

崔升, 张娜, 许建, 等. 热处理对枣果肉中纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶活性及底物含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 279–283. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.080

热处理对枣果肉中纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶活性及底物含量的影响

崔升, 张娜, 许建, 于宁, 韦玉龙, 黄雪娇, 李焕荣

(新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:为获得枣最佳的工艺参数, 以山东冬枣为原料, 通过热处理研究冬枣中纤维素酶(Cx)、多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性的变化及纤维素、果胶的保留量, 利用响应面分析法设计 3 因素 3 水平的优化试验, 结果表明, 热处理时间 4 min、处理温度 93 ℃、投料量 27 g/L 为最佳的热处理条件, 此条件下纤维素酶(Cx)和多聚半乳糖醛酸酶(PG)被灭活, 纤维素和果胶保留量分别为 0.647 0 $D_{620\text{ nm}}$ /g 和 0.085 9%。

关键词:冬枣; 热处理; 酶活; 果胶; 纤维素酶; 多聚半乳糖醛酸酶

中图分类号: S665.101; TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0279-05

冬枣别称苹果枣, 含有丰富的维生素 A、维生素 E 及钾、钠、铁、铜等多种矿物质元素。鲜冬枣皮薄、肉脆、质优、味甘的特异品质, 在古代被钦定为“贡品”^[1]。果实质地是构成果实品质的重要因素, 而采后冬枣很容易软化、腐烂, 致使各种营养成分大量丧失。目前研究认为, 果实的软化是由构成细胞间层及细胞壁的果胶降解所致, 而果胶的分解与多聚半乳糖醛酸酶(PG)的活性有密切的关系^[2-4]。与此同时, 纤维素的降解也会促进果实的软化, 而调节纤维素降解的水解酶主要是纤维素酶(Cx)^[4], 鳄梨的软化就是纤维素酶在起作用^[5]。本试验通过对冬枣进行热处理, 分析其多聚半乳糖醛酸酶、纤维素酶活性及果胶、纤维素含量的变化, 以寻求最佳的热处理条件, 使 PG 和 Cx 这 2 种酶被灭活的同时果胶和纤维素保留量最高, 为果蔬热处理技术进一步提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

冬枣, 产自山东沾化。选择着色度为 20%~60% 的半红枣, 手工采摘以防造成机械损伤; 0~4 ℃ 保藏, 待用。

0.15% 吡唑、100 μg/mL 半乳糖醛酸标准液、浓硫酸(分析纯)、50 mmol/L pH 值为 5.5 的醋酸钠缓冲液、1.8 mol/L NaCl、1% 多聚半乳糖醛酸溶液、3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂、50 mmol/L pH 值为 5.0 的柠檬酸缓冲液、1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液。

TU-1810 型紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司生产; HH-S₄ 型数显恒温水浴锅, 金坛市医疗仪器厂生产; SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸

有限公司生产; TGL-16aR 型冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂生产; 含研钵组织捣碎机; FE20K Plus 型 pH 计, 梅特勒-托利仪器有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程 原料选择→拣选→清洗→切片→热处理→热风干燥→打粉→包装。

1.2.2 操作要点 拣选无机械损伤、无病虫害、着色度为 20%~60% 且大小均匀的红枣, 用去孔器将红枣的核去掉; 顺着核孔垂直切片, 枣片厚度为 3 mm 左右; 将定量的枣片装入纱布网中, 确保网内空间足够大, 避免枣片上浮于水面; 将纱布网放入设定并达到温度的水浴锅中, 水浴锅中水量按液料比设定; 达到处理时间后迅速取出, 并用液氮冷冻, 低温存放备用。

1.2.3 热处理单因素试验设计

1.2.3.1 料液比的选择 以 Cx、PG 酶活性和纤维素、果胶保留量为指标, 处理温度为 85 ℃、时间为 4 min, 液料比(mL:g)分别为 20:1、40:1、60:1、80:1、100:1。

1.2.3.2 处理时间的选择 以 Cx、PG 酶活性和纤维素、果胶保留量为指标, 处理温度为 85 ℃、液料比为 40 mL:1 g, 处理时间分别为 1、2、3、4、5 min。

1.2.3.3 处理温度的选择 以 Cx、PG 酶活性和纤维素、果胶保留量为指标, 处理时间为 4 min、液料比为 40 mL:1 g, 处理温度分别为 75、80、85、90、95 ℃。

1.2.4 响应面试验设计 在单因素试验基础上, 选取处理温度、处理时间、液料比 3 因素为自变量(表 1), 分别以 Cx 活性、PG 活性、纤维素含量、果胶含量为响应值, 根据 Design-Expert 8.0.5b 软件 Box-Behnken 的试验设计方法, 设计 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验, 其中 12 组是析因试验, 5 组是中心试验。

1.2.5 测定指标及方法 果胶含量、Cx 酶活性和 PG 酶活性的测定参照曹建康等的方法^[6]; 纤维素含量测定参照李合生等的方法^[7-8], 并进行部分修改。准确称量 2 g 枣果置于冰水浴的烧杯中, 用 60 mL 60% 硫酸溶液消化 30 min; 转入

收稿日期: 2015-02-10

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31360401)。

作者简介: 崔升(1990—), 男, 山西大同人, 硕士, 从事农产品深加工与综合利用研究。E-mail: 995832319@qq.com。

通信作者: 李焕荣, 教授, 从事农产品深加工与综合利用研究。E-mail: lhrgjw@sina.com。

表 1 响应面试验因素水平

| 水平 | 因素 | | |
|----|------------------|----------------|----------------|
| | A:热处理时间 (min) | B:热处理温度 (℃) | C:料液比 (g:L) |
| -1 | 3 | 85 | 1:20 |
| 0 | 4 | 90 | 1:40 |
| 1 | 5 | 95 | 1:60 |

100 mL 的容量瓶中,用同一浓度硫酸定容至刻度线;用布氏漏斗过滤,取溶液 5 mL 用蒸馏水定容至 100 mL,摇匀;取溶液 2 mL 于比色管中,加 0.5 mL 2% 萘酚试剂,再缓慢加入 5 mL 浓硫酸,摇匀;静置 12 min,波长 620 nm 下测吸光度。

1.2.6 数据统计分析 采用 Design-Expert 8.0.5b 数据处理软件进行响应面分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对冬枣片热处理的效果 由图 1 可见,随料液比的增大,纤维素酶(Cx)、多聚半乳糖醛酸酶(PG)的活性越高;液料比为 20 mL:1 g 和 40 mL:1 g 时,2 种酶的活性变化不大,说明此时枣片的添加量基本不会影响酶活性的变化;随料液比的增大,纤维素和果胶保留量下降明显,这可能是因为料液比增加使水温下降,致使酶能够长时间保持较高的活性,促进了纤维素和果胶的分解,而液料比为 20 mL:1 g 和 40 mL:1 g 时,酶的活性降低很快,故而纤维素和果胶保留量较高。考虑实际操作和人力、物力消耗,选择液料比为 40 mL:1 g 较合适。

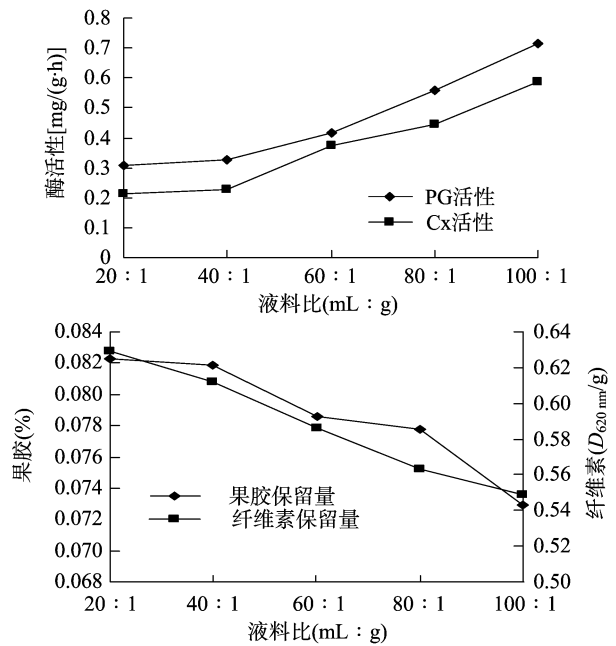


图 1 料液比对热处理冬枣片酶活、果胶和纤维素保留量的影响

2.1.2 热处理时间对冬枣片的影响效果 由图 2 可见,随热处理时间的延长,酶活性总体呈下降趋势,相应的纤维素和果胶的保留量也逐渐减少,5 min 时保留量下降明显,这可能是纤维素和果胶溶解到热水中的缘故。因此,选择热处理时间为 4 min 较合适。

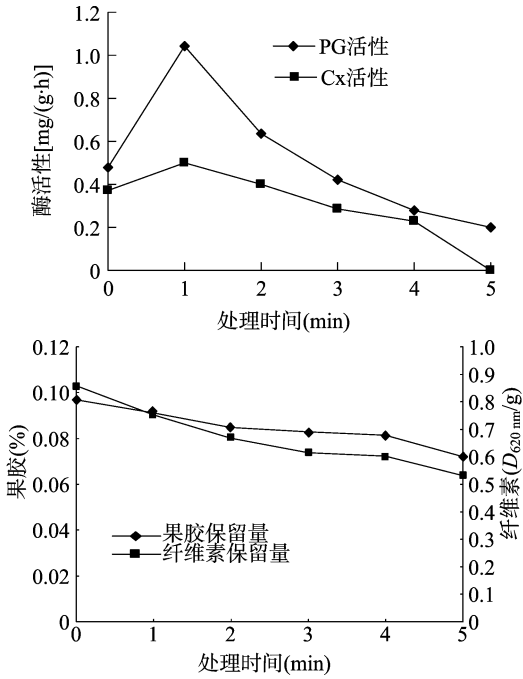


图 2 热处理时间对冬枣片酶活、果胶和纤维素保留量的影响

2.1.3 热处理温度对冬枣片的影响效果 由图 3 可见,热处理温度越高,酶的活性越低,75~90℃酶活性急剧下降,90~95℃酶活变化趋于平缓;90℃处理时纤维素和果胶的保留量最高,95℃时有所降低,这可能是因为高温促进纤维素和果胶热分解的发生^[9]。因此,选择处理温度为 90℃较合适。

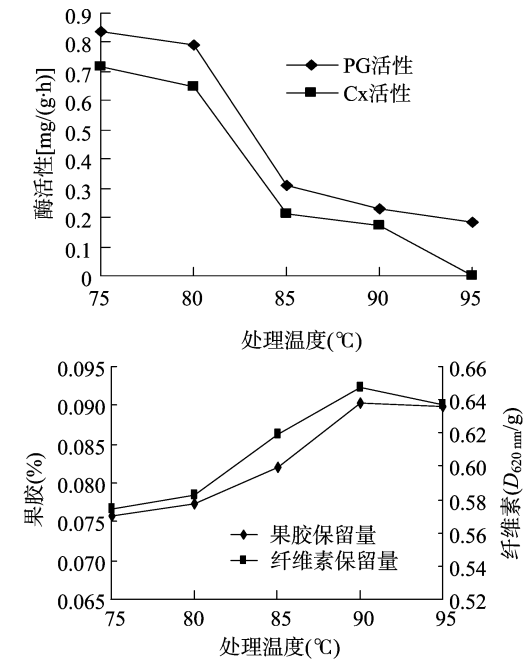


图 3 处理温度对冬枣片酶活、果胶和纤维素保留量的影响

2.2 响应面分析

2.2.1 模型建立及显著性检验 利用软件对试验结果(表 2)进行拟合,得到热处理时间(A)、热处理温度(B)、料液比(C)分别与纤维素酶活性、果胶酶活性、纤维素含量、果胶含量的二次多项回归方程为:Cx 酶活 = 0.037 - 0.039A - 0.22B +

$$0.032C - 0.097AB + 0.039AC - 0.018BC + 0.072A^2 + 0.19B^2 + 0.037C^2; PG \text{ 酶活} = 0.037 - 0.033A - 0.24B + 0.085C - 0.11AB + 0.05AC - 0.074AB + 0.082A^2 + 0.21B^2 - 0.032C^2;$$

$$\text{纤维素保留量} = 0.64 - 0.000\ 125A + 0.022B - 0.017C - 0.001\ 5AB + 0.013AC + 0.005\ 25BC - 0.008\ 45A^2 - 0.024B^2 - 0.013C^2;$$

$$\text{果胶保留量} = 0.085 + 0.000\ 0625A + 0.003\ 125B - 0.001\ 888C + 0.000\ 375AB + 0.001\ 35AC + 0.001\ 075BC - 0.001\ 785A^2 - 0.002\ 71B^2 - 0.001\ 085C^2。$$

表 2 响应面试验设计与试验结果

| 试验号 | A:热处理时间 | B:热处理温度 | C:料液比 | Cx 酶活 [mg/(g·h)] | PG 酶活 [mg/(g·h)] | 纤维素保留量 (<i>D</i> _{620 nm} /g) | 果胶保留量 (%) |
|-----|---------|---------|-------|---------------------|---------------------|--|--------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.649 | 0.085 7 |
| 2 | 1 | 0 | 1 | 0.171 1 | 0.184 8 | 0.614 | 0.081 9 |
| 3 | 0 | 1 | -1 | 0 | 0 | 0.636 | 0.085 4 |
| 4 | -1 | 1 | 0 | 0.228 6 | 0.231 4 | 0.634 | 0.083 2 |
| 5 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0.623 | 0.084 5 |
| 6 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.630 | 0.082 9 |
| 7 | -1 | 0 | -1 | 0.199 9 | 0.215 9 | 0.657 | 0.085 1 |
| 8 | 0 | -1 | 1 | 0.559 6 | 0.697 6 | 0.567 | 0.074 9 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.642 | 0.085 4 |
| 10 | -1 | 0 | 1 | 0.214 3 | 0.200 3 | 0.587 | 0.077 9 |
| 11 | 1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0.631 | 0.083 7 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.184 8 | 0.645 | 0.085 4 |
| 13 | 1 | -1 | 0 | 0.559 6 | 0.635 4 | 0.591 | 0.077 1 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.642 | 0.083 9 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0.185 5 | 0 | 0.639 | 0.084 7 |
| 16 | 0 | -1 | -1 | 0.487 7 | 0.402 3 | 0.601 | 0.080 1 |
| 17 | -1 | -1 | 0 | 0.401 3 | 0.433 4 | 0.589 | 0.078 9 |

统计分析表明,回归模型均显著($P<0.05$),失拟项不显著($P>0.05$),这说明方程拟合性较好,可用回归方程来预测实际的试验结果(表 3 至表 6);纤维素酶活性、果胶酶活性、纤维素含量、果胶含量的二次多项回归方程决定系数 R^2 分别为 0.934 8、0.949 5、0.975 7、0.951 7,不良适配度仅分别为 0.065 2、0.050 5、0.024 3、0.048 3,这说明响应值与自变量之间的回归系数呈现较高比例,回归线与回归数据之间适配度较好;信噪比分别为 10.349、11.760、18.986、11.846,均大于 4,这说明 4 个模型均可以准确反映试验结果。由表 3 可见,处理温度、处理温度和时间的交互项、处理温度的二次项对 Cx 酶活性的影响显著, P 值分别为 0.000 1、0.047 1、0.002 0,均小于 0.05;由表 4 可见,处理温度、处理温度和时间的交互项、处理温度的二次项对 PG 酶活性的影响显著, P 值分别为 $<0.000\ 1$ 、0.027 9、0.001 0,均小于 0.05;由表 5 可见,处理温度、处理时间和料液比的交互项、处理温度的二次项对纤维素保留量影响显著, P 值分别为 $<0.000\ 1$ 、0.003 5、 $<0.000\ 1$,均小于 0.05;由表 6 可见,处理温度、料液比、处理时间和料液比的交互项、处理时间的二次项、处理温度的二次项对果胶保留量影响显著, P 值分别为 0.000 1、0.002 1、0.046 9、0.013 7、0.001 6,均小于 0.05。

2.2.2 各因素交互作用的影响 采用 Design Expert 8.0.5 b 软件,按照回归方程式绘制等高线图和响应面图(图 4 至图 7)。从等高线可以观察交互影响效应的强弱,圆形表示 2 个因素交互影响作用不显著,而椭圆形则表示 2 个因素交互影响作用显著。响应面图是依照响应值对各试验因子构成的三围空间曲面图形,可以形象地看出各参数间的相互作用及最佳参数,当特征值均为正值时,响应面图表现为山谷形曲面,存在最小值,当特征值均为负值时,响应面图表现为山丘形曲面,存在最大值,当特征值有正值、有负值时,响应面图表现为

表 3 Cx 酶活的试验结果方差分析

| 方差来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | <i>F</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|----------------|-----|-----------|-----------|------------|------------|
| 模型 | 9 | 0.65 | 0.072 | 11.16 | 0.002 2 |
| A | 1 | 0.012 | 0.012 | 1.90 | 0.210 7 |
| B | 1 | 0.40 | 0.40 | 61.20 | 0.000 1 |
| C | 1 | 0.008 282 | 0.008 282 | 1.28 | 0.295 1 |
| AB | 1 | 0.037 | 0.037 | 5.79 | 0.047 1 |
| AC | 1 | 0.006 139 | 0.006 139 | 0.95 | 0.362 4 |
| BC | 1 | 1 292 | 0.001 292 | 0.20 | 0.668 4 |
| A ² | 1 | 0.022 | 0.022 | 3.14 | 0.107 3 |
| B ² | 1 | 0.150 | 0.150 | 22.98 | 0.002 0 |
| C ² | 1 | 0.005 714 | 0.005 714 | 0.88 | 0.378 6 |
| 残差 | 7 | 0.045 | 0.006 468 | | |
| 失拟项 | 3 | 0.018 | 0.005 916 | 0.86 | 0.530 7 |
| 纯误差 | 4 | 0.028 | 0.006 882 | | |
| 总离差 | 16 | 0.69 | | | |

表 4 PG 酶活的试验结果方差分析

| 方差来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | <i>F</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|----------------|-----|-----------|-----------|------------|-------------|
| 模型 | 9 | 0.81 | 0.090 | 14.62 | 0.000 9 |
| A | 1 | 0.008 502 | 0.008 502 | 1.38 | 0.278 0 |
| B | 1 | 0.470 | 0.470 | 76.33 | $<0.000\ 1$ |
| C | 1 | 0.027 | 0.027 | 4.39 | 0.074 4 |
| AB | 1 | 0.047 | 0.047 | 7.64 | 0.027 9 |
| AC | 1 | 0.010 | 0.010 | 1.63 | 0.242 0 |
| BC | 1 | 0.022 | 0.022 | 3.55 | 0.101 7 |
| A ² | 1 | 0.028 | 0.028 | 4.57 | 0.069 8 |
| B ² | 1 | 0.180 | 0.180 | 29.19 | 0.001 0 |
| C ² | 1 | 0.004 206 | 0.004 206 | 0.68 | 0.435 4 |
| 残差 | 7 | 0.043 | 0.006 146 | | |
| 失拟项 | 3 | 0.016 | 0.005 234 | 0.77 | 0.569 5 |
| 纯误差 | 4 | 0.027 | 0.006 830 | | |
| 总离差 | 16 | 0.85 | | | |

表 5 纤维素保留量试验结果方差分析

| 方差来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|----------|
| 模型 | 9 | 0.011 | 1.178×10^{-3} | 31.17 | <0.000 1 |
| A | 1 | 1.250×10^{-7} | 1.250×10^{-7} | 3.309×10^{-3} | 0.955 7 |
| B | 1 | 3.828×10^{-3} | 3.828×10^{-3} | 101.33 | <0.000 1 |
| C | 1 | 2.245×10^{-3} | 2.245×10^{-3} | 59.41 | 0.000 1 |
| AB | 1 | 9.000×10^{-6} | 9.000×10^{-6} | 0.24 | 0.640 6 |
| AC | 1 | 7.023×10^{-4} | 7.023×10^{-4} | 18.59 | 0.003 5 |
| BC | 1 | 1.103×10^{-4} | 1.103×10^{-4} | 2.92 | 0.131 3 |
| A ² | 1 | 3.006×10^{-4} | 3.006×10^{-4} | 7.96 | 0.025 7 |
| B ² | 1 | 2.415×10^{-3} | 2.415×10^{-3} | 63.93 | <0.000 1 |
| C ² | 1 | 6.791×10^{-4} | 6.691×10^{-4} | 17.98 | 0.003 8 |
| 残差 | 7 | 2.644×10^{-4} | 3.778×10^{-5} | | |
| 失拟项 | 3 | 2.072×10^{-5} | 6.908×10^{-5} | 4.83 | 0.081 1 |
| 纯误差 | 4 | 5.720×10^{-4} | 1.430×10^{-5} | | |
| 总离差 | 16 | 0.011 | | | |

表 6 果胶保留量的试验结果方差分析

| 方差来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------|-----|------------------------|------------------------|-------|---------|
| 模型 | 9 | 1.733×10^{-4} | 1.925×10^{-6} | 15.32 | 0.000 8 |
| A | 1 | 3.125×10^{-8} | 3.125×10^{-6} | 0.025 | 0.879 2 |
| B | 1 | 7.813×10^{-5} | 7.813×10^{-5} | 62.14 | 0.000 1 |
| C | 1 | 2.850×10^{-5} | 2.850×10^{-6} | 22.67 | 0.002 1 |
| AB | 1 | 5.625×10^{-7} | 5.625×10^{-7} | 0.45 | 0.525 0 |
| AC | 1 | 7.290×10^{-6} | 7.290×10^{-7} | 5.80 | 0.046 9 |
| BC | 1 | 4.622×10^{-6} | 4.622×10^{-7} | 3.68 | 0.096 7 |
| A ² | 1 | 1.342×10^{-5} | 1.342×10^{-6} | 10.67 | 0.013 7 |
| B ² | 1 | 3.092×10^{-5} | 3.092×10^{-5} | 24.60 | 0.001 6 |
| C ² | 1 | 4.957×10^{-6} | 4.957×10^{-8} | 3.94 | 0.087 5 |
| 残差 | 7 | 8.800×10^{-6} | 1.257×10^{-7} | | |
| 失拟项 | 3 | 6.692×10^{-6} | 2.231×10^{-7} | 4.23 | 0.0986 |
| 纯误差 | 4 | 2.108×10^{-6} | 5.270×10^{-8} | | |
| 总离差 | 16 | 1.821×10^{-4} | | | |

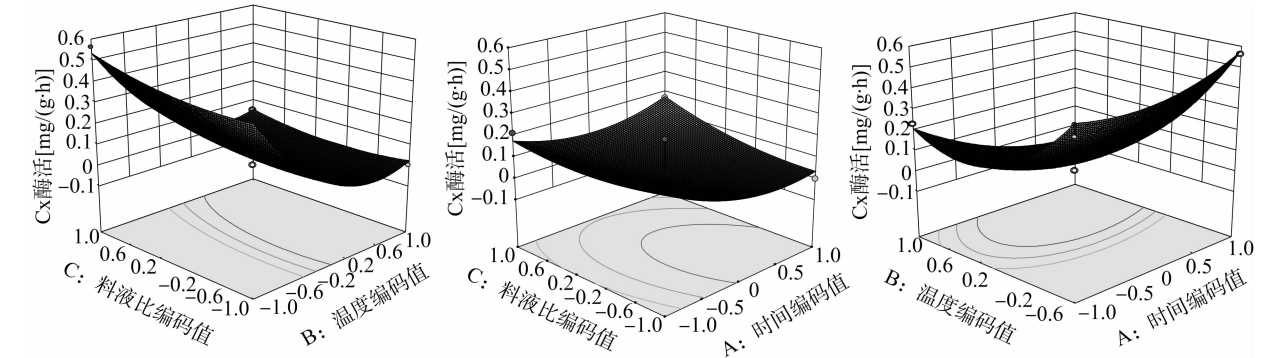


图4 交互作用对Cx活性的影响

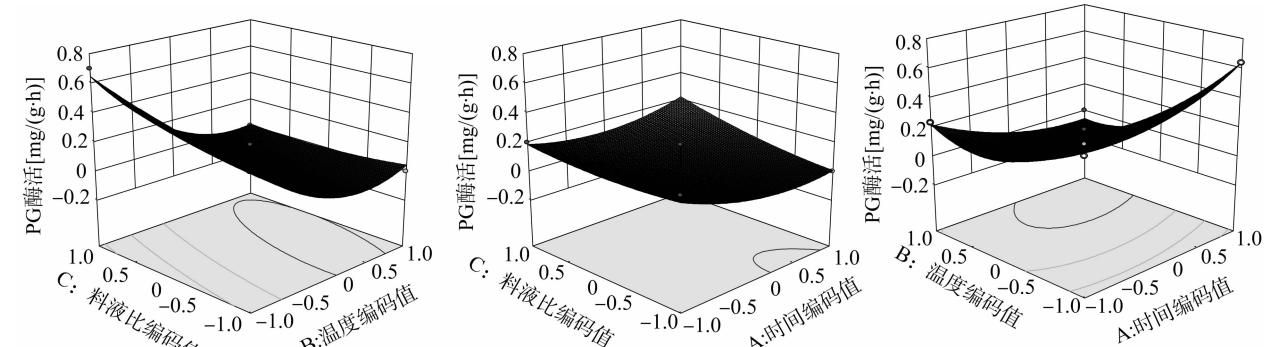


图5 交互作用对PG活性的影响

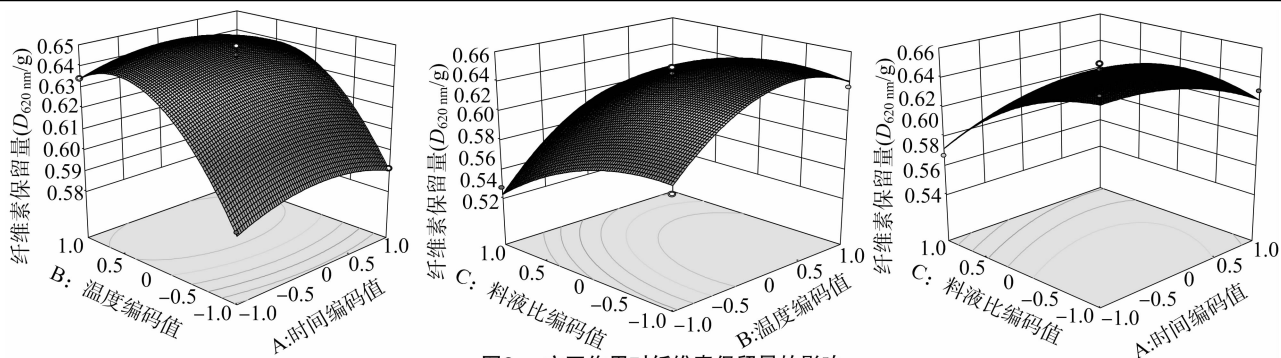


图6 交互作用对纤维素保留量的影响

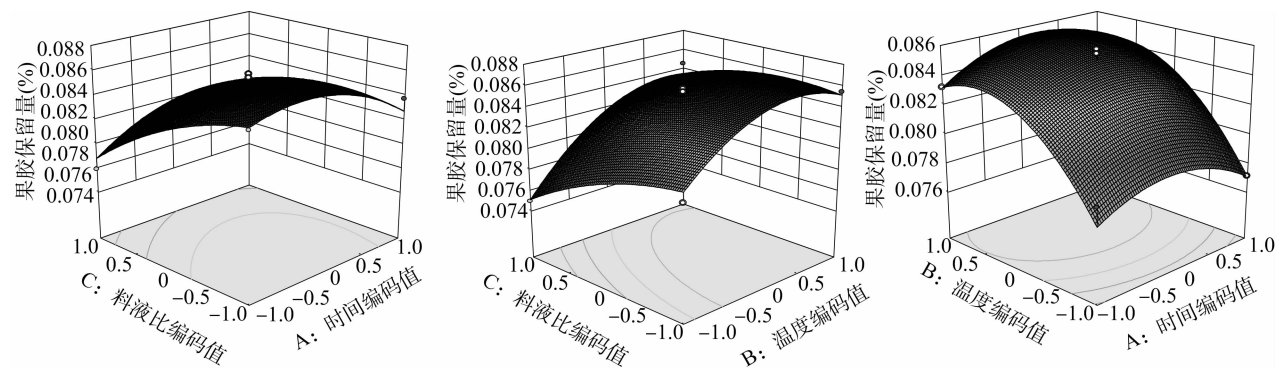


图7 交互作用对果胶保留量的影响

鞍马形曲面,无极值存在,从经济角度考虑,响应面 0 点水平的处理条件较为合适。

通过等高线图可见,热处理时间和热处理温度 2 个因素的交互作用对 Cx 酶和 PG 酶活性影响显著,热处理时间和料液比 2 个因素的交互作用对纤维素和果胶保留量影响显著;从响应面图可见,各因素水平过高或过低,对考察指标均有不利影响,处理温度高、处理时间长能够很好地将酶灭活,但处理温度升到 95 ℃,其果胶和纤维素保留量有下降的趋势(图 4 至图 7),这可能是高温使果胶和纤维素发生热分解,而时间越长溶出量越大,从而导致保留量下降。

2.2.3 反应条件优化及模型验证 通过数学模型及响应面分析得出,枣热处理的最佳工艺条件为:处理时间 3.80 min、处理温度 92.12 ℃、料液比 27.42 g/L,此条件下 PG 酶和 Cx 酶被灭活,纤维素和果胶保留量分别为 0.654 $D_{620\text{ nm/g}}$ 、0.086 4%。为实际操作方便,将热处理条件调整为:处理时间 4 min、处理温度 93 ℃、料液比 27 g/L,经 5 次平行试验发现,此条件下 Cx 酶和 PG 酶被完全灭活,纤维素和果胶保留量分别为 0.647 $D_{620\text{ nm/g}}$ 、0.085 9%,与预测值相差较小。

3 结论

试验利用 Design-Expert 8.0.5 b 软件设计响应面,优化热激处理工艺条件,并进行试验验证,得到枣最佳提取工艺条件为:处理时间 4 min、处理温度 93 ℃、料液比 27 g/L,此条件下 Cx 酶和 PG 酶被完全灭活,纤维素和果胶保留量分别为

0.647 $D_{620\text{ nm/g}}$ 、0.085 9%,这可为相关生产加工提供理论参考和借鉴。

参考文献:

- [1] 王 军,张宝善,陈锦屏. 红枣营养成分及其功能的研究[J]. 食品研究与开发,2003,24(2):68-72.
- [2] 郭时印,谭兴和,李清明,等. 热激处理对柰李抗冷性及其内源激素含量的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2006(5):508-512.
- [3] 傅茂润,陈庆敏,杜金华. 二氧化氯气体(ClO_2)处理对葡萄内源激素含量的影响[J]. 食品科学,2006(6):227-230.
- [4] 寇莉萍. 热处理对轻度加工葡萄保鲜效应及机理的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [5] Pesis E, Marinansky R, Zauberman G, et al. Reduction of chilling injury symptoms of stored avocado fruit by prestorage treatment with high nitrogen atmosphere[J]. Acta Horticulturae, 1993, 343: 251-255.
- [6] 曹建康,姜微波,赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007:79-80.
- [7] 于 宁,韦玉龙,许铭强,等. 哈密大枣在干制过程中几种酶及果胶和纤维素变化的研究[J]. 新疆农业科学,2014(5):846-854.
- [8] 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,2000.
- [9] 田 辉. 连续逆流法提取橙皮果胶及其动力学研究[D]. 成都:西华大学,2007.