

荸荠英提取物抑菌成分稳定性的探讨

郝淑贤^{1,2}, 刘欣², 赵力超², 陈永泉²

(1.中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2.华南农业大学, 广东广州 510642)

摘 要: 本文主要对荸荠英抑菌性能进行研究, 结果表明, 荸荠英粗品提取物具有强抑菌活性, 在中性 pH 条件下提取物对细菌具有较好的抑菌效果, 明显强于山梨酸钾。同时以金色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌, 研究荸荠英粗品提取物活性成份的稳定性, 结果表明提取物经过酸、碱处理后均具有一定的抑菌活性, 碱处理对其抑菌活性有部分减弱; 温度对其抑菌活性影响不大, 在 121℃ 下处理 30min, 抑菌活性才略有减弱; 紫外照射及常见金属离子(Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+})对其稳定性几乎没有影响。

关键词: 荸荠英; 抑菌; 稳定性

Study on the Effects of Puchiin Extract Antimicrobial Properties

HAO Shu-xian^{1,2}, LIU Xin², ZHAO Li-chao², CHEN Yong-quan²

(1.South China Sea Fisheries Research Institution, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2.South China Agriculture University, Guangzhou 5106642, China)

Abstract: Ethanol extract of puchiin was assayed for its antimicrobial properties. The results showed that puchiin extract had antibacterial activities. Further more study revealed that the puchiin extract had stronger antimicrobial activity against the tested bacterial *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* than that of potassium sorbate. Extract of puchiin was also studied for its stability to acid, alkali, temperature, ultraviolet and metal ions. The results showed that the extract was very stable to acid and alkali. After treated with alkali, the extract still showed high antibacterial activity. Ultraviolet and metal ions also had little effect on the antibacterial activity of puchiin extract. Only high temperature up to 121℃ with half an hour's treatment showed a little effect on extract antimicrobial activity. The UV radiation and metalions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) showed also little effect on extract antimicrobial activity.

Key words: puchiin; antimicrobial; stable

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0071-04

随着生活水平的不断提高和对健康问题的日益关注, 人们对防腐剂之类的食品添加剂在安全性上提出了更高的要求, 消费者倾向于选择天然物作为防腐抑菌剂, 科技工作者也对化学合成防腐剂的使用持慎重态度^[1]。

荸荠是典型的具有药理作用的食物原料, 有药膳同源之功效, 安全性高。《中药大辞典》^[2]中认为荸荠英是荸荠中主要的活性物质。民间将荸荠英又称作马蹄黄, 据说在荸荠果皮与果肉之间的部位富集比较多。我国作为荸荠生产大国, 现仅限于马蹄淀粉, 马蹄饮料, 马蹄罐头的生产, 而荸荠皮往往被作为产品废料弃去, 例如某马蹄粉厂日产淀粉 30 吨, 其产生的废液量在 35 吨以上, 含水量为 88% 的湿渣则高达 185 吨, 如果能够将这些废弃物加以利用, 生产出一种天然抑菌防腐

剂, 满足各种保健食品生产的需要, 对增加产品附加值将具有不可估量的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及其来源

细菌: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*); 金色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*); 大肠杆菌(*Escherichia coli*); 沙门氏菌(*Salmonella sp.*); 酵母菌: 啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、假丝酵母(*Candida sp.*); 霉菌: 黑曲霉(*Aspergillus niger* van)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。

以上菌种由华南农业大学食品微生物教研室提供。

混合细菌：参考郭新竹等^[3]的方法。采用室温下放置变质的牛乳中的混合微生物菌群作为供试混和细菌，以1%比例接种于肉汤培养基中，37℃培养6h后供实验用。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(一般培养细菌用)；马铃薯培养基(一般培养真菌用)；麦芽汁琼脂培养基(一般培养酵母菌用)。

1.1.3 制备荸荠英提取物

荸荠英粗品取自于某马蹄粉厂

取荸荠英粗品若干，用浓度为95%的乙醇于室温下浸提一周，浸提液过滤。滤渣用相应溶剂浸提两次，方法同上。合并滤液即为荸荠英粗提液。将粗提液于低于50℃的条件下浓缩。得棕色膏状物即为待测荸荠英粗提物。

1.2 实验方法

1.2.1 微生物生长适应期

参考郭新竹^[3]、林捷^[4]等的方法。将制好的培养基加一定量的待试防腐剂，各培养基中提取物浓度分别为1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.0625%、0.03125%、0.015625%，倾注平皿，琼脂凝固后划线接种混合细菌，置于37℃培养箱中培养，观察微生物开始生长的时间并记录，此时间为微生物的生长适应期，从中可反应出防腐剂的抗菌活性。

1.2.2 抑菌谱的确定 - 滤纸片法

参考张文治等^[5,6]法。将菌悬液按一定比例加入到培养基中，摇匀后倾注平皿。将滤纸片在一定浓度的待测液中浸湿，取出晾干，隔一定距离平铺于含菌培养皿中，在适宜的温度下培养一定时间(细菌37℃，12h；霉菌28℃，48h；酵母菌28℃，24h)后，测定抑菌圈直径。以无待测样的试液作为空白。

2 结果与讨论

2.1 提取物的抑菌活性

在微生物转种到新的培养基中后，其自身首先调节体内酶系使之适应环境的变化，包括分解抑菌物质，然后才开始分裂繁殖，进入对数生长期快速增长。一般把接种到对数生长期的这一段时间称为生长适应期^[8]。越不容易被微生物分解的防腐剂，使微生物进入对数生长的时间越长，即生长适应期越长，所以可以用生长适应期为指标来衡量防腐剂的抗菌活性。本实验是在培养基中加不同浓度的提取物后测定微生物的生长适应期，结果如图1所示。随着提取物浓度的提高，微生物代谢其中的抑菌物质所需的时间越长，微生物的生长适应期也随之延长，说明提取物有一定的抑菌活性。当粗提物的含量达到1%时，接种混和细菌的培养基经73h的培养仍无细菌生长，这些结果表明，荸荠材料粗提物具有一定的抑菌活性，有必要对其进行进一步的研究。

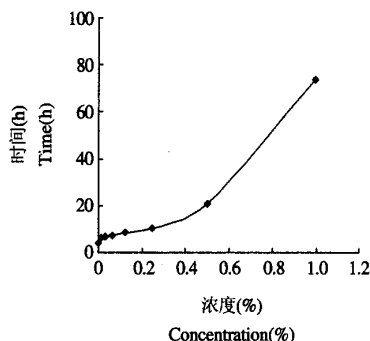


图1 粗提物对混和细菌的抑菌能力

Fig.1 Antimicrobials capability of puchiin extract

2.2 粗提物抑菌谱的确定

从表1可知，粗提物对所选细菌的抑菌效果较好，且抑菌活性具有量效关系，特别是对细菌中大肠杆菌和金色葡萄球菌的抑菌能力最显著，添加量为3.13%就具有抑菌现象，当添加量为50%时抑菌活性明显高于同条件下浓度为60%的山梨酸钾，对沙门氏菌也有一定的抑

表1 荸荠英粗提物对常见污染菌的抑菌状况
Table 1 Effect of puchiin extract on some bacterials

| 实验菌种(Test bacterials) | 50% | 25% | 12.5% | 6.25% | 3.13% | 山梨酸钾(Potassium sorbate) |
|---|------|-----|-------|-------|-------|-------------------------|
| 金色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>) | 15.2 | 9.0 | 7.7 | 7.3 | 5.9 | 14.5 |
| 枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>) | 8.8 | 8.6 | 7.2 | 6.8 | 6.3 | 6.2 |
| 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>) | 12.1 | 9.3 | 8.7 | 7.7 | 7.2 | 8.7 |
| 沙门氏菌(<i>Salmonella sp.</i>) | 8.2 | 7.2 | 6.5 | 5.5 | 5.5 | 11.3 |
| 假丝酵母(<i>Candida sp.</i>) | 7.0 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 11.5 |
| 啤酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 11.1 |
| 米曲霉(<i>Aspergillus niger</i>) | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 23.8 |
| 黑曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>) | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 16.4 |

注：抑菌圈直径(Antibacterial diameter), mm。

菌作用。但是, 荸荠英粗提取物除了对假丝酵母有效外, 对啤酒酵母及其它所选霉菌均不显示抑菌活性。

2.3 荸荠英粗提取物稳定性的研究

2.3.1 酸碱稳定性的研究

用不同 pH 值的乙醇溶液浸泡荸荠英粗提取物, 其中粗提取物的浓度是 25%, 12h 后测定其抑菌活性。由图 2 可见, 随 pH 值的升高, 粗提取物对菌体的抑制能力有所下降, 在 pH6~8 之间变化最大, 但粗提取物经酸或碱处理后均有一定的抑菌性。原因可能是碱处理会使某些抑菌成份与溶液中的酸发生反应, 从而使该物质的抑菌性减小。

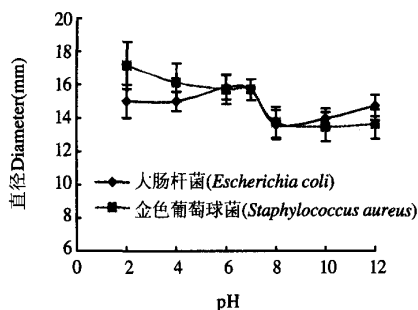


图2 pH 值对粗提取物抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of pH on antimicrobials activity of puchiin extract

2.3.2 温度稳定性研究

将粗提取物分别在 30、40、60、80、100、121℃ 下处理 30min, 用乙醇制成浓度为 25% 的溶液, 测定其抑菌活性, 得图 3。结果表明, 荸荠英粗提取物经不同温度处理后仍然保持原有的抑菌能力, 仅仅在 121℃ 处理 30min 后, 抑菌效力才开始减弱。

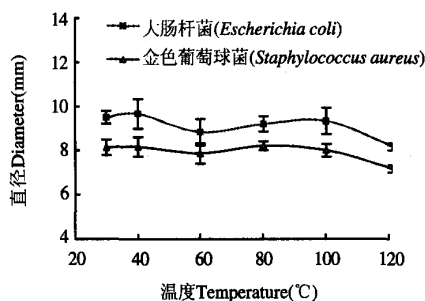


图3 温度对粗提取物的抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on antimicrobials activity of puchiin extract

2.3.3 紫外稳定性研究

将粗提取物分别在紫外灯下处理 5、10、15、20、25min, 用乙醇制成浓度为 25% 的溶液, 测定其抑菌活性, 见图 4。结果表明随紫外处理时间的变化, 粗提取物的抑菌活性基本保持不变, 由此可见, 该提取物对紫外

具有极高的稳定性。

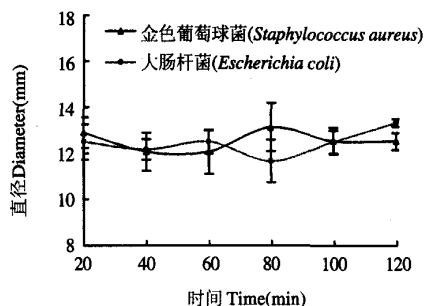


图4 紫外照射对粗提取物的抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of ultraviolet on antimicrobials activity of puchiin extract

2.3.4 金属离子稳定性研究

用 1N 的不同金属离子(Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+}) 溶液浸泡荸荠英粗提取物, 其中粗提取物的浓度是 25%, 12h 后测定其抑菌活性。由图 5 可见粗提取物经 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 三种离子处理后, 抑菌活性基本保持不变。但经 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 处理后的粗提取物的抑菌活性明显高于对照样, 其中可能的原因有两种: 一是金属离子本身对菌体的生长存在抑制作用; 二是金属离子与抑菌成份发生螯合作用, 从而提高其抑菌效力。

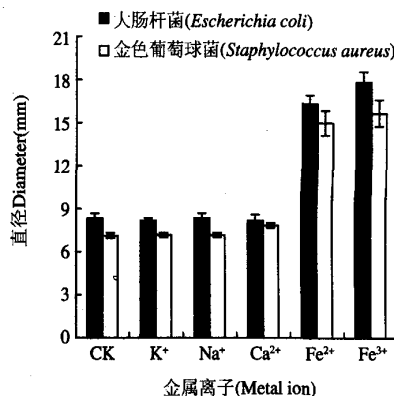


图5 金属离子对粗提取物抑菌活性的影响

Fig.5 Effect of metal ion on antimicrobials activity of puchiin extract

本实验在研究酸碱及金属离子对荸荠英粗提取物稳定性的影响时, 采用滤纸片法, 此法要求样品的浓度要足够大, 约为 25%, 由于原料有限, 无法就所配溶剂中的真实酸碱度及金属离子浓度进行确定, 只采用一定酸碱度及金属离子浓度的溶液浸泡提取物而取得的研究成果。可以说在一定程度上存在某种缺陷, 如果能用 MIC 涂布法或稀释法测定酸碱性及金属离子对提取物抑菌效果的影响, 结论会更准确。

研究表明, 荸荠英粗提取物的活性组分对热具有良好

的稳定性,在121℃下处理,活性才略有下降,这对于以后的提取分离具有重要的意义,对提取物的长期贮存及实际应用也十分有利。荸荠英粗提物经碱处理后仍然具有一定的活性,但较酸处理活性略有减弱,其机理应当与抑菌成分的分子结构有关。通常情况下,抑菌剂的分子结构特征与生物膜脂分子结构特征愈相似,则愈易进入菌体从而更易发挥抑菌作用^[7]。通过对荸荠英成分粗测,发现在酸性乙醇提取液加入1%三氯化铁乙醇溶液1~2滴,有绿色反应产生,表明含有酚性成分;此外通过测定荸荠英水提取液的pH值发现溶液呈酸性,由此可见,活性成分中可能含有有机酸。酚羟基及羧基经碱处理会发生不同程度的转化,从而导致整体的抑菌活性降低。提取物之所以经碱处理后仍具有一定的活性,可能与其中的碱性成分有关,成分粗测中证实了生物碱的存在,此外,杨炳辉^[8]等也曾成功从荸荠中分离出一种具有消炎作用的生物碱。

运用生物自显影技术对抑菌活性成分进行跟踪,通过进一步的分离纯化,初步确定其主要的抑菌活性成分为一种甾醇类物质。对该物质进行小鼠表皮及体内抑菌实验,均取得了明显的功效。

3 结 论

3.1 荸荠英粗提物稳定性的研究在中性条件下,荸荠英粗品提取物对不同菌种都具有抑制作用,其中对细菌的抑菌能力大于酵母和霉菌,特别是对细菌中大肠杆菌和

金色葡萄球菌的抑菌能力最显著,在滤纸片实验中,提取物浓度为3.13%就具有抑菌现象;但是,荸荠英粗提物除了对假丝酵母有效外,对啤酒酵母及其它所选霉菌的抑菌活性均不显著,而山梨酸钾的结果正好相反可见二者存在复配提高抑菌活性及抑菌范围的可能性,但其实际应用还有待于进一步研究。

3.2 荸荠英粗提物对温度、紫外照射及金属离子都具有良好的稳定性。荸荠英粗品提取物经过酸、碱处理后都存在抑菌性,但经过碱处理,提取物抑菌活性明显下降,下降幅度为12.7%。

参考文献:

- [1] 范青生,马振亚.防腐抑菌中药的微量快速筛选法研究及其应用[J].微生物学通报,1991,18(2):114-118.
- [2] 中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1986.
- [3] 郭新竹,宁正祥,黄志良.核酸发酵液抑菌成份的分离提取[J].食品与发酵工业,2001,27(8):13-16.
- [4] 林捷,吴锦铸,朱新贵,等.柚皮提取物的抑菌作用研究[J].华南农业大学学报,1999,20(3):59-62.
- [5] 程丽娟,唐明,袁静,等.微生物学实验技术[M].科学技术出版社,1993.57.
- [6] 张文治,等.实用食品微生物学[M].轻工业出版社,1991.
- [7] 宁正祥,高建华,秦燕,等.荔枝精油对西式火腿肠的保鲜效果[J].食品与发酵工业,1997,23(4):34-36.
- [8] 杨炳辉,张一兵,黄建华.荸荠中一种生物碱(MTC)的鉴定和绝对构型的确定[J].天然产物研究与开发,1995,7(1):1-4.

信 息

我国出口信用保险将促进农产品出口和中西部企业外向发展

保监会主席助理周延礼在贸易强国与出口信用保险研讨会上强调,要在促进我国农产品出口、支持中西部地区发展外向型经济等方面,进一步发挥出口信用保险政策性功能。

周延礼说,中国出口信用保险公司作为国家出口信用保险政策的承办机构,落实国家外贸发展战略,当前应重点做好四方面工作:

一是在鼓励农产品加工出口、降低国外农产品非贸易壁垒、维护我国农产品生产者经济利益方面,加大支持力度;二是通过灵活的融资担保与贸易安排,帮助国内企业实施“走出去”战略,建立海外战略资源储备;三是通过汇率优惠、延伸服务等手段支持中西部地区发展外向型经济,鼓励中西部企业出口产品与劳务;四是为出口企业提供完善的理赔服务和信用风险管理服务,帮助企业开展贸易融资,当好银行和出口企业的信用桥梁,努力成为企业出口的“稳定器”和“催化剂”。

商务部部长助理傅自应表示,世贸组织的反补贴原则要求我国的外贸促进体系必须由以政府直接补贴为主,转向国际通行的以出口政策性金融工具为主的间接支持体系。他说,在加入世贸后外贸发展的新形势下,出口信用保险将大有用武之地,今后,应在促进我国农产品出口、支持中西部企业“走出去”等方面充分发挥政策性杠杆作用,从而提升贸易运行质量。