

The Antibacterial Effect of the Alcoholic Extract from Walnut Green Peel

Lili Zhang, Anqi Du, Xinyi Wang, Jinbao Li, Haiyang Yu, Yiliang Liu, Min Zhou, Xinru Kong, Na Xu

School of Biological Science/Jining Medical University, Rizhao Shandong
Email: xuna828@163.com, skyxsh24@163.com

Received: Oct. 8th, 2019; accepted: Oct. 23rd, 2019; published: Oct. 30th, 2019

Abstract

This research aims to determine the antibacterial effect of the alcoholic extract from walnut green peel. We used *Physalospora nasei* and *Monilinia fructicola* to do this study. The alcoholic extracts were diluted 10, 100 and 1000 times respectively to determine the antibacterial effect, the results showed that ten times dilution has the significant bacteriostatic effects on *Physalospora nasei* and *Monilinia fructicola*, and there were no significant differences between 100 times and 1000 times dilutions at 0.01 level and 0.05 level. Then we continued to use the ten times dilution to deal with the two bacterial solutions to test the catalase activity in the solution, the extract had been proved to have inhibitory effect on catalase activity.

Keywords

Walnut Green Peel, Alcoholic Extracts, Bacteriostatic Determination, Catalase

核桃青皮乙醇提取物的抑菌效果测定

张黎丽, 杜安琪, 王欣艺, 李金宝, 于海洋, 刘祎良, 周敏, 孔心茹, 徐娜

济宁医学院生物科学学院, 山东日照
Email: xuna828@163.com, skyxsh24@163.com

收稿日期: 2019年10月8日; 录用日期: 2019年10月23日; 发布日期: 2019年10月30日

摘要

利用核桃青皮组织的乙醇粗提取物对苹果轮纹病菌和桃褐腐病菌的生长抑制效果进行测定。将核桃青皮组织的乙醇提取物稀释10倍, 100倍和1000倍, 分别测定不同稀释液的抑菌效果, 结果表明, 10倍稀释

文章引用: 张黎丽, 杜安琪, 王欣艺, 李金宝, 于海洋, 刘祎良, 周敏, 孔心茹, 徐娜. 核桃青皮乙醇提取物的抑菌效果测定[J]. 农业科学, 2019, 9(10): 980-984. DOI: 10.12677/hjas.2019.910137

提取物的抑菌效果最为显著, 10倍和100倍液之间具有极显著差异($P < 0.01$), 100倍和1000倍液之间在0.01水平和0.05水平上无显著差异($P > 0.05$)。取10倍乙醇提取物处理菌液2小时, 对菌液中的过氧化氢酶的活性进行鉴定, 结果表明核桃青皮提取物对病菌的抗逆性有一定限制, 抑制了细胞酶的活性。

关键词

核桃青皮, 乙醇提取, 抑菌测定, 过氧化氢酶

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

核桃(*Juglans regia* Linn)又称胡桃、羌桃, 是胡桃科植物, 胡桃科核桃属落叶乔木, 是核桃属植物中经济价值最高的一种, 在中国进行栽种的历史悠久, 种植资源丰富, 在我国新疆, 山东, 云南等省份都普遍种植, 截止到2004年, 全国核桃树的栽培面积约91.75 hm², 种植颗数在2亿株左右, 面积和数量均居世界第一位。为了充分利用核桃青皮这一资源, 已有学者对核桃青皮提取物的除草、杀虫以及抗病毒等农药活性做了研究[1], 核桃青皮为核桃没有成熟时外部的一层绿色果皮, 其涩、微寒、味苦、有毒[2]。据研究表明, 核桃青皮的提取物可以抑制枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌[3], 对甘薯黑斑病菌、马铃薯晚疫病均有抑制作用[4], 对萝卜蚜虫具有较强的拒食和触杀活性[5], 对小麦赤霉病菌等有抑制作用[6], 还具有较强抗病毒、除草活性[7], 已有实验结果表明核桃青皮乙醇提取物均可以抑制供试病原真菌的活性。如核桃青皮乙酸乙酯萃取相在浓度为40 mg/ml时抑菌效果最好, 对小麦纹枯、番茄灰霉、棉花立枯3种病原真菌的抑制率均为100% [8]。由此看出, 核桃青皮均有抑菌性。本研究选取了两种常见的果树病原真菌, 苹果轮纹病菌和桃褐腐病菌, 利用乙醇对核桃青皮进行提取, 检测乙醇提取物对这两种病原菌的抑制作用, 目前我国大力推广油料植物立体种植, 在无公害生产中, 防治病害化学农药品种使用受到限制, 而核桃本身发病少, 为此, 开展本次试验主要为了在核桃中发现对牡丹叶斑病菌有抑制作用的物质, 开辟新的牡丹病害的无公害防治途径。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

核桃青皮(采自沂蒙山区核桃树); 100%无水乙醇(分析纯)、PDA培养基。供试菌种苹果轮纹病菌(*Physalospora nasei*)桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)种病原菌由植物病理实验室提供。

2.2. 培养基配制

PDA培养基: 200 g 土豆, 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 1000 ml 水。

首先洗净去皮马铃薯, 然后将其切碎, 加水 1000 ml 煮沸半小时, 用纱布将马铃薯滤掉, 将其滤液加水补足到 1000 ml, 然后加琼脂和葡萄糖, 然后加热使琼脂完全熔化后, 趁热用纱布过滤掉滤渣, 然后分装三角瓶, 加棉塞, 121°C, 高压灭菌 20 min。

2.3. 核桃青皮粗提取物的提取

核桃青皮干粉和无水乙醇按 1:10 比例混合, 先称取 200 g, 合并萃取液三次, 并在过滤后, 将滤液浓

缩在电动恒温水浴中以得到粗提取物，即核桃剥离，将其放置在一个灭菌的烧瓶加盖并预留的粗提取物。

2.4. 室内抑菌测定

定量培养基的制备：严格量取 27 ml 液体 PDA 培养基及 0.54 g 琼脂粉装于三角瓶中，封口，121℃，灭菌 20 min。

含有提取物的培养基制备：加热并熔化定量培养基，将其冷却至 50℃~55℃，加入 3 ml 原浓缩液和 10 倍、100 倍稀释液，并加少量链霉素抑制细菌生长，充分摇匀后迅速倒入 3 个培养皿中，浓度恰好是上述浓缩液和稀释液的十分之一，即得到提取物稀释 10 倍、100 倍、1000 倍的培养基，等到凝固后，标记各培养皿提取物的浓度，对照组的培养基加 3 ml 的无菌水[9]。

菌饼的制备：待分离鉴定的菌种的培养需要在 25℃ 恒温条件下进行，等到菌丝长到培养基的 2/3 时，再用直径 0.7 cm 打孔器在菌落的边缘打取菌块，即为接种用的菌饼。

菌饼的接种与培养：培养基凝固后，将菌饼接种到培养皿，并且滤饼加入到各培养皿，在恒温培养箱中培养，观察其生长情况，测量菌落的直径。

菌落直径的测定：3 株菌培养 3、5、7 d，用“十”字交叉法测量三组菌落的生长直径，分别测量每个菌落的最大和最小直径，取其平均值，然后减去接种菌饼的直径，即为菌落直径。

2.5. 过氧化氢酶活性测定

参考蔡庆生[10]主编的《植物生理学试验》过氧化氢酶的活性分别采用电导法、丙二醛含量测定法和过氧化氢酶活性测定法进行测定。

2.6. 数据处理

抑制生长率(%) = [(对照菌落平均直径-处理菌落平均直径)/对照菌落平均直径] × 100 [8]。

数据处理采用 SPSS 21.0 对实验结果进行统计分析，多组间比较采用单因素方差分析。

3. 结果与分析

3.1. 不同浓度乙醇提取物对苹果轮纹病菌的抑菌测定

将乙醇提取物分别稀释 10 倍、100 倍、1000 倍后，再对抑制效果进行统计，结果如表 1 所示。

Table 1. Antimicrobial activities of alcoholic extracts with different concentrations on *Physalospora nasei*

表 1. 不同浓度乙醇提取物对苹果轮纹病菌的抑菌效果

稀释倍数	3d		5d		7d	
	直径/cm	抑菌率(%)	直径/cm	抑菌率(%)	直径/cm	抑菌率(%)
10	0.03	98.92aA	0.05	98.43aA	0.12	97.90aA
100	2.30	17.86bB	2.37	25.93bB	5.17	9.77bB
1000	2.37	15.36bB	2.67	16.56bB	5.33	6.98bB
C K	2.80	/	3.20	/	5.73	/

*说明：不同小写字母表示处理间 0.05 水平上差异显著(P < 0.05)；不同大写字母表示 0.01 水平上差异极显著(P < 0.01)。

对表 1 分析可得出，乙醇提取物在稀释 10 倍时抑菌效果均为 100%，稀释 100 倍和 1000 倍后，抑菌效果显著降低。10 倍和 100 倍液之间具有差异极显著，100 倍和 1000 倍液之间在 0.01 水平和 0.05 水平上无显著差异。

3.2. 不同浓度乙醇提取物对桃褐腐病菌的抑菌测定

桃褐腐病菌经过不同浓度乙醇提取物处理后, 连续培养, 期间测定其抑菌直径, 结果见表 2。

Table 2. Antimicrobial activities of alcoholic extracts with different concentrations on *Monilinia fructicola*

表 2. 不同浓度乙醇提取物对桃褐腐病菌的抑菌效果

稀释倍数	3d	抑菌率(%)	5d	抑菌率(%)	7d	抑菌率(%)
	直径/cm		直/cm		直径/cm	
10	0.09	97.35aA	0.19	96.92aA	0.24	96.87aA
100	2.37	30.29bB	5.07	17.82bB	6.33	20.08bB
1000	2.93	13.82bB	5.70	7.61bB	6.63	15.59bB
C K	3.40	/	6.17	/	7.67	/

*说明: 不同小写字母表示处理间 0.05 水平上差异显著($P < 0.05$); 不同大写字母表示 0.01 水平上差异极显著($P < 0.01$)。

表 2 结果表明, 10 倍和 100 倍液、1000 倍液之间具有差异极显著, 100 倍和 1000 倍液之间无显著差异性, 且乙醇提取物的抑菌率基本是随浓度的降低而降低。

3.3. 过氧化氢酶活性的测定

从表 1 和表 2 可以看出, 核桃青皮乙醇提取物在稀释 10 倍时抑菌效果最好。因为微生物在受到外界迫害时会产生过氧化氢, 过氧化氢酶是一种酶类清除剂, 它可以促进过氧化氢分解为分子氧和水, 清除体内的过氧化氢, 从而使细胞免于过氧化氢毒害, 因而, 过氧化氢酶活性值的检测可以作为微生物防御功能的重要指标之一。我们在培养的菌液中加入 10 倍乙醇提取物处理 2 小时, 来检测两种菌液中的过氧化氢酶的活性, 结果如表 3 所示。

Table 3. Catalase activities of the two strains after treatment with 10-times alcoholic extracts

表 3. 10 倍乙醇提取物处理后两株菌的过氧化氢酶活性

	苹果轮纹病菌	桃褐腐病菌	空白对照
过氧化氢酶活性值	4.56	3.46	22.468

表 3 结果表明, 核桃青皮提取物对病菌的抗逆性有一定限制, 抑制了酶的活性。

4. 讨论

据文献报道, 核桃和同属植物核桃富含次生物质, 包括酚类, 黄酮类, 香豆素类, 木质素类, 生物碱, 糖苷和有机酸等[11], 它具有更好的农药活性。它可以抑制多种真菌, 并抑制细菌[12]。中国核桃资源丰富, 但核桃青皮的利用率不高。当核桃收获季节, 青皮常被作为垃圾处理, 造成环境污染。据悉, 核桃青皮含有具有抗真菌的抗菌活性丰富的次生代谢产物[13]。如果新技术可以通过, 新的方法将大力开发和利用核桃青皮。将其变废为宝, 核桃青皮将会成为很好的杀菌剂生产原材料, 本实验仅对核桃青皮的乙醇提取物对苹果轮纹病菌和桃褐腐病菌的抑菌效果进行了初步讨论。因此, 有必要确定来自核桃绿色果皮的提取物的具体组合物, 抗菌谱, 作用方式, 作用机理。对其他植物上的抑菌进一步的研究和讨论, 提高核桃青皮的利用价值, 并为斑病的无公害防治开辟了新的途径。

基金项目

山东省自然科学基金(ZR2017BC081), 国家重点实验室开放项目(2017KF08), 大学生创新训练计划

(cx2019096), 大学生创新训练计划(cx2019044)。

参考文献

- [1] 郗荣挺. 中国核桃[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 35-39.
- [2] 翟梅枝, 王磊, 何文君, 等. 核桃青皮乙醇提取物抑菌活性研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(12): 2542-2547.
- [3] 赵岩, 刘淑萍, 吕朝霞, 等. 核桃青皮的化学成分与综合利用[J]. 农产品加工, 2008(11): 66-68.
- [4] 梁永锋. 核桃青皮提取物对萝卜蚜虫毒杀和拒食活性研究[J]. 江苏农业科学院, 2011, 39(2): 187-188.
- [5] 苏学友, 李疆, 师光禄, 等. 核桃青皮提取物对 6 种植物病原真菌的抑菌活性研究[J]. 北京农学院学报, 2008, 23(1): 42-44.
- [6] 张新华, 翟梅枝, 景炳年, 等. 核桃青皮中抗植物病毒活性物质的提取条件的研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(1): 149-153.
- [7] 薛应龙. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 176-781.
- [8] 乔永刚, 牛颜冰, 乔木, 等. 核桃青皮提取物对 4 种植物枯萎病菌的抑菌作用研究[J]. 农学学报, 2011, 1(7): 9-12.
- [9] 黄彰欣. 植物化学保护实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992: 105-112.
- [10] 蔡庆生. 植物生理学实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2013.
- [11] 周明国, 梁桂梅, 陈长军, 等. 中国植物病害化学防治研究[J]. 北京: 农学院学报, 2002: 23-25.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979: 475-479.
- [13] 李秀凤. 核桃青皮的成分与药理研究进展[J]. 食品科技, 2007, 32(4): 241-242.