

响应面法优化毛葡萄酒泥中 $L(+)$ -酒石酸提取工艺

米思¹, 李华^{2,*}, 刘晶²

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

2.西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:在单因素试验基础上,采用响应面法中的 Box-Behnken 试验设计优化毛葡萄酒泥提取 $L(+)$ -酒石酸工艺中的酸浸和沉降两个技术参数。结果得出酸浸的最佳工艺参数为:温度 82℃、时间 7min、37% 盐酸 8mL(以 100mL 毛葡萄酒泥计);沉降的最优工艺参数为:CaCl₂ 质量浓度 50g/L、pH6.64、反应时间 2.4h。在此条件下,毛葡萄酒泥中 $L(+)$ -酒石酸的实际酸浸提量为 41.63g/L,实际提取回收率可达 87.64%。

关键词:毛葡萄;酒泥; $L(+)$ -酒石酸;响应面法;提取工艺

Optimization of Extraction Process for $L(+)$ -Tartaric Acid from *Vitis quinquangularis* Lees via Response Surface Methodology

MI Si¹, LI Hua^{2,*}, LIU Jing²

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: On the basis of one-factor-at-a-time experiments, Box-Behnken design (BBD) and response surface methodology (RSM) were applied to optimize extraction with 37% HCl and subsequent precipitation with CaCl₂ involved in the extraction of $L(+)$ -tartaric acid from *Vitis quinquangularis* lees. The optimal HCl treatment conditions were 82 °C of temperature, 7 min of treatment time and 18% (V/V) of lees-to-HCl. The optimal precipitation conditions were addition of CaCl₂ at a ratio of 50 g/L for 2.4 h of precipitation at pH 6.64. Under these conditions, the $L(+)$ -tartaric acid yield from *Vitis quinquangularis* lees was 41.63 g/L and the actual recovery rate of $L(+)$ -tartaric acid was 87.64%.

Key words: *Vitis quinquangularis*; lees; $L(+)$ -tartaric acid; response surface methodology; extraction

中图分类号: TS262.91

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0049-05

毛葡萄(*Vitis quinquangularis* Rehd.)又名野葡萄、五角叶葡萄、鸡葡萄,是原产于我国本土的珍稀野生酿酒葡萄品种之一,是我国葡萄属东亚种群中蕴藏量最大、分布最广的一个野生种^[1],在中国秦岭、秦山以南至广西境内均有分布,其浆果具有酸高、糖低、单宁含量高三个显著特点。 $L(+)$ -酒石酸(又名右旋-2,3-二羟基丁二酸)是一种天然有机酸,主要存在于葡萄及罗望子果实中,是葡萄酒中主要的有机酸之一,也是酒石酸四种异构体中最有价值的一种,在食品、医药及化工等领域有着广泛的应用^[2-3]。

我国 $L(+)$ -酒石酸的生产起步较晚,80 年代开始才

进行探索性的 $L(+)$ -酒石酸试验研究,已形成规模的生产厂家较少,主要集中在江浙一带。目前存在的 $L(+)$ -酒石酸的生产方法主要有 4 种:抽提法、糖质发酵法、化学拆分法、酶合成法^[4]。葡萄酒的酿造过程通常伴随大量废弃物的产生,如葡萄皮渣、酒泥、粗酒石等。抽提法是指直接从葡萄工业废料中提取得到 $L(+)$ -酒石酸,这是最早使用的方法,意大利、西班牙等西欧国家一般依据此法从粗酒石中提取 $L(+)$ -酒石酸,但是目前国内外对于以葡萄酒泥为原料提取 $L(+)$ -酒石酸的方法罕有研究。酒泥是葡萄酒酿造过程中产生的一种重要的副产物,占葡萄鲜果干质量的 3.5%~8.5%,其中酒

收稿日期: 2011-03-29

作者简介: 米思(1987—),女,硕士研究生,研究方向为食品营养与安全。E-mail: babymisi@126.com

* 通信作者: 李华(1959—),男,教授,博士,研究方向为葡萄与葡萄酒学。E-mail: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

石酸含量约为 100~150kg/t^[5-6], 数量十分可观。因此以葡萄酒工业酒泥为基础, 优化 $L(+)$ - 酒石酸的提取工艺, 对提高 $L(+)$ - 酒石酸产量及降低其生产成本具有重要意义。此外, 本实验选择以野生毛葡萄酒泥为原料进行研究, 不仅充分利用了毛葡萄含酸量高这一特点, 而且为我国特色野生植物资源的深度开发利用创造了新的途径, 对改善山区环境和解决山区农民贫困问题具有重要意义。

响应曲面法是一种优化试验条件的数学统计方法, 被广泛的应用于食品工业及化学工业中^[7-10]。本研究在单因素试验的基础上, 通过 Box-Behnken 试验设计及响应面分析法对毛葡萄酒泥中 $L(+)$ - 酒石酸的提取工艺进行优化, 以期对 $L(+)$ - 酒石酸的大规模生产及研究提供科学的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

毛葡萄酒泥: 由广西都安密洛陀野生葡萄酒有限公司提供, 蒸馏, 放入冰箱, 4℃ 保存备用; 冰醋酸、氢氧化钠、偏钒酸钠、酒石酸、浓盐酸、碳酸钙、氯化钙(均为分析纯)。

1.2 仪器与设备

723A 型可见分光光度计、pHS-3C 型 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; JB-2 型恒温磁力搅拌器 上海智光仪器仪表有限公司; GSY-II 型电热恒温水浴锅 北京医疗设备厂有限责任公司; TDL-40B 型离心机 上海安亭科学仪器有限公司; 101A-1 型电热鼓风干燥箱 上海实验仪器厂有限公司; 电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 $L(+)$ - 酒石酸的提取工艺

工艺流程: 毛葡萄酒泥→酸浸→离心→沉降→过滤→酸解→脱色→结晶→ $L(+)$ - 酒石酸晶体。

操作要点: 取预先经过蒸馏处理的毛葡萄酒泥 100mL, 按照实验设计的方案进行 $L(+)$ - 酒石酸的提取。酸浸结束后, 离心、去残渣, 得到上清液, 向上清液中加入细粉状 CaCO_3 , 边加边搅拌, 使溶液达到 pH7.0, 将生成的酒石酸钙移出, 向余下的料液中按试验设计加入 CaCl_2 进行沉降、静置后, 将上述两步生成的沉淀物合并, 然后加入 40℃ 热水 95mL 及 5mL、37% 的盐酸进行溶解, 最后酸解液经脱色、结晶, 得到 $L(+)$ - 酒石酸, 称量并计算 $L(+)$ - 酒石酸的回收率, 每组实验重复 3 次, 取平均值。计算 $L(+)$ - 酒石酸回收率:

$$L(+)\text{- 酒石酸回收率}/\% = \frac{C}{A} \times 100$$

式中: A 为酸浸提液中 $L(+)$ - 酒石酸的质量浓度/(g/L); C 为酸解液中 $L(+)$ - 酒石酸的质量浓度/(g/L)。

1.3.2 $L(+)$ - 酒石酸含量的测定方法

采用偏钒酸钠溶液比色法^[11]。在室温条件下, 500nm 波长处测定 $L(+)$ - 酒石酸质量浓度与吸光度的数学关系, 绘制标准曲线, 得到标准曲线方程: $y = 0.2087x + 0.675$, $R^2 = 0.9982$ 。该方程拟合度良好, 可以用于 $L(+)$ - 酒石酸含量的计算。

1.3.3 $L(+)$ - 酒石酸提取工艺优化试验

在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计方案^[12-15], 分别以 $L(+)$ - 酒石酸酸浸提量和 $L(+)$ - 酒石酸回收率为响应值, 利用 Design Expert 7.0 进行响应面分析, 优化 $L(+)$ - 酒石酸的提取工艺。酸浸和沉降两步的试验因素和所选水平分别见表 1、2。

表 1 $L(+)$ - 酒石酸提取工艺酸浸工序响应面试验因素与水平表
Table 1 Coded values and corresponding real values of the optimization extraction parameters used in the response surface

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 酸浸温度/℃	80	85	90
X_2 37% 盐酸体积/mL	2	6	10
X_3 酸浸时间/min	5	10	15

表 2 $L(+)$ - 酒石酸提取工艺沉降工序响应面试验因素与水平表
Table 2 Coded values and corresponding real values of the optimization precipitation parameters used in the response surface

因素	水平		
	-1	0	1
X_4 CaCl_2 质量浓度/(g/L)	30	50	70
X_5 pH	5	7	9
X_6 反应时间/h	1.5	2.0	2.5

2 结果与分析

2.1 酸浸工序试验设计与优化结果

Box-Behnken 试验设计与结果见表 3, 采用数据处理软件 Design Expert 7.0 对表 3 进行拟合的二次模型方差分析, 分析结果见表 4。

当 $P < 0.05$ 时, 表明该项指标显著。由表 4 可知该工序建立的回归模型是极显著的($P < 0.0001$), 失拟项 $P = 0.2356 > 0.05$, 不显著; 并且多元相关系数 $R^2 = 0.9992$, 调整 $R^2 = 0.9978$, 说明该模型与实际试验拟合情况良好, 可以用该回归方程代替真实试验点对试验结果进行分析; 变异系数 $CV = 1.73\%$, 变异性较小。

回归方程中各变量对响应值影响的显著程度, 由 F 检验来判定, 概率 $P(F > F_{\alpha})$ 的值越小, 则说明该变量

对响应值影响的显著程度越高。表4显著性检验结果表明,一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 的影响极显著,交互项 X_1X_2 影响显著, X_1X_3 影响极显著,二次项 X_2^2 影响极显著。由此可知,各试验因素对 $L(+)$ -酒石酸酸浸提量的影响不是简单的线性关系。

表3 $L(+)$ -酒石酸提取工艺酸浸工序 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 3 Box-Behnken design and corresponding experimental results for optimizing acid extraction parameters

试验号	X_1	X_2	X_3	酸浸提量/(g/L)
1	-1	0	-1	41.537
2	0	1	1	42.472
3	0	-1	1	14.464
4	1	0	-1	38.906
5	1	-1	0	19.470
6	-1	0	1	35.937
7	1	0	1	50.016
8	0	-1	-1	14.231
9	0	1	-1	40.460
10	1	1	0	44.693
11	-1	-1	0	11.014
12	-1	1	0	40.670
13	0	0	0	42.710
14	0	0	0	42.830
15	0	0	0	42.110

表4 酸浸工序回归模型方差分析结果

Table 4 ANOVA of the regression equation describing acid extraction

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	2334.36	259.37	714.72	< 0.0001**
X_1	1	71.56	71.56	197.19	< 0.0001**
X_2	1	1488.29	1488.29	4101.05	< 0.0001**
X_3	1	7.52	7.52	20.71	0.0061**
X_1X_2	1	4.91	4.91	13.54	0.0143*
X_1X_3	1	69.81	69.81	192.35	< 0.0001**
X_2X_3	1	0.79	0.79	2.18	0.1998
X_1^2	1	9.98×10^{-3}	9.98×10^{-3}	0.028	0.8748
X_2^2	1	686.98	686.98	1893.00	< 0.0001**
X_3^2	1	3.71	3.71	10.240	0.0240
残差	5	1.81	0.36		
失拟项	3	1.52	0.51	3.400	0.2356
纯误差	2	0.30	0.15		
总和	14	2336.18			
$R^2 = 0.9992$		$R^2_{Adj} = 0.9978$	CV = 1.73%		

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

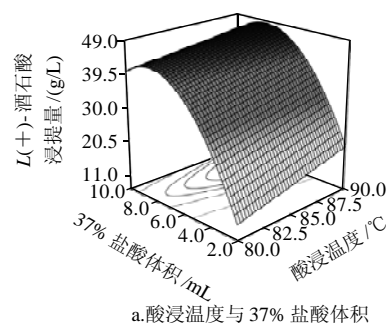
对表3结果进行多元回归分析,得到各因素对 $L(+)$ -酒石酸酸浸提量(Y_1)影响的多元二次回归方程模型:

$$Y_1 = 42.5500 + 2.9909X_1 + 13.6395X_2 + 0.9694X_3 - 1.1083X_1X_2 + 4.1775X_1X_3 - 0.4448X_2X_3 - 0.0520X_1^2 - 13.6403X_2^2 + 1.0030X_3^2 \quad (1)$$

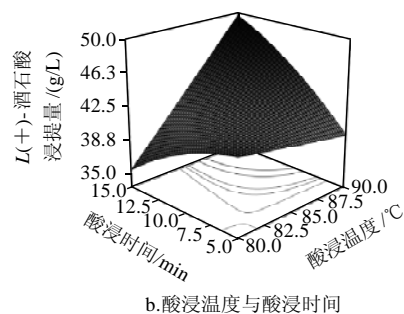
通过对上述多元二次回归方程进行分析求解,得到

$L(+)$ -酒石酸酸浸提的最优工艺参数:酸浸温度 82.2°C 、37% 盐酸 8.04mL、酸浸时间 7.15min,考虑到实际操作的便利,将 $L(+)$ -酒石酸的酸浸提最佳工艺条件修正为酸浸温度 82°C 、37% 盐酸体积 8mL、酸浸时间 7min。在此条件下, $L(+)$ -酒石酸理论预测值为 42.55g/L,实际测得的值为 41.63g/L,表明该模型合理可行。

对酸浸提中有交互作用的因素所做的响应面图见图1。由图1a可知,在37%盐酸体积不变的前提下,随着温度的升高, $L(+)$ -酒石酸的浸提量呈现逐渐上升的趋势。因为酒泥中的 $L(+)$ -酒石酸主要是以酒石酸氢钾和酒石酸钙的形式存在的,温度越高,酒石酸氢钾的溶解度越大,反应越容易进行,温度的升高还能够增加体系中分子的热运动,从而导致 $L(+)$ -酒石酸的浸提更容易进行。在温度不变的条件下,随着37%盐酸体积的增加, $L(+)$ -酒石酸的浸提量先升高,在37%盐酸体积接近8mL时,出现缓慢下滑趋势。酒泥中主要存在3种有机酸:苹果酸、酒石酸、柠檬酸,其中酒石酸是最强的酸。如果37%盐酸加入过量,会同时使其他种类的有机弱酸浸提到溶液中,进而对 $L(+)$ -酒石酸的浸提造成干扰,影响其提取量。



a. 酸浸温度与37%盐酸体积



b. 酸浸温度与酸浸时间

固定水平: 酸浸温度 85°C ; 37% 盐酸体积 6mL; 酸浸时间 10min。

图1 各两因素交互作用对 $L(+)$ -酒石酸酸浸提量影响的响应面图
Fig.1 Response surface plot for the interactive effects between extraction temperature and the amount of 37% HCl addition or extraction time on the extraction rate of $L(+)$ -tartaric acid

由图1b可知,在酸浸时间不变的情况下,随着酸浸温度的升高, $L(+)$ -酒石酸的浸提量变化不明显。在浸提温度不变的条件下,随着酸浸时间的延长, $L(+)$ -

酒石酸的浸提量出现下降的趋势,变化较明显。葡萄酒泥是一种混合物,如果浸提时间过长,会使酒泥中的色素、糖等有机物充分浸出,由于这些有机物的干扰, $L(+)$ -酒石酸的浸提量开始下降。

2.2 沉降工序试验设计与优化结果

在前期得到的酸浸提最优工艺参数的基础上,以 $L(+)$ -酒石酸回收率(Y_2)为响应值,采用相同的试验设计方法及数据处理软件对沉降工序工艺参数进行优化,Box-Behnken 试验设计与结果见表5,方差分析结果见表6。

表5 $L(+)$ -酒石酸提取工艺沉降工序 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 5 Box-Behnken design and corresponding experimental results for optimizing precipitation parameters

试验号	X_4	X_5	X_6	回收率/%
1	-1	0	-1	67.23
2	0	1	1	83.70
3	1	0	1	84.43
4	1	-1	0	74.60
5	1	0	-1	88.32
6	1	1	0	80.90
7	0	-1	1	73.10
8	-1	0	1	86.70
9	0	1	-1	72.20
10	-1	-1	0	68.40
11	0	-1	-1	76.50
12	-1	1	0	69.60
13	0	0	0	90.23
14	0	0	0	87.70
15	0	0	0	87.10

表6 沉降工序回归模型方差分析

Table 6 ANOVA of the regression equation describing CaCl_2 precipitation

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	899.58	99.95	38.71	0.0004**
X_4	1	164.89	164.89	63.86	0.0005**
X_5	1	23.80	23.80	9.22	0.0289*
X_6	1	70.09	70.09	27.14	0.0034**
X_4X_5	1	6.50	6.50	2.52	0.1734
X_4X_6	1	136.42	136.42	52.83	0.0008**
X_5X_6	1	55.50	55.50	21.49	0.0057**
X_4^2	1	86.38	86.38	33.45	0.0022**
X_5^2	1	379.02	379.02	146.78	< 0.0001**
X_6^2	1	12.46	12.46	4.82	0.0795
残差	5	12.91	2.58		
失拟项	3	7.39	2.46	0.89	0.5668
纯误差	2	5.52	2.76		
总和	14	912.49			

$R^2 = 0.9859$ $R^2_{\text{Adj}} = 0.9604$ $CV = 2.02\%$

从表6可以看出,一次项 X_4 、 X_6 对响应值影响极显著,交互项 X_4X_6 、 X_5X_6 影响极显著,此外,二次

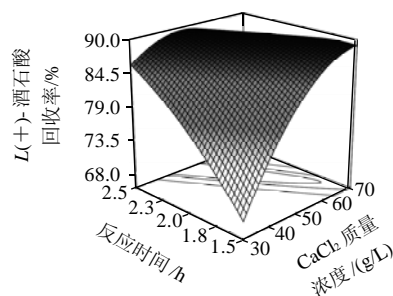
项 X_4^2 和 X_5^2 的影响也极显著,这表明各因素均不同程度的对响应值产生影响,因此本试验的因素选择合理。从表6还可知,对 $L(+)$ -酒石酸沉降工序建立的模型是极显著的($P = 0.0004$),失拟项($P = 0.5668 > 0.05$)不显著;并且该模型 $R^2 = 0.9859$,调整 $R^2 = 0.9604$,说明响应值的变化有98.59%来源于所选变量,回归方程对实际试验拟合程度较好。变异系数 $CV = 1.73\%$,说明建立的模型可以代替试验真实点对响应值进行预测和分析。

以 $L(+)$ -酒石酸的回收率为响应值(Y_2),各因素经过二次回归拟合后,得到的多元二次回归方程为:

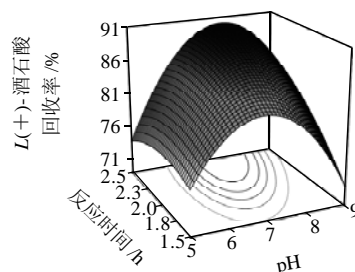
$$Y_2 = 88.3433 + 4.5400X_4 + 1.7250X_5 + 2.9600X_6 + 1.2750X_4X_5 - 5.8400X_4X_6 + 3.7250X_5X_6 - 4.8367X_4^2 - 10.1317X_5^2 - 1.8367X_6^2 \quad (2)$$

对回归方程(2)进行进一步分析求解,得到沉降工序的最优工艺条件: CaCl_2 质量浓度50.15g/L、pH6.64、反应时间2.36h,理论回收率为88.34%。考虑到实际操作的便利,将得到最优工艺参数修正为 CaCl_2 质量浓度50g/L、pH6.64、反应时间2.4h,在此条件下进行试验,得到 $L(+)$ -酒石酸的回收率为87.64%,比理论预测值低0.79%,因此,利用响应面分析法得到的沉降工序的工艺参数合理可靠,具有实际应用价值。

$L(+)$ -酒石酸沉降工序中,对响应值产生交互作用影响的各因素的响应面图分别见图2。



a. CaCl_2 质量浓度与反应时间



b. pH 值与反应时间

固定水平: CaCl_2 质量浓度 50g/L; pH7; 反应时间 2h。

图2 各两因素交互作用对 $L(+)$ -酒石酸回收率影响的响应面图
Fig.2 Response surface plot for the interactive effects between reaction time and the amount of CaCl_2 addition or pH on the extraction rate of $L(+)$ -tartaric acid

由图 2a 可知, 随着 CaCl_2 质量浓度和反应时间的增加, $L(+)$ - 酒石酸的回收率均呈现上升趋势, 而且变化明显。加入 CaCl_2 的目的是为了将溶液中的酒石酸盐类及酒石酸全部转化为酒石酸钙沉淀, 因此 CaCl_2 质量浓度越大, 反应越充分, 最终回收得到的酒石酸的量也就更多; 同样, 随着反应时间的增加, 反应会更加彻底, 也会使 $L(+)$ - 酒石酸的回收率上升。

图 2b 直观的反映了在 CaCl_2 质量浓度一定的条件下, pH 值和反应时间对 $L(+)$ - 酒石酸回收率产生的交互影响。在反应时间不变的情况下, 随着 pH 值的变化, $L(+)$ - 酒石酸的回收率呈现先上升后下降的趋势, 在 pH 值接近 7 时, 回收率达到最大值。因为 $L(+)$ - 酒石酸的沉降反应是在一个混合溶液体系中进行的, 其中包含很多的胶体物质, 如色素、单宁与色素生成的络合物、磷酸铁等, 这些胶体物质在远离它们的等电点处会发生絮凝作用而生成沉淀, 因此 pH 值过大或是过小都可能影响 $L(+)$ - 酒石酸的回收。

3 结 论

通过响应曲面分析法优化 $L(+)$ - 酒石酸提取过程中的酸浸和沉降两个重要参数, 最终得到 $L(+)$ - 酒石酸酸浸的最优工艺参数为: 酸浸温度 82°C 、37% 盐酸体积 8mL(以 100mL 毛葡萄酒泥计)、酸浸时间 7min; 沉降工序的最佳工艺参数为: CaCl_2 质量浓度 50g/L、pH6.64、反应时间 2.4h。照上述工艺条件进行验证实验, 毛葡萄酒泥中 $L(+)$ - 酒石酸的实际酸浸提量为 41.63g/L, 实际回收率可达 87.64%, 与预测值接近, 且重现性较好, 证明优化结果准确可靠。

参考文献:

- [1] 涂佳, 邓学良, 李忠海, 等. 响应面法优化野生毛葡萄中原花青素醇提工艺的试验[J]. 湖南林业科技, 2010, 37(1): 1-6.
- [2] YALCIN D, OZCALIK O, ALTIOK E, et al. Characterization and recovery of tartaric acid from wastes of wine and grape juice industries[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2008, 94(3): 767-771.
- [3] VERSARI A, CASTELLARI M, SPINABELLI U, et al. Recovery of tartaric acid from industrial enological wastes[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2001, 76(5): 485-488.
- [4] 楼锦芳, 张建国. 酶法合成 $L(+)$ - 酒石酸的研究进展[J]. 食品科技, 2006, 31(11): 162-164.
- [5] NERANTZIS E T, TATARIDIS P. Integrated enology-utilization of winery by-products into high added value products[J]. Journal of Food Science and Technology, 2006(3): 1-12.
- [6] SALGADO J M, RODRIGUEZ N, CORTES S, et al. Improving downstream processes to recover tartaric acid, tartrate and nutrients from vinasses and formulation of inexpensive fermentative broths for xylitol production[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(13): 2168-2177.
- [7] 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 68-71.
- [8] BRANDVIK P J, DALING P S. Optimization of oil spill dispersant composition by mixture design and response surface methods[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1998, 42(1/2): 63-72.
- [9] 王振宇, 周芳, 赵鑫. 响应面分析法优化超声波提取大果沙棘总黄酮工艺[J]. 中国食品学报, 2007, 7(6): 44-51.
- [10] 孟宪军, 李冬男, 汪艳群, 等. 响应曲面法优化五味子多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 111-115.
- [11] 庞玉珍, 齐风兰. 比色法测定葡萄酒中酒石酸的条件试验[J]. 天津轻工业学院学报, 1991, 11(1): 74-78.
- [12] 张志清, 吕晓飞, 姚艳艳, 等. 响应面法优化超声波辅助提取麦麸中阿魏酸[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(9): 76-81.
- [13] 刘军海, 黄宝旭, 蒋德超. 响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 114-118.
- [14] BOX G E P, BEHNKEN D W. Some new three level designs for the study quantitative variables[J]. Technometrics, 1960, 2(4): 455-475.
- [15] RIVAS B, TORRADO A, MOLDES A B, et al. Tartaric acid recovery from distilled lees and use of the residual solid as an economic nutrient for *Lactobacillus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(20): 7904-7911.