



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20210007

超声波辅助水酶法提取棕榈油工艺优化及其成分分析

高 淼, 马晓军

(天津科技大学轻工科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 以棕榈果为原料,通过超声波辅助水酶法提取棕榈油.在单因素实验基础上选择液料比、酶添加量、酶解温度为自变量,以棕榈油提取率为考察指标,利用 Box-Behnken 的中心组合方法进行 3 因素 3 水平的实验设计和响应面分析,得到最佳的工艺条件为:液料比 8.2 : 1、酶添加量 4.2%、酶解温度 42 ℃.在最佳工艺条件下,棕榈油的平均提取率为 34.62%.通过 GC-MS 实验对水酶法提取的棕榈油成分进行分析鉴定,共检测出 8 种脂肪酸,其中棕榈酸和油酸的相对含量较高,分别为 34.91%和 29.56%.

关键词: 棕榈油;水酶法;响应面分析法;超声波;脂肪酸

中图分类号: TS225.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2021)04-0014-06

Optimization of Ultrasound-Assisted Enzymatic Aqueous Extraction of Palm Oil and Its Composition Analysis

GAO Miao, MA Xiaojun

(College of Light Industry Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: With fruit of palm as raw material, the palm oil was extracted by ultrasound-assisted enzymatic aqueous method. On the basis of single factor test, the experiment of three factors and the three levels was designed by Box-Behnken center combination method; the ratio of solid to liquid, enzyme dosage and enzymolysis temperature were chosen as independent variables, the yield of palm oil as the standard of evaluation; the analysis was conducted by Box-Behnken methodology. The optimum extraction conditions were the ratio of liquid to solid 8.2 : 1, enzyme dosage of 4.2% and enzymolysis temperature 42 ℃. The extraction rate of oil under this condition was 34.62%. A total of 8 kinds of fatty acid were identified from palm oil by GC-MS, among which the content of palmitic acid (34.91%) and oleic acid (29.56%) were higher.

Key words: palm oil; aqueous enzymatic extraction; response surface methodology; ultrasound; fatty acid

棕榈(*Trachycarpus fortune* (Hook.) H. Wendl.) 属棕榈科属直立乔木状植物,是热带本木油料作物,原产非洲热带地区,是目前世界上产油生产效率最高的植物.从棕榈果中榨取棕榈油,含油量可达 50% 以上.棕榈的单位面积最高产油量是大豆的 8 倍,菜籽的 10 倍,故被人们誉为“世界油王”^[1].在棕榈油中,主要的脂肪酸是棕榈酸和油酸.就稳定性而言,由于天然抗氧化剂的存在,棕榈油是抗氧化能力最强的植物油之一^[2].它的脂肪酸组成为 50% 饱和脂肪酸、

40% 单不饱和脂肪酸和 10% 多不饱和脂肪酸.由于棕榈油在室温下呈半固态,因此广泛应用于食品、医疗、日用品加工等行业^[3].

目前,植物油的提取方法主要为传统的压榨法和有机溶剂浸提法.然而,传统的压榨法机械设备复杂耗能大、残油率高,且蛋白质在榨油过程中变性严重^[4].有机溶剂浸提法提油,成品油中会有微量有机溶剂残留,污染环境且危害人体^[5].水酶法作为一种新兴的植物油脂和蛋白质提取技术,利用酶解和机械

收稿日期: 2021-01-19; 修回日期: 2021-03-31

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(18JCYBJC90100)

作者简介: 高 淼(1997—),女,河北人,硕士研究生;通信作者: 马晓军,教授, mxj75@tust.edu.cn

方式破坏植物原料细胞壁和脂蛋白、脂多糖等,使蛋白质水解为小分子肽,油脂从物料中分离出来^[6]。另外,温和的工艺条件还可以使油脂、蛋白质、胶质等保持良好的营养价值和功能性质^[7]。此种提取油脂的方法操作简单、提油率高、工艺条件温和^[8]、合乎绿色可持续发展的要求,且避免了对油脂和蛋白质的严重破坏^[9],近年来受到越来越多研究者的关注。

虽然酶可以促进细胞壁降解从而改善油脂通过膜的渗透性,但是利用水酶法提取油脂工艺的生产效率仍然低于常规方法;若通过超声波辅助水酶法,则能够进一步提高渗透性^[10-13]。超声波辅助水酶提取油脂工艺主要是通过超声波在物料中迅速集中和扩散,让液体产生空化效果,是传统提取方法的先进辅助技术,普遍应用于油脂提取工艺^[14]。特别是空化气泡对于物料表面凹陷处产生的冲击力和剪切力会破坏物料细胞结构^[5],与此同时,还可利用超声波具有的化学效应、机械振动、热效应等多种次级效应^[15],促进物料中棕榈油和蛋白质等有效成分的扩散,提高棕榈油提取率^[16]。

本研究以棕榈果为原料,利用超声波辅助水酶法提取棕榈油,探究了液料比、酶添加量、酶解温度对棕榈油提取率的影响,并运用响应面设计优化其工艺参数,同时进行了 GC-MS 实验对其化学成分进行分析与鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

棕榈果,由海南热带农业发展研究所提供;CTec2 纤维素酶(酶活性 1 000 BHU-2/g),诺维信生物技术有限公司。

FZ102 型微型植物试样粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;ZNCL-B 型智能磁力搅拌器,天津科诺仪器设备有限公司;TD3102 型电子天平,天津天马衡基仪器有限公司;KQ-500DE 型超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;H1650 型离心分离机,湘仪离心机仪器有限公司;QP2010 型气相色谱-质谱联用仪(GC-MS),日本岛津仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 超声波辅助水酶法提取棕榈油工艺

取一定量的棕榈果用粉碎机粉碎后,将棕榈果渣(质量为 m_0)按一定的液料比进行调制。将制备好的溶液放入超声波清洗机中超声 30 min,超声温度

40 °C,超声功率 400 W。超声处理结束后的溶液于 100 °C沸水中灭菌 10 min,冷却至室温后加入一定量的纤维素酶,在一定温度下酶解 2 h,酶解的同时不断搅拌,搅拌速率 500 r/min;酶解结束后沸水浴 10 min 灭酶。酶解液冷却至室温后 7 000 r/min 离心 7 min,得到上层清油 a、乳状液、水解液、废渣,取水解液留存备用。取离心后的乳状液于 -20 °C 冷冻 18 h,然后于 50 °C 解冻破乳 2 h,解冻后将乳状液 7 000 r/min 离心 7 min,收集上层清油 b。合并两次离心得到的上层清油(质量分别为 m_a 和 m_b),根据式(1)计算棕榈油提取率。

$$\text{提取率} = \frac{m_a + m_b}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 单因素实验设计

根据 1.2.1 节所述的超声波辅助水酶法,分别以液料比、酶添加量、酶解温度为单因素探究对棕榈油提取率的影响,单因素水平设计:液料比(g : mL) 4 : 1、6 : 1、8 : 1、10 : 1、12 : 1,酶添加量为棕榈果渣物料总质量的 2%、3%、4%、5%、6%,酶解温度 30、40、50、60、70 °C。每个单因素实验平行重复 3 次,结果取平均值。

1.2.3 响应面优化实验设计

以单因素实验为基础,综合实验结果和经济效益,选择液料比(A)、酶添加量(B)、酶解温度(C)为因素,提取率(Y)为响应值,利用 Design Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 中心组合实验设计和响应面分析。

1.2.4 棕榈油油脂脂肪酸 GC-MS 分析

样品前处理:称取 900 mg 油脂样品于比色管中,加入 2 mL 5% KOH-甲醇溶液,置于 40 °C 水浴中反应 20 min;待反应完成后,冷却至室温并加入 2 mL 正己烷溶解试样,然后转移到 10 mL 容量瓶中定容;静置 24 h 后吸取上层有机相过 0.45 μm 滤膜,置于进样小瓶中,待进行 GC-MS 分析。

气相色谱条件:毛细管色谱柱为 HP-INNOWAX 型石英毛细管柱,进样口温度 280 °C,样品进样量 0.4 μL。升温程序:初始温度 80 °C,保留 1 min;以 10 °C/min 的升温速率升温到 200 °C;然后以 5 °C/min 的升温速率升温到 250 °C;最后以 2 °C/min 的升温速率升温到 270 °C,保留 5 min;整个升温程序运行的时间为 36 min。

质谱条件:采用 EI 离子源,离子源温度 230 °C,溶剂延时 5 min,电子能量 70 eV,分辨率 1 000。

对上述检测的色谱峰采用 NIST05 标准谱库对分析的样品进行峰匹配, 逐一对应进行定性分析, 采用面积归一法进行定量分析.

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 液料比对棕榈油提取率的影响

在酶添加量为 4%、酶解温度为 40 °C 的条件下, 液料比对棕榈油提取率的影响如图 1 所示. 随着液料比的增加, 棕榈油提取率缓慢增加, 当液料比超过 8 : 1 时, 棕榈油提取率迅速下降. 这可能是由于体系中液料比较小, 整个体系黏度过大, 影响酶和底物的流动性, 不利于油脂的分离; 当液料比过大时, 降低了酶和底物的浓度, 减小了酶分子与底物分子碰撞概率, 不利于酶解充分. 因此, 选择 8 : 1 为最佳液料比进行优化实验.

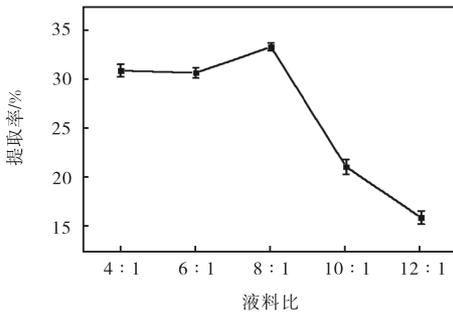


图 1 液料比对棕榈油提取率的影响

Fig. 1 Effect of ratio of material to liquid on the extraction rate of palm oil

2.1.2 酶添加量对棕榈油提取率的影响

在液料比为 8 : 1、酶解温度为 40 °C 的条件下, 酶添加量对棕榈油提取率的影响如图 2 所示.

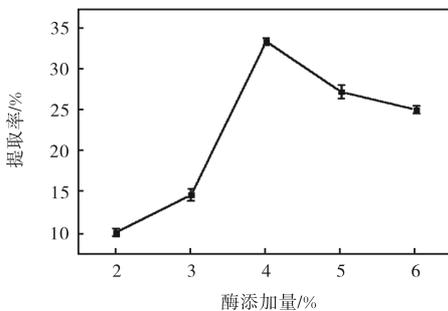


图 2 酶添加量对棕榈油提取率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme dosage on the extraction rate of palm oil

从图 2 可知: 棕榈油提取率随酶添加量的增加而

升高, 当酶的添加量达到 4% 时棕榈油提取率最高; 随着酶添加量继续增加, 提取率开始呈现下降趋势. 分析原因可能是: 酶添加量越多, 对细胞结构破坏越大, 对脂蛋白等复合体酶解更充分, 从而促进油脂从脂质体膜中释放出来; 但是当酶添加量超过一定范围时, 酶对脂蛋白作用达到饱和, 限制了酶解效果, 因此选择酶添加量为 4%.

2.1.3 酶解温度对棕榈油提取率的影响

在液料比为 8 : 1、酶添加量为 4% 的条件下, 酶解温度对棕榈油提取率的影响如图 3 所示. 在起始阶段, 随着温度的升高, 棕榈油的提取率呈现先增加后减少的趋势, 在 40 °C 时出现最大值; 当温度超过 50 °C 时, 提取率随温度升高迅速下降. 分析原因可能是: 随着温度升高, 酶活性提高, 加速了分子的热运动, 使细胞内的可溶性物质更好地与酶接触; 当超过酶适宜温度, 酶的活性降低, 使酶部分甚至全部失去催化活性, 同时会导致部分油脂水解成脂肪酸, 降低了游离油的提取率. 因此, 选择酶解温度为 40 °C.

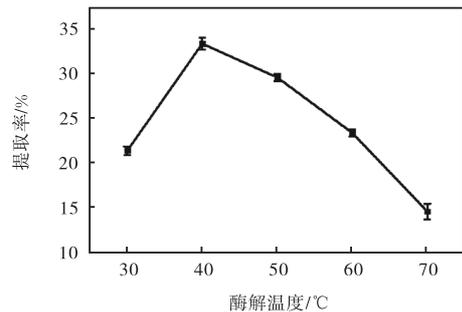


图 3 酶解温度对棕榈油提取率的影响

Fig. 3 Effect of enzymolysis temperature on the extraction rate of palm oil

2.2 响应面实验及显著性检验

2.2.1 Box-Behnken 中心组合实验设计

以单因素实验为基础, 选择液料比(A)、酶添加量(B)、酶解温度(C)为因素, 提取率(Y)为响应值, 响应面设计及结果见表 1, 实验号 1、4、8、14、16 是 5 个中心实验, 用来测试实验误差, 其余是析因实验. 响应面二次回归模型方差分析结果见表 2.

以棕榈油提取率(Y)为响应值, 对表 1 数据通过 Design Expert 8.0.6 软件进行多元回归拟合, 建立响应面二次回归模型为

$$Y = 34.32 + 0.91A + 0.87B + 1.77C + 1.13AB - 0.91AC - 0.60BC - 3.81A^2 - 2.38B^2 - 3.20C^2$$

由表 2 可知: 整体模型的 $F = 95.27, P < 0.0001$,

此模型回归项极显著, 回归模型的自变量和因变量存在显著的线性关系, 说明这是一种可靠的实验方法.

表 1 响应面设计及结果

Tab. 1 Response surface test design and results

编号	液料比	酶添加量/%	酶解温度/°C	提取率/%
1	8 : 1	4	40	34.33
2	6 : 1	5	40	27.26
3	10 : 1	4	30	27.58
4	8 : 1	4	40	34.32
5	10 : 1	3	40	26.74
6	8 : 1	3	30	25.58
7	6 : 1	4	30	23.25
8	8 : 1	4	40	34.00
9	6 : 1	3	40	28.76
10	8 : 1	3	50	30.07
11	8 : 1	5	30	28.62
12	8 : 1	5	50	30.70
13	6 : 1	4	50	28.86
14	8 : 1	4	40	34.87
15	10 : 1	4	50	29.55
16	8 : 1	4	40	34.08
17	10 : 1	5	40	30.65

失拟项 $F = 3.14, P = 0.1490$, 失拟项不显著, 说明此模型是正确的选择. 模型相关系数 $R^2 = 99.19\%$, 说明该回归方程与实验具有很好的拟合性, 调整系数 $R^2_{Adj} = 98.15\%$, 表明 98.15% 的响应值变化能够利用模型进行解释. 由 F 值检验可以判断各个因素的影响力为 $C > A > B$, 即酶解温度 > 液料比 >

酶添加量.

表 2 方差分析结果

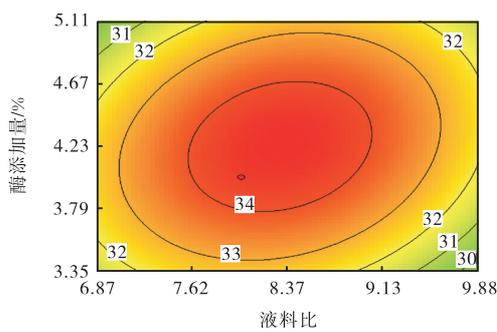
Tab. 2 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	190.05	9	21.12	95.27	<0.000 1**
A	6.64	1	6.64	29.97	0.000 9*
B	6.09	1	6.09	27.47	0.001 2*
C	25.03	1	25.03	112.91	<0.000 1**
AB	5.09	1	5.09	22.94	0.002 0*
AC	3.31	1	3.31	14.94	0.006 2*
BC	1.45	1	1.45	6.55	0.037 6*
A^2	61.20	1	61.20	276.10	<0.000 1**
B^2	23.85	1	23.85	107.60	<0.000 1**
C^2	43.05	1	43.05	194.21	<0.000 1**
回归	1.55	7	0.22		
失拟项	1.09	3	0.36	3.14	0.149 0
纯误差	0.46	4	0.12		
总回归	191.60	16			

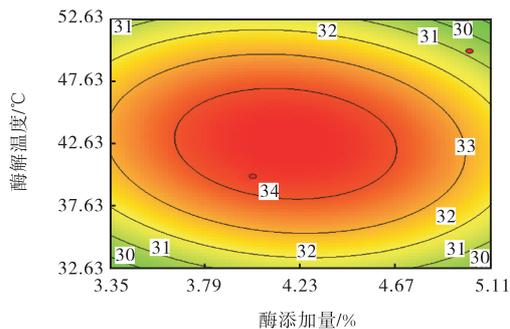
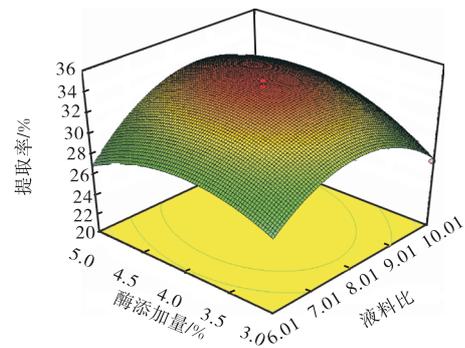
注: *表示有显著差异 ($P < 0.05$), **表示有极显著差异 ($P < 0.001$).

2.2.2 响应面分析与最优条件的确定

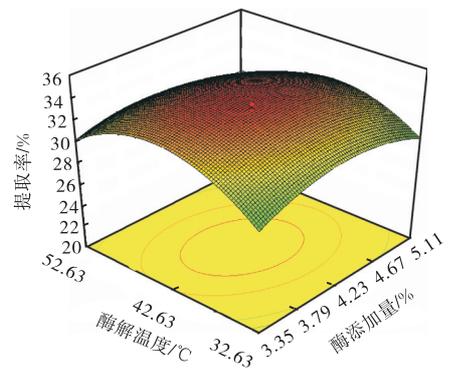
使用 Design Expert 8.0.6 软件对上述二次回归模型分别作出 2D 等高线图和 3D 曲面图, 如图 4 所示. 等高线的形状判断不同影响因素之间的交互作用是否显著: 椭圆形或马鞍形表示显著, 圆形表示不显著. 由图 4 可知: 棕榈油提取实验中, 液料比、酶添加量和酶解温度相互两个影响因素的等高线图呈明显的椭圆形, 说明 3 个因素两两之间的交互作用较为显著.

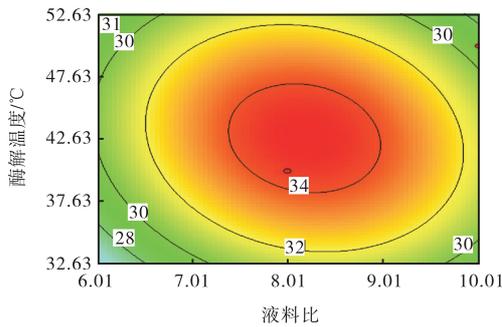


(a) 液料比与酶添加量



(b) 酶添加量与酶解温度





(c) 液料比与酶解温度

图 4 各因素对棕榈油提取率交互作用的影响面和等高线图

Fig. 4 Contour response surface plots for the interactive effects of three factors on palm oil yields

棕榈油提取率随液料比和酶添加量的变化呈先升高后降低的趋势(图 4(a)). 当酶添加量一定时, 棕榈油提取率随着酶解温度的升高而升高, 随后有所下降(图 4(b)). 同时, 酶解温度对棕榈油提取率有二次影响, 棕榈油提取率升高到酶解温度为 42.43 °C 后下降. 在较高温度下预处理的生物质中, 棕榈油提取率的下降幅度较大. 当酶解温度一定时, 随着液料比的增大, 油脂提取率升高到一定程度后逐渐降低; 而当液料比一定时, 油脂提取率随酶解温度的变化呈先升高后降低的趋势(图 4(c)).

利用模型方程可以预测超声波辅助水酶法提取棕榈油的最佳工艺条件是液料比 8.2 : 1、酶添加量 4.2%、酶解温度 42 °C, 在此条件下棕榈油提取率为 34.67%. 为进一步考察模型的准确性, 在最佳条件下进行了 3 次平行实验, 得到棕榈油的平均提取率是 34.62%, 与理论预测值接近, 说明回归模型方程和实际情况有较好的拟合性.

2.3 GC-MS分析

通过 GC-MS 实验对超声辅助水酶法提取出的棕榈油成分进行检测(图 5), 使用峰面积归一化的方法对其进行含量鉴定.

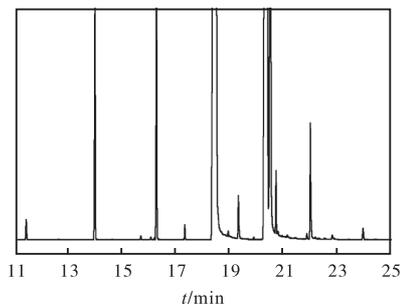
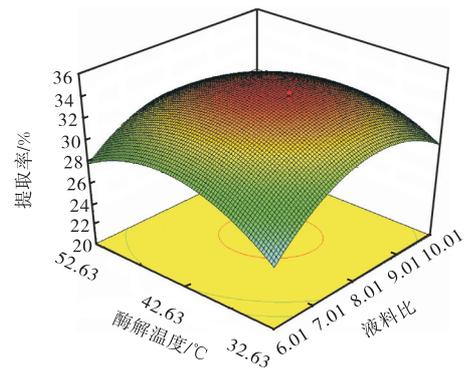


图 5 棕榈油油脂 GC-MS 总离子流色谱图

Fig. 5 Total ion current chromatogram of fatty acids in palmoil



利用质谱数据库进行检索, 同时采用人工谱图进行解析, 脂肪酸的组成及相对含量分析见表 3. 由表 3 可知: 从棕榈油中共检测出了 8 种脂肪酸成分, 其中油酸为不饱和脂肪酸, 相对含量为 29.56%; 饱和脂肪酸共 7 种, 棕榈酸相对含量为 34.91%.

表 3 棕榈油脂脂肪酸组成及相对含量分析

Tab. 3 Fatty acid composition and relative content analysis of palm oil

保留时间/min	脂肪酸名称	分子式	相对含量/%
11.372	癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.87
13.954	月桂酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	10.57
16.235	肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	13.19
17.285	十五烷酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.59
19.310	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	34.91
18.334	十七烷酸	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	3.19
20.267	油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	29.56
21.960	花生酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	7.12

3 结 语

以棕榈果为原料, 利用超声辅助水酶法提取棕榈油, 采用单因素实验和 Box-Behnken 实验设计及响应面分析方法, 对超声波辅助水酶法提取棕榈油的工艺进行优化实验, 得到提取棕榈油的最佳工艺条件为: 液料比 8.2 : 1、酶添加量 4.2%、酶解温度 42 °C. 在该最佳条件下, 得到棕榈油的平均提取率为 34.62%. 各因素对棕榈油提取率影响的显著程度依次为酶解温度、液料比、酶添加量, 并得到棕榈油提取率和每个因素的二次回归方程模型, 此模型的回归性非常显著, 较于实验的拟合性很高, 说明超声波辅助水酶法可以有效地提取油脂. 通过 GC-MS 实验对水酶法提取的棕榈油成分进行分析鉴定, 共检测出 8 种脂肪酸, 其中, 棕榈酸和油酸含量较高.

本实验只使用了 CTec2 纤维素酶, 后续研究中

可以进一步探究蛋白酶、糖化酶等对其酶解效果的影响;还可以以棕榈果水解液和棕榈油全组分有机酸为碳源调控合成 PHA, 为寻找廉价的碳源、降低 PHA 生产成本提供理论依据。

参考文献:

- [1] THINAGARAN L, SUDESH K. Evaluation of sludge palm oil as feedstock and development of efficient method for its utilization to produce polyhydroxyalkanoate[J]. Waste and biomass valorization, 2019, 10(3): 709-720.
- [2] TAN I K P, KUMAR K S, THEANMALAR M, et al. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1[J]. Applied microbiology and biotechnology, 1997, 47(3): 207-211.
- [3] LEE W S, CHUA S M, YEOH H K, et al. Influence of temperature on the bioconversion of palm oil mill effluent into volatile fatty acids as precursor to the production of polyhydroxyalkanoates[J]. Journal of chemical technology & biotechnology, 2014, 89(7): 1038-1043.
- [4] ZHANG Z, WANG L, LI D, et al. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed[J]. Separation and purification technology, 2008, 62(1): 192-198.
- [5] CAMPBELL K, GLATZ C, JOHNSON L, et al. Advances in aqueous extraction processing of soybeans[J]. Journal of the American oil chemists' society, 2011, 88(4): 449-465.
- [6] 吴非, 李钊, 周琪, 等. 超声波辅助水酶法提取米胚油及其成分分析[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 233-241.
- [7] 杨柳, 江连洲, 李杨, 等. 超声波辅助水酶法提取大豆油的研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(12): 10-14.
- [8] 刘志强, 贺建华, 曾云龙, 等. 酶及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): 592-593.
- [9] LI Y, ZHANG Y, WANG M, et al. Simplex-centroid mixture design applied to the aqueous enzymatic extraction of fatty acid-balanced oil from mixed seeds[J]. Journal of the American oil chemists' society, 2013, 90(3): 349-357.
- [10] LI H, PORDESIMO L, WEISS J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans[J]. Food research international, 2004, 37(7): 731-738.
- [11] ROSTAGNO M A, PALMA M, BARROSO C G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones[J]. Journal of chromatography A, 2003, 10(12): 119-128.
- [12] CHEMAT F, GRONDIN I, COSTES P, et al. High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil[J]. Ultrasonics sonochemistry, 2004, 11(5): 281-285.
- [13] LI Y, ZHANG Y, SUI X, et al. Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from perilla (*Perilla frutescens* L.) seeds[J]. CyTA-Journal of food, 2013: 782070.
- [14] JACOBS H, DELCOUR J A. Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: a review[J]. Journal of agricultural food chemistry, 1998, 46(8): 2895-2905.
- [15] 郭孝武. 超声波技术在油脂加工提取中的应用[J]. 中国油脂, 1996, 21(5): 36-37.
- [16] 王小英, 曹安银. 超声波协同水酶法提取小麦胚芽油的研究[J]. 中国油脂, 2008, 33(4): 16-19.

责任编辑: 郎婧