

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

台灣蜂膠之抗菌活性

Antimicrobial activity of Taiwanese propolis

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-353

執行期限：90年8月1日至91年10月31日

主持人：周正俊 國立台灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

蜂膠是蜜蜂蒐集特定植物樹皮或葉芽所分泌的樹脂，混入蜜蜂分泌之酵素，並結合蜂蠟及花粉所製成的膠狀物質。本研究探討台灣不同地區（北-台大，中-南投名間鄉，南-屏東枋寮鄉）、不同季節（六月、八月、十~十一月）所收集蜂膠之抗菌活性。

結果發現，蜂膠之香膠 (balsam, 80% 酒精萃出物) 含量與抗菌效果因產地、產季之不同而有差異。大致而言，無論其產地，香膠含量以六月產者最高，十~十一月產者最低。此外名間產者其香膠含量最高。

不同病原菌對蜂膠的敏感性也不同，*Staphylococcus aureus* 及 *Listeria monocytogenes* 對蜂膠較為敏感，而對 *Salmonella typhimurium* 及 *Escherichia coli* O157:H7 則否。大致而言，以六月產台灣蜂膠之抗菌效果較佳。而在所有蜂膠樣品中則以名間六月產蜂膠之抗菌活性最強。

進一步對 *Sta. aureus* 測試顯示，蜂膠酒精萃出物在 37°C 時所表現之抗菌效果比在低溫時 (4、25°C) 佳。且其抗菌效果在酸性環境下 (pH 5.0、6.0) 亦比在高 pH 環境下 (pH 8.0、9.0) 強。菌齡影響 *Sta. aureus* 對蜂膠酒精萃出物之敏感性，其敏感性依序為對數期中期、末期及定常期之菌體。此外，蜂膠酒精萃出物會造成 *Sta. aureus* 胞內 260 nm 吸光物質 (核酸、DNA、RNA) 的洩漏。蜂膠中的抗菌物質具有良好的熱安定性。

關鍵字：蜂膠, 季節, 地區, 抗菌活性

Abstract

Propolis is a resinous substance collected by honeybees from buds and leaves of trees and plants, mixing with pollen, bee wax as well as enzymes secreted by bees. In the present study, the antibacterial activities of Taiwanese propolis obtained from various regions (NTU, Mingchien and Fangliao) at different seasons (June, August, and October-November), was examined.

Results showed that the balsam content and antibacterial activities propolis varied with the harvesting regions and seasons. In general, the balsam content of propolis obtained in June was the highest, while those collected in October-November was the lowest, regardless of harvesting regions. The balsam content of propolis obtained from Mingchien in June was the highest.

The pathogens tested showed various extents of susceptibility to ethanolic extract of propolis (EEP). *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were found susceptible while *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* were resistant to propolis. The Taiwanese propolis collected in June possessed a higher antibacterial activity than those collected in other seasons, and the Mingchien propolis collected in June exhibited the highest antibacterial activity among all of Taiwanese propolis tested.

Further test on *Sta. aureus* revealed that EEP showed stronger antibacterial activity at 37 °C than at 4 °C or 25 °C, in acid environment (pH 5.0 and pH 6.0) than in higher pH environment (pH 8 and pH 9). Cell age also affected the susceptibility of *Sta.*

aureus to EEP. Cells in the mid-exponential phase were most sensitive, followed by the late exponential phase cells and stationary phase cells. In addition, it was also noted that EEP caused the leakage of 260-nm-absorbing materials (nucleotide, DNA, RNA) from *Sta. aureus* cells and possessed good thermal stability.

Keywords: propolis, region, season, antimicrobial activity

二、緣由與目的

蜂膠被應用於民俗醫藥中已有幾千年之歷史 (Ghisalberti, 1979), 近年來有關它生物特性之研究顯示它具有抗細菌 (Amoros *et al.*, 1992) 等作用。

蜂膠之化學成分相當複雜, 蜜蜂從不同之樹芽 (plant buds) 吸取蜂膠 (Crane, 1997), 使得蜂膠的化學組成及生物活性因而有所差異。

就蜂膠之抗菌作用而言已有許多文獻報告, 且蜂膠之抗菌活性與其成分關係密切。Menezes *et al.* (1997) 指出抗菌活性之而與其化學組成有關。部分文獻也顯示不同地區收集之蜂膠, 其抗菌活性亦有所不同 (Koo *et al.*, 2000; Park *et al.*, 1998; Kujumgiev *et al.*, 1999; Hegazi *et al.*, 2000; Nieva Moreno *et al.*, 1999)。

不同地區、季節因為蜜蜂所吸取膠質樹源 (膠原植物) 之不同, 因而蜂膠之物化、生物特性亦會有所不同。目前市面上已有多種型式的蜂膠產品, 但所使用的蜂膠仍以進口的巴西、大陸蜂膠為主。台灣的蜂膠因未能有效量產, 且傳統的採膠法所得的蜂膠雜質甚多、品質不佳, 所以尚未有效的應用於商業製造上。但在台大養蜂實驗室設計的採膠器的研發成功後, 已可有效提升台產蜂膠的產能及品質, 惟國產蜂膠在各項功能性的相關資料仍尚為欠缺。而本研究乃企圖以台灣不同地區、不同季節所收集之蜂膠, 對其抗菌活性進行探討, 以期有助於台灣產蜂膠產品在市場上之開發。

三、結果與討論

1. 不同來源蜂膠及其萃取液感官特性之差異

大致而言, 台灣六月產的蜂膠呈翠綠色, 8月產的蜂膠呈棕綠色, 而10、11月產的蜂膠則呈深棕褐色。蜂膠經過萃取後也發現萃取液的顏色因產季、產地有明顯的差異。

2. 不同季節產地蜂膠之酒精萃取率

本實驗以 80% 乙醇溶液萃取蜂膠, 檢測蜂膠酒精萃取液中可溶性物質含量。結果發現, 季節對蜂膠樣品萃出物含量之影響較明顯。蜂膠酒精萃取液中的萃出物成分含量分布於 2.43% 至 7.09%, 依序為名間 6 月 (7.09%)、枋寮 6 月 (5.68%)、名間 8 月 (5.67%)、台大 6 月 (5.37%)、名間 10 月 (4.96%)、大陸 (4.95%)、巴西 (4.52%)、枋寮 8 月 (4.27%)、枋寮 10 月 (3.73%)、台大 8 月 (3.14%) 及台大 11 月 (2.43%)。

3. 不同病原菌對蜂膠酒精萃出物之敏感性

將蜂膠酒精萃取液添加於無菌水中觀察不同病原菌對蜂膠酒精萃出物 (ethanolic extract of propolis, EEP) 之敏感性, 顯示 *Staphylococcus aureus* 及 *Listeria monocytogenes* 對蜂膠較為敏感, 經 6 小時培養後, 其菌數降低 (population reduction) 分別為 2.41-6.47 及 3.82-6.92 log CFU/mL。而蜂膠酒精萃出物在 7.5 μ g/mL 的劑量下, 對 *Salmonella typhimurium* 及 *E. coli* O157:H7 並無明顯的抗菌效果。

就不同蜂膠樣品對 *Sta. aureus* 之抗菌作用而言, 結果顯示六月份的蜂膠對於此病原菌的抑制效果均顯著 ($p < 0.05$) 優於八月及十、十一月份產的蜂膠。而台灣產的蜂膠相較於巴西及大陸產者對於 *Sta. aureus* 皆具較佳的抗菌效果。

4. 蜂膠對金黃色葡萄球菌之最低抑菌濃度及最低殺菌濃度

本實驗中定義各蜂膠樣品可完全抑制 *Sta. aureus* 生長亦而使終菌數低於接菌量或與接菌量無顯著差異 ($p < 0.05$) 之最低劑量為該樣品之最低抑菌濃度 (minimum

inhibitory concentration, MIC)；若可減少 99.9% 以上菌量之最低劑量則稱為該樣品之最低殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration, MBC)。

試驗結果發現除台大十一月產的蜂膠外，台灣各地產蜂膠的 MIC 都在 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下，效果明顯優於巴西 (240 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及大陸 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，而名間 6 月產 EEP 的抑菌能力最強，僅需要 3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甚至更低的劑量便可展現完全的抑菌效果；而 MBC 部分，同樣發現台灣蜂膠對 *Sta. aureus* 具備優越的殺菌能力，所有台灣蜂膠的 MBC 值皆比巴西及大陸膠為低。

5. 蜂膠酒精萃出物在不同條件下對金黃色葡萄球菌之抑菌效果

在過去有關蜂膠抗菌之試驗報告上，主要偏於最小靜菌或殺菌劑量之探討，殊少涉及在不同的條件下對蜂膠抗菌效果之影響。因此進一步試著以 *Sta. aureus* 在不同條件下探討蜂膠之抗菌效果。

(1) 培養溫度

在控制組中 (未添加蜂膠酒精萃出液) *Sta. aureus* 在 37°C 下生長最好，25°C 次之，於 4°C 下，菌量則幾乎沒有變化。添加台大六月產蜂膠酒精萃出物 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的實驗組中以在 37°C 下的抗菌效果最好，經過 9 小時培養後，*Sta. aureus* 不但未生長，活菌數約降低 2.0 log CFU/mL，且比控制組低了約 5.0 log CFU/mL，在 25 及 4°C 下，蜂膠萃取液雖然沒有呈現殺菌之效應，但卻完全抑制 *Sta. aureus* 生長，最終菌數也相對比其控制組低。

(2) 菌齡

相對於控制組，添加 EEP 皆可有效的抑制三種不同生長階段菌體的生長，其中定常期的 *Sta. aureus* 菌體相對於對數中期、末期的菌體對蜂膠具有較佳之忍受性；而以對數期之菌體對蜂膠之酒精萃出物最為敏感。

(3) pH

pH 值會影響蜂膠對 *Sta. aureus* 生長所呈現的抗菌作用。在 pH 5 及 6 下所添加之 EEP (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 迅速造成 *Sta. aureus* 之死亡，分別在培養 1.5 及 3 小時後即未測得

活菌之存在。在 pH 7.1，相同劑量之 EEP 則僅顯示些微的殺菌效果，經 9 小時培養後仍有約 3.0 log CFU/mL 的菌量存活。相反的，在 pH 8 及 9 下，添加 EEP 只呈現靜菌作用。顯示蜂膠酒精萃出物在酸性環境下對 *Sta. aureus* 較具抗菌效果，其所呈現的抗菌效果隨著所試的 pH 上升而下降。

6. 金黃色葡萄球菌經蜂膠酒精萃出物作用後其細胞內 260 nm 吸光物質之洩漏

Takaisi-Kikuni and Schilcher (1994) 以電子顯微鏡發現添加蜂膠萃取液會破壞菌體細胞質、細胞質膜及細胞壁，產生溶菌作用。添加 EEP 於含菌體之生理食鹽水一段時間後，將菌液經離心所得的上清液進行 260 nm 吸光值之測定。結果發現，相較於控制組，*Sta. aureus* 之活菌數隨著作用時間的延長而下降，所測得之 OD₂₆₀ 不但高於控制組且隨著存活菌量之下降及作用時間之延長而上升。顯示蜂膠酒精萃出物會造成菌體細胞膜的傷害，使得細胞內的物質洩漏至胞外，而造成菌體之死亡。

7. 蜂膠酒精萃出物抑菌活性之熱穩定性

蜂膠之抗菌活性是否受熱影響目前尚無相關之文獻。因此在本試驗中將蜂膠利用水浴迴流的方式分別在 50、80 及 100°C 下加熱 1 小時，以探討熱處理是否會影響蜂膠的抑菌效果。結果發現，經過加熱處理的蜂膠對試驗菌株生長之影響與添加未經加熱的蜂膠者並無顯著性差異 ($p>0.05$)，顯示 EEP 中具抗菌效果的物質乃為熱安定者，在試驗條件下並不會受到熱處理而破壞。

四、參考文獻

1. Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L. and Cormier, M. 1992. *In vitro* antiviral activity of propolis. *Apidologie* 23: 231-240.
2. Crane, E. 1997. The past and present importance of bee products to man. Bee products : properties, applications, and apitherapy. New York: Plenum Press. p 1-14.
3. Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: A

- review. *Bee World* 60: 59-84.
4. Hegazi, A. G., Hady, F. K. A. E. and Allah, F. A. M. A. 2000. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Naturforsch.* 55c: 70-75.
 5. Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K. and Cury, J. A. 2000. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogen. *Archives of Oral Biol.* 45: 141-148.
 6. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Chrostov, R. and Popov, S. 1999. Antimicrobial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64: 235-240.
 7. Menezes, H., Bacci, M. Jr., Oliveira, S. D. and Pagnocca, F. C. 1997. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. *Apidologie* 28: 71-76.
 8. Nieva Moreno, M. I., Isla, M. I., Cudmani, N. G., Vattunoe, M. A. and Samoietro, A. R. 1999. Screening of antibacterial activity of American del Valle (Tucumán Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.* 68: 97-102.
 9. Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A. S., Ikegaki, M., Cury, J. A. and Rosalen, P. L. 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbial.* 36: 24-28.
 10. Takaisi-Kikuni, N. B. and Schilcher, H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 60: 222-227.