

陈 谦,傅 舒,高 鹏,等. 辣椒碱的提取优化及对储粮害虫的防治效果[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):157-162.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.038

辣椒碱的提取优化及对储粮害虫的防治效果

陈 谦^{1,2},傅 舒³,高 鹏^{1,2},杨 敏^{1,2},刘绵学^{1,2},吴 琴^{1,2},郑 宇²,潘平川^{1,2},黄 敏^{1,2}

(1. 辐照保藏四川省重点实验室,四川成都 610101; 2. 四川省原子能研究院,四川成都 610101;

3. 成都中科能源环保有限公司,四川成都 610041)

摘要:利用超声-溶剂法提取辣椒中的辣椒碱,采用 Plackett-Burman 设计对影响辣椒碱提取率的 7 个因素进行评价,筛选出具有显著效应的 3 个因素:乙醇浓度、颗粒大小、提取温度,通过 Box-Behnken 试验研究各因素及其交互作用对响应值的影响。结果表明,最优提取工艺参数是乙醇浓度为 60%,颗粒大小为 80 目,温度为 41.8℃,提取次数为 3 次,超声功率为 120 W,料液比为 1 g:6 mL,提取时间为 10 min,在此条件下,辣椒碱提取率为(54.08 ± 0.74) mg/g,与模型预测值相符。另外,辣椒碱浓度大于 8.0 mg/mL 时,对赤拟谷盗和谷蠹均有较好的驱避效果,而糙米中的辣椒碱浓度为 1.0 mg/g 时,对这 2 种害虫的拒食作用显著,辣椒碱处理组的粮食损失量仅为对照的 43.17% (赤拟谷盗)、41.59% (谷蠹)。

关键词:辣椒碱;响应面法;储粮害虫;驱避作用;拒食作用

中图分类号: S482.3+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0157-05

粮食安全是关系国计民生的重大战略问题,目前我国耕地不断减少,人口逐渐增加,粮食单产提高幅度有限。而根据国家粮食丰产工程项目组调研结论,我国每年储粮损失率约为 5%~10%,若按 8% 来计算,每年仅储粮损失就达 240 亿 kg^[1],因而降低粮食产后储藏损失是减轻国内粮食供需矛盾、保障粮食安全的重要手段。长期以来,国内外主要利用化学杀虫剂,如磷化氢熏蒸法来杀灭储粮害虫,造成粮食中有毒有害物质残留、环境污染、害虫产生抗性以及用药量不断增加等后果^[1-2]。因此,迫切须要开发一种高效、安全、环境相容性优良的储粮害虫防治技术。

植物源杀虫剂(plant-based insecticides)具有选择性强、作用机制复杂、害虫不易产生抗药性、环境友好、安全性高等突出优点,是开发绿色储粮杀虫剂的重要来源^[3]。香草酰胺类生物碱成分是辣椒辛辣味的主要来源,主要由辣椒素(capsaicin)、二氢辣椒素(dihydrocapsaicin)和降二氢辣椒素(nordihydrocapsaicin)等 3 种类似物组成,三者占辣椒总碱含量的 95% 以上。辣椒碱具有多种生物活性和生理功效,目前被广泛应用于医药、食品、农业、军事等领域,是一种天然、安全、环境友好的化合物^[4]。Madhumathy 等的研究证明,辣椒碱对致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)和斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)的幼虫有良好的杀灭作用^[5];刘新等的研究表明,辣椒碱对桃蚜(*Myzus persicae* (Sulzer))具有良好的防治效

果^[6];陈学文通过研究发现,辣椒碱对枸杞蚜虫(*Aphis* sp.)的杀灭作用显著,其致死中浓度(lethal concentration 50,简称 LC₅₀)为 13.21 mg/L^[7];邹华娇的田间试验结果表明,9% 的辣椒碱微乳剂对菜青虫[*Pieris rapae* (L.)]和菜蚜(*Lipaphis erysimi*)有较好的防治效果^[8];Saah 等通过研究发现,辣椒碱可使泰国香米中米象(*Sitophilus oryzae*)数量从(137.0 ± 4.08)个/100 g 降低到(3.67 ± 0.82)个/100 g,同时也可明显降低米中总菌落数和霉菌数^[9];尉洪超等的研究表明,含辣椒碱的聚乙烯(polyethylene,简称 PE)防虫薄膜对赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)在 80 h 触杀死亡率可达 90% 以上^[10];还有研究表明,2% 辣椒碱对书虱(booklice)的防治效果优于几种化学驱虫剂^[11]。因此,辣椒碱在防治储粮害虫中具有较大的应用潜力。

超声辅助提取技术具有提取时间短、提取效率高、适用性广等优点,广泛应用于天然产物的提取中^[12-14]。而响应面法(response surface methodology,简称 RSM)可以有效快速地确定多因子系统的最佳工艺条件,是一种应用广泛的试验优化方法^[15-17]。本试验首先对辣椒碱超声-溶剂法提取条件进行研究并优化,并分析辣椒碱对 3 种储粮害虫-玉米象(*Sitophilus zeamais*)、赤拟谷盗(*T. castaneum*)和谷蠹(*Rhizopertha dominica*)的趋避和拒食作用,为开发绿色、高效的储粮害虫防治技术提供一定的理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

供试害虫为谷蠹、赤拟谷盗、玉米象,来源于中储粮成都粮食储藏科学研究所;大红袍干辣椒购买于本地大型超市,50℃ 平衡水分 4 h 后利用粉碎机粉碎,过 60 目筛后避光保存备用;合成辣椒碱(nonivamide),购自于浙江杭州瑞树生化有限公司,HPLC 级(可在高效液相色谱中使用的试剂的纯度),纯度为 95.84%;中速定性滤纸,购自于浙江杭州特种纸业有

收稿日期:2017-11-06

基金项目:四川省应用基础计划(编号:2015JY0114、2016JY0137、2017JY0212);四川省科技支撑计划(编号:2015SZ0215、2016NZ0117)。

作者简介:陈 谦(1982—),男,四川资阳人,博士,副研究员,主要从事食品加工与贮藏研究。Tel:(028)65985221;E-mail:ggcqlz@163.com。

通信作者:黄 敏,博士,副研究员,主要从事食品加工与贮藏研究。Tel:(028)65985221;E-mail:hml2190520@163.com。

限公司;广口塑料瓶,容量为 240 mL,口径为 60 mm,底部直径×高度为 70 mm×90 mm;所用试剂均为分析纯,购自于四川成都科龙化工有限公司。

1.2 主要仪器与设备

分析天平,精度为 0.1 mg,MS104S,购自于瑞士 Mettler Toledo 公司;紫外分光光度计,UV-1700(E),购自于日本岛津公司;电热鼓风干燥箱,TH-02-260B,购自于四川成都易华天宇试验设备有限责任公司;人工气候箱,PQX-330B-22H,购自于浙江宁波莱福科技有限公司;超纯水机,艾科浦 AFZ-1002-U,购自于重庆颐洋企业发展有限公司;小型粉碎机,JYL-C025,购自于九阳股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 供试害虫的饲养 谷蠹、赤拟谷盗、玉米象培养方法参考欧阳建勋等的方法^[2],在室内恒温培养箱中培养,温度设为(26.0±0.5)℃,相对湿度为 65%,试验时间为 2017 年的 4—6 月。

1.3.2 辣椒碱的提取 取过筛后的 0.500 0 g 辣椒粉,加入一定体积、一定浓度的乙醇,超声处理后,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液混合后定容于 25 mL 容量瓶中待测。

1.3.3 辣椒碱提取率的测定 上清液中辣椒碱含量的测定按照 GB 28314—2012《食品添加剂 辣椒油 树脂》中方法 2 的描述进行测定,然后再换算成相应的辣椒碱提取率^[18]:

表 2 N=12 的 PB 设计及结果

试验号	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	提取率 (mg/g)
1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	17.78
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	22.24
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	12.69
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	3.50
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	32.06
6	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	17.14
7	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	35.88
8	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2.97
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	16.88
10	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	6.69
11	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	3.08
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	9.18

1.3.4.2 最陡爬坡试验 响应面法优化必须在最优点的附近区域模拟真实情形,为获得最佳提取条件范围,可采用最陡爬坡试验对影响结果显著因素进行逼近。根据 PB 试验结果,选择对辣椒碱提取率有显著效应的因素,根据这些因素效应大小及变化方向进行最陡爬坡试验,由此接近最大响应值的区域,所有试验重复 3 次,结果以平均值±标准误表示。

1.3.4.3 Box-Behnken design(BBD)优化提取条件 根据最陡爬坡试验结果,利用 BBD 试验设计,建立 3 因素 3 水平数学模型对辣椒碱的提取工艺参数进行优化,试验的因素水平如表 3 所示,试验设计和数据分析在 Design Expert 10.0.7 中进行。

1.3.5 辣椒碱对供试害虫的驱避作用

1.3.5.1 辣椒碱-乙醇溶液的配制 准确称取 10.416 7 g 的 95.84% 辣椒碱标品,溶于少量无水乙醇,再定容至 100 mL,

辣椒碱提取率(mg/g 干样)=[辣椒碱含量(%)×提取液体积(mL)×1 000]/[100×辣椒质量(g)]。

1.3.4 提取条件优化

1.3.4.1 Plackett-Burman(PB)设计 影响辣椒碱提取效果的可能因素有料液比、乙醇浓度、提取次数、提取时间、超声功率、处理温度、颗粒大小等。利用 Design Expert 10.0.7 软件进行 PB 试验设计,选用试验次数 N=12 的设计组合对这 7 个因素进行分析,另设置 4 个虚拟变量用于估计误差,响应值为辣椒碱的提取率(mg/g)。每个因素设置高低 2 个水平(表 1)。试验设计和结果见表 2,所有试验重复 3 次,取平均值。

表 1 PB 设计各因素水平

编码	因素	高水平值	低水平值
A	乙醇浓度(%)	90	40
B	提取次数(次)	3	1
C	提取时间(min)	15	5
D	料液比(g:mL)	1:3	1:10
E	超声功率(W)	210	120
F	提取温度(℃)	50	30
G	颗粒大小(目)	20	80
H	虚拟	—	—
J	虚拟	—	—
K	虚拟	—	—
L	虚拟	—	—

表 3 响应面试验的因素水平及编码

变量	编码	水平		
		-1	0	1
乙醇浓度(%)	X ₁	40	50	60
颗粒大小(目)	X ₂	40	60	80
提取温度(℃)	X ₃	30	40	50

配制成 10% 的辣椒碱-乙醇储备液。其他浓度的辣椒碱-乙醇溶液则通过储备液稀释配制。

1.3.5.2 驱避试验 驱避试验方法参考文献[1,19]进行,略有改进的地方有:将直径为 7 cm 的圆形定性滤纸裁成两半,一半滤纸均匀滴加 0.2 mL 辣椒碱溶液,另一半滴加等量无水乙醇作对照,在室温下静置使乙醇完全挥发,然后用双面胶滤纸重新拼接并固定于培养皿内,接入 3 种害虫,每个处理各 20 头,避光放入人工气候箱中,温度为(26.0±0.5)℃,相对湿度为(75±5)%,每个处理设 3 个重复,接虫后于 1、6、

12、24、48、72、96 h 检查成虫分布,取平均值计算驱避率。驱避效果评价方法如表 4 所示^[1]。

驱避率 = (对照纸上害虫数量 - 处理纸上害虫数量) / 对照纸上害虫数量 × 100%。

表 4 害虫驱避效果评价方法

驱避率 (<i>R</i> , %)	评价结果
$R \leq 5$	-
$5 < R \leq 10$	+
$10 < R \leq 20$	2+
$20 < R \leq 30$	3+
$30 < R \leq 40$	4+
$40 < R \leq 50$	5+
$R > 50$	6+

注:“-”表示没有驱避作用,“+”表示有驱避作用,“*n* +”表示有 *n* 个“+”,*n* 越大表示驱避效果越好。表 9 同。

1.3.6 辣椒碱对供试害虫的拒食作用 拒食试验方法参考文献[1,19]进行,略有改进的地方有:将糙米与辣椒碱储备液均匀混合,使糙米中辣椒碱含量为 0.5、1.0、2.0 mg/g,在室温下挥发乙醇。称取 15.0 g 糙米装入广口塑料瓶中,接入 20 头害虫,同时设置等量乙醇处理的对照组,放入人工气候箱,温度为(26.0 ± 0.5)℃,相对湿度为(75 ± 5)%,每个处理设 3 个重复。每隔 3 d 清理 1 次幼虫,每隔 7 d 分离害虫和糙米,计算粮食损失质量,取平均值为试验结果,进行为期 35 d 的跟踪试验。利用 PASW Statistics 18 软件对结果进行 ANOVA 分析,采用 Duncan’s 多重比较法分析结果之间的差异,显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 Plackett - Burman 试验设计

采用 PB 试验设计可以快速有效地筛选出影响辣椒碱提取率的关键因素,方便进一步研究。利用 Design Expert 10.0.7 软件对 PB 结果进行回归分析,如表 5 所示。

表 5 PB 试验结果回归分析

变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	1 322.51	10	132.250	1 555.75	0.019 7
A	373.30	1	373.300	4 391.36	0.009 6
B	235.23	1	235.230	2 767.18	0.012 1
C	0.05	1	0.052	0.61	0.577 4
D	6.74	1	6.740	79.23	0.071 2
E	26.02	1	26.020	306.08	0.036 3
F	65.19	1	65.190	766.91	0.023 0
G	395.03	1	395.030	4 646.92	0.009 3
残差	0.085	1	0.085		
总离差	1 322.60	11			

决定系数 $R^2 = 0.999\ 9$, 调整决定系数 $\text{Adj} - R^2 = 0.999\ 3$

由表 5 可知,此回归模型的主效应 *P* 值为 0.019 7,表明 PB 试验设计因素在所选取的水平范围内对辣椒碱提取率的作用显著,同时决定系数为 0.999 9,调整决定系数为 0.999 3,说明回归模型设计可靠。另外,由表 5 还可知,对辣椒碱提取率有显著影响的前 4 位因素有颗粒大小、乙醇浓度、提取次数、提取温度,其相关性可用方程表示,即提取率

(mg/g) = 15.01 - 5.58A + 4.43B - 0.066C - 0.75D - 1.47E - 2.33F - 4.74G。从方程可知,颗粒大小、乙醇浓度、提取温度对辣椒碱提取率呈现负效应,而提取次数为正效应。而根据预试验结果,提取次数超过 3 次后,辣椒碱提取率没有出现明显增加的趋势,因此提取次数设为 3 次,其他因素采用单因素预试验中的最优条件:超声功率为 120 W,料液比为 1 g : 6 mL,提取时间为 10 min。

2.2 最陡爬坡试验

根据 PB 试验的结果,选择乙醇浓度、颗粒大小、提取温度进行最陡爬坡试验,试验设计及结果如表 6 所示。

表 6 最陡爬坡试验设计及结果

实验号	乙醇浓度 (%)	颗粒大小 (目)	提取温度 (℃)	提取率 (mg/g)
1	70	20	60	21.66 ± 0.90
2	60	40	50	36.15 ± 2.25
3	50	60	40	40.45 ± 3.38
4	40	80	30	36.62 ± 0.23
5	30	100	20	26.11 ± 0.45

由表 6 可知,试验 3 所得的辣椒碱提取率最高,因此选择第 3 组试验的条件作为响应面优化的中心点,并设定第 2、4 组试验条件为边界条件,进行下一步的响应面优化试验。

2.3 响应面优化试验

为进一步确定超声 - 溶剂提取辣椒碱的最优工艺参数,以乙醇浓度、颗粒大小、提取温度这 3 个因素为变量,辣椒碱提取率为响应值,进行 Box - Behnken 响应面优化,结果如表 7 所示。

表 7 BBD 设计及试验结果

试验号	编码水平			提取率 (mg/g)
	X_1	X_2	X_3	
1	0	0	0	38.85
2	-1	0	-1	30.89
3	0	-1	1	44.98
4	-1	1	0	24.04
5	0	1	1	28.82
6	1	1	0	32.01
7	1	0	-1	38.93
8	1	1	-1	32.80
9	0	0	0	39.65
10	0	-1	-1	48.73
11	1	-1	0	54.30
12	-1	0	1	22.69
13	1	0	1	40.13
14	-1	-1	0	33.28
15	0	0	0	39.09

采用 Design - Expert 10.0.7 软件对表 7 试验数据进行二次多元回归拟合,获得变量(乙醇浓度 X_1 、颗粒大小 X_2 、提取温度 X_3)与响应值辣椒碱提取率(*Y*)之间的回归模型方程:
 $Y = -92.106 + 5.135X_1 + 19.167X_2 - 0.098X_3 - 3.263X_1X_2 + 0.024X_1X_3 - 0.058X_2X_3 - 0.045X_1^2 + 119.167X_2^2 - 0.016X_3^2$ 。

对该回归模型进行方差分析,由表 8 可知,模型的 $P < 0.000\ 1$,而失拟项不显著($P = 0.243\ 8$),说明该回归模型高度显著,拟合度良好,表明辣椒碱提取率的试验值与预测值之

表 8 回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 058.03	9	117.56	296.43	<0.000 1	**
X_1 (乙醇浓度)	370.87	1	370.87	935.18	<0.000 1	**
X_2 (颗粒大小)	505.94	1	505.94	1 275.76	<0.000 1	**
X_3 (提取温度)	27.12	1	27.12	68.39	0.000 4	**
X_1X_2	42.58	1	42.58	107.36	0.000 1	**
X_1X_3	22.09	1	22.09	55.70	0.000 7	**
X_2X_3	0.01	1	0.01	0.03	0.862 3	
X_1^2	74.13	1	74.13	186.93	<0.000 1	**
X_2^2	5.24	1	5.24	13.22	0.015 0	*
X_3^2	8.94	1	8.94	22.54	0.005 1	**
残差	1.98	5	0.40			
失拟	1.65	3	0.55	3.26	0.243 8	
误差	0.34	2	0.17			
总离差	1 060.01	14				

决定系数 $R^2=0.998\ 1$, 调整决定系数 $\text{Adj}-R^2=0.994\ 8$

注: “*” “**” 分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。

间一致性好。响应值 Y 的 R^2 为 0.998 1, 调整决定系数 ($\text{Adj}-R^2$) 为 0.994 8, 说明回归模型能在 99.48% 的概率上解释试验结果, 仅有 0.52% 的变异不能由该模型解释。因此, 该回归模型拟合程度较高, 试验误差小, 能准确分析和预测超声-溶剂法的辣椒碱提取率。

进一步分析结果显示, 一次项乙醇浓度 (X_1)、颗粒大小

(X_2)、提取温度 (X_3)、交互项 (X_1X_2 、 X_1X_3)、二次项 (X_1^2 、 X_3^2) 对响应值的影响极显著 ($P<0.01$), 二次项 X_2^2 对响应值影响显著 ($P<0.05$), 交互项 X_2X_3 不显著 ($P>0.05$)。

由图 1 可以看出, 乙醇浓度和颗粒大小之间以及乙醇浓度与提取温度之间的交互作用最显著, 表现为响应曲面较陡, 而提取温度和颗粒大小之间交互作用不显著。

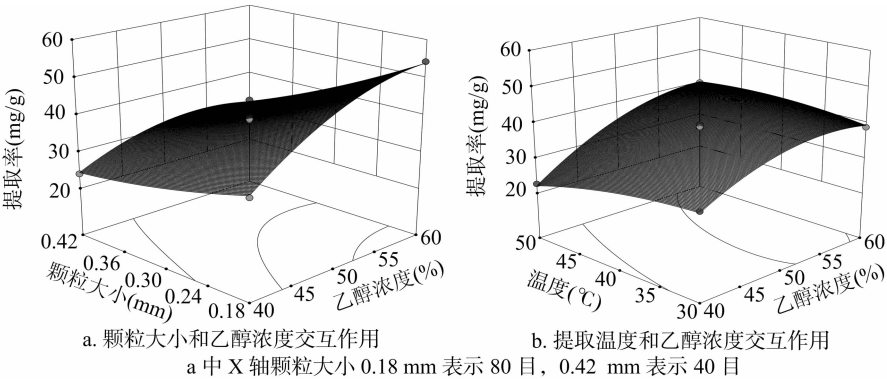


图 1 提取条件对辣椒碱提取率影响的响应面

通过软件分析回归模型, 预测辣椒碱提取率的最优工艺参数: 乙醇浓度为 60%, 颗粒大小为 80 目, 温度为 41.8℃, 预测的辣椒碱提取率为 53.98 mg/g。为进一步验证 BBD 设计的可靠性, 采用上述最优提取条件对辣椒碱进行提取。另外考虑到实际操作的可性, 将提取条件设定为乙醇温度 60%, 颗粒大小为 80 目, 温度为 42.0℃, 进行 5 次验证试验, 提取率为 (54.08 ± 0.74) mg/g, 与预测值的相对误差 <0.2%, 说明回归模型对辣椒碱提取率的预测非常可靠。

2.4 辣椒碱对害虫的驱避作用

配制浓度为 1.0、2.0、4.0、8.0、20.0、40.0 mg/mL 的辣椒碱-乙醇溶液, 分析不同处理时间下辣椒碱浓度在对常见储粮害虫赤拟谷盗、谷蠹、玉米象的驱避作用 (表 9)。

由表 9 可知, 在 96 h 的试验时间内, 不同浓度的辣椒碱对 3 种储粮害虫均有一定的驱避作用, 在辣椒碱浓度大于 8.0 mg/mL 时, 驱避效果较好。总体上辣椒碱对赤拟谷盗和谷蠹的驱避效果相对较好, 驱避作用持续时间长, 但驱避效果

有波动。而随着辣椒碱浓度降低, 处理时间延长, 驱避效果有一定程度降低, 可能由于害虫对辣椒碱产生适应性, 在试验后期玉米象甚至还出现反驱避现象。

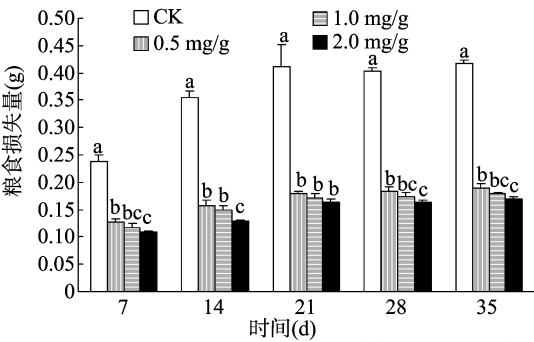
2.5 辣椒碱对害虫的拒食作用

根据辣椒碱对害虫驱避作用的试验结果, 选择驱避作用较好的害虫赤拟谷盗和谷蠹进行拒食试验, 辣椒碱浓度设为 0.5、1.0、2.0 mg/g。试验结果如图 2、图 3 所示。

由图 2、图 3 可知, 在 35 d 的试验时间内, 辣椒碱的添加使赤拟谷盗和谷蠹均表现出不同程度的拒食效果。在 35 d 处理时间点上, 1.0 mg/g 辣椒碱处理组的粮食损失量仅为对照组的 43.17% (赤拟谷盗)、41.59% (谷蠹), 拒食效果显著。与对照相比, 辣椒碱处理组粮食损失速率非常缓慢。总体上看, 1.0、2.0 mg/g 浓度的辣椒碱处理组之间表现出的拒食效果差异不显著, 因此糙米中辣椒碱浓度为 1.0 mg/g 时可对储粮害虫表现出较好的拒食效果。另外在试验中还观察到辣椒碱的添加降低了上述害虫的繁殖速率, 辣椒碱处理组中幼虫

表 9 不同浓度辣椒碱对害虫的驱避作用

害虫	辣椒碱浓度 (mg/mL)	不同时间的驱避效果						
		1 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
赤拟谷盗	1	6 +	4 +	6 +	6 +	6 +	6 +	—
	2	1 +	3 +	5 +	6 +	6 +	6 +	—
	4	4 +	5 +	5 +	—	6 +	6 +	6 +
	8	6 +	5 +	6 +	2 +	6 +	5 +	5 +
	20	6 +	6 +	6 +	6 +	6 +	6 +	6 +
	40	6 +	6 +	6 +	6 +	6 +	6 +	—
谷蠹	1	—	+	6 +	6 +	6 +	6 +	6 +
	2	—	4 +	6 +	6 +	6 +	5 +	6 +
	4	—	—	6 +	5 +	6 +	6 +	5 +
	8	—	5 +	6 +	2 +	6 +	6 +	5 +
	20	—	2 +	6 +	5 +	5 +	6 +	6 +
	40	4 +	3 +	6 +	6 +	6 +	6 +	6 +
玉米象	1	—	3 +	—	6 +	6 +	2 +	—
	2	—	4 +	—	6 +	5 +	5 +	2 +
	4	—	—	—	6 +	6 +	+	—
	8	3 +	6 +	—	6 +	6 +	5 +	6 +
	20	5 +	5 +	5 +	6 +	6 +	5 +	4 +
	40	6 +	4 +	4 +	6 +	6 +	5 +	5 +



柱上不同小写字母表示在同一时间点内的处理间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。下同

图2 不同浓度辣椒碱对赤拟谷盗的拒食作用

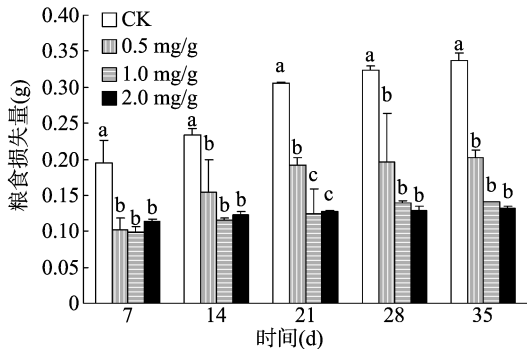


图3 不同浓度辣椒碱对谷蠹的拒食作用

数量远低于对照组,这与欧阳建勋等的研究结果^[2]相符。纪明山等通过研究发现,辣椒碱对小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 有较强的产卵忌避和拒食作用,进一步研究发现,辣椒碱对害虫体内谷胱甘肽-S-转移酶和 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性产生明显作用^[20]。因此,推测辣椒碱可能通过影响赤拟谷盗和谷蠹体内相关重要酶的活性进而对这 2 种害虫产生驱避和拒食作用。

3 结论

本研究通过 PB 设计、最陡爬坡试验及 BBD 响应面试验确定了辣椒碱的最优提取工艺条件,最优提取工艺参数是乙醇浓度为 60%,颗粒大小为 80 目,温度为 41.8℃,提取次数 3 次,超声功率为 120 W,料液比为 1 g : 6 mL,提取时间为 10 min,在此条件下,辣椒碱提取率为 (54.08 ± 0.74) mg/g,与模型预测值相符;另外,辣椒碱浓度大于 8.0 mg/mL 时,对害虫赤拟谷盗和谷蠹均表现出较好的驱避效果,而糙米中辣椒碱浓度为 1.0 mg/g 时,对上述 2 种害虫则表现出明显的拒食作用,辣椒碱处理组的粮食损失量仅为对照组的 43.17% (赤拟谷盗)和 41.59% (谷蠹),研究结果可为开发绿色、高效的储粮害虫防治技术提供一定的理论依据。

参考文献:

[1] 欧阳建勋. 辣椒素抗有害生物及在稻谷绿色储藏中的应用研究 [D]. 长沙:湖南农业大学,2011:28-42.
[2] 欧阳建勋,刘营营,李忠海,等. 辣椒素对储粮害虫防治效果研究 [J]. 食品与机械,2012,28(1):200-204.
[3] 刘雨晴,陈 飞,崔 炜. 植物中萜烯类和生物碱类杀虫活性物质研究综述[J]. 农业灾害研究,2013,3(6):19-21.
[4] 孔 学,王加宁,陈贯虹,等. 辣椒碱在农药领域的应用研究进展 [J]. 农药,2011,50(4):244-248,257.
[5] Madhumathy A P, Aivazi A A, Vijayan V A. Larvicidal efficacy of *Capsicum annum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* [J]. Journal of Vector Borne Diseases,2007,44(3):223.
[6] 刘 新,林 永. 辣椒碱对桃蚜的生物活性及其与几种杀虫剂的联合作用[J]. 农药学报,2003,5(2):94-96.
[7] 陈学文. 辣椒碱对枸杞蚜虫的毒性研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(19):11488,11491.
[8] 邹华娇. 9%辣椒碱·烟碱微乳剂防治菜青虫和菜蚜效果试验 [J]. 植物保护,2002,28(1):45-47.

陈光哲,曾德新,周 昊,等. PMA 在副溶血性弧菌检测中的应用[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):162-167.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.039

PMA 在副溶血性弧菌检测中的应用

陈光哲¹, 曾德新², 周 昊¹, 谢青轩¹, 沈嘉敏¹

(1. 江苏省农业科学院中心实验室, 江苏南京 210014; 2. 南京海关检验检疫动植物与食品检测中心, 江苏南京 210019)

摘要:在我国,副溶血性弧菌被认为是海产品衍生疾病的主要因素,因此急需一种能快速、灵敏、特异、准确地检测食品中副溶血性弧菌的方法。传统培养法一直是检测的金标准,但是其检测周期较长;分子生物学方法如聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光定量 PCR(qPCR)、环介导等温扩增技术(LAMP)已被广泛用于食品中副溶血性弧菌的检测,但是这些方法不能区分死菌和活菌的 DNA,容易造成假阳性。而叠氮溴化丙锭(propidium monoazide,简称 PMA)等核酸染料的使用可以有效地消除这一弊端。研究者们将 PMA 处理与 PCR(qPCR)结合,应用于食品中多种食源性致病菌活菌的检测,但是关于 PMA 在副溶血性弧菌检测中应用的报道并不多见。因此,拟对 PMA 应用于食品中副溶血性弧菌检测的可行性进行分析,以便为进一步开展相关研究提供参考。

关键词:副溶血性弧菌;活菌检测;食源性病原菌;叠氮溴化丙锭(PMA)

中图分类号: TS207.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0162-06

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 VP)是导致胃肠道感染的主要致病菌,广泛存在于海水、沉积物和各类海鲜(包括牡蛎、蛤蜊、扇贝、章鱼、虾、蟹、龙虾、克氏原螯虾和众多鱼类)中^[1]。VP 感染可引起腹泻、呕吐、腹部痉挛,在少数情况下可引起发烧^[2],但并不是所有的副溶血性弧菌都具有致病性。该菌的致病性与耐热直接溶血素(TDH)和耐热相关溶血素(TRH)相关,分别由 *tdh*、*trh* 基因编码^[3-5]。此外,VP 的主要毒力因子还有不耐热溶血毒素(TLH)。研究表明,TLH 是一种非典型的磷脂酶,能溶解人和马的红细胞,具有副溶血性弧菌种属的特异性。TDH 能在我妻氏血平板上引起 β -溶血(神奈川现象),具有致死毒性、心脏毒性、细胞毒性和肠毒素作用;TRH 虽然不能引起神奈川现象,但其与 TDH 有相似的免疫原性和 67% 的相同氨基酸序列,并同样具

有致死作用和细胞毒性。我国食源性疾病监测网站相关工作人员调查了其监测地区(16 个省)14 年间的 8 000 多起食物中毒案例,发现微生物性病原仍然是我国食源性疾病的主要病因(占 30%~40%)。近 10 年来,由交叉污染导致肉类食品或水产品(包括淡水鱼污染)而引起的副溶血性弧菌食物中毒已取代沙门氏菌,跃居第 1 位^[6]。因此,迫切需求一种快速、简便、准确、实用的检测方法对副溶血性弧菌进行实时监控。

用传统培养法检测食品中的副溶血性弧菌一般需要经历增菌、选择性平板培养、生化鉴定等过程,检测周期长达 5~7 d。而对副溶血性弧菌的定量检测,在对样品中的病原菌做定量分析后还需要对可疑菌落做定性验证,使得检测周期更长^[7-10]。分子生物学方法,如实时荧光定量 PCR(qPCR)具有快速、检测灵敏度高的优点,但是这类检测技术无法区分死菌和活菌,因为细菌 DNA 在菌体死亡后还能留存几天到几周。因此,使用该检测技术用于副溶血性弧菌的定性检测可能导致假阳性,若用于定量检测则无法得到准确的数据^[11-12]。

收稿日期:2018-10-19

作者简介:陈光哲(1965—),女,江苏南通人,副研究员,主要研究方向为食品农产品检测技术及方法。E-mail: 13813841207@126.com。

[9] Saah S, Chanthachum S, Petcharat J. Effect of herb on insect growth in brown jasmine rice during storage[J]. Kasetsart Journal (Nature Science), 2008, 42: 144-149.

[10] 尉洪超, 杨志清. 12 种 PE 防虫薄膜对赤拟谷盗触杀效果的研究[J]. 内蒙古农业科技, 2014(6): 56-57.

[11] 欧阳建勋, 朱邦雄, 夏延斌, 等. 辣椒素粉剂防治书虱的效果[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(6): 690-693.

[12] 罗 磊, 张冰洁, 朱文学, 等. 响应面试验优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, 37(6): 13-19.

[13] Zheng Y, Li Y, Wang W D. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes orientalis* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111(20): 315-323.

[14] 李芬芳, 马艳弘, 赵密珍, 等. 草莓多酚的提取工艺优化及其抑

菌活性研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 155-158.

[15] 施 琰, 裴 斐, 周玲玉, 等. 响应面法优化紫菜藻红蛋白复合酶法提取工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 51-57.

[16] 甘 锋, 唐建忠, 王 轩, 等. 响应面法优化红曲霉固态发酵产 Monacolin K 工艺条件的研究[J]. 中国食品添加剂, 2011, 104(1): 131-136.

[17] 张红波, 高艳平, 周恩旭, 等. 响应面法对酶解法提取鲤鱼多肽工艺的优化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 151-154.

[18] 中华人民共和国卫生部. 食品添加剂 辣椒油树脂: GB 28314—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[19] 刘营营. 辣椒素对中南地区储粮害虫的作用研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012: 11-26.

[20] 纪明山, 刘少武, 谷祖敏, 等. 辣椒碱对小菜蛾的驱避活性及其体内谷胱甘肽-S-转移酶和 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 2008, 51(10): 1039-1043.