

大青叶抗菌物质提取及抗菌效果研究

赵良忠, 王放银, 段林东
(湖南邵阳学院生物工程系, 湖南 邵阳 422004)

摘 要: 研究了用水浸提法抽提大青叶中抗菌物质的方法, 并通过抑菌实验检验了它对细菌和霉菌的抑菌能力。正交实验结果表明最佳抽提工艺为: 料水比 1:20, 加热时间 40min, 回流温度 100℃; 滤纸片法抑菌实验发现: 大青叶提抽浓缩液(浓缩比为 5:1)对大肠杆菌及枯草杆菌的最低抑菌浓度为 2.77%(ml/100ml)左右, 青霉, 黄曲霉为 0.55%(ml/100ml)左右, 金黄色葡萄球菌为 0.055%(ml/100ml)左右。

关键词: 大青叶; 最佳提取工艺条件; 抑菌作用; 最低抑菌浓度

The Study on Antiseptic of the Extract and Antimicrobial Action from *Cloyodendron cvrtophyuan*

ZHAO Liang-zhong, WANG Fang-yin, DE Lin-dong
(Dept of Bioengineering, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422004, China)

Abstract: By using water a kind of antiseptic from *Cloyodendron Cvrtophyuan* which could be added into feed was extracted. By means of filter paper disks tests the antimicrobial effect of *Cloyodendron Cvrtophyuan*'s extract were verified and then. The extract's antimicrobial efficey on *Staphylococcus* and *Penieillum* was taken as the measurements in this experiment. After orthogonal design and experiments, the optimal extract process qualifications are extractive ratio is 1:20, circumfluence temperture is 100℃, circumfluence time is 40min, The marium absorbing peak is 270nm. *Cloyodendron Cvrtophyuan* have obvious antimicrobial actions on bacteria and mod. The lowest antimicrobial level for *Staphylococcus aureus* is 0.055%(ml/100m), *Aspergillus flavus* and *Penicillium* is 0.55%(ml/100m), *Escherichia coli* form and *Bacillus subtilis* is 2.77%(ml/100m).

Key words: *Cloyodendron cvrtophyuan* optimal extract process antimicrobial action the lowest antimicrobial level
中图分类号: Q946.887 文献标识码 A 文章编号 1002-6630(2004)11-0138-03

大青叶(*Clorodendron cyrtophyuan* Turcz.)马鞭草科赤贞桐属植物, 又名大青木, 根叶入药, 有凉血、清热、解毒、利尿之效^[1]。主治菌痢、咽喉炎、扁桃腺炎、黄疸丹毒、偏头痛、虫蚊咬等症^[2]。大青叶水煎剂对金黄色葡萄球菌有较强抑制作用^[3]。资料显示, 大青叶的有效抑菌成分是靛甙^[4]。

本研究探讨了大青叶抗菌物质的水抽提法, 确定了水抽提的最佳工艺条件, 通过滤纸片法抑菌实验发现: 大青叶提抽浓缩液(浓缩比为 5:1)对大肠杆菌及枯草杆菌的最低抑菌浓度为 2.77%(ml/100ml)左右, 青霉, 黄曲霉为 0.55%(ml/100ml)左右, 金黄色葡萄球菌为 0.055%(ml/100ml)左右。研究发现, 大青叶提取物防霉菌的效果较为理想, 可用于食品、饲料及饲料添加剂的防霉。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 大青叶 大青叶于 2003 年 4 月采摘于湖南邵阳学院生物工程系实习基地。

1.1.2 仪器 回流装置 真空抽虑装置, 7520 分光光度计, 杀菌锅。

1.1.3 菌种 枯草杆菌, 大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, 青霉, 黄曲霉五种菌种均由邵阳学院微生物研究室提供。

1.2 大青叶有效物质提取方法

1.2.1 工艺流程

原料采集→干燥(阴干)→粉碎→称取→按比例加水→水浴回流→真空抽滤→提取液

1.2.2 大青叶水煎剂光谱特性研究

称取 10g 原料, 加水 200ml, 水浴 90℃, 回流 50min

收稿日期: 2004-08-24

基金项目: 湖南省教育厅科技基金资助项目(01C008)

作者简介: 赵良忠(1962-), 男, 副教授, 主要从事生物工程和食品科学研究。

冷却, 真空抽滤, 用移液管取滤液 1ml, 用 100ml 容量瓶定容至 100ml。在 7520 型分光光度计上扫描, 确定提取特的最高吸波峰(OD 值)。

1.2.3 提取工艺条件确定

试验设计考虑料水比、提取温度 $^{\circ}\text{C}$ 和回流时间三个因素, 设计方案见表 1。

表1 抽提因素与水平设计表

实验水平	料水比 A	温度B($^{\circ}\text{C}$)	时间C(min)
1	1:20	80	60
2	1:30	90	50
3	1:40	100	40

根据表 1 选用 $L_9(3^3)$ 正交试表研究提取工艺参数。

1.3 抑菌实验方法

1.3.1 实验原理

将浸制好的滤纸片, 放入倒好的培养器表面培养 24h 后, 观察结果, 看有无抑菌圈, 并测量其大小以确定其抑菌能力大小。

1.3.2 制作无菌滤纸片

用打孔器直径为 6mm, 打出小滤纸片, 在干燥培养皿中倒入上抽提液 30ml, 用镊子将滤纸片夹入浸泡 4h 后, 取出置于另一干燥培养皿中, 再置于真空鼓风于烘箱中, 60°C 左右, 干燥滤纸片, 待干燥后, 连同培养皿取出, 置无菌室中待用。

1.3.3 培养基配方

细菌培养基: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 5~20g, 水 1000ml, pH 值 7.0~7.2。

霉菌培养基: Na_2CO_3 3g, K_2HPO_4 1g, KCl 0.8g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, FeSO_4 0.5g, 蔗糖 30g, 琼脂 15~20g, 水 1000ml, pH 值 自然。

1.3.4 操作

A. 菌种活化 首先配制培养基, 细菌和霉菌培养基分别按其配方的二分之一称量, 即每种培养基各配 500 ml, 分装杀菌后, 摆斜面, 待凝固后到无菌室接种, 然后于恒温干燥箱中, 培养 24h 后待用。细菌 37°C 左右, 霉菌 29°C 左右。

B. 配制培养基 细菌、霉菌各 500ml, 即按各自的配方, 样品称取原配方中的 50%。

C. 制作无菌水每种菌种配制三支无菌水, 于高压杀菌锅内 121°C 杀菌 20min, 待冷却后送无菌室中待用。

D. 制作菌悬液, 采用 10 倍稀释法, 用移液管从每种菌种吸取一毫升, 放到相应的培养皿中再用手轻轻摇晃, 使之在培养皿中分布均匀。待培养基冷却到手摸感觉到烫手但能够忍受时, 开始倒平板。每皿倒 20~25 ml 培养基, 先用手轻摇晃, 使之均匀, 再放在操作

台上用右手来回轻推几次。待培养基稍凝固后, 用镊子放置滤纸片。注意轻放且放置均匀, 5 片 / 皿。一切准备好后, 将培养皿放在恒温干燥箱中培养, 霉菌 29°C 左右, 细菌 37°C 左右, 24h 后观察结果。如果滤纸片周围无菌或比其它没放滤纸片的地方细菌个体长得小证明有抑菌作用, 即有抑菌圈。有明显抑菌的测其抑菌圈的直径。

1.4 最低抑菌浓度试验

1.4.1 细菌最低浓度测定方案

- 配制液体培养基 8ml / 管;
- 加待测试菌液 0.1ml / 管;
- 配制好样品系列浓度浓缩液;
- 做空白对照试验一(不加菌液);
- 空白对照试验二(不加浓缩液);
- 培养 36h 后测 OD 值。

1.4.2 霉菌最低浓度测定方案

配制含不同浓度提取物固体培养基若干皿(10ml / 皿), 加入待试菌液 0.1ml / 皿, 做空白对照试验一(不加菌液), 和空白对照试验二(不加浓缩液), 培养 36h, 目测生长情况。+ 有菌生长 ++ 有很多菌生长, - 无菌生长。

1.4.3 操作

1.4.3.1 配制液体培养基分装 8ml, 杀菌 121°C , 杀菌 20min。

1.4.3.2 配制样品系列浓度, 因为原液对大肠杆菌及枯草杆菌几无抑菌作用, 故选 5:1 的浓缩液做实验。规定它的浓度为 100%, 以此为标准, 分别使培养基中含浓缩液 5.50%、5.00%、4.40%、3.88%、2.77%、1.66%、1.11%、1.00%、0.88%、0.77%、0.66%、0.55%、0.44%、0.11%、0.055%。

1.4.3.3 细菌测 OD 值、霉菌目测分析结果

1.5 与青霉素的对照试验

试验方法: 将两种样品配制成系列浓度, 再浸制成不同浓度的滤纸片, 在相同条件下, 倒平板, 培养 24h 后, 测抑菌圈的大小, 如果有相等或相近大小的抑菌圈则此两种浓度应有相等的当量关系。

2 结果与讨论

2.1 光谱特性

光谱测定结果见表 2。

表2 大青叶水煎剂光谱特性表

入值	240	250	260	270	280	290	300	310
A 值	0.408	0.550	0.638	0.691	0.634	0.592	0.520	0.495

注: 表内数据为三次试验的平均值(下同)。

由表看出扫描的最高波峰为270nm, 下面的正交实验的OD值在此波长中测出。

2.2 工艺条件试验结果

最佳工艺条件试验结果见表3。

表3 抽提3因素3水平正交试验表

因素/编号	A	B	C	OD
1	1:20	80	60	0.349
2	1:20	90	50	0.635
3	1:20	100	40	0.699
4	1:30	80	60	0.278
5	1:30	90	50	0.624
6	1:30	100	40	0.377
7	1:40	80	60	0.228
8	1:40	90	50	0.131
9	1:40	100	40	0.609
三次水平因素1之和	1.683	1.127	0.96	
三次水平因素2之和	0.855	1.39	1.685	
三次水平因素3之和	0.855	1.39	1.685	
极差R	0.241	0.277	0.277	

由上表看出影响抽提因素最大的是湿度和回流时间, 其次是料水比。从正交表很显然看出最佳抽提工艺条件是A₁B₂C₃, 即料水比为1:20, 加热时间40min, 回流温度100℃。最佳工艺条件验证试验结果为OD值0.707, 说明试验结果是可信的。

2.3 抑菌实验

表4、表5是用原液(5g大青叶/100ml)和浓缩液((25g大青叶/100ml))浸制的滤纸片, 加入到置好的培养皿中

表4 抽提原液抑菌效果 (mm)

菌种	①	②	③	④	平均
青霉	8.5	8	9	9	8.6255
黄曲霉	9	8	8	7.5	8.125
大肠杆菌	0	0	0	0	0
枯草杆菌	0	0	0	0	0
金黄色葡萄球菌	12	10	9	11	10.5

表5 大青叶的浓缩液抑菌效果 (mm)

菌种	①	②	③	④	平均
青霉	12	10	13	13	11.7
黄曲霉	12	11	13	12	12
大肠杆菌	9	10	9.5	9.6	9.5
枯草杆菌	10	9	9	8.0	9
金黄球菌	15	16	18.5	17	16.6

培养24min后的结果。

由表4表5可以看出, 原液对大肠杆菌及枯草杆菌无抑菌作用, 但对青霉及金黄色葡萄球菌有良好的抑菌作用, 原液浓缩后, 大青叶提出液对供试菌种都有抑菌作用, 并且抑菌效果与浓度成正相关, 浓度越大抑制

效果越好。尔后我们做了一组10:1的浓缩液抑菌试验, 发现各种菌种的抑菌圈直径都增大了。大肠杆菌达16mm, 而金黄色葡萄球菌竟达26mm。

2.4 最低抑菌浓度测定

对各种试验菌的最低抑菌浓度结果见表6、7、8。

表6 最低抑菌浓度试验结果表(OD值, 270nm)

菌种浓度	大肠杆菌	枯草杆菌
0.00%	0.70	0.89
5.50%	0.43	0.52
5.00%	0.43	0.52
4.40%	0.425	0.51
3.88%	0.43	0.53
2.77%	0.43	0.52
1.00%	0.56	0.78
空白	0.425	0.51

表7 金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度表(OD值, 270nm)

浓度	0.00%	1.11%	0.10%	0.66%	0.55%	0.11%	空白
OD值	0.62	0.47	0.47	0.46	0.46	0.55	0.46

表8 青霉、黄曲霉

菌种	0.00%	1.66%	1.00%	1.11%	0.55%	0.11%	0.05%	空白
青霉	++	-	-	-	-	+	+	-
黄曲霉	++	-	-	-	-	+	+	-

由表6、表7、表8可得出结论即大青叶提抽液对大肠杆菌及枯草杆菌的最低抑菌浓度为2.77%左右(以5:1的浓缩液为100%), 青霉, 黄曲霉为0.55%左右, 金黄色葡萄球菌为0.055%左右。大青叶抽提物具有良好的抑菌作用。

3 结论

本试验实验结果表明大青叶提抽最佳抽提工艺为: 料水比1:20, 加热时间40min, 回流温度100℃; 抑菌实验发现: 大青叶提抽浓缩液(浓缩比为5:1)对大肠杆菌及枯草杆菌的最低抑菌浓度为2.88%(ml/100ml, 下同)左右, 青霉, 黄曲霉为0.55%左右, 金黄色葡萄球菌为0.055%左右。大青叶提取物用于饲料生产既可以防止动物被金黄色葡萄球菌感染, 同时还右用于饲料防霉。

参考文献:

- [1] 中国科学植物研究所. 中国高等植物图鉴(第三册)[M]. 科学出版社, 1985.
- [2] 吴贻谷, 宋立人. 中华本草(上册)[M]. 上海科学技术出版社, 1996.
- [3] 中国植物志[M]. 中国食品杂志社, 1988. 48(2).
- [4] 王宪楷. 天然药物化学[M]. 人民卫生出版社出版.