

黑豆皮花青素的不同提取方法及其体外抗菌活性比较研究

褚盼盼,靳泽荣,乔元彪

(吕梁学院,山西 吕梁 033000)

摘要:对黑豆皮花青素不同提取方法,传统有机溶剂法、水浸提法、超声波辅助法的提取率进行了比较,结果表明:超声波辅助法的提取率最高,达到20.50%。并采用滤纸片法对3种不同提取方法所得的花青素抑菌效果进行了比较,结果显示:水浸提法对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌3种细菌的抑菌圈均最大,抑菌效果最好。另采用平板菌落计数法对水浸提法所得的花青素抑菌率进行比较发现,从低浓度到高浓度抑菌效果逐渐增强。当花青素在浓度为0.3 g·mL⁻¹时,对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌3种细菌的抑菌率最高,分别达到79.75%、74.50%和81.60%。

关键词:黑豆皮;花青素;提取;抑菌圈;抑菌率

中图分类号:TS201 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.04.0685

Comparison of Different Extraction Methods of Black Soybean Skin Anthocyanin and Its Antibacterial Activity *in vitro*

CHU Pan-pan, JIN Ze-rong, QIAO Yuan-biao
(Lyuliang University, Lyuliang 033000, China)

Abstract: The extraction yield of different extraction methods of anthocyanin in black soybean skin including the traditional method of organic solvent, water extraction, ultrasonic auxiliary method were compared, method of ultrasonic assisted extraction yield was the highest, reached 20.50%. And by the method of filter, three different extraction methods of the bacteriostatic effect of anthocyanins were compared. The result showed that the bacteriostatic ring of the water extraction of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* was the largest and the bacteriostasis effect was the best. The anthocyanin bacteriostatic rate compared by the plate colony counting method of water extraction showed that from low concentration to high concentration bacteriostatic effect was increased. When anthocyanins in concentration was 0.3 g·mL⁻¹, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* antibacterial rate was 79.75%, 74.50% and 81.60%, respectively.

Keywords: Black soybean skin; Anthocyanins; Extraction; Bacteriostatic ring; Antibacterial rate

花青素是黑豆中重要的生物活性物质。随着花青素的广泛使用,其提取方法逐渐成为人们研究的热点问题。黑豆皮中的花青素提取方法多种多样,主要有传统有机溶剂法^[1-4]、超声波辅助法^[5-6]、微波辅助法^[7]等,提取率在18%左右。目前国内外使用最多的是有机溶剂法提取。但是,随着花青素越来越多地被用于食品和药物,而有机溶剂提取的花青素大多具有毒性残留且生产过程环境污染大,因此需要寻找一种更为安全、环保的方法来提取花青素。目前主要集中在黑豆皮花青素抗氧化、降血糖等作用的研究^[8-10],体外抗菌活性^[11]方面的研究较少。另外,对不同提取方法得到的黑豆皮花青素体外抗菌活性的比较至今未见报道。从这个角度出发,本试验采用常温常压下水浸提法和超声波辅助法来提取黑豆皮中的花青素,与传统有机溶剂提取法进行比较,研究不同提取方法得到的黑豆皮花

青素的体外抗菌活性。旨在寻找一种安全、简单、高效的黑豆皮花青素提取方法,使其能够合理地投入市场,生产花青素功能性产品,加强原料的综合利用。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 供试材料 青仁黑豆,由吕梁当地市场购得。人工剥取黑豆皮,粉碎后过80目筛,棕色瓶避光保存备用。
- 1.1.2 供试菌种 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)由吕梁学院微生物学实验室提供。
- 1.1.3 主要试剂与仪器 牛肉膏,蛋白胨,氯化钠,琼脂,盐酸,氢氧化钠,无水乙醇等均购自山西航科科技有限公司。电动搅拌机(杭州仪表电机厂),

收稿日期:2014-09-21
基金项目:山西省高等学校科技创新项目(2013168);山西省自然科学基金(2012011002-3)。
第一作者简介:褚盼盼(1982-),女,硕士,讲师,主要从事植物生理活性物质的研究与开发。E-mail:chupanpan@sohu.com。
通讯作者:乔元彪(1970-),男,博士,副教授,主要从事药物化学研究。E-mail:qyb_0222@sina.com。

SHB-III A 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),恒温摇床(江苏省金坛市环宇科学仪器有限公司),JL-120DTH 超声波清洗器(上海吉理科学仪器有限公司),Neofuge 13R 台式高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 传统有机溶剂法 准确称取黑豆皮 4.00 g,60%乙醇作为提取剂,料液比为 1:20,在温度为 60℃条件下用电动搅拌机进行搅拌,提取 80 min,提取后进行抽滤,所得滤渣再次提取 3 次。将几次获得的滤液混合,经真空冷冻干燥获得黑豆皮花青素。

1.2.2 水浸提法 准确称取黑豆皮 4.00 g,蒸馏水作为提取剂,料液比为 1:8,在常温常压下用恒温摇床进行震荡,提取 8 h,提取后进行抽滤,所得滤渣再次提取 3 次。将几次获得的滤液混合,经真空冷冻干燥获得黑豆皮花青素。

1.2.3 超声波辅助法 准确称取黑豆皮 4.00 g,蒸馏水作为提取剂,料液比为 1:8,在常温常压下用超声波进行辅助提取,超声波功率为 120 W,提取 30 min,提取后进行抽滤,所得滤渣再次提取 3 次。将几次获得的滤液混合,经真空冷冻干燥获得黑豆皮花青素。

1.2.4 黑豆皮花青素提取率 提取率(%)=(黑豆皮花青素干重/黑豆皮干重)×100。

1.2.5 菌悬液的配制 将枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌分别接种于牛肉膏蛋白胨培养基 37℃培养 24 h,挑取一菌环于无菌生理盐水的试管内,震荡摇匀制成菌悬液。调整菌悬液浓度,并稀释至 1.0×10⁴ cfu·mL⁻¹ 备用。

1.2.6 抑菌圈-滤纸片法 将不同提取方法得到的黑豆花青素分别配制成 0.05,0.1 和 0.3 g·mL⁻¹ 三个不同浓度梯度的样品稀释液,将灭菌后的直径 10 mm 滤纸片放入样品稀释液中浸泡 0.5 h 后晾干,紫外线灭菌 30 min,无菌水浸泡的滤纸片作对照。后贴于含有 0.2 mL 菌悬液的平板培养基表面,37℃倒置培养 24 h,观察平板培养基上微生物生长情况并用尺子测量抑菌圈的直径。抑菌圈大,说明抑菌效果好。

1.2.7 抑菌率-平板菌落计数法 对测得抑菌圈较大的提取方法获得的黑豆皮花青素采用平板菌落计数法测定抑菌率。将牛肉膏蛋白胨培养基灭菌,水浴 50℃保温备用,将 0.2 mL 菌悬液滴在平板中央位置,再加入不同浓度的黑豆皮花青素溶液(0.05,0.1 及 0.3 g·mL⁻¹) 1.0 mL,避免与菌悬液

接触,最后注入培养基至平板 1/2~1/3 处,混合均匀。每处理 3 次重复,无菌水作为对照组。将细菌平板倒置 37℃培养 24 h,计得菌落个数,计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照菌落数-处理菌落数)/对照菌落数×100。

1.3 数据分析

采用 SPSS 19.0 进行数据处理及分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法的花青素提取率

采用 3 种不同提取方法提取黑豆皮花青素提取率高低依次是超声波辅助法>传统有机溶剂法>水浸提法。其中,超声波辅助法提取率最高,达到 20.50%。水浸提法提取率最低,仅为 15.60%。3 种提取方法提取黑豆皮花青素颜色略有差异,超声波辅助法提取的花青素颜色较深,为浅黑色,有机溶剂法为黄棕色,水浸提法为红棕色。

2.2 不同提取方法提取的黑豆皮花青素体外抑菌活性

2.2.1 滤纸片法 3 种不同提取方法提取的黑豆皮花青素在低浓度(0.05 和 0.1 g·mL⁻¹)时对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 3 种细菌抑菌圈不明显,抑菌效果不明显。高浓度(0.3 g·mL⁻¹)时抑菌圈较大,有一定抑菌效果(表 1)。

通过对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌圈的方差分析结果如下:进行主体间的效应检验,得知因素一提取方法的 *P* 值分别是 0.287,0.385,0.572,均大于 0.05,所以不同提取方法对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌圈没有显著影响;因素二花青素浓度的 *P* 值分别是 0.004,0.07,0.029,均小于 0.05,花青素不同浓度对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌圈有显著影响;对 3 种不同提取方法进行 LSD 多重比较,得知传统有机溶剂法、水浸提法、超声波辅助法间的 *P* 值均大于 0.05,3 种水平两两间均没有显著差异;对花青素不同浓度进行 LSD 多重比较,得知除花青素浓度为 0.05 g·mL⁻¹ 与花青素浓度为 0.1 g·mL⁻¹ 间无显著差异外,其它浓度间均存在显著差异。

从图 1 可以看出,3 种不同提取方法得到的黑豆皮花青素浓度为 0.3 g·mL⁻¹ 对枯草芽孢杆菌的抑菌圈从大到小依次为水浸提法>传统有机溶剂法>超声波辅助法,对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌

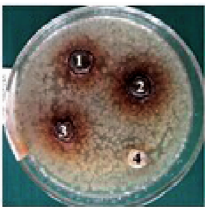
的抑菌圈从大到小依次为水浸提法 > 超声波辅助法 > 传统有机溶剂法。从 3 种提取方法的抑菌活性来看,水浸提法的抑菌活性最好,黑豆皮花青素浓度为 0.3 g·mL⁻¹时对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 3 种细菌抑菌圈分别达到 1.48,1.44,

1.42。这可能是因为水浸提法是在常温常压下直接用蒸馏水提取,提取物过程没有使用有机溶剂和超声波,很好的保护了花青素中某些物质的生物活性,使得其提取的花青素物抑菌活性最高。所以,如果从抑菌的角度来考虑,水浸提法最佳。

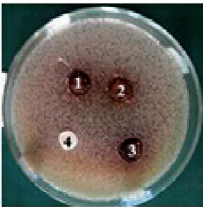
表 1 不同提取方法得到的不同浓度黑豆皮花青素对细菌的影响

Table 1 Effect of different concentrations anthocvanin extracted by different methods on bacteria

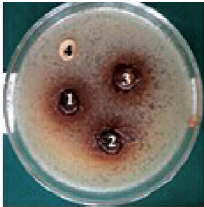
提取方法 Extraction method	花青素浓度 Anthocyanin concentration/g·mL ⁻¹	抑菌圈直径 Bacteriostatic ring diameter/cm		
		枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
传统有机溶剂法 Traditional organic solvent method	0.05	1.00	1.00	1.01
	0.1	1.05	1.02	1.06
	0.3	1.33	1.23	1.16
水浸提法 Water extraction	0.05	1.00	1.00	1.00
	0.1	1.08	1.03	1.03
	0.3	1.48	1.44	1.42
超声波辅助法 Ultrasonic assisted method	0.05	1.01	1.00	1.00
	0.1	1.02	1.01	1.04
	0.3	1.26	1.26	1.25



Bacillus subtilis



Staphylococcus aureus



Escherichia coli

1:水浸提法;2:超声波辅助法;3:传统有机溶剂法;4:对照。
1:Water extraction; 2:Ultrasonic assisted method; 3:Traditional organic solvent method; 4:CK.

图 1 不同提取方法得到的黑豆皮花青素在浓度为 0.3 g·mL⁻¹时的抑菌圈

Fig. 1 Anti-bacteria circle of 0.3 g·mL⁻¹ anthocyanin extracted by different extraction methods in black beans skin

2.2.2 平板菌落计数法 对测得抑菌圈较大的水浸提法获得的黑豆皮花青素采用平板菌落计数法测定抑菌率。从表 2 和图 2 可看出,黑豆皮花青素对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 3 种细

菌均有一定的抑菌作用,且从低浓度到高浓度的条件下抑菌效果逐渐增强。黑豆皮花青素浓度在 0.3 g·mL⁻¹时,对 3 种细菌的抑菌率达到最大,分别为 79.75%、74.50% 和 81.60%。

表 2 不同浓度黑豆皮花青素溶液对细菌的抑菌率

Table 2 Black soybean skin anthocyanin solution different concentrations of bacteria antibacterial rate(%)

细菌 Bacteria	花青素浓度 Anthocyanin concentrations/ g·mL ⁻¹		
	0.05	0.1	0.3
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	17.53	57.00	79.75
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	9.90	52.20	74.50
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	10.70	55.20	81.60

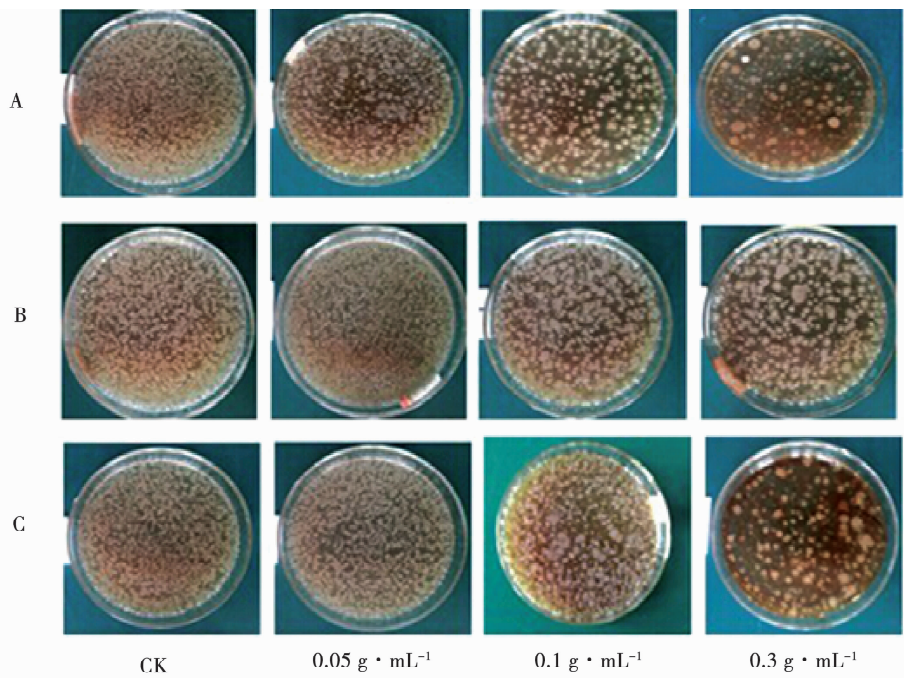


图 2 不同浓度黑豆皮花青素溶液对不同细菌生长的抑制作用
Fig. 2 Inhibition effect of different concentrations anthocyanin solution on different bacteria

3 结论与讨论

黑豆皮花青素的提取方法很多,本试验对传统有机溶剂法、水浸提法、超声波辅助法进行了研究比较。以黑豆皮花青素的提取率为指标,提取率高低依次是超声波辅助法 > 传统有机溶剂法 > 水浸提法。其中,超声波辅助法的提取率最高,达到 20.50%。

采用滤纸片法对 3 种不同提取方法所得的花青素抑菌效果进行了比较。结果显示:水浸提法对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等 3 种细菌的抑菌圈均最大,抑菌效果最好。方差分析结果表明:不同提取方法对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌圈没有显著影响,花青素不同浓度对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌抑菌圈有显著影响。

实验另采用平板菌落计数法对水浸提法所得的花青素抑菌率进行比较发现,从低浓度到高浓度抑菌效果逐渐增强。当花青素在浓度为 0.3 g · mL⁻¹ 时,对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 3 种细菌的抑菌率最高,分别达到 79.75%、74.50%、81.60%。结果表明,如果以抑菌效果为指标,水浸提法所得的花青素抑菌活性最好。

在体外抑菌实验中,多采用滤纸片法。其操作简单,抑菌圈大小便于测量,可以对花青素的抑菌

强度做初步定性判断。但是花青素在培养基中的扩散速度及滤纸片的吸附能力不同,可能导致抑菌圈不明显。另外,贴在培养基表面的滤纸片容易干燥,会影响花青素的扩散速度,不能真正反映该花青素的抑菌效果。平板菌落计数法是一种常用的细菌计数法^[12],其能通过计算不同浓度花青素的抑菌率较精确地反映花青素的抑菌效果。但是操作过程繁琐可能带入杂菌,影响计数结果。本试验表明,滤纸片法和平板菌落计数法在反映黑豆皮花青素抑菌作用上是一致的,只是定性和定量区别。

目前,黑豆皮花青素的提取最常使用的是有机溶剂提取法,但是传统的方法提取率低、溶剂易残留在提取物中,存在安全隐患。鉴于其重要的生物学活性,近年来人们一直在努力探索一种更为有效的提取方法,但主要仍集中在对有机溶剂提取法的改进上,如采用超声波辅助提取等。而超声波辅助法提取可能由于较高的振动频率会破坏黑豆皮花青素中的某些活性抑菌成分。而水浸提法是在常温常压下直接用蒸馏水提取,提取过程不使用有机溶剂、超声波或高温,保护了花青素中某些生物活性物质,使提取的花青素抑菌活性最高。所以,如果从开发相关抑菌活性物质的角度考虑,水浸提法为最佳提取方法。

综上所述,选择有效的提取方法开发安全无毒的黑豆皮花青素作为功能性食品添加剂,兼顾营养

和食品防腐剂的功效,在食品、饮料、医药方面的应用潜力巨大。

参考文献

[1] 朱宏达,张慧,张美荣,等. 黑豆红色素的提取工艺及其理化性质的研究[J]. 中国食品添加剂,2009(1):86-90. (Zhu H D, Zhang H, Zhang M R, et al. The study of black bean red extracting from black soybean and its physical and chemical properties [J]. China Food Additives,2009(1):86-90.)

[2] Choung M G, Baek I Y, Kang S T, et al. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2001, 49(12):5848-5851.

[3] 肖怀秋,李玉珍. 黑豆皮中红色色素萃取工艺的响应面优化[J]. 氨基酸和生物资源,2010,32(2):30-34. (Xiao H, Li Y Z. Optimization of extraction technology of red pigment from BSC using response surface methodology[J]. Amino Acids & Biotic Resources,2010,32(2):30-34.)

[4] 杨卫民,刘保琪,李团霞,等. 黑豆种皮中红色素的提取及稳定性研究[J]. 大豆科学,2010,29(4):688-691. (Yang W M, Liu B Q, Li T X, et al. Extraction of red pigments from seedcoat of black soybean and its stability [J]. Soybean Science, 2010, 29(4):688-691.)

[5] 王少波. 黑豆皮中花色苷的提取及纯化研究[D]. 西安:西安理工大学,2008. (Wang S B. Study on extraction and purification process of anthocyanins from black bean peal[D]. Xi'an: Xi'an University of Technology,2008.)

[6] 李大婧,宋江峰,刘春泉,等. 超声波辅助提取黑豆皮色素工艺优化[J]. 农业工程学报,2009,25(2):273-279. (Li D J, Song J F, Liu C Q, et al. Optimization of technology for ultrasonic-assisted extraction of pigments from black soybean hulls [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,

2009,25(2):273-279.)

[7] 高雪琴,王若兰,杨建平. 黑豆皮红色素微波辅助提取与乙醇浸提的工艺比较研究[J]. 食品与药品,2006(5):39-41. (Gao X Q, Wang R L, Yang J P. A comparison study on extraction technology of black bean peal red pigment between microwave-assisted extraction and traditional extraction method [J]. Food and Drug, 2006(5):39-41.)

[8] Xu B J, Chang S K C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56(18), 8365-8373.

[9] 滕学峰. 黑豆皮中色素的提取纯化、结构鉴定及其性质的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008. (Teng X F. The extraction, refinement structural identification property of pigment compound in the coat of black soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2008.)

[10] 张芳轩,张名位,张瑞芬,等. 不同黑大豆种质资源种皮花色苷组成及抗氧化活性分析[J]. 中国农业科学,2010,43(24):5088-5099. (Zhang F X, Zhang M W, Zhang R F, et al. Comparative analysis of the anthocyanin profiles and antioxidant activity of seed coats from different black soybean germplasm resources [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(24):5088-5099.)

[11] 张花利,冯进,董晓娜,等. 黑豆皮中黄酮提取及粗提物抑菌效果研究[J]. 大豆科学,2001,30(3):497-501. (Zhang H L, Feng J, Dong X N, et al. Extraction of flavonoids from the peel of black bean and bacteriostatic effect of crude extractings [J]. Soybean Science,2011,30(3):497-501.)

[12] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社,2000. (Qian C R, Huang Y X. Microbiology experiment course [M]. Beijing: Peking University Press, 2000.)