

苦杏壳木醋液最小抑菌浓度及其抑菌活性的稳定性

易允喻¹, 马希汉², 赵 忠¹, 尉 芹^{1*}, 李宏伟¹

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 理学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:采用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为指示菌,由D值计算法得到了对苦杏壳木醋液在不同浓度时的存活曲线及死亡曲线,从而精确求得最小抑菌浓度(MIC);木醋液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的MIC分别为0.44%和0.46%,可见木醋液对2种代表性细菌有较显著的抑菌效果;采用滤纸片法,对木醋液抑菌稳定性测试结果表明,苦杏壳木醋液在温度、pH值、紫外光、活性碳吸附及微波加热等不同处理下,抑菌效果基本不变,具有良好的抑菌稳定性。

关键词:苦杏壳木醋液;D值法;最小抑菌浓度(MIC);抑菌;稳定性

中图分类号:S731 文献标志码:A 文章编号:1001-7461(2014)06-0127-05

Minimal Inhibitory Concentration and Activity Stability of Bitter Almond Shell Pyroligneous Acid to Bacteria

YI Yun-yu¹, MA Xi-han², ZHAO Zhong¹, WEI Qin^{1*}, LI Hong-wei¹

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were used as indicator bacteria to investigate the minimal inhibitory concentration (MIC) of pyroligneous acid made from bitter almond shell. The procedures included to obtain the survival and mortal curves under different concentrations of the acid by decimal reduction time method (D value method), and then to get MIC. The MIC of pyroligneous acid to *S. aureus* and *E. coli* were 0.44% and 0.46%, respectively, indicating the significant inhibitory effects of the acid. The inhibition stability of the acid to temperature, acid, alkali, ultraviolet, activated carbon, and microwave were also studied by filter paper method. The results demonstrated that the acid almost kept the same level of the inhibition to bacteria under different treatments, showing its satisfactory antibacterial stability.

Key words: bitter almond shell pyroligneous acid; method of decimal reduction time; MIC; antibacterial activity; stability

苦杏树为蔷薇科植物杏(*Prunus armeniaca*)、山杏(*Prunus armeniaca* var. *ansu*)及西伯利亚杏(*Prunus sibirica*)等的统称。苦杏壳木醋液(MP)是苦杏壳烧制过程中的副产物,成分复杂,为约含40余种成分的有机混合物。有机成分中主要组分是有机酸(主要是乙酸),约占80%(质量分数),其

次是酚类、呋喃类、酯类物质,分别占7.0%、2.6%和0.4%;pH2.31~3.38,相对密度约1.03,并且随着生产条件、收集方法、贮存运输条件等的不同而变化^[1-2]。

苦杏壳木醋液具有良好的抗氧化活性及抑菌活性,目前国内评价最小抑菌浓度(MIC)的方法主要

收稿日期:2013-12-16 修回日期:2014-04-29

基金项目:陕西省2010年“13115”科技创新工程重大科技专项计划项目(2010ZDKG-05)。

作者简介:易允喻,女,在读硕士,研究方向:树木提取物化学与工程。E-mail:altayiyunyu@gmail.com

* 通信作者:尉芹,女,教授,博导,研究方向:植物资源化学与生物活性物质。E-mail:ma_weiqin@aliyun.com.cn

有肉眼观察浑浊度法、比浊法等^[3-6],前者操作简单,但工作量大,准确度低;后者的实质是使用分光光度计测定菌悬液的光度密度 OD 值,虽然测定方便,结果具有一定的准确性,但由于菌体有一定的沉降性,且检测时间的长短会对结果产生较大影响,导致试验再现性差,需要反复取样,操作繁琐。相比于传统 MIC 测定方法, D 值计算法^[7-8]得到的最小抑菌浓度更加精确,也是目前国外评价防腐剂抑菌效果的主要方法。本研究采用 D 值计算法,用线性回归快速准确地得出苦杏壳木醋液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度,并绘制出在不同浓度的苦杏壳木醋液中细菌的存活曲线和死亡曲线;同时对木醋液抑菌活性稳定性进行研究,以期对苦杏壳木醋液在保鲜剂、防腐剂等方面的应用提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

干馏釜(南京林业大学化工学院);旋转蒸发器(R206B 上海申生科技有限公司)。

试验菌株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*),均由西北农林科技大学资源与环境学院微生物实验室提供。

培养基:马铃薯培养基^[9]、营养琼脂培养基、细菌(LB)培养基。

样品的制备:在干馏釜中加入苦杏壳,以 1 kW、550℃持续内加热,收集冷凝的馏出液为粗制木醋液。将粗制木醋液静置 3~6 个月左右,将上层澄清液进行虹吸处理,用粒径 ≤ 0.5 mm 上层澄清液质量的 5%的木炭粉处理,虹吸后的上层澄清液,搅拌 10 min,静置 48~72 h,虹吸上层澄清液。所得澄清液经 5 层中速滤纸抽滤 2 次,得到精制木醋液。

将精制木醋液放入旋转薄膜蒸发器中进行旋蒸,参数 $T=70^{\circ}\text{C}$, $P=0.095\text{ MPa}$, $n=35\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,直至无蒸出物为止,收取蒸馏出的木醋液再一次进行旋蒸, $T=50^{\circ}\text{C}$, $P=0.09\text{ MPa}$, $n=35\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,至无蒸出物止,得到二次蒸馏出木醋液。

取二次蒸馏出木醋液用无水乙醚萃取,得到脱水木醋液,供试验用。

1.2 试验方法

1.2.1 最小抑菌浓度的测定

1.2.1.1 制备菌悬液 分别取 2 个装有 100 mL 无菌水的锥形瓶,各用接菌环均匀刮取一定量已活化的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌于其中,充分混匀制成菌悬液,分别置于 28℃和 37℃恒温培养 24 h。准确吸取 1.0 mL 菌悬液、9.0 mL 无菌水加入试管

中,再从试管中吸取 1.0 mL 菌悬液进行稀释,每次稀释 10 倍,经过多次稀释后用平板菌落计数法记录菌体个数,调至浓度为含菌体数 $1.0\times 10^6\sim 8.0\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。

1.2.1.2 抑菌试验 将浓度调好的菌悬液(菌液浓度范围约为 $1.0\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)标记为 0 时间;取多支装有 9.0 mL 的 0 时间菌悬液的试管,分别加入 1.0 mL 不同浓度梯度的木醋液,在合适的温度下进行培养,分别于 4、8、12 h 与 24 h 取出,用平板菌落计数法测定各试样的细菌数量,试验平行 3 次取平均值。

1.2.1.3 D 值法 D 值^[7-8,10]指试验微生物菌群数量每减少一个对数单位所需的时间,即防腐剂接触微生物后 90%菌群失活所需要的时间。 D 值可以用来评价防腐剂的有效性。通常将细菌存活数的对数作为纵坐标,相对应的取样时间为横坐标作图,可绘制出细菌的存活曲线,由存活曲线可得到相应的回归方程, D 值即为回归方程斜率的负倒数。 D 值越小,表示细菌失活速度越快,也就是所添加样品的抑菌活性越强。

1.2.1.4 有效性标准 CFU(美国药典)规定有效性标准细菌 $D<112$;CTFA(美国化妆品、盥洗用品和香精协会)^[11-12]规定有效性标准得是细菌 D 值 <56 。而线性回归法只要求致病菌 $D<4$,非致病菌 $D<28$ 。相对于 CFU 和 CTFA,只要满足线性回归法条件的就可以满足前两种标准。

1.2.1.5 致死时间曲线 制备含不同浓度木醋液的样品,将样品的浓度作为 x 轴,据上述的测定计算出不同浓度样品的 D 值,用 D 值作为 y 轴,绘制出致死时间曲线。由死亡曲线可算出给定死亡时间对应的细菌死亡所需的样品浓度,即最小抑菌浓度。

1.2.2 抑菌活性稳定性研究

1.2.2.1 木醋液的滤纸片制备 用打孔器将滤纸制成 6 mm 的滤纸片,140℃~160℃干热灭菌 4~6 h,冷却至室温,无菌操作将滤纸放在样品液的培养皿中浸渍 24 h,晾干,备用。

1.2.2.2 抑菌试验 采用滤纸片法,往培养皿中倒入灭菌后的 10~15 mL 培养基,冷却凝固,移取 0.1 mL 菌液加到平皿上,并用 L 型刮铲刮均,用无菌镊子将浸透样品液的滤纸片贴在含菌平板上,每菌进行 3 次重复。分别将金黄色葡萄球菌置于 28℃,大肠杆菌置于 37℃下培养 24 h,测定滤纸片周围抑菌圈的大小。

1.2.2.3 稳定性试验^[13-16] 将 MP 用无菌水稀释成质量浓度为 $0.04\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为样品液,

进行抑菌稳定性试验。

1)紫外光对木醋液抑菌活性的影响 用紫外光对样品液进行 5 个梯度的照射时间(5、10、15、20 min 和 25 min),对照组则是室内避光处理,对抑菌效果试验重复 3 次,取平均值。

2)pH 值对木醋液抑菌活性的影响 用不同 pH 值的缓冲液将苦杏壳木醋液 pH 值调成 3.0~8.0 的 6 个梯度,用相对应 pH 值的缓冲溶液为对照。分别测定各组的抑菌效果,重复 3 次,取平均值。

3)温度对木醋液抑菌活性的影响 对照组为 25℃室温,取等量试样分别置于 0℃、50℃、75℃、100℃和 121℃湿热条件下各处理 30 min。用滤纸片法测定处理前后样品的抑菌效果。重复 3 次,取平均值。

4)活性碳脱色及微波处理对木醋液抑菌活性的影响 分别取 2 份等量样品液,一份加入质量百分比 2.0%的活性碳在热水浴中煮沸 30 min,另一份置微波炉中微波加热(250 W,加热 30 s)。以未经活性碳脱色和微波加热的苦杏壳木醋液为空白对照。重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度

金黄色葡萄球菌在浓度为 0.40%的木醋液中 24 h 内基本失活(表 1),而大肠杆菌在 0.80%的木醋液中才会失活(表 2)。说明苦杏壳木醋液满足线性回归法的有效性标准,而且对致病菌的抑制效果比非致病菌好。

表 1 不同浓度木醋液对金黄色葡萄球菌的激发

Table 1 Results of antibacterial challenge test of bitter almond shell pyroigneous acid against *S. aureus*(Sa)

时间/h	木醋液浓度/(cfu·mL ⁻¹)			
	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%
0	1.5×10 ⁶	1.5×10 ⁶	1.5×10 ⁶	1.5×10 ⁶
4	9.6×10 ⁵	7.7×10 ⁵	3.0×10 ⁵	3.7×10 ⁴
8	5.8×10 ⁵	1.8×10 ⁵	3.6×10 ⁴	4.6×10 ²
12	2.3×10 ⁵	7.9×10 ⁴	6.2×10 ³	5
24	3.8×10 ⁴	4.4×10 ³	22	0

存活曲线和 X 轴的交点就是细菌完全失活的时间。金黄色葡萄球菌在浓度为 0.5%的苦杏壳木醋液中大约 14 h 完全失活(图 1),而大肠杆菌在 0.8%的苦杏壳木醋液中基本失活需要 17 h 左右(图 2)。由表 3,表 4 可得细菌各存活曲线的斜率,通过斜率的负倒数计算得出相应的 D 值。当木醋液浓度在 0.50%时,对金黄色葡萄球菌(致病菌)D

值<4,在 0.60%的木醋液中,大肠杆菌(非致病菌)D 值<28,均满足标准。随着木醋液浓度的增大,对应的 D 值逐渐变小(表 3、表 4),说明对应细菌失活速率增大。

表 2 不同浓度木醋液对大肠杆菌的激发

Table 2 Results of antibacterial challenge test of bitter almond shell pyroigneous acid against *E. coli*(Ec)

时间/h	木醋液浓度/(cfu·mL ⁻¹)			
	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%
0	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶	1.0×10 ⁶
4	8.5×10 ⁵	7.3×10 ⁵	5.7×10 ⁵	2.5×10 ⁴
8	7.3×10 ⁵	5.9×10 ⁵	2.3×10 ⁵	2.1×10 ³
12	5.7×10 ⁵	4.3×10 ⁵	1.9×10 ⁵	54
24	3.2×10 ⁵	1.8×10 ⁵	2.8×10 ⁴	0

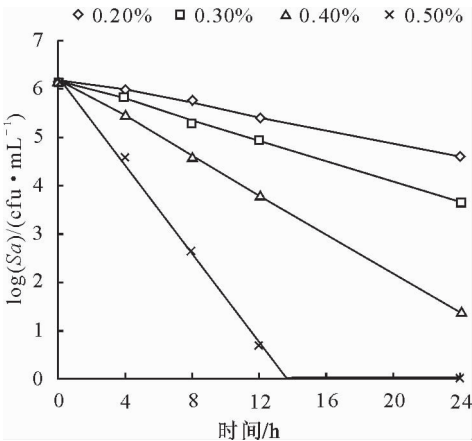


图 1 Sa 在不同浓度苦杏壳木醋液中的存活曲线
Fig. 1 Survival curves of Sa in pyroigneous acid with different concentrations

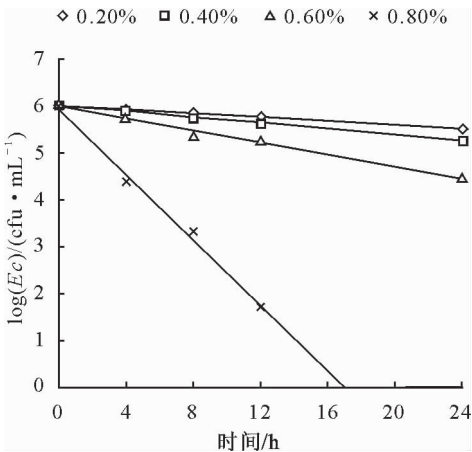


图 2 Ec 在不同浓度苦杏壳木醋液中的存活曲线
Fig. 2 Survival curves of Ec in pyroigneous acid with different concentrations

将木醋液的浓度作为 X 轴,用 D 值作为 Y 轴,绘制出致死时间曲线(图 3),根据线性回归的有效性标准,对于致病菌,将 D=4 代入方程,求得苦杏壳木醋液对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.44%;对于

非致病菌当 D 值等于 28 时,求得 MP 对大肠杆菌的 MIC 为 0.46%(表 5)。

表 3 Sa 在不同浓度木醋液中的 D 值

Table 3 D -values of bitter almond shell pyrolygneous acid with different concentrations against Sa			
浓度/%	回归方程	R^2	D 值
0.20	$Y=-0.068\ 4x+6.229\ 1$	0.992\ 2	14.62
0.30	$Y=-0.107\ 4x+6.203\ 2$	0.994\ 4	9.31
0.40	$Y=-0.202\ 9x+6.216\ 6$	0.999\ 4	4.93
0.50	$Y=-0.458\ 4x+6.277\ 0$	0.998\ 0	2.18

表 4 Ec 在不同浓度木醋液中的 D 值

Table 4 D -value of bitter almond shell pyrolygneous acid against Ec in different concentrations			
浓度/%	回归方程	R^2	D 值
0.20	$Y=-0.020\ 9x+6.011\ 6$	0.996\ 4	47.85
0.40	$Y=-0.030\ 9x+6.001\ 0$	0.998\ 4	32.36
0.60	$Y=-0.064\ 0x+5.983\ 0$	0.987\ 8	15.63
0.80	$Y=-0.347\ 0x+5.944\ 9$	0.994\ 4	2.88

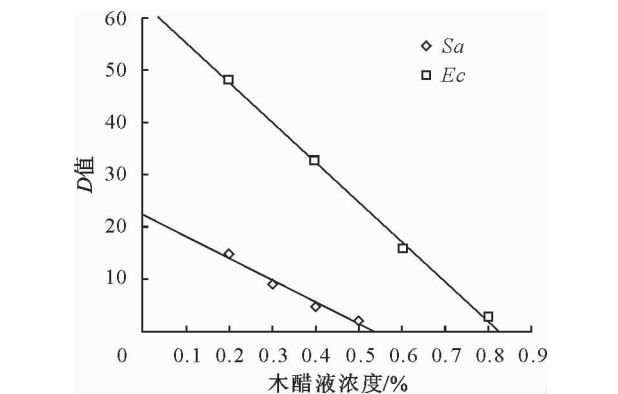


图 3 细菌死亡的时间曲线

Fig. 3 Curves of mortal time of two bacteria

表 5 苦杏壳木醋液的最小抑菌浓度

Table 5 MIC of bitter almond shell pyrolygneous acid				
菌株	回归方程	R^2	D 值	$MIC/\%$
Sa	$Y=-41.698x+22.354$	0.981\ 2	4	0.44
Ec	$Y=-75.816x+62.587$	0.997\ 2	28	0.46

2.2 抑菌活性稳定性

紫外灯不同时间照射下,随着处理时间的改变,MP 的抑菌活性并未发生明显的变化(图 4),可见苦杏壳木醋液对紫外光照射有很好的稳定性。

pH3~6 的缓冲液对供试菌有微弱的抑菌能力,pH7~8 的缓冲液对供试菌几无抑菌活性;随 pH 值的升高,MP 对大肠杆菌的抑菌活性有微小变化,对金黄色葡萄球菌的抑菌活性稳定性较平稳。当 pH7~8 时稍有降低,可能是因为缓冲液的低 pH 值对细菌产生微小的影响。在 pH3~8 范内,MP 的抑菌活性稳定性较好(图 5)。

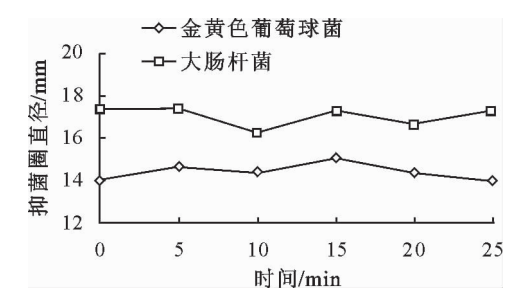


图 4 紫外光对木醋液抑菌活性的影响

Fig. 4 The effect of ultraviolet radiation on antimicrobial activity of bitter almond shell pyrolygneous acid

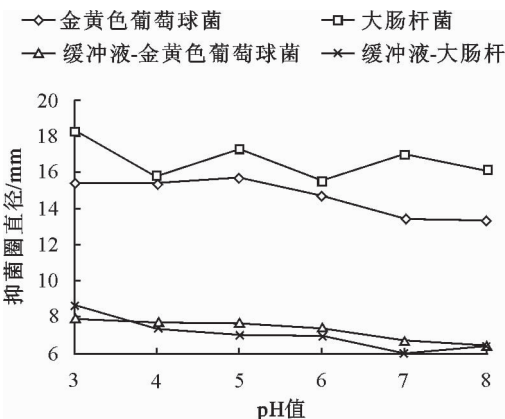


图 5 pH 值对木醋液抑菌活性的影响

Fig. 5 The effect of acidity on antimicrobial activity of bitter almond shell pyrolygneous acid

在几个不同温度处理后,MP 基本具有平稳良好的抑菌功能,甚至在高温(121℃)下依然有很强的抑菌效果(图 6)。说明 MP 的抑菌活性有良好的热稳定性。

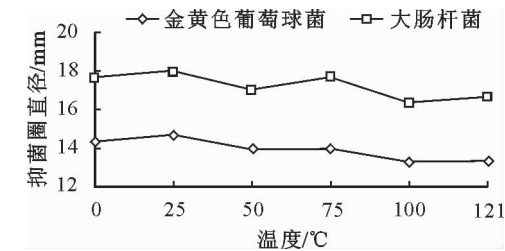


图 6 温度对木醋液抑菌活性的影响

Fig. 6 The effect of temperature on antimicrobial activity of bitter almond shell pyrolygneous acid

MP 经过活性炭脱色吸附处理和微波处理后的抑菌效果与对照组差异不大(图 7),证明 MP 的抑菌效果基本不受脱色吸附及微波加热的影响。

3 结论与讨论

随着人们越来越注重自然、健康等产品特点,一些天然安全的原料正逐渐成为防腐剂领域的研究热点。近年国内外不少学者已经从不同植物中提取出一些有抑菌活性的物质,并用于防腐剂的开发研究。人们从天然食用香料里的提取天然防腐物质作为天

然防腐物质,例如从大蒜中提取出蒜氨酸,肉桂和肉豆蔻中提取挥发油,丁香中的丁香油等的抑菌作用也有报道^[17]。柿子中的提取物或者其收敛物质已经在化妆品防腐剂方面应用已经初见成效^[18]。此外,一些微生物源天然防腐剂,如乳酸链球菌素和纳他霉素等也成为天然食品防腐剂的研究热点^[19]。

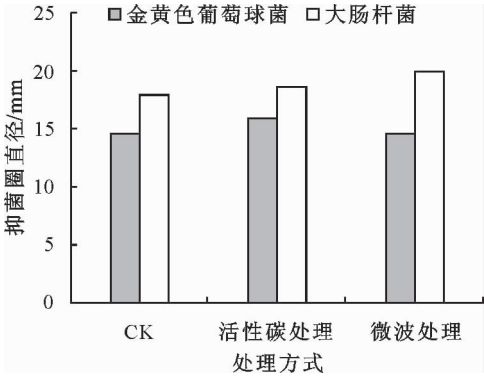


图 7 其他处理方式对木醋液抑菌活性的影响

Fig. 7 The effect of other treatments on antimicrobial activity of bitter almond shell pyroligneous acid

通过 D 值计算法求得金黄色葡萄球菌,大肠杆菌在不同浓度的苦杏壳木醋液中的存活曲线,随着苦杏壳木醋液浓度的增加,对细菌的抑菌效果越明显。根据线性回归法准确求得 D 值,可以看到,苦杏壳木醋液对 2 种细菌都符合有效性标准。依据各自的 D 值分别绘出 2 种细菌在木醋液中的死亡曲线,从而准确求得 MIC :MP 对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 0.44%,对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.46%。

苦杏壳木醋液的抑菌活性稳定性试验表明,苦杏壳木醋液抑菌效果基本不受温度的影响,说明添加到需要进行加热处理的食品、化妆品中也能够发挥其良好的抑菌作用;同时,苦杏壳木醋液在紫外光照射下,其抑菌效果几乎保持一致,说明苦杏壳木醋液抑菌活性对紫外光具有稳定性,此特性可以应用于辐照食品中; pH 3~8 时,苦杏壳木醋液对细菌的抑制效果较好,其中,在酸性条件下抑菌活性较强,碱性条件下,木醋液的抑菌效果稍有下降;用活性炭处理、微波加热处理抑菌效果不受影响。对于苦杏壳木醋液作为防腐剂在食品、化妆品及医药等行业的应用具有重要意义。

参考文献:

[1] MA X, WEI Q, ZHANG S, *et al.* Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyroligneous acid[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2011, 91:338-343.

[2] 尉芹,马希汉,郑韬. 核桃壳木醋液的制取、成分分析及抑菌试

验[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(7): 276-279.

WEI Q, MA X H, ZHENG T. Preparation, chemical constituents analysis and antimicrobial activities of pyroligneous acid of walnut shell[J]. *Transactions of the CSAE*, 2008, 24(7): 276-279. (in Chinese)

[3] 常雅宁,俞建瑛,倪炜,等. 竹醋液对食品污染菌的抗菌作用的研究[J]. *林产化学与工业*, 2005, 25(4): 83-85.

CHANG Y N, YU J Y, NI W, *et al.* Study on bacteriostasis of bamboo vinegar against food-polluting bacteria[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2005, 25(4): 83-85. (in Chinese)

[4] 戴肖东,张介驰,孔祥辉,等. 姬松茸抑菌作用的初步研究[J]. *中国食用菌*, 2007, 26(6): 36-37.

DAI X D, ZHANG J C, KONG X H, *et al.* Preliminary research on antimicrobial effect of *Agaricus blazei* Murr[J]. *Edible Fungi of China*, 2007, 26(6): 36-37. (in Chinese)

[5] 翁佩芳,江华珍,冯凤琴,等. 酶标比浊法评价月桂酸单甘油酯对肉葡萄球菌的抑菌活性[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(5): 188-194.

WENG P F, JIANG H Z, FENG F Q, *et al.* Evaluating of antimicrobial activity of glycerol monlaurate against *Staphylococcus carnosu* with the micropl reader[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(5): 188-194. (in Chinese)

[6] 万力,郭志君,闵卓,等. 野生葡萄枝条多酚粗提物抑菌活性研究[J]. *西北林学院学报*, 2014, 29(1): 122-126.

WAN L, GUO Z J, MIN Z, *et al.* Antimicrobial activities of phenolics from Chinese wild grape canes[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2014, 29(1): 122-126. (in Chinese)

[7] ORTH D S. Linear regression method for rapid determination of adequacy of cosmetic preservative efficacy [J]. *J. Soc. Cosm. Chem.*, 1979(30): 321-332.

[8] ORTH D S. Preservative efficacy testing: a review of various testing methods and their reliability[J]. *Cosmetics and Toiletries*, 1997, 112: 58-61.

[9] 苏世彦. 食品微生物检验手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 50-76.

[10] ORTH D S. Microbiological considerations in cosmetic formula development and evaluation, 1. microbiological quality of a product[J]. *Cosmetic and Toiletries*, 1989, 104(4): 49-64.

[11] MUSCATELLO M J. CTFA's preservation guidelines; a historical perspective and review[J]. *Cosmetics and Toiletries*, 1993, 108(10): 53-59.

[12] CTFA Survey: Test Methods Companies Use[J]. *Cosmetics and Toiletries*, 1990, 105(3): 79-82.

[13] ALARCON E I, UDEKWU K, SKOG M, *et al.* The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2012(33): 4947-4956.

[14] 郝淑贤,刘欣,赵力超,等. 葶荠英提取物抑菌成分稳定性的探讨[J]. *食品科学*, 2005, 26(2): 71-74.

HAO S X, LIU X, ZHAO L C, *et al.* Study on the effects of puchiin extract antimicrobia lproperties [J]. *Food Science*, 2005, 26(2): 71-74. (in Chinese)

YUE Z Y, ZHANG X P, MA P P, *et al.* Resistance of different poplars in the initial afforestation stages on *Cytospora chrysosperma* in Xinjiang[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(1):113-118. (in Chinese)

[10] DAHMEN H, STAUB T, SCHWINN F J. Technique for longterm preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen[J]. Phytopathology, 1983, 73:241-246.

[11] HWANG S W. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration[J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1966, 14(5):784-789.

[12] 任俊琦, 贺稚非 , 赵季, 等. 接种发酵泡菜及其低温保藏微生物变化规律[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(5):38-41.

REN J Q, HE Z F, ZHAO J, *et al.* Inoculated fermentation of kimchi and its low-temperature variation of microorganisms[J]. Food and Fermentation Technology, 2009, 45(5):38-41. (in Chinese)

[13] 高永强. 黄酒酵母菌种和米曲霉菌种的保藏[J]. 山东食品发酵, 2011(4):43-44.

[14] 李育岳, 汪麟. 草菇厚垣孢子低温保藏试验[J]. 微生物学研究与应用, 1989(1):9-11.

[15] 杨淑玺. 食用菌菌种的简易保藏[J]. 农村百事通, 2008(14):15.

[16] 范立宝. 食用菌菌种的简易保藏法[J]. 吉林农业, 2004(9):31.

[17] 黄河, 徐大雅. 液氮保存疫霉属菌种存活期检测[J]. 真菌学报, 1993, 12(1):48-53.

HUANG H, XU D Y. Determination of the viability of *Phytophthora* cultures stored in liquid nitrogen [J]. Aeta Mycologlca Slnica, 1993, 12(1):48-53. (in Chinese)

(上接第 131 页)

[15] 王杰, 张名位, 刘兴华. 苦瓜提取物抑菌作用及其稳定性研究[J]. 食品科技, 2004(4):71-74.

WANG J, ZHANG M W, LIU X H. Study on antimicrobial actions and stability of *Momordica charantia* extracts[J]. Food Science and Technology, 2004(4):71-74. (in Chinese)

[16] 王博, 徐龙光, 余仲东, 等. 刀孢轮枝菌产红色素条件及稳定性研究[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(6):112-116.

WANG B, XU L G, YU Z D, *et al.* Study of producing condition and the stability of a red pigment from *Lecanicillium psalliotae* Zare & W. Gams[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(6):112-116. (in Chinese)

[17] 向志楠, 宁正祥. 植物性天然防腐剂及其在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004, 6(3):79-83.

XIANG Z N, NING Z X. Application of natural preservation [J]. China Food Addictives, 2004, 6(3):79-83. (in Chinese)

[18] 李丙菊. 食品和化妆品用柿子提取物或收敛物质反复[J]. 林产化工通讯, 2000, 34(1):46-47.

LI B J. Extractive from persimmon or material of convergence in food and cosmetics[J]. Forest Chemical Communication, 2000, 34(1):46-47. (in Chinese)

[19] 邢宇, 郭丽娜, 孙伟. 微生物源天然防腐剂在食品上的应用研究[J]. 生物技术, 2012, 22(6):93-96.

XING Y, GUO L N, SUN W. Research of natural microor-ganism sources preservation application on food[J]. Biotechnology, 2012, 22(6):93-96. (in Chinese)