

黑曲霉 DB056 柚苷酶制剂对琯溪蜜柚果汁的脱苦效果

翁聪泽^{1,2}, 蔡慧农^{1,2,*}, 倪辉¹, 肖安风¹, 李利君¹

(1.集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2.厦门市食品生物工程技術研究中心, 福建 厦门 361021)

摘 要: 采用高效液相色谱法测定琯溪蜜柚果汁中柚皮苷及其降解产物的变化, 研究黑曲霉 DB056 柚苷酶制剂脱苦琯溪蜜柚果汁的优化条件; 并且在此优化条件下, 使用该柚苷酶制剂对琯溪蜜柚鲜果汁、浑浊浓缩柚汁和澄清浓缩柚汁进行脱苦。结果表明: 黑曲霉 DB056 柚苷酶制剂催化琯溪蜜柚果汁中柚皮苷水解成普鲁宁和柚皮素; 该柚苷酶制剂在 40~55℃、果汁自然 pH 值条件下对琯溪蜜柚鲜果汁进行脱苦, 酶用量 90U/mL、处理时间 80min, 柚皮苷脱除率达到 89%; 处理不同浓缩程度的浑浊浓缩柚汁, 脱苦率约为 80% 左右。结果说明黑曲霉 DB056 柚苷酶制剂对琯溪蜜柚果汁具有良好的脱苦作用。

关键词: 黑曲霉 DB056; 柚苷酶制剂; 琯溪蜜柚果汁; 高效液相色谱; 脱苦率

Bitterness Removal in Guanxi Pomelo Juice by Naringinase from *Aspergillus niger* DB056

WENG Cong-ze^{1,2}, CAI Hui-nong^{1,2,*}, NI Hui¹, XIAO An-feng¹, LI Li-jun¹

(1. College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Food Bio-engineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine naringin and hydrolysates in Guanxi pomelo juice to explore the optimal conditions of bitterness removal for Guanxi pomelo juice by the naringinase from *Aspergillus niger* DB056. Under optimized conditions, the naringinase was used to debitter Guanxi pomelo fresh fruit juice, cloudy concentrated juice and clarified concentrated juice. The results showed that the optimal debittering conditions were natural pH, 40—55 °C treatment temperature, 90 U/mL naringinase amount and 80 min treatment time. Under the optimal debittering conditions, the naringin in pomelo juice could be effectively degraded into prunin and naringenin by the enzyme and the removal rate of naringin was up to 89%; meanwhile, the debittering efficiency of cloudy concentrated juice was up to 80%. Therefore, naringinase has an excellent debittering capability for Guanxi pomelo juice.

Key words: *Aspergillus niger* DB056; naringinase; Guanxi pomelo juice; HPLC; removal rate

中图分类号: TS255.44

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)11-0033-06

琯溪蜜柚(*Citrus grandis* (L.) Osbeck c.v.)是芸香科柑橘属水果中的柚类, 原产于福建省平和县琯溪镇, 以果皮薄、肉嫩多汁、清甜微酸而出名, 经过 20 多年的发展, 其种植面积已达 4 万公顷, 年产量达到 80 万 t, 年产值超过 15 亿元^[1]。随着琯溪蜜柚种植业的发展, 果汁加工产业化的意义越来越突出: 1)可推动整果深加工利用, 解决果农鲜果销售的问题, 带动种植业的进一

步发展; 2)蜜柚的营养及保健成分与橙相似, 但其产量大, 榨汁得率高, 果汁的生产成本比橙汁低, 更具有生产价值。

琯溪蜜柚榨汁后的果汁具有明显的苦味, 需要经过脱苦处理后才能被人们接受。虽然人们研究了用代谢法、吸附法、酶法、屏蔽法、加热法、膜过滤法、超临界 CO₂ 萃取法等多种方法对柑橘类果汁进行脱苦^[2-8],

收稿日期: 2011-02-03

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2009N0044); 科技部科技人员服务企业行动项目(2009GJC40050);

集美大学中青年创新团队专项基金项目(2010A006)

作者简介: 翁聪泽(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wengcongze@stu.jmu.edu.cn

* 通信作者: 蔡慧农(1957—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为发酵工程。E-mail: chn@jmu.edu.cn

但只有吸附法和酶法满足“能有效的去除苦味、又容易操作”的产业化生产需求^[2-3,9]。虽然,吸附法能取得很好的脱苦效果,但树脂吸附苦味物质的同时,也吸附了柚汁中某些风味物质、营养成分及保健成分等,因而其应用受到了限制。与吸附法相反,利用酶对苦味成分进行专一性修饰的办法进行脱苦,具有工艺条件温和、不影响其他风味、营养及保健成分的优点,因而更具有生产应用价值。研究表明,柚皮苷(naringin)是蜜柚果汁的主要苦味成分,用水解柚皮苷的酶(柚苷酶, naringinase)处理蜜柚果汁,使其柚皮苷水解成无苦味的柚皮素(naringenin),如图1所示,就可达到脱苦的目的^[9-10]。

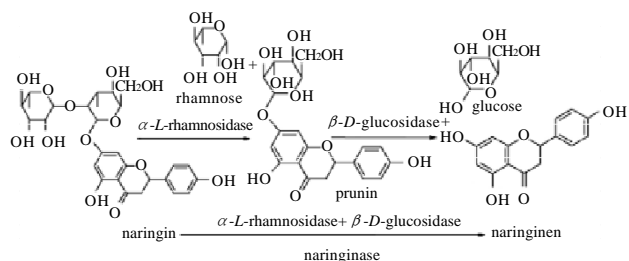


图1 柚苷酶脱苦蜜柚果汁的原理^[6]

Fig.1 Debittering principle of pomelo juice by naringinase^[6]

目前国外对柚苷酶有很多研究报道,特别是对固定化柚苷酶^[10],而在果汁脱苦方面报道比较常见的是用聚合体进行吸附脱苦的研究^[3],用柚苷酶对果汁脱苦的报道不多。国内虽然有很多针对黑曲霉柚苷酶高产菌株选育、发酵工艺优化及酶分离纯化的研究^[11-13],但对于用黑曲霉柚苷酶制剂脱苦柑橘类水果的研究报道却很少,而用柚苷酶制剂脱苦浓缩果汁的研究更少。

在前期研究中,本实验室建立了黑曲霉高产发酵柚苷酶的技术、分离纯化并制备得到了卫生安全的柚苷酶制剂。本研究在此基础上,以琯溪蜜柚果汁为原料,采用高效液相色谱法测定柚皮苷去除率,优化柚苷酶制剂脱苦琯溪蜜柚果汁的条件,并且对蜜柚鲜果汁和蜜柚浓缩果汁进行脱苦,为后续研究与利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂

琯溪蜜柚 漳州市平和县琯溪镇;柚苷酶高产菌株 DB056 黑曲霉 本研究中心分离筛选获得;柚皮苷、普鲁宁、柚皮素标样(HPLC 级) 美国 Sigma 公司;甲醇、乙腈(色谱纯) 美国 Tedia 公司;商品果胶酶制剂 (5×10^5 U/g) 和氏璧生物技术有限公司;其他实验试剂

均为国产分析纯。

1.1.2 培养基与样品制备

摇瓶培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g/L、 KH_2PO_4 1.0 g/L、KCl 0.5 g/L、无水 CaCl_2 0.1 g/L、柚皮苷 3.5 g/L、玉米浆 4.0 g/L、乳化剂 Triton X-100 体积分数 1.0%, 初始 pH 6.0。

发酵培养基: 柚皮苷 10 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、 KH_2PO_4 1.5 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.09 g/L、无水 CaCl_2 0.1 g/L、酵母膏 1.0 g/L、黄豆饼粉 2.0 g/L、胰蛋白胨 2.0 g/L, 初始 pH 6.0。

鲜柚汁: 将蜜柚果实去除皮层和籽, 然后打浆机打浆, 用三足离心机离心榨取鲜柚汁。

澄清柚汁: 500 mL 鲜柚汁中加入 0.5 g 商品果胶酶制剂, 50°C 水浴保温 60 min, 沸水浴灭活, 静置获取澄清柚汁。

浓缩柚汁: 鲜柚汁(或澄清柚汁)真空浓缩至糖度为 65%, 然后用水稀释成不同糖度的浑浊浓缩柚汁(或澄清浓缩柚汁)。

1.2 仪器与设备

Waters 1525 高效液相色谱仪、Symmetry C_{18} 柱 ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $3.5\text{ }\mu\text{m}$)、Waters 2487 紫外检测器、Waters System Breeze 系统控制和数据处理工作站 美国 Waters 公司; WNB22 型精密数显恒温水浴锅 德国 Memmert 公司; PHS-2C 型酸度计 上海雷磁仪器厂; 5424 小型高速离心机 德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 黑曲霉 DB056 的发酵与柚苷酶制剂的制备

将黑曲霉 DB056 菌株斜面 28°C 活化 3 d, 洗下孢子接种至摇瓶培养基中 28°C 、190 r/min 培养 24 h, 以 10% 的接种量接种至装有 5 L 发酵培养基的 7 L 发酵罐中, 在 28°C 、pH 6.0、溶氧 20%~80% 的条件下培养 7 d, 取发酵液于 4°C 、15000 r/min 冷冻离心 15 min, 离心获得上清, 用硫酸铵盐析法沉淀, 收集质量分数 40%~80% 硫酸铵的沉淀组分, 沉淀用 pH 5.5 的柠檬酸缓冲液溶解, 透析脱盐, 采用 10 kD 超滤膜超滤浓缩, 加入一定量的酶载体(麦芽糊精)后喷雾干燥得到柚苷酶活力为 10000 U/g 柚苷酶制剂^[11-12]。柚苷酶活力单位定义为在 50°C 、pH 3.5 条件下, 每分钟水解 $1\text{ }\mu\text{g}$ 柚皮苷所需要的酶量。

1.3.2 HPLC 定性分析柚苷酶制剂脱苦琯溪蜜柚果汁

取 2 mL 鲜柚汁加入 2 mL 350 U/mL 柚苷酶液, 50°C 水浴保温 20 min, 沸水浴灭活 20 min 后, 13000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 HPLC 测定, 定性分析柚皮苷的水解产物。

1.3.3 柚苷酶制剂脱苦琯溪蜜柚果汁的单因子试验

1.3.3.1 酶用量

考察柚苷酶酶用量0~175U/mL对鲜柚汁中柚皮苷的水解效果。2mL鲜柚汁中加入2mL柚苷酶解液,在自然pH值体系下,50℃水浴保温60min,沸水浴灭活20min后,13000r/min离心10min,取上清液测定柚皮苷含量,以完全灭活的柚苷酶酶液为对照按照公式(1)计算柚皮苷的去除率。

$$\text{柚皮苷去除率}/\% = \frac{c_0 - c_1}{c_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: c_0 为对照中柚皮苷含量/($\mu\text{g/mL}$); c_1 为酶反应后剩余柚皮苷含量/($\mu\text{g/mL}$)。

1.3.3.2 酶反应 pH 值

利用磷酸盐缓冲液调节柚汁 pH 值,考察反应体系 pH 3.0~6.0 范围内柚苷酶制剂水解柚皮苷的效果。2mL鲜柚汁中加入2mL 350U/mL柚苷酶酶液(其实际酶质量浓度为175U/mL),实测其反应体系 pH 值,50℃水浴保温60min,沸水浴灭活20min后,13000r/min离心10min,取上清液测定柚皮苷含量,以完全灭活的柚苷酶酶液为对照计算柚皮苷的去除率。

1.3.3.3 反应温度

考察不同的水浴温度下柚苷酶制剂水解柚皮苷的效果。2mL鲜柚汁中加入2mL柚苷酶酶液,在自然pH值体系、酶用量为175U/mL下,不同水浴温度保温60min,沸水浴灭活20min后,13000r/min离心10min,取上清液测定柚皮苷含量,以完全灭活的柚苷酶酶液为对照计算柚皮苷的去除率。

1.3.3.4 保温时间

考察不同的保温时间柚苷酶制剂水解柚皮苷的效果。2mL鲜柚汁中加入2mL柚苷酶酶液,在自然pH值体系、酶用量为175U/mL下,50℃水浴保温0~120min,沸水浴灭活20min后,13000r/min离心10min,取上清液测定柚皮苷含量,以完全灭活的柚苷酶酶液为对照计算柚皮苷的去除率。

1.3.4 柚苷酶制剂对鲜果汁的脱苦及营养成分的影响

500mL鲜柚汁中加入4.5g柚苷酶酶制剂,在55℃水浴保温80min后,取样两份,一份13000r/min离心10min,取上清液测定柚皮苷含量;另一份测定脱苦前后鲜柚汁的糖度、总酸及VC变化。

1.3.5 柚苷酶制剂对浓缩果汁的脱苦作用研究

1.3.5.1 浑浊浓缩柚汁的脱苦

不同糖度的浑浊浓缩果汁,由于浓缩液黏稠,酶制剂粉末不能完全溶解,因此加入等体积的180U/mL柚苷酶酶液,实测其反应液糖度,在55℃水浴保温80min

后,13000r/min离心10min,取上清液测定柚皮苷含量,以完全灭活的柚苷酶酶液为对照计算柚皮苷的去除率。

1.3.5.2 澄清浓缩柚汁的脱苦

不同糖度的澄清浓缩果汁,加入等体积的180U/mL柚苷酶酶液,实测其反应液糖度,在55℃水浴保温80min后,13000r/min离心10min,取上清液测定柚皮苷含量,以完全灭活的柚苷酶酶液为对照计算柚皮苷的去除率。

1.3.6 分析检测方法

采用高效液相色谱法测定柚皮苷含量^[7,8,14-15],流速为0.9mL/min,进样量为20 μL ,柱温为35℃,检测波长为280nm,用表1所示的梯度条件洗脱。

表1 梯度洗脱参数

Table 1 Gradient elution program used in HPLC analysis

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	25.0	75.0
1.50	65.0	35.0
7.00	65.0	35.0
8.00	25.0	75.0
10.00	25.0	75.0

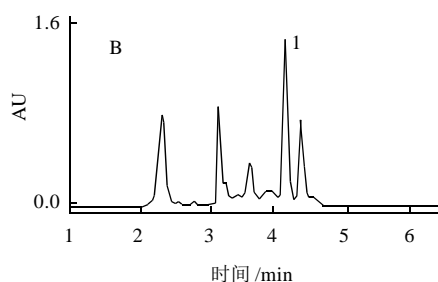
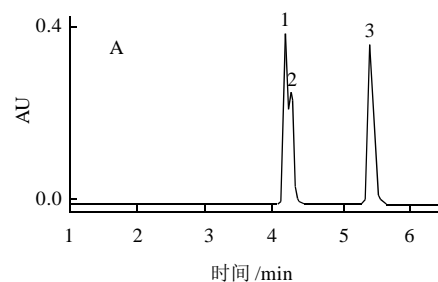
注:流动相A为甲醇-乙腈体积比3:1;流动相B为10mmol/L、pH3.5磷酸盐缓冲液。

1.3.7 分析指标的测定

糖度(可溶性固形物)用手持糖度计测定,总酸利用酸碱中和滴定法测定^[16],2,4-二硝基苯肼法测定柚汁中的总抗坏血酸^[17]。

2 结果与分析

2.1 HPLC 定性分析柚苷酶制剂脱苦琯溪蜜柚果汁



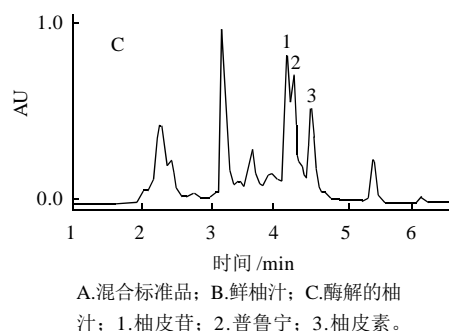


图2 柚苷酶酶解反应色谱图

Fig.2 Chromatograms of mixed naringin, prunigen and naringenin standards, pomelo juice and pomelo juice hydrolysate prepared with the naringinase from *Aspergillus niger* DB056

高效液相色谱法是对柚皮苷进行定性定量的快速有效测定方法^[8],由图2可知,鲜柚汁中含有柚皮苷,而无普鲁宁和柚皮素,当往鲜柚汁中加入柚苷酶制剂水解后其液相色谱图中,柚皮苷色谱峰高下降并出现了普鲁宁和柚皮素,这表明黑曲霉 DB056 发酵生产的柚苷酶制剂水解柚皮苷的机理与图1所示的青霉菌发酵生产的柚苷酶水解柚皮苷的机理相一致^[6,18],也是先有其中的 α -L-鼠李糖苷酶(α -L-rhamnosidase)将柚皮苷水解成普鲁宁(prunigen),再由 β -D-葡萄糖苷酶(β -D-glucosidase)将普鲁宁水解成柚皮素(naringenin)。

2.2 柚苷酶制剂脱苦甾蜜柚果汁的单因子试验

2.2.1 酶用量对蜜柚果汁脱苦的影响

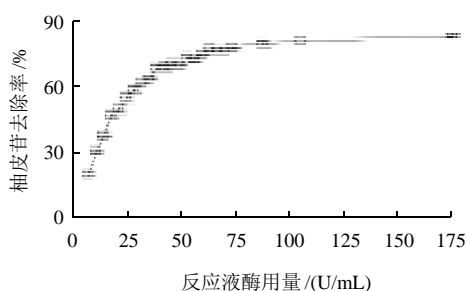


图3 柚苷酶用量与柚皮苷去除率的关系

Fig.3 Relationship between aringginase amount and removal rate of naringin

自然 pH 值体系下,将反应液 50℃ 保温 60min,考察反应液酶用量(0~175)U/mL 对鲜柚汁中柚皮苷含量的影响,由图3可知,随着柚苷酶酶用量的增加,柚皮苷去除率逐渐增大,当加入少量柚苷酶制剂时,反应液中柚皮苷的去除率较低,随着酶用量的逐渐加大,柚皮苷去除率急剧增大,当酶用量增加到 90U/mL,柚皮苷去除率率达到 80% 以上,此后去除率随酶量的增加基本趋于平稳。这结果表明,该柚苷酶制剂脱苦甾蜜柚鲜柚汁的酶用量为 90U/mL 以上。

2.2.2 酶反应 pH 值对蜜柚果汁脱苦的影响

鲜柚汁的自然 pH 值在 3.4~3.5,利用磷酸盐缓冲液改变柚汁的 pH 值,观察在强酸性条件下,柚苷酶制剂的酶活是否受到影响,结果如图4所示,受反应体系 pH 值影响,柚皮苷去除率呈现先增后降趋势,当反应体系 pH 值在 3.5~6.0 范围内,反应液中柚皮苷去除率达到 80% 以上,并且趋于平稳,当反应体系 pH4.5 时,达到 85% 的去除率,之后略有下降。这一结果表明,反应体系 pH 值呈强酸性时柚皮苷去除率降低,最佳的反应体系 pH4.5,考虑到工业应用中大批量改变柚汁 pH 值不够合理,而在反应体系 pH3.5 时,柚皮苷去除率达到了 80%,在工业生产操作中,将鲜柚汁在自然 pH 值体系下进行酶法脱苦,同样能达到很好的脱苦效果。

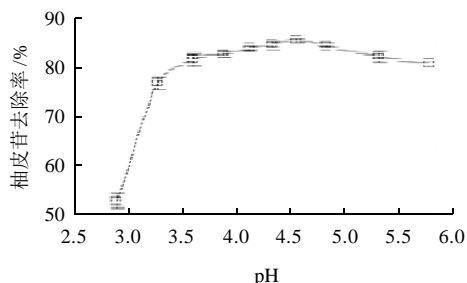


图4 不同酶反应 pH 值条件下柚皮苷的去除率

Fig.4 Removal rates of naringin under different pH conditions for enzymatic reaction

2.2.3 反应温度对蜜柚果汁脱苦的影响

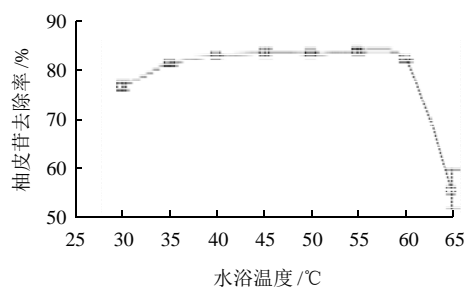


图5 反应温度与柚皮苷去除率的关系

Fig.5 Relationship between reaction temperature and removal rate of naringin

自然 pH 值体系,175U/mL 酶用量下,将反应液不同的温度保温 60min,考察反应温度对鲜柚汁中柚皮苷含量的影响。由图5可知,随着反应温度的增高,反应液中柚皮苷去除率呈现先增后降的趋势,反应温度在 40~55℃ 之间柚皮苷去除率较平稳,进一步升高反应温度会使柚苷酶开始部分失活而导致了柚皮苷去除率的下降,这表明了柚苷酶反应温度不宜超过 60℃,而其最适温度范围是 40~55℃,适合工业生产操作。

表3 柚苷酶制剂对浑浊浓缩果汁与澄清浓缩果汁的脱苦效果

Table 3 Bitterness removal efficiency in cloudy and clarified concentrated pomelo juice by naringinase

反应液糖度/%	脱苦前柚皮苷含量/($\mu\text{g/mL}$)		脱苦后柚皮苷含量/($\mu\text{g/mL}$)		柚皮苷去除率/%	
	浑浊浓缩柚汁	澄清浓缩柚汁	浑浊浓缩柚汁	澄清浓缩柚汁	浑浊浓缩柚汁	澄清浓缩柚汁
2	8.39 ± 0.14	19.77 ± 0.70	3.11 ± 0.43	6.51 ± 0.75	62.96 ± 5.13^d	67.06 ± 3.74^f
3	73.59 ± 4.24	53.16 ± 2.12	23.57 ± 0.17	12.61 ± 0.23	67.97 ± 0.24^e	$76.28 \pm 0.42^{c,d}$
6	151.18 ± 2.82	112.22 ± 2.83	33.37 ± 1.38	22.77 ± 0.32	$77.92 \pm 0.91^{b,c}$	79.70 ± 0.28^b
9	210.36 ± 2.82	172.30 ± 3.53	42.55 ± 0.24	37.66 ± 0.55	$79.77 \pm 0.11^{a,b,c}$	$78.14 \pm 0.32^{b,c,d}$
11	269.89 ± 5.66	256.32 ± 2.82	59.59 ± 1.21	52.29 ± 0.51	$77.92 \pm 0.44^{b,c}$	$79.60 \pm 0.19^{b,c}$
15	344.36 ± 11.31	280.96 ± 2.83	63.18 ± 0.72	47.88 ± 0.17	81.65 ± 0.21^a	82.96 ± 0.06^a
18	389.94 ± 2.82	337.35 ± 4.94	72.71 ± 0.95	78.91 ± 6.82	$81.35 \pm 0.24^{a,b}$	76.61 ± 2.04^d
20	445.52 ± 8.48	397.97 ± 6.36	100.71 ± 9.80	101.32 ± 6.06	77.40 ± 2.20^e	74.54 ± 1.50^d
24	511.85 ± 28.28	495.97 ± 3.53	107.84 ± 4.04	141.29 ± 8.54	$78.93 \pm 0.79^{a,b,c}$	71.51 ± 1.71^e

注：小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2.4 保温时间对蜜柚果汁脱苦的影响

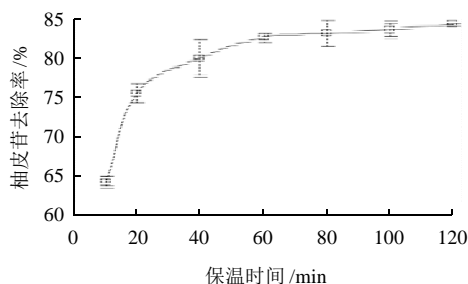


图6 保温时间与柚皮苷去除率的关系

Fig.6 Relationship between incubation time and removal rate of naringin

自然 pH 值体系, 175U/mL 酶用量下, 将反应液在 50℃下保温 0~120min, 考察保温时间对鲜柚汁中柚皮苷含量的影响。由图 6 可知, 反应液中的柚皮苷去除率随保温时间的增加而增大, 当保温 60min 后, 柚皮苷去除率趋于平稳, 此时柚皮苷大部分被水解, 之后随着保温时间的增加, 柚皮苷去除率趋于平稳。由 2.1 节的柚苷酶酶解色谱图可知, 如果保温时间不够充足, 部分柚皮苷只能转化成普鲁宁, 而未完全转化成无苦味的柚皮素, 普鲁宁仍具有苦味^[6], 因此充分的保温时间可以使柚皮苷彻底转化成柚皮素, 延长 20min 的保温时间令部分普鲁宁继续转化成柚皮素, 结合图 6 与 2.1 节结果, 该柚苷酶制剂脱苦鲜柚汁的保温时间确定为 80min。

2.3 柚苷酶制剂对鲜榨果汁的脱苦效果及营养成分的影响

表2 工艺验证实验结果

Table 2 Validation experiment results of pomelo juice debittering under optimized process conditions

柚汁	糖度/%	总酸/%	VC 含量/(mg/100mL)	柚皮苷含量/($\mu\text{g/mL}$)
原柚汁	11.5 ± 0.0	0.73 ± 0.00	54.92 ± 1.30	269.89 ± 2.62
脱苦柚汁	12.0 ± 0.0	0.78 ± 0.00	46.80 ± 0.99	28.88 ± 0.16

500mL 鲜柚汁中加入 4.5g 柚苷酶酶制剂, 在 55℃水浴保温 80min 后, 获得脱苦柚汁。从表 2 可知, 采用 2.2 节结果条件(柚汁自然 pH 值、酶用量 90U/mL、温度 55℃)对鲜柚汁处理 80min 后, 其糖度、总酸和 VC 含量变化不大, 但柚皮苷的含量降低至 28.88 $\mu\text{g/mL}$, 即去除率达到 89%, 低于果汁中柚皮苷的苦阈值(30 $\mu\text{g/mL}$), 达到了工业要求。

2.4 柚苷酶制剂对浓缩果汁的脱苦作用

工业上为了降低运输成本, 常常将柚汁进行浓缩, 而从 2.3 节结果说明该柚苷酶制剂对鲜柚汁具有有效的脱苦作用, 将该柚苷酶制剂运用于浓缩柚汁脱苦, 实验考察鲜柚汁浓缩前脱苦与浓缩后脱苦效果是否有差异以及澄清对浓缩后脱苦的影响。由表 3 可知, 随着浓缩果汁糖度增大, 两种浓缩柚汁中的柚皮苷去除率都呈先增后降的趋势, 但是当糖度高过 18% 以后, 脱苦的效能下降, 可能是由于果汁黏稠度的增高限制了酶分子与底物柚皮苷的接触, 限制了酶法脱苦效果的发挥。

3 结论与讨论

黑曲霉产的柚苷酶制剂在柑橘类水果的加工中具有广泛的应用前景, 本实验利用黑曲霉 DB056 发酵生产制备的柚苷酶制剂进行琯溪蜜柚的酶法脱苦试验研究, 取得了良好的脱苦效果, 实验结果表明:

3.1 柚苷酶脱苦蜜柚果汁的过程中检测出了普鲁宁和柚皮素两种水解产物, 说明该柚苷酶制剂含有 α -L- 鼠李糖苷酶和 β -D- 葡萄糖苷酶两种酶活性, 其脱苦的实质是柚皮苷经普鲁宁到柚皮素的双酶水解过程。

3.2 鲜柚汁脱苦的单因子试验表明该柚苷酶制剂用于脱苦琯溪蜜柚鲜果汁的酶用量为 90U/mL, pH 值为果汁自然 pH 值, 温度为 40~55℃, 在此条件范围内水解 80min 以上都具有很好的脱苦效果, 并且在柚汁自然 pH 值、酶用量 90U/mL 条件下, 将鲜柚汁 55℃保温 80min, 柚

汁中柚皮苷含量降低至苦味阈值以下,且保留了鲜柚汁大部分营养成分。

3.3 该柚苷酶制剂处理浓缩柚汁的脱苦效果并不理想。采用与对鲜榨原果汁脱苦相当的脱苦条件对浓缩果汁进行脱苦处理,在果汁糖度小于18%时,随着果汁浓度的提高,柚皮苷脱除率得到提高;但在果汁糖度大于18%以后,由于浓缩果汁的黏稠度的限制,柚皮苷的脱除率迅速下降。

目前国内外在柑橘类果汁酶法脱苦研究主要集中在柚苷酶对鲜果汁脱苦条件的优化和各种脱苦方法脱苦鲜果汁后营养成分的比较等方面。在酶法脱苦条件优化方面,如黄高凌等^[19]以单因素与正交试验优化柚皮苷酶脱苦琯溪蜜柚鲜果汁,结果表明在柚苷酶用量7.4U/mL、温度60℃、反应体系pH 3.6的条件下脱苦处理100min后,柚皮苷脱除率达97%以上。相比之下,本研究不足在于用酶量较大,而优点在于运用了鲜柚汁的自然pH值体系,更广的温度范围进行脱苦,脱苦处理时间也较短,柚皮苷含量降低至苦阈值以下,这些都有利于工业生产操作。另外,本研究将自产的柚苷酶制剂运用于浓缩柚汁的脱苦,研究发现由于浓缩柚汁黏稠度增高,不利于酶法脱苦性能的发挥,浓缩果汁糖度高过18%后脱苦效果不够理想,工业应用时宜在浓缩前先行脱苦处理。

参考文献:

- [1] 卢新坤,黄雄峰,杨凌.平和琯溪蜜柚产业化现状及可持续发展的关键创新技术[J].果农之友,2009(3): 36.
- [2] 郑立辉,吴高明,宋胜利.粒状活性炭固定床用于柑橘汁的脱苦[J].食品与发酵工业,2003,29(11): 60-62.
- [3] RIBEIRO M H, SILVEIRA D, AFERREIRA-DIAS S. Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbent[J]. Eur Food Res Technol, 2002, 215(6): 462-471.
- [4] 王贝妮,王海鸥. β -环糊精对柚汁脱苦工艺的改进研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 192-193.
- [5] 潘利华,罗水忠,杨阳,等. β -葡萄糖苷酶对胡柚汁脱苦效果的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 125-128.
- [6] PEDRO H A, ALFAIA A J, MARQUES J, et al. Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 442-446.
- [7] 黄高凌,倪辉,胡阳,等.蜜柚中主要苦味物质的快速测定方法研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 208-213.
- [8] RIBERIO I A, RIBEIRO M H. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method[J]. Food Control, 2008, 19(4): 432-438.
- [9] 王鸿飞.柚皮苷酶对柑橘类果汁脱苦效果的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(6): 174-177.
- [10] SEKEROGU G, FADILGLOU S, GOGUS F. Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin[J]. Eur Food Res Technol, 2006, 224(1): 55-60.
- [11] 吴升山,蔡慧农,苏文金,等.黑曲霉DB056发酵 α -鼠李糖苷酶和柚苷酶培养基的优化研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(4): 193-201.
- [12] 卢云真,倪辉,蔡慧农,等.黑曲霉DB056分泌的柚苷酶分离纯化及酶学性质研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(3): 69-75.
- [13] 陈华根.产柚苷酶的黑曲霉菌株的筛选、产酶特性及高产菌株选育的研究[D]. 厦门:集美大学, 2009.
- [14] 孙志高,黄学根,焦必宁,等.柑橘果实主要苦味成分的分布及橙汁脱苦技术研究[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 146-148.
- [15] 陈静,高彦祥,吴伟莉,等.高效液相色谱法测定柑橘汁中的柠檬苦素和柚皮苷[J]. 色谱, 2006, 24(2): 157-160.
- [16] TIWARI B K, MUTHUKUMARAPPAH K, DONNELL C P, et al. Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology[J]. Food Science and Technology, 2008, 41(10): 1876-1883.
- [17] DAS P, CHOUDHARI A R, DHAWAN A, et al. Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms[J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2009, 24(3): 312-315.
- [18] CHIEN P J, SHEU F, SHYU Y, et al. Monitoring enzymatic debittering in grape fruit juice by high performance liquid chromatography[J]. Food and Drug Analysis, 2001, 19(2): 115-120.
- [19] 黄高凌,倪辉,胡阳,等.柚皮苷酶对琯溪蜜柚果汁脱苦效果工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 70-73.