

植物精油与有机酸的抑菌效果及协同作用研究

■ 张浩然¹ 刘金松² 张玲玲¹ 杨彩梅^{1,2*}

(1.浙江农林大学动物科技学院,浙江临安 311300;2.浙江万方生物科技有限公司,浙江安吉 313307)

摘要:试验研究了植物精油、有机酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌效果,并研究了植物精油与有机酸复合的协同作用,结果表明:植物精油中肉桂醛的抑菌作用优于百里香酚和香兰素,肉桂醛与百里香酚以3:1的比例复合时抑菌效果最强,有机酸中柠檬酸的抑菌作用优于山梨酸和苯甲酸,植物精油与柠檬酸复合后对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌均具有明显抑菌作用,表明植物精油和有机酸具有协同作用。

关键词:植物精油;酸化剂;抑菌

doi:10.13302/j.cnki.fi.2018.18.001

中图分类号:S8-1

文献标识码:A

文章编号:1001-991X(2018)18-0002-07

Study on Bacteriostasis Effect of Essential Oil Complex with Citric Acid

Zhang Haoran, Liu Jinsong, Zhang Lingling, Yang Caimei

Abstract: This study is about the bacteriostatic effect of plant essential oil and organic acid on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*, and the synergistic bacteriostatic effect of plant essential oil and organic acid. The results showed that the bacteriostatic effect of cinnamaldehyde was better than thymol and vanillin. The bacteriostatic effect was the strongest when the ratio of cinnamaldehyde and thymol was 3 : 1. The bacteriostatic effect of citric acid was better than sorbic acid and benzoic acid. The compound essential oil and citric acid had obvious bacteriostatic effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*. The results showed that essential oil and organic acid had synergistic bacteriostatic effect.

Key words: plant essential oil; acidifying agent; antibacterial

抗生素在畜牧业中的滥用问题对动物的免疫功能和食品安全都造成了威胁。因此寻找和开发新型的,更为安全的能代替抗生素的饲料添加剂成为动物营养研究的热点。

植物精油以其天然、安全、高效等优点成为抗生素的替代品,植物精油具有促进动物采食、提高其生长性能、增强抗氧化和机体免疫力等功能^[1]。有机酸主要是针对断奶仔猪的胃酸分泌不足而开发的一种饲料添加剂,但现在经过逐步的研究,发现其具有促生长和抑制害菌的作用。研究表明有机酸可降低饲料pH值,抑制霉菌和病原菌生长^[2-3],改善畜禽的生产

性能,提高饲料利用率,增强动物机体免疫力^[4-5]。目前对植物精油和有机酸均有一定的研究,但对于植物精油的配伍及其与有机酸复合的抑菌作用研究较少。本试验通过研究不同植物精油及植物精油与有机酸复配,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌效果,从而为植物精油与有机酸在动物生产中的合理应用进一步提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物精油(肉桂醛、百里香酚、香兰素)、有机酸(山梨酸、苯甲酸、柠檬酸)均由浙江万方生物科技有限公司提供,并于阴凉避光处保存。植物精油浓度为10 mg/ml,有机酸浓度为5、10、50 mg/ml。大肠杆菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)购自中国菌种保藏中心。

1.2 试验设计

牛津杯法测定抑菌圈直径。以无菌操作在培养

作者简介:张浩然,研究方向为。

通讯作者:杨彩梅,研究员,硕士生导师。

收稿日期:2018-06-06

基金项目:浙江省重点研发项目[2017C02005]

基表面垂直放4个已灭菌的牛津杯,依次加入样品(植物精油与有机酸或丁酸类物质分别按照1:0、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5的比例复合)。加满后置于37℃恒温培养箱24h。每组做3个平行。牛津杯试验结果的判定标准:抑菌圈直径>20mm为非常敏感,15~20mm之间为高度敏感,10~15mm为中度敏感,<10mm为低度敏感。抑菌圈直径与抗菌活性成正比。

1.3 最小抑菌浓度(MIC)的测定方法

采用试管二倍稀释法测定植物精油和有机酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度。

1.4 统计分析

试验数据采用SPSS 20.0软件One Way ANOVA进行统计分析,并进行Duncan's法多重比较,结果以“平均值±标准误”表示。

2 结果分析

2.1 植物精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌的抑菌效果(见表1、图1)

表1 百里香酚、肉桂醛、香兰素的抑菌直径比较

项目	抑菌圈直径(mm)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
百里香酚	18.61±0.78	21.00±0.91	20.10±0.87
肉桂醛	28.2±0.75	27.7±1.19	24.6±0.56
香兰素	17.5±1.10	11.1±0.72	14.3±0.68

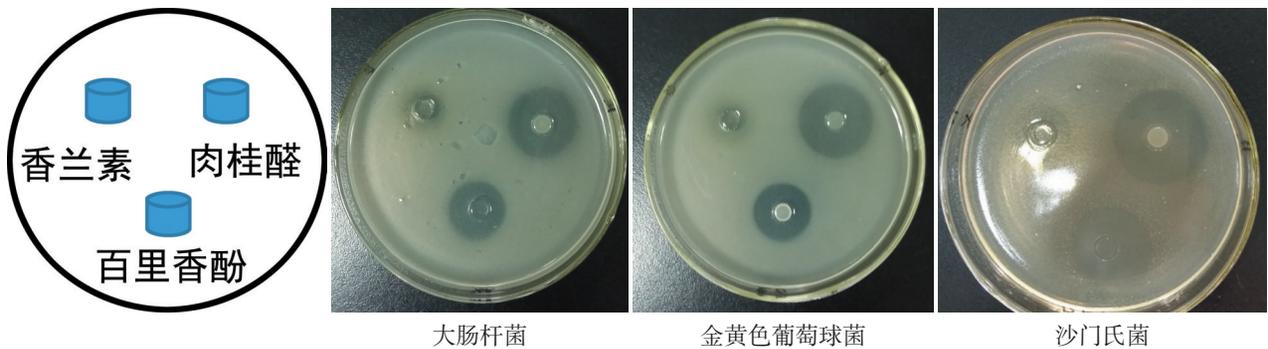


图1 百里香酚、肉桂醛、香兰素的抑菌效果

表1与图1的结果表明:植物精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌都有抑制作用,其中肉桂醛对三种菌的抑菌效果均为非常敏感。百里香酚对金黄色葡萄球菌与沙门氏菌的抑菌效果也为非常敏感。

表2的结果表明:肉桂醛的MIC值最低,表明抑

菌作用最强,百里香酚对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果好于对沙门氏菌的抑菌效果,即对革兰氏阴性菌的抑菌效果优于革兰氏阳性菌。香兰素的MIC值较高,表明抑菌效果较差,MIC的结果与抑菌圈结果基本一致。

表2 百里香酚、肉桂醛、香兰素的最小抑菌浓度比较

项目	MIC(mg/ml)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
百里香酚	0.156 25	0.156 25	0.3125
肉桂醛	0.156 25	0.156 25	0.156 25
香兰素	0.625	1.25	0.625

2.2 复合植物精油的抑菌效果(见表3)

由表3可知,百里香酚和肉桂醛的复合比例达到1:2和1:3时对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌能力均达到非常敏感,百里香酚和肉桂醛的复合比例为1:2时对大肠杆菌的抑菌效果最好。但百里香酚和肉桂醛复合的抑菌效果与单独使用肉桂醛相比并无明显差异,但两者复合可以降低肉桂醛的

用量。

2.3 有机酸的抑菌效果(见表4、图2、表5)

由表4与图2可知,苯甲酸、山梨酸与柠檬酸对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌均有抑菌效果,其中柠檬酸在50mg/ml的浓度下的抑菌效果最好,均达到非常敏感水平。有机酸的抑菌能力与其浓度相关,浓度越大,抑菌效果越强。

表3 百里香酚与肉桂醛复合的抑菌效果

百里香酚：肉桂醛	抑菌圈直径(mm)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
4：1	14.7±0.89	15.1±0.59	15.3±0.69
3：1	19.7±1.16	16.8±0.39	18.4±0.94
2：1	20.0±0.91	18.0±1.18	14.9±0.74
1：1	18.1±0.77	16.4±1.31	14.5±0.85
1：2	16.5±1.31	21.3±0.44	23.2±0.39
1：3★	18.4±0.90	25.1±0.51	27.1±0.19
1：4	18.2±0.43	24.1±0.78	17.3±0.88

表4 不同浓度山梨酸、柠檬酸、苯甲酸的抑菌效果

项目	浓度(mg/ml)	抑菌圈直径(mm)		
		大肠杆菌	金黄葡萄球菌	沙门氏菌
山梨酸	5	13.33±1.04	13.50±0.50	12.00±1.41
	10	15.26±1.10	17.53±1.36	13.00±0.70
	50	17.67±0.58	19.60±1.44	16.00±0.00
苯甲酸	5	12.43±0.51	11.00±2.00	10.50±0.40
	10	15.26±1.10	19.16±1.25	14.00±1.82
	50	19.10±1.15	23.17±1.89	18.50±1.29
柠檬酸	5	9.50±1.50	11.00±0.00	16.00±2.82
	10	15.83±4.25	16.33±1.53	16.00±2.94
	50	31.00±0.50	24.00±2.00	31.00±0.40

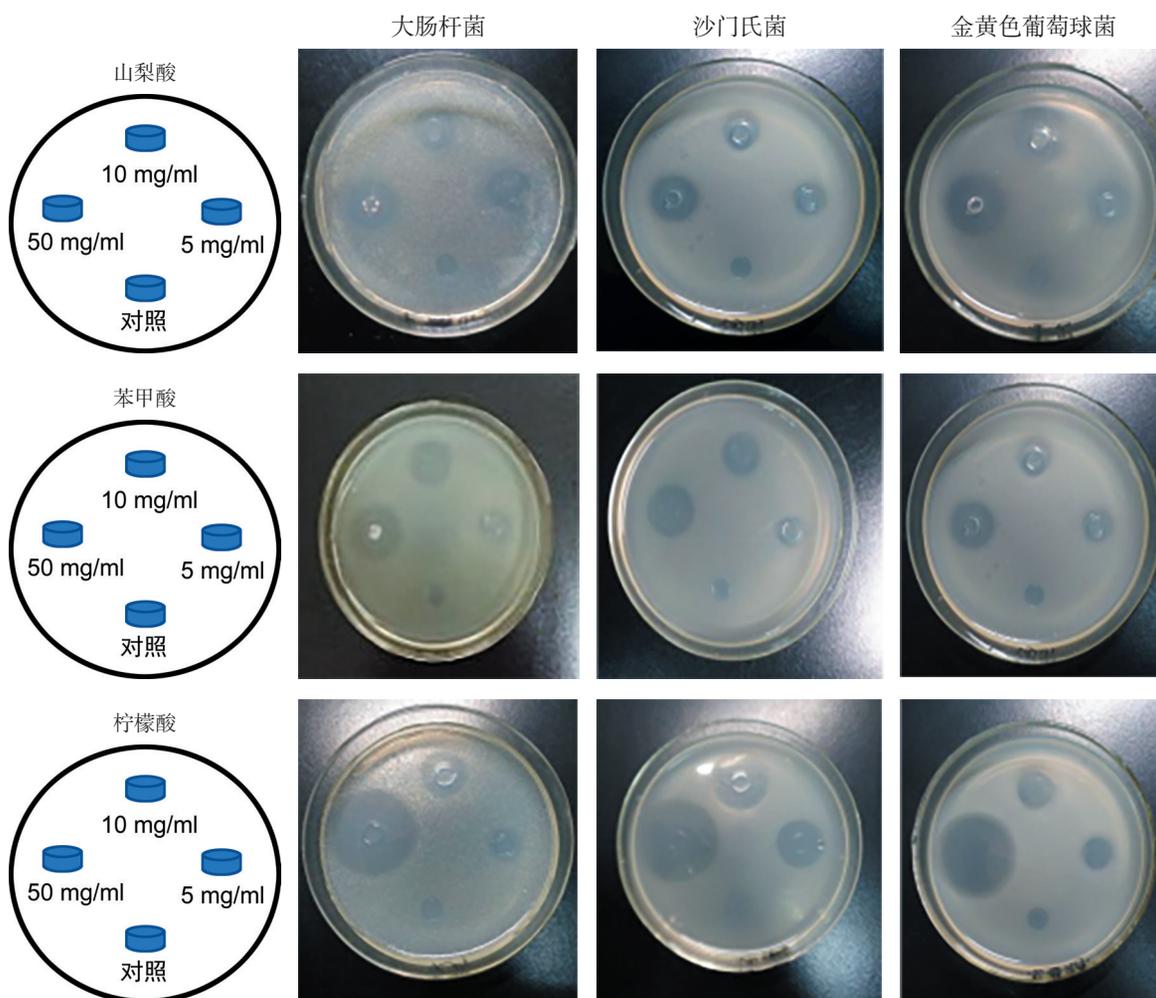


图2 不同浓度山梨酸、柠檬酸、苯甲酸的抑菌效果图

表5 山梨酸、柠檬酸、苯甲酸最小抑菌浓度比较

项目	MIC(mg/ml)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
山梨酸	0.312 5	0.625	0.312 5
苯甲酸	0.312 5	0.625	0.312 5
柠檬酸	2.5	2.5	1.25

由表5可知,柠檬酸的MIC值最大,结合表4的结

果,表明柠檬酸在高浓度下有突出的抑菌能力,但在低浓度下的抑菌能力较弱。山梨酸和苯甲酸在较低的浓度下就能产生抑菌作用,但在高浓度时抑菌能力弱于柠檬酸。

2.4 复合植物精油与酸化剂复合的抑菌效果(见表6、图3)

表6 植物精油(百里香酚:肉桂醛=1:3)与柠檬酸复合后抑菌圈直径

复合植物精油(1:3):柠檬酸	抑菌圈直径(mm)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
1:0	19.45±1.68	22.04±1.33	24.00±2.58
1:1	28.26±1.60	27.49±1.33	24.33±2.89
1:2	27.87±2.06	26.54±2.09	22.67±2.52
1:3	26.28±0.93	27.13±1.07	22.39±1.61
1:4	26.63±1.43	27.42±0.69	21.85±1.00
1:5	26.72±1.35	26.66±1.27	21.22±2.00

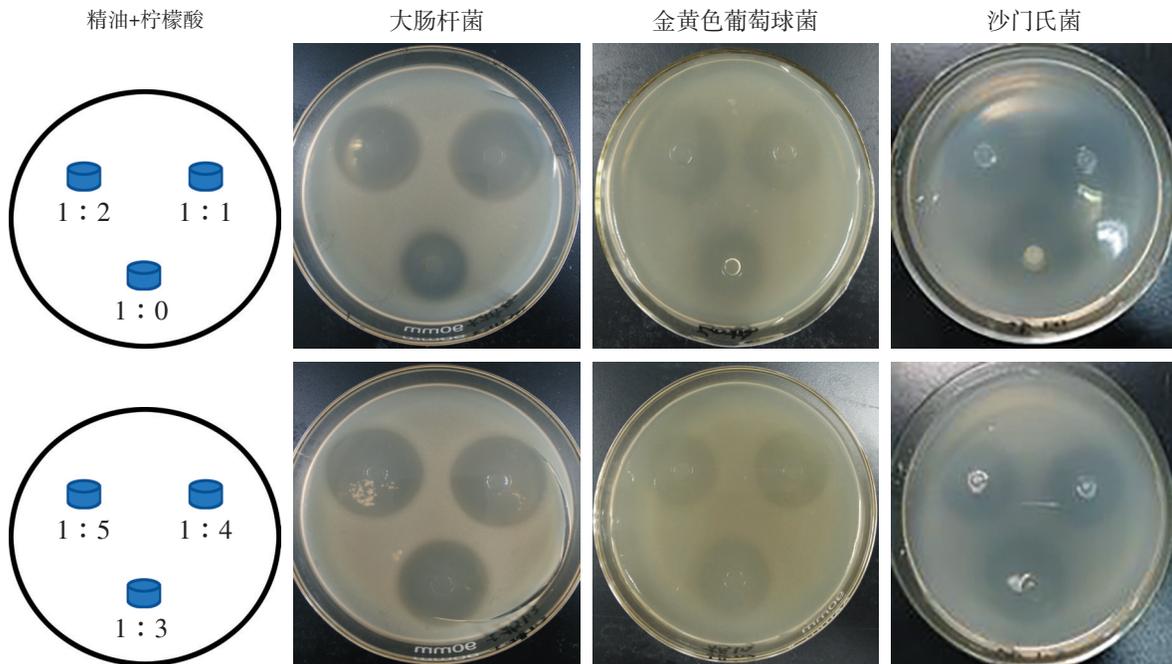


图3 精油与柠檬酸不同比例复合的抑菌效果图

由表6和图3可知,植物精油与柠檬酸以不同比例复合均可明显提高对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果,表明两者有协同作用,但是对沙门氏菌的抑菌效果无显著影响。

3 讨论

研究表明在植物精油中,百里香酚和肉桂醛属于抑菌活性最强的成分,二者均能作用于细菌细胞膜上的靶点。百里香酚的疏水性成分能够直接作用于细菌细胞膜上的双分子脂膜,使细菌细胞膜的构象发生改变,导致细胞内容物外泄。百里香酚可以改变大肠

杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的细胞膜上的脂肪酸的结构和比例,降低膜不饱和脂肪酸的含量,增加饱和脂肪酸的含量,从而降低了细胞膜的流动性,破坏细菌细胞的形态。肉桂醛的作用部位不仅仅是细胞膜,它能穿透细胞膜进入细胞质,通过影响细菌细胞中的结构保守的蛋白质,阻止细胞分裂,从而抑制了细菌的活性。王改琴等(2014)采用琼脂平板孔洞法分别对不同来源的肉桂醛、香芹酚等植物精油及其混合物进行体外抑菌效果筛选和评估,结果表明肉桂醛的抑菌效果最好,肉桂醛、香芹酚、丁香酚、百里香

酚4种精油组成的复方产品对大肠杆菌等肠道有害菌有较好的抑制作用,且热稳定性好^[6]。李文茹等(2013)研究了肉桂、山苍子、丁香、香茅、迷迭香和大蒜精油等6种典型植物精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活性。结果表明**肉桂**的抑菌效果最好^[7]。吴克刚等通过测定抑菌圈直径、最低抑菌浓度和最小杀菌浓度,研究8种植物精油对肠道致病菌和益生菌的体外抑菌活性并与5种抗生素比较,结果表明:综合抑菌效果最好的是**肉桂**和**牛至**,其对黄曲霉抗菌效果优于抗生素^[8]。Macheboeuf等(2008)结果表明,肉桂醛是醛类挥发油中抑菌效果最好的活性物质^[9]。贾聪慧的研究表明,当肉桂醛和百里香酚浓度比为6:1时,复合精油具有最强的抑制大肠杆菌、沙门氏菌和普通变形杆菌生长的作用^[10]。本试验的中植物精油的抑菌作用结果与其它研究结果基本一致,表明肉桂醛具有最强的抑菌活性,本试验的结果还表明:百里香酚和肉桂醛的复合比例达到**1:2**和**1:3**时对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌能力具有协同作用。

有机酸作为小分子可以穿过细菌外膜的孔道进入细胞质,作用于磷酸和脂多糖,从而破坏外膜的完整性,使细菌细胞的内容物外泄,达到了抑菌的效果。王丽娜等(2015)研究表明,柠檬酸表现出对沙门菌属较强的抑菌效应,并对抑制细菌增殖呈现剂量依赖性^[11]。裴瑞松等(2007)研究表明,肉桂醛与柠檬酸对抑菌有协同作用,且通过复配可降低肉桂醛的MIC^[12]。Paulus等(2016)的体外抑菌实验结果表明,山梨酸、苯甲酸和柠檬酸在较低浓度时对抑制沙门氏菌生长是有效的,其中苯甲酸的效果最好^[13]。而Friedman等(2008)研究了70多种苯甲醛和苯甲酸对大肠杆菌O157:H7、肠沙门氏菌、空肠弯曲菌和单核李斯特菌的杀菌活性,结果表明,不同种类的苯甲酸的抑菌效果是不同的^[14]。Cerisuelo等的研究结果表明,将低剂量的植物精油与丁酸钠混合,对沙门氏菌的抑制有很好的效果^[15]。本试验结果表明,植物精油复合物与柠檬酸复合的抑菌效果优于植物精油抑菌效果,但并没有表现出比柠檬酸的单独使用更强的抑菌效果,可能因为本试验使用的柠檬酸浓度较高,对3种菌的抑制作用已达到非常敏感水平,所以协同作用不明显,低浓度的柠檬酸与植物精油的协同作用还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 张克英,植物精油在家禽营养中的应用进展[J].饲料与畜牧,

2006(12):41-44.

- [2] 田冬冬,刘志强,张颖,等.酸化剂在仔猪生产中的应用[J].饲料博览,2015(2):32-36.
- [3] 景翠,陈宝江,于会民,等.复合酸化剂对断奶仔猪生长性能、营养物质表观消化率及相关理化指标的影响[J].河北农业大学学报,2009,32(4):92-95.
- [4] Caniben H, Jbergo H, Jsgaard S, et al. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs[J]. J. Anim. Sci., 2005, 83(6): 1287-1302.
- [5] 刘虎,方热军.复合酸化剂的生理功能及其组合应用[J].饲料博览,2015(3):39-43.
- [6] 王改琴,郭本成,王宇霄,等.不同植物精油体外抑菌效果的研究[J].国外畜牧学-猪与禽,2014(4):50-52.
- [7] 李文茹,施庆珊,莫翠云,等.几种典型植物精油的化学成分与其抗菌活性[J].微生物学通报,2013,40(11):2128-2137.
- [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(6):133-141.
- [9] Macheboeuf D, Morgavi D P, Papon Y, et al. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population [J]. Anim. Feed Sci. Technol., 2008, 145(1/4): 335-350.
- [10] 贾聪慧.植物精油和酸制剂复合对断奶仔猪生长性能、肠道健康和排泄物氨逸失的影响[D].杭州:浙江大学,2016.
- [11] 王丽娜,高飞,朱晓彤,等.不同有机酸对断奶仔猪肠道厌氧培养微生物菌群的影响[J].华南农业大学学报,2015,36(6):9-14.
- [12] 裴瑞松,周峰,籍保平,等.肉桂醛与5种栅栏因子复配对大肠杆菌的抑制作用[J].食品与发酵工业,2007,33(11):35-38.
- [13] Christophe Paulus, Matthias Wiemann, Rolando Valientes,等.利用苯甲酸控制沙门氏菌[J].国外畜牧学(猪与禽),2016,36(8):6-8.
- [14] Friedman M, Henika P, R Mandrell R E. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. [J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(10): 1811-1821.
- [15] Cerisuelo A, Marín C, Sánchez-Vizcaíno F, et al. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and *Salmonella* counts in experimentally challenged broilers[J]. Poultry Science, 2014, 93(3):599.