

# 磷脂酶A<sub>1</sub>用于大豆油酶法脱胶技术的研究

潘明喆<sup>1</sup>, 柴玉华<sup>1</sup>, 杜鹏<sup>2,\*</sup>

(1.东北农业大学成栋学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2.东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

**摘要:** 植物油的酶法脱胶是一种新的大豆油脱胶方法。利用新型微生物磷脂酶进行大豆油脱胶, 通过对反应时间、酶浓度、反应温度、pH、含水量、Ca<sup>2+</sup>浓度、搅拌速度等单因素实验, 研究了操作参数对大豆油脱胶效果的影响, 确定了磷脂酶脱胶的最佳条件: 反应时间 150min, 加酶量 0.04%, 温度 49~52℃, pH4.9~5.2, 含水量 2.0%~2.5%, 添加 0.1mol/L Ca<sup>2+</sup>溶液 150μL, 搅拌速度 125r/min, 可使大豆油含磷量降到 10mg/kg 以下。结果表明, Lecitase Ultra 应用于植物油脱胶效果好且稳定, 是一种适宜于工业化应用的酶种。

**关键词:** 磷脂酶 A<sub>1</sub>, 大豆油, 脱胶

## Study on enzyme catalyzed degumming of soybean oil by a phospholipase A<sub>1</sub>

PAN Ming-zhe<sup>1</sup>, CHAI Yu-hua<sup>1</sup>, DU Peng<sup>2,\*</sup>

(1.Chengdong College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2.Food College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Enzymatic degumming is a new technique of vegetable oils degumming. Enzyme-degumming of soybean oil with phospholipase A<sub>1</sub>, and the feasibility of enzyme catalyzed reaction were studied. By single-factor test in which the factors were reaction time, concentration of enzyme, reaction temperature, pH, water content, concentration of Ca<sup>2+</sup> and mixing speed, effect of operation parameters on degumming performance was discussed. The optimum process conditions of enzyme-catalyzed degumming of soybean oil were: enzyme dosage 4%, the temperature 49~52℃, the pH 4.9~5.2, water content 2%~2.5%, 150μL 0.1mol/L Ca<sup>2+</sup> solution, mixing speed 125r/min. The residual phosphorus content decreases steadily to less than 10mg/kg. In laboratory tests Lecitase Ultra has proven to be a kind of more suitable phospholipase used to soybean oils enzymatic degumming.

**Key words:** phospholipase A<sub>1</sub>; soybean oil; degumming

中图分类号: TS225.1<sup>+</sup>3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2008)05-0219-04

植物油脂脱胶是油脂精炼中主要工艺之一, 随着脱胶技术的不断进步, 油脂脱胶在理论研究和工业实践上已有许多新的进展。经过几十年的发展, 特别是物理精炼成功实施, 人们已经推出了多种脱胶方法, 如传统水化脱胶、酸法脱胶、Super 脱胶、Special 脱胶、超滤脱胶<sup>[1-2]</sup>、Top 脱胶、硅胶吸附法<sup>[3]</sup>、S.O.F.T 脱胶和酶法脱胶<sup>[4]</sup>等方法。酶制剂在油脂行业的应用, 相对于其他粮食加工业来说, 虽然起步较晚, 但其发展势头和潜力非常巨大。酶法脱胶是油脂精炼的一项高新技术, 该技术在提高油脂工业的经济效益和环保性能方面具有巨大的应用价值<sup>[5]</sup>。本文选用磷脂酶 A<sub>1</sub>, 用于黑龙江非转基因大豆油脱胶, 并对其反应条件进行优化, 为在实际生产中的应用提供基础的参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

收稿日期: 2007-10-19 \* 通讯联系人

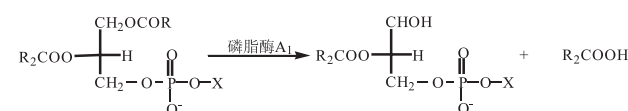
作者简介: 潘明喆(1979-), 男, 助教, 研究方向: 食品科学与工程。

水化大豆毛油 哈尔滨惠民食品有限公司提供; 磷脂酶 A<sub>1</sub> (Lecitase Ultra) Novozyme 公司提供, 实验时实测酶活力为 8620IU/g; 氢氧化钠、盐酸、硫酸、氧化锌、硫酸联氨、钼酸钠、磷酸二氢钾、柠檬酸等试剂 均为市售分析纯。

恒温水浴锅 HWS28 型 上海一恒科技; PHS-3C 型 pH 计 上海伟业仪器厂; 远红外干燥箱 厦门医疗电子仪器厂; AE100S 电子分析天平 梅特勒-拖利多仪器上海有限公司; 马弗炉 温州市双屿仪表厂。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 磷脂酶的作用模式及原理<sup>[6]</sup>



1.2.2 磷含量分析 取油样约 10mL, 为有利于油与胶质的分离, 先在水浴中加热至 80℃, 保温 10min 后, 5000r/min 离心分离 10min, 取 5g 上层油样, 进行

含磷量分析。采用 GB 5537-85 钼蓝比色法,测定磷脂的含量<sup>[7]</sup>。

1.2.3 油相中 pH 的测定 用 50mL 离心管取油水混合物 40g,5000r/min 离心 10min,弃去上层油相,再向沉淀中加入 5mL 蒸馏水,充分搅拌混合后,5000r/min 离心 10min,取离心管中水相,用 pH 计测定 pH,经校正后采用。油相 pH 为 5 左右时的经验校正公式为:  $pH_{\text{实际}} = pH_{\text{测定}} - 0.38$ <sup>[8]</sup>。

1.2.4 酶法脱胶工艺 准确称取 500g 大豆油,水浴加热至 70℃,加入 45% 柠檬酸 0.72mL,机械搅拌条件下反应 20~30min。然后冷却至预定的 45℃,加入一定量的 4% NaOH 溶液,混合均匀,使体系达到实验设定的 pH。再加入一定量的去离子水和 Ca<sup>2+</sup> 溶液,以及一定量预先经 10 倍稀释的 Lecitase Ultra 酶液,经 10000r/min 均质 5min 后,将混合物经机械搅拌,在 27~60℃ 水浴中反应。反应所得混合物再经离心分离后,定时取油相,进行磷含量分析<sup>[9]</sup>。

1.2.5 原料分析 按照检测磷脂、水分及挥发物的含量的方法,对水化毛油进行检测。得到水化毛油中磷脂含量是 173mg/kg,水分挥发物含量是 0.14%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应时间对脱胶效果的影响

在酶浓度为 0.04%, pH5.0, 温度 50℃ 的条件下,加入 0.1mol/L Ca<sup>2+</sup> 溶液 50μL 和一定量的去离子水,使该体系中的含水量达到 1%, 反应时间分别选取 60、120、180、240min, 进行脱胶实验,测定样品中含磷量。由图 1 可知,一定温度下,大部分非水化磷脂在初始阶段较快地转化为水化磷脂;但随着反应时间的延长,非水化磷脂转化为水化磷脂的速度逐渐减慢<sup>[10,11]</sup>;反应时间超过 180min 后,脱胶效果基本不变。这表明反应时间取决于酶的催化活力,时间过短,底物未充分反应;时间过长,不利于工业化生产。因此,在实际生产中,脱胶反应时间应控制在 150~180min 范围内。

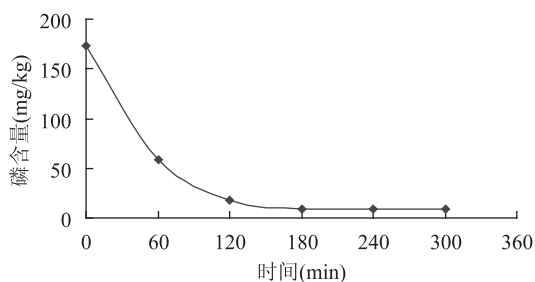


图 1 反应时间与含磷量的关系

### 2.2 加酶量对脱胶效果的影响

在反应温度为 50℃, pH5.0, 反应时间 180min 的条件下,加入 0.1mol/L Ca<sup>2+</sup> 溶液 50μL 和一定量的去离子水,使该体系中的含水量达到 1%, 分别选取酶浓度为 0.01%、0.02%、0.03%、0.04%, 进行脱胶实验,测定样品中含磷量。由图 2 可知,在酶浓度 0.04% 时,油脂中含磷量显著下降;酶浓度大于 0.04% 时,含磷量变化不大。由此可见,酶催化反应速度直接与酶浓度有关。随着反应体系中酶浓度的增大,反应速度加快,但并非总是如此,酶浓度太大,

一方面会使磷脂与蛋白质(酶)结合;另一方面,使用过量的酶,将增加生产成本<sup>[12]</sup>。

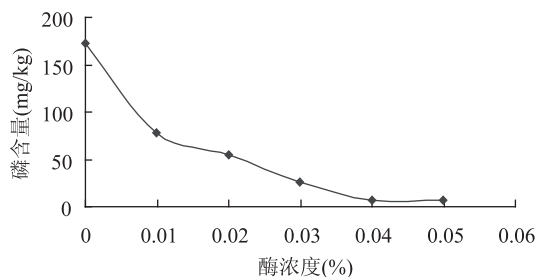


图 2 酶浓度与含磷量的关系

### 2.3 温度对催化脱胶效果的影响

在酶浓度为 0.04%, pH5.0 的条件下,加入 0.1mol/L Ca<sup>2+</sup> 溶液 50μL 和一定量的去离子水,使该体系中的含水量达到 1%, 反应时间为 180min, 分别选取 27、37、42、47、52℃, 进行脱胶实验,测定样品中含磷量。由图 3 可知,温度对反应有一定的影响。随着温度的升高,油脂中含磷量呈现先降低后升高的趋势。由于温度影响酶的催化活力、催化反应速率、稳定性,从而影响底物的状态以及反应体系的传递速度<sup>[13]</sup>。当体系的反应温度小于 47℃ 时,酶活力小,导致油脂中含磷量较高;当体系的反应温度大于 55℃ 时,酶稳定性差或失活,使其磷含量有升高现象;而当油脂在 47~52℃ 反应时,其脱胶效果最好,油脂中磷含量可降至 10mg/kg 左右。考虑到在实际生产中,加酶前要先经历一个降温过程,为避免能量的浪费,希望酶所能承受的反应温度尽可能高,所以油脂脱胶的反应温度应控制在 50~52℃ 范围内为宜。

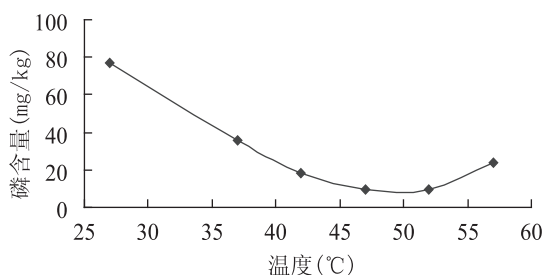


图 3 反应温度与磷含量的关系

### 2.4 pH 对脱胶效果的影响

在酶浓度为 0.04%, 温度 50℃ 的条件下,加入 0.1mol/L Ca<sup>2+</sup> 溶液 50μL 和一定量的去离子水,使该体系中的含水量达到 1%, 反应时间 180min, 分别在 pH 4.0、4.3、4.6、4.9、5.2、5.5、5.8 时,进行脱胶实验,测定样品中含磷量。由图 4 可知,pH 对脱胶效果有明显影响。pH 为 4.9、5.2 时,达到较好的效果,脱胶后油脂中含磷量分别为 8.3、8.9mg/kg,达到油脂精炼的要求;pH 为 4.6 时,也能达到一定的脱胶效果;而 pH < 4.0 和 pH > 5.8 时,油脂的脱胶效果很不理想;而 pH 在 4.9~5.2 范围时,Lecitase Ultra 酶具有较高的活力,本实验选用柠檬酸-NaOH 缓冲液。

### 2.5 水分含量对脱胶效果的影响

在酶浓度为 0.04%, 温度为 50℃, pH5.0 的条件下,加入 0.1mol/L Ca<sup>2+</sup> 溶液 50μL,再加入一定量的去离子水,使体系中的含水量分别达到 1%、1.5%、

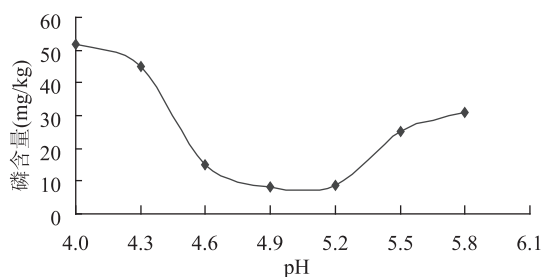


图4 pH与含磷量的关系

2.0%、2.5%、3%、4%、5%，反应时间为180min，进行脱胶实验，测定样品中含磷量。由图5可知，当水相量为2.0%~2.5%时，体系中含磷量降到最低点，由此可见，此反应是一种油水界面反应，水和油之比对反应的进行、完成有极重要的影响。与此同时，当非水化磷脂转变为水化磷脂后，再进行水化脱胶，适量的水才能形成稳定的水化混合双分子层结构，胶粒絮凝良好。水量不足时，磷脂水化不完全，胶粒絮凝不好；水量过多，则有可能形成局部的水/油或油/水乳化现象，难以分离<sup>[14]</sup>。

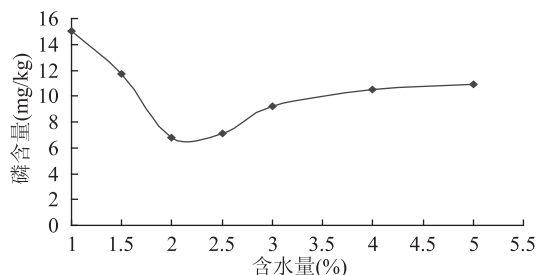


图5 含水量与含磷量的关系

### 2.6 Ca<sup>2+</sup>对脱胶效果的影响

在酶浓度为0.04%，温度为50℃，pH5.0的条件下，分别加入体积为10、20、50、100、150、200μL的0.1mol/L Ca<sup>2+</sup>溶液，反应180min，进行脱胶实验，测定样品中含磷量。由图6可知，在磷脂酶A<sub>1</sub>水解磷脂的反应中，Ca<sup>2+</sup>发挥了重要的作用。随着Ca<sup>2+</sup>浓度的增加，油脂中磷含量不断降低，当加入150μL的0.1mol/L Ca<sup>2+</sup>溶液时，油脂中含磷量降到10mg/kg以下，其磷含量达到最小值。这主要由于Ca<sup>2+</sup>是维持磷脂酶活性的辅助因子，且有助于维持酶构象的稳定，也影响磷脂水解的相转变<sup>[15]</sup>；同时，Ca<sup>2+</sup>能形成一定的渗透压，结合一定量水分子，利于磷脂水解<sup>[16]</sup>。当体系中Ca<sup>2+</sup>浓度过小时，其不能使酶完全激活；而体系中Ca<sup>2+</sup>浓度太大时，残留于油中，对油脂后加工工艺及油脂品质不利<sup>[17]</sup>。

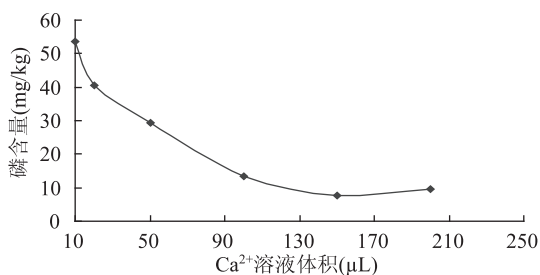


图6 钙离子浓度与含磷量的关系

### 2.7 搅拌速度对脱胶效果的影响

在其他条件相同的情况下，搅拌速度分别为50、75、100、125、150、180r/min时，进行脱胶测试。由图7可知，搅拌速度在125r/min左右时，磷脂含量最低。当搅拌速度过慢时，水相不能很好地分布于油相中，使酶与油的接触面积减小，在相同的时间内，磷脂的含量高；而搅拌速度过快时，破坏了油水体系，使酶难以接近磷脂，反应难以进行<sup>[18]</sup>。

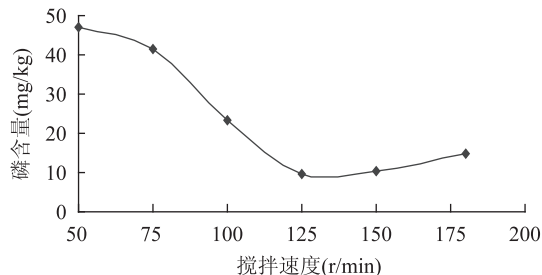


图7 搅拌速度与含磷量的关系

## 3 结论

本实验采用磷脂酶A<sub>1</sub>用于植物油精炼脱胶，在酶浓度为0.04%，温度为49~52℃，pH4.9~5.2，含水量2.0%~2.5%，添加0.1mol/L Ca<sup>2+</sup>溶液50μL，搅拌速度125r/min，反应时间150min的条件下，将初始含磷量为173mg/kg的水化大豆毛油的含磷量降至10mg/kg以下，完全满足物理精炼工艺的要求，证明酶法脱胶是一种很好的替代化学脱胶的新方法。

### 参考文献:

- [1] Sen Gupta AK. Process for refining crude glyceride oils by membrane filtration [P]. US:406 2882, 1977-12-13.
- [2] Iwama A. New process for purification of soybean oil by membrane separation and economic evaluation of the process [J]. JAOCS, 1987, 64(9):1258.
- [3] Welsh W A, Fulton M D. Method for refining glyceride oils using partially dried amorphous silica hydrogels [P]. US: 4880574, 1989-11-14.
- [4] Buchold H, Boensch R, Schroepfel. Process for enzymatically degumming vegetable oil [P]. US: 5558781, 1996-09-24.
- [5] 杨博, 杨继国, 孟庆博, 等. Lecitase Novo 用于大豆油脱胶的研究 [J]. 中国油脂, 2003, 28(9): 19-21.
- [6] 孙万成. 磷脂酶A<sub>1</sub>水解卵磷脂的研究 [J]. 中国粮油学报, 2007, 22(3): 66-70.
- [7] 中国标准出版社总编室. 中国国家标准汇编 60 GB 5487-5619 [M]. 中国标准出版社, 1991.
- [8] Kim Clausen. Enzymatic oil - degumming by a novel microbial phospholipase [J]. Eur J Lipid Sci Technol, 2001, 103: 333-340.
- [9] S K Roy, B V S K Rao. Enzymatic degumming of rice bran oil [J]. JAOCS, 2002, 79(8): 845-846.
- [10] 袁爱泳, 张绪媛, 刘晔, 等. 大豆油酶催化脱胶初探 [J]. 中国油脂, 1999, 24(4): 17-20.
- [11] 吴可克, 安庆大, 江世德. 酶促大豆油脱胶的研究 [J]. 中国粮油学报, 2004, 19(2): 79-81.
- [12] 郭勇, 郑穗平编著. 酶学 [M]. 华南理工大学出版

## 超声波强化提取玉米黄色素工艺优化研究

曹龙奎,包鸿慧,周睿

(黑龙江八一农垦大学食品学院,黑龙江大庆 163319)

**摘要:**以玉米蛋白粉为原料,乙醇、石油醚混合溶剂作为提取剂,采用超声波强化进行提取实验。采用二次旋转正交组合设计,探讨料液比、提取温度、混合溶剂中乙醇的体积百分数和提取时间对玉米黄色素提取率的影响。结果表明,最佳提取工艺条件为:液料比 15:1,温度 54℃,乙醇体积百分数 47%,提取时间 29min,玉米黄色素提取率为 5.16%。本实验确定的提取方法使玉米黄色素的提取效率得到了显著提高,为工业化生产玉米黄色素提供了理论依据。

**关键词:**玉米蛋白粉,玉米黄色素,超声波,响应面分析

## Optimization of ultrasonic-assisted extraction of maize yellow pigment

CAO Long-kui, BAO Hong-hui, ZHOU Rui

(Food Science College of Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

**Abstract:** The technology for ultrasonic wave extraction of maize yellow pigment from corn gluten was optimized by quadric regression orthogonal rotary tests. The mixed solvent of petroleum ether and ethanol was taken. The effects of extracting temperature, time, material to liquid ration and in mixed solvent on the extraction rate of yellow pigment were investigated, and a mathematical model describing the relationship between the yield of pigment and influence parameters was developed. The results showed that the optimum extraction parameters were as follows: liquid to material ration 15:1, temperature 54℃, time 29min, and volume percentage of ethanol 47%, the yield of yellow pigment was 5.16%.

**Key words:** corn gluten meal; maize yellow pigment; ultrasonic; response surface analysis

中图分类号:TS202.3

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2008)05-0222-04

玉米黄色素是一种具有多重保健功能的天然食用色素,主要由玉米黄素( $C_{12}H_{30}O_2$ , zeaxanthin)、叶黄素( $C_{12}H_{30}O_2$ , lutein)、隐黄素( $C_{40}H_{30}O$ , cryptoxanthin)组成,可在体内根据需要转化成维生素 A,具有保护视力、防止视网膜黄斑老化、抑制肿瘤的生长、抗衰老等保健功能,是国际公认的营养强化剂<sup>[1-6]</sup>,在食品、医药、化妆品行业有着广泛的应用前景。利用超声波法提取玉米黄色素,工艺流程短、成本低廉、生产周期短,有利于工业化大规模生产<sup>[7]</sup>。张秋荣等以

95%乙醇作为提取剂,研究了玉米黄色素的超声波提取工艺<sup>[8]</sup>,但采用混合溶剂进行玉米黄色素超声波提取的研究尚未见报道。玉米黄色素是极性差异较大的类胡萝卜素混合物,根据相似相溶原理,采用单一极性溶剂很难将其其他非极性组分溶出<sup>[9-12]</sup>。为此,本研究在前期实验的基础上,首次以乙醇和石油醚混合溶剂作为提取剂,采用超声波强化提取玉米黄色素,确定最佳工艺条件,旨在为工业化生产提供科学的理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料与仪器

玉米蛋白粉 黑龙江龙凤玉米开发公司;95%乙醇、石油醚 均为分析纯。

DZ47-60 超声波处理机 济宁金百特电子有限

收稿日期:2007-10-23

**作者简介:**曹龙奎(1965-),男,博士,教授,研究方向:农产品加工技术。

**基金项目:**黑龙江省教育厅骨干教师创新能力资助计划(1005G029)。

社,2000.

[13]陈石根,周润琦编著. 酶学[M]. 复旦大学出版社,2001.

[14]何东平主编. 油脂精炼与加工工艺学[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

[15]Hauser H. Effect of inorganic cations on phase transitions [J]. Chem Physlipids, 1991(57): 309~325.

[16] Juhan Kim, Chang - Soo Lee, Jongmin Oh, et al.

Production of egg yolk lysolecithin with immobilized phospholipase A<sub>2</sub> [J]. Enzyme and microbial technology, 2001 (29): 587~592.

[17]H A M AL-KAHTANI, M A HANNA, A P HANDEL. Effect of Water Quality on Degumming and Stability of Soybean Oil [J]. JAOCS, 1984, 61(1): 94~97.

[18]倪培德编著. 油脂加工技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003.