

肉桂精油复配香芹酚和百里香酚对食用畜禽有害微生物熏蒸的抗菌活性

柴向华^{1*}, 邹冬铤¹, 吴克刚¹, 段雪娟¹, 何东¹, 王贵平², 吴保庆², 孙明华², 刘琳²

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006) (2. 广东海大集团股份有限公司, 广东广州 511400)

摘要: 通过测定抑菌圈直径确定肉桂精油及单离香料香芹酚和百里香酚对食用畜禽有害微生物的敏感性, 同时采用气相熏蒸法测定最低抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 和最低杀菌浓度 (Minimum Bacterial Concentration, MBC)。结果表明: 肉桂精油及香芹酚和百里香酚对食用畜禽有害微生物都具有一定的抑杀能力。肉桂精油对黑曲霉的抗菌效果优于百里香酚和香芹酚, 肉桂精油对黑曲霉的 MIC 和 MBC 为 62.5 $\mu\text{L/L}$, 而百里香酚和香芹酚的 MIC 和 MBC 均为 125 $\mu\text{L/L}$; 将肉桂精油与香芹酚进行复配, 复配精油对白色葡萄球菌和黑曲霉均表现出相加作用 (FICI \leq 1), 而对白色念珠菌则表现为无关作用。通过 GC-MS 分析, 肉桂精油的主要挥发性化学成分中相对含量较高的为肉桂醛 (78.19%)、2-甲氧基肉桂醛 (8.70%)。采用电子鼻分析溶剂稀释后对复配精油抑菌活性的影响, 抑菌能力大小为: 丙二醇稀释 \approx 无水乙醇稀释 $>$ 未稀释 $>$ 甘油稀释 $>$ 食用油稀释。实验表明: 香芹酚与肉桂精油复配可以提高肉桂精油的抗菌活性, 溶剂挥发性的差异会对复配精油的抑菌活性造成不同影响, 稀释复配精油时溶剂的较优选择为丙二醇。

关键词: 肉桂精油; 抑菌活性; 复配; 溶剂稀释

文章编号: 1673-9078(2024)02-187-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0288

Antibacterial Activity of Cinnamon Essential Oil Compounded with Carvacrol and Thymolon Fumigation against Harmful Microorganisms in Edible Livestock and Poultry

CHAI Xianghua^{1*}, ZOU Dongxin¹, WU Kegang¹, DUAN Xuejuan¹, HE Dong¹, WANG Guiping²,
WU Baoqing², SUN Minghua², LIU Lin²

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

(2. Guangdong HAID Group Co. Ltd., Guangzhou 511400, China)

Abstract: The sensitivity of harmful microorganisms of edible livestock and poultry to cinnamon essential oil and the isolated spices carvacrol and thymol was determined by measuring the diameter of the inhibition zone. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of cinnamon essential oil, carvacrol, and thymol against harmful microorganisms were determined. The results showed that cinnamon essential oil and carvacrol and thymol had certain antibacterial activity against harmful microorganisms of edible livestock and poultry. Cinnamon essential oil had a better antibacterial effect against Aspergillus niger than carvacrol and thymol. The MIC and MBC of cinnamon essential oil against Aspergillus niger were 62.5 $\mu\text{L/L}$, while the MIC and MBC of carvacrol and thymol were 125 $\mu\text{L/L}$; the combination of cinnamon essential oil and carvacrol showed synergistic effect (FICI \leq 1) against Staphylococcus aureus and Aspergillus niger, but showed no effect against Candida albicans. Through GC-MS analysis, the main volatile chemical components in cinnamon essential oil with relatively high content were cinnamaldehyde (78.19%), 2-methoxycinnamaldehyde (8.70%). The effect of solvent dilution on the antibacterial activity of the compound essential oil was analyzed by electronic nose. The antibacterial activity was: propylene glycol dilution \approx anhydrous ethanol dilution $>$ undiluted $>$ glycerol dilution $>$ edible oil dilution. The experiment showed that the combination of carvacrol and cinnamon essential oil can improve the antibacterial activity of cinnamon essential oil, and the difference in solvent volatility will have different effects on the antibacterial activity of the compound essential oil. When diluting the compound essential oil, propylene glycol is the better choice of solvent.

引文格式:

柴向华, 邹冬铤, 吴克刚, 等. 肉桂精油复配香芹酚和百里香酚对食用畜禽有害微生物熏蒸的抗菌活性[J]. 现代食品科技, 2024, 40(2): 187-195.

CHAI Xianghua, ZOU Dongxin, WU Kegang, et al. Antibacterial activity of cinnamon essential oil compounded with carvacrol and thymolon fumigation against harmful microorganisms in edible livestock and poultry [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 187-195.

收稿日期: 2023-03-10

基金项目: 广州市科技计划项目 (202103000078; 202206010181); 广东省林业科技创新重点项目 (2020KJCX010); 广东省植物资源生物炼制重点实验室开放基金资助项目 (2021GDKLPRB01)

作者简介: 柴向华 (1971-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 天然产物开发与应用, E-mail: 1299028943@qq.com

concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined through gas phase fumigation. Cinnamon essential oil, carvacrol, and thymol all demonstrated the ability to inhibit harmful microorganisms in edible livestock and poultry. The antibacterial effect of cinnamon essential oil against *Aspergillus niger* was better than that of thymol and carvacrol, and the MIC and MBC of cinnamon essential oil against *Aspergillus niger* were 62.5 $\mu\text{L/L}$, whereas both thymol and carvacrol exhibited MIC and MBC values of 125 $\mu\text{L/L}$. When compounding cinnamon essential oil with carvacrol, the compounded essential oil showed additive effects (fractional inhibitory concentration index ≤ 1) against *Staphylococcus albus* and *Aspergillus niger* but showed no effect against *Candida albicans*. Gas chromatography-mass spectrometry analysis revealed that the main volatile chemical components in cinnamon essential oil were aldehydes, with cinnamaldehyde (78.19%) and 2-methoxycinnamaldehyde (8.70%) constituting a relatively high proportion of the composition. An electronic nose was used to analyze the effect of solvent dilution on the antibacterial activity of compound essential oils, and the antibacterial ability was as follows: propylene glycol dilution \approx absolute ethanol dilution $>$ undiluted $>$ glycerin dilution $>$ edible oil dilution. Results revealed that the compounding of carvacrol and cinnamon essential oil improved the antibacterial activity of cinnamon essential oil. Moreover, the difference in solvent volatility had different effects on the antibacterial activity of the compound essential oil, and the preferred solvent for diluting the compound essential oil was propylene glycol.

Key words: cinnamon essential oil; antimicrobial activity; compound; solvent dilution

近些年来我国食用畜禽产品的消耗量日渐增加, 食用畜禽养殖行业快速发展, 养殖模式趋向于集约化和规模化。高密度的食用畜禽饲养模式带来高效益的同时, 也给食用畜禽动物产品的食品安全带来了新的严峻问题。食用畜禽养殖环境的问题极大地影响了食用畜禽的生产性能与健康状态, 同时也会影响其产品如肉、蛋、乳的质量, 能否控制好有害食用畜禽的微生物的问题已经成为保证动物类食品质量安全和食用畜禽养殖行业顺利发展的重要因素。有害食用畜禽生理健康的微生物中, 白色葡萄球菌、白色念珠菌通过引发呼吸道疾病威胁食用畜禽的健康^[1,2], 黑曲霉引起的饲料霉变导致食用了霉变饲料的畜禽患肠道疾病^[3], 因此如何控制有害食用畜禽的这三种微生物显得至关重要。

过去, 避免动物受到致病微生物危害的主要途径是在动物的饲料中添加抗生素, 2015年9月我国农业部公告第2292号禁止了4类抗生素在食用动物中的使用, 而农业农村部第194号公告宣布2020年起我国的饲料中全面禁止添加抗生素, 正式进入饲料端“禁抗”, 养殖端“减抗、限抗”的时代, 这表明寻找绿色、安全、高效的抗生素替代品迫在眉睫^[4]。植物精油是一类很好的抗生素替代品^[5], 牛至油已获农业部批准可作为一种长期添加的药物饲料添加剂, 目前国内的牛至油主要依赖进口。肉桂作为一种药食两用的植物, 其精油也具有广谱抗菌活性^[6], 同时我国拥有丰富的肉桂资源, 使用肉桂油替代牛至油具有可行性, 但肉桂油的强烈气味限

制了其的应用, 所以解决肉桂油的气味问题十分关键。牛至油的抗菌主要成分为百里香酚和香芹酚^[7], 它们都是被允许用于添加到食品中的天然香料, 在具有优秀的综合抗菌能力的同时存在气味较小的优点。有研究显示, 多种香料复配并用相比使用单一香料时其抗菌效果更好, 原因是复配并用可以拓宽香料的抗菌谱, 并且可以在协同作用时减少单体的用量^[8]。使用百里香酚和香芹酚复配有利于减小肉桂油强烈的气味, 同时提高肉桂油的抑菌能力, 扩大其抑菌范围。本文旨在通过将百里香酚或香芹酚与肉桂油复配以达到降低肉桂油使用量, 改善肉桂油气味的目的, 并利用熏蒸的方式杀死空气中引起畜禽呼吸道疾病的有害微生物, 为肉桂精油在动物类食品生产应用和食用畜禽养殖方面提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*) GIM 1.247、白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC10231、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC 16404, 广东省微生物菌种保藏中心; 肉桂精油, 百里香酚、香芹酚, 广州市香思馨情健康科技有限公司; 营养琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 无水乙醇、丙三醇, 天津市大茂化学试剂厂; 1,2-丙二醇, 天津市致远化学试剂有限公司;

食用油, 上海嘉里食品工业有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2F 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; SPX-250 生化培养箱, 上海锐丰仪器仪表有限公司; YX-280D (242) 型手提式压力蒸汽灭菌器, 合肥华泰医疗设备有限公司; SHA-BA 恒温振荡器, 常州澳华仪器有限公司; PEN3 型电子鼻, 德国 AirSense 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化及菌悬液的制备

细菌及酵母菌悬液的制备: 平板划线活化, 37 °C 下培养 24 h。挑取单个菌落通过麦氏比浊法制成 0.5 麦氏单位 (1.5×10^8 CFU/mL) 的菌悬液, 再用无菌水稀释为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL。

霉菌孢子菌悬液的制备: 将霉菌接种在平板上活化, 28 °C 培养 4 d, 待平板中长满孢子, 向培养皿中加入适量无菌水进行洗脱, 将含有孢子的无菌水转移到锥形瓶中, 置于振荡器 30 min。采用血球板计数法统计孢子数并计算菌悬液浓度, 然后用 10 倍稀释法稀释原始菌悬液至浓度为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL。

1.3.2 抑菌圈直径的测定

采用琼脂孔注入法。用直径 5 mm 的无菌打孔器在灭菌后冷却凝固的琼脂培养基中心打孔, 剔除孔内琼脂, 向琼脂孔中添加 10 μ L 植物精油, 盖好培养皿用封口膜封口一圈。同时设置空白对照组 (添加无菌水), 每组实验设置 3 个平行, 将密封好的培养皿标记后置于恒温培养箱, 细菌 37 °C 下培养 24 h, 真菌 28 °C 下培养 4 d, 采用十字交叉法测量抑菌圈直径, 重复三次取平均直径。

1.3.3 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定

采用气相熏蒸法测定最低抑菌浓度^[9]。取 20 mL 高压蒸汽灭菌后的琼脂培养基加入培养皿, 冷却凝固后加入 100 μ L 菌悬液并涂布均匀, 待菌液被琼脂吸收后倒放静置。吸取不同体积用丙二醇稀释的精油加入培养皿盖, 同时设置对照组添加等量的丙二醇, 封口膜封口一圈。不同体积的精油使得培养皿内精油的空间浓度分别为 1 000、500、250、125、62.5、31.5 μ L/L, 另设空白组 (涂布无菌水), 每组重复 3 次于恒温培养箱中倒置培养。细菌在 37 °C 条件下培养 24 h, 真菌 28 °C 培养 4 d。培养完成后观察生长情况, 不长菌平板的精油空间浓度为该精

油的最低抑菌浓度。

采用菌块转移法测定最低杀菌浓度。取测定最低抑菌浓度实验中无菌生长的平板, 用无菌打孔器在不长菌的平板上取直径为 5 mm 的琼脂块转移到新鲜的无菌平板中央 (涂布无菌水的平板同理, 作空白对照), 每组做三个平行, 用封口膜密封。细菌在 37 °C 条件下培养 24 h, 真菌 28 °C 培养 4 d。培养完成后观察实验结果, 仍然没有菌生长的平板所对应的精油空间浓度为该精油对应的最低杀菌浓度。

1.3.4 复配肉桂精油抑菌效果的测定

将肉桂精油与香芹酚、百里香酚、百里香酚和香芹酚的混合物 (1:1) 进行复配, 肉桂精油在复配精油中的体积分数分别为 0%、20%、40%、50%、60%、80% 和 100%。采用与 1.3.3 相同的实验方法测定肉桂精油 - 百里香酚、肉桂精油 - 香芹酚、肉桂精油 - 百里香酚 / 香芹酚三种复合精油对供试菌种的最低抑菌浓度, 以分级抑菌浓度指数 (Fractional Inhibitory Concentration Index, FICI) 作为联合抗菌试验效果判定依据, 判定标准见表 1^[10]。

FICI 计算公式如下:

$$D = F_A + F_B + F_C = \frac{E_{\text{联合}A}}{H_{\text{单用}A}} + \frac{E_{\text{联合}B}}{H_{\text{单用}B}} + \frac{E_{\text{联合}C}}{H_{\text{单用}C}} \dots \dots (1)$$

式中:

D ——分级抑菌浓度指数 (FICI);

F_N —— N 的分级抑菌浓度指数;

$E_{\text{联合}N}$ —— N 联合时的最低抑菌浓度, μ L/L;

$H_{\text{单用}N}$ —— N 单用时的最低抑菌浓度, μ L/L。

表 1 FICI 指数的判定标准

Table 1 Determination criteria of fractional inhibitory concentration index

FICI 指数	作用
$FICI \leq 0.5$	协同作用 (S)
$0.5 < FICI \leq 1$	相加作用 (A)
$1 < FICI < 4$	无关作用 (I)
$FICI \geq 4$	拮抗作用 (AN)

1.3.5 溶剂稀释后复配肉桂精油挥发性的测定

使用无水乙醇、丙二醇、甘油、食用油稀释复配肉桂精油, 通过德国 AirSense 公司 PEN3 型电子鼻测定挥发性, 研究溶剂稀释对复配肉桂精油挥发性的影响。实验温度 25 °C; 复配肉桂精油浓度为 1.3.4 实验所得最低抑菌浓度; 复配肉桂精油在顶空瓶中静置 40 min; 电子鼻洗气 80 s; 数据采集 100 s; 气体流量 600 mL/min。

1.3.6 溶剂稀释复配肉桂精油抑菌效果的比较

使用无水乙醇、丙二醇、甘油、食用油稀释复配肉桂精油，以 1.3.4 测定的最低抑菌浓度为基准，采用气相熏蒸法测定溶剂稀释复配肉桂精油对供试菌种的最小抑菌浓度，以无菌水、无水乙醇、丙二醇、甘油、食用油作为空白组，不使用溶剂稀释的复配肉桂精油作为对照组，分析比较溶剂稀释复配肉桂精油的抑菌效果。

1.3.7 GC-MS分析肉桂精油组成成分

气相色谱条件：气相色谱仪 Agilent 7890B；色谱柱 HP-5MS UI (60 m×0.25 mm×0.25 μm)；升温程序为初始温度 50 °C 维持 3 min，先以 2 °C/min 的速率升温至 180 °C，其后再以 20 °C/min 的速率升温至 300 °C 并维持 10 min；进样体积为 0.2 μL；进样口温度 250 °C；进样方式为精油直接进样；分流比 120:1；载气模式为恒流 1 mL/min；传输线温度 300 °C。

质谱参数：Agilent 5977B GC/MS；离子化方式为 EI，atune；离子源温度 230 °C；四级杆温度 150 °C；扫描范围为 29~550 u。

1.3.8 数据分析

抑菌圈、抑菌浓度实验和电子鼻实验数据使用 Excel 进行处理，图形绘制使用 Origin 2018。GC-MS 实验结果采用 Agilent 5977B 进行分析，通过 Nist14 质谱库及自建香料谱库进行检索，使用峰面积归一化法计算肉桂精油各组相对含量，并结合保留时间辅助定性。

2 结果与讨论

2.1 肉桂精油组成成分及其熏蒸抗菌活性分析

2.1.1 肉桂精油组成成分分析

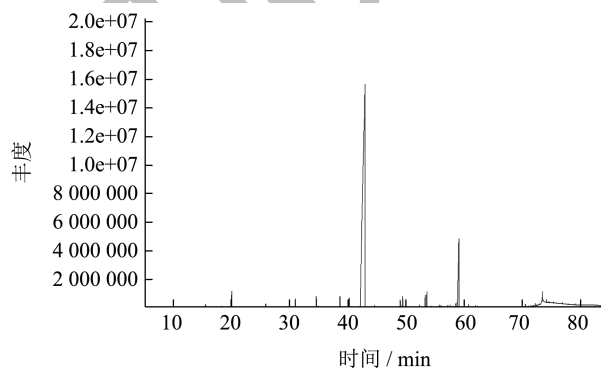


图 1 肉桂精油挥发性成分总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of volatile components of cinnamon essential oil

使用气相色谱-质谱联用仪对肉桂精油的挥发性化学成分进行分析，得到肉桂精油挥发性成分总离子流图，如图 1。通过在美国国家标准技术研究院 Nist14 质谱库和百花香料公司自建香料谱库检索，结合质谱手册并参考相关文献进行核对，共鉴定出 29 种化合物，其相对百分含量占色谱总流出峰的 95.686%，分析结果见表 2。

表 2 肉桂精油挥发性化学成分分析

峰号	保留时间/min	化合物	分子式	分子量	相对含量/%
1	15.591 0	苯乙烯	C ₈ H ₈	104	0.146
2	18.335 8	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.085
3	20.084 2	苯甲醛	C ₇ H ₆ O	106	0.822
4	21.266 2	β-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.035
5	25.933 4	水杨醛	C ₇ H ₆ O ₂	122	0.212
6	31.025 1	β-苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	122	0.541
7	34.613 7	苯丙醛	C ₉ H ₁₀ O	134	0.632
8	34.962 1	左旋龙脑	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.137
9	40.292 5	邻甲氧基苯甲醛	C ₈ H ₈ O ₂	136	0.639
10	41.237 5	乙酸苯乙酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.095
11	43.003 2	肉桂醛	C ₉ H ₈ O	132	78.191
12	44.645 6	肉桂醇	C ₉ H ₁₀ O	134	0.147
13	49.040 3	邻甲氧基苯丙酮	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	0.451
14	49.464 3	(-)-α-蒎烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.663
15	52.340 3	β-石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.188
16	53.342 5	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	146	0.809
17	53.632 0	肉桂醇乙酸酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	176	0.951
18	55.814 7	γ-摩尔烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.189
19	56.062 2	α-姜黄烯	C ₁₅ H ₂₂	202	0.152
20	57.244 6	α-摩尔烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.149
21	57.631 1	β-红没药烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.155
22	58.132 4	γ-杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.101
23	58.636 1	δ-杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.326
24	59.144 1	2-甲氧基肉桂醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	162	8.703
25	60.817 0	橙花叔醇	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.176
26	61.991 2	桉油烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.178
27	70.570 7	苯甲酸苄酯	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	212	0.095
28	72.258 5	苯甲酸-2-苯乙酯	C ₁₅ H ₁₄ O ₂	226	0.090
29	73.497 4	14-甲基十五烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	0.628
合计					95.686

由表 2 可以看出，在肉桂精油鉴定出的 29 种挥发性化学成分中，肉桂醛的含量最高，相对含量为 78.191%，其次是 2-甲氧基肉桂醛，相对含量为 8.703%。从肉桂精油中共鉴定出 6 种醛类化合物，相对含量为 89.199%；鉴定出 11 种烯烃类化合物，

相对含量为 2.189%；鉴定出 2 种酮类化合物，相对含量为 1.26%；鉴定出 5 种酯类化合物，相对含量为 1.231%；鉴定出 5 种酚醇类化合物，相对含量为 1.179%；其他化合物 1 种，相对含量为 0.628%。

肉桂精油中的挥发性化学成分中大部分为醛酮类、烯炔类化合物，小部分为酯类、酚醇类化合物，这些化合物主要为小分子化合物，碳原子个数都不超过 15。醛类化合物中以肉桂醛为主，肉桂醛具有优秀的抗菌、抗氧化作用^[11]。Vasconcelos 等^[12]的研究结果显示，肉桂精油抗菌的主要活性成分是反式肉桂醛，反式肉桂醛的活性部位是它的 α,β - 不饱和羰基。 α,β - 不饱和羰基是一个亲水基团，易被细菌或者真菌表面的亲水基所吸附从而进入到菌体细胞内，通过破坏细菌或真菌的细胞壁多糖结构导致细菌或真菌死亡，达到抗菌杀菌的效果。

2.1.2 微生物对肉桂精油及百里香酚和香芹酚的敏感性分析

采用抑菌圈分析敏感性。肉桂精油及百里香酚和香芹酚对供试菌种的抑菌圈实验测定结果见表 3。

表 3 肉桂精油及百里香酚和香芹酚对供试菌种的抑菌圈直径
Table 3 Diameter of the inhibition zone of cinnamon essential oil, thymol and carvacrol on the tested strains

名称	含量 ($\mu\text{L}/\text{孔}$)	抑菌圈/mm		
		白色葡萄球菌	白色念珠菌	黑曲霉
肉桂精油	10	13.0 \pm 1.0	33.5 \pm 0.5	35.0 \pm 1.5
百里香酚	10	37.0 \pm 0.5	53.0 \pm 1.0	33.0 \pm 1.0
香芹酚	10	30.5 \pm 1.4	50.0 \pm 1.0	30.0 \pm 1.5
无菌水	10	5.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1

供试菌种对抗菌物质敏感性的判定标准如下：抑菌圈直径 $>20\text{ mm}$ 为最敏感； $10\sim 20\text{ mm}$ 为中度敏感， $5\sim 10\text{ mm}$ 为低度敏感；无抑制作用 ($\leq 5\text{ mm}$) 为不敏感^[13]。

根据以上判定标准，从表 3 的结果可见，百里香酚和香芹酚两种香料对白色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉都表现为最敏感，抑菌圈的直径均 $>30\text{ mm}$ ，尤其对白色念珠菌的抑制更明显，抑菌圈直径可以达到 50 mm 以上；肉桂精油对白色念珠菌和黑曲霉的抑菌圈直径都 $>30\text{ mm}$ ，均表现为最敏感，对于白色葡萄球菌的抑菌圈直径处在 $10\sim 20\text{ mm}$ 范围内，仅表现为中度敏感。虽然肉桂精油与百里香酚和香芹酚相比，对白色葡萄球菌和白色念珠菌的抑制能力稍弱一些，但对于黑曲霉，肉桂精油的抑菌圈直径超过了百里香酚和香芹酚，这说明肉桂精油对黑

曲霉的抑制能力优于百里香酚和香芹酚。

2.1.3 肉桂精油及百里香酚和香芹酚的熏蒸抗菌活性分析

为了了解肉桂精油及百里香酚和香芹酚对于畜禽养殖环境有害微生物的抗菌效果，采用气相熏蒸法测定肉桂精油、百里香酚和香芹酚对于白色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度以研究其体外抑菌效果，抑菌实验测定结果如表 4 所示。

表 4 肉桂精油及百里香酚和香芹酚对供试菌种的 MIC 和 MBC
Table 4 Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of cinnamon essential oil, thymol and carvacrol on the tested strains ($\mu\text{L}/\text{L}$)

精油	白色葡萄球菌		白色念珠菌		黑曲霉	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
肉桂精油	500	625	250	250	62.5	62.5
香芹酚	250	250	125	125	125	125
百里香酚	125	250	62.5	125	125	125

表 4 中 MIC 和 MBC 的数值越小，说明其对于供试菌种的抗菌活性越强。由表 3 可以看出，肉桂精油、百里香酚和香芹酚对三种供试菌的生长都能产生不同程度的抑制效果。其中，百里香酚的综合抗菌能力最强，对于三种供试菌，百里香酚的 MIC 都 $\leq 125\ \mu\text{L}/\text{L}$ ，MBC 都在 $250\ \mu\text{L}/\text{L}$ 以下，表现出优秀的广谱抗菌性；香芹酚对白色念珠菌和黑曲霉生长的抑制效果没有什么差异，对两种菌的 MIC 和 MBC 均为 $125\ \mu\text{L}/\text{L}$ ，对白色葡萄球菌的抑菌能力则稍弱一点；肉桂精油对于白色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌效果与百里香酚和香芹酚相比存在一定的差距，不过对黑曲霉则表现出很强的抑菌能力，MIC 和 MBC 都低于百里香酚和香芹酚，这也验证了敏感性分析实验的结果。汪美君^[14]的研究结果也表明，相比细菌，肉桂精油对真菌抑制能力更强，这是由于肉桂精油对不同菌种作用机制的差异引起的。

肉桂精油的主要抗菌成分是肉桂醛，当作用于细菌时，肉桂醛破坏了细菌的细胞形态，影响了菌体的细胞膜通透性，使得细胞膜变形或产生褶皱而破裂，由于细胞膜的完整性遭到了破坏，导致细菌胞体内的营养物质泄漏，因此细菌的生长受到了影响，同时，菌体细胞膜的电位值因胞内电解质的流失而降低，新陈代谢产生紊乱，最终导致细菌死亡^[15]。而对于真菌和霉菌，肉桂醛是通过破坏其细胞壁进入到菌体细胞内，改变菌体胞内大分子的空

间结构, 减弱菌体利用碳源的能力从而影响其新陈代谢, 最终使得菌体死亡^[16]。

2.2 百里香酚和香芹酚对肉桂精油熏蒸抗菌作用的影响

按肉桂精油在复配精油中的体积分数为 0、

20%、40%、50%、60%、80%、100% 将肉桂精油与百里香酚、香芹酚、百里香酚和香芹酚的混合物分别复配, 测定 MIC 并计算 FICI, 分析百里香酚和香芹酚对肉桂精油熏蒸抗菌的协同效应, 结果如表 5 所示。

表 5 复配肉桂精油对供试菌种的 FICI

供试菌种	相关指数	肉桂精油 - 百里香酚		肉桂精油 - 香芹酚		肉桂精油 - 百里香酚 / 香芹酚	
		肉桂精油	百里香酚	肉桂精油	香芹酚	肉桂精油	百里香酚 / 香芹酚
白色葡萄球菌	MIC _{单独}	500	125	500	250	500	125
	MIC _{联合}	400	100	320	80	400	100
	FIC	0.8	0.8	0.64	0.32	0.8	0.8
	FICI	1.6 (I)		0.96 (A)		1.6 (I)	
白色念珠菌	MIC _{单独}	250	62.5	250	125	250	62.5
	MIC _{联合}	100	150	100	150	100	150
	FIC	0.4	2.4	0.4	1.2	0.4	2.4
	FICI	2.8 (I)		1.6 (I)		2.8 (I)	
黑曲霉	MIC _{单独}	62.5	125	62.5	125	62.5	125
	MIC _{联合}	30	20	40	10	25	37.5
	FIC	0.48	0.16	0.64	0.08	0.4	0.3
	FICI	0.64 (A)		0.72 (A)		0.7 (A)	

总体上看, 三种复配精油对黑曲霉抗菌效果的提升明显优于白色葡萄球菌和白色念珠菌, 尤其以肉桂精油 - 百里香酚组合最为显著, 不同组合中肉桂精油所占比例也有差异。从表 5 中可以看出, 三种复配精油组合肉桂精油 - 百里香酚、肉桂精油 - 香芹酚、肉桂精油 - 百里香酚 / 香芹酚对黑曲霉都表现出相加作用, FICI 分别为 0.64、0.72 和 0.7, 对于白色念珠菌则全都表现为无关作用, 其中复配组合肉桂精油 - 香芹酚的 FICI 数值是最小的。虽然肉桂精油 - 百里香酚、肉桂精油 - 百里香酚 / 香芹酚对于黑曲霉的 FICI 数值略小于肉桂精油 - 香芹酚, 但是复配组合肉桂精油 - 香芹酚相比另外两种组合, 对白色葡萄球菌也表现出了相加作用, FICI 为 0.96, 这是因为香芹酚对白色葡萄球菌的抑菌机制与肉桂精油不同, 两者对白色葡萄球菌的抑制效果相互叠加造成的^[17]。

尽管香芹酚与肉桂精油没有协同增效作用, 但是可以通过香芹酚的替代来减少肉桂精油的使用量, 这不仅可以有效减小肉桂精油的气味^[18], 并且可以增强肉桂精油对白色葡萄球菌的抑制能力。综合来看, 使用香芹酚与肉桂精油进行复配为较优选择。

2.3 溶剂稀释对复配肉桂精油挥发性及熏蒸抗菌活性影响

2.3.1 电子鼻分析

五种复配肉桂精油的电子鼻指纹图谱如图 2 所示, PEN3 型电子鼻各不同传感器所对应代表的化合物种类见表 6^[19]。

表 6 不同传感器序号所代表的化合物种类

Table 6 Compounds represented by different sensor sequences

传感器序号	传感器名称	代表化合物种类
S1	W1C	苯类芳香成分
S2	W5S	对氮氧化物灵敏
S3	W3C	氨类, 对芳香成分灵敏
S4	W6S	主要对氢化物有选择性
S5	W5C	短链烷烃, 芳香族
S6	W1S	对甲基类、广泛的化合物灵敏
S7	W1W	对无机硫化物、吡嗪、萜烯灵敏
S8	W2S	对醇类、醛酮、芳香族化合物灵敏
S9	W2W	对芳香成分、有机硫化物灵敏
S10	W3S	对长链烷烃、脂肪族灵敏

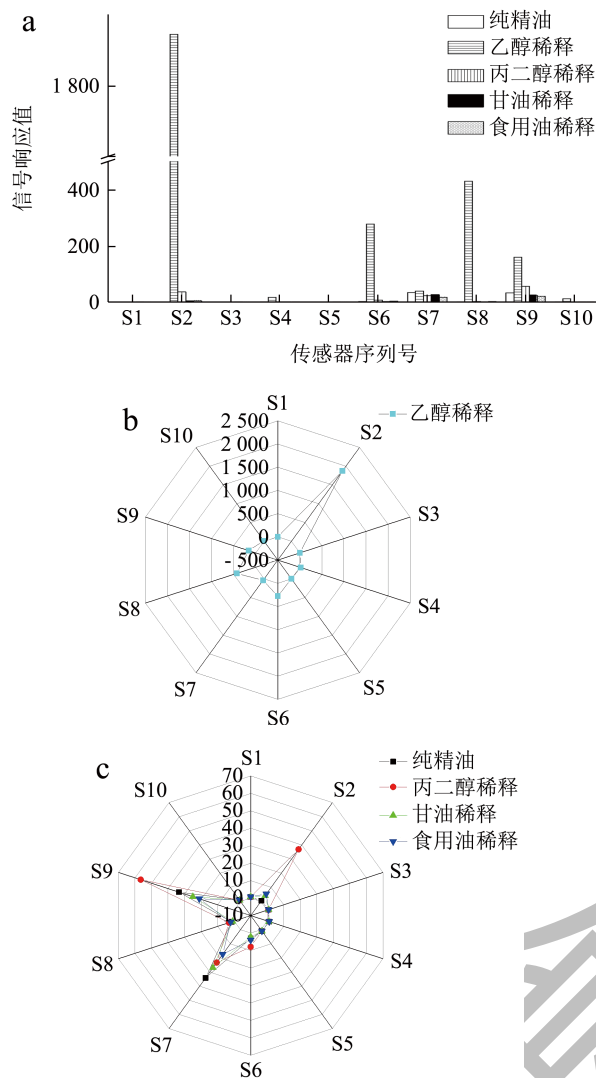


图2 五种复配肉桂精油电子鼻传感器响应值指纹图谱

Fig.2 Response value fingerprint of electronic nosesensor of five compounded cinnamon essential oil

结合表6对图2进行分析，五种复配肉桂精油对S1、S3、S4、S5、S10传感器的响应值均比较低。S1传感器主要响应苯类芳香成分，S3传感器主要对氨基类敏感，S4传感器主要对氢化物有选择性，S5传感器主要对短链烷烃、芳香类成分敏感，而S10传感器主要响应长链烷烃，对脂肪族类敏感。由图2b和图2c分析得出，五种复配肉桂精油中苯类、氨基类、短链烷烃和长链脂肪族类芳香成分的含量非常少，这与2.1.1中肉桂精油的总挥发性化学成分分析的结果相符。从图2a看到，使用无水乙醇稀释的复配肉桂精油对S2、S6、S8传感器产生了相当高的响应值，响应值均>200，这是因为无水乙醇具有极强的挥发性，其大量挥发后本身具有的羟基和甲基被对氮氧化物、甲基类化合物和醇类化合物灵敏的传感器所响应。从S9传感器的响应值可以看出，

使用无水乙醇或丙二醇稀释可以使复配肉桂精油的芳香成分更好地挥发出来，而使用甘油或食用油稀释复配肉桂精油，由于复配肉桂精油在甘油中的溶解度低，在食用油中的挥发性差，导致这两种复配肉桂精油对S9传感器的灵敏度低于未使用溶剂稀释的纯精油，使得电子鼻难以进行区分。此外，未使用溶剂稀释的纯复配精油除了使用无水乙醇稀释的复配肉桂精油外，其S7传感器的响应值均大于其他三种溶剂稀释的复配肉桂精油。S7传感器对萜烯类化合物敏感^[20]，萜烯类化合物易溶于无水乙醇并挥发，但在丙二醇、甘油、食用油中溶解挥发量少。总体上看，使用无水乙醇或丙二醇稀释可以有效地促进复配肉桂精油中芳香成分的挥发，但无水乙醇本身的基团也会对电子鼻的分析结果产生影响，通过电子鼻可以对复配肉桂精油进行分析，其对挥发性化学成分的分析结果具有一定的准确性。

2.3.2 溶剂稀释后复配肉桂精油的熏蒸抗菌活性分析

根据敏感性分析和最低抑菌浓度的实验结果，选择香芹酚复配肉桂精油，通过测定使用不同溶剂稀释的复配精油对白色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉的最低抑菌浓度，研究不同的溶剂稀释对于复配肉桂精油抗菌活性的影响。

表7 不同溶剂稀释的复配肉桂精油对供试菌的最低抑菌浓度比较

Table 7 Comparison of the minimum inhibitory concentration of compound cinnamon essential oil diluted with different solvents on the tested strains (μL/L)

肉桂油复配香芹酚溶剂类型	白色葡萄球菌	白色念珠菌	黑曲霉
无溶剂	>375	>250	>50
无水乙醇稀释	≤375	≤250	≤50
丙二醇稀释	375	250	50
甘油稀释	>375	>250	>50
食用油稀释	>375	>250	>50
无菌水空白	—	—	—
无水乙醇空白	—	—	—
丙二醇空白	—	—	—
甘油空白	—	—	—
食用油空白	—	—	—

注：“—”代表没有抑菌效果。

使用不同溶剂稀释后，复配肉桂精油的抑菌实验结果如表7所示。从表7中可以看出，使用无水乙醇作为溶剂稀释可以增强复配精油的抗菌活性，

不使用溶剂稀释,使用甘油或者食用油稀释无法达到使用1,2-丙二醇作为溶剂稀释的复配精油的抗菌效果。崔绮嫦等^[21]的实验结果显示,在相同浓度的情况下,复配精油对供试菌种抑制效果的差异是由于复配精油在不同溶剂中的溶解度与挥发性的不同引起的。复配肉桂精油可以很好地在无水乙醇、1,2-丙二醇和食用油中溶解,但在甘油中表现为部分溶解。在挥发性方面,不使用溶剂稀释的纯复配精油和使用食用油稀释的复配精油挥发性十分有限,因此精油的有效抗菌成分无法顺利作用于菌体,导致实际抑菌效果远不如使用无水乙醇或者1,2-丙二醇稀释的复配精油。此外,使用甘油作为溶剂稀释与使用食用油相比,实验结果十分相近,虽然复配精油在食用油中的溶解度高于甘油,但在甘油中的复配精油挥发性大于在食用油中的,两方面的因素综合起来最终使得这两种复配精油产生的抑菌效果没有太大区别。

3 结论

肉桂精油、香芹酚和百里酚对三种有害食用畜禽健康的微生物白色葡萄球菌、白色念珠菌和黑曲霉都具有一定程度的抑杀作用,百里香酚和香芹酚对白色葡萄球菌和白色念珠菌的抑制能力优于肉桂精油,肉桂精油对黑曲霉的抑制能力则优于百里香酚和香芹酚。使用香芹酚与肉桂精油进行复配可以明显加强肉桂精油的抑菌效果,肉桂精油-香芹酚复配组合对白色葡萄球菌和黑曲霉都表现出了相加作用($FICI \leq 1$),对白色葡萄球菌的 $FICI$ 为0.96,对黑曲霉的 $FICI$ 为0.72,与白色葡萄球菌相比,肉桂精油-香芹酚复配组合对黑曲霉抑菌能力的提升更高。GC-MS分析结果显示,肉桂精油具有抗菌作用的主要挥发性化学成分为肉桂醛,占总挥发性化学成分相对含量的78.19%。采用电子鼻分析溶剂稀释对复配肉桂精油挥发性及熏蒸抗菌活性的影响,无水乙醇或丙二醇稀释可以有效地促进复配肉桂精油中芳香成分的挥发,相同空间浓度下,这两种复配肉桂精油的抑菌效果优于未使用溶剂稀释的纯复配肉桂精油和使用甘油或食用油稀释的复配精油,但无水乙醇本身的基团会造成电子鼻S2、S6、S8传感器响应值过高,会对电子鼻的分析结果产生影响。综合来看,选用香芹酚与肉桂精油进行复配,使用丙二醇作为溶剂对于肉桂精油抑菌能力的提升是最佳和影响最小的,以丙二醇为溶剂稀释的肉桂-

香芹酚复配组合精油是对食用畜禽有害微生物发挥稳定高效抗菌作用的最优选择。

参考文献

- [1] CAROLUS H, DYCKK V, DIJCKP V. *Candida albicans* and *Staphylococcus* species: a threatening twosome [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2162-2162.
- [2] SOKOL I, BOBREK K, TOKARZEWSKI S, et al. Candidiasis in poultry [J]. *Medycyna Weterynaryjna*, 2015, 71(12): 731-735.
- [3] YANG C, SONG G, LIM W, et al. Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 289(5): 122087-122087
- [4] 胡燕,白继庚,胡先明,等.我国抗生素滥用现状、原因及对策探讨[J].*中国社会医学杂志*,2013,30(2):128-130.
- [5] MUTLU-INGOK A, DEVECIOGLU D, DIKMETAS DN, et al. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review [J]. *Molecules*, 2020, 25(20): 4711-4711.
- [6] 王秋亚,马艳阳.肉桂精油的成分分析、抑菌和抗氧化活性及在食品保鲜中的应用进展[J].*中国调味品*,2020, 45(3):183-187.
- [7] FLIOUJ, RIFFI O, AMECHROUQ A, et al. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Origanum compactum* from the seven regions of Morocco and their antimicrobial activity [J]. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2020, 10(1): 42-48.
- [8] 吴克刚,罗敏婷,魏浩.8种植物精油对肠道常见微生物体外抑菌效果的研究[J].*现代食品科技*,2017,33(6):133-141,93.
- [9] LOPEZ P, SANCHEZ C, BATTLE R, et al. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(11): 4348-4356.
- [10] LEE S, KIM H, BEUCHAT LR, et al. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymole essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice [J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103489.
- [11] KALLEL I, HADRICH 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, 2019: 6498347.
- [12] VASCONCELOS N G, CRODA J, SIMIONATTO S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: areview [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 120: 198-203.

- [13] 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(7): 681-687.
- [14] 汪美君.植物精油控制养鸡环境有害微生物和有害气体的研究[D].广州:广东工业大学,2020.
- [15] KANG J, JIN W, WANG J, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 10: 639-645.
- [16] 吴红影,王光宇,徐圆程,等.气态植物精油对黑曲霉生长及代谢活性的影响[J].中国粮油学报,2021,36(11): 137-143.
- [17] YE H, SHEN S, XU J, et al. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvyl alcohol against food-borne bacteria [J]. Food Control, 2013, 34(2): 619-623.
- [18] 吴克刚,马海杰,魏浩,等.肉桂醛及其复配单离香料对食品有害微生物的抑制作用研究[J].现代食品科技,2017, 33(7):72-78,179.
- [19] DA D, NIAN Y, SHI J, et al. Characterization of specific volatile components in braised pork with different tastes by SPME-GC/MS and electronic nose [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(5): 15492.
- [20] 段梦雅,王福清,吴桂苹,等.4种胡椒精油风味特征分析[J].食品科学,2022,43(8):213-219.
- [21] 崔绮嫦,吴克刚,莫镕弛,等.溶剂和微乳化的稀释效应对食用植物精油抗菌活性的影响[J].中国食品学报,2020, 20(3):195-203.

现代食品科技