

百里香提取物抑菌特性的研究

樊明涛¹ 陈锦屏²

(¹ 江苏理工大学生物学院 镇江 212013)

(² 陕西师范大学生命科学院 西安 710061)

摘 要:以百里香水和酒精提取物及百里香芳香油作为抑菌剂进行抑菌试验,结果表明,所用抑菌物对供试菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)均有不同程度的抑制作用,可望将其用于食品工业作为防腐和抑菌剂。

关键词:百里香, 提取物, 抑菌

中图分类号:Q949.9 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 04-0499-06

百里香是国际标准化组织(International Standard Organization, ISO)1970 年就公布并被世界许多国家承认的香辛料之一^[1],广泛分布于非洲北部、欧洲及亚洲温带,全世界百里香属植物大约有 300~400 种,我国有 12 种,分布于陕西、甘肃、山西、内蒙古、辽宁等地区,生长在海拔 1000~2500m 的山地、河水两岸草丛或沙滩,可药用及提取芳香油,民间用作香料,具有温中散寒、驱风止痛、止咳化痰、利尿通经、健胃发汗、和胃止呕等作用,外用能防腐、杀虫、治疗脚癣等疾病^[2]。我国甘肃广大地区人民常将百里香当作茶叶一样饮用,对治疗痢疾有特效,陕北人民常将百里香草和羊肉一起炖,可除去羊肉膻味,使羊肉香味更加鲜美。欧洲许多国家都把百里香作为调配混合香辛料的重要原料之一,如咖喱粉、炸猪排沙司、汉堡包肉饼、软罐头用白沙司、西式牛肉清汤等都应用百里香,然而对其抑菌特性的研究报道甚少,对其开发利用也没有受到应有的重视,致使这一资源不能为地方经济的发展作出应有的贡献。本文作了这方面的研究工作,现予报道,以期能为这一资源的开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究材料

百里香于 1997~1998 年采于甘肃省镇原县,标本经鉴定为 *Thymus monoglossus* Romm。材料于盛花期下午 5~6 时采集,洗净泥土沥干水后阴干,塑料袋密封保藏。百里香芳香油采用水蒸汽蒸馏方法提取,无水硫酸钠脱水。水和酒精提取物的制备过程为:一定量的百里香原料适当粉碎,分别加入 10 倍蒸馏水或 90% 酒精,在不断搅拌下浸提 24h,过滤,浓缩到原体积的 1/2 即为百里香提取物。供试菌种为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)。

作者简介:樊明涛(1963-),男,陕西富平人,西北农林科技大学副教授,现在江苏理工大学食品科学与工程博士后流动站从事博士后研究工作,研究方向为食品微生物。

收稿日期:2000-09-04, **修回日期:**2001-03-28

1.2 研究方法

1.2.1 菌种培养及抑菌试验:供试菌先经过肉汤琼脂培养基斜面接种、稀释,使稀释菌液的浓度约为 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL。

液体培养:制备葡萄糖肉汤培养基,分装于 250mL 锥形瓶中,每瓶 100mL,常压灭菌后加入要求的抑菌剂(见结果部分),然后接种制备好的菌种液 1mL,于 30℃ 恒温培养 24h 后,在 721 型分光光度计 610nm 测定各处理液的吸光度,计算细菌的相对生长率。

固体培养:在营养琼脂或化学合成培养基上用涂抹法接种上述菌悬液,置于 37℃ 下恒温培养 48h 后,计数各皿菌落数,计算细菌相对生长率。同时用抑菌圈法进行抑菌试验^[4]。

1.2.2 细菌脲酶活性测定:将生长于琼脂平板上的细菌一定量溶于 40mmol/L 的磷酸盐缓冲液中,充分振荡,使细菌细胞充分分散,过滤除掉琼脂,得到菌悬液,将其分为两部分,一部分用超声波处理 2min(4℃),然后在 9000g 下离心 5min 得上清液即为粗酶提液,另一部分作为细菌全细胞用。用 Lowry 法测定这两部分的蛋白质含量^[5]。

A:吸光度法^[6],在 25℃ 下向小烧杯中按次序加入 3mmol/L pH6.8 的磷酸缓冲液 2.5mL,7μg/mL 的酚红溶液 0.1mL,0.4mmol/L 的脲素溶液 0.3mL 及按要求加入抑菌剂,最后加入待测菌悬液 0.1mL,倒入比色杯中,在 560nm 下测定此溶液的吸光度。**B:pH 值变化法^[7],**向一个试管中依次加入 3mmol/L pH6.8 的磷酸缓冲液 2.0mL,7μg/mL 的酚红溶液 0.1mL,0.4mmol/L 的脲素溶液 0.4mL 及待测的抑菌剂,最后加入菌悬液 50~100μL,测定溶液的 pH,作为初始 pH,每隔 10min,测定其 pH 值,脲酶活性以下式计算:脲酶活性 = (各处理及对照定时测定的 pH—各自初始 pH)/(对照液终了时的 pH—对照液初始 pH) × 100 **C: NH₄⁺ 测定法,**利用文献^[8]并做一些修改,具体过程为:取大小试管各一个,直径分别为 3cm 和 1cm,小管高度是大管的 1/3~1/4,大管进行脲酶反应,小管装硼酸溶液吸收释放出的 NH₃。向大管依次加入 3mmol/L pH6.8 的磷酸缓冲液 2mL,0.4mmol/L 的脲素液 0.4mL。向小管加入 2% 硼酸 2mL,然后将小管放入大管中,注意勿使两管溶液混合。再向大试管加入要求的抑菌剂和 0.2mL 菌悬液,摇匀,用皮塞将大试管塞紧,勿使漏气,在 37℃ 恒温水浴中保温到所需时间(各试剂预先保温到 37℃),立即用注射器向大试管加入 20% NaOH 1mL 终止反应并赶出 NH₃,继续保温足够长的时间,让硼酸充分吸收 NH₃,取出小试管,测定 NH₄⁺ 含量。

2 结果和分析

2.1 百里香的水、酒精提取物的抑菌作用

百里香的水、酒精提取物对三种菌均有一定的抑制作用(表 1),两种提取物的抑菌能力没有本质差异,抑菌作用大小主要取决于所用提取物的浓度。相同抑菌物浓度时,液体培养条件下的抑菌能力要比固体培养时的抑菌能力大。2% 的提取物的抑菌能力比 0.1% 苯甲酸钠的抑菌能力还要稍强一些,从表 1 还可知,两种提取物对金黄色葡萄球菌的抑制能力要比另外两种菌的抑制能力大一些。

表 1 百里香水、酒精提取物对细菌的抑制作用

Table 1 The inhibition of water and alcohol thyme extracts on bacterium

Extract concentration/%	Radius of inhibition cycle/mm		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Water extract			
2	23	18	19
1	14	10	9
0.5	11	8	7
Alcohol extract			
2	22	18	20
1	13	11	10
0.5	11	9	16
0.1% Benzoic acid	18	16	16

为了避免抑菌圈法时抑菌物浓度不同对扩散的影响,特将水提取物直接加到培养基中制成含抑菌浓度 1~6mg/mL 浓度梯度并进行细菌培养,以蒸馏水为对照,结果见图 1。从图上可以看出,随着抑菌物浓度的增加,细菌的生长迅速受到抑制。当水提物的浓度为 1mg/mL,固体培养细菌能很好地生长,和对照的生长率几乎相同,而液体培养时,细菌生长率只有对照的 80%,继续提高抑菌物的浓度到 5mg/mL 时,液体培养条件下,细菌则完全不能生长,固体培养时细菌生长也只有对照的 6%。比较两种培养方式发现,液体培养时,百里香的水提物的抑菌作用更强,细菌生长差,这可能是液体条件下更有利于抑菌物向细菌细胞渗透,易于和膜蛋白质等相互结合,破坏了蛋白质空间结构的完整性,细菌细胞质膜的生理功能发生紊乱,因而生长受到影响。

2.2 水提取物对细菌脲酶活性的影响

培养基中添加抑菌物时,细菌从外观上表现为生长缓慢,菌数下降,在生理指标上也有了较大的变化,其中脲酶活性是一项重要生理指标。百里香水提物对细菌脲酶活性的影响分别见图 2、3。图 2 为吸光度法所得结果,由图上可知,对照组在开始测定后,脲酶活性迅速上升,吸光度几乎与时间成直线关系,反应进行 30min,560nm 的吸光度达到峰值(0.78),以后随着时间的延长,该值基本保持不变。添加百里香水提物 1mg/mL 时,对细菌脲酶活性有一定的影响,在最初 20min 内,脲酶上升比对照慢,在 20~35min 这段时间内,脲酶活性上升较快,但峰值比对照低。当抑菌物的浓度达到 3mg/mL,对细菌的生长有显

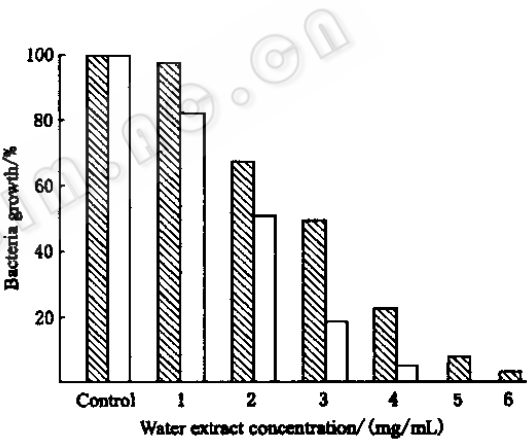


图 1 百里香的水提物对葡萄球菌的抑制作用
Fig.1 The inhibitory action of thyme extract on *S. aureus*
■ Solid; □ liquid.

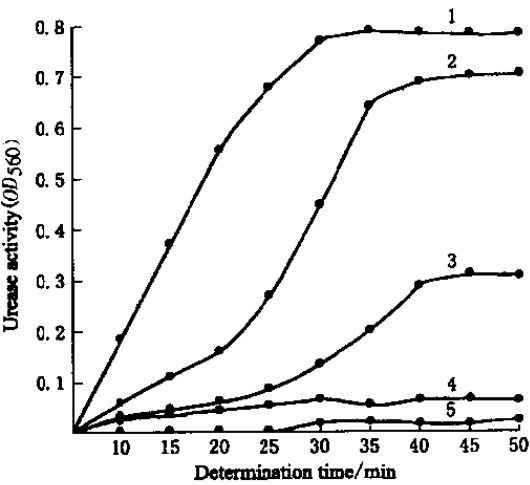


图2 百里香的水提取物对芽孢杆菌脲酶活性的影响

Fig.2 The effect of thyme water extract on urease activity of *Bacillus subtilis*
1. Control; 2. 1mg/mL; 3. 3mg/mL; 4. 4mg/mL; 5. 5mg/mL.

较著,这可能是因为酶提取过程中,由于受到外界因素的影响,部分酶变性或失活的缘故,另外抑制剂对酶活性有较强的抑制作用,使两种方法获得的酶活性没有本质的区别。

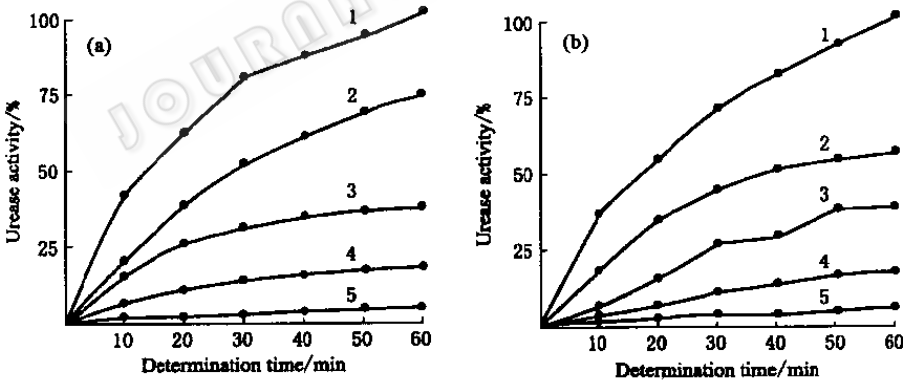


图3 百里香的水提取物对芽孢杆菌脲酶活性的影响
Fig.3 Urease activity inhibition by different concentration of thyme water extract on of *Bacillus subtilis*

a. Whole cell: 1. Control; 2. 1mg/mL; 3. 3mg/mL; 4. 4mg/mL; 5. 5mg/mL;
b. Crude urease extract: 1. Control; 2. 1mg/mL; 3. 3mg/mL; 4. 4mg/mL; 5. 5mg/mL.

2.3 百里香芳香油、百里香酚和香芹酚对细菌的抑制作用

用百里香芳香油、百里香酚和香芹酚作抑菌剂时,可获得类似于水提取物抑菌的结果,图4、图5为用pH变化法获得的脲酶活性结果,从图中可以看出,随着添加抑菌物浓度的增加,细菌脲酶活性迅速下降,当添加百里香酚的浓度为50μg/mL,反应终了时的脲

著的抑制作用,继续增加抑菌物的浓度到4mg/mL,细菌几乎不能生长,吸光度随着时间的延长始终维持在一个很低水平。

图3为用NH₄⁺法测定的结果,以一定时间内每mg酶蛋白水解液释放的NH₄⁺mmol量表示脲酶活性的高低,总的趋势是随着水提物浓度的提高,细菌脲酶活性下降,单位时间内释放的NH₄⁺的量减少。对照在最初30min内(全细胞法),脲酶活性上升很快,以后逐渐趋于恒定,各处理组脲酶活性明显受到抑制,比对照释放的NH₄⁺的量要少得多。比较图3a、3b发现,对照组用全细胞法获得的脲酶最高值为0.71mmolNH₄⁺/mg酶蛋白,而用粗酶提取液获得的脲酶活性最高值为0.60mmolNH₄⁺/mg酶蛋白,但各处理之间用全细胞法和脲酶粗提液法获得的脲酶活性差异

酶活性约相当于对照的 74%, 继续增加百里香酚的浓度到 $100\mu\text{g/mL}$, 脲酶活性只有对照的 26%, 进一步提高百里香酚的浓度, 脲酶活性继续下降, 百里香芳香油和香芹酚也有类似的效果, 但相同浓度时, 百里香酚的抑菌作用最强。当百里香芳香油、百里香酚和香芹酚的添加浓度分别为 $300\mu\text{g/mL}$ 、 $200\mu\text{g/mL}$ 、 $250\mu\text{g/mL}$ 时, 细菌的脲酶活性几乎全被抑制, 所测到的 pH 变化很小, 脲酶活性只有最初的 5% 左右。比较图 4a、4b 发现用细菌全细胞和脲酶粗提液进行测定时, 两者获得的结果差异不大。

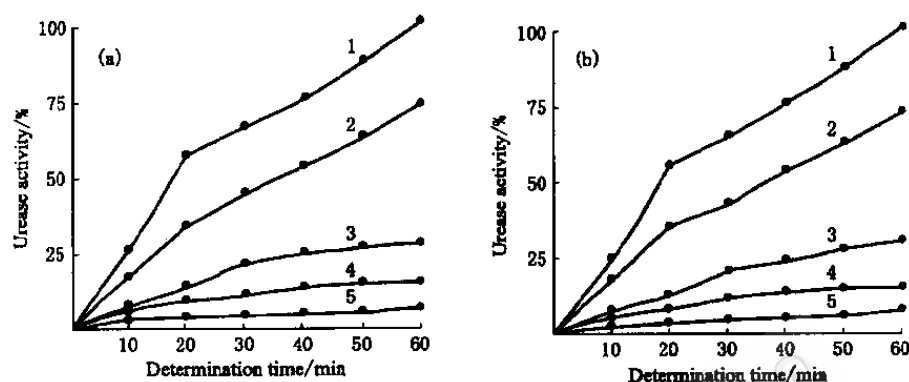


图 4 百里香酚水提取物对芽孢杆菌脲酶活性的影响

Fig.4 Effect of thymol concentration on urease activity of *Bacillus subtilis*

- a. Whole cell: 1. Control; 2. $50\mu\text{g/mL}$; 3. $100\mu\text{g/mL}$; 4. $150\mu\text{g/mL}$; 5. $200\mu\text{g/mL}$;
b. Crude urease extract: 1. Control; 2. $50\mu\text{g/mL}$; 3. $100\mu\text{g/mL}$; 4. $150\mu\text{g/mL}$; 5. $200\mu\text{g/mL}$.

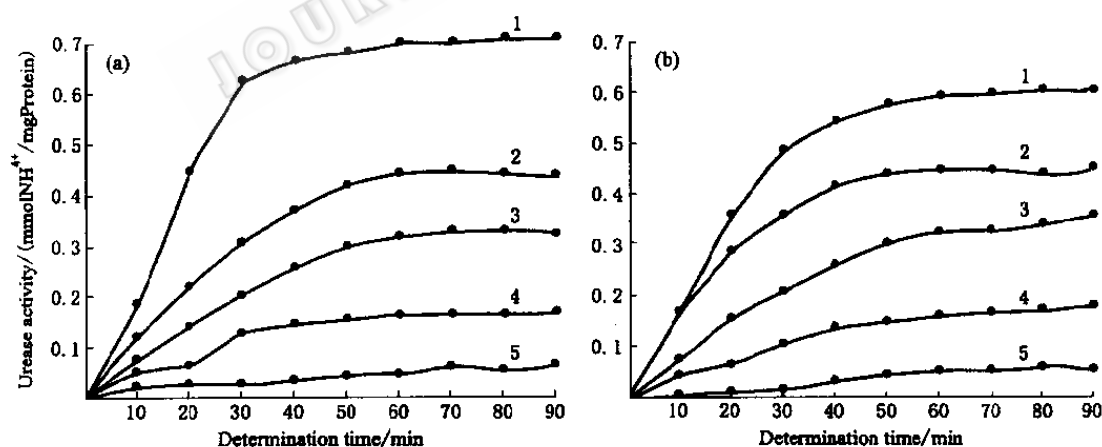


图 5 百里香芳香油和香芹酚对芽孢杆菌脲酶活性的影响

Fig.5 Effect of thyme oil and carvacrol on urease activity of *Bacillus subtilis*

- a. Thyme oil: 1. control; 2. $150\mu\text{g/mL}$; 3. $200\mu\text{g/mL}$; 4. $250\mu\text{g/mL}$; 5. $300\mu\text{g/mL}$;
b. Carvacrol: 1. control; 2. $100\mu\text{g/mL}$; 3. $150\mu\text{g/mL}$; 4. $200\mu\text{g/mL}$; 5. $250\mu\text{g/mL}$.

参 考 文 献

- [1] 林进能. 天然食用香料生产与应用. 北京: 轻工业出版社, 1991. 11.
- [2] 中国香料植物栽培与加工编写组编. 中国香料植物栽培与加工. 北京: 轻工业出版社, 1985. 74.
- [3] 王维华, 王南舟, 钟立人. 食品工业科技, 1996, 1: 27 ~ 30.
- [4] 程丽娟, 唐 明, 袁 静, 等. 微生物学实验技术. 杨凌: 天则出版社, 1993. 57.
- [5] 蔡武斌, 袁厚积. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学技术出版社, 1982. 54.
- [6] Mobley H L. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26: 831 ~ 836.
- [7] McTabak R. *Journal of Applied Bacteriology*, 1996, 80: 667 ~ 672.
- [8] Beecher J R. *Analytical Biochemistry*, 1970, 36: 243 ~ 246.

STUDIES ON ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM THYME

Fan Mingtao¹ Chen Jinping²⁽¹⁾ School of Biology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212013, China)⁽²⁾ College of life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710061, China)

Abstract: The extracts from thyme by water and ethanol, thyme essential oil, thymol and carvacrol were used as antimicrobial agents in this paper. The results show that all antimicrobial agents used have strong inhibition activity against *Staphalococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.

Key words: Thyme, Extracts, Antibacterium © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>