

覆盆子黄酮的抑菌特性研究

朱会霞

(衡水学院, 河北衡水 053000)

摘要: 本文探讨了覆盆子黄酮的抑菌作用, 研究了覆盆子黄酮对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、啤酒酵母、根霉、毛霉、青霉的抑菌作用。结果表明: 覆盆子黄酮对试验菌的抑菌顺序为: 金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>青霉, 对啤酒酵母、根霉、毛霉没有抑菌作用, 最低抑菌浓度分别为: 大肠杆菌 0.16 mg/mL, 枯草芽孢杆菌 0.08 mg/mL, 金黄色葡萄球菌 0.04 mg/mL, 青霉 0.64 mg/mL, 在 100 °C 以内, 温度对覆盆子黄酮的抑菌效果没有明显的影响, 抑菌率随作用时间的延长而增加, 随覆盆子黄酮浓度的增加而增加, 且在 pH 值 4~8 范围内, 覆盆子黄酮抑菌效果稳定。

关键词: 覆盆子; 黄酮; 抑菌

文章编号: 1673-9078(2012)11-1484-1487

Bacteriostasis Activity of Purified Raspberry Flavonoid

ZHU Hui-xia

(Hengshui College, Hengshui 053000, China)

Abstract: The bacteriostatic effect of Raspberry flavonoid was explored in the paper. The effect of raspberry flavonoid on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium Rhizopus*, and *Mucor* was studied, followed by *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Penicillium*. The results showed that it cannot inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus*, and *Mucor*. The effect of purified raspberry flavonoid on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium* were most remarkable. And the minimal inhibitory concentrations were 0.16 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.04 mg/mL and 0.64 mg/mL for *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Penicillium*, respectively. The temperature does not have an obvious effect on the bacteriostatic action of raspberry flavonoid within 100 °C. The rate of inhibition increases with time and the increase of concentration of raspberry flavonoid. Raspberry flavonoid had a stable bacteriostatic action within the pH range of 4~8.

Key words: raspberry; flavonoid; bacteriostasis

覆盆子(Raspberry)又称树莓, 蔷薇科悬钩子属浆果植物。覆盆子果实为药食两用果实, 富含氨基酸、矿物质、有机酸和 V_E 人体必需的营养素外, 还含有黄酮、多糖、粗三萜等功能性物质。因此, 覆盆子具有具有抗衰老、调节生殖系统、促进细胞免疫功能、减肥之功效, 有助阳缩尿、补肾固精功能, 用于治疗阳痿、肾虚遗精、尿频和遗尿等病症, 对金黄色葡萄球菌、人型结核杆菌和霍乱弧菌有较强的抑制作用和延缓肌体衰老, 提高免疫能力的作用, 因此, 覆盆子具有很强的药用及保健作用^[1-3]。

覆盆子黄酮类化合物是覆盆子代谢过程中产生的重要天然有机化合物, 是覆盆子中主要活性成分之一, 具有抗氧化^[4]、抑菌消炎、消除自由基抗过敏、抗感染、抗突变、抗肿瘤^[5,6]等生理活性, 且毒性较低, 因此可用作食品、化妆品的天然添加剂, 黄酮类化合物

一直是国外研究开发利用的热点, 仍是寻找有开发应用前景的先导化合物。

植物中的黄酮类化合物一般呈现弱碱性, 它能够使蛋白质凝固变性, 具有一定的抑菌和杀菌作用, 其他植物黄酮类化合物抑菌、杀菌作用的报道有一些, 但还没有有关覆盆子黄酮的抑菌、杀菌报道, 本试验以纯化后的覆盆子黄酮为研究对象, 对其抑菌作用进行了探讨, 旨在为覆盆子的开发研究及覆盆子黄酮在食品中的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

覆盆子干果(一级品, 购于衡水市中医院药店)粉碎过 60 目筛, 50 °C 烘干备用。样品成分分析中所用化学试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 菌种

细菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*); 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

收稿日期: 2012-07-07

基金项目: 河北省科技厅资助项目(11215645)

作者简介: 朱会霞, 博士, 副教授, 主要从事发酵工程、食品等方面的研究

saureus) (衡水学院微生物实验室保藏)。

酵母菌: 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

霉菌: 根霉(*Rhizopus SP*); 毛霉(*Mucor*); 青霉(*Penicillium*) (衡水学院微生物实验室保藏)。

1.3 培养基

PDA 培养基: 细菌培养基;

察氏培养基: 霉菌培养基;

麦汁培养基: 酵母菌培养基, 新鲜麦芽汁 12⁰;

2% 琼脂

1.4 实验方法

1.4.1 覆盆子黄酮的提取纯化^[8]

称取粉碎后覆盆子粉末 100 g 于三角瓶中, 加入 1 L 95% 乙醇于 50 °C 下进行提取, 提取时间 36 h, 提取中分别于第 12 h 和第 24 h 时进行超声, 超声功率 300 W, 时间 25 min, 温度 50 °C, 提取时不断震荡。提取后真空抽滤, 真空旋蒸得到膏状固体物, 加纯净水超声溶解, 石油醚萃取三次, 取水层, 乙酸乙酯萃取三次, 真空旋蒸得到黄色粉末。用 70% 乙醇超声溶解, 经 AB-8 树脂柱进行纯化, 纯化后真空旋蒸得到的黄色粉末状物, 有 70% 乙醇溶解至浓度为 2.56 mg/mL。

1.4.2 菌悬液的制备

无菌操作条件下, 将活化好的菌株用接种环分别挑去少量的霉菌孢子、细菌、酵母菌体, 分别接入无菌水中, 摇匀, 制成菌悬液待用。

1.4.3 覆盆子总黄酮抑菌效果

打孔器将滤纸片打孔得到直径为 6 mm 直径的圆形滤纸片, 置于三角瓶中, 高压蒸汽灭菌处理后, 无菌操作将滤纸片浸于各个药液中, 12 h 后用无菌镊子取出, 沥去多余的药液后按照顺时针方向贴入刚接种的培养基平板内, 37 °C 下培养 24 h, 观察有无抑菌圈, 用游标卡尺测定抑菌圈直径^[9]。

1.4.4 最低抑菌浓度的测定

取 8 支试管各加入 2 mL 液体培养基, 第 1 支试管中加入 2 mL 覆盆子黄酮纯化液浓度 2.56 mg/mL, 混匀, 自第 1 支试管中取出 2 mL 混合液加入至第 2 支试管, 依次进行, 到第 8 支试管时弃去 2 mL, 8 支试管中分别接入 200 μ L 细菌, 取 1 支不加菌的试管作为空白对照。37 °C 下培养 24 h, 观察记录不长菌的最高稀释药物浓度为最低抑菌浓度^[10]。

1.4.5 覆盆子黄酮抑菌影响因素研究

1.4.5.1 温度对覆盆子黄酮抑菌效果的影响

无菌操作下, 取 5 个无菌三角瓶, 每瓶中分别移入 5 mL 最低抑菌浓度的覆盆子黄酮稀释液, 分别放入 20、40、60、80、100 °C 的水浴中进行加热, 加热时间 20 min, 每瓶中接入 200 μ L 菌悬液, 以对各菌的

最低稀释浓度进行抑菌活性试验, 比较不同温度对覆盆子黄酮抑菌活性的影响。

1.4.5.2 覆盆子黄酮对致病菌的作用时间与抑菌率之间的关系

用无菌水将覆盆子黄酮提取液稀释成各种浓度后, 以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌, 青霉为代表来测定不同浓度的提取液对其作用时间与抑菌率之间的关系。

1.4.5.3 pH 值对覆盆子黄酮抑菌效果的影响

用稀 HCL 或 NaOH 调节营养琼脂培养基 pH, 使其 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9, 用各菌的覆盆子黄酮最低抑菌浓度进行抑菌活性试验, 以比较不同 pH 值对抑菌活性的影响。

2 结果与讨论

2.1 覆盆子黄酮抑菌效果研究

覆盆子纯化黄酮对大肠、枯草芽孢杆等菌的抑菌效果如表 1 所示。

表 1 覆盆子黄酮的抑菌效果表

Table 1 The antibacterial activity of Raspberry flavonoids

试验菌	抑菌圈(直径/mm)	空白对照样(直径/mm)
大肠杆菌	9.22	0
枯草芽孢杆菌	11.64	0
金黄色葡萄球菌	13.50	0
啤酒酵母	+	0
根霉	+	0
毛霉	+	0
青霉	5.26	0

注: +表示抑菌不明显。

由表 1 可知, 覆盆子纯化黄酮对不同的菌体表现出不同的抑菌特性, 能够被覆盆子黄酮抑制的试验菌有大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉且覆盆子黄酮对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径达到 13.50 mm, 而对啤酒酵母、根霉、毛霉的抑菌效果不明显。

2.2 覆盆子黄酮对各试验菌最低抑菌浓度的测定

覆盆子黄酮最低抑菌浓度测定结果如表 2 所示。

由表 2 可知, 覆盆子黄酮对细菌的抑菌作用较强, 最低抑菌浓度分别为大肠杆菌 0.16 mg/mL, 枯草芽孢杆菌 0.08 mg/mL, 金黄色葡萄球菌 0.04 mg/mL, 由最低抑菌浓度可以看出覆盆子黄酮对试验菌的抑菌效果顺序为: 金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>青霉, 这与管碟法检测结果的顺序是一致的。由于枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌中既有革兰氏阳性菌, 又有革兰氏阴性菌, 说明覆盆子黄酮对革

兰氏阴、阳性细菌都有抑制作用,进一步表明覆盆子黄酮对细菌有较好的抑菌作用。

表 2 覆盆子黄酮对试验菌的最低抑菌浓度

Table 2 The minimum inhibitory concentration of microorganisms for Raspberry flavonoids

试验菌	管号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
大肠杆菌	—	—	—	—	—	+	++	+++
枯草芽孢杆菌	—	—	—	—	—	—	+	++
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	—	—	+
葡萄酒酵母	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
根霉	+	++	++	++	++	++	++	++
毛霉	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
青霉	—	—	—	+	+	++	+++	+++

注:“—”表示培养皿中无菌生长;“+”表示培养皿中有少量菌生长;“++”表示培养皿中有不超过 1/5 面积的菌生长;“+++”表示培养皿中有不超过 1/3 的菌生长;“++++”表示培养皿中有不超过 1/2 的菌生长。

2.3 影响覆盆子黄酮抑菌因素研究

2.3.1 温度对覆盆子黄酮抑菌效果的影响,

温度对物质的稳定性具有很大的影响,很多物质高温条件下易分解、变质,影响其作用的发挥,不同温度条件下,覆盆子黄酮的抑菌情况如表 3 所示。

图 3 温度对覆盆子黄酮抑菌活性的影响

Table 3 The effect of different temperature on the antibacterial activity of Raspberry flavone

试验菌	温度/℃				
	20	40	60	80	100
大肠杆菌	—	—	—	—	+
枯草芽孢杆菌	—	—	—	—	+
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	+
青霉	—	—	—	+	+

由表 3 可知,温度在 100 ℃以内,覆盆子黄酮的抑菌效果并不随温度的升高而减弱,高于 100 ℃时,覆盆子黄酮的抑菌效果有所减弱,原因可能是高温对覆盆子黄酮的抑菌成分有所破坏而导致,总之,在一定的温度范围内,覆盆子黄酮的抑菌效果稳定。

2.3.2 覆盆子黄酮的抑菌时间及抑菌率

覆盆子黄酮对试验菌的作用时间与抑菌率之间的关系如图 1~4 所示。

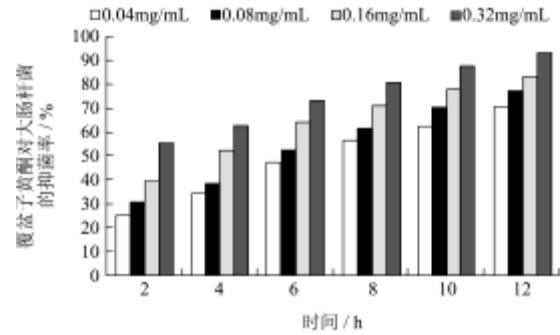


图 1 覆盆子黄酮对 Escherichia coli 的抑菌效果

Fig.1 The inhibiting effect of Raspberry flavonoid on Escherichia coli

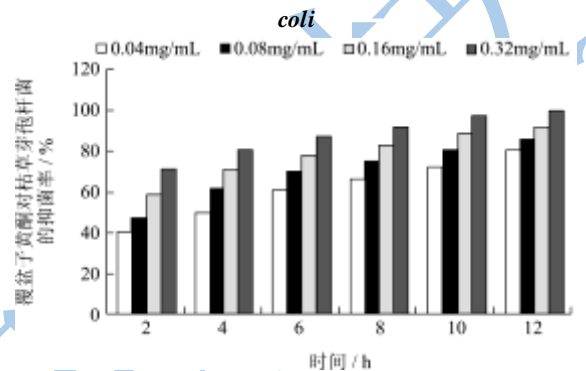


图 2 覆盆子黄酮对 Bacillus subtilis 的抑菌效果

Fig.2 The inhibiting effect of Raspberry flavonoid on Bacillus subtilis

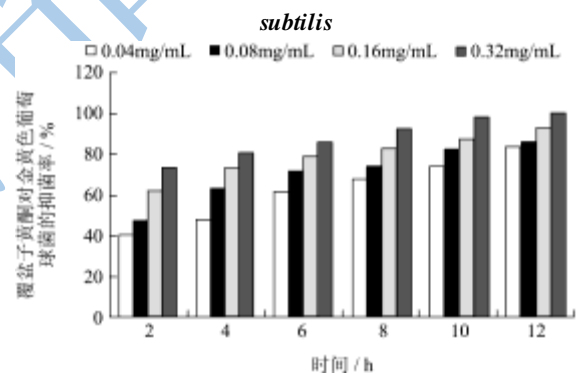


图 3 覆盆子黄酮对 Staphylococcus aureus 的抑菌效果

Fig.3 The inhibiting effect of Raspberry flavonoid on Staphylococcus aureus

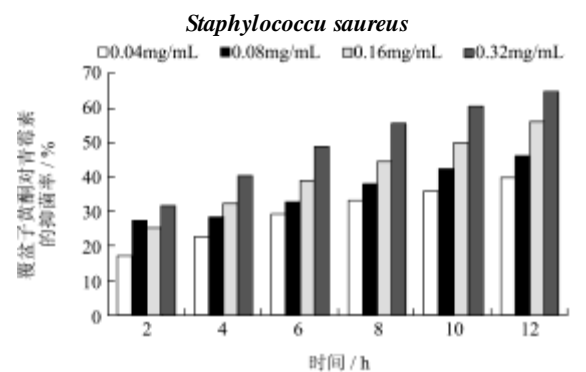


图 4 覆盆子黄酮对 Penicillium 的抑菌效果

Fig.4 The inhibiting effect of Raspberry flavonoid on Penicillium

如图 1~4 所示,覆盆子黄酮对几种试验菌的抑菌率随着时间的延长而增加,且相同时间内对于同一种菌的抑菌效果,随覆盆子黄酮浓度的增加而增加,覆盆子黄酮对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,相同浓度的覆盆子黄酮对金黄色葡萄球菌同时间的的抑菌率均高于其它试验菌。

2.3.3 pH 值对覆盆子黄酮抑菌活性的影响

表 4 不同 pH 值对覆盆子黄酮抑菌活性的影响

Table 4 The effect of different pH on the antibacterial activity of Raspberry flavone

试验菌	pH 值											
	4		5		6		7		8		9	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
大肠杆菌	—	—	+	—	++	—	++	—	+++	—	++++	+
枯草芽孢杆菌	—	—	+	—	++	—	+++	—	+++	+	++++	+
金黄色葡萄球菌	—	—	+	—	++	—	+++	—	++++	—	++++	—
青霉	—	—	+	—	++	—	+++	—	+++	—	++++	+

注:“a”表示未加入覆盆子黄酮;“b”表示添加覆盆子黄酮;“—”表示培养皿中无菌生长;“+”表示培养皿中有少量菌生长;“++”表示培养皿中有不超过 1/5 面积的菌生长;“+++”表示培养皿中有不超过 1/3 的菌生长;“++++”表示培养皿中有不超过 1/2 的菌生长。

由表 4 可知,覆盆子黄酮的抑菌活性具有较宽的 pH 值范围, pH 值较低时有较好的抑菌活性, pH 较高时也充分发挥抑菌活性。pH 值在 4~8 的范围内,覆盆子黄酮均能较好的抑制菌的生长,随 pH 值的升高至 9 时,覆盆子黄酮的抑菌活性有所减弱,细菌开始生长,但生长趋势弱于对照。因此,覆盆子黄酮不仅可以用于弱碱性食品,还可以用于酸性食品的储藏保鲜。较其它化学防腐剂,应用更广泛。

3 结论

黄酮类化学物具有可以破坏微生物细胞完整性,导致微生物细胞释放胞内成分,阻止细胞内大分子物质合成从而抑制微生物生长的作用^[1]。本试验中对覆盆子黄酮的抑菌效果进行研究,试验结果显示,覆盆子黄酮对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有较强的抑制作用,说明覆盆子黄酮具有可拓展的应用价值,既可以作为防腐保鲜剂,又可以用于医药、保健品的开发,从而达到防腐抑菌、保健的双重功效。

参考文献

- [1] 李继仁,何冰.覆盆子类 22 种生药中微量元素的含量分析[J].微量元素与健康研究,1999,6(3):29-31
- [2] 向德军.掌叶覆盆子提取物的温肾助阳作用研究[J].广东药学院学报,2002,18(3):217-218
- [3] Masao H, Kue P K, Yue Z S, et al. Atriterpene from the fruits of rubus chingii[J]. Phytochemistry, 1988, 27 (12): 3975
- [4] 郑振洵.毛莓总皂苷体外抗肿瘤作用研究[J].浙江临床医学,2007,9(5):611
- [5] 叶蕪芝.粗叶悬钩子对实验性肝损伤的治疗作用研究[J].中医药学刊,2005,23(5):829-831
- [6] 杨东梅,许实波.穿心草黄酮抗炎作用及毒性的初步研究[J].广东药学院学报,2001,17(1):33-35
- [7] 赵铁华,杨鹤松,邓淑华,等.黄琴茎叶总黄酮镇痛作用的实验研究[J].中国中医药科技,2001,8(3):175-177
- [8] 孙金旭,朱会霞,肖冬光.超声波提取覆盆子干果黄酮工艺研究[J].中国酿造,2010,58(4):85-87
- [9] 丁利君,孙俊,周送霞.超声波辅助提取海金沙黄酮及其抑菌效果研究[J].现代食品科技,2009,25(10):1212-1213
- [10] Katarzyna U, Anna M, Marta M, et al. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures [J]. Biologia, 2007, 62(2): 132-135
- [11] 袁尔东,肖仔君,刘本国,等.亮叶杨桐叶总黄酮提取及抑菌活性的研究[J].现代食品科技,2009,25(10):305-308