

响应面法优化火麻仁油水酶法提取工艺研究

所怡祯, 张玉红*

东北林业大学化学化工与资源利用学院, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2024年3月28日; 录用日期: 2024年5月17日; 发布日期: 2024年5月28日

摘要

本文以火麻仁为原料, 采用水酶法提取火麻仁油, 在确定碱性蛋白酶为最佳提取酶的条件下。在单因素实验(酶解时间、酶解温度、pH值和料液比)的基础上, 利用Design-Expert V8.0.6.1试验设计软件的Box-Behnken Design多因素试验方法, 进行响应面法分析, 优化水酶法提取火麻仁油的工艺条件。结果表明: 在碱性蛋白酶的作用下, 料液比为1:6时, 酶解温度52°C, 酶解时间2 h, 酶解pH为9.2的条件下, 火麻仁油的得率理论值可达36.30%。按照最佳提取工艺条件获得火麻仁油的利率为36.22% ± 0.05, 经方差分析实际值与理论值差异不显著($P > 0.05$), 表明该最优提取工艺稳定可靠, 能用于火麻仁油的提取, 这为火麻及火麻仁的进一步开发利用提供实验基础和数据支撑。

关键词

火麻, 种子油, 水酶法, 响应面法, 提取工艺

Optimization of Aqueous Enzymatic Extraction Technology of Hemp Seed Oil by Response Surface Methodology

Yizhen Suo, Yuhong Zhang*

College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

Received: Mar. 28th, 2024; accepted: May 17th, 2024; published: May 28th, 2024

Abstract

In this paper, seed oil of hemp was extracted by aqueous enzyme method, and alkaline protease

*通讯作者。

was determined as the best extraction enzyme. On the basis of single factor experiments (enzymolysis time, enzymolysis temperature, pH value and solid-liquid ratio), response surface analysis was carried out using Box-Behnken Design multi-factor test method of Design-Expert V8.0.6.1 test Design software, and the technological conditions of aqueous enzymatic extraction of hemp seed oil were optimized. The results showed that under the condition of solid to liquid ratio 1:6, hydrolysis temperature 52°C, enzymolysis time 2 h and pH 9.2, the theoretical yield of hemp seed oil could reach 36.30%. According to the optimal extraction conditions, the yield of hemp seed oil was 36.22% ± 0.05, and there was no significant difference between the actual and the theoretical value by variance analysis ($P > 0.05$), indicating that the optimal extraction process was stable and reliable, and could be used for the extraction of hemp seed oil, which provided experimental basis and data support for the further development and utilization of hemp seed.

Keywords

Cannabis sativa L., Seed Oil, Aqueous Enzymatic Extraction, Response Surface Methodology, Extraction Technology

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

火麻仁是桑科(Moraceae)植物大麻(*Cannabis sativa* L.)的干燥成熟去壳的种子, 又称大麻仁、麻子仁、大麻子, 是一种药食同源的植物资源。火麻广泛分布于中国东北、华北、华南等地[1] [2] [3]。研究表明, 火麻仁富含蛋白质、脂肪油、纤维素、维生素等成分[4], 具有良好的镇痛、抗炎[5]、抗血栓[6]、抗氧化[7]、改善学习和记忆功能[8]等作用。火麻仁油是火麻仁经过物理冷榨或亚临界低温萃取出的植物油, 在火麻仁中其含量可达 30%以上, 新鲜的火麻仁油在常温下呈黄绿色, 储藏过程中逐渐变成黄棕色。火麻仁油含有大量的脂肪酸, 其中不饱和脂肪酸含量高达 89.85%~91.75% [9]。火麻仁油具有降血脂[10]、抗衰老[11]、改善记忆力[12]等作用, 是一种高品质的功能性油脂[13]。长期食用火麻仁油可对便秘、瘫痪、高血脂等有较好的辅助疗效, 外用火麻仁油可对神经性皮炎有辅助疗效。

目前火麻仁油的提取方法有冷榨法、索式抽提法、热榨法等[14], 其中最佳提取方法是索式抽提法。但索式抽提法耗时长, 效率低。水酶法是上世纪末出现的一种新型油脂提取技术, 具有出油率高、油品质量好、不需要精炼、没有废水与废渣、对环境不会造成污染等优点, 虽在提取过程中容易形成乳化层, 对提取率有一定影响[15], 但由于其具有效率高、条件温和、不破坏植物油中天然成分, 被广泛应用于植物油脂的提取, 如山核桃油[16]、红花籽油[17]等。本试验以火麻仁为原材料, 利用水酶法提取火麻仁油, 并采用 Box-Behnken Design 响应面优化法对工艺参数进行优化。本研究为火麻仁油的进一步研究及综合利用提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

火麻仁, 采自黑龙江省北安建设农场; 碱性蛋白酶(2×10^5 U/g)、酸性蛋白酶(7×10^5 U/g)、中性蛋白酶(50 U/mg)、纤维素酶(5×10^5 U/mg)和果胶酶(3×10^4 U/g), 上述药品均购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 蒸馏水: 自制, 其他试剂均为分析纯。

2.2. 仪器与设备

电子天平: 北京赛多利斯科学仪器有限公司; 200 克摇摆式高速中药粉碎机: 浙江温岭市创立药材器械厂; 恒温振荡器: 常州国华电器有限公司; 数显恒温水浴锅: 常州朗越仪器制造有限公司; 台式高速离心机: 湖南湘立科学仪器有限公司。

2.3. 火麻仁油提取方法

称取 5 g 火麻仁, 粉碎, 按一定料液比与不同 pH 的蒸馏水混合, 置于恒温振荡器中预热 15 min, 加入一定量的酶, 恒温震荡酶解一定时间后, 置于 100℃ 的恒温水浴锅中灭酶 10 min, 在 12,000 r/min 条件下离心 15 min, 用 1 mL 移液枪小心移取上层清油和少许的乳化层装入 10 mL 离心管, 二次离心, 再移取上层清油, 称得清油质量, 计算火麻仁油的得率。

2.4. 火麻仁油提取方法

2.4.1. 最佳酶确定

称取 5 g 火麻仁, 粉碎。固定酶解时间和料液比, 以得率为指标, 在 5 种酶的最适温度和 pH 下, 选择最佳单一酶(表 1)。

Table 1. The optimum catalytic conditions of hydrolase

表 1. 水解酶的最佳催化条件

水解酶	纤维素酶	果胶酶	碱性蛋白酶	中性蛋白酶	酸性蛋白酶
pH	5	3	3	7	10
温度	50	50	45	45	50

2.4.2. 单因素实验

按照 2.3 的方法提取火麻仁油, 以料液比 1:4、酶解时间 1 h、酶解温度 50℃, pH 为 9.0 为基本提取条件, 采用控制单一变量的方法, 分别测定酶解时间(0.5、1、1.5、2 和 2.5 h)、酶解温度(40、45、50、55 和 60℃)、pH 值(8、8.5、9、9.5 和 10)和料液比(1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7)对火麻仁油得率的影响。

2.4.3. 响应面实验

根据单因素实验结果, 选择对指标有显著影响的因素, 以酶解时间(A)、酶解温度(B)和 pH 值(C)为响应面自变量, 以火麻仁油得率为响应值, 利用 Design-Expert V8.0.6.1 试验设计软件的 Box-Behnken Design 多因素试验方法, 以随机次序进行, 重复 3 次获得响应值, 实验因素水平见表 2。

Table 2. Experimental factors and levels of response surfaces

表 2. 响应面实验因素与水平

水平	酶解时间(A)/h	酶解温度(B)/°C	pH 值(C)
-1	1	40	8
0	2	50	9
1	3	60	10

2.5. 数据处理

Box-Behnken 试验方法使用 Design Expert V8.0.6.1 软件设计分析, 利用 Microsoft Excel 进行数据整理, 使用 Origin 9.0 软件作图, 采用 SPSS 25.0 软件进行数据统计及分析, 方差分析采用单因素 ANOVA

分析, 每组处理均重复 3 次, 数据结果以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示。

3. 结果与讨论

3.1. 单一酶确定结果

酶通过水解可破坏植物细胞壁, 使得细胞内油脂释放。本实验使用了酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、果胶酶和纤维素酶 5 种酶对粉碎后的火麻仁进行水解, 以加相同量的蒸馏水为对照, 对火麻仁中种油进行提取, 提取结果如图 1 所示。以添加碱性蛋白酶水解获得的得率是最高的, 纤维素酶最低, 但也高于对照。因此本实验选用碱性蛋白酶进行酶解提取的最佳酶。

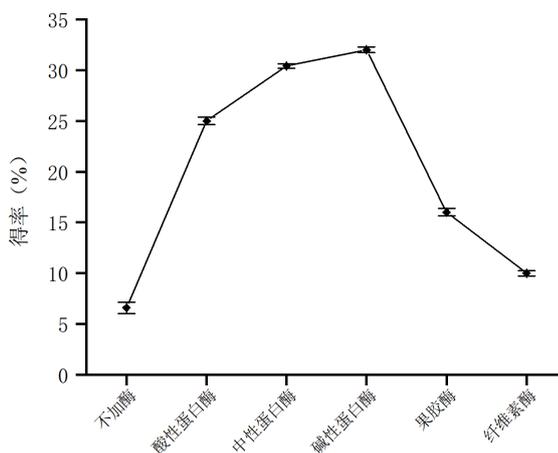


Figure 1. Yield of hemp seed oil extracted by five hydrolases
图 1. 5 种水解酶提取火麻仁油的得率

3.2. 单因素实验结果

3.2.1. pH 值的选择

由图 2 可知, 火麻仁油得率随提取液碱强, pH 值增大呈先上升后下降趋势。当 pH = 9 时, 火麻仁油得率最高, 这说明碱性蛋白酶在 pH = 9 时的酶活力最大, 而 pH 值偏高或者偏低都会影响酶的活力而导致提取得到火麻仁油降低。因此响应面实验设计中最佳 pH 值选择为 9。

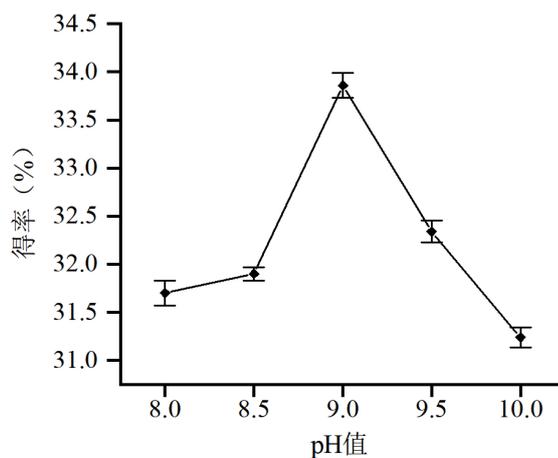


Figure 2. Effect of pH value on the yield of hemp seed oil
图 2. pH 值对火麻仁油得率的影响

3.2.2. 料液比的选择

当底物量一定, 料液比较小时, 溶液浓度高, 黏度大, 蛋白质分子不易扩散, 导致火麻仁油得率较低。随着料液比不断升高, 溶液浓度降低, 细胞壁内外浓度差增大, 分子扩散加快, 会提取出更多的火麻仁油。由图 3 可知, 在一定条件下, 随溶液是物料倍数增大时, 提取出的火麻仁油的量随之增加, 当料液比达到 1:6 时, 火麻仁油提取量达到最大, 料液比达到 1:7 和 1:8 时, 火麻仁油的量稍有增加。但得到的值与 1:6 时相比, 经方差分析, 差异不显著($P > 0.05$), 是因为细胞壁内外浓度差减小并趋于平衡, 传质效率趋于最大。因此, 本实验设计中最佳料液比选择为 1:6。

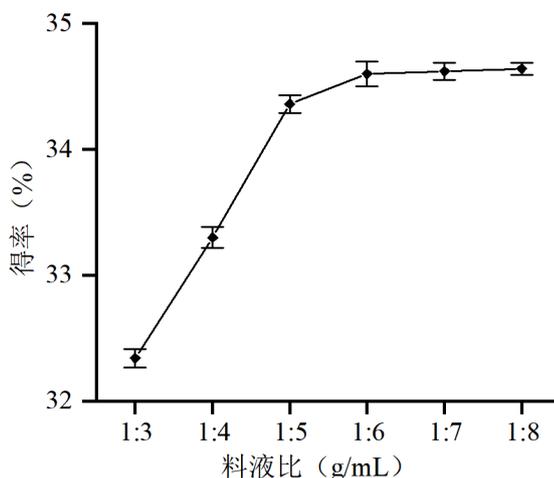


Figure 3. Effect of solid-liquid ratio on the yield of hemp seed oil
图 3. 料液比对火麻仁油得率的影响

3.2.3. 酶解温度的选择

当不同酶解温度下火麻仁油得率见图 4 所示。随酶解温度上升, 提取得到的火麻仁油量随之增大, 当酶解温度为 50℃时, 所得到的火麻仁油最高, 继续升高酶解温度会导致火麻仁油的提取量减小, 该为碱性蛋白酶的酶解最适温度为 50℃。温度过高或过低都会使酶的活性受到抑制, 而导致提取出的油量降低。因此最佳酶解温度选择为 50℃。

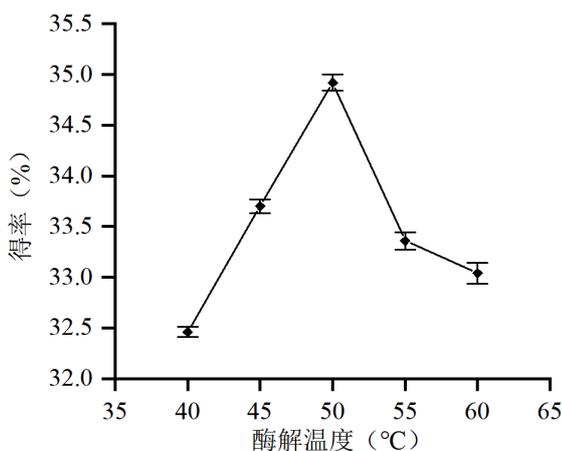


Figure 4. Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the yield of hemp seed oil
图 4. 酶解温度对火麻仁油得率的影响

3.2.4. 酶解时间的选择

酶解时间可以调节酶对细胞膜的破坏程度。从图 5 可知, 随酶解时间的延长, 提取的火麻仁油的量大幅度增加, 但酶解时间超过 2 h, 得到的油量虽有所升高, 但经方差分析, 差异不显著($P > 0.05$)。这说明随着酶解反应进行, 反应底物不断减少, 所得到的产物虽有所增加但会增大时间和其它能源成本。而且酶解时间过长也会影响油的品质。因此, 最佳酶解时间选择为 2 h。

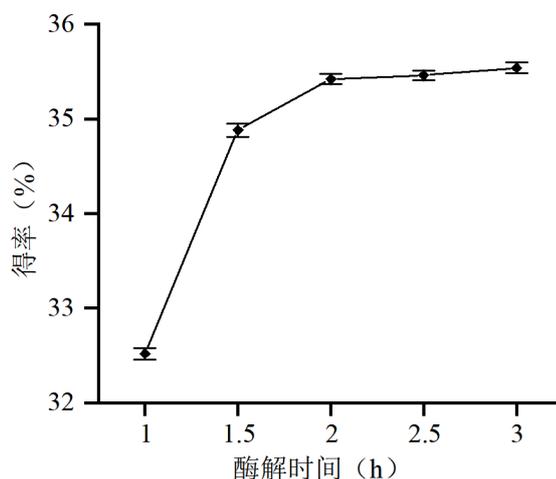


Figure 5. Effect of enzymatic hydrolysis time on the yield of hemp seed oil
图 5. 酶解时间对火麻仁油得率的影响

3.3. 响应面实验结果

3.3.1. 模型建立及方差分析

为进一步研究各因素之间的相互作用及影响, 根据单因素的实验结果, 选择对火麻仁油提取影响相对较大三种因素: 酶解时间(A)、酶解温度(B)和 pH 值(C), 以火麻仁油提取率(Y)为响应值, 利用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件中的 Box-Behnken Design 进行实验设计, 共 17 组实验, 结果见表 3 所示。使用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件对表 3 中的数据进行分析, 并进行多项回归拟合, 得到以响应值(Y)为目标函数的二次多元回归方程: $Y = 36.12 + 0.54A + 0.55B + 0.30C - 0.24AB - 0.30AC - 0.16BC - 0.57A^2 - 0.62B^2 - 0.46C^2$ 。

由表 4 可知, 建立的模型 $P < 0.0001$, 表明该模型差异极显著; 失拟项 $P = 0.0683 > 0.05$, 失拟项不显著, 表明建立的模型拟合程度良好。模型 $R^2 = 0.9750$, 表明该回归方程具有较好的相关性; $R^2_{Adj} = 0.9428$, 表明火麻仁含油率的变化有 94.28% 是因为酶解时间、酶解温度、pH 和料液比三个提取条件; 变异系数(CV) = 0.55% < 10%, CV 越小, 实验结果越稳定, 这表明本实验具有较高的可信度和精确度; 精密度(Adeq Precision) = 16.755 > 4, 表明本实验合理。从表 3 中可以看出, 拟合的回归方程符合检验原则, 适应性较好, 使用此模型进行分析响应值的变化, 能较好的反映真实的试验值。

Table 3. Experimental results of response surfaces

表 3. 响应面实验结果

编号	酶解时间(A)/h	酶解温度(B)/°C	pH 值(C)	火麻仁油得率/%
1	1	50	10	35.36 ± 0.08
2	2	40	8	34.11 ± 0.06

续表

3	2	50	9	36.15 ± 0.07
4	1	40	9	33.42 ± 0.09
5	3	60	9	35.96 ± 0.08
6	1	60	9	35.08 ± 0.12
7	3	40	9	35.28 ± 0.11
8	2	40	10	34.92 ± 0.08
9	2	50	9	36.28 ± 0.07
10	3	50	10	35.54 ± 0.06
11	2	60	8	35.48 ± 0.07
12	2	50	9	35.96 ± 0.12
13	1	50	8	34.05 ± 0.14
14	2	50	9	36.11 ± 0.06
15	3	50	8	35.41 ± 0.08
16	2	60	10	35.64 ± 0.09
17	2	50	9	36.09 ± 0.07

3.3.2. 各因素交互作用分析

各因素的 F 值可以反映出对响应指标的显著程度, F 值越大, P 值越小, 意味着对响应指标的影响越大。由表 4 可知, 3 个提取条件对火麻仁的得率影响的主次顺序: $B > A > C$, 即酶解温度 > 酶解时间 > pH, 三个因素对火麻仁油得率影响均极显著 ($P < 0.01$)。pH、酶解温度和酶解时间交互作用对火麻仁油得率影响的响应面及等高线见图 6。由图 6 和表 4 可知, 酶解温度和 pH (B 和 C) 的交互作用对火麻仁油得率影响最小; 酶解时间和酶解温度 (A 和 B) 与酶解时间和 pH (A 和 C) 的交互作用对火麻仁油得率影响显著 ($P < 0.05$), 这一结果与回归方程方差分析一致。二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 的 P 值均 < 0.01 , 对结果影响极显著。

3.4. 最佳提取工艺验证

利用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件对三个提取条件进行优化, 通过数据分析得出水酶法提取火麻仁油的最优提取条件: 酶解时间 2.20 h, 酶解温度 52°C, pH = 9.2, 在此条件下, 火麻仁油得率理论值为 36.30%。按照最佳提取条件平行实验三次, 得到火麻仁油得率的平均值为 36.22% ± 0.05, 结果与理论值方差分析差异不显著 ($P > 0.05$), 表明回归方程可以较好的预测本实验结果, 最佳提取工艺条件较为可靠。

4. 结论

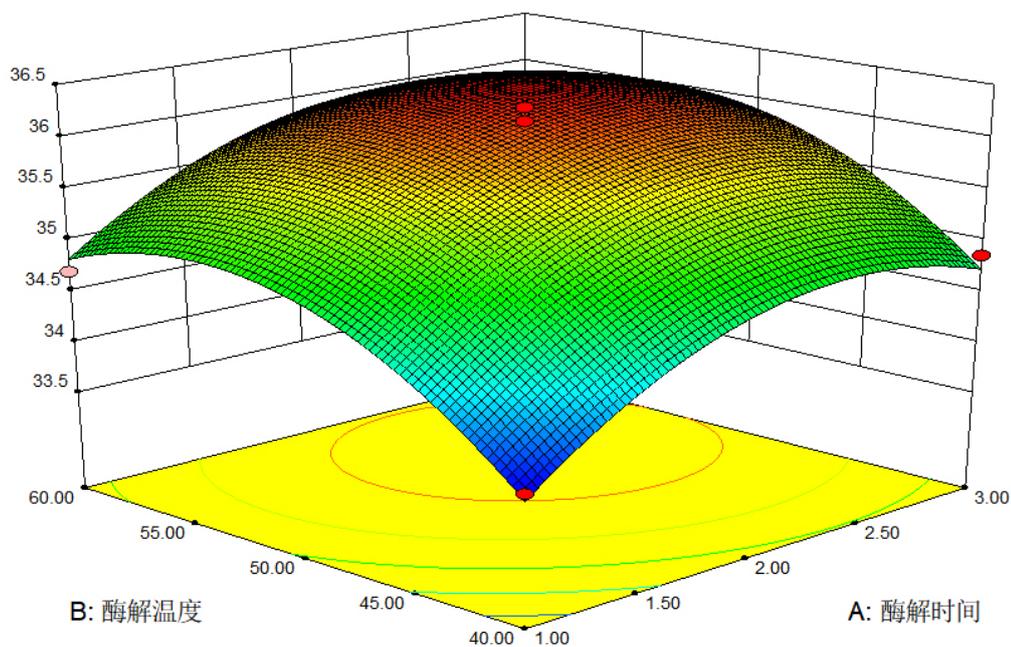
由于火麻仁油中富含 ω -3、 ω -6、 ω -9 等多种不饱和脂肪酸及多种活性物质, 具有预防和辅助治疗心脑血管病(高血压、高血脂、高血糖)的保健功效, 并且能够增加机体免疫力, 调节人体内环境, 清除细胞自由基, 延续衰老。因此提高和优化火麻仁油的提取纯化工艺, 具有重要意义。本文采用水酶法, 首先确定碱性蛋白酶为最优提取酶, 通过单因素结合响应面法, 研究了火麻仁油水酶法提取工艺。得出在料

液比为 1:6 时, 酶解温度 52℃, 酶解时间 2 h, 酶解 pH 为 9.2 的条件下, 火麻仁油得率为 $36.22\% \pm 0.05$, 经多次实验, 该提取工艺稳定可靠, 能够用于工业生产。

Table 4. Analysis of variance for regression equation
表 4. 回归方程的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	10.46	9	1.16	30.30	<0.0001	**
A-酶解时间	2.29	1	2.29	59.70	0.0001	**
B-酶解温度	2.45	1	2.45	63.95	<0.0001	**
C-pH 值	0.73	1	0.73	18.93	0.0034	**
AB	0.24	1	0.24	6.26	0.0409	*
AC	0.35	1	0.35	9.08	0.0196	*
BC	0.11	1	0.11	2.75	0.1410	
A^2	1.35	1	1.35	35.07	0.0006	**
B^2	1.61	1	1.61	41.89	0.0003	**
C^2	0.90	1	0.90	23.51	0.0019	**
残差	0.27	7	0.038			
失拟	0.22	3	0.072	5.41	0.0683	不显著
误差	0.053	4	0.013			
总和	10.7	16				

注: *表示 $P < 0.05$, 差异显著; **表示 $P < 0.01$, 差异极显著。



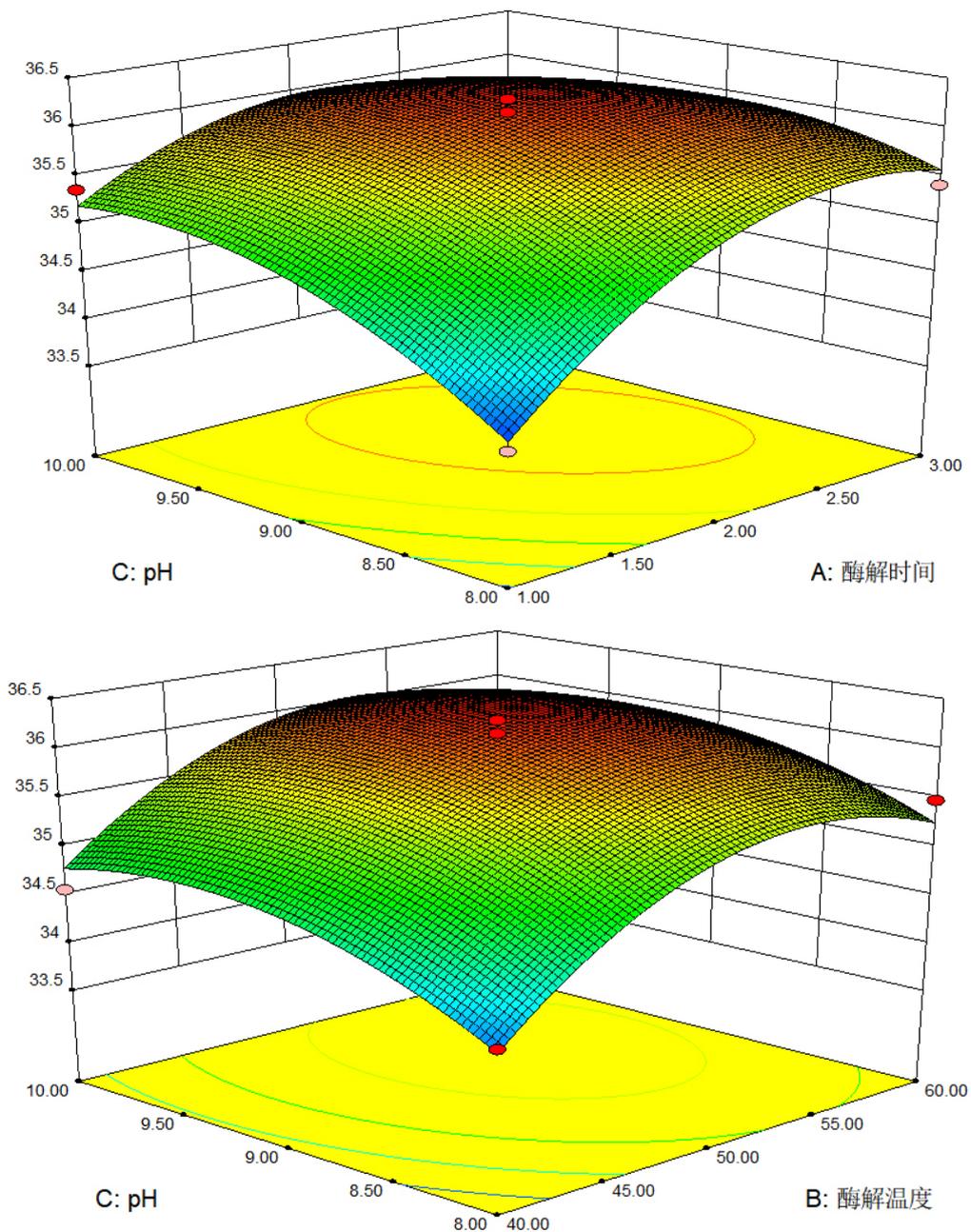


Figure 6. Effects of the interaction of various factors on the yield of hemp seed oil. A: Interaction between enzymatic hydrolysis time and temperature; B: Interaction between enzymatic hydrolysis time and pH; C: Interaction between enzymatic hydrolysis temperature and pH

图 6. 各因素交互作用对火麻仁油得率的影响。A: 酶解时间与酶解温度交互作用; B: 酶解时间与 pH 交互作用; C: 酶解温度与 pH 交互作用

参考文献

- [1] 王化东, 卫莹芳, 郭山山, 等. 不同产地火麻仁品质评价[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(17): 3782-3785.
- [2] Vonapartis, E., Aubin, M.P., Seguin, P., *et al.* (2015) Seed Composition of Ten Industrial Hemp Cultivars Approved for Production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, **39**, 8-12.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.004>

- [3] Hadnadev, M., Dapčević-Hadnadev, T., Lazaridou, A., *et al.* (2018) Hempseed Meal Protein Isolates Prepared by Different Isolation Techniques. Part I. Physicochemical Properties. *Food Hydrocolloids*, **79**, 526-533. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.015>
- [4] 林金莺, 曾庆孝. 新型食品营养源——火麻仁[J]. 中国调味品, 2008, 33(5): 22-25.
- [5] Luo, Q., Yan, X., Bobrovskaya, L., *et al.* (2017) Anti-Neuroinflammatory Effects of Grossamide from Hemp Seed via Suppression of TLR-4-Mediated NF- κ B Signaling Pathways in Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglia Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **428**, 129-137. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2923-7>
- [6] 张明发, 沈雅琴, 朱自平, 等. 火麻仁的镇痛、抗炎、抗血栓形成作用研究[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(1): 13-15.
- [7] 吴娜, 沈谦, 蔡光明, 等. 巴马火麻仁木脂素酰胺类提取物的鉴定及清除自由基活性的研究[J]. 化学学报, 2009, 67(7): 700-704.
- [8] Luo, J., Yin, J.H., Wu, H.Z., *et al.* (2003) Extract from Fructus Cannabis Activating Calcineurin Improved Learning and Memory in Mice with Chemical Drug-Induced Dysmnnesia. *Acta Pharmacologica Sinica*, **24**, 1137-1142.
- [9] 廖丽萍, 肖爱平, 冷鹃, 等. 火麻仁冷榨油脂脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(12): 42-44.
- [10] 萧闵, 李全胜. 火麻仁油与藻油混合物对营养肥胖大鼠的降脂减肥作用研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2016(18): 12-15.
- [11] 赵庄. 火麻仁油的药理功能及安全性研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(21): 319-323.
- [12] Yan, X., Tang, J., dos Santos Passos C., *et al.* (2015) Characterization of Lignanamides from Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed and Their Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 10611-10619. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05282>
- [13] 韦凤, 涂冬萍, 王柳萍. 火麻仁食用开发和药理作用研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(12): 3486-3488.
- [14] 谭晓舒. 巴马火麻仁油成分及氧化稳定性的研究[D]: [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2023.
- [15] 郝佳, 许朵霞, 王振华, 等. 水酶法提取稻米油形成乳状液的破乳技术研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(3): 12-17.
- [16] 季泽峰, 方学智, 宋丽丽, 等. 水酶法提取山核桃油工艺及其对油脂品质影响[J]. 食品工业, 2019, 40(2): 73-77.
- [17] 范康俊, 吴士筠, 艾廷阳, 等. 水酶法提取红花籽油的工艺优化及其抗氧化性研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(8): 61-65+94.