水相酶解法提取菜籽油与菜籽蛋白工艺的优化

刘志强[1], 令玉林[1], 曾云龙[1], 金 宏[2]
(1. 湖南科技大学化工系, 湘潭 411201; 2. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128)

摘 要: 为提高菜籽蛋白的利用率, 采用水相酶解法提取菜籽油与菜籽蛋白, 以超滤法分离菜籽蛋白, 重点对酶处理的工艺参数进行了研究。试验对各种酶的作用效果进行了比较, 确定采用纤维素酶、果胶酶按活力比 3∶1 配方的复合酶处理效果较好; 由优化试验得出酶处理的工艺参数为: 固液比 1∶5, 酶用量 30 U/g, 酶处理时间 100 min; 在最佳工艺条件下获得高质量的菜籽油与菜籽蛋白, 油与蛋白质得率分别为 92.6%、82.3%。

关键词: 菜籽蛋白; 菜籽油; 水相酶解法; 水浸提
中图分类号: TS224.4; TS225.14; TQ644.16 **文献标识码**: A **文章编号**: 1002-6819(2004)03-0163-04

0 引 言

从菜籽中提取油脂的常规方法有压榨法和浸出法, 这些方法均需对原料进行强烈的湿热处理, 在这种作用下, 菜籽蛋白严重变性, 一些营养物质和生理活性物质也遭破坏。同时菜籽中含有硫代葡萄糖甙和植酸、单宁、芥子碱等有毒及抗营养因子[1]。因此, 菜籽饼粕目前只能在饲料中限量使用甚至少部分用作肥料, 造成了这种优质蛋白资源的极大浪费[2]。

水剂法提取植物油的最大优点是提油后的蛋白变性程度低[3,4], 有利于再加工, 特别是对菜籽采用该法可以将油脂、蛋白质的提取与脱毒同步进行, 缩短了生产过程, 且效果较好, 但得率较压榨法和溶剂浸出法低。

为提高水剂法的油脂及蛋白质得率, 国内外许多学者等将酶运用于油脂提取工艺(采用水相酶解法)。王素梅等利用纤维素酶处理玉米胚芽, 使出油率提高到 88.72%[5]; 刘志强等利用以纤维素酶、蛋白酶为主体的复合酶对花生采用水剂法制油, 出油率比传统水剂法提高 4%～8%、蛋白质得率提高 3%～9%[6]; Kwaku[7]、Rosenthal[8]、钱俊青[9]等分别以可可、大豆等为样品展开了类似的研究, 均取得了较好的效果。由于菜籽中含有有毒及抗营养因子, 因此酶在菜籽制油中的应用研究大多集中于溶剂浸取前的预处理阶段[10,11], 随着低毒或无毒菜籽品种的推广及膜分离技术的应用, 开展水相酶解法同时提取菜籽油与无毒菜籽蛋白质的研究已成为一件很有现实意义和应用前景的工作。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 油菜籽

市售双低油菜籽, 清选、干燥, 脱皮后测得蛋白质含量 26.4%、脂肪含量 44.5%、水分含量 8%。

收稿日期: 2003-06-27 修订日期: 2004-01-09
基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(02JJY5001)
作者简介: 刘志强(1964-), 男, 湖南邵东人, 硕士, 副教授, 主要从事生物化工教学与科研。湖南湘潭 湖南科技大学化工系, 411201。
Email: sygzliu@sohu.com

1.1.2 酶

根据菜籽的化学组成选用 4 种酶: 纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、蛋白酶。

纤维素酶: Sigma 公司生产, 商品名 nº C2415, 最适 pH 值与温度为: pH 5.0、温度 50℃, 宣称活力为 5100 U/g, 实测 CMC 酶活为 2540 U/g。

果胶酶: Novo 公司生产, 商品名 Pectinex ultra sp, 最适 pH 值与温度为: pH 4.0～5.0、温度 45℃, 宣称活力为 26000 PG/mL, 实测果胶酶活力为 11350 U/mL。

半纤维素酶: Sigma 公司生产, 商品名 nº H2125, 最适 pH 值与温度为: pH 5.0、温度 37℃, 宣称活性为 260 U/g, 实测酶活为 223 U/g。

复合酶Ⅰ: 选用蛋白酶、纤维素酶、果胶酶按活力比 5∶3∶2 组成。

复合酶Ⅱ: 选用纤维素酶、果胶酶按活力比 3∶1 组成。

1.2 检测方法

蛋白酶活力测定: 酪蛋白法[12]; 纤维素酶活力(CMC 酶活)的测定: DNS 法[12]; 果胶酶活力测定: 亚碘酸法[12]; 蛋白质含量的测定: 凯氏定氮法(Kjeldahl)测定[13], 参照 GB5497-85; 油脂含量测定: 索氏抽提法(Soxhlet method)[13]; 水分测定: 常压烘干法, 参照 GB5495-85; 异硫氰酸酯的测定, 参照 GB13087-1991; 恶唑烷硫酮的测定, 参照 GB13089-1991。

1.3 试验方法

1.3.1 水相酶解法提取菜籽油与菜籽蛋白的工艺

称取经清理、干燥、去皮后的油菜籽 100 g、干碾磨至 124 μm[4], 置于浸取器中; 调节固液比、加酶量、pH 值、温度等参数, 以 50 r/min 搅拌进行酶反应一定时间。酶反应后, 调固液比 1∶6.5、pH 9.0, 室温下以 50 r/min 搅拌碱提 1 h。碱提后以 3000 r/min 离心分离 10～15 min, 吸出清油, 乳化油用沸点 60～90℃的石油醚萃取, 溶剂蒸发后, 再加上清油质量计算出油率。分离出菜籽蛋白水提液, 控制操作压力 0.20～0.30 MPa, 温度 50℃, 料液 pH 9～10 左右, 对菜籽蛋白进行超滤提取, 然后对蛋白质超滤截流液喷雾干燥, 得菜籽蛋白粉。试

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

验中菜籽油与菜籽蛋白得率以提取物的质量占原料中该物质质量的百分比表示。工艺流程如图 1 所示。

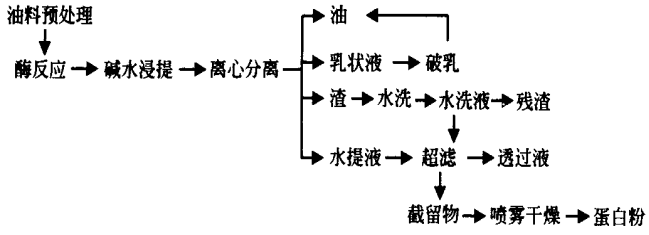

图 1 水相酶解法提取菜籽油与菜籽蛋白工艺流程

Fig. 1 Process flow of aqueous enzymatic extraction of rapeseed protein and oil

1.3.2 酶的筛选

在酶反应阶段, 于反应器中加入酶, 分别进行单因素试验, 以评价各种酶的单独作用效果。单一酶的酶反应在各种酶的最适 pH 值和温度下进行, 复合酶Ⅱ调 pH 4.5、温度 50℃, 然后调固液比 1∶4、加酶量为 35 U/g 菜籽粉, 酶反应 1 h 后, 调 pH 9.0, 室温下以 50 r/min 搅拌碱提 1 h, 计算菜籽油与菜籽蛋白得率。

复合酶Ⅰ: 加酶量取 35 U/g, 考虑到纤维素酶与果胶酶的最适 pH 值、温度比较接近, 而蛋白酶与纤维素酶、果胶酶的最适 pH 值与温度相差较远, 因此酶反应分 2 步进行(分步反应时间为酶反应总时间的一半): 首先调 pH 4.5、温度 50℃, 加入复合酶配方中的纤维素酶、果胶酶, 搅拌反应; 纤维素酶、果胶酶反应后, 调 pH 8.0、温度 50℃, 加入配方中的蛋白酶搅拌反应。为评价酶作用的效果, 同时以预处理后的油料不加酶直接调 pH 9.0, 室温下以 50 r/min 搅拌 2 h 进行水剂法制油做对照。

1.3.3 酶处理工艺参数的优化

影响菜籽油与菜籽蛋白得率的因素除了酶的种类外, 还有酶反应的参数, 采用响应面分析方法(RSA)进行酶处理参数的优化。需要探索的主要酶反应参数为固液比、加酶量、酶反应时间。根据单因素试验的情况, 选定 RSA 试验的因素和水平的取值见表 1。

表 1 试验设计中因子的水平及编码表

Table 1 Factors and levels of the independent variables used in design of test

因素		因素水平		
		-1	0	+1
X_1	固液比	1∶8	1∶6	1∶4
X_2	加酶量/$u \cdot g^{-1}$	25	30	35
X_3	酶反应时间/h	60	90	120

根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 以固液比、加酶量、酶反应时间为自变量, 以菜籽油与菜籽蛋白得率为响应值设计了三因素三水平 15 个试验点的响应面分析试验, 试验安排及结果见表 3。

2 结果与分析

2.1 酶的种类与配方对菜籽油与菜籽蛋白得率的影响

在植物油料中, 油脂存在于植物油料的细胞内, 并通常与其它大分子(蛋白质和碳水化合物)结合存在, 构成脂蛋白、脂多糖等复合体。因此只有将油料的细胞结构及油脂复合体破坏, 才能取出其中的油脂。酶的作用主要是破坏植物细胞或油脂与蛋白质或糖类的复合体, 菜籽细胞壁的主要成分是纤维素、半纤维素、果胶, 故本试验选取的酶有纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、蛋白酶。

表 2 酶对菜籽油与菜籽蛋白得率的影响

Table 2 Effect of enzymes on oil extraction rate and protein production

酶	无酶	纤维素酶	半纤维素酶	果胶酶	复合酶Ⅱ	复合酶Ⅰ
蛋白质得率/%	64.0	72.4	58.2	67.3	75.2	78.5
油脂得率/%	78.5	80.3	69.3	75.6	87.3	89.2

由表 2 可知, 不加酶和加入不同种类的酶, 其出油率与蛋白质得率差异较大, 即复合酶Ⅰ作用较明显, 复合酶Ⅱ次之, 单独的纤维素酶、果胶酶、半纤维素作用不明显。采用单独纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶作用较差的原因是单独一种酶的使用对植物细胞、脂蛋白、脂多糖等脂类复合体的破坏效果不好。采用复合酶更有得利于各组分的协同作用, 有利于油脂与蛋白质的释出。但采用复合酶Ⅰ, 由于蛋白酶对蛋白质的水解作用, 菜籽蛋白水提液中产生低分子量的短肽及氨基酸, 在后续蛋白质的超滤过程中不利于蛋白质与小分子的有毒及抗营养因子的分离, 或导致短肽及氨基酸的流失而影响蛋白质的得率。因此本试验采用复合酶Ⅱ对菜籽进行处理。

2.2 复合酶Ⅱ提取菜籽蛋白工艺参数的 RSA 试验优化

优化试验结果见表 3。

表 3 试验安排与结果

Table 3 Observed and predicted values for different levels of experimental design

序号	X_1	X_2	X_3	出油率		蛋白质得率	
				实测值	预测值	实测值	预测值
1	-1	-1	0	68.7	69.1	53.4	54.4
2	-1	0	-1	73.9	74.5	57.5	58.2
3	-1	0	1	78.8	78.5	58.7	60.0
4	-1	1	0	83.1	82.5	63.3	62.8
5	0	-1	-1	83.7	82.9	66.4	66.6
6	0	-1	1	84.3	85.0	68.3	69.1
7	0	1	-1	90.2	90.4	74.7	74.5
8	0	1	1	89.4	88.9	79.6	78.5
9	1	-1	0	75.3	76.0	58.5	57.9
10	1	0	-1	77.9	78.9	61.9	61.1
11	1	0	1	81.2	80.3	66.8	63.8
12	1	1	0	83.6	83.0	67.4	67.5
13	0	0	0	84.5	84.6	74.6	75.7
14	0	0	0	85.2	84.6	76.3	75.7
15	0	0	0	86.6	84.6	75.4	75.7

对试验结果用 SAS 软件进行回归分析, 得到复合酶Ⅱ提取油脂与蛋白质的回归方程如下:

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

$$Y_o\text{(油脂得率)} = 88.43 + 2.25X_1 + 7.05X_2 + 0.275X_3 - 12.69X_1^2 - 0.51X_1X_2 - 2.45X_2^2 - 0.43X_1X_3 - 0.10X_2X_3 + 0.28X_3^2 \quad (1)$$

$$Y_p\text{(蛋白质得率)} = 76.23 + 3.05X_1 + 1.64X_2 + 5.54X_3 - 12.93X_1^2 - 0.35X_1X_2 - 0.93X_2^2 + 0.30X_1X_3 - 1.73X_2X_3 + 2.93X_3^2 \quad (2)$$

对回归方程各项方差分析, 结果见表 4。

表 4　回归方程方差分析

Table 4　Analysis of variance components

方差来源	自由度	油脂得率		蛋白质得率	
		均方	F 值	均方	F 值
一次项	3	59.3	41.12*	69.6	151.3**
二次项	3	83.1	57.7*	206.3	448.5**
交互项	3	0.82	0.57	1.16	2.52
失拟项	3	3.37	2.34	1.74	3.78
误　差	2	1.44		0.46	
R^2		$R^2 = 0.9689$		$R^2 = 0.9834$	

由表 4 知, 所有回归方程的相关系数 R^2 达到 0.95 以上, 说明方程适用于复合酶 Ⅱ 提取油脂与蛋白质的理论预测。

表 4 回归方程各项的方差分析结果表明, 复合酶 Ⅱ 对油脂及蛋白质提取率 Y_o 与 Y_p 的 2 个回归方程一次项、二次项都很显著, 说明响应值的变化相当复杂, 试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系; 交互项不显著, 说明三因素之间的相互影响不大; 失拟项 F 值很小, 表明该方程对试验拟合情况好, 试验误差小。

对影响因子 X_1(固液比)、X_2(加酶量)、X_3(酶反应时间) 的方差分析表明: X_1(固液比) 对蛋白质提取率与油脂提取率影响显著; X_2(加酶量) 对油脂提取率影响显著, 对蛋白质提取率影响不显著; X_3(酶反应时间) 对油脂提取率影响不显著, 对蛋白质提取率影响显著。

根据响应曲面分析(RSA)绘出油脂提取率 Y_o 及蛋白质提取率 Y_p 的响应面分析图, 见图 2、图 3。

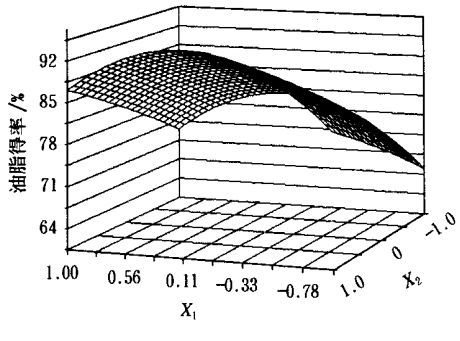

图 2　复合酶Ⅱ对油脂提取的响应面分析 (X_3 = 90 min)

Fig. 2　Response surface plot for oil yield resulting from complex enzyme process

总的来说, 2 个曲面是相似的, 在 2 个模型中, X_1(固液比) 对油脂与蛋白质得率影响较大, 固液比对油脂与蛋白质提取率存在双重影响, 一方面, 就酶反应来讲, 固液比减小, 底物浓度增大, 在加酶量一定的情况下有利于酶的作用, 但底物浓度过大会对酶反应产生底物抑制, 固液比增大, 底物浓度减小, 不利于酶的作用; 另一方面, 就油脂与蛋白质提取而言, 固液比越高, 越有利于油脂与蛋白质的释出。由曲面图得出, 其最佳值在 1∶5 左右。

由图 2 知, X_2 (加酶量) 对油脂提取率影响较明显, 理论上取值越大提取率越高, 但当酶用量超过 30 U/g 后, 油脂提取率增长趋缓。当然考虑到成本, 加酶量以取 30 U/g 左右。

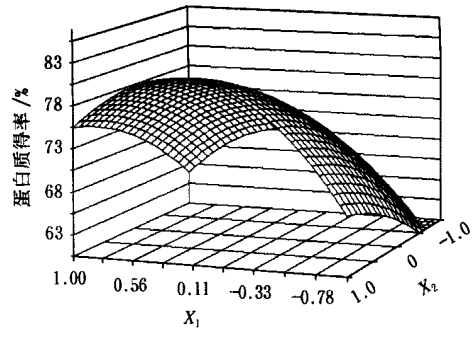

图 3　复合酶Ⅱ对蛋白质提取的响应面分析 (X_2 = 30 U/g)

Fig. 3　Response surface plot for protein yield resulting from complex enzyme process

由图 3 知, X_3(酶反应时间) 对蛋白质提取率影响较明显, 理论上提取时间越长越好, 然而水相酶解制油最大的问题是产品易被微生物污染, 适当缩短时间有助于减少污染, 同时考虑到处理时间延长直接影响生产周期, 造成能耗增加和生产效率的下降, 因此处理时间宜控制在 100 min 左右。进一步分析可知, 达到最大蛋白质与油脂提取率所需的因素条件基本相近, 说明酶处理过程中蛋白质与油脂提取率密不可分。

根据以上分析, 酶处理参数取值为: 固液比 1∶5、酶用量 30 U/g、酶处理时间 100 min。采用以上参数做验证试验得出: 油脂得率为 92.6%, 蛋白质得率为 82.3%。对所得蛋白质产品进行检测, 产品中异硫氰酸酯、恶唑烷硫酮均未检出, 产品中蛋白质含量达 90% 以上, 粗脂肪、粗纤维较低, 说明水相酶解法提取菜籽油与菜籽蛋白、菜籽蛋白超滤工艺所选工艺参数是合理的。

3　结　论

采用本文所提出的优化工艺提取菜籽蛋白与油脂, 和传统水剂法相比较, 油与蛋白质得率及质量大大提高, 分别达到 92.6% 和 82.3%, 所得蛋白质产品中异硫氰酸酯、恶唑烷硫酮均未检出。同时工艺路线简单, 所需设备少, 在生产过程中不需改变原有工艺路线, 效益比效明显。可以相信, 随着酶质量的不断提高、酶成本的降低、膜分离技术的发展, 采用水相酶解法同时提取菜籽油与菜籽蛋白的产业化应用已为期不远。

[参　考　文　献]

[1]　慕运动, 郭兴凤. 菜籽粕中硫代葡萄糖甙在芥子酶作用下分解条件研究[J]. 中国油脂, 1999, 24(5): 51-52.

[2]　余礼明, 伍冬生, 吴谋成, 等. 开发油菜籽蛋白资源的关键技术及其意义[J]. 农业工程学报, 1997, 13(1): 117-121.

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd.　All rights reserved.

[3] Rosenthal A, Pyle D L, Niranjan K. Mechanisms in the simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean[J]. Transactions of The Institute of Chemical Engineers, Part C. Food and Bioproducts, 1998, 76: 224 - 230.

[4] 刘志强, 曾云龙, 金 宏. 酶法有限水解含油菜籽蛋白的机理及动力学[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 203～206.

[5] 王素梅, 王 璋. 水酶法提取玉米胚油工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(5): 482- 486.

[6] 刘志强, 何昭青. 水酶法花生蛋白质提取及制油研究[J]. 中国粮油学报, 1999, 14(1): 36- 39.

[7] Kwaku T D. Application of enzyme assisited aqueous fat extraction to cocoa fat[J]. JAOCS, 1995, 72(10): 1409- 1411.

[8] Rosenthal A, Pyle D L, Niranjan K, et al. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(6): 224- 228.

[9] 钱俊青, 何国庆. 水相酶解大豆蛋白的条件对其油脂分布的影响[J]. 浙江大学学报(工学版), 2001, 35(6): 684- 688.

[10] Sosulski K, Sosulski F W, Coxworth E. Carbohydrase hydrolysis of canola to enhance oil extraction with hexane[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1988, 65: 357- 361.

[11] Sosulski K, Sosulski F W. Enzyme-aided vs two-stage processing of canola: technology, product quality and cost evaluation. Journal of the American Oil Chemists Society, 1993, 70: 825- 829.

[12] 张树政. 酶制剂工业(下)[M]. 北京: 科学技术出版社, 1984, 595- 653.

[13] 刘福岭, 戴行钧. 食品物理与化学分析方法[M]. 北京: 轻工业出版社, 1987, 41- 60.

Optimization of the technology for aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein

Liu Zhiqiang[1], Ling Yulin[1], Zeng Yunlong[1], Jin Hong[2]

(1. *Department of Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan* 411201, *China*;
2. *College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China*)

Abstract: In order to fully explore the rapeseed protein resources, aqueous enzymatic extraction method was adopted to extract rapeseed oil and protein and then ultrafiltration technique was used to separate the rapeseed protein. Especially, the optimized technology parameters of enzymatic treatment were studied. After the comparison of the effect of all kinds of enzyme, complex-enzyme (cellulase, pectinase in line with their activity ratio of 3∶1) was selected. With the optimized experiments, the technological parameters of enzymatic treatment were obtained as follows: the ratio of solid to liquid is 1∶5, the quantity of enzyme is 30 U/g, the enzymatic treatment time 100 min. Under this optimized condition, the rapeseed oil and protein with high quality were obtained and the yields of them were 92.6% and 82.3%, respectively.

Key words: rapeseed protein; rapeseed oil; aqueous enzymatic extraction; aqueous extraction

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.