

加拿大一枝黄花花序中黄酮类化合物的 抑菌及保鲜作用研究

钱 慧¹, 李 飞¹, 任 勇^{2,3}, 吴国荣^{1,2}

(1. 南京师范大学泰州学院生化学院, 江苏 泰州 225300)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

(3. 南京师范大学江苏省医药超分子材料及应用重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 提取加拿大一枝黄花(*Solidago canadensis* L.)花序中的黄酮类物质,并研究其抑菌及保鲜作用.利用有机溶剂乙醇提取加拿大一枝黄花花序中的黄酮类物质;采用抑菌圈法进行抑菌性研究;采用测定好果率的方法研究其保鲜作用.当提取的加拿大一枝黄花花序中的黄酮类化合物的浓度为0.056 mg/mL时,即显示对杆菌的抑制作用,其对真菌的抑制作用较弱,对各菌种的抑制效果为:大肠杆菌(*Escherichia coli*)>枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)>酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),对黑曲霉(*Aspergillus niger*)没有抑制作用.喷洒浓度为0.028 mg/mL的黄酮提取液的樱桃番茄实验组较对照组能有效降低霉变率,保鲜作用显著提高.加拿大一枝黄花花序中的黄酮类化合物具有一定的抑菌及保鲜作用.该研究为加拿大一枝黄花的综合利用提供参考.

[关键词] 加拿大一枝黄花,提取,黄酮,抑菌作用,保鲜作用

[中图分类号]Q946 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1001-4616(2015)03-0080-04

Antimicrobial Activity and Preservation Function of the Flavonoids Extracted from Inflorescence of *Solidago canadensis* L.

Qian Hui¹, Li Fei¹, Ren Yong^{2,3}, Wu Guorong^{1,2}

(1. College of Biochemical Engineering, Taizhou College, Nanjing Normal University, Taizhou 225300, China)

(2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(3. Jiangsu Key Laboratory for Supramolecular Medicinal Materials and Applications, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: The aim was to extract the flavonoids from inflorescence of *Solidago canadensis* L. and study their antimicrobial activity and preservation function. The flavonoids were optimally extracted from inflorescence of *Solidago canadensis* L. with ethanol. The antimicrobial activity of the flavonoids was tested by the experiments of anti-bacterium-circles. The good fruit rate in cherry tomatoes was tested to study the preservation function of the flavonoids. When the concentration of concentrated flavonoids extracted from inflorescence of *Solidago canadensis* L. reached 0.056 mg/mL, it could be judged that inflorescence extracts inhibition activity were: *Escherichia coli*>*Bacillus subtilis*>*Saccharomyces cerevisiae*. Besides, the total flavonoids presented no inhibition to *Aspergillus niger*. When sprayed with 0.028 mg/mL flavonoids solution, the cherry tomato of experimental group could effectively reduce the rates of its mildewing with another group sprayed with distilled water as a control. The total flavonoids in inflorescence of *Solidago canadensis* L. exhibited some antimicrobial activity and preservation function on cherry tomato, which would provide valuable information for the development of *Solidago canadensis* L.

Key words: *Solidago canadensis* L., extracted, flavonoids, antimicrobial activity, preservation function

加拿大一枝黄花(*Solidago canadensis* L.)原产北美,隶属菊科一枝黄花属^[1].我国于1935年引入作为花卉植物,20世纪80年代已扩散蔓延为一种外来引进后逃逸造成危害的新入侵杂草^[2].黄酮类化合物是

收稿日期:2013-11-20.

基金项目:江苏省大学生实践创新训练计划(1612201116)、泰州市社会发展项目(TS019).

通讯联系人:李飞,硕士,讲师,研究方向:天然产物的开发、酶工程、基因工程. E-mail: kasber-lee@163.com

植物产生的一类次生代谢产物,现代研究表明,黄酮类化合物具有明显的抗氧化、抗炎、抑菌、抗癌及降血脂等生物活性,已广泛应用于食品和医药行业^[3]。目前,国内外关于加拿大一枝黄花黄酮类成分及抗氧化与自由基消除活性的研究较多,而对其黄酮的抑菌活性则研究得较少^[4,5]。李军红等在加拿大一枝黄花的叶提取物中,竺传松等在加拿大一枝黄花种子和干根分别提取出黄酮进行了抑菌作用实验^[6-8]。本实验选用加拿大一枝黄花花序部位作为研究对象提取黄酮类化合物并探究其抑菌作用以及对樱桃番茄的保鲜作用,以期外来入侵植物能否变害为用,作为抗菌性药物或饲料、食品添加剂的药用资源及食品保鲜方面提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料和菌种

革兰氏阴性菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*),革兰氏阳性菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),真菌:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*),均由南京师范大学生命科学学院陆玲教授提供。

一枝黄花成熟花序来自校园内生株,清理后备用;选择品种一致、果形整齐、大小均匀、带叶子、无病虫害和机械损伤、色泽及成熟度一致的樱桃番茄果实进行试验,分为等量的实验组和对照组。

1.1.2 培养基

LB培养基、牛肉膏蛋白胨培养基用于培养细菌,YPD培养基用于培养酿酒酵母,查氏培养基用于培养黑曲霉。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮提取物的制备

选一枝黄花花序部分干燥后进行粉碎,过20目筛,按照一枝黄花花序:乙醇=1:10的固液比,于60℃回流提取2次,每次1h,合并2次滤液,用等体积石油醚萃取2次除去叶绿素后进行旋转蒸发回收乙醇,浓缩至生药与浓缩液体积比约为1:1,得一枝黄花花序总黄酮提取液,备用。

1.2.2 供试菌株的活化与培养^[9]

将大肠杆菌和枯草芽孢杆菌分别接种于LB固体培养基平板和牛肉膏蛋白胨培养基,置于37℃恒温培养箱培养24h;将酿酒酵母和黑曲霉分别接种于YPD培养基和查氏培养基,置于30℃恒温培养箱培养48h。取活化后的菌株,制成菌悬液,使得细菌菌悬液浓度为 $(1\sim1.8)\times10^8$ 个/mL,酿酒酵母悬液浓度为 $(1\sim2.8)\times10^6$ 个/mL,黑曲霉孢子菌悬液浓度为 $(1\sim10)\times10^6$ 个/mL。

1.2.3 总黄酮含量的测定

1.2.3.1 标准溶液的配制

准确称取芦丁标准品15mg放入25mL容量瓶中,加入甲醇溶解后定容至刻度,摇匀,得芦丁标准液,浓度为0.6mg/mL。

1.2.3.2 标准曲线的绘制

精密量取芦丁对照液0mL、0.4mL、0.8mL、1.2mL、1.6mL、2.0mL置于刻度试管中,各管加30%的乙醇至体积为10mL,加入5%NaNO₂3mL,摇匀。放置6min后加入10%Al(NO₃)₃0.3mL,摇匀。6min后再加入4.0mL1mol/LNaOH溶液,混匀。用30%乙醇稀释至20mL,15min后于波长510nm处进行比色。以吸光度为纵坐标,芦丁浓度为横坐标,得到标准曲线的回归方程为: $Y=3.6536X+0.0096$, $R^2=0.991$,在0.024mg/mL~0.12mg/mL范围内呈良好的线性关系。

1.2.3.3 总黄酮的含量测定及提取率计算

取经适当稀释后的总黄酮提取物1mL显色后测定吸光度值。根据标准曲线回归方程,得到提取液浓度,按下式计算总黄酮提取率。总黄酮提取率(%)=(稀释后提取液浓度×体积×稀释倍数)/原料质量×100%。

1.2.4 抑菌活性测定^[10-13]

将直径为6mm的滤纸圆片分别在已制备的浓度为0.028mg/mL~0.056mg/mL黄酮类物质提取液中浸

泡12 h,制成抑菌片备用.晾干后将抑菌片分别置于涂有不同菌悬液的固体培养基表面,以浸泡蒸馏水的滤纸圆片为阴性对照,以浸泡黄酮标准品的滤纸片为阳性对照.每个培养皿置3个抑菌片,每个处理重复3次.以上各处理细菌置于37℃培养24 h,酿酒酵母、霉菌置于30℃培养48 h.观察并记录供试菌的生长情况,测定抑菌圈的直径,以对照菌落长满培养皿为止.3次重复试验均有抑菌作用者,判为合格;阴性对照组应无抑菌圈产生.

1.2.5 保鲜试验^[14]

实验组贮藏用0.028 mg/mL的黄酮类化合物溶液浸泡5 min,自然晾干,对照组用无菌蒸馏水处理,每组重复3次,装入玻璃皿,用保鲜膜密封,两组都置于25℃的保温箱中,每隔24 h取出观察.

2 结果与分析

2.1 总黄酮提取物含量

由回归方程求出样品提取溶液中总黄酮含量为28.34 mg/mL.加拿大一枝黄花花序中总黄酮提取率达到5.234%.

2.2 黄酮提取物抑菌效果

当制备的黄酮类化合物浓度为0.028 mg/mL时,并未对4种微生物表现出抑制作用,随着浓度的增加,当黄酮类化合物浓度达到0.056 mg/mL时,由表1可以看出,加拿大一枝黄花花序中黄酮类提取物出现一定的抑菌作用,但对不同菌种的抑制强度有所不同.其中对大肠杆菌抑制作用较强,对枯草芽孢杆菌、酿酒酵母具有一定的抑菌作用,而对黑曲霉没有抑制作用.

表1 加拿大一枝黄花花序中黄酮类提取物对供试菌的抑菌效果
Table 1 The bacteriostasis of extracted flavonoids from inflorescence of *Solidago canadensis* L.

供试菌	抑菌效果			对照
	0.028 mg/mL	0.042 mg/mL	0.056 mg/mL	
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	--	++	-	
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	-	-	+	-
酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	-	-	+	-
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	-	-	-	-

注:一般认为抑菌圈<1.3 cm为低度抑菌,抑菌圈1.3 cm~1.9 cm为中度抑菌,抑菌圈>1.9 cm为高度抑菌^[14].表中“-”表示无抑菌圈,“+”表示抑菌圈直径在6 mm~12 mm,“++”表示抑菌圈直径在13 mm~19 mm.

由图1可知,比较抑菌圈直径,加拿大一枝黄花花序中黄酮类化合物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母有较明显的抑制作用,大小依次为:大肠杆菌>枯草芽孢杆菌>酿酒酵母.

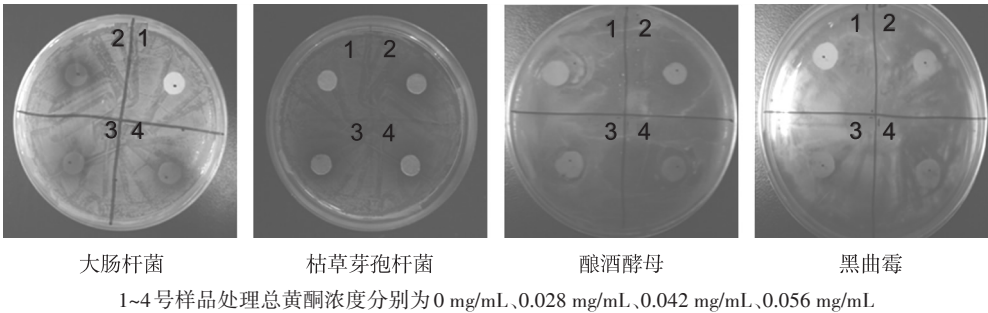


图1 加拿大一枝黄花花序中黄酮类提取物对供试菌的抑菌活性

Fig.1 The antimicrobial activity of extracted flavonoids from inflorescence of *Solidago canadensis* L.

2.3 黄酮类提取物的保鲜作用

随着贮藏时间的延长,贮藏表面出现霉斑和坏死斑.好果率的测定参照陆胜民等的称量法和记果数方法^[14].实验第三天,实验组没有长霉,好果率为100%,对照组好果率为80%.第四天,实验组好果率为90%,对照组好果率为0%.可见加拿大一枝黄花花序中的黄酮类化合物对于樱桃番茄具有较明显的保鲜效果.

3 讨论

黄酮类化合物是一类重要的天然化合物,因其独特的化学结构而具有许多重要的生理、生化作用,因此,植物中总黄酮的提取及性能研究一直是天然产物研究领域的热点^[15].周小琦^[16]等对玫瑰花干花蕾中的总黄酮提取工艺和抗氧化性能与抑菌作用进行研究,玫瑰花总黄酮提取量为4.538 g/100 g.当玫瑰花总黄酮提取液浓度为1.82 mg/mL时,对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌具有很好的抑菌效果.常丽新^[11]等采用微波法从丁香叶中提取黄酮得率为3.77%,当黄酮提取液浓度为0.942 mg/mL时,对大肠杆菌的抑制效果最好,其次是白葡萄球菌,而对金黄色葡萄球菌的抑制效果略差.虽然对一枝黄花黄酮的提取及抗氧化及自由基消除活性有一些报道^[4-8],但对于其抑菌和保鲜作用报道较少.本实验选用加拿大一枝黄花花序部位作为研究对象提取黄酮类化合物并探究其抑菌作用和对樱桃番茄的保鲜作用.

实验结果表明,加拿大一枝黄花花序中提取的黄酮类化合物对杆菌具有一定的抑菌作用,对真菌抑制作用较弱,以抑菌圈大小为据,抑制效果为:大肠杆菌>枯草芽孢杆菌>酿酒酵母,且最低抑菌浓度明显低于目前所报道的从其他来源提取的黄酮类化合物浓度.对黑曲霉未见抑菌圈,可能是未达到最低抑菌浓度,当试验物浓度大于0.056 mg/mL时是否对黑曲霉出现抑制效应有待进一步实验.加拿大一枝黄花花序中提取的黄酮类化合物对樱桃番茄果实有较显著的保鲜效果,其浓度为0.028 mg/mL时即能有效降低贮果的霉变率,其在鲜果表面的抑菌效应明显大于在培养基上的表现(黄酮类化合物浓度在0.028 mg/mL时未见明显的抑菌圈),出现差异的原因将另行探讨,但这种现象提示在实际应用中可根据具体的情况可能使用相应的浓度.就其实验本身看将其涂抹在樱桃番茄表面,能有效地降低微生物的侵染、保持果实良好的外观,延长储存时间.为从植物等天然材料中提取的效应物质在食品、药品等多个领域中的应用展现出更加深远的前景.

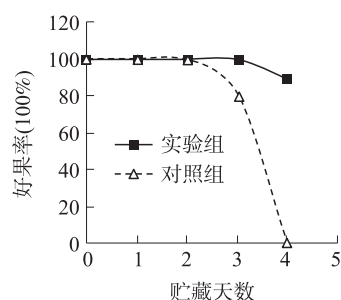


图2 黄酮类化合物对樱桃番茄好果率的影响

Fig.2 Effects of Flavonoids on the good fruit rate in cherry tomatoes

[参考文献]

- [1] 上海科学院. 上海植物志(上卷)[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1993:606.
- [2] 印丽萍,谭永彬,沈国辉,等. 加拿大一枝黄花(*Solidago canadensis* L.)的研究进展[J]. 杂草科学,2004(4):8-11.
- [3] 李安林,熊双丽. 夏枯草总黄酮的提取与抑菌活性研究[J]. 食品研究与开发,2011,32(5):27-30.
- [4] 王开金,陈列忠,李宁,等. 加拿大一枝黄花黄酮类成分及抗氧化与自由基消除活性的研究[J]. 中国药理学杂志,2006,41(7):493-496.
- [5] 鲁晓翔. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J]. 食品研究与开发,2012(3):220-224.
- [6] 竺传松,竺锡武,陈海敏,等. 加拿大一枝黄花提取物抑菌作用初步研究[J]. 湖南农业科学,2006(4):76-78.
- [7] 周玮婧,佘国涵,孙智达,等. 荔枝皮黄酮抑菌性能及其作用机理研究[J]. 天然产物研究与开发,2011,23:332-336.
- [8] 韦英亮,刘志平,马建强,等. 茉莉花渣黄酮抑菌活性研究[J]. 化工技术与开发,2010,39(4):8-9.
- [9] 韦方立,梁云贞,黄秋婵. 山黄皮果实中黄酮类物质的抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(26):15 932-15 933.
- [10] 刘松艳,张沐新,吴月红,等. 藜中黄酮类化学成分及抑菌效果的研究[J]. 东北师大学报:自然科学版,2011,43(1):93-96.
- [11] 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.
- [12] 郭娇娇,宫智勇. 西芹中总黄酮的提取工艺及抑菌作用研究[J]. 武汉工业学院学报,2011,30(3):1-5.
- [13] 沈奇,金春雁,缪月秋,等. 丹皮酚磺酸钠对樱桃番茄的保鲜作用的研究[J]. 食品科学,2005,26(4):256-259.
- [14] 陆胜民,席均芳,金勇丰,等. 采后处理对青梅果实的生理和品质的影响[J]. 园艺学报,2000,27(5):326-330.
- [15] 许伟,郭海滨,绍荣,等. 芦苇叶总黄酮抑菌及抗氧化性能研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(29):16 158-16 161.
- [16] 周小琦,方敏,宫智勇. 玫瑰花中总黄酮提取工艺及其抗氧化与抑菌作用的研究[J]. 食品科学,2010,31(20):102-105.

[责任编辑:黄 敏]