

油茶籽油水酶法制取机制的显微研究

孙红, 费学谦*, 方学智, 王金元

(中国林业科学研究院 亚热带林业科学研究所 浙江 富阳 311400)

摘要: 使用透射和扫描电子显微镜观察经水酶法提油前后的油茶籽仁细胞内部及表面形态结构的变化。实验结果表明: 油茶籽仁细胞内油脂体呈离散状分布; Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶能有效降解油茶籽仁细胞的细胞壁并释放包括油脂在内的细胞内容物, 其作用过程是一个动态的降解过程。

关键词: 油茶籽油; 水酶法; 机制

中图分类号: TS225.1+6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1117-05

A Study on the Mechanism of Aqueous Enzymatic Extraction of *Camellia oleifera* Seed Oil

SUN Hong, FEI Xue-qian*, FANG Xue-zhi, WANG Jin-yuan

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, China)

Abstract: By means of TEM and SEM the intracellular and extracellular changes in *Camellia oleifera* seed cells during aqueous enzymatic extraction of oil from it were observed. The result showed that the lipid granules were discretely distributed in camellia seed cells, and it was confirmed that Alcalase 2.4 L could degrade cell wall effectively and release cell contents including lipid granules from the morphological view. The degradation of cell wall was a dynamic process.

Key words: *Camellia oleifera* seed oil; aqueous enzymatic method; mechanism

油茶籽油(*Camellia oleifera* seed oil)富含不饱和脂肪酸和许多功能性成份,是一种营养价值、保健功能俱佳的优质木本油料^[1-2]。但目前传统的油茶籽油的生产方法,即压榨法和浸提法制油技术存在一定的不足,油茶籽油品质和加工附加值有待进一步提高。

早在20世纪50年代,国际上就有学者提出水酶法制取油脂的方法^[3],但受到当时酶制剂工业发展的影响,研究工作进展缓慢。近年来,伴随着生物技术的飞速发展,酶法制油技术逐渐成为引起广泛关注的油脂提取新工艺,国内外已经在大豆油、花生油、菜籽油等油脂的水酶法制取方面作了大量的研究^[4-8],但在油茶籽油的酶法制取方面国内还处于起步阶段^[9-11]。在之前的研究中笔者发现使用Alcalase 2.4 L碱性蛋白酶进行油茶籽油的水酶法制取能够获得较高的提油率,并且该酶价格较低、达到了食用级,适宜作为水酶法制油的水解酶,并对酶解条件进行了优化,本文旨在以Alcalase 2.4 L碱性蛋白酶为水解酶,使用扫描和透射电镜研究酶解前后的油茶籽细胞形态、结构的变化,以及酶解过程中细胞形态的动态变化,以期从形态学上分析水酶法制油技术的机制,为油茶籽油的水酶法制取提供理论支持。

收稿日期:2011-07-01 修回日期:2011-09-02

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2009BADB1B0301)和“948”引进项目(2009-4-56)

作者简介:孙红(1982—)男,硕士生,主要从事油茶加工研究,E-mail:sunh206@163.com; * 通讯作者:费学谦,研究员,E-mail:fxq6565@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

油茶籽:产于福建省福安市,干仁含油率46.15%,含水率8.48%,经3次机械研磨粉碎成80目油茶籽粉备用。酶制剂:Alcalase碱性蛋白酶,购自丹麦Novozymes公司,商品名Alcalase 2.4 L,产自*Bacillus licheniformis* 2.4 AU/g。

1.2 主要仪器、设备

Hitachi S-4700型扫描电子显微镜,JEOL公司JEM-1200EX型透射电子显微镜,Olympus光学显微镜,冰冻切片机,瑞士Buchi B-811索氏提取仪,Thermo Fisher高性能台式离心机,北京四环科学仪器厂LGJ-18c型冷冻干燥机。

1.3 实验方法

1.3.1 实验室茶籽油水酶法制取流程及提油率计算方法 准确称取一定量的油茶籽粉于离心管中,调固液比,混匀后90℃水浴10 min灭酶,降至室温后调pH值,加酶,置于恒温振荡器中,调节反应温度、震荡酶解,反应完成后90℃水浴10 min灭酶,离心分离后得到清油、乳化相、水相和残渣。取残渣测定残渣含油量及计算提油率,原料含油率及残渣中油脂含量的测定采用GB/T 5009.6-2003第一法^[12]。

$$\text{提油率} = (\text{原料中油的质量} - \text{残渣中油的质量}) / \text{原料中油的质量} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 油茶籽仁细胞内油脂体形态的光学显微镜观察 选择新鲜、饱满的油茶籽仁剥壳后取一片子叶,采用冰冻切片法制片,用苏丹Ⅲ染色后在光学显微镜中观察油茶籽仁细胞及细胞内油脂体的形态结构。

1.3.3 油茶籽仁细胞内部形态结构的透射电子显微镜观察 选择新鲜、饱满的油茶籽仁剥壳后取一片子叶,切成约1 mm³的小块,经戊二醛固定、漂洗、丙酮脱水、浸透、环氧树脂包埋、切片、醋酸枸橼酸电子染色等步骤制成超薄切片,使用透射电子显微镜观察油茶籽仁细胞的内部形态、结构。

1.3.4 经粉碎后油茶籽仁细胞表面形态结构的扫描电子显微镜观察 油茶籽仁经3次机械研磨后得到粒度约为80目的油茶籽粉,以该油茶籽粉为材料,经戊二醛固定、乙醇逐级脱水、冷冻干燥、真空喷金制成标本,使用扫描电子显微镜观察细胞表面的形态结构,并以此作为后续试验的对照。

1.3.5 Alcalase碱性蛋白酶处理后油茶籽细胞表面及内部形态结构的观察 使用Alcalase碱性蛋白酶作为水解酶,按照上述油茶籽油水酶法制取方法处理油茶籽粉,以经离心分离后得到的残渣,为材料制备标本,分别用于扫描电子显微镜和透射电子显微镜的观察,并以未经处理茶籽粉鲜样和仅用水处理的酶空白样本为对照,观察经水酶法提油后油茶籽细胞的表面及内部形态结构。

1.3.6 Alcalase碱性蛋白酶处理油茶籽细胞后细胞形态结构的动态变化 根据上述实验室油茶籽油水酶法制取流程,以Alcalase碱性蛋白酶为水解酶,分别设定酶解时间1 2 4 h,酶解完成后立即终止反应,8 000 r/min离心30 min分离得到油茶籽残渣,制备成样本后使用扫描电子显微镜观察水酶法提油后油茶籽细胞表面的形态结构变化,以时间为轴分析细胞表面形态结构的动态变化过程。

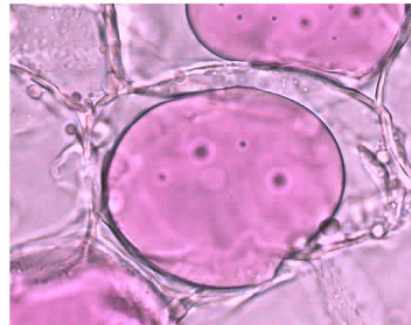


图1 苏丹Ⅲ染色后细胞形态的光学显微镜观察结果
Fig.1 Microscopic observation of oil-tea *Camellia oleifera* seed cell stained by sudan III

2 结果与分析

2.1 茶籽仁细胞中油脂体的光学显微镜观察

苏丹Ⅲ试剂能使切片中细胞内的脂肪着橘色。在成熟油茶籽细胞中油脂体呈离散分布,如图1所示,其所占细胞体积的比重较大。因苏丹Ⅲ染色法的分辨率有限,无法清晰看到细胞内单个油脂体细胞器,具体细节有待后续透射电镜的观察。

2.2 茶籽仁细胞内部形态结构的透射电子显微镜观察

对油料细胞结构的研究将有助于更好地了解水酶法提取油脂的过程。如图 2(A) 所示,油料细胞结构的一个主要特点就是细胞内含有许多离散分布的油脂体^[11],油脂体是油料细胞中油脂的主要储存部位。如图 2(B) 所示,油脂体平均直径为 1~2 μm,分析显示细胞内油脂体是分布在一个蛋白网络中^[15]。值得注意的是,油脂体中有一种称为 oleosins 的蛋白质在维持油脂体的稳定方面发挥重要作用^[16-17],其结构在所有油料细胞中几乎都是相同的,由分子质量为 15 000~26 000 ku 的低分子量蛋白构成。研究表明,oleosins 经蛋白酶水解后,油脂体发生破裂,并出现油脂体间的融合。说明 oleosins 可能起到维持油脂体的完整性,阻止细胞内油脂体间相互融合的作用。这也暗示,用蛋白水解酶处理细胞,可能更易于油脂的渗出,此外,蛋白水解酶还能够作用于细胞内的蛋白网络结构,使细胞内结构变得松弛,易于油脂和蛋白质的渗出,从而能够得到更高的提油率,Yoon 等^[18]通过实验证明仅用蛋白水解酶处理大豆就能够得到 86% 的得油率。

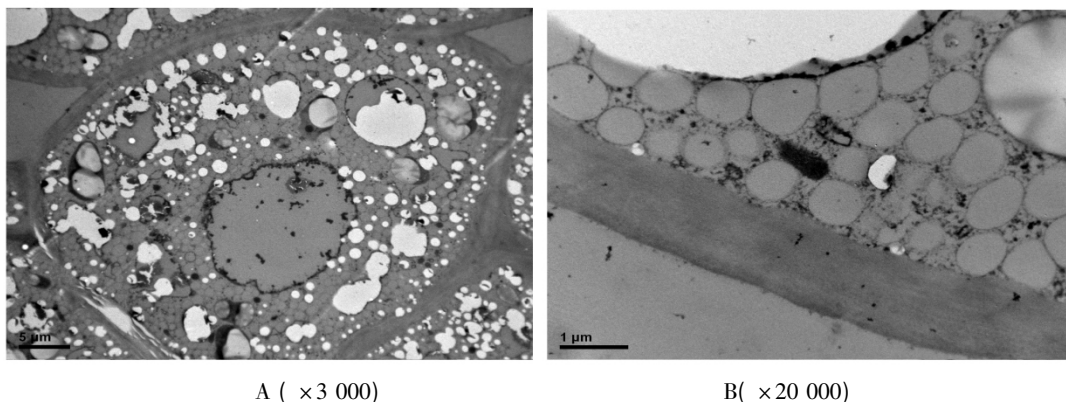


图 2 透射电子显微镜观察茶籽仁细胞的细胞形态、结构

Fig.2 Microscopic observation on morpha and structure of oil-tea *Camellia oleifera* seed cell by TEM

2.3 茶籽仁细胞表面形态结构的扫描电子显微镜观察

在水酶法制油工艺中,油料的粉碎程度决定了油料粒度的大小,对油脂的得率有重要影响^[19-20]。在进行酶解前,油料须达到足够的粉碎度从而确保油料细胞的细胞壁被充分破坏,使细胞内水溶性成分易于溶出释放油脂,也扩大了酶的相对作用面积和扩散速率,提高了酶的使用效能,使酶的作用更充分地发挥出来。如图 3 所示,经多次机械粉碎和干燥后,大部分油茶籽仁细胞的细胞壁皱缩但仍然保持细胞结构的完整性,能够在扫描电子显微镜中看到呈聚集状态的细胞团。

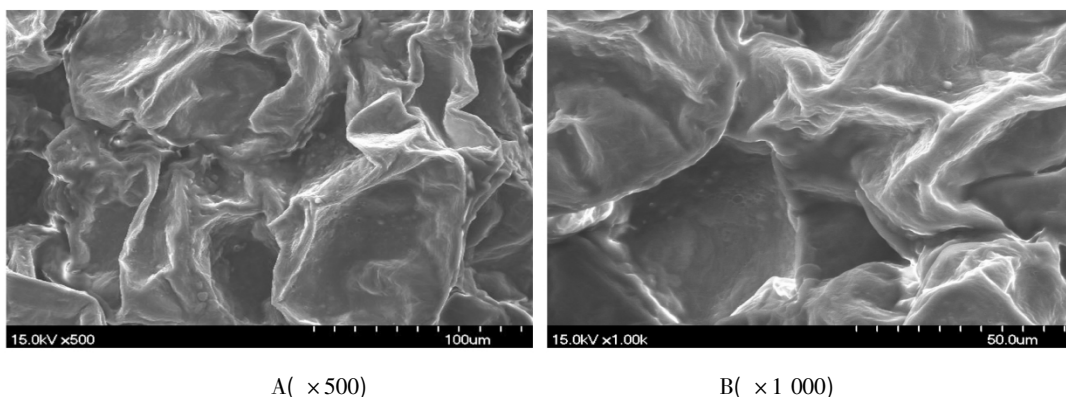


图 3 机械粉碎后茶籽仁细胞表面形态的扫描电子显微镜观察

Fig.3 Microscopic observation on cell morpha of grinded oil-tea *Camellia oleifera* seed by SEM

2.4 Alcalase 碱性蛋白酶处理后油茶籽细胞形态结构的观察

以图 4(A)、4(B) 为对照,由图 4(C) 可知,Alcalase 碱性蛋白酶能有效降解油茶籽仁细胞的细胞结构。未经处理的油茶籽粉鲜样中大部分细胞结构仍保持完整(图 4A);当用水处理时(图 4B),相当一部分表层细胞发生细胞破裂,这可能是因为机械粉碎使一部分油茶籽仁细胞的细胞壁发生损伤,在水相

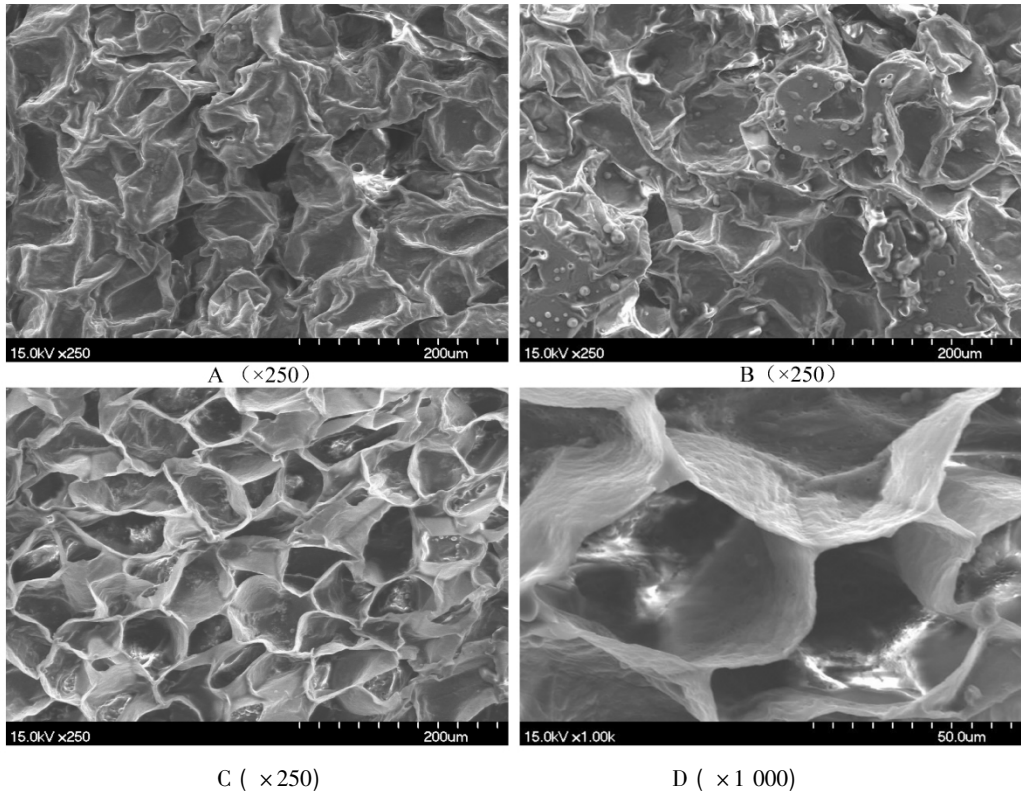


图 A 为未经处理的油茶籽粉鲜样; 图 B 为仅用水处理的酶空白样本; 图 C 为经 Alcalase 碱性蛋白酶处理后的油茶籽粉样本; 图 D 为图 C 的放大。

A: Untreated control group; B: Control group treated with water only; C: oil-tea *Camellia oleifera* seed treated with Alcalase; D: Local amplification of fig 4-C.

图 4 Alcalase 碱性蛋白酶处理后油茶籽细胞表面及内部形态结构的观察

Fig. 4 SEM observation on cell morpha and structure of oil-tea *Camellia oleifera* seed hydrolyzed by Alcalase
 溶液中这部分细胞因吸水而发生胀破, 而未被损伤的细胞在水相中仍能保持细胞结构的完整性; 当用 Alcalase 碱性蛋白酶处理时(图 4C) 经水酶法提油后的细胞几乎仅剩未完全降解的细胞壁结构残渣, 油茶籽细胞团已呈“镂空”形态(图 4D)。蛋白酶的良好作用效果可能是因为蛋白质在维持细胞结构的完整性以及细胞内脂体膜结构的稳定性方面发挥着重要的作用^[13-14]。扫描电子显微镜观察表明: Alcalase 碱性蛋白酶在油茶籽油的水酶法制取中发挥了明显的作用。

2.5 Alcalase 碱性蛋白酶处理油茶籽细胞后细胞形态结构的动态变化

由图 5 可知, Alcalase 碱性蛋白酶降解油茶籽细胞是一个渐进的过程, 图 5A 显示当酶解时间为 1 h 时, 细胞壁已经开始出现部分降解, 但大部分细胞仍保持细胞结构的完整性, 降解作用主要发生于油茶籽细胞团的表面。当酶解时间达到 2 h 时(图 5B), 降解程度明显增大。酶解时间达到 4 h 时(图 5C), 已看不到完整的细胞结构, 降解程度进一步增加, 细胞壁破碎成片状, 细胞内容物溶出。

3 结 论

(1) 研究结果表明, 在油茶籽仁细胞内含有许多呈离散分布的油脂体, 并从显微观察分析的角度证实: Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶能有效降解茶籽仁细胞的细胞壁、释放包括油脂在内的细胞内容物, 该过程是一个动态的降解过程。

(2) 实验结果证实: 水酶法制油技术是在机械破碎的基础上, 使用能降解油料细胞壁以及细胞内油脂体的酶作用于油料细胞, 破坏油料细胞结构, 从而使油脂易于从油料细胞中释出, 有利于后续利用非油组分对油和水的亲和力差异及油水比重的不同而实现对油脂的分离。

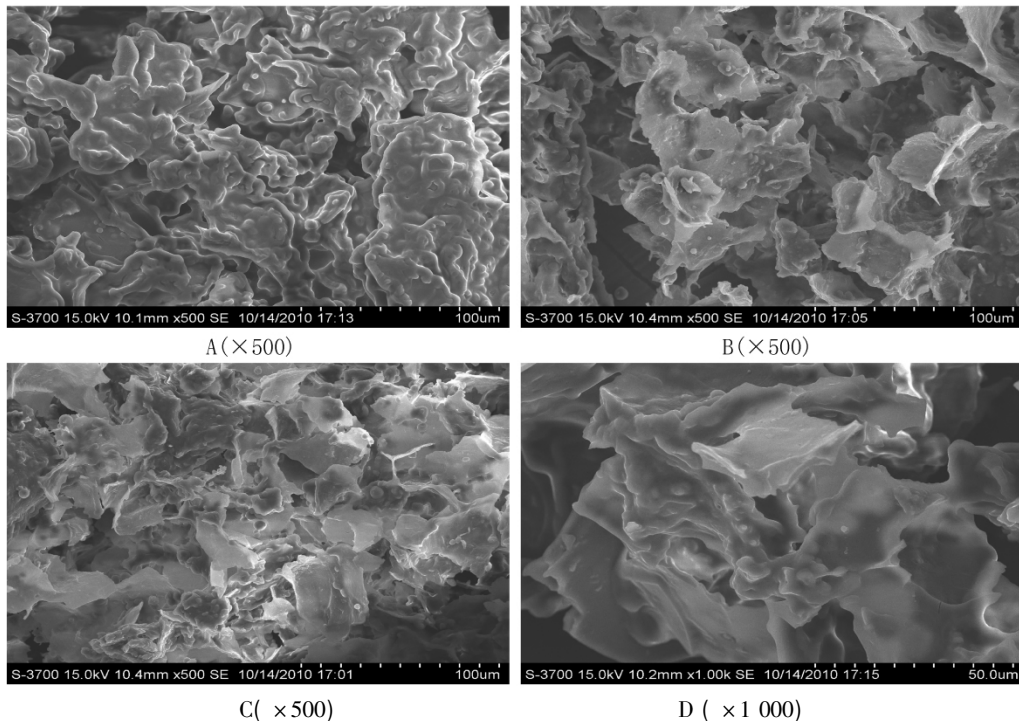


图 A、B、C 分别为酶处理 1、2、3 h 时的茶籽仁细胞形态; 图 D 为图 C 的放大。

A, B, C: The treatment time for hydrolyze were 1, 2, 3 h, respectively; D: Local amplification of fig 5-C.

图 5 Alcalase 碱性蛋白酶处理油茶籽仁细胞后细胞形态结构的动态变化

Fig. 5 SEM observation on dynamic changes of morpha and structure of oil-tea *Camellia oleifera* seed hydrolyzed by Alcalase

参考文献:

- [1] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 2 版. 北京: 中国林业出版社 2008: 1-14.
- [2] 赖梅生 杨柳. 茶油的药理与临床应用研究进展[J]. 中医外治杂志 2007, 16(3): 6-7.
- [3] Nathan S. Process for simultaneously extracting oil and protein from oleaginous materials[J]. US Patent, 1956(2): 762-820.
- [4] 王瑛瑶 贾照宝 张霜玉. 水酶法提油技术的应用进展[J]. 中国油脂 2008, 33(7): 24-26.
- [5] 王璋 许时婴. 酶法从全酯大豆中同时制备大豆油和大豆水解蛋白工艺的研究[J]. 无锡轻工业学院学报, 1994, 13(3): 179-191.
- [6] 钱志娟 王璋 许时婴. 等. 玉米胚芽水酶法提油及蛋白质的回收[J]. 无锡轻工大学学报: 食品与生物技术 2004, 23(5): 58-62.
- [7] Zhang S B, Wang Z, Xu S Y. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society 2007, 84(1): 97-105.
- [8] Moreau R A, Johnston D B, Powell M J, et al. A comparison of commercial enzymes for the aqueous enzymatic extraction of corn oil from corn germ[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society 2004, 81(11): 1071-1075.
- [9] 方学智 姚小华 王开良. 等. 不同制油方法对油茶籽油品质的影响[J]. 中国油脂 2009, 34(1): 23-26.
- [10] 聂明 杨水平 姚小华. 等. 不同加工方式对油茶籽物理性质及营养成分的影响[J]. 林业科学研究 2010, 23(2): 165-169.
- [11] 郭华 周建平 廖晓燕. 等. 油茶籽的细胞形态和成分及水酶法提取工艺[J]. 湖南农业大学学报 2007, 33(1): 83-87.
- [12] 卫生部食品卫生监督检验所. GB/T 5009.6 - 2003, 食品中脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社 2003.
- [13] Huang A. Structure of plant seed oil bodies[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1994, 4(4): 493-498.
- [14] Yoon S H, Kim I H, Kwon T W. Effects of enzyme treatments and ultrasonification on extraction yields of lipids and protein from soybean by aqueous process[J]. Korean J, 1991, 23: 673-676.
- [15] Bair C, Snyder H. Electron microscopy of soybean lipid bodies[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1980, 57(9): 279-282.
- [16] Murphy D. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants[J]. Progress in lipid research, 1993, 32(3): 247.
- [17] Huang A. Structure of plant seed oil bodies[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1994, 4(4): 493-498.
- [18] Yoon S, Kim I. Effects of enzyme treatments and ultrasonification on extraction yields of lipids and protein from soybean by aqueous process[J]. Korean Journal of Food Science and Technology (Korea Republic), 1991.
- [19] Cater C, Rhee K. Aqueous extraction: an alternative oilseed milling process[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1974, 51(4): 137-141.
- [20] Southwell K, Harris R. Extraction of oil from oilseeds using the hot water flotation method[J]. Tropical Science, 1992, 32(3): 251-262.