

柿果多酚提取工艺优化

周 舟¹, 曾建国¹, 彭 淼², 钟晓红^{1,*}, 李良导², 刘 婷¹

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学东方科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 采用单因素试验设计, 研究乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取温度 4 个因素对柿果总酚及缩合多酚超声提取效果的影响, 并采用正交试验设计对提取工艺进行优化。结果表明影响因素对提取效率影响顺序为: 乙醇体积分数>料液比>提取时间>提取温度。最佳提取条件为: 乙醇体积分数 90%、料液比 1:40(g/mL)、时间 30min、提取温度 40℃, 在此条件下进行验证实验, 总酚提取率为 2.061%。

关键词: 柿; 果实多酚; 缩合多酚; 提取

Optimization of Extraction Process for Polyphenols from Persimmon Fruits

ZHOU Zhou¹, ZENG Jian-guo¹, PENG Miao², ZHONG Xiao-hong^{1,*}, LI Liang-dao², LIU Ting¹

(1. College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Orient Science and Technology College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Solvent extraction was used to extract polyphenols from persimmon fruits in this study. Among three organic solvent investigated, ethanol was found to be the most suitable solvent for extracting total polyphenols and condensed polyphenols from persimmon fruits. The following investigations were carried out to explore the effects of ethanol concentration, material-to-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on total polyphenol yield and to optimize the four process conditions by one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods. Ethanol concentration was identified as the most important factor that affects total polyphenol yield followed by material-to-liquid ratio, extraction time and extraction temperature. The optimal extraction conditions for achieving both higher yields of total polyphenols and condensed polyphenols from persimmon fruits were ethanol concentration of 90%, material-to-liquid ratio of 1:40, extraction time of 30 min and extraction temperature of 40 °C. Under the optimal extraction conditions, the extraction rate of total polyphenols was up to 2.061%.

Key words: persimmon; total polyphenols; condensed polyphenols; extraction

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0117-04

柿(*Diospyros kaki* L.), 为柿树科柿属植物, 世界上柿科植物有 *Diospyros* L.、*Euclea* L.、*Lissocarpa* Benth. 3 个属共 500 余种^[1]。柿原产于我国长江流域, 我国也是世界上最大的柿树种植国。果实营养丰富, 风味独特, 具有很高的食用和经济价值及医疗保健效果, 历来深受人们的喜爱^[2-3]。我国柿品种繁多, 一般根据柿果涩味的差别, 将柿品种分为完全涩柿(pollination content astring, PCA), 不完全涩柿(pollination variant astringent, PVA), 不完全甜柿(pollination variant nonastringent, PVNA)和完全甜柿(pollination content nonastringent, PCNA), 其中涩柿类品种柿果采收后有涩味, 需人工脱涩后方可食用, 我国所产的品种多属涩柿类^[4]。研究表明, 柿果中含有大量的多酚类物质,

且柿果中的多酚主要为缩合多酚, 具有抑制人淋巴细胞白血病、降血压、抗氧化性、清除自由基以及抑制蛇毒等多种功能^[5-9]。目前, 对柿的研究主要集中在柿树栽培、柿果脱涩及贮藏等方面, 对于柿果多酚的提取和综合利用的研究还比较少。本实验根据单因素试验设计和正交试验设计对柿果多酚超声辅助提取进行优化, 以期对柿果多酚的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试品种为长沙牛心柿, 2010 年 7 月采自湖南农业大学果园, 于柿树朝阴、阳面, 树冠内外以及树干高低处采集发育正常的柿果; 福林酚试剂、原花青素标准

收稿日期: 2010-11-26

作者简介: 周舟(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物高值化利用。E-mail: 121372@163.com

* 通信作者: 钟晓红(1961—), 女, 教授, 博士, 研究方向为园艺和中药资源开发与利用。E-mail: xh-zhong@163.com

品 美国 Sigma 公司; 没食子酸、香草醛、无水碳酸钠、乙醇、丙酮、甲醇、盐酸。

U-3310 紫外可见分光光度计 日本 Hitachi 公司; 组织捣碎匀浆机 上海帅佳电子科技有限公司; 超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取溶剂的选择

对乙醇、甲醇和丙酮 3 种溶剂提取时柿果中总酚和缩合多酚的提取效果进行考察, 以确定合适的提取溶剂。采用 50%、60%、70%、80%、90% 体积分数对 3 种溶剂进行对比分析。

1.2.2 单因素试验

选取料液比(柿果鲜质量与不同乙醇体积分数之比, g/mL)、提取时间和提取温度 3 个可能影响提取效果的因素, 以总酚和缩合多酚含量为检测指标进行单因素试验, 以确定相关因素及各因素的适宜范围。各因素水平如下: 料液比 1:15、1:20、1:25、1:30; 超声时间 10、20、30、40min; 超声温度 30、40、50、60℃。

1.2.3 柿果多酚提取正交试验

根据溶剂选择实验以及单因素试验确定的范围, 选定乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取温度 4 个主要影响因素进行正交试验以确定最佳提取工艺条件, 正交试验设计见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels in orthogonal array design

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 料液比(g/mL)	C 超声时间/min	D 超声温度/℃
1	70	1:20	20	30
2	80	1:30	30	40
3	90	1:40	40	50

1.2.4 提取方法

将柿青果淋洗晾干, 切块, 去皮后在捣碎机中捣碎后备用, 准确称取 2.5g, 按照单因素和正交试验中设置的不同提取条件分别进行超声辅助提取。收集各个提取条件下得到的提取液, 抽滤得滤液, 减压浓缩, 浓缩液用提取溶剂定容至 100mL 备用, 每个处理重复 3 次。

1.2.5 总酚(total polyphenols, TP)含量的测定

参考文献[10]中的测定方法, 绘制没食子酸标准曲线, 得吸光度(A)与没食子酸标准溶液质量浓度(C, mg/mL)之间的回归方程为 $A=72.371C+0.0364$, $R^2=0.9988$ 。精密量取不同处理条件下制得的样品液 0.1mL 于 10mL 容量瓶中, 定容, 测定其吸光度, 按照标准曲线计算出柿果多酚质量浓度(C, mg/mL), 之后计算出总酚含量。

1.2.6 缩合多酚(condensed polyphenols, CP)含量测定

参考文献[11]中的测定方法, 绘制原花青素标准曲线, 得吸光度(A)与原花青素标准溶液质量浓度(C, mg/mL)之间的回归方程为 $A=8.2600C-0.0268$, $R^2=0.9983$ 。精密量取不同处理条件下制得的样品液 0.1mL 于 10mL 容量瓶中, 定容, 测定其吸光度, 按照标准曲线计算出柿果缩合多酚质量浓度(C, mg/mL), 之后计算出缩合多酚含量。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

常用多酚类物质的提取剂有乙醇、甲醇及丙酮等, 在柿成熟果果肉的提取中发现乙醇作为提取剂时溶出较多的杂质常常使得过滤变得困难, 不利于实验的后续处理, 而甲醇、丙酮的过滤效果较好^[12]。但是通过实验发现, 在柿青果果肉的提取中则过滤比较顺利。柿果去皮后捣碎备用, 同时称取 2.5g, 分别选用 50%、60%、70%、80%、90% 丙酮以及 50%、60%、70%、80%、90% 甲醇溶液和 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇溶液, 按料液比 1:40 于 40℃ 超声提取 30min, 测定总酚以及缩合多酚的含量。

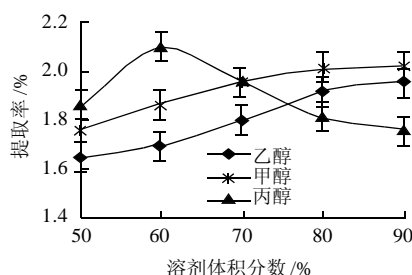


图 1 不同溶剂对总酚提取的影响

Fig.1 Effects of different solvents on extraction rate of total polyphenols

从图 1、2 可以看出, 甲醇的提取效果较其他两种试剂要好, 但是差别不大。与此同时, 由于本研究将被运用到工艺生产中生产日化产品, 考虑到安全因素, 故选定乙醇作为提取溶剂。在以缩合多酚作为考察指标时可以看出乙醇体积分数越高提取效果越好, 最终选定 90% 乙醇溶液作为提取溶剂。

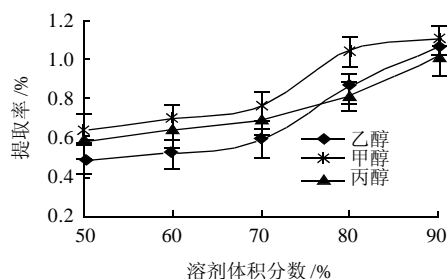


图 2 不同溶剂对缩合多酚提取的影响

Fig.2 Effects of different solvents on extraction rate of condensed polyphenols

2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 料液比对提取效果的影响

称取 2.5g 捣碎后的柿果备用材料, 在相同的实验条件下(以 90% 乙醇作为提取溶剂、超声温度 40℃、超声时间 30min)分别按 1:15、1:20、1:25、1:30 料液比超声提取, 过滤得提取液, 定容后, 测定提取液总酚及其缩合多酚含量(图 3)。结果表明: 总酚和缩合多酚的提取量随着料液比增大而逐渐增大, 至 1:30 时基本达到平衡, 故料液比以 1:30 为宜。

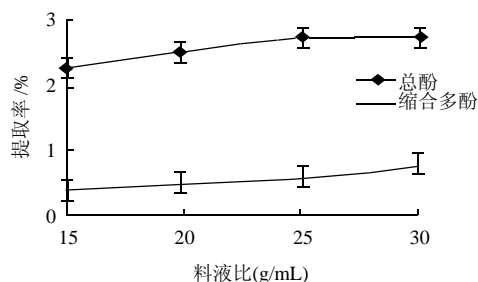


图 3 料液比对总酚和缩合多酚提取的影响

Fig.3 Effect of material-to-liquid ratio on extraction rate of total polyphenols and condensed polyphenols

2.2.2 超声时间对提取效果的影响

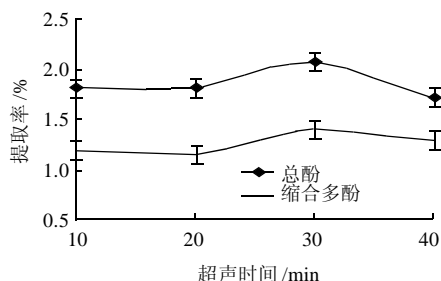


图 4 时间对总酚和缩合多酚提取的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic treatment time on extraction rate of total polyphenols and condensed polyphenols

料液比 1:30, 其他条件同 2.2.1 节, 分别按 10、20、30、40min 超声时间超声提取。过滤提取液, 定容后, 测定提取液总酚及其缩合多酚含量(图 4)。结果表明: 总酚和缩合多酚的提取量随着超声时间的增加逐渐增加, 在超声 30min 时达到最大值, 之后开始下降。故超声时间以 30min 为宜。

2.2.3 超声温度对提取效果的影响

超声时间 30min, 其他条件同 2.2.2 节, 分别在 30、40、50、60℃超声提取。过滤提取液, 定容后, 测定提取液总酚及其缩合多酚含量(图 5)。结果表明: 总酚的提取量随着超声温度的升高在 40℃时达到最大值, 之后逐渐下降。缩合多酚的提取量则是在 50℃时达到最大值才下降。

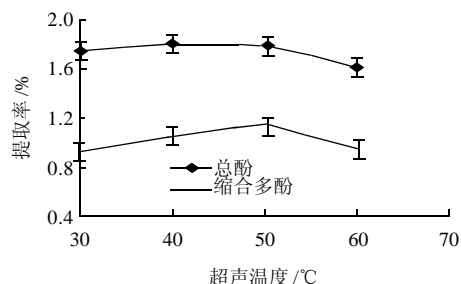


图 5 时间对总酚和缩合多酚提取的影响

Fig.5 Effect of extraction temperature on extraction rate of total polyphenols and condensed polyphenols

2.3 柿果多酚正交试验结果

表 2 柿果多酚提取工艺正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal array design and corresponding experimental results

试验号	因素				TP	CP
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	1.800	0.595
2	1	2	2	2	1.947	0.769
3	1	3	3	3	1.951	0.805
4	2	1	2	3	2.020	0.794
5	2	2	3	1	2.071	0.822
6	2	3	1	2	2.046	1.012
7	3	1	3	2	1.860	1.115
8	3	2	1	3	1.942	1.203
9	3	3	2	1	2.050	1.458
TP	K ₁	5.70	5.68	5.79	5.92	
	K ₂	6.14	5.96	6.02	5.85	Σ=17.687
	K ₃	5.85	6.05	5.88	5.91	
	R	0.44*	0.37*	0.23	0.07	
CP	K ₁	2.17	2.50	2.81	2.88	
	K ₂	2.63	2.79	3.02	2.90	Σ=8.573
	K ₃	3.78	3.28	2.74	2.80	
	R	1.61	0.78	0.28	0.10	

表 3 以缩合多酚为目标产物的正交试验方差分析

Table 3 Variance analysis for extraction rate of condensed polyphenols with various extraction conditions

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	0.46	2	0.23	281.46	**
B	0.10	2	0.05	62.30	*
C	0.01	2	0.01	8.69	
D	0.00	2	0.00	1.00	
误差	0.00	2	0.00		
总和	0.57	8			

注: **.P < 0.01, 表示差异极显著; *.P < 0.05, 表示差异显著。下同。

根据表 2 极差分析可知: 提取总酚的最佳条件为乙醇体积分数 80%、料液比 1:40、时间 30min、提取温度 40℃; 提取缩合多酚的最佳条件为乙醇体积分数 90%、料液比 1:40、时间 30min、提取温度 40℃。两

组数据中极差值最大为 *A*(乙醇体积分数), *B*(料液比)和 *C*(提取时间)次之, *D*(提取温度)最小。说明乙醇体积分数是影响多酚提取效果的主要因素, 料液比和提取时间也有一定的影响, 而提取温度影响较小。由表 3、4 方差分析可知, 以总酚为检测指标时, 乙醇体积分数和料液比有显著影响, 提取时间和提取温度没有显著影响; 以缩合多酚为检测指标时, 乙醇体积分数有极显著影响, 料液比有显著影响, 提取时间和提取温度无显著影响。综合单因素试验以及正交试验结果, 以总酚为主要指标分析其中缩合多酚含量, 选定柿果多酚提取的最佳条件为乙醇体积分数 90%、料液比 1:40、时间 30min、提取温度 40℃。

表 4 以总酚为目标产物的正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis for results of orthogonal experiments of total polyphenol

变异来源	离差平方和	自由度	均分	<i>F</i>	显著性
<i>A</i>	0.03	2	0.02	35.12	*
<i>B</i>	0.02	2	0.01	25.99	*
<i>C</i>	0.01	2	0.00	9.34	
<i>D</i>	0.00	2	0.00	1.00	
误差	0.00	2	0.00		
总和	0.07	8			

3 结 论

通过单因素和正交试验结果分析表明, 本实验选择的 4 个因素对多酚提取的影响差别较大, 顺序为乙醇体积分数>料液比>提取时间>提取温度。其中乙醇体积分数对柿果总酚和缩合多酚的提取影响较大, 而温度影响最小, 而且通过单因素试验可以看出, 温度越高对提取效果越不利, 这可能是由于多酚在高温环境下不稳定导致^[13], 而且当提取温度比较高时, 得到的提取液呈红色, 这应该是由酚类化合物的自缩合反应所致^[6,14];

柿果多酚中以没食子酸为主^[15], 而没食子酸不溶于冷水。因此, 最佳提取条件为 90% 乙醇体积分数、料液比为 1:40、40℃ 超声提取 30min。

参考文献:

- [1] 傍岛善次. 柿和人生[M]. 东京: 明玄书房, 1980: 1445.
- [2] 马丽. 柿树产品的开发利用[J]. 林产化工通讯, 2004, 38(3): 38-40.
- [3] SHELA G, ZOFIA Z, MARIA F, et al. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and Minerals in persimmons and apples[J]. Food Chemistry, 2001, 49(2): 952-957.
- [4] 宗学普. 柿树栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2000: 135-138.
- [5] WU Paiwen, HWANG L S. Determination of soluble persimmon tannin by high performance gel permeation chromatography[J]. Food Research International, 2002, 35(8): 793-800.
- [6] GU Haifeng, LI Chunmei, XU Yujuan, et al. Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp[J]. Food Research International, 2008, 41(2): 208-217.
- [7] AHN H S, JEONA T I, LEEA J Y, et al. Antioxidative activity of persimmon and grape seedextract: *in vitro* and *in vivo*[J]. Nutrition Research, 2002, 22(11): 1265-1273.
- [8] Del BUBBA M, GIORDANI E, PIPPUCCI L, et al. Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments [J]. Food Composition and Analysis, 2009, 22(7/8): 668-677.
- [9] DOWDLE J, ISHIKAWA T, GATZEK S, et al. Two genes in Arabidopsis thaliana encoding GDP-1-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability[J]. The Plant Journal, 2007, 52(4): 673-689.
- [10] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑大豆种质抗氧化能力及其与总酚和花色苷含量的关系[J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1545-1552.
- [11] 李春阳, 许时婴, 王璋, 等. 香草醛-盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 157-162.
- [12] 顾海峰, 李春美, 钟慧臻, 等. 柿子单宁优化提取工艺探讨[J]. 食品科技, 2007, 32(2): 133-136.
- [13] 张东明. 酚酸化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 107-108.
- [14] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 58.
- [15] 费学谦, 周立红, 龚榜初, 等. 不同甘、涩类型柿果实单宁组成的差异及罗田甜柿单宁的特性[J]. 林业科学研究, 1999, 12(4): 369-373.