

纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取柠檬果皮精油工艺优化

Optimization on essential oil extraction of lemon peel by cellulase-assisted hydrodistillation

辜雪冬¹ 肖娟² 周康² 胡滨² 苏赵²

GU Xue-dong¹ XIAO Juan² ZHOU Kang² HU Bin² SU Zhao²

(1. 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏 林芝 860000; 2. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(1. College of Food Science, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Nyingchi, Tibet 860000, China;

2. College of Food, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

摘要:以柠檬果皮为原料,研究纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取柠檬精油的最佳工艺条件。在单因素试验基础上,选取酶添加量、料液比、酶解时间及蒸馏时间为影响因素,以提取率为响应值,设计响应面试验;通过气相色谱-质谱法对柠檬精油的化学组分进行检测,采用扫描电镜对柠檬皮的微观结构进行观察。结果表明,最佳工艺条件为酶解温度 50 ℃、酶解 pH 5.0、酶添加量 1.1%、液料比 16:1 (mL/g)、酶解时间 63 min、蒸馏时间 140 min,提取率达到 2.12%;柠檬精油中共鉴定出 27 种化学成分,主要成分为柠檬烯;扫描电镜观察表明,纤维素酶水解了原料细胞结构,促进了精油的快速释放。该工艺与水蒸气蒸馏提取相比,提取率相近,但明显减少了提取时间。

关键词:柠檬精油;纤维素酶;水蒸气蒸馏;气相色谱-质谱法;扫描电镜

Abstract: In order to improve the utilization of lemon peel, the optimal processes for essential oil extraction of lemon peel were studied by Cellulase-Assisted Hydrodistillation(CAHE). Based on the single-factor test, taking the enzyme dosage, solvent to material ratio, enzymolysis time, and distillation time as the influence factors, the response surface methodology was applied to optimize the parameters of extraction. Meanwhile, the volatile composition were determined by GC-MS. Additionally, the microscopic structural changes of sample before and after extraction are observed to understand the characteristics of different extraction methods. The optimal extracting conditions were as followed: enzymolysis temperature 50 ℃, pH 5.0, enzyme dosage 1.1%, ratio of solvent to material 16:1 (mL/g), enzymolysis time 63 min, distillation time 140 min.

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31701518)

作者简介:辜雪冬,男,西藏农牧学院副教授,硕士。

通信作者:胡滨(1975—),男,四川农业大学副教授,博士。

E-mail: hubin2555@sina.com

收稿日期:2018-02-27

Under the conditions, the yield of essential oil reached 2.12%. A total of 27 compounds were identified, in which the limonene was the major constituent. Scanning electron microscopy demonstrated that cellulase effectively destroyed the cell structure of lemon peel, which accelerated the release of essential oil. Furthermore, the extraction efficiency of essential oil extracted by CAHE was similar in quantity (yield) and quality (chemical composition) to hydrodistillation, but less time consuming.

Keywords: essential oil of lemon peel; cellulase-assisted; hydrodistillation extraction; gas chromatography-mass spectrometry; scanning electron microscopy observation

精油又称挥发油,是一类具有芳香油状液体的总称。精油在植物界分布很广,主要存在于芸香科、菊科等芳香植物中^[1]。柠檬又称柠果、益母果等,属于芸香科柑橘属植物,果实为淡黄色柑橘类水果,原产于马来西亚、印度、北非等国家,目前在全世界广泛种植。近年来,中国柠檬种植面积不断增加,产量逐渐增加,尤其四川安岳作为中国最大的柠檬主产区,2015年安岳柠檬总产量已达到 6.0×10^5 t^[2]。柠檬除直接作为鲜果销售外,还可以加工成柠檬产品,如柠檬果酒、柠檬果醋、柠檬果汁饮料等。由此在柠檬加工过程中产生了大量皮渣等副产物,尤其柠檬皮中含有丰富的精油^[3]。柠檬精油具有广泛的生物活性,在食品、化工和医学领域有大量应用^[4]。

目前,柠檬精油提取的方法有压榨法、有机溶剂提取法、水蒸气蒸馏法、超临界流体萃取法等^[5-6]。但是直接压榨法提取率通常较低;有机溶剂提取法在去除溶剂时容易导致挥发性成分的散失;超临界流体萃取法耗时虽短,但仪器设备成本较高,在生产实践中应用还有一定局限性;水蒸气蒸馏法是《中国药典》的推荐方法,但耗时较长。因此,探索操作简单、提取率高、成本低廉的柠檬精油提取方法,依然是柠檬产品综合利用的关键,而采用酶法辅助水蒸气蒸馏提取柠檬

精油的工艺还未见报道。该方法是根据植物原料细胞壁的结构特点,利用酶反应的高度专一性,选择相应的酶在水蒸气蒸馏提取前将细胞壁的组分进行降解,使被束缚在细胞内的有效成分溶出,从而达到快速提取的目的^[7]。

本试验拟以四川安岳的尤力克柠檬果皮为原料,通过单因素和响应面试验研究纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取柠檬精油的最佳工艺条件,并采用气相色谱-质谱法(GC-MS)对其化学成分进行分析,再利用扫描电镜对柠檬果皮的微观结构变化进行观察,为柠檬精油的综合开发利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

新鲜柠檬:尤力克,采集于四川省安岳县农贸市场,取果皮,切片,真空干燥至质量恒定,备用;

纤维素酶:酶活 $\geq 40\ 000$ U/mg,最适酶解温度 $40\sim 60\ ^\circ\text{C}$,pH $4.0\sim 5.5$,上海如吉生物科技发展有限公司;

果胶酶:酶活 $\geq 30\ 000$ U/mg,最适酶解温度 $30\sim 55\ ^\circ\text{C}$,pH $3.5\sim 5.5$,上海如吉生物科技发展有限公司;

半纤维素酶:酶活 $\geq 10\ 000$ U/mg,最适酶解温度 $30\sim 55\ ^\circ\text{C}$,pH $4.0\sim 5.5$,上海如吉生物科技发展有限公司;

氢氧化钠、盐酸等:分析纯,成都科龙化工试剂厂。

1.2 主要仪器与设备

挥发油测定器:上海臻浔金属制品有限公司;

电子天平:20002型,诸暨市超泽衡器设备有限公司;

真空干燥箱:DZF-6020型,上海齐欣科学仪器有限公司;

pH计:PHS-25型,天津市华仪盛达实验仪器有限公司;

水浴恒温振荡器:DSHZ-300型,太仓市科学仪器有限公司;

电热套:PTHW型,上海贝仑仪器设备有限公司;

气相色谱—质谱联用仪:7890A-5975C型,安捷伦科技有限公司;

扫描电子显微镜:JSM-7500F型,日本电子株式会社。

1.3 试验方法

1.3.1 水蒸气蒸馏提取 根据《中国药典》I部(2010年)附录XD中测定法进行提取。取50 g经真空干燥后的柠檬果皮置于圆底烧瓶中,加一定体积水与数粒玻璃珠,振摇混合后,连接挥发油测定器和回流冷凝管,从冷凝管上端加水至挥发油测定器的刻度部分,并溢流入烧瓶为止。再将提取装置于电热套中加热至微沸,并保持微沸5 h,至挥发油测定器中油量不再增加时,停止加热,放置片刻,开启挥发油测定器下端活塞,将水缓慢放出,使油层下降到其上端与0刻度线齐平,读取油量,按式(1)计算精油提取率;其中柠檬精油相对密度测定按GB/T 11540—2008《香料 相对密度的测定》进行。按式(1)计算提取率。

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

式中:

c ——提取率, %;

m_1 ——精油体积, mL;

ρ ——精油密度, g/mL;

m_2 ——柠檬皮质量, g。

1.3.2 酶辅助水蒸气蒸馏提取 称取一定质量经真空干燥后的柠檬果皮置于圆底烧瓶中,加入一定体积蒸馏水,再加入一定量的酶,盖塞,调节pH和温度,在水浴恒温振荡器中进行酶解;酶解处理完成后,再连接挥发油测定器和冷凝管,采用电热套加热至微沸,进行水蒸气蒸馏提取。精油提取率按式(1)计算。

1.3.3 单因素试验

(1) 酶的种类:为了确定最优的水解酶,参考厂家提供纤维素酶、果胶酶和半纤维素酶的最适酶解条件,分别研究其对提取率的影响。具体酶解条件分别为:纤维素酶添加量1%(以柠檬果皮质量计),pH 5.0,温度 $45\ ^\circ\text{C}$,液料比13:1(mL/g),酶解时间60 min,蒸馏时间180 min;果胶酶添加量1%,pH 4.0,温度 $50\ ^\circ\text{C}$,液料比13:1(mL/g),酶解时间60 min,蒸馏时间180 min;半纤维素酶添加量1%,pH 4.5,温度 $40\ ^\circ\text{C}$,液料比13:1(mL/g),酶解时间60 min,蒸馏时间180 min。

(2) 纤维素酶的添加量:将试验条件设置为pH 5.0,温度 $45\ ^\circ\text{C}$,液料比13:1(mL/g),酶解时间60 min,蒸馏时间180 min,以确定适宜酶添加量。

(3) 酶解温度:将试验条件设置为酶添加量1.2%,pH 5.0,液料比13:1(mL/g),酶解时间60 min,蒸馏时间180 min,以确定适宜的酶解温度。

(4) pH值:将试验条件设置为酶添加量1.2%,温度 $50\ ^\circ\text{C}$,液料比13:1(mL/g),酶解时间60 min,蒸馏时间180 min,以确定适宜的pH值。

(5) 液料比:将试验条件设置为酶添加量1.2%,温度 $50\ ^\circ\text{C}$,pH 5.0,酶解时间60 min,蒸馏时间180 min,以确定适宜的液料比。

(6) 酶解时间:将试验条件设置为酶添加量1.2%,温度 $50\ ^\circ\text{C}$,pH 5.0,液料比为16:1(mL/g),蒸馏时间180 min,以确定适宜的酶解时间。

(7) 蒸馏时间:将试验条件设置为酶添加量1.2%,温度 $50\ ^\circ\text{C}$,pH 5.0,液料比为16:1(mL/g),酶解时间70 min,以确定适宜的蒸馏时间。

1.3.4 响应面试验 在单因素试验基础上,选择对提取率影响较大的酶添加量、液料比、酶解时间和蒸馏时间4个因素为自变量,以提取率为响应值,按照响应面(Response surface methodology, RSM)试验中的Box-Behnken Design(BBD)原理设计试验。根据试验结果进行优化分析,以得到最优提取工艺条件。

1.4 柠檬精油的化学成分检测

采用GC-MS法对柠檬精油的化学成分进行分析。其中GC条件:HP-5MS弹性石英毛细管柱(柱长:30 m,膜厚:0.25 μm ,内径:0.25 mm);载气为氦气,流速为1 mL/min。进样量0.5 μL ,进样口温度 $250\ ^\circ\text{C}$,不分流进样,解析时间5 min;升温程序:起始温度 $50\ ^\circ\text{C}$, $3\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至 $220\ ^\circ\text{C}$,

保持 2 min^[8-9]。

MS 条件:电子轰击离子源(EI),电子能量 70 eV,GC 与 MS 接口温度 280 °C;离子源温度 230 °C;电子检测器检测电压 350 V;质量扫描范围 10~450 amu。

1.5 扫描电镜观察

将未经处理、水蒸气蒸馏提取和酶辅助水蒸气蒸馏提取后的柠檬果皮作为原材料,经冷冻干燥后再作喷金处理,在放大倍数 500 倍,工作距离 8 mm,分辨率 > 20 nm 条件下,利用扫描电镜观察其表面微观结构的变化。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶的种类对提取率的影响 由图 1 可知,在酶添加量相同的情况下,纤维素酶的提取率最高。这主要是由于植物细胞壁是以纤维素为骨架结构,当纤维素被水解后,细胞中的精油成分能够快速游离出来,增加提取率。孟利娜等^[10]在研究酶法辅助提取北苍术挥发油的工艺时,比较了纤维素酶、果胶酶和半纤维素酶对挥发油提取率的影响,结果表明纤维素酶的提取率明显高于果胶酶和半纤维素酶。因此本试验选用纤维素酶辅助提取柠檬精油。

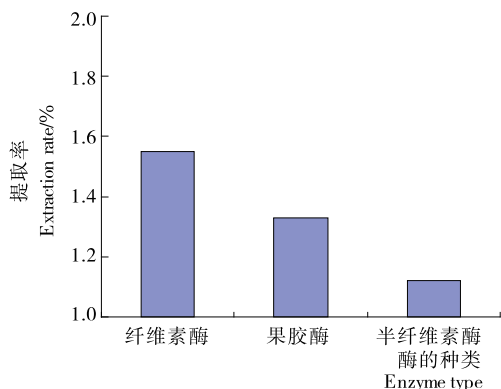


图 1 酶的种类对提取率的影响

Figure 1 Effect of enzyme type on extraction rate

2.1.2 酶添加量对提取率的影响 由图 2 可知,酶添加量由 0.3% 增加至 1.2% 时,提取率明显增加;当酶添加量超过 1.2% 后,提取率增幅不显著。这是由于随着纤维素酶量的增加,细胞壁被充分降解,精油提取率快速增加;但当纤维素酶增加到一定浓度后,与底物的结合已经饱和,继续增加酶量,已没有多余的底物与其结合,提取率不再增加。张辰露等^[11]在采用纤维素酶提取紫苏叶挥发油时也证实,随着纤维素酶用量增加,提取率先增加,然后增幅不明显。因此,综合考虑生产成本和提取率等因素,本试验适宜的纤维素酶添加量为 1.2%。

2.1.3 酶解温度对提取率的影响 由图 3 可知,当酶解温度从 40 °C 上升到 50 °C 时,提取率明显增加;在 50~55 °C 时,提取率增幅不明显;超过 55 °C 后,提取率降低。这是由于在酶促反应过程中,温度增加能够促进反应进行。但温度过高会导致纤维素酶失活,从而降低酶促反应速度。而在 50~55 °C 时,提取率较高,这是由于酶都有最适的温度范围,当

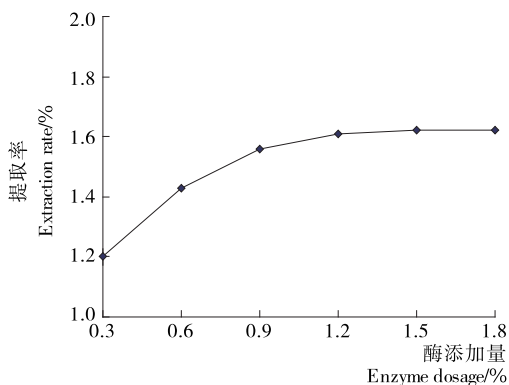


图 2 酶添加量对提取率的影响

Figure 2 Effect of enzyme dosage on extraction rate

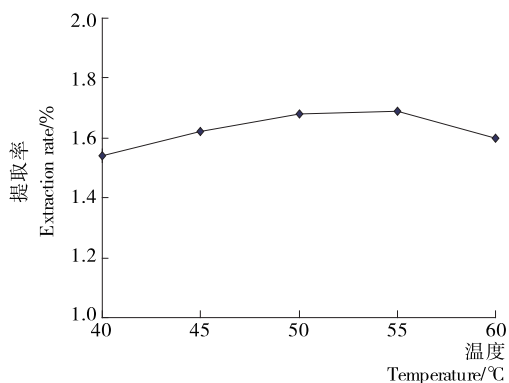


图 3 酶解温度对提取率的影响

Figure 3 Effect of enzyme temperature on extraction rate

纤维素酶保持在此温度范围时,温度对其活性没有影响。吕晓玲等^[12]在采用纤维素酶提取迷迭香挥发油时也发现,温度过高或过低提取率都相应下降,可能是低温抑制酶的活性,而高温导致酶失活。因此,本试验适宜酶解温度为 50~55 °C。

2.1.4 pH 对提取率的影响 由图 4 可知,当 pH 从 3.5 上升到 5.0 时,提取率明显增加;pH 在 5.0~5.5 时,提取率增幅不显著;当 pH 超过 5.5 后,提取率降低。通常酶都有其适宜的 pH 范围,pH 值过高或过低都影响酶的活性,导致酶促反应速率降低。这与回瑞华等^[13]在采用纤维素酶辅助提取卷柏挥发油时得出的结论相似。因此,本试验适宜的酶解 pH 为 5.0~5.5。

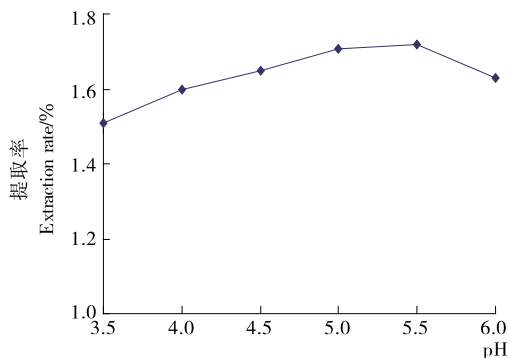


图 4 酶解 pH 对提取率的影响

Figure 4 Effect of enzyme pH on extraction rate

2.1.5 液料比对提取率的影响 由图5可知,液料比在7:1~16:1 (mL/g)时,提取率随着液料比上升而增加;当液料比超过16:1 (mL/g)时,提取率逐渐下降。这是因为一定体积的水作为反应介质,对酶解反应具有促进作用。若液料比较低,酶解液的黏度较大,影响了酶的流动性,不利于酶解反应进行;而液料比过大,酶浓度和底物浓度均下降,降低了酶与底物的碰撞机率,导致酶的作用效果降低,提取率下降。冷进松等^[14]在研究酶法辅助提取啤酒花精油时,也证实精油提取率随着液料比增加而上升,当液料比增加至一定程度后,提取率随着液料比增加而下降。因此,本试验选择适宜液料比为16:1 (mL/g)。

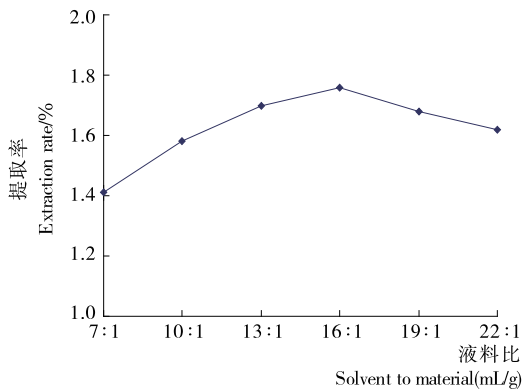


图5 液料比对提取率的影响

Figure 5 Effect of solvent to material on extraction rate

2.1.6 酶解时间对提取率的影响 由图6可知,当酶解时间从25 min延长到70 min时,提取率明显增加;当酶解时间超过70 min后,提取率不再增加。这是由于随着酶解时间的延长,酶与底物结合后充分进行反应,提取率相应增加。但是酶解反应进行一定时间后,由于底物浓度减少,酶解反应已经基本完成,提取率不会进一步增加。此外,如果酶解反应时间过长,还会增加能耗。丁兴红等^[15]在采用纤维素酶辅助提取温莪术挥发油时也得出类似的结论。因此,本试验选择适宜的酶解时间为70 min。

2.1.7 蒸馏时间对提取率的影响 由图7可知,当蒸馏时间从60 min延长到150 min时,提取率明显上升;当蒸馏时间超过150 min后,提取率不再增加。这可能是随着蒸馏时间

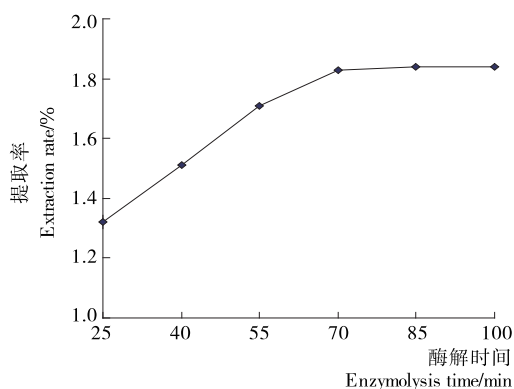


图6 酶解时间对提取率的影响

Figure 6 Effect of enzymolysis time on extraction rate

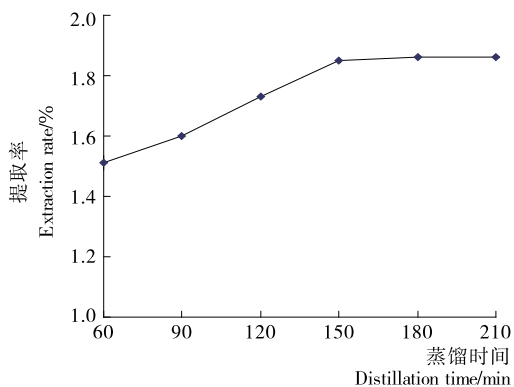


图7 蒸馏时间对提取率的影响

Figure 7 Effect of distillation time on extraction rate

延长,柠檬果皮细胞中的精油不断游离出来,使提取率上升;当蒸馏时间超过150 min后,精油已经基本溶出,提取率不再增加,继续延长蒸馏时间对提取率影响不大。而且蒸馏时间过长也会增加能耗。这与包怡红等^[16]研究蒸馏时间对艾叶精油提取率影响的结果一致。因此,本试验较适宜蒸馏时间为150 min。

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面模型的建立 单因素试验结果表明,酶解温度和pH值分别保持在50~55℃和5.0~5.5时,对提取率影响不显著。因此,响应面试验选择对精油提取率影响较显著的酶添加量、液料比、酶解时间和蒸馏时间4个因素为自变量,以提取率为响应值,按照Design-expert 11.0软件中Box-Behnken Design (BBD)设计响应面试验(response surface methodology, RSM),各因素的具体取值见表1, RSM的结果见表2。

采用Design-expert 11.0软件对表2的试验结果进行优化分析,得出了提取率与酶添加量、液料比、酶解时间和蒸馏时间的二次回归方程模型:

$$Y = 1.82 + 0.14A + 0.08B + 0.14C + 0.06D + 0.04AB + 0.08AC + 0.05AD + 0.03BC + 0.06BD + 0.02CD - 0.13A^2 - 0.08B^2 - 0.09C^2 - 0.09D^2 \quad (2)$$

2.2.2 响应面模型的显著性检验 将二次回归方程模型进行方差分析,对模型系数进行显著性检验,结果见表3。

F值是用于检测回归方程模型中各变量对响应值的影响程度,概率P值越小,则相应变量的显著程度越高;失拟项是用于反映回归方程模型与实际的拟合或差异程度^[17]。由表3可知,该二次回归方程模型差异极显著($P < 0.01$),失拟项差异不显著($P > 0.05$),表明该模型与实际误差小。 R^2 为

表1 BBD设计因素水平编码表

Table 1 Factors and levels of BBD

编码	A 酶添加量/%	B 液料比 (mL/g)	C 酶解时间/min	D 蒸馏时间/min
-1	0.6	10:1	40	90
0	0.9	13:1	55	120
1	1.2	16:1	70	150

表 2 BBD 设计及结果

Table 2 Experiment design and results of BBD

序号	A	B	C	D	Y 提取率/%
1	-1	0	-1	0	1.41
2	1	0	1	0	1.95
3	0	-1	-1	0	1.46
4	0	-1	0	1	1.56
5	0	1	-1	0	1.53
6	0	0	1	1	1.87
7	0	-1	0	-1	1.58
8	0	1	0	1	1.86
9	0	0	0	0	1.83
10	0	0	-1	1	1.56
11	1	0	-1	0	1.53
12	-1	-1	0	0	1.43
13	0	1	0	-1	1.63
14	0	-1	1	0	1.71
15	1	0	0	1	1.85
16	-1	0	1	0	1.51
17	0	0	0	0	1.83
18	1	-1	0	0	1.62
19	-1	0	0	1	1.45
20	-1	0	0	-1	1.44
21	0	1	1	0	1.88
22	0	0	-1	-1	1.46
23	0	0	1	-1	1.68
24	1	1	0	0	1.87
25	0	0	0	0	1.80
26	0	0	0	0	1.82
27	-1	1	0	0	1.53
28	0	0	0	0	1.84
29	1	0	0	-1	1.63

0.993 1, R_{Adj}^2 为 0.986 3, R^2 和 R_{Adj}^2 都接近 1, 表明此模型能够解释响应值中 98.63% 的变化。此外, 信噪比为 38.318, 远大于 4, 且变异系数为 1.21%, 均表明该模型的可信度和拟合度很高; 而且一次项 (A、B、C、D)、交互项 (AB、AC、AD、BC、BD、CD)、二次项 (A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2) 对试验结果的影响显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$), 说明试验各因素对响应值的影响不是简单线性关系, 而是二次抛物线关系, 存在极大值。因此, 以上结果表明该模型能用于预测柠檬精油的提取率。

2.2.3 各因子间交互作用的响应面分析 各因子间交互作用的响应面分析见图 8。

由图 8 可知, 将酶添加量、液料比、酶解时间和蒸馏时间中的任意 2 个因素固定在中心点位置时, 其他 2 因素对提取率均存在显著或极显著交互作用。

2.2.4 验证实验 采用 Design-expert 11.0 软件对回归方程模型进行预测, 得出理想的提取工艺为: 酶添加量 1.13%, 液料比 15.78 : 1 (mL/g), 酶解时间 62.47 min, 蒸馏时间

表 3 回归方程的方差分析[†]

Table 3 Variance analysis of regression equation

变异原因	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著程度
模型	0.820 3	14	0.058 6	144.460 0	<0.000 1	**
A	0.235 2	1	0.235 2	579.890 0	<0.000 1	**
B	0.073 6	1	0.073 6	181.540 0	<0.004 1	**
C	0.226 9	1	0.226 9	559.360 0	<0.000 1	**
D	0.044 4	1	0.044 4	109.490 0	<0.000 1	**
AB	0.005 6	1	0.005 6	13.870 0	0.002 3	**
AC	0.025 6	1	0.025 6	63.120 0	<0.000 1	**
AD	0.011 0	1	0.011 0	27.180 0	0.000 1	**
BC	0.002 5	1	0.002 5	6.160 0	0.026 3	*
BD	0.015 6	1	0.015 6	38.520 0	<0.000 1	*
CD	0.002 0	1	0.002 0	4.990 0	0.042 3	*
A^2	0.117 3	1	0.117 3	289.310 0	<0.000 1	**
B^2	0.041 0	1	0.041 0	101.080 0	<0.000 1	**
C^2	0.056 4	1	0.056 4	139.060 0	<0.000 1	**
D^2	0.053 4	1	0.053 4	131.710 0	<0.000 1	**
剩余	0.005 7	14	0.000 4			
失拟	0.004 8	10	0.000 5	2.070 0	0.252 1	不显著
纯误差	0.000 9	4	0.000 2			
总误差	0.826 0	28				

[†] * 表示差异显著, $P < 0.05$; ** 表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

139.67 min, 理论提取率 2.23%。考虑到实际操作的可行性, 将提取工艺参数修正为酶添加量 1.1%, 液料比 16 : 1 (mL/g), 酶解时间 63 min, 蒸馏时间 140 min。按照上述修正条件下进行 3 次验证实验, 实际提取率的平均值为 2.12%, 与理论预测值基本吻合。表明该模型可以预测试验结果, 具有较好的应用价值。

2.3 柠檬精油的化学成分分析

水蒸气蒸馏和纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取柠檬精油的总离子流图见图 9。

采用 GC-MS 对提取的柠檬精油进行定性定量分析, 利用 NIST11 质谱数据库进行对照解析, 取匹配度 85% 以上数据, 相对质量分数在 0.1% 以上的化合物 27 种列于表 4。

由表 4 可知, 2 种不同方法提取的柠檬精油化学成分基本相同, 表明纤维素酶在辅助提取柠檬精油的过程中, 没有对柠檬精油的化学组成产生影响, 保留了其原有成分。纤维素酶辅助提取的柠檬精油共鉴定出 27 种化学成分, 占总成分的 97.05%。其中烯类化合物 15 种, 醛类化合物 5 种, 酯类化合物 3 种, 萜类化合物 2 种和醇类化合物 2 种, 尤其柠檬烯含量较高。Al-Jabri 等^[18]采用 GC-MS 对水蒸气蒸馏提取的柠檬果皮精油进行检测, 证实柠檬烯、 β -蒎烯、月桂烯等是其 主要特征组分。Vaio 等^[17]和秦轶等^[4]分别以乙醇提取和压榨提取得到的柠檬果皮精油, 经 GC-MS 检测也得到了类似结论。

2.4 2 种提取方法比较

柠檬精油 2 种提取方法测定结果见表 5。

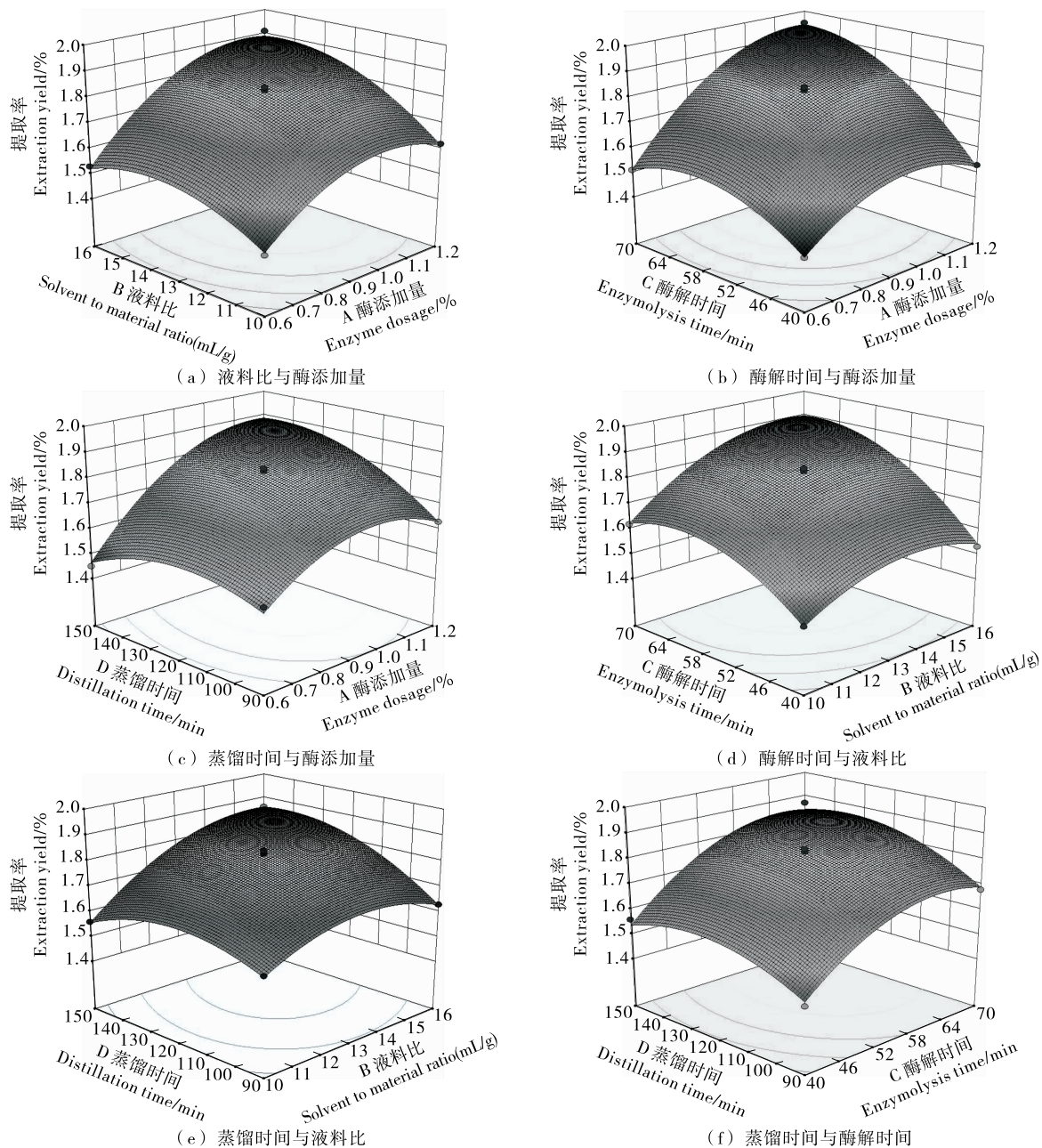


图 8 两因子交互作用对提取率影响的响应面图

Figure 8 Response surface of mutual-influence of two factors on extraction rate

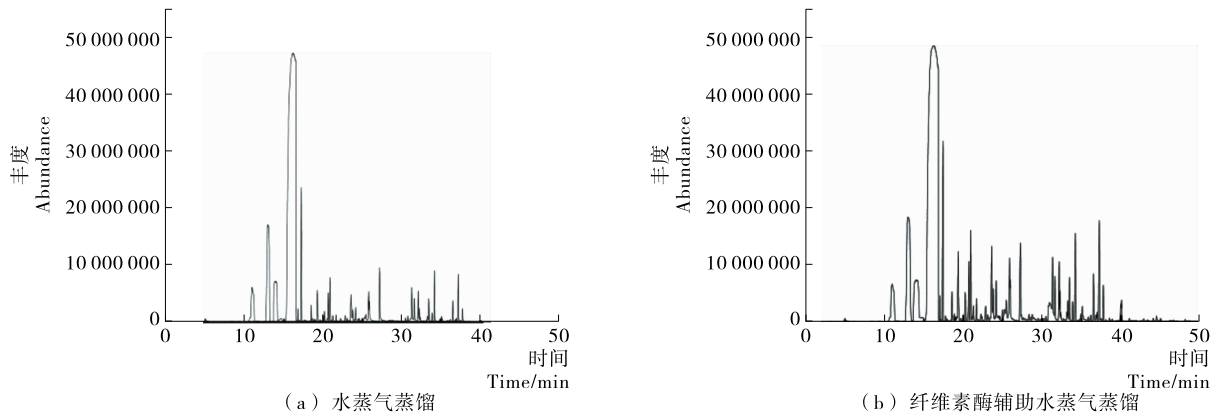


图 9 水蒸气蒸馏和纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取柠檬精油的总离子流图

Figure 9 Total ion current of essential oil of lemon from hydrodistillation and cellulase-assisted hydrodistillation extraction

表 4 2 种不同方法提取柠檬精油的化学成分分析

Table 4 Analyses of chemical components oil of lemon extracted by different methods

序号	化合物名称	水蒸气蒸馏提取			纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取		
		保留时间/min	相似度/%	含量/%	保留时间/min	相似度/%	含量/%
1	α -蒎烯	10.96	94	3.23	10.96	95	2.49
2	樟脑萜	11.68	90	0.10	11.68	89	0.12
3	β -蒎烯	12.97	98	9.25	12.97	97	10.13
4	月桂烯	13.95	95	5.22	13.96	93	4.78
5	柠檬烯	16.15	98	61.81	16.15	98	63.52
6	罗勒烯	16.93	89	0.19	16.93	90	0.16
7	萜品烯	17.35	90	3.31	17.36	92	3.42
8	异松油烯	18.52	88	0.55	18.53	87	0.41
9	芳樟醇	19.32	89	1.09	19.33	90	0.95
10	樟脑			未检出	20.23	89	0.18
11	(R)-氧化柠檬烯			未检出	20.92	87	0.45
12	香茅醛	21.67	87	0.22	21.68	85	0.31
13	α -松油醇		90	未检出	23.53	88	0.52
14	癸醛	24.16	93	0.62	24.17	92	0.71
15	(Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛	25.84	94	1.86	25.85	93	1.67
16	柠檬醛	27.23	92	1.83	27.24	92	1.91
17	3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇甲酸酯	25.57	85	0.10	25.58	87	0.11
18	十一醛	28.73	86	0.12	28.74	86	0.13
19	α -萜荜茄油烯	30.46	85	0.11	30.47	87	0.13
20	乙酸橙花酯	31.26	92	0.94	31.27	90	1.05
21	2-茨烯	31.87	87	0.10	31.88	86	0.10
22	乙酸香叶酯	32.09	90	0.64	32.10	89	0.73
23	1-石竹烯	33.43	93	0.54	33.44	95	0.59
24	α -法尼烯	34.16	94	1.28	34.17	92	1.32
25	(E)- β -金合欢烯	35.87	87	0.12	38.88	90	0.19
26	巴伦西亚橘烯	36.45	88	0.58	36.46	93	0.62
27	氧化石竹烯	40.02	92	0.27	40.03	93	0.35
合计				94.08		97.05	

表 5 2 种提取方法提取率的比较

Table 5 Comparisons of extraction rate of two extraction methods

方法	时间/min	提取率/%
水蒸气蒸馏提取	300	1.98
纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取	203	2.12

由表 5 可见,纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取的柠檬精油提取率不仅略高于水蒸气蒸馏提取率,而且纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取法明显减少了提取时间。这是由于在水蒸气蒸馏前采用纤维素酶对柠檬果皮进行预处理,使得柠檬果皮的细胞结构被有效水解,促进了精油成分能够在水蒸气蒸馏时快速溶出,从而缩短了提取时间。Sowbhagya 等^[19]在提取孜然精油时证实,采用酶预处理后进行水蒸气蒸馏提取,不仅提高提取率,还明显缩短水蒸气蒸馏时间。Hosni 等^[20]在采用酶预处理后进行水蒸气蒸馏提取百里香精油和迷迭香精油时,也得出了类似结论。由此可见,纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取法的提取率不仅与水蒸气蒸馏提取法相类似,

而且还能缩短提取时间而减少能耗。

2.5 2 种提取方法对柠檬皮超微结构的影响

采用扫描电镜对未经处理、水蒸气蒸馏、纤维素酶辅助提取后的柠檬果皮超微结构进行观察,结果见图 10。

由图 10 可以观察到,未经处理的柠檬果皮表面结构与水蒸气蒸馏和纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取的柠檬果皮有明显差异。未经处理的柠檬果皮表面结构平滑和完整;水蒸气蒸馏提取后的柠檬果皮表面部分结构遭到破坏,出现了部分空洞和间隙;纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取后的柠檬果皮表面结构破坏严重,出现了大量不规则的脆片、裂痕和间隙。通常植物原料中有效成分的提取,与原料细胞结构的破坏程度密切相关^[21]。在纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取过程中,纤维素酶对柠檬果皮细胞进行了水解,使得细胞表面结构被严重破坏,但是这促进了细胞中精油成分的快速溶出。Baby 等^[22]在提取豆蔻精油和茴香精油时证实,经酶预处理后的原料表面结构破坏严重,促进了精油的快速提取。李明月等^[23]在采用酶辅助提取沉香精油时,也得出了类似结论。

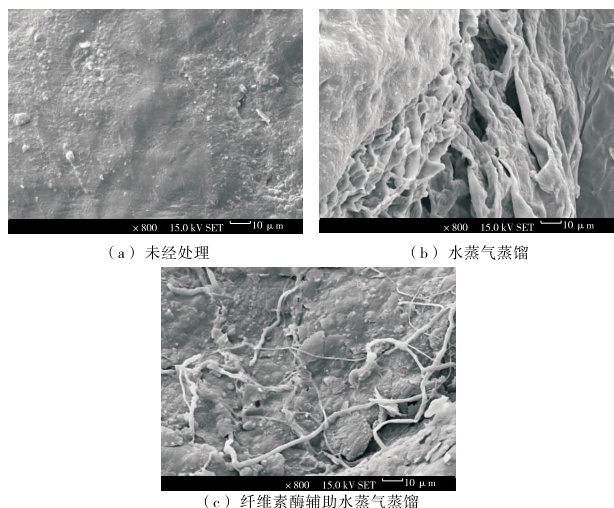


图 10 未经处理、水蒸气蒸馏、纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取后的柠檬皮扫描电镜观察

Figure 10 Scanning electron micrographs of lemon peel: lemon peel without treatment, lemon peel by hydrodistillation, lemon peel by cellulase-assisted hydrodistillation extraction

3 结论

本试验通过单因素和响应面试验确定了纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取柠檬果皮精油的最佳工艺条件为:酶解温度 50 ℃,酶解 pH 5.0,酶添加量 1.1%,液料比 16:1 (mL/g),酶解时间 63 min,蒸馏时间 140 min,提取率为 2.12%,所得精油为淡黄色液体,其香气接近鲜柠檬果香。该柠檬精油共鉴定出 27 种化学成分,占总成分的 97.05%,其主要成分为柠檬烯、 β -蒎烯和月桂烯。此外,扫描电镜观察表明,纤维素酶通过对原料细胞结构的水解,促进了精油的快速释放。本工艺与传统水蒸气蒸馏提取相比,提取率相近,但明显减少了提取时间,降低了能耗。所以,纤维素酶辅助水蒸气蒸馏提取柠檬精油是一种有效的精油提取方法。

参考文献

- [1] CHEN Feng-li, DU Xin-qi, ZU Yuan-gang, et al. Microwave-assisted method for distillation and dual extraction in obtaining essential oil, proanthocyanidins and polysaccharides by one-pot process from Cinnamomi Cortex[J]. Separation and Purification Technology, 2016, 164: 1-11.
- [2] 徐焱. 2015 年安岳柠檬总产量达 60 万吨畅销欧美数十国家[N/OL]. 华龙网, 2016-01-21(12)[2018-02-28]. http://cq.cqnews.net/html/2016-01/21/content_36247279.htm.
- [3] 章斌, 秦轶, 邓其海, 等. 柠檬果皮精油的应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(11): 119-122.
- [4] 秦轶, 侯小桢, 章斌, 等. 柠檬精油的化学成分分析及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 169-173.
- [5] KOSHIMA Cristina C, CAPELLINI Maria C, GEREMIAS Ivana M, et al. Fractionation of lemon essential oil by solvent extraction: Phase equilibrium for model systems at $T=298.2$ K[J]. The Journal of Chemical Thermodynamics, 2012, 54: 316-321.
- [6] GIRONI F, MASCHIETTI M. Phase equilibrium of the system supercritical carbon dioxide-lemon essential oil: New experimental data and thermodynamic modelling[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 70: 8-16.
- [7] AZMIR J, ZAIDUL I S M, RAHMAN K M, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117: 426-436.
- [8] 黄聪. GC/MS 法鉴定食用柠檬精油的化学成分[J]. 质谱学报, 2000, 21(3/4): 15-16.
- [9] 朱春华, 高俊燕, 李进学, 等. 柠檬和莱檬果皮精油挥发性成分分析[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1565-1570.
- [10] 孟利娜, 于敏, 许静, 等. 酶法辅助提取北苍术挥发油的工艺及成分分析[J]. 中成药, 2013, 35(4): 844-847.
- [11] 张辰露, 张晓娟, 朱双全, 等. Box-Behnken 响应面法优化纤维素酶提取紫苏叶挥发油工艺[J]. 中成药, 2016, 38(9): 2055-2059.
- [12] 吕晓玲, 张琳琳, 马立强, 等. 迷迭香挥发油的酶法辅助提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 233-235.
- [13] 回瑞华, 侯冬岩, 刘晓媛, 等. 苍柏中挥发性组分的酶提取及气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2006, 27(1): 17-21.
- [14] 冷进松, 朱珠, 周跃勇. 超声波辅助水酶法提取啤酒花精油的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(1): 34-41.
- [15] 丁兴红, 温成平, 丁志山, 等. 纤维素酶辅助提取温莪术挥发油工艺条件研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(5): 65-67.
- [16] 包怡红, 段伟丽, 王芳, 等. 响应面法优化艾叶精油的提取工艺及其化学成分分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 287-292.
- [17] VAIO C Di, GRAZIANI G, GASPARI A, et al. Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars[J]. Scientia Horticulturae, 2010, 126(1): 50-55.
- [18] AL-JABRI Najwa Nasser, HOSSAIN Mohammad Amzad. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria[J]. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 2014, 3(4): 247-253.
- [19] SOWBHAGYA H B, SRINIVAS P, PURNIMA Kaul T, et al. Enzyme-assisted extraction of volatiles from cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds[J]. Food Chemistry, 2011, 127: 1856-1861.
- [20] HOSNI Karim, HASSEN Imed, CHAABANE Hedia, et al. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 47: 291-299.
- [21] PURI M, SHARMA D, BARROW C J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30: 37-44.
- [22] BABY Kumaranthura Chacko, RANGANATHAN Thottiam Vasudevan. Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum maton.*) volatile oil[J]. Industrial Crops and Products, 2016, 89: 200-206.
- [23] 李明月, 沈华杰, 何海珊, 等. 果胶酶预处理辅助提取沉香精油研究[J]. 林业工程学报, 2017, 2(6): 55-59.