

蓝莓花青素的抗氧化作用和抑菌性研究

郝文博¹ 姜广明² 车文实¹

(1.黑河学院,黑龙江黑河164300;2.黑河市农林科技有限公司,黑龙江黑河164300)

摘要:以测定蓝莓花青素对超氧阴离子自由基、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、DPPH 自由基(DPPH \cdot)的清除能力来评价蓝莓花青素的抗氧化能力,通过对 *E. coli* 的抑制作用评价其抑菌性。结果显示,蓝莓花青素对超氧阴离子自由基、羟基自由基及 DPPH 自由基清除率随着蓝莓花青素浓度的增大而提高,并且其抗氧化能力高于等浓度的抗坏血酸;蓝莓花青素可有效抑制 *E. coli* 的生长。所以,蓝莓花青素具有很高的抗氧化活性和一定的抑菌作用。

关键词:蓝莓花青素;抗氧化性;抗菌性

中图分类号:TS201

文献标志码:A

文章编号:1674-9499(2014)03-0123-03

花青素又称花色素^[1],是一类水溶性天然色素,属黄酮类化合物,多以糖苷形式存在,结构单元为 α -苯基苯并吡喃型阳离子。蓝莓又名越橘,为杜鹃花科越橘属多年生落叶或常绿灌木,品种丰富,富含花青素^[2]。野生种蓝莓鲜果每百克鲜果中花青素含量高达0.33—3.38g,栽培种每百克鲜果中含量为0.07—0.15g^[3]。本试验采用花青素含量高的野生种蓝莓鲜果。目前,国内外对蓝莓花青素已有多项研究,常规提取工艺已经建立^[4]。本研究在蓝莓花青素高效提取的基础上,深入探明其抗氧化能力和抗菌能力,以加速蓝莓花青素的市场开发。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

野生种蓝莓果采自黑龙江省黑河市逊克县;大肠杆菌(*E. coli*)由中国医学菌种保藏中心提供。SP22100UV型紫外-可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;DK29821型电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;DF204电热鼓风干燥箱,北京西城区医疗器械二厂;超净工作台,北京东联哈尔滨仪器制造有限公司。

1.2 蓝莓花青素制剂

蓝莓花青素制剂由本实验室制备。主要工艺流程如下:取蓝莓鲜果破碎后用乙醇浸提,过滤后离心得花青素提取液,经聚酰胺树脂吸附,

用60%乙醇洗脱后旋蒸得到花青素纯化液,再低温真空干燥得蓝莓花青素冻干粉^[5]。最后用超纯水配制成100mg/ml的蓝莓花青素制剂。

1.3 实验方法

1.3.1 蓝莓花青素抗氧化活性的测定

1.3.1.1 超氧阴离子自由基清除能力的测定

25℃水浴中放置4.5ml 50mM pH 8.2的Tris-HCl缓冲液20min,加入1ml 100mg/ml的蓝莓花青素制剂样品和0.5ml 25mM邻苯三酚溶液,混匀并在25℃水浴中静置5min后加入1ml 8M HCl终止反应。以Tris-HCl Buffer作为参比,空白对照组为双蒸水,对照组为等浓度的抗坏血酸溶液。每个试验重复三次,425nm处测定其吸光度A,取平均值用以计算清除率。

超氧阴离子自由基清除率(%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$
式中, A_0 为空白的平均吸光度; A_1 为样品的平均吸光度。

1.3.1.2 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力的测定

取1ml 9mM FeSO₄、1ml 9mM水杨酸的乙醇溶液、1ml蓝莓花青素样品,加入1ml 8.8mM H₂O₂, 37℃水浴静置30min。以蒸馏水为参比,空白对照组为双蒸水,对照组为等浓度的抗坏血酸溶液。每个试验重复三次,510nm处测定其吸光度A,取平均值用以计算清除率。

$\cdot\text{OH}$ 的清除率(%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$

收稿日期:2014-03-04

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目《蓝莓花青素抗电磁辐射的研究》(12511351)

作者简介:郝文博(1982—),女,黑龙江五常人,讲师,硕士,主要从事生物化工研究;姜广明(1978—),男,黑龙江黑河人,主要从事生物学研究;车文实(1957—),男,黑龙江黑河人,教授,主要从事化学研究。

式中, A_0 为空白的平均吸光度; A_1 为样品的平均吸光度。

1.3.1.3 DPPH 自由基 (DPPH·) 清除能力的测定

用无水乙醇配制 0.04mg/ml DPPH· 溶液, 避光保存。2ml DPPH· 溶液与 2ml 蓝莓花青素样品充分混合, 静置 30min。空白对照组为双蒸水, 对照组为等浓度的抗坏血酸溶液。每个试验重复三次, 515nm 处测定其吸光度 A , 取平均值用以计算清除率。

$$\text{DPPH} \cdot \text{的清除率}(\%) = \frac{A_c - (A_i - A_j)}{A_c} \times 100$$

式中: A_i = 2ml DPPH· 溶液 + 2ml 待测溶液吸光度; A_j = 2ml 待测溶液 + 2ml 溶剂的吸光度; A_c = 2ml DPPH· 溶液 + 2ml 溶剂的吸光度。

1.3.2 蓝莓花青素抑菌活性的测定

1.3.2.1 *E. coli* 生长曲线的绘制

配置 1.25mg/ml 蓝莓花青素菌液, 且含菌数为 $10^3 - 10^5$ 个/ml, 37°C 震荡培养, 每小时取样测 A_{532} 绘制 *E. coli* 生长曲线。

1.3.2.2 蓝莓花青素对 *E. coli* 敏感性的测试

分别于 1.5ml EP 管中加入 0、12.5、25、50 μ l 蓝莓花青素样品, 加入 5 μ l *E. coli* LB 培养基补至 1ml。37°C 震荡培养 1.5h, 取 100 μ l 菌液接种至 LB 固体培养基。37°C 恒温培养 12h。采用液体倍比稀释法测定 MIC(最低抑菌浓度)和 MBC(最低杀菌浓度)。每个处理重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 蓝莓花青素的抗氧化活性

蓝莓花青素抗氧化活性的测定方法有多种, 本文通过测定超氧阴离子自由基的清除能力、羟基自由基的清除能力、DPPH 自由基的清除能力来确定蓝莓花青素的抗氧化能力。

2.1.1 对超氧阴离子自由基的清除作用

图 1 表明, 蓝莓花青素清除超氧阴离子自由基的能力显著, 且随着制剂浓度的增加, 其清除作用不断增强。当浓度达 0.3mg/ml 时, 其清除率达 80%。

2.1.2 对羟基自由基的清除作用

蓝莓花青素清除羟基自由基的清除率见图 2, 蓝莓花青素清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力高于抗坏血酸。

2.1.3 对 DPPH 自由基的清除作用

图 3 表明, 蓝莓花青素对 DPPH 自由基清除作用显著, 且其清除率在制剂浓度高于 0.005mg/ml 时高于抗坏血酸。而在药物浓度低于 0.005mg/ml 时低于抗坏血酸。

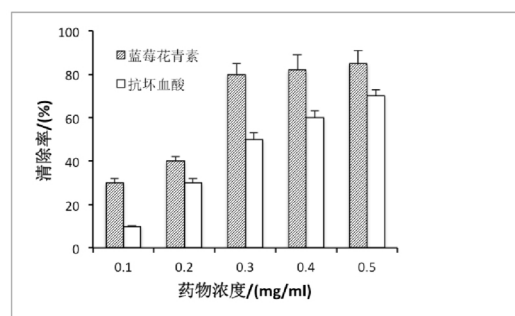


图 1 蓝莓花青素、抗坏血酸清除超氧阴离子自由基的能力比较

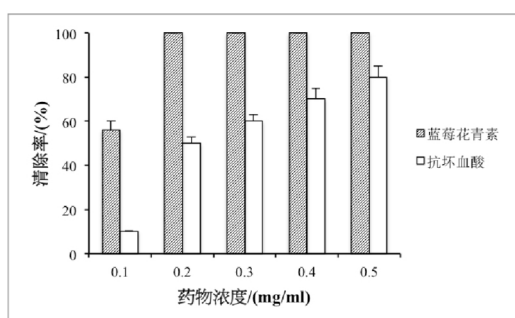


图 2 蓝莓花青素和抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力比较

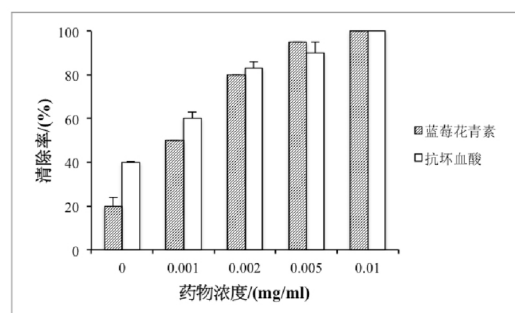


图 3 蓝莓花青素和抗坏血酸对 DPPH· 的清除能力比较

2.2 蓝莓花青素对 *E. coli* 生长曲线的影响

由图 4 可知, 在 3-8h 为 *E. coli* 的正常对数生长期, 在含有 1.25mg/ml 蓝莓花青素的 LB 中, *E. coli* 生长曲线变化明显: 在蓝莓花青素制剂作用 4h 后, 菌体数目下降, 6h 后很快进入衰亡期, 没有达到正常的生长高峰。这表明, 蓝莓花青素主要抑制了 *E. coli* 对数生长期的菌体分裂。

2.3 蓝莓花青素对 *E. coli* 生长的抑制作用

蓝莓花青素对 *E. coli* 的生长有明显的抑制作用, 且随着蓝莓花青素浓度增加, 抑菌效果显著增加。图 5 表明, 当蓝莓花青素样品浓度达 5mg/ml 时, 未检测到 *E. coli* 菌落的出现, 对 *E. coli* 生长的抑制率为 100%。液体倍比稀释法测得蓝

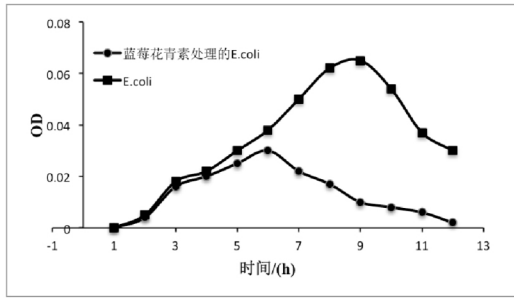


图4 蓝莓花青素对 *E. coli* 生长曲线的影响
 莓花青素对 *E. coli* 的 MIC 及 MBC 为 0.734 (mg/ml) 和 1.36 (mg/ml)。

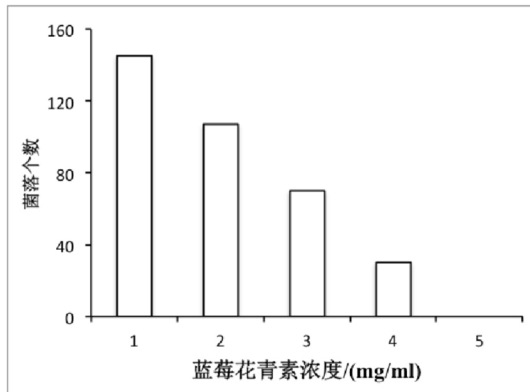


图5 蓝莓花青素对 *E. coli* 生长的抑制作用

3 结论

蓝莓花青素清除超氧阴离子自由基、羟基自由基、DPPH 自由基的能力显著高于等浓度的抗坏血酸,其清除率随其浓度增加而提高,且对 *E. coli* 生长具有较好的抑制作用,可以作为天然抗氧化剂在食品工业中进行开发应用。

参考文献:

- [1] Anna R ,Renato C N ,Daniela V et al. Modification of glass transition temperature through carbohydrates addition and anthocyanin and soluble phenol stability of frozen blueberry juices [J]. Food Eng ,2003 ,56(2 - 3) : 229 - 231.
- [2] 焦龙,李玉伟. 蓝莓果实中花青素提取方法的研究进展[J]. 北京农业 2011(3) : 10 - 11.
- [3] 杨桂霞,等. RP - HPLC 法测定栽培种越橘果中花色苷的含量[J]. 药物分析杂志 2005 ,25(10) : 1222 - 1224.
- [4] 吴敏,等. 天然花青素稳定性研究现状[J]. 中国食品添加剂 , 2008(5) : 50 - 54.
- [5] 刘新,等. 响应面法优化超声波辅助提取芒果核中原花青素的研究[J]. 食品工业科技 2012 ,33(3) : 227 - 231.

The Study on Antioxidant and Antibacterial Activity of Anthocyanins from Blueberry

Hao Wenbo¹ Jiang Guangming² Che Wenshi¹

(1. Heihe University ,Heihe164300 ,China; 2. Heihe Agriculture and Forestry Science and Technology Co. ,Ltd ,Heihe 164300 ,China)

Abstract: The antioxidant capacity of blueberry anthocyanins by measuring scavenging ability of blueberry anthocyanins superoxide anion radical ,hydroxyl radical (\cdot OH) ,DPPH radical (DPPH \cdot) was evaluated. By valuating its antibacterial activity by inhibition of *E. coli* , the results showed that blueberry anthocyanins superoxide anion radicals ,hydroxyl radicals and DPPH radical scavenging rate increased as the increase of the concentration of blueberry anthocyanins , and its antioxidant capacity than equal concentrations of ascorbic acid ,blueberry flower astaxanthin can effectively inhibit the growth of *E. coli* . Therefore ,blueberry anthocyanins have high antioxidant activity and some antibacterial effect.

Key words: anthocyanins from blueberry; antioxidant; antibacterial activity

[责任编辑:李慧慧]