

百香果籽油超临界 CO₂ 萃取工艺优化 及其体外抗氧化活性

Optimization of supercritical CO₂ extraction for passion fruit seed oil
by response surface methodology and investigation
of antioxidant activities of extracted oil in vitro

马金魁¹ 李珂² 韦炳墩¹ 姚紫婷¹ 黄晓辰³

MA Jin-kui¹ LI Ke² WEI Bing-dun¹ YAO Zi-ting¹ HUANG Xiao-chen³

(1. 肇庆学院化学化工学院, 广东 肇庆 526061; 2. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128;

3. 肇庆学院生命科学学院, 广东 肇庆 526061)

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China;

2. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;

3. College of Life Science, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China)

摘要:以百香果为原料,在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 响应面分析,优化超临界 CO₂ 萃取百香果籽油的工艺,并对百香果籽油的体外抗氧化活性进行研究。结果表明,超临界 CO₂ 萃取百香果籽油的最佳工艺为萃取温度 53.1 °C,萃取压力 33.9 MPa,萃取时间 3.6 h,百香果籽出油率值为 26.95%,所得百香果籽油具有较好的还原力,且呈量效关系,对 DPPH· 的清除能力达 80%。超临界 CO₂ 萃取百香果籽油工艺稳定可行,提取的百香果籽油具有抗氧化活性,是一种潜在可用的天然抗氧化资源。

关键词:百香果;籽油;超临界 CO₂ 萃取;抗氧化性

Abstract: The Box-Behnken design and response surface methodology (RSM) were employed to optimize the process parameters of supercritical carbon dioxide extraction of the passion fruit seed oil and the antioxidant activities of the extracts was also investigated in this study. Results obtained from the RSM showed that the optimum extraction process parameters within the experimental ranges would be the extraction temperature of 53.1 °C, pressure of 33.9 MPa, and extraction time of 3.6 h. Under these conditions, the oil yield was 26.95%. The results of the antioxidant experimental

also showed that the extracted oil have a potent reducing power and the relative antioxidant ability of oil to scavenge the DPPH· radicals was found to be 80%. Based on these results it can be concluded that supercritical carbon dioxide extraction could be applied to the oil extraction of the passion fruit and the extracted oil have shown promise as a natural antioxidant resource.

Keywords: passion fruit; seed oil; supercritical CO₂ extraction; antioxidant activities

百香果(*Passiflora edulis Sims*)又名西番莲、鸡蛋果,是一种源自南美洲的多年生长青藤本类双子叶植物。中国于 20 世纪初引种栽培,现广泛栽植于南方热带、亚热带地区^[1]。百香果果瓤汁多,香味浓郁,富含多种植物蛋白、多糖、维生素、氨基酸和微量元素,具有极高的营养价值^[2]。每颗百香果包含种籽约 160 粒,约占果重 10%,含油量可达 28.2%,籽仁含油率超过 60%。其中不饱和脂肪酸含量高达 80% 以上,可以帮助人体清除游离的自由基,延缓自然衰老,辅助多种维生素的吸收。

目前,随着国际市场对百香果果汁需求份额的增大,一些热带、亚热带栽植地区掀起了种植百香果的高潮。但大部分百香果籽仍是果汁加工产业的废弃物,仅少部分被加工为动物饲料的添加物。迄今为止,对百香果籽油营养价值、生理活性和潜在应用价值的研究也较少,许晓静等^[3]利用索氏提取获得百香果籽油,并对其理化性质及抗氧化活性进行研究;程谦伟等^[4]研究了利用响应面优化超声辅助提取百香果籽油的工艺参数;何冬梅等^[5]用水蒸气蒸馏法和索氏法提取

基金项目:广东省青年创新人才项目(编号:2016KQNCX176, 2015KQNCX182);广东大学生科技创新培育专项资金(编号:pdjh2017b0552, pdjh2017b0550);大学生创新创业训练计划项目(编号:201610580057)

作者简介:马金魁,男,肇庆学院讲师,博士。

通信作者:李珂(1982—),男,湖南农业大学实验师,博士研究生。

E-mail: Leekel4@163.com

收稿日期:2017-05-16

百香果籽挥发油,并利用 GC-MS 对所得挥发油的成分进行分析。

超临界 CO₂ 萃取是利用 CO₂ 在超临界状态下强大的溶解能力和在非超临界状态下低溶解能力的特性,实现对目标物质的分离和提取^[6]。与其他萃取方法相比,超临界 CO₂ 萃取技术传质速率快、提取率高,操作条件温和、无氧,可减少萃取过程中不饱和脂肪酸的氧化,且萃取后处理简单,无有机溶剂残留^[7],在油脂萃取领域有诸多研究报道^[8-9]。本研究拟采用超临界 CO₂ 萃取技术提取百香果籽油,以提取率为指标,在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 响应面分析对影响萃取工艺的主要参数进行优化,建立超临界 CO₂ 萃取百香果籽油的数学模型,优选出最佳工艺条件,并对提取所得籽油进行体外抗氧化活性分析,以期为百香果籽潜在价值的充分利用和开发提供有效的研究依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

百香果籽:挑选市售新鲜紫色百香果,取其籽粒,清除表面杂质,置于通风处过夜晾干。将阴干的百香果籽放入热风干燥箱中 105 ℃ 干燥至恒重,放入中药粉碎机粉碎,得均匀的百香果籽粉末;

CO₂ 气体:纯度 > 99.9%,广州市广气气体有限公司;

V_C:分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;

1,1-二苯基-2-苦肼基 (DPPH):分析纯,美国 Sigma 公司;

其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

离心机:TDL-40B 型,上海安亭科学仪器厂;

中药粉碎机:DFY-600C 型,温岭林大机械有限公司;

电热鼓风干燥箱:DHG-9055A 型,上海一恒科学仪器有限公司;

真空干燥箱:DZF-6050 型,上海一恒科学仪器有限公司;

分光光度计,V-1100D 型,上海美普达仪器有限公司;

超临界 CO₂ 萃取仪:1L-SFE 型,广州美晨高新分离技术有限公司;

电子天平:BSA124S-CW 型,赛多利斯科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 百香果籽油超临界 CO₂ 提取工艺流程

百香果籽 → 烘干 → 破碎 → 过筛 → 称量 → 装入萃取器 → 设定 CO₂ 流量 → 控制萃取条件 (压力、温度、时间等) → 超临界 CO₂ 萃取 → 分离 → 百香果籽油

1.3.2 百香果籽油萃取率 按式(1)计算。

$$E = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

E ——萃取率, %;

m_1 ——萃取百香果籽油质量, g;

m_2 ——样品质量, g。

1.3.3 单因素试验设计 分别以萃取温度、萃取压力、萃取时间为变量,以籽油提取率为评价指标,进行单因素试验,确定各影响因素的适宜范围。

(1) 萃取温度对籽油提取率的影响:在萃取压 30 MPa 条件下,分别在 30, 40, 50, 60, 70 ℃ 萃取 3.0 h,考察温度对籽油提取率的影响。

(2) 萃取压力对籽油提取率的影响:选取萃取温度 50 ℃,分别在 20, 25, 30, 35, 40 MPa 萃取 3.0 h,考察压力对籽油提取率的影响。

(3) 萃取时间对籽油提取率的影响:在萃取压力 30 MPa,萃取温度 50 ℃ 条件下,分别萃取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h,考察萃取时间对籽油提取率的影响。

1.3.4 响应面优化试验设计 在单因素试验的基础上,以萃取温度、萃取压力、萃取时间为自变量,以提取率为响应值,根据 Box-Behnken 中心旋转组合设计,采用三因素三水平响应面分析法进行响应面分析,对百香果籽油萃取工艺进行优化。

1.3.5 百香果籽油体外抗氧化活性测定

(1) DPPH· 清除能力的测定:分别取不同质量浓度的百香果籽油溶液 2 mL,各加入 0.04 mg/mL 的 DPPH-乙醇溶液 2.0 mL,混合均匀,于常温下避光反应 30 min,以无水乙醇为空白在 517 nm 波长处测吸光度,以 V_C 为阳性对照,按式(2)计算 DPPH· 的清除率。

$$K = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_s}{A_{\text{DPPH}}} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

K ——DPPH· 清除率, %;

A_{DPPH} ——DPPH 溶液的吸光度;

A_s ——添加百香果籽油或 V_C 的 DPPH 溶液的吸光度。

(2) 还原力的测定:采用普鲁士蓝法测定百香果籽油还原 Fe³⁺ 的能力^[10]。分别取不同质量浓度的百香果籽油溶液 1.0 mL,加入 pH 6.6 的磷酸盐缓冲溶液 2.0 mL 和 1% 的铁氰化钾溶液 1.0 mL,充分摇匀混合,置于 50 ℃ 恒温水浴锅中保温 25 min。冷却后加入 10% 三氯乙酸溶液 1 mL,充分混合,于 3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液 1.0 mL 于试管中,再加入 0.1% FeCl₃ 溶液 1.0 mL 和蒸馏水 2.0 mL,充分混匀,常温反应 5 min 后于 700 nm 波长处测定其吸光度 A₁,甲醇代替百香果籽油溶液作为空白对照 A₀,以 V_C 为阳性对照,按式(3) 计算百香果籽油的总还原能力。

$$A = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

A ——百香果籽油的总还原能力, %;

A_0 ——甲醇空白对照吸光度;

A_1 ——百香果籽油溶液吸光度。

2 结果与分析

2.1 百香果籽油超临界 CO₂ 萃取工艺的优化

2.1.1 响应面法试验设计 由单因素试验可知,超临界 CO₂

萃取百香果籽油的较优温度范围为 45~55 ℃,压力范围为 25~35 MPa,提取时间范围在 2~4 h。在此基础上,采用响应面分析法对百香果籽油提取工艺参数进行优化,Box-Behnken 试验设计因素与水平见表 1,试验结果见表 2。

表 1 响应面分析法的因素与水平

Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

| 水平 | A 萃取温度/℃ | B 萃取压力/MPa | C 萃取时间/h |
|----|----------|------------|----------|
| -1 | 45 | 25 | 2 |
| 0 | 50 | 30 | 3 |
| 1 | 55 | 35 | 4 |

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and corresponding results for response surface analysis

| 试验号 | A | B | C | 提取率/% |
|-----|----|----|----|-------|
| 1 | 0 | 1 | -1 | 19.22 |
| 2 | -1 | 1 | 0 | 26.34 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 21.11 |
| 4 | 0 | 1 | 1 | 21.60 |
| 5 | -1 | -1 | 0 | 26.42 |
| 6 | 1 | 1 | 0 | 18.70 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 22.44 |
| 8 | 1 | -1 | 0 | 19.45 |
| 9 | 1 | 0 | 1 | 20.79 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 21.42 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 19.20 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 26.51 |
| 13 | 0 | -1 | -1 | 25.89 |
| 14 | 1 | 0 | -1 | 25.80 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 25.69 |
| 16 | -1 | 0 | -1 | 25.31 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 25.30 |

对表 2 中的数据进行多元回归拟合,得到拟合方程为:

$$Y = -180.788 + 5.758A + 2.916B + 1.698C + 0.047AB + 0.105AC + 0.141BC - 0.072A^2 - 0.088B^2 - 1.502C^2 \quad (4)$$

2.1.2 回归方程的检验 对回归模型进行方差分析,以检验方程的有效性。由表 3 可知,该模型极显著($P < 0.000 1$),且方差的失拟项不显著($P = 0.181 2 > 0.05$),表明非试验因素对试验结果影响不大,模型选择适宜。决定系数 R^2 为 0.992 4,表明模型与实际试验拟合程度较好,可以此模型对超临界 CO₂ 萃取百香果籽油得率进行分析及预测。此外,从表 3 中还可看出,模型中 A、B、C、AB、BC、A²、B²、C² 项影响均极显著($P < 0.01$),AC 项影响也达到显著水平。

2.1.3 响应面交互作用分析 图 1 为萃取温度、压力和时间两两交互作用的响应面图和等高线图。

从等高线图中可以看出,萃取温度、压力和时间两两之

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance the regression model

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------|-----------|-----|----------|-----------|-----------|
| 模型 | 141.346 3 | 9 | 15.705 6 | 118.842 7 | < 0.000 1 |
| A | 15.235 2 | 1 | 15.235 2 | 115.286 6 | < 0.000 1 |
| B | 32.441 5 | 1 | 32.441 5 | 245.488 7 | < 0.000 1 |
| C | 36.765 3 | 1 | 36.765 3 | 278.207 4 | < 0.000 1 |
| AB | 5.452 2 | 1 | 5.452 2 | 41.257 6 | 0.000 4 |
| AC | 1.092 1 | 1 | 1.092 0 | 8.263 5 | 0.023 8 |
| BC | 1.988 1 | 1 | 1.988 1 | 15.044 2 | 0.006 1 |
| A ² | 13.626 9 | 1 | 13.626 9 | 103.116 7 | < 0.000 1 |
| B ² | 20.314 1 | 1 | 20.314 2 | 153.719 6 | < 0.000 1 |
| C ² | 9.492 6 | 1 | 9.492 6 | 71.831 9 | < 0.000 1 |
| 残差 | 0.925 1 | 7 | 0.132 2 | | |
| 失拟项 | 0.618 8 | 3 | 0.206 3 | 2.693 7 | 0.181 2 |
| 纯误差 | 0.306 3 | 4 | 0.076 6 | | |
| 总误差 | 142.271 4 | 16 | | | |

间均有显著交互作用。从响应面图中可以看出,提取率随萃取温度升高、压力增大和时间的延长均呈现先升后降的趋势,表明在一定的范围内萃取温度、压力和时间的增加,有利于百香果籽油的提取,但超过一定的温度、压力和时间,产物得率反而降低。可能原因在于:① 温度的升高使 CO₂ 流体黏度降低,提高了溶质与溶剂间的传质效率,且溶质的蒸汽压上升使其溶解度增大,有利于溶质萃取,但温度过高会使流体密度下降,导致其溶解度下降,不利于溶质的萃取;② 压力升高使流体密度增大,流体的溶剂化效应加强,传质效率增大,提取率增加,压力过高则导致流体选择性降低,溶质溶解增加变缓,不利于提取;③ 随着萃取时间的延长,传质达到良好的状态,溶质与溶剂接触充分,有利于萃取进行,但超过一定萃取时间,待萃组分含量明显减少,传质能力下降,导致萃取速率下降。

2.1.4 验证实验 采用响应面优化百香果籽油提取工艺,确定最终优化工艺条件为:萃取温度 53.1 ℃,萃取压力 33.9 MPa,萃取时间 3.6 h,在此条件下产物得率为 27.86%。为了检验该响应面法的可行性,利用所得最佳提取条件进行百香果籽油提取的验证实验。3 次平行实验结果的平均值为 26.95%,与理论值相差 0.91%,表明该响应面分析法对百香果籽油提取条件的优化切实可行。

2.2 百香果籽油体外抗氧化活性

2.2.1 对 DPPH· 的清除能力 DPPH· 是一种较为稳定的自由基,在 517 nm 波长处有强吸收,其醇溶液呈紫色,被广泛应用于评价抗氧化成分的自由基清除能力。自由基清除剂可与 DPPH· 的单电子配对,导致其在最大吸收波长处颜色变浅,吸光度也随之减小。DPPH· 清除率越高,表明该物质抗氧化能力越大^[1]。

由图 2 可知,百香果籽油有显著的清除 DPPH· 的活性,且清除率随质量浓度的增加而增大,呈现较好的量效关系。以 V_c 为参照,随着样品质量浓度的增加,百香果籽油对

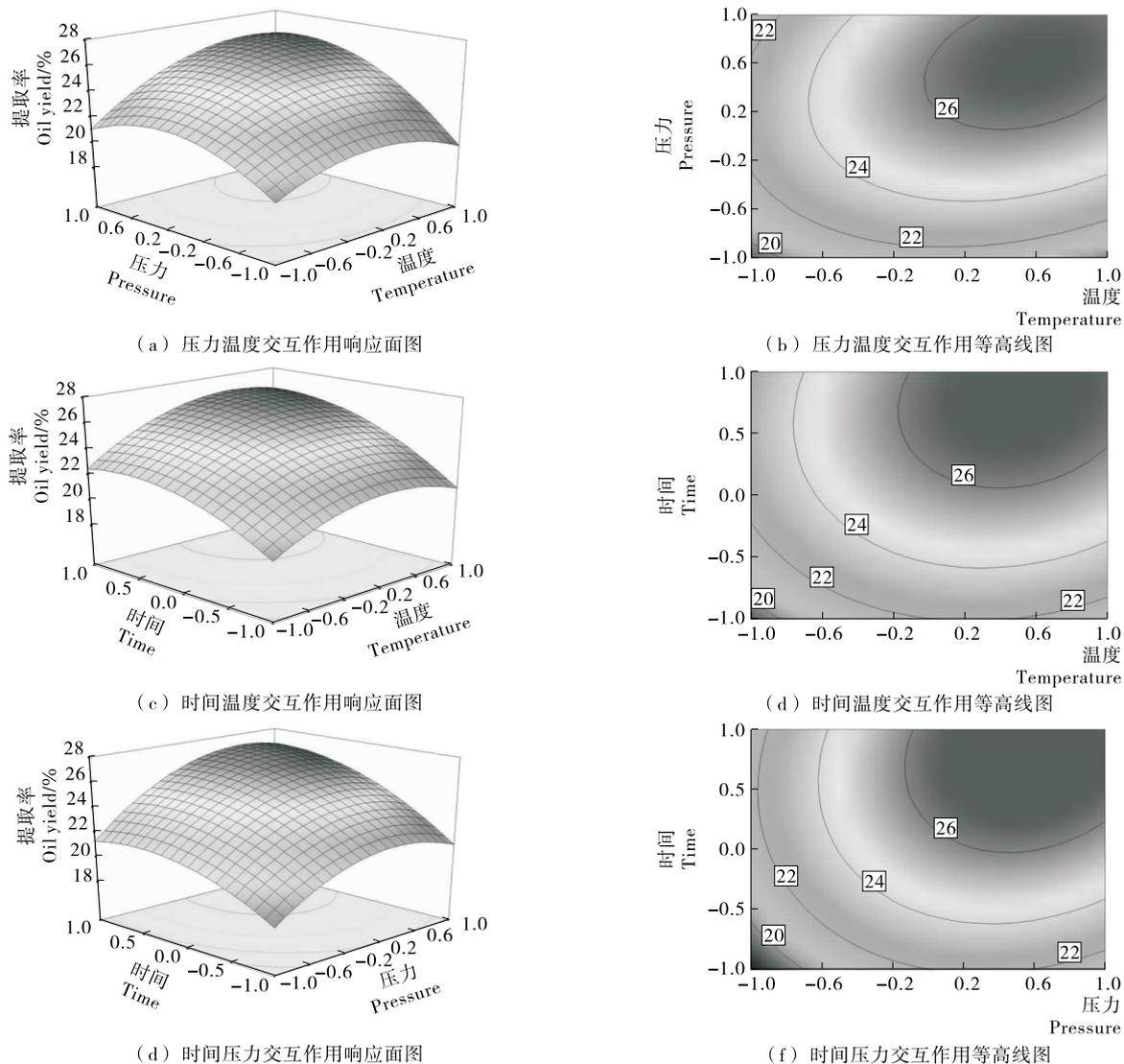


图 1 各因素交互作用对百香果籽油提取率的响应面和等高线图

Figure 1 Response surface and contour plots for the interaction effects of extraction parameters on the yield of Passion fruit seed oil

DPPH·的清除率逐渐增加,在质量浓度达 10 mg/mL 时,与 V_c 接近,清除率达 80%。

2.2.2 还原力测定 测定百香果籽油对 Fe^{3+} 的还原力,本质

是对其供电子能力进行检验。理论上,还原力强的物质能更好地提供电子。通常,样品抗氧化能力的强弱可由其还原能力的大小间接反映出来。由图 3 可知,不同质量浓度的百香果籽油和 V_c 均对 Fe^{3+} 具有一定的还原能力。尽管在相同

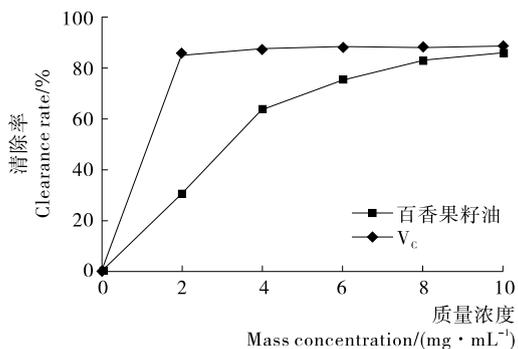


图 2 百香果籽油对 DPPH· 的清除能力

Figure 2 DPPH radical-scavenging activity of passion fruit seed oil

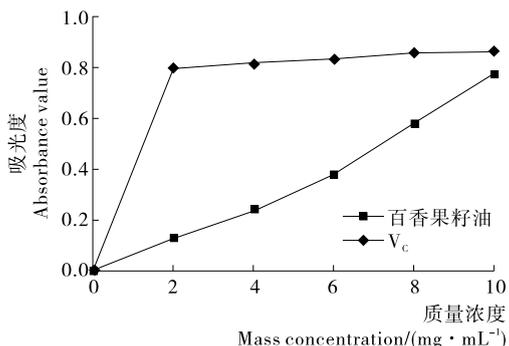


图 3 百香果籽油还原 Fe^{3+} 的能力

Figure 3 Fe^{3+} reducing power of passion fruit seed oil

质量浓度下百香果籽油的还原能力不如 V_C,但随着质量浓度的增大,百香果籽油对 Fe³⁺还原力也呈现不断增高的趋势。

3 结论

采用超临界 CO₂萃取法提取百香果籽油,通过响应面法对萃取工艺进行优化,确定了最佳萃取条件为:萃取温度 53.1 ℃,萃取压力 33.9 MPa,萃取时间 3.6 h。在此条件下,百香果籽油的得率为 27.86%。体外抗氧化研究结果表明,百香果籽油具有较好的还原力,且对 DPPH·清除力较强,呈量效依赖关系。Zahedi 等^[12]利用中心组合试验设计优化所得百香果籽油提取率为 26.55%,何冬梅等^[5]利用索氏提取法提取百香果籽油的得率为 26.9%,程谦伟等^[4]利用超声波辅助提取得到的百香果籽油提取率为 19.72%。相比之下,本研究所得优化工艺条件下籽油提取率稍高,且超临界 CO₂萃取后处理简单,产物中无有机溶剂残留,比传统的试剂提取法更绿色、环保。综合研究发现,超临界 CO₂萃取百香果籽油的工艺稳定可行,提取的百香果籽油具备天然的抗氧化活性,具有广阔的开发前景,为百香果资源的进一步充分利用提供了理论依据。由于百香果籽油的含量和抗氧化性受产地、品种、成熟度等因素的影响,在后续的研究中,还有待进一步探索。

参考文献

[1] 霍丹群,蒋兰,马璐璐,等.百香果功能研究及其开发进展[J].

食品工业科技,2012,33(19):391-395.

[2] 林日高.沙田柚和西番莲复合果汁饮料的研制[J].食品与机械,2014,30(4):204-206.

[3] 许晓静,陶志华.黄色和紫色百香果籽油抗氧化作用的对比研究[J].食品工业科技,2016,37(11):49-52,57.

[4] 程谦伟,孟陆丽,何仁,等.响应面优化超声波辅助提取百香果籽油工艺研究[J].粮油加工,2010(8):6-9.

[5] 何冬梅,刘红星,黄初升,等.百香果籽挥发油的提取研究[J].中国酿造,2010,29(3):150-153.

[6] 王亚琦,陈奕洪,黄卫文,等.超临界 CO₂萃取崖柏精油的研究[J].食品与机械,2015,31(3):175-178.

[7] 李松,吴光斌,陈发河.超临界萃取瑁溪蜜柚精油工艺优化及组分分析[J].食品与机械,2013,29(1):113-117.

[8] 付复华,潘兆平,谢秋涛,等.超临界 CO₂萃取条件对紫苏籽油脂肪酸组成的影响及工艺优化[J].食品与机械,2016,32(7):166-170.

[9] 旷春桃,吴斌,唐宏伟,等.山桐子油的超临界 CO₂萃取工艺优化及脂肪酸组成分析[J].食品与机械,2016,32(11):154-157.

[10] 张婷婷,郭夏丽,黄学勇,等.辛夷挥发油 GC-MS 分析及其抗氧化、抗菌活性[J].食品科学,2016,37(10):144-150.

[11] 李旭,刘停.杜仲叶总黄酮微波辅助提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2013(4):243-248.

[12] ZAHEDI G, AZARPOUR A. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora, seed oil[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2011, 58(1): 40-48.

(上接第 132 页)

[4] LAKSHMINARAYANA S. Respiration and ripening patterns in the life cycle of mango fruit[J]. J Hort Sci, 1973, 48: 227-233.

[5] 刘继红,徐小勇,邓秀新.我国园艺产品辐射保鲜研究进展[J].核农学报,2002(6):414-417.

[6] 滕建文,曾文谨,姬晨,等.芒果的臭氧保鲜研究[J].食品科技,2008(8):233-235.

[7] CONEY M H. Chilling injury in crops of tropical and subtropical origin[J]. Hotscience,1986(17):162-165.

[8] 吴振麟.芒果采后生理及贮藏保鲜技术研究进展[J].安徽农业通报,2011,17(19):82-84.

[9] LU Jian-bo, VIGNEAULT C, CHARLES M T, et al. Heat treatment application to increase fruit and vegetable quality[J]. Stewart Postharvest Review, 2007, 3: 1-7.

[10] 康明丽,张平.减压贮藏理论及技术研究进展[J].食品与机械,2001(2):9-10.

[11] HASHMI M S, EAST A R, PALMER J S, et al. Hypobaric treatment stimulates defence-related enzymes in strawberry[J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 85(11): 77-82.

[12] 杨虎清,吴峰华,周存山,等.“东魁”杨梅在减压贮藏过程中品质及相关酶活性的变化[J].中国食品学报,2010,10(1):161-166.

[13] 李志刚,宋婷,郝利平,等.适宜压力条件保持减压贮藏杏鲍菇品质[J].农业工程学报,2015,31(18):296-303.

[14] 程曦,张敏,傅阳,等.减压贮藏对双孢菇保鲜品质的影响[J].食品与机械,2016,32(8):110-114.

[15] 陈文炬,宋丽丽,廖小军.减压对水蜜桃采后呼吸途径和活性氧代谢的影响[J].中国食品学报,2016,16(7):171-175.

[16] 薛应龙.植物生理学实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1990:129-131.

[17] 王瑞庆,马书尚,武春林,等.嘎拉苹果对不同浓度 1-MCP 处理的反应[J].西北植物学报,2005,25(2):256-261.

[18] 郑小林,吴小业.柠檬酸处理对采后芒果保鲜效果的影响[J].食品科学,2010,31(18):381-383.

[19] 张意静.食品分析技术[M].北京:中国轻工业出版社,2001:114-118.

[20] 曹建康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007.

[21] 居益民,周慧娟,叶正文,等.1-MCP 处理对猕猴桃贮藏保鲜效果的影响[J].食品与机械,2010,26(6):40-43.

[22] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2001:248.

[23] 张长峰.细胞膜脂和膜蛋白在果实抵御低温逆境中的作用[D].北京:中国科学院,2010.

[24] 龚国强.芒果常温贮藏保鲜技术的研究[J].中国农业科学,1994,27(3):82-88.

[25] 陈文炬,邵海燕,毛金林,等.黄花梨减压贮藏保鲜技术研究[J].食品科学,2004,25(11):326-329.