

桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除效果及抑菌活性研究

徐艳阳, 蔡森森, 于静

(吉林大学生物与农业工程学院, 吉林长春 130022)

摘要: 为了探索桑白皮甾醇的功能, 首先测定在不同的甾醇质量浓度、反应时间、反应温度和 pH 值条件下桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除效果, 结果显示质量浓度为 0.80 mg/mL 桑白皮甾醇溶液对亚硝酸盐清除率达到 72.65%; 在此浓度下进行的单因素试验结果表明, 当反应时间 60 min、反应温度 65 °C、pH 值 3.0 时, 桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除率分别达到最大值。接着, 初步探讨桑白皮甾醇的抑菌活性及作用机制, 采用滤纸片法观察桑白皮甾醇对不同细菌和霉菌的影响, 并测定桑白皮甾醇对大肠杆菌生长曲线、菌体蛋白、电导率的影响。结果显示桑白皮甾醇对大肠杆菌的 MIC 值为 10.0 mg/mL, 其对大肠杆菌的菌体分裂、对菌体蛋白的正常代谢都有明显抑制, 且引起细胞膜通透性变化, 这些都表明桑白皮甾醇能抑制大肠杆菌生长。

关键词: 桑白皮; 植物甾醇; 亚硝酸盐; 抑菌作用; 大肠杆菌

文章编号: 1673-9078(2014)2-53-57

Scavenging Ability for Nitrite and Antibacterial Mechanism of Phytosterol from *Cortex mori*

XU Yan-yang, CAI Sen-sen, YU Jing

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: In order to explore functional properties of phytosterol extracted from *Cortex mori*, scavenging ability for nitrite was determined under different conditions, such as phytosterol concentration, reaction time, reaction temperature and pH. The results showed that nitrite scavenging rate reached 72.65% when concentration of phytosterol was 0.80 mg/mL. At this concentration, the nitrite scavenging rate reached the maximum under the following conditions: reaction time of 60 min, reaction temperature of 65 °C and pH of 3.0 by the single factor tests. Then antibacterial activities and mechanism of phytosterol from *Cortex mori* were also discussed. The antimicrobial effects against various bacterial and mold strains were tested by filter paper method. Effects of phytosterol from *Cortex mori* against *Escherichia Coli* were obtained by determination of bacterial growth curves, bacterial protein content and conductivity of bacterial suspension solution. MIC of phytosterol against *E. coli* was 10.0 mg/mL. Phytosterol from *Cortex mori* inhibited bacterial split, cell division, normal metabolism activities of bacterial proteins, and made the change of cell membrane permeability, showing that it inhibited the normal growth of *E. coli*.

Key words: *Cortex mori*; phytosterol; nitrite; antibacterial effect; *Escherichia Coli*

桑白皮 (*Cortex Mori*) 为桑科桑属植物白桑 (*Morus alba* L.) 的干燥根皮, 是我国卫生部于 2002 年公布的可用于保健食品的中药之一。其药理作用主要有利尿、降血压、镇咳、平喘、抗炎和降糖等。植物甾醇是以甾核为骨架、结构上类似于胆固醇的甾体化合物, 是植物性原料细胞膜的组成成分之一, 具有降胆固醇、抑制肿瘤和抗炎退热等功效。

目前国内外学者对桑白皮的研究主要集中在多糖、黄酮等的提取及抗氧化性、降糖、平喘和治疗肺疾病等方面^[1-6]。对桑白皮甾醇的研究报道很少, 仅有

收稿日期: 2013-08-12

基金项目: 吉林大学基本科研业务费项目 (450060487500)

作者简介: 徐艳阳 (1972-9), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品营养与安全

Piao Shu-juan^[7]等学者采用色谱法测定了桑白皮甾醇的含量。韩军花等学者^[8]研究发现, 通常用于利尿、抗炎和降血脂的中药中含有较多的植物甾醇, 其中桑白皮的植物甾醇总含量超过 2 mg/g。李丹平等学者^[9]研究表明红黑二九甾醇对金黄色葡萄球菌抑制作用较强, 麻兵继等^[10]研究表明麦角甾醇过氧化物对金黄色葡萄球菌和苏云金芽孢杆菌的抑菌活性显著, 毛春季^[11]研究表明米糠甾醇对大肠杆菌、巴氏杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为 0.025 mg/mL。目前对桑白皮甾醇的亚硝酸盐清除作用、抑菌活性及其机制的研究尚未见报道, 本文研究桑白皮甾醇在不同的甾醇质量浓度、反应时间、反应温度和 pH 值条件下对亚硝酸盐清除作用的影响, 采用滤纸片法观察桑白皮甾醇对不同细菌和霉菌的影响, 并测定桑白皮甾醇对

大肠杆菌生长曲线、菌体蛋白、电导率的影响,以探讨桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除效果以及对大肠杆菌的抑制作用,为桑白皮甾醇的应用开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑白皮甾醇,本实验室法制备;大肠杆菌 CICC 10389,购于中国工业微生物菌种保藏管理中心;枯草芽孢杆菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、霉菌由本院食品科学与工程实验室提供。

1.2 原料主要仪器与设备

AL104 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;CY-100 微量进样器,北京青云卓立精密设备有限公司;T22N 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;SHA-C 水浴恒温振荡器,金坛市恒丰仪器厂;LD4-2A 型低速离心机,北京市雷勃尔离心机有限公司;PH070A 干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;DDS-307 雷磁电导率仪,上海精密科学仪器有限公司;DHP060 恒温培养箱,上海实验仪器厂有限公司;洁净操作台,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 试验方法

1.3.1 桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除效果

根据文献^[2]方法测定亚硝酸盐含量,按照式(1)计算亚硝酸盐清除率,同时设置抗坏血酸作为阳性对照组。

$$I = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

注: I 为亚硝酸盐清除率(%); A_0 为空白测得的吸光度值; A_i 为加一定质量浓度样品的吸光度值。

1.3.2 桑白皮甾醇抑菌活性研究

1.3.2.1 滤纸片法测定桑白皮甾醇的抑菌效果

参照文献^[13]滤纸片法测定。

1.3.2.2 最低抑制浓度(MIC)测定

参照文献^[13]方法测定。

1.3.3 桑白皮甾醇对大肠杆菌抑制机制初探

1.3.3.1 桑白皮甾醇抑制大肠杆菌生长的曲线

参照文献^[14]方法测定。

1.3.3.2 考马斯亮蓝法测定大肠杆菌蛋白的含量

参照文献^[13]方法测定。

1.3.3.3 大肠杆菌培养液电导率的测定

参照文献^[14]方法测定。

1.4 数据分析

每次试验重复三次,运用 SPSS V17.0 对数据进行方差分析(Analysis of Variance, ANOVA),组间比较采用 LSD 法(Least-significant difference)和 S-N-K 法(Student-Newman-Keuls), $p < 0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除作用研究

2.1.1 质量浓度对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除效果的试验方法见 1.3.1,结果见图 1。由图知 1 可知,桑白皮甾醇质量浓度在 0.16~0.80 mg/mL 范围内,对亚硝酸盐的清除率从 $(9.11 \pm 1.63)\%$ 逐渐增加至 $(72.65 \pm 1.36)\%$ ($p < 0.01$),而抗坏血酸对亚硝酸盐清除率则从 $(93.15 \pm 0.45)\%$ 增加至 $(96.35 \pm 1.90)\%$ 。表明桑白皮甾醇对亚硝酸盐有一定的清除效果,低浓度时对亚硝酸盐的清除率较低,质量浓度为 0.80 mg/mL 桑白皮甾醇溶液对亚硝酸盐的清除率为 $(72.65 \pm 1.36)\%$,低于抗坏血酸的清除率 $(96.35 \pm 1.90)\%$ 。

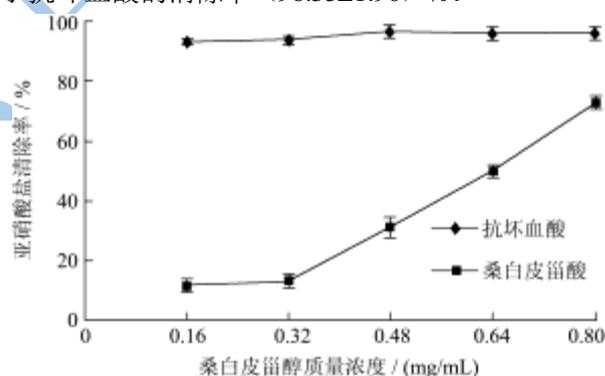


图 1 质量浓度对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

Fig.1 Scavenging effects of mass concentration on nitrite by phytoesterol from *Cortex mori*

2.1.2 反应时间对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

准确量取 0.8 mg/mL 桑白皮甾醇样液 2.0 mL,加入 5 $\mu\text{g/mL}$ NaNO_2 溶液 2.0 mL,定容至 10.0 mL,在 $\text{pH}=5.0$ 、 50°C 条件下反应,每隔 20 min 取 5.0 mL 反应液测定亚硝酸盐的含量,并计算桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除率,同时做空白试验,结果见图 2。由图 2 可以看出,桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除作用随反应时间的延长而增大。在 0~60 min 内随时间的延长对亚硝酸盐的清除率显著增加,超过 60 min 对亚硝酸盐的清除率增加缓慢。其

原因可能为随着反应的进行, 反应液中的亚硝酸盐含量降低, 导致桑白皮甾醇与亚硝酸盐的结合机率下降。

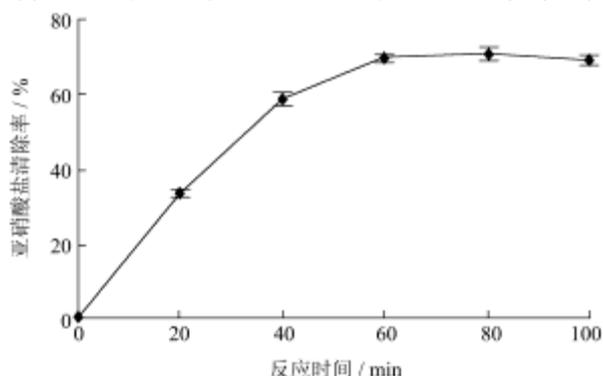


图2 反应时间对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

Fig.2 Scavenging effects of reaction time on nitrite by phytosterol from *Cortex mori*

2.1.3 反应温度对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

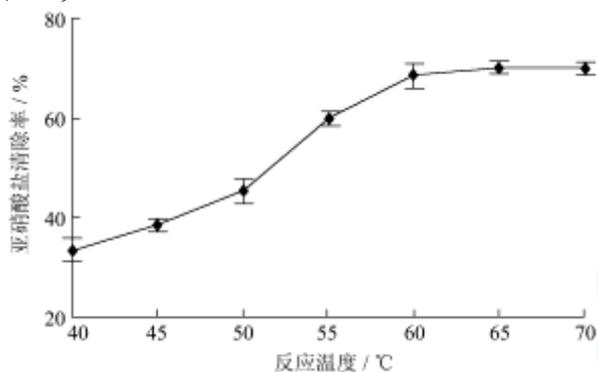


图3 反应温度对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

Fig.3 Scavenging effects of reaction temperature on nitrite by phytosterol from *Cortex mori*

准确量取0.8 mg/mL桑白皮甾醇样液2.0 mL, 加入5 μg/mL NaNO₂ 溶液2.0 mL, 定容至10.0 mL, 分别在40、45、50、55、60、65、70 °C条件下进行反应, 每隔20 min取5 mL反应液测定亚硝酸盐的含量, 并计算桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除率, 同时做空白试验, 结果见图3。由图3可以看出, 桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除作用随反应温度的升高而增强。当温度升高到65 °C时对亚硝酸盐的清除率最大, 超过65 °C后桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除作用增加缓慢, 其原因可能为随着反应温度的增加, 加快了反应液中分子的运动速度, 从而加快了反应速度。同时温度升高超过65 °C导致氧化反应的发生, 使部分亚硝酸盐发生氧化作用而减少。

2.1.4 pH值对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

准确量取0.8 mg/mL桑白皮甾醇样液2.0 mL, 加入5 μg/mL NaNO₂ 溶液2.0 mL, 定容至10.0 mL, 分别在pH值为3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 时, 在50 °C条

件下进行反应, 每隔20 min取5 mL反应液测定亚硝酸盐的含量, 并计算桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除率, 同时做空白试验, 结果见图4。由图4可以看出, 随着pH值的增大, 桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除作用显著下降。其原因可能是在低pH条件下, 桑白皮甾醇具有较高的稳定性, 并与亚硝酸盐更易发生氧化还原反应。

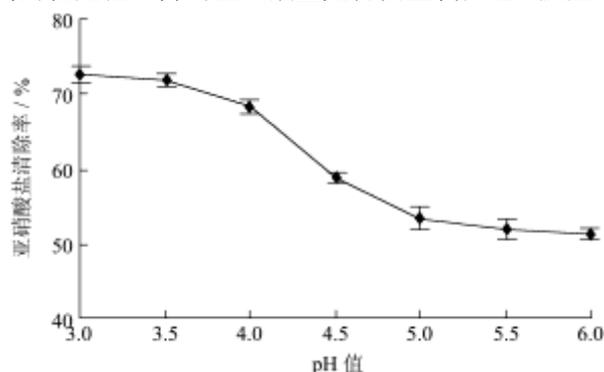


图4 pH值对桑白皮甾醇清除亚硝酸盐作用的影响

Fig.4 Scavenging effects of pH value on nitrite by phytosterol from *Cortex mori*

2.2 桑白皮甾醇的抑菌活性研究

2.2.1 桑白皮甾醇对不同供试菌的抑制效果

考查 10.0 mg/mL 桑白皮甾醇溶液对不同细菌以及 20.0 mg/mL 桑白皮甾醇溶液对不同霉菌的抑菌活性, 同时做空白对照 (25%乙醇) 和阳性对照 (山梨酸钾), 试验结果见表 1。

表 1 桑白皮甾醇溶液对不同细菌的抑菌圈直径 (mm)

Table 1 The diameter of inhibition zone after treated by phytosterol from *Cortex mori*

供试菌	桑白皮甾醇溶液	山梨酸钾溶液	25%乙醇
大肠杆菌	9.38±0.33	6.38±0.25	6.56±0.25
枯草芽孢杆菌	8.43±0.10	9.22±0.14	6.59±0.27
志贺氏菌	8.30±0.06	6.54±0.06	6.60±0.14
金黄色葡萄球菌	8.00±0.06	6.46±0.08	6.56±0.20
毛霉菌	9.45±0.21	9.24±0.23	6.76±0.14
灰绿曲霉菌	6.87±0.23	6.44±0.23	6.74±0.12
青霉菌	6.79±0.10	6.63±0.08	6.63±0.24

由表 1 可知, 25%乙醇对不同供试菌没有抑制作用, 其滤纸直径增加是由于 25%乙醇浸泡导致了溶胀。10.0 mg/mL 桑白皮甾醇溶液对不同细菌都有明显的抑制作用 (p<0.01), 其中对大肠杆菌的抑制作用最强, 其次为枯草芽孢杆菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌; 与相同质量浓度的山梨酸钾相比, 桑白皮甾醇对大肠杆菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用较强, 对枯草芽孢杆菌的抑制作用较弱。20.0mg/mL 桑白皮甾醇溶液和山梨酸钾溶液均对毛霉菌具有较强的抑制

作用,对灰绿曲霉菌和青霉菌没有抑制作用($p < 0.01$)。

2.2.2 桑白皮甾醇对大肠杆菌的最低抑制浓度(MIC)

不同质量浓度的桑白皮甾醇溶液对大肠杆菌的抑制效果见表 2。由表 2 可知,在桑白皮甾醇质量浓度

0.5~8.0 mg/mL 范围内,有大肠杆菌菌落生长,所以对其没有抑制作用;当质量浓度为 10.0~20.0 mg/mL 时,没有菌落生长,表明桑白皮甾醇溶液对大肠杆菌有抑制作用。因此,桑白皮甾醇溶液对大肠杆菌的 MIC 值为 10.0 mg/mL。

表 2 不同质量浓度的桑白皮甾醇溶液对大肠杆菌的抑制效果

Table 2 The antibacterial effect on *E. coli* after treated by various concentrations of phytosterol from *Cortex mori*

桑白皮甾醇溶液质量浓度/(mg/mL)	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	20.0
大肠杆菌	+	+	+	+	+	+	-	-

注:“+”表示有菌落生长;“-”表示无菌落生长。

2.3 桑白皮甾醇抑菌机制初探

2.3.1 桑白皮甾醇对大肠杆菌生长的影响

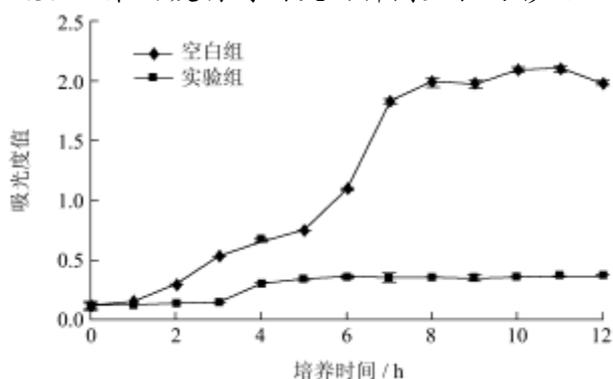


图 5 桑白皮甾醇对大肠杆菌生长曲线的影响

Fig.5 Effects on *E. coli* growth curve after treated by phytosterol from *Cortex mori*

桑白皮甾醇对大肠杆菌生长曲线的影响见图 5。由图 5 可知,与空白组相比,加桑白皮甾醇的菌悬液生长曲线有明显的变化($p < 0.01$)。空白组的大肠杆菌从 4 h 起进入对数生长期,在 7~12 h 范围内达到了稳定期。实验组的大肠杆菌从培养 1 h 起菌悬液吸光度值开始缓慢增加,3~4 h 时增加较多,但远远低于空白组,在 4~12 h 范围内菌悬液吸光度值趋于稳定。由此表明桑白皮甾醇能够明显抑制大肠杆菌对数生长期的菌体分裂,即抑制大肠杆菌生长,与董周永^[12]认为石榴果皮提取物能抑制金黄色葡萄球菌对数生长期菌体分裂的结果一致。

2.3.2 桑白皮甾醇对大肠杆菌蛋白质的影响

采用考马斯亮蓝法测定了桑白皮甾醇对大肠杆菌蛋白质的影响,试验结果见图 6~7。由图 7 可知,空白组随着培养时间的延长,大肠杆菌外膜蛋白质的质量浓度逐渐增加。实验组在培养时间为 0~2 h 时菌体蛋白的质量浓度没有明显变化;超过 4 h 后,实验组菌体蛋白质量浓度逐渐增加,然而增加幅度明显低于空白组($p < 0.01$)。这说明桑白皮甾醇对大肠杆菌外膜蛋白质的正常代谢具有明显的抑制作用。

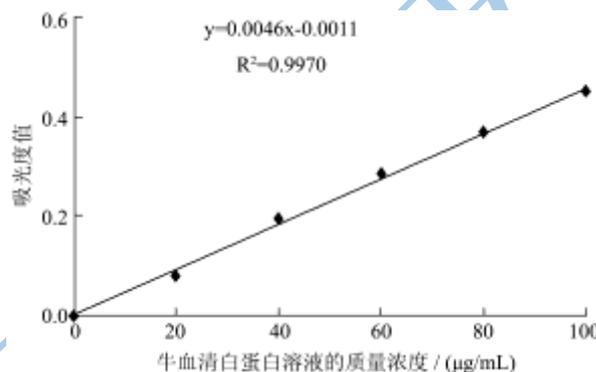


图 6 牛血清白蛋白溶液的标准曲线

Fig.6 Standard curve of bovine serum albumin

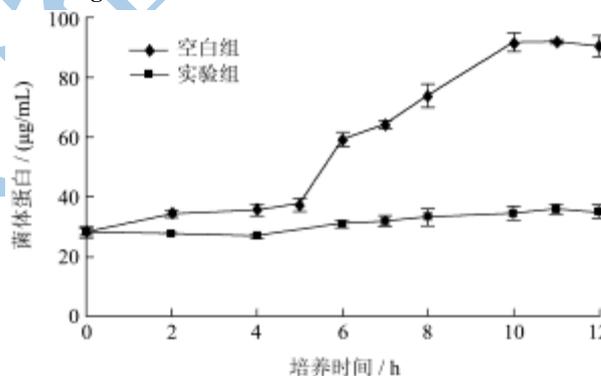


图 7 桑白皮甾醇对大肠杆菌蛋白质的影响

Fig.7 Effects on *E. coli* protein after treated by phytosterol from *Cortex mori*

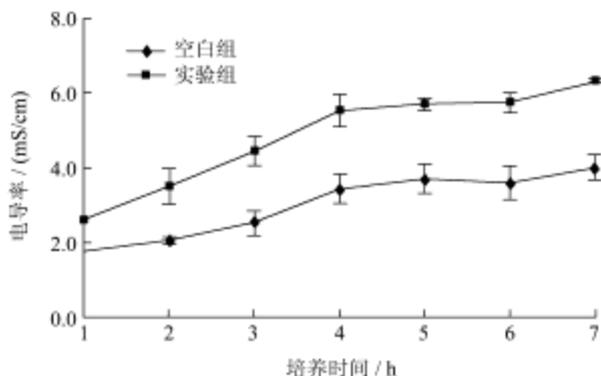


图 8 桑白皮甾醇对大肠杆菌培养液的影响

Fig.8 Effects on *E. coli* culture medium after treated by phytosterol from *Cortex mori*

2.3.3 桑白皮甾醇对大肠杆菌培养液的影响

桑白皮甾醇对大肠杆菌培养液的影响见图 8。由图 8 可知,随着培养时间的延长,实验组大肠杆菌培养液的电导率明显高于空白组 ($p < 0.01$)。这说明桑白皮甾醇引起细胞膜通透性发生变化,破坏细胞内环境的稳定性,导致电解质渗出,从而起到抑菌作用。

3 结论

3.1 通过分光光度法测定桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除率,表明桑白皮甾醇纯化样品对亚硝酸盐有一定的清除效果。质量浓度为 0.80 mg/mL 桑白皮甾醇对亚硝酸盐清除率达到 (72.65±1.36)%;当质量浓度为 0.80 mg/mL 时,桑白皮甾醇对亚硝酸盐清除作用的单因素试验结果表明,当反应时间 60 min、反应温度 65℃时、pH 值 3.0 时,桑白皮甾醇对亚硝酸盐的清除率分别达到最大值。

3.2 采用滤纸片法测定桑白皮甾醇对不同细菌和霉菌的抑菌活性。结果表明,桑白皮甾醇对细菌的抑制作用强弱顺序依次为:大肠杆菌>枯草芽孢杆菌>志贺氏菌>金黄色葡萄球菌,对大肠杆菌的最低抑制浓度为 10.0 mg/mL;对毛霉菌具有较强的抑制作用,对灰绿曲霉菌和青霉菌没有抑制作用。

3.3 通过测定桑白皮甾醇对大肠杆菌生长曲线、菌体蛋白、电导率的影响,探索桑白皮甾醇对大肠杆菌的抑菌机制。结果显示,质量浓度为 10.0 mg/mL 桑白皮甾醇溶液对大肠杆菌的菌体分裂、菌体蛋白的正常代谢均有明显抑制作用,且引起细胞膜通透性的变化,表明桑白皮甾醇能抑制大肠杆菌的生长。

参考文献

- [1] CHANG Lee-wen, JUANG Lih-jeng, WANG Bor-sen, et al. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(4): 785-790
- [2] DOMINIK K, JÓZEF K, MAGDALENA R, et al. β -Sitosterol and campesterol stabilisation by natural and synthetic antioxidants during heating [J]. *Food Chemistry*, 2011, 128(4): 937-942
- [3] MA Song-Tao, ZHANG Xiao-Ke, WANG Qiu-Lin. Experimental study on the preventive and treatment function of cortex mori for peripheral nervous lesion at the early stage of diabetes rats [J]. *Chinese journal of applied physiology*, 2008, 24(2): 201-204
- [4] KIM Hyun-Ji, LEE Hai-ja, JEONG Soo-Jin, et al. Cortex Mori Radicis extract exerts antiasthmatic effects via enhancement of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and inhibition of Th2 cytokines in a mouse asthma model [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138(1): 40-46
- [5] OROZCO-SOLANO M, RUIZ-JIMÉNEZ J, LUQUE de CASTRO M D. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(8): 1227-1235
- [6] CHANG Lee-wen, JUANG Lih-jeng, WANG Bor-sen, et al. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(4): 785-790
- [7] PIAO Shu-juan, CHEN Li-xia, KANG Ning, et al. Simultaneous Determination of Five Characteristic Stilbene Glycosides in Root Bark of *Morus alba* L. (Cortex Mori) Using High-Performance Liquid Chromatography [J]. *Phytochemical Analysis*, 2011, 22(3): 230-235
- [8] 韩军花,胡叶梅,王雷,等.我国保健食品常用植物资源中植物甾醇含量研究[J].*营养学报*,2010,32(1):82-85
Han Jun-hua, Hu Ye-mei, Wang Lei, et al. The Phytosterols Content in Plant Materials Commonly Used in Functional Food in China [J]. *Nutrimenta Sinica*, 2010, 31(1): 82-85
- [9] 李丹平,朱乐,余卓尔,等.红黑二丸中甾醇类物质的抑菌活性[J].*食品科学*,2012,33(11):70-74.
Li Dan-ping, Zhu Le, Yu Zhuo-er, et al. Antimicrobial Activity of Sterol Extracts from *Begonia sinensis* Rhizome [J]. *Food Science*, 2012, 33(11): 70-74
- [10] 麻兵继,文春南,吴婷婷,等.麦角甾醇过氧化物的抑菌活性研究[J].*食品研究与开发*,2012,33(7):42-44
Ma Bing-ji, Wen Chun-nan, Wu Ting-ting, et al. Study on the Anti-bacterial Activity of Ergosterol Peroxide [J]. 2012, 33(7): 42-44
- [11] 毛春季.米糠甾醇体外抑菌作用及免疫增强作用研究[D].长沙:湖南农业大学,2012
Mao Chun-ji. Rice Bran Sterol Antibacterial Activity in Vitro and Enhancement of Immunity Research [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012
- [12] 王海凤,王常青,刘佳璐,等.不同方法制备的葵花籽多肽酶解物对亚硝化反应的抑制作用[J].*食品科学*,2011,32(9): 51-54
Wang Hai-feng, Wang Chang-qing, Liu Jia-lu, et al. Anti-nitrosation Effects of Sunflower Seed Peptides Prepared by Different Enzymatic Hydrolysis Methods [J]. *Food*

- Science, 2011, 32(9): 51-54
- [13] 姜玮. 长白山杜香挥发油抑菌活性成分提取及抑菌机理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012
- Jiang Wei. Extraction and Anti-bacterial Mechanism of the Anti-bacterial Essential Oil of *Ledum Palustre* L. from Changbai Mountain [D]. Changchun: Jilin University, 2012
- [14] 刘蔚, 周涛. ϵ -聚赖氨酸抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9): 15-20
- Liu Wei, Zhou Tao. Action Mechanism of Antimicrobial ϵ -Poly-L-lysine [J]. Food Science, 2009, 30(9): 15-20

现代食品科技