

丁香精油与茶多酚复合抗菌液的抑菌活性 协同作用及抗氧化活性

都津铭^{1,2}, 张萍², 高德^{2*}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058)

(2. 浙大宁波理工学院机电与能源工程学院, 浙江宁波 315100)

摘要: 该研究通过将丁香精油 (EO) 和茶多酚 (TP) 复合得到复合抗菌液, 然后研究了两者不同配比下的协同抑菌效果, 并考察了协同作用最佳的复合抗菌液对鱼类特征腐败菌的抑菌作用、抑菌持久性及其抗氧化性能。研究发现, 丁香精油与茶多酚具有较强的协同抑菌作用, 且当 $m(\text{EO}):m(\text{TP})=2:1$ 时协同效应最强, 2E/T 的最小抑菌浓度为 0.2%, 对大肠杆菌的抑菌率为 98.74%, 协同系数为 4.46, 对金黄色葡萄球菌的抑菌率为 73.37%, 协同系数为 1.04。在最佳协同比条件下, 复合抗菌液的总质量浓度为 0.6% 时对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和铜绿假单胞菌的抑制作用性价比最高, 且对这些腐败菌种的抑菌持久性分别为 48 h、60 h、60 h 和 72 h。此浓度下的 DPPH 自由基清除率可达 86.68%, ABTS 自由基清除率可达 81.26%。这表明丁香精油与茶多酚复合抗菌液具有良好的抑菌协同作用、抑菌持久性和抗氧化性, 可为天然抗菌剂在鱼产品抗菌保鲜领域的应用提供一定的理论基础。

关键词: 丁香精油; 茶多酚; 协同抑菌作用; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2021)10-87-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0098

Synergistic Antibacterial Effect and Antioxidant Activity of the Compound

Liquid with Clove Essential Oil and Tea Polyphenols

DU Jin-ming^{1,2}, ZHANG Ping², GAO De^{2*}

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

(2. School of Electrical and Mechanical and Energy Engineering, NingboTech University, Ningbo 315100, China)

Abstract: In this study, a compound antibacterial liquid was prepared through combining essential oil and tea polyphenols. Then the synergistic antibacterial effects of the compound liquid containing different proportions of essential oil and tea polyphenols were studied. The antibacterial activity, antibacterial persistence and antioxidant activity of the compound antibacterial liquid with the greatest synergistic effect on the characteristic spoilage bacteria of fish were also investigated. It's found that clove essential oil and tea polyphenols exhibited a strong synergistic antibacterial effect, with the strongest synergy occurring at the EO-to-TP mass ratio of 2:1. The minimum inhibitory concentration of 2E/T was 0.2%, and the inhibitory rate of 2E/T against *Escherichia coli* was 98.74%, with the synergistic coefficient as 4.46, and the bacteriostatic rate against *Staphylococcus aureus* being 73.37%, and the synergistic coefficient being 1.04. At the ratio to achieve the optimal synergistic effect, a total mass concentration of the compound antibacterial liquid at 0.6% led to the greatest cost-effectiveness in inhibiting *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Pseudomonas aeruginosa*, with the antibacterial persistence against these spoilage strains being 48 h, 60 h, 60 h and 72 h, respectively. At this mass concentration, the DPPH free radical scavenging rate and ABTS free radical scavenging rate could reach 86.68% and 81.26%, respectively. These results indicated that the antibacterial compound liquid of clove

引文格式:

都津铭,张萍,高德.丁香精油与茶多酚复合抗菌液的抑菌活性协同作用及抗氧化活性[J].现代食品科技,2021,37(10):87-95

DU Jin-ming, ZHANG Ping, GAO De. Synergistic antibacterial effect and antioxidant activity of the compound liquid with clove essential oil and tea polyphenols [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 87-95

收稿日期: 2021-01-28

基金项目: 浙江省公益技术研究项目 (LGG18E030001); 宁波市自然科学基金项目 (2019A610435)

作者简介: 都津铭 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 13065738090@163.com

通讯作者: 高德 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工技术与装备, E-mail: gaode63@163.com

essential oil and tea polyphenols exhibited good antibacterial synergistic effect, antibacterial persistence and antioxidant activity, which can provide a theoretical basis for the application of natural antibacterial agents in the field of antibacterial preservation of fish products.

Key words: clove essential oil; tea polyphenols; synergistic bacteriostasis; antioxidation

鱼产品是人类饮食中重要的蛋白质来源,随着人们对食品品质和安全要求的提高,保持其新鲜度和货架期已成为当前亟待解决的问题。微生物腐败^[1]和脂质的氧化变化^[2]是鱼产品腐败的最主要两种机制,因此开发具有高效抑菌能力和抗氧化性的抗菌剂是鱼类保鲜的主要研究方向。丁香精油(Essential Oils, EO)是植物次生代谢产物中对鱼类腐败菌的抑制效果最佳的一种精油^[3],具有高效的抑菌活性^[4]。赵冉冉等^[5]研究发现丁香精油对青霉和灰霉的生长抑制时间可达9 d和8 d。但单一的精油种类在鱼产品的实际应用中很少能起到理想的保鲜效果^[6],而且对于不同的革兰氏阴性菌(大肠杆菌、沙门氏菌和铜绿假单胞菌)和革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、粪肠球菌和单增李斯特氏菌),精油对铜绿假单胞菌的抑制作用相对最低^[7]。因此将EO与其他天然抗菌剂进行复合,制备高效、广谱的天然复合抗菌剂具有更大的研究价值。如Hafsa等^[8]研究发现桉树精油与壳聚糖的复合涂层对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌有更好的抗菌活性,而且可以显著提高纯壳聚糖涂层的抗氧化性。黄酒等^[9]研究发现不同的精油之间对金黄色葡萄球菌均有协同作用。

茶多酚(Tea polyphenols, TP)是茶叶中多羟基酚类化合物的复合物,具有显著的抗氧化活性^[10],是一种天然酚类抗氧化剂,且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有显著的抑菌效果^[11],因此是鱼类抗菌保鲜领域的良好抗菌剂。蓝蔚青等^[12]研究发现茶多酚具有较强的抗氧化作用。而且茶多酚的抗氧化性高于维生素C^[13]。已有研究表明茶多酚与其他天然抗菌剂进行复合,可以起到协同抑菌、抗氧化作用。如Li等^[14]研究的天然防腐剂茶多酚(TP)与壳聚糖复合使用可以发挥出协同作用,比对照组延长红鲢鱼片6~8 d的货架期。唐煜括等^[15]从茶多酚与维生素C的混合物中得出2:1的时候对大肠杆菌的协同作用最强。这些研究为TP与其他天然抗菌剂的复配提供了良好的参考。

目前国内外许多研究主要集中在不同精油之间^[16]、精油与其他抗菌剂^[17,18]、茶多酚与其他抗菌剂^[19]的组合的抑菌协同作用,而对EO和TP这两者兼具抗菌性和抗氧化性的天然抗菌剂之间的复合液对鱼类特征腐败菌^[20]的抑制效果研究还鲜有报道。本文通过制备一系列丁香精油和茶多酚的复合抗菌剂,考察了丁香精油与茶多酚两者质量比对大肠杆菌和金黄色葡萄

球菌的协同抑菌作用及最佳抑菌浓度的复合抗菌液对鱼类特征腐败菌的抑菌效果,并对其抗氧化性进行了研究,为开发对抑制鱼类特征腐败菌效果良好的复合天然抗菌液和鱼产品保鲜应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

丁香精油(分析纯,≥80%)购自上海麦克林生化科技有限公司;茶多酚(97%)购自上海麦克林生化科技有限公司;氯化钠(分析纯)购自上海麦克林生化科技有限公司;大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 ATCC9027、副溶血性弧菌 ATCC17802 均购自上海鲁微科技有限公司;肉汤琼脂培养基(分析纯)购自杭州微生物试剂有限公司;2,2-联苯基-1-苦肟基(分析纯)购自上海易恩化学技术有限公司;无水乙醇(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

AL104型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;US-300T型超声波均化器,上海生析超声仪器有限公司;LRH-250F型生化培养箱,上海慧泰仪器制造有限公司;BGLL-230BE型电热鼓风干燥箱,上海本亭仪器有限公司;SPH-211B型标准型大容量恒温培养摇床,上海世平实验设备有限公司;LDZX-50L型立式高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂。

1.3 试验方法

1.3.1 复合抗菌液的制备

茶多酚溶液浓度的配制:将1.5 g茶多酚溶于水中定容至50 g,密封磁力搅拌30 min,制成3%的茶多酚溶液,再用无菌蒸馏水稀释成质量浓度为0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%的溶液。

丁香精油浓度的配制:先将丁香精油用无水乙醇按质量比1:2溶解,再按所需的浓度用水具体稀释成质量浓度为0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%的溶液。

复合抗菌液浓度的配制:按 $m(\text{EO}):m(\text{TP})=1:1$ 、 $1:2$ 、 $2:1$ 配制总质量浓度为0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%的复合抗菌液。

1.3.2 菌悬液的配制

采用麦氏比浊法^[21], 将斜面菌种接种于 LB 培养基中, 37 °C 恒温振荡培养箱中活化 24 h, 接种在 LB 琼脂平板上, 平板划线后倒置与 37 °C 恒温培养箱中培养过夜, 挑取典型菌落加入培养基中, 并依次做 10 倍递增稀释, 将菌悬液稀释至比色浊度, 配制成菌液浓度为 100~300 cfu/mL 左右的稀释液作为试验用菌液。

1.3.3 最小抑菌浓度的测定

采用二倍稀释法^[22]测定茶多酚、精油及其混合物 [m(EO):m(TP)=1:1、1:2、2:1] 的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。取 26 支灭菌试管并编号, 纯精油抗菌液记为 E, 纯茶多酚抗菌液记为 T, 不同质量百分比的丁香精油/茶多酚复合抗菌液分别记为 E/T (1:1)、2E/T (1:2)、E/2T (2:1)。将 1.6% 的 E、T、E/T、E/2T、2E/T 各 1 mL 加入试管中, 然后分别加入 1 mL 液体培养基中, 顺序对应分别记为 E-1.6、T-1.6、E/T-1.6、E/2T-1.6、2E/T-1.6, 混合均匀; 从 E-1.6 号试管中吸取 1 mL 混合溶液加入 E-0.8 号试管, 再加入等体积的液体培养基, 混合均匀, 以此类推二倍梯度稀释四次, 在最后编号的试管中加入 1 mL 灭菌生理盐水和等体积的液体培养基, 作为空白对照。其它抗菌液组重复上述操作。在所有试管中分别加入 200 μ L 活化菌悬液, 塞上棉塞, 在 37 °C 培养 16 h, 观察试管中是否变浑浊, 若变浑浊则表明有菌落形成, 从没有明显菌落生长的试管中吸取 200 μ L 液体, 涂布在平板培养基上培养 24 h, 观察是否有菌落长出, 确定样品溶液 MIC。每组实验设 2 个重复, 取平均值。

1.3.4 协同效应试验

表 1 抗菌液成分分配比表

Table 1 Composition ratio table of antimicrobial solution

Samples	EO/%	TP/%
E	0.4	0
T	0	0.4
E/T	0.2	0.2
E/2T	0.133	0.267
2E/T	0.267	0.133

根据 MIC 实验结果确定的最小抑菌浓度, 以纯精油和茶多酚抗菌液为对照组, 将复合抗菌液 (E/T、E/2T、2E/T) 作为实验组。分别向 4.5 mL 的不同抗菌液中加入 0.5 mL 菌悬液, 搅拌 2 min, 混合均匀, 然后每组吸取 0.5 mL 注入到琼脂 LB 培养基中, 于 37 °C 生化培养箱中培养 14 h, 计算活菌落数, 每种抗菌液平行做三组求平均。各抗菌液成分分配比表如表 1。

$$\text{协同系数值} = \frac{\text{EO作用后细菌存活率} \times \text{TP作用后细菌存活率}}{\text{EO/TP共同作用后细菌存活率}}$$

式中: 存活率为 0 时, 按 0.0001% 计算^[23]。

1.3.5 抑菌圈试验

按 m(EO):m(TP)=2:1 配制总质量浓度分别为 0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0% 的复合抗菌液, 分别记为 2E/T-0.4、2E/T-0.6、2E/T-0.8、2E/T-1.0。

改进了 Kalembe^[24] 的抑菌圈法, 将 25 g LB 液体培养基粉末和 15 g 琼脂 LB 固体培养基粉末分别加到蒸馏水中定容至 1 L, 然后分装于锥形瓶中, 置于高温灭菌锅中, 高温灭菌 30 min, 冷却到 45 °C 后将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和副溶血性弧菌放入 LB 液体培养液中进行活化培养, 于 37 °C 摇床中培养 24 h, 另外将固体培养基置于 45 °C 恒温箱内备用。

向各培养皿内注入 15 mL~20 mL 的固体培养基 (约 45 °C), 然后取活化好的菌悬液等量加入培养皿中, 待其冷却凝固。

用滤纸 (直径 15 mm) 浸泡不同浓度的复合抗菌液, 滤掉多余的液体, 然后放在培养基表面, 然后放置在恒温 (37 °C) 摇床中培养 12 h。最后用十字交叉法观察透明抑菌圈直径, 并用游标卡尺记录, 每组各做 3 个平行样最后取平均。

判定标准: 抑菌圈大小与滤纸直径的差 >9 mm (极度敏感); 7~9 mm (高度敏感); 4~6 mm (中度敏感); 1~3 mm (低度敏感); <1 mm (不敏感), 抑菌圈直径与抑菌活性成正比。

1.3.6 抑菌持久性试验

选用最小抑制浓度的复合抗菌液探究其抑菌持久性, 用抑菌圈法将该复合抗菌液分别用滤纸片法贴于培养基表面, 观察每天不同特征菌的抑菌圈大小变化。

1.3.7 抗氧化性试验

1.3.7.1 DPPH 自由基清除率的测定

参考符群等^[25] 的方法, 略有改动。配制质量浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 及 1% 的 2E/T 复合抗菌液。配制 0.1 mmol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液, 量取 3 mL 于试管中, 加入 1 mL 不同配比的复合抗菌液, 立即混匀, 于室温条件下避光放置 30 min, 在 517 nm 波长下测定吸光值 A_1 ; 取 3 mL 无水乙醇和 1 mL 不同配比的复合抗菌液混合于室温条件下避光放置 30 min, 于 517 nm 波长下测定吸光值 A_2 ; 以无水乙醇代替复合抗菌液, 加入 3 mL DPPH 无水乙醇测定吸光值 A_0 , 每组平行 3 次。DPPH 自由基清除率 (K) 的计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right) \times 100\%$$

1.3.7.2 ABTS 自由基清除率的测定

参考孙世利等^[26]的方法略有改动, 配制终浓度为 7.4 mmol/L ABTS 和 2.6 mmol/L 过硫酸钾的混合液, 室温避光条件下静置过夜 (12 h), 制得 ABTS 自由基储存液, 使用时用 75%乙醇稀释至 734 nm 处吸光度为 0.70 (±0.05) 的应用液。0.1 mL 样品待测液加入 3.9 mL ABTS 应用液, 充分混合后置于室温下避光反应 6 min 后测定其在 734 nm 处的吸光度 (10 min 内吸光度稳定), 以蒸馏水代替样品液作为空白对照。每组平行 3 次。

$$\text{ABTS 自由基清除率} / \% = [(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$$

1.3.8 数据处理

数据结果采用 SPSS 26 进行方差分析, 显著性取 $p < 0.05$ 。采用 Microsoft Excel 2016 作图, 所有的数据均至少重复 3 次进行, 结果以平均值±标准差进行表示。

2 结果与讨论

2.1 不同抗菌液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度

表 2 不同抗菌液对大肠杆菌的最小抑菌浓度结果

Table 2 Results of the minimum inhibitory concentration of different antibacterial solutions to *E. coli*

样品种类	样品梯度总质量浓度/%				
	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
E	+	+	+	+	-
T	+	+	-	-	-
E/T	+	+	-	-	-
E/2T	+	+	-	-	-
2E/T	+	-	-	-	-

注: +表示有菌生长, -表示无菌生长。表 3 同。

表 3 不同抗菌液对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度结果

Table 3 Results of the minimum inhibitory concentration of different antibacterial solutions to *S. aureus*

样品种类	样品梯度总质量浓度/%				
	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
E	+	+	-	-	-
T	+	+	-	-	-
E/T	+	+	-	-	-
E/2T	+	+	-	-	-
2E/T	+	-	-	-	-

不同抗菌液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度实验结果如表 2 和 3 所示。由表 2 可知, 纯精油组对大肠杆菌的最小抑菌浓度大于 0.8%, T、E/T 和 E/2T 抗菌液对大肠杆菌的最小抑菌浓度均为 0.4%, 2E/T 抗菌液对大肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.2%。显然 2E/T 组对大肠杆菌的抑制作用最强。

由表 3 可知, E、T、E/T、E/2T 抗菌液对金黄色葡萄球菌的最小抑制浓度均为 0.4%, 而 2E/T 抗菌液对金黄色葡萄球菌的最小抑制浓度为 0.2%。由表 2 和表 3 可知, 丁香精油抗菌液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果最差, T、E/T 和 E/2T 抗菌液的抑菌效果相似, 2E/T 抗菌液的抑菌效果最好; 并且抗菌液对金黄色葡萄球菌的抑制效果要好于对大肠杆菌的抑制效果, 这与刘倩等^[6]的研究结果一致。刘倩等得出精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 0.5% 和 0.3%, 与本实验结果接近。综合考虑, 确定丁香精油/茶多酚复合抗菌液的最小抑菌浓度为 0.4%, 而且当 E:T=2:1 时, 复合抗菌液的最小抑菌浓度为 0.2%。

2.2 精油与茶多酚对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的协同抑菌作用

表 4 不同抗菌液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的协同效果和抑菌率大小

Table 4 Synergistic effects and bacteriostatic rate of different antibacterial solutions against *E. coli* and *S. aureus*

Samples	抑菌率/%		协同系数	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	E	68.91	52.70	-
T	81.93	44.47	-	-
E/T	97.90	73.78	2.67	1.00
E/2T	96.64	66.84	0.70	0.79
2E/T	98.74	74.81	4.46	1.04

选择浓度为 0.4% 的抗菌液, 考察丁香精油和茶多酚的协同抑菌效果, 不同抗菌液的抑菌率及其协同系数结果列列表 4 和图 1。由表 4 可知, 复合抗菌液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用明显好于单一抗菌液, 其中抑菌率最高的 2E/T 抗菌液对两种菌株的抑菌率分别为 98.74% 和 74.81%。由抑菌率的结果可知, 抗菌液对大肠杆菌的抑菌率明显高于对金黄色葡萄球菌的抑菌率, 即对大肠杆菌的杀菌效果要优于对金黄色葡萄球菌的杀菌效果, 这与上述最小抑菌浓度的实验结果不一致。这可能是因为大肠杆菌的对数生长期比金黄色葡萄球菌的短^[27], 由于最小抑菌浓度实

实验的抑菌处理时间 (24 h) 大于协同效应实验的时间 (14 h), 早期被杀死的大肠杆菌在抗菌液的抑菌性减弱后 (抗菌液的抑菌性随时间而变化) 再次繁殖, 从而导致最小抑菌浓度的实验结果与抑菌率实验结果相悖。

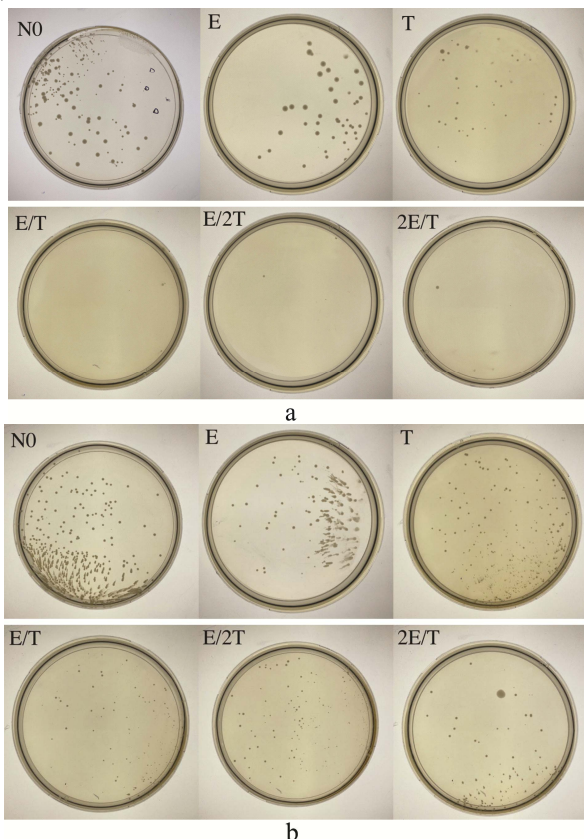


图1 不同抗菌液对大肠杆菌 (a) 和金黄色葡萄球菌 (b) 的杀菌效果

Fig.1 The bactericidal effect of different antibacterial solutions on *E. coli* (a) and *S. aureus* (b)

由表 4 可知, EO 与 TP 复合对大肠杆菌具有较强的协同作用, 而对金黄色葡萄球菌仅在 2E/T 时具有协同效应, 推测其协同抗菌的原因可能是丁香精油与茶多酚均能通过破坏细胞壁而影响细胞膜的通透性达到共同抑菌的作用^[28]。与 E/T、E/2T 抗菌液相比, 相同总浓度下, 丁香精油含量更高的 2E/T 复合抗菌液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的协同系数和抑菌率更高。因此, 本实验将 2E/T 作为抑制腐败菌种的最佳复合抗菌液。任艳丽等^[29]通过三因素二次通用旋转设计计算出茶多酚 (2.78%)、丁香精油 (0.66%) 和乳酸链球菌素 (0.033%) 进行复合得到的防腐液抑菌效果最佳, 与本文协同抗菌结果不同的是, 当乳酸链球菌素存在时, 其复合抗菌液中茶多酚的含量最高, 这可能是因为乳酸链球菌素提供了较高的抑菌作用而导致对丁香精油的含量降低。Wang 等^[30]研究发现, 当茶多酚和曲酸按 1:1 复合时, 两者对鱼类腐败菌种具有较强的

协同抑菌作用。Sharma 等^[31]研究发现香茅精油、曲松精油、长叶精油和黄花精油之间对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有协同抑制作用, 且可以显著降低它们的活性剂量, 但未对精油与茶多酚的协同作用进行研究。

2.3 不同浓度的复合抗菌液对鱼类特征腐败菌的抑菌效果

不同浓度的复合抗菌液对副溶血性弧菌 (*V. Parahemolyticus*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小如表 5 和图 2 所示。

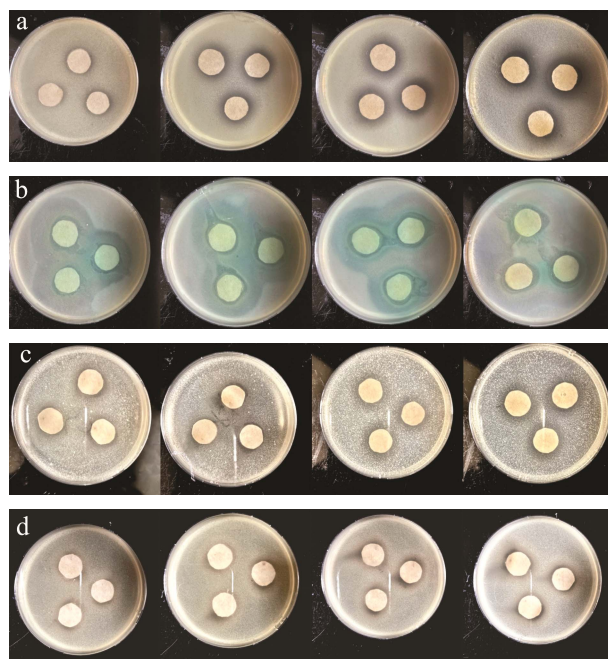


图2 不同浓度复合抗菌液对副溶血性弧菌 (a)、铜绿假单胞菌 (b)、大肠杆菌 (c) 和金黄色葡萄球菌 (d) 的抑菌圈大小

Fig.2 The zone of bacteriostatic circle of *V. Parahemolyticus* (a), *P. aeruginosa* (b), *E. coli* (c) and *S. aureus* (d) under different concentrations of compound antibacterial solutions

注: 复合抗菌液组从左至右依次是 2E/T-0.4、2E/T-0.6、2E/T-0.8、2E/T-1.0。

由表 5 和图 2 可知, 随着复合抗菌液总浓度的提高, 对所有菌种的抑制能力均逐渐增大。复合抗菌液总质量浓度在 0.4% 时对四种菌种的抑制效果均为低度敏感, 而在 0.6% 甚至更高浓度的情况下, 对鱼产品特征腐败菌 (铜绿假单胞菌和副溶血性弧菌) 的抑菌效果都已经达到了极度敏感, 推测其原因可能是因为茶多酚可以抑制铜绿假单胞菌中蛋白质的合成与表达, 影响了酶的催化活性及其细胞结构的组成, 导致细菌丧失正常的生理活性^[32], 而且 EO 和 TP 均可

以破坏副溶血性弧菌细胞膜的结构,使其细胞的通透性增加,从而影响细胞结构的新陈代谢活动导致其死亡^[33]。复合抗菌液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果均处于中等敏感级别,且对大肠杆菌的抑菌效果好于对金黄色葡萄球菌的抑菌效果,与抑菌率实验结果一致,两者抑菌观察时间接近。余小亮等^[19]

研究发现茶多酚与肉桂精油按 1:1 复合时获得的复合抗菌液浓度在 0.4%~1.0% 时,对金黄色葡萄球菌的抑制能力也处于中度敏感级别,与本实验中丁香精油/茶多酚复合抗菌液对金黄色葡萄球菌的抑菌效果相似。综合考虑,2E/T 抗菌液的质量浓度为 0.6% 时,抑菌效果最佳。

表 5 复合抗菌液的浓度对不同菌种抑菌圈大小的影响

Table 5 Effect of concentration of compound antimicrobial solution on the size of inhibition zone of different bacterial species

Samples	Zone of inhibition in /mm			
	<i>V. Parahaemolyticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
2E/T-0.4	17.03±0.63 ^a	18.21±0.36 ^b	18.02±0.63 ^b	18.01±0.09 ^b
2E/T-0.6	24.12±0.28 ^a	20.15±0.57 ^b	20.14±0.11 ^b	19.08±0.51 ^b
2E/T-0.8	26.24±0.35 ^a	22.04±0.38 ^b	21.22±0.45 ^c	20.05±0.05 ^c
2E/T-1.0	28.15±0.21 ^a	23.11±0.26 ^b	22.18±0.51 ^c	21.21±0.33 ^c

注: a, b, c 表示同种抗菌液处理下不同菌种抑菌圈之间的显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.4 复合抗菌液对不同菌种的抑菌持久性结果

果

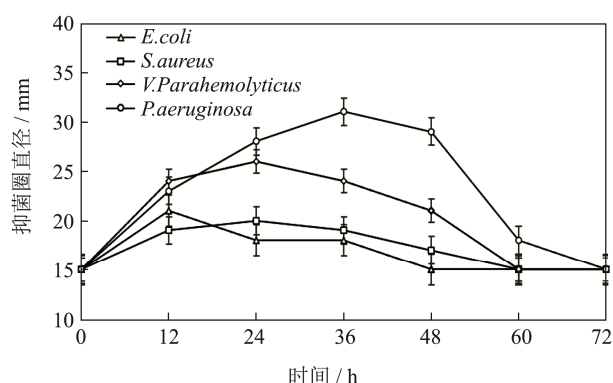


图 3 最佳协同比下复合抗菌液对不同菌种的生长抑制曲线

Fig.3 Growth inhibition curves of different antibacterial solution on different strains under optimal synergetic ratio

最佳协同比下,质量浓度为 0.6% 的复合抗菌液对不同菌种的生长抑制曲线如图 3 所示。由图 3 可知,随着培养时间的延长,2E/T-0.6 对所有菌种的抑制曲线均是先增后减。复合抗菌液对铜绿假单胞菌的抑制性最强,在 36 h 达到最大值 30 mm,至 72 h 才对其失去效力。其次是副溶血性弧菌,在 24 h 达到抑菌圈最大值,然后抑菌能力开始逐渐下降,直至 60 h 时对副溶血性弧菌失去效力。复合抗菌液对金黄色葡萄球菌抑制效果最大的时候也是在第 24 h,然后逐渐下降至 60 h 时失去效力。复合抗菌液对大肠杆菌的抑制能力在 12 h 达到最高,且仅在前 16 h 左右的时间段时,大肠杆菌的抑菌圈略大于金黄色葡萄球菌,这与协同效应实验的结果相符。因此 2E/T-0.6 对铜绿假单胞菌具有最高的抑菌效力,对副溶血性弧菌的抑制效果

次之,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果相对较弱;对铜绿假单胞菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的有效抑菌时间分别为 72 h、60 h、60 h 和 48 h。由此发现 2E/T-0.6 复合抗菌液对铜绿假单胞菌的抑制效果最好,推测原因可能是因为复合抗菌液中的多酚对铜绿假单胞菌的细胞膜蛋白破坏程度更强,因为多酚类抗菌剂对不同细菌的抑制能力大小取决于细菌对多酚的耐受力,而细菌对多酚的耐受力又取决于细菌的种类和多酚的结构^[34,35]。茶多酚的结构基础主要为多酚基及多环结构,它对生物大分子如脂类、蛋白质、碳水化合物和核酸有高度的亲和力,以致可以破坏细菌细胞膜的结构^[36]。仪淑敏等^[37]也研究证实了茶多酚使破坏铜绿假单胞菌的代谢发生紊乱,显著破坏铜绿假单胞菌的膜蛋白。刘文伟等^[38]研究发现茶多酚对副溶血性弧菌的抑制效果约为 36 h,由此可知,茶多酚与丁香精油进行复合后,其协同效应显著提高了抗菌液对副溶血性弧菌的抑制时长。

2.5 抗氧化性试验结果

2.5.1 2E/T-0.6 对 DPPH 自由基的清除能力

抗氧化性的大小可以用抗氧化物质监测体系中 (DPPH) 的自由基清除能力来反应和表征。浓度对 2E/T 复合抗菌液 DPPH 自由基清除率的影响结果如图 4 所示。由图 4 可知,复合抗菌液的 DPPH 自由基清除率随着浓度的增加而缓慢增加,当质量浓度为 0.6% 时,达到 86.68%,浓度进一步增加后,DPPH 自由基清除率基本稳定不变。孙伟等^[39]研究发现丁香精油的抗氧化作用在 80% 左右。余小亮等^[19]研究的茶多酚与肉桂精油按 1:1 配制的复合保鲜剂 (6 $\mu\text{g/mL}$) 的 DPPH 清除率为 66.23%,由此可知,该复合抗菌液具有更强

的抗氧化性,推测原因可能是 TP 在发挥抗氧化作用后产生的游离基与精油相互作用产生新的酚类物质继续发挥作用,从而增强了 DPPH 自由基的清除效果^[32]。

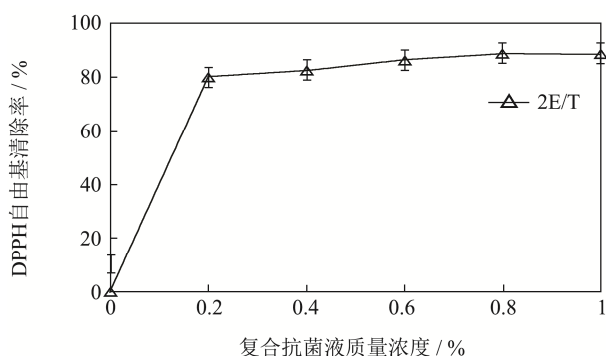


图4 不同总浓度的复合抗菌液对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 Effect of different total concentration of compound antibacterial solutions on DPPH free radical clearance rate

2.5.2 2E/T-0.6 对 ABTS 自由基的清除能力

ABTS 易被氧化剂氧化成绿色的 $ABTS^+$, 而当有抗氧化物存在时, $ABTS^+$ 的形成就会被抑制, 且在 734 nm 处有最大吸收值, 因此在 734 nm 处测定吸光度即可计算出抗氧化物的总抗氧化能力^[40]。浓度对 2E/T 复合抗菌液 ABTS 自由基清除率的影响结果如图 5 所示。由图 5 可知, 复合抗菌液的 ABTS 自由基清除率随着浓度的增加而缓慢增加, 当质量浓度为 0.6% 时, 达到 81.26%, 继续增加浓度, ABTS 自由基清除率基本保持不变, 无显著性差异。韦芳媚等^[41]研究发现 0.6% 的茶多酚对 ABTS 自由基清除率在 80% 左右, 因此本文的复合抗菌液可以增强茶多酚的抗氧化能力。

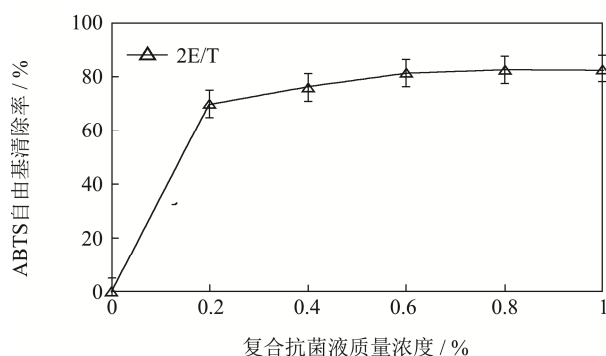


图5 不同总浓度的复合抗菌液对 ABTS 自由基清除率的影响

Fig.5 Effect of different total concentration of compound antibacterial solutions on ABTS free radical clearance rate

3 结论

本研究以丁香精油与茶多酚为原料, 得到一系列的复合抗菌液。研究发现, 当丁香精油与茶多酚的质量比为 2:1 时, 两者协同作用最佳, 对大肠杆菌的协同系数为 4.46, 对金黄色葡萄球菌的协同系数为 1.04,

且 2E/T 复合抗菌液的 MIC 为 0.2%。该复合抗菌液对养殖鱼产品的特征腐败菌种 (铜绿假单胞菌和副溶血性弧菌) 具有良好的抑制作用。当复合抗菌液的质量浓度为 0.6%, 对铜绿假单胞菌和副溶血性弧菌的抑制时间分别为 72 h 和 60 h。复合抗菌液具有很好的抗氧化性能, 当质量浓度为 0.6%, DPPH 自由基清除率可达 86.68%, ABTS 自由基清除率可达 81.26%, 下一步将通过探讨不同菌种在复合抗菌液处理下的代谢变化、膜结构变化和蛋白质表达等揭示复合抗菌液对腐败菌种的抑菌机理, 并将其应用于鱼类抗菌保鲜领域。

参考文献

- [1] Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria - problems and solutions [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 262-266
- [2] Cheng J H, Sun D W. Rapid and non-invasive detection of fish microbial spoilage by visible and near infrared hyperspectral imaging and multivariate analysis [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 62(2): 1060-1068
- [3] Gomez-Estaca J, Lacey A L D, Lopez-Caballero M E, et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation [J]. Food Microbiology, 2010, 27(7): 889-896
- [4] Yuan G, Chen X, Li D. Chitosan films and coatings containing essential oils: the antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems [J]. Food Research International, 2016, 89(pt.1): 117-128
- [5] 赵冉冉. 中草药抗菌膜的制备及性能研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017
ZHAO Ran-ran. Study on preparation and properties of Antibacterial membrane of Chinese herbal medicine [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017
- [6] 刘倩. 孜然、花椒、肉桂精油复配冷鲜羊肉保鲜效果的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019
LIU Qian. Study on the preservation effect of cumin, prickly ash and cinnamon essential oil combined with cold fresh mutton [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019
- [7] P López, C Sánchez, Batlle R, et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(17): 6939-6946
- [8] Hafsa J, Smach M A, Med Raáfet Ben Khedher, et al. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing eucalyptus globulus essential oil [J]. LWT - Food Science and Technology, 2016

- [9] 黄酒.复配精油的筛选及抗菌膜的制备研究[D].杭州:浙江工商大学,2019
HUANG Sa. Study on the screening of compound essential oil and preparation of antibacterial film [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2019
- [10] Pandey R, Ter B A, Vischer N O. Quantitative analysis of the effect of specific tea compounds on germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores at single cell reagents [J]. Food Microbiology, 2015, 45(10): 63-70
- [11] 杨俊.茶多酚 EGCG 抑制拟态弧菌生物膜和毒力的研究[D].武汉:武汉轻工大学,2019
YANG Jun. Inhibition of *Vibrio mimicus* biofilm and virulence by tea polyphenol EGCG [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2019
- [12] 蓝蔚青,谢晶,赵海鹏,等.茶多酚对冷藏带鱼保鲜效果的比较研究[J].湖北农业科学,2010,49(1):159-161
LAN Wei-qing, XIE Jing, ZHAO Hai-peng, et al. Comparison research on the fresh-keeping effect of tea polyphenols on *Trichiurus haumela* under the cold storage [J]. Hubei Agricultural Science, 2010, 49(1): 159-161
- [13] 马慧,茹鑫,王津,等.4 种茶叶水提物及茶多酚的体外抗氧化性能研究[J].食品研究与开发,2019,40(8):65-70
MA Hui, RU Xin, WANG Jin, et al. Study on antioxidant properties of four tea extracts and tea polyphenols *in vitro* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 40(8): 65-70
- [14] Li T, Li J, Hu W, et al. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives[J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3):821-826
- [15] 唐煜括,左聪聪,李佳笑,等.汉中仙毫茶多酚与维生素 C 抗氧化及抑菌活性的协同作用[J].食品科学技术学报,2017, 35(3):55-60
TANG Yu-kuo, ZUO Cong-cong, LI Jia-xiao, et al. Synergistic effects of Chinese Xianhao tea polyphenols with antioxidant and antibacterial activities of vitamin C [J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 35(3): 55-60
- [16] 王帆,杨静东,王春梅,等.复配植物源杀菌剂的开发研究[J].江西农业学报,2010,22(2):87-89
WANG Fan, YANG Jing-dong, WANG Chun-mei, et al. Study on the development of compound fungicides of plant origin [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2010, 22(2): 87-89
- [17] 吕飞.生物抗菌包装体系及其对黑鱼品质影响的研究[D].杭州:浙江大学,2009
LYU Fei. Study on biological antibacterial packaging system and its effect on quality of snakehead [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009
- [18] Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y, et al. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester [J]. Food Microbiology, 2004, 21: 283-289
- [19] 余小亮,陈舜胜,俞三月,等.茶多酚-肉桂精油复合保鲜剂抗氧化活性及抑菌作用[J].食品工业科技,2017,38(22):226-230,245
YU Xiao-liang, CHEN Shun-sheng, YUN San-yue, et al. Antioxidant activity and bacteriostatic effect of tea polyphenol-cinnamon essential oil composite preservative [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(22): 226-230, 245
- [20] Bozariar I S, Parlapani F F. Specific spoilage organisms (SSOs) in fish [J]. The Microbiological Quality of Food, 2017: 61-98
- [21] 朱艳静,李宇.测定菌体浓度的简便方法[J].工业微生物, 2006,36(4):47-49
ZHU Yan-jing, LI Yu. Simple method for determination of bacterial concentration [J]. Industrial Microbiology, 2006, 36(4): 47-49
- [22] Mathela C, Joshi S. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil and its constituents furanodienone and curzerenone from *Lindera pulcherrima* (Nees.) Benth. ex hook. F [J]. Pharmacognosy Research, 2012, 4(2): 80-84
- [23] 聂绍发,朱桂宝,林天晖,等.新洁尔灭与戊二醛协同杀菌作用的实验研究[J].同济医科大学学报,2001,1:50-52
NIE Shao-fa, ZHU Gui-bao, LIN Tian-hui, et al. Experimental study on the synergistic bactericidal action of neogermine and glutaraldehyde [J]. Acta Universitatis Medicinæ Tongji, 2001, 1: 50-52
- [24] Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils [J]. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10(10): 813-829
- [25] 符群,徐明慧,王振宇.红松种鳞多酚超声波辅助提取优化工艺及其抗氧化性研究[J].北京林业大学学报,2015,37(11): 128-135
FU Qun, XU Ming-hui, WANG Zhen-yu. Optimization of ultrasonic assisted extraction of polyphenols from *Pinus bunge* and its antioxidant properties [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(11): 128-135
- [26] 孙世利,刘淑媚,赵超艺,等.茶多酚与维生素 C/E 的协同抗氧化作用研究[J].广东农业科学,2013,40(1):96-98
SUN Shi-li, LIU Shu-mei, ZHAO Chao-yi, et al. Research on the synergistic anti-oxidative effects of tea polyphenols and

- vitamin C/E [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(1): 96-98
- [27] 索相敏.三种昆虫抗菌物质的诱导及抑菌活性研究[D].保定:河北农业大学,2006
SUO Xiang-min. Study on induction and antibacterial activity of three insect antibacterial substances [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2006
- [28] 余小亮.复合生物保鲜剂保鲜机理及对鲈鱼冷藏过程中品质变化的研究[D].上海:上海海洋大学,2018
YU Xiao-liang. Preservation mechanism of compound biological preservatives and the changes in quality of perch during chilled storage [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018
- [29] 任艳丽.天然防腐剂在熟肉制品防腐中的应用[D].成都:西华大学,2007
REN Yan-li. Use of natural preservatives to prolong the shelf life of meat product [D]. Chengdu: Xihua University, 2007
- [30] Wang R, Hu X, Agyekumwaa A, et al. Synergistic effect of kojic acid and tea polyphenols on bacterial inhibition and quality maintenance of refrigerated sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets [J]. LWT, 2021, 137: 110452
- [31] Kanika S, Sanjay G, Vijay K, et al. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 154: 112569
- [32] 钱丽红,陶妍,谢晶.茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J].微生物学通报,2010,37(11):1628-1633
QIAN Li-hong, TAO Yan, XIE Jing. Antibacterial mechanism of tea polyphenols against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Microbiology China, 2010, 37(11): 1628-1633
- [33] 吴伟华.几种天然食用成分对副溶血性弧菌的协同抑菌效果及其损伤机理[D].上海:上海海洋大学,2013
WU Wei-hua. Synergistic inhibitory effect of several natural edible ingredients on *Vibrio parahaemolyticus* and its damage mechanism [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013
- [34] Campos F M, Couto J A, Hogg T A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94: 167-174
- [35] Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food - borne disease [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27: 1965-1969
- [36] 吴勇.茶多酚作用的分子机理与闽东绿茶发展前景[J].茶叶科学技术,2008,2:40-43
WU Yong. Molecular mechanism of tea polyphenols and development prospect of green tea in eastern Fujian [J]. Tea Science and Technology, 2008, 2: 40-43
- [37] 仪淑敏,王崑,励建荣,等.茶多酚对假单胞菌抑菌机理研究[J].渤海大学学报(自然科学版),2011,32(4):376-382
YI Shu-min, WANG Wei, LI Jian-rong, et al. Study on the bacteriostatic mechanism of tea polyphenols against pseudomonas [J]. Journal of Bohai University (Natural Science Edition), 2011, 32(4): 376-382
- [38] 刘文伟,沈晓盛,刘承初.茶多酚对泥蚶中副溶血性弧菌的抑制效果[J].食品与发酵工业,2010,36(5):41-44
LIU Wen-wei, SHEN Xiao-sheng, LIU Cheng-chu. Inhibitory effect of tea polyphenols on *Vibrio parahaemolyticus* in *Tegillarca granosa* [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(5): 41-44
- [39] 孙伟.16种芳香植物精油抗氧化活性的比较研究[J].食品科技,2004,11:54-51
SUN Wei. A comparative study on antioxidant activity of 16 aromatic plant essential oils [J]. Food Science and Technology, 2004, 11: 54-51
- [40] 马慧,茹鑫,王津,等.4种茶叶水提物及茶多酚的体外抗氧化性能研究[J].食品研究与开发,2019,40(8):65-70
MA Hui, RU Xin, WANG Jin, et al. Study on the antioxidant capacity of four tea water extracts and tea polyphenols *in vitro* [J]. Food Research and Development, 2019, 40(8): 65-70
- [41] 韦芳媚.桑叶提取物、茶多酚及其复配物的抗氧化和降血糖活性[D].广州:华南理工大学,2019
WEI Fang-mei. Antioxidant and hypoglycemic activities of mulberry leaves extract, tea polyphenols and their compounds [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019