

混合发酵法生产脐橙皮膳食纤维的研究

卫娜

(广州泰邦食品添加剂有限公司, 广东广州 510655)

摘要: 以绿色木霉和米根霉为发酵菌种, 制备脐橙皮膳食纤维, 以膳食纤维得率为参考指标, 通过单因素及正交试验以优化最佳制备条件, 结果表明: 最佳制备条件为接种比例(绿色木霉:米根霉) 3:2; 发酵温度 25 ℃; 发酵 pH 值为 6.5; 发酵时间为 3 d。此时, 所得的发酵产物中, SDF、IDF 以及 TDF 得率分别为 32.93%、49.87%、82.80%, 持水力和溶胀性分别为 6.12 g/g、15.29 mL/g。

关键词: 发酵; 膳食纤维得率; 脐橙皮; 绿色木霉; 米根霉

文章编号: 1673-9078(2012)4-434-437

Preparation of Dietary Fiber from Peel of *Citrus sinensis Osbeck* by Fermentation

WEI Na

(Taibang Food Additive Co., Ltd, Guangzhou 510655, China)

Abstract: Dietary fiber from peel of *Citrus sinensis Osbeck* was prepared by fermentation of *Trichoderma viride* and *Rhizopus oryzae*. The optimal medium composition was found by single factor and orthogonal design method as follows: *Trichoderma viride*-*Rhizopus oryzae* ratio 3:2, fermentation temperature 25 ℃, pH 6.0 and fermentation time 3d. Under the optimal conditions, SDF, IDF and TDF were 32.93%, 49.87% and 82.80%, respectively. The expansibility and water-holding capacity of dietary fiber were 14.5 mL/g and 6.23 g/g, respectively.

Key words: fermentation; yield of dietary fiber; *Citrus sinensis Osbeck*; *Trichoderma viride*; *Rhizopus oryzae*

膳食纤维(dietary fiber, DF)是指能抗人体小肠消化吸收而在大肠中部分或全部发酵的可食用植物性成分、碳水化合物及其类似物的总称。因其具有较强的持油、持水、增容功能, 可用于调节肠胃道、防治便秘, 预防结肠癌, 预防心血管疾病, 降低胆固醇等^[1]。用酸碱法制取膳食纤维时, 反复的水浸泡冲洗和频繁的热处理会明显减少纤维终产品的持水力和溶胀性^[2]。近年来, 有不少关于酶法提取植物膳食纤维的相关报道^[1,3]。但是由于酶本身存在易失活, 提取条件要求高, 不易于多批次反复使用的缺点, 限制了其的大规模应用^[4]。微生物, 特别是霉菌是纤维素酶的良好来源。与酶法提取植物膳食纤维方法相比, 微生物可以再生利用, 更加经济, 同时, 微生物细胞作为酶的保护介质, 提高酶的活性^[5,6]。近些年微生物法提取植物纤维素引起了科研人员的兴趣, 同时脐橙皮渣是良好的膳食纤维原料^[7], 本试验使用霉菌进行脐橙皮膳食纤维的制备。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

赣南脐橙, 产自江西赣州; 原粉的制作: 去果肉、

去油囊, 留果皮。果皮经干燥箱 60 ℃, 鼓风烘干。干燥果皮粉碎, 过 20 目筛, 干燥器保存; 绿色木霉、米根霉, 本实验室自行分离保存; 土豆培养基, 广东环凯微生物科技有限公司; 发酵培养基: 硫酸铵 0.5 g/L, 磷酸氢二钾 0.1 g/L, 硫酸镁 0.02 g/L, 脐橙皮原粉 15 g/mL。

1.2 仪器与设备

HH-8 恒温水浴锅, 江苏省金坛市环宇科学仪器厂; QK-30 型高压蒸汽灭菌锅, 上海坤肯生物化工有限公司; THZ-D 台式恒温振荡器, 江苏太仓实验设备厂; 恒温培养箱, 上海跃进医疗器械一厂; SW-CJ 超净工作台, 江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; pH 计, 上海器宏科学仪器设备有限公司; 高速冷冻离心机, 日立 Hitachi; DZF-6210 真空干燥箱, 上海和呈仪器制造有限公司; FW80 万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵样品的制备

将配制的发酵培养基 1000 mL 进行 121 ℃、20 min 的灭菌处理, 冷却后, 于超净工作台内将 2 mL 的 107 个/mL 的混合菌种(孢子液)接种至冷却至室温的培养基中, 进行不同条件的培养。一定培养时间

后将发酵液过滤，滤渣为不溶性膳食纤维 (IDF)，向滤液中加入 4 倍体积的 95% 乙醇，静置 5 h，沉淀则为可溶性膳食纤维 (SDF)。两者的总和即为总膳食纤维 (TDF)。在 50 °C 条件下烘干至质量不在变化则为膳食纤维样品。

1.3.2 测定方法

1.3.2.1 膳食纤维的测定

采用酶重量法测定发酵样品以及原粉中各种膳食纤维得率：TDF、SDF、IDF。具体步骤参见 AOAC991.43《膳食纤维的测定》^[8]。

其中膳食纤维提高率的计算公式为：

$$\frac{\text{发酵后的膳食纤维质量} - \text{原粉中膳食纤维的质量}}{\text{原粉中膳食纤维的质量}} \times 100\%$$

1.3.2.2 溶胀性测定^[9]

将一定质量 M 的样品放入量筒中，加入室温的蒸馏水使总体积达到 50 mL，记录加入的蒸馏水的体积 V₁，摇匀后于室温下静置 24 h，再次记录量筒中的内容物的总体积 V₂。最后将 V₂ 减去 V₁ 即为溶胀的体积。

$$\text{溶胀性} = \frac{V_1 - V_2}{M}$$

注：V₁、V₂ 单位为 mL，M 单位为 g。

1.3.2.3 膳食纤维持水力的测定^[10]

将一定质量 M₁ 的样品放入量筒中，加入室温的蒸馏水使样品达到饱和，同时在室温下浸泡 24 h，在 3000 r/min 条件下将浸泡了水的样品离心 15 min，去除离心后的水分，将固体称重，记录质量 M₂。

$$\text{持水力} = \frac{M_2 - M_1}{M_1}$$

注：M₁、M₂ 单位为 g。

1.3.2.4 纤维素和木质素的测定^[10]

参考《绿色木霉发酵制取柑桔膳食纤维及其理化特性研究》中纤维素和木质素的测定。

1.3.2.5 其他理化指标测定方法^[11-13]

蛋白质、水分、灰分均采用国家标准进行测定。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 接种比例对膳食纤维得率的影响

接种绿色木霉和米根霉一共 2 mL。按照绿色木霉：米根霉的体积比 (mL/mL) 为 3:1、2:1、1:1、1:0 接入相应体积的两种菌悬液至发酵培养基中，在 30 °C 条件下培养 2 d，分别测定 SDF、IDF、TDF 得率，结果见图 1。

从图 1 可以看出，当绿色木霉与米根霉按照等体积的比例接种时，SDF 得率较高，此时的 SDF 得率达

25.53%。而 IDF 的得率则是随着绿色木霉比例的升高而增加。经过发酵处理的 SDF 得率相对于未经处理的原粉，有较大的提高 (提高率 62.4~97.8%) 而 IDF 得率的相对原粉来说变化不如 SDF 明显，其变化率仅为 15.9~25.3%。

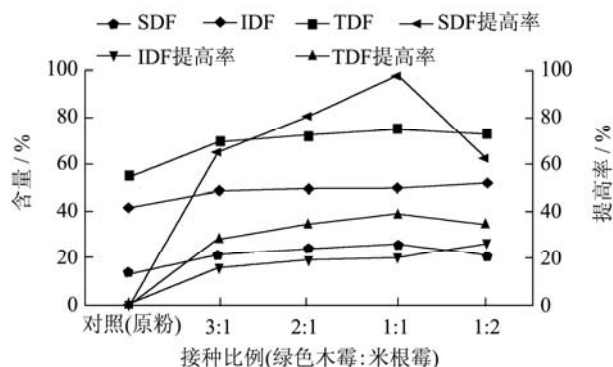


图 1 接种比例对膳食纤维的率的影响

Fig.1 Effect of inoculation of starter on DF extraction

2.1.2 发酵温度对膳食纤维得率的影响

接种量为 10⁷ 个/mL 的绿色木霉和米根霉各 1 mL。分别在 10、20、30、40 °C 条件下培养 2 d，分别测定 SDF、IDF、TDF 得率，结果见图 2。

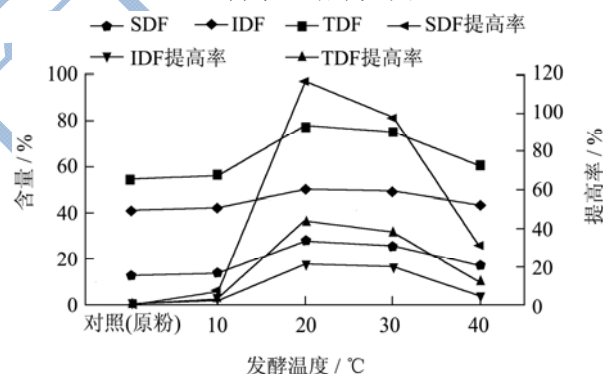


图 2 发酵温度对膳食纤维的率的影响

Fig.2 Effect of temperature on DF extraction

从图 2 可以得出，当发酵温度在 10 °C 时，菌体基本上不进行发酵，SDF 和 IDF 几乎没有增加。而温度在 20 °C 时，能产生较高含量的 SDF 和 IDF，随着温度的升高，两者的含量均进一步下降。

2.1.3 pH 值对膳食纤维得率的影响

接种量为 10⁷ 个/mL 的绿色木霉和米根霉各 1 mL。分别 30 °C 条件下发酵培养 2 d，调节发酵液的 pH 值分别至 5、6、7、8。测定 SDF、IDF、TDF 得率，结果见图 3。

pH 值是影响微生物生长和酶发挥催化功能的重要因素。从图 3 可以得出，最适发酵 pH 在 6~7 之间。这可能是弱酸性的环境有助于绿色木霉和米根霉的中相关酶系发挥催化功能。其中，pH 为 7 时，SDF、IDF、TDF 分别为 27.10%、50.10%、77.20%。

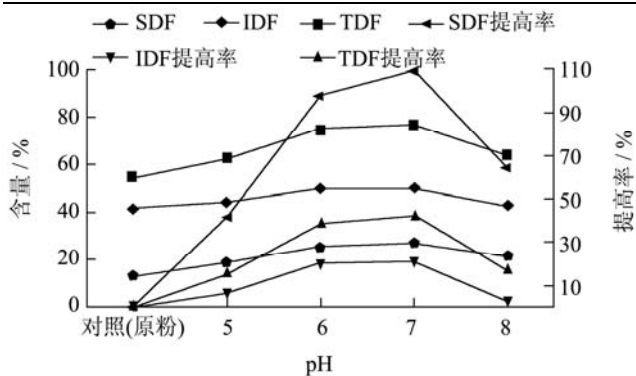


图3 pH对膳食纤维的率的影响

Fig.3 Effect of pH on DF extraction

2.1.4 发酵时间对膳食纤维得率的影响

接种量为 10^7 个/mL 的绿色木霉和米根霉各 1 mL。分别 30 °C 条件下发酵培养 1、2、3、4 d，测定 SDF、IDF、TDF 得率，结果见图 4。

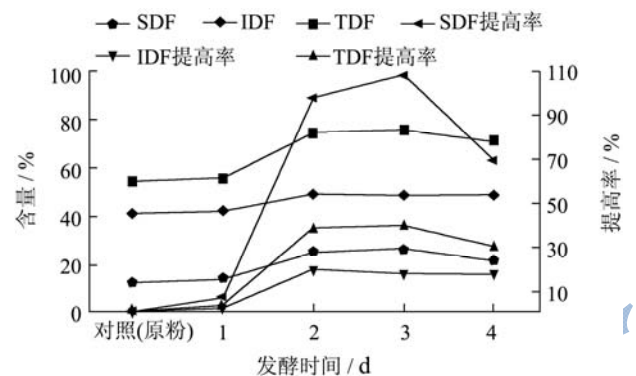


图4 发酵时间对膳食纤维的率的影响

Fig.4 Effect of time on DF extraction

根据有关文献报道^[4]，绿色木霉发酵产生 SDF 时，初始阶段为延滞期，此时将利用发酵液中的果胶、糖类等成分，导致 SDF 下降而随着时间的延长，绿色木霉进入对数生长期，产生大量的纤维素酶和淀粉酶，这些酶能够将不可溶性膳食纤维分解为可溶成分，使得 SDF 含量增加并达到最大值。

在本实验中，研究发酵时间对 SDF、IDF、TDF 三者得率的影响如图 4 所示，不论是 SDF，或者 IDF，其含量均随着发酵时间的延长出现先提高后降低的趋势。最适发酵时间为 3 d。其 SDF、IDF、TDF 的量分别为 26.90%、48.79%、75.69%。

2.2 正交实验

通过单因素实验得出了各项因素的最佳条件范围，在此基础上通过正交实验，进一步优化实验条件。在单因素试验中，各个条件的变化对 SDF 得率的影响大于对 IDF 得率的影响大。并且，不管是发酵后的产品还是原粉中，SDF 的得率远小于 TDF 的得率，然而 SDF 的生理作用明显大于 IDF。因此在正交试验中，以 SDF 得率为评价参数。

表1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A [接种比例/ (绿色木霉:米根霉)]	B (发酵 温度/h)	C (发酵 pH)	D (发酵时 间/d)
1	3:2	20	6	2
2	1:1	25	6.5	2.5
3	2:3	30	7	3

表2 正交实验结果

试验号	A	B	C	D	SDF/%
1	1	1	1	1	25.12
2	1	2	2	2	31.21
3	1	3	3	3	31.89
4	2	1	2	3	30.01
5	2	2	3	1	28.81
6	2	3	1	2	27.67
7	3	1	3	2	26.92
8	3	2	1	3	28.39
9	3	3	2	1	28.17
A1	29.41	27.35	27.06	27.37	
A2	28.83	29.47	29.80	28.60	
A3	27.83	29.24	29.21	30.10	
R	1.58	2.12	2.74	2.73	

按 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验，正交实验因素水平见表 2。从表 2 中，可以得到，4 个因素对 SDF 得率的影响大小依次为 C>D>B>A，即发酵 PH 值>发酵时间>发酵温度>接种量，最佳发酵工艺条件为接种量（绿色木霉:米根霉）3:2；发酵温度 25 °C；发酵 pH 值为 6.5；发酵时间为 3 d。即最佳发酵工艺条件为 A₁B₂C₂D₃，用此发酵条件进行混合发酵制备脐橙皮膳食纤维的各项结果见表 3、表 4。

2.3 发酵样品理化分析

表3 脐橙皮及发酵样品化学组成 (%)

样品	蛋白质	木质素	纤维素	水分	灰分	SDF	IDF	TDF
发酵样品	10.31	21.19	19.80	9.57	13.29	32.93	49.87	82.80
原粉	5.19	13.18	29.87	13.11	3.99	12.91	41.27	54.18

表4 发酵样品的溶胀性和持水力

样品	溶胀性/(mL/g)	持水力/(g/g)
发酵样品	15.29	6.12
原粉	10.46	5.28

根据 2.2 中正交实验, 优化所得的最佳发酵工艺条件进行发酵, 对发酵样品的理化成分进行分析, 结果见表 3。从表 3 可得, 与脐橙皮原粉相比, 发酵样品的蛋白含量有了明显的增加, 木质素含量有明显的增加。TDF 也达到了整个发酵试验的最大值 82.80%。

通过表 4 可知, 发酵样品的溶胀性和持水力均高于原粉, 持水力和溶胀性的增大表明膳食纤维的吸水、吸油能力增强, 膳食纤维的生理活性越好^[15]。因此通过发酵处理的样品其膳食纤维的生理活性好于原粉。

3 结论

3.1 通过单因素试验和正交试验确定了混合法发酵制备脐橙皮膳食纤维的最佳工艺: 接种量(绿色木霉: 米根霉) 3:2; 发酵温度 25 °C; 发酵 pH 值为 6.5; 发酵时间为 3 d。此条件发酵所得的发酵产物中, SDF、IDF 以及 TDF 得率分别为 32.93%、49.87%、82.80%。

3.2 在本试验中, 发酵样品的持水力和溶胀性要好于原粉, 这也避免了在酸碱法制备过程中由于酸碱对纤维结构的破坏而导致的持水力和溶胀力的下降。

3.3 在本试验中, 通过混合发酵制备的产物, 均能获得较高的 SDF 得率, 而 SDF 有比 IDF 更好的生理活性, 文献指出^[16]膳食纤维组成中 SDF 含量达到 10% 以上才是高品质膳食纤维, 否则只能被称 SDF 作填充料型膳食纤维。因此本混合发酵法是一种良好的制备 SDF 的方法。本研究方法为综合利用加工废料脐橙皮提供了理论依据, 也为其它农副产品膳食纤维的制备提供了参考和方法。

参考文献

- [1] 冯志强, 李梦琴, 刘燕燕. 生物酶法提取麦麸膳食纤维的研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(1): 8-10
- [2] 郑建仙, 丁霄霖. 大豆膳食纤维化学结构与工艺学的研究化学结构的鉴定(上)[J]. 中国粮油学报, 1995, 10(3): 15-24
- [3] 周小理, 钱韻芳, 周一鸣. 酶法处理对苦荞麦麸皮膳食纤维物性的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 36-39
- [4] 吴义真, 邹有土, 林琳. 脂肪酶催化合成生物柴油的瓶颈问题及其对策[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 117-123
- [5] Molinari F, Gandolfi R, Converti A, Zilli Mycelium-bound carboxylesterase from *Aspergillus oryzae*: an efficient catalyst for acetylation in organic solvent [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 27(8): 626-630
- [6] Parizia Spizzo, Alessandra Basso, Cynthia Ebert, et al. Resolution of (R, S)-flurbiprofen catalysed by dry mycelia in organic solvent [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63: 11005-11010
- [7] 陈美芬. 江西赣南脐橙化学组分分析方法及其指纹图谱研究[D]. 南昌大学, 2011
- [8] The American Association of Cereal Chemists (AACC). The definition of dietary fiber [J]. *Cereal Food World*, 2001, 46(3): 112-126
- [9] 陈晓凤, 杨贤庆, 戚勃. 混合发酵法制备龙须菜膳食纤维[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 112-115
- [10] 王庆忠. 绿色木霉发酵制取柑桔皮膳食纤维及其理化特性研究[D]. 四川农业大学, 2004
- [11] GB/T 5009.5-2010. 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010
- [12] GB/T 5009.3-2003. 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [13] GB/T 5009.4-2003. 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [14] 姜茂竹, 陈美新, 缪静. 从豆渣中制取可溶性膳食纤维的研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(3): 52-55
- [15] MAURICE R, MOHAMED N B, MARGUERITE R. Rheological behavior of polysaccharide aqueous solution [J]. *Polymer*, 2005, 46(26): 12348-12358
- [16] 郑建仙. 功能性食品: 第二卷[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999