

杂交瓠瓜中抗菌组分的分离及其抗菌活性研究

李正英¹, 张保军², 陈忠军², 赵恒栋¹, 李红杰¹, 李钰金³

(1.内蒙古农业大学职业技术学院, 内蒙古 包头 014109;

2.内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 3.上海梅林食品有限公司, 山东 荣成 264300)

摘要: 本实验进行了杂交瓠瓜(瓠瓜(♀)×苦瓜(♂))抗菌组分的分离及其抑菌效果的研究。结果表明, 杂交瓠瓜水提物采用乙醇沉淀法分离得到的醇溶组分具有抑菌活性, 该抑菌组分对7种供试的细菌和3种霉菌具有抑菌效果, 对2种供试的酵母菌没有抑菌效果, 7种供试细菌的最低抑菌浓度为60~100mg/ml, 3种供试霉菌的最低抑菌浓度为70~80mg/ml。

关键词: 杂交瓠瓜; 分离; 抑菌效果

Study on Separation and Activities of Antimicrobial Ingredients from Hybrid Edible Gourd

LI Zheng-ying¹, ZHANG Bao-jun², CHEN Zhong-jun², ZHAO Heng-dong¹, LI Hong-jie¹, LI Yu-jin³

(1.College of Vocational Technology, Inner Mongolia Agricultural University, Baotou 014109, China;

2.College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhehot 010018, China;

3.Shanghai Maling Food Co. Ltd., Rongcheng 264300, China)

Abstract: The ethanol soluble fraction in water extracts from hybrid edible gourd has some antimicrobial effects against 7 bacteria and 3 fungus, but no antimicrobial effects against 2 yeasts. The minimum inhibitory concentration to 7 bacteria and 3 fungus are 60~100 mg/ml and 70~80 mg/ml, respectively.

Key words: hybrid edible gourd; antimicrobial ingredients; antimicrobial effect

中图分类号: TS251.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0112-03

抗菌剂分为天然抗菌剂和化学合成抗菌剂, 天然抗菌剂按其来源不同分为植物源抗菌剂、微生物源抗菌剂和动物源抗菌剂^[1]。由于植物源杀菌剂来源于自然, 具有对人、畜安全, 不污染环境, 不易引起抗药性, 在自然环境中易于降解等优点, 研究与开发安全性高的植物源农药、防腐剂、医用药类等成为当今新型杀菌剂研究的热点。

本实验采用乙醇沉淀法将杂交瓠瓜抗菌活性组分进行分离提纯, 并研究其抑菌效果, 为杂交瓠瓜抗菌物质在食品防腐、医疗、绿色农药等方面的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

杂交瓠瓜(瓠瓜(♀)×苦瓜(♂)): 内蒙古农业大学职业技术学院科技园区。

1.2 仪器与设备

LABCONCO 真空冷冻干燥机; VD-1320 无菌操作台 哈尔滨东联电子公司; RE-52AAA 旋转蒸发器 上海嘉

鹏科技有限公司。

1.3 供试菌种

细菌: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus Aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、肠膜沙门氏菌(*S. enteritidis*)、伤寒沙门氏菌(*S. p. aratyphi A*)、志贺痢疾杆菌(*S. higella dysenteriae*)、李斯特杆菌(*Listeria*); 酵母菌: 啤酒酵母(*Saccharomyces*)、面包酵母(*Sacharomycesfermentali*) 霉菌: 黑曲霉(*Aspergillus niger*)、白色念珠菌(*C. albicans*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)。

1.4 方法

1.4.1 细菌菌悬液的制备

将细菌接种于灭菌后的牛肉蛋白胨培养基, 37℃下培养24h, 活化3次, 将第三代的菌种用无菌的生理盐水配制成 10^{-6} ~ 10^{-8} CFU/ml的细菌菌悬液。

1.4.2 霉菌菌悬液的制备

将霉菌接种于灭菌后的马铃薯培养基, 30℃下培养48h, 活化3次, 将第三代孢子菌种用无菌的生理盐水

收稿日期: 2008-08-06

作者简介: 李正英(1964-), 男, 教授, 博士研究生, 主要从事食品加工技术的研究。E-mail: lizhy2002lizhy@163.com

配制成 10^{-6} ~ 10^{-8} CFU/ml 的霉菌菌悬液。

1.4.3 酵母菌悬液的制备

将酵母菌接种于灭菌后的麦芽汁培养基, 28℃下培养 48h, 活化 3 次, 将第三代的菌种用无菌的生理盐水配制成 10^{-6} ~ 10^{-8} CFU/ml 的酵母菌菌悬液。

1.4.4 抑菌粗提物的制备

将杂交瓠瓜(瓠瓜(♀)×苦瓜(♂))去皮后榨汁, 取汁后的杂交瓠瓜的渣与水按 1:14 的比例混合, 在 50~60℃下浸提 80min, 重复提取 2 次, 将瓠瓜汁及其渣的水提液混合后用旋转蒸发仪在 50℃下浓缩成膏状, 然后真空冷冻干燥, 即得杂交瓠瓜抑菌粗提物 I。

1.4.5 抑菌组分的分离

在杂交瓠瓜抑菌粗提物 I 与浓度为 95% 的乙醇按 1:10(W/V)的比例混合, 搅拌均匀, 在 0~5℃的冰箱放置 12h, 离心(4000r/min, 20min), 分别收集上清液和沉淀物, 得到醇溶物 II、沉淀物 III, 将沉淀物 III 与水按 1:25(W/V)的比例混合, 搅拌均匀, 离心(4000r/min, 20min), 得到沉淀物中溶于水的组分 IV 和不溶于水的组分 V; 沉淀物直接用真空冷冻干燥机干燥, 以上所得的醇溶物 II 和水溶液 IV 分别用旋转蒸发仪在 50℃浓缩后, 用真空冷冻干燥机干燥。采用牛津杯法将分离的组分(II~V)与粗提物 I 进行抑菌实验(具体操作同 1.4.6)。根据不同组分对大肠杆菌、啤酒酵母以及黑曲霉的抑菌效果选择抑菌组分。

1.4.6 抑菌谱

采用牛津杯法。

1.4.6.1 培养基制备

细菌采用牛肉蛋白胨固体培养基, 霉菌采用马铃薯固体培养基, 酵母菌采用麦芽汁固体培养基。将固体培养基灭菌(121℃、20min)。冷却至 50℃左右, 倾入灭菌培养皿中, 冷却凝固。

1.4.6.2 抑菌液的制备

将 1.4.5 分离的抑菌组分 0.10g 溶于 5ml 20% 的乙醇溶液。

1.4.6.3 抑菌实验

将 0.2ml 菌悬液接入盛有相应培养基的培养皿中, 涂布均匀。用灭菌的镊子将灭菌后的牛津杯放在接种后的培养基上。将 200 μ l 抑菌液注入牛津杯中, 以抑菌液的溶剂作为对照。细菌在 37℃下培养 24h, 霉菌在 30℃下培养 48h, 酵母菌在 28℃下培养 48h, 根据抑菌圈直径大小判断抑菌效果。抑菌圈直径大于 0.10cm 为抑菌效果明显, 抑菌圈直径小于或等于 0.10cm 为不明显。

1.4.7 最低抑菌浓度

采用抑菌组分梯度浓度培养法。将 1.4.5 分离的抑

菌组分溶于 20% 的乙醇溶液, 配置成不同浓度的溶液, 其浓度为 500、600、700、800、900、1000、1100、1200mg/ml。培养基经高压灭菌(121℃, 15min), 冷却至 50℃左右。将不同的菌悬液及其相应的培养基与抑菌液或 20% 的乙醇溶液按下述比例注入培养皿, 混合均匀, 制成平板。

实验组: 菌悬液 0.5ml+ 抑菌液 1.0ml+ 培养基 8.5ml, 注入培养皿, 摇匀, 制成平板。培养基中抑菌组分的浓度为 50、60、70、80、90、100、110、120mg/ml。

对照组: 菌悬液 0.5ml+20% 的乙醇 1.0ml+ 培养基 8.5ml, 注入培养皿, 摇匀, 制成平板。

细菌在 37℃下培养 24h, 酵母菌在 28℃下培养 48h, 霉菌在 30℃下培养 48h。观察不同处理的菌落生长情况。

2 结果与分析

2.1 抑菌组分的分离

按 1.4.4 的方法制备杂交瓠瓜抑菌粗提物 I, 然后按 1.4.5 的实验设计分离为 II、III、IV、V 四个组分, 各组分对大肠杆菌、啤酒酵母、黑曲霉的抑菌效果见表 1。

表 1 不同组分的抑菌效果
Table 1 Antimicrobial effects of different ingredients

组分	不同菌种的抑菌圈直径(cm)		
	大肠杆菌	啤酒酵母菌	黑曲霉
I	0.70	—	0.50
II	0.70	—	0.60
III	—	—	—
IV	—	—	0.10
V	—	—	—

注: “—”表示抑菌圈直径小于 0.1cm。

由表 1 可见, 醇溶组分 II 与抑菌粗提物 I 对大肠杆菌、黑曲霉的抑菌圈直径为 0.5~0.7cm, 组分 III、IV、V 对大肠杆菌、啤酒酵母、黑曲霉都没有抑菌效果。所以采用乙醇沉淀法对杂交瓠瓜抑菌粗提物进行处理, 可去除非抑菌组分。

2.2 抑菌效果

2.2.1 抑菌谱

从抑菌粗提物 I 中分离的抑菌组分 II 按 1.4.5 的实验设计进行抑菌谱实验, 实验结果见表 2。由表 2 可见, 抑菌组分 II 对供试菌的抑菌圈直径为 0.3~0.7cm, 即组分 II 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、肠膜沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、志贺氏痢疾杆菌、李斯特杆菌、黑曲霉、黄曲霉、白色念珠菌均有明显的抑菌效果, 对啤酒酵母菌、面包酵母菌没有抑菌效果。所以, 组分 II 对大多数细菌与霉菌有抑菌效果, 对酵母菌可能没有抑菌效果。

表2 抑菌组分的抑菌效果表
Table 2 Antimicrobial effects of ingredient II

菌种	抑菌圈直径(cm)	菌种	抑菌圈直径(cm)
大肠杆菌	0.7	李斯特杆菌	0.6
金黄色葡萄球菌	0.7	黑曲霉	0.6
枯草芽孢杆菌	0.5	白色念珠菌	0.3
伤寒沙门氏菌	0.4	黄曲霉	0.5
肠膜沙门氏菌	0.5	啤酒酵母	—
志贺痢疾杆菌	0.5	面包酵母	—

注：“—”表示抑菌圈直径小于0.1cm。

2.2.2 最低抑菌浓度

组分II在不同浓度下的抑菌效果见表3。由表3可见，组分II对不同微生物的最低抑菌浓度不同，对7种供试细菌的最低抑菌浓度为60~100mg/ml，对三种供试霉菌的最低抑菌浓度为70~80mg/ml。

3 结论

杂交瓠瓜抑菌粗提物I采用乙醇沉淀法分为II、III、IV、V四个组分，其中醇溶组分II具有抑菌活性；抑菌组分II对7种供试的细菌和3种霉菌具有抑菌效果，对2种供试的酵母菌没有抑菌效果，而且不同微生物的最低抑菌浓度不同，对7种供试细菌的最低抑菌浓度为

表3 组分II在不同浓度下的抑菌效果
Table 3 Antimicrobial effects of ingredient II at different concentrations

菌种	组分II的浓度(mg/ml)					
	50	60	70	80	90	100
大肠杆菌	+	+	+	+	+	—
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	—	—
枯草芽孢杆菌	+	+	+	—	—	—
伤寒沙门氏菌	+	—	—	—	—	—
肠膜沙门氏菌	+	—	—	—	—	—
志贺痢疾杆菌	+	+	—	—	—	—
李斯特杆菌	+	+	+	+	—	—
黑曲霉	+	+	—	—	—	—
白色念珠菌	+	+	+	+	—	—
黄曲霉	+	+	+	—	—	—

注：“+”表示有菌落生长，“—”表示没有菌落生长。

60~100mg/ml，对三种供试霉菌的最低抑菌浓度为70~80mg/ml。

参考文献：

- [1] 李正英, 张保军, 陈忠军. 杂交瓠瓜中抑菌物质的提取条件的优选[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 209-212.
- [2] 张合文, 忠立人. 鲑鱼鱼精蛋白抗菌活性的研究[J]. 黑龙江商学院学报, 1999, 15(4): 5-9.