

利用水解酶提取文冠果油脂

刘苗苗^{1,2}, 王晓东¹, 赵兵¹, 王玉春¹

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 采用3种酶对文冠果种仁进行水酶法提油, 其中 Alcalase 2.4 L 蛋白酶的效果最好. 在 Alcalase 2.4 L 蛋白酶用量为 0.02 mL/g 的条件下, 通过单因素实验和 Box-Behnken 中心组合实验, 应用 SAS 软件分析得出水酶法提取文冠果油脂的最佳工艺条件为: 温度 55℃, pH 9, 固液比 1 g:6 mL, 水解时间 4 h, 在此条件下油脂提取率和蛋白水解度分别达到 78.67%和 9.15%.

关键词: 文冠果; 水解酶; 油脂提取; 蛋白水解

中图分类号: TS224.4

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2007)04-0778-04

1 前言

文冠果(*Xanthoceras sorbifolia* Bunge)为无患子科文冠果属植物, 又名木瓜、文官果, 为落叶灌木或乔木, 原产于我国北方, 生长于海拔 52~2260 m 处的荒坡、沟谷和丘陵地带^[1]. 其种子含油率 30.4%, 去皮后种仁含油率 66.39%, 含蛋白质 25.75%, 油中不饱和脂肪酸含量高达 94%, 亚油酸占 36.9%, 油酸占 57.16%, 是比橄榄油、茶油营养更加丰富的高级食用油. 另外文冠果适应性强, 耐寒、耐旱、耐瘠薄^[2], 可在荒山、丘陵地带广泛种植. 开发文冠果资源既可以绿化荒山、防风固沙, 又可以创造经济价值.

水酶法是近年来研究和应用的一种新型提油工艺, 它以机械和酶解为手段降解植物细胞壁, 使油脂释放^[3]. 与传统的压榨法和溶剂浸出法相比, 它可以同时提取油脂和蛋白, 条件温和, 蛋白变性少, 操作安全^[4]. 国内外研究者已经针对此技术应用于大豆、菜籽、玉米胚芽、葵花子、花生仁等油料作物油脂和蛋白的提取展开了研究^[5]. 王素梅等^[6]研究得到的水酶法提取玉米胚芽油工艺路线简单可行, 且油脂提取率达 88%~92%; 谢祥茂等^[7]研究水相酶法处理萃取大豆油工艺, 提取率为 70%. 目前文冠果的油脂提取也多采用传统的压榨法, 不仅油脂提取率低, 而且其中的蛋白质遭到破坏. 本工作就水酶法对文冠果油脂的提取进行了研究, 在单因素实验的基础上, 通过响应面分析法确定了水酶法提取文冠果油脂的最佳工艺.

2 实验

2.1 实验材料

文冠果种子购于陕西省志丹县, 种仁含油率为

62.83%, 粗蛋白含量为 24.69%.

液态酶制剂: Celluclast 1.5 L 复合纤维素酶(pH 4.5~6.0, 50~60℃, 酶活力 1500 NCU/g); Viscozyme L 戊聚糖复合酶(pH 3.3~5.5, 25~55℃, 酶活力 100 FBG/g); Alcalase 2.4 L 水解蛋白酶(pH 6.5~8.5, 55~70℃, 酶活力 2.4 AU/g), 丹麦 Novo 公司生产.

2.2 实验仪器

QN-999 粉碎机(韩国日进精工有限公司), HJ-4A 型数显恒温多头磁力搅拌器(江苏金坛市荣华仪器制造有限公司), HHS.11-M 电热恒温水浴锅(北京靖卫科学仪器厂), TDL-5-A 型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), Φ72 Beckman pH 计, DGG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司).

2.3 实验方法

2.3.1 测定方法

文冠果种仁水分的测定采用 105℃恒重法, 参照 GB/T5497-1985; 种仁含油率测定采用索氏提取法, 参照 GB/T14488.1-1993; 粗蛋白含量测定采用凯氏定氮法, 参照 GB/T14489.2-1993; 水解液中氨基氮含量的测定采用甲醛滴定法^[8].

2.3.2 水酶法提取文冠果油脂工艺流程

将文冠果种仁干燥、粉碎, 过 40 目(0.38 mm)标准筛, 加适量蒸馏水配成一定固液比的悬液, 用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液调节到适宜的 pH, 按种仁质量加入一定体积的液态酶, 在一定温度下搅拌一定时间, 酶解结束后, 浸提液在 4000 r/min 转速下离心 20 min, 得到清油和蛋白水解液.

2.3.3 水酶法提取文冠果油脂的单因素实验

分别进行酶种类及浓度、复合酶作用、酶处理时间、温度、pH、固液比、盐浓度等单因素实验, 以油脂提取

率和蛋白水解度为指标, 考察不同因素对文冠果油脂提取的影响.

$$\text{油脂提取率} = \frac{\text{总清油质量(g)}}{\text{原料中油质量(g)}} \times 100\%$$

$$\text{蛋白水解度} = \frac{\text{水解液中氨基氮质量(g)}}{\text{原料中总氮质量(g)}} \times 100\%$$

2.3.4 水酶法提取工艺的优化

根据 Box-Behnken 中心组合设计^[9]安排优化实验, 采用响应曲面分析方法优化得出文冠果油脂水酶法提取的最佳条件.

3 结果与讨论

3.1 酶用量对油脂提取率和蛋白水解度的影响

大多数油料种子(包括文冠果)细胞中, 油脂通常与其他大分子结合构成脂多糖、脂蛋白等复合体, 油籽的细胞壁又是由纤维素、半纤维素、木质素和果胶等组成, 因此只有将油料组织的细胞结构及油脂复合体破坏才能使油脂释放^[10]. 采用能降解植物油料细胞壁的酶, 或对脂蛋白、脂多糖等复合体有降解作用的酶(主要包括纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、葡聚糖酶、蛋白酶等)处理油料, 可以提高油脂提取效果^[11]. 本实验针对文冠果种子细胞的结构组分选择了 3 种液态酶制剂: 促进纤维素分解的 Celluclast 1.5 L、降解细胞壁和脂多糖的 Viscozyme L 和作用于脂蛋白的 Alcalase 2.4 L^[12-15]. 根据这 3 种酶各自适宜的工作条件, 分别选定 50℃, pH=5; 50℃, pH=4.8; 60℃, pH=9, 在固液比 1:6 (g/mL, 下同)条件下, 对文冠果种仁进行酶处理 4 h, 考察不同酶用量对油脂提取率和蛋白水解度的影响.

从图 1 可以看出, 加入不同酶对水酶法提油的提取率与蛋白质水解度的影响不同. 其中 Alacalse 2.4 L 蛋白酶作用效果显著, 酶用量为 0.02 mL/g 时提油效果最

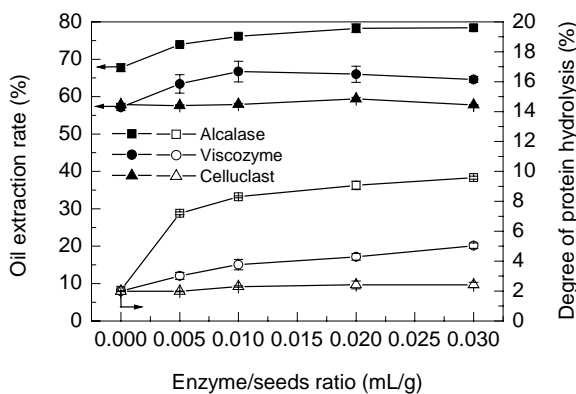


图 1 酶的种类及用量对油脂提取率和蛋白水解度的影响
Fig.1 Effects of enzyme type and quantity used on oil extraction rate and degree of protein hydrolysis

好, 油脂提取率和蛋白水解度分别达到 78.28%和 9.07%, 油脂提取率比不加酶提高了 10%, Viscozyme L 的作用效果次之, Celluclast 1.5 L 的作用不明显. 由此可见, 经过一定程度的机械破碎后, 阻碍油脂释放的主要因素是油脂与蛋白质之间的亲和力, 蛋白酶对脂蛋白的降解可以更好地促进油脂释放, 蛋白水解度越高, 油脂提取率越大. 因此后续实验着重研究各种提取因素对 Alcalase 2.4 L 蛋白酶提油效果的影响, 其中酶用量均为 0.02 mL/g.

3.2 影响 Alcalase 2.4 L 酶解效果的因素分析

3.2.1 酶处理时间对油脂提取和蛋白水解效果的影响

适宜的酶解时间应从油料细胞的降解程度及提取油效果两方面确定, 因油籽种类不同而有所差异^[16]. 控制体系固液比 1:6, 温度 60℃, pH=9, 对文冠果油脂提取进行不同水解时间的考察. 图 2 表明, 在 1~4 h 内, 酶解时间越长, 蛋白降解越彻底, 蛋白的水解度越高, 油脂释放越充分, 4 h 时油脂提取率达到最高, 为 78.28%, 4 h 后, 油脂提取率和蛋白水解度变化不明显, 因此确定酶解时间为 4 h.

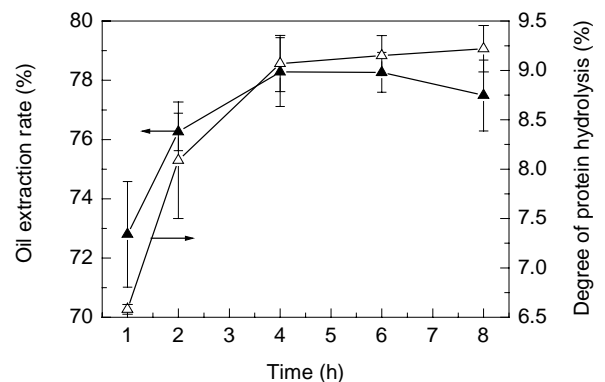


图 2 酶解过程中油脂提取率和蛋白水解度的变化
Fig.2 Changes of oil extraction rate and degree of protein hydrolysis in the process of enzyme hydrolysis

3.2.2 温度对油脂提取和蛋白水解效果的影响

提取温度影响酶解效果和提油率, 并随油料不同而异^[17-20]. 控制体系固液比 1:6, pH 9, 在不同温度下提取 4 h, 测定油脂提取率和蛋白水解度. 从表 1 可以看出, 在 60℃时文冠果油脂的提取率和蛋白水解度均达到最高, 温度过低或过高都不利于油脂提取和蛋白降解.

表 1 温度对油脂提取率和蛋白水解度的影响
Table 1 Effect of temperature on oil extraction rate and degree of protein hydrolysis

Temperature (°C)	Oil extraction rate (%)	Degree of protein hydrolysis (%)
50	77.26	7.51
60	78.28	9.07
70	66.96	6.57

3.2.3 pH 对油脂提取和蛋白水解效果的影响

酶解 pH 值随所用酶种类不同而异, pH 值既影响酶活性, 又影响油与植物蛋白的分离提取^[21]. 控制体系固液比 1:6、温度 60℃, 在不同 pH 下酶解提取 4 h, 测定油脂提取率和蛋白水解度. 表 2 表明, pH 在 8~10 之间变化对油脂提取率的影响不大, 在 pH=9 时, 油脂的提取率稍高, 随着 pH 的升高蛋白水解度有增大趋势, 但碱性过高的环境会加速酶的失活, 降低其作用效果.

表 2 pH 对油脂提取率和蛋白水解度的影响
Table 2 Effect of pH on oil extraction rate and degree of protein hydrolysis

pH	Oil extraction rate (%)	Degree of protein hydrolysis (%)
8	77.18	8.80
9	78.28	9.07
10	76.23	9.21

3.2.4 固液比对油脂提取和蛋白水解效果的影响

在水酶法提油中高的固液比使乳状液不稳定, 导致处理困难. 控制体系 pH=9, 温度 60℃, 酶解 4 h, 研究不同固液比对油脂提取效果的影响. 从表 3 可以看出, 固液比为 1 g:6 mL 时, 油脂提取率达到最高, 再增加用水量, 油脂提取率下降, 固液比对蛋白水解度的影响不显著.

表 3 固液比对油脂提取率和蛋白水解度的影响
Table 3 Effect of ratio of solid to water on oil extraction rate and degree of protein hydrolysis

Ratio of solid to water (g/mL)	Oil extraction rate (%)	Degree of protein hydrolysis (%)
1:4	72.91	10.5
1:6	78.28	9.07
1:8	72.90	8.98
1:10	72.68	9.05

3.2.5 中性盐及浓度对油脂提取和蛋白水解效果的影响

低浓度的盐离子可以增加蛋白质的溶解性, 降低物

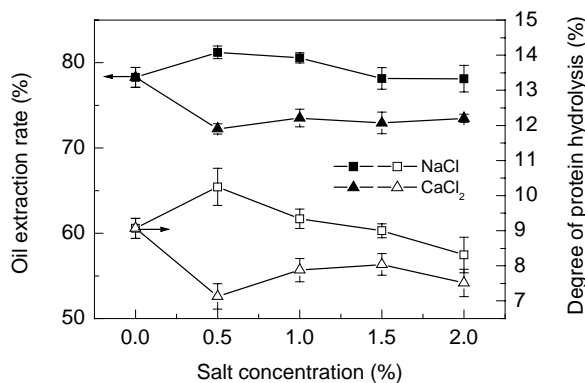


图 3 中性盐及其浓度对油脂提取率和蛋白水解度的影响
Fig.3 Effects of solutes and their concentrations on oil extraction rate and degree of protein hydrolysis

料的粘度, 因此水酶法提油中常加入一定浓度的 NaCl 和 CaCl₂^[22]. 控制体系固液比 1:6, 温度 60℃, pH=9, 酶解时间 4 h, 分别考察 NaCl 和 CaCl₂ 对文冠果油脂提取效果的影响. 图 3 表明, NaCl 浓度为 0.5% 时对油脂提取有促进作用, 油脂提取率和蛋白水解度有所升高, 但升高幅度不大, 钙离子的存在使油脂提取率和蛋白水解度都降低.

3.3 酶处理工艺条件的优化

以油脂提取率(Y_1)和蛋白水解度(Y_2)为响应值, 设计了三因素三水平的响应面分析实验, 其中 Alcalase 2.4 L 蛋白酶用量为 0.02 mL/g, 酶解时间为 4 h, 实验因素及水平见表 4, 实验结果见表 5. 用 SAS 软件对响应值进行回归分析, 得到最优提取条件为 55℃, pH=9, 固液比 1:6, 理论油脂提取率和蛋白水解度分别为 78.71% 和 9.22%, 在此条件下进行验证实验, 得到油脂提取率和蛋白水解度分别为 78.67% 和 9.15%, 提取率高于压榨法.

表 4 实验设计中定量因子水平及编码
Table 4 Code and levels of the independent variables used in experimental design

Code	Independent variable	Factor level		
		-1	0	1
X_1	Temperature (°C)	50	60	70
X_2	pH	8	9	10
X_3	Ratio of solid to water (g/mL)	1:4	1:6	1:8

表 5 实验结果

Table 5 Results for different levels of experimental design						
No.	Factor			Oil extraction rate, Y_1 (%)	Degree of protein hydrolysis, Y_2 (%)	
	X_1	X_2	X_3			
1	-1	-1	0	77.41	8.25	
2	-1	1	0	77.56	8.61	
3	1	-1	0	73.32	7.61	
4	1	1	0	73.44	7.87	
5	0	-1	-1	76.28	8.47	
6	0	-1	1	74.21	8.35	
7	0	1	-1	76.77	9.01	
8	0	1	1	75.80	9.08	
9	-1	0	-1	76.42	8.46	
10	1	0	-1	73.21	7.34	
11	-1	0	1	76.09	8.95	
12	1	0	1	73.96	7.78	
13	0	0	0	78.36	9.31	
14	0	0	0	78.34	9.25	
15	0	0	0	78.01	9.07	

4 结论

采用不同酶提取文冠果油脂, 发现 Alcalase 2.4 L 蛋白酶最有利于蛋白降解和油脂的提取, 其用量为 0.02 mL/g 时, 油脂提取率和蛋白水解度达到最高. 考察了温度、pH、固液比等对油脂提取率和蛋白水解度的影响, 用响应面法优化并确定了酶法提油的最佳条件为温度 55℃, pH=9, 固液比 1 g:6 mL, 在此条件下酶水解 4 h,

油脂提取率和蛋白水解度分别达到 78.67%和 9.15%, 油脂提取率高于压榨法。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国经济植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1961. 877-878.
- [2] 王力川. 文冠果化学成分综合利用及栽培技术 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1850-1851.
- [3] Olsen H S, Alder N T. Industrial Production and Application of Soluble Enzymes by Drolgate of Soy Protein [J]. Process Biochem., 1981, 16(7): 6-11.
- [4] Rosenthal A, Pyle D L, Niranjana K, et al. Combined Effect of Operational Variables and Enzyme Activity in Aqueous Enzymatic Extraction of Oil and Protein from Soybean [J]. Enzyme Microb. Technol., 2001, 28: 499-509.
- [5] 王文侠, 任健. 植物油水酶法浸提工艺研究进展 [J]. 现代食品科技, 2005, 21(2): 181-185.
- [6] 王素梅, 王璋. 水酶法提油工艺对玉米胚芽油质量的影响 [J]. 中国油脂, 2003, 28(4): 18-20.
- [7] 谢祥茂, 钱俊青. 水相酶法处理萃取大豆油工艺研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2001, 29(2): 194-199.
- [8] 黄晓钰, 刘邻渭. 食品化学综合实验 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002. 131-132.
- [9] 吴建福, 迈克尔·哈曼蒂. 试验设计与分析及参数优化 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2003. 1-157.
- [10] 刘志强, 贺建华, 曾云龙, 等. 酶及处理参数对水酶法提取菜籽油和蛋白质的影响 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(4): 592-596.
- [11] 李汴生, 彭志英, 宁正祥. 植物油料取油的酶预处理工艺 [J]. 中国粮油学报, 1997, 12(6): 24-30.
- [12] 刘志强, 易平贵, 吴苏喜. 酶法有限水解花生蛋白条件对其含油率影响研究 [J]. 中国粮油学报, 2003, 18(3): 73-77.
- [13] Hanmoungjai P, Pyle D L, Niranjana K. Enzyme-assisted Water-extraction of Oil and Protein from Rice Bran [J]. Chem. Technol. Biotechnol., 2002, 77: 771-776.
- [14] Domínguez H, Sineiro J, Núñez M J. Optimization of the Enzymatic Treatment during Aqueous Oil Extraction from Sunflower Seeds [J]. Food Chem., 1997, 61(4): 467-474.
- [15] Rosenthal A, Pyle D L, Niranjana K. Aqueous and Enzymatic Process for Edible Oil Extraction [J]. Enzyme Microb. Technol., 1996, 19: 402-420.
- [16] 钱俊青, 谢祥茂. 酶法提取植物油的工艺方法及特点 [J]. 中国油脂, 2003, 28(4): 14-17.
- [17] Rhee K C, Cater C M, Mattil K F. Simultaneous Recovery of Protein and Oil from Raw Peanuts in an Aqueous System. [J]. Food Sci., 1972, 37: 90-93.
- [18] Hagenmaier R, Cater C M, Mattil K F. Critical Unit Operations of the Aqueous Processing of Fresh Coconuts [J]. J. Am. Oil Chem. Soc., 1972, 49: 178-181.
- [19] Embong M B, Jelen P. Technical Feasibility of Aqueous Extraction of Rapeseed Oil—A Laboratory Study [J]. J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment., 1977, 10: 239-243.
- [20] Hagenmaier R D. Aqueous Processing of Full-fat Sunflower Seeds: Yields of Oil and Protein [J]. J. Am. Oil Chem. Soc., 1974, 51: 470-471.
- [21] 杜彦山, 张连富. 水酶法提油工艺初步研究 [J]. 粮食与油脂, 2005, (6): 10-12.
- [22] 倪培德, 江志炜. 高油份油料水酶法预处理制油新技术 [J]. 中国油脂, 2002, 27(6): 5-8.

Extraction of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge Oil with Hydrolysis Enzymes

LIU Miao-miao^{1,2}, WANG Xiao-dong¹, ZHAO Bing¹, WANG Yu-chun¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Three commercial enzymes were used for extraction of oil from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge seeds. The results showed that Alcalase 2.4 L was the most effective hydrolysis enzyme. The main factors influencing the oil extraction rate and degree of protein hydrolysis were analyzed by response surface methodology. Under the fixed ratio of enzyme to seeds (0.02 mL/g), the optimal parameters were temperature 55 °C, pH=9, the ratio of solid to water 1:6 (g/mL), and enzyme incubation time 4 h. Under these conditions, the oil extraction rate and degree of protein hydrolysis reached 78.67% and 9.15% respectively.

Key words: *Xanthoceras sorbifolia* Bunge; hydrolysis enzyme; oil extraction; protein hydrolysis