

微波、酶法双辅助提取葡萄籽原花青素及其抑菌性研究

张兵兵¹, 杨华峰², 陈明舜¹, 皱积赞², 李瑞琴², 张涛¹, 于淑娟¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 新疆海瑞盛生物工程股份有限公司, 新疆巴州 841100)

摘要: 本文以新疆白葡萄籽为研究对象, 利用微波、酶法双辅助提取葡萄籽中原花青素, 并研究其抑菌性。在单因素实验的基础上, 利用 Box-Behnken 原理设计响应面实验, 研究了料液比、微波时间、微波温度及纤维素酶添加量 4 个因素对葡萄籽原花青素提取率的影响, 经过 AB-8 型大孔树脂纯化后, 得到的原花青素纯度为 95.6%, 探究其抑菌性。实验表明, 在微波温度 60 ℃、料液比 1:14.6 (g/mL)、微波时间 9 min、纤维素酶添加量 0.56 mg/mL 的条件下, 得到的原花青素提取率最大为 5.72%。经纯化后的原花青素能有效抑制金黄色葡萄球菌, 抑菌圈直径达 19.2 mm, 最低抑菌浓度 (MIC) 为 2.5 mg/mL, 最低杀菌浓度 (MBC) 为 5 mg/mL。经原花青素作用后的细菌, 细胞膜通透性增加, 细胞壁遭到破坏, 扫描电镜照片显示细菌细胞表面凹陷褶皱, 细胞大小不一。

关键词: 葡萄籽; 酶法; 原花青素; 响应面; 微波; 金黄色葡萄球菌

文章编号: 1673-9078(2017)8-146-154

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.022

Microwave and Enzyme-assisted Extraction of Grape Seed Procyanidins and Study of Their Antibacterial Activity

ZHANG Bing-bing¹, YANG Hua-feng², CHEN Ming-shun¹, ZHOU Ji-yun², LI Rui-qin², ZHANG Tao¹, YU Shu-juan¹

(1. College of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Xinjiang Hai Ruisheng Biological Engineering Co., Ltd, Bazhou 841100, China)

Abstract: Procyanidins of Xinjiang white grape seeds were extracted by microwave and enzyme-assisted treatments for study of their antibacterial activity. Response surface analysis was conducted, using the Box-Behnken design experiment based on the single-factor test, to investigate the influence of four main factors (solid-liquid ratio, microwave time, microwave temperature, and cellulose dosage) on the procyanidin extraction rate. The extracted procyanidin sample was purified (purity 95.6%) using AB-8 macroporous resins. The optimal extraction conditions were as follows: temperature, 60 ℃; solid-liquid ratio, 1:14.6 (g/mL); microwave time, 9 min; and cellulose dosage, 0.56 mg/mL. Under these conditions, the procyanidin extraction yield was 5.72%. The purified procyanidins could effectively inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, with an inhibition zone diameter of 19.2 mm, a minimal inhibitory concentration (MIC) of 2.5 mg/mL, and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 5 mg/mL. After treatment with the procyanidins, the permeability of the bacterial cell membrane was increased and the cell wall was destroyed. Scanning electron microscope images of the procyanidin-treated *S. aureus* showed wrinkled bacterial surfaces and different cell sizes.

Key words: grape seeds; enzyme; procyanidins; response surface methodology; microwave; *Staphylococcus aureus*

原花青素 (Procyanidins, PC) 是植物中广泛存在的一类属于双黄酮衍生物的天然多酚化合物, 有人

收稿日期: 2016-12-13

基金项目: 广东省科技计划项目 (2013B051000015)

作者简介: 张兵兵 (1991-), 男, 硕士, 主要从事原花青素的提取及性质研究

通讯作者: 于淑娟 (1955-), 女, 教授, 主要从事制糖工程、食品科学与工程以及中草药成分修饰的科学技术研究

将其归为生物类黄酮^[1], 也有人将其归为缩合鞣质。这类化合物由不同数量的儿茶素或表儿茶素结合而成, 最简单的是儿茶素、表儿茶素或儿茶素与表儿茶素形成的二聚体, 此外还有三聚体、四聚体等直至十聚体。它具有良好的抗氧化作用, 其清除自由基的能力是维生素 C 的 50 倍, 维生素 E 的 20 倍^[2]。此外, 还具有抗突变、抗心血管疾病、抗癌和延缓衰老等活性^[3,4]。葡萄籽原花青素的提取方法主要有溶剂提取

法、超临界流体萃取法、超声波辅助法,微波辅助提取等^[5-8]。使用传统方法提取原花青素,提取率不高,造成一定的资源浪费,同时,使用微波消解仪可以达到控温的效果,能较好的探究微波温度这一因素对原花青素提取率的影响。

葡萄是世界上经济价值较高的一种果树,又名单龙珠、山葫芦、蒲桃,为葡萄科葡萄属植物。新疆葡萄种植面积占全国的21%,其中酿酒葡萄占全国的19%,新疆现有葡萄酒加工厂近三十家,生产能力在20万t左右,但是葡萄酒加工后的皮渣及葡萄籽的利用还不充分^[9]。葡萄籽中的酚类物质主要是原花青素,其在酸性热醇作用下会产生花青素,包括单体和聚合物^[10]。目前为止,研究者已从葡萄籽和皮中分离、鉴定了16种原花青素,多属于低聚原花青素(OPC)^[11]。

金黄色葡萄球菌是引起细菌性食物中毒的重要病原菌之一,是肉制品和发酵食品主要污染菌^[12]。美国疾病控制中心(CDC)报告显示,由金黄色葡萄球菌引起的疾病感染占第二位,仅仅次于大肠杆菌。金黄色葡萄球菌感染的预防是世界性卫生难题,在美国由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒占细菌性食物中毒的33%,金黄色葡萄球菌引起的食物中毒事件在国内也时有发生。

目前国内对葡萄籽原花青素抑菌效果的研究较少,仅有董晓敏、陈茵茹^[13,14]等人的少许报道,大部分研究集中于对原花青素抗氧化性的研究。本文通过微波、酶法双辅助提取葡萄籽中原花青素,经纯化后探究其抑菌性,通过比较不同浓度原花青素作用后的金黄色葡萄球菌细胞膜通透性、蛋白含量以及电导率变化等,探究葡萄籽原花青素抑菌机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验原料:新疆白葡萄籽,烘干粉碎后备用;USA300金黄色葡萄球菌,中国菌种保藏中心;ATCC-25922大肠杆菌,中国菌种保藏中心;琼脂(批号:20160108)、肉汤培养基(批号:20160808),上海恒远生物科技有限公司等。

实验药品:石油醚(批号:20140801),江苏强盛功能化学股份有限公司;乙醇(批号:20150930),国药集团化学试剂有限公司;甲醇(批号:20160316),天津市富宇精细化工有限公司;香草醛(批号:Q/12HB 3637-2010),天津市科密欧化学试剂有限公司;AB-8型大孔树脂,杭州争光树脂有限公司;碱性磷酸酶试剂盒(批号:20140414),南京建成生物工程研究所;

考马斯亮蓝(分析纯),天津市登科化学试剂有限公司。

1.2 实验仪器

Mars6 型号微波消解仪,美国 CEM 公司;Scientz-18N 型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;FA1104N 型电子分析天平,LEICI/雷磁;TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;101-1 型电热恒温干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;RW20 数显型顶置式机械搅拌器,德国 IKA 公司;高速冷冻离心机,株式会社日立制作所;水平流形超净工作台,南通沪南科学仪器有限公司;电热恒温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 葡萄籽的预处理

预处理:葡萄籽→粉碎→过60目筛→石油醚索氏提取,去脂→干燥,备用。

提取方法:称取干燥后的葡萄籽20g,放入500mL锥形瓶中,依次添加纤维素酶、浓度为50%的乙醇溶液,搅拌浸泡30min后,放入微波消解仪中辅助处理,一定时间后取出冷却,8000r/min条件下高速离心10min,取上清液并测定其吸光度,计算原花青素提取率。

1.3.2 原花青素标准曲线的绘制

香草醛-盐酸法:精确称量香草醛40g,甲醇溶解并定容至1L。配置浓度为50μg/mL、100μg/mL、150μg/mL、200μg/mL和250μg/mL的儿茶素标准溶液,取儿茶素标准溶液1mL,依次加入香草醛-甲醇溶液6mL、浓盐酸3mL,混合均匀后恒温反应15h,以香草醛-甲醇溶液:甲醇:浓盐酸=6:1:3的混合溶液为空白对照,500nm处测吸光度。以儿茶素标准溶液浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制儿茶素标准曲线,得回归方程 $y=0.00119x+0.0106$, $R^2=0.996$ 。

1.3.3 原花青素含量及纯度的测定

$$\text{原花青素提取率}(\%) = \frac{c \times m \times v}{M \times 1000} \times 100\% \quad (1)$$

式中: c 为回归方程得到的浓度(mg/mL); m 为稀释倍数; v 为待测液体积(mL); M 为称取的脱脂葡萄籽质量(g)。

$$\text{原花青素纯度}(\%) = \frac{c \times m \times v}{W \times 1000} \times 100\% \quad (2)$$

式中: c 为回归方程得到的浓度(mg/mL); m 为稀释倍数; v 为待测液体积(mL); W 为冷冻干燥后葡萄籽提取物的质量(g)。

1.3.4 单因素实验及响应面优化

在预实验的基础上,以50%乙醇(分析纯)为提取试剂,选取料液比、微波时间、微波温度和纤维素加入量四个因素对原花青素得率的影响进行单因素试验,以确定最佳提取条件。在单因素试验结果的基础上,以Design-expert 8.06分析软件为辅助手段,根据Box-Behnken 试验设计原理^[15],以原花青素的得率为响应值,设计四因素三水平的响应面分析试验。

表1 响应面分析因子及水平表

Table 1 Factors and levels of the response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 微波温度/°C	50	60	70
B 微波时间/min	7	9	11
C 纤维素添加量/(mg/mL)	0.4	0.6	0.8
D 料液比/(g:mL)	12	14	16

1.3.5 葡萄籽原花青素抑菌性研究

1.3.5.1 牛津杯法细菌敏感性实验

取对数生长期的两种试验菌,液体培养基接种,37 °C条件下培养10 h。用无菌液体培养基将菌液调配成0.5麦氏浊度的菌悬液,进行1:1000比例稀释至含菌量约为 10^5 CFU/mL。取两种菌悬液0.4 mL至平皿中,使菌悬液均匀涂布在固体培养基表面上,将无菌不锈钢小管(牛津杯)放置在培养基上,使其与培养基无空隙接触静置2 min后,向各小管中加入10 mg/mL待测样品溶液200 μ L,每皿做3组平行实验,0.85%无菌氯化钠溶液作为空白对照,37 °C培养18~24 h,观察抑菌效果并用直尺测量抑菌圈直径。

1.3.5.2 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定

取八只试管,采用二倍稀释法配制各种浓度样液(10.0、5.0、2.5、1.25、0.625、0.312及0.156 mg/mL,8号试管不加样液做空白对照),然后各管均加入供试菌液0.05 mL,每个待测样品做3个平行组,另取8只试管不加任何菌液作为空白对照,1%吐温40作为空白,37 °C恒温培养箱中培养24 h后观察,以试管中无细菌生长的最低浓度为该试验样品最低抑菌浓度(MIC)。从无菌生长的各个试管中吸取0.2 mL样液均匀涂布于平板培养基上,37 °C恒温条件下培养24 h,观察。含原花青素量最少并且平板上无菌生长的试管,对应的浓度为原花青素对试验菌种的最低杀菌浓度(MBC)。

1.3.5.3 原花青素对细菌细胞膜通透性的影响

分别将1倍MIC和3倍MIC的原花青素加入到菌悬液中,37 °C、150 r/min摇床培养,以1%吐温40作为阴性对照组,0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、

7 h、8 h测定菌悬液的电导率值,每样重复三次。

1.3.5.4 葡萄籽原花青素对金黄色葡萄球菌细胞壁完整性的影响

分别将1倍MIC和3倍MIC的原花青素加入到菌悬液中,37 °C、150 r/min摇床培养,以1%吐温40作为阴性对照组,0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h和8 h取样。5000 r/min离心10 min,取上清液用碱性磷酸酶试剂盒方法测定碱性磷酸酶(AKP)的含量。

1.3.5.5 原花青素对细菌可溶性蛋白含量的影响

取1.3.5.4方法制备的上清液,采用考马斯亮蓝G-250比色法测定原花青素溶液对细菌可溶性蛋白质含量的影响。

1.3.5.6 用扫描电镜观察原花青素对细菌细胞超微结构的影响

接种对数生长期的菌种至含有含1倍MIC浓度的原花青素的液体培养基中,使培养基中活菌数约为 10^5 CFU/mL,以1%吐温40为阴性对照,37 °C摇床培养6 h后,3000 r/min离心弃上清,按照扫描电镜制备方法制备样品。

1.3.6 数据统计分析

借助Design-expert 8.06分析软件进行响应面统计分析,相关数据及图形均是从软件中得出;抑菌性研究数据分析则使用Origin 8.0软件做图,使用SPSS Statistics 21.0软件进行单因素ANOVA分析, $p < 0.01$ 时为极显著性差异, $p < 0.05$ 时为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 单因素结果及分析

在探究温度对提取率的影响时,得到最佳提取温度为60 °C。随着温度的升高,提取率逐渐上升,当温度超过60 °C时,原花青素得率有下降趋势,在温度达到70 °C以后,原花青素提取率下降尤其明显。这可能由于温度升高,分子运动速率加快,渗透、扩散、溶解速率加快,同时高温可以引起细胞膜结构的变化,使原花青素由葡萄籽的外层细胞转移到溶剂中,但若温度超过某一界线,可能会造成原花青素结构的破坏,同时较高的温度会破坏纤维素酶活性,最终导致提取率下降。

在探究微波时间对提取率影响时,得到最佳微波作用时间是9 min。随着微波时间的延长,提取率快速提高,效果较为明显,这可能是因为微波使分子的热运动加剧,快速将细胞壁破坏,葡萄籽细胞内的原花青素较快地分离浸提出来。随着微波时间的继续延

长, 9 min 后原花青素提取率出现拐点, 提取率下降, 由于大部分原花青素已经被浸提出来, 如果仍继续微波助提, 会破坏已经提取出的原花青素稳定性, 因此选择 9 min 为最佳微波时间。

在探究料液比对提取率影响时, 得到最佳料液比倍数是 14。随着料液比倍数的增加, 原花青素提取率逐步上升, 当料液比超过 14 时, 提取率增幅显著降低, 考虑到生产成本, 选择 14 倍料液比为最佳料液比。

在探究纤维素酶对提取率影响时, 得到最佳纤维素酶加入量是 0.6 mg/mL。纤维素酶的加入明显提高原花青素的提取率, 当纤维素酶添加量达到 0.6 g/L 以后, 提取率反而下降。这是因为纤维素酶催化细胞壁中纤维素水解, 使细胞壁破损, 膜的渗透性增加, 促

进细胞内原花青素的溶出, 而且细胞壁的破损也有利于下一步微波提取, 跟微波助提起到良好的协同作用。但当纤维素酶继续添加时, 原花青素提取率反而下降, 这可能是由于在纤维素酶浓度较低时, 酶与底物充分结合, 随着纤维素酶浓度的提高, 底物与纤维素酶结合未达到饱和状态, 导致纤维素酶的催化作用受到抑制。

2.2 响应面试验优化结果及分析

根据 Design Expert Software 8.06 分析软件设计的微波、酶法双辅助提取葡萄籽原花青素的实验方案与结果见表 2。

表 2 响应面分析方案及实验结果

Table 2 Experimental design and results of RSM analysis

试验号	微波温度(A)	微波时间(B)	纤维素酶添加量(C)	料液比(D)	原花青素提取率/%	预测值	原花青素纯度/%
1	50	7	0.6	14	5.04	5.08	69
2	70	7	0.6	14	4.87	4.86	73
3	50	11	0.6	14	4.76	4.81	66
4	70	11	0.6	14	5.11	5.11	70
5	60	9	0.4	12	5.22	5.1	71
6	60	9	0.8	12	5.06	5	74
7	60	9	0.4	16	5.34	5.45	81
8	60	9	0.8	16	5.04	5.20	71
9	50	9	0.6	12	4.73	4.81	65
10	70	9	0.6	12	4.53	4.73	67
11	50	9	0.6	16	5.22	4.96	76
12	70	9	0.6	16	5.28	5.13	78
13	60	7	0.4	14	5.32	5.28	78
14	60	11	0.4	14	5.41	5.38	80
15	60	7	0.8	14	5.25	5.22	74
16	60	11	0.8	14	5.13	5.1	74
17	50	9	0.4	14	4.76	4.84	68
18	70	9	0.4	14	5.06	5.07	80
19	50	9	0.8	14	4.83	4.85	67
20	70	9	0.8	14	4.77	4.71	71
21	60	7	0.6	12	5.11	5.07	75
22	60	11	0.6	12	5.27	5.22	81
23	60	7	0.6	16	5.43	5.51	79
24	60	11	0.6	16	5.28	5.34	81
25	60	9	0.6	14	5.72	5.72	85
26	60	9	0.6	14	5.68	5.72	83
27	60	9	0.6	14	5.64	5.72	87
28	60	9	0.6	14	5.75	5.72	82
29	60	9	0.6	14	5.83	5.72	84

对上述实验数据进行多元回归分析, 得到原花青素提取率对提取微波温度 (A)、微波时间 (B)、纤维素酶添加量 (C) 及料液比 (D) 的二次多项回归模型:

$$\text{原花青素提取率 (\%)} = 5.72 + 0.023A + 0.0033B - 0.094C + 0.14D + 0.13AB - 0.090AC + 0.065AD - 0.077BC - 0.077BD - 0.035CD - 0.57A^2 - 0.18B^2 - 0.28C^2 - 0.25D^2$$

该二次多项回归方程中各项系数绝对值大小直接反映各因素对响应值的影响程度, 系数的正、负反映影响的方向。由方程的二次项系数为负值, 推断方程代表的抛物面开口向下, 具有极大值点, 可以进行优化分析对该模型进行显著性检验及方差分析以验证此方程的有效性, 结果见下表。

表 3 回归分析结果

Table 3 Results of the regression analysis

方差来源	平方和(SS)	自由度(DF)	均方(MS)	F 值(F)	P 值(P)	显著性
模型	2.94	14	0.21	11.53	<0.0001	**
A	6.53E-03	1	6.53E-03	0.36	0.5588	
B	1.33E-04	1	1.33E-04	7.32E-03	0.933	
C	0.11	1	0.11	5.84	0.0299	*
D	0.23	1	0.23	12.76	0.0031	**
AB	0.068	1	0.068	3.71	0.0746	
AC	0.032	1	0.032	1.78	0.2036	
AD	0.017	1	0.017	0.93	0.3517	
BC	0.024	1	0.024	1.32	0.27	
BD	0.024	1	0.024	1.32	0.27	
CD	4.90E-03	1	4.90E-03	0.27	0.6121	
A ²	2.12	1	2.12	116.53	<0.0001	**
B ²	0.21	1	0.21	11.8	0.004	**
C ²	0.51	1	0.51	28.07	0.0001	**
D ²	0.42	1	0.42	22.84	0.0003	**
残差	0.25	14	0.018			
失拟项	0.23	10	0.023	4.47	0.0808	
纯误差	0.021	4	5.23E-03			
总离差	3.19	28				

注: “**”为极显著水平, 即 $p < 0.01$; “*”为显著水平, 即 $p < 0.05$ 。

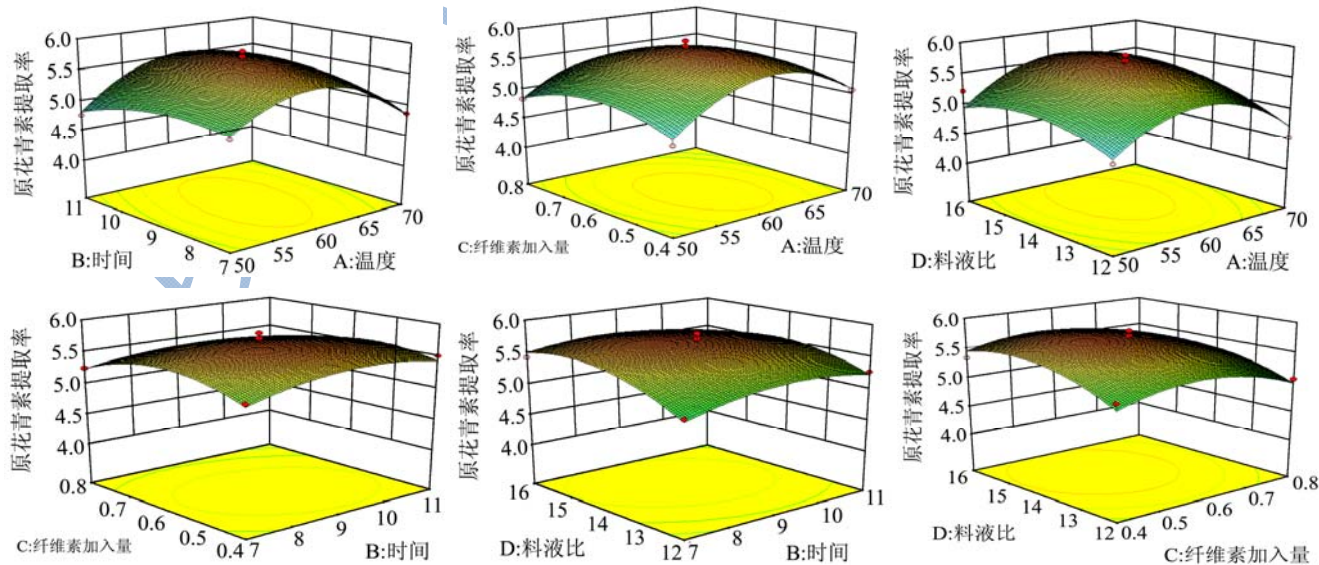


图 1 任意两因素交互作用对提取率影响的响应面

Fig.1 Response surface showing the interaction of any two factors on the extraction ratio

从表 3 可以看出, $p < 0.0001$, 表明模型极显著, 具有统计学意义。方程中温度的二次项、纤维素添加量和料液比的二次项对响应值的影响极显著, 微波时间和料液比的二次项影响也极显著, 纤维素添加量影响显著, 其他因素对响应值的影响不显著。各因素影响程度为料液比 > 纤维素添加量 > 微波温度 > 提取时间。失拟项 $p = 0.0808 > 0.05$, 这对模型是有利的, 失拟度不显著, 因此可用该回归方程代替试验真实点对结果进行分析。校正决定系数 $R^2(\text{adj}) = 0.9202 > 0.80$, 表明该模型能够准确解释 92.02% 的响应值变化, 进一步说明试验有较好的可靠性。

根据回归分析结果做出响应曲面图, 确定提取温度、液料比、乙醇浓度以及超声时间 4 个因素对原花青素提取率的影响, 结果见图 1, 由图可知微波温度和纤维素酶加入量对提取率影响曲面图坡度明显较为陡峭, 尤其温度在 60 °C 附近、纤维素添加量在 0.6 g/L 左右, 原花青素提取率较高。由 Design Expert Software 8.06 软件处理得到最佳提取条件: 料液比 14.59, 提取温度 60.53 °C, 微波时间 9.01 min, 纤维素添加量 0.56 g/L, 此条件下原花青素提取率为 5.75%。提取工艺调整为: 料液比 15, 提取温度 60 °C, 微波时间 9 min, 纤维素添加量 0.56 g/L, 进行 3 次验证试验, 原花青素平均提取率 5.72%, 相对偏差为 0.5%, 验证了响应曲面分析法所得最佳工艺可靠, 验证了该回归模型的

表 5 原花青素的 MIC 和 MBC

Table 5 MIC and MBC of procyanidins

	MIC/(mg/mL)		MBC/(mg/mL)	
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
原花青素	/	2.5	/	5
链霉素	0.156	0.625	0.312	0.625

注: “/”代表在原花青素浓度范围内均有细菌生长。

2.3.3 原花青素对金黄色葡萄球菌细胞膜通透性得影响

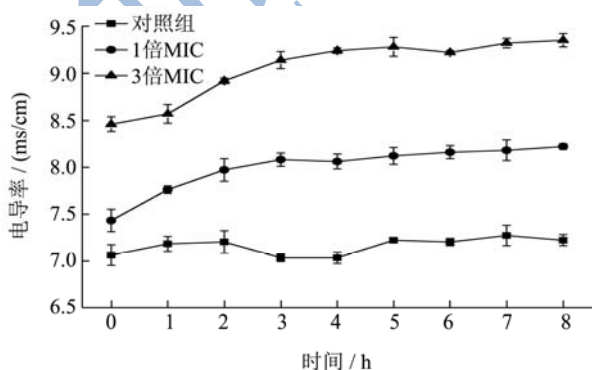


图 2 原花青素对金黄色葡萄球菌作用不同时间的电导率变化
Fig.2 Effect of procyanidins on the electrical conductivity of *Staphylococcus aureus*

合理性。与以往传统提取法(如李春阳等^[5-8])相比较, 本实验原花青素提取率有较大的提高。

2.3 葡萄籽原花青素抑菌性研究结果与分析

2.3.1 牛津杯法细菌敏感性实验

表 4 葡萄籽原花青素对两种菌的抑制作用

Table 4 Inhibitory effect of grape seed procyanidins on two

组别	抑菌圈直径/mm	
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
对照组(生理盐水)	8.20	8.20
原花青素溶液	10.50	19.20

表 4 中抑菌圈直径包含了牛津杯的直径(8.20 mm), 原花青素浓度为 10.00 mg/mL。可以看出, 原花青素对大肠杆菌抑制作用不明显, 抑菌圈较小; 原花青素对金黄色葡萄球菌抑制效果较好, 抑菌圈较大。

2.3.2 原花青素对细菌最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定

表 5 可以看出, 葡萄籽原花青素对金黄色葡萄球菌有明显抑菌作用, 其 MIC 值为 2.5 mg/mL, MBC 为 5.0 mg/mL。而观察含大肠杆菌的试管, 发现均有浑浊出现, 即使加入一定量的原花青素, 大肠杆菌也会有不同程度的生长, 表明葡萄籽原花青素对大肠杆菌几乎无抑制作用。

分别将 1 倍 MIC 和 3 倍 MIC 的的原花青素加入到菌悬液中, 37 °C、150 r/min 摇床培养, 以 1%吐温 40 作为阴性对照组, 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 和 8 h 测定菌悬液的电导率值, 每样重复三次。

由图 2 可知, 在 0 h 时, 含有原花青素的菌悬液高于对照组, 且添加三倍 MIC 原花青素的菌悬液明显高于其他两组, 三组之间呈现极显著性差异 ($p < 0.01$)。这可能由于原花青素自身含有大量酚羟基等带电荷成分, 致使电导率增加。随着时间的延长, 对照组电导率变化不大, 但添加有原花青素的菌悬液电导率逐渐增大, 且添加三倍 MIC 原花青素的菌悬液电导率增大趋势比添加一倍 MIC 原花青素的菌悬液更加明显, 4 h 后电导率趋于稳定。可以推断原花青素的加入破坏了细胞膜完整性, 致使细胞膜通透性增加, 胞内细胞质

渗漏、电解质渗出，导致溶液电导率升高。

2.3.4 葡萄籽原花青素对金黄色葡萄球菌细胞壁完整性的影响

细菌的保护膜是它的细胞膜，当菌体遇到抑菌性物质而细胞膜遭到破坏时，菌体的细胞膜破裂，使其内部的电解质外泄至培养液中，致使培养液的电导率上升，因此菌液电导率的变化可以反映了细菌细胞膜通透性的变化^[16]。碱性磷酸酶是存在于细胞壁与细胞膜之间的一种酶，正常情况下在胞外不能检测到其活性。

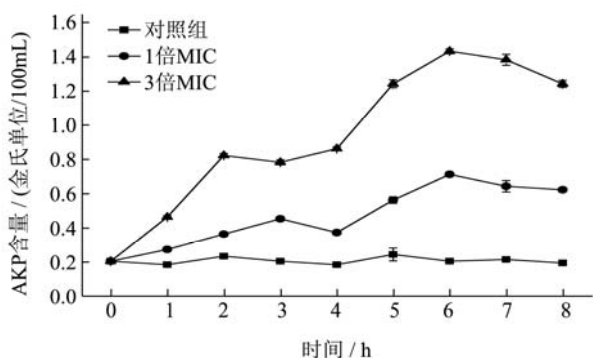


图3 金黄色葡萄球菌胞外 AKP 含量的变化

Fig.3 Effect of procyanidins on the extracellular AKP content of *Staphylococcus aureus*

由图3可以看出，对照组菌悬液中 AKP 含量几乎无明显变化，而原花青素作用后的菌液，胞外碱性磷酸酶含量明显增高，且三倍 MIC 作用后的菌液中碱性磷酸酶含量明显高于一倍 MIC 作用后的菌悬液，一倍 MIC 组与对照组差异性显著 ($p < 0.05$)，三倍 MIC 组与一倍 MIC 组、对照组之间均呈现极显著差异 ($p < 0.01$)。

随着时间的增加，原花青素作用过的菌悬液碱性磷酸酶快速泄露，之后在 2~4 h 泄露趋于缓和，这可能是由于原花青素的突然加入，对细菌细胞刺激较大，细胞壁通透性增加，而 2~4 h，通透性降低，泄露减缓。在 4~6 h，AKP 泄露量急剧增多，这可能是由于细胞壁被严重破坏，细胞完整性受到极大损伤，通透性再次急剧增加。实验结果表明，原花青素对金黄色葡萄球菌细胞壁有破坏作用，使得细胞壁通透性增加，胞外碱性磷酸酶含量上升，且高浓度原花青素对细菌细胞破坏力更强。

2.3.5 原花青素对金黄色葡萄球菌可溶性蛋白含量的影响

蛋白标准曲线如图4，线性方程为：

$$y=168.94x+11.309, R^2=0.9978$$

由图5看出，三倍 MIC 和一倍 MIC 的原花青素作用后的菌悬液胞外蛋白质含量明显高于对照组，且

三倍 MIC 高于一倍 MIC，三组之间差异性极显著 ($p < 0.01$)。在细胞质中，含有较多的蛋白质，且蛋白质相对分子质量较大，当金黄色葡萄球菌细胞壁受损后，细胞质外泄，蛋白质会随着细胞质大量泄漏到胞外，造成胞外蛋白含量增高。其中，在 6~8 h，检测到蛋白含量上升较为明显，这可能是由于细胞完整性被严重破坏，导致胞内物质加速外流。

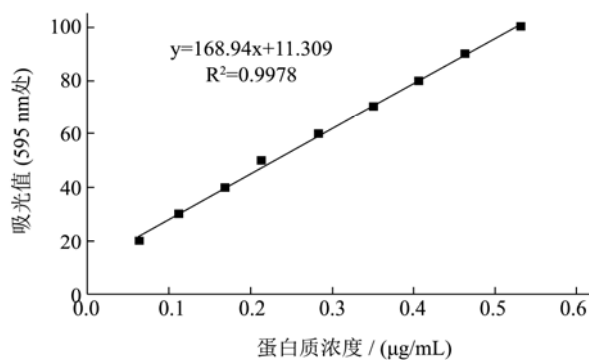


图4 蛋白含量标准曲线

Fig.4 Standard curve of protein content

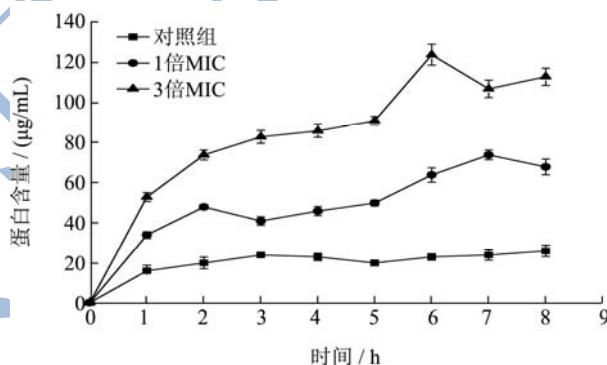


图5 原花青素对金黄色葡萄球菌蛋白含量影响

Fig.5 Effect of procyanidins on the extracellular protein content of *Staphylococcus aureus*

2.3.6 用扫描电镜观察原花青素对金黄色葡萄球菌细胞超微结构的影响

由图6看出，在扫描电镜下，原花青素作用后的金黄色葡萄球菌较为松散，大小不一，表面有凹陷，细胞遭到明显破坏。而对照组金黄色葡萄球菌，表面光滑，外观饱满，整体像葡萄状，十分紧实。扫描电镜结果表明，原花青素作用后，细胞完整性确实遭到较大破坏，整体松散。

革兰氏阳性菌（如金黄色葡萄球菌）细胞壁的主要成分是肽聚糖和部分磷壁酸，它对糖类、氨基酸、多酚类小分子和大部分离子来说容易透过，原花青素（尤其是所含的低聚原花青素）分子量较小，较易透过细胞壁，而原花青素分子结构中包含大量酚羟基，酚羟基可损坏细胞膜，导致细胞胞内内容物流出，因此扫描电镜下，可以观察到细胞形态发生明显变化。

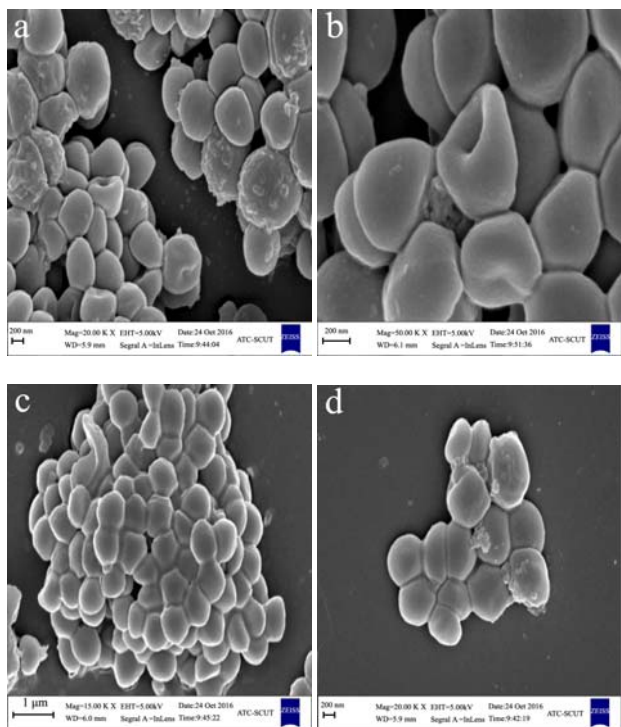


图6 扫描电镜下金黄色葡萄球菌的形态结构

Fig.6 Morphological structure of *Staphylococcus aureus* under scanning electron microscopy

注: a和b为原花青素处理12h后菌种; c和d为对照组正常菌种。

3 结论

3.1 本研究采用了微波萃取仪、纤维素酶双辅助提取葡萄籽原花青素,将料液比、微波时间、微波温度及纤维素酶添加量作为四个单因素变量,以原花青素提取率作为响应值,采用Box-Behnken实验设计及响应面优化分析,建立葡萄籽原花青素提取的二次多项式回归模型,得到双辅助提取的最佳工艺:料液比14.59,提取温度60.53℃,微波时间9.01min,纤维素添加量0.56g/L,此条件下原花青素提取率为5.75%。提取工艺调整为:液料比15,提取温度60℃,微波时间9min,纤维素添加量0.56g/L,进行3次验证试验,原花青素平均提取率5.72%,相对偏差为0.5%,表明该回归模型是可靠的、合理的。本实验与传统提取方法相比较有了较大改进,原花青素提取率有较大提高,使用微波消解仪代替传统微波炉进行实验,以微波温度和时间作为变量,实验更具说服力和创新性。

3.2 以革兰氏阴性代表菌大肠杆菌和革兰氏阳性代表菌金黄色葡萄球菌为研究对象,通过牛津杯法细菌敏感性实验和原花青素对细菌的MIC和MBC实验,发现通过上述提取方法得到的原花青素对金黄色葡萄球菌抑制效果远好于大肠杆菌,且对金黄色葡萄球菌

的抑菌圈达19.2mm, MIC为2.5mg/mL, MBC为5mg/mL。进一步研究原花青素抑制金黄色葡萄球菌的抑菌机理,发现经过原花青素作用后的菌悬液,电导率上升明显,胞外碱性磷酸酶含量上升,胞内可溶性蛋白外泄,扫描电镜照片显示细菌细胞表面凹陷褶皱,细胞大小不一,散乱分布。表明原花青素的加入,破坏了金黄色葡萄球菌细胞壁完整性,细胞膜通透性增加,且抑菌效果与葡萄籽原花青素浓度正相关。

参考文献

- [1] 吕丽爽,曹栋.薄层色谱法分离葡萄籽中的低聚原花青素[J].无锡轻工大学学报,2001,20(1):65-67
LV Li-shuang, CAO Dong. Thin layer chromatographic method for separation of oligomeric procyanidins from grape seeds [J]. Journal of Wuxi Light Industry University, 2001, 20(1): 65-67
- [2] 王辉宪,姜晖霞,王仁才,等.葡萄籽油及原花青素研究与开发利用[J].果树学报,2005,22(5):542-547
WANG Hui-xian, JIANG Hui-xia, WANG Ren-cai, et al. Review of studies on grape seed oil and procyanidins [J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(5): 542-547
- [3] Kidd P M. Bioavailability and activity of phytosome complexes from botanical polyphenols: the silymarin curcumin green tea and grape seed extracts [J]. Alternative Medicine Review, 2009, 14(3): 223-226
- [4] Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of vitis vinifera grape and its bioactive compounds [J]. Phytotherapy Research, 2009, 23(9): 1192-1197
- [5] 马美玉,王辉宪,谢聃,等.葡萄籽中原花青素提取分离纯化研究进展[J].湖南工程学校学报,2006,16(3):88-90
MA Mei-yu, WANG Hui-xian, XIE Dan, et al. Technics of extraction, separation and purification method of procyanidins from grape seed [J]. Journal of Hunan Engineering School, 2006, 16(3): 88-90
- [6] 吕丽爽,曹栋.葡萄籽中低聚原花青素的研制[J].中国油脂,2001,26(1):38-49
LV Li-shuang, CAO Dong. Study on oligomeric procyanidins in grape seed [J]. China Oils and Fats, 2001, 26(1): 38-49
- [7] 宋学娟.葡萄籽功能性成分提取研究[D].石家庄:河北科技大学,2007
SONG Xue-juan. Study on extraction of functional components from grape seeds [D]. Shijiazhuang: Master Hebei University of Science and Technology, 2007
- [8] 李春阳.葡萄籽中原花青素的提取纯化及其结构和功能研

- 究[D].无锡:江南大学,2006
- LI Chun-yang. Study on extraction, purification, structure and function of procyanidins from grape seeds [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006
- [9] 史学伟,程卫东,肖婧,等.新疆脱脂葡萄籽天然蛋白的研究现状[J].肉类研究,2010,3:73-76
- SHI Xue-wei, CHENG Wei-dong, XIAO Jing, et al. Research status of natural protein in xinjiang skimmed grape seed [J]. Meat Research, 2010, 3: 73-76
- [10] DA Silvaj, Riguad J, Cheynier V, et al. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds [J]. Phytochemistry, 1991, 30(4): 1259-1264
- [11] Romeyer F, Macheix J, Sapis J. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds [J]. Phytochemistry, 1986, 25: 219-221
- [12] 索玉娟,于宏伟,凌巍,等.食品中金黄色葡萄球菌污染状况研究[J].中国食品学报,2008,8(3):88-93
- SUO Yu-juan, YU Hong-wei, LING Wei, et al. Study on contamination of staphylococcus aureus in food [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(3): 88-93
- [13] 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
- DONG Xiao-min, HAN Rui-fang, LIU Tian-ming. Antibacterial mechanism of grape seed procyanidins against staphylococcus aureus [J]. Food Industry, 2015, 36(8): 188-192
- [14] 陈茵茹,康健,赵芙蓉.赤霞珠葡萄籽原花青素抗菌抗氧化活性研究[J].食品科技,2014,39(2):209-215
- CHEN Yin-ru, KANG Jian, ZHAO Fu-rong. Antibacterial and antioxidant activity of procyanidins from grape seeds of cabernet sauvignon [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(2): 209-215
- [15] 徐向宏,何明珠.试验设计与 Design Expert SPSS 应用[M].北京:科学出版社,2010
- XU Xiang-hong, HE Ming-zhu. Experimental design and design expert SPSS application [M]. Beijing: Science Press, 2010
- [16] 刘梦茵,刘芳,周涛,等.乌梅提取物对蜡状芽孢杆菌的抑菌机理研究[J].食品科学,2012,33(1):103-105
- LIU Meng-yin, LIU Fang, ZHOU Tao, et al. Study on antibacterial mechanism of fructus mume extract on bacillus cereus [J]. Food Science, 2012, 33(1): 103-105