

靖西大果山楂皮红色素的提取及 抑菌活性的研究

李 容,覃 涛,梁榕珊,尹建华,黄祖良*
(右江民族医学院药学院,广西百色 533000)

摘 要:研究了微波辅助提取靖西大果山楂皮中红色素的最佳工艺条件,考察乙醇浓度、料液比、微波功率、微波时间对色素提取的影响,通过正交实验对上述条件进行了优化,并采用滤纸片琼脂扩散法测定了红色素的抑菌活性。结果表明:山楂皮红色素提取的最佳条件为:乙醇浓度60%,料液比1:50(g/mL),微波功率500W,微波时间60s,提取2次。抑菌实验结果显示,红色素对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠杆菌、伤寒杆菌均有一定的抑制作用。
关键词:靖西大果山楂,果皮,提取,色素,抑菌活性

Study on extraction and antibacterial activity of the red pigment from *Crataegus jingxiensis* Li peel

LI Rong, QIN Tao, LIANG Rong-shan, YIN Jian-hua, HUANG Zu-liang*

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

Abstract: Studied the best condition for the extraction of the red pigment from the *Crataegus jingxiensis* Li peel through microwave-assisted technology, and investigated the influence of alcohol concentration, liquid ratio, microwave power, microwave minute on the extraction of the pigment. In the whole process of the experiment, the above conditions were optimized by the orthogonal experiment. Antibacterial activities of red pigment were determined by paper disk diffusion. Results showed that the best conditions for the extraction of the red pigment from the *Crataegus jingxiensis* Li peel were as follows: alcohol concentration 60%, liquid ratio 1:50(g/mL), microwave power 500W, microwave minute 60s and extraction twice. The results of the antibacterial experiments showed that the red pigment had certain inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*.

Key words: *Crataegus jingxiensis* Li; peel; extraction; pigment; antibacterial activities

中图分类号:TS255.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2015)08-0226-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.08.039

山楂为我国传统的药食同源品之一,其果可生吃或作果脯果糕;干制后也可入药,能健胃消食;降压、降血脂,还有抑菌、抗肿瘤等药理作用^[1]。我国使用历史非常悠久,品种资源来源极其复杂,市场上有北山楂、南山楂、广山楂、云山楂等多个品种,不同品种,不同产地其品质相差很大^[2]。

靖西大果山楂(*Crataegus jingxiensis* Li)是20世纪80年代初期全国山楂普查时发现的一个新品种,1985年被林学专家黎向东等定为此名^[3]。靖西大果山楂果产于广西百色靖西县,因果大而闻名,每公斤鲜果6~12个,比北方山楂大6~10倍,最大单果重120g^[3]。目前,靖西大果山楂主要用于食品加工,已开发出山楂糕、山楂酸、山楂应子等食品。在制作多种山楂食

品时,常需去除山楂皮,因此,得到大量的食品加工副产品山楂皮。山楂红色素,属于天然花青素类色素,其红色素主要存在于山楂果皮中,具有一定的药用和保健价值^[4],具有很好的研究价值。大量研究表明,天然色素不仅安全、无毒,还有营养、保健及药理作用^[5-6]。目前,从山楂果实中提取红色素的研究已有大量报道,但未见从靖西果大果山楂果皮提取红色素的报道。

微波作为一门新技术,被广泛的应用于植物有效成分的提取。近年来,微波辅助提取技术在色素提取领域也在逐渐推广^[7]。采用微波辅助提取山楂皮红色素具有工艺稳定、提取速度快、时间短及对色素物质破坏少等优点。本文就靖西大果山楂皮的红色素进

收稿日期:2014-08-01

作者简介:李容(1981-),女,硕士,讲师,研究方向:天然产物有效成分提取分离及活性研究。

* 通讯作者:黄祖良(1965-),男,本科,教授,研究方向:中草药有效成分及活性研究。

基金项目:广西百色市科学研究与技术开发计划项目(20121402);校级大学生创新训练计划项目(XJCXB201414)。

行微波辅助提取及抑菌活性研究,为山楂皮的综合利用开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

山楂皮 购自广西百色市靖西县;乙醇 分析纯,成都科龙化工试剂厂;牛肉膏、蛋白胨、琼脂 生化试剂,青岛海博生物技术有限公司;供试菌种为大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、伤寒杆菌(*Salmonella enterica*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)由右江民族医学院基础医学院微生物教研室提供。

FZ102型植物粉碎机 上海锐丰仪器仪表有限公司;TU-1800型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;RE-52AA型旋转蒸发器 上海安亭实验仪器有限公司;CPA64型电子天平 北京塞多利斯仪器公司;XH-300A型微波超声波组合萃取仪 北京祥鸽科技发展有限公司;LRH-150D型生化培养箱 韶关泰红宏医疗器械有限公司;SW-CJ-2型双人双面净化工作台 苏州净化设备有限公司;HVE50L型高压蒸汽灭菌器 日本三洋公司。

1.2 实验方法

1.2.1 色素提取工艺流程 靖西大果山楂皮→50℃条件下烘干2h→植物粉碎机粉碎→过80目筛→以乙醇为溶剂微波辅助提取→抽滤→3000r/min转速离心8min(取少量测吸光度)→减压浓缩(回收乙醇)→真空干燥→红色素浸膏。

1.2.2 单因素实验设计 根据山楂果实红色素研究结果,选取乙醇为提取溶剂,色素的含量用最大吸收波长520nm处的吸光度值来表示^[8]。考察乙醇浓度、料液比、微波功率、微波时间对色素提取的影响,固定山楂皮粉末2g,乙醇浓度60%,料液比1:50(g/mL),微波功率300W,提取时间40s,改变乙醇浓度(30%、40%、50%、60%、70%、80%),料液比(1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70g/mL),微波功率(100、200、300、400、500、600W),微波时间(20、30、40、50、60s),在各条件下提取色素,抽滤,定容后测吸光度值。

1.2.3 正交实验 根据单因素实验结果,选取乙醇浓度、料液比、微波功率、微波时间的较优水平,进行L₉(3⁴)正交实验,优化山楂皮红色素提取工艺,正交实验因素水平见表1。

表1 因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 乙醇浓度 (%)	B 料液比 (g/mL)	C 微波功率 (W)	D 微波时间 (s)
1	40	1:40	300	40
2	50	1:50	400	50
3	60	1:60	500	60

1.2.4 提取次数的确定 称取4份3g山楂皮粉末,在最佳工艺优化条件下,分别提取1、2、3、4次,合并滤液,浓缩,定容,分别测定吸光度值,确定提取次数。

1.2.5 抑菌活性测定 采用滤纸片法测定山楂皮红

色素成分对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、表皮葡萄球菌的抑制作用^[9]。将山楂皮红色素浸膏溶解在水中,配制成不同浓度梯度的待测液,用滤菌膜过滤除菌,备用。在无菌操作台中将灭菌后的滤纸片浸泡在色素溶液中12h,得色素滤纸片。在平板培养基中加入菌悬液,涂布均匀制成含菌平板,将色素滤纸片贴于平板中,在37℃恒温培养箱中培养24h,测量抑菌圈直径大小。每个样品重复测定3次,抑菌圈直径取平均值。

1.3 数据处理

实验数据均用Origin 7.0软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 乙醇浓度对色素提取的影响 从图1可知,红色素吸光度值随着乙醇浓度的增加而增大,在60%时达最大,随着乙醇浓度的进一步增大,红色素的吸光度值急剧下降。其可能的原因是,乙醇体积分数增大,极性减小,不利于山楂皮红色素的溶解,只有在合适的极性条件下,才利于红色素的提取。

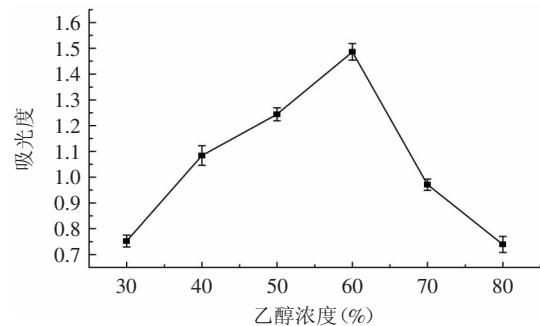


图1 乙醇浓度对提取的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on extraction

2.1.2 料液比对色素提取的影响 料液比对色素提取的影响如图2所示,当料液比达到1:50(g/mL)时吸光度值已基本达到稳定,进一步增大料液比色素吸光度值无明显提高。这表明色素在料液比为1:50(g/mL)时已经基本提取完全,考虑到溶剂及后序浓缩成本^[10],料液比以1:50(g/mL)较合适。

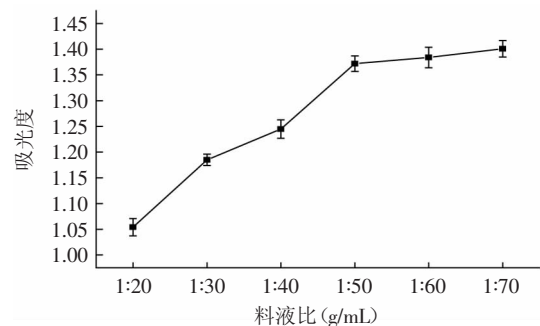


图2 料液比对色素提取的影响

Fig.2 Effect of solid to liquid ratio on extraction

2.1.3 微波功率对色素提取的影响 微波功率对色素提取的影响如图3所示,从图3可知,微波功率在

400W前,吸光度值随微波功率的增大而增加,当功率高于400W后,吸光度值下降,可能是微波功率过大,引起变色素的结构改变^[1]。

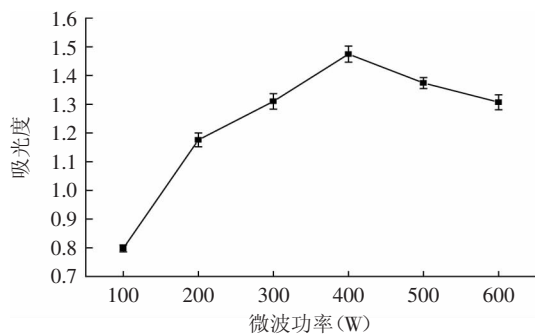


图3 微波功率对色素提取的影响

Fig.3 Effect of microwave power on extraction

2.1.4 微波时间对色素提取的影响 微波时间对色素提取的影响如图4所示,随着提取时间的延长溶液的吸光度先增大后减小,微波提取时间为50s时达最大值,超过50s后吸光度值下降,其原因可能为长时间微波加热导致部分红色素结构破坏,因此微波加热时间以50s较为合适。

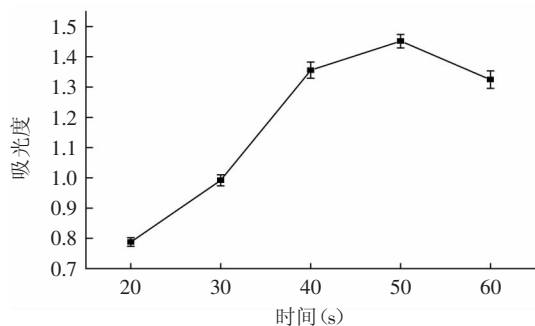


图4 微波时间对色素提取的影响

Fig.4 Effect of microwave irradiation time on extraction

2.2 正交实验结果

表2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	吸光度A
1	1	1	1	1	1.252
2	1	2	2	2	0.997
3	1	3	3	3	1.346
4	2	1	2	3	1.279
5	2	2	3	1	1.440
6	2	3	1	2	1.029
7	3	1	3	2	1.213
8	3	2	1	3	1.498
9	3	3	2	1	1.375
k_1	1.198	1.248	1.260	1.356	
k_2	1.249	1.311	1.217	1.080	
k_3	1.362	1.250	1.333	1.374	
R	0.164	0.063	0.116	0.294	

表3 方差分析

Table 3 The results of variance analysis

方差来源	SS	f	F	p
A	0.042	2	5.250	>0.05
B(误差)	0.008	2		
C	0.021	2	2.625	>0.05
D	0.163	2	20.037	<0.05

正交实验结果和方差分析如表2、表3所示。从表2分析可知,各因素对色素吸光度的影响因素顺序为:D>A>C>B,即微波时间>乙醇浓度>微波功率>料液比;方差分析可知,D因素对色素提取工艺有显著影响,A和C对提取工艺无显著影响。综合分析,最优组合为 $A_3B_2C_3D_3$,即最佳工艺为:乙醇浓度60%,料液比1:50,微波功率500W,微波时间60s,吸光度值平均为1.531 ($n=3$)。

2.3 提取次数

在最佳工艺下对山楂皮红色素进行反复提取,分别测定提取1~4次的吸光度值,实验结果如图5所示。山楂皮红色素经过2次提取后,吸光度值则没有明显提高,表示红色素已基本溶出,故提取次数确定为2次。

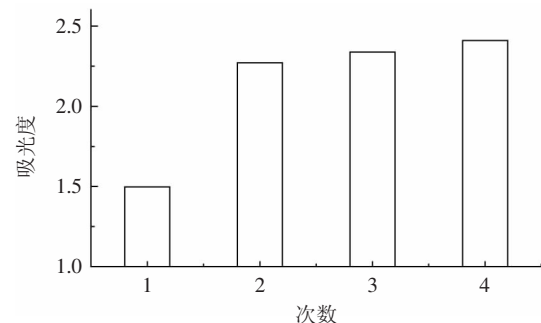


图5 次数对色素提取的影响

Fig.5 Effect of times on extraction

2.4 验证实验

取山楂皮粉末5份,每份3g,在最佳工艺条件下重复提取2次,合并2次滤液,定容测吸光度值。5份色素溶液的吸光度值分别为2.186、2.315、2.301、2.270、2.261,平均吸光度值为2.277,RSD为2.21%,表明该工艺稳定。

2.5 抑菌实验

采用滤纸片法测定山楂皮红色素成分的抑菌活性,结果见表4。由表4可知,山楂皮红色素对四种

表4 红色素抑菌活性(mm, $n=3$)Table 4 Antibacterial activities of red pigment (mm, $n=3$)

菌株	红色素浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	1	2	3	4	5
表皮葡萄球菌	7.5	8.9	10.2	11.1	11.8
大肠杆菌	-	5.8	6.3	6.7	7.0
金黄色葡萄球菌	-	5.6	5.7	6.0	6.2
伤寒杆菌	6.2	6.8	7.4	8.0	9.1

注:“-”代表无抑菌圈。

供试菌株均有一定的抑制作用,其抑菌作用与色素的浓度呈正相关性,浓度太低抑菌效果不理想。四种菌株对比,红色素对表皮葡萄球菌和伤寒杆菌的抑制作用较大肠杆菌和金黄葡萄球菌的作用要强。

3 结论

采用微波辅助法从靖西大果山楂皮中提取红色素,考察了乙醇浓度、料液比、微波功率、微波时间对色素提取的影响,通过正交实验对上述条件进行了优化,优化后的提取工艺条件为:乙醇浓度60%,料液比1:50(g/mL),微波功率500W,微波时间60s。抑菌活性实验表明,山楂皮红色素对表皮葡萄球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌均有一定的抑制作用。从山楂皮中提取得到的红色素安全、无毒副作用,可用于食品、药品和化妆品等多方面,具有良好的市场开发应用前景。

参考文献

- [1] 吴士杰,李秋津,肖学风,等. 山楂化学成分及药理作用的研究[J]. 药物评价研究,2010,33(4):316-319.
[2] 张宏平,张晋元,刘群龙,等. 我国山楂种植资源及选育品

种研究进展[J]. 中国种业,2014(2):15-17.

- [3] 李开祥,邓绍林,廖健明,等. 靖西大果山楂生产及加工现状的调查[J]. 广西林业科学,2003,32(4):214-216.
[4] 张素敏,冯翠萍,张振田,等. 山楂红色素的提取及其稳定性和抗氧化性的研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2012,32(1):32-36.
[5] 曾桥,董文宾. 功能性食用天然色素研究进展[J]. 食品科学,2012,33(6):22-24.
[6] 吴灿军,赵萍,王雅,等. 天然色素及枸杞色素的提取和抗氧化作用的研究进展[J]. 山西科学,2010(1):103-106.
[7] 姚壮合. 微波辅助提取芒果皮黄色素的研究[J]. 中国调味品,2009,34(5):1973-1977.
[8] 陶满庆,李炳诗,李峰,等. 山楂红色素提取及其稳定性研究[J]. 安徽农业科学,2012,32(1):32-36.
[9] 梁引库. 巨型蒲公英根脂溶性成分的抗氧化活性及抑菌实验研究[J]. 食品工业科技,2013,34(12):153-160.
[10] 张俊杰,王淑霞,周云,等. 响应面分析法优化米团花黄色素提取工艺研究[J]. 食品工业科技,2010,31(6):259-210.
[11] 陈红,崔海月,刘秀奇,等. 微波协同酶法提取玉米皮中的黄色素[J]. 食品科学,2012,33(6):50-53.

(上接第214页)

aeruginosa nitrite reductase(or cytochrome oxidase):an overview [J]. Biochimie,1994,76(7):641-654.

- [9] Leferink N G H, Pudney C R, Brenner S, et al. Gating mechanisms for biological electron transfer: Integrating structure with biophysics reveals the nature of redox control in cytochrome P450 reductase and copper-dependent nitrite reductase[J]. FEBS Letters,2012,586(5):578-584.
[10] Rinaldo S, Brunori M, Cutruzzola F. Nitrite controls the release of nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase[J]. Biochemical and Biophysical Research communications,2007,363(3):662-666.
[11] Wijma H J, MacPherson I, Alexandre M, et al. A rearranging ligand enables allosteric control of catalytic activity in copper-containing nitrite reductase[J]. Journal of Molecular Biology, 2006,358(4):1081-1093.
[12] Bowsher C G, Emes M J, Cammack R, et al. Purification and properties of nitrite reductase from roots of pea (*Pisum sativum* cv. Meteor)[J]. Planta, 1988,175(3):334-340.
[13] Datta R, Sharma R. Temporal and spatial regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in greening maize leaves[J]. Plant Science, 1999,144(2):77-83.
[14] Li X Z, Oaks A. The effect of light on the nitrate and nitrite reductases in *Zea mays*[J]. Plant Science, 1995,109(2):115-118.
[15] Gøtterup J, Olsen K, Knøchel S, et al. Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities[J]. Meat Science, 2008,78(4):492-501.
[16] Migge A, Meya G, Carryol E, et al. Coaction of light and the nitrogen substrate in controlling the expression of the tomato

genes encoding nitrite reductase and nitrate reductase[J]. Journal of Plant Physiology, 1997,151(2):151-158.

- [17] Ogawa K, Soutome R, Hiroyama K, et al. Co-regulation of nitrate reductase and nitrite reductase in cultured spinach cells [J]. Journal of Plant Physiology, 2000,157(3):299-306.
[18] Ogawa K, Shiraishi N, Ida S, et al. Effects of glutamine on the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in cultured spinach cells[J]. Journal of Plant Physiology, 1999,154(1):46-50.
[19] 隋志文. 天津冬菜中亚硝酸盐降解菌的筛选与应用[D]. 天津:天津科技大学,2008.
[20] 管世敏. 降解亚硝酸盐乳酸菌的分离筛选及其在泡菜发酵中的应用研究[D]. 上海:上海师范大学,2009.
[21] Hood R L, Nicholson C K, Moody B F, et al. P23. Disruption of NFAT signaling impairs the cardioprotective effects of exercise training by reducing the nitrite reductase capacity of the heart[J]. Nitric Oxide, 2011,24:S24-S25.
[22] Wang Y N, Wu Y Y, Yang X Q, et al. Optimization of Nitrite Reductase Production Conditions in *Lactobacillus plantarum* from Salted Fish[J]. Advanced Materials Research, 2013,781:1595-1598.
[23] 吴燕燕,王雅楠. 咸鱼中戊糖球菌产亚硝酸盐还原酶的条件优化[J]. 食品工业科技,2013,34(24):195-199.
[24] 吴燕燕,刘法佳,李来好,等. 改良离子色谱法测定咸鱼中亚硝酸盐的研究[J]. 南方水产科学,2011,7(6):1-6.
[25] GB 5009.33-2010食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2010.
[26] 郑怀忠. 产亚硝酸还原酶菌株发酵特性及酶在肉制品中的应用[D]. 厦门:集美大学,2009.