

液体接触法与气相接触法对单离香料抗菌作用的影响

林雅慧^{1,2}, 苏俊婷^{1,2}, 陈海宁^{1,2*}, 陶平^{1,2}, 刘学文^{1,2}

¹广东省科学院生物工程研究所; ²中国轻工业甘蔗制糖工程技术研究中心, 广州 510316

摘要:通过测定单离香料在液体接触、气相接触 2 种方法对 7 种供试菌的最小抑菌浓度 (MIC 值) 和最小杀菌浓度 (MBC 值), 用重复测量方差分析、秩和检验探讨不同接触方式对单离香料抗菌效果的影响。结果表明液体接触法中百里香酚、水杨醛对供试菌 MIC 值均为 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 肉桂醛、柠檬醛 MIC 值范围为 0.25 ~ 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 丁香酚、芳樟醇的 MIC 值范围为 0.25 ~ 2.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。气相法试验中水杨醛、百里香酚对供试菌的 MIC 值均为 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 芳樟醇 MIC 值范围为 0.25 ~ 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 肉桂醛、柠檬醛 MIC 值范围为 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 而丁香酚在供试范围 (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 内仅对副溶血性弧菌有抗菌作用。用 MIC 值重复测量方差分析, 水杨醛、百里香酚在液体接触法与气相接触法存在显著性差异, $P < 0.05$, 液体接触法明显优于气相法; 从 MBC 值分析, 芳樟醇、水杨醛、丁香酚在 2 种接触方式中存在显著性差异, $P < 0.05$, 其中芳樟醇、水杨醛的液体接触法明显优于气相法, 而丁香酚则相反。单离香料与菌体的作用方式会影响其抗菌效果, 因此利用单离香料的抗菌性能开发新型抗菌剂, 需全面评估其抗菌性能。

关键词:单离香料; 作用方式; 气相接触抗菌; 液体接触抗菌

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)4-0638-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.4.014

Effect of liquid and vapour-phase contact methods on the antibacterial activity of isolate spices

LIN Ya-hui^{1,2}, SU Jun-ting^{1,2}, CHEN Hai-ning^{1,2*}, TAO Ping^{1,2}, LIU Xue-wen^{1,2}

¹Institute of Bioengineering, Guangdong Academy of Science;

²Research Center for Sugarcane Industry Engineering Technology of Light Industry of China, Guangzhou 510316, China

Abstract: The aim of this study was to test the antibacterial activity of selected isolate spices against pathogens microorganisms by two types of contact methods (liquid and vapour-phase contact). The isolate spices were tested against an array of four types of Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*) and three types of Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of different isolate spices were determined by the broth dilution method in liquid contact method and the disc volatilization method was used in the vapour-phase contact method. The results show that the antimicrobial activity of the six isolate spices in the liquid contact assay are as follows: thymol > salicylaldehyde > cinnamaldehyde > citral > eugenol > linalool. The MIC values of thymol and salicylaldehyde were both 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The value of cinnamaldehyde and citral were in the range of 0.25 to 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, and the value of eugenol and linalool were 0.25-2.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. cinnamaldehyde and citral range from 0.25-0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, eugenol for 0.25-2.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and linalool for 0.25-2.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. In the vapour-phase contact assay, the antimicrobial activity was in the order of thymol and salicylaldehyde > linalool > cinnamaldehyde > citral > eugenol. The MIC values of thymol and salicylaldehyde were both 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$, linalool values ranged from 0.25 to 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, citral were mostly 0.5-1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and cinnamaldehyde ranged from 0.5 to 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$, while eugenol only effective against *V. parahaemolyticus* in the test range. According to the analysis of variance of repeated measurement by the MIC values, thymol and salicylaldehyde were significantly difference between the liquid contact method and the vapour-phase contact method, $P < 0.05$, and the liquid contact method was signifi-

cantly better than the vapour-phase contact method. The analysis of MBC values, linalool and salicylaldehyde had significant differences in the two contact methods, $P < 0.05$, in which the liquid contact method of linalool and salicylaldehyde was significantly better than vapour-phase contact method, while eugenol was the opposite. In conclusion, the different assay methods between isolate spices and pathogens would lead to various antimicrobial effects. Therefore, the development of new antimicrobial agents using the antimicrobial properties of isolate spices requires a comprehensive evaluation of their antibacterial properties.

Key words: isolate spices; contact mode; vapour-phase contact antimicrobial; liquid contact antimicrobial

单离香料 (isolate spices) 是指通过物理或化学方法从植物精油中分离提纯的单体化合物, 如肉桂醛、香芹酚、月桂烯、柠檬醛、水杨醛、丁香酚、百里香酚、茴香脑等, 从植物精油及单离香料中探索抗菌活性物质, 成为国内外研发新型抗菌剂的一大热点^[1-4]。全国正处于被新型冠状病毒围困之际, 人民对物品、空气消毒的要求提升到了最高水平, 75% 乙醇、紫外线照射、过氧乙酸、过氧化氢、普通含氯消毒剂喷雾 (洒) 消毒这些方法都会对人体有不同程度的刺激, 甚至对物品、用具造成腐蚀性损害, 利用植物精油及其单离成分开发安全、高效、绿色的消毒剂具有巨大的市场前景。最常用的体外抗菌试验采用菌体与抗菌物质直接接触的方法, 例如琼脂扩散法、滤纸片法和稀释法等, 扩散法是通过抑菌圈直径大小来衡量抗菌物质的抗菌活性及细菌对其的敏感程度; 稀释法是将抗菌物质加入肉汤/固体培养基测定精油的最小抑菌浓度 MIC (minimum inhibitory concentrations) 和最小杀菌浓度 MBC (minimum bactericidal concentrations) 以及杀菌时间^[5-7]。气相抗菌法是利用抗菌物质易挥发的特性, 形成一定浓度的空间氛围与微生物接触, 通过保持、移除抗菌成分气相氛围来测定 MIC 值与 MBC 值^[3]。但目前对植物精油及单离香料气相抗菌作用、抗菌测试方法对抗菌效果影响以及抗菌机制差异的研究较少。

本文选取《GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》食品中允许添加的合成香料: 芳樟醇、肉桂醛、水杨醛、柠檬醛、丁香酚和百里香酚, 采用液体接触抗菌法、气相抗菌法分别测定 6 种单离香料对 7 种食源性致病菌的抗菌效果, 根据单离香料的溶解性、挥发性对引起抗菌效果差异的因素进行讨论, 旨在全面评估 6 种单离香料的抗菌效果, 为单离香料深入开发新型防腐抗菌剂, 拓宽应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 单离香料

芳樟醇 (98% , CAS 78-70-6); 肉桂醛 (>95% ,

CAS 104-55-2); 水杨醛 (98% , CAS 90-02-8); 柠檬醛 (97% 顺式 + 反式, CAS 5392-40-5); 丁香酚 (99% , CAS 97-53-0); 百里香酚 (98% , CAS 89-83-8) 购于阿拉丁试剂公司。

1.1.2 供试菌种

包括 4 种革兰氏阴性菌 (GN) 和 3 种革兰氏阳性菌 (GP), 其中蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus* ATCC 11077)、单核增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115)、沙门氏菌 (*Salmonella* ATCC 14028)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802) 购于美国菌种保藏中心, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC 26003)、志贺氏菌 (*Shigella* CMCC 51572) 购于中国医学细菌保藏管理中心。

1.1.3 培养基及试剂

磷酸盐缓冲液 (PBS)、脑心浸出液肉汤、营养肉汤、缓冲蛋白胨水、3% 氯化钠碱性蛋白胨水、胰蛋白胨大豆琼脂、3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂购于北京陆桥技术股份有限公司。丙二醇、吐温-80 购于成都科龙化学试剂厂。

1.1.4 仪器设备

SQ810C 高压灭菌锅 (雅马拓科技有限公司); AC2-6S1 生物安全柜 (新加坡艺思高科技有限公司); PHY-330H 生化培养箱 (宁波莱福科技有限公司); 比浊计 (法国生物梅里埃公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液的配制

取菌种接种于合适的肉汤 (BHI 肉汤或 3% 氯化钠碱性蛋白胨水) 活化 16 h, 4 °C 6 000 rpm 离心 5 min, 用无菌 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 制得 1 麦氏单位 ($10^8 \sim 10^9$ CFU/mL) 的菌悬液。

1.2.2 单离香料的配制

用丙二醇配制体积分数 10%、25%、50% 的单离香料稀释溶液, 装于棕色试剂瓶中, 存于 4 °C 冰箱备用。

1.2.3 液体接触法

本文采用双倍稀释法, 分别吸取不同浓度单离

香料溶液一定量分别加入装有含 0.1% 吐温-80 等量营养肉汤的试管中,使营养肉汤含单离香料浓度为 0.125、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$,置培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,观察生长情况,取没有变浑浊的培养液在平板上划线,置培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,观察生长情况。培养液不变浑浊的最小浓度为该单离香料的最小抑菌浓度(MIC),取该管培养液涂布仍不长菌最小浓度为最小杀菌浓度(MBC)。本实验中单离香料浓度为 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 仍不能抑制微生物生长视为该单离香料对其无抗菌作用。实验设 3 组平行。

1.2.4 气相抗菌法

参考 Lopez 的气相挥发试验^[3]。含定量凝固培养基的平皿上加入 100 μL $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL 的菌悬液,用无菌的涂抹棒涂抹均匀。待菌液被吸收后倒置放置。取上述稀释的单离香料,均匀滴在无菌滤纸圈上,置于皿盖内侧中心形成气相氛围(空间单离香料浓度为 0.125、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$),取等量的丙二醇作为对照,另设一空白组。抑菌实验直接将此培养皿盖好用封口膜密封;37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察记录菌体在培养皿的生长情况。杀菌实验取抑菌实验中无菌生长的平板,在无菌环境更换培养皿盖,用封口膜密封,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察实验结果。如果将气相氛围移除,细菌开始生长,则该浓度为最小抑菌浓度(MIC);而仍

然没有细菌生长则说明细菌被杀灭,该浓度就是最小杀菌浓度(MBC)。实验设 3 组平行。

1.3 数据分析

采用 WPS 软件进行数据计算及图表制作。MIC/MBC 值经对数转换后,不同接触方式对单离香料对 MIC/MBC 值影响采用 SPSS 19.0 软件重复测量方差分析方法,不同单离香料对 MIC/MBC 值影响、液体接触法 MIC/MBC 值比较采用秩和检验,统计结果 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 芳樟醇对食源性致病菌的抗菌作用

作者通过实验发现芳樟油对呼吸道致病菌有显著的抗菌作用^[8],芳樟油中含 84% ~ 94% 的芳樟醇,芳樟醇对常见食源致病菌的抗菌作用如表 1。

液体接触法实验中志贺氏菌和单增李斯特菌对芳樟醇最敏感(MIC 值为 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$),其次是副溶血性弧菌、大肠埃希氏菌、蜡样芽孢杆菌(MIC 值为 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$),沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的敏感性较弱(MIC 值分别为 1、2 $\mu\text{L}/\text{mL}$),芳樟醇对供试菌的抑制作用较明显,杀灭作用则需要增加 3 倍 MIC 值。气相抗菌试验中 MIC 值等于 MBC 值,其中对副溶血性弧菌、志贺氏菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌的 MIC 值为 0.25、1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 空间浓度时可以杀灭全部供试食源性致病菌。

表 1 芳樟醇对常见食源性致病菌 2 种测试方法的 MIC 值、MBC 值

Table 1 The MIC and MBC values of linalool against foodborne pathogens($\mu\text{L}/\text{mL}$)

供试菌 Microbial		液体接触法 Liquid contact method		气相接触法 Vapour-phase contact method	
		MIC	MBC	MIC	MBC
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	1	4	1	1
	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	0.25	1	0.25	0.25
	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	0.5	1	1	1
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	0.5	2	0.25	0.25
	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	0.5	2	0.5	0.5
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	2	2	0.25	0.25
	单增李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	0.25	2	0.25	0.25

2 种作用方式比较,芳樟醇气相抗菌作用优于液体接触抗菌作用,气相浓度 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时可以杀灭全部供试食源性致病菌,而液体接触法需要 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。

2.2 肉桂醛对食源性致病菌的抗菌作用

肉桂醛是肉桂精油的主要成分,肉桂醛的抗菌作用如表 2。

表2 肉桂醛对常见食源性致病菌2种测试方法的MIC值、MBC值

Table 2 The MIC and MBC values of cinnamaldehyde against foodborne pathogens ($\mu\text{L}/\text{mL}$)

供试菌 Microbial		液体接触法 Liquid contact method		气相接触法 Vapour-phase contact method	
		MIC	MBC	MIC	MBC
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	0.5	0.5	1	1
	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	0.25	0.5	1	1
	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	0.5	0.5	1	1
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	0.25	0.5	1	1
	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	0.25	1	0.5	0.5
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.5	1	0.5	0.5
	单增李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	0.25	1	0.5	0.5

液体接触法肉桂醛体积浓度为 $0.5 \mu\text{L}/\text{mL}$ 能对所有供试微生物起抑菌作用,对4种革兰氏阴性菌起杀菌作用。肉桂醛在液体接触法对革兰氏阴性菌的杀菌浓度与抑菌浓度相近,对革兰氏阳性菌的杀菌浓度与抑制浓度相差较大,为1~3倍。气相抗菌法对3种革兰氏阳性菌抗菌作用优于4种革兰氏阴性菌,对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、单增李斯特菌的MIC/MBC值为 $0.5 \mu\text{L}/\text{mL}$,对志贺氏菌、沙门氏菌、大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌MIC/MBC值为 $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ 。

肉桂醛对供试革兰氏阴性菌的抗菌作用,液体

表3 水杨醛对常见食源性致病菌2种测试方法的MIC值、MBC值

Table 3 The MIC and MBC values of salicylaldehyde against foodborne pathogens ($\mu\text{L}/\text{mL}$)

供试菌 Microbial		液体接触法 Liquid contact method		气相接触法 Vapour-phase contact method	
		MIC	MBC	MIC	MBC
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	0.125	1	0.125	0.125
	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	0.125	0.25	0.125	0.125
	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	0.125	1	0.125	0.125
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	0.125	0.25	0.125	0.125
	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	0.125	>8	0.125	0.125
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.125	0.25	0.125	0.125
	单增李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	0.125	0.25	0.125	0.125

如表3所示,2种测试方法中水杨醛的抑菌效果良好, $0.125 \mu\text{L}/\text{mL}$ 即可抑制所有供试菌,气相法的效果更优, $0.125 \mu\text{L}/\text{mL}$ 空间浓度即可杀灭7种供试菌。

2.4 柠檬醛对食源性致病菌的抗菌作用

柠檬醛是山苍子油、柠檬油的主要成分,对大肠

杆菌法优于气相法;对革兰氏阳性菌的抗菌作用,气相法优于直接接触法。

2.3 水杨醛对食源性致病菌的抗菌作用

水杨醛学名为邻羟基苯甲醛,是苯甲醛的最重要的衍生物之一。低浓度的水杨醛除具有一定的香味外,还具有很强的抗菌能力,常作为防腐剂用于香精和香料中。Sun等^[9]对30种芳香醛类进行防腐抑菌测试,发现绝大多数芳香醛类食用香料有较强的抑菌活性,其中水杨醛、苯丙醛、肉桂醛、2-呋喃丙烯醛对供试菌的抑菌效果最明显。

埃希氏菌、单增李斯特菌、尖孢镰刀菌等均有显著的抑菌活性^[10]。

如表3所示,液体接触法中, $0.5 \mu\text{L}/\text{mL}$ 柠檬醛对其他供试微生物都可起抑制作用,对沙门氏菌敏感程度最低, $2 \mu\text{L}/\text{mL}$ 可以杀灭除沙门氏菌的其他6种供试菌。气相抗菌法显示柠檬醛对革兰氏阳性

表4 柠檬醛对常见食源性致病菌2种测试方法的MIC值、MBC值

Table 4 The MIC and MBC values of citral against foodborne pathogens($\mu\text{L}/\text{mL}$)

供试菌 Microbial	液体接触法 Liquid contact method		气相接触法 Vapour-phase contact method		
	MIC	MBC	MIC	MBC	
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	2	8	1	1
	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	0.25	2	1	1
	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	0.5	1	3	3
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	0.5	0.5	0.5	0.5
	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	0.25	0.5	0.5	0.5
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.5	1	0.5	0.5
	单增李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	0.25	1	0.5	0.5

菌的抗菌效果优于革兰氏阴性菌,0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 即可杀灭所有供试革兰氏阳性菌,而对革兰氏阴性菌的抗菌效果各异,MIC 值从小到大排列:副溶血性弧菌 < 沙门氏菌、志贺氏菌 < 大肠埃希氏菌。综合来说,柠檬醛的液体接触抑菌效果优于气相法,杀菌效果较气相法弱。

2.5 丁香酚对食源性致病菌的抗菌作用

丁香酚在丁香精油中含量最高(80%以上),对多种菌株具有强效的抗菌活性,比如革兰氏阳性菌(蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌、粪肠球菌、单核细胞增生李斯特氏菌)和革兰氏阴性菌(大肠杆

菌、伤寒沙门氏菌、霍乱沙门氏菌、铜绿假单胞菌、幽门螺杆菌,小肠结肠炎耶尔森菌、变形杆菌)^[11,12]。

如表5所示,液体接触抗菌中丁香酚对志贺氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌的MIC值最低为0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$,对沙门氏菌、大肠埃希氏菌的MIC值为0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$,对蜡样芽孢杆菌和副溶血性弧菌的抗菌效果较弱,MIC值分别为1、2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。气相抗菌法丁香酚在供试浓度范围内(8 $\mu\text{L}/\text{mL}$)仅对副溶血性弧菌有抗菌作用,对其他6种试验菌无抗菌效果。这与López等^[13]的研究相似,丁香油在琼脂稀释法中对大肠杆菌较强,但气相熏蒸试验抗菌效果较差。

表5 丁香酚对常见食源性致病菌2种测试方法的MIC值、MBC值

Table 5 The MIC and MBC values of eugenol against foodborne pathogens($\mu\text{L}/\text{mL}$)

供试菌 Microbial	液体接触法 Liquid contact method		气相接触法 Vapour-phase contact method		
	MIC	MBC	MIC	MBC	
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	0.5	1	>8	>8
	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	0.25	1	>8	>8
	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	0.5	1	>8	>8
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	2	2	2	2
	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	1	2	>8	>8
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.25	2	>8	>8
	单增李斯特氏菌 <i>L. monocytogenes</i>	0.25	1	>8	>8

2.6 百里香酚对食源性致病菌的抗菌作用

百里香酚是疏水物质,能与蛋白质的疏水区结合并溶解在脂相发生抗菌作用,百里香酚对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及霉菌、酵母菌都有较好的抑

菌活性^[14,15]。

如表6所示,百里香酚具有优异的抗菌能力,气相抗菌优于直接接触抗菌效果,0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 空间浓度可以杀灭7种供试菌,相同浓度下直接接触法

表 6 百里香酚对常见食源性致病菌 2 种测试方法的 MIC 值、MBC 值

Table 6 The MIC and MBC values of thymol against foodborne pathogens($\mu\text{L}/\text{mL}$)

供试菌 Microbial		液体接触法 Liquid contact method		气相接触法 Vapour-phase contact method	
		MIC	MBC	MIC	MBC
革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	0.125	0.25	0.125	0.125
	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	0.125	0.125	0.125	0.125
	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	0.125	1	0.125	0.125
革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	0.125	0.25	0.125	0.125
	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	0.125	>8	0.125	0.125
	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	0.125	0.125	0.125	0.125
	单增李斯特氏菌 <i>L. monocytogen</i>	0.125	0.25	0.125	0.125

可以抑制 7 种供试菌,但对大肠埃希氏菌的 MBC 值为 $1 \mu\text{L}/\text{mL}$,在供试浓度范围内($8 \mu\text{L}/\text{mL}$)都未能杀灭蜡样芽孢杆菌。

2.7 液体接触法与气相法显著性差异分析

2 种接触方式的 MIC/MBC 值经对数转换后,采用重复测量方差分析比较 2 种接触方式对不同单离香料 lg MIC 值、lg MBC 值的影响:通过图 1 lg MIC 值变化可以看出接触方式对肉桂醛、丁香酚对微生物的抑菌作用存在显著差异($P < 0.05$),液体接触效果优于气相法($P = 0.002$)。

图 2 通过 lg MBC 值变化可以看出接触方式对芳樟醇、水杨醛、丁香酚、百里香酚杀菌作用有显著影响($P < 0.05$),其中芳樟醇、水杨醛和百里香酚气相法效果优于液体接触法($P = 0.042$)。

对液体接触法中 MIC 值与 MBC 值进行秩和检验 Wilcoxon(W)检验,结果如表 7:液体接触法中的 MIC 值与 MBC 值存在显著性差异, $P < 0.05$,MBC 均值是 MIC 均值的 4 倍。

2.8 不同单离香料抑菌作用、杀菌作用显著性差异分析

不同单离香料的 MIC/MBC 值非参数检验 Friedman(F)检验比较均有显著性差异,MIC(卡方 = 58.802, $P < 0.05$),MBC(卡方 = 36.293, $P < 0.05$)。几种单离香料的 MIC 值经过 Bonferroni 校正后,水杨醛与百里香酚的抑菌作用显著优于其他香料($P < 0.05$);几种单离香料的 MBC 值经过 Bonferroni 校正后,百里香酚的杀菌作用显著优于芳樟醇、柠檬醛和丁香酚($P < 0.05$),水杨醛的杀菌作用显著优于丁香酚($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

目前学界认为植物精油及其单离成分抗菌机理是疏水性和分子小的精油穿过细胞膜和线粒体膜特殊的脂质结构使菌体结构破坏,导致(1)细胞壁结构的降解;(2)细胞膜损伤;(3)膜蛋白损伤;(4)胞内成分的外流;(5)细胞质成分凝固;(6)消耗质子流等,进而导致菌体死亡。上述列出的几种机制并不是都独立作用的,它们可能会相互影响,一种机制的反应也可能会受到另一种反应物或者生成物的影响^[7,8,12]。比较 2 种接触方式对常见食源致病菌的影响,单离香料抗菌能力会因与菌体作用的方式而异,芳樟醇、水杨醛、百里香酚的气相抗菌效果优于液体接触法,而丁香酚液体接触抗菌效果优异但气相抗菌效果不显著。不同单离香料与菌体的接触方式,对其抗菌机理的差异有待进一步研究。

有学者用直接接触法测定精油组分抗菌活性,抗菌效果排序如下:酚类(活性最高) > 肉桂醛 > 醇类 > 醛类 = 酮类 > 酯类 > 碳氢化合物类^[16]。Kn-bloch 等^[17]对植物芳香精油的抗菌性能的研究提出精油在水相中的溶解度与有效成份透过细胞壁进入菌体的能力直接相关,而抗菌能力则与抗菌剂在菌体细胞膜双磷脂层中溶解度有关的观点。本文结合溶解性和挥发性来讨论影响单离香料在这 2 种测试方法中抗菌活性:芳樟醇等 6 种供试单离香料均为亲脂性物质,直接接触法中单离香料需溶于水后嵌入脂肪酰基链之间进而改变膜脂质的组成,达到扰乱细胞膜结构影响其功能来达到抗菌效果。因此直接接触抗菌能力与单离香料的溶解性有关,溶解性越大,说明其亲水性越强,直接接触抗菌作用更明

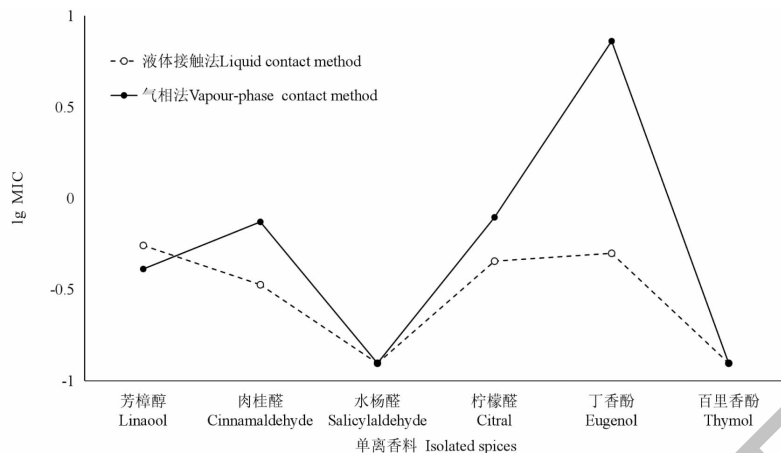


图1 接触方式对单离香料抑菌作用的影响

Fig. 1 The bacteriostasis effect of isolate spices on contact methods

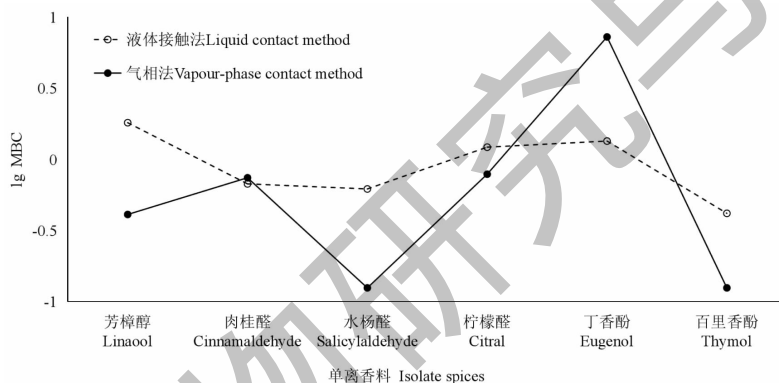


图2 接触方式对单离香料杀菌作用的影响

Fig. 2 The bactericidal effect of isolate spices on contact methods

表7 液体接触法中 MIC 值与 MBC 值的秩和检验

Table 7 Rank sum test of the influence of MIC value in different contact modes

秩和检验参数 Parameters of rank sum test	$M(P_{25}, P_{75})$	Z	P
MIC	0.25(0.125 ~ 0.5)	-5.172	<0.05
MBC	1.0(0.5 ~ 2.0)		

显。表8是www.chemspider.com检索的单离香料部分物化参数,从中可以看出酚类物质百里香酚的溶解度大于丁香酚,醛类物质中溶解度从大到小依次为水杨醛、肉桂醛、柠檬醛。这与本文液体接触抗菌效果完全吻合,酚类物质中百里香酚的抗菌作用大于丁香酚,醛类物质抗菌作用由强到弱依次为水杨醛、肉桂醛、柠檬醛。

气相抗菌是通过单离香料挥发到空间与培养基表面的菌体接触进而发挥抗菌作用,因此抗菌能力

还与气体挥发性及其在琼脂层的溶解度有关。如果单离香料挥发性强,相对亲水性弱,琼脂层对单离香料的吸收少,所形成的气相精油浓度大且稳定,气相抗菌效果较好;相反地单离香料挥发性弱,相对亲水性强,所形成的气相氛围浓度较低,气相抗菌效果较差。表7用蒸气压代表单离香料的挥发性,亲疏水性质以 $\log P$ (辛醇/水分配系数)表示,值越大,说明该物质越亲油,反之,则越亲水,即水溶性越好。从表7可以看出挥发性由强至弱:百里香酚 > 水杨醛

表 8 单离香料的物化参数

Table 8 Physical and chemical parameters of isolated components

物化参数 Physical and chemical parameters	芳樟醇 Linalool	肉桂醛 Cinnamaldehyde	水杨醛 Salicylaldehyde	柠檬醛 Citral	丁香酚 Eugenol	百里香酚 Thymol
溶解性 Water solubility (mg/L)	683.7	2 150	10 670	84.71	754	1 000
蒸气压 (mm Hg, 25 °C) Vapour pressure	0.083 2	0.033 7	0.222	0.091 7	0.009 48	0.40
油水分配系数 Log P Oil-water partition coefficient	2.468	1.968	5.449	2.701	2.223	3.281

注:数据来自 www.chemspider.com。

Note: Data comes from www.chemspider.com.

> 柠檬醛 > 芳樟醇 > 肉桂醛 > 丁香酚; 相对亲水性最强的是肉桂醛 > 丁香酚 > 芳樟醇 > 柠檬醛 > 百里香酚 > 水杨醛。这与本文试验结果吻合: 气相抗菌效果最佳为水杨醛、百里香酚 > 芳樟醇 > 肉桂醛 > 柠檬醛 > 丁香酚。酚类物质中百里香酚的挥发性比丁香酚强, 丁香酚的相对亲水性强于百里香酚, 因此百里香酚的效果远比丁香酚效果好; 醛类物质中, 挥发性强弱依次为水杨醛 > 柠檬醛 > 肉桂醛, 相对亲水性依次为肉桂醛 > 柠檬醛 > 水杨醛, 因此气相抗菌效果最佳的为水杨醛 > 柠檬醛 > 肉桂醛。Inouye^[18] 在研究植物精油及其单离成分气相抗菌活性时发现: 抗菌活性与琼脂层对挥发性物质的吸收、其亲水性、挥发性和稳定性有关。López 等^[13,19] 也发现类似的发现, 在琼脂稀释法中肉桂和丁香油对大肠杆菌的抑制作用相似。但气相熏蒸试验肉桂油的抑菌作用比丁香油强, 琼脂稀释法抑菌活性的大小取决于融入到琼脂中的精油化合物的扩散性和溶解度, 而气相抗菌则与挥发性物质(包括亲水性和亲脂性物质)在空间与被琼脂层吸收的部分水溶性物质之间的平衡有关。

利用植物精油及单离香料的抗菌性能开发新型抗菌剂, 有利于林业产品的高值化利用, 开发应用时需根据各种使用状态的全面评估抗菌性能, 根据使用状态选择合适的植物精油/单离香料。目前大部分植物精油及单离香料的抗菌研究仅从直接接触方面考虑, 如果将直接接触法的抗菌结果应用在空间消毒, 结果会相去甚远。利用植物精油及单离香料的气相抗菌作用开发食品气调保藏、空气杀菌剂具有广阔的前景。本文的实验结果将为开发单离香料天然气态抗菌剂奠定研究基础。

参考文献

1 Bhanu P, Akash K, Prashant K, et al. Plant essential oils as

food preservatives to control moulds mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-potentials and challenges [J]. *Food Control*, 2015, 47: 381-391.

2 Hassani A, Fathi Z, Ghosta Y, et al. Evaluation of plant essential oils for control of postharvest brown and gray mold rots on apricot [J]. *J Food Saf*, 2012, 32(1): 94-101.

3 Lopez P, Sanchez C, Batlle R, et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53: 6939-6946.

4 Huang MX, Zhao WH, Bai WD, et al. Research progress of antibacterial effect of several kinds of spices [J]. *China Condiment (中国调味品)*, 2015, 40(7): 138-140.

5 Sun JW, Han S, Liu YP, et al. Research on the antibacterial activity of phenol flavor compounds [J]. *J China Inst Food Sci Technol (中国食品学报)*, 2017, 17(12): 243-250.

6 Wu KG, Ma HJ, Wei H, et al. The antibacterial effect of cinnamaldehyde and its mixtures with other isolate flavors against foodborne harmful microorganisms [J]. *Mod Food Sci Technol (现代食品科技)*, 2017, 33(7): 1-8.

7 Zhang YB, Liu XY, Jiang PP, et al. Mechanism and antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Mod Food Sci Technol (现代食品科技)*, 2015, 31(5): 31-35.

8 Lin YH. Mechanisms of vapor-phase antibacterial action of essential oil from *Cinnamomum camphora* var. *linaloofera* Fujita [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology (广东工业大学), 2012.

9 Sun JW, Gao TT, Li YM, et al. Research on the antibacterial activity of aromatic aldehyde flavor compounds against four kinds of bacteria [J]. *Food Ferment Ind (食品与发酵工业)*, 2015, 41(9): 57-62.

10 Wang X, Liang XJ, Gao M, et al. Analysis of chemical constituents and antimicrobial activity of essential oils in three species from May Chang tree [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 31: 1847-1856.

- 11 Lu SM, Chen ZL, Chen JX, et al. Study on antibacterial activity of eugenol *in vitro* [J]. Food Sci (食品科学), 2008, 29 (9): 122-124.
- 12 Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(1): 110-115.
- 13 Goni P, Lopez P, Sanchez C, et al. Antimicrobial activity in the vapour phase of combination of cinnamon and clove essential oils [J]. Food Chem, 2009, 116: 982-989.
- 14 Chen LY, Wang C. Analysis of chemical composition of thymus essential oil and its antibacterial activity [J]. Heilongjiang Med J (黑龙江医药), 2009, 22: 636-637.
- 15 Kim SA, Rhee MS. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, b-resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O₁₅₇: H₇ [J]. Food Control, 2016, 60: 447-454.
- 16 Murbach TA, Bruna F, Nunes B, et al. Antimicrobial activity of essential oils [J]. J Essent Oil Res, 2014, 36(11): 34-40.
- 17 Knobloch K, Pauli A, Iberl B, et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components [J]. J Essent Oil Res, 1989, 1(3): 119-128.
- 18 Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact [J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 47: 565-573.
- 19 Patricia L, Cristina S, Ramon B, et al. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms [J]. J Agr Food Chem, 2007, 55: 4348-4356.

计算预测天然产物生物合成

植物天然产物 (Plant natural products, PNP) 及其衍生物是重要的但未被充分开发的药物分子来源。为了利用这种未开发的潜力,在工程微生物中重组植物天然产物及其衍生物生物合成途径可以用于探索和产生新的 PNP 衍生物。

2021年3月19日 Nature Communications 报道,斯坦福大学研究者开发了一个计算 workflow,用于系统地筛选生物分子合成的衍生途径,该 workflow 在预测代谢工程中的反应、途径和酶上具有很高的价值。

研究人员将此 workflow 应用在了诺沙平 (noscapine) 以及衍生分子的合成途径的挖掘和测试之中。诺沙平是一种具有悠久药用历史的苄基异喹啉生物碱 (benzylisoquinoline alkaloid, BIA)。该计算 workflow 确定了生产 (S)-四氢巴马汀 ((S)-tetrahydropalmatine 一种已知的镇痛剂和抗焦虑剂) 和另外三种衍生物的途径和候选酶。接着,研究者在酵母中构建了这些化合物的合成途径,为 BIA 衍生物的新生物合成提供了平台,并展示了化学信息学工具在合成生物学和代谢工程中预测反应、途径和酶的价值。

吴晓燕编译自: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-22022-5>

原文标题: A computational workflow for the expansion of heterologous biosynthetic pathways to natural product derivatives.

原文链接: <https://www.pnas.org/content/118/6/e2019988118>