

低温等离子体协同防腐剂对苏云金芽孢杆菌芽孢灭活的影响

谭秀山¹, 赵兴², 黄现青^{3*}

(1. 新疆职业大学 烹饪与餐饮管理学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆科技项目服务中心, 新疆 乌鲁木齐 830011;

3. 河南农业大学 河南省食品加工与流通安全控制工程技术研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 以浓度为 2.64×10^6 cfu/mL 的苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 芽孢悬浮液为原液, 研究防腐剂和低温等离子体对苏云金芽孢杆菌芽孢致死率的影响。结果表明: 随着防腐剂浓度的增加, 苏云金芽孢杆菌的芽孢抑制率增加; 5 mg/mL 的脱氢乙酸钠可完全抑制苏云金杆菌芽孢生长; 20 mg/mL 的山梨酸钾对苏云金杆菌芽孢抑制率为 68%; 10 mg/mL 的乳酸链球菌素 (*Nisin*) 抑菌效果最显著; 当低温等离子参数为 250 s、400 W 时, 对苏云金杆菌芽孢抑制效果最明显, 抑制率达到 57.5%。3 种防腐剂复配后在 250 s、400 W 的低温等离子体处理后显示, 采用 1、3、4、5、6、7、8 种复配方式抑菌效果最好, 抑菌率均能达到 95.8% 以上。

关键词: 防腐剂; 苏云金芽孢杆菌; 低温等离子体; 腐败微生物; 食品卫生

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-8730(2019)04-0056-05

芽孢又被称为内生孢子, 属细菌休眠体。常见的产芽孢细菌主要有芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌、芽孢乳酸菌及少数球菌等。该类细菌在营养缺乏、代谢产物积累等条件下, 会在细胞内形成椭圆形或圆形的芽孢休眠体。芽孢的代谢能力极差, 但具有潜在的萌发力。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种革兰阳性细菌, 在芽孢形成过程中产生成为 δ -内毒素的杀虫伴孢晶体蛋白。^[1] 食品中苏云金芽孢杆菌能分泌蛋白酶, 使动植物组织中的蛋白质分解, 特别是会让肉色变暗, 并产生难以接受的异味, 使肉类发生腐败变质, 从而失去食用价值。^[2]

目前, 对于防腐剂和低温等离子体抑菌方面的研究, 主要集中于对细菌营养体的作用, 但对其如何影响芽孢萌发生长的研究较少。而在国外的研究中, 也仅仅关注了少数的耐热芽孢杆菌及梭状芽孢杆菌等菌株,^[3-6] 在国内仅有少数学者研究抑菌剂对芽孢耐热性的影响。^[7] 而低温等离子

体杀菌法是一种新型的杀菌方法, 具有时间短、无毒无残留、低热等特点。^[8] 目前认为, 微生物会处于受损、未受损、死亡 3 种状态, 受损细胞在适宜的环境下可恢复活力, 从而影响食品保藏品质。^[9] 本研究以从中温乳化香肠中, 分离筛选的苏云金芽孢杆菌芽孢为研究对象, 研究低温等离子体和防腐剂的单一与复配对芽孢生长的抑制率, 从而为食品加工条件的控制和保鲜技术研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

苏云金芽孢杆菌来自于双汇食品有限公司技术研究中心。

1.2 主要实验试剂

营养琼脂 (NA)、计数琼脂培养基 (PCA)、酵母浸粉、蛋白胨、氯化钠: 北京奥博星生物技术有限责任公司; 山梨酸钾 (99.2%)、脱氢乙酸钠、乳

收稿日期: 2019-07-02 * 通信作者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31671916)

作者简介: 谭秀山 (1976-) 女, 重庆万州人, 新疆职业大学烹饪与餐饮管理学院副教授, 从事食品营养、微生物及感官分析研究;

黄现青 (1977-) 男, 河南安阳人, 河南农业大学河南省食品加工与流通安全控制工程技术研究中心教授, 博士, 从事肉品科学与食品微生物研究。

酸链球菌素(效价 940 U/mg):双汇食品有限公司技术研究中心。

1.3 主要仪器与设备

THZ-C 台式恒温振荡器:太仓市华美生化仪器厂;SX-500 全自动蒸汽灭菌器:北京五洲东方科技发展有限公司;SY-DT02 低温等离子体处理器:苏州市奥普斯等离子体科技有限公司;BM 1000 生物显微镜:南京江南永新光学有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 芽孢菌悬液的制备

将分离纯化后的苏云金芽孢杆菌菌株接入液态培养基,在 37℃、150 r/min 条件下震荡培养,取对数生长期 0.2 mL 菌液,涂布于含有 0.001% MnCl₂ 的营养琼脂平板上,在 37℃ 条件下培养 5 d,室温放置 1~3 d,镜检芽孢达 95% 以上,用 PBS 缓冲液(pH7.2)洗下,倒入含有玻璃珠的三角瓶内,持续震荡 5 min。在经过 80℃ 水浴 30 min 后离心(5 000 r/min,15 min),用无菌 PBS 缓冲液重悬 3 次后,配成 2.64 × 10⁶ cfu/mL 芽孢菌悬液,置于冰箱中(4℃)备用,使用前用巴杀方法(70℃ 30 min)灭活繁殖体。

1.4.2 单一防腐剂分别对苏云金杆菌芽孢的抑制作用

选用牛津杯法完成实验,乳酸链球菌素设置浓度为 2~10 mg/mL,梯度设置为 1 mg/mL;山梨酸钾设置的浓度梯度为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 mg/mL;脱氢乙酸钠设置的浓度为 0~10 mg/mL,梯度设置为 1 mg/mL;取 100 μL 芽孢悬液至平板计数琼脂培养基上,并用涂布棒将菌液涂布均匀。依次向牛津杯中加入 200 μL 含上述不同浓度防腐剂的溶液,放入 37℃ 电热恒温培养箱培养 24 h。本实验每个梯度 3 个平行,外加空白对照组。

1.4.3 单一低温等离子体处理对苏云金杆菌芽孢的抑制作用

分别设置 200/300、200/400、200/500、250/300、250/400、250/500、300/300、300/400、300/500、350/300、350/400、350/500、400/300、400/400、400/500、450/300、450/400、450/500 (s/W) 这 18 个处理及一组空白对照组,共 19 组试验,按照同样方法将芽孢悬液进行平板涂布培养,计算

致死率,每组实验 3 个平行。

1.4.4 3 种防腐剂的复配对苏云金杆菌芽孢的抑制作用

由单一防腐剂的抑菌效果,初步推断出 3 种防腐剂对芽孢的抑制强度从强到弱分别为脱氢乙酸钠、乳酸链球菌素、山梨酸钾。实际操作发现,完全抑制芽孢的防腐剂浓度远远大于国标,故此实验以乳酸链球菌素 10 mg/mL、脱氢乙酸钠 5 mg/mL、山梨酸钾 20 mg/mL 为基准,混合使用时,各自用量占其最大用量的比例之和不超过 1。依据该标准,本实验按照复配添加量 = 各自用量占其最大用量的比例之和等于 1 来添加。^[10]

1.4.5 3 种防腐剂的复配和低温等离子体复合处理

与复配防腐剂的方法步骤相同,除此之外,菌液选用杀菌率最佳的低温等离子体参数,即 250 s、400 W,在同一低温等离子体参数条件下处理菌液后,涂布培养。抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组菌落数}}{\text{空白组菌落平均数}} \right) \times 100\%$$

1.5 数据分析

采用 Excel 分别计算每组实验芽孢抑制率后,采用 Spss16.0 计算其均值、标准差和致死率。对于低温等离子体处理芽孢的实验组,采用 Origin2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度单一防腐剂对苏云金杆菌芽孢抑制影响

2.1.1 不同浓度乳酸链球菌素对苏云金杆菌芽孢抑制影响

由表 1 可知,随着乳酸链球菌素浓度的上升,抑菌圈呈逐渐增大趋势。在最低浓度 2 mg/mL 时无明显抑菌效果;当浓度为 5~8 mg/mL 时,4 组抑菌效果无显著性差异 ($P > 0.05$),但抑菌效果显著大于 ($P < 0.05$) 较小的 3 个浓度;当浓度为 9 mg/mL 时,抑菌圈达到 2 cm 以上,当浓度为 10 mg/mL 时,抑菌圈达到 2.5 cm 以上;总体来说,浓度越高,乳酸链球菌素抑制效果最好,在实验选取的范围中,乳酸链球菌素浓度为 10 mg/mL 时抑制效果最佳。

2.1.2 不同浓度山梨酸钾对苏云金杆菌芽孢抑制影响

由表2可知,不同浓度的山梨酸钾对应的抑菌效果有显著差异。总体趋势上来看随着浓度的增加,抑菌率19.82%增加到68.06%。当山梨酸钾浓度为3~7 mg/mL时,相互之间没有显著差异($P > 0.05$),且抑菌率均处于25%~28%的水平;当山梨酸钾浓度超过7 mg/mL时,其抑菌效果增加明显,超过39%以上。

表1 不同浓度乳酸链球菌素对苏云金杆菌芽孢抑制影响

浓度/mg · mL ⁻¹	抑菌圈直径/cm
2	0.80 ± 0.01 ^e
3	0.95 ± 0.06 ^d
4	1.05 ± 0.06 ^d
5	1.65 ± 0.06 ^c
6	1.68 ± 0.13 ^c
7	1.78 ± 0.10 ^c
8	1.68 ± 0.10 ^c
9	2.03 ± 0.10 ^b
10	2.58 ± 0.13 ^a

注:不同字母数值间差异显著($P < 0.05$)

表2 不同浓度山梨酸钾对苏云金杆菌芽孢抑制影响

浓度/mg · mL ⁻¹	抑菌率/%
1	19.82 ± 9.16 ^{efg}
2	21.38 ± 5.55 ^{fg}
3	27.27 ± 5.21 ^{ede}
4	28.03 ± 6.44 ^{ede}
5	26.01 ± 1.10 ^{edef}
6	25.74 ± 0.76 ^{def}
7	25.82 ± 0.46 ^{def}
8	44.19 ± 0.58 ^{bcd}
9	39.02 ± 0.38 ^{bcd}
10	45.71 ± 0.58 ^{bc}
15	58.84 ± 5.30 ^{ab}
20	68.06 ± 2.32 ^a

注:不同字母数值间差异显著($P < 0.05$)

2.1.3 不同浓度脱氢乙酸钠对苏云金杆菌芽孢抑制影响

由表3可知,不同浓度的脱氢乙酸钠对抑菌效果有显著差异。随着脱氢乙酸钠浓度的上升,抑菌率逐渐增大。在浓度1 mg/mL和2 mg/mL时,抑菌率接近50%;浓度为3 mg/mL和4 mg/mL时,抑菌率达到70%以上;当浓度大于5 mg/mL时,抑菌率达到97%以上。总体来说,脱氢乙酸钠的浓度越高,苏云金芽孢杆菌芽孢的被抑制效果越好,当脱氢乙酸钠浓度大于5 mg/mL时其抑菌率可达到100%。

表3 不同浓度脱氢乙酸钠对苏云金杆菌芽孢抑制影响

浓度/mg · mL ⁻¹	抑菌率/%
1.00	49.12 ± 8.75 ^c
2.00	49.24 ± 5.92 ^c
3.00	70.33 ± 6.88 ^b
4.00	76.01 ± 8.38 ^b
5.00	97.73 ± 1.52 ^a
6.00	100.00 ± 0.00 ^a
7.00	100.00 ± 0.00 ^a
8.00	100.00 ± 0.00 ^a
9.00	100.00 ± 0.00 ^a
10.00	100.00 ± 0.00 ^a

注:不同字母数值间差异显著($P < 0.05$)

2.2 不同参数的低温等离子体处理对苏云金杆菌芽孢抑制影响

2.2.1 在300、400、500 W时不同处理时间对苏云金芽孢抑制率影响

由图1可见,低温等离子体功率在300 W时,处理时间为200和250 s时,苏云金芽孢杆菌芽孢的抑制率呈正值,即对芽孢的生长起到了抑制作用;当处理时间大于250 s、小于450 s时,苏云金芽孢杆菌芽孢的抑制率呈负值,反而对芽孢的生长起到了促进作用。从图中可知,300 W功率下,250 s的处理时间时苏云金芽孢杆菌芽孢的被抑制效果最明显。低温等离子体功率为400 W,处理时间为200、250、300、450 s时,对苏云金芽孢杆菌芽孢的生长起到了抑制作用,且250 s的处理时间对苏云金芽孢杆菌芽孢的生长抑制作用最佳。低温等离子体功率为500 W,处

理时间为 250 s 具有最佳抑制作用。

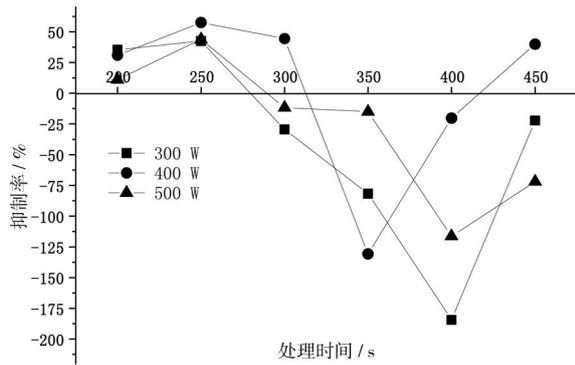


图 1 低温等离子体处理对苏云金芽孢抑制影响

综上所述,当低温等离子体的功率在 300、400、500 W 时 250 s 的处理时间时抑制苏云金芽孢杆菌芽孢的效果最明显;且当处理时间相同时,400 W 处理下的芽孢生长抑制率最高。因此选择 400 W、250 s 处理参数进行后续实验。

2.3 3 种防腐剂不同复配方式对苏云金芽孢抑制影响

由表 4 可知,取第 1、3 种复配方式时抑制效果最佳,且与设置的其他复配比例存在显著性差异,抑菌率可达 100%;第 4、5、7 种复配方式抑菌效果次之,抑菌率为 92% 左右;第 8、9、13 种复配方式抑制效果居中,抑菌率为 70% 左右;取第 10、11、12 种复配方式相互不存在显著性差异且抑制效果最低,抑菌率仅为 35% 左右。

表 4 3 种防腐剂不同复配添加比例对苏云金芽孢抑制影响

编号	山梨酸钾 /%	脱氢乙酸钠 /%	乳酸链球菌素 /%	抑菌率 /%
1	0	0	100	100.00 ± 0.00 ^a
2	0	25	75	45.83 ± 5.51 ^d
3	0	50	50	100.00 ± 0.00 ^a
4	0	75	25	91.67 ± 6.50 ^b
5	0	100	0	93.75 ± 4.17 ^b
6	25	0	75	80.90 ± 1.59 ^c
7	25	25	50	90.62 ± 4.77 ^b
8	25	50	25	75.70 ± 8.09 ^c
9	25	75	0	70.49 ± 15.64 ^c
10	50	0	50	34.38 ± 8.95 ^e
11	50	25	25	37.15 ± 6.74 ^e
12	50	50	0	36.81 ± 7.82 ^e
13	75	0	25	69.10 ± 7.95 ^c
14	75	25	0	55.90 ± 2.91 ^d
15	100	0	0	59.72 ± 2.07 ^d

注:不同字母数值间差异显著 ($P < 0.05$)

2.4 3 种防腐剂不同复配方式复合低温等离子体处理对苏云金芽孢抑制影响

由表 5 可知,用 250 s、400 W 的低温等离子体处理芽孢悬液后,采用第 1、3、4、5、6、7、8 种复配方式时,其抑菌率可达到 100%;当采用第 9、11、12、13、14、15 种复配方式时,其抑菌率为 80% 左右;第 2、10 种复配方式的抑菌效果最差,为 60% 左右。

表 5 3 种防腐剂不同复配添加比例复合低温等离子体处理对苏云金芽孢抑制影响

编号	山梨酸钾 /%	脱氢乙酸钠 /%	乳酸链球菌素 /%	抑菌率 /%
1	0	0	100	100.00 ± 0.00 ^a
2	0	25	75	65.28 ± 9.10 ^c
3	0	50	50	100.00 ± 0.00 ^a
4	0	75	25	100.00 ± 0.00 ^a
5	0	100	0	95.83 ± 7.22 ^a
6	25	0	75	98.27 ± 1.59 ^a
7	25	25	50	99.31 ± 0.60 ^a
8	25	50	25	100.00 ± 0.00 ^a
9	25	75	0	88.54 ± 9.08 ^b
10	50	0	50	55.21 ± 7.29 ^c
11	50	25	25	71.53 ± 12.51 ^b
12	50	50	0	87.85 ± 3.66 ^b
13	75	0	25	76.04 ± 14.58 ^b
14	75	25	0	87.15 ± 3.35 ^b
15	100	0	0	75.00 ± 8.90 ^b

注:不同字母数值间差异显著 ($P < 0.05$)

3 结论

单一添加防腐剂时,脱氢乙酸钠 5 mg/mL 时,抑制率可达到 95% 以上;乳酸链球菌素为 10 mg/mL 时,其抑制率可达到 100%;山梨酸钾 20 mg/mL 时,抑制率仅达到 67% 左右。单一使用低温等离子体处理芽孢时,参数设置为 250 s、400 W 时效果最佳。平均抑制率达到 57.52%;当参数为 300/300、300/500、350/300、350/400、350/500、400/300、400/400、400/500、450/500 (s/W) 时,对苏云金杆菌芽孢生长有不同程度的促进作用。3 种防腐剂复配后用低温等离子体处理的结果显示,第 1、3、4、5、6、7、8 种复配方式抑菌效果最好,抑菌率均能达到 95.8% 以上;实验结果表明,选择合适参数的低温等离子体处理苏云杆菌

芽孢可以提高复配防腐剂对其抑菌率。

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] 黄现青,张建威,高晓平,等. 防腐剂复配对苏云金芽孢杆菌抑菌效果研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(5): 419-421.
- [3] ÁVILA M, GÓMEZ T, HERNÁNDEZ M, et al. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 172: 70-75.
- [4] AOUDHI C, MEJRI S, MAAROUFI A, et al. Inhibitory effects of nisin and potassium sorbate alone or in combination on vegetative cells growth and spore germination of *Bacillus sporothermodurans* in milk [J]. Food Microbiology, 2015, 46(101): 40-45.
- [5] ARAN N. The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in a “sous-vide” beef goulash under temperature abuse [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 63(1): 117-123.
- [6] VELUGOTI P R, RAJAGOPAL L, JUNEJA V, et al. Use of calcium, potassium, and sodium lactates to control germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores during chilling of injected pork [J]. Food Microbiology (London), 2007, 24(7/8): 687-694.
- [7] 王涛. 食品组分与抑菌剂对嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢耐热性的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [8] 陈玥. 低温等离子体对生鲜湿面表面杀菌研究及装置开发[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- [9] RYSER E. Stress, Sublethal Injury, Resuscitation and virulence of bacterial foodborne pathogens: a review [J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(5): 1121-1138.
- [10] 李素,张顺亮,潘晓倩,等. 中温乳化肠中凝结芽孢杆菌芽孢萌发及热致死规律[J]. 肉类研究, 2017(4): 10-16.

Effect of cryogenic plasma combined with preservatives on inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores

TAN Xiushan¹, ZHAO Xing², HUANG Xianqing³

(1. College of Cooking and Catering Management, Xinjiang Vocational University, Urumqi, Xinjiang Autonomous Region 830013, China;

2. The Center of Development of Science and Technology in Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang Autonomous Region 830011, China;

3. College of Food Science and Technology, Henan Agriculture University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The suspension of *Bacillus thuringiensis* spores at a concentration of 2.64×10^6 cfu/mL was used as the starter to investigate the effect of complex preservatives and low temperature plasma on the lethality of *B. thuringiensis* spores. The results showed that the spore inhibition rate of *B. thuringiensis* increased with the increase of preservative concentration, with the complete concentration of 5 mg/mL for sodium dehydroacetate. 68% of *B. thuringiensis* spores could be inhibited at 20 mg/mL of potassium sorbate. Nisin functioned at 10 mg/mL. The combination of preservatives with the low temperature plasma at 250 s and 400 W could inhibit 95.8% of the spores.

Key words: preservatives; *Bacillus thuringiensis*; low temperature plasma; spoilage microorganisms; food hygiene

(责任编辑: 赵勇)