

陶鸿伟, 孟苓凤, 张建岭, 等. 复配植物精油的协同抗菌活性及作用机制[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(7): 1429-1437.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.07.019

复配植物精油的协同抗菌活性及作用机制

陶鸿伟^{1,2}, 孟苓凤³, 张建岭³, 郭晓飞³, 解晓³, 江居立³, 王洪新^{1,2}, 娄在祥^{1,2}

(1. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 山东省胶类中药技术创新中心/东阿阿胶股份有限公司, 山东 东阿 252201)

摘要: 鉴于植物精油的优良抑菌性能, 为突破单一植物精油在食品保鲜领域抑菌剂应用中的局限性, 本研究评价了 10 种植物精油的抗菌活性, 并探讨了其复配使用的协同效应。采用滤纸片法和棋盘稀释法, 筛选出具有协同抗菌作用的精油组合, 考察了其在不同温度和紫外线照射时间下的抗菌稳定性, 并进一步以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为供试菌, 探究了其抗菌机制。结果表明, 肉桂精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉的最小抑菌含量(MIC)分别为 4.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、8.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、4.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 而山苍子精油的 MIC 则分别为 32.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、32.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。肉桂与山苍子精油以 4:6 (体积比) 复配时展现出显著的协同抗菌作用, 抑菌圈直径超过 26.00 mm。该复合精油在热处理和紫外线照射下能保持良好的抗菌稳定性。相较于单一精油, 复合精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果更佳, 其中大肠杆菌中核酸和蛋白质的泄漏量分别较山苍子精油处理增加 3.11 倍和 2.03 倍, 表明复合精油能破坏供试菌的细胞膜并影响其通透性。本研究结果为复合植物精油应用于食品工业提供了理论基础与科学佐证。

关键词: 复合植物精油; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 抑菌稳定性; 抑菌机理

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)07-1429-09

Synergistic antimicrobial activity and mechanism of action of composite plant essential oils

TAO Hongwei^{1,2}, MENG Lingfeng³, ZHANG Jianling³, GUO Xiaofei³, XIE Xiao³, JIANG Julì³, WANG Hongxin^{1,2}, LOU Zaixiang^{1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Key Laboratory of Food Science and Resource Mining, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Shandong Provincial Technology Innovation Center of Gelatine Traditional Chinese Medicine/Dong'e Ejiao Co., Ltd., Dong'e 252201, China)

Abstract: Given the outstanding antimicrobial activity of plant essential oils and the need to overcome the limitations of single essential oils in food preservation, this study evaluated the antibacterial potential of ten essential oils and explored the synergistic effects of their combinations. The disc-diffusion method and checkerboard dilution method were employed to screen for synergistic pairs, and their antimicrobial stability was further assessed under different temperatures and ultraviolet (UV) irradiation durations. The underlying mechanisms were investigated using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as test organisms. The results showed that cinnamon essential oil exhibited minimum inhibitory concentrations (MICs) of

4.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 8.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 4.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against *E. coli*, *S. aureus* and *Aspergillus niger*, respectively, whereas *Litsea cubeba* essential oil showed MICs of 32.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 32.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively. A mixture of cinnamon and *L. cubeba* oils with the volume ratio of 4:6 exhibited a prominent synergistic antibacterial effect, and the

收稿日期: 2024-12-06

作者简介: 陶鸿伟(2000-), 女, 湖北十堰人, 硕士研究生, 研究方向为天然成分抗菌与食品保鲜。(E-mail) hongweiTao0718@163.com

通讯作者: 娄在祥, (E-mail) louzaixiang@126.com

inhibitory circle measured more than 26.00 mm in diameter. The composite essential oil retained good antibacterial stability after heat treatment and UV exposure. Compared with the single essential oil, the composite formulation displayed better inhibition of *E. coli* and *S. aureus*. Compared with *L. cubeba* essential oil treatment, the leakage of nucleic acids and proteins of *E. coli* under composite formulation treatment increased by 3.11 times and 2.03 times, respectively. These results indicated that the composite essential oil can disrupt bacterial membranes and affect their permeability. The findings provide a theoretical basis and scientific support for the application of composite plant essential oils in the food industry.

Key words: composite plant essential oils; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; bacteriostatic stability; bacteriostatic mechanism

食品保鲜是确保食品品质、延长食品货架期和维持消费者健康的关键^[1]。化学合成防腐剂在食品工业中广泛用于抑制微生物生长^[2]、抑制酶活性和防止氧化。然而,随着对食品中合成防腐剂可能对健康产生不良影响的担忧日益增加,消费者对于含有这些成分的产品接受度正在下降^[3]。天然防腐剂的来源多种多样,包括植物、动物、细菌、藻类和真菌^[4-5]。作为一种源自天然植物的次生代谢产物,植物精油已被证实能有效抑制食源性病原体和腐败微生物^[6-7],是化学防腐剂的环保替代品^[8]。刘晓丽等^[9]在4℃下用肉桂精油保存冷鲜牛肉,发现冷鲜牛肉的贮藏期延长至10~20 d甚至更长。王清瑶等^[10]将茶树精油应用于冷鲜猪肉的保鲜,发现茶树精油可延长冷鲜猪肉的货架期3 d左右。

单独使用某一种精油在保鲜方面的效果存在一定的限制,如精油因其不稳定、具有高挥发性且不溶于水而使用受限^[11],Turek等^[12]发现,光的影响很容易导致迷迭香精油化学成分发生变化,且随着储存时间的延长及温度升高植物精油中的主要成分含量会减少。将不同种类的精油进行混合搭配,一方面可以互相补充不足,拓宽抑制菌种的覆盖范围,从而更全面地抑制食源性腐败菌和致病菌的生长与繁殖;另一方面,现有研究表明,不同精油的组合可能因为增加了抑制和杀灭微生物的途径,而达到协同的抗菌效果^[13-14]。陈泳琪等^[15]发现当牛至精油:百里香精油:肉桂精油=1:2:4(体积比)时制备的复配植物精油可有效抑制草鱼在贮藏期13 d时微生物的生长,结合真空包装可将鱼肉的保质期由6 d延长至13 d以上。基于以上背景,本研究拟采用滤纸片法对10种常用植物精油进行筛选,并对具有显著抗菌活性的精油进行最小抑菌含量(MIC)和最小杀菌含量(MBC)测定,以期得到抑菌效果良好的单一植物精油。采用棋盘稀释法确定复合精油的种类及最佳体积比,对该复合精油在不同温度条

件及不同时间的紫外线照射下的稳定性进行评估,并进一步以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为受试菌种,探究复合精油的抑菌机理。本研究结果可为植物精油作为天然抑菌剂在阿胶产品及其他领域的应用提供有益的参考和思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桉树精油、薄荷精油、茶树精油、丁香精油、肉桂精油、牛至精油、生姜精油、百里香精油、山苍子精油、八角茴香精油等均购自吉安市中香天然植物有限公司,购买后于避光室温环境下保存。氯化钠(分析级)、吐温-80(化学级)均购自国药集团化学试剂有限公司;试验用水为超纯水。

大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)购于广东省微生物菌种保藏中心;黑曲霉(*Aspergillus niger*, ATCC 16404)购于上海鲁微科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液的制备 参照胡虹等^[16]的方法制备活化菌悬液,并稍作修改。分别将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌于伊红美蓝琼脂培养基(EMB)和甘露醇氯化钠琼脂培养基中进行活化(37℃、24~28 h),黑曲霉则置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基中进行活化(28℃、3~5 d)。挑取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的典型菌落接种于无菌的脑心浸出液肉汤(MH肉汤)培养基、脑心浸出液(BHI)培养基中,置于37℃摇床中培养18~24 h,离心后重悬3次。通过紫外分光光度计测定菌液于600 nm处的吸光值(OD_{600}), $OD_{600} = 1.00 \pm 0.05$ 时含菌数约为 1×10^8 CFU/mL,将菌液用液体培养基倍比稀释至 1×10^6 CFU/mL备用。向培养基内添加5 mL无菌水,轻柔吹打并振荡混匀,重复3次。利用无菌离心管收集无菌纱布过

滤后的黑曲霉孢子悬浮液,调整孢子悬浮液含量为 1 mL $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个,置于 4 °C 条件下备用。

1.2.2 植物精油抑菌活性的测定 通过纸片扩散法对供试精油进行抑菌活性评价,选出抑菌效果较好的精油。向平板内倾注约 25 mL 的固体培养基,待其凝固后使用涂布棒将制备所得菌悬液均匀涂布在固体培养基表面,将载有 5 μ L 待测精油的滤纸片置于固体培养基表面,以装载有无菌生理盐水的滤纸片为空白对照。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌于 37 °C 下培养 24 h,黑曲霉于 28 °C 下培养 48 h。培养结束后,对带菌平板的抑菌圈直径进行测量,重复 3 次并计算平均值。

1.2.3 植物精油最小抑菌含量及最小杀菌含量的测定 采用二倍稀释法对 1.2.2 中筛选出的几种具有良好抑菌活性的精油 (EOs) 进一步测试,旨在精确测定这些精油的 MIC 及 MBC。以吐温-80 作为稀释剂,将几种精油分别稀释至 1 280 μ L/mL、640 μ L/mL、320 μ L/mL、160 μ L/mL、80 μ L/mL、40 μ L/mL、20 μ L/mL、10 μ L/mL。在无菌条件下,取 0.5 mL 稀释后的精油样品加入含有 4.5 mL 液体培养基的试管中,振荡混匀,使试管中最终精油含量分别为 128 μ L/mL、64 μ L/mL、32 μ L/mL、16 μ L/mL、8 μ L/mL、4 μ L/mL、2 μ L/mL、1 μ L/mL,空白对照组加入 0.5 mL 吐温-80。将分别加入 100 μ L 待测菌种菌悬液的上述试管于摇床中振荡混匀后恒温培养,其中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌于 37 °C 下培养 24 h,黑曲霉于 28 °C 下培养 48 h。培养结束后若试管中的液体培养基呈现完全清澈透明状态,则视为无菌生长,并将此含量记录为最低抑菌含量。随后,对外观澄清透明的试管液体再次进行培养,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌于 37 °C 下培养 24 h,黑曲霉于 28 °C 下培养 48 h。再次观察时,将试管中的液体培养基保持完全清澈透明时的最低精油含量确定为最低杀菌含量。重复 3 次,计算平均含量。

1.2.4 复合精油抑菌活性的研究 根据 1.2.2 和 1.2.3 中的试验结果,初筛后选择抑菌效果较好的精油进行两两复配,测试精油在抑制病原微生物生长繁殖方面是否存在协同效果。通过棋盘稀释法选取 9 支空试管进行试验,按照 3 \times 3 方阵排布,以吐温-80 为稀释剂,按照预定的含量梯度对精油 A 和精油 B 进行适当稀释。向每个试管中加入 4.50 mL 培养基后分别添加 0.25 mL 的精油 A 和 0.25 mL

的精油 B,以确保方阵各试管中精油 A、精油 B 的最终含量符合表 1 所示的配置。将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在 37 °C 条件下培养 24 h,黑曲霉在 28 °C 下培养 48 h。培养结束后,按照 1.2.3 中的方法对每支试管中的菌种生长状况进行 3 次重复检验。采用分级抑菌浓度指数 (FIC) 来评估复配精油的协同增效性。若 $FIC \leq 0.500$,表明存在协同效应;若 $0.500 < FIC < 1.000$,则表现为相加效应;若 $1.000 \leq FIC < 2.000$,则意味着其作用效果为无关^[17]。

根据公式(1)计算不同精油联用的 FIC^[18]。

$$FIC = \frac{MIC_{A\text{联}}}{MIC_{A\text{单}}} + \frac{MIC_{B\text{联}}}{MIC_{B\text{单}}} \quad (1)$$

式中, $MIC_{A\text{单}}$ 为精油 A 单用时的 MIC, $MIC_{B\text{单}}$ 为精油 B 单用时的 MIC, $MIC_{A\text{联}}$ 为精油 A 联用时的 MIC, $MIC_{B\text{联}}$ 为精油 B 联用时的 MIC。

表 1 棋盘稀释法方阵

Table 1 Square diagram of the checkerboard dilution method

方阵 1	方阵 2	方阵 3
A_1B_1	A_1B_2	A_1B_3
A_2B_1	A_2B_2	A_2B_3
A_3B_1	A_3B_2	A_3B_3

$A_1 = \frac{1}{2} MIC_A; A_2 = \frac{1}{4} MIC_A; A_3 = \frac{1}{8} MIC_A; B_1 = \frac{1}{2} MIC_B; B_2 = \frac{1}{4} MIC_B; B_3 = \frac{1}{8} MIC_B$ 。式中, MIC 为最小抑菌含量, MIC_A 为精油 A 单用时的 MIC, MIC_B 为精油 B 单用时的 MIC。

1.2.5 复合精油最佳复配体积比的测定 以筛选后的精油 A、精油 B 为主要原料,经初步试验后,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉为测试菌,按照 1.2.2 中的方法,测定精油 A、精油 B 体积比为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 时的抑菌圈大小,获得最佳复合精油配比。

1.2.6 复合精油抑菌稳定性测定

1.2.6.1 温度对复合精油抑菌稳定性的影响 为考察不同温度条件下复合精油抗菌效果的变化,将复合精油分别暴露于 40 °C、60 °C、80 °C、100 °C、120 °C 的环境中 30 min,同时以室温 (25 °C) 下的复合精油为对照。按照 1.2.2 中方法,测定各样品的抑菌圈直径变化,以此评估温度对复合精油抑菌效果的影响。

1.2.6.2 紫外线照射对复合精油抑菌稳定性的影响

为探究紫外线照射时间对精油抑菌活性的影响,将复合精油于超净台紫外环境中分别照射 40 min、

80 min、120 min、160 min、200 min,以未经紫外线照射处理的复合精油为对照,按照 1.2.2 中的方法,通过测量不同样品的抑菌圈直径,评估紫外线照射时间对精油抗菌效果的影响。

1.2.7 复合精油对供试菌抑菌机理的分析

1.2.7.1 供试菌生长曲线的测定 以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为供试菌种测定细菌生长曲线,参考胡璇等^[19]的方法,稍作修改。取 200 mL 方法 1.2.1 中制备所得的菌悬液,向其中加入肉桂精油、山苍子精油及复合精油(肉桂精油:山苍子精油=4:6,体积比),使其终含量为 16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$,以不加精油的菌悬液为空白对照,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床内对菌液进行连续 24 h 的培养,每隔 2 h 取样 1 次,并测定其 OD_{600} 。以抑菌时间作为横轴,以 OD_{600} 作为纵轴,绘制出试验菌株的生长曲线。每组样品进行 3 次平行测定。

1.2.7.2 供试菌相对电导率的测定 相对电导率的测定参考 Diao 等^[20]的方法,并加以修改。取部分 1.2.1 中菌悬液进行离心(5 000 r/min、10 min),收集沉淀物后,使用质量分数为 5% 的葡萄糖溶液清洗 3 次,随后将其重新悬浮,直至上清液的电导率与 5% 葡萄糖溶液的电导率相近,此时上清液的电导率记录为 L_0 。在 5% 葡萄糖溶液中分别加入肉桂精油、山苍子精油及复合精油(肉桂精油:山苍子精油=4:6,体积比),使其终含量为 16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$,均匀混合后,各自进行电导率测定,记为 L_1 。采用同样的方法向等渗处理后的菌液中分别加入肉桂精油、山苍子精油及复合精油(肉桂精油:山苍子精油=4:6,体积比),使其终含量为 16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$,混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 12 h,每 2 h 取样 1 次并测量其相对电导率,记为 L_2 。最后,将悬浮在 5% 葡萄糖溶液中的菌液加热至沸腾状态,持续 5 min 后迅速冷却,测定其电导率,记为 L_0' 。按照公式(2)计算供试菌膜通透性的相对电导率。试验重复 3 次。

$$\text{相对电导率} = \frac{L_2 - L_1}{L_0' - L_0} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.7.3 供试菌菌体内核酸和蛋白质泄漏情况的测定 取 1.2.1 中的菌悬液进行离心(5 000 r/min、10 min)后收集菌体,用磷酸盐缓冲液(pH=7.2)冲洗 3 次后重悬于磷酸盐缓冲液。取 100 mL 重悬液分别加入肉桂精油、山苍子精油及复合精油(肉桂精油:山苍子精油=4:6,体积比),使其终含量为

16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$,将未添加精油的菌悬液作为空白对照,所有样品于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 4 h。随后,将菌悬液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液用紫外-可见分光光度计测定并记录 OD_{260} 和 OD_{280} ,以确定细胞内核酸和蛋白质的泄漏情况,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 植物精油的抑菌活性

10 种植物精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉的抑菌活性(抑菌圈直径)如表 2 所示。在测试试验中,10 种精油展现了不同的敏感性反应。其中,牛至精油、肉桂精油、百里香精油和山苍子精油均对 3 种供试菌种表现出了较好的抗菌能力,肉桂精油对大肠杆菌形成的抑菌圈直径可达 30.50 mm,牛至精油对金黄色葡萄球菌、黑曲霉形成的抑菌圈直径分别可达 31.83 mm、48.17 mm。相较于对金黄色葡萄球菌的抑菌性而言,肉桂精油、丁香精油对大肠杆菌(革兰氏阴性菌)的抑菌活性更强,抑菌圈直径分别可达 30.50 mm、16.17 mm;牛至精油、百里香精油、山苍子精油和茶树精油对金黄色葡萄球菌展现出较高的抗菌效力,抑菌圈直径分别为 31.83 mm、31.83 mm、30.67 mm 和 30.67 mm,而茶树精油对黑曲霉的抑菌活性较弱,抑菌圈直径为 7.00 mm,这可能与不同精油发挥抑菌效果时的作用靶向位点不同有关^[21]。因此,本研究选取肉桂精油、牛至精油、百里香精油、茶树精油、山苍子精油和丁香精油作为后续研究对象。

表 2 植物精油的抑菌圈直径

Table 2 Antibacterial circle diameter of essential oils of plants

植物精油	抑菌圈直径(mm)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	黑曲霉
牛至精油	29.00±2.76ab	31.83±1.17a	48.17±2.23a
肉桂精油	30.50±2.88a	24.17±4.49b	45.17±4.58b
丁香精油	16.17±2.04c	12.83±0.98c	34.67±1.21c
百里香精油	28.00±1.67b	31.83±3.54a	44.33±1.86b
茶树精油	14.83±3.97c	30.67±0.82a	7.00±1.26d
山苍子精油	15.17±1.47c	30.67±3.20a	44.83±2.86b
生姜精油	6.00±0f	8.17±0.98e	6.50±0.84d
桉叶精油	9.67±0.52d	9.33±0.52de	6.50±0.84d
薄荷精油	9.00±0.89de	11.17±1.83cd	6.67±0.82d
八角茴香精油	7.50±0.55ef	8.00±1.55e	7.17±1.17d

同一列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 植物精油的最小抑菌含量和最小杀菌含量

采用二倍稀释法测定肉桂精油、牛至精油、百里香精油、茶树精油、山苍子精油及丁香精油对3种供试菌的MIC值,试验结果见表3。由表3可知,肉桂精油、牛至精油和山苍子精油都具有较强的广谱抑菌活性,在4.0~64.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的较低含量下对3种供试菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉)都表现出了良好的抑菌效果。相较而言,肉桂精油对大肠杆菌和黑曲霉的抑菌能力更强,其MIC值为4.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$;山苍子精油对金黄色葡萄球菌表现出较强的抗菌作用,在16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的含量下即可抑制金黄色葡萄球菌的生长繁殖,但其对大肠杆菌和黑曲霉的抑制能力较弱,MIC值均为32.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。精油的抗菌性能取决于其内含的活性组分。肉桂醛作为肉桂精油的主要成分,主要针对细胞膜发挥作用,破坏细胞膜的完整性,进而影响细菌的代谢活性,最终达到抑制细菌生长的效果^[22]。牛至精油的关键活性物质香芹酚可以通过改变胞外多糖合成和pH值来阻碍生物膜的发育,破坏微生物细胞的正常生理代谢机能^[23]。山苍子精油含有大量的柠檬醛,这种成分能与微生物DNA结合,产生嵌合结构,进而有效抑制细菌活性,表现出较强的抗菌能力^[24]。

表3 植物精油对测试菌种的最小抑菌含量(MIC)

Table 3 Minimum inhibitory concentration (MIC) of plant essential oils against test strains of bacteria

精油种类	MIC($\mu\text{L}/\text{mL}$)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	黑曲霉
肉桂精油	4.0	8.0	4.0
山苍子精油	32.0	16.0	32.0
牛至精油	64.0	64.0	64.0
茶树精油	128.0	128.0	128.0
丁香精油	128.0	128.0	128.0
百里香精油	128.0	128.0	128.0

肉桂精油、牛至精油、百里香精油、茶树精油、山苍子精油及丁香精油对3种供试菌的MBC值如表4所示。几种精油对供试菌的MBC值与MIC值相近或略有差异,这反映出供试菌对这些精油的耐受性较低,说明这些精油在抑制微生物生长及繁殖方面展现出了较为稳定的效果。

2.3 复合精油的抑菌活性

为了进一步研究植物精油的协同抑菌作用,选

表4 植物精油对测试菌种的最小杀菌含量(MBC)

Table 4 Minimum bactericidal concentration (MBC) of plant essential oils against test strains

精油种类	MBC($\mu\text{L}/\text{mL}$)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	黑曲霉
肉桂精油	4.0	8.0	4.0
山苍子精油	32.0	16.0	32.0
牛至精油	64.0	64.0	64.0
茶树精油	>128.0	>128.0	>128.0
丁香精油	>128.0	>128.0	>128.0
百里香精油	>128.0	>128.0	>128.0

取抑菌性能突出的肉桂精油、牛至精油和山苍子精油进行后续试验。通过棋盘稀释法对这些精油的协同抗菌作用进行评价,具体试验结果参见表5、表6、表7。肉桂精油与山苍子精油的复配使用对抑制黑曲霉有协同增效作用,其FIC低至0.500,同时对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌均展现出协同抑制作用,二者的FIC均达到1.000。Xiang等^[25]发现肉桂精油、牛至精油和柠檬草精油协同使用时对黄曲霉菌有协同抑制作用。这可能是因为植物精油中化合物组成种类不同,最终表现出的抑菌效果并非由单一特定抑菌机制导致的,而是由多种抑菌机制共同作用引起的^[26]。因此本研究选择肉桂精油和山苍子精油制备复合精油,并进行最佳复配体积比的筛选。

2.4 复合精油的最佳复配体积比

表8详细展示了在不同体积比例下,肉桂精油与山苍子精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及黑曲霉3种受试菌株的抗菌效果。试验结果显示,在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的培养基上,当肉桂精油与山苍子精油的体积比为4:6时,观察到的抑菌圈直径达到最大值,分别为27.75 mm与26.50 mm。已有研究结果表明,精油中的一些微量成分也具有辅助抑菌的作用,可在一些体积比下完全抑制黑曲霉的生长。Miladinovic等^[27]研究发现,精油中的微量成分或者它们的组合可能是精油抗菌的主要成分,这表明了精油中少量成分的关键作用。通过对精油进行复配,不仅增加了有效成分的多样性,还可能加强了这些微量成分之间的相互作用,从而提升了整体的抗菌效果^[28]。因此,复合精油中肉桂精油与山苍子精油最佳体积比确定为4:6。

表 5 肉桂精油和牛至精油协同抑菌的最小抑菌含量 (MIC) 及协同效果

Table 5 Evaluation of combined minimum inhibitory concentration (MIC) and combined effect of cinnamon and oregano essential oils

精油	$MIC_{\text{肉桂}} (\mu\text{L}/\text{mL})$		$MIC_{\text{牛至}} (\mu\text{L}/\text{mL})$		FIC	协同效果
	单用	联用	单用	联用		
大肠杆菌	4.0	0.5	64.0	32.0	0.625	相加
金黄色葡萄球菌	8.0	2.0	64.0	32.0	0.750	相加
黑曲霉	4.0	2.0	64.0	8.0	0.625	相加

FIC: 分级抑菌浓度指数。

表 6 肉桂精油和山苍子精油协同抑菌的最小抑菌含量 (MIC) 及协同效果

Table 6 Evaluation of combined minimum inhibitory concentration (MIC) and combined effect of cinnamon and *Litsea cubeba* essential oils

精油	$MIC_{\text{肉桂}} (\mu\text{L}/\text{mL})$		$MIC_{\text{山苍子}} (\mu\text{L}/\text{mL})$		FIC	协同效果
	单用	联用	单用	联用		
大肠杆菌	4.0	2.0	32.0	16.0	1.000	相加
金黄色葡萄球菌	8.0	4.0	16.0	8.0	1.000	相加
黑曲霉	4.0	1.0	32.0	8.0	0.500	协同

FIC: 分级抑菌浓度指数。

表 7 牛至精油和山苍子精油协同抑菌的最小抑菌含量 (MIC) 及协同效果

Table 7 Evaluation of combined minimum inhibitory concentration (MIC) and combined effect of oregano and *Litsea cubeba* essential oils

精油	$MIC_{\text{牛至}} (\mu\text{L}/\text{mL})$		$MIC_{\text{山苍子}} (\mu\text{L}/\text{mL})$		FIC	协同效果
	单用	联用	单用	联用		
大肠杆菌	64.0	32.0	32.0	8.0	0.750	相加
金黄色葡萄球菌	64.0	32.0	16.0	2.0	0.625	相加
黑曲霉	64.0	32.0	32.0	8.0	0.750	相加

FIC: 分级抑菌浓度指数。

表 8 不同体积比复合精油抑菌效果

Table 8 Bacteria inhibition effect of composite essential oils with different volume ratios

肉桂精油与 山苍子精油 的体积比	抑菌圈直径 (mm)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	黑曲霉
1 : 9	20.75±3.77b	23.00±5.48abc	90.00±0.00a
2 : 8	21.75±3.59ab	19.00±2.45c	90.00±0.00a
3 : 7	23.50±1.91ab	24.50±2.64ab	90.00±0.00a
4 : 6	27.75±2.22a	26.50±2.38a	90.00±0.00a
5 : 5	25.38±5.19ab	25.50±3.32ab	78.50±13.50a
6 : 4	24.50±0.58ab	23.25±1.71abc	48.00±3.65bc
7 : 3	23.00±4.76ab	22.50±1.29abc	51.25±19.62b
8 : 2	21.75±3.50ab	21.25±2.75bc	44.75±13.60bc
9 : 1	21.75±4.35ab	21.00±2.58bc	36.75±4.99c

同一列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 复合精油的稳定性

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉作为测

试菌种,探讨了复合精油在多种温度和不同时间紫外线照射下的抑菌圈直径变化,评价该复合精油在不同环境下的稳定性能。由图 1A 可知,复合精油对大肠杆菌的抑菌活性在低于 100 °C 时较为稳定,在加热至 80 °C 后开始下降,100 °C 时抑菌圈直径最小,但仍对菌种表现出强抑制能力。与室温 (25 °C) 条件下对照样品的抑菌效果相比,经过 40 °C、60 °C、80 °C、100 °C 直至 120 °C 的热处理后,复合精油对金黄色葡萄球菌和黑曲霉的抑菌活性并未发生显著变化 ($P > 0.05$),说明复合精油对 3 种供试菌的抑菌效果具有较强的热稳定性。图 1B 显示,与未经紫外线照射处理的空白对照组的抑菌效果相比,经过 40 min、80 min、120 min、160 min 及 200 min 的紫外线照射处理后,复合精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和黑曲霉的抑菌活性并未发生显著变化 ($P > 0.05$)。综上所述,复合精油的抑菌效果具备一定的环境稳定性,其在极端贮藏和使用过程中仍能保

持良好的抑菌性能,可以作为食品保鲜领域中有效的天然防腐剂使用。

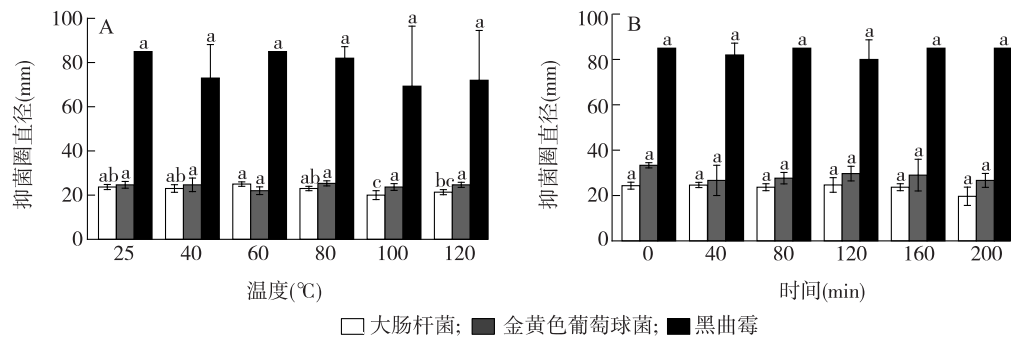


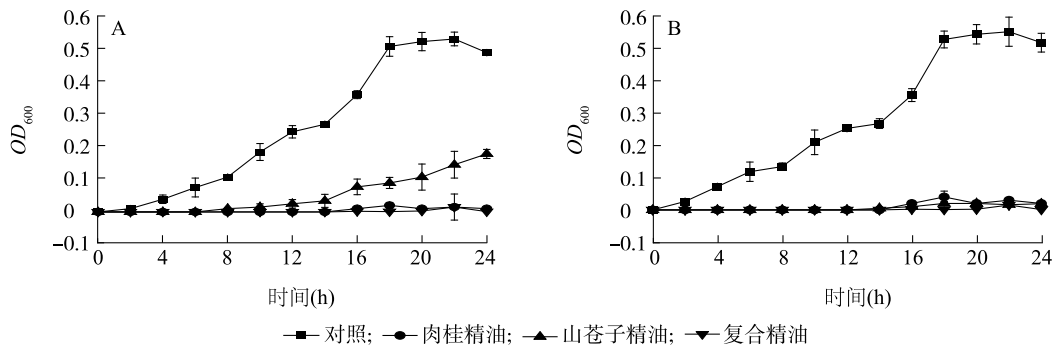
图1 复合精油在不同温度(A)和不同紫外照射时间(B)下抑菌活性的变化

Fig.1 Variation of antibacterial activity of composite essential oils at different temperatures (A) and different ultraviolet irradiation times (B)

2.6 复合精油对供试菌的抑菌机理

2.6.1 复合精油对供试菌生长曲线的影响 由图2可知,对照的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在指数增长阶段快速增殖,并维持了稳定的生长趋势。添加了肉桂精油、山苍子精油及其复合精油后,这2种细菌的生长明显受到抑制。在处理的前8 h内,大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的生长曲线未表现出明显差异,细菌生长停滞在迟缓期,未能进入对数生长期,

表明精油对细菌增殖具有显著抑制作用。经过16 h培养,复合精油处理组的细菌生长曲线增长上限较单一精油处理组更低。因此可以得出精油的使用主要阻断了细菌在对数生长期的分裂和增殖,显著减少了活菌数量,并阻止了细菌达到正常的生长峰值。此外,复合精油在抑制细菌生长方面表现出了更佳的效果。



OD_{600} : 菌液在600 nm处的吸光值。

图2 肉桂精油、山苍子精油及复合精油对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)生长曲线的影响

Fig.2 Impact of cinnamon oil, *Litsea cubeba* oil and blended essential oil on the growth curves of *Escherichia coli* (A) and *Staphylococcus aureus* (B)

2.6.2 复合精油对供试菌相对电导率的影响 相对电导率的变化是衡量精油对细菌细胞膜通透性作用的一个重要指标。如图3所示,在12 h内,对照组的相对电导率增加不超过20个百分点,然而,经过精油处理的细菌,其相对电导率显著增加,并且这种增加趋势随着处理时间的延长更加明显。经过12 h复合精油的处理,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的相对电导率分别是单独使用山苍子精油处理后的

1.56倍和1.53倍,以及单独使用肉桂精油处理后的1.13倍和1.29倍,表明精油能够破坏细菌细胞膜,提高其通透性,进而干扰细胞内部环境,导致细胞内物质泄漏,从而使相对电导率上升^[29]。

2.6.3 复合精油对供试菌菌体内核酸和蛋白质泄漏情况的影响 精油发挥抑菌作用的机制之一是破坏细菌的细胞壁或细胞膜,进而引起细胞内生命物质及遗传物质的逸出。这种泄漏造成了细胞质膜的

不可逆损伤,并进一步干扰细菌的代谢活动,最终引起细菌死亡。由于核酸和蛋白质在 260 nm 和 280 nm 处分别具有最大的紫外吸收,因此,通常利用 OD_{260} 和 OD_{280} 来评估细胞膜的破坏程度及细胞内容物的泄漏程度。表 9 显示,与单一精油相比,复合精油能够显著增加菌悬液中核酸和蛋白质的含量。具

体来说,与山苍子精油相比,复合精油处理的大肠杆菌中核酸和蛋白质的泄漏量分别增加了 3.11 倍和 2.03 倍。这一泄漏趋势与张赟彬等^[22]的研究结果一致,复合精油能显著破坏细菌细胞膜的完整性,破坏细胞膜的通透性,从而引起细胞内离子、核酸、蛋白质等物质的外泄。

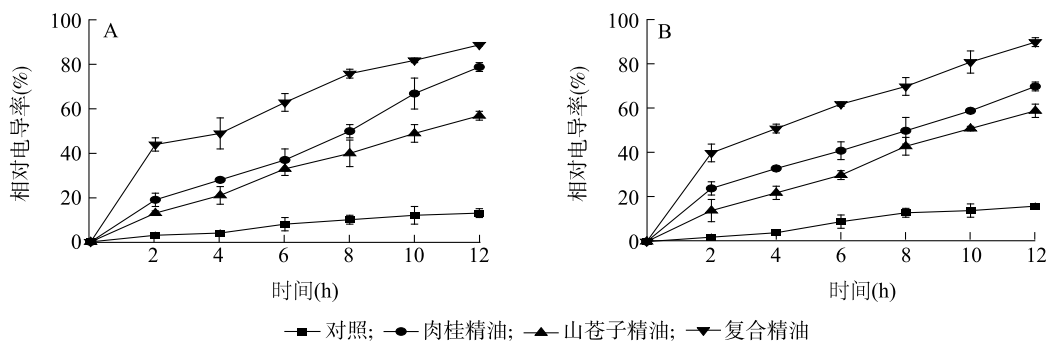


图 3 肉桂精油、山苍子精油及复合精油对大肠杆菌 (A) 和金黄色葡萄球菌 (B) 相对电导率的影响

Fig.3 Effects of cinnamon essential oil, *Litsea cubeba* essential oil and compound essential oil on the relative conductivity of *Escherichia coli* (A) and *Staphylococcus aureus* (B)

表 9 肉桂精油、山苍子精油、复合精油对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌体内核酸和蛋白质泄漏情况的影响

Table 9 Effects of cinnamon essential oil, *Litsea cubeba* essential oil and compound essential oil on nucleic acid and protein leakage in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

菌种	精油种类	OD_{260}	OD_{280}
大肠杆菌	肉桂精油	0.33±0.06b	0.45±0.03b
	山苍子精油	0.19±0.02c	0.29±0.05c
	复合精油	0.78±0.05a	0.88±0.02a
金黄色葡萄球菌	肉桂精油	0.39±0.07c	0.47±0.05c
	山苍子精油	0.54±0.08b	0.78±0.03b
	复合精油	0.85±0.03a	0.93±0.01a

同种供试菌同一列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。 OD_{260} 为核酸的吸光度, OD_{280} 为蛋白质的吸光度。

3 结论

本研究采用滤纸片法对 10 种常见的植物精油的抗菌活性进行了系统分析。通过比较植物精油的抑菌圈直径及 MIC 和 MBC, 得到抑菌效果良好的单一精油, 进一步筛选获得了最佳复配比例。本研究结果表明, 肉桂精油与山苍子精油展现出较优的抗菌效果, 其中肉桂精油对大肠杆菌和黑曲霉的最小抑菌含量为 4.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 而山苍子精油对金黄色葡

萄球菌的最小抑菌含量为 16.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。基于 FIC 的评价标准, 采用棋盘稀释法筛选出了协同抑菌效果最佳的肉桂精油与山苍子精油组合, 并确定了其最优复配体积比为 4 : 6。此外, 本研究还考察了复合精油在不同环境条件下的稳定性, 发现不良环境因素 (高温和长时间紫外线照射) 并未显著影响复合精油的抑菌效力。最后以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为试验菌株, 探讨了复合精油的抗菌作用机制。结果显示, 复合精油在处理 8 h 期间有效抑制了 2 种供试细菌的对数生长期, 并在处理 16 h 后进一步降低了生长上限。处理 12 h 后, 复合精油显著增加了细菌的相对电导率, 揭示了复配精油具有更强的抗菌活性。另外, 复合精油显著提高了细胞内容物的泄漏量, 这表明其通过破坏细胞膜结构并改变其透性, 从而实现了对细菌生长的抑制。综上所述, 本研究为复合植物精油作为天然抑菌剂的研发提供了理论依据和数据支持, 为进一步探索天然抑菌剂的潜在应用领域奠定了基础。

参考文献:

- [1] CICHIELLO S A. Oxygen absorbers in food preservation: a review [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(4): 1889-1895.
- [2] KANELAKI A, ZAMPOUNI K, MOURTZINOS I, et al. Hydro-

- gels, oleogels and bigels as edible coatings of sardine fillets and delivery systems of rosemary extract[J]. *Gels*, 2022, 8(10): 660.
- [3] BEYA M M, NETZEL M E, SULTANBAWA Y, et al. Plant-based phenolic molecules as natural preservatives in comminuted meats: a review[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 263.
- [4] GHANBARI M, JAMI M, DOMIG K J, et al. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria—a review[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 54(2): 315-324.
- [5] HASSOUN A, EMIR ÇOBAN Ö. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 68: 26-36.
- [6] ÁLVAREZ-MARTINEZ F, BARRAJÓN-CATALÁN E, HERRANZ-LÓPEZ M, et al. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: an updated review on their effects and putative mechanisms of action[J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153626.
- [7] SELVARAJAN V S, SELVARAJAN R, PANDIYAN J, et al. Unveiling the potency and harnessing the antibacterial activities of plant oils against foodborne pathogens[J]. *Microbiology Research*, 2023, 14(3): 1291-1300.
- [8] JU J, XU X M, XIE Y F, et al. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods[J]. *Food Chemistry*, 2018, 240: 850-855.
- [9] 刘晓丽, 吴乐萍, 杨霞芳, 等. 肉桂精油处理结合真空包装对冷鲜牛肉的保鲜作用[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(15): 93-99.
- [10] 王清瑶, 肖性龙, 刘媛媛, 等. 茶树精油对单增李斯特菌的抑制作用及其在冷鲜猪肉中的应用[J]. *现代食品科技*, 2025, 41(3): 175-183.
- [11] SHEN C, CHEN W Q, LI C Z, et al. Topical advances of edible coating based on the nanoemulsions encapsulated with plant essential oils for foodborne pathogen control[J]. *Food Control*, 2023, 145: 109419.
- [12] TUREK C, STINTZING F C. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils[J]. *Food Research International*, 2012, 46(1): 341-353.
- [13] BASSOLÉ I H N, JULIANI H R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties[J]. *Molecules*, 2012, 17(4): 3989-4006.
- [14] SETHUNGA M, RANASINGHE M M K D, RANAWEERA K K D S, et al. Synergistic antimicrobial activity of essential oils and oleoresins of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), clove bud (*Syzygium aromaticum*) and ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2023, 51: 102800.
- [15] 陈泳琪, 柴向华, 吴克刚, 等. 香辛料精油结合真空包装对草鱼肉的低温保鲜研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(18): 233-239.
- [16] 胡虹, 杜迅, 张秀江, 等. 液体发酵饲料植物乳杆菌诱变育种的研究[J]. *河南科学*, 2019, 37(4): 570-574.
- [17] 曲春阳, 潘磊庆, 屠康, 等. 复合精油对黄曲霉联合抑菌作用研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(10): 128-130, 134.
- [18] 黄洒. 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.
- [19] 胡璇, 黄英, 王凯, 等. 益智精油化学成分分析及其对单核细胞增生李斯特氏菌的抑菌机理[J]. *食品科学*, 2024, 45(16): 140-150.
- [20] DIAO W R, HU Q P, ZHANG H, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) [J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 109-116.
- [21] SÁNCHEZ ALDANA D, ANDRADE-OCHOA S, AGUILAR C N, et al. Antibacterial activity of pectic-based edible films incorporated with Mexican lime essential oil[J]. *Food Control*, 2015, 50: 907-912.
- [22] 张赆彬, 刘笑宇, 姜萍萍, 等. 肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(5): 31-35, 11.
- [23] CUI H Y, ZHANG C H, LI C Z, et al. Antibacterial mechanism of oregano essential oil[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 139: 111498.
- [24] HU W, LI C Z, DAI J M, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 130: 34-41.
- [25] XIANG F Z, ZHAO Q Q, ZHAO K, et al. The efficacy of composite essential oils against aflatoxigenic fungus *Aspergillus flavus* in maize[J]. *Toxins*, 2020, 12(9): 562.
- [26] CÉLIZ G, DAZ M, AUDISIO M C. Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(3): 731-738.
- [27] MILADINOVIC D L, DIMITRIJEVIC M V, MIHAJLOV-KRSTEV T M, et al. The significance of minor components on the antibacterial activity of essential oil *via* chemometrics[J]. *LWT*, 2021, 136: 110305.
- [28] BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94(3): 223-253.
- [29] KANG Y X, WU K W, SUN J, et al. Preparation of Kushui Rose (*Rosa setata*×*Rosa rugosa*) essential oil fractions by double molecular distillation: aroma and biological activities[J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 175: 114230.

(责任编辑:陈海霞)