

黑豆皮花青素的提取及体外抗菌活性研究

苏 适 李 月 董立强 马 瑞

(绥化学院 食品与制药工程学院 黑龙江 绥化 152061)

摘 要: 以黑豆皮为原料,采用单因素和正交试验确定了微波辅助离子液体法提取黑豆皮中花青素的最佳工艺条件,并对花青素的体外抗菌活性进行研究.结果显示,当离子液体浓度为 1.0 mol/L,微波功率为 400 W,料液比为 1:20,提取时间为 5 min 时,最佳条件下花青素的提取率最高为 4.45%,优化工艺稳定,可靠.采用滤纸片法做抑菌实验,结果表明黑豆皮花青素对受试菌均有显著的抑制作用,且抑菌性随花青素浓度增大而增强.

关键词: 黑豆;微波辅助提取;花青素;离子液体;抑菌作用;滤纸片法

中图分类号: R284.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-0946(2020)05-0532-05

DOI:10.19492/j.cnki.1672-0946.2020.05.004

Study on extraction and antibacterial activity of anthocyanin from black soybean peel

SU Shi ,LI Yue ,DONG Li-qiang ,MA Rui

(School of Food and Pharmaceutical Engineering, Suihua University, Suihua 152061, China)

Abstract: The optimum conditions for the extraction of anthocyanins from black soybean peel by microwave-assisted ionic liquid method were determined by single factor and orthogonal experiments. The antibacterial activity of anthocyanins in vitro was studied. The results showed that when the concentration of ionic liquid was 1.0 mol/L, microwave power was 400 W, ratio of material to liquid was 1:20, extraction time was 5 min. Under these conditions, the yield of anthocyanins was 4.45%. The optimization process was stable and reliable. The antibacterial experiment was observed through filter paper method. The results showed that the anthocyanins of black soybean had significant inhibitory effects on the tested bacteria, the antibacterial activity increased with the increase of anthocyanins concentration.

Key words: black soybean; microwave-assisted extraction; anthocyanins; ionic liquid; anti-microbial activity; filtering paper method

收稿日期: 2019-10-10.

基金项目: 黑龙江省本科高校基本科研业务费项目(KYYWF10236180105); 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201910236027)

作者简介: 苏 适(1985-),女,硕士,讲师,研究方向:药理学.

黑豆(*Glycinemax*(L.) Merr)为豆科植物大豆的黑色种子,属一年生草本植物,其中富含脂肪、多糖、蛋白质、纤维素、维生素、氨基酸和微量元素等营养成分^[1]。根据中医理论,黑豆具有乌发养血、补肾益精、明目镇心、消肿解毒等功效。黑豆种皮中富含的花青素是一种类黄酮化合物,具有抗氧化、抗肿瘤、减轻肝功能障碍、美容养颜和改善视力等作用^[2-5]。原花青素的抗菌、抗病毒作用的研究表明一定浓度的原花青素溶液对多种细菌均有抑制作用^[6]。随着黑豆的营养价值逐渐被人们所认识,作为一种食药两用型的健康食品,黑豆的种植范围和产量也逐年扩大。

花青素的提取方法有超声法、有机溶剂浸提法和微波法等。传统提取和分离方法有污染重、能耗高、试剂回收率低等问题。微波辐射提取技术利用电磁场的作用使样品中的某些有机物成分与基体有效的分离,且提取效率高^[7],已经成为研究的热点。离子液体在室温下呈液态,由有机阳离子和无机阴离子构成,具有溶解性好、极性高、可设计性和循环使用等特殊优点,是一种绿色的有机溶剂^[8-10]。本文采用微波辅助离子液体提取黑豆皮花青素,利用正交试验优化提取工艺,同时对花青素的抑菌能力进行研究,为黑豆的进一步开发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

材料:黑豆,购自永辉超市。原花青素标准品(质量分数98%):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;染料木素标准品(质量分数98%):中国药品生物制品检定所;1-丁基-3-甲基咪唑氯盐(质量分数97%):阿尔法试剂有限公司;琼脂粉、蛋白胨、牛肉膏、硝酸铝、氯化钠、氢氧化钠、亚硝酸钠(均为分析纯):国药试剂有限公司。

供试菌种:供试菌种均为绥化学院微生物实验室提供。

1.2 试验仪器

PZ-TQ-Q微波提取器:上海翰龙微波科技有限公司;101C-2B电热鼓风干燥箱:上海市实验仪器总厂;XV-9200紫外分光光度计:北京市精

密仪器厂;HB-III水循环多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;SPX-150B-2生化培养箱:海博迅实业有限公司医疗设备厂;JD-CJ-1A型超净工作台:苏州金大净化工程设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品预处理

将黑豆人工去皮,置于40℃烘箱中干燥至恒重,粉碎后过60目筛,备用。

1.3.2 标准曲线绘制

参考文献[3]采用盐酸-香草醛法测定花青素质量浓度,花青素能与显色剂反应,在500nm处有最大的吸收峰。称取10mg原花青素标准品,配成0.1mg/mL的标准品溶液。分别移取0.1、0.3、0.5、0.7、0.9mL标准品溶液置于10mL的容量瓶中,加入5.00mL显色剂,用1%的盐酸甲醇溶液定容,恒温水浴30min,花青素在530nm波长处有最大吸收峰,在此波长下测出待测溶液的吸光度值。以花青素质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得标准曲线为 $Y=0.9620X+0.0067$, $R^2=0.9964$ 。

1.3.3 提取率计算

称取1.0g黑豆皮粉末,以离子液体为提取剂,在一定实验条件下提取花青素,提取液以3000r/min离心40min,取得上层清液,按1.3.1项下方法测定其吸光度,并根据回归方程,计算黑豆皮花青素质量浓度及提取率:

$$\text{花青素提取率} = \frac{C \times V \times n}{M} \times 100\%$$

其中: C 为花青素质量浓度($\mu\text{g/mL}$); V 为定容体积(mL); n 为稀释倍数; M 为原料质量(g)。

1.3.4 微波辅助离子液体提取花青素及纯化

称取黑豆皮粉末1.0g,采用离子液体水溶液为溶剂,料液比为1:20,微波功率500W,温度60℃,提取6min;加入2倍体积的无水乙醇,沉淀去除粗提取液中的蛋白质、多糖等杂质,2000r/min,离心10min,取上清液再用石油醚、氯仿依次萃取,除去粗提取液中的脂溶性成分,弃掉有机层。合并离心后的上清液;对分离纯化后的提取液用旋转蒸发仪在40℃水浴中蒸发浓缩至10mL,装入容量瓶中,4℃保存,备用。

1.4 微波辅助离子液体提取法单因素实验设计

离子液体浓度: 固定提取温度 50 °C, 微波功率 300 W, 料液比 1:15 g/mL, 提取 6 min, 考察不同离子液体浓度(0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mol/L) 对花青素提取率的影响。

微波功率: 固定提取温度为 50 °C, 料液比 15 g/mL, 离子液体浓度 0.8 mol/L, 提取 6 min, 考察不同微波功率(100、200、300、400、500、600 W) 对花青素提取率的影响。

料液比: 固定提取温度 50 °C, 微波功率 300 W, 离子液体浓度 0.8 mol/L, 提取 6 min, 考察不同

料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30) 对花青素提取率的影响。

提取时间: 固定提取温度 50 °C, 微波功率 300 W, 离子液体浓度 0.8 mol/L, 料液比 15 g/mL, 考察不同提取时间(3、4、5、6、7、8 min) 对花青素提取率的影响。

1.5 正交试验设计

在单因素试验的基础上, 选取离子液体浓度(A)、微波功率(B)、料液比(C)、提取时间(D) 进行四个因素三水平正交试验, 如表 1 所示。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	离子液体浓度/(mol·L ⁻¹)	微波功率/W	料液比/(g·mL ⁻¹)	提取时间/min
1	0.8	300	1:10	5
2	1.0	400	1:15	6
3	1.2	500	1:20	7

1.6 花青素的抑菌圈实验

试验采用大肠杆菌、短小芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌作为供试菌; 采用滤纸片法^[10] 判断花青素的抑菌活性。将黑豆皮花青素提取液稀释至 0.0、0.05、0.25、0.35、0.45、0.55 mg·mL⁻¹ 作为供试样品溶液。在超净台上分别将菌种活化, 并用无菌涂布棒涂布均匀到牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 在平板上分别放置浸有不同浓度样品溶液的 6 mm 滤纸片, 放生化培养箱内 37 °C 培养 24 h, 观察抑菌效果, 用游标卡尺测定抑菌圈的直径, 另选取一个只加以无菌水为对照组, 抑菌圈直径越大则抑菌活性越强^[11-12]。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法对提取率的影响

提取黑豆皮花青素提取率高低依次是微波辅助离子液体法 > 传统有机溶剂法。

2.1.1 离子液体浓度对提取率的影响

由图 1 可知, 随着离子液体浓度的增加, 花青素的提取率随之升高。在离子液体浓度试验设定范围内, 花青素的提取率也随着 [BMIM]_{Cl} 浓度的增加而增大。当 [BMIM]_{Cl} 的浓度达到 1.0 mol/L 时,

花青素提取率达最大, 当离子液体的浓度超过 1.0 mol/L 时, 提取率开始下降。可能是花青素类化合物是一类极性化合物, 在离子液体浓度为 1.0 mol/L 溶液中溶出程度最大^[13]。所以, 离子液体浓度选择 1.0 mol/L 最佳。

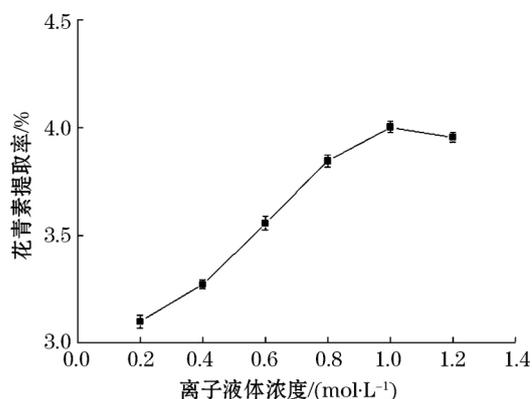


图 1 离子液体浓度对提取率的影响

2.1.2 微波功率对提取率的影响

由图 2 可知, 微波功率在 100 ~ 500 W 的试验设定范围内, 随着微波功率的升高, 黑豆皮花青素的提取率逐渐升高, 当功率为 500 W 时, 花青素的提取率最高, 随后提取率开始下降。微波功率越大, 使得体系温度上升迅速, 花青素的浸出量逐渐增

加;而功率过大时,系统内的强热导致花青素被氧化^[14],故提取率下降。所以,最佳的微波功率选为400 W。

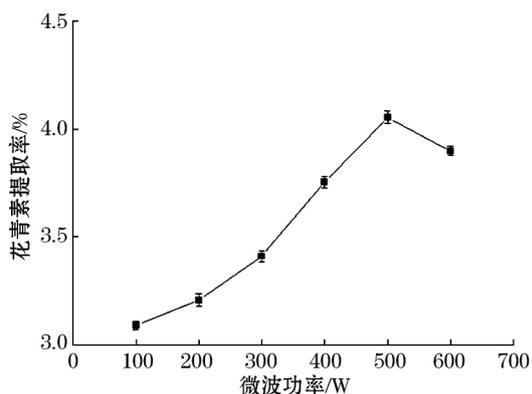


图2 微波功率对提取率的影响

2.1.3 料液比对提取率的影响

由图3可知,料液比在1:5~1:25的试验设定范围内,花青素提取率随着料液比的增大而升高,料液比为1:25时,提取率达到最大值,当料液比高于1:25时,花青素提取率开始下降。可能是体系中所能提取的花青素达到溶解极限,溶剂量增加也不能再提高花青素提取率,反而会增加杂质成分的溶出^[15],影响后序浓缩工艺,加大成本。所以,选择料液比为1:15。

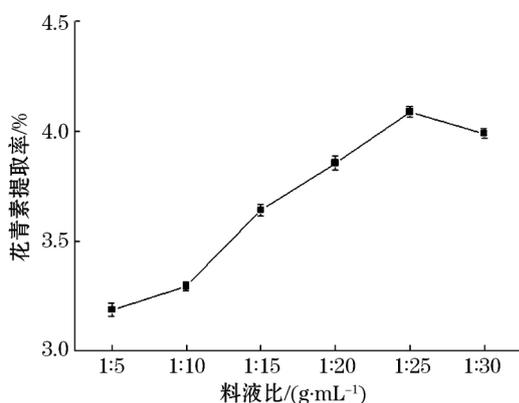


图3 料液比对提取率的影响

2.1.4 提取时间对提取率的影响

由图4可知,提取时间在3~7 min的试验设定范围内,花青素提取率随着时间的延长而升高,

微波提取时间在7 min时,提取率达到最大值,随后没有明显增加。可能是花青素溶出量达到饱和,继续延长提取时间花青素也不再继续溶出^[16]。所以,综合考虑成本因素,超声时间选择7 min。

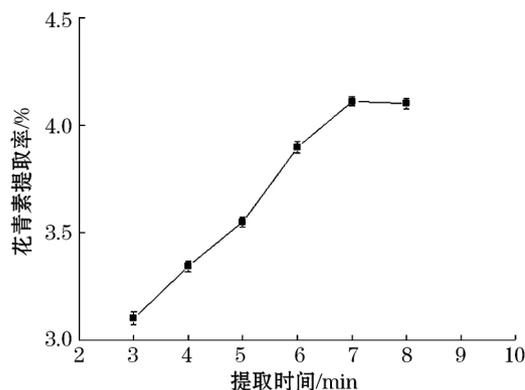


图4 提取时间提取率的影响

2.2 提取工艺优化

根据正交试验分析的结果,各因素对黑豆皮花青素提取效果影响的主次顺序依次为A>C>D>B。由表2极差分析可知,花青素提取率最高的理论组合应为A₁B₃C₃D₁,即离子液体浓度0.8 mol/L、微波功率500 W、料液比1:25(g/mL)、提取时间5 min,此条件下多酚提取率为4.45%。

2.3 抑菌活性研究

本试验测定了不同质量浓度黑豆花青素的抑菌活性,结果如表3所示。由表3可知,花青素质量浓度低于0.25 mg/mL时,对五种菌株的生长均无抑制作用;质量浓度在0.5~1.75 mg/mL对金黄色葡萄球菌的生长有较明显的抑制作用;质量浓度在0.75~1.75 mg/mL对短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌的生长有较明显的抑制作用。在一定质量浓度范围内,花青素的抑菌作用随着质量浓度的升高而增强。

由表3可知,用最佳工艺条件下制得的黑豆皮花青素对受试三个菌种均有抑制作用,最小抑菌质量浓度均为0.20 mg/mL,按敏感程度顺序依次为:枯草芽孢杆菌,金黄色葡萄球菌,大肠杆菌。

表2 正交试验结果表

试验号	A	B	C	D	花青素得率/%
1	1	1	1	1	3.78
2	1	2	2	2	3.97
3	1	3	3	3	4.14
4	2	1	2	3	3.49
5	2	2	3	1	4.09
6	2	3	1	2	3.71
7	3	1	3	2	3.59
8	3	2	1	3	3.16
9	3	3	2	1	3.48
K_1	11.87	10.83	10.61	11.32	
K_2	11.28	11.23	10.95	11.27	
K_3	10.23	11.32	11.82	10.79	
R	1.64	0.49	1.23	0.53	

表3 黑豆花青素的最低抑菌质量浓度实验结果

样品质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌圈直径/mm		
	短小芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
空白对照	-	-	-
0.05	-	-	-
0.10	-	-	-
0.20	1.52	1.31	1.09
0.40	1.93	1.78	1.71
0.80	3.16	2.75	2.64

注: -表示无抑菌活性

3 结 语

黑豆皮中花青素含量丰富,本研究采用微波辅助离子液体提取法,正交试验优化得到最佳工艺条件为:离子液体浓度 1.0 mol/L 、微波功率 400 W 、料液比 $1:20(\text{g/mL})$ 、提取时间 5 min ,此条件下黑豆花青素的提取率可达 4.45% ,离子液体可重复利用,是一种高效提取黑豆花青素的方法。抗生素的广泛使用导致耐药菌株越来越多,本试验采用滤纸片法确定黑豆皮花青素的抑菌活性,花青素对细菌的生长具有良好的抑制作用,后续可对其抑菌机制等进行研究,本研究对更好地为天然抗菌抑菌剂的研发提供理论依据,更为黑豆皮的综合利用开辟新路。

参考文献:

[1] 张芳轩. 黑大豆种皮花色苷物质组成及其抗氧化活性与抗血管平滑肌细胞增生作用[D]. 武汉:华中农

业大学,2010.

- [2] 李文斌. 黑豆营养保健功能的研究与产品开发[J]. 食品工程,2010(4):19-20,27.
- [3] 杨民乐,侯俊仙,陈树俊,等. 黑豆皮花青素提取物的抗氧化活性研究[J]. 农产品加工(学刊),2013,338(12):11-13.
- [4] 赵巧玲,陈晓梅,赵晋忠,等. 黑豆种皮花色苷含量及抗氧化活性的测定[J]. 山西农业科学,2017,45(8):1240-1243,1267.
- [5] 李文斌. 黑豆营养保健功能的研究与产品开发[J]. 食品工程,2010(4):19-20,27.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 李明英. 离子液体在天然活性物质提取中应用研究进展[J]. 药学进展,2015,39(6):437-445.
- [9] LIU Z Z, GU H Y, YANG L. An approach of ionic liquids/lithium salts based microwave irradiation pretreatment followed by ultrasound-microwave synergistic extraction for two coumarins preparation from Cortex Fraxini [J]. J Chromatogr A, 2015, 1417: 8-20.
- [10] 巩育军,阮春平,黄学锋,等. 离子液体双水相萃取山楂黄酮和多糖的相行为研究[J]. 化学研究与应用,2014,26(9):1417-1421.
- [11] 张喜峰,何倩,张斌,等. 离子液体超声辅助提取桑葚中原花青素[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(6):963-970.
- [12] 史丽娟,彭胜,郑阳,等. 离子液体超声波辅助法提取杜仲皮总木脂素的工艺研究[J]. 应用化工,2015,44(12):2250-2254.
- [13] 丁存宝,刘海燕,李桂秋,等. 月季果黄酮的提取及抑菌效果研究[J]. 食品工业,2012(1):107-109.
- [14] 王虹玲,武婷茹,姜诗文. 香蕉皮单宁的提取及其提取物的抑菌抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2014,40(11):253-258.
- [15] 张俊,程卫东,史学伟,等. 紫胡萝卜花青素提取工艺及其体外抗菌活性研究[J]. 中国调味品,2016,41(11):140-144+151.
- [16] 苏适,赵东江,柴宝丽,等. 离子液体超声辅助提取黑豆皮花青素及其抗氧化活性研究[J]. 中国酿造,2014,40(6):171-175.