

超声波辅助提取大黄抑菌物质的工艺研究

瞿冬梅, 孙培冬, 何强飞, 俞俊 (1. 江南大学化学与材料工程学院, 江苏无锡214122; 2. 江南大学食品科学与工程学院, 江苏无锡214122)

摘要 [目的] 为进一步开发利用大黄资源提供理论依据。[方法] 以抑菌圈直径作为评价指标, 通过对乙醇浓度、回流温度、超声波时间、液料比4个单因素分析和正交试验优化出最佳工艺条件。[结果] 最佳工艺条件为: 乙醇浓度70%、回流温度60℃、超声波处理时间35 min、液料比20:1。在此条件下所得提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌圈直径分别为20.0、18.9和18.1 mm。[结论] 超声波辅助法提取明显优于常规回流法。

关键词 大黄; 超声波; 抑菌

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00177-03

Research on the Extraction Technology of Antibacterial Substance From Rhubarb with Ultrasonic Assisted Extraction Method

QU Dong-mei et al (School of Chemical and Material Engineering, Jiang Nan University, Wuxi, Jiangsu, 214122)

Abstract [Objective] The study aimed to provide theoretical foundation for development and utilization of rhubarb. [Method] It was studied with the antibacterial circle diameter as the evaluation index based on the concentration of alcohol, recycling temperature, time of ultrasound and the ratio of liquid to material. Four single factor analysis and optimization using orthogonal design were used to obtain the best conditions. [Result] The optimum condition: ethanol concentration of 70 percent, recycling temperature of 60℃, ultrasonic processing time of 35 min, the ratio of liquid to material 20:1, under these conditions, the circle diameters of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi* were 20.0, 18.9 and 18.1 mm. [Conclusion] Ultrasonic assisted extraction significantly better than normal refluxing method.

Key words Rhubarb; Ultrasonic; Antibacterial

大黄是一种常用的中药, 为蓼科植物多年生草本的根茎, 具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗高血脂、降血压、健胃、利胆、保肝、强心、延缓衰老、调节机体免疫等作用^[1]。近年来, 人们对大黄的研究主要集中于医疗卫生, 而在添加剂方面的应用和研究相对较少。超声波法作为一种新兴的应用技术, 近年来已被广泛用于天然植物有效成分的提取。它是利用超声波在液体中发生强烈的空穴作用使细胞破碎, 增加其中有效成分的溶出速度和数量, 从而提高有效成分的浸提率并缩短浸提时间^[2-3]。笔者对超声波辅助提取大黄抑菌成分的工艺条件进行研究, 旨在开发一种天然的抑菌剂及进一步促进中草药大黄的有效利用, 对提高中草药大黄种植者的经济效益具有重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材料 大黄: 购于无锡市海王星辰药店。菌种: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella typhi*), 以上3种常见致病菌由江南大学食品科学与工程微生物重点实验室提供。牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏3 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 琼脂15~20 g, 水1 000 ml, pH值7.0~7.2。乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、乙醚、生理盐水(0.8% NaCl) 均为分析纯。

设备: KQ250B型超声波清洗机, 上海绿宇生物科技有限公司; 101-A型电热鼓风干燥箱, 上海中南医药机械有限公司; JFSD100粉碎机, 上海嘉定粮油仪器有限公司; R201旋转蒸发器 W201D恒温水浴锅, 上海申顺生物科技有限公司; 不锈钢手提式灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 数显电子分析天平, 上海天平仪器厂; 生化培养箱 SPX250型, 上海跃进医疗器械厂; 超静工作台, 上海生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 提取工艺流程。 大黄干片 粉碎 过100目筛 称样 加提取剂浸润 超声波处理 恒温回流提取1 h 真空抽滤 浓缩 原液(1 ml 提取液中含有1 g 大黄的提取物^[4])。

1.2.2 提取工艺试验方案。 采用超声波辅助提取的方法, 选用3种常见的致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌为供试菌, 考察提取物的抑菌效果。以不同提取剂、提取剂浓度、液料比、超声波处理时间、回流提取温度为因素, 先进行单因素试验, 再在单因素试验的基础上进行正交试验, 得到最佳提取工艺条件。试验的评价指标选择衡量抑菌效果的抑菌圈直径, 由于供试菌为3种常见的致病菌, 正交试验时选取能表示总效果的平均抑菌圈直径作为评价指标^[5-6]。

1.2.3 抑菌能力的测定。 菌悬液的制备^[7-11]。采用无菌操作法, 取各菌种一接种环, 分别接种于牛肉膏蛋白胨琼脂斜面上, 置于37℃恒温培养箱中培养24 h。24 h后从各新鲜菌种斜面上沾取少量菌苔接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 于37℃恒温培养箱中培养24 h后作为原菌液, 分别用灭菌生理盐水将各原菌液制成含菌数为 10^6 CFU/ml的菌悬液。

抑菌圈直径的测定^[12]。采用滤纸片法测定, 将滤纸片用打孔器打成直径为6 mm的滤纸片, 灭菌, 把灭菌好的滤纸片浸入样品液中3 h, 用移液管移取0.2 ml菌悬液涂于平板上。将浸泡过的滤纸片取出, 贴于含菌平板上, 每个培养皿等距离放3片, 并以对应的溶剂做对照试验, 每菌重复3次, 将制好的培养皿置于37℃培养箱培养24 h, 24 h后取出测量各抑菌圈直径(mm), 取其平均值。

抑菌菌直径 = 提取物原液的抑菌菌直径 - 对应溶剂的抑菌圈直径

2 结果与分析

2.1 提取溶剂对抑菌效果的影响 超声波处理时间25 min, 液料比10:1, 回流温度分别接近各溶剂的沸点: 甲醇65℃、70%乙醇80℃、水100℃、乙酸乙酯75℃、丙酮55℃、乙

作者简介 瞿冬梅(1985-), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的提取及应用。

收稿日期 2008-07-07

醚35，试验结果见图1。由图1可知，由于提取溶剂极性不同，其提取液对供试菌的抑制程度有较大差异，甲醇>70%乙醇>水>乙酸乙酯>丙酮>乙醚，其中甲醇和70%乙醇的效果相当，考虑到使用溶剂的安全性，故选用乙醇作为提取溶剂。

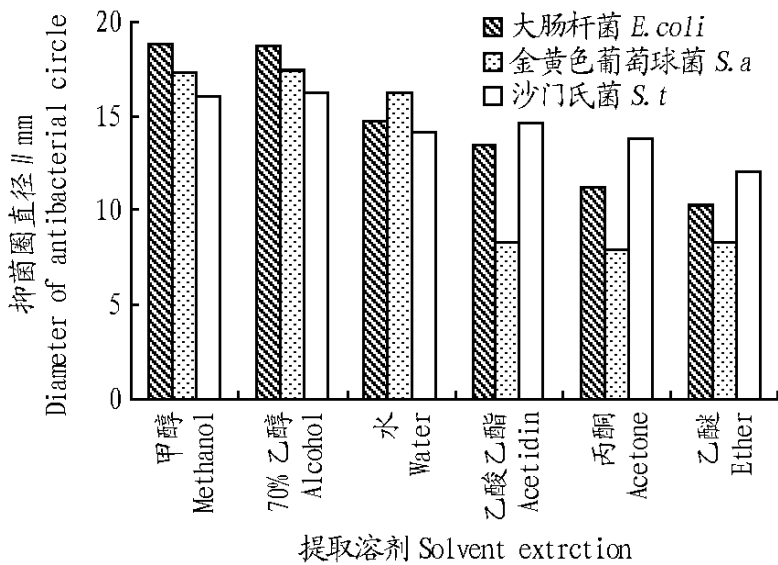


图1 提取溶剂对抑菌效果的影响

Fig.1 The impact of solvent extraction on antibacterial effect

2.2 乙醇浓度对抑菌效果的影响 超声波处理时间25 min，回流温度80，液料比10:1，试验结果见图2。由图2可知，在其他条件相同的情况下，大黄提取物的抑菌能力随乙醇浓度的增大呈先强后弱的趋势。当乙醇浓度为70%时，提取物的抑菌能力达到最强。当乙醇浓度大于70%时，随着浓度的增加，其抑菌能力有所下降。这可能是由于当乙醇浓度增加到一定值时，溶剂与抑菌物质极性差别拉大，造成抑菌物质溶解度减小。因此，选取70%左右的乙醇为最佳浓度。

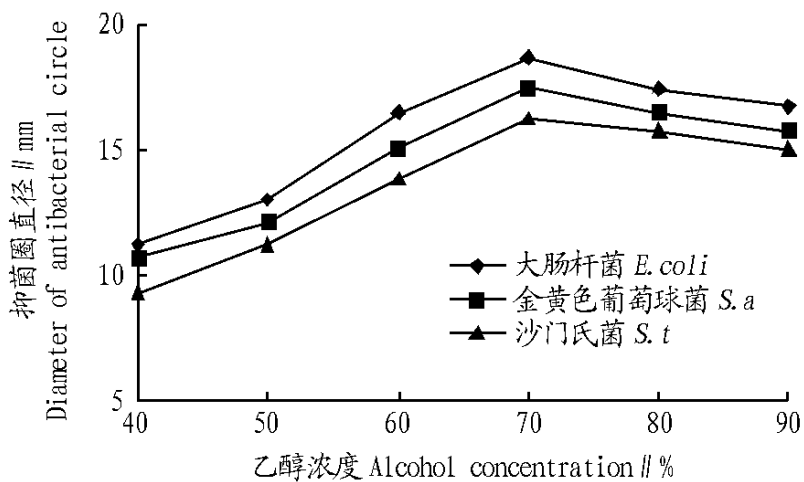


图2 乙醇浓度对抑菌效果的影响

Fig.2 The impact of ethanol concentration on antibacterial effect

2.3 回流提取温度对抑菌效果的影响 超声波处理时间25 min，乙醇浓度70%，液料比10:1，试验结果见图3。由图3可知，随着温度的升高，大黄提取物的抑菌能力快速增加，当温度为70时达到最大值，温度再升高大黄提取物的抑菌能力反而有所下降。这主要是由于一方面温度的过高容易造成溶剂的挥发，另一方面随着温度的上升，大黄中的非抑菌成分的溶解度增大，从而影响了大黄原液的抑菌效果。因此，选取70左右的温度为最佳温度。

2.4 超声波处理时间对抑菌效果的影响 乙醇浓度70%，回流温度80，液料比10:1，试验结果见图4。由图4可知，大黄提取物的抑菌效果随着处理时间的延长呈先升后降的趋势，这主要是由于开始时原料和溶剂之间的浓度差比较大，扩散速度快，有效抑菌成分浸出速度也快，但随着时间的

延长，一方面溶剂的挥发，另一方面非抑菌成分的溶出，从而造成了大黄提取物抑菌效果的下降。因此，选取35 min为最佳超声波处理时间。

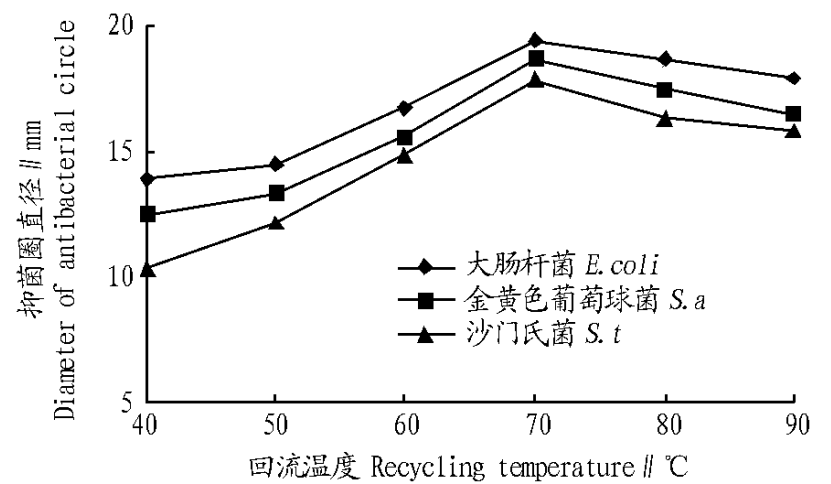


图3 回流提取温度对抑菌效果的影响

Fig.3 The impact of recycling temperature on antibacterial effect

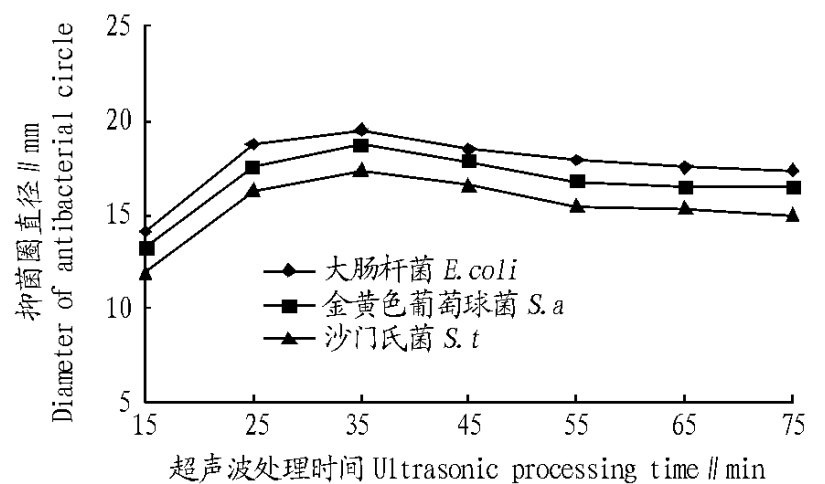


图4 超声波处理时间对抑菌效果的影响

Fig.4 The impact of ultrasonic processing time on antibacterial effect

2.5 液料比对抑菌效果的影响 乙醇浓度70%，超声波处理时间25 min，回流温度80，试验结果见图5。由图5可知，大黄提取物的抑菌效果随液料比的增加呈先升后降的趋势，当液料比为5~20时，抑菌效果呈上升趋势，当液料比大于20时呈缓慢下降的趋势。这主要是由于随着液料比的增加有效抑菌成分浸出加快，但当提取溶剂的量增大到一定程度时，大黄的非抑菌成分溶出影响了大黄原液的抑菌效果。因此选取液料比为20:1左右为最佳液料比。

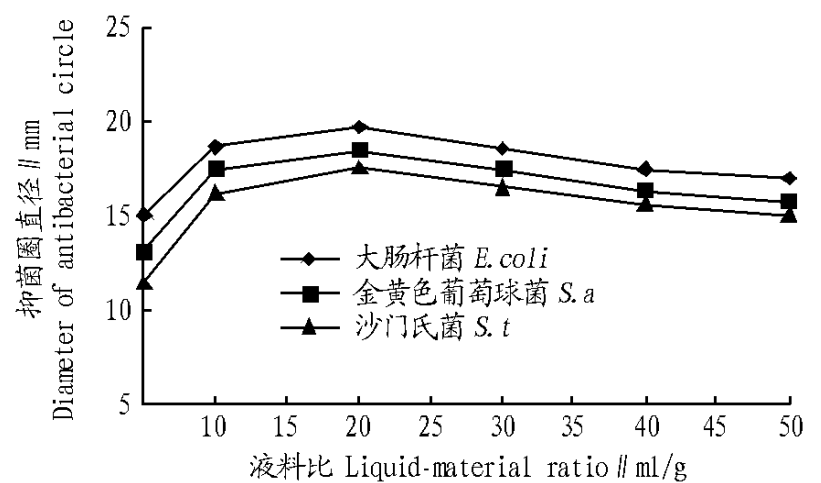


图5 液料比对抑菌效果的影响

Fig.5 The impact of liquid/material ratio on antibacterial effect

2.6 正交试验 在以乙醇作为提取溶剂的条件下选用乙醇浓度、回流提取温度、超声波处理时间、液料比作为考察的4个因素，以抑菌圈直径作为考察指标，根据单因素试验结果，采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验，因素和水平见表1，试验结果见表2。

由表2 中可知,在该试验设定的试验条件范围内,影响抑菌效果各因素主次顺序为B、A、C、D,即主要因素是乙醇浓度和回流温度,超声波处理时间和液料比的影响其次。大黄抑菌物质的最佳提取工艺条件为 $A_2B_1C_2D_2$ 。

2.7 验证试验 进一步对 $A_2B_1C_2D_2$ 的条件进行验证试验,在乙醇浓度70%、回流温度60℃、超声波处理时间35 min、液料比20:1的条件下,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌圈直径分别为20.0、18.9和18.1 mm。

表1 正交试验设计

Table 1 Design for orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	乙醇浓度 % Ethanol concentration (A)	回流提取 温度 Recycling temperature (B)	超声波处 理时间 min Ultrasonic processing time (C)	液料比 ml/g Liquid/ Material ratio (D)
1	60	60	25	10:1
2	70	70	35	20:1
3	80	80	45	30:1

表2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test and results

编号 NO	因素 Factor				抑菌圈直径 mm Diameter of antibacterial circle			平均 Average
	A %	B min	C ml/g	D ml/g	E. coli	S. aureus	S. typhi	
1	1	1	1	1	17.6	16.5	15.8	16.6
2	1	2	2	2	16.9	15.9	15.2	16.0
3	1	3	3	3	16.6	15.3	14.7	15.5
4	2	1	2	3	19.2	18.7	17.8	18.6
5	2	2	3	1	18.7	17.6	15.7	17.3
6	2	3	1	2	18.2	17.4	16.7	17.4
7	3	1	3	2	19.5	18.3	17.6	18.5
8	3	2	1	3	15.8	14.7	13.9	14.8
9	3	3	2	1	18.5	17.4	16.6	17.5
R	1.8	1.9	1.1	1.0				

2.8 提取方法比较 在 $A_2B_1C_2D_2$ 的条件下,直接用常规回流法提取大黄抑菌成分,其提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄

球菌和沙门氏菌的抑菌圈直径分别为14.1、13.5和12.2 mm。由此可以看出,超声波辅助法提取明显优于常规回流法。

3 结论

(1) 选用超声波辅助提取大黄的抑菌物质,不同于以往的常规回流提取。将超声波技术应用于大黄抑菌物质的提取可以大大提高提取效率,节省能源,并且显示出超声波法在天然活性成分的提取中具有广阔的应用前景。

(2) 通过一系列的单因素、正交试验及极差分析得到了最佳提取工艺条件,即乙醇浓度70%、回流温度60℃、超声波处理时间35 min、液料比20:1,在此条件下大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌圈直径分别为20.0、18.9和18.1 mm。

参考文献

- [1] 王玲,张福宝.中草药大黄提取色素的抑菌作用研究[J].食品工业科技,2000,21(6):27-28.
- [2] 屈平,胡传荣.超声波辅助提取苦苣茶中多酚类物质的研究[J].食品与机械,2007,23(2):15-17.
- [3] 胡爱军,郑婕.食品工业中的超声提取技术[J].食品与机械,2004,20(4):57-60.
- [4] 徐燕,刘德清.胡椒中天然防腐剂的提取方法及其抑菌作用研究[J].中国调味品,2007,6(7):57-59.
- [5] 卢成英,徐东翔,杜勇,等.木叶抑菌活性成分提取分离及活性检测[J].食品科学,2005,26(7):40-42.
- [6] 吴周和,吴晓刚,吴传茂.花椒中天然防腐剂的提取及其抑菌作用[J].食品工业,2004(7):18-24.
- [7] 韩文瑜,何昭阳,刘俞斌.病原细菌检测技术[M].长春:吉林科学技术出版社,1992:33-38.
- [8] 乔军,孟庆龄,贾桂珍.运用OD值法进行细菌计数的研究[J].中国家禽,1996(4):26-27.
- [9] 郭学君,文书明.微生物湿法冶金学中生物量测定的有关方法综述[J].国外金属矿选矿,2003(1):8-10.
- [10] 张平.光电比浊法测算顶头孢霉菌斜面孢子数[J].中国药业,2002,11(11):33.
- [11] 陶海静,王老七.鸡大肠杆菌自家苗制备过程中细菌计数方法研究[J].郑州牧业高等专科学校学报,2003,23(3):161-162.
- [12] 姚淑敏.芦荟提取物抑菌作用的研究[J].食品科学,2002,23(4):137-139.
- [13] 张海晖,裘爱泳,刘军海.超声波辅助提取大黄蒽醌类成分[J].食品与生物技术学报,2005,24(4):52-56.
- [14] GAO S Y. Determination of the trace element contents in plants using atomic absorption spectrophotometer[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(2):6-9.
- [15] 李大鹏.添加剂对玉米秸秆青贮质量影响的研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2002(4):65-68.
- [16] ORLY ARDON,ZOHAR KEREM,YITZHAK HADAR. Enhancement of lignin degradation and laccase activity in *Heurctus ostreatus* by cotton stalk extract[J]. Canadian Journal of Microbiology,1998,44(7):676-680.
- [17] 杨炜华.真菌产生的短肽对天然纤维材料的降解作用[J].自然科学进展,2004(11):1230-1236.
- [18] 赵健亚.反刍动物瘤胃真菌在饲料开发上的应用[J].饲料博览,2004(12):21-23.
- [19] WARE R A,CALDERON J F,CORONA L,et al. Case study: Comparative feeding value of rice straw in growing finishing diets for calf-fed holstein steers: Hydrolytic enzyme supplementation[J]. Professional Animal Scientist, 2005, 21(5):416-419.
- [20] 宋安东.杂色云芝产木质纤维素酶及对稻草秸秆的降解[J].过程工程学报,2005(8):414-420.
- [21] 杨永明.微生物发酵秸秆饲料的研究现状及展望[J].饲料工业,2002(2):14-18.
- [22] 孙耀华,杨奎林.纤维素复合酶半干贮秸秆饲料制作与饲喂效果[J].四川畜牧兽医,1997(2):32-33.
- [23] 张山林.秸秆微贮饲料养牛效果研究[J].黄牛杂志,1997(4):34-35.
- [24] 马效林.麦秸微贮与氯化饲喂肉羊对比试验[J].中国草食动物,2004(3):21.
- [25] 逮素芬.效秸秆微生物调制剂发酵农作物秸秆试验[J].内蒙古畜牧科学,2002(3):27.
- [26] 刘兴伟.玉米秸秆微贮饲喂辽宁绒山羊效果观察[J].中国草食动物,2000(2):7.
- [27] 武英.发酵玉米秸秆饲料饲喂肉兔试验[J].山东农业科学,2001(2):41.
- [28] 马一.玉米秸秆微生物发酵饲料及喂猪试验效果[J].河南农业科学,1998(4):31-32.
- [29] 宋金昌,范莉.利用微生物提高秸秆粗蛋白质的试验[J].动物科学与动物医学,2002(1):46-50.
- [30] 张福友.秸秆发酵饲料饲喂生长猪的试验[J].山东畜牧兽医,2001(5):41-42.
- [31] 刘科.酵活杆菌发酵秸秆喂猪效果[J].现代畜牧,2004(4):42.
- [32] 张桂荣.仔鸡饲喂玉米秸秆粉发酵饲料初探[J].中国家禽,2003(14):17-18.
- [33] 陈秀为.复合菌发酵秸秆的理化效应及饲喂效果[J].农业环境科学学报,2004,23(2):45-347.
- [34] 冯仰廉,张子仪.低质粗饲料的营养价值及合理利用[J].中国畜牧杂志,2001(6):3-5.

(上接第161页)