

鹿蹄草提取物抑菌活性的研究

王储炎^{1,2}, 艾启俊³, 范涛², 刘晓萌³, 孙娜³

(1. 江苏科技大学, 江苏镇江 212003) (2. 安徽省农业科学院蚕桑研究所, 安徽合肥 230061)

(3. 北京农学院食品科学系, 北京 102206)

摘要: 本文以鹿蹄草为研究对象, 利用制得的鹿蹄草提取物对多种食品中常见的微生物进行抑菌活性试验, 结果表明: 鹿蹄草提取物抑菌作用因菌种不同而最低抑菌浓度有所不同, 金黄色葡萄球菌为 5%, 大肠杆菌为 10%, 绿脓杆菌 20%, 根霉 10%, 青霉 20%; 同时, 其抑菌活性随着浓度的增加而增强; 鹿蹄草提取物具有一定的耐热性, 但不是很稳定; 鹿蹄草提取物与盐、糖都有较强的协同作用。此外, 鹿蹄草提取物的抑菌效果与时间有一定关系, 随着作用时间的越长, 其抑菌率越高。

关键词: 鹿蹄草提取物; 抑菌活性; 研究

文章编号: 1673-9078(2011)1-26-28

Study on Antimicrobial Activity of *Pyrola calliantha* Extracts

WANG Chu-yan^{1,2}, AI Qi-jun³, FAN Tao², LIU Xiao-meng³, SUN Na³

(1. Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212003, China)

(2. Sericultural Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei 230061, China)

(3. College of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

Abstracts: The antimicrobial action of *Pyrola calliantha* extracts (PCB) against a series of microbe was studied. The results showed that the antimicrobial effect of PCB varies with the pathogenetic microbes. The minimum antimicrobial dosages of PCB for different microbes were as follows: 5% for *Staphylococcus aureus*; 20% for *Pseudomonas aeruginosa*, 10% for *Escherichia coli*, 10% for *Rhizopus*, 20% for *Penicillium*. The more the concentration of PCB, the higher the antimicrobial activity was. It was also proved that PCB had moderate thermo-stability and the addition of sugar or salt can improve the antimicrobial activity. Besides, the longer the action time of PCB with the same concentration will bring higher inhibition rate.

Key words: PCB; antimicrobial; activity; study

鹿蹄草 (*Pyrola Calliantha*) 为小型草本状半灌木, 它内含多种生物活性物质, 其中有酚醌类、甙类、有机酸类和糖类^[1]。鹿蹄草的研究历史悠久, 在中医上早就被作为中草药使用。研究表明, 鹿蹄草浸提液及其提取分离出来的化学成分-鹿蹄草素、没食子酸、原儿茶酚、槲皮素、梅笠草素等均有广谱的抗菌作用, 对金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、志贺氏菌、福式痢疾杆菌等固紫色染色阳性及阴性菌都有较强的抑制效果^[2-3]。艾启俊等证实鹿蹄草浸提液对霉菌具有明显的抑制效果, 并将其应用在苹果贮藏中^[4]。为此, 本文以鹿蹄草提取物对几种常见的食品腐败菌做抑菌活性试验, 旨在能开发出一种天然的食品抑菌剂, 同时, 也

收稿日期: 2010-09-16

资助项目: 北京市自然科学基金会资助 (6042005); 安徽省农业科学院院长青年基金 (09A0503) 资助

作者简介: 王储炎 (1982-), 男, 博士, 主要从事蚕桑资源综合利用和食品加工研究

为进一步探索开发我国鹿蹄草资源提供科学的实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鹿蹄草: 采于陕西省太白县。其形状为: 全体光滑无毛, 根状茎细长呈匍匐状; 叶基生, 圆形或广椭圆形, 带革质, 叶背和叶柄灰蓝绿色。样品采回后经晒干保存备用。

供试菌种: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 均由中国科学院微生物所提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 青霉 (*Penicillium*), 根霉 (*Rhizopus*), 由北京农学院食品科学系提供。

培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基, 马铃薯培养基。

1.2 仪器

GHP-9160 隔水式恒温培养箱; LS-B50L 型立式

压力蒸汽灭菌器; HY-04A 小型高速粉碎机; RE52-99 旋转蒸发器; SW-CJ-IFD 洁净工作台。

1.3 鹿蹄草提取物的制备

称取 100 g 鹿蹄草, 用组织捣碎机破碎后置于烧杯中, 加入 1000 mL 70% 乙醇浸泡 24 h, 超声波常温下辐照 30 min, 待溶液颜色变为棕褐色之后真空过滤。取全部滤液蒸馏, 旋转蒸发除去乙醇, 加蒸馏水使体积为 400 mL, 得到鹿蹄草提取液, 其浓度为 0.25 g/mL。

1.4 菌悬液的制备^[5-6]

在无菌操作室中分别将金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌接种至牛肉膏蛋白胨培养液中, 青霉、根霉接种至马铃薯培养液中, 各在 37 °C 或 28 °C 下培养 1 d 或 3 d, 现配现用。

1.5 抑菌试验方法

1.5.1 滤纸片法测定抑菌作用^[7-8]

按照无菌操作方式将适量培养基 (大约 15 mL) 倒入培养皿中, 待冷却、凝固后, 用无菌吸管分别加入 200 μ L 相应的待试菌悬液于其表面, 用无菌涂布器将菌液涂布均匀, 制成含菌平板, 置 20 °C 恒温箱中 15 min 后取出, 目的使琼脂表面干燥, 待用。选择吸水性强的定性滤纸, 用打孔器打成若干直径为 6 mm 的圆形滤纸片, 分装于洁净干燥的小培养皿内, 50 张/皿, 干热灭菌后, 浸在提取液 24 h, 烘干后取出备用。再用无菌镊子镊取滤纸片贴在含菌平板上, 每只含菌平板上间隔一定距离贴 3 片, 并用浸有无菌水的滤纸片作对照, 放入培养箱中倒置培养, 细菌均在 37 °C 下培养 1 d, 霉菌在 28 °C 下培养 3 d。观察结果。

1.5.2 抑菌强度试验

鹿蹄草提取液按照不同比例 (20%、10%、5%、2.5%、1.25%、0.625%) 加入到已灭菌的培养基中混匀, 加入培养皿内, 吸取 200 μ L 细菌菌悬液于其表面, 用无菌涂布器将菌液涂布均匀。细菌在 37 °C 下培养 1 d, 并进行平板菌落计数, 计算抑菌率。以未加鹿蹄草提取物的作为对照。每个浓度作 3 个平行样, 抑菌率 (%) = (对照试验菌落数 - 相应浓度的菌落数) / 对照试验的菌落数 \times 100%。

同时, 吸取 200 μ L 菌悬液接到已凝固的培养基中心。青霉和根霉在 28 °C 下培养 3 d。以不加鹿蹄草提取液为对照。每个浓度作 3 个平行样, 然后测量其菌落直径, 再根据下面的公式算出其抑菌率。纯生长量 = 菌落平均直径 - 菌饼直径; 抑菌率 (%) = (对照纯生长量 - 相应浓度的生长量) / 对照纯生长量 \times 100%^[9]。

1.5.3 温度对鹿蹄草提取物抑菌作用的影响^[10-11]

取鹿蹄草提取液 (1.25%) 在 121 °C 湿热灭菌 5 min, 细菌以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, 真菌以青霉和根霉作为试验菌, 进行抑菌试验。具体操作见 1.5.2。同时, 取鹿蹄草提取物溶液 (1.25%) 分别在 75 °C、85 °C、100 °C 水浴加热 20 min, 经冷却后加入到培养基中, 进行抑菌试验。

1.5.4 鹿蹄草提取物对微生物作用时间与抑菌率的关系

以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为代表来测定不同浓度 (10%、5%、2.5%、1.25%) 的提取液对其作用时间与抑菌率关系。用无菌水将鹿蹄草原液稀释成各种浓度后, 各取 1 mL 并分别与 0.1 mL 的菌悬液混合, 充分摇匀。当作用时间为 1 h、3 h、6 h、12 h, 分别用培养基倾注平皿。另取 1 mL 无菌水与 0.1 mL 菌液相混合作空白对照试验。以上各皿均 37 °C, 24 h 培养, 取出分别进行平板菌落总数计数, 再计算出其抑菌率。

1.5.5 鹿蹄草提取液与盐或糖的协同抑菌作用试验^[12]

向鹿蹄草提取液 (1.25%) 中加入一定浓度的氯化钠 (3%、6%、9%) 或蔗糖 (20%、40%、60%), 以不加氯化钠或蔗糖作为对照。按照 1.5.2 的方法做金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌试验, 并采用平板菌落计数法进行计数, 算出其抑菌率。

2 结果与分析

2.1 鹿蹄草提取物的抑菌效果

表 1 鹿蹄草提取物对供试菌的抑菌效果

Table 1 The antibacterial effect of PCB

供试菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	绿脓杆菌	根霉	青霉
抑菌圈直径/mm	17	15.75	11	19	13

从表 1 知, 鹿蹄草提取物对供试菌均有明显的抑制效果。其对金黄色葡萄球菌和根霉的抑制作用较强, 而对大肠杆菌、绿脓杆菌和青霉的抑制作用相对较弱。

2.2 不同浓度的鹿蹄草提取物对供试菌的抑菌效果

从表 2 可知, 鹿蹄草提取物对于供试菌有显著的抑制作用, 并且随着鹿蹄草提取物浓度的增加, 其抑菌率明显增高。在鹿蹄草提取物的浓度在 20% 的时候, 能抑制所有供试菌的生长, 其中鹿蹄草提取物对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好, 其最低抑制浓度 (MIC) 为 5%; 对根霉和大肠杆菌抑菌效果较好, 其最低抑制浓度 (MIC) 为 10%; 对青霉和绿脓杆菌最小抑制浓度为 20%。

表2 不同浓度鹿蹄草提取物的抑菌率 %

Table 2 The inhibitory rates of PCB with different concentration

供试菌种	鹿蹄草提取物浓度/%					
	0.625	1.25	2.5	5	10	20
金黄色葡萄球菌	57.8	85.1	97.6	100	100	100
大肠杆菌	24.3	34.6	73.7	88.1	100	100
绿脓杆菌	19.9	37.3	51.3	67.8	90.1	100
根霉	6.8	30	62.6	82.4	100	100
青霉	16	28.3	42.1	61.9	86.8	100

2.3 温度对鹿蹄草提取物抑菌的影响

表3 不同温度处理下鹿蹄草提取液的抑菌率 %

Table 3 The inhibitory rate of PCB after different temperatures treated

温度/℃	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	青霉	根霉
75	85.8	30.7	24.8	28.6
85	81.1	29.4	21.5	27.8
100	75	21.7	19.6	21.4
121	68.6	15.8	18.4	17.9

从表3可知，鹿蹄草提取物具有一定的耐热性。但从中看出，鹿蹄草提取物经高温处理后，对供试菌的抑菌活性有所降低，说明鹿蹄草提取物的耐热性不是很稳定。

2.4 鹿蹄草提取物抑菌浓度与抑菌时间的关系

由图1和图2可知，在相同时间内，提取液浓度越高，抑菌率越高；在相同浓度内，作用时间越长，其抑菌率也就越高。

2.5 鹿蹄草提取物与糖、盐协同抑制效果

表4 鹿蹄草提取物与盐或糖的协同作用

Table 4 Synergistic effect of sugar and salt on antimicrobial action of PCB

供试菌种	未加处理	抑菌率/%					
		NaCl 溶液/%			蔗糖溶液/%		
		3	6	9	20	40	60
金黄色葡萄球菌	85.1	90.4	96.9	100	89.8	96.4	100
大肠杆菌	34.6	42.2	64.5	86.4	41.3	69.6	85.3

由表4可看出，在含糖和盐的溶液里，其抑菌作用明显加强，添加的糖和盐的浓度越大，抑菌率也随之增大，这表面鹿蹄草提取液与糖、盐有较强的协同作用，其作用机理应该与糖和盐本身也是食品防腐剂有关。

3 结论

鹿蹄草提取物对供试菌种均有一定的抑制作用，

其对金黄色葡萄球菌上位抑菌效果最好，其 MIC 为 5%；对根霉和大肠杆菌次之，MIC 为 10%；对青霉和绿脓杆菌最差，MIC 为 20%。随着浓度的增加或作用时间的延长，鹿蹄草提取物的抑菌率明显增高。此外，鹿蹄草提取物的耐热性不是很好，但在与糖和盐的在一起的溶液里，其抑菌效果明显。

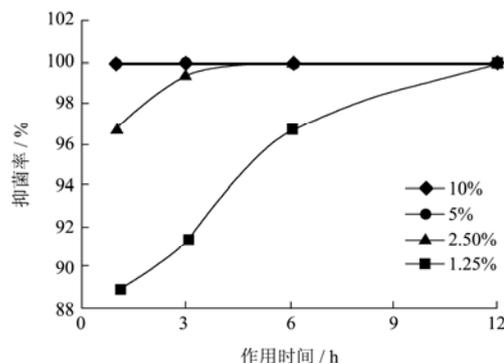


图1 金黄色葡萄球菌的抑菌时间和抑制率的关系趋势图

Fig.1 The relation between inhibitory rates and times to

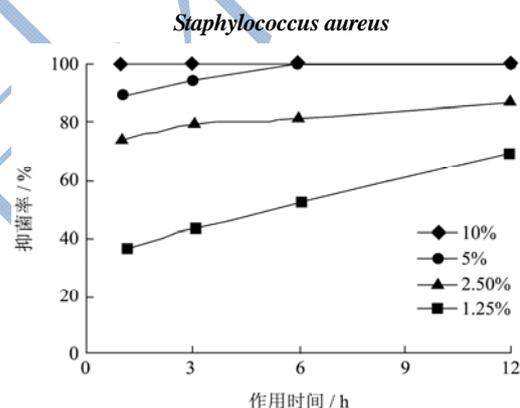


图2 大肠杆菌的抑菌时间和抑制率的关系趋势图

Fig.2 The relation between inhibitory rates and times to

Escherichia coli

参考文献

- [1] 郑虎占.中药现代研究与应用[M].学苑出版社,1999
- [2] 王储炎,艾启俊,陈颀,等.鹿蹄草的化学成分、生理功能及其在工业中的应用[J].中国食品添加剂,2006,5:127-131
- [3] 田玉先.鹿蹄草的研究与应用[J].陕西中医函授,1998,5:1-2
- [4] 艾启俊.苹果贮藏中鹿蹄草浸提物抗真菌研究初探[J].西北园艺,2003,12:9-10
- [5] 薛泉宏,程丽娟.微生物学实验教程[M].西安:世界图书出版公司,2000
- [6] 毛琼,罗宗铭.几种中草药提取物的抑菌研究[J].食品与机械,1999,5:38-39
- [7] 薛泉宏,程丽娟.微生物学实验教程[M].西安:世界图书出版公司,2000

- [8] 钟振声,黄景怡,蒲公英,等.五种常见中草药的抑菌研究[J].现代食品科技,2007,23(6):15-17
- [9] 关文强,李淑芳.丁香精油对果蔬采后病原菌抑制效应研究[J].食品科学,2005,26(12):227-230
- [10] 吴周和,徐燕,吴传茂.丁香、甘草与迷迭香的抑菌作用及其在酱油中的应用研究[J].中国酿造,2003,127(4):18-21
- [11] 陈锡雄,叶祖云,丁建发.尖叶提灯藓抑菌作用的初步研究[J].宁德师专学报,2005,17(4):353-355
- [12] 胡静丽.杨梅叶提取物抑菌作用的研究[D].浙江大学硕士学位论文,2002

现代食品科技