

柿叶和桔皮提取物的体外协同抑菌效果研究

李丹花*, 咎立峰, 岳丹, 王磊, 陈建中

邯郸学院生命科学与工程学院, 邯郸 056005

摘要:用柿叶和桔皮乙醇提取物进行复配实验,采用滤纸片法测定复配液对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果。采用二倍稀释法测定复配液对三种供试菌株的最小抑菌浓度,并测定温度、pH和紫外线照射对复配液稳定性的影响。结果表明,柿叶和桔皮醇提取物对三种供试菌株均具有良好的抑制作用,两种醇提取物的不同质量比例复配液的体外抑菌效果表现为协同,复配液的最佳质量配比为2:3。复配液(2:3)对三种供试菌株最低抑制浓度分别为6.25、6.25和12.50 mg/mL,在20~80℃,pH为5~9时具有很好的稳定性,对紫外线照射比较敏感。

关键词:柿叶;桔皮;复合物;协同;稳定

中图分类号:S665

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.4.016

In vitro Synergistic Antibacterial Effect of *Diospyros kaki* Leaf and *Citrus reticulata* Peel Extracts

LI Dan-hua*, ZAN Li-feng, YUE Dan, WANG Lei, CHEN Jian-zhong

College of Biology science and project, Handan College, Handan 056005, China

Abstract: Filter paper method and double broth dilution method were used to test optimal proportion and minimum inhibitory concentration (MIC) of mixture of *Diospyros kaki* leaf and *Citrus reticulata* peel extracts against three bacteria namely *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Meanwhile, the effect of temperature, pH and UV irradiation on stability of extract mixture was also evaluated. The results showed that *D. kaki* leaf and *C. reticulata* peel extracts revealed good inhibitory effect against the three tested strains and the extract mixture showed the *in vitro* synergistic effect. The optimal combination ratio of extracts was 2:3 (g/g), which exhibited a MIC of 6.25 mg/mL against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* and a MIC of 12.50 mg/mL against *Staphylococcus aureus*. In addition, this extract mixture (2:3) was stable between 20-80℃ and pH 5-9, but was sensitive to UV irradiation.

Key words: *Diospyros kaki* leaf; *Citrus reticulata* peel; mixture; synergy; stability

食品微生物污染所造成的经济损失及对人类健康的威胁是巨大的。为了防止食品的变质、腐败,延长食品的储存期,一般会在食品中添加防腐剂。目前市场上常用的防腐剂多为苯甲酸钠、山梨酸钾、亚硝酸盐等化学防腐剂。但是,近期研究发现大多数化学防腐剂有诱癌或致癌的风险,并易引起食物中毒。为此人们开始关注寻求新的、无毒副作用的天然生物源防腐剂^[1]。

研究表明,柿叶具有较高的营养和药用价值,柿叶中含有黄酮、胡萝卜素、胆碱、多糖及有机酸等多种物质,其提取物具有良好的抗氧化、抗菌、抗肿瘤的作用^[2-4]。桔皮是我国大量加工和消费柑桔的副

产物,有研究表明,桔皮中富含醇溶性色素、橙皮甙和桔皮素等多种生物活性成分,具有显著的抑菌效果^[5,6]。综上所述,柿叶和桔皮提取物都具备一定的抑菌作用效果,但对两者复配后抑菌效果的研究较少。实际利用率也较低。

本文选用柿子叶和桔皮为原料,提取抑菌活性成分,通过对两种提取物进行复配研究,并对其协同效应进行最低抑菌浓度和稳定性检测,以期制备一种健康、无毒副作用、广谱型天然植物防腐剂^[7-10],为食品工业中防腐抑菌的研究提供一定的参考,也为柿树和桔皮资源的综合利用提供良好途径。

1 材料与仪器

1.1 实验原料

柿叶:采摘于校园柿树(*Diospyros kaki*),清洗烘

干备用。桔皮:购置新鲜柑桔(*Citrus reticulata*),剥皮烘干备用。

1.2 供试菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由邯郸学院微生物实验室提供。

1.3 实验仪器

分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;N-1100 旋转蒸发器:上海爱朗仪器有限公司。FA2204B 电子天平:上海精科;BSC-250 恒温恒湿培养箱:上海博迅。

2 实验方法

2.1 原料处理及提取液制备

将新鲜柿子叶和桔皮分别置于电热鼓风干燥箱中,恒温 60 °C 干燥至恒重,粉碎机粉碎后置于阴暗干燥的地方贮存,待用。取干柿子叶粉末和桔皮粉末各 100 g,分别按照 1:10 的比例加入 70% 的乙醇溶液,混合均匀后 50 °C 水浴保温 2 h,而后超声波辅助提取 30 min,共重复 3 次。将所有滤液过滤除渣后于 50 °C 真空减压蒸发浓缩回收,用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液将回收得到的膏状物分别配成 500 mg/mL 母液备用,即得柿叶提取液和桔皮提取液。

2.2 抑菌圈直径的测定

采用滤纸片法测定抑菌圈直径^[11,12]。将生长至对数期的菌液用无菌生理盐水清洗三次后,制成浓度为 $10^6 \sim 10^8$ 的菌悬液备用。取 0.1 mL 菌悬液均匀涂布于制备好的固体培养基平板上,制成含菌平板。用镊子将已灭菌的圆滤纸片(6 mm)均匀放入含菌平板,并依次滴加复配液(表 1)、氨苄青霉素钠溶液(20 mg/mL)和空白溶液(DMSO),静置 30 min 后将培养皿放入培养箱 37 °C 培养 24 h 后观察,用游标卡尺测量抑菌圈直径。以上实验均进行三次平行实验,结果取其平均值。

2.3 最低抑菌浓度(MIC)的测定

最低抑菌浓度的测定采用连续稀释法进行测定^[13,14]。将配置好的 500 mg/mL 复配液(2:3)稀释为 100 mg/mL,然后通过二倍稀释法依次将 100 mg/mL 复配液稀释为 50、25、12.5、6.25、3.13 mg/mL 5 个浓度梯度的溶液备用。取 1 mL 菌悬液加入到 1~5 管中,再分别取 5 个稀释梯度的溶液 1 mL 加入

到 1~5 的管中,第 6 个管中加入 2 mL 培养基作为阴性对照,所有试管均放入 37 °C 培养 24 h 后观察,无菌生长的最低浓度即为最低抑菌浓度(MIC)。

2.4 温度对复配液稳定性的影响

采用复配液(2:3)进行实验。把复配液分别在 20、40、60、80 和 100 °C 下处理 20 min,以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌作为指示菌,三次平行实验,测定抑菌圈的直径(mm)。考察不同温度对复配液稳定性的影响^[15,16]。

2.5 酸碱度对复配液稳定性的影响

采用复配液(2:3)进行实验。用 0.1 mol/L HCl 或 NaOH 将复配液的 pH 值分别调成 3、5、6、7、8、9、10,然后在 4 °C 放置 24 h 再调 pH 至 7,以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌作为指示菌,三次平行实验,测定抑菌圈的直径(mm)。考察不同酸碱度对复配液稳定性的影响^[15,16]。

2.6 紫外线照射对复配液稳定性的影响

采用复配液(2:3)进行实验。把复配液放置于无菌的培养皿中,在 15 W 的紫外灯下分别照射 5、10、15、20、25、30 min,以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌作为指示菌,三次平行实验,测定抑菌圈的直径(mm)。考察不同紫外线照射时间对复配液稳定性的影响^[15,16]。

2.7 数据分析

所有实验数据用 Microsoft Excel 2010 分析抑菌效果,用 SPSS 20.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性检验。

3 结果与分析

3.1 柿子叶、桔皮提取物体外联合抑菌配方的确定

依据表 1 的柿叶和桔皮提取物的不同质量复配比例进行抑菌圈直径测定,结果见表 2。结果可知,柿叶乙醇提取物和桔皮乙醇提取物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌都显示出良好的抑菌活性。其中,柿叶和桔皮提取物都对大肠杆菌表现出最强的抑菌活性。

柿叶和桔皮提取物的不同质量复配溶液的抑菌结果显示,两种提取物的体外联合使用均在一定程度上提高了抑菌活性,所以两种提取物联合使用对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌三种供试菌种的抑菌效果表现为协同。

表1 柿叶、桔皮乙醇提取物的不同质量复配比例

Table 1 Different ratio of *D. kaki* leaf and *C. reticulata* peel extracts

复配物比例 Compound proportion (mg/mL)	5:0	4:1	3:2	1:1	2:3	1:4	0:5
柿叶醇提取物 <i>D. kaki</i> leaf extract	500	400	300	250	200	100	0
桔皮醇提取物 <i>C. reticulata</i> peel extract	0	100	200	250	300	400	500

当复配液的质量配比为2:3时,复配液对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌表现出了显著的抑菌活性($P < 0.05$),抑菌圈直径分别为16.3 mm和15.8 mm。当复配液的质量配比为1:1时,复配液对金黄色葡萄球菌表现出最高的抑菌活性,抑菌圈直径为15.2 mm,但与质量配比为2:3时的抑菌圈直径相比,差

异不显著。根据以上结果分析得知,当复配液的质量配比为2:3时,对三种供试菌种的综合抑菌效果最强,因此将复配物比例2:3定为最佳复配液配方。取2 mL柿叶提取物(500 mg/mL)和3 mL桔皮提取物(500 mg/mL)制成5 mL最佳复配液(2:3)。

表2 柿叶和桔皮乙醇提取物的不同质量比例复配液抑菌效果

Table 2 Antibacterial effect of different ratios of *D. kaki* leaf and *C. reticulata* peel extracts

样品 Sample	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm) \pm SE		
	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>
1:0	12.3 \pm 0.5 ^e	11.6 \pm 0.8 ^e	11.2 \pm 0.4 ^f
4:1	13.0 \pm 0.9 ^e	12.9 \pm 0.6 ^{de}	12.7 \pm 1.0 ^{de}
3:2	14.6 \pm 0.2 ^{cd}	12.4 \pm 0.3 ^{de}	13.6 \pm 0.9 ^{cd}
1:1	15.1 \pm 0.5 ^e	13.1 \pm 0.7 ^{cd}	15.2 \pm 0.3 ^b
2:3	16.3 \pm 0.6 ^b	15.8 \pm 0.4 ^b	14.2 \pm 0.8 ^b
1:4	14.0 \pm 0.7 ^d	14.4 \pm 0.7 ^d	12.9 \pm 0.4 ^{de}
0:1	13.7 \pm 0.5 ^{de}	12.8 \pm 1.4 ^{de}	12.1 \pm 0.8 ^{ef}
氨苄青霉素钠 Ampicillin sodium	25.4 \pm 1.7 ^a	36.5 \pm 1.2 ^a	39.6 \pm 1.0 ^a
二甲基亚砷 DMSO	6.5 \pm 0.4 ^f	6.8 \pm 0.4 ^f	6.7 \pm 0.4 ^g

注:同一列中的不同字母表示该列中的数值间具有显著差异($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level.

3.2 复配液(2:3)的最小抑菌浓度确定

复配液(2:3)对供试菌种的最小抑菌浓度见表3。由表3可以看出,复配液(2:3)对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的最低抑制浓度均为6.25 mg/mL,对金

黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为12.50 mg/mL。因此,复配液(2:3)对三种供试菌种均有抑制作用,对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌抑制作用较强,对金黄色葡萄球菌的抑制作用稍弱。

表3 复配液(2:3)的最小抑菌浓度确定

Table 3 Determination of MIC of extract mixture (2:3)

供试菌种 Tested strains	复配液(2:3)浓度 Concentration of extract mixture (2:3) (mg/mL)				
	25.00	12.50	6.25	3.13	1.56
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-	-	-	+	+
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	-	-	+	+	+

3.3 复配液(2:3)的稳定性研究

从图1(A)可以看出,复配液(2:3)在20~80℃时,抑菌活性没有显著变化,具有很好的热稳定性。从图1(B)可以看出,复配液(2:3)在pH为5~9时能保持很好的稳定性,其中复配液在pH为7时对大肠杆菌有最高的抑制性,在pH为8时对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌具有最高的抑制性。

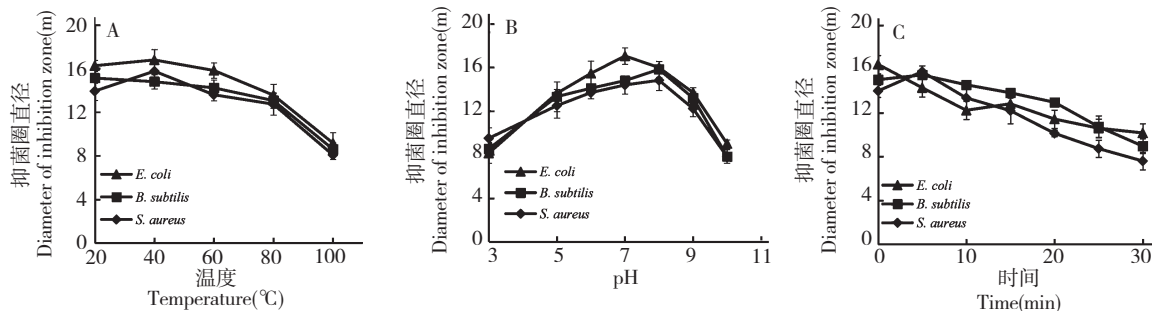


图1 温度(A)、酸碱度(B)和紫外线(C)对复配液(2:3)稳定性的影响

Fig. 1 Effects of temperature (A), pH (B) and UV irradiation (C) on stability of extract mixture (2:3)

3 结论与讨论

柿叶茶是我国很多地区的传统饮品,具有食品开发的良好基础,最近更有研究表明,柿子叶中具有很多抑菌活性物质,主要有黄酮及多酚类化合物(槲皮素、山奈酸及其苷类等)、萜类、鞣质等^[4,17],这些物质均可溶于醇中。本实验采用70%乙醇在超声波辅助下对柿子叶震荡提取的工艺。结果显示,柿叶乙醇提取物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均具有良好的抑菌活性。桔皮是我国消费和加工柑桔的副产物,研究发现,桔皮富含橙皮甙、桔皮素、色素、果胶、黄酮类和纤维素等多种生物活性成分,其中醇溶性的色素和黄酮类具有很好的抑菌活性^[5,6]。本研究采用70%乙醇在超声波辅助下对桔皮震荡提取的工艺,结果显示,桔皮乙醇提取物对三种供试菌种亦表现出良好抑菌活性。在此基础上,进而对柿叶醇提取物和桔皮醇提取物进行体外协同抑菌效应研究。

研究表明,柿叶和桔皮提取物复配后表现出了良好的体外协同抑菌效果。当复配液的质量配比为2:3时,对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌三种供试菌种的综合抑菌效果最强,因此将复配物比例2:3定为最佳复配液配方。利用最小抑菌浓度测定法测定出最佳复配液(2:3)对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的最低抑制浓度均为6.25 mg/mL,对金

黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为12.50 mg/mL。从图1(C)可以看出,复配液在紫外线照射30 min内,随着照射时间延长,抑菌活性整体呈下降趋势,但在照射30 min时,复配液对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为10.2 mm、9.0 mm和7.6 mm,仍具有一定的抑菌活性,所以复配液对紫外线比较敏感,在紫外线照射的30 min内具有相对稳定性。

黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为12.50 mg/mL。

复配液的稳定性研究结果表明,复配液在20~80℃,pH为5~9时抑菌活性没有显著变化,具有很好的稳定性。复配液对紫外线照射比较敏感,在紫外线照射30 min内,随着照射时间延长,抑菌活性整体呈下降趋势,但在照射30 min时,仍具有一定的抑菌活性,所以具有相对稳定性。

柿叶和桔皮提取物复配后对食品污染中的常见菌表现出了良好的体外协同抑制效果,为柿叶和桔皮的综合利用开发奠定基础。柿叶乙醇提取物的抑菌活性,与柿叶中的黄酮及多酚类化合物、萜类化合物等多种成分相关,桔皮乙醇提取物的抑菌活性,与桔皮中的醇溶性的色素和黄酮类化合物等多种成分相关,这些化合物需要进行进一步的成分分离、鉴定及含量测定,其抑菌机理也需要进一步研究;而柿叶醇提取物和桔皮醇提取物在体外的协同作用机理也需要进一步的分析研究。

参考文献

- Jia SR (贾士儒). Biopreservatives (生物防腐剂). Beijing: China Light Industry Press, 2009.
- Ling M (凌敏), Han XX (韩晓晓), Ao CW (敖常伟). Free radical scavenging and antibacterial activities of persimmon leaf extraction. *Food Sci Technol* (食品科技), 2011, 36:182-195.
- Niu FL (牛凤兰), Dong Q (董卿), Song LJ (宋丽君).

- Primary study on anti-tumor effects of extract of leaves of persimmon *in vitro*. *Food Sci* (食品科学), 2007, 28: 475-478.
- 4 Hong SA, Tae IJ, Joo YL, *et al.* Antioxidant activity of persimmon and grape seed extract; *in vitro* and *in vivo*. *Nutr Res*, 2002, 22: 1265-1273.
 - 5 Zhao XM (赵雪梅), Zhu DY (朱大元), Ye XQ (叶兴乾), *et al.* The study progress of the citrus flavonoids. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2001, 14: 89-92.
 - 6 Ma QY (马庆一), Chen CT (陈春涛), Jing XY (荆晓艳), *et al.* Studies on extraction of hesperidin and other active components from citrus peels and their antimicrobial effects. *Food Sci* (食品科学), 2004, 12: 112-114.
 - 7 Wang TT (王婷婷), Li DP (李大鹏), Xu XY (徐晓燕), *et al.* The *in vitro* synergy of *Coptis chinensis* and *Forsythia suspensa* against several common microorganisms causing food contamination. *Food Ferm Ind* (食品与发酵工业), 2011, 37(5): 70-72.
 - 8 Man DH (满德慧), Deng SG (邓尚贵), Tang Y (唐艳), *et al.* Study on antimicrobial action and formulation research of the extraction mixture from *Dictyophora indusiata* and other three substances. *J Zhejiang Ocean Univ, Nat Sci* (浙江海洋学院学报, 自科版), 2011, 30: 137-141.
 - 9 Sun T (孙涛), Liu HW (刘华巍), Chen QM (陈麒名), *et al.* Preservation of *Penaeus vannamei* using mixture of bamboo vinegar and tea polyphenols. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1828-1832.
 - 10 Lan WQ (蓝蔚青), Xie J (谢晶), Hou WF (侯伟峰), *et al.* Antimicrobial activity and mechanism of complex biological fresh-keeping agents against *Staphylococcus sciuri*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 741-746.
 - 11 Matasyoh JC, Maiyo ZC, Ngure RM, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chem*, 2009, 113: 526-529.
 - 12 Khizar A, Uzma N, Talib H, *et al.* Antimicrobial activity of fruits of *Solanum nigrum* and *Solanum xanthocarpum*. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71: 415-421.
 - 13 Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48: 5-16.
 - 14 Jiang WJ (姜文洁), Sun XH (孙晓红), Zhu Y (朱颖), *et al.* Antibacterial effects of Chinese wild blueberry extracts on four pathogenic bacteria. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1884-1888.
 - 15 Dang Z (党珍), Zhou T (周涛). Antifungal activity of several plant extracts and combinatorial formula. *Food Sci* (食品科学), 2009, 30(23): 88-91.
 - 16 Shi L (石琳), Yao YF (姚勇芳). Synergistically antibacterial effect of abstracted substance of wormwood and citrus peel. *Food Sci Technol* (食品科技), 2013, 38: 239-242.
 - 17 Zhou XT (周鑫堂), Wang LL (王丽莉), Han L (韩璐). Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Diospyros kaki* leaves. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 28: 3195-3203.

(上接第 626 页)

- 28 Inada A, *et al.* Pregnanes and triterpenoid hydroperoxides from the leaves of *Aglaia grandis*. *Phytochemistry*, 1997, 45: 1225-1228.
- 29 Yang SM, *et al.* Two new pregnanes from *Aglaia perviridis* Hiern. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10: 459-462.
- 30 Wang BG, *et al.* Aglacins A-D, first representatives of a new class of aryltetralin cyclic ether lignans from *Aglaia cordata*. *J Nat Prod*, 2001, 64: 1521-1526.
- 31 Wang BG, *et al.* New methoxylated aryltetrahydronaphthalene lignans and a norlignan from *Aglaia cordata*. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43: 5783-5787.
- 32 Wang BG, *et al.* Aglacins I-K, three highly methoxylated lignans from *Aglaia cordata*. *J Nat Prod*, 2004, 67: 82-84.
- 33 Fuzzati N, *et al.* Triterpenoids, lignans and a benzofuran derivative from the bark of *Aglaia elaeagnoidea*. *Phytochemistry*, 1996, 42: 1395-1398.
- 34 Salim AA, *et al.* Carcache-Blanco, E. J., Ponapensin, a cyclopenta[bc]benzopyran with potent NF-kappaB inhibitory activity from *Aglaia ponapensis*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 109-112.
- 35 An FL, *et al.* Cytotoxic flavonol-diamide 3 + 2 adducts from the leaves of *Aglaia odorata*. *Tetrahedron*, 2015, 71: 2450-2457.
- 36 Greger H, *et al.* Amide-esters from *Aglaia tenuicaulis*--first representatives of a class of compounds structurally related to bisamides and flavaglines. *Phytochemistry*, 2008, 69: 928-938.
- 37 Sianturi J, *et al.* New bisamide compounds from the bark of *Aglaia eximia* (Meliaceae). *Phytochemistry Lett*, 2015, 13: 297-301.