

纤维素酶协同提取鱼腥草多酚工艺优化及抑菌活性测定

丁鹏鹏, 欧美亚, 刘江, 张煜, 李玉林, 黄雪立, 杨姗*

贵州工程应用技术学院化学工程学院, 贵州 毕节

收稿日期: 2025年3月17日; 录用日期: 2025年5月20日; 发布日期: 2025年5月28日

摘要

采用乙醇回流法从纤维素酶协同提取鱼腥草中多酚类化合物, 通过正交试验对提取条件进行优化, 结果显示, 最佳提取条件为温度80℃、提取时间90 min、乙醇浓度40%、液料比1:60, 多酚得率为2.16%; 同时对粗提物抑制金黄色葡萄球菌金葡亚种的活性进行测定, 结果表明该提取物对金黄色葡萄球菌金葡亚种具有明显抑菌效果, 最小抑菌浓度为0.0187 (g/mL)、最小杀菌浓度为0.25 (g/mL)。

关键词

鱼腥草, 多酚, 抑菌活性

Optimization of Cellulase Assisted Extraction of Polyphenols from *Houttuynia cordata* and Determination of Antibacterial Activity

Pengpeng Ding, Meiya Ou, Jiang Liu, Yu Zhang, Yulin Li, Xueli Huang, Shan Yang*

School of Chemical Engineering, Guizhou University of Engineering Science, Bijie Guizhou

Received: Mar. 17th, 2025; accepted: May 20th, 2025; published: May 28th, 2025

Abstract

The ethanol reflux method was used to synergistically extract polyphenolic compounds from *Houttuynia cordata* using cellulase. The extraction conditions were optimized through orthogonal

*通讯作者。

experiments, and the results showed that the optimal extraction conditions were temperature of 80°C, extraction time of 90 minutes, ethanol concentration of 40%, liquid to material ratio of 1:60, and polyphenol yield of 2.16%; At the same time, the activity of crude extract in inhibiting *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* was determined, and the results showed that the extract had a significant antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, with a minimum inhibitory concentration of 0.0187 (g/mL) and a minimum bactericidal concentration of 0.25 (g/mL).

Keywords

Houttuynia cordata, Polyphenols, Bacteriostatic Activity

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

鱼腥草是一种传统的药用植物，产于长江以南，在云南、贵州、四川等地栽培较多，资源极丰富[1][2]。鱼腥草中主要含有挥发性油类、黄酮类、多酚类、有机酸类等多种化学成分[3][4]，具有清热解毒[5]，消痈排脓，利尿通淋的作用。近年来，随着对天然产物研究的深入，鱼腥草多酚的提取及生物活性备受关注。然而，现有提取方法在效率和成本上仍有局限性，并且其具体的作用机制尚未明确。因此，研究鱼腥草多酚的提取工艺及其生物活性，不仅有助于明确其作用机制，还可为其在医药、食品领域[6][7]的应用提供技术支持。

2. 原料与方法

2.1. 实验原材料

见表 1：

Table 1. Main experimental materials involved in the experiment

表 1. 实验涉及的主要实验材料

名称	生产厂家
鱼腥草	贵州省毕节市七星关区仁德堂中西药房
胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)	北京陆桥技术股份有限公司
胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)	北京陆桥技术股份有限公司
大肠杆菌菌株	广东省微生物菌种保藏中心
金黄色葡萄球菌	上海鲁微科技有限公司

2.2. 实验方法

2.2.1. 实验提取方法及样品处理

实验提取方法见图 1。

原料的处理：将鱼腥草平铺在铁丝网架平面上，铺成 15 mm 的薄层，在真空干燥箱中 60°C 干燥 15 min，用摆动式高速万能粉碎机粉碎约 3 s~5 s 过 30 目筛，放入干燥容器中备用。

**Figure 1.** Experimental flowchart**图 1. 实验流程图**

2.2.2. 试剂配制

(1) 实验所需试剂的制备：实验中应配制 10% Na_2CO_3 溶液，用电子天平准确称取 10.0000 g 亚硝酸钠固体，在烧杯中搅拌溶解均匀后，转移到 100 mL 容量瓶中，并用去离子水定容至刻度，备用。

(2) 标准曲线的制作：参考肖溪[8]的方法并稍加改动。准确称取没食子酸为标准品 20.0 mg，用蒸馏水稀释至 100 ml，分别取一定体积(0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL)的没食子酸标准液($1.6 \mu\text{g}/\text{mL}$)置于 50 mL 容量瓶中，分别加入 1 mL 福林酚试剂，摇匀，静置 5 min 后加入 5 mL 10% Na_2CO_3 溶液，用蒸馏水定容至刻度。避光放置 120 min，设置空白，测定 765 nm 的吸光值。以吸光值 A 为纵坐标，没食子酸标准液浓度 C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标，所得回归方程为 $y = 0.1081x + 0.0237$, $R^2 = 0.999$ 。

2.2.3. 多酚类化合物的得率

将鱼腥草干燥、粉碎。精密称取鱼腥草粉末 1.0 g，置于 100 mL 圆底烧瓶中，加入 30 mL 50% 乙醇溶液(液料比 1:30 (g/mL))，在水浴中加热至 50°C，用盐酸、氢氧化钠调节 pH 至 5 (纤维素酶的最适 pH [9])，在如下条件下进行提取：纤维素酶添加量(酶与物料的质量比)5%、回流温度 50°C、提取时间 30 min，减压抽滤，得到鱼腥草提取液，将滤液置于离心机内以 1000 r/min 离心 5 min，提取液取 1 mL 转移到总容积约为 25 mL 的容量瓶中，分别加入 1 mL 福林酚试剂，摇匀，静置 5 min 后加入 2 mL 10% Na_2CO_3 溶液，用蒸馏水定容至刻度避光放置 120 min，设置空白，测定 765 nm 的吸光值。按公式(1)计算总多酚得率。

$$(C * V * V_2 * 1000)/(V_1 * W) \times 100\% \quad (1)$$

式中：

C——为依据所测吸光度计算出测量液中的浓度 mg/mL ；

V——为移取液定容后的体积 mL ；

V_1 ——为移取液的体积 μL ；

V_2 ——为反应完后测量的提取液体积 mL ；

W——为加入的脱脂葡萄籽粉质量 mg 。

2.2.4. 提取条件优化

将提取时间 A (min)、温度 B (°C)、液料比 C (g/mL) 和乙醇浓度 D (%) 为变量，反响值为多酚得率，选择正交试验。根据正交表进行优化试验所得到的数据来确定提取的最佳实验参数。实验中因子水平表见表 2。

Table 2. Orthogonal horizontal factor table**表 2. 正交水平因素表**

水平	A 提取时间 min	B 回流温度 °C	C 料液比(g/mL)	D 乙醇浓度%
1	110	80	60	60
2	90	70	50	50
3	70	60	40	40

在得到最佳提取条件后，以最佳提取条件提取多酚溶液抽滤，用旋蒸浓缩液体至 10 mL (用 80 度下杀菌 30 分钟)放入超净工作台备用。

2.2.5. 鱼腥草提取物的体外抗菌实验

(1) 培养基的配置和菌悬液的配制

培养基的配置：

分别按照胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)瓶身上的比例称取(TSA)和(TSB)并加入自来水加热至沸腾，转移至锥形瓶用一次性封口膜覆盖住瓶口，下一步用实验室消毒专用牛皮报纸包裹住瓶口放入高压蒸汽灭菌锅高压灭菌 20 min，放入超净工作台备用。

菌悬液的配制：

取菌种和分别装有 10 mL 和 5 mL 蒸馏水的试管一起放入超净工作台，用接种环在装有 5 mL 蒸馏水的试管配置 0.5 麦氏的菌液。用移液枪吸取 0.1 mL 的菌液加入到装有 10 mL 蒸馏水的试管中，达到稀释 100 倍的目的。放置在一旁备用。

(2) 抑菌效果测定

参考叶文初[10]的方法并稍加改动，采用试管二倍稀释法来测定鱼腥草提取物对各菌的最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)：取 13×50 mm 灭菌有棉塞试管 13 支，编号，排成一列，然后每支试管先加入无菌胰蛋白胨大豆肉汤 1.0 mL，然后于第一支试管中用移液枪注入鱼腥草提取物 1.0 mL，混合均匀后移液枪抽出 1.0 mL 注入第 2 支试管中，依次类推 1:1~1:1024 稀释，直到第 11 管取出 1.0 mL 弃去。第 12 管不加入药物，可作为阳性对照管；第 13 管不加入细菌，可作为阴性对照管。经过恒温箱恒温培养 18~24 h 的菌液用无菌肉汤稀释成细菌浓度为 10^6 (比浊法测定)。移液枪抽取细菌稀释液 0.1 mL 分别加入到上述 1~12 管中混合摇匀，第 13 支试管注入 0.1 mL 灭菌生理盐水，将各试管放于恒温培养箱中恒温培养 24 h，观察该结果。经观察，在阳性对照管中的肉汤培养液呈浑浊状，而阴性对照管中的肉汤培养液呈透明状的前提下，观察其它试管中的肉汤培养液浑浊情况。如试管内肉汤培养液出现浑浊，说明有细菌生长；如试管内肉汤培养液澄清透明，说明无细菌生长。眼观选出无菌生长的各支试管，分别取其肉汤培养液均匀涂布于琼脂平板培养基上，培养箱恒温培养 24 h，观察该结果。

依上述方法测出最小抑菌浓度(MIC)之后，将未见细菌生长各支试管培养物混匀后，分别采用移液枪抽取肉汤培养液 0.2 mL 倾倒于 2 个胰蛋白胨大豆琼脂培养基上，再用三角头玻璃涂抹棒均匀涂于琼脂平板上，37℃ 恒温箱恒温培养 18~24 h 后，用活菌计数器计数培养基上的菌落数，平均菌落数小于 5 个的为最小稀释度的苦豆子提取物药液浓度即为最小杀菌浓度(MBC)。

3. 结果与讨论

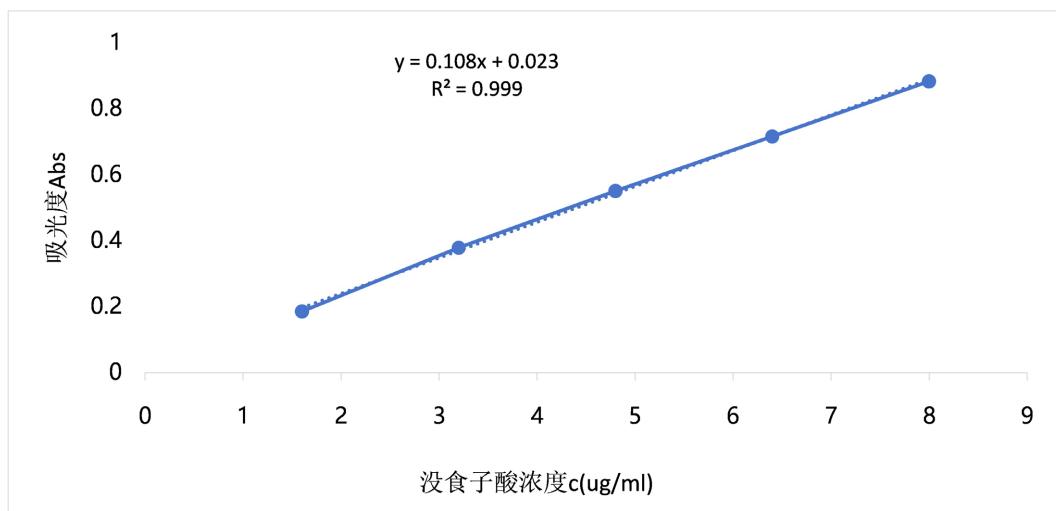
3.1. 标准曲线的绘制

按照 2.2.2 中的方法对不同浓度没食子酸标准品吸光度作图，见下图 2。

由图 2 可知，以标准品质量浓度为横轴，多酚标准品测定的吸光度值为纵轴。根据最小二乘法，得到标准品的线性回归方程，多酚标椎品的吸光值(Abs)和鱼腥草中多酚标准品的质量浓度之间关系为： $y = 0.1081x + 0.0237$, $R^2 = 0.999$ ，它们之间具有良好的线性关系。

3.2. 提取条件的优化

采用乙醇回流法纤维素酶协同提取鱼腥草多酚乙醇回流法，采用温度、乙醇浓度、提取时间、液料比进行正交试验优化提取条件。测试结果如表 3 所示。

**Figure 2.** Standard curve of polyphenols**图 2.** 多酚的标准曲线图**Table 3.** Results of orthogonal experiment**表 3.** 正交试验结果

No.	A 提取时间 min	B 回流温度 °C	C 液料比 g/mL	D 乙醇浓度 %	多酚得率/%
1	110	80	60	60	2.16
2	110	70	50	50	1.89
3	110	60	40	40	1.74
4	90	80	50	40	2.3
5	90	70	40	60	1.63
6	90	60	60	50	2.12
7	70	80	40	50	1.67
8	70	70	60	40	2.29
9	70	60	50	60	1.79
K1	1.930	2.043	2.190	1.860	-
K2	2.017	1.937	1.993	1.893	-
K3	1.917	1.883	1.680	2.110	-
R	0.100	0.160	0.510	0.250	-
最佳水平	90	80	1:60	40	-

以鱼腥草多酚化合物的总得率为综合评价的指标时，极差(R)的大小可判断各因素对酶辅助提取鱼腥草多酚影响的强弱，极差(R)越大，影响作用越强。由表3表明，以鱼腥草多酚得率水平为主要评定标准时。干扰因素之间的关系为提取时间(A) < 回流温度(B) < 乙醇的浓度(D) < 液料比(C)。可看出回流过程中液料比的变化对鱼腥草多酚的有效得率影响明显，其次是乙醇的浓度的大小。根据各因素均值 K₁、K₂、K₃ 的大小可判断各因素对最佳工艺条件影响的强弱，K 越大，最佳工艺条件越好。可以得出最佳工艺组合为 A₂B₁C₁D₃，即鱼腥草多酚的最佳酶解工艺条件为提取时间 90 min，回流温度 80°C，乙醇的浓度 40%，液料比 1:60。

3.3. 鱼腥草提取物对不同菌株的抑制效果

按照 2.2.5 的方法, 将鱼腥草粗提物(多酚类)对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌金葡亚种进行抑菌试验, 结果见表 4 及图 3。

Table 4. Antibacterial effect of crude extract of *Houttuynia cordata* (polyphenols) on bacterial strains
表 4. 鱼腥草粗提物(多酚类)对菌种的抑菌效果

菌种	最小抑菌浓度(g/mL)	最小杀菌浓度(g/mL)
大肠杆菌菌株	0.0375	0.5
金黄色葡萄球菌	0.075	0.5
普通变形杆菌	0.25	0.5
肺炎克雷伯氏菌	0.125	0.5
金黄色葡萄球菌金葡亚种	0.0187	0.25

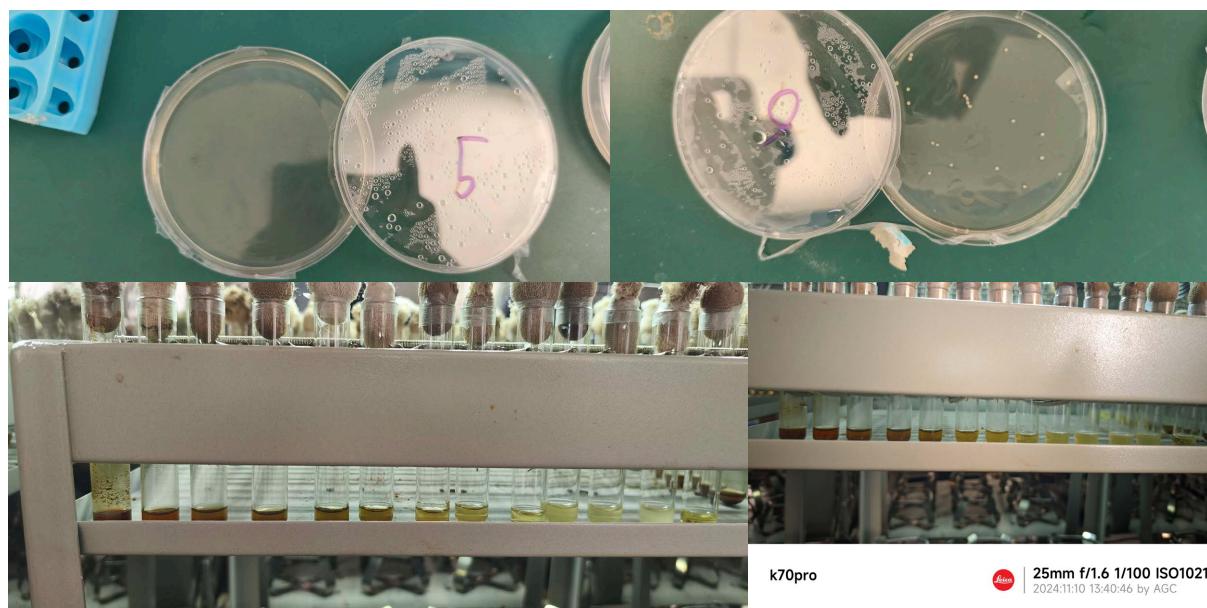


Figure 3. Antibacterial effect of *Houttuynia cordata* extract on *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* and *Escherichia coli*
图 3. 鱼腥草提取液对金黄色葡萄球菌金葡亚种和大肠杆菌抑菌效果图

从结果可以看出, 粗提物对供试菌有一种强而稳定的抑菌作用。鱼腥草中多酚类化合物对 5 种不同菌株有不同程度的抑制效果, 如对金黄色葡萄球菌金葡亚种的抑制作用最强最小抑菌浓度为 0.0187 (g/mL)、最小杀菌浓度为 0.25 (g/mL), 其次为大肠杆菌菌株最小抑菌浓度为 0.0375 (g/mL)、最小杀菌浓度为 0.5 (g/mL), 对普通变形杆菌的抑制作用最弱最小抑菌浓度为 0.25 (g/mL)、最小杀菌浓度为 0.5 (g/mL)。

4. 结论

以纤维素酶协同乙醇回流提取法从鱼腥草中提取多酚类物质的单因素实验中, 其他提取条件保持不变的情况下, 纤维素酶量为 5%, 多酚得率为 1.34%。乙醇浓度为 50%, 多酚的得率最高为 1.5%。回流温度 70°C, 多酚得率为 1.79%; 同理, 提取时间为 90 min, 多酚得率为 1.89%。液料比为 1:50, 多酚得率为 2.4%。在此基础上进行正交试验中, 得出最佳组合为 A₂B₁C₁D₃; 最佳条件为时间 90 min, 温度 80°C,

液料比 1:60, 乙醇浓度 40%。在该条件下, 提取出的多酚得率是最高。由 R 确定干扰因素中液料比影响最大, 最小是时间, 为今后提高鱼腥草的附加值提供一定的理论依据。另外, 探讨鱼腥草粗提物(多酚)的抑菌活性, 对 5 种供试菌的抑菌程度关系为普通变形杆菌 < 肺炎克雷伯氏菌 < 金黄色葡萄球菌 < 大肠杆菌菌株 < 金黄色葡萄球菌金葡亚种: 其最小抑菌浓度分别为 $0.25 < 0.125 < 0.075 < 0.0375 < 0.0187$ (g/mL), 最小杀菌浓度分别为 $0.5 = 0.5 = 0.5 < 0.25$ (g/mL)。所以说粗提物对五种菌株都起到有一定杀菌作用, 只是对普通变形杆菌抑制效果稍微弱点。

基金项目

大学生创新创业训练计划项目“鱼腥草中鱼腥草素提取及抑菌作用测定”(S202310668294)。

参考文献

- [1] Luo, Q., Meng, P., Jiang, D., Han, Z., Wang, Z., Tan, G., et al. (2022) Comprehensive Assessment of *Houttuynia cordata* Thunb., an Important Medicinal Plant and Vegetable. *Agronomy*, **12**, Article No. 2582. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102582>
- [2] Rafiq, S., Hao, H., Ijaz, M. and Raza, A. (2022) Pharmacological Effects of *Houttuynia cordata* Thunb (*H. cordata*): A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals*, **15**, Article No. 1079. <https://doi.org/10.3390/ph15091079>
- [3] 钟兆银, 黄锁义. 鱼腥草提取物鱼腥草素对肿瘤细胞抑制作用[J]. 广东化工, 2019, 46(16): 27-28.
- [4] 蔡红蝶, 刘佳楠, 陈少军, 等. 鱼腥草化学成分、生物活性及临床应用研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2719-2728.
- [5] 龚乃超, 陈箐筠, 刘枣, 等. 鱼腥草黄酮抗抑郁活性的研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(3): 41-44.
- [6] 孟江, 董晓萍, 姜志宏, 等. 鲜鱼腥草的黄酮类化合物研究[J]. 中国中药杂志, 2006(16): 1335-1337.
- [7] 孟江, 董晓萍, 周毅生, 等. 鲜鱼腥草酚类化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007(10): 929-931.
- [8] 肖漫, 胡露, 陈杰, 等. 响应面法优化姜根多酚类成分提取及纯化工艺[J]. 当代化工研究, 2022(22): 61-63.
- [9] 周志红, 赵昕, 胡勤, 等. 超声波处理与纤维素酶协同提取山楂总多酚的工艺优化研究[J]. 当代化工研究, 2024(11): 152-155.
- [10] 叶文初. 苦豆子提取物的抑菌、抗炎及对小鼠免疫功能的影响和毒性作用研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.