

响应面法优化菠萝皮渣酵素的发酵工艺

南竹¹, 曹博恒²

(1. 锦州医科大学医疗学院形态实验中心, 辽宁锦州 121001; 2. 锦州医科大学医疗学院, 辽宁锦州 121001)

摘要 [目的] 利用乳酸菌发酵菠萝皮渣制备菠萝皮渣酵素。[方法] 以蛋白酶活性为指标, 运用 Box-Behnken Design 8.0.5v 响应面法优化制作菠萝皮渣酵素的工艺参数。[结果] 菠萝皮渣酵素制备的最佳工艺条件为发酵温度 23 ℃, 酵母菌接种量 0.3%, 发酵时间 16.5 h。按上述工艺制得的菠萝皮渣酵素颜色均匀, 酸甜适口并伴有发酵香味, 有光泽。[结论] 研究可为菠萝副产物的综合开发利用提供理论依据。

关键词 菠萝皮渣; 酵素; 响应面法; 发酵

中图分类号 TS255 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)20-0098-03

Optimization of Fermentation Process of Pineapple Peel by Response Surface Methodology

NAN Zhu¹, CAO Bo-heng² (1. Experiment Center of Medical College, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001; 2. Medical College, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001)

Abstract [Objective] Preparation of pineapple peel enzyme by fermentation of pineapple peel with lactic acid bacteria. [Method] The process parameters of pineapple peel were optimized by Box-Behnken Design 8.0.5v response surface method using protease activity as an index. [Result] The optimum conditions were as follows: the fermentation temperature was 23 ℃, the inoculation amount of yeast was 0.3%, the fermentation time was 16.5 h. According to the above process made of pineapple skin residue enzyme color uniform, sweet and sour taste and accompanied by fermentation fragrance, shiny. [Conclusion] The study can provide a theoretical basis for the comprehensive utilization of pineapple by-products.

Key words Pineapple peel; Enzyme; Response surface method; Fermentation

菠萝皮渣是菠萝鲜食或生产加工后的副产物, 约占全果重量的 50%。研究显示, 菠萝皮渣中的营养成分比例与果肉相差并不多^[1]。目前菠萝生产过程中产生的皮渣多被废弃, 不仅污染环境, 同时浪费了大量的生物资源。如果对菠萝皮渣进一步加工制成菠萝皮渣酵素, 它的经济价值会大大提高, 并且可为菠萝副产物的综合利用开辟新的途径。

酵素又称作酶, 是一种具有催化作用的大分子物质, 深受日本及我国台湾地区人民喜爱的一种植物功能食品。酵素中含有丰富的矿物质、维生素、低聚糖、多酚、黄酮、酶和次生代谢产物等营养成分, 具有美白抗氧化、抗菌消炎、润肠通便、解酒护肝、增强机体免疫力、修复机体损伤等保健功能^[2-5]。但目前国内关于菠萝酵素的介绍和研究并不多见。笔者以加工生产后的废弃物菠萝皮渣为原料, 利用酵母菌发酵制备菠萝皮渣酵素, 探究制备的工艺条件, 为菠萝的副产物综合利用以及以后的规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与主要试剂。菠萝皮渣, 购置于农贸市场, 低温保存; 果酒专用酵母, 安琪酵母股份有限公司; 乳酸菌, 锦州医科大学医疗学院形态实验中心。

1.1.2 仪器设备。CR21G 高速冷冻离心机, 日本日立公司; 泰光 906200 手持式折光仪, 河北润联科技开发有限公司; TU-1810 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; HZP-250 型全温振荡培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 血球计数板, 上海市求精生化试剂仪器有限公司; 真空冷冻干燥机, 沈阳航天新阳速冻设备制造有限公司。

1.2 工艺流程 菠萝皮渣 → 酶解 → 灭菌 → 接种 ^{+ 酵母菌} → 发酵 → 浓缩 → 真空冷冻干燥 → 菠萝皮渣酵素 → 包装。

1.3 操作要点

1.3.1 酶解。将菠萝皮渣用果胶酶及纤维素酶进行酶解, 水解后生成了便于吸收和利用的小分子糖类^[6-7]。酶解工艺条件如下: pH 4.5, 料液比 1:5 (g: mL), 温度为 55 ℃, 酶解时间 160 min。加酶量为纤维素加酶量 1.5%, 果胶酶加酶量 1.0%。菠萝皮渣酶解率为 63.50%, 可溶性固形物含量为 6.23%。

1.3.2 酵母菌的活化和培养。用 0.5 mL 的生理盐水溶解酵母菌粉, 使菌体溶解成悬浮液状态, 然后将菌液在 YPD 培养基上进行涂布, 在 30 ℃ 恒温培养箱内培养 2~3 d。菌种经过冷冻干燥后, 生长延迟期较长, 故需经过 2 次继代培养, 菌液待用^[8]。

1.3.3 发酵液的制备。将酶解液浓缩至可溶性固形物含量为 25%^[9], 适量补充营养物质。

1.3.4 接种和发酵。设置温度 26 ℃, pH 5.0 条件下, 接种 0.3% 酵母菌到发酵液, 酵母菌初始活菌数为 3.28×10^5 CFU/mL 左右, 发酵 20 h。最后保持温度在 18~20 ℃, 静置 24 h, 进行后发酵, 使发酵液产香^[10]。

1.3.5 真空冷冻干燥。将发酵液可溶性固形物含量浓缩到 45%, 通过真空冷冻干燥得到水分含量小于 4% 的菠萝皮渣酵素粉。在冷冻温度为 -20 ℃, 真空度为 10~20 Pa, 冷阱温度为 -45 ℃ 的条件下进行真空冷冻干燥^[11]。

1.4 酵母菌发酵单因素试验

1.4.1 发酵温度的确定。发酵温度的高低会直接影响酵母菌的生长繁殖和发酵产物的生成。菠萝皮渣发酵液要充分溶氧, 并设置酵母菌接种量 0.3%, 分别在 20、22、24、26、28 ℃ 下进行发酵, 发酵时间 20 h。发酵结束后测定蛋白酶活

性,以确定最适的酵母菌发酵温度。

1.4.2 起始 pH 的确定。菠萝发酵液自身的 pH 在 4.6 左右,试验用到的葡萄酒酵母在微酸性环境下适宜生长。菠萝皮渣发酵液在充分溶氧的条件下,控制发酵温度为 24 ℃,酵母菌接种量为 0.3%,用 CaCO_3 调节发酵液酸度,使 pH 分别在 4.8、5.0、5.2、5.4、5.6 条件下进行发酵,发酵时间为 20 h。发酵结束后测定蛋白酶活性,以确定最适的发酵起始 pH。

1.4.3 接种量的确定。发酵液发酵的速度会随着接种量的不同而变化,并进一步影响了发酵产物的品质。菠萝皮渣发酵液在充分溶氧的条件下,控制发酵温度为 24 ℃,pH 为 5.2,分别接种 0.20%、0.25%、0.30%、0.35%、0.40% 酵母菌进行发酵,发酵时间为 20 h。发酵结束后测定蛋白酶活性,以确定最适的酵母菌接种量。

1.4.4 发酵时间的确定。菠萝皮渣发酵液在充分溶氧的条件下,控制发酵温度为 24 ℃,酵母菌接种量为 0.3%,pH 为 5.2,发酵时间分别设置为 10、15、20、25、30 h。发酵结束后测定蛋白酶活性,以确定最适的发酵时间。

1.5 响应面试验 在单因素试验基础上,根据 Box - Behnken 试验设计原理,选取对酵母菌发酵有显著影响的 3 个因素,发酵温度(A)、酵母菌接种量(B)和发酵时间(C)为自变量,以蛋白酶活性为响应值,设计 3 因素 3 水平试验,确定最佳参数进行响应面设计(表 1)。

表 1 菠萝皮渣酵素发酵工艺响应面试验因素与水平

Table 1 Factor and level of response surface of enzymatic fermentation process of pineapple peel

水平 Level	因素 Factor		
	发酵温度(A) Fermentation temperature//℃	酵母菌接种量(B) Yeast inoculum amount//%	发酵时间(C) Fermentation time//h
-1	22	0.20	15
0	24	0.25	20
1	26	0.30	25

2 结果与分析

2.1 酵母菌发酵单因素试验

2.1.1 发酵温度对蛋白酶活性的影响。由图 1 可知,发酵温度在 20~24 ℃ 范围内的时候,蛋白酶的活性随着温度的升高而升高,在 24 ℃ 时达到最大值。当温度超过 24 ℃ 后,蛋白酶的活性明显降低。所以选择发酵温度在 24 ℃ 最适宜。

2.1.2 起始 pH 对蛋白酶活性的影响。由图 2 可知,随着 pH 的升高,蛋白酶的活性逐渐升高,当 pH 超过 5.2 后,随着 pH 的升高,蛋白酶活性逐渐降低。可能是由于溶液趋于中性,抑制了酵母菌的发酵作用。起始 pH 为 5.2 时,蛋白酶活性达到最大值 2 535.70 U/g,所以确定该酵母的最适起始 pH 为 5.2。

2.1.3 接种量对蛋白酶活性的影响。由图 3 可知,酵母菌的接种量在 0.20%~0.25% 时,蛋白酶的活性迅速升高,在 0.25% 时达到最高点,蛋白酶的活性为 2 582.30 U/g。当接种量超过 0.25% 后,蛋白酶活性基本保持不变并略有降低。

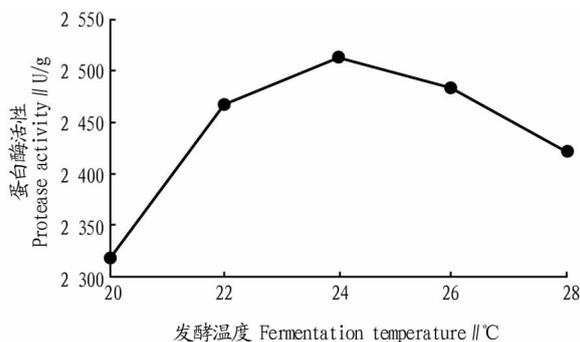


图 1 发酵温度对蛋白酶活性的影响

Fig. 1 Effect of fermentation temperature on protease activity

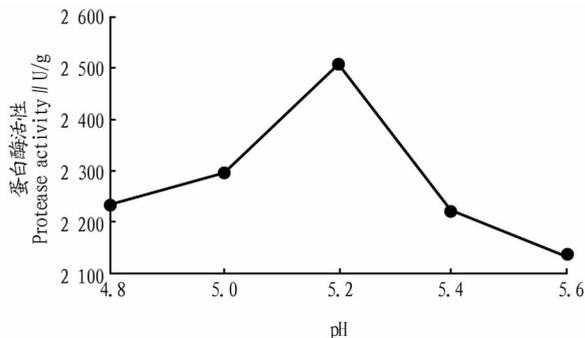


图 2 起始 pH 对蛋白酶活性的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on protease activity

综合考虑实际生产及经济等因素,选择酵母菌的最适宜接种量为 0.25%。

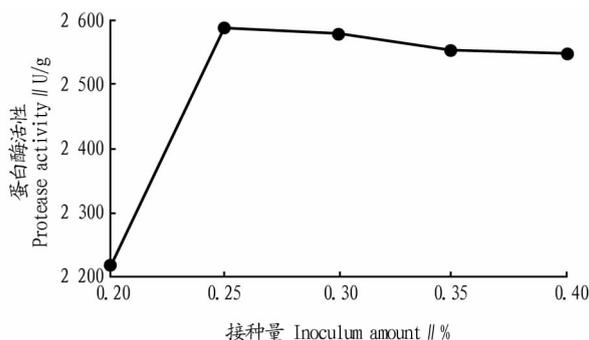


图 3 接种量对蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effect of inoculum amount on protease activity

2.1.4 发酵时间对蛋白酶活性的影响。由图 4 可知,蛋白酶的活性随着发酵时间的延长而增加,但到 15 h 后,蛋白酶活性增长的速度并不明显,所以将发酵时间选在 15 h 比较适宜。

2.2 酵母菌发酵工艺条件优化

2.2.1 响应面试验结果。该试验采用 Design - Expert 8.0.5v 进行响应面设计,获得的结果详见表 2,对表 2 进行回归分析,得到回归方程: $Y = 521.18 - 34.68A + 7.53B - 83.03C + 18.83AB + 34.72AC + 15.81BC - 60.48A^2 - 64.39B^2 - 70.90C^2$ 。

2.2.2 响应面分析与方差分析结果。通过对模型进行方差分析和显著性检验来验证回归方程的有效性。结果得出: $F_{模型} = 9.04, P_{模型} = 0.004 2^{**}; F_A = 5.90, P_A = 0.045 5^*$; $F_B = 0.28, P_B = 0.614 3; F_C = 33.80, P_C = 0.000 7^{**}; F_{AB} =$

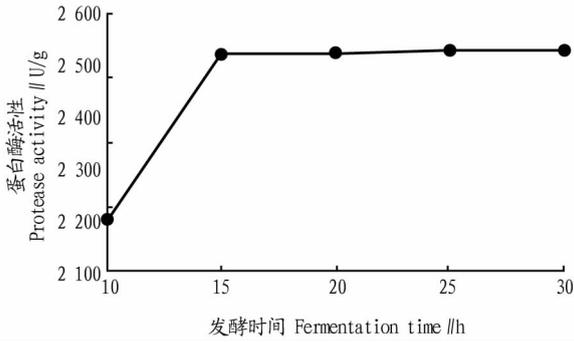


图4 发酵时间对蛋白酶活性的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on protease activity

0.87, $P_{AB} = 0.3822$; $F_{AC} = 2.96$, $P_{AC} = 0.1293$; $F_{BC} = 0.61$, $P_{BC} = 0.4594$; $F_{A^2} = 9.44$, $P_{A^2} = 0.0180$; $F_{B^2} = 10.70$, $P_{B^2} = 0.0137^*$; $F_{C^2} = 12.97$, $P_{C^2} = 0.0087^{**}$; $F_{失拟} = 4.37$, $P_{失拟} = 0.0942$ 。模型 $P < 0.01$, 说明模型极其显著, 失拟项为 0.0942, 说明不显著。模型中 R^2 的值达到 0.9208, R^2_{adj} 为 0.8190, 则说明模型具有高度拟合性, 可以应用此模型来优化菠萝皮渣酵素制备的工艺条件。

表2 菠萝皮渣酵素发酵工艺响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface design and result of enzymatic fermentation process of pineapple peel

试验号 Test No.	因素 Factor			蛋白酶活性(Y) Protease activity U/g
	发酵温度(A) Fermentation temperature	酵母菌接 种量(B) Yeast inoculum amount	发酵时间(C) Fermentation time	
1	1	1	0	2 355.64
2	0	0	0	2 516.08
3	1	0	1	2 311.68
4	1	-1	0	2 368.24
5	0	0	0	2 561.44
6	0	1	1	2 353.68
7	0	0	0	2 489.48
8	-1	0	-1	2 537.36
9	0	-1	-1	2 449.72
10	0	0	0	2 516.92
11	-1	-1	0	2 474.64
12	0	0	0	2 521.96
13	0	-1	1	2 241.68
14	0	1	-1	2 498.48
15	-1	1	0	2 386.72
16	1	0	-1	2 397.92
17	-1	0	1	2 312.24

图5、6、7分别表示的是两两因素的交互作用对蛋白酶活性的影响。如图5所示,随着发酵温度的升高及酵母菌接种量的增大,蛋白酶活性都是先升高后降低,两者交互作用使蛋白酶的活性达到最大值为2485.30 U/g;如图6所示,发酵温度与发酵时间两者交互作用的最大值达2452.70 U/g;由图7可知,酵母菌接种量和发酵时间对蛋白酶活性的影响都较大,两者交互影响蛋白酶活性的最大值达2558.20 U/g。通过软件分析,得到菠萝皮渣酵素发酵的最佳工艺是发酵温

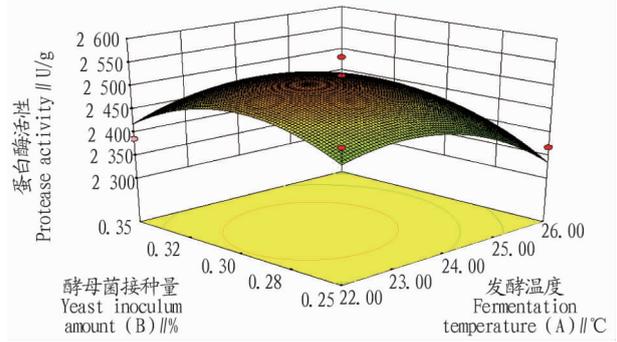


图5 发酵温度与酵母菌接种量的交互作用对蛋白酶活性影响的响应曲面

Fig. 5 Response surface of the interaction between fermentation temperature and yeast inoculum amount on protease activity

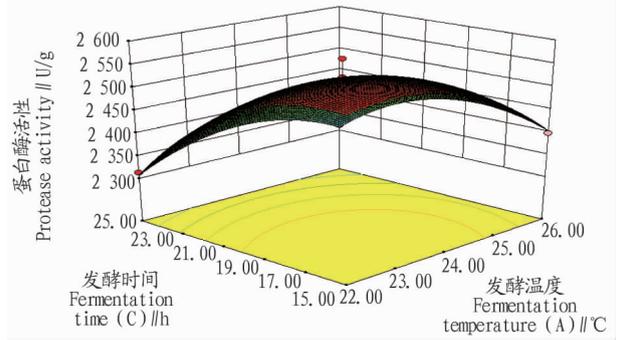


图6 发酵温度与发酵时间的交互作用对蛋白酶活性影响的响应曲面

Fig. 6 Response surface of the interaction between fermentation temperature and fermentation time on protease activity

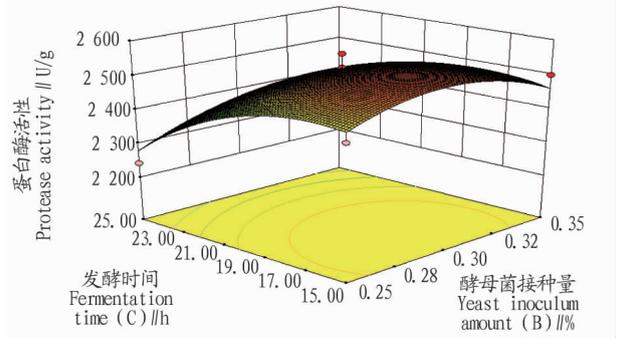
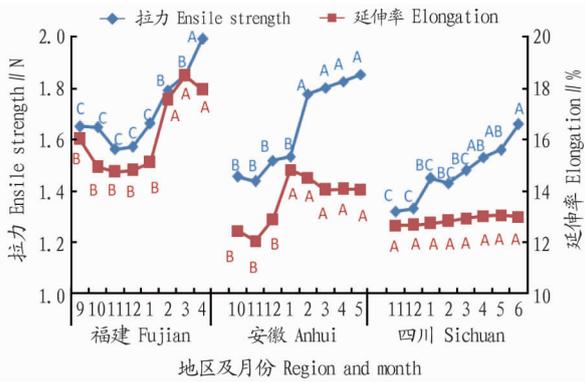


图7 酵母菌接种量与发酵时间的交互作用对蛋白酶活性影响的响应曲面

Fig. 7 Response surface of the interaction between yeast inoculum amount and fermentation time on protease activity

度 22.98 ℃, 酵母菌接种量 0.29%, 发酵时间 16.39 h, 考虑到实际生产的需要及可操作性, 修正其工艺条件为发酵温度为 23 ℃, 酵母菌接种量为 0.3%, 发酵时间为 16.5 h, 重复试验 3 次, 得到蛋白酶活性分别为 2 549.70、2 543.60 和 2 547.10 U/g, 其平均值为 2 546.80 U/g, 与模型的预测值 2 559.60 U/g 较为接近, 说明该模型对菠萝皮渣酵素制备的预测具有实际意义。

2.3 真空冷冻干燥制备菠萝皮渣酵素产品质量指标 试验 (下转第 103 页)



注:图中同一地区不同月份间不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著

Note: In the same region, the different capital letters in different months indicate significant differences at 0.01 level

图 1 不同地区初烤烟叶自然醇化过程中拉力和延伸率变化
Fig. 1 Change of the ensile strength and elongation of flue-cured tobacco leaves during natural alcoholization process in different region

烟叶厚度、叶质重总体上呈下降趋势;平衡含水率呈上升趋势;拉力和延伸率的变化趋势差异较大。福建 C2F 拉力呈先降低后升高趋势,安徽和四川 C2F 拉力呈现升高趋势;福建和安徽 C2F 延伸率总体上呈现升高趋势,但发生转折点的月间差异较大;安徽 C2F 烟叶延伸率变化较为平缓。

当前多数工业企业按照原料品质特点和加工特性进行配方模块设计^[5],这就需要等待配方原料所有单等级烟叶到齐后才能开始安排模块加工,故在此之前,原料仓库库存压力巨大。而各配方原料到齐的时间相对集中,这就需要科学合理地安排加工顺序。从厚度、叶质重、平衡含水率、拉力和延伸率等物理特性变化规律综合考虑,福建、安徽和湖南烟叶适宜加工时间分别为 3 月份、3 月份和 5 月份之前。在储

存过程中发现,福建、安徽烟叶在 4 月份、四川烟叶在 5 月份发生了虫情霉变,霉菌和幼虫可能早已发展。华环公司所处地理位置属于北亚热带湿润季风气候,冬温夏热、四季分明、降水充沛。气候是影响虫情霉变发展和烟叶质量变化程度的重要因素。因此,综合气候因素、物理特性变化规律和模块加工实际,福建、安徽和四川烟叶适宜打叶复烤加工时间为 3 月份、3 月份和 4 月份之前。

该试验从烟叶物理特性方面确定了打叶复烤加工时间,但在储存过程中烟叶的化学成分、感官质量、外观质量也发生了巨大变化。如总糖、还原糖先降低后升高,烟碱、总氮逐渐降低;致香成分先增加后减少;颜色逐渐加深等。因此,分析初烤烟叶自然醇化过程中其他质量变化规律,可以为科学存储、合理安排打叶复烤时间提供更为全面的参考。

参考文献

- [1] 张清明,张瀛,林建麒,等. 不同品种初烤烟叶短期醇化过程中质体色素和化学成分的变化[J]. 中国烟草科学,2014,35(2):55-58.
- [2] 刘红光,胡玲,颜克亮,等. 初烤烟叶自然醇化过程中内在化学成分变化研究[J]. 江西农业学报,2015,27(8):71-75.
- [3] 付秋娟,张忠锋,窦家宇,等. 烤烟物理特性与常规化学成分及外观质量的关系[J]. 中国烟草科学,2014,35(1):117-122.
- [4] 陈家东,陶智麟,刘全喜. 打叶复烤加工过程造碎及碎烟处理工艺研究[J]. 烟草科技,2000(4):4-7.
- [5] 李晓,刘文锋,张磁元. 河南烤烟烟叶叶片厚度的研究[J]. 农产品加工,2008(3):16-17,28.
- [6] 王卫康.《烤烟》国标中分级因素的概念及把握[J]. 烟草科技,2004(5):44-48.
- [7] 蔡宪杰,王信民,尹启生. 成熟度与烟叶质量的量化关系研究[J]. 中国烟草学报,2005,11(4):42-46.
- [8] 阎克玉,刘江豫,徐传贵. 烟国家标准(40 级)烟叶平衡含水率测定报告[J]. 烟草科技,1993(2):16-19.
- [9] 马林,张相辉,刘强,等. 烟丝中糖组分含量对平衡含水率的影响[J]. 中国烟草学报,2010,16(6):10-13.
- [10] 张玉海,邓国栋,冯春珍,等. 含水率对烟叶力学特性的影响[J]. 烟草科技,2013(1):10-12,24.
- [11] 刘丽,张晓兵,许自成,等. 烤烟拉力与主要化学成分的关系研究[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版),2007,22(4):1-3,45.

(上接第 100 页)

制得的产品质量各指标如下:①色泽:颜色均一的淡黄色。②气味:菠萝特有的酸甜果香味及发酵香味。③酸度:酸甜适口。④组织形态:松散无结块。

3 结论

该试验选用菠萝加工后的废弃皮渣为原料,利用乳酸菌进行发酵制备酵素,在单因素试验的基础上,根据 Box - Behnken 响应面设计进行试验并分析数据,再结合实际操作情况,获得制备菠萝皮渣酵素的工艺条件为发酵温度 23 ℃,酵母菌接种量 0.3%,发酵时间 16.5 h,在此条件下,制得的菠萝皮渣酵素颜色均匀,酸甜适口并伴有发酵香味,蛋白酶活性为 2 546.80 U/g。该试验结果可以为规模化生产及功能性产品的开发提供理论依据,其理化性质及稳定性有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨瑞,翟海瑞,杨劲松. 菠萝皮渣生产虾青素的发酵条件研究[J]. 食品工业科技,2011,32(9):261-266.

- [2] 罗建平,徐学玲,潘利华,等. 菠萝皮渣多糖的提取与体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2009,30(18):172-175.
- [3] 蒋增良,毛建卫,黄俊,等. 葡萄酵素在天然发酵过程中体外抗氧化性能的变化[J]. 中国食品学报,2014,14(10):29-34.
- [4] 赵金凤,曲佳乐,皮子凤,等. 植物酵素润肠通便保健功能研究[J]. 食品与发酵科技,2012,48(3):54-56.
- [5] 曲佳乐,赵金凤,皮子凤,等. 植物酵素解酒护肝保健功能研究[J]. 食品科技,2013,38(9):51-54.
- [6] 赵金凤,宿秀芹,曲佳乐,等. 散东酵素对脾淋巴细胞增殖作用的影响[J]. 食品与发酵科技,2014,50(3):50-52.
- [7] 蔡爽. 人参术苓酵素的制备及改善肠胃功能研究[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [8] 董银卯,何聪芬,王领,等. 火龙果酵素生物活性的初步研究[J]. 食品科技,2009,34(3):192-196.
- [9] 杨培青,李斌,颜廷才,等. 猕猴桃渣酵素发酵工艺优化[J]. 食品科学,2016,37(23):205-210.
- [10] WANG S Y, CHEN H J, EHLENFELDT M K. Variation in antioxidant enzyme activities and nonenzyme components among cultivars of rabbiteye blueberries (*Vaccinium ashei* Reade) and *V. ashei* derivatives[J]. Food chemistry, 2011, 129(1):13-20.
- [11] 李加兴,孙金玉,陈双平,等. 猕猴桃果醋发酵工艺优化及质量分析[J]. 食品科学,2011,32(24):306-310.