

枸杞汁发酵预处理条件对枸杞类胡萝卜素的影响

周广志, 王琦, 张惠玲

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:以枸杞汁为试材,采用高效液相色谱法(HPLC),研究分析了果胶酶处理、添加 SO_2 、调节 pH 值及高压蒸汽灭菌等枸杞汁发酵预处理操作对主要类胡萝卜素(β -胡萝卜素、玉米黄素及玉米黄素双棕榈酸酯)含量及类胡萝卜素总量的影响。结果表明:果胶酶能降解玉米黄素双棕榈酸酯,同时分解果胶物质产生的-COOH,能与含有羟基的玉米黄素发生酯化反应; SO_2 具有抗氧化作用,可以缓解类胡萝卜素的氧化降解,对类胡萝卜素具有一定的保护作用;pH 值在 3.0~3.5 范围内,各类胡萝卜素的含量随 pH 值降低而下降,类胡萝卜素在较强酸下不稳定;高压蒸汽灭菌对类胡萝卜素的破坏较严重,尤其是酯类胡萝卜素。

关键词:枸杞汁;发酵;预处理;类胡萝卜素

中图分类号:TS 275.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0149-04

枸杞酒是用枸杞汁经酵母发酵后制成的酒,枸杞汁发酵需要在进行果胶酶处理、添加 SO_2 、调节 pH 值及高压蒸汽灭菌等预处理后进行接种酵母发酵,由于受到原料和加工工艺等因素的影响参差不齐,枸杞酒的香气还有待提高。枸杞中类胡萝卜素含量丰富,且类胡萝卜素主要组分为 β -胡萝卜素、玉米黄素及玉米黄素酯,研究者发现类胡萝卜素的降解产物降异戊二烯类化合物与其它挥发性化合物的协同作用对果酒的香气品质影响极为明显^[1-2]。类胡萝卜素是一类由 8 个异戊二烯单元首尾相连且分子两端各有一个不饱和己烯环的四萜化合物总称^[3],这个结构遇光、酸、热、氧、微生物和酶易降解,因此在枸杞酒生产中不同的预处理方法对类胡萝卜素含量有一定的影响。现研究枸杞酒生产中预处理操作,即果胶酶处理、添加 SO_2 、调节 pH 值及高压蒸汽灭菌等对枸杞汁中主要类胡萝卜素以及类胡萝卜素总量的影响,对枸杞酒发酵产香具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试枸杞干果为“宁杞 1 号”,购自百瑞源。标准品

β -胡萝卜素(β -carotene, HPLC \geq 98%, 国产);玉米黄素(Zeaxanthin, HPLC \geq 97%, ChromaDex, 美国);玉米黄素双棕榈酸酯(zeaxanthin dipalmitate, HPLC \geq 98%, ChromaDex, 美国);甲醇、乙腈、正己烷、二氯甲烷(均为色谱纯,产自天津大茂化学试剂厂);丙酮(分析纯,产自天津东方化工厂);石油醚(分析纯,产自天津市光复精细化工研究所,沸程 60~90℃);二丁基羟基甲苯(BHT)、亚硫酸、柠檬酸(产自天津博迪化工股份有限公司);无水硫酸钠(分析纯,产自烟台市双双化工有限公司)。

AGILENT 1100 高效液相色谱仪:安捷伦公司,配有自动进样器;色谱柱为 ZORBAX Edipse XDB-C18 反相色谱柱(4.6 nm \times 250 nm, 5 μ m, 安捷伦公司);紫外可见光检测器:安捷伦 1100 系列检测器;LDZX-40C 型自动立式电热压力蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理方法 枸杞汁制备:将枸杞以 1:4 加水比复水打浆制成枸杞汁,并取样测定枸杞汁中各类胡萝卜素的含量,然后分成若干份分别进行酶解、添加 SO_2 、调节 pH 值及高压蒸汽灭菌等酿酒工艺需要的预处理,并测定处理结束后枸杞汁中各类胡萝卜素的含量,试验均在避光条件下进行。酶解:分别添加 20、40、60、80、100 mg/L 的果胶酶,并放在 40℃ 水浴锅中酶解 2 h 后取样测定。添加 SO_2 :根据 GB 2758-2005 发酵酒卫生标准规定 SO_2 浓度 \leq 250 mg/L 的限定,添加 SO_2 使枸杞汁中 SO_2 浓度分别达到 20、40、60、80、100、120 mg/L,

第一作者简介:周广志(1990-),男,硕士研究生,研究方向为微生物发酵。E-mail:deryck123@163.com.

责任作者:张惠玲(1963-),女,教授,硕士生导师,现主要从事生物工程等研究工作。Email:zh15792@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360402)。

收稿日期:2015-01-20

常温放置 5 h 后取样测定。调节 pH 值:枸杞酒发酵,应将 pH 值控制在 3.0~3.5,因为在这个酸度下,杂菌受到抑制,而酵母菌能正常发酵,因此用柠檬酸分别调节枸杞汁的 pH 值至 3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5,常温(25℃)放置 5 h 后取样测定。高压蒸汽灭菌:枸杞汁在 0.10~0.15 MPa,121~126℃下灭菌 30min,每隔 10min 取样。

1.2.2 类胡萝卜素提取 取枸杞汁 10 mL,离心除去上清液(若有枸杞籽漂浮在液面上,研碎后置于料渣中),以除去糖和蛋白质便于后续的提取,然后加入少量丙酮(除水,有利于后续有机溶剂的提取),离心收集上清液于分液漏斗。料渣倒入 100 mL 烧杯中,加入适量抗氧化剂 0.01% 二丁基羟基甲苯(BHT),用丙酮:石油醚=1:2(V/V)进行提取,磁力搅拌辅助提取,800 r/min,提取温度为 30℃,反复提取至料渣无色,合并提取液于分液漏斗;然后分次加入少量蒸馏水洗去水溶性杂质,然后静置分层,放掉下层水层,含有类胡萝卜素的上层加入无水硫酸钠去水;然后把上层转移到圆底烧瓶中,继而在 38℃ 下用旋转蒸发仪浓缩,再加入少量二氯甲烷溶解类胡萝卜素后用该试验所用流动相定容至 10 mL 棕色容量瓶,再转存到冻存瓶,−35℃ 超低温冰箱保存备用,全过程需避光操作^[4-5]。

1.3 项目测定

类胡萝卜素的定性定量采用高效液相色谱测定。色谱条件:紫外可见光检测器;流动相:甲醇:乙腈:正己烷:二氯甲烷=15:40:20:20(V/V);柱温:25℃;流速:1 mL/min,等度洗脱;检测波长 450 nm。取 1.2.2 的处理的各样品进样 10 μL,记录保留时间及其峰面积和标准品对照以定性定量。用玉米黄素、β-胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯标准品制作标准曲线,外标法定量。

精密称取玉米黄素标准品 0.000 5 g、β-胡萝卜素标准品 0.001 0 g、玉米黄素双棕榈酸酯标准品 0.001 5 g,用流动相定容于 10 mL 容量瓶,然后用有机滤膜(0.45 μm)过滤后进样,以不同进样量(μL)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。得出玉米黄素双棕榈酸酯标准曲线 $y=942.58x-230.91$, $R^2=0.999\ 3$;玉米黄素标准曲线 $y=470.35x+32.957$, $R^2=1.000\ 0$;β-胡萝卜素标准曲线 $y=42.752x-2.575\ 5$, $R^2=0.999\ 9$ 。

准确称取 β-胡萝卜素标准品 6.000 0 mg,用流动相定容至 100 mL,配制质量浓度为 0.06 mg/mL 的标准溶液,然后稀释 10、5、4、2、1 倍,于 454 nm 处测定其吸光度,以溶液质量浓度为横坐标,吸光值为纵坐标得出总类胡萝卜素的标准曲线 $y=0.024\ 0x-0.016\ 0$, $R^2=0.999\ 9$ 。

1.4 数据分析

试验数据采用 Excel 软件计算,Origin 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 原枸杞汁各类胡萝卜素含量

原枸杞汁中含 β-胡萝卜素 4.76 μg/mL,玉米黄素 6.88 μg/mL,玉米黄素双棕榈酸酯 911.08 μg/mL,类胡萝卜素总量 1 005.49 μg/mL。其中,玉米黄素双棕榈酸酯为枸杞中主要的类胡萝卜素,占类胡萝卜素总量的 90% 以上,可作为枸杞类胡萝卜素的特征性指标。

2.2 酶解对类胡萝卜素的影响

由图 1、2 可知,随着果胶酶浓度的升高,玉米黄素含量先是急剧上升,由原来的 6.88 μg/mL 变为 22.34 μg/mL,随后渐渐下降,最后逐渐稳定;β-胡萝卜素随果胶酶浓度的改变含量变化不大;玉米黄素双棕榈酸酯及总类胡萝卜素的含量随果胶酶浓度的升高先是上升,然后缓慢下降,最后分别趋于稳定。

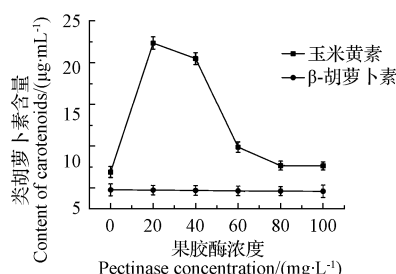


图 1 果胶酶处理对玉米黄素和 β-胡萝卜素含量的影响

Fig. 1 Effect of pectinase treatment on the contents of zeaxanthin and β-carotenoid

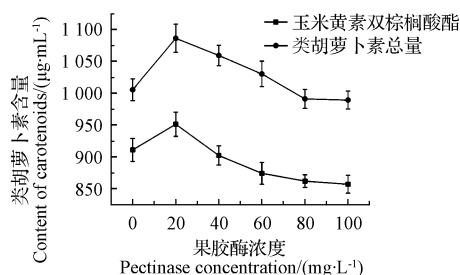


图 2 果胶酶对玉米黄素双棕榈酸酯的含量以及类胡萝卜素总量的影响

Fig. 2 Effect of pectinase treatment on the contents of zeaxanthin dipalmitate and carotenoids

各类胡萝卜素含量在低果胶酶浓度时上升是因为类胡萝卜素的合成反应,这种合成可通过诸多的外界因素在酶、叶绿体和细胞水平上分别调控^[6]。李赫^[4]发现枸杞中类胡萝卜素的含量受 2 个生理生化反应的调控,其中一个就是外界环境的改变造成的内源类胡萝卜素的前体物质以及单体和酯化的类胡萝卜素在其中各种酶的作用下所表现出的合成反应。该试验榨汁改变了环境因素,造成枸杞内与此合成反应相关的酶恢复活

性,并且在低果胶酶浓度时合成反应占主导地位,从而导致各类胡萝卜素的含量均升高,同时果胶酶中的酯酶降解玉米黄素双棕榈酸酯产生一部分玉米黄素。果胶酶是一种由酯酶、解聚酶、纤维酶和半纤维酶等组成的复合高效酶,通过它们的协调作用,可以有效的切裂并降解果肉和果胶的复杂分子链结构^[7],将果胶结构完全降解生产半乳糖醛酸,释放出-COOH^[8]。随着果胶酶浓度的升高,更多的玉米黄素双棕榈酸酯被分解,导致其含量降低,同时果胶物质分解更完全,产生更多的-COOH,并与羟基类物质结合,包括与含有羟基的玉米黄素结合,生成新的酯类物质,从而导致玉米黄素含量下降。 β -胡萝卜素结构相对比较稳定,变化较小。

2.3 不同 SO_2 浓度对类胡萝卜素的影响

由图 3、4 可知,经过 SO_2 处理后各类胡萝卜素的含量均升高,随 SO_2 浓度的升高除玉米黄素的含量下降外,其余类胡萝卜素的含量均持续升高,当 SO_2 浓度大于 80 mg/L 时,各类胡萝卜素的含量均趋于稳定。经过 SO_2 处理各类胡萝卜素的含量升高一方面是因为类胡萝卜素的合成反应,另一反面是因为 SO_2 具有抗氧化作用,抑制了氧化酶的活力,防止了枸杞汁中类胡萝卜素的氧化降解,使得酯类类胡萝卜素及总类胡萝卜素的含量升高,与相关文献中研究的结果一致^[5,9-11]。同时一

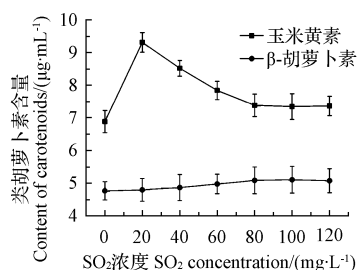


图 3 不同 SO_2 浓度对玉米黄素、 β -胡萝卜素含量的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of sulfur dioxide on the contents of zeaxanthin and β -carotenoid

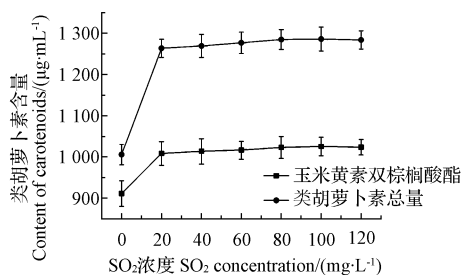


图 4 不同 SO_2 浓度对玉米黄素双棕榈酸酯含量以及类胡萝卜素总量的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of sulfur dioxide on the contents of zeaxanthin dipalmitate and carotenoids

部分 SO_2 在枸杞汁中以亚硫酸氢根离子形式出现,使枸杞汁氢离子浓度增高,进一步导致结构为 β -胡萝卜素的二羟基衍生物的玉米黄素所带的羟基有可能转化,使玉米黄素转化为 β -胡萝卜素,从而导致随 SO_2 浓度升高 β -胡萝卜素含量增加,玉米黄素含量减少。

2.4 pH 值对类胡萝卜素的影响

由图 5、6 可以看出,玉米黄素、玉米黄素双棕榈酸酯的含量以及类胡萝卜素总量均随 pH 值的降低而降低, β -胡萝卜素的含量变化不明显。类胡萝卜素的 5,6-环氧化合物结构在酸性催化作用下会发生重排,形成 2,5-二氢呋喃,导致类胡萝卜素降解^[5],因此含此结构的类胡萝卜素在较强酸下不稳定,随着 pH 值的降低,含量也降低,而 β -胡萝卜素的不含此结构,故受 pH 值影响不明显。

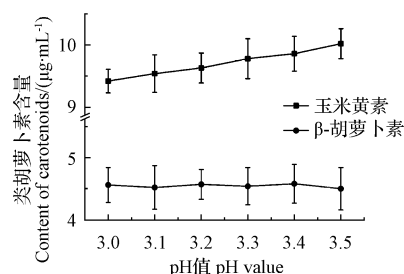


图 5 不同 pH 值对玉米黄素以及 β -胡萝卜素含量的影响

Fig. 5 Effect of different pH value on the content of zeaxanthin and β -carotenoid

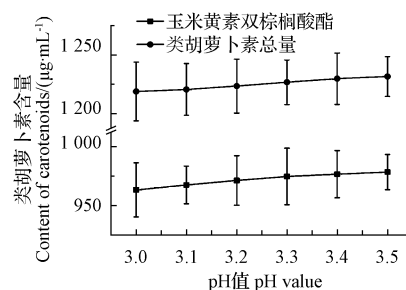


图 6 不同 pH 值对玉米黄素双棕榈酸酯含量以及类胡萝卜素总量的影响

Fig. 6 Effect of different pH value on the contents of zeaxanthin dipalmitate and carotenoids

2.5 高压蒸汽灭菌对类胡萝卜素的影响

由图 7、8 可知,经过高压蒸汽灭菌各类胡萝卜素的含量均降低,其中单体类胡萝卜素(玉米黄素、 β -胡萝卜素)的含量在后期稍有回升。这是因为含有多个不饱和双键结构的类胡萝卜素是热不稳定化合物,高温导致类胡萝卜素降解,含量降低。而在灭菌的后期由于酯类降解幅度增大,生成更多的单体类胡萝卜素,从而使得单体类胡萝卜素的含量有小幅度的回升。

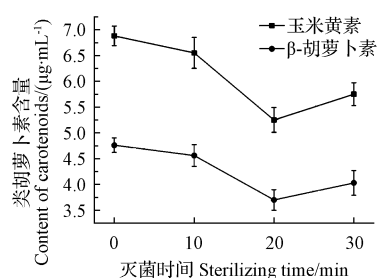


图7 高压蒸汽灭菌对玉米黄素以及β-胡萝卜素含量的影响

Fig. 7 Effect of high pressure steam sterilization on the contents of zeaxanthin and β-carotenoid

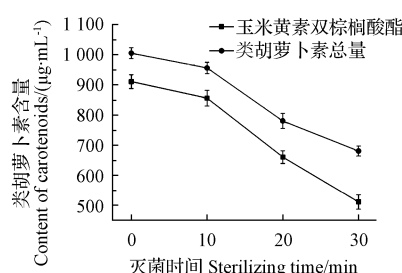


图8 高压蒸汽灭菌对玉米黄素双棕榈酸酯含量以及类胡萝卜素总量的影响

Fig. 8 Effect of high pressure steam sterilization on the contents of zeaxanthin dipalmitate and carotenoids

3 讨论与结论

枸杞汁在经过果胶酶处理、添加 SO₂、调节 pH 值及高压蒸汽灭菌等预处理操作后,玉米黄素、β-胡萝卜素、玉米黄素双棕榈酸酯以及总类胡萝卜素的含量都会有不同程度的变化。果胶酶会引起玉米黄素双棕榈酸酯降解,并且降解果胶结构产生半乳糖醛酸,从而释放出

的-COOH 可以与玉米黄素结合生成其它酯类;SO₂ 具有一定的抗氧化性,可以缓解类胡萝卜素的氧化降解,对类胡萝卜素具有一定的保护作用;由于类胡萝卜素的酸不稳定性,pH 值在 3.0~3.5 范围内改变时,随着 pH 值的降低,各类胡萝卜素的含量均降低,而 β-胡萝卜素受其影响不大;类胡萝卜素的热不稳定性导致高压蒸汽灭菌对类胡萝卜素的破坏较为严重,各类胡萝卜素的含量均降低,酯类大量降解的同时产生一部分单体类胡萝卜素使得单体类胡萝卜素的含量降幅较小。

参考文献

- [1] Mendes-Pinto M M, Silva Ferreira A C, Caris-Veyrart C, et al. Carotenoid, chlorophyll, and chlorophyll-derived compounds in grapes and port wines[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53(26): 10034-10041.
- [2] Guedes de Pinho P, Silva Ferreira A C, Mendes Pinto M, et al. Determination of carotenoid profiles in grapes, musts, and fortified wines from Douro varieties of *Vitis vinifera* [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49: 5484-5488.
- [3] 李忠,彭光华,张声华. 枸杞子中类胡萝卜素的组成及含量[J]. 植物资源与环境, 1999, 8(4): 57-58.
- [4] 李赫. 枸杞类胡萝卜素的分析方法及其加工过程中变化的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [5] 王晓璇. 枸杞皮渣中类胡萝卜素的提取及稳定性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [6] 惠伯棣. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 53.
- [7] 高年发. 葡萄酒生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [8] 兰颖辉. 果胶酶不同组分发酵条件的优化及酶学性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2006.
- [9] 郭庆海. 亚硫酸钠及维生素 C 对枸杞鲜汁生物活性成份的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(1): 21-22.
- [10] 孙明奇, 胡建中. 柑橘皮类胡萝卜素提取物稳定性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 48.
- [11] 晏志云, 赵谋明, 彭志英, 等. 干制和保藏过程中枸杞 β-胡萝卜素的保存率的研究[J]. 食品发酵与工业, 1998, 24(4): 37.

Effect of Pre-processing on Carotenoids in Brewing Medlar Juice

ZHOU Guangzhi, WANG Qi, ZHANG Huiling

(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking medlar juice as test materials, the content of major carotenoids (β-carotene, zeaxanthin, zeaxanthin esters) and total carotenoids in the medlar juice before and after the pre-processing of fermentation, like pectinase treatment, adding SO₂, adjust pH value and high pressure steam sterilization were studied by a HPLC method. The results showed that pectinase can degrade zeaxanthin esters, and zeaxanthin can occur esterification with -COOH that produced by decomposition of the pectic substances; SO₂ can relieve oxidization degradation of carotenoids because of its fight oxidation, having a protective effect of carotenoids; when pH value of 3.0~3.5, contents of carotenoids were declining as pH value getting lower, carotenoids are not stable under heavily acidic conditions; high pressure steam sterilization disrupted carotenoids heavily, especially esters.

Keywords: medlar juice; fermentation; pre-processing; carotenoids