(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110213967 A
(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201780078386.X

(22)申请日 2017.12.21

(30)优先权数据
1663205 2016.12.22 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/084116 2017.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/115296 FR 2018.06.28

(71)申请人 安托芬诺公司
地址 法国蒙彼利埃

(72)发明人 F·罗瑞坦 L·法布尔

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
A01N 65/08(2009.01)
A01P 3/00(2006.01)
A61K 36/87(2006.01)
A61P 17/10(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61K 8/9789(2017.01)
A23L 33/105(2016.01)
A23B 7/154(2006.01)
A23L 3/349(2006.01)
A23L 3/3472(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

富含多酚的干燥生物质提取物的制备

(57)摘要

本发明涉及用于制备干燥植物生物质的富含多酚的提取物的方法、所得提取物及其用于抗真菌应用、具体地为用于预防和处置收获后的水果和植物上的真菌感染但也用于与其抗细菌和抗氧化性能相关的应用的用途，所述植物生物质具体地为藤本植物的部分。

CN 110213967 A

1.用于制备干燥植物生物质的富含多酚的提取物的方法,其包括(a)通过将其与水性溶剂接触提取干燥生物质的步骤和(b)回收富含多酚的水相的步骤,其特征在于在提取步骤(a)中,同时或顺序地通过下列措施处理植物生物质/水性溶剂混合物:

(i)具有在915MHz至28GHz范围内的频率的电磁波,和

(ii)搅拌所述混合物,和/或

(iii)5,000至95,000Pa(50至950毫巴)的压力。

2.根据权利要求1所述的方法,其特征在于所述水性溶剂是水或包含10至70体积%乙醇的乙醇/水混合物。

3.根据权利要求2所述的方法,其特征在于所述水性溶剂是包含30至50%乙醇的乙醇/水混合物。

4.根据权利要求1-3中一项所述的方法,其特征在于干燥植物生物质与水性溶剂的质量比为1/5至1/30。

5.根据权利要求4所述的方法,其特征在于干燥植物生物质与水性溶剂的质量比为1/10至1/20。

6.根据权利要求1-3中一项所述的方法,其特征在于所述电磁波的频率的范围为915MHz至2.45GHz。

7.根据权利要求1-6中一项所述的方法,其特征在于所述电磁波的功率的范围为300W至100kW。

8.根据权利要求7所述的方法,其特征在于所述电磁波的功率的范围为1至75kW。

9.根据权利要求1-8中一项所述的方法,其特征在于所述提取步骤(a)进一步包括超声处理(iv),其频率的范围为25kHz至1MHz。

10.根据权利要求9所述的方法,其特征在于超声功率的范围为200至4000W。

11.根据权利要求1-10中一项所述的方法,其特征在于所述植物生物质由葡萄属种的藤本植物的枝条构成。

12.根据权利要求1-11中一项所述的方法,其特征在于其包括通过部分或全部蒸发所述水性溶剂来浓缩所述多酚的步骤(c)。

13.根据权利要求12所述的方法,其特征在于通过冻干回收的水相实现所述浓缩(c)。

14.通过根据权利要求1-13中一项所述的方法可获得的富含多酚的提取物。

15.一种组合物,其特征在于其包含根据权利要求14所述的提取物和适合其使用的载体。

16.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物用于预防和处置植物上的真菌感染的用途。

17.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物用于预防和处置收获后的水果和植物上的真菌感染的用途。

18.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物用于预防和/或处置植物中的氧化应激的用途。

19.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物作为化妆品或食品组合物中的抗氧化剂的用途。

20.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物,其用于疗法。

21.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物,其用于治疗皮肤感染。

22.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物,其根据权利要求21使用,其特征在于所述皮肤感染是痤疮。

23.根据权利要求14所述的提取物或根据权利要求15所述的组合物,其用于治疗人或动物中的氧化应激。

富含多酚的干燥生物质提取物的制备

技术领域

[0001] 本发明涉及用于制备干燥植物生物质的富含多酚的提取物的方法、所得提取物及其用于抗真菌应用、具体地用于预防和处置收获后的水果和蔬菜上的真菌感染但也用于与其抗细菌和抗氧化性能相关的应用的用途，所述植物生物质具体地为藤本植物的部分。

背景技术

[0002] 植物生物质的富含多酚的提取物是技术人员已知的。许多工作已经专注于提取生物质以获得富含多酚的提取物，其全部在方法的经济可行性方面都具有一些劣势，例如低产率或非常长的提取时间，或限制它们在提取后的用途，特别是有毒有机溶剂的使用(Goupil等人2012，Alexa等人2012，Sanchez等人2008，Pezet等人2004)。

[0003] 具体地，在专利和专利申请US 2012/0021080、US 5,989,557、US 2012/0142105、JP 2016 102192、CN 205 759 861、CN 103 875 842中或在Osorio等人(2010)、Luque-Rodriguez等人(2006)或Favaron和Lucchetta(2009)的文章中描述了各种多酚提取技术和用途。

[0004] 研究已经表明，通过微波、超声或高温处理来改善生物质提取工艺是可能的(Quan等人2006、CN 104 177 463、CN 104 435 135、CN 102 757 512、CN 104 256 432、CN 104 256 641、CN 103 783 506、CN 102 757 509、CN 101 816 349)，例如用于制备生物柴油(CN 19 35 947)。一些推荐在高压下进行高温处理(Casazza等人2010)。

[0005] 但是，这种高温处理可能改变获得的提取物的性质并且将不适于对大体积原材料和溶剂实施工业过程。

[0006] 对于生物质提取以制备富含多酚的提取物的以下有效方法存在需要，所述方法是有效的和更加经济的并且不影响涉及其多酚的生物质的性质。

发明内容

[0007] 本发明涉及用于制备干燥植物生物质的提取物、具体地为葡萄属种(Vitissp.)的富含多酚的提取物的方法，其包括(a)通过将其与水性溶剂接触提取干燥生物质的步骤和(b)回收富含多酚的水相的步骤，其特征在于在提取步骤(a)中，同时或顺序地通过下列措施的组合处理植物生物质/水性溶剂混合物：

[0008] (i)具有在915MHz至28GHz范围内的频率的电磁波，和

[0009] (ii)搅拌混合物，和/或

[0010] (iii)50至950毫巴(5,000至95,000Pa)的压力。

[0011] 本发明还涉及通过该方法可获得的提取物及其用于抗真菌应用、具体地用于预防和处置收获后的水果和植物上的真菌感染的用途。

具体实施方式

[0012] 本发明涉及通过利用水性溶剂提取干燥生物质来制备富含多酚的提取物。

[0013] 根据本发明，术语“水性溶剂”意思是水或脂族醇/水混合物，具体地为乙醇/水。在这种情况下，醇/水混合物，具体地为乙醇/水，包含10至70体积％的乙醇。根据本发明的优选实施方案，水性溶剂是包含15至40％乙醇的乙醇/水混合物。

[0014] 根据本发明的植物生物质是其自身已知含有多酚的生物质，所述多酚具体地为反式-白藜芦醇、反式-ε-葡萄双芪、反式-白皮杉醇和反式-葡萄素。技术人员熟悉来自已知含有这些多酚的植物的该生物质，所述植物单独或混合使用，通常地为双子叶植物，例如藤本植物、茶和日本紫菀科植物，更具体地为藤本植物。对于根据本发明的生物质，将使用完整植物或植物部分，更具体地为植物的地上部分，例如果实、花、叶、茎、枝条或枝干片段(藤本植物)及其混合物。如果需要，生物质还可以包括植物根或由植物根构成。

[0015] 生物质是干燥的，也就是说，通过干燥上面提及的植物或植物部分获得。干燥可以通过技术人员已知的任何方法实施。有利地，通过使植物或其部分在开放空气中干燥实现干燥。根据本发明的优选实施方案，将植物或其分离部分置于开放空气中干燥1个月至4年，优选地1至2年。

[0016] 优先地，干燥生物质由葡萄属(Vitis)的植物的干燥部分构成，所述植物具体地为欧洲葡萄(Vitis vinifera)、美洲葡萄(Vitis labrusca)、河岸葡萄(Vitisriparia)、沙地葡萄(Vitis rupestris)、冬葡萄(Vitis berlandieri)、山葡萄(Vitisamurensis)、紫葛(Vitis coignetiae)、霜葡萄(Vitis vulpina)、钝叶葡萄(Vitisacerifolia)、夏葡萄(Vitis aestivalis)、圆叶葡萄(Vitis rotundifolia)，更具体地为欧洲葡萄。根据本发明的有利实施方式，干燥生物质包括藤本植物枝条或由其组成。

[0017] 有利地，该干燥的生物质由植物片段、具体地为经研磨的植物或植物部分构成。优先地，片段具有小于1cm、更优先地小于或等于5mm、更优先地为范围是从1至5mm的粒度。干燥物质片段/经研磨的干燥物质的粒度根据技术人员熟知的一般方法测量。

[0018] 干燥植物的片段化将根据技术人员已知的一般方法实施。根据本发明的具体实施方案，这些片段如下获得：首先破碎干燥物质以获得1至20cm片段，然后将其研磨以获得优选的1至5mm片段，所述1至5mm片段对应于用于提取的优选粒度。

[0019] 技术人员将能够确定与生物质的量相关的待使用的提取溶剂的量。有利地，干燥植物生物质与水性溶剂的质量比在1/5至1/30、优先地为1/10至1/20的范围内。

[0020] 根据本发明的方法的特征在于同时或相继地施加在提取混合物(生物质/溶剂)上的至少两种应力的组合：

[0021] (i)具有在915MHz至28GHz范围内的频率的电磁波，和

[0022] (ii)搅拌，和/或

[0023] (iii)50至950毫巴的压力。

[0024] 根据本发明，表达“同时或顺序搅拌”意思是同时或以任何次序一个接一个地进行微波处理和至少搅拌和/或小于或等于950毫巴的压力，具体地根据顺序(i)+(ii)或(i)+(iii)或(i)+(ii)+(iii)或[(i)、(ii)]+(iii)或[(ii)、(iii)]+(i)。在顺序处理的情况下，技术人员可以选择重复每个顺序几次或根据预定的程序组合不同的顺序，任选地与一个或多个同时处理顺序进行组合。

[0025] 根据本发明的优选实施方案，同时进行三种处理[(i)、(ii)、(iii)]。

[0026] 步骤a)也可以包括超声处理(iv)。可以与上面限定的处理(i)、(ii)和/或(iii)顺

序地或同时地应用该处理。

[0027] 具有在915MHz至28GHz范围内的频率的电磁波对应于微波域中的波。技术人员将能够选择最适合于实施方法的频率，具体地根据生物质，以便于优化提取方法。电磁波的频率在915MHz至2.45GHz的范围内。有利地，将根据用于在工业规模上产生电磁波的已知工业设备来选择电磁波的频率，所述设备具体地为频率低于1500MHz、更有利地为约915MHz的发生器。

[0028] 技术人员也将能够选择最适合于生物质和获得的提取物的波功率。电磁波的功率范围为300W至100kW，更有利地为1至75kW。

[0029] 该功率将具体地根据待处理的体积和提取所需的时间来选择。根据本发明的优选实施方案，电磁波的功率根据以下比率来选择：对于1kg待提取的材料，电磁波的功率为1至10kW，理想地为2至6kW。

[0030] 有利地，提取时间将是至少20min，或甚至至少30min，并且优选地小于125min，应当理解，太短的时间可能与可以改变生物质的过度功率条件相关联，而太长的时间可能导致提取的产物的降解，因此在两种情况下都有多酚损失的风险。

[0031] 根据本发明的方法适合用于不同体积的生物质/溶剂混合物，具体地适用于至少1L，优先地为至少5L。根据本发明的方法特别适合于干燥生物质的工业提取。有利地，方法将用于至少30L的生物质/溶剂混合物体积，其范围可以是超过50L或甚至超过100L。取决于技术人员可利用的提取反应器，根据本发明的方法可以用于超过200L的体积。

[0032] 生物质/溶剂混合物经历搅拌(ii)，所述搅拌(ii)优先地与电磁波处理(i)同时进行。该搅拌对于使电磁波达到全部混合是重要的，否则仅混合物的表面将经历这些波的作用。

[0033] 技术人员知晓用于根据待处理的混合物的体积进行搅拌操作的适合方式。具体地，存在旋转待处理的混合物的已知方式，通常通过在混合物内部旋转叶片的方式，或通过旋转包含待处理的混合物的反应器的方式。技术人员可以考虑其他搅拌方式，例如通过鼓入空气或惰性气体使混合物处于运动。优先地，通过在旋转速度下旋转混合物进行搅拌，该旋转速度的范围可以是3至20转/分钟，更优先地通过在混合物内部旋转叶片的方式。

[0034] 技术人员将能够选择用于在经历电磁波处理的环境中实施的最适合的旋转方式，可能生成电弧。

[0035] 方法还包括使混合物经历真空(iii)，优选地在电磁波处理(i)和搅拌(ii)期间。

[0036] 技术人员熟悉在含有待处理的混合物的封闭区中获得真空(或部分真空)所需的方式。这些工业方式使得获得范围在50至950毫巴(5,000至95,000Pa)的压力是可能的。他或她将能够根据待处理的体积选择合适的压力。具体地，对于如上所述的工业体积，在50至950毫巴(5,000至95,000Pa)、优先地为50至500毫巴(5,000至50,000Pa)的压力处理混合物将是有利的。

[0037] 由于方法还包括超声处理，因此技术人员将能够选择超声的频率以及功率。有利地，超声频率的范围为25kHz至1MHz。根据本发明的优选实施方案，超声功率的范围为200至4000W。

[0038] 本发明还涉及如上面限定的和实施例中的方法，其包括通过部分或完全蒸发水性溶剂浓缩多酚的另外步骤(c)。

[0039] 根据本发明的优选实施方案，通过冻干回收的水相完成该浓缩(c)。

[0040] 根据本发明的具体实施方案，在提取步骤(a)之前，利用适合溶剂使干燥生物质经历沥滤以去除糖类。技术人员将能够根据干燥的生物质和其糖含量确定该沥滤的条件。

[0041] 取决于处理的生物质，糖的去除对于获得具有抗真菌性质的富含多酚的提取物将是重要的。实际上，已经表明，糖的存在可通过促进真菌生长而对多酚的抗真菌活性具有拮抗效应。

[0042] 本发明还涉及通过根据本发明的方法可获得的富含多酚的生物质提取物。有利地，这些提取物具有4种感兴趣的分子，其为二苯乙烯家族的多酚。这4种分子是反式-白皮杉醇、反式-白藜芦醇、反式-ε-葡萄双芪和反式-葡萄素。优选地，与常规的乙醇提取物相比，该提取物包含多于至少2倍的反式-ε-葡萄双芪(或多于至少2.5倍)、多于至少3倍的反式-葡萄素(或多于至少6倍)。

[0043] 本发明还涉及通过用于生物质的根据本发明的方法可获得的富含多酚的生物质提取物，该生物质由葡萄属的植物的干燥部分构成，所述葡萄属的植物具体地为欧洲葡萄、美洲葡萄、河岸葡萄、沙地葡萄、冬葡萄、山葡萄、紫葛、霜葡萄、钝叶葡萄、夏葡萄、圆叶葡萄，更具体地为欧洲葡萄。根据本发明的优选实施方案，富含多酚的提取物是藤本植物枝条的提取物，更具体地为欧洲葡萄枝条的提取物。

[0044] 根据本发明的提取物具有杀真菌、杀细菌和抗氧化性质，如通过欧洲葡萄枝条的提取物的实施例所示。

[0045] 根据本发明的提取物，具体地为藤本植物枝条提取物，作为控制(预防)食品和农业中的有害真菌的发展的杀真菌剂是有活性的，例如罐装水果中的污染物(雪白丝衣霉(Byssochlamys nivea))，或果树、蔬菜和植物的疾病，例如苹果腐烂病(仁果干癌丛赤壳菌(Nectria galligena))、果树褐腐病(桃褐腐病菌(Monilinia fructicola)、梨褐腐病菌(Monilinia fructigena)和核果链核盘菌(Monillinia laxa))、胡萝卜枯萎病(胡萝卜链格孢(Alternaria daucil))、马铃薯银皮病(茄长蠕孢(Helminthosporium solani))、镰孢菌穗枯萎病(玉米赤霉(Gibberella zeae))、镰孢菌头枯萎病(黄色镰刀菌(Fusarium culmorum))、小麦壳针孢叶斑病(禾生球腔菌(Mycosphaerella graminicola))或各种腐烂(包括指状青霉(Penicillium digitatum)、意大利青霉(Penicillium italicum)、丁香疫霉(Phytophthora syringae)或匍枝根霉(Rhizopus stolonifer))。

[0046] 本发明还涉及用于杀真菌处理植物以预防或控制所述植物上致病真菌的发展的方法，所述方法包括向所述植物应用有效量的根据本发明的提取物，具体地为如上面限定和实施例中的藤本植物枝条提取物。

[0047] 利用根据本发明的提取物可处理的植物有利地是培育用于人类消费的植物，例如市场园艺、马铃薯作物、田地作物，例如谷类作物，具体地为大麦、小麦和玉米，大豆或含油种子作物，例如油菜、向日葵、亚麻、大麻或棉花。处理还可以应用至果树，具体地为苹果、梨、杏、桃子和藤本植物树木。

[0048] 根据需要进行应用至植物，当气候条件有利于真菌发展时作为预防措施，或者在疾病出现之后作为处置措施。通常将使用标准喷雾法进行应用。技术人员将能够确定何时以及如何利用根据本发明的提取物处理植物，单独使用或以与因其杀真菌性质而已知的其他产品的混合物使用，所述其它产品为例如硫酸铜、波尔多混合剂或来自农药工业的其他

植物保护产品。有利地，在不使用来自农药工业的植物保护产品的情况下进行处理，用于有机或生物动力农业。

[0049] 本发明还涉及用于预防和/或处置收获后的水果和植物的降解、具体地为真菌腐烂的发展的方法，所述方法包括向所述水果和植物应用适合量的通过根据本发明的如上面所限定和实施例中的方法可获得的提取物。

[0050] 通过这些抗氧化性质，根据本发明的提取物，具体地为藤本植物枝条提取物，也可以用于保存食物组合物或化妆品组合物。

[0051] 通过其延迟收获后的水果氧化的能力，根据本发明的提取物，具体地为藤本植物提取物，可以用于预防和/或处置植物中的氧化应激，通过应用至这些植物或植物部分，具体地应用至氧化敏感型水果，例如香蕉或异国或热带水果例如芒果、百香果等，其当存储于比在它们的天然环境中发现的那些温度较低的低温时对氧化应激是敏感的。本发明还涉及根据本发明的提取物、具体地为藤本植物枝条提取物或包含其的组合物用于预防和/或处置植物中的氧化应激的用途。

[0052] 根据本发明的提取物，具体地为藤本植物枝条提取物，也可以凭借其抗氧化性质用于预防和治疗人和动物中的氧化应激。

[0053] 它们还具有抗细菌活性，特别是对致病性革兰氏阳性细菌，同时保留人体内的共生细菌。它们尤其对葡萄球菌属、李斯特菌属、链球菌属和丙酸杆菌属的细菌具有活性，特别是痤疮丙酸杆菌，一种导致痤疮的病原体。根据本发明的提取物，具体地为藤本植物枝条提取物，具有广谱抗微生物活性，对皮肤病原体具有更强的功效。

[0054] 因此，本发明涉及根据本发明的提取物，具体地为藤本植物枝条提取物，其用于疗法，具体地用于治疗和预防细菌感染，更具体地用于治疗和预防皮肤细菌感染，甚至更具体地用于治疗和预防痤疮。

[0055] 本发明还涉及组合物，其包含通过根据本发明的如上面限定的和实施例中的方法可获得的提取物和适合使用的载体。

[0056] 其可以是在收获之前或之后应用至植物的抗真菌组合物，或药物组合物。这些组合物是已知的，并且技术人员将能够确定用于该用途的适合载体。

[0057] 本发明尤其涉及植物健康组合物，其包含至少如上面所描述的提取物和至少一种相容的配方剂。该植物健康组合物可以是干燥形式，例如粉末形式或颗粒状形式，或液体形式，例如悬浮液、浓缩或非浓缩的分散液、凝胶、乳液等的形式。

[0058] 配方剂是天然试剂或由合成化学衍生的试剂，并且常规地用于植物健康组合物中。

[0059] 配方剂可以是分散剂、稳定剂、表面活性剂、防腐剂、湿润剂、粘结剂、缓冲剂、pH调节剂、光保护剂等。它们可以单独或混合使用。

[0060] 通过根据本发明的方法可获得的提取物以及包含其的组合物尤其适用于预防和处置收获后的水果和植物上的真菌感染。

[0061] 根据本发明的方法包括在同一提取介质上实施所组合的几种技术。每种技术(电磁波、超声、真空)和用于其实施的方式是熟知的(WO 2012/045923、EP 2 530 059、FR 2 976 062)。技术人员将能够使现有的水醇提取系统适合于干燥生物质以应用这些相关的处理。

附图说明

[0062] 图1示出在通过根据本发明的方法获得的提取物中和通过常规方法获得的提取物中包含的反式-白皮杉醇、反式-白藜芦醇、反式-ε-葡萄双芪和反式-葡萄素的相对量的比较。显示的值表示4种分子中每种的相对浓度(以任意单位),其由HPLC峰的曲线下面积计算。

[0063] 图2示出通过根据本发明的方法获得的提取物(圆形)和通过常规方法获得的提取物(正方形)的抗真菌活性的比较。显示的值为在3次相同条件下接种后4天的效力(0%＝正常真菌生长;100%＝无真菌生长)的平均值,其为提取物浓度的函数。

[0064] 实施例

[0065] 实施例1,欧洲葡萄枝条生态提取物的制备:

[0066] 起始植物原料是欧洲葡萄枝条(八月枝条)。枝条是经干燥的(在开放空气中或在烘箱中)。一旦干燥,枝条首先被破碎成2至10cm片段,然后精细地研磨成包含1和5mm之间的粒度。在30%水性或乙醇溶液中提取如此获得的欧洲葡萄枝条粉末。提取时间在30min和1h 30min之间,优先地为45min至60min。用于提取的技术是微波、超声、真空和同时搅拌。如此获得的提取物通过20微米过滤器真空过滤。然后将提取物在真空下蒸发且喷雾干燥或冻干。然后将如此获得的干燥提取物在室温避光储存。

[0067] 实施例2,根据实施例1制备的欧洲葡萄枝条提取物的化学表征:

[0068] 在1ml 50%乙醇中溶解5毫克根据实施例1获得的冻干的干燥欧洲葡萄枝条生态提取物。使溶液溶解,然后在注入到条件如下的高效液相色谱法/质谱法(HPLC-MS)系统中之前在12000RCF离心10min。注射的提取物体积是25μl。迁移溶剂是超纯水(0.1%甲酸)和乙腈(0.1%甲酸)。根据下列溶剂梯度以1ml/min在55min内进行分离:

[0069]

时间(min)	乙腈(%)	水(%)
0	5	95
0.1	5	95.00
45	50	50.00
46	100	0.00
51	100	0.00
52	5	95.00
55	5	95.00

[0070] 使用的柱包含移植有C18功能的固定相。在200和800nm之间进行UV检测。通过负模式ESI进行质量检测。获得四种主要化合物,其保留时间、吸光度和分子量在下面的表中示出。

[0071]

化合物	保留时间(min)	最大吸光度(nm)	分子量(g/mol)
反式-白皮杉醇	19	306-323	244
反式-白藜芦醇	23	306-323	228
反式-ε-葡萄双芪	30	306-323	454
反式-葡萄素	36	306-327	906

[0072] 图1中示出了这4种化合物的含量与常规乙醇提取物的比较。

[0073] 实施例3,针对灰葡萄孢菌(Botrytis cinerea)的抗真菌作用:

[0074] 将灰葡萄孢菌孢子置于透明96孔板的孔的底部,其中先前已经倒入琼脂营养物培养基。

[0075] 然后将以不同浓度(0g/l、2.5g/l、5g/l、10g/l、20g/l和30g/l)溶解在8%乙醇中的根据实施例1获得的冻干的干燥欧洲葡萄枝条生态提取物置于孔中。

[0076] 在21℃和避光的各个孵育时间之后,经由在800nm的吸光度测量每个孔中的菌丝的相对密度。然后由这些吸光度值计算抗真菌效力。

[0077] 在图2中示出利用根据本发明的方法获得的提取物和利用常规方法获得的提取物的在孵育4天时观察到的抗真菌效力。孵育多达至少15天,结果与图2中呈现的那些结果类似。

[0078] 实施例4,抗真菌作用

[0079] 以不同的真菌菌株利用根据实施例2的提取物测量对于多达240小时的100%效力的最小抑制浓度(MIC)。下面的表中详细描述了结果。

[0080]

真菌	MIC g/L
雪白丝衣霉	28
仁果干癌丛赤壳菌	13
核果链核盘菌	8
胡萝卜链格孢	7
茄长蠕孢	2
玉米赤霉	9
黄色镰刀菌	9
禾生球腔菌	1

[0081] 实施例5,抗细菌作用

[0082] 对于不同的细菌物种测定实施例2的提取物的MIC。对在下面的表中列举的27种细菌菌株进行测试。在富含营养物的培养基中进行研究,其中在5•10^5-10^6CFU/mL校准测试的菌落的浓度。

[0083]

细菌	MIC mg/mL
芽孢杆菌目	

[0084]

蜡状芽孢杆菌	0.234
枯草芽孢杆菌	0.938
金黄色葡萄球菌	0.469
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)	0.469
表皮葡萄球菌	0.234
单核细胞增多性李斯特氏菌	0.469
乳杆菌属	
海氏肠球菌	0.469
嗜酸乳杆菌	7.5
干酪乳杆菌	7.5
植物乳杆菌	> 7.5
变异链球菌	3.75
酿脓链球菌	0.234
猪链球菌	0.469
Selenomonadales	
殊异韦荣菌	0.938
梭菌目	
艰难梭菌	0.938
肠杆菌目	
鼠伤寒沙门氏菌	1.875
大肠杆菌	7.5
小肠结肠炎耶尔森氏菌	3.75
弧菌目	
霍乱弧菌	0.938
鳗弧菌	> 7.5
弯曲菌目	
空肠弯曲杆菌	1.875
拟杆菌目	
脆弱拟杆菌	3.75
双歧杆菌目	
短双歧杆菌	1.875
乳双歧杆菌	1.875
长双歧杆菌	0.938
放线菌目	
内氏放线菌	3.75
痤疮丙酸杆菌	0.117

[0085] 除了植物乳杆菌和鳗弧菌之外，实施例2的提取物显示了对测试的所有菌株的抑制活性。测试的最敏感的菌株是痤疮丙酸杆菌，一种导致痤疮的病原体。最后，芽孢杆菌目、

肠球菌属种和某些链球菌属种的细菌最敏感于根据实施例2的提取物。另一方面，测试的其他菌株不太敏感，特别是有益细菌双歧杆菌属种和乳杆菌属种以及革兰氏阴性细菌。

[0086] 实施例2的提取物是对皮肤病原体具有更强效力的广谱抗微生物剂。

[0087] 实施例6，抗氧化活性

[0088] 通过在应用后7天和9天时比较在应用或不应用实施例2的提取物的情况下保持在开放空气中的香蕉的皮的状况来研究实施例2的提取物的抗氧化活性。

[0089] 在不应用实施例2的提取物的情况下，在7天时观察到香蕉的皮覆盖有其氧化的棕色斑点特征，而处理的香蕉的皮受到轻微影响(1个特征斑点)。

[0090] 在9天时，未处理的香蕉的皮的氧化从在7天时观察到的斑点的覆盖继续到完整的变黑区域，而处理的香蕉的皮相对于在7天时观察到的状况改变很小。

[0091] 对香蕉观察到的该抗氧化活性表明根据本发明的提取物处理植物中的氧化应激的兴趣，尤其是对于异国或热带水果。

[0092] 参考文献

[0093] -Alexa,E.,Poiana,M.A.&Sumalan,R.M.Mycoflora and ochratoxin a control in wheat grain using natural extracts obtained from wine industry by-products.Int.J.Mol.Sci.13,4949-4967(2012).

[0094] -Casazza,A.a.,Aliakbarian,B.,Mantegna,S.,Cravotto,G.&Perego,P.Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques.J.Food Eng.100,50-55(2010).

[0095] -Favaron&Lucchetta,Role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against Botrytis Cinerea and of fungal Lacasse on the solubility of putatibe grapepr proteins J.of Plant Pathology vol 91,n°3,579-588(2009)

[0096] -Goupil,P.et al.Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses.Ecotoxicology 21,1541-1549(2012).

[0097] -Luque-Rodriguez&al.Extraction of polyphenols from Vine shoots of Vitis vinifera by Superheated Ethanol-Water Mixtures J.of Agriculture and Food Chemistry vol 54,n°23,8775-8781(2006)

[0098] -Osorio&al Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell(Carya Illinoensis),pomegranate husk(Punica granatum)and creosote bush leaves(Larrea tridentate Cov.)against plant pathogen fungi Industrial Crops and Products,col 31,n°1,153-157(2010),

[0099] -Pezet,R.,Gindro,K.,Viret,O.&Spring,J.L.Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew.Physiol.Mol.Plant Pathol.65,297-303(2004).

[0100] -Quan,P.T.,Hang,T.Van,Ha,N.H.,De,N.X.&Tuyen,T.N.Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot.Sci.Technol.Dev.9,69-75(2006).

[0101] -Sanchez,J.B.J.,Orea,J.M.,Gonzalvez,A.G.&Urena,A.G.On the Use of the Own Plant's Defence Compounds to Maintain the Post-Harvest Fruit Quality.Open

Agric.J.43-48(2008).

[0102] -CN 104 177 463,CN 104 435 135,CN 102 757 512,CN 104 256 432,CN 104 256 641,CN 103 783 506,CN 102 757 509,CN 101 816 349,CN 19 35947,CN 205 759 861,CN 103 875 842

[0103] -EP 2 530 059

[0104] -FR 2 976 062

[0105] -JP 2016 102192

[0106] -WO 2012/045923,

[0107] -US 5,989,557,US 2012/0142105

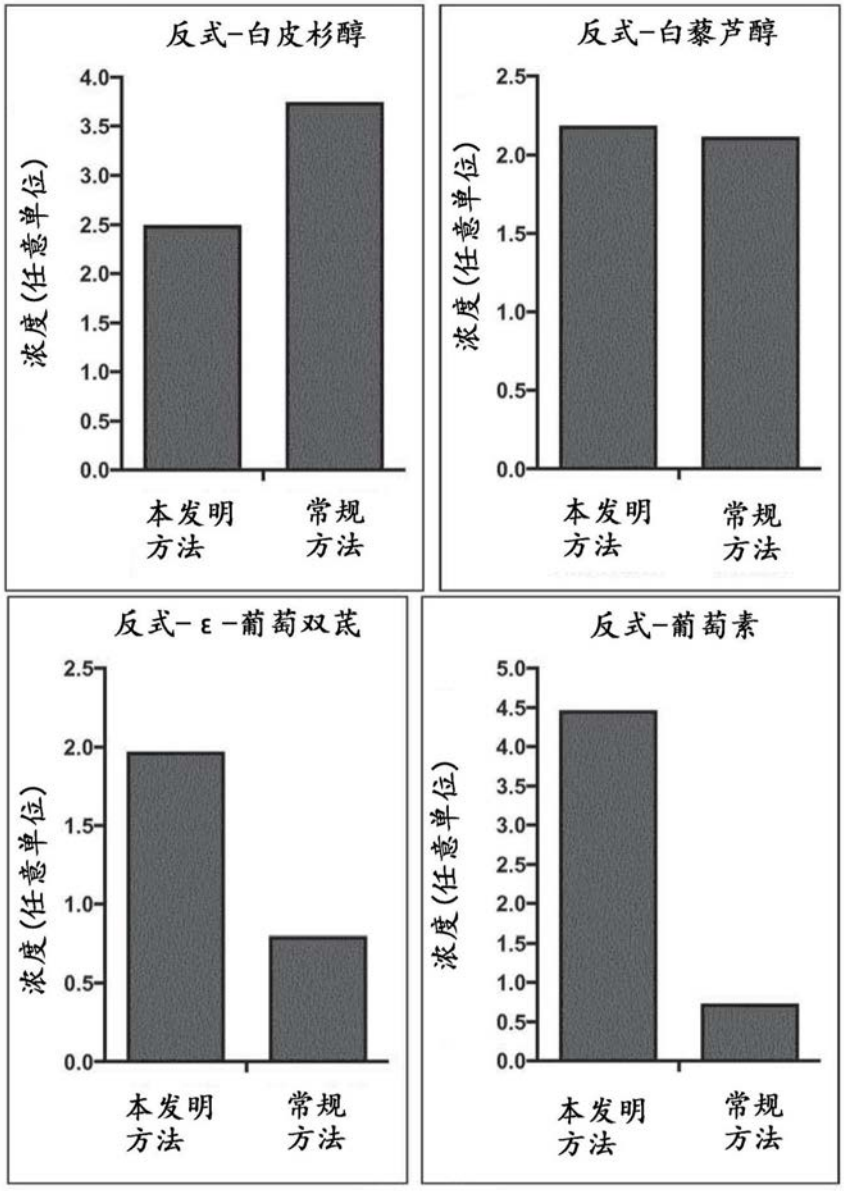
反式-白皮杉醇
浓度(任意单位)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
本发明方法
常规方法
反式-白藜芦醇
浓度(任意单位)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
本发明方法
常规方法
反式-ε-葡萄双芪
浓度(任意单位)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
本发明方法
常规方法
反式-葡萄素
浓度(任意单位)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
本发明方法
常规方法

图1

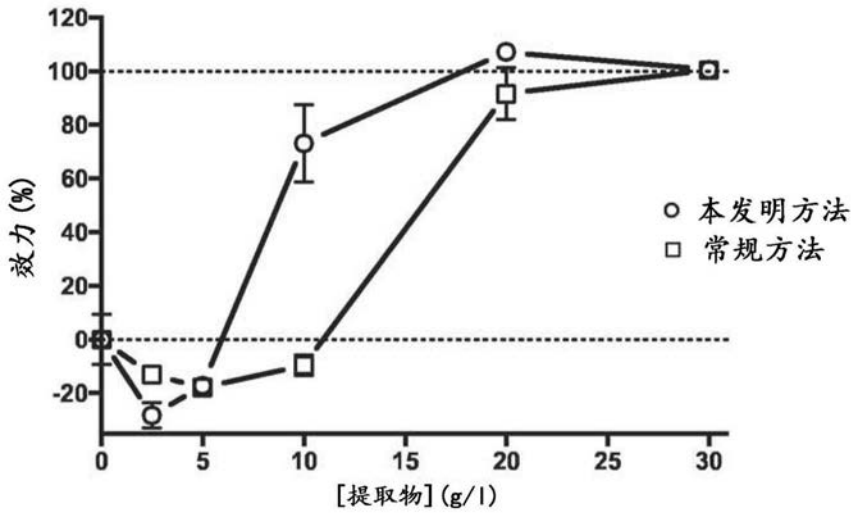

图2