

十五味中草药醇提液的抗真菌活性研究

袁贵英, 姬长新, 焦 镭, 朱维军

(河南农业职业学院, 河南 郑州 451450)

摘要: 选择 番、麻黄、艾叶等 15 味中草药的乙醇提取液, 利用滤纸片扩散法测试其对果蔬贮藏保鲜中常见的灰霉菌、青霉菌、毛霉菌及酵母菌 4 种真菌的抑菌作用, 并将筛选出的 5 味中草药醇提液进行 1:1:1 配伍, 测定其复配液对供试菌种的抑菌作用, 同时对其稳定性进行初步研究。结果表明: 15 味中草药中, 番、紫丹参、厚朴、苦参、迷迭香 5 种醇提取液抗真菌效果较好; 确定了 DZM(番、紫丹参、迷迭香)、ZHK(紫丹参、厚朴、苦参)、HKM(厚朴、苦参、迷迭香)组合是抗真菌效果较好的复配液。

关键词: 中草药; 醇提液; 抗真菌活性; 复配; 稳定性

中图分类号: S 567.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)07-0156-04

我国拥有丰富的天然植物中草药资源, 从植物资源中寻找抗菌活性物质是目前研究开发安全、低毒、低残留的新型防腐剂杀菌剂的重要途径之一^[1]。许多中草药都具有抗菌、杀菌作用^[2,4]。但目前, 有关中草药抗真菌方面的研究仍不多, 特别是中草药抗菌稳定性方面研究更少。因此, 该试验在查阅有关资料的基础上, 筛选了 15 味中草药, 以果蔬贮藏保鲜中常见的灰霉菌、青霉菌、毛霉菌及酵母菌 4 种病原真菌为供试菌种, 进行抗菌活性研究, 并对其复配液稳定性进行了研究, 从而为中草药提取物应用于果蔬采后保鲜防腐和天然植物防腐剂的开发和应用提供一定的理论基础和依据。

第一作者简介: 袁贵英(1972-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事食品营养与检验的教学与研究工作。

收稿日期: 2011-01-18

1 材料与方法

1.1 试验材料

中草药: 丁香、麻黄、艾叶、鱼腥草、厚朴、百部、黄柏、苦参、银杏叶、紫丹参、大青叶、黄芩、野菊花、乌梅、迷迭香, 均购于郑州向民医药超市。

供试菌种: 假丝酵母, 毛霉菌, 桔青霉, 灰霉, 均由河南农业职业学院微生物实验室提供。

营养琼脂培养基: 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g, 氯化钠 5 g, 牛肉膏 3 g, 加水定容至 1 000 mL, pH 值调整为 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 30 min, 备用。

马铃薯培养基: 马铃薯去皮并切成小块, 称 200 g, 加 800 mL 水煮沸 30 min 后过滤, 滤液中添加 20 g 琼脂和 20 g 蔗糖, 待溶化后补充水定容至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 30 min, 备用。

其它试验所用试剂均为分析纯, 由河南农业职业学

Optimization of Straw Mushroom Mycelium Culture Conditions

JIN Wei-gen

(Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou Jiangxi 344000)

Abstract: Taking the rice bran as the primary material to configuration straw mushroom mycelium liquid media, the effect of different rice bran culture medium, the pH, the vaccination quantity, the temperature and the inorganic salt the influence which grows to the straw mushroom mycelium were studied. The results indicated that the best culture medium formula which the straw mushroom mycelium grows were 2.0% rice bran, rice bran hydrolysis fluid 1.0%, KH₂PO₄ 0.25%, CaCl₂ 0.25%. The suitable craft was fermentation time 4 day, installs liquid volume 50 mL in the 250 mL triangle bottle, the fermentation temperature 33 °C, the vaccination quantity was 10%, the outset pH was 7.0.

Key words: straw mushroom; mycelium; medium with rice bran; miquid culture; optimization

院实训中心提供。

仪器设备: AUY220 型分析天平; Shimadzu Philippines 生产; FZ-102 型微型植物粉碎机; XZ 型 BCD-206T 冰箱; PHX-280HY 型生化培养箱由宁波莱福科技有限公司生产; YM-50Z 型电热式压力蒸汽灭菌器由浙江新丰医疗器械有限公司生产; FAB101-2 鼓风干燥箱由上海三发科学仪器有限公司生产; DL-CJ-2N 超级洁净工作台由北京东联哈尔仪器制造有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 中草药醇提液的制备^[9] 将供试样品在鼓风干燥箱 60℃ 烘干、用微型植物粉碎机粉碎后各取 25 g 分别置于具塞广口瓶中, 加入 75% 乙醇 200 mL 加热回流 3 h, 冷却后过滤得到粗提取液。利用减压蒸馏去除其中的乙醇, 使其浓缩至 50 mL (浓缩液已不含乙醇, 浓度为 0.5 g/mL), 醇提液经微孔过滤 (0.22 μm) 除菌后备用。

1.2.2 供试菌液的制备 将供试菌种进行斜面接种, 28℃ 条件下, 培养 48~72 h, 然后各挑取一环, 移入无菌水做成 10 倍系列稀释 用血球计数板计数。控制供试菌悬液浓度分别为: 酵母菌 (2~4) × 10⁸ CfU/mL 左右、霉菌移入适量无菌生理盐水中, 充分振荡, 制成供试菌液 (孢子数达到 (1~2) × 10⁸ cfu/mL)。

1.2.3 抗菌活性试验^[9] 中草药醇提液滤纸片制备: 取 102 型新华滤纸, 经打孔器制成 6 mm 的圆片, 将 50 片装于干燥的培养皿中, 干热 (140~160℃) 灭菌 4~6 h, 待冷却至室温后, 无菌操作将 5 mL 中草药醇提液原液加入培养皿中让其充分浸透 24 h, 把滤纸片不重迭的转入干燥灭菌的平皿中备用。滤纸片法测定抗菌活性试验: 在无菌条件下, 用无菌移液管移取 1 mL 供试菌液加到平皿上, 再将灭菌后的培养基倒入培养皿, 每皿 20~25 mL。待其冷却凝固后, 用无菌镊子夹取浸透中草药醇提液原液的滤纸片贴在含菌平板上, 每菌做 3 次重复。酵母菌、霉菌置于 28℃ 条件下分别培养 48、72 h 后测定滤纸片上抑菌圈的大小, 同时以蒸馏水和 0.2% 山梨酸钾作对照, 初步测定 15 味中草药提取液对供试菌的抗菌效果。中草药醇提液复配组合抗菌试验: 将初步筛选有效的中草药进行三复配抗菌试验。复配采用中草药提取原液, 浓度比为 1:1:1, 测定其对供试菌抗菌效果 筛选出抗菌效果较好的复配组合。

1.2.4 中草药提取液稳定性的研究 光照对中草药醇提液抑菌效果稳定性的影响: 以青霉菌作为供试菌, 将中草药提取液分成 7 等份, 分别在 4 000~6 000 lx 日光灯光照下做 2、4、8、16、24、48、72 h 处理 用滤纸片法测试抑菌率的方法进行复配提取液抑菌活性测定。温度对中草药醇提液抑菌效果稳定性的影响: 以青霉菌作为供试菌, 把中草药提取液分成 6 份, 温度处理分别为 -5.5、

30、55、80、100℃, 处理时间 1 h, 用滤纸片法测试抑菌率的方法分别测定其抑菌活性。不同 pH 对中草药醇提液抑菌效果稳定性的影响: 以青霉菌作为供试菌, 把中草药提取液 pH 分别调为 4、5、6、7、8 和 9 (调整用酸: 5% 柠檬酸, 调整用碱: 1% NaOH), 用滤纸片法测试抑菌率的方法进行复配提取液抑菌活性测定。贮存时间对中草药复配液抑菌活性的影响: 以青霉菌作为供试菌。在恒温培养箱 30℃ 贮存中草药复配液, 分别处理 0.5、10、15、20、25、30 d 后, 用滤纸片测试抑菌率的方法进行复配提取液抑菌活性测定。

2 结果与分析

2.1 中草药醇提液对供试真菌生长的抑制作用

中草药提取液的抑菌效果如表 1 所示。试验测定表明, 不同的中草药提取液在抑菌活性和抑菌谱表现出很大的差异。综合抑菌效果, 初步筛选丁香、紫丹参、厚朴、苦参、迷迭香 5 种中草药作为进一步试验材料。

2.2 筛选对供试菌抑制作用的中草药醇提液复配液

采用筛选出的丁香(D)、紫丹参(Z)、厚朴(H)、苦参(K)、迷迭香(M) 5 种中草药, 以其单一提取原液, 以 1:1:1 三复配为供试复配液, 10 种复配液编号分别为 DZH、DZK、DZM、DHK、DHM、DKM、ZHK、ZHM、ZKM、HKM (表 2)。测定复配液对供试菌种的抑制作用, 试验方法同 1.2.3, 复配液的抑菌效果见表 3。

表 1 不同提取液及 2 种对照对供试菌种抑菌圈直径

	mm			
	假丝酵母	青霉	毛霉	灰霉
丁香	7.9	10.6	9.8	10.4
麻黄	9	-	-	-
艾叶	-	-	-	-
鱼腥草	-	-	7.5	7.2
厚朴	7.9	10.6	9.8	9.2
百部	-	-	-	-
黄柏	8.2	-	-	7.4
苦参	7.5	13.1	12.4	8.1
银杏叶	-	-	-	-
紫丹参	8.2	16.8	11.6	12.4
大青叶	-	-	-	-
黄芩	8	-	-	8.1
野菊花	8	-	-	7.6
乌梅	8	-	-	8.1
迷迭香	7.5	7.9	8.4	7.8
蒸馏水	-	-	-	-
0.2% 山梨酸钾	7.9	8.1	8.9	8.6

注: 表中各数据均为 3 个平行, 3 次重复的平均值, “-”表示无抑菌作用。下同。

表 2 5 种中草药提取液三三复配

编号	复配液成分		
DZH	丁香	紫丹参	厚朴
DZK	丁香	紫丹参	苦参
DZM	丁香	紫丹参	迷迭香
DHK	丁香	厚朴	苦参
DHM	丁香	厚朴	迷迭香
DKM	丁香	苦参	迷迭香
ZHK	紫丹参	厚朴	苦参
ZHM	紫丹参	厚朴	迷迭香
ZKM	紫丹参	苦参	迷迭香
HKM	厚朴	苦参	迷迭香

表 3 提取液复配液对供试菌种的抑菌圈直径 mm

	假丝酵母	青霉	毛霉	灰霉
DZH	8.6	-	8.4	9.1
DZK	9.4	8.7	9.6	8.6
DZM	11	13.1	14.1	12.8
DHK	9.8	10.1	11.2	10.9
DHM	-	9.2	8.9	8.3
DKM	8.9	10.3	9.7	8.9
ZHK	11.2	13.3	12.8	11.7
ZHM	9.2	8.9	9.7	8.6
ZKM	-	-	-	-
HKM	10.8	12.2	13.2	11.9

由表 3 复配效果可知 复配中草药提取液的抑菌作用并不是几种中草药提取液的抑菌作用简单加合。中草药各成分的复合作用,可能既存在着相互增效作用,又存在有拮抗作用。用以复配的单味中草药均为筛选出的相对抑菌效果较好的,复配后 DZM、ZHK、HKM 复配液对供试菌种的抑菌效果均有不同程度提高,而其它复配抑菌作用无明显增效,并且还有的复配比单一提取液抑菌作用下降甚至失去抑菌效果,原因可能是由于不同中草药提取液的有效成分产生拮抗,亦可能相互反应生成新的物质,致使复配液抑菌活性降低或失去抑菌活性。很多中草药成分相互之间的反应机理尚不清楚,有待今后进一步研究。根据试验结果,选择复配效果较好的 DZM、ZHK、HKM 进行进一步研究。因该试验时间所限,仅做了提取液 1:1:1 三配比方案,对于其它不同配比方案的试验效果,将在今后的工作中进一步研究。

2.3 中草药复配液抑菌效果稳定性的研究

2.3.1 光照对中草药复配液抑菌效果稳定性的影响

由图 1 可知,随光照时间的延长,3 组中草药复配液的抑菌活性均逐渐下降;光照 8 h,3 组抑菌活性下降不明显,16 h 后抑菌活性则显著性下降,说明短时间光照对中草药复配液的抑菌活性影响不大,但光照时间长则会产生显著影响(图 1)。

2.3.2 温度对中草药复配液抑菌效果稳定性的影响

由图 2 可知,中草药复配液经 80℃ 以上温度处理 1 h,抑菌圈直径降至 60% 以下;100℃ 以上温度处理 1 h,抑菌圈直径降至 20% 左右;因此可以得出中草药提取液随着处理温度的提高,中草药提取液活性均逐渐下降(图 2)。

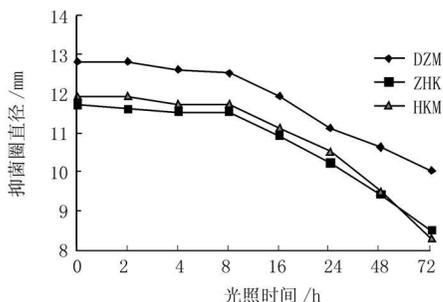


图 1 光照时间对中草药复配液抑菌活性的影响

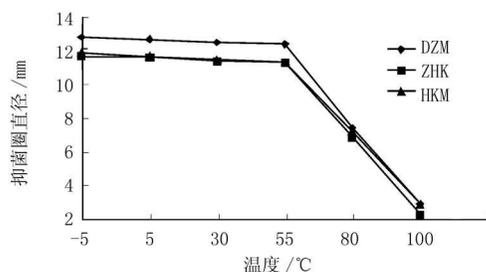


图 2 温度对中草药复配液稳定性的影响

2.3.3 不同 pH 对中草药复配液抑菌效果稳定性的影响 由图 3 可知,3 组中草药复配液的抑菌活性在 pH 6 左右最强,酸性或碱性增强,复配液的抑菌活性均呈下降趋势。综上所述 在果蔬贮藏保鲜实验中,要注意中草药提取液抑菌作用的适用条件,在低温、pH 中性偏酸的环境下,使用中草药提取物作抑菌防腐剂,其活性较强,能发挥更好的保鲜效果。

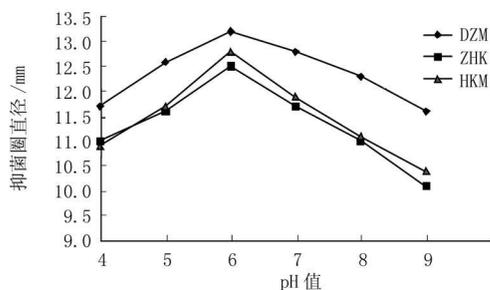


图 3 pH 对中草药复配液抑菌效果稳定性的影响

2.3.4 不同贮存时间对中草药复配液抑菌活性的影响

由图 4 可知,中草药复配液随着贮存时间的延长,抑菌活性呈下降趋势;贮存时间在 10 d 内,3 组抑菌活性下降速度慢,而 15 d 后抑菌活性速度下降明显加速,说明短时间贮存对 3 组中草药复配液抑菌活性影响不是太大,但长时间贮存则对其抑菌活性有显著影响。

综合以上测定结果,光照时间、处理温度、贮藏时间、pH 的变化都会影响到中草药复配液抑菌活性。对于所筛选出的 3 组中草药复配液来说,在一定的光照强度条件下,光照时间越长,其抑菌活性下降越多;同样的处理时间,但在不同的处理温度下测定 3 组中草药复配液抑菌活性,则会出现处理温度越高,其抑菌活性下降

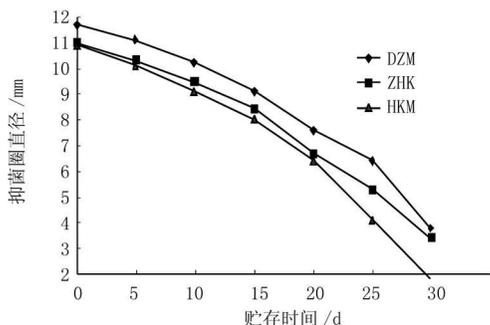


图 4 贮存时间对中草药复配液抑菌效果稳定性的影响

越快,但同样贮存温度,贮存时间越长,草药复配液抑菌活性越低;而 pH 为 6 时,中草药复配液抑菌活性最好。这些结果提示,若将中草药提取液用于果蔬贮藏保鲜,应注意其适用条件,最好应用在低温贮藏、中性偏酸的果蔬中。这样,中草药提取液抑菌活性不容易受到破坏,能更好的发挥保鲜效果。

3 结论

通过对 15 种中草药单一提取液的抑菌作用初步筛选,丁香、紫丹参、厚朴、苦参、迷迭香 5 种中草药提取液

的抑菌效果较好,抑菌谱较宽。

采用筛选出的 5 种中草药提取液进行复配,测定 10 种复配液抑菌效果,筛选出 DZM、ZHK 和 HKM 的综合抑菌效果较好。

对复配液 DZM、ZHK 和 HKM 的稳定性做了初步研究,得出 3 组复配液对青霉菌的抑菌活性最佳抑菌 pH 为 6,适用温度范围较广,同时应该低温避光保存。

参考文献

- [1] 朱璇.天然中草药果蔬防腐保鲜剂的研究进展[J].新疆农业科学,2004,41:110-111.
- [2] 余世望,范青生,肖小年,等.60种食药两用中药抗菌防腐作用研究[J].天然产物研究与开发,1997,9(4):61-67.
- [3] 吴京平.新型植物源天然食品防腐剂及其抑菌性能[J].中国食品添加剂,2009(3):61-64.
- [4] 章薇,熊国远,吴世义.中草药抗菌抑菌作用在食品保鲜中的应用[J].肉类工业,2009(7):52-54.
- [5] 吴传茂,吴周和.从植物中提取天然防腐剂的研究[J].食品科学,2000,21(9):24-27.
- [6] 周邦靖.常用中药的抗菌作用及其测定方法[M].重庆:科学技术文献出版社重庆分社,1987:178-238.

Study on Antifungal Activity of Alcohol Extracts from 15 Kinds of Chinese Herbal Medicine

YUAN Gui-ying, JI Chang-xin, JIAO Lei, ZHU Wei-jun

(Henan Vocational College of Agriculture, Zhengzhou, Henan 451450)

Abstract: The antifungal effect of alcohol extracts from 15 selected chinese herbal medicine (Clove, Ephedra, Chinese mugwort leaves etc.) were tested by using the filter paper method. 4 kinds of usual fungal (including botrytis cinerea, penicillium, mucor and yeast) in fruit and vegetable storage were used for experiment material. The results showed that the antifungal effect of alcohol extracts from Clove, Purple Salvia, Magnolia officinalis, Sophora flavescens ait and Rosemary were better than of other alcohol extracts. Alcohol extracts of the selected five were re-dubbed by 1:1:1 to do antifungal test on the subject bacteria. The results showed that the compound liquid DZM (Clove, Purple Salvia, Rosemary), ZHK (purple Salvia, Magnolia officinalis, Sophora flavescens ait), and HKM (Magnolia officinalis, Sophora flavescens ait, Rosemary) had the best-performing compatibility.

Key words: Chinese herbal medicine; alcohol extract; antifungal activity; compound; stability