

正交试验优化南瓜籽发芽工艺及亚油酸与其他主要营养成分分析

范三红, 毛强强, 王亚云, 冯雨薇, 胡雅喃, 王相帅, 刘晓华
(山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006)

摘 要: 以南瓜籽X-10为原料, 亚油酸为评价指标, 应用单因素及正交试验优化南瓜籽发芽工艺, 并对南瓜籽发芽过程中亚油酸及其他主要成分含量变化进行研究。结果表明南瓜籽发芽最佳工艺条件为: 发芽温度28℃、发芽时间60h、浸泡时间5h, 此时发芽南瓜籽亚油酸含量达到60.4mg/g。在发芽时间为72h过程中, 主要营养成分含量变化: 脂肪、蛋白质、淀粉、可溶性糖、VE含量呈降低趋势, 游离氨基酸、灰分含量逐渐增加, 植物甾醇、角鲨烯变化不大。

关键词: 南瓜籽; 发芽; 营养成分; 亚油酸

Changes of Nutrients and Linoleic Acid during Germination of Pumpkin Seed

FAN San-hong, MAO Qiang-qiang, WANG Ya-yun, FENG Yu-wei, HU Ya-nan, WANG Xiang-shuai, LIU Xiao-hua
(College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Orthogonal array design was applied to optimize the germination conditions of pumpkin seed from X-10 cultivar to obtain the maximum content of linoleic acid. Meanwhile, changes in the contents of linoleic acid other major nutrients during the germination process were examined. The optimal germination conditions that provided the maximum content of linoleic acid (60.4 mg/g) were 28 °C, 60 h and 5 h for temperature, germination time and soaking time, respectively. During 72 h of germination, the major nutrients fat, protein, starch, soluble sugar and VE showed a decreasing trend, while free amino acids and ash gradually rose and only minor changes were observed for phytosterols and squalene.

Key words: pumpkin seeds; germination; nutrients; linoleic acid

中图分类号: TS210.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)14-0259-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201314053

南瓜籽中含有大量的脂肪、蛋白质和矿物质等营养成分, 同时含有丰富的维生素^[1], 粗脂肪中不饱和脂肪酸含量较高, 不饱和脂肪酸主要是亚油酸、油酸、亚麻酸, 其中亚油酸含量达到43.0%~64.0%^[2]。而目前关于发芽工艺研究主要集中在不同发芽条件对种子的酶及主要成分变化的影响, 研究表明影响发芽工艺的主要因素为发芽温度、发芽时间、浸泡时间^[3-4]。种子在发芽过程中, 环境条件的改变不仅会影响萌发的速度, 还会影响种子组成成分及其含量的变化^[5-6]。

关于发芽南瓜籽成分含量变化的文章很多^[7], 大多数集中于南瓜籽发芽后蛋白质、脂肪、淀粉总量的变化, 对发芽过程中脂肪酸变化及其发芽工艺条件研究的不多, 翟爱华等^[8]研究了发芽南瓜籽中脂肪酸变化, Feussner等^[9]研究了发芽南瓜籽中脂肪酸变化原因, 对于发芽条件对南瓜籽中亚油酸变化影响均未为做具体研

究, 本实验以亚油酸为指标, 研究了最佳发芽工艺条件, 发芽过程中油脂中不皂化物及其他重要营养成分变化规律, 为开发发芽南瓜籽提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南瓜籽(X-10) 山西省晋黎来种业公司; 脂肪酸甲酯标准品(纯度99%)、生育酚标准品(纯度99.8%)、正三十二烷(纯度97%)、角鲨烯标准品、菜籽甾醇、谷甾醇、豆甾醇(纯度95%)、5- α -胆甾烷-3 β 醇、N-甲基-N-三甲基硅烷基七氟丁酰胺(BSTFA)、1-甲基咪唑(TMCS) 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

XF50实验室粉碎机 吉首市中诚制药机械厂;

收稿日期: 2012-06-25

基金项目: 山西省自然科学基金项目(2012011031-4); 山西省高等学校高新技术产业化项目(20111003)

作者简介: 范三红(1963—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: fsh729@sxu.edu.cn

101-2AB型电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司; HRSP-H生化培养箱 青岛海尔集团; GC-2010气相色谱仪 日本岛津有限公司; AL204电子分析天平 梅特勒托利多仪器上海有限公司; SP2000UV型分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 南瓜籽萌发工艺流程

南瓜籽→筛选→消毒→浸泡→沥水→在不同条件下进行萌发→每12h淋洗1次→发芽南瓜籽

1.3.2 发芽南瓜籽粉的制备

将发芽南瓜籽, 在60℃条件下干燥至恒质量后粉碎, 过60目筛, 得到发芽南瓜籽粉, 低温保存备用。

1.3.3 南瓜籽发芽工艺单因素试验

选取饱满南瓜籽若干, 分为6份, 在浸泡1h、发芽温度28℃, 发芽时间60h条件下, 进行发芽试验, 固定其他条件, 分别考察发芽时间(24、36、48、60、72、84h)、发芽温度(20、22、24、26、28、30℃)、浸泡时间(1、3、5、7、9、11h)对不同组分亚油酸含量的影响。

1.3.4 南瓜籽发芽工艺条件的正交试验

采用 $L_9(3^3)$ 进行正交试验, 优化南瓜籽发芽最佳工艺条件。

1.3.5 基本成分测定

水分含量的测定: GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》; 粗脂肪的测定: GB/T14772—2008《食品中粗脂肪的测定》; 灰分的测定: GB5009.4—2010《食品中灰分的测定》; 还原糖的测定: GB/T 5009.7—2008《食品中还原糖的测定》; 食品中淀粉的测定: GB/T 5009.9—2008《食品中淀粉的测定》; 蛋白质的测定: GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》; 食品中游离氨基酸的测定: GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定》。

$$\text{最大变化率/\%} = \frac{\text{含量减少或增加最大值} - \text{最初含量值}}{\text{最初含量值}} \times 100$$

1.3.6 不皂化物的提取与气相色谱测定预处理

称取1g南瓜籽油采用脲包-皂化法^[10], 对其中的不皂化物进行提取, 将所得到的不皂化物用正己烷溶解。

VE的测定: 采用外标法, 加入正三十二烷10mg作为内标液, 用正己烷定容于10mL。在暗室中低温保存, 用于VE的测定。

角鲨烯含量的测定: 采用外标法, 称取100mg角鲨烯标准品, 用正己烷定容于10mL容量瓶中, 配制质量浓度为10mg/mL的标准液, 分别取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL标准液至于10mL容量瓶中, 用正己烷定容, 配制0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL角鲨烯标准液, 低温保存, 用于气相色谱测定。

称取5g南瓜籽油, 参照GB/T 25223—2010《动植物油脂 甾醇组成和甾醇总量的测定: 气相色谱法》对

其中植物甾醇进行粗提, 粗提植物甾醇用正己烷定容于10mL容量瓶中, 加入1mL 0.1% 5- α -胆甾烷-3 β 醇做内标液, 在加入0.2mL BSTFA与0.2mL TMCS在70℃恒温水浴30min, 对植物甾醇进行衍生化, 待反应完毕, 用正己烷定容于100mL容量瓶。

1.3.7 不皂化物中VE、角鲨烯、植物甾醇气相色谱测定条件

色谱柱: Wonda CAP5毛细管色谱柱(30m×0.25mm, 0.25 μ m); 氢火焰检测器(FID)载气: 高纯氮气(99.999%), 流量0.45mL/min; 进样口温度: 290℃; 检测器温度: 300℃; 柱箱温度250℃, 保持5min, 以10℃/min升至300℃, 保持25min, 分流进样1 μ L, 分流比10:1。以角鲨烯标准品质量浓度(μ g/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得到的回归方程为 $Y=1443884X-33889$, $R^2=0.9998667$ 。以总VE质量浓度(μ g/mL)为纵坐标, VE峰面积/内标物峰面积比值为横坐标绘制标准曲线, 得到的线性回归方程为 $Y=1.89444X-0.65421$, $R^2=0.994572$ 。以总植物甾醇质量浓度(μ g/mL)为纵坐标, 植物甾醇峰面积/内标物面积比值为横坐标绘制标准曲线, 得到的线性回归方程为 $Y=0.875634X+0.0355441$, $R^2=0.9845234$ 。

1.3.8 脂肪酸含量提取分析测定方法

精确称取100mg亚油酸甲酯标准品, 用苯-石油醚(1:1, V/V)溶液溶解并定容于10mL容量瓶中, 混匀, 制成质量浓度为10mg/mL的标准液。再分别取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL标准液至于10mL容量瓶中, 用苯-石油醚溶液定容, 制成0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL亚油酸甲酯标准液, 室温条件下静置30min, 低温保存待测。

气相色谱条件: SGE AC-20色谱柱(30m×0.2mm, 0.25 μ m); 氢火焰检测器(FID); 载气: 高纯氮气(99.999%), 流量0.35mL/min; 进样口温度: 250℃; 检测器温度: 260℃; 柱箱起始温度180℃, 保持2min, 以3℃/min升至220℃, 保持10min, 以4℃/min升至230℃, 保持5min; 分流进样1 μ L, 分流比30:1。以亚油酸标准品质量浓度(mg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y=4052017X+29359.99$, $R^2=0.99964$ 。

2 结果与分析

2.1 南瓜籽发芽工艺单因素试验

2.1.1 发芽时间对亚油酸含量的影响

由图1可以看出, 随着发芽时间的延长亚油酸含量增加, 当种子发芽初期, 三酰甘油在酶的作用下分解, 油酸在脂肪酸去饱和酶^[12]作用下转换为亚油酸, 同时亚油

酸开始降解代谢, 60h时亚油酸含量达到最大, 相对于发芽24h增加了5.3%, 随着发芽时间的延长, 亚油酸降解代谢速度加快, 为种子发芽生长供能。

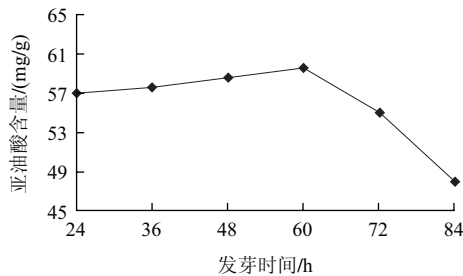


图1 发芽时间对亚油酸含量变化的影响

Fig.1 Effect of germination time on linoleic acid content

2.1.2 发芽温度对亚油酸含量的影响

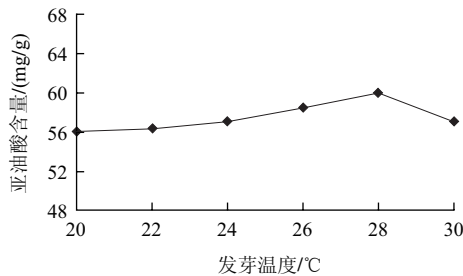


图2 发芽温度对亚油酸含量的影响

Fig.2 Effect of germination temperature on linoleic acid content

由图2可以看出, 随着发芽温度的升高, 亚油酸含量增加, 由于温度的提高使得去饱和酶的活性增强, 同时亚油酸降解代谢速度也加快。当发芽温度为28℃时, 油酸转化含量达到最大, 随着温度的升高, 亚油酸降解代谢速度加快, 含量降低。

2.1.3 浸泡时间对亚油酸含量变化的影响

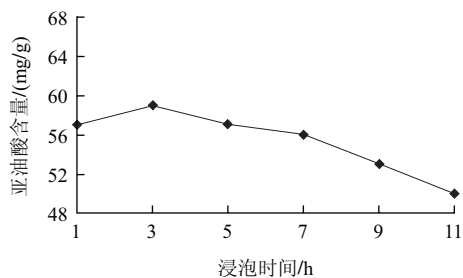


图3 浸泡时间对亚油酸含量的影响

Fig.3 Effect of soaking time on linoleic acid content

由图3可以看出, 当浸泡时间为3h时亚油酸含量达到最大, 随着浸泡时间的增加, 亚油酸含量随之降低。由于浸泡能够打破种子休眠, 促进种子发芽^[13], 脂肪酸去饱和酶被激活, 油酸开始转化为亚油酸, 同时亚油酸被种子生长利用。

2.2 南瓜籽发芽正交试验设计

在单因素试验的基础上设计发芽时间、发芽温度、浸泡时间3因素3水平正交试验, 通过亚油酸含量结果, 确定最佳工艺参数。

表1 发芽工艺正交试验结果

Table 1 Orthogonal array design layout and experimental results

试验号	A发芽温度/°C	B发芽时间/h	C浸泡时间/h	亚油酸含量/(mg/g)
1	1(26)	1(48)	1(1)	53.42
2	1	2(60)	2(3)	55.81
3	1	3(72)	3(5)	54.01
4	2(28)	1	2	57.02
5	2	2	3	60.40
6	2	3	1	58.01
7	3(30)	1	3	56.13
8	3	2	1	58.42
9	3	3	2	57.35
k ₁	54.41	55.52	56.62	
k ₂	58.48	58.21	56.73	
k ₃	57.30	56.45	56.85	
R	4.07	2.69	0.23	

从表1中各个因素的R值可看出, 影响亚油酸含量因素主次顺序为A>B>C, 即发芽温度对结果的影响最大, 其次为发芽时间, 浸泡时间影响相对较小, 且最优水平为A₂B₂C₃, 即发芽温度28℃、发芽时间60h、浸泡时间5h。在此条件下进行验证实验, 得到亚油酸含量为60.38mg/g。表2表明, 发芽时间、发芽温度对亚油酸含量的影响达到显著水平(P<0.05), 浸泡时间对亚油酸含量变化影响不显著。

表2 正交试验结果方差分析表

Table 2 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	26.23	2	13.11	50.26	0.020
B	11.16	2	5.58	21.39	0.045
C	0.079	2	0.040	0.15	0.868
误差	0.522	2	0.261		

2.3 南瓜籽不同发芽条件下成分含量的变化

表3 不同发芽时期各成分含量变化

Table 3 Changes in chemical composition of pumpkin seed during germination

成分	发芽时间/h						最大变化率/%
	0	24	36	48	60	72	
脂肪/%	48.67	48.46	48.03	47.81	47.32	46.93	3.58
蛋白质/%	40.86	40.53	40.22	40.01	39.82	39.46	3.43
淀粉/%	1.51	1.42	1.38	1.30	1.28	1.26	16.55
可溶性糖/%	1.67	1.63	1.58	1.51	1.48	1.42	14.97
总灰分/%	4.75	4.78	4.81	4.86	4.90	4.95	4.21
游离氨基酸/(mg/g)	10.32	10.82	11.26	11.85	12.01	12.03	16.57
亚油酸/(mg/g)	52.82	53.16	54.51	57.24	58.42	57.64	10.60
VE/(μg/g)	56.12	55.34	53.24	52.18	51.61	50.82	9.44
植物甾醇/(μg/g)	65.56	65.55	65.65	66.12	66.05	65.95	0.85
角鲨烯/(μg/g)	17.92	17.86	18.01	17.95	17.89	17.88	0.50

在发芽温度为28℃、浸泡时间为5h条件下,对不同发芽时间内,南瓜籽主要营养成分进行测定,结果如表3所示。

由表3可知,南瓜籽在发芽过程中,脂肪含量减少,在发芽72h后,其在南瓜籽中含量减少了3.58%随着发芽时间延长脂肪不断的分解,产生能量,供给新的生长部位的合成之用^[14]。蛋白质含量下降,在发芽72h后在南瓜籽中含量减少了3.43%,游离氨基酸含量增加了16.57%,原因是在种子发芽初期不会合成新的蛋白质,蛋白质在酶的作用下分解为氨基酸。淀粉含量下降,可溶性总糖也同时下降,主要用于芽体生长所需营养能量的供给^[15],亚油酸含量在发芽60h过程中含量逐渐增加,60h时含量达到了最高值,随着发芽时间的增加,亚油酸含量开始下降。种子在发芽过程中不能从外界吸收无机盐,脂肪和蛋白质含量下降,灰分的相对含量增加。VE在发芽过程中被氧化,总量在发芽72h后减少了9.44%^[16],植物甾醇,角鲨烯的含量变化不大。

3 结 论

以南瓜籽为原料制备发芽南瓜籽,通过对发芽条件及成分含量变化的研究得出:1)在发芽温度28℃、发芽时间60h、浸泡时间5h时,亚油酸含量最高为60.4mg/g。2)发芽过程中蛋白质、脂肪、淀粉、可溶性糖含量、VE含量减少,游离氨基酸、灰分含量增加,植物甾醇、角鲨烯的含量变化不大。

参考文献:

- [1] MURKOVIC M, HILLEBRAND A, WINKLER J, et al. Variability of fatty acid content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.)[J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1996, 203(3): 216-219.
- [2] STEVENSON D G, ELLER F J, WANG Liping, et al. Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(10): 4005-4013.
- [3] 顾振新, 陈志刚, 岳建华, 等. 发芽糙米制备工艺研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(1): 70-72.
- [4] 丰素娟, 胡黎光, 等. 稻谷发芽工艺探讨[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(9): 538-539.
- [5] 李笑梅. 大豆萌发工艺条件及成分含量变化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 29-32.
- [6] NISHIMURA M, BHUSAWANNG P, STRZALKA K. Developmental formation of glutamine synthetase in greening pumpkin cotyledons and its subcellular localization[J]. Plant physiology, 1982, 70(2): 353-356.
- [7] KURTAR E S. Influence of gamma irradiation on pollen viability, germination ability, and fruit and seed-set of pumpkin and winter squash[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(24): 6918-6926.
- [8] 翟爱华, 张洪微, 赵明玉. 发芽提高南瓜籽油提取率和亚油酸含量的研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 98-103.
- [9] FEUSSNER I, WASTERNAK C, KINDL H, et al. Lipoygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(25): 11849-11853.
- [10] 吴侯, 翁新楚, 邱祺宏, 等. 脲包-皂化法提取大豆油脱臭馏出物中的生育酚[J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2001, 7(4): 331-333.
- [11] FERNÁNDEZ-MOYA V, MARTÍNEZ-FORCE E, GARCÉS R. Metabolism of triacylglycerol species during seed germination in fatty acid sunflower (*Helianthus annuus*) mutants[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(3): 770-774.
- [12] GHILDIYA S K, SHSNNAC M, KHANDURI V P. Effect of pre-soaking and pre-chilling treatments on seed germination of *Pinus roxburghii* provenances from western Himalaya, India[J]. Journal of Forestry Research, 2009, 20(4): 323-330.
- [13] 程红焱, 宁松泉. 种子萌发过程中贮藏油脂的动员[J]. 云南植物研究, 2007, 29(1): 67-73.
- [14] GIAMI S Y, CHIBOR B S, EDEBIRI K E, et al. Changes in nitrogenous and other chemical constituents, protein fractions and *in vitro* protein digestibility of germinating fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook) seed[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 1999, 53(4): 333-342.
- [15] 鹿天成, 吴雅奇, 王贞. 种子萌发过程中淀粉含量的变化[J]. 生物学教学, 2011, 36(2): 61-62.
- [16] BUTINAR B, BUČAR-MIKLAVČIČ M, MARIANI C, et al. New vitamin E isomers (gamma-tocomonoenol and alpha-tocomonoenol) in seeds, roasted seeds and roasted seed oil from the Slovenian pumpkin variety 'Slovenska golica'[J]. Food Chemistry, 2011, 128(2): 505-512.