

响应面法优化桔皮酵素的发酵工艺

孙惠佳¹, 郝子娜², 刘富来¹

¹佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东 佛山

²锦州医科大学食品科学与工程学院, 辽宁 锦州

Email: sunhuijia0000@163.com

收稿日期: 2020年12月7日; 录用日期: 2021年2月13日; 发布日期: 2021年2月23日

摘要

采用新鲜柑橘桔皮为原料制备桔皮酵素, 发酵所使用的真菌为酵母菌。以以下四种因素进行单因素试验: 发酵时间、初始pH值、酵母接种量、加糖量, 并以其结果为基础, 以SOD活力为响应值进行实验, 确定最佳桔皮酵素发酵条件, 进行工艺优化。实验所得结果显示, 桔皮酵素的最优发酵工艺条件为: 发酵时间4 d, 初始pH 4, 酵母菌接种量0.2%, 加糖量18%。根据此条件所生产的产品品质优良, 此实验可为桔皮酵素的生产和加工提供依据和参考。

关键词

酵素, 响应面法, SOD活力

Orange Peel Enzyme by Response Surface Methodology

Huijia Sun¹, Zina Hao², Fulai Liu¹

¹School of Food Science and Engineering, Foshan University of Science and Technology, Foshan Guangdong

²School of Food Science and Engineering, Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

Email: sunhuijia0000@163.com

Received: Dec. 7th, 2020; accepted: Feb. 13th, 2021; published: Feb. 23rd, 2021

Abstract

Fresh orange peel was used as raw material to prepare orange peel enzyme, and the fungus used in fermentation was yeast. The single factor experiment was carried out with the following four factors: fermentation time, initial pH value, yeast inoculation amount and sugar amount. Based on

the results, the optimal fermentation conditions of orange peel enzyme were determined and the process was optimized. The results showed that the optimal fermentation conditions were as follows: fermentation time 4 D, initial pH 4, yeast inoculation 0.2%, sugar content 18%. According to this condition, the product quality is excellent. This experiment can provide basis and reference for the production, preparation and processing of orange peel enzyme.

Keywords

Ferment, Response Surface Method, SOD Activity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

柑桔又称为宽皮橘、松皮橘，古时称为黄甘。归类于芸香科，柑橘属，木本。原产于我国，主要种植于长江流域及江南。柑桔在我国已有 4000 余年的食用历史[1]。中国是全球柑橘生产种植的大国，柑橘种植面积居世界首位，年生产总量居世界第二位[2]。伴随着高产量的同时，桔皮所带来的浪费也不可小觑。桔皮作为新鲜食品的下脚料其用于加工的数量只占柑橘总产量的 20%左右，柑桔中含有丰富的水分、纤维素和木质素，这些都是人体所必需的，另外还含有丰富的营养保健成分如：香精油、色素、果胶、橙皮甙等[3]。

响应面法可以有效地用高效数理统计方法建立回归模型[4]，评价多种变量，并确定最优条件，提供理想的结果[5]，此方法成功地克服了传统方法所具有的局限性[6]。

酵素为酶的旧称[7]。但当今，酵素已经不仅仅用来形容酶，还形容了其及其产酶微生物和有关调节因子以及之间的相互作用[8]。自从 20 世纪以来利用一种或多种水果、蔬菜、食用菌、中草药为制作酵素的原料[9] [10]，酵素中所含的营养成分，其保健功能主要来源于原料本身所含的营养成分和提取物中所含的黄酮类、植物色素、超氧化物歧化酶(SOD)等活性成分[11]，超氧化物歧化酶(SOD)也为评价酵素质量的最重要指标[12]。

本试验使用酵母菌作为发酵剂发酵新鲜柑桔桔皮制备桔皮酵素。根据不同发酵条件所测得的 SOD 活力，得到最佳配比，对桔皮酵素进行工艺优化。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

柑桔(砂糖桔)选购于大润发超市；安琪高活性干酵母粉 安琪酵母股份有限公司；柠檬 选购于大润发超市；红糖 辽宁省帝华味精食品有限公司；三羟甲基氨基甲(Tris)；HXSJ-021154 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)；盐酸；邻苯三酚(焦性没食子酸)；硝酸银；硝酸；乙酸锌；硫酸铁铵；亚铁氰化钾；硫氰酸钾；氯化钠；95%乙醇。以上等级皆为分析纯，杰辉生物科技发展有限公司。

2.2. 仪器与设备

TG16MW 高速台式离心机：湖南赫西仪器装备有限公司；YXQ-30SII 立式高压蒸汽灭菌器：上海博

迅实业有限公司医疗设备厂；紫外可见分光光度计：天津市特纳科学仪器有限公司；WZS 手持式折光仪：上海仪电物理光学仪器有限公司；MIR-254 恒温培养箱、HH-S 水浴锅：上海精密科学仪器有限公司；XJA 微型粉碎机：北京北信科仪分析仪器有限公司；FA2004B 型电子天平：上海心仪仪器科技有限公司；WTTLAB 型移液枪：北京星越天成科技有限公司；PHSJ-3F 酸度计：赛科环保科技有限公司；SW-CJ-2F 超净工作台：深圳市惠士顿科技有限公司；486 恒温烘箱：北京东方大林科技有限公司；DK 电热恒温数显水浴锅：常州迈科诺仪器有限公司。

2.3. 试验方法

除了一些众所周知的英文缩写，如 IP、CPU、FDA，所有的英文缩写在文中第一次出现时都应该给出其全称。文章标题中尽量避免使用生僻的英文缩写。

2.3.1. 工艺流程

红糖→干燥
↓
桔皮→破碎→成分调整→杀菌→接种酵母菌→发酵→发酵液→SOD 活力测定。

2.3.2. 单因素及响应面试验

以发酵时间(3、4、5、6、7、8 天)、初始 pH (3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0)、酵母菌的接种量(0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%)、加糖量(12%、14%、16%、18%、20%、22%)为因素，在发酵时间 4 天、初始 pH4、0.15% 的酵母菌接种量、18% 的加糖量、27℃ 的温度下发酵，其余条件不变，测定其 SOD 活性，分别进行单因素试验。

Box-Behnken 响应面法优化桔皮酵素加工工艺[13]。基于单因素试验所得的数据，根据 Box-Behnken 实验的设计原理，SOD 活性被用作响应值，发酵时间、初始 pH 值、接种量和加糖度是四个因素，设计四因素三水平响应面。响应曲面实验的因素与水平见于表 1，以得到最适于桔皮酵素的发酵条件，使工艺得到优化。

Table 1. Box-Behnken response surface test factors and levels

表 1. Box-Behnken 响应面试验因素与水平

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
发酵时间(A)/d fermentation time	3	4	5
初始 pH (B) Initial pH value	3.5	4	4.5
接种量(C)% Inoculum amount	0.15	0.2	0.25
加糖量(D)% Additive amount of sugar	16	18	20

2.3.3. SOD 活力测定方法

采用改良的 Marklund 法对 SOD 活性进行测定。使用 SOD 标准品作为对照可以更准确地测定 SOD 活性[14]。当邻苯三酚处于碱性条件下会产生自动氧化，按照邻苯三酚自氧化被 SOD 抑制的能力得到 SOD 活性[15]。

2.4. 产品品质测定

2.4.1. 感官评定

酵素为发酵型食品，感官要求至关重要[16]。根据我国 GB12310-GB12316 对感官的要求，从酵素的外观、香气、滋味这三方面[17]，制作感官评定评分表，见表 2。

Table 2. Sensory evaluation score

表 2. 感官评定评分表

项目	权重	分数及评分标准		
		1~3	4~7	8~10
外观	30%	不符合产品应有色泽，浑浊，无光泽	合乎产品应有色泽，少量沉淀，稍有光泽	合乎产品应有色泽，无沉淀，有光泽
香气	30%	无果香，有异味	果香不足，轻微异味	果香宜人，无异味
滋味	40%	口感协调性差，有明显苦涩味	滋味协调，稍有苦涩味	舒适爽口，酸甜适宜

2.4.2. 表格

酒精度：依照我国《葡萄酒、果酒通用分析方法》，使用酒精计法测定酒精度。

氯化钠：按照我国 GB/T 12457-2008 所规定的测定方法，采用容量法测定样液的氯化钠含量。

菌落总数：依据标准 GB 4789.2-2016 所规范的平板计数法测定试样的菌落总数。

大肠菌群计数：采用国家标准 GB 4789.3-2016 所规定大肠菌群平板计数法测定大肠菌群数。

3. 结果与分析

3.1. 酵母菌发酵桔皮酵素单因素实验结果

3.1.1. 发酵时间对 SOD 活性的影响

桔皮酵素在 pH4 的初始值、0.15% 的酵母菌接种量、18% 的加糖量、27℃ 的发酵条件下，由图 1 可知，SOD 活力波动幅度较大，当发酵时间为 1~4 天时，SOD 活力上升较快，在 4 天时达到最高点 1226.35 U/ml，当大于 4 天小于 6 天时，活力下降，在 7 天与 8 天时有一个小范围波动。因而，当在发酵第 4 天时，SOD 活性最高。

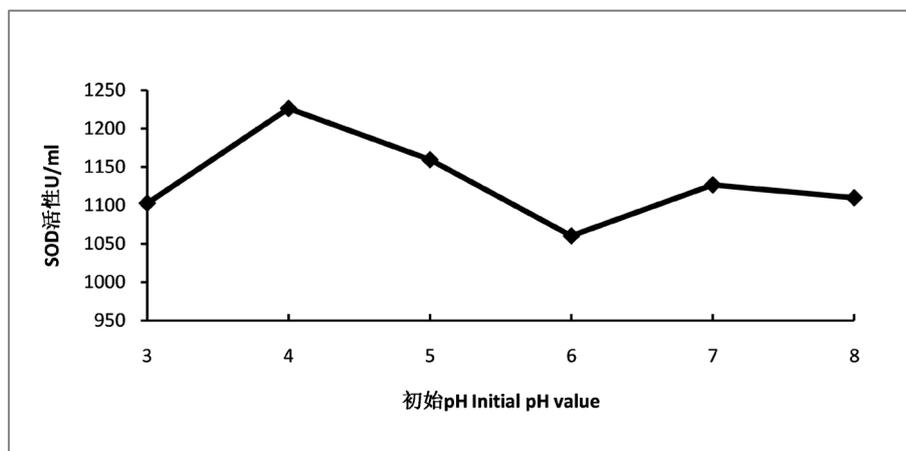


Figure 1. Effect of fermentation time on SOD activity

图 1. 发酵时间对 SOD 活性的影响

3.1.2. 初始 pH 值对 SOD 活性的影响

桔皮酵素在 4 天的发酵时间、0.15% 的酵母菌接种量、18% 的加糖量、27℃ 的温度下发酵，使用新鲜柠檬调节酸度，以 SOD 活力为评价指标，由图 2 可知，随着 pH 的逐步提升，SOD 活力也随之提高，在 pH4 时到达最高点，为 1224.63 U/ml，当初始 pH 大于 4 后 SOD 活性开始下降。因此可认定在此条件下最适初始 pH 为 4。

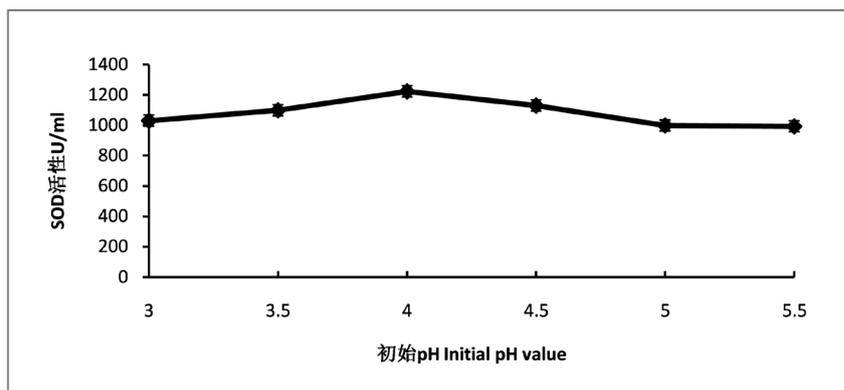


Figure 2. Effect of initial pH on SOD activity

图 2. 初始 pH 对 SOD 活性的影响

3.1.3. 接种量对 SOD 活性的影响

桔皮酵素在发酵时间 4 d、初始 pH 4、加糖量 18%、27℃ 条件下发酵，以 SOD 活力为评价指标，由图 3 可知，随着接种酵母菌量的增多，SOD 活力因此而升高，当酵母菌的接种量到达 0.20% 时，活性最高，达 1170.26 U/ml，当接种量超过 0.20%，SOD 活性开始逐步迟缓下降。因而可认定在此条件下最适酵母菌接种量为 0.20%。

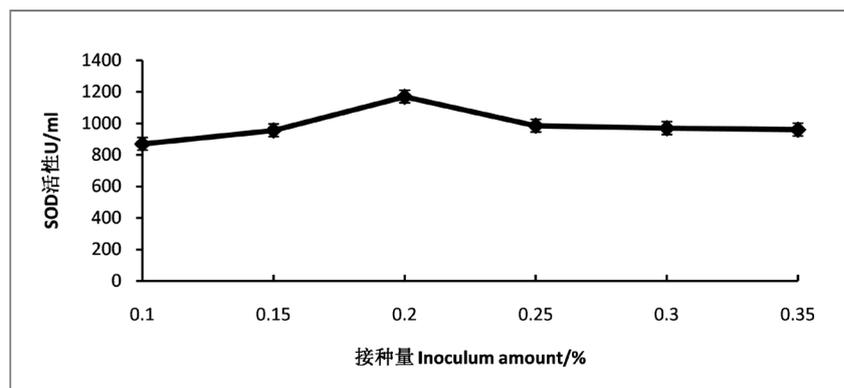


Figure 3. Effect of inoculation amount on SOD activity

图 3. 接种量对 SOD 活性的影响

3.1.4. 加糖量对 SOD 活性的影响

桔皮酵素在发酵时间 4 d、酵母菌接种量 0.15%、加糖量 18%、27℃ 的温度下进行发酵，以 SOD 活力为评价指标，由图 4 可知，当加糖量为范围 12%~18% 时，SOD 活力随加糖量上升而上升，加糖量为 18% 时 SOD 活力为 1175.63 U/ml，当加糖量大于 18% 时，SOD 活力逐渐降低。由此实验可认定，在此条件下，最优加糖量为 18%。

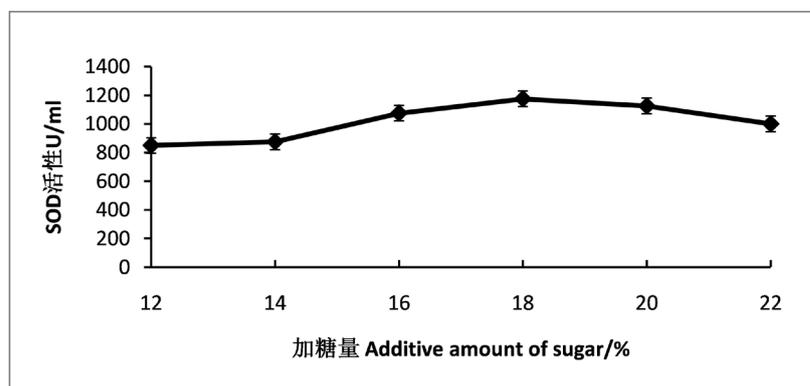


Figure 4. Effect of sugar content on SOD activity

图 4. 加糖量对 SOD 活性的影响

3.2. Box-Behnken 响应面试验结果及试验设计

基于单因素实验所得的结果，按照 Box-Behnken 的试验设计原理进行响应面试验。一般包括以下的几个步骤：试验设计、模型的构建与检验、最佳组合条件的优化及验证等[18]。响应值设定为 SOD 活性，四个因素分别为发酵时间、初始 pH、接种量、加糖量，对发酵工艺进行优化，制订科学的试验设计方案，结果见表 3。

Table 3. Response surface test design scheme and results

表 3. 响应面试验设计方案及结果

序号	A: 发酵时间	B: 初始 pH	C: 接种量	D: 加糖量	SOD 活力 U/ml
1	-1	-1	0	0	1153.65
2	0	-1	-1	0	1125.11
3	-1	0	-1	0	1128.58
4	-1	0	1	0	1136.61
5	0	0	1	-1	1163.45
6	0	0	-1	1	1133.87
7	-1	1	0	0	1157.07
8	-1	0	0	1	1159.11
9	0	1	-1	0	1126.79
10	0	1	0	-1	1137.26
11	1	1	0	0	1149.61
12	1	-1	0	0	1141.28
13	1	0	-1	0	1109.92
14	-1	0	0	-1	1125.98
15	0	0	0	0	1226.73
16	0	0	1	1	1149.43
17	0	-1	0	-1	1134.19
18	0	1	1	0	1128.15
19	0	0	-1	-1	1157.88
20	1	0	0	-1	1150.01

Continued

21	0	-1	1	0	1142.42
22	0	0	0	0	1226.57
23	0	0	0	0	1199.25
24	0	1	0	1	1163.78
25	0	-1	0	1	1157.31
26	0	0	0	0	1220.93
27	0	0	0	0	1223.26
28	1	0	1	0	1123.73
29	1	0	0	1	1134.27

3.2.1. 模型的构建与检验

基于此结果，运用 Design-Expert 11v 程序对表 3 实行模型构建，得到的多元二次回归方程，如下：

$$Y = 1219.348 - 4.35A + 0.7250B + 5.14C + 2.42D + 1.23AB + 1.44AC - 12.22AD - 3.99BC + 0.8500BD + 2.50CD - 42.17A^2 - 36.32B^2 - 47.66C^2 - 30.08D^2$$

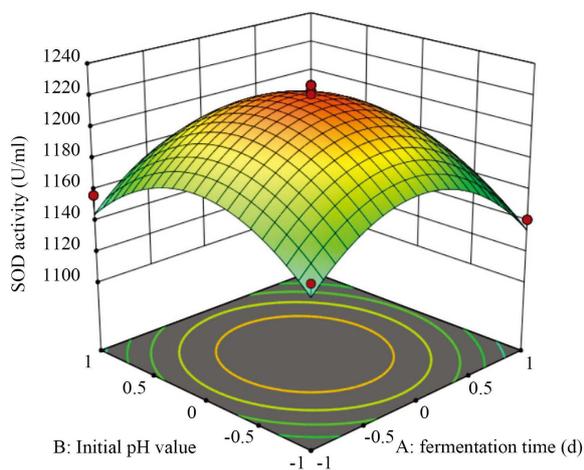
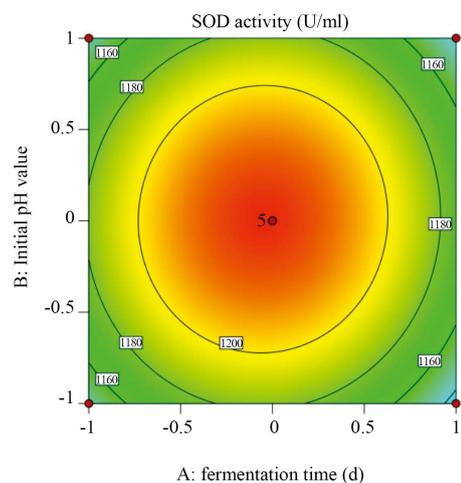
进行方差分析及其显著性检验用于模型的检验，结果见于表 4。

Table 4. Analysis of variance

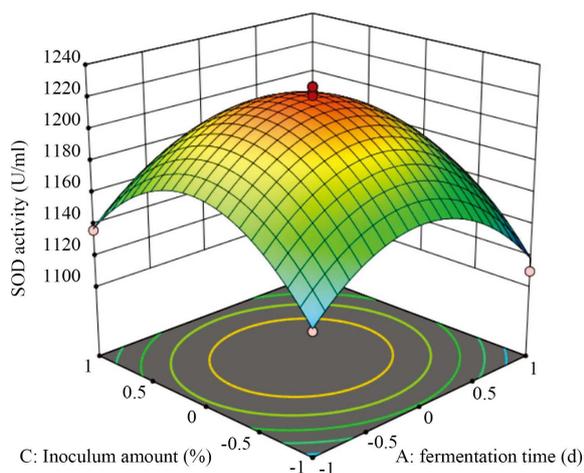
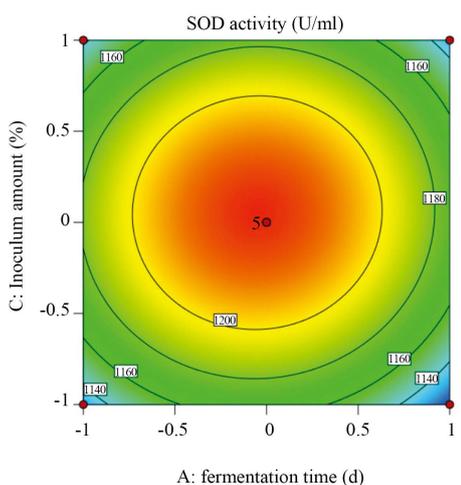
表 4. 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	27,949.37	14	1996.38	9.92	<0.0001
A-发酵时间	226.90	1	226.90	1.13	0.3064
B-初始 pH	6.31	1	6.31	0.0313	0.8620
C-接种量	316.62	1	316.62	1.57	0.2304
D-加糖量	70.08	1	70.08	0.3481	0.5646
AB	6.03	1	6.03	0.0299	0.8651
AC	8.35	1	8.35	0.0415	0.8415
AD	597.07	1	597.07	2.9655	0.1071
BC	63.60	1	63.60	0.3159	0.5830
BD	2.89	1	2.89	0.0144	0.9063
CD	24.95	1	24.95	0.1239	0.7301
A ²	11,537.17	1	11,537.17	57.30	<0.0001
B ²	8558.48	1	8558.48	42.51	<0.0001
C ²	14,733.28	1	14,733.28	73.18	<0.0001
D ²	5870.58	1	5870.58	29.16	<0.0001
残差	2818.77	14	201.34		
失拟项	2290.38	10	229.04	1.73	0.3138
纯误项	528.39	4	132.10		
总差	30,768.14	28			

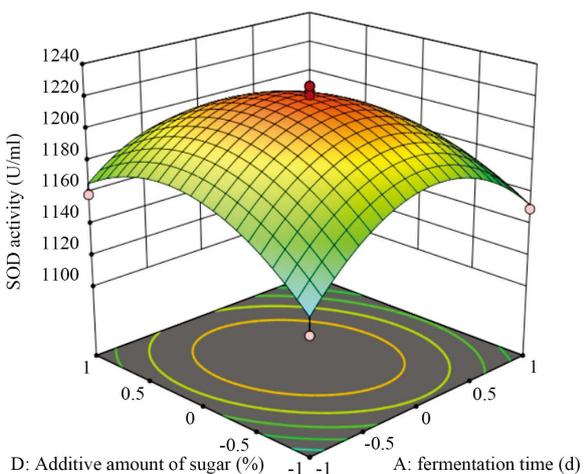
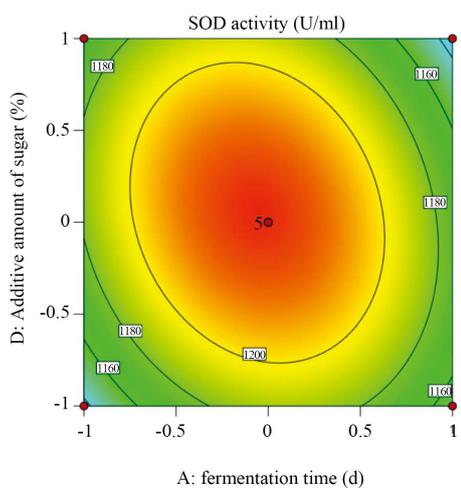
基于表 4 方差分析所示, 可知: 此模型的 $P < 0.0001$, 证实为极显著, 失拟项 $P = 0.3138 > 0.05$, 证实为不显著。模型方差分析中 A2、B2、C2、D2 的 P 值均 < 0.0001 , 证明影响极为显著。而交互的 AB、



AB



AC



AD

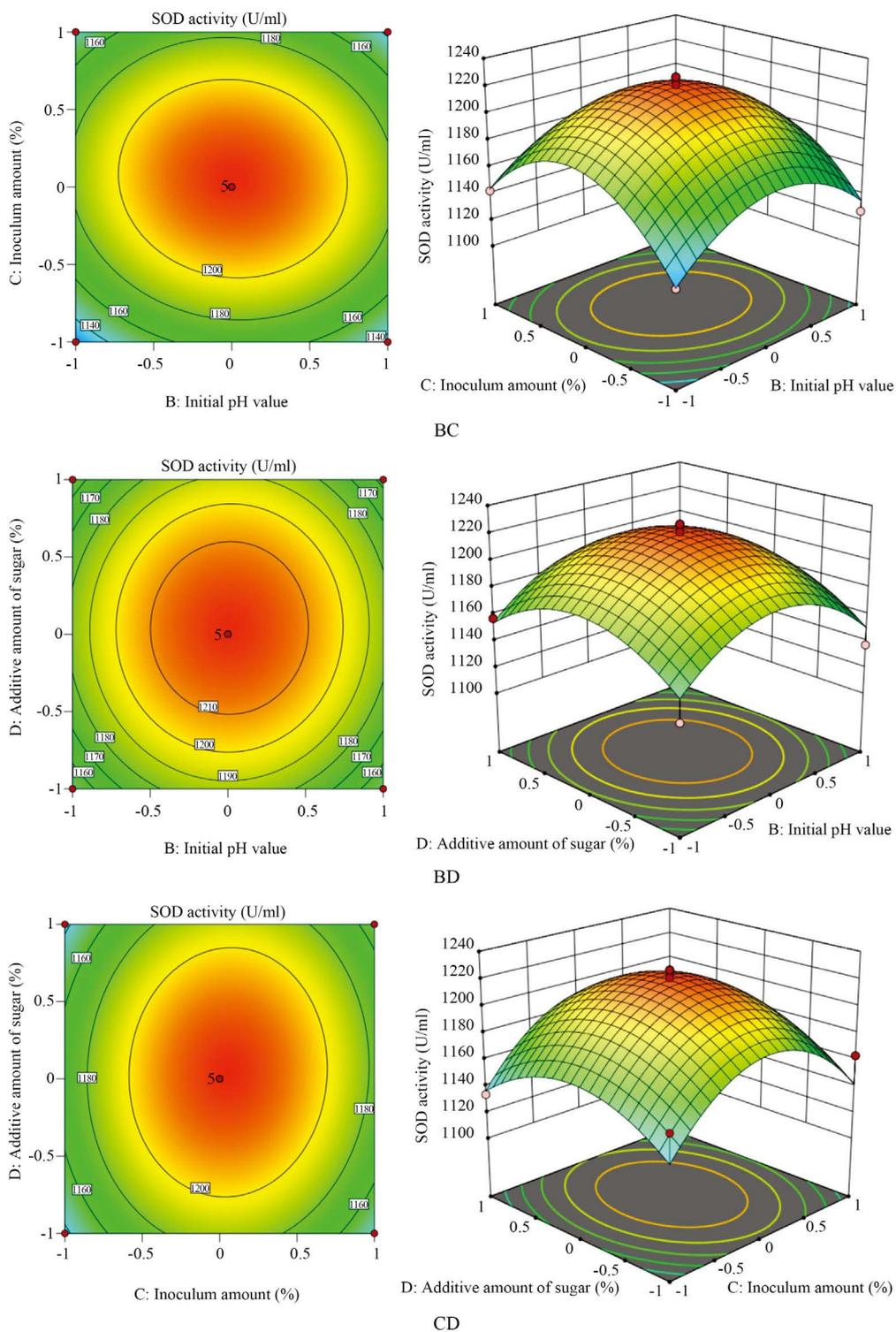


Figure 5. Interaction response surface and contour map of each fact
图 5. 各因素交互响应面图及等高线图

AC、AD、BC、BD、CD 的 P 值均>0.05, 证明影响不显著。R² 值为 0.9083 说明此模型拟合性较好。

运用 Design-Expert 11v 程序, 对四种因素交互性影响实行数据处理, 取得此回归方程的响应面图及

等高线图, 于图 5 所示。如图 5 所示, 等高线轮廓的形态可以反映出各因素之间彼此作用的强弱情况, 形状为椭圆表示这两个因素之间彼此作用强烈, 圆形则相反[19]。图中交互的 AB、AC、AD、BC、BD、CD 等高线形状均为圆形, 相互作用不强烈, 与方差分析得到的结果并无差别。

3.2.2. 表格

经由 Design-Expert 11v 软件的数据处理结果, 所显示的最优发酵条件为: 3.941 天发酵时间, 初始 pH3.954, 0.203% 的酵母菌接种量, 18.109% 的加糖量, 软件所预测的 SOD 活力为 1219.68 U/ml。

为验证此最佳发酵条件, 并操作便捷, 采用的发酵条件为: 发酵时间: 4 天, 初期 pH4, 接种量 0.2%, 加糖量 18%, 所测得的 SOD 活力为 1216.35 U/ml, 与软件所预测 SOD 活力相差较小, 说明, 此模型合理, 可为桔皮酵素的制备, 生产, 加工提供一定的依据与参考。

3.3. 产品品质测定结果

3.3.1. 感官指标

基于响应面所得到的最适发酵条件, 制得的桔皮酵素产品, 经 10 位经过培训的, 不同性别、不同年龄对产品的感官评价, 根据感官评定评分表进行打分, 所得到的平均分为 8.5 分。对产品的普遍评价为: 果香较少, 色泽浅黄色透明清澈, 酸甜适宜, 无苦涩味。

3.3.2. 表格

按照团体标准 T/CBFIA 08003-2017《食用植物酵素》所规定的要求, 本产品所测得的酒精度、氯化钠含量、菌落总数、大肠菌群数均符合标准。

酒精度: $0.3 \text{ g}/100 \text{ g} < 0.5 \text{ g}/100 \text{ g}$

氯化钠: $0.1 \text{ g}/100 \text{ g} < 0.2 \text{ g}/100 \text{ g}$

菌落总数: $86 \text{ CFU}/\text{ml} < 102 \text{ CFU}/\text{ml}$

大肠菌群数: $1 \text{ MPN}/100 \text{ ml} < 10 \text{ MPN}/100 \text{ ml}$ 。

4. 结论

通过实验证明, 以新鲜柑橘桔皮为原料, 酵母菌为发酵剂, 制得的桔皮酵素最优发酵条件为: 发酵时间 4 天, 初始 pH4, 酵母菌接种量 0.2%, 加糖量 18%, 可以测得的 SOD 活力为 1216.35 U/ml。产品感官良好, 既安全保健价格低廉, 又可为减少桔皮的浪费起到帮助作用。此实验可为桔皮酵素的生产和加工提供依据和参考。

参考文献

- [1] 林正秋. 中国饮食大辞典[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1991.
- [2] 单杨. 中国柑橘工业的现状、发展趋势与对策[J]. 中国食品学报, 2008(1): 1-8.
- [3] 黄筱雄, 张玉蓉. 桔皮的综合利用[J]. 中国林副特产, 2004(1): 40-42.
- [4] Wang, Y., Chen, K., Mo, L., Li, J. and Xu, J. (2014) Optimization of Coagulation-Flocculation Process for Paper Making Reconstituted Tobacco Slice Wastewater Treatment Using Response Surface Methodology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **20**, 391-396. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.04.033>
- [5] Granata, F., Papirio, S., Esposito, G., Gargano, R. and de Marinis, G. (2017) Machine Learning Algorithms for the Forecasting of Wastewater Quality Indicators. *Water*, **9**, 105. <https://doi.org/10.3390/w9020105>
- [6] Ratnaweera, H. and Fetting, J. (2015) State of the Art of Online Monitoring and Control of the Coagulation Process. *Water*, **7**, 6574-6597. <https://doi.org/10.3390/w7116574>
- [7] 阮智富, 郭忠新. 现代汉语大词典: 下册[M]. 上海: 上海辞书出版社, 2009.

- [8] 陈丹. 浅论食用酵素[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(12): 210-214.
- [9] 李占东, 王丁, 李皓. 酵素主要功能及其行业展望[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 301-303.
- [10] 山口庄太郎. 食品加工への酵素の応用[J]. 食品科学, 2004, 25(z1): 221-224.
- [11] 胡学智. “酵素”和酶的辨异——论酶和“酵素”制品的保健功能[J]. 工业微生物, 2016, 46(2): 60-68.
- [12] 孙倩. 检测微生物、功效酶和有机酸揭开酵素食品的神秘面纱[J]. 中国食品, 2019(18): 138-139.
- [13] 李莉, 张赛, 何强, 胡学斌. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- [14] 董海胜, 陈斌. 利用修改的 Marklund 方法测定 SOD 活性[J]. 保鲜与加工, 2009, 9(1): 27-29.
- [15] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 保健食品中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定: GB/T 5009.171-2003 [S]. 2003.
- [16] 宋佳. 酵素发酵工艺的优化研究[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西大学, 2017.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 冰葡萄酒: GB/T 25504-2010[S]. 2011.
- [18] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 河南教育学院学报(自然科学版), 2011, 20(4): 34-37
- [19] 张良, 刘媛洁, 包珍, 肖勇生. 响应面法优化仙人掌酵素的发酵工艺[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(17): 170-172+203.