

nisin 和 EDTA 对牛源致病性大肠杆菌体外抑菌效果的研究

张燕¹ 敖日格乐^{1*} 王纯洁² 姜晶¹ 赵称赫¹ 曹晓波¹

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018)

摘要 为研究乳酸链球菌素(nisin)和四乙酸乙二胺(EDTA)的联合作用对5种血清型牛源致病性大肠杆菌(O₁、O₂、O₈、O₇₈和O₈₆)的体外抑菌效果,利用牛津杯法测定抑菌圈直径;结合微量稀释法和平板法测定最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。结果表明:1)nisin或EDTA单独使用无抑菌圈;2)将nisin分成12个质量浓度分别与0.1 mg/mL的EDTA相混合进行协同作用,均产生明显的抑菌圈,并且随着nisin质量浓度的增加,抑菌圈越大;3)O₈、O₇₈和O₈₆型大肠杆菌的MIC均为0.063 mg/mL,而O₁型的MIC为0.016 mg/mL,O₂型的MIC为0.031 mg/mL,O₂、O₈和O₈₆型大肠杆菌的MBC均为0.125 mg/mL,O₁型的MBC为0.063 mg/mL,O₇₈型的MBC为0.25 mg/mL。EDTA或nisin溶液单独使用时,对5种血清型致病性大肠杆菌无抑菌效果;EDTA和nisin联合使用时,对5种致病性大肠杆菌有明显的抑菌效果;5种大肠杆菌的MIC为0.016~0.063 mg/mL,MBC为0.063~0.250 mg/mL。

关键词 nisin;EDTA;致病性大肠杆菌;体外抑菌;最小抑菌浓度;最小杀菌浓度

中图分类号 S 852.61+2

文章编号 1007-4333(2016)05-0098-06

文献标志码 A

Antibacterial effects of nisin and EDTA on bovine pathogenic *Escherichia coli* in vitro

ZHANG Yan¹, AO-ri-ge-le^{1*}, WANG Chun-jie², JIANG Jing¹, ZHAO Chen-he¹, CAO Xiao-bo¹

(1. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract Purpose of this study was to investigate the antibacterial effect of combination of nisin and EDTA on 5 different serotypes of pathogenic *Escherichia coli* (O₁、O₂、O₈、O₇₈、O₈₆) in vitro. The diameter of inhibition zone was determined by Oxford cup method. Micro dilution method and plate method were adopted to determine minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). EDTA and nisin alone essentially had no inhibitory effects. Nisin was divided into 12 concentration groups, each of which was mixed with EDTA 0.1 mg/ml and used to carry out synergetic action test. The diameter of inhibition zone increased with the increase of nisin concentration. O₈、O₇₈ and O₈₆ serotypes of *E. coli* 0.063 mg/mL of MIC, O₁ type MIC was 0.016 mg/mL, and O₂ 0.031 mg/mL of MIC. O₂、O₈、O₈₆ serotypes *E. coli* MBC were 0.125 mg/mL, O₁ type MBC was 0.063 mg/mL, and O₇₈ MBC was 0.025 mg/mL. EDTA or nisin solution alone had no inhibitory effect on 5 different serotypes of pathogenic *E. coli* and their combination had obvious bacteriostatic effect. The 5 different serotypes of pathogenic *E. coli* with 0.016 – 0.063 mg/mL of MIC and 0.063 – 0.250 mg/mL of MBC.

Keywords nisin; EDTA; pathogenic *Escherichia coli*; bacteriostasis; MIC; MBC

收稿日期: 2015-08-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31060318,31260570,31260590)

第一作者: 张燕, 硕士研究生, E-mail: Corber0710@163.com

通讯作者: 敖日格乐, 教授, 博士生导师, 主要从事牛生产学与产品品质研究, E-mail: aori6009@163.com

大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌引起的人畜共患的局部或全身感染性疾病,覆盖面广,全球畜牧业养殖中均可见到,对全球畜牧养殖业造成了巨大的损失^[1]。牛现今已成为携带致病性大肠杆菌的主要载体,有研究证实普通大肠杆菌存在于牛的肠道内,而致病性大肠杆菌主要寄生在牛胃肠道下端,主要通过粪-食物-口的途径传播。致病性大肠杆菌所引发的各类疾病通常采用抗生素治疗,但是抗生素的滥用会导致致病性大肠杆菌产生耐药性,降低治疗效果,增加治疗的难度,同时引起动物免疫力降低和畜产品药物残留量增多等问题^[2-3]。因此,研究新型抗生素替代品引起了广大科研工作者的重视。

乳酸链球菌素(nisin)属乳酸乳球菌乳酸亚种,在代谢过程中通过核糖体合成机制产生的一大类具有抑菌活性的多肽、蛋白质或蛋白质复合物,具有高效无毒副作用、能耐高温、无残留、不产生抗药性等特点。自1988年nisin首次作为食品添加剂得到FDA的认可,从而促进了细菌素这类绿色环保型产品的深入研究,有望成为新型抗生素替代品。nisin对革兰氏阳性菌的抑菌效果比较好,对革兰氏阴性菌抑菌范围较窄,这样限制了其在畜牧业的应用。但是有研究发现,nisin与某些物理因子或某些化学物质联合使用可以抑制甚至杀灭革兰氏阴性菌。目前四乙酸乙二胺(EDTA)作为化学防腐剂一般被认为是安全物质,与nisin的螯合作用可以扩宽革兰氏阴性菌的抑菌谱^[4]。有研究指出^[5]EDAT在动物体内不发生新陈代谢,而是结合机体有害放射性金属后以络合物形态随尿液排出,起到解毒剂的作用。关于nisin和EDTA联合使用对致病性大肠杆菌的抑菌作用国内外报道较少。本试验深入研究了nisin与EDTA联合作用对5种血清型致病性大肠杆菌的抑菌效果,表明nisin单独使用时的缺陷和不足,拓宽抑菌谱,旨在为研究新型绿色环保产品和预防由致病性大肠杆菌引起的肠道疾病提供参考,同时为小鼠体内试验提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

受试菌:5种血清型牛源致病性大肠杆菌分别为O₁、O₂、O₈、O₇₈和O₈₆,由内蒙古农业大学牛生产学实验室在奶牛直肠粪样中分离、纯化并提供。

nisin溶液:乳酸链球菌素,使用时用双蒸水溶解,现配现用。

EDTA溶液:EDTA(纯度99.5%)购自天津市光复科技发展有限公司,使用时用双蒸水溶解,用漩涡震荡仪室温震荡10 min左右,直至EDTA全部溶解,4℃保存备用。

普通营养琼脂培养基和普通肉汤培养基;购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

全自动立式电热压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;恒温培养箱(JC-SPJ-480),济南精诚实验仪器有限公司;净化工作台,上海新苗医疗器械制造有限公司;电子分析天平(CP224C),上海奥豪斯仪器有限公司;漩涡震荡仪、牛津杯、培养皿、涂布棒、酒精灯、离心管、96板和游标卡尺(精确度0.02 mm)。

1.3 方法

1.3.1 菌液的复苏与制备

将实验室保存的5种致病性大肠杆菌,使用前经过划线培养,确定为纯培养物(菌落生长状况与菌的形态、典型特征保持一致)后,将其接种于营养琼脂斜面培养基37℃,培养24 h后,4℃冰箱保存备用。使用前将斜面培养基上的5种大肠杆菌接种于肉汤培养基,37℃培养18 h,采用活菌计数法将菌液配成 1×10^8 cfu/mL备用。

1.3.2 nisin与EDTA溶液的配制

用双蒸水配制不同质量浓度nisin(0.01、0.1和0.5 mg/mL)和EDTA(0.01、0.05和0.1 mg/mL)溶液,2种溶液过滤除菌后4℃保存备用。

混合溶液配制:先用双蒸水把EDTA溶解成0.1 mg/mL的溶液,然后与不同质量浓度0.01~0.50 mg/mL的nisin分别配成混合溶液(现配现用,时间过长或隔夜会影响试验效果)。

1.3.3 牛津杯法抑菌试验

取100 μL配制后的大肠杆菌菌液,均匀涂布于营养琼脂平板上,于无菌操作台内将牛津杯放入带菌层的平皿内,每种药液设定3个平行,每个牛津杯注入nisin或EDTA或两者混合溶液200 μL,37℃恒温培养24 h后,游标卡尺测定抑菌圈直径,结果取平均值。

1.3.4 最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定

采用2倍稀释法和平板法,测定不同质量浓度的nisin分别与0.1 mg/mL EDTA的混合溶液对5种大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度

(MBC)。

方法参照文献[6]采用微量稀释法和平板 OD 值测定法。620 nm 条件下测定 OD 值,取 OD 值有下降趋势的为最小抑菌浓度(MIC)。

选取 OD 值小于和等于 MIC 的溶液各 100 μ L,接种于营养琼脂上,放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 24 h,生长菌数小于 5~10 个的最低浓度为最低杀菌浓度(MBC)^[2]。

1.4 数据统计

应用 Excel 软件对测定数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 体外抑菌试验

2.1.1 nisin 及 EDTA 单独抑菌效果

由表 1 可以看出:质量浓度为 0.01~0.5 mg/mL 的 nisin 溶液对 O₁、O₂、O₈、O₇₈ 和 O₈₆ 均无抑菌圈。质量浓度为 0.01~0.1 mg/mL 的 EDTA 溶液单独使用时,对 5 中致病性大肠杆菌也无抑菌圈。结果表明,EDTA 或 nisin 单独使用时,对大肠杆菌无抑菌效果。

表 1 nisin 与 EDTA 联合作用对 5 种血清型大肠杆菌的体外抑菌直径

Table 1 Diameter of inhibition zone of nisin and EDTA synergetic action against 5 serotypes of pathogenic *Escherichia coli* in vitro

组别 groups	nisin 质量浓度/ (mg/mL) nisin concentration	EDTA 质量浓度梯度/ (mg/mL) EDTA Concentration group	牛源致病性大肠杆菌 Pathogenic <i>E. coli</i>				
			O ₁	O ₂	O ₈	O ₇₈	O ₈₆
阳性对照组	0.00	0.00	*	*	*	*	*
	0.01	0.00	*	*	*	*	*
	0.10	0.00	*	*	*	*	*
	0.50	0.00	*	*	*	*	*
EDTA	0.00	0.01	*	*	*	*	*
	0.00	0.05	*	*	*	*	*
	0.00	0.10	*	*	*	*	*
联合作用	0.01	0.10	9.48	9.96	9.86	9.28	8.76
	0.025	0.10	9.54	10.63	9.97	9.32	8.79
	0.05	0.10	9.56	10.65	10.11	9.34	8.82
	0.10	0.10	9.67	10.73	10.32	9.46	8.86
	0.15	0.10	9.98	10.83	10.50	9.62	8.95
	0.20	0.10	10.19	10.98	10.65	9.78	9.08
	0.25	0.10	10.29	11.10	10.86	9.90	9.18
	0.30	0.10	10.40	11.32	11.00	10.12	9.45
	0.35	0.10	10.91	11.39	11.25	10.58	9.76
	0.40	0.10	11.12	11.45	12.02	11.20	10.02
0.45	0.10	11.48	11.87	12.58	12.30	10.54	
0.50	0.10	11.82	11.96	13.19	13.47	11.13	

注:“*”代表牛津杯直径 8.00 mm。

Note: * is the diameter of Oxford cup, 8.00 mm.

2.1.2 nisin 及 EDTA 联合抑菌效果

由表 1 还可以看出,当 EDTA 质量浓度为一定量(0.1 mg/mL)时,随着 nisin 质量浓度由 0.01~0.5 mg/mL 不断增大,5 种大肠杆菌的抑菌圈直径也不断增大,抑菌效果越来越明显。其中 O₈ 和 O₇₈ 型致病性大肠杆菌的抑菌圈变化最大,抑菌效果最为明显。此研究结果表明,0.1 mg/mL 的 EDTA 和 0.01~0.5 mg/mL 的 nisin 溶液混合使用时,会对 5 种牛源致病性大肠杆菌产生明显的抑菌效果,并且随着 nisin 浓度的增大,抑菌效果越好。

2.2 MIC 及 MBC 测定结果

由表 2 可以看出,O₁、O₂、O₈、O₇₈ 和 O₈₆ 5 种致

病性大肠杆菌吸光度开始有下降趋势的编号分别是 8、7、6、6 和 6,所对应的质量浓度为 0.016、0.031、0.063、0.063 和 0.063 mg/mL,该质量浓度也是对应致病性大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)。以 O₁ 型大肠杆菌为例,与空白对照相比,编号 9 和 10 的吸光度几乎无变化,说明 nisin 为 0.004 和 0.008 mg/mL 时,对 O₁ 型大肠杆菌无抑菌效果;nisin 为 0.016 mg/mL 时,吸光度有所下降,说明孔内大肠杆菌的生长受到抑制,导致大肠杆菌的浓度降低,因此,可以判定 0.016 mg/mL 为 O₁ 型大肠杆菌的最小抑菌质量浓度(MIC)。其他 4 种大肠杆菌的 MIC 同理判定。

表 2 各药物组 MIC 对应的吸光度

Table 2 MIC corresponding absorbance in each drug group

编号 Number	EDTA 质量浓度/ (mg/mL) EDTA concentration	nisin 质量浓度梯度/ (mg/mL) nisin concentration group	牛源致病性大肠杆菌 Pathogenic <i>E. coli</i>				
			O ₁	O ₂	O ₈	O ₇₈	O ₈₆
1	0.1	2.000	0.070	0.080	0.070	0.230	0.354
2	0.1	1.000	0.498	0.396	0.397	0.499	0.484
3	0.1	0.500	0.595	0.470	0.468	0.515	0.505
4	0.1	0.250	0.689	0.554	0.561	0.535	0.549
5	0.1	0.125	0.740	0.704	0.653	0.639	0.565
6	0.1	0.063	0.778	0.717	0.714	0.665	0.635
7	0.1	0.031	0.799	0.725	0.724	0.745	0.717
8	0.1	0.016	0.803	0.745	0.727	0.752	0.718
9	0.1	0.008	0.818	0.750	0.729	0.750	0.716
10	0.1	0.004	0.820	0.746	0.730	0.745	0.720
空白	0.1	0.000	0.819	0.748	0.732	0.748	0.719

由表 3 得出,O₈、O₇₈ 和 O₈₆ 型大肠杆菌的 MIC 相同,均为 0.063 mg/mL,而 O₁ 型的 MIC 为 0.016

mg/mL,O₂ 型的 MIC 为 0.031 mg/mL。O₂、O₈ 和 O₈₆ 型大肠杆菌的 MBC 均为 0.125 mg/mL,O₁ 型的

表 3 nisin 和 EDTA 混合液对 5 种血清型致病性大肠杆菌的 MIC 及 MBC

Table 3 MIC and MBC of the combination of nisin and EDTA against 5 serotypes of pathogenic *Escherichia coli* mg/mL

项目 Items	牛源致病性大肠杆菌 Pathogenic <i>E. coli</i>				
	O ₁	O ₂	O ₈	O ₇₈	O ₈₆
MIC	0.016	0.031	0.063	0.063	0.063
MBC	0.063	0.125	0.125	0.250	0.125

MBC为0.063 mg/mL, O_{78} 型的MBC为0.250 mg/mL。进一步研究发现, O_1 型大肠杆菌的MIC和MBC比其他大肠杆菌小,说明 O_1 型大肠杆菌对低浓度的nisin和EDTA极其敏感;相反, O_{78} 反应较缓。这可能是由于同种浓度对不同血清型致病性大肠杆菌的抑菌作用不同,也可能与不同血清型致病性大肠杆菌含有的致病性毒力因子不同有关,大肠杆菌的毒力基因携带情况可以反映出其致病力的高低,致病力的高低又可反映对药物的敏感性。

3 讨论

nisin是一种安全无毒副作用的抗菌肽,对热稳定性好,人或动物摄取后在消化道内很快被蛋白水解酶消化成氨基酸,不产生抗性和过敏反应^[7],同时作为食品添加剂广泛应用于食品行业。有报道称,乳酸链球菌素仅对葡萄球菌、链球菌以及产生芽孢的革兰氏阳性菌等有抑制作用,所以在保质期内,不能抑制酸奶中革兰氏阴性致病菌、霉菌及酵母的增殖^[8]。由于nisin对革兰氏阴性菌无抑菌效果,限制了其应用范围,但经过冷冻、加热、低pH处理或与其他生物和化学防腐剂整合使用,可扩大抑菌谱,增强抑菌效果,达到酸奶有效保存的目的^[9-10]。这是由于革兰氏阴性菌的外膜是其外源物质的透性屏障,本身对清洁剂、去污剂、防腐剂等有很强的阻碍作用,所以一般对nisin不敏感,一些螯合剂处理可以改变阴性菌的外膜通透性,从而使nisin产生对革兰氏阴性菌的抑制作用^[11]。有研究表明^[12],0.05~1.0 mg/mL nisin和0.02~0.10 mol/mL EDTA单独使用时对产肠毒素大肠杆菌基本无抑菌作用。Tony等^[13]报道指出nisin和EDTA单独使用时对牛肉储藏时 $O_{157} : H_7$ 无抑菌作用,本试验与以上报道结果基本一致。

Tony等^[13]还指出nisin和EDTA联合使用在10℃条件下对牛肉中 $O_{157} H_7$ 的抑制作用明显增强。Singh等^[6]研究表明nisin与抗生素和EDTA联合作用对小鼠体内沙门氏菌的影响明显,对扩大nisin抑菌谱对抗更多革兰氏阴性菌有额外潜力。Economou等^[14]指出,nisin分别为(500和1500 IU/g时)和EDTA(50 mmol/L)联合作用可使新鲜鸡肉的保质期延长至20~24 d。在肉制品的卤水中,添加nisin和EDTA可以减少病原菌,延长肉制品的保质期^[15]。邓明等^[16]在nisin和山梨酸钾的复配物中加入EDTA,研究了三者对真空包装冷鲜肉

的复配作用并分析了交互效应时指出,按nisin 0.05%、EDTA 0.112%、山梨酸钾 0.054%比例添加,效果最好。其中乳链菌肽与EDTA的交互效应显著,本试验结果与上述报道相一致,但是也有一定的差异,这可能是由于革兰氏阴性菌的血清型、毒力基因和乳酸链球菌的来源不同以及提取方法的差异性等有关。

本研究发现不同质量浓度的nisin或EDTA溶液单独使用时,对 O_1 、 O_2 、 O_8 、 O_{78} 和 O_{86} 血清型牛源致病性大肠杆菌无任何抑菌效果;nisin和EDTA联合使用时,对5种致病性大肠杆菌有明显的抑菌效果,大肠杆菌的MIC为0.016~0.063 mg/mL, MBC为0.063~0.250 mg/mL,由于国内外暂无nisin与EDTA联合作用体外抑制牛源致病性大肠杆菌的相关报道,测定数据有待进一步论证。

参 考 文 献

- [1] 张越男,张彦明,张怀喜. 大肠杆菌毒力因子研究概况[J]. 动物医学进展,2003,24(4):26-29
Zhang Y N, Zhang Y M, Zhang H X. The research on virulence factors of *Escherichia coli* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2003, 24(4): 26-29 (in Chinese)
- [2] 杨斯琴,敖日格乐,王纯洁,斯木吉德,包永光. 蒙药对牛源致病性大肠杆菌的体外抑菌效果研究[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1): 124-128
Yang S Q, AO-Ri G L, Wang C J, Si-Mu J D, Bao Y G. Antibacterial effects of Mongolian medicines on bovine pathogenic *Escherichia coli* in vitro [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2015, 20(1): 124-128 (in Chinese)
- [3] 王俊丽,张要齐,孙雪峰,张新蕾,陈静,张妍,张玲. 18种中药对猪大肠杆菌的体外抑菌活性的测定方法比较[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(26): 12947-12948
Wang J L, Zhang Y Q, Sun X F, Zhang X L, Chen J, Zhang Y, Zhang L. Study on the in vitro bacteriostatic test of 17 kinds of traditional Chinese herbs against swine *E coli* [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2012, 40(26): 12947-12948 (in Chinese)
- [4] 杜琨. Nisin和EDTA联合抑制金黄色葡萄球菌效果研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2): 1016-1019
Du K. Study on the effect of combined Nisin and EDTA to inhibit *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2012, 40(2): 1016-1019 (in Chinese)
- [5] 薛福连. 乙二胺四乙酸的开发应用[J]. 上海化工, 2005(7): 47
Xue F L. The development and application of ethylene diamine tetraacetic acid [J]. *Shanghai Chemical Industry*, 2005(7): 47 (in Chinese)
- [6] Singh A P, Prabha V, Rishi P. Value addition in the efficacy of

- conventional antibiotics by nisin against *Salmonella*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76844
- [7] 宋连花, 王彦文. 乳链菌肽(Nisin)研究进展[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(5): 18-20
Song L H, Wang Y W. The study progress of nisin[J]. *Food Research and Development*, 2004, 25(5): 18-20 (in Chinese)
- [8] 应杰, 沈玲, 周凌华. 乳酸链球菌素对控制酸奶后发酵的作用分析[J]. 中国乳业, 2009(7): 26-27
Ying J, Shen L, Zhou L H. Effects analysis of nisin on yogurt post-fermentation[J]. *Chinese Dairy Industry*, 2009(7): 26-27 (in Chinese)
- [9] 李海娜, 朱希强, 郭学平. 天然防腐剂乳链菌肽复配应用的研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(1): 51-54
Li H N, Zhu X Q, Guo X P. Progress on application of compound nisin[J]. *Food and Medicine*, 2010, 12(1): 51-54 (in Chinese)
- [10] Stevens K A, Sheldon B W, Klapes N A, Klaenhammer T R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(12): 3613-3615
- [11] Masschalck B, Deckers D, Michiels C W. Sensitization of Outer-Membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial peptides under high pressure[J]. *Journal of Food Protect*, 2003, 66(8): 1360-1367
- [12] 云雪霞, 胡静, 陈清. 乳酸链球菌素对产毒素大肠杆菌的抑菌作用观察[J]. 中国消毒学杂志, 2006, 23(6): 529-531
Yun X X, Hu J, Chen Q. Observation on inhibitory effect of nisin on enterotoxin *Escherichia coli* [J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2006, 23(6): 529-531 (in Chinese)
- [13] Tony J F, Hung-Chi T. Growth patterns of *Escherichia coli* O157 : H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels[J]. *Food Microbiology*, 2003, 20(2): 243-253
- [14] Economou T, Pournis N, Ntzimani A, Savvaidis I N. Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(4): 1470-1476
- [15] Adler J M, Geornaras I, Oleksandr A, Byelashov, Belk K E, Smith G C, Sofos J N. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 in meat product brines containing antimicrobials[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(7): M478-M485
- [16] 邓明, 哈益明, 严奉伟, 吴谋成. nisin、EDTA 和山梨酸钾在冷却肉贮藏保鲜中的交互效应分析[J]. 食品科技, 2005, 30(9): 66-70
Deng M, Ha Y M, Yan F W, Wu M C. Interaction analysis of nisin, EDTA and potassium sorbate on chilled meat preservation[J]. *Food Science and Technology*, 2005, 30(9): 66-70 (in Chinese)

责任编辑: 苏燕