

佛手的抗菌抗氧化研究^{*}

付 丽, 卢文青, 周晓敏, 李泽谦, 谢志成 (广东省广州市荔湾区疾病预防控制中心检验科 510176)

【摘要】 目的 了解佛手对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌等 8 种常见致病菌的抗菌作用及其抗氧化性能。**方法** 分别用 80% 的甲醇水提取新鲜成熟的佛手及其烘干制品的酚类物质。采用微量稀释法, 测定其提取液对金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、铜绿假单胞菌、蜡样芽孢杆菌、表皮葡萄球菌及白色念珠菌 8 种常见致病菌的最小抑菌浓度及最小杀菌浓度, 并对其抗菌活性进行评价; 采用紫外可见分光光度计测定其氧化还原能力及清除自由基能力, 对其抗氧化活性进行评价。**结果** 佛手提取液对革兰阳性菌的抗菌作用强于革兰阴性菌。烘干后的佛手提取液的抗氧化作用强于新鲜佛手。**结论** 佛手对常见的致病菌有较强的抗菌作用, 可以开发其成为新型天然抑菌剂。

【关键词】 佛手; 抗菌活性; 抗氧化活性; 最小杀菌浓度
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.13.008 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)13-1837-03

Study on antibacterial and antioxidant activities of extraction from C. m. var. sarcodactylis^{*} FU Li, LU Wen-qing, ZHOU Xiao-min, LI Ze-qian, XIE zhi-cheng (Liwan District Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510176, China)

【Abstract】 Objective To understand the antibacterial activity of extract of C. m. var. sarcodactylis, against 8 kinds of common pathogenic bacteria and its antioxidant activity. **Methods** The phenolic substances from fresh and dried C. m. var. sarcodactylis, were extracted by 80% methanol. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracting solution against 8 kinds of target pathogens involving Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis and Monilia albican were determined and its antibacterial activities were evaluated by using microdilution broth method; FRAP and TEAC were also determined and its antioxidant activities was evaluated by using ultraviolet and visible spectrophotometer. **Results** The antibacterial effect of the extracting solution from C. m. var. sarcodactylis, against Gram-positive bacteria was stronger than that against Gram-negative bacteria. The antioxidant effect of the extracting solution from dried C. m. var. sarcodactylis, was stronger than that of the fresh. **Conclusion** C. m. var. sarcodactylis has strong antibacterial effect on common pathogenic bacteria and can be developed to become a new type of natural bacteriostatic agent.

【Key words】 C. m. var. sarcodactylis; antibacterial activity; antioxidant activity; minimum bactericidal concentration

佛手为热带、亚热带植物, 是芸香科常绿小乔木或灌木。又名九爪木、五指橘、佛手柑, 在我国主要产于闽粤、川、江浙等地区^[1-2]。佛手可以入药, 制作凉茶饮料, 有理气化痰、止呕消胀、舒肝健脾、缓解哮喘等多种作用。但对其机理的研究目前尚缺乏。本研究选取广州市市场上销售的佛手, 研究其酚类提取液对常见 8 种致病菌的抗菌作用, 并研究新鲜和烘干制品佛手的抗氧化作用。

1 材料与方法

1.1 样品前处理、实验菌种与试剂

1.1.1 样品前处理 抗菌研究的前处理: 将新鲜成熟的佛手用自来水反复冲洗干净后用去离子水洗净, 切片置 60℃ 烘箱 48 h, 烘干样品并粉碎。称取 50.0 g 烘干粉碎的佛手, 加入 250 mL 去离子水, 超声萃取 60 min。滤去残渣, 将剩余液体加热浓缩 20 mL (制成浓度为 2.5 g/mL 的原液), 置 4℃ 冰箱保存备用, 待测抗菌指标。抗氧化研究的前处理: 取适量新鲜成熟的佛手匀浆, 分别称取佛手的匀浆液和烘干物 1.0 g 左右,

加入 9.00 mL 80% 的甲醇水, 充分振摇, 微波超声萃取 30 min, 3 500 r/min 下离心 30 min, 取上清液待测抗氧化指标。

1.1.2 实验菌种 实验选取了金黄色葡萄球菌 CMCC(B) 26003、大肠埃希菌 ATCC25922、鼠伤寒沙门氏菌 CMCC(B) 50115、福氏志贺氏菌 CMCC(B) 51572、铜绿假单胞菌 ATCC27853、蜡样芽孢杆菌 CMCC(B) 63301、表皮葡萄球菌 CMCC(B) 26069 及白色念珠菌 CMCC(F) 98001 共 8 种常见的致病菌。所有的标准菌株全部购于广东环凯生物科技有限公司。将菌株从长期贮存的 CRYOBANK 菌种保存管中取出, 接营养肉汤复活, 并分别培养做各项生化实验进行验证。

1.1.3 试剂 三吡啶三吡嗪 TPTZ (2, 4, 6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine/triprydyltriazine)、VitE 衍生物 Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)、ABTS (2, 2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-sulphonic acid)) 等化学试剂购于美国 Sigma-aldrich 公司。无水醋酸钠、三氯化铁、硫酸亚铁、过硫酸钾、碳酸钠等化学试剂均为分析纯, 由天津市大茂化

^{*} 基金项目: 广东省广州市荔湾区科技计划项目 (20141215057)。
作者简介: 付丽, 女, 硕士, 主管技师, 研究方向为微生物检验。

学试剂厂生产。甲醇、盐酸、无水醋酸等均为分析纯,由成都市科龙化工试剂厂生产。

1.1.4 仪器 分析天平、超声清洗器、培养箱、酶标仪、紫外可见分光光度计等。

1.2 测定原理与方法

1.2.1 抗菌研究

1.2.1.1 实验菌种配制 用麦氏比浊仪将实验所用菌液配制为 0.5 麦氏浓度(约为 1.5×10^8 /mL)的菌液并用生理盐水按 1:10 的比例稀释 2 次,菌液最终浓度约为 1.5×10^6 /mL。

1.2.1.2 最小抑菌浓度(MIC)检测 用去离子水将实验样品依次等倍稀释。分别取 70 μ L 不同浓度的样品加入装有营养肉汤(70 μ L)和菌液(70 μ L)的无菌 96 孔板中,每个浓度样品重复 3 个平行样。于微量振荡器振荡混匀后放入酶标仪(630 nm)读取培养前吸光度。再置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24 h 再次测定其吸光度。用肉眼从最小浓度开始观察,第 1 个出现未浑浊的孔所对应的样品浓度即为样品的 MIC^[3-4]。

1.2.1.3 最小杀菌浓度(MBC)检测 从所有未出现浑浊的微孔中,取出 200 μ L 液体接种到营养琼脂培养基中。置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24 h 后观察菌落生长状况。24 h 培养后没有出现细菌生长的培养皿所对应的样品最小浓度即为样品的 MBC^[3-4]。

1.2.2 抗氧化研究

1.2.2.1 氧化还原能力——FRAP 法^[5-7] FRAP 法是由 Benzie 和 Strain 建立的,其原理为 Fe^{3+} -TPTZ 可被样品中还原物质还原为二价铁形式,呈现出蓝色,并于 593 nm 处具有最大光吸收,根据吸光度大小计算样品抗氧化活性的强弱。实验步骤如下:以 FeSO_4 溶液作为参考标准,建立标准曲线。取 100 μ L 样本稀释液加入到 3.00 mL FRAP 反应液中(由 300 mmol/L 的醋酸钠、10 mmol/L 的 TPTZ、20 mmol/L 的三氯化铁按照 10:1:1 的体积比组成),混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 4 min,用紫外分光光度计在 593 nm 下测定混合物的吸光度,根据吸光度在标准曲线上求得相应 FeSO_4 的浓度。每份样品重复测定 3 次。

1.2.2.2 清除自由基能力——TEAC 法^[8] TEAC 法的原理是 ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的 ABTS^+ ,在抗氧化物存在时 ABTS^+ 的产生会被抑制,在 734 nm 或 405 nm 下测定 ABTS^+ 的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。Trolox 是一种 VitE 的类似物,具有和 VitE 相近的抗氧化能力,用作其他抗氧化物总抗氧化能力的参考。实验步骤如下:以 Trolox 溶液作为参考标准,建立标准曲线。取 100 μ L 被稀释了的样品与 3.80 mL 被稀释了的 ABTS 自由基溶液(7 mmol/L ABTS 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾等量混合避光放置 16 h 后将 ABTS 稀释到在 734 nm 处的吸光度为 0.7 ± 0.05)充分混合,并在室温下反应 6 min,用紫外分光光度计在 734 nm 下测定混合物的吸光度,根据吸光度在标准曲线上求得相应 Trolox 的浓度。每份样品重复测定 3 次。

1.3 统计学处理 所有数据用 EXCEL 录入,使用 SPSS13.0 进行统计分析。

2 结 果

2.1 抗菌研究结果 佛手提取液对实验所选的 8 种常见致病菌都有一定的抗菌作用,尤其对金黄色葡萄球菌抑菌作用明显强于其他菌种,其 MIC 可达到 312.5 mg/mL。实验发现,佛手提取液对所选革兰阳性菌的 MIC 在 312.5~625 mg/mL,对革兰阴性菌的 MIC 在 625~1 250 mg/mL;佛手提取液对革兰阳

性菌的 MBC 在 312.5~1 250 mg/mL;对革兰阴性菌的 MBC 均为 1 250 mg/mL。综合 MIC、MBC 研究结果,当 $\text{MBC}/\text{MIC} \leq 4$ 时,表明研究样品对该菌种有杀菌作用;当 $\text{MBC}/\text{MIC} > 4$,表明研究样品对该菌种有抑菌作用。本实验结果显示,佛手对实验的 8 种常见致病菌均有杀菌作用。见表 1。

表 1 佛手抗菌检测 MIC、MBC 结果(mg/mL)

细菌		佛手		
		MIC	MBC	MBC/ MIC
革兰阳性菌	金黄色葡萄球菌	312.5	312.5	1
	蜡样芽孢杆菌	625	625	1
	表皮葡萄球菌	625	1 250	2
革兰阴性菌	白色念珠菌	625	1 250	2
	大肠埃希氏菌	1 250	1 250	1
	鼠伤寒沙门氏菌	625	1 250	2
	福氏志贺氏菌	1 250	1 250	1
	铜绿假单胞菌	625	1 250	2

2.2 抗氧化研究结果 FRAP 检测中 FeSO_4 标准曲线的绘制的回归方程: $Y=0.000\ 72X+0.051\ 70$, $R^2=0.999\ 99$,TEAC 检测中 ABTS 标准曲线的绘制的回归方程: $Y=0.000\ 93X-0.003\ 67$, $R^2=0.999\ 93$ 。本研究发现,烘干佛手的抗氧化作用[FRAP:(15.60 ± 0.54) $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g, TEAC:(0.83 ± 0.39)mol Trolox /g]明显强于新鲜佛手[FRAP:(4.82 ± 0.11) $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g, TEAC:(3.11 ± 0.31) $\mu\text{mol Trolox}$ /g]。烘干样品的抗氧化研究结果大约为新鲜样品结果的 3 倍左右。另外,本实验以维生素 C 作参照[FRAP:(12.66 ± 0.13)mmol Fe^{2+} /g, TEAC:(5.42 ± 0.05)mmol Trolox/g],发现烘干的佛手(1 g/10 mL)的抗氧化活性高于 100 μg /mL 的 VC 的抗氧化活性,而新鲜的佛手(1 g/10 mL)的抗氧化活性明显低于 100 μg /mL 的 VC 的抗氧化活性。

3 讨 论

总体来说,从实验结果可以发现,佛手对革兰阳性菌的抗菌作用要强于革兰阴性菌。此研究结果与其他抗菌研究结果一致^[9-12]。其原因可能是因为革兰阴性菌与革兰阳性菌拥有不同的细胞壁结构,此外革兰阴性菌还具有独特的壁膜间隙^[13],这些不同使得革兰阴性菌在抵挡细菌入侵方面更胜一筹。抗氧化方面,作者曾检测过广州市市场上销售的 62 种水果的抗氧化活性及其总酚含量^[11]。与之相比,新鲜佛手抗氧化的结果低于作者先前研究的平均结果,其 FRAP 明显低于金丝小枣、红石榴、番石榴、番荔枝、大红柿,但高于山竹、蜜梨、黄瓢西瓜、火龙果等,基本与哈密瓜、水仙芒、国产青提 FRAP 水平相当。其 TEAC 明显低于青橄榄、红石榴、番荔枝、番石榴、大红柿,但高于蜜梨、黄瓢西瓜、牛油果、红提、有机蓝莓和国产青提,基本与西柚、柚子、木瓜 TEAC 水平相当。

近年来,由于食品添加剂致病和致癌风险的逐渐增大,人工合成抑菌剂及防腐剂越来越受到普通老百姓的质疑。从自然界的植物中寻求天然产物来替代人工合成物质成为现代工业研究的一个新领域。对传统植物应用现代科学方法进行研究,揭示其传统保健作用的科学基础,是目前这一领域研究的热点,也是未来研究的重要方向。国内的植物抗菌抗氧化研究主要是针对大量中草药、香料抗菌抗氧化能力的筛选上,而国外的植物抗菌抗氧化研究则主要是针对单个植物品种抗菌抗

氧化能力的检测和活性成分化学结构的研究。除了中草药和香料,许多水果蔬菜也被研究发现具有较强的抗菌、抗氧化、抗癌的成分。金丝小枣、石榴、番石榴、番荔枝、柿子等水果被研究发现具有较强的抗氧化作用^[11]。而牛油果、葡萄籽、石榴皮也被发现具有抗菌的作用^[14-16]。

中医认为佛手具有理气化痰、止呕消胀、舒肝健脾、和胃等多种药用功能,对气管炎、哮喘病有明显的缓解作用,同时对一般的消化不良、胸腹胀闷也有明显疗效。这些作用和本研究中发现的佛手较强的抗菌作用关系有待进一步明确。目前对佛手的其他微生物和理化研究比较少。郭卫东等^[1]研究发现佛手挥发油对酵母菌、大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌均有明显的抑制作用,并且对枯草杆菌的抑菌效果最强。水果蔬菜中含有大量的酚类和黄酮类物质,作者先前的实验已经证实水果中的酚类物质具有抗氧化活性,许多研究也发现酚类物质具有抗菌抗氧化的作用^[14-20]。通过对佛手提取物的研究,发现虽然佛手的抗氧化能力一般,但其抗菌活性较强。有研究发现佛手含有柚苷、橙皮素、异槲皮苷、香叶木素、柚皮芸香甙等酚类及黄酮类物质。佛手的抗菌活性同时可能与其含有的酚类物质、黄酮类物质等可能密切相关。由于抗菌药物的滥用,多药耐药菌的出现越来越引起医疗界的关注。其中金黄色葡萄球菌就是全球公认的一种多药耐药菌,而在本实验中发现佛手对金黄色葡萄球菌具有非常明显的抑制作用,或许佛手中的某些生物成分可以用来制成未来临床应用的药物。虽然许多对水果蔬菜的研究已证明其含有的许多天然成分可以促进人类健康、降低常见疾病的风险,但是公众似乎并没有意识到这些天然成分可以被加以利用,无论是药品制造业,还是食品加工工业,植物提取抗菌抗氧化成分完全可以替代现在常用的人工化学制品。

本研究发现,佛手对常见的致病菌有较强的抗菌作用,其酚类具有一定的抗氧化作用。这可能构成佛手常见的药理和食疗作用机理。据此可以考虑开发佛手成为新型天然抑菌剂。

参考文献

[1] 郭卫东,郑建树,邓刚,等.佛手挥发油抑菌活性的研究[J].中国粮油学报,2009,24(8):103-107.

[2] 崔红花,高幼衡,蔡鸿飞,等.主成分分析对佛手最佳产地的探讨[J].广州中医药大学学报,2009,26(3):281-287.

[3] Shan B,Cai YZ,Brooks JD,et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts[J]. Int J Food Microbiol,2007,117(1):112-119.

[4] Zhao J,Li Y,Liu Q,et al. Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the Roots of Inula hupehensis [J]. Food Chem,2010,120(2):512-516.

[5] Benzie IF,Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”:the FRAP assay[J]. Anal Biochem,1996,239(1):70-76.

[6] Pulido R,Bravo L,Saura-calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay[J]. J Agric Food Chem, 2000,48(8):3396-3402.

[7] Halvorsen BL,Holte K,Myhrstad MC,et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants[J]. J Nutr,2002,132(3):461-471.

[8] Re R,Pellegrini N,Proteggente A,et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radic Biol Med,1999,26(9/10):1231-1237.

[9] O’neill AJ,Chopra I. Preclinical evaluation of novel antibacterial agents by microbiological and molecular techniques[J]. Expert Opin Investig Drugs,2004,13(8):1045-1063.

[10] Seukey JA,Fankam AG,Djeussi DE,et al. Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes[J]. Springer Plus,2013,2(12):363-366.

[11] Fu L,Xu BT,Xu XR,et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits[J]. Food Chem,2011,129(2):345-350.

[12] 付丽,李泽谦,谢志成,等.八种广东传统汤料干花水提取物的抗菌活性研究[J].中国热带医学,2014,14(4):404-406.

[13] Duffy CF,Power RF. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts[J]. Int J Antimicrob Agents,2001,17(6):527-529.

[14] Field D,Quigley K,O’connor PM,et al. Studies with bio-engineered Nisin peptides highlight the broad-spectrum potency of Nisin V[J]. Microb Biotechnol,2010,3(4):473-486.

[15] Navarra M,Ursino MR,Ferlazzo N,et al. Effect of citrus bergamia juice on human neuroblastoma cells in vitro and in metastatic xenograft models[J]. Fitoterapia,2014,95(12):83-92.

[16] Saravanakumar A,Venkateshwaran K, Vanitha J,et al. Evaluation of antibacterial activity, phenol and flavonoid contents of Thespesia populnea flower extracts[J]. Pak J Pharm Sci,2009,22(3):282-286.

[17] Fu L,Xu BT,Xu XR,et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China [J]. Molecules,2010,15(12):8602-8617.

[18] Fu L,Xu BT,Gan R,et al. Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions[J]. Int J Mol Sci,2011,12(4):2112-2124.

[19] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents[J]. Clin Mic Revi,1999,12(4):564.

[20] Cho YS,Schiller NL,Oh KH. Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Curr Microbiol, 2008,57(6):542-546.