

响应面法优化多穗石柯总黄酮提取工艺及抗氧化活性研究

唐健民, 朱成豪, 高丽梅, 熊雅兰, 邹蓉, 熊忠臣, 蒋运生*

(广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室, 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006)

摘要 [目的]优化多穗石柯总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性的研究。[方法]运用单因素和响应面法相结合,通过超声波辅助对其总黄酮的提取进行优化,利用响应面分析法考察料液比、提取温度、提取时间对其总黄酮含量的影响,并进行抗氧化活性分析。[结果]多穗石柯总黄酮最佳提取条件为超声功率 328.8 W、超声频率 35 kHz、乙醇浓度 60%、料液比 1:41.2(g:mL)、提取温度 63.2 °C、提取时间 37.8 min,总黄酮提取率为 19.18%。抗氧化活性试验结果表明,当黄酮浓度为 2 mg/mL 时,对 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH \cdot 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的最大清除率分别为 11.70%、75.86%和 32.00%,并具有很好的还原能力。[结论]通过热溶剂浸提超声波辅助提取法提取多穗石柯中的黄酮类化合物,所用时间短、要求温度低、提取率好,方法简单易行,具有明显的优势。该研究采用响应面法确定该方法的最佳提取工艺,以期为多穗石柯产业化及开发新天然抗氧化剂提供理论依据。

关键词 多穗石柯;响应面法;总黄酮;提取工艺;优化;抗氧化活性

中图分类号 R 284 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)01-0181-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.055



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Lithocarpus polystachyus* Rehd by Response Surface Methodology

TANG Jian-min, ZHU Cheng-hao, GAO Li-mei et al (Guangxi Key Laboratory of Karst Plant Conservation and Restoration Ecology, Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin, Guangxi 541006)

Abstract [Objective] To optimize the extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from *Lithocarpus polystachyus*. [Method] The combination of single factor and response surface test was used to optimize the extraction of total flavonoids by ultrasonic assist, the effects of solid-liquid ratio, extraction temperature and extraction time on the content of total flavonoids were investigated by response surface analysis, and the antioxidant activity was analyzed. [Result] The optimal extraction conditions of total flavonoids from *Lithocarpus polystachyus* were ultrasonic power 328.8 W, ultrasonic frequency 35 kHz, ethanol concentration 60%, solid-liquid ratio 1:41.2(g:mL), extraction temperature 63.2 °C, extraction. At time 37.8 min, the flavonoid yield was 19.18%. The results of antioxidant activity test showed that when the concentration of flavonoids was 2 mg/mL, the maximum clearance rates of $\cdot\text{OH}$, DPPH \cdot and $\text{O}_2^{\cdot-}$ were 11.70%, 75.86% and 32.00%, respectively, and had good reducing ability. [Conclusion] Ultrasonic assisted extraction with hot solvent extraction is a simple and effective method for extraction of flavonoids from *Lithocarpus polystachyus*. In this study, the response surface method is used to determine the optimal extraction process of this method, so as to provide theoretical basis for the industrialization and the development of new natural antioxidants.

Key words *Lithocarpus polystachyus* Rehd; Response surface method; Total flavonoids; Extraction process; Optimization; Antioxidant activity

多穗石柯(*Lithocarpus polystachyus* Rehd),别名甜茶、甘茶、多穗柯或甜叶子树,为壳斗科石柯属常绿乔木,主要分布于我国长江以南各省区的低山密林中^[1]。多穗石柯是我国传统悠久的民族中药和保健饮品,药食同源植物之一;其味甘、性平,具有清热解毒、化痰、安神降压、补肾益阴等功效。作为民间茶饮,其茶液金黄,气味醇香,甘甜可口,是款待宾客的至上饮品,是人类追求具有茶、糖、药 3 种功能的理想饮料,具有巨大的开发前景^[2-3]。现代医学研究发现,多穗石柯中含有丰富的黄酮类、三萜类、多酚类等物质,具有抗氧化、降血压、降血糖、抗过敏等药理作用^[4-5]。鉴于对多穗石柯总黄酮类提取和抗氧化研究报道较少,该试验采用一种更合理的试验设计方法——响应面法^[6-9],优化超声波提取技术对多穗石柯总黄酮提取工艺,通过响应面法对多穗石柯总黄酮含量进行测定,确定最佳提取工艺并利用其总黄酮进行体外抗氧化活性,从而为其进一步开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试材 多穗石柯样品 2018 年 10 月采自于广西植物研究所喀斯特植物园,取其完整叶片、烘干、粉碎后过 60 目筛备用。样品经广西植物研究所蒋运生研究员鉴定。

1.2 仪器与试剂 TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);DL-720E 智能超声波;电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。芦丁标准品(批号: MUST-12040302,中国药品生物制品检定所);乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、铁氰化钾、磷酸盐缓冲液、三氯乙酸、三氯化铁、邻苯三酚、邻二氮菲、PBS 均为分析纯试剂,桂林卓一生物有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的绘制。精密称取真空干燥至恒重的芦丁标准品 20 mg,乙醇溶解制成 0.4 mg/mL 的对照品溶液。分别取制备好的对照品溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 及提取液 1 mL,置于 25 mL 容量瓶中;加 50%乙醇至 10 mL,加 5%亚硝酸钠 1 mL,混匀,静置 6 min;加 10%硝酸铝溶液 1 mL,混匀,静置 6 min;加 4%氢氧化钠溶液 10 mL,50%乙醇调至刻度,混匀,得空白液、对照品溶液及样品供试液;静置 15 min 后在 190~900 nm 处进行光谱扫描,确定选用 510 nm 作为测定波长。以吸光度为纵坐标、总黄酮浓度为横坐标绘制回归曲线,回归方程为 $y = 0.2038x - 0.0078$ ($R^2 =$

基金项目 中央引导地方科技发展专项(桂科 ZY1949013);广西科技基础和人才专项(桂科 AD17129022);广西植物研究所基本业务费(桂植业 18013,桂植业 18014,19002);河池市科技攻关项目(河科 AB198807)。

作者简介 唐健民(1988—),男,广西桂林人,助理研究员,硕士,从事药用植物学和保护生物学研究。*通信作者,研究员,从事药用植物学和保护生物学研究。

收稿日期 2019-08-15

0.999 2),总黄酮浓度在 0.001 3~0.013 0 mg/mL 线性关系良好。

1.3.2 供试品溶液的制备。称取样品粉末 0.5 g,按照料液比为 1:48.5 加 100%乙醇 24.5 mL,61.9 °C 水浴提取 20 min,超声波频率为 35 kHz,超声波功率为 409.6 W,提取结束后过滤,洗涤液合并,定容至 50 mL,即得供试品溶液。

1.3.3 总黄酮提取工艺优化试验。

1.3.3.1 单因素试验。

(1) 超声频率对总黄酮提取率的影响。准确称取 0.5 g 样品粉末,按照料液比 1:20(g:mL)加入 50%乙醇 10 mL,40 °C 水浴中提取 30 min,超声功率为 180 W,超声频率分别为高频(61 kHz)和低频(35 kHz),过滤,定容至 50 mL,取 1 mL 至 25 mL 容量瓶中。

(2) 超声功率对总黄酮提取率的影响。准确称取样品粉末 0.5 g,按料液比 1:20 加入 50%乙醇 10 mL,40 °C 水浴中提取 30 min,超声功率分别为 60、180、300、420、540 W,超声频率为高频(61 kHz),过滤,定容至 50 mL,按照“1.3.1”步骤加样,测定吸光度,计算总黄酮含量。

(3) 提取温度对总黄酮提取率的影响。准确称取样品粉末 0.5 g,按料液比 1:20 加入 50%乙醇 10 mL,分别在 30、50、60、70、90 °C 水浴中提取 30 min,超声功率为 420 W,超声频率为高频(61 kHz),过滤,定容至 50 mL,按照“1.3.1”步骤加样,测定吸光度,计算总黄酮含量。

(4) 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响。准确称取样品粉末 0.5 g,按料液比 1:20,分别加入 20%、40%、60%、80%、100%乙醇 10 mL,在 60 °C 水浴中提取 30 min,超声功率为 420 W,超声频率为高频(61 kHz),过滤,定容至 50 mL,按照“1.3.1”步骤加样,测定吸光度,计算总黄酮含量。

(5) 料液比对总黄酮提取率的影响。准确称取样品粉末 0.5 g,分别按料液比 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60,加入 100%乙醇 10 mL,在 60 °C 水浴中提取 30 min,超声功率为 420 W,超声频率为高频(61 kHz),过滤,定容至 50 mL,按照“1.3.1”步骤加样,测定吸光度,计算总黄酮含量。

(6) 提取时间对总黄酮提取率的影响。准确称取样品粉末 0.5 g,按料液比 1:20,加入 100%乙醇 10 mL,在 60 °C 水浴中分别提取 10、30、60、90、120 min,超声功率为 420 W,超声频率为高频(61 kHz),过滤,定容至 50 mL,按照“1.3.1”步骤加样,测定吸光度,计算总黄酮含量。

1.3.3.2 总黄酮提取率的计算方法。其计算公式为:

$$\text{提取率} = (C \times V) / M \times 100\% \quad (1)$$

式中, C 为提取液中总黄酮的含量(mg/mL); V 为提取液体积(mL), M 为样品粉末质量(g)^[10]。

1.3.3.3 响应面分析。采用 Design Expert 8.0.6 软件设计响应面试验。根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,从单因素试验中选取对提取结果影响比较大的 4 个因素(料液比、超声功率、提取温度、提取时间)为自变量,总黄酮提取率为响应值,共计 29 个试验点进行组合试验^[11-13]。因素与水平见表 1。

1.3.4 体外抗氧化活性试验。

1.3.4.1 对·OH的清除作用。试管中加入 1 mL 0.75 mol/L 邻二氮菲、2 mL pH=7.45 PBS 溶液、1 mL 蒸馏水、1 mL 0.75 mmol/L FeSO₄ 溶液、1 mL 0.01% H₂O₂,充分混匀后于 37 °C 下恒温水浴 1 h。536 nm 处测定其吸光度 A_p ;用 1 mL 水代替 H₂O₂,测定其吸光度 A_b ;用 1 mL 样液代替 1 mL 水,测定其吸光度 A_s ^[14]。根据公式(2)计算对·OH 的清除率。以 V_c 作对照。

$$\cdot\text{OH 清除率} = (A_s - A_p) / (A_b - A_p) \times 100\% \quad (2)$$

表 1 响应面试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface test

水平 Level	因素 Factor			
	A(料液比) Solid-liquid ratio	B(超声功率) Ultrasonic power/W	C(提取温度) Extraction temperature/°C	D(提取时间) Extraction time/min
-1	1:30	180	50	10
0	1:40	300	60	30
1	1:50	420	70	60

1.3.4.2 对 DPPH· 的清除作用。不同浓度的黄酮样液与 DPPH 溶液等体积混合,30 min 后用无水乙醇作参比,在 517 nm 处测定其吸光度 A_1 ,测定不同浓度的样液与无水乙醇等体积混合液的吸光度 A_2 ;DPPH 溶液与无水乙醇等体积混合液的吸光度 A_0 ,取 3 次平行试验结果根据下列公式计算对 DPPH· 的清除率^[15]。以 V_c 作对照。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

1.3.4.3 对 O₂⁻· 的清除作用。取 5 mL 0.05 mol/L、pH=8.2 的 Tris-HCL 缓冲液 25 °C 水浴预热 20 min,分别加入 1 mL 样液、0.5 mL 25 mmol/L 的邻苯三酚,混匀后 25 °C 水浴准确反应 4 min,立即加入 2 滴 8 mol/L HCl 终止反应。299 nm 处测定吸光度 A_1 ,空白对照组的吸光度 A_0 。将邻苯三酚溶液用 0.5 mL 蒸馏水代替,得到吸光度 A_2 。取 3 次平行试验结果根据下列公式计算对 O₂⁻· 的清除率。以 V_c 作对照^[16]。

$$\text{O}_2^- \cdot \text{清除率} = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\% \quad (4)$$

1.3.4.4 总还原力的测定。1.0 mL 样液加入 2.5 mL 的 1% 铁氰化钾溶液和 2.5 mL 的 0.22 mol/L 磷酸盐缓冲液,混合均匀后于 50 °C 水浴中反应 30 min,迅速冷却加入 10%三氯乙酸 2.5 mL,在 4 000 r/min 下离心 10 min。最后取 2.5 mL 上清液,加 2.5 mL 蒸馏水和 2.5 mL 0.1%三氯化铁溶液,混匀后静置 10 min 测定 700 nm 处的吸光度^[17]。以 V_c 作对照。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取温度的选择。由图 1 可见,随着温度的升高总黄酮的提取率先增加后降低,在 60 °C 时,总黄酮提取率达峰值(13.3%)。继续升高温度,总黄酮提取率逐渐降低,高温条件下,致使黄酮类化合物的结构被破坏或影响其析出,导致总黄酮提取率降低。按照单因素试验结果选择,应以 60 °C 为宜。

2.1.2 乙醇浓度的选择。由图 2 可知,在乙醇单因素条件

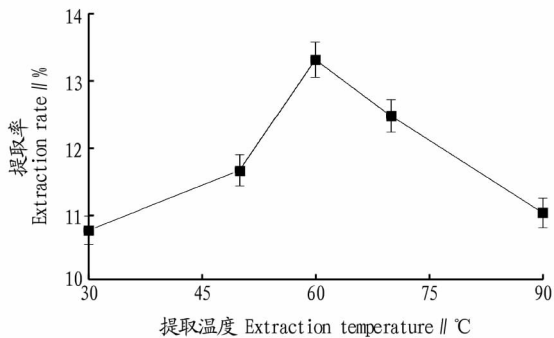


图 1 提取温度对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on extraction rate of total flavonoids

下,随着乙醇浓度的增加,总黄酮的提取率先升高后降低。在乙醇浓度为 60% 的条件下,所提取总黄酮提取率达到最高值 (13.58%)。随着浓度增加,致使脂溶性杂质增加,抑制了总黄酮的浸出,逐渐降低了其提取率,因此选择 60% 的乙醇浓度作为提取溶剂。

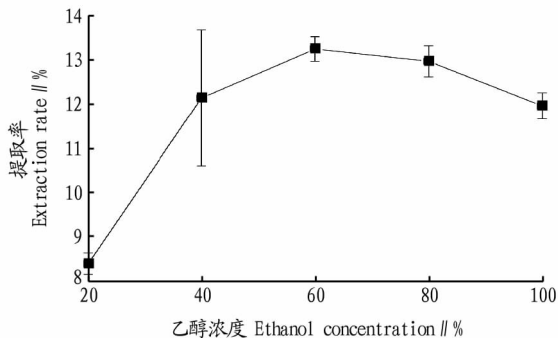


图 2 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids

2.1.3 料液比的确定。由图 3 可知,随着料液比的增多,总黄酮的提取率先增加后降低。在料液比 1:50 处,所提取的总黄酮提取率达 18.62%。继续增大料液比后,总黄酮提取率不再增加甚至明显降低,且继续增大溶剂量既浪费溶剂又不易回收,所以选择料液比 1:50 为宜。

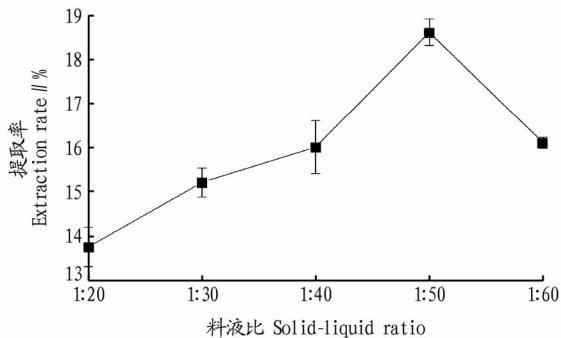


图 3 料液比对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on extraction rate of total flavonoids

2.1.4 超声功率的选择。由图 4 可知,随着超声功率的增大,总黄酮的提取率也相应增加。在超声功率达 300 W 时,

所提取的总黄酮提取率为 13.86%。继续增大超声功率,总黄酮提取率开始降低。可能由于超声功率的增大导致了总黄酮的结构被破坏,所以超声功率以 300 W 为宜。

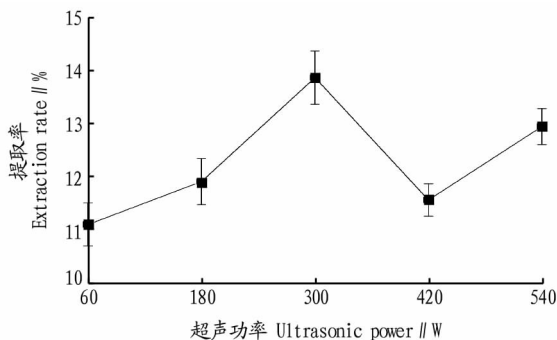


图 4 超声功率对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic power on extraction rate of total flavonoids

2.1.5 提取时间的确定。由图 5 可知,在 10~30 min 内总黄酮提取率随着时间的增加而增大,在 30 min 总黄酮提取率达到最高值 (12.78%)。随着时间继续增加总黄酮提取率开始降低,可能是因为长时间使黄酮类化合物的结构遭到破坏或粉末溶出其他杂质,使得总黄酮提取率降低。故为了保证总黄酮的提取率以及减小提取周期,以 30 min 为宜。

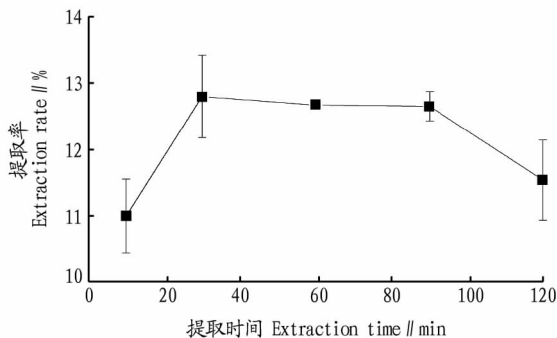


图 5 提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction time on extraction rate of total flavonoids

2.1.6 超声频率的选择。经分析,当超声频率为低频 (35 kHz) 时,总黄酮的提取率要优于高频 (61 kHz),达 12.85%。所以在超声辅助提取时选用低频 (35 kHz) 即可。

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面正交试验。根据表 1 设定的水平和因素,共设 29 个试验点,其中 24 个为析因点,5 个为零点。得到各个试验条件的总黄酮提取率,试验结果见表 2。

由 Origin 2015 软件分析得到回归方程为: $Y = 19.13 + 0.033A + 0.069B + 0.17C + 0.11D - 0.015AB + 0.06AC - 0.038AD - 0.04BC + 0.028BD - 0.04CD - 0.16A^2 - 0.13B^2 - 0.24C^2 - 0.19D^2$, 其中 Y 为总黄酮含量的预测值。该模型的预测复相关系数 $R^2 = 0.9847$, 校正系数 $Adj R^2 = 0.9694$, 说明试验的实际值和预测值拟合度较好。模型 $P < 0.0001$, 说明该模型极其显著,在统计学上是有意义的。 A, C 2 个因素所模拟的一次项小于 0.05, 说明因变量和所选自变量之间的线性关系

显著,该回归方程能代替试验真实点分析试验结果。模拟的二次项 B^2 ($P < 0.01$),表明 B 因素对总黄酮提取率达到极显著的水平,交互项 BC 的 P 值 < 0.05 ,达到显著水平,由此可知,料液比与超声功率、超声功率与提取时间、提取温度与提取时间这些因素之间都存在一定的交互作用,并且它们之间的交互作用会对总黄酮提取率产生显著的影响。

2.2.2 响应面交互作用分析。通过 Design-Expert 8.0.6 软件,将 AC 、 BD 、 CD 交互进行分析比较,做出响应面曲线图,见图 6。由图 6 可知,当各因素在一定范围内增大时,对应的响应值也增大;但当响应值达到最高点,各因素的值继续增大时,其响应值却不断减小。等高线图的中心点在 3D 图上的投影即最高点,表明该点的提取率最高。

2.2.3 优化与验证试验。依据以上响应面试验模型和结果分析,得出最佳提取条件下总黄酮提取率为 19.18%,料液比 1:41.2,超声功率 328.8 W,提取温度 63.2 °C,提取时间 37.8 min。在此最佳条件下,将平行验证试验重复进行 5 次,可得总黄酮提取率平均为 19.07%。实际所测得的提取率的平均值和预测值减少 0.11%,表明该模型的可靠性较高,并且提取工艺的重复性良好,在后续试验中可选取以上条件进行抗氧化活性研究。

2.3 总黄酮体外抗氧化活性 根据图 7 能够看出,总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 均能够起到清除作用,并且在试验浓度范围内,对自由基的清除能力呈现量效关系。当黄酮浓度为 2 mg/mL 左右时,对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\text{DPPH}\cdot$ 的最大清除率分

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

试验号 No.	料液比 Solid-liquid ratio	超声功率 Ultrasonic power W	提取温度 Extraction temperature °C	提取时间 Extraction time min	总黄酮提取率 Total flavonoid extraction rate//%
1	1:50	420	60	30	18.91
2	1:50	180	60	30	18.82
3	1:40	300	50	10	18.38
4	1:40	180	60	60	18.86
5	1:40	300	60	30	19.16
6	1:40	420	60	10	18.72
7	1:30	300	50	30	18.55
8	1:40	300	60	30	19.13
9	1:30	300	60	10	18.59
10	1:40	420	70	30	18.92
11	1:40	300	60	30	19.13
12	1:40	180	50	30	18.47
13	1:40	300	70	60	18.95
14	1:30	300	70	30	18.81
15	1:30	300	60	60	18.85
16	1:30	420	60	30	18.91
17	1:50	300	50	30	18.53
18	1:40	300	70	10	18.82
19	1:50	300	60	10	18.73
20	1:40	180	70	30	18.84
21	1:30	180	60	30	18.76
22	1:40	420	50	30	18.71
23	1:40	420	60	60	19.05
24	1:40	180	60	10	18.64
25	1:40	300	50	60	18.67
26	1:40	300	60	30	19.12
27	1:40	300	60	30	19.11
28	1:50	300	70	30	19.03
29	1:50	300	60	60	18.84

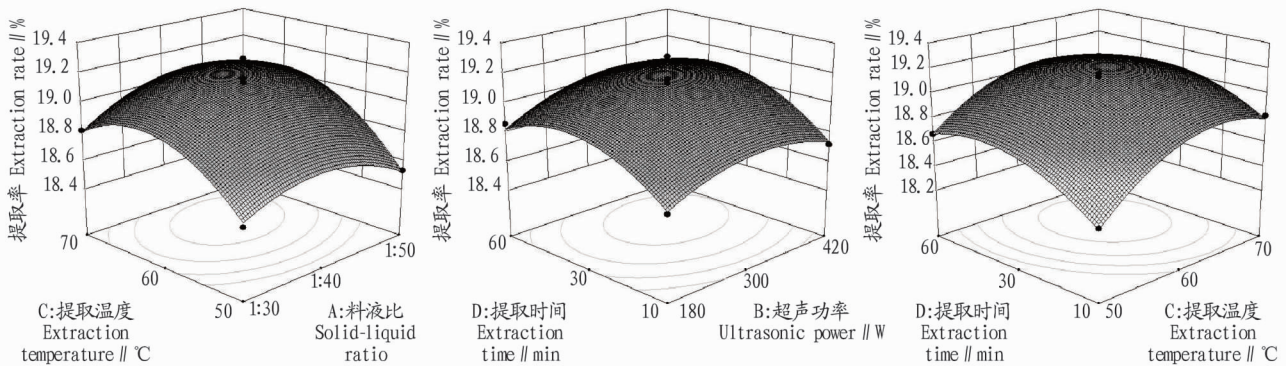
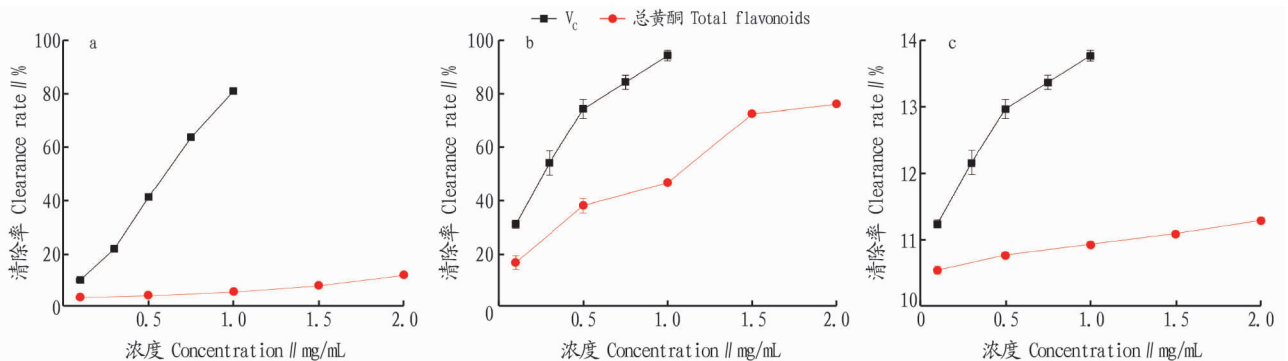


图6 各个因子交互作用的响应面图

Fig. 6 Response surface diagram of each factor interaction

图7 总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ (a)、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (b) 和 $\text{DPPH}\cdot$ (c) 的清除作用Fig. 7 Scavenging effects of total flavonoids on $\cdot\text{OH}$ (a), $\text{O}_2^{\cdot-}$ (b) and $\text{DPPH}\cdot$ (c)

别为 11.70%、32.00% 和 75.86%。在试验浓度范围内,总黄酮和 V_c 的还原力均随浓度的增大而增大(图 8),线性关系较好,其中 2 mg/mL 的总黄酮与 0.67 mg/mL 的 V_c 几乎均等,可见其总黄酮体外抗氧化活性较好。

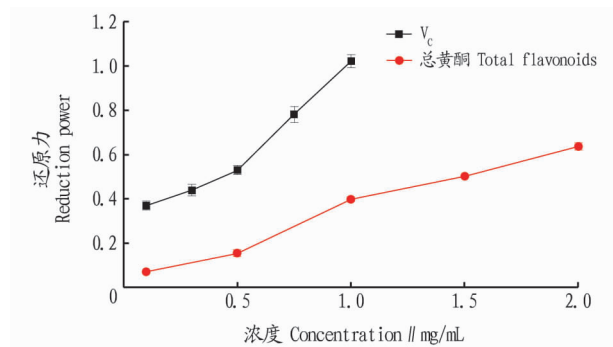


图 8 总黄酮的还原力

Fig. 8 Reduction power of total flavonoids

3 结论

该试验采用响应面法优化多穗石柯总黄酮的提取工艺条件,然后在最佳提取条件下对其进行含量测定,并研究其体外抗氧化活性。结果表明,多穗石柯总黄酮提取的最优条件为:超声功率 328.8 W、超声频率 35 kHz、乙醇浓度 60%、料液比 1:41.2、提取温度 63.2 °C、提取时间 37.8 min,总黄酮提取率为 19.18%;其黄酮对 $\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 、DPPH \cdot 均能够起到清除作用,当总黄酮浓度为 2 mg/mL 时,对它们的最大清除率分别为 11.70%、32.00% 和 75.86%。浓度为 2 mg/mL 的总黄酮与 0.67 mg/mL V_c 的吸光度几乎均等,可见其总黄酮体外抗氧化活性较好。通过响应面法优化,采用超声波提

取提取法多穗石柯中的黄酮类化合物,所用时间短,要求温度低,提取率好,方法简单易行,具有明显的优势。

参考文献

- [1] 雷鸣. 多穗石柯水提物对人正常肝细胞 L-02 增殖作用的研究[D]. 遵义:遵义医学院,2018.
- [2] 申东,赖飞,姚文化,等. 多穗石柯茶[J]. 贵州茶叶,2001(2):28-29.
- [3] 王国晖,肖晓清,胡应祥. 多穗石柯人工繁育及丰产栽培技术[J]. 湖南林业科学,2012,39(5):126-128,131.
- [4] 陆武弟,杨仕婷,赵志文,等. 多穗石柯叶提取物的急性毒性实验研究[J]. 右江医学,2017,45(5):535-538.
- [5] 丰金玉,秦昱,段继春,等. 超声波辅助提取多穗石柯根皮苷研究[J]. 中国农学通报,2015,31(10):251-255.
- [6] 盛云杰,赵天文,方大宽,等. 响应面法优化白花蛇舌草中总黄酮的提取工艺[J]. 时珍国医国药,2018,29(6):1284-1286.
- [7] 许静雅,苏小军,李清明,等. 响应面法优化淮山中总黄酮提取工艺的研究[J]. 中国酿造,2016,35(5):115-118.
- [8] 李云龙,李红梅,胡俊君,等. 响应面法优化苦荞酒糟黄酮提取工艺的研究[J]. 中国酿造,2013,32(7):38-42.
- [9] 邓梦琴,何夏怡,何慕怡,等. 响应面法优化菠萝蜜果皮黄酮提取工艺[J]. 食品工业科技,2016,37(5):222-227.
- [10] 赵娟娟. 分心木黄酮超声-微波协同提取及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2018,39(18):70-76.
- [11] 井文华,骆立双,刘永芳,等. 超声提取红花总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药,2018,29(7):1540-1543.
- [12] 史艳财,邹蓉,韦记青,等. 黄花倒水莲总黄酮提取工艺研究[J]. 北方园艺,2014(12):134-137.
- [13] 焦文静,林洁荣,叶健军,等. 响应面分析法优化紫象草花青素提取工艺[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版),2015(19):11-15.
- [14] 蔡碧琼. 稻壳黄酮类化合物的提取、精制及抗氧化活性研究[D]. 福州:福建师范大学,2008:58-60.
- [15] 朱会霞. 覆盆子黄酮抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2012,28(10):1302-1305.
- [16] 吴玉兰. 金樱子总黄酮对氧化损伤 HUVEC 保护作用的研究[D]. 衡阳:南华大学,2012:15.
- [17] 高行恩,王洪新. 不同提取方法对山药多糖含量及其体外抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业,2015,41(7):256-262.
- [18] 能研究[J]. 工业微生物,2017,47(5):31-35.
- [19] 胡敏,郝林,贾丽艳. 枯草芽孢杆菌产细菌素发酵条件的优化[J]. 食品科学,2014,35(9):198-202.
- [20] AN J Y, ZHU W J, LIU Y, et al. Purification and characterization of a novel bacteriocin CAMT2 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from marine fish *Epinephelus areolatus* [J]. Food control, 2015, 51: 278-282.
- [21] 陈雪,侯红漫,陈莉,等. 产细菌素芽孢杆菌的筛选及发酵条件的研究[J]. 中国酿造,2008(9):26-30.
- [22] 林文凭. *Bacillus subtilis* ZJU15 产生的抗菌肽研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [23] 严涛,朱建国,姜甜,等. 一株凝结芽孢杆菌的分离筛选及产孢条件优化[J]. 微生物学通报,2018,45(2):238-249.
- [24] 罗宝龙,魏军林,黄丽丽,等. 一猪源产细菌素芽孢杆菌的筛选及抑菌特性[J]. 微生物学通报,2018,45(6):1342-1349.
- [25] 钟小廷. 产细菌素蜡样芽孢杆菌的筛选、鉴定及其培养基优化[D]. 成都:西华大学,2014:15-16.
- [26] CAROLISSEN-MACKAY V, ARENDSE G, HASTINGS J W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: Problems and pointers[J]. International journal of food microbiology, 1997, 34(1):1-16.
- [27] CHEN C Z, COOPER S L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes [J]. Biomaterials, 2002, 23(16):3359-3368.

(上接第 175 页)

参考文献

- [1] 何国庆,贾英民,丁立孝. 食品微生物学[M]. 3版. 北京:中国农业大学出版社,2016.
- [2] 朱沁玲,余蓓,蒲玟静,等. 食品防腐剂苯甲酸钠多次给药对雌性大鼠肝脏、肾脏及卵巢毒性的研究[J]. 广东医学,2018,39(3):355-358.
- [3] 丁捷枫,王强胜,李建芬. 天然植物源食品防腐剂的研究进展[J]. 武汉轻工大学学报,2015,34(1):26-31.
- [4] 王晔,张辉华,胡民强. 中草药及其提取物在食品防腐中的应用研究进展[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版),2015,33(1):5-9.
- [5] 孙兆竹,申秋华,白文杰. 乳酸链球菌肽的特性及其在食品工业中的应用[J]. 安徽农业科学,2013,41(13):5949-5951.
- [6] MATARAGAS M, MELAXOPOULOUS J, DROSINOS E H A. Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2002, 18(9):847-856.
- [7] KEMPERMAN R, KUIPERS A, KARSENS H, et al. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and clocistin 574 [J]. Appl Environ Microb, 2003, 69(3):1589-1597.
- [8] 张红梅,符丹丹,赵君峰,等. 泡菜中抑菌性芽孢杆菌的筛选及其细菌素理化特性[J]. 食品工业科技,2018,39(14):110-114,119.
- [9] 冯劲,周少璐,顾振东,等. 产细菌素的细菌筛选鉴定及其产物抑菌性