

# 响应面法优化紫甘薯酒中花色苷含量

宋雪樊, 李楠, 熊伟, 曾丽萍, 邬应龙\*  
(四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014)

**摘要:**以紫甘薯酒为研究对象,在单因素实验的基础上,应用Box-Behnken方法进行三因素三水平实验,以液料比、发酵初始pH和发酵温度为影响因素,花色苷含量为响应值,进行响应面分析。确定最佳发酵工艺条件为液料比1.4:1, pH4.15, 发酵温度24℃。在此条件下发酵,可得酒度为12.3°, 花色苷含量为123.34mg/L的紫甘薯酒,花色苷含量与其理论值124.54mg/L接近,相对误差小于0.96%。结果表明,采用响应面分析法对紫甘薯酒中的花色苷含量进行优化合理可行,可为进一步研究提供依据。

**关键词:**花色苷, 紫甘薯酒, 响应面法, 发酵

## Optimization of anthocyanin content in purple potato wine by response surface analysis

SONG Xue-fan, LI Nan, XIONG Wei, ZENG Li-ping, WU Ying-long\*

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** With purple potato wine as the research object, the methods of single factor and response surface was used to maximize the anthocyanin content in the wine. A regression equation was established to obtain the optimal fermentation parameters. The optimal fermentation conditions were as follows: proportion of water and material 1.4:1, pH4.15, and fermentation temperature 24℃. Under this optimal fermentation conditions, the purple potato wine of 12.3° with a anthocyanin content of 123.34mg/L was obtained and the anthocyanin content was close to the predicted value 124.54mg/L with a relative error less than 0.96%. Accordingly, response surface could be a reasonable and feasible approach to maximize the anthocyanin content in purple potato wine, providing the basis for further researche.

**Key words:** anthocyanin; purple potato wine; response surface analysis; fermentation

中图分类号: TS262.7      文献标识码: B      文章编号: 1002-0306(2015)10-0297-05  
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.10.054

紫甘薯富含淀粉、水溶性膳食纤维、粗蛋白等营养成分,其最大的特点是富含花色苷色素<sup>[1]</sup>。紫甘薯花色苷主要组成成分是矢车菊素和芍药素,花色苷含量的测定是紫甘薯酒一项重要的理化指标<sup>[2]</sup>。花色苷具有清除自由基<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抑菌<sup>[5]</sup>、降血糖<sup>[6]</sup>、保护肝功能<sup>[7]</sup>等生理功能,紫甘薯用作酿酒原料,花色苷会保留在酒液中,得到具有较强抗氧化活性的保健酒<sup>[8]</sup>。

研究表明,花色苷的稳定性受到pH、温度、光照等影响<sup>[9-10]</sup>。本实验在前期实验的基础上<sup>[11]</sup>,选择打浆液料比、初始pH和发酵温度作为单因素,花色苷含量为响应值,采用响应面法优化紫甘薯酒的酿造工艺条件,用以提高酒中花色苷含量,为紫甘薯酒的进一步开发提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

蒸紫甘薯 汉源紫甘薯酒厂提供;酵母菌118 四川农业大学功能性实验室保藏;α-淀粉酶(酶活力>3600U/g)、葡萄糖酶(酶活力>105U/g) 上海瑞丰生物有限公司;蔗糖 太古炼糖厂有限公司;所用其他试剂 均为分析纯。

BT-124S型电子天平 北京赛多斯仪器系统有限公司;JOUANBR4i型恒温水浴锅 上海光地仪器设备有限公司;UV-2101型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;打浆机 美的电器制造有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 紫甘薯酒的制作流程 蒸紫甘薯→打浆→α-淀

收稿日期:2014-08-18

作者简介:宋雪樊(1992-),女,本科在读,研究方向:食品科学与工程。

\*通讯作者:邬应龙(1963-),男,博士,教授,研究方向:功能性食品、粮油加工。

基金项目:四川省科技厅2014年科技富民强县项目。

粉酶酶解液化→葡萄糖酶酶解糖化→调节pH→调节糖度→杀菌→加酿酒酵母→发酵7d→过滤→紫甘薯酒<sup>[12]</sup>。

1.2.2 紫甘薯酒发酵过程中花色苷含量和酒度的变化规律探讨 固定蒸紫甘薯打浆液料比为1.5:1, 酵母添加量1%, 在 $\alpha$ -淀粉酶添加量1%, 液化温度90℃条件下液化1h, 葡萄糖酶添加量1%, 糖化温度65℃条件下糖化时间1h, 调节初始pH4.0, 调糖度至22°Bx, 发酵温度24℃, 发酵7d<sup>[13-14]</sup>。每天跟踪测量花色苷含量及酒度, 探究它们在发酵过程中变化规律及在发酵结束时是否趋于稳定。

1.2.3 发酵条件的单因素实验设计 以发酵7d结束时酒中花色苷含量和酒度为指标, 固定酵母添加量1%, 在 $\alpha$ -淀粉酶添加量1%, 液化温度90℃, 液化时间1h, 葡萄糖酶添加量1%, 糖化温度65℃, 糖化时间1h, 调糖度至22°Bx, 发酵7d, 分别考察液料比(1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1), 初始pH(3、3.5、4、4.5、5), 发酵温度(16、20、24、28、32℃)对花色苷含量及酒度的影响。

1.2.4 响应面的实验设计 在单因素实验分析的基础上, 采用三因素三水平的Box-Behnken响应面设计方法<sup>[15-16]</sup>, 选择液料比, 初始发酵pH和发酵温度这3个因素进行响应面实验, 以花色苷含量为指标进行优化, 所有实验均重复3次。实验因素水平设计具体见表1。

表1 Box-Behnken响应面实验设计因素水平

Table 1 Coded values and corresponding real values of fermentation conditions tested in Box-Behnken experimental design

因素	编码水平		
	-1	0	1
A 液料比(mL/g)	1:1	1.5:1	2:1
B 发酵初始pH	3.5	4	4.5
C 发酵温度(℃)	20	24	28

### 1.3 指标检测方法

1.3.1 花色苷含量的检测方法 采用pH示差法<sup>[17-18]</sup>, 取1mL发酵酒液加入pH为1.0、4.5的缓冲液24mL, 静置平衡60min后, 以去离子水为空白, 在520nm和700nm波长下测定吸光度。

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5};$$

$$\text{花色苷含量 (mg/L)} = \frac{A \times M_w \times D_f \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

式中: A为由公式计算得的吸光度差值;  $M_w$ 为矢车菊素葡萄糖苷的相对分子质量(449.2g/mol);  $\epsilon$ 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数(26900L/mol·cm);  $D_f$ 为稀释因子(样品总的稀释倍数);  $10^3$ 为转换系数, g转换为mg。

1.3.2 常规指标测定 还原糖含量: GB/T 5009.7-2008, 直接滴定法; pH: pH计直接测定; 酒度: 采用GB/T 5009.48-2003比重计法, 以乙醇的体积分数计。

### 1.4 数据的统计与分析

利用Origin 8.0软件对单因素实验的数据进行处理, 并采用Design-Expert 7.0软件对响应面实验得到

的数据进行线性回归和方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵过程中花色苷含量和酒度的变化规律

由图1可知, 在发酵初期酒精度上升明显, 临近发酵结束时酒精度上升缓慢甚至不变。前期, 由于花色苷的积累与酒精的浸渍作用, 花色苷含量逐渐增大, 在发酵第4d达到最大值; 在发酵后期, 随着糖分渐渐减少, 酵母菌的老化会在某种程度上吸附一部分色素<sup>[19]</sup>, 致使花色苷含量减少并逐步稳定。发酵结束时, 酒度与花色苷含量均已趋于稳定。因此, 采用发酵第7d的花色苷含量为指标进行单因素及响应面实验。

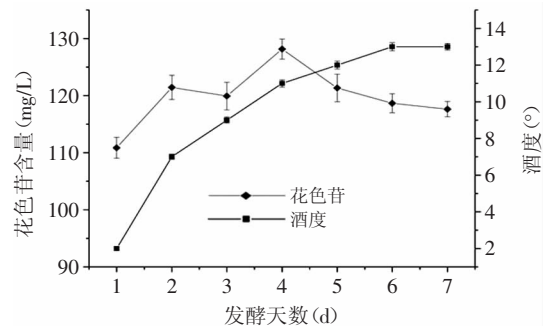


图1 发酵过程中花色苷含量随时间的变化

Fig.1 Changes of the anthocyanin content of the time

### 2.2 单因素实验结果与分析

2.2.1 液料比对花色苷含量及酒度的影响 从图2可知, 花色苷含量与酒度在液料比为1.5:1时均有最大值。当液料比为1:1时, 紫甘薯浆液成糊状, 不利于花色苷的析出; 随着加水量的增加, 花色苷含量增加, 在液料比为1.5:1时达到最大值; 后加水量继续增加, 紫甘薯浆液的浓度降低, 花色苷含量随之逐渐降低。因此, 液料比选择1.5:1为宜。

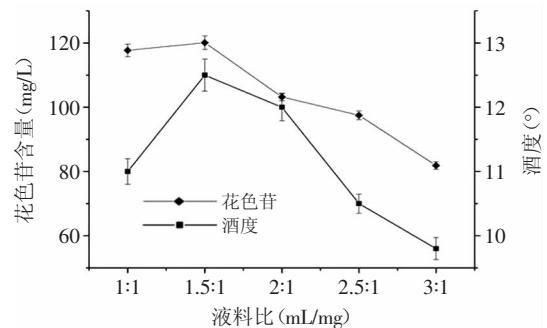


图2 液料比对花色苷含量的影响

Fig.2 Effect of extraction proportion of water and material on anthocyanin content of purple potato wine

2.2.2 初始pH对花色苷含量及酒度的影响 花色苷在酸性环境下较稳定, 其稳定性随着碱度的增加而降低<sup>[9]</sup>; 在pH为4.0时, 花色苷的降解速度最慢<sup>[20]</sup>, 具有最大的稳定性。由图3可知, 花色苷含量随着pH的升高而升高, 到达pH为4.0后, 花色苷含量随着pH的增大而逐渐减小, 这符合花色苷的理化性质。微酸性

环境有利于酵母菌的生长和高级醇的形成<sup>[12]</sup>, 酒度在pH为4.0时也有最大值。因此, 发酵的初始pH以4.0为宜。

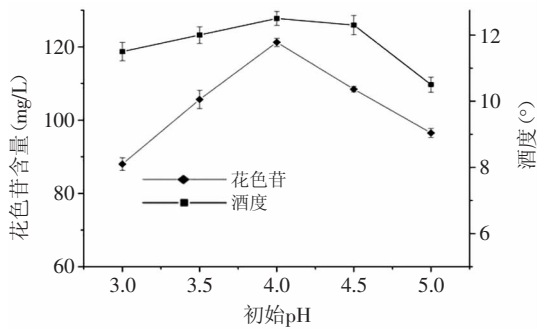


图3 发酵初始pH对花色苷含量的影响

Fig.3 Effect of extraction pH on anthocyanin content of purple potato wine

2.2.3 发酵温度对花色苷含量及酒度的影响 从图4可以看出, 当发酵温度为24℃时, 酒中花色苷的含量和酒度都为最高。当温度小于24℃时, 随着发酵温度的增加, 花色苷的含量和酒度都逐渐升高; 当温度大于24℃时, 因花色苷的稳定性随着温度的升高而降低<sup>[20]</sup>, 所以花色苷含量开始降低, 且随着发酵温度的增加, 酵母菌发酵速度快衰老快, 酒度也随之下降。因此, 发酵温度选择24℃最优。

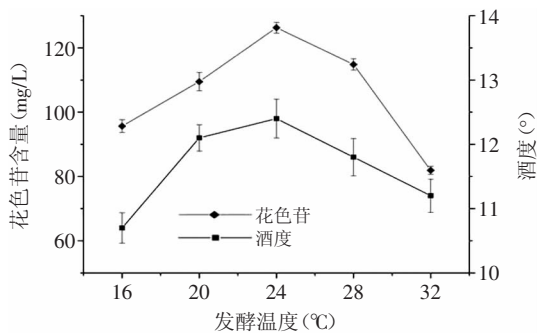


图4 发酵温度对花色苷含量的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on anthocyanin content of purple potato wine

### 2.3 响应面法发酵条件的优化

2.3.1 响应面实验设计及结果 根据表1的实验编码表进行实验, 表2是响应面实验设计及结果。

采用Design Expert 7.0软件对实验数据进行分析, 得到二次回归方程如下:  $Y=122.39-7.13A+6.35B-5.48C+3.49AB-5.24AC+9.41BC-10.05A^2-7.89B^2-8.67C^2$ 。对表2实验结果进行统计分析, 方差结果如表3所示。

从表3可知, 该回归模型 $p<0.0001$ , 模型极显著,  $R^2=0.9858, R^2_{Adj}=0.9676$ , 说明模型与实际值拟合程度较好, 建模成功; 一次项A、B、C, 交互项BC、AC及二次项 $A^2、B^2、C^2$ 极显著 ( $p<0.01$ ), 交互项AB显著 ( $0.01<p<0.05$ ), 可用该回归模型对紫甘薯酒发酵工艺进行分析和预测。

表2 Box-Behnken实验设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken experiment

实验号	A	B	C	Y: 花色苷含量(mg·L <sup>-1</sup> )
1	-1	1	0	114.33
2	-1	0	1	112.20
3	0	1	-1	108.34
4	0	0	0	120.12
5	0	-1	1	84.51
6	0	0	0	125.60
7	0	-1	-1	115.90
8	1	1	0	108.70
9	-1	0	-1	111.05
10	1	0	1	85.81
11	0	0	0	123.51
12	0	0	0	122.73
13	0	0	0	119.97
14	0	1	1	114.59
15	-1	-1	0	107.19
16	1	-1	0	87.59
17	1	0	-1	105.63

表3 回归方程方差分析表

Table 3 Analysis result of regression and variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	2601.11	9	289.01	54.04	<0.0001	**
A	406.70	1	406.70	76.05	<0.0001	**
B	322.20	1	322.20	60.25	0.0001	**
C	239.91	1	239.91	44.86	0.0003	**
AB	48.79	1	48.79	9.12	0.0194	*
AC	109.94	1	109.94	20.56	0.0027	**
BC	354.19	1	354.19	66.23	<0.0001	**
A <sup>2</sup>	425.10	1	425.10	79.49	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	261.81	1	261.81	48.95	0.0002	**
C <sup>2</sup>	316.17	1	316.17	59.12	0.0001	**
残差	37.44	7	5.35			
失拟项	14.75	3	4.92	0.87	0.5279	
净误差	22.69	4	5.67			
总离差	2638.55	16				

$R^2=0.9858, R^2_{Adj}=0.9676$

注:\*\*表示极显著 ( $p<0.01$ ), \*表示显著 ( $0.01<p<0.05$ )。

由自变量的F值可知各因素对花色苷含量的影响依次为: A>B>C, 即液料比>pH>发酵温度。说明液料比对花色苷含量影响最大, 其次为初始pH, 发酵温度影响最小。

2.3.2 交互作用分析 经Design Expert软件分析可得到3个影响因子之间的响应面分析图, 如图5所示。响应曲面坡度相对平缓, 表示响应值可以忍受处理条件的变异; 响应曲面坡度非常陡峭, 表示响应值对于处理条件的改变非常敏感<sup>[21]</sup>。

由图5a可以看出, 液料比与初始pH对花色苷含量的作用显著。当初始pH在3.8~4.0之间, 液料比介于1.5~1.7时, 花色苷含量可获得最大值。当pH小于



3.8或大于4.0,液料比小于1.5或大于1.7时,花色苷含量较小。由图5b可知液料比与发酵温度作用极显著,花色苷含量随着液料比和发酵温度这两个编码值得变化而快速变化。当液料比在1.4~1.6之间,发酵温度在22~24℃之间时花色苷含量有最大值。液料比增加,含量有所增加,在高于1.4左右开始下降;温度下降,含量增加,在23℃左右时趋于平缓。从图5c可以看出,发酵温度与发酵初始pH对花色苷含量有极显著影响,两者在花色苷含量的提高中起到关键作用。当初始pH介于3.9~4.1之间,发酵温度在23~25℃时,花色苷含量可获得最大值,这与花色苷在低温酸性条件下较稳定的理化性质相符。

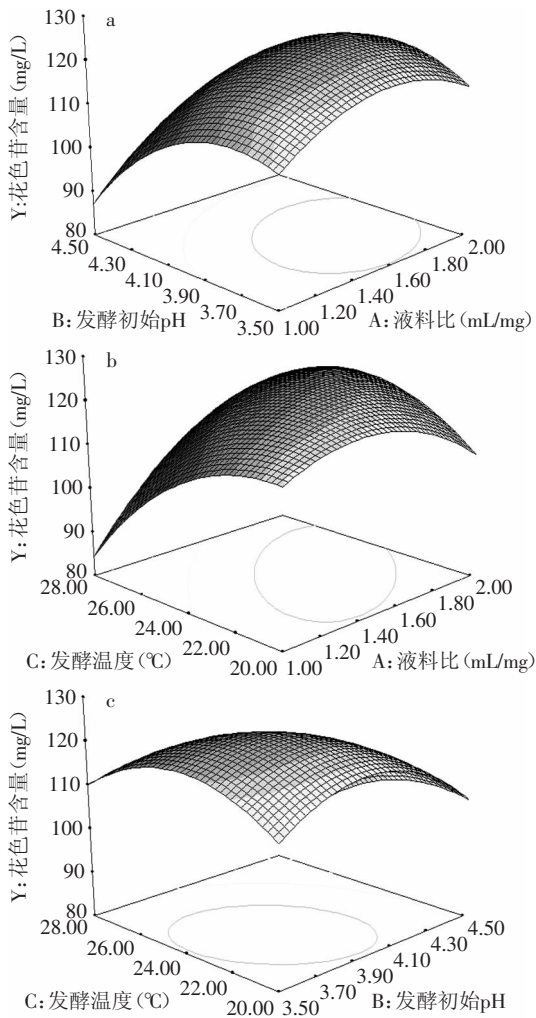


图5 两因素交互作用对提取效果的影响响应面图

Fig.5 Response surface for the effect of two factors on extraction rate

2.3.3 发酵工艺条件验证 在上述响应面分析的结果确定的最佳工艺条件下,即液料比1.36:1,初始pH4.15,发酵温度23.73℃,考虑到实际操作的便利,确定工艺条件为液料比1.4:1,初始pH4.15,发酵温度24℃,做3组平行实验,得到花色苷含量的平均值为123.34mg/L,酒度为12.3°的紫甘薯酒。花色苷含量实际值与理论值124.54mg/L相对误差在±0.96%以内。

### 3 结论

紫甘薯酒中花色苷含量在随着发酵时间的延长而呈现上升趋势,在发酵第4d出现峰值,后缓慢下降,在发酵结束时趋于稳定;酒度随着发酵进行而逐渐上升,在发酵后期趋于稳定。发酵过程中各因素中对花色苷含量的影响顺序为:液料比>初始pH>发酵温度。响应面方法优化确定酒中花色苷含量最高的发酵条件为:打浆液料比1.4:1,初始pH4.15,发酵温度24℃。在此条件下发酵,可得酒度为12.3°,花色苷含量为123.34mg/L的紫甘薯酒,花色苷含量与其理论值124.54mg/L相对误差为±0.96%以内,说明利用本实验建立的模型的优化结果与实际情况吻合。在优化的工艺条件下测得的花色苷含量达123.34mg/L,为紫甘薯酒的进一步研发提供重要参考依据。

### 参考文献

- [1] 冯晓群. 紫甘薯的保健功能及应用前景[J]. 甘肃科技, 2011, 27(9): 160-162.
- [2] 吴发萍, 郝萍萍, 张楷正, 等. 紫甘薯与紫甘薯清酒中花青素的测定及稳定性研究[J]. 酿酒科技, 2012(11): 108-110.
- [3] Kano M, Takayanagi T, Harada K, et al. Ant-oxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki[J]. Biosci Biotechnology Biochem, 2005, 69(5): 979-988.
- [4] 叶小利, 李学刚, 李坤培. 紫色甘薯多糖对荷瘤小鼠抗肿瘤活性的影响[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2005, 30(2): 332-336.
- [5] 韩永斌, 朱洪梅, 顾振新, 等. 紫甘薯花色苷色素的抑菌作用研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 913-917.
- [6] Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, et al. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glycosidase inhibitory action[J]. J Agric Food Chemistry, 2002, 50(25): 7244-7248.
- [7] 彭强, 高彦祥, 袁芳. 紫甘薯及其花色苷的研究与开发进展[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 401-405.
- [8] 张明, 王燕. 紫甘薯中的功能性成分研究[J]. 农产品加工, 2010(5): 65-67.
- [9] 王晰锐. 紫甘薯花色苷的结构鉴定以及稳定性和功能性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [10] 孙欣, 赵林, 厉玉婷, 等. 紫甘薯花色苷提取工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2013(1): 81-87.
- [11] 洪秀景. 紫甘薯酒发酵工艺研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [12] 楚文靖, 滕建文. 紫甘薯酒发酵工艺条件研究[J]. 资源开发与市场, 2010, 26(8): 686-688.
- [13] 杨大毅. 紫甘薯发酵酒的生产工艺[J]. 酿酒, 2011, 38(1): 77-78.
- [14] 杨雅利, 阚建全, 沈海亮, 等. 紫甘薯酒发酵工艺条件的优化[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 157-162.
- [15] Vohra A, Satyanarayana T. Statistical optimization of the

(下转第306页)

- [21] 时宏. 分子蒸馏单甘脂的近况与发展(一)[J]. 粮油食品科技, 1998, 6: 5-7.
- [22] 罗志刚, 胡乐孙. 分子蒸馏单甘脂在食品工业中的发展前景[J]. 粮油食品, 2003(2): 40-42.
- [23] 聂凌鸿, 周如金, 宁正祥. 黄原胶的特性、发展状况、生产及其应用[J]. 中国食品添加剂, 2003(3): 82-85.
- [24] 赵兴春. 黄原胶的应用与发展前景[J]. 食品工业科技, 1996, 5: 72-76.
- [25] 余蕾. 新型复合膨松剂[J]. 中国食品添加剂, 2006, 3: 128-129.
- [26] Robert J Whitehurst. Emulsifier in food technology[M]. Oxford: Blackwell Pub, 2004: 26-27.
- [27] 熊华, 郑为完. 粉末油脂的特点与在食品工业中的应用[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 154-157.

(上接第300页)

- medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *pichia anomala*[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(9): 999-1004.
- [16] Cui F J, Li Y, Xu HY, et al. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology [J]. Bioresource Technol, 2006, 97(10): 1209-1216.
- [17] 吴发萍, 郝萍萍, 张楷正, 等. 紫薯与紫薯清酒中花青素的测定及稳定性研究[J]. 酿酒科技, 2012(11): 108-110.
- [18] Lee J, Durst R W, Wrolstad R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study[J]. Journal of AOAC international, 2005, 88(5): 1269-1278.
- [19] 孙婧超. 蓝莓酒酿造过程中花色苷变化规律的研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2012.
- [20] 沈昌. 优良果酒酵母筛选与紫甘薯酒发酵工艺研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [21] 刘振春, 刘春萌, 苏彤. 响应面优化超声波辅助提取大麦 $\beta$ -葡聚糖工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 113-117.
- [22] Shaileshkumar D S, Lele S S. Statistical optimization of media for dextran production by *Leuconostoc* sp., isolated from fermented Idli batter[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(2): 471-478.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”优先数字出版库)独家全文收录,所以所付稿酬中已包含该网站及光盘应付的稿酬。