

DOI:10.11937/bfyy.201608032

经酿酒发酵后葡萄籽中原花青素提取工艺优化

李善菊, 师守国, 杨 姝

(运城学院 生命科学系, 山西 运城 044000)

摘 要:以葡萄发酵后的葡萄籽粉碎物为试材,采用浸提方法,研究了浸提温度、时间、料液比、乙醇浓度对发酵后葡萄籽中原花青素提取率的影响。结果表明:4个因素的影响顺序为料液比>提取温度>提取时间>乙醇浓度。原花青素提取工艺的最佳条件为提取温度为40℃、提取时间为90 min、料液比为1:28 g/mL、乙醇浓度为60%,提取率为3.05%。

关键词:发酵后葡萄籽;原花青素;浸提法;提取

中图分类号:TS 261.4⁺3 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)08-0114-04

原花青素可视为花青素类物质的聚合物,是一种广泛存在于植物界的多酚化合物,属于黄烷醇类或缩合鞣质^[1],随着分离鉴定技术的提高以及人们对该类物质研究的不断深入,已认识到其有别于缩合单宁,现成为单独的一大类物质并称之为原花青素^[2]。

原花青素广泛存在于自然界中,自20世纪80年代以来,世界对其的研究日益广泛。美、法、德、日、奥、韩等国的研究人员对葡萄、松树皮、银杏、山楂、草莓、大黄、番

荔枝等中的原花青素含量进行了深入研究^[3-9]。在有关的众多植物中,因葡萄籽资源丰富,其提取物中原花青素较其它植物高,所以对葡萄的研究一直经久不衰,人们从葡萄果实、皮、籽及其它部位分离、鉴定的蛋白质、果胶、维生素、脂类等物质高达100多种^[10]。其中,人们较为感兴趣的是白藜芦醇、花色苷、鞣花酸和原花青素及其低聚物,最感兴趣的就是原花青素。1991年,法国的DUMON等^[11]指出,相同地区的不同年份或不同种类收获的葡萄,其葡萄籽中原花青素含量及聚合度有很大差别,不同方法及不同溶剂所得的提取物作用也不同,葡萄籽作为原花青素的重要来源,关注度日益增加^[12]。其优越的抗氧化性能、抗血管活性、抗肿瘤及弹性酶活性等使其在治疗眼部疾病、清除氧自由基、提高免疫、化妆品等领域中受到公众的青睐,是具有广阔发展前景的植物药之一^[13]。

葡萄籽主要来源于酒厂边角料,约占整粒葡萄的

第一作者简介:李善菊(1974-),女,山西运城人,硕士,讲师,研究方向为食品营养与分析。E-mail:lishanju_0@163.com.

责任作者:师守国(1973-),男,山西运城人,博士,副教授,研究方向为园艺植物育种与分子生物学。E-mail:shishouguo2009@163.com.

基金项目:“131”领军人才资助项目(XK-2015022);产学研资助项目(CY-2013012)。

收稿日期:2015-12-16

Toxicity of 4 Fungicides to *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

HU Xiaoying, ZHAO Jie

(Shanghai Pudong New District Agro-technology Extension Center, Shanghai 201201)

Abstract: Taking *Colletotrichum gloeosporioides* as test organism, using mycelium growth rate method, the toxicity of 4 fungicides such as 75% trifloxystrobin-tebuconazole WG, 60% pyraclostrobin-metiram WG, 30% tebuconazole-carbendazim SC and 80% mancozeb WP were tested against *Colletotrichum gloeosporioides* from pear, grape and fig. The results showed that 4 fungicides had different toxicity on *C. gloeosporioides*. Trifloxystrobin-tebuconazole, pyraclostrobin-metiram and tebuconazole-carbendazim had the higher toxicity than mancozeb, and tebuconazole-carbendazim had the highest toxicity on *C. gloeosporioides* from 3 hosts. Tebuconazole-carbendazim and trifloxystrobin-tebuconazole had similar EC₅₀ on *C. gloeosporioides* from 3 hosts. Pyraclostrobin-metiram had higher toxicity on *C. gloeosporioides* from grape, and the rest were *C. gloeosporioides* from pear and fig in turn.

Keywords: fungicides; *Colletotrichum gloeosporioides*; toxicity

5%~7%。葡萄是世界第二大果树作物,种植面积和产量仅次于柑橘,据调查,2014 年世界葡萄种植总面积约为 800 万 hm^2 ,总产量约为 6 592 万 t。我国地域辽阔,葡萄种植总面积约为 42 万 hm^2 ,葡萄总产量约为 627 万 t,其中 70%鲜食,20%酿酒,每年大约产生 30 万~40 万 t 的葡萄籽副产品。但是我国对有关葡萄籽的开发利用还很少,如若能充分开发利用这一资源,必会带来巨大的经济效益与社会效益^[14]。

我国葡萄栽培地域广阔,用于酿酒和其它行业的葡萄量很大,葡萄籽作为副产品很浪费,而且对环境造成污染。该研究旨在提高葡萄籽中原花青素的提取率,降低成本,使原花青素更好地为人类服务,并且可以充分利用资源,变废为宝,对建立节约型社会具有积极意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄籽为发酵实验后自制产品产物。将葡萄籽放入粉碎机中进行粉碎,粉碎完全后取出,过筛备用。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理 称取 1 g 葡萄籽粉末,装于滤纸包中,将其置于索式抽提装置的圆底烧瓶中,加入 60 mL 的石油醚,置于 55℃ 的恒温水浴锅中提取 150 min,然后将滤纸包取出,干燥,即为后续过程中使用的原料。

1.2.2 原花青素的提取 称取 1 g 脱脂后的葡萄籽粉末,置于乙醇浸提装置中,加入不同体积的乙醇溶液,放入恒温水浴锅中,50℃ 提取 120 min,然后将提取液置于布氏漏斗中,用真空泵抽滤。抽滤结束后,置于 100 mL 的容量瓶中,用蒸馏水定容至 100 mL,标号,避光保存。

1.2.3 单因素试验 提取温度对原花青素提取率的影响:提取温度分别设为 30、40、50、60、70℃,提取时间为 90 min,乙醇浓度 60%,料液比 1:18 g/mL,考查不同温度对发酵后葡萄籽中原花青素提取率的影响。提取时间对原花青素提取率的影响:提取时间分别设为 60、90、120、150、180 min,温度为 40℃,乙醇浓度 60%,料液比 1:18 g/mL,考查提取时间对发酵后葡萄籽中原花青素提取率的影响。料液比对原花青素提取率的影响:料液比分别设为 1:8、1:18、1:28、1:38、1:48 g/mL,温度 40℃,提取时间 120 min,乙醇浓度 60%,考查不同料液比对发酵后葡萄籽中原花青素提取率的影响。乙醇浓度对原花青素提取率的影响:乙醇浓度分别设为 50%、60%、70%、80%、90%,温度 40℃,提取时间 120 min,料液比 1:28 g/mL,考查不同乙醇浓度比对发酵后葡萄籽中原花青素提取率的影响。

1.2.4 正交实验 根据单因素试验结果对影响原花青素提取率的主要因素,即提取温度、提取时间、料液比以及乙醇浓度进行正交实验,各选取 3 个水平,研究其对原花青素提取率的影响,因素和水平见表 1。

表 1 乙醇浸提葡萄籽中原花青素
正交实验因素水平

	A 提取温度 /℃	B 提取时间 /min	C 料液比 /(g·mL ⁻¹)	D 乙醇浓度 /%
1	40	90	1:8	60
2	50	12	1:18	70
3	60	150	1:28	80

1.2.5 原花青素标准曲线的制作 准确称取原花青素标准对照品 0.010 g,然后用蒸馏水将其定容至 10 mL,以所得浓度为 1 mg/mL 作为标样。吸取标样溶液 0.10、0.25、0.50、1.00 mL 分别置于 10 mL 具塞试管中,加无水乙醇定容至 3 mL,然后加入 6 mL 正丁醇-盐酸溶液(95:5)与 0.2 mL 的 2% 硫酸铁胺溶液(溶解于 2 mol/L 的盐酸中),混匀,置于 (99±1)℃ 的沸水浴中加热 40 min 后取出,并迅速冷却至室温。用无水乙醇为空白对照,在 550 nm 处测其吸光值 A_{550} 。

1.2.6 原花青素的检测 采用正丁醇-盐酸法进行检测。用无水乙醇为空白对照,在 550 nm 处测其吸光值 A_{550} 。根据标准曲线方程测定原花青素的浓度,计算原花青素的提取率。 $PC(\%) = X \times V_2 / (m \times V_1 \times 10) \times 100$,式中:PC 为样品中原花青素提取率,%;X 为查标准曲线所得待测样品液中原花青素质量浓度,mg/mL; V_1 为取样体积,mL; V_2 为定容后样品总体积,mL; m 为原料质量,g。

2 结果与分析

2.1 原花青素标准曲线图

以吸光度 y 为纵坐标,原花青素的含量 $x(\text{g/mL})$ 为横坐标绘制标准曲线,得回归方程式为: $y=0.5403x+0.0181$, $R^2=0.9965$ 。

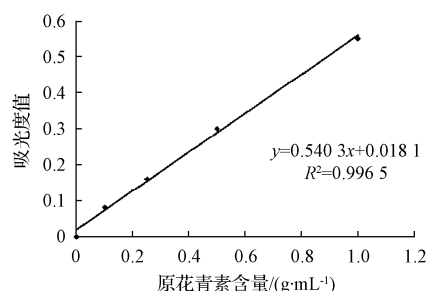


图 1 原花青素标准曲线

2.2 不同因素对原花青素提取最佳条件的筛选

2.2.1 提取温度对原花青素提取率的影响 由图 2 可知,随着温度的升高,分子运动加速,乙醇溶剂的提取率越高。当提取温度达到 40℃ 时,提取率高达 2.98%。温度在 60~70℃ 时,提取率有升高的趋势,但是该温度已越来越接近乙醇的沸点,而且原花青素在高温下会遭到破坏,因此该温度不可取。所以最佳的提取温度为 40℃。

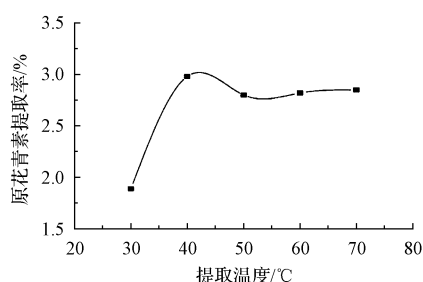


图2 提取温度对原花青素提取率的影响

2.2.2 提取时间对原花青素提取率的影响 由图3可知,原花青素提取率随提取时间的延长而增加,提取时间至120 min时,提取率最高为2.55%,随后逐渐下降。提取时间过短时,原花青素溶解量不足。但是当提取时间过长时,原花青素因在高温下长时间受热而发生结构的变化。因此最佳提取时间为120 min。

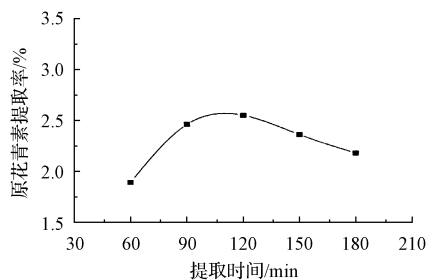


图3 提取时间对原花青素提取率的影响

2.2.3 料液比对原花青素提取率的影响 由图4可知,料液比为1:28 g/mL时,原花青素提取率最高达2.93%。溶剂用量少,原花青素溶出量不足,但是当溶剂用量达到一定量时,原花青素基本已全部溶出,再增加溶剂量,不仅收效甚微,还会给后续处理增加难度,所以乙醇溶剂用量不宜过大。因此最佳料液比为1:28 g/mL。

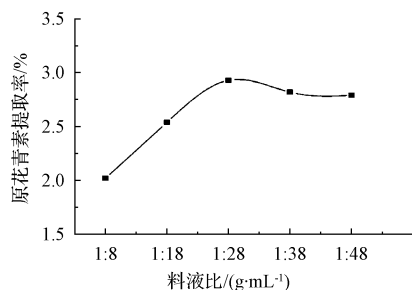


图4 料液比对原花青素提取率的影响

2.2.4 乙醇浓度对原花青素提取率的影响 由图5可知,乙醇溶液的溶解性能好,能够穿过细胞提取原花青素。随着乙醇溶液浓度的增加,原花青素的提取率也随之增加。当乙醇的浓度增加到70%时,原花青素提取率

最高。原花青素含有大量羟基,具有一定极性,根据相似相溶原理,当提取剂的极性与原花青素的极性相近时,溶解度最大,如若继续加大乙醇溶液浓度,极性差距增大,而且溶出的醇溶性杂质、亲脂性强的成分、色素增加,这些物质与原花青素竞争和乙醇水分子结合,使得原花青素的提取率降低。因此最佳乙醇浓度为70%。

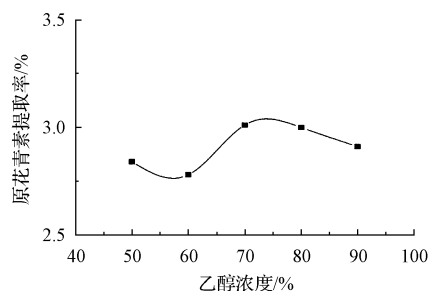


图5 乙醇浓度对原花青素提取率的影响

2.3 正交实验

由表2可知,根据R值可知,影响原花青素提取率的各个因素为料液比>提取温度>提取时间>乙醇浓度。根据k值可知,最佳水平为A₁B₁C₃D₂,因此最佳组合为提取温度为40℃、提取时间为90 min、料液比为1:28 g/mL、乙醇浓度为60%。

2.4 验证试验

通过正交实验得出的最佳水平与直观最佳提取率不同,因此要进行验证试验,由表3可知。通过验证试验可知,最佳的提取组合为提取温度为40℃、提取时间为90 min、料液比为1:28 g/mL、乙醇浓度为60%,提取率为3.05%。

表2 乙醇浸提提取葡萄籽中原花青素正交实验

试验号	A 提取温度 /℃	B 提取时间 /min	C 料液比 / (g·mL ⁻¹)	D 乙醇浓度 /%	A ₅₅₀	原花青素提取率 /%
1	40	90	1:8	50	0.902	2.27
2	40	120	1:18	60	0.996	2.51
3	40	150	1:28	70	1.102	2.79
4	50	90	1:18	60	0.882	2.22
5	50	120	1:28	70	1.199	3.03
6	50	150	1:8	50	0.866	2.18
7	60	90	1:28	70	1.150	2.91
8	60	120	1:18	50	0.671	1.68
9	60	150	1:8	60	0.570	1.41
K ₁	7.57	7.40	6.13	6.71		
K ₂	7.43	7.22	6.14	7.60		
K ₃	6.00	6.38	8.73	6.69		
k ₁	2.52	2.48	2.04	2.24		
k ₂	2.48	2.41	2.05	2.53		
k ₃	2.00	2.13	2.91	2.23		
R	0.52	0.35	0.87	0.30		

表 3 验证试验

	A ₅₅₀	提取率/%
平行 1	1.176	2.98
平行 2	1.220	3.09
平行 3	1.227	3.10
正交最高	1.183	3.05

3 结论

发酵后的葡萄籽经过索式抽提脱脂之后,采用乙醇浸提法提取原花青素,通过铁盐催化法结合原花青素标准曲线计算原花青素的提取率。通过对提取时间、提取温度、料液比以及乙醇浓度 4 个因素的试验,在其基础上进行正交实验,经比较发现二者结果部分吻合,经后期验证试验,得到葡萄籽中原花青素提取的最佳提取条件是提取温度为 40℃、提取时间为 90 min、料液比为 1:28 g/mL、乙醇浓度为 60%,提取率为 3.05%。同时通过正交实验表明,影响原花青素提取的 4 个因素的先后顺序为料液比、提取温度、提取时间和提取浓度。

影响葡萄籽中原花青素提取率的主要条件是料液比、提取时间、提取温度和乙醇浓度等,选择这 4 个因素综合起来进行比较研究具有重要的意义。在各个因素研究的基础上通过正交实验进行比较,经此得出的最佳工艺提取条件比较准确。

参考文献

- [1] 吴春,张艳. 纤维素酶法提取葡萄籽中原花青素的研究[J]. 食品科学,2006,27(10):258-261.
- [2] 樊丽华,葡萄籽中原花青素提取方法的进一步研究[J]. 新疆大学学报,2004,21(1):103.
- [3] BAGCHI D,BAGCHI M,STOHS S J,et al. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds[J]. Annals of the New York Academy of Sciences,2002,957(1):260-270.
- [4] 金宁,刘通讯. 山楂原花青素的抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(1):45-47.
- [5] 于立梅,赵谋明,李莹. 基于响应面法的马尾松树皮原花青素提取及抗氧化性研究[J]. 食品与机械,2007,23(1):64-68.
- [6] YAO X,ZHOU G S,TANG Y P,et al. Simultaneous quantification of flavonol glycosides, terpene lactones, biflavones, proanthocyanidins, and ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* leaves from fruit cultivars by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry[J]. Biomed Res Int,2013;582-591.
- [7] SCHAART J G,CHRISTIAND,IRENE R D L F,et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits[J]. New Phytologist,2013,197:454-467.
- [8] 罗宝生,戴万生. 大黄原花青素提取纯化工艺研究[J]. 云南中医中药杂志,2007,28(1):36-38.
- [9] 张驰,徐晓云,潘思轶. 沙棘果原花青素的分离纯化研究[J]. 食品科学,2005,26(5):183-185.
- [10] 吴春,陆海燕,李健. 葡萄籽原花青素的提取工艺[J]. 食品工业,2004(3):22-23.
- [11] DUMON M C,MICHAUD J,MASQUELIER J. Dosage des procyanidols des pépins de raisin de cépages rouges et blancs du Bordelais[J]. Bulletin De L'oiv,1991,64:533-542.
- [12] 姚方耀. 葡萄籽中葡萄籽油和原花青素的提取分离工艺研究[D]. 天津:天津大学,2004.
- [13] 傅武胜,蔡一新,林丽玉,等. 铁盐催化比塞法测定葡萄籽提取物中的原花青素[J]. 食品与发酵工业,2001,10(27):57-61.
- [14] 刘叶玲,王春波. 原花青素的研究进展[J]. 社区医学杂志,2004,2(6):7-8.

Optimization of Extraction Technology From Fermented Grape Seed

LI Shanju,SHI Shouguo,YANG Shu

(Department of Life Science,Yuncheng University,Yuncheng,Shanxi 044000)

Abstract: Taking fermented grape seeds as material,using extraction method,the effect of extraction temperature,time,solid-liquid ratio,alcohol concentration on fermentation anthocyanin extraction yield of grape seeds after the central plains was studied. The results showed that the influence of four factors order was solid-liquid ratio>extraction temperature>extraction time>ethanol concentration. The best condition of extraction process of procyanidins was extraction temperature 40℃,the extraction time was 90 min,material liquid ratio was 1:28 g/mL,ethanol concentration was 60%,the extraction yield was 3.05%.

Keywords: fermented grape seed;proanthocyanidins;ethanol;extraction