鱼腥草组分对生物膜的抑制作用及其应用

李 成[1,2]，娄在祥[1,2]，王洪新[1,2]

（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 国家功能食品工程技术研究中心，江苏 无锡 214122）

摘要：研究了体积分数30%乙醇洗脱的鱼腥草柱层析组分对细菌生物膜的抑制活性，发现鱼腥草组分质量浓度在4.0 mg/mL的时候，对*E.coli*生物膜及*Salmonella typhimurium*生物膜形成的抑制率均为100%，同时鱼腥草组分在3.0 mg/mL和4.0 mg/mL时分别完全能够抑制*E.coli*和*Salmonella typhimurium*的生长。对鱼腥草组分进行成分分析，发现其主要成分为3,4-二羟基苯甲酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮苷以及槲皮素。同时研究了鱼腥草柱层析组分对冷藏猪肉的保鲜效果，对微生物含量、挥发性盐基氮(TVB-N)、pH以及汁液流失率均有积极效果，在柱层析组分质量浓度为4.0 mg/mL的时候，每克肉品在15 d时微生物数量对数值达到5.95，而此时对照组微生物数量对数值为8.01。结果表明，鱼腥草柱层析组分在冷藏猪肉贮存中具有一定的应用潜力。

关键词：鱼腥草；生物膜；活性；冷藏肉；贮存

中图分类号：TS 202；TS 205　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2016)03—0284—06

Components of *Houttuynia conrdata* on the Inhibition of Bacterial Biofilm and Its Application

LI Cheng[1,2]，　*LOU Zaixiang*[1,2]，　*WANG Hongxin*[1,2]

（1. School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. National Functional Food Engineering Technology Research Center，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The inhibition of bacterial biofilm activity by 30% ethanol elution of Houttuynia cordata was studied. The results showed that the inhibition rates of *E.coli* and Salmonella typhimurium biofilms were up to 100% when the extract concentration of H. cordata was 4.0 mg/mL. At the same time，the growth of *E.coli* and *S.typhimurium* were inhibited by H. cordata extract when its concentrations were 3.0 and 4.0 mg/mL，respectively. Further analysis of its extracts showed that 3，4-dihydroxy benzoic acid，chlorogenic acid，rutin，hyperin，quercetin，and quercetin were its main components. Meanwhile，the effect of preservation of chilled pork by the extracts of H. cordata were also studied. The results exhibited that the microbial content，volatile base nitrogen（TVB-N），pH and SAP turnover rate all had positive effects after the addition of the extractions. The total number of bacteria in per gram of the pork treated by 4.0 mg/mL extract was 5.95 at 15th d，while the control

收稿日期：2014-12-29

基金项目：国家自然科学基金项目(31201433)。

* **通信作者**：王洪新(1964—)，男，江苏徐州人，教授，博士研究生导师，主要从事食品功能因子和功能食品研究开发。

E-mail：hxwang@jiangnan.edu.cn

group was 8.01. The results suggested that the extraction of H. cordata had potential applications in chilled pork during storage.

Keywords: *Houttuynia cordata*, biofilm, activity, chilled pork, preservation

细菌生物膜是细菌在生长过程中为适应生存环境而在固体表面上生长的一种与游走态细胞相对应的存在形式。生物膜细菌与游离或浮游的细菌在形态和生理特征上均有着显著的区别。由于膜的包裹,化学品很难有效地渗入生物膜,因而很难将膜内的细菌钝化,其对抗生素的抵抗力要比自由存在的单个细菌高 1 000 倍以上[1-2]。冷藏猪肉是生鲜猪肉的一种新型消费形态,代表着生鲜猪肉生产和消费的发展方向。但是在贮存过程中因为污染微生物的生长繁殖,导致产品的腐败,这一直是困扰生产者的一个重要问题,同时也是消费者最为关注的肉品安全的核心问题。由于细菌生物膜是抑制细菌的关键,因此在生鲜猪肉贮存期间,保鲜过程中抑制其生物膜的形成有着至关重要的作用[3]。

鱼腥草(*Houttuynia cordata*)属三白草科蕺菜属野生草本植物,分布在长江以南及西藏等省区。鱼腥草中 VC 质量分数高达 202.5 mg/kg,是小白菜 VC 含量的 2.3 倍;有机酸质量分数高达 0.264%,与商品腌菜含量相当;氨基酸态氮质量分数为 0.158%,是一种比较理想的野生蔬菜[4-5]。以往对鱼腥草的药用及药理的研究较多,但对鱼腥草抑菌防腐作用的研究甚少。本文在上述基础上探究了鱼腥草柱层析组分对 *E.coli* 及 *Salmonella typhimurium* 生物膜的抑制作用,同时研讨了在冷藏猪肉贮存过程中的应用,为下一步鱼腥草在食品、医药领域更广泛的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

鱼腥草,市购。新鲜的原料猪肉(屠宰后 12 h 以内)去骨前腿肉,购于无锡华润万家超市。

1.2 供试菌株及其培养基

大肠杆菌(*E.coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),作者所在实验室保存,在 LB 培养基中 37 ℃培养。LB 培养基:NaCl 10 g,胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,水 1 000 mL,pH 7.0。

1.3 试剂与设备

试剂为分析纯或色谱纯;全自动酶标仪,紫外分光光度计,DELTA320 型针探式自动酸度测试仪。

1.4 样品处理

鱼腥草干品与体积分数 30%乙醇以 1:15 的料液比混合搅拌 12 h,经过离心抽滤、原液浓缩,用 HPD/100 大孔树脂柱层析,分别用 3 倍柱体积的纯水、体积分数 10%乙醇溶液、体积分数 30%乙醇溶液和体积分数 65%乙醇溶液进行柱层析,取体积分数 30%层析液进行浓缩干燥,得到样品柱层析组分,保存待用。

1.5 成分分析

将得到的体积分数 30%乙醇洗脱的鱼腥草柱层析组分配成 1 mg/mL 的样品甲醇溶液,过 0.45 μm 滤膜,进行液质联用分析测量。用 Sunfire C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm,3.5 μm),甲醇与水(含 2 mmol/L 乙酸铵,质量分数 0.1%甲酸)梯度洗脱,采用电喷雾离子源正离子模式、多反应监测(MRM)模式、外标法进行质谱定量分析,分析时间为 12 min[6]。

1.6 对生物膜的抑制作用

用 24 孔平底组织培养板培养细菌生物膜,每孔加入 100 μL 菌液和 2 mL 培养基,空白对照孔只加培养液,每株菌作 6 个复孔,37 ℃静止培养,取 24 h 生物膜培养物进行定量分析。每个菌株取 3 个复孔,吸掉培养物,用无菌磷酸缓冲液冲洗,干燥 2 h 固定,室温干燥,加入 150 μL 0.25 g/L 的结晶紫染液,室温染色 15 min,用生理盐水冲洗后晾干,每孔加入体积分数 95%乙醇 150 μL,室温脱色 90 min,用酶标仪在波长 570 nm 下测量吸光度[7-8]。

1.7 对 *E.coli* 及 *Salmonella typhimurium* 生存能力的影响

在以上实验的基础上选取适当的鱼腥草柱层析组分浓度,加入试管培养 24 h 后取出静置一段时间,观察试管中液体的澄清度,澄清透明组浓度即为最小抑菌浓度[9-10]。

1.8 对冷藏猪肉保鲜效果的影响

事先用体积分数 75%酒精棉球擦拭刀具和案板,将购回的肉去掉筋膜,切成约 100 g 左右的肉块,随机分为对照组和鱼腥草柱层析组分组,每组 24 块。将 3 组的肉块分别浸入无菌蒸馏水和配好的

2.0、4.0 mg/mL 的体积分数 30%乙醇洗脱的鱼腥草柱层析组分的溶液中 1 min，取出自然沥干 5 min，然后用保鲜膜包装，放在(3±1)℃温度冰箱贮存。将处理后的样品分别在 0、3、6、9、12、15、18、21 d 测定下列各项指标[11-16]。

1.8.1 感官品质测定 通过感觉器官，主要观察肉样表面和切面的状态，如色泽、黏度、弹性、气味等状况，并做出判定。参照 GB2706-94 中猪肉感官指标进行实验。根据色泽、组织状态、黏度、气味、煮沸后肉汤 5 项指标综合评定。并采纳 Williams 介绍的 9 点评分法作评分。本实验取 6 分及 6 分以上为消费者可接收的肉样，即是否达到 6 分为肉样货架寿命终点。

1.8.2 微生物指标测定 在超净台内取 25 g 肉样置于灭菌研钵内，充分研磨后加灭菌生理盐水转移至三角瓶中，充分振荡制成体积比 1:10 的稀释液，用灭菌移液管吸取稀释液再次配制成体积比 1:100 以及体积比 1:1 000 的稀释液并如此每次递增稀释。根据肉样腐败程度，选择 2 个适宜的稀释度，吸取 200 μL 置于固体培养基上，37 ℃培养 2 d，统计菌落数。

1.8.3 挥发性盐基总氮(TVB-N)的测定 称取肉样 5 g 置于 250 mL 的具塞锥形瓶中，加 100 mL 蒸馏水振荡摇匀 30 min，上清液即为样液。按照 GB/T5000.44-96 进行，取 10 mL 样液注入蒸馏装置反应室，再加入 10 mL 质量分数 1%氧化镁溶液，蒸馏 10 min，尾端流入硼酸溶液中（按体积比 1:1 添加 0.1 g/dL 甲基红乙醇溶液及 0.5 g/dL 溴甲酚绿乙醇溶液），吸收液用 0.01 mol/L 盐酸标准液滴定。

1.8.4 汁液流失率 每次测量时打开包装袋取出样品称质量，所测质量和原来的质量之差即为汁液流失量。

1.8.5 pH 的测定 采用 DELTA320 型针探式自动酸度测试仪测试。每次测试肉样 3 个点，计算平均值，即为肉样在该贮存时间下的 pH。

2 结果与分析

2.1 成分分析

体积分数 30%乙醇洗脱的鱼腥草柱层析组分色谱图如图 1 所示。

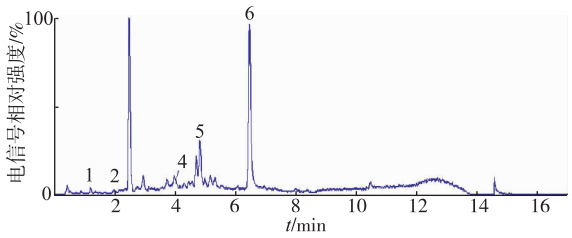


图 1 体积分数 30%鱼腥草柱层析组分色谱图

Fig. 1 Chromatogram of *Houttuynia cordata* eluted by 30% ethanol

峰 1，保留时间 1.22 min，ESI-MS(*m/z*)：153[M-H]⁻，其相对分子质量为 154，UV λ_{max}=261 nm，并将这些信息与 3,4-二羟基苯甲酸标准品的保留时间、质谱进行比较，比较分析两者的紫外光谱，发现化合物 1 的信息与 3,4-二羟基苯甲酸标准品的特征相同，因此化合物 1 鉴定为 3,4-二羟基苯甲酸。

峰 2，保留时间 1.99 min，ESI-MS(*m/z*)：353[M-H]⁻，其相对分子质量为 354，UV λ_{max}=326 nm，保留时间、质谱、紫外光谱信息与标准品绿原酸的特征相同，并且有特征碎片离子 *m/z* 191，因此化合物 2 可鉴定为绿原酸。

峰 3，保留时间 3.97 min，ESI-MS(*m/z*)：609[M-H]⁻，其相对分子质量为 610，UV λ_{max}=353 nm，保留时间、质谱、紫外光谱信息与标准品芦丁的特征相同，结合碎片离子 *m/z* 463，可鉴定化合物 3 为芦丁。

峰 4，保留时间 4.06 min，ESI-MS(*m/z*)：463[M-H]⁻，其相对分子质量为 464，UV λ_{max}=360 nm，保留时间、质谱、紫外光谱信息与标准品金丝桃苷的特征相同，因此化合物 4 鉴定为金丝桃苷。

峰 5，保留时间 4.82 min，ESI-MS(*m/z*)：447[M-H]⁻，其相对分子质量为 448，UV λ_{max}=326 nm，保留时间、质谱、紫外光谱信息与标准品槲皮苷的特征相同，因此化合物 5 鉴定为槲皮苷。

峰 6，保留时间 4.82 min，ESI-MS(*m/z*)：301[M-H]⁻，其相对分子质量为 302，UV λ_{max}=256、371 nm，保留时间、质谱、紫外光谱信息与标准品槲皮素的特征相同，结合特征碎片离子 *m/z* 267、229，可鉴定化合物 6 为槲皮素。

2.2 对生物膜形成的抑制作用

将鱼腥草柱层析组分溶解于蒸馏水中，测定其对 *E.coli* 及 *Salmonella typhimurium* 生物膜形成的影响，最终质量浓度分别定为 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/mL，以蒸馏水为对照，结果如图 2 所示。

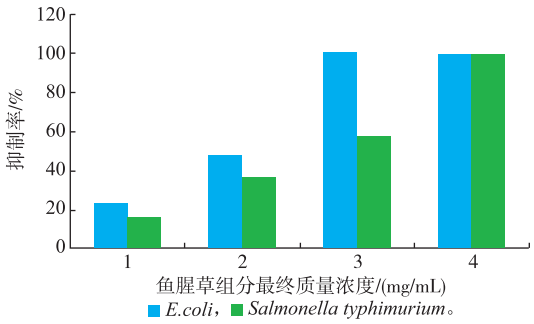


图 2 不同质量浓度鱼腥草组分对细菌生物膜的抑制率

Fig. 2 Inhibition rate of bacterial biofilm by different concentrations of *H. cordata* fractions

可以看出,随着鱼腥草柱层析组分质量浓度的增加,对两种细菌生物膜形成的抑制率也逐渐升高。并且当柱层析组分最终质量浓度为 3.0 mg/mL 时,对 *E.coli* 生物膜形成的抑制率为 100%。最终质量浓度为 4.0 mg/mL 时,对 *Salmonella typhimurium* 生物膜形成的抑制率也为 100%。

2.3 对 *E.coli* 和 *Salmonella typhimurium* 生存能力的影响

通过测定体积分数 30%乙醇洗脱的鱼腥草柱层析组分对两种细菌的 MIC(最低抑菌质量浓度),发现对 *Salmonella typhimurium* 的 MIC 为 4.0 mg/mL,对 *E.coli* 的 MIC 为 3.0 mg/mL。

2.4 对冷藏猪肉保鲜效果的影响

2.4.1 肉样整体感官品质的变化 经过鱼腥草柱层析组分处理的肉样和未经处理的肉样在贮存期间整体感官品质变化如表 1 所示。

表 1 鱼腥草柱层析组分对肉样整体感官品质评分的影响

Table 1 Sense effects of three samples by different concentrations of *H. cordata* fractions

组别	保存时间/d							
	0	3	6	9	12	15	18	21
对照组	8	8	7	6	5	3	1	1
2 mg/mL 组	7.3	7.3	6.7	6	5.3	4	1	1
4 mg/mL 组	7.7	7.3	7	6.3	6	5	3.7	2

注:6 分为肉样货架寿命终点。

从表 1 可以看出,3 组肉样整体感官评分均随贮存期的增长而下降。其中各组在 0 d 感官评分区别不大,4.0 mg/mL 组由于其添加柱层析组分浓度较大,导致色泽变暗。另外可以发现,对照组货架期为 9 d,而鱼腥草作用后 2.0 mg/mL 组仍为 9 d,4.0 mg/mL 组为 12 d,总体感官品质评分(包括色泽、组织状态、黏度和气味)稍高于对照组,但添加鱼腥草组分对肉样色泽以及气味均有不利影响。

2.4.2 肉样微生物含量的变化 经过鱼腥草柱层析组分处理后的肉样以及未经处理肉样在贮存过程中微生物含量的变化如图 3 所示。可以看到,肉样在贮存过程中微生物的含量整体呈现上升的趋势,同时鱼腥草柱层析组分对微生物有明显的抑制作用,而且柱层析组分质量浓度升高对抑制效果有积极作用。在 21 d 的时候,对照组细菌总数对数值为 9.74,2.0 mg/mL 组为 9.28,4.0 mg/mL 组为 7.59。此时在 4.0 mg/mL 鱼腥草柱层析组分中浸泡的肉样刚超过 7(冷藏肉腐败的极限值)。

2.4.3 挥发性盐基总氮(TVB-N)的变化 经过鱼腥草柱层析组分处理后的肉样及未经处理肉样在贮存过程中 TVB-N 值的变化如图 4 所示。可以看出,在 6 d 以后 3 组肉样中 TVB-N 值都开始快速增加,到 21 d 对照组中 TVB-N 值达到103.21 mg/hg,而添加鱼腥草柱层析组分的两组明显小于对照组,这说明鱼腥草柱层析组分的保鲜效果明显。

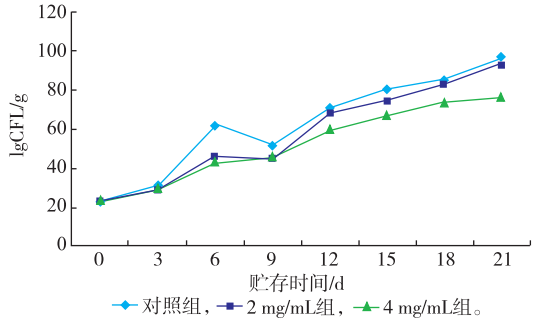


图 3 冷藏猪肉在冷藏过程中微生物含量的变化

Fig. 3 Changes of the bacteria counts of chilled pork during the storage

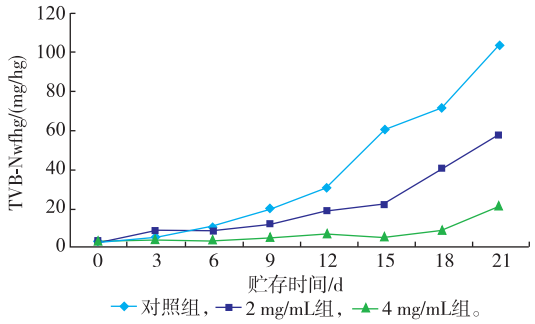


图 4　冷藏猪肉在冷藏过程中 TVB-N 值的变化

Fig. 4　Change of the TVB-Nvalue of chilled pork during the storage

2.4.4　汁液流失率的变化　经过鱼腥草柱层析组分处理后的肉样以及未经处理肉样在贮存过程中汁液流失率的变化如图 5 所示。

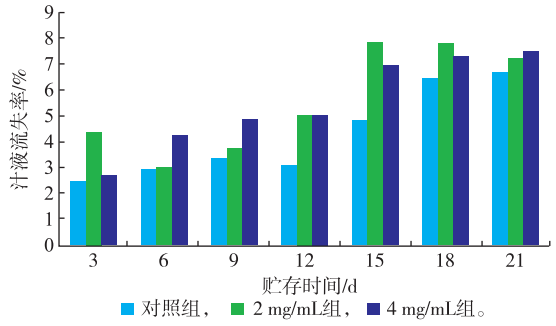


图 5　冷藏猪肉在冷藏过程中汁液流失率的变化

Fig. 5　Changes of the drop loss of chilled pork during the storage

可以看出，肉样随着贮存时间的增加汁液流失率亦在不断上升，即加入鱼腥草柱层析组分并没有对其产生减缓作用，可能是由于鱼腥草柱层析组分导致肌肉组织外部渗透压高，使部分水分流出组织，因而比对照组汁液流失率更高些。

2.4.5　肉样 pH 的变化　经过鱼腥草柱层析组分处理后的肉样以及未经处理肉样在贮存过程中 pH 的变化如图 6 所示。可以看出，pH 在贮存过程中出现整体升高的走势。与对照组对比，加鱼腥草柱层析组分组的样品 pH 在升高过程中明显趋缓，这说明鱼腥草柱层析组分保鲜效果明显。肉样贮存过程中，由于其自身的成熟过程，肉组织细胞中产生部分乳酸、磷酸等酸性物质，致使刚开始 pH 变化不大甚至有所降低，但随着贮存时间的增加，肉样中的腐败菌以葡萄糖、氨基酸、乳酸等为底物，代谢产生了硫化物、分子胺类物质以及挥发性氨，导致肉样 pH 升高[13]。鱼腥草柱层析组分的添加明显减缓了肉样 pH 的上升速度，因此鱼腥草柱层析组分对冷藏猪肉保鲜过程中的 pH 有积极作用。

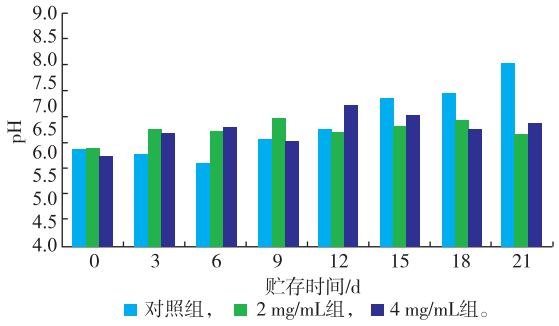


图 6　冷藏猪肉在冷藏过程中 pH 的变化

Fig. 6　Changes of the pH of chilled pork during the storage

3 结　语

研究了鱼腥草柱层析组分对 *E.coli* 及 *Salmonella typhimurium* 生物膜的抑制作用，发现其能够显著抑制这两种细菌生物膜的形成，而且能够完全抑制两种菌的生长。同时，通过研究鱼腥草组分对冷藏猪肉贮存期间各项保鲜指标的影响，发现有较好的保鲜效果，但各项指标的变化趋势不同。其中微生物含量变化和 TVB-N 值变化最能反映冷藏猪肉贮存过程中的腐败状况。3,4-二羟基苯甲酸、绿原酸与芦丁被证明具有良好的抑菌效果，因此可以推断这 3 种成分是在冷藏猪肉贮存过程中起保鲜作用的主要成分[17]。鱼腥草是一种常见的蔬菜，其组分对致病菌的生存及其生物膜形成具有良好的抑制效果。因此，作为一种安全无毒副作用的抑菌防腐剂，鱼腥草柱层析组分在肉制品等食品保藏中会有很强的应用价值。

参考文献：

[1] 李京宝，韩峰，于文功. 细菌生物膜研究技术[J]. 微生物学报，2007，47(3)：558-561.
LI Jingbao，HAN Feng，YU Wengong. Model systems for bacterial biofilm research [J]. **Acta Microbiologica Sinica**，2007，47(3)：558- 561.(in Chinese)

[2] Koo H,Gome B P F A. In vitro antimicrobial activity of propoils and Arnica montana against oral pathogens[J]. **Archives of Oral Biology**,2000,45:141-148.

[3] 柴春祥. 猪肉品质变化的动力学模型[J]. 食品与发酵工业,2004,30(6):10- 12.
CHAI Chunxiang. Research on the kinetics model of pork quality[J]. **Food And Fermentation Industries**,2004,30(6):10- 12.(in Chinese)

[4] Meng Jiang,Dong Xiaoping,Jiang Zhihong,et al. Study on chemical constituents of flavonoids in fresh of houttuynia cordata[J]. **African Journal of Biotechnology**,2006,31(16):1335-1337.

[5] 吴佩颖,徐莲颖,陶建生. 鱼腥草的研究进展[J]. 上海中医药杂志,2006,40(3):62-64.
WU Peiying,XU Lianying,TAO Jiansheng. Research progress of herba houttuyniae [J]. **Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine**,2006,40(3):62-64.(in Chinese)

[6] Liu Lu,Li Cheng,Xia Wentong,et al. Inhibition effects of houttuynia cordata thunb. On Microcystis aeruginosa [J]. **Journal of Hygiene Research**,2014,43(3):483-487.

[7] 曹勇. 不同内镜洗涤剂对内镜管腔大肠杆菌生物膜清除力比较[D]. 杭州:浙江大学医学院,2009.

[8] 马同锁,张红兵,刘月英,等. 十三种天然香辛料的抑菌作用研究[J]. 山西食品工业,2005(1):8-10.
MA Tongsuo,ZHANG Hongbing,LIU Yueying,et al. Bacteriostatic function of 13 natrual flavor [J]. **Shanxi Food Industries**,2005(1):8-10.(in Chinese)

[9] 赵赟鑫, 刘开辉, 邓百万, 等. 2 株中国红豆杉内生细菌代谢产抑菌活性物质的研究 [J]. 食品与生物技术,2010,29(4):617-623.
ZHAO Yunxin,LIU Kaihui,DENG Baiwan,et al. Antibacterial activities of metabolites produced by two endophytic bacteria isolates in taxus chinensis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(4):617-623.(in Chinese)

[10] Jin Xiao,Zuo Lingyu,Liu Yuan,et al. Effects of nidus vespae extract and chemical fractions on glucosyltransferases,adherence and biofilm formation of streptococcus mutans[J]. **Archives of Oral Biology**,2007,52:869-875.

[11] 段静芸,徐幸莲,周光宏. 壳聚糖在冷却鲜猪肉保鲜中的应用研究[J]. 食品工业科技,2001,22(4):26-28.
DUAN Jingyun,XU Xinglian,ZHOU Guanghong. The application of chitosan in the preservative effect on chilled fresh pork[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2001,22(4):26-28.(in Chinese)

[12] 刘长建, 权春善, 范圣第, 等. 类植物乳酸菌物质的性质及其在猪肉保鲜中的应用 [J]. 食品研究与开发,2009,30(8):152-155.
LIU Changjian,QUAN Chunshan,FAN Shengdi,et al. Properties of an Antimicrobial substance from lactobacillus paraplantarum and applicaton of the fermented solution on pork preservation [J]. **Food Research and Develop**,2009,30 (8):152- 155.(in Chinese)

[13] 黄宾. 冷却猪肉天然保鲜剂的研究[D]. 保定:河北农业大学 动物营养与饲料科学学院,2008.

[14] 廖晓珊,钟晓红,孟娟,等. 壳聚糖竹醋液复合膜抗菌活性及其应用[J]. 食品与生物技术学报,2010,29(3):395-400.
LIAO Xiaoshan,ZHONG Xiaohong,MENG Juan,et al. Antimicrobial properties and application of composite film from chitosan anf bamboo vinegar[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2010,29(3):395- 400.(in Chinese)

[15] Bonilla J,Vargas M,Atares L,et al. Effect of chitosan essential oil films on storage-keeping quality of pork meat products[J]. **Food and Bioprocess Technology**,2014,7(8):2443-2450.

[16] Kandeepan G,Anjaneyulu A S R,Kondaiah N,et al. Evaluation of quality and shelf life of buffalo meat keema at refrigerated storage[J]. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**,2013,50(6):1069-1078.

[17] 孙文基,绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:464.