

石花菜醇提物提取工艺及抗氧化、抗菌活性研究

王奇升¹, 但阿康¹, 罗海涛¹, 田永奇^{1*}, 汪少芸¹, 邓尚贵²

(¹福州大学生物科学与工程学院 福州 350108

²浙江海洋大学食品与药学学院 浙江舟山 316000)

摘要 在单因素实验基础上,通过响应面法优化石花菜醇提物的提取工艺。将石花菜醇提物经石油醚、乙酸乙酯和正丁醇依次萃取,研究不同萃取相的抗氧化和抑菌活性。结果表明,石花菜醇提物的最佳提取工艺为:60%乙醇溶液、料液比 1:35、提取时间 64 min、超声功率 350 W、提取温度 55 ℃。在此条件下,石花菜醇提物得率为 0.0165 g/g, DPPH 自由基清除率为 58.29% (质量浓度 2 mg/mL)。不同萃取相抗氧化和抗菌活性均具有浓度依赖性,其中乙酸乙酯相活性最强,清除 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和羟基自由基的 IC₅₀ 值分别为 672.4, 14.1, 599.7 μg/mL。对金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 156.3, 156.3 μg/mL, 最小杀菌浓度 (MBC) 分别为 625, 312.5 μg/mL。

关键词 石花菜; 醇提物; 抗氧化; 抗菌活性

文章编号 1009-7848(2023)01-0171-13 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.01.017

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 通过正常的代谢活动产生。当 ROS 过量时, 机体氧化-还原平衡被打破, 产生氧化应激反应, 并且 ROS 过量会导致衰老, 以及增加各种人类疾病的风险。因此, 维持机体 ROS 水平处于动态平衡至关重要^[1]。在国内发生的食品安全问题中, 最为严重的是由微生物污染造成的食物中毒, 现有研究表明, 我国约 81% 的食源性疾病由食用不洁食品导致细菌感染引起, 细菌性食源性疾病年发病量超过 9 400 万例次^[2]。清除和控制食品接触表面的食源性致病菌显得尤为重要。

石花菜 (*Gelidium amansii*) 属于石花菜科 (Gelidiaceae) 石花菜属 (*Gelidium*), 分布在我国福建、浙江、山东和台湾等沿海地区^[3]。石花菜生长于低潮带下 2~4 m 处的珊瑚礁上, 是温带重要的经济性海藻^[4]。石花菜中含有丰富的蛋白质、多糖和脂肪酸等, 在食品、生物技术和美容等领域都得到广泛应用^[5]。石花菜可药食两用, 具有清热解毒、抗肿瘤和防便秘等功效, 闽南地区将其制成石花膏食用, 山东地区则制成美味的凉粉^[6-7]。石花菜作为全球的经济红藻之一, 其研究主要集中在多糖等大分子, 醇溶性小分子等成分常被当作副产物而

丢弃。其实, 石花菜醇提物有很高的利用价值, 其蕴含的化合物很可能作为功能食品或药品的先导物。Seo 等^[8]及 Lee 等^[9]研究发现石花菜醇提物能有效抑制活性氧的生成。王慧等^[10]研究发现石花菜多糖对糖尿病大鼠有降血糖作用。此外, 林雄平等^[11]研究发现石花菜提取物对黑曲霉有较强的抑制作用。

本研究以石花菜为原料, 通过单因素实验和响应面法探究石花菜醇提物的提取工艺, 比较石花菜醇提物不同萃取相清除 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基和羟基自由基的能力, 并探究其对食源性致病菌的抑菌活性, 为石花菜高值化利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

石花菜来自于福建福州、漳州海域; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2-联氨-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS), 上海源叶生物科技有限公司; 酶标板 (96 孔), 上海百千生物科技有限公司; 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) CMCC (B) 26003、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) CICC 21528、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) ATCC 8739、弗尼斯弧菌 (*Vibrio furnissii*) ATCC 35016, 保藏于福州大学生物科学与工程学院。

收稿日期: 2022-01-23

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2020YFD0900900)

第一作者: 王奇升, 男, 硕士生

通信作者: 田永奇 E-mail: tian.yongqi@fzu.edu.cn

1.2 仪器与设备

超声清洗仪(KQ5200DE),昆山超声仪器有限公司;旋转蒸发仪(RE-52AA),上海亚荣生化仪器厂;超纯水机(QYSW-10A),宝尔水处理有限公司;电子天平(HZK-FA2105),梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;pH计(FE20),河南爱博科技发展有限公司;紫外可见分光光度计(Genesys10s),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;粉碎机(RS-FS1406),合肥荣事达小家电有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备 用清水漂洗石花菜后,置于阴凉处自然风干。称取 1 kg 石花菜,用粉碎机将其打碎,制成石花菜粉末,过 100 目筛,得石花菜粗粉。称取该粗粉,按比例与不同体积分数的乙醇溶液混合,在不同温度下,超声浸提不同时间,浸提结束后,8 500 r/min 离心 10 min,取上清液减压浓缩后,获得石花菜醇提物。以石花菜醇提物得率及 DPPH 自由基清除率(质量浓度为 2 mg/mL)为指标进行工艺优化。

1.3.2 单因素实验

1.3.2.1 乙醇体积分数的选择 称取 10 g 石花菜粗粉,以 1:25 的料液比加入体积分数分别为 40%,50%,60%,70%,80%的乙醇溶液,搅拌均匀后在超声波功率为 300 W,45 °C 下,恒温搅拌提取 40 min。

1.3.2.2 料液比的选择 准确称取 10 g 石花菜粗粉,分别以 1:20,1:25,1:30,1:5,1:40 的料液比,加入体积分数为 60%的乙醇溶液,搅拌均匀后,在超声波功率为 300 W,45 °C 下,恒温搅拌提取 40 min。

1.3.2.3 超声时间的选择 准确称取 10 g 石花菜粗粉,以 1:35 的料液比加入体积分数为 60%的乙醇溶液,45 °C 下,恒温搅拌分别处理 20,40,60,80,100 min。

1.3.2.4 超声功率的选择 准确称取 10 g 石花菜粗粉,以 1:35 的料液比加入体积分数为 60%的乙醇溶液,45 °C 下,分别选用不同超声波功率 200,250,300,350,400 W 处理 60 min。

1.3.2.5 提取温度的选择 准确称取 10 g 石花菜粗粉,以 1:35 的料液比加入体积分数为 60%的乙

醇溶液,分别在 25,35,45,55,65 °C 下,选用超声波功率 350 W 处理 60 min。

1.3.3 响应面试验设计 参照文献[12]和[13]利用 Design-Expert V8.0.6 进行 Box-Behnken 设计响应面试验,以单因素实验结果为基础,以提取时间(A)、超声波功率(B)和提取温度(C)为自变量,响应值分别选择醇提物得率(Y_1)和 DPPH 自由基清除率(Y_2),采用 3 因素 3 水平星点设计-响应面分析法拟合模型,得出最佳工艺参数。响应面因素和水平取值见表 1。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factor levels of response surface methodology

因素	水平		
	-1	0	1
A(时间/min)	40	60	80
B(功率/W)	300	350	400
C(温度/°C)	45	55	65

1.3.4 石花菜醇提物体外抗氧化活性分析

1.3.4.1 样品溶液配制 使用 DMSO 溶解样品,配制成 2 mg/mL。

1.3.4.2 DPPH 自由基清除能力测定 参照文献[14]和[15]中的检测方法并做适当调整。将 DPPH 用乙醇溶解并用磁力搅拌器搅拌 30 min,于 A_{517nm} 处调节吸光度为 0.5~0.6,采用二倍稀释法,配制不同浓度的石花菜醇提物溶液。100 μ L 样品溶液中加入 100 μ L 的 DPPH 混匀后记为 A_1 样品组。100 μ L 样品溶液中加入 100 μ L 乙醇记为 A_2 参比组。100 μ L 的 DPPH 中加入 100 μ L 乙醇混匀后记为 A_0 空白组。25 °C 避光条件下静置孵育 30 min,517 nm 波长处测定吸光值。按公式(1)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中, A_1 ——样品组测定吸光值; A_2 ——样品参比组测定吸光值; A_0 ——空白组测定吸光值。

1.3.4.3 ABTS⁺自由基清除率的测定 参照文献[16]中的测定方法做适当修改。配制 ABTS⁺自由基工作溶液。采用二倍稀释法,配制不同浓度的石花菜醇提物溶液。100 μ L 样品溶液中加入 100 μ L ABTS⁺自由基工作溶液,快速振荡混匀,25 °C 避光孵育 10 min,在 734 nm 波长处测定吸光值 A_p 。同

时用甲醇试剂代替 ABTS⁺自由基工作液,其所测吸光值记为 A_c ;用甲醇试剂代替样品溶液,作为空白组对照组,其所测吸光值记为 A_{max} 。用甲醇试剂调零。所得结果按公式(2)计算:

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_p - A_c}{A_{max}}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中, A_p ——样品工作液组吸光度; A_c ——样品工作液参比组吸光度; A_{max} ——空白对照组吸光度。

1.3.4.4 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力测定 参照文献[17]中的检测方法并做适当调整。0.5 mL 样品与 150 μL FeSO_4 (8 mmol/L), 0.5 mL 水杨酸(3 mmol/L)和 125 μL H_2O_2 (20 mmol/L)混合,并在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 30 min。用水冷却后,添加 225 μL 蒸馏水以使总体积达到 1.5 mL,然后以 3 000 r/min 离心 10 min。在 510 nm 波长处测量上清液的吸光度,并且使用甲醇代替样品作为空白对照 A_0 。所得结果按公式(3)计算:

$$\text{羟自由基}(\cdot\text{OH})\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中, A_0 ——空白组吸光度; A_i ——样品组吸光度。

1.3.5 石花菜醇提物不同溶剂萃取相抗氧化活性测定

1.3.5.1 石花菜醇提物不同溶剂萃取相的制备

将制备的石花菜醇提物分别加入石油醚、乙酸乙酯和正丁醇中萃取,4 000 r/min 条件下,离心 10 min,取上清液,蒸发浓缩至近干,DMSO 溶解配制成 40 mg/mL 萃取相溶液,4 $^\circ\text{C}$ 冷藏保存备用。

1.3.5.2 DPPH 自由基清除能力的测定 参见 1.3.4.2 节的方法。

1.3.5.3 ABTS⁺自由基清除率的测定 参见 1.3.4.3 节的方法。

1.3.5.4 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率的测定 参见 1.3.4.4 节的方法。

1.3.6 石花菜醇提物不同溶剂萃取相的抑菌活性评价

1.3.6.1 抑菌圈测定 参考文献[18]中的检测方法并做适当调整。将石花菜醇提物不同溶剂萃取相溶于 DMSO,配制样品质量浓度为 10 mg/mL。分为石油醚萃取相、乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相

和剩余的水相。试验中细菌培养用 LB 培养基,将已灭菌好的固体培养基趁热倾注入培养皿内,在无菌条件下吸取菌液 0.1 mL 滴在培养皿内摇匀。待平板凝固后用无菌打孔器(直径 6 mm)在平板上打孔,用无菌镊子小心挑去培养基以做成圆孔,向孔中注入 10 μL 样品,细菌放置 37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h。测量抑菌圈直径,每组样品重复 3 次,得出抑菌圈直径平均值。

1.3.6.2 MIC 和 MBC 参照文献[19]中的检测方法并做适当调整,采用二倍稀释法测定石花菜醇提物石油醚相和乙酸乙酯相对金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌的 MIC,设立只加菌液的阳性对照组,只加石花菜醇提物不同溶剂萃取相的阴性对照组,只加培养基的空白对照组,37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h 后,肉眼观测,所有透明且澄清的 96 孔板中,含最小的石花菜醇提物不同萃取相浓度的 96 孔板所设定的浓度值,即为 MIC。采用斜面滴液法测定 MBC,从 MIC 试验中所有澄清的试管中吸取 0.05 mL 点滴到琼脂固体培养基上,37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后观察,无菌落生长的培养基区域所对应的萃取相浓度为 MBC。

1.3.6.3 抑菌成分对菌生长曲线的影响 参照文献[20]和[21]中的检测方法并做适当调整,将处于对数生长期的食源性致病菌,用 LB 肉汤稀释至吸光度为 0.06~0.08 之间(LB 肉汤调零)。吸取 1 mL 菌液到 30 mL 的 LB 肉汤中,加入样品并使其浓度为 MIC。并将 LB 肉汤设置为空白组。置于恒温摇床中 37 $^\circ\text{C}$,180 r/min 培养。每隔 2 h,测定各组吸光度。

1.3.7 数据分析 所有试验重复 3 次,结果表示为“平均值 \pm 标准偏差”。Design-Expert V8.0.6 Box-Behnken 设计原理进行响应面表格的制作,GraphPad Prism 8 绘制各影响因素间的互作图,最后利用 SPSS 19.0 进行概率单位分析得出 IC_{50} ,并且对全部数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 单因素分析

2.1.1 乙醇体积分数对醇提物得率及 DPPH 自由基清除率的影响 由图 1a 可知,当乙醇体积分数为 60%时,石花菜醇提物得率达到最大值 0.0149

g/g, DPPH 自由基清除率达到最大值 57.52%。因此, 石花菜醇提物提取的最适乙醇体积分数为 60%。

2.1.2 料液比对醇提物得率及 DPPH 自由基清除率的影响 由图 1b 可知, 当料液比为 1:35 时, 石花菜醇提物得率达到最大值 0.0145 g/g, DPPH 自由基清除率也达到最大值 56.48%。因此, 石花菜醇提物提取的最适料液比为 1:35。

2.1.3 超声波处理时间对醇提物得率及 DPPH 自由基清除率的影响 由图 1c 可知, 当超声波处理时间为 60 min 时, 石花菜醇提物得率达到最大值 0.0149 g/g, DPPH 自由基清除率也达到最大值 56.37%。因此, 石花菜醇提物提取的最适超声波处

理时间为 60 min。

2.1.4 超声波处理功率对醇提物得率及 DPPH 自由基清除率的影响 由图 1d 可知, 当超声波处理功率为 350 W 时, 石花菜醇提物得率达到最大值 0.0163 g/g, DPPH 自由基清除率也达到最大值 61.43%。因此, 石花菜醇提物提取的最适超声波处理功率为 350 W。

2.1.5 浸提温度对醇提物得率及 DPPH 自由基清除率的影响 由图 1e 可知, 当浸提温度为 55 °C 时, 石花菜醇提物得率达到最大值 0.0157 g/g, DPPH 自由基清除率也达到最大值 58.77%。因此, 石花菜醇提物提取的最适浸提温度为 55 °C。

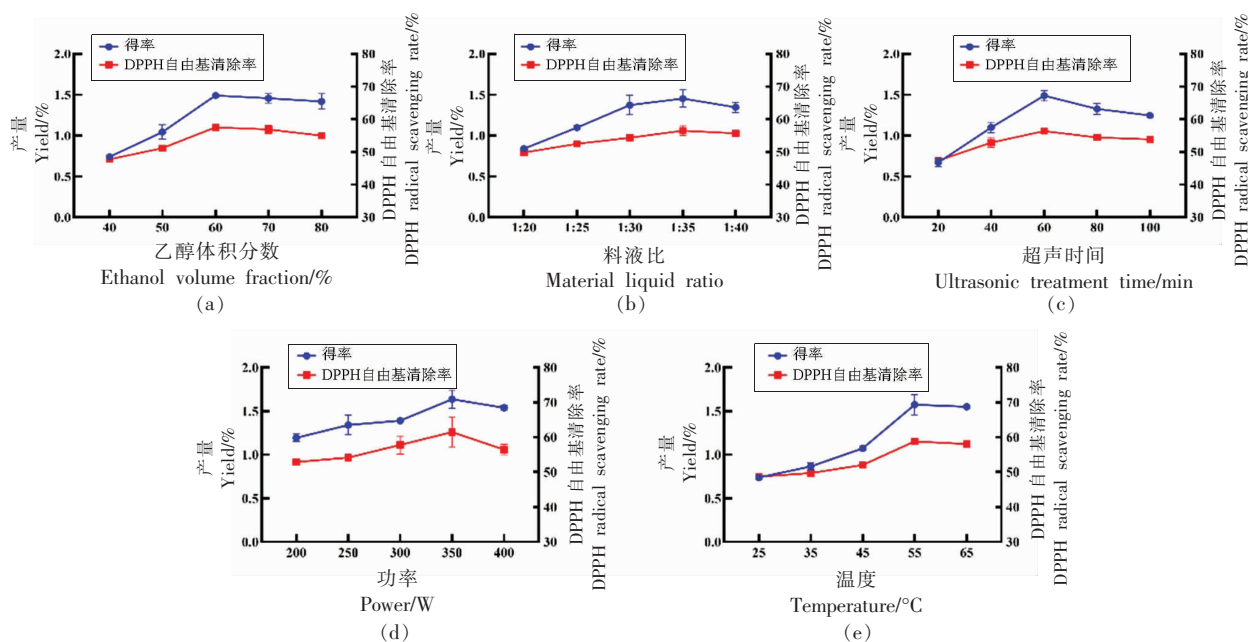


图 1 不同因素对石花菜醇提物得率和 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 Effects of different factors on the yield and DPPH radical scavenging rate of *G. amansii* ethanol extract

2.2 响应面试验结果

2.2.1 试验设计与分析 利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 的数据进行多元回归拟合, 得到石花菜醇提物得率(Y_1)和 DPPH 自由基清除率(Y_2)对提取时间(A)、超声功率(B)和提取温度(C)的二次多元回归模型。

$Y_1 = 1.67 + 0.0961A + 0.2108B + 0.0271C - 0.0525AB - 0.0083AC - 0.0475BC - 0.3620A^2 - 0.4652B^2 - 0.2995C^2, R^2 = 0.9969$ 。

$Y_2 = 58.37 + 1.10A + 2.43B + 0.3731C + 1.05AB + 0.0668AC - 0.0397BC - 2.01A^2 - 7.04B^2 - 3.32C^2, R^2 = 0.9922$ 。

回归模型 Y_1 的 R^2 和 Y_2 的 R^2 接近于 1, 说明该模型可以较好地拟合。

由表 3 可知, 回归模型的 $P < 0.0001$, 得知模型所得方程与实际数据非常拟合, 可用该模型设计试验, 优化石花菜醇提物得率提取工艺。根据 Y_1 发现, 该拟合方程 F 检验极显著 ($P < 0.0001$), 各种

表 2 响应面分析优化

Table 2 Optimization of response surface analysis

序号	A(时间/ min)	B(功率/ W)	C(温度/ ℃)	Y_1 (得率/ %)	Y_2 (DPPH 自由基清 除率/%)	序号	A(时间/ min)	B(功率/ W)	C(温度/ ℃)	Y_1 (得 率/%)	Y_2 (DPPH 自由基清 除率/%)
1	60	300	45	0.60	44.87	10	60	350	55	1.63	58.95
2	40	400	55	1.01	49.66	11	40	300	55	0.52	47.60
3	80	300	55	0.78	46.88	12	80	350	65	1.14	55.03
4	60	400	65	1.11	51.07	13	60	400	45	1.15	50.49
5	60	350	55	1.69	58.48	14	60	300	65	0.75	45.61
6	40	350	65	0.93	51.88	15	80	350	45	1.10	54.06
7	40	350	45	0.86	51.18	16	80	400	55	1.06	53.15
8	60	350	55	1.69	58.10	17	60	350	55	1.66	58.25
9	60	350	55	1.67	58.08						

表 3 石花菜醇提物得率方差分析表

Table 3 Analysis of variance of yield of *G. amansii* ethanol extract

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.5	9	0.2781	247.92	<0.0001	**
A(时间)	0.0739	1	0.0739	65.90	<0.0001	**
B(功率)	0.3553	1	0.3553	316.79	<0.0001	**
C(温度)	0.0059	1	0.0059	5.25	0.0557	
AB	0.011	1	0.011	9.83	0.0165	*
AC	0.0003	1	0.0003	0.24	0.6373	
BC	0.009	1	0.009	8.05	0.0252	*
A ²	0.5517	1	0.5517	491.85	<0.0001	**
B ²	0.9113	1	0.9113	812.47	<0.0001	**
C ²	0.3776	1	0.3776	336.67	<0.0001	**
残差	0.0079	7	0.0011			
失拟项	0.005	3	0.0017	2.39	0.2099	
纯误差	0.0028	4	0.0007			
总和	2.51	16				
R ²	0.9969	R ² _{Adj}	0.9929			

注:*. $P < 0.05$ 为显著; **. $P < 0.01$ 为极显著。R². 决定系数; R²_{Adj}. 调整后的决定系数。

因素之间存在着一定的交互作用。其中 A、B、A²、B² 和 C² 影响极为显著 ($P < 0.01$), AB、BC 影响显著 ($P < 0.05$)。根据模型方差分析中可知 A、B 和 C 的 F 值分别为 65.90, 316.79, 5.25, 在因素水平内, 3 个因素对石花菜醇提物得率的影响顺序为超声波功率(B) > 提取时间(A) > 提取温度(C)。考虑各因素的交互作用, 对石花菜醇提物得率的影响顺序为 AB > BC > AC。

从表 4 可知, 回归模型的 $P < 0.0001$, 得知模型

所得方程与实际数据非常拟合, 可用该模型设计试验, 优化石花菜醇提物的 DPPH 自由基清除率提取工艺。3 个因素对石花菜醇提物的 DPPH 自由基清除率的影响机理复杂。根据 Y² 发现, 该拟合方程 F 检验极显著 ($P < 0.0001$), 各种因素之间存在着一定的交互作用。其中 A、B、A²、B²、C² 影响极为显著 ($P < 0.01$), AB 影响显著 ($P < 0.05$)。根据模型方差分析中可知 A、B、C 的 F 值分别为 24.19, 117.52, 2.78, 在因素水平内, 3 个因素对石

花菜醇提物的 DPPH 自由基清除率的影响顺序为超声波功率(B)>提取时间(A)>提取温度(C)。考

虑各因素的交互作用,对石花菜醇提物的 DPPH 自由基清除率的影响顺序为 AB>AC>BC。

表 4 石花菜醇提取物 DPPH 自由基清除率方差分析表

Table 4 Analysis of variance on DPPH radical scavenging rate of *G. amansii* ethanol extract

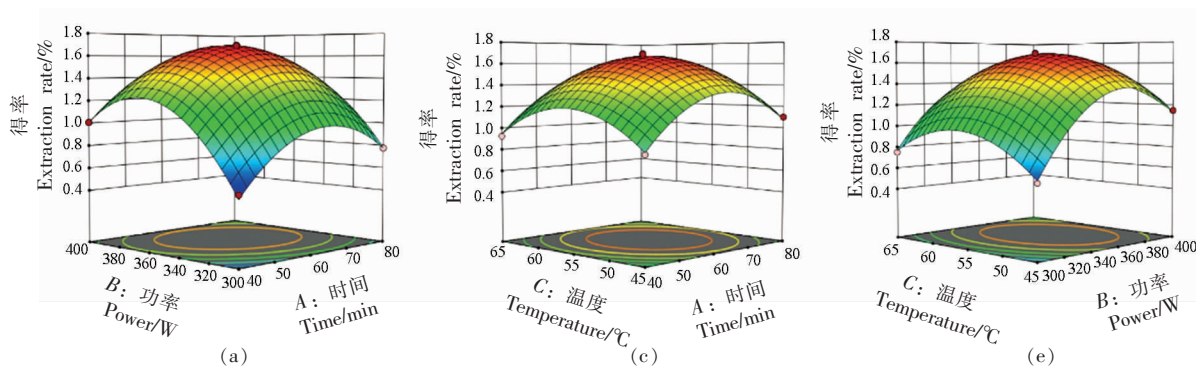
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	356.81	9	39.65	98.89	< 0.0001	**
A(时间)	9.7	1	9.7	24.19	0.0017	**
B(功率)	47.11	1	47.11	117.52	< 0.0001	**
C(温度)	1.11	1	1.11	2.78	0.1395	
AB	4.43	1	4.43	11.05	0.0127	*
AC	0.0179	1	0.0179	0.04	0.8388	
BC	0.0063	1	0.0063	0.02	0.9037	
A ²	17.01	1	17.01	42.42	0.0003	**
B ²	208.6	1	208.6	520.34	< 0.0001	**
C ²	46.43	1	46.43	115.82	< 0.0001	**
残差	2.81	7	0.4009			
失拟项	2.28	3	0.7614	5.83	0.0607	
纯误差	0.5221	4	0.1305			
总和	359.62	16				
R ²	0.9922	R ² _{Adj}	0.9822			

注:*. $P < 0.05$ 为显著; **. $P < 0.01$ 为极显著。R². 决定系数; R²_{Adj}. 调整后的决定系数。

2.2.2 因素间交互作用 3 个因素中固定其中一个因素,分析另外 2 个因素,得到相应的响应曲面。根据拟合的二次多项式模型,使用 Design-Expert 8.0.6 软件绘制二维等高线图和三维效应图,根据提取时间、超声波功率和提取温度 3 个因素构成的响应面图,可以直观地反映两因素交互作用对石花菜醇提取物得率和 DPPH 自由基清除率的影响。

2.2.2.1 提取时间(A)、超声波功率(B)和提取温度(C)对石花菜醇提取物得率(Y₁)的影响 根据图

2 可以直观地看出各因素交互作用对石花菜醇提取物得率的影响,若曲面越陡峭,表明响应值对于操作条件的改变越显著,此因素的交互作用对石花菜醇提取物得率影响越大;反之曲面坡度越平缓,操作条件的改变对响应值的影响也就越小。温度在 0 水平时,超声功率在 350 W 附近时,随着提取时间的延长,石花菜醇提取物得率先上升后下降;超声功率在 0 水平时,时间在 60 min 附近时,随着温度的升高,石花菜醇提取物得率先上升后下降;提取时间在 0 水平时,温度在 55 °C 附近时,随着超声功



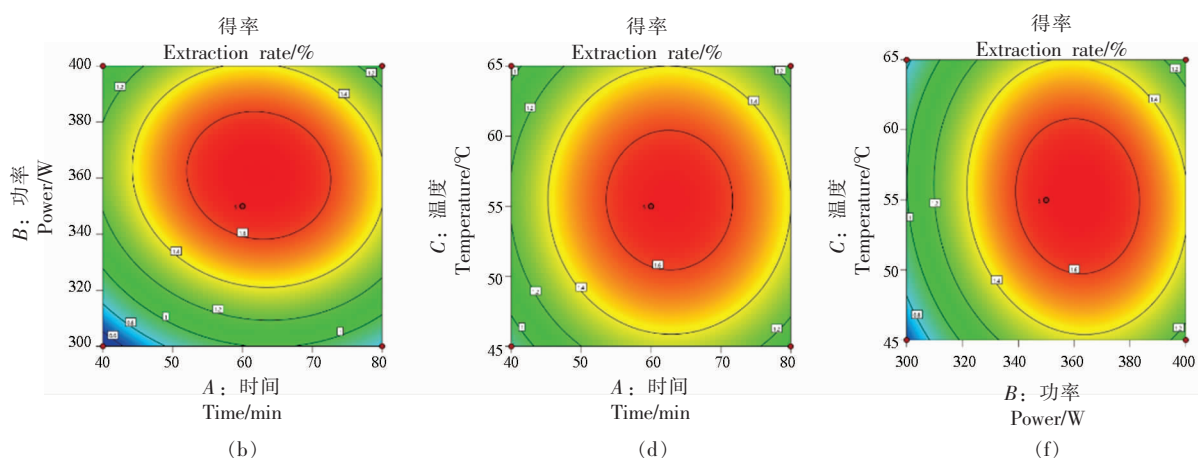


图 2 等高线图和响应面图

Fig.2 Contour plot and response surface plot

率的增加,石花菜醇提物得率先上升后下降。超声功率与时间交互作用对石花菜醇提物得率影响更为显著。

2.2.2.2 提取时间(A)、超声波功率(B)和提取温度(C)对石花菜醇提物 DPPH 自由基清除率(Y₂)

的影响 根据图 3 可以直观地反映出各因素交互作用对石花菜醇提物 DPPH 自由基清除率的影响。温度在 0 水平时,超声功率在 350 W 附近时,随着提取时间的延长,石花菜醇提物 DPPH 自由基清除率先升高后降低;超声功率在 0 水平时,时

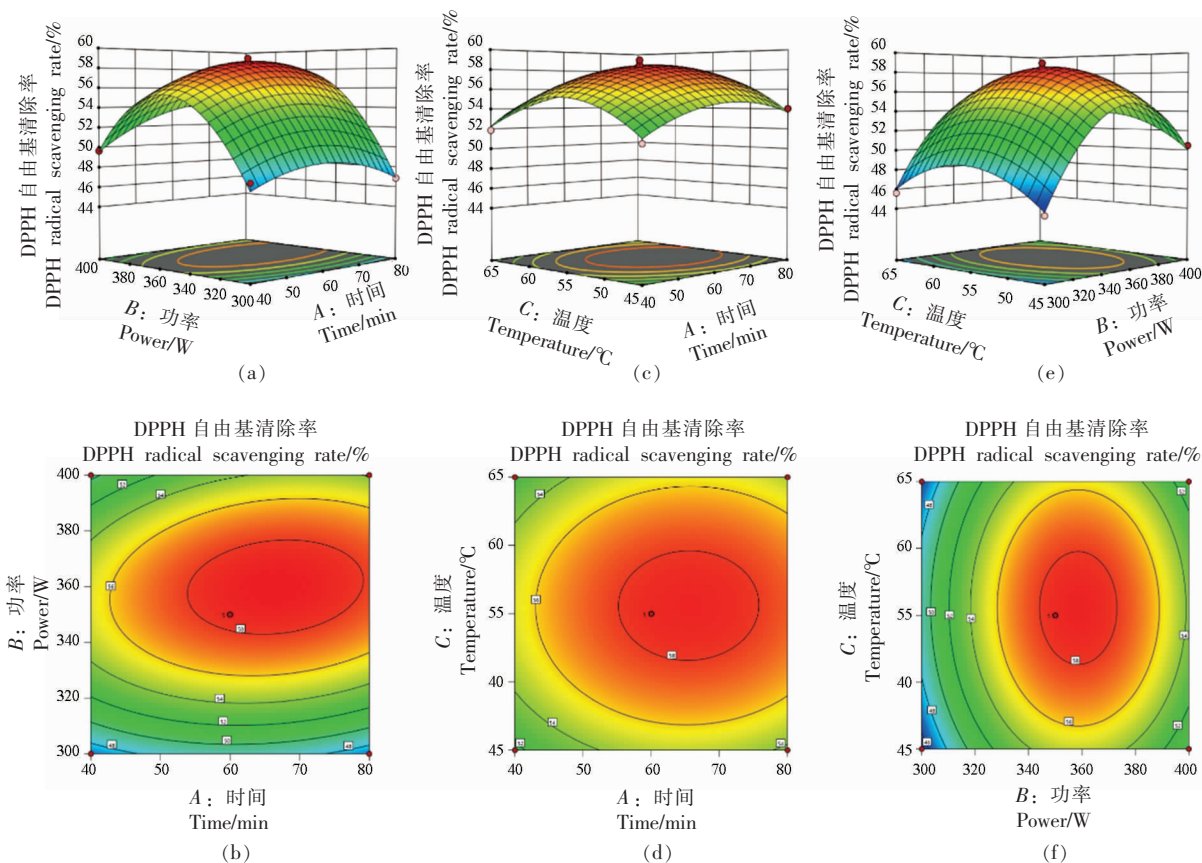


图 3 等高线图和响应面图

Fig.3 Contour plot and response surface plot

间在 60 min 附近时,随着温度的升高,石花菜醇提取物 DPPH 自由基清除率先升高后降低;提取时间在 0 水平时,温度在 55 °C附近时,随着超声功率的增加,石花菜醇提取物 DPPH 自由基清除率先升高后降低。超声功率与时间交互作用对石花菜醇提取物 DPPH 自由基清除率影响更为显著。

2.2.3 验证试验 该试验设计优化后的最佳提取工艺条件为:提取时间 63.71 min, 超声功率 359.89 W,提取温度 55.42 °C。结合试验条件的可行性,将实际操作改良为提取时间 64 min,超声功率 350 W,提取温度 55 °C,在此条件下重复 3 次试验,石花菜醇提取物的得率为 0.0165 g/g($n=3$),石花菜醇提取物 DPPH 自由基清除率为 58.29%($n=3$)与理论得率接近,表明响应面优化得到的提取条

件可用于提高石花菜醇提取物得率与 DPPH 自由基清除率。

2.3 石花菜醇提取物不同溶剂萃取相抗氧化活性分析

2.3.1 石花菜醇提取物不同溶剂萃取相对 DPPH 自由基清除作用的比较 由图 4a 可知,质量浓度为 0~10 mg/mL 时,石花菜醇提取物不同溶剂萃取相清除 DPPH 自由基能力随质量浓度增大而增大。由图 4b 可知,乙酸乙酯萃取相清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 最小,为 672.4 $\mu\text{g/mL}$ 。正丁醇萃取相、石油醚萃取相和萃取后剩余的水相, IC_{50} 分别为 1 759.4, 3 372.9, 3 461.2 $\mu\text{g/mL}$ 。综上,乙酸乙酯萃取相清除 DPPH 自由基能力最好,水相清除 DPPH 自由基能力最弱。

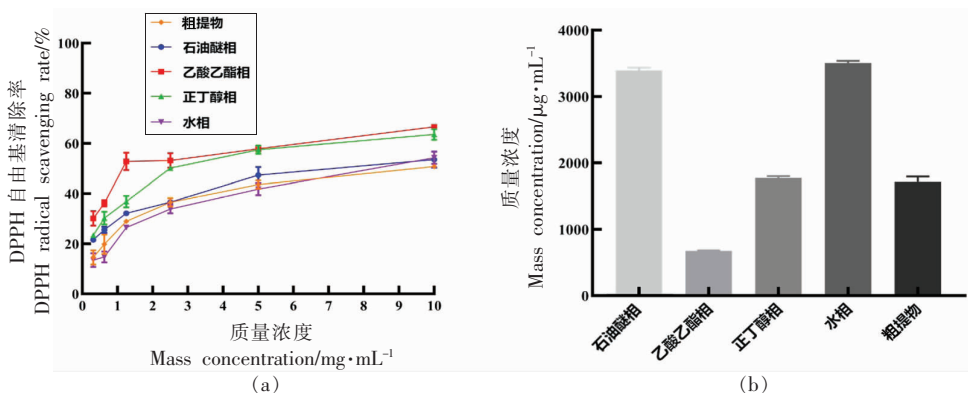


图 4 不同溶剂萃取相清除 DPPH 自由基能力及 IC_{50}

Fig.4 DPPH radical scavenging ability and IC_{50} of different solvent extraction phases

2.3.2 石花菜醇提取物不同溶剂萃取相对 ABTS⁺自由基清除作用的比较 由图 5a 可以看出,质量浓度为 0~0.35 mg/mL 时,石花菜醇提取物不同溶剂萃

取相随着质量浓度增加,萃取相清除 ABTS⁺自由基能力增强,当达到 0.2 mg/mL 时,清除率均大于 80%,此后,清除 ABTS⁺自由基能力随质量浓度增

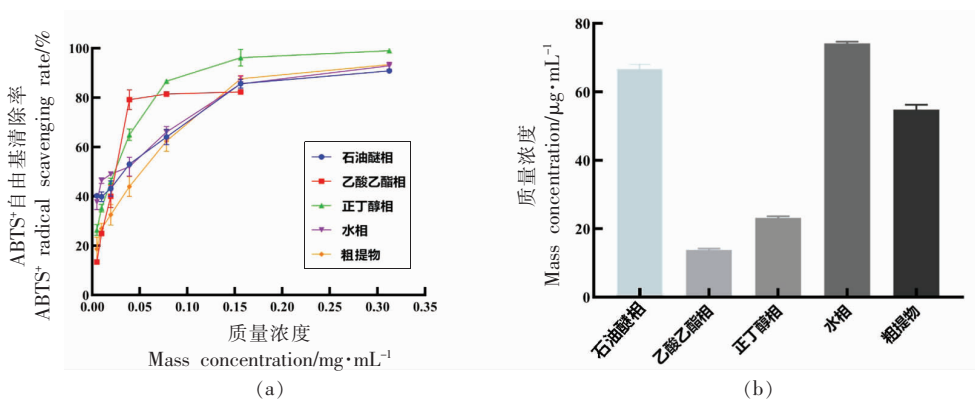


图 5 不同溶剂萃取相清除 ABTS⁺自由基能力及其 IC_{50}

Fig.5 ABTS⁺ radical scavenging ability and IC_{50} of different solvent extraction phases

加的递增趋势逐渐变缓。由图 5b 可知,不同溶剂萃取相清除 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 大小顺序为:乙酸乙酯>正丁醇>粗提物>石油醚>水,表明乙酸乙酯萃取相清除 ABTS⁺自由基能力最好,其 IC₅₀ 为 14.1 μg/mL。

2.3.3 石花菜醇提取物不同溶剂萃取相对羟自由基清除能力清除作用的比较 由图 6a 可以看出,质

量浓度为 0~2 mg/mL 时,石花菜醇提取物不同溶剂萃取相随着质量浓度增加,萃取相清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力增强。由图 6b 可知,不同溶剂萃取相清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的 IC₅₀ 大小顺序为:乙酸乙酯>正丁醇>水>粗提物>石油醚,表明乙酸乙酯萃取相清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力最好,IC₅₀ 为 599.7 μg/mL。

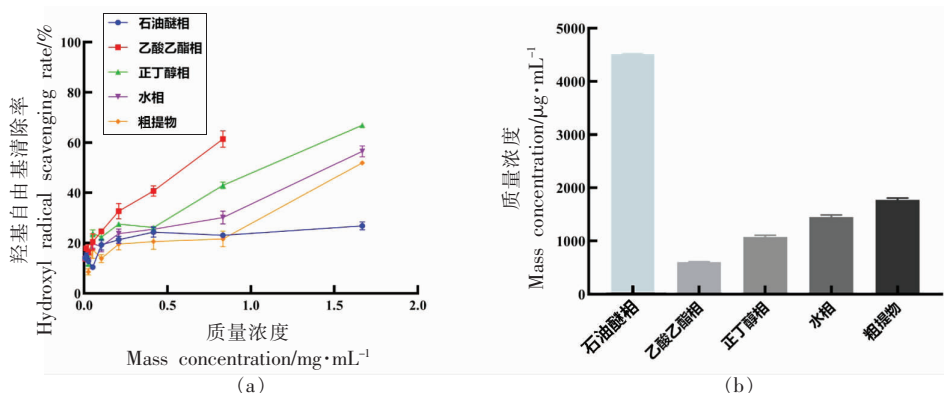


图 6 不同溶剂萃取相清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力及 IC₅₀

Fig.6 Hydroxyl radical scavenging ability and IC₅₀ of different solvent extraction phases

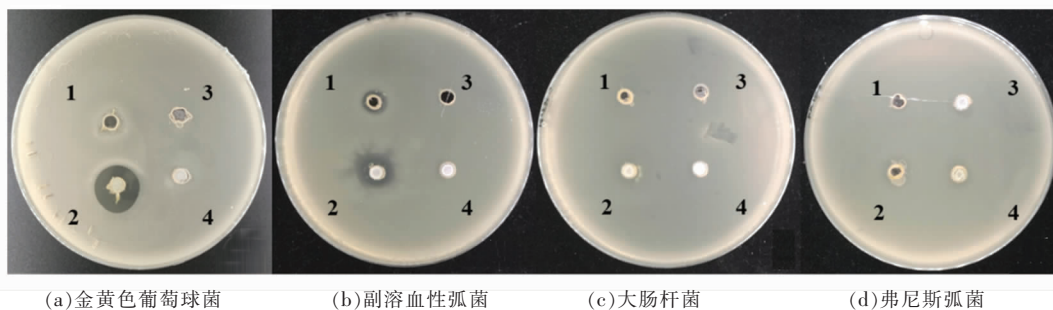
2.4 石花菜醇提取物不同溶剂萃取相的抑菌作用

由图 7 和表 5 可知,石油醚相和乙酸乙酯相对金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌具有一定抑制效果,而对大肠杆菌和弗尼斯弧菌无明显抑菌活性。其余萃取相对 4 种菌均无明显抑制活性。石油醚相对金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的抑菌圈大小为(6.21±0.39)mm 和(7.41±0.47)mm;乙酸乙酯相对金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的抑菌圈大小为(11.43±0.45)mm 和(8.92±0.61)mm。乙酸乙酯相抑菌圈显著大于石油醚相抑菌圈,表明石花

菜醇提取物乙酸乙酯相抑菌活性最强,且乙酸乙酯相中含有抑制金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的活性物质。

2.5 MIC 和 MBC 结果

试验结果可得,石油醚相对金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌的 MIC 为 0.6250,0.1563 mg/mL。乙酸乙酯相为 0.1563,0.1563 mg/mL。由图 8 可知,石油醚相对金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的 MBC 分别为>0.6250 mg/mL 和 0.6250 mg/mL。乙酸乙酯相对金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的



(a)金黄色葡萄球菌

(b)副溶血性弧菌

(c)大肠杆菌

(d)弗尼斯弧菌

注:1. 石油醚相,2. 乙酸乙酯相,3. 正丁醇相,4. 水相。

图 7 石花菜醇提取物不同萃取相对菌的抑菌圈大小

Fig.7 Inhibition zone size of different extracts of *G. amansii* ethanol extract on bacteria

表5 不同萃取相对金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌和弗尼斯弧菌的抑菌效果
Table 5 Antibacterial effect of different extracts of *G. amansii* ethanol extract on *S. aureus*,
V. parahaemolyticus, *E. coli*, and *V. furnissii*

抑菌圈直径/mm	金黄色葡萄球菌	副溶血弧菌	大肠杆菌	弗尼斯弧菌
石油醚	6.21 ± 0.39	7.41 ± 0.47	-	-
乙酸乙酯	11.43 ± 0.45	8.92 ± 0.61	-	-
正丁醇	-	-	-	-
水	-	-	-	-

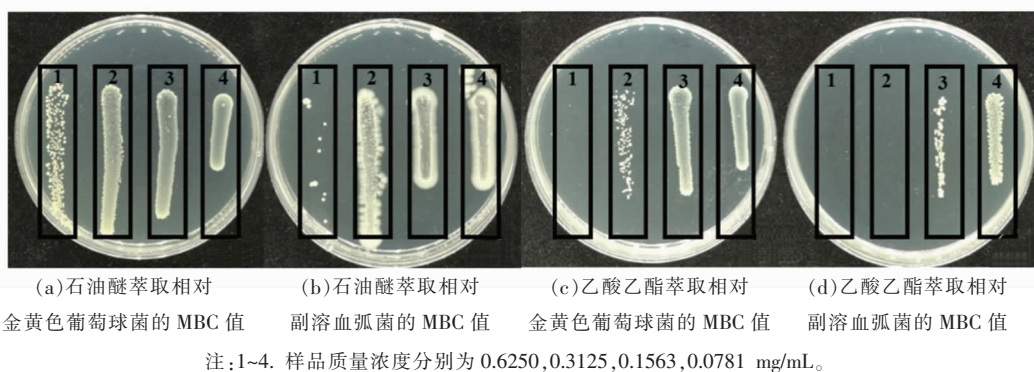


图8 石花菜醇提取物对食源性致病菌的最小杀菌浓度

Fig.8 MBC of different extracts of *G. amansii* ethanol extract against bacteria

MBC 分别为 0.6250 mg/mL 和 0.3125 mg/mL。表明石花菜醇提取物乙酸乙酯相杀菌能力最强。

2.6 石花菜石油醚萃取相和乙酸乙酯萃取相对菌株生长的影响

由图9可知,金黄色葡萄球菌空白组在0~8 h,快速繁殖,在8~24 h,繁殖速度减缓。副溶血性弧菌空白组在0~4 h,快速繁殖,在4~24 h,繁殖速

度减缓。浓度为MIC的石油醚萃取相和乙酸乙酯萃取相能明显抑制金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的生长。试验表明石油醚萃取相和乙酸乙酯萃取相能抑制金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌的生长,2个萃取相中均含有抑菌活性物质,其中乙酸乙酯相中含有抑菌能力更强的活性物质,值得后续深入研究。

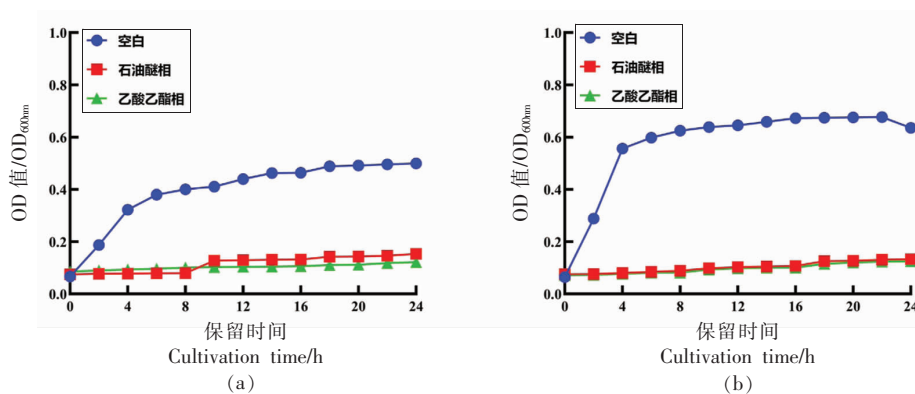


图9 不同萃取相对金黄色葡萄球菌生长曲线(a)、副溶血弧菌的生长曲线(b)的影响

Fig.9 Effects of different extraction phases of *G. amansii* ethanol extract on the growth curve of *S. aureus* (a), *V. parahaemolyticus* (b)

3 结论与讨论

本研究通过响应面法优化石花菜醇提物的提取工艺,并研究石花菜醇提物不同萃取相的抗氧化和抑菌活性。结果显示,石花菜醇提物的最佳提取工艺为:提取时间 64 min,超声功率 350 W,提取温度 55 ℃,60%乙醇溶液,料液比 1:35,所得石花菜醇提物得率为 0.0165 g/g,DPPH 自由基清除率为 58.29%(质量浓度为 2 mg/mL)。石花菜醇提物不同萃取相的抗氧化能力依次为乙酸乙酯相>正丁醇相>石油醚相。石花菜醇提物抑菌能力依次为乙酸乙酯相>石油醚相>正丁醇相。其中,乙酸乙酯相抗氧化能力和抑菌能力均为最高,值得后续深入研究。

目前,对于石花菜的研究多集中在多糖等大分子,而小分子化学成分研究较少。试验结果表明,石花菜醇提物与石花菜多糖相比,具有更强的抗氧化活性和抑菌活性^[1]。因此,对石花菜醇提物抗氧化和抑菌活性进行更加系统深入的研究,并以此指导天然抗氧化剂、防腐剂的开发应用具有重要意义。本试验研究对象均为粗提物,其活性成分物质并未详细明确的指出,后续研究可以通过药物化学手段详细阐明其具有活性的化学成分,并且深入到石花菜醇提物体内抗氧化活性和抗菌机制的研究。本研究表明,石花菜醇提物具有作为天然抗氧化剂和防腐剂的应用潜力,可为石花菜高值化利用提供理论参考。

参 考 文 献

- [1] 裴育, 杨胜涛, 冯瑞, 等. 细毛石花菜多糖自由基清除能力和理化性质的研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 4(6): 1-11.
PEI Y, YANG S T, FENG R, et al. Study on free radical scavenging ability and physicochemical properties of polysaccharides from *Pyrophylla chinensis*[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 4(6): 1-11.
- [2] 王奕雯, 梁志强, 顾时平, 等. 安吉县食品食源性致病菌检测结果[J]. 预防医学, 2021, 33(7): 732-734, 737.
WANG Y W, LIANG Z Q, GU S P, et al. Detection results of foodborne pathogens in food in Anji County[J]. Preventive Medicine, 2021, 33(7): 732-734, 737.
- [3] 张英格, 伍冠一, 陈曦. 石花菜化学成分与药理作用研究进展[J]. 海洋科学, 2021, 45(1): 129-138.
ZHANG Y G, WU G Y, CHEN X. Research progress in chemical constituents and pharmacological effects of cauliflower[J]. Marine Science, 2021, 45(1): 129-138.
- [4] 裴若楠, 翟红蕾, 戚勃, 等. 石花菜多糖的分离纯化及单糖组成分析[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(7): 57-62.
PEI R N, ZHAI H L, QI B, et al. Isolation, purification and monosaccharide composition analysis of polysaccharides from cauliflower[J]. Food and Fermentation Industry, 2020, 46(7): 57-62.
- [5] 杨红岩, 宋新伟, 闫昊, 等. 光强、温度和 N、P 浓度对石花菜幼孢子体生长的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2020, 4(5): 164-169.
YANG H Y, SONG X W, YAN H, et al. Effects of light intensity, temperature and N, P concentration on the growth of young sporophyte of cauliflower[J]. Marine Lake and Marsh Bulletin, 2020, 4(5): 164-169.
- [6] 林圣楠, 李天骄, 田永奇, 等. 低场核磁共振技术测定石花菜对酸奶水分迁移及超微结构的影响[J]. 中国酿造, 2018, 37(3): 49-52.
LIN S N, LI T J, TIAN Y Q, et al. The effect of cauliflower on water migration and ultrastructure of yoghurt was determined by low field nuclear magnetic resonance[J]. China Brewing, 2018, 37(3): 49-52.
- [7] ARIVALAGAN P, DESIKA P, MARY J J, et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property against various pathogenic bacteria[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 114(5): 41-45.
- [8] SEO M J, LEE O H, CHOI H S, et al. Extract from edible red seaweed (*Gelidium amansii*) inhibits lipid accumulation and ROS production during differentiation in 3T3-L1 cells [J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2012, 17(2): 129-135.
- [9] LEE O H, YOON K Y, KIM K J, et al. Seaweed extracts as a potential tool for the attenuation of oxidative damage in obesity-related pathologies [J]. Journal of Phycology, 2011, 47(3): 548-556.
- [10] 王慧, 周星, 唐菲, 等. 石花菜多糖对糖尿病大鼠降

- 血糖作用的实验研究[J]. 保健医学研究与实践, 2011, 8(4): 8-10.
- WANG H, ZHOU X, TANG F, et al. Experimental study on the hypoglycemic effect of lycoris polysaccharide on diabetes rats[J]. Health Medicine Research and Practice, 2011, 8(4): 8-10.
- [11] 林雄平, 周逢芳, 陈晓清, 等. 石花菜和海蒿子提取物抗菌活性初步研究[J]. 亚热带植物科学, 2011, 40(1): 28-30.
- LIN X P, ZHOU F F, CHEN X Q, et al. Preliminary study on antibacterial activity of the extracts from cauliflower and artemisia selengensis [J]. Subtropical Plant Science, 2011, 40(1): 28-30.
- [12] 刘淑兰, 周艺林, 林鹏, 等. Box-behken 响应面法优化紫红生肌软膏的醇提工艺[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(4): 528-535.
- LIU S L, ZHOU Y L, LIN P, et al. Box-behken response surface methodology was used to optimize the alcohol extraction process of Zihong Shengji ointment[J]. Journal of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, 2021, 41(4): 528-535.
- [13] 裴若楠, 翟红蕾, 戚勃, 等. 复合酶法提取石花菜粗多糖工艺的响应面优化[J]. 南方水产科学, 2019, 15(6): 88-95.
- PEI R N, ZHAI H L, QI B, et al. Response surface optimization of extraction process of crude polysaccharides from cauliflower by complex enzyme method[J]. South Fisheries Science, 2019, 15(6): 88-95.
- [14] CHOE J H, JANG A, CHOI J H, et al. Antioxidant activities of lotus leaves (*Nelumbo nucifera*) and barley leaves (*Hordeum vulgare*) extracts [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(3): 831-836.
- [15] AKANG D, YUJIA H, RUYAN C, et al. Advances in research on chemical constituents and pharmacological effects of *Paecilomyces hepiali*[J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(4): 401-407.
- [16] AKKARI H, HAJAJI S, B'CHIR F, et al. Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) against *Haemonchus contortus*[J]. Veterinary Parasitology, 2016, 221(5): 46-53.
- [17] ZHANG S, ZHANG R, PEDRESCHI F P. Effects of microwave pretreatment of apple raw material on the nutrients and antioxidant activities of apple juice [J]. Journal of Food Processing, 2014, 2014(5): 1-9.
- [18] 林标声, 曹红云, 洪燕萍. 香花枇杷与普通枇杷叶片提取物抑菌效果和抗氧化活性的比较研究[J]. 食品科技, 2011, 36(3): 172-175.
- LIN B S, CAO H Y, HONG Y P. Comparative study on bacteriostasis and antioxidant activity of extracts from leaves of fragrant loquat and common loquat[J]. Food Technology, 2011, 36(3): 172-175.
- [19] 王小敏, 张民, 杨钰昆. 大蒜提取物萃取部位的抑菌活性及成分分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(1): 65-70.
- WANG X M, ZHANG M, YANG Y K. Antimicrobial activity and component analysis of the extract of garlic[J]. Modern Food Technology, 2015, 31(1): 65-70.
- [20] 管敏, 张力文, 徐致远, 等. 白毛夏枯草对金黄色葡萄球菌的作用规律及抗菌机理[J]. 中成药, 2017, 39(11): 2393-2396.
- GUAN M, ZHANG L W, XU Z Y, et al. The action rule and antibacterial mechanism of *Prunella vulgaris* on *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese patent medicine, 2017, 39(11): 2393-2396.
- [21] 宋丽雅, 倪正, 樊琳娜, 等. 花椒抑菌成分提取方法及抑菌机理研究[J]. 中国食品学报, 2016, 16(3): 125-130.
- SONG L Y, NI Z, FAN L N, et al. Study on the extraction method and antibacterial mechanism of the antibacterial components of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. Chinese Journal of Food, 2016, 16(3): 125-130.

Studies on the Extraction Process, Antioxidant and Antibacterial Activity of *Gelidium amansii* Ethanol Extract

Wang Qisheng¹, Dan Akang¹, Luo Haitao¹, Tian Yongqi^{1*}, Wang Shaoyun¹, Deng Shanggui²

¹College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108

²College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, Zhejiang)

Abstract On the basis of single factor experiment, the extraction process of *Gelidium amansii* ethanol extract (GAEE) was optimized by response surface methodology. Then, the GAEE was successively extracted by petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol, and the antioxidant and antibacterial activities of different extraction phases were evaluated. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: extraction time was 64 min, ultrasonic power was 350 W, extraction temperature was 55 °C, ethanol concentration was 60% and solid-liquid ratio was 1:35. The extraction rate of GAEE was 1.654 g/g, and DPPH radical scavenging rate of GAEE (2 mg/mL) was 58.29%. Subsequent experiments proved that the antioxidant and antibacterial activities of different extraction phases were concentration dependent, and the antioxidant and antibacterial activities of ethyl acetate phase were the strongest. IC₅₀ values of ethyl acetate phase against DPPH, ABTS free radicals, and hydroxyl radical were 672.4, 14.1, 599.7 μg/mL respectively. Their minimum inhibitory concentrations (MIC) of ethyl acetate phase against *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* were 156.3, 156.3 μg/mL, and the minimum bactericidal concentrations (MBC) of ethyl acetate phase against *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* were 625, 312.5 μg/mL.

Keywords *Gelidium amansii*; ethanol extract; antioxidant activity; antibacterial activity