

芦笋皮抑菌作用的研究

冯翠萍, 王亚琴

(山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 芦笋皮中除含有大量的营养成分外, 还含有许多特殊的物质, 具有很高的营养价值和药学价值。本实验利用平板菌落计数法探讨芦笋皮水提取液和乙醇提取液对空气中最常见细菌的抑制作用, 并在此基础上测定了水提取液和乙醇提取液在几个不同体积分数的抑菌率, 得出最低抑菌体积分数, 并探讨了 pH 值和热处理对其抗菌活性的影响; 同时还采用分光光度法测定抑菌性及抑菌活性与作用时间的关系, 比较了两种提取液抑菌活性能力的大小。结果表明: 芦笋皮提取物对空气中最常见细菌有较好的抑制效果, 并且乙醇提取物的抑菌效果明显强于水提取物, 且在弱酸性环境下抑菌效果有所加强, 121℃, 15min 的高温处理后其抑菌效果有所减弱, 芦笋皮提取液的抑菌活性在与细菌作用 12h 后达到高峰, 随后抑菌活性逐渐减弱。

关键词: 芦笋皮; 抑菌作用; 平板菌落计数法; 醇提物; 水提物

Study on Antimicrobial Characteristics of *Asparagus* Peel Extracts

FENG Cui-ping, WANG Ya-qin

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: *Asparagus* peel contains a lot of special constituents besides the nutritional components, and belongs to the high nutritional and pharmaceutical type of material. The antimicrobial activities of water extracts and ethanol extracts of *Asparagus* peel against the most common air contaminative microorganisms were determined with the experimentation method of dull colony notation. The results showed that there are antibacterial genes in the *Asparagus* peel, then the minimal inhibitory volume score of water extracts and ethanol extracts of *Asparagus* peel and the effects of pH value and heating were all determined. At the same time the relationship between inhibitory activity and time and the capability of inhibitory of water extracts and ethanol extracts of *Asparagus* peel were argued by means of spectrophotometric. The results showed that both two types of extracts have evidently antibacteriostatic effect, but ethanol extracts show stronger inhibitory activity than water extracts especially in acid condition. The inhibitor has also good stability and inhibitory effects with heat treatment (121 °C, 15 min), even though there is a little weakened. After 12 hours the antimicrobial activities of water extracts and ethanol extracts of *Asparagus* peel reach the peak, then weaken gradually.

Key words *Asparagus* skin antimicrobial characteristics dull colony notation ethanolic extracts water extracts

中图分类号: S644.6 Q935

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0105-05

芦笋, 又名石刁柏(*Asparagus officinalis* L), 是天门冬属百合科宿根性多年生草本植物, 是一种药食同源的蔬菜^[1]。我国的《神农本草经》将芦笋列为“上品之上”。芦笋中含有许多活性成分, 如天门冬酰胺、天门冬氨酸、叶酸、核酸、果糖、低聚糖、黄酮类物质等药用成分。现代医学研究证明, 芦笋不仅可以提高人的体力, 消除疲劳, 医治食欲不振等疾病, 而且对尼古丁中毒、心脏病、动脉硬化、神经病、皮炎、结核病等也有食疗作用。更重要的是它具有抗癌

作用, 是世界十大名菜之一, 在国际市场上有“蔬菜之王”的美称。芦笋近年来受到人们的广泛关注和赞赏, 这不但得益于它有很高的营养价值, 而且得益于它有极强的药学价值。研究表明芦笋具有抗肿瘤、降血脂、抗衰老、抗疲劳、抗突变、抗菌及防癌抗癌功效^[2]。

据统计, 芦笋在加工罐藏品和速冻品过程中, 占原料重量 15%~25% 的芦笋皮被去掉^[3], 芦笋皮中的营养成分种类与去皮笋相同^[4], 有多种营养成分的含量超

收稿日期: 2006-10-16

基金项目: 山西省青年科技基金研究项目(20021039); 山西农业大学科技创新基金项目(200003)

作者简介: 冯翠萍(1970-), 副教授, 博士研究生, 研究方向为食品营养与卫生。

过去皮笋,但这一宝贵资源没有得到合理利用,不仅造成了资源浪费,还增加了企业处理废弃料的成本。本课题组对芦笋皮进行了一系列的研究,结果表明芦笋皮具有抗疲劳、降血脂的功能,另外还对芦笋皮中的膳食纤维和黄酮类物质进行了提取纯化^[5-7]。经过长期保存的芦笋皮未发现有任何的生霉生虫现象,这可能与它自身含有抑菌成分有关,而目前对于芦笋皮抗菌功能的研究基本属于空白。大量报道黄酮类物质具有抗菌性,例如李春美等研究的柚皮提取物抗菌性能的研究以及李云燕等发表的板栗壳色素抑菌性能的研究,均与提取物中所含的黄酮类物质有关^[8-9]。本实验在这一假设的基础上,运用微生物学实验方法,研究芦笋皮的抗菌功效,为天然抗菌剂提供原料,并可提高芦笋的综合利用价值。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

芦笋皮 山西省闻喜县绿色食品厂;营养琼脂培养基;菌种 自制。

1.2 试剂

乙醇溶液、蒸馏水和氯化钠(分析纯)。

1.3 仪器与设备

植物粉碎机、电热恒温水浴锅、电热恒温培养箱、电热恒温鼓风干燥箱、空气浴振荡器、超净工作台、手提式压力消毒器、2100型分光光度计、菌落计数器、分析天平。

1.4 方法

1.4.1 提取液的配制

称取一定量粉碎后的芦笋皮粉,置于三角瓶中,加入一定量的蒸馏水或一定浓度(90%)的酒精溶液,配制成料液比为1:20的溶液,然后在90℃的恒温水浴锅中浸提1h后,过滤即得提取液。

1.4.2 培养基的制备

取45g营养琼脂培养基粉加入到1000ml蒸馏水中,加热待完全融化后分装,并经121℃,15min高压灭菌后备用。

1.4.3 无菌生理盐水的配制^[10]

准确称取0.9g NaCl加入100ml蒸馏水中充分溶解,而后经121℃,15min高压灭菌后备用。

1.4.4 菌种的筛选

将灭菌后的培养基倒平板,而后在空气中敞口放置约30min,后置于37℃恒温培养箱中培养24h,选择生长良好、数量较多的一种菌作为优势菌;取优势菌的一个菌落接种到平板培养基上纯化,又经37℃恒温培养箱中培养24h后,作为配制菌悬液的目标菌。

1.4.5 菌悬液的制备

在无菌状态下,向灭过菌的试管中加9ml无菌生理盐水,然后用接种环挑取1~2个大小适宜的菌落,经空气浴振荡器充分振荡1h后即可得一定浓度的菌悬液,此时菌悬液浓度约为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/ml。取1ml制备好的菌悬液,采用10倍稀释法稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 后待用。

菌落总数(个/平皿)=菌落数×稀释倍数

1.4.6 芦笋皮提取液最低抑菌体积分数的确定及抑菌率的测定

用平板稀释法测定芦笋皮提取物的抑菌率,进而确定最低抑菌体积分数。取适量原液加入到无菌培养皿中,定量加入温度约45℃的营养琼脂培养基15ml,使提取液的体积分数分别为20%、15%、10%、5%、2.5%、1.25%,后用无菌吸管吸取0.1ml的菌悬液加入到上述平板培养基中并涂布均匀,经37℃、24h恒温培养后进行观察,以完全无菌生长的最低体积分数作为芦笋皮提取液最低抑菌体积分数,以乙醇,无菌蒸馏水作对照。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照皿菌落数} - \text{试验皿菌落数}}{\text{对照皿菌落数}} \times 100\%^{[11]}$$

1.4.7 利用分光光度法测定抑菌性及抑菌活性与作用时间的关系

向两支无菌试管中分别加入9ml芦笋皮水提取液和乙醇提取液及1ml菌悬液,振荡使混合均匀充分,在560nm处定时测定其吸光度,以乙醇、无菌蒸馏水作对照,找出最大抑菌时间,同时以蒸馏水作空白对照^[12]。

1.4.8 抗菌活性成分的热稳定性实验

将芦笋皮提取物经121℃,15min热处理后测定其抑菌活力,取经高温处理后的适量提取液加入到无菌培养皿中,定量加入温度约45℃的培养基15ml,此时提取液的体积分数为最低抑菌体积分数,并加入经稀释后的菌悬液0.1ml,涂布均匀后经37℃、24h培养后进行观察,同时做一空白对照,最后计数并计算抑菌率。

1.4.9 不同pH值对芦笋皮抑菌活性的影响

用0.1mol/L柠檬酸和2.0%的NaOH溶液分别调整培养基pH为5、6、7、8、9,用平板菌落计数的方法,制成含一定浓度芦笋皮提取物溶液的不同pH值环境的微生物培养平板。经37℃恒温培养24h后,观察平板中菌落的生长情况,菌落越少,说明其抑菌效果越好^[13],同时做不加芦笋皮提取液的平行实验,计算出抑菌率。

2 结果与分析

2.1 芦笋皮提取液最低抑菌体积分数及抑菌率的测定结果

2.1.1 芦笋皮水浸提液体积分数对抑菌率的影响

芦笋皮提取液占整个培养基的体积分数与它的抑菌率有重要关系,大多数的食品防腐剂在加入食品中时,都要考虑其适宜添加量,添加量过高或过低其防腐效果都会受到影响。在此选择几个体积梯度,以期找到其提取液的最低抑菌体积分数的范围,为以后精确测定抑菌成分并制定适宜添加量做准备。菌悬液的浓度对最低抑菌体积分数的测定有很大影响,原因是菌悬液浓度过高,平板内生长的菌落数过多,给计数带来很大困难,所以可以对菌悬液做10倍及100倍稀释,然后进行菌落计数,并计算抑菌率。如图1所示,当芦笋皮水提取液的体积分数达到10%时,抑菌率可达到94.3%,当芦笋皮水提取液的体积分数达到20%时,几乎所有菌的生长都受到抑制,抑菌率达到99.9%,所以可初步估计芦笋皮水提取液的最低抑菌体积分数为20%。

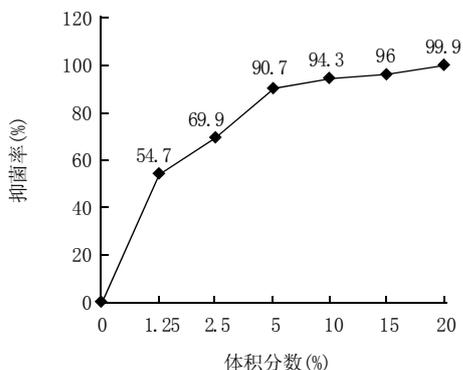


图1 芦笋皮水提取液体积分数对抑菌率的影响

Fig.1 Antimicrobial ratio induced by volume percent of water extracts in *Asparagus* peel

2.1.2 芦笋皮乙醇提取液体积分数对抑菌率的影响

采用与芦笋皮水提取液最低抑菌体积分测定相同的体积分数梯度和测定方法。结果如图2所示。当菌悬液为原液时,10%的乙醇提取液就可以完全抑制菌落的生长,当体积分数为5%时,也只有十几个菌落生长,将菌悬液稀释10倍、100倍后计数,并计算出抑菌率,当芦笋皮乙醇提取液体积分数为2.5%时,就可抑制97.2%的细菌生长,而当体积分数达到5%时,几乎没有菌生长,所以可初步估计芦笋皮乙醇提取液的最低抑菌体积分数为5%。

由图1和2可见,芦笋皮的乙醇提取液与水提取液的最低抑菌体积分数分别为5%和20%,且当提取液取为相同体积分数时,醇提液比水提液有更高的抑菌活性。这可能是由于芦笋皮抗菌性功能成分在乙醇中比在水中有更高的溶解度,进而可以推测其发挥抗菌功能的并不是单一组分,而是几种或几类抗菌因子的混合物。

2.2 利用分光光度法测定抑菌性及抑菌活性与作用时间

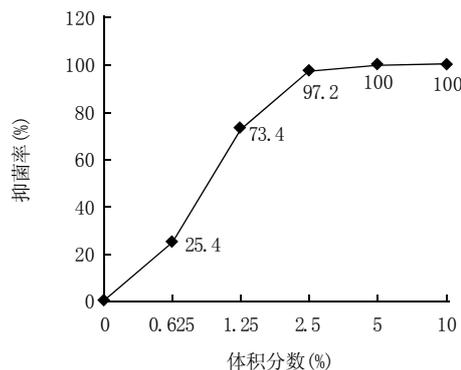


图2 芦笋皮乙醇提取液体积分数对抑菌率的影响

Fig.2 Antimicrobial ratio induced by volume percent of ethanolic extracts of *Asparagus* peel

的关系

2.2.1 时间对芦笋皮水提液吸光度的影响

芦笋皮提取液在560nm处的吸光度随提取液与细菌作用时间的延长而变化,主要是由于溶液中所含有的菌体数量越大,溶液的浑浊度越高,故而吸光度也大,刚开始加入菌体的提取液,其中菌体数目最大,所以刚开始时吸光度最大,随着作用时间的延长,芦笋皮提取液杀灭加入其中的细菌,菌体解体,致使吸光度下降,达到一个最低值后,提取液对细菌的这种抑制作用逐渐削弱,吸光度又开始缓慢上升。芦笋皮水提液吸光度随时间的变化如图3所示。经过12、24、36h,其吸光度由最初的1.100,变为1.027、1.035、1.124,其对照组蒸馏水的吸光度依次为0.009、0.014、0.017、0.021,呈逐渐上升趋势。可以看出:芦笋皮水提取液对细菌有一定抑制作用,但作用比较缓慢,并没有出现大的转折点,在12h达到最大抑制作用,而后趋于平缓,到24h后这种抑制作用慢慢减弱,此时芦笋皮水提取物有可能作为细菌生长繁殖所需营养物质的来源,供细菌生长。

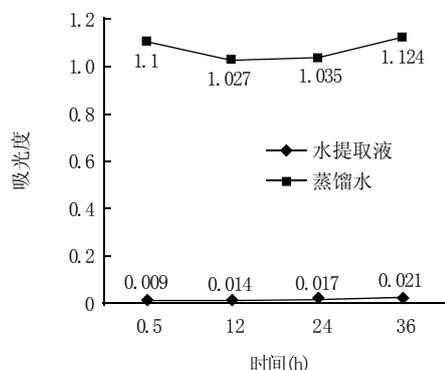


图3 时间对芦笋皮水提液吸光度的影响

Fig.3 Absorbance of water extracts of *Asparagus* peel induced by time

2.2.2 时间对芦笋皮乙醇提取液吸光度的影响

芦笋皮乙醇提取液在 560nm 处的吸光度随时间的变化如图 4 所示。其吸光度由最初的 0.260, 经过 12、24、36h 后变为 0.250、0.195、0.228; 其对照组 90% 乙醇溶液的吸光值依次为 0.008、0.006、0.014、0.020。可以看出: 芦笋皮的醇提取液的抑菌作用一开始缓慢增强, 在 24h 达到最高, 而后有逐渐降低趋势, 对照乙醇溶液的抑菌作用, 可知乙醇对菌本身有一定抑制作用, 但作用很小, 同芦笋皮乙醇水提液比较起来, 其作用可忽略, 这进一步证实芦笋皮内确实含有抗菌因子。

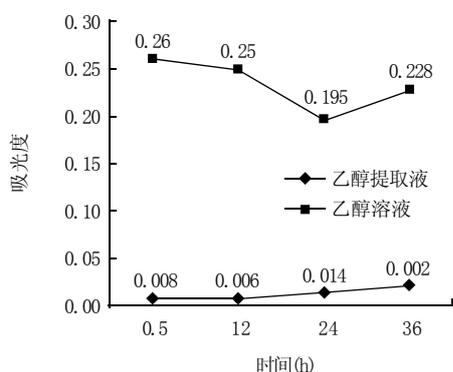


图 4 时间对芦笋皮乙醇提取液吸光度的影响

Fig.4 Absorbance of ethanolic extracts of *Asparagus* peel induced by time

综上所述, 芦笋皮的醇提取液和水提取液都有抗菌作用, 但乙醇提取液的抗菌作用明显强于水提取液, 并且可推测其抗菌作用主要体现在延长菌体生长延滞期, 抑制细菌孢子的萌发, 减少了微生物在相同时间内繁殖的代数, 从而抑制菌体的生长。

2.3 不同 pH 值对芦笋皮抑菌活性的影响

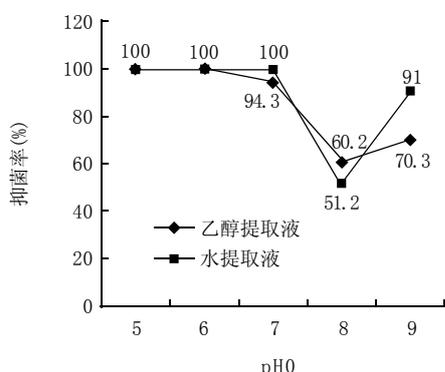


图 5 pH 对芦笋皮乙醇提取液及水提取液抑菌率的影响

Fig.5 Antimicrobial ratios of water and ethanolic extracts of *Asparagus* peel induced by pH

当芦笋皮乙醇提取液的体积分数为 5%, 水提取液的体积分数为 10%, 菌悬液的稀释度为 100 倍时, 测得

的菌落总数及抑菌率随 pH 的变化如图 5 所示。结果表明, pH 对醇提液和水提液的抑菌率有影响。当培养基 pH 值为 5、6 时, 醇提液和水提液的抑菌率都达到了 100%; 当 pH 值为 7 时醇提液的抑菌率仍为 100%, 而水提液的抑菌率开始下降; 当 pH 8 时, 醇提液和水提液的抑菌活性明显减弱, 达到一个最低点, 而后又渐渐回升; 当 pH 9 时, 抑菌率又上升到 90% 以上。

可见, 芦笋皮提取液的抑菌活性与 pH 值有很大关系, 在酸性 pH 范围内, 芦笋皮提取液的抑菌活性随 pH 降低而加强, 而在弱碱性 pH 条件下, 抑菌率明显降低。而当 pH 上升到一定值后, 抑菌率又有所上升, 这可能是由于强酸性或强碱性环境本身抑制了细菌的生长。

2.4 抗菌活性成分的热稳定性实验

经高温处理后的芦笋皮用平板菌落计数法测得其菌落数如表 1 所示, 其中芦笋皮水提取液的体积分数为 10%, 芦笋皮乙醇提取液的体积分数为 5%。对照图 1 和图 2 可以看出, 芦笋皮水提取液经高温高压处理后, 抑菌率由原来的 94.3% 降低到 62.5%, 芦笋皮乙醇提取液经高温高压处理后, 抑菌率由原来的 100% 下降到 90%, 说明芦笋皮水提取物耐高温能力不强, 而醇提物则有很好的耐高温能力, 经高温处理后, 仍具有良好的抑菌作用, 但抑菌活性有一定程度的下降。这可能是由于芦笋皮乙醇提取物中发挥抗菌功能的因子数量远大于芦笋皮水提取物, 并且这些抗菌因子的耐热性较强, 所以对于一些需经高温高压处理的食品来说, 芦笋皮醇提取物这种良好的耐热性与其保存性至关重要。

表 1 芦笋皮提取液高温处理后对抑菌率的影响

Table 1 Antimicrobial ratio induced by extracts of *Asparagus* peel after high-temperature

稀释度	0	10 倍	100 倍	菌落总数	抑菌率 (%)
水提取液	多不可计	多不可计	96	9600	62.5
乙醇提取液	多不可计	213	26	2130	90
对照组	多不可计	多不可计	256	25600	0

3 结论

芦笋皮的水提物及乙醇提取物中均含有抑菌成分, 乙醇提取物的抑菌作用明显强于水提取物, 采取料液比为 1:20、温度为 90℃、时间 1h、水浴加热浸提得到的芦笋皮水提取液和 90% 乙醇提取液对空气中最常见污染菌的最低抑菌体积分数分别为 20% 和 5%, 并且乙醇提取物的抑菌效果明显强于水提取物, 两种提取物在 pH 5~9 范围内均具有抗菌活性, 但在弱酸环境下抑菌效果有所加强, 121℃, 15min 的高温处理后其抑菌效果有所减弱, 芦笋皮提取液的抑菌活性在与病菌作用 12h 后达到高峰, 随后抑菌活性逐渐减弱。

枇杷花系统溶剂提取物抑菌作用研究

何莲¹, 张宏², 李琪¹, 杨必坤¹, 张晓喻^{1*}, 严伟¹

(1. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610068

2. 四川师范大学植物资源应用与开发研究所, 四川 成都 610068)

摘要: 研究枇杷花系统溶剂提取物抑菌的作用。实验以苯甲酸钠为对照组, 分别研究了枇杷花石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮、95%乙醇和水的提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的抑菌效果, 并对不同提取物进行薄层色谱分析。结果表明, 枇杷花的提取液对细菌、真菌均有抑制作用, 并优于对照组。正丁醇、丙酮提取物对金黄色葡萄球菌抑制能力优于其他溶剂; 石油醚提取物对大肠杆菌抑制能力优于其他溶剂; 石油醚、乙酸乙酯提取物对白色念珠菌抑制能力优于其他溶剂。

关键词: 枇杷花; 次生代谢物; 系统溶剂; 抑菌; 薄层色谱

Study on Bacteriostasis of Extracts from Flowers of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.
by Systematic Solvents

HE Lian¹, ZHANG Hong², LI Qi¹, YANG Bi-kun¹, ZHANG Xiao-yu^{1*}, YAN Wei¹

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China;

2. Institute of Phytochemistry, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China)

Abstract: The bacteriostasis of systematic solvents extracts from flowers of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl was studied. Seven systematic solvents extracts were conducted for the inhibitory effects against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, with calcium propionate as control group. The different extracts were tested by thin layer chromatography. The results indicated that the flower of *Eriobotrya japonica* was well at restraining bacillus and epiphyte. The average inhibitory effects of the flower of *Eriobotrya japonica* on bacteria and epiphyte were better than control groups. The butanol and acetone extracts had strong effect on *Staphylococcus aureus* than others. The petroleum ether extract had strong effect on *Escherichia coli*. The petroleum ether and ethyl acetate extract had strong effect on *Candida albicans*.

Key words flowers of *Eriobotrya japonica*; secondary chemicals; systematic solvents; bacteriostasis; TLC

中图分类号: Q946.838.4 Q935

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0109-04

收稿日期: 2007-07-26

*通讯作者

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(2006B035); 四川师范大学校级重点课题

作者简介: 何莲(1984-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物资源的开发与研究。

参考文献:

- [1] 叶春美, 林媚. 芦笋营养成分分析研究[J]. 中国果菜, 2005(2): 37.
- [2] 孙春艳, 赵伯涛, 郁志芳, 等. 芦笋的化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 1-5.
- [3] 顾振新, 张建惠. 芦笋弃料的营养价值和开发利用研究[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17(2): 111-113.
- [4] 周续. 芦笋无公害高效栽培[M]. 北京: 金盾出版社, 2003.
- [5] 冯翠萍, 庞候英, 常明昌, 等. 酶法提取芦笋皮中高活性膳食纤维的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(3): 188-191.
- [6] 冯翠萍, 程红艳, 刘喜文. 芦笋皮对小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 营养学报, 2003, 25(3): 330.
- [7] 冯翠萍, 常霞, 卢耀环. 芦笋皮对实验性高脂血症大鼠血脂水平的影响[J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(3): 265-267.
- [8] 李云雁, 宋光森. 板栗壳色素抑菌性的研究[J]. 湖北农业科技, 2004(5): 63-65.
- [9] 李春美, 邓明, 谢笔钧. 柚皮提取物对金黄色葡萄球菌抑制作用的初步研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(5): 64-66.
- [10] 郝林. 食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [11] 杨凯, 段作营, 张建华, 等. 尼泊尔庚酯对常见食品污染菌抑制作用的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(2): 116-118.
- [12] 黄文, 王益, 胡筱波, 等. 竹叶提取物抑菌特性的研究[J]. 林产化学与工业, 2002(1): 68-70.
- [13] 周建新, 嵇美华, 汪海峰, 等. 花生壳乙醇提取物抗菌性研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 64-66.