

松萝酸的防腐作用研究

李荣钦^{1,2}, 苏印泉¹, 宋晓斌¹, 王海宏^{1,3}, 玉泉幸一郎⁴, 牟田信次⁵

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西藏大学, 西藏 林芝 860000; 3 米林县团委, 西藏 米林 860500;

4 九州大学 812-8581, 日本; 5 九州电力 849-0922, 日本)

[摘要] 以西藏色季拉山长松萝为材料, 乙酸乙酯为溶剂回流提取制备松萝酸, 并采用滤纸片法对提取物松萝酸进行了抑菌活性和最小抑制浓度测定, 同时以苯甲酸为对照, 研究了松萝酸的防腐作用。结果表明, 松萝酸对细菌、霉菌和酵母菌的生长均有明显的抑制作用; 将用松萝酸处理的鲜猪肉、豆腐和牛奶放入 37℃ 的恒温培养箱中 1 周后, 其菌数均不超过 $5 \times 10^8/\text{g}(\text{mL})$, 而对照不低于 $15 \times 10^8/\text{g}(\text{mL})$ 。细菌菌落数的明显减少表明, 松萝酸具有一定的防腐效果; 但与相同浓度的苯甲酸相比, 松萝酸的抑菌防腐效果稍差。

[关键词] 长松萝; 松萝酸; 抑菌作用; 防腐作用

[中图分类号] Q949.34+2.2; Q949.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)05-0123-03

长松萝 (*Usnea longissima* Ach) 属菌藻门地衣类松萝科松萝属植物, 俗名女萝、树挂、天蓬草、龙须草, 植株长 20~40 cm, 最长者可达 100 cm, 多附生在针叶树的树枝上。长松萝的主要有效成分松萝酸具有广谱抗菌活性^[1], 对革兰氏阳性细菌及结核杆菌的抑制作用较强, 可用于治疗外伤、溃疡、寒热及烧伤等症^[2], 在试管中对肺炎球菌、溶血性球菌、白喉杆菌的完全抑制浓度为 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 当其抑制浓度达 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 可完全抑制细菌的生长^[3-4]。松萝酸 (Usnic acid) 为黄色针状晶体, 25℃ 在水、丙酮、乙酸乙酯和乙醇等溶剂中的溶解度分别为 0.1, 7.7, 8.8 和 0.2 g/L ^[5], 有 (+)、(-) 旋体 2 种形式^[6], 且均有抗菌作用。目前, 国内外对松萝酸的抑菌作用研究较多, 但对其防腐性的研究报道较少。西藏地衣资源丰富, 其生长的环境如林芝、波密等地均为污染极小的地区, 为了开发利用这一资源, 本试验对西藏长松萝中松萝酸的抑菌和防腐作用进行了研究。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用原材料长松萝 (*Usnea longissima* Ach) 采自西藏海拔 3 400 m 的色季拉山。供试细菌

有大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 编号分别为 1 和 2, 用牛肉膏蛋白胨培养基培养; 供试真菌有啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、假丝酵母 (*Candida norvegica*)、红酵母 (*Rhodotorula glutinis*)、黑曲霉 (*Aspergillus* sp.) 和黄曲霉 (*Aspergillus flavus*), 分别编为 3, 4, 5, 6 和 7 号, 用马铃薯培养基 (PDA) 培育。以上菌种均由西北农林科技大学微生物实验室提供。鲜猪肉、牛奶、豆腐均购自当地副食市场。

1.2 方法

1.2.1 松萝酸的提取与制备 称取剪碎的长松萝 5.0 g 置于 500 mL 烧瓶中, 用乙酸乙酯 75 mL 回流提取 2 次, 每次 4 h, 合并提取液, 抽滤, 浓缩至原体积的 1/6~1/8, 自然冷却, 析出结晶, 滤去母液, 于 80℃ 烘干, 即得松萝酸粗品。向粗品中加入 30 倍量苯-乙醇 (体积比 1:1) 混合溶剂, 回流 2 h, 趁热过滤, 将滤液浓缩至原体积的 1/5, 冷却析出结晶, 于 80℃ 烘干, 用乙酸乙酯重结晶 2 次, 所得较纯的淡黄色针晶即为松萝酸精品。用丙酮作溶剂配制松萝酸溶液, 待用。

1.2.2 松萝酸抑菌活性的测定 抑菌活性测定采用滤纸片法^[7]。将 102 型滤纸制成直径为 6 mm 的圆纸片, 放入干燥的小烧杯中, 在 121℃ 高压蒸汽下

[收稿日期] 2005-11-15

[基金项目] 中日合作课题

[作者简介] 李荣钦 (1968—), 女, 四川达川人, 讲师, 在读硕士, 主要从事植物资源开发利用研究。

[通讯作者] 苏印泉 (1954—), 男, 陕西白水人, 教授, 主要从事植物资源开发利用研究。E-mail: suyinq@public.xa.sn.cn

灭菌 30 min 后备用;将供试菌用适宜的斜面培养基活化后,用生理盐水稀释成浓度为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , …… 10^{-10} 的菌液,各吸取 0.2 mL 分别加入已灭菌冷却的平面培养基中涂布均匀,将细菌置于 37℃ 下培养 48 h,真菌置于 28℃ 下培养 48 h。根据观察,含菌量为 $10^6 \sim 10^8$ /mL 时菌能够长满整个培养皿且分布均匀。用无菌吸管吸取已制备好的菌悬液 0.2 mL,加入已制好的平面培养基中涂布均匀,然后将经过灭菌并饱和吸入浓度为 300 μ g/mL 松萝酸丙酮溶液的滤纸放入含菌平皿上,对照用滤纸饱和吸入丙酮,放置于接种菌种的平皿中。试验设 3 次重复,按前述条件各培养 48 h。然后用游标卡尺测定培养 24 和 48 h 的抑菌圈直径大小,以此判断松萝酸的抑菌力。

1.2.3 松萝酸最低抑制浓度的测定(MIC) 最低抑制浓度的测定采用滤纸片法。用丙酮作溶剂分别配制浓度为 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.5 和 15.36 μ g/mL 的松萝酸溶液,测定方法同松萝酸抑菌效力的测定方法,以没有抑菌圈的松萝酸浓度为最小抑菌浓度(MIC),并与苯甲酸最小抑菌浓度进行比较。

1.2.4 松萝酸防腐效果的测定 取鲜肉和豆腐各 3 等份,每份 10 g,分别取其中 2 份各置入 50 mL 的三角瓶中,加无菌水 20 mL。取熟牛奶 3 份各 20 mL,分别加入三角瓶中。在第 1 份中加入 6 mg 松萝酸,在第 2 份中加入 6 mg 化学防腐剂苯甲酸,第 3 份作空白对照。所有处理与对照均置于 37℃ 恒温培养箱中培养 7 d,然后用平板计数法^[8]计算 3 种物质中的细菌数,并以此判别防腐效果。

2 结果与分析

2.1 松萝酸的抑菌效果

从表 1 可以看出,浓度为 300 μ g/mL 的松萝酸-丙酮溶液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黄曲霉、黑曲霉、啤酒酵母、红酵母以及假丝酵母等供试微生物均有不同程度的抑制作用,其中对大肠杆菌(1 号)的抑制作用最强,24 和 48 h 的抑菌圈直径分别达到了 10 和 10.3 mm;其次为对金黄色葡萄球菌(2 号)的抑制作用,24 和 48 h 的抑菌圈直径分别达 8.9 和 8.7 mm;对假丝酵母(4 号)的抑制作用最弱,24 和 48 h 的抑菌圈直径仅为 6.9 和 6.3 mm。表明松萝酸对供试细菌的抑制作用较强,而对供试真菌的抑制作用相对较弱,对供试酵母菌类的抑制作用最弱。对照丙酮则对上述供试菌均无明显抑制

作用。

表 1 松萝酸对供试菌种的抑制效果
Table 1 Anticicrobial effect of the usnic acid

供试菌种编号 Test microbe number	平均抑菌圈直径/mm Diameter of antimicrobial ring		CK (丙酮 Acetone)
	松萝酸 Usnic acid		
	24 h	48 h	
1	10.0	10.3	—
2	8.9	8.7	—
3	7.9	7.2	—
4	6.9	6.3	—
5	7.6	6.5	—
6	8.7	7.4	—
7	8.4	7.5	—

注:“—”表示无抑菌效果。
Note:“—”means no antibacterial effect.

2.2 松萝酸的最小抑菌浓度(MIC)

从松萝酸和苯甲酸对 7 种微生物的最小抑制浓度测定结果(图 1)可以看出,松萝酸对大肠杆菌(1 号)和金黄色葡萄球菌(2 号)的最小抑制浓度相对较低,即在 50 μ g/mL 以下;对黑曲霉(6 号)和黄曲霉(7 号)的最小抑制浓度为 50~100 μ g/mL;对啤酒酵母(3 号)和红酵母(5 号)的最小抑制浓度为 100~150 μ g/mL;对假丝酵母(4 号)的最小抑制浓度值最大,达到 250~300 μ g/mL。最小抑制浓度值的大小反映了松萝酸对不同微生物抑制力的强弱,因此以上结果表明,松萝酸对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制力最强,对黑曲霉和黄曲霉的抑制力次之,而对假丝酵母的抑制力最弱。大肠杆菌、黑曲霉和黄曲霉是引起食物腐败的重要菌种,松萝酸对这些微生物较强的抑制作用表明,其在食品生产和保存中具有一定的应用前景。

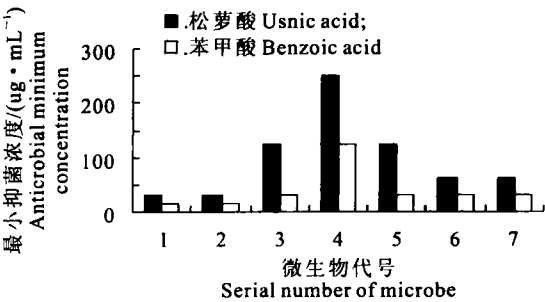


图 1 松萝酸对不同微生物的最小抑菌浓度比较
Fig. 1 Comparison of antibacterial minimum concentration of Usnic acid to different microbes

2.3 松萝酸的防腐效能

由表 2 的防腐试验结果可以看出,经松萝酸处理的鲜肉细菌含量最低,其次为豆腐,细菌含量最高

的是牛奶。由表 2 还可以看出,鲜肉、牛奶和豆腐经松萝酸处理后,其细菌含量均低于相应的对照,菌落总数均不超过 $5 \times 10^8/\text{g}(\text{mL})$,而对照均不低于 $15 \times 10^8/\text{g}(\text{mL})$ 。表明松萝酸具有较好的防腐作用,其在脂肪含量高的食品中使用效果更好。但与对照苯甲酸相比,松萝酸的防腐效果稍差。

表 2 松萝酸在鲜肉、鲜牛奶和豆腐中的防腐效果比较
Table 2 Antisepsis effect of usnic acid in fresh meat,milk and bean curd

物质 Matter	处理 Disposal	稀释倍数 Diluent proportion					菌落总数/ $\text{g}^{-1}(\text{mL}^{-1})$ Number of bacterium
		10^3	10^1	10^5	10^6	10^7	
鲜肉 Meat	松萝酸 Usnic acid	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	217	31	2.6×10^8
	苯甲酸 Benzoic acid	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	182	13	1.8×10^8
	CK	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	>300	152	1.5×10^9
牛奶 Milk	松萝酸 Usnic acid	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	276	64	4.6×10^8
	苯甲酸 Benzoic acid	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	208	25	2.1×10^8
	CK	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	>300	223	2.2×10^9
豆腐 Bean curd	松萝酸 Usnic acid	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	283	36	3.2×10^8
	苯甲酸 Benzoic acid	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	261	27	2.6×10^8
	CK	多不可计 Countless	多不可计 Countless	>300	>300	146	1.5×10^9

3 小结与讨论

本试验结果表明,松萝酸对大肠杆菌等 7 种供试菌种均有抑菌作用,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,对黑曲霉、黄曲霉的抑制作用次之,对啤酒酵母、红酵母以及假丝酵母的抑制作用相对较差。从表 1 中可以看出,除大肠杆菌外,松萝酸对其他供试微生物的 48 h 抑菌圈直径反而小于 24 h 的抑菌圈直径,出现这种现象的原因可能是松萝酸在随丙酮扩散的过程中面积扩大,而浓度因之降低,微生物在松萝酸浓度降低的情况下开始繁殖,从而使得抑菌圈缩小。这也说明,与抑菌圈未变小的微生物相比,这些微生物对松萝酸的敏感性相对较低,如表中的假丝酵母菌对松萝酸的敏感程度就远远低于大肠杆菌。

防腐试验结果表明,松萝酸具有一定的防腐作用,尤其在脂肪含量高的食品中使用效果更好。因为松萝酸是脂溶性的,在鲜肉中的溶解性大,故防腐效果较为明显;而其在豆腐和牛奶中的溶解性比较小,其防腐作用不能够充分发挥。

与常用食品防腐剂苯甲酸相比,松萝酸达到完全抑菌的最小浓度较高,其抑菌防腐能力较苯甲酸弱,但松萝酸是从地衣中提取的天然防腐剂,毒性低,安全可靠,其小鼠静脉注射毒性 LD_{50} 为 25 mg/kg ,皮下注射仅为 $700 \text{ mg/kg}^{[9]}$;而苯甲酸为化学防腐剂,其在未来食品加工中可能会被逐步淘汰。因此,尽管松萝酸的抑菌效果不及苯甲酸,但其属于天然产物,很有可能作为新一代的天然食品防腐剂被广泛应用。该研究结果可为新食品防腐剂的开发提供有价值的参考。

[参考文献]

[1] 中国医学科学院药物研究所. 中草药有效成分的研究:第一分册[M]. 北京:人民卫生出版社,1972:369.
[2] 韩留福,王晓蕊. 地衣植物的经济意义[J]. 生物学杂志,2003,20(3):61-62.
[3] Vartia K O. The Lichens[M]. New York and London:Academic Press,1973:547.
[4] 江苏新医学院. 中药大辞典(上)[M]. 上海:上海人民出版社,1979.
[5] 柯铭清. 中草药有效成分理化与药理特性[M]. 长沙:湖南科技出版社,1982:65.
[6] 王 丽,阿德里江·阿不都拉,孙 华. 松萝酸研究进展[J]. 生物技术通讯,2005,16(4):472-473.
[7] 祖若夫,胡宝龙,周德庆. 微生物实验教程[M]. 上海:复旦大学出版社,1993.
[8] 唐丽杰. 微生物学实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2005:99-100.
[9] 赵小钊. 防腐剂松萝酸的实验研究[J]. 化学工程师,2000,76(1):12-13.

(下转第 130 页)

- [9] 傅泽强,戴尔阜. 大兴安岭森林火险季节动态特征及其气候条件分析[J]. 自然灾害学报, 2001, 10(4): 113-116.
- [10] 罗 亚,徐建华,岳文泽. 基于遥感影像的植被指数研究方法述评[J]. 生态科学, 2005, 24(1): 75-79.
- [11] 何筱萍,易浩若. 归一化差分植被指数(NDVI)在林海监测中的应用[J]. 林业科技通讯, 1997(8): 18-20.
- [12] 徐希孺. 环境监测与作物估产的遥感研究论文集[C]. 北京: 北京大学出版社, 1981.

Distribution features of forest fires and relations between forest fires and vegetation index in Gansu Province

HUANG Yu-xia, WANG Bao-jian, XU Dong-bei, PU Su

(Lanzhou Institute of Arid Meteorology, Chinese Meteorology Administration, Key Laboratory of Arid Climatic Change and Reducing Disaster, Lanzhou, Gansu 730020, China)

Abstract: By using the data of forest fires from 1988 to 2003 in Gansu province, the space-time distribution features of forest fires were analyzed. The results are as follows: The fires mostly happened from Feb. to Mar.. The forest fires averagely happened during the period from the last ten-day of Oct. to the middle ten days of May.. Most of forest fires occur in the forestry centre of Ma-han Mountain and Xiao-long hill and Bai-long river. Furthermore, the vegetation index of forest in Gansu province was analyzed by using NOAA satellite data. The results show that there is marked corresponding connection between vegetation index and forest fires, and the normalized difference vegetation index could be used in research of forest fire forecast.

Key words: forest fires; space-time distribution; satellite remote sensing; vegetation index

(上接第 125 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)05-0123-EA

Study on antiseptic effect of usnic acid

LI Rong-qin^{1,2}, SU Yin-quan¹, SONG Xiao-bin¹,
WANG Hai-hong³, Koichiro Gyokusen⁴, Shinji Muta⁵

(1 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 Tibet University, Linzhi, Tibet 860000, China; 3 Youth League committee, MiLin, Tibet 860500, China;
4 Kyushu University 812-8581, Japan; 5 Kyushu Electric Power Co, INC 849-0922, Japan)

Abstract: With *Usnea longissima* from Shegyla Mountain in Tibet as the subject, usnic acid was extracted with EtOAc refluxing. The antimicrobial activities and minor inhibitory concentration of usnic acid by filtering paper method and contrasting with benzoic acid had been studied. The results are as follows: usnic acid not only had obvious inhibitory effect on the hapthal growth of mold, bacterium, yeast, but also had stronger preservation effect on fresh meat, bean curd and milk. However, compared with benzoic acid of the same concentration, the inhibitory and preservation effects of usnic acid are not better than these of benzoic acid.

Key words: *Usnea longissima* Ach; usnic acid; antimicrobial effect; antiseptic effect