

# 蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉菌的抑制作用及稳定性研究

杨书珍, 彭丽桃, 潘思轶\*, 姚晓琳, 高远丽

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 本实验以青霉属的意大利青霉菌(*Penicillium italicum*)为研究材料, 研究蜂胶不同溶剂提取物对意大利青霉菌的抑制作用及其对温度和 pH 值的稳定性的影响。结果表明, 乙酸乙酯提取物和乙醇提取物活性最高, 氯仿提取物次之, 石油醚提取物和水提取物活性最弱。提取物的抑菌活性与提取物中的黄酮含量和总酚呈显著正相关。乙酸乙酯提取物对意大利青霉的孢子萌发具有同样的抑制作用。蜂胶乙酸乙酯提取物溶液分别经过 25、35、50、70、100℃ 的温度处理后其抑菌活性没有明显差异; 在 pH3.6~7.6 的范围内, 随着 pH 值的升高, 提取物的抑菌活性先升高后降低, 于 pH5.2 时抑制率最高, pH4.4 时次之。这表明该蜂胶提取物能够有效的抑制意大利青霉的生长, 在采后柑橘的防腐保鲜中具有良好的应用前景。

**关键词:** 蜂胶提取物; 意大利青霉; 抑菌活性; 稳定性

## Antifungal Activity of Ethyl Acetate Extract of Propolis against *Penicillium italicum* and Its Stability

YANG Shu-zhen, PENG Li-tao, PAN Si-yi\*, YAO Xiao-lin, GAO Yuan-li

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Propolis extracts were prepared by extraction with different solvents and were subjected to assay of antifungal activity against *Penicillium italicum* and determination of components (i.e. total flavonoids and phenols). In addition, the correlation between the inhibitory rate and the contents of total flavonoids and phenols was analyzed. The results showed that among five extracts of propolis with different solvents, both the ethyl acetate extract and the alcohol extract presented the highest inhibitory rate, 100% ± 0%, but the former contained more total flavonoids than the latter did. The correlation coefficient between the inhibitory rate and the content of total flavonoids was higher than that between the inhibitory rate and the content of total phenols. According to these results, we concluded that the ethyl acetate extract has stronger antifungal activity than the alcohol extract do. Subsequently, the antifungal activity of this ethyl acetate extract was further investigated, as well as the effects of pH and temperature on the stability of the antifungal activity. The results showed that the ethyl acetate extract of propolis exhibited strong inhibitory effects against mycelial growth and spore germination of *Penicillium italicum* in a concentration-dependent manner. After being heated for 30 min at different temperatures of 25 to 100 °C, the ethyl acetate extract still retained marked inhibitory effect, and no differences were found in heating temperatures. In the range of pH 3.6 to 7.6, the antifungal activity of the ethyl acetate extract firstly increased and reached a maximum at pH 5.2 and then fell down.

**Key words:** ethyl acetate extract of propolis; *Penicillium italicum*; antifungal activity; stability

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0087-04

蜂胶是蜜蜂从植物芽胞或树干采集树脂加工形成的, 用来修补巢房和内环境消毒杀菌的芳香性树脂状固体物质, 早在公元前 4 世纪就在古希腊作为治疗创伤的良方<sup>[1]</sup>。近二十年来, 研究发现蜂胶具有极强的抗菌、抗真菌、抗寄生虫、抗病毒、抗肿瘤、调节人

体免疫等丰富的药理学作用, 是新药开发的巨大宝库<sup>[2]</sup>。多种以蜂胶为重要活性成分的保健品, 受到广大消费者的青睐<sup>[3]</sup>。蜂胶对园艺产品保鲜也有较好的效果, 采前喷施蜂胶提取液可延长菜椒、苹果、葡萄的贮藏和货架寿命, 显示蜂胶作为保鲜剂的巨大潜力<sup>[4-6]</sup>。

收稿日期: 2009-02-24

作者简介: 杨书珍(1971-), 女, 讲师, 博士研究生, 主要从事食品贮藏保鲜与加工技术研究。E-mail: yszhen@mail.hzau.edu.cn

\* 通讯作者: 潘思轶(1964-), 男, 教授, 主要从事食品科学研究。E-mail: pansiyi@hzau.edu.cn

柑橘青霉病是由意大利青霉(*Penicillium italicum*)侵染引起的重要采后病害, 10%~30% 的柑橘由于感染青霉病而腐烂变质, 造成严重经济损失<sup>[7]</sup>。目前生产上广泛应用的柑橘青霉病的防治措施是采用化学杀菌剂如噻菌灵、抑霉唑、邻苯基苯酚钠(SOPP)等, 这些药剂作为柑橘防腐剂使用已有二十多年<sup>[8]</sup>。但化学杀菌剂的大量使用, 诸如农药残留、抗性菌株的产生问题。因此, 寻找高效、稳定、安全的杀菌剂已成为大势所趋<sup>[9-11]</sup>。蜂胶含有丰富的活性物质, 对医学真菌白念珠菌属以及皮癣菌属的微生物具有很强的抑制作用<sup>[12-13]</sup>, 但有关蜂胶提取物对植物病原真菌的影响的相关报道较少。本实验以青霉属的意大利青霉菌为材料, 研究蜂胶提取物的对意大利青霉的抑制作用以及抑菌稳定性, 旨在为进一步研究蜂胶对意大利青霉的抗菌机理及开发适合柑橘贮藏的防腐保鲜剂提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

蜂胶采自河北保定

供试病原菌分离于自然发病的柑橘果实, 经鉴定为意大利青霉菌(*P. italicum* Weh), 将意大利青霉菌置入 PDA 培养基于 4℃ 下保存。

石油醚、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、蔗糖、琼脂(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。没食子酸、芦丁(均为色谱纯) Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蜂胶提取物的制备

称取冷冻粉碎的蜂胶样品 2g, 分别用不同极性的溶剂石油醚、氯仿、乙酸乙酯、乙醇、水等进行浸提, 料液比为 1:40(W/V), 在 40℃ 条件下浸提 4h, 取上清液进行真空旋转蒸发浓缩后冷冻干燥, 所得干燥粉末备用。

#### 1.2.2 蜂胶中黄酮及总酚含量的测定

黄酮含量的测定参照 Popova 等的方法<sup>[14]</sup>: 取蜂胶提取物溶液 0.5ml, 加入 1ml 1% 的氯化铝-甲醇溶液, 再用甲醇定容至 5ml, 摇匀, 放置 15min, 于 425nm 下比色, 以芦丁为标品做标准曲线。

总酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteus 法<sup>[15]</sup>: 取蜂胶提取物溶液 0.5ml, 加入 2.5ml Folin 试剂, 再加入 2ml 75g/L 碳酸钠溶液, 摇匀放置 2h, 再加入 0.3ml 乙醇定容至 5ml, 摇匀, 放置 2h 后, 于 760nm 波长下测定其吸光度。以没食子酸为标品做标准曲线。

#### 1.2.3 抑菌实验

##### 1.2.3.1 霉菌孢子悬液及菌饼的制备

将供试菌种分别斜面接种到 PDA 培养基中, 在 28℃ 培养 72h, 取活化好的斜面菌种, 用无菌生理盐水配制

成  $1 \times 10^6$  CFU/ml 的霉菌孢子菌悬液。取菌悬液 1ml 接入至已凝固的 PDA 培养基上, 用涂布器将菌悬液涂布均匀, 于 26℃ 恒温培养箱中培养 5d, 用打孔器在菌落边缘打出 5mm 直径的菌饼, 待用。

##### 1.2.3.2 蜂胶不同溶剂提取物对霉菌抑菌效果评价

称取 0.2g 蜂胶提取物冻干粉, 用相应溶剂配制成 80  $\mu$ g/ml 浓度的蜂胶提取液, 取 1ml 加入 19ml 的 PDA 培养基中, 充分混匀后, 将菌饼反贴至已凝固的 PDA 培养基上, 于 26℃ 恒温培养箱中培养, 定期测定菌落的直径, 并计算抑菌率。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{(\text{对照菌落直径} - \text{初始菌落直径}) - (\text{处理菌落直径} - \text{初始菌落直径})}{\text{对照菌落直径} - \text{初始菌落直径}} \times 100$$

##### 1.2.3.3 蜂胶乙酸乙酯提取物对霉菌菌丝体生长的抑制作用

将蜂胶乙酸乙酯提取物冻干粉用 50% 乙醇溶液配制浓度梯度为 0、375、750、1500、300  $\mu$ g/ml, 然后分别取 1ml 加入至 19ml 55℃ PDA 培养基中, 充分混匀, 溶液终浓度分别为 0、18.7、37.5、75、150  $\mu$ g/ml。待培养基凝固后, 将菌饼反贴至 PDA 培养基上, 于 26℃ 恒温培养箱中培养, 每皿贴菌饼 3 块。每个处理设 3 次重复, 定期测定菌落的直径。

##### 1.2.3.4 蜂胶乙酸乙酯提取物对霉菌孢子萌发的影响

将蜂胶乙酸乙酯提取物冻干粉用含 50% 乙醇的水溶液溶解, 配制成浓度为 0、75、150、300、600、1200  $\mu$ g/ml 的蜂胶提取液, 然后取 1ml 蜂胶提取液加入至 4ml 1% 的 PDA 培养基中混合均匀, 使溶液终浓度为 0、15、30、60、120、240  $\mu$ g/ml 的蜂胶提取液, 然后取 1ml 加入至 4ml 2% 的 PDA 培养基的混合均匀, 然后均匀涂布在载玻片上, 待培养基凝固后, 吸取 40  $\mu$ l 的待测菌的孢子菌悬液(浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/ml)滴在带毒培养基上, 然后将载玻片放置在培养皿(底部铺一层吸水滤纸)内在 26℃ 的培养箱中培养, 12h 后观察孢子的萌发情况, 并计算孢子萌发率和抑制率。

$$\text{孢子萌发率(\%)} = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{总孢子数}} \times 100$$

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100$$

##### 1.2.3.5 温度对蜂胶提取物抑菌作用的稳定性研究

将蜂胶乙酸乙酯提取物用 50% 乙醇溶液配制成浓度为 50  $\mu$ g/ml 溶液分别放置在 25、35、50、70、100℃ 的温度条件下处理 30min, 然后将经上述温度处理过的溶液取 1ml 分别加入至 19 ml PDA 培养基中, 充分混匀, 将菌饼反贴于已凝固的 PDA 培养基上, 每皿贴 3 个菌饼, 将不做任何温度处理的 50% 乙醇溶液作为对

照。每处理设3次重复。定期测定菌落直径。

### 1.2.3.6 pH 值对蜂胶提取物抑菌作用的稳定性研究

取1ml含一定浓度蜂胶乙酸乙酯提取物的溶液分别加入19ml pH值为3.6、4.4、5.2、6.0、6.8、7.6(磷酸缓冲液)的PDA培养基中,充分混合均匀,将菌饼反贴于已凝固的PDA上,每皿贴3个菌饼,对照为将50%乙醇溶液代替蜂胶提取物,其他操作与处理相同。每处理设3次重复。培养72h后测量菌落直径并计算抑菌率。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜂胶提取物抑菌效果的评价

蜂胶的生物活性与其所含的复杂的活性成分有密切关系<sup>[6]</sup>,而提取溶剂的选择对蜂胶提取物的成分有重要的影响,因此,本实验选择了五种不同极性溶剂提取的蜂胶提取物,并测定了它们的抑菌活性和主要活性物质黄酮、总酚含量。如表1所示,在五种不同极性溶剂的提取物中,乙酸乙酯提取物与乙醇提取物抑菌活性最高,而水提取物和石油醚提取物表现较弱的抑菌活性。不同极性溶剂提取物中的黄酮含量和总酚含量顺序与蜂胶提取物抑菌活性的顺序相一致。对蜂胶提取物的抑制率和蜂胶提取物中的黄酮含量和总酚含量做相关性分析,抑制率与黄酮含量的相关系数为0.946,抑制率总酚含量的相关系数为0.846。进一步比较乙酸乙酯提取物与乙醇提取物抑菌活性发现,乙酸乙酯蜂胶提取物有更强烈的活性,与其黄酮和总酚含量的结果一致(数据未列出),故采用乙酸乙酯提取物进行后续研究。

表1 蜂胶提取溶剂对蜂胶黄酮、总酚含量及抑菌作用的影响

Table 1 Inhibitory rates against *P. italicum* and contents of total flavonoids and phenols of five extracts of propolis with different solvents

蜂胶提取物	抑制率(%)	黄酮含量(%)	总酚含量(%)
水提取物	22.8 ± 2.7 <sup>c</sup>	0.64 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>d</sup>
乙醇提取物	100 ± 0.0 <sup>a</sup>	8.13 ± 0.46 <sup>b</sup>	4.96 ± 0.12 <sup>b</sup>
乙酸乙酯提取物	100 ± 0.0 <sup>a</sup>	12.84 ± 0.62 <sup>a</sup>	6.93 ± 0.19 <sup>a</sup>
氯仿提取物	73.1 ± 2.9 <sup>b</sup>	6.55 ± 0.23 <sup>c</sup>	0.61 ± 0.04 <sup>c</sup>
石油醚提取物	26.3 ± 1.9 <sup>c</sup>	0.74 ± 0.07 <sup>d</sup>	0.50 ± 0.03 <sup>cd</sup>

注:同列字母不同表示差异显著,  $p < 0.05$ 。下同。

### 2.2 蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉菌丝体生长抑制作用的浓度效应

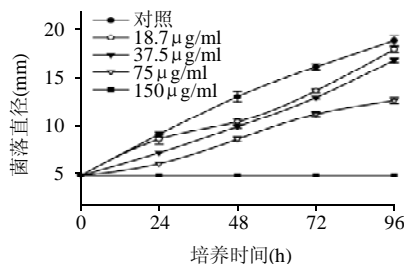


图1 不同浓度蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉的抑菌作用  
Fig.1 Inhibitory effects of propolis ethyl acetate extract at different concentrations against mycelial growth of *P. italicum*

为探讨蜂胶乙酸乙酯对意大利青霉的抑菌效果的浓度效应,采用系列浓度蜂胶提取物的带毒培养基培养意大利青霉,并观察培养过程中菌丝体的直径变化。由图1可知,蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉具有较强的抑制作用,并且随着浓度的增加,抑菌效果增强,表现较好的量效关系;当浓度达到150 µg/ml时,蜂胶提取物完全抑制了意大利青霉的生长。

### 2.3 蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉孢子萌发的影响

由表2可见,蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉的孢子萌发有很强的抑制作用,随着提取物浓度增加,培养基上孢子萌发数逐渐减少,当浓度达到240 µg/ml时,青霉孢子完全不萌发,未加蜂胶提取物的孢子萌发率达88.7%。上述结果还表明蜂胶乙酸乙酯提取物对孢子萌发的抑制作用浓度范围与菌丝体相似,而且同样表现良好的量效关系。

表2 蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉孢子萌发的影响

Table 2 Inhibitory effects of propolis ethyl acetate extract at different concentration on spore germination of *P. italicum*

蜂胶提取物浓度(µg/ml)	孢子萌发率(%)	抑制率(%)
0	88.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	0.0
15	44.1 ± 3.6 <sup>b</sup>	50.2
30	32.7 ± 1.4 <sup>c</sup>	63.1
60	21.8 ± 2.7 <sup>d</sup>	75.4
120	15.8 ± 2.5 <sup>e</sup>	82.2
240	0.0 ± 0 <sup>f</sup>	100

### 2.4 蜂胶乙酸乙酯提取物抑菌稳定性分析

#### 2.4.1 温度对蜂胶提取物抑菌作用稳定性的影响

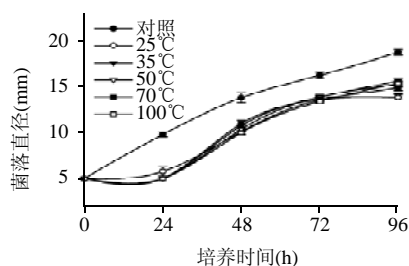


图2 不同温度处理对蜂胶提取物抑菌活性的影响。

Fig.2 Effects of different temperature treatments for 30 min on antifungal activity of propolis ethyl acetate extract against *P. italicum*

温度是影响杀菌剂药效的重要因素,为探讨蜂胶乙酸乙酯提取物对温度的稳定性,对50 µg/ml的蜂胶乙酸乙酯提取物溶液分别在25、35、50、70、100 °C温度下处理30min,然后加入到PDA培养基中,接种意大利青霉,观察意大利青霉的生长情况。由图2可知,不同温度条件下,乙酸乙酯提取物溶液处理的意大利青霉的菌丝体生长的菌落直径均低于空白对照,而不同温度处理之间的菌丝体的生长直径没有明显差异。表明蜂胶提取物对温度表现出很强的稳定性,适合在不同温度条件下使用。

### 2.4.2 pH 值对蜂胶提取物抑菌活性的影响

为了探讨乙酸乙酯蜂胶提取物对最佳使用的 pH 值范围, 本实验将一定浓度的蜂胶乙酸乙酯提取物溶液加入到不同 pH 值的 PDA 培养基中, 测定处理培养 72h 后的菌落直径, 并计算抑制率。由表 3 可知, 在设定的范围内, 随着 pH 值的升高, 提取物的抑菌活性先升高后降低, pH5.2 时抑制率最高, pH 4.4 时次之, 因此, 乙酸乙酯蜂胶提取物适用于中酸性环境。

表 3 pH 值对蜂胶提取物抑菌活性的影响

Table 3 Effects of different medium pH values on antifungal activity of propolis ethyl acetate extract against *P. italicum*

介质 pH 值	处理菌落直径(mm)	对照菌落直径(mm)	抑制率(%)
3.6	8.7 ± 0.15	10.8 ± 0.23	36.2 ± 2.7 <sup>bc</sup>
4.4	8.3 ± 0.18	10.93 ± 0.27	43.9 ± 3.2 <sup>b</sup>
5.2	8.2 ± 0.12	11.9 ± 0.31	54.2 ± 3.6 <sup>a</sup>
6.0	9.3 ± 0.13	11.8 ± 0.24	37.0 ± 2.2 <sup>bc</sup>
6.8	8.8 ± 0.27	10.9 ± 0.28	34.8 ± 3.4 <sup>c</sup>
7.6	10.2 ± 0.23	11.7 ± 0.33	22.7 ± 3.8 <sup>d</sup>

### 3 讨论

蜂胶中含有多种生物活性成分, 有极强的杀菌效力。研究表明, 蜂胶对多种医学真菌如念珠菌属、皮癣菌属, 青霉菌属等具有较强的抑制作用<sup>[17-18]</sup>; 同时可以抑制一些常见的食品病原真菌如链格孢属、青霉菌、曲霉菌属等菌的生长<sup>[19-20]</sup>。本实验的研究结果表明, 蜂胶提取物对导致采后柑橘产生青霉病的意大利青霉具有较强的抑制作用, 并且不同极性溶剂提取的蜂胶提取液对意大利青霉的抑制强度不同, 其中乙酸乙酯提取物和乙醇提取物的抑菌效果最好。这与蒋志国等<sup>[21]</sup>在蜂胶不同有机溶剂提取物对黑曲霉和扩展青霉的抑菌结果相一致。Ghsalbert<sup>[22]</sup>认为蜂胶具有的抗真菌活性是由于蜂胶中含有白杨树中的一些化学成分, 主要是酚类物质(黄酮类、酚酸类以及酯类)。本实验也发现蜂胶乙酸乙酯提取物和乙醇提取物中的黄酮含量和总酚含量在五种植物中比较高, 与抑菌活性呈较显著的正相关。可以推断河北保定蜂胶中抑制意大利青霉的活性物质主要是蜂胶黄酮和酚类物质, 具体的活性成分需要进一步追踪研究。

蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉的抑菌效果在一定浓度范围内具有明显的浓度效应, 达到一定浓度后(150 μg/ml)时可以完全抑制意大利青霉的生长。蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉孢子萌发也有很强的抑制作用, 在当提取液浓度达 240 μg/ml 时可以完全抑制青霉孢子的萌发。国际上普遍认为植物提取物的 MIC 在 0.5mg/ml 之内均属于高抑制活性, 在 0.6~1mg/ml 内属于中等抑制活性<sup>[23]</sup>, 这说明蜂胶乙酸乙酯提取物对意大利青霉具有极强的抑菌作用。同时还在实验中还发现蜂胶的乙酸乙酯提取物对温度和溶液的酸碱性有很好的稳定性, 在极端的温度条件下仍能保持较好的抑菌活性。因

此, 蜂胶乙酸乙酯提取物在生产应用中能够适应柑橘采后处理及贮藏过程中的温度、酸碱等环境变化, 有望作为天然防腐保鲜剂应用于柑橘类果实的防腐保鲜。

### 参考文献:

- [1] QUIROGA E N, SAMPIETRO D A, SOBERON J R, et al. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles[J]. J Appl Microbiol, 2006, 101: 103-110.
- [2] CASTALDO S, CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine[J]. Fitoterapia, 2002, 73: 1-6.
- [3] BANSKOTA A H, TEZUKA Y, KADOTA S. Recent progress in pharmacological research of propolis[J]. Phytother Res, 2001, 15: 561-571.
- [4] 霍君生, 关艳, 邓春景. 蜂胶对菜豆常温贮藏生理的影响[J]. 河北农业大学学报, 1994, 17(s1): 266-268.
- [5] 田学军, 王艳辉. 蜂胶对葡萄的保鲜效果研究[J]. 红河学院学报, 2008, 6(5): 35-36.
- [6] 雷明霞, 王喜平. 蜂胶浸出液在预防苹果腐烂病中的应用探析[J]. 养蜂科技, 2003(3): 40-41.
- [7] 龙超安, 邓伯勋, 何秀娟. 柑橘青、绿霉病高效拮抗菌 34-9 的筛选及其特性研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2434-2439.
- [8] ZHANG J X. The potential of a new fungicide fludioxonil for stem-end rot and green mold control on Florida citrus fruit[J]. Posthar Biol Technol, 2007, 46: 262-270.
- [9] HOLMES G J, ECKERT J W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California[J]. Phytopathol, 1999, 89: 716-721.
- [10] KINAY P, MANSOUR M F, GABLER F M, et al. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California [J]. Crop Protect, 2007, 26: 647-656.
- [11] TAQARORT N, ECHAIRI A, CHAUSSEOD R, et al. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24: 3031-3038.
- [12] OTA C, UNTERKIRCHER C, FANTINATO V, et al. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*[J]. Mycoses, 2001, 44: 375-378.
- [13] 徐颖, 雷明击, 程诚. 蜂胶与蜂胶黄酮[J]. 食品工业, 2005(3): 18-20.
- [14] POPOVA M, BANKOVA V, BUTOVSKA D, et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis[J]. Phytochem Anal, 2004, 15: 235-240.
- [15] 曹伟, 索志荣. Folin-Ciocalteu 比色法测定蜂蜜中总酚酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(12): 80-82.
- [16] GÜLHAN V U, SILICI S, UNLÜ M. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24: 1011-1017.
- [17] MARTINS R S, PEREIRA E S J, LIMA S M, et al. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis[J]. J Oral Sci, 2002, 44: 41-48.
- [18] OLIVEIRA A C, SHINOBU C S, LONGHINI R, et al. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006, 101: 493-497.
- [19] OZCAN M, UNVER A, CEYLAN D A, et al. Inhibitory effect of pollen and propolis extracts[J]. Nahrung, 2004, 48: 188-194.
- [20] ALY S A, ELEWA N A. The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese[J]. J Dairy Res, 2007, 74: 74-78.
- [21] 蒋志国, 施瑞城. 10 种中草药提取物对常见果蔬致腐真菌的抑制作用及有效成分分析[J]. 食品科技, 2004, (3): 68-71.
- [22] GHSALBERT E. Propolis: a review[J]. Bee World, 1979, 60: 59-84.
- [23] ALIGIANNIS N, KALPOTZAKIS E, MITAKU S, et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species [J]. J Agric Food Chem, 2001, 40: 4168-4170.