

桑葚汁复合酶法制取工艺的优化研究

徐丽萍¹, 杜宝磊^{1,2}, 李春阳^{2,*}, 刘晓林³

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150000;

2. 江苏省农业科学院农产品加工所, 江苏南京 210000;

3. 徐州林泉绿色食品饮料厂, 江苏徐州 221711)

摘要: 本文对复合酶法制取桑葚汁进行了研究。通过对多种酶的筛选, 选定果胶酶、纤维酶为复合对象。在单因素基础上, 对酶的复配比例、酶解pH、酶解温度、酶解时间进行组合实验, 采用响应曲面分析, 对复合酶法制取桑葚汁工艺参数进行优化。结果表明: 酶的复配比例1.0:1.36、酶解pH5.0、酶解温度49.5℃、酶解时间2.6 h, 此时桑葚出汁率最高为86.13%, 较果胶酶酶解出汁率提高了10.92%。

关键词: 桑葚汁, 复合酶法, 响应面法, 出汁率

Optimum technology of preparing mulberry juice by compound enzymolysis method

XU Li-ping¹, DU Bao-lei^{1,2}, LI Chun-yang^{2,*}, LIU Xiao-lin³

(1. College of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150000, China;

2. Agricultural Products Processing Institute of Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210000, China;

3. Xuzhou Linquan Green Food Beverage Factory, Xuzhou 221711, China)

Abstract: The conditions of preparing mulberry juice by compound enzymolysis were studied. The pectinase and cellulase were regard as compound object by selecting of enzymes. On the basis of single-factor-test, process parameters of mulberry juice were optimized by combination experiments, with response surface methodology analysis was employed to explore the effect of the ratio of enzyme complex, enzymolysis solution pH, enzymolysis hydrolysis temperature, enzymolysis time on the yield of mulberry syrup. The results showed that the optimal parameters were as follows: the ratio of enzyme complex was 1.0:1.36, enzymolysis pH5.0, enzymolysis temperature 49.5℃, enzymolysis time 2.6 h, the juice yield was 86.13%, compared with the pectinase enzyme hydrolysis rate increased by 10.92%.

Key words: mulberry juice; compound enzymolysis; response surface methodology; juice yield

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)18-0165-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.025

桑葚(Mulberry)又名桑果、桑葚子、桑枣等,为多年生桑科属植物成熟果实的统称,已被列为我国首批“既食品又是药品”^[1-2]。桑葚中含有丰富的活性蛋白、维生素A、维生素B、氨基酸、酒石酸、矿物质钙、锌、磷、铁、多酚、花色苷、白藜芦醇等营养成分。桑葚能够显著提高人体免疫力,预防动脉硬化、高血压、高血脂、瘰疬关节不利等疾病,具有延缓衰老、乌发明目、促进消化、补血益阴、固精安胎等功效,被医学界誉为“21世纪的最佳保健果品”^[3-5]。

桑葚果柔软多汁,成熟后含水量在80%以上,由于没有坚硬的外壳保护,其采后十分容易腐烂^[6],且

每年桑葚采收季短,产量大,致使大量桑葚资源浪费。目前,桑葚加工产品已有桑葚汁饮料、果酱、糕点等,其中桑葚汁饮料生产占了很大的比重,并且饮料的市场需求量呈逐年上升趋势。

在果汁加工中,由于水果细胞壁和细胞膜是由果胶、纤维素、淀粉、蛋白质等物质构成,传统压榨工艺难将原料中果胶、纤维素、淀粉等大分子物质形成的网络结构破坏,且得到果浆粘稠,压榨取汁困难,出汁率低。酶法出汁是当前较为新颖的提高果蔬出汁率的技术,但大部分采用单一酶酶解处理技术,如利用果胶酶、纤维素酶等酶法提高水果出汁常有报

收稿日期: 2014-12-05

作者简介: 徐丽萍(1963-),女,硕士,研究方向: 食品营养与安全, E-mail: xuliping@126.com。

* 通讯作者: 李春阳(1966-),男,博士,研究员,研究方向: 营养与活性物质,农产品精深加工, E-mail: lichunyang968@126.com。

基金项目: 2014年国家公益性行业(农业)科研专项(201503147); 2014江苏省农业自主创新基金(CX(14)2120); 2014江苏省苏北科技专项资金(富民强县)项目(BN2014088)。

道^[7-10]。而在桑葚汁加工中仍常采用压榨法出汁,此法不仅出汁率低,并且残渣过多,难以处理^[11-12]。

本研究样品桑葚中含有粗纤维、蛋白质、转化糖等多种成分^[13],通过综合分析,最终从多种酶中选取果胶酶、纤维素酶、蛋白酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶进行酶解实验,并对其作用效果进行评价,通过筛选得到酶解效果较优的两种酶作为复合目标酶,并进行单因素实验和响应面优化实验,得到最优复合酶酶解制取桑葚汁条件,旨在为桑葚汁的酶法制取工艺提供一定的理论基础和依据,同时为桑葚的深加工开辟一条新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑葚果 由江苏海苑食品有限公司提供;果胶酶(酶活30000 IU/g)、纤维素酶(酶活20000 IU/g)、蛋白酶(酶活50000 IU/g)、木聚糖酶(酶活85000 IU/g)、 β -葡聚糖酶(酶活38000 IU/g)、柠檬酸、碳酸钠 湖南尤特生化有限公司,均为分析纯。

组织捣碎机 江阴市保利科研仪器有限公司;DD-5M湘仪离心机 湖南湘仪实验仪器开发有限公司;HJ-6A磁力加热搅拌器、XH-C型漩涡混合器 金坛市白塔新宝仪器厂;CHD-0515低温恒温槽 金坛市维诚实验器有限公司;分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;UV5500紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程 冷冻桑葚→挑选→解冻→捣碎→桑葚浆→调节pH→添加酶→酶解→85℃灭酶→过滤→桑葚汁。

1.2.2 单酶筛选 将桑葚解冻、组织捣碎后,称取桑葚浆50 g,加入一倍质量的去离子水,筛选目标酶为果胶酶、纤维素酶、蛋白酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶,各酶最大添加量为0.20%(以桑葚浆质量计),酶解条件为:温度50℃、时间2 h、pH以各酶最适pH为准,以出汁率评价酶解效果^[14]。选取酶解效果较好的两种酶。

1.2.3 复合酶组合酶解单因素实验

1.2.3.1 酶的复配比例对桑葚汁出汁率的影响 在酶解温度50℃、pH4.0基础上,改变酶的复配比例为1.0:0.5、1.0:1.0、1.0:1.5、1.0:2.0、1.0:2.5、1.0:3.0(酶的复配比例1.0:1.0时,果胶酶添加量为0.06%,纤维素酶添加量为0.14%,以桑葚浆重量计,在改变酶的复配比例时,固定果胶酶添加量为0.06%),恒温酶解2 h,取出后加热至85℃灭酶5 min,经过滤,得到桑葚汁,测定出汁率。出汁率计算公式如下:

$$\text{出汁率}(\%) = \frac{\text{过滤后桑葚汁质量}}{\text{桑葚浆质量}} \times 100$$

1.2.3.2 酶解pH对桑葚汁出汁率的影响 在酶的复配比例1.0:1.5、酶解温度50℃基础上,改变酶解pH为3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5,恒温酶解2 h,取出后加热至85℃灭酶5 min,经过滤,得到桑葚汁,测定出汁率。

1.2.3.3 酶解时间对桑葚汁出汁率的影响 在酶的复配比例1.0:1.5、酶解温度50℃、酶解pH4.0的基础

上,恒温酶解,改变酶解时间为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 h,取出后加热至85℃灭酶5 min,经过滤,得到桑葚汁,测定出汁率。

1.2.3.4 酶解温度对桑葚汁出汁率的影响 在酶的复配比例1.0:1.5、酶解pH4.0基础上,改变酶解温度值为35、40、45、50、55、60℃,恒温酶解2 h,取出后加热至85℃灭酶5 min,经过滤,得到桑葚汁,测定出汁率。

1.2.4 酶解条件优化方案 在单因素实验基础上,选取酶的复配比例(A)、酶解pH(B)、酶解时间(C)、酶解温度(D)作为响应曲面的考察因素,以1、0、-1分别代表高、中、低水平,以出汁率(R_1)为响应值,设计4因素3水平27个实验点的响应曲面实验,各响应因子的实验水平见表1。根据实验表进行实验,对实验数据进行二次回归拟合,得到回归方程。

表1 中心组合设计因素水平
Table 1 Factors and levels of central composite design

因素	水平		
	-1	0	+1
A 酶的复配比例	1.0:1.0	1.0:1.5	1.0:2.0
B 酶解pH	4.0	4.5	5.0
C 酶解时间(h)	1.5	2.0	2.5
D 酶解温度(℃)	45	50	55

1.3 数据处理

实验设计和数据处理使用Design-Expert 8.06.1软件完成^[15]。

2 结果与讨论

2.1 单酶筛选结果与分析

由单酶筛选所得到的图1可以看出,与无酶条件相比,果胶酶酶解作用效果最优,出汁率可达75.21%,其次为纤维素酶,出汁率可达74.55%,其他三种酶酶解出汁率均小于两者,故选果胶酶、纤维素酶作为复合目标酶,研究其最优酶解工艺条件。

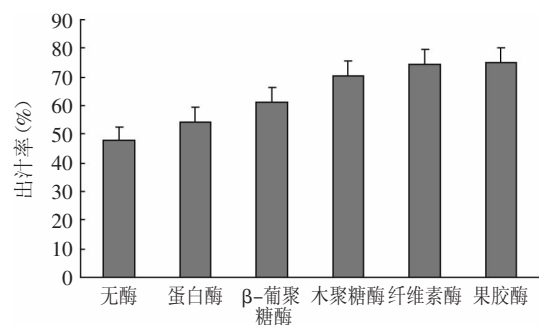


图1 不同水解酶对桑葚汁出汁率的影响

Fig.1 The effect of different enzymes on the yield of mulberry juice

2.2 单因素实验结果与分析

2.2.1 酶的复配比例对桑葚汁出汁率的影响 由图2可知,桑葚出汁率随酶的复配比例的增大而增大,是由于果胶酶能够使聚半乳糖醛酸分解成游离的半乳

糖醛酸,破坏组织结构,纤维素酶破坏纤维素链的结晶结构,破坏细胞壁,从而促使细胞液流出,提高出汁率^[16-17]。

当酶的复配比例为1.0:1.5时,出汁率达到80.41%,此时,继续增大果胶酶、纤维素酶的添加比例,其出汁率不再增加,因为此时酶用量已经趋于饱和,水解环境中能够与果胶反应的果胶酶分子,与纤维素、半纤维素等反应的纤维素酶分子已基本达到酶解结合反应体系稳态。致使多余的酶无法与底物发生催化作用,从而不能起到提高催化效果的作用,出汁率没有产生明显变化。

根据出汁率的变化情况,选择果胶酶、纤维素酶的复配比例1.0:1.0~1.0:2.0作为优化范围。

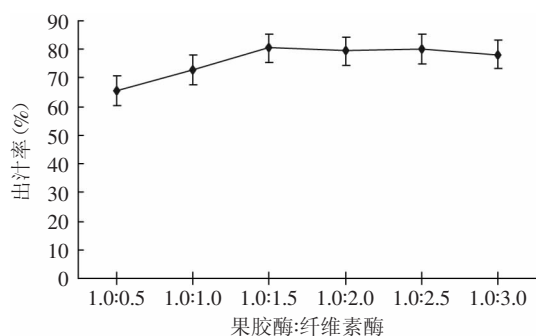


图2 果胶酶、纤维素酶复配比例对桑葚汁出汁率的影响
Fig.2 The effect of the ratio of pectinase and cellulose enzyme complex on the yield of mulberry juice

2.2.2 酶解pH对桑葚汁出汁率的影响 由图3可知,在pH为3.5~4.5时,桑葚出汁率随酶解pH的增大而增大,当解pH为4.5时,出汁率达到80.80%。本文中所用为酸性果胶酶、酸性纤维素酶,最适pH分别为3.5和4.5,继续增高pH,果胶酶、纤维酶的活力将会受到抑制,造成酶活力下降,同时会破坏酶的空间构象,改变酶分子与底物分子的带电基团状态,无法完成酶催化作用。pH的改变影响酶活中心基团的解离状态和底物的解离状态,使得底物不能与其结合,造成酶促反应无法发生^[18],还能影响酶活性中心催化基团的解离,使得底物转变成产物过程受到影响,从而使得单位时间内分解底物量减少,导致细胞溶出物降低,出汁率下降。

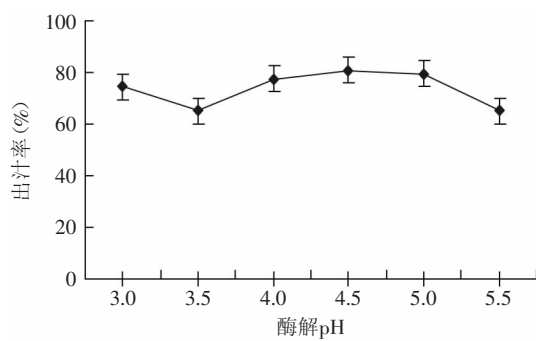


图3 酶解pH对桑葚汁出汁率的影响
Fig.3 The effect of pH of enzymolysis solution on the yield of mulberry juice

根据出汁率的变化情况,选择酶解pH4.0~5.0作为优化范围。

2.2.3 酶解温度对桑葚汁出汁率的影响 由图4可知,桑葚出汁率随酶解温度值的增大而增大,因为温度升高,底物活化能增加,分子热运动加快,邻近效应、静电结合效应^[19]及分子内催化反应增强,提高了酶与底物的结合率,促进了酶解反应的发生,出汁率增加。

当酶解温度为50℃时,桑葚汁的出汁率为79.23%,此时温度继续升高,会造成局部酶解环境差异,导致催化的部分基团出现状态不一的解离;并会破坏酶与底物某些基团形成的不稳定共价中间物,导致共价结构解除,无法完成酶催化反应;还可能导致部分酶分子发生变性甚至失活,导致酶分子与底物结合效率下降^[20],酶解速率降低,从而使出汁率呈下降趋势。

根据出汁率的变化情况,选择酶解温度45~55℃作为优化范围。

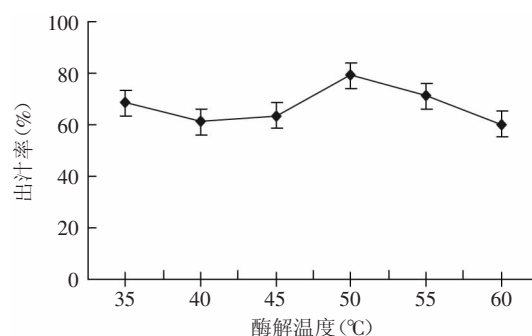


图4 酶解温度对桑葚汁出汁率的影响
Fig.4 The effect of enzymolysis hydrolysis temperature on the yield of mulberry juice

2.2.4 酶解时间对桑葚汁出汁率的影响 由图5可知,桑葚出汁率随酶解时间的增大而增大,当酶解时间2.5 h时,桑葚汁的出汁率为81.70%,随着时间的延长,出汁率没有明显变化。这是由于在相同底物浓度的情况下,经过一定时间酶解反应后,底物中能够与酶结合的有效反应物质已经得到充分分解,酶解作用基本趋于最终态。从而造成持续延长对酶解效果无明显影响,出汁率变化不明显。

据出汁率的变化情况,选择酶解时间1.5~2.5 h

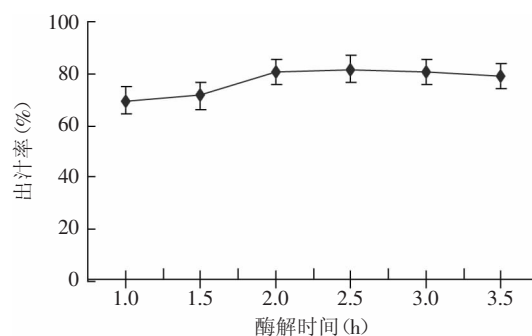


图5 酶解时间对桑葚汁出汁率的影响
Fig.5 The effect of enzymolysis time on the yield of mulberry juice

作为优化范围。

2.3 响应面优化结果与分析

由响应曲面实验,得出以下结果,见表2。

表2 Box-behnken实验方案与结果
Table 2 Box-behnken design and results

实验号	A	B	C	D	Y: 出汁率(%)
1	-1	-1	0	0	78.41
2	1	-1	0	0	83.21
3	-1	1	0	0	84.52
4	1	1	0	0	83.72
5	0	0	-1	1	78.43
6	0	0	1	-1	79.13
7	0	0	-1	1	79.34
8	0	0	1	1	78.41
9	-1	0	0	-1	80.55
10	1	0	0	-1	76.62
11	-1	0	0	1	75.50
12	1	0	0	1	82.06
13	0	-1	-1	0	79.49
14	0	1	-1	0	84.69
15	0	-1	1	0	80.44
16	0	1	1	0	85.14
17	-1	0	-1	0	76.83
18	1	0	-1	0	81.41
19	-1	0	1	0	80.10
20	1	0	1	0	81.21
21	0	-1	0	-1	78.14
22	0	1	0	-1	82.50
23	0	-1	0	1	78.10
24	0	1	0	1	83.83
25	0	0	0	0	84.20
26	0	0	0	0	84.43
27	0	0	0	0	84.96
28	0	0	0	0	84.81
29	0	0	0	0	84.83

由表2中实验数据得到如下出汁率回归方程:

$$Y=84.25+1.03A+2.22B+0.35C+0.16D-0.140AB-0.87AC+2.62AD-0.13BC+0.34BD-0.41CD-2.10A^2+0.16B^2-2.04C^2-3.54D^2$$

出汁率回归模型的相关系数平方 $R^2=0.9590$,说明回归拟合度良好,可以对出汁率进行分析和预测。

方程中各项系数绝对值大小直接反应各因素对响应值的影响程度,根据以上两个方程中系数绝对值大小对比,可知影响因子的主效应顺序为: $B>A>C>D$,即酶解pH>酶的复配比例>酶解时间>酶解温度。

对回归方程进行显著性检验、方差分析及各因素最佳点分析,结果见表3。

用Design-Expert软件对表3进行二次多元回归拟合,并对各个模型的回归方程进行显著性检验、方差分析及各因素最佳点分析,可以得到酶的复配比

表3 回归方程ANOVA分析出汁率结果

Table 3 ANOVA analysis of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F	显著性
模型	227.34	14	16.24	23.40	<0.0001	**
A	12.66	1	12.66	18.24	0.0008	*
B	58.98	1	58.98	84.98	<0.0001	**
C	1.51	1	1.51	2.18	0.1620	
D	0.30	1	0.30	0.43	0.5205	
AB	7.85	1	7.85	11.31	0.0046	*
AC	3.01	1	3.01	4.34	0.0560	
AD	27.53	1	27.53	39.66	<0.0001	**
BC	0.065	1	0.065	0.093	0.7645	
BD	0.47	1	0.47	0.68	0.4244	
CD	0.68	1	0.68	0.98	0.3394	
A ²	28.52	1	28.52	41.09	<0.0001	**
B ²	0.17	1	0.17	0.24	0.6332	
C ²	26.88	1	26.88	38.74	<0.0001	**
D ²	81.29	1	81.29	117.13	<0.0001	**
残差	9.72	14	0.69			
失拟项	7.02	10	0.7	0.75	0.6786	
纯误差	3.76	4	0.94			
总离差	335.29	28				
方差	0.9590					

注:**表示极显著水平($p<0.01$);*表示显著水平($p<0.05$)。

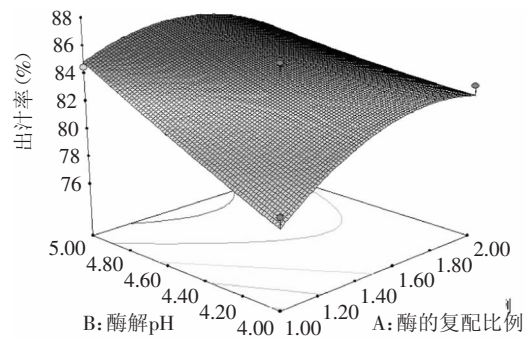


图6 酶的复配比例、酶解pH交互作用影响出汁率曲面图
Fig.6 Response surface plot of the ratio of enzyme complex, enzymolysis solution pH on the yield of juice

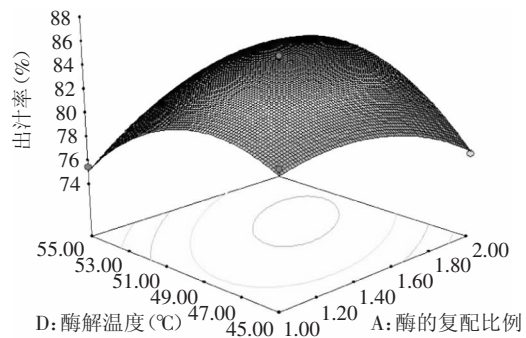


图7 酶的复配比例、酶解温度交互作用影响出汁率曲面图
Fig.7 Response surface plot of the ratio of enzyme complex, enzymolysis hydrolysis temperature on the yield of juice

例与酶解pH、酶解温度交互作用显著,所得的二次回归方程的响应曲面见图6~图7。

由图6可知,当固定酶的复配比例时,桑葚出汁率在pH5.0之前随pH的增大而增大,当pH超过5.0时,持续增大pH,出汁率出现下降趋势,这是由于酶解环境酸碱度的变化,会影响酶分子活性部位上有关基团的解离,从而影响酶与底物的结合或催化,使酶活性降低,造成桑葚出汁率下降^[21];当固定酶解pH,出汁率随酶的复配比例增大而增大,果胶酶、纤维素酶复配加入比例逐渐达到饱和时,出汁率趋于平缓。

由图7可知,当固定酶的复配比例时,随着酶解温度的升高,出汁率升高,当温度达到49.54℃时,继续升高温度,出汁率下降。这是由于升高温度虽能够增强酶解效果,但当温度超过最适酶解温度时,酶活力会受到抑制,从而导致了出汁率下降。当固定酶解温度不变时,随着双酶复配比例增加,出汁率出现先增加后下降趋势,当果胶酶、纤维素酶复配比例达到1.0:1.36时,出汁率达到最大值。

2.4 验证实验

通过对桑葚汁出汁率的二次项数学模型解逆矩阵,得出在酶的复配比例1.0:1.36、pH5.0、温度49.54℃、时间2.63 h的工艺条件下,桑葚汁出汁率预测值为86.55%。为方便实验将参数修改为:酶的复配比例1.0:1.36、pH5.0、温度49.5℃、时间2.6 h。按上述最优条件进行酶解实验,3次实验测得的桑葚汁平均出汁率为86.13%,理论值和实验值的相对误差为0.42%,基本与预测值保持一致,因此采用响应曲面优化得到的提取条件准确可靠,具有使用价值。

3 结论

通过对5种酶单酶酶解桑葚出汁效果的筛选,得到果胶酶、纤维素酶单酶酶解效果明显,出汁率分别可达75.21%、74.55%,从而选取两者作为复合目标酶,将两种酶复配后,根据单因素和响应曲面分析,得出复合酶酶解最优工艺参数为果胶酶、纤维素酶的复配比例1.0:1.36、pH5.0、酶解温度49.5℃、酶解时间2.6 h,此时酶解桑葚出汁率可达86.13%,较果胶酶单酶酶解出汁率提高了10.92%。

参考文献

[1] Bae S H, Suh H J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007,40(6):955-962.

[2] 李颖,李庆典. 桑葚多糖抗氧化作用的研究[J]. 中国酿造, 2010(4):59-61.

[3] 霍究起. 1-MCP对桑葚采后生理效应的影响[J]. 食品科学, 2011,32(2):310-313.

[4] 马慧. 桑椹叶果复合汁饮料的工艺研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2012.

[5] 梁贵秋,吴婧婧,陆春霞,等. 浅谈桑椹酒的酿制工艺与营养成分[J]. 中国蚕业,2011,32(4):70-73.

[6] 李良,邱庆峰,任运宏,等. 桑葚葡萄复合果汁饮料的研制[J]. 食品工业,2012(2):84-85.

[7] 张瑶,蒲彪,刘云,等. 枇杷果浆酶解工艺的响应面法优化[J]. 食品科学,2010(14):106-110.

[8] 刘兴艳,蒲彪,鞠从荣,等. 响应面法优化草莓浆酶解工艺[J]. 食品科学,2012,33(16):63-67.

[9] 杜喜玲. 果胶酶对樱桃出汁率的影响[J]. 北京农业,2014(12).

[10] 李静燕,杨玉玲,李春阳,等. 酶法提高草莓出汁率的工艺优化[J]. 江西农业学报,2011(9):155-158.

[11] 霍究起. 1-MCP对桑葚采后生理效应的影响[J]. 食品科学,2011,32(2):310-313.

[12] 张志强,杨清香,孙来华. 桑葚的开发及利用现状[J]. 中国食品添加剂,2009(4):65-68.

[13] 李冬香,陈清西. 桑葚功能成分及其开发利用研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(24):293-297.

[14] 李跃,石彦国,李春阳. 油菜籽酶法破壁出油工艺研究[J]. 中国粮油学报,2012,27(11):45-49.

[15] 汪志慧,孙智达,谢笔钧. 响应曲面法优化双酶法提取莲房原花青素[J]. 食品科学,2011,32(4):64-68.

[16] 田野,马永强,李春阳. 响应面法优化草莓清汁加工工艺[J]. 食品工业科技,2013,34(19):225-229.

[17] 康纪婷,吴翔,甘炳成,等. 纤维素酶活力测定方法[J]. 河北农业科学,2010,14(4):151-153.

[18] Warshel A, Sharma P K, Kato M, et al. Electrostatic basis for enzyme catalysis[J]. Chemical reviews,2006,106(8):3210-3235.

[19] 张建安,闫科. 木素对纤维素酶解的影响及纤维素酶解[J]. 化学工程,2000,28(1):38-39.

[20] 石亚中,方娇龙,钱时权,等. 响应曲面法优化纤维素酶酶解提取工艺[J]. 食品科学,2013,34(4):75-79.

[21] 杨会涛,陈代文,余冰. pH对木聚糖酶活性的影响[J]. 饲料博览,2006(7):42-44.

(上接第164页)

Characterisation of lipoxygenase from pea seeds(*Pisum sativum* var. Telephone L.)[J]. Food Chem,2009,116(4):906-910.

[20] Garreta A, Val-Moraes S P, Garcia-Fernandez Q, et al. Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Faseb J,2013,27(12):4811-4821.

[21] Piela L, Nemethy G, Scheraga H A. Proline-Induced Constraints in Alpha-Helices[J]. Biopolymers,1987,26(9):1587-1600.

[22] Daopin S, Baase W A, Matthews B W. A Mutant T4 Lysozyme

(Val 131-[Ala] Designed to Increase Thermostability by the Reduction of Strain within an Alpha-Helix[J]. Proteins,1990,7(2):198-204.

[23] Schwehm J M, Kristyanne E S, Biggers C C, et al. Stability effects of increasing the hydrophobicity of solvent-exposed side chains in staphylococcal nuclease[J]. Biochemistry,1998,37(19):6939-6948.

[24] Strub C, Alies C, Lougarre A, et al. Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability [J]. BMC Biochemistry,2004(5):9.