

调理石斑鱼产品腐败菌的分离及抑菌研究

沈春玉, 赵玉巧* (淮海工学院 海洋生命与水产业学院, 江苏连云港 222005)

摘要 为研究天然防腐剂对调理石斑鱼腐败菌的抑菌效果, 对调理石斑鱼的腐败菌进行分离纯化, 选择能适应低温环境或能产生芽孢的腐败菌作为试验菌。使用滤纸片法测定乳酸链球菌素、茶多酚、聚赖氨酸对试验菌的抑菌效果, 同时采用平板培养法测定天然防腐剂对试验菌的最低抑菌浓度(MIC)。试验结果表明, 乳酸链球菌素对7种试验菌都有抑菌效果, 茶多酚对5种试验菌有抑菌效果, 聚赖氨酸对3种试验菌有抑菌效果。乳酸链球菌素对试验菌中革兰氏阳性菌抑菌效果最好, 其中对S-3、S-9、S-11和S-13的MIC分别为0.1、0.4、0.5、0.4 mg/mL; 茶多酚对S-3、S-5、S-8、S-10和S-11的MIC分别为0.5、8.0、2.0、0.5、1.0 mg/mL。聚赖氨酸对试验菌S-5、S-8和S-10的MIC分别为2.5、1.5、2.0 mg/mL。

关键词 调理石斑鱼; 腐败菌; 抑菌; 最低抑菌浓度

中图分类号 S986 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)23-0186-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Isolation and Bacteriostasis of Spoilage Bacteria from the Prepared Grouper Products

SHEN Chun-yu, ZHAO Yu-qiao (College of Marine Life and Fisheries, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005)

Abstract In order to study the natural preservatives effect on the spoilage bacteria from the prepared grouper products, the spoilage bacteria of the prepared grouper products were isolated and purified, and the spoilage bacteria that can adapt to low temperature environments or produce spores were selected as experimental bacteria. Using filter paper method to determine the antibacterial effect of nisin, tea polyphenols and polylysine on spoilage bacteria. At the same time, the minimum inhibitory concentration (MIC) of natural preservatives against spoilage bacteria was determined by plate culture method. The experimental results showed that nisin had antibacterial effect on 7 experimental bacteria. Tea polyphenol had antibacterial effect on 5 experimental bacteria, and polylysine had antibacterial effect on 3 experimental bacteria. Nisin had the best antibacterial activity against gram-positive bacteria in the experimental bacteria, and the MIC for S-3, S-9, S-11 and S-13 were 0.1, 0.4, 0.5, 0.4 mg/mL. The MIC of tea polyphenols on S-3, S-5, S-8, S-10 and S-11 were 0.5, 8.0, 2.0, 0.5 and 1.0 mg/mL. The MIC of polylysine against experimental bacteria S-5, S-8 and S-10 were 2.5, 1.5 and 2.0 mg/mL.

Key words Prepared grouper products; Spoilage bacteria; Bacteriostasis; MIC

调理石斑鱼产品以石斑鱼为原料, 经过一定加工步骤后, 以包装的形式在冷藏(4℃)的条件下储存和贩卖, 可直接食用或食用前只需要简单加工或热处理。该产品采用低热强度灭菌技术以保证产品良好的风味, 但是该技术使产品灭菌不彻底, 在储存和贩卖的过程中, 产品中残留的细菌就会在适合的条件下生长繁殖, 导致产品出现腐败变质现象, 限制产品发展。目前, 该产品腐败微生物的控制技术成为产品发展的关键问题, 而产品腐败菌的分离及抑菌研究是这个问题得以解决的基础^[1]。

在控制产品腐败微生物方面, 陈佳丽等^[2]研究了香辛料对烧鸡中分离的腐败菌的抑制作用; 骆琦^[3]从烧鸡老汤中筛选了一株耐热芽孢菌, 研究了一系列抑菌方法; 马含笑等^[4]研究了Nisin、聚赖氨酸、单辛酸甘油酯和壳聚糖对腐败酱猪肝中分离出的3株污染微生物的抑制作用; 白艳红^[5]从低温熏煮香肠中优势腐败菌的角度出发, 研制成功了2种复配生物型抑菌剂, 延长了低温熏煮香肠货架期。

以上有关产品腐败微生物的分离及抑菌研究方面较少, 有关调理石斑鱼产品腐败菌的分离及抑菌鲜见。笔者从调理石斑鱼产品中分离出腐败微生物, 靶向选择芽孢菌或能够在低温储藏条件下生长良好的2类影响产品品质关键菌种作为试验菌, 体外研究天然防腐剂^[6-8]对试验菌的抑菌作用,

选出高效天然防腐剂, 旨在为调理石斑鱼产品提供防腐理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 石斑鱼(连云港三开食品有限公司); 乳酸链球菌素(浙江银象生物工程有限公司); 茶多酚(万利达生物科技有限公司); 聚赖氨酸(河南万邦实业有限公司)。

培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基^[9]和芽孢培养基^[10]。

1.2 方法

1.2.1 石斑鱼预处理。将新鲜程度不同的原料石斑鱼分成2组, 新鲜度如表1所示, 第1组去鳞、去腮、去内脏(“三去”)后立即取鱼肉部分培养; 第2组“三去”后油炸、包装, 30℃加速培养3d。

表1 原料石斑鱼新鲜度
Table 1 Freshness of grouper

序号 No.	新鲜等级 Fresh grade	感官评价 Sensory evaluation
1	一级	鱼眼凸起, 内脏、肚皮完整
2	二级	鱼眼凹陷, 内脏、肚皮轻微破裂
3	三级	有异味, 内脏、肚皮破裂

1.2.2 调理石斑鱼腐败微生物的分离和初步鉴定。使用平板计数法分离调理石斑鱼腐败微生物, 根据肉眼观察菌落形态、菌落颜色、隆起状态、边缘和表面状态, 挑选出存在差异的菌落^[11], 将其编号并且记录形态、颜色、状态等。对挑选出的菌落进行革兰氏染色和芽孢染色^[9]的初步鉴定。

1.2.3 不同温度下腐败微生物的生长。将腐败微生物接入

基金项目 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX19-0960)。
作者简介 沈春玉(1995—), 女, 江苏海门人, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全。*通信作者, 教授, 硕士, 从事食品生物技术与海洋生物活性物质研究。

收稿日期 2019-06-25

牛肉膏蛋白胨培养基,分别置于 5、10、15、20 ℃ 温度下培养,观察 10 d 内菌株生长情况。

1.2.4 菌悬液的制备。从菌种保藏斜面上取适量菌,研磨洗入 15 mL 无菌生理盐水中,振荡均匀,菌悬液浓度为 10^7 CFU/mL。

1.2.5 滤纸片法抑菌试验。配制 5 mg/mL 的乳酸链球菌素、茶多酚、聚赖氨酸溶液,现配现用。同时配制相同浓度的 3 种溶液,于 121 ℃ 灭菌 20 min 后使用。

将灭菌后的 $\Phi 6$ mm 滤纸片置于防腐液中浸泡 5 min,贴于涂有 0.1 mL 菌悬液的细菌平板上,同种菌株做 2 组平行样。将平板置于 30 ℃ 培养箱培养 48 h 后取出,测量抑菌圈大小。

1.2.6 乳酸链球菌素 MIC 的测定。配制含乳酸链球菌素浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL 的牛肉膏蛋白胨培养基,灭菌后倒 30 mL 该培养基于含有菌悬液的平板中混合均匀,每个菌株做 2 个平行,将平板放入 30 ℃ 培养箱培养 48 h 后,观察菌株生长情况,将没有菌生长的该乳酸链球菌素浓度牛肉膏蛋白胨培养基作为 MIC。

1.2.7 茶多酚 MIC 的测定。配制含茶多酚浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 mg/mL 的牛肉膏蛋白胨培养基,试验方法同“1.2.6”。

1.2.8 聚赖氨酸 MIC 的测定。配制含聚赖氨酸浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mg/mL 的牛肉膏蛋白胨培养基,试验方法同“1.2.6”。

2 结果与分析

2.1 调理石斑鱼腐败微生物菌落形态 从图 1 所示的菌相中挑选出 13 种腐败微生物,菌落形态结果如表 2 所示,S-1~S-12 为第 1 组预处理石斑鱼中挑选出的菌落,S-13 为第 2 组加速培养油炸石斑鱼中挑出的菌落。

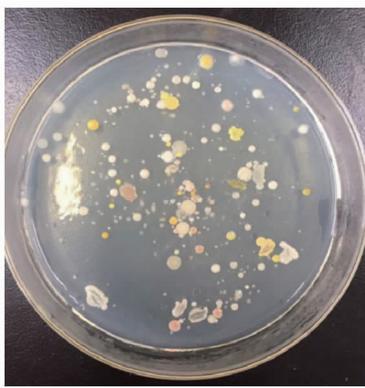


图 1 石斑鱼产品中的部分菌相

Fig. 1 Partial bacterial phase in grouper products

将这 13 种菌落划线分离纯化,得到单菌落形态与初始记录相符合,对其进行初步的革兰氏染色、芽孢染色及镜检^[12]。图 2 分别是编号为 S-5 号和 S-10 号的菌种划线分离单菌落形态图。

2.2 腐败微生物菌种的镜检结果统计 13 种腐败微生物镜检结果统计如表 3 所示,其中球菌较多,S-13 能够产生芽孢。有资料显示^[13-14],大部分芽孢杆菌产生的芽孢抵抗性较

强,耐高温,能够在较高温度下存活,是导致灭菌食品腐败变质的主要原因,且有些芽孢杆菌会在食品中产生毒素,从而造成腹泻、呕吐等不良症状。选择 S-13 为抑菌试验菌株。

表 2 调理石斑鱼中分离菌株革兰氏染色和菌落形态结果

Table 2 Results of gram staining and colony morphology of separate strains from grouper products

菌种编号 Strain No.	革兰 氏染色 Gram stain	菌体形态 Mycelial morphology	菌落形态 Colony morphology
S-1	G ⁺	球	较大,橙色,表面湿润,中间凹陷
S-2	G ⁻	球	中等,淡黄色,表面湿润
S-3	G ⁺	小球	中等,柠檬黄,表面湿润,对光透明
S-4	G ⁺	球	中等,乳白色,表面湿润
S-5	G ⁻	球	较大,乳白色,表面湿润,对光透明
S-6	G ⁻	小短杆	中等,乳白色,表面干燥,中间凹陷
S-7	G ⁻	球	中等,乳白色,表面干燥,褶皱
S-8	G ⁻	球	较小,乳白色,表面湿润
S-9	G ⁺	球	较大,奶黄色,表面干燥,褶皱
S-10	G ⁻	中长杆	较大,淡粉色,表面湿润
S-11	G ⁺	球	中等,淡黄色,表面干燥
S-12	G ⁺	球	中等,橘黄色,表面湿润
S-13	G ⁺	中长杆	较大,乳白色,中间干燥边缘湿润,边缘透明



图 2 部分试验菌单菌落形态

Fig. 2 Partial colony morphology of experimental bacteria

表 3 腐败微生物菌株镜检结果统计

Table 3 Statistics of microscopic examination results of spoilage strains

序号 Number	菌种类别比 Strain type ratio	比例 Proportion
1	球菌:杆菌	9:4
2	G ⁺ 菌:G ⁻ 菌	7:6
3	产芽孢菌:不产芽孢菌	1:12

2.3 不同温度下腐败微生物生长结果 由表 4 可知, S-3、S-5、S-8、S-9、S-10 和 S-11 能够在 5 ℃ 良好生长。由于调理石斑鱼产品的储藏和运输条件为 4 ℃ 左右,因此能够在 5 ℃ 左右生长良好的菌种会在储藏和运输过程中导致调理石斑鱼产品的腐败变质^[15]。故将该 6 种能够低温生长的菌种选为部分试验菌。

2.4 天然防腐剂的抑菌效果 由表 5 可知,乳酸链球菌素对 S-3、S-9、S-11 和 S-13 抑菌圈大,对 S-5、S-8、S-10 抑菌圈较小,结合表 2 结果说明乳酸链球菌素对革兰氏阳性菌抑菌效果极好,对革兰氏阴性菌抑菌效果不明显,这与他人研究的乳酸链球菌素对革兰氏阴性菌几乎无抑菌效果的结果

相符合^[16]。茶多酚对 S-3、S-10 和 S-11 也有较大的抑菌圈,对 S-5 和 S-8 的抑菌圈小;聚赖氨酸仅对 S-8 有较大的抑菌圈,对 S-5 和 S-10 的抑菌圈小。比较三者,乳酸链球菌素对试验菌抑菌谱更广,属于高效天然防腐剂,茶多酚其次。

表 4 不同温度下腐败微生物生长情况

Table 4 Growth of spoilage microorganisms at different temperatures

菌种编号 Strain No.	温度 Temperature/°C			
	5	10	15	20
S-1	-	+	+	+
S-2	-	-	+	+
S-3	+	+	+	+
S-4	-	-	+	+
S-5	+	+	+	+
S-6	-	+	+	+
S-7	-	+	+	+
S-8	+	+	+	+
S-9	+	+	+	+
S-10	+	+	+	+
S-11	+	+	+	+
S-12	-	+	+	+
S-13	-	-	+	+

注:“+”表示有菌生长;“-”表示无菌生长

Note: “+” means bacterial growing; “-” means no bacterial growing

表 5 天然防腐剂对试验菌的抑菌效果

Table 5 Antibacterial effect of natural preservative on experimental bacteria mm

菌种编号 Strain No.	乳酸链球菌素 Nisin	茶多酚 Tea polyphenol	聚赖氨酸 Polylysine
S-3	19.92±0.92	11.42±0.74	—
S-5	7.33±0.61	7.50±0.45	6.83±0.52
S-8	7.33±0.41	7.50±0.45	10.33±0.41
S-9	17.00±2.28	—	—
S-10	8.00±0.63	11.75±0.42	7.83±0.26
S-11	11.50±0.45	13.00±1.14	—
S-13	12.83±0.26	—	—

注:“—”表示没有抑菌作用

Note: “—” means no bacteriostatic effect

2.5 高压灭菌处理对天然防腐剂抑菌活性的影响 将表 6 与表 5 对比可知,表 6 中乳酸链球菌素的抑菌圈比表 5 小很多,高温处理乳酸链球菌素不稳定,降低了其对试验菌的抑菌效果;茶多酚的抑菌圈大小稍有变化,说明其热稳定性一般;聚赖氨酸的抑菌圈大小几乎无变化,说明聚赖氨酸具有热稳定性^[17]。

表 6 高温处理的天然防腐剂对试验菌的抑菌效果

Table 6 Antibacterial effect of high temperature treated natural preservative on experimental bacteria mm

菌种编号 Strain No.	乳酸链球菌素 Nisin	茶多酚 Tea polyphenol	聚赖氨酸 Polylysine
S-3	10.25±0.61	10.50±0.32	—
S-5	7.67±0.41	7.25±0.52	7.58±0.66
S-8	7.83±0.52	7.08±0.20	10.08±0.92
S-9	8.25±0.42	—	—
S-10	7.67±0.41	10.25±1.57	7.25±0.68
S-11	6.67±0.41	8.83±0.93	—
S-13	8.50±0.45	—	—

注:“—”表示没有抑菌作用

Note: “—” means no bacteriostatic effect

2.6 乳酸链球菌素 MIC 的测定 从表 7 可以看出,乳酸链球菌素对 S-3 的 MIC 为 0.1 mg/mL,对 S-9 的 MIC 为 0.4 mg/mL,对 S-11 的 MIC 为 0.5 mg/mL。继续增加乳酸链球菌素浓度会超过食品添加剂最大允许添加量,而且乳酸链球菌素对革兰氏阴性菌抑菌效果不好,故未对 S-5、S-8、S-10 进一步测定 MIC。乳酸链球菌素对该研究试验菌的 MIC 均高于吕志飞等^[18]研究的乳酸链球菌素对金黄色葡萄球菌的 MIC,是因为菌种及研究方法不同,该研究以平板中是否生长菌为标准测定 MIC 比液体培养测 OD 值法更为可靠。

表 7 不同浓度的乳酸链球菌素对试验菌的抑菌效果

Table 7 Antimicrobial effect of nisin at various concentrations on experimental bacteria

菌种编号 Strain No.	乳酸链球菌素浓度 Nisin concentration/mg/mL					
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
S-3	+++	-	-	-	-	-
S-5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S-8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S-9	+++	+++	++	+	-	-
S-10	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S-11	+++	+++	+++	++	+	-
S-13	+++	++	+	+	-	-

注:“-”表示无菌生长;“+”表示少量菌生长;“++”表示较多菌生长;“+++”表示菌生长旺盛

Note: “-” means no bacteria growing; “+” means a small amount of bacteria growing; “++” means bacteria growing; “+++” means the bacteria growing vigorously

2.7 茶多酚 MIC 的测定 从表 8 可以看出,茶多酚对 S-3 和 S-10 的 MIC 为 0.5 mg/mL,对 S-5 的 MIC 为 8.0 mg/mL,对 S-8 的 MIC 为 2.0 mg/mL,对 S-11 的 MIC 为 1.0 mg/mL。与李柯欣^[19]研究结果的茶多酚对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌的 MIC 分别为 0.25、8.00、10.00 mg/mL 相差不大。由于茶多酚对试验菌的 MIC 均超过食品添加剂最大允许添加量,在后续研究中可配合其他高效防腐剂应用于产品,降低其使用量。

表 8 不同浓度的茶多酚对试验菌的抑菌效果

Table 8 Antimicrobial effect of tea polyphenol at various concentrations on experimental bacteria

菌种编号 Strain No.	茶多酚浓度 Tea polyphenol concentration/mg/mL					
	0	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
S-3	+++	-	-	-	-	-
S-5	+++	++	++	++	+	-
S-8	+++	++	++	-	-	-
S-10	+++	-	-	-	-	-
S-11	+++	++	-	-	-	-

注:“-”表示无菌生长;“+”表示少量菌生长;“++”表示较多菌生长;“+++”表示菌生长旺盛

Note: “-” means no bacteria growing; “+” means a small amount of bacteria growing; “++” means more bacteria growing; “+++” means the bacteria growing vigorously

2.8 聚赖氨酸 MIC 的测定 从表 9 可以看出,聚赖氨酸对 S-5 的 MIC 为 2.5 mg/mL,对 S-8 的 MIC 为 1.5 mg/mL,对 S-10 的 MIC 为 2.0 mg/mL。有研究报道称^[20],聚赖氨酸作为一种天然防腐剂,抑菌谱广,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、酵母菌以及霉菌等都有较好的抑制作用。其抑菌谱虽

广,但也不能全部抑制,其能抑制的调理石斑鱼产品中试验菌较少,故后续不考虑其在调理石斑鱼产品中的应用。

表 9 不同浓度的聚赖氨酸对试验菌的抑菌效果

Table 9 Antimicrobial effect of polylysine at various concentrations on experimental bacteria

菌株编号 Strain No.	聚赖氨酸浓度 Polylysine concentration//mg/mL					
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
S-5	+++	++	++	++	+	-
S-8	+++	++	++	-	-	-
S-10	+++	++	++	+	-	-

注:“-”表示无菌生长;“+”表示少量菌生长;“++”表示较多菌生长;“+++”表示菌生长旺盛

Note:“-” means no bacteria growing;“+” means a small amount of bacteria growing;“++” means more bacteria growing;“+++” means that the bacteria growing vigorously

3 结论

由于石斑鱼生长环境温度低,其携带的微生物也适宜低温生长,且石斑鱼营养丰富,鱼体捕捞死亡后,其携带微生物迅速繁殖,因而从调理石斑鱼中挑选出的 13 种腐败微生物中,能够低温生长的菌株占比较多。挑选出的 7 种试验菌产芽孢或能够在 5℃ 生长的特性,使得这 7 种腐败菌在调理石斑鱼产品生产和储存过程中占有优势,极易引起产品腐败,影响产品发展。

天然防腐剂体外抑菌试验表明,乳酸链球菌素对试验菌具有广谱抑菌性,乳酸链球菌素对革兰氏阳性菌试验菌 S-3、S-9、S-11 和 S-13 的 MIC 分别为 0.1、0.4、0.5、0.4 mg/mL,都在食品添加剂最大添加范围内;茶多酚对抑菌效果紧随其后,对试验菌 S-3、S-5、S-8、S-10 和 S-11 的 MIC 分别为 0.5、8.0、2.0、0.5、1.0 mg/mL;聚赖氨酸抑菌效果最差,对试验菌 S-5、S-8 和 S-10 的 MIC 分别为 2.5、1.5、2.0 mg/mL。选择乳酸链球菌素和茶多酚这 2 种高效天然防腐剂做后续研究。

参考文献

- [1] 李艳亮,金邦荃,诸永志. 低温肉制品中腐败菌的分离鉴定[J]. 内蒙古农业科技,2009(3):62-63,77.
- [2] 陈佳丽,王可,赵敏,等. 香辛料对烧鸡中腐败菌抑制效果的研究[J]. 肉类工业,2018(10):28-32.
- [3] 骆琦. 肉制品中产芽孢菌的分离鉴定及抑菌方法研究[D]. 天津:天津科技大学,2017.
- [4] 马含笑,李春,周晓宏. 真空包装酱猪肝中污染微生物的分离鉴定和抑菌研究[J]. 食品研究与开发,2012,33(8):204-210.
- [5] 白艳红. 低温熏煮香肠腐败机理及生物抑菌研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [6] 蓝蔚青,谢晶,杨胜平,等. Nisin 生物保鲜剂对冷藏带鱼的保鲜效果研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(4):683-686.
- [7] 于林,陈舜胜,王娟娟,等. 茶多酚改性胶原蛋白-壳聚糖复合膜对冷藏斜带石斑鱼的保鲜效果[J]. 食品科学,2017,38(3):220-226.
- [8] 张涵,徐高原,冯爱国,等. 聚赖氨酸复合涂膜协同气调包装对金鲳鱼保鲜作用研究[J]. 食品科技,2018,43(11):166-171.
- [9] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:高等教育出版社,2007.
- [10] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.
- [11] 由高铭,陈欣然,赵前程,等. 抑菌剂浸泡液对冷藏高白鲑鱼肉腐败菌的抑制效果[J]. 水产科学,2018,37(5):584-590.
- [12] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京:科学出版社,1984.
- [13] 郭全友,王晓晋,姜朝军. 微波杀灭虾源地衣芽孢杆菌孢子特性及效果[J]. 农业工程学报,2018,34(21):281-287.
- [14] 李唐飞,范大明,黄建联,等. 聚赖氨酸抑制冷藏鱼糜制品优势菌及品质影响[J]. 食品研究与开发,2018,39(17):9-14.
- [15] 徐维艳,刘芳,朱恩俊,等. 低温肉制品中腐败菌研究进展[J]. 江苏农业科学,2012,40(11):320-321.
- [16] REUNANEN J,SARIS P E J. Bioassay for nisin in sausage;a shelf life study of nisin in cooked sausage[J]. Meat science,2004,66(3):515-518.
- [17] HYLDEGAARD M,MYGIND T,VAD B S,et al. The antimicrobial mechanism of action of epsilon-poly-L-lysine[J]. Applied and environmental microbiology,2014,80(24):7758-7770.
- [18] 吕志飞,连战,王如娜,等. 内酯型槐糖脂与乳酸链球菌素对金黄色葡萄球菌的抑菌活性比较及联合抑菌效果研究[J]. 中国调味品,2018,43(6):13-18.
- [19] 李柯欣. 茶多酚的提取、抑菌作用与抑菌机理研究[D]. 成都:西华大学,2017.
- [20] 刘蔚,周涛. e-聚赖氨酸抑菌机理研究[J]. 食品科学,2009,30(9):15-20.