

尹礼国,邓世琼,游 玲,等. 酿酒葡萄皮渣花色苷的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):260-262.

酿酒葡萄皮渣花色苷的提取工艺

尹礼国^{1,2,3}, 邓世琼², 游 玲³, 张 超^{1,2,3}, 王蒨波²

(1. 宜宾学院食品科学与工程研究所,四川宜宾 644007;2. 宜宾学院生命科学与食品工程学院,四川宜宾 644007;

3. 宜宾学院发酵资源与应用四川省高校重点实验室,四川宜宾 644007)

摘要:通过单因子试验与正交试验,对酿酒葡萄皮渣花色苷乙醇溶液提取工艺条件进行了研究,确定最优工艺条件为:料液比 1 g : 30 mL,提取溶剂的乙醇浓度和 pH 值分别为 60%、1.0,提取温度和时间分别为 80 ℃、80 min,花色苷提取率为 0.168 4%,产品得率为 2.57%,产品花色苷含量为 6.55%。产品呈紫褐色,易溶于 pH 值为 1.0 的 60% 乙醇溶液,溶于该溶液后呈紫红色,色泽鲜艳,可进一步分离纯化得到纯度更高的产品,开发为食品着色剂和抗氧化剂。

关键词:酿酒葡萄皮渣;花色苷;提取工艺;纯化

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0260-03

花色苷由花色素和糖基以糖苷键结合而成,属于黄酮类化合物,在食品、水果、蔬菜中广泛存在,随着 pH 值的变化能呈现红、紫红、黄至蓝等不同颜色,可满足人们对食物色泽的多种需要^[1]。现代研究表明,花色苷能够较好地清除自由基,抑制低密度脂蛋白氧化,具有抗氧化、抗癌、抗动脉硬化、抗衰老、增强免疫力及心血管保护作用,可预防冠心病、高血脂、动脉粥样硬化、胃黏膜损伤、白内障等疾病^[2-7]。由于合成抗氧化剂常常对身体健康有害,消费者对来自天然产物的抗氧化剂的需求量日益增大^[8]。花色苷既具有良好的着色性能,又具有良好的抗氧化性与生理功能,在食品领域的应用具有很好的前景。据报道,我国 2007 年酿酒葡萄年产量超过 200 万 t,产酒约 66.5 万 t,其中约有 70% 的为红葡萄酒,酿酒葡萄出渣率约为 10%,其中 33% 为葡萄皮,约有 6.9 万 t/年葡萄皮被丢弃^[9]。葡萄皮含有丰富的花色苷,且种类丰富^[10-11],葡萄皮色素可广泛应用于果酱、酸性饮料、果酒中,具有营养价值高、安全无毒副作用等优点^[7],从中提取花色苷具有较好的开发前景。笔者采用单因子与正交试验开展了酿酒葡萄皮渣花色苷提取工艺研究,对进一步综合利用酿酒葡萄皮渣进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期:2013-12-05

基金项目:四川省宜宾市科技重点项目(编号:200801007)。

作者简介:尹礼国(1979—),男,湖北黄石人,博士研究生,副教授,主要从事食品生物技术研究。E-mail:156948727@qq.com。

[8] 宗宪峰. 酸奶的营养价值与保健功能[J]. 中国食物与营养, 2008(9):60-61.

[9] 康怀彬,李道敏,陈树兴. 凝固型酸牛乳新品种的研究现状[J]. 河南科技大学学报:农学版,2003,23(1):67-70.

[10] 王克会,李 卫,程 倩. 我国风味型酸奶的研究现状及发展趋势[J]. 广东化工,2009,36(5):120-121,138.

[11] 宿丽娜,孙艺宁,郭 影,等. 混合型酸奶研究现状及发展趋势[J]. 科技信息,2010(1):510,486.

酿酒葡萄皮渣由河北昌黎凤凰酒庄提供;氢氧化钠、乙醇、盐酸、柠檬酸、柠檬酸钠均为分析纯。RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、pHS-3C 酸度计(上海理达仪器厂)、T-214 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)、DHG-905 鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司)、SHB-B95 真空泵(河南郑州长城科工贸有限公司)、电热恒温水浴锅(北京光明医疗仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 花色苷含量的测定 花色苷含量的测定采用 pH 值示差法,其具体步骤为:参照文献[12],配制不同 pH 值的缓冲液;吸取适量体积花色苷溶液于 100 mL 烧杯中(吸取体积以稀释后 $D_{521\text{nm}}$ 在 0.2~0.8 为宜),用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调 pH 值至 3.0,转移至 100 mL 容量瓶中,用 pH 值为 3.0 的缓冲液定容,得样品待测液;分别取 1 mL 待测液于 2 个 10 mL 比色管中,各加入 9 mL pH 值为 1.0、4.5 的缓冲液,40 ℃ 水浴 20 min,使其显色稳定,采用光程为 1 cm 的比色皿在 521、700 nm 下测定吸光度,根据下式计算提取液中花色苷含量:

花色苷含量(mg/L) = $[\Delta D \times M_w / (\varepsilon \times l)] \times N \times 1000 \times 100\%$ 。
式中: $\Delta D = (D_{521\text{nm}} - D_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1.0} - (D_{521\text{nm}} - D_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4.5}$; M_w 、 ε 分别为葡萄中常见花色苷锦葵色素-3-葡萄糖苷的相对分子质量和摩尔消光系数,其值均参照文献[13], $M_w = 493.2 \text{ g/mol}$, $\varepsilon = 28\,000 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; l 为比色皿光程,其值为 1 cm; N 为样品稀释倍数。

1.2.2 葡萄皮渣花色苷提取率的计算 将葡萄皮渣在鼓风干燥箱中 60 ℃ 下干燥至足干,用粉碎机将其粉碎,并过 40 目

[12] 邓功成, 洪,高礼安,等. 灰树花菌丝体液体发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):216-218.

[13] 李春喜,邵 云,姜丽娜. 生物统计学[M]. 4 版. 北京:科学出版社,2008.

[14] GB 19302—2010 食品安全国家标准 发酵乳[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[15] 范秀容,沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京:人民教育出版社,1980.

筛。准确称取 10.00 g 葡萄皮渣粉末于 500 mL 锥形瓶中,加入提取溶剂,用盐酸溶液和氢氧化钠溶液调节 pH 值,放入水浴锅中恒温回流浸提,浸提过程中每隔 10 min 振荡 1 次。浸提结束后真空抽滤得提取液,将提取液定容,测定溶液中花色苷浓度,计算花色苷提取率:

$$\text{花色苷提取率} = (C \times V) / m \times 100\%$$

式中: C 为花色苷浓度; V 为定容体积; m 为葡萄皮渣质量。

2 结果与分析

2.1 葡萄皮渣花色苷提取工艺单因素优化

2.1.1 乙醇浓度对花色苷提取率的影响 花色苷具有较强的极性,易溶于甲醇、乙醇,乙醇对人体的毒害作用小于甲醇,其水溶液是一种理想的花色苷提取溶剂。分别称取 10.00 g 葡萄皮渣粉 5 份,置于三角瓶中,依次加入 300 mL 20%、40%、60%、80%、90% 乙醇溶液,用盐酸溶液调节 pH 值为 1.0,接上冷凝管,于 70 ℃ 水浴回流浸提 60 min,测定花色苷提取率。由图 1 可知,以 60% 乙醇作为溶剂时,提取率优于其他浓度的乙醇溶剂,说明 60% 乙醇溶液最适合用于花色苷的提取,选取 40%、60%、80% 乙醇溶液开展正交试验。

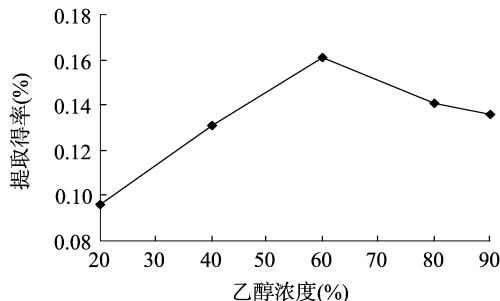


图1 乙醇浓度对花色苷提取率的影响

2.1.2 料液比对花色苷提取率的影响 分别称取 10.00 g 葡萄皮渣粉 5 份,置于 5 个三角瓶中,依次加入 200、250、300、350、400 mL 的 60% 乙醇,调节 pH 值至 1.0,70 ℃ 水浴回流浸提 60 min,测定花色苷提取率。由图 2 可知,料液比自 1 g : 20 mL 变为 1 g : 30 mL,花色苷提取率明显提高;料液比由 1 g : 30 mL 变为 1 g : 35 mL,1 g : 40 mL,花色苷提取率的变化不大。这是由于溶剂较少时,对花色苷的溶解能力有限,不能使花色苷充分溶解于提取溶剂中,当提取剂体积增至一定体积时,花色苷能充分地溶解于提取溶剂中;进一步增加体积,对花色苷的溶解影响不大,初步确定料液比为 1 g : 30 mL,并对其他因子开展正交试验进一步优化。

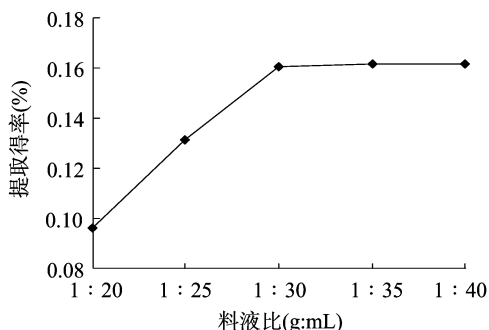


图2 料液比对花色苷提取率的影响

2.1.3 提取时间对花色苷提取率的影响 分别称取 10.00 g 葡萄皮渣粉 5 份,置于三角瓶中,加入 300 mL 60% 乙醇,调节 pH 值至 1.0,在 70 ℃ 水浴条件下分别回流浸提 20、40、60、80、100 min,测定花色苷提取率。由图 3 可知,提取时间由 20 min 增加至 60 min 时,花色苷提取率的增加幅度较大;当提取时间由 60 min 增加至 100 min 时,花色苷提取率的增加幅度较小,因此,选取提取时间 60、70、80 min 进一步开展正交试验。

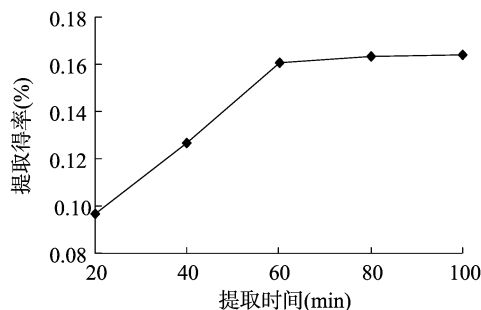


图3 提取时间对花色苷提取率的影响

2.1.4 提取温度对花色苷提取率的影响 分别称取 10.00 g 葡萄皮渣粉于 5 个锥形瓶中,加入 300 mL 60% 乙醇,调节 pH 值至 1.0,分别于 40、50、60、70、80 ℃ 恒温水浴中提取 60 min,测定花色苷提取率。由图 4 可知,提取温度由 40 ℃ 升至 60 ℃ 时,花色苷提取率的增加幅度较大;提取温度由 60 ℃ 升至 80 ℃ 时,花色苷提取率的增加幅度很小,因此,选取提取温度 60、70、80 ℃ 进一步开展正交试验。

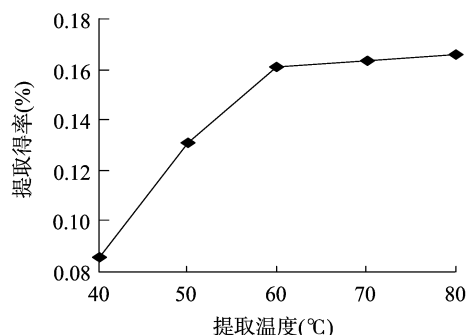


图4 提取温度对花色苷提取率的影响比较

2.1.5 提取溶剂 pH 值对花色苷提取率的影响 分别称取 10.0 g 葡萄皮渣 5 份,放入 500 mL 锥形瓶中,加入 300 mL 60% 乙醇,调节 pH 值至 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0,于 70 ℃ 恒温水浴中提取 60 min,测定花色苷提取率,结果如图 5 所示。由图 5 可知,pH 值为 1.0 时,花色苷提取率最高;pH 值由 1.0 升至 3.0 时,花色苷提取率逐渐降低,因此,选取 0.5、1.0、1.5 的 pH 值进一步开展正交试验。

2.2 酿酒葡萄皮渣花色苷提取工艺的正交试验

基于单因素试验结果,在料液比 1 g : 30 mL 的条件下,对提取溶剂的乙醇浓度、pH 值、提取温度、提取时间进行正交优化,设计试验方案见表 1,试验结果见表 2。

由表 2 可知,4 个因素对葡萄皮渣花色苷提取率影响从大到小依次为 $D > C > B > A$,提取的最优条件为 $A_2B_2C_3D_3$,即提取剂的乙醇浓度为 60%,pH 值为 1.0,提取温度为

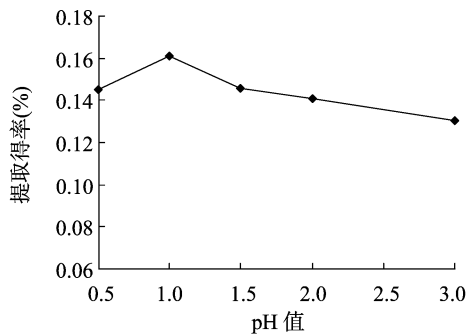


图5 提取溶剂 pH 值对花色苷提取率的影响

表 1 酿酒葡萄皮渣花色苷提取工艺的正交试验因素和水平

水平	A:乙醇浓度 (%)	B:pH 值	C:提取温度 (℃)	D:提取时间 (min)
1	40	0.5	60	40
2	60	1.0	70	60
3	80	1.5	80	80

表 2 酿酒葡萄皮渣花色苷提取工艺的正交试验结果

编号	A	B	C	D	提取率 (%)
1	1	1	1	1	0.105 5
2	1	2	2	2	0.125 6
3	1	3	3	3	0.135 6
4	2	1	2	3	0.150 7
5	2	2	3	1	0.150 7
6	2	3	1	2	0.125 6
7	3	1	3	2	0.155 7
8	3	2	1	3	0.145 6
9	3	3	2	1	0.085 4
k_1	0.122 2	0.137 3	0.125 6	0.113 9	
k_2	0.142 3	0.140 6	0.120 6	0.135 6	
k_3	0.128 9	0.115 5	0.147 3	0.144 0	
R	0.020 1	0.025 1	0.026 7	0.030 1	

80 ℃,提取时间为 80 min。准确称取 10.00 g 葡萄皮渣粉,开展验证试验,结果表明,在最优条件下花色苷的提取率为 0.168 4%,优于其他条件,确定此工艺参数最优。称取 10 份葡萄皮渣粉,分别以此工艺参数进行提取,将提取液合并后真空浓缩,在 50 ℃ 条件下用鼓风干燥箱干燥得紫褐色粉末 2.57 g,产品中花色苷含量为 6.55%。

3 结论

通过单因素试验和正交试验确定从酿酒葡萄皮渣中提取花色苷的最优条件是:将葡萄皮渣打成粉末后,用料液比为 1 g:30 mL,pH 值为 1.0 的 60% 乙醇在 80 ℃ 下水浴浸提 80 min,花色苷提取率为 0.168 4%,产品得率为 2.57%,产品中花色苷含量为 6.55%。花色苷作为天然色素,在酸性条件下有良好的稳定性,具有降低肝脏及血清中脂肪含量、抗氧化、抗肿瘤、延迟血小板凝集等多种生理和药用活性功能,在食品、化妆品、医药领域有很大的应用前景。开展酿酒葡萄皮

渣中花色苷的提取,可变废为宝,促进葡萄酒行业的健康发展。乙醇溶液萃取法具有设备要求低、毒副作用小、易产业化等优点。乙醇溶液提取法制备的产品中花色苷纯度较低,能进一步提高产品附加值,研究花色苷的种类与功能,可采用大孔树脂柱层析、溶剂萃取、膜过滤等分离纯化技术开展纯化工艺研究,开发绿色健康的食品着色剂与抗氧化剂。为促进人们对花色苷综合利用水平的提高,了解其生理功能,需进一步开展高效液相色谱、液相色谱-质谱联用检测技术对提取物中花色苷种类及含量进行定性定量分析,开展花色苷精制产品的抗氧化性、抗菌性、降胆固醇、预防心血管系统、调节免疫系统等功能研究。

参考文献:

[1] 庞志申. 花色苷研究概况[J]. 北京农业科学,2000,18(5):37-42.

[2] Harborne J B,Williams C A. Anthocyanins and other flavonoids[J]. Natural Product Reports,2004,21(4):539-573.

[3] Harborne J B,Williams C A. Anthocyanins and other flavonoids[J]. Natural Product Reports,2001,18(3):310-333.

[4] Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2002,50(4):850-857.

[5] Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, et al. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6):2111-2117.

[6] Spigno G, Tramelli L, de Faveri D M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81:200-208.

[7] 唐传核,彭志英. 天然花色苷类色素的生理功能及应用前景[J]. 冷饮与速冻食品工业,2000,6(1):26-28.

[8] Martin B J, Ramos - Escudero F, Saez - Plaza P, et al. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part I: General considerations concerning polyphenols and flavonoids[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry,2012,42(2):102-125.

[9] 张莹,丁辰,赵岩,等. 葡萄酒皮渣提取花色苷研究应用进展[J]. 农产品加工·学刊,2012(5):95-98.

[10] Luque - Rodriguez J M, de Castro M D L, Perez - Juan P. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from redgrape skins of wine making residues[J]. Bioresource Technology,2007,98:2705-2713.

[11] 于庆泉. 蛇龙珠红葡萄酒酿造过程中花色苷的变化规律研究[D]. 北京:中国农业大学,2006.

[12] 孙婧超,刘玉田,赵玉平,等. pH 示差法测定蓝莓酒中花色苷条件的优化[J]. 中国酿造,2011(11):171-174.

[13] 翦伟,韩舜愈,张波,等. 单一 pH 法、pH 示差法和差减法快速测定干红葡萄酒中总花色苷含量的比较[J]. 食品工业科技,2012,33(23):323-325,423.