

沙棘果油的酶法提取及其脂肪酸的测定

康健, 顾晶晶, 王继国, 吴桐, 张丽霞

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的: 对酶法提取沙棘果油及其脂肪酸测定进行相关研究。方法: 通过正交试验确定酶法提取沙棘果油的最佳工艺条件。结果: 果胶酶用量 0.50%、胃蛋白酶用量 0.15%、提取时间 6h、酶解温度 55℃, 此条件下果油得率 4.946%。最佳工艺条件下的果油提取率为 82.16%~97.17%。利用 GC-MS 共检测出 11 种脂肪酸, 其主要化学成分为棕榈油酸 35.07%、棕榈酸 35.61%、亚油酸 12.77%、顺式-11-十八碳烯酸 6.19%、(12E)-12-十八烯酸 7.26%, 酶法提取沙棘果油中不饱和脂肪酸的含量占总脂肪酸的 61.56%。结论: 酶法提取沙棘果油安全温和而无毒害, 反应彻底, 提取率高, 提取后的果汁易于进行澄清处理。

关键词: 沙棘; 果油; 酶法提取; 测定

Enzymatic Extraction of Seabuckthorn Fruit Oil and Its Fatty Acids Profile Analysis

KANG Jian, GU Jing-jing, WANG Ji-guo, WU Tong, ZHANG Li-xia

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China)

Abstract: For the extraction of seabuckthorn fruit oil, pectinase and pepsin were used to simultaneously hydrolyze seabuckthorn fruit pulp, and the enzymatic extraction process was optimized by single factor experiments in combination with orthogonal array design method. Pectinase dose of 0.50%, pepsin dose of 0.15%, extraction time of 6 h, hydrolysis temperature of 55 °C were found optimum, and a maximum oil yield of 4.946% was achieved under these conditions, and the recovery of the optimized extraction process was calculated to be 82.16% — 97.17% based on 5.09% — 6.02% theoretical oil content of seabuckthorn fruit. In addition, the fatty acid composition of seabuckthorn fruit oil was analyzed by GC-MS. Eleven fatty acids were identified in seabuckthorn fruit oil, mainly including 35.07% palmitoleic acid, 35.61% palmitic acid, 12.77% linoleic acid, 6.19% cis-11-octadecenoic acid, and 7.26% (12E)-12-octadecenoic acid, and unsaturated fatty acids occupied 61.56% of the total fatty acids. In conclusion, the extraction process has the benefits of mild conditions, safe, nontoxic and thorough reaction, high extraction efficiency, and ease of clarification of fruit juice after oil extraction.

Key words: seabuckthorn; fruit oil; enzymatic extraction; determination

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)02-0260-03

应用酶法提取植物油, 应使用产量大、价格低的酶种。而当前文献报道多采用纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶及其复合酶, 主要是降解油料细胞壁及离析油的复合体, 但加工成本很高。如果对油料进行适当的预处理, 以水为溶剂, 通过浸泡、水磨、调节 pH 值等条件, 使油料蛋白充分进入水相, 则只使用蛋白酶即可达到酶解提油的目的。

沙棘油是从沙棘果实中提取的油脂。来自于果肉的称为沙棘果油, 来自种籽的称为沙棘籽油, 来自榨汁后剩余果皮与果肉的油称为沙棘渣油。研究表明, 沙棘果油生物活性优于沙棘籽油和沙棘渣油^[1]。

沙棘油富含 VE、VB、VK、VC、VP 类, 胡萝

卜素, 黄酮类化合物, 脂肪酸, 叶酸, 8 种必需氨基酸和多种微量元素, 是多种天然生物活性物质的浓缩物^[2-4]。沙棘油对烧伤、溃疡等疾病有特殊疗效, 其所具有的抗辐射、抗衰老、调节人体免疫功能、缓解动脉硬化等功能, 使其广泛应用于医药、保健食品、美容化妆品等领域^[5]。目前沙棘果油的提取方法多采用有机溶剂萃取法、机械压榨法和超临界萃取法等, 酶法提取沙棘果油的方法鲜有报道。本实验就酶法提取沙棘果油及其脂肪酸测定进行相关研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2010-03-24

基金项目: 新疆大学博士科研启动基金项目

作者简介: 康健(1959—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学与工程。E-mail: kangjian505@sina.com

沙棘原料为新疆青河县当年的成熟沙棘果,经榨汁后,以果汁作为提取果油的原料。

果胶酶(酶活力>20000U/g) 上海蓝季科技发展有限公司;胃蛋白酶 上海蓝季科技发展有限公司。

硫酸、乙醚、正己烷、氢氧化钾、无水乙醇、甲醇(均为分析纯)。HPLC用甲醇、乙酸(均为色谱纯)。高纯蒸馏水由实验室自制。

1.2 仪器与设备

THZ-82 数显气浴振荡器 常州国华电器有限公司;D-37520 osterode Biofuge primo 离心机 Kendro laboratory products 公司;ZH-25-C 型多功能食物加工机 广东佛山市顺德区每时乐电器厂;GCMS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪、GC-2010 气相色谱仪 日本岛津公司;SYZ-550 石英亚沸高纯水蒸馏器 金拓市华锋仪器有限公司;2695 高效液相色谱仪(配2487紫外检测器)美国 Waters 公司;索氏提取器。

1.3 方法

1.3.1 酶种类的确定

沙棘果细胞壁的组成是很复杂的,它由纤维素、半纤维素、果胶质等物质组成。油存在于细胞质的网络结构中,用单一的酶进行酶法提油,其提油率是有限的,有必要研究复合酶,以使细胞壁与胞内网络结构能够更彻底地降解,以提高提油率^[6]。从提取率和成本各方面考虑,筛选出果胶酶和胃蛋白酶作为沙棘果油提取时所用的复合酶。

1.3.2 沙棘果油提取工艺

沙棘果实的主要质量指标是油脂含量。大多数沙棘品种的油脂含量在1.7%~6.6%之间。但是,据报道一些生长在俄罗斯的栽培品种中含油量达到9%左右。同时沙棘果实含油量还受气候影响:干燥温暖的春季和秋季适宜油脂积聚,而湿润的环境,长期多雨和寒冷的气候,以及日照周期缩短都会降低油脂含量^[7]。

本实验采用国标(GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》)对新疆阿勒泰地区青河县的大、中、小各类沙棘进行了果油测定,结果表明,平均果油含量在5.09%~6.02%范围内^[8]。

沙棘果油的酶法提取工艺流程:沙棘果→拣选→破碎压榨→过滤→果肉汁→加酶→加热振荡→离心分离→吸取上层果油。

通过前期实验及相关文献可知,影响沙棘果油提取率的因素有:果胶酶用量、胃蛋白酶用量、酶解温度、酶解时间、酶解速度、离心速率、离心时间等,但其中果胶酶用量、胃蛋白酶用量、酶解时间和酶解温度对沙棘果油提取率的影响较大。因此在设计正交试验时,选取果胶酶用量、胃蛋白酶用量、酶解时间和酶解温度作为4个因素,并在果油得率最大时对应的水平范围内确定3个水平,进行四因素三水平的正交试验,

按L₉(3⁴)正交表安排各试验组合,每个试验组合做平行样3次,取平均值。

将酶解后的游离油计为沙棘果油,其得率和果油提取率计算公式如下:

$$\text{果油得率}/\% = \frac{\text{油质量}}{\text{果肉汁体积}} \times 100$$

$$\text{果油提取率}/\% = \frac{\text{果肉得率}}{\text{平均果油含量}} \times 100$$

1.3.3 GC-MS 和 HPLC 法测定沙棘果油中的脂肪酸

由前期实验及文献[9-15]可知,碱催化法对沙棘油的甲酯化效果优于酸催化法,而且酸浓度过大不利于甲酯化,因此本实验选用碱催化法。

碱催化法:精确称取沙棘油5g,于小烧杯中,加入乙醚16.7mL,正己烷8.3mL,使脂肪完全溶解后转入250mL容量瓶,加入甲醇25mL,再加入0.8mol/L 甲醇-KOH溶液25mL,摇匀后静置10min。加蒸馏水至刻度,吸取上层溶液,待作GC-MS分析。

气相条件:进样口温度270℃,温100℃,以10℃/min升到170℃保持1min后,以3℃/min升到250℃,保持4min;流速:恒流模式2.4mL/min,分流进样分流比为50:1。

测定方法:将沙棘油进行氢氧化钾-甲醇室温酯化法处理后进样分析,进样量0.2μL。

按气相条件,用GC-MS测定样品后得到色谱图。利用气质联用仪所带的标准图谱库的质谱数据进行自动检索,同时根据质谱图及相关文献鉴定出主要色谱峰对应的物质名称,并使用数据处理系统对色谱峰进行面积归一化处理,从而计算出各物质相对含量。

2 结果与分析

2.1 沙棘果油提取工艺

各因素水平见表1,试验设计及结果见表2。

表1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素			
	A 果胶酶用量/%	B 胃蛋白酶用量/%	C 酶解时间/h	D 酶解温度/℃
1	0.2	0.1	4	45
2	0.5	0.15	6	50
3	0.8	0.2	8	55

由表2可知,影响酶解效果的主次因素排列为果胶酶用量>胃蛋白酶用量>酶解时间>酶解温度。并得出正交试验的最佳试验组合为A₂B₂C₂D₃,即果胶酶用量0.50%、胃蛋白酶用量0.15%、酶解时间6h、酶解温度为55℃。正交试验中没有A₂B₂C₂D₃这组试验组合,需要验证实验。验证实验结果表明,试验组合A₂B₂C₂D₃测定的果油得率为4.946%,高于其他各试验组合的测定

表3 酶提取沙棘油的脂肪酸成分及含量

Table 3 Fatty acid profile of seabuckthorn oil derived from enzymatic extraction

序号	保留时间/min	峰面积/%	分子式	化合物英文名	化合物中文名	匹配度/%
1	6.615	0.04	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	4-decenoic acid, methyl ester	4-癸烯酸	83
2	6.894	0.06	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	lauric acid, methyl ester	月桂酸	95
3	9.882	1.06	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	tetradecanoic acid, methyl ester	肉豆蔻酸	94
4	13.615	35.07	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	methyl palmitoleate	棕榈油酸	96
5	13.799	0.29	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	methyl (11E)-11-hexadecenoate	(11E)-11-十六碳烯酸	86
6	14.139	35.61	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	palmitic acid, methyl ester	棕榈酸	97
7	18.182	12.77	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	linoleic acid, methyl ester	亚油酸	96
8	18.369	6.19	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	cis-11-octadecenoic acid methyl ester	顺-11-十八碳烯酸	95
9	18.522	7.26	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	methyl (12E)-12-octadecenoate	(12E)-12-十八碳烯酸	95
10	19.089	1.38	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	stearic acid, methyl ester	硬脂酸	94
11	24.329	0.27	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	methyl arachisate	花生酸	89

表2 正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal array design arrangement and experimental results

试验号	A	B	C	D	果油得率/%
1	1	1	1	1	2.386
2	1	2	2	2	3.380
3	1	3	3	3	3.010
4	2	1	2	3	4.396
5	2	2	3	1	4.924
6	2	3	1	2	4.556
7	3	1	3	2	3.480
8	3	2	1	3	4.330
9	3	3	2	1	4.006
k ₁	2.925	3.421	3.757	3.772	
k ₂	4.625	4.211	3.927	3.805	
k ₃	3.939	3.857	3.805	3.912	
R	1.700	0.790	0.170	0.140	

值, 所以 A₂B₂C₂D₃ 为最佳试验组合。若以新疆青河县的大、中、小各类沙棘平均果油含量(5.09%~6.02%)来计算, 最佳试验组合的提取率 82.16%~97.17%。

2.2 沙棘果油组成成分分析

由表3可知, 酶法提取沙棘果油经 GC-MS 色谱分析共检测出 11 种脂肪酸, 其主要化学成分为棕榈油酸 35.07%、棕榈酸 35.61%、亚油酸 12.77%、顺式-11-十八碳烯酸 6.19%、(12E)-12-十八碳烯酸 7.26%, 酶法提取沙棘果油中不饱和脂肪酸的含量占总脂肪酸的 61.56%。

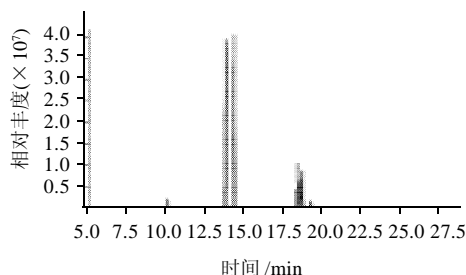


图1 酶提取沙棘油谱图

Fig.1 TIC of seabuckthorn oil derived from enzymatic extraction

3 结 论

酶法提取沙棘果油的最佳工艺条件: 果胶酶用量 0.50%、胃蛋白酶用量 0.15%、提取时间 6h、酶解温度 55℃, 此条件下果油得率 4.946%。最佳工艺条件下的果油提取率为 82.16%~97.17%。利用 GC-MS 共检测出 11 种脂肪酸, 其主要化学成分为棕榈油酸 35.07%、棕榈酸 35.61%、亚油酸 12.77%、顺式-11-十八碳烯酸 6.19%、(12E)-12-十八碳烯酸 7.26%, 酶法提取沙棘果油中不饱和脂肪酸的含量占总脂肪酸的 61.56%。

目前关于沙棘油的提取方法, 国内外的研究报道有很多, 如压榨法、离心分离法、4 号溶剂萃取法、超临界 CO₂ 萃取法、扩散法等, 但是关于酶提取的报导并不多。酶法提取沙棘果油安全温和而无害, 反应彻底, 提取率高, 提取后的果汁易于进行澄清处理, 有利于后续澄清沙棘果汁的加工, 有望解决沙棘果汁分层的难题。

参考文献:

- [1] 张哲民. 沙棘果油与籽油内含物之若干比较[J]. 国际沙棘研究与开发, 2007, 5(3): 1-7.
- [2] 梁德年. 中华沙棘油中成分分析的研究[J]. 中医药信息, 2004(5): 42-44.
- [3] 郑汉臣. 沙棘果实的化学成分[J]. 国外医学: 药学分册, 2001(3): 178-179.
- [4] ÇAKIR A. Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2004, 32(9): 809-816.
- [5] 赵元藩. 沙棘油的精制及其在化妆品中的应用[J]. 云南师范大学学报, 2000, 20(2): 48-50.
- [6] 钱俊青, 谢祥茂. 酶法提取植物油的工艺方法及特点[J]. 中国油脂, 2003, 28(4): 14-16.
- [7] OOMAH B D, 土小宁, 陆海. 沙棘油脂[J]. 国际沙棘研究与开发, 2005, 3(3): 1-10.
- [8] 康健, 王爱芹, 顾晶晶, 等. 新疆青河沙棘生产性能和主要营养成分研究初报[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 99-102.
- [9] 寇秀颖, 于国萍. 脂肪和脂肪酸甲酯化方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 46-47.
- [10] 吴平, 张林, 孙荣先, 等. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 104-107.
- [11] 端木凡林. 4 号溶剂浸出技术在沙棘油提取中的应用[J]. 沙棘, 1999, 12(1): 31-33.
- [12] 汪正范, 杨树民, 岳卫华, 等. 色谱联用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 122-126.
- [13] 邹元生. 沙棘果油药理研究进展[J]. 沙棘, 2006, 19(1): 24-26.
- [14] 邹元生, 苏琳, 聂勇, 等. 沙棘果油保肝作用的研究[J]. 沙棘, 2005, 18(3): 27-32.
- [15] 张凤桦, 索有瑞, 王洪伦, 等. 毛细管气相色谱内标法测定沙棘油中的脂肪酸[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(1): 198-201.