

酶法脱酯从柚皮中制取低甲氧基果胶的工艺研究

高 雪, 蔡伟玉, 吴礼文, 黄伟桓, 陈少双, 张雪萍

(韩山师范学院 生物系, 广东 潮州 521041)

摘 要:以新鲜柚皮为原料, 添加碳酸钠激活内源果胶酯酶制备低甲氧基果胶。以果胶甲氧基含量和得率为指标, 通过正交实验优化酶法脱酯及酸提取的工艺条件, 确定最优低甲氧基果胶制备工艺。结果表明: 加入果皮浆液量 0.15% 的果胶酯酶激活剂碳酸钠, 在 pH 7.5、45℃ 的下脱酯 50 min, 然后采用 85℃、pH 3.5、60 min 进行酸水解提取果胶。在此工艺条件下制备的果胶甲氧基含量为 5.9%, 符合低甲氧基果胶标准, 且果胶得率较高, 为 3.0%。

关键词: 低甲氧基果胶; 提取; 果胶酯酶; 柚皮

中图分类号: TS 202.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2011)09-0191-03

果胶是植物组织中天然存在的高分子聚合物, 广泛分布于高等植物的根、茎、叶、果中, 是细胞壁的组成成分之一, 主要成分是多缩半乳糖醛酸甲酯^[1]。当果胶分子中的羧基完全甲基化时甲氧基的含量为 16.32%, 通常按甲氧基含量将果胶分为二类: 甲氧基含量高于 7% 的为高甲氧基果胶(High methoxyl pectin, HMP), 低于 7% 的为低甲氧基果胶(Low methoxyl pectin, LMP)。果实中天然存在的果胶通常为 HMP, 经处理降低甲氧基含量后可获得 LMP^[2,3]。

果胶具有良好的胶凝、乳化、增稠和稳定作用, 广泛用于食品工业中, 作为果冻、果汁、糖果及饮料等的胶凝剂、增稠剂、稳定剂及蛋黄乳化剂等, 此外, 果胶还是医药和化妆品工业的生产辅料。世界上所有国家都允许使用果胶作为食品添加剂, WHO 推荐果胶为不受添加量限制的安全食品添加剂^[2,4]。果胶最主要的用途是做酸性条件下的胶凝剂, 但 HMP 只能在可溶性固形物高于 55% 左右和较小的 pH 范围(3.0 左右)才能胶凝, 主要用于高糖类食品的生产; 而 LMP 在钙、镁等离子存在条件下, 即使可溶性固形物浓度低至 1%, 也能形成性质优良的凝胶, 因此广泛用于低糖低热量食品的生产。与 HMP 相比较, LMP 能在较宽 pH 范围(2.6~6.8)形成胶凝, 还具有胶凝能力强、不易脱水、凝胶有很好的风味释放能力等特点^[5,6]。近年来, 随着人们保健意识的增

强, LMP 由于在降血脂、减少人体对铅等有害金属的吸收以及低糖食品及中的突出作用, 逐渐受到人们的青睐, 对 LMP 的需求日益增加^[7]。国内 LMP 产量较低, 每年需大量从国外进口, 价格昂贵; 提取技术采用传统碱法脱酯, 产品胶凝度不稳定, 工艺条件不易控制。针对 LMP 的生产和市场现状, 有必要对其生产技术进行系统化研究。

目前果胶的脱酯主要有酸法、碱法和酶法。酶法脱酯与酸法相比较, 可大大简化工艺流程和设备, 并能提高生产效率; 与碱法相比较, 其工艺易于控制, 能更好地保持产品的胶凝度^[5,8]。果胶甲酯酶(Pectin esterase, PE)对聚半乳糖醛酸甲酯有高度专一性, 作用于多聚半乳糖醛酸的半乳糖醛酸残基的 C-6 羧基基团, 去掉甲酯, 催化果胶酯酸转化为果胶酸^[9,10]。因此, PE 能使果胶脱去甲氧基, 使 HMP 脱酯生成 LMP。根据 PE 的来源可将酶法脱酯分为内源酶法和外源酶法。内源酶法是利用激活剂激活植物本身的 PE 酶活性使果胶脱酯, 外源酶法是从植物或微生物发酵液中提取 PE, 再用于果胶脱酯^[9,11]。目前已有商品果胶酯酶出售, 但价格昂贵, 因此进行内源酶法制备 LMP 的研究大有开发前途。

我国具有丰富的果胶提取原料, 如柑橘类果皮特别是柚皮中的果胶含量高且凝胶强度高, 是提取果胶的良好原料, 但往往作为垃圾扔掉, 造成资源的极大浪费^[12,13]。因此, 急需加大对果皮综合利用的研究和应用。现以新鲜柚皮为材料, 在传统的加酸水解步骤之前, 添加内源酶激活剂, 激活原料中固有的 PE 活性进行脱酯, 以改进传统的碱法脱酯制备 LMP 的工艺, 并为果皮的利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验原料: 新鲜柚子来自广东潮州果园; 试剂: 乙

第一作者简介: 高雪(1972-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事农产品加工与贮藏工程及果蔬采后生物学等方向研究工作。E-mail: gaoxue_1@163.com。

基金项目: 国家星火计划资助项目(2008GA780034); 韩山师范学院团队科研资助项目(LT200802); 韩山师范学院“大学生创新性实验计划”资助项目。

收稿日期: 2011-02-24

醇、NaOH、盐酸、无水碳酸钠、酚酞、硫酸等均为分析纯。

1.2 试验仪器

HH-8 恒温水浴锅(江苏省金坛市宏华仪器厂制造); RE-52D 旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂); HJ-6A 六联恒温磁力搅拌器(金坛市宏华仪器厂); LGJ-18 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂生产); SL320N 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司生产)

1.3 工艺流程及操作要点

预处理→酶法脱酯→酸水解提取果胶→过滤、浓缩、沉淀→过滤、干燥、粉碎→低甲氧基果胶成品^[89]。

操作要点: (1)原料预处理: 新鲜柚子取皮后削去油胞层, 切成 0.5 cm^3 大小的颗粒, 用蒸馏水浸泡 1 h, 过滤, 再用蒸馏水漂洗 2~3 次, 直至洗出液无色为止。(2)酶法脱酯: 果皮原料中加入果皮量 5 倍的水混匀成浆液, 加入 Na_2CO_3 作为激活剂以激活果皮中固有的果胶甲酯酶活性, 进行酶法脱酯(该步进行正交设计以获得最佳脱酯条件)。(3)酸水解: 脱酯后的皮渣加入盐酸进行水解(进行正交设计以获得最佳酸水解提取条件)。(4)过滤、浓缩、沉淀: 过滤得到果胶提取液, 于旋转蒸发器中抽真空浓缩至原体积的 1/2, 加入等量的 95% 酒精, 放置 1 h, 使果胶沉淀析出。(5)过滤、干燥、粉碎: 将沉淀抽滤后, 于冷冻干燥机中干燥至含水量降至 10% 即可。然后用研钵碾成粉状, 过 100 目筛即得果胶成品。

1.4 实验设计

1.4.1 酶法脱酯正交实验设计 以脱酯温度、脱酯时间、脱酯 pH 值和碳酸钠浓度(占果皮浆液量的质量分数)为试验因素, 以甲氧基含量和果胶得率为指标, 进行正交设计以获得最优脱酯条件(表 1)。

表 1 脱酯正交实验因素水平

水平	因素			
	A 温度/℃	B 时间/min	C pH 值	D 激活剂浓度/%
1	45	40	7.5	0.15
2	50	50	8.0	0.20
3	55	60	8.5	0.25

1.4.2 酸水解提取果胶正交实验设计 脱酯后加酸水解提取果胶。以提取温度、时间、pH 值为因素, 以果胶得率为指标进行正交设计, 以获得最优酸水解条件(表 2)。

表 2 酸法提取果胶正交实验因素水平

水平	因素		
	A 温度/℃	B 时间/min	C pH
1	80	45	2.5
2	85	60	3.0
3	90	75	3.5

1.5 测定方法

果胶得率=成品果胶重量(g)/鲜果皮原料重量(g)×100%; 果胶甲氧基含量采用容量法; 果胶物质含量采用重量法。

2 结果与分析

2.1 酶法脱酯正交实验

酶法脱酯正交实验结果及分析见表 3、4。由正交实验的直观分析结果可知, 脱酯 pH 值和脱酯温度对果胶甲氧基含量及得率的影响较大。从得率看, 最佳组合是 $C_1A_1B_1D_1$; 由甲氧基指标分析, 最佳组合是 $C_2A_2D_3B_1$; 因此, 将 2 个指标进行综合考虑如下。

对于因素 C: 采用水平 2 进行试验所得果胶的甲氧基含量都小于 7%, 但得率偏低; 采用水平 3 的试验结果中有一个甲氧基大于 7%, 不符合 LMP 的标准; 而水平 1 的试验结果中果胶甲氧基含量都小于 7%, 得率也高, 所以选择 C_1 。

同理, 对于因素 A: 水平 3 的试验结果甲氧基含量有一个大于 7%; 水平 2 的试验结果虽然甲氧基含量都小于 7%, 但得率偏低; 而水平 1 的试验结果甲氧基含量合格, 且得率较高, 所以选择 A_1 。

对于因素 B: 水平 1 的试验结果甲氧基含量有 1 个大于 7%; 水平 3 的试验结果果胶得率偏低; 水平 2 的试验结果甲氧基含量小于 7%, 得率也较高, 所以选择 B_2 。

对于因素 D: 水平 2 的试验结果甲氧基含量有 1 个大于 7%; 水平 3 的试验结果果胶得率偏低; 水平 1 的试验结果果胶甲氧基含量都小于 7%, 得率也较高, 所以选择 D_1 。

综合以上分析得出最优组合为 $C_1A_1B_2D_1$, 即 pH 7.5、45℃、50 min, 激活剂浓度 0.15% 为最优脱酯条件。在这一条件下做验证试验, 测得果胶的甲氧基含量为 6.012, 得率为 2.7%

表 3 酶法脱酯正交实验结果

试验号	因素 A 温度/℃	因素 B 时间/min	因素 C pH	因素 D 激活剂浓度/%	得率/%	甲氧基含量/%
1	45	40	7.5	0.15	3.0	6.95
2	45	50	8.0	0.20	2.2	5.61
3	45	60	8.5	0.25	1.5	5.95
4	50	40	8.0	0.25	1.9	5.35
5	50	50	8.5	0.15	1.6	6.18
6	50	60	7.5	0.20	2.5	6.54
7	55	40	8.5	0.20	2.3	7.15
8	55	50	7.5	0.25	2.8	6.73
9	55	60	8.0	0.15	2.3	6.37

2.2 酸法提取果胶正交实验

确定脱酯工艺后, 以果胶得率为指标进行酸水解提取果胶的正交实验, 结果见表 5。由表 5 可知, 影响果胶得率的主次因素为 $C>B>A$, 即 pH 值>时间>温度; 最佳果胶提取条件为: $C_3B_2A_2$, 即提取 pH 3.5、时间 60 min、温度 85℃。

2.3 验证试验

采用上述酶法脱酯和酸法提取果胶的最优组合条件从新鲜柚皮中提取 LMP 进行验证, 所得成品果胶的甲氧基含量为 5.9%, 小于 7%, 属低甲氧基果胶, 测定其果胶物质含量为 66.7%, 果胶得率较高, 为 3.0%。

表 4 脱酯工艺正交实验结果分析

试验指标	因素	K_1	K_2	K_3	R
果胶得率	A	2.233	2.000	2.467	0.467
	B	2.400	2.200	2.100	0.300
	C	2.767	2.133	1.800	0.967
	D	2.300	2.333	2.067	0.266
	因素主次	CABD			
甲氧基含量	A	6.170	6.023	6.750	0.727
	B	6.483	6.173	6.287	0.310
	C	6.740	5.777	6.427	0.963
	D	6.500	6.433	6.010	0.490
	因素主次	CADB			

表 5 酸法提取果胶正交实验结果与分析

编号	因素 A 温度/℃	因素 B 时间/min	因素 C pH 值	得率/%
1	80	45	2.5	1.3
2	80	60	3.0	2.5
3	80	75	3.5	2.9
4	85	45	3.0	2.8
5	85	60	3.5	3.1
6	85	75	2.5	1.0
7	90	45	3.5	2.9
8	90	60	2.5	2.6
9	90	75	2.0	2.1
K_1	2.233	2.333	1.633	
K_2	2.300	2.733	2.467	
K_3	2.533	2.000	2.967	
R	0.300	0.733	1.334	
因素主次	CBA			

3 结论

试验探讨了内源酶法脱酯提取低甲氧基果胶的工艺条件, 利用正交实验设计得到的最优低甲氧基果胶生产工艺条件为: 加入果皮浆液量 0.15% 的内源果胶酯酶激活剂碳酸钠, 控制脱酯条件为 pH 7.5、45℃、50 min; 然后结合酸法水解提取果胶, 条件为 pH 3.5、85℃、60 min; 在此工艺条件下制备的果胶甲氧基含量为 5.9%, 符合低甲氧基果胶甲氧基含量低于 7% 的标准, 且果胶得率

较高, 为 3.0%。利用内源酶法脱酯需要植物组织具有一定的果胶酯酶活性, 所以原料需要具有一定的果胶酯酶活性, 如新鲜的果皮等, 如果原料果胶酯酶的活性高低不能确定, 应该进行果胶酯酶的活性测定^[9]。而关于内源果胶酯酶活化的作用机理尚待进一步研究。

参考文献

[1] Naséna A, Philippe L, Christophe C. Pectin secretion and distribution in the anther during pollen development in *Lilium*[J]. *Planta* 2001; 213: 71-79.
[2] 余映慧, 高雪. 果胶提取方法及其在食品中的应用研究进展[J]. 现代农业科技 2009, 23: 351-352.
[3] 胡国华. 功能性食品胶[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 115-138.
[4] 魏海香, 木泰华, 孙艳丽, 等. 果胶制备的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 157-160.
[5] 雷激, 马力. 低温碱法脱酯制取低酯果胶的研究[J]. 食品发酵工业 2006, 31: 45-48.
[6] 汪海波. 低酯果胶的胶凝质构性能研究[J]. 食品科学 2006, 27(12): 123-129.
[7] Maxim K, Irina S Yuri K. The effects of low-esterified pectin on lead-induced thyroid injury in rats [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2004 17: 6771.
[8] 赵静, 吴永娴, 高雪, 等. 碱法脱酯制备低甲氧基果胶的研究[J]. 西南农业大学学报, 1995(5): 428-430.
[9] 雷激, 马力. 酶法制备低甲氧基果胶的工艺研究[J]. 食品添加剂 2007, 28(2): 211-213.
[10] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 165.
[11] Ishii S. Low-methoxyl pectin prepared by pectinesterase from *Aspergillus japonicus*[J]. *Journal of Food Science* 1979, 44(2): 611-614.
[12] 徐泽敏, 殷涌光. 柚皮的综合利用[J]. 食品研究与开发 2007(1): 176-178.
[13] 陈雪峰, 詹雪英. 苹果渣中提取果胶工艺研究[J]. 食品工业科技 2000, 23(3): 19-21.
[14] 顾复昌. 果胶半乳糖醛酸及甲氧基含量的分析[J]. 食品科学 1984(8): 45-46.
[15] 无锡轻工业大学. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 201-203.
[16] 刘刚, 雷激, 张庆坤, 等. 果胶碱法脱酯工艺影响因素的研究[J]. 食品科技, 2008(6): 61-64.

Extraction of Lowmethoxyl Pectin from Grapefruit Peel by Activation Pectin Esterase

GAO Xue, CAI Wei-yu, WU Li-wen, HUANG Wei-huan, CHEN Shao-shuang, ZHANG Xue-ping
(Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041)

Abstract: Lowmethoxyl pectin(LMP)was obtained form fresh grapefruit peel by using Na_2CO_3 as activator to active pectin esterase in fresh peel. Pectin was de-esterified, then extracted, precipitated and purified. The results showed that de-esterified temperature, pH level, time, and the percent of Na_2CO_3 to peel and water were 45℃, pH 7.5, 50 min and 0.15%, respectively, and the acid-extraction temperature, pH level and time were 85℃, pH 3.5 and 60 min, respectively. Under this condition, the output rate of pectin was 3.0% with the content of methoxyl below 7%, which was in accordance with the national standard for LMP.

Keywords: low methoxyl pectin; extraction; pectin esterase; grape fruit peel