

野苜蓿抑菌活性物质提取工艺的优化

祖丽皮亚·玉努斯, 买尔哈巴·艾合买提

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046)

摘要: 对野苜蓿抑菌活性物质的提取工艺进行研究, 分析比较提取物对不同测试菌的抑菌效果。以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和变形杆菌为指示菌, 在单因素实验基础上通过正交实验对野苜蓿的提取工艺进行优化。野苜蓿抑菌活性物质最佳提取工艺为: 乙醇体积分数80%, 料液比为1:12, 提取时间2.0h, 此条件下的野苜蓿提取物抑菌效果大大增强。

关键词: 野苜蓿, 抑菌活性, 正交实验

Study on the extraction technique of the antibacterial components from *Medicago falcata* L.

ZULFIYA·Yunus, MERHABA·Ehmet

(College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Antibacterial materials were extracted from *Medicago falcata* L. and the inhibitory effect of the extract on different test strains was evaluated. Single-factor and orthogonal test experiments were used to explore the optimal extraction processing parameters for antibacterial materials from *Medicago falcata* L. using *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris* as the indicators. The optimal extraction processing parameters for antibacterial materials from *Medicago falcata* L. were ethanol concentration of 80%, material-liquid ratio of 1:12 and extraction time of 2.0h. The extract obtained by optimal extraction enhanced inhibitory effect on test bacterial strains.

Key words: *Medicago falcata* L.; antibacterial activity; orthogonal test

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)06-0309-04

野苜蓿(*Medicago falcata* L.) 别名为黄花苜蓿、扁苜蓿、镰荚苜蓿, 为双子叶植物药豆科植物黄花苜蓿的全草, 是广布于东北、华北和西北、草原的野生种, 尤其分布于北方的高山草原、典型草原和荒漠化草原^[1]。野苜蓿具有抗旱、耐寒、耐瘠薄、耐践踏等特点, 有较多的生态型, 是一种营养价值和产量较高的优良牧草。在改良草地、建立人工草地、防治水土流失等方面具有重要意义, 尤其是寒冷半干旱、土壤贫瘠区引种具有特殊意义^[2-3]。其含有的次生代谢产物主要为黄酮和皂苷类物质, 还含有叶蛋白、多糖、香豆素等活性成分, 提取物具有降胆固醇、抗动脉粥样硬化、消炎、抗霉菌、抗真菌、杀虫、增强免疫和抗感染等药理作用。Hoagland等^[4-5]通过实验证明苜蓿皂苷在极低的浓度(1.6mg/L)即可100%抑制绿色木霉生长, 在3~15mg/L时也可高度抑制在医疗上十分重要的几种酵母病菌。野苜蓿的药用价值很高, 具有理气健脾、利尿消肿的功效, 还可治疗胸腹胀满、消化不良、浮肿, 同时还具有清脾胃、利大小肠、下膀胱结石的功效。古人吃野苜蓿的记载, 在群芳谱中记载尤多, 据唐孟记载, 食用野苜蓿有“利五脏, 轻身健人,

洗去脾胃间邪热气, 通小肠热毒”的用途。民间有些验方用其治胃或痔、肠出血。野苜蓿中含有许多有益的成分, 对这些成分的提取、分离和开发利用日益受到人们重视^[4-5]。本文研究了野苜蓿在不同的浸提条件下对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和变形杆菌的抑菌作用, 并进行正交实验, 以期寻找较优处理和最佳提取条件, 并确定了野苜蓿提取液的抑菌效力与最低抑菌浓度, 从而为其在食品、化妆品、医药等行业中的广泛开发和利用提供理论及实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

野苜蓿 购于二道桥维吾尔生药店, 经新疆大学生命科学与技术学院植物教研室鉴定为野苜蓿, 选取干燥纯净、无霉变、虫蛀优良的原料, 粗略粉碎后储藏备用; 供试菌种 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 变形杆菌(*Proteus vulgaris*); 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基; 试剂 均为分析纯。

LDZX-40BI立式自动电热压力蒸汽灭菌仪 上海申安医疗器械厂; GHP-9050隔水式恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; SW-CJ-2FD超净工作台 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; RE-52A旋转蒸发

收稿日期: 2012-06-25

作者简介: 祖丽皮亚·玉努斯(1970-), 女, 副教授, 研究方向: 微生物学。

仪 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 样品处理

取野苜蓿原料50.00g(干燥)→粉碎过30目筛→溶剂浸提(热回流)→过滤→浓缩(回收溶剂)→提取液原液(1g/mL)。

1.3 抑菌实验方法^[6-10]

抗菌实验采用滤纸片法,操作步骤如下:

1.3.1 菌种活化 在无菌室里,将细菌培养基加热融化,摆斜面,带凝固后再接种,然后于37℃恒温培养箱中培养24h,每一菌种各活化2次。

1.3.2 菌悬液的制备 供试菌从4℃冰箱中取出后,接在新鲜斜面培养基上,经37℃、24h恒温培养活化后,用无菌生理盐水制备菌原液。吸取1.00mL菌原液加入9.00mL无菌生理盐水中,依次进行梯度稀释。将不同稀释度的菌悬液各吸取0.10mL分别加入到已灭菌冷却的各自适宜的平板培养基表面,涂布均匀。按上述条件培养,根据观察结果,选取各自适宜的菌液浓度,要求在该浓度下,菌能长满整个培养皿且分布均匀。

1.3.3 滤纸片的制备 用打孔器将102型新华滤纸制成直径为6mm的圆片,放入干燥洁净的培养皿内,经121℃热灭菌30min,浸入各提取液及相应的提取溶剂中,2h后取出,备用。

1.3.4 抑菌效力的测定 无菌枪头吸取各自适宜浓度的菌悬液0.1mL,在已倒好的平板培养基表面,涂布均匀。用无菌镊子夹取已制备好的滤纸片,放到上述含菌平皿上,每1个平皿均匀放6个滤纸片(包括同一抑菌液的5个浓度梯度和空白对照)。每种抑菌液做3个平板重复。然后将平皿倒置于37℃恒温箱中培养24h。用测微尺测量各抑菌圈大小,以抑菌圈直径作为野苜蓿抑菌活性指标,直径越大抑菌活性越强。

1.4 单因素实验

通过提取溶剂、乙醇浓度、料液比、提取时间单因素实验,考察上述因素对抑菌效果的影响。以大肠杆菌与金黄色葡萄球菌作为指示菌,将不同条件下的提取物分别进行抑菌实验。

1.5 正交实验^[11-16]

以乙醇浓度、浸提时间(h)、料液比为因子,供试

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	因素		
	A 乙醇浓度(%)	B 提取时间(h)	C 料液比
1	60	2.0	1:8
2	70	2.5	1:10
3	80	3.0	1:12

表2 不同溶剂提取物的抑菌圈直径(mm)

Table 2 Inhibition zone diameters of the extract from different extraction solvents(mm)

菌种	石油醚	氯仿	乙酸乙酯	丙酮	95%乙醇	蒸馏水
枯草芽孢杆菌	—	—	—	—	10.36	8.26
大肠杆菌	—	—	—	—	10.24	8.18
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	10.02	7.82
变形杆菌	—	—	—	—	11.04	8.46

注:以上均为3次平行实验结果。

菌的抑菌圈直径(mm)为指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验,因素水平编码表见表1。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.2.1 不同溶剂提取物对抑菌作用的影响 溶剂极性的不同,对各成分的溶解能力也有所差别,会影响提取率。本实验分别采用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、95%乙醇和蒸馏水6种不同极性的溶剂在料液比1:10、温度80℃下对野苜蓿提取1.5h,测定抑菌活性,确定适宜的提取溶剂(见表2)。

从表2可以看出,6种溶剂提取液对四种细菌的抑菌效果明显不同。乙醇提取液对细菌的抑菌效果最好,抑菌圈直径最大达到11.04mm;蒸馏水提取液的抑菌效果次之,抑菌圈直径7.82~8.46mm;石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮提取物没有抑菌效果。乙醇提取液的抑菌顺序与蒸馏水提取液一致,但乙醇对细菌的抑菌效果高于水提取液;乙醇作溶剂可以在较低的温度下浓缩,生产中可以根据实际情况以及要求的抑菌范围确定选择不同浓度乙醇作溶剂。

2.2.2 乙醇浓度对抑菌效果的影响 如图1所示,随着乙醇浓度的增大,提取物抑菌活性先增大再减小,乙醇体积分数80%时,提取物抑菌效果最好。据相似相溶原理推测,可知80%乙醇较适合野苜蓿中抑菌物质的提取。

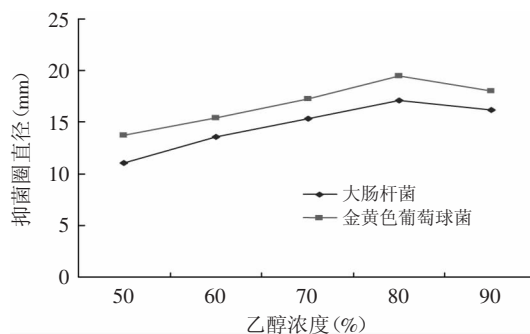


图1 乙醇浓度对野苜蓿抑菌作用的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on antibacterial activity of extract from *Medicago falcata* L.

2.2.3 料液比的影响 如图2所示,野苜蓿提取物的抑菌作用随着料液比的增加而增强,但到一定程度,又有所下降。一般来说,溶剂量越大,有效成分浸出越完全,提取率亦越大;但过大的料液比也会使杂质大量浸出,不仅造成溶剂和能量的浪费,也给后续的浓缩工作增加困难。当乙醇用量达到样品量的8倍左右时抑菌效果最佳。

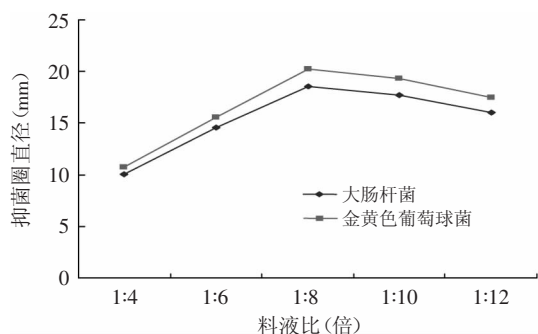


图2 料液比对野苜蓿抑菌作用的影响

Fig.2 Effect of material-liquid ratio on antibacterial activity of extract from *Medicago falcata* L.

2.2.4 提取时间的选择 如图3所示,随提取时间的延长,提取物抑菌效果增强的趋势并不是很明显。当时间达2.5h左右时,抑菌圈直径较大,抑菌效果较好,但时间继续延长,抑菌圈直径不再增加反而略微减小,提取物抑菌效果降低,其原因可能是在长时间的加热过程中其抑菌活性被破坏。

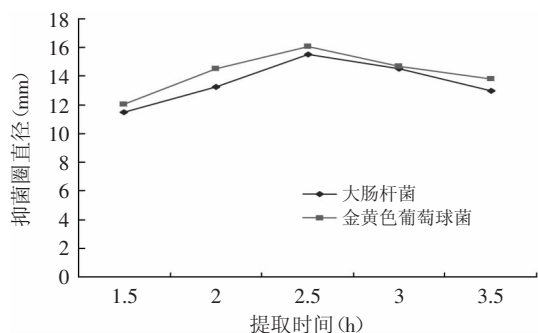


图3 提取时间对野苜蓿抑菌作用的影响

Fig.3 Effect of extraction time on antibacterial activity of extract from *Medicago falcata* L.

2.3 抑菌物质提取工艺的优化

2.3.1 对枯草芽孢杆菌的抑菌效果 从表3可看出,野苜蓿的有机溶剂浸提液对枯草芽孢杆菌的抑菌圈平均直径为21.04mm。第7组实验条件下的抑菌圈直径最大,为26.83mm,即在 $A_3B_1C_3$ 浸提条件下野苜蓿对枯草芽孢杆菌的抑菌能力较强。从极差R的大小可以看出,影响野苜蓿对枯草芽孢杆菌的抑菌能力的主要因素是乙醇浓度,其次是料液比,提取时间对抑菌能力的影响最小,统计分析得到的最佳处理组合是 $A_3B_2C_3$ 。考虑到工作效率及经济效益,综合分析认为,以 $A_3B_1C_3$ 即乙醇浓度80%、提取时间2.0h、料液比为1:12作为最佳提取条件,该条件下提取物的抑菌能力最强。

2.3.2 对大肠杆菌的抑菌效果 从表4中可见,野苜蓿的有机溶剂浸提液对大肠杆菌的抑菌圈平均直径为22.02mm。同样也是在第7组实验条件下的抑菌圈直径最大,为33.17mm,即在 $A_3B_1C_3$ 浸提条件下提取液对大肠杆菌的抑菌能力较强。对不同浸提条件的正交实验结果进行极差分析,计算出相应的k和R后,从极差R的大小可以看出,影响野苜蓿对大肠杆菌的

表3 枯草芽孢杆菌的正交实验结果

Table 3 Orthogonal test results of *Bacillus subtilis*

实验号	A	B	C	枯草芽孢杆菌 抑菌圈直径 (mm)
1	1	1	1	11.67
2	1	2	2	17.00
3	1	3	3	19.50
4	2	1	2	26.50
5	2	2	3	22.67
6	2	3	1	18.33
7	3	1	3	26.83
8	3	2	1	26.50
9	3	3	2	20.33
k_1	16.05	21.67	18.83	
k_2	22.50	22.05	21.27	
k_3	24.55	19.38	23.00	
R	8.5	2.67	4.17	

表4 对大肠杆菌的正交实验结果

Table 4 Orthogonal test results of *Escherichia coli*

实验号	A	B	C	大肠杆菌 抑菌圈直径 (mm)
1	1	1	1	17.83
2	1	2	2	19.66
3	1	3	3	18.83
4	2	1	2	17.67
5	2	2	3	20.83
6	2	3	1	17.50
7	3	1	3	33.17
8	3	2	1	23.33
9	3	3	2	29.33
k_1	18.77	22.89	19.55	
k_2	18.67	21.27	22.22	
k_3	26.61	21.88	24.27	
R	7.94	1.62	4.72	

抑菌能力的主要因素同样是乙醇浓度,其次是料液比,提取时间对抑菌能力的影响最小,即主次顺序是 $A>C>B$ 。

2.3.3 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果 从表5可见,野苜蓿的有机溶剂浸提液对金黄色葡萄球菌的平均抑菌圈直径为25.88mm。第7组实验条件下的抑菌圈直径最大,为33.67mm,即在 $A_3B_1C_3$ 浸提条件下野苜蓿对枯草芽孢杆菌的抑菌能力最强。所选定的3个因素中,影响野苜蓿在不同浸提条件下对大肠杆菌抑菌能力大小的主要因素是 $B>A>C$,即浸提时间对抑菌能力的影响最大,其次是乙醇浓度,而料液比对抑菌能力的影响较小。经统计分析得到的最优提取条件组合是 $A_3B_1C_3$ 。即乙醇浓度80%、提取时间2.0h、料液比1:12作为最佳提取条件,该条件下提取液对金黄色葡萄球菌的的抑菌能力最强。

2.3.4 对变形杆菌的抑菌效果 从表6中可知,野苜蓿的乙醇溶剂浸提液对变形杆菌的抑菌圈平均直径为22.63mm。同样在第7组实验条件下的抑菌圈直径

表5 对金黄色葡萄球菌的正交实验结果

Table 5 Orthogonal test results of *Staphylococcus aureus*

实验号	A	B	C	金黄色葡萄球菌 抑菌圈直径(mm)
1	1	1	1	28.33
2	1	2	2	18.83
3	1	3	3	23.66
4	2	1	2	28.66
5	2	2	3	23.00
6	2	3	1	19.33
7	3	1	3	33.67
8	3	2	1	28.17
9	3	3	2	28.83
k ₁	23.77	30.38	25.44	
k ₂	23.66	23.33	25.44	
k ₃	30.22	23.94	26.77	
R	6.56	7.05	1.33	

表6 对变形杆菌的正交实验结果

Table 6 Orthogonal test results of *Proteus vulgaris*

实验号	A	B	C	变形杆菌 抑菌圈直径(mm)
1	1	1	1	17.16
2	1	2	2	14.83
3	1	3	3	15.33
4	2	1	2	27.83
5	2	2	3	23.50
6	2	3	1	23.50
7	3	1	3	34.00
8	3	2	1	25.50
9	3	3	2	22.00
k ₁	15.77	26.33	22.05	
k ₂	24.94	21.27	21.55	
k ₃	27.16	20.27	24.27	
R	11.39	6.06	2.72	

最大,为34.00mm,即在A₃B₁C₃浸提条件下野苜蓿对枯草芽孢杆菌的抑菌能力较强。不同浸提条件下的提取物对变形杆菌的抑菌能力中,乙醇浓度是影响提取率从而影响抑菌能力的主要因素,其次是提取时间,料液比的多少对抑菌能力的影响不大,主次顺序为A>B>C。经统计分析得到的最佳处理组合是A₃B₁C₃即乙醇浓度80%、提取时间2.0h、料液比1:12作为最佳提取条件,该条件下提取物对变形杆菌的抑菌能力最强。

3 结论

3.1 提取溶剂对野苜蓿的抑菌效果有很大的影响。

实验所用的6种溶剂中,95%乙醇提取物抑菌效果最佳,而且各溶剂所得提取液的抑菌活性之间亦存在较大差异。

3.2 四种菌抑菌条件的最优组合为:抑制枯草芽孢杆菌的A₃B₂C₃,其他三种菌为A₃B₁C₃;而因子B,即提取时间对枯草芽孢杆菌的提取效果影响最小,因此,为降低成本、节省工时,可将B₂改为B₁,由此可得抑制四种菌的最优组合条件为A₃B₁C₃。即在12倍的80%乙醇浓度中提取2.0h时,野苜蓿的抑菌能力最强。

3.3 从抑菌圈平均直径可以得出,野苜蓿对金黄色葡萄球菌产生的抑菌能力最强,其次为变形杆菌和大肠杆菌,而对枯草芽孢杆菌最弱。

参考文献

- [1] 内蒙古自治区革命委员会卫生局编. 内蒙古中草药[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1972.
- [2] 内蒙古植物志编委会. 内蒙古植物志(第3卷)[M]. 第2版. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1989.
- [3] 袁有福. 野苜蓿的主要经济性状及栽培技术的研究[J]. 中国草原,1986(2):38-41.
- [4] 周兆祥. 苜蓿的化学成分与研究[J]. 天然产物研究与开发,1992,4(1):44-51.
- [5] 殷晓静,秦民坚. 苜蓿属植物化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2008,27(6):4-7.
- [6] 郑钧鏞,王光宝. 药品微生物学及检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1989.
- [7] Srinivasan D, Perumalsamy LP, Nathan S. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine[J]. J Ethnopharm, 2001, 94: 217-222.
- [8] 陈文学,胡月英,张伟敏,等. 白胡椒抑菌活性物质提取工艺的优化[J]. 食品科学,2010,31(12):11-15.
- [9] 周英,段震,王寒,等. 百合提取物的体外抑菌作用研究[J]. 食品科学,2008,29(2):94-96.
- [10] 张霞,孙宝忠,哈斯格根,等. 五倍子抑菌物质的提取及其抑菌作用的研究[J]. 食品工业科技,2010,31(7):290-294.
- [11] 贵州农学院. 生物统计实验设计[M]. 北京:农业出版社,1987.
- [12] 陈文学,胡月英,葛畅,等. 黑胡椒抑菌活性物质提取工艺的优化[J]. 食品工业科技,2010,31(11):279-282.
- [13] 董周永,胡青霞,郭松年,等. 石榴果皮中抑菌活性物质提取工艺的优化[J]. 农业工程学报,2008,24(3):274-277.
- [14] 解茂蕾,张子德,马俊莲,等. 红提葡萄致病菌的筛选及丁香抑菌成分提取工艺研究[J]. 食品工业科技,2011,32(4):152-154.
- [15] 苗子健,李从发,唐艳平,等. 腰果粒抑菌活性物质提取工艺的优化[J]. 食品科学,2010,31(24):1-7.
- [16] 刘娜,林华庆,邓红,等. 双料喉风散的提取工艺优化研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(4):983-984.

权威·核心·领先·实用·全面