

天山冷水藻营养成分、油脂提取工艺 条件优化及其脂肪酸组成分析

艾斯卡尔·吐尔逊¹, 茹先古丽·买买提依明¹, 古丽菲热·伊力哈木¹, 肖移聪¹,
潘红军¹, 艾买提·买买提明², 祖丽胡玛尔·亚库普¹, 古丽加乃提·阿布拉¹,
艾合买提江·艾海提¹, 秦新政³, 刘 军¹

(1. 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046;

2. 新疆新光生物科技有限公司, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆农业科学院 微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830000)

摘要:为对开展天山冷水藻相关功效研究提供参考数据,以新疆赛里木湖的天山冷水藻粉为原料,采用凯氏定氮法测定其蛋白质含量,苯酚-硫酸法测定多糖含量,分光光度比色法测定叶绿素含量;采用超声波辅助有机溶剂提取法提取其中的油脂,通过单因素试验优化油脂提取工艺条件;采用气相色谱测定油脂脂肪酸组成及含量。结果表明:天山冷水藻中蛋白质含量为41.58%,多糖含量为15.34%,总叶绿素含量为2.42%;天山冷水藻油最佳提取工艺条件为以体积分数为70%的乙醇为提取溶剂、料液比1:25、超声提取时间20 min,在此条件下油脂得率为32.80%。天山冷水藻油中共检测出14种脂肪酸,以多不饱和脂肪酸为主,占总脂肪酸的66.53%,主要包括亚油酸、 α -亚麻酸和花生四烯酸,含量分别为50.77%、13.28%和2.48%。天山冷水藻中不仅蛋白质、多糖、叶绿素含量较高,其油脂中多不饱和脂肪酸含量也比较高,具有很大的研究价值。

关键词:天山冷水藻;蛋白质;多糖;叶绿素;油脂;脂肪酸

中图分类号:TS222;TS224.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)11-0110-05

Nutrient components, optimization of oil extraction conditions and fatty acid composition analysis of Tianshan cold water algae

ASKAR Tursun¹, RUXIANGULI Maimatyiming¹, GULIFEIZHE Yilihamu¹,
XIAO Yicong¹, PAN Hongjun¹, AIMAITI Mematim², ZULIHUMAER Yakupu¹,
GULIJIANAITI Abula¹, AIHAMATIJIANG Aihaiti¹, QIN Xinzheng³, LIU Jun¹

(1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetics Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Xinjiang Xinguang Biological Technology Co., Ltd., Urumqi 830000, China; 3. Institute of Microbiology Application, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000, China)

Abstract: In order to provide reference data for research on the efficacy of Tianshan cold water algae, using the Tianshan cold water algae powder from Sayram Lake in Xinjiang as raw materials, the Kjeldahl

收稿日期:2021-09-29;修回日期:2022-07-04

基金项目:自治区创新环境(人才基地)建设项目;新疆地理标志林果产品品质特征成分数据库构建(PT2009)

作者简介:艾斯卡尔·吐尔逊(1999),男(维吾尔族),硕士研究生,研究方向为食品科学与工程(E-mail)206407811@qq.com。

通信作者:艾合买提江·艾海提,副教授(E-mail)2386935884@qq.com;刘 军,副教授,博士(E-mail)105506757@qq.com。

method was used to determine its protein content, the polysaccharide content was determined by the phenol-sulfuric acid method, the chlorophyll content was determined by spectrophotometric colorimetry, the oil was extracted by ultrasonic-assisted organic solvent extraction method, and the oil extraction conditions were optimized by single-factor experiment, and the fatty acid

composition and content of the oil were determined by gas chromatography. The results showed that the protein content of Tianshan cold water algae was 41.58%, the polysaccharide content was 15.34%, and the total chlorophyll content was 2.42%. The optimal extraction conditions of Tianshan cold water algae oil were 70% ethanol as the extraction solvent, solid-liquid ratio 1:25, and ultrasonic extraction time 20 min. Under these conditions, the oil yield of Tianshan cold water algae was 32.80%. A total of 14 fatty acids were detected in Tianshan cold water algae oil, mainly polyunsaturated fatty acids, accounting for 66.53% of the total fatty acids, mainly including linoleic acid, α -linolenic acid and arachidonic acid, with contents of 50.77%, 13.28% and 2.48% respectively. The contents of protein, polysaccharide and chlorophyll in Tianshan cold water algae are relatively high, and the polyunsaturated fatty acid content in its oil is also relatively high, which makes Tianshan cold water algae have great research value.

Key words: Tianshan cold water algae; protein; polysaccharide; chlorophyll; oil; fatty acid

藻类分为盐藻、裸藻、红球藻、小球藻4种,是一种高效生长、可积累大量脂质的光合生物^[1]。其中小球藻(*Chlorella*)是一种普遍存在的单细胞藻类,包括10个品种,常见的品种有蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)、椭圆小球藻(*C. ellipsoidea*)、普通球藻(*C. vulgaris*)等^[2]。天山冷水藻属于蛋白核小球藻类,因长期生存于属高山冷水性湖泊的新疆赛里木湖^[3],其细胞拥有极强的抗氧化、抗辐射、耐热、耐寒等性能。蛋白核小球藻含有丰富的蛋白质、多糖、膳食纤维、叶绿素、微量元素等多种活性物质^[4]。其中:小球藻蛋白质具有减轻应激反应、提高抗病能力和提高钙吸收量^[5]等应用价值;小球藻多糖具有调节免疫机能和抗病毒的作用^[6-7];叶绿素具有抗炎、抗溃疡、抗癌、抗胆固醇、造血等作用^[8]。

目前,国内外对其他藻类的研究比较广泛,但对新疆赛里木湖的天山冷水藻的研究鲜有报道。为了探究天山冷水藻的营养成分,本文采用凯氏定氮法测定其蛋白质含量,苯酚-硫酸法测定多糖含量,分光光度比色法测定叶绿素含量,通过超声波辅助有机溶剂提取法提取其中的油脂,采用单因素试验优化油脂提取工艺条件,并测定油脂的脂肪酸组成及含量,以期开展天山冷水藻相关功效研究提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

天山冷水藻粉(野生型天山冷水藻通过液体培养大量扩繁、干燥获得),由新疆新光生物科技有限公司提供。

硫酸钾,硫酸铜,石油醚,正己烷,无水乙醇,纯

水,浓硫酸(纯度95%~98%),甲醇,无水乙醚,37种混合脂肪酸甲酯标准品,溴甲酚绿-甲基红混合指示剂,正丁醇。

1.1.2 仪器与设备

KDN-1自动凯氏定氮仪,KDNX-20消解炉,F-200旋转蒸发仪,JP96-II超声波细胞粉碎机,AXTGL16M离心机,L5S紫外可见分光光度计,Agilent HP-88气相色谱仪。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白质含量测定

参照GB 5009.5—2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》第一法和刘军^[9]的方法测定蛋白质含量。

1.2.2 多糖含量测定

参考DB 45/T 2143—2020《甘蔗叶中多糖的测定 苯酚-硫酸法》以及文献[10-11]的方法并作一定修正。

标准曲线的绘制:称取0.1 g葡萄糖配制成质量浓度为0.1 mg/mL的葡萄糖标准溶液,分别吸取0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL葡萄糖标准溶液于具塞试管中,加水至1 mL,分别加入1 mL 5%的苯酚溶液和3 mL浓硫酸溶液,振荡混匀后沸水浴中加热10 min,冷却之后用紫外可见分光光度计测定485 nm处的吸光度。以葡萄糖质量浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到葡萄糖标准曲线回归方程: $y = 0.0093x - 0.01$ ($R^2 = 0.9938$)。

样品测定:称取0.1 g天山冷水藻粉置于25 mL烧杯中,按料液比1:25加入无水乙醇,超声提取40 min之后离心10 min,弃去上清液。藻泥中加入50 mL蒸馏水,超声提取3次,每次25 min,冷却之

后过滤,收集滤液,混匀后移取 1 mL 到 50 mL 容量瓶中,定容,摇匀后吸取 100 μ L 加入具塞试管中,按照葡萄糖标准曲线的绘制方法测定吸光度,带入标准曲线回归方程中计算多糖含量。做 6 组重复性试验。

1.2.3 叶绿素含量测定

参考 Seyfabadi^[12]、魏东^[13]等方法并作一定修正。称取 100 mg 天山冷水藻粉于 10 mL 螺口离心管中,加入 10 mL 95% 乙醇,在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 24 h,冰浴下超声波破碎细胞 60 s,于 6 000 r/min 离心 6 min,吸取上清液采用紫外分光光度计分别测定 412、431、460、480 nm 处的吸光度,根据魏东等^[13]的计算公式分别计算叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量。做 3 组平行试验。

1.2.4 天山冷水藻油的提取

称取 1 g 天山冷水藻粉于烧杯中,以一定料液比加入提取溶剂,在常温、超声功率 200 W 条件下超声辅助提取一定时间后,在 20 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 下离心 15 min,取上清液,沉淀重复提取 3 次。合并上清液,过滤后利用旋转蒸发器回收溶剂,再于 (100 \pm 5) $^{\circ}$ C 干燥 0.5 h 后称量质量,计算油脂得率。

1.2.5 脂肪酸组成分析

准确称取 0.02 g 天山冷水藻油,加入 1 mL 正己烷、500 μ L 无水乙醚涡旋 1 min,再加入 1 mL 2 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液、1 mL 甲醇后,涡旋 5 min,静置 15 min 后加入 5 mL 纯净水,取出上清液,放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱待测。

采用气相色谱测定脂肪酸含量,面积归一化法定量。气相色谱条件:Agilent HP-88 色谱柱(100 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m);进样量 0.5 μ L;分流进样,分流比 50:1,分流流量 50 mL/min;柱箱温度 120 $^{\circ}$ C,最高柱箱温度 260 $^{\circ}$ C;进样口温度 250 $^{\circ}$ C;升温程序为初始温度 120 $^{\circ}$ C,以 20 $^{\circ}$ C/min 升温至 175 $^{\circ}$ C,保持 10 min,以 1 $^{\circ}$ C/min 升温至 200 $^{\circ}$ C,保持 15 min,以 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 220 $^{\circ}$ C,保持 12 min;氢火焰离子检测器温度 260 $^{\circ}$ C;空气流量 400 mL/min,氢气燃气流量 40 mL/min,尾吹气(氮气)流量 30 mL/min。

1.2.6 数据处理

数据采用 Microsoft Excel 2016 进行统计分析;利用 Origin Pro 2021 软件绘图;采用 SPSS 25.0 软件进行差异显著性分析($p < 0.05$),结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

2 结果与分析

2.1 天山冷水藻营养成分(见表 1)

蛋白质	多糖	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素
41.58 \pm 1.14	15.34 \pm 0.03	1.97 \pm 1.23	0.26 \pm 0.31	2.42 \pm 1.20

由表 1 可以看出,天山冷水藻蛋白质含量为 41.58%,多糖含量为 15.34%,叶绿素 a 含量为 1.97%,叶绿素 b 含量为 0.26%,总叶绿素含量为 2.42%。可见天山冷水藻是很好的蛋白质、叶绿素和多糖来源。另外,经前期简单测定,天山冷水藻粗脂肪含量达到 30% 以上。

2.2 天山冷水藻油提取工艺优化

2.2.1 提取溶剂的选择

在料液比 1:25、超声提取时间 20 min、有机溶剂体积分数 100% 的条件下,考察不同提取溶剂对天山冷水藻油提取的影响,结果见图 1。

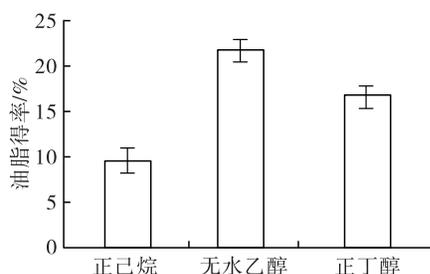


图 1 不同提取溶剂对天山冷水藻油提取的影响

由图 1 可见:无水乙醇提取天山冷水藻油时油脂得率最大,为 21.98%;其次是正丁醇,油脂得率为 16.98%;而采用正己烷提取时油脂得率最低,只有 9.66%。因此,选择乙醇作为提取天山冷水藻粉中油脂的溶剂。

2.2.2 乙醇体积分数的选择

在料液比 1:25、超声提取时间 20 min 的条件下,考察乙醇体积分数对天山冷水藻油提取的影响,结果见图 2。

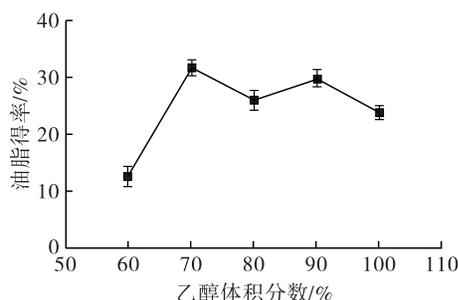


图 2 乙醇体积分数对天山冷水藻油提取的影响

由图 2 可见,乙醇体积分数分别为 60%、70%、80%、90% 和 100% 时,油脂得率分别为 12.96%、

32.28%、26.62%、30.60%、24.58%，乙醇体积分数为70%时油脂得率最高。因此，最佳乙醇体积分数选择70%。

2.2.3 料液比的选择

料液比是影响油脂得率的重要因素之一，适合的料液比有利于提取溶剂与底物充分接触，从而有效提高油脂得率。在乙醇体积分数70%、超声提取时间20 min的条件下，考察料液比对天山冷水藻油提取的影响，结果见图3。

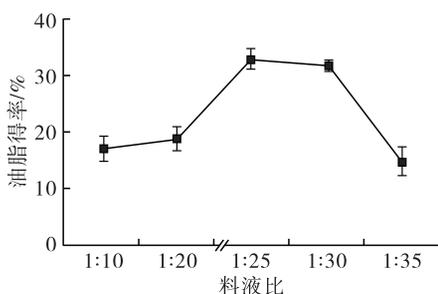


图3 料液比对天山冷水藻油提取的影响

由图3可知，当料液比从1:10增加到1:25时，油脂得率从17.24%提高到32.80%。之后随料液比的继续增大，油脂得率下降。当提取溶剂的量过低时，提取液比较黏稠，不利于提取溶剂与底物充分接触，造成油脂得率降低；当提取溶剂量过高时，一些杂质被提取出来，影响油脂的提取，造成油脂得率降低。因此，最佳料液比选择1:25。

2.2.4 超声提取时间的选择

在料液比1:25、乙醇体积分数70%的条件下，考察超声提取时间对天山冷水藻油提取的影响，结果见图4。

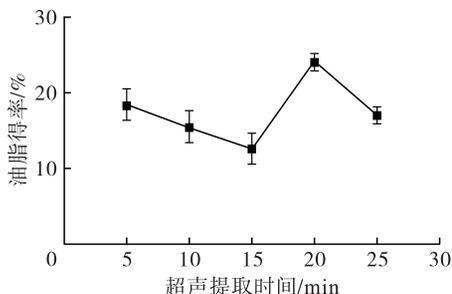


图4 超声提取时间对天山冷水藻油提取的影响

由图4可知：随超声提取时间的延长，油脂得率呈先降低后升高再降低的趋势，在超声提取时间为20 min时油脂得率最高，为24.62%；超声提取时间为15 min时油脂得率最低，只有13.31%。超声提取时间延长，可能会引入杂质使油脂没有被完全提取出来而出现油脂得率降低；超声提取20 min时油脂得率又升高可能与提取过程中温度的变化有关。因此，最

佳超声提取时间选择20 min。

通过单因素试验确定天山冷水藻油的最佳提取工艺条件为料液比1:25、超声提取时间20 min、乙醇体积分数70%，该条件下油脂得率为32.80%。

2.3 天山冷水藻油脂肪酸组成及含量

取最佳条件下提取的天山冷水藻油，测定其脂肪酸组成及含量。图5为天山冷水藻油的气相色谱图，表2为其脂肪酸组成及相对含量。

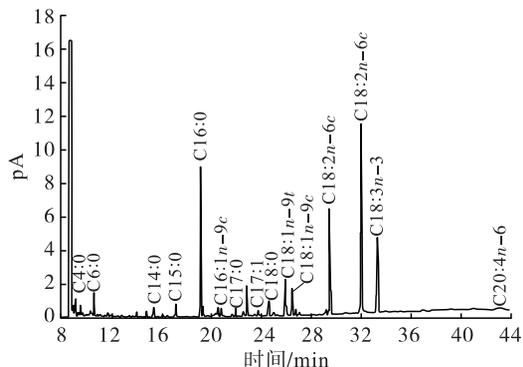


图5 天山冷水藻油的气相色谱图

表2 天山冷水藻油脂肪酸组成及相对含量

脂肪酸	相对含量/%
丁酸(C4:0)	0.64
己酸(C6:0)	0.66
肉豆蔻酸(C14:0)	1.13
十五烷酸(C15:0)	1.41
棕榈酸(C16:0)	16.06
棕榈油酸(C16:1n-9c)	0.93
十七烷酸(C17:0)	0.94
顺-10-十七碳烯酸(C17:1)	0.52
硬脂酸(C18:0)	2.24
反油酸(C18:1n-9t)	5.34
油酸(C18:1n-9c)	3.59
亚油酸(C18:2n-6c)	50.77
α -亚麻酸(C18:3n-3)	13.28
花生四烯酸(C20:4n-6)	2.48
饱和脂肪酸	23.08
单不饱和脂肪酸	10.38
多不饱和脂肪酸	66.53

从表2可看出，天山冷水藻油中共检出14种脂肪酸，其中：饱和脂肪酸含量为23.08%，主要为棕榈酸、硬脂酸，含量分别为16.06%和2.24%；单不饱和脂肪酸含量为10.38%，主要为反油酸、油酸，含量分别为5.34%和3.59%；多不饱和脂肪酸含量为66.53%，主要为亚油酸、 α -亚麻酸和花生四烯酸，含量分别为50.77%、13.28%和2.48%。

2.4 讨论

天山冷水藻中的多糖含量丰富，达到15.34%，是理想的、高效率的多糖来源。藻多糖具有降血糖、

降血脂、增强免疫等生物功能^[14],因此天山冷水藻可用于制造功能食品、健康生物产品和药品。天山冷水藻的总叶绿素含量为2.42%,是螺旋藻类叶绿素含量(1.42 g/100 g^[15])的1.7倍。研究发现,叶绿素对造血、排毒等有益^[16],其含量与很多营养成分具有正相关关系,叶绿素含量越高,其合成营养成分的能力越强,营养价值也越高^[17]。本研究说明天山冷水藻是较好的叶绿素营养补充物质。天山冷水藻油中多不饱和脂肪酸含量为66.53%,其中亚油酸含量为50.77%, α -亚麻酸含量为13.28%,花生四烯酸含量为2.48%,这些多不饱和脂肪酸在降血脂中发挥关键作用,如:吴洪号等^[18]研究发现膳食中合理比例的多不饱和脂肪酸可以有效保持身体健康,促进生长发育,降低心脑血管疾病发病率,降低血脂与血压,抗炎和抗癌;戴毅等^[19]研究发现 α -亚麻酸和 γ -亚麻酸具有辅助降血脂功能,且对机体健康无不良影响;林非凡等^[20]研究发现 α -亚麻酸具有显著的预防和治疗高脂血症的作用。

3 结论

天山冷水藻中蛋白质、多糖、总叶绿素含量分别为41.58%、15.34%、2.42%;天山冷水藻油提取的最佳工艺条件为以70%乙醇为提取溶剂、料液比1:25、超声提取时间20 min,在此条件下油脂得率为32.80%。天山冷水藻油中共检出14种脂肪酸,其中多不饱和脂肪酸含量最高,为66.53%,主要为亚油酸、 α -亚麻酸和花生四烯酸,含量分别为50.77%、13.28%和2.48%。天山冷水藻是优质的蛋白质、多糖、叶绿素来源,可以进一步开发成功能性食品以及高蛋白饲料等产品。天山冷水藻中的油脂富含多不饱和脂肪酸,为天山冷水藻降血脂功能的研究提供一定的参考数据。

参考文献:

[1] GERULOVÁ K, BARTOŠOVÁ A, BLINOVÁ L, et al. Magnetic Fe₃O₄ - polyethyleneimine nanocomposites for efficient harvesting of *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella ellipsoidea* and *Botryococcus braunii*[J]. Algal Res, 2018,33:165 - 172.

[2] 桂林,史贤明,李琳,等.蛋白核小球藻不同培养方式的比较[J].河南工业大学学报(自然科学版),2005(5):55 - 58.

[3] 杨文荣,郭焱,蔡林钢,等.赛里木湖饵料生物及渔业现状的研究[J].水产学杂志,2000(1):1 - 10.

[4] PUTRI T W, RAYA I, NATSIR H, et al. *Chlorella* sp.: extraction of fatty acid by using avocado oil as solvent and its application as an anti - aging cream [J/OL]. J Phys

Confer Series,2018,979(1):012009[2021-09-29].
https://doi.org/10.1088/1742-6596/979/1/012009.

[5] 虞梦恩.小球藻蛋白质的制备及其对氧化应激和糖代谢的影响[D].杭州:中国计量大学,2020.

[6] 吴思伟.小球藻多糖CEP4对RAW264.7小鼠巨噬细胞免疫调节活性的研究[D].南宁:广西民族大学,2021.

[7] QI J, KIM S M. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*[J]. Int J Biol Macromol, 2017,95:106 - 114.

[8] 邓祥元,成婕,刘孟姣,等.响应面法优化小球藻叶绿素提取工艺及其稳定性研究[J].东北农业大学学报,2015,46(7):40 - 49.

[9] 刘军.食品中蛋白质凯氏定氮法测定比较[J].食品安全导刊,2021(12):147,149.

[10] 雷铮宇.小球藻胞外多糖的分离纯化及其抗氧化和抗炎活性研究[D].湖南湘潭:湘潭大学,2020.

[11] 彭焱辉,王志强,徐阳纯,等.白桦茸中总糖含量测定方法的建立[J].特产研究,2021,43(4):53 - 55,59.

[12] SEYFABADI J, RAMEZANPOUR Z, KHOEYI Z A. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes[J]. J Appl Phycol, 2011,23:721 - 726.

[13] 魏东,张会贞,陈娇敏,等.优化营养方式强化蛋白核小球藻生物量及蛋白质和叶绿素生产[J].现代食品科技,2017,33(4):160 - 167.

[14] MIRZADEH M, KESHAVARZ L A, KHEDMAT L. Plant/algal polysaccharides extracted by microwave: a review on hypoglycemic, hypolipidemic, prebiotic, and immune - stimulatory effect[J]. Carbohydr Polym, 2021,266:118 - 134.

[15] 史坤,张旗,王娜,等.小球藻和螺旋藻的营养成分及其降血糖活性比较[J].食品研究与开发,2015,36(5):121 - 125.

[16] 王康君,樊继伟,张广旭,等.不同粒色小麦籽粒色素与功能营养成分积累的分析[J].江西农业学报,2021,33(4):17 - 21.

[17] 李静蕊.披针形蜈蚣藻的营养成分分析及其即食产品的研究开发[D].上海:上海海洋大学,2019.

[18] 吴洪号,张慧,贾佳,等.功能性多不饱和脂肪酸的生理功能及应用研究进展[J].中国食品添加剂,2021,32(8):134 - 140.

[19] 戴毅,闫慧慧,王枫. α -亚麻酸和 γ -亚麻酸对高脂血症人群的降血脂作用[J].现代生物医学进展,2009,9(23):4492 - 4495.

[20] 林非凡,谭竹钧.亚麻籽油中 α -亚麻酸降血脂功能研究[J].中国油脂,2012,37(9):44 - 47.