

石榴皮多酚的微波辅助提取及提取物 抗氧化与抑菌作用研究

宋薇薇, 焦士蓉, 周佳, 叶春燕

(西华大学生物工程学院, 四川 成都 610039)

摘要: 通过单因素实验、正交实验, 用微波辅助法提取石榴皮多酚类化合物, 确定了石榴多酚提取的最优工艺条件: 40% (体积分数) 乙醇作溶剂, 料液比 (g:mL) 1:35, 微波功率为 242 W, 提取时间 60 s, 提取三次, 以该优化条件提取时, 多酚粗提物的得率 26.52%。同时还研究了石榴皮提取物对羟自由基清除作用和小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用, 研究显示, 其半抑制浓度 IC_{50} , EC_{50} 分别为 0.288 mg/mL, 0.0079 mg/mL。同时还通过测定抑菌圈直径和最小抑菌浓度 (MIC) 研究了石榴多酚的提取物对大肠杆菌和枯草杆菌的抑制作用, 实验表明: 石榴皮多酚类物质对大肠杆菌和枯草杆菌有较好的抑制作用, 其作用在浓度为 1g/L 时最为显著; 对应的抑菌圈直径分别为 1.15 cm 和 1.25 cm; 其最小抑菌浓度分别为 0.5 g/L 和 2 g/L。

关键词: 石榴皮; 多酚; 微波辅助提取; 抗氧化活性; 抑菌作用

中图分类号: TS201.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0023-05

Microwaves Assisted Extraction of Polyphenol from Pomegranate Peel and its Antioxidant and Antimicrobial Activities

SONG Wei-wei, JIAO Shi-rong, ZHOU Jia, YE Chun-yan

(School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

Abstract: The extraction conditions of pomegranate polyphenols were optimized by orthogonal and single factor experiments. The results showed that the optimum volume percent of ethanol in the extraction solution, the ratio of pomegranate peel powder to the solution, the microwave power, extraction time and times were 40%, 1:35, 242 w, 60 s and 3 times, respectively. Under those conditions, the yield of polyphenols from pomegranate peel was 26.52%. Besides, the effects of the extract on hydroxyl radical scavenge and lipid peroxidation of mouse liver suspension were investigated and the values of IC_{50} and EC_{50} were shown to be 0.288mg/mL and 0.0079 mg/mL, respectively. It was also found that 1 g/L of the pomegranate polyphenol extracts had the highest inhibition effects on both *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* with the inhibition zone diameter and minimum inhibitory concentration of 1.15 cm and 0.5 g/L respectively for *Escherichia coli*, and 1.25 cm and 2 g /L respectively for *Bacillus subtilis*.

Key words: pomegranate peel; polyphenol; microwave assisted extraction; antioxidant activity; antimicrobial activity

石榴 (*Punica granatum*) 多酚^[1]是一类具有多酚羟基化合物的总称, 包括鞣花单宁、没食子单宁、鞣花酸、没食子酸、儿茶素、花色素、绿原酸、阿魏酸和栲精等多种化合物, 主要存在于石榴皮中, 含量约为其干质量的10%~20%, 具有抗氧化、抗衰老、抗癌防癌、抗菌、润肤美容、降血压和预防心脑血管疾病等多种生理和药理活性。石榴多酚在食品、医药和日用化学品等领域显示出巨大的应用价值。目前, 国内外对石榴多酚的抗氧化活性以及石榴皮在中药方面的应用报道较多, 但对石榴皮中多酚提取的报道极少, 并

收稿日期: 2007-09-13

作者简介: 宋薇薇, 女, 硕士

且对石榴多酚的提取和石榴皮的利用方法多为煎煮法。该法具有操作简便和成本低等特点, 但容易造成石榴皮中多酚类和其它抗氧化成分的破坏, 并且提取液中杂质含量较高, 不利于多酚的分离与纯化。与醇提法相比, 微波辅助提取能强化浸取过程, 体系受热均匀, 提取物中多酚含量高, 提取时间较短等优点^[4,5]。鉴于此, 本实验是为了找出微波辅助提取多酚最佳试验条件并验证多酚的抗氧化性^[6-8]。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂与设备

1.1.1 试验原料

石榴皮粉：由新鲜石榴皮晒干后粉碎后过60目，实验小白鼠（四川大学动物中心）。

1.1.2 试验试剂

福林-酚试剂（北京奥博星生物技术有限责任公司）、95%的乙醇、碳酸钠（成都科龙华工厂）、2-硫代巴比妥酸（TBA液）、邻二氮菲、（天津市化学试剂六厂三分厂）、双蒸水、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸亚铁、双氧水（成都科龙华工厂）、三氯醋酸（天津市科密欧化学试剂开发中心）、大肠杆菌、枯草杆菌、肉汤蛋白胨培养基。

1.2 总多酚类物质含量的测定（福林-酚比色法）

总多酚类物质含量的测定采用福林-酚比色法（Folin-Ciocalteu法）。用前稀释2倍。

1.2.1 多酚类的测定标准曲线的制作

准确称取真空干燥至恒重的没食子酸标准品44.3 mg。用水溶解并定容100 mL。以此溶液配成浓度8.86 $\mu\text{g/mL}$ 、17.72 $\mu\text{g/mL}$ 、35.44 $\mu\text{g/mL}$ 、70.88 $\mu\text{g/mL}$ 、88.60 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。分别取上述不同浓度溶液1 mL加到10 mL比色管中，然后依次加入1 mL去离子水，0.5 mL已稀释2倍的福林-酚试剂，1.5 mL 26.7% Na_2CO_3 溶液，最后用水定容至10 mL，室温下反应2 h，在760 nm下测定其吸光度。由吸光度对浓度进行回归，求得标准曲线为 $y=89.524x-3.1977$ ，相关系数 $R^2=0.9991$ 。

1.2.2 试样测定

准确称取适量试样，用水溶解，浓度在0.08 mg/mL左右。取1 mL样品液加到10 mL比色管中，依次加入去离子水1 mL、福林-酚试剂0.5 mL、26.7%碳酸钠溶液1.5 mL，然后用水定容至10 mL，室温下反应2 h，在760 nm下测定其吸光度。测得的吸光度代入标准曲线，求得试样中总多酚含量。

按回归方程计算。回归方程 $C=89.524x-3.1977$ 。相关系数 $R^2=0.9991$ ，计算公式^[12]为：

$$P\% = \frac{C \times V \times n}{W \times 10^3} \times 100\%$$

式中： P -总多酚类物质含量，g/100 g； C -从回归方程计算得到样品中多酚类物质质量， $\mu\text{g/mL}$ ； n -稀释倍数； V -浓缩液的体积，mL； W -投料量，g。

1.2.3 粗多酚含量测定

在最佳实验条件下进行提取，将提取液同旋转蒸发器中进行浓缩，在-78 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻冰箱中冷冻2 h后再冷冻干燥器中干燥24 h，得到粗提取物，称量。称取适量干燥粉末，溶于蒸馏水中，然后在 $A_{760\text{nm}}$ 下测定其吸光度，确定粗提取物中的多酚含量。

1.2.4 小鼠肝匀浆脂过氧化的抑制作用^[9]

小鼠处死后取肝洗净血污，剪碎用生理盐水制3%匀浆。取此匀浆0.3 mL加入各种试剂，反应液总体积为0.67 mL，含不同质量浓度药液0.17 mL，0.0024% H_2O_2 ，0.03 mmol/L FeSO_4 ，37 $^{\circ}\text{C}$ 保温60 min，加入1 mL 20%三氯醋酸及1 mL 0.67% TBA，90 $^{\circ}\text{C}$ 保温15 min后水冷4000 r/min离心20 min，取上清测定 $A_{532\text{nm}}$ 。以蒸馏水代替药液的反应管为空白管，则脂质过氧化抑制率 I_1 为：

$$I_1 = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{药液}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

1.2.5 羟自由基测定方法

将冷冻干燥得到的多酚粉末溶解成1 mg/mL的溶液，再稀释成适当浓度进行测定。

①取0.75 mmol/L邻二氮菲溶液1 mL，PBS缓冲液2 mL和无水乙醇1 mL，充分混合后，加0.75 mmol/L硫酸亚铁1 mL混匀，加0.01%的过氧化氢1 mL，于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育60 min，于536 nm处测其吸光度，其值为 A_p 。

②同①，其中用1 mL蒸馏水代替1 mL H_2O_2 ，测得的吸光度称 A_B 。

③用1 mL的试样液代替①中的1 mL无水乙醇，测的吸光度称 A_S 。

④计算HO·自由基清除率(d)：

$$d\% = \frac{A_S - A_P}{A_B - A_P} \times 100\%$$

1.2.6 抑菌圈直径的测定方法

将培养基灭菌后倒于平皿内，每个平皿约20 mL，待培养基凝固后，用移液枪吸取上述各种菌悬液100 μL 注入平皿内，再用灭菌的涂布棒迅速将菌液涂抹均匀，制成含菌平板。每组做2个平行实验。把每个处理过的培养皿放到如下条件培养：37 $^{\circ}\text{C}$ ，24 h。用直尺测定抑菌圈直径，取其平均值。并以此判断石榴皮多酚类物质对细菌的抑制效果。

1.2.7 最小抑菌浓度（MIC）的测定方法

将原液分别配制成4 g/L、2 g/L、1 g/L、0.5 g/L、0.25 g/L、0.125 g/L，同时将菌悬液配制成3个浓度梯度的溶液。用吸管分别吸取2 mL 6个浓度梯度的溶液注入到6个已灭菌的平板内，然后加入熔化的培养基，摇匀，待培养基凝固后，用移液枪移取0.1 mL菌悬液，按上述方法涂布，培养。凡是最高稀释平板中无菌落形成者，即为该物质的MIC。

将培养皿放入电热恒温培养箱中培养一天后取出，观察长菌情况。

2 结果与分析

2.1 乙醇体积分数的选择

精确称取 2 g 石榴皮粉, 料液比为 1:20 (m/V), 提取功率在 269 W, 提取 3 次, 每次提取时间为 100 s; 改变乙醇体积分数, 实验结果见表 1。由表 1 可知, 乙醇体积分数为 50% 时, 多酚的提取最高, 因此, 确定微波提取最佳乙醇体积分数为 50%。

表 1 乙醇浓度对提取率的影响

乙醇/%	0	10	30	50	70	90
P/(g/100 g)	16.564	15.022	19.595	19.854	19.273	15.776

2.2 提取功率的选择

采用 50% 的乙醇溶液, 提取时间为 100 s, 提取 3 次, 料液比为 1:20, 改变功率, 实验结果见表 2。由表 2 可知, 当微波功率为 269 W 时, 多酚的提取率最高, 因此确定提取功率为 269 W。

表 2 功率对提取率的影响

提取功率/W	136	216	269	308
P/(g/100 g)	21.327	22.245	23.921	23.415

2.3 提取时间的选择

提取溶剂采用 50% 的乙醇溶液, 提取功率 269 W, 料液比为 1:20, 提取 3 次, 改变提取时间, 实验结果见表 3。由表 3 可以看出, 当提取时间为 60 s 时, 石榴皮中的多酚提取率最高, 时间过长会破坏多酚。

表 3 提取时间对提取率的影响

提取时间/s	60	80	100	120	140
P/(g/100 g)	25.068	24.288	24.259	24.192	24.872

2.4 料液比的选择

乙醇体积分数为 50%, 提取功率为 269 W, 提取时间为 60 s, 提取 3 次, 改变料液比, 实验结果见表 4。由表 4 可知, 料液比为 1:30 时的提取率最大, 因此选择 1:30 的料液比为多酚的提取最佳工艺条件。

表 4 料液比对提取率的影响

料液比	1:10	1:15	1:20	1:25	1:30	1:35
P/(g/100 g)	6.695	24.005	19.846	22.894	24.795	22.808

2.5 提取级数的选择

采用 50% 的乙醇溶液, 提取功率为 269 W, 提取时间为 60 s, 料液比为 1:30, 改变提取次数, 实验结果见表 5。由表 5 可知, 第 3 次和第 4 次的提取率都很低, 从成本角度考虑, 选择提取次数为 3 次较为合适。

表 5 提取级数对提取率的影响

提取级数/次	1	2	3	4
P/(g/100 g)	18.432	4.179	0.969	0.388

2.6 正交实验

通过单因素分析, 微波法提取石榴皮多酚类物质的最佳工艺条件为: 50% 的乙醇溶液, 提取功率为 269 W, 60 s 的提取时间, 料液比为 1:30, 提取次数为 3 次。根据单因素试验, 设计正交因子和水平见表 6。正交结果见表 7, 由正交结果极差 R 可知, 各因素对多酚类物质的提取率的影响次序为 $D > C > B > A$, 即提取多酚的最佳方案是: $A_1B_1C_2D_3$, 即乙醇体积分数为 40%, 提取功率为 242 W, 提取时间为 60 s, 料液比为 1:35, 提取 3 次。按照正交所得最佳方案, 进行提取 5 次, 得平均值为 26.52 g/100 g。

表 6 正交试验因素及水平设计

水平	A(乙醇/%)	B(功率/W)	C(时间/s)	D(料液比)
1	40	242	40	1:25
2	50	269	60	1:30
3	60	296	80	1:35

表 7 正交设计及试验结果

编号	A	B	C	D	得率(g/100 g)
1	1	1	1	1	23.112
2	1	2	2	2	22.717
3	1	3	3	3	23.173
4	2	1	2	3	24.237
5	2	2	3	1	22.198
6	2	3	1	2	22.264
7	3	1	1	2	21.749
8	3	2	3	3	23.508
9	3	3	2	1	23.326
I	69.002	69.098	67.125	68.636	
II	68.699	68.422	70.280	66.730	
III	68.583	68.764	68.878	70.917	
K1	23.001	23.033	22.375	22.879	
K2	22.900	22.808	23.427	22.244	
K3	22.861	22.921	22.959	23.639	
R	0.140	0.225	1.052	1.395	

$A_1B_1C_2D_3$ 理论得率 = $24.237 + 0.101 = 24.338$ g/100 g

2.7 粗提取物多酚含量

在最佳实验条件下(乙醇为 40%, 提取功率为 242 W, 提取时间为 60 s, 料液比为 1:35, 提取 3 次) 平行进行 5 次, 将提取液混合后进行浓缩, 冷冻干燥得到 3.9825 g 粗提取物, 测得其多酚含量为 19.548 g/100 g。

2.8 对羟自由基($\cdot OH$)清除作用的测定

实验结果见图 1。

清除自由基能力可以用清除 50% 自由基所需样品

的质量浓度来表示,即半抑制浓度 IC_{50} 表示。 IC_{50} 与样品清除自由基的能力成反比,即 IC_{50} 越小,表明样品清除自由基的能力越强;反之亦然。根据上式得回归方程 $y=270.98x-28.103$, 相关系数 $R^2=0.9866$, 微波提取的 IC_{50} 为 0.288 mg/mL 。

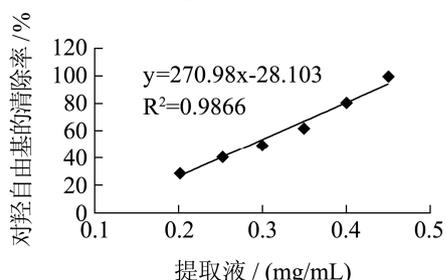


图1 不同提取液质量浓度对羟自由基的清除作用

2.9 抑制小鼠肝匀浆脂过氧化实验

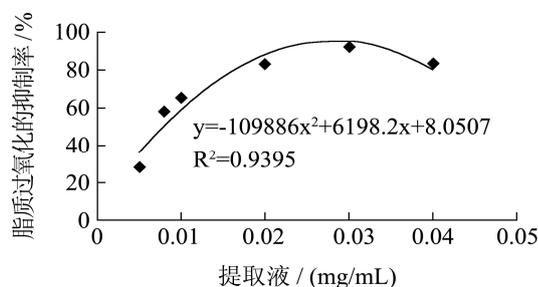


图2 不同提取液质量浓度对小鼠肝匀浆脂质过氧化的抑制作用

根据上图的回归 $y=-109886x^2+6198.2x+8.0507$, 相关系数 $R^2=0.9395$, 计算出微波提取多酚的 EC_{50} 为 0.0079 mg/mL 。

3 抑菌作用的研究

3.1 抑菌圈直径的测定

不同浓度的石榴多酚对大肠杆菌的抑制效果图3 (抑菌圈直径越大,表明抑菌效果越明显)。

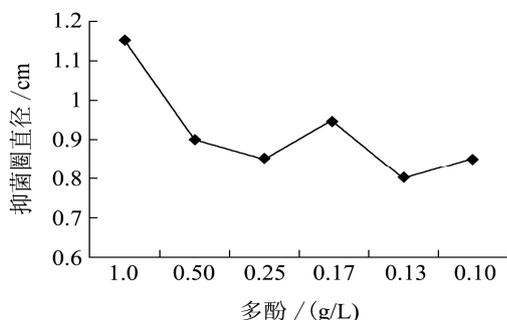


图3 石榴皮多酚类物质对枯草杆菌的抑制效果

结合图4可见,石榴皮多酚类物质对大肠杆菌的抑制作用在浓度为 1 g/L 时最为显著。在此浓度下,大肠杆菌所对应的抑菌圈直径为 1.15 cm 。

同理,石榴皮多酚类物质对枯草杆菌的抑制作用

在浓度为 1 g/L 时最为显著。在此浓度下,枯草杆菌所对应的抑菌圈直径为 1.25 cm 。

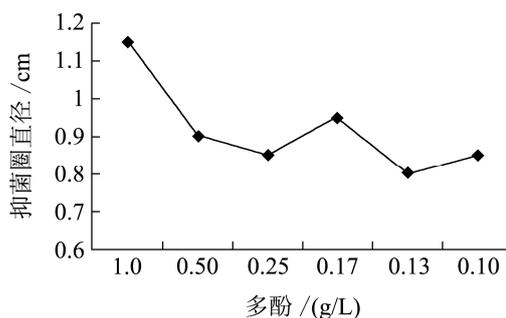


图4 多酚类物质对大肠杆菌的抑制效果(抑菌圈直径)

表8 多酚类物质对大肠杆菌和枯草杆菌的抑制效果(抑菌圈直径)

多酚浓度/(g/L)	抑菌圈	抑菌圈直径	直径/cm	平均值/cm
1	大肠杆菌	1.2	1.1	1.15
1	枯草杆菌	1.2	1.3	1.25
0.5	大肠杆菌	1.0	0.8	0.90
0.5	枯草杆菌	0.9	1.1	1.0
0.25	大肠杆菌	0.9	0.8	0.85
0.25	枯草杆菌	0.8	1.1	0.85
0.125	大肠杆菌	1.0	0.9	0.95
0.125	枯草杆菌	0.7	0.9	0.8
0.0625	大肠杆菌	0.8	0.8	0.80
0.0625	枯草杆菌	0.7	0.8	0.75
0.03125	大肠杆菌	1.0	0.7	0.85
0.03125	枯草杆菌	0.7	0.9	0.85

3.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定

将培养皿放入电热恒温培养箱中培养1 d后取出,观察长菌情况,得到的结果如表9所示。

表9 枯草杆菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度(MIC)的确定

多酚/(g/L)	4	2	1	0.5	0.25	0.125
枯草杆菌	-	-	+	+	++	+++
大肠杆菌	-	-	-	-	++	+

注: -表示没有长菌, +表示少量长菌, ++表示适度长菌, +++表示大量长菌)。

凡是最高稀释平板中无菌落形成者,即为该物质的MIC(最小抑菌浓度)。由实验结果可知:枯草杆菌的最小抑菌浓度为 2 g/L 。

同理可知,大肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.5 g/L 。抑菌浓度(MIC),来进行石榴皮对这两种细菌的抑菌实验,结果发现均有较好效果。

4 结论

微波法提取石榴皮多酚类物质的最佳条件是:

40% (体积分数) 乙醇作溶剂, 料液比 (g:mL) 1:35, 微波功率为242 W, 提取时间60 s, 提取三次, 以该优化条件提取时, 多酚粗提物的得率26.52%。

石榴皮多酚类物质对大肠杆菌和枯草杆菌的抑制作用在浓度为 1 g/L 时最为显著。对应的抑菌圈直径分别为 1.15 cm 和 1.25 cm。其最小抑菌浓度分别为 0.5 g/L 和 2 g/L。

参考文献

- [1] 贾冬英,姚开,谭薇,等.石榴皮中多酚提取条件的优化[J].林产化学与工业 2006.26(3):123-126
- [2] 程慧青,肖荔人,林云珠,等.微波法提取茶多酚工艺优化实验[J].福建农业科技, 2006(2):51-53
- [3] Hua-Ying Zhou, Chun-Zhao Liu. Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves[J]. Journal of Chromatography A, 2006,1129:135-139
- [4] 焦士蓉,郑贵菊.柚皮黄酮类物质的微波辅助提取及其抗氧化性研究[J].食品机械,2007,23(1):73-75
- [5] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等.邻二氮菲 Fe^{2+} 氧化法检测 H_2O_2/Fe^{2+} 产生的羟自由基[J].生物化学与生物物理进展, 1996,23(6):553-555
- [6] 张茜,贾冬英,姚开,等.石榴皮提取物的抗氧化作用研究[J].中国油脂 2006.31(8):1-54
- [7] 金鸣,李金荣,吴伟.食品红花黄色素抗氧化作用的研究[J].首都医科大学学报 2004.25(2):174-176

超高压技术保鲜食品

来自食品技术行业的消息指出,超高压食品技术是一种理想的非热力杀菌保鲜技术,其特点是:温度升高值很小,能很好地保留食品原有的风味、营养和保健成分;杀菌快速、高效、均匀;能耗比热力杀菌法更低;可提高食品卫生安全性;有利环保。经超高压处理的食物,符合现代食品“天然、营养、卫生、安全”的发展方向,市场潜力巨大。

超高压食品技术是这样一种措施:将食品密封于弹性容器或置于无菌压力设备中,用 100MPa (约 987 个大气压) 以上超高压处理一段时间,从而达到杀菌保鲜、保存食品的目的。

用超高压处理时,在液体介质中的食品物料体积被压缩,超高压产生的极高的静压不仅会影响细胞的形态,还能使形成的生物高分子立体结构的氢键、离子键和疏水键等非共价键发生变化,使蛋白质凝固、淀粉等变性,使酶失活或激活,使细菌、寄生虫、病毒等生物被杀死。超高压技术也可用来改善食品的组织结构或生成新型食品。

食品杀菌时所用的超高压一般在 200~600 MPa 之间,多种生物体经 200 MPa 以上加压处理即会出现生长迟缓,甚至死亡。一般情况下,寄生虫的杀灭和其他生物体相近,只要低压处理即可杀死,病毒在稍低的压力下即可失活,无芽孢细菌、酵母、霉菌的营养体在 300~500 MPa 压力下可被杀死,而芽孢杆菌属和梭状芽孢杆菌属的芽孢对压力比其营养体具有更强的抵抗力,需采用更高的压力才会被杀灭。压力处理的时间与压力成反比,压力越高,则处理所需的时间越短。

利用超高压对食品杀菌,是一个纯物理过程,具有瞬间压缩、作用均匀、操作安全、温度升高值小、耗能低、污染少、利于环保的特点。

用超高压技术处理食品,可达到高效杀菌的目的,且对食品中的维生素、色素和风味物质等低分子化合物的共价键无明显影响,从而使食品能较好地保持原有的色、香、味、营养和保健功能,这是超高压技术的突出优点,也是超高压技术与其他常规食品杀菌技术的主要不同之处。

蒸汽、远红外、微波、高频电场和电磁场等食品杀菌技术,都存在较明显的热效应,加工过程中温度的升高较明显。采用热力杀菌,会对保健食品的热敏性功能成分造成破坏,导致保健作用降低、产生异味,有的功能成分会降解为没有任何保健作用的物质。利用辐照方法处理食品,虽然温度的变化值较小,但会发生辐照裂解反应,产生复杂的化学物质和辐照异味;而且,辐照食品的安全性尚无定论,日本、欧盟等西方国家禁止或者限制辐照食品的进口;消费者对包装上已经明示的辐照食品,也持十分谨慎的购买态度。

超高压能破坏高分子的氢键、离子键、盐键,对共价键影响小,尤其对食品中的小分子色素、维生素、氨基酸、多肽、果酸、果糖、呈香物质和果蔬抗诱变活性成分等物质的破坏作用较小。经超高压处理的功能食品,能较好地保持功能因子的活性和产品的原有风味,符合现代功能食品“天然、营养、卫生、安全”的发展方向。超高压技术在功能食品的开发和生产中,具有重要的营养价值。

(新闻来源:中国食品科技网)