

黑豆油水酶法提取工艺及其脂肪酸组成分析

尹璐海^{1,2}, 余 佶^{1,2}, 余兆硕², 吕雯姣², 唐谦为², 麻成金^{1,2}, * 吴竹青^{1,2}

(1. 吉首大学 植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000;

2. 吉首大学 食品科学研究所, 湖南 吉首 416000)

摘要: 以黑豆为原料, 探讨水酶法及超声波辅助水酶法提取黑豆油工艺条件, 对酶解条件和超声波预处理条件进行研究。通过单因素试验和正交试验, 确定水酶法提取的最适条件为料液比 1 : 8 (g : mL), 碱性蛋白酶用量 2.0%, 酶解 pH 值 8.5, 酶解温度 55 °C, 酶解时间 5 h, 在此条件下黑豆油提取率为 89.2%。超声波辅助处理可有效提高黑豆油提取率, 在超声功率 420 W 下处理 20 min 可将黑豆油提取率提高至 94.5%, 比未经超声波预处理的高出 5.3%。对黑豆油进行 GC-MS 分析, 其主要脂肪酸有棕榈酸 19.33%, 亚油酸 46.17%, 油酸 18.73% 和硬脂酸 7.18% 等 10 种脂肪酸, 其不饱和脂肪酸相对含量达 68.34%。

关键词: 黑豆油; 超声波辅助提取; 水酶法; 脂肪酸组成

中图分类号: TS224.4 文献标志码: A doi: 10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2016.01.007

Aqueous Enzymatic Extraction of Black Soybean Oil and Analysis of Fatty Acid Composition

YIN Luhai^{1,2}, YU Ji^{1,2}, YU Zhaoshuo², LV Wenjiao², TANG Qianwei², MA Chengjin^{1,2}, * WU Zhuqing^{1,2}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization, Jishou University, Jishou, Hu'nan 416000, China;

2. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou, Hu'nan 416000, China)

Abstract: Aqueous enzymatic extraction of black soybean oil from black soybean assisted by ultrasound is studied. Effects of enzymatic hydrolysis conditions and ultrasonic pretreatment conditions on the extraction rate are explored, the optimum extraction condition is obtained as follows: ratio of stuff to water 1 : 8 (g : mL), dosage of alcalase 2.0%, pH 8.5, temperature 55 °C, time 5 hours. Under this optimal conditions, the oil extraction efficiency reached 89.2%. The ultrasound irradiation at 420 W for 20 min followed by aqueous enzymatic extraction could increase the oil extraction efficiency to 94.5%, which is 5.3% higher than that of non-irradiation with ultrasound. GC-MS is employed to analyze the components of fatty acid of black soybean oil. The main components of black soybean oil are ten kinds of fatty acid such as palmitic acid 19.33%, linoleic acid 46.17%, oleic acid 18.73%, stearic acid 7.18%, total content of unsaturated fatty acids is 68.34%.

Key words: black soybean oil; ultrasonic-assisted extraction; aqueous enzymatic extraction; fatty acid composition

0 引言

黑豆为豆科植物大豆的黑色种子 (*Glycine max* L. merr), 又叫黑大豆、乌豆等。我国黑豆资源丰富, 已形成规模化种植^[1]。黑豆粗脂肪含量为 20% 左右, 富含油酸和亚油酸, 具有较高的营养价值^[2-3]; 黑豆还含有异黄酮等活性成分, 具有抗氧化和抗肿瘤等多种功效^[4]。

植物油脂提取方法主要有压榨法、溶剂萃取法、水酶法、超临界流体萃取法等^[5], 尤其是超声波、微波等辅助技术的应用, 有助于提高油脂提取率。目

前, 国内外对豆类油脂的水酶法提取研究已有文献报道^[6-10], 但未见水酶法提取黑豆油脂的相关报道。本试验以黑豆为原料, 对黑豆油脂提取工艺中料液比、碱性蛋白酶用量、酶解 pH 值、酶解温度、酶解时间, 以及超声功率、超声时间等工艺参数进行探讨, 并对其脂肪酸组成进行 GC-MS 分析, 旨在为黑豆油的提取和应用提供试验参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

7890A-5975C 型气相色谱 - 质谱联用仪, 美国

收稿日期: 2015-10-23

基金项目: 吉首大学大学生创新训练中心资助项目 (JDCX2013-24)。

作者简介: 尹璐海 (1993—), 男, 在读本科, 研究方向为食物资源研究与利用。

* 通讯作者: 吴竹青 (1964—), 女, 高级实验师, 研究方向为天然产物化学。

安捷伦公司产品; LXJ-IIB型离心机, 上海安亭科学仪器厂产品; 101-2AB型鼓风恒温干燥箱, 天津泰斯特公司产品; FA2004型电子天平, 上海舜宇恒平科仪公司产品; JY92-DN型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技公司产品; PH-2型酸度计, 上海科仪公司产品; FW-100型高速万能粉碎机, 天津泰斯特公司产品; HJ-3数型显恒温磁力搅拌器, 常州澳华仪器有限公司产品; HH-S2型恒温水浴锅, 金坛市成辉仪器厂产品; MDF-192型超低温冰箱, 日本三洋公司产品。

1.2 原料与试剂

黑豆, 购于湖南吉首市农贸市场; 碱性蛋白酶, 江苏锐阳生物科技有限公司产品, 最适温度 50~60 °C, 最适 pH 值 8.5~10.5; 氢氧化钠、氢氧化钾、盐酸, 均为国产分析纯; 甲醇、正己烷, 为国产色谱纯。

1.3 研究方法

1.3.1 样品处理

将烘干后的黑豆粉碎, 过 40 目筛, 备用。

1.3.2 黑豆粗脂肪含量测定

采用索氏提取法 (GB/T 5009.6—2003), 测得其粗脂肪含量平均值为 20.15%。

1.3.3 工艺流程

水酶法提取: 黑豆粉→调浆→超声波预处理→调节温度、pH 值→酶解→离心分离→破乳→干燥→黑豆毛油。

1.3.4 操作要点

准确称取 10 g 黑豆粉, 装于烧杯中, 加入一定容积的蒸馏水, 混匀, 用超声波预处理后调整 pH 值, 加入一定量碱性蛋白酶, 恒温搅拌反应。反应结束后, 以转速 4 000 r/min 离心分离 20 min, 收集上层乳状液, 在 -20 °C 冷冻处理 12 h, 然后在 35 °C 解冻 2 h, 离心分离, 收集上层游离油, 测定并计算黑豆油提取率。

1.3.5 黑豆油提取率计算

$$Y = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

式中: Y ——黑豆油提取率, %;
 m_1 ——黑豆粗脂肪含量, g;
 m_2 ——提取黑豆油质量, g。

1.3.6 单因素试验

在其他条件相同的情况下, 分别探讨水酶法提取黑豆油试验中料液比、碱性蛋白酶用量、酶解 pH 值、酶解温度、酶解时间等因素对黑豆油提取率的影响, 以及超声波辅助处理时超声功率、超声时间对黑豆油提取率的影响。

1.3.7 提取工艺条件优化试验

在单因素试验结果的基础上, 对料液比、碱性

蛋白酶用量、酶解 pH 值、酶解温度 4 个因素进行正交试验设计, 并对酶解条件参数进行优化。

1.3.8 黑豆油脂肪酸组成分析

(1) 甲酯化方法。称取 1 g (精确到 0.000 1 g) 水酶法提取所得黑豆油油样, 置于具塞锥形瓶中, 加入 0.5 mol/L 的 KOH - 甲醇溶液 10 mL, 混匀后置于 70 °C 下水浴超声波辅助处理 1 h, 冷却至室温, 用 20 mL 色谱纯正己烷萃取, 静置分层取上层液, 用蒸馏水洗涤 2~3 次, 加入无水硫酸镁干燥脱水, 最后以转速 4 500 r/min 离心 10 min, 取上层清液置于瓶中待测。

(2) 仪器 MS 条件。四级杆温度 150 °C, EI 离子源温度 230 °C, 溶剂延时 4 min, 电子能量 70 eV, 扫描范围 30~500 u。

(3) 仪器 GC 条件。HP-5MSAgilent 190191S-433 型石英毛细管柱 (325 °C, 30 m × 250 μm); 载气为高纯氦气 (99.999%); 柱前压 69.8 kPa; 柱内载气流量 2 mL/min; 80 °C 保持 2 min, 以 10 °C/min 升温到 160 °C, 保持 2 min, 再以 5 °C/min 升温到 250 °C 保持 5 min; 样品进样量 1 μL; 分流比 80 : 1。

2 结果与讨论

2.1 酶解条件对黑豆油提取率影响的单因素试验

2.1.1 料液比对黑豆油提取率的影响

在未经超声波预处理, 碱性蛋白酶用量 2.0%, 酶解温度 50 °C, 酶解时间 4 h, 酶解 pH 值 9.0 的条件下, 考察料液比对黑豆油提取率的影响。

料液比对黑豆油提取率的影响见图 1。

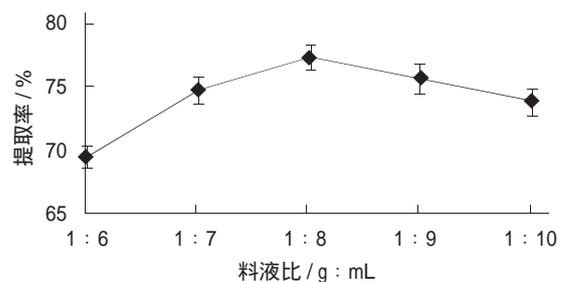


图 1 料液比对黑豆油提取率的影响

由图 1 可知, 随着料液比的增加, 黑豆油提取率快速上升, 在料液比 1 : 8 (g : mL) 时达到最高。当料液比较低时, 由于浆料黏稠度大, 酶与底物接触不充分, 酶解效果较差; 随着料液比增加, 酶与底物接触面积增大, 作用效果明显提高; 但料液比过大时, 底物浓度较低, 减弱了酶解效果, 黑豆油提取率反而下降。

2.1.2 碱性蛋白酶用量对黑豆油提取率的影响

在未经超声波预处理, 料液比 1 : 8 (g : mL), 酶解温度 50 °C, 酶解时间 4 h, 酶解 pH 值 9.0 的条件下, 考察碱性蛋白酶用量对黑豆油提取率的影响。

碱性蛋白酶用量对黑豆油提取率的影响见图2。

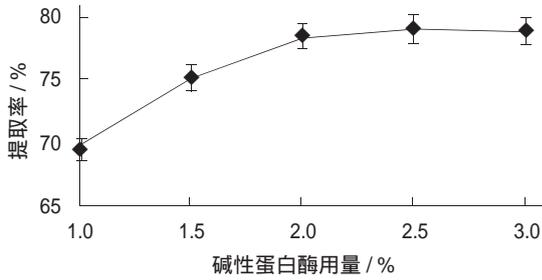


图2 碱性蛋白酶用量对黑豆油提取率的影响

由图2可知，随着碱性蛋白酶用量的增加，黑豆油提取率不断升高；当碱性蛋白酶用量超过2.5%时，黑豆油提取率增加缓慢，这是因为酶对底物作用饱和所致。因此，碱性蛋白酶用量以2.5%左右为宜。

2.1.3 酶解 pH 值对黑豆油提取率的影响

在未经超声波预处理，碱性蛋白酶用量2.0%，料液比1:8(g:mL)，酶解温度50℃，酶解时间4h的条件下，考察酶解pH值对黑豆油提取率的影响。

酶解pH值对黑豆油提取率的影响见图3。

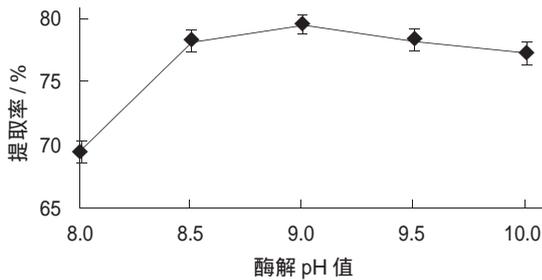


图3 酶解 pH 值对黑豆油提取率的影响

由图3可知，黑豆油提取率随着酶解pH值的升高而迅速增加，在酶解pH值9.0时达到最高；但当酶解pH值超过9.0时，提取率随酶解pH值的升高而下降。因此，选择酶解pH值9.0为宜。

2.1.4 酶解温度对黑豆油提取率的影响

在未经超声波预处理，料液比1:8(g:mL)，碱性蛋白酶用量2.0%，酶解pH值9.0，酶解时间4h的条件下，考察酶解温度对黑豆油提取率的影响。

酶解温度对黑豆油提取率的影响见图4。

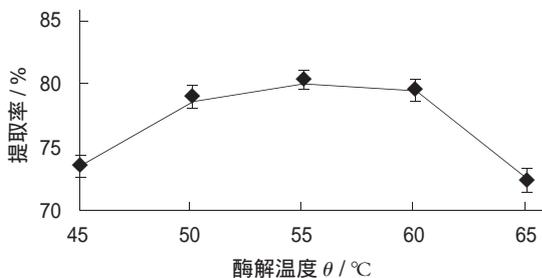


图4 酶解温度对黑豆油提取率的影响

由图4可知，随着酶解温度升高，黑豆油提取率不断上升，在55℃时达到最高；超过55℃时，

随着酶解温度升高，黑豆油提取率迅速下降，这与碱性蛋白酶的最适作用温度有关。

2.1.5 酶解时间对黑豆油提取率的影响

在未经超声波预处理，料液比1:8(g:mL)，碱性蛋白酶用量2.0%，酶解温度50℃，酶解pH值9.0的条件下，考察酶解时间对黑豆油提取率的影响。

酶解时间对黑豆油提取率的影响见图5。

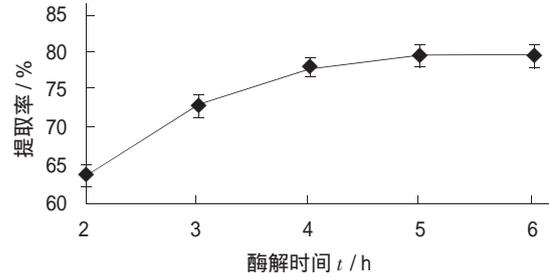


图5 酶解时间对黑豆油提取率的影响

由图5可知，随着酶解时间的延长，黑豆油提取率逐渐上升；当酶解时间超过5h时，黑豆油提取率趋于稳定。因此，酶解时间选择5h即可。

2.2 水酶法提取黑豆油酶解条件优化试验

在单因素试验结果基础上，以黑豆油提取率为评价指标，选用L₉(3⁴)正交试验设计对酶解条件进行优化。

正交试验因素与水平设计见表1，正交试验结果与分析见表2。

表1 正交试验因素与水平设计

水平	A 料液比 / g : mL	B 碱性蛋白酶用量 / %	C 酶解 pH 值	D 酶解温度 θ / °C
1	1 : 7	1.5	8.5	50
2	1 : 8	2.0	9.0	55
3	1 : 9	2.5	9.5	60

表2 正交试验结果与分析

试验号	A	B	C	D	提取率 / %
1	1	1	1	1	79.2
2	1	2	2	2	81.9
3	1	3	3	3	71.3
4	2	1	2	3	85.5
5	2	2	3	1	84.4
6	2	3	1	2	88.7
7	3	1	3	2	82.8
8	3	2	1	3	83.2
9	3	3	2	1	82.3
\bar{K}_1	77.5	82.5	83.9	81.9	
\bar{K}_2	86.4	83.2	83.2	84.6	
\bar{K}_3	82.8	80.9	79.5	80.0	
R	8.9	2.3	4.4	4.6	
优水平	A ₂	B ₂	C ₁	D ₂	

由表2可知，各因素影响酶解效果的主次顺序为料液比 > 酶解温度 > 酶解pH值 > 碱性蛋白酶用量，

最优水平组合为 $A_2B_2C_1D_2$, 即料液比 1:8 (g:mL), 碱性蛋白酶用量 2.0%, 酶解 pH 值 8.5, 酶解温度 55 °C。在此条件下进行 3 组验证试验, 黑豆油提取率平均值为 89.2%。

2.3 超声波辅助处理对黑豆油提取率的影响

在优化的酶解条件下, 探讨超声功率和超声时间对黑豆油提取率的影响。

2.3.1 超声功率对黑豆油提取率的影响

固定超声时间 10 min, 在优化酶解条件下考察超声功率对黑豆油提取率的影响。

超声功率对黑豆油提取率的影响见图 6。

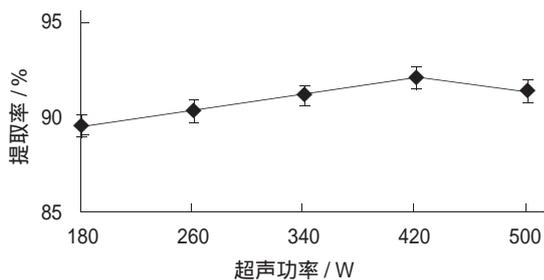


图 6 超声功率对黑豆油提取率的影响

由图 6 可知, 随着超声功率增大, 黑豆油提取率相应提高, 因为超声功率 420 W 时提取率最高, 达到 92.2%。超声波功率越大, 空化作用和机械作用越强烈, 分子扩散速度也就越大, 油脂渗出就越多^[3]。但在超声功率超过 420 W 后, 黑豆油提取率反

而略有减小, 这可能是由于功率大, 超声波瞬间热效应过于明显, 使得局部温度过高导致蛋白质变性, 影响酶解效果, 从而影响油脂溶出。

2.3.2 超声时间对黑豆油提取率的影响

固定超声功率 420 W, 在优化酶解条件下考察超声时间对黑豆油提取率的影响。

超声时间对黑豆油提取率的影响见图 7。

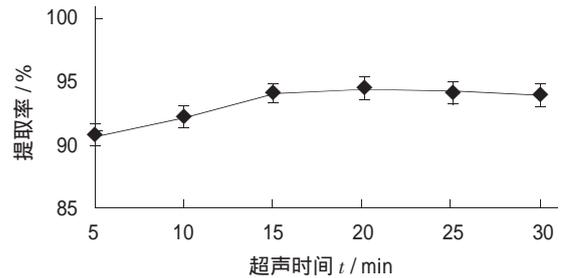


图 7 超声时间对黑豆油提取率的影响

由图 7 可知, 黑豆油提取率随超声时间延长而升高, 20 min 达到 94.5%, 之后渐趋于稳定。因此, 选择超声时间 20 min 即可。

2.4 黑豆油脂肪酸组成分析

黑豆油经甲酯化处理后进行 GC-MS 分析, 形成的色谱峰通过 NIST 05 标准谱库逐个进行检索, 解析出各峰相应的质谱图, 并利用不做校正的峰面积归一法确定各组分的相对含量。

黑豆油中脂肪酸组分及相对含量见表 4。

表 4 黑豆油中脂肪酸组分及相对含量

序号	保留时间 / min	名称	分子式	分子量	相对百分含量 / %	匹配度 / %
1	20.10	棕榈酸(Hexadecanoic acid)	$C_{15}H_{31}COOH$	256	19.33	98
2	22.73	十七烷酸(Heptadecanoic acid)	$C_{16}H_{33}COOH$	270	1.20	95
3	23.31	亚油酸(9,12-Octadecadienoic acid)	$C_{17}H_{31}COOH$	280	46.17	99
4	23.41	油酸(9-Octadecenoic acid)	$C_{17}H_{33}COOH$	282	18.73	99
5	23.48	8-十八烷酸(8-Octadecenoic acid)	$C_{17}H_{33}COOH$	282	3.11	99
6	23.64	11-十八烷酸(11-Octadecenoic acid)	$C_{17}H_{33}COOH$	282	0.33	99
7	23.83	硬脂酸(Stearic acid)	$C_{17}H_{35}COOH$	284	7.18	99
8	26.86	顺-11-二十烯酸(cis-11-Eicosenoic acid)	$C_{19}H_{37}COOH$	311	0.78	93
9	30.49	山俞酸(Docosanoic acid)	$C_{21}H_{43}COOH$	341	0.80	99
10	34.54	二十四烷酸(Tetracosanoic acid)	$C_{23}H_{47}COOH$	368	0.15	98

由表 4 可知, 黑豆油中主要含有棕榈酸、亚油酸、油酸、硬脂酸等 10 种脂肪酸, 其中亚油酸相对含量最高, 达 46.17%; 亚油酸、油酸、8-十八烷酸等不饱和脂肪酸含量达到 68.34%。

3 结论

以黑豆为原料, 研究水酶法提取油脂工艺条件, 测定黑豆原料粗脂肪含量为 20.15%, 通过单因素试验及正交试验, 确定水酶法提取黑豆油的优化酶解条件为料液比 1:8 (g:mL), 碱性蛋白酶用量 2.0%, 酶解 pH 值 8.5, 酶解温度 55 °C, 酶解时间 5 h, 此

时黑豆油提取率为 89.2%。采用超声波辅助处理, 可有效提高黑豆油提取率, 在超声功率 420 W 下处理 20 min 可使黑豆油提取率提高至 94.5%, 比未经超声波预处理的高出 5.3%。提取所得黑豆油经 GC-MS 分析, 其主要脂肪酸组成为棕榈酸、亚油酸、油酸和硬脂酸等 10 种脂肪酸, 不饱和脂肪酸含量高达 68.34%, 具有较高的应用价值。

参考文献:

[1] 王璇, 田少君, 张喆, 等. 超声波辅助酶解黑豆蛋白工

(下转第 28 页)

表3 2种工艺牛肉干的理化检验指标

项 目	传统牛肉干的 理化检验指标	新工艺牛肉干的 理化检验指标
水分	19.5	11.3
脂肪	9.2	9.4
蛋白质	40.3	43.1
总糖	25.1	24.9
氯化钠	6.2	6.1

牛肉干中的水分由内外同时蒸发,干燥速度快,干燥较彻底,干燥后的牛肉干含水量低。

3.2.2 蛋白质

传统牛肉干由于2次煮制处理,导致部分盐溶性蛋白和其他可溶性营养物质流失,影响了产品的风味和营养价值。

3.3 牛肉干的出品率检验及结果评定

对2种工艺生产的牛肉干进行出品率检验。

2种工艺牛肉干的出品率见表4。

表4 2种工艺牛肉干的出品率

名 称	出品率 / %	名 称	出品率 / %
传统牛肉干	31.1	新工艺牛肉干	33.8

由表4可知,2种工艺生产的牛肉干其出品率相差2.7%。其原因是传统工艺中的煮制导致牛肉干的蛋白、矿物质、维生素等营养物质流失,从而使牛肉干的出品率降低,营养成分流失。

3.4 牛肉干的贮藏试验

将2种牛肉干在 37 ± 1 °C的条件下进行贮藏试验,结果发现,新工艺生产的牛肉干采用真空包装保质期为10个月,传统牛肉干采用真空包装保质期为6个月;若采用普通的包装技术,新工艺牛肉干保质期为6个月,传统牛肉干保质期为3.5个月。由此可见,影响牛肉干保质期的因素中除了水分含量以外,还与包装材料、包装方法等有关。

3.5 牛肉干的微生物检验结果及分析

2种工艺牛肉干的微生物指标见表5。

表5 2种工艺牛肉干的微生物指标

项 目	传统牛肉干 微生物指标	新工艺牛肉干 微生物指标
细菌总数 / CFU·g ⁻¹	23 000	13 000
大肠菌群 / MPN·(100 g) ⁻¹	30	10
致病菌	未检出	未检出

由表5可知,采用微波加热干燥还可以降低牛肉干的带菌量,提供产品的卫生品质。

4 结论

(1) 新工艺牛肉干产品品质得到了保障。将传统加工工艺中的2次煮制、恒温干燥改为分段干燥,缩短了干燥时间,降低了产品的热损伤,避免了由于2次煮制导致产品中营养成分的流失,提高了产品的出品率;采用2次调味,提高了产品的色、香、味,使牛肉干的感官品质、营养品质、商品品质均得到了改善。

(2) 新工艺牛肉干贮藏稳定性良好。新工艺采用分段干燥,产品脱水彻底,不利于微生物生长繁殖。同时,微波干燥杀菌效果良好,产品带菌量低,产品的耐贮性自然就有所提高。

(3) 新工艺与包装技术有机结合,提高了牛肉干的保质期。新工艺在改进加工工艺的同时,采用真空包装技术,避免了产品在贮藏和流通中的氧化、返潮及霉变,保证了产品的贮藏稳定性,延长了产品的货架期,有利于产品的远距离流通。

参考文献:

- [1] 展跃平. 肉制品加工技术 [M]. 北京: 化工出版社, 2006: 123-158.
- [2] 袁仲. 肉品加工技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 57-98.
- [3] 李艳伍, 韩建春. 新型牛肉干生产工艺的研究 [J]. 肉类研究, 2008 (10): 41-43. ◇

(上接第25页)

- [1] 艺优化 [J]. 粮食与油脂, 2011 (12): 39-42.
- [2] 娄丽娟, 马传国, 盖争艳. 黑豆油理化指标及脂肪酸组成分析 [J]. 粮食与油脂, 2010 (5): 23-24.
- [3] 陈静静, 沈旭, 唐谦为, 等. 超声波辅助提取黑豆油及其脂肪酸组成分析 [J]. 粮食科技与经济, 2013, 38 (6): 50-53.
- [4] 吴夏花, 陈树俊, 冯斌, 等. 低温冷榨黑豆油特征营养分析及抗氧化活性研究 [J]. 农产品加工 (创新版), 2011 (10): 64-69.
- [5] 李娜, 黄耀江. 植物油浸出技术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (6): 3 572-3 574.

- [6] 韩宗元, 江连洲, 李杨, 等. 水酶法提取大豆油的扩大试验研究 [J]. 中国粮油学报, 2015, 30 (2): 37-42.
- [7] 李杨, 张雅娜, 王欢, 等. 水酶法提取大豆油与其他不同种大豆油品质差异研究 [J]. 中国粮油学报, 2014, 29 (6): 46-52.
- [8] 王心刚, 江连洲, 李杨, 等. 真空挤压膨化水酶法提取大豆油的工艺研究 [J]. 中国粮油学报, 2013, 28 (11): 28-31.
- [9] 耿梦楠. 水酶法提取油莎豆油的研究 [J]. 煤炭与化工, 2015, 38 (9): 53-55.
- [10] 金婷, 谭胜兵. 水酶法提取石榴籽油工艺条件探究 [J]. 农产品加工 (学刊), 2014 (10): 42-44. ◇