

固定化混合酶提取番茄红素的工艺研究

龙海涛^{1,2,3},薛利新⁴,张志霞^{1,2},吴龙婷³,王娟¹,蒲陆梅^{1,2,*}

(1.甘肃农业大学理学院,甘肃兰州 730070;

2.甘肃农业大学农业资源化学与应用研究所,甘肃兰州 730070;

3.甘肃农业大学食品科学与工程学院,甘肃兰州 730070;

4.甘肃省疾病预防控制中心,甘肃兰州 730000)

摘要:使用海藻酸钠固定纤维素酶及果胶酶,对其提取番茄酱中番茄红素的工艺进行了研究。在单因素实验基础上,采用了响应面优化方法,得到的最佳条件为:酶解时间为2.8h,pH为4.0,酶解温度50℃,酶用量为1.00g/100g,在此条件下番茄红素提取量达到3.68μg/mL。固定化混合酶重复循环利用7次以上仍然保持了良好的稳定性。

关键词:番茄红素,固定化酶,果胶酶,纤维素酶,提取

Extraction of lycopene from tomato paste with immobilized pectinase and cellulase

LONG Hai-tao^{1,2,3}, XUE Li-xin⁴, ZHANG Zhi-xia^{1,2}, WU Long-ting³, WANG Juan¹, PU Lu-mei^{1,2,*}

(1. College of Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Institute of Agricultural Resources Chemistry and Application, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

4. Gansu Center for Disease Prevention and Control, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Pectinase and cellulase were immobilized on sodium alginate and was applied in the extraction of lycopene from tomato paste. Based on single factor experiments, response surface optimization method was used to determine the optimal conditions for immobilization. Results showed that the using immobilized pectinase and cellulase could improve the extraction rate of lycopene from tomato paste and the best time, pH, extraction temperature, enzyme–tomato mass ratio value were 2.8h, 4.0, 50℃ and 1.00g/100g respectively. Under these conditions, the extraction rate of lycopene was 3.68μg/mL. The immobilized pectinase and cellulase showed high stability, and could be used for 7 batches and its properties still kept fine performance.

Key words: lycopene; immobilized enzymes; pectinase; cellulase; extraction

中图分类号:TS202.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2014)04-0189-05

番茄红素(lycopene)是一种植物中所含的脂溶性色素,其结构是由2个非共轭的和11个共轭的碳-碳双键组成的直链多不饱和烯烃,经过环化可形成β-胡萝卜素,分子式为C₄₀H₅₆,熔点为174℃。天然存在的番茄红素都是全反式结构^[1]。自由基能够对细胞膜的功能以及结构造成损害,番茄红素中共轭的多个碳-碳双键能够捕获自由基,从而使得番茄红素具有了优良的抗氧化性能。因此能够有效地减少人类癌症、心脏病、动脉硬化、白内障和老年斑的发病率^[2-4]。此外,番茄红素有着巨大的需求量,不仅可用于制药工业,还能用于食品工业、化妆品等。

番茄一直被认为是番茄红素的主要来源之一,由于番茄红素在番茄中含量比较低,因此提取效率

的提高已经成为研究的热点之一,常用的方法有浸提法^[5]、酶反应法^[6]、超临界CO₂流体萃取法^[7]以及利用工程菌株发酵法生产番茄红素^[8],其中酶反应法由于催化效率高,条件比较温和,受到了广泛的欢迎,但由于酶的价格比较高和不易回收的缺陷,限制了酶辅助法提取番茄红素工艺的实际推广应用;与之相比,固定化酶不仅易于回收,而且可以重复利用,能够降低生产成本,因此,本文将常用的破壁用的果胶酶及纤维素酶按照一定的比较混合后,然后用海藻酸钠固定化,用于番茄红素的提取工艺,实现了酶的回收利用。且通过响应面优化设计,研究了用固定化的酶从番茄酱中提取番茄红素的工艺条件,为提高番茄红素的提取率提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

番茄酱 新疆迪盛番茄制品有限公司;果胶酶(酶活力≥10万U/g)、纤维素酶(酶活力≥2000U/g) 上海源叶生物科技有限公司;柠檬酸,柠檬酸三钠,

收稿日期:2013-06-07 * 通讯联系人

作者简介:龙海涛(1982-),男,硕士研究生,研究方向:营养与食品卫生学。

基金项目:甘肃省财政厅资助。

氯化钙 分析纯,天津化学试剂有限公司;海藻酸钠 食品级,天津市光复精细化工研究所;乙酸乙酯,戊二醛 分析纯,上海中泰化学试剂有限公司。

电热恒温水浴锅 上海市南阳仪器有限公司;UV-2100紫外可见分光光度计 日本岛津;pHS-3C型酸度计 上海雷磁仪器厂;SH2-D(Ⅲ)循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 番茄红素标准曲线的制定 番茄红素标含量的测定采用以苏丹I色素为标准物法^[9]。称取苏丹I色素0.025g(精确到0.0001g),用无水乙醇定容至50.00mL。准确移取上述标准溶液0.26、0.52、0.78、1.04、1.30mL。分别注入5个50mL容量瓶中,用无水乙醇定容至50.00mL,此溶液即相当于0.5、1.0、1.5、2.0、2.5μg/mL番茄红素的标准溶液。然后依次在472nm波长下,分别测定吸光度。以测得的吸光度为纵坐标,苏丹I色素标准溶液所相当的番茄红素质量浓度为横坐标,用Microcal Origin 6.0绘制标准曲线为番茄红素标准曲线,曲线方程为 $y=0.2307x-0.0155$, $r=0.9997$ 。

1.2.2 固定化酶的制备 将一定浓度的酶液加入到4g/100mL的海藻酸钠水溶液中,于37℃下搅拌均匀;用蠕动泵将混合液从5cm高度处滴入3%的CaCl₂水溶液中形成凝胶珠,在4℃条件下硬化一段时间。得到颗粒直径约为3mm、形状为球形的海藻酸钠固定化酶;将所得微球用0.5%的戊二醛液浸泡16h后,分别用蒸馏水、去离子水洗涤,4℃保存备用^[10]。

1.2.3 酶用量的确定 称取番茄酱100g,分别装在5个250mL的带塞三角瓶中,依次各加入含有游离酶0.6、0.8、1.0、1.2、1.4g的固定的果胶酶,pH为7,45℃酶解1h,冷却至室温,再加入乙酸乙酯100mL浸提1h,取上层有机相过滤后,测定滤液中番茄红素浓度。确定固定化果胶酶的最佳用量。再按同样上述方法确定固定化纤维素酶的最佳用量。

1.2.4 酶混合比例的确定 称取番茄酱100g,分别装在5个250mL的带塞三角瓶中,加入固定化果胶酶和纤维素酶质量比3:1、2:1、1:1、1:2、1:3,总酶量为1.2g/100g,pH为7,于45℃酶解1h,冷却至室温,再加入乙酸乙酯100mL浸提1h,取上层有机相过滤后,测定滤液中番茄红素浓度。确定混合酶的最佳比例。

1.2.5 混合酶用量的确定 称取番茄酱100g,分别装在6个250mL的带塞三角瓶中,在纤维素酶和果胶酶质量比为1:2的条件下,分别加入总酶量0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6g,pH为7,于45℃酶解1h,冷却至室温,再加入乙酸乙酯100mL浸提1h,取上层有机相过滤后,测定滤液中番茄红素浓度。确定混合酶最佳用量。

1.2.6 酶解pH的确定 称取番茄酱100g,分别装在5个250mL的带塞三角瓶中,用柠檬酸-柠檬酸三钠溶液依次调节pH为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0,而后往三角瓶中分别加入1.0g的混合酶,其中纤维素酶和果胶酶的质量比为1:2,于45℃酶解1h,冷却至室温,再加入乙酸乙酯100mL浸提1h,取上层有机相过滤后,测定滤

液中番茄红素浓度。确定最佳pH。

1.2.7 酶解温度的确定 称取番茄酱100g,分别装在5个250mL的带塞三角瓶中,加入1.0g的混合酶,其中纤维素酶和果胶酶的质量比为1:2,pH为4,分别在30、35、40、45、50、55℃下,酶解1h,冷却至室温,再加入乙酸乙酯100mL浸提1h,取上层有机相过滤后,测定滤液中番茄红素浓度。确定酶解的最佳温度。

1.2.8 酶解时间的确定 称取100g的番茄酱,分别装在5个250mL的带塞三角瓶中,加入1.0g的混合酶,其中纤维素酶和果胶酶的质量比为1:2,pH为4,于50℃酶解1、2、3、4、5h,冷却至室温,再加入乙酸乙酯100mL浸提1h,取上层有机相过滤后,测定滤液中番茄红素浓度。确定酶解的最佳时间。

1.2.9 酶解最佳提取条件的确定 在单因素实验基础上,确定纤维素酶和果胶酶的质量比为1:2,通过混合酶用量、酶解温度、酶解pH、酶解时间4个主要因素,进行四因素三水平的响应面实验设计(表1),以确定酶解提取番茄红素的最佳条件。

表1 果胶酶和纤维素酶提取番茄红素的因素水平编码表

Table 1 Factors and levels for the Box-Behnken design

因素	编码水平		
	-1	0	1
X ₁ 酶解时间(h)	1	2	3
X ₂ pH	3	4	5
X ₃ 酶解温度(℃)	45	50	55
X ₄ 混合酶用量(g/100g)	0.8	1.0	1.2

2 结果与分析

2.1 酶单独用量对番茄红素提取的影响

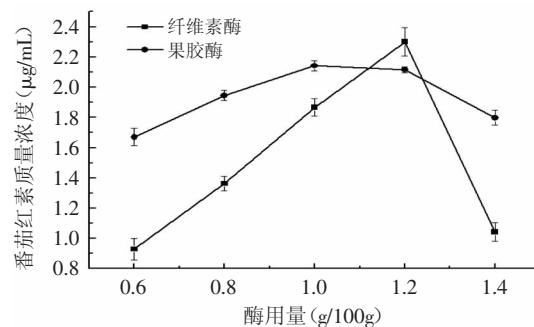


图1 果胶酶、纤维素酶单独使用对番茄红素提取的影响

Fig.1 Effect of individual hydrolysis of tomato by cellulase and pectinase on lycopene extraction

由图1可见,单独使用果胶酶酶解提取番茄红素时,随着酶用量的增多,番茄红素质量浓度逐渐增加,但是超过最佳用量后质量浓度反而下降。果胶酶最佳用量是1.0g/100g,此时番茄红素的质量浓度可达2.14μg/mL;纤维素酶随着酶用量的增加,质量浓度先升高,而后逐渐下降,最佳用量是1.2g/100g,此时番茄红素的质量浓度可达2.30μg/mL。而且图1中可以看出,纤维素酶的提取效率与果胶酶提取基本相当,这个与袁春龙等^[11]所报道的果胶酶效果优于

纤维素酶的结论有所差异,可能是所用番茄的品种存在差异。果胶酶和纤维素酶是主要的破壁酶,能够释放出封闭在细胞里面的番茄红素,从而使得提取率大幅提高。

2.2 酶混合比例对番茄红素提取的影响

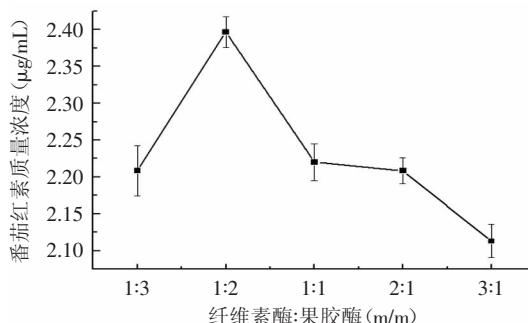


图2 纤维素酶和果胶酶混合比例的确定

Fig.2 Effect of pectinase/cellulase ratio on lycopene extraction

由图2可知,随着纤维素酶和果胶酶的比例的逐渐升高,番茄红素质量浓度也逐渐升高,二者比例在1:2时,番茄红素质量浓度达到最大值,此后随着比例的增加,番茄红素质量浓度随之减少,因此选择最佳质量比例为1:2,此时番茄红素的质量浓度可达 $2.40\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

图1和图2可知,单独使用酶时,番茄红素的最大质量浓度可达 $2.30\mu\text{g}/\text{mL}$,混合酶使用时,番茄红素的质量浓度可达 $2.40\mu\text{g}/\text{mL}$,因此选用混合酶作为破壁酶。

2.3 混合酶用量对番茄红素提取的影响

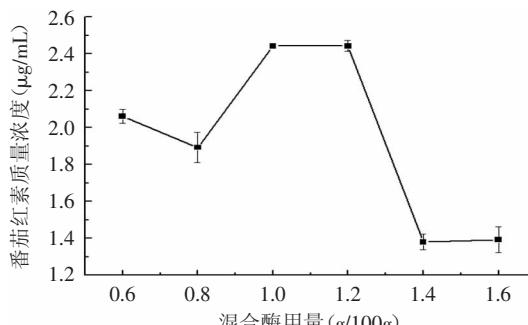


图3 混合酶用量对番茄红素提取的影响

Fig.3 Effect of total dosage of pectinase and cellulase on lycopene extraction

由图3可见,纤维素酶和果胶酶以1:2的比例混合均匀,随着混合酶总量的增多,番茄红素质量浓度缓慢升高,至 $1.0\text{g}/100\text{g}$ 达到最大,故选择最佳用量为 $1.0\text{g}/100\text{g}$ 。过多的固定化酶不仅不能提高提取率,反而造成了提取率的下降,这个主要是由于果胶在酶的作用下水解产物 β -半乳糖醛酸等聚集在固定化酶的附近,从而改变了固定化酶的微环境,产生了扩散限制效应,使得番茄红素质量浓度反而下降。

2.4 pH对番茄红素提取的影响

由图4可知,在纤维素酶和果胶酶最佳比例1:2,用量 $1.0\text{g}/100\text{g}$, 45°C 酶解1h,随着提取液pH的升高,

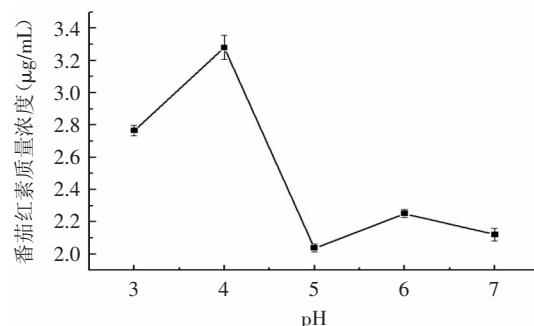


图4 pH对番茄红素提取的影响

Fig.4 Effect of pH on lycopene extraction

提取率先上升后下降,当pH4.0时,番茄红素质量浓度最大,故选择最佳pH为4.0。袁永成^[2]研究表明,番茄红素在碱性条件下比较稳定,因此条件选择倾向于pH比较大的条件,但是果胶酶的最佳酶活在pH3.8,纤维素酶的最佳酶活在pH5.0,最佳酶活存在的pH与番茄红素最稳定的pH两者之间存在冲突,根据实验数据,本研究选择最佳pH为4.0。

2.5 酶解温度对番茄红素提取的影响

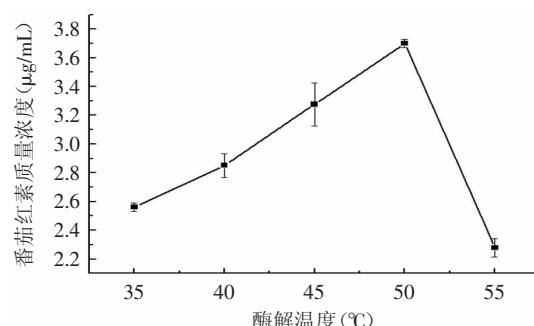


图5 酶解温度对番茄红素提取的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis temperature on lycopene extraction

由图5可见,纤维素酶和果胶酶的比例1:2,用量 $1.0\text{g}/100\text{g}$,pH4.0,酶解1h,随着酶解温度的升高,番茄红素质量浓度先升高再下降,在 50°C 时达到最大,故选择酶解温度为 50°C 。

2.6 酶解时间对番茄红素提取的影响

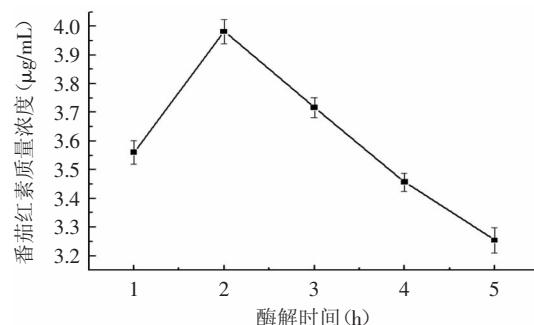


图6 酶解时间对番茄红素提取的影响

Fig.6 Effect of hydrolysis time on lycopene extraction

由图6可知,纤维素酶和果胶酶的比例1:2,用量 $1.0\text{g}/100\text{g}$,在 50°C 、pH4.0条件下提取番茄红素,随着

酶作用时间的延长,番茄红素质量浓度迅速增加,当达到2h时,再延长酶解时间,其质量浓度趋于下降,所以酶解时间确定为2h。时间越长,一方面番茄红素在空气中容易被氧化,导致番茄红素质量浓度的下降,另一方面,时间长在工艺上来说会延长生产的周期,也会造成不利影响。此结果与Sheetal M等^[13]报道的时间为20min有所不同,主要是由于他们所采用的酶为游离酶,且提取温度为25℃,所以需要的时间较短。

2.7 响应曲面实验结果与分析

2.7.1 实验结果 Box-Behnken的4因素3水平实验的取值见表2,共27个实验点。其中实验号1~4和8~27是析因实验,实验号5~7是中心实验。这27个实验点可分为析因点和零点,其中析因点为自变量取值在X₁、X₂、X₃所构成的三维顶点;零点为区域的中心点,零点实验重复3次,用以估计实验误差^[14]。

2.7.2 回归方程建立与方差分析 通过SAS 8.2数据分析软件进行回归分析,由表3可知二次回归方程为:

$$Y_3 = 62.77 + 1.64X_1 - 2.27X_2 + 4.66X_3 - 0.46X_4 - 0.57X_1X_2 - 3.5X_1X_3 + 4.84X_1X_4 - 1.04X_2X_3 + 0.56X_2X_4 -$$

表2 响应面分析方案及实验结果

Table 2 Design and test results of response surface analysis

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y 番茄红素质量浓度(μg/mL)
1	-1	1	0	0	2.594278
2	0	-1	-1	0	3.105765
3	1	-1	0	0	2.711313
4	-1	0	-1	0	2.945384
5	0	0	0	0	3.981361
6	0	0	0	0	3.994365
7	0	0	0	0	3.946684
8	-1	0	0	-1	2.381881
9	-1	0	1	0	3.383182
10	0	0	1	-1	3.396186
11	0	1	0	1	2.529259
12	0	0	1	1	3.071088
13	0	-1	1	0	3.469874
14	0	1	-1	0	2.728652
15	1	1	0	0	2.572605
16	0	-1	0	1	2.477243
17	0	0	-1	-1	2.685306
18	1	0	0	1	2.902037
19	1	0	0	-1	2.182488
20	0	1	1	0	3.036411
21	0	0	-1	1	2.910707
22	0	1	0	-1	2.702644
23	0	-1	0	-1	2.758994
24	-1	0	0	1	2.017772
25	1	0	1	0	3.248808
26	-1	-1	0	0	2.624621
27	1	0	-1	0	3.274816

$$3.88X_3X_4 - 22.17X_1^2 - 21.93X_2^2 - 9.28X_3^2 - 24.91X_4^2。$$

表3 Box-Behnken回归方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression equation for Box-Behnken experiments

变异源	平方和	自由度	均方	F值	p值
模型	5826.85	14	416.2	22.91	<0.0001**
X ₁	32.21	1	32.21	1.77	0.2078
X ₂	61.8	1	61.8	3.4	0.09
X ₃	260.9	1	260.9	14.36	0.0026**
X ₄	2.54	1	2.54	0.14	0.7149
X ₁ X ₂	1.31	1	1.31	0.072	0.7932
X ₁ X ₃	49.01	1	49.01	2.7	0.1264
X ₁ X ₄	93.54	1	93.54	5.15	0.0425*
X ₂ X ₃	4.29	1	4.29	0.24	0.6359
X ₂ X ₄	1.25	1	1.25	0.069	0.7973
X ₃ X ₄	60.09	1	60.09	3.31	0.094
X ₁ ²	2621.48	1	2621.48	144.29	<0.0001**
X ₂ ²	2565.04	1	2565.04	141.18	<0.0001**
X ₃ ²	459.04	1	459.04	25.27	0.0003***
X ₄ ²	3308.8	1	3308.8	182.12	<0.0001**
常数项	218.02	12	18.17		
失拟值	215.31	10	21.53	15.87	0.0607

注:*表示显著($p<0.05$);**表示极显著($p<0.01$)。

从表3回归方程各项方差分析结果看出,X₃、X₁²、X₂²、X₃²、X₄²对番茄红素提取率的影响极显著,X₁X₄对番茄红素提取率的影响显著。可见:实验各因素对番茄红素提取率的影响不是简单的线性关系,各因素对番茄红素提取率影响大小顺序为:酶解温度>pH>酶解时间>酶用量。从表3可得,模型极显著($p<0.0001$),模型失拟项p值为0.0607,即模型失拟项不显著,模型选择合适。

2.7.3 响应曲面的分析以及最佳操作点的确定 根据回归分析结果(表2)做出相应的响应曲面分析图,结果见图7。

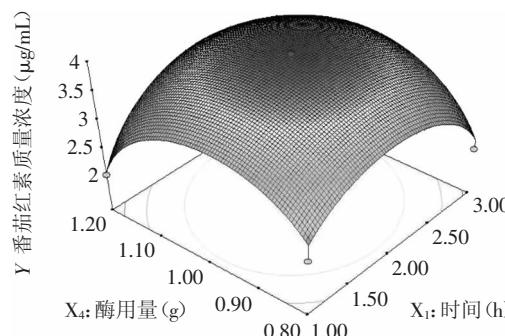


图7 酶解时间和酶用量对提取量的影响

Fig.7 Response surface plot of combined effects of time and total dosage of pectinase and cellulase on extracting rate

图7为酶解时间和酶用量之间的交互作用。提高酶解时间和混合酶用量均能提高番茄红素的质量浓度。当时间处于中心点时,番茄红素的质量浓度表现

出随着酶用量先升高后下降的趋势。为了确定各因素的最优值,利用SAS软件的Rsreg程序进行典型分析,通过分析后得到最优条件:酶解时间为2.84h,pH为3.94,酶解温度50.4℃,酶用量为1.01g/100g,此时番茄红素的质量浓度为3.65μg/mL。

2.7.4 回归模型的验证实验 为了实验的方便性,将上述优化条件进行校正,选择酶解时间为2.8h,pH为4.0,酶解温度为50℃,混合酶用量为1.0g/100g,纤维素酶和果胶酶的质量比为1:2,共进行3次平行验证实验,实验结果番茄红素的质量浓度为3.68μg/mL,与预测值3.65μg/mL接近,可见该模型能较好地预测实际酶解情况。

2.8 固定化酶处理番茄红素的重复利用率

将酶解后的残渣过滤,然后将残渣用100目的筛子浮选,将上层的固定化酶分离出来,而后用蒸馏水清洗,微球用0.5%的戊二醛液浸泡16h,分别用蒸馏水、去离子水洗涤,4℃保存备用。按1.2.3的方法和2.7.4确定的最佳条件下将固定化酶重复使用7次,得到的番茄红素提取液质量浓度结果见图8。从图8可知,固定化酶重复回收使用7次,其提取液的番茄红素质量浓度依然大于不使用固定化酶的提取液的番茄红素质量浓度。此外,从图8也可以看见,使用混合的游离酶其效果要好于固定化酶,但是游离酶不能重复使用,而固定化酶可以多次使用,所以经济效应优于游离酶,因此,固定化酶有着其独有的优势。

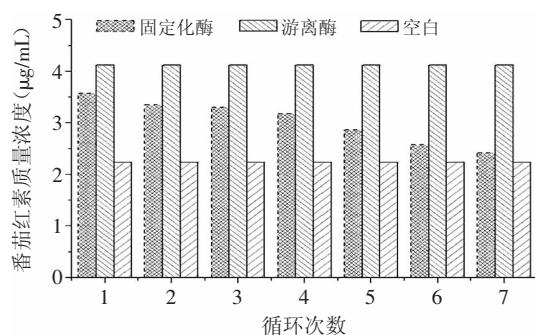


图8 酶处理次数对提取效果的影响

Fig.8 Effect of enzymatic treatment batch on the extraction of lycopene from tomato

3 结论

本实验采用价格相对低廉和低毒的乙酸乙酯为提取溶剂,经响应曲面法优化后确定的番茄红素提取实验的最佳条件为:酶解时间为2.8h,pH为4.0,酶解温度50℃,酶用量为1.00g/100g,在此条件下番茄红素提取量达到3.68μg/mL。

采用固定化酶可以实现酶活力的缓慢释放,酶的稳定性要比游离状态的好,而且还可以实现酶的重复利用,节约生产成本;其次番茄红素提取采用固

定化酶虽然已有报道^[15],但是以往的报道中大多采用固定一种酶,而对于混合酶的固定化应用于番茄红素的提取未见报道,而且本文中用了番茄红素的质量浓度来衡量提取率,相对于以往用吸光度衡量更加直观反映出提取效果。随着社会经济发展,番茄红素的需求量越来越大,但番茄红素提取率一直较低,本文通过响应面优化设计,得到了比现有方法更高的提取率的理论模型及数据,而且随着固定化技术的发展,将来在固定化载体技术方面突破,那么固定化酶的活性将会得到进一步提高,会产生良好的经济价值。

参考文献

- [1] Beecher G R. Nutrient content of tomatoes and tomato products[J]. Pro Soc Exp Biol Med, 1998, 218(2):98-100.
- [2] Visconti R, Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer[J]. Current Opinions in Drug Discovery and Development, 2009, 12(2):240-245.
- [3] Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2009, 2(5):259-269.
- [4] Stefano Cuccolini, Antonio Aldini, Livia Visai. Environmentally Friendly Lycopene Purification from Tomato Peel Waste: Enzymatic Assisted Aqueous Extraction[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61:1646-1651.
- [5] 赵功玲, 娄天军. 提高粗制品番茄红素提取率的工艺[J]. 食品工业, 2003(3):32-33.
- [6] 袁春龙, 张金. 纤维素酶和果胶酶对番茄红素提取的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(13):100-104.
- [7] 刘振春, 陈彦平, 李慧, 等. 酶辅助超临界萃取番茄红素工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(20):246-250.
- [8] 王航, 袁其朋, 张黛黛. 发酵法生产番茄红素培养方法的改进及优化[J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(6):38-41.
- [9] 刘玉梅, 刘奎钫. 番茄红素油树脂中番茄红素的分析方法的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(12):127-130.
- [10] 刘伟雄. 游离果胶酶和固定化果胶酶的酶学性质[J]. 食品研究与开发, 2001, 22(4):5-7.
- [11] 袁春龙, 张金. 纤维素酶和果胶酶对番茄红素提取的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(13):100-104.
- [12] 袁永成. 浅析多种因素对于番茄红素稳定性影响的研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(11):128-131.
- [13] Sheetal M, Choudhari, Laxmi ananthanarayanan. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues[J]. Food Chemistry, 2007, 102(1):77-81.
- [14] Quanhong L, Caili F. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein[J]. Food Chemistry, 2005, 92(4):701-706.
- [15] 周丹丹, 吴晓英, 甄双染. 固定化果胶酶提取番茄红素的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(11):1157-1159.