DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2010.02.008

银杏外种皮酚酸类物质的抑菌活性

邓业成, 骆海玉, 张　明, 覃　旭, 韦登会, 玉艳珍, 李丽芬
(广西师范大学 生命科学学院, 广西环境工程与保护评价重点实验室, 广西 桂林 541004)

摘要: 以 9 种植物病原真菌和 10 种动物病原细菌为供试菌, 采用菌丝生长速率法和带药培养基涂布法, 测定了银杏外种皮中酚酸类物质的抑菌活性。结果表明, 酚酸类物质对 9 种植物病原真菌均有抑制活性, 对柿角斑病菌、稻瘟病菌、梨锈病菌、玉米炭疽病菌、柑橘疮痂病菌、甘蔗凤梨病菌、西瓜枯萎病菌、梨褐斑病菌和香蕉炭疽病菌的 EC_{50} 在 0.6657～19.5580g/L, 对香蕉炭疽病菌活性最高, 对稻瘟病菌活性最低。银杏外种皮酚酸类物质对 10 种动物病原细菌也有不同程度的抑制活性, 其中对巨大芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性最高, 最低抑菌浓度(MIC)均为 1.25g/L。

关键词: 银杏外种皮; 酚酸类物质; 抑菌活性
中图分类号: S431　　文献标识码: A　　文章编号: 1004－3268(2010)02－0064－03

Inhibitory Activity of Ginkgolic Acids from Ginkgo Sarcotesta against Pathogenic Fungi and Bacteria

DENG Ye-cheng, LUO Hai-yu, ZHANG Ming, QIN Xu, WEI Deng-hui, YU Yan-zhen, LI Li-fen
(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guangxi Key Laboratory of Enviromnental Engineering, Protection and Assessment, Guilin 541004, China)

Abstract: The hypha grow th rate method and culture medium coating method were used to determine the inhibitory activity of ginkgolic acids from ginkgo sarcotesta against 9 plant pathogenic fungi and 10 animal pathogenic bacteria. The results showed that ginkgolic acids had inhibitory activity against such 9 plant pathogenic fungi as *Cercospora kaki*, *Pyricularia oryzae*, *Gymnosporangium haraeanum*, *Colletotrichum graminicola*, *Sphaceloma fawcettii*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Mycosphaerella sentina* and *Glorosprium mussruum*. The EC_{50} values were 0.6657－19.5580g/L. The inhibitory activity against *Glorosprium mussruum* was the highest and that against *Pyricularia oryzae*, the lowest. Ginkgolic acids also had inhibitory activity against 10 animal pathogenic bacteria, and the inhibitory activity against *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis* was the highest, with the MIC values of 1.25g/L.

Key words: Ginkgo sarcotesta; Ginkgolic acids; Inhibitory activity

银杏酚酸(ginkgolic acids)属漆酚类物质, 可看作是水杨酸分子在苯环 C_6 位上有饱和或不饱和长链烃基的衍生物。银杏酚酸类物质是一系列化合物, 按化学结构可分为白果酸(ginkgoic acid)、氢化白果酸(hydroginkgoic acid)、氢化白果亚酸(hydroginkgolinic acid)、白果酚(ginkgol)、银杏酚(bilobol)、白果醇(ginnol)、银杏黄素(ginkgetin)、异银杏黄素(isoginkgetin)和腰果酚(cardanol)等[1]。银杏酚酸存在于银杏叶、种核和外种皮中, 在外种皮中含量最高, 占干重的 3%以上[2]。银杏酚酸是一类生理活性物质, 有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗过敏、抑菌等作用[3-5], 在医药领域有重要的应用价值。银杏酚酸在农药领域也有多种生物活性, 可防治多种农作物病虫害[6-8]。银杏外种皮资源丰富, 我国每年大约产 30000t 外种皮, 但绝大部分被当作废弃物扔掉, 既污染了环境, 又浪费了资源。如果以银杏外种皮为原料提取银杏酚酸, 在医

收稿日期: 2009－08－04
基金项目: 广西环境工程与保护评价重点实验室资助项目(桂科能 0702K026); 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室资助项目(桂科能 07109001－11); 桂林市科学研究与技术开发计划项目(050110－3)
作者简介: 邓业成(1965－), 男, 广西全州人, 教授, 博士, 主要从事植物源农药和天然产物的研究与开发。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

药和农药领域进行开发利用，就能变废为宝，既能产生经济效益，又可减少对环境的污染。鉴此，进行了银杏外种皮酚酸类物质的抑菌活性研究，旨在为其在农药和医药领域的开发利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物材料 银杏(*Ginkgo biloba* L.)外种皮，2008年9月采自广西兴安县海洋乡。

1.1.2 供试植物病原真菌 柿角斑病菌(*Cercospora kaki* Ell.et Ev.)、梨锈病菌(*Gymnosporangium haraeanum* Syd.)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae* Cav.)、玉米炭疽病菌(*Colletotrichum graminicola*(Ces.)Wilson.)、甘蔗凤梨病菌(*Thielaviopsis paradoxa*(de Seynes) V. Hohnel)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*(E.F. Smith) Syn.et Hans)、柑橘疮痂病菌(*Sphaceloma fawcettii* Jenkins)、香蕉炭疽病菌(*Glorosprium mussruum* Cookeet Mass)、梨褐斑病菌(*Mycosphaerella sentina*(Fr.)Schroeter)。以上植物病原真菌采自田间植物发病部位，在室内用马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA)分离纯化获得。

1.1.3 供试动物病原菌 绿脓杆菌(*Pesudomonas aeruginosa*(Schroeter) Migula)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* Frankland)、变形杆菌(*Proteus vulgaris* Hauser)、金黄色葡萄球菌(*Staphyloccocus aureus* Rosenbach)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* de Bary)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*(Shiga) Castellani and Chalmers)、大肠杆菌(*Escherichia coli*(Migula)Casleillii and Chalmers)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*(Ehrenberg) Cohn)、伤寒杆菌(*Salmonella typhi*(Schroeter) Warren and Scott)。以上供试病原菌由桂林医学院微生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 银杏外种皮提取物的制备 植物材料的提取采用有机溶剂冷浸提取法。将采集的新鲜银杏外种皮放在室内通风处晾干，再在60 ℃恒温鼓风干燥箱烘干至发脆，用植物粉碎机粉碎，过孔径368 μm的筛。称取一定量的银杏外种皮干粉放入玻璃容器中，加入5倍量体积的甲醇，于室温下浸提(其间每隔12 h振摇1次)48 h，抽滤。共浸提2次，合并2次滤液，用旋转蒸发器减压浓缩，将甲醇蒸干，得膏状提取物。称重，置4 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 银杏外种皮酚酸类物质的制备 参照阳振等[6]的酸碱分离法对银杏外种皮提取物进行分离，获得酚酸类物质，用于抑菌活性测定。

1.2.3 对植物病原真菌的毒力测定 采用生长速率法进行测定[9]。将供试植物病原真菌接种在PDA平板培养基上培养3 d，备用。用丙酮和无菌水(1∶1)组成的混合溶剂将样品配成5个以上系列浓度的药液，以丙酮和无菌水(1∶1)为对照。在无菌条件下，吸取1 mL药液与热熔的9 mL PDA培养基混合均匀，倒入直径为9 cm的玻璃培养皿中，制成厚薄均匀的带药培养基。用直径为0.4 cm的打孔器在培养好的菌落边缘切取菌饼，接到带药培养基表面，使菌丝面朝下。每个皿接种3个菌饼，呈等边三角形分布，置于(27±1) ℃的恒温培养箱中培养，72 h后用十字交叉法测量各处理菌落的直径，并按下式计算抑菌率：

$$\text{菌落直径} = \text{测量直径} - 0.4,$$

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%。$$

最后用最小二乘法求出毒力回归方程、有效中浓度EC_{50}、EC_{50}的95%置信限等。

1.2.4 对动物病原菌的最低抑菌浓度测定 采用带药培养基涂布法测定最低抑菌浓度(MIC)[9]。将样品用丙酮和无菌水(1∶1)组成的混合溶剂溶解，配制成系列浓度的药液。吸取1 mL药液(空白对照以丙酮∶无菌水=1∶1的混合溶剂代替)加入9 mL热熔的牛肉膏培养基中，混匀，倒入直径为9 cm的玻璃培养皿中，配制成带药培养基，每个处理设3个重复。待带药培养基冷却后，吸取0.1 mL供试菌悬液(菌悬液浓度为$1\times10^6 \sim 1\times10^7$ cfu/mL)加到带药培养基表面，涂布均匀。37 ℃恒温培养箱中培养72 h，观察各培养皿中病原菌的生长情况，并记录结果。完全不长菌的药液浓度即为最低抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 银杏外种皮酚酸类物质对9种植物病原真菌的毒力

在实验室条件下，测定了银杏外种皮酚酸类物质对柿角斑病菌、稻瘟病菌、梨锈病菌、玉米炭疽病菌、柑橘疮痂病菌、甘蔗凤梨病菌、西瓜枯萎病菌、梨褐斑病菌和香蕉炭疽病菌等9种植物病原真菌菌丝的毒力，结果见表1。由表1可知，银杏外种皮酚酸类物质对以上9种植物病原真菌的EC_{50}值分别为3.9213 g/L、19.5580 g/L、5.4798 g/L、3.2223 g/L、6.0162 g/L、11.0688 g/L、6.7261 g/L、17.7619 g/L和0.6657 g/L，对香蕉炭疽病菌的毒力最高，对稻瘟病菌的毒力最低，前者的毒力是后者的29.38倍。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　银杏外种皮酚酸类物质对 9 种植物病原真菌的毒力

供试植物病原真菌	毒力回归方程	r	EC_{50}(95%置信限)/(g/L)	相对毒力 *
柿角斑病菌	$Y=4.7007+0.5045X$	0.9870	3.9213(2.76689~5.0757)	4.99
稻瘟病菌	$Y=4.4401+0.4336X$	0.9915	19.5580(10.9131~28.2029)	1
梨锈病菌	$Y=4.0112+0.5687X$	0.9879	5.4798(2.0001~8.9589)	3.57
玉米炭疽病菌	$Y=4.6702+0.6489X$	0.9967	3.2223(2.2295~4.2151)	6.07
柑桔疮痂病菌	$Y=4.2888+0.9126X$	0.9748	6.0162(4.2635~7.7689)	3.25
甘蔗凤梨病菌	$Y=3.9498+0.5137X$	0.9868	11.0688(8.0391~15.3337)	1.77
西瓜枯萎病菌	$Y=3.8011+0.6559X$	0.9719	6.7261(4.5485~9.9036)	2.91
梨褐斑病菌	$Y=4.4381+0.4993X$	0.9664	17.7619(13.4481~21.0756)	1.14
香蕉炭疽病菌	$Y=5.0549+0.3108X$	0.9743	0.6657(0.3816~0.9499)	29.38

注：具有最大 EC_{50}值的相对毒力为 1，其他病菌的相对毒力为最大 EC_{50}值除以该病菌的 EC_{50}值

2.2　银杏外种皮酚酸类物质对 10 种动物病原菌的抑菌活性

采用带药培养基涂布法测定了银杏外种皮酚酸类物质对 10 种动物病原菌的抑菌活性，结果见表 2。由表 2 可知，银杏外种皮酚酸类物质对 10 种供试动物病原菌具有不同程度的抑制活性，其中对巨大芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性最高，MIC 均为 1.25 g/L；其次是蜡样芽孢杆菌、变形杆菌、藤黄微球菌和伤寒杆菌，MIC 值分别为 7.5 g/L、7.5 g/L、5 g/L 和 5 g/L；对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和痢疾志贺氏菌的抑制作用较弱，MIC 值均为 15 g/L；对大肠杆菌的抑制活性最低，MIC 值为 30 g/L。

表 2　银杏外种皮酚酸类物质对 10 种动物病原菌的抑菌活性

供试动物病原菌	样品质量浓度/(g/L)									
	30	20	15	10	7.5	5	2.5	1.25	0.625	对照
绿脓杆菌	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
蜡样芽孢杆菌	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++
变形杆菌	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++
金黄色葡萄球菌	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
巨大芽孢杆菌	−	−	−	−	−	−	−	−	+++	+++
痢疾志贺氏菌	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
大肠杆菌	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
藤黄微球菌	−	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++
枯草芽孢杆菌	−	−	−	−	−	−	−	−	+++	+++
伤寒杆菌	−	−	−	−	−	−	+++	+++	+++	+++

注：“+”表示有菌落生长，“−”表示无菌落生长，每处理重复 3 次

3　讨论

银杏酚酸类物质是银杏外种皮中主要的化学成分，占提取物的 65%左右[6]。银杏酚酸也是银杏外种皮中主要的生理活性物质，其杀虫和抗菌活性已有报道，并分离鉴定出杀虫或抑菌的活性化合物[6-8]。本研究发现，银杏酚酸的抑菌谱广，不但对大多数植物病原真菌有抑菌活性，对多种动物致病细菌也有抑菌活性，这一特性为其实际应用提供了优越条件。在农业生产中，经常有多种作物病害同时发生，如果用银杏酚酸防治，就能收到一药多治的效果，可以节约用药成本。银杏酚酸的提取分离方法简单，资源丰富，生物活性多样，所以在农药和医药领域有开发利用价值，尤其是作为生物农药应用有很好的发展前景。

参考文献：

[1] 赵肃清，李锋，孙远明. 银杏外种皮研究进展[J]. 武汉植物学研究，2000，18(6)：515-518.

[2] 倪学文，吴谋成. 从银杏外种皮中提取银杏酚酸的工艺条件研究[J]. 工艺技术，2003，24(3)：64-67.

[3] 唐于平，楼凤昌，王欢. 银杏外种皮的化学成分和药理作用[J]. 药学进展，2000，24(3)：152-155.

[4] 倪学文，吴谋成. 银杏外种皮中银杏酚酸抗肿瘤活性[J]. 华中农业大学学报，2006，25(4)：449-451.

[5] Ideji Itokawa. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. [J]. Chem Pharm Bull，1987，35(7)：3016-3020.

[6] 阳振，邓业成，侯美珍，等. 银杏外种皮杀虫活性成分研究[J]. 广西师范大学学报，2008，26(2)：68-71.

[7] 石启田. 银杏外种皮中银杏酚酸类物质防治农业害虫试验初报[J]. 江苏林业科技，2003，30(5)：19-20.

[8] 倪学文，杨志坚，吴谋成. 银杏外种皮中银杏酚酸的分离和抑菌试验[J]. 天然产物研究与开发，2001，13(6)：30-32.

[9] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京：中国农业出版社，1994：76-82.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net