

复合抑菌剂对凉茶中腐败菌抑制的研究

徐青¹, 许喜林¹, 李志民²

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 邯郸职业技术学院管理系, 河北邯郸 056002)

摘要: 对凉茶中的腐败菌进行分离鉴定得出其中腐败菌主要为革兰氏阳性芽孢杆菌(多粘芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌), 通过对腐败菌的抑菌剂进行筛选和优化得出乳酸链球菌素(Nisin)、尼泊金复合酯、壳聚糖 3 种对腐败菌有明显的抑制作用的抑菌剂。利用响应面方法对三种抑菌剂复合后的抑菌效果进行优化, 应用 Box-Behnken 试验设计, 建立 3 种抑菌剂的二次多项式回归方程模型进行分析得出最佳复合抑菌剂配方, 并对获得配方的抑菌效果进行验证, 以检验响应面法的可靠性。

关键词: 凉茶; 复合抑菌剂; 抑菌; 响应面法

文章编号: 1673-9078(2013)6-1270-1272

Inhibition Effect of a Compound Preservative on Spoilage Bacteria in Herbal Tea

XU Qing¹, XU Xi-lin¹, LI Zhi-min²

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Department of management, Handan Polytechnic College, Handan 056002, China)

Abstract: Separation and identification of spoilage bacteria from herbal tea showed that the main spoilage organisms in the herbal tea were Gram-positive *Bacillus* bacteria (*Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus megaterium*). The better preservative for inhibition of the spoilage bacteria in herbal tea were found as Nisin, Nipagin ester and Chitosan. The formulation of a compound preservative with the three preservatives for enhanced efficacy was optimized by response surface methodology. A quadratic polynomial regression model was built using Box-Behnken design, The best composite bacteriostatic agent formula and the antibacterial effects of preservatives combination were validated.

Key words: herbal tea; preservatives combination; inhibition; response surface methodology

目前, 我国凉茶行业呈现几家规模化生产的龙头品牌企业和几十家连锁经营的凉茶铺, 不同企业在原料及工艺方面还存在较大差别^[1], 凉茶的原料来源很难控制, 数量上占绝大多数的作坊式的个体小摊档也存在着规模小、设备落后及加工工艺粗放等特点, 受条件所限, 凉茶易因微生物活动作用而发生腐败变质, 为了延长凉茶的保质期有必要对凉茶的腐败原因作深入研究, 并寻找一些有效的抑菌剂。

Nisin 作为一种新型的生物抑菌剂具有安全、无毒的特性, 但是抑菌谱较窄, 其能抑制大部分 G⁺菌及其芽孢的生长和繁殖, 但对 G⁻菌抑制效果不明显^[2]。尼泊金复合酯是高效、广谱、安全的抑菌剂, 其对真菌、细菌都有一定的抑制效果^[3-4]。壳聚糖是一种天然高分子聚合物, 具有高效抑菌能力, 良好的成膜性, 并且天然、无毒、无害, 在食品的防腐保鲜方面有着较高的应用价值^[5]。响应面法是降低成本、优化加工条件

的一种有效方法, 广泛地应用于农业、生物、食品、化学等领域^[6-7]。本实验采用响应面的方法对 3 种抑菌剂的复配^[8-9]进行研究, 旨在为选择延长凉茶保质期的复合抑菌剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验菌株(多粘芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌)是本实验室从凉茶中分离出来的腐败菌^[10]。

营养琼脂培养基、营养肉汤培养基, 广东环凯微生物科技公司; 乳酸链球菌素(Nisin), 兰州伟日生物工程有限公司; 尼泊金复合酯, 无锡江大百泰科技有限公司; 壳聚糖, 上海崇明生化制品厂

1.2 仪器与设备

JA2003 型电子天平, 上海精科天平; 数显不锈钢电热培养箱, HPX-9272 MBE 型, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器,

收稿日期: 2012-12-27

通讯作者: 许喜林, 博士, 副教授

SYQ-DSX-280B 型, 上海申安医疗器械厂; 牛津杯, 内径 6.0±0.1 mm, 外径 7.8±0.1 mm, 高 10.0±0.1 mm

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备

将菌株活化后, 以无菌操作的方法取一环菌至 100 mL 营养肉汤液体培养基, 于 36±1 °C 培养 24 h, 最终制备成浓度约为 10⁶ cfu/mL 的菌悬液, 置于 4 °C 冰箱备用。

1.3.2 单一抑菌剂的抑菌效果实验

通过牛津杯法测定每种抑菌剂最小抑菌浓度, 确定复合抑菌剂的浓度^[11]。

1.3.3 响应面试验设计

采用 Design-Expert V8 软件中的 Box-Behnken 试验设计, 对抑菌剂的抑菌效果进行响应面优化。考察 Nisin、尼泊金复合酯和壳聚糖的复合防腐效果。

2 结果与讨论

2.1 不同抑菌剂对凉茶腐败菌的影响

利用牛津杯法测定不同抑菌剂对腐败菌抑菌圈的大小, 确定不同抑菌剂的抑菌性能, 测定最小抑菌浓度, 试验结果如表 1。各抑菌剂对三种菌的最小抑菌浓度均没有超过允许的最大使用量。通过这一实验结果确定复合实验各抑菌剂的浓度选择。

表 1 各种抑菌剂的最小抑菌浓度

Table 1 The results of the minimum inhibitory concentration

MIC/%	多粘芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌
Nisin	0.005	0.004	0.004
尼泊金复合酯	0.01	0.01	0.009
壳聚糖	0.04	0.04	0.04

2.2 复合抑菌剂对凉茶腐败菌的抑制

2.2.1 响应面模型的建立与检验

表 2 Box-Behnken 试验分析因素与水平设计表

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素		
	A (Nisin)	B (尼泊金复合酯/%)	C (壳聚糖/%)
1	0.004	0.009	0.040
0	0.005	0.010	0.050
1	0.006	0.011	0.06

根据单因素试验结果选取乳酸链球菌素、尼泊金复合酯和壳聚糖 3 个因素为自变量, 根据每种抑菌剂最小抑菌浓度选取每个因素的 3 个水平, 以 (-1,0,1) 编码, 以抑菌率为响应值, 试验因素水平编码见表 2。抑菌率=[(对照菌落总数-加入抑菌剂菌落总数)/对照菌落总数×100。

其中菌落总数的测定按照 GB/T4789.2-2010, 采用平板倾注法^[12]。

表 3 响应面试验设计方案及结果

Table 3 Box-Behnken design and corresponding results

试验号	A	B	C	抑菌率%		
				多粘芽孢杆菌	短小芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌
1	0.004	0.01	0.05	93.80	94.35	94.95
2	0.005	0.011	0.05	94.93	95.68	96.18
3	0.005	0.009	0.05	88.54	89.65	90.83
4	0.004	0.01	0.03	80.65	81.75	82.48
5	0.004	0.011	0.04	82.24	84.24	84.86
6	0.005	0.01	0.04	99.62	99.99	99.88
7	0.004	0.009	0.04	70.25	71.35	73.93
8	0.005	0.01	0.04	98.27	98.23	98.98
9	0.005	0.01	0.04	100.00	98.97	99.00
10	0.005	0.01	0.04	99.00	100.00	98.76
11	0.005	0.011	0.03	88.46	89.25	90.12
12	0.006	0.011	0.04	88.98	89.15	91.23
13	0.005	0.01	0.04	98.92	98.64	98.94
14	0.006	0.01	0.05	97.89	98.47	98.69
15	0.006	0.009	0.04	85.21	86.23	88.02
16	0.005	0.009	0.03	76.45	78.28	79.18
17	0.006	0.01	0.03	92.69	93.26	94.17

表 4 响应面回归模型的方差分析

Table 4 Variance analysis of the Box-Behnken design results

方差来源	平方和	自由度	均方	F	Prob>F
模型	977.71	9	108.63	166.09	<0.0001
A	161.01	1	161.01	246.17	<0.0001
B	115.75	1	115.75	176.97	<0.0001
C	150.51	1	150.51	230.11	<0.0001
AB	14.90	1	14.90	22.78	0.0020
AC	15.80	1	15.80	24.16	0.0017
BC	7.81	1	7.81	11.94	0.0106
A ₂	129.86	1	129.86	198.54	<0.0001
B ₂	344.74	1	344.74	527.06	<0.0001
C ₂	4.09	1	4.09	6.26	0.0409
残差	4.58	7	0.65		
失拟项	3.81	3	1.27	6.56	0.0504
纯误差	0.77	4	0.19		

注: R²=0.9953; R²_{Adj}=0.9893; R²_{Pred}=0.9368

以表 2 的因素水平制备 17 组复合抑菌剂, 其中, 中心点处重复 5 次, 实施方案及结果见表 3。分别对三种菌所得到的响应面模型进行方差分析(ANOVA), 其中巨大芽孢杆菌结果如表 4 所示。

方程模型的 F 值为 166.09 说明该模型具有显著性, 失拟项为 6.56, 说明此模型可以应用于该实验。方差分析的结果表明 A、B、C、AB、AC、BC、A₂、B₂、C₂ 为模型的显著因素。R²=0.9957, 即该模型可用于预测, 并且 R²_{Pred}(0.9295)与 R²_{Adj} 值(0.9853)相差不大, 亦表明该响应面方程可以直接应用。相应的响应面方程为:

$$Y = 99.11 + 4.49A + 3.80B + 4.34C - 1.93AB - 1.99AC - 1.40BC - 5.55A^2 - 9.05B^2 - 0.99C^2$$

2.2.2 响应面分析

上图中等高线曲率较小, 形状近似椭圆, 表明三者间的交互作用较显著。

根据回归分析结果, 选取代表菌巨大芽孢杆菌做出相应的响应曲面图, 考察拟合响应面的形状, 从中分析 Nisin、尼泊金复合酯、壳聚糖对抑菌率的影响, 结果如图 1、图 2、图 3。

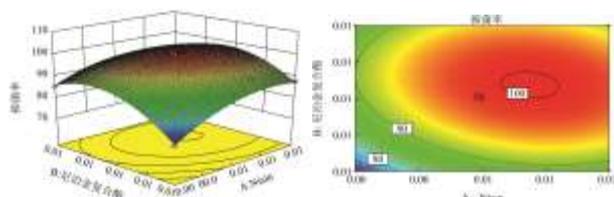


图 1 Y=f(A, B) 响应面立体图和等高线图

Fig.1 Response surface plot and contour plot for Y=f(A, B)

图1中, Nisin 含量固定时, 抑菌率随尼泊金复合酯浓度的增加而增加, 含量增加到一定程度后, 抑菌率有所下降。同样地, 尼泊金复合酯含量固定时, 抑菌率随 Nisin 浓度的增加而增加, 含量达到一定程度后, 抑菌率有所下降。

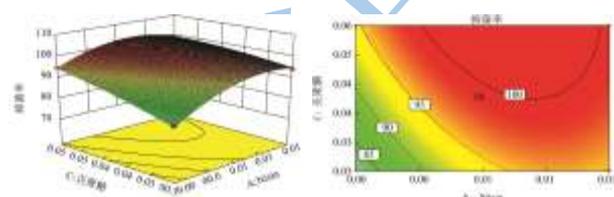


图 2 Y=f(A, C) 响应面立体图和等高线图

Fig.2 Response surface plot and contour plot for Y=f(A, C)

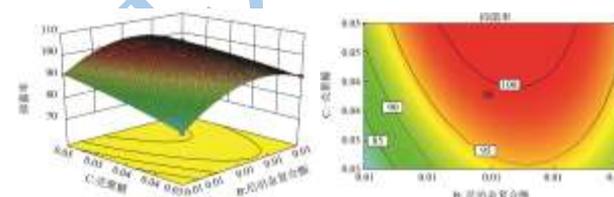


图 3 Y= f(B, C) 响应面立体图和等高线图

Fig.3 Response surface plot and contour plot for Y= f(B, C)

图2中, Nisin 含量固定时, 抑菌率随壳聚糖浓度的增加而增加; 壳聚糖含量固定时, 抑菌率随 Nisin 浓度的增加而增加, 含量达到一定程度后, 抑菌率有所

下降。图3中尼泊金复合酯含量固定时, 抑菌率随壳聚糖浓度的增加而增加; 壳聚糖含量固定时, 抑菌率随尼泊金复合酯浓度的增加而增加, 含量达到一定程度后, 抑菌率有所下降。

2.2.3 最优抑菌条件的确定与验证

综合以上分析, 可得出由 Nisin、尼泊金复合酯、壳聚糖组成最优的复配配方, 复合抑菌剂响应值 Y 为最大, 表明微生物的生长最受抑制。为检验响应面法的可靠性, 按照最佳复配配方优化的复合抑菌剂进行实验验证, 共进 3 次验证实验, 测得抑菌率的平均值 100.00%, 说明采用响应面法优化得到的实验参数真实可靠, 具有实用价值。

3 结论

试验对乳酸链球菌素 (Nisin), 尼泊金复合酯, 壳聚糖三种抑菌剂进行复配, 研究了不同复配比的抑菌剂对引起凉茶腐败变质的 3 种微生物(多粘芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌)的抑菌效果, 结果表明, 乳酸链球菌素 (Nisin), 尼泊金复合酯, 壳聚糖复配成的溶液对 3 种微生物的生长有明显的抑制效果。试验所得出的各种抑菌剂的添加量均未超过国家标准, 而且对能引起凉茶腐败的微生物有较好的抑制效果, 在生产中, 一方面能够减少单一抑菌剂的用量, 降低化学抑菌剂对人体的危害, 对人体健康有重要意义; 另一方面, 还可节约成本, 减少生产过程中的资金投入, 对生产实践有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 方新才.推行 HACCP 提升凉茶品质.[J].食品安全导刊, 2008,3:40-41
- [2] REUNANEN J, SAIRSP E J. Bioassay for Nisin in sausage; a shelf life study of Nisin in cooked sausage [J]. Meat Science, 2004, 66(3): 515-518
- [3] 黎婉园,姚朔影,夏枫耿.脱氢醋酸钠及其抗菌性试验[J].中国食品添加剂,2004,2:41-44
- [4] 李永飞,沈良,齐艳.尼泊金复合酯在酱菜生产中的应用[J].中国酿造,2004,133(4):19-20
- [5] 吴慧清,吴清平,石立三,等.壳聚糖复合生物抑菌剂的抑菌效果研究[J].食品科学,2007,28(10):112-117
- [6] Liu Cheng, Sun Zhongtao, Du Jinhua, et al. Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05 [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35: 703-711
- [7] CURTIN A C. Amino acid catabolism in cheese-related

- bacteria: selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001,91: 312-321
- [8] 姜绍通,孙磊,罗水忠,等.复合抑菌剂对腌制蔬菜中腐败细菌的抑制效果研究[J].食品科学,2010,9:54-58
- [9] 张宗舟,薛林贵,陈志梅.不同抑菌剂复配的抑菌效果研究[J].中国酿造,2010,11:26-29
- [10] 徐青,许喜林,王蔚瑜.凉茶中腐败微生物的分离纯化及初步鉴定的研究[J].食品科技,2012,37(11):31-34
- [11] 冯卫华,吴沛霞,蒋雨.绿色木霉菌代谢产物抑制芒果炭疽菌特性研究[J].中国食品学报,2011,11(7):56-60
- [12] 中华人民共和国卫生标准.GB4789-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验[S].北京:中国标准出版社,2010

现代食品科技