

# 火麻油水解提取多酚工艺优化及 多酚对线虫行为能力的影响

姚鉴芯<sup>1</sup>, 张哲皓<sup>1</sup>, 张帅<sup>2</sup>, 刘元法<sup>1</sup>, 徐勇将<sup>\*1</sup>

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 中国焙烤食品糖制品工业协会, 北京 100833)

**摘要:** 火麻油中的酚类化合物不仅可以提高油的抗氧化活性, 还具有抗癌、抗炎、预防心脑血管疾病等功效。热榨、冷榨、水酶、浸出 4 种提油方式中, 水酶法得油兼具高总酚质量分数和色泽清亮的优点, 故选择此法进行工艺优化。采用 Alcalase 2.4 L 蛋白酶水解火麻子, 提取火麻油, 以总酚质量分数为优化指标, 采用单因素实验对加酶量、料液比、酶解 pH 共 3 个影响因素进行研究, 并设计响应面实验。得到最佳工艺条件为加酶量 4.57% (质量分数), 料液比 1 g:4.79 mL, pH 8.24, 在此条件下, 测得火麻油中总酚为 65.78 mg/kg, 各因素对火麻油总酚质量分数的贡献顺序为: 加酶量>pH>料液比。氧化损伤是一些恶性疾病发展与生命体衰老的重要病理因素, 利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液处理同步化生长的野生型线虫, 模拟线虫体内的氧化应激损伤, 建立线虫运动缺陷模型, 将其转移至涂布不同加工火麻油的培养基上, 探究加工方式及油中主要活性成分对线虫的影响。结果表明: 火麻油中的多酚物质可以改善线虫的行为能力, 改善效果的顺序为: 水酶法>热榨法>冷榨法>浸出法。

**关键词:** 火麻油; 水酶法; 总酚; 响应面; 线虫行为

中图分类号: TS 224.3 文章编号: 1673-1689(2022)06-0060-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.06.007

## Process Optimization of Polyphenols Extracted from Hemp Seed Oil by Hydrolysis and Influence of *C. elegans* Behavior

YAO Jianxin<sup>1</sup>, ZHANG Zhehao<sup>1</sup>, ZHANG Shuai<sup>2</sup>, LIU Yuanfa<sup>1</sup>, XU Yongjiang<sup>\*1</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. China Association of Bakery and Confectionery Industry, Beijing 100833, China)

**Abstract:** The phenolic compounds in hemp seed oil can not only improve the antioxidant activity of oil, but also have the functions of anti-cancer, anti-inflammatory, and prevention of chronic diseases such as cardiovascular and cerebrovascular diseases. Among the four oil extraction methods of hot pressing, cold pressing, aqueous enzymatic and leaching, aqueous enzymatic process has the advantages of high total phenolic content and bright color. Therefore, this method is selected for process optimization. In this paper, Alcalase 2.4 L protease was used to hydrolyze hemp seeds and extract oil. The total phenolic content was taken as the optimization index. Three influencing factors were studied by single factor experiment including the amount of enzyme added, the ratio of solid to liquid and the pH value of enzymatic hydrolysis, and the single factor experiment was designed. The optimum process conditions were as follows: enzyme content of 4.57% (mass fraction), the ratio of

收稿日期: 2022-02-21

基金项目: 江苏省重点科技项目(BE2021306); 食品科学与技术国家重点实验室开放课题资助项目(SKLF-ZZB-202113)。

\* 通信作者: 徐勇将(1982—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事油脂营养安全与绿色制造研究。E-mail: yxutju@gmail.com

material to liquid of 1g:4.79 mL, and pH of 8.24. Under these conditions, the total phenolic content in hemp seed oil was determined to be 65.78 mg/kg. The contribution of various factors to the total phenolic content of hemp seed oil was as follows: the amount of enzyme added > pH value > ratio of solid to liquid. Oxidative damage is an important pathological factor in the development of some malignant diseases and the aging of living organisms. The synchronous growth of wild-type nematodes was treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution to simulate the oxidative stress damage in nematodes, and the nematode motor deficit model was established. These nematodes were transferred to the culture medium coated with different processed hemp seed oil to investigate the effects of processing methods and main active components in the oil on nematodes. The results showed that the polyphenols in hemp seed oil could improve the behavior of *C. elegans*, and the order of the improvement effect was as follows: aqueous enzymatic method > hot pressing method > cold pressing method > leaching method.

**Keywords:** hemp seed oil, aqueous enzymatic method, total phenolic content, response surface, *C. elegans* behavior

火麻(*Cannabis sativa* L.),俗称大麻、线麻、山丝苗等,桑科,大麻属,一年生草本植物。火麻的主要成分为脂肪酸、大麻素以及一些碳水化合物和微量元素<sup>[1-2]</sup>。火麻油可由火麻子直接压榨而得,油呈黄绿色且具有特殊的清香。根据干燥时烘箱的温度差异,压榨可分为冷榨和热榨,热榨油比冷榨油颜色更深。除此之外,还可通过加水酶解和溶剂浸出的方式得到火麻油。水酶法和浸出法制得的火麻油颜色较清亮,比压榨制油的色泽更好,但是出油率更低一些。不同加工方式制备的火麻油在总酚质量分数、理化指标、感官评定等方面都有差异,寻求一种综合评定较好且更具发展前景的加工方式,可以得到品质更优,更符合当下健康饮食需求的火麻油产品。

火麻油含有酚类化合物及生育酚,其抗氧化活性因为这类活性物质的存在而提高。研究发现,酚类物质可以有效预防一些慢性疾病,如肥胖、高血压、高血脂、心脑血管疾病等,对癌症、炎症等疾病的抵抗与治疗也发挥着积极作用<sup>[3-4]</sup>。植物油中酚类物质的存在,使得油脂的氧化稳定性较好,储藏期相对较长,可以长久地保持油的稳定色泽与感官品质<sup>[5]</sup>。不同加工方式制油测得的酚类化合物含量不同,其中水酶法和热榨制油总酚质量分数最高,同时,水酶法制油的呈色明显优于热榨制油,如果对其进行工艺优化,有望成为较理想的制油方法。

热榨、冷榨、水酶、浸出4种制油方式中,水酶法制油兼具环境友好、有益副产物多、安全性高、反

应条件温和、节能、无有机溶剂残留、总酚含量高等优点,有利于环境保护和提升油脂品质<sup>[6]</sup>。为得到营养价值更高的油脂产品,作者选择 Alcalase 2.4 L 蛋白酶水解火麻子,提取火麻油,以总酚质量分数为优化指标,用单因素实验对加酶量、液料比、酶解 pH 3 个影响因素进行研究,并用响应面法进行优化<sup>[7]</sup>。

以总酚为指标优化水酶法提油工艺后,需进一步检验其可行性:包括方法选择的生物适用性与酚类物质的生物活性作用。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是一种以细菌为食的多细胞动物,对生长环境要求不高,有较强的环境抵抗力,适用于实验室的培养条件,被国际公认为脂质代谢的模式生物之一。秀丽隐杆线虫具有很多研究优点:如生长周期短,虫体结构简单;在显微镜下呈透明状,便于染色和观察;和人体具有 40% 以上的同源性基因,发育繁殖快,后代多且易于保存;遗传背景清晰,进化高度保守;培育方式简单,成本低廉等<sup>[1,3,8-9]</sup>。因此,选择秀丽隐杆线虫作为研究的模式生物。

对于线虫这类模式生物而言,选择合适的模型用于研究,才更易于检验活性成分的功能。氧化损伤是一些恶性疾病发展与生命体衰老的重要原因,活性氧 ROS 和抗氧化防御系统的不稳定状态会引起机体的过氧化,破坏细胞并产生病理性蛋白质<sup>[3,10-12]</sup>。近年来,已有多种具有抗氧化功能的物质用于研究治疗线虫的氧化应激损伤,如红茶、虾青素、海带提取物中的对百草枯、姜黄素类化合物等<sup>[13-16]</sup>。根据酚类物质在油脂中的抗氧化作用,推测不同加工方式

制取的火麻油因总酚含量的差异会对线虫氧化应激损伤起到不同的治疗效果。因此,选择  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液处理同步化生长的野生型线虫,模拟线虫内源性的氧化应激损伤<sup>[10-12]</sup>,建立线虫运动缺陷模型,将其转移至涂布不同加工方式所得火麻油的培养基上,待幼虫成年后,测定其行为能力,探究加工方式以及油中的酚类物质对线虫的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 原料与试剂** 火麻子:购自广西壮族自治区巴马瑶族自治县;Alcalase 2.4 L 蛋白酶:诺维信生物技术有限公司产品;野生型秀丽隐杆线虫、大肠杆菌 *E. coli* OP50:来自江南大学孙秀兰教授实验室;质量分数 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液、二甲基亚砜、乙醇、甲醇、正己烷、氯化钠、胰蛋白胨、琼脂、碳酸钠、NaOH、盐酸、氯化钙、硫酸镁、磷酸钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、福林酚、胆固醇、酵母粉(均为分析纯):国药化学试剂集团产品;二醇基固相萃取(Diol-SPE)小柱:上海安谱实验科技股份有限公司产品。

**1.1.2 设备与仪器** FD56 干燥箱:德国 Binder 公司产品;DF-8L 氮吹设备:杭州德尔克设备有限公司产品;YX-18HDD 蒸汽灭菌锅:苏州奥普实验设备有限公司产品;scientz-IIID 超声波细胞破碎仪:宁波新芝生物科技公司产品;mini-240 紫外分光光度计:美国 Zeiss 公司产品;SW-CJ-1FD-II 生物安全柜:苏净安泰有限公司产品;ME204E 电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司产品;S8 专业商用榨油机:东莞香聚智能有限公司产品;旭曼 800Y 高速多功能粉碎机:永康市铂欧五金制品有限公司产品;5804R 高速离心机:德国 Eppendorf 公司产品;RE-52A 旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂产品;HH.S11-2 电热恒温水浴锅:上海博迅医疗生物仪器股份有限公司产品;RW20DS025 搅拌器:上海翼控机电有限公司产品;VGA/USB/AV 三合一接口 CCD 显微镜:上海韧跃电子科技有限公司产品。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 不同加工方法提取火麻油

1)冷榨制油 取火麻子 1 000 g 在 60 °C 烘箱中干燥 10 h,冷却后送入螺杆压榨机压榨,设置榨膛温度为 120 °C。收集的毛油以 5 000 r/min 离心 10

min,取上清液倒入 50 mL 离心管,用封口膜封好,保存在 4 °C 冰箱中备用。

2)热榨制油 取火麻子 1 000 g 在 100 °C 烘箱中干燥 3 h,冷却后送入螺杆压榨机压榨,设置榨膛温度为 120 °C。收集的毛油以 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液倒入 50 mL 离心管,用封口膜封好,保存在 4 °C 冰箱中备用。

3)水酶法制油 取火麻子 1 000 g 在 40 °C 烘箱中干燥 12 h,放入粉碎机粉碎。取 300 g 火麻子粉,按料液比 1 g:5 mL 加入蒸馏水并搅拌均匀,调节体系 pH 为 8.5,添加 8%(质量分数,以火麻子质量计)Alcalase 2.4 L 蛋白酶,放入 60 °C 水浴锅以 135 r/min 恒温搅拌,酶解 3 h 后升温至 90 °C 灭酶 10 min,冷却至室温,8 000 r/min 离心 30 min,取出上层游离油,置于 4 °C 冰箱保存备用。

4)浸出提油 火麻子在 40 °C 烘箱干燥 12 h 后,放入粉碎机粉碎,取 300 g 粉末,加入正己烷(料液比 1 g:5 mL)后,用搅拌仪恒速搅拌过夜,静置过滤,在旋转蒸发器中蒸出溶剂,收集油液。

#### 1.2.2 水酶法提油单因素实验

1)加酶量对火麻油总酚质量分数的影响 在料液比 1 g:5 mL,体系 pH 8.5,恒温 60 °C 搅拌,酶解 3 h,90 °C 灭酶 10 min,8 000 r/min 离心 30 min 的条件下,分别考察加酶量为 2%、4%、6%、8%(质量分数)时,火麻油中的总酚质量分数。

2)料液比对火麻油总酚质量分数的影响 在加酶量 8%(质量分数),体系 pH 8.5,恒温 60 °C 搅拌,酶解 3 h,90 °C 灭酶 10 min,8 000 r/min 离心 30 min 的条件下,分别考察料液比为 1 g:3 mL、1 g:4 mL、1 g:5 mL、1 g:6 mL 时,火麻油中的总酚质量分数。

3)pH 对火麻油总酚质量分数的影响 在加酶量 8%(质量分数),料液比为 1 g:5 mL,恒温 60 °C 搅拌,酶解 3 h,90 °C 灭酶 10 min,8 000 r/min 离心 30 min 的条件下,分别考察体系 pH 为 6.5、7.5、8.5、9.5 时,火麻油中的总酚质量分数。

**1.2.3 响应面实验设计** 基于单因素实验结果,设计主要影响因素的水平取值范围。采用响应面中心复合实验,观察各酶解参数对优化指标的影响规律。以加酶量、料液比、pH 为自变量,以火麻油中总酚质量分数为响应值,实验设计见表 1。

**1.2.4 火麻油中总酚含量测定** 用 10 mL 甲醇和 10 mL 正己烷活化 Diol-SPE 柱。在离心管中称取

表1 响应面实验设计表

Table 1 Factors and levels of response surface methodology

水平	加酶量/%	料液比/(g:mL)	pH
-1	2	1:4	7.5
0	4	1:5	8.5
1	6	1:6	9.5

3.0 g 火麻油,加入 5 mL 正己烷,振荡 1 min 使其溶解,沿萃取柱管壁加入后,用 10 mL 正己烷洗柱,弃去全部淋洗液。用 10 mL 甲醇溶液洗脱,洗脱液在氮气下吹干后加入 2.0 mL 甲醇复溶,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后置于样品瓶中<sup>[12]</sup>。在 15 mL 离心管中加入 1 mL 火麻油多酚提取物、0.5 mL 福林酚试剂、2 mL 质量分数 7.5% 的碳酸钠溶液和 6.5 mL 去离子水,涡旋振荡 2 min 混匀。将反应物置于 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中加热 30 min,溶液将由无色变蓝色。在 750 nm 波长下测定溶液吸光度,通过标准曲线计算火麻油中总酚的质量分数。

**1.2.5 线虫实验** 线虫培养基 (nematode growth medium, NGM): 3 g NaCl、2.5 g 蛋白胨、17 g 琼脂、25 mL 的 1 mol/L 磷酸钾缓冲液、975 mL 去离子水, 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min 后,加入 1 mL 的 1 mol/L  $\text{MgSO}_4$  溶液、1 mL 的 1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液、1 mL 胆固醇溶液 (5 mg/mL 无水乙醇配制)。

M9 缓冲液: 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、15.1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、5 g NaCl、1 mL 的 1 mol/L  $\text{MgSO}_4$  溶液,加去离子水至 1 L,摇匀后 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min。

5 mg/mL 火麻油溶液 (4 种加工方式制得): 在 10 mL 离心管中加入 40 mg 油液和 8  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,加去离子水至 8 mL,涡旋混匀后,使用超声波细胞破碎仪充分破碎浊液,至不分层为止。

1) 线虫生长同步化 用 M9 缓冲液将培养基表面的成虫冲洗至 1.5 mL 离心管中,离心后弃上清液,再用 M9 缓冲液清洗两遍,留 500  $\mu\text{L}$  缓冲液于离心管内。然后加入 500  $\mu\text{L}$  的裂解液 (M9 缓冲液、5 mol/L NaOH 溶液、质量分数 10% NaClO 溶液体积比为 7:2:1) 混匀,用 M9 洗涤沉淀 3 次,去除残存的裂解液,最终得到的沉淀即为虫卵。

2) 运动缺陷模型建立 配制 10 mmol/mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液,待虫卵在 M9 缓冲液中孵育 16 h 成长为 L1 期幼虫后,转移到 1.5 mL 离心管中,6 500 r/min 离心 2 min 后弃上清液,留下 500  $\mu\text{L}$  的液体,加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液至 1 mL,实际的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液处理浓度为 5

mmol/mL,混匀后在 24 孔板中浸泡 1 h。

3) 培养分组 线虫培养一共分 10 组,2 组培养基不涂油,另外 8 组培养基分别涂布热榨油、冷榨油、浸出油和水酶法得油,每种油涂布 2 个平板,共得到 5 种处理方式的培养基,每种培养基分别转入运动缺陷的 L1 期幼虫和正常幼虫。

4) 线虫行为能力测定 头部摆动频率测定:在空白的 NGM 培养基上滴加 50  $\mu\text{L}$  M9 缓冲液,挑取线虫到缓冲液中,待线虫在缓冲液中稳定 1 min 后,用显微镜拍摄,录制视频,数出线虫 1 min 内头部往返摆动的次数,每组测定 20 条。身体弯曲频率测定:挑取线虫到空白的 NGM 培养基上,待线虫恢复稳定 1 min 后,用显微镜拍摄,录制视频,20 s 内记录线虫身体弯曲的次数,每组测定 20 条。

### 1.3 数据处理

采用 Excel、SPSS 28.0 和 Design-Expert 8.0 对实验数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 水酶法提取火麻油单因素实验

**2.1.1 加酶量对火麻油总酚质量分数的影响** 在料液比 1 g:5 mL,体系 pH 8.5,恒温 60  $^{\circ}\text{C}$  搅拌,酶解 3 h,8 000 r/min 离心 30 min 的条件下,考察加酶量对火麻油中总酚质量分数的影响,结果见图 1。随着加酶量的增加,火麻油中总酚质量分数先升高后下降,当加酶量 4% (质量分数) 时,总酚质量分数明显高于其他组。随着酶量增多,酶与底物相互作用,使酶功能进一步发挥,分解油脂颗粒内部的脂蛋白与脂多糖,释放油脂<sup>[6]</sup>,进而使得多酚物质充分溶出;当加酶量进一步增加,酶与底物的作用位点逐渐达到饱和,降低了溶出率。故响应面实验中,加酶量选择质量分数 2%~4%。

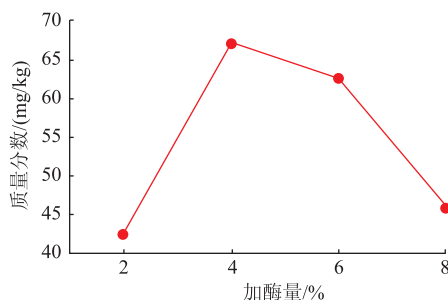


图1 加酶量对火麻油总酚质量分数的影响

Fig. 1 Effect of enzyme dosage on total phenol content of hemp seed oil

**2.1.2 料液比对火麻油总酚质量分数的影响** 在加酶量 8%(质量分数), 体系 pH 8.5, 恒温 60 °C 搅拌, 酶解 3 h, 8 000 r/min 离心 30 min 的条件下, 考察料液比对火麻油中总酚质量分数的影响, 结果见图 2。料液比在 1 g:3 mL~1 g:5 mL 时, 火麻油中总酚质量分数上升; 在 1 g:5 mL~1 g:6 mL 时, 总酚质量分数明显下降。适量的水可促进酶解作用, 随着水分增多, 酶反应体系中的酶浓度和底物浓度降低, 分子碰撞概率减小, 酶作用效果降低, 使酚类物质难以溶出<sup>[3]</sup>; 水量过少时, 料液黏度较大, 酶与底物流动受到阻滞, 油中的物质难以分解出来。因此, 响应面实验设计中, 料液比选择 1 g:4 mL~1 g:6 mL。

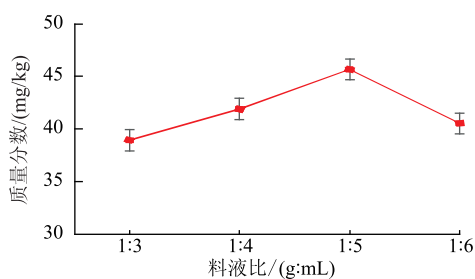


图 2 料液比对火麻油总酚质量分数的影响

Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on total phenol mass fraction of hemp seed oil

**2.1.3 pH 对火麻油总酚质量分数的影响** 在加酶量 8%(质量分数), 料液比为 1 g:5 mL, 恒温 60 °C 搅拌, 酶解 3 h, 8 000 r/min 离心 30 min 的条件下, 考察体系 pH 对火麻油中总酚质量分数的影响, 结果见图 3。随着体系 pH 增加, 火麻油中总酚质量分数先上升后下降, 在 pH 8.5 附近出现最大值。Alcalase 2.4 L 蛋白酶的最适 pH 为 8.5, 此时酶的水解作用最佳, 得到的活性物质含量最高。因此, 响应面实验中, 选择 pH 为 7.5~9.5。

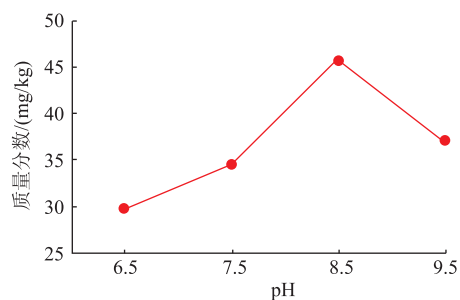


图 3 pH 对火麻油总酚质量分数的影响

Fig. 3 Effect of pH on total phenol content of hemp seed oil

## 2.2 响应面实验结果分析

在单因素实验基础上, 选取加酶量( $X_1$ )、料液比( $X_2$ )、pH( $X_3$ )为自变量, 火麻油中总酚质量分数为响应值, 进行响应面实验, 结果见表 2。通过软件 Design-Expert 8.0 对表 2 的数据进行回归分析, 得到的回归方程为:

$$Y = 66.94 + 5.86X_1 + 1.24X_2 - 2.44X_3 + 3.26X_1X_2 - 2.08X_1X_3 + 1.24X_2X_3 - 11.72X_1^2 - 7.22X_2^2 - 6.88X_3^2$$

表 2 响应面实验设计与结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Y
1	0	1	-1	54.85
2	0	-1	1	48.35
3	-1	0	1	43.88
4	-1	-1	0	41.97
5	1	0	1	49.69
6	0	1	1	50.66
7	1	-1	0	48.92
8	0	-1	-1	57.49
9	1	0	-1	56.96
10	0	0	0	66.94
11	-1	0	-1	42.83
12	1	1	0	60.54
13	-1	1	0	40.57

由表 3 可知, 模型  $F$  为 9.27,  $P < 0.05$  (差异显著), 自变量与响应值之间有显著的线性关系, 模型选择合适。该模型  $R^2 = 0.9653$ ,  $R^2_{Adj} = 0.8612$ , 说明模型与实验拟合性较好。实验的变异系数为 5.80%, 模型置信度较好, 说明该方程能很好地反映实验值的真实性。各因素对火麻油总酚质量分数的影响大小为:  $X_1 > X_3 > X_2$ , 即加酶量  $>$  pH  $>$  料液比。

加酶量与料液比、加酶量与酶解 pH、料液比与酶解 pH 的交互作用对火麻油中总酚质量分数的影响见图 4。利用 Design-Expert 软件对模型进一步分析, 得到最优响应结果: 加酶量为 4.57%(质量分数), 料液比为 1 g:4.79 mL, pH 为 8.24, 在此条件下, 火麻油中总酚的理论预测值为 67.29 mg/kg。

在响应面分析法求得的最佳条件下, 进行 3 次平行实验, 测得火麻油中总酚的 3 次平均值为 65.78 mg/kg, 与理论值差距较小, 说明实验结果与回归方程的预测值吻合性较好。

表 3 回归方程与方差分析

Table 3 Variance analysis for regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	732.15	9	81.35	9.27	0.046 6
$X_1$	274.48	1	274.48	31.28	0.011 3
$X_2$	12.23	1	12.23	1.39	0.322 9
$X_3$	47.78	1	47.78	5.45	0.101 8
$X_1X_2$	42.38	1	42.38	4.83	0.115 4
$X_1X_3$	17.31	1	17.31	1.97	0.254 8
$X_2X_3$	6.13	1	6.13	0.70	0.464 7
$X_1^2$	313.90	1	313.90	35.78	0.009 4
$X_2^2$	119.19	1	119.19	13.58	0.034 6
$X_3^2$	108.23	1	108.23	12.34	0.039 1
残差	26.32	3	8.77		
总误差	758.48	12			

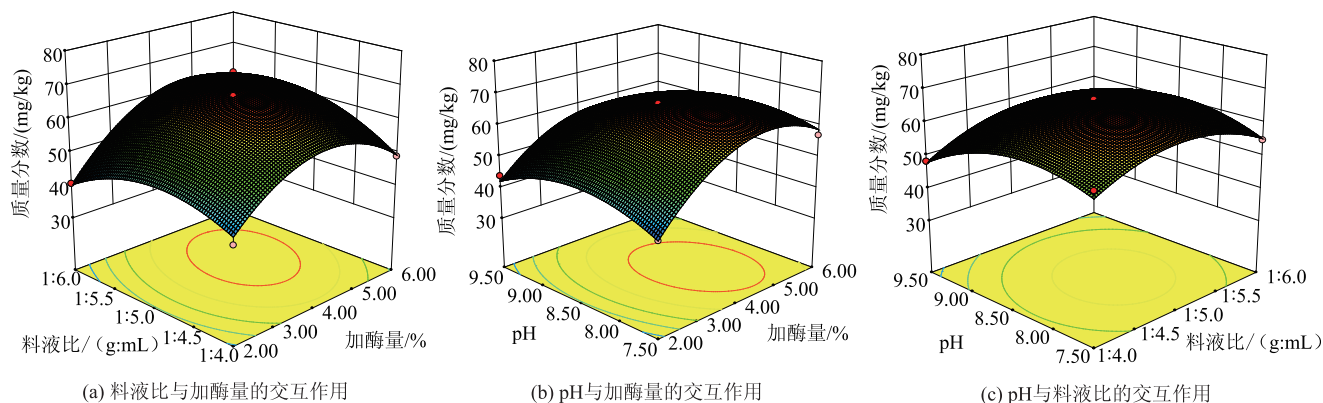


图 4 各因素的交互作用对大麻油总酚质量分数的影响

Fig. 4 Response surface plots for the interactive effects of different hydrolysis parameters on the total phenol content of hemp seed oil

### 2.3 大麻油对线虫行为能力的影响

线虫的运动行为能力主要包括头部摆动频率和身体弯曲频率,运动频率越高,能量消耗越多,机体代谢加速,会使脂质积累的程度降低<sup>[1,4]</sup>。实验采用 5 mmol/mL 的  $H_2O_2$  溶液处理裂解后同步生长到 L1 期的幼虫,建立运动缺陷模型,分别用 4 种加工方式处理的大麻油喂养,探究对线虫行为能力的影响。培养实验设计分组见表 4。

由图 5 可知,对比 4 种不同加工方式处理后的大麻油可以发现,水酶法和热榨法制油能够保持较高的总酚质量分数,且明显高于其他两组油样,冷榨法油样次之,浸出法油样最低;制备的油样中,水酶法和浸出法得油色泽较浅,冷榨油颜色较深,热榨油最深。

大麻油及其活性成分可以提高大脑组织中多种酶的活性,增加大脑组织的总抗氧化能力,降低神经细胞膜的脂质过氧化水平,保护细胞膜和脑组织形态的完整性,增强神经系统的功能<sup>[1,4]</sup>。由图 6 可知, $H_2O_2$  处理组线虫的行为能力都比正常线虫低一些。添加大麻油之后,由于油中活性物质的影响,可以改善线虫的行为能力,改善效果依次为:水酶法>热榨法>冷榨法>浸出法。根据不同加工方式下大麻油总酚质量分数测定结果可以得出,大麻油中的多酚活性物质确实可以改善线虫的行为能力,即使是经过  $H_2O_2$  处理的运动缺陷型线虫,受到油液中活性物质的作用之后,其头部摆动频率和身体弯曲频率也有所提高,可见线虫受到了油及其活性成分的影响,行为能力得到了改善。

表 4 线虫培养实验分组

Table 4 Different experimental groups for *C. elegans* culture

培养组号	培养基处理	线虫处理(已全部同步化生长)
1	不涂油	不处理
2		5 mmol/mL 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶液浸泡 1 h
3	涂布水酶法得油	不处理
4		5 mmol/mL 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶液浸泡 1 h
5	涂布热榨法得油	不处理
6		5 mmol/mL 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶液浸泡 1 h
7	涂布冷榨法得油	不处理
8		5 mmol/mL 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶液浸泡 1 h
9	涂布浸出法得油	不处理
10		5 mmol/mL 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 溶液浸泡 1 h

### 3 结语

选用 Alcalase 2.4 L 蛋白酶对火麻子水解,利用响应面法进行优化,得到水酶法提油最佳工艺条件:加酶量为 4.57%(质量分数),料液比为 1 g:4.79 mL, pH 为 8.24,在此条件下,火麻油中总酚为 65.78 mg/kg。由 *F* 检验可得各因素对火麻油总酚质量分数的贡献顺序为: $X_1 > X_3 > X_2$ ,即加酶量>pH>料液比。火麻油中的多酚物质可以改善线虫的运动行为能力。不同加工方式处理的火麻油总酚质量分数依次为:水酶法>热榨法>冷榨法>浸出法。受到火麻油中活性成分的影响,线虫行为能力的改善效果也不同,其顺序为:水酶法>热榨法>冷榨法>浸出法。

### 参考文献:

- [1] 姜璠. 火麻油中大麻素及其生物活性研究[D]. 无锡:江南大学,2021.
- [2] 臧佳辰,陶莎,薛璟怡,等. 火麻油脂酶水解条件的优化研究[J]. 中国油脂,2013,38(7):56-58.
- [3] BEGONA A, SUSANA G, ANA M G, et al. *Caenorhabditis elegans* as a model organism to evaluate the antioxidant effects of phytochemicals[J]. *Molecules*, 2020, 25(14):1-23.
- [4] ANCA R P, NATALIA S, ANDREEA I S, et al. New insights on hemp oil enriched in cannabidiol: decarboxylation, antioxidant properties and *in vitro* anticancer effect[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(5):1-25.
- [5] 许春芳,肖俊勇,郑明明,等. 火麻子油中酚类化合物的检测及抗氧化活性研究[J]. 中国油料作物学报,2018,40(4):585-591.
- [6] 沈玉平,周旭,张祖姣,等. 水酶法提取油脂研究进展[J]. 中国油脂,2021,46(2):14-19.
- [7] 王欢,李杨,江连洲,等. 水酶法提取火麻子油的工艺优化及其脂肪酸组成分析[J]. 食品科学,2013,34(22):27-32.
- [8] JENNIFER L W, MICHAEL R. Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 2017, 207(2):413-446.
- [9] 赵悦,卞倩. 秀丽隐杆线虫在环境毒理学中的应用研究进展[J]. 癌变·畸变·突变,2022,34(1):79-80.
- [10] ELITE P, ARNIM P. Measuring oxidative stress resistance of *Caenorhabditis elegans* in 96-well microtiter plates[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2015, 5(99):1-8.
- [11] 赵江,陈纯,王轶菲,等. 山楂提取物对秀丽隐杆线虫急性氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国食品添加剂,2015(10):53-57.
- [12] 刘涵,陈晓枫,刘晓娟,等. 不同几何构型虾青素的体外抗氧化作用及对秀丽隐杆线虫氧化应激的保护作用[J]. 食品科学,2019,40(3):178-185.
- [13] 国家粮食局. 粮油检验 植物油中多酚的测定 分光光度法:LS/T 6119-2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [14] 王梅,江连洲,李杨,等. 响应面法优化水酶法提取火麻仁油的研究[J]. 中国油脂,2013,38(6):9-12.
- [15] 周兴华,张晓伟,肖香,等. 双酚 S 暴露对秀丽隐杆线虫行为学及生长发育的影响[J]. 现代食品科技,2018,34(1):1-4.

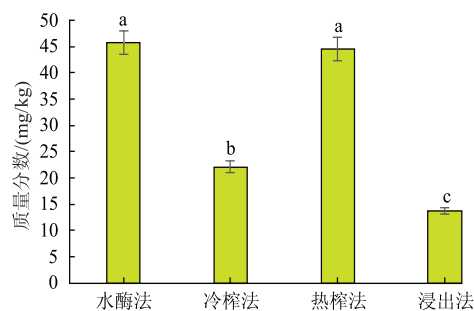
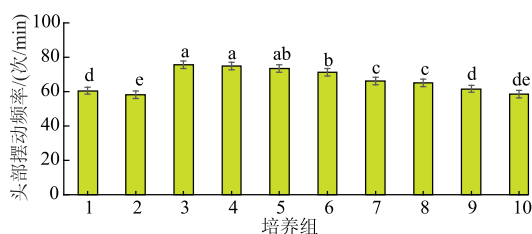
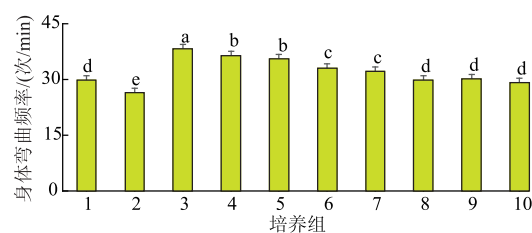


图 5 不同加工方式下火麻油的总酚质量分数

Fig. 5 Total phenol content of different processed hemp seed oils



(a) 火麻油对线虫头部摆动频率的影响



(b) 火麻油对线虫身体弯曲频率的影响

图 6 不同加工方式下火麻油对线虫行为能力的影响

Fig. 6 Effects of different processing hemp seed oils on the motor behavior of *C. elegans*