复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁的影响

宁豫昌[1]，高俊杰[1,2]，袁艺萌[1]

（1. 河南牧业经济学院 食品与生物工程学院，河南 郑州 450000；2. 西北农林科技大学 葡萄酒学院，陕西 杨凌 712100）

摘要：为了研究复合酶（果胶酶和纤维素酶）处理对刺梨、苹果混合发酵果汁品质的影响，首先优化了复合酶处理混合果汁的工艺条件，然后分别以经过和未经过复合酶处理的混合果汁为实验组和对照组，利用副干酪乳杆菌（*Lactobacillus paracasei*）对果汁进行发酵，研究果汁在理化性质、抗氧化性、感官评价等方面的差异。结果表明：当复合酶的添加量为 3 g/L（果胶酶与纤维素酶的质量比为 3∶2），处理温度 35 ℃，处理时间 1.5 h 时，混合果汁的透光率最高，为 97.97%。复合酶处理导致实验组的类胡萝卜素显著下降，还原糖的质量浓度显著提高，但 pH、酸度以及总酚、总黄酮、维生素 C 的质量浓度无显著变化。羟自由基和超氧阴离子自由基的清除率分别为 72.86%和 81.94%，分别极显著和显著高于对照组。在感官评价方面，实验组的色泽、香气、组织状态和口感均优于对照组。因此，复合酶处理可显著改善刺梨、苹果混合果汁的透光率，复合酶处理对混合发酵果汁中维生素 C、黄酮等营养物质的质量浓度无显著影响，有助于提高混合发酵果汁的抗氧化性和感官品质。

关键词：刺梨；苹果；果胶酶；纤维素酶；抗氧化性

中图分类号：TS 255.1　**文章编号：**1673-1689(2023)08-0087-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.08.011

Effect of Compound Enzyme Treatment on Mixed Fermented Juice of *Rosa roxburghii* Tratt and *Malus pumila* Mill

NING Yuchang[1]，*GAO Junjie*[1,2]，*YUAN Yimeng*[1]

（1. School of Food and Bioengineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450000, China; 2. College of Enology, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China）

Abstract: To study the effect of compound enzyme (pectinase and cellulase) treatment on the quality of mixed fermented juice of *Rosa roxburghii* Tratt and *Malus pumila* Mill, the conditions of compound enzyme treatment of mixed fruit juice were optimized first. Then the mixed juice with (test group) and without compound enzyme treatment (control group) were fermented with *Lactobacillus paracasei* to study their differences in physical and chemical properties, antioxidant properties, and sensory evaluation. The results showed that when the amount of compound enzyme added was 3 g/L (the mass ratio of pectinase to cellulase was 3∶2), the treatment temperature was 35 ℃, and the treatment time was 1.5 h, the maximum light transmittance of the mixed juice was obtained, which was 97.97%. The compound enzyme treatment resulted in a significant decrease in the mass concentrations of carotenoids and increase in reducing sugars in the test group. However,

收稿日期：2021-08-07

基金项目：河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目（2019GGJS259）；河南牧业经济学院博士科研启动基金项目（2022HNUAHEDF0387）。

作者简介：宁豫昌（1979—），男，博士，副教授，主要从事食品生物技术研究。E-mail：ningyuchang1979@163.com

there was no significant difference in pH, acidity, total phenols, total flavonoids, and vitamin C between the test and the control group. The scavenging rates of hydroxyl free radicals and superoxide anion free radicals in the test group were 72.86% and 81.94%, respectively, which were extremely and significantly higher than those of the control group. In terms of sensory evaluation, the color, aroma, tissue state and taste of the test group were better than those of the control group. Therefore, the treatment of compound enzyme can significantly improve the light transmittance of the mixed juice. Moreover, the treatment of complex enzyme had no significant effect on the mass concentration of nutrients like vitamin C and flavonoids in the mixed fermented juice, and improved the antioxidant property and sensory quality of the mixed fermented juice.

Keywords: *Rosa roxburghii* Tratt, apple, pectinase, cellulase, antioxidant

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)又名缫丝花,是蔷薇科多年生落叶灌木,广泛分布于贵州、云南、湖南等地,在贵州存在大面积人工种植。刺梨果实具有独特浓郁果香,含有丰富的维生素 C、多酚、黄酮、类胡萝卜素等抗氧化物质,以及三萜皂苷、有机酸、氨基酸等多种生物有效成分[1-4]。刺梨具有健脾开胃、滋阴补津、强身健体、抗衰老等功效,且无急慢性毒性,可长期安全食用[5]。由于富含营养且具有保健功能,刺梨已被广泛应用于食品、保健品等行业,研发出果汁、果酒、饮料、果干、果脯、冻干粉胶囊等相关产品[6]。但是由于刺梨果实中含有丰富的单宁和有机酸,因此刺梨鲜果和果汁往往表现出明显的酸涩口感,影响了刺梨产品的开发与销售。为了解决这一问题,本课题组前期将刺梨果汁与苹果汁按一定比例混合,并利用副干酪乳杆菌进行发酵,制得了一种抗氧化性强、口感柔和、兼具刺梨和苹果风味的混合发酵果汁。但是,由于刺梨和苹果果汁中果胶和纤维素的含量较高,导致发酵后的混合果汁容易出现混浊、沉淀、分层等现象,严重影响了该混合发酵果汁产品的开发。

果实中含有的果胶和植物纤维使果汁的压榨与澄清变得十分困难[7]。果胶酶和纤维素酶能有效地降解果胶和植物纤维等复杂分子链结构,破坏植物组织细胞壁的网状结构,使细胞内物质最大限度地释放出来,从而提高出汁率,使果汁变得清澈透亮,因此常被用于果蔬汁的澄清处理。晏敏等采用果胶酶处理,使红柠檬果汁的透光率由 2.5%提升到了 93.8%[8]。吕长鑫等利用果胶酶与纤维素酶的复合酶制剂对南果梨汁饮料进行了澄清处理,透光率达到了 93.4%[9]。目前,人们的关注点多为果胶酶、纤维素酶等处理对果蔬汁出汁率和透光率等的影响,而酶制剂处理是否会影响果汁或发酵果汁的活性成分、抗氧化性等相关报道尚不多见。王美美等研究了果胶酶、纤维素酶等对红树莓果汁抗氧化性的影响,发现用果胶酶、纤维素酶和半纤维素酶进行处理,可以提高果汁中总酚、花色苷、总黄酮的含量,且能改善果汁的 DPPH 自由基清除率等抗氧化指标[10]。为了提高刺梨、苹果混合发酵果汁的澄清度,并探究酶处理工艺对混合果汁发酵后品质的影响,作者使用由果胶酶和纤维素酶组成的复合酶对刺梨、苹果混合果汁进行处理,然后用副干酪乳杆菌分别对经过和未经过复合酶处理的混合果汁进行发酵,并对它们的理化性质、抗氧化性、感官评价等进行研究,探讨将复合酶应用于刺梨、苹果混合果汁发酵前处理的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红富士苹果:市售,产地烟台;新鲜刺梨:购自贵州省六盘水市;副干酪乳杆菌:购于北纳创联生物技术有限公司,菌种编号 BNCC 189800;食品级果胶酶(酶活力为 1 U/mg)和食品级纤维素酶(酶活力为 10 U/mg):购于河南万邦实业有限公司;MRS 培养基:购自北京奥博星生物技术有限责任公司;芦丁(色谱纯)、2,6-二叔丁基对甲酚(butylated hydroxytoluene,BHT):购自北京索莱宝科技有限公司;色谱纯 1,1-二苯基-2-苦基肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,DPPH):购自上海蓝季科技发展有限公司;福林酚试剂(纯度 99%)、维生素 C 标准品、没食子酸、3,5-二硝基水杨酸、焦性没食子酸、氢氧化钠、无水碳酸钠、酚酞、亚硝酸钠、硫酸铜、硫酸亚铁、质量分数 30%过氧化氢、正己烷、丙酮、碘、碘化

钾、盐酸、TRIS、次甲基蓝、酒石酸钾钠、可溶性淀粉：均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

DNP 恒温培养箱、DNP-9272BS-Ⅲ电热恒温培养箱：上海新苗医疗器械有限公司产品；H1850R 台式高速冷冻离心机：湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品；FA1104 电子天平：上海舜宇恒平科学仪器有限公司产品；HHS-21-6 电热恒温水浴锅：上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品；752 紫外可见分光光度计：上海菁华科技仪器有限公司产品；LDZM-60KCS 立式高压蒸汽灭菌锅：上海申安医疗器械厂产品；便携式 pH 计：梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 原料前处理 将新鲜苹果和刺梨分别清洗后去核、切块、榨汁、过滤，得苹果汁和刺梨汁，然后将刺梨汁、苹果汁、水按 1∶2∶2 的体积比混合均匀，得到刺梨、苹果混合果汁，最后将混合果汁在 85 ℃水浴中保温 15 min 以进行巴氏杀菌。

1.3.2 复合酶处理混合果汁的单因素实验 复合酶处理混合果汁的基础条件为酶制剂添加量 3 g/L、果胶酶与纤维素酶质量比 3∶2、酶解温度 40 ℃、酶解时间 1.5 h。在基础处理条件的基础上，通过设置不同的酶解时间（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h）、酶解温度（30、35、40、45、50 ℃）、果胶酶与纤维素酶质量比（1∶1、2∶1、3∶1、3∶2、4∶1、2∶3）进行复合酶处理混合果汁的单因素实验，以透光率和出汁率为评价指标，探究各因素对果汁澄清效果的影响，并确定各因素的最优值。其中，将复合酶处理过的混合果汁5 000 r/min 离心 10 min，取上清液于波长 680 nm 处测透光率，并称量离心前的果汁质量和离心后的沉淀质量，计算出汁率。

1.3.3 复合酶处理混合果汁的正交实验 在单因素实验基础上，每个因素选取 3 个水平，选用 $L_9(3^4)$正交表，以透光率为指标进行正交实验并经过数据分析得出最优酶解条件。正交实验因素及水平见表1。

1.3.4 复合酶处理对混合发酵果汁品质的影响 将副干酪乳杆菌斜面菌种转接到液体 MRS 培养基中，在 37 ℃、150 r/min 的摇床中培养 48 h，再用液体 MRS 培养基继续转接活化 2~3 代，直至培养液中乳酸菌含量达到 1.0×10^8 CFU/mL。将培养过的菌液于 6 000 r/min 离心 5 min 后，弃去上清液，然后

表 1 正交因素水平表

Table 1 Orthogonal factor level table

水平	*A* 温度/℃	*B* 时间/h	*C* 果胶酶与纤维素酶的质量比
1	35	1.5	1∶1
2	40	2.0	2∶3
3	45	2.5	3∶2

用等量无菌生理盐水重悬后即为种子液。向混合果汁中接种体积分数 7%的种子液，在 37 ℃下静置培养 21 h 后获得刺梨和苹果混合发酵果汁。以经复合酶处理后发酵制得的混合发酵果汁为实验组，未经复合酶处理制得的混合发酵果汁为对照组，分别对实验组和对照组进行透光率、酸度、还原糖、维生素 C 等各项指标的测定，以分析复合酶处理对混合发酵果汁品质的影响。

1)酸度测定 取适量发酵果汁超声 5 min 以去除 CO_2，然后 8 000 r/min 离心 5 min，上清液即为待测液。待测样液与 40.0 mL 经脱气处理的蒸馏水加入 100.0 mL 锥形瓶中，向锥形瓶中滴加 2~3 滴酚酞指示剂，然后用已标定的 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液进行滴定，并不断摇晃锥形瓶，直至溶液变至微红色且在 30 s 内不褪色。按照公式(1)计算酸度值。实验重复 3 次。

$$Y=\frac{100CVK}{0.1V_0} \quad (1)$$

式中：Y 为酸度值（以乳酸计），%；C 为标准氢氧化钠溶液的浓度，mol/L；V 为待测发酵果汁所消耗的标准氢氧化钠溶液的体积，mL；K 为 1mol 氢氧化钠相匹配的主要酸的克数，当用乳酸表示时，K=0.090；V_0 为待测样品体积，mL。

2)pH 测定 取待测发酵果汁用 pH 计直接测定，实验重复 3 次。

3)还原糖质量浓度测定 参考李孟平等[11]的方法，采用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法测定待测发酵果汁中还原糖的质量浓度(g/L)。

4) 乳酸菌含量测定 利用 MRS 固体培养基，采用稀释平板法对样品中的乳酸菌含量(单位体积样品的菌落形成单位数，CFU/mL)进行计数。

5)维生素 C 质量浓度测定 参考张歆皓等[12]的方法，采用直接碘量法测定发酵果汁中维生素 C 的质量浓度(mg/dL)。首先，精确称取 100 mg 维生素 C 标准品，用蒸馏水定容至 100.0 mL，调匀即为标准维生素 C 溶液。分别取 25.0 mL 标准维生素 C 溶液

4 等份,用稀盐酸调其 pH 值至 3.0,分别加入 2.0 mL 的 10 g/L 的淀粉溶液作为指示剂,用 0.02 mol/L 的碘液滴定标准维生素 C 溶液至蓝色,并保持 30 s 不褪色。记录标准维生素 C 溶液所消耗碘液的体积,并求其平均值。然后,取 25.0 mL 待测发酵果汁 4 份,分别加入 2.0 mL 10 g/L 的淀粉溶液作为指示剂,用 0.02 mol/L 的碘液滴定待测样液至蓝色,并保持 30 s 不褪色。记录待测样液所消耗碘液的体积,并求其平均值。维生素 C 的质量浓度 C_{VC} 按照公式(2)计算:

$$C_{VC}=\frac{mV_1}{V_2}\times 4 \tag{2}$$

式中:C_{VC} 为维生素 C 的质量浓度,mg/dL;m 为 25.0 mL 标准维生素 C 溶液中维生素 C 的质量,g;V_1 为待测发酵果汁所消耗碘液体积的平均值,mL;V_2 为标准维生素 C 溶液所消耗碘液体积的平均值,mL。

6)总酚质量浓度测定　参照赖婷等人[13]的方法测定样品中总酚的质量浓度(mg/mL),但略有修改。取待测发酵果汁 1.0 mL 于 10.0 mL 容量瓶中,加入 2.0 mL 福林酚试剂,充分混匀,加入 0.75 mL 质量分数 7.5%碳酸钠溶液,混匀后以蒸馏水定容至刻度,再次混匀后静置 2 h,同时制作不加待测样液的空白组。在 765 nm 处测定实验组和空白组的吸光值并记录,然后根据标准曲线方程计算样品中总酚的质量浓度(y=0.544 8x−0.008 1,R^2=0.994 6)。

7)总黄酮质量浓度测定　参考孙雪皎等人[14]的方法测定样品中总黄酮的质量浓度(mg/mL),但略有修改。取待测发酵果汁 1.60 mL 于 10.0 mL 容量瓶中,加入 50 g/L 亚硝酸钠溶液 0.28 mL,摇匀,5 min 后加入 100 g/L 硝酸铝溶液 0.28 mL,摇匀,6 min 后加入 4.00 mL 体积分数 30%的乙醇溶液,再次摇匀,加入 40 g/L 的氢氧化钠溶液 4.0 mL,用体积分数 30%的乙醇溶液定容至 10.0 mL,再次摇匀,静置 10 min 后于 520 nm 测定其吸光度。根据标准曲线计算出待测样液中总黄酮的质量浓度(y=1.125 9x−0.011 9,R^2=0.995 2)。

8)类胡萝卜质量浓度测定　参考刘嘉宁等人[15]的方法测定样品中类胡萝卜素的质量浓度(μg/mL),但稍有修改。取 10.0 mL 待测发酵果汁加入 20.0 mL 提取液于 100.0 mL 带盖锥形瓶中,常温下搅拌 30 min,加入 7.5 mL 蒸馏水,继续在常温下搅拌 10 min。提取液组成如下:体积分数 50%的正己烷、体积分数 25%的乙醇、体积分数 25%的丙酮、0.25 g 氯化钠、质量分数 0.1%的 BHT。搅拌结束后将混合物倒入分液漏斗中,充分振荡后静置,待液体清晰地分为 2 层后,收集上层有机相。该实验的空白组为加入质量分数 0.1%的 BHT 并充分搅拌溶解的正己烷。在 450 nm 下测定其吸光度,按照公式(3)计算混合发酵果汁中类胡萝卜素 C_{ca} 质量浓度:

$$C_{ca}(\mu g/mL)=\frac{AV\times 10^4}{2\ 560V_1} \tag{3}$$

式中:A 为待测发酵果汁在 450 nm 处的吸光度;V 为收集的有机相的体积,mL;V_1 为量取的待测混合发酵果汁的体积,mL;2 560 为 1%质量分数 β−类胡萝卜素在正己烷中的消光系数。

9)羟自由基清除率测定　参考束文秀等人[16]的方法并略有修改:吸取待测发酵果汁 1.0 mL,9 mmol/L 硫酸亚铁溶液 2.0 mL,9 mmol/L 水杨酸−乙醇溶液 2.0 mL,8.8 mmol/L 过氧化氢溶液 0.2 mL,摇匀并于 37 ℃下保温 30 min。以超纯水代替待测样液其他条件不变的反应溶液作为空白组,以超纯水代替水杨酸−乙醇溶液其他条件不变的反应溶液作为调零组。测定实验组与空白组在 510 nm 处测定吸光值,实验设置 3 个重复并取其平均值。羟自由基清除率 R_1 按公式(4)计算:

$$R_1=\frac{A_0-A_S}{A_0}\times 100\% \tag{4}$$

式中:R_1 为羟自由基清除率,%;A_0 为空白组的吸光度;A_S 为待测发酵果汁作为自由基清除剂加入后的吸光度。

10)超氧阴离子自由基清除率测定　参考束文秀等[16]的方法并略有修改:向试管中加入 4.5 mL 的 0.05 mol/L Tris−HCl 缓冲液(pH 8.2),置于 25 ℃水浴中预热 20 min,然后分别加入 1.0 mL 的待测发酵果汁、0.4 mL 的 25 mmol/L 邻苯三酚溶液(以 10 mmol/L 盐酸溶液配制)混匀,置于 25 ℃水浴中反应 5 min,加入 1.0 mL 的 8 mol/L 盐酸溶液终止反应。将以 1.0 mL 蒸馏水代替待测发酵果汁,其他条件不变的所得反应溶液作为空白组,以 0.4 mL 蒸馏水代替 25 mmol/L 邻苯三酚溶液(以 10 mmol/L 盐酸溶液配制)其他条件不变的反应溶液作为背景组。于 325 nm 处测定实验组、空白组、背景组的吸光度,实验设置 3 个重复并取其平均值。超氧阴离子自由基清除率 R_2 按公式(5)计算:

$$R_2=\frac{A_0-(A-A_1)}{A_0}\times 100\% \quad (5)$$

式中：R_2 为超氧阴离子自由基清除率，%；A 为待测发酵果汁作为自由基清除剂加入后的吸光度；A_1 为背景组的吸光度；A_0 为空白组的吸光度。

11）DPPH 自由基清除率测定　参考束文秀等[16]的方法测定发酵果汁的 DPPH 自由基清除率。分别吸取 2.0 mL 的待测样液，2.0 mL 的 0.2 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液，混匀后于 37 ℃水浴中避光反应 30 min，于 517 nm 波长下测定吸光度，记为 A_i。同上条件，测定 2.0 mL 的待测样液、2.0 mL 的无水乙醇溶液混合液的吸光度，记为 A_j，测定 2.0 mL 的无水乙醇、2.0 mL 的 0.2 mmol/L DPPH 无水乙醇溶液混合液的吸光度，记为 A_c。实验设置 3 个重复并取其平均值。DPPH 自由基清除率 R_3 按公式（6）计算：

$$R_3=\left(1-\frac{A_i-A_j}{A_c}\right)\times 100\% \quad (6)$$

式中：R_3 为 DPPH 自由基清除率，%；A_i 为待测发酵果汁作为 DPPH 自由基清除剂加入后的吸光度；A_j 为背景组的吸光度；A_c 为空白组的吸光度。

1.1.5　复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁感官评价的影响　根据刺梨、苹果混合发酵汁的色泽、香气、组织状态、口感 4 个方面设定感官评价标准，评分选用百分制，其中色泽 20 分，香气 30 分，组织状态 20 分，口感 30 分。感官评价小组由受过专业训练且获得品酒师三级证书的 20 名学生组成，其中男女各 10 人。对照组和实验组各设置 20 个样本，感官评价表如表 2 所示。

表 2　混合发酵果汁感官评价表

Table 2　Sensory evaluation index of mixed fermented juice

评分项目	评分标准	得分/分
色泽（20 分）	呈黄色，色泽透亮，有光泽	16~20
	呈黄色，色泽较暗，略有光泽	11~15
	呈暗黄色，色泽暗淡，无光泽	10 以下
香气（30 分）	具有典型刺梨、苹果香气，柔和，清爽	21~30
	具有典型刺梨、苹果香气，柔和，但香气不明显	11~20
	具有近似刺梨、苹果气味，但有异味	10 以下
组织状态（20 分）	均匀一致，无沉淀、分层，组织细腻	16~20
	果汁略混浊，有轻微分层、沉淀	11~15
	果汁混浊，有严重分层、沉淀	10 以下
口感（30 分）	酸甜适度，口感清香，柔和.爽口	21~30
	酸甜略过度，口感一般，略有粗糙感	11~20
	酸甜度过高，口感粗糙、寡淡	10 以下

2　结果与讨论

2.1　复合酶处理刺梨、苹果混合果汁条件的单因素实验

2.1.1　酶解时间　酶解时间对刺梨、苹果混合果汁澄清效果的影响见图 1。无论是透光率还是出汁率，随酶解时间的延长均呈先上升后下降的趋势，在酶解时间为 2.0 h 时，透光率和出汁率均达到最大值。结果表明酶解时间并非越长越好，酶解时间过长反而会影响果汁的澄清效果和出汁率。任旭桐等利用果胶酶澄清处理枸杞汁时发现，当酶解时间为 1.5 h 时，枸杞汁透光率最大，随后透光率变化趋势趋于平缓[17]。本实验中当酶解时间超过 2.0 h 后透光率下降，推测可能是由于酶解时间过长导致果肉组织中的一些物质被酶解成小分子物质并过多地溶进果汁引起的。

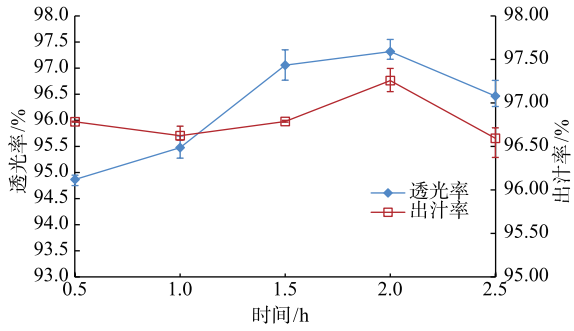


图 1　酶解时间对混合果汁澄清效果的影响

Fig. 1　Effect of enzymolysis time on the clarification effect of mixed juice

2.1.2　果胶酶与纤维素酶质量比　果胶酶与纤维素酶的质量比对混合果汁澄清效果的影响见图 2。果胶酶与纤维素酶的质量比对混合果汁出汁率的

影响并不大,而对透光率的影响较大,当果胶酶与纤维素酶的质量比为 2:3~4:1 时,混合果汁出汁率为 96.37%~97.36%,而透光率的变化范围则为 89.55%~97.32%。当果胶酶与纤维素酶的比例为 3:2 时透光率最大,为97.32%。安玉红等人在优化果胶酶与纤维素酶添加比例时发现,随着果胶酶与纤维素酶质量比的增大,刺梨汁的透光率呈先增大后减小的趋势,其中果胶酶与纤维素酶质量比为 3:1 时刺梨汁的透光率最大[5]。安玉红等认为这可能是由于果胶酶的质量浓度不断增加的同时对纤维素酶活性产生了抑制作用。本实验结果与安玉红等的研究结果类似,只是本实验中,当果胶酶与纤维素酶质量比为 3:2 时,刺梨、苹果混合果汁的透光率最大,可能是由于苹果汁的加入导致果胶酶与纤维素酶达到另一个合适比例时才能表现出最优的澄清效果。

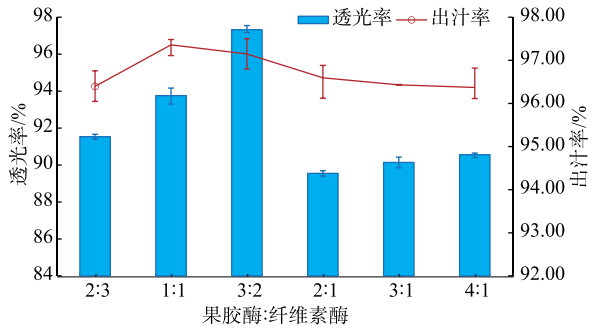


图 2 果胶酶与纤维素酶质量比对混合果汁澄清效果的影响

Fig. 2 Effect of the ratio of pectinase and cellulase on the clarification effect of mixed juice

2.1.3 酶解温度 酶解温度对混合果汁澄清效果的影响见图 3。

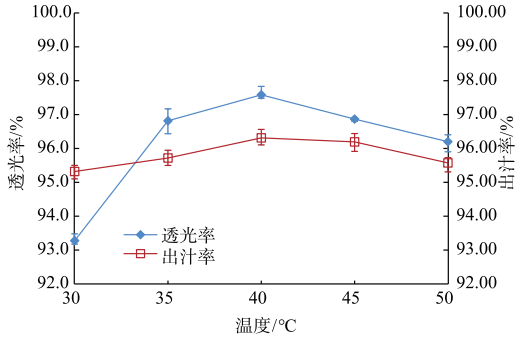


图 3 酶解温度对混合果汁澄清效果的影响

Fig. 3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the clarification effect of mixed juice

无论是透光率还是出汁率,都随酶解温度的上升,呈现先上升后下降的趋势,且透光率与出汁率均在 40 ℃时达到最大值。但是,随着酶解温度的变化,混合果汁的出汁率变化不大,在 95.32%~96.31%变化,而透光率的变化范围则相对出汁率的变化范围更大,为 93.3%~97.6%。

2.2 混合酶处理刺梨、苹果混合果汁条件的正交实验

在单因素优化实验的基础上,对酶解时间、果胶酶与纤维素酶的比例、酶解温度进行 $L_9(3^4)$正交实验。混合酶处理刺梨、苹果混合果汁条件的正交实验结果见表 3。

表 3 酶解温度、酶解时间、果胶酶与纤维素酶的比例,正交实验结果

Table 3 Results of orthogonal test of enzymolysis temperature, enzymolysis time, and ratio of pectinase to cellulase

实验号	*A* 酶解温度/℃	*B* 酶解时间/h	*C* 果胶酶与纤维素酶质量比	透光率/%
1	1	1	1	97.4±0.4
2	1	2	2	97.6±0.6
3	1	3	3	97.2±1.4
4	2	2	3	96.2±0.7
5	2	3	1	94.8±0.6
6	2	1	2	97.0±0.7
7	3	3	2	96.4±0.8
8	3	1	3	96.7±0.7
9	3	2	1	96.0±0.6

由极差分析可知,影响复合酶处理刺梨、苹果混合果汁透光率的 3 个因素主次顺序为 $A>B>C$,即影响最大的是酶解温度,其次是酶解时间,影响最小的是果胶酶与纤维素酶质量比。复合酶澄清处理混合果汁的最优条件为 $A_1B_1C_2$,即酶解温度为 35 ℃,酶解时间为 1.5 h,果胶酶与纤维素酶质量比为 3:2。采取此条件进行验证实验,经验证此条件下处理的混合果汁的透光率为 97.97%,比正交实验表中任一实验的透光率都高,达到了正交实验优化复合酶处理刺梨、苹果混合果汁酶解工艺条件的目的。

2.3 复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁品质的影响

2.3.1 复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁理化品质的影响 复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁理化品质的影响结果见表 4。实验组与对照组的 pH 和酸度并无显著差异,乳酸菌质量浓度较对照组有显著下降($P<0.05$),推测可能是因为复合酶澄清处理后的混合果汁经沉淀及过滤后丧失了部分营养物质,导致果汁中提供给乳酸菌的营养物质减

少，从而影响了乳酸菌的生长。实验组的透光率和还原糖质量浓度较对照组分别有极显著（$P<0.01$）和显著（$P<0.05$）提高，张铎等研究发现经果胶酶处理的山楂果浆，其还原糖质量浓度相较未经果胶酶处理的对照组有一定程度的增加[18]，与本实验结果相似。这一方面可能是酶制剂处理使果肉组织中的还原糖进一步溶出，提高了还原糖质量浓度，另一方面，可能是因为实验组的乳酸菌质量浓度少于对照组，导致乳酸菌对还原糖的利用降低，使得实验组中还原糖的质量浓度高于对照组。

表 4　复合酶处理对混合发酵果汁理化品质的影响

Table 4　Effect of compound enzyme treatment on the physical and chemical quality of mixed fermented juice

组别	pH 值	透光率/%	还原糖质量浓度/（g/L）	酸度%	乳酸菌含量/（×10⁶ CFU/mL）
对照组	3.68±0.02	76.1±0.90	32.95±1.34	3.00±0.04	14.9±1.3
实验组	3.67±0.03	96.37±0.60**	40.77±0.50*	2.95±0.07	6.5±3.1*

注：* 表示与对照组相比差异显著（$P<0.05$），** 表示与对照组相比差异极显著（$P<0.01$）。

2.3.2　复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁抗氧化品质的影响　复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁抗氧化品质的影响结果见表 5。相较对照组，实验组的总酚、总黄酮质量浓度均有所下降，但差异不显著。安玉红等用壳聚糖共固定化复合酶澄清处理刺梨汁，发现酶解后刺梨汁较酶解前总黄酮的质量浓度下降了 7.23%，但差异不显著[5]，与本实验结果相符。蒋永波等用酶解–吸附联用和酶解–絮凝联用 2 种方式澄清处理柠檬汁，经 2 种方式处理的柠檬汁相较柠檬原果汁中总酚的质量浓度均在一定程度上有所下降，且有显著影响，但本实验中澄清处理对总酚质量浓度的影响并不显著[19]，可能是由于蒋永波等采用的方法中，吸附或絮凝不利于总酚的稳定。实验组的类胡萝卜素相比对照组呈极显著下降（$P<0.01$）。果蔬汁中的果胶与类胡萝卜素之间存在某些相互作用，从而降低了类胡萝卜素的生物可及性[20]。通过果胶酶的水解作用，可破坏果胶与类胡萝卜素之间的相互作用，使植物细胞中的类胡萝卜素被更多地释放出来，提高其生物可及性[21]，而乳酸菌通过代谢则可分解类胡萝卜素从而显著降低类胡萝卜素的质量浓度[22]，因此，推测是果胶酶和纤维素酶的水解作用提高了实验组中类胡萝卜素的生物可及性，而乳酸菌的代谢进一步降低了果汁中类胡萝卜素的质量浓度。实验组中维生素 C 质量浓度、DPPH 自由基清除率较对照组均有所增加，但差异均不显著；但是实验组的超氧阴离子自由基清除率较对照组高了 17.35%，且二者差异极显著（$P<0.01$），实验组羟自由基清除率较对照组高了 14.13%，二者间差异显著（$P<0.05$）。李菀等人的研究显示，当利用果胶酶和纤维素酶分别提取甘草渣多糖时，随着果胶酶或纤维素酶用量的提高，提取物的超氧阴离子自由基清除率等抗氧化性指标也会逐渐增加[23]，这与本研究结果类似，推测是因为果胶酶或纤维素酶的作用，破坏了细胞大分子结构，从而使细胞中更多的抗氧化性物质得以释放。

表 5　复合酶处理对混合发酵果汁抗氧化品质的影响

Table 5　Effect of compound enzyme treatment on the antioxidant quality of mixed fermented juice

组别	总酚质量浓度/（mg/mL）	总黄酮质量浓度/（mg/mL）	类胡萝卜素质量浓度/（μg/mL）	维生素 C 质量浓度/（mg/dL）	DPPH 自由基清除率/%	超氧阴离子自由基清除率/%	羟自由基清除率/%
对照组	0.571 5±0.030 3	0.397 8±0.021 6	0.418±0.004	72.86±0.50	91.52±0.05	64.59±2.95	58.73±0.97
实验组	0.559 0±0.012 2	0.377 6±0.014 7	0.023±0.003**	75.09±0.73	93.49±0.11	81.94±2.40**	72.86±1.85*

注：* 表示与对照组相比差异显著（$P<0.05$），** 表示与对照组相比差异极显著（$P<0.01$）。

2.3.3　复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁感官评价的影响　复合酶处理对刺梨、苹果混合发酵果汁感官评价的影响见表 6。

实验组在色泽、组织状态方面所得评分均极显著高于对照组（$P<0.01$）；在香气和口感方面，实验组得分亦大于对照组，但差异不显著；从综合感官评价总分来看，实验组的感官评价总分亦大于对照组，且差异极显著（$P<0.01$）。具体而言，实验组在色泽方面呈黄色、澄清透亮；在香气方面可能由于酶解更利于挥发性物质的逸出，使得试验组的果香味更明显；组织状态方面，对照组略有沉淀，而实验组发酵果汁组织细腻、均匀一致；在口感方面，对照组

表 6　复合酶处理对混合发酵果汁感官评价的影响

Table 6　Effect of compound enzyme treatment on sensory evaluation of mixed fermented juice

组别	色泽	香气	组织状态	口感	总分
对照组	13±1.14	24±3.29	14±2.74	23±2.43	73±2.11
实验组	17±0.91**	26±2.83	18±1.44**	26±2.93	87±1.52**

注：* 表示与对照组相比差异显著（$P<0.05$），** 表示与对照组相比差异极显著（$P<0.01$）。

相较于实验组有明显粗糙及苦涩感。综上，果胶酶和纤维素酶组成的复合酶处理的刺梨、苹果混合发酵果汁的感官品质更受评价者接受或喜爱。

3 结　语

作者优化了果胶酶和纤维素酶澄清处理刺梨、苹果混合果汁的条件，得到最优的处理条件为：果胶酶与纤维素酶质量比为 3∶2，酶解温度 35 ℃，酶解时间 1.5 h，此时混合果汁的透光率可达到 97.97%。酶制剂澄清处理对混合果汁发酵后品质的影响。研究显示，果胶酶和纤维素酶的澄清处理虽然导致混合发酵果汁的类胡萝卜素的质量浓度显著下降，但对 pH、酸度以及总酚、总黄酮、维生素 C 的质量浓度无显著影响，还能显著提升混合发酵果汁中还原糖的质量浓度。同时，混合发酵果汁的超氧阴离子自由基和羟自由基清除率分别有显著和极显著的提高。因此，利用果胶酶和纤维素酶进行澄清处理，不仅可显著改善刺梨、苹果混合果汁的透光率，且能在发酵后较好地维持果汁中营养物质的稳定性，并显著提高发酵果汁的抗氧化性，改善发酵果汁的感官品质。

参考文献：

[1] 何春丽，樊卫国. 遮光对刺梨果实和叶片中维生素 C 与糖含量以及相关酶活性的影响[J]. 西北植物学报，2020，40(12)：2081-2092.
[2] 王慧竹. 刺梨有效成分分析及其体外生物活性研究[D]. 长春：吉林大学，2018.
[3] 陈代秀，夏伟丽，胡思前，等. 刺梨中活性物质的提取与性能探讨[J]. 化肥设计，2020，58(2)：13-17.
[4] 熊巧仪，刘丁群，鲁敏. 刺梨自然发酵后抗氧化物质含量与抗氧化活性分析[J]. 食品研究与开发，2018，39(1)：147-151.
[5] 安玉红，陆敏涛，黎代余，等. 共固定化复合酶澄清刺梨汁工艺的优化[J]. 贵州农业科学，2020，48(4)：134-138.
[6] 彭邦远. 刺梨果汁挥发性风味化合物组成及变化特性研究[D]. 贵阳：贵州大学，2018.
[7] 金丽梅，白静，刘伟，等. 柠檬果汁超声辅助果胶酶澄清工艺研究[J]. 饮料工业，2018，21(4)：50-54.
[8] 晏敏，周宇，贺肖寒，等. 红柠檬果汁澄清工艺的优化[J]. 食品与发酵工业，2018，44(8)：224-230.
[9] 吕长鑫，刘苏苏，李萌萌，等. 响应面复合酶法澄清南果梨汁及其饮料技术[J]. 食品与发酵工业，2016，42(5)：159-166.
[10] 王美美，刘振忠，于泳渤，等. 复合酶解制作红树莓汁工艺的优化及抗氧化研究[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12(12)：4970-4977.
[11] 李孟平，殷飞，张晓鸣，等. 榴梿的酶解工艺优化及其制备美拉德反应香料的研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(5)：23-29.
[12] 张歆皓，高竹婷，王卫东，等. 果汁中维生素 C 含量的测定及其稳定性研究[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版)，2018，33(3)：213-218.
[13] 赖婷，刘磊，张名位，等.不同乳酸菌发酵对桂圆肉中酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. 中国农业科学，2016，49(10)：1979-1989.
[14] 孙雪皎，史琳，张旋，等. 沙棘汁总黄酮测定方法的对比分析[J]. 沈阳农业大学学报，2019，50(1)：120-127.
[15] 刘嘉宁，刘璇，毕金峰，等. 破碎和均细化处理方式对胡萝卜汁中类胡萝卜素释放的影响[J]. 农业工程学报，2017，33(14)：307-314.
[16] 束文秀，吴祖芳，翁佩芳，等. 植物乳杆菌和发酵乳杆菌对胡柚汁发酵品质及其抗氧化性的影响[J]. 食品科学，2019，40(2)：152-158.
[17] 任旭桐，崔振华，邱佳，等. 枸杞汁澄清工艺研究[J]. 农产品加工，2019(14)：43-45.
[18] 张铎，毛健，刘双平，等. 果胶酶低温处理山楂鲜果浆制备山楂酒工艺优化[J]. 食品工业科技，2017，38(19)：161-165.
[19] 蒋永波，汪开拓，代领军，等. 不同澄清工艺对柠檬果汁品质影响及柠檬苦素贮存期间降解速率预测模型建立[J]. 食品工业科技，2020，41(22)：35-42.
[20] CERVANTES-PAZ B，JOSE O P，DAVID P M J，et al. Effect of pectin concentration and properties on digestive events involved on micellarization of free and esterified carotenoids[J]. **Food Hydrocolloids**，2016，60：580-588.
[21] 丁莹颖. 胡萝卜汁体系中果胶结构及变化对类胡萝卜素生物可及性的影响[D]. 北京：中国农业科学院，2020.
[22] 于金慧，马德源，刘云鹏，等. 乳酸菌发酵对螺旋藻主要功效成分影响的初步研究[J]. 食品工业科技，2019，40(18)：85-90.
[23] 李菀，胡月，李光霞，等. 纤维素酶和果胶酶提取对甘草渣多糖抗氧化和抗肿瘤性能的影响[J]. 食品工业科技，2020，41(9)：309-313.