

文章编号:1671-1513(2012)01-0030-06

两株自选乳酸菌的益生特性

林晓姿^{1,2}, 梁璋成^{1,2}, 何志刚^{1,2}, 李维新^{1,2}, 任香芸^{1,2}

(1.福建省农业科学院 农业工程技术研究所,福建 福州 350003;

2.福建省农业科学院 农产品加工研究中心,福建 福州 350013)

摘要:研究了两株自选乳酸菌的益生特性,为其应用于果蔬汁乳酸发酵的功能性饮料研制提供理论依据.以自选植物乳杆菌 R23 和干酪乳杆菌 R35 为目标菌,以德氏乳杆菌保加利亚亚种 6045 为对照菌,考察各菌对模拟胃液酸度和肠道胆盐的抗逆性以及凝集能力、表面疏水性等黏附性能,并评价其发酵液对超氧阴离子和羟基自由基的清除能力等体外抗氧化功能.结果表明:两菌株对酸度和胆盐的耐受能力均优于对照菌,植物乳杆菌 R23 的抗逆性最强,能耐受 pH 值 2.5、胆盐质量浓度 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. 干酪乳杆菌 R35 的黏附能力强,而植物乳杆菌 R23 疏水性较强而凝集能力较弱.各菌株的胞外代谢产物均有抗氧化能力,以植物乳杆菌 R23 为最强,其培养 24 h 后的发酵液对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除率达 77.8% 和 80.94%,分别比对照菌高 36.72% 和 5.81%.

关键词:植物乳杆菌;干酪乳杆菌;益生特性;抗氧化**中图分类号:**TS201.3**文献标志码:**A

欧洲食品和饲料菌种协会(European food and feed cultures association, EFFCA)于2002年给益生菌作出最新定义:益生菌(probiotics)是活的微生物,摄入充足的数量后,对宿主产生一种或多种特殊且经论证的健康益处,如调节免疫系统,显著降低血清胆固醇和低密度脂蛋白含量,提高人体抗氧化能力,维持肠道内菌群平衡,促进营养物质吸收等^[1-3].我国国家卫生部2010年4月印发的《可用于食品的菌种名单》,包含了双歧杆菌属6种,乳杆菌属14种,链球菌属1种,丙酸杆菌属1种,乳酸乳球菌属3个亚属,均属于益生菌.植物乳杆菌与干酪乳杆菌是两种较为常用的潜在益生菌^[4].本实验室筛选出的适合果蔬全汁乳酸发酵的植物乳杆菌 R23 和干酪乳杆菌 R35^[5],是两株植物源乳酸菌.益生菌要在人体内发挥其独特的功能,就必须对宿主的胃肠环境具有理想的抗逆性,能够耐受胃液、肠液和胆汁的胁迫.并且具有较强的肠道定植力,在肠道内维持一定数量级的活菌数.益生菌株通过自凝集作

用集合到一定数量使菌株发挥益生功效^[6],并形成多细胞簇以阻碍致病菌定植和感染^[7],因此,乳酸菌对肠黏膜上皮细胞的黏附能力是其作为益生菌菌株的前提,与同菌种(自凝集)或与不同菌株的凝集作用(交互凝集)及菌体表面疏水特性通常被认为是两个独立的、能反应乳酸菌黏附能力的特征^[8].

目前对乳酸菌抗氧化能力的研究多集中在对活菌细胞或超声波破碎活菌细胞后离心得到的无细胞抽提液(胞内代谢产物)的抗氧化能力上,尚未见有关乳酸菌发酵液(胞外代谢产物)抗氧化能力的研究报道.本研究考察了乳酸菌发酵液耐受酸度和胆盐能力、黏附性能,评价了无菌发酵液的体外抗氧化能力,为乳酸菌活体细胞及其代谢产物的高效利用,研发具有益生功能的食品提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

植物乳杆菌 R23 (*Lactobacillus plantarum* R23)、

收稿日期:2011-11-08

基金项目:福建省科技计划项目(2011R1017-4).

作者简介:林晓姿,女,副研究员,主要从事农产品贮藏与加工方面的研究.

何志刚,男,研究员,主要从事农产品贮藏与加工方面的研究.通讯作者.

干酪乳杆菌 R35 (*Lactobacillus casei* R35), 福建省农业科学院农产品加工研究中心选育并保存^[9]。

德氏乳杆菌保加利亚亚种 6045 (下简称 6045)、大肠杆菌, 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基

1.2.1 LH18 培养基^[10]

用于乳酸菌液体培养。

1.2.2 细菌培养基

蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 蒸馏水补足 1 L, pH 值 7.0 ± 0.1 , 1×10^5 Pa 下灭菌 20 min. 用于指示菌(大肠杆菌)液体培养。

1.2.3 TJA 培养基

番茄汁 50 mL, 酵母抽提液 5 g, 牛肉膏 10 g, 乳糖 20 g, 葡萄糖 2 g, 磷酸氢二钾 2 g, 吐温 80 1 g, 乙酸钠 5 g, 加蒸馏水至 1 L, pH 值 6.8 ± 0.2 , 1×10^5 Pa 灭菌 20 min. 用于细胞活菌计数。

1.3 种子液制备

将乳酸菌株接入 LH18 培养基, 25 °C 控温培养 24 h, 菌体生物量达 10^9 CFU/mL 以上, 将发酵液在 3 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 收集菌泥, 备用。大肠杆菌(指示菌)在细菌培养基中 25 °C 控温培养 24 h, 菌体生物量达 10^7 CFU/mL 以上, 将培养液 3 000 r/min、4 °C 离心 10 min 收集菌泥, 备用。

1.4 耐酸及耐胆盐实验

收集的乳酸菌菌泥用无菌生理盐水洗涤 2 次, 并以原体积的十分之一制成悬浮菌, 以 1% 的接种量分别接种于 pH 值为 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5 和胆盐质量浓度为 0, 1, 3, 5 g·L⁻¹ 的 LH18 培养基中, 25 °C 控温培养 4 h, 每 2 h 取样进行活菌计数, 平行 3 次取平均值。

1.5 体外黏附能力实验

1.5.1 菌体处理

将收集的乳酸菌和大肠杆菌菌泥分别用 PBS (磷酸盐缓冲液, pH7.0) 洗涤 2 次, 制成在波长 600 nm 处的吸光度值为 0.4 ± 0.1 的悬浮菌液。

1.5.2 自凝集能力^[11]

吸取各乳酸菌悬液 4 mL 加入试管中, 于 25 °C 静置培养 24 h, 测定各菌悬液在波长 600 nm 处的吸光值。自凝集率公式:

$$A(\%) = (A_0 - A_{24}) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, A_0 和 A_{24} 分别为菌悬液在 0 h 和 24 h 的吸光值。

1.5.3 交互凝集能力^[11]

吸取各乳酸菌菌悬液 2 mL 和大肠杆菌菌悬液 2 mL 混合, 振荡 30 s, 于 25 °C 静置培养 24 h, 测定混合菌悬液在波长 600 nm 处的吸光值。交互凝集率公式:

$$A(\%) = (1 - A_{24}/A_0) \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, A_0 和 A_{24} 分别为混合菌悬液 0 h 及静置 24 h 后的吸光值。

1.5.4 表面疏水性

采用菌体对碳氢化合物的黏附法 (adherence of bacteria to hydrocarbons, BATH)^[12], 即菌体对碳氢化合物的黏附测定。将各乳酸菌菌泥分别用 PBS 制成在 560 nm 处的吸光值为 0.6 ± 0.1 的悬浮菌液, 吸取 5 mL 与 1 mL 二甲苯涡旋混合 30 s, 25 °C 下静置 20 min, 取下层水相在波长 560 nm 处测量吸光度值, 以 PBS 为参比液。表面疏水率:

$$H(\%) = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中, A_0 和 A_t 分别是与二甲苯混匀前、后的菌液在 560 nm 处的吸光值。

1.6 无细胞发酵液的抗氧化能力测定

1.6.1 发酵液制备

将乳酸菌以 10^7 CFU/mL 的接种量接入 LH18 培养基中, 将 25 °C 控温发酵 24 h 的发酵液在 4 800 r/min、4 °C 离心 10 min, 收集上清液, 即为无细胞发酵液。

1.6.2 抗氧化能力的阳性对照标准曲线的绘制

以不同质量浓度 (0.05 ~ 0.25 mg/mL) 的 Vc 作为阳性对照, 测定其对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除率。Vc 添加量对超氧阴离子自由基及羟基自由基清除率符合方程 $y = 2.8315x + 0.1112$ ($R^2 = 0.9921$) 和 $y = 0.6677x - 0.0086$ ($R^2 = 0.9933$), 两曲线均为线性相关 (见图 1)。

图 1 Vc 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of Vc

1.6.3 超氧阴离子自由基清除率的检测^[13-14]

采用邻苯三酚自氧化法测定发酵液对超氧自由基的清除率。按照表 1 中配制溶液 A_{00} 、空白溶液

A_0 、样品空白溶液 A'_0 和样品测定溶液 A_x , 于 25 ℃ 水浴中保持 5 min, 而后迅速加入 1 mL 8 mol/L HCl 中止反应, 测定吸光值. 分别以不加乳酸菌的培养基 LH18、0.2 mg/mL 的 Vc 溶液为对照. 超氧阴离子自由基清除率(%) = $[A_0 - (A_x - A'_0)]/A_0 \times 100\%$.

表 1 超氧阴离子自由基清除率分析加样表

Tab. 1 Samples table of superoxide radical scavenging

mL			
处理	Tris-HCl 缓冲液 (pH8.2, 0.05 mol/L)	发酵液	邻苯三酚 溶液
A_{00}	9.2	—	—
A_0	9.0	—	0.2
A'_0	8.2	1	—
A_x	8.0	1	0.2

1.6.4 羟基自由基清除率的检测^[13-14]

采用 Fenton 反应法测定发酵液对羟基自由基的清除率. 按照表 2 配制溶液 A_{00} 、空白溶液 A_0 、样品空白溶液 A'_0 和样品测定溶液 A_x , 于 37 ℃ 水浴中保持 1 h, 测定吸光度. 分别以不加乳酸菌的培养基 LH18、0.2 mg/mL 的 Vc 溶液为对照. 羟基自由基清除率/% = $[A_0 - (A_x - A'_0)]/A_0 \times 100\%$.

1.7 统计分析

采用 DPS 软件进行显著性分析, 所有数据均以 $x \pm s$ 表示, 结果以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为

差异极显著.

表 2 羟基自由基清除率分析加样表

Tab. 2 Samples table of hydroxy radical scavenging

mL					
处 理	水杨酸 溶液 (6 mmol/L)	硫酸铁溶液 $FeSO_4$ (2 mmol/L)	蒸馏 水	双氧水 溶液 (6 mmol/L)	发酵液
A_{00}	—	—	7	—	—
A_0	2	2	1	2	—
A'_0	2	2	2	—	1
A_x	2	2	—	2	1

2 结果与分析

2.1 各菌株的耐酸及耐胆盐能力

各菌株在不同 pH 值及胆盐浓度环境中培养 4 h 后的菌量变化见表 3、表 4. 植物乳杆菌 R23 在 pH 值 2.5 环境下培养 4 h 的生物量仍达 10^6 CFU/mL, 干酪乳杆菌 R35 可耐受 pH 值 3.0 的酸度, 但在 pH 值 2.5 和 2.0 条件下培养 4 h 和 2 h 均已死亡; 植物乳杆菌 R23 可耐受 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胆盐, 培养 4 h 后的生物量仍可达 10^7 CFU/mL, 干酪乳杆菌 R35 可耐受 0.3% 胆盐浓度. 结果表明, 植物乳杆菌 R23 具有较强的抗逆性能, 能在 pH 2.5, 胆盐浓度 0.5% 的条件下维持生长.

表 3 耐酸能力试验结果

Tab. 3 Results of acid resistance

菌种	t/h	pH				
		3.5	3.0	2.5	2.0	1.5
R23	0	8.891 ± 0.021	8.891 ± 0.021	8.891 ± 0.021	8.891 ± 0.021	8.891 ± 0.021
	2	8.767 ± 0.011	8.556 ± 0.012	6.106 ± 0.009	3.000 ± 0.004	ND
	4	8.853 ± 0.002	8.512 ± 0.013	6.204 ± 0.055	ND	ND
R35	0	8.806 ± 0.007	8.806 ± 0.007	8.806 ± 0.007	8.806 ± 0.007	8.806 ± 0.007
	2	8.754 ± 0.013	8.597 ± 0.017	3.000 ± 0.005	ND	ND
	4	8.831 ± 0.011	8.547 ± 0.015	ND	ND	ND

注: ND 代表未检出.

表 4 耐胆盐能力试验结果

Tab. 4 Results of bile tolerance

菌种	t/h	胆盐质量浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			
		0	1	3	5
R23	0	8.628 ± 0.041	8.628 ± 0.041	8.628 ± 0.041	8.628 ± 0.041
	2	8.854 ± 0.009	8.811 ± 0.002	8.000 ± 0.004	7.648 ± 0.012
	4	9.039 ± 0.006	8.866 ± 0.062	8.008 ± 0.005	7.623 ± 0.005
R35	0	8.371 ± 0.009	8.371 ± 0.009	8.371 ± 0.009	8.371 ± 0.009
	2	8.760 ± 0.042	8.631 ± 0.013	7.605 ± 0.046	ND
	4	8.977 ± 0.031	8.789 ± 0.021	7.594 ± 0.075	ND

注: ND 代表未检出.

2.2 各菌株的黏附能力

各菌株凝集特性试验结果,见图2。结果表明,干酪乳杆菌 R35 的自凝集和对大肠杆菌的交互凝集率最高,分别达 48.17%,24.31%,比植物乳杆菌和 6045 高 15.50%,9.35% 和 11.89%,6.12%,菌株间的差异均达极显著水平($P < 0.01$);菌株的自凝集能力与其交互凝集能力呈正相关。各菌株表面疏水性试验结果,见图3。结果表明,干酪乳杆菌 R35 的表面疏水性最高,达 20.75%,分别比植物乳杆菌 R23 和 6045 高 3.41% 和 4.51%,菌株间的差异均达极显著水平($P < 0.01$)。菌株的凝集能力及表面疏水性越高,则菌株的黏附能力也高。实验表明:干酪乳杆菌 R35 具有较高的凝集能力和表面疏水性,黏附能力最强。植物乳杆菌 R23 与对照菌比,凝集能力弱,疏水性强。

图2 凝集特性

Fig. 2 Aggregation properties

图3 表面疏水性

Fig. 3 Cell-surface hydrophobicity

2.3 各菌株的抗氧化能力

各菌株的无菌发酵液对超氧阴离子和羟自由基均有一定的清除能力(见图4),与培养基的差异均达极显著($P < 0.01$),说明各菌株的胞外代谢产物均有抗氧化能力,尤其是清除超氧阴离子自由基的能力。其中,以植物乳杆菌 R23 发酵液的清除自由基能力最强,发酵 24 h 后的发酵液对超氧阴离子自由基和羟自由基的清除率分别达到 77.8% 和 80.94%,比对照菌 6045 高 36.72% 和 5.81%,Vc

相当量为 0.231 mg/mL 和 0.167 mg/mL。干酪乳杆菌 R35 的清除羟自由基的能力比对照菌 6045 略强而清除超氧自由基的能力比对照菌 6045 弱。

图4 抗氧化能力

Fig. 4 Oxidation resistance

3 结论与讨论

1) 乳酸菌要发挥益生作用就必须通过胃部和肠道,而胃液的强酸性和肠道的胆盐可以杀死随食物进入胃内的细菌,因此,具有益生性的乳酸菌必须有耐受强酸及胆盐的能力,才能保证有足够生物量通过消化道环境的胁迫,进入宿主肠道发挥益生功效。植物乳杆菌 R23 及干酪乳杆菌 R35 是本实验室从自然发酵的枇杷酒酒醪中分离选育而得的两株植物源乳酸菌,耐受总 SO_2 质量浓度达 120 mg/L,具有苹果酸乳酸代谢能力^[9],表现出较强的抗逆性,这可能与植物源乳酸菌的细胞壁等外部结构较为坚韧复杂有关,其机理有待进一步研究。

2) 含活菌的乳酸发酵制品具有抗氧化作用,是因为乳酸菌代谢过程能产生一些抗氧化酶类物质^[15],或者乳酸菌体内存在天然的抗氧化剂使乳酸菌菌体自溶后能产生抗氧化活性^[16],有的乳酸菌存在一种基于细胞内 Mn^{2+} 积聚的非酶歧化系统,能够清除超氧自由基^[17],有些乳酸菌通过控制转运铁离子的吸收和储存来防御细胞的氧化损伤^[18]。本实验结果表明,乳酸菌发酵后的无菌发酵液即胞外代谢产物,也有较强的抗氧化能力,尤其是清除超氧阴离子自由基的能力,说明非活菌的乳酸发酵制品也具有清除自由基等抗氧化益生功能。

3) 实验结果表明,植物乳杆菌 R23 可耐受 pH 值 2.5、胆盐质量浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,对消化道环境的耐受能力强,还具有较强的黏附能力,其发酵液清除超氧阴离子自由基和羟自由基的抗氧化功能理想。因

此,植物乳杆菌 R23 是开发益生功能的乳酸发酵饮料的优良菌株. 干酪乳杆菌 R35 虽然具有较强的黏附能力及抗氧化性,但其耐受强酸及胆盐的能力较植物乳杆菌 R23 差.

4) 凝集能力、表面疏水性等黏附性能是菌株重要的特性之一,彼此间具有相关性. 菌株的自凝集能力与其交互凝集能力呈正相关,菌株的凝集能力及表面疏水性越高,这与刘勇、王丽群^[19-20]等人的研究结果一致.

参考文献:

- [1] 曾东,唐雨蕊,倪学勤,等. 植物乳杆菌 F22 对肝脏和肠道微生物菌群的影响研究[J]. 营养学报, 2010, 32(4): 370-374.
- [2] Guo Z, Wang J C, Yan L Y, et al. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42: 1640-1646.
- [3] de Vries M, Vaughan E E, Kleerebezem M, et al. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(9): 1018-1028.
- [4] 方立超,魏泓. 益生菌的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(6): 463-466.
- [5] 林晓姿,梁璋成,何志刚,等. 枇杷汁乳酸发酵优良菌株筛选及其发酵特性研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(3): 1-7.
- [6] Collado M C, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226: 1065-1073.
- [7] Schachtsiek M, Hammes W P, Hertel C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein mediating coaggregation with and aggregation among pathogens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7078-7085.
- [8] Vlková E, Rada V, Smehilová M, et al. Autoaggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia [J]. Folia Microbiologica, 2008, 53(3): 263-269.
- [9] 何志刚,任香芸,李维新,等. 枇杷酒中苹果酸乳酸发酵优良乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2011, 11(1): 165-171.
- [10] 梁璋成,何志刚,任香芸,等. MLF 植物乳杆菌 R23 培养基优化[J]. 福建农业学报, 2009, 24(6): 570-574.
- [11] Collado M C, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains [J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(5): 1065-1073.
- [12] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity [J]. FEMS Microbiology Letters, 1980, 9(1): 29-33.
- [13] 刘利娥,张浩勤,刘金盾,等. 芝麻叶多糖的提取及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5): 160-165.
- [14] 蒋超,陆军,林莉莉,等. 红薯茎叶提取物抗氧化性的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5): 74-77.
- [15] 刘晶,黄珊珊,赵征. 乳酸菌抗氧化能力研究进展 [J]. 中国乳品工业, 2010, 38(5): 38-41.
- [16] Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, et al. Two antioxidative *Lactobacilli* Strains as Promising Probiotics [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 72(3): 215-224.
- [17] Archibald F S, Fridovich I. Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus Plantarum* [J]. Journal of Bacteriology, 1981(145): 442-451.
- [18] Gavin I M, Melnik S M. Zero-length protein-nucleic acid crosslinking by radical-generation coordination complexes as a probe for analysis of protein-DNA interactions in vitro and in vivo [J]. Analytical Biochemistry, 1998(263): 26-30.
- [19] 刘勇,张勇,包艳,等. 4 株益生菌的表面特性及抑制致病菌作用研究 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 28-34.
- [20] 王丽群,张佰荣,王彦,等. 双歧杆菌体外对 Caco-2 的黏附及其表面性质分析 [J]. 微生物学报, 2010, 50(5): 606-613.

Probiotic Properties of Two Self-chosen *Lactobacillus* Strains

LIN Xiao-zi^{1,2}, LIANG Zhang-cheng^{1,2}, HE Zhi-gang^{1,2}, LI Wei-xin^{1,2}, REN Xiang-yun^{1,2}

(1. Institute of Agricultural Engineering Technology, Fujian Academy Agricultural Sciences, Fujian Fuzhou 350003, China; 2. Agricultural Products Storage and Process Research Centre, Fujian Academy Agricultural Sciences, Fujian Fuzhou 350013, China)

Abstract: The probiotic properties of two self-chosen *lactobacillus* strains were studied to provide the theoretical foundation for the research and development of lactic acid fermentation beverage. The stress resistance of *lactobacillus plantarum* R23 and *lactobacillus casei* R35 were investigated in a simulated environment of gastric acidity and bile salts, the adhesion ability were determined such as their aggregation properties and cell-surface hydrophobicity. The antioxidation of the broth including the scavenging effects on superoxide radical and hydroxyl radical was evaluated in vitro. The results showed that the stress resistance of the both strains was superior to the control group *lactobacillus delbrueckii subsp* 6045. The tolerance of pH value was 2.5 and bile salt was 5 g·L⁻¹ for the *lactobacillus plantarum* R23, showing the strongest stress resistance. The adhesion of the *lactobacillus casei* R35 was the strongest in contrast with the control group, the hydrophobicity of the *lactobacillus paltarum* R23 was stronger, while its aggregation properties was weaker. The extracellular products of three strains had antioxidant capacity after 24 h culture, while *lactobacillus paltarum* R23 showed the best. Its scavenging rate to superoxide radical and hydroxyl radical was 77.8% and 80.94% respectively, which was 36.72% and 5.81% higher than the control group.

Key words: *lactobacillus plantarum*; *lactobacillus casei*; probiotic properties; antioxidation

(责任编辑:叶红波)

(上接第29页)

Response Surface Method for Microwave-Assisted Extraction of Rosmarinic Acid in *Perilla Frutescens* Leaves

XU Chun-ming, LI Dan

(School of Food and Chemical Engineering/Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients/Beijing Key Laboratory of Food Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Microwave-assisted extraction of rosmarinic acid in *perilla frutescens* leaves was optimized by response surface method. The optimal process conditions were as follows, the microwave power 560 W, processing time 4.5 min, solid-liquid ratio 1:33 (1 g solid in 33 mL solvent). Under the optimal conditions, the rosmarinic acid yield reached 2.55 g/mg. Compared with conventional extraction process of rosmarinic acid in *perilla frutescens* leaves, microwave-assisted extraction process is feasible.

Key words: *perilla frutescens*; microwave-assisted extraction; response surface method; rosmarinic acid

(责任编辑:李 宁)