

壳聚糖絮凝—盐诱导双水相萃取分离 红葡萄籽中原花青素

Chitosan-based flocculation and salt induced aqueous two-phase
extraction of procyanidins from red grape seeds

张喜峰^{1,2} 何 倩¹ 张 斌¹ 王明卉¹ 罗光宏^{3,4}

ZHANG Xi-feng^{1,2} HE Qian¹ ZHANG Bin¹ WANG Ming-hui¹ LUO Guang-hong^{3,4}

(1. 河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室,
甘肃 张掖 734000; 3. 河西学院凯源生物技术开发中心, 甘肃 张掖 734000;
4. 甘肃省微藻工程技术研究中心, 甘肃 张掖 734000)

(1.College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;
2. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Zhangye, Gansu 734000, China;
3. Kaiyuan Biotednology Development Center, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;
4. Research Center of Gansu Province Microalgae Engineering, Zhangye, Gansu 734000, China)

摘要:以原花青素回收率为主要考察指标,通过正交试验确定壳聚糖絮凝纯化的最佳条件;通过研究盐诱导(盐的种类和浓度)双水相体系对红葡萄籽中原花青素萃取效果,建立盐诱导双水相萃取最佳条件。结果表明:在 20 mL 原花青素提取液中,壳聚糖的加入量 2 mL、絮凝温度 35 ℃、提取液 pH 4 时,葡萄籽原花青素回收率为 95.62%;盐诱导双水相萃取分离絮凝后原花青素提取液结果表明,加入 K₂HPO₄ 诱导双水相萃取原花青素效果较好,在 2 mL 絮凝后原花青素提取液中,K₂HPO₄ 加入量为 0.5 g 时,原花青素萃取率和分配系数分别为 87.2% 和 1.97。

关键词:葡萄籽;原花青素;壳聚糖;盐诱导双水相

Abstract: According to the recovery rate of procyanidins, the purification process of procyanidins from red grape seeds by chitosan flocculation was optimized by orthogonal test. After procyanidins in the ethanol aqueous extract solution of red grape seeds was separated into two phases by salts, the partition characteristics of it in two phases were studied. Chitosan flocculation was investigated, and the results were as follows. The optimum flocculation was obtained using 2 mL of chitosan with 20 mL ethanol solution of procyanidins at 35 ℃ and pH 4. The recovery rate of procyanidins reached to

95.62%. Then, the salts inducing aqueous two-phase extraction systems were used to further investigate extraction of procyanidins from the pretreated ethanol solution. The results showed that K₂HPO₄ could be used as a good inducer in ethanol aqueous solution. during the inducing separation phase. When 0.5 g K₂HPO₄ was added into ethanol solution of procyanidins (volume 2 mL), the partition coefficient and recovery of procyanidins reached to 1.97 and 87.2% respectively.

Keywords: grape seeds; procyanidins; chitosan; salt induced aqueous two-phase

在葡萄酒酿造过程中,会产生大量葡萄皮渣废弃物,基本作为饲料和肥料处理,附加值较低。原花青素是葡萄籽中多酚类化合物之一,具有良好抑制癌细胞、护肝、抗氧化、提高免疫力等作用^[1],已得到国内外研究人员充分肯定^[2-3]。目前,制备的葡萄籽原花青素仅为粗提物,只能作为粗品低价销售。因此,对葡萄籽中原花青素分离方法进行研究,可为葡萄籽产品开发及深加工和延长葡萄酒产业链提供技术支持。

国内外研究原花青素提取方法有超声波辅助提取法^[4]、微波辅助提取法^[5]、水提醇沉法^[6]、双酶法^[1]、超临界萃取法^[7]、高压水提法^[8]等。这些方法均存在一些不足,如超声波辅助提取法可能对部分活性物质有影响;微波辅助提取法由于其高效加热方式使有机溶剂挥发较多,且活性成分结构易受到破坏;水提醇沉法工艺提取率低,成本较高;双酶法影响反应速率和产物纯度;超临界萃取法、高压水提法设备投资大、能耗高;壳聚糖是甲壳素的脱乙酰化产物,是一种优良

基金项目:甘肃省中小企业创新基金项目(编号:1047GCCG001);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201510740005)
作者简介:张喜峰,男,河西学院讲师,硕士。
通讯作者:罗光宏(1965—),男,河西学院教授,硕士。
E-mail:luoguanghong@163.com
收稿日期:2015—12—01

的絮凝剂,可对提取液中不稳定胶粒或悬浊液进行絮凝除杂净化,絮凝后对提取液中其它活性成分不受影响,因此,在医药、环保、食品领域具有广泛应用前景^[9-10];盐诱导双水相萃取技术是基于盐析作用形成的两相,适于极性化合物的萃取分离;壳聚糖絮凝和盐诱导双水相萃取技术具有传质速度快、容易放大、环境友好、能耗低等优点。

目前对葡萄籽原花青素壳聚糖絮凝纯化的研究未见报道。笔者^[11]在前期已对超声辅助双水相萃取葡萄籽原花青素进行了分析,但萃取后原花青素中仍含有其它活性成分,增加了分离纯化难度。本研究拟以原花青素回收率为考查指标,通过单因素及正交试验确立壳聚糖絮凝除杂的最佳条件,并对葡萄籽醇提取中原花青素在盐诱导相分离后的分配行为进行分析,以期为进一步扩展葡萄籽原花青素研究范围提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与仪器

红葡萄籽:取自甘肃滨河食品工业集团葡萄酒下脚料,经挑选、清洗、阴干、粉碎备用;

儿茶素标准品:纯度≥99.8%,上海源叶生物科技有限公司;

食品级壳聚糖:脱乙酰度≥95%,青岛潜光生物工程有限公司;

香草醛:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

甲醇、无水乙醇:分析纯,天津市光复科技发展有限公司;

微型植物试样粉碎机:FZ102型,河北省黄骅市中兴仪器有限公司;

电子天平:PL203型,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;

可见分光光度计:722型,上海光谱仪器有限公司;

立式大容量离心机:DD-5M,湖南凯达科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 壳聚糖絮凝剂的制备 称取1 g壳聚糖,加入1%乙酸溶液90 mL,充分溶解后,用1%乙酸定容至100 mL,即得1%壳聚糖溶液^[12]。

1.2.2 葡萄籽原花青素粗提液制备 称取一定量的葡萄籽粉末,按照1:15(g/mL)比例加入体积分数为50%的乙醇溶液,在30℃超声提取10 min,2 000 r/min离心5 min,取上清液储存于4℃备用。

1.2.3 壳聚糖絮凝过程 量取20 mL原花青素提取液,分别改变壳聚糖加入量、絮凝温度、pH值,50 r/min搅拌15 min后静置5 h,2 000 r/min离心5 min,采用香草醛—浓盐酸法^[11]测定上清液中原花青素含量,并按式(1)计算原花青素回收率。

$$R = \frac{F_2}{F_1} \times 100\%,$$

(1)

式中:

R——原花青素回收率,%;

F_1 ——絮凝前原花青素的质量,mg;

F_2 ——絮凝后原花青素的质量,mg。

1.2.4 单因素试验 选择壳聚糖加入量、絮凝温度、pH值3个因素,考察其对葡萄籽原花青素絮凝的影响,确定各因素对原花青素纯化效果的影响。

(1) 壳聚糖加入量的影响:取5份20 mL pH 6原花青素提取液,分别加入1%壳聚糖1,2,3,4,5 mL,在25℃以50 r/min搅拌15 min,静置5 h,按照1.2.3计算方法,考察壳聚糖加入量对原花青素回收率的影响。

(2) 絮凝温度的影响:取5份20 mL pH 6原花青素提取液,加入1%壳聚糖2 mL,设定温度分别为25,30,35,40,45℃条件下,50 r/min搅拌15 min,静置5 h,按照1.2.3计算方法,考察温度对原花青素回收率的影响。

(3) 提取液pH的影响:取5份20 mL原花青素提取液,采用1 mol/L HCl和NaOH调节pH分别为3,4,5,6,7,加入1%壳聚糖2 mL,在35℃以50 r/min搅拌15 min,静置5 h,按照1.2.3计算方法,考察提取液pH对原花青素回收率的影响。

1.2.5 正交试验设计 在单因素试验基础上,选取壳聚糖加入量、絮凝温度、提取液pH3个因素进行正交试验设计,以原花青素回收率为指标,优化壳聚糖絮凝除杂工艺。

1.2.6 盐诱导双水相萃取 取2 mL絮凝后原花青素提取液,分别考察盐的种类和浓度诱导双水相体系对原花青素分离纯化效果的影响。

(1) 不同种类的盐诱导双水相对絮凝后原花青素萃取效果影响:取絮凝后醇提液各2 mL于10 mL刻度离心管中,分别加入0.3 g (NH₄)₂SO₄、NaCl、K₂HPO₄、MgCl₂,充分混匀后,静置10 min,得到上下两相,测定上下两相原花青素浓度,分别读取相体积,根据式(2)、(3)计算原花青素分配系数和萃取率。

$$K = \frac{C_t}{C_d},$$

(2)

$$Y = \frac{M_t}{M} \times 100\%,$$

(3)

式中:

K——分配系数;

C_t ——双水相萃取时上相中原花青素的浓度,mg/mL;

C_d ——双水相萃取时下相中原花青素的浓度,mg/mL;

Y——萃取率,%;

M_t ——上相中原花青素质量,mg;

M——2 mL絮凝后原花青素提取液质量,mg。

(2) K₂HPO₄加入量对絮凝后原花青素双水相萃取效果影响:取絮凝后醇提液各2 mL于10 mL刻度离心管中,分别加入0.1,0.3,0.5,0.7,0.9 g K₂HPO₄,充分混匀后,静置10 min,得到上下两相,测定上下相原花青素浓度,读取上下相体积,按照1.2.6(1)中公式计算原花青素分配系数和萃取率。

1.2.7 数据处理 使用Excel 2003和DPS 6.55软件对单因素和正交试验数据进行处理,每个试验均重复3次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 壳聚糖的加入量对原花青素回收率的影响 由图 1 可知,葡萄籽醇提液中原花青素回收率随壳聚糖加入量变化先增大后减小,当壳聚糖加入量为 2 mL 时,原花青素回收率达到最大值,而壳聚糖加入量继续增大时,原花青素的回收率呈下降的趋势。原因可能是壳聚糖加入较少时,壳聚糖与醇提液中蛋白质、单宁等杂质接触概率小,静电引力、氢键、范德华力作用不充分,絮凝效果不好;壳聚糖加入量过多时,醇提液中吸附的物质的量也增加,可能将有效成分原花青素也形成絮凝团沉淀、包裹^[12],导致原花青素回收率下降。因此,选择壳聚糖的加入量为 2 mL。

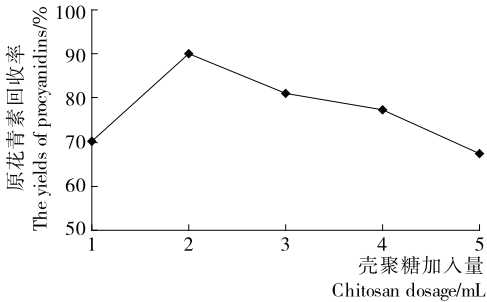


图 1 絮凝剂的加入量对原花青素回收率的影响
Figure 1 The effect of chitosan dosage on yields of procyanidins

2.1.2 絮凝温度对原花青素回收率的影响 由图 2 可知,当温度为 25~35 ℃时,原花青素回收率随着温度的增加而增加,超过 35 ℃后,原花青素回收率逐渐下降。说明温度较低时,醇提液中胶粒能量较少,热运动速度较慢,杂质不能被有效除去;温度过高时,醇提物中原花青素、蛋白质、单宁与壳聚糖之间接触几率增加^[13],加速了絮凝沉淀,使原花青素回收率也降低。因此,选择絮凝温度为 35 ℃。

2.1.3 pH 对原花青素回收率的影响 由图 3 可知,当 pH 在 3~4 时,原花青素的回收率随着 pH 增大而上升,pH 在 4~7 时,絮凝率随 pH 增大而降低。这是因为当醇提液的 pH 过低时,醇提液中胶粒带有正电荷,与带正电荷壳聚糖之间静电斥力较强,导致壳聚糖絮凝除杂效果较差;但 pH 过高时,醇提液中胶粒带有负电荷与带正电荷壳聚糖之间电中和作用加强,使双电层受到压缩而变薄^[14],影响了絮凝作用的发生。因此,选择体系 pH 为 4。

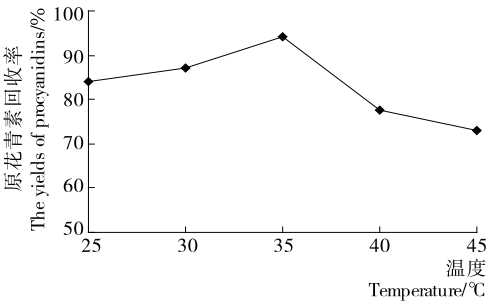


图 2 絮凝温度对原花青素回收率的影响
Figure 2 The effect of flocculation temperature on yields of procyanidins

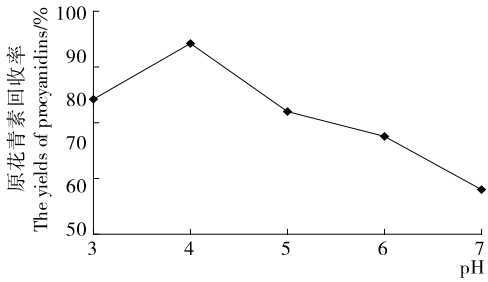


图 3 pH 对原花青素回收率的影响
Figure 3 The effect of pH on yields of procyanidins

2.2 正交试验优化原花青素絮凝条件

在单因素试验的基础上,设置 3 因素 3 水平正交试验(表 1),确定葡萄籽中原花青素絮凝优化工艺的最佳试验条件,试验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 正交试验因素水平表			
Table 1 The factors and levels table of orthogonal experiment			
水平	A 壳聚糖加入量/mL	B 絮凝温度/℃	C pH
1	1	30	3
2	2	35	4
3	3	40	5

表 2 正交试验结果					
Table 2 The result of orthogonal experiment					
试验号	A	B	C	D(空白)	原花青素回收率/%
1	1	1	1	1	85.2
2	1	2	2	2	92.3
3	1	3	3	3	90.1
4	2	1	2	3	93.5
5	2	2	3	1	95.6
6	2	3	1	2	89.2
7	3	1	3	2	76.2
8	3	2	1	3	80.1
9	3	3	2	1	82.1
K ₁	267.6	254.9	254.5	262.9	
K ₂	278.3	268.0	267.9	257.7	
K ₃	238.4	261.4	261.9	263.7	
R	39.9	13.1	13.4	6.0	

表 3 方差分析表					
Table 3 Variance analysis					
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	284.348 9	2	142.174 4	40.187 5	0.024 3
B	28.602 2	2	14.301 1	4.042 4	0.198 3
C	30.035 6	2	15.017 8	4.245 0	0.190 7
D	7.075 6	2	3.537 8		
误差	7.075 6	2	3.537 8		
总和	350.062 2				

由表 2、3 可知,各因素对原花青素回收率的影响次序为 A(壳聚糖加入量)>C(pH)>B(絮凝温度),壳聚糖加入量对葡萄籽原花青素絮凝的影响显著,其它因素影响不显著;最佳工艺条件为 A₂B₂C₂,即:壳聚糖加入量 2 mL,絮凝温度 35 ℃,pH 为 4。按照上述条件再次进行 3 次平行验证实验,原花青素平均回收率为 95.62%。

2.3 盐诱导双水相体系选择

2.3.1 不同种类盐诱导双水相对絮凝后原花青素萃取效果影响 由图 4 可知,不同种类的盐诱导原花青素萃取效果不同,K₂HPO₄诱导双水相体系对原花青素有较高萃取率和分配系数。因此,选择盐的种类为 K₂HPO₄。

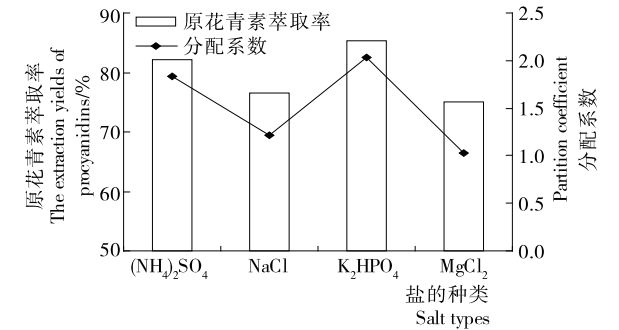


图 4 不同种类盐对原花青素分配效果影响
Figure 4 Effects of the types of salts on the partition characteristics of procyanidins

2.3.2 K₂HPO₄加入量对絮凝后原花青素双水相萃取效果影响 由图 5 可知,当 K₂HPO₄加入量为 0.1 g 时,未形成双水相,可能是盐太少时无法去争夺水分子;适当增加 K₂HPO₄加入量,盐分子将醇提液中水分子吸引过来的能量增加,从而促进相的分离,使萃取率和分配系数都在增加;但当 K₂HPO₄加入量过大时,会导致盐析现象出现,使原花青素萃取率和分配系数下降。因此,确定 K₂HPO₄加入量为 0.5 g。

3 结论

采用壳聚糖对红葡萄籽醇提液中原花青素进行絮凝,通过单因素和正交试验对絮凝工艺条件进行了研究。结果表明:取 pH 为 4 的醇提液 20 mL,加入 1% 壳聚糖 2 mL,在 35 ℃ 以 50 r/min 搅拌 15 min,静置 5 h 时,原花青素回收效

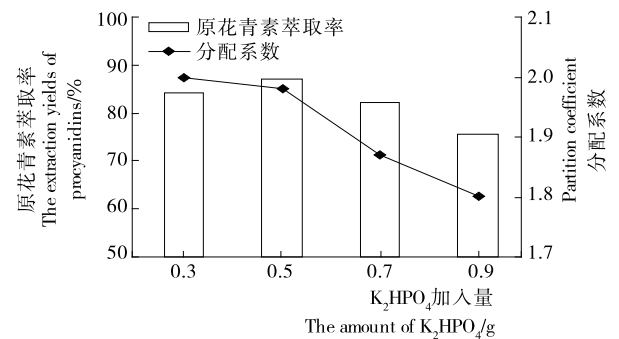


图 5 K₂HPO₄加入量对原花青素分配效果影响
Figure 5 Effects of the additive of amount K₂HPO₄ on the partition characteristics of procyanidins

果较好,且壳聚糖加入量对原花青素回收效果影响最大,其次是提取液 pH,絮凝温度影响最小。在此条件下,原花青素的回收率为 95.62%;将絮凝后上清液加入不同种类盐构成双水相体系,对体系中原花青素进行萃取。结果表明,絮凝后上清液加入 K₂HPO₄诱导双水相萃取原花青素效果较好,在 2 mL 絮凝后原花青素提取液中,当 K₂HPO₄加入量为 0.5 g 时,其萃取率和分配系数分别为 87.2% 和 1.97。絮凝和诱导双水相萃取技术具有容易放大、处理容量大、回收率高、能耗低的优点,将两者技术耦合可为其它天然产物中活性成分萃取分离提供参考依据。但絮凝结合诱导双水相体系获得的原花青素抗氧化性能还有待进一步分析研究。

参考文献

[1] Xu Chang-mou, Yagiz Y, Borejsza-Wysocki W, et al. Enzyme release of phenolics from muscadine grape (*Vitis rotundifolia Michx.*) skins and seeds[J]. Food Chemistry, 2014, 157: 20-29.

[2] 樊金玲, 罗磊, 武涛, 等. 沙棘籽原花色素与葡萄籽原花青素抗氧化活性的比较[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 26-30.

[3] 涂佳, 邓学良, 周文化, 等. 野生毛葡萄常规营养成分和原花青素含量分析[J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 82-85.

[4] Liaid A, Barbero G F, Azaroual L, et al. Stability of anthocyanins from red grape skins under pressurized liquid extraction and ultrasound-assisted extraction conditions[J]. Molecules, 2014, 19(12): 21 034-21 043.

[5] Pedroza M A, Amendola D, Maggi L, et al. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from dried waste grape skins[J]. International Journal of Food Engineering, 2015, 11(3): 359-370.

[6] Gambutti A, Capuano R, Lecce L, et al. Extraction of phenolic compounds from 'Aglianico' and 'Uva di Troia' grape skins and seeds in model solutions: Influence of ethanol and maceration time[J]. VITIS-Journal of Grapevine Research, 2009, 48(4): 193-200.

[7] Chafer A, Pascual-Marti M C, Salvador A, et al. Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin[J]. Journal of Separation Science, 2005, 28(16): 2 050-2 056.

[8] Corrales M, Garcia A F, Butz P, et al. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 90(4): 415-421.

[9] 吴慧清, 吴清平, 张菊梅, 等. 壳聚糖复合防腐剂对新鲜猪肉冷藏的保鲜效果[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 211-213.

[10] 刘婧, 胡长鹰, 曾少甫, 等. 壳聚糖/尼泊金酯共混膜的制备及性能研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 131-136.

[11] 张喜峰, 李彩霞, 张瑾, 等. 超声集成双水相体系提取葡萄籽中的原花青素[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(4): 444-449.

[12] Lertsutthiwong P, Sutti S, Powtongsook S. Optimization of chitosan flocculation for phytoplankton removal in shrimp culture ponds[J]. Aquacultural Engineering, 2009, 41(3): 188-193.

[13] Divakaran R, Pillai V N S. Flocculation of algae using chitosan [J]. Journal of Applied Phycology, 2002, 14(5): 419-422.

[14] Zhu Yan, Dunford N T, Goad C. Effect of processing parameters on flocculation of *Picochlorum oklahomensis*[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2014, 91(2): 317-324.