

仙人掌醇溶物的超声波辅助提取及其 对食品腐败菌的抑制作用研究

豁银强,郑建荣,汤尚文,吴进菊
(襄樊学院,湖北 襄阳 441053)

摘要:为开发仙人掌在食品工业上的应用,尤其是仙人掌醇溶物在食品防腐和抑菌上的应用,采用超声波辅助乙醇提取仙人掌醇溶物,通过正交试验对主要工艺参数进行优化,确定最佳提取工艺,并通过体外抑菌试验分析其抑菌活性。结果表明:超声波辅助乙醇提取仙人掌醇溶物的最佳工艺为粉碎度 60~80 目,乙醇体积分数 75%,料液比 1:20,超声波提取时间 30 min,在此工艺条件下,仙人掌醇溶物得率为 15.63%;体外抑菌试验表明,仙人掌醇溶物对细菌(大肠杆菌)、霉菌(黄曲霉)和酵母菌(鲁氏酵母)等常见食品腐败菌都有良好的抑制作用。

关键词:仙人掌;醇溶物;抑菌作用

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)04-0103-04

仙人掌(*Opuntia stricta*)又名仙巴掌、霸王树、火焰、火掌、观音刺,为仙人掌科仙人掌属植物。我国仙人掌分布广泛、资源丰富,以野生仙人掌为主,全年均可采集。仙人掌的化学成分十分复杂,含有较丰富的维生素 C、维生素 B₂ 及 K、Ca、Mg、Fe 等无机元素,总氨基酸中必需氨基酸含量达 30% 以上^[1],此外含有丰富的类黄酮、生物碱、甾体类、皂苷类、多糖及有机酸等,它们是各种植物中常见的对食品中腐败菌及致病菌具有抑制效果的化学成分^[2]。仙人掌的抑菌作用可能是这些多种抑菌组分综合作用的结果。因此没有必要将其中的抑菌有效成分一一分离出来进行抑菌研究。最近国内外对仙人掌的研究多集中在对其化学成分分析及其保健食品的研究和开发^[3-5]。该研究以采之湖北襄阳的野生仙人掌为原料,用超声波辅助提取法,通过正交试验设计选择仙人掌醇溶物的最佳提取工艺,并用其制备的仙人掌醇溶物对常见的食品腐败菌的抑菌作用进行试验,旨在为开发仙人掌在食品工业上的应用,尤其在当前食品中滥用各类化学防腐剂的情况下,为仙人掌醇溶物用于食品防腐和抑菌提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试野生仙人掌采自襄阳市郊外;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、鲁氏酵母(*Saccharomyces rouxii*)由襄樊学院化学工程与食品科学学院微生物实验室提供。

牛肉膏蛋白胨固体培养基:牛肉 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH7.4~7.6,将其配料加热融化即可。马铃薯培养基(PDA):去皮马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 18 g,水 1 000 mL,pH 自然。将马铃薯去皮,切成约 2 cm² 块,放入 1 500 mL 的烧杯中煮沸 30 min,同时用玻棒搅拌防止糊底,然后用双层纱布过滤,取其滤液加糖及琼脂,补足水分至 1 000 mL 煮沸即得^[6]。

试验仪器采用 GZX-9243 MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博讯事业有限公司医疗设备),DS-1 型高速组织捣碎机(上海精密仪器仪表有限公司),B-220 型恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂),RE52CS 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂),800 型离心沉淀器(上海手术器械厂),LS-B50L 立式高压蒸汽消毒锅(上海华线医用核子仪器有限公司),CJ-1680 型洁净工作

收稿日期:2012-01-10

第一作者简介:豁银强(1979-),男,河南省信阳市人,硕士,讲师,从事食品加工与储藏的研究与教学工作。E-mail:huoyinqiang@yahoo.com.cn。

台(苏净安泰器械厂),漩涡混合器(上海清浦沪西仪器厂),SP-01 型生化培养箱(湖北黄石市恒丰医疗器械有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 仙人掌醇溶物提取工艺的研究 将新鲜的仙人掌去刺、洗净、切碎后自然晾干,用高速组织捣碎机捣碎至粉末状。以乙醇为溶剂,采取超声波辅助法提取仙人掌醇溶物。以粉碎度、液料比、乙醇体积分数和超声提取时间为单因素,通过重量法测定提取液中醇溶物的含量,分别研究其对仙人掌醇溶物得率的影响。在单因素试验的基础上,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验^[7],正交因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	乙醇体积分数 A/%	粉碎度 B/目	超声提取时间 C/min	料液比 D/g:mL
1	65	40~60	10	1:10
2	75	60~80	20	1:20
3	85	80~100	30	1:30

正交试验的具体做法是:取仙人掌干粉 5 g,加入一定量乙醇,充分振荡,浸提 6 h 后,置于超声波(频率 70 kHz,放射 1 s 间歇 1 s)作用一定的时间,过滤。向滤渣加等量乙醇,重复提取一次。合并 2 次滤液,于离心机中 $4\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液于旋转蒸发仪中 60°C 减压浓缩,除去乙醇,待冷却后称量醇溶物的质量,进而计算提取率。

提取率/ $\%$ = $n/m \times 100$ 。

式中: m 为仙人掌干粉的质量(g); n 为仙人掌醇溶物的质量(g)。

1.2.2 菌悬液与滤纸片的制备 供试菌从 4°C 冰箱取出后,接种于新鲜斜面培养基上,细菌接种于牛肉膏蛋白胨培养基,黄曲霉和鲁氏酵母菌接种于马铃薯培养基,置于 37°C 培养 48 h 后用无菌生理盐水制备菌悬液。吸取 1.00 mL 菌悬液加入 9.00 mL 无菌生理盐水中,得到稀释 10 倍的菌悬液,采用二倍管法依次进行梯度稀释。将不同稀释度的菌悬液各吸取 0.20 mL 分别加入至灭菌冷却的相应的平板培养基表面,涂布均匀进

行培养。根据观察结果,选取各自适宜的菌液浓度,要求在该浓度下(约为 $10^6\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$),菌能长满整个培养皿且分布均匀。3 种菌接种浓度分别为大肠杆菌 $1.2 \times 10^7\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,黄曲霉 $2.1 \times 10^7\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,鲁氏酵母菌 $2.7 \times 10^7\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

用打孔器将普通定性滤纸制成直径为 6 mm 的圆片,放入干燥洁净的试管内,经 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min,无菌条件下晾干备用。

1.2.3 滤纸片扩散法 参照文献的方法进行改进^[8]。将无菌滤纸片分别浸入浓度 1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.125 0 和 0.062 5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的仙人掌醇溶物溶液中浸泡 3 h,取出置无菌操作台晾干备用。每个灭菌培养皿中倒入冷却至 45°C 的培养基 10~15 mL,待培养基凝固后加入 0.2 mL 菌悬液,涂匀。用无菌镊子贴滤纸片,每皿贴浸泡过同种浓度醇溶物的滤纸片 3 片,以无菌水作为对照。培养箱中培养,大肠杆菌 37°C 培养 24 h,黄曲霉 28°C 培养 48 h,鲁氏酵母 30°C 培养 24 h 后取出观察,用游标卡尺测定抑菌圈的直径(mm),取平均值。

1.2.4 最低抑菌浓度(MIC)的测定 MIC 的测定参照文献^[9]的方法进行改进。取仙人掌醇溶物与 45°C 的培养基共 10 mL,配制 10 个浓度梯度(0.100、0.090、0.080、0.070、0.060、0.050、0.040、0.020、0.010、0.005 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)混合均匀,待培养基凝固后,在培养基表面分别涂布 0.2 mL 3 种供试菌菌悬液涂匀。在培养箱中培养,大肠杆菌 37°C 培养 24 h,黄曲霉 28°C 培养 48 h,鲁氏酵母 30°C 培养 24 h 后取出观察各菌的生长情况,以完全没有菌生长的最低浓度为最 MIC。

2 结果与分析

2.1 仙人掌醇溶物最优提取工艺的确定

各因素对仙人掌醇溶物得率影响的主次顺序主要由极差的大小来决定,极差大的说明该因素影响大,是主要因素,极差值小的是次要因素。由表 2 可知,B 因素 3 个水平的极差值为 4.8,A 因素 3 个水平的级差值为 1.4,D 和 C 因素 3 个水平的极差值较小,分别为 0.9 和 0.7。所以按因素对提取率的综合比较分析,得出粉碎度>乙醇体积分数>液料比>超声提取时间。各因素的最

优水平主要由 k 值大小来决定,选出各个因素的最优水平,然后将它们组合起来,成为最优方案。D₂通过正交试验确定的最优方案为:A₂B₂C₃。即乙醇体积分数 75%,粉碎度 60~80 目,料液比 1:20,超声波提取时间 30 min。在最佳组合条件下,重复 3 次测定超声波辅助乙醇提取仙人掌醇溶物提取率的平均值为 15.36%,与正交试验结果基本吻合。

表 2 正交试验设计结果分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验	乙醇体积分数/%	粉碎度/目	超声提取时间/min	液料比/g:mL	醇溶物得率
Test	Volume fraction of ethanol	Fragmentation degree	Time of ultrasonic extraction	Proportion of material to liquid	/% Yield
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	12.2
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	13.4
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	8.7
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	14.2
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	14.6
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	9.7
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	14.3
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	13.8
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	7.9
K ₁	34.3	40.7	35.7	34.7	108.8
K ₂	38.5	28	35.5	37.4	
K ₃	36	26.3	37.6	36.7	
k ₁	11.4	13.6	11.9	11.6	
k ₂	12.8	14	11.8	12.5	
k ₃	12	8.8	12.5	12.2	
R	Ra=1.4	Rb=4.8	Re=0.7	Rd=0.9	

2.2 仙人掌醇溶物的抑菌活性

杆菌、黄曲霉、鲁氏酵母菌 3 种供试菌的抑制效果。由表 3 可知,醇溶物浓度越高,其抑菌活性越

采用滤纸片扩散法研究仙人掌醇溶物对大肠

表 3 仙人掌醇溶物的抑菌直径比较

Table 3 Comparison on microbes inhibition diameter of alcohol sduble substance from *Opuntia*

供试菌	抑菌直径/mm Microbes inhibition diameter				
	Test microbes	1.0000 g•mL ⁻¹	0.5000 g•mL ⁻¹	0.2500 g•mL ⁻¹	0.1250 g•mL ⁻¹
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		14.34±0.02	10.85±0.24	8.53±0.04	7.14±0.07
黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>		12.58±0.12	10.01±0.17	7.48±0.22	6.10±0.12
鲁氏酵母 <i>Saccharomyces rouxii</i>		11.74±0.08	10.00±0.06	7.11±0.32	6.00±0.32

大,这与他人研究结果相一致。

参照文献[10]的标准。将抑菌圈直径 r<6.5 mm规定为无抑菌作用或抑菌效果不明显;抑菌圈直径 6.5≤r<8.0 mm 为有抑菌作用;抑菌圈直径 8.0≤r<10.0 mm 为抑菌较明显;而抑菌圈直径 r≥10.0 mm 为有明显的抑菌效果。从表 3 可以看出,不同浓度的仙人掌醇溶物对不同的供试菌株抑制效果不同,当仙人掌醇溶物浓度为 0.062 5 g•mL⁻¹时,对 3 种供试菌的抑制效果均不明显。醇溶物浓度为 0.125 0 g•mL⁻¹仅对大肠杆菌有抑制作用;醇溶物浓度为 0.250 0 g•mL⁻¹对大肠杆菌、黄曲霉和鲁氏酵母均有抑制作用,但仅对大肠杆菌的抑制较明显;醇溶物浓度为 0.500 0 g•mL⁻¹时,对 3 种供试菌均表现出明显的抑制效果;醇溶物浓度为 1.000 0 g•mL⁻¹时,对 3 种菌均表现为明显的抑菌效果。总体上说,其抑制效果是随醇溶物浓度的升高而呈递增趋势,且对 3 种供试菌抑制效果从大到小依次为:大肠杆菌>黄曲霉>鲁氏酵母。

2.3 仙人掌醇溶物的 MIC

由表 4 可知,仙人掌提取物对大肠杆菌、黄曲霉和鲁氏酵母的 MIC 分别为 0.02、0.04 和

0.07 g·mL⁻¹,对大肠杆菌的抑菌效果最好,对黄曲霉和鲁氏酵母的效果也不错,其 MIC 值均不超过 0.1 g·mL⁻¹。

表 4 仙人掌醇溶物对供试菌的 MIC 分析

Table 4 Analysis on the MIC of ethanol EO on experimented microbes

菌种 Microbes	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	鲁氏酵母 <i>Saccharomyces rouxii</i>
MIC/g·mL ⁻¹	0.02	0.04	0.07

3 结论

该研究在单因素试验的基础上,采用正交 L₉(3⁴)试验确定超声波辅助提取仙人掌醇溶物的最佳工艺。结果表明,在影响仙人掌醇溶物的提取因素中,粉碎度和乙醇浓度是影响提取率的主要因素,料液比和超声提取时间影响相对较小,其最佳工艺参数为:粉碎度过 60~80 目,料液比 1:20,乙醇浓度 75%,超声波提取时间 30 min。最佳提取条件下,仙人掌醇溶物的提取率为 15.63%。

通过滤纸片扩散法和 MIC 测定,仙人掌醇溶物对 3 种供试菌均有一定的抑制作用。在 0.062 5~1.000 0 g·mL⁻¹ 的浓度范围内,对于不同的供试菌株抑制作用随醇溶物浓度的升高而逐渐增强,其抑菌圈直径从大到小排列:大肠杆菌>

黄曲霉>鲁氏酵母。仙人掌醇溶物对供试菌的 MIC 均小于 0.1 g·mL⁻¹。表明,仙人掌醇溶物对食品经常污染的细菌、霉菌和酵母菌均有良好的抑制作用,在食品防腐方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 赵声兰,陈朝银,段家贵.仙人掌提取物的抑菌作用研究[J].食品工业科技,2003(5):40-43.
- [2] 杨洋,刘翀,覃记杰,等.仙人掌提取物的抑菌作用[J].精细化工,2005,22(4):269-271,276.
- [3] 王伟伟,王琳.仙人掌化学成分及药理研究进展[J].中国中医药咨讯,2010,2(31):1-2.
- [4] Moussa-Ayoub T E, El-Samahy S K, Rohn S, et al. Flavonols, betacyanins content and antioxidant activity of cactus *Opuntia macrorhiza* fruits[J]. Food Research International, 2011, 44(7):2169-2174.
- [5] Yahia E M, Mondragon-Jacobo C. Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit(*Opuntia* spp.)[J]. Food Research International, 2011, 44(7):2311-2318.
- [6] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].4版.北京:高等教育出版社,2007.
- [7] 李春喜,邵云,姜丽娜.生物统计学[M].4版.北京:科学出版社,2008.
- [8] 胡永金,乔金玲.丹皮与赤芍提取物体外抑菌效果的研究[J].2010,38(8):4060-4061,4065.
- [9] 何爱华,张曦,陶琳丽,等.6种中草药对4种淡水鱼致病菌体外抑菌作用的研究[J].南方水产科学,2011,7(2):73-76.
- [10] 郭庆启,张娜,张玲.微波辅助提取仙人掌多糖工艺条件及抑菌效果的研究[J].中国调味品,2010,35(10):97-99,103.

Study on Ultrasound-assisted Extraction of the Alcohol Soluble Substance from *Opuntia* and Its Antimicrobial Activity on Food Spoilage Bacteria

HUO Yin-qiang, ZHENG Jian-rong, TANG Shang-wen, WU Jin-ju

(Xiangfan University, Xiangyang, Hubei 441053)

Abstract: In order to explore the application of *Opuntia stricta* in food industry, especially for its application in antimicrobial activity, the main technical parameters of the ultrasonic-assisted extraction of the alcohol soluble substance from *opuntia* were optimized by the orthogonal experiment, and its antimicrobial activity were analyzed. The best technical parameters were as follows: fragmentation degree was 60~80 mesh, the volume fraction of ethanol was 75%, the proportion of material to liquid was 1:20, time of ultrasonic extraction was 30 min. In this condition, the yield of alcohol soluble substance from *opuntia* was 15.63%. By using filter paper diffusion method, inhibitory activity of alcohol soluble substance from *opuntia* on food spoilage bacteria: bacteria (*E. coli*), mold (*Aspergillus flavus*) and yeast (*Saccharomyces rouxii*) was studied, and the minimal concentration (MIC) was determined by concentration gradient method. Results indicated that alcohol soluble substance of *opuntia* had effective inhibition on three kinds of tested bacteria.

Key words: *opuntia*; extract; antimicrobial activity