

响应曲面法优化磷脂酶 Lecitase Ultra 用于茶油脱胶工艺的研究

李 晶¹, 胡婕伦¹, 谢明勇^{1,*}, 聂少平¹, 张 彬¹, JULIA Goh su-yun²

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.淡马锡理工学院应用科学系, 新加坡 529757)

摘 要: 本研究在单因素试验的基础上, 利用 Box-Behnken 的中心组合试验设计及响应面分析法优化磷脂酶 Lecitase Ultra 对茶油脱胶的工艺, 建立反应时间、反应温度、酶用量与磷脂脱除率之间的数学模型, 确立酶法对茶油脱胶的最佳工艺条件, 即反应时间 4.3h、反应温度 47℃、酶用量 44mg/kg。在此最佳工艺条件下, 茶油脱胶率达 89.41%(n=3)。

关键词: 茶油; 脱胶; 磷脂酶; 响应曲面法

Optimization of Degumming Process of Camellia Oil with Phospholipase Using Response Surface Methodology

LI Jing¹, HU Jie-lun¹, XIE Ming-yong^{1,*}, NIE Shao-ping¹, ZHANG Bin¹, JULIA Goh su-yun²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. School of Applied Science, Temasek Polytechnic, Singapore 529757, Singapore)

Abstract: On the basis of single-factor tests, the degumming conditions of camellia oil by enzyme method were optimized through Box-Behnken design and response surface methodology (RSM). The mathematical-regression model was established about the dependent variable (degumming rate of camellia oil) and independent variables (time, temperature and phospholipase Lecitase Ultra dosage). According to this model, the optimum degumming conditions are determined as time 4.3 h, temperature 47 °C and phospholipase Lecitase Ultra dosage 44 mg/kg. The response value (degumming rate) for these optimum values is 89.41% (n=3).

Key words: camellia oil; degumming; phospholipase; response surface methodology

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0326-05

茶油是我国特有的木本食用植物油, 其脂肪酸组成与世界上公认的最好的植物油脂橄榄油相似, 有“东方橄榄油”之美称^[1]。据《中国医药大辞典》记载, 茶油不仅营养丰富, 还具有重要的药用价值, 能增强血管弹性和韧性, 延缓动脉粥样硬化, 增加肠胃吸收功能, 促进内分泌腺体激素分泌, 防治神经功能下降, 提高人体免疫力等功效。茶油经过精炼加工, 可以用做高级食用油、化妆品和医药用油。

在植物油的精炼工艺中, 脱胶工序起着极为重要的作用, 脱胶效果的好坏直接影响着脱酸、脱色、脱臭等后续工序, 也直接影响着成品油的质量。植物油中

的磷脂分为水化磷脂和非水化磷脂两类^[2]。目前常用的脱胶方法是水法脱胶和酸法脱胶。采用水法脱胶只能除去油脂中的水化磷脂, 而油中仍然残留大量的非水化磷脂, 很难满足精炼工艺的要求。酸法脱胶虽然操作简单, 但脱胶效果一般, 仅适合于加工质量较好的毛油^[3]。而酶法脱胶是利用磷脂酶水解磷脂的脂肪酸链而生成水化性溶血磷脂, 再通过水化的方法除去^[2,4]。与传统的脱胶方法相比, 酶法脱胶具有反应条件温和, 不破坏油脂结构, 油损耗少, 节约化学物质消耗量, 经济、环保等特点^[5]。

响应曲面法(response surface methodology, RSM)是 Box 等于 20 世纪 50 年代提出的, 其以回归模型作为

收稿日期: 2008-06-29

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD27B04); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0540); 南昌大学测试基金项目(2008034)

作者简介: 李晶(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: doudouljl@sina.com

* 通讯作者: 谢明勇(1957-), 男, 教授, 研究方向为食品营养与安全中药现代化。E-mail: myxie@ncu.edu.cn

函数估算的工具,在多因子试验中,将因子与实验结果(响应值)的相互关系用多项式拟合,把因子和实验结果的关系函数化。因而,通过对函数的面进行分析,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,并进行优化,是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法^[6-7],已经广泛应用在诸多工艺过程优化控制等领域^[8]。本实验将磷脂酶 Lecitase Ultra 应用于茶油脱胶工艺,在反应时间、温度、加酶量单因素试验的基础上,运用响应曲面法,以磷脂脱除率为响应值,优化酶法脱胶工艺参数,为其在生产工业中的应用提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

毛茶油(江西宜春) 初始磷脂含量 394.6mg/kg; Lecitase Ultra A₁ 位磷脂酶 Novozyme 公司;磷酸二氢钾、硫酸联氨、钼酸钠、稀硫酸、氧化锌、浓盐酸、柠檬酸、氢氧化钠均为分析纯。

1.2 仪器与设备

TU-1990 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司; FA1104 电子天平 上海精天电子仪器厂; HH-4 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; JJ-1 大功率电动搅拌器 常州国华电器有限公司; T-25 Basic 组织分散机 德国 IKA 公司; 箱式电阻炉 上海新苗医疗器械制造有限公司; 可调温电炉 北京中兴伟业仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 磷脂含量的测定^[9]

油脂中磷脂含量的测定方法参照 GB5537—1985 进行。

1.3.2 酶法脱胶步骤

取 200g 毛油水浴加热至 80℃, 加入浓度为 45% 的柠檬酸 0.24ml, 以 9600r/min 均质 1min, 再于 80℃ 水浴下搅拌 20min, 然后加入一定量的浓度为 4.0% NaOH 溶液混合均匀, 调节 pH 至 4.8, 以 9600r/min 均质 1min 后, 置于 80℃ 水浴下搅拌 20min, 加入 6ml 蒸馏水, 搅拌 20min。冷却至室温后, 向体系中加入一定量预先经 10 倍稀释的酶液, 以 9600r/min 均质 1min, 在预定条件下进行酶解。酶解反应完毕后于 90℃ 条件下灭酶 10min, 再于 4800r/min 条件下离心 20min 即得脱胶油。将脱胶油按 1.3.1 方法进行磷脂含量测定。

1.3.3 单因素试验

选取对酶法脱胶工艺有显著影响的三个因素, 即酶解时间、酶解温度、酶用量。按照 1.3.2 方法对毛茶油进行酶解脱胶, 并计算磷脂脱除率。

1.3.4 响应曲面试验设计

在单因素试验结果的基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 三个主要因素酶解时间(h), 酶解温度(℃)以及加酶量(mg/kg), 分别用 X_1 、 X_2 、 X_3 来表示, 每一个自变量的低、中、高试验水平分别以 -1、0、+1 进行编码。试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应曲面实验设计因素水平及编码
Table 1 Variables and their levels for response surface

因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
时间(h)	X_1	3	4	5
温度(℃)	X_2	40	45	50
加酶量(mg/kg)	X_3	30	40	50

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 反应时间对脱胶效果的影响

固定酶用量为 30mg/kg, 反应温度 45℃, 设定酶解时间为 1、2、3、4、5、6h, 考察酶解时间对磷脂脱除率的影响。得到酶解时间与脱胶茶油中磷脂含量的关系如图 1 所示。

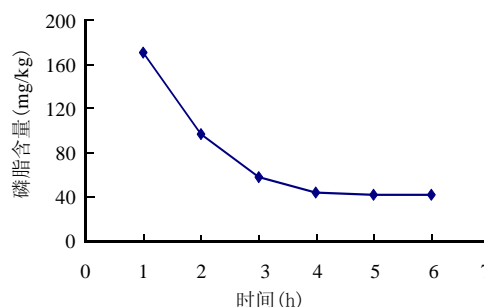


图 1 时间对脱胶效果的影响

Fig.1 Effects of reaction time on degumming result

如图 1 所示, 随着反应时间的增加, 脱胶油中磷脂含量逐渐降低。在脱胶的初始阶段磷脂含量快速下降, 但随着反应时间的增加, 磷脂含量变化很小。当反应时间超过 4h 后, 脱胶效果变化不显著。因此认为脱胶时间设定在 4h 左右较理想。

2.1.2 反应温度对脱胶效果的影响

固定酶用量为 30mg/kg, 反应时间 3h, 设定酶解温度为 35、40、45、50、55、60℃, 考察酶解温度对磷脂脱除率的影响。得到酶解温度与脱胶茶油中磷脂含量的关系如图 2 所示。

如图 2 所示, 温度对脱胶效果有显著的影响。温度太低, 酶活力不高, 磷脂酶不能与油样充分反应, 而温度太高易使酶失活, 导致脱胶效果也不理想。所以磷脂酶的反应温度应设定在 45℃ 左右。

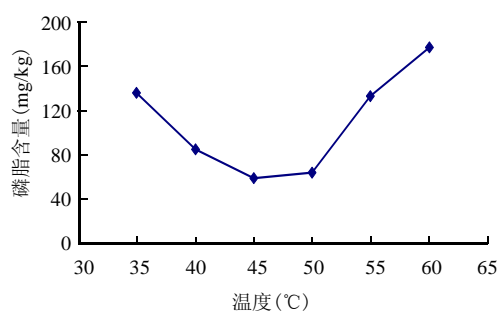


图2 温度对脱胶效果的影响

Fig.2 Effects of temperature on degumming result

2.1.3 加酶量对脱胶效果的影响

固定反应温度 45℃, 反应时间 3h, 设定加酶量为 10、20、30、40、50mg/kg, 考察加酶量对磷脂脱除率的影响。得到加酶量与脱胶茶油中磷脂含量的关系如图 3 所示。由图 3 可知, 茶油中的磷脂含量随着酶用量的增加而降低。当酶用量为 40mg/kg 时, 进一步增加酶用量脱胶效果差别不显著。因此从经济角度考虑, 选择加酶量在 40mg/kg 左右。

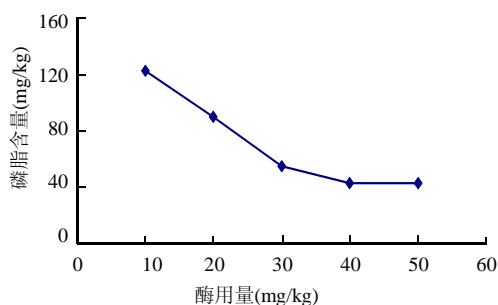


图3 酶用量对脱胶效果的影响

Fig.3 Effects of enzyme dosage on degumming result

2.2 响应曲面试验结果与分析

2.2.1 试验结果

Box-Behnken 的三因素三水平试验的取值见表 2, 共 15 个试验点。其中试验号 1~12 是析因试验, 试验号 13~15 是中心试验。这 15 个试验点可分为析因点和零点, 其中析因点为自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点; 零点为区域的中心点, 零点试验重复 3 次, 用以估计试验误差^[10]。每次试验所得的磷脂脱除率见表 2。

2.2.2 模型的建立

利用 SAS 软件对表 2 中的试验数据进行多元回归拟合, 得到磷脂脱除率对时间 (X_1)、温度 (X_2) 和加酶量 (X_3) 的二次多项回归模型为:

$$Y_1 = 87.84 + 2.0925X_1 + 2.36125X_2 + 4.59375X_3 - 3.3575X_1^2 - 0.2475X_1X_2 + 0.2075X_1X_3 - 2.82X_2^2 - 0.08X_2X_3 - 5.59X_3^2$$

2.2.3 方差分析

采用 SAS Rsreg 程序对表 2 中磷脂脱除率试验数据

表2 响应面分析试验设计及结果

Table 2 Test design and result of response surface method analysis

试验号	编码水平			磷脂脱除率 (%)
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	76.67
2	-1	1	0	82.55
3	1	-1	0	81.47
4	1	1	0	86.36
5	0	-1	-1	73.28
6	0	-1	1	81.72
7	0	1	-1	77.5
8	0	1	1	85.62
9	-1	0	-1	72.12
10	1	0	-1	75.77
11	-1	0	1	81.8
12	1	0	1	86.28
13	0	0	0	85.86
14	0	0	0	89.2
15	0	0	0	88.76

表3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression equation

回归项	自由度	平方和	F 值	大于F的概率
一次项	3	0.5874	45.3	0.0005***
平方项	3	0.39	30.08	0.0013**
交互项	3	0.001	0.08	0.9677
总回归	9	0.9784	25.16	0.0012**

注: *** 显著性在 0.001 水平; ** 显著性在 0.01 水平; * 显著性在 0.05 水平。

进行多元回归分析, 分析结果见表 3、4。回归方程的方差分析 (表 3) 结果表明, 以磷脂脱除率为响应值所建立的回归模型是极显著的。方程一次项、二次项的影响都是高度显著的, 并且交互项中 X_1 与 X_3 项交互效应显著, 表明各影响因素对磷脂脱除率都不是简单的线性关系。

表4 回归方程偏回归系数的估计值

Table 4 Estimate values of partial regression coefficients of regression equation

参数	自由度	参数估计	大于 t 的概率
X_1	1	2.0925	0.0072**
X_2	1	2.36125	0.0043**
X_3	1	4.59375	0.0002***
X_1^2	1	-3.3575	0.0050**
X_1X_2	1	-0.2475	0.7293
X_1X_3	1	-0.2075	0.0102*
X_2^2	1	-2.82	0.7713
X_2X_3	1	-0.08	0.9104
X_3^2	1	-5.059	0.0005***
残差标准差	离回归偏差	1.352045	
R^2	决定系数	97.84%	

注: *** 显著性在 0.001 水平; ** 显著性在 0.01 水平; * 显著性在 0.05 水平。

从表4中可以看出,方程的决定系数为97.84%,表明用上述回归方程描述各因素与响应值之间的关系时,其因变量和全体自变量之间的线性关系显著。

2.2.4 响应曲面分析

根据回归分析结果(表4)做出相应的响应曲面分析图及等值线图,结果见图4~9。这些图直观地反映了各因素对响应值的影响,由等值线图可以看出存在极值的条件应该在圆心处。比较可知:加酶量(X_3)对磷脂脱除率的影响最为显著,温度和时间次之。

2.2.5 确定最优值

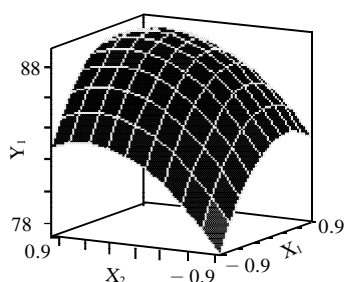


图4 时间(X_1)与温度(X_2)对磷脂脱除率影响的响应曲面图
Fig.4 Response surface plot of combined effects of time and temperature on degumming rate

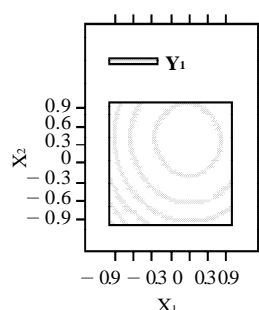


图5 时间(X_1)与温度(X_2)对磷脂脱除率影响的等高线图
Fig.5 Contour plot of combined effects of time and temperature on degumming rate

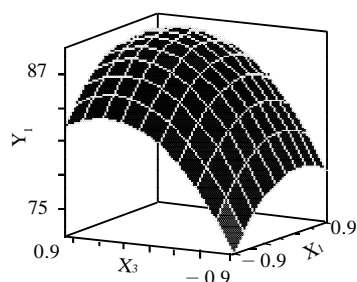


图6 时间(X_1)与酶用量(X_3)对磷脂脱除率影响的响应曲面图
Fig.6 Response surface plot of combined effects of time and enzyme dosage on degumming rate

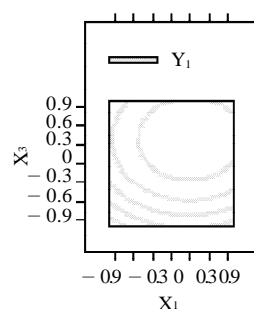


图7 时间(X_1)与酶用量(X_3)对磷脂脱除率影响的等高线图
Fig.7 Contour plot of combined effects of time and enzyme dosage on degumming rate

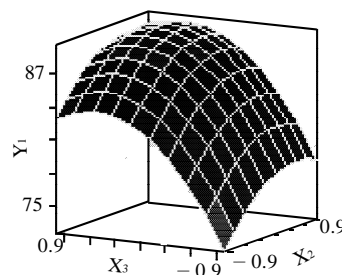


图8 温度(X_2)与酶用量(X_3)对磷脂脱除率影响的响应曲面图
Fig.8 Response surface plot of combined effects of temperature and enzyme dosage on degumming rate

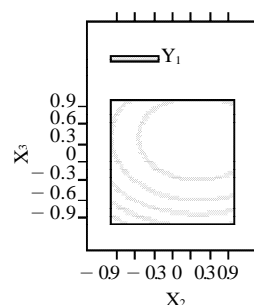


图9 温度(X_2)与酶用量(X_3)对磷脂脱除率影响的等高线图
Fig.9 Contour plot of combined effects of temperature and enzyme dosage on degumming rate

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 X_1 、 X_2 、 X_3 的代码值分别为0.309688、0.399202、0.413781;与之换算得出相应的实际值为时间(X_1)为4.31h,温度(X_2)为46.99℃,加酶量(X_3)为44.13mg/kg,此时磷脂脱除率的理论值Y为89.69%。

2.2.6 回归模型的验证实验

为检验响应曲面法所得结果的可靠性,采用上述优化的脱胶条件进行酶法脱胶实验,考虑到实际操作的情况,将脱胶工艺参数修正为时间4.3h,温度47℃,加酶量44mg/kg,在此条件下脱胶3次,实际测得的平均磷脂脱除率为89.41%,实验值与理论值的相对误差

为 0.31%。可见该模型可以很好的反映酶法脱胶的条件,同时也证明了响应曲面法在确立茶油酶法脱胶工艺参数上的可行性。

3 结 论

利用磷脂酶 Lecitase Ultra 对茶油进行脱胶,具有高效、经济、环保的优点。同时采用 Box-Behnken 中心组合试验设计和响应面分析法,借助 SAS 统计软件能简便、可靠地进行优化试验和数据分析。本研究应用这一方法对脱胶工艺条件进行了优化,得到最佳脱胶工艺条件为:反应时间 4.3h、反应温度 47℃、加酶量 44mg/kg,在此条件下茶油的脱胶率可达到 89.41%。

参考文献:

- [1] 吴雪辉,黄永芳,谢治芳.茶油的保健功能作用及开发前景[J].食品科技,2005(8): 94-96.
- [2] 李秋生,杨继国,杨博,等.不同磷脂酶用于植物油脱胶的研究[J].中国油脂,2004,29(1): 19-22.
- [3] 杨博,王旋.植物油物理精炼中多种脱胶方法评价[J].中国油脂,2004,29(12): 18-21.
- [4] 万楚筠,黄凤洪,夏伏建.生物酶技术在油脂制取中应用[J].粮食与油脂,2005(11): 33-35.
- [5] BUCHOLD H,BOENSCH R,SCHROEPPEL J. Process for enzymatical degumming vegetable oil: US, 5558781[P]. 1996-09-24.
- [6] LI Q H, FU C L. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein[J]. Food Chemistry, 2005, 92(4): 701-706.
- [7] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 91-94.
- [8] CHANDRIKA L P, FERREIDON S. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2005, 93(1): 47-56.
- [9] 中华人民共和国国家技术监督局. GB5537 植物油检验磷脂检验法测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1985.
- [10] 黄璞,谢明勇,聂少平,等. 响应曲面法优化微波辅助提取黑灵芝孢子多糖工艺研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 200-203.