

栗壳抑菌物质的提取及其抑菌作用的研究

陈晓天¹, 李俊卿², 宋元达^{*1}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 郑州绿叶堂本草科技有限公司, 河南 郑州 450000)

摘要: 研究了栗壳提取物中抑菌物质的主要成分及其对常见食品污染菌的抑制作用, 并且在食品体系中进行了初步防腐试验。以 MCI 为填料, 采用柱层析法对栗壳粗提物进行初步分离, 采用琼脂扩散法和常量肉汤稀释法考察栗壳提取物对 4 种细菌及 2 种霉菌的抑制作用。结果表明, 栗壳提取物中主要抑菌成分可能为可水解单宁, 栗壳单宁对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌均有较明显的抑制作用, 最低杀菌质量浓度为 0.062 5~2.5 mg/mL, 对黑曲霉, 青霉孢子的最低杀菌质量浓度为 20~40 mg/mL, 对霉菌菌丝无抑制作用。食品防腐实验表明, 同等质量浓度的栗壳单宁对苹果汁的防腐效果与苯甲酸钠基本相同。

关键词: 栗壳; 单宁; 抗菌; 最低杀菌浓度; 苹果汁

中图分类号: S 664 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)01—0054—05

Extraction and Antimicrobial Activity Assay of Bioactive Compounds from Chestnut Shell

CHEN Xiaotian¹, LI Junqing², SONG Yuanda^{*1}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Zhengzhou Ivyetown Technology Co. Ltd, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: The bioactive component of chestnut shell and its inhibitory effect on the food-borne microbes were studied, and preliminary test of its preservation function was carried out in a food system. The chestnut shell crude extracts were separated by MCI column and the inhibitory effects were investigated via agar diffusion method and macrodilution broth method on four bacteria and two fungi. Column separation showed that the activity component of chestnut shell is hydrolysable tannin, in vitro antimicrobial assay showed that chestnut shell tannin possesses a remarkable antimicrobial activity against tested food-borne microbes including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* with the minimum bactericidal concentration (MBC) values in the ranges of 0.062 5~2.5 mg/mL on bacteria and 20~40 mg/mL on fungal spores, but with no inhibitory effect on fungal hyphae. Food preservation experiment indicated that the chestnut shell tannins have a basically identical antiseptic capacity than sodium benzoate in apple juice.

Keywords: chestnut shell, tannins, antimicrobial, MBC, apple juice

收稿日期: 2014-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271812)。

* 通信作者: 宋元达(1964—), 男, 江苏南通人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物生物合成与提取研究。

E-mail: 493375956@qq.com

栗壳为壳斗科植物栗 (*Castanea mollissima* Blume) 的外果皮,约占栗实质量的 10%,栗壳含有酚类、有机酸、多糖、黄酮、内酯、香豆素、植物甾醇和单宁等化学成分。据联合国粮农组织统计,至 2009 年底,我国板栗产量约为 109 万吨,约占世界总产量的 77%^[1],但随之产生的板栗壳却未得到有效利用,所以挖掘板栗壳的应用价值很有意义。

国际上,食品防腐剂正朝着安全、天然、营养、多功能的方向发展^[2],而目前在食品工业中却以苯甲酸、山梨酸及其盐类和对羟基苯甲酸酯类的人工合成防腐剂使用最为广泛,但经长期研究发现,这些人工合成防腐剂的超量和超范围使用对人体存在一定的毒副作用及慢性伤害^[3]。周国燕等^[4]发现栗壳中的黄酮类色素对细菌和霉菌有一定抑制作用,鲁晓翔等^[5]对板栗壳多酚的最佳提取工艺进行了探讨,在料液质量体积比 1 g:23 mL(30%乙醇溶液),70 °C 水浴振荡提取多酚,得率可达 7.9%。栗壳中含有的酚类、有机酸、黄酮、单宁等化学成分具有作为天然防腐剂开发的物质基础。

作者首先采用柱色谱法对栗壳的乙醇粗提物进行了初步分离,发现主要抗菌物质可能为可水解单宁。在此基础上,选择了体积分数 50%丙酮提取栗壳单宁,并进行了栗壳单宁对常见食品污染菌的抑菌作用研究,为开发栗壳作为天然防腐剂提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、桔青霉 (*Penicillium citrinum*):江南大学生物技术中心提供;MCI 柱(CHP20/P120):三菱化学公司产品。

ZHJH-1029C 垂直流超净工作台:上海智城分析仪器制造有限公司产品;GRP-9080 型隔水式恒温培养箱:上海森信实验仪器有限公司产品;ZHTY-70 振荡培养箱:上海知楚仪器有限公司产品;RE-52C 型旋转蒸发器:上海勒顿实业有限公司产品;DFT-50 型高速万能粉碎机:上海新诺仪器设备有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 栗壳抑菌物质有效成分的定性确定 取干燥至恒重的板栗壳 20 g,用 200 mL 体积分数 95%乙醇于室温浸泡 24 h,提取 2 次,抽滤,蒸发后所得浸膏用水溶解,上 MCI 柱,分别用 500 mL 水,体积分数 10%、30%、50%、70%的甲醇溶液及无水甲醇进行洗脱,收集洗脱液,浓缩,进行抑菌实验。

对抑菌活性最强的洗脱液部位进行定性实验^[6],初步明确抗菌物质种类。

1.2.2 栗壳单宁的提取 取干燥至恒重的粉碎后栗壳 20 g,用 200 mL 体积分数 50%丙酮溶液^[7]于室温浸泡 24 h,浸提 2 次,抽滤,浓缩至干,于 4 °C 冰箱保存。

1.2.3 抑菌实验

1) 供试菌悬液的制备 将供试菌种活化后,细菌于 37 °C 培养 12~18 h,真菌于 28 °C 培养 48 h,制备初始菌悬液及孢子悬液。以无菌生理盐水对菌悬液进行稀释,控制培养时细菌终浓度 5×10^5 cfu/mL,真菌孢子浓度 $(0.4 \sim 5.0) \times 10^4$ cells/mL^[8]。

2) 抑菌效力的评价 细菌:采用琼脂扩散法^[9],涂布菌液后用 6 mm 打孔器于培养基上打孔,孔中加入 100 μ L 0.01 g/mL 栗壳单宁提取液,于 37 °C 培养 12 h,十字交叉法测量抑菌圈直径,以无菌水作为对照空白对照,100 mg/mL 苯甲酸钠作为阳性对照,重复 3 次,取均值。

真菌:采用生长速率法^[10],用打孔器取菌落边缘生长旺盛的菌丝移入含有 10 mg/mL 提取物的查氏培养基平板上,28 °C 培养,待对照组菌落生长接近培养皿边缘时,测定实验组菌落直径,计算抑制率,重复 3 次,取均值,以无菌水作为对照空白对照,100 mg/mL 苯甲酸钠作为阳性对照。

菌丝生长抑制率=(对照组菌落直径-实验组菌落直径)/对照组菌落直径 $\times 100\%$

3) 最低杀菌浓度(MBC)的测定 最低杀菌浓度测定采用常量肉汤稀释法,取含有 1 mL LB 液体培养基的灭菌试管,并取 1 mL 板栗壳单宁提取液(已过滤除菌)1 mL 加入第一支试管,混合均匀后从中吸取 1 mL 加入第二支试管,再取 1 mL 加入第三支试管,依次类推,进行二倍稀释,最后一支试管中取 1 mL 弃去,制成含不同质量浓度栗壳提取液的试管。

在上述含不同浓度提取液的试管中接种供试

菌液及孢子悬液,细菌置于 37 °C 恒温箱中培养 16~20 h,霉菌于 28 °C 培养 3 d。取无明显浑浊的试管涂布平板,于 37 °C 培养 18~24 h,无菌落生长的平板对应的最低提取液浓度定义为最低杀菌浓度;观察接种孢子悬液对应试管,无霉菌生长的试管对应的提取液浓度定义为最低杀菌浓度。

1.2.4 苹果汁防腐实验 取新鲜苹果,洗净,去皮,榨汁,分装于灭菌三角瓶中,每瓶 100 mL。向三角瓶中加入质量浓度 0.05 g/dL 的栗壳单宁提取液,对照组加入 0.05 g/dL 的苯甲酸钠,分装于无菌试管中,以苹果汁原液为空白对照,37 °C 下放置,分别于 3,6,9,12,15 d 测定菌落总数^[13],所有操作均在无菌

下进行,重复 3 次^[14]。

2 结果与分析

2.1 栗壳抑菌物质的确定

栗壳中抑菌成分为中高极性物质,MCI 柱为聚苯乙烯基的反相树脂填料,主要用于分离中高极性物质,将体积分数 95%乙醇栗壳粗提液装柱,用不同体积分数甲醇进行洗脱,浓缩并检测抑菌效果。不同洗脱液部位对 4 种供试菌的抑菌圈大小见表 1,其中体积分数 30%甲醇洗脱液对 4 种供试细菌的抑菌圈直径大于其它洗脱部位,抑菌效果最强,说明主要抗菌物质集中于体积分数 30%甲醇洗脱液。

表 1 不同洗脱液对细菌的抑菌圈直径

Table 1 Inhibition zone size by different eluent

mm

供试菌种	水	甲醇体积分数/%				
		0	30	50	70	100
大肠杆菌	6.0	6.5	19.5	9.2	10.1	6.0
枯草芽孢杆菌	6.0	6.3	20.3	8.7	7.4	6.0
金黄色葡萄球菌	6.0	6.7	13.4	7.5	6.9	6.0
鼠伤寒沙门氏菌	6.0	6.5	15.2	6.8	7.6	6.0

对体积分数 30%甲醇洗脱液部位进行定性实验,结果如表 2 所示,质量分数 1%三氯化铁溶液显蓝黑色证明存在酚类物质;明胶沉淀反应显阳性,证明有单宁存在;饱和溴水、饱和石灰水及稀盐酸共沸实验进一步证明所含单宁为可水解单宁,推测栗壳中可水解单宁可能为主要抗菌成分。

表 2 体积分数 30%洗脱液定性实验结果

Table 2 30% methanol eluent qualitative results

反应条件	实验现象	结果分析
明胶沉淀	白色沉淀	+
质量分数 1%三氯化铁溶液	蓝黑色	+
饱和溴水	黄棕色沉淀	
饱和石灰水	青灰色沉淀	+
稀盐酸共沸	暗红色沉淀	

注:“+”表示为阳性结果

2.2 栗壳单宁的提取

丙酮-水体系对单宁溶解能力最强,能够打开单宁-蛋白质的连接键,且与单宁无溶剂化作用,减压蒸发易除去,提取效率高,是目前使用最普遍的

溶剂体系^[12],所以在推测栗壳中主要抗菌成分为单宁后,后续提取采用丙酮作为溶剂。20 g 栗壳经体积分数 50%丙酮-水提取后得 1.1 g 干浸膏,得率 5.5%,配制 10 mg/mL 的栗壳单宁提取液。

2.3 栗壳单宁抑菌实验结果

2.3.1 栗壳单宁提取液对细菌的抑制作用 以抑菌圈直径和最低杀菌浓度(MBC)为评价指标,通过琼脂扩散法及常量肉汤稀释法测定栗壳单宁对四种供试菌的抑制作用,实验结果见表 3,可见 10 mg/mL 的栗壳单宁提取液对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌的抑菌效果要强于化学防腐剂苯甲酸钠。

2.3.2 栗壳单宁提取液对真菌的抑菌效果 以菌丝生长抑制率和最低杀菌浓度(MBC)为评价指标,通过生长速率法及常量肉汤稀释法测定栗壳单宁对两种供试霉菌菌丝及孢子的抑制作用(表 4)。实验结果表明,10 mg/mL 的栗壳单宁对霉菌菌丝生长无抑制作用;对黑曲霉、桔青霉孢子的最低杀菌浓度为 40 和 20 mg/mL,抑菌效果要弱于苯甲酸钠,说明栗壳单宁提取物对霉菌的抑制效果较差。

表 3 栗壳单宁对 4 种细菌的抑制作用

Table 3 Inhibitory effect of chestnut shell tannin on 4 kinds of bacteria

供试菌种	抑菌圈直径/mm			MBC/(mg/mL)	
	栗壳单宁	苯甲酸钠	无菌水	栗壳单宁	苯甲酸钠
大肠杆菌	22.2	16.5	0	2.5	4
枯草芽孢杆菌	19.5	13.6	0	2.5	2
金黄色葡萄球菌	11.6	18.2	0	1.25	4
鼠伤寒沙门氏菌	16.8	12.1	0	0.0625	1

表 4 栗壳单宁对 2 种真菌的抑制作用

Table 4 Inhibitory effect of chestnut shell tannin on 2 kinds of fungi

供试菌种	菌丝生长抑制率		MBC(mg/mL)	
	栗壳单宁	苯甲酸钠	栗壳单宁	苯甲酸钠
黑曲霉	-	-	40	12.5
桔青霉			20	12.5

注:“-”表示无抑制作用。

2.4 苹果汁防腐试验

苹果汁在添加同等质量浓度下(0.05 g/dL)的栗壳单宁与苯甲酸钠后,37 °C下放置,于3,6,9,12,15 d测定菌落总数(图 1)。实验结果表明,同等质量浓度下,栗壳单宁的抑菌效果与苯甲酸钠基本相同。

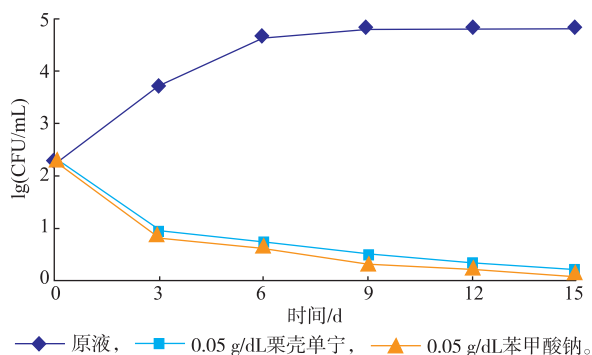


图 1 栗壳单宁对苹果汁的防腐效果

Fig. 1 Antiseptic capacity of chestnut shell tannins in apple juice

参考文献:

[1] 张雪丹,张倩,辛力,等. 板栗壳的化学成分及其应用研究进展[J]. 落叶果树,2014,44(1):20-22.
ZHANG Xuedan,ZHANG Qian,XIN Li, et al. Review on the chemical composition of chestnut shell and its application[J]. *Deciduous Fruits*, 2014, 44(1):20-22. (in Chinese)

[2] 尤新. 天然营养功能化发展趋势—美国 FDA 公布 2001 年度公认安全食品 (GRAS) 简析[J]. 中国食品添加剂,2003(2):1-4.
YOU Xin. Trends on natural, nutrient and functional food additives—brief analysis about the safety food (GRAS) released by FDA in 2001[J]. *China Food Additives*, 2003(2):1-4 (in Chinese)

[3] 唐春红. 天然防腐剂与抗氧化剂[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010.

[4] 周国燕,桑迎迎,宫春波,等. 板栗壳色素的提取工艺优化及其抑菌性能[J]. 食品科学,2010,31(22):101-105.

3 结语

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌以及黑曲霉、青霉是食品生产、加工和储藏过程中常见的污染菌。研究发现,栗壳中的主要抗菌活性物质可能为可水解单宁。栗壳单宁提取物对常见食品污染菌均有一定的抑菌作用,其中对细菌的抑制作用最显著,对 4 种供试细菌的最低杀菌质量浓度为 0.0625~2.5 mg/mL。20~40 mg/mL 的单宁提取物对霉菌孢子的萌发有一定抑制作用,而对霉菌菌丝生长则无抑制作用。

将栗壳单宁提取物应用于苹果汁中,发现在同等质量浓度下抑菌效果与化学防腐剂苯甲酸钠基本相同,表明栗壳单宁提取物具有作为天然食品防腐剂的潜力^[13]。

- ZHOU Guoyan, SANG Yingying, GONG Chunbo, et al. Optimal extraction parameters and antibacterial properties of pigment from Chestnut Shell[J]. **Food Science**, 2010, 31(22): 101-105. (in Chinese)
- [5] 鲁晓翔, 赵晨光, 连喜军. 板栗壳多酚提取条件及其抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3): 32-35.
LU Xiaoxiang, ZHAO Chenguang, LIAN Xijun. Study on the extraction conditions and antioxidation of polyphenol from chestnut-shells[J]. **Food Research and Development**, 2008, 29(3): 32-35. (in Chinese)
- [6] 张国华, 桑春燕. 鞣质的鉴别方法[J]. 黑龙江科技信息, 2009(7): 186.
ZHANG Guohua, SANG Chunyan. Identification of tannins [J]. **Heilongjiang Science and Technology Information**, 2009(7): 186. (in Chinese)
- [7] L W WANG. Antibacterial activity of the vegetable extract from chestnut (*Castanea mollissima* blume) shell[J]. **Asian Journal of Chemistry**, 2011, 23(9): 4243-4244.
- [8] Araújo jo. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method[J]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 2009, 51(1): 9-12.
- [9] 陈佳佳, 刘凡, 廖森泰, 等. 桑叶提取物抑菌活性及抑菌稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 88-91.
CHEN Jiajia, LIU Fan, LIAN Sentai, et al. Study on antibacterial activity and stability of extracts from mulberry (*Morus alba* L.) leaves[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(9): 88-91. (in Chinese)
- [10] 刘国坤, 陈启建, 吴祖建, 等. 几种植物提取物对 4 种植物病原真菌的抑制作用[J]. 福建农林大学学报, 2004, 33(3): 295-299.
LIU Guokun, CHEN Qijian, WU Zujian, et al. Inhibition of plant extracts against plant pathogenic fungi [J]. **Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)**, 2004, 33(3): 295-299. (in Chinese)
- [11] ZENG Weicai, HE Qiang, SUN Qun, et al. Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2012(153): 78-84.
- [12] 徐勤. 鞣质的研究进展[J]. 华夏医学, 2004, 17(1): 113-115.
XU Qing. Research progress on tannins[J]. **Acta Medicinæ Sinica**, 2004, 17(1): 113-115. (in Chinese)
- [13] 徐进, 赵声兰, 陈朝银, 等. 细菌抗单宁作用机制及其意义[J]. 生物学杂志, 2008, 25(4): 4-6.
XU Jin, ZHAO Shenlan, CHEN Chaoyin, et al. The resistant mechanism and significance of bacteria to tannins [J]. **Journal of Biology**, 2008, 25(4): 4-6. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 第五届中国食品与农产品安全检测技术与质量控制国际论坛

开始日期: 2016-03-28

结束日期: 2016-03-30

所在城市: 北京市 朝阳区

具体地点: 北京国际会议中心

主办单位: 中国仪器仪表学会分析仪器分会 中国仪器仪表行业协会分析仪器分会 中国质量检验协会

会议主席: 陈洪渊院士

组织委员会主席: 刘长宽

联系人: 于健、蒋士强、刘长宽

联系电话: 010-82967491

E-MAIL: cfas@lanneret.com.cn

会议网站: <http://www.cfaschina.com/>