

石榴果皮中抑菌活性物质提取工艺优化

董周永¹, 胡青霞², 郭松年¹, 赵国建¹, 杜宝生¹, 刘兴华^{1*}

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 河南农业大学林学院, 郑州 450002)

摘要: 为了研究石榴果皮中抑菌活性物质的提取工艺, 以金黄色葡萄球菌做指示菌, 以抑菌圈直径为活性追踪指标, 在单因素试验的基础上通过二次回归正交旋转组合设计进行工艺参数优化。结果表明, 对石榴果皮抑菌活性物质提取效果的影响大小顺序为: 乙醇浓度、提取温度、液固比、提取时间; 其最佳提取工艺条件为乙醇浓度60%, 液固比10:1, 提取温度60℃, 提取时间4 h。在此优化条件下, 石榴果皮提取液抑菌圈直径为16.30 mm。

关键词: 石榴果皮; 提取; 抑菌活性物质

中图分类号: TS209; S38

文献标识码: B

文章编号: 1002-6819(2008)-3-0274-04

董周永, 胡青霞, 郭松年, 等. 石榴果皮中抑菌活性物质提取工艺优化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 274-277.

Dong Zhouyong, Hu Qingxia, Guo Songnian, et al. Optimization of technology for extracting antibacterial substances from pomegranate peel [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(3): 274-277. (in Chinese with English abstract)

0 引言

石榴(*Punica Granatum* L.)属于石榴科石榴属落叶灌木或小乔木, 中国有 5 个主要石榴产区, 即陕西临潼、山东枣庄、安徽怀远、四川会理、云南蒙自^[1]。据不完全统计, 截至 2005 年, 中国石榴栽植面积达 64668 hm² (97 万亩), 居世界第 1 位, 产量约 38 万 t^[2]。近年来, 欧、美、日等国对石榴的研究逐步升温, 研究表明石榴具有抗菌^[3,4]、抗肿瘤^[5,6]、免疫调节^[7]及对酒精诱发的胃损伤具有保护作用^[8]等多种生理活性功能, 所有这些必将推动石榴产业进一步发展。但鲜石榴的可食部分(籽粒部分)仅占 50%左右, 而对剩余的 50%左右的石榴果皮目前还没有很好地利用, 只能废弃, 不但造成了资源浪费, 而且对环境造成了污染。

近年来, 随着人们对食品安全意识的逐渐增强, 对天然无公害、无污染产品的需求也越来越多。为了满足这种需要, 国内外学者对天然产物提取成分在抗菌、抑菌方面作了许多工作^[9,10]。一些学者对于石榴皮中多酚^[11]、单宁^[12]等的提取工艺及其抗氧化^[13]、降血脂^[14]、抑菌等活性进行了一定的研究, 而以往这些研究大多是先分离某种既定的目标物质, 然后再研究其活性, 故确定的提取工艺往往是目标物质产率最高, 但活性未必最高。但至今为止, 对石榴果皮中的抑菌活性物质提取工艺的优化研究尚未见报道。

本试验以抑菌圈直径为活性追踪指标, 对石榴果皮中抑菌活性物质进行提取, 优化其提取工艺, 以期拓宽石榴综合加工途径提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

石榴果皮: 以陕西省临潼区主栽品种净皮甜为试材, 从临潼园艺站品种园中采摘, 采收当天运回实验室, 去除病果和裂果, 洗净果皮, 手工取皮, 避光干燥, 粉碎后过 40 目筛, 4℃冷藏备用。

培养基: 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基^[15]。

菌种: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 由西北农林科技大学食品科学与工程学院微生物实验室提供。

1.2 主要仪器设备

ZPS-250 智能生化培养箱(黑龙江东拓仪器制造有限公司)、ES-315 TOMY 高压蒸汽灭菌锅(基因有限公司)、PK121R 冷冻离心机(意大利 ALC 公司)、LXJ-II 旋转蒸发器(上海医用分析仪器厂)。

1.3 试验方法

1) 石榴果皮提取液的制备: 取石榴果皮粉 10 g 加入一定体积一定浓度的乙醇, 于 150 r/min 的摇床中提取一段时间, 4000 r/min 离心 15 min, 弃去沉淀, 取上清液真空旋转蒸发至干, 再用蒸馏水溶解, 定容至 10 mL, 4℃保藏备用。

2) 抑菌试验方法: 将经过活化的试验用菌接种到营养肉汤培养基中, 细菌经 37℃培养 24 h, 使菌液浓度达到 10⁸ cfu/mL 备用。在无菌条件下吸取适量的菌悬液加入到备用的平板培养基上, 涂布均匀。灼热玻璃棒在直径为 9 cm 的培养皿培养基上烫出 8 mm 直径孔, 每孔加入 25 μL 提取液, 做 3 次重复, 以水做空白对照。37℃条件下培养 24 h, 采用十字交叉法测量抑菌圈直径。

3) 单因素试验: 以抑菌圈直径为指标, 分别研究乙醇浓度、液固比、浸提温度、浸提时间对石榴果皮提取液抑菌活性的影响。

4) 石榴果皮抑菌活性物质的提取工艺参数优化: 在单因素试验的基础上, 对乙醇浓度、液固比、浸提温度、浸提时间 4 个因素进行 4 因子二次回归正交旋转设计(1/2 实施)进行工艺优化^[16], 确定其最优提取工艺, 因素水平见表 1。

收稿日期: 2007-07-12 修订日期: 2008-01-24

基金项目: 西安市科技计划项目(YF07127)

作者简介: 董周永(1982—), 男, 陕西扶风人, 博士生, 主要从事果蔬保鲜和加工技术的研究。杨凌 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 712100。Email: dongzhouyong3421@163.com.

*通讯作者: 刘兴华(1948—), 陕西周至人, 教授, 博士生导师, 主要从事果蔬贮藏及加工的教学与研究。杨凌 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 712100。Email: Liuxh2830@163.com

表 1 试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of the experiment

规范变量 Z_j	乙醇浓度 $X_1/\%$	液固比 X_2	提取温度 $X_3/^\circ\text{C}$	提取时间 X_4/h
下星号臂(-1.6818)	6.4	6.6:1	43.2	2.3
下水平(-1)	20	10:1	50	3
零水平(0)	40	15:1	60	4
上水平(1)	60	20:1	70	5
上星号臂(1.6818)	73.6	23.4:1	76.8	6.7
变化区间 Δ_j	20	5	10	1

注: $j=1, 2, 3, 4$

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度对石榴果皮提取液抑菌活性的影响

取 10 g 石榴果皮干粉, 设定液固比 5 : 1, 提取温度 30 $^\circ\text{C}$, 提取时间 2 h, 不同浓度乙醇的石榴果皮提取液的抑菌圈直径如图 1 所示。随着乙醇浓度的逐渐增大, 石榴果皮提取液抑菌活性先增大后减小, 乙醇浓度 40% 时, 石榴果皮提取液抑菌圈直径最大, 为 14.6 mm。根据相似相溶原理, 说明 40% 乙醇的极性较适合石榴果皮中抑菌物质的提取。

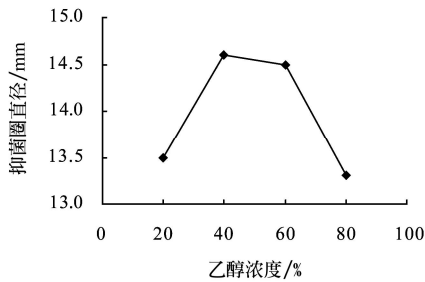


图 1 乙醇浓度对抑菌活性的影响

Fig.1 Effect of the ethanol concentration on the antibacterial activity

2.2 液固比对石榴果皮提取液抑菌活性的影响

取 10 g 石榴果皮干粉, 以 40% 乙醇为提取溶剂, 设定提取温度 30 $^\circ\text{C}$, 提取时间 2 h, 不同液固比的石榴果皮提取液的抑菌圈直径如图 2 所示。随着液固比逐渐增大, 抑菌活性也逐渐增大。在液固比 15 : 1 时, 抑菌圈直径为 14.7 mm, 液固比在 5 : 1~15 : 1, 抑菌活性增加趋势明显, 在 20 : 1~30 : 1 时抑菌圈直径增大趋势逐渐减缓。这是由于液固比太小, 难以保证

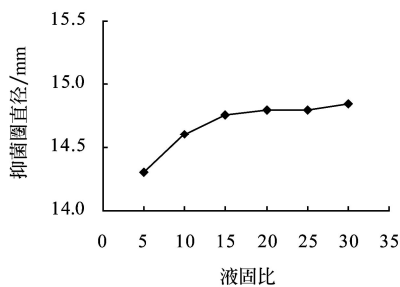


图 2 液料比对抑菌活性的影响

Fig.2 Effect of the ratio of liquid to solid on the antibacterial activity

石榴果皮中的抑菌活性物质转移到提取溶剂中, 而且乙醇是挥发性物质, 造成物料黏度过大, 过滤困难, 提取不完全, 故抑菌活性较低。反之液固比变大时, 石榴果皮可与提取溶剂充分接触, 提取较完全, 所以抑菌活性较高。但液固比太大, 乙醇消耗量大, 同时也增大了浓缩能耗。综合考虑, 选液固比 15 : 1 为较佳液固比。

2.3 提取温度对石榴果皮提取液抑菌活性的影响

取 10 g 石榴果皮干粉, 以 40% 乙醇为提取溶剂, 固定液固比 15 : 1, 提取时间 2 h, 不同提取温度的石榴果皮提取液的抑菌圈直径如图 3 所示。在 60 $^\circ\text{C}$ 下石榴果皮抑菌物质提取液的抑菌活性最大, 抑菌圈直径达到了 15.3 mm。在 30~60 $^\circ\text{C}$, 随温度的升高抑菌活性逐渐增大, 而温度高于 60 $^\circ\text{C}$ 时随温度的升高, 抑菌活性逐渐减小。这是由于温度在 30~60 $^\circ\text{C}$ 时, 随温度的升高, 石榴果皮中抑菌活性物质的提取除了溶剂效应以外, 还有热效应, 有利于其溶解, 使提取效率提高。但当温度超过 60 $^\circ\text{C}$ 时, 可能由于石榴果皮中的抑菌物质受热而使其活性降低。此外, 温度太高, 乙醇挥发加剧, 使整个溶剂系统极性过大, 影响乙醇浸提效果, 所以抑菌活性逐渐降低。故较佳提取温度确定为 60 $^\circ\text{C}$ 。

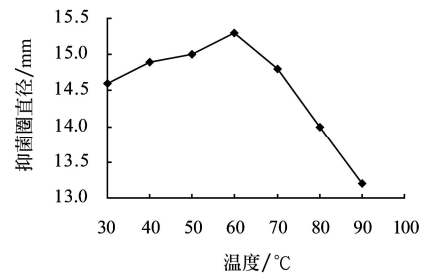


图 3 提取温度对抑菌活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on the antibacterial activity

2.4 提取时间石榴果皮提取液抑菌活性的影响

取 10 g 石榴果皮干粉, 以 40% 乙醇为提取溶剂, 固定液固比 15 : 1, 提取温度 60 $^\circ\text{C}$, 不同提取时间的石榴果皮提取液的抑菌圈直径如图 4 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 4 h 时, 石榴果皮提取液的抑菌活性最强, 抑菌圈直径达到 15.4 mm; 提取时间小于 4 h 时, 由于加热时间比较短, 有利于保持石榴果皮中抑菌物质的活性, 而且随着提取时间的延长, 石榴果皮中的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 4 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。

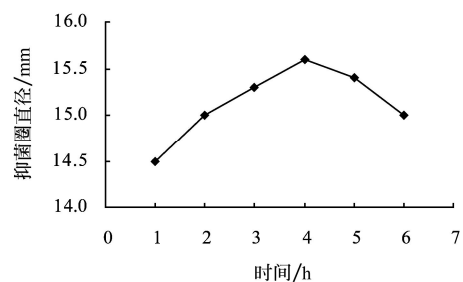


图 4 提取时间对抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of time on the antibacterial activity

2.5 石榴果皮抑菌活性物质提取工艺参数的优化

2.5.1 石榴果皮中抑菌活性物质提取工艺优化结果

单因素试验表明，浸提温度、时间、乙醇浓度、以及液固比等对石榴果皮抑菌活性物质的提取均具有不同程度的影响。由于各因素间的相互作用比较复杂，因此本研究以抑菌圈直径为指标，采用二次回归正交旋转设计对提取工艺进行了优化，试验结果见表 2。

表 2 二次回归正交旋转组合设计试验及结果

Table 2 Design and results of quadric regression orthogonal rotational experiment

试验号	乙醇浓度 Z ₁	液固比 Z ₂	提取温度 Z ₃	提取时间 Z ₄	抑菌圈平均 直径 Y/mm
1	1	1	1	1	13.51
2	1	1	-1	-1	14.72
3	1	-1	1	-1	15.52
4	1	-1	-1	1	14.91
5	-1	1	1	-1	14.00
6	-1	1	-1	1	14.38
7	-1	-1	1	1	13.50
8	-1	-1	-1	-1	13.05
9	-1.6818	0	0	0	13.05
10	1.6818	0	0	0	15.19
11	0	-1.6818	0	0	14.91
12	0	1.6818	0	0	14.11
13	0	0	-1.6818	0	14.63
14	0	0	1.6818	0	13.66
15	0	0	0	-1.6818	14.58
16	0	0	0	1.6818	14.16
17	0	0	0	0	15.08
18	0	0	0	0	15.70
19	0	0	0	0	15.50
20	0	0	0	0	15.25
21	0	0	0	0	15.58
22	0	0	0	0	15.62
23	0	0	0	0	14.83

通过 DPS 数据分析软件对表 2 中石榴果皮抑菌活性物质的抑菌圈直径进行处理，方差分析见表 3。由表 3 可知，乙醇浓度的一次项、二次项以及提取温度的二次项对石榴果皮抑菌活性物质的提取效果影响在 0.01 水平达到极显著，提取时间的二次项、乙醇浓度与液固比的交互作用和提取温度与提取时间的交互作用在 0.05 水平显著，各因素对提取石榴果皮抑菌活性物质抑菌效果的影响大小顺为：乙醇浓度 > 提取温度 > 液固比 > 提取时间。由于各因素对提取抑菌活性物质的抑菌效果的影响不是简单的线性关系，为了更明确各因子对其的影响，采用 DPS 软件对表 2 中抑菌圈大小数据进行多元回归分析，并在 $\alpha=0.05$ 显著水平剔除回归方程中不显著项后，得到如下简化后的回归数学模型：

$$Y = 15.31245 + 0.53666Z_1 - 0.36533Z_1^2 - 0.35649Z_3^2 - 0.27694Z_4^2 - 0.25187Z_1Z_2 - 0.25187Z_3Z_4 \quad (1)$$

回归方程 $F_2 > F_{0.01(14, 8)} = 5.56$ ，即得到的回归方程在 0.01 水平显著。通过 DPS 软件的优化功能，可进一步得到石榴果皮中抑菌活性物质的最优提取工艺条件：乙醇浓度 60%、液固比 10 : 1、提取温度 60℃、提取时间 4 h，优化条件下石榴果皮提取液抑菌圈直径的理论值为 15.51 mm。对该优化条件进行试验验证，其抑菌圈直径达 16.30 mm，二者相对误差仅 4.8%。

这一结果证实试验优化得到的工艺参数基本是可靠的，可以为石榴果皮中抑菌活性物质的工业化生产提供技术依据。

表3 试验结果方差分析表

Table 3 Variance analysis of experimental results

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平 P
Z ₁	3.9332	1	3.9332	23.7119	0.0012**
Z ₂	0.2155	1	0.2155	1.2990	0.2874
Z ₃	0.3421	1	0.3421	2.0621	0.1889
Z ₄	0.2107	1	0.2107	1.2703	0.2924
Z ₁ ²	2.0528	1	2.0528	12.3760	0.0079**
Z ₂ ²	0.7732	1	0.7732	4.6616	0.0629
Z ₃ ²	1.9524	1	1.9524	11.7707	0.0089**
Z ₄ ²	1.1621	1	1.1621	7.0060	0.0294*
Z ₁ Z ₂	1.0151	1	1.0151	6.1195	0.0385*
Z ₁ Z ₃	0.0281	1	0.0281	0.1691	0.6917
Z ₁ Z ₄	0.4389	1	0.4389	2.6460	0.1425
Z ₂ Z ₃	0.4389	1	0.4389	2.6460	0.1425
Z ₂ Z ₄	0.0281	1	0.0281	0.1691	0.6917
Z ₃ Z ₄	1.0151	1	1.0151	6.1195	0.0385*
回归	13.7252	14	0.9804	F ₂ =5.910	0.0020
剩余	1.3270	8	0.1659		
失拟	0.7046	2	0.3523	F ₁ =3.396	0.0855
误差	0.6224	6	0.1037		
总和	15.0522	22			

注：*表示在 0.05 水平显著，**表示在 0.01 水平显著。

2.5.2 双因素交互作用分析

依据各因素 Z₁、Z₂、Z₃、Z₄ 对其响应值 (Y) 所构成的三维空间的曲面图，可反映各因素对其响应值的影响。本试验所建立的模型中 Z₁Z₂ (乙醇浓度与液固比)、Z₃Z₄ (提取时间与提取温度) 两交互项达显著水平，固定两个因素在零水平上，研究另两个因素间的交互作用，根据所作的三维空间曲面图，分析乙醇浓度与液固比、提取时间与提取温度交互作用对提取效果的影响。

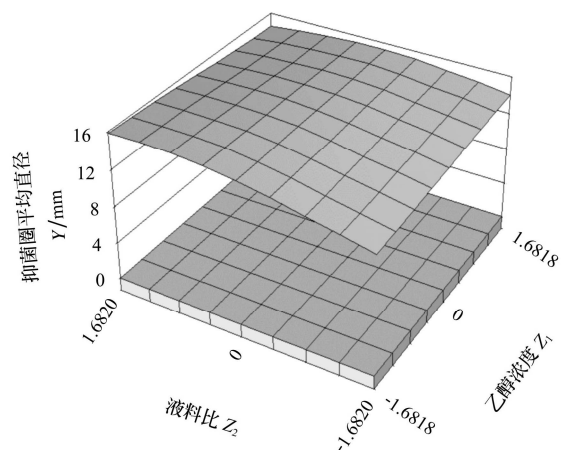


图5 乙醇浓度与液固比交互作用

Fig.5 Interaction of ethanol concentration and ratio of liquid to solid

由图5可知，在试验范围内抑菌活性随着乙醇浓度的增大是先增后减，要想获得较好的抑菌效果，最优的乙醇浓度范围应

在0~1.34水平(实际值乙醇浓度在40%~66.8%)之间; 抑菌圈直径随着溶剂的增加也呈先增后减的趋势, 最优的液固比范围应在-1~1水平(实际值10:1~20:1)之间。在乙醇浓度的不同水平下, 随着液固比的增加, 抑菌圈平均直径改变的变化不同; 在液固比不同水平下, 随着乙醇浓度的增加, 抑菌活性改变的变异度亦不同, 且乙醇浓度对抑菌圈平均直径的影响较液固比更为敏感。

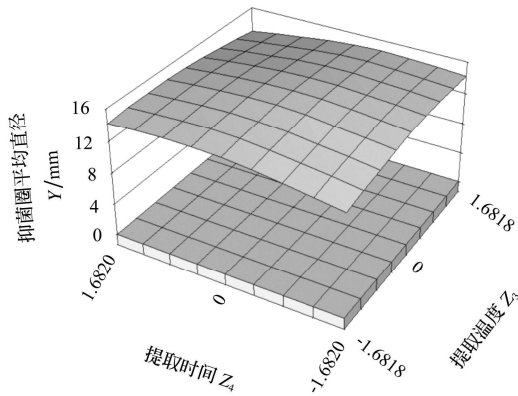


图6 提取温度与提取时间交互作用

Fig.6 Interaction of temperature and time

由图6看出, 抑菌圈平均直径随着提取温度与提取时间的增加呈先增后减的趋势。要想获得较大的抑菌圈直径, 最优的提取温度范围应在-1~0.5水平(实际值50~65℃)之间; 最优提取时间范围应在-0.5~0.5水平(实际值3.5~4.5 h)之间。

3 结论

1) 通过二次正交旋转设计建立了石榴果皮中抑菌活性物质提取的乙醇浓度、液固比、浸提温度、浸提时间4个因素的回归方程, 此模型在试验范围内能较准确地预测石榴果皮中抑菌活性物质的提取效果。

2) 4个因素对石榴果皮抑菌活性物质提取效果的影响大小顺序为: 乙醇浓度>提取温度>液固比>提取时间。

3) 石榴果皮中抑菌活性物质的最佳提取工艺参数为: 溶剂为60%乙醇, 液固比为10:1, 提取温度为60℃, 提取时间为4 h。在此条件下石榴果皮提取液抑菌圈直径为16.30 mm, 提取效果较好。

[参考文献]

- [1] 杨丽平, 杨永红. 石榴果皮研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2004, 25(3): 45-47.
- [2] 王爱伟, 孟繁锡, 刘春鸽, 等. 我国石榴产业现状、发展对策及前景分析[J]. 中国果业信息, 2006, 23(6): 6-8.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(精华本)[M]. 上海: 上海科学技术出版社. 1998.
- [4] Prashanth D, Asha M K, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum* [J]. Journal of Fitoterapia, 2001, 72(2):171-173.
- [5] Boukharta M, Jalbert G, Castonguay A. Efficacy of ellagitannins and ellagic acid as cancer chemopreventive agents[J]. Journal of Bull Liaison-Gruppe Polyphenols, 1992, 16(1): 245-249.
- [6] Lansky E P, Newman R A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 109(2): 177-206.
- [7] Ross R G. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits-a preliminary study [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 78(1): 85-87.
- [8] Khennouf J S, Glarzouli K, Amira S, et al. Effects of *Quercus ilex* and *Punica granatum* polyphenols against ethanol-induced gastric damage in rats[J]. Journal of Pharmazie, 1999, 14(1): 75-76.
- [9] 陈庆敏, 傅茂润, 王国庆. 凤尾兰中抗果蔬病原菌成分的提取工艺优化[J]. 农业工程学报, 2007, 23(1): 268-270.
- [10] 关文强, 李淑芬. 天然植物提取物在果蔬保鲜中应用研究进展[J]. 农业工程学报, 2006, 22(7): 200-203.
- [11] 贾冬英, 姚开, 谭薇, 等. 石榴皮中多酚提取条件的优化[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3): 123-126.
- [12] 任平, 岳淑宁, 李忠玲, 等. 石榴皮单宁类化合物的提取研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(1): 149-153.
- [13] 李云峰, 郭长江, 杨继军, 等. 石榴皮抗氧化物质提取及其体外抗氧化作用研究[J]. 营养学报, 2004, 26(2): 144-147.
- [14] 程霜, 郭长江, 杨继军, 等. 石榴皮多酚提取物降血脂效果的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2005, 23(3): 160-162.
- [15] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学试验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [16] 袁志发. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 360-366.

Optimization of technology for extracting antibacterial substances from pomegranate peel

Dong Zhouyong¹, Hu Qingxia², Guo Songnian¹, Zhao Guojian¹, Du Baosheng¹, Liu Xinghua^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shanxi 712100, China;

2. College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to investigate the technology for extracting antibacterial substances from pomegranate peel, *Staphylococcus aureus* was used as indicator bacteria and diameter of inhibition zone was used as the activity monitoring parameter. The optimum extraction conditions were obtained by quadric regression orthogonal rotational experiments. The results show that the order of the main factors influencing the extracting effect from more important to less are as follows: ethanol concentration, extraction temperature, ratio of liquid to solid and extraction time; the optimum extraction conditions are that the concentration of ethanol is 60%, the ratio of liquid to solid is 10:1, the temperature of extraction is 60℃ and the time of extraction is 4 h. Under the above mentioned conditions, the diameter of inhibition zone is 16.30 mm.

Key words: pomegranate peel; extraction; antibacterial substances