0.01, 0.078 and 0.039 mg/ml respectively. The inhibitive effect of a mixture of preservatives on *Bacillus thuringiensis* examined by orthogonal design showed that the best combination was nisin, polylysine and ethylparaben at 0.313, 0.039 and 0.25 mg/ml respectively. The bacteriostatic effect was better under combining use of preservatives, and the number of *Bacillus thuringiensis* in food medium could be depressed 2.35 orders of magnitude. **Conclusion** The growth of *Bacillus thuringiensis* in fruit juice, meat and milk stored under room temperature (25℃) for 4 days was increased 1.61, 2.95 and 2.16 orders of magnitude, those stored at 0-4℃ for 5 days was increased only 1.24, 0.94 and 0.14 orders of magnitude.

**Key words:** Preservatives; *Bacillus thuringiensis*; inhibition; food safety

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)为革兰氏阳性杆菌,菌体短杆状,生鞭毛,单生或形成短链。它在芽孢形成过程中产生称为 $\delta$ -内毒素的杀虫伴胞晶体蛋白<sup>[1]</sup>。肉及肉制品的营养极为丰富,

是多种微生物良好的培养基,苏云金芽孢杆菌能产生蛋白分解酶,使动植物组织发生腐败分解<sup>[2]</sup>。在一定程度上可使肉表面颜色发暗,并产生难闻的臭味。

食品防腐剂是防止食品腐败变质的重要手段之一。但是,人们逐渐发现长期过量使用化学合成的食品防腐剂对人体健康有潜在危害。因此,研究和开发利用天然、广谱、低毒、价格低廉的食品防腐剂,其使用环境更宽泛、方便,是食品防腐剂发展的趋势<sup>[3]</sup>,开发与选用食品防腐剂的标准是“高效低毒”<sup>[4]</sup>。

收稿日期:2010-09-29

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903012);

河南省基础与前沿技术研究计划项目(082300430050)

作者简介:黄现青 男 博士 研究方向为肉品科学与食品微生物

E-mail:hxq8210@126.com

通信作者:赵改名 男 博士 副教授 硕士生导师

本实验研究了苏云金芽孢杆菌对乳酸链球菌素、山梨酸钾、乳酸钠、聚赖氨酸和尼泊金乙酯的敏感性,并通过正交试验,优化出复合防腐剂的最佳配方。最后应用于猕猴桃汁、里脊肉糜、牛乳中,观察其作用效果,旨在为延长其货架期提供研究基础,为企业应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与标准菌株

乳酸链球菌素、聚赖氨酸由浙江银象生物工程有限公司惠赠;山梨酸钾、乳酸钠、尼泊金乙酯均为食品级。牛肉浸膏、蛋白胨购自北京双旋 WSW 培养基制品厂,平板计数琼脂由北京奥博星生物技术有限责任公司提供。苏云金芽孢杆菌标准株购自中科院微生物所。

### 1.2 培养基的配制

LB 液体培养基(牛肉膏 0.5%、蛋白胨 1%、氯化钠 0.5%,pH 7.2~7.4)、LB 固体培养基(在 LB 液体培养基中加入 1.5% 琼脂粉)、平板菌落计数琼脂(称取 23.5 g 加入到 1 L 蒸馏水中加热煮沸溶解后分装),均于 121 °C 灭菌 15 min,冷却后备用。

### 1.3 敏感性测定

敏感性测定分别采用药敏纸片法和最小抑菌浓度法(MIC),参照文献[5]进行。

### 1.4 正交试验设计

选取 3 种敏感性较高、MIC 较小的防腐剂,设计三因素三水平正交试验,筛选最优防腐剂复配组合。

### 1.5 应用试验

利用优化后的最佳配方,以猕猴桃汁、里脊肉糜、牛乳为基质,以食品中常用防腐剂山梨酸钾为对照,分别于 25 °C、0~4 °C 放置不同时间,研究复合防腐剂对苏云金芽孢杆菌的抑制效果。

### 1.6 菌落计数

菌落总数的测定按照 GB/T 4789.2—2010《食品微生物学检验 菌落总数测定》,采用平板倾注法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 敏感性测定结果

利用药敏纸片法测定不同防腐剂对苏云金芽孢杆菌抑菌圈大小,确定苏云金芽孢杆菌对不同防腐剂的敏感性,结果见表 1。乳酸链球菌素、聚赖氨酸、尼泊金乙酯对苏云金芽孢杆菌有抑菌作用。

以 96 孔微量酶标板测定 MIC,利用 GF-M2000 酶标仪在 492 nm 处测定吸光度值,结果表明,乳酸链球菌素、聚赖氨酸、尼泊金乙酯的 MIC 分别为 0.01、0.078、0.039 mg/ml。

表 1 抑菌圈直径

浓度 (mg/ml)	乳酸钠 (mm)	尼泊金乙酯 (mm)	聚赖氨酸 (mm)	山梨酸钾 (mm)	乳酸链球菌素 (mm)
20	-	12.0	10.0	-	9.0
10	-	10.0	8.0	-	8.0
5	-	8.0	6.0	-	6.0

注: - 无抑菌效果。

### 2.2 正交试验结果

正交试验设计见表 2,试验结果见表 3。由表 3 可知,3 种防腐剂抑菌性由强至弱依次为尼泊金乙酯 > 聚赖氨酸 > 乳酸链球菌素,最优组合为乳酸链球菌素 0.313 mg/ml、聚赖氨酸 0.039 mg/ml、尼泊金乙酯 0.25 mg/ml。

表 2 正交试验因素与水平

水平	因素		
	乳酸链球菌素(A)	聚赖氨酸(B)	尼泊金乙酯(C)
1	0.313	0.156	0.25
2	0.078	0.078	0.125
3	0.02	0.039	0.0625

表 3 正交试验结果

试验号	乳酸链球菌素(A)	聚赖氨酸(B)	尼泊金乙酯(C)	log 细菌总数 [log(CFU/ml)]
1	1	1	1	3.34
2	1	2	2	3.36
3	1	3	3	4.33
4	2	1	2	3.13
5	2	2	3	3.61
6	2	3	1	4.52
7	3	1	3	3.56
8	3	2	1	3.69
9	3	3	2	4.64
10	0	0	0	5.48
k1 [log(CFU/ml)]	2.75	3.24	2.73	
k2 [log(CFU/ml)]	3.61	3.75	3.34	
k3 [log(CFU/ml)]	3.76	3.11	4.04	
极差 R [log(CFU/ml)]	0.15	0.64	1.31	
因素主次顺序	C < B < A			
优组合	A1B3C1			

### 2.3 应用试验

室温(25 °C)及 0~4 °C 处理 3 种样品菌落计数结果见表 4。3 种样品在室温贮藏加入最佳防腐剂配比后和对照相比,可有效减缓细菌的增殖,猕猴桃汁、里脊肉糜、牛乳中细菌数在经过 4 d 放置后,仅仅分别增长 1.61、2.95、2.16 个数量级。在 0~4 °C 放置 5 d 后分别增长 1.24、0.94、0.14 个数量级。对照组的山梨酸钾浓度在猕猴桃汁、里脊肉糜、牛乳中的浓度分别为 0.5、0.075、0.5 mg/g。

表4 复配防腐剂对不同食品介质的抑菌效果  
Table 4 Inhibition test results in different food medium

时间 (d)	猕猴桃汁 [log(CFU/ml)]				里脊肉糜 [log(CFU/ml)]				牛乳 [log(CFU/ml)]			
	0~4℃		25℃		0~4℃		25℃		0~4℃		25℃	
	对照	试验	对照	试验	对照	试验	对照	试验	对照	试验	对照	试验
0	4.12	4.12	4.12	4.12	4.95	4.95	4.95	4.95	5.44	5.44	5.44	5.44
2	-	-	5.47	4.53	-	-	7.12	5.92	-	-	7.68	6.52
4	-	-	7.03	5.73	-	-	>9.00	7.90	-	-	>9.00	7.60
5	6.78	5.36	-	-	7.27	5.89	-	-	6.78	5.58	-	-
6	-	-	>9.00	6.79	-	-	-	>9.00	-	-	-	>9.00
8	-	-	-	>9.00	-	-	-	-	-	-	-	-
10	>9.00	7.42	-	-	>9.00	8.21	-	-	8.59	7.76	-	-

注: - 未检测。

### 3 讨论

目前对苏云金芽孢杆菌研究最多的是其伴孢晶体在抗病虫害方面的应用<sup>[7,8]</sup>,关于研究不同的防腐剂对于其抑制效果研究较少<sup>[9]</sup>。本研究结果表明,乳酸链球菌素、聚赖氨酸和尼泊金乙酯对苏云金芽孢杆菌具有明显的抑菌效果,为预防苏云金芽孢杆菌在食品安全中的危害奠定了前期研究基础。虽然本研究获得的复配防腐剂对苏云金芽孢杆菌有一定抑制作用,并在不同介质中可发挥有效的抑制效果,但是并不能完全抑制其增殖。获得高效抑制苏云金芽孢杆菌的复合防腐剂配方,有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 陈月华,任改新,吴卫辉,等. 苏云金芽孢杆菌科默尔亚种15A3株的 cry 基因分析及杀虫特性[J]. 微生物学报,2002,42(2):169-175.
- [2] 王长远. 肉与肉制品中的微生物及其检测[EB/OL]. [2005-02-22]. <http://www.foodmate.net/lesson/32/07.php>.
- [3] 王心礼. 食品防腐剂的发展趋势及天然食品防腐剂-R-多糖(克霉王)简介[EB/OL]. [2008-08-14]. <http://www.21food.cn/html/news/6/353469.htm>.
- [4] 孙宝国. 食品添加剂[M]. 北京:化学工业出版社,2008:162-180.
- [5] 黄现青,别小妹,吕凤霞,等. 枯草芽孢杆菌 fmbJ 产脂肽抑制点青霉效果及其桃防腐试验[J]. 农业工程学报,2008,24(1):263-267.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.2—2010 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [7] 任羽,刘华梅,宋福平,等. 苏云金芽孢杆菌 Cry1Ca7 蛋白定点突变对甜菜夜蛾杀虫活性的影响[J]. 微生物学报,2008,48(6):733-738.
- [8] 刘石泉,单世平,夏立秋. 苏云金芽孢杆菌高效价杀虫剂的研究进展[J]. 微生物学通报,2008,35(7):1091-1095.
- [9] 翟兴礼. 大蒜水提取物对苏云金芽孢杆菌的抑制作用[J]. 长江农业,2009,6:70-72.

## 公告栏

# 关于发布食品安全国家标准《复配食品添加剂通则》的公告

2011年 第18号

根据《中华人民共和国食品安全法》和《食品安全国家标准管理办法》的规定,经食品安全国家标准审评委员会审查通过,现发布食品安全国家标准《复配食品添加剂通则》(GB 26687—2011)。

特此公告。

复配食品添加剂通则(略)

卫生部

二〇一一年七月五日