

3种昆虫黄酮提取物的大肠杆菌抑菌活性研究

孙宇辰¹, 程吉云¹, 张立愔^{1,2}, 吕晓文^{1,3}, 许龙^{1,4*}

(1. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154002; 2. 佳木斯市第十一中学, 黑龙江佳木斯 154002; 3. 佳木斯市第二中学, 黑龙江佳木斯 154002; 4. 佳木斯大学应用昆虫研究所, 黑龙江佳木斯 154002)

摘要 [目的]测定美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁3种昆虫体内黄酮提取物的抑菌作用效果。[方法]采用溶剂萃取法(SFE)提取3种昆虫总黄酮,根据公式计算不同浓度的黄酮提取物对大肠杆菌的抑制率。[结果]其他条件相同时,美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁3种昆虫的黄酮浓度与抑制大肠杆菌繁殖的作用效果呈正相关;浓度相同时,美洲大蠊黄酮体内提取物抑菌效果最佳,中华稻蝗次之,芫菁的抑菌效果最弱。[结论]美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁3种昆虫黄酮提取物对大肠杆菌有一定的抑制作用。

关键词 总黄酮;提取物;大肠杆菌;抑菌

中图分类号 R 282.74 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)14-0183-02

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.14.054



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Bacteriostasis of Three Insect Flavonoid Extracts against *Escherichia coli*SUN Yu-chen¹, CHENG Ji-yun¹, ZHANG Li-yin^{1,2} et al (1. School of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002; 2. The 11th High School of Jiamusi City, Jiamusi, Heilongjiang 154002)

Abstract [Objective] The research aimed to determine the antibacterial effect of total flavonoids in *Periplaneta americana*, *Oxya chinensis* and *Mylabris phalerate*. [Methods] Total flavonoids were extracted by solvent extraction (SFE), and the inhibition rates of flavonoids extracts with different concentrations of three insects on *Escherichia coli* were calculated according to the formula. [Results] When other conditions were the same, the flavonoid concentrations of the three insects of *Periplaneta americana*, *Oxya chinensis* and *Mylabris phalerate* were positively correlated with the effect of inhibiting the reproduction of *Escherichia coli*. Under the same concentration, the flavonoids extracted from *Periplaneta americana* had the best bacteriostatic effect, followed by *Oxya chinensis*, and *Mylabris phalerate* had the weakest bacteriostatic effect. [Conclusion] Three insect flavonoid extracts of *Periplaneta americana*, *Oxya chinensis* and *Mylabris phalerate* have certain inhibitory effects on *Escherichia coli*.

Key words Total flavonoids; Extraction; *Escherichia coli*; Bacteriostatic

黄酮具有多方面医疗作用,能抗氧化、扩张血管、保持血管的弹性、抑制血小板活化因子、保护大脑等,可治疗心脑血管、肾病综合症、糖尿病及血管型痴呆等疾病^[1-2]。目前研究较多的是植物黄酮的提取,由于昆虫黄酮的提取过程和成分都很复杂,所以昆虫方面的研究相对很少^[3-4]。该试验用不同有机溶剂提取美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁3种昆虫的黄酮化合物,为今后昆虫类总黄酮的提取提供参考;通过测定美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁3种昆虫体内黄酮提取物对抑菌作用效果的研究,为今后昆虫类黄酮提取物在抑菌抗菌方面奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 美洲大蠊(*Periplaneta americana*)、中华稻蝗(*Oxya chinensis*)、芫菁(*Mylabris phalerata*)均来自佳木斯大学生命科学学院动物学实验室;菌种大肠杆菌(*Escherichia coli*)来自于佳木斯大学生命科学学院微生物学实验室。

1.2 方法**1.2.1 3种昆虫总黄酮提取工艺。**

1.2.1.1 溶剂种类的筛选。将分拣好的美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁烘干后粉碎,取2g样品用甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷5种有机溶剂萃取,在45℃的试验环境下进行分离提纯,其中,料液比为1:8(g:mL)。使用水浴法萃取8h,共2次,将所得到的试验溶液进行试验结果测定,计算出黄

酮的含量。

1.2.1.2 黄酮的提取。取粉碎后样品3.33g,按1:1(g:mL)比例加入石油醚脱脂,室温环境下使用100mL浓度为50%的甲醇浸泡36h,每3h振荡一次,继续抽滤,用提取溶剂反复洗涤3次,待溶液中的甲醇挥发后定容至100mL。

1.2.1.3 总黄酮含量的测定。绘制芦丁标准曲线^[5-6],参考文献[7]中的方法测定3种昆虫总黄酮含量。

1.2.2 3种昆虫黄酮提取物的大肠杆菌抑菌试验。

1.2.2.1 菌种的活化及传代培养。配制LB溶液200mL,高温杀菌。乙醇灯旁操作,选用K88和K992种菌种,同时放入5mL的试管中,恒温培养12h,并设置对照试验。循环操作,接种几次大肠杆菌后,得到纯度比较高的菌种,备用。

1.2.2.2 抑菌作用的定性判断。将含有黄酮提取物和大肠杆菌的悬液用玻璃棒涂于培养皿上,在37℃下培养24h,同时培养未添加黄酮提取物的对照组,观察大肠杆菌的生长繁殖的数量和大小。

1.2.2.3 不同浓度黄酮提取物抑菌效果的测定。将传代大肠杆菌K88和K99均用0.9%氯化钠溶液稀释,将美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁黄酮提取液配制成1000.0、500.0、250.0、125.0、62.5mg/mL5种稀释液,分别滴入不同的大肠杆菌培养基中,24h后使用菌落计数器计算大肠杆菌的繁殖程度,多次试验,计算均值。根据抑制率公式^[8]计算不同浓度黄酮分离液的抗菌效果:抑制率=(CK菌落数-处理菌落数)/CK菌落数×100%。

2 结果与分析

2.1 提取剂的选择 从表1可以看出,在相同条件下,甲醇

基金项目 佳木斯大学研究生科技创新基金项目(YZ2016-007)。**作者简介** 孙宇辰(1996—),女,黑龙江佳木斯人,硕士研究生,研究方向:资源昆虫开发与应用。*通信作者,教授,硕士生导师,从事昆虫学研究。**收稿日期** 2019-04-24; **修回日期** 2019-05-13

最适合对美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁黄酮进行提取,三氯甲烷最不适合对这3类黄酮化合物提取,说明不同的溶剂极性对美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁黄酮的提取效果不同,溶剂的极性

越大,提取效果就越好^[9]。由于甲醇对人体有害,所以以下试验均以乙醇为溶剂。

表1 提取剂种类对黄酮含量的影响

Table 1 Effect of extractant species on flavonoid content

提取剂 Extractant	甲醇 Methyl alcohol	乙醇 Ethyl alcohol	丙酮 Acetone	乙酸乙酯 Ethyl acetate	三氯甲烷 Trichloro- methane
美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	4.13	3.87	3.53	3.76	1.68
中华稻蝗 <i>Oxya chinensis</i>	4.20	3.96	3.76	3.63	1.53
芫菁 <i>Mylabris phalerate</i>	4.18	3.82	3.65	3.78	1.78

2.2 抑菌效果的定性判断 大肠杆菌在含有黄酮化合物浓度较高的提取剂的培养基中,生长情况很不好,其繁殖数量远小于对照组试验,即黄酮提取剂很大程度上抑制了大肠杆菌的生长繁殖。

2.3 黄酮提取液浓度对抑菌效果的影响 从表2可以看出,对于美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁3种昆虫提取的黄酮类化合物而言,其浓度越高对大肠杆菌的抑制生长效果越强,即黄酮浓度对大肠杆菌抑菌效果成正比。浓度相同的情况下,美洲大蠊提取的黄酮类化合物抑菌效果最佳,中华稻蝗次之,芫菁的抑菌效果最弱。

2.4 黄酮提取物抑菌效果机理分析 从图1可看出,添加适量的提取物后大肠杆菌数目降低,显示在指数生长期菌的繁殖速度放缓,可能是菌在生长繁殖和代谢时受到了BLF的抑制。结合黄酮的结构和以上结果推测黄酮提取物的抑制菌繁殖原理可能有2种:一是提取物中黄酮类物质与细菌细胞壁中的糖类物质结合,生成一种名为黄酮苷的物质,它能够破坏细胞壁中的糖苷键,使细菌细胞吸水涨破死亡;二是黄酮化合物中的黄酮分子含有亲水性基团和疏水性基团,亲

水性基团和疏水性基团分别通过化学反应和物理过程来破坏细菌细胞膜,使细菌失去膜的保护,从而细胞开始无止境地吸水,最终结果就是细胞破裂死亡^[10]。

表2 3种昆虫黄酮提取物浓度对大肠杆菌的抑制率

Table 2 Inhibition rate of three insect flavonoid extracts on *Escherichia coli*

昆虫种类 Insect species	浓度 Concentration mg/mL	抑制率 Inhibition rate/%
美洲大蠊 <i>Periplaneta americana</i>	1 000.0	94.35
	500.0	73.62
	250.0	57.88
	125.0	46.53
	62.5	32.68
中华稻蝗 <i>Oxya chinensis</i>	1 000.0	89.47
	500.0	72.23
	250.0	56.83
	125.0	42.58
	62.5	31.89
芫菁 <i>Mylabris phalerate</i>	1 000.0	89.21
	500.0	71.23
	250.0	54.36
	125.0	45.78
	62.5	31.09

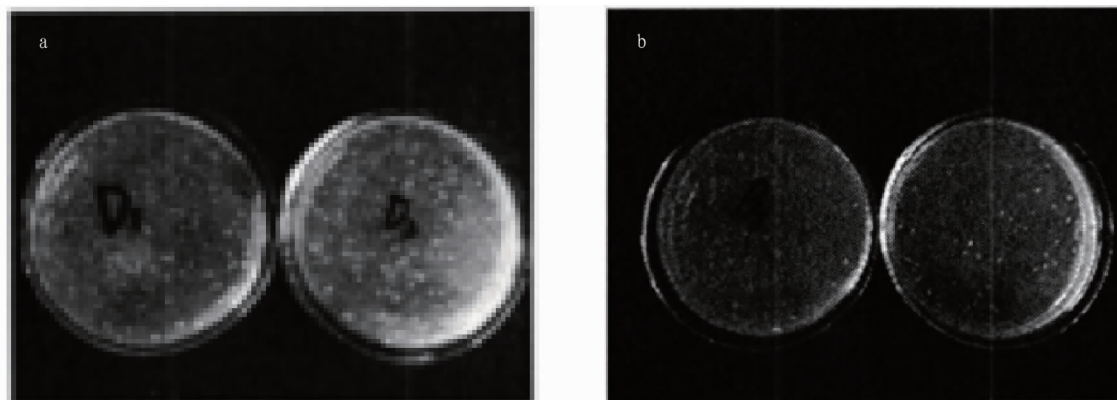


图1 不加黄酮提取物(a)和加黄酮提取物(b)大肠杆菌生长情况

Fig.1 Growth of *Escherichia coli* without flavonoid extract (a) and added flavonoid extract (b)

3 结论

试验结果表明,美洲大蠊、中华稻蝗、芫菁3种昆虫的黄酮类物质对大肠杆菌均有抑制作用。随着黄酮类物质浓度的增加,对大肠杆菌的抑制作用越显著,即黄酮浓度与抑制大肠杆菌繁殖的作用呈正相关;浓度相同的情况下,美洲大蠊提取的黄酮类化合物抑菌效果最佳,中华稻蝗次之,芫菁

的抑菌效果最弱。该试验对于昆虫酮类化合物在抑菌抗菌研究方面具有积极意义。

参考文献

- [1] 张来,杨碧昌,刘宁.植物黄酮类化合物在医药上的应用[J].安顺学院学报,2010,12(2):84-88.

果相吻合。主成分 3 代表可溶性固形物(TSS),正值代表 TSS 含量高,负值代表 TSS 含量低,江坝柚、沙田柚、水晶柚和红心柚的 TSS 与主成分 3 相一致。依据标准化后的原始数据带入主成分表达式计算出各样本的综合得分,从表 4 可以看出,8 个柚子品质由高到低依次为沙田柚、红囊柚、江坝柚、龙回早熟柚、琯溪蜜柚、红心柚、练家柚、水晶柚,总分可作为南康甜柚品种品质排名的一个参考数据。

3 讨论与结论

该研究采用差异统计和相关性分析柚子的果实指标间的差异性和相关性,并采用主成分分析法进行综合评价。通过差异统计分析可逐项比对同一指标在不同的 2 个品种间是否存在显著差异性,反映不同柚子间果实品质差异。

相关性分析发现,不同柚子单果重与果形指数呈极显著相关,果实大小与果树本身的遗传因子相关,还受生理、形态、营养等因素影响^[8],果形性状是数量遗传性状,多基因控制,并受基因间互作作用影响,遗传机制复杂^[9]。不同品种柚子果形指数与单果重呈极显著正相关,表明随着单果重的增加,果形由近圆形逐渐变成长圆形,单果重和果形指数的品种间差异越发明显。皮厚与可食率呈极显著负相关,柚子果皮厚度越大,果皮重越大,反之果肉重会变小,可食率下降。TA 与固酸比呈极显著负相关,在可滴定酸含量越大时,固酸比反而变小,TSS 与 TA 的相关系数仅为 0.198,相关性小,TSS 数值大多在 11%左右,变异系数仅有 5.51%,TA 变异系数为 31.74%,相差较大,可认为可滴定酸含量上升与下降不能引起 TSS 发生剧烈变化,因此固酸比会随着可滴定酸增加而变小。TA 与 V_c 呈极显著负相关,已有报道荔枝的 TA 与 V_c 呈极显著的相关性^[10],桃的 TA 与 V_c 呈一定的正相关性^[11],穆瑞等^[12]研究表明刺梨中的 TA 与 V_c 呈极显著相关性,不同柚子间的品质分析指标相关性报道较少。

主成分分析将 8 个指标通过降维过程转化为 3 个综合指标(主成分),它们可反映原来 8 个指标中 92.078%的信息,通过特征值和贡献率构建综合评价模型,综合评价模型

中的总分项可直接反映柚子综合品质的优劣程度^[13]。结果显示,在 8 个柚子品种中沙田柚、红囊柚、江坝柚、龙回早熟柚等评分较高,沙田柚是南康主要栽培品种,在市场上较受欢迎,这与评价结果是相一致的。

果实品质由多方面因素来综合决定的,该研究选取具有代表的 8 个指标进行了指标间差异性和相关性,并通过主成分分析法综合成数值形式,研究结果更加直接地展示。由于主成分分析法没有考虑到人们的喜好,今后应完善分析方法,以便更加全面合理地评价南康柚子的品质,为南康柚子的良种化和生产种植提供参考依据。

参考文献

- [1] MÄKYNYEN K, JIITSAARDKUL S, TACHASAMRAN P, et al. Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand[J]. Food chemistry, 2013, 139 (1/2/3/4): 735-743.
- [2] AGUDELO C, BARROS L, SANTOS-BUELGA C, et al. Phytochemical content and antioxidant activity of grapefruit (Star Ruby): A comparison between fresh freeze-dried fruits and different powder formulations[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 80: 106-112.
- [3] 孙慧慧, 余元善, 吴继军, 等. 沙田柚的加工和综合利用研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(6): 209-214.
- [4] 黄宗发, 赖锋生. 南康甜柚产业的现状与发展[J]. 现代园艺, 2009(3): 2-4.
- [5] 魏张奎, 陈红, 董梦婷, 等. 5 个夏橙品种果实品质分析[J]. 中国南方果树, 2014(2): 39-40.
- [6] 胡孝贵. 2,6-二氯酚法测赣南脐橙中 Vc 含量的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [7] 沈渊. SPSS 17.0(中文版)统计分析及应用实验教程[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2013.
- [8] 宋志海, 高飞飞, 陈大成. 果实大小相关性及其影响因素研究进展[J]. 福建果树, 2002(3): 9-12.
- [9] 乔军, 刘富中, 陈钰辉, 等. 园艺作物果形遗传研究进展[J]. 园艺学报, 2011, 38(7): 1385-1396.
- [10] 龙淑珍, 何永群. 荔枝可滴定酸与维生素 C 的测定及其相关性[J]. 广西农业科学, 2002(4): 188-189.
- [11] 黄丽萍, 张倩茹, 尹蓉, 等. 不同品种桃果实糖、酸、Vc 含量分析[J]. 农学学报, 2017, 7(10): 51-55.
- [12] 穆瑞, 樊卫国. 不同大小的刺梨果实品质特征及重要指标间的相关性[J]. 中国南方果树, 2018, 47(5): 122-127.
- [13] 蔡楠, 陈金印, 彭旋, 等. 主成分分析法对“新余蜜橘”果实常温贮藏效果的评价[J]. 中国果树, 2018(6): 10-13.
- [14] 张路, 于慧敏, 杜凤沛, 等. 金花葵中总黄酮的分离提取及含量测定[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2015, 36(4): 104-108.
- [15] 程吉云, 岳明, 王涛, 等. 美洲大蠊黄酮提取工艺条件研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(10): 148-149, 190.
- [16] 周琰冰, 赵鑫荟, 艾启俊. 三种中草药对大肠杆菌的抑制作用及机理初探[J]. 中国农学通报, 2014, 30(21): 294-300.
- [17] 丁红军, 段玉峰, 刘爱青, 等. 中华稻蝗黄酮的提取及抗氧化活性研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(7): 87-89.
- [18] 刘如龙, 付鸣佳. 茶花与红花檵木花中黄酮类物质抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8647-8648.

(上接第 184 页)

- [2] 韩芸, 梁伟玲, 徐迎涛, 等. 广藿香总黄酮提取工艺及抑菌活性研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 65-69.
- [3] ZHENG Y, HUANG W, YOO J G, et al. Antibacterial compounds from *Siraitia grosvenorii* leaves [J]. Natural product research, 2011, 25(9): 890-897.
- [4] 常丽新, 贾长红, 高曼, 等. 丁香叶黄酮的抑菌作用研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 126-128.
- [5] 陈文光, 陈地灵, 林励, 等. 广藿香中总黄酮含量测定方法的建立[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(5): 526-528.