

超声波辅助酶法提取甜玉米穗轴黄酮及抑菌性检测

刘晓飞, 刘 宁, 张 娜, 荆丽荣, 于兹冰, 马永强
(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要:以甜玉米穗轴为原料,利用超声波辅助纤维素酶法提取其中的黄酮类物质,考察纤维素酶作用的酶解时间、酶解温度、pH值以及酶用量对甜玉米穗轴中黄酮类物质提取效果的影响。结果表明:超声波辅助纤维素酶法提取黄酮类物质最佳工艺条件为:超声处理20 min后,酶解温度55 ℃、pH 4.8、纤维素酶用量0.008 g/2.0 g甜玉米穗轴、酶解时间1.5 h,此条件下甜玉米穗轴中黄酮类物质提取率0.318%。甜玉米穗轴中黄酮类物质对白葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有明显的抑制作用,最低抑菌质量浓度分别为0.5、0.25、2 mg/mL。

关键词:甜玉米穗轴;黄酮;超声波辅助酶法;抑菌活性

Ultrasonic-Assisted Enzymatic Extraction and Antimicrobial Activity of Sweet Corn Cob Flavonoids

LIU Xiao-fei, LIU Ning, ZHANG Na, JING Li-rong, YU Zi-bing, MA Yong-qiang
(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Flavonoids were extracted by ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of sweet corn cobs using cellulase and the optimal extraction conditions were established by orthogonal array design. An ultrasonication time of 20 min followed by enzymatic hydrolysis at 55 ℃ and pH 4.8 for 1.5 h with an enzyme dosage of 0.008 g/2.0 g substrate provided maximum extraction yield of 0.318%. The flavonoids extracted from sweet corn cobs had significant antibacterial activity against white *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The minimum inhibitory concentrations were 0.5, 0.25 and 2 mg/mL respectively.

Key words: sweet corn cob; flavonoids; ultrasonic-assisted enzymatic extraction; antibacterial activity

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)20-0079-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201420016

甜玉米穗轴俗称玉米芯,是玉米果穗脱去籽粒后的穗轴,占玉米穗20%~30%。我国玉米年产量位于美国之后,居世界第二位^[1-2],按3 kg玉米产1 kg玉米芯计算,仅2013年我国产生的玉米芯近0.72亿 t。目前利用率仅有10%~15%^[3],绝大部分玉米芯作为农家燃料被烧掉,造成资源浪费。

植物黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物,是植物长期自然选择过程中产生的一类次生代谢产物^[4],它具有抗病毒、抗肿瘤、延缓衰老及降血糖、降血压、降血脂、抗炎镇痛等作用^[5]。黄酮类化合物还是一种天然的抗氧化剂,具有抗氧化和清除自由基抗衰老作用,已成为人类膳食中的一种不可或缺的抗氧化营养因子^[6-9],它在替代人工合成抗氧化剂成为未来油脂或含油食品添加剂方面拥有巨大潜力^[10-12]。甜玉米穗轴中含有黄酮类物质,最高含量可达0.05 mg/g^[13]。

黄酮的提取方法有水浸提法、索氏提取法、渗透法、

水蒸气蒸馏法、超声波提取法、酶法等^[14-19]。超声波能在液体中高频振动并产生“空穴作用”,可以破坏细胞组织,有助于黄酮类化合物的溶出和扩散,具有提取时间短、效率高的优点^[20-21]。酶法是近年来运用较多的一种技术,使提取液发生酶解反应,破坏组织细胞,降低提取条件,从而有利于有效成分的提取,提高提取率^[22-23]。为充分利用甜玉米穗轴资源,本研究采用超声波辅助酶法从甜玉米穗轴中提取黄酮类化合物,确定最佳提取工艺条件,并测定其抑菌活性,为今后甜玉米芯的开发利用及工业化生产天然抗氧化剂提供理论依据和方法指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甜玉米穗轴 哈尔滨市郊区;纤维素酶

收稿日期: 2014-02-08

基金项目: 哈尔滨商业大学博士科研启动项目(12DL014)

作者简介: 刘晓飞(1980—),女,讲师,博士,研究方向为农产品加工利用。E-mail: liuxiaofei72@163.com

(150 000 U/g) 和氏璧生物技术有限公司; 芦丁中国食品药品检定研究院; 硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、无水乙醇等试剂均为分析纯。

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白葡萄球菌由哈尔滨商业大学食品工程学院保存。

1.2 仪器与设备

Y92-2D超声波细胞粉碎仪 宁波新知生物科技股份有限公司; 紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; 高速离心机 上海安亭科技仪器厂; 电热恒温干燥箱 上海博迅实业有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线

量取120 °C干燥至恒质量的芦丁标准品20 mg, 用甲醇溶解, 定容在100 mL的容量瓶中, 制备成0.2 mg/mL的芦丁标准溶液备用。

吸取芦丁标准液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 分别加入质量分数5%亚硝酸钠溶液1 mL, 摇匀, 放置6 min后加入质量分数10%硝酸铝溶液1 mL, 摇匀, 放置6 min; 最后加入质量分数10%氢氧化钠溶液10 mL, 用蒸馏水定容至25 mL, 定容后的溶液放置15 min后, 在510 nm波长处测定吸光度, 并做空白对照。以芦丁标准液质量浓度为横坐标, 相应的吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.2 超声波辅助纤维素酶法提取甜玉米穗轴黄酮单因素试验

选择新鲜、无虫蛀、无霉变的甜玉米穗轴, 粉碎过80目筛子, 烘干至恒质量备用。准确称取粉碎后的甜玉米穗轴样品2.0 g, 按料液比1:20加入蒸馏水后, 使用功率520 W的细胞破碎仪作用20 min, 停止超声, 加入纤维素酶。考察酶解时间、酶用量、酶作用pH值、酶解温度4个单因素对总黄酮提取率的影响^[24]。

黄酮的提取率按照下面公式计算:

$$\text{黄酮提取率}/\% = \frac{\text{黄酮质量浓度} \times \text{体测液体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{甜玉米穗轴质量}} \times 100$$

1.3.3 超声波辅助纤维素酶法提取甜玉米穗轴黄酮正交试验

根据单因素试验结果, 设计正交试验并优化黄酮的工艺参数, 如表1所示。将正交试验得出的最佳条件进行验证。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels used in orthogonal array design

水平	A酶解时间/h	B酶解温度/°C	C pH	D酶用量/g
1	1.0	45	4.4	0.006
2	1.5	50	4.8	0.008
3	2.0	55	5.2	0.010

1.3.4 甜玉米穗轴中黄酮的抑菌性测定

1.3.4.1 纸片法测定黄酮的抑菌圈^[25]

使用大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白葡萄球菌测定甜玉米穗轴中黄酮的抑菌性, 将菌种接种到液态培养基上进行活化, 用无菌水将菌液稀释至0.5麦氏浊度后备用。将黄酮粗提液分别配制成质量浓度0.5、1、2 mg/mL的溶液, 以不加黄酮为对照, 过滤除菌, 备用。

在超净工作台上, 将灭菌的直径为10 mm圆形滤纸片, 浸泡在提取的甜玉米穗轴黄酮液中30 min。分别取约0.4 mL菌悬液, 均匀涂布在固体琼脂平板上, 再取浸有黄酮液的滤纸片贴在含菌平板上。每个平皿贴2个滤纸片, 重复3次。置于37 °C恒温培养箱中培养24 h, 观察黄酮的抑菌效果, 并测量抑菌圈直径, 计算平均值。

1.3.4.2 琼脂稀释法测定黄酮的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)^[26]

将黄酮粗提液配制成质量浓度1.25、2.5、5、10、20 mg/mL的供试液, 过滤除菌后按琼脂-黄酮 (9:1, m/m) 的比例加入融化的MHA琼脂 (muller hinton agar, MHA), 混匀倒板, 得到含黄酮分别为0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL的琼脂平板。用移液枪逐一点种供试液10 μL, 菌液干后置37 °C恒温培养箱中培养24 h, 菌落生长被完全抑制的最低药物质量浓度为该黄酮液对检测菌的MIC。每个受试样平行重复3次, 以不含黄酮的琼脂板作对照。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的回归方程

由不同质量浓度的芦丁标准液得到的线性方程为: $y=5.5298x+0.0022$, $r^2=0.9993$ 。

2.2 超声波辅助酶法提取甜玉米穗轴黄酮工艺的单因素试验

2.2.1 酶用量对甜玉米穗轴黄酮提取率的影响

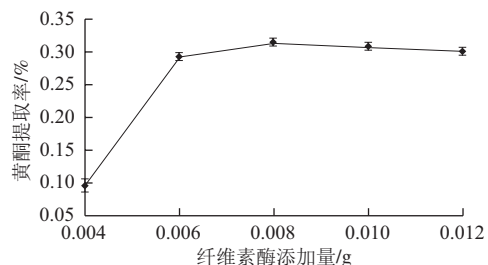


图1 不同加酶量对黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of cellulose dose on the extraction yield of flavonoids

如图1所示, 当酶用量为0.008 g时, 黄酮提取率达到最高, 随着酶添加量的增加, 黄酮提取率没有明显提高, 说明溶液中酶添加量已接近饱和, 继续提高酶添加量, 对提取率影响不明显。因此酶添加量选择0.008 g。

2.2.2 pH值对甜玉米穗轴黄酮提取率的影响

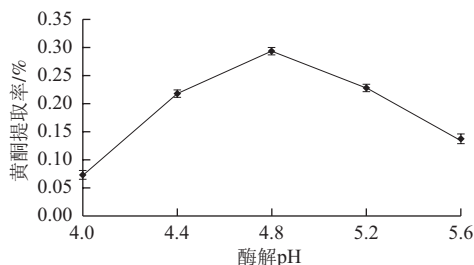


图2 酶解pH值对黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of pH on the extraction yield of flavonoids

如图2所示,在pH值为4.0时,黄酮提取率最低,随着pH值的升高而逐渐增加,在pH值为4.8时,提取率达到最高,而后随着pH值的升高,反而提取率下降。因为酶活力受环境的影响,pH值不仅影响酶的构象,而且也影响底物的解离状态。pH值为4.8时,纤维素酶处于最佳pH值区间,能够发挥纤维素酶的最大活力,使之最大限度地作用于细胞壁纤维素。因此酶解的最佳pH值选择为4.8。

2.2.3 酶解温度对甜玉米穗轴黄酮提取率的影响

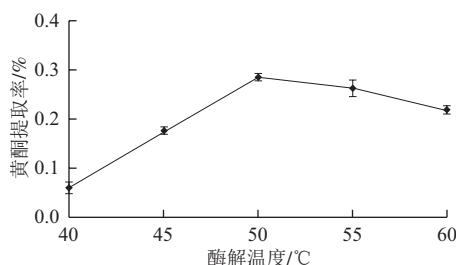


图3 酶解温度对黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on the extraction yield of flavonoids

如图3所示,在40~50℃随着温度的升高,黄酮提取率不断增加,当温度达到50℃时,黄酮提取率最高;在55℃时黄酮提取率减少。因为当温度升高到一定程度时,酶蛋白受热变性,从而影响对细胞的分解,降低了黄酮提取率。因此酶解最佳温度选择为50℃。

2.2.4 酶解时间对甜玉米穗轴黄酮提取率的影响

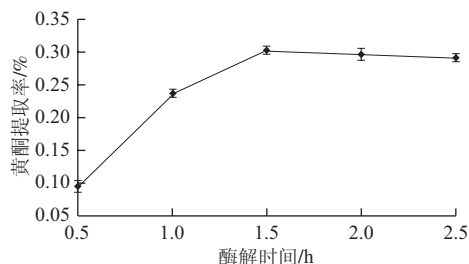


图4 不同酶解时间对黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on the extraction yield of flavonoids

如图4所示,随着时间的延长,黄酮提取率增加,酶解1.5 h后,提取率增加缓慢,因为此时的细胞壁已基

本被破坏,再延长酶解时间,提取率增加的幅度不是很大。本着节约时间的原则,选用酶解时间为1.5 h。

2.2.5 超声波辅助酶法提取甜玉米穗轴黄酮工艺的正交试验及验证结果

表2 正交试验设计及结果

试验号	因素				黄酮提取率/%
	A酶解时间/h	B酶解温度/°C	C pH	D酶用量/g	
1	1 (1)	1 (45)	1 (4.4)	1 (0.006)	0.275
2	1	2 (50)	2 (4.8)	2 (0.008)	0.298
3	1	3 (55)	3 (5.2)	3 (0.010)	0.290
4	2 (1.5)	1	2	3	0.298
5	2	2	3	1	0.282
6	2	3	1	2	0.289
7	3 (2)	1	3	2	0.287
8	3	2	1	3	0.279
9	3	3	2	1	0.294
k_1	0.288	0.287	0.281	0.284	
k_2	0.290	0.286	0.297	0.291	
k_3	0.287	0.291	0.286	0.289	
R	0.003	0.005	0.016	0.007	

由表2可以知,最佳提取条件为 $A_2B_3C_2D_2$,即酶解时间为1.5 h、酶解温度为55℃、pH值为4.8、酶用量为0.008 g较为适合;各因素对黄酮类物质提取率的影响的主次顺序依次为pH值>酶用量>酶解温度>酶解时间。在此条件下,甜玉米穗轴中黄酮的最佳提取率为0.298%,正交试验验证结果得到黄酮的提取率为0.318%,比文献[27]报道中使用乙醇作为溶剂,振荡法提取的玉米芯黄酮提取率分别提高11.2%。原因在于超声波剧烈振荡产生的空化作用会产生相当大的破坏应力,破坏细胞壁结构,使纤维素酶充分作用在细胞壁上,能够使黄酮充分暴露出来,同时机械振动作用还能够加快黄酮在媒介中的传递扩散。因此,黄酮的提取率有所提高。

2.3 甜玉米穗轴中黄酮的抑菌性结果

表3 甜玉米穗轴黄酮抑菌实验结果

受试菌	抑菌圈直径/mm			MIC/(mg/mL)
	1	2	3	
大肠杆菌	13.3 (2)	12.1 (1)	11.0 (0.5)	0.5*
枯草芽孢杆菌	14.8 (2)	13.2 (1)	12.4 (0.5)	0.25**
白葡萄球菌	16.5 (2)	15.8 (1)	14.1 (0.5)	2

注:括号内数据为黄酮质量浓度/(mg/mL);*.与白葡萄球菌比较差异显著($P < 0.05$);**.与白葡萄球菌比较差异极显著($P < 0.01$)。

如表3所示,甜玉米穗轴黄酮对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白葡萄球菌均有一定的抑制作用。其中对枯草芽孢杆菌的抑制作用最强,MIC为0.25 mg/mL;其次为大肠杆菌MIC为0.5 mg/mL,白葡萄球菌MIC为2 mg/mL。甜玉米穗轴中黄酮对大肠杆菌的MIC是文献[28]报道的橄榄中黄酮MIC的1倍,是枯草芽孢杆菌的MIC的0.5倍。

3 结 论

本实验以来源丰富的甜玉米穗轴为原料, 利用超声波辅助纤维素酶法提取甜玉米穗轴中的黄酮, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选出最佳工艺条件: 酶解温度 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH值4.8、纤维素酶用量 $0.008\text{ g}/2\text{ g}$ 甜玉米穗轴、酶解时间1.5 h, 此条件下甜玉米穗轴的黄酮提取率为0.318%。甜玉米穗轴中黄酮类物质对白葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌有明显的抑制作用, 加之我国甜玉米产量巨大, 甜玉米穗轴黄酮用来作为天然食品防腐剂前景广阔。

参考文献:

- [1] 胡叶碧, 王璋. 纤维素酶和木聚糖酶对玉米皮膳食纤维组成和功能特性的影响[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11): 103-105.
- [2] 张静文, 张凤清, 张培刚, 等. 玉米芯多糖的提取及其单糖组成研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 242-244.
- [3] 石波, 李里特. 玉米芯酶法制取低聚木糖的研究[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(2): 92-95.
- [4] MORIMOTO M, TANIMOTO K, NAKANO S, et al. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(2): 389-393.
- [5] 于晶, 郝再彬, 苍晶, 等. 黄酮类化合物的活性研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(12): 125-130.
- [6] 王文渊, 周振华, 龙红萍. 复合酶法提取苦瓜叶总黄酮的研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(4): 107-112.
- [7] 肖崇厚, 杨松松, 洪筱坤. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 256-274.
- [8] 张春红, 许宁, 吴双, 等. 纤维素酶-微波辅助提取软枣猕猴桃茎黄酮的工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 24-28.
- [9] HABTEMARIAM S. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α in L-929 tumor cells[J]. Journal of Natural Products, 1997, 60(8): 775-778.
- [10] 张俊生, 陈莉华, 侯孝璇, 等. 超声波辅助乙醇提取垂盆草总黄酮及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 18-23.
- [11] 万忠民, 鞠兴荣, 姚琦, 等. 中草药提取物对油脂抗氧化的比较研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 89-92.
- [12] 邓斌, 王存娣, 徐安武. 微波辅助提取花生壳黄酮类化合物及其抗氧化性研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(3): 54-57.
- [13] 陈家明, 余稳稳, 吴晖, 等. 玉米芯的营养成分分析[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1073-1075.
- [14] 王雪锋, 单美娟, 韩曜平, 等. 鸭血糯中黄酮类化合物提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 284-286.
- [15] 赖毅勤, 周宏兵. 近年来黄酮类化合物提取和分离方法研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(4): 54-58.
- [16] 刘海鹏, 刘延成, 马东升, 等. 超声波/回流法银杏叶总黄酮提取的研究[J]. 化学工程师, 2005(8): 49-50.
- [17] 霍丹群, 张文. 超声波法与热提取法提取山楂总黄酮的比较研究[J]. 中成药, 2004, 26(12): 1063-1065.
- [18] 杨志刚, 张燕萍, 杨海定. 超声波辅助提取常熟黑米类黄酮及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 118-122.
- [19] 王晓, 张红侠, 王其亮. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(3): 37-39.
- [20] 乔孟, 屈晓清, 丁之恩. 响应面法优化超声波辅助提取湖北棠叶中总黄酮工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 143-147.
- [21] WEI Lingyun, WANG Jianhua, ZHENG Xiaodong, et al. Studies on the extracting technical conditions of inulin from *Jerusalem artichoke tubers*[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(3): 1087-1093.
- [22] 王岩岩, 李文娟. 纤维素酶提取陈皮黄酮的工艺条件[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 71-74.
- [23] 彭晶, 杨颖, 牛付阁, 等. 响应曲面法优化大高良姜黄酮酶法提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 169-172.
- [24] 马燮, 李敏, 杨虎, 等. 正交试验优选叶下珠中黄酮类化合物的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 117-119.
- [25] 马永强, 荆丽荣, 刘晓飞, 等. 双水相超声波法辅助提取甜玉米芯多酚及抑菌性研究[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 61-64.
- [26] 宋晓勇, 刘强, 杨磊, 等. 蒲公英多糖提取工艺及其抗菌活性研究[J]. 中国药房, 2010, 21(47): 4453-4455.
- [27] 常丽新, 贾长虹, 郁春乐. 响应面优化玉米芯黄酮的提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 259-263.
- [28] 曲中堂, 项昭保, 赵志强. 橄榄总黄酮抑菌作用研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(4): 62-64.