

超声波辅助酶法 提取葡萄皮渣多酚工艺优化

陈瑞喜¹,王璐璐^{1,*},陈德蓉¹,雷芳萍¹,杨学山^{1,2},祝霞^{1,2,*}

(1.甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃兰州 730070;

2.甘肃省葡萄与葡萄酒工程学重点实验室,甘肃兰州 730070)

摘要:以赤霞珠葡萄皮渣为原料,采用超声波辅助酶法提取多酚化合物。在探讨超声时间、超声功率、酶解 pH 及酶解温度对葡萄皮渣多酚得率影响的基础上,应用正交试验优化超声波辅助酶法提取葡萄皮渣多酚的工艺条件。结果表明:影响多酚得率的主次因素为超声时间>酶解温度>超声功率>酶解 pH,最佳工艺参数为超声时间 15 min,超声功率 400 W,酶解 pH6.0,酶解温度 60 ℃,在此工艺条件下多酚得率最高为 1.493%±0.0068%。该工艺成本低、简单快速、稳定可行且提取剂环保无公害,因此可以有效替代传统方法提取葡萄皮渣中的多酚。

关键词:葡萄皮渣,多酚,超声波,纤维素酶

Process Optimization for Ultrasonic-Assisted Enzymatic Extraction of Polyphenols from Grape Pomace

CHEN Rui-xi¹, WANG Lu-lu^{1,*}, CHEN De-rong¹,

LEI Fang-ping¹, YANG Xue-shan^{1,2}, ZHU Xia^{1,2,*}

(1.College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2.Gansu Key Laboratory of Viticulture and Enology, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Taking Cabernet Sauvignon grape pomace as the research material, polyphenols were extracted by ultrasonic-assisted enzymatic method. Based on the influence of ultrasonic treatment time, ultrasonic power, enzymatic hydrolysis pH and enzymatic hydrolysis temperature on the yield of grape marc polyphenols were discussed, the optimal conditions of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polyphenols from grape pomace were determined using the orthogonal experiments. The results showed that the primary and secondary factors affecting polyphenols yield were ultrasonic time > enzymatic hydrolysis temperature > ultrasonic power > enzymatic hydrolysis pH. The optimal process parameters identified were as follows: ultrasonic time was 15 minutes, ultrasonic power was 400 W, enzymatic hydrolysis pH was 6.0, enzymatic hydrolysis temperature was 60 ℃, under these process conditions, the highest polyphenol yield could reach 1.493%±0.0068%. The process is less expensive, simple and ripe, stable and feasible, and since it is based on the environmentally friendly extraction solvent, it may provide a valuable alternative to the conventional extraction methods.

Key words: grape pomace; polyphenols; ultrasonic; cellulase

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)09-0198-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.034

引文格式: 陈瑞喜,王璐璐,陈德蓉,等.超声波辅助酶法提取葡萄皮渣多酚工艺优化[J].食品工业科技,2019,40(9):198-201.

甘肃省河西走廊葡萄酒产区因其得天独厚的地理条件(北纬 36~40°),非常适合酿酒葡萄的栽培,酿酒葡萄种植面积超过 30 万亩,年产量达 2.41 万吨^[1]。与此同时,酿酒后葡萄皮渣的产量也逐年增长^[2],大部分酒厂将皮渣直接废弃或闲置堆积,只有

少量用作田间肥料、动物饲料或当燃料处理,不仅造成资源的大量浪费,同时对环境造成了严重污染^[3]。

葡萄酿酒后的皮渣主要由葡萄皮(78%)和葡萄籽(16%)组成,含有大量多酚化合物、芳香化合物、葡萄籽油和膳食纤维等许多高营养价值的化合

收稿日期:2018-08-14 + 并列第一作者

作者简介:陈瑞喜(1997-),男,大学本科,研究方向:葡萄与葡萄酒,E-mail:2741425119@qq.com。

王璐璐(1992-),女,硕士研究生,研究方向:葡萄与葡萄酒,E-mail:2544621439@qq.com。

* 通讯作者:祝霞(1977-),女,硕士,副教授,研究方向:葡萄酒风味品质调控,E-mail:zhux@gsau.edu.cn。

基金项目:甘肃农业大学 SRTP 重点项目(20180946);国家自然科学基金地区基金项目(31660455;31760454);甘肃省重点研发计划(17YF1NA060)。

物^[4-5]。研究表明,多酚类物质具有抗氧化和清除自由基的特性,对癌症、糖尿病和动脉粥样硬化等疾病的预防具有积极作用^[6-7],多酚提取物的抗氧化效果为 V_C 的50倍, V_E 的20倍^[8-10],具有较强的资源化开发潜力。多酚化合物的提取多采用有机溶剂提取法,该方法溶剂消耗量大,操作费时,且提取物中含有溶剂残留,使多酚化合物的实际应用受到限制^[11]。超声波是一种弹性机械波,其萃取效果主要取决于它在溶剂中产生的空化效应和机械效应,能够使溶剂最大程度地渗透到样品基质中,增加固相和液相之间的接触面积,从而使样品中的有效成分迅速溶解到溶剂中^[12-13];生物酶能够水解植物纤维等组织,破坏植物细胞壁,进而充分释放细胞内含物,有利于植物生物活性物质的提取,从而提高葡萄皮渣的利用价值^[14]。超声波辅助酶法可使生物活性成分提取过程更加简单有效,并能有效提高提取的安全性,但目前采用超声波辅助酶法提取葡萄酒皮渣中多酚的研究还未见报道。

本实验以甘肃河西走廊产区酿酒葡萄主栽品种赤霞珠(Cabernet Sauvignon)酿酒后的皮渣为原料,对超声波辅助酶法提取多酚的工艺条件进行优化,以期确定最佳提取工艺参数,为葡萄酒皮渣资源的合理开发利用提供理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

赤霞珠葡萄酒皮渣 于2017年11月采自甘肃农业大学食品学院葡萄酒生产车间酒精发酵结束后皮渣;纤维素酶 酶活力400 U/mg,上海源叶生物科技有限公司;Folin-Ciocalteus显色剂 北京索莱宝科技有限公司;氢氧化钠 天津市百世化工有限公司;无水碳酸钠 天津开发区海光化学制药厂;没食子酸 上海鼓臣生物科技有限公司。

SCIENITZ IID型超声波细胞破碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司;PHS-3C pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司;TU-1810紫外-可见分光光度计 上海仪电分析仪器有限公司;TD5A-WS台式低速离心机 东莞康润实验科技有限公司;CPJ214电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;恒温水浴箱 北京科伟永兴仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 葡萄皮渣预处理 将酒精发酵结束后的赤霞珠葡萄酒皮渣经手工去籽后,置于鼓风干燥箱中60℃干燥24 h,粉碎机粉碎后得到葡萄皮粉末作为实验原料备用。

1.2.2 单因素实验设计

1.2.2.1 超声时间对多酚得率的影响 准确称取预先处理好的葡萄酒皮渣粉各0.500 g并溶于40 mL水中,加入纤维素酶25 mg,设置超声功率300 W,超声时间分别为5、10、15、20、25 min,在酶解温度60℃、pH5.5的条件下酶解2.5 h。测定多酚得率,选出较佳超声时间。

1.2.2.2 超声功率对多酚得率的影响 超声时间10 min,设置超声功率分别为100、200、300、400、

500 W,其他操作同1.2.2.1。测定多酚得率,选出较佳超声功率。

1.2.2.3 酶解 pH 对多酚得率的影响 在超声时间10 min,超声功率300 W,酶解温度60℃的条件下,调节酶解 pH 为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5,其他操作同1.2.2.1。测定多酚得率,选择较佳酶解 pH。

1.2.2.4 酶解温度对多酚得率的影响 在超声时间10 min,超声功率300 W、酶解 pH5.5的条件下,设置酶解温度分别为50、55、60、65、70℃,其他操作同1.2.2.1。测定多酚得率,选出较佳酶解温度。

1.2.3 正交试验 根据单因素实验结果,选取超声时间、超声功率、酶解 pH、酶解温度为实验因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表,做四因素三水平正交实验。通过测定各组样品多酚得率,选出最佳工艺条件。试验因素和水平设计见表1。

表1 正交试验设计因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 超声时间 (h)	B 超声功率 (W)	C 酶解 pH	D 酶解温度 (℃)
1	5	200	5.0	50
2	10	300	5.5	55
3	15	400	6.0	60

1.2.4 葡萄皮渣多酚的测定 采用福林-肖卡法^[15]测定葡萄皮渣多酚。吸取1 mL样品溶液,加入5 mL蒸馏水、1 mL Folin-Ciocalteus显色剂和3 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液。阴暗处室温条件下放置2 h显色后,在765 nm波长下测定吸光度,再根据总酚标准曲线方程($y = 0.0775x + 0.0032, R^2 = 0.9985$)计算样品中多酚的得率。葡萄酒皮渣中多酚得率按以下公式计算:

$$\omega(\%) = \frac{CV}{1000 \times m} \times 100$$

式中, ω 为多酚得率,%;C为根据标准曲线计算得到的多酚质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;V为提取液的体积,mL;m为葡萄皮渣的质量,g。

1.3 数据处理

采用Excel 2010和SPSS 20.0处理数据并作图,结果以平均值表示。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声时间对多酚得率的影响 由图1可知,不同超声时间对葡萄皮渣中多酚得率影响显著($p < 0.05$),随着超声时间的延长,葡萄皮渣中多酚得率增加,在超声10 min时达到最大值(1.304%),之后超声时间再增加,多酚得率显著下降。这表明当超声时间达到10 min时,葡萄皮渣中多酚化合物已充分浸出,提取量接近饱和,继续延长超声时间可使更多杂质溶出,加速多酚氧化,增加提取成本,并使葡萄皮渣中多酚得率减小^[16]。因此,超声时间宜选用10 min。

2.1.2 超声功率对多酚得率的影响 不同的超声功率对葡萄皮渣多酚得率的影响较大。如图2所示,

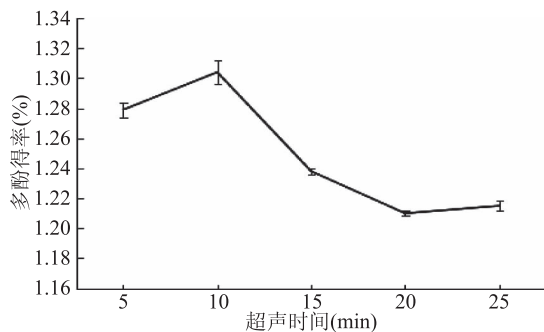


图1 超声时间对多酚得率的影响

Fig.1 Effect of the ultrasonic time on the yield of polyphenols

随着超声功率的不断增大,葡萄皮渣中多酚得率也随之增加,当超声功率为 300 W 时,多酚得率最高。当超声功率超过 300 W 时,多酚得率呈显著下降($p < 0.05$)。这主要是由于超声功率的大小会直接影响超声波的机械效应和空化效应。当超声功率增大时,其机械效应和空化效应相应增强,从而增大介质的运动速度、强化介质的扩散、传播,使多酚物质充分溶出,增加得率^[17]。但当超声功率过大,其强烈的空化效应易破坏目标产物,局部高温易使多酚氧化分解,进而使多酚得率下降^[11]。后续实验选择超声功率 300 W 为宜。

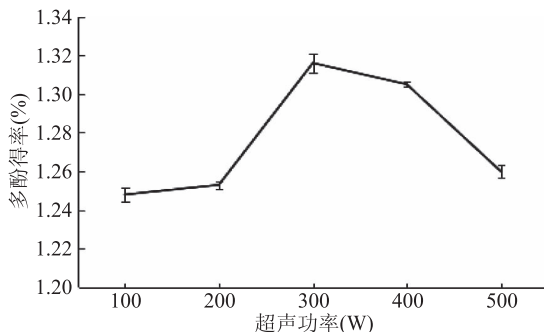


图2 超声功率对多酚得率的影响

Fig.2 Effect of the ultrasonic power on the yield of polyphenols

2.1.3 酶解 pH 对多酚得率的影响 如图 3 所示,在 pH4.0~5.0 的条件下,多酚得率差异性较小,在 pH 为 5.5 时,多酚得率达到最大值;当 pH 超过 5.5 时,多酚得率显著下降,且在 pH6.0 和 pH6.5 时,多酚得率无显著性差异($p > 0.05$)。这可能与纤维素酶的最适酶解 pH 有关,当 pH 为 5.5 时,纤维素酶酶活力达到最大值,能够充分水解植物纤维,破坏植物细胞壁,进而充分释放细胞内的多酚物质;当 pH 超过纤维素酶的最适 pH 范围时,其酶活性大大降低,且过高的 pH 可能会改变底物的解离状态,从而影响酶与底物的充分结合,最终使多酚得率下降^[14],因此选择较佳的酶解 pH 为 5.5。

2.1.4 酶解温度对多酚得率的影响 由图 4 可知,在酶解温度为 55 ℃ 时,多酚得率达到最大值,超过 55 ℃ 后,多酚得率不再增加,其中 70 ℃ 时多酚得率最小。适宜的高温能够促进多酚物质的充分溶解,但由于多酚物质在高温下不稳定,易被氧化分解,因

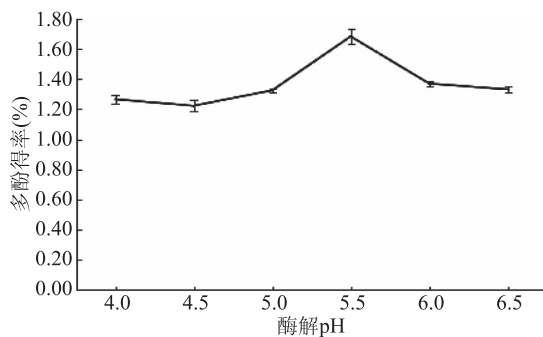


图3 酶解 pH 对多酚得率的影响

Fig.3 Effect of the enzymolysis pH on the yield of polyphenols

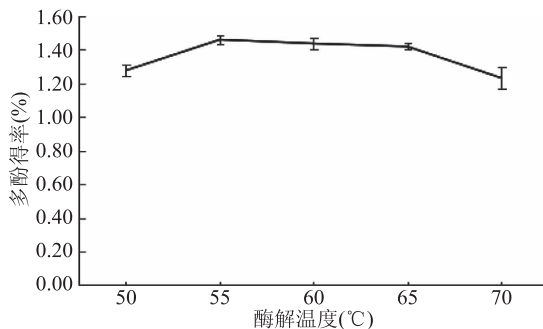


图4 酶解温度对多酚得率的影响

Fig.4 Effect of the enzymolysis temperature on the yield of polyphenols

此,过高的温度反而使多酚得率下降^[18]。选择 55 ℃ 为较优酶解温度。

2.2 正交试验

根据单因素实验结果,选取超声时间、超声功率、酶解 pH、酶解温度为实验因素,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,并应用 SPSS 20.0 对正交试验结果进行方差分析。结果如表 2、表 3 所示。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal design					
试验号	A	B	C	D	多酚得率(%)
1	1	1	1	1	0.751
2	1	2	2	2	0.907
3	1	3	3	3	1.041
4	2	1	2	3	1.308
5	2	2	3	1	1.271
6	2	3	1	2	1.382
7	3	1	3	2	1.309
8	3	2	1	3	1.390
9	3	3	2	1	1.284
k_1	0.900	1.123	1.174	1.102	
k_2	1.320	1.189	1.166	1.199	
k_3	1.328	1.236	1.207	1.246	
R	0.428	0.113	0.041	0.144	

通过正交试验结果(表 2)直观分析可知,影响赤霞珠葡萄皮渣中多酚得率的主次因素依次为 $A > D > B > C$,即超声时间 > 酶解温度 > 超声功率 > 酶解 pH。通过方差分析(表 3)可知,因素 A 差异显著

表3 方差分析表

Table 3 Results of variance Analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	0.360	2	32.727	6.940	*
B	0.019	2	1.727	6.940	
C	0.003	2	0.273	6.940	
D	0.033	2	3.000	6.940	
误差 e	0.02	4			

注：* 代表 $p < 0.05$ 。

($p < 0.05$)，即超声时间对葡萄皮渣多酚得率具有显著性影响。试验确定超声波辅助酶法提取赤霞珠葡萄皮渣中多酚的最佳工艺条件为 $A_3B_3C_3D_3$ ，即超声时间 15 min，超声功率 400 W，酶解 pH6.0，酶解温度 60 ℃。

2.3 工艺条件验证

对正交试验得到的最佳工艺条件进行验证实验，在最佳工艺条件下，进行三次重复实验，得到赤霞珠葡萄皮渣中多酚的平均得率为 $1.493\% \pm 0.0068\%$ ，其结果高于正交试验中任一组合的多酚得率，表明正交试验确定组合为提取赤霞珠葡萄皮渣中多酚的最佳工艺参数。

3 结论

本实验通过单因素实验，并采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对赤霞珠葡萄皮渣多酚的提取条件进行了优化，确定最佳提取工艺参数为：超声时间 15 min，超声功率 400 W，酶解 pH6.0，酶解温度 60 ℃，在此条件下多酚得率达 $1.493\% \pm 0.0068\%$ 。超声波辅助酶法提取葡萄皮渣多酚具有工艺稳定可行，环保节能且能够保持葡萄皮渣中的有效活性成分等优点，是提取葡萄皮渣多酚的有效途径。

参考文献

[1] 张秀娟. 甘肃省葡萄酒产业发展研究[J]. 价值工程, 2011, 30(29): 123-124.

[2] 白耀栋. 甘肃河西走廊地区酿酒葡萄发展的优劣势分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2016, 15(2): 60-62.

[3] 梁传红, 陈帅, 李开雄, 等. 响应面法优化赤霞珠葡萄籽多酚提取工艺[J]. 价值工程, 2015, 73(23): 179-181.

[4] Dwyer K, Hosseinian F, Rod M. The market potential of grape waste alternatives [J]. Journal of Food Research, 2014, 3(2):

(上接第 197 页)

[22] 郭婷, 郝一江, 张健, 等. 传统藏灵菇发酵乳挥发性风味特征研究[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(1): 8-11.

[23] 崔国庭, 李沁沛, 王缎, 等. 红枣多糖对乳酸菌发酵及酸奶品质的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 203-207.

[24] 中华人民共和国国家标准. 乳和乳制品酸度的测定: GB 5413.34-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[25] 王岩. 新型螺旋藻酸奶的研制[J]. 农业科技与装备, 2011(9): 20-23.

[26] 亢晓霞. 甜玉米酸奶的工艺及风味的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

91-106.

[5] Štambuk P, Tomašković D, Tomaz I, et al. Application of pectinases for recovery of grape seeds phenolics [J]. Biotech, 2016, 6(2): 224.

[6] Giovino G, Grieco F. Functional properties of grape and wine polyphenols [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2015, 70(4): 454-462.

[7] Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses [J]. Food Chemistry, 2006, 99(1): 191-203.

[8] Szajdek A, Borowska E J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2008, 63(4): 147-156.

[9] Dai J, Mumper R J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties [J]. Molecules, 2010, 15(10): 7313-7352.

[10] Pandey K B, Rizvi S I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease [J]. Oxidative Medicine & Cellular Longevity, 2009, 2(5): 270-278.

[11] 陈红, 崔海月, 李玉扩, 等. 超声波协同酶法提取大豆多糖工艺的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2011, 33(5): 581-586.

[12] Wang J, Sun B, Cao Y, et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 482-488.

[13] Rostagno M A, Palma M, Barroso C G. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(2): 265-272.

[14] 钱时权, 石亚中, 伍亚华, 等. 纤维素酶对山葡萄渣中白藜芦醇提取的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(3): 207-209.

[15] 李素岳. 蛇龙珠果实成熟过程中的品质变化及浸渍工艺对其葡萄酒品质的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.

[16] 张蕊, 闫凤超, 李佳梅, 等. 超声波辅助提取香菇多糖工艺研究[J]. 现代化农业, 2017, 17(12): 32-34.

[17] 吴昊, 宗志敏, 石金龙. 超声波协同酶法提取银杏黄酮的工艺研究[J]. 中国资源综合利用, 2012, 30(11): 26-29.

[18] 张建华, 李敏, 陈霞, 等. 响应面法优化‘蛇龙珠’葡萄皮渣中多酚提取条件的研究 [J]. 甘肃农业大学学报, 2016, 51(5): 141-147.

[27] 李广富, 陈伟, 范路平, 等. 灵芝功能成分酸奶营养品质与风味物质分析[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 168-173.

[28] 梁琪, 张卫兵, 张炎, 等. 百合酸奶的挥发性风味物质成分分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(16): 99-104.

[29] 贺红军, 邹慧, 孙宁, 等. 紫薯酸奶和普通酸奶挥发性风味物质差异性研究[J]. 现代食品科技, 2014(8): 225-230.

[30] 武士美, 靳汝霖, 任为一, 等. 德氏乳杆菌保加利亚亚种发酵乳中挥发性风味物质的比较分析[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(9): 4-10.