

酶解法制备胡柚汁的响应面优化

田 园, 吴祖芳*, 翁佩芳, 张 鑫

(宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832)

摘要: 胡柚汁是益生菌发酵果汁饮料的重要原料, 采用果胶酶和纤维素酶对胡柚果肉进行酶解处理以提高胡柚出汁率. 研究复合酶用量、酶比例、酶解温度、酶解时间对胡柚酶解效果的影响. 采用响应面法优化酶解条件, 得到胡柚酶解的最优条件: 复合酶用量为 0.05%, 果胶酶与纤维素酶比例为 3, 酶解温度为 53 °C, 酶解时间为 97 min. 在最优条件下, 胡柚出汁率可达 65.72%, 固形物白利度为(15.80±0.10)%, 可滴定酸为(1.14±0.10)%, 对胡柚汁实际生产具有借鉴意义.

关键词: 胡柚; 果胶酶; 纤维素酶; 出汁率

中图分类号: TS255.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2019) 04-0020-05

常山胡柚(*Citrus grandis* (L.) Changshan-huyou) 是浙江省常山县独有的柑橘品种, 是橙子与柚子的天然杂交品种^[1-2]. 胡柚果实营养价值高, 含 8 种人体必需的氨基酸, 维生素 C 质量分数高达 1.10 g·kg⁻¹, 富含葡萄糖、果糖和蔗糖, 含有 Ca、P、K、Mg、Zn、Fe 等无机元素^[3]. 与其他柑橘类果实相比, 胡柚中含有更高的类黄酮化合物、柠檬苦素和 α 、 β -胡萝卜素等对人体健康有益的功能性组分^[4].

利用胡柚原料制备益生菌发酵用果汁时发现果实中果胶与可食性纤维含量较高, 出汁率较低, 影响其果实中营养及功能性成分的得率. 胡柚细胞壁是由纤维素、半纤维素、亲水性果胶和少量结构蛋白构成的复杂网状结构^[5]. 利用酶法处理能有效提高果蔬出汁率^[6-8]. 果胶酶作用于果胶半乳糖醛酸残基间的糖苷键, 可将原果胶分解为小分子的半乳糖醛酸和小分子可溶性果胶^[9-10]. 纤维素酶的不同组成部分协同作用于纤维素, 使其降解为葡萄糖和可溶性寡聚葡萄糖^[11]. Macedo 等^[12]研究发现果胶酶和纤维素酶在酶解腰果果渣时具有协同作用. 由于胡柚组分的复杂性及其不同酶作用的特异性, 本试验以常山胡柚为原料, 采用果胶酶和纤维素酶复配后处理胡柚浆液, 运用响应面法对酶解条件进行优化, 提高胡柚汁制备效率, 也为

胡柚汁发酵饮料的工业化生产提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胡柚: 产自浙江省常山县, 单果重约 350 g; 果胶酶: 上海源叶生物科技有限公司, 2 000 U·g⁻¹; 纤维素酶: 北京索莱宝科技有限公司, 3 000 U·g⁻¹.

1.2 仪器与设备

DK-S22 型电热恒温水浴锅: 上海精宏实验设备有限公司; MX-GX1011 型打浆机: 厦门建松电器有限公司; HUZK24WNM 型多功能榨汁机: 余姚惠人电器有限公司; SL-502 型电子天平: 上海民桥精密科学仪器有限公司; PHS-3C 型 pH 计: 上海仪电科学仪器股份有限公司; LDZX-40B 型立式蒸汽灭菌器: 上海申安医疗器械厂; RHB-50ATC 型手持折光仪: 上海垒固仪器有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程

胡柚(验收)→清洗→去皮、去囊衣、去籽→打浆→酶处理→过滤→胡柚汁.

选取新鲜、成熟充分、无霉变虫害的胡柚果实, 清洗表面杂质, 晾干后去皮、去囊衣、去籽, 得胡柚果肉, 按料液比 2:1 加水打浆, 称取 100 g 果浆按

收稿日期: 2019-01-08.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省重点研发计划 (2018C02047) .

第一作者: 田园 (1995-), 女, 山东德州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品生物技术. E-mail: 1609613982@qq.com

*通信作者: 吴祖芳 (1963-), 男, 浙江奉化人, 教授, 主要研究方向: 食品生物技术. E-mail: wzfwf@163.com

酶解条件酶解处理. 处理过程中用保鲜膜对反应容器进行密封以防止水分蒸发. 酶解后冷却至室温, 进行过滤处理. 过滤共经过 2 次, 第 1 次将原汁通过 100 目筛, 第 2 次将第 1 次过滤的胡柚汁通过 200 目筛, 测定胡柚出汁率.

1.3.2 单因素酶解试验

酶用量的确定: 在果汁自然 pH 3.65±0.01, 酶解温度为 50℃, 酶解时间 90 min, 复合酶比例(果胶酶:纤维素酶)为 3:1 条件下, 分别选取复合酶添加量 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06% 和 0.07% 进行单因素试验, 分别测定胡柚出汁率和可溶性固形物含量, 确定最佳复合酶添加量.

复合酶比例的确定: 在果汁自然 pH, 酶解温度为 50℃, 酶解时间 90 min, 酶添加量 0.05% 条件下, 分别选取复合酶比例 2:3, 1:1, 3:2, 2:1, 3:1 和 4:1 进行单因素试验, 分别测定胡柚出汁率和可溶性固形物含量, 确定最佳复合酶比例.

酶解温度的确定: 在果汁自然 pH, 酶解时间 90 min, 酶添加量 0.05%, 复合酶比例为 3:1 条件下, 根据酶的催化动力学特性及果胶酶和纤维素酶的温度作用范围^[13-14], 分别选取酶解温度 35, 40, 45, 50, 55, 60 和 65℃ 进行单因素试验, 分别测定胡柚出汁率和可溶性固形物含量, 确定最佳酶解温度.

酶解时间的确定: 在果汁自然 pH, 酶解温度为 50℃, 酶添加量 0.05%, 复合酶比例为 3:1 条件下, 分别选取酶解时间为 30, 60, 90, 120 和 150 min 进行单因素试验, 分别测定胡柚出汁率和可溶性固形物含量, 确定最佳酶解时间.

1.3.3 响应面优化试验

在单因素试验的基础上, 采用 Design-Expert 8.1.6 Trial5 软件, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理^[15], 以酶用量(A)、复合酶比例(B)、酶解温度(C)、酶解时间(D) 4 个因素为自变量, 胡柚出汁率为响应值, -1、0、1 分别代表低、中、高 3 个水平. 研究各因素的交互作用及对出汁率的影响, 确定胡柚的最优酶解条件. 试验因素与水平见表 1.

表 1 响应面试验自变量因素与编码水平表

编码水平	酶用量/%	酶比例	酶解温度/℃	酶解时间/min
-1	0.04	2	45	60
0	0.05	3	50	90
1	0.06	4	55	120

1.3.4 可溶性固形物含量测定

采用手持折光仪测定.

1.3.5 出汁率测定

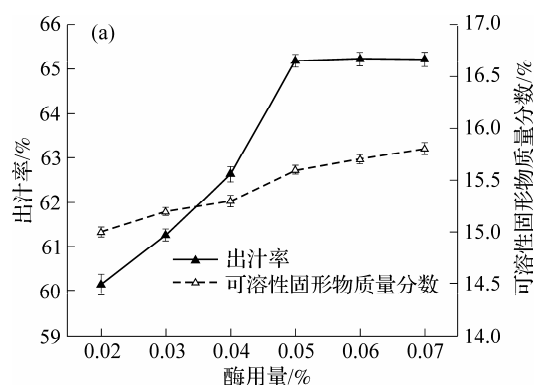
参照赵能等^[16]方法, 测定过滤后胡柚出汁率, 计算公式如下: 胡柚出汁率/%=(胡柚汁质量-加水质量)/胡柚果肉质量×100.

2 结果与讨论

2.1 单因素分析

复合酶用量、酶比例、酶解温度、酶解时间对胡柚出汁率及可溶性固形物含量的影响结果如图 1 所示.

由图 1 可知, 当果胶酶和纤维素酶用量在 0.02%~0.05% 时, 胡柚出汁率和可溶性固形物含量随酶添加量的增加而增加, 酶解未进行完全. 当 2 种酶用量大于 0.05% 时, 酶用量增加, 出汁率不再增加, 趋于稳定, 可溶性固形物含量也增长缓慢, 酶解进行彻底. 结合生产成本考虑, 选择酶用量为 0.05%. 当果胶酶与纤维素酶的比例为 3:1 时, 胡柚出汁率最高, 达到 65.31%, 可溶性固形物含量也达最高, 故选择酶比例为 3:1. 随酶解温度升高, 胡柚出汁率呈现先上升后下降趋势. 酶解温度为 50℃ 时, 胡柚果肉出汁率最高为 65.29%. 超过最适温度后, 果胶酶和纤维素酶的催化活性降低, 胡柚汁水分蒸发也较快, 导致胡柚出汁率急剧下降, 可溶性固形物含量升高, 故选择酶解温度为 50℃. 当酶解时间小于 90 min 时, 随酶解时间增加, 胡柚出汁率增幅显著. 90 min 时, 出汁率为 65.34%. 随着酶解时间的继续增加, 胡柚出汁率略有升高, 但增幅不大, 可溶性固形物含量随酶解时间延长缓慢增加, 考虑长时间酶解会加深果汁褐变程度^[17], 故选择酶解时间为 90 min.



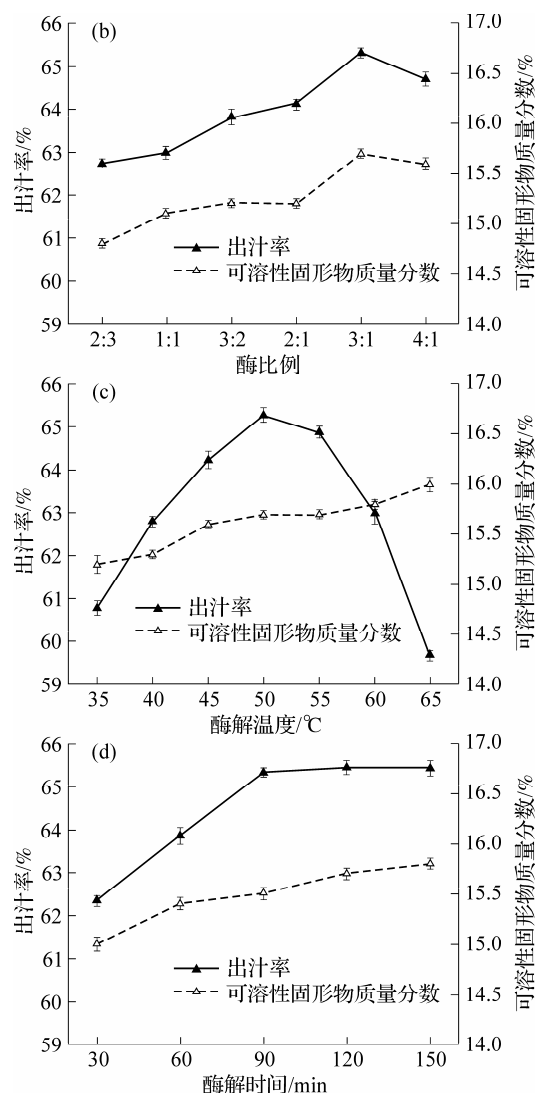


图1 复合酶用量、酶比例、酶解温度与酶解时间对胡柚酶解效果的影响

2.2 响应面法优化分析

2.2.1 回归方程与方差分析

运用软件 Design-Expert 8.1.6 Trial5 对因素水平进行多元回归拟合分析^[18], 建立因变量胡柚榨汁率(Y)与自变量酶用量(X_1)、酶比例(X_2)、酶解温度(X_3)、酶解时间(X_4)之间的二次多项回归方程:

$$Y = 65.41 + 0.36X_1 - 0.11X_2 + 0.75X_3 + 0.52X_4 - 0.22X_1X_2 + 0.19X_1X_3 + 0.22X_2X_4 - 0.93X_1^2 - 0.72X_2^2 - 0.73X_3^2 - 1.09X_4^2$$

方差分析及显著性检验结果见表2。经方差分析可以看出, 模型 $P < 0.0001$, 所建立的二次多项回归方程模型具有高度显著性; 方程相关系数 $R^2 = 0.9830$, 校正决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9661$, 方程具有较好

的回归效果, 说明试验选取的各因素与胡柚榨汁率之间的相关性很好; 失拟项 P 为 $0.1037 > 0.05$, 失拟项不显著, 说明各因素高次项等所引起的差异不显著, 方程具有较好的拟合度; 各因素值与响应值之间的关系可以用此回归模型来函数化。各因素对胡柚榨汁率的影响大小依次为: 酶解温度 > 酶解时间 > 酶用量 > 酶比例。表1数据经 Quadratic 回归模型拟合, 结合胡柚汁制备操作参考的可控性, 最后得到胡柚酶解的最佳条件为: 复合酶用量为 0.05% , 果胶酶与纤维素酶比例为 3 , 酶解温度为 53°C , 酶解时间为 97 min 。在此酶解条件下, 胡柚榨汁率可达最高值为 65.72% , 固形物白利度为 $(15.80 \pm 0.10)\%$, 可滴定酸为 $(1.14 \pm 0.10)\%$, 较好地保留了胡柚的营养成分。

表2 回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	25.41	14	1.82	57.93	<0.0001	**
X_1	1.56	1	1.56	49.64	<0.0001	**
X_2	0.15	1	0.15	4.70	0.0478	*
X_3	6.69	1	6.69	213.52	<0.0001	**
X_4	3.19	1	3.19	101.91	<0.0001	**
X_1X_2	0.20	1	0.20	6.46	0.0235	*
X_1X_3	0.14	1	0.14	4.61	0.0498	*
X_1X_4	0.11	1	0.11	3.48	0.70834	
X_2X_3	0.016	1	0.016	0.50	0.4917	
X_2X_4	0.20	1	0.20	6.46	0.0235	*
X_3X_4	0.011	1	0.011	0.35	0.5625	
X_1^2	5.57	1	5.57	177.71	<0.0001	**
X_2^2	3.32	1	3.32	105.91	<0.0001	**
X_3^2	3.47	1	3.47	110.78	<0.0001	**
X_4^2	7.67	1	7.67	244.95	<0.0001	**
残差	0.45	14	0.031			
失拟项	0.40	10	0.040	3.83	0.1037	
纯误差	0.041	4	0.010			
总和	25.85	28				

注: “*”表示差异显著($P < 0.05$); “**”表示差异极显著($P < 0.01$)。

2.2.2 交互作用分析

胡柚榨汁率两两交互作用显著的响应曲面和等高线如图2所示。两两因素相互作用下, 胡柚榨汁率的等高线呈闭合的椭圆形, 等高线图的中心点即为榨汁率的最大值。由图2(a)可知, 与酶比例相比, 酶用量对榨汁率的影响更为显著; 从图2(b)

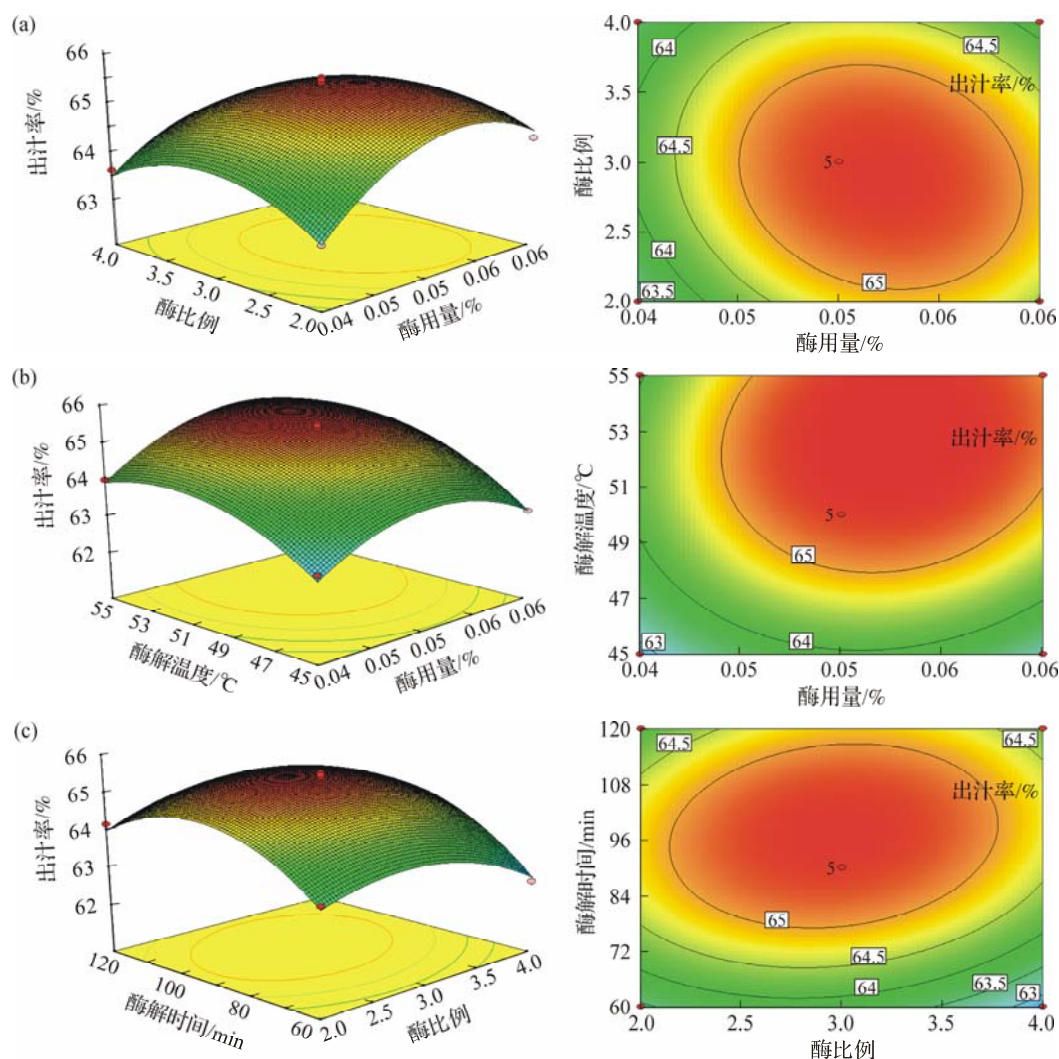


图2 酶用量与酶比例、酶用量与酶解温度、酶比例与酶解时间交互作用下胡柚出汁率的响应面及等高线

得到, 酶解温度比酶用量对出汁率的影响更显著; 从图 2(c)可知, 与酶比例相比, 酶解时间对出汁率的影响更显著。

2.2.3 验证试验

为验证响应面所得数据的可靠性, 用得出的最佳酶解条件酶解胡柚果肉, 且进行 3 次平行试验, 试验结果见表 3。测得胡柚出汁率平均值 65.46%, 该结果与理论预测出汁率仅相差 0.26%, 证明该模型可以很好地反映试验的真实性。

表3 胡柚出汁率验证试验结果

试验号	1	2	3	平均值	空白值
出汁率/%	65.47	65.51	65.40	65.46	57.30

3 结论

运用统计分析软件 Design-Expert 8.1.6 Trial5,

采用响应面法对影响胡柚出汁率的 4 个参数及其相互作用进行分析, 建立了因变量出汁率与自变量酶用量、酶比例、酶解温度、酶解时间之间的二次多项回归模型。各因素对胡柚出汁率的影响程度依次为: 酶解温度>酶解时间>酶用量>酶比例。复合酶酶解胡柚的最优工艺为复合酶用量 0.05%, 果胶酶与纤维素比例为 3, 酶解温度 53 °C, 酶解时间 97 min。在最优工艺条件下, 胡柚汁的理论出汁率为 65.72%, 实际出汁率为 65.46%。

参考文献:

- [1] 王艳丽, 张俊, 褚武菁, 等. 胡柚果肉组分的降糖作用及其降糖成分分布研究[J]. 营养学报, 2015, 37(2):173-177.
- [2] 张韵冰. 中国柑桔属植物一新种[J]. 植物研究, 1991, 11(2):5-7.

- [3] 仲山民, 田荆祥. 常山胡柚果实营养成分分析[J]. 经济林研究, 1995(2):23-25.
- [4] 马芹标. 胡柚果实生理活性物质及品质相关成分的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [5] 赵庆新, 袁生. 植物细胞壁研究进展[J]. 生物学通报, 2007, 42(7):8-9.
- [6] 程红, 隋秀芳. 酶解法提取蓝莓果汁的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(4):153-157.
- [7] 刘小莉, 汤莉莉, 刘安虎, 等. 酶解条件对提高复合果蔬汁出汁率的影响研究[J]. 食品工程, 2016(2):29-31; 45.
- [8] 唐仕斌, 房海灵, 黄丽莉, 等. 响应面法优化双酶提取南酸枣果汁工艺的方法[J]. 南方林业科学, 2017, 45(2): 48-52.
- [9] 蔡荟梅, 侯如燕, 宛志沪. 果胶酶澄清西洋参果酒的影响因素与效果评价[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11): 86-90.
- [10] Demir N, Acar J, Sarıoğlu K, et al. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment[J]. Journal of Food Engineering, 2001, 47(4):275-280.
- [11] 于跃, 张剑. 纤维素酶降解纤维素机理的研究进展[J]. 化学通报, 2016, 79(2):118-122.
- [12] Macedo M, Robrigues R D P, Pinto G A S, et al. Influence of pectinolytic and cellulolytic enzyme complexes on cashew bagasse maceration in order to obtain carotenoids [J]. Journal of Food Science & Technology, 2015, 52(6): 3689-3693.
- [13] 林建城, 杨文杰, 朱丽华, 等. 商品果胶酶(*Aspergillus niger*)的催化动力学研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2006 (4):81-85.
- [14] 夏安. 纤维素酶水解动力学及影响因素研究[D]. 成都: 四川大学, 2002.
- [15] 谢勇, 张榕, 张江湖, 等. Box-Behnken 试验设计优化刺梨果汁饮料工艺[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 119-126.
- [16] 赵能, 罗安伟, 姚婕, 等. 响应面试验优化胡萝卜浆复合酶解工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(16):83-87.
- [17] 舒念辉. 果汁褐变及控制研究[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(5):59-61.
- [18] 黄乐丹, 吴祖芳, 张林楠, 等. 利用副干酪乳杆菌发酵风味鱿鱼制品条件研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2017, 30(3):6-11.

The optimization of enzymatic hydrolysis technology for grapefruit juice by response surface methodology

TIAN Yuan, WU Zufang*, WENG Peifang, ZHANG Xin

(College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: The grapefruit juice is an important material for fermented fruit beverage production by probiotics. The enzymatic hydrolysis of grapefruit pulp treated with pectinase and cellulase for improving grapefruit juice yield was investigated in this paper. The effect of composite enzyme dosage, enzyme ratio (pectinase/cellulase), hydrolysis temperature and time on enzymatic hydrolysis was examined in the current study. The response surface methodology was used to optimize the enzymatic conditions and the optimal conditions for enzyme dosage, pectinase-cellulase ratio, hydrolysis temperature and time were obtained as 0.05%, 3, 53 °C and 97 min, respectively. Under the optimum conditions, the juice yield reached 65.72%. The soluble solids, titratable acid in grapefruit juice were (15.80±0.10)% and (1.14±0.10)%, respectively. The results are suggested to direct the actual production of grapefruit juice.

Key words: grapefruit; pectinase; cellulase; juice yield

(责任编辑 韩 超)