

博落回不同部位提取物对大肠菌群的抑菌作用研究

汪学军^{1,2*}, 闵长莉^{1,2}, 韩彭垒^{1,2}¹皖西学院生物与制药工程学院; ²皖西学院大别山植物内生菌资源研究中心, 六安 237012

摘要:研究了博落回提取物对大肠菌群的抑制作用。本实验以大肠杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌为指示菌, 采用牛津杯法筛选对三种指示菌有最佳抑制作用的博落回组织粗提物; 对抑菌效果好的粗提物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 采用滤纸片法筛选出抑菌活性最高的萃取物, 并测定其最小抑制浓度和最小杀菌浓度。实验结果表明博落回不同部位粗提物有抑制指示菌的活性, 其中以博落回根部提取物的抑菌活性最佳; 根部萃取物抑菌实验结果表明正丁醇萃取物对三种指示菌均有较好的抑制效果, 抑菌圈直径均在 12 mm 以上, 远高于粗提物, 对大肠杆菌, 其最小抑制浓度和最小杀菌浓度分别为 400、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对产气肠杆菌与阴沟肠杆菌, 其最小抑制浓度均为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最小杀菌浓度均为 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。博落回根部提取物对上述三种指示菌均有抑制作用, 尤其以正丁醇萃取物的抑菌效果最佳。

关键词:博落回; 抑菌作用; 大肠菌群

中图分类号: Q949.95; R284.2; TS201.3 文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.014

Antibacterial Effect of the Extracts from Different Parts of *Macleaya cordata* Against Coliforms

WANG Xue-jun^{1,2*}, MIN Chang-li^{1,2}, HAN Peng-lei^{1,2}¹ College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University;² Research Center for Endophytic Fungi Resources of Dabie Mountain, West Anhui University, Lu'an 237012, China

Abstract: In this study, the antibacterial effects of plume poppy (*Macleaya cordata*) extracts against *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* were screened by Cylinder-plate method. Subsequently, crude extracts with good antibacterial effect was sequentially extracted with petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol. The filter paper method was employed to study the antimicrobial activities of these fractions against the tested microorganisms. Moreover, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were also studied. The results showed that crude extracts from different parts of *M. cordata* had antibacterial effect on the tested bacteria, among of which, the extracts of *M. cordata* roots displayed remarkable inhibition effect. In addition, the n-butanol fractions of *M. cordata* roots exhibited high antimicrobial activities, the inhibition zones were all over 12 mm, which were even better than their crude extracts. The MIC and MBC of *E. coli* were 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively; while the MIC (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and MBC values (700 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were the same for *E. aerogenes* and *E. cloacae*. The extracts of *M. cordata* roots had antibacterial effects, and the effects of n-butanol fraction were the best.

Key words: *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.; bacteriostatic effect; coliforms

随着食品工业的快速发展, 越来越多的人对食品安全的要求亦越来越高, 寻找高效、绿色、安全的新型天然防腐剂已经成为食品工业的热点, 其中从植物中提取活性物质被认为是能有效解决上述问题的一条重要途径^[1,2]。大量的文献报道表明, 许

多中草药的直接提取物能够抑制食品腐败菌和致病菌的生长, 是理想的天然抑菌防腐材料, 故这些中草药的防腐作用已日益引起人们的研究兴趣, 从而成为植物源天然食品防腐剂的宝贵资源, 具有无限的开发前景^[3-6]。

博落回 [*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.] 系罂粟科多年生高大草本植物, 又名号筒杆、喇叭筒、落回等, 在我国分布广泛。博落回中含有多种异喹啉生物碱活性成分, 如血根碱 (sanguinarine)、白屈菜

收稿日期: 2015-08-31 接受日期: 2015-10-21

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目 (KJ2015A172); 国家自然科学基金 (31100019)

* 通讯作者 Tel: 86-564-3305073; E-mail: xjwang0917@163.com

红碱(chelerythrine)等^[7,8]。研究表明,博落回具有抗菌、抗肿瘤、杀虫、改善肝功能等作用^[9,10]。目前,博落回提取物的抑菌活性已经有相关报道^[11,12],但是有关博落回提取物对大肠菌群抑菌活性的研究还很少见。为了进一步开发博落回的利用潜力,本文以野生博落回不同部位提取物为研究对象,以大肠杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌为指示菌,根据抑菌圈的有无来筛选其有抑菌活性的部位,并测定了其最小抑制浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC),为更加全面研究博落回的抑菌活性提供实验数据,以期为其能运用于食品产业奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料样品

博落回成熟植株于2014年11月采自安徽省六安市毛坦厂镇燕山村公路旁,经皖西学院植物学教授闵运江所鉴定。

1.1.2 指示菌株

大肠菌群中的大肠杆菌(*Escherichia coli*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)均为本实验室保藏菌种。

1.1.3 培养基

LB肉汤培养基、牛肉膏蛋白胨琼脂培养基^[13]。

1.1.4 主要仪器设备

DXF-20C型摇摆式粉碎机(广州大祥电子机械设备有限公司);电子天平(Precisa公司);CHK2-FGS型显微镜(奥林巴斯光学株式会社);PYX-150H-A型恒温恒湿培养箱(广东韶关科立实验仪器有限公司);RV10D旋转蒸发器(IKA仪器设备有限公司);HX-1050型恒温循环器(北京博医康实验仪器有限公司);GL-21M高速冷冻离心机(湖南省凯南凯达科学仪器有限公司);SHB-III S循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);LS-100LD立式蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备有限公司);SW-CJ-1CU双人单面净化工作台(苏州净化有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 博落回不同部位提取物的制备

采集的博落回植株经手工分拣,进行根、茎、叶的归类,且根部在水中漂洗去除泥土和污物;分别在日光和秋风共同作用下自然干燥。经过粉碎过筛后不同部位各称取100 g,分别加入90%乙醇1 L浸渍3 d后进行真空低温离心处理(8000 rpm),收集上

清液,沉淀物再次加入乙醇进行同样方法进行处理,共浸渍3次,合并离心上清液。60℃的旋转蒸发器减压去除提取物中的乙醇和部分水,最后加入纯净水分别定容至100 mL。

1.2.2 指示菌株的活化和菌悬液的制备

取实验室低温保藏的*E. coli*、*E. aerogenes*、*E. cloacae*菌株接种至牛肉膏蛋白胨斜面中于37℃培养过夜,观察各菌株的生长情况并制片镜检有无杂菌污染。活化后的指示菌株接种到LB肉汤培养基中于摇床上37℃恒温震荡培养16 h,得到原菌液。指示菌的原菌液经平板计数法以无菌的生理盐水将其稀释为 10^8 CFU/mL的菌悬液备用。

1.2.3 博落回不同部位粗提物的抑菌活性测定

采用牛津杯法对博落回粗提物进行活性测定。分别取*E. coli*、*E. aerogenes*、*E. cloacae*菌悬液1 mL加入到200 mL融化冷却至45℃左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基中迅速混匀后制备成混菌平板;向其中放置无菌的牛津杯,并向牛津杯的腔中滴加粗提物200 μL,37℃正置培养24 h,观察不同部位粗提物抑菌效果。

1.2.4 博落回粗提物的萃取

根据1.2.3的实验结果,取抑菌效果好的粗提物100 mL置于分液漏斗中,分别以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等体积的萃取3次,分别合并不同的有机相,有机相经减压浓缩至膏状。取部分样品以甲醇溶解制备成100 mg/mL备用。

1.2.5 博落回萃取物的抑菌活性测定

根据1.2.4的实验结果对粗提物抑菌效果好的萃取物采用滤纸片法对提取物进行活性测定。分别向直径为6 mm的Whatman 2017-006抗生素检测试纸滴加样品20 μL,其中,另向滤纸片中加入20 μL甲醇以做空白对照。加样后的滤纸片置于超净台的紫外下进行照射2 h,除去滤纸上的微生物同时挥发去除滤纸上残留的溶剂。把加样后各滤纸片分别放置在含有*E. coli*、*E. aerogenes*、*E. cloacae*的牛肉膏蛋白胨平板上,37℃培养24 h,观察抑菌效果。

1.2.6 最小抑制浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的测定

将1.2.4制备得到的膏状物添加至45℃左右的牛肉膏蛋白胨培养基中摇匀后倒平板,使其浓度分别为200、300、400、500、600、700 μg/mL,并在凝固的平板上涂布有各指示菌悬液后倒置培养24 h。设置对照组,每个处理作三个重复。在没有指示菌

生长平板中所含样品的浓度为其 MIC,将无菌生长的培养皿继续培养 3 d 后观察,以无菌生长的培养皿的所含样品的浓度为其 MBC^[14,15]。

2 结果与分析

2.1 博落回不同部位粗提物的抑菌活性

制备得到的博落回不同部位粗提物对三种指示菌具有不同程度的抑制作用,其中博落回根部提取

物抑菌效果相对较好,其中根部提取物对 *E. coli*、*E. aerogenes*、*E. cloacae* 抑菌圈直径分别为 12.52、12.91 mm 和 10.26 mm,而茎部和叶部的提取物对三种指示菌中一种或两种具有抑制能力,并且其效果比根部的效果差,见表 1。这说明药用植物博落回不同的组织部位含有抑菌效果的活性成分具有差异性。

表 1 博落回不同部位提取物对大肠菌群抑菌活性 (mm)

Table 1 Antibacterial effect of the extracts from different parts of *M. cordata* against coliforms (mm)

指示菌 Indicator bacteria	博落回不同部位提取物 The extracts from different parts of <i>M. cordata</i>		
	根部 Roots	茎部 Stems	叶部 Leaves
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	12.52 ± 0.23	-	11.58 ± 0.31
产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	12.91 ± 0.36	9.60 ± 0.53	8.25 ± 0.74
阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	10.26 ± 0.55	-	-

2.2 博落回根部提取物萃取后的抑菌活性

选取对三种指示菌实验效果最好的根部提取物,分别经石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取后,分别浓缩后制备成 100 mg/mL 的浓缩物,采用滤纸片法对提取物进行活性测定。恒温培养后的实验结果显示,博落回根部粗提物的石油醚萃取相没有检测出抑菌活性,乙酸乙酯的萃取相具有一定的抑菌效果,而正丁醇萃取相对 *E. coli*、*E. aerogenes* 和 *E. cloacae* 抑菌圈的直径分别为 24.33、15.18 mm 和 12.97

mm,在这三者之间抑菌效果最为明显,见表 2。这说明活性物质在正丁醇中的溶解度较好,极性较大,虽然乙酸乙酯也能够进行萃取,但效果较差。同时,在实验过程中设置的滴加 20 μL 甲醇滤纸片的空白对照无抑菌现象,说明抑菌的活性物质来源于提取物。虽然萃取后添加样品的量仅为粗提物的 1/10,而抑菌圈的直径远高于粗提物,这说明正丁醇对活性物质起到了一定的纯化和浓缩效果。

表 2 博落回根部提取物萃取后对大肠菌群抑菌活性 (mm)

Table 2 Antibacterial effects of different fractions of *M. cordata* roots extract against coliforms (mm)

指示菌 Indicator bacteria	博落回根部提取物的萃取物 Fractions of <i>M. cordata</i> roots extract		
	石油醚 Petroleum ether	乙酸乙酯 Ethyl acetate	正丁醇 n-Butanol
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-	8.96 ± 0.44	24.33 ± 0.43
产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	-	7.11 ± 0.24	15.18 ± 0.52
阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	-	6.88 ± 0.26	12.97 ± 0.48

2.3 博落回根部正丁醇萃取物的 MIC 和 MBC

把博落回根部提取物经正丁醇萃取后的浓缩物制备成不同浓度的含菌悬液混菌平板,经培养后的最小抑菌浓度结果见表 3。博落回根部提取物对不同的指示菌的 MIC 有所差异:其根部提取物对 *E. coli* 的最小抑菌浓度在 400 μg/mL,而对 *E. aerogenes* 和 *E. cloacae* 的最小抑菌浓度均为 500 μg/

mL。无指示菌生长平板继续置于培养箱进行进一步培养 3 d,在含样品的浓度为 600 μg/mL 时,大肠杆菌仍然没有细菌生长的现象,而产气肠杆菌和阴沟肠杆菌无菌生长的样品所需浓度为 700 μg/mL。MIC 和 MBC 实验结果进一步说明了博落回根部提取物对三种指示菌的抑菌效果的有效性,同时,不同指示菌对提取物的敏感性不同,因此,最小抑菌浓度

不同,这与 2.2 的实验所得到的抑菌圈大小不同相吻合。

表 3 博落回根部粗提物的萃取物的最小抑菌浓度
Table 3 MIC of n-butanol fraction of *M. cordata* root extract

指示菌 Indicator bacteria	博落回根部正丁醇萃取物 n-Butanol fraction of <i>M. cordata</i> root extract						
	200 μg/mL	300 μg/mL	400 μg/mL	500 μg/mL	600 μg/mL	700 μg/mL	CK
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	+++	+	-	-	-	-	+++
产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	+++	++	+	-	-	-	+++
阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	+++	+++	+	-	-	-	+++

注: - 为无菌生长, + 为少量细菌生长, +++ 为细菌大量生长, CK 为不加药液的空白对照。

Note: - indicated no bacteria grew; + indicated a few bacteria grew; +++ indicated a lot bacteria grew; CK was blank control.

3 讨论

随着生活水平的提高,人们日益青睐于天然、健康的食品,故开发绿色、安全且成本低廉的天然防腐剂已成为食品工业领域研究的热点之一。从中草药博落回中提取得到的天然物质,具有较高的抑菌活性,并且这种药用植物在全国普遍存在,这正好符合了食品业的发展趋势。本文选择博落回为研究对象,其不同部位粗提物的抑菌实验结果表明其含有抑菌效果的活性成分具有差异性,其中茎部提取物仅对产气肠杆菌有一定的抑制作用;叶部提取物则对大肠杆菌与产气肠杆菌有不同程度的抑制作用;而根部提取物抑菌范围最广,对三种指示菌均有抑菌作用,效果最好。这初步说明与博落回茎和博落回叶相比,活性更强的博落回根更适合作为新型天然防腐剂开发的资源。

进一步选取对三种指示菌实验效果最好的根部提取物,其萃取后的抑菌活性结果表明,不同极性提取物对三种指示菌的抑菌效果也存在差异性:石油醚萃取相的抑菌效果最差,没有抑菌活性;乙酸乙酯萃取相的抑菌效果较差,具有一定的抑菌效果;而正丁醇萃取相的抑菌效果最好,且抑菌圈的直径远高于粗提物。这说明了根部提取物的抑菌物质主要存在于其高极性部位。

同时,博落回根部正丁醇萃取物的最小抑制浓度实验和最小杀菌浓度实验表明,其对三种指示菌的最小抑制浓度和最小杀菌浓度亦有所差异:对大肠杆菌,其最小抑制浓度为 400 μg/mL,最小杀菌浓度为 600 μg/mL;而对产气肠杆菌和阴沟肠杆菌,其最小抑制浓度均为 500 μg/mL,最小杀菌浓度均为 700 μg/mL。由上述研究结果可知,博落回根作为植物源天然防腐剂,效果较明显。

总之,本研究结果表明博落回提取物具有良好的抑菌活性,其中,正丁醇萃取物抑菌活性最高。但仍不清楚其抑菌物质成分,有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Wang XM(王小敏), Zhang M(张民), Yang YK(杨钰昆). Antimicrobial activities and component analysis of solvent extracts from aged garlic extract. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2015, 31: 65-70.
- 2 Zeng R(曾荣), Zhang AS(张阿珊), Chen JY(陈金印). Research advances on application of natural plant antimicrobials to fresh-keeping of fruits and vegetables. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报), 2011, 11: 161-165.
- 3 Zhang CX(张驰翔), Wang Z(王周), Zhu QQ(朱奇奇), et al. Inhibitory effects and mechanism of *Coptis chinensis* extract against plant pathogenic fungi. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 1232-1236.
- 4 Fankam AG, Kuate JR, Kuete V. Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *Allanblackia gabonensis*, *Combretum molle* and *Gladiolus quartianianus* against gram-negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes. *BMC Complement Alternat Med*, 2015, 15: 206-217.
- 5 Feng S, Zeng WC, Luo F, et al. Antibacterial activity of organic acids in aqueous extracts from *Pine Needles* (*Pinus massoniana* Lamb.). *Food Sci Biotechnol*, 2010, 19: 35-41.
- 6 Song L(宋雷), Zhan CR(绽春蕊), Yang SY(杨世英), et al. Anti-bacterial activity of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 455-458.
- 7 Wu ML(武美兰), Zhang DZ(张德志), Xu QJ(徐庆军), et al. Advance in studies on *Macleaya cordata*. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2009, 5: 144-145.