

廖建良,吴国祥,曾令达,等.沉香提取物的抑菌活性[J].江苏农业科学,2013,41(6):285-287.

沉香提取物的抑菌活性

廖建良¹,吴国祥¹,曾令达¹,林芳花¹,叶海宇²

(1.惠州学院生命科学系/惠州学院生物技术研究所,广东惠州 516007; 2.广东省惠州龙发山农业发展有限公司,广东惠州 516007)

摘要:为了研究沉香提取物的抑菌活性,以金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、绿脓杆菌、青霉菌、黑曲霉为供试菌种,采用滤纸扩散法、平板稀释法分别对沉香叶、沉香木、沉香皮提取液的抑菌活性进行研究。结果显示,沉香叶、沉香木、沉香皮提取液对 5 种供试菌种都有不同程度的抑制作用,沉香叶提取液的抑菌作用强于沉香木、沉香皮提取液。说明沉香叶提取液对细菌及霉菌都有较强的抗菌能力,尤其对细菌的抗菌能力较强。

关键词:沉香;提取液;抑菌作用

中图分类号: S482.2⁺94 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0285-03

沉香[*Aquilaria agallocha* (Lour.) Roxb],又被称为“土沉香”,属瑞香科(Thymelaeaceae)植物。沉香植株中含有一些活性物质成分,对人体健康具有特定的保健作用,而且对食品中的一些常见腐败菌具有一定的抑制作用^[1]。细菌、霉菌、酵母菌等微生物是造成食品腐败变质的重要因素^[1],为了延长食品的保藏期限,人们在食品的生产、加工和贮藏过程中经常采用添加防腐剂的方法。但近年来有研究发现,合成的食品防腐剂有一定的毒副作用,不利于人体的健康,因此人们通常倾向于选择新的安全高效的天然食品防腐剂^[2-3]。本试验用沉香叶的乙醇提取液进行抑菌活性试验和抑菌防腐效果的研究,旨在研究开发出集防腐与保健为一体的无毒无副作用的天然抑菌防腐剂。我国南方野生植物资源丰富,分布广泛,从植物中提取天然防腐剂有很好的基础条件及广阔的应用前景。

收稿日期:2012-11-09

基金项目:惠州学院生化与分子生物学重点学科项目[编号:惠院科发(2009)41号];惠州科技计划(编号:20110220、20110220);惠州学院质量工程(编号:kc2010003、rcpy2010001);惠州学院教改项目(编号:JG2011007);惠州学院大学生新性实验项目(编号:2012.52)。

作者简介:廖建良(1965—),男,广东紫金人,硕士,教授,研究方向为药用植物学。E-mail:chxnjl@163.com。

内蓄积,本研究通过对比 ICP-MS 法与石墨炉原子吸收法对水样中重金属的测定方法,并筛选出较好的测定方法。

石墨炉原子吸收法测定的结果为 0~3.9 ng/mL,最高值为 3.9 ng/mL,与样品值相差较大,不能确保测定结果准确;ICP-MS 法的测定结果为 4.09~4.78 ng/mL,最高值为 4.78 ng/mL,与样品值接近,更为精确且操作简便,为水样重金属测定的最佳方案,可为人民用水安全提供可靠性的检测依据。

参考文献:

[1]高怀友,刘凤枝,赵玉杰.中国农产品产地环境标准中存在的问

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生沉香、栽培引种的沉香试验材料均在惠州市龙发山采集。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草杆菌[*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn]、青霉菌(*Penicillium* sp.)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)均由惠州学院微生物实验室提供。

牛肉膏蛋白胨培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、乙醇等均为分析纯。

1.2 主要仪器

FZ102 微型植物粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;PC-1000 数显式电热恒温水浴锅,上海跃进医疗器械厂;RE-52AAA 旋转蒸发器,上海申生科技有限公司;YX280A(S)手提式高压蒸汽灭菌锅,北京维欣仪奥科技发展有限公司;HD-650-U 超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;ZF5 型紫外分析仪,上海嘉鹏科技有限公司;HYG-转式恒温调速摇瓶柜,上海欣蕊自动化设备有限公司。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(细菌培养基):牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15 g,加水至 1 000 mL,搅拌煮沸后调 pH 值至(7.3±0.2),于 121 ℃、15 min 条件下灭菌。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:取马铃薯葡萄糖琼脂 40.1 g,加水至 1 000 mL,调节 pH 值至(6.0±0.2),于

题与对策研究[J].生态环境,2004,13(4):691-693,701.

[2]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科学技术出版社,2010.

[3]张荣,姬丁坤,杨英桂.固体进样-石墨炉原子吸收法测定沙棘维生素 P 粉中铜含量的研究[J].现代科学仪器,2012(4):106-108.

[4]Tanner S D,Baranov V I,Bandura D R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review[J] Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,2002,57(9):1361-1452.

[5]刘彦彦.微波消解-ICP-MS 测定淫羊藿中 26 种元素含量[J].铜仁职业技术学院学报:自然科学版,2010,8(5):55-57.

121 ℃、20 min 条件下灭菌。用于真菌培养。

1.4 方法

1.4.1 沉香乙醇提取物的制备 称取 50 g 新采摘的种植的和野生的新鲜沉香叶,洗净、剪碎研磨后加入适量 95% 乙醇,在 40 ℃ 下浸泡提取 24 h,再过滤、定容至 100 mL。分别称取沉香木质部、沉香皮 21.5、21.1 g,分别将无结香的沉香木质部和树皮剪碎,然后加无水乙醇浸泡,间隔 24 h 收集初提液,并在原瓶上加新的无水乙醇浸泡,收集所有初提液并抽滤得过滤液。用旋转蒸发仪减压浓缩上述过滤液,得膏状提取物,于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.4.2 菌种活化及菌悬液制备 在无菌室中,将供试菌种接种入相对应的试管斜面培养基上,细菌置于 35 ~37 ℃ 恒温培养箱内培养 24 h;霉菌置于 28 ~30 ℃ 恒温培养箱内培养 48 h。之后用接种环挑取少许已活化的菌种菌体于装有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,振荡均匀,制成菌悬液^[4] 备用。根据菌落大小、形状、高度、干湿等特征观察不同的菌落类型。但要注意,如果细菌数量太多,会使很多菌落生长在一起,或者限制了菌落生长而使其变得很小,因而外观不典型,所以在观察菌落特点时,要选择分离得很开的单个菌落^[5]。

1.4.3 提取液抑菌效果的测定 采用滤纸片扩散法^[6] 进行提取液抑菌效果的测定。圆滤纸片用打孔器在白色滤纸上打出直径为 6.0 mm 的小圆片,高压蒸汽灭菌后备用。选用直径为 7 cm 的培养皿,每皿加 10 mL 培养基,凝固后移取各菌种悬液 50 μL 并分别加入各平板表面,干燥后取直径 6.0 mm 的无菌圆滤纸片贴在含菌平板上,用 60% 乙醇为溶剂配制成 1 g/mL 提取物溶液,吸取 0.1 mL 并缓慢点于滤纸片中心,每皿 3 片,每种菌做 3 次重复。以 60% 乙醇作为对照,将细菌置于 37 ℃ 条件下,分别培养 24、48 h;霉菌置于 28 ℃ 条件下培养 48 h,取出后测量其抑菌圈大小并比较其抑菌效果。抑菌圈直径的测定:抑菌圈直径大于 8 mm 为有明显抑菌效果,小于 6 mm 为没有抑菌效果,抑菌圈在 6 ~8 mm 为有一定的抑菌作用。试验数据均为 3 次重复的平均值。

1.4.4 提取液抑菌效力的测定 采用平板稀释法^[6] 进行提取液抑菌效力的测定。用平板稀释法测定提取液的最低抑菌体积分数,以 60% 乙醇为溶剂,将沉香乙醇提取物配制成一系列浓度梯度的溶液,加入已融化的培养基中并混合均匀,使培养基中提取物的质量浓度分别达到 1.000、0.500、0.250、0.125 g/mL。静置凝固后支撑含样品平板并做好记号。以乙醇和空白作为对照,空白组即没有加入任何提取液或乙醇,只加入了菌悬液。每个系列接种 1 种菌种,细菌置于 37 ℃ 条件下培养 24 h,霉菌置于 28 ℃ 条件下培养 48 h,观察各菌的生长情况,以完全没有菌生长的最低浓度为最低抑制浓度(MIC)。提取液的 MIC 越低,其抑菌效力就强。试验数据为 3 次重复的平均值。

1.4.5 提取液热稳定性测定 采用滤纸片扩散法^[6] 进行提取液热稳定性的测定。选用直径为 7 cm 的培养皿,每皿加 10 mL 培养基,凝固后分别移取 50 μL 金黄色葡萄球菌悬液加入各平板中,表面干燥后取直径 6 mm 的无菌圆滤纸片贴在含菌平板上。将各提取液(以 60% 乙醇为溶剂,配制浓度为 1 g/mL)分别在 40、60、80 ℃ 中水浴处理 15min 后,用微量可调移液器分别吸取各提取液 15 μL,缓慢点于滤纸片中心,

每皿 3 片。将细菌置于 37 ℃ 条件培养 24 h,霉菌置于 28 ℃ 条件培养 48 h,取出后测量抑菌圈大小并比较其抑菌效果。试验数据为 3 次重复的平均值。

1.5 数据处理和分析

试验所得数据和图表均用 Microsoft Office Word 2003 和 Microsoft Office Excel 2003 进行计算分析。

2 结果与分析

2.1 滤纸片法测定抑菌效果

由表 1 可以看出,用种植沉香叶、野生沉香叶、野生沉香木、野生沉香皮提取液处理金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、绿脓杆菌 24 h 后的抑菌圈大于或略低于 13.90 mm,抑菌效果较好;而 60% 乙醇对金黄葡萄球菌、枯草杆菌无抑制作用,培养皿上的菌落生长良好,但对绿脓杆菌的抑菌圈直径 9.25 mm。处理 48 h 后,2 种植沉香叶提取液对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、绿脓杆菌的抑制作用有所减弱,但种植沉香叶、野生沉香叶提取液对金黄色葡萄球菌的抑菌圈仍然分别达 13.00、14.00 mm;种植沉香叶、野生沉香叶、野生沉香皮提取液对枯草杆菌的抑制圈仍然分别达 9.60、9.00、9.35 mm;种植沉香叶、野生沉香叶、野生沉香皮提取液对绿脓杆菌的抑制圈仍然分别达 9.65、12.30、12.35 mm。可以看出野生沉香叶提取液的抑制效果较好。处理 48 h 后,沉香木提取液对 3 种菌都没有抑制作用,原因可能是沉香木提取液的有效成分浓度比沉香叶提取液低,这有待于进一步研究。由以上分析和表 1 可以看出,2 种植沉香叶提取液对金黄色葡萄球菌的抑制能力比沉香木和沉香皮提取液强,其中野生沉香叶提取液对金黄色葡萄球菌的抑制效果较好。

表 1 沉香粗提物对细菌的抑菌效果

提取液来源	抑菌圈直径(mm)					
	金黄色葡萄球菌		枯草杆菌		绿脓杆菌	
	培养 24 h	培养 48 h	培养 24 h	培养 48 h	培养 24 h	培养 48 h
种植沉香叶	15.60	13.00	12.95	9.60	14.90	9.65
野生沉香叶	27.25	14.00	14.90	9.00	15.50	12.30
野生沉香木	11.90	6.00	10.80	6.00	14.30	6.00
野生沉香皮	13.10	6.00	11.40	9.35	13.90	12.35
对照(60%乙醇)	6.00	6.00	6.00	6.00	9.25	6.00

注:圆滤纸片直径为 6.0 mm;表中数据为 3 次重复的平均值。表 2、表 3 同。

由表 2 可以看出,培养 48 h 后的种植沉香叶、野生沉香叶、野生沉香木、野生沉香皮提取液对青霉的抑制圈分别 13.50、11.80、12.70、13.65 mm,而 60% 乙醇对青霉的抑制圈为 8.6 mm;种植沉香叶、野生沉香叶、野生沉香木、野生沉香

表 2 沉香粗提物的对霉菌的抑菌效果(培养 48 h)

提取液来源	抑菌圈直径(mm)	
	青霉	黑曲霉
种植沉香叶	13.50	14.10
野生沉香叶	11.80	14.75
野生沉香木	12.70	13.50
野生沉香皮	13.65	13.00
对照(60%乙醇)	8.60	9.10

皮提取液对黑曲霉的抑制圈分别为 14. 10、14. 75、13. 50、13. 00 mm,而 60% 乙醇对黑曲霉的抑制圈是 9. 1 mm。由这些数据 and 表 2 可以看出,4 种提取液对霉菌的抑制能力相差不多。

由表 1 可以看出,沉香叶、沉香木、沉香皮提取液都有很强的抑菌作用,且种植沉香叶提取液、野生沉香叶提取液、野生沉香木提取液、野生沉香皮提取液的抑菌效力远远大于乙醇,而沉香叶提取液的抑菌效力又大于沉香其他部位,其中又以野生沉香叶提取液对细菌的抑菌效力最强。由表 1、表 2 可以看出,沉香各部分的提取液不仅能抑制细菌,同时对霉菌也有抑制作用,是一种具有广谱抑菌作用的天然材料。

2.2 最低抑菌浓度 (MIC) 的测定结果

由表 3 可以看出,种植沉香叶提取液对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、青霉、黑曲霉的 MIC 分别为 0. 25、0. 50、0. 25、0. 25 g/mL;野生沉香叶提取液对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、青霉、黑曲霉的 MIC 分别为 1. 000、0. 500、0. 125、0. 250 g/mL;沉香木提取液对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、青霉、黑曲霉的 MIC 分别为 0. 25、0. 50、0. 50、1. 00 g/mL;野生沉香皮提取液对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、青霉、黑曲霉的 MIC 分别为 0. 25、0. 50、1. 00、0. 25 g/mL。4 种提取液的抑菌效果远远大于乙醇,进一步说明了沉香粗提物有较强的抑菌能力。种植沉香叶提取液对枯草杆菌的抑制效果较差,对其他 3 种菌的抑制效果较好;野生沉香叶提取液对金黄色葡萄球菌的抑制效果较差,对青霉的抑制效果较好;而沉香木提取液对黑曲霉的抑制效果较差,对金黄色葡萄球菌的抑制效果较好;沉香皮提取液对青霉的抑制效果较差,对金黄色葡萄球菌和黑曲霉的抑制效果较好。对这种差异的原因有待于进一步研究。试验结果表明,不同浓度的沉香各部分提取液在浓

表 3 沉香各部分提取液的抑菌能力

提取液来源	体积分数 (g/mL)	金黄葡萄球菌	枯草杆菌	青霉	黑曲霉
种植沉香叶	1. 000	—	—	—	—
	0. 500	—	—	—	—
	0. 250	—	+	—	—
	0. 125	+	++	+	+
野生沉香叶	1. 000	—	—	—	—
	0. 500	+	—	—	—
	0. 250	++	+	—	—
	0. 125	++	++	—	++
野生沉香木	1. 000	—	—	—	—
	0. 500	—	—	—	+
	0. 250	—	++	+	+
	0. 125	+	++	++	+
野生沉香皮	1. 000	—	—	—	—
	0. 500	—	—	+	—
	0. 250	—	++	+	—
	0. 125	+	+	++	++
60% 乙醇		+++	+++	++	++
空白对照		+++	+++	+++	+++

注:“—”表示无菌生长,“+”表示少数菌落生长,“++”表示稍多菌落生长,“+++”表示菌落生长良好。对照组为 60% 乙醇,空白组不加任何提取液。

度为 0. 5 g/mL 以上时,对 5 种供试菌种有较强的抑制作用,说明沉香的粗提物具有较强的抑菌能力,并且在较低浓度下仍然对细菌和霉菌有很好的抑制作用。

2.3 提取液的热稳定性

由表 4 可以看出,80 ℃ 处理后,只有种植沉香叶提取液还有抑菌作用,其他 3 种提取液都已经没有抑菌活性;60 ℃ 处理后,沉香各部分提取液的抑菌活性与 40 ℃ 处理相比稍微有所减弱;40 ℃ 处理后的抑菌效果最好。说明各提取液对热不稳定,其活性温度在 80 ℃ 以下。随着处理温度的升高,4 种提取液活性逐步减弱,可能是因为使各提取液的抑菌成分被破坏或挥发,因此对供试菌种的抑制作用不明显,因此在实际生产添加此类抑菌剂时,不宜进行高温加热处理。

表 4 热处理对提取液抑菌效果的影响

提取液来源	对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径 (mm)		
	80 ℃ 处理	60 ℃ 处理	40 ℃ 处理
种植沉香叶	9. 73	9. 90	15. 60
野生沉香叶	6. 00	10. 00	27. 25
野生沉香木	6. 00	10. 15	11. 90
野生沉香皮	6. 00	6. 00	13. 10

3 结论与讨论

试验表明,沉香叶、沉香木、沉香皮提取液中含有对细菌、霉菌抑制作用较强的物质,且对细菌的抑制能力比对霉菌强,又以沉香叶的抑菌效果最好。沉香是一种很好的天然防腐剂,沉香叶中的有效抑菌物具有开发和利用价值。沉香的粗提物具有较强的抑菌能力,而且在较低浓度下仍然对细菌和霉菌有很好的抑制作用,因此具有很好的应用前景,可以应用于现实中的食品生产和食品保存。

沉香各部分提取液对 5 种供试菌种都有不同程度的抑制作用,这可能与提取液所含活性成分的含量及种类有关^[7-8],其具体的作用机制还不清楚,还有待于进一步探讨。本试验结果是通过体外抑菌试验得到的,而沉香在机体内的杀菌效果、有关抑菌活性成分及抑菌机理还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 张百刚,高春燕,刘晓风. 甘草、黄花菜提取液复配抑菌防腐作用的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(9):136-138.

[2] 向智男,宁正祥. 植物性天然防腐剂及其在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂,2004(3):79-82.

[3] 陆志科,谢碧霞. 植物源天然食品防腐剂的研究进展[J]. 食品工业科技,2003,24(1):94-96.

[4] 王 蓓,刘冠卉. 植物抑菌活性研究及清咽润喉饮料的优化配方[J]. 食品工业科技,2009,30(9):246-249.

[5] 沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2000:9-11.

[6] 吴士筠,邱品琼. 荸荠皮和荸荠肉的提取液抑菌作用研究[J]. 食品科学,2009,30(19):143-146.

[7] 李 妍,苏倩倩. 巴戟天水提取物油脂抗氧化性和抗菌活性研究[J]. 食品与机械,2008,24(1):93-95.

[8] 张显忠,郭爱军,李艳玲,等. 中草药提取物的体外抑菌活性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(5):563-565.