

# 小檗碱和壳聚糖抗蔬菜病原真菌活性测定及复合膜制备

阎春琦<sup>1</sup>, 葛喜珍<sup>2</sup>, 田平芳<sup>1</sup>

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京联合大学 生物化学工程学院, 北京 100023)

**摘要:** 研究了小檗碱和壳聚糖对几种常见蔬菜病原真菌的抑制活性, 以及以小檗碱和壳聚糖为主料制备复合膜的方法, 并测定了该膜的药物释放效果。试验表明: 低浓度(0.234 mg/mL)小檗碱即可抑制辣椒炭疽病菌(*Vermicularia capsici*)等5种蔬菜病原真菌的生长。20 mg/mL 浓度壳聚糖对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的抑制率高达65%, 而对其余4种果蔬病原真菌也有一定的抑制作用。为了集成这2种天然化合物的优点, 制备了小檗碱-壳聚糖复合膜, 该膜具有缓释功能, 在模拟外部环境(磷酸缓冲液, pH 6.8)条件下, 20 d小檗碱累计释放率接近25%, 提示其在果蔬贮藏抗菌中的应用价值。

**关键词:** 小檗碱; 壳聚糖; 复合膜; 蔬菜病原真菌

**中图分类号:** S 482.2<sup>+</sup>92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)08—0131—03

随着环保和食品安全意识的增强, 采用天然物质防治植物病害成为现代农药研发的重要方向。壳聚糖又名β-1, 4-聚葡萄糖胺, 是迄今发现的唯一天然碱性多糖, 具有良好成膜性、生物降解性和生物亲和性。其无毒、抑菌等优越特性可用于果蔬保鲜。壳聚糖还可诱导植

物产生抗病性<sup>[1-2]</sup>, 并广泛用于缓控释制剂<sup>3-4</sup>。另一天然化合物小檗碱是中药黄连(*Coptis chinensis* Franch)中的抗菌活性成分, 对革兰氏阴性和阳性细菌以及许多真菌等均具有抑制或杀灭作用。该研究分别测定了小檗碱和壳聚糖对常见蔬菜病原真菌的抑制效果。基于集成两者优良性能的考虑, 制备了小檗碱-壳聚糖复合膜, 研究结果显示其缓释性能, 为两者进一步优化复配奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

88%脱乙酰度壳聚糖购自山东海德贝, 小檗碱购自中国药物鉴定所, 其余试剂均为分析纯。供试菌种番茄

第一作者简介: 阎春琦(1982-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物病理学。

通讯作者: 田平芳(1965-), 男, 博士, 副教授, 现从事分子植物病理学研究工作。E-mail: tianpf@mail.buct.edu.cn。

基金项目: 北京市科协金桥工程资助项目。

收稿日期: 2009—03—20

## Studies on Extraction and Antibacterial Activity of Antibacterial Material in *Folium Ilicis Cornutae*

ZENG Chao-zhen, LIU Zhi-xiang

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

**Abstract:** The optimum extractive conditions of bacteriostasis from *Folium Ilicis Cornutae* were studied by orthogonal experiment, then the bacteriostatic activity of *Folium Ilicis Cornutae* extracts and the effects of temperature, time, pH value on it were studied by cylinder plate method. The results showed the optimum extractive conditions of bacteriostasis from *Folium Ilicis Cornutae* was: ethyl acetate solvent, leaching-temperature 40 ℃, ratio of solid to liquid 1 : 10, extracting time 2.5 h. The substance extracted showed some antibiotic activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.0625, 0.5, 0.5 mg/mL, and minimum bactericidal concentrations (MBC) was 0.125, 1, 0.5 mg/mL respectively. The antibacterial effects was best at pH 7~9. The antibacterial activity of *Folium Ilicis Cornutae* extracts was unstable under heating, The optimum antibacterial time was 24 h.

**Key words:** *Folium Ilicis Cornutae*; Orthogonal experiment; Antibacterial activity

早疫病菌 (*Alternaria solani*)、辣椒炭疽病菌 (*Vermicularia capsici*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*)、甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*)均由北京市农科院植物保护研究所提供。

## 1.2 方法

### 1.2.1 小檗碱、壳聚糖对蔬菜病原真菌抑制作用的测定

用生长速率法测定对真菌的抑制作用<sup>[9]</sup>。在灭菌溶化的 PDA 培养基中分别添加小檗碱、壳聚糖,使其终浓度分别为 0.234、20 mg/mL,冷却成平板。无菌条件下,用孔径 0.6 cm 打孔器取菌落边缘的菌饼,移入 PDA 平板,每个处理重复 5 次,以未加小檗碱、壳聚糖所制平板作为对照。28℃ 恒温培养 36 h 后每 12 h 用游标卡尺十字交叉法测量菌落直径,直至对照平板上的菌落长至培养皿边缘,计算抑制率。菌落直径 (cm) = 测量菌落的直径平均值 - 0.6 (菌饼直径)。菌丝生长抑制率 = (对照组纯生长量 - 处理组纯生长量) / 对照组菌落直径 × 100%。

1.2.2 小檗碱-壳聚糖复合膜的制备 将壳聚糖加入含醋酸和甘油的水溶液中,同时加入小檗碱 (0.234 mg/mL),室温搅拌,使小檗碱及壳聚糖完全溶解。静置使膜液中气泡完全消失。将膜液倾倒在平板上,风干后揭膜。

1.2.3 小檗碱-壳聚糖复合膜的释药测定 以 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为递质,测定上述复合膜中小檗碱的释药度。将准确称取的复合膜密封于透析袋内,浸入递质中,恒温下振荡,模拟菌生长温度 (28 ± 0.1)℃,于设定时间取样,同时补加同量新鲜稀释液。用紫外分光光度法在 345 nm 下测定释放液中的小檗碱吸光度,换算成浓度,计算小檗碱的累计释放百分数。释放率 (%) = (C × V) / (m × 载药量) × 100%。式中 C 为释放各时刻溶液中小檗碱的浓度 (μg/mL), V 为释放介质体积 (mL), m 为复合膜的质量 (mg)。制作释放率-时间曲线,考察复合膜的释药性能。

## 2 结果与分析

### 2.1 小檗碱、壳聚糖的体外抑菌

2.1.1 小檗碱的抑菌效果 已往研究表明小檗碱对真菌有抑制作用,因此在 PDA 培养基中添加微量小檗碱,考察其对 5 种蔬菜病原真菌的抑制效果。结果发现,当浓度仅为 0.234 mg/mL 时,小檗碱对 5 种真菌的平均抑制率接近 10%;对 *B. cinerea* 的抑菌率最高,在 120 h 内平均抑制率达 15% 以上。此外,小檗碱对 5 种真菌的抑制率存在差异 (图 1)。

2.1.2 壳聚糖体外抑菌测定 壳聚糖分子量越大,抑菌效果愈好<sup>[9]</sup>;浓度越高,抑菌能力越强。该研究考察壳聚糖在 20 mg/mL 浓度时 (该浓度时成膜效果较好)对 5 种蔬菜病原真菌的抑制情况,结果表明,该浓度壳聚糖

对 5 种真菌的平均抑制率超过 25%;对 *B. cinerea* 的抑菌率较高,120 h 内的平均抑制率达 60% 以上。此外,壳聚糖对不同真菌的抑制率存在差异 (图 2)。

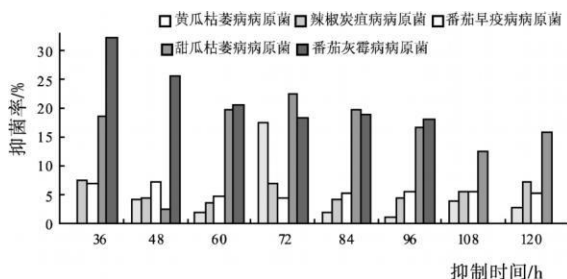


图 1 小檗碱对 5 种真菌的抑制率

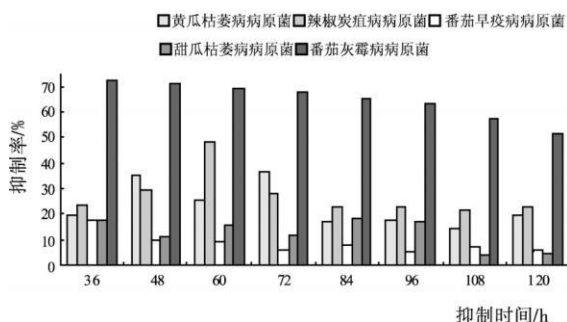


图 2 壳聚糖对 5 种真菌的抑制率

图 3.4 是加药菌落生长平板与不加药菌落生长平板 (108 h) 的对照图,可以很直观地看出,在同等培养条件下小檗碱、壳聚糖对真菌不同的抑制效果。与低浓度相比,高浓度小檗碱可明显抑制 *B. cinerea* 的生长 (图 3D)。

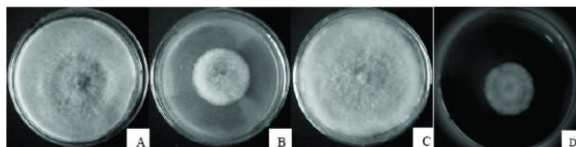


图 3 小檗碱、壳聚糖对番茄灰霉病菌的抑制

注: A: 空白样品, B: 添加 2% 壳聚糖, C: 添加低浓度小檗碱, D: 添加高浓度小檗碱。

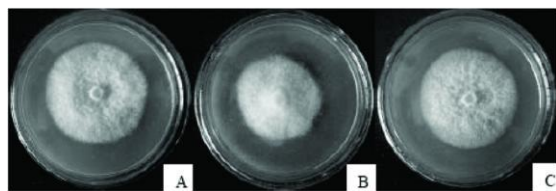


图 4 小檗碱、壳聚糖对黄瓜枯萎病菌的抑制效果

注: A 为空白样品, B 为添加 2% 壳聚糖, C 为添加小檗碱。

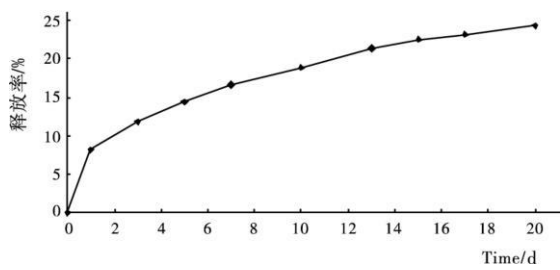


图 5 小檗碱-壳聚糖复合膜的体外释放曲线

2.2 小檗碱-壳聚糖复合膜的缓释效果

依照 1.2.3 方法,在模拟外部环境(磷酸盐缓冲液 pH 6.8)中,复合膜在第 1 天小檗碱释放速度很快,释放率将近 8%。随后时间里释放速度减缓,20 d 累计释放率约 25%,可见该膜具有缓释功能(图 5)。

3 讨论

通过测定小檗碱和壳聚糖对常见蔬菜病原真菌的抑制率及其复合膜的缓释性能,得出以下结论:当小檗碱浓度仅为 0.234 mg/mL 时,即可抑制 5 种真菌的生长,其中对 *B. cinerea* 的抑制率最高。低浓度小檗碱对 *B. cinerea* 抑制率不高(图 3C),若适当增加其浓度,抑制率明显提高(图 3D)。浓度 20 mg/mL 壳聚糖对 *B. cinerea* 的平均抑制率接近 65%;对 *V. capsici* 等其余 4 种真菌的平均抑制率也超过了 25%。表明壳聚糖在控制 *B. cinerea* 这一重要植物病原真菌上的应用价值。小檗碱-壳聚糖复合膜具有良好缓释能力,在模拟外部环境中,

20 d 累计释放率接近 25%。释放出的小檗碱不仅抑制某些真菌的生长,更能抑制大部分细菌的繁殖。表明复合膜在果蔬储藏抗菌上的应用价值。

研究表明,小檗碱、壳聚糖这 2 种天然化合物对常见蔬菜病原真菌的抑制作用,而且以两者为主料制备的复合膜还具有缓释效果。除了复合膜,将二者制备成悬浮剂,可能更利于杀灭病原真菌。由于小檗碱和壳聚糖均为天然无毒化合物,且廉价易得,因此市场潜力巨大。该研究为天然抑菌物质复配防治果蔬病害提供了一种思路。

参考文献

[ 1 ] Doares S H, Syrovets T, Weiler E W, et al. Oligogalacturonides and Chitosan Activate Plant Defensive Genes Through the Octadecanoid Pathway [ J ]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995 92: 4095-4098.  
[ 2 ] Reddy M V B, Anil J, Angers P, et al. Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to Fusarium Graminearum and Improves Seed Quality [ J ]. J Agric Food Chem, 1999 47(3): 1208-1216.  
[ 3 ] Agnihotri S A, Mallikarjuna N N, Aminabhavi T M. Recent Advances on Chitosan-based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery [ J ]. J Controlled Release, 2004 100(1): 5-28.  
[ 4 ] Mi F L, Shyu S S, Chen C T, et al. Porous Chitosan Microsphere for Controlling the Antigen Release of Newcastle Disease Vaccine: Preparation of Antigen-adsorbed Microsphere and in Vitro Release [ J ]. Biomaterials, 1999 20(17): 1603-1612.  
[ 5 ] 侯东耀, 田平芳, 谭天伟. 四味中草药微波提取物的体外抑菌活性研究 [ J ]. 北方园艺, 2008(2): 222-224.  
[ 6 ] 胡瑛, 杜予民, 刘慧. 壳聚糖抗菌性与分子量和环境介质相关性研究 [ J ]. 分析科学学报, 2003 19(4): 305-308.

Fungistasis of Berberine and Chitosan and Preparation of Composite Membrane

YAN Chun-qi<sup>1</sup>, GE Xi-zhen<sup>2</sup>, TIAN Ping-fang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; 2. Bioengineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China)

**Abstract:** The antifungal activities of berberine and chitosan were studied by growth rate method. It was found that berberine of low concentration (0.234 mg/mL) could inhibit the mycelial growth of vegetable pathogenic fungi, including *Alternaria solani*, *Vermicularia capsici*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. cucumerium, and *Fusarium oxysporum* f.sp. melonis. Another natural compound, chitosan also inhibited their mycelial growth. Chitosan showed approximately 65% inhibition rate against *B. cinerea*. To integrate the two naturally occurring compounds, berberine-chitosan composite membrane was thus prepared and *in vitro* experiment revealed the berberine slow release, suggesting its potential utilization in controlling vegetable storage diseases.

**Key words:** Berberine; Chitosan; Composite membrane; Vegetable pathogenic fungi