

## 野生葡萄枝条多酚粗提物抑菌活性研究

万力<sup>1</sup>, 郭志君<sup>1</sup>, 闵卓<sup>1</sup>, 房玉林<sup>1,2\*</sup>

(1. 西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**以连山葡萄、毛葡萄和山葡萄冬剪枝条为研究对象,以栽培品种赤霞珠为对照,采用牛津杯法测定其多酚粗提取物抑菌能力和连续稀释法测定其最小抑菌浓度。对4种细菌的抑制作用试验结果表明,3种野生葡萄枝条多酚粗提取物对枯草芽胞杆菌都有较好的抑制效果,其中连山葡萄最小抑菌浓度(MIC)  $216 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为最小。山葡萄对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、破伤风杆菌的抑菌能力比其他野生葡萄强,抑菌平均值(MIC)分别为  $934$ 、 $584$ 、 $1\,210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对2种真菌试验表明,山葡萄枝条多酚粗提取物对黄曲霉和青霉的抑制能力均为最强,对这2种真菌的最小抑菌浓度分别为  $383 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $766 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;4种葡萄枝条多酚粗提取物对黄曲霉抑制效果都较好。表明中国野生葡萄枝条多酚粗提取物有较强的抑菌能力,尤其以山葡萄枝条多酚抑菌能力最好。

**关键词:**野生葡萄;枝条;多酚类物质;抑菌活性

**中图分类号:**S663.1

**文献标志码:**A

**文章编号:**1001-7461(2014)01-0122-05

### Antimicrobial Activities of Phenolics from Chinese Wild Grape Canes

WAN Li<sup>1</sup>, GUO Zhi-jun<sup>1</sup>, MIN Zhuo<sup>1</sup>, FANG Yu-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Anti-microbial activities and minimum concentrations (MIC) of the phenolic extracts from the branches of three Chinese wild vitis species (*Vitis luochengensis* var. *tomentoso-nerva*, *Vitis quinquangularis* and *Vitis amurensis*) and cultivated species were investigated. The bacteria were *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium* and *Aspergillus flavus*. The wild grape cane extracts exhibited excellent antibacterial activity. The MICs of the phenolic extract from *V. amurensis* against *E. coli*, *S. aureus* and *C. tetani* were  $934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $584 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and  $1\,210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. And MICs against *Penicillium* and *A. flavus* were  $766 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $383 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. It was concluded that wild grapevine cane, especially the *V. amurensis* cane, had higher antimicrobial activities, and may be developed as a good natural antibacterial reagent.

**Key words:** wild grape; cane; polyphenols; antibacterial activity

多数植物多酚对多种细菌、真菌的抑制都有明显效果,其最小抑菌浓度较低,且基本在相应的抑制浓度下不会影响到动物的生长<sup>[1-2]</sup>。植物多酚抗菌机制目前尚不完全清楚,主要机制是多酚能特异性地凝固细菌蛋白、破坏细菌细胞膜结构、与细菌遗传

物质DNA结合,从而改变细菌生理抑制生长<sup>[3-4]</sup>。S. Pettia<sup>[5]</sup>等指出植物多酚有抑制肠道细菌及口腔细菌能力。此外,茶多酚对口腔主要致龋菌——链球菌突变株也有抗菌的效果。茶多酚能杀灭肉毒杆菌及其孢子,抑制细菌外毒素的活性,对引起腹泻、

收稿日期:2013-05-26 修回日期:2013-07-22

基金项目:国家林业局“948”项目(2009-04-09);国家现代农业(葡萄)产业技术体系项目(nycytx-30-2p-04);西安市科技创新支撑计划(NC10003);农业部杨陵苗木繁殖基地项目。

作者简介:万力,女,硕士研究生,研究方向:葡萄与葡萄酒。E-mail:lilywanhp@126.com

\* 通信作者:房玉林,男,教授,博士,研究方向:葡萄与葡萄酒。E-mail:fangyulin@nwsuaf.edu.cn

呼吸道和皮肤感染的各种病原菌也具有抗菌作用; H. Y. Wang<sup>[6]</sup>等指出烟草叶多酚是很好的抑菌剂, 何带桂<sup>[7]</sup>等指出血桐叶多酚对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、藤黄微球菌有很好的抑制作用。国内外对葡萄多酚抑菌性做了大量试验, 李建慧<sup>[8]</sup>等采用滤纸圆片法、牛津杯测试法以及扩散法研究了葡萄多酚对 10 种细菌、2 种酵母、5 种霉菌等在食品中常见的微生物和病原菌都有抑制作用。N. H. Yim<sup>[9]</sup>研究发现山葡萄果梗多酚提取物可以抑制肠道和口腔细菌。V. Katalini<sup>[10]</sup>等研究葡萄皮提取多酚物对革兰氏阳性菌有较好的抑制效果。但中国野生葡萄枝条抑菌性研究还未见报道。

为寻找出更多的抑菌效果好的酚类物质, 科研工作者扩大细菌真菌种类的尝试, 以更充分地证明植物多酚是一种很有开发前景的天然抑菌剂。

目前多酚的抑菌试验方法主要有琼脂扩散法和连续稀释法, 其中琼脂扩散法又可分为滤纸片法、牛津杯法和打孔法; 连续稀释法分为液体培养稀释法和固体培养基稀释法<sup>[11]</sup>。本试验采用牛津杯对多酚类物质含量较高的连山葡萄(*Vitis luochengensis* var. *tomentoso-nerva*), 毛葡萄(*Vitis quinquangularis*) 和山葡萄(*Vitis amurensis*) 枝条, 以赤霞珠

(Cabernet Sauvignon) 枝条作对照, 对 4 种细菌(大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、破伤风杆菌(*Clostridium tetani*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 和 2 种真菌(青霉菌 *Penicillium* 和黄曲霉菌 *Aspergillus flavus*) 进行抑制试验, 并讨论其最小抑菌浓度(MIC) 和多酚提取物是否有抑菌效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 以多酚含量高的连山葡萄、毛葡萄和山葡萄枝条 3 种野生葡萄, 以赤霞珠葡萄为对照。采用随机取样方法采集 1 年生冬剪枝条, 连山葡萄枝条从江西省赣州市崇义县君子谷野生葡萄资源圃采集, 毛葡萄枝条从广西省都安县密洛陀野生葡萄酒有限公司葡萄基地采集, 山葡萄枝条从陕西省宝鸡市眉县太白山麓采集, 赤霞珠葡萄枝条由位于陕西省杨凌区的西北农林科技大学葡萄酒学院教学葡萄园采集。

供试菌种由西北农林科技大学动物科学院和生命学院提供(表 1)。

表 1 抑菌试验菌种  
Table 1 Strains of antibacterial experiments

菌种名称	生物学特点	致病性
大肠杆菌(G-)	革兰氏阴性短杆菌大小 0.5×1~3μm、周身鞭毛, 能运动, 无芽孢, 能发酵多种糖类产酸、产气 <sup>[12]</sup>	广泛分布在自然界中, 主要附生在人或动物的肠道里, 多数为非致病, 但是也有少数的大肠杆菌具有毒性, 可引起严重疾病
金黄色葡萄球菌(G+)	为一种革兰氏阳性的球型细菌显微镜下排列成葡萄串状, 金黄色葡萄球菌无芽孢、鞭毛, 大多数无荚膜 <sup>[13]</sup>	是常见的引起食物中毒的致病菌
破伤风杆菌(G+)	一种革兰氏阳性厌氧芽孢杆菌	广泛存在于泥土、粪便之中, 对环境有很强的抵抗力, 是一种特殊的创伤感染菌, 在体内产生外毒素可危及生命
枯草芽孢杆菌(G+)	革兰氏阳性菌产生芽孢, 需氧或兼性厌氧, 大多数有动力, 无荚膜 <sup>[14]</sup> 。	可污染食物, 对食草动物及人都有一定的危害
青霉(F.)	属于多细胞分枝, 营养菌丝颜色不固定, 明显特征是气生菌丝可继续指状分枝呈扫帚状 <sup>[15]</sup>	引起水果等食品霉变, 青霉菌对于健康的人类来说都是不会引发感染的非病原性霉菌
黄曲霉(F.)	曲霉菌属丝状真菌, 气生菌丝黄绿色	人类的病原, 会造成肺的曲菌症, 及其他部位的感染, 曲霉菌的孢子是一种过敏原

1.1.2 试剂 焦没食子酸、乙醇、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.85% 无菌生理盐水、营养琼脂培养基(蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 20 g, pH 7.4, 蒸馏水定容至 1 000 mL)、PDA 培养基<sup>[16]</sup>。

Folin-Ciocalteu 试剂: 在 1 L 磨口回流蒸馏器中加入钨酸钠(Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>) 100 g, 钼酸钠(Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) 25 g, 蒸馏水 700 mL, 质量分数 85% 的磷酸 50 mL, 体积分数为 37% 盐酸(HCl) 100 mL。冷凝回流 10 h 后, 添加 150 g 硫酸锂(Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 和数滴液溴(Br<sub>2</sub>),

取下冷凝管, 重新加热至沸并维持 15 min。除去多余溴之后冷却, 补足蒸馏水至 1 000 mL, 用棕色试剂瓶装好, 于冰箱中冷藏备用<sup>[17]</sup>。

1.2 仪器

UV-1700 紫外可见分光光度计, SHIMADZU 公司; 冷冻高速离心机, 美国科峻仪器公司; SW-CJ-2FD 型洁净工作台; YX0602 型自动蒸汽灭菌器, 山东新华器械股份有限公司; 智能生化培养箱 LRH-150-S, 广东省医疗器械厂; 旋转蒸发仪 BUCHI-

B408, 瑞士 BUCHI 公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 万分之一电子天平, 日本岛津公司; pH 计; 电子万用炉。

### 1.3 方法

1.3.1 葡萄枝条多酚提取方法 将采集的葡萄枝条在  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  自然干燥至恒重后研磨成直径  $< 1\text{ mm}$  的粉末。精确称取  $2.50\text{ g}$  枝条粉末, 添加乙醇提取剂在  $100\text{ Hz}$  超声波条件下进行浸提<sup>[18]</sup> (乙醇溶液体积分数  $60\%$ , 浸提温度  $20^\circ\text{C}$ , 料液比  $1:8$ , 超声提取时间  $30\text{ min}$ , 提取  $2$  次), 收集提取液, 离心过滤后合并滤液, 于  $-4^\circ\text{C}$  环境中保存。

1.3.2 抑菌直径测定方法 将多酚粗提液浓缩。各受试菌体分别以对应培养基进行抗菌活性测定。金黄色葡萄球菌(G+)、枯草芽孢杆菌(G+)、大肠杆菌(G-)、破伤风杆菌(G+)用营养琼脂培养基; 青霉(F-)、黄曲霉(F-)用 PDA 培养基。配置对照药液。细菌: 取庆大霉素  $0.5\text{ mg}$  加入  $1\text{ mL}$  蒸馏水, 摇匀, 配成浓度为  $5\%$  的对照药液; 青霉、曲霉: 取制霉菌素  $0.5\text{ mg}$  加入  $1\text{ mL}$  蒸馏水, 摇匀, 配成浓度为  $5\%$  的对照药液。

牛津杯法<sup>[19]</sup>测定多酚粗提取物抑菌能力。用光电比浊计数法<sup>[20]</sup>配制浓度为  $105 \sim 106\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  菌悬液。吸取  $100\text{ }\mu\text{L}$  菌悬液于已做好的平板上, 轻轻用涂布棒涂均, 放置约  $5\text{ min}$ , 用无菌镊子夹取已高压蒸汽消毒并烘干的牛津杯(内径  $6\text{ mm}$ 、外径  $7.2\text{ mm}$ 、高  $6\text{ mm}$  的圆形小管), 轻轻平置于已涂布菌液的培养皿表面, 轻轻加压, 使其与培养基接触无空隙。每个培养皿内放  $3$  支牛津杯作为  $3$  组平行, 分别小心仔细地加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  (枝条粉末质量浓度为  $62.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的山葡萄、毛葡萄、连山葡萄枝条多酚粗提取溶液的浓缩液, 以生理盐水为空白对照, 制霉菌素做真菌的阳性对照, 庆大霉素做细菌的阳性对照, 用  $40\%$  乙醇做阴性对照以去除提取液对抑菌试验的影响。

将已经加样的平板倒置放入  $37^\circ\text{C}$  恒温箱, 青霉、

曲霉放置在  $28^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中, 在细菌培养  $24\text{ h}$ , 青霉、曲霉培养  $48\text{ h}$  后, 测量抑菌圈直径的大小。

1.3.3 抗菌活性数据分析 用游标卡尺测量透明圈的直径, 十字交叉法测量, 取横竖平均值为一个数值, 测  $3$  个平行值; 抑菌圈直径的有无和大小即表明中国野生葡萄枝条多酚粗提液抑菌活性的强弱。设置的阳性对照用来与化学药物作比较, 阴性对照用来去除溶剂的影响。所有数据均采用平均值  $\pm$  标准差形式。

1.3.4 最小抑菌浓度的测定 总酚(TP)的测定采用 Folin-Ciocalteu<sup>[21]</sup> 法。取稀释  $2$  倍的粗提液  $0.2\text{ mL}$ , 加入 FCR(Folin-Ciocalteu 试剂)  $0.4\text{ mL}$ ,  $10\%$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $2.0\text{ mL}$ , 最后加入  $10\text{ mL}$  水, 避光反应  $2\text{ h}$  后测定  $750\text{ nm}$  处的吸光值。以焦没食子酸做标准曲线。

采用试管稀释法<sup>[22]</sup>测定最小抑菌浓度(MIC), 取  $10$  支无菌小试管, 其中  $2$  支试管标记为空白对照(生理盐水)和阴性对照( $40\%$  乙醇), 其余  $8$  支试管编号  $1 \sim 8$  号试管, 在各管中加入牛肉浸膏液体培养基  $2\text{ mL}$ 。先在  $1$  号试管加入浓缩  $2$  倍的多酚粗提液  $1\text{ mL}$ , 混匀后取  $1\text{ mL}$  加入  $2$  号管, 将  $2$  号管液体混匀后取  $1\text{ mL}$  加入  $3$  号管。依次类推稀释至  $8$  号试管混匀, 再从  $8$  号管吸取  $1\text{ mL}$  液体弃去, 形成递减梯度。在各管中加入事先制备好的菌悬液  $100\text{ }\mu\text{L}$ , 混匀后放至培养箱中  $37^\circ\text{C}$  培养  $24\text{ h}$ , 将  $10$  支试管逐支摇匀, 肉眼观察, 以无细菌生长的多酚最低浓度为最低抑菌浓度 MIC。

1.3.5 数据统计分析 分析采用 SAS 8.1 作方差分析, 显著性差异采用 Duncan 多重检验法( $p < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄枝条粗提液对细菌的抑制菌圈直径

$3$  种野生葡萄枝条多酚粗提液和赤霞珠葡萄枝条多酚粗提取液(枝条干粉质量浓度为  $62.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对  $4$  种细菌的抑菌圈大小测定结果见表 2。

表 2 葡萄枝条粗提液对细菌的抑制菌圈直径

Table 2 Antibacterial activities of wild grape canes against bacteria

mm

菌种	连山葡萄	毛葡萄	山葡萄	赤霞珠	庆大霉素/( $400\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	乙醇( $40\%$ )
大肠杆菌	$9.24 \pm 1.00\text{c}$	$11.64 \pm 1.05\text{b}$	$13.13 \pm 0.94\text{b}$	$8.70 \pm 0.00\text{c}$	$> 20.00$	0
金黄葡萄球菌	$10.57 \pm 0.00\text{b}$	$12.13 \pm 1.20\text{ab}$	$12.69 \pm 0.37\text{b}$	$12.04 \pm 0.95\text{ab}$	$> 20.00$	0
破伤风杆菌	$11.49 \pm 0.56\text{b}$	$11.90 \pm 1.01\text{b}$	$15.48 \pm 0.57\text{a}$	$10.75 \pm 0.54\text{b}$	$> 20.00$	0
枯草芽孢杆菌	$16.00 \pm 1.13\text{a}$	$13.50 \pm 0.50\text{b}$	$16.45 \pm 0.64\text{a}$	$9.90 \pm 0.00\text{c}$	$> 20.00$	0

注: 表中的数值为  $3$  次测定的平均值  $\pm$  标准差; 同一列内数据相比较, 数据后字母不同表示经 Duncan 检验在  $0.05$  水平上差异显著。

$4$  种葡萄对  $4$  种细菌的抑制效果为: 连山葡萄枝条对枯草芽孢杆菌抑制能力显著高于其他  $3$  种细

菌; 毛葡萄枝条对  $4$  种细菌抑制效果均未达到显著性水平; 山葡萄对破伤风杆菌和枯草芽孢杆菌抑制

效果显著高于大肠杆菌和金黄葡萄球菌。

一般认为抑菌圈 $<1.3\text{ cm}$ 为低度抑菌、 $1.3\sim 1.9\text{ cm}$ 为中度抑菌、 $>1.9\text{ cm}$ 为高度抑菌<sup>[23]</sup>。所以连山葡萄枝条对枯草芽孢杆菌为中度抑菌,而对其他 3 种菌为低度抑菌。赤霞珠、毛葡萄、山葡萄 3 种枝条,对 4 种细菌的抑菌能力基本为低度水平,只有山葡萄枝条对枯草芽孢杆菌和破伤风杆菌为中度抑菌。因此 4 种葡萄枝条中,山葡萄的抑菌效果显著高于其他葡萄品种。

表 3 葡萄枝条粗提液对真菌的抑制

Table 3 Antibacterial activities of wild grape canes against fungi

菌种	连山葡萄	毛葡萄	山葡萄	赤霞珠	制霉菌素/(200 mg·L <sup>-1</sup> )	乙醇(40%)
青霉	++	+	+++	—	++++++	—
黄曲霉	+++	+++	++++	+++	+++++	—

注:“+”表示菌体生长,多酚具有抑制效果,“—”表示抑菌效果不明显,符号的多少代表效果的强弱。

2.3 葡萄枝条粗提液对细菌的最小抑菌浓度

野生葡萄枝条多酚粗提取物总酚含量如表 4。

表 4 葡萄枝条总酚含量测定结果

Table 4 Content of TP in wild grapevine cane mg·g<sup>-1</sup>

样品	连山葡萄	山葡萄	毛葡萄	赤霞珠
总酚 TP	31.94±1.50	35.74±2.07	33.82±0.57	21.30±0.63

3 种野生葡萄枝条多酚粗提液和赤霞珠葡萄枝条多酚粗提取液对 4 种细菌的最小抑菌浓度测定结果见表 5。

表 5 葡萄枝条粗提液对细菌的 MIC

Table 5 MIC of wild grape canes against bacteria g·L<sup>-1</sup>

菌种	连山葡萄	毛葡萄	山葡萄	赤霞珠	庆大霉素	空白对照
大肠杆菌	2 026	2 026	934	1 270	266.67	长菌
金黄葡萄球菌	790	1 270	584	790	36.57	长菌
破伤风杆菌	2 459	2 459	1 210	2 459	5.85	长菌
枯草芽孢杆菌	216	324	239	324	0.15	长菌

4 种葡萄枝条中,山葡萄枝条对大肠杆菌、金黄葡萄球菌、破伤风杆菌的 MIC 值最小,分别为 943、584、1 210 mg·L<sup>-1</sup>,抑菌能力最强;而连山对枯草芽孢杆菌的抑制效果高于其他野生品种, MIC 值最小,为 216 mg·L<sup>-1</sup>。4 种葡萄枝条抑制枯草芽孢杆菌的能力最好,抑制金黄葡萄球菌能力次之。

2.4 葡萄枝条粗提液对真菌的最小抑菌浓度

3 种野生葡萄枝条多酚粗提液和赤霞珠葡萄枝条多酚粗提取液对 2 种真菌的最小抑菌浓度测定结果见表 6。

表 6 葡萄枝条粗提液对真菌的 MIC

Table 6 MIC of wild grape canes against fungi mg·L<sup>-1</sup>

菌种	连山葡萄	毛葡萄	山葡萄	赤霞珠	制霉菌素	空白对照
青霉(F.)	1 038	1 038	766	1 038	7.41	长菌
黄曲霉(F.)	1 038	1 038	383	1 038	7.41	长菌

4 种葡萄枝条相比,山葡萄枝条对青霉和黄曲

2.2 葡萄枝条粗提液对真菌的抑制菌圈直径

3 种野生葡萄枝条多酚粗提液和赤霞珠葡萄枝条多酚粗提取液(枝条干粉质量浓度为 62.5 g·L<sup>-1</sup>)对 2 种真菌的抑菌能力大小测定结果见表 3。

结果表明,消除乙醇的影响后,所有野生葡萄枝条多酚提取液对黄曲霉的抑菌效果都好于对青霉菌的抑菌效果,其中山葡萄对 2 种真菌的抑菌能力均较好。野生葡萄品种抑菌能力明显高于栽培葡萄品种。

霉的 MIC 值最小,分别为 766、383 mg·L<sup>-1</sup>,抑菌能力最强。而连山葡萄、毛葡萄对 2 种真霉的抑制效果均不明显,测得 MIC 和栽培品种赤霞珠相同。

3 结论与讨论

通过对 4 种细菌的抑制作用试验,枝条多酚对枯草芽孢杆菌的抑菌效果最明显,其中连山葡萄的 MIC 值最小,为 216 mg·L<sup>-1</sup>。而山葡萄枝条的提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、破伤风杆菌的抑菌效果最好,对以上 3 种细菌的平均 MIC 值分别为 934、584、1 210 mg·L<sup>-1</sup>。而毛葡萄,赤霞珠枝条多酚粗提物的抑菌效果一般。

通过对供试真菌的抑菌试验,发现葡萄枝条对黄曲霉的抑制作用较强。相比之下,山葡萄枝条的抑制效果最好,其对黄曲霉的 MIC 为 383 mg·L<sup>-1</sup>,对青霉的 MIC 为 766 mg·L<sup>-1</sup>。此外连山葡萄和毛葡萄枝条对真菌的最小抑菌浓度几乎没有差异, MIC 值为 1 038 mg·L<sup>-1</sup>。

从抑菌效果结果可以看出,野生葡萄枝条多酚类物质抑菌能力均高于栽培品种赤霞珠多酚类物质,尤其山葡萄枝条的抑菌活性明显高于其他品种。

此次选择的抑制细菌,菌体形状类型较丰富,包括革兰氏阳性菌和阴性菌,选择面相对较宽。此 4 种细菌都是食品中的致病菌,测试结果表明,野生葡萄枝条多酚对上述 4 种细菌均有一定的抑制作用,而栽培品种的抑菌效果则不明显。本试验用牛津杯测试法测得的抑菌直径与其他研究试验结果并不完全一致,原因可能是无法一次同时完成所有测定,需分次配制菌悬,因此溶液浓度会有所差别,以致影响试验结果;葡萄多酚粗提液浓缩时也会产生一定误差,虽可尽量减少但还是不可避免。

目前植物多酚类物质的抑菌活性机理并不完全明确,但可以肯定不是单一因素影响,而是多种因素共同作用的结果。有研究表明可能的抑菌途径有:1)植物多酚具有与蛋白质高度结合的基团,也就是常说的多酚收敛性,可以影响蛋白质活性,使微生物不能完成正常代谢过程;2)植物多酚可能与除蛋白质外的微生物生长必需物质相结合,抑制微生物生长从而使其死亡;3)多酚类物质分子具有较强的金属结合能力(分子中有多个邻苯二酚结构),可以使金属离子(铁、铜等)形成沉淀,微生物正常生命活动因而遭到破坏;4)植物多酚对病毒的抑制机理相对复杂,一般认为是多酚分子功能基团与寄主的细胞膜特异识别蛋白或病毒蛋白外壳相结合,病毒失去附着在寄主细胞上的能力所致<sup>[24-26]</sup>。

本次试验结果和以往相关研究结果相差较大。孙红男<sup>[27]</sup>等研究苹果多酚对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度分别为 0.7、0.8、0.5 g·L<sup>-1</sup>,董金甫<sup>[28]</sup>等报道对这 3 种菌的最小抑菌浓度分别为 0.1%、0.08%、0.08%,李建慧<sup>[8]</sup>等测得葡萄多酚对这 3 种菌的最小抑菌浓度分别为 0.3、0.5、0.3~0.1 g·L<sup>-1</sup>。以上结果都证明植物多酚抑菌性很好,但结果间的可比性不高。究其原因,从多酚本身来讲,样品的提取工艺条件(提取液、物料比、时间、温度等)、多酚粗提液的浓缩损失、多酚存放时间都会影响多酚的活性。由于试验条件、试验手段不一致,即使同一药品对同种微生物的抑菌作用试验,结果也会有很大差异;另一重要原因来自菌株,菌株生理活性和抗药性等生理性质会因来源不同而具有较大差异。科研工作者的菌种来源很难统一,所以各报道结果会有较大差别。因此进行植物多酚抑菌活性测定时,可以从两个方面保证试验的准确性和可比性:一是注意植物材料采样的统一、提取方法应科学统一;二是注意菌种的选择,受试菌株应统一参照国家菌种保藏委员会标准<sup>[29]</sup>。

综上所述,野生葡萄枝条有很好的抑菌能力,尤其是山葡萄枝条,是较好的多酚提取物来源,且抑菌效果最佳,作为可能的植物天然抑菌剂其开发前景非常广阔。

## 参考文献:

- [1] 王忠猛,谢江辉,杨晓红,等. 植物多酚的分离、检测及其在抗性领域的应用进展[J]. 广东农业科学, 2007, (6): 69-73.  
WANG Z M, XIE J H, YANG X H, *et al.* Progress on the isolation and detection methods and resistance of plant polyphenols[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2007, (6): 69-73. (in Chinese)
- [2] 翟梅枝,李晓明,林奇英,等. 核桃叶抑菌成分的提取及其抑菌活性[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(4): 89-91.  
ZHAI M Z, LI X M, LIN Q Y, *et al.* Extract of inhibiting composition and inhibitory activity from walnut leaves[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2003, 18(4): 89-91. (in Chinese)
- [3] 刘颖. 茶多酚的抑菌活性及其应用前景[J]. 高新技术, 2008 (16): 3.  
LIU Y. The antimicrobial activity and application prospects of polyphenols[J]. Science & Technology Information, 2008, (16): 3. (in Chinese)
- [4] 王新新. 茶多酚缓解鸡胚生殖腺氧化损伤的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [5] PETTIA S, SCULLY C. Polyphenols, oral health and disease: a review[J]. Journal of Dentistry, 2009, 37(6): 413-423.
- [6] WANG H Y, ZHAO M M, YANG B, *et al.* Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities[J]. Food Chem., 2008, 107(4): 1399-1406.
- [7] 何带桂,温俊林,周剑青,等. 血桐叶提取物抑菌活性及抗氧化作用研究[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(2): 160-163.  
HE D G, WEN J L, ZHOU J Q, *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of the extracts of *Macaranga tanarius* leaves[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(2): 160-163. (in Chinese)
- [8] 李建慧,马会勤,陈尚武. 葡萄多酚抑菌效果的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 100-107.  
LI J H, MA H Q, CHEN S W. Studies on antimicrobial effect of grape-polyphenols[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(2): 100-107. (in Chinese)
- [9] YIM N H, HA D T, TRUNG T N, *et al.* The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, 20(3): 1165-1168.
- [10] KATALINI V, MO INA S S, SKROZA D, *et al.* Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia) [J]. Food Chem., 2010, 119(2): 715-723.
- [11] 唐亮,刘翠艳,韩春杨,等. 中药研究常用三种体外抑菌方法的比较[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(5): 419-420.  
TANG L, LIU C Y, HAN C Y, *et al.* Comparison of three Chinese medicine traditional antibacterial research[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2011, 18(5): 419-420. (in Chinese)
- [12] 卢勉飞,蔡芷荷,吴清平,等. 显色培养基快速检测食品中大肠杆菌的应用研究[J]. 中国热带医学, 2009, 9(7): 1194-1196.  
LU M F, CAI Z H, WU Q P, *et al.* Application of chromogenic *Escherichia coli* medium in food inspection[J]. China Tropical Medicine, 2009, 9(7): 1194-1196. (in Chinese)
- [13] 魏志恒. 金黄色葡萄球菌及其溶血素基因分布研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [14] 李雪娇. 油茶软腐病内生拮抗细菌的分离筛选及菌剂的研制[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2011.
- [15] 赵瑛琛. 2-巯基氧化吡啶钠盐的合成及抑菌性能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.
- [16] 杨会成. 海带(*Laminaria japonica* Aresch)多酚的提取、分离及其抗肿瘤、抗菌活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.

- canopy closure based on fish lenses[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2009, 31(6): 60-66. (in Chinese)
- [13] 李宇昊. 无人遥感飞机在林业调查中的应用研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2008: 23-24.
- [14] 刘丽华. 非线性优化模型的数码相机定标[J]. 计算机工程与应用, 2010, 46(25): 181-184.  
LIU L H. Digital camera calibration based on non-linear optimal model[J]. Computer Engineering and Applications, 2010, 46(25): 181-184. (in Chinese)
- [15] 杨俊, 赵忠明, 杨建. 一种高分辨率遥感影像阴影去除方法[J]. 武汉大学学报: 信息科学版, 2008, 33(1): 17-20.  
YANG J, ZHAO Z M, YANG J. A shadow removal method for high resolution remote sensing image[J]. Geomatics and Information Science of Wuhan University, 2008, 33(1): 17-20. (in Chinese)
- [16] 党安荣, 王晓栋, 陈晓峰, 等. Erdas Imagine 遥感图像处理方法[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003: 120-121.
- [17] 张慧, 王宏琦, 孙显. 结合颜色和纹理特征的树冠提取方法[J]. 光学技术, 2008, 34(4): 613-616.
- [18] PU R G. Wavelet transform applied to EO-1 hyperspectral data for forest LAI and crown closure mapping[J]. Remote Sensing of Environment, 2004, 91(2): 212-224.
- [19] 李崇贵, 赵宪文. 确定监测区域建立森林郁闭度估测方程最优样地的研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(6): 24-28.  
LI C G, ZHAO X W. Determining the optimum sample plots for establishing canopy density estimating equation in monitoring area[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2005, 27(6): 24-28. (in Chinese)
- [20] 欧阳勋志, 廖为明, 彭世揆. 天然其它林景观质量评价及其垂直结构优化技术[J]. 应用生态学报, 2007, 18(6): 1388-1392.  
OUYANG X Z, LIAO W M, PENG S K. Landscape quality evaluation and vertical structure optimization of natural broadleaf forest[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(6): 1388-1392. (in Chinese)
- [21] 姜大志, 孙俊兰, 郁倩, 等. 标准图形法求解相机镜头非线性畸变的研究[J]. 东南大学学报: 自然科学版, 2001, 31(4): 1-5.  
JIANG D Z, SUN J L, YU Q, *et al.* Research on solving non-linear distortion of camera lens by standard graphic method[J]. Journal of Southeast University: Natural Science Edition, 2001, 31(4): 1-5 (in Chinese)
- [22] ENGLUND S R, OBRIEN J J, CLARK D B. Evaluation of digital and film hemispherical photography and spherical densitometry for measuring forest light environments [J]. Can J. For. Res., 2000, 30: 1999-2005.
- (上接第 126 页)
- [17] 李英军. 龙眼核中抗氧化活性物质的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2009.
- [18] 高园. 葡萄成熟枝条中多酚类物质提取及分离纯化方法的研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2009.
- [19] 刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111.  
LIU D M, LI L, YANG X Q, *et al.* Determination of the antimicrobial activity of probiotic by oxford plate assay system[J]. Food Research and Development, 2006, 27(3): 110-111. (in Chinese)
- [20] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [21] SINGLETON V L, ROSSI J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1965, 16: 144-158.
- [22] 冯黎莎, 陈放, 白洁. 金荞麦的抑菌活性研究[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(3): 240-244.  
FENG L S, CHEN F, BAI J. Study of antimicrobial *in vitro* from fagopyrum dibotrys extracts[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2006, 24(3): 240-244. (in Chinese)
- [23] 许申鸿, 杭瑚. 葡萄籽和葡萄皮清除自由基作用的研究[J]. 食品科学, 1999, 20(12): 28-30.  
XU S H, HANG H. Studies on the scavenging effects of grape seed and grape peel on free radicals[J]. Food Science, 1999, 20(12): 28-30. (in Chinese)
- [24] 马珍和, 李吕木. 苹果多酚用作肉品保鲜剂的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(1): 147-151.  
MA Z H, LI L M. Research progress of apple polyphenol as preservative in meat product[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(1): 147-151. (in Chinese)
- [25] 严守雷, 王清章, 彭光华, 等. 莲藕多酚对微生物抑制作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(2): 148-151.  
YAN S L, WANG Q Z, PENG G H, *et al.* Study on the antimicrobial activities of lotus root polyphenols[J]. Food Research and Development, 2006, 27(2): 148-151. (in Chinese)
- [26] 范青生, 肖小年, 余世望. 我国抗菌植物资源研究与开发利用[J]. 自然资源, 1995: 20-24.  
FAN Q S, XIAO X N, YU S W. The current situation and exploitation and utilization of antiseptic plant in China[J]. Natural Resources, 1995: 20-24. (in Chinese)
- [27] 孙红男, 孙爱东, 苏雅静, 等. 苹果多酚抑菌效果的研究[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(4): 280-283.  
SUN H N, SUN A D, SU Y J, *et al.* Antimicrobial effect of apple polyphenols[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010, 32(4): 280-283. (in Chinese)
- [28] 董金甫, 李瑶卿, 洪绍梅. 茶多酚(TPP)对 8 种致病菌最低抑制浓度的研究[J]. 食品科学, 1995, 16(1): 6-12.  
DONG J P, LI Y Q, HONG S M. Polyphenols (TPP) for eight kinds of minimum inhibitory concentration of pathogens[J]. Food Science, 1995, 16(1): 6-12. (in Chinese)
- [29] 刘志芹. 不同植物材料总多酚的测定及抑菌特性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2004.