

艾蒿多糖抑菌活性及稳定性

孙义玄, 包怡红*

(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 采用水提法提取艾蒿多糖,用滤纸片法测定多糖的抑菌活性及最低抑菌浓度(MIC),同时研究艾蒿多糖抑菌活性的酸碱稳定性、热稳定性、紫外稳定性。结果表明:艾蒿多糖对3种常见细菌均有一定的抑制效果,对革兰氏阳性细菌如金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑制作用较强,对革兰氏阴性菌大肠杆菌的抑制作用较弱;艾蒿多糖对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的最小抑制质量浓度(MIC)分别为0.625、0.625、1.25 mg/mL;多糖的抑菌活性对温度和紫外照射具有较好稳定性,在不同的pH值条件下抑菌活性相对不稳定,酸性处理条件下抑菌活性较强,碱性处理条件下抑菌活性较弱。艾蒿多糖具有良好的抑菌活性,可用于天然食品防腐剂的开发利用。

关键词: 艾蒿;多糖;抑菌活性;稳定性

中图分类号: TS 201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)09-0990-06

Study on Antimicrobial Activities of Polysaccharides from *Artemisia argyi* and Its Stability

SUN Yixuan, BAO Yihong*

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: *Artemisia argyi* polysaccharide extracted by hot water and measurement the antibacterial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) of polysaccharides by using the filter paper method, also studied the pH stability, thermal stability, UV stabilizers stability of *Artemisia* polysaccharide antibacterial activity. The results showed that: *Artemisia argyi* polysaccharides have a certain inhibitory effect on three common bacteria, and have strong effect on gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, but the effect on gram-negative bacteria *E. coli* is weak. The MICs of the polysaccharide against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were 0.625, 0.625, 1.25 mg/mL respectively. The antimicrobial activities of the polysaccharide were stable under the conditions of heat and ultraviolet ray, but were unstable under different pH values, strong in acid and weak in base. *Artemisia argyi* polysaccharide has good antibacterial

收稿日期: 2015-04-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项项目(2572014EA02); 哈尔滨市科技创新人才项目(2015RAXXJ010)。

* 通信作者: 包怡红(1970—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术与功能食品方面的研究。

E-mail: baoyihong@163.com

引用本文: 孙义玄, 包怡红. 艾蒿多糖抑菌活性及稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(09): 990-995.

activity, it can be used for the development and utilization of natural food preservatives.

Keywords: *Artemisia argyi*, polysaccharide, antimicrobial activity, stability

艾蒿(*Artemisia argyi* Levl.et Vant), 俗称艾叶草等, 在亚洲多个国家均有生长, 在我国东北等地区种植十分广泛^[1]。艾蒿本身是一味传统的中草药, 具有止血阵痛、镇咳祛痰、防过敏、抗病毒、维护神经系统等药用功效^[2]。艾蒿作为一种被广泛应用的中药材, 其较强的抑菌活性, 可用于多种水果和食品防腐, 可大大延长食品的储藏期^[3-5]。艾蒿作为一种应用价值极高的药用植物之一, 含有大量挥发油、多糖、黄酮等多种生物活性成分, 不仅可以抗氧化防衰老, 还能抑制多种有害细菌生长繁殖^[6]。

近年来我国对抗菌植物资源种类进行相关调查研究, 这些植物中提取能防治一些常见的细菌病害和真菌病害, 且防治效果好, 对环境无污染。如何从植物体中提取到高效、低毒无残留的新型植物源农药及新型植物源杀菌剂已经成为研究热点^[7-9]。目前研究艾蒿的抑菌主要集中在艾蒿精油方面, 对多糖的研究较少。作者旨在研究艾蒿多糖的抑菌作用及各因素对其稳定性的影响, 为艾蒿植物的开发利用及新型天然无污染的食品防腐剂的研究提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 供试菌种和培养基 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*): 均为东北林业大学微生物实验室培养。

培养基: 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(供试验细菌生长繁殖)

1.1.2 试验仪器 FJ-200 高速万能粉碎机: 天津苔丝特仪器设备有限公司; RE-52E 旋转蒸发仪: 上海荣科设备仪器厂; DK-S12 电热恒温水浴锅: 天津恒天设备有限公司; 721 分光光度计: 上海光谱仪器设备有限公司; JA2003 电子天平: 常熟市天圣仪器有限责任公司; 恒温加热磁力搅拌器: 上海思乐仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 艾蒿粗多糖的制备 取干燥艾蒿叶用粉碎机粉碎后, 过 40 目筛, 取 20 g 干粉放入烧杯中, 料液比 1:90, 置于 70~80 ℃ 恒温水浴锅中搅拌提取 2 h, 重复 3 次, 提取液混合浓缩, 抽滤后旋转蒸发浓缩, 得到艾蒿粗多糖液。

1.2.2 抑菌活性的测定 多糖抑菌活性的测定主要采用滤纸片法, 选取圆形灭菌滤纸片直径为 6 mm, 将其浸泡质量浓度分别为 2.5、5、10 mg/mL 的艾蒿多糖提取液中, 滤纸片浸入多糖溶液中 2 h, 使其浸泡充分后备用。在无菌环境中, 将以灭菌培养基在温度 60 ℃ 左右倒成平板, 待完全冷却后, 向培养基中间加入 0.1 mL 供试菌。用无菌涂布器涂布均匀, 使供试菌被培养基吸收后, 每个平皿贴 3 片滤纸片, 并以无菌水作为空白对照。每一种菌种做 3 个平行样。倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 12 h, 取出观察滤纸片周围抑菌圈大小并测量, 计算 3 个平均值。

1.2.3 最低抑菌浓度(MIC)测定 配置 80 mg/mL 的艾蒿多糖溶液, 用两倍法稀释多糖液质量浓度为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 mg/mL 共 7 个浓度, 取 0.1 mL 的三种菌悬液, 滴加于平板培养基中央并涂布均匀, 尽量使菌悬液被培养基吸收, 在平板上放置浸泡于艾蒿多糖溶液的灭菌滤纸片, 每平板分别放 3 片, 倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 12 h, 观察 3 种菌在不同多糖质量浓度下的抑菌圈大小, 比较抑菌活性, 重复 3 次, 无菌水作为对照。

1.2.4 艾蒿多糖稳定性研究

1) 温度对艾蒿多糖稳定性的影响: 用无菌水将艾蒿多糖溶液稀释成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液, 分别在水浴温度 20、40、60、80、100、121 ℃ 湿热环境下各处理 30 min, 选取常见 3 种细菌金色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌进行比较分析, 处理结束后, 通过测定多糖溶液处理前后抑菌圈大小, 比较 3 种细菌抑菌活性, 重复 3 次试验, 取平均值计算结果。

2) pH 对艾蒿多糖稳定性的影响: 取不同 pH 值

的缓冲液,将艾蒿多糖用其稀释成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,各溶液的 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,并以空白缓冲溶液为对照。选取常见 3 种细菌金色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌进行比较分析,通过测定多糖溶液处理前后抑菌圈大小,比较 3 种细菌抑菌活性,重复 3 次试验,取平均值计算结果。

3)紫外对艾蒿多糖稳定性的影响:取质量浓度为 5 mg/mL 的多糖溶液,在 40 W 紫外灯垂直 30 cm 处下紫外照射 5、10、15、20、25 min,选取常见 3 种细菌金色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌进行比较分析,通过测定多糖溶液处理前后抑菌圈大小,比较 3 种细菌抑菌活性,重复 3 次试验,取平均值。

2 结果与分析

2.1 艾蒿多糖对不同细菌抑菌活性比较分析

采用滤纸片法,试验研究艾蒿多糖对不同细菌的抑菌活性,选取浓度为 2.5、5.0、10 mg/mL 的艾蒿多糖溶液,通过抑菌圈直径大小判定对供试细菌的抑制活性强弱,结果见表 1。

表 1 艾蒿多糖对供试细菌的抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi* on tested microbes

多糖 质量浓度/ (mg/mL)	抑菌圈直径/mm			
	大肠杆菌	金黄色 葡萄球菌	枯草芽 孢杆菌	无菌水
2.5	14.2 ^a	19.2 ^a	20.5 ^a	—
5.0	21.6 ^b	26.4 ^b	28.8 ^b	—
10	24.5 ^c	30.56 ^c	31.36 ^c	—

注:表中小写字母的不同表示差异显著($p < 0.05$)

通过衡量抑菌圈的直径大小,比较 3 种浓度下艾蒿多糖溶液对 3 种细菌抑菌效果。从表 1 可知,艾蒿多糖对 3 种常见细菌的抑菌性均呈阳性。如图 1~3 所示,随多糖质量浓度的升高,3 种细菌抑菌圈有所扩大,抑菌作用较强,特别是对 3 种细菌中的枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果最为显著,表明其对革兰氏阳性菌抑制效果显著,对大肠杆菌的抑制作用相对较弱,表明其对革兰氏阴性菌抑制效果相对较弱。随着多糖质量浓度的升高,分析得到 3 种细菌抑菌效极显著增强($p < 0.01$)。



图 1 不同艾蒿多糖对枯草芽孢杆菌的抑菌图

Fig. 1 Antimicrobial activities of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi* on *Bacillus subtilis*

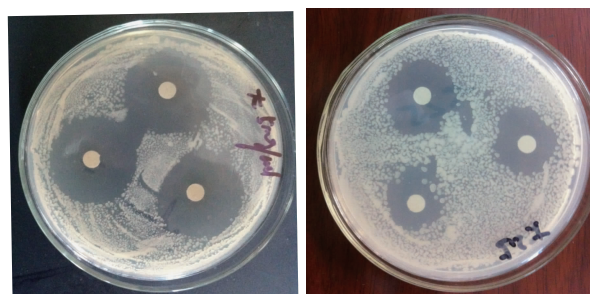


图 2 不同艾蒿多糖对大肠杆菌的抑菌图

Fig. 2 Antimicrobial activities of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi* on *Escherichia coli*



图 3 不同艾蒿多糖对金黄色葡萄球菌的抑菌图

Fig. 3 Antimicrobial activities of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi* on *Staphylococcus aureus*

2.2 艾蒿多糖对不同细菌最低抑菌浓度(MIC)

艾蒿多糖对各供试菌均有一定的抑制作用,因此,采用适当的艾蒿多糖稀释浓度对各受试菌进行稀释敏感实验,结果见表 2。

应用二倍法稀释艾蒿多糖溶液,观察不同质量浓度下多糖对 3 种细菌的抑菌性,以抑菌圈直径大小的变化来衡量不同细菌的最小抑菌浓度。在一定浓度范围内,艾蒿多糖对 3 种细菌的最小抑菌浓度有所不同。对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的最

小抑制质量浓度均为 0.625 mg/mL,而大肠杆菌的最小抑制质量浓度较高,为 1.25 mg/mL,试验结果

显示,艾蒿多糖对 3 种常用细菌均有较为显著的抑菌作用。

表 2 艾蒿多糖的最小抑制质量浓度(MIC)

Table 2 MICs of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi*

菌种	艾蒿多糖质量浓度/(mg/mL)							MIC/(mg/mL)
	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	
大肠杆菌	+	+	+	+	+	-	-	1.25
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+	-	0.625
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+	-	0.625

注:抑菌圈直径 ≤ 6 mm 用“-”表示,抑菌圈直径 >6 mm 用“+”表示,滤纸片直径 6 mm。

2.3 温度对艾蒿多糖抑菌活性的影响

温度是艾蒿多糖抑菌活性的影响因素之一,试验选取 20~121 $^{\circ}\text{C}$ 共 6 个温度,研究不同温度对艾蒿多糖抑菌活性的影响,结果见图 4。

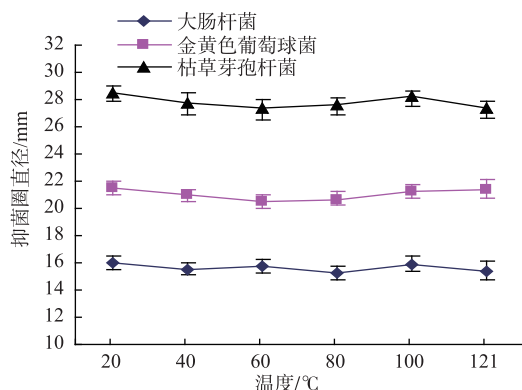


图 4 温度对艾蒿多糖抑菌效果的影响

Fig. 4 Effect of temperatures on antibacterial activities of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi*

由图 4 可知,经过不同温度处理的艾蒿多糖对受试菌的抑菌圈直径没有明显变化,表明艾蒿多糖热处理后其抗菌成分活性并未受到显著影响,说明温度变化的对艾蒿多糖抑菌活性影响不大,具备很好的热稳定性。艾蒿多糖耐热性可应用于食品保鲜储藏,对于高温环境下食品运输过程的防腐保鲜具有重要的应用价值,可大大提高食品的储藏期^[13]。

2.4 pH 值对艾蒿多糖抑菌活性的影响

pH 是影响多糖抑菌活性的重要因素,试验选取 pH 4~10 共 7 个不同酸碱环境,研究不同 pH 条件下对艾蒿多糖抑菌活性的影响,结果见图 5。

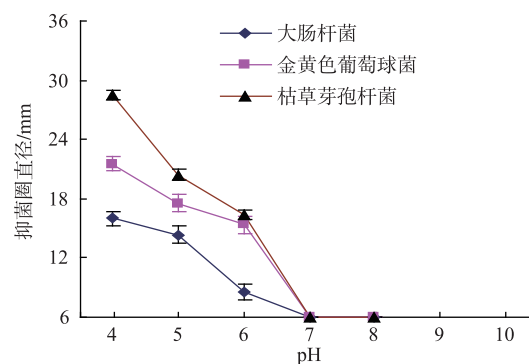


图 5 pH 值对艾蒿多糖抑菌效果的影响

Fig. 5 Effect of pH on antibacterial activities of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi*

不同 pH 对艾蒿多糖抑菌效果影响较大,由图 5 可知,在 pH 4~10 范围内,随 pH 值的不断升高,艾蒿多糖的抑菌能力逐渐减弱。在酸性条件 pH 4~6 之间变化幅度较大,表明酸性条件有利于多糖溶液对供试菌的抑制,但 pH 在 8 之后无抑菌活性,主要由于在碱性条件下,艾蒿多糖中的抑菌物质与溶液中的碱相互作用,导致抑菌性减弱甚至消失,但缓冲液自身对 3 种细菌不具有抑菌活性^[14]。试验结果表明,酸性条件下有助于抑菌作用的增强。

2.5 紫外线照射对艾蒿多糖抑菌活性的影响

紫外线照射是影响艾蒿多糖抑菌活性的主要因素,将艾蒿多糖经紫外光垂直照射一段时间后,试验选取 5、10、15、20、25、30 min 6 个不同时间,研究不同紫外照射时间对艾蒿多糖抑菌活性的影响,结果见图 6。

由图 6 可知,随紫外线照射时间的延长,艾蒿多糖对 3 种细菌的抑菌活性无明显变化,始终保持平稳趋势。试验结果表明,艾蒿多糖的抑菌活性不受紫外线垂直照射的影响。

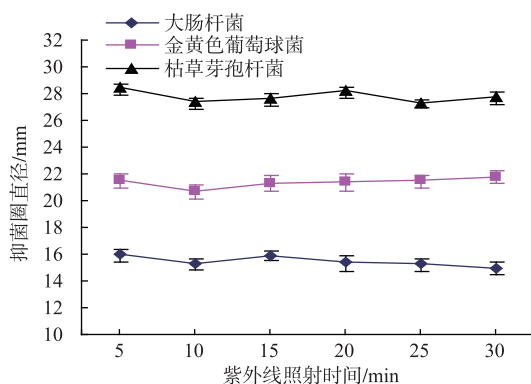


图6 紫外线照射时间对艾蒿多糖抑菌效果的影响

Fig. 6 Effect of ultraviolet irradiation on antibacterial activities of polysaccharide from leaves of *Artemisia argyi*

3 结 语

采用水提法提取艾蒿多糖,因艾蒿多糖有较强的抑菌性,应用滤纸片法对艾蒿多糖的抑菌活性作了研究,发现艾蒿多糖对细菌抑菌效果较显著,对常见细菌金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌抑菌效果强于大肠杆菌。艾蒿多糖对温度、紫外线垂直照射都表现较好的稳定性。艾蒿多糖在酸性环境处理时抑菌活性较强,在碱性下多糖抑菌活性减弱,当

pH 达到 8 以后,抑菌活性变弱甚至消失。

在研究艾蒿多糖抑菌稳定性试验中,酸性条件对艾蒿多糖的抑菌活性影响较大,在酸性环境下其抑菌活性强,在碱性环境下抑菌活性弱。在 pH 较低的情况下,抑菌活性强的原因主要:一方面在酸性条件下, H^+ 的作用使细菌生长繁殖环境变化,大大降低了细菌的活性,从而抑制细菌繁殖^[15];另一方面,酸性环境引起非极性酚类物质上所带的酚羟基的电离度变弱,从而提高了与膜上蛋白质的结合能力,因而 pH 值降低,抑菌作用增大^[16-17]。

郑煜焱等^[18]利用野生软枣猕猴桃提取的多糖进行抑菌研究,发现多糖对细菌、霉菌均有抑菌,且多糖质量浓度增大,抑制活性增强,温度和 pH 对其稳定性有所影响;王晶晶等^[19]研究无梗五加果多糖抑菌试验中,发现这种多糖对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及根霉等几种常见菌抑制作用显著;孙茜等^[20]利用匀浆热水提法提取蜀本草多糖,研究表明大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等细菌均有不同程度抑制作用,在 100 °C 及以下稳定性良好。本试验研究表明,艾蒿多糖具有较强的抑菌活性,可作为食品防腐剂来提高食品储藏期,为艾蒿多糖的开发应用奠定基础。

参考文献:

- [1] JIE Jinghua. The development and utilization of *Artemisia annua*[J]. *Journal of Ningxia Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2004(5): 57-58. (in Chinese)
- [2] JIANG Yong. Research advances on medicinal composition of *A. argyi*[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2011, 39(14): 8367-8368. (in Chinese)
- [3] ZHOU Jianxin. Reviews on research progresses, actual problem and prospects on natural food preservatives from plant materials [J]. *Food Science*, 2006, 27(1): 263-268. (in Chinese)
- [4] HU Linfeng, CUI Chengxin, et al. Research advances on chemical constituents and bioactivities of *Artemisia argyi*[J]. *Journal of Henan Institute of Science and Technology*, 2010, 38(4): 75-78. (in Chinese)
- [5] OZKAL S G, YENER M E, BAYINDIRLI L. Response surfaces of apricot kernel oil yield in super critical carbon dioxide[J]. *Food Science and Technology*, 2005, 38(6): 611-616.
- [6] LIU Junhai, HUANG Baoxun, JIANG Dechao. Optimization of extraction technology of *Eupatorium odoratum* by response surface methodology[J]. *Food Science*, 2009, 30(2): 114-118. (in Chinese)
- [7] HU Guoyuan, LI Chaoying, CHEN Mo, ZHANG Qian, ZHANG Zhe. Extraction and antimicrobial activities of polysaccharide from *Lentinus edodes* and *Flammulina velutipes*[J]. *Journal of Wuhan Engineering University*, 2013, 35(6): 30-34. (in Chinese)
- [8] LI Yonggang, WEN Jingzhi, HAO Zhongna. The state of researching and expectation of pesticides made from plant in the plant disease[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2002, 33(2): 198-202. (in Chinese)
- [9] XU Yejun, ZHAO Longfei. Inhibitory activities of the extracts from field *Artemisia argyi* on *Escherichia coli*[J]. *Journal of Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(4): 306-308. (in Chinese)

- [10] GU Lin, KONG Fan wei, WANG Jin-xi The antimicrobial activity of garlic residues polysaccharides in vitro[J]. **Food Science and Technology**, 2011, 36(11): 166-168. (in Chinese)
- [11] HUANG Qiong, MA Zhongwen, LAI Tengqiang. Primary antibiotic investigation of flammulina velutipes polysaccharides [J]. **Food Research And Development**, 2015, 36(1): 10-12. (in Chinese)
- [12] WU Yue Hong. Comparative study on antibacterial effect about plant extracts of six species of *Artemisia L.* plants. [J]. **Northern Gardening**, 2014(19): 121-125. (in Chinese)
- [13] WANG Zhongmin, WANG Yuejin. Studies on the antimicrobial activity of VLP[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2005, 31(1): 77-79. (in Chinese)
- [14] ZHENG Yuyan, YANG Yue, LIU Xiaohe, et al. Antimicrobial activities of *Actinidia arguta* polysaccharides [J]. **Food Science and Technology**, 2012, 37(4): 171. (in Chinese)
- [15] ZHANG Xiaowei, WANG Shumin, WANG Deguo, et al. Study on the extreact technoledge and antimicrobial activity of sieboldi miq polysaccharide [J]. **Food Research And Development**, 2011, 32(7): 25-28. (in Chinese)
- [16] XU Longquan, LU Jun, GE Lili, et al. Bacteriostasis of polysaccharides extractive of sweet potato stem and leafs [J]. **Food Science and Technology**, 2011, 36(1): 163-166. (in Chinese)
- [17] ZHANG Wenbo, WEI Wenlong, LI Hongrui. Study on ultrasonic extraction and antimicrobial activity of polysaccharide from balsam pear [J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, 2011, 22(7): 1676-1677. (in Chinese)
- [18] ZHENG Yuyan, YANG Yue, LIU Xiaohe, et al. Antimicrobial activities of *Actinidia arguta* polysaccharides [J]. **Food Science and Technology**, 2012, 37(4): 171-173. (in Chinese)
- [19] WANG Jingjing, MENG Xianjun. Effect of purification of polysaccharides from *acanthopanax sessiliflorus* seem. fruits on bacteriostasis activity [J]. **Food Science and Technology**, 2011, 32(12): 173-176. (in Chinese)
- [20] SUN Qian, ZHANG Wenquan, AI Hongchao, et al. Extraction and bioactivity of polysaccharide from *Portulaca oleracea L* [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2014, 42(36): 12909-12911. (in Chinese)

科技信息

欧盟批准氯化锰、二氧化锰等作为动物饲料添加剂

2017年8月21日欧盟发布(EU) 2017/1490号条例,批准氯化锰、二氧化锰、一水硫酸锰、氨基酸水合物螯合锰、水解蛋白螯合锰、甘氨酸水合物螯合锰、三水氯化锰作为动物饲料添加剂。

按照新条例要求,以上7种锰化合物在添加剂类别组属于“营养添加剂”、在功能组类别属于“微量元素”。

另外,以上7种锰化合物不能用于动物饮用水,将其用于动物饲料时,在水分含量12%的饲料中的添加限量为:鱼饲料100 mg/kg,其他动物饲料150 mg/kg。

新条例还规定,在2018年3月11日之前,按照原来规定生产和标注的饲料、锰化合物可以继续使用至库存用完。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟批准氯化锰、二氧化锰等作为动物饲料添加剂 [EB/OL]. (2017-8-23). <http://news.foodmate.net/2017/08/440868.html>.