

荞麦麸皮中黄酮类物质的提取纯化及壳聚糖复合膜的制备

王昱儒, 岳田利, 袁亚宏, 蔡瑞, 王周利

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 农业部农产品质量安全风险评估实验室, 国家杨凌农业综合试验工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘要: 为了提高荞麦的利用率以及延长鲜切果蔬的货架期, 以工业废渣荞麦麸皮为原料, 采用超声辅助醇溶法提取荞麦麸皮中黄酮类物质, 提取工艺为: 70% (体积分数) 乙醇, 提取温度为 50 °C, 料液比为 1:40 (m/V), 超声波频率为 2500 Hz, 提取时间 40 min, 荞麦麸皮中黄酮类物质的得率为 29.3 mg/g。测定了荞麦麸皮黄酮对 2 种鲜切果蔬腐败菌的抑菌效果, 最小抑菌浓度实验结果显示: 荞麦麸皮黄酮对大肠杆菌、荧光假单胞菌的最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 0.595、1.190 mg/mL, 对大肠杆菌、荧光假单胞菌的最低杀菌浓度 (MBC) 分别为 1.19、2.38 mg/mL。将提取出的黄酮与壳聚糖混合后制备成复合膜, 制作工艺为: 黄酮-壳聚糖比值为 27%, 甘油-壳聚糖比值为 1:3。制成的可食性复合膜具有良好的抑菌性能且安全无毒、操作简单、成本较低。

关键词: 荞麦麸皮; 黄酮类物质; 提取; 抑菌; 壳聚糖复合膜

文章编号: 1673-9078(2017)11-119-126

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.018

Extraction and Purification of Flavonoids from Buckwheat Bran and Preparation of Chitosan Composite Membrane

WANG Yu-ru, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, CAI Rui, WANG Zhou-li

(College of Food Science and Engineering, Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products (Yangling), Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Agriculture Integration Test (Yangling), Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to improve the utilization of buckwheat and prolong the shelf life of fresh cut fruits and vegetables, the industrial waste residue of buckwheat bran was used as raw materials to extract flavonoids by ultrasonic-assisted alcohol dissolution method. The extraction process was as follows: ethanol 70% (volume fraction), the extraction temperature 50 °C, the ratio of material to liquid 1: 40 (m/V). The ultrasonic frequency was 2500 Hz and the extraction time was 40 min. The yield of flavonoids in buckwheat bran was 29.3 mg/g. The bacteriostatic effect of buckwheat bran flavonoids on the two kinds spoilages of fresh fruits and vegetables was studied, the results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of buckwheat bran flavonoids on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* were 0.595 and 1.19 mg/mL, respectively. The minimal bactericidal concentration (MBC) of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* were 1.19 and 2.38 mg/mL, respectively. The extracted flavonoids were mixed with chitosan and Freeze-dried to prepare composite membrane. The reparation process was as follows: flavonoid-chitosan ratio 27%, and glycerol-chitosan ratio 1: 3. The composite film had a good antibacterial effect and was safe, simple operation, and low-cost.

Key words: buckwheat bran; flavonoids; extraction; antibacterial; chitosan composite membrane

鲜切果蔬是指将新鲜的果蔬经一系列处理(分级、清洗、整修、去皮、切分、保鲜和包装)后, 冷藏运输

收稿日期: 2017-07-23

基金项目: 陕西省科技统筹项目 (2016KTQ03-12); 国家自然科学基金青年项目 (31301498); 西北农林科技大学基本科研业务费专项 (2452016085)

作者简介: 王昱儒 (1994-), 女, 本科, 主要从事果蔬保鲜方面研究

通讯作者: 王周利 (1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 农产品加工与安全控制

到制冷柜台直接销售的即食或即用果蔬产品^[1]。由于加工过程会产生很多机械伤害、营养物质外漏等现象, 造成有利用微生物生存的有益环境并促使其增长, 因而鲜切果蔬极易受到微生物侵染而腐烂变质^[2]; 除此切割预处理会降低果蔬组织自然抵抗微生物的能力, 增加了更多种类和数量的微生物对鲜切果蔬的侵染机会^[3]。研究表明, 常见的鲜切果蔬致病菌有李斯特菌 (*Listeria*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等^[4];

致腐菌有霉菌、欧文菌属 (*Erwinia*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等。目前常用的控制方法有化学抑制剂、物理控制法、生物防腐和气调包装等^[5]。这些技术的一些综合应用在鲜切果蔬的保质期延长和微生物抑制方面较为有效^[6], 但也存在很大的限制。可食性涂膜法作为一种前景广阔的新方法, 只需将鲜切果蔬浸泡在无毒的可食性涂膜剂中, 表层就会形成半透气薄膜^[7], 从而延长货架期。有研究表明, 膜包装能够降低胡萝卜的失重率^[8]。目前使用较多的可食性涂膜包装材料主要有多糖、蛋白质、纤维素和类脂等。该法操作简单、无毒害、卫生安全, 还可以减少切割果蔬水分散失, 阻止和 O₂ 的接触^[9], 减少微生物的污染, 阻碍乙烯合成, 减缓代谢速度, 从而降低切割果蔬软化腐烂的速度, 保持产品的质量和稳定性等。因此, 开发获得以天然可降解的生物材料为核心的鲜切果蔬保鲜膜, 且食用时无需撕开包装, 可以同果蔬一起食用, 安全卫生, 又方便快捷^[10], 不仅拓展了可食性复合膜研究的理论方法, 促进了鲜切果蔬的快速发展, 又可以带来显著的经济和社会效益, 具有较高的理论意义和应用价值^[11]。

荞麦作为一种消费者喜爱的小杂粮, 在种植及加工等方面研究广泛。中国绝大多数地区都有荞种植, 华北、东北、西北以及西南一带高寒山区都是荞麦的主要产区^[12]。我国荞麦产业发展迅猛, 种植量相当大^[13], 同时也存在综合利用率太低的现状^[14]。据分析, 苦荞麦加工产生的副产品如荞麦麸皮富含黄酮类化合物, 主要为芦丁^[15], 为有害微生物的有效控制提供了基础材料, 而且壳聚糖产量较大, 来源广泛^[16]。因此, 本研究以荞麦麸皮为基础原料, 筛查获得对果蔬制品中有害微生物具有高效抑制作用的黄酮类物质活性成分, 制备获得基于壳聚糖载体^[17]的天然可食用果蔬抑菌剂, 优化建立了新型果蔬抑菌剂制备方法, 以期为果蔬制品中有害微生物的高效抑制提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

荞麦麸皮 (四川省凉山州); AB-8 大孔树脂。

供试菌: 荧光假单胞菌 (CICC 21620); 大肠埃希氏菌 (ATCC25922)。

主要试剂: 芦丁标品 (BR); 亚硝酸钠 (含量 ≥99.0%); 硝酸铝 (含量 ≥99.0%); 氢氧化钠 (AR); 无水乙醇 (AR); 蛋白胨 (BR); 酵母浸粉 (BR); 氯化钠 (AR); 冰醋酸 (AR); 琼脂; 壳聚糖等试剂。

1.2 主要设备

电子天平 (HANGPING JA2003, 上海天平仪器厂); 紫外分光光度计 (UVmini-1240, SHIMADZU 公司); 循环水式多用真空泵 (SHB-III 型号, 郑州长城科工贸有限公司); 超声波恒温清洗 (SBL-30DTY 型号, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 超声波清洗器 (KQ-500 型号, 昆山市超声仪器有限公司); 旋转蒸发器 (RE-5205 型号, 上海亚荣生化仪器厂); 低温冷却循环泵 (GLSB-5L/20 型号, 郑州长城科工贸有限公司); 电陶炉 (LC-EA6S 型号, 广东顺德忠臣电器有限公司); 生物安全柜 (BSC-1300 II A2, 苏州安泰空气技术有限公司); 恒温培养振荡器 (ZWY-240 型号, 上海智城分析仪器制造有限公司); 全温摇床 (NRY-2102C 型号, 上海南荣实验室设备有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱 (DGX-9143BC 型号, 上海福玛实验设备有限公司); 生化培养箱 (ZXSD-A1160, 上海智城分析仪器制造有限公司); 高速冷冻离心机 (HC-3018R 型号, 安徽中科中佳科学仪器有限公司); 水浴恒温振荡器 (SHZ-B 型号, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 磁力加热搅拌器 (78-1 型号, 江苏金怡仪器科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 芦丁标曲的绘制

将 6 只 10 mL 的容量瓶洗净烘干, 用移液枪精确吸取 0、1、2、3、4 和 5 mL 的芦丁标准液于对应的容量瓶中, 准确加入 5% 的 NaNO₂ 0.3 mL, 摇匀, 溶解放置 6 min 后, 准确加入 10% 的 Al(NO₃)₃ 0.3 mL, 摇匀, 静置 6 min 后, 加入 1 mol/L 的 NaOH 4 mL, 再分别用 30% 的乙醇定容到 10 mL, 混匀, 密塞, 室温下放置 15 min 后在 510 nm 波长处测定其吸光值^[18]。横坐标为芦丁的浓度, 纵坐标为吸光度, 做标准曲线并线性拟合求得曲线方程。

1.3.2 粗黄酮的提取

分 3 次分别准确称取 3 g 荞麦麸皮置于三个锥形瓶中, 按 1:40 的料液比, 每瓶加入 120 mL 70% 的乙醇, 然后封口置于超声波清洗机中, 设置频率为 2500 Hz, 温度为 50 °C, 超声助溶 40 min 后取出。抽滤去除杂质, 将滤液分别收集于三个锥形瓶中作为待测液并做标记 1、2 和 3, 分别取 0.5 mL 黄酮粗提液于三个 10 mL 的容量瓶中, 依据测定芦丁标准液吸光度的步骤测定吸光度 A, 按式 (1) 计算黄酮的提取率^[19]。

$$\text{黄酮提取率}(\text{mg/g}) = \frac{Y \times 10 \times 120}{W \times 0.5} \quad (1)$$

式中: Y , 根据回归方程计算得到的芦丁浓度, mg/mL; 10, 稀释倍数; 120, 待测液的总体积, mL; 0.5, 待测液所测体积, mL; W , 荞麦麸皮质量, g。

1.3.3 粗黄酮的纯化

1.3.3.1 大孔吸附树脂预处理

称取 8 g、AB-8 大孔树脂于 250 mL 的三角瓶中, 加入适量 95% 的乙醇, 浸没全部的树脂, 浸泡过夜, 然后用蒸馏水洗至无醇味^[20]。

1.3.3.2 总黄酮的静态吸附

分别从 1、2 和 3 号粗黄酮中准确量取 10 mL 于 3 个 100 mL 的三角瓶中并标号, 每个瓶中加入 1 g 活化好的 AB-8 大孔吸附树脂, 置于摇床上振荡, 温度设为 37 °C, 转速设为 120 r/min。24 h 后取出抽滤, 水洗树脂滤饼, 振荡混匀滤液, 准确吸取 0.5 mL 的吸附残液于 10 mL 的容量瓶, 按照测定芦丁标准液吸光度的步骤测定吸光度 A , 并根据标准方程以及吸附残液的体积计算出 AB-8 大孔树脂吸附的总黄酮量, 然后按式 (2) 计算出其对苦荞麦麸皮总黄酮的吸附率^[21]。

$$\text{吸附率} = \frac{M}{N} \times 100\% \quad (2)$$

式中: M 为吸附总黄酮量; N 为上样液总黄酮量。

1.3.3.3 总黄酮的树脂静态解吸

将吸附荞麦麸皮总黄酮的 AB-8 大孔吸附树脂分别装入三个锥角瓶中, 每个瓶加入 70% 的乙醇 30 mL, 置于摇床上振荡, 设置温度为 37 °C, 转速为 120 r/min。24 h 之后取出, 过滤, 收集滤液, 然后分别准确吸取 0.5 mL 解吸液于 10 mL 的容量瓶, 按照测定芦丁标准液吸光度的步骤测定吸光度 A , 并根据标准方程以及解吸液的体积计算出 AB-8 大孔树脂解吸的总黄酮量, 然后按式 (3) 计算出其对苦荞麦麸皮总黄酮的解吸率^[21]。

$$\text{解吸率} = \frac{P}{M} \times 100\% \quad (3)$$

式中: P 为解吸总黄酮量; M 为吸附总黄酮量。

1.3.4 黄酮提取液浓缩

采用旋转蒸发仪对纯化后的黄酮蒸发浓缩, 精确吸取 0.1 mL 的浓缩液于 10 mL 的容量瓶, 按照测定芦丁标准液吸光度的步骤测定吸光度 A , 带入标准方程计算出黄酮浓缩后的浓度。

1.3.5 荞麦麸皮黄酮的抑菌实验

1.3.5.1 菌株活化培养

将一定量甘油管保藏的大肠杆菌和荧光假单胞菌分别接入 100 mL 培养基中, 于设定条件下摇床培养 24 h。然后分别准确吸取 2 mL 于 100 mL 的 LB 培养基中, 扩大培养, 4 °C 冰箱备用。

1.3.5.2 选出最佳接菌量

将 LB 培养基冷却, 分别接入 20 μ L、100 μ L 大肠杆菌二代菌液, 20 μ L、50 μ L、100 μ L、200 μ L、400 μ L 和 1 mL 的荧光假单胞菌液, 充分混匀后快速倒板。静置凝固并做标记, 凝固后取出牛津杯, 标号。每孔加入溶液静置培养 24 h 后取出培养皿, 用游标卡尺测量抑菌圈直径并记录, 选出最佳的接菌量。

1.3.5.3 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

二倍稀释法将黄酮稀释 4 倍, 30% 乙醇为稀释液, 摇匀做好标记, 备用。然后把琼脂白板倒好, 待其凝固, 摆放牛津杯, 每板 4 个牛津杯。取出营养培养基冷却, 分别依此接入 20 μ L 大肠杆菌和 50 μ L 的荧光假单胞菌, 充分混匀后快速倒板。静置凝固并做标记, 凝固后取出牛津杯, 标号^[22]。每孔加入对应溶液静置培养 24 h 后取出培养皿, 测抑菌圈的大小, 与酒精对照孔作比较, 以没有圈的最低浓度为最小抑菌浓度 (MIC)。

1.3.5.4 最小杀菌浓度 (MBC) 的测定

将荞麦麸皮黄酮的浓度高于及等于最小抑菌浓度 (MIC) 的培养皿继续培养 24 h, 观察菌体的生长情况, 以仍无菌生长的最低浓度为荞麦麸皮黄酮的最小杀菌浓度 (MBC)。

1.3.6 黄酮-壳聚糖复合膜的制备

1.3.6.1 壳聚糖最佳浓度筛选

用 2% 冰醋酸配制 1%、1.5%、2% 和 2.5% 的壳聚糖溶液^[23], 超声助溶 40 min 后置于恒温水浴摇床振荡过夜, 待壳聚糖完全溶解时取出。

每 60 mL 冷却的 LB 培养基中接入 20 μ L 大肠杆菌, 每 60 mL 培养基接入 100 μ L 的荧光假单胞菌, 充分混匀后快速倒板。静置凝固并做标记, 待其凝固后取出牛津杯, 标号。每孔加入对应的溶液静置培养 24 h 后取出培养皿, 用游标卡尺测量抑菌圈直径并记录, 选出抑菌效果最好的壳聚糖浓度。

1.3.6.2 黄酮-壳聚糖最佳配比筛选

(1) 不同浓度黄酮-壳聚糖混合液的配制: 取四个离心管, 每管加入 2 mL 2.5% 的壳聚糖并标号, 然后依次加入 2、4、6 和 8 mL 的黄酮浓缩液, 用 30% 的乙醇定容到 10 mL, 配制成黄酮浓度为 0.45、0.9、1.35 和 1.80 mg/mL 的系列混合液, 每管壳聚糖浓度为 0.5%, 摇匀备用。

(2) 不同浓度黄酮提取液配制: 取四个离心管标号并依次加入 0.4、0.8、1.2 和 1.6 mL 的黄酮浓缩液, 用 30% 的乙醇定容到 2 mL, 配制成黄酮浓度为 0.45、0.9、1.35 和 1.80 mg/mL 的系列溶液, 摇匀备用。

(3) 牛津杯抑菌试验: 采用牛津杯法, 每个培

养皿上有 5 个孔：1 号孔作对照，加入对应浓度的黄酮；2 和 4 号孔加入黄酮-壳聚糖的混合液；3 号孔作对照，加入 0.5% 的壳聚糖；5 号孔作对照，加入 30% 的乙醇，每孔加入量为 50 μ L。静置培养 24 h 后取出培养皿，用游标卡尺测量抑菌圈直径并记录，选出抑菌效果最佳的黄酮-壳聚糖配比。

1.3.6.3 甘油最佳添加量筛查

配制 2.5% 的壳聚糖 250 mL，分别精确量取 40 mL 于 5 个离心管中，每管依次加入 1、0.5、0.33、0.25 和 0.2 mL 的甘油，制成甘油与壳聚糖的比值为 1:1、1:2、1:3、1:4 以及 1:5 的系列混合液。将每管混合液倒在方形塑料培养皿中，摇晃均匀，放置于烘箱烘干，设置温度为 60 $^{\circ}$ C，24 h 后取出方形塑料培养皿，用镊子轻轻将膜揭下来装入塑料自封袋，做好标记，放入干燥器中。之后测量其强度，选出韧性最佳的膜。

1.3.6.4 复合膜的抑菌效果

按之前所得的最佳配比配制混合液并制成复合膜，用打孔器将复合膜裁成直径为 6 mm 的小圆片，放置于干燥的培养瓶中备用。取出 LB 固体培养基，快速倒板，静置冷凝。待其凝固，每个培养皿中准确加入活化好的菌液，用涂布棒涂布均匀。然后用夹子夹取 4 个复合膜片均匀放置于培养皿上，做好标记，静置培养 24 h 后测量抑菌圈的大小并记录。

1.3.7 数据统计分析

采用 minitab 16.2.3 软件进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据录入和制图采用 Excel 2010。

2 结果与讨论

2.1 标准芦丁曲线的绘制

按照实验要求以芦丁样品浓度为横坐标，吸光度为纵坐标作出芦丁的标准曲线。根据图 1 可知，芦

表 2 粗黄酮的纯化

Table 2 Purification of crude flavonoids

	吸附液吸光度	吸附液浓度/(mg/mL)	解吸液吸光度	解吸液浓度/(mg/mL)
1 号	0.254	0.564	0.058	0.064
2 号	0.364	0.809	0.065	0.072
3 号	0.343	0.762	0.062	0.068
平均值	0.320	0.712	0.062	0.068

2.2.3 黄酮的浓缩

经过真空旋转蒸发，测得浓缩液的吸光度 0.098，计算得黄酮浓缩液浓度为 1.085 mg/mL，蒸发掉部分酒精后溶剂为 30% 的乙醇。本研究与陈运中文献^[24]所报道的相似，蒸馏水对黄酮的提取率很低，因此蒸

发时要特别注意，不能将酒精蒸干，若有沉淀析出，需进行离心操作。

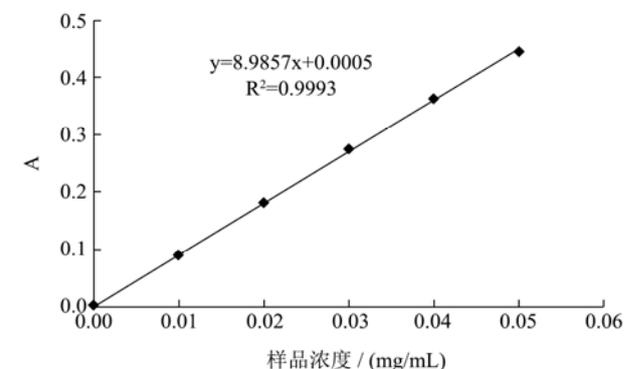


图 1 芦丁的标准曲线

Fig.1 Rutin's standard curve

2.2 粗黄酮提取纯化

2.2.1 提取及测定

通过查阅大量相关资料，了解到提取黄酮时多采用醇提法加其他方法的辅助，结合实验室条件，我们采用如下工艺：70%乙醇、料液比 1:40、超声波频率 2500 Hz、50 $^{\circ}$ C、提取时间 40 min。在此提取工艺下，提取率达到 44.77 mg/mL。结果如表 1。

表 1 粗黄酮的提取

Table 1 Extraction of crude flavonoids

	1 号	2 号	3 号	平均值
吸光度	0.449	0.530	0.531	0.503
浓度/(mg/mL)	0.998	1.179	1.181	1.119

2.2.2 粗黄酮的纯化

经过 24 h 的纯化后，溶液变澄清，AB-8 大孔吸附树脂变为淡黄色，抽滤后滤液大约为 120 mL。先取 10 mL 进行吸附及解吸并测其吸光度，结果如表 2。吸附率为 36.39%，解吸率为 16.71%。

发时要特别注意，不能将酒精蒸干，若有沉淀析出，需进行离心操作。

2.3 抑菌实验

2.3.1 筛选最佳接菌量

表3 不同接菌量的抑菌效果

Table 3 The antibacterial effect of different amount of bacteria

供试菌株	黄酮类化合物抑菌圈直径/mm			平均值/mm	70%乙醇空白对照抑菌圈/mm
	1	2	3		
20 μL 大肠杆菌	20.60	18.52	19.82	19.57±1.15	-
	20.80	19.00	19.10		-
	21.00	17.52	19.74		-
100 μL 大肠杆菌	19.26	18.22	18.50	18.31±0.59	-
	18.00	17.60	18.36		-
	19.10	17.52	18.22		-
20 μL 荧光假单胞菌	19.92	22.66	22.36	19.65±2.12	-
	18.92	19.52	19.12		-
	20.72	17.56	16.04		-
50 μL 荧光假单胞菌	16.64	13.94	13.74	13.68±1.82	-
	15.50	14.52	10.54		-
	12.44	13.58	12.22		-
100 μL 荧光假单胞菌	11.00	22.54	28.04	17.28±5.05	-
	13.84	15.22	16.86		-
	15.64	16.48	15.92		-
1 mL 荧光假单胞菌	10.84	9.82	10.74	10.59±0.84	-
	12.16	11.24	10.36		-
	9.62	10.94	9.62		-

注：“-”表示无抑菌圈。

表4 不同接菌量的抑菌效果

Table 4 The antibacterial effect of different amounts of bacteria

供试菌株	黄酮类化合物抑菌圈直径/mm		平均值/mm	空白对照/mm	30%乙醇对照抑菌圈/mm
	1	2			
20 μL 大肠杆菌	10.72	11.52	11.58±0.62	-	-
	12.00	12.06		-	-
	-	-		-	-
50 μL 荧光假单胞菌	25.74	20.00	23.16±2.60	-	-
	20.74	22.22		-	-
	23.98	26.28		-	-
100 μL 荧光假单胞菌	26.56	21.88	18.75±4.56	-	-
	15.42	15.16		-	-
	15.94	17.56		-	-
200 μL 荧光假单胞菌	17.12	17.88	16.43±0.95	-	-
	15.44	16.54		-	-
	15.50	16.08		-	-
400 μL 荧光假单胞菌	13.38	12.16	11.89±1.15	-	-
	10.78	11.22		-	-
	-	-		-	-

注：“-”表示无抑菌圈。

最佳接菌量筛选结果如表 3 和 4。从表 3 中可以看出, 荞麦麸皮中黄酮类化合物的浸提液对两种供试菌有显著的抑制活性, 且不同的接菌量对抑菌圈的大小影响较大, 从表中可知: 每 60 mL 的 LB 培养基中分别接入 20 μ L 大肠杆菌和荧光假单孢菌菌液时抑菌圈最佳。实验过程中采用旋转蒸发的方法对黄酮提取液进行浓缩, 通过计算得出, 荞麦麸皮黄酮浓缩液中的酒精浓度为 30%, 因此对照孔由 70% 乙醇改为 30% 乙醇。此次实验为了排除酒精挥发对实验的影响, 将接好菌的培养皿先放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 4 h, 使小孔中的溶液充分扩散, 4 h 后转移到培养箱培养 24 h。但从表 4 中可知, 30% 酒精几乎没有抑菌作用。而且此次实验进一步做了荧光假单孢菌接菌量的选择, 结果表明每 60 mL 的 LB 液体培养基接入 50 μ L 荧光假单孢菌, 抑菌圈效果最好。

2.3.2 MIC及MBC的测定

表 5 荞麦麸皮黄酮最小抑菌浓度 (MIC)、最小杀菌浓度 (MBC)

Table 5 The MIC and MBC of flavonoids in buckwheat bran

供试菌株	黄酮溶液 (MIC)/(mg/mL)	黄酮溶液 (MBC)/(mg/mL)
大肠杆菌	0.595	1.190
荧光假单孢菌	1.190	2.380

因为涂布法的效果不易观察, 采用牛津杯法进行 MIC 及 MBC 的测定, 实验结果如表 5。由表中可知, 荞麦麸皮黄酮类化合物对大肠杆菌的抑菌能力要比对荧光假单孢菌的抑菌能力强, 最低的抑菌浓度 (MIC) 分别是 0.595 mg/mL 和 1.190 mg/mL。对大肠杆菌和荧光假单孢菌的最低杀菌浓度 (MBC) 为 1.190 mg/mL

和 2.380 mg/mL。

2.4 黄酮-壳聚糖复合膜的制备

2.4.1 壳聚糖最佳浓度筛选

不同浓度壳聚糖的抑菌效果如表 6。从表中可知, 相同浓度的壳聚糖对荧光假单孢菌的抑制作用要远远大于对大肠杆菌的抑制效果, 说明壳聚糖对不同种类细菌的抑制效果有差异。南开大学的荆迎军等人^[25]也得出相同的结论: 壳聚糖的最小抑菌浓度与细菌的种类相关, 大肠埃希菌的最小抑菌浓度较高, 表明壳聚糖对大肠埃希菌抑菌能力较低。同时, 对于大肠杆菌来说, 随着壳聚糖浓度的升高, 抑菌圈先增大后减小, 且趋于平缓, 几乎没有差别; 而对于荧光假单孢菌来说, 随着壳聚糖浓度的升高, 抑菌圈先减小后逐渐增大, 2.5% 的壳聚糖抑菌圈达到 38.55 \pm 5.13 mm, 有研究表明^[26]壳聚糖浓度越大, 粘度也越大, 不仅不利于涂膜, 且会降低抑菌作用, 因此采用对两种致腐菌的抑菌效果都较好的 2.5% 的壳聚糖做黄酮的成膜载体。

2.4.2 黄酮-壳聚糖最佳配比筛选

黄酮-壳聚糖不同配比的抑菌效果如表 7。表中纵向比较可得: 黄酮-壳聚糖混合液抑制荧光假单孢菌的能力要比抑制大肠杆菌的强; 纯壳聚糖的抑菌效果强于纯黄酮, 而黄酮-壳聚糖混合液的抑菌效果是纯黄酮抑菌效果的两倍多, 且混合液的抑菌浓度相对于壳聚糖溶液有大幅度提升。横向比较可得: 对大肠杆菌的抑菌效果为 3 号>4 号>1 号>2 号; 而对荧光假单孢菌的抑菌效果为 1 号>3 号>2 号>4 号。综合考虑两种菌, 选用 3 号混合液即黄酮-壳聚糖的比值为 27%。

表 6 不同浓度壳聚糖的抑菌效果

Table 6 The antibacterial effect of different concentrations of chitosan

供试菌	1%壳聚糖抑菌圈直径	1.5%壳聚糖抑菌圈直径	2%壳聚糖抑菌圈直径	2.5%壳聚糖抑菌圈直径
	/mm	/mm	/mm	/mm
大肠杆菌	14.11 \pm 0.77	15.37 \pm 0.56	15.23 \pm 1.03	15.25 \pm 0.45
荧光假单孢菌	41.51 \pm 4.03	33.22 \pm 2.26	35.57 \pm 11.77	38.55 \pm 5.13

表 7 黄酮-壳聚糖不同配比的抑菌效果

Table 7 The antibacterial effect of different flavonoids-chitosan ratios

供试菌	小孔所加液体	1号混合液	2号混合液	3号混合液	4号混合液
大肠杆菌	黄酮提取液	11.77 \pm 0.13	11.95 \pm 0.24	11.65 \pm 0.04	12.51 \pm 0.69
	混合液	28.58 \pm 1.41	27.97 \pm 2.13	34.53 \pm 1.30	31.10 \pm 1.70
	壳聚糖	12.85 \pm 0.81	12.47 \pm 0.55	12.12 \pm 0.08	12.61 \pm 0.52
	30%乙醇	-	-	-	-
荧光假单孢菌	黄酮提取液	13.24 \pm 1.75	13.37 \pm 0.24	13.12 \pm 1.05	12.04 \pm 0.54
	混合液	36.58 \pm 2.28	33.58 \pm 1.89	33.80 \pm 1.35	32.47 \pm 1.39
	壳聚糖	17.19 \pm 3.30	17.86 \pm 3.71	17.12 \pm 0.65	17.37 \pm 1.20
	30%乙醇	-	-	-	-

注: 1~4 号黄酮-壳聚糖的比值分别为 9%、18%、27%和 36%; “-” 表示无抑菌圈。

2.4.3 筛选塑化剂最佳添加量

塑化剂的种类和含量是对成膜效果具有重要影响。加入塑化剂,不仅可以减少膜的抗拉强度,而且能够增加膜的延伸率,选择合适的塑化剂对成膜效果非常关键^[27]。由于含甘油的成膜液粘度最小且当塑化剂量相同时,甘油膜中的含水量最多,本研究中以甘油作为塑化剂,评价了不同甘油添加量对成膜效果影响(如图2)。结果表明,1、2号膜强度太低,4、5号膜虽不易撕裂,但较硬,不易包裹食品,3号强度、硬度都适宜,说明甘油与壳聚糖的比值为1:3时获得的成膜材料效果最好。



图2 不同甘油的成膜效果

Fig.2 Effects of different amounts of glycerol on film formation

2.4.4 黄酮-壳聚糖复合膜的抑菌效果

近年来,对黄酮壳聚糖复合膜的研究备受关注,在医学,食品等领域都有应用。关月药师^[28]曾对该复合膜的抑菌止血作用进行研究,发现其吸水性良好,还能很好地贴附创面上,防止二次损伤。加入黄酮等有效成分,明显提高了膜的这些功能。本实验结果也表明,无论荧光假单孢菌还是大肠杆菌,黄酮-壳聚糖复合膜所覆盖的地方几乎没有菌的生长,复合膜之外,菌生长状况良好,说明黄酮-壳聚糖复合膜对这两种鲜切果蔬致病菌具有良好的抑菌效果,且比两者单独的抑菌作用要强。

3 结论

本研究以荞麦麸皮为基础原料对其黄酮类物质活性成分进行提取纯化,并以此为基础制备获得了基于壳聚糖载体的天然可食用果蔬抑菌剂,优化建立了新型果蔬抑菌剂的最佳作用参数和范围,主要获得以下结论:(1)荞麦麸皮中黄酮类化合物的提取工艺:70%(体积分数)乙醇,提取温度50℃,料液比为1:40(m/V),超声波频率为2500 Hz,提取时间40 min,此工艺黄酮的得率为29.3 mg/g。(2)荞麦麸皮黄酮对大肠杆菌和荧光假单孢菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为0.595和1.190 mg/mL,对大肠杆菌和荧光假单孢

菌的最低杀菌浓度(MBC)分别为1.190和2.380 mg/mL。(3)黄酮-壳聚糖比值为27%,甘油-壳聚糖比值为1:3制成的可食性复合膜具有良好的抑菌性能。本研究不但实现了工业废渣荞麦麸皮的高效利用,而且还为国内鲜切果蔬的保鲜提供一种新思路,新方法。该复合膜的安全可食性及成本低廉的特性也为食品安全的发展提供了重要的基础数据和技术支持。

参考文献

- [1] Lee L, Arul J, Lencki R, et al. A review on modified atmosphere packaging and preservation of fresh fruits and vegetables: physiological basis and practical aspects & mdash; Part I [J]. *Packaging Technology & Science*, 2010, 8(6): 315-331
- [2] 吴昊,朱俊向,王成荣,等.壳聚糖没食子酸衍生物制备及其对鲜切苹果的保鲜作用[J].*现代食品科技*,2014,5:251-257
WU Hao, ZHU Jun-xiang, WANG Cheng-rong, et al. Preparation of chitosan gallic acid derivatives and its fresh-keeping effect on fresh-cut apple [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 5: 251-257
- [3] 吴晓彬,胡文忠,刘程惠,等.鲜切果蔬微生物污染及控制研究进展[J].*食品工业科技*,2011,4:415-418
WU Xiao-bin, HU Wen-zhong, LIU Cheng-hui, et al. Progress control of microbial contamination of fruits and vegetables and fresh-cut [J] *Food Industry Science and Technology*, 2011, 4: 415-418
- [4] 关文强,井泽良,张娜,等.新鲜果蔬流通过程中致病微生物种类及其控制[J].*保鲜与加工*,2008,8(1):1-4
GUAN Wen-qiang, JING Ze-liang, ZHANG Na, et al. Species and control of pathogenic microorganisms in the process of fresh fruit and vegetable circulation [J]. *Preservation and Processing*, 2008, 8(1): 1-4
- [5] 龙超安,邓伯勋,何秀娟.柑橘青、绿霉病高效拮抗菌34-9的筛选及其特性研究[J].*中国农业科学*,2005,38(12): 2434-2439
LONG Chao-an, DENG Bo-xun, HE Xiu-juan. Study on screening and characterization of highly antagonistic antagonistic bacteria 341 of citrus green and green mold [J]. *Chinese Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 38(12): 2434-2439
- [6] Ma L, Zhang M, Bhandari B, et al. Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 64: 23-38
- [7] 叶云,何英姿.涂膜保鲜技术应用于果蔬保藏的研究[J].食

- 品科技,2009,6:243-246
- YE Yun, HE Ying-zi. Study on application of film preservation technology in preservation of fruits and vegetables [J]. Food Science and Technology, 2009, 6: 243-246
- [8] Fai A E C, Souza M R A D, Barros S T D, et al. Development and evaluation of biodegradable films and coatings obtained from fruit and vegetable residues applied to fresh-cut carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Postharvest Biology & Technology, 2016, 112: 194-204
- [9] 田密霞,胡文忠,王艳颖,等. 鲜切果蔬的生理生化变化及其保鲜技术的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(5): 132-135
- TIAN Mi-xia, HU Wen-zhong, WANG Yan-ying, et al. Fresh cut fruits and vegetables progress physiological and biochemical changes and preservation [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(5): 132-135
- [10] 卞雪,曹龙奎. 马铃薯薯渣制备可食性内包装膜技术研究 [J]. 包装工程, 2010, 1: 47-50
- BIAN Xue, CAO Long-kui. Study on the preparation of edible inner packaging film for potato residue [J]. Packaging Engineering, 2010, 1: 47-50
- [11] 刘敏,赵浩,范贵生,等. 壳聚糖-酪蛋白酸钠可食性抑菌膜结构表征及抑菌性的研究 [J]. 食品研究与开发, 2017, 2: 12-16
- LIU Min, ZHAO Hao, FAN Gui-sheng, et al. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan-sodium caseinate in edible fungi [J]. Food Research and Development, 2017, 2: 12-16
- [12] 徐春明,李婷,王英英,等. 响应曲面法优化微波辅助双水相提取苦荞麦麸皮中黄酮类化合物的工艺研究 [J]. 中国食品添加剂, 2014, 2: 80-86
- XU Chun-ming, LI Ting, WANG Ying-ying, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids from tartary buckwheat bran by response surface method [J]. Chinese Journal of Food Additives, 2014, 2: 80-86
- [13] 宋金翠. 荞麦产业具有良好的发展前景 [J]. 食品科学, 2004, 25(10): 415-419
- SONG Jin-cui. Buckwheat industry has a good development prospects [J]. Food Science, 2004, 25(10): 415-419
- [14] 杨芙莲,郭翠翠. 荞麦皮粉中膳食纤维的制备工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 3: 539-542
- YANG Fu-lian, GUO Cui-cui. Study on preparation technology of dietary fiber in buckwheat powder [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 3: 539-542
- [15] 王静波,赵江林,彭镰心,等. 苦荞芽中黄酮类化合物含量及其抗氧化性的研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 5: 965-968
- WANG Jing-bo, ZHAO Jiang-lin, PENG Lian-xin, et al. Studies of flavonoids and antioxidant activity of buckwheat bud [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 5: 965-968
- [16] 段文凯,吕美巧,郑春翠,等. 壳聚糖的结构及抑菌作用 [J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 259-261
- DUAN Wen-kai, LV Mei-qiao, ZHENG Chun-cui, et al. Structure and antimicrobial activity of chitosan [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(4): 259-261
- [17] Qin Y Y, Wu Y, Zhang Z H, et al. Effect of an active film from chitosan and pomegranate rind powder extract on shelf-life extension of pork meat patties [J]. Modern Food Science & Technology, 2014, 30(4): 181-188
- [18] 蔡健,王薇. 桂花中总黄酮含量的测定 [J]. 食品科技, 2007, 32(4): 178-180
- CAI Jian, WANG Wei. Determination of total flavonoids in osmanthus fragrans [J]. Food Science & Technology, 2007, 32(4): 178-180
- [19] 薛长晖. 微波法提取党参黄酮的最佳提取工艺研究 [J]. 粮油加工, 2008, 11: 124-126
- XUE Chang-hui. Study on optimum extraction process of flavonoids from codonopsis pilosula by microwave method [J]. Petroleum Processing, 2008, 11: 124-126
- [20] 王华,菅蓁. 大孔吸附树脂纯化葡萄果皮花色苷的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(1): 86-90
- WANG Hua, JIAN Zhen. Study on purification of anthocyanin from grape peel by macroporous adsorption resin [J]. Food Science, 2008, 29(1): 86-90
- [21] 杨芙莲,夏银,任蓓蕾. 大孔树脂对甜荞麦壳类黄酮的纯化研究 [J]. 食品科技, 2009, 1: 135-139
- YANG Fu-lian, XIA Yin, REN Bei-lei. Preparation of macroporous resin for flavonoids from tartary buckwheat [J]. Food Science & Technology, 2009, 1: 135-139
- [22] 焦翔,殷丽君,程永强. 沙棘叶黄酮的提取及抑菌作用研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(8): 124-129
- JIAO Xiang, YIN Li-jun, CHENG Yong-qiang. Studies on extraction and antifungal effects of flavonoids from seabuckthorn leaves [J]. Food Science, 2007, 28(8): 124-129
- [23] 张慧君,宫春宇,王文侠,等. 壳聚糖涂膜保鲜菠菜研究 [J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 112-115
- ZHANG Hui-jun, GONG Chun-yu, WANG Wen-xia, et al. Spinach chitosan coating preservation [J]. Food and Machinery, 2011, 27(3): 112-115

- [24] 陈运中,胡小泓,周享春.苦荞麦黄酮提取最佳条件的研究[J].现代食品科技,1999,3:29-31
CHEN Yun-zhong, HU Xiao-hong, ZHOU Xiang-chun. Study on optimum conditions of flavonoids extraction from tartary buckwheat [J]. Modern Food Science and Technology, 1999, 3: 29-31
- [25] 荆迎军,郝友进,渠晖,等.壳聚糖的抑菌活性分析及其抑菌机理的研究[J].中国抗生素杂志,2006,31(6):361-365
JING Ying-jun, HAO You-jin, QU Hui, et al. Preliminary studies on antibacterial mechanism and analysis of antibacterial activity of chitosans [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31 (6): 361-365
- [26] 杨胜平,谢晶,佟懿.不同浓度壳聚糖对带鱼冷藏保鲜效果的研究[J].山西农业科学,2010,38(2):77-80
YANG Sheng-ping, XIE Jing, TONG Yi. Study on the effect of different concentrations of chitosan on fresh-keeping of pika [J]. Shanxi Agricultural Sciences, 2010, 38(2): 77-80
- [27] 吴磊燕,温其标,杨晓泉.塑化剂对玉米醇溶蛋白膜表面及机械性质的影响[J].化工学报,2010,61(1):137-145
WU Lei-yan, WEN Qi-biao, YANG Xiao-quan. Plasticizer impact on the surface and mechanical properties of zein film [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering(China), 2010, 61(1): 137-145
- [28] 关月,田云,杨志福,等.壳聚糖-黄酮复合膜的抑菌止血促愈合作用研究[J].中国药房,2011,11:961-963
GUAN Yue, TIAN Yun, YANG Zhi-fu, et al. Study on the healing effect of chitosan-flavonoid composite membrane in inhibiting hemostasis [J]. Chinese Journal of Pharmacology, 2011, 11: 961-963