

肖 香,周 慧,支竹伟,等. 天然产物对肴肉中特定腐败菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):302-307.

# 天然产物对肴肉中特定腐败菌的抑制作用

肖 香,周 慧,支竹伟,刘 涵,董 英

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

**摘要:**选择 18 种不同来源的天然产物,以抑菌圈大小为指标,采用超声波辅助提取技术,考察各天然产物提取(溶解)液对肴肉中特定腐败微生物—中间耶尔森菌、屎肠球菌和清酒乳杆菌的抑制效果,结果表明:大蒜、肉桂、肉豆蔻及茶多酚提取(溶解)液对 3 种受试菌株均具有较好的抑制效果。通过单因素和正交试验进一步优化了生大蒜、肉桂、肉豆蔻及茶多酚的抑菌活性物质提取(溶解)条件,抑菌效果为大蒜 > 肉桂 > 茶多酚 > 肉豆蔻;以 MIC 大小为指标,通过正交  $t$  值法得到的天然生物抑菌剂的最佳剂量配比为大蒜:茶多酚 = 1:1,该复合生物抑菌剂对 *Lactobacillus sakei* 的最低抑菌浓度为 0.56 mg/mL。

**关键词:**天然产物;肴肉;特定腐败菌;抑菌

**中图分类号:** TS251.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0302-06

真空包装水晶肴肉是一种秉承中式传统工艺,并引进现代低温肉制品加工技术生产的低温肉制品,在加工过程中涉及到的原、辅材料种类多且来源复杂,源头污染和二次污染的情况难以完全控制;且煮制过程中热加工的温度较低,杀菌不彻底,因而产品需在冷链条件下运输、保存和销售。贮存或销售温度稍高即容易引起微生物孳生而导致产品腐败变质,即使产品在冷藏条件下也常出现卫生指标或质量指标不合格的现象,这是限制肴肉产品在地区间交流及大规模生产的主要因素<sup>[1-2]</sup>。要解决这个问题关键是建立以真空包装水晶肴肉

中特定腐败菌(specific spoilage organism, SSO)为核心的控制技术,从而有效延长产品货架期。延长产品的货架期既是有效预防和控制食源性疾病的重要前提和基础,也是现代肴肉生产企业快速发展的迫切需求。

目前,国内外很多学者针对低温肉制品货架期短、安全问题突出等系列问题,开展了广泛的研究,并提出一系列低温肉制品防腐保鲜抑菌的方法,可以概括为物理保鲜技术(低温贮藏保鲜、气调保鲜、辐照保鲜、热处理保鲜等)、化学保鲜技术(化学防腐剂)、生物保鲜技术(天然防腐剂主要包括天然植物、动物或微生物的提取物或分泌物)。目前,低温肉制品贮藏最有效的手段是热处理结合化学保鲜技术,但由于消费者对食品安全的重视,人们越来越倾向于在食品加工和贮藏过程中尽可能使用天然产物作为防腐剂。因此,高效、低毒的天然生物抑菌剂的开发和利用成为目前食品科学研究中的热

收稿日期:2013-07-29

基金项目:江苏省镇江市科技支撑计划(编号:SH2011015)。

作者简介:肖 香(1980—),女,江苏镇江人,博士,讲师,从事食品质量与安全研究。E-mail: xiaoxiang1@aliyun.com。

并不显著。但食品企业品牌的建立对于我国食品产业的良性发展有着重要意义。提高消费者对食品安全品牌的认识,企业不仅需要认识到发展食品品牌的重要性,政府也要引导消费者对于食品品牌的认识。我国国内的某些大型食品企业已经注意到,国内某食品企业就开放自己的工厂,让消费者真实感受到企业的整个生产过程。

## 3.2 建立统一、权威食品安全发布渠道

3.2.1 建立统一食品安全信息发布平台 调查结果,84.4%的消费者认为,需要建立统一的信息发布平台。目前消费者获得食品安全信息渠道很多,但是鱼龙混杂,消费者认知水平有限,对众多的信息无从选择,造成消费者对食品安全问题认知的混乱,亟需建立统一食品安全信息发布平台,可通过网络等形式,实现食品安全信息共享,互相监督。

3.2.2 加强食品安全认证的宣传 根据消费者购买行为因素分析,第三方认证对于消费者购买行为影响并没有显著性,导致市场上高品质食品品质优价不优的现象。消费者购买行为、支付意愿不强、利润不高。消费者缺乏对于认证直观的认识,并对认证产生疑虑,造成支付意愿不足。通过将“三品一标”食品的认证要求和过程拍摄成公益的宣传视频,通过媒

体发布,使消费者理性了解到整个严格的控制过程,增加“三品一标”食品的知名度和可信度。在一定程度上提高消费者对高品质产品的支付意愿,从市场方面激励相应的食品企业的自律意识,引导他们自觉进行安全优质农产品公共品牌认证,一定程度上减轻政府监管的压力。

## 参考文献:

- [1] Frewer L J. Risk perception and risk communication about foodsafety issues[J]. British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 2000, 25: 31-33.
- [2] Slovic P, Fischhoff B, Lichtenstein S. Rating the risks[J]. Environment, 1979, 21(3): 36-39.
- [3] 周洁红. 消费者对蔬菜安全认知和购买行为的地区差别分析[J]. 浙江大学学报:人文社会科学版, 2005, 35(6): 113-121.
- [4] 周应恒, 霍丽玥, 彭晓佳. 食品安全: 消费者态度、购买意愿及信息的影响——对南京超市消费者的调查分析[J]. 中国农村经济, 2004(11): 53-80.
- [5] 胡卫中, 齐 羽, 华淑芳. 浙江消费者食品安全信息需求实证研究[J]. 湖南农业大学学报:社会科学版, 2007, 8(4): 8-11.

点之一<sup>[3-4]</sup>。

笔者前期对镇江肴肉的贮藏特性进行了研究,同时完成了镇江肴肉中特定腐败菌的分离鉴定工作,得到了 4 ℃ 贮藏期间肴肉中的 3 株特定腐败菌:中间耶尔森菌(*Yersinia intermedia*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)。本研究选择了 18 种不同来源的天然产物,以抑菌圈大小为指标,筛选出对 SSO 作用较强的提取物,并采用单因素试验和正交试验的方法对筛选出来的天然产物的提取条件进行优化;并以最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)为指标,参考中草药复方配伍方法(正交 *t* 值法)<sup>[5-6]</sup>的原则对 4 种提取物进行复配,得到较优的复合生物抑菌剂配方,从而为开发天然安全的生物抑菌剂,延长肴肉货架期提供理论与试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

受试菌株 *Yersinia intermedia*、*Enterococcus faecium*、*Lactobacillus sakei* 均为笔者所在实验室分离鉴定;大蒜、桂皮、花椒、生姜、甘草、丁香、肉豆蔻、百里香、肉桂购自镇江香辛料批发市场,迷迭香、薄荷购自大润发超市镇江店;98% 茶多酚购自湖州荣凯植物提取有限公司;溶菌酶购自广西庞博生物工程有限公司(20 000 μg/mg);乳酸链球菌素购自连云港友进食品添加剂技术有限公司;氯化钠、大豆蛋白胨、胰蛋白胨等均为 BR 级,购自中国医药(集团)上海化学试剂有限公司;试验所用肴肉均由镇江源春肉制品有限公司提供。

### 1.2 主要仪器与设备

超净工作台:扬州净化设备有限公司;微电脑光照培养箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂;3110-P1000 型移液器:德国 Eppendorf 公司;SK-1 型快速混匀器:江苏金坛医疗仪器厂;牛津杯:上海东方药品科技实业有限公司;智能型不锈钢立式电热蒸汽消毒器:上海三申医疗器械有限公司。

### 1.3 天然产物预处理

将大蒜、桂皮、花椒、生姜、甘草、丁香、肉豆蔻、百里香、肉桂、迷迭香、薄荷破碎后称取 200 g,加 600 mL 50% 乙醇于室温下经 200 W、40 kHz 超声波辅助提取 30 min,过滤后经旋转蒸发浓缩后定容至 50 mL 即得提取液。

茶多酚、溶菌酶、乳酸菌素均采用直接溶解法,分别称取 2 g 溶解于 50 mL 50% 乙醇中,于室温下经 200 W、40 kHz 超声波辅助提取 30 min,过滤除去沉淀即得溶解液。

### 1.4 受试菌悬液的制备

分别采用营养琼脂 PCA 培养基、MRS 培养基对肠杆菌及乳酸菌进行培养。将受试菌种接种于相应固体斜面培养基上,并将其分别放于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h,连续传代 2 次。在无菌条件下,用接种环分别挑取 2 环活化后的单菌落,用无菌生理盐水梯度稀释受试菌,振荡数秒混匀,稀释菌液经计数,将菌体浓度控制在  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL。

### 1.5 牛津杯抑菌圈试验

采用涂布法,在无菌条件下吸取 200 μL 受试菌悬液,均匀涂布于相应固体培养基平板上,凝固后在每个培养基中等距离、平稳放置 3 个灭菌牛津杯,并用无菌移液枪向牛津杯内分别滴加 0.25 mL 的天然产物提取溶解液,对照加 0.85% 的

生理盐水,将培养皿置于 37 ℃ 培养 48 h 后,移去牛津杯,采用十字交叉法测定各抑菌圈的直径,试验重复 3 次取平均值。

### 1.6 提取条件优化

选择 4 种具有较好抑菌效果的天然产物,针对受试菌以抑菌圈大小为指标,分别按乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间为研究对象进行单因素试验,在此基础上进行  $L_9(3^4)$  正交优化,4 因素分别为:乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间;3 水平根据单因素试验结果进行适当增减。

### 1.7 最低抑菌浓度的测定

将大蒜、肉桂、肉豆蔻和茶多酚提取(溶解)物在最优条件下提取过滤后经旋转蒸发浓缩后定容至 500 mL。用相应液体培养基以二倍稀释法对各提取物进行梯度稀释,稀释成 12 个 2 倍系列浓度,最后 1 管不加提取物作为阴性对照。最后加入细菌悬液,使细菌终浓度达到  $10^6$  CFU/mL。37 ℃ 培养 24 h,630 nm 测定吸光值,无菌生长的试管中的最小提取物浓度即为该提取物的 MIC。试验重复 3 次。

### 1.8 正交 *t* 值法进行复方组合及剂量配比

利用正交 *t* 值法以 *Lactobacillus sakei* 为受试菌株,以最小抑菌浓度为检测指标,对筛选出的提取物进行复方组合和剂量配比。用正交 *t* 值法优选复方,一般分 3 步进行:主成分分析、辅助成分交互作用分析、剂量分析。

1.8.1 正交 *t* 值法-主成分分析 将筛选出来的提取物其中每种为 1 个因素,每种提取物均有 2 个水平,设水平 1 为添加,水平 2 为不添加。各提取物在每组方中的用量采用前期工作正交试验中效果最优的剂量组合。

1.8.2 辅助成分交互作用分析 用正交表着重分析辅助成分彼此间的交互作用,以 MIC 为检测指标,每组 3 个重复。

1.8.3 剂量配比 各因素确定后,采用正交表进行剂量配比优化,以最小抑菌浓度 MIC 为检测指标,每组 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 18 种天然产物的抑菌作用初筛

根据抑菌圈试验,不同天然产物对受试菌株的抑制作用见表 1。结果丁香、桂皮、大蒜、熟大蒜、肉豆蔻、肉桂、茶多酚、泡菜液、链球菌素对受试菌株 *Yersinia intermedia* 均有抑制效果,其中以大蒜、茶多酚、桂皮、肉桂的抑菌效果最为显著;桂皮、大蒜、熟大蒜、肉豆蔻、肉桂、茶多酚、链球菌素对受试菌株 *Enterococcus faecium* 和 *Lactobacillus sakei* 均有抑制效果,并以大蒜、茶多酚、肉豆蔻、肉桂较为明显。18 种天然产物中有部分没有表现出明显的抑菌效果,可能与提取的条件以及受试菌株本身的特性有关<sup>[7]</sup>。

大蒜对 2 种受试菌株的抑制效果均比较强,但由于大蒜本身特有浓重味道,高浓度大蒜提取液将会影响产品的风味;肉桂及肉豆蔻对 2 种受试菌株也具有比较好的抑制效果,同时,这 2 种香辛料在家庭中也常用于肉类的烹调,其气味对大蒜的刺激味有良好掩盖效果;此外,茶多酚也表现出了明显的抑菌效果,近年来对茶多酚的研究表明其具有良好的保健作用,综合考虑选择生大蒜、肉桂、肉豆蔻及茶多酚 4 种物质进行提取(溶解)条件优化,以获得最佳抑菌效果。考虑到不同天然产物对 *Lactobacillus sakei* 的抑制效果最弱,为了降低试验工作量,单因素试验及正交试验均以 *Lactobacillus sakei* 为

表 1 不同天然产物对受试菌株的抑制效果

天然产物	受试菌株		
	<i>Y. intermedia</i>	<i>E. faeciums</i>	<i>L. sakei</i>
甘草	-	-	-
丁香	+	-	-
桂皮	++	+	+
大蒜	+++	+++	++
熟大蒜	+	+	+
肉豆蔻	+++	++	++
迷迭香	+	-	-
薄荷	-	-	-
百里香	-	-	-
肉桂	++	++	++
花椒	-	-	-
生姜	-	-	-
菊芋	-	-	-
溶菌酶	-	-	-
茶多酚	+++	+++	++
泡菜液	+	-	-
乳酸菌片剂	+	-	-
链球菌素	+	+	+

注:本结果的测定标准按《中药制剂经验录》中提供的方法,即抑菌圈直径 $\leq 8$  mm 记为“-”;抑菌圈直径 $> 8 \sim 13$  mm 记为“+”;抑菌圈直径 $> 13 \sim 19$  mm 记为“++”;抑菌圈直径 $> 19$  mm 记为“+++”。

受试菌株。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 乙醇浓度对抑菌效果的影响 控制大蒜的提取温度为室温 $20^{\circ}\text{C}$ ,提取时间 $30\text{ min}$ ,料液比 $1\text{ g}:2.5\text{ mL}$ ;肉桂及肉豆蔻的提取温度为室温 $20^{\circ}\text{C}$ ,提取时间 $30\text{ min}$ ,料液比为 $1\text{ g}:4\text{ mL}$ ;茶多酚的提取温度为室温 $20^{\circ}\text{C}$ ,提取时间 $30\text{ min}$ ,提取料液比为 $1\text{ g}:50\text{ mL}$ ,考察不同乙醇浓度 $0\%$ 、 $20\%$ 、 $40\%$ 、 $60\%$ 、 $80\%$ 、 $100\%$ 对 *Lactobacillus sakei* 抑制效果的影响。试验重复 3 次取平均值,结果如图 1。

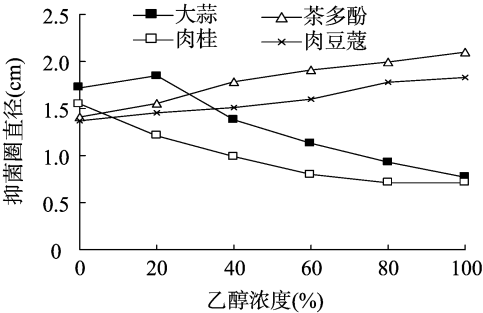


图 1 乙醇浓度对提取（溶解）液抑菌效果的影响

由图 1 可以看出,对受试菌株 *Lactobacillus sakei*,当乙醇浓度为 $20\%$ 时,大蒜提取液的抑菌圈直径最大,乙醇浓度增加或降低,生大蒜提取液的抑菌圈直径都会减小;肉桂提取液的抑菌效果随着乙醇浓度的增加均呈逐渐减小的趋势,当用纯水为提取溶剂时提取效果最好;肉豆蔻提取液及茶多酚溶解液的抑菌效果均随着乙醇浓度的增加而变大,呈正相关关系,当乙醇浓度为 $100\%$ 时肉豆蔻提取液及茶多酚溶解液的抑菌效果最好。

乙醇浓度差异对不同天然产物提取液的抑菌效果产生影

响,主要是乙醇浓度变化引起提取剂物理性质,如密度、黏度、介电常数等变化,尤其是溶剂的极性发生变化,影响抑菌成分的提取或溶解<sup>[8]</sup>。

2.2.2 料液比对抑菌效果的影响 控制大蒜的乙醇浓度 $20\%$ 、肉桂的乙醇浓度 $0\%$ 、肉豆蔻及茶多酚的乙醇浓度 $100\%$ ,考察在提取温度为室温 $20^{\circ}\text{C}$ ,提取时间 $30\text{ min}$ 时,不同料液比 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 、 $1:4$ 、 $1:5$ ( $\text{g}:\text{mL}$ )对受试菌株抑菌效果的影响[茶多酚的料液比为 $1:25$ 、 $1:50$ 、 $1:75$ 、 $1:100$ 、 $1:125$ ( $\text{g}:\text{mL}$ )]。试验重复 3 次取平均值,结果如图 2。

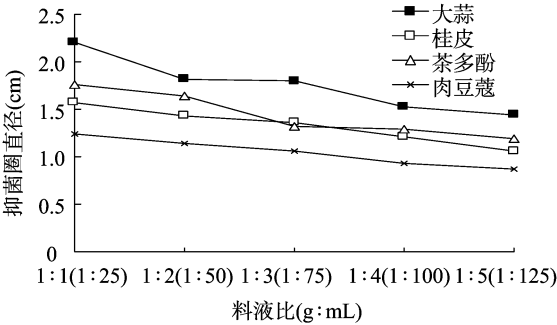


图 2 料液比对提取（溶解）液抑菌效果的影响

在大蒜、肉桂、肉豆蔻以及茶多酚的提取（溶解）过程中,使用的料液比越高,抑菌圈直径越小,两者呈负相关,主要是由于料液比越高提取（溶解）液中抑菌活性的浓度越低的原因。但是料液比越小,提取（溶解）液的得率也越低,会使生产应用的成本大大增加,因此料液比需适中。生大蒜提取液,当料液比为 $1\text{ g}:1\text{ mL}$ 和 $1\text{ g}:2\text{ mL}$ 时,抑菌圈直径变化较大,正交试验选择料液比为 $1:1$ 、 $1:1.5$ 、 $1:2$ ( $\text{g}:\text{mL}$ )进行优化;针对肉桂及肉豆蔻提取液,料液比越小提取液的颜色越深,影响产品外观,故应适当提高料液比,降低提取液的色泽,当料液比为 $1\text{ g}:4\text{ mL}$ 和 $1\text{ g}:5\text{ mL}$ 时,抑菌圈直径变化比较大,正交试验选择 $1:4$ 、 $1:4.5$ 、 $1:5$ ( $\text{g}:\text{mL}$ )进行优化;针对茶多酚溶解液,当料液比为 $1\text{ g}:50\text{ mL}$ 和 $1\text{ g}:75\text{ mL}$ 时,抑菌圈直径变化比较大,正交试验选择 $1:50$ 、 $1:60$ 、 $1:70$ ( $\text{g}:\text{mL}$ )进行优化。

2.2.3 提取温度对抑菌效果的影响 控制大蒜的乙醇溶液 $20\%$ 、料液比 $1\text{ g}:1\text{ mL}$ ;肉桂的乙醇溶液 $0\%$ 、料液比 $1\text{ g}:4\text{ mL}$ ;肉豆蔻的乙醇浓度 $100\%$ 、料液比 $1\text{ g}:4\text{ mL}$ ;茶多酚的乙醇浓度 $100\%$ 、料液比 $1\text{ g}:50\text{ mL}$ ,考察在提取时间 $30\text{ min}$ 条件下,不同提取温度 $20$ 、 $30$ 、 $45$ 、 $60$ 、 $75^{\circ}\text{C}$ 对受试菌株抑制效果的影响,试验重复 3 次取平均值,结果如图 3。

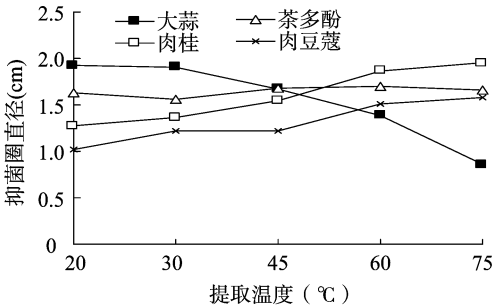


图 3 提取温度对提取（溶解）液抑菌效果的影响

随着提取温度的增加,大蒜提取液的抑菌效果呈降低趋势,并且提取温度 20 ℃ 时抑菌圈直径最大;随着提取温度的升高,肉桂及肉豆蔻提取液的抑菌效果均呈上升趋势,当温度为 75 ℃ 时抑菌圈直径最大,考虑到 60、75 ℃ 时抑菌圈直径变化不大,因此选择提取温度 60 ℃ 较为合适;当提取温度为 60 ℃ 时,茶多酚的抑菌效果最好;低于 60 ℃ 时随着温度的升高,抑菌圈直径逐渐变大;当温度超过 60 ℃ 以后,随着温度的升高,抑菌圈直径变小。

提取温度不同对不同天然产物提取液的抑菌效果产生影响,主要是由于在溶剂提取传质的过程中,温度既影响溶质在溶剂中的溶解速度,又影响溶质向外扩散的速度,温度影响很明显。一般来说温度升高,传质速率增加,扩散速度加快,提取速率也就加快;过高温度的会影响热敏性物质的活性,甚至使之完全失活,因此提取温度不能太高。

2.2.4 提取时间对抑菌效果的影响 控制大蒜的提取温度 20 ℃、料液比 1 g : 1 mL、乙醇溶液 20%;肉桂的提取温度 60 ℃、料液比为 1 g : 4 mL、乙醇溶液 0%;肉豆蔻的提取温度 60 ℃、乙醇浓度 100%、料液比 1 g : 4 mL;茶多酚的提取温度 60 ℃、料液比为 1 g : 50 mL,乙醇溶液 100%,考察不同提取时间 10、20、30、40、50 min 对受试菌株抑制效果的影响,试验重复 3 次取平均值,结果见图 4。随着提取时间的延长,大蒜提取液的抑菌圈直径明显增大,30 min 后抑菌圈直径增大的速率有所减小;肉桂、肉豆蔻及茶多酚的变化情况与大蒜类似。

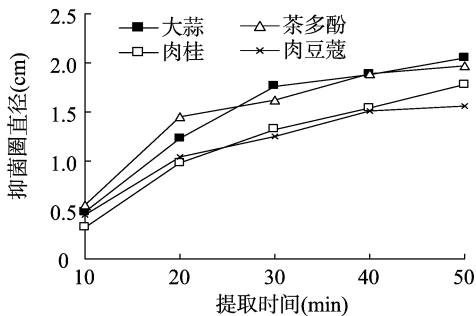


图4 提取时间对提取(溶解)液抑菌效果的影响

溶剂提取过程需要一定的时间,一般来说提取时间越长,原料与提取剂的接触越充分,而且搅拌过程也更利于细胞壁的破碎,使活性成分能够更好地溶出。但是提取时间过长,能耗加大,导致生产成本增加,综合考虑选择提取时间为 30 min 为宜。

2.3 正交试验结果

试验采用 *Lactobacillus sakei* 为受试菌株,采用  $L_9(3^4)$  对 4 种天然产物提取(溶解)液的提取条件进行正交优化。

2.3.1 大蒜提取条件优化 大蒜提取液的提取工艺优化结果见表 2。大蒜提取液对 *Lactobacillus sakei* 抑制效果最好的处理组合条件为  $A_2B_2C_2D_3$ ,即处理温度 25 ℃,料液比 1 g : 1.5 mL,提取剂乙醇浓度 20%,提取时间 35 min,在此条件下,得到抑菌圈直径为 3.07 cm,固形物含量为 158 mg/mL。通过极差分析可知,料液比是影响大蒜提取液抑菌效果的主要因素。

相关研究表明,大蒜中的活性成分可以进入致病菌的细

胞质,干扰细胞的正常代谢,起到对致病菌的抑制和杀灭作用,大蒜被人们誉为是天然广谱抗生素<sup>[9-12]</sup>。本研究对大蒜中天然产物的提取工艺进行了优化,在优化后提取条件下,固形物含量为 154 mg/mL 大蒜提取液即具有较显著的抑菌效果,该浓度低于文献报道的针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草杆菌等受试菌株所使用大蒜提取液浓度。主要是由于大蒜汁的抑菌作用会受到试验菌株种类、大蒜汁体积分数及 pH 值等因素的影响<sup>[13]</sup>。

表 2 大蒜提取条件的正交试验结果

组别	A:温度 (℃)	B:料液比 (g : mL)	C:乙醇 浓度(%)	D:提取 时间(min)	抑菌圈直径 (cm)
1	20	1 : 2	10	25	2.42
2	20	1 : 1	20	30	3.03
3	20	1 : 1.5	30	35	2.63
4	25	1 : 2	20	35	2.57
5	25	1 : 1	30	25	2.89
6	25	1 : 1.5	10	30	2.63
7	30	1 : 2	30	30	2.22
8	30	1 : 1	10	35	2.89
9	30	1 : 1.5	20	25	2.64
$k_1$	2.69	2.40	2.65	2.64	
$k_2$	2.70	2.94	2.75	2.62	
$k_3$	2.58	2.63	2.58	2.68	
R	0.12	0.54	0.17	0.06	

2.3.2 肉桂提取条件优化 肉桂提取液的提取工艺优化结果见表 3。肉桂提取液对 *Lactobacillus sakei* 抑菌效果最好处理组合条件为  $A_3B_1C_3D_1$ ,即处理温度 65 ℃,料液比 1 g : 4 mL,提取剂乙醇浓度 10%,提取时间 25 min,经验证试验在此条件下,得到的抑菌圈直径为 2.06 cm,固形物含量为 50 mg/mL。通过极差分析可知,料液比是影响肉桂提取液抑菌效果的主要因素。

表 3 肉桂提取条件的正交试验结果

组别	A:温度 (℃)	B:料液比 (g : mL)	C:乙醇 浓度(%)	D:提取 时间(min)	抑菌圈直径 (cm)
1	55	1 : 4.0	10	25	1.71
2	55	1 : 4.5	5	30	1.56
3	55	1 : 5.0	0	35	1.58
4	60	1 : 4.0	5	35	1.76
5	60	1 : 4.5	0	25	1.81
6	60	1 : 5.0	10	30	1.52
7	65	1 : 4.0	0	30	1.97
8	65	1 : 4.5	10	35	1.60
9	65	1 : 5.0	5	25	1.58
$k_1$	1.62	1.81	1.61	1.70	
$k_2$	1.70	1.66	1.63	1.68	
$k_3$	1.72	1.56	1.79	1.65	
R	0.10	0.25	0.16	0.05	

肉桂对大肠杆菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、白色念珠菌等都有明显的抑菌作用,并且效果好于山梨酸钾,对冷却肉也具有较好的抑菌保鲜作用<sup>[14-15]</sup>,但是并未见肉桂对 *Lactobacillus sakei* 有抑制作用的报道。

2.3.3 肉豆蔻提取条件优化 肉豆蔻提取液的提取工艺优化结果见表 4。肉豆蔻提取液对 *Lactobacillus sakei* 抑菌效果最好处理组合条件为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即处理温度 60 ℃,料液比 1 g : 4 mL,提取剂乙醇浓度 100%,提取时间 30 min,经验证试验在此条件下,得到的抑菌圈直径为 1.87 cm,固形物含量为 36 mg/mL。通过极差分析可知,乙醇浓度是影响肉豆蔻提取液抑菌效果的主要因素。

表 4 肉豆蔻提取条件的正交试验结果

组别	A:温度 (℃)	B:料液比 (g : mL)	C:乙醇 浓度(%)	D:提取 时间(min)	抑菌圈直径 (cm)
1	55	1 : 4.0	100	25	1.65
2	55	1 : 4.5	95	30	1.57
3	55	1 : 5.0	90	35	1.51
4	60	1 : 4.0	95	35	1.74
5	60	1 : 4.5	90	25	1.78
6	60	1 : 5.0	100	30	1.55
7	65	1 : 4.0	90	30	1.89
8	65	1 : 4.5	100	35	1.54
9	65	1 : 5.0	95	25	1.50
k <sub>1</sub>	1.58	1.76	1.58	1.64	
k <sub>2</sub>	1.69	1.63	1.60	1.67	
k <sub>3</sub>	1.64	1.52	1.73	1.60	
R	0.11	0.13	0.15	0.07	

2.3.4 茶多酚提取条件优化 茶多酚溶解液的工艺优化结果见表 5。茶多酚溶解液对 *Lactobacillus sakei* 抑菌效果最好的处理组合条件为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>,即处理温度 65 ℃,料液比 1 g : 60 mL,提取剂乙醇浓度 90%,提取时间 25 min,经验证试验在此条件下,得到的抑菌圈直径为 1.87 cm,固形物含量为 18 mg/mL。通过极差分析可知,乙醇浓度是影响茶多酚溶解液抑菌效果的主要因素。

表 6 植物提取物对受试菌株的最小抑菌浓度测定

菌种	最小抑菌浓度(mg/mL)			
	大蒜	肉豆蔻	茶多酚	肉桂
<i>Yersinia intermedia</i>	0.62 ~ 1.24	2.24 ~ 4.50	0.14 ~ 0.28	3.12 ~ 6.15
<i>Enterococcus faecium</i> s	1.24 ~ 2.47	4.50 ~ 9.00	0.56 ~ 1.12	6.25 ~ 12.50
<i>Lactobacillus sakei</i>	2.47 ~ 4.94	4.50 ~ 9.00	1.12 ~ 2.25	6.25 ~ 12.50

注:n = 3。

2.5 采用正交 t 值法进行组合复方和剂量配比

正交 t 值法一般适合于 4 ~ 11 味药的复方研究,它源于正交设计,它的优点是虽然各因素间的交互作用并未在表内,但是可以用较少的试验次数来分析较多的因素,并从中找出各因素对试验指标的影响,从而能找出各因素之间的主次地位、交互作用以及最佳组合。正交 t 值法是进行多因素、多水平试验时效率较高的设计方法,这种方法可以避免全面设计正交试验时的工作量大、计算繁琐等弊端<sup>[5]</sup>。

2.5.1 主成分分析 分别将筛选出的大蒜、肉桂、茶多酚以及肉豆蔻提取物命名为 A、B、C、D,采用正交 t 值法 L<sub>8</sub>(4<sup>2</sup>)的组方原则进行主因素分析,结果见表 7。大蒜的抗菌作用显著,故为发挥抑菌作用的主要成分,肉桂、茶多酚以及肉豆蔻提取物可能为辅助成分。

茶多酚的抑菌谱广,对有细胞壁和无细胞壁的革兰氏阳性、阴性菌均有抑制作用,如对肉制品中常见的致病菌金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌都有抑菌活性<sup>[16-17]</sup>,但已报道的茶多酚对假单胞菌、热死环丝菌、乳酸菌等菌株的 MIC 值比本试验结果相比低很多<sup>[18-19]</sup>,原因可能是茶多酚的纯度、抑菌方法以及受试菌株等不同所致。

表 5 茶多酚溶解条件的正交试验结果

组别	A:温度 (℃)	B:料液比 (g : mL)	C:乙醇 浓度(%)	D:提取 时间(min)	抑菌圈直径 (cm)
1	55	1 : 50	100	25	1.74
2	55	1 : 60	95	30	1.67
3	55	1 : 70	90	35	1.58
4	60	1 : 60	100	35	1.61
5	60	1 : 70	95	25	1.57
6	60	1 : 50	90	30	1.74
7	65	1 : 70	100	30	1.59
8	65	1 : 50	95	35	1.89
9	65	1 : 60	90	25	1.81
k <sub>1</sub>	1.66	1.65	1.79	1.71	
k <sub>2</sub>	1.64	1.71	1.70	1.67	
k <sub>3</sub>	1.76	1.71	1.58	1.69	
R	0.10	0.06	0.21	0.04	

2.4 4 种天然产物对受试菌的 MIC 值

4 种植物提取物对 *Yersinia intermedia*、*Enterococcus faecium*s 和 *Lactobacillus sakei* 的最小抑菌浓度(MIC)测定结果(表 6)表明:茶多酚的提取物抑菌作用最明显,对 *Yersinia intermedia*、*Enterococcus faecium*s 和 *Lactobacillus sakei* 的最小抑菌浓度分别为 0.14 ~ 0.28 mg/mL、0.56 ~ 1.12mg/mL 和 1.12 ~ 2.25 mg/mL;大蒜提取物次之,肉豆蔻及肉桂的抑菌效果最弱。这与抑菌圈试验的结果有所不同,可能是由于大蒜提取物的固形物含量较高导致的两者结果有差异。

2.5.2 辅助成分交互作用分析 以各提取物的 MIC 为检测指标,对各辅助成分交互作用进行分析,茶多酚、肉桂及桂皮的 MIC 分别为 2.25、12.50、9.00 mg/mL。但是将茶多酚和肉桂复配、茶多酚和桂皮复配、肉桂和桂皮复配以后的 MIC 分别为 70.50、25.12、10.02 mg/mL。3 种辅助成分两两组合后 MIC 都有所增加,表明各辅助成分之间均有拮抗作用;考虑到 3 种辅助成分中茶多酚的 MIC 最小,故仅选择茶多酚作为辅助成分。

2.5.3 剂量配比 主成分和辅助成分确定以后,在原有剂量上适当增减,以 MIC 为检测指标,用正交试验表 L<sub>7</sub>(2<sup>3</sup>)的组方原则进行剂量优化分析,大蒜、茶多酚 3 个水平分别为 1 (10 mL)、2(20 mL)、3(30 mL),试验结果(表 8)表明,结果最佳剂量配比为大蒜 : 茶多酚 = 1 : 1,此时的 MIC 为 0.42 mg/mL。

表 7 正交  $t$  值法的试验结果

组别	因素				MIC (mg/mL)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	6.02
2	1	1	2	2	2.59
3	1	2	1	2	0.56
4	1	2	2	1	2.51
5	2	1	1	2	71.50
6	2	1	2	1	10.34
7	2	2	1	1	25.62
8	2	2	2	2	
$M_1$	11.68	90.45	105.65	42.54	
$M_2$	107.46	28.69	13.49	76.60	
$D$	95.78	-61.76	-92.16	34.06	
$t$	95.78	61.76	92.16	34.06	

注:1 水平用;2 水平不用; $M_1$ :用某成分各组的指标测定值的总数; $M_2$ :未用某成分各组的指标测定值的总数; $D = M_2 - M_1$ 。  $n = 3$ 。

表 8 剂量优化试验结果

组别	A:大蒜	B:茶多酚	MIC (mg/mL)
A1	1	2	4.23
A2	1	1	0.42
A3	1	3	4.38
A4	3	1	3.12
A5	3	2	6.07
A6	2	1	4.22
A7	2	3	8.87
$k_1$	3.01	2.59	
$k_2$	6.55	5.15	
$k_3$	4.60	6.62	
$R$	3.54	4.03	

注: $n = 3$ 。

### 3 结论与讨论

水晶肴肉作为一种特殊的高水分含量凝胶状肉制品,在后期贮藏过程中极易受到微生物污染而导致产品腐败。为了有效延长产品的货架期,并保障食品安全,本试验选择了 18 种不同来源的天然物质,针对肴肉中的 2 种特定腐败微生物——小肠结肠炎耶尔森菌和变形斑沙雷氏菌进行了抑制作用研究。在 18 种天然产物中,大蒜、肉桂、肉豆蔻及茶多酚对 3 种受试菌株均具有较好的抑菌效果,优化后的提取(溶解)液抑菌效果为:大蒜 > 肉桂 > 茶多酚 > 肉豆蔻。以 MIC 大小为指标,通过正交  $t$  值法对这 4 种天然产物进行抑菌效果复配试验,最后得到的天然生物抑菌剂的最佳剂量配比为大蒜:茶多酚 = 1:1,该复合生物抑菌剂对 *Lactobacillus sakei* 的最低抑菌浓度为 0.42 mg/mL。

研究结果可为我国开发其他低温肉制品的现代保藏技术、提高低温肉制品的品质和安全性提供理论参考,增强我国低温肉制品的国内外市场竞争力,推动我国肉制品行业的加速发

展。但由于实验室研究和工业化生产间存在显著差异,今后试验可以考虑将优化的复合生物抑菌剂进行生产线配套试验,考察经过复合生物抑菌剂处理后的肴肉在贮藏期间的品质变化,进一步优化抑菌剂配方,降低生产成本,提高保质效果。

### 参考文献:

- [1] Borch E, Kant - muelmans M, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat products and cured meat[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33: 103 - 120.
- [2] Grant G, McCurdy A, Osborne A. Bacterial greening in cured meats: A review[J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1988, 21: 50 - 56.
- [3] 张 鹰, 曾新安, 温其标. 生物防腐剂及其在食品中的应用[J]. 食品与机械, 2006, 22(1): 77 - 79.
- [4] Rechard A. Improvement in shelf - life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials[J]. Food Microbiology, 2005(22): 273 - 292.
- [5] 孙卫民, 孙瑞元. 中药方剂研究的正交  $t$  值法[J]. 中药药理与临床, 1992, 8(1): 41 - 45.
- [6] 李广清, 汪 悦, 夏卫军. 痹痛灵抗炎作用处方筛选正交  $t$  值法实验研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2159 - 2160.
- [7] Aiyegoro O, Adewusi A, Oyedemi S, et al. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia africana* (Smith) against drug resistance bacterial isolates [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(7): 4477 - 4503.
- [8] 石 碧, 狄 莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 112 - 115.
- [9] 张宝善, 王 君, 陈锦屏, 等. 大蒜汁对枯草芽孢杆菌抑制作用的研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1269 - 1275.
- [10] 徐文静, 杜 茜, 赵洪锟, 等. 大蒜提取液抑菌活性及其稳定性分析[J]. 中国生物防治, 2008, 24(增刊): 76 - 80.
- [11] 苏凤贤. 大蒜汁生物抑菌特性的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2007.
- [12] 葛红莲, 赵锦慧, 李军伟. 大蒜液抗菌活性的研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(10): 102 - 104.
- [13] 宋卫国, 李宝聚, 刘开启. 大蒜化学成分及其抗菌活性机理研究进展[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 263 - 268.
- [14] 邱世翠, 李连锦, 刘云波, 等. 肉桂体外抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(1): 13.
- [15] 彭雪萍, 王花俊, 王春晖, 等. 肉桂提取物在冷却肉保鲜中的应用研究[J]. 肉类研究, 2008, 22(12): 46 - 48.
- [16] 白传记, 孔德荣, 张淑伟, 等. 茶多酚抑菌活性的实验研究[J]. 食品卫生, 1997, 5(5): 3 - 5.
- [17] Almajano P M, Carbo, R, Jiménez J, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions[J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 55 - 63.
- [18] 马丽珍, 南庆贤, 戴瑞彤. 几种天然防腐剂的抑菌性能研究[J]. 食品工业科技, 2003(增刊): 82 - 88.
- [19] 刘书亮, 夏静华, 叶劲松, 等. 三种天然保鲜剂对肉中腐败菌和致病菌的抑制效果[J]. 食品与发酵工业, 2010(3): 46 - 50.