

# 凤仙透骨草中抑菌活性物质提取工艺研究

曾荣<sup>1,2</sup>, 陈金印<sup>3\*</sup>, 张阿珊<sup>3</sup>, 付永琦<sup>3</sup>

(1. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 佛山科学技术学院 食品科学系, 广东 佛山 528200; 3. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:** 以意大利青霉做指示菌, 以抑菌圈直径为活性追踪指标, 在单因素实验的基础上通过二次回归正交旋转组合设计进行凤仙透骨草中抑菌活性物质的提取工艺参数优化。结果表明: 最佳提取工艺条件为  $\varphi$ (乙醇) = 96.8%, 溶剂倍数 10 倍, 提取温度 50 °C, 提取时间 3 h。在此优化条件下抑菌圈直径为 36.95 mm。各因素对凤仙透骨草提取物抑菌效果的影响由大到小依次为: 乙醇浓度, 溶剂倍数, 提取时间, 提取温度。

**关键词:** 凤仙透骨草; 抑菌活性物质; 提取; 意大利青霉

中图分类号: Q946.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)01-0141-06

## Optimization of Technology for Extracting Antimicrobial Components from Stems of *Impatiens balsamina*

ZENG Rong<sup>1,2</sup>, CHEN Jin-yin<sup>3\*</sup>, ZHANG A-shan<sup>3</sup>, FU Yong-qi<sup>3</sup>

(1. The National Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Department of Food Science, Foshan University, Foshan 528200, China; 3. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The diameter of inhibition zone against *Penicillium italicum* was used as activity tracking indicators to investigate the technology for extracting antimicrobial components from stems of *Impatiens balsamina*. The optimum parameters of the extracting technology were obtained by quadric regression orthogonal rotational experiments. The results showed that: the best extraction conditions were: the ethanol concentration was 96.8%, solvent times were 10, extraction temperature was 50 °C, extraction time was 3 h. The diameter of inhibition zone against *Impatiens balsamina* was 36.95 mm when inhibited by the extracts extracted under the above mentioned conditions. The order of the main factors influencing the extracting effect from more important to less is as follows: ethanol concentration, solvent times, extraction time and extraction temperature.

**Key words:** *Impatiens balsamina* L., antimicrobial substances; extracting; *Penicillium italicum*

柑桔类果实在采、贮、运环节当中容易发生机械损伤, 在贮藏运输过程中可发生 20 多种病害, 其中最常见的是青霉病和绿霉病, 约占腐烂率的 40% 左右<sup>[1]</sup>。目前, 生产上主要利用化学防腐剂对柑桔果实进行保鲜, 而化学防腐剂的残留成分对消费者的健康存在威胁。为了满足人们对天然无公害、无污染产品的需求, 国内外学者都在积极探索能代替化学药物的保鲜新技术<sup>[2-3]</sup>。

许多植物都具有抗菌能力, 植物源防腐剂来源非常广泛, 目前世界上大约存在 20 000 种植物具有

收稿日期: 2010-12-21 修回日期: 2010-12-30

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD61B07) 和江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目(050007)

作者简介: 曾荣(1978—), 女, 讲师, 博士生, 主要从事果蔬采后生理及保鲜技术研究; \* 通讯作者: 陈金印, 教授, 博士, E-mail: jinyinchen@126.com。

抑菌作用,不少学者对天然产物提取成分在抗菌、抑菌方面进行了大量工作<sup>[4-6]</sup>。为了寻找对柑桔果实采后主要致病菌具有抑菌活性的植物,本实验室前期已进行了96种植物提取液抑菌活性的筛选<sup>[7-8]</sup>,发现凤仙透骨草(*Impatiens balsamina* L.)丙酮提取物对柑桔青霉病和绿霉病的病原菌——意大利青霉和指状青霉具有非常好的抑制作用。凤仙透骨草为凤仙花科凤仙花属凤仙花的干燥茎,中国南北各地均有栽培,凤仙花具有抗过敏<sup>[9]</sup>、抗炎<sup>[10]</sup>、抗真菌<sup>[11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12]</sup>等多种生理活性。本试验以意大利青霉作指示菌,抑菌圈直径为活性追踪指标,应用单因素试验和二次正交旋转组合试验对凤仙透骨草中抑菌有效成分进行提取,为科学合理地确定实际生产条件下的适宜提取工艺提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种:意大利青霉(*Penicillium italicum*)由中国农业微生物菌种保藏中心(ACCC)提供。

植物:凤仙透骨草购于江西省樟树市华丰药业,产地为安徽。

### 1.2 主要仪器设备

SPX-250型生化培养箱(上海楚定分析仪器公司);YXQ-LS-S II全自动电热高压蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);Rotavapor R-3旋转蒸发器(瑞士BUCHI);FW100干样粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);AUY220电子分析天平(日本岛津)。

### 1.3 方法

凤仙透骨草提取液的制备:将材料于60℃烘干,粉碎,过40目筛,取25g粉末加入15倍体积的提取溶剂,超声辅助提取(超声频率40kHz)。提取液过滤后减压浓缩,用提取溶剂定容至25mL,制得原液(1g/mL),4℃保存备用。

菌液的制备<sup>[13]</sup>:取经过活化的供试菌接种于试管斜面培养基,28℃培养2~3d,用无菌水洗入三角瓶中,过滤掉菌丝,采用比浊法制备菌悬液,浓度控制在 $10^6 \sim 10^7$  cfu/mL,备用。

提取液抑菌活性的测定<sup>[14]</sup>:采用琼脂扩散法测定提取液对供试病原菌的抑制作用。吸取10mL制好的菌液,混入冷却至50℃左右90mL PDA培养基中,使最终菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$  cfu/mL,制备带菌培养基,倒平板。凝固后在平板上对称放置无菌牛津杯,向牛津杯中加入200μL植物提取原液,用提取试剂作为溶剂对照,重复3次。28℃生化培养箱中培养72h,十字交叉法测量抑菌圈的大小。

单因素试验:以抑菌圈直径为指标,分别研究不同有机溶剂、提取溶剂浓度、溶剂、浸提温度、浸提时间对凤仙透骨草提取液抑菌活性的影响。

凤仙透骨草抑菌活性物质的提取工艺参数优化<sup>[15]</sup>:在单因素试验的基础上,对提取溶剂浓度、溶剂倍数、浸提温度、浸提时间4个因素进行四因素二次回归正交旋转设计(1/2实施),数据处理采用Excel、Origin和DPS软件对数据进行分析、处理以及图形的制作。确定其最优提取工艺(表1)。

表1 二次回归正交旋转组合试验因素水平

Tab. 1 Factors and levels of the quadric regression orthogonal rotational experiment

规范变量 $X_j$ Canonical variates	$X_1$ 乙醇浓度/% Ethanol concentration	$X_2$ 溶剂倍数 Solvent times	$X_3$ 提取温度/℃ Extracting temperature	$X_4$ 提取时间/h Extracting time
$-r(-1.6818)$	63.2	6.6	33.2	1.3
-1	70	10	40	2
0	80	15	50	3
1	90	20	60	4
$r(1.6818)$	96.8	23.4	66.8	4.7
变化区间 $\Delta_j$ Change interval	10	5	10	1

$j = 1, 2, 3$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果与分析

2.1.1 不同提取溶剂对凤仙透骨草提取液抑菌活性的影响 取25g凤仙透骨草干燥粉末,加入15倍

体积不同极性的提取溶剂,提取温度为 30 ℃,超声辅助提取 2 h,不同极性提取溶剂的抑菌圈直径如图 1 所示。丙酮和乙醇 2 种溶剂的提取液抑菌效果最好,抑菌圈直径分别为 33.2 mm 和 32.1 mm。根据相似相溶原理可知,抑菌活性物质主要为较高极性成分。水提取液中含有较多蛋白质、糖和无机盐等杂质,浓缩困难,而且很容易发霉发酵,抑菌效果最差,因此从提取成本考虑,选择乙醇作为提取溶剂进行提取工艺优化。

2.1.2 乙醇浓度对凤仙透骨草提取液抑菌活性的影响 取 25 g 凤仙透骨草干燥粉末,加入 15 倍体积不同浓度的乙醇,提取温度 30 ℃,超声辅助提取 2 h,不同浓度乙醇提取液的抑菌圈直径如图 3A 所示。凤仙透骨草提取液抑菌活性随着乙醇浓度的逐渐增大而增大, $\varphi$ (乙醇) = 80% 时,提取液抑菌圈直径最大,为 31.6 mm; $\varphi$ (乙醇) = 100% 提取液的活性稍有下降,抑菌圈直径为 30.1 mm。低浓度的乙醇提取液杂质较多,黏度大,给过滤和浓缩带来很大困难。因此, $\varphi$ (乙醇) = 80% 比较适合凤仙透骨草抑菌活性物质的提取。

2.1.3 溶剂倍数对凤仙透骨草提取液抑菌活性的影响 取 25 g 凤仙透骨草干燥粉末,以  $\varphi$ (乙醇) = 80% 为提取溶剂,提取温度为 30 ℃,超声辅助提取 2 h,不同溶剂倍数的凤仙透骨草提取液的抑菌圈直径如图 3B 所示。随着溶剂倍数逐渐增大,抑菌活性也逐渐增大。在溶剂倍数为 15 倍时,抑菌圈直径为 30.9 mm,随后增加趋势较为平缓。

溶剂倍数太小,抑菌活性物质仅少部分转移到提取溶剂中,提取不完全,故抑菌活性较低;反之溶剂倍数大,物料可与提取溶剂充分接触,提取较完全,所以抑菌活性较高。但溶剂倍数大,溶剂消耗量也大,同时增大了浓缩能耗。综合考虑,选择 15 倍为较佳溶剂倍数。

2.1.4 提取温度对凤仙透骨草提取液抑菌活性的影响 取 25 g 凤仙透骨草粉末,加入 15 倍体积  $\varphi$ (乙醇) = 80%,超声辅助提取 2 h,不同提取温度对抑菌活性的影响见图 3C。30 ~ 50 ℃ 提取液抑菌活性随着温度的升高而逐渐增大;在 50 ~ 60 ℃ 温度范围内抑菌活性变化趋于平缓,提取温度为 60 ℃ 时凤仙透骨草提取液的抑菌活性最大,抑菌圈直径达到 35.4 mm;当温度超过 60 ℃ 时,提取液抑菌活性迅速降低,可能是由于凤仙透骨草中的抑菌物质受热而使其活性降低。由于 50 ℃ 和 60 ℃ 提取液抑菌效果差异不显著,综合考虑能耗和提取成本,故较佳提取温度确定为 50 ℃。

2.1.5 提取时间对凤仙透骨草提取液抑菌活性的影响 取 25 g 凤仙透骨草粉末,以  $\varphi$ (乙醇) = 80% 为提取溶剂,固定溶剂倍数为 15 倍,提取温度 50 ℃,不同提取时间提取液的抑菌圈直径如图 3D 所示。随着提取时间的延长,抑菌活性先增大后减小。提取时间小于 5 h 时,由于加热时间比较短,有利于保持凤仙透骨草中抑菌物质的活性,而且随着提取时间的延长,抑菌物质的提取率增大,所以抑菌活性逐渐增大;而时间超过 5 h 时,可能由于加热时间较长,影响了抑菌物质的活性,使抑菌活性降低;提取时间在 3 ~ 5 h,抑菌效果差异不显著,而延长提取时间会增加能耗,因此选取 3 h 为最佳提取时间。

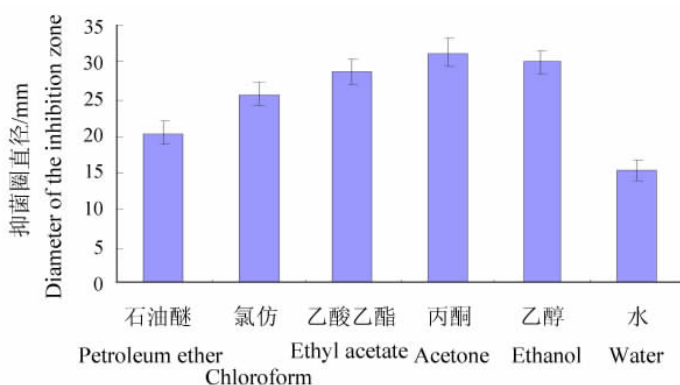


图 1 不同提取溶剂对抑菌活性的影响

Fig. 1 Effect of extracting solvent on antifungal activity

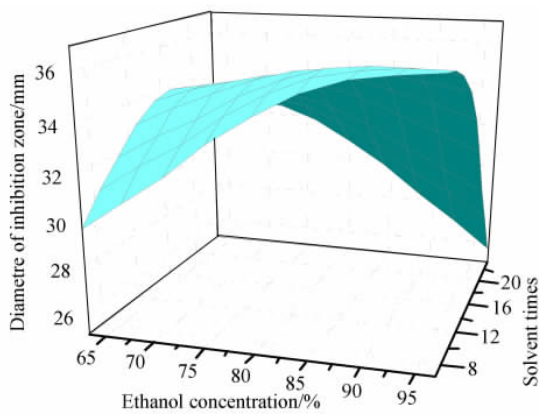


图 2 乙醇浓度和溶剂倍数对抑菌活性的影响

Fig. 2 Influence of ethanol concentration and solvent times on antifungal activity

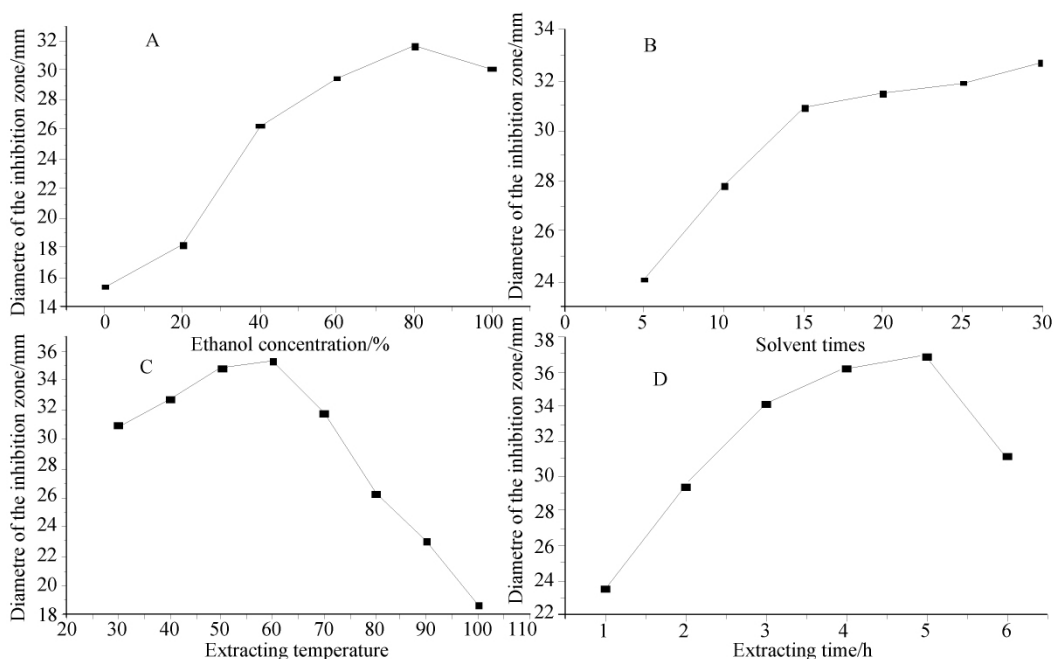


图3 不同因素对提取液抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of different factors on extracts antifungal activity

## 2.2 凤仙透骨草中抑菌活性物质提取工艺参数的优化

2.2.1 工艺优化结果 单因素试验结果表明,乙醇浓度、液固比、提取温度和时间对凤仙透骨草中抑菌活性物质的提取均具有不同程度的影响。由于各因素之间还存在相互作用,因此本试验以抑菌圈直径为检测指标,采用四因素二次回归正交旋转设计(1/2 实施),试验参数组合和所得的抑菌圈平均直径如表2所示。应用 DPS 数据分析软件对试验结果进行处理分析,方差分析结果见表3。从结果可以看出,各因素对凤仙透骨草提取物抑菌效果的影响由大到小依次为:乙醇浓度,溶剂倍数,提取时间,提取温度;乙醇浓度的一次项、二次项、提取温度的二次项以及乙醇浓度与溶剂倍数的交互作用对凤仙透骨草中抑菌活性物质的提取效果影响在 0.01 水平达到极显著,溶剂倍数的二次项和提取时间的二次项在 0.05 水平显著。应用 DPS 数据分析软件求解出抑菌圈直径与影响因素间关系的回归方程,经显著性检验,在  $\alpha = 0.05$  显著水平剔除不显著项,得到优化后的回归方程:

$$Y = 35.24570 + 1.12726X_1 - 0.87843X_1^2 - 0.56129X_2^2 - 0.85810X_3^2 - 0.67513X_4^2 - 1.22737X_1X_2 \quad (1)$$

以上方程体现了乙醇浓度、溶剂倍数、提取温度和提取时间 4 个因素对抑菌圈直径的影响规律及各因素相互间的交互作用。回归方程的失拟性检验  $F_1 = 1.3907 < F_{0.01(5,6)} = 8.75$ ,表明不存在其他失拟因子对试验结果产生影响;回归方程的显著性检验  $F_2 = 9.9966 > F_{0.01(11,11)} = 4.46$ ,说明模型的预测值与实际值非常吻合,模型成立。凤仙透骨草提取液抑菌效果与乙醇浓度、溶剂倍数、浸提温度、浸提时间的相关系数( $R^2$ ) = 回归平方和/总平方和 = 0.9091,表明该数学模型 4 个因素对提取率的影响占 90.91%,而其他因素的影响和误差占 9.09%。

通过非线性优化方法计算可得到各工艺参数的最优组合如下: $\varphi$ (乙醇) = 96.8%,溶剂倍数 10 倍,提取温度 50 °C,提取时间 3 h,优化条件下最大抑菌圈理论值为 36.54 mm。对该优化条件进行试验验证,其抑菌圈平均直径为 36.95 mm,二者相对误差仅为 1.2%,说明试验结果的准确性。

2.2.2 影响因素交互作用分析 本试验所建立的模型中  $X_1X_2$ (乙醇浓度与溶剂倍数)交互项达到极显著水平,我们将另外 2 个因素固定在 0 水平上,即提取温度为 50 °C、提取时间为 3 h 时,用三维曲面图分析乙醇浓度和溶剂倍数对抑菌圈直径的影响规律。将提取温度和提取时间代入式(1),应用 Origin8.0 绘制的三维曲面图见图 2。由图 2 可见,乙醇浓度和溶剂倍数对抑菌效果影响非常大,抑菌直径在 25.8 ~ 36.5 mm 变化,曲面变化明显。抑菌效果随着乙醇浓度的增加而增大,随着溶剂倍数的增加呈先增后减的趋势。

表2 二次回归正交旋转组合设计试验及结果

Tab.2 Design and results of quadric regression orthogonal rotational experiment

试验号 Experiment number	乙醇浓度 $X_1$ Ethanol concentration	溶剂倍数 $X_2$ Solvent times	提取温度 $X_3$ Extracting temperature	提取时间 $X_4$ Extracting time	抑菌圈直径/mm Diameter of the inhibition zone
1	1	1	1	1	31.07
2	1	1	-1	-1	32.85
3	1	-1	1	-1	35.24
4	1	-1	-1	1	34.29
5	-1	1	1	-1	32.20
6	-1	1	-1	1	33.07
7	-1	-1	1	1	31.05
8	-1	-1	-1	-1	30.02
9	-1.681 8	0	0	0	30.02
10	1.681 8	0	0	0	34.94
11	0	-1.681 8	0	0	34.29
12	0	1.681 8	0	0	32.45
13	0	0	-1.681 8	0	33.65
14	0	0	1.681 8	0	31.42
15	0	0	0	-1.681 8	33.53
16	0	0	0	1.681 8	32.57
17	0	0	0	0	34.68
18	0	0	0	0	36.11
19	0	0	0	0	35.65
20	0	0	0	0	35.08
21	0	0	0	0	35.83
22	0	0	0	0	35.93
23	0	0	0	0	34.11

表3 试验结果方差分析

Tab.3 Variance analysis of experimental results

变异来源 Sources of variation	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	$F$ 值 $F$ Value	$p$ 值 $p$ Value
$X_1$	12.621	1	12.621	19.531 9	0.001 **
$X_2$	1.076 2	1	1.076 2	1.665 5	0.223 3
$X_3$	1.040 9	1	1.040 9	1.610 8	0.230 6
$X_4$	0.316 9	1	0.316 9	0.490 5	0.498 3
$X_1^2$	8.916 5	1	8.916 5	13.798 9	0.003 4 **
$X_2^2$	3.640 5	1	3.640 5	5.633 9	0.036 9*
$X_3^2$	8.508 5	1	8.508 5	13.167 6	0.004 **
$X_4^2$	5.267	1	5.267	8.151	0.015 7*
$X_1X_2$	8.764 8	1	8.764 8	13.564 2	0.003 6 **
$X_1X_3$	0.089 3	1	0.089 3	0.138 2	0.717 2
$X_1X_4$	1.951 3	1	1.951 3	3.019 8	0.110 1
回归 Regression	71.055	11	6.459 5	$F_2 = 9.996 6$	0.000 3
剩余 Remainder	7.107 9	11	0.646 2		
失拟 Lack of fit	3.815 6	5	0.763 1	$F_1 = 1.390 7$	0.300 5
误差 Error	3.292 3	6	0.548 7		
总和 Summation	78.163	22			

### 3 结 论

(1) 采用四因素二次回归正交旋转组合试验设计,建立了凤仙透骨草中抑菌有效成分抑菌效果与乙醇浓度、提取温度、溶剂倍数和提取时间的回归模型,所得模型有效,与实际拟合较好,为凤仙透骨草抑菌活性物质提取工艺的确定提供了量化条件。

(2) 采用非线性优化的方法,得出凤仙透骨草中抑菌有效成分提取的最优工艺为 $\varphi$ (乙醇)=96.8%、溶剂倍数10倍、提取温度50℃、提取时间3h,优化条件下最大抑菌圈直径理论值为36.54mm。验证结果表明,所得模型的计算值与试验值吻合较好。考虑到实际生产和推广应用,最后确定提取工艺条件为 $\varphi$ (乙醇)=95%、溶剂倍数10倍、提取温度50℃、提取时间3h。

#### 参考文献:

- [1]吕庆,徐志德,夏金初. 柑桔贮藏期病害及药剂防腐保鲜技术研究[J]. 湖南农业科学, 2000, 4: 44-45.
- [2]Sivakumar D, Wilson W R S, Wijesundera R L C, et al. Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde [J]. Crop Protection 2002, 21(9): 847-852.
- [3]Wen-Tao Xu, Xiao-li Peng, Yun-Bo Luo, et al. Physiological and biochemical responses of grapefruit seed extract dip on 'Redglobe' grape [J]. Food Science and Technology, 2009, 42(2): 471-476.
- [4]Castillo S, Navarro D, Zapata P J, et al. Antifungal efficacy of Aloe vera in vitro and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality [J]. Postharvest Biol Technol 2010, 57(3): 183-188.
- [5]Okigbo R N, Ogbonnaya U O. Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot [J]. African Journal of Biotechnology 2006, 5(9): 727-731.
- [6]Bautista-Banos S, Hernándeiz-Lo'pez M, Di'az-Pe'rez J C. Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of 'ciruela' fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage [J]. Postharvest Biol & Technol 2000, 20(1): 99-106.
- [7]李百健,曾荣,黄长干,等. 植物源杀菌剂的筛选[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2010, 32(10): 28-31.
- [8]曾荣,陈金印,张阿珊. 植物提取液对柑桔采后青、绿霉抑菌活性的研究[J]. 江西农业大学学报:自然科学版, 2010, 32(6): 1142-1145.
- [9]Ishiguro K, Oku H, Suitani A, et al. Effects of conjugated linoleic acid on anaphylaxis and allergic pruritus [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2002, 25(12): 1655-1657.
- [10]Oku H, Ishiguro K. Antipruritic and antidermatitic effect of extract and compounds of *Impatiens balsamina* L. in atopic dermatitis model NC mice [J]. Phytother Res 2001, 15(6): 506-510.
- [11]Lim Y H, Kim I H, Seo J J. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes* [J]. J Microbiol, 2007, 45(5): 473-477.
- [12]Ding Z S, Jiang F S, Chen N P, et al. Isolation and identification of an anti-tumor component from leaves of *Impatiens balsamina* [J]. Molecules 2008, 13(2): 220-229.
- [13]苏世彦. 食品微生物检验手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998: 303-365.
- [14]周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社, 2006: 196-204.
- [15]唐启义,冯明光. DPS数据处理系统:实验设计、统计分析及数据挖掘[M]. 北京:科学出版社, 2007: 290-295.