

白刺果实提取物的体外抑菌活性研究

张桂霞, 齐敬浩, 任旭, 陈贵林*

(内蒙古大学生命科学学院, 内蒙古呼和浩特 010021)

摘要:探讨白刺果实提取物的体外抑菌活性, 以期对白刺果实的综合利用及天然食品防腐剂的开发提供依据。用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇分别对白刺果实95%乙醇提取物进行萃取, 纸片法测定各萃取部分对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、酵母菌、青霉、根霉和黑曲霉7种常见的食源性污染菌的抑菌效果, 并通过倍比稀释法测定乙酸乙酯部分对其中3种细菌的最低抑菌浓度。结果表明: 白刺果实乙酸乙酯部分、乙醇部分和氯仿部分对3种供试细菌均有抑菌作用, 其中乙酸乙酯部分抑菌效果最好, 且乙酸乙酯部分对3种细菌的抑制强弱顺序为: 枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>金黄色葡萄球菌; 其中乙酸乙酯部分对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)均为25mg/mL, 对大肠杆菌的MIC是50mg/mL。各萃取部分对供试真菌均无明显抑制作用。

关键词: 西伯利亚白刺, 提取物, 抑菌活性, 最低抑菌浓度(MIC)

In vitro antimicrobial activity of extracts from fruits of *Nitraria sibirica* pall.

ZHANG Gui-xia, QI Jing-hao, REN Xu, CHEN Gui-lin*

(College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: Evaluated the in vitro antimicrobial activity of *Nitraria sibirica* Pall. Fruits extracts to provide the basis for utilizing *Nitraria* resources and developing natural food antiseptic. *Nitraria sibirica* Pall. fruits were extracted with 95% ethanol, then fractionated with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol respectively. The filter paper disc diffusion method was performed to determine the influence of the different extracts on the growths of 3 bacterium (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) and 4 fungus (*Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*), and the minimal inhibitory concentrations (MICs) of ethyl acetate extracts againsts the 3 kinds of bacterium were tested using the doubling dilution method. The results showed that the ethyl acetate, ethanol and chloroform extracts had antibacterial activity against the 3 kinds of bacterium. In addition, the ethyl acetate extracts presented higher antibacterial activity than others. The MIC of ethyl acetate extract against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* were 25, 25, 50mg/mL. None of the extracts exhibited inhibitory activity against Fungus.

Key words: *Nitraria sibirica* Pall; extract; antimicrobial activity; MIC

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0104-03

食品腐败变质是一个复杂的生物化学反应过程, 涉及食品内物理、化学、酶、微生物等一系列反应, 其中微生物的毒害最为严重。食品污染中主要的病原体包括埃希氏菌属的大肠杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌和杆菌。在延长食品保存期、保证食品品质的过程中, 食品防腐剂具有非常重要的作用。目前常见食品防腐剂如苯甲酸钠、山梨酸钾等多由化学合成, 而化学合成防腐剂大多具有潜在毒性, 同时对自然界的生态环境也会造成不利影响。此外, 微生物在不断的

进化过程中多重耐药性的增强限制了合成药物的发展, 同时也迫使我们寻求新的抗菌药物^[1]。一般情况下, 微生物的耐药性是可遗传的, 因此寻求新的抗菌药物不应该再建立在合成药物的基础上, 而天然产物成为最有效的来源^[2]。尽管已经从浆果, 如越橘、葡萄和沙棘籽的提取物中发现具有较高的抗菌活性物质^[3-5], 但尚待开发的植物还很多, 从自然界各类植物中发掘更高效、广谱、安全、稳定的天然防腐剂将对食品安全贮存有重要意义。白刺为蒺藜科落叶灌木。内蒙古分布有西伯利亚白刺、唐古特白刺、球果白刺和齿叶白刺4种^[6]。白刺果实被美誉为“沙漠樱桃”, 药食兼用, 含有较丰富的维生素、氨基酸、多糖、红色素及其他生理活性物质^[7]。本课题组研究发现, 白刺果

收稿日期: 2011-10-31 * 通讯联系人

作者简介: 张桂霞(1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物化学。

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAI07B07)。

[18] 何会, 宋哲, 谢碧秀, 等. 荔枝皮花色苷体外抗氧化能力研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 22-25.

[19] 单良, 徐利萍, 金青哲, 等. 黑芝麻黑色素的稳定性及自由

基清除活性[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11527-11531.

[20] 霍婷, 杨惠玲, 薛文通, 等. 花生红衣色素的研究进展[J]. 食品工业科技, 2008, 29(11): 289-295.

实各提取部分具有较强的抗氧化活性,且乙酸乙酯部分抗氧化活性最强^[9]。但是关于其抑菌活性的研究尚未见报道。本研究比较了白刺果实提取物不同萃取部分对7种常见的食品腐败菌的抑菌效果及最低抑菌浓度,以期对白刺果实的综合利用及天然食品防腐剂的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

西伯利亚白刺(*Nitraria sibirica* Pall.) 2010年7月16日于内蒙古自治区鄂尔多斯市杭锦旗独贵塔拉镇采集,经内蒙古大学生物系陈贵林教授鉴定为西伯利亚白刺,果实经阴干后,粉碎,过30目筛,待用;青霉(*Penicillium sp.*)、根霉(*Rhizopus sp.*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 以上菌种均由内蒙古大学生命科学学院微生物实验室提供;乙酰螺旋霉素 赤峰蒙欣药业有限公司;苯甲酸 国药集团化学试剂有限公司;其它化学试剂 均为分析纯。

BT124S、BT2202S型电子天平 德国Startorius公司;Hei-VAP系列旋转蒸发仪 德国TEGENT公司;KQ-250V型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;YXQ-LS-S II型高压蒸汽灭菌锅 上海博讯;SPX-150型数显生化培养箱 宁波海曙赛福。

1.2 实验方法

1.2.1 白刺果实活性成分的提取 取干燥粉碎的白刺果实240g,用95%的乙醇加热回流提取(料液比为1:5,提取3次,分别提取2、1.5、1h),抽滤,真空旋转蒸发浓缩得95%乙醇提取物浸膏62.34g。将其分散于水中(1:1.2),依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇对95%乙醇提取物进行萃取,合并萃取液抽滤,真空旋转蒸发浓缩,得浸膏石油醚部分1.42g,氯仿部分1.35g,乙酸乙酯部分2.34g,正丁醇部分6.44g。

1.2.2 菌种活化及菌悬液的制备^[1] 取冷藏保存的上述供试菌,用接种环分别取少量菌落均匀的接种于相应斜面培养基上,放置生化培养箱中进行活化,扩大培养。细菌于37℃培养24h,真菌于28℃培养24h。将活化好的各种菌分别挑取一环制成初试菌悬液,10倍稀释法稀释后通过平板皿计数,确定菌液的稀释度,使菌悬液所含活菌量为 1.0×10^8 cfu/mL和 1.0×10^6 cfu/mL,备用。

1.2.3 培养基的制备 牛肉膏蛋白胨培养基(用于细菌培养):牛肉膏3g、NaCl 5g、蛋白胨10g、琼脂粉20g,用蒸馏水定容于1000mL容量瓶中,pH调至7.2~7.4。

马铃薯培养基(用于真菌培养):鲜马铃薯200g、葡萄糖10g、琼脂粉20g,用蒸馏水定容于1000mL容量瓶中,pH自然。

1.2.4 抑菌实验——滤纸片扩散法 白刺果实萃取部分的处理:用二甲基亚砜(DMSO)将白刺果实乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇提取物、水相提取物充分溶解,配成浓度为80mg/mL的药液。阴性对照是DMSO;细菌实验阳性对照选用乙酰螺旋霉素,真菌阳性对照选用苯甲酸。

抑菌圈直径测定:采用滤纸片扩散法^[10]。用打孔器自制直径为7mm的滤纸。取经干热灭菌法灭菌的滤纸片,分别浸泡于各提取物所配的药液中2h,药液浓度80mg/mL,干燥。在无菌条件下,取 1.0×10^8 cfu/mL菌悬液100μL涂布在凝固的平板表面,再将滤纸片贴在表面含菌的平板上。细菌37℃倒置培养24h,真菌28℃倒置培养48h。培养结束后测量抑菌圈的大小,计算平均值。每组实验设3次重复。

1.2.5 最低抑菌浓度(MIC)——倍比稀释法^[11] 取抑菌效果最好的白刺果实萃取物部分,用DMSO溶解配成50mg/mL的药液,取样品溶液以相应体积的溶剂连续倍半稀释成样品浓度分别为50.0、25.0、12.5、6.3、3.2、1.6mg/mL的药液,取各药液1mL,分别加入 1.0×10^6 cfu/mL的3种细菌菌悬液10μL,混匀后取100μL菌药混合液均匀涂布3个平皿,同时用DMSO作阴性对照,乙酰螺旋霉素做阳性对照,37℃倒置培养24h。每组实验设3次重复。

2 结果与分析

2.1 白刺果实提取物各萃取部分对细菌的抑菌效果

从表1可以看出,白刺果实不同萃取部分浓度为80mg/mL时,白刺果实乙醇萃取部分、乙酸乙酯萃取部分对3种供试细菌都有较好的抑菌效果。对不同萃取部分,乙酸乙酯萃取部分的抑菌能力要比乙醇萃取部分更明显;对不同供试菌,乙酸乙酯萃取部分对供试细菌的抑菌效果依次为:枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>金黄色葡萄球菌。氯仿萃取部分对金黄色葡萄球菌有抑菌活性,且抑菌能力大于乙酸乙酯部分。各萃取部分对3种供试细菌的抑菌能力均小于同等浓度的乙酰螺旋霉素。

2.2 白刺果实提取物对真菌的抑菌效果

本实验中我们还对白刺果实乙醇、水相、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇各萃取部分,浓度为80mg/mL时,对青霉(*Penicillium sp.*)、根霉(*Rhizopus sp.*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)四种供试真菌进行了抑菌实验,研究结果发现各萃取部分均没有抑菌效果,说明白刺对供试真菌没有抑菌

表1 白刺果实提取物对供试细菌的抑菌活性

Table 1 Diameters of inhibition zone of extract of *N. sibirica* fruit against bacteria

供试细菌	抑菌圈直径(mm)							
	乙醇 提取物	水相 部分	石油醚 部分	氯仿 部分	乙酸乙酯 部分	正丁醇 部分	乙酰螺旋 霉素	二甲基 亚砷
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	8.2	7.0	7.0	7.0	10.1	7.0	14.7	7.0
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	7.7	7.0	7.0	7.0	11.4	7.3	35.2	7.0
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	7.5	7.0	7.0	9.4	8.9	7.0	15.1	7.0

表2 白刺果实乙酸乙酯提取物的抑菌效果

Table 2 Antimicrobial activities of acetoacetate extract from *N. sibirica* fruit

供试细菌	乙酸乙酯提取物的浓度(mg/mL)						二甲基 亚砷
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	-	+	++	+++	++++	++++	++++
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	-	-	+	+	+++	+++	++++
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	-	-	+	+++	+++	++++	++++

注:“-”表示无菌生长,“+”表示有1~10个菌落,“++”表示有11~20个菌落,“+++”表示有21~30个菌落生长,“++++”表示有30个以上的菌落生长。

作用。阳性对照苯甲酸对四种菌均有抑菌活性,其中对酵母菌的抑菌活性最强,抑菌圈直径为22.1mm。

2.3 白刺果实萃取物对供试菌最低抑菌浓度(MIC)的确定

采用倍比稀释法测定白刺果实乙酸乙酯部分对革兰氏阴性菌大肠杆菌和枯草芽孢杆菌,以及革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度。由表2可知,白刺果实乙酸乙酯提取物对枯草芽孢杆菌最低抑菌浓度是25mg/mL,对大肠杆菌的最低抑菌浓度是50mg/mL。枯草芽孢杆菌对白刺果实乙酸乙酯提取物的敏感度明显高于大肠杆菌,这一结果与滤纸片法测定抑菌效果的结果一致。革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌对乙酸乙酯提取物也较敏感,其最低抑菌浓度为25mg/mL。

3 讨论

常见浆果中含有丰富的生物活性成分,其多酚类、黄酮类和有机酸等均具有显著的抗菌活性。以前的很多研究中也发现同一活性成分对不同菌种的抑制能力存在很大的差距,酸樱桃的花青素萃取物对金黄色葡萄球菌有较强的抑制活性,而对革兰氏阴性菌和酵母菌的抑制活性较弱^[12]。苦瓜汁对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌均具有较好的抑菌活性,其中对大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌活性明显强于对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性^[13]。紫草的正丁醇、乙酸乙酯、石油醚和氯仿四种溶剂提取物均具有较强的抑菌活性,抑菌能力大小依次为乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物、石油醚提取物和氯仿提取物。四种提取物对细菌的抑菌能力均大于真菌^[14]。这种差距可能与抑菌机制有关。在抑菌过程中涉及到多项作用机理,如通过药物作用使微生物的细胞膜失去稳定性,质膜通透性增加,抑制细胞外微生物代谢所需酶及微生物生长所需底物的合成,浆果的抑菌作用可能还与其抗黏附剂作用有关,在微生物增殖传染过程中,它对细菌上皮细胞的黏附起抑制作用,从而抑制其增殖传染。

本研究发发现白刺果实乙酸乙酯提取物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性最强,这可能与该提取部分多酚类物质含量高有关。很

多研究表明多酚类物质对微生物的生长繁殖有很大的抑制作用,如有研究发现龙爪栗中主要起抗菌作用的物质是多酚类^[15],沙棘籽甲醇提取物具有较高的抗菌活性也是由于其中含有丰富的多酚类物质^[9],一系列的研究一致认为多酚类物质对微生物有抑制活性。本课题前期研究发现,含有大量多酚类物质的白刺果实乙酸乙酯提取部分抗氧化活性最强^[8],本研究同时又发现乙酸乙酯萃取部分又有很强的抑菌活性,所以选择性提取并浓缩酚类化合物能够提高其生物活性,对开发利用天然防腐剂具有重要指导意义,因此,白刺95%乙醇提取物乙酸乙酯萃取部分具有开发成天然食品防腐剂的应用前景。

参考文献

- [1] Shah PM. The need for new therapeutic agents:What is in pipeline?[J]. Clinical Microbiology and Infection,2005(11):36-42.
- [2] Riitta PP,Alakomi HL. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005,67(1):8-18.
- [3] Yoen JP,Ronita B,Robert DP,et al. Antibacterial activities of blueberry and muscadine phenolic extracts[J]. Journal of Food Science,2011,76(2):101-105.
- [4] Caroline H,Graham M,David N,et al. Cherie millar antibacterial activity of elder(*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens[J]. Journal of Medicinal Plants Research,2010,4(17):1805-1809.
- [5] Negi PS, Chauhan AS, Sadia GA, et al. Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts[J]. Food chemistry,2005,92(1):119-124.
- [6] 内蒙古植物志编辑委员会.内蒙古植物志:第三卷[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1987:414-418.
- [7] 樊莲莲,刘金荣,赵文彬,等. 唐古特白刺不同时期果实及叶所含黄酮的比较[J]. 中医药导报,2007,13(5):7-8.
- [8] 任旭,陈贵林. 唐古特白刺果实提取物抗氧化活性评价[J]. 食品科学,2011,32(3):95-97.
- [9] 张伟,崔同,檀建新. 蜂胶对食品致病菌抑菌作用的研究[J]. 食品科学,1998,19(3):40-43.
- [10] 肖靖萍,任玉红. 松针抑菌作用研究[J]. 食品科学,1994(2):52-54.
- [11] 吕翠玲,巫中德,戴欣,等. 常用食品防腐剂抗菌作用的研究[J]. 微生物学通报,1995,22(1):36-41.
- [12] Liegiute S, Majiene D, Trumbeckaite S, et al. Anthocyanin composition and antimicrobial activity of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) fruit extracts[J]. Zemdirbyste Agriculture,2009,96(3):141-148.
- [13] 刘锐,赵翊,胡诗娜. 苦瓜汁的抑菌活性及其热稳定性的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(5):142-144.
- [14] 侯美珍,韦红群,潘英明. 紫草不同溶剂提取物抑菌活性研究[J]. 食品工业科技,2006,27(11):52-54,57.
- [15] Varsha V,Asna U,Mallesht NG. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of finger millet polyphenols(*Eleusine coracana*)[J]. Food Chemistry,2009,114:340-346.