

余甘子果实粗提物的抑菌活性研究

唐春红¹, 陈 岗^{1,2}, 陈冬梅¹, 幸宏伟¹, 高伦江^{1,2}

(1.重庆工商大学环境与生物工程学院, 绿色食品研究所, 重庆 400067; 2.西南大学食品科学学院, 重庆 400716)

摘 要: 本实验研究并探讨了余甘子果实 70% 乙醇提取物的抗菌谱和抑菌特性, 结果表明: 70% 的乙醇提取物对供试霉菌几乎没有抑菌活性; 对啤酒酵母有一定的抑菌活性; 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、变形杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌有很强的抑菌活性, 抑菌活性强弱顺序为: 嗜热脂肪芽孢杆菌>变形杆菌>金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>枯草芽孢杆菌, 其 MIC 值分别为: 2.0%、2.0%、2.0%、4.0%、4.0%, 啤酒酵母的 MIC 值为 8.0%。

关键词: 余甘子果实粗提取; 抗菌谱; 抗菌活性

Study on Antimicrobial Activity of Crude Extract from *Phyllanthus emblica* L. Fruits

TANG Chun-hong¹, CHEN Gang^{1,2}, CHEN Dong-mei¹, XIN Hong-wei¹, GAO Lun-jiang^{1,2}

(1. College of Environmental and Biological Engineering, Natural and Health Food Research Institute, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China; 2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: This study investigated the antimicrobial spectrum and activities of 70% ethanol extract of *Phyllanthus emblica* L. fruits. The results indicated that the extract shows little antimicrobial activity against tested mold, but it has certain antimicrobial activity against *Saccharomyces cerevisiae* with a MIC of 8.0%, and presents strong antimicrobial activities against *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in turn with MICs of 2.0%, 2.0%, 2.0%, 4.0%, and 4.0%, respectively.

Key words: crude extract from *Phyllanthus emblica* L. fruits; antimicrobial spectrum; antimicrobial activity

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0106-03

余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)来源于大戟科(*Euphorbiaceae*)叶下珠属(*Phyllanthus*)的果实。余甘子的化学成分比较多, 含有 VC、脂肪、蛋白质、多酚、VE、鞣质、黄酮、生物碱、氨基酸及各种微量元素等^[1]。现代药理研究证实余甘子具有广泛的抗菌能力, 余甘子果实浸出液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、鼠沙门氏菌、霍乱弧菌、大肠埃希氏菌、酵母菌、须发癣菌和红色癣菌均有抑(杀)菌效果^[2]。由于本实验主要研究该提取物是否可以用于食品防腐剂, 因此只选择乙醇溶剂对余甘子果实进行粗提, 研究该粗提物对食品中常见菌的抗菌谱和抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

余甘子果实购于云南思茅。

供试菌种由重庆工商大学生化实验中心提供。

95% 乙醇(分析纯); 葡萄糖(分析纯); 蛋白胨; 琼脂; 麦芽汁; 牛肉膏; 二甲基亚砜(DMSO) 成都市科龙化工试剂厂; MTT 染料(噻唑蓝 Tluka, 用 PBS-G 配成 1 mg/ml, 4℃ 避光保存); 其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

YXQ.SG41.280 手提式压力蒸汽灭菌器; SHA-C 恒温振荡器; TDZ5-WS 离心机; BC-R5001 旋转蒸发仪; DNM-9602G 酶标仪。

1.3 方法

1.3.1 余甘子粗提物的制备

余甘子干果粉碎, 过 40 目的孔筛, 放入旋转蒸发仪器(不开真空泵), 用 70% 的乙醇分两次提取, 提取温

收稿日期: 2008-12-31

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTC2006bb125205)

作者简介: 唐春红(1965-), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然防腐抗氧化剂和保健食品的开发。E-mail: 023tch@163.com

度 50℃、时间 4h。第一次用 6 倍体积的醇液提取, 第二次用 4 倍体积的醇液提取。两次提取液过滤合并, 以 3000r/min 离心 20min, 上清液用旋转蒸发仪浓缩至无醇味。浸膏用真空微波干燥器干燥成粉末。用二甲基亚砜(DMSO)溶解粗提物配成 10%、1% 和 0.1% 三个浓度梯度备用。

1.3.2 菌悬液的制备

配制培养基: 分别对各菌种接种、常规培养至三代备用。取培养后的细菌原液, 采用 10 倍稀释法稀释, 依次标记为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ... 10^{-8} , 各浓度分别做两个平行实验。采用平板菌落计数法, 培养后计算各培养皿的菌落, 得最佳供试菌液浓度为 10^6 CFU/ml。

1.3.3 粗提物抑菌实验

在无菌条件下, 取 10^6 的菌悬液 0.2ml 涂布在凝固的平板表面, 每个浓度的菌悬液做三个平行; 分别取各个浓度的含药溶液及二甲基亚砜(空白)2ml 于灭菌培养皿中, 放入直径为 5mm 的中性滤纸片, 浸泡 4h, 用无菌镊子夹起滤纸片(按浓度从大到小)顺时针贴在表面含菌的同一平板上, 细菌 37℃ 培养 24h, 酵母菌 28℃ 培养 24h, 霉菌 28℃ 培养 48h。培养结束后测量抑菌圈的大小, 计算平均值。

1.3.4 粗提物最低抑菌浓度实验

MTT 比色分析法的原理是利用活细菌细胞内的琥珀酸脱氢酶, 将染料 MTT 还原成不溶性的甲臢颗粒, 按酸化异丙醇溶解甲臢颗粒所呈现的颜色深浅来反映细菌、酵母、霉菌的数量及代谢活跃程度。

通过抑菌圈实验, 选择有较强抑菌作用的菌株做最低浓度实验。将 96 孔培养板经紫外线消毒 30min 后, 每排第 1 孔加入 16% 的 DMSO 溶解的提取液 0.1ml, 依次加入 2 倍稀释度的提取物溶液至第 9 孔, 各孔均以菌悬液(10^6 CFU/ml)补充至 0.2ml, 第 10 孔作为对照, 做三个平行。将细菌培养板置于 37℃ 培养箱培养 2h, 酵母菌于 28℃ 培养箱培养 6h, 然后每孔加入 MTT 液 50 μ l, 再培养 1~4h, 当培养板底微显蓝色颗粒物样时, 3000r/min 离心 10min, 吸取上清液, 加入酸化异丙醇 100 μ l, 振荡 1min, 在 570/630nm 处比色, 按下式计算抑菌百分率(A)。

$$A(\%) = (1 - \frac{\text{不同浓度药液孔 OD 值}}{\text{对照孔 OD}}) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 余甘子果实粗提物得率

余甘子果实 1kg 粉碎后, 过 40 目孔筛, 用 70% 乙醇(10L)、转速 50r/min、50℃ 浸提 4h, 合并提取液,

离心分离, 回收溶剂至无醇味, 真空微波干燥得到提取物粉末 317g, 得率为 31.7%。

2.2 余甘子果实粗提物对霉菌的抑菌活性

实验用的滤纸片是由直径为 5mm 的打孔器制成的, 当抑菌圈接近 5mm 时, 可以认为不抑菌, 结果见表 1。

表 1 不同浓度余甘子果实粗提物对霉菌的抑菌活性

Table 1 Diameters of inhibition zone of extract of *Phyllanthus emblica* L. at different concentrations against different species of molds

供试菌	抑菌圈直径(mm)			
	10.0%	1.0%	0.1%	空白
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	5.0	5.0	5.0	5.0
青霉(<i>Penicillium</i> sp.)	5.0	5.0	5.0	5.0
黑根霉(<i>Rhizopus nigricans</i>)	5.0	5.0	5.0	5.0

从表 1 可以看出, 实验中采用的余甘子果实提取的浓度范围内对黑曲霉、青霉、黑根霉没有抑菌活性。考虑到提取物要在食品中使用, 选取较大的浓度进行实验意义不大, 所以最大浓度只选择了 10%。

2.3 余甘子果实粗提物对酵母菌的抑菌活性

表 2 不同浓度余甘子果实粗提物对酵母菌的抑菌活性

Table 2 Diameters of inhibition zone of extract of *Phyllanthus emblica* L. at different concentrations against *Saccharomyces cerevisiae*

供试菌	抑菌圈直径(mm)			
	10.0%	1.0%	0.1%	空白
啤酒酵母菌(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	7.0	5.0	5.0	5.0

从表 2 看出, 余甘子果实粗提物对啤酒酵母有一定的抑菌作用, 但抑菌活性不是很强, 在三个浓度梯度中, 只有 10% 的供试液有抑菌活性, 而 1.0% 和 0.1% 的供试液没有抑菌活性, 这是由于供试液浓度未达到最低抑菌浓度值。

2.4 余甘子果实粗提物对细菌的抑菌活性

表 3 不同浓度余甘子果实粗提物对细菌的抑菌活性

Table 3 Diameters of inhibition zone of extract of *Phyllanthus emblica* L. at different concentrations against different species of bacteria

供试菌	抑菌直径(mm)			
	10.0%	1.0%	0.1%	空白
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	12.3	7.8	5.0	5.0
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	10.3	5.7	5.0	5.0
凝结芽孢杆菌(<i>Bacillus coagulans</i>)	6.83	5.0	5.0	5.0
嗜热脂肪芽孢杆菌(<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	15.3	8.3	5.0	5.0
苏云金杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i>)	6.8	5.0	5.0	5.0
变形杆菌(<i>Bacillus proteus</i>)	14.0	7.8	5.0	5.0
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	12.3	7.0	5.0	5.0
绿脓杆菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	9.3	5.0	5.0	5.0
产气荚膜杆菌(<i>Enterobacter aerogenes</i>)	7.3	5.0	5.0	5.0

从表3看出,提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、变形杆菌的抑制活性非常强,尤其是对嗜热脂肪芽孢杆菌的作用最强,除了10%的供试溶剂有作用外,1%提取物也有作用,只是抑制活性没有前者强。

2.5 余甘子果实粗提物的最低抑菌浓度(MIC)

通过MTT微量法快速测定余甘子粗提取物对嗜热脂肪芽孢杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和啤酒酵母的抑制作用,结果如图1所示。

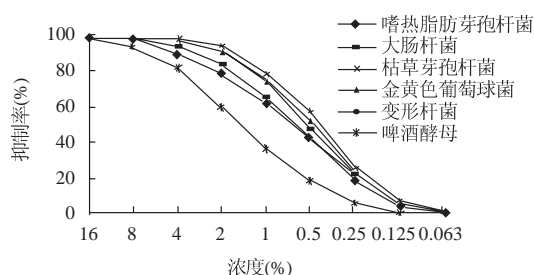


图1 提取物对细菌和啤酒酵母的抑制效果

Fig.1 Inhibition rates of extract of *Phyllanthus emblica* L. at different concentrations against *Saccharomyces cerevisiae* and different species of bacteria

MTT法显示的结果和滤纸片抑菌圈法的结果有很好的同一性,即抑制作用大小为:嗜热脂肪芽孢杆菌>变形杆菌>金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>枯草芽孢杆菌。如果以100%的抑菌率为完全抑菌,90%以上的抑菌率为具有抑菌作用,则余甘子提取物对嗜热脂肪芽孢杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的最小完全抑菌浓度为4.0%、4.0%、4.0%、8.0%、8.0%。最小抑菌浓度为2.0%、2.0%、2.0%、4.0%、

4.0%。啤酒酵母的最小完全抑菌浓度为16.0%,最小抑菌浓度为8.0%。

3 结论

通过余甘子果实粗提取物对9株细菌、3株霉菌、1株啤酒酵母菌的抑菌实验可知,粗提取物对霉菌没有抑菌活性;对啤酒酵母有一定的抑菌活性,但活性不强;对9株细菌都有一定的抑制作用,但对凝结芽孢杆菌、苏云金杆菌、产气荚膜杆菌、绿脓杆菌的作用效果不明显,对另外5种细菌的抑菌效果明显,1%浓度的提取物也有一定的活性,抑制作用强弱顺序为:嗜热脂肪芽孢杆菌>变形杆菌>金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>枯草芽孢杆菌。采用MTT法来测定粗提取物对嗜热脂肪芽孢杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、啤酒酵母的MIC值分别为:2.0%、2.0%、2.0%、4.0%、4.0%、8.0%。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 2229.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国经济植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1961: 1177.
- [3] 吴少雄. 余甘果的营养成分研究[J]. 昆明医学院报, 1995, 16(2): 27-23.
- [4] 张俊魏. 余甘子微量元素及功效研究[J]. 微量元素与健康研究, 1996, 13(1): 32.
- [5] 吴少雄. 余甘子粉的食用价值研究[J]. 昆明医学院学报, 1996, 17(3): 22-23.
- [6] 夏泉, 肖培根, 王立力. 传统药物余甘子的民族药理学研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 17(5): 344.
- [7] 毛琼, 张卫红. 几种中草药混合制剂抑菌作用的实验观察[J]. 洛阳医学学报, 2004(4): 297-298.
- [8] 余世望, 范青生, 肖小伟, 等. 60种食药两用中药抗菌防腐作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(4): 62-67.