

文章编号: 1008-830X(2014)02-0147-07

# 具有抑菌活性的海藻多酚联合提取工艺优化研究

杨会成<sup>1,2</sup>, 郑斌<sup>1</sup>, 郝云彬<sup>1</sup>, 相兴伟<sup>3</sup>, 周宇芳<sup>1</sup>, 廖妙飞<sup>1</sup>, 李瑞雪<sup>3</sup>

(1. 浙江省海洋开发研究院, 浙江舟山 316021; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003;  
3. 舟山出入境检验检疫局, 浙江舟山 316100)

**摘要:** 采用超声波、微波联合浸提方式提取海藻多酚, 通过正交实验确立了多酚提取工艺条件, 并以平板打孔抑制法测定了海藻多酚粗提物对 7 种细菌和 4 种真菌的抑菌活性。结果表明: 采用料液比(匀浆:乙醇, g/mL)1:7, 乙醇浓度 85%, 浸提温度 70 °C, 浸提次数 2 次, 浸提时间 4 h, 提取效果最佳, 海带多酚提取率为 2.08%。海藻多酚对供试的 2 种革兰氏阳性菌和 5 种革兰氏阴性菌都有一定程度的抑制活性, 量效关系均呈剂量依赖型, 最小抑菌浓度为 10~40 μg/mL。其中对大肠杆菌、绿脓杆菌抑制效果较明显, 对青霉、白色念珠菌亦有抑制作用。

**关键词:** 海藻; 多酚; 提取; 抑菌

中图分类号: R282.77

文献标识码: A

## Study on the Combined Extraction Technology of Algae Polyphenols with Antibacterial Activity

YANG Hui-cheng<sup>1,2</sup>, ZHENG Bin<sup>1</sup>, HAO Yun-bin<sup>1</sup>, et al

(1. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316021; 2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Method of microwave and ultrasonic joint extraction of algae polyphenols was established by orthogonal experiment, and meanwhile antimicrobial activity of polyphenols was carried out in seven kinds of bacteria and four fungi by flat punch. The best process was solid-liquid ratio (homogenized: ethanol, g/mL) 1:7, 85% ethanol concentration, temperature 70 °C, extraction 2 times, extraction 4 h, kelp polyphenols extraction rate 2.08%. Polyphenols had antimicrobial effects on 2 Gram-positive bacteria and five Gram-negative bacteria in a dose-dependent effect relationship type. The minimum inhibitory concentration of 10-40 μg/mL, which showed obvious inhibitory effect on *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium*, *Candida albicans* also inhibited.

**Key words:** algae; polyphenols; extraction; antibacterial

收稿日期: 2013-12-02

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项(2011-2-2-07-3); 浙江省重点科技创新团队项目(2011R09031-13); 国家科技支撑计划项目子课题(2012BAD29B06)

作者简介: 杨会成(1982-)男, 安徽淮南人, 博士研究生, 研究方向: 水产品加工, E-mail: huicheng@163.com

21世纪中国学术电子期刊网, Electronic Publishing House, All Rights Reserved. http://www.cnki.net

海藻生活在特殊生态环境下,在其进化过程中产生了与陆上生物不同的代谢和机体防御系统,普遍含有特殊功能的生物活性物质如酚类、吲哚类、萜烯类等化合物,是海洋天然产物的重要来源。其中海藻多酚是一大类结构不同、含有多羟基的化合物,由多种简单酚结构单元组成。它作为天然食品添加剂中的抗氧化剂、防腐剂等方面具有重要的意义<sup>[1-4]</sup>。此外,海藻多酚还具有抗肿瘤、抗病毒、化学防御、除臭等生物活性。目前,人们已发现海藻多酚在红藻、褐藻、蓝藻、绿藻中均有分布,其中以褐藻中含量较大,种类较多,包括马尾藻、鼠尾藻、海带、海黍子、裙带菜、羊栖菜等。海藻多酚的提取方法主要有极性溶剂提取法、超临界提取法等<sup>[3,6-7]</sup>。但是目前国内外关于海藻多酚提取方法的系统研究报道还不多见。

海带具有分布广、藻体大、生长快等特点,含有多种保鲜成分和功能性物质,是我国优势海洋生物资源,养殖产量居世界首位,但目前对其高值化利用程度低,且加工过程中产生的废弃物对环境也造成很大污染。因此,以海带、鼠尾藻等野生海藻为原料制备海藻多酚保鲜防黑变抑制剂,不但可以克服含硫违法添加剂的使用及残留问题,又能有效抑制甲壳类黑变现象,延长其货架期,提升商品价值,同时提高藻类的附加值。

本文运用超声波、微波等提取手段,通过多种因素分析比较确定海藻多酚的最佳浸提工艺参数,为海藻多酚和海藻的综合利用提供基础技术资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲜海带和鼠尾藻采自于舟山嵊泗,南美白对虾购自于舟山北门水产市场。

金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、痢疾志贺菌、产气肠杆菌、普通变形杆菌、白色念珠菌、青霉、灰霉、黄曲霉,由中科院微生物所提供。

### 1.2 主要试剂

酒石酸钾钠、七水合硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、没食子酸丙酯、无水乙醇,均为分析纯。

无菌生理盐水、营养琼脂培养基、PDA 培养基。

### 1.3 主要仪器设备

分光光度计,超声波清洗器,多功能微波炉,组织捣碎匀浆机,恒温水浴摇床,电热压力蒸汽灭菌器,智能生化培养箱,等。

### 1.4 海藻多酚类物质的提取<sup>[8-12]</sup>

新鲜海藻先用清水洗去表面附着物,自然风下晾干,后用组织匀浆机打碎备用。

称取上述匀浆 200 g,放入烧杯中加入 400 mL 80%乙醇,搅拌均匀,放在超声波处理器或多功能微波炉(设置为低火)中处理一段时间(单一方式使用时间为 6 min,联合使用时各处理 3 min)。再放入 60 ℃水浴摇床中,100 r/min,闭光浸提 1 h。最后抽滤,滤渣重复浸提,合并滤液,再经减压浓缩除去乙醇,浓缩液冷冻干燥即得海藻多酚粗提物。

### 1.5 总酚含量及提取率的测定<sup>[13]</sup>

用没食子酸丙酯配制成 0.5 mg/mL 的对照品标准溶液。

表 1 标准曲线测定实验组  
Tab.1 Standard solution curve

名称	1	2	3	4	5	6
没食子酸丙酯标准溶液	0 mL	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
水	5 mL	4 mL	3 mL	2 mL	1 mL	0 mL
酒石酸铁溶液	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
pH 7.5 磷酸缓冲液	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL	15 mL

混匀,静置 15 min,于 540 nm 波长处测定吸光值 A

取上述浸提液 5.0 mL 加入 25 mL 容量瓶中,自加入酒石酸铁溶液开始按绘制标准曲线的操作步骤操作。以蒸馏水代替试液加入同样试剂作空白,每个样品做三次平行实验,结果取平均值。按公式计算海带多酚的提取率。

$$T(\%)=S \times V / [M \times (1-C)] \times 100\%$$

式中, *S*—海带多酚浓度(mg/mL);

*V*—提取液体积(mL);

*M*—鲜海带质量(mg);

*C*—鲜海带含水率(%)。

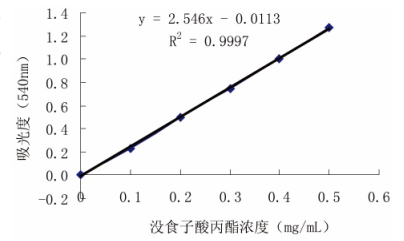


图 1 多酚标准曲线

Fig.1 Polyphenols standard curve

### 1.5 海带多酚抗菌活性测定

制备浓度大约在 105~106 cfu/mL 菌悬液,用移液枪吸取 100 μL 菌悬液,放在已标明样品号的无菌平板上(真菌外加 1mL 浓度为 200 μg/mL 的多酚粗提液),每种菌制备 3 个平板,立即倒入融化后冷却至 50 °C 左右的培养基约 15 mL,随即在平面上快速而轻巧地晃动平皿,使菌悬液(样液)和培养基混合均匀后平置,待其冷却。采用平板生长抑制法进行多酚抑菌活性测定。即在洁净工作台内,将经过紫外线照射杀菌 20 min 后的移液枪装上特制枪头,在已冷却的营养琼脂平板上均匀的打上 5 个直径为 3 mm 的光滑小孔,其中 1 个小孔加 30 μL 无菌蒸馏水作为对照,其余 4 个小孔分别加 30 μL 过滤除菌后的待测液。加完样液后平板静置放置 10 min,以保证待测液分散均匀。将已经加样的含菌平板倒置放入 37 °C(真菌 28 °C)的恒温培养箱中,培养 12~24 h 后观察抑菌结果。

### 1.6 抗菌活性数据分析

细菌测量透明圈的直径,取所测 4 孔抑菌圈直径的平均值,真菌则观察加样平板与未加样对照菌落或菌丝生长状况的差别。以大于空白的抑菌圈直径所对应的多酚浓度(μg/mL)为最低抑菌浓度(MIC),并对所得结果进行统计学分析,所有数据均采用平均值±标准差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取方法比较

从图 2 可以看出,复合处理较无处理和单一方式处理,多酚的浸出率要高,且超声波→微波复合处理效果最好。因为先通过超声波的机械粉碎和空化效应等作用,可使物质分子运动的频率和速度增大,溶剂的穿透力增强,组织内部或胶体里的有效成分溶出速度和溶出数量得到提高<sup>[14-15]</sup>,再辅以微波的生理、物理效应使极性分子随微波频率摆动并产生热量,使体系更加分散,有利于物质的溶出。超声波处理过后的样品更适宜于微波发挥其功效,使原料内部温度在微波辐射下得以全面、快速、均匀升高,从而加快溶剂对多酚的提取过程,大大提高提取的效率。此复合提取法克服了传统方法的缺点,具有操作简便、经济、省时的优点,所以在相同的时间内大大提高了多酚的浸出率<sup>[12]</sup>。因此,最佳前处理方式选择超声波→微波。

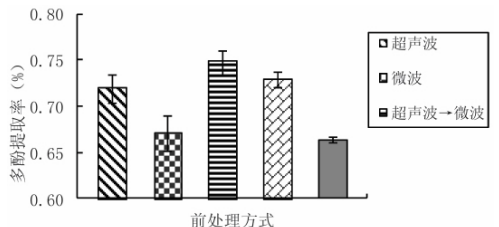


图 2 前处理方式对多酚浸出率的影响

Fig.2 Polyphenols extraction ration of different methods

### 2.2 单因素实验

#### 2.2.1 浸提时间对多酚浸出率的影响

采用超声波→微波前处理方式,固定浸提温度 60 °C,乙醇浓度 80%,料液比(匀浆:乙醇 g/mL)1:4,浸提 2 次的提取条件,观察不同提取时间对海带多酚提取率的影响,结果如图 3。

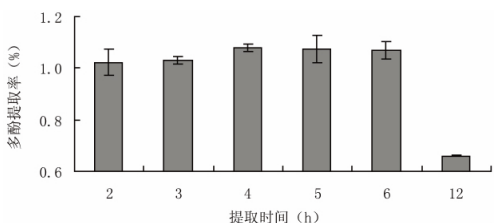


图 3 时间对多酚浸出率的影响

Fig.3 Time on polyphenols extraction rate

下降趋势,这可能是浸提时间太长多酚被氧化或降解的缘故,因此,正交实验中浸提时间范围应选 3.5~5 h。

### 2.2.2 浸提温度对多酚浸出率的影响

采用超声波→微波前处理方式,固定提取时间 4 h,乙醇浓度 80%,料液比(匀浆:乙醇 g/mL)1:4,浸提 2 次的提取条件,观察不同浸提温度对海带多酚提取率的影响,结果如图 4。

从图 4 可以看出,随着温度的升高,多酚的浸出率呈上升趋势,在 20~40 °C 之间时浸出率基本上没有变化,40~80 °C 时浸出率明显升高。这是由于温度升高,分子运动加速,氢键更易断裂,多酚的渗透、溶解、扩散速度也加快,因而酚类物质更易于从原料中溶出。而超过 80 °C 时,浸出率反而降低,可能由于高温下海带多酚类物质易于发生氧化或降解反应。因此,初步确定 60~90 °C 为正交实验的提取温度范围。

### 2.2.3 乙醇浓度对多酚浸出率的影响

采用超声波→微波前处理方式,固定提取时间 4 h,浸提温度 60 °C,料液比(匀浆:乙醇 g/mL)1:4,浸提 2 次的提取条件,观察不同乙醇浓度对海带多酚提取率的影响,结果如图 5。

从图 5 可以看出,匀浆中加入乙醇后,随着乙醇浓度的升高,多酚的浸出率有上升的趋势,但当乙醇浓度超过 80% 后,多酚浸出率呈下降趋势。原因可能是低浓度的乙醇含水量过高,促进了海带中的许多粘性物质和外来水分互溶形成胶团,从而影响浸出率,而高浓度的乙醇挥发性较大,使提取液极性降低,也会影响浸出率。因此,正交实验乙醇浓度应在 75%~90%。

### 2.2.4 料液比对多酚浸出率的影响

采用超声波→微波前处理方式,固定提取时间 4 h,浸提温度 60 °C,乙醇浓度 80%,浸提 2 次的提取条件,观察不同料液比(匀浆:乙醇 g/mL)对海带多酚提取率的影响,结果如图 6。

料液比(匀浆:乙醇 g/mL)是影响多酚浸出率的重要因素之一,适当的料液比不仅能使原料中的多酚物质得到充分提取,而且可减少溶剂的浪费和节省提取成本<sup>[16]</sup>。从图 6 可以看出,随着料液比的增大,多酚的浸出率呈上升趋势但趋势并不明显。且过大的料液比也使得乙醇的用量增加,成本上升,对乙醇的回收不利。因此,初步确定正交实验的料液比(匀浆:乙醇 g/mL)在 1:5~1:8 之间。

### 2.2.5 浸提次数对多酚浸出率的影响

采用超声波→微波前处理方式,固定提取时间 4 h,浸提温度 60 °C,乙醇浓度 80%,料液比(匀浆:乙醇 g/mL)1:7 的提取条件,观察不同浸提次数对海带多酚提取率的影响,结果如图 7。

从图 7 可以看出,提取 3 次时多酚含量最高,随着提取次数的增加,浸出率反而下降,原因可能是由于提取次数过多导致多酚溶出量提高的同时,也将大分子物质如糖、蛋白质等提取出来,多酚与这些大分子物质形成复合物,同时部分多酚也会发生氧化损耗,降低多酚浸出率。所以,正交试验选择提取次数为 1~4 次。

### 2.3 提取条件优化

在单因素实验的基础上,选用 L16(4<sup>3</sup>)设计表格进行正交实验,因素水平见表 2。

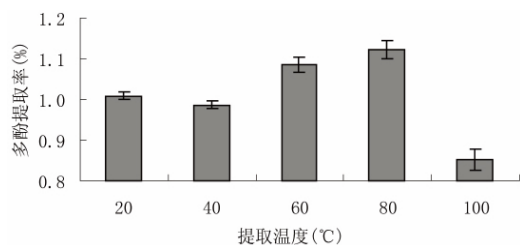


图 4 温度对多酚浸出率的影响

Fig.4 Temperature on on polyphenols extraction rate

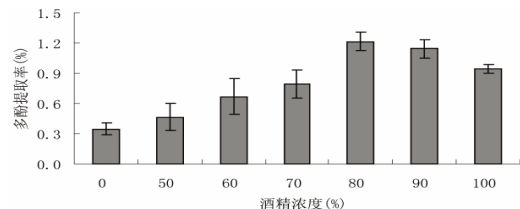


图 5 乙醇浓度对多酚浸出率的影响

Fig.5 Ethanol concentration on polyphenols extraction rate

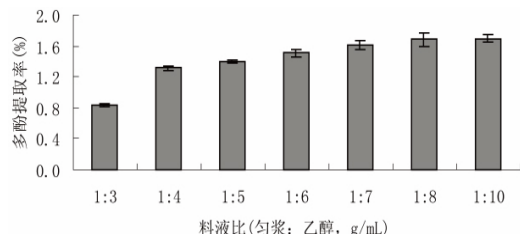


图 6 料液比对多酚浸出率的影响

Fig.6 Solid-liquid ratio on polyphenols extraction rate

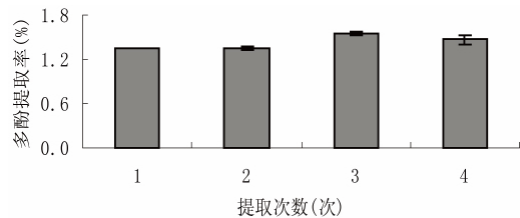


图 7 提取次数对多酚浸出率的影响

Fig.7 Extraction times on polyphenols extraction rate



表 2 因素水平表

Tab.2 Table of factors and levels

水平	A 浸提时间/h	B 浸提温度/°C	C 乙醇浓度/%	D 浸提次数/次	E 料液比 (匀浆:乙醇 g/mL)
1	3.5	60	75	1	1:5
2	4.0	70	80	2	1:6
3	4.5	80	85	3	1:7
4	5.0	90	90	4	1:8

表 3 正交实验结果

Tab.3 Results of orthogonal experiments

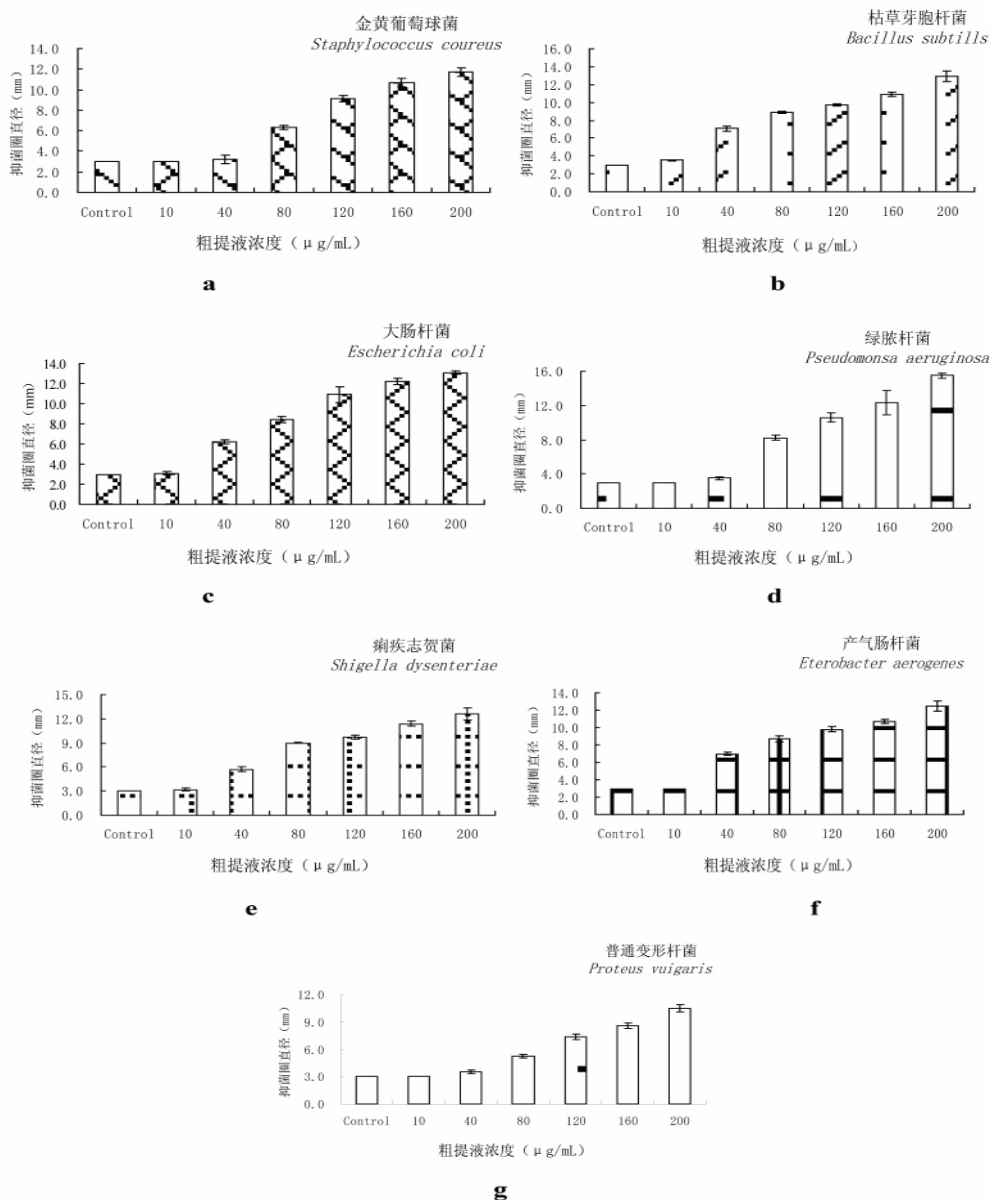
编号	A	B	C	D	E	T/%
1	1	1	1	1	1	0.792 7
2	1	2	2	2	2	1.290 7
3	1	3	3	3	3	1.577 8
4	1	4	4	4	4	1.777 5
5	2	1	2	3	4	1.669 5
6	2	2	1	4	3	1.573 3
7	2	3	4	1	2	1.429 6
8	2	4	3	2	1	1.114 1
9	3	1	3	4	2	1.441 1
10	3	2	4	3	1	1.368 1
11	3	3	1	2	4	1.443 2
12	3	4	2	1	3	1.226 8
13	4	1	4	2	3	1.856 8
14	4	2	3	1	4	1.864 9
15	4	3	2	4	1	1.030 6
16	4	4	1	3	2	0.955 1
R1	1.360	1.440	1.191	1.329	1.076	
R2	1.447	1.524	1.304	1.426	1.279	
R3	1.370	1.370	1.499	1.393	1.559	
R4	1.427	1.268	1.608	1.456	1.689	
R	0.087	0.256	0.417	0.127	0.613	

通过极差分析可知,各因素对多酚浸出率影响的顺序是:料液比 E>乙醇浓度 C>浸提温度 B>浸提次数 D>浸提时间 A,从表中数据看,最佳工艺条件应是 E<sub>4</sub>C<sub>4</sub>B<sub>2</sub>D<sub>4</sub>A<sub>2</sub>,在此条件下,多酚的浸出率为 2.20%。但是,比较相邻两个水平之间的斜率 E<sub>3</sub>、C<sub>3</sub>、D<sub>2</sub> 较高,另外,从经济角度考虑,采用 E<sub>3</sub>、C<sub>3</sub>、D<sub>2</sub> 可以减少工序并降低提取成本,且在 E<sub>3</sub>C<sub>3</sub>B<sub>2</sub>D<sub>2</sub>A<sub>2</sub> 条件下多酚的浸出率为 2.08%,与上述浸出率 2.20%无明显差异。因此,得出多酚提取的最佳条件是: E<sub>3</sub>C<sub>3</sub>B<sub>2</sub>D<sub>2</sub>A<sub>2</sub>,即料液比(匀浆:乙醇 g/mL)1:7,乙醇浓度 85%,浸提温度 70 °C,浸提次数 2 次,浸提时间 4 h。

## 2.4 抗菌试验结果

### 2.4.1 抗细菌试验结果

抑菌实验结果表明, KP 粗提液在一定的浓度下,对供试的 2 种革兰氏阳性菌和 5 种革兰氏阴性菌都有一定程度的抑制活性,但是不同的微生物对其敏感性不同,多酚对革兰氏阴性细菌的抑制效果较明显,又以对大肠杆菌、绿脓杆菌的抑制效果更佳。而且所有细菌对多酚的量效关系均呈剂量依赖型,因而可以开发成一种高效广谱抗菌剂。



a 表示金黄色葡萄球菌 b 表示枯草芽孢杆菌 c 表示大肠杆菌 d 表示绿脓杆菌 e 表示痢疾志贺菌 f 表示产气肠杆菌 g 表示普通变形杆菌  
图 8 不同浓度的粗提液对细菌的抑制作用

Fig.8 Antibacterial effect of different concentration extraction

同时,从图 8 中也可以看出,随着多酚浓度的降低,抑菌效果也明显降低,当浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, KP 粗提液对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和普通变形杆菌的抑菌活性已经不明显。当浓度降至 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,已无抑菌圈, KP 粗提液对大多数供试菌种基本失去抑菌活性。因而可以认为 KP 粗提液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、痢疾志贺菌、产气肠杆菌、普通变形杆菌 7 种供试菌的 MIC 分别为 40、10、10、40、10、40 和 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在此浓度下,它们的抑菌圈直径分别是 3.2、3.5、3.1、3.5、3.2、7.0 和 3.5 mm。

2.4.2 抗真菌试验结果

表 4 中结果显示,供试的 KP 对青霉菌菌丝生长的抑制活性最高,其次是白色念珠菌,对黄曲霉、灰霉菌丝生长的抑制活性较小。而且供试 KP 对青霉、白色念珠菌真菌生长的抑制主要是抑制菌丝和菌落的生长速度,表现为菌落直径比对照减小。但对黄曲霉、灰霉菌的抑制主要表现为菌丝明显比对照稀薄,而菌落直径并未明显减小。海带粗提物抑制真菌菌丝生长的机理尚有待明确。

表 4 粗提液对真菌的抑制作用

Tab.4 Inhibition fungi of algae extraction

菌种	白色念珠菌	青霉	灰霉	黄曲霉	空白
生长状况	++	++	++++	+++	++++

注:“+”越多,表示菌体生长越旺盛,菌丝越长,多酚抑制效果越差。

### 3 结论

通过单因素实验和正交实验确定了超声波、微波复合提取海带多酚类物质的最佳提取工艺条件,即料液比(匀浆:乙醇 g/mL)1:7,乙醇浓度 85%,浸提温度 70 °C,浸提次数 2 次,浸提时间 4 h。在该条件下总多酚的浸出率可以达到 2.08%。

海带多酚粗提液具有广谱抗微生物性能,对供试的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有一定程度的抑制活性,对真菌如青霉、白色念珠菌亦有抑制作用。所有细菌对多酚的量效关系均呈剂量依赖型。另外,多酚对革兰氏阴性细菌的抑制效果较明显,又以对大肠杆菌、绿脓杆菌的抑制效果更佳。粗提液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、痢疾志贺菌、产气肠杆菌、普通变形杆菌 7 种供试菌的 MIC 分别为 40、10、10、40、10、40 和 40  $\mu\text{g/mL}$ 。将超声波、微波技术应用于海带中多酚类活性物质的提取,可获得较好的效果,具有广阔的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 范晓,严小军,陈予敏,等.高分子量褐藻多酚抗氧化性质研究[J].水生生物学报,1999,23(5):494-499.
- [2] 吕志华,于广利,迟连利,等.海黍子多酚对亚油酸甲酯氧化的抑制作用[J].中国海洋药物,2001,(6):2-28.
- [3] 魏玉西,于曙光.两种褐藻乙醇提取物的抗氧化活性研究[J].海洋科学,2002,26(9):49-51.
- [4] YAN X J, LI X C, ZHOU C X, et al. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjllmanianum* [J]. Appl phycol, 1996, 8: 201-203.
- [5] 魏玉西,牛锡珍,李智恩,等.褐藻中多酚化合物的研究进展[J].海洋科学,2002,26(10):18-20.
- [6] JORMALAINEN V, HONKANEN T, VESAKOSKI O, et al. Polar extracts of the brown alga *Fucus vesiculosus* (L.) reduce assimilation efficiency but do not deter the herbivorous isopod *Idotea baltica* (Pallas)[J]. Exp Mar Biol Ecol, 2005, 317: 143-157.
- [7] VAHER M, KOEL M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis[J]. Chromatogr A, 2003, 990: 225-230.
- [8] 周贞兵,王士长.马尾藻多糖与多酚的提取及其活性研究[D].南宁:广西大学,2002.
- [9] PEKIC B, KOVAC V, ALONSO E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape Seeds[J]. Food Chem, 1998, 61(12): 201-2066.
- [10] 李华.超声波法从葡萄籽中提取多酚的研究[J].酿酒科技,2005(5):89-91.
- [11] 覃勇军,黄道战,石灵高,等.微波萃取茶叶中茶多酚的工艺改进[J].广西民族学院学报:自然科学版,2002,8(4):36-38.
- [12] 张熊祿,陈厚辉,史燃云,等.微波法从茶叶中提取茶多酚[J].林产化工通讯,2001,35(5):20-22.
- [13] 张铁英.红豆中多酚类物质的提取及其含量测定的研究[J].中国食品添加剂,2004(15):99-100.
- [14] 陈素艳,邓清莲,巫晶晶,等.超声波法从茶叶中提取茶多酚[J].渤海大学学报,2005,26(4):316-319.
- [15] 刘清,姚惠源,杨赟,等.超声法提取大麦多酚类活性物质的研究[J].食品科技,2006(5):26-29.
- [16] 贾冬英,李尧,姚开,等.香蕉皮中多酚的提取工艺条件研究[J].四川大学学报:工程科学版,2005,37(6):52-55.