

王 帆,刘小莉,王兴娜,等. 肉桂醛对生鲜湿面中霉菌的气相抑制作用[J]. 江苏农业科学,2020,48(10):214-216,223.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.039

肉桂醛对生鲜湿面中霉菌的气相抑制作用

王 帆,刘小莉,王兴娜,李春阳,周剑忠

(江苏省农业科学院农产品加工研究所,江苏南京 210014)

摘要:初步研究肉桂醛对生鲜湿面中霉菌的气相抑制作用,从生鲜湿面中分离纯化出 6 种优势腐败霉菌,18S rDNA 分子鉴定结果表明,其中将 2 种青霉属的霉菌鉴定为产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)和扩展青霉(*Penicillium expansum*),3 种曲霉属的霉菌鉴定为灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)、阿姆斯特丹曲霉(*Aspergillus amstelodami*)和白曲霉(*Aspergillus candidus*),1 种毛霉属的霉菌鉴定为总状毛霉(*Mucor racemosus*)。肉桂醛采用气相扩散法和固相扩散法测定时均对生鲜湿面中的霉菌表现出抑制作用,其中青霉属和曲霉属的菌种对肉桂醛的敏感性较毛霉属菌种高。将肉桂醛置于生鲜湿面包装袋的密闭空间内,通过其自身的挥发性来抑制霉菌的生长,经气相浓度为 200 $\mu\text{L/L}$ 的肉桂醛处理后可将生鲜湿面在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏的货架期延长 35 d,说明肉桂醛具备开发成为一种气相抑菌剂的潜力。

关键词:生鲜湿面;肉桂醛;霉菌;气相抑制;分子生物学鉴定;货架期;抑菌圈

中图分类号: TS213.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)10-0214-03

生鲜湿面是指压延成型后未经干燥处理的面条,因具有较干挂面更佳的风味口感而受到消费者青睐,日本、美国、中国以及东南亚各国等已实现生鲜湿面的产业化生产^[1]。生鲜湿面水分含量高,在流通和贮藏过程中易出现霉变现象,目前生产中主要采用减菌加工与化学保藏的方法延长产品的货架期。然而化学药物残留在食品中会对人体造成危害,存在安全隐患。因此,研究开发安全高效的新型植物源抑菌剂替代传统化学抑菌剂是生鲜湿面工业化生产中亟待解决的问题。

肉桂醛(*Cinnamaldehyde*),别称 3-苯基-2-丙烯醛,主要存在于樟属植物中,是肉桂提取物肉桂油的主要成分,已被广泛运用于食品、化妆品和医药领域^[2]。研究表明,肉桂醛对多种细菌、真菌均具有较高的抑制活性^[3-5]。但是肉桂醛具有特殊的气味,如果直接添加到食品中会改变食品的风味和口感,因此其应用受到限制。利用肉桂醛容易挥发到空气中变为气相的特性,将其置于食品贮藏的密闭空间内,通过其自身的挥发性来有效抑制生鲜湿面中霉菌的生长和繁殖,不需要直接与食品接触即可达到抑菌的作用。肉桂醛作为一种天然植物

源化合物,具有高安全性和广谱抑菌性,若能将其在食品加工工业上开发为新型抑菌剂,可能会有巨大的研发和应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

生鲜湿面(淮安唯新食品有限公司);肉桂醛(国药集团化学试剂有限公司);马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(北京路桥技术有限责任公司);霉菌基因组 DNA 提取试剂盒(Solarbio Fungi Genomic DNA Extraction Kit D2300,北京索莱宝科技有限公司);引物 NS1、NS6、Premix Tap(Ex Taq Version 2.0 plus dye,RP902A)由日本宝生物工程株式会社提供。

1.2 方法

1.2.1 生鲜湿面中霉菌的分离纯化及初步鉴定

采用无菌操作方法取 25 g 霉变的生鲜湿面样品加入 225 mL 生理盐水中,梯度稀释制备成菌悬液,取 100 μL 稀释液用涂布法接种到 PDA 培养基上,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d。从得到的分离菌种中挑取形态各异的特征菌落,点种到新的 PDA 培养基上,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d,必要时可以反复进行上述操作,直至获得纯化的单菌落。观察并记录菌落特征,在光学显微镜下用低倍镜和高倍镜观察菌丝形态及孢子囊类型,参照 GB 4789.16—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 常见产毒霉菌的形态学鉴定》等对霉菌种类进行初步鉴定。

收稿日期:2019-05-17

基金项目:江苏省农业科学院农产品加工研究所科研基金项目[编号:JG(2017)05]。

作者简介:王 帆(1983—),女,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事食品微生物的研究。E-mail:wangfan713@126.com。

1.2.2 生鲜湿面中霉菌的分子生物学鉴定 将分离纯化的霉菌,用霉菌基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。取 5 μL 提取的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,并将有明显条带的 DNA 放置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存待用。采用真菌 DNA 扩增通用引物 NS1 (5' - GTAGTCATATGCTTGTCTC - 3') 和 NS6 (5' - GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC - 3') 进行 18S rDNA 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL : 模板 DNA 1 μL , 正反向引物 (25 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , Premix Tap 25 μL , 加灭菌去离子水补足至 50 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,38 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。反应结束后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,确定扩增片段长度与目的片段长度 (1300 bp 左右) 相同并且无杂带后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序,测序引物与扩增引物相同。将获得的霉菌 18S rDNA 序列结果提交到 NCBI 的 BLAST 网页 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 中,在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源比对,对菌种进行分子生物学分析鉴定。

1.2.3 肉桂醛对霉菌的气相抑制作用测定 选取生鲜湿面中的优势霉菌,在 PDA 平板上于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d 后,刮取孢子放入加有适量灭菌水的三角瓶中,用 2 层无菌纱布过滤去除菌丝后,加入灭菌玻璃珠振荡摇匀,制备成孢子悬液,用血球计数板将孢子悬液的浓度调整为 1×10^5 个/mL。采用气相扩散法测定肉桂醛对霉菌的抑制作用,方法参照文献 [6]。取 100 μL 孢子悬液均匀涂布于 PDA 平板上,待菌液被吸收后倒置放置,制成含菌平板。分别吸取不同体积 (2、4、8、16 μL) 的肉桂醛,均匀滴

加在无菌滤纸片上,置于皿盖内侧中心形成气相氛围,使得培养皿中肉桂醛的空间含量分别为 25、50、100、200 $\mu\text{L/L}$ (9 cm 培养皿的体积约为 80 mL),将各培养皿盖好用封口膜密封,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 ~ 5 d 后,采用十字交叉法测量抑菌圈大小。固相扩散法和气相扩散法的操作大致相同,只是将含有不同体积肉桂醛的无菌滤纸片置于含菌平板中心。试验结果的判定标准:抑菌圈直径 $>15\text{ mm}$ 为高度敏感,10 ~ 15 mm 为中度敏感,7 ~ 9 mm 为低度敏感, $<7\text{ mm}$ 为不敏感^[7]。

1.2.4 肉桂醛对生鲜湿面的气相防霉作用测定 将肉桂醛溶液均匀滴加在无菌滤纸片上,置于生鲜湿面包装袋的密闭空间内,使得包装袋中肉桂醛的空间含量为 200 $\mu\text{L/L}$ (每 100 g 生鲜湿面的包装体积约为 200 mL),以相同空间含量的乙醇为阳性对照,未加药液的滤纸片为空白对照。根据 NY/T 1512—2014《绿色食品 生面食、米粉制品》中生面食制品菌落总数 $\leq 3 \times 10^5$ CFU/g 的要求,测定生鲜湿面在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏的货架期。

2 结果与分析

2.1 生鲜湿面中霉菌的分离纯化及初步鉴定

从生鲜湿面中共分离纯化出 6 种优势腐败霉菌,通过观察菌落特征、显微镜下的菌丝形态和孢子囊类型,初步鉴定出霉变菌种分为 3 个菌属,其中 2 种为青霉属,3 种为曲霉属,1 种为毛霉属,其特征描述见表 1。根据其一般来源和生长特性,可以判断生鲜湿面中大部分种类的霉菌是由原料中污染的霉菌或孢子萌发而成的,而少部分种类的霉菌则是在生产加工的过程中进入产品的。

表 1 生鲜湿面中霉菌菌落形态及镜检特征

菌种	菌落形态	镜检特征
青霉属	菌落生长局限,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d 后,直径为 1.2 ~ 1.8 cm,菌落致密,边缘为白色,内部为暗绿色呈粉粒状	菌丝有横隔,分生孢子梗顶端不膨大,分生孢子头呈帚状,卵圆形孢子呈链状排列
曲霉属	菌落生长较慢,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d 后,直径为 2.4 ~ 3.0 cm,菌落致密,具有绒状白色、淡黄色或黄褐色菌丝	菌丝有横隔,分生孢子梗顶端膨大呈球形,卵圆形孢子覆盖整个顶囊
毛霉属	菌落生长较快,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d 后,直径可达 6.0 cm,菌落疏松,具有纤毛状白色菌丝	菌丝无横隔,无假根,孢囊梗顶生孢子囊,孢囊孢子呈球形

2.2 生鲜湿面中霉菌的分子生物学鉴定

以霉菌基因组 DNA 为模板,采用引物 NS1 和 NS6 对 18S rDNA 序列进行扩增,将扩增产物用琼脂糖凝胶进行电泳,发现在 1 300 bp 处出现条带。对测序后的扩增产物在 GenBank 数据库中进行

BLAST 同源比对,得到基因序列最为接近的已知霉菌菌株序列,序列相似度 $\geq 99\%$ 时视为同一种菌,其中将 2 种青霉属的霉菌鉴定为产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 和扩展青霉 (*Penicillium expansum*),3 种曲霉属的霉菌鉴定为灰绿曲霉 (*Aspergillus*

glaucus)、阿姆斯特丹曲霉(*Aspergillus amstelodami*)和白曲霉(*Aspergillus candidus*),1 种毛霉属的霉菌鉴定为总状毛霉(*Mucor racemosus*)。6 种霉菌与 GenBank 数据库中已登记菌株的 18S rDNA 序列同源性均≥98%,菌株登录号及名称见表 2。

表 2 生鲜湿面中霉菌的 18S rDNA 分子鉴定

分离菌种	登录号	名称	匹配程度 (%)
A	AF548086.1	产黄青霉	99
B	GU561988.1	扩展青霉	98
C	NG_063391.1	灰绿曲霉	99
D	MF038186.1	阿姆斯特丹曲霉	100
E	AB008396.1	白曲霉	99
F	AF113430.1	总状毛霉	98

表 3 肉桂醛对霉菌的固相和气相抑制作用

菌种	抑菌圈直径(mm)							
	16 μL		8 μL		4 μL		2 μL	
	气相	固相	气相	固相	气相	固相	气相	固相
A	56.7±3.1	62.0±1.0	51.3±1.5	59.0±1.0	47.3±2.1	55.3±1.5	44.0±2.7	47.0±2.7
B	49.3±1.2	66.0±1.7	47.7±2.5	57.0±5.2	44.0±1.7	53.3±1.2	37.0±4.4	52.0±2.0
C	50.7±3.1	78.0±2.0	41.3±1.2	75.0±1.0	32.3±2.5	72.7±2.3	26.7±1.2	62.3±5.9
D	51.7±1.5	77.3±1.2	40.0±2.0	69.0±2.7	36.3±1.5	65.7±4.0	33.7±1.5	55.7±5.1
E	52.0±3.1	68.0±1.2	45.3±1.2	66.0±5.0	42.0±3.0	61.0±2.9	36.3±3.1	53.3±5.3
F	18.0±2.0	26.0±2.0	15.0±1.0	21.3±1.2	13.0±1.0	20.0±0.0	11.0±1.0	15.7±1.2

注:表中数据为平均值±标准差。

感,这可能是由不同菌属之间的差异所决定的。

2.4 肉桂醛对生鲜湿面的气相保鲜作用测定

生鲜湿面在 28℃ 下贮藏的菌落总数变化规律见表 4。根据 NY/T 1512—2014《绿色食品 生面食、米粉制品》中生面食制品菌落总数≤3×10⁵ CFU/g 的要求,未经任何处理的生鲜湿面在 28℃ 下的货架期仅为 7 d,当菌落总数超过 10⁵ CFU/g 时,生鲜湿面出现肉眼可见的黄绿色霉点;经气相浓度为 200 μL/L 的乙醇处理后,生鲜湿面的货架期可延长至 14 d;经气相浓度为 200 μL/L 的肉桂醛处理后,生鲜湿面的货架期可延长至 42 d,且最先出现的霉变为白色菌丝。由此进一步验证了肉桂醛对生鲜湿面中的霉菌具有气相抑制效果,对青霉属和曲霉属霉菌的抑制作用较毛霉属霉菌强。

3 结论与讨论

本研究初步探讨了肉桂醛对生鲜湿面中霉菌的气相抑制作用。从生鲜湿面中共分离纯化出 6 种优势腐败霉菌,通过观察菌落特征、显微镜下的菌

2.3 肉桂醛对霉菌的气相抑制作用测定

从表 3 可以看出,采用气相扩散法和固相扩散法均测得肉桂醛对生鲜湿面中的 6 种霉菌具有抑制作用,且随着加入药液体积的增加,抑制效果也逐渐增强。各稀释度的肉桂醛对青霉属(A、B)和曲霉属(C、D、E)的 5 种霉菌均具有很强的抑制作用,虽然采用气相扩散法的抑制效果比固相扩散法弱一些,但是 2 种抑菌方式的抑菌圈直径均>15 mm,说明青霉属和曲霉属的菌种对肉桂醛高度敏感。毛霉属菌种对肉桂醛的敏感性不如青霉属和曲霉属的菌种强,采用固相扩散法时抑菌圈直径>15 mm,为高度敏感,采用气相扩散法时仅 16 μL 药液处理的抑菌圈直径大于 15 mm,为高度敏感,其他药液处理的抑菌圈直径均在 10~15 mm 之间,为中度敏

表 4 生鲜湿面在 28℃ 下贮藏的菌落总数

时间 (d)	菌落总数(CFU/g)		
	空白对照	乙醇处理	肉桂醛处理
0	2.2×10	2.2×10	2.2×10
7	1.7×10 ⁴	3.8×10 ²	1.3×10 ²
14	>3×10 ⁵	6.5×10 ⁴	2.9×10 ²
21	—	>3×10 ⁵	4.0×10 ²
28	—	—	1.0×10 ³
35	—	—	7.4×10 ³
42	—	—	5.2×10 ⁴
48	—	—	>3×10 ⁵

丝形态和孢子囊类型,初步鉴定出霉变菌种分为 3 个菌属,其中 2 种为青霉属,3 种为曲霉属,1 种为毛霉属。将分离纯化的霉菌,用霉菌基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取,采用真菌扩增通用引物 NS1 和 NS6 对 18S rDNA 序列进行扩增,将扩增产物测序后在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源比对,最终将 2 种青霉属的霉菌鉴定为产黄青霉和扩展青霉,3 种曲霉属的霉菌鉴定为灰绿曲霉、阿姆斯特丹 (下转第 223 页)

2016,56(6):1175-1183.

- [19] Wang X, Shen Y, Wang S, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. Nucleic acids research, 2017, 45(1):356-360.
- [20] 杨 沙, 段灿灿, 晏仁义, 等. 基于网络药理学的半枝莲抗肿瘤活性成分及整合作用机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(15): 3471-3482.
- [21] 贺勤杰. 一种治疗糖尿病的中草药丸:CN200910065089.9[P]. 2009-10-21.
- [22] 赵志祥, 简小兵, 王文英. 脉复生合剂治疗糖尿病足的临床疗效观察[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(6):620-622, 626.
- [23] 袁永春, 宋成爱, 王玉红. 一种治疗糖尿病足的护理药液及其应用:CN201410103709.4[P]. 2014-06-04.
- [24] 李送南. 一种牛大力枸杞茶及其制备方法:CN201410555036.6[P]. 2016-04-20.
- [25] 杨能英, 何风雷, 彭富全, 等. 一种治疗腰膝酸痛、坐骨神经痛的中药组合物的检测方法:CN201511019196.X[P]. 2017-07-04.
- [26] 钟永明. 一种中药足浴粉及其制备方法:CN201410088816.4[P]. 2015-05-28.
- [27] 臧文霞, 王 菁, 韩长日, 等. 五种药用植物萃取物对四种组织来源肿瘤细胞体外增殖抑制作用的观察[J]. 山东医药, 2012,

52(42):7-10.

- [28] 傅曼琴. 千斤拔和牛大力的体外抗肿瘤成分研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2012.
- [29] 马 帅. EB 病毒感染相关肿瘤增殖性疾病的研究进展[J]. 中国急救医学, 2016, 36(8):749-753.
- [30] 刘兴楼, 舒赛男, 周 华, 等. 儿童慢性活动性 EB 病毒感染 19 例临床分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(22): 1705-1709.
- [31] 王 宾, 李光新, 张曙光, 等. 双链蛋白聚糖在胃癌组织中的表达及其意义[J]. 中华普通外科杂志, 2012, 27(1):59-60.
- [32] 曹 利, 刘 韬, 陈卓佳, 等. 丝甘蛋白聚糖在乳腺癌对多柔比星耐药过程中的重要性研究[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(4): 284-287.
- [33] 易达委, 孙 斌, 刘晓霓, 等. *GPC3* 在癌症免疫治疗及诊断中的意义[J]. 中国免疫学杂志, 2014(6):858-861.
- [34] 谢小娟, 潘晶晶, 魏力强, 等. *miR-199a-3p* 靶基因预测及生物信息学分析[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(2): 244-249.
- [35] 何 强, 黄美近, 彭宝岗, 等. *ErbB2* 诱导的肿瘤形成和侵袭有赖于 FAK 功能[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(12):2369-2373.
- [36] 王 悦, 魏丽惠, 廖永新, 等. 雌激素对内膜癌细胞中 FAK 基因转录的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2006, 7(1):37-40.

(上接第 216 页)

曲霉和白曲霉, 1 种毛霉属的霉菌鉴定为总状毛霉, 6 种霉菌与 GenBank 数据库中已登记菌株的 18S rDNA 序列同源性均 $\geq 98\%$ 。采用气相扩散法和固相扩散法测定肉桂醛对生鲜湿面中 6 种霉菌的抑制作用, 结果表明, 不同体积(2、4、8、16 μL)的肉桂醛采用气相扩散法和固相扩散法测定时对生鲜湿面中的霉菌均表现出抑制作用, 其中青霉属和曲霉属的菌种对肉桂醛的敏感性较毛霉属菌种高。将气相浓度为 200 $\mu\text{L/L}$ 的肉桂醛置于生鲜湿面包装袋的密闭空间内, 通过肉桂醛自身的挥发性来抑制霉菌的生长, 测定生鲜湿面在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下贮藏的货架期, 结果发现, 未经任何处理的生鲜湿面在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下的货架期仅为 7 d, 经气相浓度为 200 $\mu\text{L/L}$ 的肉桂醛处理后可将生鲜湿面的货架期延长 35 d, 说明肉桂醛具备开发成为一种气相抑菌剂的潜力。

参考文献:

- [1] 宋显良, 邓学良, 周文化. 生鲜湿面防霉保鲜技术[J]. 食品与机

械, 2013, 29(2):159-162.

- [2] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94:223-253.
- [3] Alzoreky N S, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 80:223-230.
- [4] Matan N, Rimkeeree H, Mawson A J, et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 107(2):180-185.
- [5] Cheng S S, Liu J Y, Hsui Y R, et al. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(2):306-312.
- [6] Lopez P, Sanchez C, Battle R, et al. Solid and vapor - phase antimicrobial activities of six essential oils; susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(17):6939-6946.
- [7] 岳淑丽, 任小玲, 陈 霞, 等. 桉叶精油包埋前后抑菌性能及成分比较研究[J]. 食品科学, 2017, 38(11):155-160.