

丁香油与月桂酸对金黄色葡萄球菌的协同抑制作用

谭婉静, 张笑薇, 白泓, 李晓凤, 余以刚, 肖性龙*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究探讨了丁香油、百里香油、薄荷油等三种植物精油以及中链脂肪酸月桂酸对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 筛选出具有协同抑制作用的组合丁香油与月桂酸, 测定协同组合对金黄色葡萄球菌生长、细胞膜通透性的影响, 并将该组合制成抑菌保鲜液, 应用于生鲜米粉保鲜。结果表明, 丁香油、薄荷油、百里香油及月桂酸对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度分别为 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 、4.00 $\mu\text{g/mL}$ 、7.50 $\mu\text{g/mL}$ 以及 9.00 $\mu\text{g/mL}$, 丁香油和月桂酸联合使用, 在浓度为 1/4 MIC 丁香油+1/4 MIC 月桂酸时具有协同抑菌效果, 此时分级抑菌浓度系数为 0.50。丁香油与月桂酸协同处理使金黄色葡萄球菌细胞膜损伤, 增加通透性。抑菌保鲜液对生鲜米粉中的菌落总数、金黄色葡萄球菌均有抑制作用, 对维持生鲜米粉品质具有积极影响。72 h 贮藏期间, 处理组初始菌落总数比对照组至少低 1.50 lg CFU/g; 金黄色葡萄球菌降低 1.65 lg CFU/g; 酸度值比对照组至少低 0.8 °T; 感官评价得分均高于对照组。结果表明, 丁香油与月桂酸协同组合制成抑菌保鲜液有可能成为生鲜米粉的可替代复合保鲜液。

关键词: 丁香油; 月桂酸; 协同抑菌; 金黄色葡萄球菌; 生鲜米粉; 保质期

文章编号: 1673-9078(2022)02-278-285

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0312

Synergistic Inhibitory Effect of Clove Oil and Lauric Acid on *Staphylococcus aureus*

TAN Wanqing, ZHANG Xiaowei, BAI Hong, LI Xiaofeng, YU Yigang, XIAO Xinglong*

(School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The inhibitory effects of three plant essential oils, clove oil, thyme oil, peppermint oil, as well as medium-chain fatty acid, lauric acid, on *Staphylococcus aureus* were investigated. The combination of clove oil and lauric acid with a synergistic inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* was selected. The effects of such a combination on the growth and cell membrane permeability of *Staphylococcus aureus* were studied. The combination was used to prepare an antimicrobial preservative solution, which was applied to preserve fresh rice noodles. The results showed that the minimum inhibitory concentrations of clove oil, peppermint oil, thyme oil and lauric acid against *Staphylococcus aureus* was 2.00 $\mu\text{g/mL}$, 4.00 $\mu\text{g/mL}$, 7.50 $\mu\text{g/mL}$ and 9.00 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The combined use of clove oil and lauric acid exhibited a synergistic antimicrobial effect when the concentration was 1/4 MIC clove oil + 1/4 MIC lauric acid, leading to a fractional inhibitory concentration index (FICI) of 0.50. The synergistic action of clove oil and lauric acid damaged the cell membrane of *Staphylococcus aureus* and increased the permeability. The antimicrobial preservative solution had inhibitory effects on the total plate counts and *Staphylococcus aureus* in the fresh rice noodles, and exerted a positive impact on maintaining the quality of fresh rice noodles. During the 72-h storage, the treatment group had a lower initial total plate counts (by at least 1.50 lg CFU/g), smaller number of *Staphylococcus aureus* (by 1.65 lg CFU/g), lower acidity value (by at least 0.8 °T), compared with those of the control group; The sensory evaluation score of the treatment group was higher than that of the control group. The results showed that the antimicrobial preservative solution made by the combination of clove oil and lauric acid might be an alternative compound preservative solution for fresh rice noodles.

引文格式:

谭婉静,张笑薇,白泓,等.丁香油与月桂酸对金黄色葡萄球菌的协同抑制作用[J].现代食品科技,2022,38(2):278-285,+265

TAN Wanqing, ZHANG Xiaowei, BAI Hong, et al. Synergistic inhibitory effect of clove oil and lauric acid on *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 278-285, +265

收稿日期: 2021-03-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602201); 广东省自然科学基金项目 (2021A1515011068); 国家自然科学基金面上项目 (32172320)

作者简介: 谭婉静 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: 1026590538@qq.com

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: fexxl@scut.edu.cn

Key words: clove oil; lauric acid; synergistic antibacterial; *Staphylococcus aureus*; fresh rice noodles; shelf life

金黄色葡萄球菌在自然环境中广泛存在,是最常见的食源性致病菌之一。污染金黄色葡萄球菌的食品,不仅保质期缩短,误食后还可能引起食物中毒。为了抑制食品中致病菌、腐败菌等微生物的生长,延长其保质期,添加防腐剂是食品生产企业的首选。随着化学防腐剂弊端的出现,以及人们对绿色、安全食品的追求,使用安全、有效的植物源天然防腐剂已成为食品保鲜的趋势^[1,2]。许多天然防腐剂如精油、酶、壳聚糖等已经被用于食品保鲜^[3]。从植物的不同部位提取出来的植物精油,长期以来一直被用作食品调味剂,并被美国食品和药物管理局认定是安全的^[4,5]。丁香油等精油被证明能够有效灭活微生物,维持食品品质,延长保质期^[6,7]。中链脂肪酸(medium chain fatty acid, MCFA)是一组天然存在于椰子油、棕榈油和牛奶等食物中的甘油饱和脂肪酸酯^[8,9]。在 MCFA 中,月桂酸及其酯类被证明是食品和化妆品中最有效的抗菌剂^[10]。尽管精油和中链脂肪酸有很多优点,但单独使用时要想达到理想的保鲜效果,仍需要大量添加。对精油和中链脂肪酸联合使用进行抑菌的研究发现,两种化合物联合时对大肠杆菌具有协同杀菌作用,此时所需的抑菌物浓度更低且效果更好^[9]。

生鲜米粉在我国历史悠久^[11],因其风味独特、易于消化,在东南亚大部分地区都很受欢迎^[12]。然而,水分含量高、营养丰富,使生鲜米粉很容易受到微生物的污染^[13]。因微生物增殖导致保质期的缩短,限制了生鲜米粉产业的发展^[14]。因此,控制生鲜米粉中微生物的生长对延长其保质期尤为重要。

革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌具有不同的细胞结构,中链脂肪酸和精油联合对革兰氏阳性菌是否具有协同作用尚未被研究,且二者联合在食品中的作用尚未被证实。本文选择金黄色葡萄球菌作为模式菌,探究丁香油、百里香油、薄荷油等三种植物精油以及中链脂肪酸月桂酸对金黄色葡萄球菌的抑制效果,并筛选出具有协同抑制作用的组合丁香油与月桂酸,测定协同组合对金黄色葡萄球菌生长、细胞膜通透性的影响。此外,还将协同组合丁香油与月桂酸制成抑菌保鲜液用于生鲜米粉保鲜,通过测定生鲜米粉中的微生物及理化性质,并进行感官鉴评,评价该抑菌保鲜液对生鲜米粉的保鲜效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生鲜米粉,购买自当地生鲜超市;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA),购买自广州环凯微生物有限公司;平板计数琼脂,购买自青岛高科园海博生物技术有限公司;丁香油、薄荷油,购买自安徽酷尔生物工程有限公司;百里香油,购买自江西雪松天然医药油有限公司;月桂酸,购买自国药控股化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

LRH-250A-2 恒温培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司;HZQ-F100 恒温振荡培养箱,哈尔滨市东联仪器有限公司;TYXH-1 旋涡混合器,上海兰仪实业有限公司;YXQ-LS-100S II 高压蒸汽灭菌锅,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;SW-CJ-1SD 超净工作台,苏州尚田洁净技术有限公司;SORVALL Stratos 台式高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技有限公司;BCD-256KFA 冰箱,山东青岛海尔股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 菌悬液的制备

用接种环蘸取保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油管中的金黄色葡萄球菌,在 TSA 平板上划线,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 24 h。随后用接种环挑取单菌落接种于 40 mL TSB 培养基中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 恒温振荡培养箱中震荡培养,活化菌株。无菌环境下吸取生长到指数期的菌液 1 mL 接种于 40 mL TSB 中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 恒温振荡培养箱中震荡培养至稳定期,取菌液于 8000 r/min 条件下离心 5 min 收集菌体,用无菌生理盐水洗涤 2 次,最后重悬于无菌 TSB 溶液中得到 10^6 CFU/mL 菌悬液。

1.3.2 抑菌剂母液的制备

月桂酸母液:称取适量月桂酸固体颗粒,用 50%乙醇水溶液溶解,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机系滤膜过滤除菌后加入无菌水稀释至 $576\text{ }\mu\text{g/mL}$,此时乙醇浓度为 25%, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅保存备用。

丁香油、薄荷油、百里香油母液:吸取适量精油原液,用 50%乙醇水溶液溶解,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机系滤膜过滤除菌后加入无菌水分别配制成 $512\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $512\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $480\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的丁香油、薄荷油、百里香油母液,此时乙醇浓度为 25%, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅保存备用。

1.3.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定

三种精油及月桂酸对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度(Minimum inhibition concentration, MIC)的

测定参照 Purkait 等^[5]所描述的方法。按照 1.3.1 所述制备菌悬液, 1.3.2 的方法配置三种精油及月桂酸母液。在 96 孔板中每孔加入 100 μL 菌悬液, 再向孔中加入 100 μL 丁香油母液进行等倍稀释, 混合均匀后反复吹打, 此时丁香油的终浓度依次为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。随后将样品放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 观察金黄色葡萄球菌生长情况, 用接种环蘸取 96 孔板中溶液在 TSA 平板上划线, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 观察平板上细菌生长情况。依此方法测定薄荷油、百里香油及月桂酸对金黄色葡萄球菌的 MIC。实验以不含抑菌物的 TSB 菌悬液为阴性对照, 不含细菌的 TSB 为阳性对照, 并另外做乙醇空白试验, 每组样品做三个平行。MIC 定义为在肉眼观察下, 抑菌物抑制金黄色葡萄球菌生长的最低浓度。

1.3.4 分级抑菌浓度 (FIC) 的测定

参照 Bag 等^[15]的方法, 采用棋盘滴定法测定三种植物精油和月桂酸联合使用时对金黄色葡萄球菌的分级抑菌浓度 (Fractional Inhibitory Concentration, FIC)。按照 1.3.1 所述制备菌悬液, 1.3.2 的方法配置三种精油及月桂酸母液。由 1.3.3 所得结果, 用无菌 TSB 稀释抑菌物母液, 得到浓度为 8 \times MIC、4 \times MIC、2 \times MIC、1 \times MIC、1/2 \times MIC、1/4 \times MIC 的溶液。在 96 孔板中每孔加入 100 μL 菌液, 50 μL 不同浓度的精油和月桂酸溶液分别加入到 96 孔板的横行竖列中, 以得到最终浓度 (2 \times MIC、1 \times MIC、1/2 \times MIC、1/4 \times MIC、1/8 \times MIC、1/16 \times MIC)。反复吹打混合均匀后放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 观察 96 孔板中金黄色葡萄球菌的生长情况, 每组样品三个平行。记录并计算每个样品的 FIC 值, 按照如下公式计算每组样品的分级抑菌浓度系数 (Fractional Inhibitory Concentration Indices, FICI)。

FICI 计算公式:

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \frac{\text{MIC}_{A(\text{联合使用})}}{\text{MIC}_{A(\text{单独使用})}} + \frac{\text{MIC}_{B(\text{联合使用})}}{\text{MIC}_{B(\text{单独使用})}}$$

FICI 解释标准: 协同作用 (FICI \leq 0.5); 相加作用 (0.5<FICI \leq 1); 无关 (1<FICI \leq 4); 拮抗作用 (FICI $>$ 4)。

1.3.5 丁香油、月桂酸及其协同组合对金黄色葡萄球菌生长的影响

根据 1.3.4 的实验结果, 选择具有协同作用的组合丁香油和月桂酸进行后续实验。参照 Basri 和 KhaIron^[16]的方法, 测定丁香油和月桂酸在不同浓度下 (1/2 \times MIC 丁香油、1/2 \times MIC 月桂酸、1/4 \times MIC 丁香油+1/4 \times MIC 月桂酸和 1/2 \times MIC 丁香油+1/2 \times MIC 月桂酸) 单独或联合使用对金黄色葡萄球菌生长的影响。按照 1.3.1 所述的方法制备 10⁵ CFU/mL 菌悬液, 1.3.2

的方法配置三种精油及月桂酸母液, 在灭菌试管中加入菌悬液及不同浓度丁香油和月桂酸溶液, 得到最终浓度 (1/2 \times MIC 丁香油、1/2 \times MIC 月桂酸、1/4 \times MIC 丁香油+1/4 \times MIC 月桂酸和 1/2 \times MIC 丁香油+1/2 \times MIC 月桂酸)。将试管放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 分别在 0、0.5、1、1.5、2、3、4、8、12、24 h 后从试管中吸取 50 μL 样液, 用 0.85% 无菌生理盐水稀释后, 选取适宜稀释度, 取样 100 μL 注入 TSA 平板上涂布, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 24 h 后计算菌落数。每个样品三个平行。

1.3.6 丁香油、月桂酸及其协同组合对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性的影响

当细菌细胞膜的完整性被破坏时, 细胞大分子内容物 (如核酸和蛋白质) 被释放到培养基中^[17]。与 1.3.5 相同, 制备经不同浓度丁香油和月桂酸处理的样品, 对照组不添加抑菌物。样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养, 在培养 0、1、2、4、8、24 h 后, 取样, 8000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 用多功能酶标仪分别测定上清液在 260 nm 和 280 nm 处的吸光值, 以评估核酸和蛋白质的泄漏情况。每组样品做三个平行。

按照 1.3.1 的方法制备菌悬液, 8000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 5% 葡萄糖溶液重悬, 反复洗涤, 至菌液的电导率与 5% 葡萄糖溶液的电导率相当, 此菌液作为等渗液。按照 1.3.2 的方法配置丁香油和月桂酸母液, 与 1.3.5 相同, 制备经不同浓度丁香油和月桂酸处理的样品, 对照组不添加抑菌物, 其中菌悬液使用等渗液替代。样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 24 h, 分别于 0、1、2、3、4、5、6、10、24 h 测定样品电导率, 记为 L₂。5% 葡萄糖与不同浓度的丁香油和月桂酸混合, 其电导率记为 L₁。等渗液沸水浴 5 min, 冷却后测定电导率, 记为 L₀。每组样品做三个平行。金黄色葡萄球菌经不同浓度丁香油和月桂酸及其组合处理后, 相对电导率 (Relative Electric Conductivity, REC) 由下列公式计算:

$$\text{REC} / \% = 100 \times \frac{L_2 - L_1}{L_0} \times 100\%$$

1.3.7 生鲜米粉保鲜效果评价

生鲜米粉 (共 10 批次) 从当地一家生鲜超市购买, 并在 2 h 内运抵实验室进行下一步实验。根据感官可接受性和食品基质对保鲜效果的影响, 制备浓度为丁香油 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、月桂酸 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑菌保鲜液。将生鲜米粉随机分为两组: 1-对照组 (记为 CK), 浸泡在蒸馏水中; 2-处理组 (记为 T), 浸泡在丁香油 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和月桂酸 (9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 抑菌保鲜液中。每组样品在相应的处理溶液中浸泡 1 min 后, 捞出沥干并包

装在聚乙烯袋中，在 4 °C 保存并进行菌落总数、酸度值测定及感官分析实验。

将生鲜米粉在 95 °C 的水浴中杀菌 40 min^[18]，捞出沥干，将金黄色葡萄球菌悬液接种到生鲜米粉中，使得生鲜米粉中初始金黄色葡萄球菌菌落数达到 5~7 lg CFU/g。将生鲜米粉随机分为两组：1-对照组（记为 CK），浸泡在蒸馏水中；2-处理组（记为 T），浸泡在丁香油（2 μg/mL）和月桂酸（9 μg/mL）抑菌保鲜液中。每组样品在相应的处理溶液中浸泡 1 min 后，捞出沥干并包装在聚乙烯袋中，在 4 °C 保存并进行金黄色葡萄球菌菌落数测定。

为了确定抑菌保鲜液的保鲜效果，按照 GB 4789.2-2016《食品微生物学检验菌落总数测定》的方法并略作修改，测定生鲜米粉中的菌落总数（TPC）。将 25 g 生鲜米粉用 225 mL 0.85% 无菌生理盐水均质后，用 0.85% 无菌生理盐水配制成 10 倍系列稀释液，选取适宜稀释度进行平板计数。每组样品做三个平行。

酸度值的测定参照 GB 5009.239-2016《食品酸度的测定》第一法并有改动，每组（15 g）样品用 150 mL 蒸馏水研磨成匀浆，均质，在匀浆中滴入 5 滴三氯甲烷进行浸提。浸提完成后，匀浆以 5000 r/min 离心 5 min，收集上清液，测定酸度值。每组样品做三个平行。

4 °C 冷藏 72 h 后，对各组样品进行感官分析。生鲜米粉在沸水中漂烫 3 min。热烫后，由 10 名训练有素的专家对米粉的颜色、外观、气味、口感和质地进行 1 到 10 的可接受性评分，其中 10=非常喜欢，1=非常不喜欢。评分低于 5 分意味着没有通过可接受性感官测试。

1.4 数据处理

使用 SPSS Statistics 23 软件对数据进行差异性显著分析， $p < 0.05$ 为显著差异，用 Origin 2018 进行数据绘图。

表 1 生鲜米粉感官评定标准

Table 1 Sensory evaluation standard of fresh rice noodles

| 项目 | 评分标准 |
|---------|------------------------|
| 颜色（10分） | 颜色暗淡、有明显异色、不均匀 |
| | 颜色略暗、有少量异色 |
| | 具有米粉固有的色泽、颜色均匀自然 |
| 外观（10分） | 表面粗糙、缺乏弹性 |
| | 表面平整、有一定弹性 |
| | 表面光滑、柔软有弹性 |
| 气味（10分） | 酸味、馊味明显，异味 |
| | 米香味、略带酸馊味 |
| | 米香浓郁、无不良气味 |
| 口感（10分） | 口感较差、硬度过高或烂，粘牙或有明显的夹生感 |
| | 口感过硬或过软、少量粘牙或略有夹生感 |
| | 硬度适中，口感爽滑，不粘牙、无夹生现象 |
| 质地（10分） | 有较多杂质、异物 |
| | 略有杂质、异物 |
| | 没有杂质、异物 |

表 2 植物精油与月桂酸联合作用时对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度和分级抑菌浓度系数

Table 2 The MICs and FICI values of combination of the essential oils and lauric acid against *S. aureus*

| 分组 | 抑菌物 | MIC/(μg/mL) | | FIC | FICI | 结果 |
|----|---------|-------------|------|------|------|----|
| | | 单独使用 | 联合使用 | | | |
| 1 | A: 丁香油 | 2.00 | 0.50 | 0.25 | 0.50 | 协同 |
| | B: 月桂酸 | 9.00 | 2.25 | 0.25 | | |
| 2 | A: 薄荷油 | 4.00 | 2.00 | 0.50 | 0.75 | 相加 |
| | B: 月桂酸 | 9.00 | 2.25 | 0.25 | | |
| 3 | A: 百里香油 | 7.50 | 3.75 | 0.50 | 0.75 | 相加 |
| | B: 月桂酸 | 9.00 | 2.25 | 0.25 | | |

2 结果与讨论

2.1 最小抑菌浓度和分级抑菌浓度

如表 2 所示, 丁香油对金黄色葡萄球菌的 MIC 低于薄荷油和百里香油。三种精油对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 2.0~7.5 μg/mL。月桂酸对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 9.0 μg/mL。结果表明, 三种精油和月桂酸对金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用。

不同的抑菌物联合使用时可能会产生协同效应。三种植物精油与月桂酸联合作用对金黄色葡萄球菌的抑菌效果如表 2 所示, 其中丁香油-月桂酸的 FICI 为 0.50, 表现为协同作用, 薄荷油-月桂酸和百里香油-月桂酸表现为相加作用。Kim 等^[9]的研究指出, 百里香酚-月桂酸联合处理对大肠杆菌 O157:H7 表现出协同杀菌作用, 0.50+1.00 mmol/L 和 1.00+1.00 mmol/L 的处理使细菌数量由 7.54 lg CFU/mL 降至 0.43 lg CFU/mL 或无法检测。百里香酚是百里香油的主要成分, 二者作用效果存在差异, 且金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 的细胞结构不同。Gomori 等^[19]证实百里香油中百里香酚比例的下降, 导致精油的抗菌和抗生物膜形成能力的变化, 并且与微生物的类型也有关系。本研究揭示了丁香油和月桂酸对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)的协同抑制作用。

2.2 丁香油、月桂酸及其协同组合对金黄色葡萄球菌生长的影响

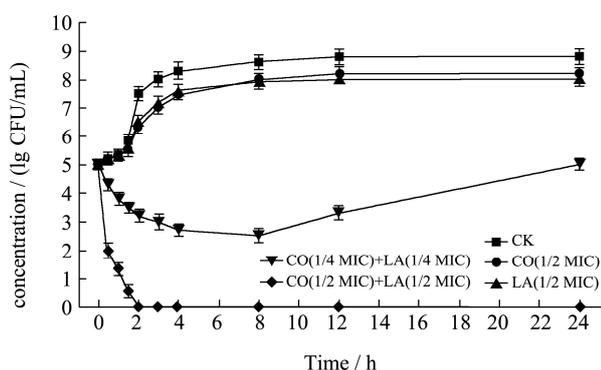


图 1 丁香油、月桂酸及其协同组合作用下金黄色葡萄球菌的生长曲线

Fig.1 Time-kill curves of *S. aureus* treated by clove oil, lauric acid and their combinations

注: CO: 丁香油; LA: 月桂酸。

生长曲线结果如图 1 所示。从时间-杀菌动力学曲线上可以观察到, 丁香油、月桂酸联合处理时, 金黄色葡萄球菌的数量比单独使用丁香油、月桂酸时有所

减少。对照组 24 h 后细菌数量增加至 9 lg CFU/mL 左右。丁香油或月桂酸单独处理时, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用有限, 当两种抑菌物联合处理时, 对金黄色葡萄球菌具有明显的抑制作用。低浓度联合处理 (1/4 MIC+1/4 MIC) 作用 8 h 后, 细菌数量下降 2~3 lg CFU/mL, 然后逐渐增加, 24 h 恢复到初始浓度。高浓度联合处理 (1/2 MIC+1/2 MIC), 2 h 内细菌数量降至检测不到。结果证实了丁香油、月桂酸组合对金黄色葡萄球菌的协同抗菌效果。我们的结果与 Purkait 等^[5]的研究一致, 两种物质联合抑菌效果优于单一成分抑菌效果。

2.3 细胞膜通透性的影响

260 nm 和 280 nm 处的吸光度被广泛用作核酸和蛋白质从细胞内渗漏到细胞外的标志^[20,21]。如表 3 所示, 丁香油和月桂酸单独处理金黄色葡萄球菌时, 260 nm 和 280 nm 处的吸光度与对照组无显著差异。经 1/2 MIC+1/2 MIC 处理的金黄色葡萄球菌的核酸和蛋白质释放量较对照组显著增加, 260 nm、280 nm 处的吸光值分别由 1.64、1.71 升高至 1.81、2.28, 表明核酸和蛋白质的漏出量是各处理中最高的。Cui 等^[20]的研究表明, 丁香油处理后细菌结构遭到破坏, 导致细胞膜通透性改变, 核酸泄漏, 260 nm 吸光度增加。当不同浓度的月桂酸处理细胞时, 与阴性对照相比, 核酸泄漏的量也明显增加, 260 nm 处吸光度的增加证明了这一点^[22]。同样, 丁香油和封装大气压等离子体联合使用对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 280 nm 处吸光度比对照组或两种物质单独处理组的吸光度高^[23]。因此, 丁香油和月桂酸联合使用, 二者协同损伤细胞膜, 增加细胞膜的通透性, 从而导致更多的核酸和蛋白质泄漏。

表 3 金黄色葡萄球菌大分子内容物渗漏

| Table 3 Leakage of macromolecule content of <i>S. aureus</i> | | | | |
|--|----------------|------------------------|------------------------|--|
| 组别 | 浓度 | 260 nm | 280 nm | |
| 对照组 | | 1.64±0.01 ^a | 1.71±0.02 ^a | |
| 丁香油 | 1/2 MIC | 1.64±0.01 ^a | 1.71±0.03 ^a | |
| 月桂酸 | 1/2 MIC | 1.64±0.01 ^a | 1.71±0.03 ^a | |
| 丁香油+月桂酸 | 1/4 MIC+1/4MIC | 1.75±0.01 ^b | 2.07±0.02 ^b | |
| | 1/2 MIC+1/2MIC | 1.81±0.01 ^c | 2.28±0.04 ^c | |

注: 结果为三次实验的均值±标准差。小写字母不同的列的平均值在 $p < 0.05$ 上有显著性差异。

细胞膜是细菌转运各种离子和无机盐的通道, 当细胞膜受损渗透性改变时, 电解质溢出胞外, 因此可以通过测量培养液电导率的变化来反映细胞膜的损伤程度^[24]。丁香油和月桂酸联合处理金黄色葡萄球菌时,

电导率的变化如图 2 所示。经丁香油、月桂酸混合溶液处理后，随着时间的延长，培养液电导率逐渐增加。随着丁香油和月桂酸浓度的增加，电导率也增加。与对照组相比，经低、高浓度丁香油、月桂酸协同处理组电导率由 2.50% 升高至 12.20%、29.50%。同样，丁香油、月桂酸单独使用时，对金黄色葡萄球菌的细胞膜的影响有限。对照组培养液中电导率的微小变化可能与细胞的正常溶解和死亡有关^[17]。一些研究表明，丁香油和月桂酸显著影响细胞膜，引起细胞溶解，导致细胞完整性丧失和细胞膜通透性增加，这与我们的研究结果一致^[20,25]。细胞膜是细胞内物质（如核酸、蛋白质和多种离子）通过的屏障，这些物质是促进细胞膜功能所必需的^[26]。因此，细胞膜损伤引起的核酸、蛋白质和多种离子的外泄可造成细菌的死亡^[27]。

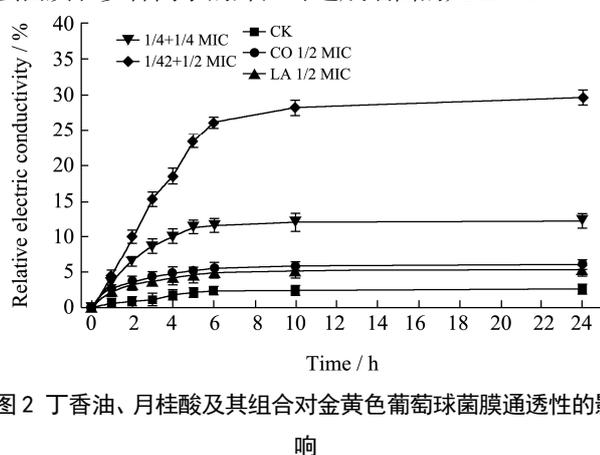


图 2 丁香油、月桂酸及其组合对金黄色葡萄球菌膜通透性的影响

Fig.2 Effect of clove oil, lauric acid and their combination on membrane permeability of *S. aureus*

注：CO：丁香油；LA：月桂酸。

2.4 生鲜米粉保鲜效果评价

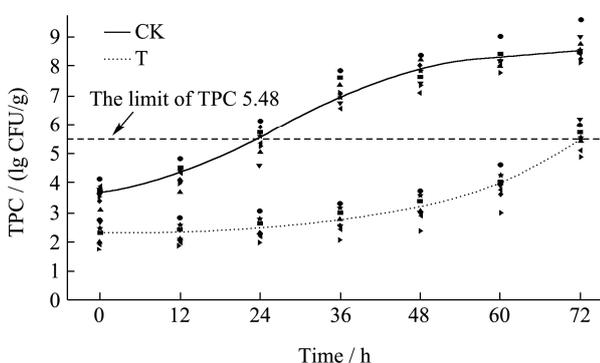


图 3 4 °C 储存条件下生鲜米粉中的菌落总数变化

Fig.3 Changes of total plate counts of fresh rice noodle during storage at 4 °C

菌落总数是衡量食品是否安全卫生的重要指标，我国现有的食品标准基本上均对菌落总数有明确要求。各组生鲜米粉的菌落总数变化如图 3 所示。从结

果可以看出，在贮藏 72 h 期间，对照组生鲜米粉的菌落总数在 24 h 内超过了规定的安全限值（5.48 lg CFU/g）^[12]，与对照组相比，处理组生鲜米粉的细菌数量缓慢增加，菌落总数超过规定限值的时间为 72 h，表明抑菌保鲜液对生鲜米粉中微生物的生长有抑制作用。从初始细菌数量看，处理组生鲜米粉的初始菌落数比对照组的低至少 1.5 lg CFU/g，表明抑菌保鲜液浸泡可以显著降低生鲜米粉的初始细菌量，对生鲜米粉中的微生物有良好的抑制及杀灭作用。Dunn 等^[28]的研究表明，丁香油或百里香油乳剂可有效减少辣椒上沙门氏菌的交叉污染，多数情况下沙门氏菌数量低于检测限（1 CFU/10 g； $p < 0.05$ ），可作为采后农产品清洗系统中氯的合适替代品。同样，Tangwacharin 和 Khopaibool^[29]发现将月桂酸、月桂酸单甘油酯以及乳酸联合使用时，可显著抑制鲜猪里脊中金黄色葡萄球菌以及菌落总数的生长。

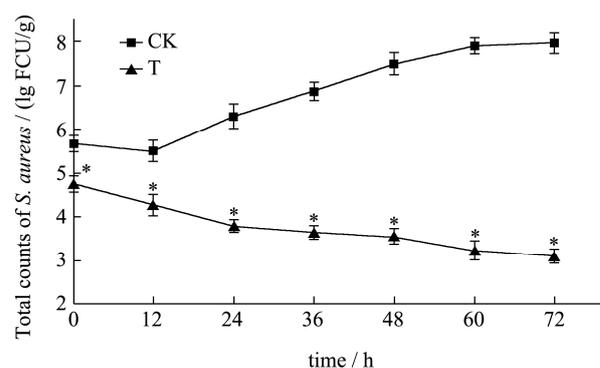


图 4 4 °C 储存条件下抑菌保鲜液对生鲜米粉中的金黄色葡萄球菌的抑制作用

Fig.4 Inhibitory effect of antibacterial solution on *S. aureus* in fresh rice noodles during storage at 4 °C

图 4 为在 4 °C 下，72 h 贮藏时间内生鲜米粉中金黄色葡萄球菌的生长变化情况。对照组中金黄色葡萄球菌菌落数呈现先减少后增加趋势，这可能是金黄色葡萄球菌在适应新环境时产生的滞后现象^[30]。在贮藏终点，对照组金黄色葡萄球菌菌落数增加至 7.96 lg CFU/g。在 72 h 贮藏期内，处理组金黄色葡萄球菌菌落数低于对照组，贮藏期间处理组菌落数降低了 1.65 lg CFU/g。此外，与对照组相比，处理组的金黄色葡萄球菌初始菌落数降低了 0.92 lg CFU/g。由 Oliveira 等人^[31]的研究可知，丁香油对金黄色葡萄球菌有较好的抑制效果，且与浓度成比例。Kelsey 等^[32]的研究表明，月桂酸能有效抑制金黄色葡萄球菌的生长。

酸度是评价生鲜米粉品质的主要指标之一，食品中酸度值的增加会对感官质量产生不利影响。图 5a 展示了生鲜米粉在储藏过程中酸度值的变化。在储藏的前 24 h 内，各组生鲜米粉的酸度均保持相对稳定。

24 h 后, 对照组的酸度值至少增加 0.8 °T, 而处理组生鲜米粉的酸度值变化不大。值得注意的是, 随着储藏时间的不断延长, 生鲜米粉的酸度值与细菌数量呈正相关, 表明微生物是生鲜米粉腐败变质的主要决定因素。在富含碳水化合物的食品中, 由于微生物的活动, 食品中的酸度变化是常见的, 它们消耗碳水化合物并利用新陈代谢来产酸和降低 pH^[12]。Li 等^[33]研究发现新鲜面条在储藏过程中 pH 值持续下降, pH 值与菌落总数呈极显著正相关 ($p < 0.01$)。此外, Angiolillo 等^[34]的研究表明, 不加任何添加剂的意大利面因微生物腐败, 会出现 pH 下降和大肠菌群增加。这些结果表明, 抑菌保鲜液处理可以通过抑制细菌的生长来控制酸度值的增加。

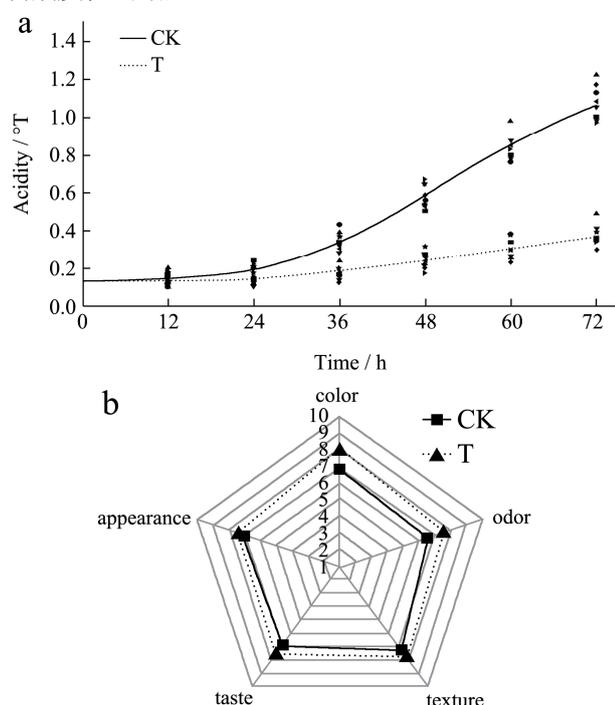


图5 生鲜米粉贮藏期酸度变化和感官评分

Fig.5 Changes of acidity and sensory evaluation of fresh rice noodle during storage

注: a: 生鲜米粉贮藏期酸度的变化; b: 生鲜米粉感官评价。

感官特性是食品变质的最直接反映, 随着储存时间的增加, 食品的颜色、外观、气味、口感和质地逐渐发生不可接受的变化。每组生鲜米粉的感官得分如图 5b 所示, 对照组生鲜米粉的气味平均得分最低, 处理组生鲜米粉的颜色平均得分最高。另外, 各组生鲜米粉样品在储藏过程中质地和外观的平均得分变化不大。所有特征的平均得分都在可接受阈值以上。结果表明, 72 h 后, 处理组生鲜米粉的感官品质和可接受性均高于对照组。在碳水化合物和蛋白质含量较高的食品中, 由于微生物作用造成食品品质劣变是较为常

见现象, 其中包括微生物大量增殖、发酵产酸、pH 值下降等。因此本文分析, 经过抑菌保鲜液处理的生鲜米粉, 是通过抑制其中微生物的生长, 进而保持了生鲜米粉的品质。

综合菌落总数、金黄色葡萄球菌菌落数、酸度值、感官评分等评价指标, 在 4 °C 下贮藏 72 h, 丁香油和月桂酸抑菌保鲜液处理对生鲜米粉有较好的保鲜效果, 对其中金黄色葡萄球菌的生长具有良好的抑制作用。

3 结论

3.1 丁香油、薄荷油、百里香油及月桂酸对金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用。且丁香油和月桂酸组合, 对金黄色葡萄球菌具有协同抑制作用。细胞膜通透性的测定结果表明, 丁香油与月桂酸协同作用, 可影响细胞膜, 导致通透性增加, 胞内物质渗漏, 最终导致细胞死亡。

3.2 丁香油 (2 µg/mL) 和月桂酸 (9 µg/mL) 抑菌保鲜液处理生鲜米粉, 可抑制生鲜米粉表面微生物的生长, 对其中金黄色葡萄球菌的生长具有较好的抑制效果, 延缓酸度值的增加, 维持较好的感官品质, 使生鲜米粉货架期延长了近 48 h, 有可能成为生鲜米粉或其他生鲜产品的可替代复合保鲜液。

参考文献

- [1] Wang Z, Jia Y, Zhang M. Effect of curcumin on the quality properties of millet fresh noodle and its inhibitory mechanism against the isolated spoilage bacteria [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(3): 1451-1460
- [2] Sun Q, Li J, Sun Y, et al. The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation [J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126405
- [3] Angiolillo L, Spinelli S, Conte A, et al. Extract from broccoli byproducts to increase fresh filled pasta shelf life [J]. Foods, 2019, 8(12): 621
- [4] Ju J, Xie Y, Guo Y, et al. The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(20): 3281-3292
- [5] Purkait S, Bhattacharya A, Bag A, et al. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination [J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(6): 1439-1448
- [6] Hu Q, Zhou M, Wei S. Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antiseptic field

- [J]. Journal of Food Science, 2018, 83(6): 1476-1483
- [7] Hasheminejad N, Khodaiyan F. The effect of clove essential oil loaded chitosan nanoparticles on the shelf life and quality of pomegranate arils [J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125520
- [8] Lalouckova K, Mala L, Slanickova P, et al. *In vitro* antimicrobial effect of palm oils rich in medium-chain fatty acids against mastitis-causing Gram-positive bacteria [J]. Czech Journal of Animal Science, 2019, 64(8): 325-331
- [9] Kim S A, Rhee M S. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, beta-resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Food Control, 2016, 60: 447-454
- [10] Khoramnia A, Ebrahimpour A, Ghanbari R, et al. Improvement of medium chain fatty acid content and antimicrobial activity of coconut oil via solid-state fermentation using a Malaysian *Geotrichum candidum* [J]. Biomed Research International, 2013, 2013: 954542
- [11] Li Y, Liang J F, Yang M Y, et al. Traditional Chinese rice noodles: history, classification, and processing methods [J]. Cereal Foods World, 2015, 60(3): 123-127
- [12] Xue W, Zhang C, Wang K, et al. Understanding the deterioration of fresh brown rice noodles from the macro and micro perspectives [J]. Food Chemistry, 2020, 128321
- [13] Shi F F, Zhao H W, Song H B, et al. Effects of electron-beam irradiation on inoculated *Listeria innocua*, microbiological and physicochemical quality of fresh noodles during refrigerated storage [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 8(1): 114-123
- [14] Low Y K, Effarizah M E, Cheng L H. Factors influencing rice noodles qualities [J]. Food Reviews International, 2019, 36(8): 781-794
- [15] Bag A, Chattopadhyay R R. Synergistic antibacterial and antibiofilm efficacy of nisin in combination with p-coumaric acid against food-borne bacteria *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 65(5): 366-372
- [16] Basri D F, Khairon R. Pharmacodynamic interaction of quercus infectoria galls extract in combination with vancomycin against MRSA using microdilution checkerboard and time-kill assay [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 493156
- [17] Debaon N, Wang Q Y, Ren E F, et al. Multi-target antibacterial mechanism of eugenol and its combined inactivation with pulsed electric fields in a hurdle strategy on *Escherichia coli* [J]. Food Control, 2019, 106: 106742
- [18] 张玮,陈洁,陈玲. 杀菌工艺对鲜湿米粉的保鲜效果及品质的影响[J].河南工业大学学报,2019,40(5):32-37
ZHANG Wei, CHEN Jie, CHEN Ling. Effect of sterilization process on preservation and quality of fresh wet rice noodles [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2019, 40(5): 32-37
- [19] Gomori C, Vidacs A, Kerekes E B, et al. Altered antimicrobial and anti-biofilm forming effect of thyme essential oil due to changes in composition [J]. Natural Product Communications, 2018, 13(4): 483-487
- [20] Cui H, Zhang C, Li C, et al. Antimicrobial mechanism of clove oil on *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2018, 94: 140-146
- [21] Sinsinwar S, Vadivel V. Catechin isolated from cashew nut shell exhibits antibacterial activity against clinical isolates of MRSA through ROS-mediated oxidative stress [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(19): 8279-8297
- [22] Yang H T, Chen J W, Rathod J, et al. Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth *in vitro* and reduces inflammation in a mouse infection model [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 1-16
- [23] Yoo J H, Baek K H, Heo Y S, et al. Synergistic bactericidal effect of clove oil and encapsulated atmospheric pressure plasma against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* and its mechanism of action [J]. Food Microbiology, 2021, 93: 103611
- [24] 操庆国,郭钦,蔡佳惠,等.黄精与土霉素协同抑制副溶血弧菌研究[J].食品工业科技,2021,42(13):141-148
CAO Qingguo, GUO Qin, CAI Jiahui, et al. Synergistic antibacterial effects of *Polygonatum sibiricum* Red. with oxytetracycline on *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(13): 141-148
- [25] Valle-Gonzalez E R, Jackman J A, Yoon B K, et al. Characterizing how acidic pH conditions affect the membrane-disruptive activities of lauric acid and glycerol monolaurate [J]. Langmuir, 2018, 34(45): 13745-13753
- [26] Dannenberg G D, Funck G D, da Silva W P, et al. Essential oil from pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi): chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action [J]. Food Control, 2019, 95: 115-120

(下转第 265 页)