



北京化工大学学位论文原创性声明

本人郑重声明： 所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 兰飞 日期： 2011.5.23

关于论文使用授权的说明

学位论文作者完全了解北京化工大学有关保留和使用学位论文的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属北京化工大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以允许采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

保密论文注释：本学位论文属于保密范围，在__年解密后适用本授权书。非保密论文注释：本学位论文不属于保密范围，适用本授权书。

作者签名： 兰飞 日期： 2011.5.23

导师签名： 梁书 日期： 2011.5.23

学位论文数据集

中图分类号	TQ654	学科分类号	0817	
论文编号	1001020111206	密 级	公开	
学位授予单位代码	10010	学位授予单位名称	北京化工大学	
作者姓名	吕飞	学 号	2008001206	
获学位专业名称	化学工程与技术	获学位专业代码	081720	
课题来源	自选课题	研究方向	天然植物香料	
论文题目	天然植物精油的抑菌活性及其作用机理研究			
关 键 词	植物精油，食品微生物，抑菌活性，协同增效作用，GC/MS，作用机理，增溶剂			
论文答辩日期	2011 年 5 月 23 日	• 论 文 类 型	基础研究	
学位论文评阅及答辩委员会情况				
	姓名	职称	工作单位	学科专长
指导教师	梁浩	副教授	北京化工大学	天然药物研究与开发
评阅人 1	郑国均	教授	北京化工大学	制药工程
评阅人 2	杨晶	副教授	北京化工大学	生物材料
评阅人 3				
评阅人 4				
评阅人 5				
答辩委员会主席	谭天伟	教授	北京化工大学	生物化工
答辩委员 1	谭天伟	教授	北京化工大学	生物化工
答辩委员 2	苏海佳	教授	北京化工大学	生物化工
答辩委员 3	罗施中	副教授	北京化工大学	生物化工
答辩委员 4	邓利	副教授	北京化工大学	生物化工
答辩委员 5	张栩	副教授	北京化工大学	生物化工

注：一. 论文类型：1. 基础研究 2. 应用研究 3. 开发研究 4. 其它

二. 中图分类号在《中国图书资料分类法》查询。

三. 学科分类号在中华人民共和国国家标准（GB/T 13745-9）《学科分类与代码》中查询。

四. 论文编号由单位代码和年份及学号的后四位组成。

天然植物精油的抑菌活性及其作用机理研究

摘要

本论文研究了植物单精油以及复配精油对四种食品微生物(大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, 枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)的抑制活性。使用滤纸片法和试管梯度稀释法对十种植物精油的抑菌活性进行了初步筛选。结果显示, 牛至精油对四种供试菌种均显示出了最强的抑制活性, 罗勒精油和佛手柑精油对革兰氏阳性菌有很好的抑制效果, 而紫苏精油则对酿酒酵母有很强的抑制专一性。采用棋盘稀释法, 研究复配精油间可能存在的协同增效作用。以 FIC 指数作为参照依据, 选定的复配精油组合及联合最小抑菌浓度如下: 大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油, MIC_{联合}: 0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$); 金黄色葡萄球菌(罗勒精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: 0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$); 枯草芽孢杆菌(牛至精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: 0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$); 酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油, MIC_{联合}: 0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$)。

采用气质联用技术(GC/MS), 对所选植物精油的化学组成进行了分析鉴定: 牛至精油和罗勒精油的主要化学成分是酚类和萜烯类物质, 佛手柑精油中主要含有萜烯类、醇类和酯类物质, 而酮类物质在紫苏精油中的含量相对较高。

通过观察菌体的扫描电镜图片, 测定菌体细胞培养液的电导率、细胞溶出物以及菌体细胞膜脂肪酸的变化, 研究了复配精油的抑菌机理。结果表明, 所有的复配精油均能够破坏菌体细胞膜的完整性, 并使其通透性增加, 最终达到抑制菌体生长的目的。

最后，为了改善精油的溶解度以提高抑菌活性，本研究比较了九种增溶剂对精油的增溶效果，并对增溶体系的抑菌活性和抑菌机理进行了研究。结果发现，HP- β -CD 对精油的增溶效果最为明显。随着 HP- β -CD 的加入，可以显著降低复配精油的用量，提高了复配精油对菌体的作用强度。

关键词：植物精油，食品微生物，抑菌活性，协同增效作用，GC/MS，作用机理，增溶剂

ANTIMICROBIAL EFFECTS AND MECHANISM OF ACTION OF SELECTED PLANT ESSENTIAL OILS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial efficacy of selected essential oil (EO) and their combinations against four food-related microorganisms. Ten EOs were initially screened against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* using agar disc diffusion and broth dilution methods. The highest efficacy against all the tested strains was shown when testing the oregano EO. EOs of basil and bergamot were active against the Gram-positive bacteria, while perilla EO strongly inhibited the growth of *S.cerevisiae*. The checkerboard method was then used to investigate the antimicrobial efficacy of EO combinations by means of the fractional inhibitory concentration index (FICI). Based on an overall consideration of antimicrobial activity, organoleptic impact and cost, four EO combinations were selected and their MIC values were listed as follows: oregano-basil (0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$) for *E. coli*, basil-bergamot (0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$) for *S. aureus*, oregano-bergamot (0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$) for *B. subtilis* and oregano-perilla (0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$) for *S. cerevisiae*.

The chemical components of selected EOs were then analyzed by GC/MS. Phenols and terpenes were the major antimicrobial compounds in oregano and basil EOs. The dominant active components of bergamot EO were alcohols, esters and terpenes. For perilla EO, the major active constituents were mainly ketones.

Furthermore, the mechanisms of the antimicrobial action of EO combinations were studied by the measurement of conductivity and the release of cell constituents, the electronic microscopy observations of the cells and the changes in the percentage of principal fatty acids of cells. The results demonstrated that all EO combinations destroyed the integrity of cell membrane, resulting in the death of microorganisms.

Finally, we test the ability of nine solubilizers to increase EOs solubility and the effect of selected solubilizer on the antimicrobial activity of EO combinations by checkerboard method. The results indicated that the effect of HP- β -CD on increasing EOs solubility was most obvious. The addition of HP- β -CD could not only decrease the usage of EO combinations significantly, but also enhance the effects of EO combinations on microorganisms.

KEY WORDS: essential oils, food-related microorganisms, antimicrobial activity, synergism, GC/MS, action mechanisms, solubilizer

目 录

第一章 绪论	1
1.1 植物精油的介绍	1
1.1.1 植物精油的定义及植物分布	1
1.1.2 植物精油的理化性质	2
1.1.3 植物精油的化学成分	2
1.2 植物精油的提取、分离纯化及分析检测	4
1.2.1 植物精油的提取方法	4
1.2.2 植物精油的分离纯化方法	4
1.2.3 植物精油的分析检测方法	5
1.3 植物精油的生物活性	5
1.3.1 植物精油的抑菌活性	5
1.3.2 植物精油的抗氧化活性	5
1.3.3 植物精油的医药活性	6
1.3.4 植物精油的杀虫作用	6
1.4 植物精油抑菌活性的研究现状	6
1.4.1 植物精油的抑菌活性	6
1.4.2 植物精油的抑菌有效成分	7
1.4.3 植物精油的体外抑菌方法	9
1.4.4 抑菌活性的协同作用	11
1.4.5 植物精油的抑菌机理	12
1.4.6 植物精油在食品体系中的应用	12
1.4.7 植物精油的安全性与应用前景	13
1.5 本论文的研究意义和研究内容	13
1.5.1 研究意义	13
1.5.2 研究内容	14
第二章 十种天然植物精油的体外抑菌活性研究	15
2.1 引言	15
2.2 实验材料与方法	15
2.2.1 实验材料	15

2.2.2 实验仪器及试剂.....	16
2.2.3 实验方法.....	17
2.3 实验结果与讨论.....	19
2.3.1 十种植物精油的抑菌活性.....	19
2.3.2 pH 值对精油抑菌活性的影响.....	22
2.3.3 热处理对精油抑菌活性的影响.....	23
2.3.4 紫外线照射对精油抑菌活性的影响.....	24
2.3.5 植物精油最小抑菌浓度(MIC)的测定.....	25
2.3.6 复配植物精油的抑菌活性.....	26
2.4 本章小结.....	28
第三章 四种植物精油化学组成的 GC/MS 分析.....	30
3.1 引言.....	30
3.2 实验材料与方法.....	30
3.2.1 实验材料.....	30
3.2.2 实验方法.....	30
3.3 实验结果与讨论.....	31
3.3.1 牛至精油的化学组成.....	35
3.3.2 罗勒精油的化学组成.....	35
3.3.3 佛手柑精油的化学组成.....	36
3.3.4 紫苏精油的化学组成.....	37
3.4 本章小结.....	38
第四章 复配精油的抑菌机理研究.....	39
4.1 引言.....	39
4.2 实验材料与方法.....	39
4.2.1 实验材料.....	39
4.2.2 实验仪器及试剂.....	40
4.2.3 实验方法.....	40
4.3 实验结果与讨论.....	43
4.3.1 复配精油对四种供试菌种生长曲线的影响.....	43
4.3.2 复配精油对菌体细胞膜通透性的影响.....	45
4.3.3 复配精油对菌体细胞膜脂肪酸变化的影响.....	49
4.4 本章小结.....	52

第五章 精油增溶剂的筛选及其对精油抑菌活性影响的研究	53
5.1 引言	53
5.2 实验材料与方法	53
5.2.1 实验材料	53
5.2.2 实验仪器及试剂	54
5.2.3 实验方法	54
5.3 实验结果与讨论	56
5.3.1 增溶剂对植物精油在水相中溶解度的影响	56
5.3.2 增溶体系的抑菌活性研究	57
5.3.3 增溶体系的抑菌机理研究	59
5.4 本章小结	63
第六章 结论与建议	64
6.1 本文主要结论	64
6.2 建议	65
参考文献	66
附 录	72
致 谢	74
研究成果及发表的学术论文	75
作者和导师简介	76

Contents

Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction of EOs	1
1.1.1 Definition of EOs and Plant Distribution.....	1
1.1.2 Physicochemical Property of EOs.....	2
1.1.3 Chemical Composition of EOs.....	2
1.2 Distillation, Purification and Detection of EOs	4
1.2.1 Distillation Method of EOs.....	4
1.2.2 Purification Method of EOs.....	4
1.2.3 Detection Method of EOs.....	5
1.3 Biological Activity of EOs	5
1.3.1 Antimicrobial Activity of EOs.....	5
1.3.2 Antioxidant Activity of EOs.....	5
1.3.3 Pharmaceutical Activity of EOs.....	6
1.3.4 Insecticidal Activity of EOs.....	6
1.4 Research Situation of EOs' Antimicrobial Activity.....	6
1.4.1 Antimicrobial Activity of EOs.....	6
1.4.2 Antimicrobial Components of EOs.....	7
1.4.3 Antimicrobial Test Methods of EOs In Vitro.....	9
1.4.4 Synergism of Antimicrobial Activity.....	11
1.4.5 Antimicrobial Mechanism of EOs.....	12
1.4.6 The applications of EOs in Food System.....	12
1.4.7 The Safety and Application Prospect of EOs.....	13
1.5 The Significance and Content of This Paper.....	13
1.5.1 The Significance of This Paper.....	13
1.5.2 The Content of This Paper.....	14
 Chapter 2 In Vitro Antimicrobial Activities of Ten Plant EOs.....	 15
2.1 Introduction.....	15
2.2 Materials and Methods.....	15
2.2.1 Materials.....	15

2.2.2 Instruments and Reagents.....	16
2.2.3 Methods.....	17
2.3 Results and Discussion	19
2.3.1 In Vitro Antimicrobial Activities of Ten Plant EOs.....	19
2.3.2 Effect of pH Value on Antimicrobial Activities of EOs.....	22
2.3.3 Effect of Heat Treatment on Antimicrobial Activities of EOs.....	23
2.3.4 Effect of Ultraviolet Rays on Antimicrobial Activities of EOs.....	24
2.3.5 Determination of MIC.....	25
2.3.6 Antimicrobial Activities of EO Combinations.....	26
2.4 Summary.....	28

Chapter 3 GC/MS Analysis of Four Selected EOs.....30

3.1 Introduction.....	30
3.2 Materials and Methods.....	30
3.2.1 Materials.....	30
3.2.2 Methods.....	30
3.3 Results and Discussion	31
3.3.1 Chemical Compositions of Oregano EO.....	35
3.3.2 Chemical Compositions of Basil EO.....	35
3.3.3 Chemical Compositions of Bergamot EO.....	36
3.3.4 Chemical Compositions of Perilla EO.....	37
3.4 Summary.....	38

Chapter 4 Antimicrobial Mechanisms of Action of the Selected EO Combinations.....39

4.1 Introduction.....	39
4.2 Materials and Methods.....	39
4.2.1 Materials.....	39
4.2.2 Instruments and Reagents.....	30
4.2.3 Methods.....	40
4.3 Results and Discussion	43
4.3.1 Effect of EO Combinations on Growth Curve.....	43
4.3.2 Effect of EO Combinations on Membrane Permeability.....	45

4.3.3 Effect of EO Combinations on Membrane Fatty Acid.....	49
4.4 Summary.....	52
 Chapter 5 Screening of EOs Solubilizers and Their Effects on the Antimicrobial Activity of EOs.....	53
5.1 Introduction.....	53
5.2 Materials and Methods.....	53
5.2.1 Materials.....	53
5.2.2 Instruments and Reagents.....	54
5.2.3 Methods.....	54
5.3 Results and Discussion	56
5.3.1 Effect of Solubilizers on the Solubility of EOs.....	56
5.3.2 Antimicrobial Activities of Solubilized System.....	57
5.3.3 Antimicrobial Mechanisms of Action of Solubilized System.....	59
5.4 Summary.....	63
 Chapter 6 Conclusion and Advice.....	64
6.1 Conclusion.....	64
6.2 Advice.....	65
 References.....	66
 Appendixes.....	72
 Acknowledgements.....	74
 Research Results and Papers.....	75
 Introduction of Authors and Directors.....	76

第一章 绪论

1.1 植物精油的介绍

1.1.1 植物精油的定义及植物分布

植物精油(Essential oils, EOs), 又称挥发油(Volatile oils), 属于植物源次生代谢产物(Secondary metabolites)^[1], 是存在于植物体中的一类可随水蒸汽蒸出且分子量较小的挥发性油状液体物质, 具有强烈的气味和香味^[2]。一般情况下, 植物中精油在含量少于 1%, 但少数也可达到 10% 以上(如丁香精油)。植物精油一般从植物原料的种子、茎、叶、根、嫩枝、皮、花、果实、树胶和全草中获得, 其成分受植物品种, 采摘时间, 栽种地理位置以及栽培环境的影响^[3]。

精油在植物中的分布是不均匀的^[4], 有的存在于全株植物中, 有的则在特定的器官中含量较多, 例如桂花精油和玫瑰精油主要集中于花朵中, 薄荷精油和留兰香精油在叶子中的含量较高, 而柠檬精油和柑橘精油则主要存在于果皮中。另外, 有时同一株植物的精油化学组成随其器官分布部位的不同, 也有明显差异: 肉桂根部精油中富含樟脑, 叶片中精油主要含丁香酚, 而皮中精油则含肉桂醛较多^[4]。

表 1-1 常见的富含精油植物

Table 1-1 Common plants rich in essential oils

科	富含精油植物名称
菊科	菊、蒿、艾、苍术、白术、泽兰、佩兰、木香
芸香科	芸香、降香、花椒、橙、桔、枳、柠檬、佛手、吴茱萸
桃金娘科	丁香、桉、白千层
唇形科	薄荷、霍香、香薷、荆芥、紫苏、罗勒
樟科	山鸡椒、乌药、肉桂、阴香、樟
木兰科	五味子、八角茴香、厚朴、辛荑
伞形科	小茴香、芫荽、川芎、白芷、前胡、防风、柴胡、当归、羌活、
马兜铃科	细辛、杜衡、马兜铃
马鞭草科	马鞭草、牡荆、蔓荆
败酱科	败酱、缬草、甘松
姜科	郁金、姜黄、莪术、山奈、姜、高良姜、砂仁、豆蔻
禾本科	香茅、芸香草

我国幅员辽阔，地域广博，自然气候条件具有多样性，适合多种类型的精油植物生长，是世界上精油植物资源最丰富的国家之一。据不完全统计，我国的精油植物约有八百三十五种^[5]。常见的富含精油植物见表 1-1。这些品种绝大多数原产自我国，其中薄荷、八角茴香和肉桂等，已成为我国的传统香料品种。

1.1.2 植物精油的理化性质^[4]

植物精油多为无色(或淡黄色)的透明状液体，有些精油因溶有少量色素而呈现特殊的颜色。精油在常温下容易挥发。精油的 pH 值呈中性或酸性，且具有特殊而强烈的气味。大多数精油具有高的折光率(1.43-1.61)和一定的旋光度(+97°-117°)；一般比水轻(丁香油和桂皮油除外)，其比重一般在 0.85-1.065 之间；沸点在 70 ℃-300 ℃之间。精油在常温下为液体，有时在低温环境下可析出其主要成分，如樟脑和薄荷脑等。精油不溶于水，而易溶于如石油醚、乙醚和二硫化碳等极性小的有机溶剂中；在高浓度的乙醇中全部溶解，在低浓度的乙醇中部分溶解。精油对空气、日光和温度较为敏感，经常接触空气会使其逐渐氧化变质，使自身的比重加大，颜色变深，失去原有的气味，而精油的气味是评判其质量优劣的重要标准。

1.1.3 植物精油的化学成分

精油的化学组成十分复杂，一种精油往往含有几十种甚至上百种组分^[6]。随着近些年来气相色谱分离技术(GC)和质谱分析技术(MS)的快速发展，各种常见的植物精油化学成分已经基本被分析清楚。表 1-2 列出了常见植物精油的主要成分。

精油的化学组成虽然复杂，但从结构上大体上可以分为四大类，分别是：萜烯类化合物、芳香族化合物、脂肪族化合物以及含氮含硫类化合物^[7]。

1.1.3.1 萜烯类化合物

萜烯类化合物是绝大部分植物精油的主要成分，按碳原子数可以分为单萜(C_{10})、倍半萜(C_{15})和二萜(C_{20})等，前两者占大多数。单萜及其含氧衍生物是植物精油的特征香气成分，具有镇痛镇静、消毒杀菌、消炎抗病毒等作用，如月桂烯、薰衣草醇、环柠檬醛、草酚酮、蒎烯、樟脑、香草醛和香叶醇等。倍半萜及其含氧衍生物具有镇痛、抗炎症、消毒杀菌和降血压等作用，如金合欢烯、吉马酮、 α -蛇麻烯、 α -桉叶醇、 β -杜松烯、 γ -没药烯和广藿香酮等。

1.1.3.2 芳香族化合物

芳香族化合物在植物精油中广泛存在, 含量也比较高, 仅次于萜烯类化合物, 结构特点是都带有芳香环基团。其按结构分为两类, 一类是萜源衍生物, 如孜然芹烯、百里香酚和对-聚伞花素; 还有一类是苯丙烷类衍生物, 如茴香脑、肉桂醛和丁香酚等。

1.1.3.3 脂肪族化合物

脂肪族化合物在所有精油中普遍存在, 但其含量相对较小, 且作用不太明显。此类化合物在植物精油中一般以醇、醛、酮、酸和酯的形式存在。

1.1.3.4 含氮含硫类化合物

该类化合物中氮、硫元素含量较多, 因此一般具有强烈的辛辣刺激气味。含氮元素的化合物, 如柠檬精油中的吡咯和茉莉精油中的吲哚等; 含硫元素的化合物, 如橙花中的邻氨基苯甲酸酯、大蒜精油中的大蒜素和洋葱精油中的三硫化合物等。

表 1-2 常见植物精油的主要成分

Table 1-2 Main composition of the common plant essential oil

植物	精油中主要成分
茴香	茴香脑、 α -蒎烯等
丁香	丁香酚、丁香酚乙酸酯、石竹烯等
牛至	百里酚、香芹酚、龙脑等
鼠尾草	桉树脑、樟脑、 α , β -蒎烯、龙脑等
桂皮	肉桂醛、丁香酚、糠醛、 α -蒎烯、桉树脑、苯甲醛等
小豆蔻	桉树脑、柠烯、沉香醇等
月桂	桉树脑、 α -蒎烯、沉香醇等
生姜	姜烯、水芹烯、龙脑、柠檬醛等
枯茗	枯茗醛、 α -蒎烯、水芹烯等
胡椒	α , β -蒎烯、 α -水芹烯、柠檬烯等
羌活	沉香醇、水芹烯、 α , β -蒎烯等
迷迭香	桉树脑、龙脑、樟脑、沉香醇等
茵芋	香芹酮、柠烯、 α -蒎烯
藏茴香	香芹酮、柠檬烯、香芹酚等
麝香草	百里酚、沉香醇、 α , β -蒎烯、龙脑等

1.2 植物精油的提取、分离纯化及分析检测

1.2.1 植物精油的提取方法

提取精油的方法很多,对于同一种植物来讲,经不同提取方法提取出的精油,其提取效率、化学成分和生物活性也会有所差异。目前较为常用的精油提取方法主要有:蒸馏法(分为共水蒸馏和水蒸汽蒸馏两种)、溶剂浸提法、吸收法、水扩散法、冷压法、冷冻法、超临界流体萃取法和超声波萃取法等。下面对常用的蒸馏法和超临界流体萃取法做一下简介^[8]:

1.2.1.1 蒸馏法

蒸馏法是最传统也是目前应用最广泛的一种方法,可分为共水蒸馏和水蒸汽蒸馏两种:共水蒸馏是指将植物原料和水直接加热进行蒸馏,蒸馏液经冷却分层后,分离得到精油;水蒸汽蒸馏是指将植物原料粗粉置于蒸馏器中,当高温的水蒸汽通过植物原料时,精油随蒸汽一同馏出,再进行后续的分离操作。蒸馏法操作简便,设备简单,成本较低,应用广泛,适用于有挥发性且在水中溶解度不高的溶质的提取。但是在蒸馏过程中,由于高温会使精油中的某些热不稳定成分分解,因此可能会影响精油的品质。

1.2.1.2 超临界流体萃取法

超临界流体萃取(SFE)技术是一种新型的化工分离技术。处于临界温度和临界压力以上的超临界流体分子兼具气、液两种流体的特点,粘度接近于气体,密度接近于液体,因此具有良好的流动性、溶解能力和传质性能,特别适用于热稳定性较差的溶质的提取。超临界流体溶剂主要有:CO₂、NH₃、CH₃OH、C₂H₅OH、CH₂Cl₂、C₆H₅CH₃、C₂H₄、C₂H₆和C₃H₈等。其中,CO₂的临界条件温和,将其应用于提取植物精油,具有防止热分解并提高精油品质的优点,具有广阔的应用前景。

1.2.2 植物精油的分离纯化方法

目前可用于植物精油分离纯化的方法主要有:化学分离法、层析法、冷冻处理法、分子蒸馏法和分馏法等^[9,10],其中层析法和化学分离法的应用比较普遍。分子蒸馏法^[9]是一种新型的液-液分离技术,是在高真空条件下进行的非平衡蒸馏,特别适用于热敏性或高沸点物质的分离纯化。随着提取分离技术的日趋成熟,天

然植物精油的提取将向着多种技术联合使用及高效环保的方向发展^[10]。

1.2.3 植物精油的分析检测方法

存在于天然植物体内的植物精油含量低且化学成分多样,因此需要高灵敏度的分析检测手段。目前,常用的分析方法有薄层色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)、气质联用技术(GC/MS)和超临界流体色谱(SFC)等^[11]。气相色谱/质谱联用技术(Gas chromatography-Mass Spectrometry, GC/MS)不仅能确定化合物的元素组成,还能鉴定其分子结构,是目前定性定量分析植物精油化学组成最适合的办法。化学成分分析精密性的提高,为进一步深入研究植物精油的生物活性及作用机理打下了良好的基础。

1.3 植物精油的生物活性

1.3.1 植物精油的抑菌活性

据报道,许多植物具有抑菌活性,而真正起抑菌作用的是植物精油。目前,研究主要集中在新型抑菌植物的发现、抑菌活性成分的提取分离与结构分析鉴定、抑菌成分抑菌效果的评价、抑菌作用机理研究、抑菌成分间的协同作用以及在实际中的应用范围等。这一部分内容将在 1.5 节中重点论述。

1.3.2 植物精油的抗氧化活性

人们对植物精油的抗氧化活性研究由来已久。研究发现,很多植物具有较强的抗氧化活性,而酚类化合物及其衍生物是最主要的抗氧化成分。

李荣等^[12]研究了月桂精油的抗氧化性能及清除自由基的能力,实验结果证实,在一定的浓度范围内,月桂精油的抗氧化活性和羟自由基清除能力比 BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)和 PG(没食子酸丙酯)要强,表明了月桂精油具有良好的抗氧化效果。冯雪等^[13]研究发现,众香子精油在一定的浓度范围内,清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力均强于 PG。顾仁勇等^[14]研究了牛至、肉桂、连翘、丁香和山苍子等五种精油的抗氧化能力,结果发现,五种精油均对猪油的氧化有较好的抑制效果,其中牛至、连翘、丁香和山苍子精油的抗氧化效果更为明显。王颖等^[15]比较了黑胡椒精油和白胡椒精油的抗氧化能力及清除自由基的能力,结果显示:两种胡椒精油在一定的浓度范围内,清除超氧阴离子自由基的能力比 BHT 和 PG 要强,总体而言,黑胡椒精油的抗氧化效果略优于白胡椒精油。

综上所述,以植物精油为代表的天然抗氧化剂的抗氧化效果明显,并且有自身独特的优势。因此,植物精油在食品抗氧化领域的应用前景十分广阔。

1.3.3 植物精油的医药活性

在我国古代医学的记载中,植物精油就早已当作药物来使用。精油的来源广泛,化学成分各不相同,所以具有的医药功效也比较广,多有杀菌防腐、平喘、止咳、健胃、祛痰、驱风、消炎、解热和镇痛作用。另外,精油多有适宜的香味,故可用作矫味剂或医药中的香料^[16]。

在临床上已有多种精油被用来治疗各种疾病,如柴胡精油制备的注射液具有解热止痛作用^[17];牡丹皮中含有的牡丹酚有镇痛和镇静的功效,临床上可用于治疗内脏疼痛^[18];大蒜精油具有很强的抗菌消炎和降血压血脂能力,对治疗心血管疾病有非常好的效果^[19];薄荷精油具有清凉、祛风、消炎和局麻的功效^[20];山鸡椒精油可用来治疗心绞痛和冠心病,疗效良好^[21]。

从各种精油中提取出来的天然产物也有多种已用于临床,如芸香草精油的主要成份胡椒酮在临床上可用于治疗支气管炎、慢性气管炎和支气管哮喘^[22];莪术精油中的莪术醇对治疗子宫颈癌有很明显的效果^[23]。此外,冰片、樟脑、薄荷脑、丁香酚和百里香酚等在临床上也有应用^[22,23]。

1.3.4 植物精油的杀虫作用

植物精油不仅可以驱虫,还对某些害虫具有触杀作用。研究证实,植物精油对许多仓储害虫具有杀灭作用,并且对成虫和虫卵均有抑制作用。Keita 等^[24]研究了罗勒精油和丁香罗勒精油对四纹豆象成虫的驱避作用,结果显示,用纯精油熏蒸 12h 后,分别有 80 %和 70 %的成虫死亡。烟草甲是烟叶仓库与药材仓库里的重要害虫,研究表明,肉桂精油、芥菜精油和辣根精油直接接触或熏蒸对烟草甲具有强烈的毒杀作用,杀虫效果明显^[25]。二斑叶螨存在于世界各地,是田间中常见的经济害虫,并已产生了强烈的抗药性。Aslan 等^[26]发现罗勒精油和麝香草精油对二斑叶螨的成虫与若虫均有杀虫活性。有些植物精油已经被开发为驱虫剂,如香茅精油已经成为“避蚊胺”的无毒替代物,其主要成分为香茅醛,可以制成防治蚊蝇的药膏和洗剂^[27]。

1.4 植物精油抑菌活性的研究现状

1.4.1 植物精油的抑菌活性

植物精油以其显著的抑菌活性和广泛的抗菌谱范围, 以及与化学抑菌剂相比副作用和残留毒性小的独特优势, 近年来在抑菌研究方面得到了广泛的关注。国内外出现了大量的关于精油抑菌活性的报道。

钱骅等^[28]研究了九种精油(八角、大蒜、花椒、牛至、生姜、桉叶、山苍子、薄荷、紫苏)的抑菌活性, 结果表明: 桉叶精油对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的抑制作用较好, 牛至精油、大蒜精油和山苍子精油对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用, 而紫苏精油则能显著抑制枯草芽孢杆菌的生长。Valero 和 Salmeron^[29]研究了 11 种芳香精油对蜡状芽孢杆菌的抑制作用, 发现肉桂精油的抑制效果最为明显, 其次为百里香精油、丁香精油、牛至精油、迷迭香精油和鼠尾草精油等。何伟等^[30]利用纸片扩散法和连续稀释法, 对薰衣草精油和橙花精油进行体外抑菌活性测定, 发现两种精油对 5 种供试菌(金黄色葡萄球菌、乙型溶血性球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和表皮葡萄球菌)均有一定的抑制作用。吴慧清等人^[31]采用纸片扩散法和试管稀释法比较了 42 种植物精油的抑菌作用, 结果显示真菌和革兰氏阳性菌对植物精油最为敏感, 其中 13 种精油对 5 种供试菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌和黑曲霉)的抑制效果最好, 其强弱顺序如下: 肉桂精油 > 百里香精油 > 柠檬草精油 > 香茅精油 > 雪松精油 > 山鸡椒精油 > 天竺葵精油 > 桂皮精油 > 芫荽精油 > 罗勒精油 > 山苍子精油 > 欧薄荷精油 > 茴香精油。马英姿等人^[32]采用水蒸气蒸馏法制备樟树叶精油和天竺桂叶精油, 并测定了这两种精油对 4 种供试菌种(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、青霉和黑曲霉)的抑菌效果, 结果表明: 樟树叶精油的含量为 0.52 %, 而天竺桂叶精油的含量为 0.53 %; 天竺桂叶精油对除青霉外的菌种都有较好的抑制效果, 而樟树叶精油则对所有的供试菌种都有明显的抑制作用。Serge Ankri 和 David Mirelman^[33]研究发现大蒜油的抗菌谱非常广, 对常见的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有强烈的抑制作用。钟瑞敏等人^[34]研究了小茴香精油的抑菌活性。结果显示, 小茴香精油对所研究的 9 种供试菌种表现出了广谱抗菌性, 并且对其中的副溶血性嗜盐菌和黑曲霉表现出了极强的抑制效果。

综上所述, 国内外对植物精油的抑菌活性已做了大量研究。植物精油表现出的优良抑菌活性和广谱性, 将有助于人们找到更为理想的天然防腐剂, 这也符合人们追求“绿色健康”理念的需要。与世界上的植物资源总量相比, 目前的研究工作还远远不够, 因此在抑菌植物的开发与利用方面还需做进一步的努力。

1.4.2 植物精油的抑菌有效成分

植物精油的化学成分组成十分复杂, 经 GC/MS 分析, 通常有几十至上百种化合物。经研究表明, 在这些大量的精油成分中, 小分子的酚类物质、萜烯类物质

和醛酮类物质是主要的抑菌有效成分。此外，醇类，醚类和烃类物质也具有一定的抑菌活性^[35]。因此，植物精油的抑菌活性是各成分抑菌效果的综合体现。图 1-1 列出了已被证明的几种精油抑菌有效成分的化学结构。下面对各种成分单体进行简要介绍。

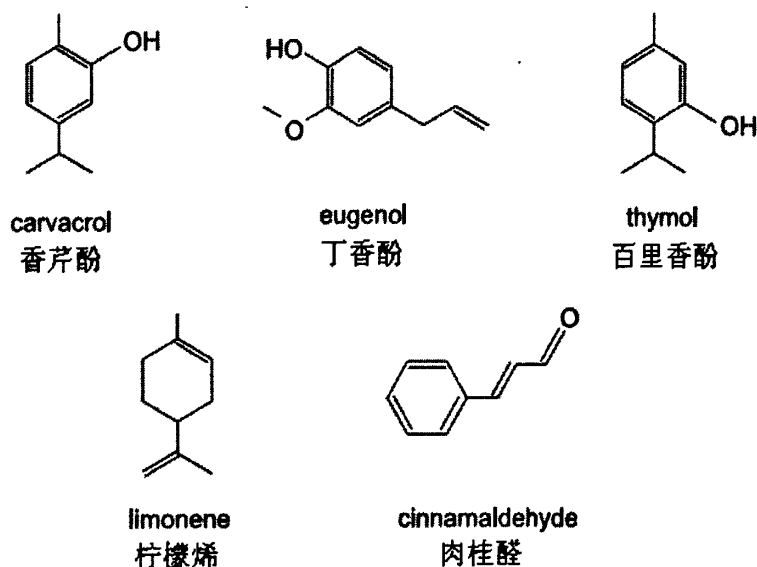


图 1-1 几种植物精油抑菌有效成分的化学结构式

Fig.1-1 Chemical structural formula of several antimicrobial components of EOs

(1) 香芹酚(Carvacrol)

香芹酚是无色或淡黄色的油状液体，是牛至精油的主要成分之一。Mohamed Hazzit 等人^[36]研究了生长在非洲南部的牛至精油的化学组成，发现香芹酚的含量为 29.7 %，这种精油对除李斯特氏菌外的所有受试菌种都有很好的抑制效果。胡艳芬等人^[37]测定了香芹酚单体对常见的病原菌(大肠埃希氏杆菌、金黄色葡萄球菌和猪霍乱沙门氏菌)及益生菌(保加利亚乳杆菌和枯草芽孢杆菌)的抑制效果，结果证实一定的药物浓度下香芹酚能够杀灭常见的病原菌，并且对肠道益生菌也有一定的抑制效果。

(2) 丁香酚(Eugenol)

丁香酚为无色或淡黄色液体，有强烈的丁香香气，是丁香精油的主要成分。楼兴隆等人^[38]对丁香精油进行了化学成分分析，发现丁香酚的含量高达 97.29 %。随后，他们又研究了丁香酚单体对番茄黑霉、白菜黑斑病菌、玉米大斑病菌、小麦纹枯病菌和葡萄炭疽病菌的抑菌作用，发现均有较好的抑制效果。吕世明等^[39]

研究了丁香酚的体外抑菌活性,结果发现丁香酚对 12 种供试细菌具有广谱抗菌性,其中对大肠杆菌的作用最为明显,其最小抑菌浓度(MIC)为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(3) 百里香酚(Thymol)

百里香酚又称麝香草酚,与香芹酚是同分异构体,可以从百里香精油和牛至精油中提取,具有宜人香气和很强的杀菌作用。郑国华等人^[40]发现 7 月是牛至药材的最佳采摘期,此时牛至精油中的百里香酚含量越为 0.117 g/mL。张静等人^[41]研究了百里香酚对植物病原真菌的体外抗菌作用,发现百里香酚能够很好地抑制 10 种植物病原菌的生长,尤其对番茄灰霉病菌有明显的抑制效果。

(4) 柠檬烯(Limonene)

柠檬烯是为无色油状液体,有类似柠檬的香味。王雪梅等人^[42]采用琼脂扩散法和 MIC 法研究了柠檬烯单体的抑菌活性,结果显示柠檬烯单体在较宽的 pH 范围内具有广谱抗菌性,对 6 种供试菌种都有明显的抑制效果,并且对面包酵母、啤酒酵母和黑曲霉的抑制作用强于化学防腐剂(苯甲酸钠和山梨酸钾)。

(5) 肉桂醛(Cinnamaldehyde)

肉桂醛是一种醛类有机化合物,为黄色黏稠状液体,大量存在于肉桂等植物体内。自然界中天然存在的肉桂醛均为反式结构。李京晶等人^[43]通过 GC/MS 分析肉桂精油的成分,发现肉桂醛的含量高达 86.8 %,并且肉桂醛单体对 5 株食品中常见污染菌的抗菌作用均强于化学防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾。最近有日本学者研究发现肉桂醛对真菌有明显的抑制作用^[44],其作用方式是降解真菌的细胞壁,使其可以进入真菌菌体细胞内,继而损坏细胞器而起到抑菌效果。

1.4.3 植物精油的体外抑菌方法

抑菌实验(antimicrobial test)用于测定抑菌剂在体外抑制微生物生长的效能。虽然已报道的抑菌方法有很多,但是由于操作中的影响因素很多(如植物的类型、精油提取方法的多样性、菌体的差异性、培养基的差异性及培养条件的不同,等等),因此现在还没有一个统一的实验操作标准。目前,精油体外抑菌的实验方法大体上分为琼脂扩散法和稀释法两种。

1.4.3.1 琼脂扩散法

琼脂扩散法是抑菌实验中最常用的方法^[45]。根据操作的不同又可分为滤纸片

扩散法(图 1-2)和琼脂杯扩散法(图 1-3)。其中滤纸片扩散法更为常用,其操作是将浸泡过精油的滤纸片放置在涂过菌的琼脂平板表面,随后精油会由纸片中心向边缘扩散出浓度梯度,经过一段时间的培养后,通过测量抑菌圈直径的大小来评价抑菌效果。琼脂杯扩散法是把精油滴入到培养基预先打的孔里面,经培养后再进行抑菌圈直径的测量。

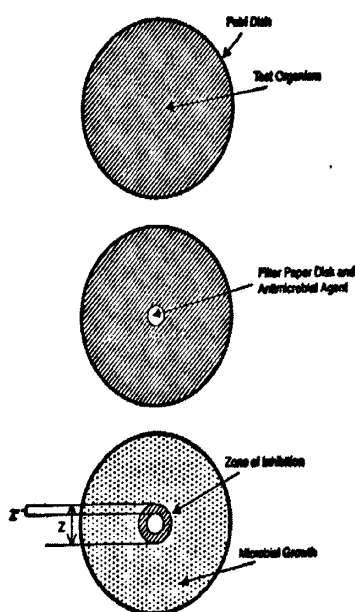


图 1-2 滤纸片扩散法

Fig.1-2 Filter paper disk diffusion method

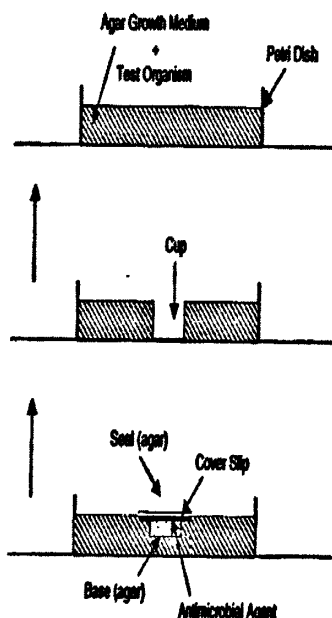


图 1-3 琼脂杯扩散法

Fig.1-3 Agar cup method

影响琼脂扩散法实验结果的因素有很多,比如滤纸片上精油的吸附体积、精油的挥发性以及是否使用乳化剂作为溶剂等。因此,琼脂扩散法只是初步筛选抑菌剂抑菌效果的过程,重复性不高,更为精确的定量分析还需要稀释法来测定。

1.4.3.2 稀释法

稀释法可分为琼脂稀释法和肉汤稀释法两种,都能用于定量分析抑菌剂的抑菌效果。最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)是指能抑制细菌生长的抑菌剂的最低浓度,是定量分析植物精油抑菌效果的重要指标之一^[46]。

琼脂稀释法的特点是在可以在同一平板上,同时测定多种菌株。肉汤稀释法又分为常量稀释法(试管稀释法)和微量稀释法(96孔板法),其判断结果的方法有肉眼观测法、分光光度计法及菌落计数法等。各种判断方法各有利弊:肉眼观测法非常简便,但不够精确;分光光度计法操作简单,但是测定的是总菌液浓度,而不

是活菌浓度；菌落计数法测定结果精确，但是工作量大。

1.4.4 抑菌活性的协同作用

研究发现，抑菌物质之间的相互作用可以分为四种：协同作用、相加作用、无关作用和拮抗作用^[47]。有报道称，植物精油的总体抑菌活性比其各主要成分按比例混合时的抑菌活性要强，这说明在精油中的微量物质对抑菌活性也有很大的影响，它们的存在可能会和主要成分之间形成协同作用，从而增强抑菌活性。研究发现，精油的抑菌作用是其所含的各种抑菌活性成分协同增效作用总和的体现^[48]。抑菌活性的协同作用又可以体现在三个方面：植物精油内各活性成分之间的协同作用；不同植物精油之间的协同作用；植物精油与其他抑菌剂之间的协同作用。对于抑菌物质的协同作用，国内外已有大量的文献报道。

王帆等人^[49]研究了抑菌活性成分丁香酚、肉桂醛、单宁酸和百里香酚对 5 种供试菌种 (铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、大肠杆菌和李斯特氏菌) 的抑制效果，发现各成分对受试菌种均表现出不同程度的抑制活性(MIC 在 19.53-2500 $\mu\text{g/mL}$ 之间)，且各成分两两复配后的 MIC 均有所降低，即存在协同作用。顾仁勇等人^[50]测定了丁香精油和肉桂精油独自使用以及复配使用时的最小抑菌浓度(MIC)，并用 FIC 指数评价协同增效作用。结果显示：丁香精油和肉桂精油复配使用时对 3 株供试菌种均表现出协同增效作用，其中对枯草芽孢杆菌的增效作用最为明显(增效 8 倍)。单独使用时，丁香精油和肉桂精油的 MIC 都是 0.125 %；两者复配使用时，丁香精油和肉桂精油的 MIC 均减小为 0.0025 %。

植物精油也可与其他类型的天然抑菌剂联合使用。研究发现，肉桂精油在单独使用时，对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的 MIC 值分别是 0.2, 0.1, 0.1, 0.4 和 0.4 $\mu\text{L/mL}$ ，而当肉桂精油与天然微生物源抑菌剂 Nisin(乳酸链球菌素)联合使用时，能够达到协同或相加作用，使肉桂精油的用量大大减少^[51]。Yamazaki 等人^[52]研究发现，向香芹酚、百里香酚和丁香酚中加入 0.625 mg/mL Nisin 后，在达到相同抑制李斯特菌生长效果的时候，其使用量分别减少了 30 %，20 %和 20 %。

在实际的食品防腐应用中，协同作用的存在可以使植物精油的使用量大大降低。在不影响抑菌效果的前提下，既可以降低成本，保证安全性，又可以减少精油气味对食品品质的影响，还可以赋予食品特殊香味。因此，研究植物精油的协同作用有着重要的科学意义和实用价值。但是，植物精油不同成分之间或者与其他抑菌剂混用时，协同作用、相加作用、无关作用和拮抗作用都是可能出现的，其作用机理目前也未十分明确，所以还需要大量的实验基础来证实。

1.4.5 植物精油的抑菌机理

目前,关于植物精油抑菌机理的报道有很多,通常是认为精油的疏水性成分能够直接作用于微生物细胞膜,导致细胞膜的流动性增加,随之细胞膜结构被破坏,细胞内部的重要离子和溶物会渗出,最终导致细胞死亡。

Turgis 等人^[53]研究了芥子精油(mustard EO)对大肠杆菌 O157: H7 和沙门氏菌的作用机理。经扫描电镜(SEM)观察,这两种菌的细胞膜完整性都被破坏,细胞内部的 pH 值下降,胞内 ATP 大量流失,并且伴有明显的细胞内溶物流出,最终导致细胞死亡。Oussalah 等人^[54]研究牛至精油、肉桂精油和香薄荷精油对大肠杆菌和李斯特氏菌的作用方式,得到了和 Turgis 等人相同的结论。孙岫等人^[55]对迷迭香酸的抑菌机理作了研究,发现迷迭香酸可改变金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的细胞膜通透性,导致胞内还原糖和蛋白质的渗漏,引起细胞死亡。Pasqua 等人^[56]在研究天然抑菌物质(丁香酚、百里香酚、香芹酚、柠檬烯和肉桂醛)对细胞膜的作用机理时发现,这些物质能显著降低细胞膜中的不饱和脂肪酸(UFA)含量,并且能够损坏细胞膜的结构。郑罡等人^[57]在研究茶树精油对白假丝酵母的抑制作用时,发现茶树精油能够扰乱菌体胆固醇、甘油三脂以及蛋白质的合成,从而产生抑菌与杀菌作用。

总体来说,目前对植物精油抑菌机理的研究还不成熟,活性抑菌物质的具体作用方式和作用靶点还有待进一步探讨。

1.4.6 植物精油在食品体系中的应用

最初关于植物精油抑菌活性的报道都集中于体外抑菌实验。直到近十多年来,才陆续出现了大量关于将精油应用于食品体系中的报道,这些食品体系涉及果蔬、肉制品、鱼、奶制品和粮食等方面。

顾仁勇^[58]研究了五种香辛料精油(牛至、山苍子、丁香、连翘和肉桂精油)对冷却猪肉的保鲜效果,通过将精油按不同比例进行复配,发现当牛至精油、丁香精油、山苍子精油、肉桂精油和连翘精油的浓度均为 0.9 %时,对冷却猪肉的保鲜效果最好,结合真空包装可以使储藏期可以达到 18 天。李鹏霞等人^[59]比较了 36 种植物精油对番茄的防腐保鲜效果,发现番茄经丁香罗勒等 10 种浓度均为 20 $\mu\text{L/L}$ 的精油处理后,好果率达 70 %以上,防腐保鲜效果明显。在冬枣的防腐保鲜实验中,加入峨眉含笑精油(浓度 4 $\mu\text{g/g}$)可以有效地防止冬枣果实腐烂,并且可以抑制 Vc 和还原性糖含量的下降速率^[60]。张春红等人^[61]测定了丁香、肉桂、小茴香精油对存在于大米中的两种主要霉菌的抑制效果,发现肉桂精油抑菌效果最佳;将 3 种精油应用于大米储藏中,可以有效的防止大米霉变。

很多研究发现,在食品体系中常常需要更高的精油浓度,才能达到与体外抑菌实验相同的抑菌效果^[62]。例如,在猪肉肠中需要 10 倍于体外抑菌实验的精油量,而在汤中则需要 50 倍。造成这种现象的原因,可能是因为食品体系中的营养丰富(富含脂肪和蛋白质),可以对造成伤害的菌体进行修复,从而降低了精油的抑菌效果。其次,如果食品中水分含量很低,或者食品中存在大量的胶体结构,就会影响精油的扩散效果,造成抑菌效果下降。另外,一些外部的因素,比如环境温度和包装类型,也可以影响微生物对精油的敏感度。

1.4.7 植物精油的安全性与应用前景

植物精油属于天然香料组分,在一般情况下被认为是对人体健康无害的,可以安全食用。2003 年,已有 2068 种天然香料被美国食品香料与萃取物制造者协会(FEMA)认定为是“对人体无害成分”(generally recognized as safe, GRAS)。但在不同的国家或地区,对于有些香料组分的规定是不一样的。如存在于茴香精油中的草蒿脑,已被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)列入可安全食用名单,在中国(GB 2760-1996)也被批准为允许使用的食品香料,但是其在欧盟是特别禁止使用的^[63]。

尽管大量的植物精油成分被认为是安全的,但是也有研究指出,个别成分具有微量的毒性或刺激性。例如长时间使用某些植物精油或其成分,可能会引发过敏性皮炎。一些常见的精油成分,如香芹酚和百里香酚,在动物实验中没有表现出副作用,但在细胞实验中却存在弱度的毒性^[64]。因此,新发现的天然植物精油,必需要通过体内代谢评价和毒理学实验后,才能获准使用。

1.5 本论文的研究意义和研究内容

1.5.1 研究意义

食品腐败问题一直存在于食品工业中。据报道,全世界每年由于腐败造成的食物损失约占总损失的 20 %左右,造成了巨大的经济损失。腐败的食品不仅品质被破坏,而且误食的话还会引起人体疾病,危害人类健康^[65,66]。食品腐败由物理、化学及微生物等多方面的作用而致,其中微生物方面的影响最为明显。

为防治食品腐败问题,长期以来的做法是在食品中添加化学防腐剂。化学防腐剂以其使用方法简便、成本低廉、效果显著等诸多优点而被广泛应用,常用的有苯甲酸钠、山梨酸钾、丙酸和尼泊金甲酯等。但经研究发现,长期食用化学防腐剂会危害人体健康^[67],并且其防腐效果很大程度上受食品微生物种类、溶解度

以及 pH 值环境等影响因素的限制。近些年来,天然防腐剂的关注度在不断提高。这类防腐剂一般具有天然、高效、无毒或低毒等特点。天然绿色、回归自然是现代人生活的追求,随着人们对自身健康问题的愈发重视,健康、绿色的天然防腐剂将会日益受到人们的青睐^[68]。

植物源防腐剂是天然防腐剂的重要组成部分,而抑菌植物中真正起抑菌防腐作用的是其精油。研究发现,许多植物精油具有良好的抑菌活性,有作为天然防腐剂的潜在价值。同时也有研究表明,精油在食品中的扩散程度受食品内部空间结构位阻以及精油本身水溶性较差的限制,因此当向食品体系中添加植物精油作为防腐剂时,往往需要更高的精油浓度,才能达到与体外抑菌实验相同的效果。而高浓度的精油会改变食品本身的风味,影响食品的感官品质^[69,70]。此外,目前关于植物精油的抑菌机理尚不明确,精油对菌体的作用方式还有待进一步讨论。

针对上述问题,本论文的研究目的和意义是:

(1) 筛选出几种抑菌活性强的植物精油,并对它们进行复配组合,研究复配精油的抑菌活性,希望可以利用协同增效作用,达到降低精油使用量的目的;另一方面,希望可以筛选出增溶效果较好的增溶剂,改善精油的水溶性,提高其抑菌效果,以降低精油的使用量。

(2) 从植物精油对菌体的细胞膜毒性入手,对精油的抑菌机理进行探讨,为精油在食品中的应用提供理论基础。

1.5.2 研究内容

本课题的研究内容主要有以下几方面:

(1) 利用滤纸片法对 10 种植物精油的体外抑菌活性进行筛选,并对筛选出的精油进行稳定性分析(pH 值、温度和紫外线照射的影响)。

(2) 用梯度稀释法测定所选植物精油的最小抑菌浓度(MIC),并用棋盘稀释法比较几种复配精油组合的联合抑菌活性,寻求最低的复配精油使用量。

(3) 利用气质联用技术(GC/MS),分析所选植物精油的化学组成。

(4) 从复配精油对四种供试菌种生长曲线的影响、对菌体细胞膜通透性的影响(扫描电镜观察菌体结构、细胞溶出物的测定和电导率的测定)以及对菌体细胞膜脂脂肪酸变化的影响这几方面,研究复配精油对菌体的作用机理。

(5) 比较 3 大类(吐温系列乳化剂、环糊精及其衍生物和聚乙二醇系列溶剂)共 9 种增溶剂对所选植物精油在水相中溶解度的影响,并对增溶体系(增溶剂+复配精油)的抑菌活性和抑菌机理进行研究,以期可以得到一种性质优良的精油增溶剂。

第二章 十种天然植物精油的体外抑菌活性研究

2.1 引言

长期以来,植物精油(EO)以其独特的气味和增香作用,被广泛地应用于香精香料行业和化妆品行业。随着人们对植物精油化学成分和生物特性研究的深入,其表现出的强抑菌活性越来越得到学者的关注,成为寻找新型安全高效的天然防腐剂的重要来源之一。大量研究发现,许多植物精油具有抑菌活性强,无刺激作用,毒副作用小,安全性高的优点。因此,将植物精油开发为天然防腐剂,符合现代人们追求绿色安全生活的需求,具有巨大的潜在市场价值。

目前关于植物精油抑菌活性的报道有很多,主要集中于抑菌植物的筛选以及精油成分的分析中,并且已经筛选得到了一些抑菌活性很强的植物精油或组分。但是,已有的报道大多仅限于对单精油抑菌活性的研究,对复配精油的研究还很少^[71]。当植物精油作为天然防腐剂用于食品中时,会产生一些难以遮盖的气味,影响食品品质。因此,研究复配精油的协同作用,可以在保证抑菌效果的前提下,减少精油使用量,从而解决气味的可接受性问题。

本章主要的研究内容是比较筛选十种天然植物精油(牛至精油,佛手柑精油,绿薄荷精油,紫苏叶精油,薰衣草精油,鼠尾草精油,广藿香精油,迷迭香精油,罗勒精油和艾叶精油)对四种供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)的体外抑菌能力,并且对筛选出的精油进行稳定性分析,包括 pH 值、温度和紫外线照射的影响。随后,对所选精油的最小抑菌浓度(MIC)进行测定,并且研究几种复配精油的联合抑菌活性,旨在为植物精油在抑菌领域应用技术的开发提供科学依据。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 供试菌种

细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 8739、金黄色葡萄糖球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633

真菌:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC 9763

以上菌种购自中国科学院微生物研究所(The Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, IMCAS)。

2.2.1.2 植物精油(EO)

本实验所选十种植物精油如下：牛至精油，佛手柑精油，绿薄荷精油，紫苏精油，薰衣草精油，鼠尾草精油，广藿香精油，迷迭香精油，罗勒精油和艾叶精油。

以上精油全部购自中国湖南长沙冠香日化贸易公司。所有精油都是通过水蒸汽蒸馏法制得，实验前置于低温(4 ℃)、避光环境下保存。关于精油的细节描述列于表 2-1 中。

表 2-1 十种植物精油的细节描述

Table 1 The details of ten plant essential oils.

精油种类	英文名	种拉丁名	蒸馏部位
广藿香	Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>	叶子
鼠尾草	Clary sage	<i>Salvia sclarea</i>	叶子、花朵
迷迭香	Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	嫩枝
罗勒	Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	叶子、花朵
绿薄荷	Spearmint	<i>Mentha spicata</i>	茎、叶子
牛至	Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	全草
紫苏	Perilla	<i>Perilla arguta</i>	叶子
艾叶	Absinthe	<i>Artemisia absinthium</i>	叶子、嫩枝
佛手柑	Bergamot	<i>Citrus bergamia</i>	果皮
薰衣草	Lavender	<i>Lavandula angustifolia</i>	花朵

2.2.1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(细菌)：牛肉膏 3 g，蛋白胨 1 g，NaCl 0.5 g，琼脂 1.5-2.0 g (液体培养基不含琼脂)，水 1000 mL，pH 为 7.0-7.2 之间 (使用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH)。

YPD 培养基(真菌)：酵母浸粉 1 g，蛋白胨 2 g，葡萄糖 2 g，琼脂 1.5-2.0 g (液体培养基不含琼脂)，水 1000mL，自然 pH 值。

2.2.2 实验仪器及试剂

仪器：无菌超净操作台，紫外可见分光光度计，电子天平，全自动立式电热

压力蒸汽灭菌锅, 恒温振荡箱, 生化培养箱, 玻璃仪器气流烘干机, 移液枪(各种量程), pH 计, 打孔器, 直尺。另外, 还有无菌操作工具, 如接种环, 培养皿, 试管, 酒精灯, 一次性枪头和涂布棒等。

试剂: 柠檬酸, 氢氧化钠, 硫酸卡那霉素, 苯甲酸钠, 山梨酸钾, 尼泊金甲酯。

2.2.3 实验方法

2.2.3.1 培养基的配制

按 2.2.1.3 中的配方分别配制牛肉膏蛋白胨培养基(固体和液体)和 YPD 培养基(固体和液体), 115 °C、30 min 灭菌后待用。

2.2.3.2 菌悬液的配制

从经过活化的菌体斜面上挑取一环菌体接种于相应的液体培养基中, 放入恒温振荡培养箱培养至对数生长期(对数生长期的细胞代谢最旺盛, 对外界环境因素十分敏感, 故用作抑菌实验)。根据生长曲线来看, 细菌培养至对数生长期的时间约为 8-10 h 左右, 酵母培养至对数生长期的时间约为 12-16 h 左右。分别吸取以上培养时间的供试菌液 0.5 mL, 加入无菌水倍比稀释到 10^5 - 10^6 CFU/mL^[72], 备用。

2.2.3.3 精油的抑菌活性——抑菌圈的测定(滤纸片法)^[73]

使用打孔器, 将定性滤纸制成小圆纸片(D=6 mm), 高压灭菌后备用。无菌条件下, 在已灭菌的培养皿中倾入相应菌种的培养基 20-25 mL, 冷却凝固后制成固体平板。吸取已制备好的菌悬液 200 μ L 加入到相应的固体平板培养基中, 涂布均匀。取滤纸片贴在含菌平板上, 在每片滤纸片上滴加 5 μ L 植物精油, 每皿贴 3 片, 贴时注意滤纸片之间要保持一定的距离。精油在含菌平板上自纸片中心向外围扩散, 逐渐形成由大到小的浓度梯度, 从而可以抑制供试菌种的生长, 形成透明的抑菌圈。根据抑菌圈直径的大小可初步判断精油的抑菌效果。此外, 选取一种抗生素(硫酸卡那霉素)和三种化学合成防腐剂(苯甲酸钠、山梨酸钾和尼泊金甲酯)作为阳性对照, 用以比较精油的抑菌效果。将各菌种放入生化培养箱, 细菌在 37 °C 下培养 24 h, 酵母在 28 °C 下培养 48 h。选取抑菌圈明显的平板测量直径大小, 结果取重复试验的平均值。

2.2.3.4 pH 值对精油抑菌活性的影响

用 2% 的 NaOH 和 50% 的柠檬酸将培养基的 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 五个梯度，并按 2.2.3.3 的方法进行抑菌圈的测定。研究 pH 值对精油抑菌活性的影响

2.2.3.4 热处理对精油抑菌活性的影响

将各精油分别置于 80℃、100℃ 和 121℃ 下受热 15 min，用未经热处理的精油作为对照，然后按 2.2.3.3 的方法进行抑菌圈的测定。研究热处理对精油抑菌活性的影响。

2.2.3.5 紫外线照射对精油抑菌活性的影响

将各精油分别在紫外灯下照射 20 min、40 min 和 60 min，用未处理的精油作为对照，然后按 2.2.3.3 的方法进行抑菌圈的测定。研究紫外线照射对精油抑菌活性的影响。

2.2.3.6 植物精油最小抑菌浓度(MIC)的测定^[74]

对于经过滤纸片法初筛得到的具有较好抑菌活性的植物精油，采用试管梯度稀释法测定其最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)。取 8 支 10 mL 的试管(编号 1-8)，每管加入相应的液体培养基 3 mL(其中 1 号管中加入 6 mL 液体培养基)。在 1 号管中加入 20 μ L 植物精油，然后进行梯度稀释，使得 1-8 号试管中的最终精油浓度范围为 0.039-5 μ L/mL。最后，向每个试管中加入 50 μ L 菌悬液。同时设立对照组：阴性对照组只含培养基和菌液，不含精油；阳性对照组除含培养基和菌液外，每管再加入标准抗生素——硫酸卡那霉素(50 μ g/mL)。细菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌)置于 37℃ 下培养 24 h，酿酒酵母置于 28℃ 下培养 48 h。培养结束后，如培养基出现浑浊，则说明有菌生长；对于临界的透明试管，需要用营养平板进行检验。将完全抑制菌落生长的最低精油浓度定义为最小抑菌浓度(MIC)。

2.2.3.7 复配植物精油的抑菌活性

根据滤纸片法的初筛结果以及最小抑菌浓度(MIC)的测定结果，选取对供试菌

种抑菌效果明显的精油进行复配抑菌实验。复配设计实验采用棋盘稀释法 (checkerboard method) (图 2-1)。具体操作：对于每一种供试菌，选取 9 支试管按照横排 3 管×纵列 3 管的顺序排布。每支试管中加入 3 mL 培养基。将 A 精油和 B 精油按照一定浓度进行稀释，A 精油按横排从上至下加入到各试管中，B 精油按纵列从右至左加入到各试管中，使得 A、B 精油在方阵中的最终浓度分布如图 2-1 所示。细菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌)置于 37 ℃下培养 24 h，酿酒酵母置于 28 ℃下培养 48 h。培养结束后，采用测定最小抑菌浓度 (MIC) 的方法对各试管内的菌体生长情况进行检验。实验重复 3 次。

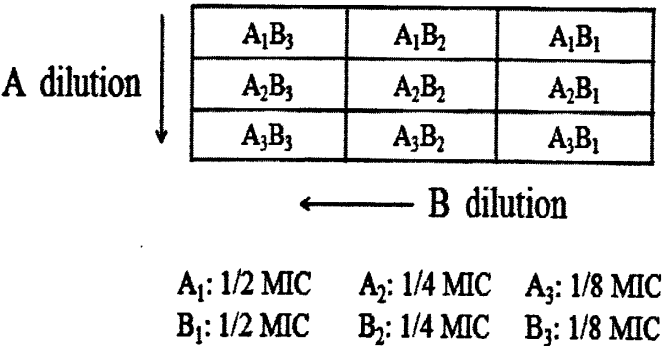


图 2-1 棋盘稀释法示意图

Fig.2-1 Sketch map of checkerboard method

棋盘稀释法的结果采用组分抑菌浓度指数 FICI(Fractional inhibitory concentration indices)进行评价^[75]。FICI 可按下列公式进行计算：

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{A \text{ 联合时的 MIC}}{A \text{ 单独时的 MIC}} + \frac{B \text{ 联合时的 MIC}}{B \text{ 单独时的 MIC}}$$

FICI 的判定标准为：FICI < 0.5 为协同作用，0.5 ≤ FICI ≤ 1 为相加作用，1 < FICI ≤ 2 为无关作用，FICI > 2 为拮抗作用。

2.3 实验结果与讨论

2.3.1 十种植物精油的抑菌活性

十种植物精油(牛至精油，佛手柑精油，绿薄荷精油，紫苏叶精油，薰衣草精油，鼠尾草精油，广藿香精油，迷迭香精油，罗勒精油、艾叶精油)对四株供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)的抑菌活性(抑菌圈大小)测定结果在表 2-2 中列出。

滤纸片法实验结果的判定标准是^[76]: 抑菌圈直径大于 20 mm 为非常敏感, 介于 12-20 mm 时为中度敏感, 介于 7-12 mm 时为弱度敏感, 无抑菌圈为不敏感。

表 2-2 十种植物精油的抑菌活性

Table 2-2 Antimicrobial activity of ten EOs against the tested microorganisms

抑菌剂		抑菌圈直径 ^a (mm)			
		革兰氏阳性菌		革兰氏阴性菌	真菌
		金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠杆菌	酿酒酵母
精油	广藿香	10.1±0.4	10.4±0.3	0	8.1±0.3
	鼠尾草	15.4±0.4	15.0±0.6	0	10.0±0.4
	迷迭香	10.2±0.2	0	8.6±0.2	12.3±0.5
	罗勒	23.3±0.4	20.2±0.3	15.2±0.5	18.3±0.6
	绿薄荷	0	16.1±0.6	0	12.6±0.8
	牛至	27.4±0.5	27.4±0.7	18.2±0.8	27.2±0.6
	紫苏	0	15.0±1.7	0	25.9±0.2
	艾叶	0	15.2±0.6	0	11.5±0.6
	佛手柑	26.2±0.6	24.3±0.6	0	15.2±0.4
	薰衣草	0	13.5±1.0	0	11.0±0.4
抗生素 ^b	硫酸卡那霉素	19.5±0.4	18.4±0.6	24.3±0.6	21.0±0.3
化学防腐剂 ^c	苯甲酸钠	10.3±0.4	7.8±0.2	10.7±0.4	9.8±0.3
	山梨酸钾	10.6±0.3	8.7±0.2	11.9±0.4	8.5±0.3
	尼泊金甲酯	12.6±0.3	11.4±0.4	11.8±0.3	8.8±0.4

^a 实验结果表示为: 抑菌圈直径平均值 ± 标准偏差(3 次实验)

滤纸片直径(6 mm)包含在测量结果中

^b 硫酸卡那霉素的浓度为 30 µg/disc

^c 化学防腐剂(苯甲酸钠、山梨酸钾和尼泊金甲酯)的浓度均为 200 µg/disc

参照以上标准, 牛至精油对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母的抑菌活性最强, 抑菌圈直径分别达到了 27.4 ± 0.5 mm、 27.4 ± 0.7 mm 和 27.2 ± 0.6 mm。罗勒精油对革兰氏阳性菌的抑菌活性强烈, 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆

菌的抑菌圈直径分别达到了 $23.3 \pm 0.4 \text{ mm}$ 和 $20.2 \pm 0.3 \text{ mm}$ 。类似地，佛手柑精油也对革兰氏阳性菌表现出了强抑菌性，对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径分别达到了 $26.2 \pm 0.6 \text{ mm}$ 和 $24.3 \pm 0.6 \text{ mm}$ 。紫苏精油对细菌的抑制效果一般，只对枯草芽孢杆菌有一定的作用($15.0 \pm 1.7 \text{ mm}$)，但是其对酿酒酵母有很强的抑制专一性，抑菌圈直径达到了 $25.9 \pm 0.2 \text{ mm}$ ，仅次于牛至精油的抑菌效果。值得注意的是，大肠杆菌(革兰氏阴性菌)在精油抑菌实验中表现出了低敏感度，只有牛至精油和罗勒精油对其表现出了一定的抑制效果，抑菌圈直径分别为 $18.2 \pm 0.8 \text{ mm}$ 和 $15.2 \pm 0.5 \text{ mm}$ 。植物精油对四种供试菌种的抑制效果见图 2-2。

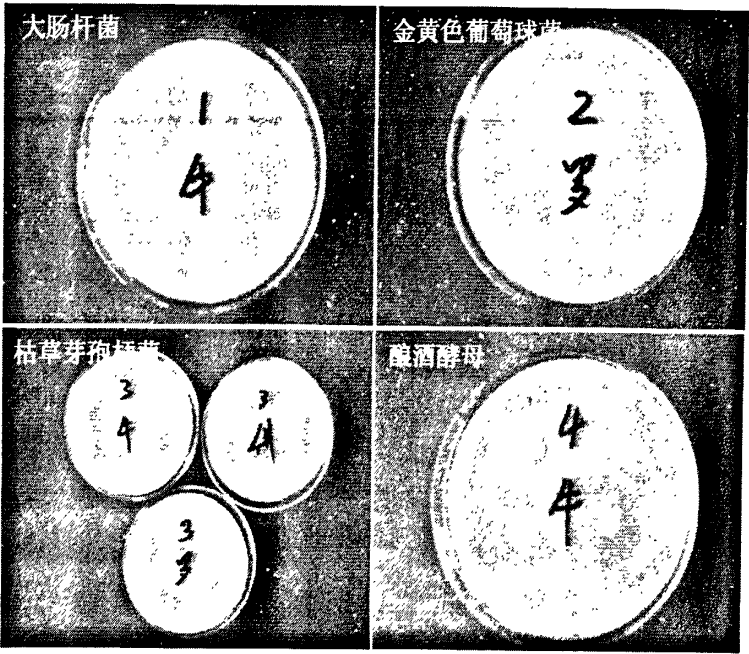


图 2-2 植物精油对供试菌种的抑菌效果

Fig.2-2 The inhibiting effects of selected EOs against the tested microorganisms

通常来讲，革兰氏阳性菌对植物精油的敏感性要大于革兰氏阴性菌^[77]。这是因为革兰氏阴性菌的细胞壁外侧含有一层脂多糖，它能够阻止疏水性的化合物进入到菌体细胞体内，从而降低了抑菌效果^[78]。本实验中，革兰氏阴性菌大肠杆菌就符合这一规律，只有牛至精油和罗勒精油对其有中度敏感的抑制作用(抑菌圈直径 15-19 mm)。

总体来看，和对照组(硫酸卡那霉素、苯甲酸钠、山梨酸钾和尼泊金甲酯)相比较，某些植物精油表现出了很强的抑菌效果。具体来看，牛至精油对所有菌种都具有较强的抑制活性，罗勒精油和佛手柑精油对革兰氏阳性菌有很好的抑制效果，而紫苏精油则对酿酒酵母有很强的抑制专一性。因此，我们选定牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油作为研究对象进行后续的实验。

2.3.2 pH 值对精油抑菌活性的影响

在不同的 pH 条件下,牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油对四株供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)的抑菌活性(抑菌圈大小)测定结果见表 2-3 所示。

表 2-3 不同 pH 值下精油对供试菌种的抑菌圈直径(mm)

Table 2-3 Antimicrobial activities of selected EOs against the tested microorganisms under different pH value

菌种	精油	pH 值				
		4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
大肠杆菌	对照	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长
	牛至精油	>30	>30	20.8±0.6	18.9±0.6	16.1±0.3
	罗勒精油	>30	>30	17.8±0.3	15.7±0.7	13.0±0.2
金黄色葡萄球菌	对照	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长
	牛至精油	>30	>30	29.7±0.9	28.5±0.5	26.5±0.5
	罗勒精油	>30	>30	25.8±1.1	24.1±0.8	22.3±0.6
	佛手柑精油	>30	>30	29.8±0.9	27.2±0.5	24.6±0.4
枯草芽孢杆菌	对照	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长
	牛至精油	>30	>30	28.4±0.5	27.3±0.8	24.8±0.9
	罗勒精油	>30	>30	23.7±0.4	22.9±1.0	20.6±0.8
	佛手柑精油	>30	>30	25.9±0.5	24.5±0.4	21.4±0.7
酿酒酵母	对照	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长	正常生长
	牛至精油	>30	>30	29.0±0.6	27.5±1.2	25.7±1.2
	紫苏精油	>30	>30	28.7±0.3	25.4±0.9	23.7±1.1

实验结果表示为: 抑菌圈直径平均值 ± 标准偏差(3 次实验)

滤纸片直径(6 mm)包含在测量结果中

表 2-3 的结果显示,各对照组菌种(不含精油)在 pH 4.0-8.0 范围内可以正常生长。加入相应的精油后,当 pH 值为 4.0 和 5.0 时,各供试菌种的生长被完全抑制,培养基上无任何菌落生长;随着 pH 值的增大(pH = 6.0、7.0、8.0),精油的抑菌作用逐渐减弱,表现为抑菌圈逐渐减小。

综上所述, 各种植物精油的抑菌效果与培养基的 pH 值有关。在 pH < 5.0 时, 抑菌效果非常显著, 培养基上无菌落生长; 在 pH > 5.0 时, 抑菌效果随 pH 值的增大而有所降低。精油在低 pH 条件下抑菌活性增强, 可能与供试菌种在酸性环境中自身活性降低有关; 另一方面, 也可能与精油活性成分在酸性环境下的结构形式有关。具体来讲, pH 的降低能够减小精油中酚类化合物上所带羟基的电离度, 使其疏水性增加, 因此更易与菌体的细胞膜及其脂蛋白相结合, 从而提高抑菌活性。

2.3.3 热处理对精油抑菌活性的影响

牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油分别经 80 ℃、115 ℃和 121 ℃处理 20 min 后, 对四株供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)的抑菌活性(抑菌圈大小)测定结果见表 2-4 所示。

表 2-4 不同温度处理后精油对供试菌种的抑菌圈直径(mm)

Table 2-4 Antimicrobial activities of selected EOs after heat treatment against the tested microorganisms

菌种	精油	处理温度 (℃)			
		80 ℃	115 ℃	121 ℃	对照(室温)
大肠杆菌	牛至精油	18.5±0.7	17.9±0.3	18.3±0.4	18.6±1.0
	罗勒精油	15.8±0.4	15.9±0.9	15.4±0.5	16.0±0.9
金黄色葡萄球菌	牛至精油	28.1±0.5	28.0±0.4	27.4±0.9	28.6±0.4
	罗勒精油	23.9±0.4	24.2±0.5	23.1±0.8	23.9±0.3
	佛手柑精油	25.5±0.9	25.9±0.5	24.6±0.7	24.8±0.5
枯草芽孢杆菌	牛至精油	28.1±0.2	27.3±0.4	28.0±0.9	27.6±0.8
	罗勒精油	23.1±0.5	23.7±0.5	24.1±0.4	24.1±0.3
	佛手柑精油	24.8±0.2	25.1±0.4	24.9±0.9	25.1±0.6
酿酒酵母	牛至精油	27.3±0.6	27.8±0.9	28.5±0.4	27.1±0.4
	紫苏精油	25.1±0.5	24.9±1.2	24.7±0.7	25.2±0.6

实验结果表示为: 抑菌圈直径平均值 ± 标准偏差(3 次实验)

滤纸片直径(6 mm)包含在测量结果中

由表 2-4 所示的结果可以看出, 与对照组(室温)的抑菌效果相比, 各精油经不同温度的热处理后, 其抑菌活性没有明显变化。这表明各植物精油具有良好的热稳定性。由于许多食品在加工过程中需要高温灭菌, 因此良好的热稳定性是天然防腐剂应具备的重要特性之一。

2.3.4 紫外线照射对精油抑菌活性的影响

牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油分别经紫外线照射 20 min、40 min 和 60 min 后, 对四株供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)的抑菌活性(抑菌圈大小)测定结果见表 2-5 所示。

表 2-5 紫外线照射后精油对供试菌种的抑菌圈直径(mm)

Table 2-5 Antimicrobial activities of selected EOs after ultraviolet radiation against the tested microorganisms

菌种	精油	紫外线照射时间(min)			
		20	40	60	对照
大肠杆菌	牛至精油	17.5±0.8	18.2±0.8	18.9±0.5	18.6±0.7
	罗勒精油	15.2±1.1	15.5±0.9	15.6±0.6	16.0±1.1
金黄色葡萄球菌	牛至精油	27.9±1.2	27.8±0.8	28.2±0.5	28.6±0.6
	罗勒精油	24.1±0.6	23.2±0.6	24.9±0.8	23.9±0.5
	佛手柑精油	26.1±0.8	24.7±0.4	25.8±1.1	24.8±0.8
枯草芽孢杆菌	牛至精油	27.0±0.5	26.1±1.1	26.8±0.5	27.6±0.7
	罗勒精油	23.9±0.4	22.9±0.9	23.7±0.6	24.1±0.5
	佛手柑精油	24.8±0.8	25.9±0.6	24.6±0.4	25.1±0.9
酿酒酵母	牛至精油	28.8±1.3	28.0±0.5	28.5±0.9	27.1±0.5
	紫苏精油	24.3±0.9	25.8±0.6	24.7±0.4	25.2±0.5

实验结果表示为: 抑菌圈直径平均值 ± 标准偏差(3 次实验)

滤纸片直径(6 mm)包含在测量结果中

由表 2-5 所示的结果可以看出, 四种精油经过不同时间的紫外线照射后, 其抑菌活性与未经紫外线照射时相比没有明显变化。这说明精油对紫外线具有较强的

稳定性。紫外线灭菌应用于许多食品的加工过程中，因此良好的紫外线照射稳定性也是天然防腐剂需具备的重要特性之一。

2.3.5 植物精油最小抑菌浓度(MIC)的测定

采用试管梯度稀释法测定了植物精油的最小抑菌浓度(MIC)，表 2-6 列出了供试菌种在不同浓度的精油作用下的生长情况以及 MIC 值。精油的 MIC 值越小，说明抑菌效果越强。

表 2-6 植物精油对供试菌种的最小抑菌浓度 MIC(μL/mL)

Table 2-6 Minimal inhibitory concentration (MIC) (μL/mL) of selected essential oils against the tested microorganisms

菌种	抑菌剂	抑菌剂浓度(μL/mL)								MIC(μL/mL)
		5.0	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	0.039	
大肠杆菌	牛至精油	-	-	-	-	++	++	++	++	0.625
	罗勒精油	-	-	-	++	++	++	++	++	1.25
	抗生素(KS)	-	-	-	-	-	-	+	++	0.156
金黄色葡萄球菌	牛至精油	-	-	-	-	+	++	++	++	0.625
	罗勒精油	-	-	-	++	++	++	++	++	1.25
	佛手柑精油	-	-	-	++	++	++	++	++	1.25
	抗生素(KS)	-	-	-	-	-	+	++	++	0.313
枯草芽孢杆菌	牛至精油	-	-	-	-	++	++	++	++	0.625
	罗勒精油	-	-	-	-	++	++	++	++	0.625
	佛手柑精油	-	-	-	+	++	++	++	++	1.25
	抗生素(KS)	-	-	-	-	-	+	++	++	0.313
酿酒酵母	牛至精油	-	-	-	-	+	++	++	++	0.625
	紫苏精油	-	-	-	-	+	++	++	++	0.625
	抗生素(KS)	-	-	-	-	-	+	++	++	0.313

注：- 表示无菌生长，+ 表示少量菌生长，++ 表示大量菌生长

KS：硫酸卡那霉素(μg/mL)

从表 2-6 中可以看出,供试菌种在不同浓度的精油作用下,生长情况差异明显,实验所得到的 MIC 值也与滤纸片法初筛精油抑菌活性时的结果基本一致。牛至精油对所有供试菌种都有较强的抑制效果, MIC 值均为 $0.625\ \mu\text{L/mL}$, 表现出了广谱抑菌性。紫苏精油对酿酒酵母的 MIC 值也达到了 $0.625\ \mu\text{L/mL}$, 表现出了很强的抗真菌活性。佛手柑精油对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)的抑制效果明显, MIC 值均为 $1.25\ \mu\text{L/mL}$ 。而罗勒精油对革兰氏阳性菌和阴性菌都有很好的抑制作用, 对大肠杆菌的 MIC 值为 $1.25\ \mu\text{L/mL}$, 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值分别为 $1.25\ \mu\text{L/mL}$ 和 $0.625\ \mu\text{L/mL}$ 。

在先前的报道中,牛至精油(*O. vulgare*)已经被证实有很强的抑制细菌和真菌的活性^[79,80,81]。本实验中,牛至精油在利用滤纸片法初筛抑菌效果时体现出了很强的抑制活性(抑菌圈直径最大),并且在 MIC 值的测定实验中对所有供试菌种表现出了最低的 MIC 值($0.625\ \mu\text{L/mL}$)。Hammer 等人^[82]也报道了类似的结果,他们测定的牛至精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 值均在 $0.5\text{-}1.2\ \mu\text{L/mL}$ 之间。罗勒精油(*O. basilicum*)对革兰氏阳性菌体现出了很强的抑制活性(MIC 值: $0.625\text{-}1.25\ \mu\text{L/mL}$),这一数值是 Runyoro 等人^[83]报道结果的数倍(MIC 值: $3.14\text{-}12.5\ \mu\text{L/mL}$)。由于 *O. basilicum* 存在许多不同的基因型种类,因此它们的精油成分含量也会不同,这可能是不同报道中抑菌活性差异的主要原因^[84]。据我们所知,目前对佛手柑精油(*C. bergamia*)和紫苏精油(*P. arguta*)抑菌活性的报道很少^[85,86],因此本实验所发现的佛手柑精油对革兰氏阳性菌的强抑制活性和紫苏精油对酿酒酵母的专一抑制性,还有待进一步研究。

2.3.6 复配植物精油的抑菌活性

采用棋盘稀释法(checkerboard method)对所选精油的联合抑菌活性进行了研究,并以 FICI 值进行效果评价。对各供试菌种所研究的复配精油组合如下:大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油);金黄色葡萄球菌(牛至精油-罗勒精油,牛至精油-佛手柑精油,罗勒精油-佛手柑精油);枯草芽孢杆菌(牛至精油-罗勒精油,牛至精油-佛手柑精油,罗勒精油-佛手柑精油);酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油)。复配精油的抑菌效果见表 2-7 所示。

我们使用 FIC 指数(FICI)来评价复配精油的联合抑菌活性。从表 2-7 中可以看出,对于金黄色葡萄球菌来讲,所有的复配精油组合(牛至精油-罗勒精油,牛至精油-佛手柑精油,罗勒精油-佛手柑精油)都显示出了协同作用, FICI 值均为 0.375。对于大肠杆菌,牛至精油和罗勒精油的组合可以实现相加作用(FICI 值为 0.75)。类似地,对于酿酒酵母,牛至精油和紫苏精油的组合也显示出了相加作用(FICI 值为 0.75)。对于枯草芽孢杆菌来讲,3 种复配精油组合都可以显示出相加作用,其中牛

至精油-罗勒精油和牛至精油-佛手柑精油组合的 FICI 值均为 0.75, 而罗勒精油-佛手柑精油组合的 FICI 值为 1。实验中没有发现无关作用和拮抗作用。

表 2-7 复配精油对供试菌种的 FIC 指数(FICI)

Table 2-7 FIC indices (FICI) of essential oil combinations against the tested microorganisms

菌种		牛至-罗勒		牛至-佛手柑		罗勒-佛手柑		牛至-紫苏	
		牛至	罗勒	牛至	佛手柑	罗勒	佛手柑	牛至	紫苏
大肠杆菌	MIC 单独	0.625	1.25						
	MIC 联合	0.313	0.313						
	FIC	0.5	0.25						
	FICI	0.75 (A)							
金黄色葡萄球菌	MIC 单独	0.625	1.25	0.625	1.25	1.25	1.25		
	MIC 联合	0.078	0.313	0.156	0.156	0.313	0.156		
	FIC	0.125	0.25	0.25	0.125	0.25	0.125		
	FICI	0.375 (S)		0.375 (S)		0.375 (S)			
枯草芽孢杆菌	MIC 单独	0.625	0.625	0.625	1.25	0.625	1.25		
	MIC 联合	0.313	0.156	0.313	0.313	0.313	0.625		
	FIC	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5		
	FICI	0.75 (A)		0.75 (A)		1 (A)			
酿酒酵母	MIC 单独							0.625	0.625
	MIC 联合							0.313	0.156
	FIC							0.5	0.25
	FICI							0.75(A)	

注: S 代表协同作用(S, $FICI < 0.5$), A 代表相加作用 ($A, 0.5 \leq FICI \leq 1$), I 代表无关作用 ($I, 1 < FICI \leq 2$), AN 代表拮抗作用 ($AN, FICI > 2$)

植物精油的气味是影响其在食品行业中应用的重要因素之一, 因此需要对精油气味的可接受性进行评价。本实验所选用的四种精油的气味可接受性顺序如下: 佛手柑精油 > 牛至精油 > 罗勒精油 > 紫苏精油。综合考虑复配精油的联合抑菌

活性, 气味可接受性和价格成本因素(精油的价格成本顺序: 紫苏精油 > 牛至精油 > 罗勒精油 > 佛手柑精油), 最终选定的复配精油组合如下: 大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油, MIC 联合: 0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$); 金黄色葡萄球菌(罗勒精油-佛手柑精油, MIC 联合: 0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$); 枯草芽孢杆菌(牛至精油-佛手柑精油, MIC 联合: 0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$); 酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油, MIC 联合: 0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$)。

植物精油的抑菌活性主要取决于其所含化学成分的结构特点(官能团), 以及各成分之间可能存在的协同作用^[87]。有研究表明, 植物精油的整体抑菌活性要比其所含的几种主要化学成分之间的混合物的抑菌活性更高^[88]。类似地, Burt^[89]和 Ultee 等人^[90]也证实, 在对精油抑菌活性的贡献方面, 精油中微量成分的存在比主要成分的简单混合更加重要, 并且精油中主要成分与微量成分的组合更有可能形成协同作用。比如, 墨角兰(一种牛至属植物)中的醋酸盐化合物对其精油抑菌活性有很大的影响^[87]。在精油中普遍存在的樟脑和桉树脑, 在它们的结构中都有含氧基团, 这些含氧基团已经被证实能够提高精油中萜烯类物质的抑菌活性^[91]。考虑到上述精油成分间的相互作用以及各种精油所含的化学成分差异, 精油之间的组合则更可能会实现协同效应, 从而提高抑菌活性。

一般情况下, 比起体外抑菌实验, 精油在实际食品模型中的抑菌效率会下降。比如, Uhart 等人^[92]将精油应用于牛肉进行防腐实验时发现, 其对牛肉中的沙门氏菌只有很微弱的抑制效果。因此, 当精油应用于食品中时, 需要添加更高的浓度才能达到和体外实验相同的抑制效果。但是, 如果这样做的话, 则会对食品的气味产生较大影响, 并且可能改变食品内部的组织结构^[93]。本实验中, 我们研究不同精油(牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油)组合之间的抑菌活性, 以期能够提高抑菌效率。结果表明, 所选的植物精油组合在较低浓度下能够有效地抑制供试菌种的生长, 因此将这些复配精油用于食品中以减少气味影响并且延长货架期, 是很有应用前景的。

2.4 本章小结

本章主要研究了十种天然植物精油(牛至精油, 佛手柑精油, 绿薄荷精油, 紫苏叶精油, 薰衣草精油, 鼠尾草精油, 广藿香精油, 迷迭香精油, 罗勒精油和艾叶精油)对四种供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)的体外抑菌活性, 主要得到了以下结论:

(1) 通过滤纸片法初筛十种植物精油的抑菌活性, 发现牛至精油对所有菌种都具有较强的抑制活性, 罗勒精油和佛手柑精油对革兰氏阳性菌有很好的抑制效果, 而紫苏精油则对酿酒酵母有很强的抑制专一性。初步选定这四种精油进行后续的研究。

(2) 四种精油的抑菌效果与培养基 pH 值有关。在低 pH 时($\text{pH} < 5.0$), 抑菌效果非常显著, 随着 pH 值的增大, 抑菌效果有所减弱。

(3) 经不同温度($80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$)的热处理后, 四种精油表现出了良好的热稳定性。

(4) 经过不同时间(20 min 、 40 min 和 60 min)的紫外线照射后, 四种精油表现出了对紫外线较强的稳定性。

(5) 采用试管梯度稀释法测定了四种精油的最小抑菌浓度(MIC)。结果发现, 牛至精油对供试菌种都有较强的抑制效果, MIC 值均为 $0.625\text{ }\mu\text{L/mL}$ 。紫苏精油表现出了很强的抗真菌活性, 对酿酒酵母的 MIC 值为 $0.625\text{ }\mu\text{L/mL}$ 。佛手柑精油对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)的抑制效果明显, MIC 值均为 $1.25\text{ }\mu\text{L/mL}$ 。而罗勒精油对革兰氏阳性菌和阴性菌都有很好的抑制作用, 对大肠杆菌的 MIC 值为 $1.25\text{ }\mu\text{L/mL}$, 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值分别为 $1.25\text{ }\mu\text{L/mL}$ 和 $0.625\text{ }\mu\text{L/mL}$ 。

(6) 采用棋盘稀释法研究了复配精油的抑菌活性。最终选定的复配精油组合如下: 大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油, MIC_{联合}: $0.313\text{-}0.313\text{ }\mu\text{L/mL}$); 金黄色葡萄球菌(罗勒精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: $0.313\text{-}0.156\text{ }\mu\text{L/mL}$); 枯草芽孢杆菌(牛至精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: $0.313\text{-}0.313\text{ }\mu\text{L/mL}$); 酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油, MIC_{联合}: $0.313\text{-}0.156\text{ }\mu\text{L/mL}$)。

第三章 四种植物精油化学组成的 GC/MS 分析

3.1 引言

在第二章中,我们通过比较十种植物精油的抑菌效果,筛选得到了牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油这四种抑菌活性较强的精油作为下一步研究的对象。植物精油(EO)所含的成分复杂,种类很多,通常一种精油的组分就有几十甚至上百种。目前,虽然关于精油成分分析的报道有很多,但是由于测定方法和条件的不同,以及精油成分受植物选材影响的原因(植物种植的地理条件,植物生长阶段,提取部位等),得到的结果往往有很大差异。因此,有必要对本实验所选用的四种植物精油的组分和含量进行分析测定。

气相色谱/质谱联用技术(GC/MS)是对精油成分进行定性定量分析最常用的方法,具有分离效率高、快速简便、应用范围广等优点。本章采用 GC/MS 技术,对牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油的组分和含量进行定性定量分析,测定其抑菌活性成分,并对成分结构类型进行归纳总结,为进一步研究提供科学依据。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 实验材料

3.2.1.1 植物精油

牛至精油(*O. vulgare*), 罗勒精油(*O. basilicum*), 佛手柑精油(*C. bergamia*)和紫苏精油(*P. arguta*)购自中国湖南长沙冠香日化贸易公司,置于低温(4℃)、避光环境下保存。

3.2.1.2 实验仪器与设备

气相色谱/质谱联用仪(GC/MS): Agilent 7890A/5975C 气相色谱/质谱联用仪(安捷伦科技有限公司, 美国)

色谱柱: DB-624 毛细管柱(30 m×0.25 mm; 膜厚, 0.25 μm)

3.2.2 实验方法

气相色谱条件: 采用安捷伦 7890A 气相色谱仪, DB-624 极性毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm; 膜厚, 0.25 μm); 升温程序: 初始温度 60 °C, 保持 3 min, 以 5 °C/min 升温至 220 °C, 保持 1 min; 进样口温度为 250 °C; 载气为高纯氮气, 流速 1 mL/min; 进样量 0.2 μL, 分流比 4:1。

质谱条件: 电离方式为电子轰击(EI), 电子能量 70 eV; 离子源温度: 230 °C; 四级杆温度: 150 °C; 扫描范围 40-350 amu (atomic mass units)。

数据处理:

(1) 定性分析: 通过计算机检索, 与 NIST 08 质谱库(National Institute of Standards and Technology, NIST 08)提供的标准质谱图对照, 并结合相关文献资料^[94], 对精油成分进行定性分析。

(2) 定量分析: 采用色谱工作软件, 用自动积分法算出各峰的峰面积, 用面积归一化法计算精油中各化学成分的相对百分含量。

3.3 实验结果与讨论

利用气相色谱/质谱联用仪(GC/MS)按上述条件分别对牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油的化学成分进行分析和鉴定。四种精油的总离子流图分别如图 3-1、3-2、3-3 和 3-4 所示, 谱图中所对应的主要化学成分名称及相对含量见表 3-1。

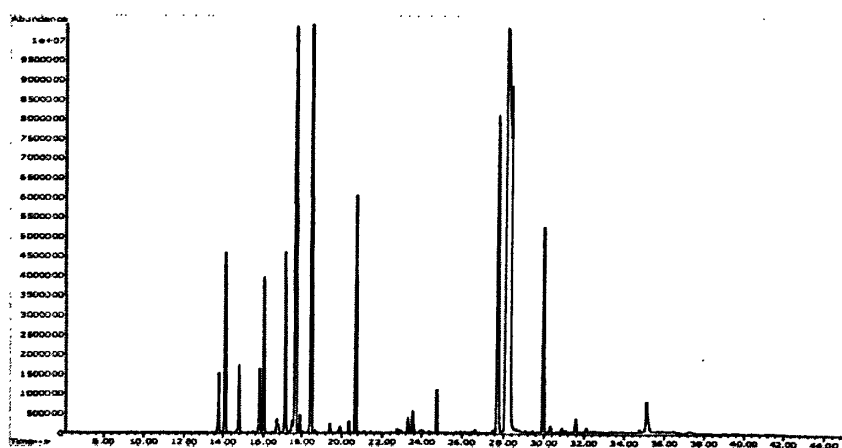


图 3-1 牛至精油的 GC/MS 总离子流图

Fig.3-1 The GC/MS chromatogram of oregano EO (*O. vulgare*)

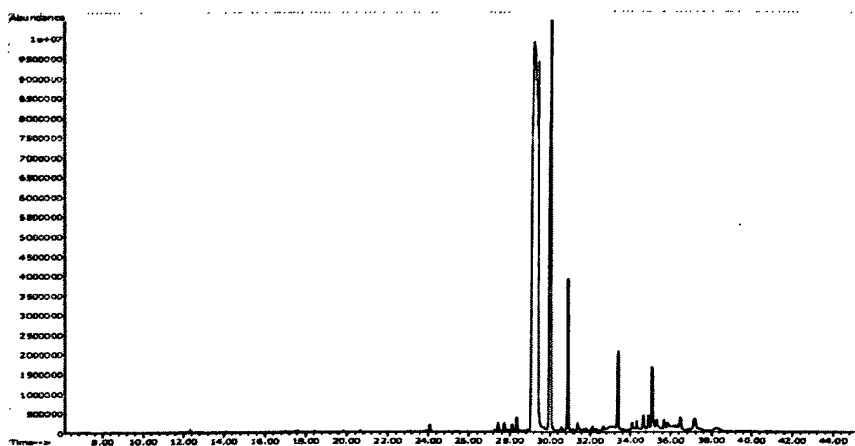


图 3-2 罗勒精油的 GC/MS 总离子流图

Fig.3-2 The GC/MS chromatogram of basil EO (*O. basilicum*)

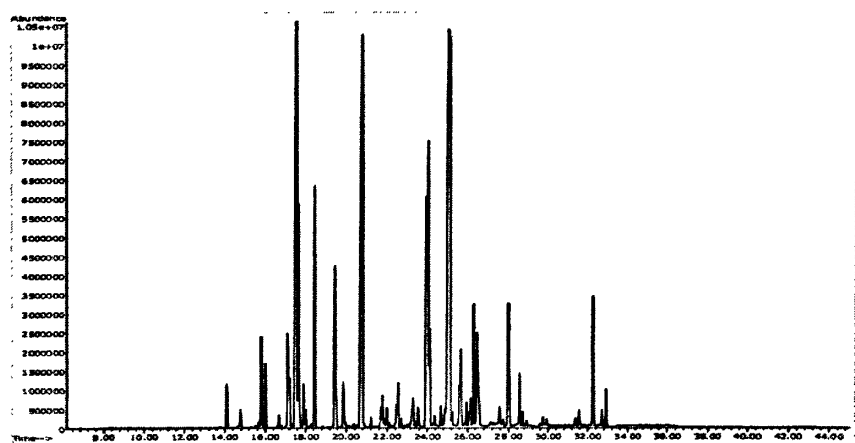


图 3-3 佛手柑精油的 GC/MS 总离子流图

Fig.3-3 The GC/MS chromatogram of bergamot EO (*C. bergamia*)

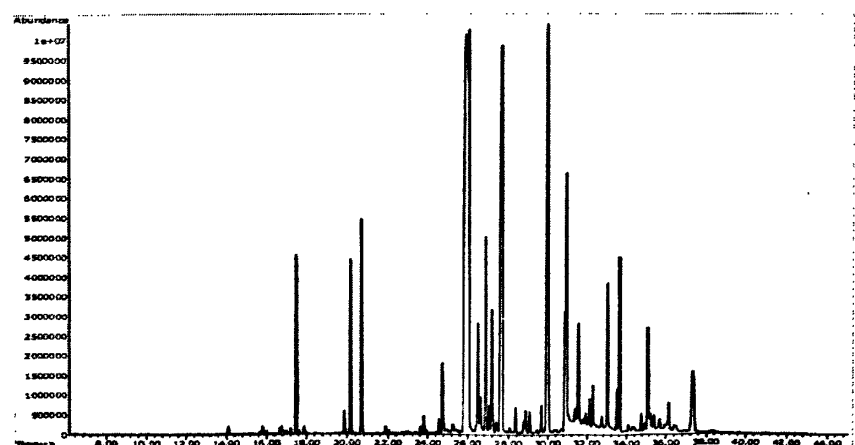


图 3-4 紫苏精油的 GC/MS 总离子流图

Fig.3-4 The GC/MS chromatogram of parilla EO (*P. arguta*)

表 3-1 牛至精油，罗勒精油，佛手柑精油和紫苏精油的主要化学成分组成(> 1 %)

Table 3-1 The main chemical compositions (> 1 %) of EOs of oregano, basil, bergamot and perilla

峰号	保留时间(min)	化合物名称	相对百分含量(%) ^a	RSD(%) ^b
牛至精油(<i>O. vulgare</i>)				
1	13.774	α -侧柏烯 (α -Thujene)	1.26 \pm 0.00	0.32
2	14.101	α -蒎烯 (α -Pinene)	4.05 \pm 0.01	0.31
3	14.783	莰烯 (Camphene)	1.52 \pm 0.00	0.17
4	15.801	β -蒎烯 (β -Pinene)	1.37 \pm 0.01	0.70
5	16.013	β -侧柏烯 (β -Thujene)	3.27 \pm 0.01	0.26
6	17.199	(+)-4 萆烯 ((+)-4-Carene)	3.84 \pm 0.02	0.45
7	17.675	对伞花烃 (p-Cymene)	15.10 \pm 0.05	0.36
8	18.487	γ -萜品烯 (γ -Terpinene)	12.52 \pm 0.06	0.51
9	20.701	里哪醇 (Linalool)	5.19 \pm 0.01	0.24
10	27.721	百里香酚 (Thymol)	8.79 \pm 0.03	0.35
11	28.145	香芹酚 (Carvacrol)	29.85 \pm 0.24	0.79
12	28.351	3-甲基-4-异丙基酚 (p-Thymol)	3.59 \pm 0.08	2.33
13	29.963	石竹烯 (Caryophyllene)	4.58 \pm 0.02	0.39
罗勒精油(<i>O. basilicum</i>)				
1	29.165	丁香酚 (Eugenol)	62.97 \pm 0.12	0.19
2	30.083	石竹烯 (Caryophyllene)	21.57 \pm 0.12	0.56
3	30.900	α -石竹烯 (α -Caryophyllene)	4.70 \pm 0.06	1.28
4	33.374	丁香酚乙酸酯 (Eugenol acetate)	2.29 \pm 0.01	0.24
5	35.104	石竹烯氧化物 (Caryophyllene oxide)	2.25 \pm 0.01	0.25
佛手柑精油(<i>C. bergamia</i>)				
1	15.801	β -蒎烯 (β -Pinene)	1.70 \pm 0.00	0.03
2	16.013	2-侧柏烯 (2-Thujene)	1.08 \pm 0.00	0.14
3	17.124	(+)-4 萆烯 ((+)-4-Carene)	1.77 \pm 0.00	0.11
4	17.556	D-柠檬烯 (D-Limonene)	13.35 \pm 0.01	0.10
5	18.455	γ -萜品烯 (γ -Terpinene)	4.29 \pm 0.01	0.19
6	19.422	异松油烯 (Terpinolene)	3.15 \pm 0.00	0.04
7	20.782	里哪醇 (Linalool)	13.97 \pm 0.02	0.15
8	23.956	α -萜品醇 (α -Terpineol)	4.87 \pm 0.01	0.30
9	24.052	1-(1, 3-二甲基-3-环己烯-1-基)-乙酮 (1-(1,3-Dimethyl-3-cyclohexen-1-yl) ethanone)	5.87 \pm 0.01	0.22
10	24.123	γ -萜品醇 (γ -Terpineol)	1.27 \pm 0.01	0.49
11	25.075	醋酸沉香醇酯 (Bergamol)	16.00 \pm 0.03	0.22

续表

峰号	保留时间(min)	化合物名称	相对百分含量(%) ^a	RSD(%) ^b
12	25.154	顺式-β-罗勒烯 (cis-β-Ocimene)	3.50±0.06	1.64
13	25.675	β-柠檬醛 (β-Citral)	1.45±0.00	0.28
14	26.292	五甲基环戊二烯(Pentamethylcyclopentadiene)	2.02±0.00	0.08
15	26.459	α-柠檬醛 (α-Citral)	2.66±0.00	0.18
16	27.984	香叶醇醋酸盐 (Geraniol acetate)	2.81±0.01	0.21
17	32.242	对甲酚 (p-Cresol)	2.28±0.00	0.04

紫苏精油(*P. arguta*)

1	17.479	柠檬烯 (Limonene)	2.97±0.05	1.76
2	20.161	紫苏烯 (Perillene)	2.78±0.04	1.58
3	20.697	里哪醇 (Linalool)	3.78±0.06	1.67
4	24.745	2,2-二甲基-3-庚酮 (2,2-Dimethyl-3-heptanone)	1.31±0.02	1.83
5	25.918	2-戊酰呋喃 (2-Pentanoylfuran)	23.03±0.04	0.19
6	26.066	4-乙酰基吡唑 (4-Acetylpyrazole)	3.87±0.03	0.78
7	26.509	薄荷酮 (Piperitone)	2.27±0.04	1.81
8	26.893	紫苏醛 (Perillaldehyde)	3.38±0.01	0.26
9	27.188	2-乙基-5-甲基呋喃(2-Ethyl-5-methylfuran)	2.14±0.04	1.77
10	27.689	1-甲氧基-4-(1-甲基苯基)-苯 (Benzene,1-methoxy-4-(1-methylpropyl)-)	13.04±0.24	1.82
11	29.671	丁香酚甲基醚 (Eugenol methyl ether)	1.08±0.01	0.54
12	30.003	石竹烯 (Caryophyllene)	11.81±0.25	2.08
13	30.877	α-石竹烯 (α-Caryophyllene)	1.85±0.04	1.98
14	30.968	α-香柠檬烯 (α-Bergamotene)	4.66±0.03	0.62
15	31.562	大香叶烯 D (Germacrene D)	2.26±0.03	1.17
16	33.015	肉豆蔻醚 ^c (Myristicin)	2.48±0.04	1.71
17	33.635	4-乙氧基苯基乙酸乙酯 (Ethyl 4-ethoxyphenylacetate)	3.06±0.01	0.21
18	34.958	石竹烯氧化物 (Caryophyllene oxide)	1.93±0.02	0.85
19	37.320	顺式细辛醚 (cis-Asarone)	2.22±0.04	1.96

^a实验结果表示为: 相对百分含量平均值 ± 标准偏差(3次实验)^bRSD: 相对标准偏差

3.3.1 牛至精油的化学组成

牛至精油的 GC/MS 总离子流图(图 3-1)共有 28 个色谱峰, 用面积归一化法计算出牛至精油中各化学成分的相对百分含量, 采用 NIST 08 标准质谱库对各个色谱峰进行检索和比较, 并经查阅相关文献资料, 最终鉴定了 28 种化合物的结构。表 3-1 列出了相对百分含量大于 1 % 的 13 种化合物的鉴定结果。

由表 3-1 所知, 牛至精油的主要化学成分是香芹酚(29.85 %), 对伞花烃(15.1 %), γ -萜品烯(12.52 %), 百里香酚(8.79 %), 里哪醇(5.19 %), 石竹烯(4.58 %)和 α -蒎烯(4.05 %)。另外, 3-甲基-4-异丙基酚、(+)-4 萜烯和 β -侧柏烯的含量也在 3 % 以上。可以看出, 酚类和萜烯类物质是牛至精油的主要成分, 另外还有少量的醇类和烃类物质。牛至精油几种主要化学成分的结构式如图 3-5 所示。

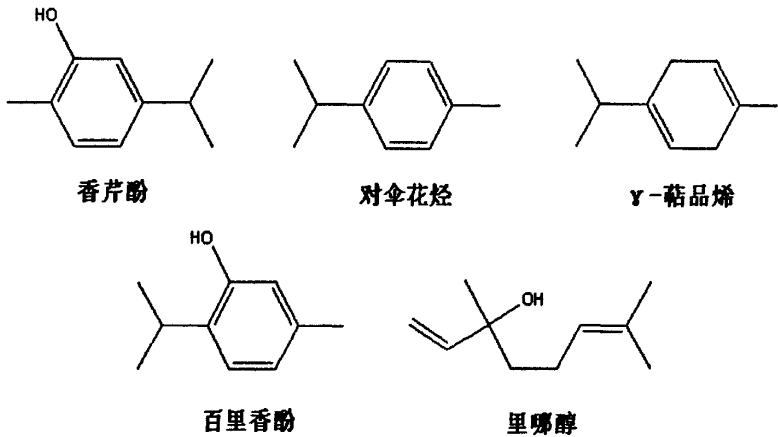


图 3-5 牛至精油主要化学成分的结构示意图

Fig.3-5 Chemical structural formula of several main components of oregano EOs

3.3.2 罗勒精油的化学组成

罗勒精油的 GC/MS 总离子流图(图 3-2)共有 18 个色谱峰, 用面积归一化法计算出罗勒精油中各化学成分的相对百分含量, 采用 NIST 08 标准质谱库对各个色谱峰进行检索和比较, 并经查阅相关文献资料, 最终鉴定了 18 种化合物的结构。表 3-1 列出了相对百分含量大于 1 % 的 5 种化合物的鉴定结果。

由表 3-1 所知, 罗勒精油的主要化学成分是丁香酚(62.97 %), 石竹烯(21.57 %)和 α -石竹烯(4.70 %)。丁香酚乙酸酯和石竹烯氧化物的含量也在 2 % 以上。可以看出, 罗勒精油的主要化学成分是丁香酚和石竹烯及其衍生物类物质。罗勒精油几种主要化学成分的结构式如图 3-6 所示。

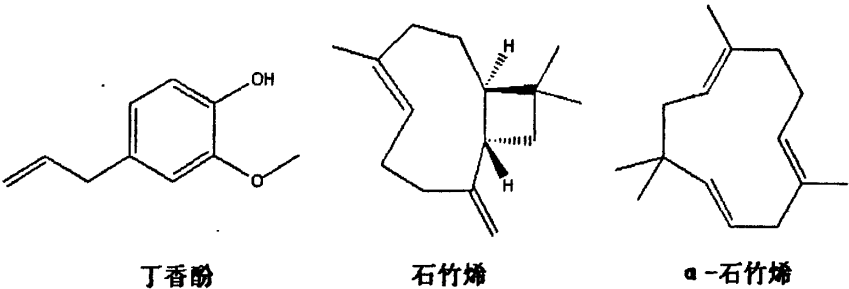


图 3-6 罗勒精油主要化学成分的结构示意图

Fig.3-6 Chemical structural formula of several main components of basil EOs

3.3.3 佛手柑精油的化学组成

佛手柑精油的 GC/MS 总离子流图(图 3-3)共有 58 个色谱峰，用面积归一化法计算出佛手柑精油中各化学成分的相对百分含量，采用 NIST 08 标准质谱库对各色谱峰进行检索和比较，并经查阅相关文献资料，最终鉴定了 58 种化合物的结构。表 3-1 列出了相对百分含量大于 1 % 的 17 种化合物的鉴定结果。

由表 3-1 所知，佛手柑精油的主要化学成分是醋酸沉香醇酯(16.00 %)，里哪醇(13.97 %)和 D-柠檬烯(13.35 %)。另外，1-(1, 3-二甲基-3-环己烯-1-基)-乙酮、α-萜品醇、γ-萜品烯、顺式-β-罗勒烯和异松油烯的含量也超过了 3 %。结构中含羰基和羟基的物质以及萜烯类物质是佛手柑精油的主要成分。佛手柑精油几种主要化学成分的结构式如图 3-7 所示。

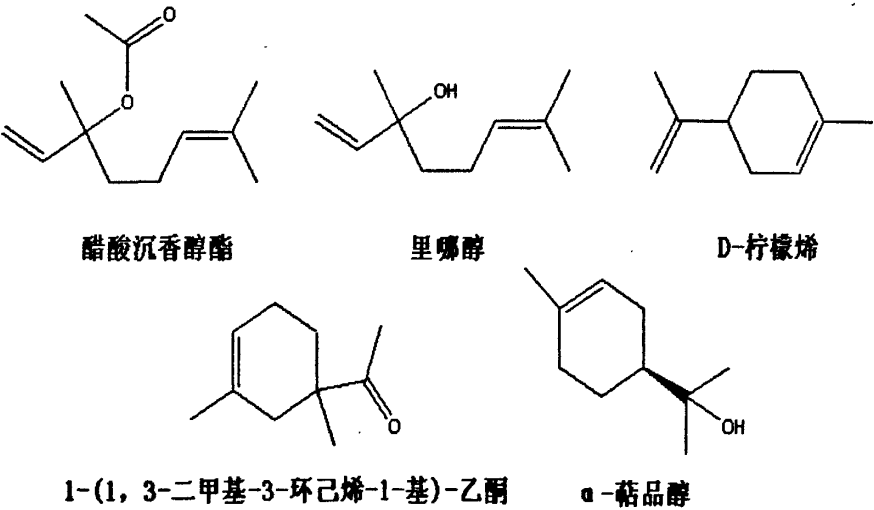


图 3-7 佛手柑精油主要化学成分的结构示意图

Fig.3-7 Chemical structural formula of several main components of bergamot EOs

3.3.4 紫苏精油的化学组成

紫苏精油的 GC/MS 总离子流图(图 3-4)共有 54 个色谱峰, 用面积归一化法计算出佛手柑精油中各化学成分的相对百分含量, 采用 NIST 08 标准质谱库对各色谱峰进行检索和比较, 并查阅相关文献资料, 最终鉴定了 54 种化合物的结构。表 3-1 列出了相对百分含量大于 1 % 的 19 种化合物的鉴定结果。

由表 3-1 所知, 紫苏精油的主要化学成分是 2-戊酰呋喃(23.03 %)、1-甲氧基-4-(1-甲基苯基)-苯(13.04 %)、石竹烯(11.81 %)和 α -香柠檬烯(4.66 %)。另外, 里哪醇、4-乙酰基吡唑、紫苏醛和 4-乙氧基苯基乙酸乙酯的含量也超过了 3 %。酮类物质和萜烯类物质是紫苏精油的主要化学成分。紫苏精油几种主要化学成分的结构式如图 3-8 所示。

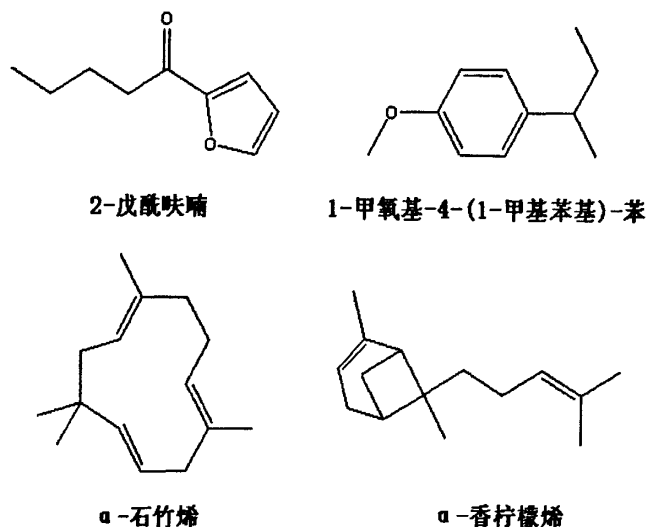


图 3-8 紫苏精油主要化学成分的结构示意图

Fig.3-8 Chemical structural formula of several main components of perilla EOs

综上所述, 我们可以看出各植物精油的成分十分复杂, 主要是由酚类、萜烯类和醛酮类物质组成。已有的研究表明^[95,96], 植物精油的抑菌活性主要是由于一些低分子量物质的存在, 比如酚类、萜烯类和醛酮类物质, 这些物质的单体已经被证实具有很好的抑菌效果。另外, 许多在精油中含量较低的成分, 比如 α -蒎烯, β -蒎烯, γ -蒎烯, 异松油烯, 薄荷酮和紫苏烯, 也被证实对精油的抑菌活性有很重要的作用^[89]。

以前报道中的牛至精油成分种类和含量和本实验中的实验结果有较大差异。Bozen 等人^[97]对牛至精油的成分进行了测定, 发现香芹酚和百里香酚的含量分别为 61.3 % 和 13.9 %, 而本实验的结果是两者含量分别为 29.85 % 和 8.79 %, 可能是

由于选用萃取牛至精油的植物部位不同而造成的。本实验所用的精油是从新鲜的牛至全草中通过水蒸汽蒸馏制得,而 Bozen 等人使用的牛至精油是以牛至的花枝为原料经蒸馏制成。据报道,罗勒植物的基因型可分为甲基肉桂酸型,甲基菱叶酚型,里哪醇型和甲基丁香酚型^[98]。Runyoro 等人^[83]发现 1,8-桉树脑(54.3 %), β -蒎烯(8.15 %) 和 α -蒎品醇(6.6 %)是罗勒精油的主要成分,而这些物质在本实验中的含量相对较低,这可能就是由于所使用的罗勒植物属于不同的基因型所致。目前关于佛手柑精油和紫苏精油化学成分组成的报道还不多见。本实验中,佛手柑精油和紫苏精油的主要成分分别是醋酸沉香醇酯(16.00 %)和 2-戊酰呋喃(23.03 %),这与以前的报道也有较大差别^[99,100,101]。总结起来,造成以上不同报道中精油化学成分差异的原因主要有:植物的基因型,植物种植的地理条件和气候,采摘的节气和植物的生长阶段等^[102]。

3.4 本章小结

本章采用气相色谱/质谱联用技术(GC/MS),对牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油的化学成分进行了分析鉴定,结果如下:

(1) 牛至精油中含有 28 种化学组分,主要物质是香芹酚(29.85 %),对伞花烃(15.1 %), γ -蒎品烯(12.52 %),百里香酚(8.79 %),里哪醇(5.19 %),石竹烯(4.58 %)和 α -蒎烯(4.05 %)。

(2) 罗勒精油中含有 18 种化学组分,主要物质是丁香酚(62.97 %),石竹烯(21.57 %)和 α -石竹烯(4.70 %)。

(3) 佛手柑精油中含有 58 种化学组分,主要物质是醋酸沉香醇酯(16.00 %),里哪醇(13.97 %)和 D-柠檬烯(13.35 %)。

(4) 紫苏精油中含有 54 种化学组分,主要物质是 2-戊酰呋喃(23.03 %),1-甲氧基-4-(1-甲基苯基)-苯(13.04 %),石竹烯(11.81 %)和 α -香柠檬烯(4.66 %)。

四种植物精油主要是由小分子的酚类、萜烯类和醛酮类物质组成,并含有少量的烃类和醇类物质。植物精油的抑菌活性大小与它们的化学组分有密切的联系,而且精油的抑菌活性是其所含单组分抑菌活性的整体表现。值得注意的是,本实验中佛手柑精油所含的醋酸沉香醇酯和紫苏精油所含的 2-戊酰呋喃是以前文献中没有提及的,其单体抑菌活性还需进一步研究。

第四章 复配精油的抑菌机理研究

4.1 引言

目前关于植物精油抑菌机理的研究尚不深入,普遍认为是精油的疏水性成分与细胞膜结合,从而导致其结构被破坏所致。Burt^[89]对精油的抑菌机理做了综述,并且列出了植物精油成分对细胞结构中的多个作用靶点(图 4-1)。这些作用方式主要包括:降解细胞壁;破坏细胞质膜;破坏膜蛋白;细胞内容物的渗出;细胞质凝结;质子主动运输力损耗。

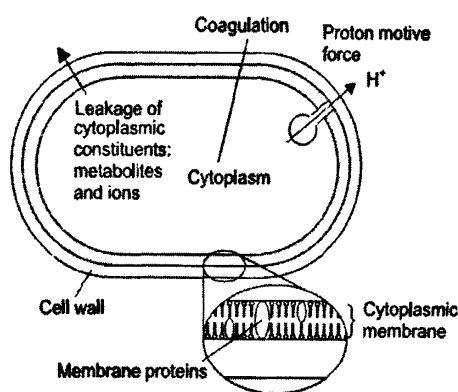


图 4-1 精油成分对菌体细胞抑制作用的靶点

Fig.4-1 Locations in the microbial cell thought to be sites of action for EO components

本章通过比较复配精油对四种供试菌种生长曲线的影响、对菌体细胞膜通透性的影响(扫描电镜观察菌体结构、细胞溶出物的测定和电导率的测定)以及对菌体细胞膜脂肪酸变化的影响,对复配精油的抑菌机理进行了初步探讨。

4.2 实验材料与方法

4.2.1 实验材料

4.2.1.1 供试菌种

细菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 8739、金黄色葡萄糖球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633

真菌: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC 9763

以上菌种均购于中国科学院微生物研究所。

4.2.1.2 植物精油(E0)

根据第二章的复配精油抑菌实验结果,在本章中选用牛至精油(*O. vulgare*),罗勒精油(*O. basilicum*),佛手柑精油(*C. bergamia*)和紫苏精油(*P. arguta*)作为研究对象,具体复配精油组合如下:大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油);金黄色葡萄球菌(罗勒精油-佛手柑精油);枯草芽孢杆菌(牛至精油-佛手柑精油);酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油)。

四种精油均购于中国湖南长沙冠香日化贸易公司。精油在进行分析前置于低温(4 °C)、避光环境下保存。

4.2.1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(细菌):牛肉膏 3 g,蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g,琼脂 1.5-2.0 g(液体培养基不含琼脂),水 1000 mL,pH 为 7.0-7.2 之间(使用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH)。

YPD 培养基(真菌):酵母浸粉 1 g,蛋白胨 2 g,葡萄糖 2 g,琼脂 1.5-2.0 g(液体培养基不含琼脂),水 1000 mL,自然 pH 值。

4.2.2 实验仪器及试剂

仪器:无菌超净操作台,紫外可见分光光度计,电导率仪,扫描电子显微镜(SEM),气相色谱/质谱联用仪(GC/MS),电子天平,全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅,生化培养箱,恒温振荡箱,高速离心机,台式离心机,恒温水浴锅,玻璃仪器气流烘干器,移液枪(各种量程),一次性枪头,接种环,培养皿,离心管(10 mL、50 mL),10 mL 试管,酒精灯。

试剂:盐酸,氢氧化钠,甲醇,乙醇,正己烷,戊二醛,磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,氯化钠,冰水浴。上述试剂均为色谱纯或分析纯。

4.2.3 实验方法

4.2.3.1 培养基的配制

按 4.2.1.3 中的配方分别配制牛肉膏蛋白胨培养基(液体)和 YPD 培养基(液体),115 °C、30 min 灭菌后待用。

4.2.3.2 菌悬液的配制

从经过活化的菌体斜面上挑取一环菌体接种于相应的液体培养基中,放入恒温振荡培养箱中培养至对数生长期。分别吸取各供试菌液 0.5 mL,加入无菌水倍比稀释到 10^5 - 10^6 CFU/mL,备用。

4.2.3.3 复配精油对四种供试菌种生长曲线的影响^[103]

将四种供试菌种培养至对数生长期,取出部分菌液,并分为对照组和复配精油组:对照组是将菌液直接用相应的液体培养基稀释到菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL;复配精油组是将菌液加到含复配精油浓度为 MIC_{联合}的液体培养基中,并使得菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL。将对照组和复配精油组继续培养,每隔 1 h 取样 2mL,离心收集菌体,重悬于 2 mL 生理盐水中测 OD 值(细菌为 OD_{600nm},真菌为 OD_{560nm}),制作出对照组生长曲线和复配精油组生长曲线,分析复配精油的抑菌活性及作用特点。

4.2.3.4 复配精油对菌体细胞膜通透性的影响

(1) 扫描电镜(SEM)观察菌体结构^[104]

将四种供试菌种培养至对数生长期,取出部分菌液,并分为对照组和复配精油组:对照组是将菌液直接用相应的液体培养基稀释到菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL;复配精油组是将菌液加到含复配精油浓度为 MIC_{联合}的液体培养基中,并使得菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL。将对照组和复配精油组继续培养 3h 后,5000 rpm 离心 15 min 收集菌体,用 0.1 M 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)清洗 3 次。按以下步骤进行电镜样品的制备:

① 固定:在菌体中加入 2.5 %戊二醛溶液,使细胞于 0-4 °C 下固定 4 h→磷酸盐缓冲液清洗 3 次→1 %锇酸固定 4 h→磷酸盐缓冲液清洗 3 次;

② 乙醇梯度脱水:使用 30 %, 50 %, 70 %, 90 % 的乙醇溶液脱水各 1 次,100 %乙醇脱水 2 次,15-20 min/次→再用乙酸异戊酯置换乙醇 2 次,20 min/次(注意:①、②中每步均需 5000 rpm 离心 10-15 min 收集菌体,弃上清后再倒入下一种试剂,并用胶头滴管来回吸几次以冲散菌块);

③ 临界点干燥:将菌体放入临界点干燥器样品室,进行 CO₂ 临界点干燥;

④ 喷金:将制好的干燥样品用导电性好的粘合剂粘在样品台上,采用离子溅射镀膜机喷金后,进行扫描电镜观察。

(2) 细胞溶出物的测定^[53]

将四种供试菌种接种于相应的 100 mL 液体培养基中,培养至对数生长期,5000 rpm 离心 15 min 收集菌体,清洗 3 次后,重悬于 100 mL 0.1 M 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)中,调整菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL。对每一种菌种,在菌悬液中分别加入不同浓度的复配精油(0, MIC_{联合}, 2MIC_{联合}),放入摇床恒温振荡 3h。随后,取 2 mL 样品于小离心管中,12000 rpm 离心 5 min,取 1 mL 上清液在 260 nm 波长下测定吸收值,计算菌体细胞溶出物的含量。用含有相同复配精油浓度的磷酸盐缓冲液接触菌体 2 min 后样品上清液的 OD_{260nm} 来校正复配精油组;用磷酸盐缓冲液接触菌体 2 min 后样品上清液的 OD_{260nm} 来校正对照组。

(3) 电导率的测定^[105]

将四种供试菌种接种于相应的 100 mL 液体培养基中,培养至对数生长期,5000 rpm 离心 15 min 收集菌体,清洗 3 次后,重悬于 100 mL 0.1 M 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)中,调整菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL。对每一种菌种,在菌悬液中加入浓度为 MIC_{联合}的复配精油,混匀后立即取出 5 mL,离心取上清液,稀释 10 倍,用电导率仪测定电导率;剩余的菌悬液继续振荡培养,分别于 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h 和 6 h 取样 5 mL,按上述方法测定上清液的电导率,从而研究菌体内部金属离子的渗出变化趋势。同时,设立不加复配精油的实验组为对照组。

4.2.3.5 复配精油对菌体细胞膜脂肪酸变化的影响^[106]

(1) 配制试剂:

溶液 1 (皂化试剂): 取 100 mL 色谱纯甲醇和 100 mL 去离子水混合均匀,再加入 22.5 g NaOH,搅拌至完全溶解。

溶液 2 (甲基化试剂): 取 6 mol/L 的盐酸溶液 260 mL 和 220 mL 色谱纯甲醇混合均匀。

溶液 3 (抽提萃取试剂): 取 100 mL 正己烷与 50 mL 乙醚混合均匀。

溶液 4 (碱洗试剂): 将 1.08 g NaOH 加入 90 mL 去离子水中。

溶液 5: NaCl 饱和溶液。

上述试剂均为色谱纯或分析纯。

(2) 操作方法:

① 菌体样品的制备

将四种供试菌种接种于相应的 100 mL 液体培养基中,培养至对数生长期,5000 rpm 离心 15 min 收集菌体,清洗 3 次后,重悬于 100 mL 0.1 M 的磷酸盐缓冲液(PBS,

pH 7.0)中, 调整菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL。对于每一种菌种, 加入相应的复配精油, 使其终浓度为 MIC 联合, 继续培养, 分别于 2 h, 4 h 和 6 h 取样, 离心取菌体, 备用。同时, 设立未经精油处理的菌体为对照组。

② 全细胞脂肪酸甲酯的提取

a 皂化: 取制备好的湿菌体 20-30 mg, 置于 5 mL 离心管中, 加入 1 mL 溶液 1, 盖紧离心管帽, 振荡 10-15 s, 将离心管置于沸水浴中 5 min, 取出振荡 10-15 s, 再度盖紧离心管帽, 继续沸水浴 25 min。

b 甲酯化: 沸水浴后将离心管置于冰浴中冷却, 打开离心管帽, 加入 2.0 mL 溶液 2, 盖紧离心管帽, 振荡 10-15 s, 然后放入 80 °C 水浴中反应 10 min, 反应结束后置于冰浴中冷却。

c 萃取抽提: 在冷却的离心中加入 1.25 mL 溶液 3, 盖紧离心管帽, 上下缓慢颠倒约 15 min, 弃去下层水相。

d 碱洗: 在剩余的有机相中加入 3.0 mL 溶液 4 及几滴溶液 5, 盖紧离心管帽, 上下缓慢颠倒 10 min, 吸取 1 mL 有机相至色谱样品瓶中, 备用。

③ GC/MS 测定条件

a 仪器: 安捷伦 7890A/5975C 气质联用仪器。

b GC 条件: PC-Wax 极性毛细管色谱柱(填充物: 聚乙二醇)。程序升温: 初始温度 50 °C, 保持 1 min; 以 25 °C/min 的速率升温到 200 °C, 保持 1 min; 再以 3 °C/min 的速率升温到 230 °C, 保持 18 min。进样口温度 250 °C; 载气为高纯氦气, 流速为 1 mL/min; 进样量为 1 μ L, 分流比 20:1。

c 质谱条件: 电离方式为电子轰击(EI), 电子能量 70 eV; 离子源温度: 230 °C; 四级杆温度: 150 °C; 扫描范围 10-800 amu (atomic mass units)。

d 数据处理: 通过计算机检索, 与 NIST 08 质谱库(National Institute of Standards and Technology, NIST 08)提供的标准质谱图对照, 并结合相关文献资料, 对脂肪酸成分进行鉴定; 用自动积分法算出各峰的峰面积, 用面积归一化法计算各脂肪酸成分的相对百分含量。实验重复 3 次, 取平均值。

4.3 实验结果与讨论

4.3.1 复配精油对四种供试菌种生长曲线的影响

复配精油对四种供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)生长曲线的影响结果见图 4-2 所示。

由图 4-2 可以看出, 与对照生长曲线相比, 经复配精油处理过的菌种生长曲线发生了明显变化。复配精油主要抑制了各供试菌体对数生长期的分裂和繁殖, 使

得活菌数明显下降,无法达到正常的生长高峰,并且很快地进入衰亡期,最终的菌体量仅达到(大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)或尚未达到(金黄色葡萄球菌)正常生长菌的一半。

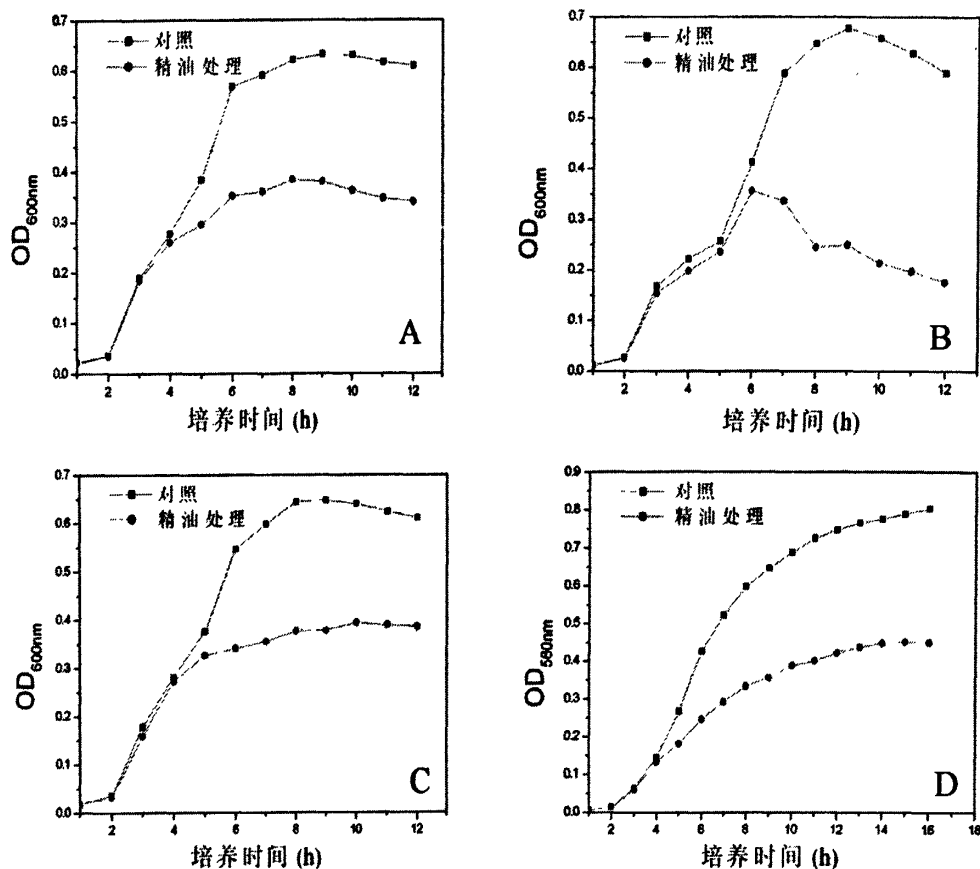


图 4-2 复配精油对四种供试菌种生长曲线的影响,

(A)大肠杆菌, (B)金黄色葡萄球菌, (C)枯草芽孢杆菌, (D)酿酒酵母

Fig.4-2 Growth curves of four tested microorganisms both normal and affected by EO combinations,

(A) *E.coli*, (B) *S.aureus*, (C) *B. subtilis*, (D) *S.cerevisiae*.

先前也有一些关于抑菌剂对菌体生长曲线影响的报道。王关林等人^[107]研究了天南星醇提取物对大肠埃希氏菌生长曲线的影响,发现向生长到对数期的菌体加入天南星醇提取物 3 h 后,活菌数目显著下降,菌体分裂受到强烈的抑制,无法正常生长。于庆华等人^[105]对鹿蹄草素作用下的绿脓杆菌的生长曲线进行了研究,结果表明鹿蹄草素能有效地抑制绿脓杆菌的生长,并且抑制强度随着药物浓度的增加而提高:根据生长曲线显示,当药物浓度为 0.2 mg/mL 时,最终菌体量为正常生长时的 2/3;当药物浓度增加为 0.4 mg/mL 时,最终菌体量为正常生长时的 3/5;而当药物浓度达到 0.8 mg/mL 时,菌体生长几乎被完全抑制,菌体量始终维持在很低的水平。

4.3.2 复配精油对菌体细胞膜通透性的影响

4.3.2.1 扫描电镜(SEM)观察菌体结构

通过扫描电镜(SEM)观察,正常生长以及经复配精油处理 3 h 后的各菌种形态特征分别如图 4-3(a)、4-3(b)、4-3(c)和 4-3(d)所示。

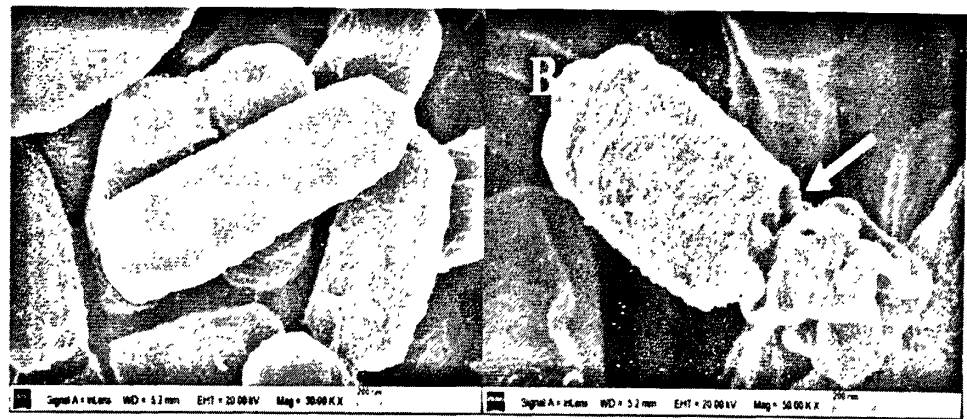


图 4-3(a) 大肠杆菌的扫描电镜图,

(A)正常生长; (B)经复配精油(牛至精油-罗勒精油)在 MIC 联合下作用 3h

Fig.4-3(a) Scanning electron micrographs of *E. coli* cells, (A) untreated; (B) treated with the combinations of oregano EO and basil EO at MIC for 3h.

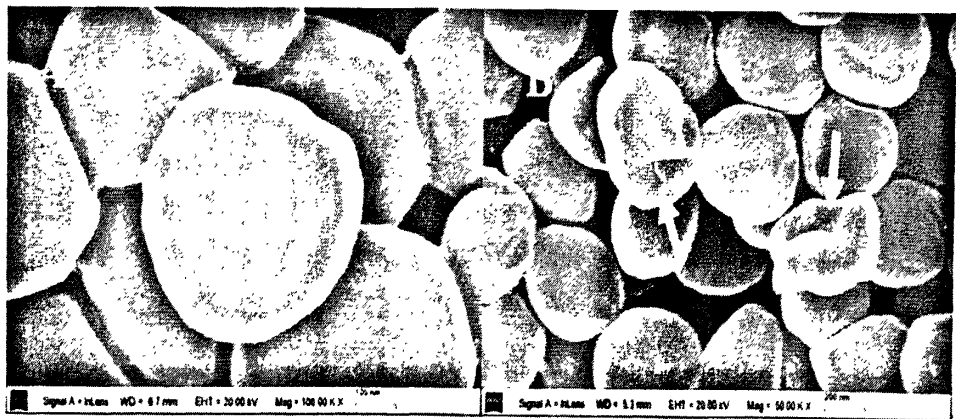


图 4-3(b) 金黄色葡萄球菌的扫描电镜图,

(A)正常生长; (B)经复配精油(罗勒精油-佛手柑精油)在 MIC 联合下作用 3h

Fig.4-3(b) Scanning electron micrographs of *S. aureus* cells, (A) untreated; (B) treated with the combinations of basil oil and bergamot oil at MIC for 3h.

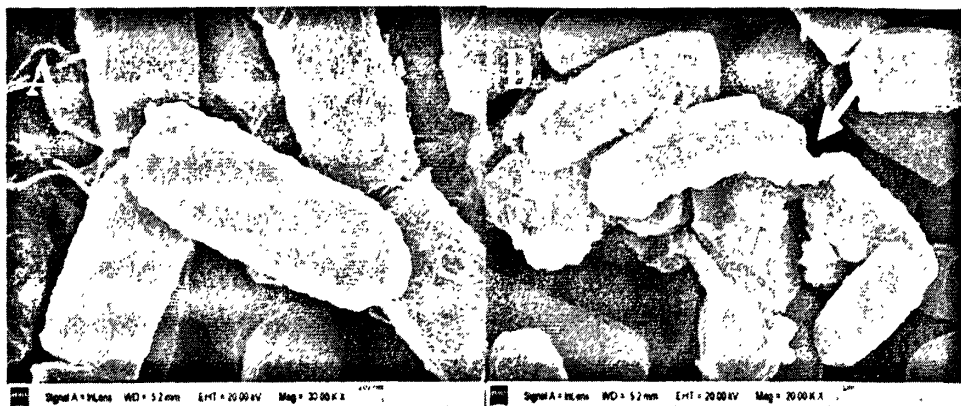


图 4-3(c) 枯草芽孢杆菌的扫描电镜图,

(A)正常生长; (B)经复配精油(牛至精油-佛手柑精油)在 MIC 联合下作用 3h

Fig.4-3(c) Scanning electron micrographs of *B. subtilis* cells, (A) untreated; (B) treated with the combinations of oregano oil and bergamot oil at MIC for 3h.



图 4-3(d) 枯草芽孢杆菌的扫描电镜图,

(A)正常生长; (B)经复配精油(牛至精油-紫苏精油)在 MIC 联合下作用 3h

Fig. 4-3(d) Scanning electron micrographs of *S. cerevisiae* cells, (A) untreated; (B) treated with the combinations of oregano oil and perilla oil at MIC for 3h.

由图 4-2 可以看出,正常生长的各菌体细胞均保持了各自的典型结构特征:大肠杆菌(图 4-2(a)-A)和枯草芽孢杆菌(图 4-2(c)-A)都是呈典型的杆状结构,且细胞表面有规律性的条纹痕迹;而金黄色葡萄球菌(图 4-2(b)-A)和酿酒酵母(图 4-2(d)-A)都是呈典型的球状结构,菌体十分饱满,且细胞表面较为光滑。相反地,当各受试菌种经过复配精油在 MIC 联合下处理 3h 后,其细胞形态发生了明显的变化。电镜图片显示,复配精油明显增加了菌体细胞膜结构的通透性,并且破坏了细胞膜结构的完整性。对于大肠杆菌(图 4-2(a)-B),经复配精油(牛至精油-罗勒精油)在

MIC_{联合}(0.313-0.313 μL/mL)下处理 3h 后, 部分菌体出现溢裂, 表面形成沟痕, 并且伴有一定的萎缩迹象; 对于金黄色葡萄球菌(图 4-2(b)-B), 经复配精油(罗勒精油-佛手柑精油)在 MIC_{联合}(0.313-0.156 μL/mL)下处理 3h 后, 菌体表面不再光滑, 而是出现严重的变形和扭曲, 菌体外表也不再呈现球状; 对于枯草芽孢杆菌(图 4-2(c)-B), 经复配精油(牛至精油-佛手柑精油)在 MIC_{联合}(0.313-0.313 μL/mL)下作用 3h 后, 细胞表面变得粗糙, 菌体发生严重的断裂和溶解, 并且伴有菌体碎片的产生; 对于酿酒酵母(图 4-2(d)-B), 经复配精油(牛至精油-紫苏精油)在 MIC_{联合}(0.313-0.156 μL/mL)下作用 3h 后, 球状形态不再饱满, 表面也不再光滑, 菌体出现明显的凹陷和空洞, 结构特征变化显著。

4.3.2.2 细胞溶出物的测定

根据文献报道的方法, 我们通过测定菌体精油处理液的上清液在 260 nm 处的吸光度值(OD_{260nm})来评价细胞溶出物的变化趋势。实验结果在表 4-1 中列出。

表 4-1 复配精油对供试菌种细胞溶出物释放量的影响

Table 4-1 The effect of EO combinations on cell constituents' release of the tested microorganisms

供试菌种	复配精油浓度(μL/mL)	细胞溶出物释放量(OD _{260nm}) ^a
金黄色葡萄球菌	0	0.018 ± 0.002
	MIC _{联合}	0.153 ± 0.007
	2×MIC _{联合}	0.260 ± 0.014
枯草芽孢杆菌	0	0.025 ± 0.002
	MIC _{联合}	0.276 ± 0.012
	2×MIC _{联合}	0.438 ± 0.017
大肠杆菌	0	0.008 ± 0.001
	MIC _{联合}	0.177 ± 0.007
	2×MIC _{联合}	0.302 ± 0.008
酿酒酵母	0	0.056 ± 0.004
	MIC _{联合}	0.142 ± 0.008
	2×MIC _{联合}	0.247 ± 0.012

^a实验结果表示为: OD_{260nm} 测定平均值 ± 标准偏差(3 次实验)

由表 4-1 中可以看出, 与对照组(不经复配精油处理)相比, 随着复配精油浓度的增加, 各供试菌种细胞溶出物的释放量明显提高。值得注意的是, 当枯草芽孢杆菌经浓度为 2×MIC_{联合}的复配精油处理后, 其细胞溶出物的释放量(OD_{260nm})达到

了 0.438, 是实验中出现的最大值。细胞溶出物释放量的增大, 再一次说明了复配精油可以增大菌体细胞膜的通透性, 使得膜结构受到不可修复的破坏, 这也与扫描电镜的观察结果相一致。

4.3.2.3 电导率的测定

采用电导率仪测定菌体精油处理液的上清液的电导率, 评价复配精油对各供试菌种细胞膜透性的影响。实验结果见图 4-4 所示。

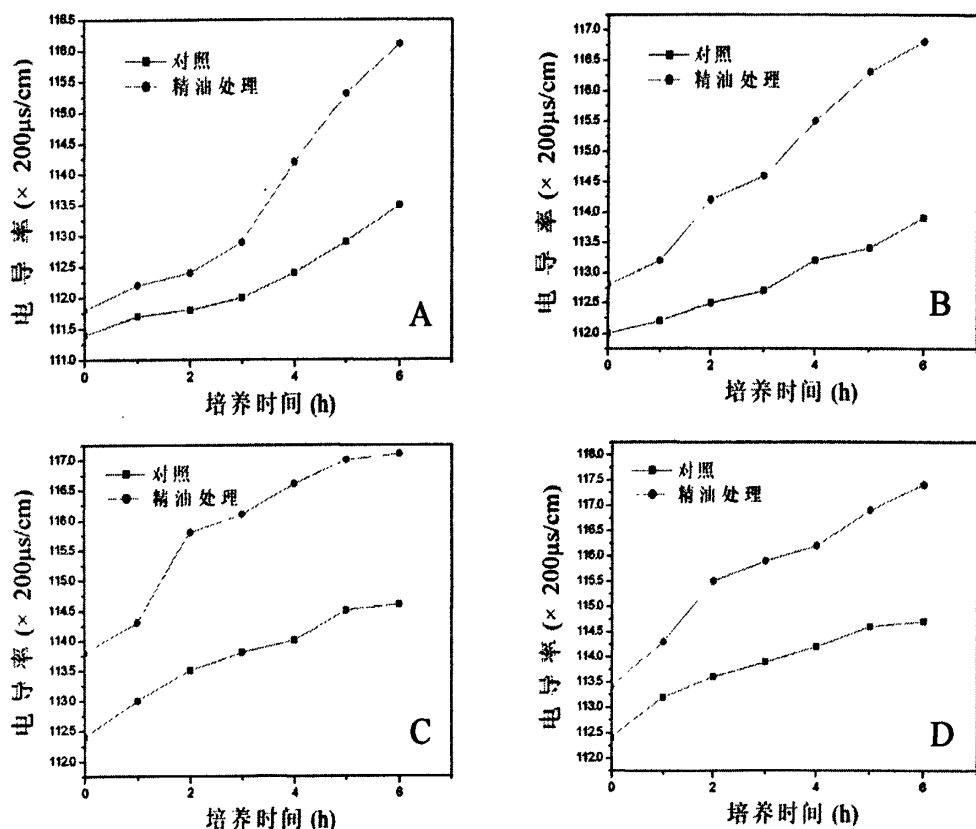


图 4-4 复配精油对四种供试菌种胞内离子外漏(电导率)的影响,

(A)大肠杆菌, (B)金黄色葡萄球菌, (C)枯草芽孢杆菌, (D)酿酒酵母

Fig.4-4 Leakage of intracellular ions (conductivity) of four tested microorganisms both normal and affected by EO combinations, (A) *E.coli*, (B) *S.aureus*, (C) *B. subtilis*, (D) *S.cerevisiae*.

当菌体的细胞膜结构受到破坏后, 不仅细胞内溶物会外漏, 而且菌体内部的一些重要离子(如 K^+ 和 Na^+)也会一同流出。这些离子的丢失会导致细胞内部多种生物酶不能进行正常的合成和工作, 从而使得细胞的代谢活动受阻^[89]。另一方面, 胞内离子对维持细胞内外渗透压有重要的作用, 因此胞内离子的流失会影响胞内

外渗透压的调节，使细胞吸涨甚至破裂^[70]。

由图 4-4 可以发现，经复配精油处理过的各供试菌种处理液电导率要明显高于对照组，且随着处理时间的延长而增大，这说明各菌种的胞内离子的泄漏程度随着复配精油作用时间的推移而不断加大。胞内离子的外流会破坏细胞内环境的稳定性，当离子外流达到一定程度时，细胞就会由于代谢紊乱或溶胀破裂而死亡，从而实现抑菌作用。

4.3.3 复配精油对菌体细胞膜脂肪酸变化的影响

不同菌种细胞膜中脂肪酸的含量和结构具有种属差异，并与其分类密切相关。根据前面实验得到的结论，当复配精油作用于菌体时，会破坏菌体细胞膜结构，因此推测脂肪酸的种类和含量也会发生变化。本实验采用脂肪酸分析法，对空白对照组菌体细胞和复配精油处理过的菌体细胞进行脂肪酸分析，进而阐述复配精油的抑菌机理。各菌体细胞主要脂肪酸变化的分析结果在表 4-2 中列出。

表 4-2 复配精油对菌体细胞主要脂肪酸的百分含量变化的影响

Fig.4-2 Changes in the percentage of principal fatty acids of cells treated with EO combinations

菌种	脂肪酸种类	脂肪酸相对含量 (%)				变化趋势
		对照	处理 2h	处理 4h	处理 6h	
大肠杆菌	C12:0	3.09	3.29	3.47	3.71	↑
	C13:0	2.88	2.02	1.80	1.47	↓
	C14:0	4.35	4.62	4.89	4.95	↑
	C14:1	4.28	3.52	2.39	1.82	↓
	C15:0	3.24	3.31	3.70	3.83	↑
	C16:0	14.53	14.69	14.41	12.65	↓
	C16:1	15.49	16.85	17.20	18.53	↑
	C17:0	2.69	2.62	2.60	1.88	↓
	C17:1c	17.68	18.13	18.22	18.35	↑
	C18:1c&t	9.90	11.00	11.04	11.77	↑
	C18:2c&t	6.02	7.71	7.86	8.44	↑
	C18:3n3	1.00	3.76	4.47	4.55	↑
	C20:5	2.18	0.75	0.15	0.08	↓
金黄色葡萄球菌	C14:0	2.49	2.20	2.07	1.99	↓
	C14:1	6.15	5.99	5.84	5.39	↓
	C15:0	57.46	55.04	52.19	49.66	↓

续表

菌种	脂肪酸种类	脂肪酸相对含量 (%)				变化趋势
		对照	处理 2h	处理 4h	处理 6h	
金黄色葡萄球菌	C16:1	2.65	3.11	3.21	3.42	↑
	C17:0	15.55	20.43	20.27	21.71	↑
	C18:0	1.27	1.86	1.96	2.43	↑
	C18:2c&t	1.27	1.91	2.03	2.61	↑
	C18:3n6	5.34	0.85	0.98	0.00	↓
枯草芽孢杆菌	C12:0	1.64	1.32	0.73	0.71	↓
	C13:0	4.32	2.86	2.86	2.38	↓
	C14:0	1.96	2.59	2.80	2.90	↑
	C14:1	40.55	48.28	49.22	50.58	↑
	C15:0	8.04	9.81	9.93	10.08	↑
	C15:1	13.26	4.48	2.97	2.04	↓
	C16:0	5.60	7.10	7.59	7.52	↑
	C16:1	7.40	8.69	9.02	9.57	↑
	C17:0	0.84	1.17	1.31	1.40	↑
	C18:0	1.15	2.00	2.13	2.46	↑
酿酒酵母	C24:0	3.91	0.24	0.23	0.24	↓
	C10:0	0.27	3.27	5.74	6.84	↑
	C12:0	2.72	2.32	2.18	1.48	↓
	C13:0	0.68	1.27	2.86	3.14	↑
	C14:0	2.98	3.86	4.07	4.43	↑
	C14:1	3.23	3.72	13.25	27.59	↑
	C15:0	0.59	2.51	3.29	5.49	↑
	C15:1	0.57	0.93	1.62	1.74	↑
	C16:0	4.86	4.33	3.84	2.71	↓
	C16:1	69.91	56.01	45.77	34.10	↓
	C17:0	3.44	2.91	2.26	0.58	↓
	C18:1c&t	4.52	4.19	3.45	2.61	↓
	C18:3n6	2.51	2.02	1.30	1.53	↓
	C22:6	0.07	0.22	0.39	1.71	↑

注：表中所列数据是三次实验结果的平均值

经过脂肪酸分析测定，四种受试菌种所含的脂肪酸种类均为 34 种，表 4-2 中列出的是百分含量大于 1 %的脂肪酸种类及含量变化：

(1) 对于大肠杆菌, 所含的脂肪酸种类主要有 4 种, 分别是 C16:0、C16:1、C17:1c 和 C18:1c。经复配精油(牛至精油-罗勒精油)处理不同时间后, C16:0 含量有所降低, 而 C16:1、C17:1c 和 C18:1c 的含量有所增加。

(2) 对于金黄色葡萄球菌, 所含的脂肪酸种类主要有 4 种, 分别是 C14:1、C15:0、C17:0 和 C18:3n6。经复配精油(罗勒精油-佛手柑精油)处理不同时间后, C15:0 和 C18:3n6 的含量明显降低, C14:1 的含量略有下降, 而 C17:0 的含量则明显增加。

(3) 对于枯草芽孢杆菌, 所含的脂肪酸种类主要有 4 种, 分别是 C14:1、C15:0、C15:1 和 C16:1。经复配精油(牛至精油-佛手柑精油)处理不同时间后, C15:0 和 C16:1 的含量略有增加, C14:1 的含量明显增加, 而 C15:1 的含量明显下降。

(4) 对于酿酒酵母, 所含的脂肪酸种类主要有 5 种, 分别是 C14:1、C16:0、C16:1、C17:0 和 C18:1c。经过复配精油(牛至精油-紫苏精油)处理不同时间后, C16:1 的含量明显下降, C16:0、C17:0 和 C18:1c 的含量有所下降, 而 C14:1 的含量明显增加。

Pasqua 等人^[56]研究了大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠道沙门氏菌、荧光假单胞菌和热杀索丝菌分别经百里香酚、香芹酚、丁香酚、柠檬烯及肉桂醛作用后, 各菌体细胞脂肪酸含量的变化规律。结果表明, 各菌体细胞中不饱和脂肪酸(UFAs)的含量显著下降; 特别地, 当用肉桂醛处理菌体时, 各菌体细胞中的 C18:2trans 和 C18:3cis 两种脂肪酸含量明显降低, 同时饱和脂肪酸 C17:0 的含量急剧上升。在本实验中, 经过复配精油处理后, 菌体细胞脂肪酸的含量也呈现出规律性的变化。可以看出, 对于某一种脂肪酸来讲, 随着复配精油作用时间的增加, 其含量或增高, 或降低; 有的变化显著, 而有的变化微弱。这也进一步证实了复配精油对微生物菌体细胞膜具有破坏作用。

目前, 关于植物精油抑菌作用的报道主要集中在抑菌活性方面, 而关于抑菌机理的研究还不是十分透彻^[108]。通过对植物精油成分进行分析, 发现其主要的活性成分是小分子的酚类、萜烯类和醛酮类物质, 并且认为其发挥抑菌活性的主要作用部位是细胞质膜^[96]。疏水性是植物精油及其成分的重要特性^[109], 这能够使它们聚积于细胞膜, 破坏膜结构的完整性, 从而能够使细胞膜的通透性大大增加。随后, 细胞内酶系统的正常工作会受到干扰, 一些重要的细胞成分(细胞质、酶和金属离子)也会流出, 并最终导致菌体死亡^[110,111,112]。

此外, 研究者也提出了一些关于复配精油抑菌机理的假说^[113], 比如: 共同作用于一条生物途径的不同位点; 同时作用于细胞内不同的酶系统; 共同作用于细胞膜上的不同位点; 先利用针对细胞膜的抑菌活性成分破坏膜结构, 从而使其他作用于细胞内部的活性成分容易进入细胞体内, 等等。综上所述, 目前关于植物精油抑菌机理的研究还不成熟, 有关植物精油具体的抑菌作用方式和作用靶点的研究还需进一步深入探讨。

4.4 本章小结

本章通过比较复配精油对四种供试菌种生长曲线的影响、对菌体细胞膜通透性的影响(扫描电镜观察菌体结构、细胞溶出物的测定和电导率的测定)以及对菌体细胞膜脂肪酸变化的影响,对复配精油的抑菌机理进行了初步探讨,现得到结论如下:

(1) 与对照生长曲线相比,经复配精油处理过的菌种生长曲线发生了明显变化。复配精油主要抑制了各供试菌种对数生长期的分裂和繁殖,使其无法达到正常的生长高峰,并且很快地进入衰亡期,导致最终活菌数明显下降。

(2) 通过扫描电镜(SEM)观察发现,当各受试菌种经过复配精油在 MIC 联合下处理 3h 后,其细胞形态发生了明显的改变,主要表现在菌体细胞膜结构完整性的破坏。对于大肠杆菌,菌体出现溢裂,表面形成沟痕,并且伴有一定的萎缩迹象;对于金黄色葡萄球菌,菌体出现严重的变形和扭曲;对于枯草芽孢杆菌,菌体表面变得粗糙,并且发生严重的断裂和溶解;对于酿酒酵母,菌体的球状形态不再饱满,表面出现明显的凹陷和空洞。

(3) 通过比较细胞溶出物的释放量可以看出,随着复配精油浓度的增加,各供试菌种细胞溶出物的释放量明显提高,这说明了复配精油可以增大菌体细胞膜的通透性,使膜结构受到不可修复的破坏。

(4) 通过比较供试菌种精油处理液的电导率可以看出,随着处理时间的延长,各菌种的胞内离子的泄漏程度不断增大,因此细胞内环境的稳定性会受到破坏。当离子外流达到一定程度时,细胞就会由于代谢紊乱或溶胀破裂而死亡。

(5) 经脂肪酸分析法测定,各供试菌种经复配精油处理后,其菌体细胞脂肪酸的含量随着作用时间的增加呈现出规律性的变化。这也进一步说明了复配精油对菌体的细胞膜结构具有破坏作用。

第五章 精油增溶剂的筛选及其对精油抑菌活性影响的研究

5.1 引言

许多天然植物精油具有良好的抑菌活性, 并以其安全性高, 毒副作用小等优点深受研究者的关注, 已经成为天然防腐剂的重要来源之一。但大量研究发现, 当向食品体系中添加植物精油作为防腐剂时, 往往需要更高的精油浓度, 才能达到与体外抑菌实验相同的效果^[62]。究其原因, 除绪论部分(1.5.6 节)中提到的几点因素之外, 我们推测精油较差的水溶性也是重要的影响因素之一。具体来讲, 由于植物精油的水溶性不高, 所以无法随水分均匀地分布在食品内部, 最终导致抑菌效果的下降。因此, 寻找能够有效提高精油水溶性的增溶剂, 是今后的研究热点之一。

本章比较了 3 类共 9 种增溶剂(吐温系列乳化剂、环糊精及其衍生物和聚乙二醇系列溶剂)对 4 种植物精油(牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油)在水相中溶解度的影响, 并对增溶体系(增溶剂+复配精油)的抑菌活性进行了研究。此外, 我们通过分析菌体细胞膜脂肪酸成分的含量变化以及观察菌体的细胞形态变化, 来研究所选的增溶剂对复配精油抑菌机理的影响。

5.2 实验材料与方法

5.2.1 实验材料

5.2.1.1 供试菌种

细菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 8739、金黄色葡萄糖球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633

真菌: 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ATCC 9763

5.2.1.2 植物精油(E0)

根据第二章的复配精油抑菌实验结果, 在本章中选用牛至精油(*O. vulgare*), 罗勒精油(*O. basilicum*), 佛手柑精油(*C. bergamia*)和紫苏精油(*P. arguta*)作为研究对象, 具体复配精油组合如下: 大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油); 金黄色葡萄糖球菌(罗勒精油-佛手柑精油); 枯草芽孢杆菌(牛至精油-佛手柑精油); 酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油)。

四种精油均购于中国湖南长沙冠香日化贸易公司。精油在进行分析前置于低温(4 ℃)、避光环境下保存。

5.2.1.3 增溶剂

本实验中,选用吐温系列乳化剂(Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80)、环糊精及其衍生物(β -CD、HP- β -CD)和聚乙二醇系列溶剂(PEG 200、PEG 400、PEG 600)共 9 种增溶剂作为研究对象。

以上增溶剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

5.2.1.4 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(细菌):牛肉膏 3 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 1.5-2.0 g (液体培养基不含琼脂), 水 1000 mL, pH 为 7.0-7.2 之间 (使用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH)。

YPD 培养基(真菌):酵母浸粉 1 g, 蛋白胨 2 g, 葡萄糖 2 g, 琼脂 1.5-2.0 g (液体培养基不含琼脂), 水 1000 mL, 自然 pH 值。

5.2.2 实验仪器及试剂

仪器: 无菌超净操作台, 扫描电子显微镜(SEM), 气相色谱/质谱联用仪(GC/MS), 电子天平, 全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅, 超声清洗机, 生化培养箱, 恒温振荡箱, 台式离心机, 玻璃仪器气流烘干器, 移液枪(各种量程), 一次性枪头, 接种环, 培养皿, 离心管(10 mL 和 50 mL), 10 mL 试管, 酒精灯。

试剂: 盐酸, 氢氧化钠, 甲醇, 乙醇, 正己烷, 戊二醛, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 氯化钠, 冰水浴。上述试剂均为色谱纯或分析纯。

5.2.3 实验方法

5.2.3.1 培养基的配制

按 5.2.1.4 中的配方分别配制牛肉膏蛋白胨培养基(液体)和 YPD 培养基(液体), 115 ℃、30 min 灭菌后待用。

5.2.3.2 菌悬液的配制

从经过活化的菌体斜面上挑取一环菌体接种于相应的液体培养基中，放入恒温振荡培养箱中培养至对数生长期。分别吸取各供试菌液 0.5 mL，加入无菌水倍比稀释到 10^5 - 10^6 CFU/mL，备用。

5.2.3.3 增溶剂对植物精油在水相中溶解度的影响

考虑到植物精油化学组分的多样性，本实验选用各精油中的主要抑菌活性物质作为研究对象(牛至精油-香芹酚，罗勒精油-丁香酚，佛手柑精油-里哪醇，紫苏精油-2-戊酰呋喃)，用以评价增溶剂对精油的增溶作用。

将各种增溶剂经超声溶解后，配制成质量分数为 0.5 %的水溶液。取 0.5 mL 植物精油与 1.5 mL 上述增溶剂溶液置于 2 mL 的小离心管中。同时设立对照组，对照组用去离子水替代增溶剂溶液。将所有的离心管管帽盖严，放入三角烧瓶中，在 30 ℃、220 rpm 下恒温振荡 12 h，使精油与增溶剂溶液充分混合。振荡结束后，使各离心管竖立静置 30 min，待分层后取水相，用于溶解度分析。

水相中的各精油主要成分含量用气质联用技术(GC/MS)进行测定，采用的气质分析条件与第三章中分析精油成分时相一致。将实验组与对照组中精油主要成分的色谱峰面积之比定义为精油在增溶剂存在时的增溶倍数。重复 3 次，取平均值。

5.2.3.4 增溶体系的抑菌活性研究

在配制好的培养基中加入增溶剂，使其终浓度为 0.5 %(质量分数)。选用第二章中提到的棋盘稀释法测定增溶体系(增溶剂+复配精油)的抑菌活性，具体操作方法不再叙述。增溶体系的抑菌活性通过复配精油的用量来评定：如果增溶体系中的复配精油用量降低，即 $FICI_{\text{增溶}}(\text{增溶体系的 } FICI) < FICI_{\text{空白}}(\text{不加增溶剂时的 } FICI)$ ，则认为增溶体系的抑菌活性提高。选用增溶体系抑菌活性最好的增溶剂用作后续的抑菌机理研究。

5.2.3.5 增溶体系的抑菌机理研究

(1) 菌体细胞的处理

将四种供试菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)接种于相应的 100mL 液体培养基中，培养至对数生长期，5000 rpm 离心 15 min 收集菌体，清洗 3 次后，重悬于含有质量分数为 0.5 %增溶剂的 100 mL 0.1 M 磷酸盐缓冲

液(PBS, pH 7.0)中, 调整菌体个数为 10^5 - 10^6 CFU/mL。随后, 向各菌悬液中加入复配精油, 使其终浓度为 MIC_{联合}, 具体组合如下: 大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油, MIC_{联合}: 0.313-0.313 μ L/mL); 金黄色葡萄球菌(罗勒精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: 0.313-0.156 μ L/mL); 枯草芽孢杆菌(牛至精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: 0.313-0.313 μ L/mL); 酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油, MIC_{联合}: 0.313-0.156 μ L/mL)。将装有上述菌悬液的三角瓶放入摇床, 常温下 220 rpm 振荡 6 h, 反应时间结束后及时取出, 离心收集菌体, 用于菌体细胞膜脂肪酸成分分析以及扫描电镜观察。将未经任何处理的菌体细胞、只经增溶剂处理的细胞和只经复配精油处理的菌体细胞用作对照实验。

(2) 增溶体系对菌体细胞膜脂肪酸含量变化的影响

按照 4.2.3.5 中的实验方法, 利用气质联用技术(SEM)分析增溶体系对菌体细胞膜脂肪酸含量的影响。

(3) 扫描电镜(SEM)观察菌体形态

按照 4.2.3.4 中的实验方法, 利用扫描电镜(SEM)观察增溶体系对供试菌种细胞形态的影响。

5.3 实验结果与讨论

5.3.1 增溶剂对植物精油在水相中溶解度的影响

表 5-1 增溶剂对植物精油在水相中溶解度的影响

Table 5-1 Effects of different solubilizers on the Solubility of plant essential oils

植物精油 (主要活性成分)	添加增溶剂后各植物精油在水相中溶解度的提高倍数								
	Tween20	Tween40	Tween60	Tween80	β -CD	HP- β -CD	PEG200	PEG400	PEG600
牛至精油 (香芹酚)	1.91	1.69	1.52	1.03	2.09	5.32	0.68	0.85	1.28
罗勒精油 (丁香酚)	1.59	2.61	2.92	1.04	2.64	4.72	1.05	1.61	1.86
佛手柑精油 (醋酸沉香醇酯)	1.04	1.19	1.17	1.04	2.31	3.65	1.80	2.20	2.33
紫苏精油 (2-戊酰呋喃)	1.87	2.02	1.46	0.58	3.85	5.28	3.92	4.02	4.62

注: 表中所列数据是三次实验结果的平均值

我们分别选取包括吐温系列乳化剂(吐温 20、吐温 40、吐温 60、吐温 80)、环糊精及其衍生物(β -环糊精、HP- β -环糊精)和聚乙二醇系列溶剂(PEG 200, PEG 400, PEG 600)在内的 9 种增溶剂作为研究对象, 考察其对 4 种植物精油主要活性成分在水相中溶解度的影响。表 5-1 列出了所选增溶剂对精油水溶性影响的实验结果。总体来讲, 各种增溶剂对 4 种精油均有增溶效果, 各类增溶剂的增溶效果大小顺序如下: 环糊精及其衍生物 > 聚乙二醇系列 > 吐温系列。其中 HP- β -CD 的增溶效果最为明显, 4 种精油的主要活性成分香芹酚、丁香酚、醋酸沉香醇酯和 2-戊酰呋喃在水相中的溶解度比未加增溶剂前分别提高了 5.32、4.72、3.65 和 5.28 倍。 β -CD 和 PEG600 的增溶效果也比较好, 各活性成分在水相中的溶解度均有一定程度的提高。

5.3.2 增溶体系的抑菌活性研究

我们利用棋盘稀释法, 通过比较加入增溶剂前后完全抑制菌体生长所需复配精油量的最小值, 来判断增溶剂对复配精油抑菌活性的影响。实验结果如表 5-2 所示。可以看出, 各种增溶剂对复配精油抑菌活性的影响不尽相同, 其中 HP- β -CD 的作用最为明显。与未加增溶剂前相比, HP- β -CD 的加入, 使得完全抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母生长所需的复配精油量均有所降低, FICI 值分别由 0.75、0.75 和 0.75 降低到了 0.625、0.625 和 0.5; 对完全抑制金黄色葡萄球菌生长所需的复配精油用量没有影响, FICI 值维持在 0.375。PEG 600 也是一种对提高复配精油抑菌活性有明显效果的增溶剂, 在其作用下, 降低了完全抑制大肠杆菌和酿酒酵母生长所需的复配精油用量, FICI 值分别由 0.75 和 0.75 降低到了 0.625 和 0.5; 但是其对完全抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌生长所需的复配精油用量没有影响, FICI 值与之前相比维持不变。HP- β -CD 和 PEG 600 可以降低复配精油的用量, 对提高复配精油的抑菌效果有明显的促进作用, 这可以用前述的精油溶解度实验结果来解释: 精油在增溶剂的作用下, 在水相中的溶解度显著提高, 因此精油中的抑菌活性成分可以更好的分散在水环境中, 从而充分的接触菌体, 提高抑菌效果。以前的报道中(Schneiderman et al., 1979; Geftter et al., 1977)曾经提到, 聚乙二醇(PEG)对哺乳动物细胞有微弱的毒性, 因此考虑到将增溶剂应用于食品防腐剂中可能涉及的安全性问题, 我们选择 HP- β -CD 作为精油增溶剂。

值得注意的是, 虽然在溶解度实验中吐温系列增溶剂对 4 种精油的溶解度均有所提高, 但是在抑菌试验中, 加入吐温后, 各复配精油的抑菌效果反而下降。其中吐温 20 抑制精油活性的效果最为明显, 在其作用下, 完全抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母生长所需的复配精油量均有所提高, FICI 值分别由 0.75、0.375 和 0.75 提高到了 1.5、0.75 和 1.5; 对完全抑制枯草芽孢杆菌生长所需的复配

精油用量没有影响，FICI 值维持在 0.75。分析其原因，可能是由于吐温分子对菌体的生长有一定的促进作用，当对精油的增溶作用和对菌体生长的促进作用同时存在时，后者的作用更为明显，因此宏观的表现为降低了复配精油的抑菌效果。

表 5-2 增溶剂对复配精油抑菌效果的影响

Table 5-2 Effects of solubilizers on the antimicrobial activity of complex EOs

增溶剂	添加增溶剂后复配精油的 MIC _{联合} 、FICI 值以及抑菌活性变化趋势											
	大肠杆菌			金黄色葡萄球菌			枯草芽孢杆菌			酿酒酵母		
对照组	牛至	罗勒	FICI	罗勒	佛手柑	FICI	牛至	佛手柑	FICI	牛至	紫苏	FICI
	0.313	0.313	0.75	0.313	0.156	0.375	0.313	0.313	0.75	0.313	0.156	0.75
Tween20	0.625	0.625	1.5↓	0.625	0.313	0.75↓	0.313	0.313	0.75 ↔	0.625	0.313	1.5↓
Tween40	0.625	0.313	1.25↓	0.313	0.156	0.375 ↔	0.625	0.313	1.25↓	0.625	0.313	1.5↓
Tween60	0.625	0.313	1.25↓	0.313	0.156	0.375 ↔	0.625	0.313	1.25↓	0.313	0.313	1↓
Tween80	0.313	0.313	0.75 ↔	0.313	0.313	0.5↓	0.313	0.313	0.75 ↔	0.313	0.313	1↓
β-CD	0.313	0.313	0.75 ↔	0.313	0.313	0.5↓	0.313	0.313	0.75 ↔	0.156	0.156	0.5↑
HP-β-CD	0.313	0.156	0.625↑	0.313	0.156	0.375 ↔	0.313	0.156	0.625↑	0.156	0.156	0.5↑
PEG200	0.625	0.625	1.5↓	0.313	0.156	0.375 ↔	0.313	0.313	0.75 ↔	0.313	0.156	0.75 ↔
PEG400	0.625	0.313	1.25↓	0.313	0.156	0.375 ↔	0.313	0.313	0.75 ↔	0.313	0.156	0.75 ↔
PEG600	0.313	0.156	0.625↑	0.313	0.156	0.375 ↔	0.313	0.313	0.75 ↔	0.156	0.156	0.5↑

注：加入增溶剂后复配精油的抑菌活性变化趋势

↑：抑菌活性提高 ↓：抑菌活性下降 ↔：抑菌活性不变

5.3.3 增溶体系的抑菌机理研究

5.3.3.1 增溶体系对菌体细胞膜脂肪酸含量变化的影响

在第四章中我们得出，当复配精油作用于菌体时，会破坏菌体细胞膜结构，从而会引起细胞膜脂肪酸的含量发生变化。利用气质联用技术，可以定量分析这种变化。本章中，我们根据精油溶解度试验和增溶体系抑菌活性的实验结果，选定 HP- β -CD 作为研究对象考察增溶体系对菌体细胞膜脂肪酸含量变化的影响。对于每种菌体细胞考察 4 种情况，分别是细胞正常生长，细胞只经增溶剂 HP- β -CD 处理，细胞只经复配精油处理和细胞经 HP- β -CD 和复配精油共同处理。表 5-3 中列出了各菌种所含的主要脂肪酸的百分含量变化。

表 5-3 菌体细胞膜所含主要脂肪酸的百分含量变化

Table 5-3 Changes in the percentage of principal fatty acids of cells

供试菌种	脂肪酸种类	正常生长	经 HP- β -CD 处理	经复配精油处理	经复配精油和 HP- β -CD 共同处理	变化趋势
大肠杆菌	C16:0	14.49	14.17	12.58	11.49	↓
	C16:1	15.45	15.02	18.56	19.97	↑
	C17:1c	17.70	17.11	18.36	20.33	↑
	C18:1c&t	11.02	11.34	9.87	9.01	↓
金黄色葡萄球菌	C14:0	2.45	2.13	1.96	1.77	↓
	C15:0	57.24	59.28	49.99	47.66	↓
	C16:1	2.58	2.11	3.46	4.09	↑
	C17:0	15.46	16.61	21.76	23.78	↑
枯草芽孢杆菌	C14:1	39.88	41.98	49.78	53.26	↑
	C15:0	8.13	8.40	10.16	11.65	↑
	C15:1	13.41	14.92	3.04	2.24	↓
	C16:1	7.22	6.79	9.65	10.09	↑
酿酒酵母	C10:0	0.19	0.11	6.99	8.16	↑
	C14:1	3.12	2.65	27.37	30.29	↑
	C15:0	0.66	0.53	5.60	6.91	↑
	C16:1	70.28	67.48	34.23	29.76	↓
	C17:0	3.60	3.16	0.52	0.40	↓

注：表中所列数据是三次实验结果的平均值

对于大肠杆菌来讲，其含量最高的脂肪酸是 C17:1c，经增溶剂 HP- β -CD 单独

处理后,其含量基本稳定;经复配精油单独处理以及复配精油和增溶剂共同处理后,其含量由 17.70 %分别上升到了 18.36 %和 20.33 %,变化比较明显。对于金黄色葡萄球菌的主要脂肪酸 C15:0 和枯草芽孢杆菌的主要脂肪酸 C14:1 来说,也有着类似的变化趋势。对于酿酒酵母的主要脂肪酸 C16:1 来说,细胞未经处理时,其含量高达 70.28 %;经增溶剂 HP- β -CD 单独处理后,其含量为 67.48 %,变化不大;但是经复配精油单独处理以及复配精油和增溶剂共同处理后,其含量大幅下降,分别降低到了 34.23 %和 29.76 %,变化十分明显。

综上所述,可以发现这样的规律:对于每种菌体细胞来说,只经增溶剂 HP- β -CD 处理后,其脂肪酸的含量与未经任何处理时基本保持一致,即 HP- β -CD 对菌体没有破坏作用;当加入复配精油后,各菌体的脂肪酸含量发生变化,或增加或减少;随着增溶剂 HP- β -CD 的加入,这种变化趋势更为明显,这是由于增溶剂的加入使得精油在水相中的溶解度明显提高,从而能够更强烈的作用于细胞膜所致。

5.3.3.2 扫描电镜(SEM)观察菌体形态

图 5-1、图 5-2、图 5-3 和图 5-4 分别是四种菌体细胞(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母)正常生长,细胞只经增溶剂 HP- β -CD 处理,细胞只经复配精油处理和细胞经 HP- β -CD 和复配精油共同处理的电镜图片。对于大肠杆菌和枯草芽孢杆菌来讲,正常生长的细胞和只经 HP- β -CD 处理的细胞均呈标准的杆状(图 5-1 (a)(b), 图 5-3 (a)(b));经复配精油处理以及经复配精油和 HP- β -CD 共同处理后,大肠杆菌菌体从中部发生了溢裂,菌体表面出现明显凹陷和变形(图 5-1 (c)(d)),而枯草芽孢杆菌表面出现很多裂痕,细胞结构被完全破坏,菌体溢裂更加明显(图 5-3(c)(d))。对于金黄色葡萄球菌和酿酒酵母来讲,未经处理的细胞和只经 HP- β -CD 处理的细胞均呈标准的球状(图 5-2(a)(b), 图 5-4(a)(b));经复配精油处理以及经复配精油和 HP- β -CD 共同处理后,金黄色葡萄球菌的菌体发生了断裂,菌体形态呈半球状,部分膜表面出现褶皱(图 5-2(c)(d)),而酿酒酵母的细胞形态发生明显变形,原先饱满的椭球体表面向内凹陷,细胞膜的完整性被严重破坏(图 5-4(c)(d))。

从电镜的结果可以看出,对各菌种起抑制作用的是复配精油,其主要作用于菌体的细胞膜结构,使得膜结构被破坏,导致菌体的凹陷、变形,甚至断裂,最终导致菌体死亡。增溶剂 HP- β -CD 对菌体几乎没有抑制作用,不能破坏菌体的膜结构,这和菌体细胞膜脂肪酸的含量变化测定结果相一致。但是 HP- β -CD 的加入,可以增大精油在水相中的溶解度,因此在一定程度上可以促进复配精油对菌体膜结构的破坏作用,达到更好的抑菌效果。

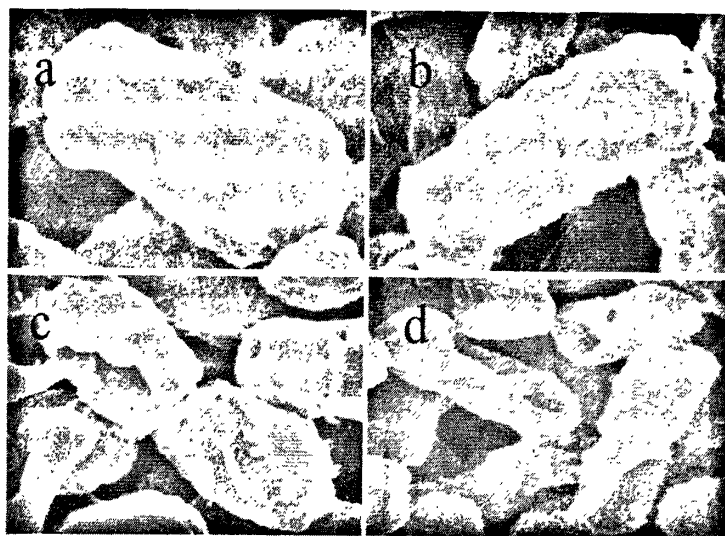


表 5-1 大肠杆菌扫描电镜图, (a)正常生长, (b)经 HP-β-CD 处理,
(c)经复配精油处理, (d)经 HP-β-CD 和复配精油共同处理

Fig.5-1 Scanning electron microscope images of *E. coli* cells, (a) Untreated cells, (b) cells after treatment with HP-β-CD, (c) EO combination, and (d) HP-β-CD + EO combination.

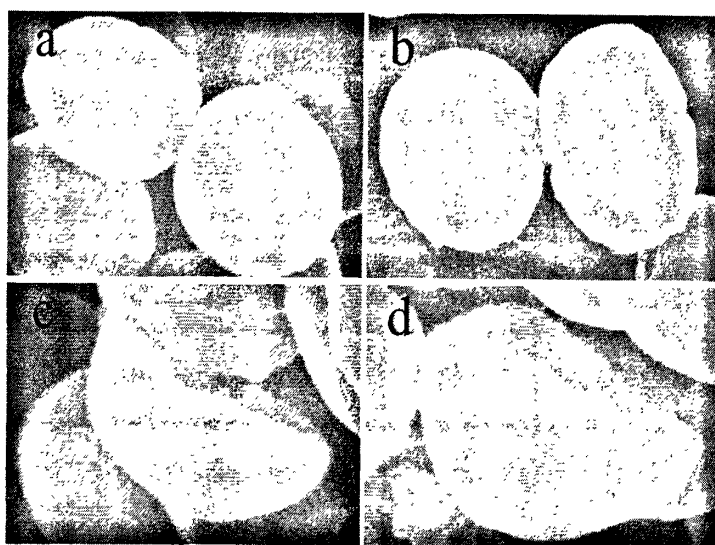


表 5-2 金黄色葡萄球菌扫描电镜图, (a)正常生长, (b)经 HP-β-CD 处理,
(c)经复配精油处理, (d)经 HP-β-CD 和复配精油共同处理

Fig.5-2 Scanning electron microscope images of *S. aureus* cells, (a) Untreated cells, (b) cells after treatment with HP-β-CD, (c) EO combination, and (d) HP-β-CD + EO combination.

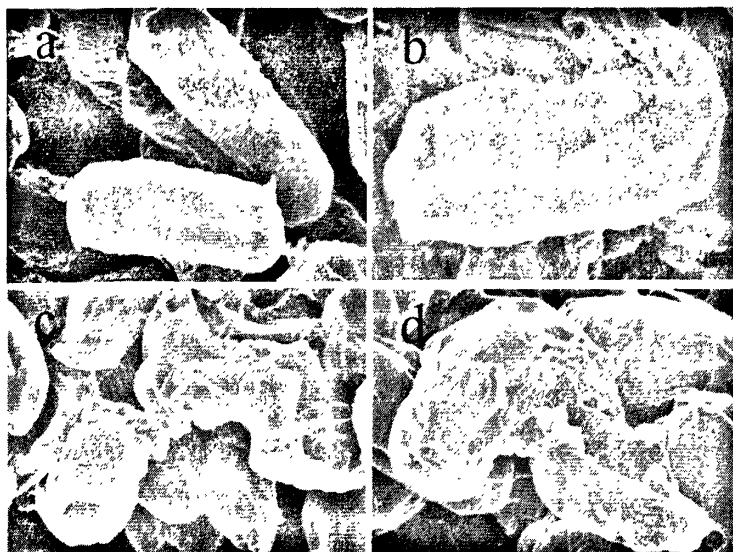


表 5-3 枯草芽孢杆菌扫描电镜图, (a)正常生长, (b)经 HP-β-CD 处理,
(c)经复配精油处理, (d)经 HP-β-CD 和复配精油共同处理

Fig.5-3 Scanning electron microscope images of *B. subtilis* cells, (a) Untreated cells, (b) cells after treatment with HP-β-CD, (c) EO combination, and (d) HP-β-CD + EO combinatio

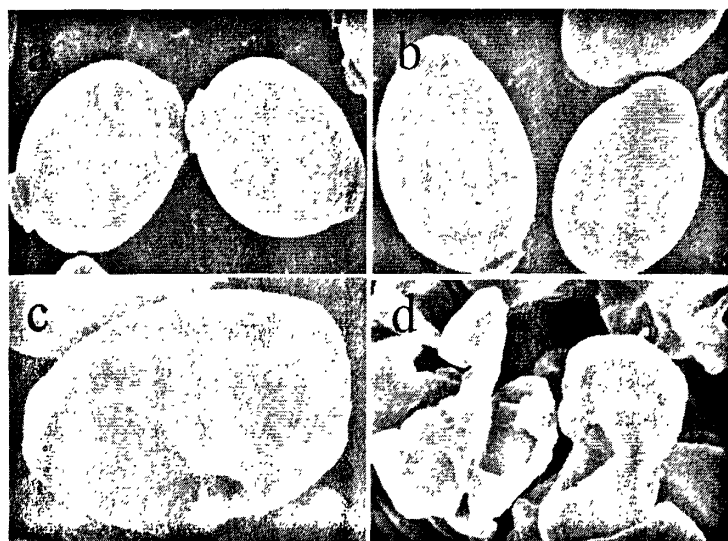


表 5-4 酿酒酵母扫描电镜图, (a)正常生长, (b)经 HP-β-CD 处理,
(c)经复配精油处理, (d)经 HP-β-CD 和复配精油共同处理

Fig.5-4 Scanning electron microscope images of *S. cerevisiae* cells, (a) Untreated cells, (b) cells after treatment with HP-β-CD, (c) EO combination, and (d) HP-β-CD + EO combination.

5.4 本章小结

本章首先研究了 3 类共 9 种增溶剂(Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80、 β -CD、HP- β -CD、PEG 200、PEG 400 和 PEG 600)对 4 种植物精油(牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油)在水相中溶解度的影响。随后,对增溶体系(增溶剂+复配精油)的抑菌活性进行了研究。最后,我们通过分析菌体细胞膜脂肪酸成分的含量变化以及观察菌体的细胞形态变化,研究了所选的增溶体系的抑菌机理。现得到如下几点结论:

(1) 9 种增溶剂对 4 种精油在水相中的溶解度均有提高,各类增溶剂的增溶效果大小顺序如下:环糊精及其衍生物>聚乙二醇系列>吐温系列。其中 HP- β -CD 的增溶效果最为明显。

(2) 在增溶体系的抑菌活性研究中,发现 HP- β -CD 的效果最好,它的加入可以使得完全抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母生长所需的复配精油量均有所降低,对于金黄色葡萄球菌来讲则与对照持平。

(3) 在增溶体系的抑菌机理研究中发现,HP- β -CD 的加入起到的只是增溶作用,而真正起抑制菌体生长作用的是植物精油。具体来讲,菌体只经增溶剂 HP- β -CD 处理后,其脂肪酸的含量与未经任何处理时基本保持一致;当加入复配精油后,各菌体的脂肪酸含量发生变化,或增加或减少;在复配精油中再加入增溶剂 HP- β -CD 后,这种变化趋势更为明显。从扫描电镜的结果也可以看出,HP- β -CD 对细胞膜结构的完整性几乎没有影响,对菌种起抑制作用的是复配精油。当加入 HP- β -CD 后,可以使复配精油对菌体的作用强度增加,其主要的作用方式是破坏菌体的细胞膜结构,最终导致菌体死亡。

本章对精油增溶剂进行了筛选,HP- β -CD 以其优越的增溶性能以及在抑菌活性研究中展现的较好效果,被认定是将精油用于食品工业中时潜在的增溶剂之一。HP- β -CD 在食品模型中的增溶效果还有待进一步研究。

第六章 结论与建议

6.1 本文主要结论

植物精油作为天然防腐剂应用于食品中,符合食品行业的发展需求,具有广阔的应用前景。本文比较了 10 种植物精油的抑菌活性,对活性较好的精油进行了化学成分分析、稳定性研究以及联合抑菌活性研究,并筛选出了最佳的复配精油组。此外,对复配精油的抑菌机理和增溶效果等方面也进行了相关讨论。主要结论如下:

(1) 利用滤纸片法和试管梯度稀释法,比较了十种植物精油的抑菌活性,发现牛至精油对所有菌种都具有较强的抑制作用,罗勒精油和佛手柑精油对革兰氏阳性菌有很好的抑制效果,而紫苏精油则对酿酒酵母有很强的抑制专一性。因此,选定牛至精油、罗勒精油、佛手柑精油和紫苏精油作为研究对象。

(2) 稳定性分析:四种精油的抑菌效果随着 pH 值的增大而有所减弱;对高温和紫外线照射稳定。

(3) 采用棋盘稀释法,研究了复配精油的抑菌活性。选定的最佳复配精油组合如下:大肠杆菌(牛至精油-罗勒精油, MIC_{联合}: 0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$);金黄色葡萄球菌(罗勒精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: 0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$);枯草芽孢杆菌(牛至精油-佛手柑精油, MIC_{联合}: 0.313-0.313 $\mu\text{L/mL}$);酿酒酵母(牛至精油-紫苏精油, MIC_{联合}: 0.313-0.156 $\mu\text{L/mL}$)。

(4) 采用气质联用技术(GC/MS),对所选植物精油的化学组成进行了分析鉴定:牛至精油和罗勒精油的主要化学成分是酚类和萜烯类物质,佛手柑精油中主要含有萜烯类、醇类和酯类物质,而酮类物质在紫苏精油中的含量相对较高。

(5) 在复配精油抑菌机理的研究中发现:复配精油主要抑制供试菌种对数生长期的分裂和繁殖;通过扫描电镜(SEM)观察,各菌种在复配精油的作用下,其细胞形态发生了明显的改变,主要表现在菌体细胞膜结构的完整性受到破坏;复配精油处理后,细胞溶出物释放量的提高以及电导率的增加,则说明菌体细胞膜通透性显著增加;脂肪酸分析结果表明,菌体细胞膜脂肪酸的含量随着复配精油作用时间的增加呈现出规律性的变化,进一步证实了复配精油对菌体的细胞膜结构具有破坏作用。

(6) 比较了 9 种增溶剂对所选植物精油在水相中溶解度的影响,发现增溶效果大小顺序如下:环糊精及其衍生物 > 聚乙二醇系列 > 吐温系列,其中 HP- β -CD 的增溶效果最为明显;在增溶体系的抑菌活性研究中发现,HP- β -CD 的效果最好,它的加入可以显著降低复配精油的用量,提高抑菌活性;在增溶体系的抑菌机理研究中发现,加入的 HP- β -CD 只起到增溶作用,而真正起抑菌作用的是植物精油。

6.2 建议

植物精油作为天然防腐剂的潜在价值和广阔市场前景已被普遍认同, 对它们的研究也在不断深入。针对目前的研究现状, 现提出以下几点建议:

(1) 继续加强对自然界中植物资源的筛选, 对抑菌效果好的精油分析鉴定其化学组成, 以期能够得到新的抑菌活性物质;

(2) 不应仅局限于植物精油之间的复配研究, 植物精油与其他天然防腐剂(如乳酸链球菌素、鱼精蛋白和壳聚糖等)之间的协同增效作用也应被重视, 这对拓宽抑菌谱和增强抑菌活性有重要意义;

(3) 植物精油的抑菌机理尚未了解清楚。如能弄清精油对菌体的作用方式, 就可以根据不同菌种的实际情况, 对精油进行有选择的使用, 提高抑菌效率。

(4) 由于植物精油的水溶性较差, 在食品中直接使用有一定的不便, 因此可以考虑将其添加到性能良好的保鲜膜中, 做成新型抑菌保鲜膜。

参考文献

- [1] 杜丽娜, 张存莉, 朱玮, 等. 植物次生代谢合成途径及生物学意义[J]. 西北林学院学报, 2005, 20 (3): 150-155
- [2] 刘洪波, 史东辉, 张瑜. 植物精油抗菌活性研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(1): 12-14
- [3] 高献礼, 李超. 植物性香料提取技术的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2006, 6: 134-138
- [4] 焦启源. 芳香植物极其利用(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963
- [5] 金琦. 香料生产工艺学[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1996
- [6] 张坚, 孙培龙, 杨开, 等. 植物性天然香料的提取与应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 181-184
- [7] 郭秀艳. 臭柏、油松精油的提取与抑菌活性[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2009
- [8] 孙鹏, 刘文文. 植物精油提取和应用的研究进展[J]. 甘肃科技, 2007, 23(5): 139-141
- [9] 毕艳红, 乔旭光, 田云. 分子蒸馏技术分离纯化大蒜精油的研究[J]. 分离与提取, 2007, 33(5): 153-157
- [10] 周峰. 香辛料精油中抗菌成分分离鉴定、功能协同强化及量化研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2007
- [11] 董丽, 邢钧, 吴采樱. 香精香料的分析方法进展[J]. 分析科学学报, 2003, 19(2): 188-192
- [12] 王颖, 姜子涛, 李荣, 等. 黑胡椒和白胡椒精油抗氧化性能及清除自由基能力的比较[J]. 中国调味品, 2009, 34(5): 50-54
- [13] 冯雪, 姜子涛, 李荣, 等. 天然调味香料众香子精油的抗氧化性能及清除自由基能力研究[J]. 中国调味品, 2010, 35(4): 52-55
- [14] 顾仁勇, 张石峰, 刘莹莹, 等. 五种香辛料精油抑菌及抗氧化性能研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 106-108
- [15] 李荣, 姜子涛, 马丽. 月桂精油抗氧化性能及清除自由基能力的研究[J]. 中国调味品, 2009, 34(11): 58-63
- [16] 丁慧. 芳香疗法与中医药理论渊源初探[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(7): 434
- [17] 黄汉超, 陈宏珪, 吴伟. 中医药治疗不稳定型心绞痛的临床研究与治疗进展[J]. 中医药学刊, 2006, 24(1): 101-104
- [18] 林木振, 王孟和, 刘秉忠. 牡丹皮散联合阿司匹林治疗腰源性腹痛 56 例[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(1): 10-11
- [19] 高健, 段大航, 蔡秀荣. 大蒜油对心血管作用研究现状[J]. 社区医学杂志, 2007, 5(15): 53-55
- [20] 刘红杰, 金若敏. 薄荷油研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(6): 502-505
- [21] 杨帆, 王羽梅. 山鸡椒(山苍子)精油研究现状[J]. 韶关学院学报(自然科学), 2009, 30(6): 80-84
- [22] 赵丽琴. 山胡椒属萆类及其生物活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 171-174
- [23] 潘年松, 盛勇, 张学愈. 莪术抗肿瘤作用与品种和加工工艺的关系[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(8): 35-36

- [24] Keita S M, Vincent C, Schmit J, et al. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* [J]. Journal of Stored Products Research, 2001, 37: 339-349
- [25] Kim S I, Park C, Ohh M H, et al. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* [J]. Journal of Stored Products Research, 2003, 39: 11-19
- [26] Aslan I, Ozbek H, Calmasur O. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn [J]. Industrial Crops and Products, 2004, 19: 167-173
- [27] 艾应伟, 范志金, 李伟, 等. 植物源生理活性物质与害虫防治[J]. 资源科学, 2000, 22(3): 78-81
- [28] 钱骅, 赵伯涛, 夏劲, 等. 九种精油的抗菌活性及其防腐特性研究[J]. 中国调味品, 2010, 35(4): 69-72
- [29] Valero M, Salmeron M C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 85: 73-81
- [30] 何玮, 李光武, 傅佳. 薰衣草及橙花精油体外抑菌作用的研究[J]. 安徽医药, 2010, 14(5): 525-527
- [31] 吴慧清, 吴清平, 石立三, 等. 植物精油对微生物的抑菌效果评估研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 83-86
- [32] 马英姿, 谭琴, 李恒熠. 樟树叶及天竺桂叶的精油抑菌活性研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(1): 36-40
- [33] Serge A, David M. Antimicrobial properties of allicin from garlic [J]. Microbes and Infection, 1999, 1: 125-129
- [34] 钟瑞敏, 肖仔君, 张振明, 等. 小茴香籽精油成分及其抗菌活性研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(6): 36-40
- [35] 陈丽艳, 崔志恒. 植物精油抗菌活性的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(3): 197-198
- [36] Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro M L, et al. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 6314-6321
- [37] 胡艳芬, 江文斌, 蒋琳琳, 等. 百里香酚和香芹酚体外抑菌作用的研究[J]. 兽药与饲料, 2010, 10: 107
- [38] 楼兴隆, 李晓明, 张鞍灵, 等. 丁香油抑菌成分研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(3): 91-93
- [39] 吕世明, 陈杖榴, 陈建新, 等. 丁香酚体外抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 122-124
- [40] 郑国华, 刘焱文, 陈树和, 等. 牛至各生长期抗菌成分的分析[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(9): 536-538
- [41] 张静, 冯岗, 袁旭超, 等. 百里香酚抑菌活性初探[J]. 中国农业学报, 2009, 25(21): 277-280
- [42] 王雪梅, 谌徽, 李雪姣, 等. 天然活性单萜—柠檬烯的抑菌性能研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 24-28
- [43] 李京晶, 籍保平, 周峰, 等. 丁香和肉桂挥发油的提取、主要成分测定及其抗菌活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 64-68
- [44] 钱昆, 周涛. 植物源天然防腐剂应用和机理研究的最新进展[J]. 中国食品添加剂, 2006, 5: 100-104
- [45] NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacterict That Grow

- Aerobically: Approved Standard-Sixth Edition [M]. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002
- [46] Reza S, Rahman A, Lee J, et al. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujube* in inhibiting food-borne pathogens [J]. Food Chemistry, 2010, 119: 981-986
 - [47] Davidson P M, Parish M E.. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials [J]. Food Technology, 1989, 43: 148-155
 - [48] 李宏. 精油的抗病毒和抗微生物作用[J]. 香料香精化妆品, 2002, 5: 5-8
 - [49] 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
 - [50] 顾仁勇, 傅伟昌, 银永忠. 丁香和肉桂精油联合抗菌作用初步研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 115-119
 - [51] 吕飞. 生物抗菌包装体系及其对黑鱼品质影响的研究[D]. 浙江: 浙江大学博士学位论文, 2009
 - [52] 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
 - [53] Turgis M, Han J, Caillet S, et al.. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi* [J]. Food control, 2009, 20: 1073-1079
 - [54] Ouassalah M, Caillet S, Saucier L, et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat [J]. Meat Science, 2006, 73: 236-244
 - [55] 孙岫汪, 汪靖超, 李洪涛, 等. 迷迭香酸的抗菌机理研究[J]. 青岛大学学报(自然科学版), 2005, 18(4): 41-45
 - [56] Pasqua R D, Betts G, Hoskins N, et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 4863-4870
 - [57] 郑罡, 曹煜, 魏羽佳. 茶树油对白假丝酵母菌抑菌效果[J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24(5): 438-440
 - [58] 顾仁勇. 五种香辛料精油的提取及用于冷却猪肉保鲜研究[D]. 湖南: 湖南农业大学硕士学位论文, 2007
 - [59] 李鹏霞, 张兴, 刘亚敏, 等. 36 种精油对采后番茄防腐保鲜活性的影响[J]. 西北林学院学报, 2008, 23 (3):156-159
 - [60] 刘芳, 张小青, 吴三林, 等. 峨眉含笑精油对冬枣保鲜的研究[J]. 长春师范学院学报(自然科学版), 2008, 27(3): 65-69
 - [61] 张春红, 刘静, 陈丽, 等. 三种植物精油对霉菌的抑制效果测定及其在大米储藏中应用研究[J]. 食品科技, 2007, 32(12): 105-108
 - [62] Shelef L A, Jyothi E K, Bulgarelli M A. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods [J]. Journal of Food Science, 1984, 49: 737-740
 - [63] 疏秀林, 施庆珊, 欧阳友生, 等. 植物精油的抗菌特性及在食品工业中应用研究新进展[J]. 生物技术, 2006, 16(6): 89-92
 - [64] Stammati A, Bonsi P, Zucco F, et al. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays [J]. Food and chemical Toxicology, 1999(37): 813-823
 - [65] Celiktas O, Kocabas E, Bedir E, et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 553-559
 - [66] Jacob C, Mathiasen L, Powell D. Designing effective messages for microbial food safety hazards [J]. Food Control, 2010, 21: 1-6
 - [67] Fleming-Jones M, Smith R. Volatile organic compounds in foods: a five year study [J].

- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 8120-8127
- [68] Goni P, Lopez P, Sanchez C, et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils [J]. Food Chemistry, 2009, 116: 982-989
- [69] Hsieh P C, Mau J L, Huang S H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts [J]. Food Microbiology, 2001, 18: 35-43
- [70] Nazer A I, Kobilinsky A, Tholozan J L, et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: A synergistic effect? [J]. Food Microbiology, 2005, 22: 391-398
- [71] Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components [J]. Food Microbiology, 2009, 26: 142-150
- [72] Firuzi O, Asadollahi M, Gholami M, et al. Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species [J]. Food Chemistry, 2010, 122: 117-122
- [73] Rota M C, Carraminana J J, Burillo J, et al. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens [J]. Journal of Food Protection, 2004, 67: 1252-1256
- [74] Weerakkody N S, Caffin N, Turner M S, et al. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria [J]. Food Control, 2010, 21: 1408-1414
- [75] Hemaiswarya S, Kruthiventi A K, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases [J]. Phytomedicine, 2008, 15: 639-652
- [76] Rota M C, Herrera A, Martinez R M, et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils [J]. Food Control, 2008, 19: 681-687
- [77] Oussalah M, Caillet S, Saucier L, et al. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat [J]. Meat Science, 2006, 73: 236-244
- [78] Vaara, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane [J]. Microbiological Reviews, 1992, 56: 395-411
- [79] Elgayyar M, Draughon F A, Golden D A, et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms [J]. Journal of Food Protection, 2001, 64: 1019-1024
- [80] Burt S, Reinders R D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Applied Microbiology, 2003, 36: 162-167
- [81] Gutierrez J, Rodriguez G, Barry-Ryan C, et al. Efficacy of plant essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: antimicrobial and sensory screening [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71: 1846-1854
- [82] Hammer K A, Carson C F, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts [J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 86: 985-990
- [83] Runyoro D, Ngassapa O, Vagionas K, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania [J]. Food Chemistry, 2010, 119: 311-316
- [84] Grayer R J, Kite G C, Goldstone F J, et al. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum* [J]. Phytochemistry, 1996, 43: 1033-1039
- [85] Friedman M, Henika P R, Levin C E, et al. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *escherichia coli* O157:H7 and *salmonella enterica* in Apple Juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 6042-6048
- [86] Yamamoto H, Ogawa T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66: 921-924
- [87] Dorman H, Deans S G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant

- volatile oils [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88: 308-316
- [88] Gill A O, Delaquis P, Russo P, et al. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 73: 83-92
- [89] Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94: 223-253
- [90] Ultee A, Kets E, Alberda M, et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol [J]. *Archives of Microbiology*, 2000, 174: 233-238
- [91] Naigre R, Kalck P, Roques C, et al. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products [J]. *Planta Medica*, 1996, 62: 275-277
- [92] 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 8°C [J]. *Journal of Food Safety*, 2006, 26: 115-125
- [93] Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables [J]. *Food Microbiology*, 2004, 21: 703-714
- [94] Adams R P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy [M]. Allured Publishing Corporation: USA, 2001
- [95] Panizzi L, Flamini G, Cioni P L, et al. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four *Mediterranean Lamiaceae* [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 1993, 39: 167-170
- [96] Ceylan E, Fung D Y C. Antimicrobial activity of spices [J]. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 2004, 12: 1-55
- [97] Bozen B, Dukic N M, Simin N, et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 1822-1828
- [98] Vina A, Murillo E. Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum spp*) grown in Colombia [J]. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003, 14: 744-749
- [99] Fang T, Goto M, Sasaki M, et al. Combination of supercritical CO₂ and vacuum distillation for the fractionation of bergamot oil [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 5162-5167
- [100] Figoli A, Donato L, Carnevale R, et al. Bergamot essential oil extraction by pervaporation [J]. *Desalination*, 2006, 193: 160-165
- [101] Nitta M, Kobayashi H, Ohnishi-Kameyama M, et al. Essential oil variation of cultivated and wild perilla analyzed by GC/MS [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006, 34: 25-37
- [102] Calvey E M, White K D, Matusil J E, et al. Allium chemistry: identification of organosulfur compounds in ramp (*Allium tricoccum*) homogenates [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49: 359-364
- [103] 吴玉荷, 杨小华, 蒋灵芝. 薇甘菊水提物的抑菌试验研究[J]. *中国野生植物资源*, 2007, 26(1): 51-51
- [104] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. *电子显微学报*, 2005, 24(4): 440
- [105] 于庆华, 殷文政, 艾启俊, 等. 鹿蹄草素对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌的抑制效果观察[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 90-93
- [106] 杜春明, 焦振泉, 郭云昌, 等. 唐菖蒲伯克霍尔德菌菌体脂肪酸成分测定与分析[J]. *卫生研究*, 2005, 34(5): 613-616
- [107] 王关林, 蒋丹, 方宏筠. 天南星的抑菌作用及其机理研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(30): 280-285
- [108] Tajkarimi M M, Ibrahima S A, Cliver D O. Antimicrobial herb and spice compounds in

- food [J]. Food Control, 2010, 21: 1199-1218
- [109] Sikkema J, De Bont J A M, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59: 201-222
- [110] Lambert R J W, Skandamis P N, Coote P, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91: 453-462
- [111] Carson C F, Mee B J, Riley T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46: 1914-1920
- [112] Moreira M R, Ponce A G, Del Valle C E, et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen [J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38: 565-570
- [113] Santiesteban-Lopez A, Palou E, Lopez-Malo A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102: 486-497

附录

附录一 实验试剂

试剂名称	纯度规格	生产厂家
葡萄糖	分析纯	北京化工试剂厂
酵母浸粉	生化试剂	北京奥博星生物技术有限责任公司
牛肉膏	生化试剂	北京奥博星生物技术有限责任公司
蛋白胨	生化试剂	北京奥博星生物技术有限责任公司
氯化钠	分析纯	北京化工试剂厂
琼脂	生化试剂	北京奥博星生物技术有限责任公司
氢氧化钠	分析纯	北京化工试剂厂
盐酸	分析纯	北京化工试剂厂
柠檬酸	分析纯	北京化工试剂厂
硫酸卡那霉素	注射剂	杭州康恩贝制药有限公司
苯甲酸钠	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
山梨酸钾	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
尼泊金甲酯	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
甲醇	色谱纯	天津市四友精细化学品有限公司
乙醇	分析纯	北京化工试剂厂
正己烷	分析纯	北京化工试剂厂
戊二醛	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
磷酸二氢钠	分析纯	北京化工试剂厂
磷酸氢二钠	分析纯	北京化工试剂厂
吐温20	分析纯	西陇化工股份有限公司
吐温40	分析纯	西陇化工股份有限公司
吐温60	分析纯	西陇化工股份有限公司
吐温80	分析纯	西陇化工股份有限公司
β -环糊精	分析纯	北京化工试剂厂
羟丙基- β -环糊精	分析纯	北京化工试剂厂
聚乙二醇200	分析纯	西陇化工股份有限公司
聚乙二醇400	分析纯	西陇化工股份有限公司
聚乙二醇600	分析纯	西陇化工股份有限公司

附录二 主要实验仪器

仪器名称	规格型号	生产厂家
气相色谱/质谱联用仪(GC/MS)	7890A/5975C	美国安捷伦(Agilent)公司
气相毛细管色谱柱	DB-624	美国安捷伦(Agilent)公司
气相毛细管色谱柱	PC-Wax	北京科瑞迈(Kromat)公司
pH计	PB-10	德国赛多利斯(Sartorius)公司
台式离心机	TDL-5-A	上海安亭科学仪器厂
紫外可见分光光度计	UV-2450	日本岛津公司
全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅	YXQ-LS-SII	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
电热鼓风干燥箱	101-3AB	天津市泰斯特仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-500B	昆山市超声仪器有限公司
玻璃仪器气流烘干机	KQ-C	巩义市英峪予华仪器厂
集热式恒温加热磁力搅拌器	DF-101S	巩义市英峪予华仪器厂制造
超净工作台	CJT-12	北京昌平长城空气净化工程公司
恒温水浴锅	SY11-Ni	北京市长凤仪器仪表公司
移液枪	10-1000 μ l	Eppendorf公司
生化培养箱	SPX-150B-Z	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
电子天平	JJ500	美国双杰集团有限公司
恒温振荡培养箱	TZ-2EH	河北霸州长城医用设备厂
高速离心机	1-13	美国Sigma公司
电导率仪	DDS-12A	上海理达仪器厂
扫描电子显微镜	S-4700	日本日立(Hitachi)公司

致 谢

时光飞逝，转眼间三年的硕士研究生学习阶段即将完成。首先要感谢我的导师梁浩副教授。梁老师在课题的选题、实验方案的设计以及英文文章和毕业论文的撰写上，给予了我悉心的指点和耐心的教诲。梁老师认真严谨的治学态度、踏实勤奋的工作作风、真诚亲切的处事原则以及对学科发展方向的高度把握，给我留下了深刻的印象，也为我今后的学习工作树立了榜样。此外，梁老师在生活方面也给了我无微不至的关怀。在此，学生表示深深的敬意和衷心的感谢！

此外，我要感谢生命学院的袁其朋老师和张淑蓉老师给予我的启示和指导，两位老师在实验过程中提出的宝贵意见和建议，使我开阔了思路，受益匪浅。同时，真诚地感谢北京工业技师学院的李春方师兄以及本实验组所有同学在实验过程中给予我的极大支持和鼓励。我还要特别感谢李加和曹艺甜两位师妹先后对本研究工作的付出和贡献，愿你们一切顺利，前程似锦！

三年的研究生生活，离不开我的家人和朋友的默默支持，他们是我科研和生活的依靠和动力，再此对你们表示深深地感谢！

学业将成，师恩难忘。衷心地祝愿生命科学与技术学院蓬勃发展，院里的每一位老师身体健康、工作顺利！

最后，谨向所有关心和帮助我的老师、同学、朋友以及家人，再次表示衷心的感谢！

研究成果及发表的学术论文

发表及已接受的论文

1. Fei Ly, Hao Liang, Qipeng Yuan, Chunfang Li. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International. (SCI). Under Review (Second revision).
2. Fei Lv, Hao Liang, Qipeng Yuan, Chunfang Li. Combination of essential oils for the application in antimicrobial food packaging. Proceedings of the 17th IAPRI World Conference on Packaging. (ISTP). 2010 , P77-85. Tianjin, China. ISI: 000285731000020

作者和导师简介

1. 导师简历

梁浩, 男, 1980 年出生, 博士, 副教授, 硕士生导师。2007 年获北京化工大学生物化工专业博士学位。2007 年至今在北京化工大学生命科学与技术学院工作。主要研究方向: 天然活性物质的生物转化与改性、高效分离科学与技术。先后主持国家自然科学基金 1 项、国家重点实验室基金 1 项, 参加国家高技术研究发展“863”计划 1 项、国家自然科学基金 2 项、北京市教委及科委项目 2 项、参与多项技术实现工业化生产。在相关领域发表论文 15 篇, 其中 SCI 收录 10 篇, 申请获得发明专利 2 项。

主要学历:

2010.10-2011.4 University of Ballarat, High Research Fellow

2004.9-2007.7 北京化工大学生命科学与技术学院, 生物化工专业博士

2002.9-2004.7 北京化工大学化学工程学院, 生物化工专业硕士

1998.9-2002.7 北京化工大学化学工程学院, 生物化工专业学士

联系方式: E-mail: lianghao@mail.buct.edu.cn

2. 作者简历

吕飞, 男, 1986 年 8 月 10 日出生于北京, 汉族, 硕士。

2004 年 9 月考入北京化工大学生命科学与技术学院, 专业为制药工程, 于 2008 年 7 月本科毕业并获工学学士学位。

2008 年 9 月考入北京化工大学生命科学与技术学院, 专业为化学工程与技术, 攻读硕士学位至今。

联系方式: 13581781676 (手机)

E-mail: lvfeik500@126.com

北京化工大学

硕士研究生学位论文答辩委员会决议书

研究生姓名: 吕 飞 专业: 化学工程与技术

论文题目: 天然植物精油的抑菌活性及其作用机理研究

指导教师姓名: 梁 浩 职称: 副教授

论文答辩日期: 2011-5-23 地点: 科技大厦 302

论文答辩委员会成员

姓名	职称	工作单位	本人签名
谭天伟	教 授	北京化工大学	谭天伟
苏海佳	教 授	北京化工大学	苏海佳
罗施中	副教授	北京化工大学	罗施中
邓 利	副教授	北京化工大学	邓利
张 栩	副教授	北京化工大学	张栩

注: 此表用于存档, 除本人签名务必用钢笔填写外, 其余处必须用计算机打印。

答辩委员会对论文的评语（选题意义、文献综述、论文所取得的成果及水平、学风和论文写作水平、论文的不足之处）：

天然植物精油在食品和医药领域有广阔的应用前景。论文通过几种天然植物精油抑菌活性及化学组成等进行研究，选题有实用价值。

论文筛选出了有明显抑菌活性的4种植物精油（牛至、罗勒、佛手柑和紫苏），并经过复配，降低了各精油用量；通过气质联用技术（GC/MS）确定了4种精油主要化学成分；对抑菌机理初步研究表明复配精油是通过破坏菌体的细胞膜结构达到抑菌效果。

该论文内容充实，书写规范，反映出论文作者具有扎实的专业基础知识和较强的独立科研能力。

在论文答辩过程中表述清楚、回答问题正确。

经答辩委员会表决，一致同意通过毕业论文答辩，建议授予工学硕士学位。

对学位论文水平的总体评价	优秀	良好	一般	较差
		✓		

答辩委员会表决结果：

同意授予硕士学位 5 票，不同意授予硕士学位 0 票，弃权 0 票。根据投票结果，答辩委员会做出建议授予该同学硕士学位的决议。

答辩委员会主席签字： 谭天伟

2011年5月23日