葡萄籽中原花青素提取工艺

肖丽霞[1]，何志贵[1,3]，朱 勇[2]，曾庆文[1]，胡博然[1,*]
(1.扬州大学食品科学与工程学院，江苏 扬州 225000；2.扬州大学生物科学与技术学院，江苏 扬州 225009；
3.桂林旅游高等专学校，广西 桂林 541006)

摘 要：以发酵后葡萄籽为原料，研究微波、纤维素酶和超声波辅助提取葡萄籽中原花青素的工艺条件，对影响原花青素提取率的因素进行考察，通过正交试验确定葡萄籽中原花青素的最佳提取工艺。结果表明最佳方法为微波辅助提取，其最佳工艺条件：料液比1:25(g/mL)、乙醇体积分数80%、微波时间40s、微波功率115W，原花青素的提取率为10.70%。

关键词：葡萄籽；原花青素；微波；酶解；超声波

Optimization of Proanthocyanidin Extraction from Grape Seed

XIAO Li-xia[1]，HE Zhi-gui[1,3]，ZHU Yong[2]，ZENG Qing-wen[1]，HU Bo-ran[1,*]
(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;
2. College of Biological Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;
3.Guilin Institute of Tourism, Guilin 541006, China)

Abstract：The aim of this study was to optimize technical conditions for ultrasonic-assisted ethanol extraction, cellulase hydrolysis-based extraction and microwave-assisted ethanol extraction of proanthocyanidins from grape seed power using one-factor-at-a-time coupled with orthogonal array design method. Microwave-assisted extraction was found to be the best of the three methods, and the optimal process conditions were ethanol concentration of 80%, material-to-liquid ratio of 1:25 (g/mL), microwave treatment time of 40 s and microwave power of 115 W. Under these conditions, the extraction rate of proanthocyanidins was 10.70%.

Key words：grape seed；proanthocyanidins；microwave；cellulose；ultrasonic
中图分类号：R284.2 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2011)20-0089-06

原花青素是从葡萄籽中提取出来的多酚类黄酮，主要是以儿茶素或表儿茶素为单体缩合而成的聚合物，还含有少量的儿茶素和表儿茶素、咖啡酸等有机酸，它们以复杂成分和协同方式起抗氧化作用，使其具有高度的生物利用度。原花青素具有多种药理活性，如抗氧化、清除自由基、护肝解毒、抗菌及抗癌等功能[1-6]。

随着我国葡萄酒业的发展，葡萄籽作为葡萄酒工业中的副产品也逐年增加。目前国内对葡萄籽的综合利用还比较低，只是简单地提取葡萄籽油或者是被用来当作饲料使用。将葡萄籽中的活性成分进行提取利用，能使葡萄籽得到充分利用，同时还能提高葡萄酒加工企业的经济效益[7-8]。

微波萃取是近年才发展起来的一门新技术，最大的特点是作用时间短，提取效率高，有效成功破坏小，节约能量等[9-11]。超声波被广泛应用于中草药有效成分的提取分离，由于这种技术具有快速、能耗低、提取率高的特点[12-14]，受到越来越多的关注。高等植物细胞壁具有一定硬度和弹性的固体结构，主要由纤维素形成其网状框架，因此可以使用纤维素酶降解纤维素，使细胞壁等结构疏松瓦解，从而提高有效成分的提取率[15-16]，具有条件温和、节约能源、提取率高、除杂等优点。

收稿日期：2011-05-31
基金项目：海南省重点科技项目(070121；ZDXM20100005)
作者简介：肖丽霞(1966—)，女，副教授，博士，研究方向为农产品贮藏加工。E-mail：lxxiao@yzu.edu.cn
* 通信作者：胡博然(1964—)，女，教授，博士，研究方向为葡萄酒、食品生物技术、食品安全。
E-mail：huboran2001@yahoo.com.cn

本实验采用微波、纤维素酶和超声波辅助提取3种方法对葡萄籽中原花青素的提取工艺进行研究，最终确定最适宜的提取方法及工艺条件，为葡萄籽中原花青素的提取和开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡萄籽由江苏太仓产地的酿酒葡萄赤霞珠经发酵后，过滤去皮获得。

儿茶素标准品　南京泽郎医药科技有限公司；纤维素酶　上海蓝季科技发展有限公司；香草醛　医药集团　上海化学试剂公司；浓硫酸　中国恒利试剂厂出品；无水乙醇　西陇化工股份有限公司。以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

V-1600PC分光光度计　上海美谱达仪器有限公司；FW135型粉碎机　天津市泰斯特仪器有限公司；RE52-4型旋转蒸发仪　上海沪西分析仪器有限公司；DL-120B型超声波清洗器　上海三信仪器有限公司；TG16A-WS型离心机　卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料处理

将葡萄籽30℃烘干、粉碎，用石油醚浸泡48h，抽滤，烘干备用。

1.3.2 原花青素标准曲线绘制

采用硫酸-香草醛法[17]。精确称取儿茶素标准品配制成1.0mg/mL对照品标准溶液，分别取0、2、4、6、8mL定容到10mL，再各取0.5mL，依次加入2.5mL 30g/L的香草醛-甲醇溶液和2.5mL 30%浓硫酸-甲醇溶液，摇匀后于30℃水浴避光反应30min，然后测定A_{500nm}，绘制标准曲线，回归方程为：$y = 0.5839x - 0.0071$(式中，y为吸光度，x为儿茶素质量浓度，$R^2 = 0.9990$)。

1.3.3 葡萄籽中原花青素的提取及测定

准确称取葡萄籽粉1.0g，在一定条件下进行提取，合并滤液，减压浓缩，回收乙醇，定容后得原花青素提取液。吸取0.5mL原花青素提取液，按照标准曲线方法测定原花青素质量浓度，每样做平行3次，计算原花青素提取率。

$$PC/\% = \frac{X \times 0.5 \times V_2}{m \times V_1 \times 10^3}$$

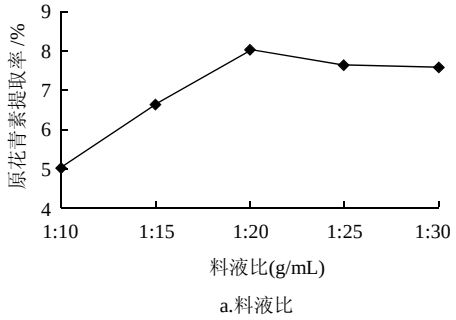
式中：PC为样品中原花青素提取率/%；X为根据标准曲线计算得的样品中原花青素质量浓度/(mg/mL)；V_1为取样体积/mL；V_2为定容后样品总体积/mL；m为原料质量/g。

1.3.4 试验设计

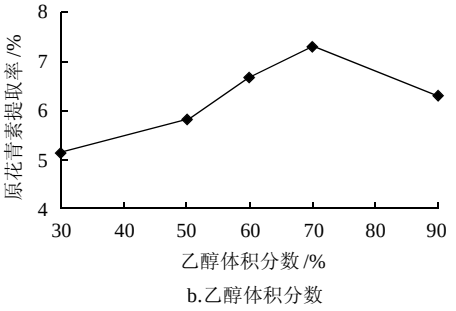
研究微波、纤维素酶和超声波辅助3种方法提取葡萄籽中原花青素的工艺条件，对影响原花青素提取率的因素进行考察，通过单因素及正交试验确定葡萄籽中原花青素的最佳提取工艺。比较3种方法的优劣，确定最佳提取工艺。

2 结果与分析

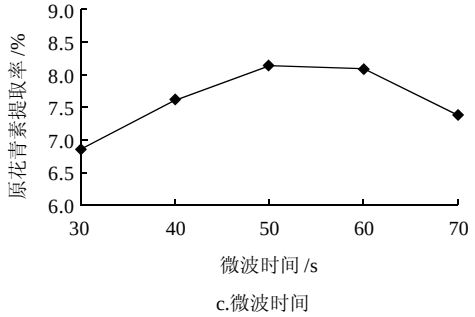
2.1 微波辅助提取葡萄籽中原花青素试验



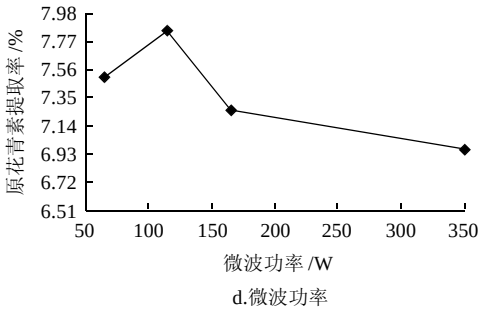
a.料液比



b.乙醇体积分数



c.微波时间



d.微波功率

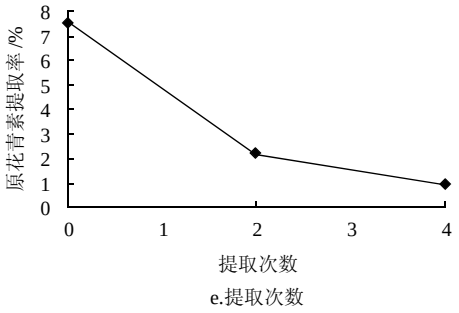


图 1 各因素对微波辅助提取葡萄籽中原花青素的影响

Fig.1 Effects of various microwave-assisted extraction parameters on extraction rate of proanthocyanidins

2.1.1 料液比对提取率的影响

如图 1a 所示，在其他条件一定的情况下，原花青素提取率随着提取液用量增加而增加，当料液比为 1:20 时，提取率达到 8.02%，随着提取液用量的进一步加大，其提取率有所降低。因此，选择 1:20 为最佳料液比。

2.1.2 乙醇体积分数对提取率的影响

如图 1b 所示，当乙醇体积分数达到 70% 时，原花青素的提取率达到最高值 7.3%。因为乙醇体积分数较低时，水的含量相应较高，则原花青素提取率会降低；而当乙醇体积分数过高时脂溶性物质容易溶出，从而降低原花青素的提取率。因此，选择 70% 为最佳乙醇体积分数。

2.1.3 微波时间对提取率的影响

如图 1c 所示，微波作用时间越长，原花青素提取率越高，微波超过 50s 后，提取率呈下降趋势，这是由于随着时间的增加，料液温度升高，使得热稳定性较差的原花青素被破坏。因此，选择 50s 作为最佳提取时间。

2.1.4 微波功率对提取率的影响

如图 1d 所示，随着微波功率的增加，提取物加热的速度加快，原花青素越容易被提取出来，当微波功率在 115W 时，提取率达到最大为 7.85%。随着微波功率的进一步加大，提取率急剧降低，因为微波功率过大使得温度过高，原花青素损失越多。此外，在较高功率下乙醇溶液容易沸腾以至冲出三角瓶，影响试验结果。因此，选择 115W 为最佳提取功率。

2.1.5 提取次数对提取率的影响

葡萄籽经一次提取后，其中的有效成分不会立即提取完全，为考察原花青素经过多次提取后，原花青素的含量变化情况及工作需要，采用同样的步骤，对一定量的葡萄籽进行多次提取实验。如图 1e 所示，经过两次提取后，葡萄籽中的原花青素得率均在 2% 以上，3 次提取时原花青素得率则较低，两次提取较为合理。

2.1.6 葡萄籽中原花青素微波提取正交试验

根据以上分析，在两次提取的情况下，对影响原花青素提取率主要因素料液比、乙醇体积分数、微波时间、微波功率进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，研究这些因素对葡萄籽原花青素提取率的影响，因素水平见表 1。

表 1 微波辅助提取葡萄籽中原花青素正交试验因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels in orthogonal array design for optimizing microwave-assisted proanthocyanidins extraction

水平	因素			
	A 料液比(g/mL)	*B* 乙醇体积分数/%	*C* 微波时间/s	*D* 微波功率/W
1	1:15	60	40	65
2	1:20	70	50	115
3	1:25	80	60	165

表 2 微波辅助提取葡萄籽中原花青素正交试验结果与分析(*n*=3)

Table 2 Orthogonal array design and corresponding experimental results for optimizing microwave-assisted proanthocyanidins extraction (*n*=3)

试验号	*A*	*B*	*C*	*D*	原花青素提取率/%
1	1	1	1	1	2.95
2	1	2	2	2	3.14
3	1	3	3	3	3.76
4	2	1	2	3	7.93
5	2	2	3	1	8.16
6	2	3	1	2	10.6
7	3	1	3	2	10.6
8	3	2	1	3	10.4
9	3	3	2	1	7.84
K_1	98.553	215.160	240.333	189.507	
K_2	267.315	217.407	189.150	244.110	
K_3	289.149	222.369	225.537	221.400	
k_1	32.851	71.720	80.111	63.169	
k_2	89.105	72.469	63.050	81.370	
k_3	96.383	74.123	75.179	73.800	
极差	63.532	2.403	17.061	18.201	
优水平	A_3	B_3	C_1	D_2	

由表 2 可知，影响原花青素提取效果各因素为料液比＞微波功率＞微波时间＞乙醇体积分数，料液比对提取率影响最大，乙醇体积分数对提取率影响最小；最佳提取条件组合为 $A_3B_3C_1D_2$，即乙醇体积分数 80%、料液比 1:25、微波时间 40s、微波功率 115W。在最佳条件下进行验证实验，得到原花青素提取率为 10.70%，高于各试验组，说明正交试验优化结果可靠。

2.2 纤维素酶辅助提取葡萄籽中原花青素试验

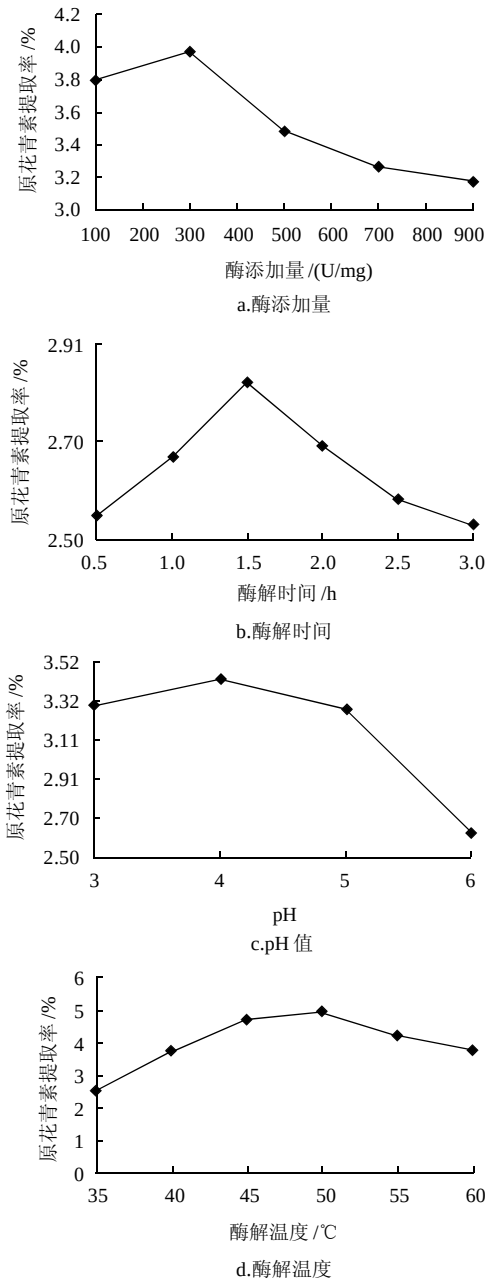


图 2 各因素对纤维素酶辅助提取原花青素的影响

Fig.2 Effects of various cellulase hydrolysis-based extraction parameters on extraction rate of proanthocyanidins

2.2.1 酶添加量对提取率的影响

如图 2a 所示，酶添加量在 300U/mg 时，原花青素的提取率最高。酶添加量过低时，酶未被底物饱和；酶添加量较高时，可能由于溶液中的抑制剂与酶结合导致酶活降低。因此，选择 300U/mg 为最佳酶添加量。

2.2.2 酶解时间对提取率的影响

如图 2b 所示，酶和底物作用的时间对原花青素提取率的作用并不明显。开始作用时，随着时间的延长，提取率也相对升高，作用时间为 1.5h 时达到最高，之后随着时间的增加，提取率呈下降趋势。可能原因是：时间较短，酶与底物反应不完全，原花青素还没有完全溶出，时间较长，原花青素已大部分溶出，且随着在空气中暴露的时间增加，发生氧化损失，所以含量呈下降趋势。因此，选择 1.5h 为最佳提取时间。

2.2.3 pH 值对提取率的影响

酶活性的发挥与它所处的 pH 值环境有关，过酸或过碱可以使酶的空间结构破坏，引起酶构象的改变，酶活性受到抑制或丧失。如图 2c 所示，pH4 时，原花青素的提取率最高。综合考虑，选择最适 pH4。

2.2.4 酶解温度对提取率的影响

如图 2d 所示，随着温度的升高，原花青素的提取率逐渐升高，50℃时达到最高，超过 50℃后，随着温度的升高，原花青素的提取率降低，可见 50℃是该反应条件下纤维素酶的最适温度，故选 50℃为最佳提取温度。

2.2.5 酶法辅助提取葡萄籽中原花青素正交试验

根据以上的分析，在两次提取的情况下，对影响原花青素提取率的主要因素酶添加量、酶解时间、pH 值、酶解温度进行 $L_9(3^4)$正交试验，研究这些因素对葡萄籽原花青素提取率的影响，因素水平见表 3。

表 3 纤维素酶辅助提取葡萄籽中原花青素正交试验因素水平表

Table 3 Factors and their coded levels in orthogonal array design for optimizing cellulase hydrolysis-based proanthocyanidins extraction

水平	因素			
	A 纤维素酶添加量 /(U/mg)	*B* 酶解时间 /h	*C* pH	*D* 酶解温度 /℃
1	100	1.0	4.0	45
2	300	1.5	5.0	50
3	500	2.0	6.0	55

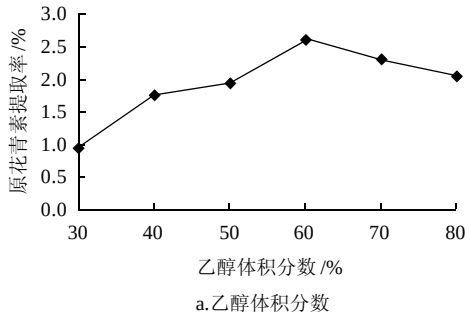
表 4 纤维素酶辅助提取葡萄籽中原花青素的正交试验结果与分析 (*n*=3)

Table 4 Orthogonal array design and corresponding experimental results for optimizing cellulase hydrolysis-based proanthocyanidins extraction (*n*=3)

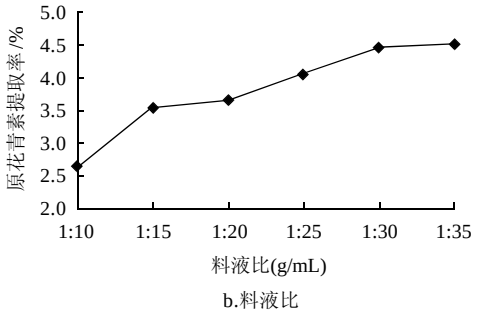
试验号	*A*	*B*	*C*	*D*	原花青素提取率 /%
1	1	1	1	1	8.77
2	1	2	2	2	2.47
3	1	3	3	3	3.66
4	2	1	2	3	3.75
5	2	2	3	1	8.14
6	2	3	1	2	2.57
7	3	1	3	2	2.38
8	3	2	1	3	3.66
9	3	3	2	1	8.41
K_1	148.335	148.278	149.301	252.507	
K_2	144.525	142.617	146.292	74.181	
K_3	144.447	146.409	141.744	110.619	
k_1	49.445	49.426	49.767	84.169	
k_2	48.175	47.539	48.764	24.727	
k_3	48.149	48.803	47.248	36.873	
极差	1.296	1.887	2.519	59.442	
优水平	A_1	B_1	C_1	D_1	

由表4可知：影响原花青素提取效果各因素为酶解温度＞pH值＞酶解时间＞纤维素酶添加量；最佳组合为$A_1B_1C_1D_1$，即纤维素酶添加量100U/mg、酶解时间1.0h、pH4.0、酶解温度45℃。在最佳条件下进行验证实验，得到原花青素提取率8.75%，说明正交试验优化结果可靠。

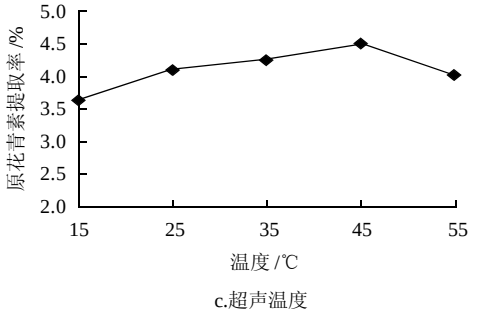
2.3 超声波辅助提取葡萄籽中原花青素试验



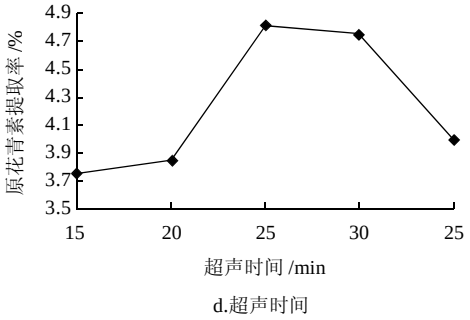
a.乙醇体积分数



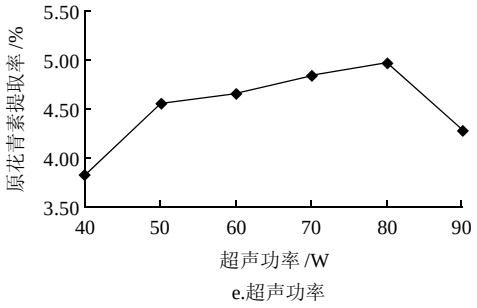
b.料液比



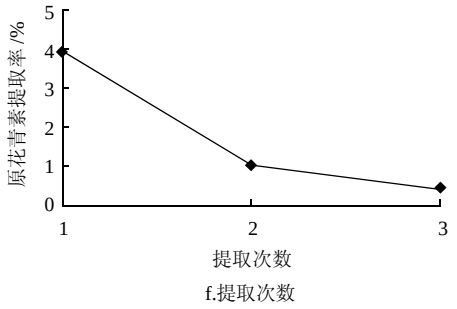
c.超声温度



d.超声时间



e.超声功率



f.提取次数

图3 各因素对超声波辅助提取葡萄籽中原花青素的影响

Fig.3 Effects of various ultrasonic-assisted extraction parameters on extraction rate of proanthocyanidins

2.3.1 乙醇体积分数对提取率的影响

如图3a所示，原花青素的提取率随着乙醇体积分数的增加而增加，乙醇体积分数达到60%时，原花青素的提取率最高达到2.61%，之后随着乙醇体积分数增加，原花青素的提取率下降。其原因可能是：当乙醇体积分数较高时，溶出的醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分增加，它们同原花青素竞争与乙醇-水分子结合，同时植物组织的通透性下降，都会导致原花青素的提取率降低。因此，确定60%为最佳乙醇体积分数。

2.3.2 料液比对提取率的影响

如图3b所示，随着提取液的增加，原花青素的提取率增大，但达到一定程度后，再增大料液比，提取率趋于稳定。这是因为溶剂用量达到一定程度后，葡萄籽中原花青素已经基本全部溶出，再增加溶剂的用量不仅造成不必要的浪费，而且还给后续加工增加麻烦。因此，提取液的用量不宜太大，故选择1:30作为最佳料液比。

2.3.3 超声温度对提取率的影响

原花青素的提取率与提取温度密切相关，一般来说，冷提杂质少；热提效率高，但是杂质也相对较多。确定一个适宜的温度不仅可以增加提取率，而且还有利于原花青素的纯化。如图3c所示，随着温度的升高，原花青素的提取率也随之增加，但当超过一定值后，随着温度的升高，提取率却有所下降。这是因为原花青素热稳定性较差，过高的温度不仅会使原花青素发生聚合氧化，而且会使提取的杂质含量增加。因此，选择45℃为最佳提取温度。

2.3.4 超声时间对提取率的影响

如图3d所示，随着超声波处理时间的延长，原花青素的提取率逐渐提高，但当超过25min时，原花青素的提取率有所下降。这主要是因为原花青素长时间受热部分结构被破坏，造成提取率下降。因此，选择25min作为最佳提取时间。

2.3.5 超声功率对提取率的影响

如图3e所示，超声波功率增加，原花青素的提取率也增加，在达到80W后，原花青素的提取率反而下降。功率增大有利于原花青素的提取，但是功率过大则会产生大量的热量使得原花青素的结构被破坏。

2.3.6 提取次数对提取率的影响

考虑到葡萄籽经一次提取，其中的有效成分不会提取完全，采用同样的步骤，对一定量的葡萄籽进行多次提取实验，由图3f可知：3次提取时，原花青素提取率很低，从工作量、生产成本等因素考虑，两次提取较为合理。

2.3.7 葡萄籽中原花青素超声波提取正交试验

表5 超声波辅助提取葡萄籽中原花青素正交试验因素水平

Table 5 Factors and their coded levels in orthogonal array design for optimizing ultraonic-assisted proanthocyanidins extraction

水平	因素			
	*A*乙醇体积分数/%	*B*料液比(g/mL)	*C*超声时间/min	*D*超声波功率/W
1	50	1:25	20	70
2	60	1:30	25	80
3	70	1:35	30	90

表6 超声波辅助提取原花青素的正交试验设计及结果(*n*=3)

Table 6 Orthogonal array design and corresponding experimental results for optimizing ultrasonic-assisted proanthocyanidins extraction (*n*=3)

试验号	*A*	*B*	*C*	*D*	原花青素提取率/%
1	1	1	1	1	3.93
2	1	2	2	2	4.76
3	1	3	3	3	5.21
4	2	1	2	3	4.30
5	2	2	3	1	4.72
6	2	3	1	2	4.56
7	3	1	3	2	4.75
8	3	2	1	3	4.23
9	3	3	2	1	4.45
K_1	139.074	129.777	127.299	131.232	
K_2	135.783	137.052	135.291	140.730	
K_3	134.484	142.509	146.748	137.379	
k_1	46.358	43.259	42.433	43.744	
k_2	45.261	45.684	45.097	46.910	
k_3	44.828	47.503	48.916	45.793	
极差	1.530	4.244	6.483	3.166	
优水平	A_1	B_3	C_3	D_2	

根据单因素试验结果，可以得出原花青素提取率的主要影响因素为乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声功率。超声温度影响较小，不予考虑，选定温度45℃。在两次提取的情况下，以乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声功率4因素进行正交试验，选择$L_9(3^4)$正交表进行试验，因素水平见表5。

由表6可知：影响原花青素提取效果各因素为超声时间＞料液比＞超声波功率＞乙醇体积分数；得出最佳提取条件组合为$A_1B_3C_3D_2$，即乙醇体积分数50%、料液比1:35、超声时间30min、超声波功率80W。在最佳条件下进行验证实验，原花青素提取率为5.57%，高于各试验组，说明正交试验优化结果可靠。

3 结 论

通过比较微波、纤维素酶和超声波辅助提取葡萄籽中原花青素的提取工艺，发现微波辅助提取优于其他两种方法。从提取时间来看，微波法能明显缩短提取时间，提取时间远小于其他两种方法，微波提取仅需40s，而其他两种方法都需时间较长；从原花青素提取率来看，微波法与纤维素酶法、超声波法相比，分别提高22.3%、92.1%。综合以上因素，葡萄籽中原花青素最佳方法为微波法，最优工艺为乙醇体积分数80%、料液比1:25、微波时间40s、微波功率115W，原花青素提取率为10.70%。

本研究为葡萄籽中原花青素的提取与开发利用提供了实验依据，为葡萄籽中原花青素的开发利用提供了参考。

参 考 文 献：

[1] 温钢, 李立群, 隋新. 葡萄籽中低聚原花青素的提取研究[J]. 中国酿造, 2010(1): 111-113.

[2] YAHARA N, TOFANI I, MAKI K, et al. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005, 5(2): 162-169.

[3] 丰佃娟, 徐贵发. 葡萄籽提取物对人体抗氧化能力的影响[J]. 山东大学学报: 医学版, 2007, 45(10): 985-987.

[4] SHARMA S D, KATIYAR S K. Dietary grape-seed proanthocyanidin inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(1): 95-102.

[5] DA SILVA J M R, RIGAUD J, CHEYNIER V, et al. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds[J]. Phytochemistry, 1991, 30(4): 1259-1264.

[6] LI Xiaoli, CAI Yongqing, QIN Hong, et al. Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis[J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2008, 86(12): 841-849.

[7] 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.

[8] 王四维, 蒋蕴珍, 陈志华. 葡萄籽的综合开发与利用[J]. 粮油食品科技, 2008, 16(1): 39-41.

[9] JACOB J, CHIA L H L. Review thermal and non- thermal interaction of microwace radiat ion with materials[J]. Journal of Materials Science, 1995(30): 5321-5327.

[10] 李凤英, 崔蕊静, 李春华. 采用微波辅助法提取葡萄籽中的原花青素[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 39-42.

[11] 白光辉, 张辉, 王克亮, 等. 微波场作用下原花青素浸提工艺研究[J]. 应用化工, 2006, 35(9): 685-687.

[12] 李雅晶, 黄美珍, 胡福良. 均匀设计法优化超声波提取蜂胶精油工艺条件的研究[J]. 农产品加工, 2011(2): 60-61.

[13] 钟振声, 冯焱, 孙立杰. 超声波法从葡萄籽中提取原花青素[J]. 精细化工, 2005, 23(1): 41-43.

[14] 李瑞丽, 乔五忠, 王艳辉, 等. 葡萄籽原花青素的超声提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(2): 64-66.

[15] 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.

[16] 汪志慧, 孙智达, 谢笔钧. 响应曲面法优化双酶法提取莲房原花青素[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 64-68.

[17] 孙芸, 古文英. 硫酸－香草醛法测定葡萄籽中原花青素含量[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(9): 43-46.