

## 抗防腐剂型微生物培养基研究\*

吴清平<sup>1,2</sup> 蔡芷荷<sup>2</sup> 张菊梅<sup>2</sup> 周小燕<sup>2</sup> 姚汝华<sup>1</sup>

(华南理工大学 广州 510641)<sup>1</sup> (广东省微生物研究所 广州 510070)<sup>2</sup>

**摘要:** 食品饮料中含有山梨酸、山梨酸钾、苯甲酸及苯甲酸钠等防腐剂会对其中的细菌和真菌的检出造成严重干扰,把测定体系的抗防腐剂指数控制在 81.1~94.5 之间,可较好地消除防腐剂对微生物生长的抑制。防腐剂解抑制剂 III 的抗防腐剂指数为 92.34,对细菌和真菌的生长无抑制作用,加入经改良和优化的普通培养基后,制得 5 种抗防腐剂型培养基,在灭菌前后和一年保存期内,它们的抗防腐剂指数基本保持不变。与普通培养基比较,当采用大样倾注平板法和液体大样法检测含有防腐剂的样品时,抗防腐剂型培养基可极大地提高样品中的细菌和真菌的检出率。

**关键词:** 抗干扰,微生物培养基,防腐剂,山梨酸,苯甲酸

**中图分类号:** Q93335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(1999)-05-0345-06

## RESEARCHES ON ANTI-PRESERVATIVE MICROBIAL MEDIA

WU Qingping<sup>1,2</sup> CAI Zhihe<sup>2</sup> ZHANG Jumei<sup>2</sup> ZHOU Xiaoyan<sup>2</sup> YAO Ruhua<sup>1</sup>

(South China University of Technology Guangzhou 510641)<sup>1</sup>

(Guangdong Institute of Microbiology Guangzhou 510070)<sup>2</sup>

**Abstract:** Bacterial and fungous detection could be disturbed seriously by the preservatives sorbic acid, potassium sorbate, benzoic acid and sodium benzoate in food and beverage, but the preservative inhibition on microbial growth could be well eliminated when the anti-preservative indexes (API) in the detection systems were controlled from 81.1 to 94.5. The API of the preservative removing reagent (PRR) III is 92.34, it does not inhibit the bacterial and fungous growth in the plates. The five kinds of the anti-preservative media (APM) could be made up by adding PRR III to the improved and optimized general microbial media. After the media were disinfected or in one-year storage life, their API could be almost kept stable. Compared with the general microbial media, the bacterial & fungous detectability could be raised very highly by the APM when the big sample pouring plate method and the liquid big sample method were used to detect the samples which contained the preservatives.

**Key words:** Anti-disturbance, Microbial media, Preservative, Sorbic acid, Benzoic acid

在食品饮料生产中,为了延长产品的保质期,在其中加入适量的山梨酸、山梨酸钾、苯甲酸及苯甲酸钠作为防腐剂是国内外广大食品饮料生产厂家的常用做法。但产品中含有防腐剂会对常规倾注平板法造成严重干扰,特别是在微生物受伤后,这种影响更加明显。另外,如

果样品中微生物的含量较少,常规倾注平板法的取样量不能有效检出其中的微生物含量,因而同样无法检出其中实际的活体微生物含量,

\* 广东省重点科技攻关项目

收稿日期: 1998-09-21, 修回日期: 1999-01-18

更为重要的情况是,有些产品由于加入的防腐剂量较大,即使从其外观上判断,其卫生指标存在问题,但用常规的培养基及检测方法仍然不能检出其中的微生物,因此无法作出正确的判断,结果不但无法改进产品的质量,而且这类产品仍有可能在市场销售,直接影响到广大消费者的身体健康。所以研究抗防腐剂干扰的微生物培养基,最大限度地消除防腐剂对微生物检测的影响,提高微生物检测的灵敏度和准确性,是当前食品饮料检测所必需解决的重要问题。

迄今为止,在国内外的文献中均未见有研究抗防腐剂型微生物培养基消除食品饮料中防腐剂干扰,提高细菌、霉菌、酵母菌和大肠菌群检出率的研究报告<sup>[1,2]</sup>,针对这种情况,本研究在测定防腐剂对微生物的抑制作用后,采用抗防腐剂指数评价微生物培养基抗防腐剂干扰的能力,对市场上常见饮料进行抗防腐剂指数测定,在完成防腐剂筛选试验和回收率试验后,制备抗防腐剂型微生物培养基,并对其进行抗防腐剂性能测试、保存期试验和检测含防腐剂的样品中细菌和真菌能力的测试。

## 1 材料与方法

### 1.1 干扰物质

防腐剂:山梨酸、山梨酸钾、苯甲酸及苯甲酸钠。

### 1.2 菌株

1.2.1 细菌:枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) MIG1.22, 大肠杆菌 (*Escherichiacoli*) MIG1.45, 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) MIG1.49, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) MIG1.55, 多粘芽孢杆菌 (*B. polymyxa*) MIG1.89。

1.2.2 真菌:克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*) MIG2.1, 威尔酵母 (*Saccharomyces willianus*) MIG2.58, 酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) R12, 桔青霉 (*Penicillium citrinum*) MIG3.100, 绳状青霉 (*P. funiculosum*) MIG3.104, 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) MIG3.27。

### 1.3 对照普通微生物培养基

对照普通培养基采用卫生部上海生物制品研究所(上海)、浙江省军区后勤部卫生防疫检验所(浙江)、中国进出口商品检验技术研究所(北京)及广东环凯微生物科技公司(环凯)生产的营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、虎红琼脂培养基、霉菌液体培养基及乳糖胆盐发酵培养基。

### 1.4 抗防腐剂型微生物培养基的研究方法

1.4.1 防腐剂浓度的测定<sup>[3]</sup>及抗防腐剂指数测定:抗防腐剂指数是设计来衡量化学物质溶于水后所具有的抗防腐剂干扰能力而建立的一种指数,其与防腐剂的存在与否无关,其数学模型为  $P = (C + 0.5)^x \times \lg(Z/V)$ , 式中 P 为抗防腐剂指数, C 为常数, Z 为抗防腐剂指数测定剂的用量, V 为测定体系的体积, X 为随条件变化的指数。抗防腐剂指数高表示抗防腐剂干扰能力强,反之,抗防腐剂指数低,则表示其抗防腐剂干扰能力弱。

1.4.2 防腐剂对微生物的抑制作用:参照吴清平等<sup>[4]</sup>的方法制备样品后,采用普通倾注平板法进行测定<sup>[5]</sup>。

1.4.3 防腐剂的抑菌作用与抗防腐剂指数关系的测定:在培养基中加入山梨酸钾或苯甲酸钠,使其浓度达到 2g/L。测定它们对微生物的抑制作用时,采用抗防腐剂指数测定剂先将普通微生物培养基的抗防腐剂指数调成 54.0~121.5,然后制备测试菌株菌悬液,采用普通倾注平板法进行测定。

1.4.4 市场上各种常见饮料的抗防腐剂指数测定及调整试验:采用抗防腐剂指数测定剂测定市场上各种常见饮料的抗防腐剂指数,然后用抗防腐剂指数测定剂调节它们的抗防腐剂指数。

1.4.5 防腐剂解抑剂的筛选试验和回收率试验:(1)防腐剂解抑剂的筛选试验 作为防腐剂解抑剂,首先必须具有调整抗防腐剂指数到一定范围的能力,从而消除防腐剂的抑制;另外,对微生物的生长不能具有明显的抑制作用。筛选试验首先设计不同组合的配方,测定它们的抗防腐剂指数,找出具有较好抗防腐剂指数调整能力的物质,然后分别将各种经筛选后的防腐剂解抑剂加入到普通微生物培养基中,接着

制备测试菌株菌悬液,采用普通倾注平板法测定其抑菌作用;(2)防腐剂解抑制剂的回收率试验防腐剂解抑制剂加入到培养基后是否稳定可靠,要通过测定它们在灭菌前后的抗防腐剂指数来确定,在具体操作中以防腐剂解抑制剂溶于一定量水中作为基准(100%),计算出回收率。

1.4.6 抗防腐剂型微生物培养基的测试<sup>[4]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 防腐剂对微生物的抑制作用

在倾注平板法中,与不含防腐剂的对照比较,含有山梨酸钾(2g/L)的样品,当取样量为

表1 倾注平板法中含有防腐剂的不同样品量对微生物检出的影响(cfu)

取样量 (mL)	MIG1.45		MIG1.22		R12		MIG3.104	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1.0	17.7±5.5	16.0±4.4	35.0±7.5	29.0±9.2	36.7±7.0	17.7±24.8	43.0±1.7	37.3±6.8
2.0	38.3±3.5	31.7±7.6	57.0±2.6	7.0±4.6	84.3±2.1	36.0±0	91.3±6.7	0
3.0	42.3±4.9	0	106.3±8.7	0	102.3±9.8	0	121.0±15.4	0
4.0	57.0±10.5	0	127.3±17.9	0	143.3±6.1	0	153.7±4.7	0
5.0	81.0±0	0	126.7±15.4	0	184.0±12.5	0	201.7±27.7	0

注: S为山梨酸钾, C为对照

表2 不同抗防腐剂指数下防腐剂对细菌和真菌的抑制作用(cfu/mL)

菌 株	防腐剂 (2g/L)	抗 防 腐 剂 指 数					
		54.0	67.5	81.0	94.5	108.0	121.5
MIG1.22	B	0	0	36.0±0.2	39.3±5.9	48.3±2.1	64.0±4.4
	S	0	0	36.3±3.5	64.7±4.2	75.7±4.5	65.0±7.0
	C	0	12.0±3.5	30.0±6.0	50.0±8.5	40.0±8.7	56.3±15.5
MIG1.45	B	0	0	31.7±1.5	22.3±6.7	34.3±19.1	21.7±3.8
	S	0	0	26.3±0.6	20.0±4.0	30.0±4.0	21.0±5.6
	C	0	20.3±5.8	22.0±1.0	52.0±14.0	23.7±5.0	18.7±3.8
R12	B	0	0	365.0±23.3	106.7±13.6	0	0
	S	0	0	352.0±6.6	270.3±24.8	127.0±23.4	0
	C	327.7±5.1	326.0±10.1	356.7±10.2	117.3±13.6	0	0
MIG3.104	B	0	0	365.0±31.2	273.0±37.5	385.3±57.7	362.3±44.9
	S	0	0	0	380.0±43.6	411.7±6.7	312.7±33.4
	C	317.3±20.5	330.0±26.0	343.3±40.4	335.7±55.0	349.3±36.9	398.0±14.2

注: B为苯甲酸钠, S为山梨酸钾, C为对照

表3 防腐剂解抑制剂抑菌试验(cfu/mL)

菌株编号	防 腐 剂 解 抑 剂					对 照
	I(84.51)	II(87.32)	III(92.34)	IV(89.43)	V(94.21)	
MIG1.45	429.3±15.0	356.7±14.6	420.7±38.6	410.3±29.4	431.5±33.4	380.3±30.2
MIG1.55	0	463.0±18.7	563.7±9.5	572.8±27.9	610.7±27.1	660.3±41.1
R12	0	81.0±12.1	120.0±9.6	125.9±7.4	130.0±25.4	137.7±7.8
MIG3.104	157.3±4.0	165.3±39.0	171.7±19.9	164.3±17.8	175.7±9.3	162.0±17.6

注: 括号内的数字为防腐剂解抑制剂在培养基中的抗防腐剂指数

1.0mL时,其平板检出的菌数偏低;当取样量2.0mL时,其平板检出的菌数就受到严重影响;当取样量3.0~5.0mL时,其平板就完全不能检出其中所含的细菌和真菌(表1)。因此当样品中含有防腐剂时就会对其中的微生物检测造成严重干扰。

## 2.2 防腐剂的抑菌作用与抗防腐剂指数关系的测定

测试时,培养基中含有2g/L的苯甲酸钠或山梨酸钾。从表2可以看出,在检测中虽然测定体系的防腐剂含量较高,但只要将抗防腐剂指数控制在81.0~94.5之间,就可较好地解除防腐剂对微生物生长的抑制。

## 2.3 市场常见饮料的抗防腐剂指数测定及调整试验

为了了解市场上各种常见饮料的抗防腐剂指数,以便选择指数较低的饮料作为下一步的研究材料。通过测定,目前市场上常见的15种饮料的抗防腐剂指数除一种为63.61外,其余均在47.0以下。而要将这些饮料的抗防腐剂指数调至94.0左右,20mL饮料需抗防腐剂指数测定剂的量为0.95~5.30mL。另外,各种饮料与普通微生物培养基混合后,体系的抗防腐剂指数虽有所提高,但仍较低,均小于81.0,因此当样品中含有防腐剂时,采用常规培养基检测其中的微生物含量,防腐剂对检测的干扰就不可避免。

## 2.4 防腐剂解抑剂的筛选试验及回收率试验

**2.4.1 防腐剂解抑剂的筛选试验:**从以上实验可知,作为防腐剂解抑剂,其抗防腐剂指数必须在81.0~94.5之间,为此,我们通过对16种配方的抗防腐剂指数进行测定,从其中筛选出5种抗防腐剂指数在81.0~94.5之间的防腐剂解抑剂,然后对这5种防腐剂解抑剂进行抑菌试验。从表3可以看出,防腐剂解抑剂I及II对MIG1.55、R12的生长有抑制作用,防腐剂解抑剂III、IV、V对MIG1.45、MIG1.55、R12及MIG3.104均无抑制作用,与对照无明显差异。

**2.4.2 防腐剂解抑剂的回收率试验:**选择防腐剂解抑剂III进行回收率试验中,以防腐剂解抑

剂III溶于一定量的水中为基准(100%),测试其抗防腐剂指数,发现它加入经改良和优化的普通微生物培养基中后,抗防腐剂指数基本不会发生改变,其回收率不会下降;另外,除了真菌液体大样检测培养基和大肠菌群测定培养基在 $1 \times 10^5$  Pa,灭菌30min后,其回收率略有下降外,在 $1 \times 10^5$  Pa,灭菌15及30min后,其回收率亦与各自灭菌前无显著差异( $P>0.05$ ),这表明加入培养基内的防腐剂解抑剂III,在培养基灭菌前后,其抗防腐剂性能均较好地得到保持。

## 2.5 抗防腐剂型培养基与七喜饮料混合后的抗防腐剂指数的测试

把防腐剂解抑剂III加入经改良和优化的普通培养基后,制得抗防腐剂型微生物培养基,它们分别为细菌平板计数琼脂培养基(营养琼脂培养基)、细菌大样检测液体培养基(营养肉汤培养基)、真菌平板计数琼脂培养基(虎红琼脂培养基)、真菌大样检测液体培养基(霉菌液体培养基)及大肠菌群测定培养基(乳糖胆盐发酵培养基)等5种。

**2.5.1 在琼脂培养基上的抗防腐剂指数测试:**在测定琼脂培养基的抗防腐剂指数时,把测定体系总体积定为10mL时,随着七喜饮料量加入的增加,抗防腐剂型培养基的抗防腐剂指数没有明显下降,而普通培养基的抗防腐剂指数则有明显的下降(表4)。

**2.5.2 在液体培养基中的抗防腐剂指数测试:**当测定体系总体积为150mL时,随着七喜量加入的增加,抗防腐剂指数比普通培养基稳定,当样品体积(%)为66.7时,抗防腐剂指数仍可控制在约80以上(表5)。

## 2.6 采用不同菌株考察抗防腐剂型培养基检测效果

**2.6.1 大样倾注平板法中不同菌株的检测效果:**本试验所用的测试菌株为MIG1.49、MIG1.89、MIG2.1、MIG3.27及MIG3.100等,在检测时,5mL样品加入5mL的培养基,当样品中含有防腐剂时,所有检测菌株在普通培养基上均不能生长,但在抗防腐剂型培养基上均生长良好,而在不含防腐剂时,所有检测菌株在普

表4 在平板上培养基与七喜饮料混合后的抗防腐剂指数的测试 (API)

培养基量(mL)	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0
七喜量(mL)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
普通营养琼脂培养基	93.96	76.68	68.31	63.45	59.81
抗防腐剂型细菌平板计数琼脂培养基	94.37	92.34	89.78	86.67	82.76
普通虎红琼脂培养基	62.37	57.65	54.68	52.11	50.22
抗防腐剂型真菌平板计数琼脂培养基	89.91	88.16	85.86	82.62	76.14

注:培养基及七喜在 $1 \times 10^5$  Pa, 灭菌15min

表5 液体中培养基与七喜饮料混合后的抗防腐剂指数的测试 (API)

样品体积 (%)	培养基体积 (%)	样品加入前的 培养基料数	营 养 肉 汤		霉 菌 液 体	
			抗防腐剂型	普通	抗防腐剂型	普通
83.3	16.7	6	77.36	64.40	71.69	51.30
80	20	5	84.11	66.42	72.09	51.30
75	25	4	85.32	66.15	74.79	51.57
66.7	33.3	3	86.94	67.64	79.79	52.38
50	50	2	89.91	71.42	85.32	54.27
0	100	1	100.31	101.79	88.83	71.55

注:培养基及七喜在 $1 \times 10^5$  Pa, 灭菌15min

表6 大样倾注平板法中不同菌株的检测效果 (cfu/5mL)

菌 株	普 通 培 养 基			抗防腐剂型培养基		
	C	S	B	C	S	B
MIG1.49	91.7±6.1	0	0	70.6±8.0	95.7±9.1	77.7±5.5
MIG1.89	17.7±6.7	0	0	10.0±0.0	9.0±3.5	6.0±2.0
MIG2.1	86.3±9.2	0	0	80.3±13.5	68.3±14.2	66.0±5.3
MIG3.27	75.0±6.0	0	0	79.7±3.5	86.7±6.5	11.7±1.2
MIG3.100	262.7±14.2	0	0	266.7±17.9	246.7±12.4	71.7±5.8

注: B为苯甲酸钠, S为山梨酸钾, C为对照

表7 液体大样法中不同菌株的检测效果 (ABS<sub>650</sub>)

菌 株	普 通 培 养 基			抗防腐剂型培养基		
	C	S	B	C	S	B
MIG1.49	0.294±0.027	0.003±0.001	-0.001±0.001	0.302±0.033	0.313±0.052	0.284±0.019
MIG1.89	0.547±0.082	-0.002±0.001	0.008±0.003	0.530±0.053	0.510±0.074	0.454±0.017
MIG2.1	0.423±0.078	0.001±0.000	0.000±0.000	0.484±0.007	0.459±0.032	0.474±0.059
MIG3.27	54.7±10.7	0	0	60.8±3.0	55.4±2.7	59.8±7.7
MIG3.100	77.5±0.7	0	0	63.4±11.5	66.7±7.8	67.9±4.2

注: B为苯甲酸钠, S为山梨酸钾, C为对照, MIG3.27及MIG3.100的数据为菌的个数

通培养基和抗防腐剂型培养基上的生长无明显差异(表6)。

2.6.2 液体大样法中不同菌株的检测效果: 本试验所用测定菌株与5mL倾注平板法相同, 检

测时, 50mL三料培养基加入100mL样品, 当样品中含有防腐剂时, 所有检测菌株在普通培养基上均不能生长, 但在抗防腐剂型培养基上均生长良好, 而当样品不含防腐剂时, 所有检测菌

表8 抗防腐剂型培养基检测实际样品中细菌和真菌的能力测试

产品名称	产地	检测方法	普通培养基		抗防腐剂型培养基	
			细菌	真菌	细菌	真菌
发酵型乳酸菌饮料	广州市	MPN法 (MPN/100mL)	0	0	8	2
酸奶	广州市	MPN法 (MPN/100mL)	0	0	110	4
		倾注平板法 (cfu/5mL)	0	0	7	0
乳酸菌饮品	广州市	倾注平板法 (cfu/1mL)	0	0	10000	0
可乐	广州市	MPN法 (MPN/100mL)	0	0	150	0
		倾注平板法 (cfu/5mL)	0	0	13	0
保健品	广东省	MPN法 (MPN/100mL)	0	0	49	13
		倾注平板法 (cfu/5mL)	0	0	4	3

株在普通培养基和抗防腐剂型培养基上的生长无明显差异(表7)。

## 2.7 抗防腐剂型微生物培养基的保存期试验

以防腐剂解抑制剂溶于一定量的水中作为基准(100%),测定各种抗防腐剂型培养基中的防腐解抑制剂的回收率。保存期试验表明,在12个月的保存期内各种抗防腐剂型培养基的防腐解抑制剂的回收率均未有明显改变,这说明抗防腐剂型培养基的抗防腐剂性能在一年内仍能较好地得到保持。

## 2.8 抗防腐剂型培养基检测实际样品中细菌和真菌能力的测试

通过检测由生产厂家送来的有质量问题的含防腐剂的乳酸菌饮料、可乐及保健食品等几十种产品,发现抗防腐剂型培养基的检出能力

大大高于普通培养基的检出能力,而且当样品中的微生物受到伤害时,即使采用1mL倾注平板法检测,抗防腐剂型培养基的检出率仍大大高于普通培养基(表8)。

## 参 考 文 献

- [1] Makdesi A K, Beuchat L R Food Microbiol., 1996, 13(4): 281~290.
- [2] 吴清平,陈素云,阙绍辉等. 微生物学通报, 1996, 23(3): 173~195.
- [3] 李明元主编. 高效液相色谱法及其在仪器分析中的应用. 北京: 北京大学出版社, 1989, 97~118.
- [4] 吴清平,蔡芷荷,张菊梅等. 微生物学通报, 1999, 26(3): 177~182.
- [5] 罗雪云,刘宏道主编. 食品卫生微生物检验标准手册. 北京: 中国标准出版社, 1995, 18~29.