

天然抑菌剂对鲁氏接合酵母的抑菌作用

王璇, 胡仲秋, 袁亚宏, 任婷婷, 岳田利

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(杨凌), 国家杨凌农业综合试验工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 本课题研究植物源、动物源与微生物源三种来源的 20 种天然抑菌剂对鲁氏接合酵母的抑菌活性。采用双层平板打孔法, 根据抑菌圈直径判断 20 种天然抑菌剂的抑菌活性; 采用二倍稀释法测定天然抑菌剂对鲁氏接合酵母的最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC); 用比色法测定鲁氏接合酵母在 YPD 培养基和果汁中的生长情况; 用比色法分别测定两种天然抑菌剂以及两者以不同的添加比例加入果汁中对鲁氏接合酵母生长状况的影响; 研究柠檬酸浓度、温度、紫外线照射时间对复合抑菌剂抑菌稳定性的影响。研究结果表明微生物源抑菌剂对鲁氏接合酵母的抑菌效果最好; 鲁氏接合酵母在 YPD 中的生长情况要好于在果汁中; 筛选出了纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸两种微生物源抑菌剂, 且两者具有协同作用; 柠檬酸浓度、温度、紫外线照射时间会影响复合抑菌剂的抑菌稳定性。

关键词: 天然抑菌剂; 鲁氏接合酵母; 抑菌活性; 最小抑菌浓度; 协同抑菌效果; 抑菌稳定性

文章编号: 1673-9078(2018)10-94-102

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.014

Antimicrobial Activity of Natural Antimicrobial Agents against *Zygosaccharomyces Rouxii*

WANG Xuan, HU Zhong-qiu, YUAN Ya-hong, REN Ting-ting, YUE Tian-li

(College of Food Science and Engineering, Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products(YangLing), Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Agriculture Integration Test (Yangling), Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The antimicrobial activity of 20 natural antimicrobial agents from plant, animal and microbial sources against *Zygosaccharomyces rouxii* was investigated in this study. The antimicrobial activity of 20 natural antimicrobial agents was determined based on the diameter of the inhibition zone by the double-layer plate perforated method. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of natural antimicrobial agents against *Zygosaccharomyces rouxii* were determined by the double dilution method. The spectrophotometric method was used to determine the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* in YPD medium and juice, e.g. the effects of two natural antimicrobial agents and different proportions of the two natural antimicrobial agents into juice on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii*, along with the effects of citric acid concentration, temperature and ultraviolet irradiation time on the stability of antimicrobial activity of the composite antimicrobial agents. The results showed that antimicrobial agents had the highest antimicrobial activities against *Zygosaccharomyces rouxii*. The growth of *Zygosaccharomyces rouxii* in YPD was better than in juice. Two kinds of microbial inhibitors, natamycin and ϵ -polylysine, were screened out, and they exhibited synergistic effect. Citric acid concentration, temperature, ultraviolet irradiation time affected the stability of antimicrobial activity of the composite antimicrobial agents.

Key words: natural antimicrobial agents; *Zygosaccharomyces rouxii*; minimum inhibitory concentration (MIC); composite antimicrobial agents; synergistic antimicrobial effect; stability of antimicrobial activity

很多食品中都含有水分, 但水分多有利于大多微生物的生长从而导致食品腐败变质^[1]。研究表明, 溶

收稿日期: 2018-04-19

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (2016KTQ003-12)

作者简介: 王璇 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 食品安全识别控制工程

通讯作者: 岳田利 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全识别控制工程, 营养健康食品制造工程

液渗透压是食品货架期的主要影响参数^[1]。许多食品为了延长其保质期, 会适量增加食品中糖或盐的浓度如蜂蜜、糖浆、酱油和浓缩苹果汁等^[2]。高渗透压的食品可以抑制大多数微生物的生长, 但是有些微生物如耐高渗酵母菌能在高糖和高盐浓度下生长。

鲁氏接合酵母是一种耐高渗酵母, 也是一种重要的食品腐败菌, 由于它具有耐酸、耐高渗、耐弱酸抑

菌剂和适应高渗环境及高温的特性,能够引起低 pH 值、高糖的食品变质^[3-5]。据报道有从浓缩苹果汁(糖度 70 °Brix, pH 值 3.5)中分离出鲁氏接合酵母菌并可在浓缩苹果汁中生长繁殖^[6],导致胀罐、果汁营养成分的损失与破坏、糖度和 pH 的改变,影响人类的身体健康。因此,控制浓缩苹果汁中鲁氏接合酵母的生长是果汁加工企业亟待解决的问题^[7]。

为延长浓缩苹果汁的保藏期限,传统的方法是向果汁中添加抑菌剂来抑制果汁中微生物的生长从而达到延长果汁贮藏期的目的,这也是一种方便有效的控制微生物生长的方法。目前世界上食品工业中常用的抑菌剂以化学合成抑菌剂居多,在欧洲国家山梨酸以及苯甲酸是被允许添加到食品中的抑菌剂,但是对被添加食品以及添加量有着严格的规定^[8,9]。Arroyo-Lopez 等人与 Rojo 等人曾报道山梨酸钾和苯甲酸钠均可有效抑制橄榄油及浓缩葡萄汁中鲁氏接合酵母的生长^[10],但山梨酸钾是一种低毒性化学抑菌剂,苯甲酸钠可在人体肠道的酸环境下转化为毒性较强的苯甲酸,会导致体重下降、腹泻、出血、瘫痪甚至死亡^[11]。化学合成抑菌剂因其具有诱癌性、致畸性和易引起食物中毒等问题无法解决,且对人体的健康带来一定的负面影响,这与人们追求安全、健康饮食方式的愿望相违背^[12],因此人们开始寻求广谱、高效、低毒的天然食品抑菌剂^[13]。在过去的二十年间,科研人员对来源于动物、植物及微生物的天然抑菌物质进行了广泛研究,以期它们能够替代传统化学抑菌剂有效抑制微生物对食品的污染^[14-16]。天然抑菌剂具有抗菌性强、安全无毒、水溶性好、热稳定性好和作用范围广等合成抑菌剂无法比拟的优点^[17]。按照其来源可分为微生物源抑菌剂、动物源抑菌剂和植物源抑菌剂^[18]。香草醛和羟基肉桂酸被报道能够有效抑制包括真菌和细菌在内的大部分微生物的生长,在有效抑制高渗酵母污染领域有着潜在的应用价值^[19-22]。纳他霉素是由纳塔链霉菌产生的一种多烯大环内脂类抗生素^[23],是一种常用的抗真菌剂,其抗真菌广谱^[24],广泛应用于食用奶酪表面涂层防止霉菌的生长和污染^[25-27],在食品工业用来防止霉菌和酵母菌的污染^[28]。 ϵ -聚赖氨酸(ϵ -PL)是一种由 25-30 的赖氨酸残基与 3-氨基和羧基功能之间的酰胺键的 HOMO 阳离子聚酰胺的多聚赖氨酸^[29,30]。这种肽最初是从一个白色链霉菌株 *inopolymerus* 分离出来的^[29]。 ϵ -聚赖氨酸抗菌广谱,对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、酵母菌和霉菌都有抗菌作用^[31]。但天然抑菌剂活性成分复杂,抑菌机制尚不完全明确^[32],其对鲁氏接合酵母的抑菌作用研究还处在雏形阶段。

本研究从浓缩苹果汁(糖度 70 °Brix, pH 值 3.5)中分离得到的鲁氏接合酵母为研究对象,通过牛津杯抑菌圈法研究植物源、动物源以及微生物源天然抑菌剂对鲁氏接合酵母的抑菌活性,通过二倍稀释法测定天然抑菌剂的 MIC,筛选出对鲁氏接合酵母抑菌效果较好的两种天然、无色无味的食品级抑菌剂,并通过比色法测定添加这两种抑菌剂后鲁氏接合酵母的生长曲线,比较这两种抑菌剂单一和复配协同抑菌效果,在不同处理条件下对抑菌剂进行处理,观察其抑菌效果的稳定性,为天然抑菌剂延长浓缩苹果汁的贮藏期提供了一个合理的解决途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酵母菌种:鲁氏接合酵母 1130 (*Zygosaccharomyces rouxii*),由西北农林科技大学食品科学与工程学院健康食品制造与安全控制工程实验室提供。

浓缩苹果汁(糖度 70 °Brix, pH 值 3.5)购买于陕西果汁加工厂。12 °Brix 苹果汁:浓缩苹果汁与去离子水按约 1.0:7.2 比例混合,搅拌均匀。

YPD 半固体培养基:蛋白胨,酵母浸粉,葡萄糖,琼脂,蒸馏水。

植物源抑菌剂:薰衣草油、甘松精油、桂油、迷迭香精油、黄荆精油、桉叶精油、阿魏酸、胡椒醇、丁香油、牛至油、香茅油、山苍子油。

动物源抑菌剂:壳聚糖、鱼精蛋白、乳铁蛋白、溶菌酶、葡聚糖。

微生物源抑菌剂: ϵ -聚赖氨酸、纳他霉素、苯乳酸。

以上天然抑菌剂均由上海源叶生物科技有限公司提供,其中精油纯度均为 99%,阿魏酸、胡椒醇、壳聚糖、鱼精蛋白、乳铁蛋白、溶菌酶、葡聚糖、 ϵ -聚赖氨酸、纳他霉素、苯乳酸均为分析标准品,纯度均为 98%。

1.2 仪器与设备

ZXSD-A1160 型生化培养箱;YXQ-LS-70A 型立式压力蒸汽灭菌器;UV-1700 紫外可见分光光度计;YT-CJ-2ND 型超净工作台;ZWY-240 恒温培养振荡器;DK-98IIA 型电热恒温水浴锅;涡旋振荡器;HC-3018R 高速冷冻离心机。

1.3 试验方法

1.3.1 抑菌剂的筛查

1.3.1.1 抑菌剂前处理

将抑菌剂溶解配成溶液,用 0.22 μm 孔径无菌滤膜进行过滤除菌待用^[33]。

1.3.1.2 菌种的活化

将保存在甘油管中的鲁氏接合酵母 1130 (*Zygosaccharomyces rouxii*)自然条件下解冻后,置于灭菌后的 YPD 培养基中进行活化,于 28 $^{\circ}\text{C}$, 120 r/min 摇床中培养 24 h。取第一代活化的种子液以 2% 的接种量接种于无菌 YPD 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$, 120 r/min 摇床中进行培养,待菌液浓度达到 10^8 CFU/mL 后,作为种子液待用^[34]。

1.3.1.3 抑菌活性的测定(牛津杯抑菌圈法)

配制固体琼脂和半固体营养琼脂培养基,高压蒸汽 121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 灭菌,在培养皿上倒入薄薄的一层固体琼脂,待固体琼脂凝固后,用无菌镊子将外直径为 8 mm 的牛津杯垂直放在琼脂平面上^[35],待无菌半固体营养琼脂培养基温度降为 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右,将二代活化好的菌液(菌浓度约 10^8 CFU/mL)用移液枪吸取 2% 至半固体营养琼脂培养基中缓慢摇匀(避免产生气泡)后倒入琼脂平面上,待半固体营养琼脂培养基凝固后拔出牛津杯,此时半固体培养基中会形成和牛津杯直径大小一样的孔洞。用移液枪吸取 100 μL 抑菌剂至孔洞中,放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中恒温培养 48 h 后用游标卡尺测量其抑菌圈直径,通过比较抑菌圈直径来比较抑菌效果。其中精油和吐温 80 以 1:1 的比例混合,其余抑菌剂均配制浓度为 10 mg/mL 的溶液。每组试验重复 3 次,取其平均值。

1.3.1.4 最小抑菌浓度的测定(二倍稀释法)^[36]

将抑菌剂用蒸馏水通过二倍稀释法稀释成 5 个梯度并进行无菌滤膜除菌。配制半固体营养琼脂培养基,121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 高压蒸汽灭菌,待培养基温度降为 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右,用移液枪吸取 2% 的抑菌剂加入培养基中混匀并倒平板待凝固形成药平板后,将活化好的二代种子液(菌液浓度约为 10^8 CFU/mL),无菌蒸馏水稀释 10 倍,用移液枪吸取 100 μL 至药平板并用刮铲涂刮均匀,放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 48 h,观察长菌情况。凡是最高稀释平板中无菌落形成者,即为该物质的 MIC。相同条件下, MIC 越小,抑菌活性越大。其中精油和吐温 80 以 1:1 的比例混合,其余抑菌剂均配制浓度为 10 mg/mL 的溶液。每组试验重复 3 次,取其平均值。

1.3.2 不同基质下鲁氏接合酵母生长曲线的测定

苹果汁中的成分与 YPD 培养基中的成分有所差

别,其对酵母菌的生长影响也会有差别。将浓缩苹果汁(糖度 70 $^{\circ}\text{Brix}$, pH 值 3.5)稀释成糖度为 12 $^{\circ}\text{Brix}$, pH 为 3.8 的普通苹果汁,105 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 进行高压蒸汽灭菌,YPD 培养基 121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 进行高压蒸汽灭菌,将二代活化好的鲁氏接合酵母接入 YPD 培养基中,涡旋振荡器震荡均匀,离心(10000 r/min, 10 min)去上清液,并用已灭菌的果汁洗菌离心(10000 r/min, 10 min)三次,接入果汁中使果汁中菌液浓度为 10^6 CFU/mL, 120 r/min, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 90 h,用分光光度计测量在 600 nm 波长下菌悬液的吸光值^[37],每 5 h 取一次样测定果汁的 OD 值,并绘制其生长曲线,吸光值越大,说明微生物的浓度越大,生长越快^[38]。每组试验重复 3 次,取其平均值。

1.3.3 协同抑菌效果的测定(紫外分光光度值法)^[39]

因精油有刺激性气味,有些精油还具有颜色,在果汁中不宜添加,因此从其余抑菌剂中通过比较 MIC 以及结合成本考虑,筛选出抑菌效果较好的两种无色无味水溶性天然食品级抑菌剂纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸,用超纯水配制 pH 为 3.8 的柠檬酸溶液,将纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸分别溶解在柠檬酸溶液中配制成浓度均为 10 mg/mL 的溶液,通过文献查阅将纳他霉素与 ϵ -聚赖氨酸的复配比设为 7:3:5:5:3:7 混合制成 1 mg/mL 的复合溶液^[10],并进行无菌滤膜除菌。将浓缩苹果汁(糖度 70 $^{\circ}\text{Brix}$, pH 值 3.5)稀释为糖度为 12 $^{\circ}\text{Brix}$, pH 为 3.8 的普通苹果汁,105 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 进行高压蒸汽灭菌,静置待温度降为室温,将纳他霉素、 ϵ -聚赖氨酸以及复配抑菌剂以不同的量接入果汁中。将二代活化好的酵母菌离心(10000 r/min, 10 min)^[34]去上清液,并用已灭菌的果汁洗菌离心(10000 r/min, 10 min)三次,接入果汁中使果汁中菌液浓度为 10^6 CFU/mL, 120 r/min, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 5 d,每 6 h 取一次样测果汁的 OD 值,并绘制其生长曲线,OD 值前后差距最小者抑菌效果最好。每组试验重复 3 次,取其平均值。

1.3.4 不同处理条件下复合抑菌剂的抑菌稳定性比较

1.3.4.1 柠檬酸浓度对复合抑菌剂抑菌稳定性的影响

用去离子水配制不同浓度梯度的柠檬酸溶液作为溶剂,浓度分别为 0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%,加入抑菌剂使其浓度为 10 mg/mL 并进行无菌滤膜除菌。牛津杯抑菌圈法^[35]测定不同柠檬酸浓度下抑菌剂的抑菌效果。每组试验重复 3 次,取其平均值。

1.3.4.2 温度对复合抑菌剂抑菌稳定性的影响

用去离子水配制溶剂,用柠檬酸调节其 pH 为 3.8,加入抑菌剂并进行无菌滤膜除菌。将抑菌剂放置不同

温度的水浴锅中加热 10 min, 温度分别为: 20 ℃、40 ℃、60 ℃、80 ℃、100 ℃, 处理完毕后牛津杯抑菌圈法^[32]测定不同温度处理条件下抑菌剂的抑菌效果。每组试验重复 3 次, 取其平均值。

1.3.4.3 紫外照射时间对复合抑菌剂抑菌稳定性的影响

用去离子水配制溶剂, 用柠檬酸调节其 pH 为 3.8, 加入抑菌剂并进行无菌滤膜除菌。将抑菌剂放置在离波长为 260 nm 的紫外灯 1 m 的直线距离下照射, 分别照射 0 min、15 min、30 min、45 min、60 min 取出抑菌剂, 牛津杯抑菌圈法测定不同紫外照射时间处理条件下抑菌剂的抑菌效果。每组试验重复 3 次, 取其平均值。

1.3.5 数据统计分析

以 SPSS 作统计学分析, 实验数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$), 采用均值比较^[41]。

2 结果与讨论

2.1 天然抑菌剂的抑菌活性测定

20 种天然抑菌剂用牛津杯抑菌圈法, 比较其抑菌圈直径, 结果见表 1、表 2、表 3、图 1、图 2 和图 3。由表 1 可知, 单宁、茶多酚和竹叶精油对鲁氏接合酵母没有抑菌作用, 其余均对鲁氏接合酵母有抑菌作用, 抑菌效果最好的是黄荆精油, 抑菌效果最差的是胡椒醇, 精油对鲁氏接合酵母的抑菌效果要比多酚和醇类的抑菌效果稍好一些。由表 2 可知, 动物源抑菌剂对鲁氏接合酵母有抑菌作用的种类比较少, 笔者选取 5 种动物源抑菌剂对鲁氏接合酵母进行抑菌试验, 其中乳铁蛋白、溶菌酶和葡聚糖酶对鲁氏接合酵母没有抑菌作用, 壳聚糖和鱼精蛋白对鲁氏接合酵母有抑菌作用, 壳聚糖的抑菌效果较差, 鱼精蛋白的抑菌效果较好。由表 3 可知, 微生物源抑菌剂对鲁氏接合酵母的抑菌效果比植物源和动物源抑菌剂效果好。由图 1、图 2 和图 3 可知, 添加相同浓度相同量的抑菌剂至孔

中, 纳他霉素的抑菌圈要大于 ϵ -聚赖氨酸, 向孔洞中添加对照组柠檬酸并未有抑菌圈形成, 表明纳他霉素对鲁氏接合酵母的抑菌效果要好于 ϵ -聚赖氨酸, 溶剂柠檬酸对鲁氏接合酵母没有抑菌作用。

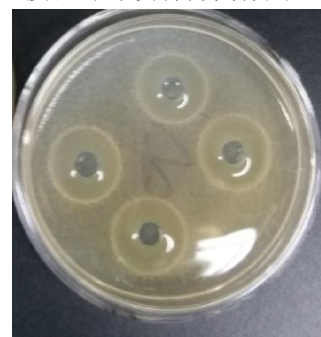


图 1 添加纳他霉素后抑菌圈大小

Fig.1 The size of bacteriostasis after adding namamycin



图 2 添加 ϵ -聚赖氨酸后抑菌圈大小

Fig.2 The size of bacteriostasis after adding ϵ -polylysine



图 3 添加柠檬酸后抑菌圈大小

Fig.3 The size of bacteriostasis after adding citric acid

表 1 不同植物源抑菌剂的抑菌活性

Table 1 The antibacterial activity of different botanical antibacterial agents

植物源抑菌剂	薰衣草油	甘松精油	桂油	迷迭精油	黄荆精油	桉叶精油
抑菌圈直径/mm	11.50±0.13	11.40±0.27	11.70±0.21	11.30±0.21	12.70±0.19	11.50±0.24
植物源抑菌剂	阿魏酸	胡椒醇	丁香油	牛至油	香茅油	山苍子油
抑菌圈直径/mm	11.70±0.13	11.20±0.21	11.70±0.15	12.50±0.28	12.10±0.24	11.90±0.18

表 2 不同动物源抑菌剂的抑菌活性

Table 2 The antibacterial activity of different animal antibacterial agents

动物源抑菌剂	壳聚糖	鱼精蛋白	乳铁蛋白	溶菌酶	葡聚糖酶
抑菌圈直径/mm	10.70±0.27	12.10±0.25	0	0	0

表3 不同微生物源抑菌剂的抑菌活性

Table 3 The antibacterial activity of different microbial

antibacterial agents

微生物源抑菌剂	ϵ -聚赖氨酸	纳他霉素	苯乳酸
抑菌圈直径/mm	12.90 \pm 0.29	13.80 \pm 0.26	12.50 \pm 0.21

2.2 天然抑菌剂最小抑菌浓度的测定

表4 不同植物源抑菌剂对鲁氏接合酵母的最小抑菌浓度

Table 4 The minimum inhibitory concentration of different botanical antibacterial agents on *Zygosaccharomyces rouxii*.

抑菌剂	阿魏酸	胡椒醇	丁香油	牛至油	香茅油	山苍子油
MIC	20.00 \pm 0.12(mg/mL)	25.00 \pm 0.15(mg/mL)	80.00 \pm 0.31(μ L/mL)	6.00 \pm 0.21(μ L/mL)	0.25 \pm 0.05(μ L/mL)	1.25 \pm 0.02(μ L/mL)

抑菌剂	薰衣草油	甘松精油	桂油	迷迭精油	黄荆精油	桉叶油
MIC	20.00 \pm 0.21(μ L/mL)	25.00 \pm 0.28(μ L/mL)	5.00 \pm 0.16(μ L/mL)	20.00 \pm 0.25(μ L/mL)	4.00 \pm 0.13(μ L/mL)	2.00 \pm 0.11(μ L/mL)

表5 不同动物源抑菌剂对鲁氏接合酵母的最小抑菌浓度

Table 5 The minimum inhibitory concentration of different animal antibacterial agents on *Zygosaccharomyces rouxii*.

动物源抑菌剂	壳聚糖	鱼精蛋白
MIC/(mg/mL)	0.50 \pm 0.24	0.13 \pm 0.08

表6 不同微生物源抑菌剂对鲁氏接合酵母的最小抑菌浓度

Table 6 The minimum inhibitory concentration of different microbial source antibacterial agent of *Zygosaccharomyces rouxii*.

微生物源抑菌剂	ϵ -聚赖氨酸	纳他霉素	苯乳酸
MIC	16.00 \pm 0.12(μ g/mL)	3.00 \pm 0.16(μ g/mL)	5.00 \pm 0.13(mg/mL)

2.3 不同基质下酵母菌生长曲线的测定

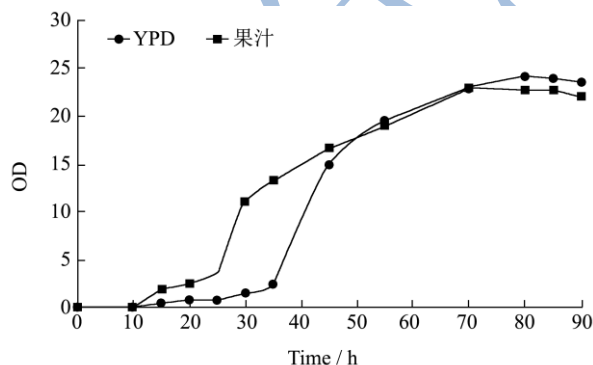


图4 鲁氏接合酵母在不同基质生长期间 OD 值的变化

Fig.4 Changes of OD during *Zygosaccharomyces rouxii* growth in different matrix

苹果汁中的成分与 YPD 培养基中的成分有所不同, 其对酵母菌的生长影响也会有差别。

图4是初始菌液浓度为 10^6 CFU/mL 的 YPD 培养基和将浓缩苹果汁稀释为糖度为 12 Brix, pH 为 3.8

由表4可知, 在植物源抑菌剂中, 阿魏酸比胡椒醇的抑菌效果好。精油对鲁氏接合酵母的抑菌效果都比较好, 效果最好的是香茅油, 效果最差的是丁香油。由表5可知, 在动物源抑菌剂中鱼精蛋白的抑菌效果比壳聚糖好。由表6可知, 在微生物源抑菌剂中, 纳他霉素的抑菌效果最好, ϵ -聚赖氨酸次之, 苯乳酸的抑菌效果最差。

的普通苹果汁在 120 r/min, 28 °C 摇床培养条件下培养 90 h 的过程中鲁氏接合酵母的生长曲线。由图4可知, 鲁氏接合酵母在 YPD 培养基中 55 h 达到稳定期, 90 h 达到稳定期末期, 在苹果汁中 70 h 达到稳定期, 90 h 达到稳定期末期, 且在稳定期期间, 鲁氏接合酵母在 YPD 中的 OD 值要高于在果汁中的 OD 值, 可能是苹果汁中含有多酚类物质会抑制鲁氏接合酵母的生长。因此, 抑菌剂在 YPD 中的 MIC 与在苹果汁中的 MIC 略微有所差异。

2.4 协同抑菌效果的测定

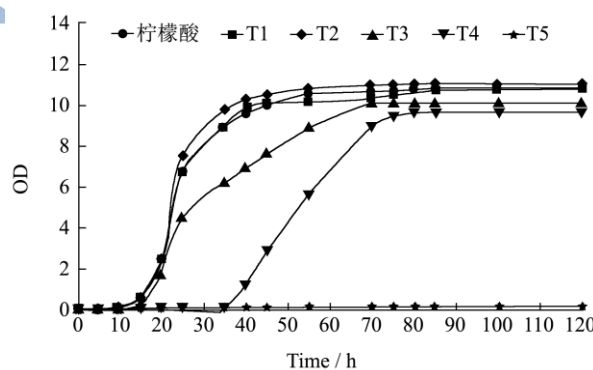


图5 果汁中不同纳他霉素添加量下鲁氏接合酵母生长期间 OD 值变化

Fig.5 Changes of OD value during *Zygosaccharomyces rouxii* growth in different amount of natamycin of fruit juice

由前面数据可知, 对鲁氏接合酵母抑菌效果较好且无色无味水溶性天然抑菌剂有纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸两种抑菌剂, 都属于微生物源抑菌剂。但纳他霉素在水中的溶解度很小, 将其配制成溶液需要添加大量的纳他霉素溶液, ϵ -聚赖氨酸在水中的溶解度较大, 但其抑菌效果较纳他霉素差, 因此需要较高浓度的 ϵ -聚赖氨酸溶液才能彻底抑制鲁氏接合酵母。因此可将

纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸两种抑菌剂进行复配制成复合抑菌剂, 以提高其抑菌效果。

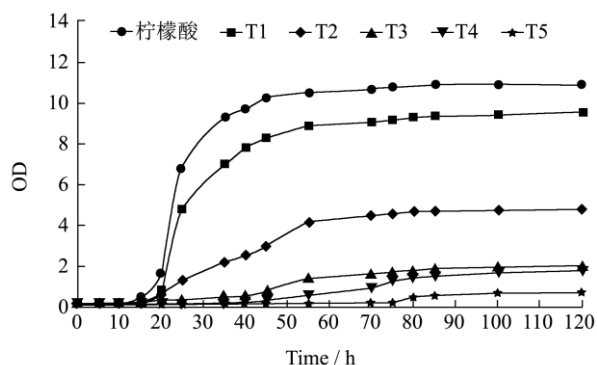


图6 果汁中不同 ϵ -聚赖氨酸添加量下鲁氏接合酵母生长期间 OD 值变化

Fig.6 Changes of OD value during *Zygocaccharomycesrouxii* growth in different amount of ϵ -polylysine of fruit juice

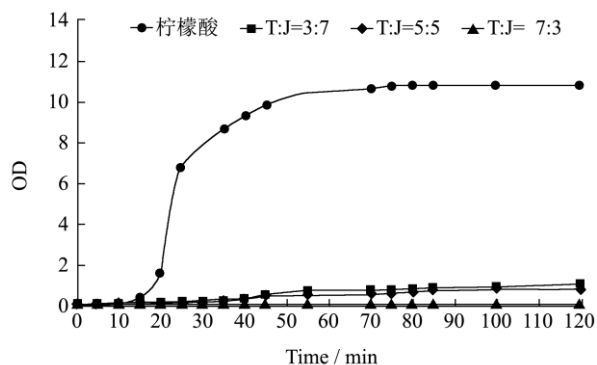


图7 果汁中不同复合抑菌剂配比下鲁氏接合酵母生长期间 OD 值变化

Fig.7 Changes of OD value during *Zygocaccharomycesrouxii* growth in different ratio of composite antibacterial agent of ϵ -polylysine of fruit juice

将纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸以不同的配比混合后加入接有鲁氏接合酵母的果汁中, 在 600 nm 的波长条件下测定其菌悬液的吸光度来判断其最小抑菌浓度。图 5、图 6 和图 7 分别为纳他霉素、 ϵ -聚赖氨酸以及复合抑菌剂在果汁中的生长曲线测定, 初始 OD 值和最终 OD 值前后差值 ≤ 0.05 即可认为抑菌剂抑制住了鲁氏接合酵母的生长, 其中 T1~T5 表示纳他霉素的浓度分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$, J1~J5 表示 ϵ -聚赖氨酸的浓度分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$, T:J=3:7、T:J=5:5、T:J=7:3 表示当纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸的复合浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时两者的复配比分别为: 纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=3:7、纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=5:5、纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=7:3。由以上数据和鲁氏接合酵母在果汁中生长曲线的测定可知, 纳他霉素在果汁中的 MIC 是 5 $\mu\text{g/mL}$, ϵ -聚赖氨酸在果汁中的 MIC 是 16 $\mu\text{g/mL}$, 当

纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸为 7:3 时, 抑菌效果最好, 复合抑菌剂的 MIC 是 1 $\mu\text{g/mL}$ 。

以前的研究表明, 当 ΣFIC 小于 1.00 时, ΣFIC 被认为是具有协同作用, 如果 ΣFIC 大于 1.00, ΣFIC 被认为是具有拮抗作用。最近新的研究表明, 如果 ΣFIC 小于或等于 0.5, 则具有协同作用^[22]; 如果 ΣFIC 大于 0.5 但小于 1.00 则具有附加作用, ΣFIC 大于 1.00 小于 4.00 时表示无作用, ΣFIC 大于 4.00 时表现出拮抗作用^[43]。

ΣFIC 由以下公式计算^[41]:

$$\Sigma\text{FIC} = \frac{C}{A} + \frac{C}{B}$$

式中: A 为纳他霉素的 MIC, B 为 ϵ -聚赖氨酸的 MIC, C 为复合抑菌剂的 MIC。

由此计算得知, 当纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=3:7 时, ΣFIC 为 0.42; 当纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=5:5 时, ΣFIC 为 0.36; 当纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=7:3 时, ΣFIC 为 0.28。因此, 纳他霉素与 ϵ -聚赖氨酸具有协同抑菌效果, 协同抑菌效果最好的复配比为: 纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=7:3。

2.5 不同处理条件下复合抑菌剂的抑菌稳定性比较

2.5.1 柠檬酸浓度对复合抑菌剂抑菌稳定性的影响

柠檬酸的浓度主要影响溶剂的 pH, 随着 pH 的降低其复合抑菌剂的溶解度会相应增大, 但根据国外有关报道, 它们也指出酸度是影响鲁氏接合酵母生长的主要限制因素^[43], 与此同时 pH 也有可能影响抑菌剂的稳定性。本试验以普通苹果汁 (糖度为 12 Brix, pH 为 3.8) 为培养基质, 比较不同柠檬酸浓度溶解相同量的复合抑菌剂对鲁氏接合酵母抑菌活性的影响。由表 7 可知, 柠檬酸浓度在 0.1% ~1.6% 范围内, 随着柠檬酸浓度的增加, 复合抑菌剂的抑菌活性呈现显著下降趋势。可能是随着柠檬酸浓度的增大, 溶液 pH 逐渐下降, 复合抑菌剂的稳定性受到了影响, 从而降低了其抑菌活性。

2.5.2 温度对复合抑菌剂抑菌稳定性的影响^[39]

温度过高会导致复合抑菌剂变性从而影响抑菌剂的抑菌稳定性。以普通苹果汁 (糖度为 12 Brix, pH 为 3.8) 为培养基质, 比较复合抑菌剂在不同温度处理条件下其抑菌活性的大小。由表 8 可知, 在热处理低于 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 温度对复合抑菌剂抑菌活性影响随着温度的升高抑菌活性逐渐降低, 但降低趋势不明显。当热

处理高于 60 °C 时,随着温度的上升其抑菌活性降低明显,当热处理达到 100 °C 时,复合抑菌剂由原来的无色澄清透明溶液变为浅绿色澄清透明溶液,其抑菌活性也明显下降。可能是因为高温条件下破坏了复合抑菌剂内部的分子结构,使复合抑菌剂的化学性质发生了改变,影响了其抑菌效果。

2.5.3 紫外照射时间对复合抑菌剂抑菌稳定性的影响^[39]

抑菌剂在紫外照射下其内部结构可能会有所变化,进而影响其结构稳定性和抑菌活性。以普通苹果汁(糖度为 12 Brix, pH 为 3.8)为培养基质,比较复合抑菌剂经不同紫外照射时间后其抑菌活性的大小。由表 9 可知,复合抑菌剂随着紫外照射时间的延长,其抑菌活性略微有所降低但不明显,说明紫外照射会对复合抑菌剂的抑菌活性有轻微影响,会使其抑菌活性略微有所降低。

表 7 柠檬酸浓度对复合抑菌剂抑菌活性的影响

柠檬酸浓度/%	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
抑菌圈直径/mm	10.63±0.15	10.47±0.21	10.30±0.17	10.15±0.09	10.00±0.10

表 8 温度对复合抑菌剂抑菌活性的影响

温度/°C	20	40	60	80	100
抑菌圈直径/mm	10.23±0.25	10.10±0.21	10.07±0.15	9.87±0.15	9.65±0.07

表 9 紫外线对复合抑菌剂抑菌活性的影响

时间/min	0	15	30	45	60
抑菌圈直径/mm	10.80±0.17	10.67±0.15	10.47±0.06	10.30±0.10	10.07±0.15

3 结论

对鲁氏接合酵母有抑菌活性的天然抑菌剂有很多,其中植物源抑菌剂的种类最多,抑菌效果较好的是阿魏酸和山苍子油,动物源抑菌剂种类最少,吴刚^[44]研究了壳聚糖对啤酒酵母表现出抑制作用,本研究发现壳聚糖对鲁氏接合酵母也有一定的抑菌效果,王南舟等人^[45]研究了鱼精蛋白对啤酒酵母和异常汉逊酵母均有抑制作用,本研究发现鱼精蛋白对鲁氏接合酵母也有较好的抑菌效果,但其提取成本较高,考虑到经济实惠因素,目前还不能大规模生产作为食品中的抑菌剂。对鲁氏接合酵母抑菌效果最好的是微生物源抑菌剂,且微生物源抑菌剂以其无色、无味、安全无毒、高效和经济实用等特点在食品中的应用也越来越广泛^[46]。本文通过对天然抑菌剂 MIC 的测定,筛选出纳他霉素和 ϵ -聚赖氨酸两种微生物源抑菌剂,并将两种抑菌剂以不同添加配比通过紫外分光光度计测量其 OD 值,发现当纳他霉素: ϵ -聚赖氨酸=7:3 时基本能完全抑制住果汁中鲁氏接合酵母菌的生长,且两种抑菌剂具有协同抑菌效果。由于不同培养基质的成分不同,对微生物的生长也有不同的影响,鲁氏接合酵母在 YPD 中的 OD 值要高于在果汁中的 OD 值,可能是苹果汁中含有多酚类物质会抑制鲁氏接合酵母的生长。因此,抑菌剂在 YPD 中的 MIC 与在苹果汁中的 MIC 也会略微有所差异。通过将抑菌剂在不同柠檬酸

浓度、不同温度以及不同紫外照射时间下测定其抑菌活性的稳定性可知,三种因素都会影响复合抑菌剂的抑菌活性。随着柠檬酸浓度的增加,其抑菌活性逐渐降低;随着温度的升高,其抑菌活性逐渐降低;随着紫外照射时间的延长,其抑菌活性逐渐降低。

参考文献

- [1] 朱玲.耐高渗透压腐败酵母的分离与控制研究[D].广州:华南理工大学,2010
ZHU Ling. Osmophilic yeast separation and control of corruption [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010
- [2] 江汉湖.食品微生物学[M].北京:中国农业出版社,2005
JIANG Han-hu. Food Microbiology [M]. Beijing: Agricultural Press Chinese, 2005
- [3] Mira N P, Teixeira M C. Microbial mechanisms of tolerance to weak acid stress [J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 416
- [4] Bnhnnva M, Zemancikva J, Sychrova H. Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses [J]. Yeast, 2014, 31(8):309-321
- [5] Martorell P, Stratford M, Steels H, et al. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar

- environments [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 114(2): 234-242
- [6] 王虎玄,岳田利,胡仲秋,等.陕西浓缩苹果汁中高渗酵母的分离鉴定[J].农业机械学报,2015,46(4):246-251
WANG Hu-xuan, YUE Tian-li, HU Zhong-qiu, et al. Isolation and identification of osmophilic yeast in the concentration apple juice in Shaanxi J [J]. Journal of Agricultural Machinery, 2015, 46(4): 246-251
- [7] 王虎玄,胡仲秋,牛晨,等.糖度与酸度对鲁氏接合酵母生长的影响[J].农业机械学报,2015,46(10):279-284
WANG Hu-xuan, HU Zhong-qiu, NIU Chen, et al. Sugar content and acidity of joint effect of yeast growth of *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. Journal of Agricultural Machinery, 2015, 46(10): 279-284
- [8] Beales N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review [J]. Compr Rev Food Sci Safety, 2004, 3(1): 1-20
- [9] Stratford M, Nebe-von-Caron G, Steels H, et al. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 161(3): 164-171
- [10] Arroyo-Lopez F N, Bautista-Gallego J, Duran-Quintana M C, et al. Modelling the inhibition of sorbic and benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives [J]. Food Microbiol, 2008, 25: 566-574
- [11] 刘宁,沈明浩.食品毒理学[M].北京:中国轻工业出版社,2007
LIU Ning, SHEN Ming-hao. Food Toxicology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007
- [12] 吴京平.新型微生物源天然食品防腐剂及其抑菌性能[J].北京联合大学学报,2011,1(1):55-58
WU Jing-ping. Natural food antiseptic and antibacterial properties of novel microbial source [J]. Journal of Beijing Union University, 2011, 1(1): 55-58
- [13] 张秀云,余有本,唐应芬.天然防腐剂综述[J].饮料工业,2001,4(4):1-5
ZHANG Xiu-yun, YU You ben, TANG Ying-fen. Review of natural preservatives [J]. Beverage Industry, 2001, 4(4): 1-5
- [14] Loettler M, Beiser S, Suriyarak S, et al. Antimicrobial efficacy of emulsified essential oil components against weak acid-adapted spoilage yeasts in clear and cloudy apple juice [J]. J Food Protect, 2014, 77(8): 1325-1335
- [15] Pozo-Bayon M A, Monagas M, Bartolome B, et al. Wine features related to safety and consumer health: an integrated perspective [J]. Crit Rev Food Sci, 2012, 52: 31-54
- [16] Tyagi A K, Gottardi D, Malik A, et al. Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays [J]. Food Chemistry, 2013, 137(1): 108-114
- [17] 郑罡,曹煜,魏羽佳.茶树油对白假丝酵母菌抑菌效果[J].中国消毒学杂志,2007,24(5):438-440
ZHENG Gang, CAO Yu, WEI Yu-jia. Tea tree oil antibacterial effect on *Candida albicans* [J]. Chinese Disinfection Journal, 2007, 24(5): 438-440
- [18] 闫雪,姚卫蓉,钱和.天然食品防腐剂的应用进展[J].食品研究与开发,2005,26(1):140-142
YAN Xue, YAO Wei-rong, QIAN He. The research and application progress of natural food preservative [J]. Food Research and Development, 2005, 26(1): 140-142
- [19] Garcia-Ruiz A, Cueva C, Gonzalez-Rompinelli E M, et al. Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic bacteria growth [J]. Food Control, 2012, 28: 212-219
- [20] Lopez-Malo A, Alzamora S M, Argai A. Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems [J]. Food Microbiol, 1995, 14: 117-124
- [21] Ou S, Kwok K C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods [J]. J Sci Food Agr., 2004, 84: 1261-1269
- [22] Walker T S, Bais H P, Halligan K M, et al. Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Agr Food Chem., 2003, 51: 2548-2554
- [23] Lule V K, Garg S, Gosewade S C, et al. Natamycin [J]. Encyclopedia of Food & Health, 2016: 56-62
- [24] Bo T, Liu M, Zhong C, et al. Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of ϵ -poly-L-lysine on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62: 4454-4465
- [25] Pintado C M B S, Ferreira M A S S, Sousa I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin [J]. Food Control, 2010, 21(3): 240-246
- [26] Ramos Ó L, Pereira J O, Silva S I, et al. Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese [J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95: 6282-6292
- [27] Rejs A, Jedrychowski L, Tomasik J, et al. Natamycin in ripening cheeses [J]. Pakistan Journal of Nutrition, 2002, 1: 243-247
- [28] Resa C P O, Jagus R J, Gerschenson L N. Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties,

- roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films [J]. *Mater Sci Eng C Mater BiolAppl*, 2014, 40: 281-287
- [29] Shih I L, Shen M H, Van Y T. Microbial synthesis of poly(epsilon-lysine) and its various applications [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(9): 1148-1159
- [30] Székán G, Almás M, Krizsán K, et al. Structure determination and synthesis of lysine isopeptides influencing on cell proliferation [J]. *Biopolymers*, 1997, 42(3): 305
- [31] Liu H, Pei H, Han Z, et al. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis* [J]. *Food Control*, 2015, 47(1): 444-450
- [32] 韩晓江,岳田利,牛晨,等.糖度胁迫下鲁氏结合酵母的代谢指纹分析[J].*食品科学*,2018:1-14
HAN Xiao-jiang, YUE Tian-li, NIU Chen, et al. Metabolic fingerprinting analysis of *Zygosaccharomyces rouxii* under sugar stress [J]. *Food Science*, 2018: 1-14
- [33] 唐聪.油茶粕粗提取物抑菌活性的初步研究[D].长沙:中南林业科技大学,2016
TANG Cong. Preliminary study on antibacterial activity of crude extracts of *Camellia oleifera* meal [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2016
- [34] 卢小菊,孟鸳.溶菌酶与壳聚糖复配液抑菌作用的研究[J].*中国食品添加剂*,2016,2:51-56
LU Xiao-ju, MENG Yuan. Study on lysozyme and chitosan compound antibacterial effect [J]. *Chinese Food Additives*, 2016, 2: 51-56
- [35] 赵国群,葛世辉,张桂.以菊粉为碳源培养酵母细胞的研究[J].*食品研究和开发*,2008,29(8):58-61
ZHAO Guo-qun, GE Shi-hui, ZHANG Gui. Study on inulin as carbon source of the culture of yeast cells [J]. *Food Research and Development*, 2008, 29(8): 58-61
- [36] 王黎光.鸡源益生菌分离鉴定及其生物特性研究与应用[D].长春:吉林大学,2006
WANG Li-guang. Isolation and identification of probiotics from chicken and its biological characteristics research and application [D]. Changchun: Jilin University, 2006
- [37] Bo T, Liu M, Zhong C, et al. Metabolomic analysis of antimicrobial mechanisms of ϵ -poly-L-lysine on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(19): 4454-4465
- [38] Taukoorah U, Lall N, Mahomoodally F. Piper betle L. (betel quid) shows bacteriostatic, additive, and synergistic antimicrobial action when combined with conventional antibiotics [J]. *South African Journal of Botany*, 2016, 105: 133-140
- [39] 苗妙,刘宇璇,胡苗苗,等.黑果腺肋花楸多酚的抑菌活性研究[J].*现代食品科技*,2017,33(12):56-60
MIAO Miao, LIU Yu-xuan, HU Miao-miao, et al. Antimicrobial activity of polyphenols from black chokeberry [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(12): 56-60
- [40] Odds F C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52(1): 1
- [41] De Rapper S, Van Vuuren S F, Kamatou G P P, et al. The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils- a combination from the pharaonic pharmacopoeia [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(4): 352-358
- [42] Davidson P M, Parish M E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials [J]. *Food Technology*, 1989, 43(1): 148-155
- [43] Vermeulen A, Daelman J, Van Steenkiste J, et al. Screening of different stress factors and development of growth / no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF) [J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(2): 389-396
- [44] 吴刚.壳聚糖作为天然食品防腐剂的研究[D].无锡:江南大学,2005
WU Gang. Study on chitosan as a natural food preservative [D]. Wuxi: Jiang Nan University, 2005
- [45] 王南舟,钟立人,黄高雄,等.鱼精蛋白抗菌特性的研究[J].*食品科学*,2000,21(4):43-46
WANG Nan-zhou, ZHONG Li-ren, HUANG Gao-xiong, et al. Studies on antibacterial properties of protamine [J]. *Food Science*, 2000, 21(4): 43-46
- [46] 杨双春,邓昊,潘一.微生物食品防腐剂的研究与应用现状[J].*中国食品添加剂*,2013,2:186-189
YANG Shuang-chun, DENG Hao, PAN Yi. Research and Application of microbial Food preservatives [J]. *Chinese Food Additives*, 2013, 2: 186-189