

花椒籽提取物对副溶血弧菌抑菌作用的研究

刘婷, 曹进, 丁宏*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 研究花椒籽提取物对副溶血弧菌的抑制效果。**方法** 采用无水乙醇提取花椒籽, 采用牛津杯法, 比较不同提取条件下花椒籽提取物对副溶血弧菌的抑制作用。**结果** 100%的花椒籽提取物抑制副溶血弧菌效果最好; 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度均为 12.50 mg/mL。温度升高不利于花椒籽提取物抑菌效果的发挥, 适宜温度范围为 20~40 °C; 酸性及中性环境中抑菌效果明显, pH 为 7.0 时, 花椒籽提取物抑菌作用最强; 紫外照射可使花椒籽提取物能力减弱。**结论** 花椒籽提取物对副溶血弧菌有明显抑制效果, 抑菌效果随提取条件的改变而改变。

关键词: 花椒籽提取物; 副溶血弧菌; 抑菌作用; 牛津杯法

Antimicrobial effect of pepper seed extract on *Vibrio parahaemolyticus*

LIU Ting, CAO Jin, DING Hong*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the antimicrobial effect of pepper extract on *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods** Pepper seeds were extracted by absolute ethyl alcohol and the antimicrobial effects on *Vibrio parahaemolyticus* under different treatment conditions were compared by the Oxford cup method. **Results** A hundred percent of the pepper seed extract had the most obvious inhibitory effect on *Vibrio parahaemolyticus*. The minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration were both 12.50 mg/mL. The inhibitory effect of pepper seed extract decreased with the increasing temperature and the suitable temperature range was 20~40 °C. The pepper seed extract could obviously inhibit *Vibrio parahaemolyticus* under acid and neural conditions, and it showed the strongest bactericidal effect when pH value was 7.0, however the inhibitory effect decreased by ultraviolet irradiation. **Conclusion** *Vibrio parahaemolyticus* can be obviously inhibited by pepper seed extract and the inhibitory effect changes with the extract conditions.

KEY WORDS: pepper seed extract; *Vibrio parahaemolyticus*; antimicrobial effect; Oxford cup method

1 引言

花椒是我国重要的经济植物, 种类丰富, 种植面积广泛。花椒籽是花椒生产的主要副产物, 含有丰富的脂肪酸、蛋白质和微量元素, 作为调味食用香料、中草药及保健品已有广泛应用^[1,2]。随着花椒种植面积的逐年扩大, 花椒籽

的产量也在逐年增加。近年来, 花椒籽的抑菌研究也有很大进展。研究表明, 花椒对白色葡萄球菌、枯草杆菌等革兰氏阳性菌^[3]以及伤寒杆菌、大肠杆菌、霍乱弧菌、绿脓杆菌等肠内致病菌^[4]都有显著抑制作用。用花椒籽无水乙醇提取物对大米防霉作用进行实验, 发现能延长大米的储藏时间^[5]。此外, 花椒籽提取物还可显著抑制损伤之后接

*通讯作者: 丁宏, 主任药师, 主要研究方向为食品、保健食品以及化妆品安全检测。E-mail: dinghong@nifdc.org.cn

*Corresponding author: DING Hong, Professor of Pharmacy, National Institutes for Food and Drug Control, No.2, Tiantanxili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: dinghong@nifdc.org.cn

种果实病斑范围的延伸。苹果、梨黑斑病病原互隔交链孢在花椒籽提取物的抑制下难以生长^[6,7]。目前关于花椒提取物抑菌研究主要集中在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门杆菌等阴性细菌^[8,9], 对副溶血弧菌抑制作用少有研究。本研究以副溶血弧菌为指示菌, 研究花椒籽提取物对副溶血弧菌的抑菌作用, 为扩大花椒籽提取物的应用提供数据支持, 同时可为发掘新的药用资源提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 试验材料

花椒籽 400 g(无虫变、无芽, 购于超市); 所用菌种副溶血弧菌(F25)由武汉轻工大学食品实验室提供。

RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 花椒籽提取物的制备

分别以无水乙醇和乙酸乙酯作为提取溶剂, 比较两种提取方法所得花椒籽提取物的抑菌效果。

取干燥完全的花椒籽捣碎, 称取 100 g 花椒籽粉末放入锥形瓶, 加入 1000 mL 无水乙醇, 40 °C 恒温水浴 1 h, 期间不断搅拌使其充分萃取。取出后真空抽滤 2 次, 收集滤液, 蒸发浓缩除去乙醇, 置 50 mL 容量瓶中, 冷冻干燥后存储备用。

乙酸乙酯提取液制备的方法同上。

2.2.2 菌体的培养

参照食品安全国家标准^[10], 取副溶血弧菌敏感菌株, 在 TCBS 培养基上进行划线分离, 培养 12h 得到单菌落。参考文献^[11], 以 LB 液体培养基代替 3%氯化钠蛋白胨水, 接种环挑取单菌落, 接种到 LB 液体培养基上, 在 37 °C, 200 r/min 的恒温摇床培养 5 h, 平板培养计数法^[11]测定菌浓度为 2.0×10^6 CFU/mL; 取 5 mL 菌液于离心管中, 5000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 沉淀中加入 5 mL 0.85% NaCl, 使细菌悬浮, 重复上述离心悬浮操作 2 次, 得到最终菌悬液。0.85% NaCl 调整, 0.5 的麦氏比浊管进行比对, 吸出麦氏浓度 0.5 的 NaCl 菌液 1400 μ L 倒入 210 mL LB 培养基中, 用于最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定和抑菌圈实验。

2.2.3 最小抑菌浓度的测定

取 13 支无菌试管并依次编号, 准备液体 LB 培养基, 1 号试管加 8 mL, 其余 12 支每管加 5 mL。吸取浓度为 1000 mg/mL 的花椒籽提取物 2 mL, 加入到 1 号试管混匀; 从 1 号管取 5 mL 加入到 2 号管摇匀, 如此依次倍比稀释至 11 号管, 最后从 11 号试管吸取 5 mL 弃去。此时 1~12 号管花椒籽提取物浓度分别为 200.00、100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.125、1.563、0.781、0.391、0.195、0 mg/mL, 12 号管为不含细菌的生长对照。1~12 号管中分别加入菌液 5

mL, 13 号试管中加入 5 mL LB 培养基并混匀。37 °C 200 r/min 摇床培养 18~24 h, 肉眼观察菌体生长情况, 溶液最后变澄清的为最小抑菌浓度。

2.2.4 最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC)的测定

以上述无水乙醇花椒籽提取液的最小抑菌浓度作为基础, 在无菌 LB 培养基琼脂平板上划线接种, 37 °C 培养 20~24 h, 以平板上无菌体生长的提取液浓度值标定为最小杀菌浓度。

2.2.5 牛津杯法测定花椒籽提取物抗菌

以副溶血弧菌为指示菌。灭菌冷却后往装有 5 mL LB 培养基的试管内打入 100 μ L 菌液并摇匀。把冷却到 55 °C 的 15 mL LB 培养基均匀倒入培养皿中, 冷却凝固。将含有菌液的 LB 快速倾注平铺在凝固的 LB 上, 待冷却凝固。把 4 个牛津杯无菌操作均匀放在培养皿上, 用针管在 3 个牛津杯中各加入 200 μ L 100%、50%、25%的花椒籽提取液, 加蒸馏水作为对照。重复试验 3 次。

2.2.6 pH 值对花椒籽提取物抑菌能力的影响

室温下, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将提取溶剂 pH 分别调为 3、5、7、9、11, 平衡 24 h, 按 2.1 方法分别制备提取液, 参考文献^[11], 调节提取液的 pH 值至 7.0; 以副溶血弧菌为指示菌, 测量抑菌圈直径大小。重复试验 3 次。

2.2.7 其他提取条件对花椒籽提取物抑菌能力的影响

确定 pH 为 7.0 适宜提取条件下, 分别对溶剂、浓度、温度以及紫外线照射等不同提取条件, 进一步采用单因素分析评估其对花椒籽提取物抑菌能力的影响。

(1)花椒籽提取物浓度对抑菌能力的影响

室温下, 分别配制浓度为 100、50、25、12.5、6.25 mg/mL 的花椒籽提取物溶液, 以副溶血弧菌为指示菌, 测量抑菌圈直径大小。重复试验 3 次。

(2) 温度对花椒籽提取物抑菌能力的影响

分别以 30、40、50、60、70 °C 水浴加热 30 min 为提取条件, 以副溶血弧菌为指示菌, 测量抑菌圈的直径。重复试验 3 次。

(3)紫外线对花椒籽提取物抑菌能力的影响

室温下, 取花椒籽提取物溶液置自制的紫外灯照射箱下(照射强度为 90 μ W/cm²), 距紫外灯管 30 cm 处, 静止照射 0、5、10、15、20、25 min, 以副溶血弧菌为指示菌, 测量抑菌圈的直径大小。重复试验 3 次。

2.2.8 花椒提取物抑菌效果评定标准

高度敏感: 抑菌圈直径大于 20 mm; 中度敏感: 抑菌圈直径 10~19 mm; 低度敏感: 抑菌圈直径小于 10 mm。

3 结果与分析

3.1 不同提取溶剂对花椒籽提取物抑菌作用的对比

乙酸乙酯的花椒籽提取液对副溶血弧菌抑菌圈直径为 11 mm, 无水乙醇花椒籽提取液对副溶血弧菌抑菌圈直

径为 16 mm, 无水乙醇提取物抑菌效果优于乙酸乙酯提取物。因此, 本研究选用无水乙醇提取花椒籽提取物。

3.2 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)的确定

当培养基中花椒籽提取液的浓度达到 12.50 mg/mL 时, 副溶血弧菌的生长受到明显抑制, 实验结果显示, 花椒籽无水乙醇提取液对副溶血弧菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度均为 12.50 mg/mL。

3.3 花椒籽提取物浓度对花椒籽提取物抑菌能力的影响

分别以花椒籽不同提取浓度对抑菌圈直径作图分析, 结果见图 1。

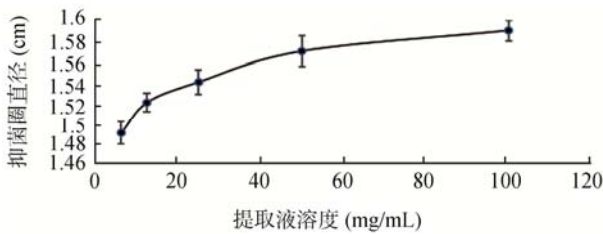


图 1 花椒籽提取物浓度对花椒籽提取物抑菌能力的影响($n=3$)
Fig. 1 Effects of extract concentration on antibacterial activity of pepper seed extract ($n=3$)

由图 1 可知, 随着花椒籽提取物浓度增加, 对副溶血性弧菌的抑菌作用增强, 当达到 100 mg/mL 时, 抑菌能力最强; 当浓度低于 12.5 mg/mL 时, 花椒籽提取物的抑菌直径远低于低敏感度指标(小于 10 mm), 基本不表现抑菌作用, 结果表明花椒籽提取浓度对副溶血弧菌的抑菌作用有显著影响。

3.4 pH 值对花椒籽提取物抑菌能力的影响

按 2.2.6 方法制备花椒籽提取液, 以提取液的 pH 值对抑菌圈直径做图分析, 结果见图 2。

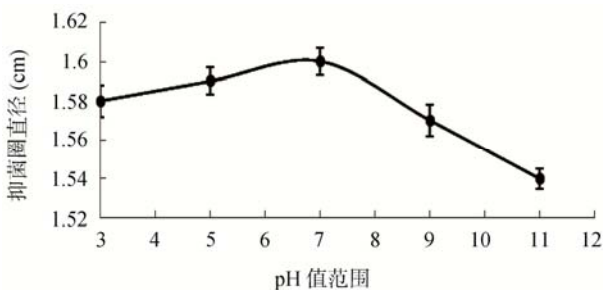


图 2 pH 值对花椒籽提取物抑菌能力的影响($n=3$)
Fig. 2 Effects of pH on antibacterial activity of pepper seed extract ($n=3$)

由图 2 可知, 花椒籽提取物对副溶血弧菌的抑制能力一定程度受提取 pH 范围影响, 偏酸性(pH 小于 5.0)或偏碱性(pH 大于 9.0)条件下, 花椒籽提取物对副溶血弧菌的抑制能力较差, 并且在 pH 8~11 范围内抑菌效果变化较大; 当 pH 为 7 时, 花椒籽提取物对副溶血弧菌的抑菌效力最强, 当 pH 高于 11, 抑菌效果最差。

3.5 温度对花椒籽提取物抑菌能力的影响

按 2.2.7(2)方法制备花椒籽提取液, 以温度对抑菌圈直径做图分析, 结果见图 3。

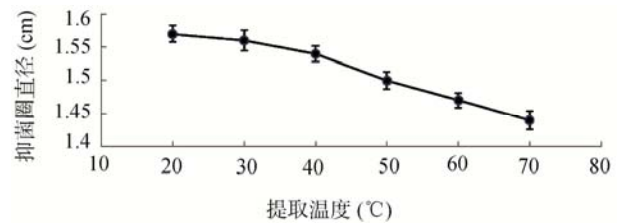


图 3 温度对花椒籽提取物抑菌能力的影响($n=3$)
Fig. 3 Effect of temperature on antibacterial activity of pepper seed extract ($n=3$)

由图 3 可知, 随着提取温度提高, 花椒籽提取物对溶血性弧菌的抑菌作用呈下降趋势; 当温度高于 40 °C 时, 花椒籽提取物的抑菌能力下降非常明显, 结果表明提取温度对其抑菌作用有显著影响, 以 20~40 °C 为宜。

3.6 紫外线处理对花椒籽提取物抑菌能力的影响

以紫外照射时间对抑菌圈直径作图分析, 结果见图 4。

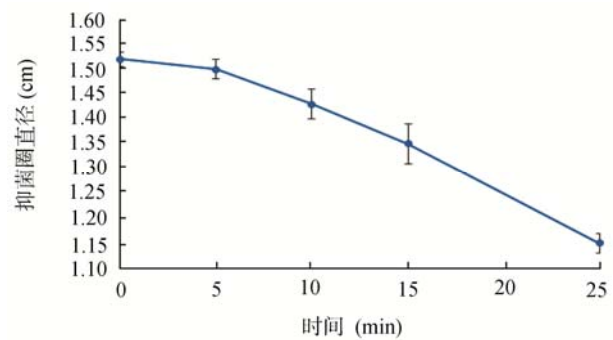


图 4 紫外线处理对花椒籽提取物抑菌能力的影响($n=3$)
Fig. 4 Effects of UV treatment on antibacterial ability of pepper seed extract ($n=3$)

由图 4 可知, 随着紫外照射时间的延长, 花椒籽提取物对副溶血性弧菌的抑菌能力呈下降趋势; 结果表明紫外照射易使花椒籽提取物失去抑菌活性。

4 结论与讨论

本研究结果表明: 用无水乙醇为溶剂提取的花椒籽提取物对副溶血弧菌有抑菌作用, 抑菌强度稍弱于对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门杆菌等致病菌^[9]的抑菌强度。同时, 研究发现提取条件可对花椒籽提取物的抑菌效果产生较为明显的影响。浓度越高抑菌作用越明显; pH、温度是影响抑菌效果的敏感因素, 当控制温度在 20~40 °C 内, pH 为 7.0 时, 花椒籽提取物对副溶血弧菌的抑菌作用最强; 而紫外照射一定程度抑制花椒籽提取物的抑菌能力。已有报道^[12,13], 花椒籽中极性较小的亲脂性分子如挥发油、籽蛋白等为主要抑菌物质, 而 pH、温度、紫外照射等均影响亲脂性分子的理化性质与稳定性。结合上述分析, 初步推测: 高温、pH 以及紫外照射环境下易导致花椒籽提取物中亲脂性分子发生降解, 挥发油对高温不稳定, 碱性、紫外照射及高温均可使籽蛋白发生变性失活, 从而影响抑菌效果。

本研究还对副溶血弧菌的增菌培养基进行替换实验, 参考文献^[11], 我们采用 LB 液体培养基替代 3% 氯化钠蛋白胨水, 实验结果表明 LB 液体培养基也适于副溶血弧菌增菌培养。另外, 在提取溶剂的筛选上, 无水乙醇明显好于乙酸乙酯, 原因在于乙酸乙酯的脂溶性低于无水乙醇的脂溶性, 在相同浓度下无水乙醇提取液中花椒籽提取物浓度要高于乙酸乙酯, 因而其抑菌更强, 结果与已有文献报道相一致^[14]。

副溶血弧菌主要存在于海产类产品^[15], 易引起食物中毒。研究证明花椒籽提取物对副溶血弧菌具有抑菌作用, 其结果不仅为今后花椒提取物的研发和应用提供技术参考, 还为日常有效预防副溶血弧菌引起的食源性污染问题提供新思路。

参考文献

- [1] 宋荣, 曹亮, 周佳民, 等. 花椒种质资源及其功能成分和生物学效应研究进展[J]. 湖南农业科学, 2014, 17: 23-26.
Song R, Cao L, Zhou JM, et al. Resarch progress in *Zanthoxylum* germplasm resources and chemical composition and biological effects [J]. Hunan Agric Sci, 2014, 17: 23-26.
- [2] 石雪萍, 李小华, 杨爱萍. 花椒有效成分以及开发利用研究进展 [J]. 中国调味品, 2012, 37(7): 6-8.
Shi XP, Li XH, Yang AP. Research progress on exploitation of the effective component of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. China Cond, 2012, 37(7): 6-8.
- [3] 干信, 吴士筠, 高雯琪, 等. 花椒挥发油抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 128-130.
Gan X, Wu SJ, Gao WQ, et al. Antimicrobial activity of volatile oil from peppers [J]. Food Sci, 2009, 30(21): 128-130.
- [4] 高逢敬, 蒲彪. 青花椒香气成分的抑菌性研究[J]. 四川食品与发酵, 2007, 42(13): 28-30.
Gao FJ, Pu B. Study on fragrant composition of the green *Zanthoxylum bungeanum* about the bacterostatic function [J]. Sichuan Food Ferment, 2007, 42(13): 28-30.
- [5] 吴周和, 吴小刚, 吴传茂. 花椒中天然防腐剂的提取及其抑菌作用 [J]. 食品工业, 2004, 25(5): 16-20.
Wu ZH, Wu XG, Wu CM. Extraction of natural preservative in pricklyash and its bacteriostasis [J]. Food Ind, 2004, 25(5): 16-20.
- [6] 吴慧昊, 王军节. 花椒提取物对苹果梨采后黑斑病的抑制[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2009, 30(1): 74-77.
Wu HH, Wang JJ. Study on inhibition of black spot of *Pyrus pyrifolia* after vest from pepper extractions [J]. J Northwest Univ Nat (Nat Sci Ed), 2009, 30(1): 74-77.
- [7] 时振东, 杜洪生, 苏延友. 生姜、花椒及黄伞提取物抑菌效果评价[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(1): 73-75.
Shi ZD, Du HS, Su YY. Effect assessment of antibacterial components in *Zingiber of ficinale* Roscoe, *Zanthoxylum bungeanum* and *Pholiota adipose* (Fr.) [J]. Chin J Public Health, 2009, 25(1): 73-75.
- [8] 江洁芳. 花椒中抑菌活性成分提取工艺的研究[J]. 中国调味品, 2011, 36(3): 30-32.
Jian JF. Study on extraction process of the antibiotic ingredients from the pepper [J]. China Cond, 2011, 36(3): 30-32.
- [9] 龚晋文, 胡变芳, 闫林林, 等. 花椒叶提取物抑菌效果的初步研究[J]. 广东农业科学, 2011, 38(24): 57-58.
Gong JW, Hu BF, Yan LL, et al. Comparative study on bacteriostasis of extracts from *Zanthoxylum bungeanum* [J]. Guangdong Agric Sci, 2011, 38(24): 57-58.
- [10] GB4789. 7-2013 食品安全国家标准 副溶血弧菌检验[S].
GB4789. 7-2013 National food safety standard-Vibrio parahaemolyticus inspection [S].
- [11] 赵广英, 申科敏, 励建荣. 副溶血性弧菌增菌培养基及培养条件的改进[J]. 水产科学, 2010, 29(3): 137-140.
Zhao GY, Shen KM, Li JR. Improving enrichment medium and culture conditions in bacterium *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fish Sci, 2010, 29(3): 137-140.
- [12] 赵晓侠. 花椒的生物活性成分及其应用研究[J]. 长春大学学报, 2008, 18(1): 108-110.
Zhao XX. Bioactive components of *Zanthoxylum* and its application research [J]. J Changchun Univ, 2008, 18(1): 108-110.
- [13] 王锐清, 郭盛, 段金廛, 等. 花椒果实不同部位及其种子油资源性化学成分分析与评价[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2781-2789.
Wang RQ, Guo S, Duan JA, et al. Analysis and evaluation of resourceful chemical compositions in different parts of *Zanthoxylum bungeanum* fruit and its seed oil [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(15): 2781-2789.
- [14] 宋丽雅, 倪正, 樊丽娜, 等. 花椒抑菌成分提取方法及抑菌机理研究 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(3): 63-66.
Song LY, Ni Z, Fan LN, et al. Antibacterial effect and extraction method

from Chinese prickly ash [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, 16(3): 63-66.

- [15] 陈坤才, 余超, 李迎月, 等. 水产品副溶血弧菌污染监测结果的比较 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 509-511.

Chen KC, Yu C, Li YY, et al. Analysis of the monitoring results for *Vibrio parahaemolyticus* pollution in aquatic products in China [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(2): 509-511.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘 婷, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品、药品检定及质量控制。
E-mail: lutyliu@126.com

丁 宏, 硕士, 主任药师, 主要研究方向为食品、保健食品以及化妆品安全检测。
E-mail: dinghong@nifdc.org.cn

《功能性食品研究》专题征稿函

功能性食品是指具有营养功能、感觉功能和调节生理活动功能的食品。目前已研发的功能性食品主要包括: 增强人体体质(增强免疫能力, 激活淋巴系统等)的食品; 防止疾病(高血压、糖尿病、冠心病、便秘和肿瘤等)的食品; 恢复健康(控制胆固醇、防止血小板凝集、调节造血功能等)的食品; 调节身体节律(神经中枢、神经末梢、摄取与吸收功能等)的食品和延缓衰老的食品等。由于其特殊的营养功能, 越来越得到人们的关注。

鉴于此, 本刊特别策划了“功能性食品研究”专题, 由南昌大学食品学院副院长邓泽元教授担任专题主编, 围绕功能性食品的营养研究、开发应用、安全质量控制等问题展开讨论, 计划在 2017 年 6 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及邓教授特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2017 年 4 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部