

肉中多种组分对乳酸链球菌素与香芹酚抑菌活性的影响

辛梦娜¹, 袁栋栋^{1,2,3}, 刘国荣^{1,2,3*}, 赵世博¹, 韩非¹

(¹北京工商大学食品与健康学院 北京 100048

²北京工商大学 老年营养与健康教育部重点实验室 北京 100048

³北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心 北京 100048)

摘要 目的:在模拟体系中,抑菌剂或其活性成分与菌体直接接触时,可以发挥良好的抑制作用,然而,当其被添加到复杂的食物体系中使用,相较模拟环境下的抑制效果变差。本研究旨在探索复杂的肉品体系中多组分对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性的影响。方法:采用琼脂扩散法测定抑菌圈直径,采用肉汤稀释法测定菌落总数,分别探究肉中多种组分对乳酸链球菌素与香芹酚抑菌活性的影响。结果:水溶性的肌红蛋白和水不溶性的肌原纤维蛋白都对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性产生了不利影响;亚油酸对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性也产生一定的抑制作用;而多种游离氨基酸和糖原未见明显的影响。结论:较高浓度的蛋白组分和脂肪组分对乳酸链球菌素与香芹酚的抑菌活性都有负面影响,而多种游离氨基酸和糖原基本没有影响。

关键词 肉组分; 乳酸链球菌素; 香芹酚; 抑菌活性

文章编号 1009-7848(2023)07-0056-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.007

肉类,是人们摄取蛋白质的主要来源之一。由于肉类具有丰富的营养成分,因此更易受到微生物污染,导致其腐败变质,引发食源性疾病。食品保鲜与防腐一直是科学研究与行业发展的重要议题。一直以来添加合成防腐剂与化学防腐剂是控制食品腐败的有效手段。然而,化学防腐剂滥用或乱用引起的食品安全事件使得消费者产生一些担忧。同时,不断提高的物质生活水平也使人们更加追求食品的品质与营养健康。绿色健康、安全无害的天然防腐剂逐渐受到人们的关注与青睐^[1-2]。

乳酸链球菌素(Nisin)是一种由 34 个氨基酸组成的多肽分子,由乳酸菌产生,进入人体后可被完全降解,安全无害,并且对革兰氏阳性菌具有良好的抑制作用。乳酸链球菌素作为一种微生物来源的天然食品防腐剂已在世界上 50 多个国家得到合法应用,然而乳酸链球菌素对革兰氏阴性菌和真菌没有抑制作用,常与其它抑菌剂复配使用^[3-4]。精油作为植物源天然抑菌剂同样具有安全健康

的优点。香芹酚是牛至精油中含量最高、最为有效的抑菌活性成分^[5-6],同时具有抗炎^[7]、抗癌^[8]的作用,然而香芹酚具有显著的挥发性气味,限制了其使用剂量。已有文献表明,乳酸链球菌素和香芹酚具有良好的协同作用^[9-12],通过复配能够相互弥补不足之处,充分发挥各自优势。

然而,防腐剂的抑菌效果在实际使用过程中仍受到多种因素的影响,例如微生物因素,化学成分的生物活性,食品体系的内在特性,以及各组分间的相互作用等^[13]。已有文献针对乳酸链球菌素和香芹酚在不同食品体系中的使用效果进行了研究。在乳制品中,乳脂的含量与乳酸链球菌素的抑菌活性紧密相关,乳脂浓度增加使乳酸链球菌素的抑菌活性显著下降甚至丧失,可能是由于乳酸链球菌素与乳脂球之间存在某些相互作用^[14-17]。在熟制香肠的保藏中,乳酸链球菌素的回收率随着脂肪含量的增加而降低^[18];而且肉中谷胱甘肽存在时也导致乳酸链球菌素回收率极大降低,通过质谱检测发现二者发生结合^[19]。一定浓度的钙离子、镁离子也造成乳酸链球菌素抑菌活性的损失^[20]。同样,在香芹酚抑菌活性的研究中发现,培养基环境中,香芹酚的最小抑菌浓度(MIC)随葵花籽油含量的增加而显著增大,蛋白提取物使 MIC 略有增大^[21]。在烤鸡、牛肉、猪肉等食品中应用时

收稿日期: 2022-07-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1606200);广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515140021)

第一作者: 辛梦娜,女,硕士生

通信作者: 刘国荣 E-mail: liuguorong@th.btbu.edu.cn

发现,与对照组相比,添加相同含量的牛至精油并没有达到相同的抑菌效果,菌的数量都有所增加,体外试验的良好抑菌效果在实际应用中并不明显^[22-24]。以上研究结果表明,抑菌剂或其活性成分与菌体直接接触时,可以发挥良好的抑制或灭活作用,然而,当被添加到一个复杂的食物系统中时,抑菌活性大大降低,显然归因于复杂的食品基质成分干扰了其抑菌活性的发挥^[3,13,17,25]。

目前,关于肉中哪些组分会对乳酸链球菌素和香芹酚抑菌活性存在影响还不明确。为此,本研究采用琼脂扩散法测定抑菌圈直径,采用肉汤稀释法测定菌落总数,分别探究肉中多种组分对乳酸链球菌素与香芹酚抑菌活性的影响,旨在为食品防腐剂的减量增效研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株 指示菌为单核增生李斯特氏菌(*L. monocytogenes*),中国微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 原料与试剂 新鲜猪肉,物美超市;乳酸链球菌素、香芹酚、亚油酸、糖原,上海麦克林生化科技有限公司;赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、甘氨酸、精氨酸、半胱氨酸、肌红蛋白, Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、胰蛋白胨大豆固体培养基(TSA)、蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;平板计数培养基(PCA),北京陆桥技术有限责任公司;盐酸、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾,福晨(天津)化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器与设备 电子天平,上海浦春计量仪器有限公司;分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;pH计,安莱立思仪器科技(上海)有限公司;立式自动压力蒸汽灭菌器,致微(厦门)仪器有限公司;洁净工作台,北京东联哈尔滨仪器制造有限公司;生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;微生物生长曲线仪,德国 BMG Micro-GCM;菌落计数器 Scan 4000,法国 interscience;切碎机,小熊电器股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 指示菌的活化与菌悬液的准备 取出冻存的单核增生李斯特氏菌(-80℃),解冻后按体积分

数 1%接种于 TSB 液体培养基中,37℃培养 12 h,连续活化 3 代后用 PCA 培养基测定活菌总数,约为 10⁹ CFU/mL。将活化后的菌液在 TSB 培养基中稀释至 2×10⁶ CFU/mL 备用。

1.2.2 肉中组分对乳酸链球菌素抑菌活性的影响

1.2.2.1 乳酸链球菌素抑菌活性的测定 采用琼脂扩散法(打孔)通过测定乳酸链球菌素的抑菌圈直径大小来表征其抑菌活性。用无菌 0.02 mol/L 盐酸溶液配制 20 mg/mL 的乳酸链球菌素溶液,用无菌纯水分别稀释至 10,5,2.5,1.25,0.625 mg/mL 的乳酸链球菌素溶液。在无菌平板中加入 1 mL 准备好的菌悬液,倒入 TSA 培养基(40~50℃),摇晃平板使菌悬液与培养基混匀,待培养基凝固,用牛津杯在合适位置打孔。孔中分别加入 100 μL 不同质量浓度的乳酸链球菌素溶液,同时,以等量的无菌 0.02 mol/L 盐酸溶液作为空白对照。每个样品做 3 次平行。将平板置于 4℃下扩散 12 h,再转移至 37℃培养 6~8 h,观察抑菌圈,测量抑菌圈直径。

1.2.2.2 肉汤对乳酸链球菌素抑菌活性的影响

将从超市采购的新鲜猪里脊肉,用无菌刀具切去表层,取里层组织肉用绞肉机绞碎,称取一定质量肉糜于无菌均质袋中,加入无菌生理盐水,均质混匀,配成质量分数为 20%的肉汤。再配制 20%肉汤与 2.5 mg/mL 乳酸链球菌素的混合样品,均质混匀。以 2.5 mg/mL 的乳酸链球菌素溶液作为对照。将所有样品置于 4℃摇床(120 r/min)作用 4 h,每个样品各取 100 μL 采用琼脂扩散法(打孔)测定乳酸链球菌素的抑菌活性,每个样品做 3 次平行。向每个样品中接入 1%指示菌,以不含样品的菌悬液作为空白对照,置于 37℃培养 12 h,每个样品各取 1 mL,在无菌生理盐水中连续 10 倍稀释至合适梯度,用 PCA 平板测定菌落总数。

1.2.2.3 肌红蛋白对乳酸链球菌素 n 抑菌活性的影响 配制 5 mg/mL 的乳酸链球菌素溶液,用无菌水配制 5,2,0.5 mg/mL 的肌红蛋白溶液,将乳酸链球菌素溶液与不同浓度的肌红蛋白溶液等量混合,以乳酸链球菌素与等量无菌水混合为空白对照,乳酸链球菌素最终质量浓度为 2.5 mg/mL,肌红蛋白的最终质量浓度为 2.5,1,0.25,0 mg/mL。将所有样品置于 4℃摇床(120 r/min),分别在

0,3,6,9,12,18,24,36,48 h 取样,采用琼脂扩散法(打孔)测定乳酸链球菌素的抑菌活性,记录抑菌圈直径,每个样品做3次平行。

1.2.2.4 肌原纤维蛋白对乳酸链球菌素抑菌活性的影响 参考文献[26]和[27]的方法提取肌原纤维蛋白,通过牛血清蛋白 BCA 法测定所提取的蛋白质浓度为 7.3 mg/mL。用无菌水稀释获得 4,2,1,0.5 mg/mL 的肌原纤维蛋白,与 5 mg/mL 的乳酸链球菌素溶液等量混合,以乳酸链球菌素与等量无菌水混合为空白对照,乳酸链球菌素最终质量浓度为 2.5 mg/mL,肌纤维蛋白的最终质量浓度为 2,1,0.5,0.25,0 mg/mL。将所有样品置于 4 °C 摇床(120 r/min)作用 12 h 后取样,采用琼脂扩散法(打孔)测定乳酸链球菌素的抑菌活性,记录抑菌圈直径,每个样品做 3 次平行。

1.2.2.5 亚油酸对乳酸链球菌素抑菌活性的影响

向无菌水中加入亚油酸,保持 55~65 °C 热水浴高速搅拌(1 500 r/min)10 min,配制 5 mg/mL 的亚油酸乳浊液,继续稀释获得 0.4,0.3,0.2,0.1,0.05 mg/mL 的亚油酸乳浊液,将不同质量浓度的亚油酸乳浊液与 5 mg/mL 的乳酸链球菌素溶液等量混合,以乳酸链球菌素与等量无菌水混合为空白对照,乳酸链球菌素最终质量浓度为 2.5 mg/mL,亚油酸的最终质量浓度分别为 0.2,0.15,0.1,0.05,0.025,0 mg/mL。将所有样品置于 4 °C 摇床(120 r/min)作用 12 h 后取样,采用琼脂扩散法(打孔)测定乳酸链球菌素的抑菌活性,记录抑菌圈直径,每个样品做 3 次平行。

1.2.2.6 游离氨基酸对乳酸链球菌素抑菌活性的影响 根据肌肉中游离氨基酸的种类及含量,选择赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、甘氨酸(Gly)、精氨酸(Arg)、半胱氨酸(Cys)8 种 L 型氨基酸,配制氨基酸溶液,分别与乳酸链球菌素等体积混合,乳酸链球菌素最终质量浓度为 2.5 mg/mL,赖氨酸的终质量浓度为 0,0.05,0.5,5,20,40 mg/mL,亮氨酸的终质量浓度为 0,0.05,0.5,1,5,10 mg/mL,异亮氨酸的终质量浓度为 0,0.05,0.1,0.5,1,15 mg/mL,缬氨酸的终质量浓度为 0,0.01,0.1,1,10,30 mg/mL,蛋氨酸的终质量浓度为 0,0.05,0.5,1,10,25 mg/mL,甘氨酸的终质量浓度为 0,0.05,0.1,1,10,60

mg/mL,精氨酸的终质量浓度为 0,0.05,0.1,1,10,45 mg/mL,半胱氨酸的终质量浓度为 0,0.05,0.1,0.5,1,5 mg/mL。将所有样品置于 4 °C 摇床(120 r/min)混合作用 12 h 后取样,采用琼脂扩散法(打孔)测定乳酸链球菌素的抑菌活性,记录抑菌圈直径,每个样品做 3 次平行。

1.2.2.7 糖原对乳酸链球菌素抑菌活性的影响

根据肌肉中碳水化合物的含量配制一系列质量浓度梯度(10,4,2,1,0.2 mg/mL)的糖原溶液,与 5 mg/mL 的乳酸链球菌素溶液等体积混合,以乳酸链球菌素与等量无菌水混合为空白对照,乳酸链球菌素最终质量浓度为 2.5 mg/mL,糖原的最终质量浓度为 5,2,1,0.5,0.1,0 mg/mL。将样品置于 4 °C 摇床(120 r/min)作用 12 h 后取样,采用琼脂扩散法(打孔)测定乳酸链球菌素的抑菌活性,记录抑菌圈直径,每个样品做 3 次平行。

1.2.3 肉中组分对香芹酚抑菌活性的影响

1.2.3.1 香芹酚在肉糜中的抑菌效果 用无菌水配制 100,50,30,10,5,1 mg/mL 的香芹酚储备液。将从超市采购的新鲜猪里脊肉,用无菌刀具切去表层,放入预先灭菌处理的绞肉机中绞碎。称取 3 份 200 g 肉糜,分别加入 20 mL 的 100,50,30,10,5,1 mg/mL 香芹酚储备液,搅拌混匀,转移至无菌样品袋中,向 200 g 猪肉中加入 20 mL 的无菌水作为空白对照。香芹酚的最终含量分别是 10,5,3,1,0.5,0.1,0 mg/g。将全部样品转移至 25 °C 下贮存,在 0,6,12,24,48 h 分别取样 25 g 置于无菌均质袋中,向每份样品中加入 225 mL 无菌生理盐水,均质后得到 1:10 的样液,继续稀释至合适梯度,用 PCA 平板测定菌落总数。

1.2.3.2 MIC 的测定 将活化好的单核增生李斯特氏菌在 TSB 培养基中稀释至 2×10^6 CFU/mL。用无菌缓冲蛋白胨水(BWP)配制初始质量浓度为 20 mg/mL 的香芹酚溶液,用漩涡振荡器混匀,继续用无菌缓冲蛋白胨水稀释香芹酚溶液至 2,1,0.5,0.25 mg/mL。将稀释好的菌液和二倍稀释后的香芹酚溶液按体积比 1:1 混合均匀,以菌液和无菌蛋白胨水的混合体系作为空白对照,体系中香芹酚的最终质量浓度为 1,0.5,0.25,0.125,0 mg/mL。每个试样分别取 200 μ L 加入到 96 孔板中,用酶标仪记录 OD_{600nm} 初始值,将所有试样在 37 °C 下

培养 24 h 后再次测定 OD_{600nm} , OD_{600nm} 无明显变化的最低抑菌剂浓度为最小抑菌浓度 (MIC)。

1.2.3.3 肌红蛋白对香芹酚抑菌活性的影响 用无菌水配制 1 mg/mL 香芹酚乳浊液, 分别称取一定质量肌红蛋白于无菌管中, 再分别加入 1 mg/mL 香芹酚溶液, 混合均匀, 使肌红蛋白质量浓度分别为 20, 14, 8, 2 mg/mL, 置于 4 °C 作用 12 h。取不同质量浓度的肌红蛋白和香芹酚的混合液各 1 mL, 分别加入 1 mL 菌悬液, 混合均匀, 以菌液加香芹酚溶液的样品为空白对照, 以菌液加无菌水的样品为阳性对照。肌红蛋白的最终质量浓度为 10, 7, 4, 1, 0 mg/mL, 香芹酚的质量浓度 (MIC) 是 0.5 mg/mL。将样品置于 37 °C 下培养, 分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 取样 100 μ L, 用无菌缓冲蛋白胨水 10 倍稀释至合适浓度, 涂布于 TSA 培养基上, 置于 37 °C 下培养 24 h, 记录活菌总数。

1.2.3.4 肌原纤维蛋白对香芹酚抑菌活性的影响

用无菌水配制 7.3, 3.65, 1.825 mg/mL 的肌原纤维蛋白, 与 2 mg/mL 香芹酚溶液等量混合制成混合反应液, 置于 4 °C 下作用 12 h。分别取混合液各 1 mL, 分别加入 1 mL 菌悬液, 混合均匀, 以菌液加香芹酚溶液的样品为空白对照, 以菌液加无菌水的样品为阳性对照。肌原纤维蛋白的最终质量浓度分别为 1.825, 0.9, 0.45, 0 mg/mL, 香芹酚的 MIC 是 0.5 mg/mL。将样品置于 37 °C 下培养, 在 0, 3, 6, 9, 12 h 分别取样测定活菌总数。

1.2.3.5 亚油酸对香芹酚抑菌活性的影响 向无菌水中加入亚油酸, 保持 55~65 °C 热水浴高速搅拌 (1 500 r/min) 10 min, 配制 5 mg/mL 的亚油酸乳浊液, 继续稀释获得 0.8, 0.4, 0.2 mg/mL 的亚油酸乳浊液, 将不同质量浓度的亚油酸乳浊液与 2 mg/mL 香芹酚溶液等量混合, 将所有混合反应液置于 4 °C 下作用 12 h。分别取混合液各 1 mL, 分别加入 1 mL 菌悬液, 混合均匀, 以菌液加香芹酚溶液的样品为空白对照, 以菌液加无菌水的样品为阳性对照。亚油酸的最终质量浓度为 0.2, 0.1, 0.05, 0 mg/mL, 香芹酚的 MIC 为 0.5 mg/mL。将样品置于 37 °C 下培养, 分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 取样测定活菌总数。

1.2.3.6 游离氨基酸对香芹酚抑菌活性的影响

配制赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨

酸、甘氨酸、精氨酸、半胱氨酸的溶液, 分别与 2 mg/mL 香芹酚溶液在 4 °C 下混合作用 12 h, 分别取不同混合液各 1 mL, 分别加入 1 mL 菌悬液, 混合均匀, 以菌液加香芹酚溶液的样品为空白对照, 以菌液加无菌水的样品为阳性对照。游离氨基酸的质量浓度均为 1 mg/mL, 香芹酚的 MIC 是 0.5 mg/mL。将样品置于 37 °C 下培养 12 h 后, 测定活菌总数。

1.2.3.7 糖原对香芹酚抑菌活性的影响 配制一系列不同质量浓度 (10, 4, 2, 1, 0.2 mg/mL) 的糖原溶液, 与 2 mg/mL 香芹酚溶液以 1:1 的体积比混合, 在 4 °C 下作用 12 h, 取各混合液 1 mL, 加入 1 mL 菌悬液, 混合均匀, 以菌液加香芹酚溶液的样品为空白对照, 以菌液加无菌水的样品为阳性对照。糖原的最终质量浓度为 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0 mg/mL, 香芹酚的 MIC 为 0.5 mg/mL。将样品置于 37 °C 下培养 12 h 后, 测定活菌总数。

2 结果与分析

2.1 肉中组分对乳酸链球菌素抑菌活性的影响

2.1.1 乳酸链球菌素的抑菌活性 以单核增生李斯特菌为指示菌, 采用琼脂扩散法通过测定抑菌圈直径来表征乳酸链球菌素的抑菌活性。如图 1 所示, 乳酸链球菌素具有良好的抑菌作用, 随着乳酸链球菌素质量浓度逐渐增大, 抑菌圈直径逐渐增大, 当乳酸链球菌素的质量浓度为 0.625 mg/mL 时, 仍然具有抑菌效果, 推断乳酸链球菌素的最小抑菌浓度小于 0.625 mg/mL。当乳酸链球菌素的质量浓度为 2.5 mg/mL 时, 抑菌圈直径达到了 20 mm, 因此选择 2.5 mg/mL 的乳酸链球菌素, 采用琼脂扩散法考察肉中组分对乳酸链球菌素抑菌活性的影响。

2.1.2 肉汤对乳酸链球菌素抑菌活性的影响 通过测定抑菌圈直径和菌落总数分别考察了鲜肉组分是否会对乳酸链球菌素的活性产生影响。如图 2a 所示, 与乳酸链球菌素对照组相比, 肉汤与乳酸链球菌素混合的试验组无抑菌圈, 乳酸链球菌素已无抑菌效果; 如图 2b 所示, 乳酸链球菌素的对照组中无菌生长, 而肉汤与乳酸链球菌素混合的试验组的菌落总数大幅度升高, 达到了 10^7 CFU/mL。结果表明, 肉汤影响了乳酸链球菌素的

抑菌活性,与溶液中的乳酸链球菌素相比,肉汤中的乳酸链球菌素的抑菌活性下降,这可能是由于

肉汤中复杂的组分与乳酸链球菌素之间存在某些效应,抑制了乳酸链球菌素抑菌活性的发挥。

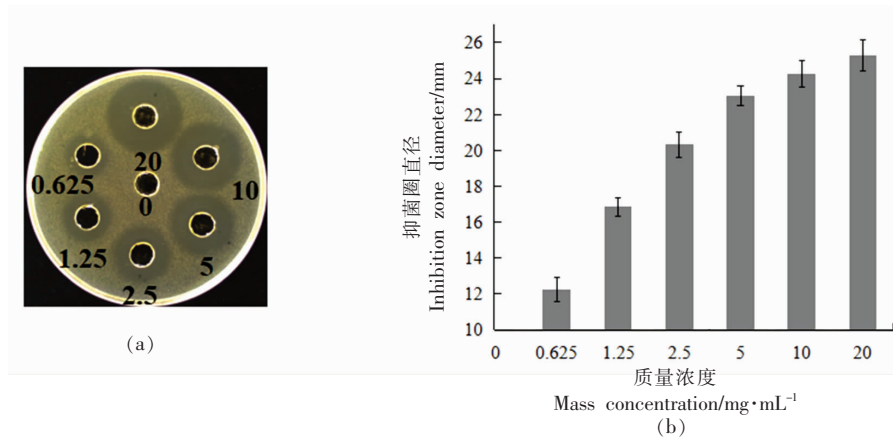


图1 乳酸链球菌素的抑菌活性

Fig.1 The antibacterial activity of nisin

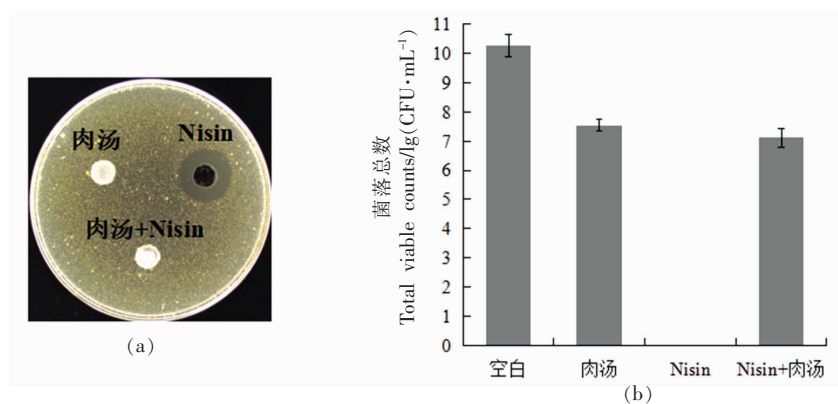


图2 肉汤对乳酸链球菌素的抑菌活性的影响

Fig.2 The effect of broth on the antibacterial activity of nisin

2.1.3 肌红蛋白对乳酸链球菌素抑菌活性的影响

肌红蛋白是决定肉的颜色的重要组分,通过测定抑菌圈直径的变化探索了其对乳酸链球菌素抑菌活性的影响。如图3所示,随着作用时间延长,乳酸链球菌素的抑菌圈直径逐渐减小,乳酸链球菌素的抑菌活性受到了抑制;而且,肌红蛋白的质量浓度与乳酸链球菌素的抑菌活性呈反比,肌红蛋白的质量浓度越大,乳酸链球菌素的抑菌活性越弱。图3a为作用24h后乳酸链球菌素的抑菌圈直径图,可以观察到抑菌圈明显减小,当肌红蛋白的质量浓度为1.0 mg/mL时,乳酸链球菌素几乎无抑菌圈,肌红蛋白削弱了乳酸链球菌素的抑菌活性,影响效果显著。

2.1.4 肌原纤维蛋白对乳酸链球菌素抑菌活性的

影响 肌原纤维蛋白是肉中含量最多的一类蛋白,约占蛋白组分的50%(质量分数),通过测定抑菌圈直径探索肌原纤维蛋白对乳酸链球菌素抑菌活性的影响。结果发现,肌原纤维蛋白对乳酸链球菌素的抑菌活性有不利影响。如图4所示,作用12h后,乳酸链球菌素的抑菌圈明显减小,肌原纤维蛋白的质量浓度越大,对乳酸链球菌素抑菌活性的影响效果越大,抑菌圈越小;当加入的肌原纤维蛋白的质量浓度为2 mg/mL时,乳酸链球菌素已无抑菌圈。

2.1.5 亚油酸对乳酸链球菌素抑菌活性的影响

亚油酸在肌肉组织中含量大约占10%(质量分数),是肌肉脂肪组织中含量最高的多不饱和脂肪酸,通过测定抑菌圈直径探索亚油酸对乳酸链球

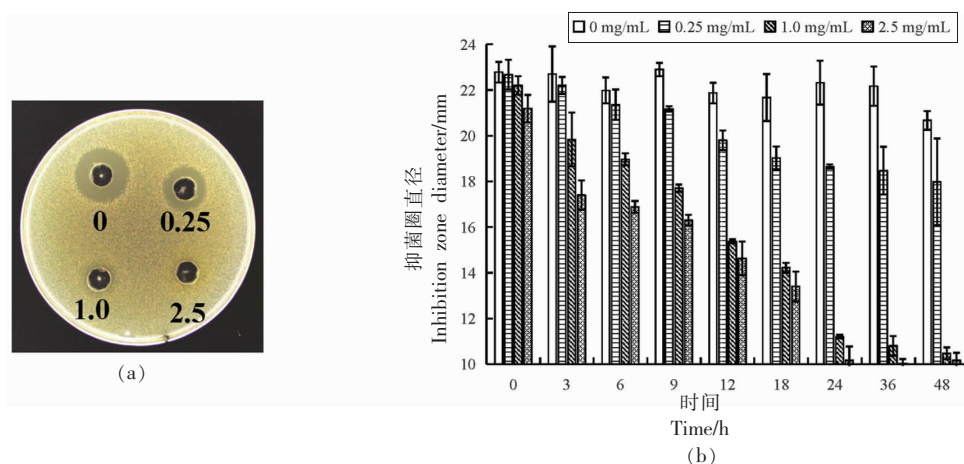


图 3 肌红蛋白对乳酸链球菌素的抑菌活性的影响

Fig.3 The effect of myoglobin on the antibacterial activity of nisin

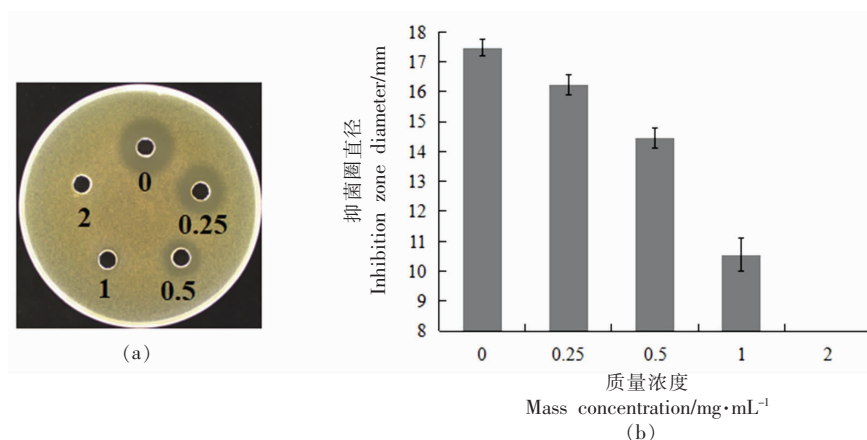


图 4 肌原纤维蛋白对乳酸链球菌素的抑菌活性的影响

Fig.4 The effect of myofibrillar protein on the antibacterial activity of nisin

菌素抑菌活性的影响。结果显示,亚油酸会减弱乳酸链球菌素的抑菌活性。如图 5 所示,乳酸链球菌素与亚油酸作用 12 h 后,乳酸链球菌素的抑菌圈

直径逐渐减小,并且与亚油酸的质量浓度呈负相关,质量浓度越大时抑菌圈直径越小,直至没有明显的抑菌区域。

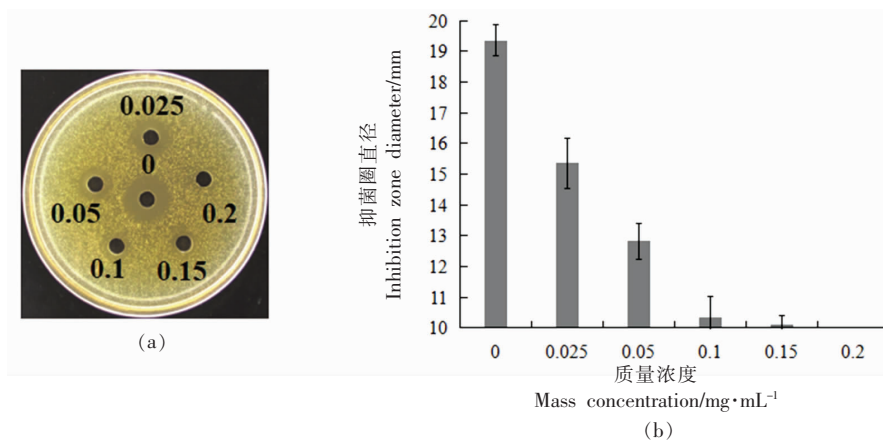


图 5 亚油酸对乳酸链球菌素的抑菌活性的影响

Fig.5 The effect of linoleic acid on the antibacterial activity of nisin

2.1.6 游离氨基酸和糖原对乳酸链球菌素抑菌活性的影响 肌肉组织中含有多种游离氨基酸,氨基酸种类和含量是评价肌肉营养价值的重要指标,同时,一些呈味氨基酸也是肉制品风味的重要来源;而肌肉组织中的碳水化合物主要是肌糖原,含量在1.0%(质量分数)左右。通过测定抑菌圈直径探索多种游离氨基酸和糖原对乳酸链球菌素抑

菌活性的影响,结果显示,游离氨基酸和糖原对乳酸链球菌素的抑菌活性无明显影响。如图6~7所示,乳酸链球菌素的抑菌圈直径大小基本一样,没有随氨基酸种类与质量浓度的不同而发生变化,也没有随糖原质量浓度的不同而发生变化,说明游离氨基酸和糖原不是影响乳酸链球菌素抑菌活性的组分。

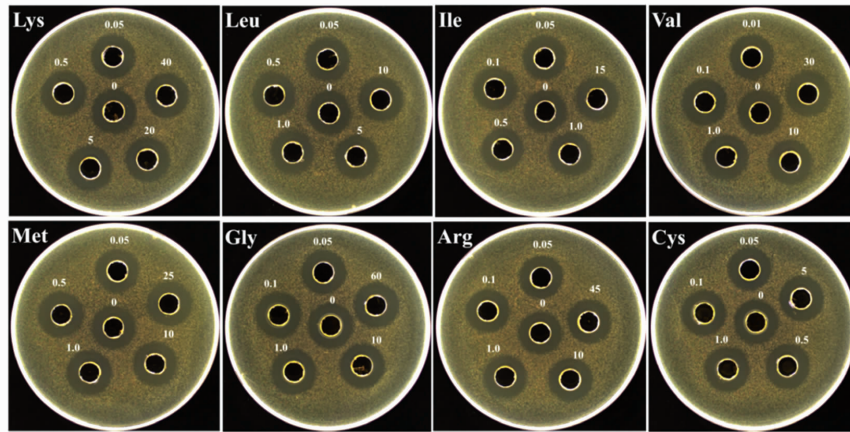


图6 多种游离氨基酸对乳酸链球菌素的抑菌活性的影响

Fig.6 The effect of several free linoleic acids the on antibacterial activity of nisin

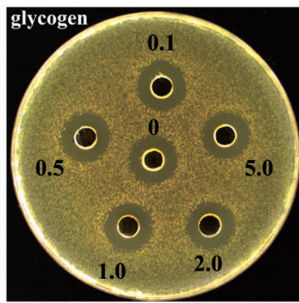


图7 糖原对乳酸链球菌素的抑菌活性的影响

Fig.7 The effect of glycogen on the antibacterial activity of nisin

2.2 肉中组分对香芹酚抑菌活性的影响

2.2.1 香芹酚在肉糜中的抑菌效果 用不同质量浓度的香芹酚处理猪肉糜,在常温条件(25℃)下贮藏,通过测定菌落总数的变化来评价香芹酚的抑菌效果。试验数据显示,10 mg/mL的香芹酚可以保证肉糜在48 h内无微生物生长;5 mg/mL的香芹酚可以很好地抑制微生物生长,在48 h时菌落总数在 10^4 CFU/g左右;3 mg/mL的香芹酚可以控

制微生物在48 h内菌落总数在 10^6 CFU/g左右,在24 h时菌落总数在 10^2 CFU/g左右;当香芹酚质量浓度在1 mg/mL及以下时,不能很好的抑制微生物生长,24 h时菌落总数接近 10^6 CFU/g。

2.2.2 香芹酚对抗单核增生李斯特氏菌的MIC 测定了单核增生李斯特氏菌在不同质量浓度的香芹酚处理下的生长状况,从图9可以看出,当初始菌落数约为 2×10^6 CFU/mL时,不同浓度的香芹酚对指示菌有一定的抑制作用,当香芹酚的质量浓度在0.25 mg/mL及以下时,不能抑制香芹酚生长,当大于0.5 mg/mL及以上时,抑制效果明显,因此推断香芹酚对单核增生李斯特氏菌的MIC为0.5 mg/mL。

2.2.3 肌红蛋白对香芹酚抑菌活性的影响 在接入 2×10^6 CFU/mL指示菌的TSB肉汤中加入0.5 mg/mL的香芹酚,再加入不同质量浓度的肌红蛋白,通过测定体系中菌落总数变化来探究肌红蛋白对香芹酚抑菌活性的影响。结果显示,肌红蛋白对香芹酚的抑菌活性产生了不利影响。如图10所示,0 h时,加入4 mg/mL及更高质量浓度肌红蛋

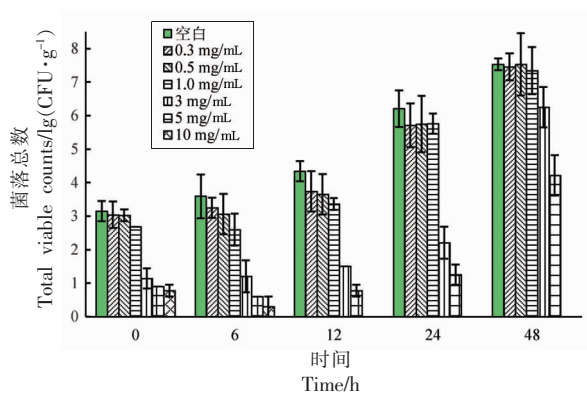


图 8 在常温条件下不同质量浓度的香芹酚处理猪肉糜的菌落总数变化

Fig.8 Changes of total number of bacteria in pork ground treated with different mass concentrations of carvacrol at room temperature

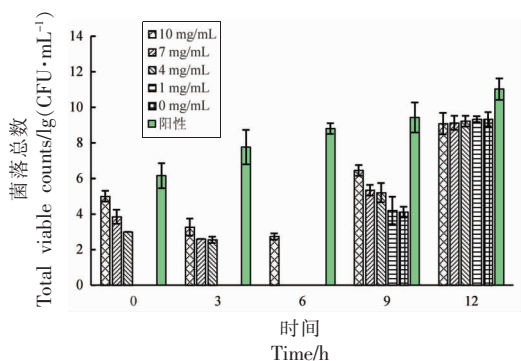


图 10 肌红蛋白对香芹酚抑菌活性的影响

Fig.10 The effect of myoglobin on the antibacterial activity of carvacrol

白的体系中有菌生长，而菌落数仍然小于阳性对照组，而加入 1 mg/mL 和不加肌红蛋白的体系无菌生长，说明足够大浓度的肌红蛋白对香芹酚的抑菌活性造成了不利影响。这种不利影响在 3 h 的取样结果中依然可以体现。通过 6 h 取样结果可以发现，随着时间延长香芹酚逐渐发挥了最大的抑菌能力，基本无活菌存在，而在添加 10 mg/mL 肌红蛋白的体系中依然有 2.5 lg(CFU/mL) 的菌。从 9 h 的取样结果发现，香芹酚的抑菌能力逐渐失效，菌落总数增长，而添加肌红蛋白的体系中菌落总数均大于空白对照组，且随肌红蛋白质量浓度的增大而增加。以上结果表明，在模拟肉汤环境中，质量浓度较大的肌红蛋白会使香芹酚的抑菌活性下降。然而，老龄牛肉中肌红蛋白的含量是 16~20 mg/g，老龄猪肉中含量为 8~12 mg/g，老龄羊

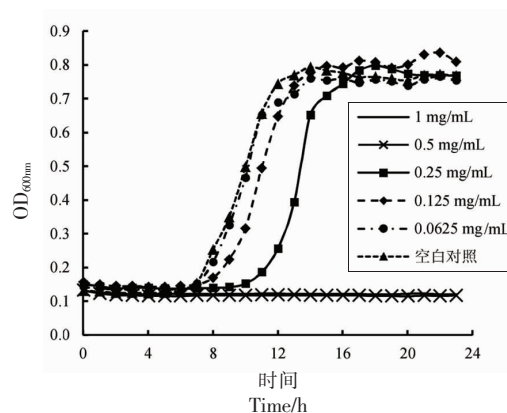


图 9 单核增生李斯特氏菌在不同香芹酚处理下的生长曲线

Fig.9 Growth curves of *L. monocytogenes* treated with different carvacrol

肉中含量为 12~18 mg/g^[28]，因此，在实际应用中，肉中的肌红蛋白可能会削弱香芹酚的抑菌效果。

2.2.4 肌原纤维蛋白对香芹酚抑菌活性的影响

在接入 2×10^6 CFU/mL 指示菌的 TSB 肉汤中加入 0.5 mg/mL 的香芹酚与不同质量浓度的肌原纤维蛋白，通过测定体系中菌落总数变化来探究肌原纤维蛋白对香芹酚抑菌活性的影响。结果显示，肌原纤维蛋白对香芹酚抑菌活性产生了一定的抑制作用。如图 11 所示，在 0, 3 h 的样品中发现，加入 1.825 mg/mL 与 0.9 mg/mL 肌纤维蛋白的体系中有指示菌生长，而加入 0.45 mg/mL 与不加肌纤维蛋白的体系没有菌生长，这表明肌纤维蛋白的对香芹酚的抑菌活性产生了抑制作用。同样在 6, 9, 12 h 的结果中也能观察到抑制作用，且肌原纤维蛋白的质量浓度越大，对香芹酚的影响越大。

2.2.5 亚油酸对香芹酚抑菌活性的影响 在接入 2×10^6 CFU/mL 指示菌的 TSB 肉汤中加入 0.5 mg/mL 的香芹酚与不同质量浓度的亚油酸，通过测定体系中菌落总数变化来探究亚油酸对香芹酚抑菌活性的影响。结果显示，亚油酸对香芹酚的抑菌活性存在不利影响。如图 12 所示，前 6 h 加入不同质量浓度的亚油酸组分与空白对照的抑菌效果基本保持一致，而 9, 12 h 取样结果中发现，加入 0.1 mg/mL 与 0.2 mg/mL 亚油酸的体系中，菌落总数大于空白对照，说明亚油酸对香芹酚的抑菌活性产生了抑制，且抑制作用强弱与亚油酸质量浓度存在正相关关系。

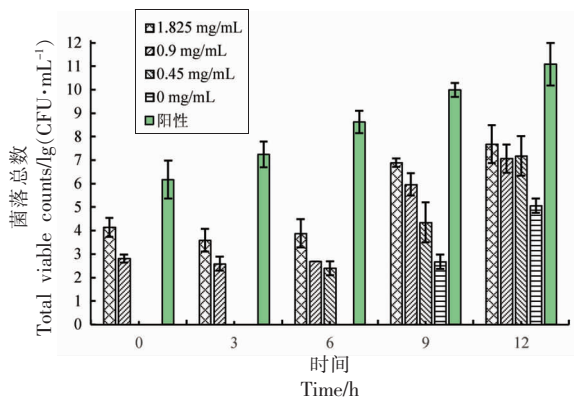


图 11 肌原纤维蛋白对香芹酚抑菌活性的影响

Fig.11 The effect of myofibrillar protein on the antibacterial activity of carvacrol

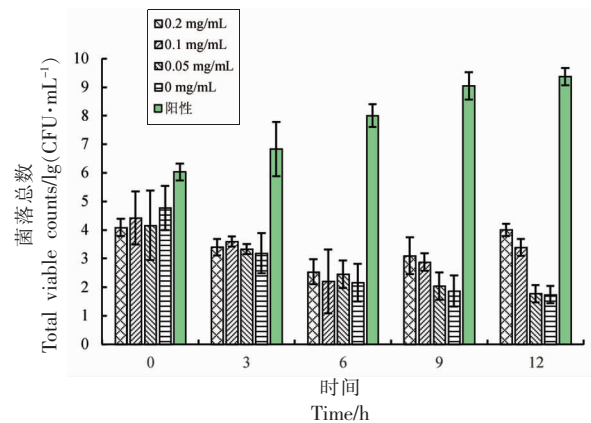


图 12 亚油酸对香芹酚抑菌活性的影响

Fig.12 The effect of linoleic acid on the antibacterial activity of carvacrol

2.2.6 游离氨基酸和糖原对香芹酚抑菌活性的影响 通过测定体系中菌落总数的变化探究多种游离氨基酸和糖原对香芹酚抑菌活性的影响,结果显示,游离氨基酸和糖原对乳酸链球菌素的抑菌活性无明显影响。如图 13 所示,加入游离氨基酸

的试验组中菌落总数与空白对照基本保持一致,没有明显的上升趋势。如图 14 显示,在加入不同质量浓度的糖原体系中,与空白对照相比也没有发现菌落总数的上升,说明游离氨基酸和糖原并不是影响香芹酚抑菌活性的组分。

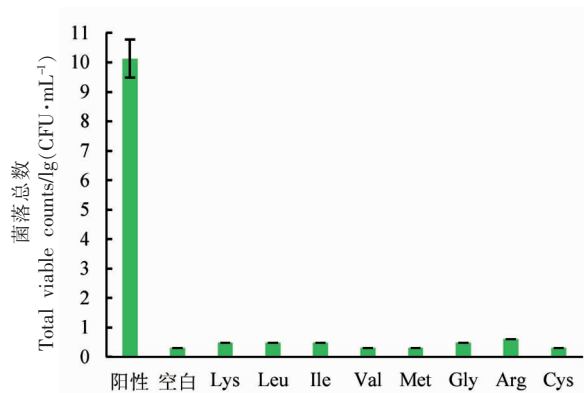


图 13 多种游离氨基酸对香芹酚抑菌活性的影响

Fig.13 The effect of several free amino acids on the antibacterial activity of carvacrol

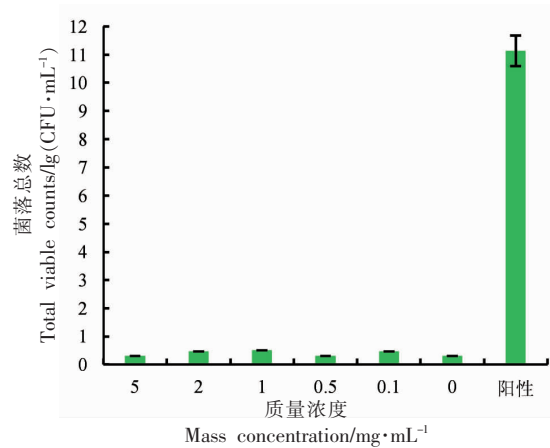


图 14 糖原对香芹酚抑菌活性的影响

Fig.14 The effect of glycogen on the antibacterial activity of carvacrol

3 讨论与结论

本研究在单一变量的模拟环境中,明确了肉中哪些组分对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性产生影响。其中,蛋白组分包括水溶性的肌红蛋白和水不溶性的肌原纤维蛋白都对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性产生了不利影响;其次,亚油酸对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性也产生了一定的抑制作用;另外,多种游离氨基酸和糖原对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性未见明显影响。

有文献探明食物中的酪蛋白、卵磷脂对乳酸链球菌素的抑菌活性有负面影响^[29]。黄现青等^[30]发现高浓度亚油酸对脂肽类抗菌肽(Surfactin)灭活芽孢具有负面影响,本试验结果与文献研究结果一致。有大量文献研究^[31-32]表明食物蛋白组分与添加剂中活性分子之间存在相互作用,形成沉淀物、凝聚体或复合物,改变蛋白结构的同时也可能会影响小分子的活性。例如,牛乳中的乳清蛋白与表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)发生共价结合,改性

后的蛋白二级结构发生变化,具有更好的发泡和乳化性能^[33],且复合物抗氧化活性明显增强^[34]。然而,乳清蛋白与 ϵ -聚赖氨酸之间主要通过静电相互作用形成凝聚物,不仅影响食品体系的稳定性,而且削弱了 ϵ -聚赖氨酸的抑菌效果^[35]。重要的是,已有文献报道香芹酚与肌原纤维蛋白、牛血清蛋白之间存在结合相互作用^[36-37]。基于以上研究推测,乳酸链球菌素和香芹酚与肌红蛋白和肌原纤维蛋白可能存在相互作用,导致抑菌活性减弱。虽然关于天然活性分子与蛋白质之间的相互作用研究成果很多,但是它们与脂类组分之间的非共价相互作用研究却较少,关于脂肪组分对乳酸链球菌素和香芹酚抑菌活性影响的具体机制未见报道,还需进一步研究。不过也有文献综述提及类黄酮类分子与脂质双分子层存在相互作用,将多酚包埋于纳米脂质体中制备运载体等^[38-39]。因此,亚油酸作为一种油性分子可能对乳酸链球菌素和香芹酚产生一定的吸附作用,附着在分子表面,使之无法有效扩散,不能与菌体直接接触,从而使其抑菌效果下降,也有可能是亚油酸与抑菌剂分子发生疏水性结合,从而影响了结构微环境导致其抑菌活性改变。

本研究明确了肉中多种组分对乳酸链球菌素和香芹酚的抑菌活性存在不利影响,对指导理论研究和生产实践具有重要意义。综上,接下来将构建单一模拟体系,针对肌红蛋白、亚油酸与乳酸链球菌素、香芹酚之间的具体互作机制展开研究,以期丰富应用这类天然抑菌剂的理论研究。

参 考 文 献

- [1] 张文远, 张强. 食品添加剂研究现状与发展趋势[J]. 现代农业科技, 2017(5): 241-242.
ZHANG W Y, ZHANG Q. Research status and development trend of food additives[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(5): 241-242.
- [2] 张琦. 天然防腐剂在肉制品保鲜中的应用研究[J]. 现代食品, 2019(2): 71-73.
ZHANG Q. Application of natural preservatives in meat products preservation [J]. Food Science and Technology, 2019(2): 71-73.
- [3] GHARSALLAOUI A, OULAHAL N, JOLY C, et al. Nisin as a food preservative: Part 1: Physico-chemical properties, antimicrobial activity, and main uses[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016, 56(8): 1262-1274.
- [4] LUCIANA J D A, ANGELA F J, PRISCILA G M, et al. Nisin biotechnological production and application: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2009, 20(3): 146-154.
- [5] 郑云峰, 沈水宝. 牛至及其精油的生物学功能研究进展[J]. 饲料工业, 2021, 42(4): 15-20.
ZHENG Y F, SHEN S B. Advances in biological function of oregano and its essential oil[J]. Feed Industry, 2021, 42(4): 15-20.
- [6] 李博萍, 胡文春. 香芹酚的生物学活性概述[J]. 陇东学院学报, 2017, 28(1): 48-52.
LI B P, HU W C. Review on the bioactivity of carvacrol[J]. Journal of Longdong University, 2017, 28(1): 48-52.
- [7] GUIMARÃES A G, XAVIER M A, DE SANTANA M T, et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response[J]. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2012, 385(3): 253-263.
- [8] TRINDADE G G G, THRIVIKRAMAN G, MENEZES P P, et al. Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex inhibits cell proliferation and migration of prostate cancer cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 125: 198-209.
- [9] CHURKLAM W, CHATURONGAKUL S, NGAMWONGSATIT B, et al. The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage[J]. Food Control, 2020, 108: 106864.
- [10] MARÍA-DOLORES E, ALFREDO P. Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat-treated *Listeria monocytogenes* cells [J]. Food Technology and Biotechnology, 2011, 49(1): 89-95.
- [11] AY Z, TUNCER Y. Combined antimicrobial effect of nisin, carvacrol and EDTA against *Salmonella typhimurium* in TSBYE at 4 degrees C and 37 degrees C [J]. Romanian Biotechnological Letters, 2016, 21(4): 11666-11674.
- [12] LIHUA F, BALARABE B I, FURONG H, et al. Ultrasound pretreatment enhances the inhibitory effects of nisin/carvacrol against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of *Bacillus*

- subtilis* ATCC6633 in laboratory medium and milk: Population and single-cell analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 311 (C): 108329.
- [13] DA SILVA B D, BERNARDES P C, PINHEIRO P F, et al. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products [J]. Meat Science, 2021, 176(3): 108463.
- [14] JUNG D S, BODYFELT F W, DAESCHEL M A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk[J]. J Dairy Sci, 1992, 75(2): 387-393.
- [15] BHATTI M, VEERAMACHANANI A, SHELEF L A. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 97 (2): 215-219.
- [16] CHOLLET E, SEBTI I, MARTIAL-GROS A, et al. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity[J]. Food control, 2008, 19(10): 982-989.
- [17] IBARRA-SÁNCHEZ L A, EL-HADDAD N, MAHMOUD D, et al. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products[J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(3): 2041-2052.
- [18] DAVIES E A, MILNE C F, BEVIS H E, et al. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage[J]. J Food Prot, 1999, 62(9): 1004-1010.
- [19] STERGIU V A, THOMAS L V, ADAMS M R. Interactions of nisin with glutathione in a model protein system and meat[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(4): 951.
- [20] HOULIHAN A J, RUSSELL J B. The effect of calcium and magnesium on the activity of bovicin HC5 and nisin [J]. Current Microbiology, 2006, 53 (5): 365-369.
- [21] SCHLÖSSER I, PRANGE A. Antifungal activity of selected natural preservatives against *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium verrucosum* and the interactions of these preservatives with food components[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(10): 1751-1760.
- [22] UHART M, MAKS N, RAVISHANKAR S. Effect of spices on growth and survival of *Salmonella typhimurium* DT 104 in ground beef stored at 4 and 8C[J]. Journal of Food Safety, 2006, 26(2): 115-125.
- [23] FIROUZI R, SHEKARFOROUSH S S, NAZER A H, et al. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken[J]. J Food Prot, 2007,70(11): 2626-2630.
- [24] PAPARELLA A, MAZZARRINO G, CHAVES-LÓPEZ C, et al. Chitosan boosts the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* essential oil in modified atmosphere packaged pork [J]. Food Microbiology, 2016, 59: 23-31.
- [25] PERRICONE M, ARACE E, CORBO M R, et al. Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1-6.
- [26] WANG C, JIANG D, SUN Y, et al. Synergistic effects of UVA irradiation and phlorotannin extracts of *Laminaria japonica* on properties of grass carp myofibrillar protein gel[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(7): 2659-2667.
- [27] 栗俊广, 张旭玥, 陈宇豪, 等. 鹰嘴豆分离蛋白对猪肉肌原纤维蛋白乳化特性的影响[J]. 轻工学报, 2021, 36(6): 30-37.
- LI J G, ZHANG X Y, CHEN Y H, et al. Effects of chickpea protein isolate on the emulsification properties of pork myofibrillar protein[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(6): 30-37.
- [28] 黄德智. 新版肉制品配方[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 16.
- HUANG D Z. New meat formula[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2002: 16.
- [29] 杜琨. 食品成分和环境对乳酸链球菌素抑菌活性的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2018(3): 28-30.
- DU K. The effect of food composition and environment on the antibacterial activity of nisin[J]. Cereal & Feed Industry, 2018(3): 28-30.
- [30] 黄现青, 乔明武, 宋莲军, 等. 肉制品主要组分对Surfactin抑制蜡样芽孢杆菌芽孢效果的影响研究[J]. 肉类工业, 2020(4): 40-43.
- HUANG X Q, QIAO M W, SONG L J, et al. Study on the effect of main components of meat products on inhibiting spore of *Bacillus cereus* by surfactin[J]. Meat Industry, 2020(4): 40-43.
- [31] BORDENAVE N, HAMAKER B R, FERRUZZI M

- G. Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods[J]. *Food & Function*, 2014, 5(1): 18–34.
- [32] MOHAMMADZADEH –AGHDASH H, AKBARI N, ESAZADEH K, et al. Molecular and technical aspects on the interaction of serum albumin with multifunctional food preservatives[J]. *Food Chem*, 2019, 293: 491–498.
- [33] JIA Z, ZHENG M, TAO F, et al. Effect of covalent modification by (–)-epigallocatechin–3–gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2016, 66: 305–310.
- [34] WANG X, ZHANG J, LEI F, et al. Covalent complexation and functional evaluation of (–)-epigallocatechin gallate and α -lactalbumin[J]. *Food Chemistry*, 2014, 150: 341–347.
- [35] 邵志鹏. ϵ -聚赖氨酸–乳清蛋白复合物的构建、抑菌机理及其分子动力学模拟的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2021.
- SHAO Z P. Studies on the construction, antibacterial mechanism and molecular dynamics simulation of ϵ -polylysine–whey protein [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2021.
- [36] LAHMAR A, AKCAN T, CHEKIR –GHEDIRA L, et al. Molecular interactions and redox effects of carvacrol and thymol on myofibrillar proteins using a non-destructive and solvent-free methodological approach[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 1042–1048.
- [37] REZAEINASAB M, BENVIDI A, GHARAGHANI S, et al. Chemometrics approaches based on electrochemical methods for the investigation of interaction between bovine serum albumin and carvacrol with the aim of its application to protein sensing[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry (Lausanne, Switzerland)*, 2019, 845: 48–56.
- [38] BORDENAVE N, HAMAKER B R, FERRUZZI M G. Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods[J]. *Food Funct*, 2014, 5(1): 18–34.
- [39] 刘霞, 罗芳, 余银, 等. 黄酮类化合物与食品成分相互作用研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(10): 1009–1015.
- LIU X, LUO F, SHE Y, et al. Research process of interaction between flavonoids and food ingredients[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2017, 36(10): 1009–1015.

Effects of Various Components in Meat on Antibacterial Activities of Nisin and Carvacrol

Xin Mengna¹, Yuan Dongdong^{1,2,3}, Liu Guorong^{1,2,3*}, Zhao Shibo¹, Han Fei¹

(¹School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

²Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health, Ministry of Education, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

³Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract Objective: In the simulated system, bacteriostatic agents and their active ingredients can exert a good inhibitory effect when in direct contact with the bacteria. However, when added to complex food systems, the inhibitory effect is less than that in the simulated environment. The purpose of this study was to explore which components in the complex meat system affect the antibacterial activities of nisin and carvacrol, and to determine the effect. Methods: A-GAR diffusion method was used to determine the diameter of antibacterial zone and broth dilution method was used to determine the total number of bacteria to explore the effects of meat components on the antibacterial activities of nisin and carvacrol, respectively. Results: Both water-soluble myoglobin and water-insoluble myofibrillar protein had adverse effects on the antibacterial activities of nisin and carvacrol. Linoleic acid also had a certain inhibitory effect on nisin and carvacrol. However, various free amino acids and glycogen had no significant effect. Conclusion: Higher concentrations of protein and fat components have negative effects on the antibacterial activities of nisin and carvacrol, while various free amino acids and glycogen have almost no effects.

Keywords meat components; nisin; carvacrol; antibacterial activity