

黑豆皮中黄酮提取及粗提物抑菌效果研究

张花利^{1,2}, 冯进³, 董晓娜^{1,2}, 张岩^{1,2}, 王世清^{1,2}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 山东 青岛 266109; 3. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要:通过对影响黑豆皮中黄酮类物质提取率的乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比、提取次数等因素进行了单因素试验、PB试验和响应面分析,将提取工艺进行了优化。结果表明:对黄酮提取具有显著影响的因子为乙醇浓度($P=0.0207$)、提取温度($P=0.0285$)和料液比($P=0.0170$)。最佳工艺为乙醇浓度70%、提取温度76.29℃、料液比为1:64.32;建立了有很好预测作用的醇提黄酮二次多项数学模型;发现黄酮粗提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有不同程度的抑制作用,最低抑菌浓度分别为40.0、2.5和5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词:黑豆皮;黄酮;提取;抑菌

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)03-0497-05

Extraction of Flavonoids from the Peel of Black Bean and Bacteriostatic Effect of Crude Extractings

ZHANG Hua-li^{1,2}, FENG Jin³, DONG Xiao-na^{1,2}, ZHANG Yan^{1,2}, WANG Shi-qing^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong; 2. Modern Agricultural Quality and Safety Engineering Key Laboratory, Qingdao 266109, Shandong; 3. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: The extraction process of flavonoids from the peel of black bean was studied in this paper. The experiments of single factors, Plackett Burman design and response surface method were used to optimize the influence factors (ethanol concentration, temperature, time, the ratio to material of liquid, extraction times) in the extraction process. It was found that ethanol concentration ($P=0.0207$), temperature ($P=0.0285$) and the ratio between material and liquid ($P=0.0170$) were the key influencing factors to the extraction. The optimal extraction conditions were as followings: ethanol concentration 70%, temperature 76.29℃, the ratio between material and liquid 1:64.32; a quadratic equation model was set up and the effects of the three factors and their corresponding relationships were obtained. The model played an important role in predicting the yield of flavonoids. In addition, the bacteriostatic effect of crude extracts was discussed. It was found that crude extractings had different bacteriostatic effects on *escherichia coli*, *staphylococcus aureus* and *bacillus subtilis*, the MIC were 40.0, 2.5 and 5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively.

Key words: Peel of black bean; Flavonoids; Extraction; Bacteriostatic effect

黑豆是一种传统的药食两用食材,源于中国,经中国的先民从祖本野生大豆驯化而来。中国的先民在利用黑豆的过程中,不仅认识到它的营养价值,还发现了它特别重要的药用价值。

现代药学研究发现,黑豆具有清除自由基、延缓衰老、改善营养性贫血、增强免疫力、改善睡眠等保健功能^[1-3]。其药用机理与其含多种生物活性成分有关,异黄酮的作用最为突出。大豆异黄酮是一种植物雌激素,对缓解更年期综合症、预防某些癌症、防治骨质疏松、防治心血管疾病都有一定作用^[4]。此外,黄酮类化合物原花青素具有改

善视疲劳和抗辐射作用,葛根素有明显的解酒与抗胆碱、解痉、增加脑血流量、改善学习记忆等作用^[5]。

该文通过单因素试验、PB试验和响应面分析等方法确定了黑豆皮中黄酮提取的最佳工艺,并对获得的粗提物进行初步的抑菌效果研究,测定粗提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的无菌生长的最低质量浓度(MIC)。上述研究内容对醇提黄酮二次多项数学模型的建立、预测黑豆皮中黄酮提取率有一定意义,并对研发天然抑菌物质、减少化学抑菌物质的使用量有较好的借鉴价值。

收稿日期:2011-03-22

第一作者简介:张花利(1986-),女,硕士,研究方向为食品安全保藏。E-mail:wszhanghuali@163.com。

通讯作者:王世清(1961-),男,教授,博士,主要从事食品安全保藏方面的研究。Email:wangshiqing@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑豆:黑龙江产青仁黑豆,购于青岛市城阳区批发市场;

试剂:葡萄糖(AR)、蛋白胨(BR)、牛肉膏(BR)、氯化钠(AR)、琼脂(BR)、无水乙醇(AR)、亚硝酸钠(AR)、硝酸铝(AR)、氢氧化钠(AR)、盐酸(AR)、芦丁(AR)。

培养基及菌种:

活化斜面培养基:葡萄糖 0.1%、蛋白胨 1%、牛肉膏 1%、酵母膏 0.5%、氯化钠 0.25%、琼脂 2%、pH 7.0~7.2。

斜面保藏培养基:蛋白胨 1%、牛肉膏 1%、氯化钠 0.5%、琼脂 2%、pH 7.0~7.2。

液体扩培培养基:葡萄糖 0.5%、蛋白胨 1%、牛肉膏 1%、酵母膏 0.5%、氯化钠 0.25%、pH 7.0~7.2。

固体平板培养基:葡萄糖 0.5%、蛋白胨 1%、牛肉膏 1%、酵母膏 0.5%、氯化钠 0.25%、琼脂 2%、pH 7.0~7.2。

细菌菌种:大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,枯草芽孢杆菌菌种均由青岛农业大学微生物实验室提供。

1.2 仪器与设备

HPX-9162MBE 型数显电热培养箱(上海博讯有限公司医疗设备厂);DZF-60508 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);紫外-可见分光光度计(上海凌光技术有限公司);ZF-90 型暗箱式紫外透射仪(上海顾村电光仪器厂);HH-2 数显恒温水浴锅(金坛市维实试验仪器有限公司);DS-200 高速组织捣碎机(江阴市保利科研器械公司);H1650-W 台式微量高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 黄酮含量标准曲线的绘制 黄酮含量标准曲线的绘制参照田新玲等^[6]的方法进行。得出黄酮含量的标准曲线的回归方程为 $y = 12.286x + 0.0029$ ($R^2 = 0.9998$),其中 y 为吸光度; x 为芦丁标准液浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); R^2 为线性回归系数。

1.3.2 提取液中总黄酮含量测定方法 准确称取样品 4.00 g 置于磨口圆底烧瓶中(其中加入不同体积和浓度的乙醇溶液),置于水浴锅中,提取黄酮,抽滤至澄清,在旋转蒸发仪中减压浓缩后定容至 150 mL。具体参照蔡建秀等^[7]的方法

进行。根据回归方程算出测量液中总黄酮的浓度 $C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$,按照以下公式计算提取物黄酮的含量。

$$\text{提取率}(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{C \times V \times N}{W}$$

式中: C —测量液总黄酮浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); V —粗提液体积(mL); N —稀释倍数; W —原料干重(g)。

1.3.3 黑豆皮中黄酮的提取方法 将黑豆皮粉碎,过 40 目筛,移入干燥器中备用^[8]。准确称取一定量的黑豆皮粉末,置于 200 mL 圆底烧瓶中,按照确定的料液比,加入一定量的不同浓度的乙醇溶液,将其放入恒温水浴锅中进行浸提。按照 1.3.2 中方法测定提取率。

1.3.4 黄酮粗提物色价的测定方法 用优化的工艺提取黑豆皮中的黄酮类物质,将滤液抽滤离心过滤后置于旋转蒸发仪中浓缩至 20 mL 左右,将浓缩液置于真空干燥箱中干燥成粉末状。具体测定方法参照 GB4926-2008^[9]。

1.3.5 菌悬液及粗提物水溶液制备 菌悬液制备参照李建武等^[10]的方法。用优化的提取方案提取黑豆皮中的黄酮,将提取液抽滤、离心、过滤后置于旋转蒸发仪中浓缩至 30~50 mL。将浓缩液置于冷冻干燥机中干燥呈粉末状固体^[11]。将黑豆皮黄酮粗提物置于 50℃ 无菌水中溶解,于紫外灯下灭菌 30 min。

1.3.6 黄酮粗提物抑菌效果分析 牛肉膏蛋白胨固体培养基倒平板,涂布接种。接种后将沾有粗提物水溶液的滤纸片放在培养皿表面的 4 个角。然后将培养皿放入 37℃ 恒温培养箱中培养 16 h,观察抑菌圈,记录试验结果^[12]。

1.3.7 粗提物 MIC 的测定 采用液体二倍稀释法^[13]。配制含有一定质量浓度黄酮粗提物的牛肉膏蛋白胨固体培养基,质量浓度分别为 80、40、20、10、5、2.5、1.75 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每一浓度的培养基都划线接种一对数生长期细菌,每浓度 3 次重复。置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h,观察生长情况,测定粗提物对每种细菌的 MIC。

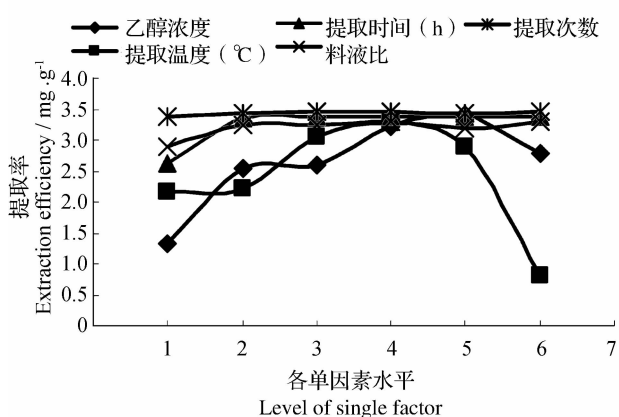
2 结果与分析

2.1 黑豆皮中黄酮提取条件的单因素试验

在提取过程中,对黑豆皮中黄酮提取影响比较大的因素如乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比、提取次数等分别进行单因素试验,确定在提取过程中每种单因素的最佳水平。各单因素试验设计因素水平如表 1 所示。

u ā, y 0) ì T V Ô Õ) ì í î					
ā, # ! Š !					
ß t Ž À ° Mª À ° M± . / ³ , ° Mā ~					
ú Ø	ð	ð% !	ð% !	Š ð% !	
û #	! ! !	!"	!	"	!
ā Ū ā ā á !					
ā	çā	çā	ā	ā Šāā	ā
ä	èā	èā	ä	ä Šäā	ä
â	éā	éā	â	â Šâā	â
æ	êā	êā	æ	ā Šâā	æ
ç	ëā	ëā	ç	ā Šāāā	ç
è	āāā	āāā	è	ā Šāāā	è

, , Ý í ā3 ´ å ã ° M < ā ß t Ž À q " # ð
" & å êâ Ū j { á } & ä å Å ß t Ž À Q èâ Ū
j q ° M < 9 } & ä n f ç › ³ â | Ñ ä / q)
À ¾ \$ å Ū ß t Ž À Q èâ Ū å ã ° M < āª À
q " # ñ " & ... o ñ å êâ´ { á } & ä âêâ´ î
... ° M < āª À " # ð o ñ å V È »ª d x ā q
l W⁻ 6 ~ v ø ù / – å´ Ä ï : W 9 Ō q ° M
ª À Q èâ´ å ã ° M < ā ° M ± . q " # ! ô "
å M ± . ^ c ä ... å ã ° M < q " # > Â Ø
ā å´ s Ū ° M ± . Q ä å # ū ß t x Ō q "
å ã ° M < ñ " # ... 7 ‡ Þ´ S ā ° M < T
| Ñ 0 / q) À ¾ \$ å Ū ° M q / ³ , Q ä Šåå
° M ā ~ ^ c äå ± å ã ° M < q " # > Â Ø
ā å´ s Ū ° M ā ~ Q äå ê



E ā, y 0) ì © ê C ° ç È * È É
õ %ä, ô ! # " ! ! % !
& #
ä%ä, ÿ !! ñ" T V Ô Õ
s – ý í ê q ÿ !! ñ" ‘ W Á Â å ç
%õ ð å ß t Ž À ø Mª À ø M ± . é ³ , ø
M ā ~ æ • ³ Á⁻ 1 2 ã z äê
K ð 6 ð ° M´ W 5 • ½ å c ÿ !! ñ" Š
‘ W Á Â • > e ä åz åä : W = > x ã ° M

< q ³ Á⁻ 6 ð ê \$ – ó Š% ! é%ä 4 d
ÿ !! ñ" ‘ W ± ² € • f „ åz åå Ó á Ä
Ð O n f „ z › å ß u á q Ó á O > ³ Á ä ý í
ä%äåååê = > ³ Á 6 %¹ ß t Ž À ä ý í ä%äåååê
° Mª À ä ý í ä%äåçâ / ³ , ä ý í ä%äåéåê

u ä, ÿ !! ñ" T V Ô Õ) ì í î — N L
ä, ô% ! ! #
ÿ ñ

u .		¥ ! ú Ø ò #
		ß ā Þ ā
ß t Ž À ð	! ! ā Ū	çā éā
° Mª À ð% ! !	!" ā	éç êç
° M ± . ð% ! !	á	ā ā
/ ³ , Š " !		ā Šâā ā Šçā
° M ā ~ ð% ! !		ā ā

u ā, ÿ !! ñ" T V Ô Õ — É´ 6		# " ÿ ñ	
ß t Ž À ° Mª À ° M ± . / ³ , ° M ā ~		x ā ° M < ò #	
l O ð ð% ! ð% ! Š ° M ā ~		õ # % ! !	
ý à ! ! ! " ð% !		á ë ß ā	
š ā Ū š" ā á ! !			
ā Þ ā	ß ā Þ ā	Þ ā Þ ā	ä%äåèæ
ä Þ ā	Þ ā Þ ā	ß ā Þ ā	ä%äåçå
â Þ ā	ß ā Þ ā	ß ā Þ ā	ä%äååå
æ Þ ā	Þ ā Þ ā	Þ ā Þ ā	ä%äåèää
ç Þ ā	ß ā Þ ā	ß ā Þ ā	ä%äåçç
è Þ ā	Þ ā Þ ā	ß ā Þ ā	ä%äåèç
é Þ ā	ß ā Þ ā	ß ā Þ ā	ä%äåçæ
ê Þ ā	Þ ā Þ ā	ß ā Þ ā	ä%äåéä

u æ = E ! " Q } . / — " " b š V
æ & !!!

O n L 8		A ò Ä Ø O T , O ð ā ÿ î õ
" #		ó " ü ò # " " "
Ä Ð ü	ç	ä%äå ä%äåé ä%äå ä%äåää
ß t Ž À ð	! ! ā	ä%äå ä%äå æ%äå ä%äåé
° Mª À ð% ! !	!" ā	ä%äåé ä%äåé ä%äåç ä%äåç
° M ± . ð% ! !	ā	ä%äåä ä%äåä æ%äå ä%äåçä
/ ³ , Š " !	ā	ä%äç ä%äç ç%äå ä%äåéä
° M ā ~ ð% ! !	ā	ä%äåä ä%äåä ä%äå ä%äåé

ä%ä, ÇE" B D ê C ° ç ñ ò ú x D F î ï T V
ä%ä%ä, %õ: %- - , ž • ð 6 ð´ W T ± ² åä
ß t Ž À å Mª À å ³ , ä%õ ð ð f ° K ä%õ ú
Ø ½ d´ j k´ W € • * l Ö f Á Ä æ¹ äé%õ
‘ W j ê X P j 7 z v á %õ § < u . q B ä ú Ø ä

