

# 葡萄皮渣原花青素酶法提取 工艺优化及抗氧化性研究

陈月英, 王彦平, 孙瑞琳, 杨会会, 谢克英, 古 洋

(河南农业职业学院, 河南 郑州 451450)

**摘 要:**以葡萄皮渣为试材,在单因素试验的基础上,采用  $L_9(4^3)$  正交实验对葡萄皮渣原花青素的提取工艺进行了优化,并对纯化后的葡萄皮渣原花青素的抗氧化性进行了研究。结果表明:葡萄皮渣原花青素提取的最佳工艺参数为纤维素酶添加量 0.4%,果胶酶添加量 0.8%,酶解时间 90 min,酶解温度 70 °C。在此条件下,葡萄皮渣原花青素的得率为 11.08 mg·g<sup>-1</sup>。体外抗氧化试验结果表明,紫甘蓝原花青素表现出明显的抗氧化能力,对 DPPH 自由基和羟基自由基具有较好的清除能力,抗氧化能力优于维生素 C。

**关键词:**葡萄皮渣;原花青素;酶法辅助提取;抗氧化

**中图分类号:**TS 202.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)16-0129-04

葡萄皮渣是葡萄酒、葡萄果汁饮料生产过程中产生的副产物,在我国资源丰富,一般当做肥料、饲料或当做废料舍弃,因其富含有机物造成了环境的严重污染,而且造成资源浪费。葡萄皮渣主要有葡萄皮和葡萄籽组成,现代研究已从中分离出原花青素、白藜芦醇、齐墩果酸、黄酮、 $\beta$ -谷甾醇、膳食纤维和超氧化物歧化酶等活性成分<sup>[1]</sup>。原花青素(Proanthocyanidins, PC)是由黄烷醇衍生而来的天然多酚类化合物,由不同数量的儿茶素或者表儿茶素结合而成<sup>[2]</sup>,广泛存在于果皮及植物的木质部,以葡萄籽和松树皮中含量最为丰富<sup>[3]</sup>。原花青素是目前研究发现最安全高效的抗氧化剂,其抗氧化能力是维生素 C 的 20 倍、维生素 E 的 50 倍,有明显的抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、抑菌、防治糖尿病和保护心血管等作用<sup>[4-8]</sup>。

原花青素在水、甲醇、乙醇中完全溶解,因此传统的原花青素提取方法主要为水浸提法<sup>[9]</sup>和有机溶剂提取法<sup>[10]</sup>。由于传统方法温度高、时间长,可能对原花青素的成分造成严重影响,而酶法提取利用纤维素酶或果胶酶使细胞壁及细胞间质的纤维素、半纤维素、果胶等物质降解,从而促进有效物质的快速溶出<sup>[11]</sup>。该研究采用双酶法提高葡萄皮渣中原花青素的提取率,用正交实验

设计优化提取条件,并利用 AB-8 大孔树脂对葡萄皮渣原花青素进行纯化,测定其体外抗氧化活性,以期葡萄皮渣的综合利用提供理论和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为河南民权产“赤霞珠”葡萄皮渣,取自郑州生源生物食品厂 2014 年葡萄酒生产中产生的葡萄皮渣。置于 60 °C 恒温箱烘 24 h,称恒重、粉碎后过 60 目筛。采用索氏抽提法脱除葡萄皮渣中的脂类物质,保存备用。

1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH, 纯度 99%)购自 Sigma-Aldrich 公司;原花青素标准品购自上海圻明生物科技有限公司;无水乙醇、甲醇、香草醛、硫酸、三氯乙酸、三氯化铁、铁氰化钾、双氧水、硫酸亚铁等均为分析纯,购自国药集团。

UV power 紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器股份有限公司);202-3AB 电热恒温鼓风干燥箱(上海乔跃电子科技有限公司);RE2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);D5-R2 离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);EG823MF3-NS 微波炉(美的集团股份有限公司);HH-2 数显恒温水浴锅(上海乔跃电子科技有限公司);BS224S 分析天平(德国赛多利斯公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 原花青素标准曲线的绘制 称取干燥至恒重的原花青素标准品 100 mg,用 95%乙醇溶解,定容至 50 mL,摇匀得 2.0 mg·mL<sup>-1</sup>的原花青素标准溶液。分别取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的 2.0 mg·mL<sup>-1</sup>原花青素标

**第一作者简介:**陈月英(1964-),女,硕士,教授,研究方向为食品功能与营养因子。E-mail:14389487@qq.com.

**基金项目:**河南农业职业学院科学研究资助项目(ky2015-zr-08);2015 年度河南省高等学校优秀教学团队建设资助项目;2014 年度河南省高等学校“专业综合改革试点”资助项目。

**收稿日期:**2016-05-10

准溶液置于 50 mL 的容量瓶中,并用 95%乙醇定容,得 0.04~0.20 mg·mL<sup>-1</sup>的原花青素标准溶液。于试管中取 0.5 mL 95%无水乙醇和不同浓度标准溶液,加入 2.5 mL 3%香草醛的甲醛溶液,再加入 2.5 mL 30%硫酸的甲醇溶液,摇匀,30 ℃水浴保温 20 min。用分光光度计于 500 nm 波长处测定其吸光度。以吸光度为纵坐标,原花青素浓度(mg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标作标准曲线见图 1,其线性回归方程为  $y=0.2629x+0.0007$ ,  $R^2=0.9993$ 。

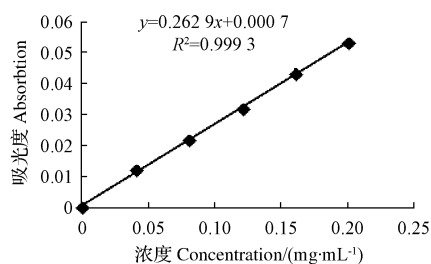


图1 原花青素标准曲线

Fig.1 Proanthocyanidins standard curve

1.2.2 葡萄皮渣原花青素的酶法提取 准确称取 2.000 0 g 葡萄皮渣粉于锥形瓶中,加入 20 mL 蒸馏水,加入双酶(纤维素酶和果胶酶)进行酶解反应,过滤所得滤液用旋转蒸发仪将大部分水蒸干,所得余液加入 65%的乙醇溶液至 20 mL,在 60 ℃条件下提取 2 h,提取液 6 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min,上清液进行旋转蒸发后用 95%乙醇定容至 25 mL。

1.2.3 单因素试验 纤维素酶添加量对原花青素提取率的影响:选择纤维素酶添加量分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%,果胶酶添加量为 0.6%,酶解时间 2 h,酶解温度 60 ℃,考察不同纤维素酶添加量对原花青素提取率的影响。果胶酶添加量对原花青素提取率的影响:选择果胶酶添加量分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%,纤维素酶添加量为 0.6%,酶解时间 2 h,酶解温度 60 ℃,考察不同果胶酶添加量对原花青素提取率的影响。酶解时间对原花青素提取率的影响:选择酶解时间分别为 30、60、90、120、150 min,果胶酶添加量 0.6%,纤维素酶添加量 0.6%,酶解温度 60 ℃,考察不同酶解时间对原花青素提取率的影响。酶解温度对原花青素提取率的影响:选择酶解温度分别为 30、40、50、60、70 ℃,果胶酶添加量 0.6%,纤维素酶添加量 0.6%,酶解时间 2 h,考察不同酶解温度对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,设计四因素三水平的正交实验表(表 1),测定提取液的吸光度,并计算原花青素提取率,以确定葡萄皮渣原花青素双酶法提取的最佳工艺条件。

表 1

正交实验因素水平

Table 1 The factor and level of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	A 纤维素酶 Cellulose /%	B 果胶酶 Pectinase /%	C 酶解时间 Enzymatic hydrolysis time /min	D 酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature/℃
1	0.2	0.4	60	50
2	0.4	0.6	90	60
3	0.6	0.8	120	70

1.2.5 葡萄皮渣原花青素制备及含量测定 称取 1 kg 葡萄皮渣粉,按正交实验得出的最佳提取工艺,提取液 6 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 20 min,合并上清液。粗提液采用 AB-8 大孔树脂进行分离纯化后测定原花青素含量。

1.2.6 葡萄皮渣原花青素体外抗氧化活性的测定 总还原能力参考孟庆焕<sup>[12]</sup>的方法测定。DPPH·清除率参考杨申明等<sup>[13]</sup>的方法测定。羟基自由基清除率参考李旭等<sup>[14]</sup>的方法测定。以上试验均以维生素 C 的抗氧化活性作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄皮渣原花青素提取的单因素试验

2.1.1 纤维素酶添加量对原花青素提取率的影响 由图 2 可知,纤维素酶添加量为 0.4%时,原花青素提取率最高,超过 0.4%后提取率反而下降,这可能由于酶浓度达到一定值后,底物浓度相对不能饱和,导致酶作用受阻。故选择纤维素酶添加量为 0.2%~0.6%用于进一步优化试验。

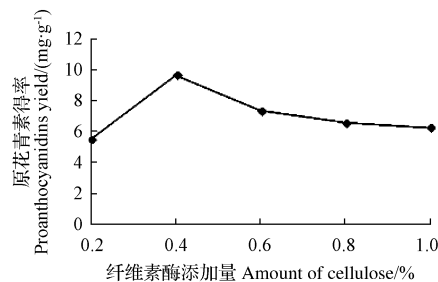


图2 纤维素酶添加量对原花青素提取率的影响

Fig.2 The influence of amount of cellulose on proanthocyanidins yield

2.1.2 果胶酶添加量对原花青素提取率的影响 由图 3 可知,相同条件下,果胶酶添加量为 0.6%时,葡萄皮渣原花青素提取率最高。故选择果胶酶添加量在 0.4%~0.8%进一步优化试验。

2.1.3 酶解时间对原花青素提取率的影响 酶解时间太短影响酶解效果,太长则不利于工业生产。由图 4 可知,酶解时间低于 90 min 时,原花青素提取率随酶解时间延长而升高,进一步延长酶解时间,得率反而降低。故选择酶解时间在 60~120 min 进一步优化试验。

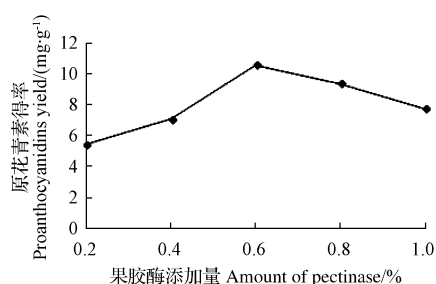


图3 果胶酶添加量对原花青素提取率的影响

Fig. 3 The influence of amount of pectinase on proanthocyanidins yield

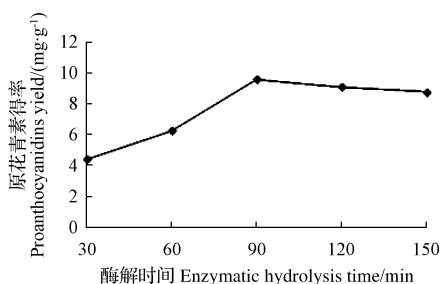


图4 酶解时间对原花青素提取率的影响

Fig. 4 The influence of enzymatic hydrolysis time on proanthocyanidins yield

2.1.4 酶解温度对原花青素提取率的影响 由图5可知,随着酶解温度的升高,葡萄皮渣原花青素提取率先升高后下降,酶解温度60℃时,原花青素提取率最高,70℃时反而下降,可能是因为温度过高使酶活性和稳定性降低所致。故选择酶解温度在50~70℃进一步优化。

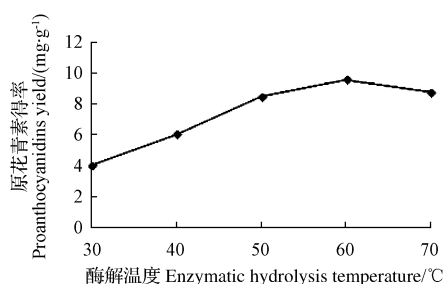


图5 酶解温度对原花青素提取率的影响

Fig. 5 The influence of enzymatic hydrolysis temperature on proanthocyanidins yield

## 2.2 葡萄皮渣原花青素提取的正交实验

由表2可知,各因素的极差顺序为  $R_B > R_A > R_D > R_C$ ,即对原花青素提取效果重要性排序为果胶酶添加量>纤维素酶添加量>酶解温度>酶解时间。最佳组合为  $A_2B_3C_2D_3$ ,最佳提取工艺为纤维素酶添加量0.4%、果胶酶添加量0.8%、酶解时间90 min、酶解温度70℃。对最佳提取工艺条件做验证试验,重复3次,该条件下葡萄皮渣原花青素的平均提取率为  $(11.08 \pm$

表2 葡萄皮渣原花青素提取的正交实验结果

Table 2 The result of grape residue proanthocyanidins

编号 NO.	因素 Factor				原花青素提取率 Proanthocyanidins yield/(mg·g <sup>-1</sup> )
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	5.43
2	1	2	2	2	8.32
3	1	3	3	3	8.39
4	2	1	2	3	9.94
5	2	2	3	1	8.76
6	2	3	1	2	9.49
7	3	1	3	2	5.87
8	3	2	1	3	7.33
9	3	3	2	1	8.60
K1	7.38	7.03	8.17	7.60	$A_2B_3C_2D_3$
K2	8.73	7.83	8.25	7.89	
K3	7.27	8.87	7.67	8.55	
R	1.46	1.84	0.50	0.95	

0.85)  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,高于正交实验中所有试验结果,故为最优组合。

## 2.3 葡萄皮渣原花青素体外抗氧化活性

2.3.1 葡萄皮渣原花青素的总还原能力 由图6可知,在试验的浓度范围内,葡萄皮渣原花青素的总还原能力随着浓度的增加而升高,并且样品浓度与总还原力存在量效关系。相同浓度下,葡萄皮渣原花青素的总还原能力略高于维生素C。

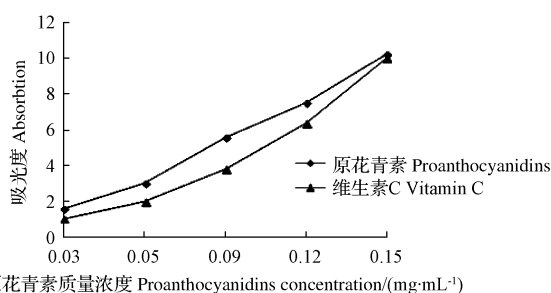


图6 葡萄皮渣原花青素的总还原能力

Fig. 6 The total reducing power of grape residue proanthocyanidins

2.3.2 葡萄皮渣原花青素对 DPPH· 的清除作用 由图7可知,在选定的浓度范围内,葡萄皮渣原花青素对

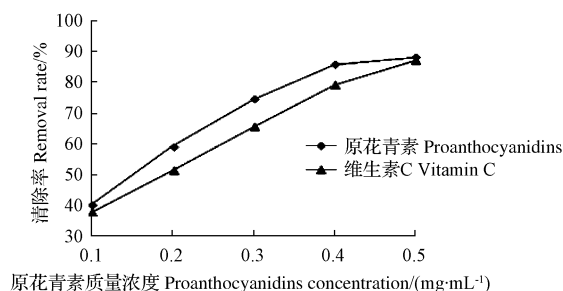


图7 葡萄皮渣原花青素对 DPPH· 的清除作用

Fig. 7 The DPPH· removal effect of grape residue proanthocyanidins

DPPH·具有良好的清除能力,且作用效果随着浓度的提高而增强,通过线性回归方程计算得到葡萄皮渣原花青素的  $IC_{50}=0.141\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,而维生素C的  $IC_{50}=0.188\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,说明在相同浓度下,葡萄皮渣原花青素对DPPH·的清除能力略强于维生素C。

2.3.3 葡萄皮渣原花青素对·OH的清除作用 由图8可知,在选定的浓度范围内,葡萄皮渣原花青素对·OH具有良好的清除能力,并且原花青素浓度与·OH清除率之间存在量效关系,通过线性回归方程计算得到葡萄皮渣原花青素的  $IC_{50}=0.304\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,而维生素C的  $IC_{50}=0.341\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,说明在相同浓度下,葡萄皮渣原花青素对·OH的清除能力略强于维生素C。

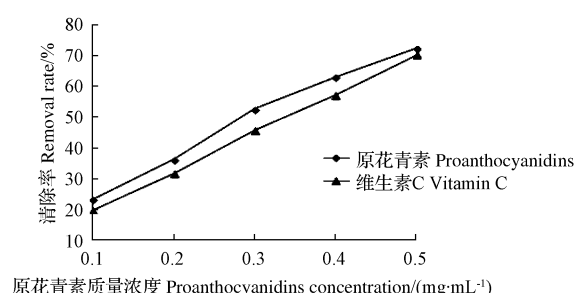


图8 葡萄皮渣原花青素对·OH的清除作用

Fig. 8 The ·OH removal effect of grape residue proanthocyanidins

### 3 结论

单因素试验与正交实验结果表明,影响酶法提取葡萄皮渣原花青素提取率的主次因素为果胶酶添加量、纤维素酶添加量、酶解温度、酶解时间。酶法提取葡萄皮渣原花青素的最佳工艺条件为纤维素酶添加量0.4%、果胶酶添加量0.8%、酶解时间90 min、酶解温度70℃。最优条件下,葡萄皮渣原花青素的平均提取率为 $(11.08\pm 0.85)\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

抗氧化试验结果表明,葡萄皮渣原花青素纯品具有较高的总还原力,有很强的清除DPPH·和·OH的能力,抗氧化能力略高于维生素C,且抗氧化作用与原花青素含量呈正相关,作为天然抗氧化物,值得进一步研究和开发。

### 参考文献

- [1] 高学峰,杨继红,王华. 葡萄及葡萄酒生产过程中副产物的综合利用研究进展[J]. 食品科学,2015,36(7):289-295.
- [2] OU K Q, GU L W. Absorption and metabolism of proanthocyanidins[J]. Journal of Functional Foods,2013,7(1):43-53.
- [3] 颜小梅,杨光,马媛,等. 葡萄籽原花青素对老年病的预防作用研究进展[J]. 食品科学,2014,35(21):339-343.
- [4] 王伟华,曹员,莫骏涛,等. 新疆慕萨莱思葡萄酒中原花青素含量测定的HPLC方法建立[J]. 北方园艺,2015(16):126-130.
- [5] NISHIZUKA T, FUJITA Y, SATO Y, et al. Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1: a new player in the French Paradox[J]. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences, 2011, 87(3): 104-108.
- [6] CASTELL-AUVI A, CEDO L, PALLARES V, et al. Procyanidins modify insulinemia by affecting insulin production and degradation[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(12): 1565-1572.
- [7] 王华,刘霞,杨继红,等. 葡萄籽原花青素抗癌活性及其机制研究进展[J]. 安徽大学学报(自然科学版),2012,36(4):101-108.
- [8] 董晓敏,韩瑞芳,刘天明. 葡萄籽原花青素对金黄色葡萄球菌的抑菌研究[J]. 食品工业,2015,36(8):188-192.
- [9] 李超,郑义,王卫东,等. 响应曲面法优化亚临界水提取葡萄籽原花青素的工艺研究[J]. 食品科学,2010,31(12):6-10.
- [10] 周玮婧,孙志达,谢笔均,等. 荔枝皮原花青素提取、纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009,30(8):68-71.
- [11] 李银花,李洪燕. 葛花原花青素的酶法提取及抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,2014,35(13):170-176.
- [12] 孟庆煊. 牡丹种皮黄酮提取分离与抗氧化及抗疲劳作用研究[J]. 哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [13] 杨申明,王波,王振吉,等. 金雀花总黄酮提取工艺优化及抗氧化性研究[J]. 浙江农业学报,2015,27(2):278-284.
- [14] 李旭,刘婷. 杜仲叶总黄酮微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2013,34(4):243-248.

## Study on Optimization of Enzyme-assisted Extraction of Proanthocyanidins From Grape Residues and Its Antioxidant Activity

CHEN Yueying, WANG Yanping, SUN Ruilin, YANG Huihui, XIE Keying, GU Yang  
(Henan Vocational College of Agriculture, Zhengzhou, Henan 451450)

**Abstract:** Taking grape residues as raw material, on the basis of single factor experiment,  $L_9(4^3)$  orthogonal experiment methodology were conducted to investigate the influences of amount of enzyme, enzyme time and enzyme temperature on the yield of proanthocyanidins, and the oxidation resistance of purified grape residues procyanidins was studied. The optimum condition were as follows: the amount of cellulase was 0.4%, the amount of pectase was 0.8%, enzyme time was 90 min, enzyme temperature was 70℃. Under such conditions, the yield of proanthocyanidins was  $11.08\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . The extraction from grape residues was then purified, and showed significant antioxidant capacity, and activity to removing DPPH· radical and ·OH radical, while stronger than vitamin C.

**Keywords:** grape residues; proanthocyanidins; enzyme-assisted extraction; antioxidant