

苦瓜水提物抗幽门螺杆菌作用及其浸提工艺研究

Anti-bacterial effects on *helicobacter pylori* of aqueous extracts from bitter melon and its optimum extraction process

张孝林^{1,2} 吴研祥¹ 陆帆¹ 何培培¹

ZHANG Xiao-lin¹ WU Yan-xiang¹ LU Fan¹ HE Pei-pei¹

(1. 安徽科技学院食品药品学院, 安徽 凤阳 233100; 2. 农业部生物有机肥创制重点实验室, 安徽 蚌埠 233030)

(1. College of Food and Drug, Anhui Science and Technology University, Fengyang, Anhui 233100, China;

2. The Ministry of Agriculture Key Laboratory of Microbial Organic Fertilizer, Bengbu, Anhui 233030, China)

摘要:为研究苦瓜水提物对幽门螺杆菌的抑制作用,以纸片扩散法的抑菌圈大小为指标,设计正交试验优化苦瓜水提物抗幽门螺杆菌活性的最佳浸提工艺,并进一步探究苦瓜水提物的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)和杀菌动力学。结果表明:苦瓜水提物抗幽门螺杆菌的最佳浸提工艺为浸提温度 80 °C、料液比 1:50(g/mL)、浸提时间 1.5 h。MIC 为 32 mg/mL;MBC 为 128 mg/mL;在 4 倍 MIC 下杀菌动力学时间为 30 min。

关键词:苦瓜;水提物;幽门螺杆菌;抗菌

Abstract: In order to study the anti-*Helicobacter pylori* activities of aqueous extracts from bitter melon, the extraction processes were optimized by orthogonal array design with respect to inhibitory zone size of bacteria using paper disc diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and bactericidal kinetics in aqueous extracts of bitter melon were further investigated. The results showed that the best anti-*Helicobacter pylori* effects of aqueous extracts from bitter melon were the water extraction condition with the temperature at 80 °C, the ratio of material to liquid at 1:50, for 1.5 h. Its MIC and MBC against *Helicobacter pylori* were 32 mg/mL and 128 mg/mL, respectively. The kinetics of fourfold anti-bactericidal activity against *Helicobacter pylori* was 30 min.

Keywords: bitter melon; aqueous extracts; *Helicobacter pylori*; antibacterial

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种广泛定植于人胃中的微需氧革兰氏阴性杆菌。世界上有 50% 以上的人被其感染,研究^[1-2]证实幽门螺杆菌感染与慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡和胃癌的高发生率密切相关。目前临床上治疗幽门螺杆菌主要方法有三联或四联疗法即 2 种或 3 种抗生素结合 1 种质子泵抑制剂或铋剂。因胃环境的特殊性及胃的排空导致幽门螺杆菌治疗用药量大、疗程长、成本高、副作用大,致使病人依从性差,部分病人未达到完整的疗程就停止服药,另外,幽门螺杆菌对使用的抗生素易产生耐药性,甚至出现了 6 种抗生素的耐药菌株^[3],幽门螺杆菌还容易重新感染。因此,根治幽门螺杆菌感染已成为医学难题。中药复方制剂治疗幽门螺杆菌虽然具有很好的疗效,但其成分不清、疗程长、服用不便且成本较西药更高。

苦瓜(*Momordica charantia* L.)是一种药食两用植物,其提取物具有广谱抗菌活性^[4],对革兰氏阳性杆菌、球菌具有抑制作用,同时对革兰氏阴性杆菌也具有较强的抑制效果。但目前还未见关于苦瓜提取物抗幽门螺杆菌的报道。

苦瓜的提取物抗菌活性与提取溶剂相关,张雅静等^[5]研究苦瓜不同溶剂提取物对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌和大肠杆菌的抑菌效果时发现,苦瓜水提物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最强,70% 乙醇的提取物对枯草杆菌的抑菌效果最强,乙酸乙酯的提取物对大肠杆菌的抑菌效果最强。其他研究证实苦瓜含有多种抑菌物质,包括苦瓜黄酮^[6]、苦瓜皂苷^[7-8]、苦瓜多糖^[8-9]、苦瓜多酚^[10]、苦瓜精油^[11]和苦瓜蛋白^[12-13]等活性成分。本研究采用水作为提取溶剂探究苦瓜提取物抗幽门螺杆菌活性。研究^[14]证实苦瓜水提物的抗菌活性与浸提温度、浸提时间和料液比有一定关系。本研究拟采用正交试验,以纸片法抑菌圈大小为指标,研究苦瓜水提物抗幽门螺杆菌活性的最佳浸提工艺,以倍比稀释法确定苦瓜水提物的最小抑菌浓度(MIC)和杀菌浓度(MBC),以 4 倍

基金项目:安徽省自然科学基金一般项目(编号:1308085MC43);安徽省教育厅重点和重大项目(编号:KJ2013A078, KJ2016SD16);安徽科技学院自然科学基金(编号:ZRC2014404);安徽省大学生创新创业训练计划项目(编号:AH201410879058)

作者简介:张孝林(1968—),安徽科技学院副教授,博士。

E-mail: zhangxiaolin8@126.com

收稿日期:2016-01-04

MIC浓度的苦瓜水提物浓度检测苦瓜水提物抗幽门螺杆菌的杀菌动力学,旨在将苦瓜开发为抗幽门螺杆菌同时具有保健功能的食品或饮品提供理论依据和技术方法。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

苦瓜:凤阳华佗大药房(经安徽科技学院药学系时维静教授鉴定为正品),在50℃烘箱干燥12h后,用粉碎机粉碎后,过40目筛,4℃干燥保存备用;

幽门螺杆菌液体培养基、固体培养基、培养剂(复合抗生素):青岛海博生物技术公司;

胎牛血清:上海生物工程有限公司;

无纤维绵羊血:郑州九龙生物技术公司;

微需氧产气袋(日本三菱瓦斯MGC):上海宝曼生物科技有限公司。

1.2 仪器

旋转蒸发仪:RE-3000型,上海亚荣生化仪器厂;

真空冷冻干燥机:ALPHA1-2 LD plus型,德国Martin Christ公司;

高压蒸汽灭菌锅:LDZX-30KBS型,三强医疗器械有限公司;

培养箱:SPX-80B型,上海跃进医疗器械厂;

恒温水浴锅:DK-8D型,上海一恒仪器有限公司;

超净工作台:SW-CJ-2FD型,苏州净化设备厂;

恒温振荡器:ZWYR-D2402型,上海志诚仪器有限公司。

1.3 供试菌种

幽门螺杆菌临床株:安徽科技学院细胞与分子生物学实验中心保存。

1.4 试验方法

1.4.1 幽门螺杆菌培养及药物抑菌试验 培养基的配制按照说明书进行。供试菌种接种于幽门螺杆菌液体培养基试管内,在放有微需氧产气袋的密闭培养罐中37℃震荡培养36h,将各菌种转移至幽门螺杆菌固体培养基进一步活化,用刮铲刮下菌苔用生理盐水制成0.5麦氏管细菌悬浊液,相当于菌的浓度为 10^8 CFU/mL,在超净工作台上用无菌移液枪吸取100 μ L菌液均匀涂到固体培养皿制成平板。同时把浸泡在药液中的纸片小心贴在培养皿的适当位置。在微需氧条件下37℃培养48h,用游标卡尺测量抑菌圈大小,每个抑菌圈从不同角度测量3次求平均值,单位为mm。

1.4.2 单因素试验 参照文献[15]的方法分别从料液比、浸提温度和浸提时间3个因素考察苦瓜浸提物的最佳单因素条件。

(1) 料液比考察:称取5份5g苦瓜的粉碎物,分别以料液比1:20,1:30,1:40,1:50,1:60(g/mL),在60℃水浴回流提取2次,每次2h,将提取液合并后用旋转蒸发仪浓缩,用真空冷冻干燥机冷冻干燥,称取适量水提物配制成100 mg/mL水溶液,分别用纸片法测抑菌圈大小,确定最佳料液比。

(2) 浸提温度考察:称取5份5g苦瓜的粉碎物,以料液比1:40(g/mL),分别在50,60,70,80,90℃水浴回流提取

2次,每次2h,按1.4.2(1)操作,分别用纸片法测抑菌圈大小,确定最佳提取温度。

(3) 浸提时间考察:称取5份5g苦瓜的粉碎物,分别以料液比1:40(g/mL),浸提温度80℃,在1.0,1.5,2.0,2.5,3.0h水浴回流提取2次,按1.4.2(1)操作,分别用纸片法测抑菌圈大小,确定最佳提取时间。

1.4.3 正交试验优化 在单因素试验结果的基础上,以水提物对幽门螺杆菌的抑菌圈大小为指标,做料液比、浸提温度和浸提时间的3因素3水平的正交试验设计,并对试验结果进行分析验证,最终得出苦瓜水提物抗幽门螺杆菌活性的最佳浸提工艺条件。

1.4.4 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度试验 取24支无菌的试管向每个试管加灭菌的幽门螺杆菌液体培养基1 mL,分成3组,每组8支试管,用倍比稀释法,将苦瓜浸提物依次稀释为最终药液浓度分别为256,128,64,32,16,8,4,2 mg/mL。向每支1 mL含不同药液浓度试管中加入 10^8 CFU/mL的幽门螺杆菌菌液10 μ L保证每支试管含幽门螺杆菌数为 10^6 CFU/mL,按照1.4.1幽门螺杆菌的培养方法培养36h,观察试管浑浊状态,出现浑浊前的试管中苦瓜浸提物的浓度即为最小抑菌浓度(MIC)。将取5 μ L澄清试管中的培养物接种于固体培养基,在微需氧37℃培养36h,无菌落出现前一试管中的苦瓜浸提物的浓度即为最小杀菌浓度(MBC)。

1.4.5 杀菌动力学试验 在4倍MIC浓度的苦瓜浸提物液体培养基中,加入幽门螺杆菌至菌数为 10^6 CFU/mL,充分混合后,采用在微需氧条件下,37℃,200 r/min震荡培养,分别在5,20,30,45,60,90 min时取5 μ L混合物(每个取3份),至固体培养基在微需氧条件,37℃培养36h,观察和计算菌落生长状况。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对苦瓜水提物抗幽门螺杆菌活性的影响 由图1可知,起初,随着溶剂量的增加,苦瓜水提物的抗幽门螺杆菌活性先增加,当料液比达到1:40(g/mL)后,苦瓜水提物抗幽门螺杆菌活性不再增加,考虑水提物的浓缩和干燥,溶剂量大会增加成本,因此,选择料液比1:40(g/mL)作为苦瓜最佳提取水平。

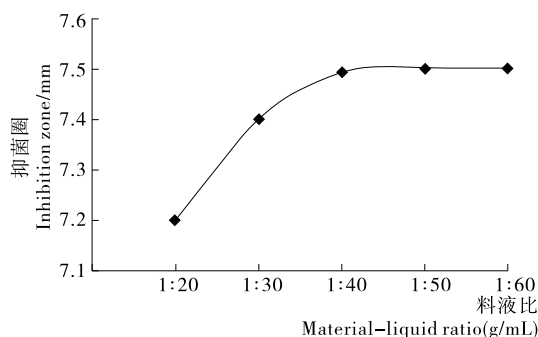


图1 料液比对水提物抑菌活性的影响

Figure 1 Effect of aqueous extract on antibacterial activity by material-liquid ratio

2.1.2 提取温度对苦瓜水提物抗幽门螺杆菌活性的影响 由图 2 可知, 起初, 随着温度的增加苦瓜水提物的抗菌活性增加, 到 80 °C 达到最大, 抑菌圈为 8.8 mm, 之后抑菌活性有所减小。说明温度过高时, 苦瓜水提物的抗菌活性成分被破坏, 因此, 选择 80 °C 作为苦瓜最佳提取水平。

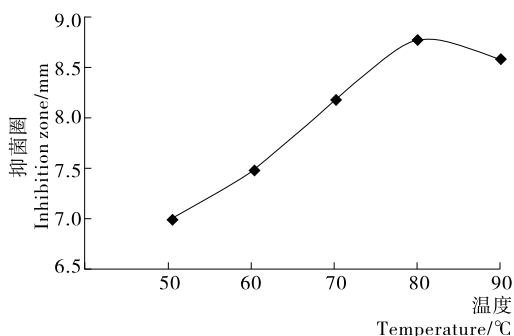


图 2 温度对水提物抑菌活性的影响

Figure 2 Effect of aqueous extract on antibacterial activity by temperature

2.1.3 提取时间对苦瓜水提物抗幽门螺杆菌活性的影响 由图 3 可知, 起初, 随着提取时间的延长, 苦瓜水提物的抗菌活性增加, 1.5 h 时达到最大, 抑菌圈为 9.0 mm, 之后抗菌活性逐渐减小, 可能是提取物长时间处在较高的温度下, 抗菌活性物质受到破坏, 进一步说明苦瓜抗菌活性物质存在热不稳定性, 因此, 选择 1.5 h 为苦瓜最佳提取水平。

2.2 正交试验优化结果

在单因素试验的基础上, 设计的 3 因素和 3 水平正交试验见表 1。

由表 2 可知: 浸提物对幽门螺杆菌抑制作用的影响顺序为 A > C > B; 最佳浸提条件组合是 A₂B₃C₂, 即提取温度 80 °C,

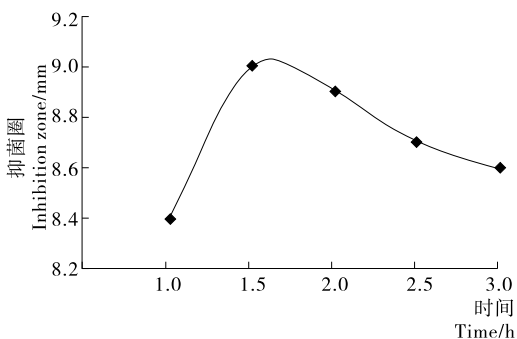


图 3 时间对水提物抑菌活性的影响

Figure 3 Effect of aqueous extract on antibacterial activity by time

表 1 正交试验各因素水平

水平	A 浸提温度/°C	B 料液比 (g/mL)	C 浸提时间/h
1	70	1:30	1.0
2	80	1:40	1.5
3	90	1:50	2.0

表 2 抑菌作用正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test on antibacterial effect

试验号	A	B	C	抑菌圈/mm
1	1	1	1	7.6
2	1	2	2	8.1
3	1	3	3	8.0
4	2	1	2	9.3
5	2	2	3	8.7
6	2	3	1	9.0
7	3	1	3	8.3
8	3	2	1	8.7
9	3	3	2	8.8
k_1	7.9	8.4	8.4	
k_2	9.0	8.5	8.7	
k_3	8.6	8.6	8.3	
R	1.1	0.2	0.4	

料液比 1:50 (g/mL), 浸提时间 1.5 h。但 A₂B₃C₂ 条件不在正交试验表中, 因此, 在 A₂B₃C₂ 条件下进行 3 次验证实验, 其提取物对幽门螺杆菌的抑菌圈大小平均值为 9.5 mm, 大于正交试验表中的最大值 9.3 mm, 故苦瓜最佳浸提条件为 A₂B₃C₂。

2.3 苦瓜浸提物对幽门螺杆菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度

苦瓜浸提物的最小抑菌试验发现第 5 支试管开始出现浑浊, 说明第 4 试管的药物浓度为苦瓜提取物的最小抑菌浓度 (32 mg/mL)。将前 4 支试管培养液接种于琼脂培养基在微需氧, 37 °C 培养 36 h 后观察菌落生长状况, 发现第 3 和第 4 支试管接种的培养基有菌落生长, 第 1 和第 2 支试管的无, 说明第 2 支试管的药物浓度为最小杀菌浓度 (128 mg/mL)。试验证明: 苦瓜提取物对幽门螺杆菌不但有抑制作用, 同时有杀灭作用。

2.4 苦瓜浸提物对幽门螺杆菌的杀菌动力学

用 4 倍 MIC 浓度即 128 mg/mL 浓度的苦瓜浸提物进行杀菌动力学试验, 结果发现在 5 min 和 20 min 取得的混合物培养基均有细菌菌落生长, 30 min 及之后的混合物培养基均无细菌菌落生长, 证明在 4 倍 MIC 浓度下苦瓜浸提物的最小杀菌时间为 30 min。说明苦瓜浸提物有较好的杀菌动力学效果。

3 结论

本研究证明苦瓜水提物具有抗幽门螺杆菌作用, 但不同条件下的水提物对幽门螺杆菌的抑制活性存在差异。通过正交试验确定了苦瓜浸提物抗幽门螺杆菌活性的最佳浸提工艺为浸提温度 80 °C, 料液比 1:50 (g/mL), 浸提时间 1.5 h。本研究还发现苦瓜水提物的抗幽门螺杆菌活性与浸提温度有较大关系, 在 80 °C 温度下所得浸提物抗菌活性最

强,浸提时间对浸提物的抗幽门螺杆菌活性也有一定的影响,高温和浸提时间过长对苦瓜抗菌活性成分都会造成破坏。

本研究还证明苦瓜在最佳浸提工艺条件下所得的苦瓜水提物对幽门螺杆菌具有抑制作用,最小抑菌浓度是 32 mg/mL,这是一个比较低的抑菌浓度。苦瓜水提物在高浓度时对幽门螺杆菌还具有杀灭作用,其杀菌浓度为 128 mg/mL。同时在 128 mg/mL 浓度条件下进行杀菌动力学研究,发现苦瓜水提物具有快速杀灭幽门螺杆菌作用,最小杀菌动力学时间为 30 min。这表明苦瓜水提物在胃中能快速杀灭幽门螺杆菌作用,因此,苦瓜水提物用于对幽门螺杆菌感染的防治具有重大的医学应用价值。

本研究只研究了苦瓜的水提物抗幽门螺杆菌作用。不同的溶剂提取所得的苦瓜浸提物活性成分存在差异,其抑菌活性也存在差异性。苦瓜用不同的溶剂提取时可以得到不同的抑菌成分,抑制幽门螺杆菌的活性会存在差异,用什么溶剂提取所得的提取物对幽门螺杆菌的抗菌活性最强有待进一步研究。

参考文献

[1] LAMB A, CHEN L F. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer[J]. *J. Cell Biochem.*, 2013, 114(3): 491-497.

[2] 康利. Hp 感染与胃癌相关性的临床研究[J]. *内蒙古医学杂志*, 2015, 47(9): 1 115-1 117.

[3] 田拥军, 张正茂, 刘慎沛, 等. 幽门螺杆菌对 6 种抗生素的耐药性及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(7):

922-925.

[4] 张绪忠, 陈清山. 苦瓜抑菌防腐作用的实验研究[J]. *预防医学情报杂志*, 1996, 12(1): 17-20.

[5] 张雅静, 文良娟, 王娇, 等. 苦瓜的抑菌作用研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(18): 132-136.

[6] 何爱丽, 肖付刚, 魏珂. 苦瓜黄酮提取及抑菌性研究[J]. *农业机械*, 2012, 30(10): 102-104.

[7] 姚毅. 苦瓜皂甙的提取纯化工艺及抑菌功效研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006: 48-52.

[8] 张平平, 刘金福, 王昌禄, 等. 苦瓜提取物的抑菌活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(4): 721-724.

[9] 何新益, 刘仲华. 苦瓜多糖的改良苯酚—硫酸法测定和提取工艺[J]. *食品与机械*, 2007, 23(4): 72-75.

[10] 张元春. 苦瓜活性物质的提取及其抑菌活力的研究[D]. 南宁: 广西大学轻工学院, 2009: 24-27.

[11] BRACA A, SICILIANO T D, ARRIGO M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil[J]. *Fitoterapia*, 2008, 79(2): 123-125.

[12] 王贻莲, 陈燕平, 黄伟. 苦瓜活性组物质抑菌活性测定[J]. *植物保护*, 2008, 34(2): 67-70.

[13] MAHMOOD A, RAJA G K, MAHMOOD T, et al. Isolation and characterization of antimicrobial activity conferring component(s) from seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*) [J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, 6: 566-573.

[14] 张雁, 池建伟, 唐小俊, 等. 苦瓜水提物的抑菌活性及其稳定性研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 121-123.

[15] 赵静, 王燕. 辣椒粕分离蛋白酶解工艺条件的优化[J]. *食品与机械*, 2016, 32(1): 162-166.

(上接第 109 页)

[3] WU Jin-zhong, ZHENG Yuan-bin, CHEN Ti-qiang, et al. Evaluation of the quality of lotus seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn from outer space mutation[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(2): 540-547.

[4] 王亮亮, 夏延斌, 任美. 湘莲的营养和保健功效及其在食品加工中的应用[J]. *食品与机械*, 2015, 31(2): 262-266.

[5] 王建辉, 靳娜, 刘永乐, 等. 低温处理对湘莲采后生理变化的影响[J]. *食品科学*, 2014, 35(18): 209-213.

[6] TOURNAS V H. Moulds in fresh and minimally processed vegetables and sprouts [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99(1): 71-77.

[7] 范贤贤, 田密霞, 姜爱丽, 等. 鲜切果蔬表面微生物侵染途径及控制[J]. *保鲜与加工*, 2009(2): 14-16.

[8] 易俊放. 莲子的贮藏技术[J]. *长江蔬菜*, 1992(2): 38-39.

[9] MIGNARD S, FLANDROIS J P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 67(3): 574-581.

[10] 杨静静, 孟镇, 钟其顶, 等. 分子生物学技术在酵母菌多相分类鉴定中的应用[J]. *中国酿造*, 2011(4): 16-19.

[11] LEI Zhang-yu, ZHANG Xiao. Application of 16S rDNA sequence analysis technique in microbial detection [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2014, 15(4): 520-523.

[12] PHILIPP S, HUEMER H P, IRSCHICK E U, et al. Obstacles

of multiplex real-time PCR for bacterial 16S rDNA: primer specificity and DNA decontamination of Taq polymerase [J]. *Transfusion Medicine & Hemotherapy*, 2010, 37(1): 21-28.

[13] KIERZKOWSKA M, MAJEWSKA A, KUTHAN R T, et al. A comparison of Api 20A vs MALDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 92(2): 209-212.

[14] 郭全友, 杨宪时, 许钟. 冷藏罗非鱼优势腐败菌的鉴定及其特征[J]. *食品与机械*, 2009, 25(3): 87-90.

[15] SUN Shan, FAN Xin-xing, PHARMACY D O, et al. RAPD-PCR and 16S rDNA phylogenetic analysis of alkaline protease producing bacteria isolated from soil of India; Identification and detection of genetic variability [J]. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 2014, 12(1): 27-35.

[16] CHANG Shu-chen, KUND H F, CHEN H C, et al. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning [J]. *Food Control*, 2008, 19(1): 16-21.

[17] 韩永和, 章文贤, 庄志刚, 等. 耐盐好氧反硝化菌 A-13 菌株的分离鉴定及其反硝化特性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(1): 47-58.

[18] 王满生. 多靶栅栏技术在草鱼贮藏过程中对微生物腐败的控制研究[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2012: 21-34.