

紫花地丁提取物对三文鱼中副溶血性弧菌的抑制作用

施 杨¹,郭法利¹,刘海泉^{2,3,4,5*}

1. 上海市食品研究所, 上海 200235
2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306
3. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306
4. 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306
5. 上海海洋大学 食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306

摘要: 为了获得具有抑菌活性的天然活性物质并应用于食品中, 本文以紫花地丁为原料, 通过设定乙醇浓度、提取温度、提取时间等不同条件开展 $L_{16}(4^3)$ 正交实验, 分析比较了在这三个不同条件下处理的 16 种提取物对纯培养副溶血性弧菌和接种到三文鱼时的抑菌效果。结果表明: 在 40 °C 下采用 75% 的乙醇溶液作为提取剂、超声波超声处理 20 min 为最优提取条件, 由此得到的提取物对三文鱼中副溶血性弧菌的最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)和最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)分别为 0.50 mg/g 和 6.25×10^{-2} mg/g。因此, 紫花地丁提取物具有在食品中应用的前景。

关键词: 紫花地丁; 提取条件; 副溶血性弧菌; 三文鱼; 抑菌

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2017)02-0161-05

The Bacteriostasis of Extracts from *Viola yedoensis* against *Vibrio parahaemolyticus* in Salmon

SHI Yang¹, GUO Fa-li¹, LIU Hai-quan^{2,3,4,5*}

1. Shanghai Food Research Institute, Shanghai 201306, China
2. College of Food Science and Technology/Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China
3. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China
4. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China
5. Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University/Shanghai 201306, China

Abstract: In order to obtain the natural active substances with antibacterial activity that can be used in food, the bacteriostasis against *Vibrio parahaemolyticus* and extracts from salmon were studied. The extracts of *Viola yedoensis* were examined by $L_{16}(4^3)$ orthogonal design with the use of combinations of ethanol concentration, ultrasound time and ultrasound temperature levels. The optimal extraction conditions were 75% (w/w) ethanol and ultrasound 20 min at 40 °C. With this extraction condition, the MBC (Minimum Bactericidal Concentration) and MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the extract for *V. parahaemolyticus* inoculated with salmon were 0.50 mg/g and 6.25×10^{-2} mg/g, respectively. The extracts could be provided a prospect for a application in in food.

Keywords: *Viola yedoensis*; extraction condition; *Vibrio parahaemolyticus*; salmon; bacteriostasis

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是嗜盐性革兰氏阴性短杆菌, 为弧菌科弧菌属, 广泛分布于近海区域、盐湖及水产品中^[1]。1992~2001 年副溶血性弧菌引起的食源性疾病居我国微生物食源性疾的首位, 占到 31.1%^[2], 它可引起头疼、腹泻、发烧、肠胃炎, 严重的甚至还会引起败血症危及生命。我国生食水产品的历史悠久, 素有“生吃螃蟹活吃虾”说法, 而导致了我国副溶血性弧菌占腹泻发病人数远高于美国等发达国家报道的比例^[3]。因此, 如何在保持生食水产品特有的风味和鲜度的同时更加保证生食水产品的安全是我们面临的重要课题。

目前越来越多的研究者通过从传统的香辛料或中草药的获得的天然活性物质来控制食品中的微生物^[4-7]。紫花地丁 (*Viola yedoensis*) 又叫犁头草、地丁草和紫地丁等, 为堇菜科堇菜属的生草本植物。

收稿日期: 2016-04-05

修回日期: 2016-06-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671779);上海市自然科学基金项目(15ZR1420600);上海海洋大学博士科研启动资金(A2-0203-17-100316)

作者简介: 施 杨(1988-),男,大学本科,助理工程师,研究方向:食品微生物检测. E-mail:602483415@qq.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:hqliu@shou.edu.cn

它作为我国传统中药之一, 具有抗菌消炎, 清热解毒, 凉血消肿等作用, 临床应用价值较高。目前对紫花地丁的研究大多集中于抗肿瘤、抗炎症及抗病毒的应用上^[8-10], 而在食品上作为保鲜剂研究却鲜有报道。本研究通过分析紫花地丁天然抑菌活性物质的提取工艺, 进行了紫花地丁提取物对副溶血性弧菌的抑菌效果和模拟生食三文鱼中抑菌效果的研究, 为紫花地丁提取物作为天然活性物质在食品安全中的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料和主要试剂 紫花地丁从市场购买, 在 25 °C 下黑暗中保存。称取 100 g, 用自来水冲洗两次, 然后在 50 °C 通风烘箱里干燥 24 h。用粉碎机粉碎为细粉, 过 60 目筛子后得到最佳颗粒大小, 置干燥袋中 4 °C 保存。测试菌株有副溶血性弧菌 ATCC33846 和 ATCC33847 均购自于美国 ATCC 菌种保藏中心, 副溶血性弧菌野生菌株 P201 分离于患病病人。胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB)、胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA)、TCBS 购于北京陆桥技术有限责任公司, 北京, 水乙醇购于国药集团化学试剂有限公司, 上海。

1.1.2 主要仪器 8010 s 粉碎机(Waring Commercial, 美国), PL2002 电子天平(Mettler Toledo, 瑞士), SK5200HP 超声波清洗机(上海科导超声波仪器有限公司), SENCO GG17 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司), QB9006 微孔板快速振荡器(金坛市医疗仪器厂), 379996 孔板 (Corning Incorporated)。

1.2 实验方法

1.2.1 提取 取 5 g 粉碎的紫花地丁加入含有 125 mL 不同浓度乙醇 (W/V) 的 250 mL 锥形瓶中, 使用聚丙烯盖密封, 并在一定温度下 180 rpm 摇床上浸泡一定时间; 然后用超声波清洗机提取。将提取物在 3500 g 下离心 10 min, 上清通过 0.45 μm 的真空过滤纸 (Whatman no.1) 过滤。最后过滤液在室温下使用真空旋转蒸发器在 30 mmHg 下蒸发得到乙醇粗提取物。最后加入无菌 Milli-Q 水, 最终提取物浓度为 100 mg/mL。样品存放在一个密闭的无菌小瓶中, 并储存在 4 °C。

1.2.2 超声波法提取紫花地丁有效成分正交试验 针对乙醇浓度、提取温度、提取时间进行三因素四水平正交试验, 按正交表 L16(4³) 研究, 每个因子 4 个水平, 每个处理 3 次重复, 具体见表 1, 根据提取物抑菌能力的大小, 最终确定最优提取工艺。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Design of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors		
	A	B	C
1	0	0	30
2	30	10	40
3	50	20	50
4	75	30	60

注: A: 乙醇质量分数/%; B: 时间/min; C: 温度/°C

Note: A: Ethyl alcohol mass percentage; B: Time/min; C: Temperature/°C

1.2.3 副溶血性弧菌培养及菌悬液制备 取保存在 -80 °C 甘油管中的菌种, 接种于 8 mL 3% NaCl 的 TSB 培养基在 37 °C、180 rpm 摇床中培养过夜。取过夜培养后的菌液 0.1 mL 转移到 8 mL 3% NaCl 的 TSB 中 37 °C、180 rpm 摇床中培养, 再次活化。最后接种到 TCBS 琼脂培养基上 37 °C 培养 24 h, 挑取单菌落接种到 8 mL 3% NaCl 的 TSB, 37 °C、180 rpm 摇床中培养 8 h, 到 OD₆₀₀=0.8, 然后 3 个菌株各取 3 mL 等量混合得 9 mL 混合菌悬液, 将混合菌悬液在 4 °C 下以 8000 g 离心 3 min, 弃上清液, 将沉淀悬浮在 9 mL 生理盐水, 混匀, 获得 1 mL 菌液含菌量约为 10⁸ CFU/mL 的等量混合菌悬液备用。

1.2.4 提取物对副溶血性弧菌抑制实验 16 种方法获得的提取物根据 Rattanachaikunsopon 等的方法并进行了一些修改^[11]。先把 0.1 mL 10⁸ CFU/mL 的细菌涂布于直径 9 cm 的 3% TSA 平板, 放置 15 min。直径为 6 mm 的 3 个 Whatman's No.1 无菌滤纸放到接种后的琼脂平板表面, 以测定抗菌活性。每个无菌纸片在放置到平板前, 先在 50 mL (粗提取物浓度为 100 mg/mL) 的粗提物内浸渍。使用无菌 Milli-Q 水作为对照。在 37 °C 下培养 24 h, 然后检查抑菌圈的大小。抑菌圈测量, 除去 6 mm 纸片

后的抑菌直径。重复3次。

1.2.5 提取物在三文鱼中的 MBC 和 MIC 分析 从超市中购买大块三文鱼, 在超净工作台中无菌切除掉约 1.5 cm 表面鱼肉, 然后每块分割为 25 g, 按照 Yang 等方法^[12]处理鱼肉为无菌鱼肉。菌悬液稀释为约 5×10^4 CFU/mL。取 10 mL 最优条件下提取原始浓度为 100 mg/mL 的提取物, 使用无菌 ddH₂O 进行 2 倍稀释, 得到浓度为 50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78、0.39、0.195、0.097、0.048、0.024 mg/mL 的提取物, 分别取 3 mL 的提取物和 3 mL 5×10^4 CFU/mL 的测试菌株, 混匀后立即取 1 mL 的混合液涂布到 24 g 无菌三文鱼鱼块上。最终提取物的浓度分别为原来的 2%, 菌体的初始浓度为 10^3 CFU/g。处理后的鱼块放在 37 °C 下培养, 培养 24 h 后, 使用 TCBS 培养基测定抑菌效果。

1.2.6 数据处理 实验数据均采用三次平行实验的平均值, 数据用 Excel 软件处理, 数据间的差异通过统计软件 SPSS 19.0 进行单因变量多因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取条件下紫花地丁提取物抑菌正交试验结果

2.1.1 16 种紫花地丁提取物抑菌效果 根据乙醇浓度、提取温度、提取时间等三因素进行的四水平上的试验, 按正交表 L16(4³)研究, 进行了 16 种不同条件的提取方法, 获得的提取物对副溶血性弧菌的抑菌效果如表 2 所示。在紫花地丁提取物浓度为 100 mg/mL 时, A4B3C2 处理组合方法获得的提取物对副溶血性弧菌抑菌能力最强, 并与其它组合提取方法获得的提取物对副溶血性弧菌抑菌能力具有显著差异; 而 A2B2C3 处理组合和 A4B4C3 处理组合获得的提取物对副溶血性弧菌抑菌能力相对最弱, 这两处理组合间没有显著差异。理论上综合因素 K 值结果, 最优条件提取条件为 A4B3C1, 结合 R 值分析影响紫花地丁提取物抑菌效果提取的影响因素排序为: B>C>A, 即提取超声波处理时间>提取温度>提取时乙醇质量分数。

表 2 16 种提取方法获得的紫花地丁提取物抑菌能力

Table 2 The antibacterial ability of *Viola yedoensis* extracted with 16 methods

实验号 No.	A	B	C	抑菌圈 (mm) Bacteriostatic circle
1	1	1	1	15.91±0.35e
2	1	2	2	15.86±0.35ef
3	1	3	3	15.09±0.04f
4	1	4	4	12.01±0.07h
5	2	1	2	14.51±0.06g
6	2	2	3	10.11±0.11j
7	2	3	4	19.51±0.72b
8	2	4	1	17.45 ±0.41d
9	3	1	3	14.32±0.20g
10	3	2	4	17.23±0.05d
11	3	3	1	16.86±0.35de
12	3	4	2	11.21±0.06i
13	4	1	4	15.93±0.07e
14	4	2	1	19.20±0.17c
15	4	3	2	21.01±0.96a
16	4	4	3	9.71±0.21j
K ₁	58.87	60.67	69.42	
K ₂	61.58	62.40	62.59	
K ₃	59.62	72.47	49.23	
K ₄	65.85	50.38	64.68	
R	6.98	22.09	20.19	

2.1.2 紫花地丁提取物抑菌效果受不同因素影响的比较 以提取物抑菌能力作为因变量, 采用 SPSS 19.0 对紫花地丁提取物浓度为 100 mg/mL 的副溶血性弧菌抑菌能力结果进行单因变量多因素方差分析, 同时使用 F 检验对比结果三次重复, 分析表明重复间差异不显著。从表 3 可以看出, A 因素(乙醇质量分数)、B 因素(超声波超声时间)和 C 因素(提取温度)间, 其显著性分析表明 p 值分别为 0.903、0.121 和 0.158, 这表明不同的乙醇质量分数、超声波超声时间和提取温度间单独对紫花地丁提取物抑菌效果影响不大, 但组合后的提取效果却有显著差异, 这些因素间具有栅栏效应。

表 3 提取物抑菌能力的方差分析

Table 3 Variance analysis on the bacteriostatic ability

来源 Source	平方和 Type III sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F	显著性 Significance
因素A	7.345	3	2.448	0.187	0.903
因素B	61.373	3	20.458	2.376	0.121
因素C	56.145	3	18.715	2.069	0.158
总和	164.688	15			

2.1.3 最优提取条件的获得 本研究以对纯培养条件下副溶血性弧菌的抑菌效果为评价指标, 均值越高则表明抑菌效果越好。结合提取物抑菌能力和方差分析表明, 各因素内的因子间的抑菌能力没有显著性差异, 但由于因素间的因子存在栅栏效应, 因此最优提取条件组合为 A4B3C2, 即采用质量分数 75% 的乙醇溶液作为提取剂、在超声波超声处理 20 min、通过提取温度为 40 °C 所得到的紫花地丁提取物对副溶血性弧菌抑菌效果最佳。

2.2 接种到三文鱼中的抑菌效果

经无菌处理后的三文鱼接种上浓度为 10^3 CFU/g 的副溶血性弧菌后, 使用最优提取条件 A4B3C2 组合获得紫花地丁提取物处理后, 紫花地丁提取物在模拟三文鱼上的 MBC 和 MIC 浓度分别为 0.50 mg/g 和 6.25×10^{-2} mg/g。将浓度为 0.50 mg/g 和 6.25×10^{-2} mg/g 的紫花地丁提取物处理含 10^3 CFU/g 副溶血性弧菌的三文鱼, 放置在 10 °C 下培养箱中培养 5 d, 每 12 h 涂布以观察紫花地丁提取物在 MBC 和 MIC 浓度下对副溶血性弧菌抑菌稳定性。通过表 4 可以发现, 紫花地丁提取物表现出较好的抑菌能力和效果, 副溶血性弧菌浓度为 10^3 CFU/g 时, 紫花地丁提取物在 MIC 浓度下, 放置在 10 °C 下能够在 48 h 内抑制细菌生长; 紫花地丁提取物在 MBC 浓度下, 放置在 10 °C 下能够在 108 h 内维持杀灭抑菌能力; 结合三文鱼销售时状态, 选择紫花地丁提取物 MIC 浓度 (6.25×10^{-2} mg/g) 使用。因此, 紫花地丁提取物在水产品上具有较好的抑菌效果和保鲜能力。

表 4 紫花地丁提取物在 MBC 和 MIC 浓度下抑菌能力稳定性分析

Table 4 Stability analysis on the antibacterial ability of extracts from *Viola yedoensis* at the concentrations of MBC and MIC

培养时间 Incubation time	浓度 mg/g Concentrations		
	0.00	0.0625	0.50
12 h	4.13 log CFU/g	3.00 log CFU/g	0.00
24 h	4.64 log CFU/g	3.01 log CFU/g	0.00
36 h	5.68 log CFU/g	3.10 log CFU/g	0.00
48 h	6.5 log CFU/g	3.03 log CFU/g	0.00
60 h	8.08 log CFU/g	3.31 log CFU/g	0.00
72 h	8.14 log CFU/g	4.06 log CFU/g	0.00
84 h	-	4.63 log CFU/g	0.00
96 h	-	5.71 log CFU/g	0.00
108 h	-	6.68 log CFU/g	0.00
120 h	-	7.78 log CFU/g	0.02 log CFU/g

注: 紫花地丁提取物处理浓度 0.00 mg/g 为对照; -: 没有测定。

Note: Concentration in CK was 0.00 mg/g; - showed it was not detected.

3 讨论

随着现代食品工业的发展, 具有良好抑菌和保鲜效果的食品添加剂越来越多, 但大部分添加剂为化学合成。虽然我国已经制定了很严格的食品添加剂使用卫生标准, 但是由于食品从业者以及加工企业的食品安全水平相差很大, 同时消费者也愈发担心化学合成添加剂的安全问题, 因此, 从天然物质中寻找具有良好抑菌能力和保鲜效果的防腐剂是替代目前化学合成添加剂的一种有效方法。

紫花地丁是我国传统中药之一, 具有悠久的民间用药历史, 临床应用价值很高, 早在 1977 年就被《中国药典》收录并广泛使用至今^[9]。体内外实验研究表明, 紫花地丁的粗提物具有广泛的药理作用, 尤其是在抗炎、抑菌、抗病毒和抗肿瘤方面效果显著。目前关于紫花地丁提取物抑菌作用的研究报道较多, 主要集中在临床上对金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌和沙门氏菌等细菌的研究上^[13-15]。本研究首次将紫花地丁提取物应用于食品保鲜研究中, 以期通过合理的提取工艺获得具有

较强抑菌活性的天然活性物质,用于食品尤其水产品的保鲜和病原菌的防控。

紫花地丁的活性成分中含黄酮类、香豆素类、有机酸、酚类、生物碱、多糖、氨基酸、多肽、植物甾醇等多种有效成分,其中黄酮和香豆素类化合物是紫花地丁药材中重要的活性成分,同时富含铜(Cu)、铁(Fe)、锌(Zn)、锰(Mn)、镁(Mg)和钙(Ca)等微量元素^[9],表现出较好的抑菌的能力^[16,17]。通过本研究发现,不同提取条件下获得的粗提物对副溶血性弧菌的抑菌能力有显著差异,这可能与通过不同提取方法获得的粗提物中活性物质的成分有较大差异有关^[18-20]。副溶血性弧菌作为一种食源性致病菌,尤其它通过水产品引发的食品安全事件越来越严重^[2,3]。本研究通过接种浓度为 10^3 CFU/g的副溶血性弧菌来模拟生食三文鱼中副溶血性弧菌的污染,经紫花地丁提取物处理后,得到最优的MBC和MIC浓度分别为0.50 mg/g和 6.25×10^{-2} mg/g。研究表明能够从紫花地丁中获得应用于食品工业中具有较强抑菌能力活性物质。本研究为进一步研究紫花地丁提取物在食品中的应用以及对副溶血性弧菌的抑菌机理研究提供了依据。

4 结论

首次将紫花地丁提取物应用于水产品的保鲜和病原菌的防控的研究。通过探讨乙醇浓度、提取温度、提取时间等不同条件下处理的16种提取物对纯培养副溶血性弧菌和接种到三文鱼的抑菌效果,确定了在40℃下采用75%的乙醇溶液作为提取剂、超声波超声处理20 min为最优提取条件,由此得到的提取物对三文鱼中副溶血性弧菌的最小杀菌浓度(MBC)和最小抑菌浓度(MIC)分别为0.50 mg/g和 6.25×10^{-2} mg/g,建议选择 6.25×10^{-2} mg/g浓度(MIC浓度)紫花地丁提取物来控制三文鱼中的副溶血性弧菌。

参考文献

- [1] Nelapati S, Nelapati K, Chinnam BK. *Vibrio parahaemolyticus*- an emerging food borne pathogen[J]. Vet World, 2012,5(1):48-63
- [2] 刘秀梅,陈 艳,王晓英,等.1992-2001年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病预防网[J].卫生研究,2004,23(6):725-727
- [3] 刘海泉,刘冰宜,李泽娟,等.上海市生食三文鱼中副溶血性弧菌污染的风险分析[J].食品科学,2015,36(24):195-199
- [4] 卢惠妮,潘迎捷,赵 勇,等.十八种辛香料对五种食源性致病菌的抑菌研究[J].天然产物研究与开发,2010,22(5):883-889
- [5] 卢惠妮,潘迎捷,孙晓红,等.棘托竹荪子实体抑菌活性的研究[J].食品科学,2009,30(15):120-123
- [6] 张怀珠,徐晓霞,冯晓群,等.中草药防腐剂在冷却牛肉中的保鲜应用研究[J].食品工业科技,2011,32(9):152-155
- [7] 孙树杰,王士奎,李文香,等.中草药提取液对鲜切西兰花保鲜效果的影响[J].食品科学,2012,33(6):283-287
- [8] 张智伟,蔡 琨,于红红,等.紫花地丁含药血清对巨噬细胞炎症因子分泌的影响[J].免疫学杂志,2014,30(1):53-56
- [9] 李永生,何希瑞,杨 燕,等.紫花地丁化学成分与药理活性研究新进展[J].环球中医药,2013,6(4):313-318
- [10] 李艳丽,胡彦武.紫花地丁抗炎作用及机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):244-247
- [11] Rattanachaiakunsoop P, Phumkhachorn P. Antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) oil against *Salmonella enteritidis* in vitro and in food[J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2010,74(6):1200-1204
- [12] Yang ZQ, Jiao XA, Li P, et al. Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature[J]. Food microbiology, 2009,26(6):606-614
- [13] 康怀兴.紫花地丁的抗菌活性分析[J].中国民族民间医药,2012,21(14):51-52
- [14] 孙艺方,杜利利,周 乐,等.紫花地丁抗菌活性成分研究[J].中国中药杂志,2011,36(19):2666-2671
- [15] 李定刚,张武岗,宋毓民,等.紫花地丁抗菌活性成分研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(4):87-90
- [16] 彭练慈,殷中琼,贾仁勇,等.20味中药提取物对无乳链球菌的体外抑菌活性研究[J].华南农业大学学报,2014,35(4):22-25
- [17] 代如意,李 莉,殷中琼,等.5味中药对鸡白痢沙门氏菌的体外联合抑菌研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2015,43(2):34-37,43
- [18] 范晓良,颜继忠,张 纯,等.响应面法优化CO₂超临界萃取紫花地丁总黄酮的工艺研究[J].中国现代应用药学,2014,31(2):172-178
- [19] 陈蔚燕.紫花地丁不同方式提取物抑菌效果研究[J].现代农药,2014,13(5):38-40
- [20] 王俊杰,刘 弘,张玲昂,等.紫花地丁不同产地及不同部位中秦皮乙素含量比较[J].中国药师,2015,18(8):1400-1402