

防腐抑菌中药的微量快速筛选法研究及其应用

范青生

马振亚

(中德联合研究院“江西-OAI”)

(陕西中医学院微生物与免疫研究室)

摘要 本文探讨了筛选防霉防腐中药的微量快速筛选方法。试用 MTT 微量快速比色分析来测定药物对细菌和酵母菌的抑制作用,用培养板连续稀释法代替传统的试管稀释法测定药物抑制霉菌的作用。此法具有操作方便、节省材料、客观可靠、快速等优点。用此法筛选了几种传统食品类中药,其中以丁香抗霉菌作用最佳,乌梅对细菌、酵母有较明显的抑制作用,可作为食品防霉防腐剂。

关键词 微量快速测定;抗菌作用;中药

细菌、酵母菌、霉菌等微生物的侵袭是导致食品腐败的主要因素^[1]。由于我国防霉防腐技术落后,以往每年腐烂的粮食占总产量的 5% 左右。因此,新型防霉防腐剂的研制已成为国内外倍受重视的研究课题。由于合成食品添加剂给健康带来一定的危害,人们越来越倾向于在食品加工和贮藏过程中尽可能使用天然物质作为抑菌防腐剂^[2]。所以,从天然植物中药中筛选出具有抑菌作用的食物保藏剂是很有实际意义的。

40 年来,用于研究植物抑菌作用的方法没有什么变化和发展,主要为琼脂扩散法、液体稀释定量法^[3]。这两种方法的操作和取得数据均颇费时间,并且需消耗大量的试剂^[4]。1983 年 Mosmann 首次运用 MTT 比色分析法来间接反应细胞增殖水平^[5],但是,将此法用来筛选植物药抑菌作用,尚未见报道。本文将 MTT 比色分析法试用于抑菌中药的筛选,用培养板连续稀释法来筛选抑霉菌中药均获满意效果。本法快速准确,操作简便,成本极低,很有推广价值,现将其方法及试用结果报告如下。

材料与 方法

(一) 供试菌种

黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、娄地青霉 (*Penicillium roqueforti*)、桔青霉 (*P. citrinum*)、黑根霉 (*Rhiz. nigricans*)、黄曲霉 (*A. flavus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金

黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

(二) 供试食品类中药

1. 乌梅、丁香、肉桂、肉豆蔻、藿香。将上述中药置 40℃ 烤箱 4 小时,碾碎至 20 目以下,称重后装入三角瓶中,加入 5 倍量 70% 乙醇浸泡三天,不时摇动,收集滤液后重复提取一次,3000 r/min 离心 30 分钟,将上清液蒸发成含生药 100% (W/V) 浓度,密封置 4℃ 保存。

2. 沙棘油: 选用沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) 干果采用分馏提取法提取,使用时加少许 Tween-80 制成混悬液。

(三) 主要试剂

1. 营养液体培养基(上海生物制品研究所,批号 870911), pH 为 7.2, 用于细菌培养。

2. Sabouroud 培养基和 PDA 培养基: 用于霉菌培养。

3. 葡萄糖-酵母汁-蛋白胨液体培养基: 用于酵母菌培养。

4. MTT 溶液: 将噻唑蓝 [3-(4,5 dimethylthi-azol-zyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Tluka AG 瑞士 269259#)] 用 PBS-G 配成 1 mg/ml 使用液, 4℃ 避光保存。

5. 酸化异丙醇: 含 0.04 mol/L HCl 的异丙醇溶液。

(四) 供试菌液准备

1. 细菌菌液准备: 将接种于固体培养基的

细菌经6—12小时培养(处于对数生长期),以生理盐水洗下,经1500 r/min离心3分钟,吸取中间均匀菌悬液作实验用。用比浊法或显微镜下计数法得出细菌含量,用培养液稀释成 10^5 — 10^6 /ml浓度。

2. 酵母菌液准备:将酵母菌接种于葡萄糖-酵母汁-蛋白胨液体培养基中,置28℃温箱培养24小时后,将浓度调整为 10^7 — 10^8 /ml。

(五) 抑制细菌、酵母菌药物的 MTT 微量快速筛选法

将洁净的40孔或96孔板置紫外灯下照射30分钟后,每孔加入培养液0.1 ml,每排第1孔加入一定量的药液后,依次对倍稀释至第9孔,然后每孔加入供试菌液0.1 ml,第10孔作对照孔,一式三份。抑制细菌试验将培养板置37℃培养2小时,抑制酵母菌试验置28℃培养6小时,然后每孔加入 MTT 溶液50 μ l,再培养1—4小时,当培养板底微显蓝色颗粒样物时,即可离心(3000 r/min, 10分钟),吸弃上清液,加入酸化异丙醇100 μ l,振荡1分钟或用加样器吸打三次,以助其溶解。置酶标仪570/630 nm处比色。按下式计算药物抑菌百分率:

$$\text{抑菌百分率}(\%) = 1 - \frac{\text{含不同浓度药液孔 OD 值}}{\text{对照孔 OD 值}} \times 100\%$$

(六) 抑制霉菌药物的培养板连续稀释筛选法

将24孔培养板经紫外线按上法消毒后,各孔按上法将药液倍比稀释至1:2560为止,最后一孔仅加培养基作霉菌对照孔,然后每孔加入50 μ l 供试菌孢子液(浓度约为 10^8 /ml),置25—28℃培养16—24小时,待对照孔霉菌生长后即可观察结果(MIC)。试验孔置解剖镜或低倍显微镜下观察,无网络样菌丝生长才可确定有抑制霉菌作用。

结 果

(一) MTT 微量快速比色 OD 值与菌量关系

MTT 比色分析法的原理,是利用活细菌细胞内的琥珀酸脱氢酶等呼吸酶,将染料 MTT 还原成不溶性的甲臜颗粒,按酸化异丙醇溶解甲臜颗粒所呈现的颜色深浅(以 OD 值表示),来反映细菌、酵母菌数量以及代谢的活跃程度。我们将大肠杆菌(5×10^6 /ml)、啤酒酵母(5×10^8 /ml)对倍稀释成不同浓度的菌液,测定菌量改变与 OD 值关系。结果见图1。细菌数量在 10^4 — 10^6 /ml、酵母菌在 10^6 — 10^8 /ml范围内,几乎与 OD 值成正比,菌量越多,OD 值越大。

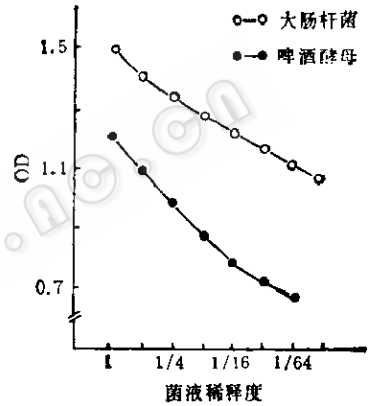


图1 菌量与 OD 值关系
1. 大肠杆菌 2. 啤酒酵母

(二) MTT 微量快速比色分析法与比浊法比较

在筛选抗菌药物时,为了证实 MTT 法可以代替传统方法,我们用试管连续稀释后比浊分析(721分光光度计, $\lambda = 520$ nm)和 MTT 比色分析,检测了同一次各稀释度的中药对同一批大肠杆菌菌液的抑制作用,结果见图2。说明两法呈正相关,相关系数 $r = 0.9123$ 。两种方法中乌梅醇提液(100% W/V)的1/5—1/40稀释度几乎均为100%抑制,其一致性较好。

(三) MTT 微量快速法筛选结果的稳定性

将同批供试菌液严格按同样时间培养和操作,测定代谢 MTT 后的 OD 值,每次10孔,实验重复三次,结果见表1。说明各菌种孔间 SD 值很小,离散程度不大,变异系数均在6%

以下,以大肠杆菌实验变异系数最小,为 3.22%。

表 1 MTT 微量快速法稳定性分析

菌株	OD($\bar{x} \pm SD$)	变异系数 (CV)
啤酒酵母	2.3988 \pm 0.1434	5.98%
大肠杆菌	5.1064 \pm 0.1643	3.22%
金黄色葡萄球菌	0.7113 \pm 0.0362	5.08%

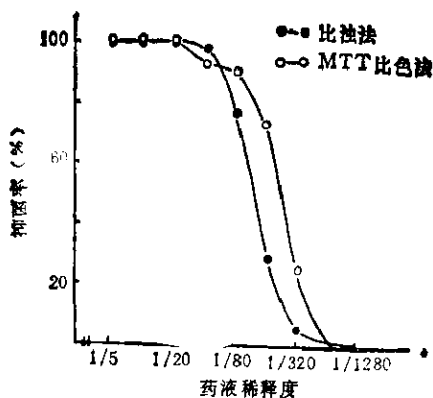
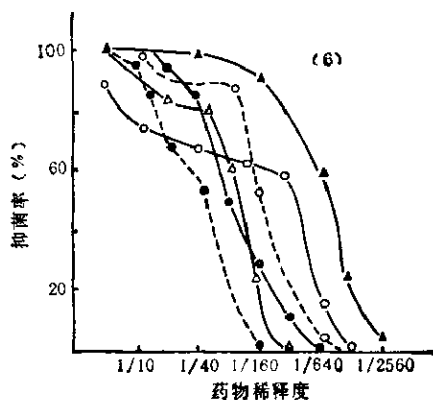
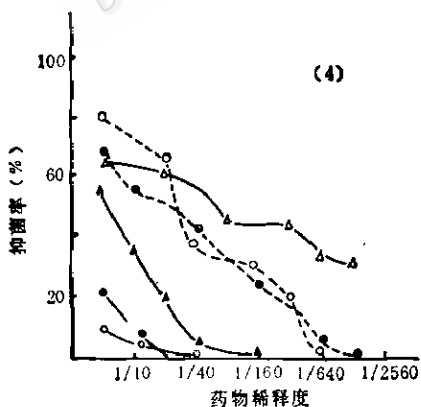
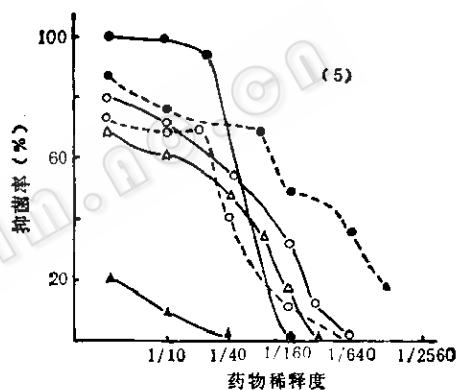
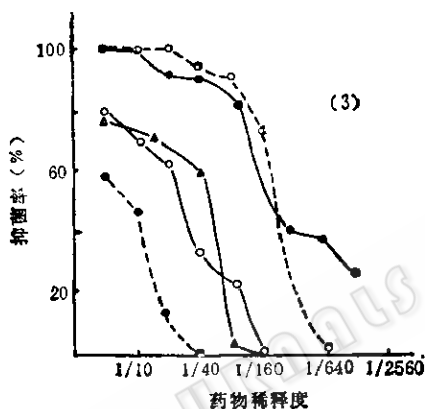


图 2. 乌梅对大肠杆菌抑制作用方法学比较
1. MTT 比色法 2. 比浊法

(四) MTT 微量快速法培养适宜时间

将大肠杆菌(菌数为 $5 \times 10^6/\text{ml}$) 培养 0、2、6 小时后,加 MTT 培养 2 小时,比较所得的 OD 值, 结果分别为 0.263 ± 0.02 、 1.10 ± 0.05



- ▲—▲ Fs 丁香
- Fm 乌梅
- Cc 肉桂
- Hd 藿香
- △—△ Fn 沙棘油
- Sm 肉豆蔻

图 3 中药对大肠杆菌抑制作用 图 4 中药对枯草杆菌抑制作用 图 5 中药对啤酒酵母抑制作用
图 6 中药对金黄色葡萄球菌抑制作用
Fm: 乌梅 Cc: 肉桂 Fn: 沙棘油 Fs: 丁香 Ha: 藿香 Sm: 肉豆蔻

表2 中药对霉菌的抑制作用(MIC)

	丁香	藿香	肉桂	肉豆蔻	乌梅	沙棘油
黑根霉	1:40	1:10	1:20	1:160	1:10	—
黄曲霉	1:26	1:20	1:20	—	1:10	—
娄地青霉	1:2560	1:40	1:40	1:20	1:640	1:640
黑曲霉	1:160	1:20	1:20	—	1:10	—
桔青霉	1:2560	1:80	1:80	1:40	1:640	1:80

和 4.56 ± 0.15 , 可见培养0和6小时OD值分别偏低或偏高。因此, 本文大肠杆菌抑制试验均采用培养2小时后再加MTT培养2小时。酵母菌因代谢较慢需培养6小时后再加MTT。加入MTT后培养时间与菌种及菌量有关, 一般以肉眼能见培养板底部出现微蓝颗粒时即可离心, 加酸化异丙醇溶解比色。

(五) 中药对细菌、酵母菌抑制作用

用MTT微量快速法筛选乌梅、丁香、肉桂、肉豆蔻、藿香和沙棘油的抑菌作用, 结果见图3—6。当肉桂、乌梅稀释度为1/160时, 对大肠杆菌抑制率达90%以上; 丁香、乌梅1/160稀释度抑制金黄色葡萄球菌能力很强, 分别为100%和95%; 肉桂稀释度为1/40时对枯草杆菌抑制率为100%; 六种中药对啤酒酵母抑制作用最差, 均不能达到完全抑制。

(六) 中药对霉菌抑制作用

采用培养板连续稀释法测定丁香等六种药物的最小完全抑菌浓度(MIC), 24小时第一次观察与7天后第二次观察结果完全一致, 结果见表2。表明以丁香的抗霉菌作用最强, 对娄地青霉和桔青霉的MIC值均为1:2560, 对黑曲霉MIC值为1:160。乌梅对娄地青霉、桔青霉也有较强抑制作用, MIC值为1:640。

讨 论

本实验所用菌株均为污染水果、果汁、饮料、罐头、水及农产品常见的腐败菌种^[6], 所用的植物药均为卫生部颁布的既是食品又是药品名单中的中药, 不但无化学防腐剂的毒副作用, 而且还含有丰富的营养素, 具有医疗保健价值, 用来制作食品防腐剂是非常适宜的。六种中药中, 以丁香抑制霉菌效果最佳, 对细菌、酵母也

有一定抑制作用, 其抑菌有效成份可能为丁香酚^[7], 值得进一步研究。乌梅对细菌、霉菌也有较强的抑制作用。

MTT微量快速测定法是筛选抑菌药物的一种比较理想的方法, 其优点在于: 1. 操作方便。一个人半天就可完成几十种药物测定; 2. 节省材料。与试管法和扩散法比较可节省10多倍量的培养液、药液等, 而且也大大节省了试管、吸管等器材。3. 快速。用该法一般数小时就可出结果, 与常规方法^[8]相比, 节省了时间。4. 客观可靠。一方面由于它避免了个体间目测误差, 另一方面由于它是定量测定, 除了能测出MIC值外, 还可测出大于MIC时不同稀释度的抑菌率, 这是以往的方法所未能解决的。

MTT微量快速筛选法只适用于细菌和酵母菌。因霉菌有菌丝及在代谢中产生多种色素, 影响比色, 不适用于此法。供试菌种及其数量, 加入MTT前后的培养时间均与OD值有着密切关系, 菌量越大, 培养时间越长, OD值就越大。反之亦然。酵母菌因代谢较慢, 培养时间和菌量都应多于细菌。但不论如何变化, 只要培养孔底呈现微蓝, 表明已产生了甲膜颗粒。测定成功与否在很大程度上取决于微孔板吸光度一致性、加样的准确性和药液的准备, 尤其是菌液应混悬均匀, 故操作时应不时摇动。

用于抑制霉菌药物测定的培养板连续稀释法, 除了具有操作简便、节省材料、比较快速等优点外, 因可借助于解剖镜观察, 得出结果更客观可靠。对于多种药物比较, 因为在一块培养板上, 抑菌强弱一目了然。而试管稀释法常因培养基药物混合不匀及试管壁粘附未加药物培养基等因素, 使霉菌易于生长, 影响实验结果准确性。

参 考 文 献

1. 张玉芬等: 食物与发酵工业, 5:61, 1986。
2. 夏奇良等: 工业微生物, 17(4):35, 1987。
3. 国外药学编辑部: 国外药学(植物药分册), 3(1):1, 1982。
4. 冯贻泽等: 微生物学通报, 14(5):173, 1987。
5. Mosmann T: *J Immunol Methods*, 55: 63, 1983.
6. Frazier W: *Food Microbiology* 2nd Edition, McGraw-Hill Book Co. 1976.
7. 刘国声: 上海中医药杂志, 5:32, 1957。
8. 周邦靖: 常用中药抗菌作用及其测定方法, 科学技术出版社重庆分社, 1987。