

枫香叶精油抑菌活性及抗氧化活性研究

刘玉民¹, 刘亚敏¹, 李鹏霞²

(1.西南大学资源环境学院, 重庆 400716; 2.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 采用水蒸气蒸馏法提取枫香叶精油, 用滤纸片法测定精油的抑菌活性, 用平板涂布法测定其最低抑菌浓度(MIC), 同时研究了枫香叶精油抑菌活性的酸碱稳定性、热稳定性、紫外稳定性和抗氧化稳定性。结果表明: 枫香叶精油对5种受试菌的抑制效果有较大差异, 对革兰氏阳性菌和霉菌的抑制作用较强, 对革兰氏阴性菌的抑制作用较弱; 精油对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、黄曲霉、青霉的MIC分别为1.25%、0.625%、5%、2.5%、2.5%; 精油对温度和紫外照射具有良好的稳定性, 在不同的pH值条件下其抑菌活性不稳定, 酸性环境下其抑菌活性强, 碱性环境下抑菌活性弱; 精油具有抑制食物氧化的作用, 随着精油浓度增大其抗氧化性增强。

关键词: 枫香叶精油; 抑菌活性; 稳定性; 抗氧化活性

Study on Antimicrobial Activities of Essential Oil from Leaves of *Liquidambar formosana* Hance as well as Its Antioxidant Activity

LIU Yu-min¹, LIU Ya-min¹, LI Peng-xia²

(1.College of Resource and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Institute of Agro-food Science Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: Essential oil was extracted from leaves of *Liquidambar formosana* Hance by steam distillation method. Paper disc assay and spread-plate method were used to determine its antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration (MIC). Stability of antimicrobial activity of the essential oil to acid, base, heat and ultraviolet ray, as well as its antioxidant activity, were studied. Results showed that the antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* Hance against five tested microbes were largely different. The essential oil had strong antimicrobial effect against the Gram positive bacteria while weak effect against Gram negative bacteria. The MICs of the essential oil against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium oxalicum* were 1.25 %, 0.625 %, 5 %, 2.5 % and 2.5 % respectively. The antimicrobial activities of the essential oil were stable under the conditions of heat and ultraviolet ray, but were unstable under different pH values, strong in acid and weak in base. The essential oil had good antioxidant activity: the higher the concentration of essential oil, the stronger the antioxidant effect.

Key words: leaves of *Liquidambar formosana* Hance; essential oil; antimicrobial activity; stability; antioxidant activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0134-04

枫香(*Liquidambar formosana* Hance), 又名枫树、三角枫, 为金缕梅科枫香属的代表植物, 主要分布于秦岭、淮河以南至珠江流域及台湾、海南、四川、西藏等省区^[1]。全株均可入药; 树皮、根、叶味辛、微苦、性温、气香, 有祛风湿、行气、解毒的功效; 果味辛、微涩、性微温, 有通经活络的功效; 树脂味淡、性平, 有止血生肌的功效。枫香鲜叶精油含量0.49%, 其中萜类及其衍生物成分占82.28%, β -蒎烯、 α -蒎烯、(E)-2-己烯醛、柠檬烯、 β -石竹烯、芳樟

醇等为其主要成分。枫香精油中的萜类化合物具有镇痉、平喘、抗肿瘤、抗菌和镇咳等多种生物活性^[2], 倍半萜类具有抑制微生物生长的作用^[3]。枫香精油中多种成分还具有特殊的芳香气味, 是有机化工、食品工业生产的重要原料: β -蒎烯可用作生产香料、合成VE的原料; 芳樟醇是合成芳樟酯类香料化合物和VE、VA、VK的重要原料, 也可用于各种香料的调配; (E)-2-己烯醛具有苹果清香气味, 被广泛应用于香料的调配; 石竹烯是高级香精成分, 可作为化妆品、香水、

收稿日期: 2008-09-20

基金项目: “十五” 国家科技攻关项目(2004BA604A05)

作者简介: 刘玉民(1973-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事植物栽培与利用研究。E-mail: yuminliu@163.com

香皂的重要原料^[4];柠檬烯可以作为添香剂^[5]。

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、青霉、黑曲霉、黄曲霉等对食品卫生、临床医学和生物材料具有严重的危害和影响。随着人们生活水平不断提高和对健康的日益关注,对防腐剂等食品添加剂在安全性上提出了更高的要求,用天然防腐剂代替化学合成防腐剂已成为发展趋势;由于抗生素的滥用造成了很多微生物产生了抗药性,临床上急需寻找新的抗菌药源。因此,本实验就枫香叶精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、青霉、黄曲霉的抑制作用进行了研究,旨在为寻找一种新的抗菌药源和有效且安全的食品天然防腐剂,也为枫香资源的综合开发利用提供一些有益的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枫香叶于2007年4月采自西南大学校园,经西南大学林学教研室鉴定为枫香,处理后用其鲜叶提取精油。

青霉素钠 哈药集团制药总厂;酮康唑 桂林大华药业有限公司;TBHQ(叔丁基对苯二酚) 滕州市天益工贸有限公司;丙酮 上海南翔试剂有限公司。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*);青霉(*Penicillium oxalicum*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*),供试菌种来源于西南大学微生物实验室。

牛肉膏蛋白胨培养基(细菌选用):牛肉膏3g、蛋白胨10g、NaCl 5g、琼脂18g、蒸馏水1000ml、pH7.2~7.4。

马铃薯蔗糖琼脂培养基(霉菌选用):马铃薯(去皮切块)200g、蔗糖20g、琼脂18g、蒸馏水1000ml,自然pH值。

1.2 仪器与设备

挥发油测定仪、压力蒸汽灭菌锅、干热灭菌器、电热恒温培养箱、旋涡混合器、微波炉、超净工作台、移液器等。

1.3 方法

1.3.1 枫香叶精油提取方法

准确称取枫香树鲜叶1000g,分成10份依次连续提取其精油,精油提取采用水蒸气蒸馏法^[6],提取仪器为挥发油测定仪,用少量乙醚多次萃取,再用少量无水硫酸钠干燥挥去乙醚后得精油,提取率为0.49%(即每100g鲜叶提取精油0.49ml)。

1.3.2 供试菌悬液的制备

供试菌的制备:在相对应的试管斜面培养基上,细菌在30℃下活化18h,霉菌在27℃下活化48h。

菌悬液的制备:细菌使用平板计数法,霉菌使用显微镜直接记数法测菌体个数,调至浓度为 $1.0 \times 10^6 \sim$

1.0^7 cells/ml的菌悬液,备用^[7]。

1.3.3 抑菌活性测定

采用滤纸片法^[7]:制直径为6mm圆形滤纸片,灭菌后备用;将各种待测菌悬液各取0.2ml在相应的固体培养基上均匀涂抹,制成含菌平板;将滤纸片放入枫香叶精油原液中浸泡2h,取浸泡过滤纸片贴在含菌平板上,每皿贴滤纸片3片。用丙酮浸泡的滤纸片做空白对照,用浓度为1mg/ml(稀释剂为蒸馏水)的青霉素钠浸泡的滤纸片作为细菌抑菌对照,用浓度为0.4mg/ml(稀释剂为丙二醇)的酮康唑浸泡的滤纸片作为霉菌抑菌对照。细菌置培养箱中30℃下培养24h,霉菌置培养箱中27℃下培养72h。测量抑菌圈的直径(mm),做5次平行实验,结果取均值。

1.3.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定

采用平板涂布法^[8]:将浓度为10%、5%、2.5%、1.25%、0.625%、0.3125%(溶剂为丙酮)的精油定量地加入到培养基中,充分混合均匀,倒入培养皿,待培养基冷却后,用接种针于各培养基中依次涂供试菌液0.2ml,细菌置培养箱中30℃下培养24h,霉菌置培养箱中27℃下培养72h,观察菌体的生长情况,每个浓度做3次重复,从无菌生长的培养基中找出提取物浓度最低的培养基,即为该抑菌剂的最低抑菌浓度。

1.3.5 抑菌活性酸碱稳定性实验

用2%的NaOH和50%的柠檬酸分别将培养基pH值调为4、5、6、7、8、9、10七个梯度,用20%浓度(溶剂为丙酮)的精油进行抑菌效果测定(方法同1.3.3节),比较pH值对精油抑菌活性的影响。

1.3.6 抑菌活性热稳定性实验

将20%浓度(溶剂为丙酮)的精油分别置于20、40、60、80、100和121℃下热处理15min,然后按照1.3.3节的方法进行抑菌活性测定。

1.3.7 抑菌活性紫外稳定性实验

将20%浓度的精油(溶剂为丙酮)分别在紫外灯下处理5、10、15、20、25min,然后按照1.3.3节中的方法进行抑菌活性测定。

1.3.8 抗氧化稳定性实验

准确称取精油0.5、1.0、2.0g各一份,分别放入装有50g新鲜猪油的锥形瓶中,拌匀,另外取两份相同的猪油各50g,其中一份加入10mg的TBHQ作对照,另一份作空白对照(CK)。各试样在60℃下搅拌0.5h,使加入物充分溶解,用棉塞塞好,置于恒温箱中60℃恒温保存,每隔24h搅拌2min,并交换它们在恒温箱中的位置,每隔3d取样一次,采用硫代硫酸钠滴定法测定其过氧化值(POV)^[9]。

2 结果与分析

2.1 枫香叶精油抑菌活性

采用滤纸片法研究枫香叶精油的抑菌活性, 由表1可见, 枫香叶精油原液对5种受试菌种均有抑制作用, 其中对黄曲霉、青霉有很强的抑制作用, 抑菌圈直径分别为对照酮康唑的1.38倍和1.39倍, 表明其对真菌有很好的抑制效果; 对枯草杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用较强, 抑菌圈直径相当于对照青霉素钠的1.13倍和0.95倍, 表明其对革兰氏阳性菌有较好地抑制效果; 对大肠杆菌的抑制作用相对较弱, 抑菌圈直径仅为青霉素钠的0.53倍, 表明其对革兰氏阴性菌抑制效果较弱。

表1 枫香叶精油对不同菌种抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* Hance against 5 tested microbes

菌种	抑菌圈直径(mm)			
	精油原液	青霉素钠	酮康唑	丙酮
枯草杆菌	18.7	16.6	×	0
金黄色葡萄球菌	14.8	15.5	×	0
大肠杆菌	9.3	17.3	×	0
黄曲霉	16.3	×	11.8	0
青霉	13.1	×	9.4	0

注: ×表示没有测定。

2.2 枫香叶精油的最低抑菌浓度(MIC)

枫香叶精油对各受试菌均有一定的抑制作用, 因此, 采用适当的枫香叶精油稀释浓度对各受试菌进行稀释敏感实验, 由表2可以看出, 枫香叶精油对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、黄曲霉、青霉各受试菌的最小抑制浓度(MIC)分别是1.25%、0.625%、5%、2.5%、2.5%。

表2 枫香叶精油对供试菌的MIC

Table 2 MICs of essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* Hance against 5 tested microbes

菌种	精油浓度(%)					
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125
枯草杆菌	—	—	—	—	+	+
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	+
大肠杆菌	—	—	+	+	+	+
黄曲霉	—	—	—	+	+	+
青霉	—	—	—	+	+	+

注: —表示无菌落出现; +表示有菌落出现。

2.3 枫香叶精油抑菌效果的酸碱稳定性

由图1可见, pH值对枫香叶精油抑菌活性有较大的影响, 酸性条件下抑菌活性强, 当pH值在6~8之

间随pH值升高其抑菌能力下降, 当pH值大于8时其抑菌能力又有所提高。低pH值抑菌力增强可能有两方面的原因: 一方面 H^+ 的作用使细菌所处环境发生变化, 降低了细菌的活性; 另一方面, pH值降低引起非极性酚类化合物上所带的酚羟基的电离度变小, 疏水性增加, 酚类更易溶于细菌细胞膜的脂相及蛋白质的疏水区域, 和细胞膜上的蛋白质结合能力更强, 因而pH值降低, 抑菌作用增大^[10]; pH值大于8时, 其抑菌能力有所提高的原因可能是强碱性环境本身抑制了细菌的生长。

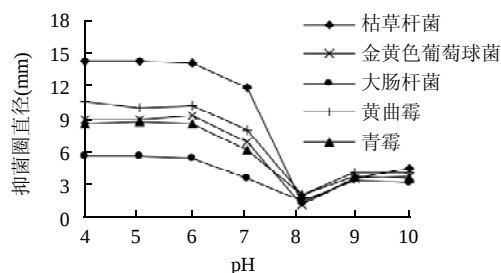


图1 pH值对枫香叶精油抑菌效果的影响

Fig.1 Antibacterial activities of essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* Hance at different pH values against 5 tested microbes

2.4 枫香叶精油抑菌效果的热稳定性

由图2可见, 经过不同温度处理的枫香叶精油对受试菌的抑菌圈直径没有明显变化, 表明枫香叶精油在加热的条件下, 其抗菌成分并未受到显著影响, 说明枫香叶精油中的抗菌成分具备良好的热稳定性。这种良好的耐热性对于一些需经高温处理的食品的防腐保鲜具有重要的现实意义。

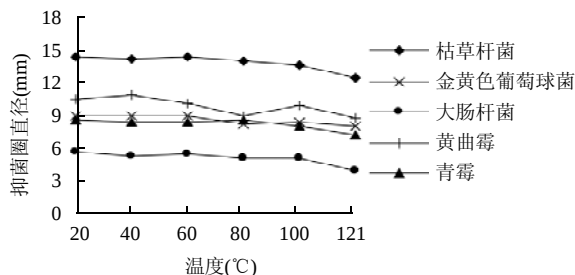


图2 温度对枫香叶精油抑菌效果的影响

Fig.2 Antibacterial activities of essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* Hance at different temperatures against 5 tested microbes

2.5 精油抑菌效果的紫外稳定性

由图3可见, 随紫外光处理时间的变化, 枫香叶精油的抑菌活性基本保持不变。说明枫香叶精油对紫外光具有极高的稳定性。

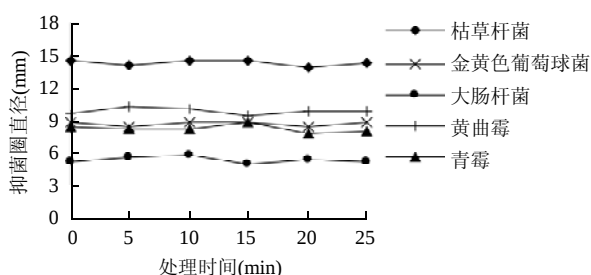


图3 紫外光处理对枫香叶精油抑菌效果的影响

Fig.3 Antibacterial activities essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* Hance under ultraviolet irradiation for different time

2.6 枫香叶精油的抗氧化性

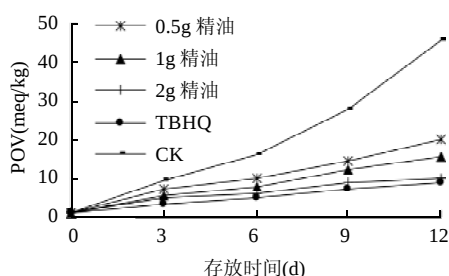


图4 枫香叶精油对猪油 POV 值的影响

Fig.4 Effects of different dosages of essential oil from leaves of *Liquidambar formosana* Hance on POV value of oil during storage

添加枫香叶精油及 TBHQ 的猪油在存放期间的 POV 值变化见图 4。经枫香叶精油处理的猪油在整个存放期间, POV 的上升速度较空白对照慢, 从第 6 天开始呈现出比较明显的差异, 表明枫香叶精油能较显著的抑制猪油的氧化; 比较精油用量分别为 0.5、1.0、2.0g 的 POV 值可以看出, 精油的抗氧化效果随着精油用量的增大而有所增强; 同使用 TBHQ 的样品相比较来看, 枫香叶精油的抗氧化效果比 TBHQ 差。

3 结 论

3.1 枫香叶精油对 5 种受试菌均具有抑制作用, 在细

菌中对革兰氏阳性菌的抑制作用大于对革兰氏阴性菌的抑制作用, 对革兰氏阳性菌中的枯草杆菌和金黄色葡萄球菌均有很显著的抑制效果, 但对枯草杆菌的抑制作用受精油浓度影响较大, 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性受精油浓度影响较小, 仅有 0.625% 的精油浓度就能抑制金黄色葡萄球菌生长; 对革兰氏阴性菌大肠杆菌的抑制作用较弱, 且受精油浓度影响较大, 只有大于 5% 的精油浓度才能抑制其生长; 枫香叶精油对霉菌的抑制作用显著, 但受精油浓度影响较大, 大于 2.5% 的精油浓度才能抑制两种霉菌的生长。

3.2 枫香叶精油对温度和紫外照射具有良好的稳定性; pH 值对枫香叶精油的抑菌活性有较大影响, 在酸性环境下其抑菌活性强, 在碱性环境下抑菌活性弱。

3.3 枫香叶精油能增强食物的抗氧化性, 但在供试的浓度范围内其抗氧化效果比 TBHQ 稍差; 枫香叶精油的抗氧化效果受自身浓度的影响较大, 随着精油浓度增大其抗氧化性增强。

参考文献:

- [1] 火树华. 树木学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 197-198.
- [2] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 226; 350-429.
- [3] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [4] 檀东飞, 吴若菁, 梁鸣, 等. 棘托竹荪精油化学成分及抑菌作用的研究[J]. 菌物系统, 2002, 21(2): 228-233.
- [5] 吴翠萍, 林清强, 陈密玉, 等. 宁德产小鱼仙草精油化学成分及抑菌作用的研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2006, 22(1): 101-106.
- [6] 国家药典委员会. 中国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 136-137; 143; 附录: 57-58.
- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [8] 赵淑艳, 呼世斌, 吴焕利, 等. 山茱萸提取物抑菌活性成分稳定性的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(1): 98-101.
- [9] 中国国家标准委员会. GB/T5009.37—2003 食用植物油卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 顾仁勇, 刘莹莹. 山苍子精油抑菌及抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 86-89.