

茶油水酶法提取工艺初步研究

孙红, 费学谦*, 方学智

(中国林科院 亚热带林业科学研究所 浙江 富阳 311400)

摘要: 采用水酶法提油技术从油茶籽中提取茶油, 研究酶的种类及不同的多酶组合对提油率的影响, 并筛选茶油水酶法提取的最佳水解酶和酶组合。结果显示, 单一酶中 Alcalase 2.4 L 蛋白酶具有较好的提油效果, 提油率达到 90.48%。而通过多级筛选试验获得的最佳多酶组合方案为依序使用果胶酶、纤维素酶和 Alcalase 2.4 L 蛋白酶对料液进行酶解, 提油率可达 91.40%。综合分析, 在茶油的水酶法提取中选用 Alcalase 2.4 L 蛋白酶作为水解酶是适宜的选择。

关键词: 茶油; 水酶法; 酶筛选; 提油率

中图分类号: TS225.1+6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)03-0597-05

A Preliminary Study on the Extraction Techology of Oil-tea Camellia Seed Oil by Aqueous Enzymatic Method

SUN Hong, FEI Xue-qian*, FANG Xue-zhi

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, China)

Abstract: An aqueous enzymatic extraction technology was adopted to extract oil from Oil-tea camellia seed. The influences of different enzymes and enzyme complex formulas on oil yield were investigated. The result showed that Alcalase 2.4 L was the best single enzyme with the highest oil yield of 90.48%. The best enzyme complex formula was composed by pectinase, cellulose and Alcalase 2.4 L, which was gained by multi-level optimization procedure. The oil yield efficiency could reach 91.40% when this enzyme complex formula was used in sequence. By comprehensive consideration, Alcalase 2.4 L is the best hydrolase.

Key words: oil-tea camellia seed oil; aqueous enzymatic method; enzymatic selection; oil yield

近年来, 国内外在大豆油、花生油、菜籽油等油脂的水酶法提取研究方面作了大量的研究^[1-4], 在油茶籽油水酶法提取方面的研究报道也逐渐增多^[5-7]。水酶法制油是在机械破碎的基础上, 采用能降解植物油料细胞壁的酶, 或对脂蛋白、脂多糖复合体有降解作用的酶作用于油料, 使油脂易于从油料细胞中释出, 利用非油组分对油和水的亲合力差异, 及油水比重不同而分离^[8]。与传统提油方法相比, 水酶法提油技术对设备要求不高, 作用条件温和, 油料不经高压高热处理, 不涉及有机溶剂, 所提油脂品质较高, 在提油的同时, 能有效回收植物原料中的茶皂素、蛋白质及碳水化合物等, 有利于副产品的综合利用^[8-10], 可以真正满足食用油生产“安全、高效、绿色”的要求。

根据已有的研究结果, 在水酶法提油工艺中酶的种类和组合方案对提油率有至关重要的影响, 本文旨在摸索以上因素对茶油的水酶法提取工艺的影响, 筛选出作用效果最佳的酶或酶组合, 以期对茶油的综合开发和精深加工提供新的途径。

收稿日期: 2010-12-08 修回日期: 2011-03-03

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2009BADB1B03) 和农业部“948”引进项目(2009-4-56)

作者简介: 孙红(1982—), 男, 硕士生, 主要从事林产品加工研究, E-mail: sunh206@163.com; * 通讯作者: 费学谦, 研究员, E-mail: fxq6565@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

油茶籽: 产于浙江省建德市, 含水率 5.81%, 干仁含油率 48.12%, 粉碎(约 60 目)备用。

酶制剂: 油茶籽仁细胞中纤维素、淀粉的含量较高, 而蛋白质可以把油脂束缚在其凝胶网络中^[7], 故根据油茶籽仁的化学组成和细胞壁结构选用下列 5 种酶。

纤维素酶: 购自 sigma 公司, 商品名 C2730, 产自 *Trichoderma reesei* ATCC 26921, 建议反应温度为 50 ~ 60 °C、反应 pH 为 4.5 ~ 6.0。

半纤维素酶: 购自 sigma 公司, 商品名 H2125, 产自 *Aspergillus niger*, 建议反应温度为 40 °C、反应 pH 4.5。

果胶酶: 购自 sigma 公司, 商品名 P2736, 产自 *Aspergillus niger*, 建议反应温度为 50 °C、反应 pH 为 8.0。

淀粉酶: 购自 sigma 公司, 商品名 10069, 产自 *Bacillus subtilis*, 建议反应温度为 25 °C、反应 pH 为 6.9。

Alcalase 2.4 L 水解蛋白酶: 购自 Novozymes, 商品名 Alcalase 2.4 L, 产自 *Bacillus licheniformis*, 建议反应温度为 50 ~ 60 °C, 反应 pH 为 8 ~ 9。

瑞士 Buchi B - 811 索氏提取仪; Thermo Fisher 高性能台式离心机; 台式冷冻恒温振荡器; 电子分析天平; pH 计; 植物粉碎机; 电热恒温鼓风干燥箱。

1.2 实验方法

1.2.1 茶油酶法提取试验流程 准确称取经清理、干燥、粉碎后的茶籽粉 5 g 于 50 mL 离心管中, 加水 25 mL, 混匀后 90 °C 水浴 10 min 灭酶, 降至室温后调 pH 值, 加酶, 置于冷冻恒温振荡器中, 在设定的酶解温度及酶解时间下进行酶解, 反应完成后 90 °C 水浴 10 min 灭酶, 8 000 r/min 离心 30 min, 收集残渣测定残渣含油量及计算提油率。

1.2.2 提油率测定 原料含油率及残渣中油脂含量的测定采用 GB/T 5009.6 - 2003 第一法^[11]。

提油率 = (原料中油的质量 - 残渣中油的质量) / 原料中油的质量 × 100%

1.2.3 最适水解酶/酶组合的筛选 (1) 最适单一水解酶的选择。分别称取 5 g 茶籽粉于 5 组 50 mL 离心管中, 按相同的酶用量(2%)、料液比(1:5)、粉碎度(60 目)、酶解时间(4 h), 在各酶生产商建议的酶解条件下进行酶解, 酶解完成后 8 000 r/min 离心 30 min, 取残渣测定残渣含油量及计算提油率, 考察不同种类的酶对提油率的影响。

(2) 最适两酶复配方案的选择。在选定最适单一水解酶后, 围绕该酶试验不同的两酶复配组合, 筛选出提油率最高的复配组合, 并比较同时加酶和按一定次序加酶对提油率的影响。按序加酶时, 各酶在生产商建议的酶解条件下按序加入进行酶解, 加酶剂量为 2%, 料液比为 1:5, 反应时间分别为 2 h。同时加酶时的酶解条件见表 1。

表 1 同时加酶时的酶解条件

Tab. 1 Enzymatic hydrolysis conditions of simultaneous enzyme supplementation

酶组合 Enzyme combination	加酶量 / % Enzyme dosage	反应 pH Reaction pH	反应温度 / °C Reaction temperature	反应时间 / h Reaction time
纤维素酶 + Alcalase Cellulose + Alcalase	2	7.0	55	4
半纤维素酶 + Alcalase Hemicellulase + Alcalase	2	8.0	50	4
果胶酶 + Alcalase Pectinase + Alcalase	2	7.0	45	4
淀粉酶 + Alcalase Amylase + Alcalase	2	7.5	40	4

(3) 最适三酶复配方案的选择。在选定最适两酶复配方案后, 围绕该方案试验不同的三酶复配组合, 筛选最适三酶组合。各酶在生产商建议的酶解条件下按序加入进行酶解, 加酶剂量为 2%, 料液比为 1:5, 反应时间分别为 2 h。

2 结果与讨论

2.1 最适单一水解酶的选择

由图 1 可知,不同酶的提油率从低到高依次为: 淀粉酶、半纤维素酶、果胶酶、纤维素酶和 Alcalase 蛋白酶,纤维素酶和 Alcalase 蛋白酶的提油率分别达到 85.38% 和 90.48%,其中 Alcalase 蛋白酶的提油率最高,比其他 4 种酶分别高出 14.20%、13.39%、11.22% 和 5.97%,这可能是因为蛋白质在维持细胞结构的完整性以及细胞内脂体膜结构的稳定性方面发挥着重要的作用^[12-13]。纤维素酶能够达到较高的提油率,可能是因为纤维素是油茶籽细胞壁的主要构成成份以及纤维素在油茶籽细胞中的含量较高^[7]。根据实验结果,Alcalase 蛋白酶可以作为油茶籽酶法制油的首选单一酶制剂。

2.2 最适两酶复配方案的选择

2.2.1 不同两酶复配组合对提油率的影响 酶解作用效果与油料细胞结构及组成成分密切相关,酶的专一性及细胞结构组分的复杂性决定了单一酶作用效果的局限性,国内外许多学者在其它油料上进行的广泛研究证明,使用复合酶比使用单一酶更有利于充分降解细胞结构提高出油率^[14-15]。由图 2 可知,不同的酶复配方案中,果胶酶与 Alcalase 蛋白酶、纤维素酶与 Alcalase 蛋白酶的复配组合能够得到较高的提油率,分别达到 90.65% 和 90.53%,比其他组合高出 1.73%,这可能是因为果胶是植物组织相邻细胞间的“粘合剂”,果胶酶的使用有利于酶解过程中茶籽细胞间的相互分离,扩大了 Alcalase 蛋白酶的相对作用面积,使酶解更充分从而提高了出油率。纤维素酶与 Alcalase 蛋白酶的复配组合作用也能得到较高的提油率,可能是因为纤维素是植物细胞细胞壁的主要结构组分。因此,在两酶复配提油时采用果胶酶或纤维素酶与 Alcalase 蛋白酶的复配组合比较适宜。

2.2.2 酶的加入次序对提油率的影响

由图 3 可知,酶的同时加入与按次序加入对提油率有不同影响,按一定次序分别加酶比同时加酶能够

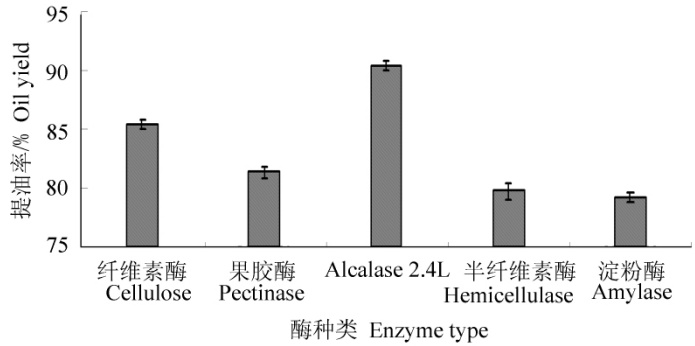
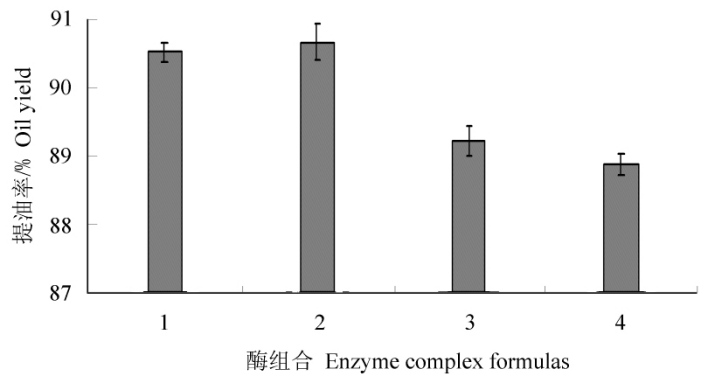


图 1 不同酶的种类对提油率的影响

Fig. 1 The influences of different enzyme type on oil yield

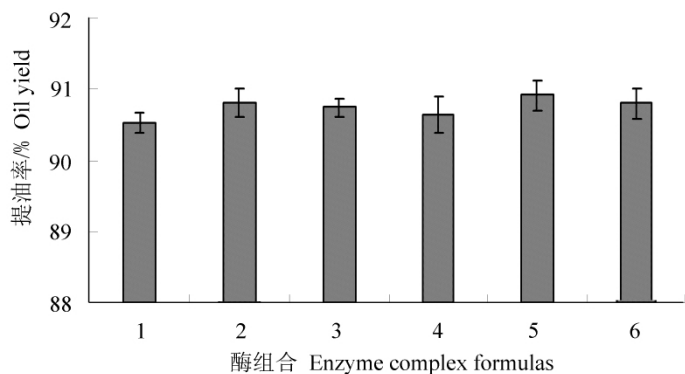


1: 纤维素酶 + Alcalase; 2: 果胶酶 + Alcalase; 3: 半纤维素酶 + Alcalase; 4: 淀粉酶 + Alcalase。

1: Cellulase + Alcalase; 2: Pectinase + Alcalase; 3: Hemicellulase + Alcalase; 4: Amylase + Alcalase.

图 2 不同两酶复配方案对提油率的影响

Fig. 2 The influences of different two-enzymes complex formulas on oil yield



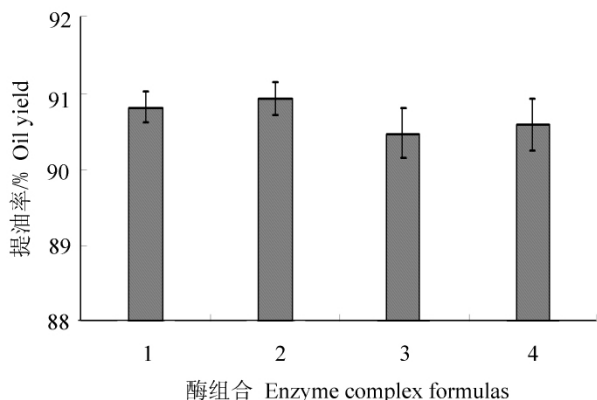
1: 纤维素酶 + Alcalase; 2: 纤维素酶/Alcalase; 3: Alcalase/纤维素酶; 4: 果胶酶 + Alcalase; 5: 果胶酶/Alcalase; 6: Alcalase/果胶酶。“+”表示同时加酶 “/”表示按先后顺序加酶。

1: Cellulase + Alcalase; 2: Cellulase/Alcalase; 3: Alcalase/Cellulase; 4: Pectinase + Alcalase; 5: Pectinase/Alcalase; 6: Alcalase/Pectinase.

“+” means simultaneous enzyme supplementation “/” means different adding sequence.

图 3 加酶顺序对提油率的不同影响

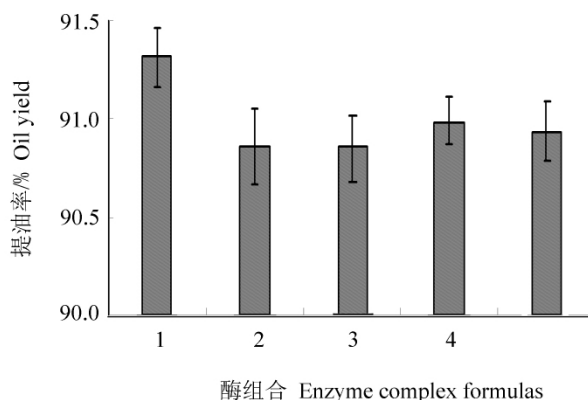
Fig. 3 The influences of different adding sequence on oil yield



1: 纤维素酶/Alcalase; 2: 果胶酶/Alcalase;
 3: 半纤维素酶/Alcalase; 4: 淀粉酶/Alcalase。
 1: Cellulase/Alcalase; 2: Pectinase/Alcalase;
 3: 半纤维素酶/Alcalase; 4: Amylase + Alcalase.

图 4 不同复配方案对提油率的影响

Fig. 4 The influences of different enzymes complex formulas on oil yield



1: 纤维素酶/果胶酶/Alcalase; 2: 纤维素酶/半纤维素酶/Alcalase;
 3: 纤维素酶/淀粉酶/Alcalase; 4: 果胶酶/半纤维素酶/Alcalase;
 5: 果胶酶/淀粉酶/Alcalase。1: Cellulase/Pectinase/Alcalase;
 2: Cellulase/Hemicellulase/Alcalase; 3: Cellulase/Amylase/Alcalase;
 4: Pectinase/Hemicellulase/Alcalase; 5: Pectinase/Amylase/Alcalase.

图 5 不同三酶复配方案对提油率的影响

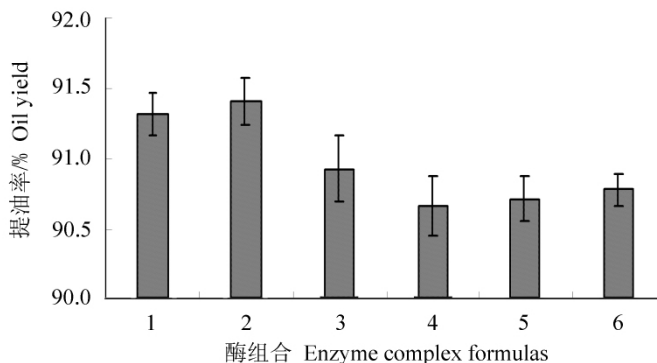
Fig. 5 The influences of different tri enzymes complex formulas on oil yield

得到更高的提油率。若同时加酶,纤维素酶和 Alcalase 蛋白酶共同作用获得的提油率约为 90.53%,而按一定次序加酶,无论是先加纤维素酶还是 Alcalase 蛋白酶,提油率都有所提高。按纤维素酶、Alcalase 蛋白酶次序进行反应能够获得更高的提油率,达到 90.81%,比同时加酶提高约 0.31%。果胶酶和 Alcalase 蛋白酶的复配组合也显示出相似的性质。这可能是因为 2 种酶的最佳反应温度和 pH 条件不同,同时加入时两酶都没有处在最适酶解条件,从而不能发挥出最佳作用效能,而纤维素酶与 Alcalase 蛋白酶混合使用时,Alcalase 蛋白酶也可能对纤维素酶有降解作用。

2.2.3 不同复配方案(按次序加酶)对提油率的影响 由图 4 可知,按次序加酶时,果胶酶和 Alcalase 蛋白酶以及纤维素酶和 Alcalase 蛋白酶的复配组合能够得到较高的提油率,分别达到 90.92%和 90.81%。比其他组合平均提高 0.39%。半纤维素酶和淀粉酶与 Alcalase 蛋白酶的复配组合作用效果较差。这可能是因为纤维素和果胶是油茶籽仁细胞壁的主要结构组分,对维持细胞壁结构的稳定起重要作用,而半纤维素的作用次之,淀粉主要存在于细胞内,没有与油脂结合也与细胞壁结构的稳定性无关。根据实验结果,在两酶复配提油时采用果胶酶或纤维素酶与 Alcalase 蛋白酶的复配组合并依序加酶进行反应比较适宜。

2.3 最适三酶复配组合的选择

2.3.1 不同三酶复配组合(按次序加酶)对提油率的影响 三酶组合实验结果如图 5 所示,在所有组合方案中,纤维素酶、果胶酶和 Alcalase 蛋白酶的三酶复配组合能够得到最高的提油率,达到 91.31%,比其他组合平均提高 0.44%。其他组合的提油率均低于 91%,提油效果与两酶复配差异不大。根据实验结果,在三酶复配提油时采用纤维素酶、果胶酶、Alcalase 蛋白酶的复配组合依序



1: 纤维素酶/果胶酶/Alcalase; 2: 果胶酶/纤维素酶/Alcalase; 3: 纤维素酶 + 果胶酶/Alcalase; 4: 纤维素酶 + 果胶酶 + Alcalase; 5: Alcalase/纤维素酶/果胶酶; 6: Alcalase/果胶酶/纤维素酶。

1: Cellulase/Pectinase/Alcalase; 2: Pectinase/Cellulase/Alcalase; 3: Cellulase + Pectinase/Alcalase; 4: Cellulase + Pectinase + Alcalase; 5: Alcalase/Cellulase/Pectinase; 6: Alcalase/Pectinase/Cellulase.

图 6 不同加酶次序对提油率的影响

Fig. 6 The influences of different adding sequence on oil yield

加酶反应能够得到较高的提油率。

2.3.2 三酶加入次序对提油率的影响 如图6所示,依次按果胶酶、纤维素酶、Alcalase 蛋白酶的顺序加酶能够得到较高的提油率,达到91.40%。这可能是因为先用果胶酶处理能够使酶解液中因粉碎程度不够而结合在一起的茶籽细胞分散开来,有利于后续的纤维素酶和Alcalase 蛋白酶充分发挥效能。图6中的试验结果也表明,三酶同时加酶的酶解复配方案得到的提油率要比依次加酶低。根据实验结果,在三酶复配提油时采用果胶酶、纤维素酶、Alcalase 蛋白酶的复配组合依序加酶反应比较适宜。

2.3.3 最适酶复配方案的进一步分析 在三酶复配方案的基础上继续进行四酶、五酶复配方案的筛选,研究表明提油率维持在91.40%左右不再提高,证实三酶复配方案的基础上继续进行多酶复配方案的筛选意义不大。综合对比分析最适单酶、两酶和三酶复配方案,其对应提油率分别为90.48%、90.92%和91.40%,多酶复配方案的使用仅使提油率分别增加了0.44%和0.92%,作用并不显著,而多酶的使用不仅增加了生产成本,影响油脂的食用安全性,而且大大提高了实际生产中的操作难度。单一使用Alcalase 2.4 L蛋白酶能够获得90.48%的提油率,且价格较便宜,达到了食用级,综合考虑生产经济性、食用油安全性及实际生产中操作程序的复杂程度等因素,适宜使用Alcalase 2.4 L蛋白酶作为茶油水酶法提取的酶制剂。

3 结论与讨论

(1) 通过上述研究,筛选到进行茶油水酶法提取时能获得最高提油率的三酶组合,即使用果胶酶、纤维素酶、Alcalase 蛋白酶依次对料液进行酶解,提油率可达到91.40%。

(2) 数据显示,多酶组合方案的使用对提高提油率的贡献有限,而Alcalase 2.4 L蛋白酶价格较便宜,且达到了食用级,单一使用就能够获得90.48%的提油率。综合考虑经济性、安全性及实际生产中操作程序的复杂程度等因素,在茶油的水酶法提取工艺中使用Alcalase 2.4 L蛋白酶作为水解酶是适宜的。

(3) 试验表明,在茶油的水酶法提取工艺中,酶的同时加入与按一定次序加入对提油率有不同影响,按序加入能够得到更高的提油率,具体原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1]王璋,许时婴.酶法从全酯大豆中同时制备大豆油和大豆水解蛋白工艺的研究[J].无锡轻工业学院学报,1994,13(3):179-191.
- [2]钱志娟,王璋,许时婴,等.玉米胚芽水酶法提油及蛋白质的回收[J].无锡轻工大学学报:食品与生物技术,2004,23(5):58-62.
- [3]Zhang S B, Wang Z, Xu S Y. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84(1):97-105.
- [4]Moreau R A, Johnston D B, Powell M J, et al. A comparison of commercial enzymes for the aqueous enzymatic extraction of corn oil from corn germ[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2004, 81(11):1071-1075.
- [5]方学智,姚小华,王开良,等.不同制油方法对油茶籽油品质的影响[J].中国油脂,2009,34(1):23-26.
- [6]聂明,杨水平,姚小华,等.不同加工方式对油茶籽油理化性质及营养成分的影响[J].林业科学研究,2010,23(2):165-169.
- [7]郭华,周建平,廖晓燕,等.油茶籽的细胞形态和成分及水酶法提取工艺[J].湖南农业大学学报,2007,33(1):83-86.
- [8]吴祥庭.酶法提油技术的研究进展[J].粮油食品科技,2006,14(6):41-42.
- [9]Dominguez H, Nunez M J, Lema J M. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: A review[J]. Food Chemistry, 1994, 49(3):271-286.
- [10]Rosenthal A, Pyle D L, Niranjana K. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19(6):402-420.
- [11]GB/T 5009.6-2003,食品中脂肪的测定[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [12]Huang A. Structure of plant seed oil bodies[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1994, 4(4):493-498.
- [13]Yoon SH, Kim IH, Kwon TW. Effects of enzyme treatments and ultrasonification on extraction yields of lipids and protein from soybean by aqueous process[J]. Korean J, 1991, 23:673-676.
- [14]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.
- [15]易建华,朱振宝,赵芳,等.酶的选择对水酶法提取核桃油的影响[J].中国油脂,2007,32(2):27-29.