五倍子抗蕃茄晚疫病原菌有效成分提取工艺研究

宋琳琳[1],李正英[2,*],陈　萍[1]
(1.吉林农业大学食品科学与工程学院,吉林长春 130118;
2.内蒙古农业大学职业技术学院,内蒙古包头 014109)

摘　要:对不同提取条件下五倍子提取液抗蕃茄晚疫病原菌作用进行比较,优选出最佳提取工艺,并测定了其最小抑菌浓度、最小杀菌浓度。结果最佳提取工艺为:水为溶剂,在80℃浸提3h,料液比1:25,提取2次。五倍子提取液对蕃茄晚疫病原菌最小抑菌浓度为15.7mg/mL,最小杀菌浓度为31.3mg/mL。在此条件下五倍子对番茄晚疫病菌的抑菌直径为33.2mm。

关键词:五倍子,蕃茄晚疫病原菌,提取条件,最小抑菌浓度

Extraction of anti-tomato late blight from *Galla chinensis* and study on the extracting technology

SONG Lin-lin[1],LI Zheng-ying[2,*],CHEN Ping[1]
(1.Jilin Agricultural University College of Food Science and Engineering,Changchun 130118,China;
2.Inner Mongolia Agricultural University Career Technical College,Baotou 014109,China)

Abstract:This paper studied the antifungal activity components extracted from *Galla chinensis* agnist tomato late blight,with the minimum inhibitory concentration(MIC) and minimal fungicidal concentration(MFC) were measured. The optimal exraction parame-ters for *Galla chinensis* were obtained as followed:extraction temperature 80℃,extraction time 3h,extraction times 2 and the ratio of herb to water was 1:25. The minimum inhibitory concentration (MIC) was 15.7mg/mL,MFC was 31.3mg/mL. The inhibition zone for tomato late blight reached 33.2mm under circvmstances mentioned above.

Key words:*Galla chinensis*;tomato late blight;extract;MIC
中图分类号:TS201.1　　**文献标识码**:B　　**文 章 编 号**:1002-0306(2013)10-0269-03

五倍子(*Galla Chinensis*),又名为文蛤,木附子,百虫仓[1],主要的化学成分为鞣质和没食子酸[2-3]。五倍子能够抑制多种微生物[4-5],广泛应用于食品、化工、医药等领域。蕃茄晚疫病俗称"过火风"[6],是毁灭性的世界蔬菜病害之一,一旦流行将会给蕃茄带来不可估量的损失。由于现在的农药大多数是有机磷农药[7-8],对人体的伤害很大[9],但是不使用这些农药将无法控制这种病害。而大多数中药对人体没有伤害或很小,所以选择有抗菌作用的中药来抑制对蕃茄的病害。其中,五倍子具有很好的抗菌作用,价格低廉,是首选材料。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

五倍子　购于内蒙古呼和浩特市京远大药房;蕃茄晚疫病原菌(Tomato Late Blight)　购于中国农科院;甲醇、无水乙醇、丙酮、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇　均购于天津市化学试剂三厂,分析纯;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯液体培养基(PDB)　购于青岛高科园海博生物技术有限公司;

RE-52AAA型旋转蒸发仪　上海嘉鹏科技有限公司;VD-1320型无菌操作台　哈尔滨东联电子公司;MJX-150BX型霉菌培养箱　天津市泰斯特仪器有限公司;KG-SX-700型灭菌锅　日本岛津。

1.2　实验方法

1.2.1　菌悬液的制备　将蕃茄晚疫病原菌接种于灭菌后的PDA培养基上,28℃下培养72h,活化三次,将第三代菌种采用平板计数法,用灭菌后的生理盐水稀释成1×10⁶CFU/mL的菌悬液。

1.2.2　五倍子中抑菌物质的提取工艺　五倍子去虫瘿→称取5.00g五倍子粗粉→置于三角瓶中→加入溶剂→水浴保温回流提取→离心(3000r/min,15min)→收集提取液,取沉淀加入提取溶剂→水浴保温回流提→离心(3000r/min,15min)→收集提取液→合并提取液→真空浓缩→定容10mL。

1.2.3　抑菌实验方法　采用牛津杯法[10]。配制PDA培

收稿日期:2012-11-27　*通讯联系人
作者简介:宋琳琳(1988-),女,硕士研究生,研究方向:现代食品分析技术。

养基，灭菌，倒入灭菌培养皿中，冷却凝固。将200μL菌悬液接入培养基中，涂布均匀。用灭菌的镊子将灭菌后的牛津杯放在培养基上，将200μL待测液注入牛津杯中，以待测液的溶剂作为对照，平行3次，在28℃培养箱中培养72h，测量抑菌圈的大小，并照相。

1.2.4 抑菌物质提取工艺

1.2.4.1 提取溶剂的选择 称取5.00g五倍子粗粉十一份，置于不同的三角瓶中，按1.2.2的提取工艺，料液比为1:15分别在40℃回流提取，然后按1.2.3进行抑菌实验，并根据抑菌圈的大小确定最佳溶剂。

1.2.4.2 提取温度的选择 称取5.00g五倍子粗粉五份，置于不同的三角瓶中，根据1.2.4.1所确定的最佳提取溶剂，料液比为1:15，按1.2.2的提取工艺，分别在20、40、60、80、100℃中回流提取。然后按1.2.3进行抑菌实验，并根据抑菌圈的大小确定最佳温度。

1.2.4.3 提取时间的选择 称取5.00g五倍子粗粉五份，置于不同的三角瓶中，根据以上所确定的最佳提取的提取条件，料液比为1:15，按1.2.2的提取工艺，分别在1、2、3、4、5h的条件下回流提取，然后按1.2.3进行抑菌实验，并根据抑菌圈的大小确定最佳提取时间。

1.2.4.4 料液比的选择 称取5.00g五倍子粗粉五份，置于不同的三角瓶中，根据以上所确定的最佳提取的条件，按1.2.2的提取工艺，分别在1:10、1:15、1:20、1:25、1:30的条件下回流提取。按1.2.3进行抑菌实验，并根据抑菌圈的大小确定最佳料液比。

1.2.4.5 浸提次数的选择 称取5.00g五倍子粗粉四份，置于不同的三角瓶中，根据所确定的最佳提取的条件，按1.2.2的提取工艺，提取次数分别在1、2、3、4次进行提取。按1.2.3进行抑菌实验，并根据抑菌圈的大小确定最佳提取次数。

1.2.5 最小抑菌浓度实验和最小杀菌浓度实验 采用倍数稀释法[11]，取具塞试管七支编号，分别加5mL的PDB液体培养基。取1g/mL的五倍子粗提液5mL加到一号试管中混匀，从一号试管中取5mL加到二号试管中以此类推，加到六号试管为止，再将第六支试管弃去5mL。即各试管中药液的浓度分别为250、125、62.5、31.3、15.7、7.9mg/mL，以不加五倍子粗提液为空白对照，灭菌。将每支试管中加入100μL菌悬液，28℃，150r/min，培养72h。观察试管是否浑浊，不浑浊记为“-”；浑浊即为“+”，以未浑浊的浓度作为最小抑菌浓度。从每只试管中取200μL加到PDA培养基中，涂布均匀，培养72h。无菌落生长则记为“-”；有菌落生长记为“+”，以未长菌的最小浓度为最小杀菌浓度。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的优选

根据1.2.4.1的实验设计进行了最佳溶剂的选择实验，实验结果见图1，不同溶剂的提取效果有很大差异。水、乙酸乙酯作为提取溶剂，提取液的抑菌圈直径均大于30mm，20%乙醇、40%乙醇、80%乙醇、无水乙醇、丙酮提取液的抑菌圈直径在20~30mm，60%乙醇、三氯甲烷、正丁醇提取液的抑菌圈直径在10~20mm，石油醚提取液的抑菌圈直径小于10mm。根据溶质的相似溶原理，结构相似的物质才能易于混溶[12]，其中水提液的抑菌圈直径最大，因此选择水作为最佳溶剂。

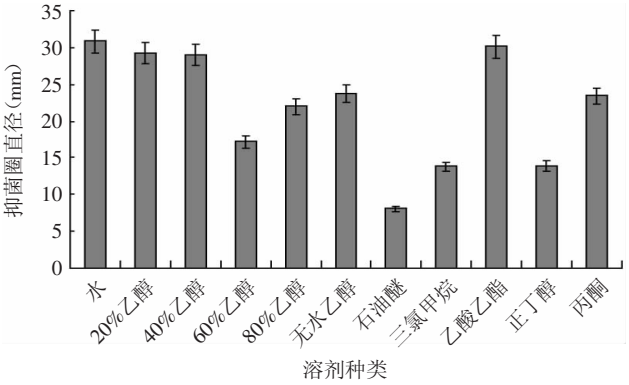

图1 溶剂对粗提液抑菌效果的影响

Fig.1 Effects of different solvents on antifungal substances

2.2 提取温度的优选

用水作为提取溶剂，根据1.2.4.2的实验设计进行了最佳提取温度的选择实验，实验结果见图2。随着温度增高，其抑菌效果逐渐提高，以提取温度在80℃时，提取物的抑菌效果最好。所以选择80℃作为最佳提取温度。

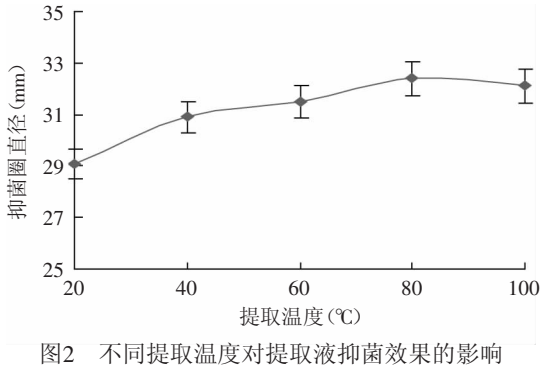

图2 不同提取温度对提取液抑菌效果的影响

Fig.2 Effects of different temperature on antifungal substances

2.3 提取时间的优选

用水作为提取溶剂，提取温度为80℃时，不同时间处理提取液的抑菌效果见图3，随着时间的延长，

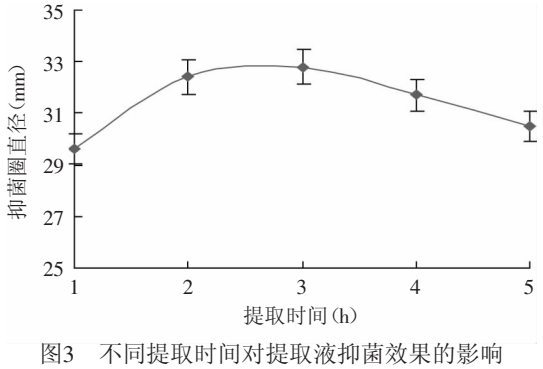

图3 不同提取时间对提取液抑菌效果的影响

Fig.3 Effects of different time on antifungal substances

提取液的抑菌效果逐渐增高，当提取时间达到2~3h时，抑菌效果最好。当提取时间3~5h时随着时间的延长，提取液的抑菌效果逐渐下降。所以，选择3h作为最佳提取时间。

2.4 提取料液比的优选

用水作为提取溶剂，提取温度为80℃，提取时间为3h，不同的料液比的提取液抑菌效果见图4，当料液比为1:10~1:15时，随着提取溶剂的增加，提取液抑菌效果也逐渐增高；当料液比在1:20~1:30时，抑菌效果趋于稳定。提取溶剂的增加，使物料与溶剂的接触面积增大，有效成分的浸出也随之加快，抑菌活性增强[13]。所以，选择1:25作为最适宜的料液比。

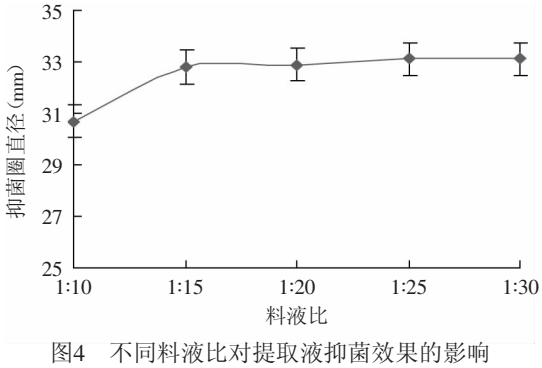

图4 不同料液比对提取液抑菌效果的影响

Fig.4 Effects of different ratios on antifungal substances

2.5 提取次数

用水作为提取溶剂，提取温度为80℃，提取时间为3h，料液比1:25。提取次数与提取液抑菌效果的关系见图5，当提取次数为1~2次时，随着提取次数的增多，抑菌效果也逐渐增高，可达33.2mm。当提取次数为2~4次时，随着提取次数的增加，提取液的抑菌效果逐渐趋于平缓，所以选择2次作为最适宜的提取次数。

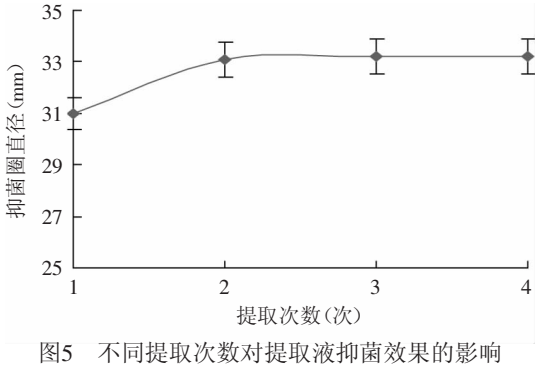

图5 不同提取次数对提取液抑菌效果的影响

Fig.5 Effects of different times on antifungal substances

2.6 最小抑菌浓度与最小杀菌浓度实验

在上述的实验结果的基础上，进行最小抑菌浓度与最小杀菌浓度的实验，由表1可以看出，当药液浓度在15.7mg/mL时五号试管未浑浊，当药液浓度达到7.9mg/mL时六号试管出现浑浊现象。然后进行最小杀菌浓度实验，当药液浓度在15.7mg/mL时有少量菌落。则表明五倍子粗提液对蕃茄晚疫病原菌的最小抑菌浓度为15.7mg/mL，最小杀菌浓度为31.3mg/mL。

表1 五倍子粗提液的最小抑菌浓度与最小杀菌浓度实验结果

Table 1 Result of MIC and MFC of antifungal substance

浓度(mg/mL)	250	125	62.5	31.3	15.7	7.9
浑浊情况	-	-	-	-	-	+
菌落生长情况	-	-	-	-	+	+

注：浑浊情况：不浑浊记为“-”；浑浊即为“+”；菌落生长情况：无菌落生长则记为“-”；有菌落生长记为“+”。

3 结论

通过对五倍子抗蕃茄晚疫病原菌有效成分提取条件的研究结果表明，五倍子提取液以水作为提取溶剂，在80℃回流提取3h，料液比为1:25，最适宜的提取次数为2次时，五倍子提取液的抑菌效果最佳，在此条件下五倍子对番茄晚疫病菌的抑菌直径为33.2mm。五倍子提取液对蕃茄晚疫病原菌最小抑菌浓度为15.7mg/mL，最小杀菌浓度为31.3mg/mL。由此可知，五倍子提取液的抑菌活性成分对蕃茄晚疫病原菌有较强的抑菌作用，为五倍子植物源杀菌剂的开发提供了良好理论的基础。

参考文献

[1] 李秀萍，李春远，梁桂荣，等. 五倍子的研究概况[J]. 中医药学报，2002，30(3)：70-82.

[2] 姜创，吴相，刘军海. 超声波辅助法提取五倍子中单宁酸的工艺研究[J]. 食品与发酵科技，2009，45(2)：11-13.

[3] 帅益武，尤玉如，袁海娜. 五倍子中鞣质的提取、分离纯化研究[J]. 食品科技，2007(6)：125-128.

[4] Hebrert Kolodziej, Oliver Kyaser, Oliver A Radtke, *et al*. Pharmacological profile of extracts of pelargonium sidoides and their constituents[J]. Phytomedicine Suttgart，2003(10)：18.

[5] 李春远，丁唯嘉，梁桂荣. 五倍子化学成分的研究[J]. 中草药学报，2008，39(8)：1129-1132.

[6] 何平高. 蕃茄晚疫病发生规律及防治方法[J]. 四川农业科技，2005(4)：32.

[7] William E Fry，Stephen B，Goodwin. Re-emergence of potato and tomato late blight in the united states[J]. Plant Disease，1995，79(8)：539-540.

[8] R D Peters，H W Patt，R Hall. Hypotheses for the interregional the interregional movement of new genotypes of phytophthora infestans in Canada[J]. Cana J Plant Plant Pathol，1999，21：132-136.

[9] 周红晞. 高等植物源农药[J]. 农药译丛，1994，16(2)：1-6.

[10] 李正英，张保军，陈忠军. 杂交弧瓜中抑菌物质提取条件的优选[J]. 食品科学，2007，28(8)：209-212.

[11] 王新伟，杜会云，宋玉函，等. 牛至油、香芹酚、柠檬醛和肉桂醛抗真菌研究[J]. 食品科技，2011，36(2)：193-202.

[12] 景维本. 相似相溶原理浅析[J]. 教学与管理，1986：75-76.

[13] 陈庆敏. 凤尾兰提取物抑菌活性研究[D]. 泰安：山东农业大学，2007.