

# 革兰氏阳性菌和阴性菌对山梨酸钾的耐受差异性

滕菲<sup>1</sup>, 郭桂萍<sup>2</sup>, 赵勇<sup>1</sup>, 潘迎捷<sup>1</sup>, 卢瑛<sup>\*1</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 江苏南通出入境检验检疫局, 江苏 南通 226000)

**摘要:** 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌对山梨酸钾防腐剂的耐受性差异进行了探讨。以食品中常见的革兰氏阳性菌(蜡样芽孢杆菌, 金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌)与革兰氏阴性菌(沙门氏菌、副溶血弧菌、荧光假单胞菌)为研究对象, 针对纯培养状态和模拟食品体系进行了研究。结果显示, 加入 1 g/L 山梨酸钾后革兰氏阴性菌的菌数可减少近  $10^2 \sim 10^{3.5}$  CFU/mL, 而革兰氏阳性菌的菌数只能减少近 10 CFU/mL, 说明山梨酸钾对革兰氏阴性菌的抑菌效果比革兰氏阳性菌要高 2 倍以上。最小抑菌浓度实验和即食海带的接种模拟实验结果与生长曲线结果相吻合, 显示革兰氏阳性菌对山梨酸钾的耐受性强于革兰氏阴性菌, 此结果对于今后应用山梨酸钾进行革兰氏阳性菌类的防控具有重要意义。

**关键词:** 革兰氏阳性菌; 革兰氏阴性菌; 耐受性; 山梨酸钾

**中图分类号:** TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)04-0417-06

## Study of the Tolerance Difference between Gram Positive and Gram Negative Bacteria to Potassium Sorbate

TENG Fei<sup>1</sup>, GUO Gui-ping<sup>2</sup>, ZHAO Yong<sup>1</sup>, PAN Ying-jie<sup>1</sup>, LU Ying<sup>\*1</sup>

(1. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Nantong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nantong 226000, China)

**Abstract:** In this study, the tolerance of 3 gram positive (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogene*) and 3 gram negative bacteria (*Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens*) to potassium sorbate were carefully studied by pure cultivation and simulation of food system. When 1 g/L potassium sorbate was presented in culture, the number of gram negative bacteria was reduced to up to  $2 \sim 3.5$  lg(CFU/mL), while those of gram positive bacteria were only reduce to 1 lg(CFU/mL). This results demonstrated potassium sorbate inhibited on the gram negative bacteria growth than that of the gram negative bacteria. Results of pure culture, minimal inhibitory concentration (MIC) and inoculation to instant kelp results all showed that the tolerance of gram positive bacteria is better than gram negative bacteria. It may have significance in the application of potassium sorbate on the control of gram positive bacteria.

**Key words:** gram positive, gram negative, tolerance, potassium sorbate, inoculation

收稿日期: 2010-12-21

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字(2009)第 6-1 号); 上海市教育委员会科研创新项目(09YZ274); 江苏出入境检验检疫局科研项目(2010KJ34); 上海市教育委员会重点学科建设项目(J50704)。

\* 通信作者: 卢瑛(1971-), 女, 浙江东阳人, 理学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

Email: y-lu@shou.edu.cn

食源性疾病是发展中国家和发达国家的首要食品安全问题,对人类健康危害严重,尤其是对儿童、孕妇和老人。食品在生产和贮藏过程中,易受细菌性微生物感染而腐败变质,并导致食物中毒和食源性疾病影响人类健康。采用防腐剂抑制腐败菌与食源性致病菌是贮藏食品的有效手段之一<sup>[1]</sup>。常见的食源性致病菌种类繁多,其中包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。目前水产品中的主要防腐剂有山梨酸钾,山梨酸,二氧化氯水溶液等<sup>[2]</sup>。山梨酸钾作为一种不饱和脂肪酸,可在体内参与新陈代谢,最终被分解成二氧化碳和水,而几乎没有毒性<sup>[3]</sup>,目前山梨酸钾已成为一种在全球范围使用广泛的化学防腐剂。

金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌是革兰氏阳性菌,在环境中分布广泛<sup>[4-5]</sup>,两者在我国水产品中都有报道被检出<sup>[4,6-7]</sup>。副溶血弧菌是一种革兰氏阴性嗜盐杆菌,主要分布于沿岸海水、海河交界处及海产品中,是沿海地区引起食物中毒的重要病原菌,在海产品上的带菌率高达 45.7%<sup>[8]</sup>。有报道称这 3 种菌引起的食物中毒事件近年来呈上升趋势<sup>[9]</sup>。沙门氏菌是革兰氏阴性无芽孢杆菌,是我国进口水产品致病菌检测中的必检项目<sup>[10]</sup>。作者选取这 4 种菌以及食品中常见的蜡样芽孢杆菌和荧光假单胞菌作为实验对象,对纯培养状态 and 模拟食品体系中的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌对山梨酸钾防腐剂的耐受性差异进行了探讨,以期今后制定更有针对性的食品防控措施提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 材料** 山梨酸钾(食品添加剂):购自珠海市悦发食品有限公司;菌株:购于 ATCC;培养基:胰蛋白胨大豆肉汤和胰蛋白胨大豆琼脂(TSB, TSA);均购于中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限责任公司;即食海带(1 kg 真空包装):上海扬骥工贸有限公司所赠。

**1.1.2 主要仪器与设备** 隔水式恒温培养箱:上海一恒科技有限公司产品;分析天平:梅特洛-托利多公司产品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌种活化及菌悬液制备** 菌种于-80℃冰

箱中取出,取一环接种于 5 mL TSB 中,活化 3 次。

**1.2.2 生长曲线实验** 取 500  $\mu$ L 活化 3 次后的菌液接种于 100 mL TSB 的三角烧瓶中,37℃、170 r/min 转摇床培养至菌数为  $10^3$  CFU/mL 时加入山梨酸钾。于 37℃ 培养箱中培养。加入的山梨酸钾质量浓度为 0.2, 1, 2, 4 g/L,另取一组未加山梨酸钾的培养基做为对照组,每个质量浓度做 3 个平行。持续培养,每小时取样品进行平板记数。

**1.2.3 最小抑菌浓度(MIC)实验** 参考 Millette 等人的试验方法<sup>[12]</sup>,首先将山梨酸钾溶于 TSB 中,二倍梯度稀释,取各梯度稀释液 0.1 mL 注入无菌的 96 孔培养板中。然后每个孔中加入  $5 \times 10^5$  CFU/mL 指示菌,实际实验中山梨酸钾的最终质量浓度为 600, 300, 150, 75, 37.5, 15, 7.5 g/L。另外取一组未接指示菌的山梨酸钾梯度液作为阴性对照。将 96 孔板盖上无菌膜放于 37℃ 培养 24 h。然后于 96 孔酶标仪 600 nm 下测定吸光值。样品孔指示菌的  $A_{600}$  值与阴性对照组有明显差异时的浓度视为最小抑菌浓度。

**1.2.4 接种海带实验** 取新鲜出厂的真空包装即食海带样品,用体积分数 95% 乙醇浸泡 30 min,无菌水洗 3 次备用,此时海带的带菌量小于 5 CFU/mL,吸取  $10^3$  CFU/mL 活化 3 次后的各菌液分别滴加到盛有 25 g 酒精处理前海带的无菌培养皿中,置于 37℃ 恒温培养箱中培养。参考食品添加标准 GB2760-1996 系列中针对即食海带的规定<sup>[11]</sup>,加入 1 g/L 山梨酸钾溶液;另取一组未加山梨酸钾的酒精处理海带做为对照组,每个质量浓度做 3 个平行。持续培养 24 h,每 4 h 取样品进行平板记数。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长曲线结果

由图 1 可见,蜡样芽孢杆菌组中加入山梨酸钾后,在进入生长平衡期时(8 h),加入 1 g/L 山梨酸钾时菌数比对照组减少了近 10 CFU/mL,加入 2, 4 g/L 山梨酸钾时比对照组减少了近 100 CFU/mL。对于金黄色葡萄球菌组,在培养 4 h 后可观察到较明显变化:加入 1, 2 g/L 山梨酸钾组其菌数比对照组减少了近  $10^{0.5}$  CFU/mL,加入 4 g/L 山梨酸钾时菌数比对照组减少了约 10 CFU/mL。对于单增李斯特菌组,培养 20 h 后,加入了 1, 2 g/L 山梨酸钾

组的菌数比对照组减少了近 10 CFU/mL,而加入了 4 g/L 山梨酸钾组的菌数则比对照组减少了近 100 CFU/mL。国标中规定的山梨酸钾最大加入量为 1 g/L,上述 3 种菌在此浓度时的菌数与对照组相比,都减少了约 10 CFU/mL。上述结果显示,山梨酸钾对蜡样芽孢杆菌,金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌有一定的抑制作用。

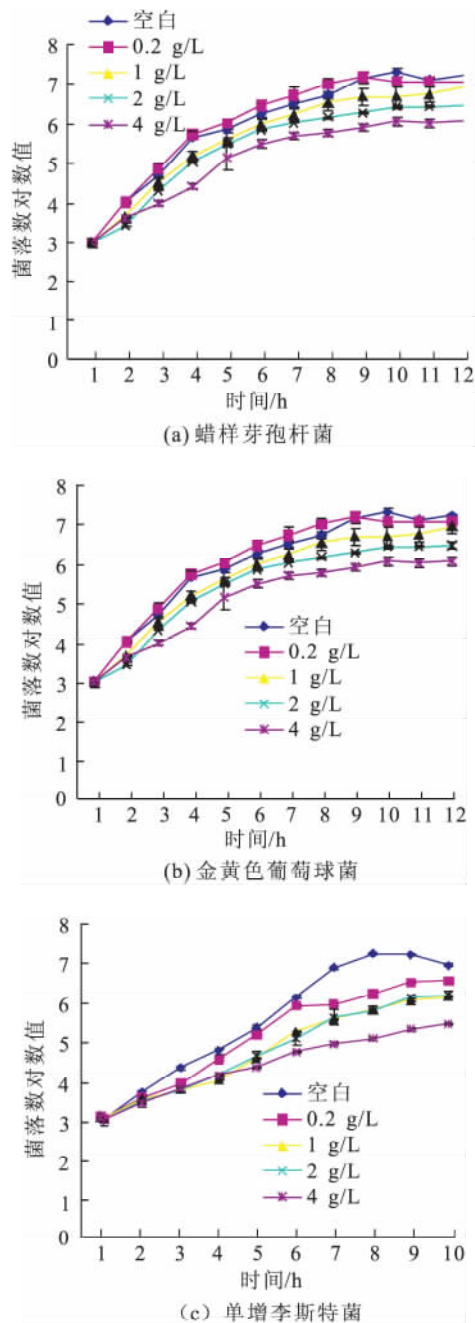


图 1 致病菌在不同山梨酸钾质量浓度下的生长曲线图  
Fig. 1 Effect of potassium sorbate concentration on the growth curves of three gram positive bacteria

由图 2 可知,沙门氏菌组中加入了 1 g/L 山梨酸钾后生长平衡期(10 h)的菌数比对照组减少了 100 CFU/mL,加入 4 g/L 山梨酸钾组则减少了将近  $10^{3.5}$  CFU/mL。副溶血弧菌组在培养 6 h 后,加入 0.2 g/L 山梨酸钾后即比对照组减少了近  $10^{1.5}$

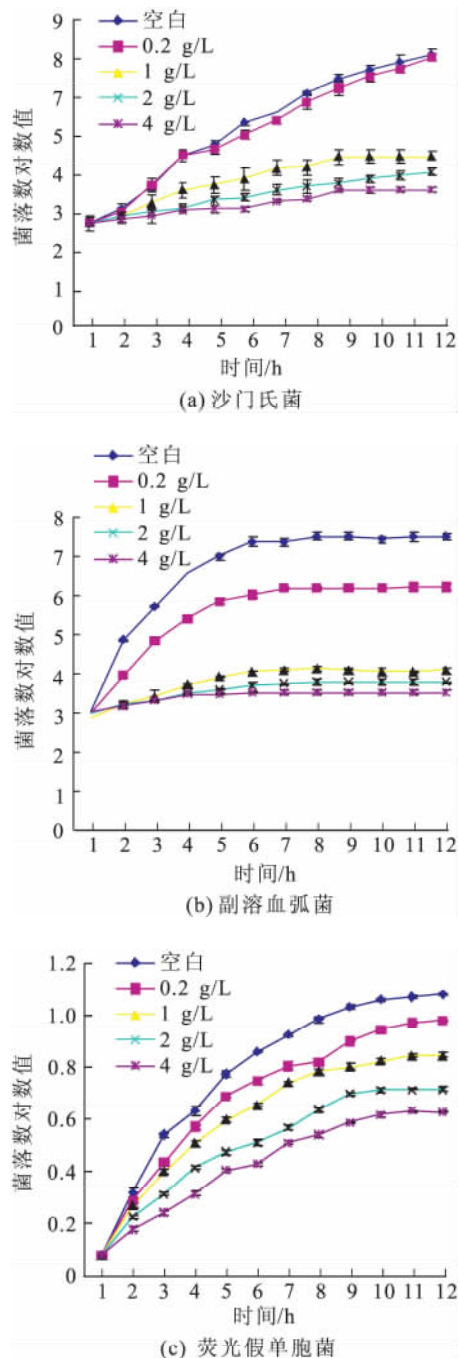


图 2 致病菌在不同山梨酸钾质量浓度下的生长曲线图  
Fig. 2 Effect of potassium sorbate concentration on the growth curves of three gram negative bacteria

CFU/mL,加入 1 g/L 山梨酸钾后减少了近  $10^{3.5}$  CFU/mL,加入 4 g/L 山梨酸钾后的菌数比对照组减少了近  $10^4$  CFU/mL。对于荧光假单胞菌,加入 0.2 g/L 山梨酸钾后在生长平衡期(10 h)的菌数比对照组减少了近 10 CFU/mL,加入 1 g/L 山梨酸钾后减少了近 100 CFU/mL,加入了 4 g/L 山梨酸钾后的平台期菌数比对照组减少了近  $10^3$  CFU/mL。综上所述,上述 3 种菌在加入了国标所规定的最大质量浓度 1 g/L 山梨酸钾时,与对照组相比,平台期的菌数减少了  $10^2 \sim 10^{3.5}$  CFU/mL。由此可见,山梨酸钾对沙门氏菌、副溶血弧菌、荧光假单胞

菌 3 种菌的抑制作用较强。

## 2.2 最小抑菌浓度(MIC)实验结果

由表 1 可见,山梨酸钾对金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌的最小抑菌浓度最高,达到 600 g/L,对单增李斯特次之,为 300 g/L,对荧光假单胞最低,仅为 37.5 g/L,对副溶血弧菌次之,为 75 g/L。虽然山梨酸钾对沙门氏菌的最小抑菌浓度与单增李斯特菌相同,但山梨酸钾对革兰氏阳性菌的最小抑菌浓度(300 g/L)整体高于革兰氏阴性菌(150 g/L)。这与前面的生长曲线结果相吻合。

表 1 山梨酸钾对革兰氏阳性菌和阴性菌的抑菌效果

Tab. 1 Effects of potassium sorbate concentration of growth of gram positive and negative bacteria

| 山梨酸钾<br>质量浓度/<br>(g/L) | 革兰氏阳性菌      |            |             | 革兰氏阴性菌    |          |            |
|------------------------|-------------|------------|-------------|-----------|----------|------------|
|                        | 金黄色<br>葡萄球菌 | 蜡样<br>芽孢杆菌 | 单增<br>李斯特氏菌 | 副溶血<br>弧菌 | 沙门<br>氏菌 | 荧光<br>假单胞菌 |
| 600                    | —           | —          | —           | —         | —        | —          |
| 300                    | +           | +          | —           | —         | —        | —          |
| 150                    | +           | +          | +           | —         | +        | —          |
| 75                     | +           | +          | +           | +         | +        | —          |
| 37.5                   | +           | +          | +           | +         | +        | +          |
| 18.75                  | +           | +          | +           | +         | +        | +          |

注:其中+代表生长,—代表不生长

## 2.3 即食海带接种实验结果

由图 3 可知,金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌接种到即食海带中后,山梨酸钾组的生长曲线与对照组基本重合,并同时达到生长平衡期。上述结果说明 1 g/L 山梨酸钾对这两种革兰氏阳性菌的生长基本上没有抑制作用。

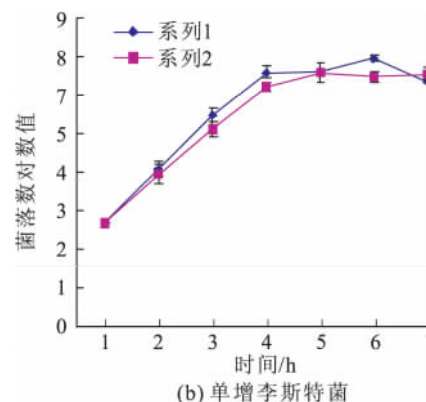
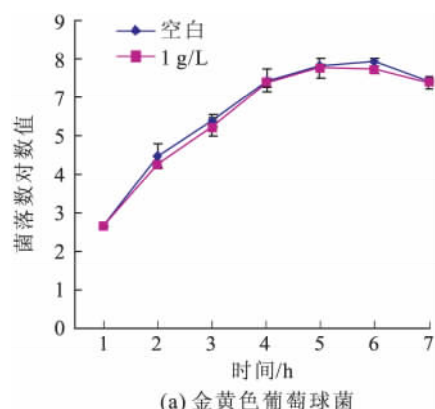


图 3 即食海带中革兰氏阳性菌的生长曲线图

Fig. 3 Growth curves of two gram positive bacteria inoculated to instant kelp

由图 4 可知,沙门氏菌和副溶血性弧菌接种到即食海带中后,在生长平衡期(16~20 h),这两种菌的山梨酸钾加入组的菌数比对照组减少了近 10 CFU/mL,结果显示 1 g/L 山梨酸钾对沙门氏菌和副溶血性弧菌有一定的抑制作用。

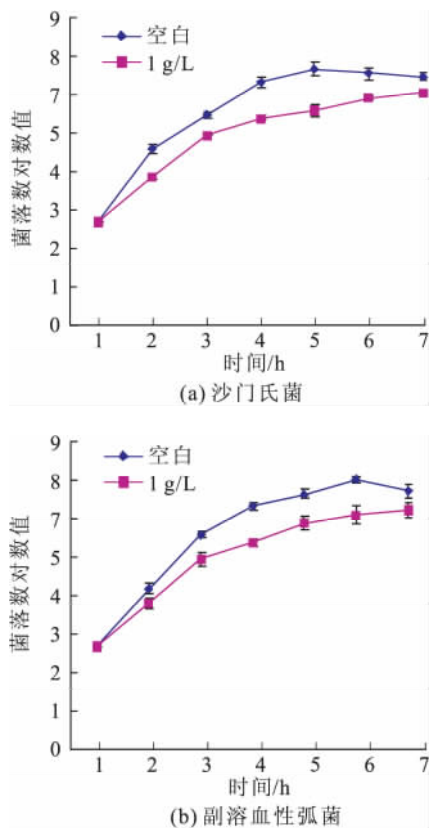


图4 即食海带中革兰氏阴性菌的生长曲线图

Fig. 4 Growth curves of two gram positive bacteria inoculated to instant kelp

### 3 结语

选用了3种革兰氏阳性菌(分别为蜡样芽孢杆菌,金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌)和3种革兰氏阴性菌(分别为沙门氏菌,副溶血弧菌和荧光假

单胞菌),探讨了食品工业中常用的防腐剂山梨酸钾对这些菌的抑菌效果。不同山梨酸钾质量浓度下的生长曲线结果显示,加入1 g/L山梨酸钾后,革兰氏阴性菌的菌数可减少近 $10^2 \sim 10^{3.5}$  CFU/mL,而革兰氏阳性菌的菌数只能减少近10 CFU/mL,即山梨酸钾对革兰氏阴性菌的抑菌效果比革兰氏阳性菌要高2倍以上。最小抑菌浓度结果和即食海带的接种模拟实验结果也显示出革兰氏阳性菌对山梨酸钾的耐受性要高于革兰氏阴性菌,与生长曲线结果相吻合。研究显示,山梨酸钾需要通过微生物细胞膜进入细胞内,造成胞内pH值降低而抑制细胞的基本代谢反应。山梨酸钾具有亲脂性<sup>[14]</sup>,革兰氏阴性菌的细胞壁脂类物质含量较高,因此山梨酸钾分子易通过;革兰氏阳性菌的细胞壁则含有大量肽聚糖,不易通过。因此,作者认为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌细胞壁的结构差异可能是造成两者对山梨酸钾耐受性差异的主要原因。

山梨酸钾在食品工业中作为防腐剂应用范围十分广泛,在很多食品中的使用质量浓度不得超过1 g/L,研究显示,蜡样芽孢杆菌,金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌这些革兰氏阳性菌在37℃时对高于此规定质量浓度的山梨酸钾仍有一定的耐受性,具有较好的生长趋势。这说明即便是添加了山梨酸钾防腐剂,一旦在食品供应销售过程中其贮藏或保存条件不当时,这些菌还是具备大量繁殖能力,即还存在着食品安全的隐患。因此,在应用山梨酸钾防腐剂时,对于革兰氏阳性菌类应予以特殊重视并多管齐下进行控制为宜。

### 参考文献(References):

- [1] 乔支红,程永强,鲁战会,等.乳酸对三种食源性致病菌的抑菌及杀菌作用[J].食品科技,2008,10:187—191.  
QIAO Zhi-hong, CHENG Yong-qiang, LU Zhan-hui, et al. Antibacterial and bactericide activity of lactic acid against three strains of food-borne pathogenic bacteria[J]. *Food Science and Technology*, 2008, 10:187—191. (in Chinese)
- [2] 凌关庭,唐述潮,陶民强,等.食品添加剂手册[M].北京:化学工业出版社,2003:645—680.
- [3] 马玉山,梁咏梅.山梨酸钾在肉制品中的应用实例[J].肉类工业,2006,8(304):3—4.  
MA Yu-shan, LIANG Ying-mei. Examples of potassium sorbate applied in meat and related products[J]. *Roulei Gongye*, 2006, 8(304):3—4. (in Chinese)
- [4] 韩斌,刘战民,高海燕,等.单核细胞增生李斯特菌的检测技术[J].中国生物工程杂志,2008,28(6):125—128.  
HAN Bin, LIU Zhan-min, GAO Hai-yan, et al. Advance on the detection assays of listeria monocytogenes[J]. *China Biotechnology*, 2008, 28(6):125—128. (in Chinese)
- [5] 王丽哲,晋怀峰,宫树权,等.金黄色葡萄球菌污染水产食品的研究[J].食品科学,2001,22(5):78—80.  
WANG Li-zhe, JIN Huai-feng, GONG Shu-quan, et al. Study on *S. Aureus* contamination of aquatic products[J]. *Food*

- Science, 2001, 22 (5): 78—80. (in Chinese)
- [6] 崔京辉, 李达, 王永全, 等. 2004—2005 年北京市食品中单核细胞增生性李斯特菌的污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(12): 1508—1509.
- CUI Jing-hui, LI Da, WANG Yong-quan, et al. Surveillance on the contamination with *Listeria monocytogenes* of food in Beijing during 2004~2005[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2006 16(12): 1508—1509. (in Chinese)
- [7] 赵晋, 杨小蓉, 薛晴. 四川省食品单核细胞增生性李斯特菌污染监测[J]. 预防医学情报杂志, 2006, 22(3): 256—258.
- ZHAO Jin, YANG Xiao-rong, XUE Qing, et al. Surveillance on contamination of listeria monocytogenes in food of sichuan province[J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2006, 22(3): 256—258. (in Chinese)
- [8] Kam ruzzam, Bhoopong P, Vuddhaku, et al. Detection of a functional insertion sequence responsible for deletion of the Therm ostable directhem olysins gene (tdh) in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Gene*, 2008, 421: 67—73.
- [9] 王娜, 陶妍. 水产中三种致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与生物技术报, 2009, 28(3): 397—402.
- WANG Na, TAO Yan. Establishment of a multiplex PCR for detection of three types of pathogen in aquatic foods[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(3): 397—402. (in Chinese)
- [10] 赵宏, 张宏伟, 魏亚东, 等. 水产品中沙门氏菌的检测和确证[J]. 口岸卫生控制, 2005, 11—4: 22—23.
- ZHAO Hong, ZHANG Hong-wei, WEI Ya-dong, et al. Detection and analysis of salmonella in import aquatic products [J]. *Port Health Control*, 2005, 11(4): 22—23. (in Chinese)
- [11] 黄志良. 山梨酸衍生物的合成与抗菌活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2002.
- [12] Millette M, Luquet F M, Lacroix M. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*-fermented milk[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44: 314—319.

## 科技信息

### 欧盟通过“禁止果汁中添加糖类成分”新规定

3月8日,“果汁中添加糖类成分属于非法行为”成为欧盟理事会通过的新规定之一。该规定将适用于所有欧盟国家、所有产品,并将与欧盟现有果汁相关法规及法典委员会(CAC)现有果汁标准内容进行统一。

新规定主要变化是不允许在果汁中添加糖类成分。之前果汁中允许加入糖成分,只是通过产品标示内容“不添加糖成分”来对添加外源糖成分或不添加外源糖成分情况进行区分。实施新规定后,标示中将不允许使用上述表示,市场销售果汁产品将禁止添加糖成分。

番茄汁的管理将从目前的通用食品法律管理首次转为果汁管理。新规定再次确认用于生产果汁产品的每种水果名称都必须列在果汁产品说明中。对于由3种以上水果生产的果汁产品,标注中可以使用“几种水果”代替各种水果名称。对于4种水果(黑醋栗、番石榴、芒果、百香果)果汁需要标注可溶性固形物数值同时,还要按照食品法典标准要求标注。

该议案已通过欧盟议会一读程序,意味着欧盟议会已经采纳该指令。预计该法律将于今年6月份实施,届时指令内容也将在欧盟官方刊物发布。

新规定实施过程中有过渡期,即允许企业在规定期限内继续在其产品标示中继续使用。“产品中不添加糖成分”新标示过渡期为36个月,即转换期18个月、旧标示结束期18个月。但从法律程序讲,该指令生效后,各成员国仅有18个月转化期,即将该法令转化为本国法律,18个月期限过后所有国家必须实施该法令。[消息来源]国家食品安全信息中心. 欧盟通过“禁止果汁中添加糖类成分”新规定[EB/OL]. (2012-3-15). <http://www.fsi.gov.cn/news.view.jsp?sort=3&id=31394>.