

# 松针提取物抑菌作用的研究

曾维才, 贾利蓉\*

(四川大学轻纺与食品学院, 四川 成都 610065)

**摘要:** 目的: 研究松针不同提取物的抑菌作用。方法: 用水和乙醇对马尾松松针进行提取, 通过平板抑菌试验, 比较水提取物和醇提取物、老叶提取物和幼叶提取物以及混合提取物的抑菌作用, 分析 pH 值对提取物抑菌作用的影响, 并比较提取物与常用食品防腐剂抑菌作用的差异。结果: 在对多数指示菌的抑制作用上, 松针水提取物比醇提取物效果明显, 幼叶提取物比老叶提取物作用强, 对食品中常见腐败细菌的抑制作用较好, 对真菌和酵母的抑制作用较弱; 松针提取物在酸性环境下能很好地发挥其抑菌活性; 在试验条件下松针提取物抑菌效果比山梨酸钾和苯甲酸钠明显。结论: 松针提取物具有良好的抑菌作用, 可作为一种天然食品防腐剂资源。

**关键词:** 松针; 提取物; 抑菌作用

## Antimicrobial Activities of Pine Needle Extracts

ZENG Wei-cai, JIA Li-rong\*

(College of Light Industry, Textile and Food, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** The aqueous extract and ethanolic extract of pine needles and their mixture at the ratio of 1:1 were compared in antimicrobial activity, and the antimicrobial activity comparison among aqueous extract and ethanolic extract of old pine needles and those of young pine needles were conducted. Meanwhile the effects of pH value on the antimicrobial activities of aqueous extract of young pine needles against 4 species of bacteria were investigated. The results indicated that the aqueous extracts display significantly higher activity than the ethanolic extracts while the extracts of young pine needles demonstrate higher activities than those of old pine needles. Under acidic condition, the aqueous extract of young pine needles has better antibacterial effects, and can significantly inhibit the growth of the most common species of spoilage bacteria except fungi and yeast. These antimicrobial effects are obviously stronger than those of common food preservatives.

**Key words:** pine needles; extract; antimicrobial activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0087-04

松针(pine needles)是松科(*Pinaceae*)松属(*Pinus*)植物的叶, 别名松毛<sup>[1]</sup>, 是松树类植物的主要副产品之一, 也是一种来源广泛、再生速度快、采收时间长、储蓄量大的天然可再生资源<sup>[2]</sup>。我国人民对松针的利用有着悠久的历史。明朝李时珍的《本草纲目》中记载:“松针气味苦、温、无毒, 主治风湿疮, 生毛发、安五脏、守中、不饥延年”<sup>[3]</sup>。《太平惠方》、《名医别录》、《滇南本草》中均记载松针有“轻身”、“延年”的功效<sup>[4]</sup>。我国民间也一直保留着用松针熬水饮用, 用松针泡酒消毒, 以松针铺垫蒸笼蒸制包子、饺子等习俗。现代科学对松针的成分和保健功能进行了大量的研究, 结果表明松针富含叶绿素、维生素、挥发油类、蛋白质、氨基酸、有机酸、可溶性糖类、矿

质元素等成分<sup>[5]</sup>, 具有镇静、镇咳、镇痛、解热、抗炎等临床药理作用<sup>[1]</sup>和增强免疫力、降血脂、抗衰老、抗疲劳等多种保健功能<sup>[6]</sup>, 对人体无毒性, 无致畸性、无致突变性<sup>[12]</sup>。近年来, 松针广泛用于饲料工业<sup>[7]</sup>、医药工业<sup>[8]</sup>和日化工业<sup>[2]</sup>, 在食品工业中, 松针可制作饮料<sup>[9]</sup>、酒类<sup>[10]</sup>、保健食品<sup>[11]</sup>以及改善食品的香味<sup>[13]</sup>。

Yong-Suk Kima 等研究了松针精油的抑菌作用, 结果表明松针精油对大肠杆菌等多种细菌有抑制作用<sup>[14-16]</sup>。肖靖萍等研究了马尾松提取物对几种食品腐败菌的抑制作用以及马尾松提取物同糖、盐等食品腌制剂在食品防腐上的协同作用。研究表明马尾松提取物对食品中常见的大肠杆菌等有抑制作用<sup>[13]</sup>, 与糖、盐有较强的协同作用。许丽璇等研究了马尾松的抑菌效果<sup>[17]</sup>, 结果表明

收稿日期: 2008-06-13

作者简介: 曾维才(1986-), 男, 本科生, 研究方向为天然产物中活性物质的探索与利用。E-mail: weicaizeng@126.com

\* 通讯作者: 贾利蓉(1972-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: lrjia@sina.com

马尾松对几种常见的腐败菌具有抑制作用,不同的提取方法得到的提取物对细菌的抑制作用不同。上述研究虽然都证实了松针提取物具有抑菌作用,但未比较研究松针提取物对细菌、真菌和酵母的抑制作用以及老叶和幼叶提取物在抑菌作用上的差异,松针提取物与食品中常见防腐剂抑菌效果的比较以及抑菌作用的最佳 pH 条件也未见报道。因此,本实验对上述问题进行了补充研究,为下一步研究松针提取物的分离纯化及抑菌机理打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

马尾松松针采集于四川大学校园内。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、嗜热链球菌(*S. thermophilus*)、保加利亚乳酸杆菌(*L. bulgaricus*)、八叠球菌(*Sarcina lutea*)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、青霉(*penicillium sp.*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、黄曲霉(*A. flavus*)及假丝酵母(*Candida krusei*) 四川大学资源微生物与微生物生物技术省重点实验室。

牛肉膏蛋白胨培养基,供被试细菌生长;土豆培养基,供被试真菌和酵母生长。

0.1% 山梨酸钾溶液、0.1% 苯甲酸钠溶液、0.1% 柠檬酸溶液及 1mol/L NaOH 溶液。

### 1.2 仪器与设备

真空抽滤机、冷冻离心机、粉碎机、酸度计、超净工作台、牛津杯等。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 松针的预处理

将采集的松针老叶、幼叶等量混合,洗净,于 35℃ 热风干燥,待松针呈干脆状后,用粉碎机打成粉,备用。选择松针老叶、幼叶,分别按上述处理,得松针老叶粉与幼叶粉,备用。

#### 1.3.2 松针提取物的制备

##### 1.3.2.1 松针水提物的制备

取 50g 松针粉,置于烧杯中,加入 1000ml 蒸馏水浸泡 24h,浸泡液过滤,将滤液在 60℃ 条件下旋转蒸发,浓缩至 50ml。在 4℃、10000r/min 的条件下,将浓缩液冷冻离心 30min,取上清液。所得液体于 20℃ 静置过夜,重复上述冷冻离心操作,取上清液,即制得松针水提物。分别取 50g 松针老叶粉与松针幼叶粉,其余操作同前述,制得松针老、幼叶水提物。

##### 1.3.2.2 松针醇提物的制备

取 50g 松针粉,置于烧杯中,加入 1000ml 75% 乙醇溶液浸泡 24h,将浸泡液过滤,取滤液。将滤液在

40℃ 条件下旋转蒸发,浓缩至 50ml,在 4℃、10000r/min 的条件下,将浓缩液冷冻离心 30min,取上清液。所得液体于 20℃ 静置过夜,重复上述冷冻离心操作,取上清液,即制得松针醇提物。分别取 50g 松针老叶粉与幼叶粉,其余操作同前述,制得松针老、幼叶醇提物。

##### 1.3.2.3 松针混合提取物的制备

取等量松针水提物和松针醇提物混合,即制得松针混合提取物。

### 1.3 抑菌实验方法

#### 1.3.3.1 含菌双碟平板的制备

先将各被测试菌种在斜面培养基上进行活化,然后挑取菌苔用无菌水进行稀释,配制成含菌数在  $10^8$ /ml 左右的菌悬液,在 30℃、200r/min 的摇床上振荡培养 30min。待预先准备好,并经高温高压(121℃, 20min)灭菌的培养基温度降到 50~60℃ 时,将制备好的菌悬液倒入培养基中(菌悬液和培养基的体积比取 1:10),充分混合均匀,制成含菌双碟平板,冷却备用。

#### 1.3.3.2 松针提取物抑菌作用的分析

采用牛津杯法。牛津杯在 121℃ 条件下高压灭菌 20min,冷却干燥备用。松针提取物均用 0.22 μm 细菌滤器过滤除菌备用。将牛津杯放置于已冷却的含菌双碟平板表面,吸取 150 μl 的松针提取物分别注入牛津杯中,然后放入各菌种适宜的温度下培养(细菌于 37℃ 培养 24h,霉菌于 37℃ 培养 36h,酵母菌于 37℃ 培养 24h),观察各平板抑菌圈直径大小。每组 4 个平板,每个平板放置 2 个牛津杯,重复 3 次,抑菌圈直径取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 松针水提物、醇提物及混合提取物抑菌作用比较

用水与乙醇分别浸提松针老、幼叶混合粉,制得松针水提物、醇提物及混合提取物,分别以细菌、真菌、酵母作为指示菌进行抑菌实验,结果见表 1、2。

表 1 松针不同提取物对细菌的抑菌圈试验

Table 1 Diameters of inhibition zone of aqueous extract and ethanolic extract of pine needles and their mixture against 8 species of bacteria

提取物	抑菌圈直径(mm)							
	枯草芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌	大肠杆菌	八叠球菌	变形杆菌	金黄色葡萄球菌	嗜热链球菌	保加利亚乳酸杆菌
水提物	21.7	21.3	18.0	14.3	14.7	23.5	0.0	0.0
醇提物	19.3	21.3	18.3	10.7	11.5	19.3	0.0	0.0
混合提取物	20.3	20.9	18.0	13.4	12.8	21.8	0.0	0.0

由表 1 可知,松针提取物对枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌、八叠球菌、变形杆菌及金黄色葡萄球菌六种食品中常见腐败菌均有较好的抑制作用,

对嗜热链球菌和保加利亚乳酸杆菌没有抑制作用, 松针醇提物和水提物对大肠杆菌与蜡状芽孢杆菌的抑制作用基本相同, 对其余细菌的抑制作用均是水提物强于醇提物, 混合提取物对所有指示细菌的抑制效果介于醇提物与水提物之间。

表2 松针不同提取物对霉菌和酵母菌的抑菌圈实验

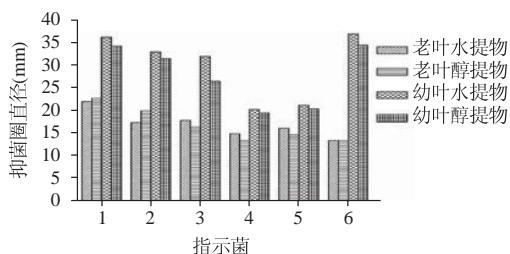
Table 2 Diameters of inhibition zone of aqueous extract and ethanolic extract and their mixture against 3 species of mold and yeast

提取物	抑菌圈直径(mm)			
	青霉	黑曲霉	黄曲霉	假丝酵母
水提物	10.3	8.3	13.7	11.0
醇提物	9.2	7.8	12.8	10.4
混合提取物	9.8	8.0	12.0	10.3

从表2可见, 松针提取物对青霉、黑曲霉、黄曲霉三种真菌和假丝酵母的抑制作用仍然是水提物强于醇提物, 混合提取物的抑制效果均大于醇提物而小于水提物。上述试验结果还表明, 松针提取物能较好的抑制食品中腐败细菌的生长繁殖, 而对真菌和酵母的抑制作用较弱。

## 2.2 松针老、幼叶提取物抑菌作用的比较分析

以细菌做指示菌, 对松针老、幼叶的水提取物与醇提取物的抑菌作用进行比较, 实验结果见图1。



1. 枯草芽孢杆菌; 2. 蜡状芽孢杆菌; 3. 大肠杆菌; 4. 八叠球菌; 5. 变形杆菌; 6. 金黄色葡萄球菌。

图1 松针老叶和幼叶提取物抑菌效果的比较

Fig.1 Comparison of antimicrobial activity among aqueous extract and ethanolic extract of old pine needles and those of young pine needles

由图1可见, 对于所有指示菌, 松针幼叶提取物的抑制作用优于老叶提取物, 特别是对金黄色葡萄球菌的抑制, 幼叶提取物的效果明显比老叶强。四种提取物中, 松针幼叶水提物具有最好的抑菌效果。

## 2.3 不同pH值条件下松针提取物抑菌作用的分析

由于绝大多数食品的pH值为3~7, 因此实验用0.1%柠檬酸溶液和1mol/L NaOH溶液将松针幼叶水提物pH值分别调至3.0、4.0、5.0、6.0、7.0, 用枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌

作为指示菌进行抑菌实验, 结果见图2。

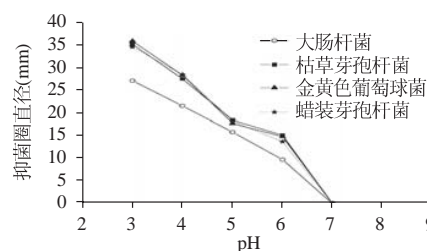


图2 不同pH值条件下松针幼叶水提取物的抑菌效果

Fig.2 Effects of pH values on antibacterial activities of aqueous extract of young pine needles against 4 species of bacteria

由图2可见, 松针提取物在酸性环境下对细菌有很好的抑制作用。随着提取物pH值的增大, 对指示菌的抑制作用逐渐减弱; 当pH7.0时, 提取物对指示菌没有任何抑制作用。

## 2.4 松针提取物与常用食品防腐剂抑菌作用的比较

用0.1%柠檬酸溶液将0.1%山梨酸钾溶液和0.1%苯甲酸钠溶液分别调至其最适pH4.50和3.47, 用松针幼叶水提取物对枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌进行抑菌对照实验, 结果见表3。

表3 松针幼叶水提取物、0.1%山梨酸钾溶液和0.1%苯甲酸钠溶液的抑菌圈实验

Fig.3 Diameters of inhibition zone of aqueous extract of young pine needles, 0.1% potassium sorbate and 0.1% sodium benzoate against 4 species of bacteria

抑菌物质	抑菌圈直径(mm)			
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	蜡状芽孢杆菌
松针幼叶水提取物	32.0	36.3	37.0	33.0
0.1% 山梨酸钾溶液	8.0	11.0	5.3	10.7
0.1% 苯甲酸钠溶液	5.0	8.0	3.9	9.0
0.1% 柠檬酸溶液	0.0	0.0	0.0	0.0

结果表明, 松针提取物对于所有指示菌的抑制效果均优于0.1%山梨酸钾溶液和0.1%苯甲酸钠溶液。按本实验方法得到的松针幼叶水提取物, 经测定其pH值为3.03。用pH2.75的0.1%柠檬酸溶液进行抑菌对照实验, 结果没有出现抑菌圈, 由此可以断定上述抑菌结果不是由溶液体系的pH值不同造成的, 其决定因素是松针提取物、山梨酸钾、苯甲酸钠的抗菌活性。

## 3 结 论

松针提取物对常见食品腐败菌有明显的抑制作用, 对腐败细菌的抑制作用优于真菌和酵母。对于多数腐败菌, 松针水提取物抑菌效果比醇提物明显。松针幼叶提取物的抑菌作用强于松针老叶提取物, 在实验条件下松

针提取物的抑菌效果比山梨酸钾和苯甲酸钠明显。松针提取物在酸性环境下能很好地发挥其抑菌作用。

#### 参考文献:

- [1] 李萍, 刘友平. 松针研究进展[J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24(3): 49-50.
- [2] 刘晓庚, 陈梅梅. 我国松针的开发利用研究及进展[J]. 林产化工通讯, 2003, 37(4): 29-33.
- [3] 李时珍. 本草纲目: 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1917.
- [4] 胡丰林, 陆瑞利. 松针的利用价值分析[J]. 生物学杂志, 1996(2): 25-26.
- [5] 田建华. 松针的组成成分及其主要生理功能[J]. 山西林业科技, 2006(2): 5-7.
- [6] 王加志, 刘树民, 孙保芳. 松针临床应用及药理研究概况[J]. 中国药师, 2007, 10(8): 816-818.
- [7] 郭爱伟, 熊春梅, 周杰珑. 绿色饲料添加剂-松针粉[J]. 饲料博览, 2007(9): 43-45.
- [8] 毕跃峰, 郑晓珂, 冯卫生, 等. 松针的研究进展及开发利用[J]. 河南中医药学刊, 1999, 14(2): 14-17.
- [9] 朱珠. 松针饮料的研制[J]. 江苏调味副食品, 2002(72): 21-22.
- [10] 汪建国. 松针养生酒的开发研制[J]. 中国酿造, 2002(4): 29-30.
- [11] 陈晓熠, 陈玉书. 松针保健饮料的研制[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(6): 67-69.
- [12] 俞红, 吴克枫, 孙如一, 等. 松针汁的毒性及致突变性研究[J]. 贵州医药, 1997, 21(3): 131-133.
- [13] 肖靖萍, 任宇红. 松针抑菌作用的研究[J]. 食品科学, 1994(2): 52-54.
- [14] TAHAR D A B, BERRAMDANE T, CHELGOU M C. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria[J]. C R Chimie, 2005(8): 1939-1945.
- [15] YANG V W, CLAUSEN C A. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine[J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2007, 59: 302-306.
- [16] KIMA Y S, SHIN B D H. Volatile components and antibacterial effects of pine needle(*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts[J]. Food Microbiology, 2005(22): 37-45.
- [17] 许丽璇, 蔡建秀. 马尾松的功用及抑菌实验[J]. 宁德师专学报: 自然科学版, 2003, 15(2): 186-189.