

枇杷叶提取物抑菌作用研究

肖新生, 林倩英

(湖南科技学院生命科学与化学工程系, 湖南永州 425100)

摘要: 该研究采用滤纸片法探讨了枇杷叶水提取物、乙醇提取物、正己烷提取物对三种食品中常见污染菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌)的抑菌性。同时还采用梯度稀释法测定各提取物对这三种菌的最小抑菌浓度。结果表明: 三种提取物对三种试验菌均有抑制作用。乙醇提取物的抑菌效果最好, 其次是水提取物, 最后是正己烷提取物。乙醇提取物的浓度在 0.1 g/mL 时的抑菌圈直径分别为: 大肠杆菌 11.8 mm, 金黄色葡萄球菌 13 mm, 枯草芽孢杆菌 11 mm。乙醇提取物的最低抑菌浓度分别为: 大肠杆菌 0.1 mg/mL, 金黄色葡萄球菌 0.01 mg/mL, 枯草芽孢杆菌 10 mg/mL。

关键词: 枇杷叶提取物; 抑菌; 防腐

文章编号: 1673-9078(2010)1-59-4

Bacteriostatic Effects of Loquat Leaf Extract

XIAO Xin-sheng, LIN Qian-ying

(Department of Chemistry and Bioengineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425100, China)

Abstract: The inhibitory activities of water extract, ethanol extract, and n-hexane extracts of loquat leaf on three common food contaminated bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) were studied uses filter paper. And the minimum inhibitory concentrations of the three extracts were determined using the Gradient dilution method. The results indicated that these extracts had inhibitory effects on three test organisms, and the sequence of their bacteriostatic effects was ethanol extract > water extract > n-hexane extract. The Diameter of inhibited halo of 0.1 g/mL Ethanol extract on *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were 11.8 mm, 13 mm, and 11 mm, respectively. The minimum inhibitory concentrations of ethanol extract on the three bacteria were 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, and 10 mg/mL, respectively.

Key words: Loquat leaf extract; Bacteriostatic; Corrosion protection

1 前言

枇杷叶为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya Japonca* (Thunb.) Lind 的叶, 别名巴叶、芦桔叶, 在我国分布很广泛。枇杷叶作为传统的中草药, 其味苦、微辛、性微寒, 具有止咳、清肺和胃的功能^[1]。目前从枇杷叶中分离的有效成分主要有挥发油、三萜酸类、倍半萜类、黄酮类、多酚类、有机酸类等, 这些成份具有抗炎、止咳、降血糖、抗病毒和抗肿瘤等药理活性^[2-5]。

近年来, 由于天然提取物的安全优势, 从植物中提取活性物质是天然物质研究的热门课题。而自然界的天然植物中存在许多生理活性物质, 具有抗菌作用。这为植物源天然食品防腐剂、抑菌剂的研究和开发提供了宝贵资源

近年有较多关于植物中黄酮类化合物的抑菌防腐

收稿日期: 2009-08-31

基金项目: (1) 湖南科技学院院级科研项目(湘科院院字〔2009〕25号): 油茶活性物质提取和水果保鲜。(2) 永州市科技局指导性科技计划项目(永科发〔2009〕20号): 油茶提取物对水果的保鲜作用。

的报道。如袁尔东等研究了亮叶杨桐叶总黄酮提取及抑菌活性的研究^[6]; 李国章等证实了桑椹籽中黄酮具有明显的抑菌作用^[7]。枇杷叶中含有很多抗氧化化合物, 包括多酚类, 皂苷等。谢红英等对枇杷叶提取物的抗氧化性和抑菌性进行了初步的研究, 证实了枇杷叶提取物具有良好的抑菌效果^[8]。为此, 该研究对不同枇杷叶提取物对不同微生物的抑制作用进行研究, 为枇杷叶提取物的抑菌防腐效果提供依据。

2 实验材料与方法

2.1 材料与仪器

枇杷叶, 永州果林采集; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 湖南科技学院微生物实验室提供。

JY92-2D 超声波细胞粉碎器(宁波新芝生物科技股份有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); R-201 真空旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司); 722 紫外-可见分光光度计(天

津市普瑞斯仪器有限公司)等。

2.2 实验方法

2.2.1 枇杷叶提取物的制备

称取一定量枇杷叶粉末,分别用水、正己烷、70%乙醇作为溶剂,在料液质量比1:10的条件下于55℃下超声波提取50 min。过滤,重复提取滤渣1次,合并滤液,提取液用旋转蒸发器抽真空减压回收。

2.2.2 提取物黄酮类含量测定

采用芦丁生化试剂作为标准物,用硝酸铝-亚硝酸钠比色法,制作芦丁标准曲线,得到芦丁标准溶液质量浓度C与吸光度值A之间关系的标准方程为: $C=0.0086A-0.0121$,相关系数 $r=0.9829$ 。然后采用标准曲线法在510 nm进行比色测定^[9]。

2.2.3 培养基的配制

营养琼脂培养基:蛋白胨10 g、牛肉膏3 g、氯化钠5 g、琼脂20 g、蒸馏水1000 mL。将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,并用150 g/L氢氧化钠溶液调pH至7.2~7.4,加入琼脂,加热煮沸使琼脂溶化,分装于烧瓶内,并于121℃下高压灭菌15 min^[10]。

营养肉汤培养基的配制:蛋白胨10 g、牛肉膏3 g、氯化钠5 g、蒸馏水1000 mL。将各组分混合、溶解后调节pH 7.4,分装于各试管、烧瓶内,121℃下高压灭菌15 min^[10]。

2.2.4 供试菌株的制备

将所有供测试的菌种移接入相对应的培养基上平板培养,每种培养三皿。细菌置于37℃恒温培养箱内培养24 h。每种菌取一皿供测试用,其余置于0~4℃冷藏备用。

2.2.5 菌悬液的制备

用接种环挑取一环菌体或孢子放入装有50 mL无菌生理盐水的锥形瓶中,充分摇匀,制成菌悬液备用。

2.2.6 滤纸圆片法测试

用打孔器将滤纸圆片打成直径8 mm的圆片,滤纸经高压灭菌后,放在提取物溶液及空白对照的生理盐水中浸泡30 min,沥去多余的试液,用无菌镊子放在涂好菌液的培养基上。每皿成“+”形对称放置4张圆片,每种菌平行做三组,置于37℃恒温培养箱内培养24 h。培养结束后,用刻度尺测量培养基中抑菌圈的直径。

2.2.7 最小抑菌浓度实验(MIC:梯度稀释法)

取9支无菌试管,各加灭菌营养肉汤9 mL,第1管加1.0 g/mL提取液1 mL,混匀后吸取1 mL于第2管,混匀后吸取1 mL于第3管,依次类推到第8管,弃去1 mL,第9管改加1 mL无菌生理盐水作为对照,

然后每管内加入菌悬液0.1 mL,摇匀,37℃培养24 h。结果判定:肉汤清亮透明表示无细菌生长(-),肉汤浑浊表示有细菌生长(+),以能抑制细菌生长的提取物最高稀释度作为其最低抑菌浓度。

3 结果与讨论

3.1 不同溶剂对枇杷叶黄酮类化合物提取的影响(如表1)

表1 不同溶剂对枇杷叶黄酮类化合物提取的影响

溶剂种类	水	乙醇	正己烷
黄酮类的含量/%	1.215	1.041	0.0319

黄酮类化合物多为极性化合物,根据相似相溶原理,黄酮类在极性溶剂中的溶解性大。由表1可知,用水提取的效果最好,乙醇次之,正己烷最少,这是因为水极性最大,乙醇次之,正己烷属于非极性溶剂。

3.2 枇杷叶提取物的抑菌作用

采用滤纸片法测定枇杷叶提取物的抑菌作用。将样品溶液配成0.1 g/mL和0.05 g/mL两个浓度,测定抑菌圈的大小,比较抑菌效果,结果如表2和表3。

表2 0.1 g/mL枇杷叶提取物溶液的抑菌圈直径(mm)

Table 2 The Diameters of inhibited halo of 0.1g/mL extract on *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*

样品	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
水提取物	11.5	12.5	10.8
正己烷提取物	10.5	10.8	9.5
乙醇提取物	11.8	13	11
生理盐水	-	-	-

注:“-”表示无抑菌圈出现

表3 0.05 g/mL枇杷叶提取物溶液的抑菌圈直径(mm)

Table 3 The Diameters of inhibited halo of 0.05g/mL extract on *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*

样品	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
水提取物	10.5	11	10
正己烷提取物	9.5	10.2	-
乙醇提取物	11	10.8	10.2
生理盐水	-	-	-

注:“-”表示无抑菌圈出现

由表2可知枇杷叶提取物溶液对大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,枯草芽孢杆菌都有明显的抑制作用。由表2和表3可知随着样品溶液的浓度降低,提取物的抑菌作用明显下降,甚至于正己烷提取物对于枯草芽孢杆菌没有抑制作用。

实验可得乙醇提取物溶液抑菌效果最优, 在 0.1 g/mL 时的抑菌圈直径分别为: 大肠杆菌 11.8 mm, 金黄色葡萄球菌 13 mm, 枯草芽孢杆菌 11 mm。其次是水提取物溶液, 在 0.1 g/mL 时的抑菌圈直径分别为: 大肠杆菌 11.5 mm, 金黄色葡萄球菌 12.5 mm, 枯草芽孢杆菌 10.8 mm。最后是正几烷提取物溶液, 0.1 g/mL 时的抑菌圈直径分别为: 大肠杆菌 10.5 mm, 金黄色葡萄球菌 10.8 mm, 枯草芽孢杆菌 9.5 mm。在样品溶液浓度为 0.05 g/mL 时对枯草芽孢杆菌失去了抑菌作用。陈剑等^[11]发现乙醇提取物中含有较多的乌索酸、齐墩果酸、皂苷类、萜酸类及黄酮类化合物等, 水提取物中则主要含有黄酮类化合物、皂苷类化合物、无机盐、蛋白质、糖类、V_C、V_{B1} 及人体所需氨基酸等营养物质^[12], 正己烷含有少量的黄酮类化合物、叶绿素和一些酸类。研究表明乌索酸、齐墩果酸、皂苷类、萜酸类及黄酮类化合物等具有较强的抗氧化或是抑菌作用。因此推测乙醇提取物抑菌作用强于水提取物是由于多种化合物的增效作用。

由表中可知, 提取物对于金黄色葡萄球菌的抑菌效果最佳, 其次是大肠杆菌, 最后是枯草芽孢杆菌。金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性无芽孢菌, 大肠杆菌是革兰氏阴性无芽孢菌, 枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性芽孢菌。枯草芽孢杆菌能产生芽孢, 而我们知道芽孢一般具有较强的抗性, 因此提取物对枯草芽孢杆菌的抑制作用较差。再则大肠杆菌较于金黄色葡萄球菌有较强的抗药性, 因此提取物对金黄色葡萄球菌有较强的抑制作用。谢红英等在研究枇杷叶提取物的抗氧化与抑菌中发现提取物对酵母菌几乎没有作用, 而且对枯草芽孢杆菌的效果也不佳, 与本实验结果吻合^[8]。

即样品抑菌强弱顺序为: 乙醇>水>正几烷。菌种的抑制效果强弱顺序是: 金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>枯草芽孢杆菌。由此可知枇杷叶提取物具有较好的抑菌效果。

3.3 枇杷叶提取物最低抑菌浓度测试 (MIC值测定)

在该测试中采用梯度稀释法。稀释后样品溶液浓度是: 100 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.001 mg/mL。结果判定: 肉汤清亮透明表示无细菌生长(-), 肉汤浑浊表示有细菌生长(+), 以能抑制细菌生长的提取物最高稀释度作为其最低抑菌浓度。数据的记录如表 4 所示。

将 100 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, 0.001 mg/mL 六个浓度梯度的三种提取物的抑菌情况进行记录, 并汇总, 得到提取物最低抑菌浓度, 即表 5。

表4 10 mg/mL枇杷叶提取物溶液的抑菌效果

Table 4 The Diameters of inhibited halo of 10 mg/mL extract on *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*

样品	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
水提取物	-	-	-
正几烷提取物	-	-	+
乙醇提取物	-	-	-
生理盐水	+	+	+

注: “-”表示肉汤清亮无细菌生长, (+) 表示肉汤浑浊表示有细菌生长

表5 枇杷叶提取物最低抑菌浓度

Table 5 The minimum inhibitory concentrations of loquat leaf extract on *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*

枇杷叶提取物	最低抑菌浓度 (mg/mL)		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌
水提取物	1	0.1	10
正己烷提取物	10	10	100
乙醇提取物	0.1	0.01	10

实验结果表明, 样品溶液为 100 mg/mL 时各种测试菌株均不能正常生长。正己烷提取物溶液对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度是 100 mg/mL, 对大肠杆菌为 10 mg/mL, 对金黄色葡萄球菌为 10 mg/mL。水提取物溶液最小抑菌浓度分别是大肠杆菌 1 mg/mL, 枯草芽孢杆菌 0.1 mg/mL, 金黄色葡萄球菌 10 mg/mL。乙醇提取物溶液最小抑菌浓度分别为大肠杆菌 0.1 mg/mL, 金黄色葡萄球菌 0.01 mg/mL, 枯草芽孢杆菌 10 mg/mL。并且实验结果表明提取物对于枯草芽孢杆菌的抑菌作用极弱。

4 结束语

通过研究可以发现, 枇杷叶提取物特别是乙醇的提取物对食品中常见的有害菌具有抑制作用。对枇杷叶提取物中各种有效成分进行分离, 然后研究其作用关系是下一步值得研究的问题。同时, 对枇杷叶提取物抑菌作用在食品防腐保鲜中的应用研究也具有非常重要的意义。

参考文献

[1] 中国药典委员会.中国药典,2000 年版(一部)[S]. 北京: 化学工业出版社,2000

[2] 刘传安,邹盛勤,陈武.枇杷叶化学成分·药理作用及其应用研究进展[J].安徽农业科技,2005,33(11):2117-2118,2171

[3] Shimizu M, Fukumura H, Tsuji H, et al. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. I. Constituents and

- anti-inflammatory effect of Eriobotrya japonica [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34 (6) : 2614-2617
- [4] de Tommasi N, de Simone F, Cirino G, et al. Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of Eriobotrya japonica [J]. Planta Med, 1991, 57(5) : 414-414
- [5] de Tommasi N, de Simone F, Pizza C, et al. Constituents of Eriobotrya japonica, a study of their antiviral properties [J]. J NatProd, 1992, 55 (8):1067 - 1073
- [6] 袁尔东,肖仔君,刘本国,宁正祥,谢梅芳.亮叶杨桐叶总黄酮提取及抑菌活性的研究.现代食品科技,2009,25(3): 305-308
- [7] 李国章,于华忠,卜晓英,曹庸,饶力群.桑椹籽中黄酮的 CO₂ 超临界流体萃取及抑菌作用研究.现代食品科技,2006,22(2):86-88
- [8] 谢红英,刘艺,王洪新等.枇杷叶提取物抗氧化和抑菌作用的研究[J].食品工业,2007(02):1-4.
- [9] 黄锁义,李卫彬,阳文辉等.超声波提取枇杷叶总黄酮及其鉴别[J].时珍国医国药,2007(03):1-2.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局职业技能鉴定指导中心.食品微生物检验[M].中国计量出版社,2008:452,454.
- [11] 陈剑,李维林,吴菊兰等.枇杷叶的化学成分[N].植物资源与环境学报.2006,15(4):67-68
- [12] 林启训.枇杷叶黄酮类化合物的水浸提工艺研究[J].农业工程学报,2005,21(07):190-192.

(接第 17 页)

- [14] TANG C H, YANG X Q, CHEN Z., et al. Physicochemical and structural properties of sodium caseinate biopolymers induced by microbial transglutaminase[J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29: 402-421.
- [15] ZHAO Y, MINE Y, MA C Y. Study of thermal aggregation of oat globulin by laser light scattering[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 3089-3096.
- [16] DE JONG G A H, KOPPELMAN S J. Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications[J]. Journal of Food Science, 2002, 67: 2798-2806.

(接第 21 页)

由基清除能力测定、超氧阴离子自由基清除作用测定、过氧化氢清除能力的测定、脂质过氧化抑制作用的测定。结果表明,鱼油具有一定的体外抗氧化能力,且清除率与样品浓度呈线性关系。

(4)通过薄层色谱和全波长扫描均可以断定鲑鱼肝脏鱼油中含有一定量的虾青素。

参考文献

- [1] 袁亚辉,姚美君.利用鲑鱼内脏生产海味素的研究.现代渔

业化,2002,(1):28-29

- [2] 章建设,雷晓凌.鲑鱼内脏糖蛋白提取工艺及其免疫活性初步研究.现代食品科技,2008,24(2):167-169
- [3] 沈彩英.乌贼油中多不饱和脂肪酸的提取.中国油脂,2008,33,(2):76-79
- [4] 郭无瑕,胡建恩等.鲑鱼肝脏鱼油的制备及其脂肪酸组成分析.大连水产学院学报,2007,22(1):79-80
- [5] 邱金芬.四种含笑挥发油的抗氧化及其对圣女果的保鲜活性研究.南京林业大学研究生硕士学位论文.2008.

上接第37页)

的培养基优化。实验确定了葡萄糖、黄豆粉和玉米浆的最佳取值,优化后的培养基组成为(g/L):葡萄糖21.80、黄豆粉36.30、玉米浆25.90、硫酸锰0.25,MSG 50。GABA产量为27.12 g/L,比液体MRS培养基的产量14.03 g/L提高了93.30%。

参考文献

- [1] 张晖,姚惠源,姜元荣.富含γ-氨基丁酸保健食品的研究与开发[J].食品与发酵工业,2002,28(9):69-72.
- [2] 徐冬云,周立平,童振宇等.产γ-氨基丁酸乳酸菌的分离筛选[J].现代食品科技,2006,22(3):59-62
- [3] Hayakawa K, Kimura M. Effect of a γ-aminobutyric acid-

enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and Normotensive Wistar-Kytorats[J].British Journal Nutrition, 2004, 92(3):411-417

- [4] Okada T, Sugishita T, Murakami T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J].Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 2000, 47(8):596-603.
- [5] 赵景联.固定化大肠杆菌细胞生产γ-氨基丁酸的研究[J].生物工程学报.1989, 5(2):124-128.
- [6] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by Lactobacillus paracasei isolated from traditional fermented foods[J].Food Microbiol.2005, 22: 497-504