

响应面分析人参果酒酿造中果胶酶对色泽的影响

苏凤贤¹, 张百刚², 苟亚峰¹, 陶 隽¹, 桑亚兰¹, 张芬琴^{1,*}

(1.河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000; 2.兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘 要: 通过单因素与响应面设计分析果胶酶用量及酶解时间、酶解温度和果浆的 pH 值对人参果酒酿造中色泽的影响, 建立相应的回归模型。结果表明, 果胶酶酶解温度、酶解时间对人参果酒发酵前护色作用影响显著 ($P < 0.05$), 果胶酶用量对人参果酒澄清作用影响显著 ($P < 0.05$), 而 pH 值对二者影响均不显著 ($P > 0.05$)。通过岭脊分析确定人参果酒的最佳护色工艺参数为 pH4.6、酶解温度 32℃、酶解时间 63min、果胶酶用量 0.3g/kg; 人参果酒最佳澄清条件: 果酒 pH4.0、酶解温度 30℃、酶解时间 55min、果胶酶用量 0.316g/kg。多元回归分析结果显示, 果酒的 pH 值、酶解温度、酶解时间及果胶酶用量与其护色、澄清效果之间回归模型拟合程度良好, 可用于实际生产预测。

关键词: 果胶酶; 果酒; 响应面法; 岭脊分析; 色泽

Response Surface Methodology for Optimization of Pectinase Treatment for Improved Clarification of Pepino Juice and Fruit Wine

SU Feng-xian¹, ZHANG Bai-gang², GOU Ya-feng¹, TAO Jun¹, SANG Ya-lan¹, ZHANG Fen-qin^{1,*}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, China;

2. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Pepino puree was treated with pectinase and centrifuged and the supernatant (fruit juice) was fermented for 10 days to make pepino fruit wine. Response surface methodology was used to optimize four pectinase treatment conditions such as pectinase dosage, time, temperature and pH for achieving the best colorization of pepino juice and fruit wine. On the basis of one-factor-at-a-time experiments, a three-level quadratic rotation-orthogonal composite design was used to set up regression models that describe the effects of these treatment conditions on the absorbance at 680 nm of pepino juice and fruit wine. Hydrolysis temperature and time had a significant effect on the absorbance at 680 nm of pepino juice ($P < 0.05$), and pectinase dosage significantly affected the absorbance at 680 nm of pepino juice ($P < 0.05$), but neither of them was significantly affected by pH ($P > 0.05$). The optimal pectinase treatment conditions determined by ridge analysis for pepino juice and fruit wine were pH 4.6 and 4.0, treatment temperature 32 °C and 30 °C, treatment time 63 min and 55 min, and pectinase dosage 0.3 g/kg and 0.316 g/kg, respectively. The multiple regression analysis indicated the established regression models could fit the relationship between various pectinase treatment conditions and the absorbance at 680 nm of pepino juice and fruit wine very well.

Key words: pectinase; wine; response surface methodology(RSM); ridge analysis; color

中图分类号: TS262.7; Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0049-09

人参果(pepino fruit)为茄科(Solanaceae)蔬菜、水果兼观赏型草本植物, 其果实形状多似人心, 成熟时, 果皮呈金黄色并有紫色条纹, 同时具有一种淡淡的清香味, 果肉多汁, 风味独特^[1]。目前, 在我国西北的河

西走廊地区被广泛种植, 并以鲜食为主。研究发现, 人参果果实富含多种维生素和人体必须微量元素^[2], 其中硒元素是一种强氧化剂, 能激活人体细胞, 保护心血管等脏器; 还能刺激免疫球蛋白及抗体的产生, 增强

收稿日期: 2010-10-29

作者简介: 苏凤贤(1974—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事食品生物技术与研究。E-mail: supeiecho@sina.com

* 通信作者: 张芬琴(1963—), 女, 教授, 博士, 主要从事生化与生物技术与研究。E-mail: fenqinzh@hxyu.edu.cn

机体对疾病的抵抗力^[3-4]。但人参果鲜果因含水量大而不耐贮藏,或因失水而使其口感受损,都会因此导致其市场价格下跌。为提高人参果的食用价值和经济附加值,对其进行深加工是一条很好的途径。大多数果蔬汁中含有0.2%~0.5%的果胶物质,这些果胶物质具有很强的亲水性能,是果蔬汁中最重要的混浊物稳定剂,尤其是其中的可溶性果胶多以保护胶体形式裹覆在混浊物颗粒表面,阻碍着果蔬汁的澄清。因此果酒加工中常需要加入果胶酶、纤维素酶等作护色澄清处理。张彧等^[5]以人参果为原料,确定了低糖人参果脯、果酱的生产工艺及质量标准;胡志和等^[6]以人参果、全脂乳粉为主料,由此制得的复合乳饮料风味稳定,评价效果较好;陈彦^[7]在人参果中加入果汁、蜂蜜等得到的复合果汁营养丰富、口感良好、含 Ca^{2+} 量高;文连奎等^[8]对人参果白兰地进行了研制,未见人参果其他加工产品。罗安伟等^[9]对甜橙汁澄清剂的选择及甜橙干酒发酵工艺参数进行了研究,结果表明果胶酶、壳聚糖、硅藻土的澄清效果显著。杨剑芳等^[10]对山茱萸发酵酒制备工艺条件进行优化研究,发现添加果胶酶进行澄清,酒液的透光率可达90.4%,较比其他澄清剂取最佳用量水平时的最大透光率高5%。

人参果营养丰富,除可供鲜食外,还可加工成人参果果酱、饮料、鲜果汁、口服液、罐头等^[15-17]。本研究采用二次正交旋转组合设计,优化果胶酶在人参果酒加工过程中的应用条件,目的在于分解人参果细胞间层的部分原果胶、纤维素,稳定其中色素,同时尽可能在发酵前将果汁中的杂质减少到最低限度,避免果酒发酵前在贮存过程中酒石结晶沉淀或无定形的色素微粒自行沉淀出来以及出现蛋白质浑浊、微生物浑浊等不良现象,从而提高人参果果酒的护色作用及澄清效果,为下一步人参果果酒发酵研究提供可靠的工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人参果(pepino fruit)产于甘肃武威市张义镇,果实长圆形,直径3~4cm,外表呈黄色并有清晰的棕色纹络;蔗糖 市售优质白砂糖;果胶酶(比活力10000U/g)武汉远城科技发展有限公司;葡萄酒高活性酿酒干酵母安琪酵母股份有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

722型分光光度计 上海凤凰光学仪器有限公司;恒温培养箱 上海柏欣仪器设备厂;无菌操作台 苏州佳宝净化工程设备有限公司;高压灭菌锅 上海道基科学仪器有限公司;手持糖量计 上海华光仪器仪表厂;PHS-3C酸度计 江苏常州金坛市精达仪器制造厂;电子天平 上海方瑞仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 人参果发酵酒加工工艺流程

新鲜成熟的人参果→分选→清洗→打浆→酶解→过滤→加硫(Na_2SO_3)→调糖(蔗糖或白砂糖)→调酸(柠檬酸)/自然pH值→接种→主发酵→倒罐→后发酵→下胶→澄清→调配

干酵母→30℃温水中摇匀静置
活化0.5h→果汁→28℃培养36~48h

1.3.2 果胶酶在不同条件对人参果果酒色泽影响的单因素试验

研究表明一般情况下对果胶酶酶解条件进行研究,都从加酶量、温度、pH值、时间4个方面进行考察^[11-14],因果胶酶适宜的pH值为2.5~6.0、作用温度为15~55℃^[15],因此本实验基于此进行设计,讨论果胶酶对人参果果酒发酵前后色泽变化的影响情况。

1.3.2.1 果胶酶用量对人参果果酒色泽的影响

将人参果果浆分别添加0、0.1、0.2、0.3、0.4g/kg和0.5g/kg果胶酶后放入40℃恒温水浴中酶解75min,4000r/min离心10min,取上清液测 A_{680} ;发酵10d后,取上清液再次测 A_{680} 。每个处理重复3次,取平均值。

1.3.2.2 酶解时间对人参果果酒色泽的影响

将人参果果浆添加0.3g/kg果胶酶于40℃恒温水浴中分别酶解45、60、75、90min和105min,之后4000r/min离心10min,取上清液测 A_{680} ;发酵10d后,取上清液再次测 A_{680} 。每个处理重复3次,取平均值。

1.3.2.3 酶解温度对人参果果酒色泽的影响

将人参果果浆添加0.3g/kg果胶酶分别放入30、35、40、45℃和50℃恒温水浴中酶解75min,之后4000r/min离心10min,取上清液测 A_{680} ;发酵10d后,取上清液再次测 A_{680} 。每个处理重复3次,取平均值。

1.3.2.4 pH值对人参果果酒色泽的影响

将人参果果浆添加0.3g/kg果胶酶后用柠檬酸分别调整pH值至3.0、3.5、4.0、4.5和5.0,置于40℃恒温水浴中酶解75min后4000r/min离心10min,取上清液,测 A_{680} ;发酵10d后,取上清液再次测 A_{680} 。每个处理重复3次,取平均值。

1.3.3 影响果胶酶对人参果果酒色泽变化的条件优化

在单因素试验基础上,再分别以pH值、酶解温度、酶解时间和果胶酶用量4个因素为响应因素,以人参果果酒发酵前、后吸光度为响应值(Y),运用SAS 9.2软件进行响应面设计,研究果胶酶对人参果果酒酿造过程中色泽变化的影响,因素水平编码见表1,试验方案及结果见表2。每个处理重复3次,取平均值进行统计分析。

表1 二次正交旋转组合试验因素水平编码表

Table 1 Factors and their coded levels in quadratic rotation-orthogonal composite design

编码	x_1 pH	x_2 酶解温度/℃	x_3 酶解时间/min	x_4 果胶酶用量/(g/kg)
-2	3.0	26	45	0.1
-1	3.5	28	60	0.2
0	4.0	30	75	0.3
1	4.5	32	90	0.4
2	5.0	34	105	0.5
Δj	0.5	2	15	0.1

1.3.4 数据处理

单因素效应图形用 DPS 软件绘制, 二次正交旋转组合试验数据采用 SAS 9.2 软件分析。

2 结果与分析

2.1 果胶酶用量对人参果果酒色泽的影响

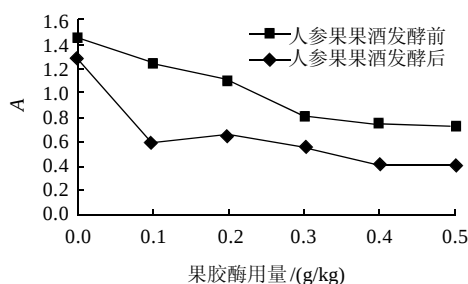


图1 果胶酶用量对人参果果酒色泽的影响

Fig.1 Effect of pectinase dosage on the absorbance at 680 nm of pepino juice and fruit wine

从图1可以看出, 无论发酵前后, 人参果果酒吸光度均随果胶酶用量增加逐渐变小, 尤其是发酵后人参果果酒添加果胶酶组酒液明显比未添加果胶酶组澄清透明, 说明果酒添加果胶酶可以明显起到酒液澄清的作用。当果胶酶用量在 0.3~0.5g/kg 范围内时, 人参果果酒发酵前吸光度变化幅度不大, 没有显著性差异; 但与空白不添加果胶酶组比护色效果明显, 有统计学意义, 由此可知添加果胶酶确实一定程度上可以对果酒发酵前起到护色、具有防止其发生褐变的作用; 而果胶酶用量在 0.1~0.5g/kg 时, 人参果果酒吸光度变化幅度不大, 但与空白不添加组相比澄清效果明显。综合考虑经济成本问题, 果胶酶用量以选择 0.3g/kg 较为适宜。

2.2 酶解时间对人参果果酒色泽的影响

由图2可知, 随着酶解时间的延长人参果果酒发酵前吸光度刚开始增幅变化很小, 无统计学差异, 酶解 75min 后, 吸光度逐渐增加, 未发酵的果酒发生褐变, 这可能是因为随着酶解时间延长, 增加了未发酵的人参果果汁中的多酚氧化酶与空气接触的机会, 从而发生了

酶促反应生成了醌类物质, 因此人参果果酒发酵前色泽加深, 吸光度增大; 而人参果果酒发酵后吸光度出现先持平略有下降后又直线上升的趋势, 当酶解时间为 75min 时, 人参果果酒澄清效果最好。综合考虑酶解时间过长可能会对人参果榨汁工艺造成营养损失, 故酶解时间以 75min 较为合理。

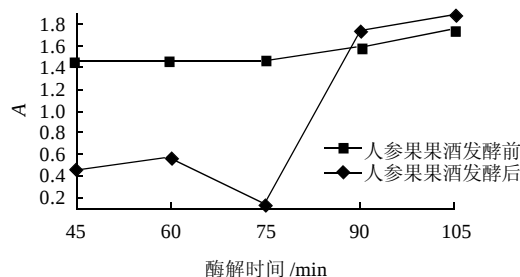


图2 酶解时间对人参果果酒色泽的影响

Fig.2 Effect of enzymolysis time on the absorbance at 680 nm of pepino juice and fruit wine

2.3 酶解温度对人参果果酒色泽的影响

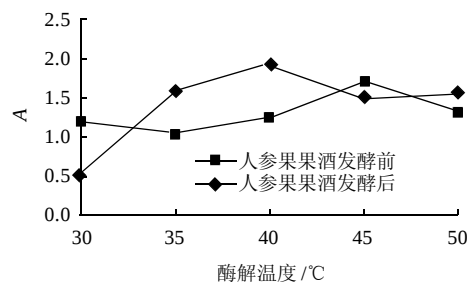


图3 酶解温度对人参果果酒色泽的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis temperature on the absorbance at 680 nm of pepino juice and fruit wine

由图3可知, 酶解温度对人参果果酒发酵前后色泽有一定影响。人参果果酒发酵前后吸光度随酶解温度升高都呈开口向上的抛物线形状, 其最低点亦即透光率最大点分别出现在酶解温度为 35℃ 和 30℃ 时, 综上, 酶解温度选择 30℃。此温度比文献[16-18]研究得到的酶解最适温要低, 原因可能为文献[16-18]考察果胶酶对人参果出汁率的影响时分别以出汁率和可溶性固形物含量为评价指标而得到的优化结果, 而本实验是以 OD 值为评价指标, 考察的是果胶酶添加对人参果果酒酿造中发酵前后色泽的影响, 因此适用的因素水平不同, 出现的结论不同。但是这一温度又与王鸿飞等^[19]于浙江宁波研究果胶酶对草莓果汁澄清效果时得到的果胶酶最适温度为 35~45℃ 中的下值接近, 从而得到了验证。

2.4 pH 值对人参果果酒色泽的影响

pH 值不仅影响果胶酶的稳定性, 而且还影响酶的

活性中心必须基团的解离状态和底物的解离状态^[16]。由图4可知,不同pH值对人参果酒发酵前后色泽的影响亦不尽相同。人参果酒发酵前果汁随pH值上升,其吸光度缓慢增加,当pH5.0时,吸光度取得极大值,此时未发酵的果汁褐变最为严重,而此pH值与人参果打浆后自然pH值(pH5.6)最为接近,说明增加酸度可以明显减轻人参果酒发酵前褐变程度;pH值在3.0~4.5范围内人参果酒发酵前吸光度变化不显著,证明果胶酶在此pH值范围内对人参果酒发酵前有较好的护色作用。发酵后人参果酒吸光度随pH值的增加呈开口向下的抛物线形状,其吸光度在pH4.5处最高,在pH3.0处最小,说明pH值增加会降低人参果酒的澄清效果,在pH3.0~4.0范围内人参果酒吸光度变化不显著,说明果胶酶在此pH值区间内对人参果酒具有很好的澄清作用。综合考虑一方面此处pH值应与果酒酿制时酿酒酵母的最适pH 3.8~6.0相统一,另外本研究发现pH值在3.0~4.0范围内虽然随pH值下降人参果酒发酵前后吸光度亦略有下降,但无统计学差异,同时考虑果酒酿造过程中大量使用柠檬酸调酸不仅会增加生产成本,还有可能对发酵后的风味产生不利影响,综上,pH值选择4.0较为合理。

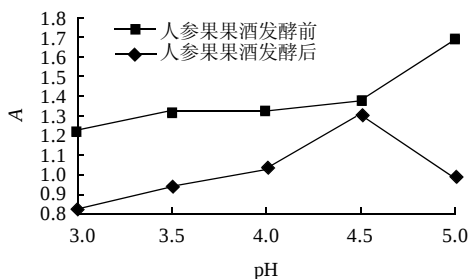


图4 pH值对人参果酒色泽的影响

Fig.4 Effect of pH on the absorbance at 680 nm of pepino juice and fruit wine

2.5 果胶酶对人参果酒色泽的影响因素参数水平优化
响应面分析是一种用于响应变量(值)和处理因素之间建模的统计分析方法^[20]。本试验使用SAS 9.2软件进行试验设计,按照四因素二次回归旋转组合设计方案,分别测定人参果酒发酵前后的吸光度,结果见表2,试验结束后再使用该软件对试验数据进行分析处理。

2.5.1 回归模型的建立及方差分析

以果酒的pH值 x_1 、酶解温度 x_2 、酶解时间 x_3 、果胶酶用量 x_4 为自变量,人参果酒发酵前后吸光度为因变量Y,建立果胶酶不同参数水平处理后的人参果酒护色与澄清作用模拟回归模型。

表2 四元线性回归正交旋转组合设计试验结果
Table 2 Quadratic rotation-orthogonal composite design and corresponding experimental results

序号	x_1 pH	x_2 酶解 温度	x_3 酶解 时间	x_4 果胶酶 用量	A_{680}	
					果酒发酵前	果酒发酵后
1	1	1	1	1	2.357	0.473
2	1	1	1	-1	2.112	0.145
3	1	1	-1	1	1.332	0.473
4	1	1	-1	-1	1.283	0.545
5	1	-1	1	1	2.530	0.825
6	1	-1	1	-1	1.385	0.78
7	1	-1	-1	1	1.696	0.726
8	1	-1	-1	-1	1.945	0.655
9	-1	1	1	1	2.520	0.722
10	-1	1	1	-1	2.564	0.644
11	-1	1	-1	1	2.345	0.649
12	-1	1	-1	-1	2.556	0.725
13	-1	-1	1	1	1.222	0.815
14	-1	-1	1	-1	1.455	0.471
15	-1	-1	-1	1	1.260	0.367
16	-1	-1	-1	-1	1.544	0.816
17	-2	0	0	0	1.853	0.404
18	2	0	0	0	2.449	0.274
19	0	-2	0	0	2.322	0.482
20	0	2	0	0	2.302	0.252
21	0	0	-2	0	2.473	0.201
22	0	0	2	0	2.310	0.322
23	0	0	0	-2	2.319	0.354
24	0	0	0	2	1.625	1.104
25	0	0	0	0	1.489	0.196
26	0	0	0	0	1.634	0.369
27	0	0	0	0	1.937	0.201
28	0	0	0	0	2.232	0.45
29	0	0	0	0	1.277	0.216
30	0	0	0	0	0.585	0.481
31	0	0	0	0	0.827	0.493
32	0	0	0	0	0.931	0.532
33	0	0	0	0	1.786	0.53
34	0	0	0	0	1.115	0.218
35	0	0	0	0	1.286	0.208
36	0	0	0	0	1.191	0.236

2.5.1.1 果胶酶对人参果酒护色作用初步回归方程模型建立及方差分析

$$Y = 1.35750 + 0.01525x_1 + 0.16633x_2 + 0.07742x_3 - 0.04042x_4 + 0.14421x_1^2 + 0.18446x_2^2 + 0.20433x_3^2 + 0.09946x_4^2 - 0.31100x_1x_2 + 0.12950x_1x_3 + 0.12262x_1x_4 + 0.11813x_2x_3 - 0.02125x_2x_4 + 0.11300x_3x_4 \quad (1)$$

从表3方差分析可以看出,果胶酶酶解温度、酶解时间的二次项、pH值和酶解温度的交互项等对人参果酒发酵前护色作用的影响均具有显著性($P < 0.05$)。对回归系数进行检验,表明酶解温度、酶解时间的二次项对人参果酒护色作用影响呈正效应,而果胶酶处理pH值和酶解温度的交互项对人参果酒护色作用影响

为负效应。其他变量影响均不显著($P > 0.05$), 无统计学差异。

表3 果胶酶对人参果果酒护色作用二次响应面
回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of the regression model for the
absorbance at 680 nm of pepino juice

变异来源	自由度	平方和	均方	F 比值	P 值	显著性
线性	X_1	1	0.0056	0.0056	0.02609	0.87323
	X_2	1	0.6640	0.6640	3.10372	0.09267
	X_3	1	0.1438	0.1438	0.67235	0.42144
	X_4	1	0.0392	0.0392	0.18325	0.67295
二次项	X_1^2	1	0.6655	0.6655	3.11060	0.09233
	X_2^2	1	1.0888	1.0888	5.08932	0.03486 *
	X_3^2	1	1.3361	1.3361	6.24513	0.02082 *
	X_4^2	1	0.3165	0.3165	1.47960	0.23733
交互项	X_1X_2	1	1.5475	1.5475	7.23359	0.01372 *
	X_1X_3	1	0.2683	0.2683	1.25422	0.27539
	X_1X_4	1	0.2406	0.2406	1.12458	0.30098
	X_2X_3	1	0.2233	0.2233	1.04356	0.31862
误差	X_2X_4	1	0.0072	0.0072	0.03377	0.85596
	X_3X_4	1	0.2043	0.2043	0.95497	0.33958
		21	4.4927	0.2139		
回归	线性	4	0.8526	0.2132	0.99635	0.4314
	二次项	4	3.4069	0.8517	3.98116	0.0148
	交互项	6	2.4912	0.4152	1.94078	0.1210
	总回归	14	6.7507	0.4822	$F_2=2.254$	0.0449
残差	失拟	10	1.9566	0.1957	$F_1=0.849$	0.5983
	随机误差	11	2.5361	0.2306		
	总残差	21	4.4927	0.2139		
总和		35	11.2434			

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

$\alpha=0.05$ 显著水平剔除不显著项, 简化后的回归方程为: $Y = 1.35750 + 0.18446x_2^2 + 0.20433x_3^2 - 0.31100x_1x_2$ (2)

对表3中失拟项作 F 检验, $F_1 = 0.849 < F_{0.05(10,11)} = 2.8655$, 说明失拟项在 $\alpha=0.05$ 水平不显著, 可以进一步考察回归项对人参果果酒护色作用的影响。用统计量 F_2 对回归方程作 F 检验, $F_2 = 2.254 > F_{0.05(14,21)} = 2.209$, 说明回归方程在 $\alpha=0.05$ 水平显著, 试验数据与所采用的二次数学模型基本符合。二次回归方程与实际情况拟合较好, 可用于果胶酶不同工艺参数对人参果果酒护色作用影响的预测, 具有实际应用意义。

2.5.1.2 果胶酶对人参果果酒澄清作用初步回归方程模型建立及方差分析

$$Y = 0.34417 - 0.03529x_1 - 0.06412x_2 + 0.00671x_3 + 0.07371x_4 + 0.03043x_1^2 + 0.03743x_2^2 + 0.01105x_3^2 + 0.12793x_4^2 - 0.10131x_1x_2 - 0.01694x_1x_3 + 0.02969x_1x_4 - 0.04594x_2x_3 + 0.01544x_2x_4 + 0.08256x_3x_4 \quad (3)$$

表4 果胶酶对人参果果酒澄清作用二次响应面回归模型方差分析
Table 4 Analysis of variance (ANOVA) of the regression model for the
absorbance at 680 nm of pepino fruit wine

变异来源	自由度	平方和	均方	F 比值	P 值	显著性
线性	X_1	1	0.0299	0.0299	0.90435	0.35244
	X_2	1	0.0987	0.0987	2.98571	0.09868
	X_3	1	0.0011	0.0011	0.03268	0.85829
	X_4	1	0.1304	0.1304	3.94481	0.06022
二次项	X_1^2	1	0.0296	0.0296	0.89630	0.35454
	X_2^2	1	0.0448	0.0448	1.35614	0.25727
	X_3^2	1	0.0039	0.0039	0.11826	0.73435
	X_4^2	1	0.5237	0.5237	15.84369	0.00068 **
交互项	X_1X_2	1	0.1642	0.1642	4.96852	0.03687 *
	X_1X_3	1	0.0046	0.0046	0.13887	0.71314
	X_1X_4	1	0.0141	0.0141	0.42663	0.52074
	X_2X_3	1	0.0338	0.0338	1.02149	0.32367
误差	X_2X_4	1	0.0038	0.0038	0.11536	0.73750
	X_3X_4	1	0.1091	0.1091	3.29964	0.08360
		21	0.6941	0.0331		
回归	线性	4	0.2601	0.065	1.96689	0.1367
	二次项	4	0.6021	0.15051	4.55359	0.0083
	交互项	6	0.3296	0.05493	1.66175	0.1800
	总回归	14	1.1917	0.08512	$F_2=2.575$	0.0245
残差	失拟	10	0.4666	0.04666	$F_1=2.256$	0.0991
	随机误差	11	0.2275	0.02069		
	总残差	21	0.6941	0.03305		
总和		35	1.8858			

从表4方差分析可以看出, 果胶酶用量的二次项以及 pH 值和酶解温度的交互项对人参果果酒澄清作用具有显著影响($P < 0.05$), 其中果胶酶用量的二次项对人参果果酒澄清作用的影响具有极显著性差异($P < 0.01$)。对回归系数进行检验, 表明果胶酶用量的二次项对人参果果酒澄清影响呈正效应, 而 pH 值和酶解温度的交互项对人参果果酒澄清作用的影响为负效应。其他变量的影响均不显著($P > 0.05$), 无统计学差异。

$\alpha=0.05$ 显著水平剔除不显著项, 简化后的回归方程: $Y = 0.34417 + 0.12793x_4^2 - 0.10131x_1x_2$ (4)

对失拟项作 F 检验, $F_1 = 0.849 < F_{0.05(10,11)} = 2.8655$, 说明失拟项在 $\alpha=0.05$ 水平不显著, 可以继续考察回归项对人参果果酒澄清的影响。用统计量 F_2 对回归方程作 F 检验, $F_2 = 2.254 > F_{0.05(14,21)} = 2.209$, 说明回归方程在 $\alpha=0.05$ 水平显著, 试验数据与所采用的二次数学模型基本上是符合的。二次回归方程与实际情况拟合得较好, 可用于果胶酶不同工艺参数对人参果果酒澄清影响的预测, 具有实际应用意义。

2.5.2 果胶酶对人参果果酒酿造中色泽变化影响的条件优化

2.5.2.1 果胶酶对人参果果酒发酵前护色作用影响的条件优化

固定其他3个因素于零水平,求第4个因素与因变量的回归方程,根据这些方程得到4个因素对人参果果酒发酵前色泽影响的关系曲线,用DPS软件绘制单因素效应图形,如图5所示。

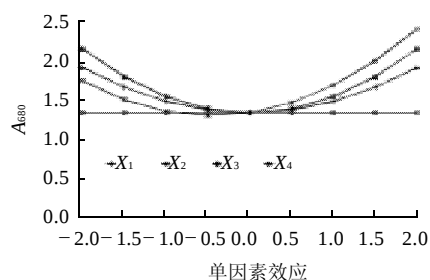


图5 单因素效应与人参果果酒发酵前吸光度关系图

Fig.5 Single-factor multi-level analysis of the effects of four pectinase treatment conditions on the absorbance at 680 nm of pepino juice

由图5可以看出,除果胶酶用量外,其余3因素与人参果果酒发酵前吸光度间均呈开口向上的抛物线关系,即吸光度随着果酒的pH值、果胶酶酶解温度和酶解时间的增加,人参果果酒发酵前吸光度呈先降后升的趋势,其护色最佳点出现在 $-0.500 \sim 0.500$ 水平之间;而果胶酶用量对人参果果酒发酵前护色作用无统计学影响。

固定两个因素于零水平,研究其他两个因素间的交互效应,用SAS 9.2软件制作出响应面图和等高线图(图6)。

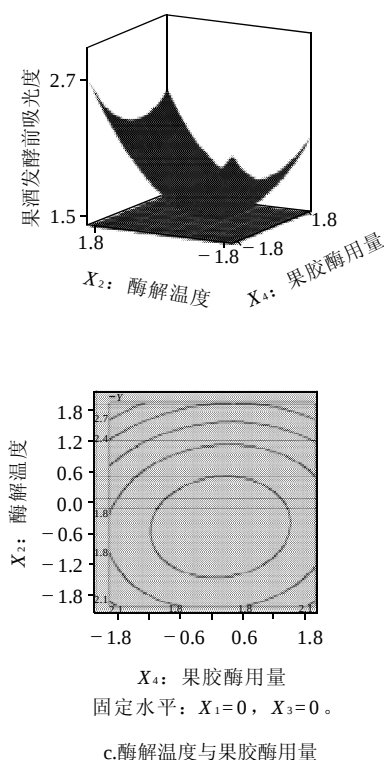
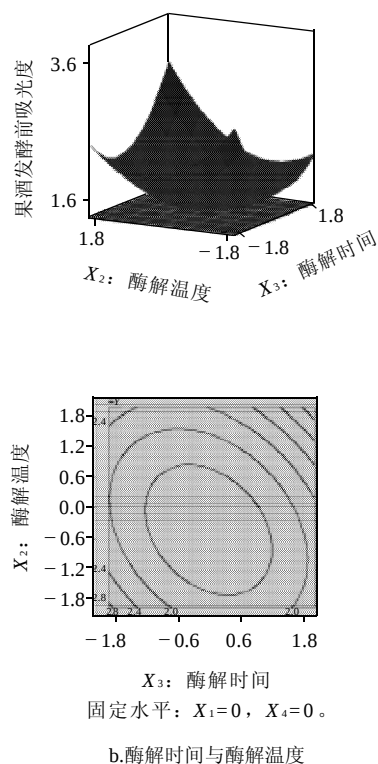
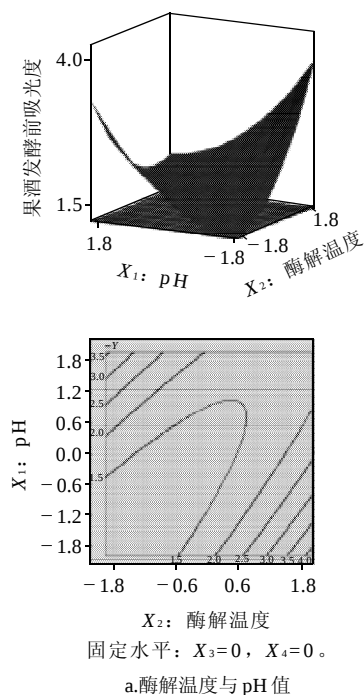


图6 果胶酶对人参果果酒发酵前吸光度影响的响应面图与等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots showing the effects of four pectinase treatment conditions on the absorbance at 680 nm of pepino juice

从果酒的 pH 值(x_1)与酶解温度(x_2)响应面和等高线图(图 6a)可以看出,二者交互作用极为显著,在酶解温度处于 -2.0000 水平时,随 pH 值降低,吸光度亦降低,二者呈正相关;之后,随着酶解温度水平升高,当 pH 值再下降时吸光度呈先降再升直至线性增加的趋势,人参果果酒发酵前吸光度极小值点随酶解温度水平增加逐渐向 pH 值极大水平处移动;并最终出现在 pH 值与酶解温度均处于最大水平 2.0000 处或者均处于最小水平 -2.0000 处,其中当二者均处于最低水平 -2.0000 时人参果果酒发酵前吸光度取得最小值;从等高线图可以看出,过程对酶解温度的变化比对果酒的 pH 值的变化更为敏感(图 6a);从酶解温度(x_2)和酶解时间(x_3)的响应面和等高线图(图 6b)可以看出,二者交互效应不很显著,最优点十分接近于酶解温度 29°C 和酶解时间 75min ,并在这两点附近取得最小值;从等高线图可以看出,过程对酶解温度的变化比对酶解时间的变化更为敏感(图 6b);从酶解温度(x_2)和果胶酶用量(x_4)的响应面和等高线图(图 6c)可以明显看出,其交互效应很显著,最优点十分接近于酶解温度 29°C 和果胶酶用量 0.3g/kg ,并在这两点附近取得最小值;从等高线图可以看出,过程对酶解温度的变化比对果胶酶用量的变化稍为敏感(图 6c)。

2.5.2.2 果胶酶对人参果果酒发酵后澄清作用影响的条件优化

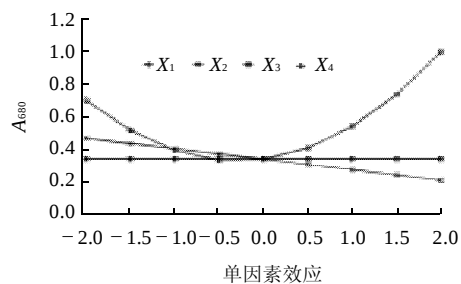


图7 单因素效应与人参果果酒吸光度关系图

Fig.7 Single-factor multi-level analysis of the effects of four pectinase treatment conditions on the absorbance at 680 nm of pepino fruit wine

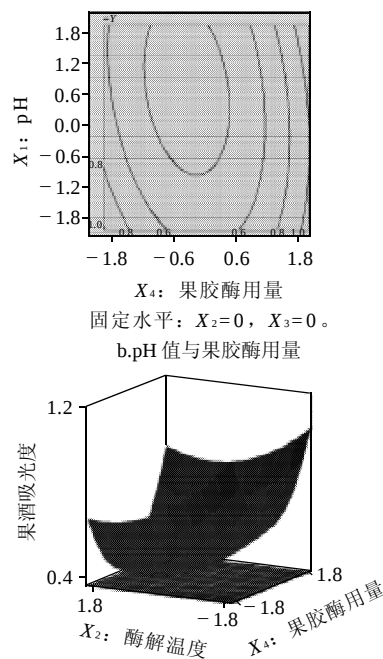
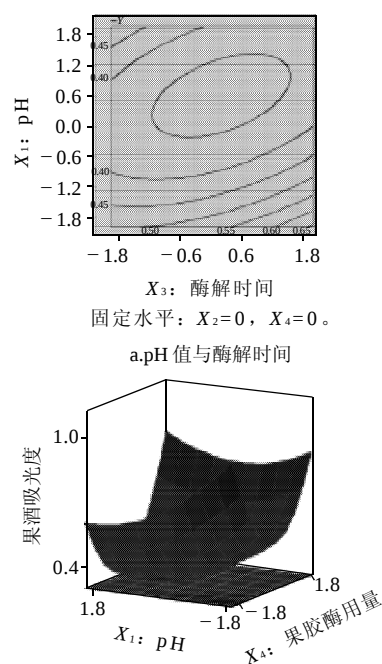
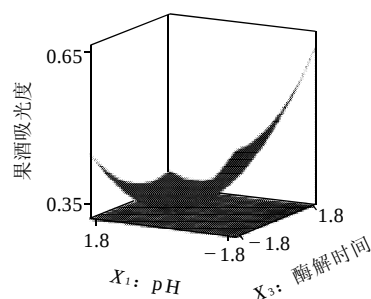


图8 果胶酶对人参果果酒吸光度影响的响应面图与等高线图

Fig.8 Response surface and contour plots showing the effects of four pectinase treatment conditions on the absorbance at 680 nm of pepino fruit wine

由图7可以看出,果胶酶用量与人参果果酒澄清度间呈开口向上的抛物线关系,人参果果酒澄清最佳点出现在 $-1.000\sim 0.500$ 水平之间;酶解温度与人参果果酒澄清度呈线性关系,随酶解温度升高,人参果果酒吸光度下降,澄清度上升,二者呈正相关;而pH值、酶解时间对人参果果酒吸光度无统计学影响。

从pH值(x_1)与酶解时间(x_3)响应面和等高线图(图8a)可以看出,二者交互作用极为显著,最优值十分接近于pH4.25和酶解时间60min,并在这两点附近取得最小值;从等高线图可以看出,过程对pH值的变化比对酶解时间的变化更为敏感(图8a);从pH值(x_1)和果胶酶用量(x_4)的响应面和等高线图(图8b)可以看出,其交互效应比较显著,最优值十分接近于pH4.6和果胶酶用量0.3g/kg,并在这两点附近取得最小值;从等高线图可以看出,过程对果胶酶用量的变化比对pH值的变化更为敏感(图8b);从酶解温度(x_2)和果胶酶用量(x_4)的响应面和等高线图(图8c)可以明显看出,二者交互效应很显著,最优值十分接近于酶解温度32.4℃和果胶酶用量0.3g/kg,并在这两点附近取得最小值;从等高线图可以看出,过程对果胶酶用量的变化比对酶解温度的变化更为敏感(图8c)。响应面的绘制进一步验证表3、4方差分析的结论。

从图6和图8响应面图还可以看出,果酒的不同pH值、酶解温度、酶解时间与果胶酶用量的二次响应面出现鞍面,无极值的存在,因此不能直接从二次响应面上找出最佳影响因素参数,需进一步作岭脊分析(ridge analysis)^[21-22]。在上述回归模型中回归系数出现负值也是由于存在“共线性”,即自变量之间存在相互影响,从而导致影响力系数失真的缘故。

2.5.3 岭脊分析

2.5.3.1 影响果胶酶对人参果果酒护色的条件岭脊分析

表5 影响果胶酶对人参果果酒护色的条件岭脊分析

Table 5 Ridge analysis for the absorbance at 680 nm of pepino juice with various pectinase treatment conditions

编码半径	响应值	标准误差	x_1	x_2	x_3	x_4
0.0	1.35750	0.13352	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.1	1.34042	0.13352	-0.02234	-0.08760	-0.03413	0.02572
0.2	1.32585	0.13356	-0.07056	-0.17106	-0.04964	0.05740
0.3	1.31244	0.13372	-0.13392	-0.24842	-0.04826	0.08956
0.4	1.29940	0.13416	-0.20359	-0.32087	-0.03630	0.11949
0.5	1.28631	0.13508	-0.27562	-0.39002	-0.01822	0.14692
0.6	1.27297	0.13673	-0.34850	-0.45701	0.00352	0.17226
0.7	1.25927	0.13940	-0.42165	-0.52254	0.02762	0.19595
0.8	1.24515	0.14341	-0.49484	-0.58704	0.05329	0.21834
0.9	1.23056	0.14905	-0.56797	-0.65080	0.08008	0.23971
1.0	1.21548	0.15657	-0.64100	-0.71399	0.10769	0.26027

从表5岭脊分析可以看出,当编码半径为1.0时响应值Y最小,约为1.22,此时果酒的pH4.6,果胶酶酶解温度32℃,酶解时间63min,用量0.3g/kg。

2.5.3.2 影响果胶酶对人参果果酒澄清的条件岭脊分析

表6 影响果胶酶对人参果果酒澄清的条件岭脊分析

Table 6 Ridge analysis for the absorbance at 680 nm of pepino fruit wine with various pectinase treatment conditions

编码半径	响应值	标准误差	x_1	x_2	x_3	x_4
0.0	0.34417	0.052483	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
0.1	0.33415	0.052484	0.04234	0.06615	0.00216	-0.06186
0.2	0.32445	0.052499	0.09632	0.13638	0.01994	-0.10829
0.3	0.31460	0.052563	0.15523	0.20619	0.04874	-0.14496
0.4	0.30435	0.052734	0.21567	0.27438	0.08464	-0.17618
0.5	0.29357	0.053094	0.27633	0.34092	0.12521	-0.20429
0.6	0.28218	0.053743	0.33674	0.40608	0.16900	-0.23054
0.7	0.27016	0.054795	0.39673	0.47011	0.21509	-0.25561
0.8	0.25747	0.056370	0.45630	0.53323	0.26290	-0.27989
0.9	0.24410	0.058585	0.51546	0.59562	0.31201	-0.30363
1.0	0.23003	0.061542	0.57425	0.65740	0.36214	-0.32699

从表6岭脊分析可以看出,当编码半径为1.0时响应值Y最小,约为0.23,此时果酒的pH4.0、果胶酶酶解温度30℃、酶解时间55min、用量0.316g/kg。

2.5.4 优化参数试验验证

在人参果果酒最佳护色工艺参数及人参果果酒最佳澄清工艺条件下对其进行验证实验,重复3次,取其平均值,所得吸光度分别为1.218和0.236,3次实验的平均误差均小于0.05%,RSD分别为1.43%和2.36%,与优化目标值非常接近。因此,进一步验证了所得回归模型和最佳工艺参数可用于指导人参果果酒生产实际的结论。

3 讨 论

3.1 本实验采用岭脊分析对人参果果酒护色及澄清两道工艺的影响因素加以分析,不仅减小了多元共线性的效应,而且由于所获得的岭回归系数为标准化系数,因此可通过它们更直观地比较果胶酶不同工艺参数对人参果果酒护色与澄清作用影响的大小。

3.2 由于中心组合设计较为复杂,加之设计时加入了中心点处理较多,所得数据处理量较大;同时岭脊分析又较一般的回归分析计算量大得多,因此本研究使用SAS 9.2软件辅以DPS软件进行数据处理,以实现多元岭回归,从而确定了与人参果果酒护色与澄清作用有关的果胶酶的重要工艺参数,获得了较为可靠的分析结果。

3.3 果胶酶之所以可以提高出汁率、澄清酒液是因为它可以分解植物细胞壁上的多聚糖类基质以及细胞间层的部分原果胶和纤维素,使果蔬汁自流量增加^[23],也可以将果胶分解成果胶酸小分子物质^[24],同时尽可能在发酵前将果汁中的杂质减少到最低限度,避免果汁在贮存过程中酒石结晶沉淀或无定形的色素微粒自行沉淀出

来以及出现蛋白质浑浊、微生物浑浊等不良现象,或者控制果汁中的浸渍作用、脱去果胶^[25],稳定其中色素,从而达到提高农产品出汁率、稳定色泽、增加透光率进而提高商品的商业价值的目的。但是目前关于果胶酶护色方面的研究未见报道。本实验从护色和澄清两个角度考察果胶酶对人参果酒发酵前后色泽的影响,为排除添加二氧化硫对果酒发酵前的护色作用的干扰,故实验设计时将二氧化硫的添加由以往常规的打浆时添加,改成了果胶酶处理后过滤完果汁,获得所有数据之后再添加,所以减少了二氧化硫护色作用对果胶酶作用的干扰。结果发现添加果胶酶组人参果酒发酵前色泽明显与初榨汁后色泽接近,而不添加果胶酶组则发生了显著的褐变,说明果胶酶的添加对人参果酒发酵前在一定程度上具有护色作用,这可能是因为果胶酶的添加使得它与人参果酒未发酵时的多酚氧化酶发生了竞争性抑制作用,从而影响了多酚氧化酶的生物活性,进而降低了人参果酒未发酵时发生酶促反应的机率,因此对人参果酒发酵前起到了一个护色作用的缘故,但其具体机理如何有待进一步研究。

4 结 论

4.1 通过4因素5水平二次回归旋转组合设计,用SAS 9.2软件和DPS软件进行回归分析和响应面分析,建立了果胶酶对人参果酒护色与澄清作用的影响与果酒的pH值、果胶酶酶解温度、酶解时间、用量变化关系的回归模型。从统计分析结果可知,果胶酶酶解温度、酶解时间对人参果酒护色作用影响显著($P < 0.05$),果胶酶用量对人参果酒澄清作用影响显著($P < 0.05$),而果酒的pH值对二者影响均不显著($P > 0.05$),无统计学差异。该回归模型的建立拟合性较好,说明可以将其用于生产预测,具有实际应用意义。

4.2 通过回归建模及方差分析可知,果胶酶对人参果酒护色与澄清作用的影响因素间存在多重共线性,故本试验使用多元回归分析。

4.3 岭脊分析可对多重共线性资料有较好的处理。本实验采用多元岭回归技术,确认果酒的pH值及果胶酶酶解温度、酶解时间和用量对人参果酒护色及澄清起重要作用。其中人参果酒护色最佳参数为果酒pH4.6、果胶酶酶解温度32℃、酶解时间63min、用量0.3g/kg;人参果酒澄清最佳条件为果酒的pH4.0、果胶酶酶解温度30℃、酶解时间55min、用量0.316g/kg。

4.4 在人参果酒最佳护色工艺参数及人参果酒最佳澄清工艺条件下对其进行验证实验,重复3次,取其平均值,所得吸光度分别为1.218和0.236,3次实验的平

均误差均小于0.05%,RSD分别为1.43%和2.36%,与优化目标值非常接近。

参考文献:

- [1] MARTNEZ-ROMERO D, SERRANO M, VALERO D. Physiological changes in pepino (*Solanum muricatum* Ait.) fruit stored at chilling and non-chilling temperatures[J]. Postharvest Biology and Technology, 2003, 30(11): 177-186.
- [2] 张建和,符伟玉,李尚德. 香瓜茄、人心果的营养成分分析研究[J]. 广东微量元素科学, 2007, 14(3): 48-52.
- [3] PROHENS J, RUIZ JUAN J, NUEZ F. The pepino(*Solanum muricatum*, Solanaceae): a "new" crop with a history[J]. Economic Botany, 1996, 50(4): 355-368.
- [4] 任雪峰,巩维忠,吴冬青,等. 火焰原子吸收光谱法测定不同产地人参中11种微量元素含量[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2009, 45(3): 73-76.
- [5] 张戎,朱蓓薇,董秀萍. 低糖人参果脯、果酱的研制[J]. 食品工业科技, 2001, 22(6): 54-56.
- [6] 胡志和,白祝清. 人参果复合乳饮料的研究[J]. 食品科学, 1998, 19(6): 20-22.
- [7] 陈彦. 人参果汁加工技术研究[J]. 食品工业科技, 2001, 22(4): 69-70.
- [8] 文连奎,张健,冯永巍,等. 人参果白兰地的研制[J]. 食品科学, 2005, 26(增刊1): 215-216.
- [9] 罗安伟,刘兴华,石慧,等. 甜橙汁澄清剂的选择及甜橙干酒的酿造工艺[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(12): 185-188.
- [10] 杨剑芳,黄明勇,路福平,等. 山茱萸发酵酒制备工艺条件优化研究[J]. 北京林业大学学报, 2009, 31(5): 131-136.
- [11] 苏东晓,张名位,侯方丽,等. 速溶龙眼粉加工的酶解提取与喷雾干燥工艺优化[J]. 农业工程学报, 2009, 25(8): 268-274.
- [12] 许文玲,熊雄,张志杰,等. 果胶酶澄清菠萝汁最佳工艺研究[J]. 食品科技, 2007, 32(5): 202-205.
- [13] 姜守军,周广麒. 果胶酶澄清葡萄汁的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(4): 1109-1110.
- [14] 郭敏辰,王瑾,刘月,等. 果胶酶生产及其在苹果汁澄清中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12): 134-137.
- [15] 朱翘楚,王志强,向晶,等. 酶法提取柳蒿芽多糖的工艺条件[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(12): 54-55.
- [16] 苏凤贤,王晓琴,苟亚峰,等. 响应面分析果胶酶提高人参果出汁率的工艺参数[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 83-88.
- [17] 苏凤贤,苟亚峰,王玉芳,等. 人参果酶法提汁工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(8): 198-203.
- [18] 杜双奎,于修焯,李志西,等. 红枣酶法提汁工艺条件响应面分析[J]. 农业机械学报, 2007, 38(3): 191-193.
- [19] 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, 19(5): 161-164.
- [20] KHAMIS A, ISMAIL Z, HARON K, et al. The use of response surface analysis in obtaining maximum profit in oil palm industry[J]. Songklanakarin J Sci Technol, 2006, 28(2): 417-429.
- [21] 查阳春,杨义昕,胡晓茵,等. 响应面法优化荞麦壳中原花青素的提取工艺[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 189-192.
- [22] ROGER W, HOERL. Ridge analysis 25 years later[J]. The American Statistician, 1985, 39(3): 186-192.
- [23] 田雅丽,马永明,王焕香,等. 陈酿型干红葡萄酒生产工艺研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003, 17(2): 50-51.
- [24] 郑宝东,陈绍军,王登飞,等. 柑桔保健果醋酿制工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 238-241.
- [25] CAMERLINGO C, ZENONE F, DELFINO I, et al. Investigation on clarified fruit juice composition by using visible light micro-Raman spectroscopy[J]. Sensors, 2007, 7(10): 2049-2061.