

辣椒细胞质雄性不育相关线粒体基因
片段的克隆及序列分析

马继鹏, 巩振辉, 黄 炜

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探究 3 种不同类型辣椒细胞质雄性不育材料的不育分子机理, 寻找与雄性不育相关的基因。【方法】采用高盐—蛋白酶 K 法提取辣椒细胞质雄性不育系及其保持系的绿色叶片线粒体 DNA(mtDNA), 根据已报道的辣椒细胞质雄性不育相关基因 *orf456* 序列设计特异引物, 利用 PCR 反应, 从 3 种不同类型辣椒细胞质雄性不育材料线粒体基因组中均扩增出 330 bp 左右大小的条带。【结果】经克隆测序及序列分析表明, 3 种不同类型辣椒细胞质雄性不育材料所获片段序列完全一致, 大小为 330 bp, 命名为 CMS330, 与 *orf456* 核酸序列同源性达 99%。【结论】3 种不同类型辣椒细胞质雄性不育材料具有相似的不育分子机理。

【关键词】 辣椒; 细胞质雄性不育; 线粒体 DNA; *orf456*

【中图分类号】 S641.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)02-0124-05

Cloning and sequence analysis of the specific mitochondrial DNA
fragment related to cytoplasmic male sterility in pepper

MA Ji-peng, GONG Zhen-hui, HUANG Wei

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 Three different types of cytoplasmic male sterile mechanism in pepper were investigated to find out the DNA fragment related to cytoplasmic male sterility. 【Method】 Pepper mitochondrial DNA (mt DNA) was extracted from green leaves of cytoplasmic male sterile line and its maintainer line based on high salt-proteinase K method. The specific fragments at around 330 bp were amplified by PCR using special primers designed on the basic of pepper cytoplasmic male sterility associated gene-*orf456* in three kinds of cytoplasmic male sterile lines. 【Result】 Further sequences analysis showed that these three fragments are identical and termed CMS330 of 99% homology with *orf456*. 【Conclusion】 It reflected that they have the similar male sterile mechanism.

Key words: pepper; cytoplasmic male sterility; mitochondrial DNA (mt DNA); *orf456*

细胞质雄性不育(Cytoplasmic Male Sterility, CMS)是一种母性遗传现象。除了在杂种优势利用方面具有重要作用外, 细胞质雄性不育也是研究核

质遗传与互作的良好模型, 尤其适合研究核基因与线粒体基因互作的关系^[1]。大量的遗传学、细胞学以及分子生物学研究表明, 雄性不育现象与线粒体

* [收稿日期] 2007-02-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30771467, 30571262); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD01A7); 教育部春晖计划项目(Z2005-2-71005)

[作者简介] 马继鹏(1982—), 男, 陕西西安人, 在读硕士, 主要从事蔬菜育种与生物技术研究。E-mail: himhim1982@163.com

[通讯作者] 巩振辉(1957—), 男, 陕西礼泉人, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜种质资源与生物技术研究。E-mail: Gzh168@yahoo.com.cn.

DNA 的结构改变有密切关系,研究与分析植物线粒体基因组结构,对于揭示细胞质雄性不育的分子机理具有重要作用^[2-3]。

辣椒(*Capsicum annuum* L.)是常异花授粉的蔬菜作物,具有明显的杂种优势。常规杂交制种方法费工费时,成本高,纯度也难以保证,而利用辣椒雄性不育系生产杂种一代,可以简化制种手续,提高种子纯度。因此,国内外非常重视对辣椒雄性不育的研究。1951 年 Martin 与 Grawford 首次报道了辣椒雄性不育现象,此后相继出现一些关于辣椒雄性不育系选育及其生理生化的研究报道^[4-5]。Kim 等^[6]研究发现了一个辣椒雄性不育相关线粒体基因 *orf456*,转录与表达水平及转基因的研究证明,其与雄性不育性状密切相关。而国内研究辣椒雄性不育和寻找相关不育基因的研究与报道比较少,对不同来源的辣椒雄性不育材料是否可能具有相似的不育分子机理,仍需要进一步研究。本研究探究了 3 种不同类型辣椒细胞质雄性不育材料可能的不育基因,寻找相关的不育基因,旨在为辣椒细胞质雄性不育的机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

陕西杨凌西北农林科技大学园艺学院辣椒育种课题组通过种间杂交与诱变相结合的技术,创制和选育了不同类型的辣椒 CMS。本试验以其中 3 种遗传性状稳定的辣椒雄性不育系 3A、4A、5A 及其保持系 3B、4B、5B 为材料。试验材料种植于西北农林科技大学园艺场,按常规方法进行田间管理。采摘辣椒幼嫩叶片用于提取线粒体 DNA。

1.2 方法

1.2.1 辣椒线粒体 DNA 的提取与制备 辣椒线粒体 DNA 提取方法以 Nunzia 等^[7]的高盐-蛋白酶 K 法为基础并作了改进。

(1)分别采集田间辣椒雄性不育系及其保持系的幼嫩叶片,用蒸馏水冲洗 2~3 次,置于预冷的研钵中,按每 g 鲜样 5 mL 的比例,加入预冷的提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.5 mol/L NaCl; 25 mmol/L EDTA, pH 8.0; 体积分数 1% BSA; 用前加入 56 mmol/L β -巯基乙醇)和石英砂在冰上研磨,直至匀浆状。

(2)用 6 层无菌纱布过滤匀浆液,滤液于 500 g 离心 10 min,除去大组织碎片。

(3)将上清液转移至一新管中,分别于 2 600 和

3 000 g 离心 15 和 10 min,以除去叶绿体等细胞器。

(4)上清液转移至一新管中,依次加入 DNase I 和 MgCl₂,使其终浓度分别为 100 和 10 mmol/L, 4 ℃ 反应 20 min,最后加入终浓度为 50 mmol/L EDTA 终止反应,于 18 000 g 离心 15 min 沉淀线粒体。去上清液,按每 g 鲜样 3 mL 的比例,加入预冷的提取缓冲液,用毛笔轻轻悬浮线粒体沉淀,于 18 000 g 离心 15 min,即得纯化的线粒体。

(5)将线粒体沉淀重悬于 1 mL 裂解缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 25 mmol/L EDTA, pH 8.0; 体积分数 0.5% SDS)中,再向其中加入蛋白酶 K,使其终浓度达 50 μ g/mL, 37 ℃ 保温 1 h,间隔晃动。

(6)裂解液中加入等体积的氯仿/异戊醇(V(氯仿):V(异戊醇)=24:1),轻轻混匀,于 13 000 g 离心 10 min,重复抽提 1 次。吸取上清液,加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠、2.5 倍体积无水乙醇,轻柔混匀。于 -20 ℃ 下放置 3 h, 13 000 g 离心 10 min,沉淀线粒体 DNA。弃去上清液,沉淀用体积分数 70% 乙醇清洗 2 次,放置室温晾干。

(7)加入适量的 TE 缓冲液,置于 -20 ℃ 冰箱保存。

用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测提取的辣椒线粒体 DNA。

1.2.2 辣椒细胞质雄性不育相关线粒体基因片段的克隆 根据 NCBI 数据库中辣椒细胞质雄性不育相关基因 *orf456* 序列设计 1 对引物。上游引物 MS8F 的序列为: 5'-GAGCAAGAAGCGGAAC-TAC-3', 下游引物 MS8R 的序列为 5'- TTCGTTCCCTCACAGTCTC-3', 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

以辣椒线粒体 DNA 为模板扩增基因片段。PCR 反应体系为:模板 50 ng, 1×PCR buffer, 1.8 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs, 上、下游引物各 0.8 μ mol/L, Taq 酶 1 U。PCR 反应程序为:95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 45 s, 51 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶回收试剂盒将 3 种不育材料的特异片段回收,回收片段与 pMD18-T(购自宝生物(大连)公司)载体连接,转化至大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞。连接和转化程序参照载体说明书进行操作。分别采用通用引物(BacBEST Primer Rv-M、BacBEST Primer M13-47)和特异引物(MS8F、MS8R)进行菌落 PCR 鉴定,挑选有外源目的片段插入的阳性克隆测序。

1.2.3 辣椒细胞质雄性不育相关线粒体基因片段的序列测定 3 条序列的测定由捷瑞生物工程(上海)有限公司完成,每个样品重复 2 次。利用 NCBI 网站和 DNAssist 2.2 等生物信息学软件对序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 辣椒线粒体 DNA 的检测

图 1 表明,采用高盐-蛋白酶 K 法提取的辣椒线粒体 DNA,经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测可见,条带清晰,无明显拖尾。采用紫外分光光度法测定表明,所有样品的 OD_{260}/OD_{280} 均为 1.8~2.0。表明提取的线粒体 DNA 质量能够满足进一步试验的要求。

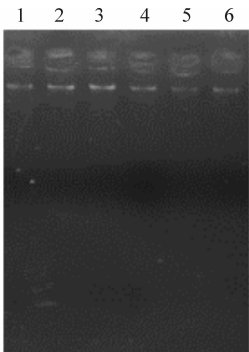


图 1 辣椒线粒体 DNA 琼脂糖凝胶电泳的检测结果
1,3,5. 3A、4A、5A 线粒体的 DNA;2,4,6. 3B、4B、5B 线粒体的 DNA

Fig. 1 Result of electrophoresis on agarose gel of mtDNA isolated from cytoplasmic male sterile line amaitainer line in pepper
1,3,5. mtDNA of 3A,4A,5A;2,4,6. mtDNA of 3B,4B,5B

2.2 辣椒细胞质雄性不育相关线粒体基因片段的克隆

2.2.1 辣椒细胞质雄性不育相关线粒体基因片段的扩增 用 3 种辣椒细胞质雄性不育系及其相应保持系线粒体 DNA 作模板,用特异引物进行 PCR 扩增,结果从雄性不育系中均扩增得到了 330 bp 的条带,而在相应保持系中均无此条带(图 2)。

2.2.2 重组质粒菌落的 PCR 鉴定 3 种辣椒细胞质雄性不育材料扩增得到的特异片段经回收后,连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞。重组质粒经通用引物 BacBEST Primer Rv-M、Bac BEST Primer M12-47 和特异引物 (MS8F、MS8R)的菌落 PCR 鉴定(图 3),获得了与目的片段大小一致的条带,证明回收片段已经连接到载体上。

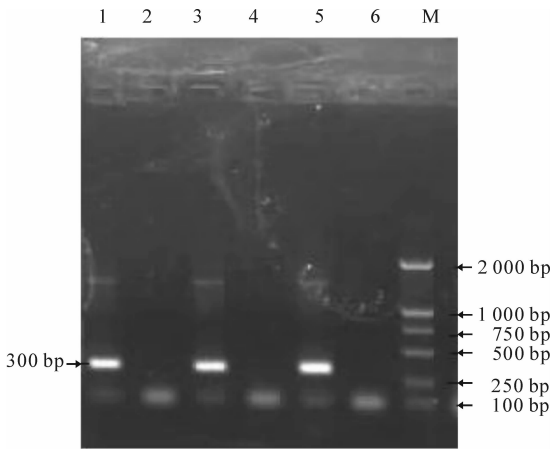


图 2 辣椒雄性不育相关线粒体基因片段 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果
1,3,5. 3A、4A、5A 的 PCR 产物;2,4,6. 3B、4B、5B 的 PCR 产物;M. DNA 标准分子量 DL2000

Fig. 2 Result of electrophoresis on agarose gel of PCR products related to cytoplasmic male sterility in pepper
1,3,5. 3A,4A,5A PCR product respectively;2,4,6. 3B,4B,5B PCR product respectively;M. DL2000 marker

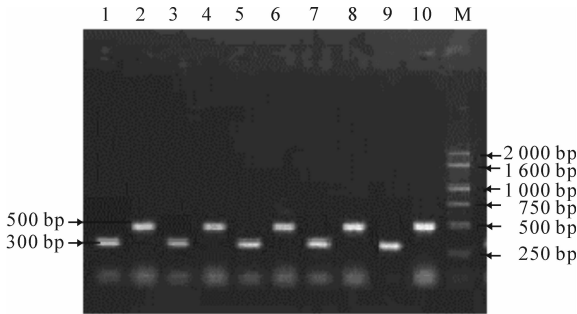


图 3 辣椒雄性不育相关线粒体基因片段 PCR 扩增产物重组质粒的菌落 PCR 鉴定结果
1,3,5,7,9. 特异引物的菌落 PCR 产物;2,4,6,8,10. 通用引物的菌落 PCR 产物;M. DNA 标准分子量 DL2000

Fig. 3 Result of bacterial colony PCR of recombinant plasmid related to cytoplasmic male sterility in pepper
1,3,5,7,9. Bacterial colony PCR by specific primer;2,4,6,8,10. Bacterial colony PCR by universal primer;M. DL2000 marker

2.3 辣椒细胞质雄性不育相关线粒体基因片段的序列测定与分析

序列的测定结果(图 4)表明,3 种辣椒细胞质雄性不育材料扩增片段的序列完全一致,扩增得到的片段大小为 330 bp,命名为 CMS330,经 NCBI 及 DNAssist2.2 软件分析比对发现,与已报道的辣椒细胞质雄性不育相关基因 *orf456* 高度同源^[7],核酸序列只有 1 个碱基差异,即 *orf456* 第 159 位 T 与 CMS330 第 89 位 C 的差异;推测 CMS330 可以编码

108 个氨基酸,与 *orf456* 所推测蛋白序列完全一致,显示出高度的保守性。

CMS330: -----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----G 1
orf456: ATGCCCAAAAGTCCCATGTATTCTGGTTAAACAACCAGCAATTTCCGACAAGTCTTTCTTCATTGGA**G** 71

CMS330: 80 90 100 110 120 130 140
AGCAAGAAGCGGAAC TACAACATTTACATGCAATTT CACCATGAATTT ATTGATTATGGCACATTGTTTA 72
orf456: AGCAAGAAGCGGAAC TACAACATTTACATGCAATTT CACCATGAATTT ATTGATTATGGCATTGTTA 142

CMS330: 150 160 170 180 190 200 210
CTTTTCTTTTTATCT CGGTATTTCAATCGGCATTTTTTGCGGGCCGGTTTTTTGAGCGAAGTGAAGTTTTA 143
orf456: TTTTCTTTTTATCTT GGTATTTCAATCGGCATTTTTTGCGGGCCGGTTTTTTGAGCGAAGTGAAGTTTTA 213

CMS330: 220 230 240 250 260 270 280
CAGGAATTGGAGAACTTCCAGCTAGAAAAAATAAAACTGAAAACGGAAGCAGAAGTGAATTTCTTTGTAG 214
orf456: CAGGAATTGGAGAACTTCCAGCTAGAAAAAATAAAACTGAAAACGGAAGCAGAAGTGAATTTCTTTGTAG 284

CMS330: 290 300 310 320 330 340 350
AGAGCACTTGAGAATGAATGAAGAATTACAATTACCTGTTCCAGATGGAACGAGTATGCACATCTCCGACT 285
orf456: AGAGCACTTGAGAATGAAGTAAGAATTACAATTACCTGTTCCAGATGGAACGAGTATGCACATCTCCGACT 355

CMS330: 360 370 380 390 400 410 420
TTTTAGGGAAAGCCTTTTTGGTCGACGAGACTGTGAGGGAACGAA----- 330
orf456: TTTTAGGGAAAGCCTTTTTGGTCGACGAGACTGTGAGGGAACGAA TATTAGGGCTGACTCAAATTTATATG 423

CMS330: 430 440 450 -----
orf456: GATCTAAAAACAATGGAGCAACCGAGTAA456

图 4 CMS330 与不育相关基因 *orf456* 的同源性比较

Fig. 4 Homologic Comparison of CMS330 and *Orf456* Related to Male Sterility

3 讨 论

近年来,分子生物学的研究与应用,使人们对于许多植物细胞质雄性不育分子机理已经有了比较清楚地认识,也克隆得到部分雄性不育的线粒体候选基因^[8-13]。此外,对辣椒雄性不育的分子生物学机理研究也取得了一定进展^[14-17]。但由于植物雄性不育分子机理的复杂性,使得寻找与雄性不育相关的分子标记乃至克隆雄性不育相关的基因变得比较困难。随着人类基因组计划及其他模式生物基因组计划的实施,相关生物信息学数据资料以前所未有的速度积累,充分发掘数据库中所积累的资料信息,减小试验的盲目性,加快试验周期,不失为一条有益的思路。

本试验利用同源序列候选克隆法,获得 1 条雄性不育相关序列 CMS330,此片段与 *orf456* 高度同源^[7],核酸序列同源性高达 99%,蛋白质序列完全一致。根据 Kim 等^[6]对于 *orf456* 所作的研究,初步说明本试验中 3 种不同类型辣椒细胞质雄性不育材料具有相似的败育分子机理,至于线粒体特异片段 CMS330 在花粉败育中的作用,以及产生这几种材料败育表型差异的原因,仍需进一步研究。

另外,前人的线粒体 DNA 提取方法^[18-19],需要黄化苗或特殊营养器官(块茎或叶球)作为提取材料,以避免线粒体 DNA 受到叶绿体 DNA 的污染,因此对于那些无特殊营养器官或者黄化苗材料需求

量较大的植物而言,取材就有一定的困难。本方法以辣椒幼嫩叶片为提取材料,操作简单且能够保证试材的供应。另外,本试验方法对试剂及仪器的要求较低,一般实验室均可满足。

4 结 论

据辣椒细胞质雄性不育相关基因 *orf456* 序列设计 1 对特异引物,以 3 种不同类型辣椒细胞质雄性不育材料及其保持系线粒体 DNA 为模板,利用 PCR 扩增,均从不育材料线粒体基因组中扩增出 330 bp 左右的条带。测序结果及分析表明,此片段与 *orf456* 核酸序列同源性高达 99%,初步说明其可能具有相似的败育机理。

〔参考文献〕

- [1] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J]. Plant Cell, 2004, 16: 154-169.
- [2] 凌杏元, 周培疆, 朱英国. 水稻红莲型细胞质雄性不育系与保持系 mtRNA 差异显示和差别片段的分析 [J]. 植物学报, 2000, 42(3): 284-288.
Ling X Y, Zhou P J, Zhu Y G. Differential display of rice mtRNA in HL type cytoplasm male sterility (CMS) line and maintainer line and analysis of differential fragments [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(3): 284-288. (in Chinese)
- [3] Linke B, Borner T. Mitochondrial effects on flower and pollen development [J]. Mitochondrion, 2005, 5(6): 389-402.
- [4] 耿三省, 王志源, 蒋健箴, 等. 辣椒雄性不育系小孢子发生的细胞学观察 [J]. 园艺学报, 1994, 21(2): 165-169.

- Geng S S, Wang Z Y, Jiang J Z, et al. Cytological studies on microsporogenesis of the male sterile lines of pepper[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1994, 21(2): 165-169. (in Chinese)
- [5] 尚宏芹, 刘建萍, 高尚勇. 辣椒雄性不育的研究进展[J]. 长江蔬菜, 2005(1): 35-38.
- Shang H Q, Liu J P, Gao S Y. Progress of the male sterility in hot pepper [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2005(1): 35-38. (in Chinese)
- [6] Kim D H, Kim B D. Isolation and characterization of CMS-associated *orf456* gene from pepper (*Capsicum annuum* L.) [C]. Plant & Animal Genomes XIII Conference, 2005, San Diego, CA: [s. n.].
- [7] Nunzia S, Teodoro C, Laurence M. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue[J]. Plant Mol Bio Rep, 2001, 19: 67a-67h.
- [8] Singh M, Brown G G. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region [J]. The Plant Cell, 1991, 3(12): 1349-1362.
- [9] Handa H, Nakajima K. Different organization and altered transcription of the mitochondrial *atp6* gene in the male-sterile cytoplasm of rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Curr Genet, 1992, 21: 153-159.
- [10] Song J, Hedgcoth C. A chimeric gene (*orf256*) is expressed as protein only in cytoplasmic male sterility lines of wheat [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26(1): 535-539.
- [11] Akagi H, Sakamoto M, Shinjyo C, et al. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility [J]. Theor Appl Genet, 1994, 25: 52-58.
- [12] 危文亮, 王汉中, 刘贵华. 植物细胞质雄性不育性与育性恢复的分子生物学研究进展[J]. 遗传, 2005(4): 651-658.
- Wei W L, Wang H Z, Liu G H. Advanced biological studies on the cytoplasmic male sterility and its fertility restoration in plants [J]. Hereditas, 2005(4): 651-658. (in Chinese)
- [13] 王永飞, 马三梅, 张鲁刚, 等. 植物细胞质雄性不育的分子机理研究进展[J]. 自然科学进展, 2002(10): 1009-1014.
- Wang Y F, Ma S M, Zhang L G, et al. Progress of the studies on molecular mechanism of plant cytoplasmic male sterility [J]. Progress in Natural Science, 2002(10): 1009-1014. (in Chinese)
- [14] 张宝玺, 王立浩, 黄三文, 等. 辣椒分子遗传图谱的构建和胞质雄性不育恢复性的 QTL 分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(7): 818-822.
- Zhang B X, Wang L H, Huang S W, et al. Construction of a molecular linkage map and QTL analysis of fertility restorer of *Capsicum annuum* L. [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(7): 818-822. (in Chinese)
- [15] 唐冬英, 邹学校, 刘志敏, 等. 辣椒胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004(4): 307-309.
- Tang D Y, Zou X X, Liu Z M, et al. Identification of rapid marker linked to a restorer gene for cytoplasmic male sterility in pepper [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences Edition, 2004(4): 307-309. (in Chinese)
- [16] 张子学, 隋益虎, 崔广荣, 等. 辣椒雄性不育 RAPD 体系优化及标记的筛选[J]. 种子, 2005(2): 24-26.
- Zhang Z X, Sui Y H, Cui G R, et al. RAPD system optimization and genetic marker filtration of cytoplasmic male sterile lines in pepper [J]. Seed, 2005(2): 24-26. (in Chinese)
- [17] 常彩涛, 王春国, 陈成彬, 等. 细胞质雄性不育辣椒育性恢复基因特异分子标记的筛选[J]. 实验生物学报, 2005, 38(3): 227-232.
- Chang C T, Wang C G, Chen C B, et al. Identification of molecular markers linked to the fertility restoring gene for the *Capsicum annuum* L. [J]. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 2005, 38(3): 227-232. (in Chinese)
- [18] 史公军, 王彦华, 侯喜林. 不结球白菜线粒体 DNA 的提取及分析[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1): 52-54.
- Shi G J, Wang Y H, Hou X L. Extraction and analysis of mitochondrial DNA in non-heading Chinese cabbage [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2004, 13(1): 52-54. (in Chinese)
- [19] 刘杰, 崔成日, 李景鹏. 一种简易快速提取洋葱线粒体 DNA 的方法[J]. 园艺学报, 2003(5): 553.
- Liu J, Cui C R, Li J P. A simple and rapid method for the isolation of mitochondrial DNA from onion [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003(5): 553. (in Chinese)

葡萄果皮花色素苷提取工艺的研究

王 华^a, 菅 蓁^a, 郭耀东^b

(西北农林科技大学 a. 葡萄酒学院; b. 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**获得葡萄果皮中花色素苷提取最佳工艺。**【方法】**分析了提取剂、盐酸用量、提取温度、料液比、提取时间、提取次数对葡萄果皮中花色素苷提取率的影响,并在此基础上进行正交试验。**【结果】**最佳提取工艺为:用含体积分数 0.1% 盐酸的甲醇作为提取剂,40 ℃ 水浴中超声波辅助提取,提取时间 50 min,料液比 1 : 7,提取 2 次。各因素对葡萄果皮中花色素苷提取率的影响程度依次为:提取次数>料液比>提取时间>提取温度。**【结论】**得到了葡萄果皮中花色素苷的最佳提取工艺,该工艺下花色素苷的提取率为 73.10%。

[关键词] 葡萄果皮;花色素苷;提取工艺优化

[中图分类号] TS261.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)02-0129-05

Study on the extraction technology of anthocyanins from the grape pomace

WANG Hua^a, JIAN Zhen^a, GUO Yao-ong^b

(a. College of Enology; b. College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study is to improve the condition for the extraction of anthocyanins from grape pomace. **【Mehtod】** Single-factor and orthogonal experiments were adopted to establish the optimal conditions for the extraction of anthocyanins, with the yield of extraction as index. **【Result】** The results showed that: with 0.1% HCl (V/V) MeOH as extractant assisted by ultrasonic extraction at 40 ℃, the extraction time is 50 min, the ratio of grape pomace and extraction being 1 : 7 and twice-time extraction the best. The sequence of actors that worked on the yield of anthocyanins were as below: extraction number> extraction vol. > extracted time> extraction temperature. **【Conclusion】** We obtained the condition for the extraction of anthocyanins from grape pomace, yiefd of extraction is 73.10%.

Key words: grape pomace; anthocyanins; optimal extraction technology

花色素苷是葡萄酒中主要的呈色物质,其对葡萄酒的感官品质和保健功能有重要影响。花色素苷广泛存在于花、果实等植物细胞中,使其呈现由红、紫红到蓝等不同的颜色。葡萄中的花色素苷主要分布于果皮、果肉、葡萄籽、芽鳞片等器官中,以果皮中的含量最高^[1]。葡萄果皮中的花色素苷通过浸渍发酵,可部分转移到葡萄酒中,成为葡萄酒最主要的呈

色物质,对葡萄酒的感官品质有重要影响^[2]。对葡萄酒中多酚类物质生理功能的研究发现,葡萄酒中花色素苷等多酚类物质具有预防心脑血管疾病、预防癌症等保健作用^[3-6]。目前已知花色素苷具有抗氧化、消除自由基、改善肝脏以及血清中的脂质、防止动脉硬化、抗变异原和抗肝炎及预防眼科领域疾病等功能^[7-8]。

* [收稿日期] 2007-03-09
[基金项目] 科技部科技成果重点推广项目计划(2004EC000317)
[作者简介] 王 华(1959—),女,河北阜城人,教授,博士,博士生导师,主要从事葡萄与葡萄酒研究。
E-mail: wanghua@nwsuaf.edu.cn

研究葡萄果皮中的花色素苷提取方法,对于利用葡萄果皮渣开发功能性食品具有重要意义。提取葡萄果皮中的花色素苷,常用的提取溶剂为酸化水溶液和酸化有机溶液。常用的酸主要有甲酸、乙酸、盐酸、酒石酸和三氟乙酸等。有机溶剂主要为甲醇、乙醇和丙酮^[9-14]。通常在低温、避光条件下提取多次后^[12,14],合并提取液,在低于 35 ℃ 的温度下用旋转蒸发仪浓缩^[15],1 200~15 000 g 离心 5~15 min^[9,12]。这些常规方法耗时长,溶媒用量大,能耗高。近年来超声波在 高分子化合物降解、有机合成、提取分离等方面得到了广泛的研究和应用^[16]。本试验采用超声波辅助提取葡萄果皮中的花色素苷,研究不同提取条件对赤霞珠(*Cabernet-sauvignon*)葡萄果皮中花色素苷提取率的影响,以期 为花色素苷提取工艺改进、降低提取成本、提高产品质量提供 参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 供试材料 赤霞珠葡萄果皮由西北农林科技大学葡萄酒学院提供。甲醇、乙醇、丙酮、甲酸、盐酸、偏重亚硫酸钠均为分析纯。

1.1.2 主要仪器 江苏 SP-KQ-300DE 数控型超声波清洗器,岛津 SP-2102UV 紫外可见分光光度计。

1.2 试验方法

1.2.1 葡萄果皮花色素苷提取工艺的单因素试验

(1)提取剂的选择。称取葡萄皮 5.00 g 3 份置于三角烧瓶中,分别加入均含体积分数 1% 盐酸的甲醇、乙醇和丙酮,料液比为 1:10(质量比体积,下同),30 ℃ 水浴中超声波辅助提取,频率 24 kHz,提取时间为 30 min,共提取 3 次,合并提取液,每处理重复 3 次。测定花色素苷含量,并计算各处理的提取率,以衡量提取溶剂对浸提效果的影响。

(2)盐酸用量的选择。称取葡萄皮 5.00 g 5 份

置于三角烧瓶中,分别加入含体积分数 0.1%,0.5%,1%,2%,5% 盐酸的甲醇,料液比为 1:10,30 ℃ 水浴中超声波辅助提取,频率 24 kHz,提取时间为 30 min,共提取 3 次,合并提取液,每处理重复 3 次。测定花色素苷含量,并计算各处理的提取率。

(3)提取温度的选择。称取葡萄皮 5.00 g 5 份置于三角烧瓶中,加入含体积分数 0.1% 盐酸的甲醇,料液比为 1:10,分别于 20,30,40,50,60 ℃ 水浴中超声波辅助提取,频率 24 kHz,提取时间为 30 min,共提取 3 次,合并提取液,每处理重复 3 次。测定花色素苷含量,并计算各处理的提取率。

(4)料液比的选择。称取葡萄皮 5.00 g 10 份置于三角烧瓶中,加入含体积分数 0.1% 盐酸的甲醇,料液比分别为 1:2,1:3,1:4,1:5,1:6,1:7,1:8,1:9,1:10 和 1:11,于 40 ℃ 水浴中超声波辅助提取,频率 24 kHz,提取时间为 30 min,共提取 3 次,合并提取液,每处理重复 3 次。测定花色素苷含量,并计算各处理的提取率。

(5)提取时间的选择。分别称取葡萄皮 5.00 g 10 份置于三角烧瓶中,加入含体积分数 0.1% 盐酸的甲醇,料液比为 1:7,40 ℃ 水浴中超声波辅助提取,频率 24 kHz,提取时间分别为 10,20,30,40,50,60,70,80,90 和 100 min,共提取 3 次,合并提取液,每处理重复 3 次。测定花色素苷含量,并计算各处理的提取率。

(6)提取次数的选择。称取葡萄皮 5.00 g 5 份置于三角烧瓶中,加入含体积分数 0.1% 盐酸的甲醇,料液比为 1:7,40 ℃ 水浴中超声波辅助提取,频率 24 kHz,提取时间为 50 min,提取次数分别为 1,2,3,4 和 5 次,合并提取液,每处理重复 3 次。测定花色素苷含量,并计算各处理的提取率。

1.2.2 葡萄果皮花色素苷提取工艺的正交试验 根据 1.2.1 中单因素试验结果,选择提取温度、料液比、提取时间、提取次数 4 个因素各 3 个水平,设计 L₉(3⁴)正交试验(表 1)。

表 1 葡萄果皮花色素苷提取工艺 L₉(3⁴)正交试验的因素水平

水平 level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	提取温度/℃ Extracted temperature	提取时间/min Extracted time	料液比 Extracted vol	提取次数 Extracted number
1	20	40	1:6	2
2	30	50	1:7	3
3	40	60	1:8	4

1.2.3 花色素苷含量的测定 花色素苷含量的测定采用亚硫酸脱色法进行^[17]。

1.3 数据处理

采用 DUNCAN 新复极差法对试验数据进行方

差分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄果皮花色素苷提取工艺的单因素试验结果

2.1.1 提取剂的选择 不同提取剂对葡萄果皮花色素苷提取率的影响见表 2。表 2 表明,采用含体

积分数 1%盐酸的甲醇作为提取剂,其提取效果与均含体积分数 1%盐酸的乙醇、丙酮作为提取剂差异显著,而含体积分数 1%盐酸的乙醇与含体积分数 1%盐酸的丙酮之间差异不显著。因此,选择含体积分数 1%盐酸的甲醇作为提取剂。

表 2 不同提取剂对葡萄果皮花色素苷提取率的影响

Table 2 Comparison of extraction capacity of different extractants

提取剂 Extactant	提取率/% Yield of extraction			
	重复 1 Repeat1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Average
甲醇 MeOH	47.54	48.05	50.56	48.72 a
乙醇 Ethanol	30.32	31.52	31.75	31.20 b
丙酮 Acetone	24.45	26.39	24.97	25.27 b

注:同列数据后标相同字母者表示差异不显著($P>0.05$),标不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note:The same word means the otherness was little ($P>0.05$),contrarily means the otherness was big ($P<0.05$). The following table is same.

2.1.2 盐酸用量的选择 不同 pH 值对花色素苷的颜色与结构影响很大。在溶液介质中,蓝色的醌式(脱水)碱、红色的黄钯盐阳离子、无色的甲醇假碱和查耳酮 4 种结构之间存在着平衡。通常在 pH 值较低时,花色素苷溶液呈现最强的红色,随着 pH 值的增大,花色素苷的颜色将褪至无色,在高 pH 值时变成紫色或蓝色^[9]。因此,对采用不同 pH 值提取剂的花色素苷溶液,需将 pH 值调到相同水平,再

进行比较。
表 3 表明,葡萄果皮花色素苷的提取率随提取剂中盐酸体积分数的增加而增大。对含不同体积分数盐酸提取剂的提取率进行方差分析,结果表明,各处理间差异不显著。据 Revilla 等^[18]报道,提取剂中添加过多的盐酸提取花色素苷,会使乙酰化的花色素苷部分分解。因此,采用含体积分数 0.1%盐酸的甲醇作为提取剂。

表 3 不同盐酸用量对葡萄果皮花色素苷提取率的影响

Table 3 Comparison of extraction capacity of different HCl content

盐酸用量/% HCl content	提取率/% Yield of extraction			
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Average
0.1	43.97	45.77	48.37	46.04 a
0.5	44.77	46.57	48.97	46.74 a
1	48.47	51.17	49.37	49.67 a
2	48.77	51.97	48.32	49.69 a
5	51.97	48.37	49.25	49.86 a

2.1.3 提取温度的选择 不同提取温度对葡萄果皮花色素苷提取率的影响见表 4。

表 4 不同提取温度对葡萄果皮花色素苷提取率的影响

Table 4 Comparison of extraction capacity of different extracted temperature

提取温度/℃ Extracted temperature	提取率/% Yield of extraction			
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Average
20	72.44	67.56	67.24	69.08 a
30	71.18	67.16	69.76	69.37 a
40	71.18	68.66	70.00	69.95 a
50	56.36	53.38	57.32	55.69 b
60	49.68	49.76	52.28	50.57 c

由表 4 可见,花色素苷的提取率随提取温度的升高总体呈下降趋势,但以提取温度为 40℃时最高。另在试验中观察到,当提取温度分别为 50 和 60℃时,花色素苷提取液中出现白色絮状沉淀,且甲醇的沸点为 64~65℃,在提取温度为 60℃时提

取剂会大量挥发。方差分析结果表明,20,30,40℃处理间差异不显著,而 50 和 60℃处理与 20,30,40℃处理差异显著。故选择提取温度为 40℃。
2.1.4 料液比的选择 由表 5 可见,当料液比为 1:2~1:7 时,随着提取剂体积的增加,提取率增

大,当料液比为 1∶7 时提取率最高且与其他处理间 不变。因此,确定料液比为 1∶7。差异显著;之后随着提取剂体积的增加,提取率基本

表 5 不同料液比对葡萄果皮花色素苷提取率的影响

Table 5 Comparison of extraction capacity of different extractant vol.

料液比 Extractant vol.	提取率/% Yield of extraction			
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Average
1∶2	44.38	46.14	49.38	46.63 e
1∶3	57.32	51.12	55.16	54.54 d
1∶4	59.95	54.01	56.27	56.74 cd
1∶5	55.74	58.83	55.13	56.57 cd
1∶6	63.04	57.68	59.56	60.09 bc
1∶7	69.53	68.15	63.93	67.20 a
1∶8	70.53	64.93	64.93	66.80 a
1∶9	63.42	68.00	63.98	65.13 ab
1∶10	67.06	62.46	64.06	64.53 ab
1∶11	65.53	61.67	67.79	65.00 ab

2.1.5 提取时间的选择 由表 6 可见,随提取时间的增加,花色素苷的提取率呈先增大后减小的趋势,其中提取时间为 50 min 时提取率最大。据报道,超声波可缩短提取时间,提高提取效率,但其在一定频

率和功率下也可使有机大分子降解^[19]。可以推断,在频率 24 kHz 时过长时间的超声波处理将导致花色素苷分解。因此,确定提取时间为 50 min。

表 6 不同提取时间对葡萄果皮花色素苷提取率的影响

Table 6 Comparison of extraction capacity of different extractant time

提取时间/min Extractant time	提取率/% Yield of extraction			
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Average
10	29.08	27.90	28.32	28.43 c
20	34.96	35.04	32.52	34.17 b
30	34.12	35.88	33.84	34.61 b
40	37.90	40.92	31.68	36.83 b
50	53.02	58.98	54.36	55.46 a
60	37.48	36.30	35.46	36.41 b
70	33.22	38.82	37.14	36.40 b
80	36.64	37.56	32.94	35.71 b
90	36.64	37.98	32.52	35.71 b
100	37.06	37.50	32.52	35.69 b

2.1.6 提取次数的选择 不同提取次数对葡萄果皮花色素苷提取率的影响见表 7。由表 7 可见,花色素苷的提取率随提取次数的增加而增大,但当提

取次数增至 3 次后,提取率基本不变。因此,从节约成本角度考虑,确定提取次数为 3 次。

表 7 不同提取次数对葡萄果皮花色素苷提取率的影响

Table 7 Comparison of extraction capacity of different extracted number

提取次数 Extracted number	提取率/% Yield of extraction			
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Average
1	29.66	30.68	26.96	29.10 c
2	50.08	54.88	54.12	53.03 b
3	63.78	63.54	58.34	61.89 a
4	59.00	63.76	62.40	61.72 a
5	61.60	61.80	60.80	61.40 a

2.2 葡萄果皮花色素苷提取工艺的正交试验结果

根据葡萄果皮花色素苷提取工艺单因素试验结果,设计的 L₉(3⁴)正交试验结果见表 8。

表 8 显示,各因素对花色素苷提取率的影响程

度依次为:提取次数>料液比>提取时间>提取温度;综合比较,A3B2C2D1 为最佳提取条件。在此最佳工艺下,提取葡萄果皮中的花色素苷,重复 3 次,平均提取率为 73.10%。

表 8 葡萄果皮花色苷提取工艺 L₉ (3⁴) 正交试验的结果

Table 8 Orthogonal experiment for extraction technology of anthocyanins from the grape pomace

试验序号 No.	A 提取温度/℃ Extracted temperature	B 提取时间/min Extracted time	C 料液比 Extracted vol.	D 提取次数 Extracted number	提取率/% Yield of extraction
1	1(20)	1(40)	1(1 : 6)	1(2)	45.43
2	1(20)	2(50)	2(1 : 7)	2(3)	73.10
3	1(20)	3(60)	3(1 : 8)	3(4)	20.79
4	2(30)	1(40)	2(1 : 7)	3(4)	28.59
5	2(30)	2(50)	3(1 : 8)	1(2)	50.43
6	2(30)	3(60)	1(1 : 6)	2(3)	36.37
7	3(40)	1(40)	3(1 : 8)	2(3)	45.24
8	3(40)	2(50)	1(1 : 6)	3(4)	34.32
9	3(40)	3(60)	2(1 : 7)	1(2)	66.69
K ₁	417.95	357.76	348.37	487.66	
K ₂	346.17	473.56	505.11	464.11	
K ₃	438.75	371.54	349.39	251.10	
k ₁	139.32	119.25	116.12	162.55	
k ₂	115.39	157.85	168.37	154.70	
k ₃	146.25	123.85	116.46	83.70	
R	30.86	38.60	52.25	78.86	

3 结 论

Renault 等^[20]采用来自香槟省的葡萄果皮渣,用含体积分数 1%甲酸的甲醇 10 L 浸提 5 d,提取葡萄皮中的花色苷,该方法耗时长,溶媒用量大。本研究采用超声波辅助提取葡萄果皮中的花色苷,以含体积分数 0.1%盐酸的甲醇为提取剂,提取葡萄果皮中花色苷的最佳工艺为:40℃水浴中超声波辅助提取,提取时间 50 min,料液比 1 : 7,提取 2 次。

采用本研究得到的最佳工艺提取葡萄果皮中的花色苷后,进行纯化、分离,可得到花色苷单体,这对于定性、定量研究葡萄酒中的花色苷类物质及鉴别掺假葡萄酒具有重要意义。

[参考文献]

[1] 温普红,王晓玲,杨得锁. 葡萄籽中色素的分离研究[J]. 精细化工,2001,18(4):218-219.
Wen P H, Wang X L, Yang D S. Separation of anthocyan from grape seeds[J]. Fine Chemicals, 2001, 18(4): 218-219. (in Chinese)

[2] 李 华. 现代葡萄酒工艺学[M]. 西安:陕西人民出版社,2001.
Li H. Modern enology[M]. Xi'an: Shaanxi People Press, 2001. (in Chinese)

[3] 高尧来,温其标,张福艳. 葡萄酒中的多酚类物质及其保健功能[J]. 食品与发酵工业,2002,8(3):124-128.
Gao Y L, Wen Q B, Zhang F Y. Polyphenols in wine and their health functions [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 8(3): 124-128. (in Chinese)

[4] 陈曾三. 红葡萄酒多酚的保健功效[J]. 酿酒科技, 2001, 2(3): 77-79.
Chen Z S. Healthy effects of polyphenols in red grape wine [J]. Liquor-making Science Technology, 2001, 2(3): 77-79. (in Chinese)

[5] 齐 慧,葛毅轩,战吉成. 多酚类物质与葡萄酒的保健作用[J]. 中国食品, 2006, 16(3): 122-123.
Qi H, Ge Y X, Zhan J M. Polyphenols and healthy protecting effects of wine [J]. China Food, 2006, 16(3): 122-123. (in Chinese)

[6] 刘树文,李 华,房玉林. 葡萄酒的营养与保健[J]. 酿酒, 1999, 5(4): 40-42.
Liu S W, Li H, Fang Y L. Nutrition and healthy protecting effects of wine [J]. Liquor Making, 1999, 5(4): 40-42. (in Chinese)

[7] Bridle P, Timberlake C F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects [J]. Food Chem, 1997, 58: 103-109.

[8] Tedesco I, Russo G L, Nazzaro F. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2001(12): 505-511.

[9] Cantos E, Espín J C, Francisco A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(20): 5691-5696.

[10] Bakker J, Timberlake C F. The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography [J]. J Sci Food Agric, 1985, 36: 1315-1324.