

肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌的抗菌机理

段雪娟¹, 韩雅莉^{2*}, 刘泽璇³, 张潼¹, 徐雨谏¹, 黄煜强¹, 吴克刚^{1*}

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006) (2. 广东工业大学生物医药学院, 广东广州 510006)

(3. 通标标准技术服务有限公司广州分公司, 广东广州 510663)

摘要: 该研究主要探讨了肉桂精油的抗菌活性及其对金黄色葡萄球菌的抗菌机制, 实验采用气相熏蒸法研究精油的气相抗菌活性, 通过 TEM、电导率实验、FT-IR、荧光光谱等方法探讨肉桂精油的气相抗菌机制。结果表明肉桂精油具有显著的气相抗菌活性, 对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度 (MIC) 为 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 最低杀菌浓度 (MBC) 为 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。TEM 观察显示, 经肉桂精油气熏后的金黄色葡萄球菌菌体细胞膜破损溶解, 细胞皱缩, 从而引起内容物外泄。电导率实验进一步表明气熏后的菌体细胞膜通透性提高, 并通过测试 OD₂₆₀ 发现核酸外泄与精油浓度变化的正相关关系。通过 FT-IR 图与荧光光谱图, 发现肉桂精油引起金黄色葡萄球菌菌体蛋白构象的变化, 并通过分析酰胺 I 带推测在气熏过程中菌体蛋白二级结构发生无序变化, 以及通过荧光强度和波长峰位的变化判断肉桂精油气熏后菌体蛋白发生了改变, 暴露出更多的发色基团。由此可见, 肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌可能的抗菌机理是改变菌体细胞膜通透性和形态, 并改变了菌体蛋白的二级结构和三级结构。

关键词: 气相抗菌活性; 肉桂精油; 金黄色葡萄球菌; 抗菌机理

文章编号: 1673-9078(2021)09-50-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.1210

Antibacterial Mechanism of Cinnamon Essential Oil Vapor Fumigation against *Staphylococcus aureus*

DUAN Xue-juan¹, HAN Ya-li^{2*}, LIU Ze-xuan³, ZHANG Tong¹, XU Yu-tan¹, HUANG Yu-qiang¹, WU Ke-gang^{1*}

(1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2. School of Biomedicine and Pharmaceutical Sciences, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(3. SGS-CSTC Standards Technical Services Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: The antibacterial function of the vapor-phase of the essential oil from *Cinnamomum cassia* (EOL) against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and the underlying mechanisms were investigated. Gas phase fumigation was used in the experiments to examine the antibacterial mechanism of gas-phase cinnamon essential oils by TEM, conductivity test, FT-IR spectroscopy, fluorescence spectroscopy and other methods were used to characterize the change of cellular membrane after treated by essential oil through gas phase fumigation method. The results showed that EOL had significant vapor-phase antibacterial activity with a MIC and MBC against *S. aureus* being 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively. TEM observations showed that the cell membrane of *S. aureus* was damaged and dissolved after being fumigated by *Cinnamomum* essential oil, and the cells shrank, causing the contents to leak out. The conductivity experiments further confirmed that the cell membrane permeability of *S. aureus* was improved, and a positive correlation between nucleic acid leakage and the changes in the concentration of essential oil was found by measuring OD₂₆₀. The FT-IR and fluorescence spectra showed the changes in protein

引文格式:

段雪娟, 韩雅莉, 刘泽璇, 等. 肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌的抗菌机理[J]. 现代食品科技, 2021, 37(9): 50-58

DUAN Xue-juan, HAN Ya-li, LIU Ze-xuan, et al. Antibacterial mechanism of cinnamon essential oil vapor fumigation against *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 50-58

收稿日期: 2020-12-28

基金项目: 广东省林业科技创新重点项目 (2020KJCX010); 广东省农村科技特派员重点项目 (19ZK0364); 广东工业大学大学生创新创业训练计划项目 (xj201911845203); 广州市科技计划项目 (202103000078)

作者简介: 段雪娟 (1984-), 女, 实验师, 研究方向: 植物精油的抗菌及其机理研究, E-mail: 279536106@qq.com

通讯作者: 韩雅莉 (1957-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物活性物质与中药活性成分, E-mail: 1539629581@qq.com; 共同通讯作者: 吴克刚 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 芳香植物及其提取物在健康领域的应用, E-mail: wukegang2003@163.com

conformation of *S. aureus* caused by the treatment with cinnamon essential oil. On the analysis of the amide I band, it was speculated that the secondary structure of bacterial proteins became more disordered in the process of fumigation. Based on the changes in fluorescence intensity and spectral peak position, one could speculate that the bacterial proteins had changed after the cinnamon essential oil fumigation, leading to more exposed chromophores. Accordingly, the possible antibacterial mechanism of cinnamon essential oil fumigation against *S. aureus* was related to the changes in the cell membrane permeability and morphology, and secondary and tertiary structures of bacterial proteins.

Key words: vapor fumigation antimicrobial activity; cinnamon essential oil; *Staphylococcus aureus*; bactericidal mechanism

精油是从植物的分泌组织中提取的具有一定生物活性的挥发性油状物质,其生理活性包括消炎抗菌,抗癌抗氧化、抗病毒以及镇静镇痛等。而肉桂精油是从肉桂树皮、树枝或树叶中提取的具有广谱抑菌性能的挥发性物质,呈淡黄色至深棕色。其中主要成分是肉桂醛,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等作用^[1]。金黄色葡萄球菌是一种能导致多种疾病的兼性厌氧革兰氏阳性菌,能够感染人类和动物,是最主要的人畜共患细菌病原体之一^[2,3]。其生长对营养的要求不高,致病力强,因此人受其感染的途径和方式很多,引起食物中毒、皮肤和软组织感染、部分炎症。由于精油对致病菌有抑制以及杀灭的作用,近年来在抑菌方面得到了广泛的应用和研究。蒋书歌等^[4]制备柑橘精油纳米乳液抑制金黄色葡萄球菌,特别对乳液稳定性以及不同柑橘精油成分的差异的抑菌能力作了对比实验。李咏梅等^[5]总结了以肉桂、丁香为代表的6种南药的抑菌活性成分分析以及作为食品抗菌剂的应用前景。Azi Mouna等^[6]研究了阿尔及利亚紫檀精油对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等6种致病菌的抑菌活性并分析其潜在药用价值。

植物精油抗菌机理的研究包括精油对致病菌的抑菌机理以及各种有效成分对致病菌的抗菌研究^[7,8],大部分的抑菌研究均属直接接触抗菌的范畴,而关于气相抗菌机理的相关研究很少。本文主要通过分析肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌的抑菌机理,以金黄色葡萄球菌为微生物模型,通过透射电镜观察肉桂精油气相熏蒸处理对菌体超微结构的影响,通过电导率、OD₂₆₀的测定检测肉桂精油气相熏蒸对菌体细胞膜渗透作用的影响,通过荧光光谱、傅里叶变换红外光谱等探究肉桂精油对金黄色葡萄球菌菌体蛋白的影响,从而探究肉桂精油对金黄色葡萄球菌的杀菌机理,为开发以植物精油为原料的新型植物消毒杀菌剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*,

ATCC65389), 实验室提供; 肉桂精油 (99%), 广东工业大学香飘三众创平台提供; 营养琼脂, 广东环凯微生物科技有限公司; 铜网, 海德创业生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯; 实验用水均为去离子水。

1.2 实验仪器与设备

紫外分光光度计 (TU-1950), 北京普析通用仪器公司; 电导率仪 (DDSJ-308A), 上海仪电科学仪器股份有限公司; 透射电子显微镜 (HT7700), 日本日立公司; 电子天平 (TP-114), 北京赛多利斯科学仪器有限公司; 高压蒸汽灭菌锅 (YXQ-70A), 上海博讯; 培养箱 (LRH-70F), 上海一恒; 超净工作台 (SW-CJ-2F), 上海申安医疗器械厂; 真空冷冻干燥机, 宁波新芝; 荧光光谱仪 (FluoroMax-4), 美国HORIBA Jobin Yvon 公司; 傅里叶变换红外光谱仪 (Nicolet 6700), 赛默飞世尔科技。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种的活化及配制菌悬液

取金黄色葡萄球菌菌种接种于营养琼脂, 经过 24 h 的活化后, 划线培养使得单个菌落在营养琼脂平板上分离, 取单个菌落用灭菌后的去离子水稀释成 0.5 麦氏单位的菌悬液, 备用。

1.3.2 肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌活性的测定

将 50 μ L 上述菌悬液加入到已冷却至室温的营养琼脂培养基上, 用涂布棒涂匀, 待菌液完全吸收后将培养板倒置, 取不同浓度的肉桂精油 (丙二醇稀释) 0.40 mL 滴加在各培养皿的血盖中央, 封口膜密封并于 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中倒置培养 24 h, 观察平板上菌体的生长情况。将完全不长菌的平板所对应的最低浓度作为最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。在完全不长菌的平板上用 6 mm 无菌打孔器打取直径为 6 mm 菌块转移到新鲜的营养琼脂平板中央, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养 24 h, 观察抑菌效果, 测量菌落直径。每个浓度梯度 3 个平板, 取平均值。并做空白对比。菌圈仍然不长菌的平板对应的最低浓

度为最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC)。

1.3.3 肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌透射电镜 (TEM) 实验

取正常培养和经肉桂精油处理(浓度 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、1.00 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 处理 24 h) 的金黄色葡萄球菌含菌平板, 刮少量菌体于 1.50 mL 的离心管中, 加入 200~400 μL 的 2.5% 戊二醛溶液覆盖住菌体, 放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱里冷藏固定 4~6 h, 固定后, 用 PBS 缓冲液洗 3 次, 洗一次离心一次, 离心参数为: 10000 r/min, 3 min, 最后弃去上清液。再依次加入 200 μL 的 30%、50%、70%、95% 和 100% 的乙醇溶液进行 10 min 梯度洗脱, 然后再次离心弃上清液, 用无水乙醇使菌体分散重悬, 滴加 1~2 滴于铜网上, 使其自然干燥。

透射电子显微镜采用 80 kV 加速电压观察菌体, 并拍照。

1.3.4 肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌对其电导率值的影响

1.3.4.1 不同精油浓度对金黄色葡萄球菌电导率的影响

将金黄色葡萄球菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 吸取 0.40 mL 不同浓度的精油至皿盖, 使得平板空间内浓度分别达到 0.0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 同时做空白对比。熏蒸 24 h, 用无菌蒸馏水洗脱平板菌落, 制成菌悬液, 将各菌液调 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 至 1.0 ± 0.01 , 用电导率仪测其电导率值。每个浓度做三次平行, 取其平均值。

1.3.4.2 不同气相熏蒸时间对金黄色葡萄球菌电导率的影响

将金黄色葡萄球菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 吸取 0.40 mL 肉桂精油至皿盖, 使得平板空间内浓度达到 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 熏蒸处理时间分别为 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h, 同时作空白对比。用无菌蒸馏水洗脱平板菌落, 制成菌悬液, 将各菌液调 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 至 1.0 ± 0.01 , 用电导率仪测其电导率值。每个处理时间做三次平行, 取其平均值。

1.3.5 肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌对其核酸的影响

1.3.5.1 不同精油浓度熏蒸对金黄色葡萄球菌核酸的影响

将金黄色葡萄球菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 将配成不同浓度的精油吸取 0.40 mL 至皿盖, 使得平板空间内浓度达到 0.0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 同时做空白对比。熏蒸 24 h, 用无菌蒸馏水洗脱平板菌落, 制成菌悬液, 将各菌液

调 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 至 1.0 ± 0.01 , 离心后取上清液 3 mL, 测其 260 nm 处的吸光度。每个浓度做三次平行, 取其平均值。

1.3.5.2 不同气相熏蒸时间对金黄色葡萄球菌核酸的影响

将金黄色葡萄球菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 吸取 0.40 mL 肉桂精油至皿盖, 使得平板空间内浓度达到 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 熏蒸处理时间为 0 h、0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h, 用无菌蒸馏水洗脱平板菌落, 制成菌悬液, 将各菌液调 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 至 1.0 ± 0.01 , 离心后取上清液 3 mL, 测其 260 nm 处的吸光度。每个浓度做三次平行, 取其平均值。

1.3.6 肉桂精油气相熏蒸对金黄色葡萄球菌蛋白质二级结构的影响

参照文献^[9], 取不同浓度肉桂精油处理的含菌平板, 用 10 mL 0.05 mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液收集菌体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 真空冷冻干燥。取少量菌体粉末与 KBr 压片, 用 Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪在 400~4000 cm^{-1} 光谱范围内, 首先对压片样品进行扫描, 再对背景进行扫描, 获取 FT-IR 谱图, 仪器分辨率为 2 cm^{-1} , 扫描次数为 16 次。

谱图处理: 用 OMNIC 软件将得到的 FT-IR 光谱图转换成吸光度模式, 并对其进行基线校正、自动平滑、纵坐标归一化处理, 使其标准化和归一化, 以提高信噪比。并在 OMNIC 中取酰胺 I 带特征峰的图谱 (1600~1700 cm^{-1}) 保存为数据模式。将所得酰胺 I 带特征峰的图谱数据用 Origin 软件生成折线图, 取其二阶导数, 在 Peakfit 软件中校正基线, 用二阶导数拟合, 多次拟合使残差最小, 根据峰面积计算各二级结构的变化和比率。

1.3.7 肉桂精油气相熏蒸对金黄色葡萄球菌蛋白质三级结构的影响

将金黄色葡萄球菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 将配成不同浓度的精油吸取 0.40 mL 至皿盖, 使得平板空间内浓度达到 0.0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 同时做空白对比。熏蒸 24 h, 用 10 mL 0.05 mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液洗脱平板菌落, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 离心 10 min。弃去上清液, 用 PBS 缓冲液悬浮菌体将各菌悬液调 $\text{OD}_{620\text{nm}}$ 至 0.4 ± 0.02 , 用荧光分光光度计测量菌悬液中氨基酸残基发出的荧光值。在 300~500 nm 内扫描样品的发射光谱, 激发光谱和发射光谱光栅的缝宽为 5 nm。

1.3.8 数据处理

表1 肉桂精油对金黄色葡萄球菌的气相抑制作用

Table 1 Vapor-phase antibacterial effect of EOL on *S. aureus*

浓度/($\mu\text{L}/\text{mL}$)	空白对照	丙二醇对照	0.0625	0.125	0.25	0.5	1
金黄色葡萄球菌	++	++	++	+	-	-	-

注：“++”表示菌种生长良好，“+”表示菌种生长较弱，“-”表示无菌生长。

每个样品重复3次实验，使用 Origin 8.1 软件对试验数据进行分析及作图，其中电导率、 $\text{OD}_{260\text{ nm}}$ 值等以平均值 \pm 标准差表示。利用 Omnic、Origin 8.1 软件对红外数据进行分析处理，并利用 Peakfit 软件处理及作图。

2 结果与讨论

2.1 肉桂精油对金黄色葡萄球菌气相抗菌活性的研究

根据实验方法，用 1.5×10^8 CFU/mL 的大肠杆菌悬液 $50\ \mu\text{L}$ 涂布平板，将肉桂精油以丙二醇稀释，加在培养皿皿盖上，使其在培养皿空间的精油组分浓度依次为：1、0.5、0.25、0.125、0.0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ，于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 24 h，观察平板长菌情况如下表 1 所示。

由实验结果可知，肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度 (MIC) 为 $0.25\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 。用无菌的打孔器在平板上打取直径为 6 mm 的菌块，菌斑朝下放入另一新鲜平板中央。于 $37\ ^\circ\text{C}$ 下培养 24 h，发现肉桂精油浓度 $0.25\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 对应的菌块长到 6.5 mm，而肉桂精油浓度 $0.5\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 及以上浓度对应的菌块依然是 6 mm，由此可知，肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌的最低杀菌浓度 (MBC) 为 $0.50\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 。

2.2 肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌透射电镜 (TEM) 研究

气熏处理前的金黄色葡萄球菌如图 1a 所示，呈正常的形态结构，菌体为圆球状，表面饱满光滑，细胞外部屏障—细胞壁、细胞膜等结构完整，细胞内细胞质分布均匀。图 1b、图 1c 为不同精油浓度处理下的金黄色葡萄球菌的形态结构。由图可知，经过精油气熏后的金黄色葡萄球菌形态发生变化，精油浓度越高，细胞皱缩程度越大，结构层次模糊不清，细胞皱缩，细胞内容物也发生收缩，菌体的细胞膜破损或溶解，使得细菌内容物发生外漏。Zhang Chenghui 等^[10]发现丁香精油能破坏李斯特菌致密的生物膜结构；Zhao Meimei 等^[11]通过透射电镜观察到从黑茶中提取的酚类化合物中的花青素-3-O-葡萄糖苷对金黄色葡萄球

菌生物膜有损伤，造成碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、蛋白质和 DNA 渗漏，可见，植物提取物在一定程度上可破坏细菌细胞膜并造成内容物外泄。

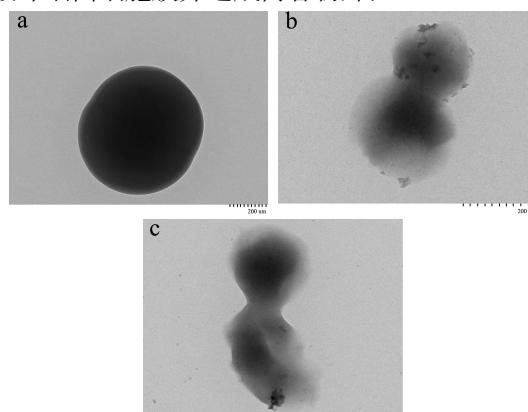


图1 不同浓度肉桂精油熏蒸处理的金黄色葡萄球菌透射电镜图

Fig.1 TEM micrograph of *S. aureus* treated with different concentration EOL

注：a：正常金黄色葡萄球菌，b、c：分别经过 $0.25\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 和 $1\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 的肉桂精油处理。

2.3 肉桂精油气相熏蒸对金黄色葡萄球菌电导率值的影响

菌体细胞膜受到破损后，细胞内的部分离子 K^+ 、 Na^+ 等进入外界液体中，离子从高浓度到低浓度环境的细胞进出方式为协助扩散，需要载体蛋白配合通过细胞膜到达菌液环境。离子进入外界液体后，造成外界液体电解质含量增加，电导率值提高，因此，可以通过电导率的改变进一步分析菌体细胞膜通透性的变化^[12]，不同浓度肉桂精油熏蒸 (24 h) 和不同时间熏蒸 ($0.5\ \mu\text{L}/\text{mL}$) 菌液的电导率变化如图 2 所示。

如图 2a 所示，不同浓度的肉桂精油对金黄色葡萄球菌进行气相熏蒸后，随着浓度的增高，电导率的变化趋势是先增高后降低再升高最后趋于平缓。在精油浓度为 $0\sim 0.0625\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 时，经过精油熏蒸后菌体的细胞膜通透性提高，电导率从 $444\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 提高至 $523.5\ \mu\text{S}/\text{cm}$ ，此时载体蛋白未发生变性，离子从胞内到达菌液环境的速率提高，电导率值升高；在精油浓度 $0.0625\sim 0.25\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 范围内，电导率值有所下降，最低到达 $439\ \mu\text{S}/\text{cm}$ ，这可能是因为随着精油浓度的提高，

使载体蛋白发生了变性,限制了协助扩散的进行,因此离子透过细胞膜受到阻碍,电导率值降低;随后的精油达到一定浓度时,细胞膜破损程度较大,胞内离子直接流出,电导率再次升高,从 439 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 升高至 559.5 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 。最后电导率趋于稳定,可能是因为细胞膜通透性达到最高,菌体死亡^[13],细胞内容物大量进入菌悬液中,电导率达到相对平衡。

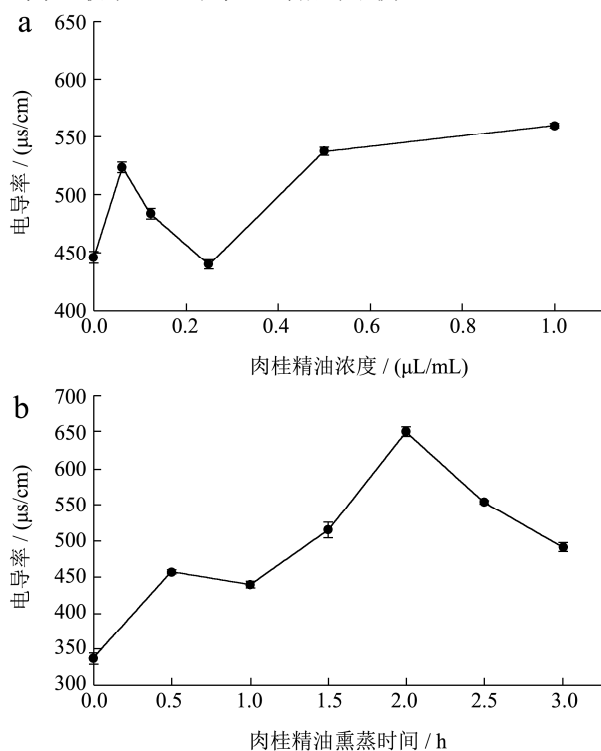


图2 (a) 不同精油浓度下菌液电导率; (b) 不同精油熏蒸时间下菌液电导率

Fig.2 (a) Effect of different EOL concentration on alternation of electric conductivity; (b) Effect of different fumigation time on alternation of electric conductivity

由图 2b 可知,在 0~3 h 的处理时间内,随着肉桂精油对金黄色葡萄球菌气相熏蒸处理时间的增加,电导率总体上是先上升后下降,且有明显的变化趋势。经过气熏处理与未处理的 337.5 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 相比,电导率均有所升高,在 439~650.5 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 的范围内变化,这表示尽管不同的处理时间细胞膜的改变程度不同,但在 0~3 h 范围内经过气熏处理后细胞膜的通透性确实提高,其中,在气熏 2 h 时,电导率最高,达到 650.5 $\mu\text{s}/\text{cm}$,说明此时细胞膜的通透性最高。这可能是因为,刚开始肉桂精油对金黄色葡萄球菌进行气熏时,需要时间吸附于细胞膜上,与细胞膜上的脂质磷脂层慢慢互溶,通透性逐渐增加,从而使得使得胞内离子渗出,电导率升高。2 h 后,精油分子达到平衡,慢慢向细胞膜内部扩散,堵住离子通道,使得电导率降低。

2.4 肉桂精油气相熏蒸对金黄色葡萄球菌核酸的影响

菌体细胞膜渗透性发生改变时,导致细胞内含有的生物大分子核酸等发生泄露,因此可通过核酸的泄露情况间接反映细胞膜通透性的改变,进而判断细菌的存活状态。有研究表明,DNA、RNA 能够强力吸收 260 nm 处的紫外可见光,被称为 260 nm 吸收物质,因此可通过紫外吸收法检测菌液离心后上清液中 OD_{260 nm} 处吸光度的变化值进一步判断菌体核酸的泄露程度^[13,14]。

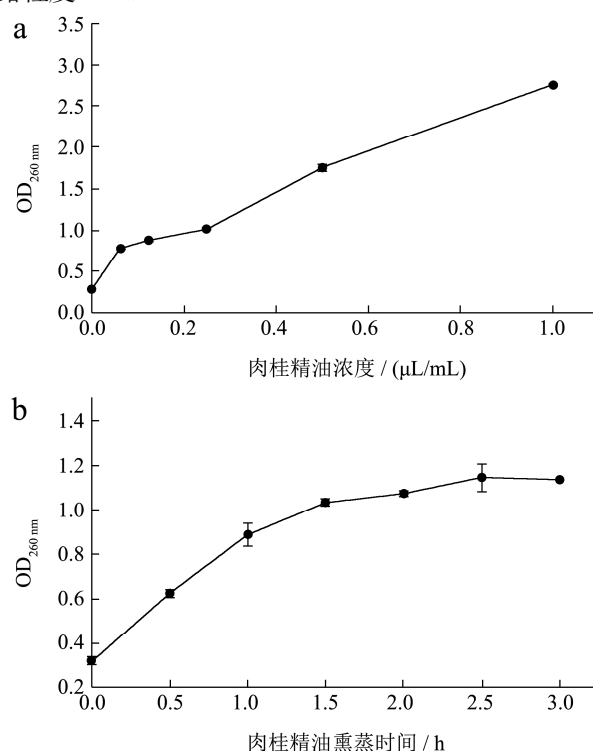


图3 (a) 不同精油浓度下菌液的 OD₂₆₀; (b) 不同精油熏蒸时间下菌液的 OD₂₆₀

Fig.3 (a) Effect of different EOL concentration on alternation of OD₂₆₀; (b) Effect of different fumigation time on alternation of OD₂₆₀

由图 3 可知,经过肉桂精油熏蒸后金黄色葡萄球菌菌液的 OD₂₆₀ 值明显增高,且随着肉桂精油浓度的提高和气熏时间的延长,菌液的吸光值愈高,其中精油浓度对吸光值影响十分明显。

由图 3a 所示,肉桂精油处理浓度为 0、0.0625、0.125、0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时 OD₂₆₀ 值分别为 0.285、0.778、0.88 和 1.007,在浓度小于 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,随着肉桂精油浓度的增大 OD₂₆₀ 值增加缓慢,到肉桂精油处理浓度为 0.5~1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 范围时,OD₂₆₀ 值增长迅猛,且有持续上升的趋势。这可能是因为精油浓度低于 0.25

$\mu\text{L/mL}$ 时, 细菌通过熏蒸只是抑制了生长, 对细胞膜的影响比较小, 随着浓度增大, 精油对细胞的破坏趋于杀灭, 对细胞膜的破坏也不断加重, 因此细胞大分子核酸泄露加剧, OD_{260} 值也越来越大。该结果与申素霞^[13]研究发现肉桂醛可损伤黄曲霉细胞生物膜, 使其孢子提取液的 OD_{260} 值增大相似。由图 3b 所示, 肉桂精油气熏时间为 0~3 h 范围内, 随着熏蒸时间的增加, OD_{260} 值不断增大。在处理时间 1 h 内, OD_{260} 值与气熏处理时间的延长呈线性关系, 随后增长相对缓慢最终趋于平缓, 说明随着时间的延长, 菌体大分子核酸泄露程度越来越大, 最后趋于平稳。

2.5 肉桂精油对金黄色葡萄球菌二级结构的影响

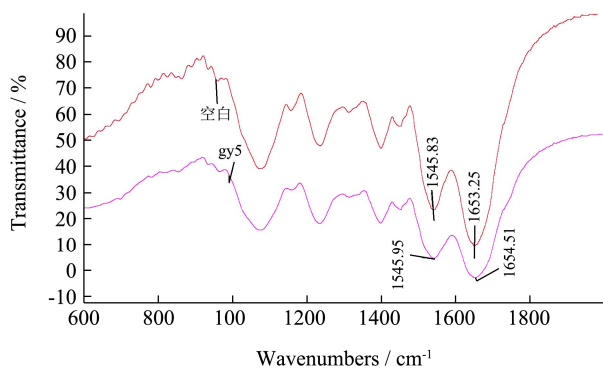


图 4 加入肉桂精油前后金黄色葡萄球菌的傅里叶变换红外光谱图

Fig.4 FT-IR spectra of *S. aureus* without (a) and with (b) EOL

注: 空白: 未加入肉桂精油, gy5: $c(\text{肉桂精油})=1 \mu\text{L/mL}$ 。

反应蛋白质二级结构最重要的红外特征是酰胺 I 带 ($1700\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$)、酰胺 II 带 ($1600\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$)。其中酰胺 I 带最能反应蛋白质二级结构的变化。

如图 4 所示, 随着肉桂精油的加入, 金黄色葡萄球菌的谱图形状没有发生显著变化, 但其透射率呈现降低的状态。肉桂精油熏蒸后, 金黄色葡萄球菌的酰胺 I 带峰值从 1545.83 cm^{-1} 红移到 1545.95 cm^{-1} , 酰胺 II 带峰值从 1653.25 cm^{-1} 红移到 1654.51 cm^{-1} , 说明肉桂精油小分子与金黄色葡萄球菌发生了相互作用, 并引起菌体蛋白的构象变化。

菌体红外光谱的酰胺 I 带 ($1600\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 区域) 主要是其氨基酸残基 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收, 主要由蛋白质的螺旋、折叠、转角、无规则卷曲结构来反映。为了得到肉桂精油对蛋白质二级结构的影响, 利用二阶导数拟合对酰胺 I 带进行处理, 得到如图 5 所示的子峰。以下为各子峰与二级结构的对应关系: $1700\sim 1680 \text{ cm}^{-1}$ 为反平行 β -折叠, $1680\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ 为 β -

转角, $1660\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ 为 α -螺旋, $1650\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ 为无规卷曲, $1640\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$ 为 β -折叠。蛋白质的二级结构中, 蛋白质分子的致密性体现在 α -螺旋结构, 而其他结构如 β -折叠、转角、无规则卷曲等反映了蛋白质分子的松散性^[15]。计算结果如表 2 所示。

从图 6c、d、e、f 中可以看出, 经过不同浓度的肉桂精油处理后, α -螺旋含量明显下降, 降幅在 $8.7\%\sim 23.6\%$ 之间; β -折叠的含量随着肉桂精油浓度的增加呈现先增加再下降的变化; 加入了肉桂精油的金黄色葡萄球菌 β -转角的含量高于对照组, 但随着精油浓度的增加含量变化不大。无规则卷曲随着肉桂精油浓度的增加呈现先轻微下降再增加的变化。

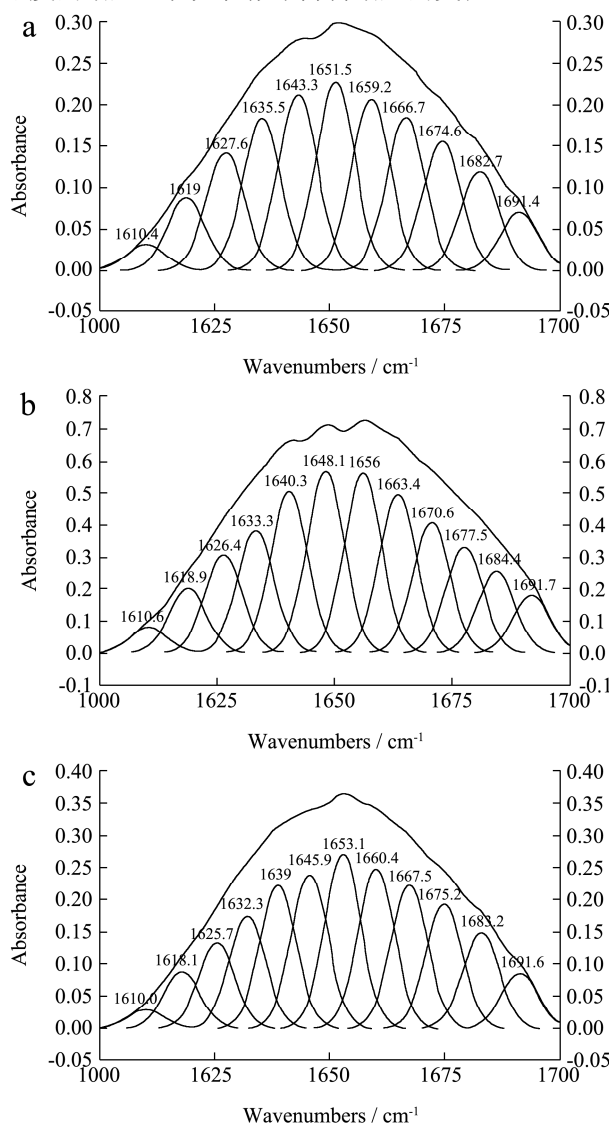


图 5 金黄色葡萄球菌酰胺 I 带 ($1600\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) 谱图

Fig.5 Curved-fitted results of amide I bands of *S. aureus* treated by EOL with different concentration

注: a: $c(\text{肉桂精油})=0 \mu\text{L/mL}$, b: $c(\text{肉桂精油})=0.25 \mu\text{L/mL}$, c: $c(\text{肉桂精油})=1 \mu\text{L/mL}$ 。

表 2 肉桂精油对金黄色葡萄球菌作用后的酰胺 I 带红外光谱曲线峰值归属与拟合结果

Table 2 The curve fitting results of IR amide I of *S. aureus*, *S. aureus*-0.25 $\mu\text{L/mL}$ EOL and *S. aureus*-1 $\mu\text{L/mL}$ EOL

光谱类型	体系	Wavenumbers/ cm^{-1}	指认	含量/%
IR	金黄色葡萄球菌	1651.5、1659.2	α -螺旋	23.55
		1610.4、1619.0、1627.6、1635.5、1643.3、1666.7、1674.6、1682.7、1691.4	其它二级结构	76.45
	金黄色葡萄球菌-0.25 $\mu\text{L/mL}$ 肉桂精油	1656.0	α -螺旋	15.70
		1610.6、1618.9、1626.4、1633.3、1640.3、1648.1、1663.4、1670.6、1677.5、1684.4、1691.7	其它二级结构	84.30
	金黄色葡萄球菌-1 $\mu\text{L/mL}$ 肉桂精油	1653.1	α -螺旋	8.77
		1610.3、1618.1、1625.7、1632.3、1639.0、1645.9、1660.4、1667.5、1675.2、1683.2、1691.6	其它二级结构	91.23

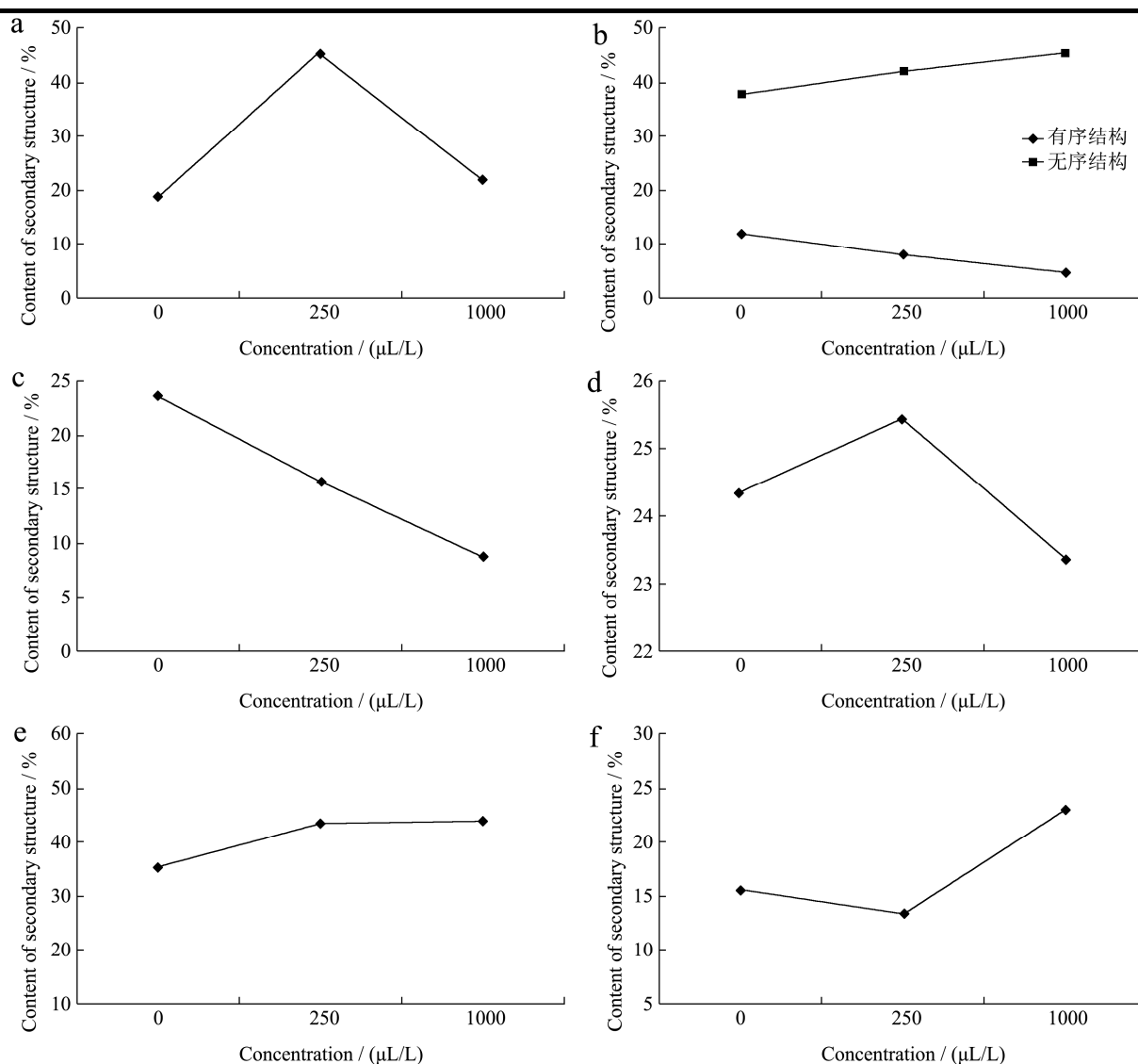


图 6 金黄色葡萄球菌经过不同浓度的肉桂精油处理后蛋白质二级结构含量的变化

Fig.6 Varying contents of secondary structure of *S. aureus* treated by EOL with different concentration

注: a、b、c、d、e、f 分别为不同浓度肉桂精油对蛋白质二级结构的总含量、有序结构与无序结构含量、 α -螺旋含量、 β -折叠含量、 β -转角含量、无规则卷曲含量的影响。 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角属于有序结构, 无规则卷曲属于无序结构。

经过肉桂精油处理后的菌体蛋白 α -螺旋含量大大降低,蛋白质分子的致密性降低,这是肉桂精油与金黄色葡萄球菌体系中的主要相互作用力是氢键和范德华力^[16],肉桂精油的加入使分子内部氢键的排列取向发生变化且破坏了菌体蛋白的氢键^[17],从而降低了菌体 α -螺旋的含量。此外, β -折叠的含量在肉桂精油达到一定浓度后也大幅降低, β -转角则有少量增加且含量稳定,无规则卷曲则有较大幅度的增加,如图6b所示增加了蛋白质二级结构中无序结构的百分比含量,反映了经肉桂精油气相熏蒸后的金黄色葡萄球菌蛋白质分子的松散性。

2.6 不同浓度肉桂精油熏蒸金黄色葡萄球菌对其膜蛋白荧光强度的影响

当抗菌剂与膜蛋白发生反应时,其构象会发生改变,原处于膜蛋白内部的氨基酸发色基团会暴露至细胞膜表面,金黄色葡萄球菌溶液中由于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在而具有内源荧光^[18]。因此通过分子在基态和激发态下转变发出辐射产生的荧光,分析荧光强度和波长峰位的变化,可以判断不同浓度肉桂精油的处理对金黄色葡萄球菌三级蛋白结构的影响。

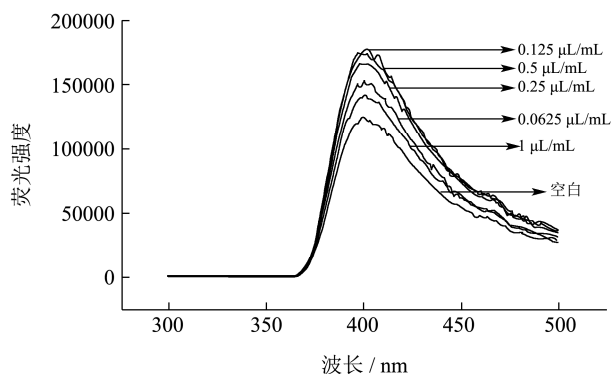


图7 不同浓度精油熏蒸下菌液的荧光强度

Fig.7 Fluorescence emission spectra of *S. aureus* treated by EOL with different concentration

由图7可知,经精油气熏后并没有改变金黄色葡萄球菌蛋白的最大发射峰峰位,但菌液荧光强度明显增加,在肉桂精油浓度0~0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的范围内,荧光强度随着精油浓度的增加而增加,具有显著性。

当浓度达到0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$,荧光强度相对浓度为0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时反而降低,这可能是因为该浓度暴露的氨基酸发色基团苯丙氨酸含量相对较多,而苯丙氨酸含有羧基作为吸电子基团使得荧光减弱。在肉桂精油浓度为0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,菌液荧光强度相对0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 增加,但低于精油浓度为0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的发光强度,这是因为此时菌体一方面正在暴露发色基团,增强荧

光吸收,另一方面,由于肉桂精油浓度过大,膜蛋白开始发生卷曲、折叠,使得部分已经外露的生色基团重新被包裹于蛋白大分子中,发生了荧光淬灭现象^[17]。当肉桂精油浓度达到1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,发色基团分子与肉桂精油相互作用、能量转换使得荧光减弱幅度更强,使所得荧光强度仅高于空白组。

3 结论

3.1 本实验通过对金黄色葡萄球菌活性的测定测得肉桂精油气相熏蒸的最低抑菌浓度为0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$,最低杀菌浓度为0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。研究发现其抗菌机理主要是通过影响细胞膜的通透性,造成菌液电解质增加以及核酸等大分子外泄,随着肉桂精油浓度在0~1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 范围内变化,菌液电导率值在439~559.5 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 范围内变化,OD值在0.285~2.754内递增变化;当以浓度为0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的肉桂精油熏蒸时,随着熏蒸时间在0~3 h内变化,菌液电导率值337.5~650.5 $\mu\text{s}/\text{cm}$ 范围内整体上呈现先增大后减小的变化,OD值在0.323~1.146内变化。从透射电镜中可以观察到菌体细胞膜破损,边界变得模糊,从而使内容物外泄的结果,与电导率实验及OD260所得结论相符。其次,肉桂精油气相熏蒸金黄色葡萄球菌的抗菌机理可能还包括对菌体蛋白质结构的影响。FT-IR实验表明,在肉桂精油气熏后,蛋白质二级结构体现出了一定程度的松散性,以及通过荧光光谱判断菌体蛋白暴露了发色基团。

3.2 精油作为天然抗菌剂的发展的产物,逐渐成为食品保鲜领域的一种潮流。本实验为研究气相抗菌机制提供了理论基础,同时阐明肉桂精油气相熏蒸对金黄色葡萄球菌的致死机理。结果表明,肉桂精油气相熏蒸对金黄色葡萄球菌具有明显的杀菌作用,能使金黄色葡萄球菌的形态发生明显的变化,影响细胞结构、改变细胞膜通透性而造成电解质外泄、核酸泄露、暴露氨基酸发色基团等。肉桂精油具有广阔的市场前景,今后应进一步研究肉桂精油在各类食品中的抗菌效果,扩大肉桂精油在食品中的应用。

参考文献

- [1] Kallel I, Hadrach B, Gargouri B, et al. Optimization of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) essential oil extraction: evaluation of antioxidant and antiproliferative effects [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019, 9: 1-11
- [2] Kaito C, Sekimizu K. Colony spreading in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(6): 2553-2557
- [3] Algharib S A, Dawood A, Xie Shu-yu. Nanoparticles for

- treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis [J]. Drug Delivery, 2020, 27(1): 292-308
- [4] 蒋书歌,侯宇豪,刘坚,等.柑橘精油纳米乳的制备及其对金黄色葡萄球菌的抑制活性研究[J/OL].食品与机械:1-8 [2021-03-18].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20200928.1743.010.html>
- JIANG Shu-ge, HOU Yu-hao, LIU Jian, et al. Preparation of citrus essential oil nanoemulsions and its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* [J/OL]. Food and Machinery: 1-8[2021-03-18].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20200928.1743.010.html>.
- [5] 李咏梅.南药源提取物食品抗菌应用研究进展[J].现代食品, 2020,20:61-65
- LI Yong-mei. Application research development of southern Chinese herbs extracts antimicrobial for foodstuffs [J]. Modern Food, 2020, 20: 61-65
- [6] Azi M, Zaidi F, Sobhi W, et al. Chemical analysis, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibitory effects of *Daucus virgatus* (Poir.) Maire essential oil from Algeria [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry Research, 2021, 8(2): 147-162
- [7] Li Ming-jun, Nan Li, Liang Chun-yong, et al. Antibacterial behavior and related mechanisms of martensitic Cu-bearing stainless steel evaluated by a mixed infection model of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in vitro [J]. Journal of Materials Science & Technology, 2021, 62: 139-147
- [8] Soliman S S M, Saeed B Q, Elseginy S A, et al. Critical discovery and synthesis of novel antibacterial and resistance-modifying agents inspired by plant phytochemical defense mechanisms [J]. Chemo-Biological Interactions, 2021, 333(5): 109318
- [9] Al-Qadiri H M, Al-Alami N I, Al-Holy M A, et al. Using Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine-induced bacterial injury in water [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(19): 8992-8997
- [10] Zhang Cheng-hui, Li Chang-zhu, Abdel-Samie M A, et al. Unraveling the inhibitory mechanism of clove essential oil against *Listeria monocytogenes* biofilm and applying it to vegetable surfaces [J]. LWT, 2020, 134: 110210
- [11] Zhao Mei-mei, Bai Jing-wen, Bu Xue-ying, et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolic compounds from *Ribes nigrum* L. and its antibacterial effect on foodborne pathogens [J]. Food Control, 2021, 119(prepublish): 107449
- [12] 洪学斌.樟树籽油甘油酯分离纯化及抑菌活性[D].南昌:南昌大学,2015
- HONG Xue-bin. Camphor seed oil glycerides purification and antibacterial activity [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015
- [13] 申素霞.植物源食品防腐剂的筛选及肉桂醛的抑菌机制研究[D].吉林:吉林大学,2015
- SHEN Su-xia. The screening of natural plant source food preservatives and the research of the antimicrobial mechanism of cinnamaldehyde [D]. Jilin: Jilin University, 2015
- [14] 侯媛媛.大黄和黄芩抑菌活性物质追踪及其抑菌机理研究[D].上海:上海海洋大学,2015
- HOU Yuan-yuan. Chemical compositions of Rhubarb and *Scutellaria baicalensis* and antibacterial mechanism [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015
- [15] 高瑞昌,盖静,孙璐,等.基于拉曼光谱特征谱带表征冷藏凡纳滨对虾肌动球蛋白的构象[J].中国食品学报,2016,16(2): 218-223
- GAO Rui-chang, GAI Jing, SUN Lu, et al. Presentation of the actomyosin structure in white shrimp during the frozen storage by Raman spectroscopy [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(2): 218-223
- [16] 周华丽.几种精油小分子与牛血清白蛋白相互作用研究[D].广州:广东工业大学,2015
- ZHOU Hua-li. Studies on the interaction of essential oil molecules with bovine serum albumin [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2015
- [17] 林雅慧.芳樟油气相抗菌机制的研究[D].广州:广东工业大学,2012
- LIN Ya-hui. Mechanisms of vapor-phase antibacterial action of essential oil from *Cinnamomum camphora* var. *linaloofera* Fujita [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2012
- [18] Shahabadi N, Maghsudi M, Kiani Z, et al. Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin [J]. Food Chemistry, 2011, 124(3): 1063-1068