

丁香抑菌成分超声波提取工艺研究

纪淑娟, 隋 时

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 天然植物提取物对多种果蔬采后致病菌有抑制作用, 实验证明丁香提取物对葡萄采后低温主要致病菌灰葡萄孢有明显的抑制作用。采用超声波法对丁香中抑菌成分进行提取。以生长速率法测定抑菌率, 通过单因素和正交设计考察了溶剂种类、溶剂浓度、料液比、超声温度、超声时间和超声功率等因素对丁香提取物抑菌效果的影响。结果表明: 采用 80% 乙醇作为提取溶剂, 料液比为 1:15、超声温度 55℃、超声时间 60 min、超声功率 210 W 的提取条件下测得的抑菌率最高、效果最好。

关键词: 丁香; 灰葡萄孢; 提取方法; 超声波

Study on Ultrasonic Wave Extraction Technology of Antibacterial Ingredients from *Flos Caryophylli*

Ji Shu-juan, Sui Shi

(College of Food Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract The natural plant extracts have inhibitory effects against pathogenic bacteria of post-harvest fruits and vegetables. It is validated that *Flos Caryophylli* extract can significantly inhibit the main low-temperature pathogenic bacterium *Botrytis gray* of post-harvest grape. Extraction of antibacterial ingredients from *Flos Caryophylli* by ultrasonic was studied. Using single factor and orthogonal design, the effects of solvent selection, solvent concentration, material to solvent ratio, ultrasonic temperature, ultrasonic power, and time on *Flos Caryophylli* extracts with growth rate method determining antibacterial rate. The results showed that on the conditions of 80% ethanol as extraction solvent, material to ethanol ratio 1:15, temperature 55℃, ultrasonic power 210 W, and time 60 min, the antibacterial activity of extracts reached the highest.

Key words *Flos Caryophylli*; *Botrytis cinerea*; extraction method; ultrasonic

中图分类号: Q946.33

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0201-04

葡萄灰霉病又叫葡萄灰腐病, 病原菌为灰葡萄孢是发生较严重的病害, 在所有贮藏病害中造成的损失最为严重^[1]。目前, 控制采后病害的最有效的手段是冷藏结合保鲜剂, 二氧化硫类保鲜剂在葡萄贮藏中已经应用了几十年^[2]。但由于二氧化硫属于化学防腐剂, 使用时很难控制其使用量。过量的二氧化硫会对果实造成漂白伤害, 其高残留也会对人体的健康造成危害, 污染环境等诸多缺点。为了防止二氧化硫对人体的伤害, 从天然资源中寻找活性物质来代替二氧化硫越来越受到国内外广泛重视。生产实践和科学研究表明植物提取物中含有抑制病原微生物的成分, 提出了利用植物中的抗菌物质对果蔬采后病害生物防治的设想并进行了大量研究。丁香为桃金娘科植物的干燥花蕾, 是一种常见的中草药, 对多种霉菌和致病菌有抑制作用, 是一种高效的抑菌剂^[3], 其主要有效成分是丁香酚^[4]。实验证明, 丁香提取物能够有效抑制葡萄采后贮藏主要致病菌

灰葡萄孢^[5]。由于超声波作用于药物提取具有提取率高、可靠性强、操作简便、大大缩短提取时间等优点^[6], 因此本研究利用超声波提取丁香中的活性物质, 通过单因素和正交试验确定提取的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试菌种灰葡萄孢由发病葡萄上分离鉴定得到。

实际用培养基为 PDA 培养基。

供试药物丁香购于中药店。

所用主要试剂为乙醇、丙酮、甲醇。

1.2 仪器

SHB-III A 循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; RE-52 型旋转蒸发仪 上海博通仪器有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

收稿日期: 2007-07-14

作者简介: 纪淑娟 (1960-), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品质量控制。E-mail: suishi821102@163.com

1.3 方法

1.3.1 超声波提取丁香抑菌成分工艺流程

丁香→粉碎→称量 10g 丁香粉末→装入 250ml 三角瓶→加入有机溶剂→超声波提取→抽滤→旋转蒸发→用水定容至 10ml→1g/ml 的粗提液→灭菌→备用

1.3.2 抑菌率的测定方法

采用生长速率法^[7]。将丁香粗提物 1ml 分别与 9ml 温度为 50~55℃ 已融化的 PDA 培养基混合, 加入 1ml 无菌水为清水对照, 溶剂的选择中还要加入 1ml 溶剂对照。摇匀后分装到直径为 9cm 的培养皿中, 待其凝固后, 取菌落直径为 0.6cm 的培养 5d (菌落生长均匀) 灰葡萄孢菌饼放置于培养皿中央, 接种后在 25℃ 的恒温培养箱中培养, 待空白已长满培养皿, 采用十字交叉法分别测量菌落大小。

菌落直径 (cm) = 测量菌落平均直径 (cm) - 0.6

$$\text{相对抑菌率 (\%)} = \frac{\text{对照菌落直径 (cm)} - \text{处理菌落直径 (cm)}}{\text{对照菌落直径 (cm)}} \times 100$$

1.3.3 溶剂的选择

分别用水、乙醇、丙酮、甲醇四种溶剂做为提取溶剂, 试验条件为: 提取时间 60min, 提取温度 55℃, 料液比 1:15。以灰葡萄孢病菌作为供试菌种, 采用生长速率法进行生物活性测定, 通过比较四种溶剂提取丁香抑菌成分的抑菌效果确定适合的提取溶剂。

1.3.4 浓度的选择

根据 1.3.3 的试验结果, 在相同条件下分别用 30%、50%、80%、95% 的乙醇提取丁香, 提取物采用生长速率法进行生物活性测定, 确定适合的浓度。

1.3.5 丁香提取单因素试验

1.3.5.1 料液比对丁香提取物抑菌效果的影响

在设定超声时间 60min、超声功率为 180W、温度为 55℃ 条件下, 以抑菌率为指标, 设料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 进行比较研究, 以确定最佳溶剂用量。

1.3.5.2 超声时间对丁香提取物抑菌效果的影响

在设定超声功率为 180W、提取温度为 55℃、料液比 1:15 的条件下, 以抑菌率为指标, 设定提取时间分别为 40、50、60、70、80min 进行比较研究, 以确定最佳超声时间。

1.3.5.3 超声温度对丁香提取物抑菌效果的影响

在设定超声时间 60min、超声功率为 180W、料液比 1:15 条件下, 以抑菌率为指标, 设定温度分别为 35、45、55、65、75℃ 进行比较研究, 以确定最佳提取温度。

1.3.5.4 超声功率对丁香提取物抑菌效果的影响

在设定超声时间 60min、超声功率为 180W、温度为 55℃、料液比 1:15 条件下, 以抑菌率为指标, 设定超声功率分别为 120、150、180、210、240W 进行比较研究, 以确定最佳超声功率。

1.3.6 正交试验

在单因素试验基础上, 对料液比、超声时间、超声温度和超声功率四个因素进行了三水平的正交试验。研究因素及水平见表 1。

表 1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 料液比 (m/V)	B 时间 (min)	C 温度 (°C)	D 功率 (W)
1	1:0	50	45	150
2	1:15	60	55	180
3	1:20	70	65	210

2 结果与分析

2.1 溶剂种类对提取物抑菌效果的影响

四种溶剂对丁香提取物抑菌率的影响见表 2, 方差分析见表 3。丙酮和甲醇丁香提取物抑菌率相对水提取的较高, 采用水提取的抑菌率最低, 用乙醇提取丁香的抑菌率较高, 而且乙醇无毒无害, 用于食品安全可靠。由方差分析可以看出乙醇的提取效果明显好于其他三种溶剂达到极显著水平, 故选用乙醇作为丁香提取溶剂比较理想。

表 2 不同溶剂提取的丁香提取物对灰葡萄孢的抑菌活性
Table 2 Antibacterial activity of *Flos Caryophylli* extract by different solvents against *Botrytis gray*

	抑菌率 (%)			
	水	乙醇	丙酮	甲醇
1	44.36	64.32	59.38	53.54
2	46.12	62.88	57.96	50.87
3	46.65	64.26	57.98	52.70
均值	45.71	63.82	58.44	52.37

表 3 方差分析
Table 3 Variances analysis

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F	p
组间	548.45	3	182.82	153.89	**
组内	9.51	8	1.188		
总来源	557.69	11			

注: $F_{0.01}(3, 8) = 7.59$; $F_{0.05}(3, 8) = 4.07$ 。

2.2 溶剂浓度对提取物抑菌效果的影响

称取 10g 丁香经粉碎后, 加入不同浓度的乙醇, 在超声功率为 120W 的条件下, 提取 30min 测定抑菌率结果见表 4, 方差分析见表 5。从表 4 可以看出, 随着乙醇浓度的增加抑菌率也随着增加, 当乙醇浓度达到 80%

时抑菌率最大,而后有所下降。经过方差分析80%乙醇作为提取溶剂时的提取物抑菌效果最好,而且达到极显著水平,故选用80%的乙醇来提取。

表4 不同浓度溶剂提取的丁香提取物对灰葡萄孢的抑菌活性
Table 4 Antibacterial activity of *Flos Caryophylli* by different concentrations ethanol against *Botrytis cinerea*

实验号	抑菌率(%)			
	溶剂浓度(%)			
	30	50	80	95
1	50.85	53.48	66.71	62.73
2	52.03	55.62	67.49	63.27
3	52.28	53.98	67.37	61.41
均值	51.72	54.36	67.19	62.47

注:表内数字代表抑菌率(%)。

表5 方差分析表
Table 5 Variances analysis

变异来源	偏差平方和	自由度	均方	F	p
组间	460.89	3	153.63	210.45	**
组内	5.84	8	0.73		
总来源	466.73	11			

注: $F_{0.01}(3, 8)=7.59$; $F_{0.05}(3, 8)=4.07$ 。

2.3 超声温度对丁香提取物抑菌效果的影响

在试验所设置的温度范围内,随着超声提取温度的升高,抑菌率增大,在55℃时表现出最大抑菌率,而后抑菌率开始下降。结果见图1。

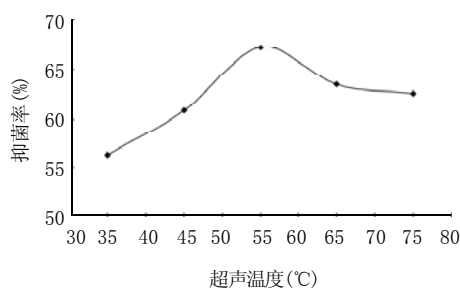


图1 超声温度对丁香提取物抑菌效果的影响

Fig.1 Effects of ultrasonic temperature on antibacterial activity of *Flos Caryophylli* extract

2.4 不同料液比对丁香提取物抑菌率的影响

从图2可看出,抑菌率随着料液比的增加而增加。料液比在1:10~1:15范围内抑菌率增加迅速,大于1:20后提取率上升的幅度不大,料液比为1:15时,达最大抑菌率72.28%。一般来说,增加溶剂的比例有利于传质扩散,但在实际操作中溶液体积过大不利于后续的浓缩,因此应依据试验条件调整适合的溶剂用量。

2.5 超声时间对丁香提取物抑菌效果的影响

通过超声提取时间对抑菌率影响的试验发现,并非

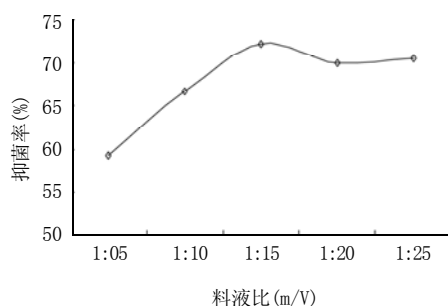


图2 料液比对丁香提取物抑菌效果的影响

Fig.2 Effects of material to ethanol ratio on antibacterial activity of *Flos Caryophylli* extract

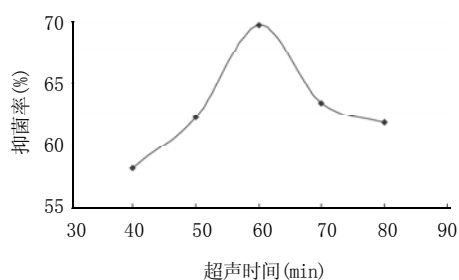


图3 超声时间对丁香提取物抑菌效果的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic time on antibacterial activity of *Flos Caryophylli* extract

时间越长抑菌率越高(图3)。随提取时间的延长,直到60min,抑菌率不断增大;但随提取时间的再延长,抑菌率有所减少。

2.6 超声功率对丁香提取物抑菌效果的影响

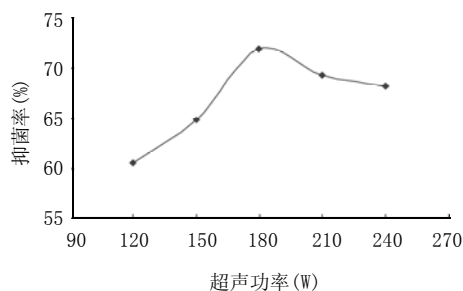


图4 超声功率对丁香提取物抑菌效果的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic power on antibacterial activity of *Flos Caryophylli* extract

从图4可以看出,随着超声强度的增大,抑菌率不断上升,直到超声强度为180W时,抑菌率最大,之后开始下降。

2.7 超声波提取丁香抑菌成分正交试验结果分析

应用正交试验探讨这四个因素对抑菌率影响,确定超声波法提取丁香抑菌活性物质的最佳工艺条件。正交试验结果见表6,方差分析见表7。

表6 超声波提取丁香抑菌成分的正交设计试验结果 $L_9(3^4)$
Table 6 Orthogonal design test result $L_9(3^4)$ for extraction of antibacterial ingredients from *Flos Caryophylli*

试验号	因素				抑菌率(%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	57.52
2	1	2	2	2	63.39
3	1	3	3	3	61.46
4	2	1	2	3	70.24
5	2	2	3	1	75.43
6	2	3	1	2	68.75
7	3	1	3	2	60.32
8	3	2	1	3	72.58
9	3	3	2	1	68.61
K_1	182.370	188.079	198.849	201.561	
K_2	214.419	211.407	202.239	192.459	
K_3	201.510	198.819	197.211	204.279	
k_1	60.790	62.693	66.283	67.187	
k_2	71.473	70.467	67.413	64.153	
k_3	67.170	66.273	65.737	68.093	
R	10.683	7.774	1.676	3.940	

表7 方差分析表
Table 7 Variances analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	173.357	2	39.516	*
B	90.825	2	20.703	*
C	4.387	2	1.000	
D	25.547	2	5.823	
误差e	4.39	2		

注: $F_{0.01}(2, 2)=99.01$, $F_{0.05}(2, 2)=19.0$ 。

从正交结果和极差分析看出, 四个因素对抑菌率的影响程度是: $A > B > D > C$, 即溶剂用量>超声时

间>超声温度>超声功率。超声波提取丁香活性物质最佳组合为: $A_2B_2C_2D_3$, 即料液比1:15 超声温度55℃, 超声时间60min, 超声功率210W。对正交试验结果进行方差分析可知, A、B 两种因素对结果均有显著性影响。

3 结 论

将超声技术应用于丁香活性物质的提取, 不仅保持有效成分的活性, 同时节省时间, 简化提取纯化流程, 提高提取效率。本实验探讨了与超声波作用效应相关的溶剂用量、超声时间、超声温度和超声功率对抑菌率的影响。通过单因素试验和正交试验确定超声波提取丁香中抑菌活性物质的最佳工艺条件为: 以80% 乙醇作为提取溶剂, 料液比1:15, 超声温度55℃, 超声时间60min, 超声波功率210W。

参考文献:

[1] 郭小侠, 陈川, 惠伟, 等. 葡萄贮藏期病害的研究[J]. 中国果菜, 2005 (5):24.
[2] 田金强, 张子德, 陈志周, 等. 防腐剂对红提葡萄中灰霉孢霉和交链孢抑制效果初探[J]. 保鲜与加工, 2004, 22(3): 13-15.
[3] 周建新, 许华, 金浩. 丁香油抑菌效果与抑菌成份的研究[J]. 食品工业, 2003(3): 24-25.
[4] 蒋志国, 施瑞城. 10种中草药提取物对常见果蔬致病真菌的抑制作用及有效成份分析[J]. 食品科技, 2006(4): 68-71.
[5] 关文强, 李淑芬. 丁香精油对果蔬采后病原菌抑制效应研究[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 227-230.
[6] 罗敏, 吴良如, 王剑雨. 超声波提取中药有效成分及竹醋液的抑菌活性研究[J]. 世界竹藤通讯, 2005(4): 17-19.
[7] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 151-154.