

新型天然提取产物果蔬保鲜生物膜

张弛

西北民族大学, 中国·甘肃 兰州 730100

【摘要】轻度腐烂主要由欧氏菌杆属(*Erwinia*)和根霉属(*Rhizopus*)的细菌引起的。真菌引起的植物病害。能导致植物组织或器官腐烂。微生物及病菌主要侵染植物的块根、块茎、果实、茎秆等肉质肥厚的器官。疾病不仅限于预期,在运输和储存过程中也会发生,危害更为严重。受损作物种类很多。中药取材于广泛的天然药物,抵抗力低,浪费少,药材以理论为基础,用于疾病的预防和治疗。中药材种类繁多,来源广泛,多种药材具有多种化学成分,大部分中药为复方,临床疗效通常体现在复方与组合物的综合配伍作用上。该化合物的组合方式不同,方法和使用方法在某些疾病中不同,综合证的比较药是中国医学的一个重要组成部分。通过正交实验在连翘、石榴皮、蒲公英和银杏叶中优选出最佳的工艺组合。

【关键词】天然产物提取; 抑菌; 中药; 生物膜

前言

我国主要的轻腐病是由欧氏杆菌(*Erwiniaaroideae*)、软腐花丹作物、西红柿、马铃薯等软腐病菌引起的轻腐病,以及由黑根霉(*Rhizopusstolonifer*)引起的马铃薯软腐病等^[1]。近年来,因药物滥用导致的临床耐药问题逐渐增多。人们开始研究中药的抗菌作用^[2]。梅林等人得出的结论是黄芩影响通过沙门氏菌的活性成分黄芩^[3]。绿脓杆菌,以前称为假单胞菌抑制效果的抗菌作用进行研究和肠炎大肠杆菌。迄今为止,植物病原体的快速发展已成为影响人们食品健康的重大问题^[4]。近年来,我国在中医药研究方面投入了大量的精力和物力,研究水平不断提高,取得了惊人的成果。深入研究配伍后的作用机制,对于优化药材配比、促进中药现代化具有重要意义。一个重要的推动作用。中药对轻度植物腐烂菌抗菌作用的实验研究与探讨,为解决临床药物耐药问题提供一定的理论依据,为今后更好的临床应用和农业问题提供指导^[5]。为今后更好地使用植物性农药提供一些理论依据和线索。通过挑选部分具有代表性的水平组合进行试验,分析中药复方各组分在整体组方中所起作用的大小以及各组分的最佳用药剂量,可以避免进行大量的拆方试验,从而大大缩短了中药组方研究开发的时间^[6]。

通过正交试验方法筛选出最合适的复方选药,再根据MIC获得的数据去选择出经济效益与成本兼顾的浓度配方。再在超声条件下,边搅拌边加入5%壳聚糖和1.5%海藻酸钠,制成粘稠的溶液,在向其中按比例加入制好的复方药物冻干粉,充分混合均匀便获得了最终产品。

1 材料与方

原料:本实验以黄芩、黄连、红景天、青海大黄、石榴皮等多种中药药物为原料进行实验,将各药物粉碎成粉末后备用。

1.1 天然产物预处理

取备用的各药物粉末,取分别粗粉80g,按料液比1:10加入一些纯净水浸泡24h,加热回流提取三次,每次二小时过滤后取上清液抽滤回收,下层滤渣继续加入适量的纯净水加热回流,将三次所取得这些滤液可以放入旋转蒸发器内浓缩,体积至原来黄芩粗粉的重量数,将药液直接放入冻干机烘干得到干燥固体后待用,研碎为粉末,即取得为冻干粉。

1.2 最小抑菌浓度的测定

测定方法为微量稀释法。取经高压灭菌过的试管,将已配制好使用的药液按一定倍数稀释(1-10号试管内药物浓度依次为0.125、0.0625、0.03125、0.016、0.008、0.004、0.002、0.001、0.0005、0.00025、0.000125g/mL,将上步制备的菌液用PBS缓冲溶

液稀释100倍后,取2mL菌液分别加入1-10号试管每管中,阴性对照为第11号试管(只加2.0mL液体LB和药液,不加菌液);阳性对照为第12号试管(加入液体LB2.0mL、菌液2.0mL)。后将1-12号试验管和对照管置33°C摇床中24h后取出,观察澄清度,无菌生长最小抑菌浓度(MIC),重复三组实验。

1.3 抗菌中药组分的筛选

采用正交实验的方法,将各药物按照2水平7因素、3水平4因素配制成相应的药液。药物浓度为0.125g/ml,采用打孔法,分别将8种药液取80ul加入含有100ul植物软腐病菌的琼脂平板中,放入33°C恒温恒湿培养箱中培养24h。观察结果,测量其抑菌圈大小的直径,每种重复三次,筛选出的最优抗菌复方药物。

1.4 正交实验

1.4.1 复方中草药醇6因素2水平正交实验

将筛选出来的提取物:银杏叶、竹茹、石榴皮、金银花、丁香花和连翘6因素2水平进行正交实验设计,以抑菌圈的平均值大小为检测指标。其中,每种提取物设定为为1个因素,这些提取物每种都有2个水平,设定水平1为添加,水平2为不添加。详情见表1,由表1可知各提取物在正交试验中,每组方中的用量,都采用前期工作的剂量组合,以此达到效果最优。

表1 复方中草药醇6因素2水平正交实验

因素	银杏叶	竹茹	石榴皮	金银花	丁香花	连翘
1水平	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2水平	-	-	-	-	-	-

1.4.2 复方中草药醇4因素2水平正交实验

将筛选出来的提取物:连翘、石榴皮、蒲公英和银杏叶4因素2水平进行正交实验设计,以抑菌圈的平均值大小为检测指标。其中,每种提取物设定为为1个因素,这些提取物每种都有2个水平,设定水平1为添加,水平2为不添加。由表2可知各提取物在正交试验中,每组方中的用量,都采用前期工作的剂量组合,以此达到效果最优。

表2 复方中草药醇4因素2水平正交实验

因素	连翘	石榴皮	蒲公英	银杏叶
1水平	0.075	0.080	0.060	0.060
2水平	0.030	0.040	0.030	0.030
3水平	-	-	-	-

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

2.1.1 复方中草药醇 6 因素 2 水平正交实验结果

中草药醇提取液的提取工艺优化结果见表 3。由极差分析可知：7 个因素的极差 R；D>C>B>G>E>A>F；所以 7 个因素影响从大到小排列为：D>C>B>G>E>A>F。最佳的工艺组合为：D1C1B2G1E2A2F2。中草药醇提取液对 *Lactobacillus sakei* 抑制效果最好的处理组合条件为 D1C1B2G1E2A2F2，在此条件下，得到抑菌圈直径为 $16.78 \pm 0.4\text{mm}$ ，Er 的平均值大小为 $15.81 \pm 0.14\text{mm}$ 。通过极差分析可知，料液比是影响中草药醇提取液抑菌效果的主要因素。

表 3 6 因素 2 水平正交实验

试管	A	B	C	D	E	F	G	抑菌圈平均值大小 (mm)	
								E. coli	Er
1	1	1	1	1	1	1	1	13.3±0.4	13.7±0.8
2	1	1	1	2	2	2	2	16.7±1.1	14.0±0.0
3	1	2	2	1	1	2	2	13.3±0.4	11.3±0.4
4	1	2	2	2	2	1	1	15.3±0.7	15.0±0.0
5	2	1	2	1	2	1	2	15.5±0.7	17.0±0.0
6	2	1	2	2	1	2	1	10.0±0.7	12.5±0.7
7	2	2	1	1	2	2	1	16.7±0.4	17.3±0.4
8	2	2	1	2	1	1	2	18.3±0.4	19.3±1.1
K1	14.65	13.88	16.25	14.70	13.73	15.60	15.60		
K2	15.13	15.90	13.53	11.40	15.08	16.05	14.18		
R	0.48	2.03	2.73	3.30	1.35	0.45	1.43		
K1'	13.50	14.30	16.08	14.83	14.20	16.25	16.25		
K2'	16.53	15.73	13.95	11.70	15.20	15.83	13.78		
R'	3.03	1.43	2.13	3.13	1.00	0.43	2.48		

2.1.2 复方中草药醇 4 因素 2 水平正交实验结果

药醇提取液的提取工艺优化结果见表 4。由极差分析可知：4 个因素的极差 R；B>D>C>A；所以 4 个因素影响从大到小排列为：B>D>C>A。最佳的工艺组合为：B1D1C3A2。中草药醇提取液对 *Lactobacillus sakei* 抑制效果最好的处理组合条件为 D1C1B2G1E2A2F2，在此条件下，得到抑菌圈直径为 $23.58 \pm 0.4\text{mm}$ ，Er 的平均值大小为 $19.41 \pm 0.14\text{mm}$ 。通过极差分析可知，料液比是影响中草药醇提取液抑菌效果的主要因素。

表 4 4 因素 2 水平正交实验

试管	A	B	C	D	抑菌圈平均值大小 (mm)	
					E. coli	Er
1	1	1	1	1	21.3±0.4	15.0±0.0
2	1	2	2	2	18.7±0.4	14.0±0.0
3	1	3	3	3	13.0±1.4	9.7±0.4
4	2	2	3	1	20.3±0.4	17.0±0.0
5	2	1	2	1	18.7±0.4	16.0±0.0
6	2	3	1	2	12.7±0.4	12.0±0.0
7	3	1	3	2	20.5±0.7	16.3±0.4
8	3	2	1	3	18.0±0.0	15.7±0.4
9	3	3	2	1	13.0±1.4	11.7±0.4
K1	17.67	20.17	17.33	20.10		
K2	17.23	19.00	16.80	17.30		
K3	17.17	12.90	17.93	14.67		
R	0.50	7.27	1.13	5.43		
K1'	12.90	15.77	14.23	19.00		
K2'	15.00	15.57	13.90	14.10		
K3'	14.57	11.13	14.33	12.37		
R'	2.10	4.63	0.43	6.63		

参考文献：

- [1]王向阳,陈贝莉,潘丽秀,黄建颖,顾双,防腐剂和消毒剂对采后芦笋欧氏杆菌的抑制作用[J].中国食品学报,2016,16(08):172-177.
- [2]李月华,赵格,赵建梅,刘俊辉,王君玮.欧盟、美国及国内畜禽屠宰环节沙门氏菌监控现状[J].中国动物检疫,2020,38(06):69-75.
- [3]全国细菌耐药监测网2014—2019年支气管肺泡灌洗液细菌耐药监测报告[J].中国感染控制杂志,2020,20(01):61-69.
- [4]王玉珊,林德贵,林珈好.中药组方优化试验设计方法概述[J].畜牧兽医学报,2020,52(03):565-575.
- [5]于玲玲,宁德生,符毓夏,李连春,李海云,潘争红.瑶药尖尾枫的化学成分、药理活性及质量标准研究进展[J].广西科学,2020,27(04):327-335.
- [6]王伟齐,孙红,葛修润.碱激发作用下海相软土固化研究[J/OL].硅酸盐通报:1-及其对生鲜鸭肉的保鲜作用[J].现代食品科技,2020,36(03):113-119+98.
- [7]蒋增海,徐耀辉,邓同炜,韩文龙.酚红指示剂微量稀释法测定副猪嗜血杆菌的药物敏感性[J].畜牧与兽医,2016,48(04):109-111.