

徐 澜,郭晨晨,赵 慧. 超声波辅助提取藜麦多糖及其抑菌性与抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):143-146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.039

超声波辅助提取藜麦多糖及其抑菌性与抗氧化性

徐 澜,郭晨晨,赵 慧

(忻州师范学院生物系,山西忻州 034000)

摘要:为明确不同产地(山西省偏关县、静乐县)藜麦种子的多糖提取率及其抑菌性、抗氧化性之间的差异,以蒸馏水为提取剂采用超声波法辅助提取藜麦多糖,滤纸片法测定抑菌活性;采用消除 DPPH 自由基法测定水提多糖的抗氧化活性,并用维生素 C 作阳性对照。结果表明:藜麦种子在料液比为 1 g : 10 mL 时多糖提取率最高,且偏关县藜麦的多糖提取率(2 094.5 $\mu\text{g/g}$)显著高于静乐县藜麦的多糖提取率(1 781.5 $\mu\text{g/g}$)。藜麦多糖对 DPPH 自由基有清除能力,且随着多糖质量浓度的增加而呈现增大趋势。藜麦多糖对大肠杆菌有较强抑菌效果,但对金黄色葡萄球菌抑菌性较弱。

关键词:藜麦;多糖;纸片扩散法;抑菌性;抗氧化性

中图分类号: R282.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0143-03

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd)是一年生的藜科双子叶草本作物,原产于南美洲安迪斯山区。藜麦中含有大量的优质蛋白,且含量与肉类含量相当,含有全部 8 种人体必需氨基酸^[1]。除此之外,藜麦中含有丰富的淀粉、脂肪、矿物质元素、维生素等。因此,藜麦被联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations,简称 FAO)认为是唯一一种单体植物就能满足人体基本营养需求的全类谷物^[2]。藜麦有均衡营养、修复体质、增强机体功能、调节免疫和内分泌系统的作用,而且具有预防疾病、抗癌、抗衰老及抗氧化的功效,因此藜麦是减肥美容、减少人类慢性病的“功能食品”的优秀代表。

作为生命四大基本物质之一的高分子聚合物多糖,由醛基和酮基通过苷键连接,是动物、植物、微生物细胞的重要组成部分,具有抗肿瘤、抗氧化、抗凝血、免疫调节、降血糖和抗病毒等重要功能^[3],因此,从很多动植物中都可以提取到多糖,近几年关于多糖的提取及其作用的报道也越来越多。目前为止,已有研究者利用不同方法对红豆、木瓜、银杏叶、枸杞、黄芪等提取了多糖,并研究它们的抑菌性及抗氧化性^[4-8]。结果表明,红豆多糖和木瓜多糖有抗氧化活性,枸杞多糖、黄芪多糖和水溶性大豆多糖有抑菌效果。藜麦中含有的多糖、多酚、黄酮等活性物质,具有很好的体外抗氧化活性和抑菌性。目前关于藜麦多糖提取方面的研究极少,未见关于藜麦多糖的抗氧化性及抑菌性的相关研究报道。

超声波辅助提取固体样品,利用超声波作用液体时产生的空化作用和机械振动作用,使溶液内产生气泡,增长并爆破压缩,导致细胞壁结构破裂^[8]。它是物理粉碎过程,伴随产

生热效应和乳化作用,提高固体中多糖的提取率,具有节能、提取率高、节省提取时间的优点;但如果温度过高,渗出的杂质也会增多,因此温度不宜过高^[9]。目前关于超声辅助提取技术已成功应用于提取木瓜多糖、银杏叶多糖等,但超声辅助提取藜麦多糖的研究较少见。本试验采用超声波辅助提取藜麦多糖,研究其抗氧化性和抑菌性,对于藜麦在功能食品、化妆品、医药、生物农药研发中的应用提供参考,并为藜麦天然抗氧化剂的开发提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要仪器

市售 2 个产地的藜麦种子(山西省忻州市偏关县、静乐县);DPPH(1,1-二苯基-2-苦基基):由西安沃尔森生物技术有限公司提供;试验用水为蒸馏水。供试菌种:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌,均由忻州师范学院生物系微生物实验室提供。UV-2102C 型紫外可见分光光度计,由上海仪电分析仪器有限公司提供;YXQ-LS-75G 型立式压力蒸汽灭菌锅,由上海云泰仪器仪表有限公司提供;Supcre 系列菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪,由杭州迅数科技有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 藜麦多糖的制备 原材料预处理:分别挑选市售偏关县和静乐县 2 地藜麦中颗粒饱满的种子,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干至恒质量,粉碎后过 40 目筛,密封备用。脱脂^[5]:分别称取偏关县和静乐县的藜麦粉各 5 份,每份 0.2 g,置于离心管中。向其中各加入 2 mL 石油醚,静置过夜,4 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。除单糖和低聚糖:向已经脱脂的藜麦中加入 2 mL 95% 乙醇,静置过夜,4 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。将沉淀放在烘箱中,50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干。

1.2.2 多糖的提取 根据试验设计,采用超声波辅助提取藜麦多糖。按照 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25 等 5 个不同的料液比(g : mL),向各离心管中加入蒸馏水。在超声功率 320 W、温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下浸提 40 min,提取藜麦多糖。浸提结束后 4 000 r/min 离心 10 min,倒出滤液至另一离心管

收稿日期:2016-10-17

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503124);山西省高等学校教学改革创新项目(编号:J2016096);忻州师范学院博士科研启动经费(编号:2016)。

作者简介:徐 澜(1975—),女,山西忻州人,博士,副教授,主要从事作物生理生化研究与教学工作。E-mail:929138055@qq.com。

中,舍弃沉淀。向离心管中加入 4 倍体积的 95% 乙醇,放置 4 ℃ 冰箱中醇沉 24 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。沉淀依次用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤, 真空干燥, 得到粗多糖。

1.2.3 脱蛋白 粗多糖用 5 mL 蒸馏水溶解, 向其中加入 Sevage 试剂 1.2 mL [Sevage 试剂: 取 100 mL 三氯甲烷, 向其中加入 20 mL 正丁醇, 混匀, 放入棕色瓶, 备用。(Sevage 法除蛋白: $V_{\text{多糖溶液}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}=25:5:1$)]^[10], 混合物用微型漩涡混合仪剧烈振荡 20 min, 4 000 r/min 离心 10 min。小心取出上层多糖溶液, 弃去下层有机相和中间蛋白沉淀。

1.2.4 醇沉 按照参考文献[4]的方法进行醇沉, 得到精制多糖。将提取的多糖用 2 mL 蒸馏水溶解得多糖溶液, 放置于冰箱中冷藏备用。

1.2.5 试验设计 根据不同料液比提取的藜麦多糖质量浓度结果, 采用多糖提取率最高的料液比, 按照上述方法, 分别提取 2 g 偏关县和静乐县藜麦多糖。并用 20 mL 蒸馏水溶解, 制成多糖溶液, 放置于冰箱中冷藏备用。

1.2.6 标准曲线的制备 精确称取 105 ℃ 干燥至质量不变的葡萄糖对照品 10 mg, 加入蒸馏水定容至 100 mL, 得到 0.1 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。分别吸取此溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 10 mL 带塞试管中, 蒸馏水定容至 1 mL, 加入 5 mL 现配的蒽酮-硫酸试剂, 充分摇匀, 盖塞, 在沸水浴中 15 min, 取出后立即用冷水冷却至室温。用 0 号管调零, 在 620 nm 波长下分别测得 $D_{620\text{ nm}}$ 。以 $D_{620\text{ nm}}$ 为纵坐标, 葡萄糖质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.2.7 藜麦多糖抗氧化作用测定方法 DPPH 溶液的配制^[6]: 准确称取 50 mg DPPH, 用无水乙醇定容到 100 mL, 使 DPPH 的终浓度为 0.5 mg/mL。取 10 mL 0.5 mg/mL 的 DPPH 溶液, 用无水乙醇定容到 100 mL, 使 DPPH 的终浓度为 0.05 mg/mL。将配好的 DPPH 溶液置于棕色瓶中, 放置冰箱中, 待用。

采用维生素 C 作阳性对照, 将配制好的 0.01 mg/mL 的维生素 C 标准液置于棕色瓶中, 放置冰箱中待用。

抗氧化能力的测定: 分别吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 维生素 C 标准液, 用蒸馏水定容到 2 mL, 加入浓度为 0.05 mg/mL 的 DPPH 2 mL, 充分混匀, 放置到黑暗的地方, 静置 30 min 左右, 测定其在 517 nm 的吸光度 D_1 。同时测定 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 蒸馏水混匀静置 30 min 后的吸光度 D_0 ; 以及在 2 mL 蒸馏水中加入 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 维生素 C 标准液, 用蒸馏水定容至 4 mL 充分振荡摇匀后的吸光度 D_2 。以浓度确定的维生素 C 标准液的体积数为横坐标, 以 DPPH 的清除率为纵坐标作图。

DPPH 的清除率计算公式为:

$$Y = [1 - (D_1 - D_2) / D_0] \times 100\%$$

采用上述方法^[4]对偏关县和静乐县的藜麦多糖提取液进行抗氧化能力的测定。

1.2.8 藜麦多糖的抑菌作用 供试菌种的活化^[11]: 连续 3 次将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进行培养基斜面活化, 采用试管牛肉膏蛋白胨固体作为培养基, 第 3 次的菌体备用。菌悬液的制备^[12]: 用无菌接种环挑取少量活化的供试菌于无菌生理水中, 用移液枪轻轻吹打使菌体分散, 稀释摇匀, 用显微镜

直接计数法计数, 制成 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 的菌悬液, 待用。圆滤纸片的准备: 用打孔器将滤纸裁制成直径大小为 6 mm 的圆滤纸片, 121 ℃ 高温蒸汽灭菌 30 min、干燥 30 min。测定藜麦多糖提取液的抑菌性: 在无菌操作台中, 将经过灭菌的培养基倒入培养皿内 10~15 mL, 室温下凝固, 记号笔标记相应的菌体及不同产地的藜麦多糖。夹取经高温蒸汽灭菌的圆滤纸片浸泡于藜麦多糖溶液中 20 min, 备用。用移液枪吸取 200 μ L 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的菌悬液至相应平板上, 用无菌涂布器涂布均匀。采用滤纸片扩散法, 用无菌镊子夹取含多糖溶液滤片平放于平板表面, 每个板放置 5 个滤纸片, 均匀分散在平板上。将各平板倒置在 37 ℃ 生化培养箱中培养 6~8 h, 观察其生长情况, 用 Supcre 系列菌落计数/筛选/抑菌圈测量联用仪记录各平板抑菌圈直径, 求平均值。

1.3 数据处理

采用料液比为 1 g : 10 mL 时的藜麦多糖提取率, 应用 Excel 2003 对藜麦多糖提取率作图, DPS 7.05 统计分析数据的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 多糖质量浓度的测定

2.1.1 标准曲线的绘制 取 7 支具塞试管, 按浓度梯度配制葡萄糖溶液, 以 $D_{620\text{ nm}}$ 值为纵坐标, 葡萄糖质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。用最小二乘法得线性回归方程: $y = 0.00669x + 0.0292$, $r^2 = 0.99109$ 。根据方程, 可计算样品中多糖质量浓度(图 1)。

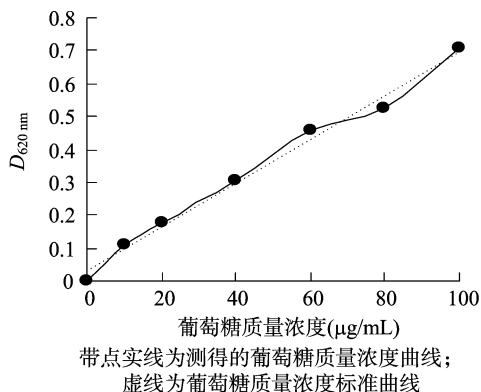


图1 葡萄糖标准曲线

2.1.2 样品中多糖提取率的测定 由图 2、图 3 可知, 超声波辅助提取藜麦多糖, 在超声波功率为 320 W、温度为 50 ℃、提取时间为 40 min 的条件下, 在料液比接近 1 g : 10 mL 时, 偏关县和静乐县的藜麦多糖提取率均为最高, 且偏关县的藜麦多糖提取率显著高于静乐的多糖提取率(表 1)。因此, 在相同提取条件下, 本试验选取 1 g : 10 mL 的料液比提取偏关县和静乐县的藜麦各 2 g, 得到精制多糖溶液。

2.2 抗氧化作用的测定

2.2.1 维生素 C 对 DPPH 的清除能力 由图 4 可知, 随着维生素 C 标准液的体积的增加(0~2 mL), 即随着维生素 C 浓度的增加, 维生素 C 标准液对 DPPH 的清除率亦增强, 且维生素 C 对 DPPH 的清除作用较明显。表明抗氧化剂维生素 C 作为阳性对照有良好的清除能力, 即有良好的抗氧化性。

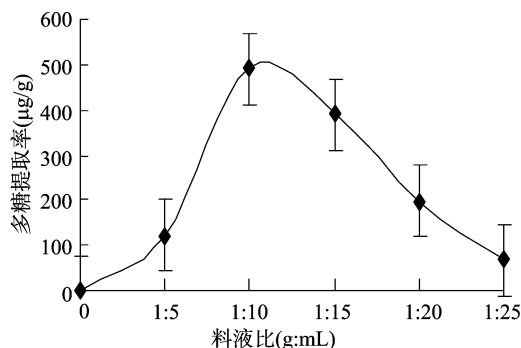


图2 不同料液比对偏关县的藜麦多糖提取率的影响

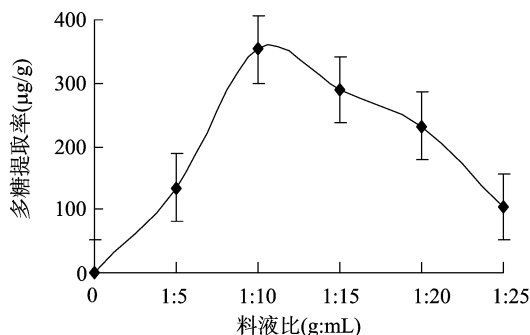


图3 不同料液比对静乐县的藜麦多糖提取率的影响

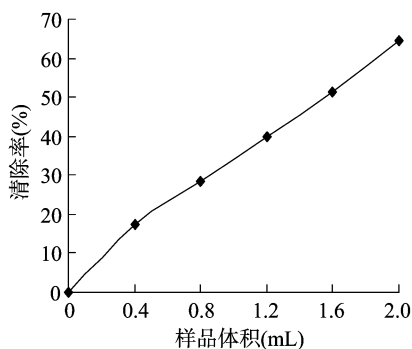


图4 维生素C对 DPPH· 的清除效果

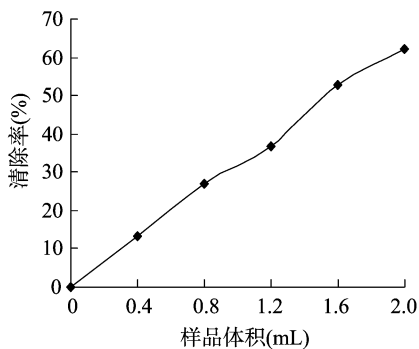


图5 偏关县的藜麦多糖对 DPPH· 的清除率

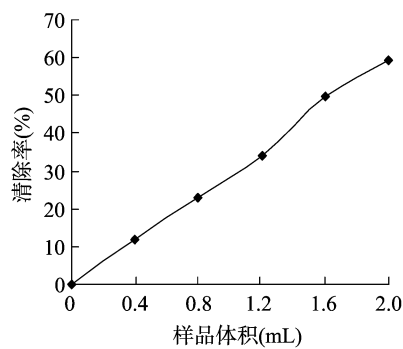


图6 静乐县的藜麦多糖对 DPPH· 的清除率

表2 藜麦多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用

| 产地 | 菌种 | 多糖抑菌圈直径(mm) | | | | 空白 | 抑菌性 |
|-----|---------|-------------|------|------|------|----|-----|
| | | I | II | III | 平均值 | | |
| 偏关县 | 大肠杆菌 | 7.81 | 8.11 | 8.99 | 8.30 | 6 | ++ |
| | 金黄色葡萄球菌 | 6.31 | 6.37 | 6.42 | 6.37 | 6 | + |
| 静乐县 | 大肠杆菌 | 7.77 | 7.01 | 7.42 | 7.40 | 6 | ++ |
| | 金黄色葡萄球菌 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6 | - |

注:“++”表示抑菌作用较强;“+”表示有抑菌现象;“-”表示无抑菌现象。

3 结论与讨论

本研究表明,偏关县、静乐县2地藜麦多糖的提取率分别为2 094.5、1 781.5 μg/g,均远低于文献[3]中0.16 g/g的藜麦多糖提取率。分析原因,首先是提取获得的目标多糖不同,袁俊杰等提取的是粗制多糖^[3],而本试验为逐级除杂后中提取的精制多糖;其次是前人以预处理后的藜麦质量作为分母,计算多糖提取率,而本试验以处理之前的藜麦质量计算多糖提取率;此外,不同试验设备以及操作过程中损失程度不同;

表1 不同产地藜麦多糖提取率

| 产地 | 多糖提取率(μg/g) | | | |
|-----|-------------|---------|-------|------------------|
| | 重复1 | 重复2 | 重复3 | $\bar{x} \pm s$ |
| 偏关县 | 1 987 | 2 094.5 | 2 202 | 2 094.5 ± 107.5a |
| 静乐县 | 1 712 | 1 781.5 | 1 851 | 1 781.5 ± 69.5b |

注:不同小写字母表示不同产地测得多糖提取率在0.05水平上的显著差异性($P < 0.05$)。

2.2.2 样品对 DPPH· 的清除能力 由图4、图5、图6可知,藜麦多糖和维生素C对DPPH·的清除率趋势相同,清除率随维生素C标准液、藜麦多糖提取液样品体积的增加而增强。偏关县、静乐县的藜麦多糖对DPPH·的清除率都随着多糖溶液体积(0~2 mL)的增加而增强,对DPPH·清除率的趋势基本相同。但由于偏关县的藜麦多糖提取率(2 094.5 μg/g)高于静乐县的藜麦多糖提取率(1 781.5 μg/g),因此同体积多糖提取液相比较,偏关县藜麦多糖对DPPH·的清除率高于静乐县藜麦多糖。

2.3 抑菌作用的测定

由表2可知,偏关县的藜麦多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌现象,但对大肠杆菌的抑菌作用较强,对金黄色葡萄球菌抑菌作用较弱。静乐县藜麦多糖对大肠杆菌有抑菌现象,但对金黄色葡萄球菌无抑菌现象。

除品种自身差异外,以上因素是造成藜麦多糖提取率差异较大的原因。研究表明,藜麦种子多糖得率在品种间存在明显差异^[3],这与本试验中不同产地的藜麦种子多糖提取率存在差异结果一致,可见藜麦多糖含量不仅与品种遗传有关,也与生态环境、栽培条件有关。

不同产地的藜麦多糖均具有一定抗氧化能力,这与前人有关红豆多糖、木瓜多糖等的研究结果一致。本试验中偏关县的藜麦多糖提取率大于静乐县藜麦多糖提取率,2地藜麦多糖对DPPH·的清除能力表现为相同趋势,即偏关县的藜麦多糖清除DPPH·的能力较强,表现出的抗氧化能力也较强。藜麦多糖和维生素C对DPPH·的清除率趋势相同。藜麦多糖具有抑菌作用,与文献[11]结果基本一致。偏关县产地的藜麦多糖对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌现象,但静乐县产地的藜麦多糖仅对大肠杆菌有抑菌现象,对金黄色葡萄球菌无抑菌现象。这可能与静乐县产地的藜麦多糖提取率低于偏关县产地的藜麦多糖提取率有关。有关不同产地、生态环境、栽培条件对藜麦种子营养成分及其抑菌性、抗氧化性的具体影响,有待进一步进行更加精确、系统的对比研究。

张 颖. 魔芋葡甘聚糖复合涂膜对蓝莓保鲜效果的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 146–149.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.040

魔芋葡甘聚糖复合涂膜对蓝莓保鲜效果的影响

张 颖

(贵阳学院, 贵州贵阳 550005)

摘要:以鲜蓝莓为原料,以魔芋葡甘聚糖(KGM)、壳聚糖、蓝莓叶多酚为膜制剂材料,以质量损失率、叶绿素含量、维生素 C 含量、丙二醛(MDA)含量、衰老指数为评价指标,研究 KGM 复合涂膜对蓝莓保鲜效果的影响。通过响应面分析法确定了 KGM 复合涂膜组合,即 KGM 用量为 16 g/L、壳聚糖用量为 5 g/L、蓝莓叶多酚用量为 0.4 g/L;同时, KGM 复合涂膜能降低蓝莓叶绿素、维生素 C 含量损失,延缓蓝莓衰老,有效抑制蓝莓 MDA 的生成和积累。

关键词:魔芋葡甘聚糖(KGM);复合涂膜;蓝莓;保鲜效果

中图分类号: TS255.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0146-04

随着社会经济的发展,人们的生活质量不断提高,蓝莓及其制品市场需求也在不断扩大。新鲜蓝莓保鲜期较短,采摘后要立即处理,否则容易腐烂变质,内部包含的营养物质也会快速流失,严重影响蓝莓口感和食用健康,会对蓝莓产业造成巨大的经济损失。因此,蓝莓保鲜以及延长保鲜期是当前亟须解决的技术问题^[1-2]。

目前,水果保鲜技术十分多样化,比较常见的保鲜方法有冷藏法、辐照保鲜法、气调保鲜法、臭氧处理保鲜法、涂膜保鲜法等。物理保鲜方法效果较好,但需要投入大量的专业设备和人员,操作流程比较繁琐,生产成本较高^[3]。近年来,多糖涂膜因有较高的安全性,生产成本相对较低,在水果保鲜中被广泛使用,特别是在浆果类水果保鲜中取得了不错的经济效益。本研究采用魔芋葡甘聚糖(KGM)复合涂膜,将其用

于蓝莓的保鲜处理,以观察保鲜效果,为蓝莓保鲜提供新的操作理论指导。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

蓝莓购自贵州省贵阳市当地蓝莓生产基地。

蓝莓叶多酚、魔芋葡甘聚糖:由笔者所在实验室提取制备;壳聚糖:食品级,西安裕华生物科技有限公司;乙醇、氢氧化钠等均为分析纯。

1.2 试验仪器与设备

BLXK-JA3003B 型电子天平(上海精科实业有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(上海美伊设备公司);UV-160A 型紫外分光光度计(日本岛津公司);DZF-6030A 真空干燥箱(天津通净仪器设备有限公司)等。

1.3 试验方法

1.3.1 KGM 复合涂膜对保鲜效果影响的单因素试验 选取 5、10、15、20、25、30 g/L 6 个水平的 KGM 用量,设定其他各因

研究进展[J]. 山西农业科学, 2016, 44(1): 110–114, 122.

[6] 李粉玲, 蔡汉权, 林泽平. 红豆多糖抗氧化性及还原能力的研究[J]. 食品工业, 2014, 35(2): 190–194.

[7] 徐怀德, 秦盛华. 超声波辅助提取光皮木瓜多糖及其体外抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 106–111.

[8] 朱秀灵, 戴清源, 冯宏波. 超声辅助提取银杏叶多糖工艺研究[J]. 安徽工程科技学院学报, 2010, 25(3): 6–8.

[9] 刘春兰, 杨逸, 何林, 等. 植物多糖抑菌作用研究方法进展[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1725–1727.

[10] 刘琴, 张薇娜, 朱媛媛. 不同产地苦荞籽粒中多酚的组成、分布及抗氧化活性比较[J]. 中国农业科学, 2014, 47(14): 2840–2852.

[11] 魏爱春, 杨修仕, 么杨, 等. 藜麦营养成分及生物活性研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 272–276.

[12] Yokozawa T, Dong E, Natagawa T, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on the radical scavenging activity of tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(6): 2143–2150.

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 贵州省科技计划(编号: 黔科合 LH[2014]7183)。

作者简介: 张颖(1976—), 女, 山东滨州人, 硕士, 副教授, 主要从事食品工程研究。E-mail: anyanerer@163.com。

藜麦种子在料液比为 1 g : 10 mL 时多糖提取率最高, 且偏关县藜麦的多糖提取率(2 094.5 μg/g)显著高于静乐县藜麦的多糖提取率(1 781.5 μg/g)。藜麦多糖对 DPPH 自由基有清除能力, 且清除率随着多糖体积的增加而呈现增大趋势。藜麦多糖对大肠杆菌有较强抑菌效果, 但对金黄色葡萄球菌抑菌性较弱。

参考文献:

[1] 王黎明, 马宁, 李頌, 等. 藜麦的营养价值及其应用前景[J]. 食品应用科技, 2014, 35(1): 381–384, 389.

[2] 董晶, 张焱, 曹赵茹, 等. 藜麦总黄酮的超声波法提取及抗氧化活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 267–269.

[3] 袁俊杰, 蒋玉蓉, 孙雪婷, 等. 藜麦多糖提取工艺的响应面法优化及其品种差异[J]. 食品科技, 2016, 41(1): 154–159.

[4] 孙雪婷, 袁俊杰, 蒋玉蓉, 等. 藜麦种子总黄酮提取及其抗氧化性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 355–358.

[5] 陈树俊, 胡洁, 庞震鹏, 等. 藜麦营养成分及多酚抗氧化活性的