

超临界 CO₂ 萃取辣根精油及其在酱油中的应用

毛文颖¹, 刘 丽¹, 张燕燕¹, 姚婉莹², 李书斌³, 马文娟¹, 赵 晓¹, 孙 波^{1,*}

(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.美国明尼苏达大学生物质工程系, 明尼苏达 双城 55108;

3.哈尔滨正阳河调味食品有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘 要: 采用超临界 CO₂ 萃取辣根精油, 研究萃取压力、萃取温度和萃取时间对得率的影响, 并利用正交试验优化最适的萃取条件, 将萃取的辣根精油进行最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)和酱油中应用的实验。结果表明: 当萃取压力 25MPa、萃取温度 40℃、萃取时间 90min 时, 辣根精油得率为 0.91%; 辣根精油对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 均为 0.04 μL/mL; 与添加 1.0g/kg 苯甲酸钠相比, 单独添加 0.04 μL/mL 辣根精油或同时添加 0.02 μL/mL 辣根精油和 0.5g/kg 苯甲酸钠, 均使酱油在 37℃ 条件下保藏 30d 品质良好, 其中同时添加两种物质的应用性更好。

关键词: 辣根精油; 超临界 CO₂ 萃取; 最小抑菌浓度(MIC); 酱油

Supercritical CO₂ Extraction of Horseradish Essential Oil and Its Application in Soy Sauce

MAO Wen-ying¹, LIU Li¹, ZHANG Yan-yan¹, YAO Wan-ying², LI Shu-bin³, MA Wen-juan¹, ZHAO Xiao¹, SUN Bo^{1,*}

(1. College of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Department of Bioproducts and Biosystem Engineering, University of Minnesota, Minneapolis-St Paul 55108, USA;

3. Harbin Zhengyanghe Seasoning Co. Ltd., Harbin 150025, China)

Abstract: Horseradish essential oil was extracted by supercritical CO₂. The effects of extraction pressure, extraction temperature and extraction time on extraction rate of essential oil were investigated. The optimal extraction conditions were optimized by orthogonal tests. The minimal inhibitory concentration (MIC) of horseradish essential oil and its application in soy sauce was determined. The results showed that the optimal extraction process parameters were extraction pressure of 25 MPa, extraction temperature of 40 °C and extraction time of 90 min. Under the optimal extraction process, the extraction rate of horseradish essential oil was up to 0.91%. The MIC of horseradish essential oil against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were 0.04 μL/mL. Compared with 1.0 g/kg sodium benzoate, 0.04 μL/mL horseradish essential oil or 0.02 μL/mL horseradish essential oil coupled with 0.5 g/kg sodium benzoate could remain good quality of soy sauce after 30 days storage at 37 °C. The simultaneous application of both antioxidants is better than their single applications.

Key words: horseradish essential oil; supercritical CO₂ extraction; minimal inhibitory concentration (MIC); soy sauce

中图分类号: TS264.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)02-0098-04

辣根(*Armoracia lapathifolia*), 又名山葵, 为十字花科辣根属多年生草本植物^[1], 其肉质根主要用作香料调味料食用。近年来研究发现, 辣根的主要辛辣成分为异硫氰酸酯类化合物^[2], 约占干辣根的 1% 左右^[3]并以精油形式存在。这些独特的辛辣成分不仅具有抗氧化及抑菌、杀菌^[4-5]功能而且它还具有一定的抗癌效果。因此具有深远的综合开发利用潜力。

精油传统的提取方法主要有水蒸气蒸馏法^[2]和有机溶剂浸提法^[6], 但这些传统方法存在耗能大、收率低、溶

剂残留、热敏性和生物活性物质易被分解破坏等弱点, 而超临界 CO₂ 萃取法则克服了上述方法的不足^[7], 因此成为当今精油提取的首选技术^[8]。但目前超临界方法萃取辣根精油的报道并不多见。

酱油是我国传统的发酵调味品。为了延长产品的保藏期, 生产企业将酱油经过 80~90℃ 加热后再添加一定量的食品防腐剂——苯甲酸钠。若苯甲酸钠添加不当或过量使用, 会对酱油食品安全造成不良影响。目前, 虽然国内外对辣根精油化学成分、理化性质及抑菌作用

收稿日期: 2011-02-16

基金项目: 大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金项目(SB08C04)

作者简介: 毛文颖(1985—), 女, 硕士, 研究方向食品微生物与发酵工程。E-mail: maowenying@yahoo.com.cn

* 通信作者: 孙波(1962—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向食品微生物与发酵工程。E-mail: bosun114@163.com

的研究报道较多^[4,9-11],但对其在酱油抑菌作用的研究却鲜有报道。由于化学合成防腐剂的食品安全性问题,人们越来越注重天然、安全防腐剂的研制与开发,因此采用辣根精油部分或完全替代苯甲酸钠进行酱油保藏期的研究意义重大。

因此,本实验旨在探讨超临界 CO₂ 萃取辣根精油提取物的最佳工艺条件并对其杀菌、抑菌活性以及酱油保藏期进行初步的研究,为辣根的综合利用提供参考文献。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣根 市售;酱油 哈尔滨正阳河调味食品有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 东北农业大学食品学院。苯甲酸钠(食品级)天津天一达化工有限公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

HA221-50-06型超临界萃取装置 南通市华安超临界萃取有限公司;RT-02型粉碎机 杭州汇尔仪器设备有限公司;DHP-9162电热恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司;01J2003-04型立式压力蒸汽灭菌锅 上海东亚压力容器制造有限公司;麦氏比浊管 北京中西泰安技术服务有限公司。

1.3 方法

1.3.1 超临界 CO₂ 萃取辣根精油

将辣根粉碎后过 40 目筛,称取 200g,加入少量 50℃ 的水,翻拌以促进酶的分解作用,使挥发物尽量从组织中释放出来。然后迅速装入萃取釜中,密封后进行加热升温到一定温度。泵入 CO₂ 气体,将萃取釜压力升高到一定压力后,调节流量,进行辣根精油的萃取。溶有辣根精油的流体在分离釜中进行 CO₂ 分离,萃取结束后,从分离釜中放出萃取物。将萃取出的辣根精油和 25mL 二乙胺标准液分别加入到 250mL 的具塞锥形瓶中,加塞置于恒温水浴(25℃)中。1h 后以甲基红-溴甲酚绿为指示剂,用盐酸标准溶液进行滴定^[12],计算萃取物中异硫氰酸酯的相对含量,即为辣根精油的得率。

1.3.2 单因素试验

萃取压力对得率的影响:在萃取温度 35℃、萃取时间为 60min 条件下,测定萃取压力 15、20、25、30、35MPa 对得率的影响;萃取温度对得率的影响:在萃取压力 25MPa、萃取时间 60min 条件下,测定萃取温度 25、30、35、40、45℃ 对得率的影响;萃取时间对得率的影响:在萃取压力 25MPa、萃取温度 40℃ 条件下,测定萃取时间 20、40、60、80、100min 对得

率的影响。

1.3.3 正交试验设计

在进行辣根精油萃取时,首先确定萃取压力、萃取温度、萃取时间 3 个因素,并采用 L₉(3⁴)正交试验进行工艺条件优化,以辣根精油得率为指标,确定最佳工艺条件,因素水平见表 1。

表 1 辣根精油萃取最佳工艺条件正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	因素		
	A 萃取压力 /MPa	B 萃取温度 /℃	C 萃取时间 /min
1	23	38	70
2	25	40	80
3	27	42	90

1.3.4 辣根精油最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)的确定

菌悬液的制备:将培养 6~8h 待测菌培养物用生理盐水稀释校正浊度至 0.5 麦氏比浊管^[13],再用生理盐水经过 10 倍稀释法稀释后备用。

MIC 的确定:向 1mL 营养肉汤培养基中加入一定浓度的辣根精油稀释液,将每管逐次进行 2 倍稀释,再加入 1mL 菌悬液,最终使每管的辣根精油质量浓度分别为 0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01 μL/mL,同时做阳性空白和阴性空白。将试管于 37℃ 恒温培养箱培养 24h,用肉眼观察试管的浑浊情况,无浑浊试管所对应的辣根精油的最低质量浓度为辣根精油的 MIC。

1.3.5 辣根精油在酱油防腐中的应用

按比例将辣根精油和苯甲酸钠添加到经过 90℃ 杀菌的酱油中(表 2),同时做空白对照,并向上述酱油中添加大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的混合菌液,将酱油在 37℃ 条件下保藏 30d,测定初始(0d)、15d 和 30d 时的菌落总数。

表 2 辣根精油和苯甲酸钠的添加量
Table 2 Addition amount of horseradish essential oil and sodium benzoate

序号	辣根精油和苯甲酸钠的添加量
1 [#]	空白
2 [#]	苯甲酸钠 1.0g/kg
3 [#]	辣根精油 0.04 μL/mL
4 [#]	辣根精油 0.02 μL/mL、苯甲酸钠 0.5g/kg

1.3.6 辣根精油得率计算

$$\text{辣根精油得率} \% = \frac{99.15}{1000} \times (C_1 V_1 - C_2 V_2) \times 100$$

W

式中: C_1 为乙二醇标准溶液浓度/(mol/L); C_2 为盐酸标准溶液浓度/(mol/L); V_1 为乙二醇标准溶液加入体积/mL; V_2 为滴定时所消耗的盐酸标准溶液体积/mL; 99.15 为 1mol 烯丙基异硫氰酸酯质量/g; W 为取样量。

1.3.7 酱油中菌落总数测定

按 GB/T 4789.2—2010《食品微生物学检验: 菌落总数测定》的方法测定。

2 结果与分析

2.1 萃取压力对得率的影响

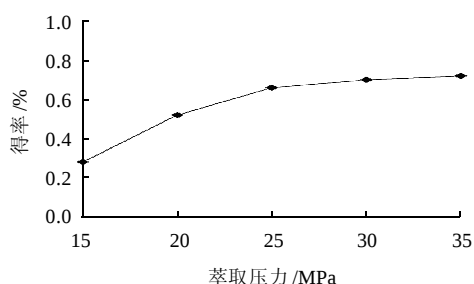


图1 萃取压力对得率的影响

Fig.1 Effect of extraction pressure on extraction rate of horseradish essential oil

图1表明,随着萃取压力的升高得率逐渐增加,当萃取压力由15MPa升至25MPa时,得率提高0.38%;而萃取压力由25MPa到35MPa时,得率仅提高0.06%。可见萃取压力对得率有明显影响,但是二者不呈线性相关,流体 CO_2 不能无限溶解辣根精油,因此不能无限地提高萃取压力。

2.2 萃取温度对得率的影响

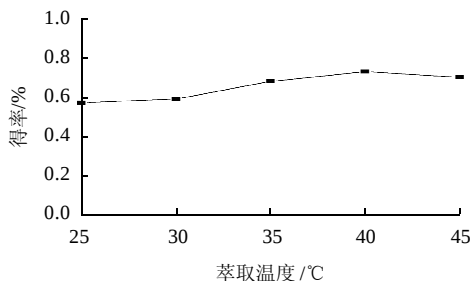


图2 萃取温度对得率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on extraction rate of horseradish essential oil

图2表明,随着温度的升高得率逐渐增加,当温度升高到40℃时,得率达到最大为0.73%,随着温度的继续升高,得率开始下降。这可能因为随着温度的升

高,精油分子的热运动加快,增加了其在流体 CO_2 中的溶解能力,但温度的升高也使流体 CO_2 分子间距增加,分子间作用力减小,溶解能力降低。这二者同时作用影响得率。

2.3 萃取时间对得率的影响

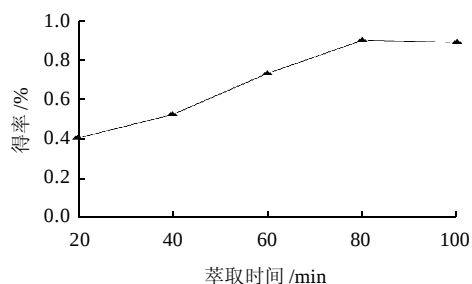


图3 萃取时间对得率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on extraction rate of horseradish essential oil

图3表明,随着萃取时间的延长得率增加。萃取时间为20~80min,得率与萃取时间几乎呈线性。萃取80min后,得率变化不明显。

2.4 最佳工艺条件优化

选用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,考察萃取压力、温度、时间对辣根精油得率的影响,确定超临界 CO_2 萃取辣根精油的最佳条件,结果见表3。

表3 超临界 CO_2 萃取辣根精油正交试验设计及结果

Table 3 Design and results of orthogonal tests for supercritical CO_2 extraction of horseradish essential oil

试验号	A	B	C	得率/%
1	1	1	1	0.58
2	1	2	2	0.65
3	1	3	3	0.69
4	2	1	2	0.88
5	2	2	3	0.91
6	2	3	1	0.79
7	3	1	3	0.71
8	3	2	1	0.63
9	3	3	2	0.66
K_1	1.92	2.17	2.00	
K_2	2.58	2.19	2.19	
K_3	2.00	2.14	2.31	
$K_1/3$	0.64	0.72	0.67	
$K_2/3$	0.86	0.73	0.73	
$K_3/3$	0.67	0.71	0.77	
R	0.22	0.02	0.10	

根据表3正交试验得到具有辣根特殊辛辣味的淡黄色油状液体。极差分析说明,3种因素对辣根精油得率的影响程度依次为: $A > C > B$,即萃取压力>萃取时

间>萃取温度,其中萃取压力对超临界CO₂萃取辣根精油的影响最大。正交设计直观分析结果显示,最佳萃取条件为A₂B₂C₃,即萃取压力25MPa、萃取温度40℃、萃取时间90min,在此工艺条件下,辣根精油得率为0.91%。

2.5 辣根精油 MIC 的确定

利用大肠杆菌、枯草芽孢杆菌检验辣根精油的抑菌效果,从实验结果可以看出(表4),当辣根精油质量浓度为0.02 μL/mL时,上述两种菌的试管均浑浊,当辣根精油质量浓度达到0.04 μL/mL时,两种菌的试管均透明,阳性和阴性空白试管分别出现了浑浊与透明两种现象,确定辣根精油对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的MIC均为0.04 μL/mL,并可抑制菌数约为10⁵CFU/mL大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的生长。

表4 辣根精油的MIC
Table 4 MIC of horseradish essential oil

菌种	辣根精油质量浓度/(μL/mL)							阳性空白	阴性空白
	0.64	0.32	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01		
大肠杆菌	—	—	—	—	—	+	+	+	—
枯草芽孢杆菌	—	—	—	—	—	+	+	+	—

注:—表示菌管透明, +表示菌管浑浊。

植物精油抑菌实验的报道很多^[14-15],将辣根精油熏蒸后进行杀虫抑菌^[16]的报道也有,但将其直接进行抑菌的报道很少,那么从实验结果来看,辣根精油对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有较好的抑菌效果。

2.6 辣根精油在酱油防腐中的应用

表5 辣根精油和苯甲酸钠对酱油的防腐效果
Table 5 Antiseptic effect of horseradish essential oil and sodium benzoate in soy sauce

指标	保藏时间/d	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]
菌落总数/(CFU/mL)	0	2.0 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁶
	15	1.5 × 10 ⁷	2.3 × 10 ⁶	1.1 × 10 ³	4.5 × 10 ³
	30	2.9 × 10 ⁹	1.7 × 10 ⁶	1.3 × 10 ³	4.3 × 10 ³

由表5可知,在酱油30d的保藏实验中,随着时间的延长,各组样品的菌落总数均有不同程度的变化,其中1[#]样品的菌落总数缓慢增加了3个数量级,2[#]样品的菌落总数变化不明显,3[#]、4[#]样品的菌落总数迅速降低了3个数量级后不再明显变化。结果表明:辣根精油与苯甲酸钠都具有较强的抑菌作用,但二者抑菌过程有些差异,其中辣根精油具有明显杀菌能力,从而使酱油的菌落总数迅速降低,而苯甲酸钠则作用相对缓慢。

因此单独添加辣根精油,即有快速抑菌作用。将辣根精油与苯甲酸钠分别减半并同时添加,其抑菌效果也较好。辣根精油的快速杀菌作用不仅可以迅速降低酱油中的菌落总数,以减轻酱油加热灭菌初始残留微生物菌数的负担,而且若将其与苯甲酸钠联合使用既可以减少苯甲酸钠用量又能弥补苯甲酸钠抑菌作用缓慢的不足,因此将辣根精油与苯甲酸钠联合用于酱油防腐则更有实际应用的其合理性。

3 结 论

本实验通过正交试验优化了超临界CO₂萃取辣根精油最适的萃取条件,即萃取压力25MPa、温度40℃、时间90min时,得率为0.91%。萃取出的辣根精油对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的MIC均为0.04 μL/mL,具有良好的抑菌效果。与添加1.0g/kg的苯甲酸钠相比,单独添加0.04 μL/mL辣根精油或同时添加0.02 μL/mL辣根精油和0.5g/kg苯甲酸钠,均使酱油在37℃条件下保藏30d品质良好,其中同时添加两种物质的应用性更好。

参考文献:

- [1] WANG Lihong, HUANG Xiaohua, ZHOU Qing. Effects of rare earth elements on the distribution of mineral elements and heavy metals in horseradish[J]. Chemosphere, 2008, 73(3): 314-319.
- [2] 林旭辉, 李荣, 姜子涛. 辣根挥发油化学成分的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(3): 73-75.
- [3] 林丽钦. 山葵、辣根、芥末的辛辣成分及功能[J]. 福建轻纺, 1999 (9): 1-4.
- [4] SHIN I S, HAN J S, CHOI K D, et al. Effect of isothiocyanates from horseradish (*Armoracia rusticana*) on the quality and shelf life of tofu[J]. Food Control, 2010, 21(8): 1081-1086.
- [5] VALERO M, FRANCES E. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth[J]. Food Microbiology, 2006, 23(1): 68-73.
- [6] 周建华, 寇兴然. 茼蒿精油提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 287-288.
- [7] 李斌, 孟宪军, 刘学, 等. 超临界CO₂萃取树莓叶片精油的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 280-281; 284.
- [8] 尹卓容. 超临界CO₂萃取辣根精油[J]. 中国调味品, 1996(7): 10-12.
- [9] 林丽钦. 山葵的风味物质及其抗菌杀虫作用[J]. 中国调味品, 2004 (1): 12-14, 23.
- [10] 张清峰, 姜子涛, 张云华, 等. 辣根油中异硫氰酸酯的水解稳定性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 125-128.
- [11] JUNG D C, LEE S Y, YOON J H, et al. Inhibition of pork and fish oxidation by a novel plastic film coated with horseradish extract[J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, 42(4): 856-861.
- [12] 张清峰, 姜子涛, 董峰光, 等. 二乙胺滴定法测定辣根及芥末制品中异硫氰酸酯含量的研究[J]. 中国调味品, 2005(2): 48-51.
- [13] 郭秀娟, 郑金秀, 李宏. 黄连、黄芩对3种厌氧菌的体外抑菌活性研究[J]. 河北中医, 2007, 29(8): 750-751.
- [14] DUNG N T, KIM J M, KANG S C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(12): 3632-3639.
- [15] AL-REZA S M, RAHMAN A, LEE J, et al. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujube* in inhibiting food-borne pathogens[J]. Food Chemistry, 2010, 119(3): 981-986.
- [16] 吴华. 辣根植物杀虫杀菌活性精油的提取及应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.