

# 响应面法优化安吉白茶抑制溶藻弧菌物质的提取工艺

吕娜<sup>1,2</sup>, 石雅丽<sup>2</sup>, 张虹茜<sup>2</sup>, 殷晓平<sup>2</sup>, 张懋岚<sup>2</sup>, 张捷<sup>1,\*</sup>  
 (1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100;  
 2. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118)

**摘要:** 考察乙醇体积分数、提取时间、超声功率对超声波法提取安吉白茶中抑制溶藻弧菌物质的影响。在单因素实验的基础上, 采用三因素三水平的响应面分析法对安吉白茶抑制溶藻弧菌物质的提取工艺进行优化, 依据回归分析确定最优提取条件。实验结果表明, 最佳提取工艺条件为: 乙醇体积分数为60%, 提取时间为55min, 超声功率为450W, 此时的抑菌效果最好, 菌落数为55CFU。

**关键词:** 响应面法, 安吉白茶, 溶藻弧菌, 抑菌活性, 提取工艺

## Optimizing extraction conditions of anti-*Vibrio alginolyticu* substances from Anji white tea by response surface methodology

LV Na<sup>1,2</sup>, SHI Ya-li<sup>2</sup>, ZHANG Hong-xi<sup>2</sup>, YIN Xiao-ping<sup>2</sup>, ZHANG Mao-lan<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>1,\*</sup>

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;  
 2. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** Ultrasonic wave was applied for extraction of effective component from Anji white tea. Effects of ethanol concentration, extraction time and ultrasonic power on the anti-*Vibrio alginolyticu* effect of the extract were investigated. On the basis of single factor investigation, response surface methodology with three factors at three levels was adopted to optimize the extraction technology of anti-*Vibrio alginolyticu* substances from Anji white tea. The best extraction parameters were determined by the regression analysis. Results showed that the optimum conditions of extraction were as follows: ethanol concentration 60%, extraction time 55 minutes, ultrasonic power 450W. Under the optimized conditions, total number of bacterial colony was 55CFU.

**Key words:** response surface methodology; Anji white tea; *Vibrio alginolyticu*; antimicrobial activity; extraction conditions

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)18-0235-04

安吉白茶是一种自然突变绿茶, 因清明前嫩叶呈白色而得名<sup>[1-2]</sup>, 是我国的珍稀茶种, 是我国绿茶中的奇葩。20世纪80年代在我国浙江省安吉县被发现, 现今在我国很多地方广泛种植<sup>[3]</sup>。近年来, 国内外对我国安吉白茶的保健功能较为关注, 因其营养学成分分析结果表明, 安吉白茶中氨基酸、茶多酚、茶氨酸、咖啡因、硒等物质含量都优于其他一般性茶类<sup>[4-5]</sup>, 因此, 专家推断安吉白茶对人体生理健康等方面所起的有益作用会更加明显<sup>[6]</sup>, 会在食品及保健品市场具有广阔前景。目前的研究表明, 安吉白茶具有降血糖、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒的作用<sup>[7-9]</sup>, 但还未见其抗菌活性的报道。溶藻弧菌存在于多种海洋动物

体内及海域水体中, 是鱼、虾、贝类等海水养殖动物的致病菌<sup>[10]</sup>, 爆发时往往会给水产养殖业造成巨大经济损失。溶藻弧菌也是人和水生动物共患的病原菌, 可以引起食物中毒、败血症及中耳炎等<sup>[11]</sup>。近几年来, 国内不少地方也不断报道了关于溶藻弧菌引起食物中毒的事件<sup>[12-13]</sup>。本研究采用响应面法(RSM)<sup>[14]</sup>优化安吉白茶抑制溶藻弧菌物质的提取工艺, 旨在为开发天然生物抑菌剂及抑制溶藻弧菌食物中毒提供一定的参考依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与仪器

安吉白茶 购于杭州佐佑茶叶有限公司; 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticu*) 保存于浙江万里学院生物与环境学院; TCBS琼脂培养基 购自青岛高科园海博生物技术有限公司; 酵母浸粉、蛋白胨 购于北京奥博星生物技术有限责任公司; 无水乙醇、氯化钠 均为国产分析纯。

JY92-2型超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科

收稿日期: 2013-02-28 \* 通讯联系人

作者简介: 吕娜(1980-), 女, 博士, 副教授, 主要从事食品安全快速检测技术方面的研究。

基金项目: 浙江省科技厅公益项目(2010C32066); 吉林农业大学博士启动基金。

技股份有限公司; BCM-1000型生物洁净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; DNP-9162BS-3型恒温培养箱 上海新苗医疗器械有限公司; CHA-S型恒温振荡器 常州国华电器有限公司; ZDX-35BI高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂; DHG-9140A型干燥箱 南京恒裕电子仪器厂; DELTA320型pH计 梅特勒-托利多仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化 在无氧条件下将溶藻弧菌种接种到TCBS琼脂固体培养基上,放入恒温培养箱,28℃培养12h。

1.2.2 增菌培养及菌悬液的制备 将活化的溶藻弧菌菌株接种于LB液体培养基中,在无氧条件下,挑取单个菌落,放入恒温振荡器,28℃增菌培养90min。根据标准曲线计算菌液浓度,获得 $1.8 \times 10^5$  CFU的菌悬液,备用。

1.2.3 安吉白茶提取物的制备 安吉白茶研磨成粉末。称取1g茶叶粉末,根据单因素和响应面实验设计确定每组的提取条件,加入一定体积分数的乙醇,放入超声波细胞粉碎机进行提取,设置提取时间和超声功率。将得到的提取液进行过滤,静置,挥发除去乙醇。

1.2.4 提取物抑菌作用的测定 将0.15mL菌悬液用9ml无菌生理盐水稀释,吸取0.1mL和茶叶提取液等体积混合,接种至TCBS琼脂培养基,涂布混匀,以未加安吉白茶提取液的培养基作空白对照。在28℃恒温培养箱中培养12h,以菌落数来衡量提取液抑菌作用的强弱。

1.2.5 单因素实验 以菌落数为衡量指标,分别研究乙醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%)、提取时间(20、30、40、50、60min)、超声功率(200、300、400、500、600W)三个因素的抑菌规律。

1.2.6 响应面实验方案 根据单因素实验结果设计因素水平,以乙醇体积分数、提取时间、超声功率三个因素为自变量,以菌落数为响应值,采用Design Expert 8.05b软件设计响应面实验方案<sup>[14]</sup>,确定最佳提取条件的因素和水平,建立数学回归模型,对工艺参数进行最优化分析,因素水平见表1。

表1 Box-Behnken实验设计因素水平及编码

Table 1 Factors and coded levels in the Box-Behnken experimental design

因素	水平		
	+1	0	-1
A 乙醇体积分数(%)	60	50	40
B 提取时间(min)	55	50	45
C 超声功率(W)	550	500	450

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

2.1.1 乙醇体积分数对抑菌作用的影响 设定超声功率为400W,提取时间30min,研究不同体积分数乙醇对安吉白茶提取物抑菌活性的影响,结果如图1所示。当乙醇体积分数在30%~50%范围内,安吉白茶提

取物的抑菌效果随乙醇体积分数的增加而增强。但当乙醇体积分数>50%时,抑菌效果随乙醇体积分数的增加而减弱。这可能是由于当乙醇体积分数增加到一定值时,提取溶剂与抑菌活性物质极性差别增大,同时安吉白茶中一些醇溶性、亲脂性强的成分溶解量增大,与抑菌活性物质竞争同乙醇-水分子结合,减小了抑菌物质的溶解。因此,选取提取剂乙醇体积分数在50%左右为适宜。

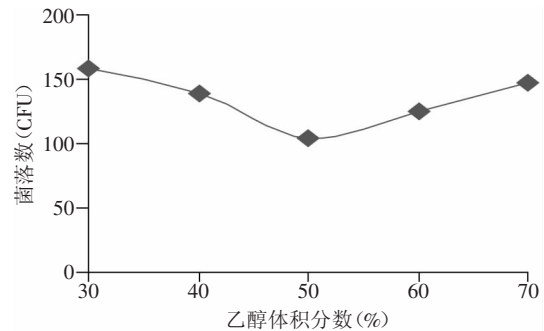


图1 乙醇体积分数对抑菌作用的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on antibacterial activity of the extract

2.1.2 提取时间对抑菌作用的影响 在超声功率400W,提取剂为体积分数50%乙醇的提取条件下,研究不同提取时间对安吉白茶提取物抑菌活性的影响,结果如图2所示。当提取时间在30min之后,菌落数随时间增加而减少,表明超声波能快速促进植物细胞破壁,加速提取溶剂对细胞内活性物质的渗透。50min时菌落数最少,之后随提取时间增加菌落数逐渐增加,这可能与较长时间暴露于超声波条件下,提取物中部分具有抑菌活性物质发生了分解关系。

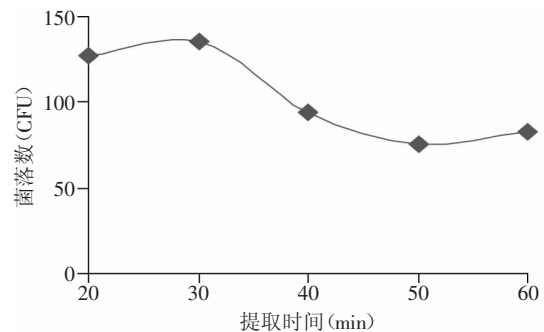


图2 提取时间对抑菌作用的影响

Fig.2 Effect of extraction time on antibacterial activity of the extract

2.1.3 超声功率对抑菌作用的影响 设定提取剂为体积分数50%乙醇,提取时间30min,研究不同超声功率对安吉白茶提取物抑菌活性的影响,结果如图3所示。由图3可知,在超声功率500W条件下,菌落数最少,提取物的抑菌活性达到最高值,继续增加超声波功率,菌落数反而增加。这可能是由于过强的超声波功率导致提取溶剂温度过高,造成了安吉白茶中抑菌活性物质的破坏;同时,较高功率条件下的超声

波可能导致一部分极性较强的抑菌活性物质发生高频运动而热降解<sup>[15]</sup>。

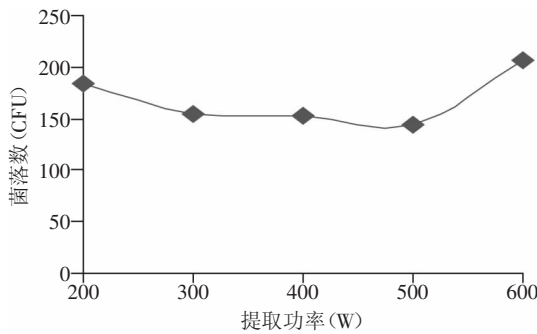


图3 提取功率对抑菌作用的影响

Fig.3 Effect of extraction power on antibacterial activity of the extract

## 2.2 响应面分析法优化安吉白茶抑菌物质提取工艺

2.2.1 响应面分析方案及结果 根据2.1单因素实验结果设计因素水平,运用Design Expert 8.05b软件的实验设计原理<sup>[16]</sup>,以表1的因素水平设计17组实验,实验分析方案及结果见表2。

表2 响应面法设计与实验结果

Table 2 Experimental design and results of the Box-Behnken test

实验号	A	B	C	Y 菌落数(CFU)
1	-1	-1	0	179
2	1	-1	0	132
3	-1	1	0	85
4	1	1	0	73
5	-1	0	-1	159
6	1	0	-1	143
7	-1	0	1	132
8	1	0	1	116
9	0	-1	-1	127
10	0	1	-1	127
11	0	-1	1	121
12	0	1	1	218
13	0	0	0	234
14	0	0	0	227
15	0	0	0	223
16	0	0	0	214
17	0	0	0	238

2.2.2 回归模型的建立及显著性分析 利用Design-Expert 8.05b软件,对表2中的数据进行多元回归拟合,获得菌落数对乙醇体积分数、提取时间和超声功率的二次多项回归方程:

$$Y=227.20-11.39A-7.00B+3.88C+8.75AB+0.00AC+24.25BC-60.35A^2-49.60B^2-29.35C^2。$$

对该模型进行方差分析,结果见表3。

从表3可知,对安吉白茶抑菌物质的抑菌作用采用此模型效果是显著的( $p=0.02<0.05$ ),说明该方法

表3 回归模型方差分析表

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
A	1035.13	1	1035.13	0.68	0.0352	*
B	392.00	1	392.00	0.26	0.2679	
C	120.13	1	120.13	0.079	0.7871	
AB	306.25	1	306.25	0.2	0.6676	
AC	0.00	1	0.00	0.00	1.0000	
BC	2352.25	1	2352.25	1.54	0.2542	
A <sup>2</sup>	15335.25	1	15335.25	10.06	0.0157	*
B <sup>2</sup>	10358.57	1	10358.57	6.79	0.0351	*
C <sup>2</sup>	3627.04	1	3627.04	2.38	0.1669	
回归	36626.33	9	4069.59	2.67	0.0200	*
误差项	354.8	4	88.70			
失拟项	10318.75	3	3439.56	38.78	0.1320	
总回归	47299.88	16	R <sup>2</sup> =0.9743			

注:\*差异显著, $p<0.05$ 。

是可靠的。失拟项( $p=0.1320>0.05$ ),差异不显著,表明无失拟因素存在,因此可用该回归方程代替实验真实点对抑菌效果进行分析。校正决定系数 $R^2=0.9743$ ,说明该模型能解释97.43%的响应面变化,只有2.57%的变异,即该模型拟合优度较好。由p值可看出乙醇体积分数提取时间的二次项差异显著,表明以上因素对抑菌效果有显著影响。由三因素的p值可见,影响安吉白茶抑菌物质提取效果的因素顺序为:乙醇体积分数>提取时间>超声功率。

2.2.3 响应面分析与优化 两因素交互作用的响应曲面及其等高线见图4~图6。各图分别表示了乙醇体积分数、提取时间及超声功率三个因素中任意一个变量为零水平时,其余两个变量对安吉白茶提取物抑菌能力的影响。在响应面分析中,响应曲面的陡峭程度反映了响应值对于处理条件改变的敏感程度,表明因素间存在较强的交互作用。图4显示了乙醇体积分数和提取时间的交互作用不显著。图5可见,提取时间相对于超声功率曲面较陡,说明提取时间相对于超声功率对抑菌物质提取的影响更显著。同样,图6显示了乙醇体积分数相对于超声功率对抑菌物质提取的影响更显著。但从表3可见,各交互项系数

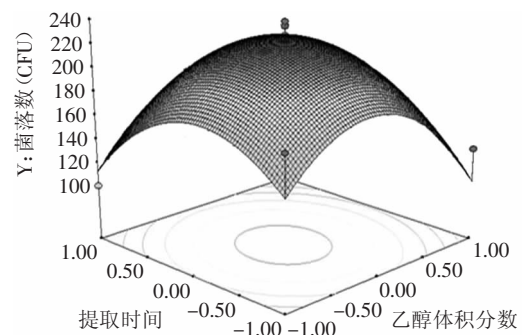


图4 提取时间和乙醇体积分数的交互影响

Fig.4 Response surface graph indicating the effects of extraction time, ethanol concentration on antibacterial activity of the extract



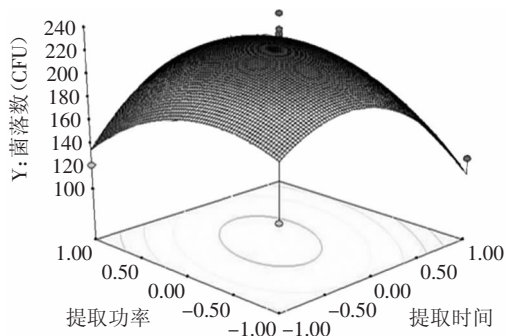


图5 提取时间和超声功率的交互影响

Fig.5 Response surface graph indicating the effects of extraction time, extraction power on antibacterial activity of the extract

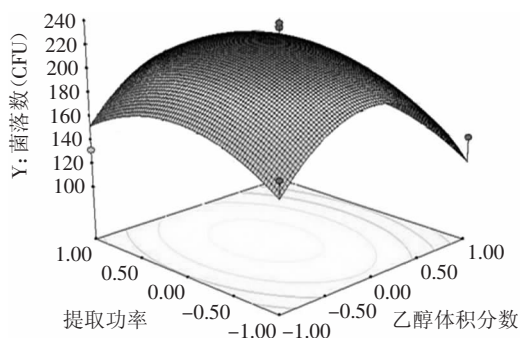


图6 乙醇体积分数和超声功率的交互影响

Fig.6 Response surface graph indicating the effects of ethanol concentration, extraction power on antibacterial activity of the extract

均不显著,所以交互作用的影响相对较小。

2.2.4 安吉白茶抑菌物质提取工艺条件的确定 利用Design-Expert软件对工艺条件进行优化分析,结合二次回归模型的数学分析结果,可以判断超声波提取安吉白茶抑制溶藻弧菌物质的最佳工艺参数为:体积分数60%乙醇溶液、超声功率450W、提取时间55min,在此条件下预测的菌落数为50CFU。验证实验结果表明,在此最佳条件下提取的安吉白茶提取物的抑菌活性最大,3次重复实验的菌落数为55CFU,与响应面优化结果差异不显著,置信区间CI(confidence interval)<95%,表明该模型具有一定的可靠性。

### 3 结论

安吉白茶抑制溶藻弧菌物质的最佳提取工艺参数为:乙醇体积分数60%,超声功率450W、提取时间

55min。在此条件下,菌落数为55CFU,与模型预测值(50CFU)接近。本研究为安吉白茶资源的综合利用和天然抑菌剂的开发奠定了基础,具有重要的现实意义。

### 参考文献

- [1] 成浩,李素芳,陈明. 安吉白茶特异性状的生理生化本质[J]. 茶叶科学,1999,19(2):87-92.
- [2] Li Q, Huang JA, Liu SQ, *et al.* Proteomic analysis of young leaves at three developmental stages in albino tea cultivar[J]. Proteome Science,2011(9):44.
- [3] 邵济波,唐茜,周晓兰,等. 四川引种安吉白茶主要生化成分分析[J]. 食品科学,2012,33(16):179-183.
- [4] 李素芳,陈明. 茶树阶段性返白现象的研究-RuBP羧化酶与蛋白酶的变化[J]. 中国农业科学,1999,32(3):33-38.
- [5] 袁玲. 安吉白茶阶段性返白过程中差异表达基因的分离及部分基因全长cDNA克隆[D]. 长沙:湖南农业大学,2012.
- [6] 谢文钢,邵济波,韩楠,等. 安吉白茶的研究进展及发展前景[J]. 蚕桑茶叶通讯,2011(5):22-25.
- [7] 于淑池,苏涛,杨建民,等. 安吉白茶多糖对实验性糖尿病小鼠的降血糖作用研究[J]. 茶叶科学,2010,30(3):223-228.
- [8] 刘琼,夏道宗,叶晓萍,等. 安吉白茶含片的制作及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技,2012,33(18):245-252.
- [9] 夏道宗,张元君,倪达美,等. 安吉白茶多糖抗肿瘤及免疫调节研究[J]. 茶叶科学,2013,33(1):40-44.
- [10] Lee K K, Liu P C, Chen Y C, *et al.* The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke[J]. Journal of Thermal Biology,2001,26:585-587.
- [11] Ardic N, Ozyurt M. Case report: Otitis due to *Vibrio alginolyticus*[J]. Microbiology Bul,2004,38:145-148.
- [12] 封会茹,游京蓉,刘玉堂,等. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究[J]. 中国食品卫生杂志,2003,15(4):331-334.
- [13] 李刚,赵军. 一起由溶藻弧菌引起的食物中毒调查[J]. 中国热带医学,2008,8(3):519-520.
- [14] Bas D, Boyaci I H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering,2007,78(3):836-845.
- [15] 熊柳,张磊,张吉民,等. 花生红衣乙醇和水提取物的抗氧化性与抑菌活性比较研究[J]. 食品科学,2010,33(3):19-22.
- [16] Zaidul I S M, Yamauchi H, Matsuura-Endo C, *et al.* Thermal analysis of mixtures of wheat flour and potato starches[J]. Food Hydrocolloids,2008,22:499-504.

(上接第234页)

measures[J]. Structural Safety,2004,26:123-132.

[15] 王福刚,曹娟. 星点设计-效应面法优选荷叶总生物碱超声提取工艺[J]. 中草药,2011,34(4):616-619.

[16] 苏柘僮,刘英. 应用Box-Behnken设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究[J]. 中草药,2012,43(3):501-504.

[17] 伍勇,贺福元,曹燕,等. 星点设计-效应面优化法对四物

汤醇沉工艺的研究[J]. 中国医药导报,2009,83(6):17-19.

[18] 伍永富,吴品江. Box-Behnken设计-效应面法优化木犀草素- $\beta$ -环糊精包合物的制备工艺研究[J]. 中草药,41(7):1094-1099.

[19] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中多指标的优化星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药理学杂志,2000,35(8):530-533.