

复合酶法提取苹果籽油工艺研究^{*}

于修焯^a, 张莉^b, 杜双奎^a, 李志西^a, 魏宗萍^a

(西北农林科技大学 a 食品科学与工程学院, b 农学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了确定复合酶法提取苹果籽油的工艺条件,以秦冠苹果籽为原料,通过单因素试验和正交试验,对其工艺条件进行了优化。结果表明,复合酶法提取苹果籽油的优化工艺条件为:苹果籽破碎度 ≤ 0.6 mm,料液比 1 : 8,复合酶添加量 0.8 % (纤维素酶与酸性蛋白酶质量比 1 : 1),酶处理时间 8 h, pH 值 4.6,常压蒸汽处理 20 min,在该提取工艺条件下苹果籽出油率高达 21.44 %。与溶剂浸出法相比,复合酶法具有出油率高和油品质好等特点。

[关键词] 苹果籽油;复合酶法;工艺优化

[中图分类号] TS224

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0189-05

Research on extraction of apple seed oil by complex enzymatic method

YU Xiu-zhu^a, ZHANG Li^b, DU Shuang-kui^a, LI Zhi-xi^a, WEI Zong-ping^a

(a College of Food Science and Engineering, b College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract : The paper focused on the study of extracting edible oil from apple seeds by using complex enzymatic method, with the Qinguan apple seeds as the subject. Based on a single and orthogonal experiment, the optimum conditions were found as follows: the fragmentation degree ≤ 0.6 mm; the solid/liquid ratio, 1 : 8; the amount of complex enzymes (fibrinase : acid protease = 1 : 1, m/m), 0.8 %; the reaction time, 8 h; pH value 4.6; detoxification time, 20 min. Under the above conditions the extraction rate was 21.44 %. The result shows the complex enzymatic method has many advantages in improving yield and quality compared with the traditional solvent extraction methods, and predictably it will be widely employed in oil-extracting industry.

Key word : apple seed oil; complex enzymatic method; technological optimization

近年来,随着对苹果籽油研究和开发的不断深入^[1-3],苹果籽油的营养价值与保健功能引起了人们的广泛关注。苹果籽油具有除皱、防老化、去疤痕,促进胶原蛋白和组织蛋白质合成、细胞再生及恢复皮肤组织功能等作用,可用于化妆品、皮肤病药品等制品中;苹果籽油中含有亚油酸、亚麻酸、角鲨烯、二十九烷等活性成分,有降低血压和胆固醇、排除体内毒素等功能^[4]。

目前,苹果籽油提取的方法有溶剂法、超声波辅助浸提法、超临界法及复合酶法等。其中,超声波辅助浸提法提取时间短,油的品质较好,但出油率偏低^[2];超临界法提取出油率高,品质好,但不适于规模化生产^[5];传统的机械压榨法制油,其产品色泽深、油质差,出油率不高,而且易造成油营养成分的损失。复合酶法是利用各种酶消化复杂的油料细胞壁组织,使细胞组分,如蛋白质、油和多糖均处于液

^{*} [收稿日期] 2006-03-23

[基金项目] 陕西省“十五”攻关项目(2003K02-G16-02);陕西省农业重点推广项目(2001-1-3-16)

[作者简介] 于修焯(1974-),男,福建尤溪人,讲师,在读博士,主要从事食品高新技术应用研究。

[通讯作者] 李志西(1958-),男,陕西临潼人,教授,博士生导师,主要从事发酵技术创新与谷物功能食品研究。

体状态,然后将其分离,从而大大提高了出油率。复合酶法的突出优点是加工条件温和,可得到高质量的油脂,并能很好地保护油脂的营养成分不受损失^[6]。

本研究以秦冠苹果籽为原料,较为系统地研究了苹果籽破碎度、料液比、复合酶添加量、酶处理时间等因素对复合酶法提取苹果籽油的影响,以期苹果籽复合酶法提油的机械化、工业化生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

苹果籽:秦冠苹果籽,由陕西海升果业发展股份有限公司乾县分公司果汁厂榨汁后的苹果渣中分选,自然风干后备用。

果胶酶(诺维信酶制剂公司,KT513011,酶活力 5 000 U/mg);纤维素酶(上海源聚科技有限公司,酶活力 40 000 U/mg);中温 α -淀粉酶(无锡酶制剂厂,酶活力 20 000 U/mg);酸性蛋白酶(上海伯奥科技有限公司,酶活力 6 000 U/mg)。石油醚:分析纯,西安化学试剂厂生产。

仪器:多功能破碎机(SO-260B 型,广东省佛山市嘉壕实业有限公司),水浴锅,蒸汽压力锅,旋转蒸发器(R-200 型,瑞士 BUCHI 公司),真空干燥箱(ZK-16 型,大连第四仪表厂),罗维朋比色计(WSL-2 型,上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 复合酶法提取苹果籽油工艺流程 苹果籽处理:按试验设计的粒度要求,将风干的苹果籽用破碎机破碎,过筛后,取筛下物备用。

称取 50.000 g 粉碎后的苹果籽加入到 0.05 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中,在料液比为 1:8、苹果籽破碎度 ≤ 0.9 mm 条件下,常压蒸汽处理 20 min。在 pH 值为 4.6 时,加入质量分数 1.0% 纤维素酶或复合酶,55℃ 酶解 6 h。80℃ 灭酶 15 min 后,将石油醚混合物与残渣分离,滤液在旋转蒸发器上蒸干,得到的苹果籽毛油在 60℃、真空度为 7.98 kPa 下干燥 1 h,所得的苹果籽油,称重,计算出油率。每组试验重复两次,取平均值。

1.2.2 复合酶法提取工艺条件对出油率的影响

(1) 苹果籽破碎度对出油率的影响。在料液比为 1:8,苹果籽破碎度分别为 ≤ 1.5 mm、 ≤ 1.2 mm、 ≤ 0.9 mm 及 ≤ 0.6 mm 条件下,常压蒸汽处理 20 min。在 pH 值为 4.6 时,加入质量分数为 1.0% 的纤维素酶,55℃ 酶解 6 h,研究苹果籽破碎度对出油率的影响。

(2) 料液比对出油率的影响。在料液比分别为 1:4、1:6、1:8、1:10、1:12 及 1:14、苹果籽破碎度 ≤ 0.9 mm 条件下,常压蒸汽处理 20 min。在 pH 值为 4.6 时,加入质量分数为 1.0% 的纤维素酶,55℃ 酶解 6 h,研究不同料液比对出油率的影响。

(3) pH 值对出油率的影响。在料液比为 1:8、苹果籽破碎度 ≤ 0.9 mm 条件下,常压蒸汽处理 20 min。在 pH 值分别为 3.0、3.8、4.6、5.4、6.2,加入质量分数为 1.0% 的纤维素酶,55℃ 酶解 6 h,研究不同 pH 值对出油率的影响。

(4) 蒸汽处理时间对出油率的影响。在料液比为 1:8、苹果籽破碎度 ≤ 0.9 mm、pH 值为 4.6 条件下,常压蒸汽处理 10、20、30、40、50 min,加入质量分数为 1.0% 的纤维素酶,55℃ 酶解 6 h,研究不同蒸汽处理时间对出油率的影响。

(5) 酶处理时间对出油率的影响。在料液比为 1:8、苹果籽破碎度 ≤ 0.9 mm、常压蒸汽处理 20 min、pH 值为 4.6 条件下,加入质量分数为 1.0% 的纤维素酶,55℃ 分别酶解 2、4、6、8、10、12 h,研究酶处理时间对出油率的影响。

(6) 不同酶对出油率的影响。在料液比为 1:8、苹果籽破碎度 ≤ 0.9 mm、常压蒸汽处理 20 min、pH 值为 4.6 条件下,分别加入质量分数为 1.0% 的纤维素酶、果胶酶、酸性蛋白酶、中温 α -淀粉酶或复合酶,55℃ 酶解 6 h,研究不同酶对出油率的影响。

1.2.3 复合酶法提取工艺条件的优化试验 在单因素试验的基础上,选取苹果籽破碎度、料液比、酶添加量、酶处理时间为试验因素,以出油率为试验指标,设置四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验,每个试验组合重复两次,计算出油率,取平均值。

1.2.4 测定方法 苹果籽水分测定参照 GB 5497-85,含仁率测定参照 GB/T 5499-85,苹果籽粗脂肪测定参照 GB/T 5512-85,苹果籽粗蛋白测定参照 GB/T 5511-85,苹果籽灰分测定参照 GB/T 5505-85,苹果籽油酸价测定参照 GB/T 5530-85,苹果籽油水分及挥发物含量测定参照 GB/T 1448.9-93,苹果籽油过氧化值测定参照 GB/T 5598-1995,苹果籽油色泽测定参照 GB/T 5525-85。

出油率/% = (提取苹果籽油质量/原料苹果籽质量) $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 苹果籽理化特性分析结果

苹果籽理化特性分析结果见表 1。

表 1 苹果籽的理化特征分析测定结果

Table 1 Physicochemical properties some components of apple seed		g/ kg
成分 Components	含量 Content	
含仁率 Kernel rate	681.4	
灰粉 Starch	55.6	
水分 Moisture	101.6	
粗脂肪 Crude fat	249.0	
粗蛋白 Crude protein	377.9	

2.2 不同预处理条件对出油率的影响

2.2.1 苹果籽破碎度对出油率的影响 由图 1 可知,苹果籽破碎度为 0.6 ~ 0.9 mm 时,出油率大幅度提高,超过 0.9 mm 时出油率开始有所下降。这

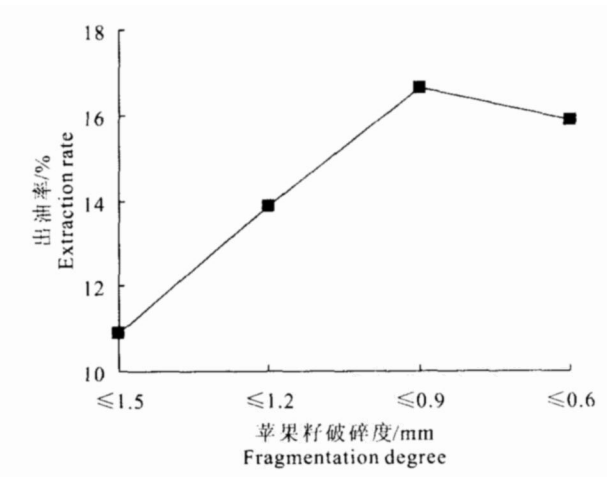


图 1 苹果籽破碎度对出油率的影响

Fig.1 Effect of fragmentation degree on extraction rate

2.2.3 pH 值对出油率的影响 酶对体系中酸碱度反应较为敏感,其只能在一定限度的 pH 值范围内才能表现出活性,过酸过碱都会使蛋白质变质,使

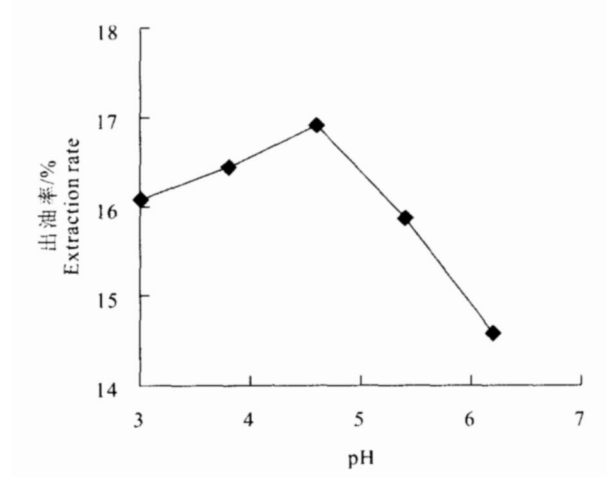


图 3 pH 值对出油率的影响

Fig.3 Effect of pH on extraction rate

可能是由于破碎程度过高,在破碎过程中造成油分的损失,影响出油率^[7]。为此,选定苹果籽破碎度为 ≤0.9 mm。

2.2.2 料液比对出油率的影响 缓冲液在整个提取过程中的作用是,润湿籽粒和提供一个合适的酸碱环境,使酶解更有效、更完全。缓冲液的加量不仅对酶解过程有作用,对后续的工艺也有影响。

由图 2 可以看出,随料液比的增加,出油率逐渐上升,当料液比为 1 : 8 时,出油率达到最高,再增加料液比出油率下降,而且对后续处理带来不利影响。因此,料液比以 1 : 8 为宜。

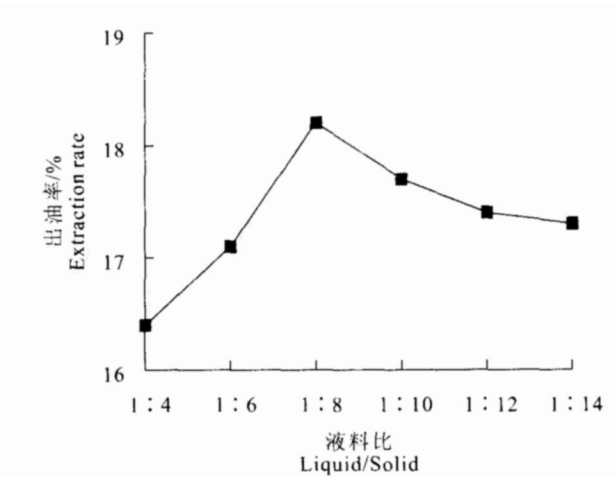


图 2 料液比对出油率的影响

Fig.2 Effect of dilution ratio on extraction rate

酶失活。由图 3 可知,在偏酸性条件下 (pH 值为 4.6),出油率较高。因此,pH 值以 4.6 为宜。

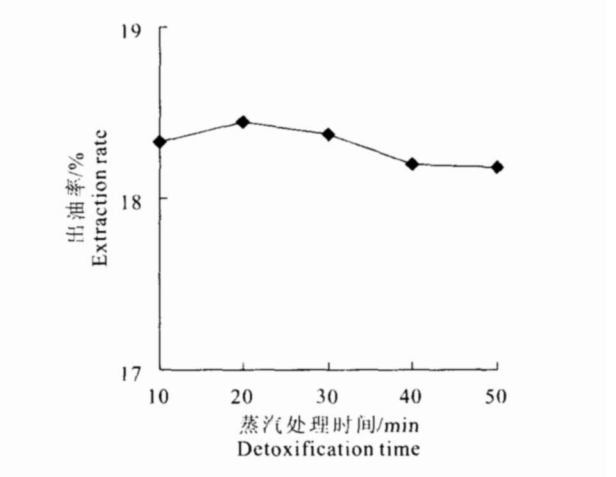


图 4 蒸汽处理时间对出油率的影响

Fig.4 Effect of detoxification time on extraction rate

2.2.4 蒸汽处理时间对出油率的影响 蒸汽热处理是为了使苹果籽内的脂肪酶、过氧化物酶失活,同时使细胞壁疏松,增加通透性和便于酶的作用,使油更容易释放出来^[8]。由图 4 可知,在 10~20 min,延长蒸汽处理时间,出油率有所提高,但变化不大;处理时间超过 20 min 时,出油率开始有所下降。其原因可能是蒸汽处理时间过长,造成粘度增加,出油率反而下降。为此,选定蒸汽处理时间为 20 min。

2.2.5 酶处理时间对出油率的影响 由图 5 可知,在酶处理时间小于 6 h 时,出油率上升非常明显,酶处理时间在 6 h 以上,出油率上升缓慢。因此,选定酶处理时间为 6 h。

2.2.6 不同酶对出油率的影响 纤维素酶、果胶酶、酸性蛋白酶、中温 α-淀粉酶对出油率有不同的影

响。由于植物细胞壁组成复杂,单一酶酶解的效果有限,多酶的复合作用具有明显效果^[9]。

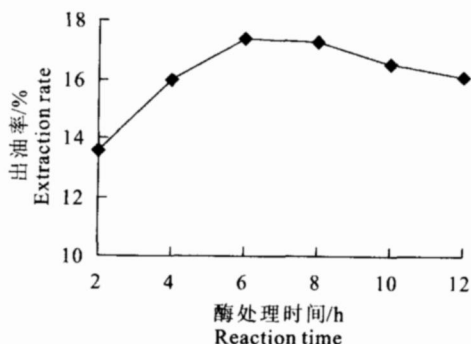


图 5 酶处理时间对出油率的影响

Fig. 5 Effect of reaction time on extraction rate

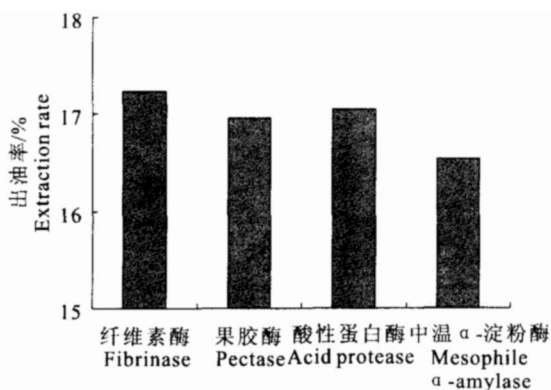


图 6 不同酶处理对出油率的影响

Fig. 6 Effect of different enzymes on extraction rate

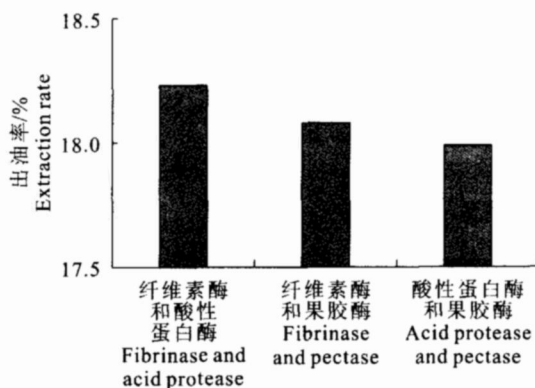


图 7 复合酶处理对出油率的影响

Fig. 7 Effect of complex enzyme on extraction rate

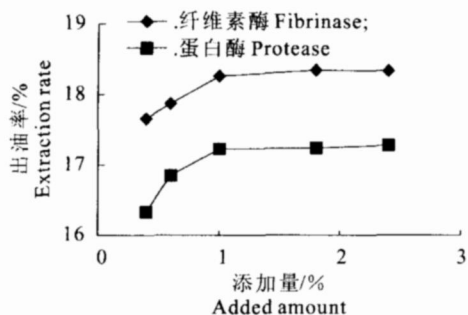


图 8 两种酶加量对出油率的影响

Fig. 8 Effect of two enzymes added amount on extraction rate

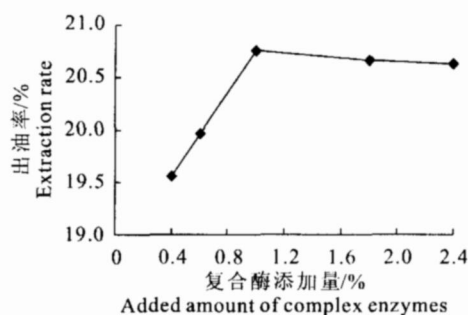


图 9 复合酶加量对出油率的影响

Fig. 9 Effect of complex enzymes added amount on extraction rate

由图 6~8 可知,对出油率影响较大的酶有纤维素酶、酸性蛋白酶、果胶酶,其中复合效果较好的是纤维素酶和酸性蛋白酶。当纤维素酶和酸性蛋白酶的添加量都增加至 1% 时,再增加酶量出油率增加不明显,所以可确定二者的复合质量比为 1:1。按照质量比 1:1 验证纤维素酶和酸性蛋白酶处理效

果(图 9)表明,复合酶的最适宜添加量为 1%。

2.2.7 复合酶法提取最佳工艺条件的确定 选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排试验,结果如表 2 所示。由表 2 可知,复合酶法提取苹果籽油过程中,各因素影响的主次顺序依次为:A>D>B、C。根据正交试验灵活运用原理,可将因素 B、因素 C 所在列作为误差

列进行方差分析,其结果见表 3。

表 3 结果表明,苹果籽破碎度对出油率有极显著影响,酶处理时间对出油率有显著影响,优化工艺条件为 A₃B₂C₁D₃,即苹果籽破碎度 ≤0.6 mm,料液比为 1 8,酶添加量 0.8%,酶处理时间 8 h,在此条件下出油率可达 21.44%。

表 2 复合酶法提取苹果籽油的 L₉(3⁴) 正交试验及结果分析

试验号 No.	因 素 / Factors				出油率/ % Extraction rate
	苹果籽破碎度 A/ mm Fragment degree	料液比 B Solid/ liquid	酶添加量 C/ % Added amount	酶处理时间 D/ h Reaction time	
1	1(≤1.2)	1(1 6)	1(0.8)	1(4)	17.75
2	1	2(1 8)	2(1.0)	2(6)	18.30
3	1	3(1 10)	3(1.2)	3(8)	18.76
4	2(≤0.9)	1	2	3	20.39
5	2	2	3	1	19.33
6	2	3	1	2	19.83
7	3(≤0.6)	1	3	2	20.08
8	3	2	1	3	21.44
9	3	3	2	1	20.10
K ₁	18.27	19.41	19.67	19.06	Σ = 175.98
K ₂	19.85	19.69	19.60	19.40	
K ₃	20.54	19.56	19.39	20.20	
R	2.27	0.28	0.28	1.14	

表 3 复合酶法提取苹果籽油正交试验的方差分析

方差来源 Variance source	偏差平方和 Sum of square due to deviation from variance	自由度 Degree of freedom	方差 Variance	F 值 F value	F _α	显著性 Significant level
A	8.12	2	4.06	33.83	F _{0.05} (2,4) = 6.94	* *
B	0.11	2	0.06		F _{0.01} (2,4) = 18.0	
C	0.12	2	0.06			
D	2.05	2	1.03	8.58		*
误差 e Error	0.23	4	0.12			
总和 Sum	10.63	8				

2.3 复合酶法提取苹果籽油的质量

将溶剂浸出法与复合酶法提取的苹果籽油进行比较,以评价复合酶法提取苹果籽油的品质^[10-11]。

由表 4 可知,复合酶法的出油率较溶剂浸出法高;且油的酸价和过氧化值较溶剂浸出法低,提取的油脂品质好,各项理化指标符合国家标准。

表 4 溶剂浸出法与复合酶法提取苹果籽油品质的比较

方法 Methods	出油率/ % Extraction rate	水分及挥发物/ (g · kg ⁻¹) Moisture and volatile	酸价/ (mg · g ⁻¹) Acid value	色泽(25.4 mm 槽) Color(25.4 mm cell)	过氧化值/ (mg · kg ⁻¹) Peroxide value
溶剂浸出法 Solvent extraction	17.3	0.15	0.15	Y70,R6.0	0.5
复合酶法 Complex enzyme	21.4	0.19	0.10	Y70,R5.0	-

3 结 论

复合酶法提取苹果籽油的工艺研究表明:苹果籽破碎度、料液比、pH 值、蒸汽处理时间、酶的选择、酶添加量以及酶处理时间对苹果籽油的出油率

都有较大影响。在给定的试验因素下,其最佳工艺条件为:苹果籽破碎度 ≤0.6 mm,料液比 1 8,复合酶添加量 0.8%,酶处理时间 8 h,pH 值为 4.6,常压蒸汽处理时间为 20 min,出油率可达 21.44%。

(下转第 198 页)

2.4.3 超声波作用时间 由图 9 可以看出,当超声波作用功率为 240 W、温度为 30 ℃ 时,随着超声波作用时间的延长,原生质体的形成率增大,再生率减小。处理时间为 0~30 min 时,超声波主要作用于原生质体的形成,对再生率的影响不大;处理时间为 30~60 min,形成率增幅不大,但原生质体的再生率明显降低,说明 30 min 为超声波处理的最佳时间,超声波作用时间超过 30 min,超声波会使早期形成的原生质体结构遭到破坏,导致原生质体的再生能力降低。

3 结 论

1) 酶解破壁较超声波法费时,而且处理后的菌液还需多次离心洗涤去酶,工序比较繁琐。

2) 超声波较酶解脱壁效果好,在其最佳条件,即菌龄 8 h、功率 240 W、温度 30 ℃、超声波作用时间为 30 min 时,原生质体形成率为 95.21%,再生率为 30.03%,均较酶解法有一定提高。

3) 本文重点考察了酶解法和超声波法脱壁时,菌龄、酶质量浓度、超声波功率及工作温度、时间等主要因素对原生质体形成和再生的影响,并未考虑菌体密度及渗透压调节剂等影响因素,这将是下一步研究的主要内容。

[参考文献]

- [1] 程东升,李国兰. 电诱导细胞融合仪的研制及在真菌原生质体融合中的应用[J]. 微生物学通报,1995,22(3):14-17.
- [2] 彭帮柱,岳田利,袁亚宏,等. 酵母菌原生质体融合技术[J]. 西北农业学报,2004,13(1):101-103.
- [3] 唐孝宣,肖信发,徐京宁. 微生物原生质体融合技术的进展[J]. 工业微生物,1987,17(5):23-29.
- [4] 余沛涛,孙宇晖. 水稻悬浮细胞和油菜叶肉细胞融合的研究[J]. 江西农业大学学报,1993,15(1):12-15.
- [5] 罗立新. 细胞融合技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004:71.
- [6] 彭帮柱,岳田利,袁亚宏,等. 优良苹果酒酵母的选育[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(5):81-84.
- [7] 甘志波,赵学慧. 酿酒酵母 *Rasse* 原生质体的形成与再生[J]. 微生物学杂志,1994,19(5):12-16.
- [8] 卫 军,陈春涛,王岁楼,等. 原生质体融合选育高产 β -胡萝卜素酵母菌[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版,2002,17(2):96-99.
- [9] Hilda R, Boris G, Odelsa A. Formation, regeneration, and fusion of protoplasts in a *Cellulomonas* strain[J]. *Current Microbiology*, 1991, 23:265-269.
- [10] 孙剑秋,周东坡. 微生物原生质体技术[J]. 生物学通报,2002,37(7):9-11.
- [11] 朱宏莉,宋纪蓉,张 嘉,等. 果胶酶产生菌 ZH-g 的原生质体形成与再生研究[J]. 食品科学,2006,27(8):68-71.
- [12] 周庆新,陈 静,于 恺,等. 疏松状嗜热丝孢菌原生质体的制备与再生[J]. 菌物研究,2006,4(2):1-5.

(上接第 193 页)

采用复合酶法制得的苹果籽油不仅出油率高,而且油的品质较好,可避免制油过程中营养成分的损失,其应用前景十分广阔。

[参考文献]

- [1] 于修焯,李志西,杜双奎. 苹果籽油脂脂肪酸组成分析初报[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(1):155-156.
- [2] 于修焯,李志西,杜双奎. 苹果籽油超声波辅助浸提及产品理化特性研究[J]. 农业工程学报,2005,21(9):155-159.
- [3] 李志西,李元瑞,于修焯,等. 苹果籽及其油的理化特性研究[J]. 中国油脂,2005,30(11):71-73.
- [4] 洪庆慈,汪海峰,杨晓蓉,等. 苹果籽营养成分测定[J]. 食品科学,2004,25(7):148-151.
- [5] 赵 兵,王玉春,欧阳藩. 超声波在植物提取中的应用[J]. 中草药,1999,30(9):1-3.

- [6] Hui Y H. 贝雷:油脂化学与工艺学(第四卷)[M]. 5 版. 北京:中国轻工业出版社,2001:115.
- [7] 魏义勇,李 珺. 水酶法提取玉米胚芽油的优化工艺研究[J]. 中国油脂,2005,30(8):17-19.
- [8] 杨慧萍,王素雅,宋 伟,等. 水酶法提取米糠油的研究[J]. 食品科学,2004,25(8):106-109.
- [9] 刘志强,贺建华,曾云龙,等. 酶及酶处理参数对水酶法提取菜籽油和蛋白质的影响[J]. 中国农业科学,2004,37(4):592-596.
- [10] 张惠敏. 低温萃取法提取杏仁油的研究[J]. 农业工程学报,2001,17(1):125-128.
- [11] Hamm W, Hamilton R J. Edible oil processing[M]. Sheffield England: Sheffield Academic Press,2000.