

响应面法优化板栗苞中抑制痢疾杆菌 活性成分的提取工艺

陈丽楠^{1,2}, 彭 飞^{1,2,3}, 靳长迎¹, 余祚庆¹, 杨越冬^{1,2,3*}

(1. 河北省天然产物活性成分与功能重点实验室, 河北 秦皇岛 066004; 2. 板栗产业技术教育部工程研究中心, 河北 秦皇岛 066004; 3. 河北省板栗产业协同创新中心, 河北 秦皇岛 066004)

摘要: 为提高板栗废弃物的资源利用率, 以板栗苞为原料, 探究其抑制痢疾杆菌活性成分的提取工艺。采用吸光光度法筛选板栗苞抑制痢疾杆菌活性成分的提取溶剂; 以抑菌率为响应值, 采用单因素实验结合响应面法优化板栗苞抑菌活性成分的提取工艺; 采用二倍稀释法测定板栗苞各提取物的最低抑菌质量浓度 (MIC), 并采用吸光光度法研究其对细菌生长曲线的影响。结果表明, 板栗苞的乙醇水提取物对痢疾杆菌的抑菌活性最好; 板栗苞抑菌成分的最佳提取工艺为乙醇体积分数 45%, 料液比 1 : 20 (g : mL), 提取温度 50 °C; 在该条件下, 板栗苞提取物抑菌率为 61.27%±2.60%, MIC 值为 3.2 g/L; 乙酸乙酯相提取物 MIC 值为 0.4 g/L, 抑菌率达 85% 以上。

关键词: 板栗苞; 提取; 抑菌活性; 响应面优化; 中药现代化技术

中图分类号: TS201.3; R284 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 01-0101-08

Extraction optimization by response surface methodology of active ingredients from chestnut burs for *Shigella dysenteriae* inhibition

CHEN Li'nan^{1,2}, PENG Fei^{1,2,3}, JIN Changying¹, YU Zuoqing¹, YANG Yuedong^{1,2,3*}

(1. Hebei Key Laboratory of Active Components and Functions in Natural Products, Qinhuangdao 066004, Hebei, China; 2. Engineering Research Center of Chestnut Industry Technology, Ministry of Education, Qinhuangdao 066004, Hebei, China; 3. Hebei Collaborative Innovation Center of Chestnut Industry, Qinhuangdao 066004, Hebei, China)

Abstract: In order to improve the resource utilization rate of chestnut waste, the extraction process of active ingredient from chestnut burs against *Shigella dysenteriae* were explored. The extraction solvent was screened via spectrophotometry, and the extraction process was optimized by single factor experiment combined with response surface methodology with bacteriostatic rate as response value. The minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts from chestnut burs were determined by double dilution method, and its effect on bacterial growth curve was analyzed by absorbance spectrophotometry. The results demonstrated that the extract from chestnut burs by ethanol and water mixture exhibited the best antibacterial activity against *Shigella dysenteriae*, with antibacterial rate of 61.27%±2.60% and MIC value of 3.2 g/L, under the optimal extraction conditions of ethanol and water mixture (ethanol volume fraction of 45%) as solvent, ratio of material to liquid 1 : 20 (g : mL), extraction temperature 50 °C. Meanwhile, the MIC value of ethyl acetate phase extract was 0.4 g/L, and the antibacterial rate was above 85%.

Key words: chestnut burs; extraction; antibacterial activity; response surface optimization; modernization technology of traditional Chinese medicines

收稿日期: 2022-06-05; 定用日期: 2022-08-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220526

基金项目: 河北省研究生创新资助项目 (CXZZSS2022090)

作者简介: 陈丽楠 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: chen15534445342@163.com。联系人: 杨越冬 (1965—), 女, 博士, 教授, E-mail: yuedongyang@hotmail.com。

板栗 (*Castanea mollissima* Bl.) 具有悠久的栽培历史, 中国栽植面积 $1.8 \times 10^{10} \text{ m}^2$, 年产量 260 多万 t (占全世界产量的 84%)。板栗苞是板栗最外层针刺状外壳, 又名栗蓬。随着板栗栽植面积及产量的逐年增加, 每年板栗成熟时节会产生大量的板栗苞等板栗废弃物。由于开发利用不足, 板栗苞被堆积在林地里或直接焚烧, 造成巨大的环境污染及资源浪费^[1-2]。据本草纲目记载, 板栗苞具有止血、化痰、清热散结的功效, 可治疗丹毒、百日咳、中风不语、便血及鼻衄^[3]; 现代科学研究表明, 板栗苞提取物具有抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5]、抗病毒、抗菌^[6-7]、抗高血压^[8]及降血糖^[9-10]等活性。多酚及黄酮类化合物是板栗苞的主要活性成分。张琳等^[11]从板栗苞中分离出槲皮素、山奈酚、大黄素、乌索酸、对苯二酚、鞣花酸、苯甲基-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、没食子酸、莽草酸等多酚类化合物, 其中鞣花酸和苯甲基-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 2 种化合物具有显著降血糖活性。CERULLI 等^[12]研究表明, 板栗苞因含有鞣花酸、酚葡萄糖苷衍生物、三萜类化合物和极性脂质而具有抗氧化和抗炎活性, 后通过细胞体外实验表明, 其具有降低核因子- κ B (NF- κ B) 表达和一氧化氮 (NO) 生成的能力。目前, 对板栗苞的化学成分及抗氧化、抗炎活性研究报道较多, 但对其抑菌活性报道较少。

据世界卫生组织统计, 痢疾是导致儿童死亡的主要疾病之一^[13]。造成痢疾的病原菌主要有以下 4 种: 福氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)、痢疾志贺菌 (*Shigella dysenteriae*)、宋内志贺菌 (*Shigella sonnei*) 和鲍氏志贺菌 (*Shigella boydii*)。在发展中国家, 痢疾志贺菌和福氏志贺菌较为常见, 通常通过环境地表水源传播^[14]。痢疾志贺菌是一种短小、无芽孢、无荚膜、无动力、无鞭毛的兼性厌氧革兰氏阴性杆菌, 在 SEM 中观察呈直杆状, 形似其他肠杆菌科, 耐寒, 可在普通琼脂培养基上生长, 形成的菌落为中等大小、半透明、光滑的圆点, 在肠道杆菌培养基中形成无色菌落。兼性厌氧, 可需氧产生呼吸代谢, 也可发酵代谢, 产酸不产气, 不能利用柠檬酸或丙二酸盐, 不产生 H_2S 。MATHAN 等^[15]表明, 痢疾杆菌可引起传染性胃肠道疾病, 是导致儿童和成人腹泻病发和死亡的原因。因此, 本文选用痢疾志贺菌 (简称痢疾杆菌) 为研究对象。目前, 常用喹诺酮类药物治疗痢疾, 如环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、萘啶酸等。但这些药物会引起肠道菌群失衡诱发疾病, 并导致痢疾杆菌产生耐药性^[16]。因此, 亟需寻找新型抵抗痢疾杆菌的抑菌剂。中国中药资源丰富, 其提取物富含生物碱、

萜类、类黄酮和多酚等活性物质, 是潜在的抑菌剂来源。LAI 等^[17]研究表明, 黄芪水提物对 5 种痢疾病原菌均有轻度抑制作用, 可与抗生素联合使用产生拮抗作用。黄燕飞^[18]和张子越^[19]也分别研究了马齿苋和黄连水提物对痢疾杆菌的抗菌活性及抗菌机理, 结果表明, 马齿苋、黄连水提物均可抑制痢疾杆菌的生长, 破坏细菌的细胞壁和细胞膜, 抑制痢疾杆菌的正常呼吸代谢。以往的研究都集中在提取物抑制痢疾杆菌活性及机理的研究, 未见板栗苞抑菌成分提取工艺优化的相关研究。

本文以痢疾杆菌为指示菌, 采用单因素实验探究乙醇体积分数、温度及料液比对板栗苞提取物抑制痢疾杆菌活性的影响, 通过响应面法优化板栗苞抑菌物质的提取工艺。此外, 对板栗苞各相萃取物的抑菌成分含量进行测定, 并比较其抑菌活性, 筛选得到活性最强的抑菌组分。以期为板栗苞等农业废弃物的研究及开发新型抑菌剂奠定基础。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

板栗苞, 2020 年 10 月采自河北省青龙县, 经河北科技师范学院园艺学院齐永顺教授鉴定为中国板栗, 属壳斗科 (*Fagaceae*) 栗属 (*Castanea*), 洗净室外晒干, 打粉过 40 目筛备用; 痢疾杆菌 (BNCC 103609), 北纳生物科技有限公司; LB 液体培养基、环丙沙星, 北京索莱宝科技有限公司; 二甲亚砜 (DMSO), 上海埃彼化学试剂有限公司; 石油醚、乙酸乙酯、正丁醇, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司; 无水乙醇, 分析纯, 上海泰坦科技股份有限公司; 没食子酸 (GA)、芦丁 (rutin)、福林酚, 分析纯, 上海源叶生物科技有限公司; 无水碳酸钠、 NaNO_2 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、NaOH, 分析纯, 天津市欧博凯化工产品销售有限公司。

ME204E 分析天平, 梅特勒-托利多 (上海) 有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 江苏金坛荣华仪器制造有限公司; EYELAN-1100 旋转蒸发器, 日本东京理化公司; Alpha 2-4 LDplus 冷冻干燥机, 德国 CHRIST 公司; 3-18KS 冷冻离心机, 德国 SIGMA 公司; JSP-200 金穗高速多功能粉碎机, 浙江省永康市金穗机械制造有限公司; SPECTRA MAX 190 型酶标仪, 美谷分子仪器有限公司; THZ-C-1 全温振荡器, 苏州市培英实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料预处理

将板栗苞用蒸馏水洗净、自然环境晒干, 用多功能粉碎机打粉, 过 40 目筛, 得到板栗苞粉末样品,

于-80 °C 冰箱冷冻储存。

1.2.2 板栗苞抑菌成分的提取

采用溶剂提取法^[20]提取板栗苞抑菌成分。具体步骤为: 精确称取板栗苞粉末 10.0 g, 以料液比 1 : 20 (g : mL), 提取温度 50 °C, 分别使用水、无水乙醇、体积分数 50% 乙醇水溶液为溶剂提取 120 min, 提取液在 7500 r/min 下离心 10 min, 过滤, 旋转蒸发 (48 °C), 真空干燥 (50 °C) 12 h, 得到粉末状板栗苞水提物 (CW)、板栗苞醇提物 (CC)、板栗苞 50% 乙醇水提物 (CCW)。并采用吸光光度法测定 3 种提取物对痢疾杆菌生长曲线的影响。

1.2.3 单因素实验

称取 5.0 g 板栗苞样品, 固定料液比为 1 : 20 (g : mL), 提取温度 50 °C, 在不同乙醇体积分数 (20%、40%、50%、60%、80%) 下提取 120 min, 研究乙醇体积分数对板栗苞提取物抗菌活性的影响。

称取 5.0 g 板栗苞样品, 固定乙醇体积分数为 50%, 提取温度 50 °C, 在不同料液比 (1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30, g : mL) 下提取 120 min, 研究料液比对板栗苞提取物抗菌活性的影响。

称取 5.0 g 板栗苞样品, 固定乙醇体积分数为 50%, 料液比 1 : 20 (g : mL), 在不同浸提温度 (30、40、50、60、70 °C) 下提取 120 min, 研究提取温度对板栗苞提取物抗菌活性的影响。

1.2.4 响应面实验

根据单因素实验结果, 选取乙醇体积分数 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 为考察因素, 以抑菌率为响应值, 采用响应面法进行 Box-Behnken 响应面实验, 用 Design Expert 8.0.6 进行数据分析, 进而优化板栗苞抑菌物质提取的工艺条件。响应面实验因素与水平设计结果见表 1。

表 1 响应面实验因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface test

水平	因素		
	A 乙醇体积分数/%	B 料液比/(g : mL)	C 提取温度/°C
-1	40	1 : 15	40
0	50	1 : 20	50
1	60	1 : 25	60

1.2.5 板栗苞提取物分离

在最佳提取工艺条件下得到板栗苞提取物 (CE), 将 200 g 板栗苞提取物在蒸馏水中溶解, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取, 得到水相 (CEW)、石油醚相 (CES)、乙酸乙酯相 (CEY) 和正丁醇相 (CED) 萃取物。

1.2.6 总酚和总黄酮含量的测定

总酚含量根据福林酚法^[21]测定, 并稍作修改。

具体步骤为: 精确称取 1.00 mg 没食子酸, 并加入到无水乙醇中, 配成质量浓度为 10 μg/mL 的没食子酸储备液; 分别取 10、20、40、60、80、100 μL 没食子酸储备液于 96 孔板中, 用去离子水定容至 120 μL, 加入 0.5 mol/L 的福林酚试剂 20 μL, 放置 10 min, 加入 60 μL 的 Na₂CO₃ 水溶液 (质量浓度为 100 g/L), 20 °C 避光放置 2 h; 在 765 nm 处测定溶液的吸光度值, 没食子酸的标准曲线方程为: $y = 0.0461x + 0.0141$ ($R^2 = 0.999$), 样品的多酚含量按式 (1) 计算, 结果以没食子酸质量的平均值 (mg GA/g) 表示:

$$W = \frac{\rho \times V \times N}{M} \times 1000 \quad (1)$$

式中: W 代表每克干重提取物的没食子酸质量, mg GA/g; ρ 代表没食子酸质量浓度, μg/mL; V 代表原料液的体积, mL; M 代表取样量, g; N 代表稀释倍数。

总黄酮含量用 NaNO₂-Al(NO₃)₃ 法^[22]测定。首先配制质量浓度为 0.2 g/L 的芦丁标准水溶液, 在 10 mL 容量瓶中分别加入 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 标准液, 加入蒸馏水定容至 5 mL, 再加入 0.3 mL 质量分数为 5% NaNO₂ 水溶液静置 6 min, 加入 0.3 mL 质量分数为 5% Al(OH)₃ 水溶液于容量瓶中, 混匀, 室温下放置 6 min, 再加入 4.4 mL 质量分数为 5% 的 NaOH 水溶液, 混匀静置 12 min, 在 510 nm 处测定溶液的吸光度值。芦丁的标准曲线方程为 $y = 0.0101x + 0.348$ ($R^2 = 0.999$), 样品的黄酮含量按式 (2) 计算, 结果以芦丁质量的平均值 (mg rutin/g) 表示:

$$w = \frac{\rho' \times V' \times N'}{M' \times 1000} \quad (2)$$

式中: w 代表每克干重提取物的芦丁质量, mg rutin/g; ρ' 代表芦丁质量浓度, g/L; V' 代表原料液的体积, mL; M' 代表取样量, g; N' 代表稀释倍数。

1.2.7 最小抑菌质量浓度 (MIC) 的测定

采用二倍稀释法^[23]测定板栗苞各提取物的 MIC 值。将板栗苞各提取物溶于 DMSO 水溶液 (DMSO 体积分数 3% 的水溶液), 得到质量浓度为 6.4 g/L 溶液, 然后依次稀释至 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 g/L。将制备好的溶液 (100 μL) 与液体 LB 琼脂培养基 (50 μL) 混合, 加入 OD₆₀₀ 值为 0.1 的痢疾杆菌菌悬液 (50 μL), 使样品最终质量浓度分别为 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 g/L。以无菌水为空白对照 (CK), DMSO (1.5%) (即 DMSO 体积分数 1.5% 的水溶液) 为阴性对照, 0.01 g/L 的环丙沙星为阳性对照。接种后, 分别在 37 °C 孵育 15 h。检查其生长情况, MIC 为无细菌生长的最低样品质量浓度。

1.2.8 痢疾杆菌生长曲线的测定

采用吸光光度法^[24]测定板栗苞各提取物对痢疾杆菌生长曲线的影响。将 OD₆₀₀ 值为 0.1 的痢疾杆菌悬液，接种在新鲜培养基中，菌悬液与培养基体积比 1 : 1 混合，在 96 孔板中加入 100 μL 样品溶液（0.5 g/L，配制方法同 1.2.7 节）和 100 μL 痢疾杆菌与培养基的混合液；使用酶标仪测试 14 h 细菌在 600 nm 处的吸光度值（OD₆₀₀），绘制细菌的生长曲线图。按式（3）计算抑菌率：

$$\text{抑菌率} / \% = \frac{A_c - A_y}{A_c} \times 100 \quad (3)$$

式中：A_c 表示痢疾杆菌溶液在 14 h 的 OD₆₀₀ 值；A_y 表示样品处理后痢疾杆菌溶液在 14 h 的 OD₆₀₀ 值。

1.3 数据分析

所有实验均平行进行 3 组，取平均值作为板栗苞提取物抑菌率的响应值，通过方差分析来确定不同因素对抑菌活性的显著性影响。通过使用 Design-Expert 8.0.6 软件对 Box Behnken 实验数据进行分析，得到工艺参数的二次回归方程。

2 结果与讨论

2.1 溶剂对板栗苞提取物抑菌活性的影响

按 1.2.2 节进行实验，通过吸光光度法比较板栗苞水提取物、板栗苞醇提取物、板栗苞 50% 乙醇水提取物抗痢疾杆菌活性，结果如图 1 所示。

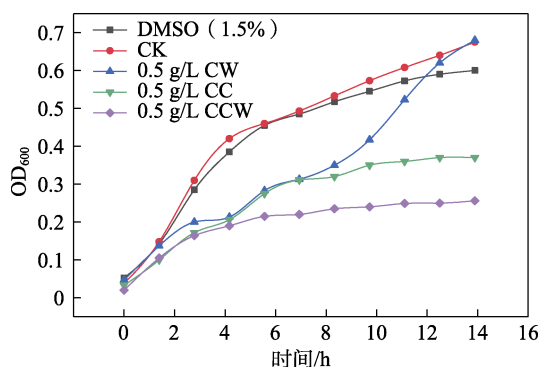


图 1 不同溶剂对痢疾杆菌生长曲线的影响

Fig. 1 Effects of different solvents on growth curve of *Shigella dysenteriae*

由图 1 可以看出，痢疾杆菌遵循 S 型生长模型，0.5 g/L 不同提取物在 3 h 时对细菌生长出现抑制，50% 乙醇水提取物的抑制作用最显著。AMALRAJ 等^[25]在对比不同溶剂对云杉叶提取物抗菌活性的研究中也表明，乙醇水提取物对普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌有显著的抑制作用，由于其多酚和黄酮类化合物含量高，使细菌体内代谢失调，细胞膜及细胞壁破裂，从而抑制细菌生长^[26]。本研究也得

出醇水溶液（双组分体系）提取物抗菌活性最好，可对乙醇水溶液提取物抑菌活性进行进一步工艺优化。

2.2 单因素实验结果与分析

2.2.1 乙醇体积分数对板栗苞提取物抑菌率的影响

按 1.2.3 节进行实验，考察乙醇体积分数对板栗苞提取物抑菌率的影响，结果见图 2。

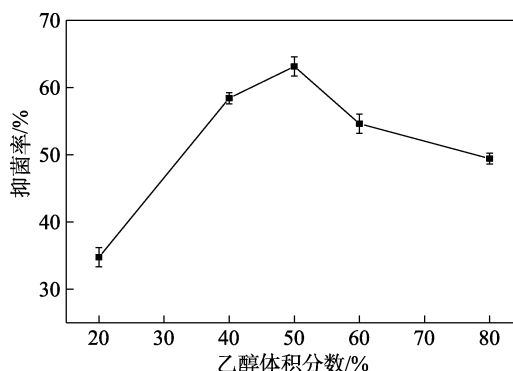


图 2 乙醇体积分数对抑菌活性的影响

Fig. 2 Effect of ethanol volume fraction on antibacterial activity

由图 2 可知，板栗苞提取物对痢疾杆菌的抑菌率随乙醇体积分数的增加呈先增后降的趋势。当乙醇体积分数为 50% 时抑菌率达最大值，之后随乙醇体积分数的增加而逐渐下降。WENDAKOON 等^[27]发现，啤酒花、合香叶、松萝提取物抑菌活性取决于乙醇的体积分数，可能由于不同乙醇体积分数的提取物成分不同，导致抑菌活性有差别。METROUH-AMIR 等^[28]表明，洋甘菊体积分数 50% 乙醇水溶液提取物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑制作用最强，主要原因是提取物中多酚和黄酮类化合物含量较高。HAYEK 等^[29]研究表明，提取物中的酚类化合物会干扰细菌膜结构的渗透屏障。根据实验结果，选取乙醇体积分数为 40%~60% 进行响应面优化。

2.2.2 料液比对板栗苞提取物抑菌率的影响

按 1.2.3 节进行实验，考察料液比对板栗苞提取物抑菌率的影响，结果见图 3。

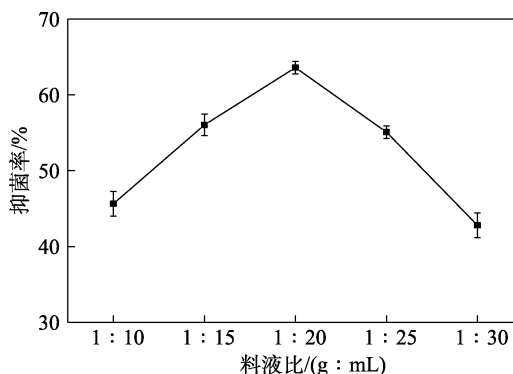


图 3 料液比对抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on antibacterial activity

由图 3 可知, 在料液比为 1:10~1:20 时, 板栗苞提取物对痢疾杆菌抑菌率不断提高, 当料液比为 1:20 时, 板栗苞提取物抑菌率达到最高值, 为 63.12%, 说明在此液料比下抑菌物质释放量达到最佳。BI 等^[30]在提取咖啡豆中活性物质的研究中也表明, 随着溶剂用量的增加, 生物活性成分与溶剂充分接触, 在料液比为 1:20 时达到较高的浸出率, 使提取物具有较好的生理活性; 而在料液比低于 1:20 后抑菌活性降低, 可能溶剂增加导致杂质溶出率也增加所致。因此, 选取料液比为 1:15~1:25 进行响应面优化。

2.2.3 提取温度对板栗苞提取物抑菌率的影响

按 1.2.3 节进行实验, 考察提取温度对板栗苞提取物抑菌率的影响, 结果见图 4。

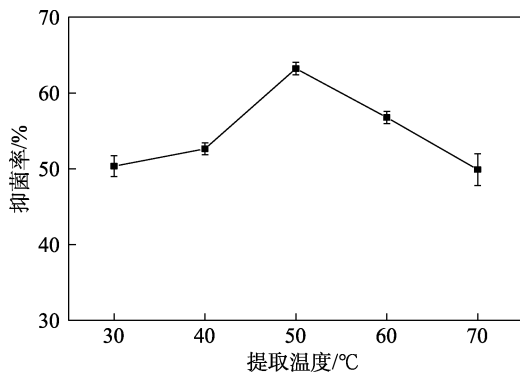


图 4 提取温度对抑菌活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on antibacterial activity

由图 4 可知, 在 30~50 °C 时, 抑菌率随提取温度升高而增加, 在提取温度为 50 °C 时板栗苞提取物抑菌率最高, 随提取温度继续升高抑菌率开始下降。提取温度升高时提取物溶解度增大, 从而提高其抑菌率, 而提取温度过高, 提取物中活性成分可能会被降解而失去活性, 使抑菌率下降。DOUGHARI 等^[31]发现, *Balanites aegyptiaca* (L.) Drel. 和 *Moringa oleifera* Lam. 的乙醇提取物的抗菌活性在 50 °C 左右未受显著影响, 提取温度继续升高会破坏抑菌成分的结构, 导致抑菌活性降低, 与本研究结果一致。所以, 选取提取温度为 40~60 °C 进行响应面优化。

2.3 响应面法优化板栗苞抑菌物质的提取工艺

2.3.1 不同因素对提取效果的影响

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 的数据进行拟合, 得到二次多项回归方程:

$$Y=64.63-5.39A-2.87B+4.10C-1.01AB+2.94AC+1.98BC-2.92A^2-5.36B^2-9.09C^2。$$

回归方程中的系数大小代表各因素对响应值的影响能力^[32]。

由表 3 的方差分析结果可知, F 值为 61.97 ($P < 0.0001$), 模型整体具有显著性, 失拟项不显著 ($P = 0.0819 > 0.05$), 即模型的拟合度好, 说明方差分析具有统计学意义。决定系数 R^2 为 0.9876, 调整决定系数 $AdjR^2$ 为 0.9719, 预测决定系数 $PredR^2$ 为 0.8406, 说明预测值与实测值高度相关, 该模型预测性良好、拟合度高。信噪比为 23.361, 说明方程的可信度较高。各因素对板栗苞提取物抑菌活性的影响为: A (乙醇体积分数) $> C$ (提取温度) $> B$ (料液比)。

表 2 响应面实验设计方案与结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

No.	A	B	C	抑菌率/%
1	0	0	0	64.39
2	1	-1	0	53.81
3	0	-1	1	56.24
4	1	1	0	48.29
5	0	0	0	63.25
6	1	0	-1	40.06
7	-1	0	-1	56.89
8	0	1	-1	40.16
9	0	1	1	52.21
10	0	0	0	65.19
11	-1	0	1	59.30
12	-1	1	0	60.91
13	1	0	1	54.24
14	-1	-1	0	62.39
15	0	0	0	65.19
16	0	-1	-1	52.12
17	0	0	0	65.12

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1036.91	9	115.21	61.97	<0.0001	**
A	232.09	1	232.09	124.85	<0.0001	**
B	66.07	1	66.07	35.54	0.0006	**
C	134.15	1	134.15	72.16	<0.0001	**
AB	4.08	1	4.08	2.19	0.1820	
AC	34.63	1	34.63	18.63	0.0035	*
BC	15.72	1	15.72	8.46	0.0227	*
A ²	35.88	1	35.88	19.30	0.0032	*
B ²	120.92	1	120.92	65.04	<0.0001	**
C ²	347.64	1	347.64	187.00	<0.0001	**
残差	13.01	7	1.86			
失拟项	10.18	3	3.39	4.80	0.0819	不显著
纯误差	2.83	4	0.71			
总和	1049.92	16				

注: **差异性极显著 ($P < 0.001$); *差异性显著 ($P < 0.05$)。

2.3.2 响应面交互作用分析

响应面实验中三因素交互作用对板栗苞提取物抑菌率的影响如图 5 所示。

由图 5 可知，响应面图均为开口向下的凸形曲线，说明响应值存在极高值。3 个图形的等高线中心均位于-1~1 水平，表明以抑菌活性为提取最优条

件在所涉及因素范围内。响应面坡度陡峭程度反映交互效应的强弱，图 5c 的鞍面最陡，表明 A 与 C 的交互作用最大，表明其对板栗苞提取物的抑菌活性的交互作用最明显^[33]。由图 5a、b 可知，这两图的坡度也呈陡峭的椭圆形，说明 B 与 C、A 与 B 对抑菌率有一定的交互作用；乙醇体积分数、提取温度和料液比对抑制率的影响与回归方程的结果一致。

2.3.3 最佳条件的确定及验证实验

利用 Design-Expert 8.0.6 软件分析得到板栗苞抑菌物质提取的最优条件为：乙醇体积分数 42.79%，液料比 18.63 : 1，提取温度 51.57 °C。预测提取物质量浓度为 0.5 g/L 时抑菌率为 67.18%。为适合实验操作，调整乙醇体积分数为 45%、液料比为 20 : 1、提取温度为 50 °C，提取时间为 120 min，在此条件下进行 3 次验证实验，抑菌率为 61.27%±2.60%，达到预测抑菌率的 91.20%，说明应用响应面法优化得到的板栗苞提取工艺参数可靠，具有一定参考价值，且板栗苞提取物抑制痢疾杆菌活性较好。

2.4 板栗苞提取物及各萃取物中总多酚、总黄酮含量的测定

按 1.2.5 节对板栗苞提取物进行萃取，按 1.2.6 节对板栗苞提取物及各层萃取物进行总多酚、总黄酮含量测定，结果如表 4 所示。

表 4 板栗苞各提取物的总酚、总黄酮含量
Table 4 Total phenol and total flavonoid contents of extracts from chestnut burs

样品	总酚含量/ (mg GA/g)	总黄酮含量/ (mg rutin/g)
CW	32.89±0.99	77.09±2.08
CE	35.07±0.36	82.81±1.57
CC	33.21±0.56	79.51±2.24
CEW	42.05±0.18	77.49±2.51
CEY	46.27±1.44	151.96±0.59
CED	39.24±0.18	127.96±2.16
CES	41.42±0.90	139.04±3.10

注：含量为平均值±SD，SD 为平行 3 次实验的标准差。

由表 4 可知，板栗苞乙酸乙酯萃取层总酚含量〔(46.27±1.44) mg GA/g〕在各萃取层中最高，水层〔(42.05±0.18) mg GA/g〕次之。总黄酮含量的测定结果与多酚相似，板栗苞乙酸乙酯层总黄酮含量〔(151.96±0.59) mg rutin/g〕最高，石油醚层〔(139.04±3.10) mg rutin/g〕次之，水相中〔(77.49±2.51) mg rutin/g〕中总黄酮含量较少。研究发现，提取物中多酚和黄酮的含量在抑制细菌生长中起关键作用，由于羟基可以与细胞膜形成质子交

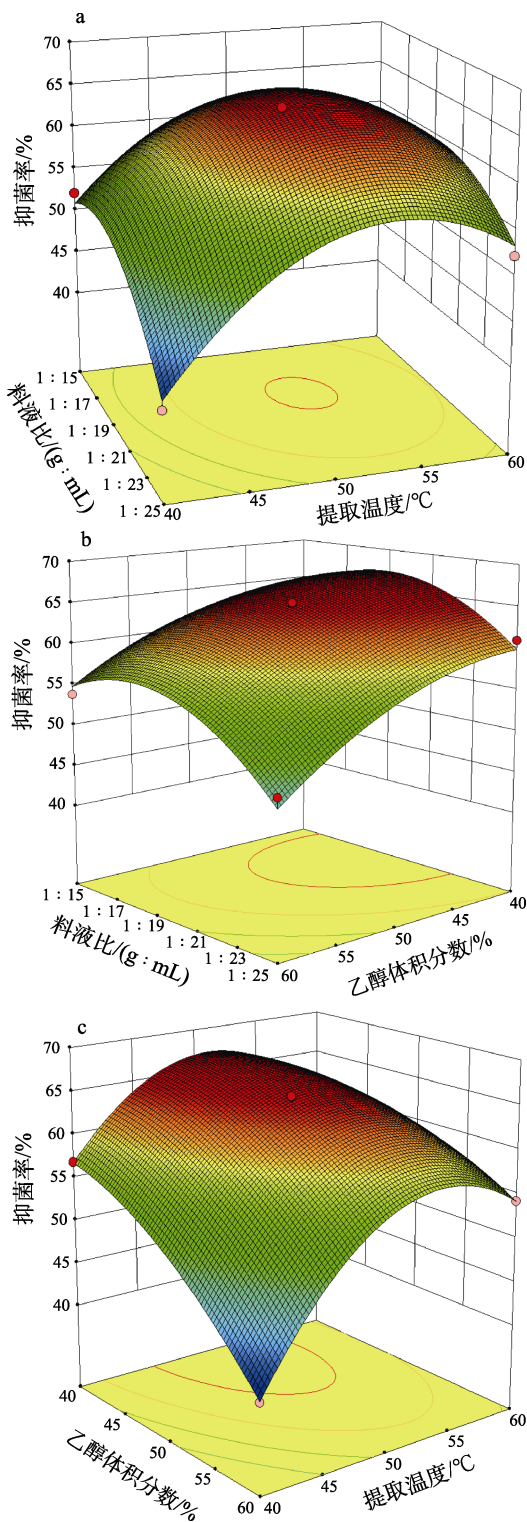


图 5 3D 响应面分析
Fig. 5 3D response surface analysis

换体, 导致电子离域和膜梯度降低, 抑制细胞质膜功能及改变细胞膜通透性, 导致细胞成分流出^[34-35]。TIAN 等^[36]研究也表明, 浆果提取物对金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌的抑制作用与总酚和鞣花丹苷的含量密切相关。ZHANG 等^[37]研究发现, 山楂甲醇和乙醇提取物 (ME 和 EE) 的总黄酮和多酚含量

较高, 其对供试细菌的抑菌活性最强, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 和最低杀菌剂质量浓度 (MBC) 均为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5 MIC 值及生长曲线的测定

按 1.2.7 节进行实验, 采用二倍稀释法进行抑菌活性测定, 以 MIC 值评价抑菌活性, 结果见表 5。

表 5 板栗苞提取物对痢疾杆菌的 MIC
Table 5 MIC of extracts from chestnut burs against *Shigella dysenteriae*

细菌	物质	样品质量浓度/(g/L)							MIC/(g/L)
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	
痢疾杆菌	CE	+++	+++	++	++	++	+	-	3.2
	CEW	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
	CEY	+++	++	+	-	-	-	-	0.4
	CED	+++	+++	++	++	++	+	-	3.2
	CES	+++	++	+	-	-	-	-	0.4
	对照 (空白)				+++				-
	对照 (-)				+++			-	
	对照 (+) 环丙沙星				-			0.01	

注: “-”代表没有细菌; “+”表示有少量细菌; “++”表示中等数量的细菌; “+++”表示大量的细菌。

由表 5 可知, 板栗苞提取物、正丁醇相的 MIC 值为 3.2 g/L, 石油醚相、乙酸乙酯相的 MIC 为 0.4 g/L, 表明石油醚相、乙酸乙酯相对痢疾杆菌的抑制效果最佳。

按 1.2.8 节进行实验, 通过生长曲线测试各萃取物对痢疾杆菌的抑制过程, 结果见图 6。

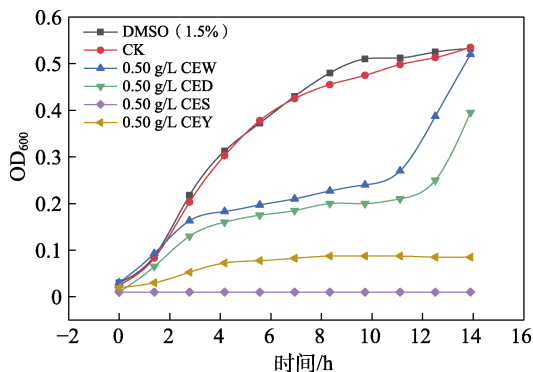


图 6 不同溶剂萃取对痢疾杆菌生长曲线的影响

Fig. 6 Effects of different solvents on growth curves of *Shigella dysenteriae*

如图 6 所示, 痢疾杆菌增长曲线遵循 S 型生长模型, 3 h 进入对数生长期, 到 11 h 处于稳定阶段。经过水相、正丁醇相处理的痢疾杆菌在 3 h 与 CK 对比有显著差异, 到 10 h 以后出现对数增长期, 说明水相、正丁醇相能延缓痢疾杆菌对数生长期的出现, 达不到完全抑制。但质量浓度 0.5 g/L 石油醚相及乙酸乙酯相处理的痢疾杆菌生长曲线在对数生长期时完全抑制细菌生长, 14 h 的抑制率达 85% 以上;

表明石油醚相、乙酸乙酯相对痢疾杆菌的生长起到明显的抑制作用。张蕾等^[38]在狼爪瓦松提取物对伤寒杆菌和痢疾杆菌的研究中也发现, 乙酸乙酯提取液与石油醚提取液对伤寒杆菌最敏感, 抑制作用和提取液质量浓度呈正相关性。任先伟等^[39]发现, 核桃青皮乙酸乙酯萃取相具有广谱抑菌作用, 提取物可破坏菌体的细胞壁及细胞膜的结构。从 MIC 值、生长曲线图可知, 石油醚相、乙酸乙酯相都能抑制痢疾杆菌的生长, 但石油醚相提取率低, 且石油醚极易挥发、具有一定毒性; 乙酸乙酯相提取率高, 总多酚、总黄酮含量比其他萃取相高, 所含活性物质较为稳定, 是一种潜在的抑菌剂。

3 结论

天然提取物具有绿色低毒、调节肠道菌群、不易产生耐药性等优点, 在抑菌剂的开发中具有良好前景。本文筛选了板栗苞抑菌成分的提取溶剂, 确定乙醇水溶液为提取溶剂, 表明双组分溶剂更易提取板栗苞中的抑菌成分。通过响应面法优化得到最佳提取工艺条件: 乙醇体积分数为 45%, 液料比为 20 : 1 (mL/g), 提取温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下质量浓度 0.5 g/L 的提取物抑菌率为 61.27% \pm 2.60%, MIC 值为 3.2 g/L。其萃取组分乙酸乙酯相 MIC 值为 0.4 g/L, 表明乙酸乙酯相萃取物具有良好的抑菌活性, 是一种潜在的抑制痢疾杆菌的天然抑菌剂。此研究可为板栗废弃物的开发利用提供理论基础, 以期延长板栗加工产业链。下一步研究需集中在提取物的纯化和结构分析, 以及抑菌机理。

参考文献:

- [1] PINTO D, BRAGA N, SILVA A M, *et al.* Valorization of fruit processing by-products[M]. Amsterdam: Elsevier, 2020.
- [2] PAILLET F L. Chestnut: History and ecology of a transformed species[J]. *Journal of Biogeography*, 2002, 29(10/11): 1517-1530.
- [3] ZHAO S X (赵守训). Traditional Chinese medicine (TCM) example[M]. Beijing: China Medical and Technology Press (中国医药科技出版社), 1997.
- [4] YOUNG U Y, SHON M S, KIM G N, *et al.* Antioxidant and anti-adipogenic activities of chestnut (*Castanea crenata*) byproducts[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25(4): 1169-1174.
- [5] KANADASWAMI C, LEE L T, LEE P P H, *et al.* The antitumor activities of flavonoids[J]. *In Vivo*, 2005, 19(5): 895-909.
- [6] FRIEDMAN M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51(1): 116-134.
- [7] SILVA V, FALCO V, DIAS M I, *et al.* Evaluation of the phenolic profile of *Castanea sativa* Mill. by-products and their antioxidant and antimicrobial activity against multiresistant bacteria[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(1): 87-101.
- [8] CIENFUEGOS-JOVELLANOS E, QUIÑONES M A D M, MUGUERZA B, *et al.* Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(14): 6156-6162.
- [9] ITANKAR P R, LOKHANDE S J, VERMA P R, *et al.* Antidiabetic potential of unripe *Carissa carandas* Linn. fruit extract[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 135(2): 430-433.
- [10] YIN P, ZHAO S, CHEN S, *et al.* Hypoglycemic and hypolipidemic effects of polyphenols from burs of *Castanea mollissima* Blume[J]. *Molecules*, 2011, 16(11): 9764-9774.
- [11] ZHANG L (张琳), GAO H Y (高慧媛), MACHANG Z S (马场正树), *et al.* Antidiabetic active constituents from involucre of *Chestnut*[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报)*, 2010, 27(7): 530-532, 538.
- [12] CERULLI A, NAPOLITANO A, HOSEK J, *et al.* Antioxidant and *in vitro* preliminary anti-inflammatory activity of *Castanea sativa* (Italian Cultivar "Marrone di Roccadaspide" PGI) burs, leaves, and chestnuts extracts and their metabolite profiles by LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 278-301.
- [13] BHATTACHARYA D, BHATTACHARYA H, SAYI D S, *et al.* Changing patterns and widening of antibiotic resistance in *Shigella* spp. over a decade (2000-2011), Andaman Islands, India[J]. *Epidemiology & Infection*, 2015, 143(3): 470-477.
- [14] ZHANG W X, CHEN H Y, TU L H, *et al.* Fluoroquinolone resistance mechanisms in *Shigella* isolates in Shanghai, China, between 2010 and 2015[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2019, 25(2): 212-218.
- [15] MATHAN M M, MATHAN V I. Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis[J]. *Reviews of Infectious Diseases*, 1991, 13(S4): S314-S318.
- [16] AHAMED S K T, GIRI N. Shigellosis and development of multiple antimicrobial resistance mechanisms of *Shigella* spp.[J]. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2021, 18(4): 703-718.
- [17] LAI W, COCK I E, CHEESMAN M J. Interactive antimicrobial profiles of astragalus membranaceus (*Fisch.*) bunge extracts and conventional antibiotics against pathogenic and non-pathogenic gastrointestinal bacteria[J]. *Pharmacognosy Communications*, 2018, 8(4): 158-164.
- [18] HUANG Y F (黄燕飞). Antibacterial mechanism of *Rhizoma Coptidis* aqueous extract against *Dysentery bacillus*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University (安徽农业大学), 2016.
- [19] ZHANG Z Y (张子越). Study on the mechanism of purslane decoction in inhibiting *E.coli* and *Dysentery in vitro*[D]. Taian: Shandong Agricultural University (山东农业大学), 2020.
- [20] PRABAKARAN M, KIM S H, SASIREKA A, *et al.* Polyphenol composition and antimicrobial activity of various solvent extracts from different plant parts of *Moringa oleifera*[J]. *Food Bioscience*, 2018, 26: 23-29.
- [21] SINGLETON V L, ROSSI J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents[J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16(3): 144-158.
- [22] GUO Y J, FAN L, WANG X Q, *et al.* Discussion about $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetry for determination of total flavonoids[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2002, 22(2): 97-98.
- [23] LIU X, CAI J, CHEN H, *et al.* Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 141: 103980.
- [24] KLANČNIK A, PISKERNIK S, JERŠEK B, *et al.* Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 81(2): 121-126.
- [25] AMALRAJ S, MARIYAMMAL V, MURUGAN R, *et al.* Comparative evaluation on chemical composition, *in vitro* antioxidant, antidiabetic and antibacterial activities of various solvent extracts of *Dregea volubilis* leaves[J]. *South African Journal of Botany*, 2021, 138: 115-123.
- [26] FATHIMA A, RAO J R. Selective toxicity of catechin—A natural flavonoid towards bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(14): 6395-6402.
- [27] WENDAKOON C, CALDERON P, GAGNON D. Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens[J]. *Journal of Medicinally Active Plants*, 2012, 1(2): 60-68.
- [28] METROUH-AMIR H, DUARTE C, MAIZA F. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*[J]. *Industrial Crops & Products*, 2015, 67: 249-256.
- [29] HAYEK S A, IBRAHIM S A. Antimicrobial activity of xocoonstle pears (*Opuntia matudae*) against *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium[J]. *International Journal of Microbiology*, 2012, 2012: 1-6.
- [30] BI W, ZHOU J, ROW K H. Decaffeination of coffee bean waste by solid-liquid extraction[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2011, 28(1): 221-224.
- [31] DOUGHARI J, PUKUMA M, DE N. Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(19): 2212-2215.
- [32] KHURI A I, MUKHOPADHYAY S. Response surface methodology[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2010, 2(2): 128-149.
- [33] WANG S S (王舒舒), ZHANG Y D (张议丹), SHI H G (石宏刚), *et al.* Optimization of *Candida rugosa* lipase-catalyzed synthesis of lignosterol oleate by response surface methodology[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(10): 2090-2095.
- [34] BOUARAB L, DEGRAEVE P, FERHOUT H, *et al.* Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(4): 1457-1474.
- [35] XIE Y, YANG W, TANG F, *et al.* Antibacterial activities of flavonoids: Structure-activity relationship and mechanism[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2015, 22(1): 132-149.
- [36] TIAN Y, PUGANEN A, ALAKOMI H L, *et al.* Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 291-303.
- [37] ZHANG L L, ZHANG L F, XU J G. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.)[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 1-13.
- [38] ZHANG L (张蕾), PAN Y M (潘一鸣), WAN C L (宛春雷), *et al.* Antibacterial activities mechanism of extracts from *Orostachys cartilagineus* A. Bor on *Salmonella typhoon* and *Shigella dysenteriae*[J]. *Journal of Jilin University (吉林大学学报)*, 2017, 55(6): 1621-1625.
- [39] REN X W (任先伟), WEI X L (魏晓璐), HUANG X (黄鑫), *et al.* Antibacterial activity and mechanism of walnut green husk' extract[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2015, 36(18): 93-98.