

鼠尾藻多酚分级组分的抑菌活性研究

郭 奇^{1,2} 魏玉西¹ 殷邦忠² 刘 淇^{2*} 刘 蕾¹

(¹青岛大学生物系, 266071)

(²中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 采用平板生长抑制法对鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* kuntze 多酚化合物各分级组分进行抑菌活性研究。结果表明,在一定浓度范围内各分级组分对副溶血弧菌、哈维氏弧菌、沙蚕弧菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鳃弧菌、溶藻弧菌和四联微球菌等受试菌株均有抑菌活性。其中,分级组分 I ($Mr < 5.0 \times 10^3$) 的抑菌效果优于其他组分,对副溶血弧菌、哈维氏弧菌和沙蚕弧菌的最低抑菌浓度(MIC)值为 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鳃弧菌和溶藻弧菌的 MIC 值为 1 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$,对四联微球菌的 MIC 值为 3 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。另外,组分 I ($Mr < 5.0 \times 10^3$) 显示出较好的热稳定性,在 pH 3~4 时对受试菌的抑菌活性最强。

关键词 鼠尾藻 褐藻多酚 抑菌活性

中图分类号 Q949.206 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)01-0117-05

Study on the antimicrobial activity of different fractions of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* kuntze

GUO Qi^{1,2} WEI Yu-xi¹ YIN Bang-zhong² LIU Qi^{2*} LIU Lei¹

(¹ Department of Biology, Qingdao University, 266071)

(² Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The antimicrobial activity of different molecular-weight fractions of phlorotannins from *Sargassum thunbergii* kuntze was screened by plate growth inhibition assay. The results indicated that all the fractions of phlorotannins can inhibit the growth of tested microorganisms including *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio nereis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* and *Micrococcus tetragenus*. Among them, the antibacterial activity of the lowest molecular-weight fraction I ($Mr < 5.0 \times 10^3$) of phlorotannins was the best with the minimum inhibition concentration (MIC) values against the tested microorganisms above as 900, 900, 900, 1 800, 1 800, 1 800, 1 800 and 3 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. Additionally, phlorotannins from *S. thunbergii* kuntze showed excellent thermal stability, and the best antimicrobial activity to the tested bacteria was in pH 3~4.

KEY WORDS *Sargassum thunbergii* kuntze Phlorotannins Antibacterial activity

鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* kuntze 是暖温带海藻,隶属于褐藻门、无孢子纲、马尾藻科、马尾藻属,是我国沿海常见的野生种。由于其具有软坚散结、利尿消肿和清热化痰之功效,被收载于《中国海洋药物辞典》(姜

公益性行业(农业)专项(2009030300)和青岛市科技计划项目(No. 06-2212-JCH)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuqi@ysfri. ac. cn

收稿日期: 2009-10-24; 接受日期: 2009-11-26

作者简介: 郭 奇(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事微生物的检测与控制研究。E-mail: guoqi263@163. com

凤梧等 1993)。研究表明,鼠尾藻中所含的由间苯三酚作为单体组成的褐藻多酚类物质(分子量最高可达 650 kD),具有许多生物活性,如抗氧化(魏玉西等 2003)、抗凝血(魏玉西等 2007;李敬等 2007)、抗肿瘤(魏玉西等 2008)和化学防御(Targett *et al.* 1998)等,但国内外学者对其抑菌活性研究的报道较少。本文在对鼠尾藻多酚按分子量大小分级的基础上,就各个分级组分进行抑菌活性筛选,并研究了其抑菌谱、最低抑菌浓度(MIC)、热稳定性及其最适 pH 值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鼠尾藻

鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* kuntze, 2008 年 8~9 月采集于青岛太平角海域潮间带,由中国科学院海洋研究所陆保仁研究员鉴定。采集后,除去泥沙及附生生物,淡水冲净后冷冻保存。

1.1.2 供试菌种

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、枯草杆菌 *Bacillus subtilis*、四联微球菌 *Micrococcus tetragenus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens*、鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*、啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 由青岛大学生物系微生物实验室提供。副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、溶藻弧菌 *V. alginolyticus*、哈维氏弧菌 *V. harveyi* 和沙蚕弧菌 *V. nereis* 由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。

1.1.3 主要仪器

Millipore Labscale-01821 切向流超滤系统由美国 Millipore Bioprocess Division Billerica Massachusetts 生产, Tu-1810 紫外可见分光光度计由北京普析通用仪器有限责任公司生产。

1.2 方法

1.2.1 多酚化合物的提取

鼠尾藻藻体经解冻、去除根部后经组织捣碎机破碎后称得样品 7.5 kg,用 85%乙醇溶液提取得粗提液。经减压蒸馏除去乙醇后,过滤,所得滤液分别用 1/2 体积乙醚和氯仿各洗涤两次,静置分层。弃去有机相,水相减压蒸馏(浓缩)、醇析(除甘露醇)再减压蒸馏(除乙醇)后,得鼠尾藻多酚精提液(魏玉西等 2002)。将此精提液用 Labscale™ TFF System 进行超滤分级、减压浓缩得按分子量大小分成的 5 个分级组分:组分 I ($Mr < 5.0 \times 10^3$),组分 II ($5.0 \times 10^3 < Mr < 1.0 \times 10^4$),组分 III ($1.0 \times 10^4 < Mr < 5.0 \times 10^4$),组分 IV ($5.0 \times 10^4 < Mr < 1.0 \times 10^5$),组分 V ($Mr > 1.0 \times 10^5$)。用 AOAC(1970)的标准分析方法,即 Folin-Denis 试剂在碱性条件下与多酚类物质形成蓝色复合物后,在 709 nm 波长作比色分析,以间苯三酚为标准绘制标准曲线,由此计算出褐藻多酚的相对含量(严小军 1996),组分 I~IV 所得多酚比例分别为 14.64%、25.68%、12.10%、9.76% 和 37.87%。将各分级组分分别配成一定浓度溶液,即为供试样品,4℃保存。另外,由于分子量最小的分级组分可能含有氯化钠等小分子化合物,故配制 5%氯化钠作对照。实验前,取各供试样品经 0.22 μm 孔径无菌过滤器过滤除菌,用于以下实验。

1.2.2 培养基制备

牛肉膏蛋白胨琼脂(沈萍等 1999):牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15 g 和蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0~7.2,该培养基用于培养金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联微球菌、大肠杆菌、痢疾志贺氏菌和荧光假单胞菌。

ZoBell2216E 琼脂(张士瑾等 1998):蛋白胨 5 g、酵母膏 1 g、磷酸铁 0.1 g、琼脂 15 g 和过滤陈海水 1 000 ml,调 pH 为 7.6~7.8,该培养基用于培养副溶血弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌和沙蚕弧菌。

PDA 培养基(沈萍等 1999):马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g 和蒸馏水 1 000 ml,该培养基用于培养灰葡萄孢。

麦氏琼脂(沈萍等 1999):葡萄糖 1 g、氯化钾 1.8 g、酵母浸膏 2.5 g、醋酸钠 8.2 g、琼脂 20 g 和蒸馏水 1 000 ml,该培养基用于培养啤酒酵母。

1.2.3 含供试菌平板的制备

取活化好的菌种,金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、四联微球菌、大肠杆菌、痢疾志贺氏菌、荧光假单胞菌和啤酒酵母用无菌水,副溶血弧菌、鳗弧菌和溶藻弧菌用无菌海水,制成一定浓度($10^8 \sim 10^9$ CFU/ml)的菌悬液。取菌悬液 0.2 ml,加至无菌平皿中,立即倒入融化后冷却至 45°C 左右的培养基 15 ml,随即快速而轻巧地晃动平皿,使菌液与培养基充分混匀后平置,取活化好的灰葡萄孢,接于倒好平皿的 PDA 培养基中央,备用。

1.2.4 不同级组分鼠尾藻多酚的抑菌活性筛选

参照 Bulet 等(1991)方法并作适当改进。用无菌玻璃吸管在含菌平板上打直径 3 mm 的孔穴,每孔穴加样品 10 μl ,平行做 3 组。其中,样品浓度都为 7 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。加样后,枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、四联微球菌和痢疾志贺氏菌置于 37°C 培养 24 h,量取抑菌圈直径(扣除所打孔径);荧光假单胞菌、副溶血弧菌、鳗弧菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、沙蚕弧菌和啤酒酵母置于 28°C 培养 48 h,灰葡萄孢置于 28°C 培养 3 d,量取抑菌圈直径(扣除所打孔径),取所测的抑菌圈直径的平均值。

1.2.5 最低抑菌浓度(MIC)的测定

平板抑菌圈法测定采用二倍稀释法,将鼠尾藻多酚抑菌活性最强分级组分分别稀释成浓度为 7 200、3 600、1 800、900、450、225、112.5、56.25、28.125 和 14.162 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的多酚溶液,打孔法测定抑菌圈直径大小,平行做 3 组,取浓度最小有抑菌圈的多酚溶液为最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.6 加热处理对鼠尾藻多酚抑菌活性的影响

取浓度为 3 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抑菌活性最强的鼠尾藻多酚分级组分,分别经温度 30、50、70、90 和 100°C 恒温 30 min 处理后,立即置于水浴中冷却,室温 25°C 为对照组,打孔法测定抑菌圈直径大小,平行做 3 组,取所测的抑菌圈直径的平均值。

1.2.7 pH 值对鼠尾藻多酚抑菌活性的影响

取浓度为 3 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抑菌活性最强的鼠尾藻多酚分级组分,调节 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、7.0 和 9.0,该分级组分(pH 3.5)为对照组,打孔法测定抑菌圈直径大小,平行做 3 组,取所测的抑菌圈直径的平均值。

表 1 浓度为 7 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鼠尾藻多酚不同分级组分的抑菌效果(抑菌圈直径以 mm 计)

Table 1 Results of antibacterial activity of different fractions of phlorotannins at 7 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

菌株 Strains	分级组分 Fraction components				
	I	II	III	IV	V
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	15	12	10	8	8
枯草杆菌 <i>B. subtilis</i>	—	—	—	—	—
四联微球菌 <i>M. tetragenus</i>	10	8	5	—	—
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	18	15	12	10	9
痢疾志贺氏菌 <i>S. dysenteriae</i>	14	15	14	12	10
荧光假单胞菌 <i>P. fluorescens</i>	—	—	—	—	—
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	23	22	20	17	16
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	8	7	7	5	5
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	9	8	7	6	6
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	21	20	15	11	13
沙蚕弧菌 <i>V. nereis</i>	22	21	20	17	17
啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	—	—	—	—	—
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	—	—	—	—	—

2 结果

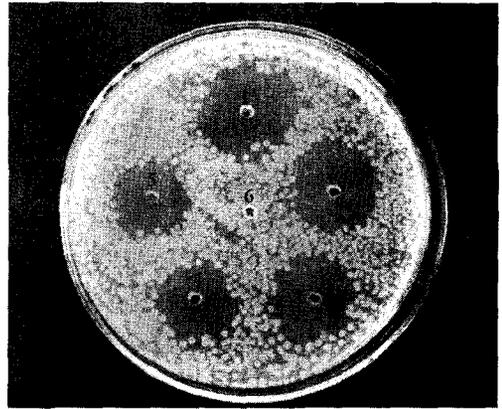
2.1 鼠尾藻多酚不同分级组分的抑菌谱

鼠尾藻多酚不同分级组分对受试菌的抑菌效果见表 1 和图 1。由表 1 可见,各分级组分对枯草杆菌、荧

光假单胞菌、啤酒酵母和灰葡萄孢没有抑菌效果,对几种海洋细菌如副溶血弧菌、沙蚕弧菌和哈维氏弧菌的抑菌效果最明显。从总体上看,各分级组分对革兰氏阴性菌的抑菌效果要好于革兰氏阳性菌,并且随着多酚分子量的增大,其抑菌圈逐渐变小。其中,分级组分 I ($M_r < 5.0 \times 10^3$) 的抑菌活性最强,尤其对副溶血弧菌的抑菌效果最为明显(图 1)。因此,以下实验均选用分级组分 I 做进一步研究。

2.2 分级组分 I 最低抑菌浓度(MIC)的测定

分级组分 I 最低抑菌浓度测定结果见表 2。结果显示,鼠尾藻多酚分级组分 I 对痢疾志贺氏菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和沙蚕弧菌的 MIC 值为 $900 \mu\text{g/ml}$,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、鳗弧菌和溶藻弧菌的 MIC 值为 $1800 \mu\text{g/ml}$,对四联微球菌的 MIC 值为 $3600 \mu\text{g/ml}$ 。



1. I 2. II 3. III 4. IV 5. V 6. 5%NaCl

图 1 鼠尾藻多酚各分级组分对副溶血弧菌的抑制效果
Fig. 1 Inhibition of different fractions of phlorotannins from *S. thunbergii* kuntze to *V. parahaemolyticus*

表 2 分级组分 I 对受试菌的最低抑菌浓度(MIC)

Table 2 Minimum antibacterial concentrations of fraction I of phlorotannins from *S. thunbergii* kuntze

菌株 Strains	最小抑菌浓度 MIC($\mu\text{g/ml}$)	菌株 Strains	最小抑菌浓度 MIC($\mu\text{g/ml}$)
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	1 800	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	1 800
四联微球菌 <i>M. tetragenus</i>	3 600	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1 800
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	1 800	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	900
痢疾志贺氏菌 <i>S. dysenteriae</i>	900	沙蚕弧菌 <i>V. nereis</i>	900
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	900		

2.3 加热处理对鼠尾藻多酚分级组分 I 抑菌活性的影响

由图 2 可知,鼠尾藻多酚分级组分 I 经加热处理后对不同细菌的抑菌作用不同,对同一种细菌的影响较小。但从总体效果来看,加热处理对其抑菌活性的影响较小,说明其热稳定性较好。

2.4 pH 值对鼠尾藻多酚分级组分 I 抑菌活性的影响

由图 3 可知,鼠尾藻多酚分级组分 I 对于各种受试菌都是在 pH 为 3~4 时抑菌效果最好,随着 pH 值的增大,其对各种受试细菌的抑菌效果减弱。其中,副溶血弧菌受 pH 值的影响最大,在 pH 值为 3.5 时抑菌效果最强。

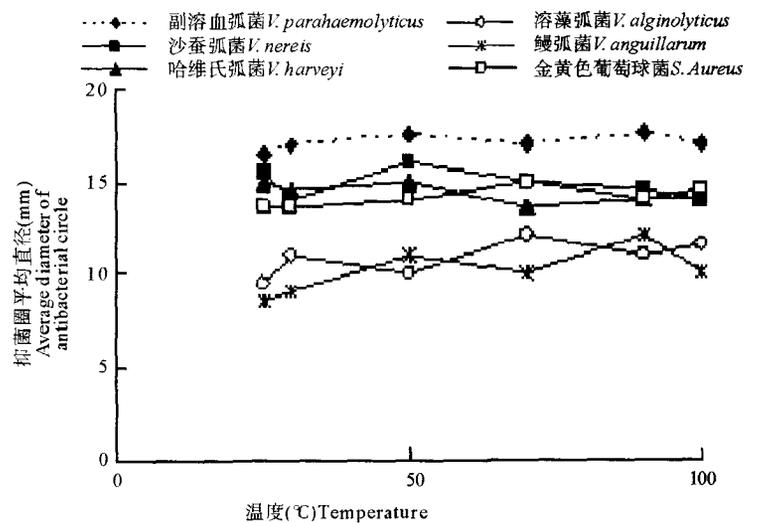


图 2 不同温度加热处理对褐藻多酚抑菌活性的影响
Fig. 2 Effects of different temperature on antibacterial activity of fraction I of phlorotannins from *S. thunbergii* kuntze

3 讨论

本文所得结果与林超等(2006)结果有所不同。该文献中仅将褐藻多酚精提液对蒸馏水透析,得鼠尾藻多酚透析内液(分子量 > 10 000)和透析外液(分子量 < 10 000),发现抑菌活性的大小与分子质量密切相关。其中,透析内液对两种海洋弧菌——溶藻弧菌和鳗弧菌、透析外液对两种海洋弧菌——鳗弧菌和副溶血弧菌的抑制效果尤其明显。本试验得到的结论是分子量小于 5 000 的鼠尾藻多酚分级组分 I 的抑菌效果优于其他分级组分,且对副溶血弧菌、哈维氏弧菌和沙蚕弧菌的抑制效果尤其明显。推测造成这种不同的原因可能与多酚分子量的分级程度不同有关,具体原因尚有待进一步探明。与茶多酚相比较(董金甫等 1995;唐玉芳等 2005),褐藻多酚同样对霉菌无抑菌作用。此外,文献中测得的茶多酚对大部分受试菌最低抑菌浓度为 0.08% 左右或低于 1.0 g/L,经换算可知褐藻多酚与茶多酚的 MIC 相近。海洋弧菌是引起海水养殖鱼类细菌性疾病的最主要的病原菌之一,由弧菌引起的疾病,流行面积广,发病率高,给养殖业造成了巨大的危害(邹文政等 2004;盖春蕾等 2008)。作者研究的结果表明,作为海洋植物天然抗菌活性成分的鼠尾藻多酚,对多种海洋弧菌具有显著的抑制作用,说明其对海产动物病害的防治具有潜在的应用价值,有待进一步研究与开发。

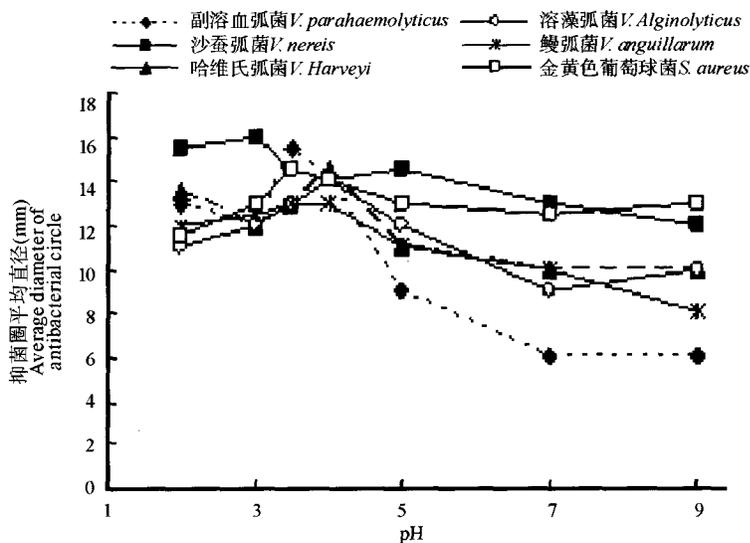


图 3 不同 pH 条件下鼠尾藻多酚分级组分 I 的抑菌活性
Fig. 3 Effects of different pH values on antibacterial activity of fraction I of phlorotannins from *S. thunbergii* kuntze

参 考 文 献

- 李 敬,魏玉西,杜桂彩,胡迎芬,李 丽. 2007. 鼠尾藻多酚的抗凝血活性研究. 中药新药与临床药理, 18(3):191~194
- 沈 萍,范秀榕主编. 1999. 微生物学实验(第三版). 北京:高等教育出版社,214~230
- 严小军. 1996. 中国常见海藻的多酚含量测定. 海洋科学集刊, 37:61~65
- 邹文政,鄢庆彬,林文雄. 2004. 大黄鱼病原弧菌拮抗菌筛选. 海洋科学, 28(3):5~8
- 张士瑾,范 晓主编. 1998. 海洋生物技术原理和应用. 北京:海洋出版社,10~11
- 林 超,于曙光,郭道森,魏玉西,艾桂花. 2006. 鼠尾藻中褐藻多酚化合物的抑菌活性研究. 海洋科学, 30(3):94~97
- 姜凤梧,张玉顺. 1993. 中国海洋药物辞典. 北京:海洋出版社
- 盖春蕾,李 健,刘 淇,王 群. 2008. 二氟沙星对 3 种海洋弧菌的抗菌后效应研究. 海洋水产研究, 29(2):97~101
- 魏玉西,李 敬,汪靖超,齐宏涛. 2007. 鼠尾藻多酚及其各组分的抗凝血活性筛选. 中国生化药物杂志, 28(4):227~229
- 魏玉西,孙 洵,王长云,王春波. 2008. 鼠尾藻多酚的抗肿瘤活性研究. 中草药, 39(1):93~95
- 魏玉西,于曙光. 2002. 两种褐藻乙醇提取物的抗氧化活性研究. 海洋科学, 26(9):49~51
- 董金甫,李瑶卿,洪绍梅. 1995. 茶多酚(TPP)对 8 种致病菌最低抑制浓度的研究. 食品科学, 16(1):6~12
- 唐裕芳,张妙玲,冯 波,陈 权,刘新乐,邓孝平. 2005. 茶多酚的抑菌活性研究. 浙江林学院学报, 22(5):553~557
- Bulet, P., Cociancich, S., and Dimarcq, J. 1991. Insect immunity. Isolation from a Coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. Biol. Chem., 266(36): 24 520~24 525
- Targett, N. M., and Arnold, T. M. 1998. The role of algal phlorotannins in marine plant herbivore interactions. J. Phycol. 34 (2):195~205
- Wei, Y. X., Li, Z. E., Hu, Y. F., and Xu, Z. H. 2003. Inhibition of mouse lipid peroxidation by high molecular weight phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. J. Appl. Phycol. 15:507~511