

香辛料精油成分对生鲜食品中有害菌杀灭活性研究



DUAN Xue-juan

段雪娟, 吴克刚*, 柴向华

(广东工业大学轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采用平板稀释法和菌块转移法研究了百里香酚、丁香酚、肉桂醛、茴香脑、水杨醛、柠檬醛、香兰素 7 种食用植物精油组分对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单增李斯特菌、副溶血性弧菌等生鲜食品常见 5 种有害菌的杀灭活性。实验结果表明,水杨醛对 5 种有害菌的综合杀灭能力最强,然后依次是百里香酚、肉桂醛、茴香脑、丁香酚、柠檬醛、香兰素。通过正交试验将水杨醛、肉桂醛、百里香酚、茴香脑复配,得到最佳组合是:水杨醛、肉桂醛、百里香酚、茴香脑的质量比为 2:5:20:5,其杀灭所有供试菌的最低质量浓度为 0.25 mg/L,仅为杀菌效果最好的单一水杨醛浓度的 1/2。通过对香辛料精油成分杀菌作用协同效应分析得出,复配的香辛精油对单增李斯特菌的杀灭表现出很强的协同增效作用效果,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和副溶血性弧菌的杀灭表现出相加作用,而对沙门氏菌则表现出无关作用。

关键词: 香辛料精油;杀菌活性;触杀

中图分类号:TQ35;TS202.3;TS201.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2012)03-0087-05

Bactericidal Activities of Spicy Essential Oils on Microorganisms in Crude Food

DUAN Xue-juan, WU Ke-gang, CHAI Xiang-hua

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

Abstract: Bactericidal activities of seven spicy essential oil components on five microorganisms (*Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aurous*, *Saimonella*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio Parahemolyticus*) were studied by plate dilution method and transferring substrate cob method. Results showed that salicylaldehyde had the best bactericidal activity, followed successively by thymol, cinnamic aldehyde, anethole, eugenol, citral, vanillin. The optimal composite essential oil (salicylaldehyde: cinnamic aldehyde: thymol: anethole 2:5:20:5.) was obtained through orthogonal test. The minimum bactericidal mass concentration of the composite essential oil for killing five pathogens was 0.25 mg/L, only 1/2 of that of salicylaldehyde. Synergistic sterilization effects of composite essential oil was analyzed. The composite essential oil showed a strong synergistic effect on *Listeria monocytogenes*, an additive effect on *Staphylococcus Aurous*, *Escherichia Coli* and *Vibrio Parahemolyticus*, and unrelated effect on *Salmonella*.

Key words: spicy essential oil; bactericidal activities; contact toxicity

微生物广泛分布于自然界,食品中不可避免的会受到一定类型和数量的微生物的污染,当环境条件适宜时,它们就会迅速生长繁殖,造成食品的腐败与变质。特别是对于生鲜食品而言,如果保藏和处理不当,很容易受到腐败菌的污染。很多的研究表明^[1-5],香辛料精油对于食品中的致病菌具有很好的抗菌作用,可作为一种新型的食品保鲜防腐剂。香辛料精油是从香料植物中提取的芳香油,由于其安全、天然、无毒等优点符合人们对绿色消费的追求,已经成为各国研究者的新宠^[6-8]。作者主要研究几种香辛料精油成分对于生食海鲜中常见的 5 种有害菌的杀灭活性,解决生鲜食品的致病菌问题,保证人们饮食健康卫生。

收稿日期:2011-08-05

基金项目:粤港关键领域重点突破项目(2009A020700005);广东工业大学校青年基金(405115040);广东省“211工程”项目(412110904)

作者简介:段雪娟(1984-),女,山西临汾人,实验员,硕士,主要从事食用天然产物的开发与利用

*通讯作者:吴克刚,硕士生导师,研究领域为食品绿色加工新技术、农产品的精深加工与安全保藏技术及食品添加剂与食品质量安全控制技术。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料与试剂 百里香酚、丁香酚、肉桂醛、茴香脑、水杨醛、柠檬醛、香兰素均为食用香辛料精油成分,纯度均为95%以上,其它试剂均为分析纯。

1.1.2 供试菌种 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌由广东工业大学生物工程实验室提供,乙型副伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌54007和副溶血性弧菌1.2164购于广州市微生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 将各细菌菌种在37℃进行活化接种,活化的细菌再经过画线培养在平板上,在37℃培养箱培养24h后,用无菌水将菌洗脱下来,充分振荡后制成菌悬液。采用平板培养计数法测定细菌数量,再调至浓度为含菌体 $10^6\sim 10^7$ CFU/mL的菌悬液,备用。

1.2.2 最低杀菌浓度(MBC)的测定 采用平板稀释法和菌块转移平板法。把香辛料精油组分用丙二醇溶解稀释后配制成不同浓度,然后分别吸取不同浓度溶液0.4 mL加入培养皿中,每皿再加入已灭菌冷却至46℃左右的培养基约19.6 mL,摇匀后,静置凝固制成含待测浓度供试样品的平板,在其上按皿底记号加入0.1 mL各菌悬液,用三角棒涂抹,使菌种均匀分布在培养基表面,倒置培养。供试细菌置培养箱中37℃下培养,每天观察生长情况,2~3 d后,用无菌的打孔器在不长菌平板上打取直径为6 mm菌块转移到新鲜的营养琼脂平板中央,放入37℃生化培养箱中连续培养2 d,以菌块直径不变的培养皿所对应的香辛精油组分最低浓度为该精油成分的最低杀菌浓度,并做空白对比。

1.2.3 联合杀菌效果评价 复合香辛精油组分联合杀菌效果可用分级杀灭浓度指数(I_{FBC})加以评价, I_{FBC} 按下式计算^[9]:

$$I_{FBC} = \frac{C'_{MBCA}}{C_{MBCA}} + \frac{C'_{MBCB}}{C_{MBCB}} + \frac{C'_{MBC C}}{C_{MBC C}} + \frac{C'_{MBCD}}{C_{MBCD}}$$

式中: C'_{MBCi} —组分*i*在联合使用时的最低杀菌浓度(MBC),*i*可为A、B、C、D,mg/L; C_{MBCi} —组分*i*在单独使用时的最低杀菌浓度(MBC),*i*可为A、B、C、D,mg/L。

I_{FBC} 判定标准为: $I_{FBC} \leq 0.5$ 时为协同作用; $0.5 < I_{FBC} \leq 1$ 时为相加作用; $1 < I_{FBC} < 4$ 时为无关作用; $I_{FBC} \geq 4$ 时为拮抗作用。

1.2.4 综合评分方法 综合得分是指某种复配组合对所有供试菌种的得分总和,综合得分越高,说明这一复配组合的抑菌效果越好,抑菌谱越宽,相应地,杀菌效果也越好。评分标准见表1。

表1 复合香辛精油抑菌效果的评分标准

Table1 Evaluation standard on the inhibition of essential oil to the tested bacteria

长菌量 ¹⁾ area of bacteria growth	得分 scores
0	5
0 ~ 1/4	4
1/4 ~ 1/2	3
1/2 ~ 3/4	2
3/4 ~ 1	1
1	0

1)长菌量是指菌种在培养皿中生长的相对面积 the area of bacteria growth was that the relative growth area of bacteria in petri dishes

2 结果与amp;讨论

2.1 最低杀菌浓度(MBC)分析

将各香辛精油组分分别以丙二醇等比稀释,分别吸取不同浓度溶液0.4 mL加入培养皿中,加入已灭菌冷却至46℃左右的培养基约19.6 mL,使培养基含各精油组分质量浓度依次为:2.000 0、1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 50、0.031 25 mg/L,再用 $10^6\sim 10^7$ CFU/mL的原菌悬液0.1 mL涂布含菌平板,置于37℃下培养。实验通过平板稀释法和菌块转移平板法,可以得到香辛料精油组分的最低杀菌质量浓度,其结果见表2。

从表2可看出,7种香辛料精油组分对生鲜食品中5种常见有害菌都有杀灭作用,其杀菌效果有所不同。当培养基中的百里香酚质量浓度为0.5 mg/L时,即可杀死全部供试菌;水杨醛在0.5 mg/L时,

也可杀死所有供试菌,但其对金黄色葡萄球菌的杀灭作用要优于百里香酚;丁香酚、肉桂醛、茴香脑杀灭所有供试菌的质量浓度相当,当质量浓度为 1 mg/L 时能杀灭所有供试菌,而肉桂醛与茴香脑对水产品中常见致病菌副溶血性弧菌的杀灭作用要强于丁香酚;柠檬醛对除大肠杆菌外的其余 4 种有害菌的杀灭质量浓度均为 0.5 mg/L,而对大肠杆菌的杀灭质量浓度要大于 2 mg/L;香兰素的综合杀菌效果稍差,它的最低抑菌质量浓度要大于 2 mg/L 才能杀灭全部供试菌。

表 2 7 种香辛料精油组分对供试菌的最低杀菌质量浓度

Table 2 Minimum bactericidal mass concentration of seven essential oils on five tested bacteria

供试菌种 tested strains	最低杀菌质量浓度 minimum bactericidal mass concentration/(mg·L ⁻¹)						
	百里香酚 thymol	丁香酚 eugenol	肉桂醛 cinnamic aldehyde	茴香脑 anethole	水杨醛 salicylaldehyde	香兰素 vanillin	柠檬醛 citral
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus Aurous</i>	0.5	0.5	0.5	1.0	0.0625	1.0	0.5
大肠杆菌 <i>Escherichia Coli</i>	0.25	1.0	1.0	0.5	0.25	>2.0	>2.0
单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	>2.0	0.5
沙门氏菌 <i>Saimonella</i>	0.125	0.5	0.5	1.0	0.125	>2.0	0.5
副溶血性弧菌 <i>Vibrio Parahemolyticus</i>	0.125	0.5	0.25	0.125	0.125	2	0.5

由表 2 可知,7 种香辛精油组分的综合杀菌能力大小依次为:水杨醛 > 百里香酚 > 肉桂醛、茴香脑、丁香酚 > 柠檬醛 > 香兰素。

2.2 香辛料精油组分的复配研究

2.2.1 复合香辛料精油的配方优选 香辛精油具有杀灭微生物的作用,而单一香辛精油的抑菌谱较窄,很难对复杂的微生物群产生良好的抗菌效果^[10],为了提高香辛精油的杀菌效果和拓宽其杀菌谱,实验进一步选取综合杀菌效果较好的水杨醛、百里香酚、肉桂醛、茴香脑 4 种香辛精油组分进行复配。利用正交表 $L_9(3^4)$ 进行试验设计。

为确定复合香辛料精油的最优配比,以 4 种精油组分为试验因素,以对各个组合抑菌效果的综合评分为考察指标。抑菌方法按照 1.2.2 节中的平板稀释法。依照表 1,利用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,并对每一组复合香辛精油的浓度进行稀释,使得稀释后最终培养基含复合香辛精油总质量浓度为 0.25 mg/L,再通过观察供试菌的生长情况来进行评分。每一个试验号做两次平行试验。试验设计和结果见表 3。

表 3 平板稀释法中复合香辛精油的正交试验结果

Table 3 Orthogonal test result of recomposed essential oil in dilution plating technique

试验号 test No	A	B	C	D	综合得分 total scores	
	水杨醛/(mg·L ⁻¹) salicylaldehyde	肉桂醛/(mg·L ⁻¹) cinnamic aldehyde	百里香酚/(mg·L ⁻¹) thymol	茴香脑/(mg·L ⁻¹) anethole	平行 1 parallel 1	平行 2 parallel 2
1	0.4	0.25	0.2	0.5	18	16
2	0.4	0.5	0.6	1.0	17	22
3	0.4	1.0	1.0	0.25	24	23
4	0.2	0.25	0.6	0.25	23	21
5	0.2	0.5	1.0	0.5	25	21
6	0.2	1.0	0.2	1.0	12	20
7	0.1	0.25	1.0	1.0	25	23
8	0.1	0.5	0.2	0.25	18	17
9	0.1	1.0	0.6	0.5	18	20
k_1	120	126	101	118		
k_2	122	120	121	119		
k_3	121	117	141	126		
R	2	9	40	8		

表4 方差分析表

Table 4 Variance analysis of orthogonal test

因素 factor	SS	<i>f</i>	<i>M</i>	<i>F</i> 值 ¹⁾ <i>F</i> value	显著性 significance
A	0.333	2	0.167	0.024	
B	7	2	3.5	0.512	
C	133.333	2	66.667	9.757	*
D	6.333	2	3.167	0.463	
误差 error	61.501	9	6.833	1	
总和 sum	208.5	17	—	—	

1) $F_{0.05}(2,9) = 4.26$

从表4中各因素的*F*值与临界值的比较可以看出,在0.05的显著性水平上, $F(C) > F_{0.05}$,说明百里香酚对复合香辛精油的抑菌效果和抑菌谱有显著的影响;而 $F_{0.05} > F(B) > F(D) > F(A)$,说明肉桂醛、茴香脑和水杨醛对复合香辛精油的抑菌效果和抑菌谱的影响不显著。另外,由各因素*F*值的大小 $F(C) > F(B) > F(D) > F(A)$ 可以看出,影响复合香辛精油的抑菌效果和抑菌谱的因素大小为:百里香酚 > 肉桂醛 > 茴香脑 > 水杨醛。因此,试验条件下的最佳搭配为 $A_3B_1C_3B_3$,即为水杨醛、肉桂醛、百里香酚、茴香脑的质量比为2:5:20:5。

2.2.2 最优复合香辛精油的MBC值测定 用 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL原菌悬液0.1 mL涂布平板,将香辛料复合物以丙二醇等比稀释,至培养基含精油复合物质量浓度依次为:0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.0156、0.0078 mg/L。通过平板稀释法得到香辛精油组分的MBC,实验结果见表5。

表5 香辛料复合物对供试菌的最低抑菌浓度¹⁾

Table 5 Minimum inhibitory concentration of composite essential oil on various tested bacteria

供试菌种 tested strains	空白对照 blank control	丙二醇对照 propylene glycol control	不同香辛料复合物质量浓度(mg·L ⁻¹)下的菌种生长情况 composite essential oil						
			0.0078	0.0156	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus Aurous</i>	++	++	++	++	++	+	+	-	-
大肠杆菌 <i>Escherichia Coli</i>	++	++	++	++	++	+	+	-	-
单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	++	++	++	++	++	+	+	-	-
沙门氏菌 <i>Saimonella</i>	++	++	++	++	++	+	+	-	-
副溶血性弧菌 <i>Vibrio Parahemolyticus</i>	++	++	++	++	+	+	-	-	-

1) “++”表示菌种生长良好“++” means good bacteria growth; “+”表示菌种生长较弱“+” means weak bacteria growth; “-”表示无菌生长“-” means no bacteria growth

从表5中可以看出,当精油复合物质量浓度达到0.25 mg/L时,就可以完全抑制所有的供试菌的生长,将不长菌的平板,即精油复合物质量浓度为0.25 mg/L和0.5 mg/L的平板以及0.125 mg/L质量浓度下的副溶血性弧菌平板做菌块转移实验,37℃培养2 d后,两种浓度的菌块直径大小均没有发生变化,0.125 mg/L质量浓度下的副溶血性弧菌菌块直径大小也没有发生变化,而空白对照中菌块直径达到61 mm以上。则香辛料复合精油对副溶血性弧菌的最低杀菌质量浓度为0.125 mg/L,对其余4种有害菌的最低杀菌质量浓度为0.25 mg/L。而杀菌效果最好的单一水杨醛质量浓度要达到0.5 mg/L才可杀灭所有供试菌。因此,在杀菌效果相同的条件下,复合香辛料精油中各组分的使用量最多为单一组分使用量的二分之一。

2.2.3 香辛料精油杀菌协同效应分析 有研究表明重组香料之间具有协同增效作用^[11],为对复合香辛料精油的杀菌作用效果进行评价,实验采用1.2.3节方法,计算相应的 I_{FBC} 值并进行评价,结果见表6。

由 I_{FBC} 可以判断,复合香辛精油对单增李斯特菌的杀灭表现出很强的协同增效作用效果,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和副溶血性弧菌的杀灭表现出相加作用,而对沙门氏菌则表现出无关作用。

表6 复合香辛料精油联合杀菌效果评价¹⁾

Table 6 Evaluation of bactericidal activity of composite essential oil

供试菌种 tested strains	最低杀菌浓度 minimum bactericidal mass concentration/(mg·L ⁻¹)								<i>I</i> _{FBC}	联合效果 joint effect
	水杨醛 salicylaldehyde		肉桂醛 cinnamic aldehyde		百里香酚 thymol		茴香脑 anethole			
	<i>C</i> _{MBC}	<i>C'</i> _{MBC}	<i>C</i> _{MBC}	<i>C'</i> _{MBC}	<i>C</i> _{MBC}	<i>C'</i> _{MBC}	<i>C</i> _{MBC}	<i>C'</i> _{MBC}		
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus Aureus</i>	0.0625	0.0156	0.5	0.0391	0.5	0.1563	1.0	0.0391	0.6795	相加作用 additive effect
大肠杆菌 <i>Escherichia Coli</i>	0.25	0.0156	1.0	0.0391	0.25	0.1563	0.5	0.0391	0.8049	相加作用 additive effect
单增李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	0.5	0.0156	0.5	0.0391	0.5	0.1563	1.0	0.0391	0.4611	协同作用 synergies
沙门氏菌 <i>Saimonella</i>	0.125	0.0156	0.5	0.0391	0.125	0.1563	1.0	0.0391	1.4925	无关作用 unrelated
副溶血性弧菌 <i>Vibrio Parahemolyticus</i>	0.125	0.0078	0.25	0.0195	0.125	0.0781	0.125	0.0195	0.9212	相加作用 additive effect

1) *C*_{MBC}:某组分在单独使用时的最低杀菌浓度 Minimum bactericidal concentration of a component when used alone; *C'*_{MBC}:某组分在联合使用时的最低杀菌浓度 Minimum bactericidal concentration of a component when used in conjunction; *I*_{FBC}:分级杀灭浓度指数 Index of fractional bactericidal concentration

3 结论

3.1 7种香辛精油组分对供试菌的杀菌能力以水杨醛最强,其次为百里香酚、肉桂醛、茴香脑、丁香酚、柠檬醛,香兰素的杀菌能力最差。香辛精油对生鲜食品中常见致病菌有强烈的杀灭作用,可以减少生鲜食品对人们的安全隐患,同时还可以对食品进行调味,将其开发为食品保鲜剂具有广阔的前景。

3.2 选取杀菌效果较好的4种精油组分进行优配,当水杨醛、肉桂醛、百里香酚、茴香脑的质量比为2:5:20:5时抑菌效果最好,此香辛料复合精油对副溶血性弧菌的最低杀菌质量浓度(MBC)为0.125 mg/L,而对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、单增李斯特菌、沙门氏菌的最低杀菌质量浓度(MBC)为0.25 mg/L。

3.3 通过对香辛料精油成分杀菌作用协同效应分析得出,复配的香辛精油对单增李斯特菌的杀灭表现出很强的协同增效作用效果,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和副溶血性弧菌的杀灭表现出相加作用,而对沙门氏菌则表现出无关作用。

参考文献:

- [1] 贺红军,姜竹茂,孙承锋,等. Nisin与香辛料提取液在五香牛肉保鲜中的应用研究[J]. 食品工业科技,2004,25(9):59-61.
- [2] 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.
- [3] 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(1):83-92.
- [4] 李鹏霞,张兴,刘亚敏,等. 植物精油对杏果实防腐保鲜的研究初报[J]. 保鲜与加工,2007,7(6):26-29.
- [5] 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(2):142-150.
- [6] BUSATTA C, VIDAL R S, POPIOLSKI A S, et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage[J]. Food Microbiology, 2008, 25(1):207-211.
- [7] SOULTOS N, TZIKAS Z, CHRISTAKI E, et al. The effect of dietary oregano essential oil on microbial growth of rabbit carcasses during refrigerated storage[J]. Meat Science, 2009, 81(3):474-478.
- [8] OLOYEDE G K. Toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of methyl salicylate dominated essential oils of *Laportea aestuans*(Gaud)[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2011.
- [9] 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):115-117.
- [10] 裴瑞松,周峰,籍保平,等. 肉桂醛与5种栅栏因子复配大肠杆菌的抑制作用[J]. 食品与发酵工业,2007,33(11):35-36.
- [11] 钟少枢,吴克刚,柴向华,等. 七种单离食用香料对食品腐败菌抑菌活性的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(5):68-71.