

壳聚糖香草醛席夫碱对猕猴桃果汁污染菌的抑制作用*

江 峰¹, 魏 洪², 黄亚励^{2**}, 徐 红², 孙晓红³

(1. 贵州医科大学 公共卫生学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 食品安全学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖及壳聚糖香草醛席夫碱4种药物对猕猴桃果汁污染菌的抑制作用。方法: 分离及培养猕猴桃果汁中的污染菌株, 采用形态学方法鉴定污染菌株, CTAB法提取污染菌DNA, 采用PCR法扩增细菌的16S rDNA区和真菌的ITS区基因, 扩增的目标条带进行测序分析, 并用MEGA6软件构建进化树, 明确猕猴桃果汁中污染菌种; 采用微量液体稀释法测定山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖及壳聚糖香草醛席夫碱4种药物对猕猴桃果汁污染菌的最小抑菌浓度(MIC)。结果: 从猕猴桃果汁中分离到4株污染菌分别为枝孢菌、歧皱青霉菌、杂色曲霉菌、坚强芽胞杆菌, MIC抑菌实验结果显示壳聚糖香草醛席夫碱对4种污染菌的抑制作用最好, 其中对枝孢菌的抑制作用等同于山梨酸钾和苯甲酸钠而强于壳聚糖, 对歧皱青霉菌和杂色曲霉菌的抑制作用强于山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖, 对坚强芽胞杆菌的抑制作用等同苯甲酸钠、强于山梨酸钾和壳聚糖。结论: 壳聚糖香草醛席夫碱的抑菌效果表现最好, 强于山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖, 具有应用潜力。

[关键词] 污染菌; 防腐剂; 抑菌活性; 壳聚糖; 席夫碱; 猕猴桃果汁

[中图分类号] TS27 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)01-0040-05

DOI:10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2017. 01. 009

Antibacterial Effects of Chitosan Vanilline Schiff-base to Contaminant Bacteria in Kiwi Fruit Juice

JIANG Feng¹, WEI Hong², HUANG Yali², XU Hong², SUN Xiaohong³

(1. College of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. College of Food Safety, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of potassium sorbate, sodium benzoate, chitosan, and chitosan vanillin schiff-bases on contaminant bacteria in Kiwi fruit juice. **Methods:** The contaminant organisms were isolated from kiwi fruit juice and identified morphologically, as well with molecular biology method. DNA of contaminants were isolated with CTAB method. The 16S rDNA of bacteria and ITS gene area of fungus were amplified by PCR and sequences were analyzed for identification. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the four drugs were tested by trace dilution method. **Results:** The 4 kinds of contaminant isolated from Kiwi fruit juice included *Cladosporium* sp., *Penicillium steckii*, *Aspergillus versicolor* and *Bacillus firmus*. Among the 4 chemicals tested, Chitosan vanillin schiff-bases showed the best inhibitory effects to these contaminants. Its effect to *Cladosporium* sp. was as strong as those of potassium sorbate and sodium benzoate, and was stronger than that of chitosan. Its inhibitory effect to *Penicillium steckii* was stronger than those of potassium sorbate, sodium benzoate, and chitosan. Its inhibitory effect to *Bacillus firmus*, equaled to that of sodium benzoate, and was stronger than those of potassium sorbate, and chitosan. **Conclusion:** The antibacterial

*[基金项目] 贵州省科技厅贵州医科大学联合基金[黔科合 LH 字(2015)7316 号]

**通信作者 E-mail:1411432215@qq. com

网络出版时间:2017-01-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170117.2102.007.html>

effect of chitosan vanillin Schiff is stronger than those of potassium sorbate, sodium benzoate, and chitosan, which shows that it might has utilization potentiality.

[**Key words**] contaminants; antiseptic; bacteriostatic activity; chitosan; Schiff-base; kiwi fruit juice

猕猴桃果汁饮料营养丰富,在加工过程采用巴氏杀菌法,但某些耐热菌仍会残留在果汁饮料中并增殖,影响果汁质量。目前在工业生产中常添加山梨酸钾或苯甲酸钠作为防腐剂抑制果汁中微生物的繁殖,延长保质期。壳聚糖被认为是新型安全的防腐剂,对果蔬具有防腐保鲜作用,但目前还未批准在果汁中添加使用,壳聚糖香草醛席夫碱是对壳聚糖进行化学修饰的产物,可提高抑菌效果^[1]。本研究选择贵州省某猕猴桃饮料生产企业,分离鉴定其不合格产品中的污染菌,在其中加入常用防腐剂山梨酸钾、苯甲酸钠、新型防腐剂壳聚糖及实验室自制的壳聚糖香草醛席夫碱 4 种药物^[2-3],比较 4 种药物对污染菌的抑菌效果,为相关猕猴桃饮料生产企业改进生产工艺,提高产品质量提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

贵州某果汁饮料公司提供的猕猴桃果汁饮料,壳聚糖(3 000 Da,浙江金壳药业有限公司)、香草醛(分析纯)、MH(A)培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司)及马铃薯葡萄糖琼脂培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司);ProFlex™ PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.2 方法

1.2.1 污染菌株的分离及培养 用移液枪吸取 100 mL 猕猴桃果汁于 PDA 培养基和普通培养基上,涂布均匀,25 ℃ 培养 7 d,挑取单菌落于另一培养基内培养,重复 3 次,得到纯化的污染菌株。

1.2.2 污染菌株形态学鉴定 将菌株在 PDA 培养基上划线培养 7 d,观察其菌落形态。在载玻片中央滴加一滴乳酸酚棉蓝染色液,挑取少量菌体于载玻片液滴中,将菌体涂抹均匀,盖上盖玻片,油镜下观察菌株的形态特征,参照真菌形态学鉴定手册,鉴定所分离的菌株种类^[4]。

1.2.3 污染菌 DNA 提取 用 CTAB 法提取污染菌的 DNA^[5],取 10 mm³ 菌体于离心管中,加入 CTAB-buffer 400 μL 和聚乙炔吡咯烷酮溶液 100 μL,旋涡震荡 10 min 后放入恒温水浴箱 60 ℃ 水浴 1 h。加入氯仿-正丁醇混合溶液 500 μL,14 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入预冷的异丙醇混匀,14 000 r/

min 离心 10 min,弃上清液,加入预冷的 70% 乙醇溶液 1 mL 混匀,14 000 r/min 离心 2 min,弃上清,加 TE-buffer 50 μL 溶解沉淀,获得 DNA 溶液。

1.2.4 PCR 扩增 对细菌的 16S rDNA 区和真菌的 ITS 区基因进行扩增^[6],引物序列见表 1,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μL,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察是否有目标条带。回收目标条带,送由英潍捷基贸易有限公司测序。获得的序列进行 BLAST 比对,并用 MEGA6 软件构建进化树^[7]。

表 1 16S rDNA 区和真菌的 ITS 区 PCR 引物序列

Tab. 1 PCR primers of bacterial 16S DNA and fungal ITS area	
引物名称	引物序列
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'
27F	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1492R	5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

1.2.5 壳聚糖香草醛希夫碱的合成 参考文献[8],取壳聚糖 3.22 g 放入圆底烧瓶中,加入甲醇 50 mL 和乙酸 1 mL 溶胀 2 h,再取香草醛 3.04 g 溶于甲醇 50 mL 后滴入圆底烧瓶。120 ℃ 反应 10 h,产物旋蒸去除甲醇,用乙醇淋洗 3 遍,得到壳聚糖香草醛希夫碱。

1.2.6 最小抑菌浓度(MIC) 参考文献[9],取新鲜培养的菌体用 RPMI-1640 液稀释成终浓度菌液,药物用双蒸水配制成 64 g/L 的储存液,阳性对照药物(两性霉素 B)溶于二甲亚砜制成 32 mg/L 储存液,在 96 孔板 1~11 孔中每孔加入菌液 100 μL,然后在 1~10 孔内加入对半稀释的药物 100 μL,第 12 孔加入不含药的 RPMI 1640 液 200 μL 作阴性对照,25 ℃ 暗箱培养 48 h,当阳性对照(第 11 孔)生长良好时,肉眼观察判读,液体澄清无菌生长孔为该药的 MIC。

2 结果

2.1 污染菌的分离及形态特征

100 mL 猕猴桃果汁通过在 PDA 培养基上涂布共得到 6 个菌落,菌落数为 60(cfu/mL),通过观

察菌落形态初步得到 3 株不同的菌株,命名为 FA、FB、FC;100 mL 猕猴桃果汁在 MH 培养基上涂布得到若干个菌落,通过观察菌落形态认为得到一株菌命名为 BA。其形态特征见图 1、表 2。

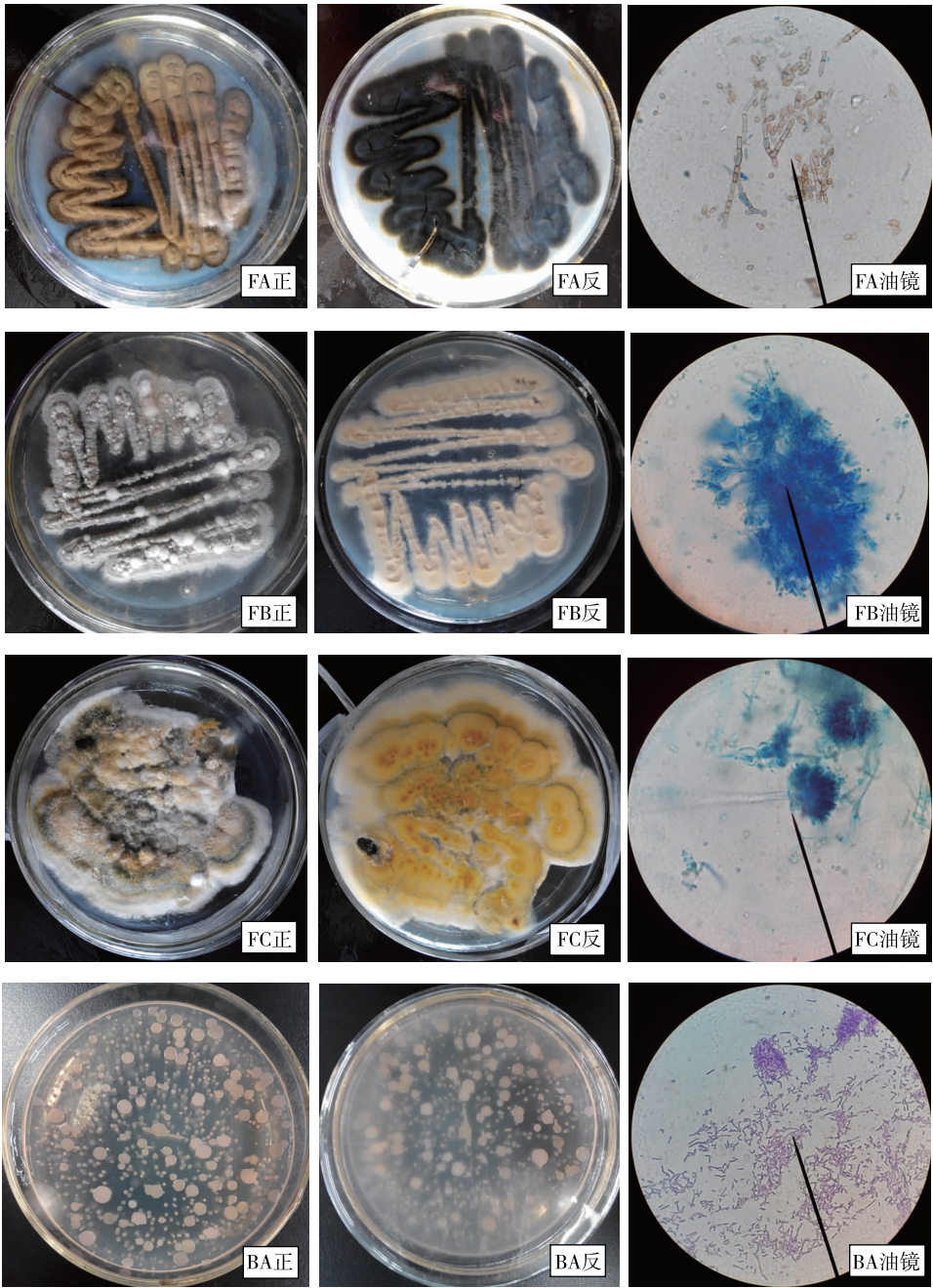


图 1 FA、FB、FC、BA 正反面菌落形态和油镜下菌体形态(100 ×)

Fig. 1 Pictures of organism colonies (both positive and negative) , and morphology under microscope

表 2 菌株形态学观察

Tab. 2 Morphological parameters of microbial strains

菌株	PDA 培养基菌落特征	油镜 (100 ×)
FA	灰绿色,表面粗糙,边缘整齐	菌丝有横隔,分生孢子呈球形、杆状、卵形
FB	青绿色,表明粗糙,边缘不整	菌丝有横隔,顶囊分枝成帚状的分生孢子
FC	黄绿色,菌落反面无色,中间部分黄棕色,丝绒状	菌丝无横隔,分生孢子头初为球形,后呈辐射形
BA	淡黄色,表面湿润,边缘整齐	菌体呈杆状

2.2 分子生物学鉴定

把测序得到的 FA、FB、FC 菌的 ITSrRNA 和 BA 菌的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对,结果显示 FA 与枝孢菌,FB 与歧皱青霉菌,FC 与杂色曲霉菌,BA 与坚强芽胞杆菌的同源性都达到 99%。利用 MEGA6 软件的 N-J 方法构建系统发育树(图 2),从图上可知 FA 菌与 Cla-

dosporiumsp KC790536.1 遗传距离最近,FB 菌与 Penicilliumsteckii HM469415.1 遗传距离最近,FC 菌与 Aspergillus versicolor HM776414.1 遗传距离最近,BA 菌与 Bacillus firmus LC019792.1 遗传距离最近。结合菌落形态和显微镜观察,参照《真菌鉴定手册》初步确定 FA 为枝孢菌,FB 为歧皱青霉菌,FC 为杂色曲霉菌,BA 为坚强芽胞杆菌。

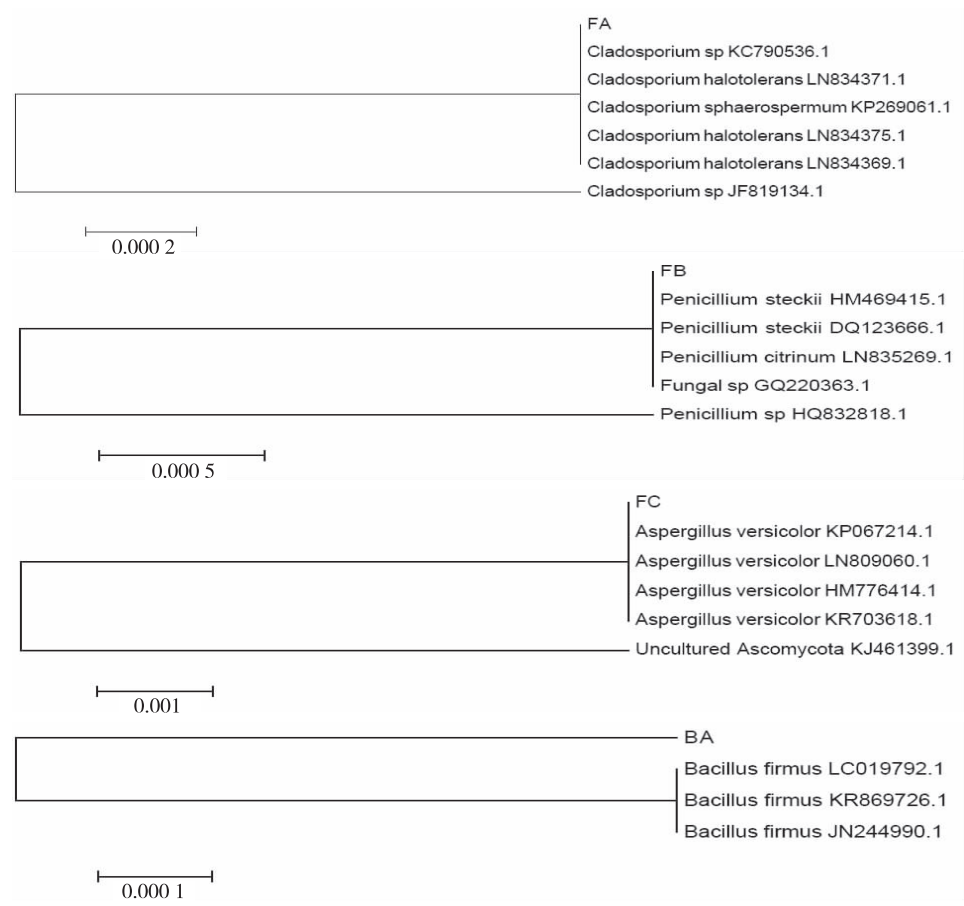


图 2 N-J 方法构建 FA、FB、FC、BA 菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strains of FA, FB, FC, BA, constructed with N-J method

2.3 MIC 值

根据抑菌试验结果(表 3)山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖和壳聚糖香草醛席夫碱对几种污染菌均有一定的抑制作用。食品添加剂使用标准^[10]规定在浓缩果蔬汁中山梨酸钾的最大使用量为 2 g/kg,该添加量大于其对枝孢菌和杂色曲霉菌的 MIC 为 1 g/kg,而小于其对歧皱青霉菌和坚强芽胞杆菌的 MIC 16 g/kg 和 8 g/kg,因此山梨酸钾在添加最大使用量 2 g/kg 时仍不能有效的抑制果汁中歧皱青霉菌和坚强芽胞杆菌。自制药物壳聚糖香草醛席夫碱对 4 种污染菌的抑制作用较好,其中对枝孢菌

的抑制作用等同于山梨酸钾和苯甲酸钠而强于壳聚糖,对歧皱青霉菌和杂色曲霉菌的抑制作用强于山梨酸钾、苯甲酸钠、壳聚糖,对坚强芽胞杆菌的抑制作用同苯甲酸钠、强于山梨酸钾和壳聚糖。质控药物两性霉素 B 的 MIC 值为 0.125 ~4 mg/L,庆大霉素的 MIC 在 1 mg/L 均符合质控要求。

3 讨论

本实验从贵州某公司生产的不合格猕猴桃果汁饮料中共分离得到 4 株污染菌,分别为枝孢菌、

表 3 最小抑菌浓度 MIC(mg/L)
Tab.3 The minimum inhibitory concentrations
of chemicals tested

药物 (mg/L)	枝孢菌	歧皱青霉菌	杂色曲霉菌	坚强芽胞杆菌
山梨酸钾	1 000	16 000	1 000	8 000
苯甲酸钠	1 000	4 000	4 000	4 000
壳聚糖	2 000	4 000	1 000	32 000
壳聚糖香草醛席夫碱	1 000	1 000	500	4 000
两性霉素 B	2	0.125	0.125	
庆大霉素				1

歧皱青霉菌、杂色曲霉菌、坚强芽胞杆菌。分析认为这些污染菌可能来源于果实、加工容器和加工环境,因巴氏消毒不能完全将其杀灭而残留在果汁饮料中,在环境适宜的条件下大量繁殖。杂色曲霉菌会代谢产生杂色曲霉毒素,在生产过程中需要重点防治。防治果汁污染措施包括:采用新鲜无腐烂的猕猴桃果实,防止污染菌从原料带入果汁;回收的饮料空瓶要严格清洗杀菌,加强加工车间、容器、管道的消毒。

从抑菌实验结果看壳聚糖香草醛席夫碱的抑菌效果表现最好,比壳聚糖本身好,说明壳聚糖经过化学修饰后抑菌效果得到增强,壳聚糖香草醛席夫碱的抑菌活性可能与其生产的亚胺键有关^[3]。山梨酸钾抑菌作用较弱,在达到最大使用量 2 g/kg 时仍不能有效的抑制果汁中歧皱青霉菌和坚强芽胞杆菌,这与其他报道青霉菌和芽胞杆菌是果汁饮料中主要的污染菌相一致^[11]。苯甲酸钠的抑菌活性比山梨酸钾好,但其具有一定的副作用。

因此,保证猕猴桃果汁质量需要提高原材料质量,改善生产环境和生产工艺,要针对污染菌寻找合适的防腐剂,自制药物壳聚糖香草醛席夫碱对污

染菌的抑制作用较好,具有应用潜力,需要进一步研究其毒理效果。

4 参考文献

[1] 王丽,徐红,黄亚励,等. 三种壳聚糖涂膜剂的抑菌效果及对猕猴桃的防腐保鲜作用[J]. 贵阳医学院学报, 2013 (10):501-504.

[2] Ana B, Daniel R, Barat JM, et al. Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009(2009):690-700.

[3] Marta S, Anicuta SG, Gabriela I, et al. Chitosan-vanillin composites with antimicrobial properties [J]. Food Hydrocolloids, 2015 (2015):62-71.

[4] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979:133-134.

[5] 刘丽,张永军,许长征,等. 一种改良的 CTAB 法提取产多糖真菌 DNA[J]. 中国生物工程杂志, 2014 (5):75-79.

[6] Martin KJ, Rygiewicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts [J]. BMC Microbiology, 2005(1):243-272.

[7] 王虎玄,岳田利,胡仲秋,等. 陕西浓缩苹果汁中高渗透酵母的分离鉴定[J]. 农业机械学报, 2015(4):246-251.

[8] 江玺,黄亚励,张奇龙,等. 壳聚糖希夫碱的合成及其对灰霉菌抑菌活性研究[J]. 化学研究与应用, 2015 (3):343-348.

[9] 蔡晴,王乐,葛一平. 微量稀释法检测念珠菌对抗真菌药物敏感性的两种观察结果方法的比较[J]. 临床检验杂志, 2011(6):416-418.

[10] 食品添加剂使用标准 GB2760—2011[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2011.

[11] 吴治海,蒲彪. 引起果蔬汁变质的微生物概述[J]. 四川食品与发酵, 2005(125):40-42.

(2016-11-20 收稿,2016-12-17 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 39 页)

[7] Beer M, Stamm H, Machann W, et al. Free breathing cardiac real-time cine MR without ECG triggering[J]. Int J Cardiol, 2010(2):380-382.

[8] Otsu, N. Athreshold selection method from gray-level histograms[J]. Automatica, 1975(11):23-27.

[9] Limberger FA, Oliveira MM. Real-time detection of planar regions in unorganized point clouds[J]. Pattern Recognition, 2015(6):2043-2053.

[10] Dhanachandra N, Manglem K, Chanu YJ. Image segmentation using K-means clustering algorithm and subtractive clustering algorithm [J]. Procedia Computer Science, 2015(54):764-771.

[11] Nguyen C, Kuoy E, Ruehm S, et al. Reliability and reproducibility of quantitative assessment of left ventricular function and volumes with 3-slice segmentation of cine steady-state free precession short axis images[J]. European Journal of Radiology, 2015(7):1249-1258.

[12] Cross R, Olivier L, O'Brien K, et al. Improved workflow for quantification of left ventricular volumes and mass using free-breathing motion corrected cine imaging [J]. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance, 2016(1):1-12.

(2016-10-29 收稿,2016-12-16 修回)
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 赵毅