

海带多酚的提取和抑菌研究

符晓杰¹, 徐年军², 廖智¹, 石戈¹, 范美华^{1*}

(1. 浙江海洋学院海洋科学与技术学院, 浙江舟山 316004; 2. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要 [目的] 对海带多酚的提取进行优化, 并研究其分离纯化和抑菌作用。[方法] 以新鲜海带为试验材料, 采用以乙醇为溶剂反复冻融法提取海带多酚, 液相色谱分离纯化海带多酚, 并利用 96 孔板进行抑菌试验。[结果] 海带多酚提取的最佳条件为: 80% 的乙醇浸提, 60 °C 浸提 3~5 h, 提取效果最好。海带多酚的最大吸收在波长 574 nm。高效液相色谱分析得到 9 种组分, 经过抑菌试验获得 5 种抑菌组分。多酚对副溶血弧菌、大肠杆菌、藤黄叠球菌和金黄色葡萄球菌有一定的抑菌作用, 对枯草芽孢杆菌无抑菌效应。[结论] 试验为深入研究海带多酚提供了参考依据, 同时也为海带的高值化利用及新的抗肿瘤药物开发提供一种新的思路。

关键词 海带; 多酚; 提取; 抑菌; 高效液相色谱

中图分类号 S946.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)09-04099-02

Study on Kelp Polyphenols Extraction and Antibacterial Activity

FU Xiao-jie et al (College of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316004)

Abstract [Objective] The aim was to optimize the extraction of kelp polyphenols, and study the separation and purification, bacteriostatic effects on kelp polyphenols component. [Method] With fresh kelp as experimental material, using repeated freeze-thawing method to extract kelp polyphenols, and liquid chromatogram to separate and purify kelp polyphenols. Furthermore, 96 orifice plate was adopted to analyze antibacterial effects. [Result] The optimum extraction conditions of kelp polyphenols are: 80% ethanol extraction, 60 °C leaching 3-5 h had better extraction effect. The maximum absorption of kelp polyphenols is at 574 nm. By high performance liquid chromatography (HPLC) analysis obtain 9 components, 5 kinds of component had antibacterial function. Polyphenols had certain bacteriostatic action on the vice *Hemolysis vibrio*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Gambogic fold coccus*. Polyphenols had not bacteriostatic effect on *Bacillus subtilis*. [Conclusion] The study provides a test basis for further research on kelp polyphenols and a new train of thought for kelp high threshold use and new antitumor drug development.

Key words Kelp; Polyphenol; Extraction; Antibacterial; High performance liquid chromatography

海带被誉为天然的保健食品, 富含多种功能性物质, 是一种既具食用价值, 又有药用、保健、工业、农业价值的大型藻类产品。但目前工业上对海带的利用主要是从中提取褐藻酸钠、碘及甘露醇, 很少涉及褐藻糖胶、膳食纤维及多酚的利用。我国为海藻养殖大国, 海带养殖产量居世界首位, 但目前我国海带资源基本上处在初级产品的加工水平上, 我国海带产业存在资源利用率低、产品附加值低、生产成本低、经济效益差、环境污染严重等问题。因此, 拓宽海带深加工渠道, 实现海带高值化利用是十分必要的。

植物多酚又称植物单宁, 是高等植物中普遍存在的次级代谢产物, 具有广泛的生物活性, 主要存在于植物体的皮、根、叶、壳和果肉中。海带多酚作为一类重要的褐藻多酚化合物, 是海带次级代谢产生的以间苯三酚为结构单元的聚合物。褐藻多酚具有较好的抗氧化和抑菌作用, 在天然食品添加剂中的抗氧化剂、防腐剂等方面均有应用^[1-2]。此外, 褐藻多酚还具有抗肿瘤、抗病毒、化学防御、除臭等活性。近年来, 随着对褐藻多酚研究的深入, 其独特的生物活性和医药价值日益受到人们的关注^[3]。但迄今为止, 国内外有关植物多酚的研究主要集中在茶多酚、松树皮多酚、葡萄籽多酚、苹果多酚、可可多酚等为数不多的几种植物种类里^[4-8], 随着人们对植物多酚研究的重视以及新的分离分析技术的应用, 开发植物多酚的新资源, 分析新来源植物多酚的化学结构及

生物活性具有理论和现实的意义。笔者以鲜海带 (*Laminaria japonica* Aresch) 为原料, 对海带多酚的提取进行了优化, 并对海带多酚的分离纯化和抑菌作用进行研究, 为深入研究海藻多酚提供了参考依据, 同时也为海带的高值化利用及新的抗肿瘤药物、保健食品的开发提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 新鲜海带购于浙江省舟山定海北门市场。将鲜海带预处理以除去沉积物、浮游动物和其他附着物, 再以自来水清洗并用纸擦拭干净冷冻保存做原料。

1.2 方法 该试验始于 2011 年 7 月中旬, 至 2012 年 5 月中旬结束。

1.2.1 多酚粗提。 将 3 g 新鲜海带置于研钵中, 加入少量石英砂研磨, 将海带样品粉碎后, 加入 70% 乙醇溶液 10 ml, 将样品迅速转入 -20 °C 冰箱中冷冻 30 min 后取出。待样品完全解冻溶解后, 再次转入 -20 °C 超低温冰箱, 重复此步骤 5 次。将所有样品转于 60 °C 水浴锅中浸提 3 h, 转入 10 ml 塑料离心管中, 在 4 000 r/min 下离心 10 min, 上清液即为海带多酚粗提液。

1.2.2 多酚粗提条件的优化。 设置不同的乙醇浓度 (0、50%、60%、70%、80%、90%、100%), 浸提温度 (20、30、40、50、60、70 °C), 浸提时间 (0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、12.0 h), 比较海带多酚提取物的含量。

1.2.3 多酚含量的测定。 酒石酸亚铁比色法测定总酚含量。其原理主要是根据植物多酚结构的羟基在苯环位置的不同, 既有邻苯二酚基, 又有联苯三酚基, 以及没食子酸形成的酯类化合物。酒石酸亚铁主要是与植物多酚中的邻位羟

基金项目 浙江省新苗计划项目 (2011R4111016)。

作者简介 符晓杰 (1989 -), 男, 浙江金华人, 本科生, 专业: 生物科学。
* 通讯作者, 高级实验师, 从事藻类活性物质提取和分子方面的研究, E-mail: dinger503@163.com。

收稿日期 2013-04-07

基和连位羟基官能团与亚铁离子形成紫色络合物,而对位羟基、间位羟基和单羟基不显色。以没食子酸为测定标准,其具有邻位羟基和连位羟基的特点,更能代表多种酚类的实际情况,1.0 mg 没食子酸的吸光度相当于 1.5 mg 植物多酚的吸光度,转换系数约为 1.5。

没食子酸标准曲线的制备:配制没食子酸标准液 1 mg/ml,分别吸取没食子酸标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 于一系列 25 ml 的容量瓶中,加水至体积为 5 ml,再各加入 5 ml 酒石酸亚铁溶液,用 pH7.5 磷酸缓冲液定容至 25 ml,混匀,静置 15 min。对形成的有色复合物用 UV-2550 型紫外可见分光光度计在波长 200~800 nm 范围内扫描,作出酒石酸亚铁反应物的吸光度曲线,选择出特征吸收波长 λ_{max} ,然后用 1 cm 比色皿在该波长处测定吸光度 A 值。最后以没食子酸标准液的浓度(mg/ml)为横坐标,以吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线: $Y=2.5620x+0.0276(R=0.9997)$ 。

取海带多酚粗提液 5.0 ml 加入 25 ml 容量瓶中,加入 5 ml 酒石酸亚铁溶液按绘制标准曲线的步骤操作。以蒸馏水代替粗提液加入同样试剂作空白,每个样品做 3 次重复,结果取平均值。按以下公式计算 KP 的提取率 T 。

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

式中, S 为 KP 浓度(mg/ml), V 为提取液体积(ml), M 为鲜海带质量(mg), C 为鲜海带含水率(%)。

1.2.4 海带多酚的液相色谱分析。用 waters600e 液相色谱分析海带多酚, C_{18} 柱,4.6 mm × 250 mm,速率为 0.75 ml/min,时间设置为 0.5、50.55 min 时,流动相分别为 H_2O - 乙腈 95%:5%、85%:15%、50%:50%、5%:95%。

1.2.5 海带多酚的抑菌试验。配制 LB 培养基,121 °C 灭菌 30 min,用 96 孔板法以大肠杆菌、藤黄叠球菌、副溶血弧菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌作指示菌,接种到 2~3 ml 培养基中,37 °C,150 r/min 摇至浑浊。对照组加 10 μ l 无菌培养基,样品组加 10 μ l 培养基溶解其对应样品,加样后酶标仪检测,记录初始数据。在 37 °C,120 r/min 摇床过夜 12 和 24 h,分别检测其吸光度。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定 没食子酸标准液与酒石酸亚铁反应的有色物质用紫外分光光度计(UV-2401)在波长 200~900 nm 范围内进行扫描。结果表明,有色物质在波长 574 nm 处具有最大吸收峰(图 1)。因此,后面试验中多酚的含量的测定就在波长 574 nm 进行。

2.2 不同浓度乙醇浸提对多酚提取率的影响 由图 2 可以看出,在其他处理条件一定的情况下,不同浓度乙醇对多酚的提取效果不同。当乙醇浓度为 0% 时(即用蒸馏水提取),多酚的提取率为 0.35%;当乙醇浓度为 80% 时,其提取效率则高达 1.20%;当乙醇浓度为 100% 时,其提取效率为 0.55%。试验结果表明,随着乙醇浓度的升高,多酚的提取率呈现先上升后下降的趋势,80% 乙醇提取的多酚提取率最高,是对照的 3.4 倍,具有极显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 不同温度对海带多酚提取率的影响 由图 3 可知,随

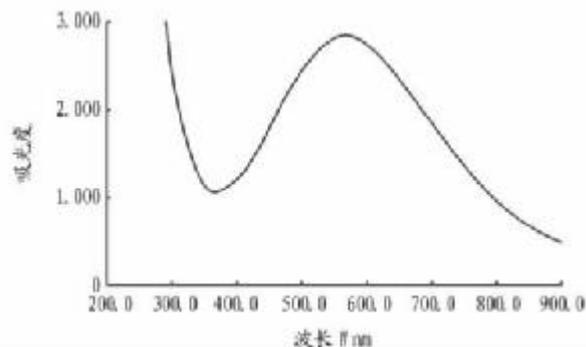


图 1 没食子酸光谱

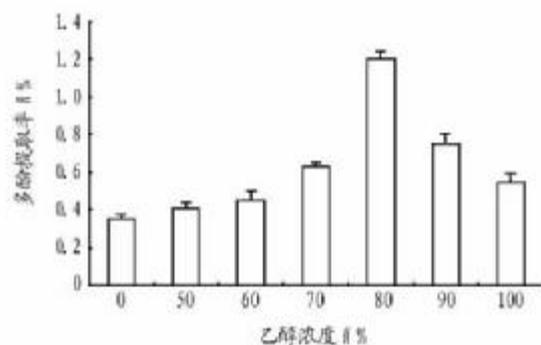


图 2 不同浓度乙醇对海带多酚提取率的影响

着温度的增高(20~50 °C),海带多酚的提取率变化不大,在 0.65%~0.73%。60 °C 时,海带多酚的提取率达到 0.96%,提取效果最好。

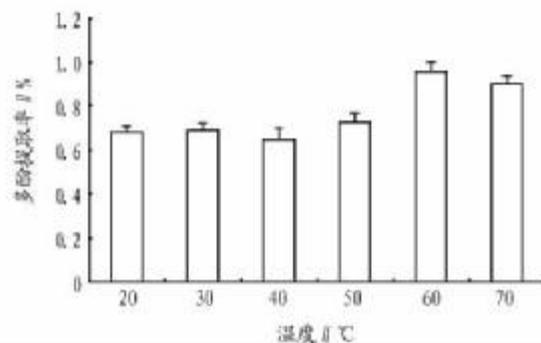


图 3 不同温度对海带多酚提取率的影响

2.4 浸提时间对海带多酚提取率的影响 由图 4 可知,浸提时间 1~4 h,随着时间的增加,海带多酚的提取率增加,4 h

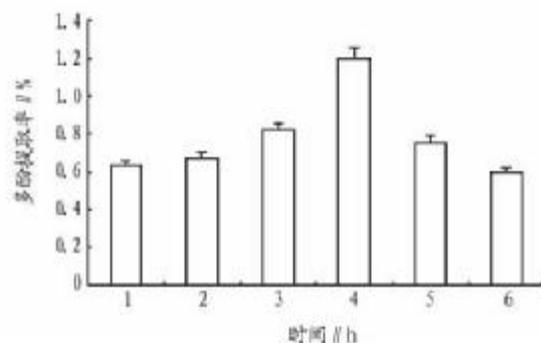


图 4 不同浸提时间对海带多酚提取率的影响

(下转第 4196 页)

料,申请并获得国家级创新项目资助,2009 级几名学生污水处理过程中限磷或限氮条件下可促进菌体积累聚羟基脂肪酸(有机塑料)很好奇,提出问题后自行研制生物反应器,在教师的指导下,也获得国家创新项目的资助。2012 年 2010 和 2011 级的学生对微生物降解农药感兴趣,在教师的帮助下开始筛选分解 2,4-D 的菌群。通过多年的微生物学实践教学和改革,使得学生对微生物在环境治理作用、功能、有机物循环上有深刻的印象和广泛的兴趣,很多学生提出一些新奇想法,并通过信息检索的途径来试图解决问题。自实践教学改革以来,微生物学科指导的本科创新项目从无到有,已获得 4 项国家级创新项目,8 项校级创新项目,这些本科创新项目的一些想法是学生认真思考后提出来的,在教师的指导下,学生通过查阅文献申请获得,学生将实验结果总结发表 2 篇 EI 收录的论文。

实习改革后,对第一批参与实习学生的教学改革效果问卷调查显示,学生认为微生物室外实习改革是对微生物学基础理论知识扩展和加深的占 96%,认为有利于提高动手能力

(上接第 4100 页)

时,达到 1.2%,提取效率最好。而浸提时间超过 12 h 后,海带多酚提取率明显降低。因此,多酚提取试验中浸提时间范围应选 3~5 h。

2.5 高效液相色谱分析海带多酚粗提液 由液相色谱分析结果(图 5)可知,海带多酚通过液相色谱分析得到 9 种主要组分,冷冻干燥放 -20 ℃ 备用。

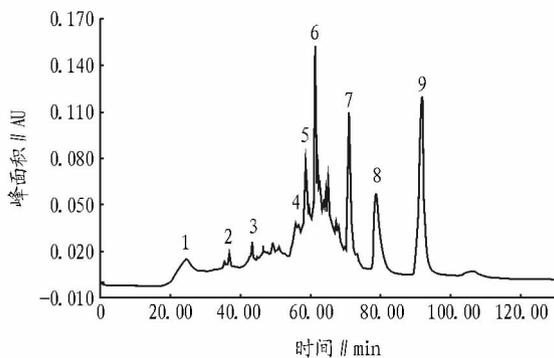


图 5 海带多酚的液相色谱分析图谱

2.6 海带多酚各组分的抑菌试验 将海带多酚经高效液相色谱分离的 9 种组分用 96 孔板法进行抑菌研究。研究结果表明(表 1),组分 1、2、7 和 9 对副溶血弧菌、大肠杆菌、藤黄叠球菌、金黄色葡萄球菌无抑菌效果;组分 3 对藤黄叠球菌和金黄色葡萄球菌有抑菌效果;组分 4 对大肠杆菌、藤黄叠球菌、枯草芽孢杆菌有抑菌效果;组分 5 对副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌有抑菌效应;组分 6 对副溶血弧菌、大肠杆菌、藤黄叠球菌和金黄色葡萄球菌有较强的抑菌效果;组分 8 对藤黄叠球菌、金黄色葡萄球菌有抑菌效果。通过抑菌试验获得了对各菌种有抑菌效果的 5 种组分。

3 结论

试验结果表明,海带多酚利用反复冻融法提取,最佳提

和树立创新思维意识的占 93.4%,学生对增设野外实习和到工厂和企业参观的教学改革非常支持和配合,实习也取得良好的教学效果。

通过两次微生物综合大实习,新增的实习任务也给任课教师提出了严峻考验和教学压力,实习的内容由教材拓展到生产实践的各方面,涉及的内容更加广泛和深入,迫使任课教师在课余时间增加环境微生物、野外大型真菌相关领域的认知,扩充相关知识才能为今后更好地完成实习任务奠定坚实基础。

参考文献

- [1] 袁生,徐德强,闵航,等. 野外实习中增加微生物学实习内容的改革与探索[J]. 高等理科教育,2010(6):90-92.
- [2] 袁生,徐旭士,戴传超,等. 微生物学实验课程的改革与实践[J]. 高等理科教育,2012(2):1-3.
- [3] 黄碧芳,余文英. 微生物实验教学之无菌操作技术关联实验[J]. 中国科技信息,2010(20):249-250.
- [4] 南旭莹,陈海敏,王江,等. 加强微生物学基本操作技能训练,提高学生的主观能动性[J]. 微生物学通报,2011,38(8):1278-1282.
- [5] 何琳燕,盛下放. 植物生产类专业《普通微生物学》教学改革的探索与实践[J]. 微生物学通报,2008,35(8):1322-1324.

表 1 海带多酚各组分抑菌效果的研究

| 组分 | 副溶血弧菌 | 大肠杆菌 | 藤黄叠球菌 | 金黄色葡萄球菌 | 枯草芽孢杆菌 |
|----|-------|------|-------|---------|--------|
| 1 | - | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | + | + | - |
| 4 | - | ++ | ++ | - | - |
| 5 | + | - | - | + | - |
| 6 | ++ | ++ | + | + | - |
| 7 | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | ++ | + | - |
| 9 | - | - | - | - | - |

注:“++、+、-”依次表示抑菌程度的强弱。

取条件为 80% 乙醇,60 ℃ 浸提 3~5 h 的提取率最好;通过 HPLC 分离和抑菌试验获得 5 种抑菌组分。5 种组分的结构和分子量分析还需要进一步试验研究。

参考文献

- [1] WANG T, JONSDOTTIR R, OLAFSDOTTIR G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1):240-2481.
- [2] YUN B K, YOUNG G M, MOON S H. Antioxidant and antimicrobial activities of seaweed, *Ecklonia cava* [J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136(1):598.
- [3] CHEW Y L, LIM Y Y, OMAR M, et al. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia [J]. LWT - Food Science and Technology, 2008, 41(6):106-107.
- [4] 刘晓丽, 吴克刚, 柴向华, 等. 海带多酚的纯化及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(5):160-163.
- [5] 徐秀丽, 范晓, 宋福行. 中国经济海藻提取物生物活性 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(1):55-62.
- [6] 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.
- [7] 冯丽, 徐桂花, 宋耀辉, 等. 植物多酚及其提取方法的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2007(10):39-41.
- [8] 龚雨顺, 刘仲化, 黄建安. 茶叶中儿茶素纯化研究进展 [J]. 茶叶通讯, 2003(1):15-18.