

壳聚糖对五种食物中毒菌生长的影响

张燕婉 王光华

(中国肉类食品综合研究中心, 北京)

摘要 本文报道了在 pH5.5 和 pH6.5 条件下,不同浓度的壳聚糖对五种主要的食物中毒菌: 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、李斯特单核细胞增生菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌生长的影响。结果表明: 在这两种 pH 条件下,壳聚糖对五种细菌有不同程度的抑制作用, 而且在 pH5.5 比在 pH6.5 的条件下抑制作用更强。

关键词 壳聚糖;食物中毒菌;食品防腐剂

食品防腐剂对保证食品的质量,抑制有害微生物的生长有着重要的作用。但一些人工合成的防腐剂本身对人体健康有着潜在的危害。为提高食品的卫生及安全性,近年来不断开发出一些新型的、安全无毒的天然防腐剂,逐步取代那些有毒的合成防腐剂。

壳聚糖 (Chitosan) 即脱乙酰甲壳质,性质稳定、无毒。甲壳质广泛存在于自然界中,在虾蟹、甲壳昆虫的壳体中含量尤为丰富。从本世纪 60 年代以来,人们对甲壳质或壳聚糖的研究十分广泛,曾于 1977 年在美国波士顿召开了第一届甲壳质和壳聚糖的国际学术讨论会^[1]。近 10 年来,壳聚糖在纺织、印染、医药及食品等众多领域中得到了广泛的应用,引起世界各国的关注^[2]。关于壳聚糖的抑菌作用,有人研究发现:壳聚糖可抑制引起植物镰孢病害中镰孢菌 (*Fusarium solani*) 孢子的发芽和生长^[3]。Kendra 等人最近报道: 0.1% 壳聚糖可抑制豌豆 (镰孢)根腐病中镰孢菌 (*F. solani* f. sp. Pisi) 的生长^[4]。有人研究发现, 0.1% 或 1% 壳聚糖醋酸溶液可以完全抑制表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 的生长,但对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 则需要 1% 壳聚糖溶液才可抑制其生长^[5]。日本已有人申请壳聚糖作为食品防腐剂的专利^[6-8],开始重视它在食品中的应用。

关于壳聚糖对食物中毒菌抑制作用的报道较少。本文报道了在不同 pH 条件下,不同浓度的壳聚糖对五种主要的食物中毒菌: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 和小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 生长的影响。

材料与 方法

(一) 材料

1. 菌种来源: 供试的五种细菌均由日本东京都卫生研究所小久保弥太郎提供。

2. 培养基: MSEY 培养基 (日本製药株式会社); DHL 培养基 (西德 Merck); PALCAM 培养基 (西德 Merck); YINSINA 琼脂选择培养基 (美国 DIFCO)。

(二) 方法

1. 培养液的制备: 将含有 0.5, 1, 1.5, 2 和 2.5% 壳聚糖的营养肉汤及不含壳聚糖的营养肉汤各 200ml, 放入三角瓶中, 各两份, 分别用醋酸或氢氧化钠溶液调节 pH 值为 6.5 和 5.5 两组。经高压灭菌冷却后, 分别接种供试菌。

2. 细菌的培养和检测: 将接菌的培养液置 30℃ 培养 8 天。每天把培养液摇匀后取出 1 ml, 进行 10 倍递增稀释。取出 0.1ml 放入选择培养基上, 均匀涂布。除金黄色葡萄球菌用

MSET 培养基, 35℃ 培养 48 小时后计数外, 对大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌用 DHL 培养基, 对利斯特氏菌用 PALCAM 培养基, 对小肠结肠炎耶尔森氏菌用 YINSINA 培养基, 均 30℃ 培养 24 小时后计数。

结 果

(一) 壳聚糖对金黄色葡萄球菌生长的影响 (表 1)

在 pH6.5 时, 金黄色葡萄球菌在不加壳聚糖的培养液中生长良好, 第 2 天后进入静止期。相反, 添加不同浓度的壳聚糖培养液明显使该

菌的生长受到抑制, 菌数迅速下降到不可检出 ($<10^2$ 个/ml)。含 0.5% 壳聚糖溶液对该菌的抑制作用比其它浓度的壳聚糖溶液弱, 但第 3 天后仍使该菌生长受到抑制。在 pH5.5 的所有添加壳聚糖的培养液中, 该菌生长在第一天后均被完全钝化。

(二) 壳聚糖对大肠杆菌生长的影响 (表 2)

在 pH6.5 时, 大肠杆菌在不加壳聚糖的培养液中生长迅速, 第 2 天后进入静止期。而添加壳聚糖的培养液中, 该菌生长受到一定的抑制, 进入静止期的时间明显推迟。尤其在含

表 1 培养液 pH6.5 和 5.5 时壳聚糖对金黄色葡萄球菌生长的影响

壳聚糖 浓度(%)		每毫升培养液中金黄色葡萄球菌的浓度(个/ml)								
		立即*	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天
pH 6.5	0	5.4×10^4	8.2×10^3	3.1×10^3	1.1×10^3	4.3×10^2	8.8×10^1	2.3×10^0	3.3×10^0	6.4×10^1
	0.5	5.4×10^4	5.0×10^3	2.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
	1.0	5.4×10^4	1.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$
	1.5	5.4×10^4	2.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^2$
	2.0	5.4×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^2$
	2.5	5.4×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^2$
pH 5.5	0	5.4×10^4	7.6×10^2	4.9×10^2	5.3×10^2	4.5×10^2	3.3×10^1	1.9×10^2	1.2×10^1	6.5×10^2
	0.5	5.4×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^1$	$<10^2$
	1.0	5.4×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.5	5.4×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.0	5.4×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.5	5.4×10^4	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

“*” 此处数据均以未添加壳聚糖的当天培养液的菌数为准, 下同。

表 2 培养液 pH6.5 和 5.5 时壳聚糖对大肠杆菌生长的影响

壳聚糖 浓度(%)		每毫升培养液中大肠杆菌的浓度(个/ml)								
		立 即	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天
pH 6.5	0	6.8×10^3	4.5×10^4	5.1×10^2	9.8×10^2	6.4×10^2	4.7×10^2	3.6×10^1	2.7×10^2	1.3×10^2
	0.5	6.8×10^3	1.0×10^5	1.4×10^6	2.3×10^2	3.4×10^2	7.5×10^2	6.5×10^2	7.7×10^2	5.3×10^2
	1.0	6.8×10^3	4.4×10^5	3.9×10^6	8.7×10^6	9.3×10^2	1.2×10^2	6.7×10^2	4.2×10^2	8.3×10^2
	1.5	6.8×10^3	4.9×10^4	8.1×10^4	1.1×10^6	1.0×10^6	4.2×10^6	5.0×10^6	6.1×10^6	1.6×10^6
	2.0	6.8×10^3	2.3×10^4	4.1×10^4	1.3×10^5	9.4×10^5	9.8×10^6	7.8×10^6	3.0×10^7	3.2×10^7
	2.5	6.8×10^3	4.4×10^3	8.0×10^2	6.0×10^2	4.0×10^2	2.4×10^3	3.3×10^1	7.9×10^3	1.4×10^2
pH 5.5	0	6.8×10^3	5.7×10^4	1.3×10^7	3.2×10^7	6.4×10^7	1.5×10^8	1.2×10^8	6.1×10^7	6.3×10^3
	0.5	6.8×10^3	3.6×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.0	6.8×10^3	1.4×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.5	6.8×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.0	6.8×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.5	6.8×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

2.5%壳聚糖的培养液中,大肠杆菌在前4天菌数不断下降,之后才迅速生长。在 pH5.5 时,该菌在不添加壳聚糖培养液中的生长情况与 pH 6.5 时基本一样。在添加 0.5 和 1%壳聚糖的培养液中,该菌生长在第2天就被完全抑制。在添加 1.5, 2 和 2.5%壳聚糖的培养液中,一天后菌数已明显小于 10^2 个/ml。

(三) 壳聚糖对小肠结肠炎耶尔森氏菌的影响(表3)

在 pH6.5 时,小肠结肠炎耶尔森氏菌在不添加壳聚糖的培养液中,第一天后菌数就达 10^7 个/ml,而在添加壳聚糖的培养液中,该菌生长

受到不同程度的抑制,其抑制作用随壳聚糖浓度的增加而增强。在 pH5.5 时,该菌在不添加壳聚糖的培养液中生长比 pH6.5 时缓慢。但在添加壳聚糖的溶液中,该菌出现停止发育并有一定程度的被完全钝化。

(四) 壳聚糖对单核细胞增生利斯特氏菌的影响(表4)

在 pH6.5 时,在培养液中壳聚糖添加与否对单核细胞增生利斯特氏菌均无影响,均在培养一天后进入静止期。在 pH5.5 时,该菌在不添加壳聚糖的培养液中生长良好,而在添加的溶液中菌生长受到抑制,并在培养2天后均被

表3 pH6.5 和 5.5 时壳聚糖对小肠结肠炎耶尔森氏菌生长的影响

壳聚糖 浓度(%)		每毫升培养液中小肠结肠炎耶尔森氏菌的浓度(个/ml)								
		立 即	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天
pH 6.5	0	3.1×10^3	1.9×10^7	2.5×10^7	2.3×10^7	5.6×10^7	1.4×10^8	1.9×10^7	4.7×10^7	2.6×10^7
	0.5	3.1×10^3	1.0×10^3	1.2×10^7	3.4×10^7	1.2×10^7	7.6×10^7	1.8×10^6	2.0×10^6	1.8×10^6
	1.0	3.1×10^3	1.3×10^6	5.4×10^7	6.4×10^7	6.6×10^3	2.6×10^7	5.5×10^7	1.2×10^8	4.8×10^7
	1.5	3.1×10^3	7.2×10^4	9.6×10^5	7.1×10^6	9.1×10^6	2.1×10^8	6.2×10^6	5.3×10^7	6.1×10^7
	2.0	3.1×10^3	3.6×10^4	2.3×10^6	1.3×10^7	4.4×10^7	5.2×10^7	4.0×10^7	1.8×10^7	1.3×10^7
	2.5	3.1×10^3	1.0×10^3	5.0×10^4	1.7×10^6	2.6×10^6	6.4×10^6	8.9×10^6	4.7×10^4	3.2×10^4
pH 5.5	0	3.1×10^3	4.0×10^3	1.8×10^7	2.3×10^7	1.9×10^8	7.4×10^7	2.2×10^7	5.3×10^4	4.1×10^4
	0.5	3.1×10^3	8.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.0	3.1×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.5	3.1×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.0	3.1×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.5	3.1×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

表4 pH6.5 和 5.5 时壳聚糖对李斯特单核细胞增生菌生长的影响

壳聚糖 浓度(%)		每毫升培养液中李斯特单核细胞增生菌的浓度(个/ml)								
		立 即	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天
pH 6.5	0	4.5×10^4	1.3×10^7	1.7×10^7	3.2×10^7	4.2×10^7	3.6×10^7	2.9×10^7	4.5×10^7	5.3×10^7
	0.5	4.5×10^4	3.1×10^6	4.3×10^7	9.2×10^6	1.0×10^7	1.1×10^7	1.3×10^7	2.4×10^7	1.5×10^7
	1.0	4.5×10^4	4.9×10^7	7.6×10^6	4.4×10^6	7.3×10^7	6.4×10^7	6.0×10^7	7.8×10^7	9.3×10^7
	1.5	4.5×10^4	2.4×10^7	1.0×10^7	6.5×10^7	8.1×10^7	8.7×10^7	3.1×10^8	4.4×10^8	7.6×10^7
	2.0	4.5×10^4	8.2×10^6	4.6×10^6	7.1×10^7	1.3×10^8	1.0×10^8	1.1×10^8	1.6×10^8	2.1×10^7
	2.5	4.5×10^4	5.1×10^6	8.0×10^7	2.2×10^7	7.4×10^7	3.1×10^7	4.3×10^7	5.8×10^7	3.4×10^4
pH 5.5	0	4.5×10^4	3.3×10^7	2.0×10^7	4.1×10^7	6.4×10^7	2.4×10^7	3.8×10^7	4.9×10^7	1.4×10^4
	0.5	4.5×10^4	7.2×10^7	4.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.0	4.5×10^4	4.1×10^3	7.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.5	4.5×10^4	3.5×10^4	9.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.0	4.5×10^4	6.4×10^3	7.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.5	4.5×10^4	2.3×10^3	2.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

表 5 pH6.5 和 5.5 时壳聚糖对鼠伤寒沙门氏菌生长的影响

壳聚糖 浓度(%)		每毫升培养液中鼠伤寒沙门氏菌的浓度(个/ml)								
		立 即	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天
pH 6.5	0	2.3×10^5	2.1×10^5	5.4×10^7	1.1×10^7	7.1×10^7	1.4×10^7	9.8×10^5	8.4×10^5	7.9×10^5
	0.5	2.3×10^5	8.5×10^5	1.0×10^7	9.3×10^5	3.2×10^7	4.7×10^7	5.2×10^7	1.6×10^7	2.3×10^7
	1.0	2.3×10^5	2.3×10^5	3.7×10^5	3.1×10^5	9.1×10^5	7.2×10^7	2.6×10^7	8.1×10^7	9.4×10^7
	1.5	2.3×10^5	4.5×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5	9.5×10^5	4.1×10^5	1.3×10^5	5.2×10^5	6.4×10^5
	2.0	2.3×10^5	1.2×10^5	4.0×10^2	4.0×10^2	9.7×10^4	2.2×10^5	3.1×10^5	4.4×10^7	7.3×10^7
	2.5	2.3×10^5	1.7×10^5	7.0×10^2	$<10^2$	4.9×10^3	6.2×10^5	7.3×10^5	7.0×10^7	2.2×10^5
pH 5.5	0	2.3×10^5	6.1×10^5	2.4×10^5	1.4×10^5	1.1×10^5	6.1×10^7	5.3×10^7	7.1×10^7	6.2×10^7
	0.5	2.3×10^5	1.4×10^5	4.8×10^5	6.6×10^5	3.9×10^5	1.4×10^5	2.2×10^5	3.2×10^5	4.1×10^7
	1.0	2.3×10^5	1.1×10^5	6.4×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	1.5	2.3×10^5	7.8×10^3	3.1×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.0	2.3×10^5	4.7×10^3	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	2.5	2.3×10^5	6.0×10^2	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

钝化。

(五) 壳聚糖对鼠伤寒沙门氏菌的影响(表 5)

在 pH6.5 时,添加不同浓度的壳聚糖对鼠伤寒沙门氏菌的生长均有抑制作用。但其中含 1.5, 2 和 2.5% 壳聚糖的培养液对该菌的抑制作用更为明显。在 pH 5.5 时,添加 0.5% 壳聚糖的培养液对该菌生长影响不大,但当壳聚糖浓度增加时,该菌生长便受到抑制并被钝化。

讨 论

世界各国特别是发展中国家,每年因食用被食物中毒菌污染的食物,而爆发多起食物中毒事件。虽然已采用很多方法,如冷藏、酸处理、降低产品的水分活度(a_w)和添加防腐剂等,以减少食物中毒菌对食品的污染,但仍存在一些实际问题,故引起人们对研究新的防腐剂的重视。壳聚糖抑菌作用的研究是近几年才开展的。已报道的有对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌等的抑制作用^[9]。其中对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用,我们的实验结果与国外报道是一致的。

从本实验结果看,壳聚糖对五种食物中毒菌确有一定的抑制作用,但需要在一定的条件

下。如在 pH6.5 时,壳聚糖的抑菌作用比较弱,只对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用。但随着壳聚糖浓度的增加,其抑制作用亦相应增加。而对利斯特氏菌的生长则无影响。在 pH5.5 时,壳聚糖对五种菌的抑制作用均较明显。我们利用壳聚糖的这一特性,在适宜条件下,在加工的食品或包装材料中添加壳聚糖,则可以有效地起到防腐和保鲜的作用,并可延长食品的货架期。壳聚糖作为一种天然防腐剂应用在食品保藏中,在我国刚刚起步。对壳聚糖的抑菌作用机理还有待深入研究。

参 考 文 献

1. 林伟忠: 食品科学, 12: 11—15, 1986.
2. Riccardo A A Muzzarelli: Chitin, Pergamon Press Oxford, p. 255, 1977.
3. Zikakis I et al.: Chitin Chitosan and Related Enzyme, Academic Press, Orlando, Fla, p. 291, 1984
4. Kendra D F and L A Hadwiger: *Expermentary Mycology*, 8: 276—281, 1984.
5. Zikakis I et al.: Chitin Chitosan and Related Enzyme, Academic press, Orlando, Fla, p. 125—133, 1984.
6. Tanida Takao et al.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01/225449A₂, 1989.
7. Izume Masato et al.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 63/251072A₂, 1988.
8. Watanabe, Kiyoshi: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 01/013983A₂, 1989.
9. 内田泰: フードケミカル, 2: 22—29, 1988.