

葡萄汁加工中葡萄皮色素低温促溶技术

孙丽娜, 米日阿依·伊力夏提, 吴晓娟, 祁岩龙, 冯作山*

(新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以“赤霞珠”葡萄为试验材料、花色苷为测定指标,采用 Box-behnken 响应曲面设计,研究果胶酶和微波处理组合技术对葡萄皮中色素物质溶出的影响。结果表明果胶酶处理的最佳工艺条件为:添加 1.1%果胶酶,40℃处理 3.15h;在酶处理的基础上确定微波处理的最佳工艺条件为:129.5g 样品微波 19s,微波次数 3 次。方差分析(analysis of variance, ANOVA)表明两个模型极显著($P < 0.0001$),失拟性不显著($P > 0.1$)。该模型可用于葡萄汁加工过程中葡萄皮色素溶出效果的分析与预测。通过该技术组合处理,可以得到花色苷物质含量高、颜色鲜艳的葡萄汁。

关键词:“赤霞珠”葡萄;原花青素;微波;果胶酶;响应曲面法

Process Parameter Optimization for Pectinase Hydrolysis Followed by Microwave Treatment for Promoting Dissolution of Grape Skin Anthocyanins in Grape Juice Processing

SUN Li-na, MIRIAYI Yilixiati, WU Xiao-juan, QI Yan-long, FENG Zuo-shan*

(College of Food Science and Pharmaceutical Science, Xinjiang Agricultural University, Ürümqi 830052, China)

Abstract: In order to accelerate the dissolution of intracellular anthocyanins into grape juice, Cabernet Sauvignon grapes were mechanically crushed and subjected to pectinase hydrolysis followed by microwave treatment. The conditions of pectinase hydrolysis and microwave treatment were optimized by Box-Behnken experimental design combined with response surface methodology for maximizing anthocyanin content in grape juice. Based on Box-Behnken experimental design, two regression models describing pectinase hydrolysis and microwave treatment were established. The optimal pectinase hydrolysis conditions were pectinase amount 1.1%, hydrolysis temperature 40 °C, and hydrolysis time 3.15 h, and the optimal microwave treatment conditions were grape amount 129.5 g, treatment time 19 s, and number of repeated treatments 3. Analysis of variance indicated that the two mathematical models were highly statistically significant ($P < 0.0001$), the lack of fit of each of which was not significant ($P > 0.1$), thereby being applicable to analyze and predict the dissolution of anthocyanins during grape juice processing. Grape juice with a higher anthocyanin content and a brilliant color can be obtained by the combined use of pectinase hydrolysis and microwave treatment.

Key words: Cabernet Sauvignon grape; anthocyanin; microwave; pectinase; response surface design

中图分类号: TS255.44

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0036-05

葡萄原花青素(grape procyanidins, GPC)是存在于葡萄中的一种天然植物多酚,也称葡萄多酚,在葡萄皮、籽中含量丰富。近年来,国内外学者已对 GPC 进行大量研究,证实 GPC 具有保护心血管系统、清除自由基、抗氧化、抗突变、抗癌、抗辐射、促进细胞增殖等生物学活性^[1-4]。

葡萄汁比任何其他水果、蔬菜及其汁液含有更多的抗氧化物质^[5]。在与橙汁及柚子汁的对比试验中,研究

人员发现,葡萄汁对心脏病的预防作用最好,而且紫葡萄汁优于白葡萄汁,紫葡萄汁甚至比预防心脏病的常用药物阿司匹林效果还好^[6]。Facino 等^[7]实验发现, GPC 可减轻大鼠缺血后的心肌损伤,降低心脏对缺血再灌注损伤的敏感性,这种作用与其提高血浆抗氧化能力有关。Bagchi 等^[2]研究发现 GPC 对氧自由基的清除能力远高于 VE 和 VC。

紫色或红色葡萄皮中的原花青素受组织和细胞的阻

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大专项(200731136-3)

作者简介: 孙丽娜(1984—),女,硕士研究生,研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: shalunna@yahoo.com.cn

* 通信作者: 冯作山(1963—),男,教授,博士,研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: fengzuoshan@126.com

隔,目前的葡萄榨汁方式很难将其溶出进入葡萄汁中,葡萄皮所含的功效成分随皮渣排出,形成一种资源浪费。采用加热的方法虽在一定程度上有助于葡萄皮花青素的溶出,但处理温度高、时间长,花青素等功效成分容易氧化分解,发生褐变,而且还易导致葡萄汁风味变劣、营养成分和活性物质损失^[8-9]。

拟采用“微波+酶”的处理方式探讨这一问题的解决方法及工艺优化。通过果胶酶处理水解葡萄皮中的果胶物质,使细胞壁透性增大,易于葡萄皮中的色素物质溶出。吴春等^[10]研究葡萄籽中原花青素的酶法提取工艺,结果表明,影响酶法提取原花青素的因素次序为:酶解温度>酶解浓度(质量体积比)>pH值>乙醇体积分数。采用多次微波处理(温度控制在50℃以内),利用微波的高频震动使细胞壁破裂,促进传质作用,加快色素物质的溶出^[11-14]。本实验通过响应面设计优化工艺可以在较低的处理温度下使色素物质大量溶出^[15],避免色素物质降解,得到色素含量高、颜色鲜艳的红色葡萄汁产品。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

“赤霞珠”葡萄 乌鲁木齐五一农场;果胶酶(食品添加剂) 南宁庞博生物工程有限公司;冰乙酸(分析纯) 天津市富宇精细化工有限公司;盐酸、氢氧化钠、氯化钾(分析纯) 天津市永晟精细化工有限公司。

1.2 仪器与设备

WF-4000 常压式微波快速反应系统 上海市市屹尧分析仪器有限公司;TDL80-2B 型台式离心机 上海安亭科学仪器厂;DZKW-D-2 型电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂;TU-1810 PC 分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;PL203 分析天平 梅特勒托利多有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

将新鲜的赤霞珠葡萄清洗、除梗。破碎,于破碎液中按试验设计加入果胶酶处理(表1),再用微波处理(表2),每次处理后快速冷却至室温,再进行下一次微波处理,过滤,清汁进行花色苷含量测定。

1.3.2 Box-behnken 响应面试验设计

1.3.2.1 果胶酶处理 Box-behnken 响应曲面设计

表1 果胶酶处理 Box-behnken 响应曲面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in the Box-behnken design for optimizing pectinase treatment

水平	因素		
	A 酶添加量/%	B 时间/h	C 温度/℃
-1	0.5	2.0	35
0	1.0	3.0	40
1	1.5	4.0	45

1.3.2.2 微波处理 Box-behnken 响应曲面设计

表2 微波处理 Box-behnken 响应曲面设计试验因素水平表

Table 2 Factors and levels in the Box-behnken design for optimizing microwave treatment

水平	因素		
	A' 样品质量/g	B' 时间/s	C' 次数/次
-1	50.0	5	1
0	100.0	15	3
1	150.0	25	5

1.3.3 花色苷测定

花色苷测定采用 pH 示差法^[16-18]。取 2.0mL 葡萄汁,分别用 pH1.0 和 pH4.5 的缓冲溶液定容至 25.0mL,置于室温处平衡 2h,用蒸馏水做对照,在 520nm 处测定吸光度,根据 Fuleki 公式^[19]求出总花色苷含量。

$$C/(\text{mg/mL}) = \frac{(A_{1.0} - A_{4.5}) \times V_1 \times n \times M}{\mu \times V_2}$$

式中: C 为每毫升葡萄汁中花色苷的含量/(mg/mL); $A_{1.0}$ 、 $A_{4.5}$ 分别为 pH1.0、pH4.5 时花色苷在 520nm 波长处的吸光度; V_1 为稀释体积/mL; V_2 为样品体积/mL; n 为稀释倍数; M 为 cy-3-glu 的相对分子质量,其值为 449g/mol; μ 为 ϵ -cy-3-glu 的消光系数(其值为 29600)。

2 结果与分析

2.1 果胶酶处理

2.1.1 回归方程的建立及显著性检验

根据响应曲面法的要求,开展 17 组试验,检测结果见表 3。

表3 果胶酶处理试验设计与结果

Table 3 Experimental design and results of parameter optimization for pectinase treatment

试验号	因素			Y 花色苷含量/(mg/mL)
	A	B	C	
1	0	1	1	0.6994
2	0	0	0	0.9611
3	0	0	0	1.0105
4	1	0	1	0.7598
5	0	-1	1	0.7380
6	-1	-1	0	0.7829
7	0	0	0	0.9924
8	0	-1	-1	0.7361
9	0	0	0	0.9812
10	0	1	-1	0.7896
11	-1	0	-1	0.7449
12	-1	0	1	0.7162
13	1	-1	0	0.8234
14	1	0	-1	0.7547
15	-1	1	0	0.8065
16	1	1	0	0.9273
17	0	0	0	0.9859

利用 Design Expert 软件进行回归分析, 得到二次多项方程(模型), 见方程(1):

$$Y = 0.99 + 0.027A + 0.018B - 0.0147C + 0.020AB + 0.0085AC - 0.023BC - 0.074A^2 - 0.077B^2 - 0.17C^2 \quad (1)$$

对该模型进行方差分析(analysis of variance, ANOVA), 结果见表4, 模型系数显著性检验见表5。由表4回归模型方差分析可以看出: $F_{\text{模型}} = 31.60 > (F_{0.01(9,4)} = 14.66)$, $P < 0.0001$ 表明模型极其显著。失拟项 $P = 0.1193 > 0.1$, 表明模型失拟不显著。模型的确定系数 $R^2 = 0.9760$, 调整确定系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.9451$, 说明该模型能解释 94.51% 响应值的变化, 因而该模型拟合程度良好, 试验误差小, 该模型是适用的。

表4 果胶酶处理回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of the established regression model describing pectinase treatment

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.2	9	0.022	31.60	< 0.0001
失拟	3.563×10^{-3}	3	1.188×10^{-3}	3.70	0.1193
误差	1.284×10^{-3}	4	3.210×10^{-4}		
总和	0.2	16			
$R^2 = 0.9760$		$R^2_{\text{Adj}} = 0.9451$			

表5 果胶酶处理方程系数显著性检验

Table 5 Significance testing of each coefficient of the regression model describing pectinase treatment

变量	A	B	C	AB	AC	BC	A ²	B ²	C ²
P值	< 0.0001	0.0235	0.0973	0.1764	0.5412	0.1236	0.0007	0.0005	< 0.0001
显著性	***	*		*			***	***	***

注: ***, 差异极显著($P < 0.001$); **, 差异高度显著($P < 0.01$); *, 差异显著($P < 0.05$)。下同。

由表5回归方程系数显著性检验可知, 模型中一次项果胶酶添加量A($P < 0.0001$)极显著, 时间B($P = 0.0235$)、交互项AB($P = 0.1764$)显著; 二次项A²($P = 0.0007$)、B²($P = 0.0005$)、C²($P < 0.0001$)极显著。

2.1.2 果胶酶处理响应面优化结果

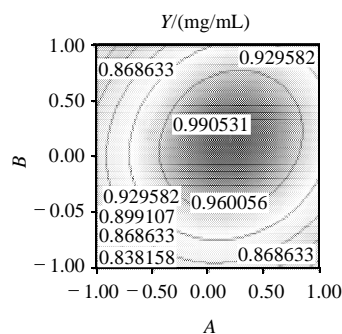
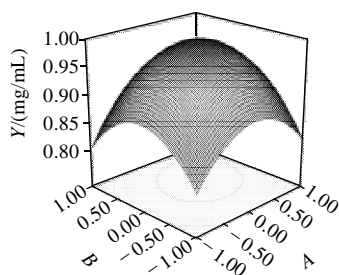


图1 果胶酶处理响应面优化结果

Fig.1 Response surface and contour plots showing the effects of pectinase dosage and treatment time on anthocyanin content in grape juice

对模型进行求解, 得花青素质量浓度最大为 0.991mg/mL, 预测得到的优化条件为 $A = 0.20$ 、 $B = 0.15$ 、 $C = -0.05$, 进行计算转化后得, 果胶酶添加量 1.1‰、处理时间 3.15h、温度 40.0℃(计算值为 39.75℃)。响应面优化结果见图1, 随着酶添加量的增加和处理时间的延长, 花青素质量浓度呈升高趋势, 当酶添加量 1.1‰、处理时间 3.15h 时, 花青素质量浓度最大, 为 0.960mg/mL, 再增加酶量后呈降低趋势。

2.2 微波处理

2.2.1 回归方程的建立及显著性检验

根据响应曲面法的要求, 开展 17 组试验, 结果见表6。

表6 微波处理试验设计与结果

Table 6 Experiment design and results of parameter optimization for microwave treatment

试验号	因素			Y' 花色苷含量/(mg/mL)
	A'	B'	C'	
1	0	0	0	1.412
2	-1	0	-1	1.254
3	-1	-1	0	1.085
4	0	0	1	1.323
5	0	0	0	1.476
6	0	0	0	1.397
7	0	-1	1	1.248
8	1	0	1	1.156
9	0	0	0	1.403
10	1	0	-1	1.133
11	1	-1	0	1.028
12	0	0	0	1.459
13	-1	1	0	1.305
14	0	1	-1	1.289
15	-1	0	1	1.344
16	1	1	0	1.287
17	0	-1	-1	1.152

叶新红等^[11]比较了不同处理方法对葡萄皮中花色苷等多酚类物质溶出效果的影响, 发现与热浸提相比, 微

波和超声波处理均能促进葡萄皮中的色素物质的溶出,但微波处理时间较短,葡萄汁颜色鲜艳。本试验将微波处理工艺进行响应面优化,利用 Design Expert 软件进行回归分析,得到二次多项方程(模型),见方程(2):

$$Y' = 1.43 - 0.048A' + 0.086B' + 0.030C' + 9.750 \times 10^{-3}A'B' - 0.017A'C' - 0.0168B'C' - 0.14A'^2 - 0.11B'^2 - 0.065C'^2 \quad (2)$$

对该模型进行方差分析,结果见表 7,模型系数显著性检验见表 8。由表 7 回归模型方差分析可以看出: $F_{\text{模型}} = 9.65 > F_{0.05(9,4)} = 6$, $P = 0.0034$ 表明模型极显著。 $F_{\text{失拟}} = 4.13 < F_{0.05(9,3)} = 8.81$, 失拟项 $P = 0.1021 > 0.1$, 表明模型失拟不显著。模型的确定系数 $R^2 = 0.9254$, 调整确定系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.8259$, 说明该模型能解释 82.59% 响应值的变化,因而该模型拟合程度较好,但试验误差偏大,故对该模型进行手动优化,去掉不显著项。

表 7 微波处理回归模型方差分析

Table 7 Variance analysis of the regression model describing microwave treatment

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.26	9	0.029	9.65	0.0034
失拟	0.016	3	5.264×10^{-3}	4.13	0.1021
误差	5.097×10^{-3}	4	1.274×10^{-3}		
总和	0.28	16			
$R^2 = 0.9254$		$R^2_{\text{Adj}} = 0.8259$			

表 8 微波处理方程系数显著性检验

Table 8 Significance testing of each coefficient of the regression model describing microwave treatment

变量	A'	B'	C'	$A'B'$	$A'C'$	$B'C'$	A'^2	B'^2	C'^2
P 值	0.0419	0.0029	0.1598	0.7316	0.5591	0.5881	0.0011	0.0042	0.0436
显著性	*	**					**	**	*

由表 8 回归方程系数显著性检验可知,模型中一次项样品质量 A' ($P=0.0419$) 显著,时间 B' ($P=0.0029$) 高度显著;二次项 A'^2 ($P=0.0011$)、 B'^2 ($P=0.0042$) 高度显著, C'^2 ($P=0.0436$) 显著。

2.2.2 微波处理响应面优化

在原有拟合方程基础上,对模型进行手动简化,去掉不显著项(不包括非交互项 C'),模型的 F 值变成 18.32 ($P < 0.0001$),失拟项 F 值变为 2.39 ($P=0.2095$),表明手动简化结果可行。简化后回归方程为:

$$Y' = 1.43 - 0.048A' + 0.086B' + 0.030C' - 0.14A'^2 - 0.11B'^2 - 0.065C'^2 \quad (3)$$

对此模型进行求解,得花青素质量浓度最大为 1.372 mg/mL,预测得到的优化条件为: $A' = 0.59$, $B' = 0.39$ 、 $C' = 0.23$,进行计算转化后得样品质量 129.50g、微波时间 19s(模型计算值为 18.9s)、微波次数

3 次(模型计算值为 3.46 次)。响应面优化结果见图 2。当处理次数为 2.3 次时,随着处理样品质量增加和时间的延长,花青素含量先呈缓慢增大趋势,后迅速下降。

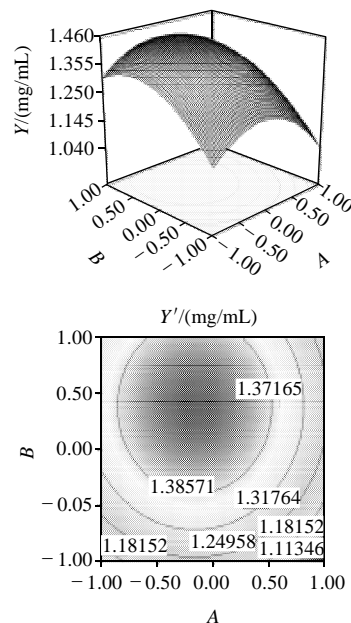


图 2 微波处理响应面优化结果

Fig.2 Response surface and contour plot showing the effects of grape amount and microwave treatment time on anthocyanin content in grape juice

2.3 验证实验

为证明模型的可靠性,采用优化条件开展 3 次验证实验。结果表明实际花青素溶出平均值为 1.352 mg/mL,相对误差为 -1.43%,因此响应面设计所得结果准确可靠。

3 结论

利用 Box-behnken 响应曲面法设计优化了深色葡萄榨汁过程中色素物质“微波+果胶酶”的低温促溶工艺。结果显示:利用 Design Expert 软件建立二次多项回归方程,方差分析表明两个模型极显著($P < 0.0001$),失拟性不显著($P > 0.1$)。

对模型进行优化求解得果胶酶处理的最佳工艺条件为:添加 1.1%果胶酶,40℃处理 3.15h;在酶处理的基础上确定微波处理的最佳工艺条件为:129.5g 样品微波 19s,微波次数 3 次。

本实验将酶解处理和微波处理结合,利用 Design Expert 软件建立二次多项回归方程,优化了“微波+果胶酶”低温促溶工艺。验证实验表明响应面设计所得结果准确可靠。该模型可用于葡萄汁加工过程中葡萄皮色素溶出效果的分析与预测。

参考文献:

- [1] 唐传核. 植物功能性食品[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 162-189.

- [2] BAGCHI D, GARG A, KROHN R L, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*[J]. *Reseomman Mol Pathol Pharmacol*, 1997, 95(2): 179-189.
- [3] 钟进义, 于洪升, 栗世如. 葡萄多酚对小鼠急性放射损伤的防护作用研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 1999, 19(5): 345-346.
- [4] 钟进义, 王建华, 刘岩, 等. 葡萄多酚对人体抗氧化能力的影响[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(4): 404-405.
- [5] BRIDLE P. Anthocyanins as natural food colors-selected aspects[J]. *Food Chem*, 1997, 58(1/2): 103-109.
- [6] KONGA J M, CHIAA L S, GOHA N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(5): 923-924.
- [7] FAEINO R M, CANMIM, ALDINIG, et al. ACE inhibition and hypotensive effect of a procyanidins containing extract from the bark of *pinus dinaster* Sol[J]. *Pharm Pharmacol Lett*, 1996, 6(1): 8-11.
- [8] 马海燕, 张振文, 汪成东. 葡萄皮花色苷不同提取方法的比较研究[J]. *酿酒科技*, 2005, 26(5): 81-83.
- [9] 孙建霞, 张燕, 胡小松, 等. 花色苷的结构稳定性与降解机制研究进展[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(3): 67-70.
- [10] 吴春, 张艳. 纤维素酶法提取葡萄籽中原花青素的研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(10): 258-261.
- [11] 叶新红, 李永春, 胡彩香, 等. 不同处理对葡萄皮中多酚类化合物溶出效果的研究[J]. *新疆农业科学*, 2009, 53(4): 877-880.
- [12] 许正虹, 高彦祥, 石素兰, 等. 微波辅助萃取紫甘薯色素的研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(9): 234-239.
- [13] 秦大伟, 李树英, 孟霞, 等. 微波预处理提取嘉菊总黄酮的工艺研究[J]. *中成药*, 2008, 31(6): 110-114.
- [14] 郑成, 李卫, 杨铃. 植物有效成分微波萃取的研究进展[J]. *世界科技研究与发展*, 2006, 28(5): 52-61.
- [15] 孟宪军, 王冠群, 宋德群, 等. 响应面法优化蓝莓花色苷提取工艺的研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(7): 98-102.
- [16] 张燕, 谢玫珍, 廖小军. 热和紫外辐照对红莓花色苷稳定性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(3): 37-39.
- [17] 冯建光, 谷文英. 葡萄皮红色素的示差法测定[J]. *食品工业科技*, 2002, 23(9): 85-86.
- [18] 赵慧芳, 王小敏, 闫连飞, 等. 黑莓果实中花色苷的提取和测定方法研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(5): 176-179.
- [19] FULEKI T, FRANCIS F J. Quantitative method for anthocyanins .1. Extraction and determination of total anthocyanin degradation in cranberry juice[J]. *Food Sci*, 1968, 33(3): 266-274.