

天然植物型抑菌剂的配制及抗菌性能评价

Preparation and antimicrobial activity evaluation of natural herbal bacteriostatic agent

崔海英 周慧 张雪婧 赵呈婷 李伟 林琳

CUI Hai-ying ZHOU Hui ZHANG Xue-jing ZHAO Cheng-ting LI Wei LIN Lin

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013)

(School of Food & Biological Engineering of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

摘要:对豆蔻、肉桂、百里香、意大利蜡菊、贯叶连翘、甘草和迷迭香 7 种香辛料用无水乙醇进行提取,并测定各种提取液对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。结果表明,豆蔻提取液的 MIC 大于 0.5%(V/V),肉桂提取液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.2%(V/V),其余香辛料提取液的 MIC 均为 0.5%(V/V)。根据各种香辛料提取液的 MIC,选择除豆蔻以外的 6 种香辛料作为原材料配制一种天然植物型抑菌剂,其抗菌性能评价试验表明,所配制的天然植物型抑菌剂对 6 种参试菌均具有显著的抑菌效果,其抑菌率达到 99.99%。在对草莓的保鲜试验中,天然植物型抑菌剂显示了较好的保鲜效果,它能有效地将草莓的保鲜期从 7 d 之内延长至 10 d。

关键词:香辛料;植物型抑菌剂;抗菌

Abstract: The active substance was extracted from seven kinds of spices: nutmeg, cinnamon, thyme, *Helichrysum italicum*, *Hypericum perforatum*, licorice and rosemary, by use of ethanol. Then determined the minimal inhibitory concentration (MIC) of different extracts against 4 pathogenic bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium*. The result suggests that, the MIC of nutmeg extraction was above 0.5% (V/V). The MIC of cinnamon extraction against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* were both 0.2% (V/V), and the other MIC of different extraction were all 0.5% (V/V). According

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31301573);江苏省自然科学基金项目(编号:BK20130493);教育部留学回国人员科研基金;中国博士后基金(编号:12M511223);江苏省教育厅高校自然科学基金(编号:12KJB550002);江苏大学高级人才引进启动基金(编号:11JDG050)

作者简介:崔海英(1979—),女,江苏大学副教授,博士。

E-mail:cuihaiying@ujs.edu.cn

通讯作者:林琳

收稿日期:2014-12-21

to the MIC results, this experiment chosen the other six kinds of spices except nutmeg as the raw material to prepare a kind of natural herbal bacteriostatic agent, and the antibacterial performance was evaluated. The experimental results indicated that, this natural herbal bacteriostatic agent had significant bactericidal effect against six experimental bacteria and the sterilization rate reached 99.99%. In strawberries preservation, this natural herbal bacteriostatic agent showed a better effect, and extending shelf life from 7 days to 10 days.

Keywords: spices; natural herbal bacteriostatic agent; antibacterial

近年来,人们对于绿色安全越来越关注,对新型植物源或动物源性质的杀菌抗菌物质的研究也愈加重视^[1]。植物型抗菌剂因其毒副作用小而越来越受到喜爱。利用植物提取抗菌材料,并添加到食品或化妆品中,可以在抗菌的同时确保它们的安全性^[2]。植物源天然香辛料,具有香、辛、麻、辣、苦、甜等滋味,它不仅能赋予食品独特的风味,还能够提高和改善食品的风味,抑制和矫正食品中不良的气味,突出食品典型风味特征,使食品风味协调^[3]。天然香辛料的杀菌防腐功能很早就已经被人发现并加以利用,因此香辛料越来越受到人们更加广泛的喜爱。国内外对香辛料的研究由来已久,日本^[4]曾研究将芥子精油加入塑料制成食品包装材料,用于替代化学防腐剂保存食品。江旺等^[5]研究了香辛料精油对油料花生气相防腐的作用。丛健民等^[6]研究了香辛料提取物对草莓的保鲜研究。张璟晶^[7]研究了天然香辛料的抑菌作用以及对冰鲜银鲱的保鲜效果。目前对香辛料提取物抗菌性的研究多集中在单个提取物抑菌性的研究,对多种提取物复配的抑菌性的研究还不多见^[8]。本试验拟利用多种具有抗菌性能的天然香辛料植物提取液来配制天然植物型抑菌剂,并对其在草莓上的保鲜作用进行研究。此类抑菌剂是由纯天然的香辛料植物提取液配制而成,可直接作用于物品、食品甚至人体,可为人们的日常生活中提供自然、健

康、无害、有效的抑菌与保鲜制剂^[9]。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 植物原料

甘草:迷迭香购于奥森中药材有限公司;
豆蔻、肉桂、百里香、意大利蜡菊、贯叶连翘:市售。

1.1.2 参试菌种及培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli* IFO 3301)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 30179)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Enteritidis* B11)、副溶血性弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumonia* ATCC 13883)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus cereus* IFO 3457);江苏大学医学院;

普通营养琼脂培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸膏 5 g/L,氯化钠 5 g/L,琼脂粉 20 g/L;

普通营养肉汤培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸膏 5 g/L,氯化钠 5 g/L。

1.1.3 主要仪器设备

高压蒸汽灭菌锅:MLS-3020 型,鸟取三洋电机(广州)有限公司;

生化培养箱:LRH-250 型,上海恒一科技有限公司;

水浴恒温振荡器:SHA-B 型,江苏金坛市中大仪器厂;

全温空气摇床:QYC-200 型,上海福玛试验设备有限公司;

高分辨透射电子显微镜:JEM-2100(HR)型,日本电子株式会社;

热场发射扫描电子显微镜:JSM-7001F 型,日本电子株式会社。

1.2 植物提取液的配制

称取百里香、甘草、肉桂等 7 种参试香辛料各 10 g 分别置于容积相同的不同广口瓶中,分别加入 90 mL 无水乙醇。将广口瓶密封后置于水浴恒温振荡器中 35 ℃ 水浴振荡 48 h,过滤、离心、蒸发得到纯植物提取液^[10]。贴上标签备用。

1.3 植物提取液最小抑菌浓度的测定

吸取不同浓度的植物提取液于各个无菌平板中,分别与热的培养基(46~48 ℃)混合均匀,得到 7 种含有体积浓度分别为 0.1%,0.2%,0.5%的植物提取液的无菌平板。待凝固后在各个平板上用划线法均匀地在 4 个不同区域分别接 4 种参试菌:大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,鼠伤寒沙门氏菌和副溶血性弧菌。在 37 ℃ 的恒温培养箱中倒置培养 48 h 后,根据培养基上划线处是否有明显的细菌生长的痕迹来判断各种植物提取液的 MIC 值。含最低浓度香辛料提取液并且无菌生长者,便为该香辛料对该参试菌的 MIC^[11]。

1.4 天然植物型抑菌剂的配制

本试验根据各个香辛料所测得的 MIC 选择了除了豆蔻的其余 6 种具有较好抑菌效果的香辛料提取液进行了抑菌

剂的配制。配料及配料比参考专利:一种天然植物提取物的混合物及其制备方法和应用^[12]。分别将体积浓度为 0.01% 的 6 种香辛料乙醇提取液,0.1% 的柠檬酸,0.05% 的柠檬酸钠,0.005% 的 EDTA,以及 15% 的乙醇加入无菌水中,摇匀,贴上标签备用。

1.5 天然植物型抑菌剂对 6 种致病菌的抗菌性能评价

在 6 支空试管里各加入 10 mL 天然植物型抑菌剂,再分别加入经前培养的 6 种参试菌,使菌液浓度为 10⁶ CUF/mL 和 10⁷ CFU/mL。另取 6 支分别加入 10 mL 磷酸盐缓冲液[Phosphate-Buffered Saline, PBS, 0.03 mol/L, pH(7.2~7.4)]的试管,同样加入经前培养的上述 6 种参试菌,作为对照^[13]。在恒温培养摇床中,35 ℃ 振荡培养,同时分别在 0,0.5,1,2,4,8,12,24 h 时对各试管中活菌数进行测定。

1.6 天然植物型抑菌剂的机理分析

分别取经天然植物型抑菌剂作用前后的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌样品进行透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)和扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)样品制备,分别进行电镜观察^[14,15]。

1.7 天然植物型抑菌剂对草莓的保鲜效果分析

分别将表观较一致的草莓放入 4 只保鲜盒中,其中两盒喷洒配制的天然植物型抑菌剂,另两盒喷洒无菌水蒸馏水作对照。将 1 盒对照组草莓和 1 盒试验组草莓放入 25 ℃ 恒温培养箱中。另外 1 盒对照组草莓和 1 盒试验组草莓放入 4 ℃ 的冰箱中冷藏。每天观察试验组和对照组的区别^[16,17]。

2 结果分析

2.1 植物提取液 MIC 的测定

7 种植物提取液对 4 种参试菌的 MIC 结果如表 1 所示。百里香、迷迭香、甘草、意大利蜡菊、贯叶连翘 5 种提取液对 4 种致病菌有明显的抑菌效果, MIC 均为 0.5%。肉桂提取液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.2%,有较好的抑菌效果。而豆蔻的植物提取液的 MIC 均大于 0.5%,抑菌作用并不明显。

表 1 7 种植物提取液的 MIC

Table 1 The MIC of the seven spices %

植物名	大肠杆菌	副溶血弧菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌
百里香	0.5	0.5	0.5	0.5
肉桂	0.2	0.5	0.2	0.5
迷迭香	0.5	0.5	0.5	0.5
甘草	0.5	0.5	0.5	0.5
意大利蜡菊	0.5	0.5	0.5	0.5
贯叶连翘	0.5	0.5	0.5	0.5
豆蔻	>0.5	>0.5	>0.5	>0.5

2.2 天然植物型抑菌剂对 6 种致病菌的抗菌性能评价

由图 1 可知,所配制的天然植物型抑菌剂对 6 种致病菌均有明显的杀菌作用。但相对而言,对金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌和铜绿假单胞菌的抑菌效果更明显。根据试验结果可知,天然植物型抑菌剂对 6 种致病菌都具有显著的抑菌效果,其杀菌率达到 99.99%。

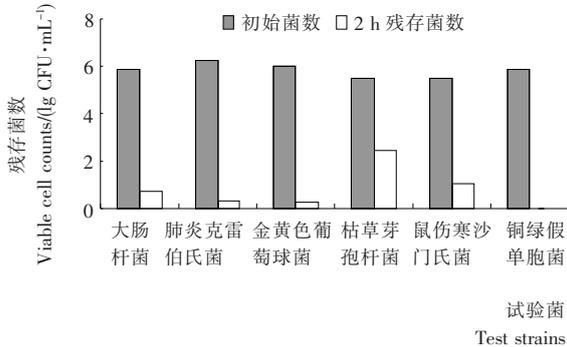


图 1 天然植物抑菌剂对 6 种致病菌的抑菌效果

Figure 1 The viable cell counts after the disinfectant treatment

2.3 天然植物型抑菌剂的机理分析

由图 2、3 可知,健康的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的细菌形态完整,细菌群落结构清晰,单个的细菌长势饱满。但是经过天然植物型抑菌剂处理的细菌其细胞膜被攻破,细菌结构散乱,细胞质流出,组织变质。从透射电镜图和扫描电镜图可以看出:天然植物型抑菌剂中的抑菌物质可以破坏细菌细胞的细胞膜,破坏细胞形态,使细胞内物质流出,最终导致细胞完全破裂。

2.4 天然植物型抑菌剂对草莓的保鲜效果

草莓在常温下保存 7 d 时,对照组草莓有明显的菌落出现,并且有汁液流出,草莓有明显的褐变腐烂现象。而喷洒了天然植物型抑菌剂的试验组草莓的颜色、气味未发生大的

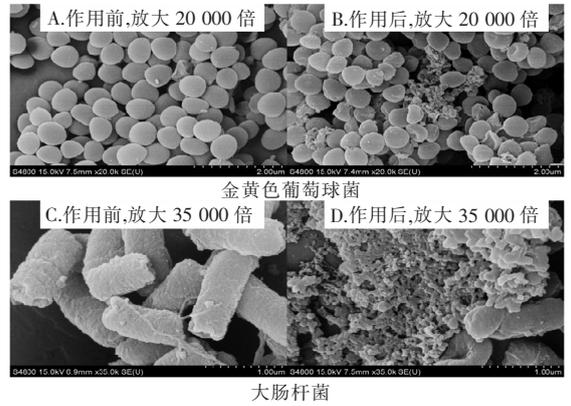


图 3 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在天然植物型抑菌剂作用前后的 SEM 图

Figure 3 SEM images of *S. aureus* and *E. coli* before or after disinfectant treatment

改变。草莓在常温下保存 10 d 时,对照组草莓已经严重腐烂,看不出原型,并且有难闻的气味。而喷洒了天然植物型抑菌剂的试验组草莓并无明显的菌落产生,也没有腐烂的迹象,仅有稍微的褐变现象。草莓在 4 °C 冷藏的条件下时,喷洒了抑菌剂的试验组草莓在第 10 天时才有了一点褐变的现象,但无菌落产生,也没有发生腐烂。而对照组草莓第 5 天就有了菌落的出现和气味的改变。第 10 天时,对照组草莓出现明显的褐变,有难闻的气味,并且有汁液流出。通过对照可知,所配制的天然植物型抑菌剂能抑制细菌的生长,起到了防腐保鲜的作用,延长了草莓的保鲜时间。

3 结论

本试验对豆蔻、肉桂、百里香、意大利蜡菊、贯叶连翘、甘草和迷迭香等 7 种香辛料进行了无水乙醇提取,并对各种香辛料的提取液进行了 MIC 的测定。根据测定的 MIC 挑选出了除豆蔻外的 6 种抗菌性能相对较好的香辛料,以这 6 种香辛料提取液为原材料根据配方配制了天然植物型抑菌剂,并对所配制的抑菌剂进行了抗菌性能评价,同时还对天然植物型抑菌剂的机理进行了分析。从试验结果可知,豆蔻的 MIC 大于 0.5%,肉桂提取液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.2%,对鼠伤寒沙门氏菌和副溶血性弧菌的 MIC 为 0.5%。其余 5 种香辛料提取液对 4 种致病菌的 MIC 均为 0.5%。由此可以明显看到,除了豆蔻外,其余 6 种香辛料均具有较好的抑菌效果。配制的天然植物型抑菌剂,对 6 种致病菌均有明显的抑菌效果,抑菌率可达到 99.99%。从透射电镜和扫描电镜图中可以看出,配制的抑菌剂可以破坏病原菌的细胞膜,使细胞内物质流出,从而导致细胞死亡。最后,在天然植物型抑菌剂对草莓的保鲜试验中,天然植物型抑菌剂能有效地延长草莓的保鲜时间,在第 10 天,喷洒了天然植物型抑菌剂的草莓才出现了质地的变化。本试验证明了以香辛料提取液为原料所配制的抑菌剂有较好抗菌性能,与此

(下转第 242 页)

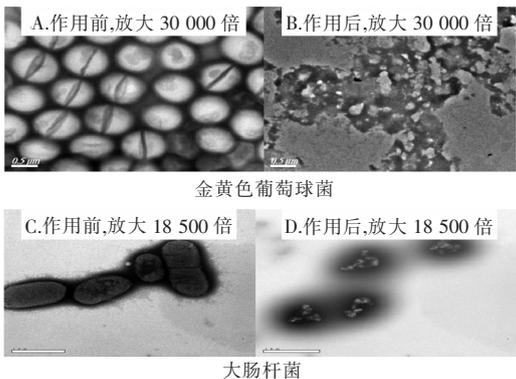


图 2 金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在天然植物型抑菌剂作用前后的 TEM 图

Figure 2 TEM images of *S. aureus* and *E. coli* before or after disinfectant treatment

4 h, 酶解温度 50.93 °C, 预期达到的水解度为 23.76%。考虑实际生产情况, 最佳酶解条件修正为酶与底物比 7.8%, 酶解时间 4 h, 酶解温度 50 °C。按照确定的最佳酶解条件进行酶解验证实验 ($n = 3$), 所得的实际水解度为 (24.81 ± 1.72)%, 说明所建立的试验模型能够真实反映三因素对于复合蛋白酶酶解方格星虫蛋白的影响, 该酶解工艺可靠稳定。

3 结论

本研究通过单因素试验和响应面分析法, 考察了酶与底物比、酶解时间和酶解温度 3 个对方格星虫蛋白水解的影响, 经过优化得到最佳酶解条件, 采用复合蛋白酶酶解, 酶与底物比为 7.8%, 酶解时间为 4 h, 酶解温度为 50 °C。在此条件下, 水解度达到 24.81%, 说明该工艺稳定可靠, 对实际生产具有指导意义。大量研究^[10-12]表明, 生物活性肽是以非活性状态存在于蛋白质中, 通过适当的酶解作用, 可以将潜在形式存在于蛋白质的活性肽释放出来, 从而得到具有特殊生物学功能的活性肽。因此本研究可为后续方格星虫蛋白的开发和利用提供理论依据, 同时方格星虫蛋白酶解产物的生物活性有待于今后进一步的研究。

参考文献

- 1 陈细香, 林秀雁, 卢昌义, 等. 方格星虫属动物的研究进展[J]. 海洋科学, 2008, 32(6): 66~69.
- 2 Liu Xin, Zhang Mian-song, Zhang Chao, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema*

- esculentum*[J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2134~2140.
- 3 Sudhakar S, Nazeer R A. Structural characterization of an Indian squid antioxidant peptide and its protective effect against cellular reactive oxygen species [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 502~512.
- 4 Pompilio A, Scocchi M, Pomponio S, et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients [J]. Peptides, 2011, 32(9): 1807~1814.
- 5 朱银玲, 李思东, 方富永. 方格星虫多肽的酶解法制备工艺优化与抗氧化作用研究[J]. 化学通报, 2012, 75(7): 642~647.
- 6 张桂和, 赵谋明, 巫光宏. 方格星虫酶解物成分分析及其抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 80~84.
- 7 董兰芳, 张琴, 童童, 等. 方格星虫多糖抗菌和抗氧化活性研究[J]. 广西科学, 2013, 20(4): 289~293.
- 8 朱银玲, 刘华忠, 李思东, 等. 酶解法制备方格形成多肽及其抗氧化作用研究[J]. 化学研究与应用, 2012, 24(9): 1397~1401.
- 9 Cian R E, Martínez-Augustin O, Drago S R. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein by-products of *Porphyra columbina*[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 364~372.
- 10 任婷婷, 董秀萍, 朱薇薇, 等. 响应面法优化海参胶原蛋白肽的制备条件[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 120~123.
- 11 徐向英, 王岸娜, 林伟静, 等. 响应面法优化燕麦全粉中蛋白质提取工艺[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 96~99.
- 12 刘新, 张绵松, 孟秀梅, 等. 海蜇 ACE 抑制肽水解用酶的筛选[J]. 食品工业, 2012, 33(3): 64~66.

(上接第 198 页)

同时还能发挥纯天然, 安全又绿色的优势, 在食品保鲜领域拥有着广阔的前景。

参考文献

- 1 鲁晓晴, 王莎莎, 邱真真, 等. 一种新型复方中草药消毒剂的性能研究[J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(10): 907~909.
- 2 戴聪杰, 林培庆. 白花败酱草乙醇提取液的抑菌作用及其稳定性研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 157~159.
- 3 郭红珍, 杜鹃, 史振霞, 等. 几种常见香辛料的抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(17): 10273~10274.
- 4 陈树生. 香辛料防腐剂的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(12): 3.
- 5 江旺, 刘晓丽, 于泓鹏, 等. 香辛料精油对油料花生气相防霉作用研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 164~167.
- 6 丛建民, 郝成欣. 香辛料提取物保鲜草莓研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 106~108.
- 7 张璟晶. 天然香辛料的抑菌作用及对冰鲜银鲑的保鲜效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 303~306.
- 8 钱昆, 周涛. 植物香辛料复配抑菌效果的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 93~95.

- 9 夏秀芳, 孔保华, 于长青. 几种天然香辛料提取物延长冷却肉货架期的研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(3): 55~59.
- 10 李妍, 苏倩清. 巴戟天水提取物油脂抗氧化性和抗菌活性研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(1): 93~95.
- 11 李巍. 香辛料提取物抑菌效果的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2012(3): 142~143.
- 12 崔海英. 一种天然植物提取物的混合物及其制备方法和应用: 中国, 201210451815.2[P]. 2013-02-20.
- 13 Adisakwattana S, Lerdsuwankij O, Poputtachai, et al. Inhibitory activity of cinnamon bark species and their combination effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2011(66): 143~148.
- 14 张赞彬, 郭媛. 香辛料精油抑菌机理研究进展及其在食品保藏中的应用[J]. 中国调味品, 2011, 36(7): 4~10.
- 15 郭媛. 八角茴香精油的抗菌机理研究及其在冷却肉保鲜中的应用[D]. 上海: 上海应用技术学院, 2012.
- 16 王振强, 申森. 利用纳豆菌提取抗菌物质的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 90~92.
- 17 文洁, 李婕, 曹维. 天然茶树油消毒剂抗菌活性与应用前景[J]. 中药材, 2011, 34(3): 487~489.