高密度二氧化碳对荔枝汁品质的影响

徐玉娟[1,2]，温　靖[1]，肖更生[1]，吴继军[1]，陈于陇[1]，余元善[1]，唐道邦[1]，潘思轶[2,*]
(1.广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所，广东省农产品加工公共实验室，广东　广州　510610；
2.华中农业大学食品科学技术学院，湖北 武汉　430070)

摘　要：为探讨高密度二氧化碳(DPCD)非热杀菌技术对荔枝汁品质的影响，将新鲜荔枝汁经DPCD处理(8MPa、36℃、10min)后，测定pH值、可溶性固形物含量、电导率、褐变度、VC含量和游离氨基酸含量等指标的变化。结果表明：DPCD处理对荔枝汁的pH值、总酸度和多酚氧化酶(PPO)活性有显著影响，经DPCD处理后荔枝汁的还原糖、总多酚和游离氨基酸的含量略有增加，其他指标没有明显变化。
关键词：DPCD非热杀菌；荔枝汁；理化性质

Effect of Dense Phase Carbon Dioxide on the Quality of Litchi Juice

XU Yu-juan[1,2]，WEN Jing[1]，XIAO Geng-sheng[1]，WU Ji-jun[1]，CHEN Yu-long[1]，
YU Yuan-shan[1]，TANG Dao-bang[1]，PAN Si-yi[2,*]
(1. Guangdong Open Access Laboratory of Agricultural Product Processing, Sericulture and Agri-food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou　510610, China；
2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan　430070, China)

Abstract: In order to investigate the effect of dense phase carbon dioxide (DPCD) as a non-thermal sterilization technology on the quality and physio-chemical properties of litchi juice, freshly prepared litchi juice was subjected to DPCD treatment at 8 MPa and 36 ℃ for 10 min. The changes of pH, soluble solid content, conductivity, browning degree, vitamin C and free amino acids were evaluated. The results showed that DPCD treatment had a significant effect on pH, total acidity and PPO, but had no obvious effect on other indicators. Slight increases in reducing sugar, total polyphenol content and free amino acid content in DPCD-treated litchi juice were observed.
Key words: dense phase carbon dioxide non-thermal sterilization technology；litchi juice；physio-chemical properties
中图分类号：TS255.44　　文献标识码：A　　文章编号：1002-6630(2012)15-0071-04

目前，果蔬汁杀菌技术以热力杀菌为主，热力杀菌具有很好的杀菌效果，但由于果蔬汁对热敏感，热力杀菌后导致果蔬汁的营养价值及感官品质发生明显劣变。高密度二氧化碳(dense phase carbon dioxide，DPCD)作为一种新型杀菌技术，对微生物和酶具有很好的杀灭和钝化作用，同时由于其杀菌技术处理压力低，容易达到并控制压力；与传统的热力杀菌技术相比，对食品的热敏物质破坏作用小，特别是能很好的保持食品原有风味，色泽和营养成分。因此，DPCD杀菌技术日渐成为食品杀菌技术研究的焦点之一[1-4]。

国内外采用DPCD研究的多数为苹果汁、橙汁、橘汁、胡萝卜汁等温带果蔬汁，而对亚热带的荔枝汁中微生物杀菌研究很少。本实验室近年来采用DPCD对荔枝汁杀菌技术进行了研究[5]，结果显示采用DPCD杀菌荔枝汁，在5MPa、36℃条件下，可杀灭大肠杆菌8个对数以上，金黄色葡萄球菌及沙门氏菌致病菌和酵母菌亦可被杀灭。因此，DPCD显示了很好的杀菌效果。本实验在前期研究的基础上，进一步分析新鲜荔枝汁经DPCD处理后主要品质的变化，探讨DPCD用于荔枝汁加工的可能性，为DPCD新技术在荔枝汁加工中的应用提供基础数据和理论依据。

收稿日期：2012-04-13
基金项目：国家公益性行业(农业)科研专项(200903043-03)；广东省自然科学基金项目(07117971)；
广东省关键领域重点突破招标项目(2008A024200008)；广东省科技计划项目(2010A020501016)
作者简介：徐玉娟(1974—)，女，研究员，博士研究生，研究方向为果蔬深加工。E-mail：xyj6510@126.com
*通信作者：潘思轶(1964—)，男，教授，博士，研究方向为农产品化学。E-mail：pansiyi@mail.hzau.edu.cn

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

荔枝(品种为淮枝)　市售。

Fe^{3+}-三吡啶三吖嗪(TPTZ)　美国Sigma公司；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、过氧化氢、乙醇、邻苯二酚等均为分析纯。

1.2　仪器与设备

HL-1L-50-ⅡB高密度二氧化碳设备　杭州华黎泵业有限公司；破碎机　荷兰Philips公司；Pocket PAL-1糖度计　日本Atago公司；ZD-2酸度计　上海精科电子有限公司；CPC-505电导率仪　德国斯玛特公司；ALC-210.4电子精密天平　德国赛多利斯公司；Cary Eclipse荧光分析仪　美国瓦里安公司；L-8900氨基酸自动分析仪　日立Hitachi公司；UV-1800紫外-可见分光光度计　日本岛津公司；手动SPME进样器　美国Supelco公司；6890-5975气质联用仪　美国Agilent公司；JB-3型定时恒温磁力搅拌器　上海智光仪器仪表有限公司。

1.3　方法

1.3.1　荔枝原汁制备

将荔枝鲜果进行拣选、清洗、去皮后，在组织捣碎机中破碎30s，将得到的荔枝果浆，用4层纱布过滤，取滤液，即为荔枝果汁样品。荔枝果汁样品用高压蒸汽灭菌后的玻璃瓶分装，并放置在4℃冰箱中保存备用。同时为了保证实验不受样品差异的影响，本实验中所使用的荔枝汁均为同一批次产品。

1.3.2　DPCD处理

超临界二氧化碳处理装置流程图如图1所示，其中萃取(杀菌)釜容量1L，直径80mm，高度50cm。二氧化碳流量9kg/h，升压速率为1MPa/min(二氧化碳压力8MPa以下)，升压速率10MPa/min(二氧化碳压力8MPa以上)。

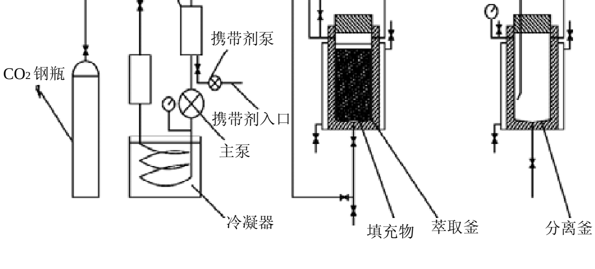

图1　超临界二氧化碳萃取设备示意图

Fig.1　Diagram of supercritical carbon dioxide extraction

将200mL荔枝原汁置于杀菌釜内，密闭，采用高压泵从底部输送二氧化碳，到达8MPa、36℃条件时，DPCD处理10min。之后，萃取釜卸压，卸压时间为1～2min，温度可控制，在设定温度上下波动1～2℃[5]。

1.3.3　多酚氧化酶(PPO)活性测定[6]

果汁样品在4℃条件下12000r/min离心15min，上清液用于PPO活性测定。PPO活性测定采用邻苯二酚法，具体为：2.9mL 10mmol/L邻苯二酚(0.1mol/L磷酸盐缓冲液配制，pH7.0)和0.1mL酶液混合，反应体系温度为30℃，置于分光光度计中，测定398nm波长处吸光度的变化，以每分钟A_{398nm}变化0.001所需的酶量为一个酶活性单位。

1.3.4　过氧化物酶(POD)活性测定[7]

果汁处理同1.3.4节。POD活性测定采用愈创木酚法，具体为：将0.1mL 4.0%愈创木酚、0.1mL 0.46%过氧化氢、2.7mL 0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)和0.1mL酶液混合，反应体系温度为30℃，置于分光光度计中，测定470nm波长处吸光度的变化，以每分钟A_{470nm}变化0.01所需的酶量为一个酶活性单位。

1.3.5　理化指标的测定

可溶性固形物含量：采用手持便携式折光仪在室温测定；pH值的测定：采用酸度计直接测定pH值；总酸度的测定：按照GB/T 12293—90《水果、蔬菜制品可滴定酸度的测定》，采用滴定法测定，总酸度以柠檬酸计。电导率的测定：用电导率仪直接测定；褐变度的测定：将果汁经4500r/min离心5min，取上清液在420nm波长处测其吸光度；还原糖含量的测定：采用菲林试剂比色法，以葡萄糖计，详细方法参照国标GB/T 6194—86《水果、蔬菜可溶性糖的测定》；总多酚含量的测定[8]：采用福林酚试剂法，含量以没食子酸(mg/L)计。分别取稀释一定倍数的荔枝汁样品1mL，加入1mL福林酚试剂，2mL 10g/100mL Na_2CO_3溶液后混匀，25℃反应1h，在765nm波长处测定吸光度，计算荔枝汁总酚含量；VC含量的测定[9]：采用邻苯二胺衍生法，使用荧光光度计测定相对荧光强度。

1.3.6　氨基酸含量的测定

氨基酸含量使用氨基酸自动分析仪测定。具体为：1)取1mL荔枝果汁样品，加入4mL 10g/100mL的5-磺基水杨酸，振荡混匀，4℃静置30min；2)接着用高速离心机在4℃、12000r/min离心15min，上清液经0.22μm的水溶性滤膜过滤后上机测试。根据氨基酸标准物质的质量浓度与峰面积的关系，外标法定量果汁样品中的氨基酸组分，单位以ng/μL表示。

色谱条件：855-350型色谱柱(4.6mm×60mm)；柱温134℃；双通道紫外检测波长440nm和570nm；进样量20μL；保留时间148min。

1.4 统计分析

实验所涉及到的统计分析均用SPSS配对 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 DPCD对荔枝汁主要理化指标的影响

DPCD处理后荔枝汁可溶性固形物含量、pH值、总酸度、电导率、褐变度、PPO活力、POD活力以及还原糖、总多酚、VC含量的变化见表1。可溶性固形物含量、电导率和褐变度基本没有发生变化($P > 0.05$)；总酸度明显增加，pH值明显降低，主要是因为经DPCD处理后，二氧化碳溶解于荔枝汁中形成H_2CO_3，并部分水解成H^+和HCO_3^-，使荔枝汁的pH值降低。同时，荔枝汁PPO活力也被完全钝化。

VC的含量呈下降趋势，可能与热降解有关，但差异不显著；还原糖、总多酚的含量略呈上升趋势，并且在$P < 0.05$水平有显著性差异。

表1 DPCD对荔枝果汁理化指标的影响

Table 1 Effect of DPCD treatment on physiochemical parameters of litchi juice

理化指标	DPCD处理前	DPCD处理后
可溶性固形物含量/%	16.60 ± 0.02	16.70 ± 0.02
pH	4.66 ± 0.01	4.57 ± 0.01*
总酸度/%	0.21 ± 0.02	0.29 ± 0.01*
电导率/(mS/cm)	2.61 ± 0.01	2.62 ± 0.02
褐变度	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01
PPO活力/(U/mL)	17.13 ± 0.02	0**
POD活力/(U/mL)	—	—
还原糖含量/(g/100g)	15.72 ± 0.75	16.83 ± 0.64*
总酚含量/(mg/L)	244.86 ± 1.42	260.97 ± 3.20*
VC含量/(mg/L)	388.04 ± 1.23	386.06 ± 1.42

注：*. 处理前后差异显著($P < 0.05$)；**. 处理前后差异极显著($P < 0.01$)；—.未检测到。

2.2 DPCD对荔枝汁中游离氨基酸含量的影响

表2 DPCD对氨基酸组分及其含量的影响

Table 2 Effect of DPCD treatment on amino acids and contents in litchi juice

ng/μL

氨基酸组分	处理前	处理后	氨基酸组分	处理前	处理后
赖氨酸(Lys)*	49.81	58.95	丙氨酸(Ala)	1110.79	1300.48
苏氨酸(Thr)*	29.48	34.28	鸟氨酸(Orn)	0.46	0.40
缬氨酸(Val)*	139.96	165.94	精氨酸(Arg)	75.52	88.97
异亮氨酸(Ile)*	108.25	128.02	半胱氨酸(Cys)	1.48	2.12
甲硫氨酸(Met)*	70.80	85.27	酪氨酸(Tyr)	28.90	33.88
苯丙氨酸(Phe)*	53.81	63.35	胱硫醚(Cysthi)	3.37	4.32
亮氨酸(Leu)*	36.80	43.68	天冬氨酸(Asp)	173.70	205.51
丝氨酸(Ser)	120.17	141.61	β-丙氨酸(β-Ala)	8.62	10.25
谷氨酸(Glu)	232.32	269.58	γ-氨基丁酸(γ-ABA)	745.80	878.26
肌氨酸(Sar)	40.07	13.92	氨基丁酸(α-ABA)	24.69	29.69
组氨酸(His)	14.82	18.62	α-氨基己二酸(α-AAA)	24.74	30.02
甘氨酸(Gly)	41.21	48.33	总计	3135.57	3655.45

注：*. 人体必需氨基酸；色氨酸和脯氨酸未检测。

由表2可知，新鲜荔枝汁中氨基酸总含量为3135.57ng/μL，必需氨基酸含488.91ng/μL，占总量的15.6%；而经过DPCD处理后，荔枝汁氨基酸明显增加，经8MPa、30℃处理后，荔枝汁氨基酸总含量达到3655.45ng/μL，与新鲜荔枝汁相比，增加了16.6%。DPCD处理后荔枝汁中必需氨基酸的含量也随之增加，含量提高了18.5%。

DPCD处理对荔枝汁中游离氨基酸含量的影响，与前人的有些研究结果相矛盾。二氧化碳虽然是惰性的，但是有些文献报道指出二氧化碳在某些条件下会和食品成分发生反应，特别是蛋白质。为了检测超临界二氧化碳对食品组分的影响，Weder等[10]研究了超临界二氧化碳对商业核糖核酸酶的组成、结构和特性的影响，结果表明，与对照组相比，DPCD处理(30MPa、80℃、6h)后的氨基酸组成和含量没有显著差异，但谷氨酸损失了15%～23%，*L*-精氨酸损失了20%，推测可能是精氨酸可与二氧化碳发生反应形成碳酸盐，但是由于这一反应要求有未质子化的α-氨基存在，pH值高于9，因此，这一反应在通常食品pH值条件下并不重要。Weder等[11]采用超临界二氧化碳处理7种游离氨基酸(*L*-谷氨酸、*L*-谷氨酸盐、*L*-甲硫氨酸、*L*-亮氨酸、*L*-丙氨酸、β-丙氨酸和*L*-赖氨酸)，发现只有谷氨酸盐部分转化为2-吡咯烷酮-5-羧酸盐，但这并不影响食品质量。本实验与这些研究存在较大差异，可能是由于该研究采用的温度较高，氨基酸易发生物理化学变化导致的，而本实验采用30℃，条件比较温和。

据报道[12]，大豆经DPCD处理后，残留蛋白质中氨基酸的组分和含量没有显著变化，而采用双向凝胶电泳检测发现超临界二氧化碳引起严重的蛋白质含量改变[13]，推测可能是由于微生物细胞在DPCD作用下细胞膜破裂，释放出细胞内多肽或氨基酸，或者细胞内蛋白酶释放出来使蛋白质降解成氨基酸，提高了荔枝汁中游离氨基酸含量，与本研究结果有些相似。

3 结论与讨论

荔枝属于热敏性较强的水果之一，通常的热处理加工方式极易使果汁的感官品质发生变化，例如荔枝果汁颜色发红，产生蒸煮味等，所以利用非热的加工技术是荔枝深加工将来的一个发展趋势。DPCD技术是通过二氧化碳的分子效应来达到杀菌和钝酶的目的，是一种绿色洁净技术，不会对食品造成安全性影响，近年来已被大量的用于液态食品的杀菌钝酶中[14-16]。

Fabroni等[17]对血橙汁进行了23MPa、36℃、流速3.91L/h CO_2条件的处理，并检测了处理后血橙汁的物理化学性质、抗氧化性，以此来评价处理效果，评估了处理后血橙汁在(4 ± 1)℃冻藏30d后的品质，结果显示DPCD处理可保持血橙汁的物理化学特性、抗氧化性和

感官特性。Zhou Liyan等[18]以胡萝卜汁为材料研究DPCD对果汁质量的影响，发现DPCD处理可显著增加胡萝卜汁的$L*$值，随着处理时间的延长，$a*$值增加，但对$b*$值没有影响；褐变度、pH值和果汁的紫外-可见吸光度下降，浊度和可滴定酸(TA)含量显著增加，但是总的可溶性固形物含量和果汁的胡萝卜素含量比较稳定；果汁的颗粒大小经DPCD处理后与未处理样相差不大。Damar等[4]研究发现DPCD处理后的很多液体食品保持了其新鲜的感官、营养和理化特性，避免了传统杀菌的热效应。Damar等[19]总结出DPCD处理后的椰汁总体可接受度与新鲜椰子汁相比没有显著差异，而热杀菌样品则显著下降，DPCD处理后椰子汁可滴定酸含量明显比新鲜和热处理样品高。但是所有样品的pH值和可溶性固形物含量分别保持在4.2和6.0°Brix，且在冻藏后都出现了粉红色。DPCD处理可提高橘汁的理化性质和营养质量特性，例如延缓混浊形成及提高稳定性，保持色泽和VC含量不变等[20]。以上研究结果表明，DPCD处理对果蔬汁中的微生物和酶均有很好的杀灭效果，同时，还能很好的保持食品原有的营养与风味。

而本实验研究结果也表明，荔枝汁经DPCD处理后，可溶性固形物含量、电导率和褐变度基本没有发生变化，总酸度明显增加，pH值明显降低。同时，荔枝汁PPO酶活力也明显降低。还原糖、总多酚含量略有上升趋势，VC的含量未发生明显的变化。荔枝汁中各种氨基酸含量经DPCD处理后均显著增加，原因可能是经DPCD处理，荔枝汁中天然微生物细胞破裂，细胞内的氨基酸渗漏到基质中，或者细胞内蛋白酶将蛋白质水解成氨基酸，由于DPCD处理温度较低，氨基酸不易与糖发生美拉德反应，相对于传统热处理，氨基酸的含量显著增加，提高了DPCD荔枝汁中的营养价值，但是，较高的游离氨基酸水平可能会在贮藏过程中起负面作用，游离氨基酸易与还原糖发生美拉德反应，引起褐变。另外，DPCD处理引起氨基酸总量增加的确切原因还有待于进一步研究。

综合考虑，DPCD处理能够较好保留荔枝汁的品质和安全。尤其是对于荔枝热敏性水果而言，经过DPCD处理后荔枝汁未发生褐变，解决了传统热杀菌对荔枝汁产生的褐变效应。

参考文献：

[1] GOODNER J K, BRADDOCK R J, PARISH M E. Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juices by high pressure[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(5): 1997-2000.

[2] MEYER R S, COOPERK L, KNORR D. High-pressure sterilization of foods[J]. Food Technology, 2000, 54(11): 67-72.

[3] YUSTE J, CAPELLAS M PLA R, et al. High pressure processing for food safety and preservation: a review[J]. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2001, 9(1): 1-10.

[4] DAMAR S, BALABAN M O. Review of dense phase CO_2 technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1): 1-11.

[5] 郭鸣鸣, 吴继军, 徐玉娟, 等. 荔枝汁高密度二氧化碳杀菌研究[J]. 食品工业科技, 2010, 26(3): 260-265.

[6] MONTGOMERY M W, SGARIERI V C. Isoenzymes of banana polyphenoloxidase[J]. Phtochemistry, 1975, 14(5/6): 1245-1249.

[7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001.

[8] JULKUNEN-TIITTO R. Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985, 33(2): 213-217.

[9] AOAC. Official methods of analysis[M].14th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1984: 844-846.

[10] WEDER J K P. Effect of supercritical carbon dioxide on the proteins[J]. European Food Research & Technology, 1980, 171(2): 95-100.

[11] WEDER J K P, BOKOR M V. Effect of supercritical carbon dioxide on arginine[J]. Food Chemistry, 1992, 44(4): 287-290.

[12] STAHL E, QUIRIN K W, BLAGROVE R J. Extraction of seed oils with supercritical carbon dioxide: effect on residual proteins[J]. J Agric Food Chem, 1984, 32(4): 938-940.

[13] KIM H T, CHOL H J, KIM K H. Flow cytometric analysis of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* inactivated with supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 78(2): 155-160.

[14] KARAMAN H, ERKMEN O. High carbon dioxide pressure inactivation kinetics of *Escherichia coli* in broth[J]. Food Microbiology, 2001, 18(1): 11-16.

[15] SPILIMBERGO S, ELVASSORE N, BERTUCCO A. Inactivation of microorganisms by supercritical CO_2 in a semi-continuous process[J]. Italian Journal of Food Science, 2003, 15(1): 115-124.

[16] BALABAN M O, ARREOLA A G, MARSHALL M R, et al. Inactivation of pectinesterase in orange juice by supercritical CO_2[J]. Journal of Food Science, 1991, 56(3): 743-750.

[17] FABRONI S, AMENTA M, TIMPANARO N. Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(3): 477-484.

[18] ZHOU Linyan, WANG Yuanyuan, HU Xiaosong, et al. Effect of high pressure carbon dioxide on the quality of carrot juice[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(3): 321-327.

[19] DAMAR S, BALABAN M O, SIMS C A. Continuous dense-phase CO_2 system processing of a coconut water beverage[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2009, 44(4): 666-673.

[20] KINCAL D, HILL S, BALABAN M O, et al. A continuous high pressure carbon dioxide system for cloud and quality retention in orange juice[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(6): C338-C344.