

探头式超声乳化催化脂肪酶 TLIM 水解茶叶籽油工艺优化

Optimization of tea seed oil hydrolysis catalyzed by lipase TLIM under probe ultrasonic emulsify

向小乐^{1,2} 余 佶² 杨万根² 麻成金^{1,2}

XIANG Xiao-le^{1,2} YU Ji² YANG Wan-geng² MA Cheng-jin^{1,2}

(1. 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000; 2. 吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000)

(1. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie, Hunan 427000, China; 2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

摘要:在单因素试验基础上,选取脂肪酶 TLIM 浓度、酶解温度、搅拌转速为试验因子,水解率为响应值,运用 Box-Behnken 试验设计对探头式超声乳化催化脂肪酶 TLIM 水解茶叶籽油工艺进行优化,建立数学回归模型。结果表明,茶叶籽油酶解优化工艺为:超声波功率 320 W,搅拌转速 840 r/min,酶解温度 50.5 °C,脂肪酶 TLIM 浓度 3.0% (油重),缓冲液初始 pH 8.5,酶解时间 8 h。该条件下,茶叶籽油水解率达 73%,说明该法酶解效率高。

关键词:茶叶籽油;探头式超声波;脂肪酶 TLIM;水解

Abstract: Based on the single factor test, an Box-Behnken design was used to optimize the parameters, Lipase TLIM dosage, bath temperature, speed of stirring, for tea seed oil enzymatic hydrolysis catalyzed by lipase TLIM under probe ultrasonic emulsify, and a mathematical regression model was established. The optimal parameters were obtained as follows: ultrasonic power 320 W, speed of stirring 840 r/min, reaction temperature 50.5 °C, concentration of lipase TLIM 3.0% (as oil weight), initial pH value 8.5, reaction time 12 h. Under this conditions, the hydrolysis rate of tea seed oil reaches 73%, and has a good effect on tea seed oil enzymatic hydrolysis.

Keywords: tea seed oil; probe ultrasonic; lipase TLIM; hydrolysis

脂肪酶催化油脂水解因具有反应条件温和、效率高、产物杂质少等优势而成为制备甘油二酯、甘油单脂、脂肪酸、结构脂质及油脂深加工的有效手段^[1,2]。超声波的空化、乳化

效应较强,能降低界面张力和溶液黏度、增加非均相之间接触界面,从而促进油脂酶解^[3,4]。

近年来,国内外对茶叶籽油的研究主要集中于提取精炼工艺、脂肪酸组成^[5]、理化特性、保健功能^[6]等方面,暂无运用探头式超声波对油脂酶解工艺进行强化处理的文献报道。本试验在前期研究^[7]的基础上,拟采用 Box-Behnken 试验设计,对探头式超声波耦合磁力搅拌协同辅助脂肪酶 TLIM,催化茶叶籽油水解工艺条件进行优化,以期进一步为茶叶籽油的综合加工利用及脂肪酶 TLIM 的酶学性质研究提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

茶叶籽油:由湖南省古丈县茶叶基地提供茶叶籽,机械压榨制油;

脂肪酶:TLIM(250 IU/g),诺维信生物技术有限公司;

磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、氢氧化钠、氢氧化钾、邻苯二甲酸氢钾、无水乙醇等:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

超声波细胞破碎机:JY92-IIDN 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

双数显恒温测速磁力搅拌器:85-2A 型,金坛市白塔新宝仪器厂;

电子天平:FA2004 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 茶叶籽油酶解 在文献[7]的基础上加以改进,将所需配比的茶叶籽油、TLIM 脂肪酶及 pH 缓冲液于 30 mL 反

基金项目:2012 年湖南省科技厅资助项目(编号:2012NK3009);2014 年吉首大学校级科研项目(编号:14JDY063)

作者简介:向小乐(1989—),男,吉首大学在读硕士研究生。

E-mail:281946730@qq.com

通讯作者:麻成金

收稿日期:2015-03-12

反应釜中混匀,调节水浴温度、磁力搅拌转速,设置超声波发生器参数,开始反应。反应结束后,直接测定茶叶籽油酶解产物——油水乳化液酸值。

1.2.2 水解率计算 参照 GB/T 5530—2005《动植物油脂酸值和酸度测定》测定油水乳化液酸值,参照 GB/T 5534—2008《动植物油脂皂化值的测定》测定茶叶籽油皂化值。酸值^[8]及水解率^[2,3]分别按式(1)和(2)计算:

$$AV = \frac{C_{KOH} \times (V_{滴} - V_{空}) \times M_{KOH}}{m_{样} \times f_o} \quad (1)$$

式中:

AV——乳化油样酸值,mg KOH/g;

C_{KOH} ——氢氧化钾浓度,mol/L;

$V_{滴}$ ——滴定油样所耗氢氧化钾,mL;

$V_{空}$ ——对照试验所耗氢氧化钾,mL;

M_{KOH} ——KOH 摩尔质量,g/mol;

$m_{样}$ ——所取乳化液质量,g;

f_o ——乳化液中油所占质量分数。

$$DH = \frac{AV_i - AV_0}{SV - AV_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

DH——茶叶籽油水解率,%;

SV——皂化值,mg KOH/g;

AV_0 、 AV_i ——分别表示酶解前后酸值,mg KOH/g。

1.2.3 单因素试验设计

(1) 超声波功率:固定油水比 1 : 1.5($m : V$),搅拌转速 600 r/min,脂肪酶 TLIM 浓度 1.0%(油重),温度 50 °C,缓冲液初始 pH 6.5,时间 2 h,研究超声波功率(20,80,140,200,260,320,380 W,空占比=1 s : 2 s)对茶叶籽油酶解的影响。

(2) 搅拌转速:固定油水比 1 : 1.5($m : V$),超声波功率 320 W,脂肪酶 TLIM 浓度 1%,温度 50 °C,pH 6.5,时间 2 h,研究搅拌转速(200,400,600,800,1 000,1 200 r/min)对茶叶籽油酶解率的影响。

(3) 酶解温度:固定油水比 1 : 1.5($m : V$),超声波功率 320 W,转速 800 r/min,脂肪酶 TLIM 浓度 1%,pH 6.5,时间 2 h,研究水浴温度(35,40,45,50,55,60,65 °C)对茶叶籽油酶解率的影响。

(4) 脂肪酶 TLIM 浓度:固定油水比 1 : 1.5($m : V$),超声波功率 320 W,转速 800 r/min,温度 50 °C,pH 6.5,时间 2 h,研究脂肪酶 TLIM 浓度(0.5%,1.0%,1.5%,2.0%,2.5%,3.0%,3.5%)对茶叶籽油酶解率的影响。

(5) 缓冲液初始 pH:固定油水比 1 : 1.5($m : V$),超声波功率 320 W,转速 800 r/min,温度 50 °C,脂肪酶浓度 2.5%,时间 2 h,研究缓冲液初始 pH(6.5,7,7.5,8,8.5,9,9.5)对茶叶籽油酶解率的影响。

(6) 酶解时间:固定油水比 1 : 1.5($m : V$),超声波功

率 320 W,转速 800 r/min,温度 50 °C,脂肪酶 TLIM 浓度 2.5%,pH 8.5,研究酶解时间(0,2,4,6,8,10,12,14 h)对茶叶籽油酶解率的影响。

1.2.4 响应面优化设计 本试验在单因素试验结果的基础上,以茶叶籽油水解率为响应值,运用 minitab. 16 中 Box-Behnken 设计四因素三水平响应面分析试验对超声波辅助脂肪酶 TLIM 水解茶叶籽油工艺进行优化。

1.3 数据处理

单因素试验数据使用 Origin 8 软件进行分析,响应面试验数据使用 minitab. 16 软件进行分析,每组试验设计 3 个平行。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 超声波功率对茶叶籽油水解率的影响 由图 1 可知,茶叶籽油水解率随超声波功率的增加先呈指数型增长而后变缓,这与马歌丽等^[9]报道的超声波对脂肪酶酶学特性的影响所得结论相似。此结果表明,适当功率的超声波强化能促进脂肪酶催化茶叶籽油水解,其原因可能是超声波的乳化效应能增大反应底物油水之间的接触面积、空化效应能促使产物释放^[3]。因此,综合考虑超声波的催化效率及仪器的使用寿命,选择超声波功率为 320 W 为宜。

2.1.2 磁力搅拌转速对茶叶籽油水解率的影响 由图 2 可

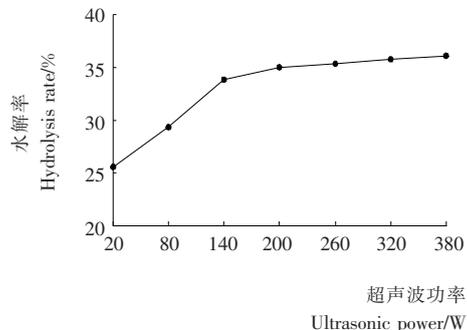


图 1 超声波功率对茶叶籽油水解率的影响
Figure 1 Effect of power of ultrasonic on tea seed hydrolysis

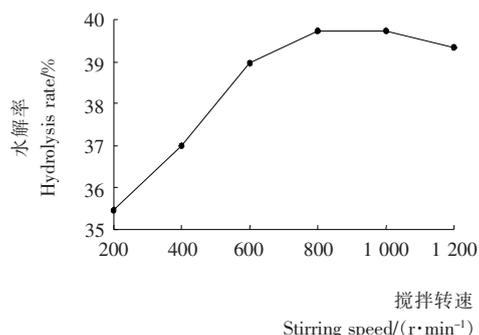


图 2 磁力搅拌转速对茶叶籽油水解的影响
Figure 2 Effect of speed of magnetic stirring on Tea seed hydrolysis

知,当搅拌转速小于 800 r/min 时,茶叶籽油水解率随转速增加而增大,当搅拌转速大于 1 000 r/min 时其水解率反而有所降低。其原因可能是增大搅拌转速能有效加大油水接触界面,而转速过高又可能破坏酶蛋白结构^[10];此外,也可能是由于当转速高于 1 000 r/min 后,磁力搅拌的磁子不稳定而导致茶叶籽油水解率降低。因此,选择磁力搅拌转速在 800 r/min 左右为宜。

2.1.3 酶解温度对茶叶籽油水解率的影响 由图 3 可知,在该酶解体系中,脂肪酶 TLIM 催化茶叶籽油水解反应的最适温度为 50 ℃,这与向小乐等^[7]、高巍等^[11]所得结论相近。因此,选择酶解温度在 50 ℃左右为宜。

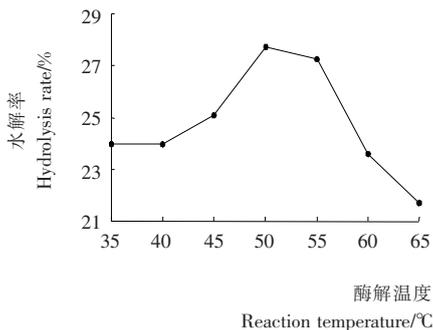


图 3 酶解温度对茶叶籽油水解率的影响

Figure 3 Effect of bath temperature on tea seed hydrolysis

2.1.4 脂肪酶 TLIM 浓度对茶叶籽油水解率的影响 由图 4 可知,在该试验范围内,茶叶籽油水解率随脂肪酶 TLIM 浓度的增加先急速增长,当其浓度达 2.5% 后水解增长放缓,说明脂肪酶基本饱和。与文献^[7]相比,此酶解体系的脂肪酶浓度稍低于机械搅拌联合超声波震荡酶解体系的饱和浓度,说明探头式超声乳化促进了脂肪酶溶解及其与油水乳化液的结合。因此,综合考虑水解效率及脂肪酶成本,选择脂肪酶 TLIM 浓度在 2.5% 左右为宜。

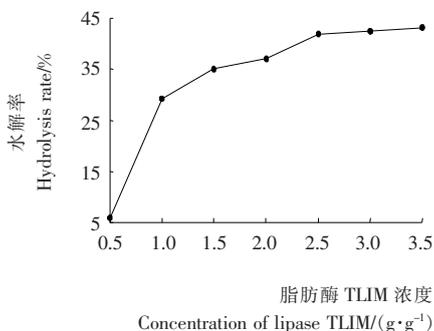


图 4 脂肪酶 TLIM 浓度对茶叶籽油水解率的影响

Figure 4 Effect of concentration of lipase TLIM on tea seed hydrolysis

2.1.5 pH 对茶叶籽油水解率的影响 酶促反应最适 pH 由酶分子本质特性及外界环境酸碱度共同决定,即反应体系中酸碱度可通过改变酶分子表面电荷及酶蛋白构象来影响

酶的催化活性^[12,13]。由图 5 可知,脂肪酶 TLIM 催化茶叶籽油水解反应的最适 pH 为 8.5,说明 TLIM 是一种碱性脂肪酶,与向小乐等^[7]所得结论基本一致。

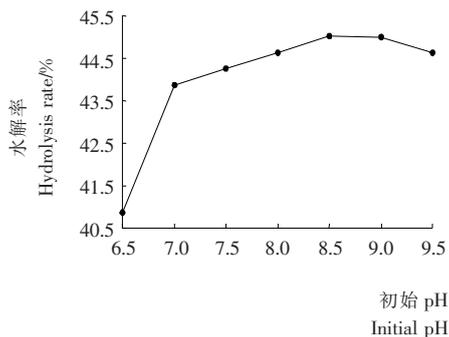


图 5 缓冲液初始 pH 对茶叶籽油水解率的影响

Figure 5 Effect of initial pH of buffer on tea seed hydrolysis

2.1.6 酶解时间对茶叶籽油水解率的影响 由图 6 可知,在该酶解体系中,反应 8 h 左右即可使水解率达 70% 左右(理论水解率为 66.67%,水解率高于 66.67% 的原因可能是 2 位上脂肪酸异构到 1,3 位来参与反应^[14,15],因此水解速率增长大幅下降)。与文献^[7]中机械搅拌联合超声波震荡辅助茶叶籽油酶解 17 h 方可使水解率达到 70% 相比,探头式超声波乳化工艺的水解效率显著提高。因此,综合考虑水解程度及酶解效率,选择酶解时间为 8 h 为宜。

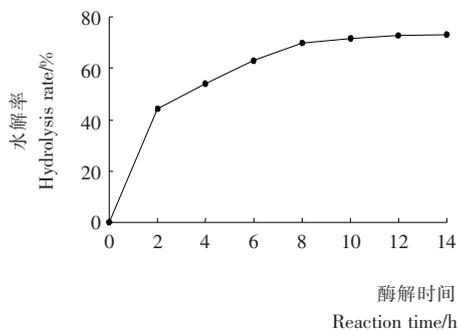


图 6 酶解时间对茶叶籽油水解率的影响

Figure 6 Effect of reaction time on tea seed hydrolysis

2.2 响应面优化试验结果与分析

2.2.1 响应面试验设计及结果 Box-Behnken 响应面试验设计因素及水平见表 1,结果及预测值见表 2、方差分析见表 3。运用软件 minitab. 16 对表 2 中试验结果进行回归分析,得预测模型方程:

表 1 Box-Behnken 设计水平编码表

Table 1 Variables and coded levels used in the B-BD

水平	A 温度 / °C	B 脂肪酶 TLIM 浓度 / %	C 转速 / (r · min ⁻¹)
-1	45	2.0	600
0	50	2.5	800
1	55	3.0	1 000

$$Y = 71.077 + 1.503A - 2.539B + 0.394C - 2.036A^2 - 0.343B^2 - 1.473C^2 - 1.128AB - 0.752AC - 0.415BC \quad (3)$$

表2 Box-Behnken 响应面试验设计及结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken Design

试验号	A	B	C	Y 水解率/%	
				实测值	预测值
1	-1	-1	0	63.81	63.53
2	1	-1	0	68.32	68.79
3	-1	1	0	71.33	70.86
4	1	1	0	71.33	71.61
5	-1	0	-1	63.81	64.92
6	1	0	-1	69.07	69.43
7	-1	0	1	67.57	67.21
8	1	0	1	69.82	68.71
9	0	-1	-1	67.57	66.74
10	0	1	-1	71.63	70.99
11	0	-1	1	66.06	66.70
12	1	0	1	71.78	72.60
13	0	0	0	70.57	71.08
14	0	0	0	71.33	71.08
15	0	0	0	71.33	71.08

表3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F	P	显著性
回归模型	9	100.676	11.186 3	9.50	0.012	*
线性	3	70.862	23.620 8	20.06	0.003	**
A	1	18.060	18.060 0	15.34	0.011	*
B	1	51.562	51.562 0	43.79	0.001	**
C	1	1.240	1.240 3	1.05	0.352	
平方	3	21.775	7.258 3	6.16	0.039	*
A ²	1	15.303	15.303 2	13.00	0.025	*
B ²	1	0.435	0.435 2	0.37	0.570	
C ²	1	8.015	8.014 9	6.81	0.048	*
交互作用	3	8.039	2.679 6	2.28	0.197	
AB	1	5.085	5.085 0	4.32	0.092	
AC	1	2.265	2.265 0	1.92	0.224	
BC	1	0.689	0.689 9	0.59	0.479	
残差误差	5	5.887	1.177 5			
失拟	3	5.502	1.834 1	9.53	0.096	不显著
纯误差	2	20.385	0.192 5			
总离差	14	106.564				

† 相关系数 R² 为 0.944 8; 调整复相关系数 R_{adj}² 为 0.845 3。

由表 3 可知, 所建模型 P<0.05(显著), 相关系数 R² = 0.944 8, 决定系数(调整相关系数) R_{adj}² = 0.845 3, 失拟项 P=0.096>0.05(不显著), 说明该模型拟合程度较高, 能在 84.53% 的变更范围内解释茶叶籽油的酶解情况^[16]; 试验因子对茶叶籽油酶解的影响顺序为 TLIM 脂肪酶浓度>温度>转速。

2.2.2 因素交互作用 根据方差分析结果, 利用软件 minitab.16 对茶叶籽油酶解影响较大的两交互因子进行响应面分析, 结果见图 7、8。响应曲面的陡度和等高线与坐标轴交点数目能在一定程度上反映试验因子对响应值的贡献大小。

由图 7、8 可知, 试验因素曲面陡度及其等高线与坐标轴的交点数目大小顺序为 B>A>C, 即说明各试验因子对超声波辅助 TLIM 脂肪酶催化茶叶籽油水解影响的大小顺序: 脂肪酶 TLIM 浓度>温度>转速, 此结论与方差分析结果一致。综合考虑反应效率和经济效益对茶叶籽油酶解工艺进行优化, 结果见 2.2.3。

2.2.3 优化工艺确定和验证实验 运用软件 minitab.16 中响应优化器对 A、B、C 三因素进行寻优处理, 结果见图 9。

由图 9 可知, 超声波耦合磁力搅拌协同辅助脂肪酶 TLIM 水解茶叶籽油的优化工艺为: A=0.090 9, B=1.000 0, C=0.212 1, 经编码公式转换为实际参数值: 温度为 50.45℃,

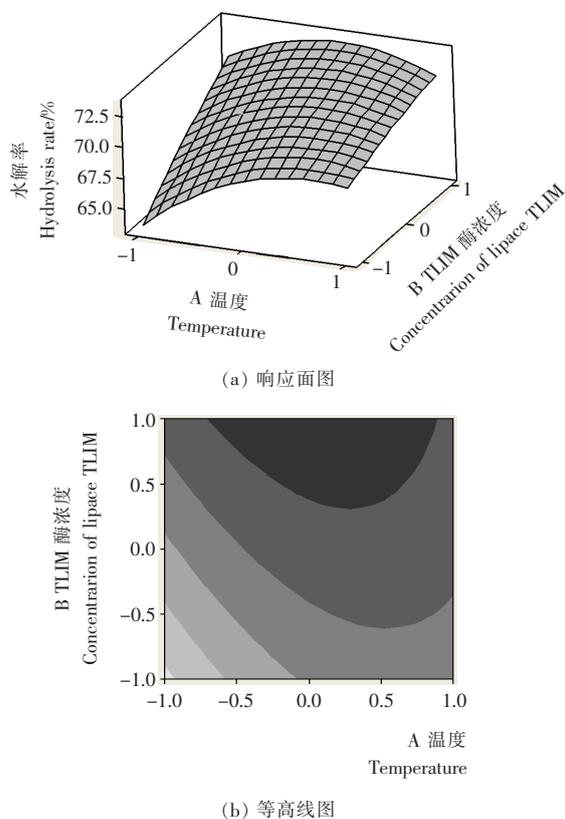
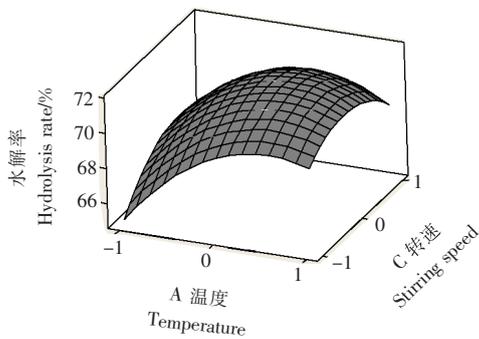
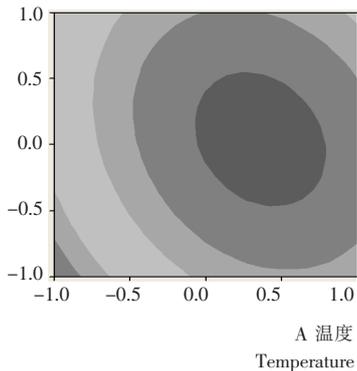


图 7 A—B 因素交互作用的响应面及等高线图
Figure 7 Response surface and contour plot for the interaction of A and B



(a) 响应面图



(b) 等高线图

图 8 A—C 因素交互作用的响应面及等高线图

Figure 8 Response surface and contour plot for the interaction of A and C

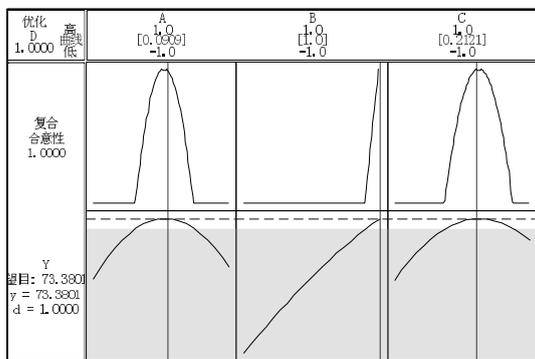


图 9 响应因子优化图

Figure 9 optimizing figure of response test factor

TLIM 脂肪酶浓度为 3.0%, 转速为 842.42 r/min。考虑实际情况, 选取: 温度 50.5 °C, TLIM 脂肪酶浓度 3.0%, 转速 840 r/min 进行 3 次平行验证实验, 测得茶叶籽油的平均水解率为 73%, 与模型预测值 73.38% 的相对标准偏差为 0.52%。说明在本试验范围内, 所建模型拟合程度较好, 预测能力较强。

3 结论

探头式超声波耦合磁力搅拌协同辅助脂肪酶 TLIM 催化茶叶籽油水解的优化工艺条件为: 超声波功率 320 W, 搅

拌转速 840 r/min, 酶解温度 50.5 °C, 脂肪酶 TLIM 浓度 3.0%, 缓冲液初始 pH 8.5, 酶解时间 8 h, 在该条件下茶叶籽油水解率约达 73%。与机械搅拌联合超声波震浴(清洗器)酶解体系^[7]相比, 此法酶解 8 h 左右即可完成脂肪酶 TLIM 催化茶叶籽油水解的主体反应(选择性水解 1,3 位上脂肪酸, 理论水解率 67%), 催化效率高, 操作简便易行。但该法酶解增大了反应产物——油水乳化混合液的分离难度。

参考文献

- 徐怀德, 唐菊, 刘立芳. 猪胰脂肪酶水解花椒籽油动力学及条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 55~59.
- 甘争艳. 无溶剂及微乳液体系中脂肪酶催化油脂水解反应研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2006.
- 刘亚轩. 超声波作用下脂肪酶催化豆油水解反应的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- Ramachandran K B, Al-Zuhair S, Fong C S, et al. Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 32(1): 19~24.
- 赖锡湖, 黄卓, 李坚, 等. 超临界 CO₂ 萃取茶叶籽油及其成分分析[J]. 食品与机械, 2011, 27(2): 38~40.
- 刘国艳, 王兴国, 金青哲, 等. 一种新资源油脂——茶叶籽油的研究现状分析[J]. 中国油脂, 2013, 38(8): 84~88.
- 向小乐, 黄群, 杨万根. 超声波辅助脂肪酶水解茶叶籽油条件的优化与动力学研究[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(2): 141~146.
- Rooney D, Weatherley L R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(10): 947~953.
- 马歌丽, 董文惠, 张勇, 等. 超声波对脂肪酶酶学特性的影响[J]. 现代食品科技, 2007, 23(8): 17~19.
- Aditi Sharma, Satyendra P Chaurasia, Ajay K Dalai. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids Production [J]. Catalysis Today, 2013, 207(30): 93~100.
- 高巍, 杨立昌, 洪鲲, 等. TLIM 脂肪酶对油脂水解特性的研究[J]. 粮油加工, 2010(4): 14~18.
- 张玉霞. 单一 AOT 微乳液与 AOT/TritonX-100 混合微乳液体系中假丝酵母脂肪酶催化蓖麻油水解的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- Sonsoles Piera-Velazquez, Frutos Maruenda-Egea, Eduardo Cadenas. The dependence of a halophilic malate dehydrogenase on Wo and surfactant concentration in reverse micelles [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, 13(1~3): 49~55.
- 周位, 杨江科, 黄瑛, 等. 复合脂肪酶催化生物柴油的初步研究[J]. 生物加工过程, 2007, 5(3): 20~26.
- 宋珂珂, 汪勇, 王丽丽, 等. 磷脂酶 A1(Lecitase Ultra)催化水解油脂机理研究(II)—立体选择性及水解进程[J]. 中国油脂, 2009, 34(11): 35~40.
- 吴琼, 代永刚, 邹险峰, 等. 响应面法优化脂肪酶水解葵花油工艺[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(6): 60~62.