

响应面法优化水酶法提取碧根果油的研究

王静¹, 张友青², 陈燕茹², 郑婷², 安啸²

(1. 浙江公正检验中心有限公司, 浙江临安 311300; 2. 临安市产品质量监测中心, 浙江临安 311300)

摘要 [目的]利用响应面法优化水酶法提取碧根果油的工艺。[方法]以碧根果为原料,在单因素试验的基础上,选取料液比、酶添加量和 pH 为响应因子,采用 3 因素 3 水平的响应面分析,建立数学模型,并得出水酶法提取碧根果油的最佳工艺条件。[结果]确定水酶法提取碧根果油的最佳工艺参数如下:烘烤温度 120 ℃,料液比 1:8 (g: mL)、碱性蛋白酶添加量 2.05%、pH 12.15,酶解时间 1.5 h,在此条件下碧根果油实际提取率为 82.24%,与模型预测值相一致。[结论]该研究可为碧根果的综合利用提供理论依据。

关键词 碧根果油;提取率;水酶法;响应面分析

中图分类号 TS225.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)28-0078-03

Optimization of Aqueous Enzymatic Extraction of Pecan Oil by Response Surface Methodology

WANG Jing¹, ZHANG You-qing², CHEN Yan-ru² et al (1. Zhejiang Gongzheng Testing Center Co., Ltd., Lin'an, Zhejiang 311300; 2. Lin'an Products Quality Inspection Center, Lin'an, Zhejiang 311300)

Abstract [Objective] The aqueous enzymatic extraction process of pecan oil was optimized by response surface methodology. [Method] Taking pecan as experiment material, based on single-factor experiments, ratio of solid to liquid, enzyme amount and pH were chosen as the response factors, and extraction rate of oil was chosen as the response value. The mathematical model was established by the response surface analysis implemented by three factors and three levels, and the optimum technological conditions for extracting pecan oil were obtained. [Result] The optimal conditions were as follows: baking temperature 120 ℃, ratio of solid to liquid 1:8 (g: mL), enzyme amount 2.05%, pH 12.15 and enzymolysis time 1.5 h. Under the above conditions, the actual extraction rate of oil was 82.24%, in agreement with the value predicted by the mathematical model. [Conclusion] The study can provide reference basis for comprehensive utilization of pecan.

Key words Pecan oil; Extraction rate; Aqueous enzymatic extraction; Response surface analysis

碧根果又名美国山核桃 [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]、薄壳山核桃、长寿果,属胡桃科山核桃属,原产北美大陆的美国和墨西哥北部,是世界著名的优质干果^[1-2]。碧根果果壳薄,出仁率高,果仁肥厚味美、无涩味,不仅可以鲜食还可榨取高级食用油和制作糕点、冰激凌等,其营养成分及风味均优于核桃、山核桃^[3]。

水酶法主要在利用物理方式破碎的基础上,通过酶(蛋白酶、淀粉酶、果胶酶、维生素酶等)的降解作用释放细胞壁中包裹的油脂,然后利用非油成分对油和水的亲和力差异将非油成分和油分离。与原始提取技术比较,水酶法具有绿色安全、投资少、能耗低、废弃物易于利用和处理等优点,在油脂工业中应用前景十分广阔^[4-5]。李杨等^[6]利用 Alcalase 碱性蛋白酶提取松子油,总油提取率可达 89.12%。李静等^[7]利用碱性蛋白酶提取牡丹籽中的油脂,出油率为 23.25%。笔者采用碱性蛋白酶提取碧根果油,利用响应面设计优化工艺参数,旨在获得一种绿色安全且提取率高的碧根果油提取工艺。

1 材料与方

1.1 材料 供试碧根果采自浙江杭州余杭长乐林场。主要试剂:碱性蛋白酶(2×10^5 U/g),最适温度 45~55 ℃,最适 pH 9.00~13.00,购自北京奥星博化学试剂有限公司;其他试剂均为国产分析纯。主要仪器设备:HWS-28 型恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;PHSJ-3F 酸度计,上海仪电科学仪器股份有限公司;CT14RD 高速冷冻离心机,上海

天美科学仪器有限公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 水酶法提取碧根果油工艺流程。准确称取 10.00 g 碧根果仁,在一定温度下烘烤 0.5 h,粉碎,加入一定体积的蒸馏水,充分混匀,调节 pH,加入一定量的碱性蛋白酶,置于 50 ℃ 恒温水浴锅内酶解。酶解结束后,将温度迅速升至 100 ℃ 灭酶 10 min,在 4 200 r/min 转速下离心 20 min,收集上层游离油脂,弃去乳状液及水解液,用 50 mL 蒸馏水将残渣洗涤,混匀,再次离心,收集上层游离油,将 2 次离心所得的游离油脂合并称重,计算提取率。

提取率 = (碧根果油质量 / 碧根果脂肪含量) × 100%

1.2.2 碧根果油脂含量测定方法。参照 GB 5009.6—2016 酸水解法测定。

1.2.3 碱性蛋白酶提取碧根果油的单因素及响应面试验。分析烘烤温度、酶解时间、料液比、酶添加量、酶解 pH 5 个因素对碧根果油提取率的影响。在单因素试验的基础上,进行 Box-Behnken 中心组合试验,利用 Design Expert 8.0 进行响应面分析,以获得最佳工艺参数。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 烘烤温度对碧根果油提取率的影响。在酶解时间 1.0 h,料液比 1:7 (g: mL),酶添加量为 2.00%,酶解 pH 为 12.00 的条件下,分析不同烘烤温度对碧根果油提取率的影响,结果见图 1。由图 1 可知,碧根果油提取率随烘烤温度升高快速上升,当温度达到 120 ℃ 后,碧根果油提取率增长缓慢。因此确定水酶法提取碧根果油的最佳烘烤温度为 120 ℃。

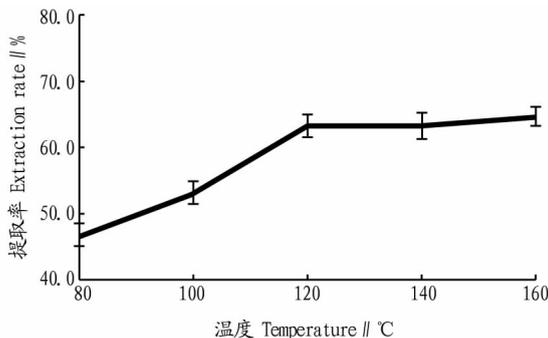


图1 烘烤温度对碧根果油提取率的影响

Fig. 1 Effect of baking temperature on the extraction rate of pecan oil

2.1.2 酶解时间对碧根果油提取率的影响。在烘烤温度为 120 °C,料液比 1:7(g: mL),酶添加量为 2.00%,酶解 pH 为 12.00 的条件下,分析不同酶解时间对碧根果油提取率的影响,结果见图 2。由图 2 可知,随着酶解时间的增加,碧根果油提取率呈快速上升趋势,当酶解时间达到 1.5 h 时,提取率达到最大值,为 69.16%;但当酶解时间超过 1.5 h 后,提取率呈缓慢增长趋势。这可能是碱性蛋白酶与底物的反应逐渐趋于完全的原因。随着时间的延长,碧根果油中不饱和脂肪酸极易发生氧化,且生产成本也会增加,因此综合考虑,确定最佳酶解时间为 1.5 h。

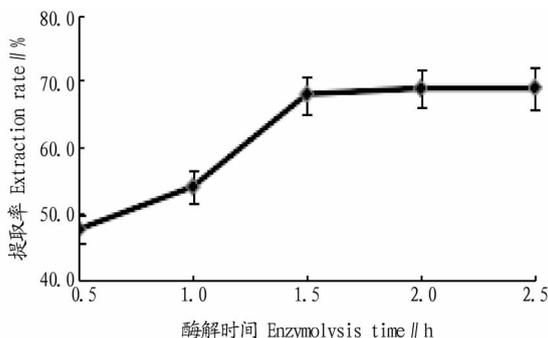


图2 酶解时间对碧根果油提取率的影响

Fig. 3 Effect of enzymolysis time on the extraction rate of pecan oil

2.1.3 料液比对碧根果油提取率的影响。在烘烤温度为 120 °C,在酶解时间 1.5 h,酶添加量为 2.00%,酶解 pH 为 12.00 的条件下,分析不同料液比对碧根果油提取率的影响,结果见图 3。由图 3 可知,碧根果油的提取率随着料液比中溶剂用量的增加快速上升,当料液比中溶剂用量超过 1:8(g: mL)后,提取率呈现下降趋势。当料液比中溶剂用量过低时,碧根果仁中大量油脂、蛋白质导致碧根果仁浆料黏度较大,碱性蛋白酶与底物没有完全接触,不利于酶解的进行。当料液比中溶剂用量过高,酶反应体系中的酶浓度和底物浓度则会变得相对较低,影响碱性蛋白酶的速率^[8]。因此,确定最佳的料液比为 1:8(g/mL)。

2.1.4 酶添加量对碧根果油提取率的影响。在烘烤温度为 120 °C,料液比 1:8(g: mL),在酶解时间 1.5 h,酶解 pH 为 12.00 的条件下,分析不同酶添加量对碧根果油提取率的影

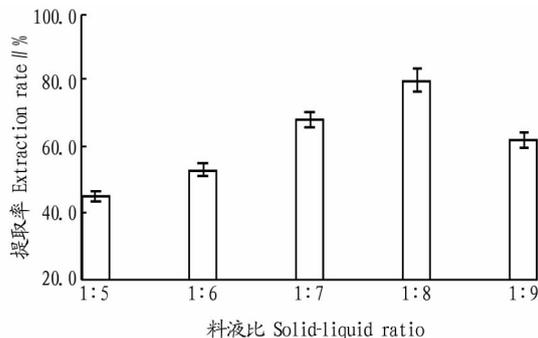


图3 料液比对碧根果油提取率的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of pecan oil

响,结果见图 4。由图 4 可知,随着碱性蛋白酶添加量的增加,碧根果油的提取率呈先上升后下降趋势,当碱性蛋白酶的添加量增加到 2.00% 时,提取率达到最大值,为 81.24%。可能是由于过多的碱性蛋白酶会吸附在被粉碎的碧根果仁表面,使得油脂被包裹在其中无法释放^[9]。因此确定最佳的碱性蛋白酶添加量为 2.00%。

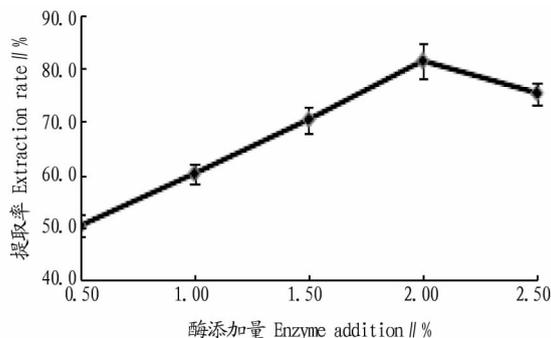


图4 酶添加量对碧根果油提取率的影响

Fig. 4 Effect of enzyme amount on the extraction rate of pecan oil

2.1.5 酶解 pH 对碧根果油提取率的影响。在烘烤温度为 120 °C,料液比 1:8(g: mL),酶解时间 1.5 h,酶添加量为 2.00% 的条件下,分析不同酶解 pH 对碧根果油提取率的影响,结果见图 5。由图 5 可知,随着酶解 pH 的升高,碧根果油的提取率呈先上升后下降趋势,酶解 pH 达到 12.00 时,碧根果油的提取率达到最大值,为 81.21%。低酶解 pH 时,碧根果油提取率较低,可能是因为低 pH 环境中碱性蛋白酶的活性较弱,随着酶解 pH 的上升,酶活增强,碧根果油的提取率开始逐渐增加。当酶解 pH 继续增加,碱性蛋白酶逐渐失去活性,酶解效果减弱,导致碧根果油提取率下降。因此,确定最佳酶解 pH 为 12.00。

2.2 响应面分析法优化提取工艺

2.2.1 响应面试验设计及结果。结合单因素试验结果,选定烘烤温度为 120 °C,酶解时间 1.5 h,以料液比(A)、酶添加量(B)、酶解 pH(C)3 个因素作为响应变量,碧根果油提取率为响应值,采用 3 因素 3 水平的 Box - Behnken 中心组合试验优化工艺参数,具体因素和水平设计见表 1,试验设计方案和结果见表 2。

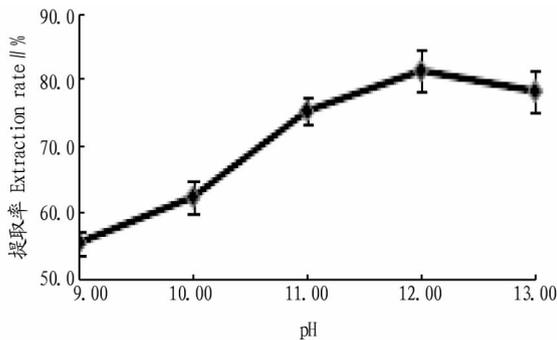


图5 酶解 pH 对碧根果油提取率的影响

Fig.5 Effect of enzymatic hydrolysis of pH on the extraction rate of pecan oil

2.2.2 模型的建立及显著性分析。运用 Design-Expert 8.0 得到碧根果油提取率(Y)对自变量料液比(A)、酶添加量(B)、酶解时间 pH(C)的二次多项回归模型: $Y = 80.59 + 0.76A - 0.60B + 3.58C + 0.03AB - 5.75AC + 9.77BC - 2.64A^2 - 7.27B^2 - 14.20C^2$ 。

表1 响应面试验因素和水平设计

Table 1 Factors and level design of response surface test

水平 Level	因素 Factor		
	料液比(A) Solid-liquid ratio	酶添加量(B) Enzyme amount %	pH(C)
1	1:7	1.50	11.00
0	1:8	2.00	12.00
-1	1:9	2.50	13.00

表2 响应面试验方案及结果

Table 2 Scheme and results of response surface test

试验号 Test No.	因素 Factor			提取率 Extraction rate // %
	A	B	C	
1	0	-1	-1	66.65
2	1	-1	0	71.09
3	0	1	1	71.14
4	-1	0	1	72.14
5	1	1	0	71.45
6	-1	-1	0	69.99
7	0	0	0	78.33
8	0	1	-1	44.42
9	0	0	0	79.95
10	-1	0	-1	53.52
11	1	0	-1	66.87
12	0	0	0	80.27
13	0	0	0	81.70
14	0	0	0	82.71
15	1	0	1	62.51
16	0	-1	1	54.31
17	-1	1	0	70.23

由显著性结果及多元回归模型的方差分析可知, $F_{\text{回归}} = 87.24, P_{\text{回归}} < 0.0001^{***}; F_A = 1.98, P_A = 0.2018; F_B = 1.25, P_B = 0.3000; F_C = 44.60, P_C = 0.0003^{***}; F_{AB} = 0.0016,$

$P_{AB} = 0.9695; F_{AC} = 57.43, P_{AC} = 0.0001^{***}; F_{BC} = 165.91, P_{BC} < 0.0001^{***}; F_{A^2} = 12.73, P_{A^2} = 0.0091^{***}; F_{B^2} = 96.69, P_{B^2} < 0.0001^{***}; F_{C^2} = 369.09, P_{C^2} < 0.0001^{***}$ 。其中 $F_{\text{回归}} = 87.24 > F_{0.01}(9,4) = 14.66; P \text{ 值} < 0.0001$, 表明模型极显著。 $F_{\text{失拟项}} = 0.56 < F_{0.05}(9,3) = 8.81$, 失拟项 $P = 0.6704 > 0.05$, 表明失拟不显著。该模型的修正相关系数 $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9798$, 说明模型能解释 97.98% 的响应值变化。综上所述, 该模型的可信度和拟合度均很高, 因此可用该模型回归方程预测水酶法提取碧根果油的工艺条件。此外, pH 的一次项、交互项、二次项、料液比和酶添加量的二次项均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

2.2.3 响应面分析与最优工艺条件确定。响应面分析及优化模型中 A、B、C 交互作用对响应值碧根果油提取率的影响如图 6、7 所示。该组图反映 3 个因素中任何 2 因素交互影响碧根果油提取率的效果。从图 6~8 可以看出, 提取率在试验区域内存在最大值, 它随着 2 个因素值的不断升高而升高, 达到最大值后又逐渐下降。

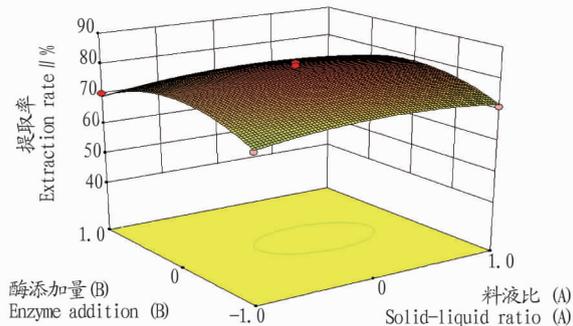


图6 料液比与酶添加量对碧根果油提取率影响的响应面

Fig.6 Response surface of effect of enzyme amount and solid-liquid ratio on pecan oil extraction rate

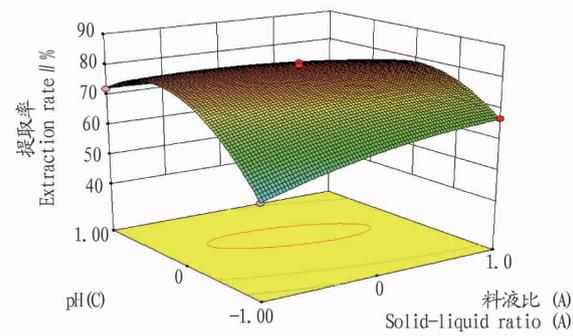


图7 料液比与 pH 对碧根果油提取率影响的响应面

Fig.7 Response surface of effect of solid-liquid ratio and pH on pecan oil extraction rate

再对三维非线性回归模型进行求一阶偏导, 并令其为零, 得出提取率最优的条件: $A = 0.00, B = 0.10, C = 0.15$, 转化为实际参数, 即料液比为 1:8 (g: mL), 酶添加量为 2.05%, pH 为 12.15, 在此条件下碧根果油的提取率为 80.84%, 验证值为 82.24%, 两者相对偏差为 0.86% $< 5\%$, 说明该模型能够较好地预测实际碧根果油提取率情况。

(下转第 87 页)

到广泛关注,尤其是酸乳中活性成分的作用机理成为研究的热点。恶性肿瘤、慢性病、心血管疾病是当今社会的主要疾病,这些近代疾病是困扰和影响生活质量的最主要因素之一。大豆酸乳中的活性成分能够有效防止这类疾病的发生,经常食用大豆酸乳可以免受这类疾病的困扰。加大对大豆酸乳的研究投入,积极改善其风味及口感,是一件有意义的事。因此,大豆酸乳具有巨大的开发价值。

参考文献

- [1] GUEIMONDE M, DELGADO S, MAYO B, et al. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks [J]. *Food research international*, 2004, 37 (9): 839 - 850.
- [2] 尤新. 功能性低聚糖生产与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 240.
- [3] 贾建光, 单卫新. 功能性低聚糖: 大豆低聚糖[J]. *甘肃农业*, 2006(6): 360.
- [4] 李文, 陈复生, 丁长河, 等. 大豆肽生理功能的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013(4): 360 - 362.
- [5] KEHRER J P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease[J]. *Critical review in toxicology*, 1993, 23(1): 21 - 48.
- [6] 郁晓敏, 吴娴静, 董德坤, 等. 米曲霉发酵制备大豆肽的分离纯化与抗氧化性研究[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(3): 20 - 23.
- [7] 王莉娟, 陶文沂. 大豆肽体外抗氧化活性研究[J]. *生物加工过程*, 2008, 6(4): 69 - 73.
- [8] 国明明, 华欲飞. 大豆肽免疫调节作用的研究[J]. *食品科技*, 2007(7): 242 - 244.
- [9] YAMAUCHI F, SUETSUNA K. Immunological effects of dietary peptide derived from soybean protein [J]. *Nutritional biochemistry*, 1993, 4(8): 450 - 457.
- [10] YIMIT D, HOXUR P, AMAT N, et al. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers [J]. *Nutrition*, 2012, 28(2): 154 - 159.
- [11] 黄丽虹. 大豆多肽的生理功能及应用(二)[J]. *食品科技*, 1993(3): 50 - 51.

- [12] 王金玲, 江连洲, 许晶. 豆粕功能肽制备及其降血脂作用[J]. *食品科学*, 2012, 33(24): 52 - 55.
- [13] 褚斌杰, 祁高富, 梁运洋. 大豆肽减肥降血脂作用的研究[J]. *食品科技*, 2011, 36(11): 65 - 68.
- [14] 李俏俏, 王清路, 薛金艳. 大豆异黄酮对绝经女性血清中脂类物质的影响[J]. *大豆科学*, 2009, 28(1): 172 - 174.
- [15] LUO T, CHEN L, HE P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms and breast cancer risk in a Chinese population [J]. *Asian pacific journal of cancer prevention*, 2013, 14(4): 2433 - 2437.
- [16] 徐春华, 张治广, 谢明杰. 大豆异黄酮的抗氧化和抗肿瘤活性研究[J]. *大豆科学*, 2010, 29(5): 870 - 873.
- [17] 王玉双, 张国瑞, 刘艳君, 等. 大豆异黄酮对女性围绝经期综合征及性激素的影响[J]. *中国综合临床*, 2006, 22(1): 86 - 88.
- [18] 刘阳. 大豆异黄酮对人体生理生化有益功能[J]. *甘肃科技*, 2004, 20(9): 178 - 179.
- [19] CHILIBECK P D, VATANPARAST H, PIERSON R, et al. Effect of exercise training combined with isoflavone supplementation on bone and lipids in postmenopausal women: A randomized clinical trial [J]. *Journal of bone and mineral research*, 2013, 28(4): 780 - 793.
- [20] SPENCER J P. The impact of flavonoids on memory: Physiological and molecular considerations [J]. *Chemical society reviews*, 2009, 38(4): 1152 - 1161.
- [21] 袁晓雪, 李丽立, 肖朝武, 等. 大豆异黄酮对雄性动物生殖系统的影响[J]. *大豆科学*, 2011, 30(3): 522 - 525.
- [22] 崔洪斌. 大豆生物活性物质的开发与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 68.
- [23] 劳文艳, 邱红. 双歧杆菌微生态调节作用的应用[J]. *中国微生态学杂志*, 2002, 14(5): 310 - 311.
- [24] 王晓, 张孝范. 保健功能因子大豆低聚糖及其开发[J]. *西部粮油科技*, 1999, 24(1): 31 - 33.
- [25] 谢少丽, 石凯, 石元刚. 大豆低聚糖和低聚肽对高脂血症大鼠抗氧化作用及胆汁酸代谢的影响[J]. *重庆医学*, 2009, 38(8): 922 - 924.
- [26] 王素敏, 刘福英, 徐增年, 等. 大豆低聚糖对大鼠血脂和抗氧化作用的影响[J]. *营养学报*, 1997, 19(4): 468 - 469.
- [27] 杨继远, 袁仲. 大豆低聚糖保健功能及其在食品工业中的应用[J]. *食品工业科技*, 2008(10): 291 - 294.

(上接第 80 页)

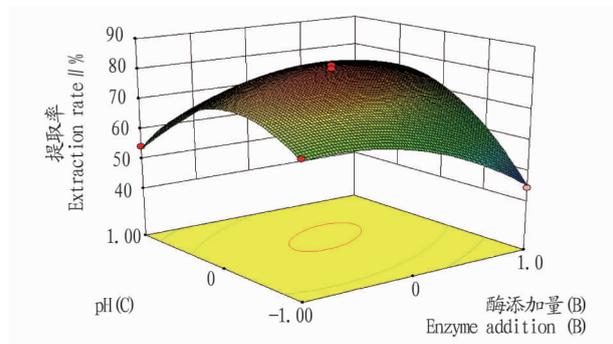


图 8 酶添加量与 pH 对碧根果油提取率影响的响应面

Fig. 8 Response surface of effect of enzyme amount and pH on pecan oil extraction rate

3 结论

该试验选用 Alcalase 碱性蛋白酶提取碧根果油, 在单因素试验的基础上, 选用料液比、酶添加量和 pH 作为研究对象, 通过 3 因素 3 水平的 Box - Behnken 响应面法优化水酶法提取碧根果油最佳工艺条件, 即烘烤温度 120℃, 料液比为

1:8(g:mL), 酶添加量为 2.05%, pH 为 12.15, 酶解时间 1.5 h。在此条件下, 碧根果油的提取率可达到 82.24%, 与预测结果基本一致。

参考文献

- [1] 贾晓东, 王涛, 张计育, 等. 美国山核桃的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(4): 74 - 78.
- [2] 朱海军, 生静雅, 张普娟, 等. 贮藏温度对薄壳山核桃抗氧化功能及品质的影响[J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(2): 449 - 453.
- [3] 吴国良, 张凌云, 潘秋红, 等. 美国山核桃及其品种性状研究进展[J]. *果树学报*, 2003, 20(5): 404 - 409.
- [4] BARRIOS V A, OLMOS D A, NOYOLA R A, et al. Optimization of an enzymatic process for coconut oil extraction [J]. *Oleagineux*, 1990, 45(1): 35 - 42.
- [5] 荣辉, 吴兵兵, 杨贤庆, 等. 水酶法提取生物油脂的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(2): 374 - 378.
- [6] 李杨, 江连洲, 王胜男, 等. 响应面法优化水酶法提取松子油的研究[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(3): 60 - 65.
- [7] 李静, 姚茂君, 李俊, 等. 响应面法优化牡丹籽油的水酶法提取工艺[J]. *中国油脂*, 2014, 39(10): 14 - 18.
- [8] 宋玉卿, 于殿宇, 王谨, 等. 水酶法提取榛子油工艺条件研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 261 - 264.
- [9] 包怡红, 郭阳. 响应面法优化超声波辅助水酶法提取松籽油工艺及其氧化稳定性[J]. *食品科学*, 2016, 37(22): 60 - 68.