

毕海丹,万照东,崔旭海,等. 花生壳总黄酮提取工艺优化及其抑菌活性研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):297-299.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.101

# 花生壳总黄酮提取工艺优化及其抑菌活性研究

毕海丹<sup>1</sup>, 万照东<sup>1,2</sup>, 崔旭海<sup>1</sup>, 李双双<sup>1</sup>

(1. 枣庄学院生命科学学院, 山东枣庄 277160; 2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:**采用醇提法探索花生壳中总黄酮的最佳提取工艺,并研究其抑菌活性。结果表明:花生壳总黄酮的最佳提取工艺为乙醇溶液浓度 80%、提取温度 80 ℃、提取时间 3.0 h、料液比 1 g:20 mL,各因素对总黄酮得率的影响由大到小依次为提取温度、乙醇溶液浓度、料液比、提取时间;验证试验表明,最佳提取工艺下花生壳总黄酮得率为 0.618%;抑菌试验表明,花生壳总黄酮对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌具有一定抑菌作用,且其抑菌效果远优于山梨酸钾。

**关键词:**花生壳;总黄酮;提取;抑菌活性;正交试验

**中图分类号:** TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0297-03

中国是花生生产大国,花生种植广泛分布于全国各地,花生产量居世界第 1 位。花生壳是花生脱壳加工而产生的农副产品,其质量约占花生荚果总质量的 30% 左右。我国花生年产量约 1 460 万 t,其中花生壳质量就高达 450 万 t<sup>[1]</sup>。有研究将花生壳热压成型制作塑木板,或加工成饲料、燃料等,但大部分花生壳被作为废弃物扔掉,不但会破坏环境,而且造成了极大的资源浪费。黄酮类化合物具有清除体内自由基及毒素、预防心血管疾病以及抗过敏、抗肿瘤、广谱抗菌、抗病毒等作用<sup>[2-7]</sup>。本研究选用花生壳作为原料优化黄酮类化合物的提取工艺,并进行了抑菌试验,以期降低黄酮类产品生产成本、拓展花生综合利用领域奠定基础。

收稿日期:2014-07-30

基金项目:枣庄学院青年基金(编号:307050914);枣庄学院博士基金(编号:307070902)。

作者简介:毕海丹(1979—),女,黑龙江肇东人,硕士,讲师,研究方向为食品营养与安全。

通信作者:崔旭海,博士,副教授,研究方向为保健食品开发。  
E-mail:bhd20032003@163.com。

现 EGCG 的稳定性较差,温度、紫外光照、持续受热、酸碱条件、氧化剂和自由基等都会引起它的分解或转化。EGCG 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、DPPH· 的反应过程中紫外可见吸收光谱连续变化明显。

## 参考文献:

- [1] 仇燕燕,李楠,韩国柱,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯的研究进展[J]. 中草药,2006,37(2):303-306.
- [2] 朱发伟. 茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯的研究进展[J]. 中草药,2005,36(8):1271-1272.
- [3] 葛建,林芳,李明揆,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)生物活性研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2011,38(2):156-163.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 将花生壳清洗烘干,冷却至室温,粉碎至通过孔径 0.3 mm 的网筛后,脱脂,备用。芸香苷标准品(纯度 99%)购于成都生物科技有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由枣庄学院生物学实验教学中心微生物实验室提供;培养基为琼脂营养培养基。

1.1.2 仪器 AL104 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司);FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);JJ-1 型精密增力电动搅拌器(江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂);R2018-II 型旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司);DK-S26 型数显恒温水浴锅(上海三发科学仪器有限公司);SHB-III A 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);BM2000 型生物显微镜(南京江南永新光学有限公司);PLY-45 型恒温培养箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);BXM-30R 型高压蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司)。

- [4] 臧鹏,屈维丽,于燕波,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯在食品体系中的抗氧化作用研究[J]. 食品工业科技,2011,32(11):361-363.
- [5] 陈惠衡,傅冬和,施玲,等. 儿茶素稳定性试验研究[J]. 食品研究与开发,2009,30(4):10-12.
- [6] 陈利燕,屠幼英,陈暄,等. 儿茶素在酸性环境中的稳定性研究[J]. 茶叶,2002,28(2):86-88.
- [7] 王静,戚向阳. 表没食子酸儿茶素没食子酸酯体外氧化影响因素及其氧化产物分析[J]. 精细化工,2006(11):1094-1098.
- [8] 吴平,夏涛,高丽萍,等. 热处理过程中表没食子儿茶素没食子酸酯变化的动力学研究[J]. 食品与发酵工业,2010,36(11):34-39.
- [9] 张玉艳,沈生荣,唐德松,等. Cu<sup>2+</sup> 与 EGCG 络合作用的研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2004,30(3):290-295.

## 1.2 方法

**1.2.1 芸香苷标准曲线的制作** 称取芸香苷标准品 0.01 g, 用 70% 乙醇溶液溶解, 定容至 50 mL 容量瓶中, 得到 0.2 g/L 芸香苷标准溶液。分别吸取芸香苷标准溶液 0、1、2、3、4、5 mL 于 10 mL 容量瓶中, 先加 70% 乙醇溶液至 5 mL 左右, 然后加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 0.3 mL, 摇匀放置 6 min 后加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 0.3 mL, 摇匀放置 6 min 后加入 1 mol/L  $\text{NaOH}$  溶液 2 mL, 混匀; 用 70% 乙醇溶液定容至刻度线, 摇匀, 放置 20 min。用 1 cm 比色皿于 510 nm 波长处测定吸光度。绘制标准曲线, 得回归方程为  $y = 15.343x - 0.0205$  ( $r^2 = 0.9987$ )。

**1.2.2 花生壳总黄酮的提取** 称取花生壳粉 5 g, 提取温度分别设置为 50、60、70、80、90  $^{\circ}\text{C}$ , 回流提取时间分别为 1、2、3、4、5 h, 料液比分别为 1 g : 10 mL、1 g : 15 mL、1 g : 20 mL、1 g : 25 mL、1 g : 30 mL, 分别以梯度浓度 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液作为提取溶剂提取总黄酮, 采用硝酸铝比色法测定总黄酮吸光度。

**1.2.3 总黄酮得率的计算** 花生壳黄酮得率 = 花生壳黄酮含量 / 花生壳粉质量  $\times 100\%$ 。

**1.2.4 花生壳总黄酮的抑菌试验** 用纸片扩散法测定花生壳总黄酮的抑菌作用<sup>[8-9]</sup>。将灭过菌的直径 5 mm 的滤纸片放入不同浓度花生壳总黄酮溶液中浸泡 1 h, 备用。吸取浓度为  $5 \times 10^7$  个/mL 的菌悬液 0.2 mL, 用涂布法接种在培养基上, 将滤纸片放入该含菌培养皿中, 置于恒温生化培养箱中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 1 d, 测量抑菌圈直径。每个样品 3 次重复, 空白对照为无菌蒸馏水。

**1.2.5 花生壳总黄酮和山梨酸钾的抑菌活性比较** 采用固体平板培养基稀释法测定抑菌活性<sup>[10]</sup>。取无菌试管 10 支, 向后 9 支试管分别加入 1 mL 无菌蒸馏水, 取花生壳总黄酮提取液 1 mL 移入 1 号试管, 混匀后取出 1 mL 混合液转入 2 号试管, 依次操作, 至 9 号试管取出 1 mL 混合液弃去, 将黄酮提取液分别稀释 1、2、4、8、16、32、64、128、256 倍。1~9 号试管中均含有 1 mL 不同稀释度的提取液, 10 号试管为空白对照。在每支试管中加入 9 mL 熔化至 55  $^{\circ}\text{C}$  的固体琼脂培养基, 充分混匀, 倾注入平板, 平板凝固后, 接 0.1 mL 的菌液于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 1 d。以培养基中完全没有菌生长时的最低浓度为最低抑菌浓度 (MIC), 根据 MIC 初步确定抑菌浓度范围。山梨酸钾对供试菌的 MIC 测定方法同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果与分析

**2.1.1 乙醇溶液浓度对总黄酮得率的影响** 由图 1 可知, 当乙醇溶液浓度为 50%~70% 时, 总黄酮得率随着乙醇溶液浓度增大而提高; 当乙醇溶液浓度为 70%~90% 时, 总黄酮得率随着乙醇溶液浓度增大而逐渐降低。由此可见, 提取花生壳总黄酮的最优乙醇溶液浓度为 70%。

**2.1.2 提取时间对总黄酮得率的影响** 由图 2 可知, 总体上看, 随着提取时间延长, 花生壳总黄酮得率不断提高。提取时间 2.0 h 下的总黄酮得率明显比提取时间 1 h 下的总黄酮得率高; 提取时间从 2.0 h 延长到 3.0 h 时, 总黄酮得率提高相对缓慢; 提取时间为 3.0~5.0 h 时, 随着提取时间延长, 总黄

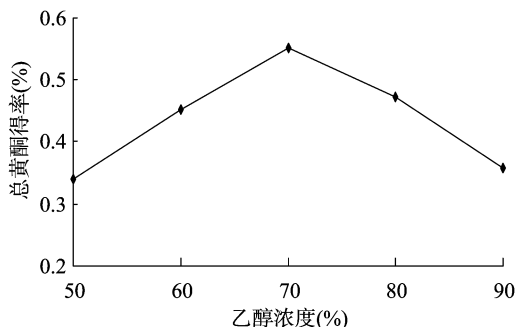


图1 乙醇溶液浓度对总黄酮得率的影响

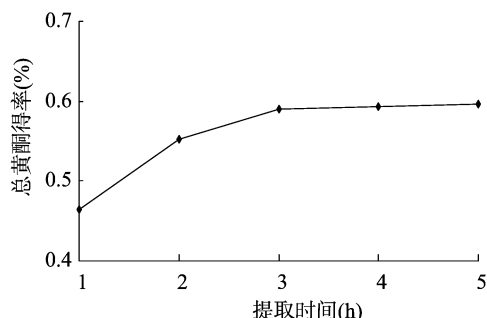


图2 提取时间对总黄酮得率的影响

酮得率提高不明显。考虑到工业化生产时应节约时间、能源等问题, 提取花生壳总黄酮的适合时间为 3.0 h。

**2.1.3 提取温度对总黄酮得率的影响** 图 3 表明, 提取温度为 50~60  $^{\circ}\text{C}$  时, 随着提取温度升高, 总黄酮得率明显提高; 提取温度为 60~80  $^{\circ}\text{C}$  时, 随着提取温度升高, 总黄酮得率提高相对缓慢; 提取温度为 80~90  $^{\circ}\text{C}$  时, 随着提取温度升高, 总黄酮得率却呈下降趋势。说明提取花生壳总黄酮的最优温度为 70  $^{\circ}\text{C}$ 。

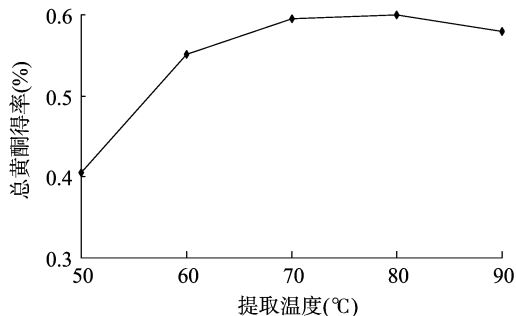


图3 提取温度对总黄酮得率的影响

**2.1.4 料液比对总黄酮得率的影响** 图 4 表明, 当料液比由 1 g : 10 mL 变化至 1 g : 20 mL 时, 总黄酮得率也随之不断增大; 当料液比由 1 g : 20 mL 变化至 1 g : 30 mL 时, 总黄酮得率反而下降。说明提取花生壳总黄酮的最佳料液比为 1 g : 20 mL。

### 2.2 正交试验结果与分析

花生壳总黄酮提取工艺正交试验方案与结果分别见表 1、表 2。由表 2 可见,  $R_A > R_B > R_D > R_C$ , 因此在一定范围内, 4 个因素对试验结果的影响是不同的, 提取温度对试验结果影响最大, 其次是乙醇溶液浓度、料液比, 最后是提取时间。花生壳提取总黄酮的最优工艺条件为  $A_3B_3C_2D_2$ , 即提取温度 80  $^{\circ}\text{C}$ 、

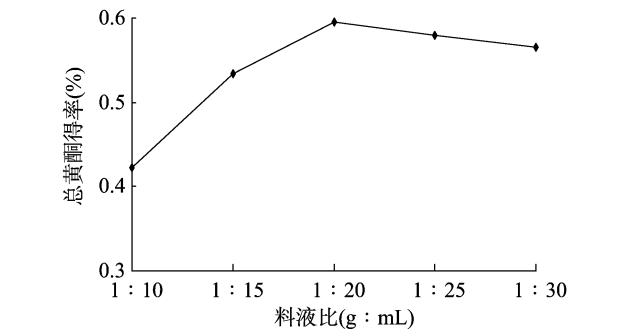


图4 提取料液比对总黄酮得率的影响

表 1 花生壳总黄酮提取工艺条件正交试验因素与水平				
水平	因素			
	A:提取温度 (℃)	B:乙醇溶液 浓度(%)	C:提取时间 (h)	D:料液比 (g : mL)
1	60	60	2.5	1 : 15
2	70	70	3.0	1 : 20
3	80	80	3.5	1 : 25

表 2 花生壳总黄酮提取工艺 L <sub>9</sub> (3 <sup>4</sup> ) 正交试验结果					
序号	因素				总黄酮得率 (%)
	A:提取 温度	B:乙醇溶 液浓度	C:提取 时间	D:料液比	
1	1	1	1	1	0.380
2	1	2	2	2	0.584
3	1	3	3	3	0.506
4	2	1	2	3	0.525
5	2	2	3	1	0.536
6	2	3	1	2	0.592
7	3	1	3	2	0.560
8	3	2	1	3	0.583
9	3	3	2	1	0.610
k <sub>1</sub>	0.490	0.488	0.518	0.509	
k <sub>2</sub>	0.551	0.568	0.573	0.579	
k <sub>3</sub>	0.584	0.569	0.534	0.538	
R	0.094	0.081	0.055	0.070	

乙醇溶液浓度 80%、提取时间 3.0 h、料液比 1 g : 20 mL。在该条件下做验证试验,测得花生壳中总黄酮得率为 0.618%。

2.3 抑菌试验结果与分析

由表 3 可知,花生壳总黄酮浓度与其抑菌效果呈正相关,表明花生壳总黄酮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均有明显的抑制作用。当花生壳总黄酮浓度为 2.0 g/L 时,上述 3 种菌的抑菌圈直径均大于 7.0 mm,花生壳总黄酮尤其对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的抑制效果明显,其抑菌圈直径分别为 7.6、8.2 mm。当花生壳总黄酮浓度为 0.5 g/L 时,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌圈直径差异不明显,这可能与花生壳总黄酮浓度过低,对这 2 种菌的破坏能力差异不明显有关。

2.4 花生壳总黄酮和山梨酸钾的抑菌活性比较

花生壳总黄酮浓缩原液中黄酮含量为 15.45 g/L,山梨酸

表 3 花生壳总黄酮的抑菌作用				
菌种	抑菌圈直径(mm)			
	2.0 g/L 花生 壳总黄酮	1.0 g/L 花生 壳总黄酮	0.5 g/L 花生 壳总黄酮	空白 对照
大肠杆菌	7.2	6.3	5.7	5.0
金黄色葡萄球菌	7.6	6.7	5.6	5.0
枯草芽孢杆菌	8.2	7.0	6.2	5.0

钾溶液中山梨酸钾含量为 103.72 g/L。从表 4 可知,花生壳总黄酮提取液的抑菌效果远高于山梨酸钾,花生壳来源广泛且无毒、无害,将其开发成为食品级的抑菌剂具有广阔前景。

表 4 花生壳总黄酮和山梨酸钾的最小抑菌浓度		
菌种	最小抑菌浓度(g/L)	
	花生壳总黄酮	山梨酸钾
大肠杆菌	1.93	12.97
金黄色葡萄球菌	0.97	6.48
枯草芽孢杆菌	3.86	12.97

3 结论

本研究表明,提取花生壳总黄酮的最佳工艺条件为提取温度 80 ℃、乙醇溶液浓度 80%、提取时间 3.0 h、料液比 1 g : 20 mL。各因素对总黄酮得率的影响由大到小依次为提取温度、乙醇溶液浓度、料液比、提取时间。验证试验表明,最佳工艺条件下花生壳总黄酮得率为 0.618%。抑菌试验表明,花生壳总黄酮对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有抑菌作用,且其抑菌效果远高于山梨酸钾,具有作为食品抑菌剂的良好开发前景。

参考文献:

[1] 郑柏勤,朱惠洪,梁文权. 不同来源的花生壳总黄酮含量测定研究[J]. 现代食品与药品杂志,2006,16(6):1-3.

[2] 许 晖,孙兰萍,张 斌,等. 花生壳黄酮类化合物的研究进展[J]. 农产品加工·学刊,2008(3):11-15.

[3] 王 伟. 响应面分析法优化花生壳黄酮类化合物提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(22):13521-13523.

[4] 李芳清,徐卫东. 花生壳中黄酮类化合物的提取及其纯化[J]. 食品科学,2009,30(8):101-105.

[5] 韩秋菊,马宏飞,李宁豫. 3 种方法提取枸杞黄酮效果的比较[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):271-273.

[6] 杨国峰,周建新,汪海峰,等. 花生壳提取物的制备及其抗氧化与抗菌活性的研究进展[J]. 食品与发酵工业,2007,33(2):97-101.

[7] 张 虹,白红丽,张江梅,等. 青叶胆不同部位总黄酮提取及其抑菌作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):224-226.

[8] 丛建民,陈凤清,孙春玲,等. 草木犀黄酮提取工艺优化及抑菌活性研究[J]. 白城师范学院学报,2012,26(5):18-24.

[9] 何爱丽,肖付刚,魏 珂,等. 苦瓜黄酮提取及抑菌性研究[J]. 农业机械,2012(30):102-104.

[10] 章海燕,王 立,张 晖. 乌饭树叶水溶性黄酮的抑菌作用的研究[J]. 中国食品添加剂,2010(5):62-67.