

樟树叶多酚抑菌活性及在冷藏草鱼肉保鲜中的应用

Antibacterial activity and application on grass carp muscle in cold storage of camphor tree leaves' polyphenol

李应洪 李忠海 付湘晋 张慧

LI Ying-hong LI Zhong-hai FU Xiang-jin ZHANG Hui

(中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南长沙 410004)

(College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology,
Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:为研究樟树叶多酚的抑菌活性及其对食品保鲜的效果,测定樟树叶多酚对7株常见致病菌、腐败菌的最低抑菌浓度、最低杀菌浓度,并研究其对冷藏草鱼肉菌落总数、pH值、挥发性盐基氮含量、三甲氮含量的影响。结果表明,樟树叶多酚对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、青霉、黑曲霉、毛霉等均有明显抑制作用,抑菌效果顺序为:荧光假单胞菌>枯草芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌>大肠埃希菌>青霉=黑曲霉=毛霉;最小抑菌浓度分别为0.500, 0.625, 1.250, 1.250, 2.500, 2.500, 2.500 mg/mL;最小杀菌浓度分别为1.000, 1.250, 2.500, 2.500, 2.500, 2.500, 2.500 mg/mL。新鲜草鱼肉添加5, 10 mg/g樟树叶多酚,可明显抑制冷藏草鱼肉中微生物生长,鱼肉pH值、挥发性盐基氮含量、三甲氮含量增加速度明显降低,使冷藏鱼肉货架期从3 d分别延长至6, 8 d。樟树叶多酚可作为鱼肉保鲜用天然抑菌剂。

关键词:樟树;多酚;抑菌;荧光假单胞菌;草鱼;挥发性盐基氮

Abstract: To investigate the antibacterial activity of camphor tree leaves' polyphenol in food preservation, the effect of camphor tree leaves' polyphenol was studied, on 7 strains of pathogenic bacteria and spoilage bacteria, and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. Furthermore, the effect of camphor tree leaves' polyphenol on the total colony, pH value, total volatile basic nitrogen (TVB-N) content and trimethylamine content of grass carp meat during cold storage was investigated. The camphor tree leaves' polyphenol inhibited these strains effectively, the MIC on *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Penicil-*

lium citrinum, *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo* were 0.500, 0.625, 1.250, 1.250, 2.500, 2.500 mg/mL, respectively, and the MBC were 1.000, 1.250, 2.500, 2.500, 2.500, 2.500, 2.500 mg/mL, respectively. The camphor tree leaves' polyphenol can significantly inhibit the growth of microorganisms in the fish, and the pH value, TVB-N content, and trimethylamine content increased slower than that of the control, the shelf life of refrigerated fish increased from 3 days to 6 days, 8 days for 5, 10 mg/g treatment, respectively. The camphor tree leaves' polyphenol could be used as effective natural antibacterial agent in fish meat preservation.

Keywords: camphor tree leaves; polyphenol; bacteriostasis; *Pseudomonas fluorescens*; grass carp; Total volatile basic nitrogen (TVB-N)

中国樟树资源丰富,目前主要是用于绿化、木料加工及提取芳樟油,大量加工下脚料(枝、叶)未被利用。樟树叶含有大量酚类物质,是多酚资源^[1-2]。多酚对多种细菌、真菌、酵母菌有明显的抑制作用。Singh等^[3]发现肯氏蒲桃多酚对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、克雷伯氏肺炎菌、佛里德兰德氏杆菌、白色念珠菌显示了较好的广谱抗菌效果,抑菌直径为14.3~23.0 mm,最小抑菌浓度为0.5~2.5 mg/mL。Aziz Shahid等^[4]从红花百里香中分离出酚类化合物,其中迷迭香酸对化脓性链球菌显出很好的抗菌活性。枣浆中多酚对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度分别为(MIC)30, 20 mg/mL^[5-6]。这些结果表明,多酚提取物作为天然抑菌剂在食品保鲜领域具有潜在的研究和开发价值。已有研究^[7-8]报道,樟树叶多酚具有优良的抗氧化活性,但其抗菌活性还未见报道。

本试验拟研究樟树叶多酚对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、黑曲霉、大肠埃希菌、荧光假单胞菌等7株常见致病菌、腐败菌的抑菌活性,以及其对草鱼肉的保鲜作用,为开发天然抗菌保鲜剂提供参考,也为樟树叶高值化利用提供参考。

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31601502)

作者简介:李应洪,男,中南林业科技大学副教授,博士。

通信作者:付湘晋(1980—),男,中南林业科技大学副教授,博士。

E-mail: drxfjfu@163.com

收稿日期:2018-02-21

1 材料与方法

1.1 材料

樟树叶多酚提取物:本实验室自制^[2,9-10];

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉、青霉、毛霉:由中南林业科技大学食品科学与工程学院提供;

草鱼:2~3 kg/尾,鲜活,市售。

1.2 方法

1.2.1 多酚对试验菌株的抑菌作用 根据参考文献^[11],采用试管法测定最低抑菌浓度(MIC),采用平皿法测定最低杀菌浓度(MBC)。

1.2.2 樟树叶多酚对草鱼片的保鲜作用 分别取 5,10 g 樟树叶多酚定容至 100 mL,得浓度分别为 50,100 mg/mL 的樟树叶多酚保鲜液。

鲜活草鱼宰杀后,去头、去尾、去内脏,清洗,切成 3 cm×3 cm 的鱼块,30 min 内进行樟树叶多酚涂抹处理完毕,冷藏于 4℃ 冰箱,使鱼肉中多酚浓度达到 5,10 μL/g。

1.2.3 鱼片菌落总数测定 按 GB 4789.2—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数的测定》执行。样品的菌落计数选择营养琼脂培养基,30℃ 培养 72 h。

1.2.4 鱼片 pH 的测定 取绞碎的草鱼鱼肉 5.0 g 于烧杯中,加入 45 mL 去 CO₂ 的蒸馏水,搅拌、浸渍 30 min,过滤静置后用 pH 计测其上清液 pH 值^[12]。

1.2.5 鱼片挥发性盐基氮(TVB-N)值的测定 根据文献^[12],采用半微量定氮法测定。

1.2.6 鱼片 TMA 值的测定 采用苦味酸法测定^[12]。

1.3 数据处理

试验数据均采用 3 次平行试验的平均值,使用 SPSS 13.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 樟树叶多酚最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)

本试验选取了常见食品腐败菌或致病菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、荧光假单胞菌、大肠埃希菌、青霉、黑曲霉、毛霉 7 株微生物进行研究,结果见表 1。从表 1 可以看出,樟树叶多酚对试验菌株均有明显抑制作用,与文献^[5]报道中其它植物多酚基本一致。樟树叶多酚对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、青霉、黑曲霉、毛霉等均有明显抑制作用,抑制效果顺序为:荧光假单胞菌>枯草芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌=大肠埃希菌>青霉=黑曲霉=毛霉,最小抑菌浓度分别为 0.500,0.625,1.250,2.500 mg/mL。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是草鱼冷藏过程中最主要的腐败菌^[13-14];樟树叶多酚对荧光假单胞菌的最小抑菌浓度只有 0.500 mg/mL,最小杀菌浓度为 1.000 mg/mL;所以可以预计,樟树叶多酚可作为靶向抑菌剂用于草鱼保鲜。

2.2 樟树叶多酚对草鱼鱼片的保鲜效果

因为樟树叶多酚对草鱼冷藏过程中最主要的腐败

表 1 樟树叶多酚的最小抑菌浓度、最小杀菌浓度

Table 1 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of camphor tree leaves' polyphenol mg/mL

受试菌种	最小抑菌浓度	最小杀菌浓度
金黄色葡萄球菌	1.250	2.500
枯草芽孢杆菌	0.625	1.250
荧光假单胞菌	0.500	1.000
大肠埃希菌	1.250	2.500
青霉	2.500	2.500
黑曲霉	2.500	2.500
毛霉	2.500	2.500

菌^[13-14]荧光假单胞菌有明显抑制作用;所以,进一步研究了樟树叶多酚对冷藏草鱼鱼片的保鲜效果。测定了樟树叶多酚对冷藏过程草鱼片中细菌总数、pH、TVB-N、TMA 的影响,结果分别见图 1~4。

2.2.1 对冷藏草鱼鱼片菌落总数的影响 菌落总数测定结果(图 1)表明,樟树叶多酚处理明显改变了鱼片中菌落总数的变化趋势,空白样品菌落总数一直快速增加,但樟树叶多酚处理鱼肉在贮藏初期菌落总数增长缓慢,有一个明显的延滞期,5,10 mg/g 樟树叶多酚添加量鱼片的延滞期分别是 2,4 d;表明樟树叶多酚能有效抑制鱼肉中微生物的繁殖、生长。以鱼肉菌落总数超过 6 lg CFU/g 为限值^[12];空白对照鱼片菌落总数 4 d 即超过 6 lg CFU/g;5,10 mg/g 樟树叶多酚添加量鱼片分别在第 6、9 天超过 6 lg CFU/g,所以,樟树叶多酚可延长鱼肉冷藏货架期。

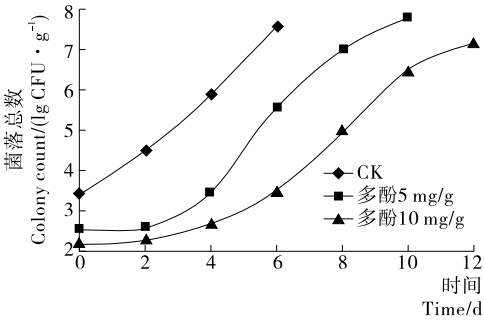


图 1 樟树叶多酚对冷藏草鱼菌落总数的影响

Figure 1 Effect of camphor tree leaves' polyphenol on the colony count of Grass carp

2.2.2 对冷藏草鱼鱼片 pH 值的影响 由图 2 可知,鱼片初始 pH 值约 6.50,空白对照鱼片 pH 值一直缓慢增加;樟树叶多酚处理明显改变了鱼片 pH 值变化趋势,贮藏初期(2 d 内),pH 值有一降低的过程,此后才缓慢升高,与茶多酚保鲜的草鱼肉 pH 值变化趋势一致^[15]。鱼肉 pH 值的变化与鱼体自身酶的作用及微生物繁殖有关。pH 值降低是因为鱼肉中糖类酵解产生乳酸,ATP 和磷酸肌酸分解产生磷酸,pH 值上升主要是由于贮藏过程中微生物利用鱼肉中的蛋白质大量生长繁殖,产生 TVB-N 和 TMA 等碱性含氮物质。所以,鱼肉 pH 值上升,间接反映了此期间鱼肉中微生物的大

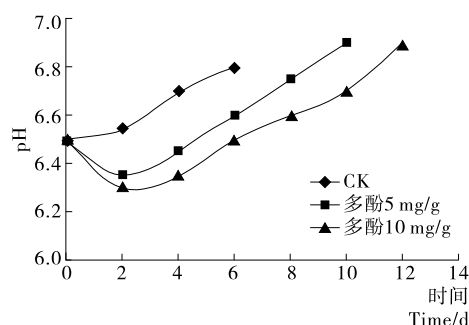


图2 樟树叶多酚对冷藏草鱼片 pH 的影响

Figure 2 Effect of camphor tree leaves' polyphenol on the pH of Grass carp

量积累和繁殖。樟树叶多酚延缓了冷藏鱼肉 pH 值上升,间接表明樟树叶多酚对鱼体微生物的繁殖、生长有抑制作用。

2.2.3 对冷藏草鱼鱼片挥发性盐基氮(TVB-N)的影响 挥发性盐基氮(TVB-N)是评价肉制品鲜度的主要卫生指标,TVB-N 的增加主要是因为蛋白质在细菌的繁殖和内源性酶的作用下,分解产生的氨及胺类等碱性含氮物质;TVB-N 含量越高,表明氨基酸被破坏的越多,肉制品的腐败程度越严重。不同种类鱼肉的 TVB-N 含量可接受的上限不同^[16]。周然等^[17]的研究中指出鳕鱼鱼肉中 TVB-N 含量的可接受上限为 60 mg/100 g,黑鲈的可接受上限为 10 mg/100 g,鲢鱼的可接受上限为 35~40 mg/100 g。杨辉等^[16]在草鱼肉保鲜研究中,确定草鱼 TVB-N 值在 17 mg/100 g 以下为新鲜水平。

图 3 表明,在贮藏前期,鱼肉的 TVB-N 值增长缓慢,随着贮藏时间的延长,鱼体 TVB-N 值的增长速度明显高于贮藏前期,主要是因为微生物大量繁殖,氨基酸被破坏,造成挥发性含氮物质大量生成,使得鱼肉的 TVB-N 值急剧上升。樟树叶多酚处理明显降低了鱼肉 TVB-N 含量的升高速度,特别是在贮藏前期,5,10 mg/g 樟树叶多酚添加量的鱼肉在冷藏开始的 2,4 d,其 TVB-N 含量升高很少,因为樟树叶多酚处理抑制了微生物的生长繁殖,所以 TVB-N 增加的速度明显降低。以 TVB-N 含量 17 mg/100 g 为限量值,则 5,10 mg/g 樟树叶多酚处理可使鱼片货架期从 3 d 分别延长至 6,8 d。

2.2.4 对冷藏草鱼鱼片三甲胺(TMA)的影响 TMA 有明显的鱼恶臭味,由氧化三甲胺在腐败细菌的氧化三甲胺还原

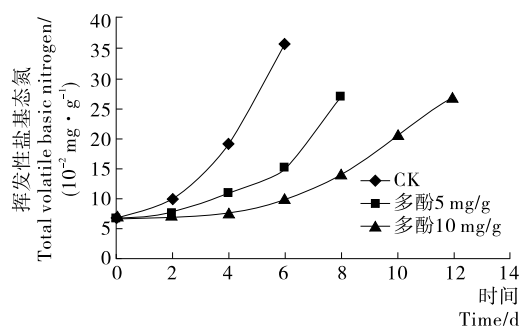


图3 樟树叶多酚对冷藏草鱼 TVB-N 含量的影响

Figure 3 Effect of camphor tree leaves' polyphenol on the TVB-N of Grass carp

酶的作用下产生。TMA 也是评价鱼肉鲜度的重要卫生指标,TMA 含量越高,其鲜度越差。图 4 表明,樟树叶多酚处理明显延缓了 TMA 升高的速度;对照样品从贮藏开始,TMA 值即呈明显上升趋势,2 d 后加速上升;樟树叶多酚处理鱼片样品在贮藏前期 6 d,TMA 值均只有缓慢升高。

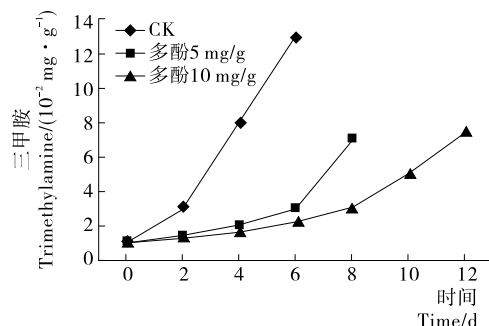


图4 樟树叶多酚对冷藏草鱼片 TMA 的影响

Figure 4 Effect of camphor tree leaves' polyphenol on the TMA of Grass carp

3 结论

樟树叶多酚对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌、青霉、黑曲霉、毛霉均有明显抑制作用;特别对荧光假单胞菌的最小抑菌浓度只有 0.500 mg/mL,最小杀菌浓度为 1.000 mg/mL。樟树叶多酚 5,10 mg/g 处理可分别使冷藏鱼片货架期从 3 d 延长至 6,8 d;樟树叶多酚可作为鱼肉靶向抑菌剂,具有进一步研究和开发价值。但樟树叶多酚的单体组成及其抑菌机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] 苏远波,李清彪,姚传义,等. 芳樟树叶乙醇提取物的抗癌作用[J]. 化工进展, 2006, 25(2): 200-204.
- [2] 冉晓敏,李忠海,付湘晋. 樟树叶多酚提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 51-54.
- [3] SINGH J P, KAUR A, SINGH N, et al. In vitro, antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 65: 1 025-1 030.
- [4] AZIZ S, IRSHAD M, HABIB-UR-REHMAN. Isolation of a new antibacterial polyphenol from thymus serpyllum[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2014, 49(6): 1 023-1 027.
- [5] TALEB H, MADDOCKS S E, MORRIS R K, et al. The Antibacterial Activity of Date Syrup Polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(213): 198.
- [6] BLANCHARD J M. Cinnamomum camphora, à cinéole (ravintsara), une plante au service de la prévention des infections nosocomiales en milieu hospitalier? [J]. Phytothérapie, 2007, 5(1): 15-20.
- [7] 付湘晋,王挥,冉晓敏,等. 樟树叶多酚提取物体外清除自由基及抗油脂氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2013(19): 108-114.
- [8] 李文清,李忠海,付湘晋,等. 樟树叶多酚复合抗氧化剂配方的筛选及优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 206-211.

(下转第 141 页)

- ELHAUSEN E. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 22: 446-453.
- [3] LU Xu, ZHANG Yi, WU Xiao-ting, et al. Effect of specific structure of lotus seed oligosaccharides on the production of short-chain fatty acids by *Bifidobacterium adolescentis*[J]. Chinese Journal of Structural Chemistry, 2015, 34(4): 510-522.
- [4] AWAD T, MOHARRAM H, SHALTOUT O, et al. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review[J]. Food Research International, 2012, 48(2): 410-427.
- [5] LUQUE-GARCIA J, DE CASTRO M L. Ultrasound: a powerful tool for leaching[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(1): 41-47.
- [6] ZHANG Bin, YANG Rui-yuan, LIU Chun-Zhao. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 62(2): 480-483.
- [7] CRAVOTTO G, BOFFA L, MANTEGNA S, et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(5): 898-902.
- [8] CHEN Yi-yong, GU Xiao-hong, HUANG Sheng-quan, et al. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 429-435.
- [9] GUO Ze-bin, ZENG Shao-xiao, ZHANG Yi, et al. The effects of ultra-high pressure on the structural, rheological and retrogradation properties of lotus seed starch [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 44: 285-291.
- [10] MACHADO M T, EÇA K S, VIEIRA G S, et al. Prebiotic oligosaccharides from artichoke industrial waste: evaluation of different extraction methods[J]. Industrial Crops and Products, 2015, 76: 141-148.
- [11] 田玉庭, 卢旭, 郑宝东. 响应面法优化莲子低聚糖超声波辅助提取工艺[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2012, 30(2): 17-21.
- [12] WU Yan, CUI Steve, TANG Jian, et al. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1 599-1 605.
- [13] MARAN J P, SIVAKUMAR V, SRIDHAR R, et al. Development of model for barrier and optical properties of tapioca starch based edible films[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1 335-1 347.
- [14] KRATCHANOVA M, PAVLOVA E, PANCHEV I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin[J]. Carbohydrate polymers, 2004, 56(2): 181-185.
- [15] TOMA M, VINATORU M, PANIWNKY L, et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8(2): 137-142.
- [16] 卢旭, 张帅, 林姗, 等. 莲子低聚糖提取工艺优化及其组分分析[J]. 热带作物学报, 2015, 36(4): 813-820.
- [17] 宋春丽, 王文侠, 曾凤彩, 等. 超声波和微波辅助提取大豆低聚糖的工艺比较[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 47-50.
- [18] QUAN Can, SUN Yong-yue, QU Jia. Ultrasonic extraction of ferulic acid from *Angelica sinensis*[J]. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2009, 87(4): 562-567.
- [19] SANTOS H, CAPELO J. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment[J]. Talanta, 2007, 73(5): 795-802.
- [20] KNORR D, ADE-OMOWAYE B, HEINZ V. Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing[J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2002, 61(2): 311-318.
- [21] YANG Li, CAO Ya-lan, JIANG Guo-jiang, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl[J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(9): 1 349-1 355.
- [22] YAN Ming-ming, LIU Wei, FU Yu-jie, et al. Optimisation of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in *Radix Astragali*[J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1 663-1 670.
- [23] YING Zhi, HAN Xiao-xiang, LI Jian-rong. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1 273-1 279.
- (上接第 130 页)
- [9] 付湘晋, 冉晓敏, 张慧, 等. 大孔树脂 AB-8 对樟树叶多酚的静态吸附与解析特性研究[J]. 福建农林大学学报, 2013, 42(2): 1-4.
- [10] 周海旭, 李忠海, 张慧, 等. 微波法提取樟树多酚的工艺优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 161-163.
- [11] 刘文朵, 于新, 刘淑宇, 等. 马尾松针系统溶剂提取物的抑菌活性比较研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(9): 133-138.
- [12] 蓝蔚青, 谢晶. 壳聚糖复合生物保鲜剂对冷藏带鱼保鲜效果的优化配比[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(3): 311-317.
- [13] 潘子强, 张玉山, 贾冠聪, 等. 脆肉鲩鱼在冷藏条件下的特定腐败菌分析[J]. 食品科技, 2011, 36(9): 36-40.
- [14] 王建辉, 杨晶, 刘永乐, 等. 基于 PCR-DGGE 技术对冷藏过程中草鱼肌肉的细菌群落结构分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14(9): 216-223.
- [15] FAN Wen-jiao, CHI Yuan-long, ZHANG Shuo. The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice[J]. Food Chemistry, 2008, 108(1): 148-153.
- [16] 杨辉, 杨福馨, 欧丽娟, 等. 植物精油-EVOH 活性包装膜对草鱼鱼肉保鲜效果的研究[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 320-324.
- [17] 周然, 刘源, 谢晶, 等. 电解水对冷藏河豚鱼肉质构及品质变化的影响[J]. 农业工程学报, 2011, 27(10): 365-369.