

# 松针提取物对导致苹果腐败的细菌的抑制作用研究

贺莹, 冯彩平, 杭伟, 邓乃飞, 董文 (吕梁学院生命科学系, 山西吕梁 033000)

**摘要** [目的]研究从松针中提取的蹂质物质对苹果滋生的细菌的抑菌作用。[方法]分别利用水提取法和醇提取法提取出松针中的抑菌物质,并研究其对苹果中腐败细菌的抑菌性。[结果]试验表明,松针乙醇提取物与水提取物对苹果中革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性球菌均有抑菌效果,而且乙醇提取物对苹果中革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性球菌的抑菌作用要强于水提取物。[结论]研究可为苹果的防腐保鲜提供技术参数依据。

**关键词** 苹果;松针;抑菌

中图分类号 S661.1;Q935 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)23-07986-02

## Study on Inhibition Effects of Pine Needle Extracts on Bacteria in Apple

HE Ying et al (Department of Life Science, Lvliang College, Lvliang, Shanxi 033000)

**Abstract** [Objective] To study the inhibition effect of pine needle extracts on bacteria in apple. [Method] By using water extraction and ethanol extraction method, the antibacterial materials in pine needle were extracted, the inhibition activity on bacteria was studied. [Result] The results showed that ethanol and water extracts both have antibacterial effect on gram negative bacilli and gram positive cocci, the antibacterial activity of ethanol extract is stronger than that of water extract. [Conclusion] The study can provide technical parameter basis for apple preservation.

**Key words** Apple; Pine needles; Antibacterial

近年来随着人们对健康的追求,绿色无公害的水果越来越受到人们的青睐。苹果作为北方最常见的水果之一,因其价格适中、营养丰富而倍受大家喜爱,但由于保鲜不到位易造成腐烂变质而造成大量浪费,食品防腐保鲜始终是一个待解决的重要问题<sup>[1]</sup>。随着人们对化学防腐剂潜在的安全问题的认识逐步深入,安全、高效、无毒的天然防腐剂成为食品学科研究的热点。由化学合成的保鲜剂又因食品安全等问题为人们所诟病,因此研究天然的苹果保鲜剂不但有利于苹果的保鲜还有利于健康饮食<sup>[2]</sup>。

研究表明,松针中含有大量挥发油、色素、纤维素、氨基酸、黄酮等化合物<sup>[3-4]</sup>,此外还含有钙、磷、铁、锰等多种微量元素。松针中含有大量的蹂质,国内外学者对蹂质的研究表明,蹂质在抑制脂质过氧化、心血管病、抗衰老、抗癌等方面有独到功效<sup>[5-7]</sup>。秋季采摘下来的新鲜苹果在贮藏期间会发生生理病害和真菌病害,导致苹果腐烂而失去食用价值,由此造成的经济损失巨大<sup>[8]</sup>。据统计,在发达国家每年有10%~30%的新鲜苹果损失于采后腐烂,而在缺乏贮运冷藏设备的发展中国家,其腐烂损失量则高达40%~50%<sup>[9]</sup>。

笔者将分别利用水提取法和醇提取法提取出松针中的抑菌物质并对其抑菌性做研究,以达到利用天然物质进行抑制细菌生长的目的。同时,探讨松针水提取物的抑菌作用,可为其在食品防腐保鲜中的应用提供可靠的技术参数。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 原材料:市售苹果、马尾松松针(校园采集)。主要试剂:牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、蒸馏水、琼脂、生理盐水、95%乙醇、乳糖、磷酸氢二钾、2%伊红水溶液、0.5%美蓝水溶液、酵母粉、蛋白胨、葡萄糖、胆盐、结晶紫、中性红、蛋白胨、牛肉膏粉末、D-甘露醇、酚红。主要仪器与设备:培养皿、

试管、蜡笔、玻璃棒、胶头滴管、pH试纸、移液枪、酒精灯、涂布棒、三角瓶、手术刀、天平(AR1140,江门市东信仪器服务有限公司)、粉碎机、灭菌锅、旋转蒸发仪、恒温培养箱(BSP-250生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、真空干燥机、恒温摇床培养箱。

## 1.2 菌种的筛选

**1.2.1 培养基的制备**<sup>[10]</sup>。营养琼脂培养基:牛肉膏0.3g,蛋白胨1.0g,氯化钠0.5g,琼脂1.5g,蒸馏水100ml。伊红美蓝培养基<sup>[11-13]</sup>:蛋白胨10g,乳糖10g,磷酸氢二钾2g,琼脂15g,蒸馏水1000ml,2%伊红水溶液20ml,0.5%美蓝水溶液13ml。

## 1.2.2 腐烂苹果中优势菌的分离。

**1.2.2.1 样品来源及处理。**样品来源于吕梁超市,一经买回不经过任何处理就放在自然通风处让其自身发生病变腐烂,以便后用。

**1.2.2.2 试验方法。**涂布培养:在生物洁净工作台上取苹果腐烂部分25g绞碎,放在225ml无菌生理盐水中,在摇床中振荡30min,然后取1ml上清液进行梯度浓度稀释,每个稀释度做3个重复,倾倒在营养琼脂培养基培养,放到37℃培养箱中倒扣培养48h。

**1.2.3 菌种初步鉴定。**菌落观察。观察平板的菌落边缘,形状,光泽,干湿润,粗糙光滑,颜色等特征。革兰氏染色:按革兰氏染色步骤进行染色。

## 1.3 松针有效成分的提取试验

**1.3.1 马尾松针预处理。**马尾松针清洗后,于50℃热风干燥,粉碎,备用。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 松针水提物的制备**<sup>[14]</sup>。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

**基金项目** 山西省基础研究计划项目。

**作者简介** 贺莹(1984-),男,山西临县人,助教,硕士,从事发酵工程与代谢研究。

**收稿日期** 2014-07-03

条件下,将浓缩液冷冻离心 30 min,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。将水提取物放入烧杯中,放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥,得到黏稠状物质,制成松针水提取物编号为 A。取 10 g 该物,用蒸馏水配制成 1 000 g/L 的溶液,备用。

**1.3.3 松针醇提物的制备<sup>[15]</sup>**。取 50 g 松针粉,置于烧杯中,加入 1 000 ml 75% 乙醇溶液浸泡 24 h,将浸泡液过滤,取滤液。将滤液在 40 ℃ 条件下旋转蒸发,浓缩至 50 ml,在 40 ℃, 10 000 r/min 的条件下,将浓缩液冷冻离心 30 min,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。将醇提取物放入烧杯中,放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥,制成松针醇提取物编号为 B。取 10 g 该物,用蒸馏水配制成 1 000 g/L 的溶液,备用。

#### 1.4 松针提取物对不同细菌的抑菌效果试验

**1.4.1 供试菌株悬浮液的制备**。将上述从腐烂苹果中筛选的 p-1、p-2 菌分别接种于营养琼脂培养基中,37 ℃ 恒温培养 24 h,用接种环挑取已进行菌种斜面活化的培养基表面的菌块,加入盛放无菌生理盐水的三角瓶中振荡均匀<sup>[16]</sup>。

**1.4.2 不同浓度抑菌液的制备**。分别将松针水提取物按 1:10、1:100 的等比例稀释得到浓度为 1 000、100、10 g/L 的提取物液。用同样的方法得到浓度为 1 000、100、10 g/L 的松针醇提取物液。

**1.4.3 抑菌试验**。采用滤纸片法,将直径 5 mm 的滤纸圆片经高压灭菌处理后干燥,分别滴加 20 μl 上述 6 种不同溶剂的提取液作为试验样片以抑菌液命名纸片,滴加蒸馏水作为阴性对照。

准备 7 个营养琼脂培养基,用移液枪移取 p-1 菌悬菌液均匀涂布培养基表面,制成含菌平板,稍干后用无菌镊子将 6 片试验样片和 1 片对照样片贴放于每个培养皿的表面,盖好培养皿,放入恒温培养箱中 37 ℃ 培养 24 h<sup>[16]</sup>,测量抑菌圈直径。准备 7 个营养琼脂培养基,用移液枪移取 p-2 菌悬菌液均匀涂布培养基表面,制成含菌平板,余下步骤同上,最后测量抑菌圈直径。

## 2 结果与分析

**2.1 菌种初步鉴定** 从表 1 可以看出,初步鉴定 p-1 为革兰氏阴性杆菌,p-2 为革兰氏阳性球菌。

表 1 菌种的初步鉴定

菌种	边缘	形状	光泽 与否	透明度	个体 形状	革兰氏染 色结果
p-1	整齐	圆形	有光泽	不透明	杆菌	阴性
p-2	整齐	圆形	有光泽	不透明	球菌	阳性

#### 2.2 马尾松针乙醇提取物和水提取物对 p-1 菌的抑制作用

**2.2.1 水提取物对 p-1 菌的抑制作用**。试验得出,马尾松针水提物浓度为 1 000、100、10、0 g/L 时,其对 p-1 菌的抑菌圈直径依次为 15、7、0、0 mm。由此可以看出,马尾松针水提取物浓度越高,对 p-1 菌抑菌效果越强,浓度为 10 g/L 时,没有抑菌作用。

**2.2.2 醇提取物对 p-1 菌的抑制作用**。试验得出,马尾松针醇提物浓度为 1 000、100、10、0 g/L 时,其对 p-1 菌的抑菌圈直径依次为 20、10、3、0 mm。由此可以看出,马尾松针醇提取物浓度越高,对 p-1 菌抑菌效果越强,浓度为 10 g/L 时,仍有抑菌作用。从以上试验结果得出,在相同浓度下,马尾松针醇提取物对 p-1 菌的抑菌效果好于水提取物。

#### 2.3 马尾松针乙醇提取物和水提取物对 p-2 菌抑制作用

**2.3.1 水提取物对 p-2 菌的抑制作用**。试验得出,马尾松针水提物浓度为 1 000、100、10、0 g/L 时,其对 p-2 菌的抑菌圈直径依次为 14、8、0、0 mm。由此可以看出,马尾松针水提取物浓度越高,对 p-2 菌抑菌效果越强,当浓度低到 10 g/L 时,没有抑菌作用。

**2.3.2 醇提取物对 p-2 菌的抑制作用**。试验得出,马尾松针醇提物浓度为 1 000、100、10、0 g/L 时,其对 p-2 菌的抑菌圈直径依次为 21、12、2、0 mm。由此可以看出,马尾松针醇提取物浓度越高,对 p-2 菌抑菌效果越强,浓度为 10 g/L,仍有抑菌作用。以上试验结果得出,在相同浓度下,马尾松针醇提取物对 p-2 菌的抑菌效果好于水提取物。

## 3 结论

研究得出,马尾松针乙醇提取物与水提取物对苹果中革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性球菌均有抑菌效果,而且乙醇提取物对苹果中革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性球菌的抑菌作用要强于水提取物,这可能是因为抗菌活性高的成分更容易溶于乙醇。该法提取的抗菌活性物质,在很低的浓度下,仍有抗菌活性。建议今后可以采用醇提法提取马尾松针抗菌活性物质,应用到苹果的防腐保鲜中。

## 参考文献

- [1] 闻玉梅. 现代医学 微生物学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1999: 383-389.
- [2] 刘晓庚,陈海梅. 我国松针的开发利用研究及进展[J]. 粮食与食品工业,2003(3):26-29.
- [3] 冯卫生,毕跃峰,郑晓珂,等. 马尾松松针中木脂素类化学成分的研究[J]. 药学报,2003,38(3):199-200.
- [4] 黄荣奇. 介绍一种实验室松针挥发油提取的简易方法[J]. 中国药房,2006,17(15):1198.
- [5] 毕跃峰,郑晓珂,刘宏民,等. 马尾松松针化学成分的研究[J]. 药学报,2001,36(11):832-835.
- [6] 王焰山,张自文,黄晓萍,等. 松针提取液对实验性高脂血症及脂质过氧化作用的影响[J]. 北京中医药大学学报,2001,24(2):35-36.
- [7] 罗玉萍,姚容君,杨希楠,等. 从松针中提取混合氨基酸的方法研究[J]. 贵州大学学报:自然科学版,2001,18(1):54-57.
- [8] 刘力恒,王立升,白海强,等. 广西产湿地松松针挥发性成分的提取及分析[J]. 分析实验室,2008,27(10):84-87.
- [9] 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.
- [10] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册[M]. 北京:中国科技出版社,1992:211-212.
- [11] 段翰英,何永佳,罗卓铭,等. 中草药提取物在黄瓜保鲜上的应用研究[J]. 现代食品科技,2005,22(1):95-96.
- [12] 韩瑞婷. 松针的提取方法及研究进展[J]. 黑龙江医药,2007,20(4):313-314.
- [13] 汪建国. 松针养生酒的开发研制[J]. 中国酿造,2002(4):29-30.
- [14] 董雍年,王守全,张瑞花,等. 松针原汁的提取方法:中国, CN 93118751.6[P]. 1995-05-03.
- [15] 李志强. 生皮蛋白质化学基础[Z]. 成都:成都科技大学皮革工程系,1988.
- [16] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州:华南理工大学出版社,1996:81.