

南五味子不同溶剂提取物的抑菌活性研究

王少杰, 杨敏*, 于新 (仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510225)

摘要 [目的]研究南五味子的乙醇提取物和水提取物的抑菌活性。[方法]分离南五味子提取物中的乙醇相物质和水相物质,用牛津杯法测定其对常见的致病菌和酵母菌的抑菌活性,用平板涂布法测定最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。[结果]南五味子的醇相和水相物质对革兰氏阳性菌(G^+)和革兰氏阴性菌(G^-)均有明显的抑菌活性,对 G^+ 的抑菌活性均强于对 G^- 的抑菌活性;醇相的抑菌活性优于水相的抑菌活性;对酵母菌的抑菌活性均不明显;醇相和水相的抑菌活性顺序均依次为:金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>沙门氏菌>酵母菌。[结论]南五味子的乙醇提取物和水提取物均有一定的抑菌活性,值得进一步开发利用。

关键词 南五味子(FRUCTUS SCHISANDRAE SPHENANTHERAE);乙醇相和水相;最低抑菌浓度;最低杀菌浓度

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-01922-03

Study on Antibacterial Activity of Alcohol-soluble and Water-soluble Extracts from *Kadsura longepedunculata*

WANG Shao-jie et al (College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

Abstract [Objective] To study antibacterial activity of alcohol-soluble and water soluble extracts of *Kadsura longepedunculata*. [Method] The ethanol phase and water phase were isolated from the extracts of *Kadsura longepedunculata*. Oxford cup method was used for determination on antibacterial activity of common pathogenic bacteria and yeast. Plate coating method was adopted for determination of minimal inhibitory concentration(MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC). [Results] The results showed that *Kadsura longepedunculata* alcohol phase and water phase have obvious antimicrobial activity on the G^+ and G^- , and G^+ antibacterial activity is stronger than the antibacterial activity of G^- , antibacterial activity of alcohol is stronger than the water. Alcohol and water phase bacteriostatic activity order all are as follows: *Staphylococcus aureus* Rosenbach > *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn > *Escherichia coli* > *Salmonella paratyphi* B Castellani et Chalmers > *Saccharomyces cerevisiae*. [Conclusion] alcohol-soluble and water soluble extracts of *Kadsura longepedunculata* all have antibacterial activities, which could be further developed and used.

Key words *Kadsura longepedunculata*; Alcohol-soluble and water-soluble; Minimal Inhibition Concentration (MIC); Minimal Bactericidal Concentration(MBC)

南五味子(FRUCTUS SCHISANDRAE SPHENANTHERAE)为木兰科(Magnoliaceae)植物华中五味子(*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.)的干燥成熟果实^[1],广泛分布在我国南部地区,是我国最为重要的药用植物资源之一^[2]。随着食品安全问题的日益严重,各国越来越重视天然食品防腐剂的研究与开发,植物提取物的抑菌防腐作用成为当今食品研究的热点^[3]。南五味子是传统的药食两用植物果实,含有多钟天然抑菌成分,如五味子甲素、五味子酯甲、乙、丙、丁、戊等木脂素类成分;此外还含有挥发油、有机酸、脂肪及三萜类化合物等成分。其中,木脂素和三萜类是南五味子属植物主要的生物活性成分^[4-5],能抑制多种致病菌^[6-7],研究者探讨了五味子等29种中草药对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌和绿脓杆菌的抑菌作用,其中对3种试验菌抑菌作用最强的就是五味子^[8],所以南五味子具有食品防腐及果蔬保鲜的潜在应用前景。因此,笔者将南五味子的提取物分离成乙醇相和水相物质后,分别研究其对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及酵母菌的抑菌活性,以期在南五味子抑菌物质的成分分析和抑菌机理以及开发成天然食品防腐剂的研究提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。南五味子果实,采自广东省阳西县,经鉴

基金项目 广东省科技计划项目(2010B020312015)。

作者简介 王少杰(1987-),男,河北邯郸人,硕士研究生,研究方向:南五味子果酒,E-mail:569942105@qq.com。*通讯作者,副教授,从事功能食品开发和加工技术研究,E-mail:yangmgz_001@163.com。

收稿日期 2013-01-06

定为华中五味子(*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.)的干燥成熟果实。

1.1.2 供试细菌。革兰氏阳性菌(G^+):金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn);革兰氏阴性菌(G^-):大肠杆菌(*Escherichia coli*)和乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi* B Castellani et Chalmers);均由广东省疾病预防控制中心提供。酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*),由安琪酵母公司生产。

1.1.3 主要仪器。MJ-176NR型多功能粉碎机,购自日本松下电器株式会社;BS-224S电子天平,购自德国赛多利斯公司;SYQ-DSX-280B灭菌锅,购自上海申安医疗器械厂;R201D-II型旋转蒸发仪,购自无锡星海王生化设备有限公司;SW-CJ-IF型无菌超净工作台,购自苏州净化设备有限公司;LRH-250A型生化培养箱,购自广东省医疗器械厂。

1.1.4 主要试剂。细菌学蛋白胨、牛肉浸膏和琼脂粉,均由广东环凯微生物科技有限公司生产;氯化钠,购自江苏强盛化工有限公司;乙醇,购自天津富宇精细化工有限公司;所用试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 南五味子提取物的乙醇相和水相物质的制备与分离。将采摘的南五味子阴干后密封置于4℃保存,然后经60℃干燥2h,进行破碎,取适量,以浓度70%的乙醇为溶剂,料液比1:7(W/V,g/ml,下同),提取温度为75℃,提取3次,每次1h;合并提取液,于45℃进行真空旋转蒸发浓缩,至稀膏状,然后加入适量的无水乙醇,充分混合,静置,分离上清液,

余下的沉淀物加入少量蒸馏水溶解至稀膏状,重复操作3次,合并上清液,得到乙醇相液;最后的沉淀物即为水相液膏。将得到的醇相上清液于45℃下真空旋转蒸发浓缩到膏状程度。将醇相膏和水相膏分别溶于对应溶剂中,配制成浓度1.0 g/ml的醇相液和水相液试样,4℃贮存备用。

1.2.2 培养基的制备。(1)细菌培养基。采用牛肉膏蛋白胨培养基,即牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、琼脂18 g、NaCl 5 g、pH7.2~7.5、蒸馏水1 000 ml,于121℃灭菌30 min;冷却,4℃贮存备用。(2)真菌培养基。采用土豆蔗糖琼脂培养基,即200 g土豆(去皮)、葡萄糖20 g、琼脂18 g、蒸馏水1 000 ml,于121℃灭菌30 min;冷却,4℃贮存备用。

1.2.3 供试菌悬液的制备。(1)供试菌的活化。在相对应的试管斜面培养基上,细菌在37℃下活化24 h;真菌在27℃下活化48 h。(2)菌悬液的制备。细菌使用平板计数法,真菌使用显微镜直接计数法测菌体个数,调至浓度为 1×10^8 CFU/ml的菌悬液,备用。

1.2.4 抑菌活性测定。采用牛津杯法^[9](即管碟法)。在距培养皿边缘2 cm的3个等距离方向放置外直径为8 mm的牛津杯,缓缓倒入含供试菌的培养基,厚度为5 mm。待培养基完全凝固后,取出牛津杯,用移液枪向各孔内加入0.1 ml稀释成浓度为10 mg/ml的南五味子醇相液和水相液。阴性对照组各孔内加入0.1 ml各对照液。细菌培养皿置于37℃培养24 h,酵母菌培养皿置于27℃培养48 h,十字交叉法测量抑菌圈直径^[10]。重复3次,结果取平均值。

1.2.5 最低抑菌浓度(MIC)测定。用二倍稀释法将浓度1.0 g/ml的南五味子的醇相和水相稀释至1 000.00~1.85 mg/ml的10个浓度梯度,然后吸取2 ml加入到18 ml经过灭菌融化的培养基中,充分混匀后倒平板,使提取物的最终浓度为100.000~0.185 mg/ml^[11]。待培养基冷却后,用移液枪吸取浓度为 1×10^8 CFU/ml的供试菌菌悬液0.2 ml于平板上涂布均匀。每个样液浓度3个重复试验,并作1个阴性对照组。细菌培养皿和酵母菌培养皿分别置于37和27℃下培养24 h,观察菌体的生长情况,从无菌生长的培养基中找出醇相液和水相液浓度最低的培养基,该培养基对应的醇相液和水相液浓度即为该相液的最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.6 最低杀菌浓度(MBC)测定。将醇相和水相抑菌液的

浓度高于及等于MIC的培养皿继续培养24 h,观察菌体的生长情况,以无菌生长的最低抑菌液浓度为该抑菌液的最低杀菌浓度(MBC)。

2 结果与分析

2.1 南五味子醇相和水相液抑菌活性检测 由表1可知,南五味子的醇相和水相液对供试菌有很好的抑制作用。醇相液对供试菌的抑制活性为:金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>沙门氏菌>酵母菌;水相抑菌液对供试菌的抑制活性为:金黄色葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌>沙门氏菌>酵母菌。南五味子醇相和水相液对G⁺的抑制效果强于G⁻。由于G⁺和G⁻二者除在细胞壁的化学组成上有很大的差异外,其细胞的内部结构差异很小,提取物对两者抑菌活性的差异,可能是由于二者的细胞壁组成构造不同而引起的。

表1 南五味子醇相和水相液对供试菌的抑菌效果

	菌种	抑菌圈直径/mm	阴性对照
水相液	金黄色葡萄球菌	21.10±0.20	—
	枯草芽孢杆菌	20.89±0.36	—
	大肠杆菌	17.86±0.30	—
	乙型副伤寒沙门氏菌	16.93±0.15	—
	酵母菌	10.38±0.17	—
醇相液	金黄色葡萄球菌	23.79±0.31	—
	枯草芽孢杆菌	23.02±0.27	—
	大肠杆菌	18.79±0.13	—
	乙型副伤寒沙门氏菌	17.43±0.27	—
	酵母菌	10.79±0.33	—

注:抑菌液浓度为10 mg/ml;“—”没有抑菌圈;用溶剂代替试样即为阴性对照。

2.2 南五味子中醇相和水相液对供试菌MIC的初步测定 由表2可知,南五味子的水相液对金黄色葡萄球菌的MIC为1.562 mg/ml,对枯草芽孢杆菌的MIC为3.125 mg/ml,对大肠杆菌的MIC为6.250 mg/ml,对乙型副伤寒沙门氏菌的MIC为6.250 mg/ml,对酵母菌的MIC为12.500 mg/ml;醇相液对金黄色葡萄球菌的MIC为0.781 mg/ml,对枯草芽孢杆菌的MIC为1.562 mg/ml,对大肠杆菌的MIC为3.125 mg/ml,对乙型副伤寒沙门氏菌的MIC为3.125 mg/ml,对酵母菌的MIC为6.250 mg/ml。

表2 南五味子中醇相液和水相液对供试菌的最低抑菌浓度(MIC)

菌种		提取物浓度/mg/ml						
		25.000	12.500	6.250	3.125	1.562	0.781	0.390
水溶相液	金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	+	++	+++
	枯草芽孢杆菌	—	—	—	+	++	+++	+++
	大肠杆菌	—	—	+	++	+++	+++	+++
	乙型副伤寒沙门氏菌	—	—	+	++	+++	+++	+++
	酵母菌	—	+	++	+++	+++	+++	+++
醇溶相液	金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	+	++
	枯草芽孢杆菌	—	—	—	—	+	++	+++
	大肠杆菌	—	—	—	++	++	+++	+++
	乙型副伤寒沙门氏菌	—	—	—	+	++	+++	+++
	酵母菌	—	—	+	++	+++	+++	+++

注:“—”无菌生长,“+”菌落较少,“++”菌落较多,“+++”菌落较多。

2.3 南五味子中醇相和水相液对供试菌 MBC 的测定 缩小初步确定的 MIC 及其相邻的两个浓度之间的梯度距离,培养 24 h,观察菌体的生长情况,以仍无菌生长的最低试样浓度为该相最终的 MIC 值。继续培养 24 h 仍然没有细菌生长的最低的浓度,即为最低杀菌浓度(MBC)值。由表 3 可知,南五味子醇相对金黄色葡萄球菌的 MIC 值最低,为 1.562 mg/ml,其次是枯草芽孢杆菌,MIC 值为 3.125 mg/ml;对酵母菌的 MIC 值最高,为 15.625 mg/ml;大肠杆菌和沙门氏菌的 MIC 值均为 7.031 mg/ml。南五味子水相对金黄色葡萄球菌的 MIC 值最低,为 3.125 mg/ml,其次是枯草芽孢杆菌,MIC 值为 6.250 mg/ml;对酵母菌的 MIC 值最高,为 18.750

mg/ml;大肠杆菌和沙门氏菌的 MIC 分别为 9.375 mg/ml 和 10.156 mg/ml。

南五味子醇相对金黄色葡萄球菌的 MBC 值最低,为 2.344 mg/ml,其次是枯草芽孢杆菌,MBC 值为 4.688 mg/ml;对酵母菌的 MBC 值最高,为 18.750 mg/ml;大肠杆菌和沙门氏菌的 MBC 值分别为 7.813 和 8.594 mg/ml。南五味子水相液对金黄色葡萄球菌的 MBC 值最低,为 3.906 mg/ml,其次是枯草芽孢杆菌,MBC 值为 7.031 mg/ml;对酵母菌的 MBC 值最高,为 21.875 mg/ml;大肠杆菌和沙门氏菌的 MBC 值分别为 10.938 和 11.719 mg/ml。

表 3 南五味子中醇相和水相液对供试菌的 MIC 和 MBC

菌种		金黄色葡萄	枯草芽孢	大肠杆菌	乙型副伤寒沙	酵母菌
		球菌//mg/ml	杆菌//mg/ml	mg/ml	门氏菌//mg/ml	mg/ml
水溶相抑菌液	MIC	3.125	6.250	9.375	10.156	18.750
	MBC	3.906	7.031	10.938	11.719	21.875
醇溶相抑菌液	MIC	1.562	3.125	7.031	7.031	15.625
	MBC	2.344	4.688	7.813	8.594	18.750

3 结论

试验结果表明,南五味子中醇相和水相物质均对供试细菌具有广谱抑菌效果,且醇相的抑菌性强于水相的抑菌性,这是因为醇相和水相中溶解的抑菌成分和含量不同造成的。醇相中溶解了更多的木脂素类物质,水相中溶解的木脂素少于醇溶相;而多糖类物质更多的溶于水相中,溶于醇相中的比较少;三萜类物质大部分溶于醇相中;木脂素和三萜类物质是南五味子中抑菌物质中最主要的有效成分,所以会出现醇相的抑菌性强于水相的抑菌性。醇相和水相抑菌液对酵母菌的抑制效果不明显。

南五味子的醇相和水相物质若经进一步纯化分离,其 MIC 和 MBC 值将会明显降低,进一步增强其抑菌活性。南五味子作为药食两用的药材,在食品防腐等领域具有潜在的应用前景。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005 年版一部(中药)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:169.

[2] 邓白罗,谢碧霞,刘晖,等. 南五味子的地理分布与园林应用[J]. 中南

林业科技大学学报,2009,29(5):184-186.

[3] 向智男,宁正祥. 植物性天然防腐剂及其在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂,2004(4):79-82.

[4] LI R T,SUN H D. Studies on the chemical constituents and bioactivities of five *Schisandra* medicinal species and *Elsholtzia bodinieri*[J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences,2008,25(4):569-575.

[5] PU J X,YANG L M,XIAO W L,et al. Compounds from *Kadsura heteroclita* and related anti-HIV activity[J]. Phytochemistry,2008,69(5):1266-1272.

[6] 王锦文,边才苗. 五味子提取物的抑菌和杀菌活性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(16):6799-6800.

[7] MULYANINGSIH SRI,YOUNS MAHMOUD,EL-READI MAHMOUD Z, et al. Biological activity of the essential oil of *Kadsura longipedunculata* (Schisandraceae) and its major components[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology,2010,62(8):1037-1044.

[8] 刘志春,王小丽,林鹏,等. 五味子等 29 种中草药的体外抑菌实验[J]. 赣南医学院学报,2004,24(5):509-512.

[9] 周德庆,胡宝龙. 微生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2006:3.

[10] 马永全,于新,黄雪莲,等. 南药五味子提取物的抗菌及抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业,2010,36(6):45-48.

[11] 董周永. 石榴果皮提取物抑菌活性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.

(上接第 1921 页)

而达到提高产量、增加经济效益的目的。由于花蕾的最适去除量较大,可以机械方式大规模去除。这种方式适用于以根系作为药用器官的植物大量种植生产的情况,且实用性强,操作方便。

试验中单位面积的根系产量是基于盆栽试验数据换算而来,应该与大田种植时的实际产量有一定出入。但从植物营养物质在营养器官和生殖器官分配间的负耦联原理和试验的结果来看,去除紫菀花蕾具有增加单株根系生物量和单

位面积产量的效应。

参考文献

[1] 雷抒情,王海洋,潘声旺,等. 刈割后两种不同体型植物的补偿式样对比研究[J]. 植物生态学报,2005,29(5):740-746.

[2] 侯海燕,陈立,董俊兴. 紫菀化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国药杂志,2006,41(3):161.

[3] 盛承发. 植棉理论的一个新发展[J]. 山西农业科学,1990(4):5-6.

[4] 李彦连,张爱民. 植物营养生长与生殖生长辩证关系解析[J]. 中国园艺文摘,2012(2):36-37.

[5] 杨铁钢,谈春松,郭红霞. 棉花营养生长和生殖生长关系研究[J]. 中国棉花,2003,30(7):13-16.