

柑橘皮提取物抑菌性能研究

岳 静¹, 朱志成², 姜 水³

(1. 沈阳化工大学 制药与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142; 2. 辽宁省种子管理局, 辽宁 沈阳 110034;

3. 沈阳红梅集团, 辽宁 沈阳 110026)

摘 要:利用不同浓度的柑橘皮提取物, 对不同指示菌株进行抑菌试验, 探讨其抑菌性能。结果表明: 柑橘皮提取物对金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌和大肠杆菌均有一定的抑制作用, 对青霉无抑制作用; 其中藤黄微球菌的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)均最低, 说明其对柑橘皮提取物最敏感。同时, 通过比较柑橘皮提取物作用各指示菌后生长曲线的变化, 分析其抑菌机理, 可为研发一种新型的果味生物防腐剂提供参考依据。

关键词:柑橘皮; 抑菌; 防腐剂

中图分类号:S 666.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)23-0025-03

柑橘(*Citrus aurantium*)因其甘甜多汁、清香怡人、营养丰富, 深受人们的喜爱, 现已成为世界第一大宗水果。近年来, 柑橘产业迅猛发展, 然而在深加工(果汁、罐头、酱等)和利用的同时, 会产生大量的柑橘皮^[1-2]。如弃而不用, 会造成环保压力和经济上的巨大浪费。其实, 柑橘皮中含有许多功能性成分, 对其加以利用将会带来可观的经济效益和社会效益^[2-3]。目前, 关于柑橘皮综合利用的报道也有很多: 如用作增稠剂、乳化剂、制取香精油^[4-6]等。然而, 对于柑橘皮用作防腐剂方面的文献报道较少, 且多为柑橘皮中精油的抑菌作用研究^[5-8]。

该研究以柑橘加工中的副产物柑橘皮为对象, 采用食品行业常用的乙醇-柠檬酸溶液对其进行抽提, 通过分析各浓度柑橘皮提取物对各指示菌株的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)及生长周期的影响, 探讨柑橘皮提取物的抑菌性能, 为其综合利用提供参考。

第一作者简介:岳静(1978-), 女, 辽宁葫芦岛人, 在读博士, 讲师, 研究方向为食品分析与生物技术。E-mail: yuejing@yeah.net.

收稿日期:2012-08-20

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试样品 柑橘购于沈阳市家乐福云峰店; 取其皮于 40℃烘干粉碎, 过 40 目筛制成柑橘皮粉备用。

1.1.2 供试菌株 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、青霉(*Penicillium*), 均由沈阳化工大学食品科学与工程实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 柑橘皮提取物的制备 取 20 g 制好的柑橘皮粉, 以 80% 的乙醇-柠檬酸溶液为提取液, 60℃抽提 4 h。提取液低速离心后取上清液, 经浓缩后定容至 20 mL, 4℃密封保存备用。此浓缩液为原液, 相当于 1 mL 提取液中含有 1 g 柑橘皮粉溶出物质^[1], 即 1 g/mL。利用液体倍比稀释法^[9]将柑橘皮提取原液稀释成浓度为 70、35、17.5、8.75、4.36、2.18、1.09、0.55 mg/mL 的溶液备用。

1.2.2 供试菌液的制备 用接种环分别挑取各供试菌苔 2 环于 50 mL 无菌生理盐水中, 摇床培养 15~18 h, 将菌培养到对数生长期, 制成菌体悬液或孢子悬液备用。

Abstract: The chemical components of the pigment extracted from roots and stems of *Eupatorium adenophorum* were studied by the system preliminary experiments. Possible chemical components of the pigment were deduced by precipitation reaction or color reaction. The results of preliminary test was to provide reference for further study and application of the pigment. The results showed that, the chemical components probably included sugar and polysaccharide, anthraquinone, flavonoids, coumarin, lactones and so on, but no alkaloids, saponins, protein and cardiac glycosides for chemical composition.

Key words: *Eupatorium adenophorum* Spreng; pigment; chemical components; the system preliminary experiments

1.2.3 柑橘皮提取物对各指示菌株的敏感性测试 将处于对数生长期的各菌液稀释成浓度为 10^5 cfu/mL 的菌悬液。分别取 1 mL 各菌液加入到无菌空白培养皿中,然后每皿注入彻底融化、冷却至 45°C 左右的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,平面旋摇,充分混匀。取牛津杯数枚,等距离在琼脂表面上立置,将各待测样液(表 1)分别加入钢杯中,平置放入 37°C 温箱中培养 24~48 h。每株指示菌做 3 个平行,取其结果的平均直径(mm),即为该样液对此菌株的抑菌结果。

表 1 菌株敏感性试验所需试剂

编号	试剂名称
1(对照 1)	培养菌液的生理盐水
2(对照 2)	提取柑橘皮用的 80%乙醇-柠檬酸溶液
3	8.75 mg/mL 柑橘皮提取物溶液
4	17.5 mg/mL 柑橘皮提取物溶液
5	35 mg/mL 柑橘皮提取物溶液

1.2.4 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的确定 取对数生长期的各指示菌液加入到 25 mL 含不同浓度柑橘皮提取物(1.2.1 中各浓度提取物)的液体培养基中, 37°C 振荡培养。15~18 h 后取出观察,从其中找出无菌生长时的最低柑橘皮提取物浓度,则该浓度即为柑橘皮提取物对该菌的最低抑菌浓度(MIC);将各试验管菌液分别划线于牛肉膏蛋白胨琼脂培养皿中,置 37°C 恒温箱中继续培养,18~24 h 后取出观察,平皿上的菌落数小于 5 个的最低柑橘皮提取物浓度即为其对该菌的最低杀菌浓度(MBC)^[9]。

1.2.5 对指示菌菌体生长的影响 用浓度为各指示菌 1 倍 MBC 的柑橘皮提取物溶液作用各指示菌株,通过比较各指示菌生长曲线的变化考察柑橘皮提取物对各指示菌生长周期的影响。以大肠杆菌为例加以说明。取 30 支无菌的含 5 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基的试管,每管均接种大肠杆菌菌悬液,浓度控制在 $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL。然后将其分成 2 组(每组 15 管),1 组用于测定 15 h 内该菌的正常生长曲线;另 1 组用于测定 15 h 内加柑橘皮提取物后该菌的生长曲线。每隔 1 h 取样测 OD_{540} 值,绘制正常生长曲线(对照)和柑橘皮提取物作用后的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 柑橘皮提取物对 4 种指示菌的抑制作用

由表 2 和图 1 可知,不同浓度的柑橘皮提取物对黄色葡萄球菌、藤黄微球菌、大肠杆菌均有一定的抑制作用,抑制效果与浓度呈正相关,而对青霉没有抑制效果。

2.2 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的确定

液体倍比稀释法测出柑橘皮提取物对各指示菌的最低抑菌浓度及最低杀菌浓度见表 3,由表 3 可知,藤黄微球菌的最低抑菌浓度、最低杀菌浓度均最低,说明该

表 2 不同浓度柑橘皮提取物的抑菌作用
(抑菌圈直径 $d=\text{mm}$)

菌种名称	药品编号				
	1	2	3	4	5
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	—	8.5	8.8	9.4	10.1
黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	—	8.8	10.6	12.1	12.5
藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	—	16.3	17.4	18.1	20.2
青霉 <i>Penicillium</i>	—	—	—	—	—

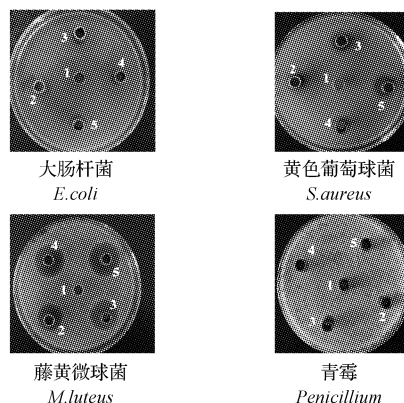


图 1 柑橘皮提取物对各指示菌的抑制作用

注:编号 1~5 为表 1 所示。

表 3 各指示菌的最低抑菌浓度、最低杀菌浓度

菌种名称	最低抑菌浓度 MIC	最低杀菌浓度 MBC
	/mg · mL ⁻¹	/mg · mL ⁻¹
黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	4.3625	8.75
藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	1.090625	2.18125
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	17.5	35

指示菌对柑橘皮提取物最敏感。

2.3 柑橘皮提取物对大肠杆菌、黄色葡萄球菌、藤黄微球菌生长曲线的影响

由图 2、3、4 可知,以大肠杆菌、黄色葡萄球菌、藤黄微球菌的正常生长曲线为对照,加入各种指示菌 1 倍最低杀菌浓度的柑橘皮提取物后各菌株生长曲线发生明显变化。柑橘皮提取物作用大肠杆菌 7 h 后,活菌数目开始明显下降;12 h 后,很快进入衰亡期,没有达到正常的生长高峰。同样在柑橘皮提取物作用黄色葡萄球菌、藤黄微球菌 6 或 7 h 后有活菌下降现象,11~12 h 后进入衰亡期。这些表明,柑橘皮提取物主要抑制了大肠杆菌、黄色葡萄球菌、藤黄微球菌对数生长期的菌体分裂。但同时由图 3 还可知,柑橘皮提取物作用黄色葡萄球菌大约 9 h 时,菌体又有一段时间生长起来,速率比正常生长要快,之后才又快速衰亡;推断产生这种现象的原因是由于柑橘皮提取物中包含了柑橘的大部分成分,其中可能有某些物质对菌种的生长有促进作用,之后又被抑菌物质所控制。

3 结论与讨论

不同浓度的柑橘皮提取物对金黄色葡萄球菌、藤黄

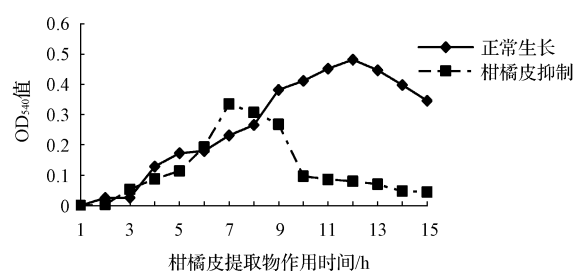


图2 柑橘皮提取物对大肠杆菌生长曲线的影响

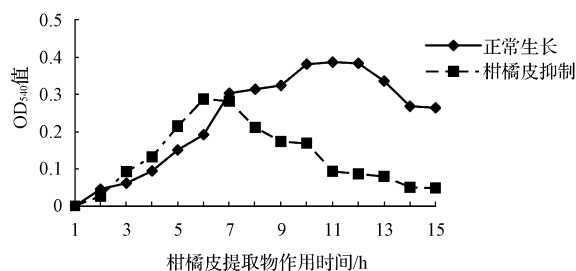


图3 柑橘皮提取物对黄色葡萄球菌生长曲线的影响

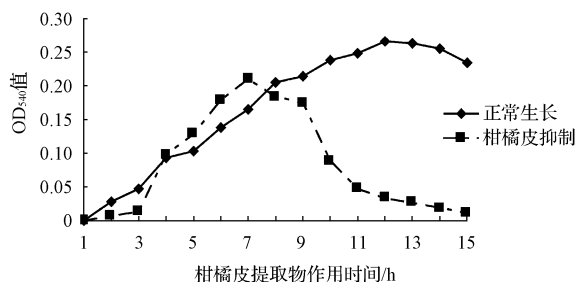


图4 柑橘皮提取物对藤黄微球菌生长曲线的影响

微球菌和大肠杆菌均有一定的抑制作用,抑制效果与浓度呈正相关,而试验范围内各浓度柑橘皮提取物对青霉均没有抑制效果;藤黄微球菌的最低抑菌浓度、最低杀菌浓度均最低,说明该指示菌对柑橘皮提取物最敏感;加入各种指示菌1倍最低杀菌浓度的柑橘皮提取物后

各菌株生长曲线与正常生长曲线相比发生明显变化。菌种生长刚刚进入对数生长期其生长状态就受到提取液的控制不能继续生长而进入稳定期,进而开始衰亡。但同时也发现了生长曲线的异常并不是如想象中的那样完全受到柑橘皮提取物的抑制,而是菌体又有一段时间生长起来,初步分析可能是粗样中含有促进菌种生长的物质。

大量的试验表明,各种天然防腐剂的抑菌机理都是抑制菌体的呼吸途径,导致能量物质 ATP 和还原物质 NADH 亏缺,所有合成代谢受阻,活性的动态膜结构不能维持,代谢方向趋于水解,最后产生细胞自溶^[10]。

由于我国柑橘资源丰富,廉价易得,从天然防腐剂取代人工防腐剂趋势来看,柑橘具有较好的利用价值。且柑橘中各物质的提取工艺相对简单,具有橙香气,所以根据其对微生物的抑制作用,可成为一种新型的果味生物防腐剂。

参考文献

- [1] 叶兴乾. 柑桔加工与综合利用[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.
- [2] 马亚琴,孙志高,吴厚玖,等. 响应面法优化提取甜橙皮渣中果胶的工艺[J]. 食品科学,2010,31(14):10-13.
- [3] 黄来发. 食品增稠剂[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000.
- [4] 张火云. 从柑橘皮中提取果胶工艺条件研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(4):73-76.
- [5] 陈林林,米强,辛嘉英,等. 柑橘皮精油成分分析及抑菌活性研究[J]. 食品科学,2010,31(17):25-28.
- [6] 刘晓军. 柑橘加工副产品加工利用[J]. 农产品加工,2007(11):29-30.
- [7] 沈妍,傅瑜,陈健初,等. 柑橘精油在食品中的抗菌应用[J]. 食品工业科技,2009,30(6):315-318.
- [8] 张丽杰,赵天涛,全学军,等. 柑橘皮渣粗提物的抑菌研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(4):73-76.
- [9] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京:科学出版社,2001:210-215.
- [10] 吴京平. 新型微生物源天然食品防腐剂及其抑菌性能[J]. 北京联合大学学报(自然科学版),2011,25(1):55-58.

Study on Antimicrobial Properties of the Extracts from Citrus Peels

YUE Jing¹, ZHU Zhi-cheng², JIANG Shui³

(1. College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142; 2. Seeds Administration Bureau of Liaoning Province, Shenyang, Liaoning 110034; 3. Shenyang Hongmei Group, Shenyang, Liaoning 110026)

Abstract: The antimicrobial properties of the extracts from citrus peels by different concentrations with the help of antimicrobial experiments on different strains were discussed. The results showed that the extracts from citrus peels had certain inhibition on *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*, however had no inhibition on *Penicillium*. Among them, *Micrococcus luteus* had the lowest MIC and MBC. It also showed that *Micrococcus luteus* was the most sensitive to the extracts from citrus peels. At the same time, the antibacterial mechanisms were analyzed through the variations on the growth curve of each bacteria after adding the extracts from citrus peels. It could provide basis and reference for researching a new biological preservative.

Key words: citrus peel; antimicrobial property; preservative