

复合酶法澄清葡萄籽提取液工艺研究

伊丽孜拉·吐尔干, 杨浩, 苏力坦·阿巴白克里* (新疆大学生命科学与技术学院, 新疆乌鲁木齐 830046)

摘要 [目的]对葡萄渣提取液进行澄清,并对工艺参数进行优化。[方法]选择果胶和纤维素复合酶对葡萄籽提取物进行澄清,分别在最适温度和常温作用、最适 pH 和不调 pH 条件下比较了复合酶对葡萄籽提取液澄清效果及多酚和原花青素含量的影响。[结果]试验表明,复合酶对葡萄籽提取液澄清效果受温度的影响较大,调节 pH 对澄清度的影响则表现不明显。正交试验证明,最佳澄清工艺条件为 pH 5.5、酶解温度 45 ℃、作用时间 6 h、酶剂量 60 mg/kg,透光率达到 76%,澄清过程中不影响葡萄籽多酚以及原花青素含量。[结论]研究可为葡萄籽提取液的开发利用提供理论依据。

关键词 葡萄籽提取液;复合酶;最佳澄清工艺;多酚以及原花青素含量

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)11-03363-03

Clarified Grape Seed Extract by Combined-enzyme Method

Yilizila Tuergan, Sulitan Ababaikeli et al (College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

Abstract [Objective] To clarify grape seed extract and optimize process parameters. [Methods] Selected pectin and cellulose complex enzyme for clarification effect of grape seed extract, at the appropriate temperature and room temperature effects, and non-optimal pH, appropriate pH, and compared clarification effect of grape seed extract and polyphenols and proanthocyanidins efficiency levels of complex enzyme. [Results] The results showed the effect of enzyme clarifying the grape seed extract was greatly influenced by the temperature; the effect of the adjusted pH was not significant on the clarification result. Orthogonal showed the Best clarification process condition is pH 5.5, reaction temperature 45 ℃, reaction time for 6 h, enzyme dose 60 mg/kg. Transmittance efficiency reaches 76% and the process does not affect the content of grape seed polyphenols and proanthocyanidins. [Conclusion] This study can provide certain basis for development and application of grape seed extract.

Key words Grape seed extract; Combined-enzyme; Optimal clarification process; Content of polyphenols and proanthocyanidins

葡萄酒的大量生产和消费,也产生了大量的葡萄酿酒后的副产品——葡萄废弃物(葡萄皮渣、籽、梗)^[1]。葡萄渣中含有以植物多酚为主的生物活性物质,如:酚酸、原花青素、黄酮、白藜芦醇等。葡萄渣是由碳水化合物(种子 8%,皮 13%)、纤维(总质量的 50%)、脂肪(种子 4%,皮 10%)、蛋白质(种子 8%,皮 14%)、矿物质、木质素(种子 64%,皮 59%)、半纤维素(种子 18%,皮 31%)、纤维素(种子 17.75%,皮 6%)和果胶(种子 0.25%,皮 4%)构成^[2]。在葡萄废弃物中,葡萄籽生物活性物质最丰富,其中多酚和原花青素为最主要的活性物质。

葡萄籽多酚的提取方法主要有溶剂浸提法、酶解提取法、超临界萃取法以及微波、超声波、超高压辅助提取法^[3]。有机溶剂萃取是葡萄籽多酚常用的提取方法,但易造成环境污染。采用水剂法提取葡萄籽多酚,但发现葡萄籽提取物中含有大量的果胶类物质,致使提取液浑浊不清,严重影响葡萄渣提取物纯度,因杂质多,尤其是脂溶性杂质对色谱柱污染大,多糖、果胶、纤维素、半纤维素、木质素和淀粉、蛋白质等严重影响色谱柱的使用寿命。

果胶存在于大多数植物中,在果蔬中加入酶制剂水解果胶质,使果汁中其他胶体失去果胶的保护作用而聚积沉淀就可达到澄清的目的。纤维素酶、果胶酶使提取液变澄清,并且用这 2 种酶来提高提取物黏度,降低和簇的形成,这有利于离心或过滤分离,使提取液具有更高的清晰度和更浓缩的风味及颜色^[4-5]。葡萄渣细胞壁成分主要是果胶和纤维素,

加入这些酶增加了葡萄皮的降解,提高香气,有利于酚类化合物在葡萄酒中的释放,有助于稳定提取液颜色^[5]。因此,笔者采用酶法对葡萄渣提取液进行澄清,并对工艺参数进行优化,为葡萄籽提取液的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 葡萄籽,中信国安葡萄酒业股份有限公司。发酵红葡萄酒后的红葡萄籽,粉碎 60 目过筛,低温干燥至恒质量后备用。主要试剂:纤维素酶(酶活力 $\geq 300\ 000$ U/g)、果胶酶(酶活力 $\geq 20\ 000$ U/g),上海蓝季科技发展有限公司;没食子酸,天津市兴复精细化工研究所;福林酚试剂,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。主要仪器:FW-80 型高速万能粉碎机,北京市永光明医疗仪器有限公司;DKB-501A 型恒温水浴锅,上海精宏实验设备公司;PH-29A 酸度计,上海精科雷磁设备公司;spectrumbiolab53 分光光度计,上海棱光技术有限公司;RE-52A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;JM5102 电子天平,余姚纪铭称重校验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原料预处理。葡萄籽粉碎过 60 目筛→料液比按 1:7 g/ml,75 ℃水浴浸提 5 h→酶解澄清→离心、静置→取上清液→测定透光度→测定多酚含量→测定原花青素含量。

1.2.2 单因素试验。

1.2.2.1 不同酶用量对葡萄籽提取液澄清效果的影响。在 45 ℃、pH 5.5、酶解时间 10 h 条件下,考察酶用量分别为 20、40、60、80、100 mg/kg 对葡萄籽提取液澄清效果的影响。

1.2.2.2 不同温度对葡萄籽提取液澄清效果的影响。在 pH 5.5、酶用量 60 mg/kg、酶解时间 10 h 条件下,考察最适温度(45 ℃)和常温(18 ℃)对葡萄籽提取液澄清效果的影响。

1.2.2.3 不同 pH 对葡萄籽提取液澄清效果的影响。在 45

作者简介 伊丽孜拉·吐尔干(1987-),女,维吾尔族,新疆伊犁人,硕士研究生,研究方向:生化制药。*通讯作者,副教授。

收稿日期 2014-03-31

℃、酶用量 60 mg/kg、酶解时间 10 h 条件下,考察最适 pH (pH 5.5) 和不调 pH (pH 3.5) 对葡萄籽提取物澄清效果的影响。

1.2.3 正交试验 根据单因素试验结果选取混合酶用量、酶解时间、pH、酶解温度 4 个因素的 3 个水平进行正交试验,因素水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	混合酶用量 (A) // mg/kg	酶解时间 (B) // h	酶解温度 (C) // °C	pH (D)
1	40	6	35	2.5
2	60	8	45	4.0
3	80	10	55	5.5

1.3 测定项目及方法 透光度的测定:取上清液,在波长 530 nm^[7] 下用分光光度计测定透光度。葡萄籽多酚含量的测定:采用 Folin-cioalteu 法^[8] 测定多酚含量。葡萄籽原花青素含量的测定:采用香草酸-盐酸法^[9] 测定原花青素含量。

2 结果与分析

2.1 酶用量的确定

2.1.1 果胶酶与纤维素酶的单独用量确定。由图 1 可见,单独使用果胶酶和纤维素酶时,随着用量的不同而透光率也有变化,果胶酶最佳用量 60 mg/kg,纤维素酶最佳用量 40 mg/kg。

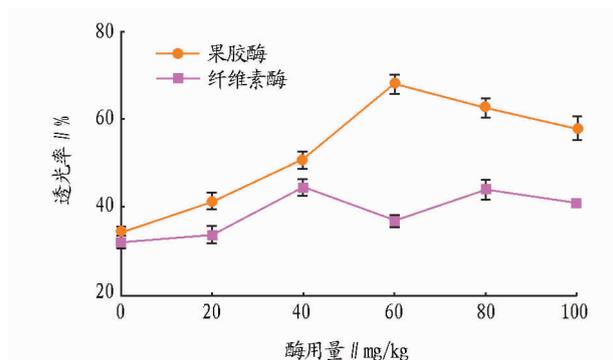


图 1 果胶酶和纤维素酶单独使用对透光率的影响

2.1.2 酶混合比例的确定。由图 2 可知,随着果胶酶和纤维素酶的比例的增加,葡萄籽提取液的透光率也有所变化,2:1 和 3:1 的透光率基本上一致,从成本上考虑,选择最佳比例为 2:1。

2.1.3 混合酶用量的确定。由图 3 可知,果胶与纤维素酶混合使用后透光率比单独使用后高。随着混合酶量增加透光率也有所提高,60 mg/kg 时达到透光率最大,继续增加用量,透光率有下降趋势。

2.2 温度对葡萄籽提取液澄清效果的影响 酶澄清葡萄籽提取液时,温度对透光率的影响程度很大。果胶酶的本质为蛋白质,蛋白质的活性受温度影响,当温度过高或过低时都会抑制酶的活力释放,温度太高还可能使酶失活,这是因为高温导致了蛋白质的变性。由图 4 可见,45 °C 酶解的透光率

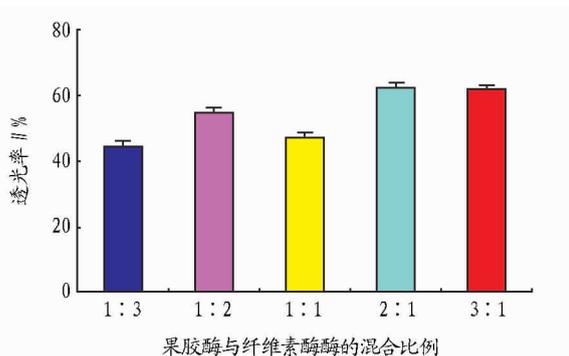


图 2 果胶酶与纤维素酶的混合比例对透光率的影响

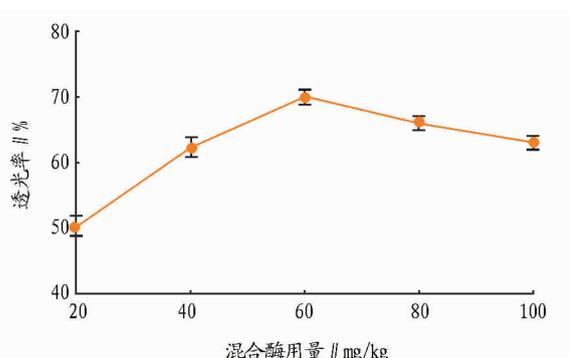


图 3 混合酶用量对透光率的影响

一直大于常温酶解。

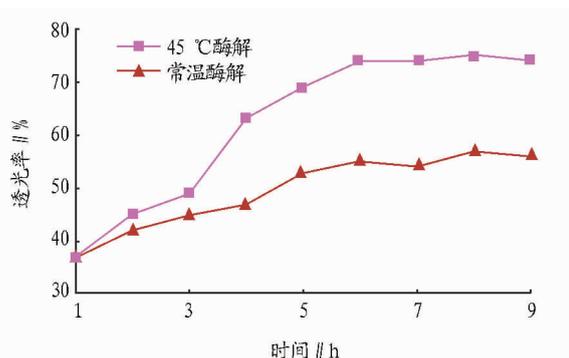


图 4 温度对葡萄籽提取液澄清效果的影响

2.3 pH 对葡萄籽提取液澄清的影响 pH 对酶活性的影响是通过改变环境酸碱度影响离子与活性中心的结合来实现的^[10-11]。不同的酶有它们对应的最适 pH,过酸或过碱都能使酶的分子结构遭到破坏而失去活性。

由图 5 可以看出,酶的活性受 pH 的影响极为显著。最适 pH (pH 5.5) 下,酶的反应速率较自然酸度快,不经过调 pH 的条件下的透光率只能达到 62%。由此可知,进行酶处理前调节 pH 不但能加快反应的速度,而且能提高感官质量。

2.4 酶用量对葡萄籽提取液澄清效果的影响 酶澄清葡萄籽提取液时,酶用量对透光度的影响程度很大。酶用量少时,对产生浑浊物质分解不完全,澄清效果差;酶用量多时,酶蛋白本身就引起了葡萄籽提取液浑浊^[12]。

由图 6 可以看出,酶用量 40、60、80 mg/kg 中,60 mg/kg 时透光率达到最大,可以看出酶用量多时,因蛋白质本身引起浑浊,透光率变低。

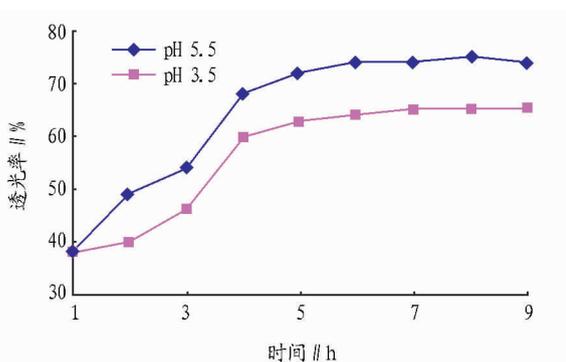


图5 pH对葡萄籽提取液澄清效果的影响

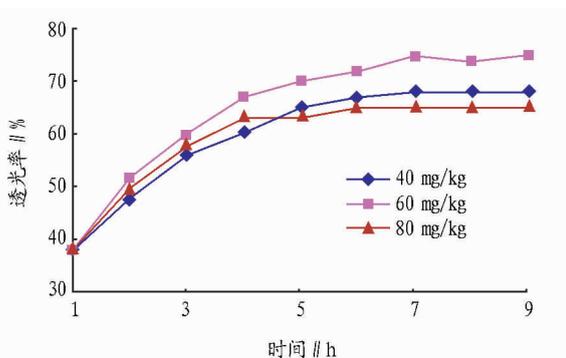


图6 酶用量对葡萄籽提取液澄清效果的影响

2.5 正交试验结果分析 由表2数据通过极差 R 可知,影响复合酶对葡萄籽提取液的因素为 $C > A > D > B$,即混合酶解温度 $>$ 混合酶用量 $>$ 酶解pH $>$ 酶解时间,酶用量以及酶解温度为主要的因素。复合酶澄清葡萄籽提取液的最佳工艺条件为 $A_2B_1C_2D_3$,即酶用量60 mg/kg,酶解时间6 h,酶解温度45 ℃,pH为5.5时对葡萄籽提取液的澄清效果最佳,透光率达到76%,即为正交试验中的组合4,色泽自然,清澈透明。

表2 正交试验结果分析

试验号	因素				透光率 %
	混合酶用量(A)	酶解时间(B)	酶解温度(C)	pH(D)	
1	1	1	1	1	60
2	1	2	2	2	69
3	1	3	3	3	66
4	2	1	2	3	76
5	2	2	3	1	68
6	2	3	1	2	67
7	3	1	3	2	64
8	3	2	1	3	61
9	3	3	2	1	66
K_1	0.650	0.667	0.627	0.647	
K_2	0.703	0.660	0.703	0.667	
K_3	0.637	0.663	0.660	0.677	
R	0.066	0.007	0.076	0.030	
最优水平	A_2	B_1	C_2	D_3	

2.6 澄清前后提取液中总多酚以及原花青素含量的测定 试验得出,没食子酸标准曲线方程: $y = 1.9523x + 0.0248$,

$R^2 = 0.9926$,通过测得的吸光值来确定多酚含量。儿茶素标准曲线方程: $y = 0.0019x - 0.0160$, $R^2 = 0.9929$,通过测得的吸光值来确定原花青素含量。

加酶澄清前后多酚以及原花青素含量见表3。由表3可以看出,澄清后葡萄籽多酚、原花青素含量差异不显著,因此说明,在澄清的同时可以达到活性成分含量的保留,对提取液有较好的改良作用。

表3 酶澄清前后多酚以及原花青素含量比较 mg/g

项目	多酚含量	原花青素含量
未添加酶澄清	17.89	9.89
添加果胶酶澄清	18.43	10.03
添加纤维素酶澄清	18.35	9.85
添加复合酶澄清	18.45	10.09

3 结论与讨论

复合酶澄清葡萄籽提取液单因素试验表明,常温处理和45 ℃水浴处理对葡萄籽提取液的影响极为显著。45 ℃水浴酶解不但使酶促反应速率加快,还能提高汁体的透光率。适当地调节pH使之接近最适宜可改善澄清效果。酶的用量应控制在60 mg/kg,较低的剂量导致处理效果不佳,较高则成本高,还会引起蛋白性浑浊。正交试验表明,最佳澄清工艺条件为:pH 5.5,酶解温度45 ℃,作用时间6 h,酶剂量60 mg/kg,颜色光亮自然。并且由多酚以及原花青素含量比较可以看出,在澄清过程中多酚以及原花青素含量不受影响。

参考文献

- [1] 刘树文. 葡萄与葡萄酒中白藜芦醇的研究进展[J]. 西北植物学报, 1999,5(5):144-148.
- [2] BOTELLA C, DE ORY I, WEB C, et al. Hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on grape pomace[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2005,26:100-106.
- [3] 春艳,姜晓坤. 葡萄皮渣中多酚物质提取工艺的研究[J]. *辽宁化工*, 2011,40(9):917-919.
- [4] CELESTINO M, FREITAS M, MEDRANO J, et al. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora naimiana* with emphasis on its physicochemical properties[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123:33-42.
- [5] CELESTINO M, FREITAS M, MEDRANO J, et al. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora naimiana* with emphasis on its physicochemical properties[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123:33-42.
- [6] REHM H, REED G. *Biotechnology: Enzymes, biomass, food and feed*, Vol. 9 [M]. Weinheim, Germany: VCH, 1996.
- [7] 邢浩,王尚义,张久红,等. 果胶酶澄清沙棘果汁最佳工艺研究[J]. *沙棘*, 2006(1):20-23.
- [6] 王鸿飞,李和生,马海乐,等. 果胶酶对草莓果汁澄清效果的研究[J]. *农业工程学报*, 2003(3):161-164.
- [8] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. *Methods in Enzymology*, 1999,299:152-178.
- [9] 姚开,何强,吕远平,等. 葡萄籽提取物中种原花青素含量不同测定方法比较[J]. *化学研究与应用*, 2002,28(2):230-232.
- [10] 孟鹏,郑宝东. 酶法高透光率青梅汁生产工艺的研究[J]. *农产品加工*, 2006(4):43-45.
- [11] CARRILLO F, LIS M J, COLOM X, et al. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study[J]. *Process Biochem*, 2005,40:3360-3364.
- [12] 项本平,陈亚萍. 变性淀粉的黏度与透光率关系的研究[J]. *化工时刊*, 2005(1):26-28.