

黄芪茎叶总皂苷提取物的抑菌活性研究

郭丽丽, 王小敏, 秦楠, 房雪

(山西中医药大学制药与食品工程学院, 山西晋中 030619)

摘要: 本文采用滤纸片法和倍比稀释法测定黄芪茎叶不同成分对 6 种供试菌的抑菌圈直径和最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC), 分析了黄芪茎叶资源的抑菌活性, 并通过测定大肠杆菌的生长曲线及菌悬液中高分子物质的含量, 初步阐述了黄芪茎叶的抑菌机理。结果表明, 黄芪茎叶总皂苷对 6 种供试菌均具有明显的抑菌活性, 尤其是对大肠杆菌的 MIC 值可达 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 黄芪茎叶总黄酮仅对 2 种供试菌具有明显抑菌活性, MIC 值均为 93.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 黄芪茎叶总多糖无抑菌活性。黄芪茎叶皂苷类提取物的加入可严重抑制大肠杆菌的生长, 使菌悬液中核酸物质含量增大, 表明黄芪茎叶皂苷可通过破坏菌体细胞膜的完整性, 致使大分子物质外溢而发挥抑菌作用。本研究为黄芪茎叶作为一种天然防腐剂在食品保鲜与贮藏领域的应用提供了理论依据。

关键词: 黄芪茎叶; 提取物; 食品防腐剂; 机理

文章编号: 1673-9078(2019)01-82-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.012

Study on the Antibacterial Activity of the Total Saponins Extract from the Stems and Leaves of *Astragalus membranaceus*

GUO Li-li, WANG Xiao-min, QIN Nan, FANG Xue

(College of Pharmaceutical and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

Abstract: In this study, the antibacterial activity of the stems and leaves of *Astragalus membranaceus* (denoted as AMSL herein) was explored through testing the inhibition zone diameter and the minimum inhibitory concentration (MIC) of different components on six test bacteria by the filter paper method and double dilution method respectively. Besides, the antibacterial mechanism of AMSL was preliminarily described by measuring the growth curve of *Escherichia coli* and evaluating the influence of AMSL on the release of macromolecular substances in the suspension. The results showed that the total saponins of AMSL had obvious antibacterial activities against the six test bacteria, especially its effect on *Escherichia coli* with the MIC value of 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The total flavonoids had significant antibacterial activities against only two test bacteria with the MIC values of 93.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the total polysaccharides had no activity. After the extract of AMSL saponins was added to the bacterial suspension, the growth of *Escherichia coli* was severely inhibited and the content of macromolecules such as nucleic acids in the bacterial suspension increased, indicating that the AMSL exerted bacteriostatic action mainly by destroying the integrity of the cell membrane which caused the macromolecular substances to overflow. This study provides a theoretical basis for the application of AMSL as a natural preservative in the field of food preservation and storage.

Key words: the stems and leaves of *Astragalus membranaceus* (AMSL); extraction; food preservatives; mechanism

黄芪, 又名黄耆, 是山西省的大宗道地药材, 首次记载于《神农本草经》, 主要的活性成分是皂苷类、多糖类、黄酮类三大物质, 已有 2000 多年的药用历史。现代研究表明黄芪具有抗衰老、增强免疫、抗菌、抗病毒、抗癌、益智等作用^[1-3], 并且具有很好的抗氧化活性^[4]。黄芪传统药用部位为地下根, 而产量为根部数十倍的地上部分极少被使用, 往往在采挖后被直接弃掉, 造成严重的资源浪费。研究表明黄芪茎叶含有

收稿日期: 2018-08-26

基金项目: 山西省科技攻关项目 (2016ZD0506); 山西中医药大学博士科研启动项目 (2015BK11); 晋药综合开发利用协同创新项目 (2017-JYXT-08)

作者简介: 郭丽丽 (1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能食品学

与黄芪根部种类相似的有效成分, 包括多糖类、皂苷类、黄酮类、氨基酸等^[5], 加之其资源丰富、天然绿色, 具有良好的开发利用前景。

防腐剂是一类具有防止由微生物引起的腐败变质、延长食品保质期作用的食物添加剂, 常用的有苯甲酸及其盐类、山梨酸及其盐类、对羟基苯甲酸的酯类等化学防腐剂。适量的使用可以有效的延长食品保质期和货架期, 然而违规违法的超量、超范围使用会给人体健康带来威胁。面对由食品添加剂滥用而引发的食品安全事件的频发, 开发安全无害的天然来源的防腐剂成为研究热点。姚淑敏等^[6]研究了黄芪水醇法所得提取物的抑菌作用, 结果表明黄芪提取物对革兰

氏阴性细菌具有更明显的抑制效果,且黄芪提取物在抑菌活性方面具有良好的热稳定性。随后周建新等^[7]比较了不同产地黄芪提取物的抑菌效果,结果表明黄芪醇提物的抑菌作用较水提物明显,而不同产地的黄芪醇提物的抑菌作用无显著区别。王宁等^[8]进一步采用体内外相结合的方式验证了黄芪水煎提取物对常见致病菌的抑菌活性。以上研究表明黄芪是一种潜在的、具有良好开发前景的天然食品防腐剂。尽管目前尚未有黄芪茎叶抑菌活性方面的研究报道,但鉴于上述基于黄芪生药的抑菌作用研究以及黄芪茎叶与黄芪根部在成分类别上的相似性,本论文对黄芪茎叶的抑菌活性进行了全面分析。通过比较黄芪茎叶中不同有效成分的抑菌效果,探究有效成分的抑菌机理,可为黄芪茎叶在食品保鲜与贮藏领域的充分开发与利用提供理论依据,同时进一步拓宽药食两用中药黄芪的产业链,极大地促进天然黄芪茎叶资源的有效利用与转化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

主要材料:黄芪茎叶,山西省应县乾宝黄芪开发有限公司;新鲜马铃薯,本地农贸市场。

供试菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白假丝酵母菌(*Candida albicans*)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)均由山西农业大学食品科学与工程学院微生物实验室馈赠。

主要试剂:牛肉膏、蛋白胨、琼脂、葡萄糖,北京奥博星生物技术有限责任公司;芦丁、黄芪甲苷、无水葡萄糖标准品,上海融禾医药科技发展有限公司;其他试剂如无水乙醇、亚硝酸钠、苯酚、香草醛、硝酸铝等均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

HH-2 数显恒温水浴锅,江苏省金坛市杰瑞尔电器有限公司;AR423CN 电子天平,美国奥豪斯仪器有限公司;VORTEX KB3 旋涡振荡器,江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;Ultra-3000 紫外-可见分光光度计,北京普源精电科技有限公司;SB-5200DT 超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;SCB-1520 超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;HXP-9082MBE 电热恒温培养箱,上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;DY04-13-44-00 立式压力蒸汽灭菌器,上海东亚压力容器制造有限公司;SY2000

旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;FW177 中草药粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 黄芪茎叶活性成分的提取及含量测定

1.2.1.1 总皂苷的提取及含量测定

黄芪茎叶总皂苷的提取参照高山等的文献进行^[9]。具体为:将所采集的黄芪茎叶经中草药粉碎机进行充分粉碎,并过 50 目筛后备用。称取 3 份黄芪茎叶粉末,每份 10 g,按料液比 1:15 加入 70%乙醇,在 60 °C 下超声处理 40 min,抽滤,合并三份滤液后浓缩,用 1 倍体积的水饱和正丁醇萃取 2 次,合并上层正丁醇萃取液并减压浓缩至干,加入甲醇溶解并定容至 50 mL,得黄芪茎叶总皂苷提取液,用 0.45 μm 滤膜过滤除菌后 4 °C 保存备用。参照刘昌福等的文献测定所得提取物中总皂苷的含量^[10],以黄芪甲苷为标准品,在 560 nm 处测定系列标准品与经适当倍数稀释后的待测液吸光度值,绘制标准曲线后根据回归方程结合稀释倍数计算得总皂苷浓度(mg/mL)。

1.2.1.2 总黄酮的提取及含量测定

黄芪茎叶总黄酮的提取及含量测定参考孔繁晟等的文献进行^[11]。具体如下:称取 3 份黄芪茎叶粉末,每份 10 g,按料液比 1:10 加入 75%乙醇,在 60 °C 下超声处理 20 min,抽滤,合并三份滤液后浓缩至干,加入甲醇溶解并定容至 50 mL,得黄芪茎叶总黄酮提取液,用 0.45 μm 滤膜过滤除菌后 4 °C 保存备用。以芦丁为标准品,参照文献所述利用显色原理进行提取物总黄酮含量的测定^[11],在 510 nm 处测定系列标准品与经适当倍数稀释后的供试品吸光度值,绘制标准曲线后根据回归方程结合稀释倍数计算得总黄酮浓度(mg/mL)。

1.2.1.3 总多糖的提取及含量测定

黄芪茎叶总多糖的提取采用水醇法进行^[12]。称取 3 份黄芪茎叶粉末,每份 10 g,按料液比 1:5 加入蒸馏水,在 65 °C 下浸取 2 h 后过滤得提取液,合并 3 份提取液并冷却至室温,适当速度搅拌下加入 2 倍体积的 95%乙醇,静置,离心分离取沉淀,用 95%乙醇洗涤 2 次后干燥,再用适量无菌蒸馏水溶解并定容至 500 mL 即得黄芪茎叶总多糖提取液,于 4 °C 保存备用。总多糖含量的测定以无水葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法进行^[13],在 490 nm 处测定系列标准品与经适当倍数稀释后的待测液吸光度值,绘制标准曲线后根据回归方程结合稀释倍数计算得多糖浓度(mg/mL)。

1.2.2 抑菌活性检测

1.2.2.1 培养基的制备

细菌的培养采用牛肉膏蛋白胨培养基^[14]: 准确称取牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 加约 500 mL 蒸馏水, 电炉搅拌加热至溶解, 再加入琼脂粉 15 g, 继续搅拌加热至完全熔化, 补足蒸馏水至 1000 mL, 调节 pH 7.2~7.4, 趁热分装, 121 °C 灭菌 20 min。

霉菌和酵母使用马铃薯葡萄糖培养基^[14]: 称取去皮的马铃薯 300 g, 切成小丁置于小铝锅中, 加 1000 mL 蒸馏水于电炉上煮沸 20 min, 双层纱布过滤, 向滤液中加入葡萄糖 20 g, 琼脂粉 15 g, 加热搅拌至完全熔化, 补足蒸馏水至 1000 mL, 趁热分装, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2.2.2 菌悬液的制备

供试细菌和霉菌分别用相应的培养基进行菌种斜面活化, 其中细菌在 37 °C 培养 24 h, 霉菌和酵母在 28 °C 培养 48 h。分别将每个菌种挑取菌苔置液体培养基培养, 控制菌液浓度达到 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL 后待用。

1.2.2.3 抑菌圈直径的测定

将已灭菌好的固体培养基倾注入培养皿内, 凝固厚度约为培养皿的 2/3, 在无菌条件下吸取供试菌液 0.1 mL 滴在平板表面, 用 L 型玻璃棒将菌液涂布均匀, 将已灭菌的直径为 8 mm 的滤纸片分别浸于所提取到的黄芪茎叶总皂苷、总黄酮和总多糖提取液中数分钟, 取出沥干贴于平板表面, 以甲醇和无菌生理盐水作为阴性对照。盖上平皿盖, 静置 30 min 后放置于培养箱中于 37 °C 下恒温培养 24 h (细菌) 或 28 °C 下恒温培养 48 h (霉菌及酵母), 观察结果, 测定抑菌圈直径, 每个平皿重复 3 次。

1.2.2.4 最低抑菌浓度的测定

以甲醇为溶剂采用 2 倍梯度稀释法将黄芪茎叶总皂苷和总黄酮提取液分别制成系列浓度样品液备用。然后取 9 支无菌试管, 分别标记为 1~9, 向每管加入 1.5 mL 与供试菌对应的液体培养基; 再向 1~8 号试管中加入 0.5 mL 的系列浓度样品液, 使其中提取物浓度依次为原液浓度的 1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256 和 1/512, 而甲醇终浓度 (V/V) 均为 25%; 然后向第 9 号试管中加入 0.5 mL 的甲醇使其终浓度为 25%, 并将该管作为阴性对照; 最后向各管内加入制备好的菌悬液 0.1 mL, 细菌在 37 °C 下培养 20~24 h, 霉菌和酵母在 28 °C 下培养 40~48 h, 观察供试菌的生长情况, 以不发生浑浊、沉淀、表面生长任一现象的最小提取物质量浓度为该提取物的最低抑菌浓度。对于肉眼不易辨明菌体生长情况的提取物培养液, 可从各管中吸取 0.1 mL 培养液涂布于固体培养基平板上, 经培养箱培养后观察菌落生长用以判断其最小抑菌浓度。每一系列接种一种菌, 每个浓度做三次重复。

1.2.3 抑菌机理的初步研究

1.2.3.1 生长曲线的测定

本部分选取抑菌实验效果最明显的菌种作为供试菌, 研究抑菌效果最显著的提取物对该菌生长的影响, 生长曲线的测定参考王巍等^[15]的方法并略作修改。配制与该菌种相对应的液体培养基, 分别取 100 mL 装入 3 个 250 mL 锥形瓶中, 并标记为 1、2、3 号, 121 °C 高压灭菌 20 min, 冷却后接种入 1 mL 适宜浓度 ($10^5\sim 10^6$ CFU/mL) 的菌悬液。向 1、2 号锥形瓶中分别加入等体积的适量提取物原液和 2 倍稀释液, 使其终浓度达到 $1\times MIC$ 和 $1/2\times MIC$, 以加有等体积甲醇的 3 号液体培养基为对照。将锥形瓶置于 37 °C 下 150 r/min 摇床培养 24 h, 期间每隔 2 h 在无菌条件下取样, 在 600 nm 波长处测定并记录吸光度 OD 值, 重复 3 次, 然后以时间为横坐标, OD 平均值为纵坐标绘制供试菌的生长曲线。

1.2.3.2 内容物的测定

大分子内容物的测定参考 Lv Fei 等^[16]的方法进行并稍作修改。取培养至对数生长期的供试菌液在 4000 r/min 下离心 15 min, 菌体用磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 重悬后得菌悬液。分别取 30 mL 菌悬液装入 3 个 100 mL 锥形瓶中, 并标记为 1、2、3 号, 向 1、2 号锥形瓶中分别加入等体积的适量提取物原液和 2 倍稀释液, 使其终浓度达到 $1\times MIC$ 和 $1/2\times MIC$, 以加有等体积甲醇的 3 号菌悬液为对照, 将各锥形瓶置于 37 °C 下 150 r/min 摇床培养 6 h, 期间每隔 2 h 在无菌条件下取样, 菌悬液在 8000 r/min 下离心 5 min, 取上清液在 260 nm 波长处测定其吸光度以反映菌悬液中核酸的含量, 重复 3 次。为了消除提取物样品本身的紫外吸收对结果的影响, 以含黄芪茎叶皂苷终浓度为 MIC 值的磷酸盐缓冲液与供试菌作用两分钟后离心取上清来校正 1 号样品的吸光度值, 以含黄芪茎叶皂苷终浓度为 $1/2\times MIC$ 值的磷酸盐缓冲液与供试菌作用两分钟后离心取上清来校正 2 号样品的吸光度值; 同时以磷酸盐缓冲液与供试菌作用两分钟后离心取上清来校正 3 号对照样品的吸光度值^[17]。

1.3 数据统计与分析

用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 组间数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 以 $p<0.05$ 表示有显著性差异, 所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 黄芪茎叶活性成分含量的测定

与黄芪根部类似,黄芪茎叶中的主要活性成分为多糖类、黄酮类和皂苷类三大物质^[5],因此本实验首先对这三大物质进行了提取和含量的测定。根据最大波长检测结果,本实验将皂苷类、黄酮类和多糖类物质的检测波长分别确定为560、510和490 nm,所得的标准曲线回归方程分别为 $y=25.97x+0.0123$ ($R^2=0.9901$), $y=10.336x-0.0061$ ($R^2=0.9973$) 和 $y=6.0875x-0.0184$ ($R^2=0.9975$),经计算,以30 g黄芪茎叶为材料,所提取得到的三类物质提取液的浓度分别3.2、1.5和5.0 mg/mL,提取率分别为0.53%、0.25%和8.3%,其中黄芪茎叶中多糖的提取率与文献报道的8.5%^[12]接近,而皂苷和黄酮类物质的提取率均低于文献中所报道的0.658%^[9]和0.325%^[11],这是由于虽然黄芪茎叶具有与黄芪根相似类别的活性成分,但两者在某些成分的含量上有所不同,李倩等的研究显示黄芪地上部分的总黄酮和总皂苷含量均低于地下根^[18],因而本论文中以黄芪茎叶为原料所得到的总皂苷和总黄酮的提取率稍低于所参考的文献。

2.2 黄芪茎叶活性成分的抑菌活性

2.2.1 不同提取物的抑菌性分析

本实验对黄芪茎叶提取物抑菌活性的研究采用滤纸片抑菌圈法,供试细菌菌悬液浓度为 1×10^5 CFU/mL,供试霉菌和酵母菌悬液浓度为 1×10^6 CFU/mL。由图1可以看出,黄芪茎叶皂苷具有广谱的抑菌性,对3种供试细菌、2种供试霉菌和1种供试酵母均有明显的抑菌效果;黄芪茎叶黄酮也具有抑菌活性,但就广度与强度而言明显弱于皂苷;黄芪茎叶多糖并未表现出抑菌活性。Ma Yihua等^[19]对以黄芪多糖作为还原剂和稳定剂合成的银纳米颗粒的抑菌活性进行了研究,发现从黄芪根部所提取的水溶性多糖不具有抑菌活性,与本部分所得到的结果一致。Wang Qinghu等^[20]从黄芪根部阐明了两种异黄酮糖苷的结构,并对其对多种细菌与真菌的抑制作用进行了验证,从侧面说明了黄芪中黄酮类物质的抑菌作用。进一步对数据进行如表1所示的分析,结果表明与空白对照相比,黄芪茎叶皂苷对6种供试菌均有明显的作用,但抑菌作用的大小在6种供试菌内具有显著差异,其对大肠杆菌具有最强的抑菌作用,其次为金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌,对三种真菌作用相当。黄芪茎叶黄酮仅对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌具有显著的作用,且对这两种革兰氏阳性菌的作用大小相当,然而黄芪茎叶黄酮对这两种菌的作用大小仍显著弱于黄芪茎叶皂苷。该部分结果说明黄芪茎叶的提取物具有显著的抑菌作用,尤其是其皂苷类和黄酮类成分,

具有深度开发利用的潜力。

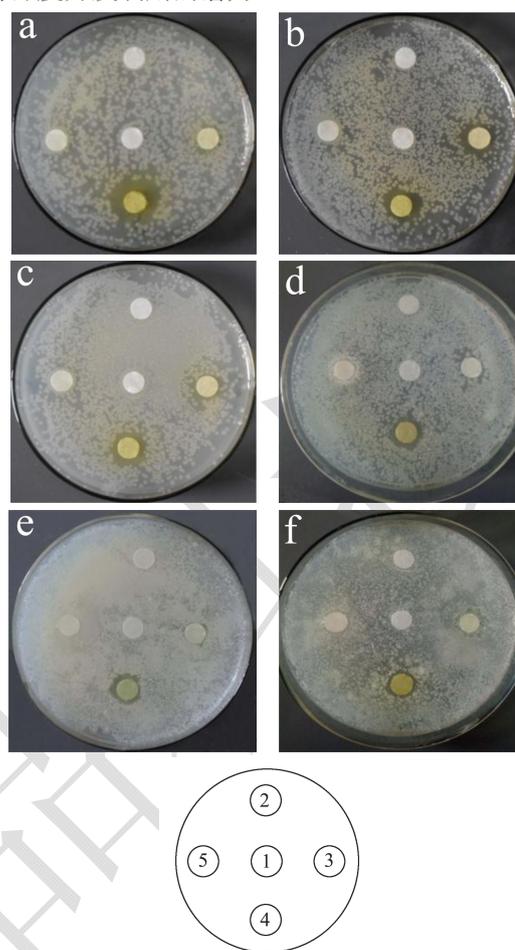


图1 黄芪茎叶不同提取物的抑菌效果

Fig.1 Bacteriostatic effect of different extracts from stems and leaves of *Astragalus membranaceus*

注: a: 大肠杆菌; b: 金黄色葡萄球菌; c: 枯草芽孢杆菌; d: 黄曲霉; e: 白地霉; f: 白假丝酵母菌。位置1: 无菌生理盐水; 位置2: 甲醇; 位置3: 黄芪茎叶总黄酮提取液; 位置4: 黄芪茎叶总皂苷提取液; 位置5: 黄芪茎叶总多糖提取液。

表1 黄芪茎叶中不同提取物的抑菌圈直径

Table 1 Diameter of inhibition zone of different extracts from stems and leaves of *Astragalus membranaceus* (mm, n=3)

供试菌	抑菌圈直径/mm		
	黄芪茎叶皂苷	黄芪茎叶黄酮	甲醇
大肠杆菌	16.93±3.00 ^{aA}	8.77±0.75 ^{bcB}	8.0 ^B
金黄色葡萄球菌	13.73±0.78 ^{bA}	10.83±1.92 ^{abB}	8.0 ^C
枯草芽孢杆菌	13.80±0.70 ^{bA}	11.03±1.04 ^{aB}	8.0 ^C
黄曲霉	12.07±1.23 ^{bcA}	8.90±0.53 ^{bcB}	8.0 ^B
白地霉	10.17±0.81 ^{cA}	8.80±0.85 ^{bcB}	8.0 ^B
白假丝酵母菌	11.70±0.61 ^{bcA}	8.50±0.87 ^{cbB}	8.0 ^B

注: 实验中所用的滤纸片大小为8.0 mm; 同一列中不同的小写上标字母以及同一行中不同的大写上标字母表示显著性差异 ($p<0.05$)。

2.2.2 最低抑菌浓度的测定

为进一步对黄芪茎叶提取物的抑菌活性和抑菌能力进行研究,选取抑菌圈直径测定结果较好的黄芪茎叶皂苷提取液和黄芪茎叶黄酮提取液进行最小抑菌浓度(MIC)的测定,结果如表2所示。黄芪茎叶皂苷对大肠杆菌的抑制作用最强, MIC 值为 12.5 $\mu\text{g/mL}$,对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 50

$\mu\text{g/mL}$,仅次于大肠杆菌,对黄曲霉、白地霉和白假丝酵母菌的 MIC 均为 100 $\mu\text{g/mL}$;黄芪茎叶黄酮对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 均为 93.8 $\mu\text{g/mL}$ 。最低抑菌浓度的结果与抑菌圈结果完全一致。综上,本试验表明黄芪茎叶中的抑菌物质主要是其中的皂苷和黄酮类成分,下一步应当着重对这两类物质的提取与活性成分的富集方法展开深入研究。

表2 黄芪茎叶提取物 MIC 值的测定

Table 2 Determination of MIC values of the extracts from stems and leaves of *Astragalus membranaceus*

提取物浓度/ $(\mu\text{g/mL})$	菌体生长情况					
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	黄曲霉	白地霉	白假丝酵母菌
黄芪茎叶皂苷						
800	-	-	-	-	-	-
400	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	+	+	+
25	-	+	+	++	+	+
12.5	-	+	++	++	+	++
6.3	+	++	++	++	++	++
黄芪茎叶黄酮						
375	/	-	-	/	/	/
187.5	/	-	-	/	/	/
93.8	/	-	-	/	/	/
46.9	/	+	+	/	/	/
23.4	/	+	+	/	/	/
11.7	/	+	++	/	/	/
5.9	/	++	++	/	/	/
2.9	/	++	++	/	/	/

注:“-”无菌生长,“+”较少菌生长,“++”较多菌生长;“/”未测定。

2.3 黄芪茎叶皂苷提取物抑菌机理的初步研究

2.3.1 对大肠杆菌生长曲线的影响

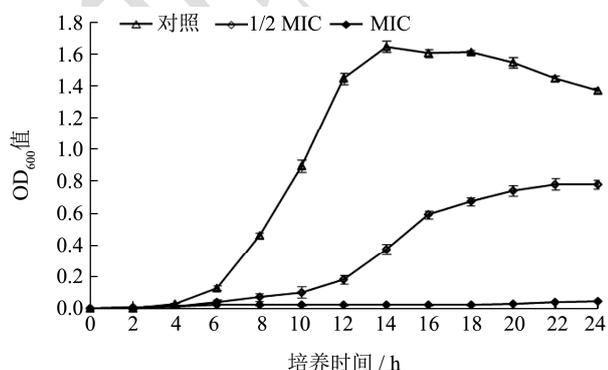


图2 黄芪茎叶皂苷对大肠杆菌生长曲线的影响

Fig.2 Effect of saponins from stems and leaves of *Astragalus membranaceus* on growth curve of *Escherichia coli*

前期实验结果表明黄芪茎叶中皂苷类物质的抑菌效果明显优于黄酮类物质,且黄芪茎叶皂苷对大肠杆菌的抑菌作用最显著,因此本部分以大肠杆菌为供试菌初步研究黄芪茎叶皂苷提取液对革兰氏阴性菌的抑菌机理。黄芪茎叶皂苷对大肠杆菌生长曲线的影响如图2所示。对照组大肠杆菌正常生长,有明显的迟缓期、对数期、稳定期和衰退期。大肠杆菌经浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (即 MIC 值) 的黄芪茎叶皂苷作用后,生长受到明显抑制, 600 nm 处的吸光度值在整个培养时间内只有微小变化,菌体停止生长,说明黄芪茎叶皂苷对大肠杆菌的抑制效果显著。当黄芪茎叶皂苷浓度减少为 1/2×MIC 值时,可以看出此条件下菌体有少量繁殖,但生长速率和浓度明显低于对照组,说明菌体的部分生长活性受到了抑制。此外还可以观察到黄芪茎叶皂苷的加入在延迟对数期的同时影响了大肠杆菌的整个

生长周期,使菌的迟缓期、对数期和稳定期均发生了变化。

2.3.2 对菌悬液中高分子内容物含量的影响

细胞膜的完整性是维持菌体正常生长繁殖的主要因素之一。核酸是重要的遗传物质,存在于胞膜与胞质中,核酸的释放可表明细胞膜完整性的破坏。如图3所示,对照组大肠杆菌菌悬液的 $OD_{260\text{nm}}$ 值在6h内极其稳定,几乎无变化,表示正常生长的菌体在前期并无核酸等大分子内容物的外泄。随着黄芪茎叶皂苷的加入,培养液的 $OD_{260\text{nm}}$ 值逐渐上升,由于 $1/2 \times \text{MIC}$ 下的黄芪茎叶皂苷浓度低于 $1 \times \text{MIC}$ 下,因此前者吸光度值低于后者,但均明显高于对照。这说明黄芪茎叶皂苷可破坏菌体细胞膜的完整性,致使核酸等大分子物质发生泄漏,影响菌体细胞的正常生长,从而抑制其繁殖。

由于革兰氏阴性菌大肠杆菌的细胞结构明显不同于本实验所用的其他2种革兰氏阳性菌和3种真菌,因此推测黄芪茎叶皂苷的抑菌作用可能与菌体细胞对其敏感性有关,使得因暴露于黄芪茎叶皂苷而引起的细胞结构破坏的程度有所不同,从而表现出有差异的抑菌活性。总之,黄芪茎叶皂苷对大肠杆菌的抑制作用是一个复杂的过程,其更深层次的抑制机理还需进一步深入研究。

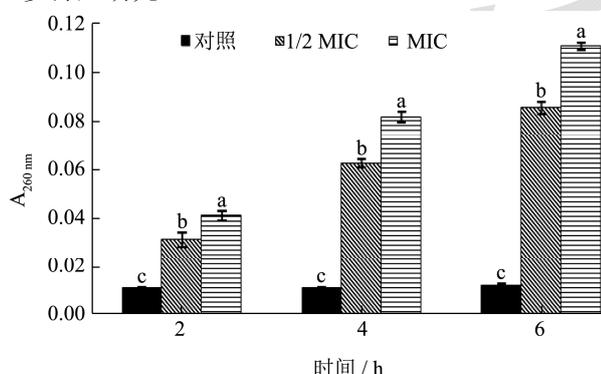


图3 黄芪茎叶皂苷对菌悬液中核酸类物质含量的影响

Fig.3 Effect of saponins from stems and leaves of *Astragalus membranaceus* on the content of nucleic acids in bacteria suspension

3 结论

黄芪在药食两用物品名单中的增列必将极大地促进其临床使用和工业应用,随之而来的将会是大量地上茎叶部分的直接丢弃,如何变废为宝,使之能为发展绿色农业、生产天然食品服务成为迫切且具有重大意义的一个关注点。目前黄芪茎叶在食品领域的利用尚未见报道,但鉴于黄芪的诸多药理作用及其提取物在抑菌作用方面的研究,本文对黄芪茎叶提取物对6

种微生物的抑菌效果作了研究,结果表明黄芪茎叶皂苷类的抑菌效果明显优于黄酮类,尤其是黄芪茎叶皂苷对大肠杆菌具有很好的抑菌效果, MIC 值为 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$;通过测定大肠杆菌的生长曲线和菌悬液中核酸内容物的含量,揭示黄芪茎叶皂苷是通过破坏菌体胞膜的完整性,造成大分子物质泄漏和释放,菌体生长受阻从而达到抑菌作用的。本实验为黄芪茎叶在食品贮藏与保鲜领域的应用提供了理论依据,也为黄芪茎叶资源的精深开发利用指明了方向。

参考文献

- [1] Liu P, Zhao H, Luo Y. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): A well-known Chinese tonic [J]. Aging and Disease, 2017, 8(6): 868
- [2] Wang Z, Liu Z, Zhou L, et al. Immunomodulatory effect of APS and PSP is mediated by Ca^{2+} -cAMP and TLR4/NF- κ B signaling pathway in macrophage [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 94: 283-289
- [3] Liu A, Yu J, Ji H, et al. Extraction of a novel cold-water-soluble polysaccharide from *Astragalus membranaceus* and its antitumor and immunological activities [J]. Molecules, 2018, 23(1): 62
- [4] Shahzad M, Shabbir A, Wojcikowski K, et al. The antioxidant effects of *Radix Astragali* (*Astragalus membranaceus* and related species) in protecting tissues from injury and disease [J]. Current Drug Targets, 2016, 17(12): 1331-1340
- [5] 张艳,周庆民,徐馨,等.黄芪茎叶药物成分及营养成分测定 [J].中国草食动物科学,2016,36(5):32-35
ZHANG Yan, ZHOU Qin-min, XU Xin, et al. Determination of pharmaceutical ingredients and nutrients in stems and leaves of *Astragalus membranaceus* [J]. China Herbivore Science, 2016, 36(5): 32-35
- [6] 姚淑敏,池振明,段效辉.黄芪提取物对细菌抑制作用的研究 [J].食品科学,2006,27(8):90-93
YAO Shu-min, CHI Zhen-ming, DUAN Xiao-hui. Study on antimicrobial action of extract of *Astragalus membranaceus* bge [J]. Food Science, 2006, 27(8): 90-93
- [7] 周建新,彭雪霁,姚明兰.黄芪提取物抗菌作用及其方式的研究 [J].粮食与食品工业,2009,16(6):14-16
ZHOU Jian-xin, PENG Xue-ji, YAO Ming-lan. Study on antibacterial action and mode of extracts of *Astragalus membranaceus* [J]. Cereal & Food Industry, 2009, 16(6): 14-16
- [8] 王宁,崔一喆,蒋剑成,等.黄芪提取物对常见致病菌的体内外抑菌活性测定 [J].畜牧与饲料科学,2014,35(4):1-2

- WANG Nin, CUI Yi-zhe, JIANG Jian-cheng, et al. Determination of antibacterial activity of extract of *Astragalus* on common pathogenic bacteria *in vitro* and *in vivo* [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2014 35(4): 1-2
- [9] 高山,郭爱华,黄芪总皂苷提取方法的优化[J].山西职工医学院学报,2011,21(3):1-3
GAO Shan, GUO Ai-hua. Optimization of extract method for astragaloside from *Radix Astragali* [J]. *Journal of Shanxi Medical College*, 2011, 21(3): 1-3
- [10] 刘昌福,肖海涛,李莉,等.黄芪皂苷的提取和纯化工艺研究[J].中国农学通报,2010,26(9):97-101
LIU Chang-fu, XIAO Hai-tao, LI Li, et al. Study on the method of extracting and purifying process of astragaloside from *Radix Astragali* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(9): 97-101
- [11] 孔繁晟,贲永光,孙爱群,等.超声法与连续回流法提取黄芪总黄酮的工艺对比研究[J].中国药房,2010,21(19):1752-1754
KONG Fan-sheng, BI Yong-guang, SUN Ai-qun, et al. Comparison of ultrasonic method and continuous reflux extraction process of total flavonoids from *Radix Astragali* [J]. *China Pharmacy*, 2010, 21(19): 1752-1754
- [12] 孙瑞敏,刘冬平,陈俊,等.黄芪多糖的提取[J].南开大学学报(自然科学版),2005,38(1):33-36
SUN Rui-min, LIU Dong-ping, CHEN Jun, et al. Extration of astragalus polysaccharides in *Astragalus* [J]. *Journal of Nankai University (Natural Science Edition)*, 2005, 38(1): 33-36
- [13] 张亚环,陈萍,王小芳.正交试验法优选黄芪多糖的水提工艺研究[J].化学世界,2007,6:345-347
ZHANG Ya-huan, CHEN Ping, WANG Xiao-fang. Study on extraction process of *Astragalus* polysaccharide of *Radix Astragali* by method of orthogonal design [J]. *Chemical World*, 2007, 6: 345-347
- [14] 郝林,孔庆学,方祥.食品微生物学实验技术[M].北京:中国农业大学出版社,2016
HAO Lin, KONG Qing-xue, FANG Xiang. *Food Microbiology Experiment Technology* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2016
- [15] 王巍,牟德华,李丹丹.山楂果胶寡糖的抑菌性能及机理[J].食品科学,2018,39(3):110-116
WANG Wei, MOU De-hua, LI Dan-dan. Antibacterial activity and mechanism of hawthorn pectin oligosaccharides [J]. *Food Science*, 2018, 39(3): 110-116
- [16] Lv F, Liang H, Yuan Q, et al. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms [J]. *Food Research International*, 2011, 44(9): 3057-3064
- [17] 张英.根皮素抑菌活性及抑菌机理的研究[D].西安:陕西师范大学,2016
ZHANG Ying. Study on antibacterial activity and mechanism of phloretin [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2016
- [18] 李倩,徐珍,刘亮亮,等.浑源黄芪—地上部分和地下部分的主要有效成分比较研究[J].临床医药实践,2018,27(2):121-124
LI Qian, XU Zhen, LIU Liang-liang, et al. A comparative study on the main active components of the aboveground and underground parts of Huangqi from Hunyuan [J]. *Clinical medicine practice*, 2018, 27(2): 121-124
- [19] Ma Y, Liu C, Qu D, et al. Antibacterial evaluation of silver nanoparticles synthesized by polysaccharides from *Astragalus membranaceus* roots [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 89: 351-357
- [20] Wang Q, Han N, Dai N, et al. The structural elucidation and antimicrobial activities of two isoflavane glycosides from *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2014, 1076: 535-538

(上接第8页)

- [26] 李振洁,彭丽倩,江娜,等.枸杞多糖对紫外线辐射 HaCaT 细胞急性损伤中 Nrf2/Bach1 通路的影响[J].中国皮肤性病学杂志,2017(11):1169-1174
LI Zhen-Jie, PENG Li-qian, JIANG Na, et al. Study on the role of Nrf2/Bach1 pathway in the *Lycium barbarum* polysaccharide against UV-induced acute damage in HaCat keratinocytes [J]. *Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2017, 11: 1169-1174
- [27] 霍仕霞,彭晓明,高莉,等.高良姜素对过氧化氢诱导的 A375 细胞氧化损伤后 Nrf2,γ-GCS 基因表达的影响[J].中国中医药信息杂志,2015,22(11):69-72
HUO Si-xia, PENG Xiao-ming, GAO Li, et al. Effects of galangin on gene expressions of Nrf2 and γ-GCS in oxidative damage of A375 cell induced by H₂O₂ [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2015, 22(11): 69-72

现代食品科技