

油脂深加工

响应面法优化精制沙丁鱼油 EPA 和 DHA 富集工艺

张蒙娜¹, 宋恭帅¹, 彭 茜¹, 薛 静¹, 朱凤仙², 戴志远^{1,3}

(1. 浙江工商大学 海洋食品研究院, 杭州 310012; 2. 香川大学, 日本 高松 7610795;

3. 浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室, 杭州 310012)

摘要:以乙酯型精制沙丁鱼油(EPA 含量(15.41 ± 0.13)%, DHA 含量(8.00 ± 0.03)%)为原料,在尿酯比、包合温度、醇尿比、包合时间4个单因素试验的基础上,采用响应面分析法优化尿素包合法富集工艺。结果表明:最优工艺条件为尿酯比3.5:1、包合温度0℃、醇尿比2.6:1、包合时间1.2 h,此条件下,产物中EPA + DHA含量为(78.12 ± 0.12)%(EPA含量(53.35 ± 0.10)%;DHA含量(24.77 ± 0.02)%),与理论值78.17%基本一致。

关键词:精制沙丁鱼油;二十碳五烯酸(EPA);二十二碳六烯酸(DHA);响应面法;乙酯型

中图分类号:TS225.2;TQ641 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2018)08-0042-05

Optimization of EPA and DHA enrichment process of refined sardine oil by response surface methodology

ZHANG Mengna¹, SONG Gongshuai¹, PENG Xi¹, XUE Jing¹,
ZHU Fengxian², DAI Zhiyuan^{1,3}

(1. Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China; 2. Kagawa University, Takamatsu 7610795, Japan; 3. State Key Laboratory of Aquatic Products Processing of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Using refined sardine oil ethyl ester (EPA content (15.41 ± 0.13)%, DHA content (8.00 ± 0.03)%) as raw material, the effects of urea-ester ratio, inclusion temperature, ethanol-urea ratio and inclusion time on the EPA and DHA enrichment process were studied by single factor experiment, and the response surface methodology was used to optimize the urea inclusion enrichment process. The results showed that the optimal process conditions were obtained as follows: urea-ester ratio 3.5:1, inclusion temperature 0℃, ethanol-urea ratio 2.6:1, and inclusion time 1.2 h. Under these conditions, the total content of EPA and DHA was (78.12 ± 0.12)% (EPA content (53.35 ± 0.10)%, DHA content (24.77 ± 0.02)%), which was consistent with the theoretical value of 78.17%.

Key words: refined sardine oil; EPA; DHA; response surface methodology; ethyl ester type

沙丁鱼作为一种小型远洋鱼类,具有生长快、繁殖能力强等优点,被大量捕获和消费,除小部分流通于零售市场外,主要被用于精深加工的原材料^[1-2]。

沙丁鱼体内含油量较高,且富含多不饱和脂肪酸,因此将沙丁鱼作为生产鱼油的原料具有较大的经济价值^[3]。鱼油是鱼体内所有脂肪的统称,包括体油、肝油和脑油三大类^[4]。鱼油中富含多种人体所必需的多不饱和脂肪酸,尤其是二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、亚油酸及花生四烯酸等,被认为对人类的健康具有重要作用^[5]。其中,EPA与DHA为水产生物所特有的脂肪酸组分,具有良好的营养价值及生理活性功能^[6]。EPA和DHA具有预防心脑血管疾病、预防癌症、增强大脑活性、抗炎

收稿日期:2018-01-15;修回日期:2018-05-25

基金项目:科技部国际科技合作项目(2014DFA32880);浙江省重大科技专项重点项目(2012C03009-4)

作者简介:张蒙娜(1993),女,硕士研究生,研究方向为水产品加工与贮藏(E-mail)1063552284@qq.com。

通信作者:戴志远,教授级高级工程师(E-mail)dzy@mail.zjgsu.edu.cn。

作用等生理保健功能^[7-12]。因此,从鱼油中提取纯化高纯度 EPA 和 DHA 已成为各个国家研究的热点^[13]。

目前,市场上大多数的鱼油浓缩制品都是乙酯型的。精制鱼油经乙酯化处理后,能有效地富集 *n*-3 脂肪酸,以满足消费者需求。多不饱和脂肪酸的富集方法主要有低温结晶法、尿素包合法、分子蒸馏法、银离子层析法、超临界流体萃取法等^[14-17]。其中,尿素包合法所需设备简单、生产成本低、效率高、操作方便,尿素和乙醇均可回收再利用,并且较低的反应温度在一定程度上具有防止鱼油氧化的作用。之前的研究大多集中于采用尿素包合法富集动植物油中的亚麻酸^[18-19]、亚油酸^[14]等,而对精制沙丁鱼油中 EPA 和 DHA 富集工艺的研究较少。

因此,本研究以乙酯型精制沙丁鱼油为原料,采用尿素包合法对其多不饱和脂肪酸的富集工艺进行探究,研究尿酯比、包合温度、醇尿比、包合时间对包合效果的影响,以 EPA + DHA 含量为指标,通过响应面法确定最佳富集工艺参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

精制沙丁鱼油,浙江舟山奥旭鱼油制品有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、氯化钠、异丙醇、乙醚、95%乙醇、无水硫酸钠、正己烷,均为分析纯;百里香酚酞,尿素。

加热磁力搅拌器;AL204 电子天平;分液漏斗;旋转蒸发器;7890A 气相色谱仪,美国 Agilent 公司;SHZ-D(III)循环水式多用真空泵。

1.2 试验方法

1.2.1 精制沙丁鱼油乙酯化

称取 100 g 精制沙丁鱼油于三口烧瓶中,置于加热磁力搅拌器中,预热达到反应温度 50℃,将已完全溶解的 NaOH-无水乙醇(质量比 1:50)混合液缓慢加入鱼油中,反应密闭进行,边搅拌边加热 75 min 后,把反应溶液倒至分液漏斗中,分别加入 100、50、50 mL 的 5% 氯化钠热溶液清洗 3 次,静置一段时间后,去除下层浊液,将上层清液置于圆底烧瓶中,旋转蒸发除去乙醇和水,即得到乙酯型鱼油。

1.2.2 尿素包合法富集 EPA 和 DHA

将尿素溶于 95% 乙醇中,75℃ 条件下加热至混合溶液澄清,再倒入 20 g 乙酯型鱼油,恒温搅拌 1 h,自然冷却至室温后,低温静置一定时间。待反应结束,进行真空抽滤,收集滤液并旋蒸将乙醇脱去,水洗分液,分离得到上层液体即为纯化产物,按

下式计算得率。

$$\text{得率} = \frac{\text{纯化产物质量}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

1.2.3 纯化产物脂肪酸组成分析

称取 0.1 g 纯化乙酯型鱼油,加入 2 mL 正己烷提取,静置分层,取上层清液加入 1/10 体积的无水 Na₂SO₄ 去除溶液中痕量的水,将处理好的上层清液过有机相滤膜,后用气相色谱仪进行脂肪酸组成测定。

气相色谱条件:HP-88 氰丙基色谱柱(30 m × 0.25 mm, 0.20 μm);载气为 N₂;不分流进样;进样量 1 μL;检测器温度 220℃;程序升温,起始柱温 70℃,以 15℃/min 升至 120℃,保持 1 min,再以 5℃/min 升至 175℃,保持 10 min,最后以 5℃/min 升至 220℃,保持 5 min。采用脂肪酸乙酯标品进行定性和定量。

1.2.4 数据分析

利用 Origin Pro 8.0 作图分析并借助 Design Expert 8.0 进行响应面优化试验及数据分析。对样品进行 3 次平行测定,取平均值。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 尿酯比对包合效果的影响

在包合温度 5℃、醇尿比 3:1、包合时间 1.0 h 的条件下,考察尿酯比对包合效果的影响,结果如图 1 所示。

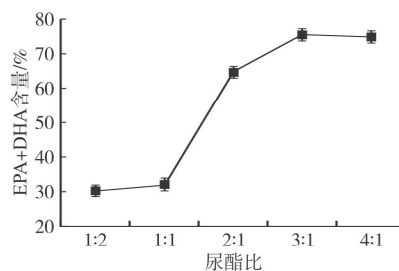


图1 尿酯比对包合效果的影响

由图 1 可知,随着尿酯比的增加,EPA + DHA 含量增加至一定程度后有稍微的降低。当尿酯比为 3:1 时,EPA + DHA 含量达到最大值。当尿素用量较少时,尿素在乙醇溶液中形成的框架少,只与饱和脂肪酸形成包合物结晶析出。随着尿素比例的增加,其形成的框架随之增多,也能与部分低不饱和脂肪酸形成包合物,从而提高包合效果。但尿素用量过多时,其在乙醇溶液中的溶解不充分,且一部分多不饱和脂肪酸也会与尿素形成包合物从而影响包合效果。当尿酯比为 4:1 时,产物得率仅为 11.50%,低于尿酯比 3:1 的得率 20.50%。因此,综合考虑

EPA + DHA 含量及得率, 尿酯比应选择 3:1 为宜。

2.1.2 包合温度对包合效果的影响

在尿酯比 3:1、醇尿比 3:1、包合时间 1.0 h 的条件下, 考察包合温度对包合效果的影响, 结果如图 2 所示。

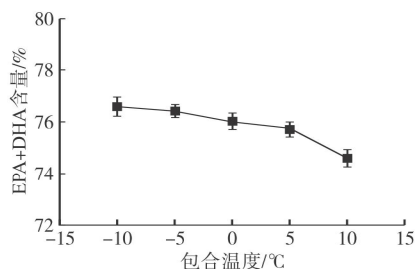


图2 包合温度对包合效果的影响

由图 2 可知, EPA + DHA 含量随着包合温度的升高而降低, 但影响较小。尿素包合反应是放热反应, 温度降低, 有利于反应向正反应方向进行, 加速形成包合物。当包合温度为 -10°C 时, 得率仅为 9.00%, EPA + DHA 含量为 76.49%; 而包合温度为 5°C 时, 得率达到 20.00%, EPA + DHA 含量为 76.22%, 仅比 -10°C 时低了 0.27 个百分点。因此, 综合考虑, 选择 5°C 为最适包合温度。

2.1.3 醇尿比对包合效果的影响

在尿酯比 3:1、包合温度 5°C 、包合时间 1.0 h 的条件下, 考察醇尿比对包合效果的影响, 结果如图 3 所示。

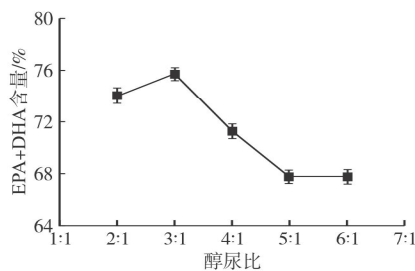


图3 醇尿比对包合效果的影响

由图 3 可知, 随着醇尿比的增加, EPA + DHA 含量先升高后降低, 在醇尿比 3:1 时达到最高。乙醇的作用是提供包合过程传质和传热的场所, 当乙醇用量较少时, 尿素无法充分溶解, 从而导致包合效果不理想; 当乙醇用量过大时, 溶质分散, 使得一些饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸溶解在乙醇溶液中, 而没有和尿素形成脲包结晶析出。因此, 选择醇尿比 3:1 为最佳。

2.1.4 包合时间对包合效果的影响

在尿酯比 3:1、包合温度 5°C 、醇尿比 3:1 的条件下, 考察包合时间对包合效果的影响, 结果如图 4 所示。

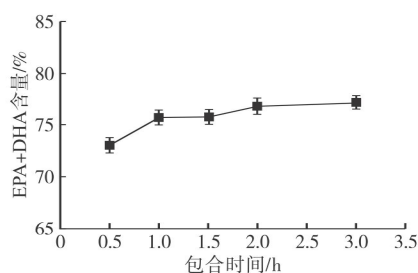


图4 包合时间对包合效果的影响

由图 4 可知, 在包合时间 0.5 ~ 1.0 h 范围内, EPA + DHA 含量增加明显, 而在包合时间 1.0 ~ 3.0 h 范围内, EPA + DHA 含量增加速度较缓, 且得率不断降低。当包合时间为 1.0 h 时, 得率在 20.00% 左右, 比 1.5 h 时增加了 8.00 个百分点, 而 EPA + DHA 含量却只相差了 0.10 个百分点。因此, 综合考虑, 选择 1.0 h 为最佳包合时间。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计

根据单因素试验结果, 对尿酯比、包合温度、醇尿比、包合时间四因素三水平的 29 个组合进行尿素包合响应面试验, 以 EPA + DHA 含量为响应值, 响应面试验因素水平见表 1, 响应面试验设计和结果见表 2。

表1 响应面试验因素水平

水平	A 尿酯比	B 包合温度/ $^{\circ}\text{C}$	C 醇尿比	D 包合时间/h
-1	2:1	0	2:1	0.5
0	3:1	5	3:1	1.0
1	4:1	10	4:1	1.5

表2 响应面试验设计和结果

试验号	A	B	C	D	EPA + DHA 含量/%
1	1	0	0	1	75.44
2	1	1	0	0	71.25
3	-1	-1	0	0	63.07
4	0	0	0	0	75.70
5	0	0	0	0	75.69
6	-1	0	0	-1	60.23
7	1	0	0	-1	73.13
8	0	0	1	1	69.46
9	0	0	0	0	75.70
10	-1	1	0	0	60.71
11	0	1	0	-1	71.86
12	1	-1	0	0	76.07
13	0	1	1	0	71.75
14	0	-1	0	-1	74.04
15	0	-1	-1	0	74.95
16	0	0	0	0	75.69
17	0	0	-1	1	73.91
18	0	-1	0	1	76.63

续表 2

试验号	A	B	C	D	EPA + DHA 含量/%
19	0	1	-1	0	73.51
20	1	0	1	0	70.01
21	-1	0	0	1	62.04
22	0	0	-1	-1	74.97
23	0	0	1	-1	69.75
24	-1	0	1	0	61.13
25	-1	0	-1	0	58.84
26	0	-1	1	0	71.30
27	1	0	-1	0	71.34
28	0	1	0	1	75.27
29	0	0	0	0	74.09

2.2.2 模型建立及显著性分析

应用 Design Expert 8.0 对试验数据进行多元回归拟合,得到 EPA + DHA 含量(Y)的回归方程为:

$$Y = 75.37 + 5.94A - 0.98B - 1.18C + 0.73D - 0.61AB - 0.90AC + 0.12AD + 0.47BC + 0.20BD + 0.19CD - 7.31A^2 - 0.16B^2 - 2.60C^2 - 0.62D^2$$

回归模型的方差分析见表 3。

表 3 回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	837.46	14	59.82	25.89	<0.000 1***
A	422.98	1	422.98	183.08	<0.000 1***
B	11.43	1	11.43	4.95	0.043 1*
C	16.61	1	16.61	7.19	0.017 9*
D	6.41	1	6.41	2.77	0.118 1
AB	1.51	1	1.51	0.65	0.432 3
AC	3.27	1	3.27	1.41	0.254 2
AD	0.06	1	0.06	0.03	0.873 0
BC	0.89	1	0.89	0.39	0.543 9
BD	0.17	1	0.17	0.072	0.791 8
CD	0.15	1	0.15	0.065	0.801 7
A ²	346.20	1	346.20	149.85	<0.000 1***
B ²	0.18	1	0.18	0.076	0.786 8
C ²	43.84	1	43.84	18.97	0.000 7***
D ²	2.50	1	2.50	1.08	0.315 7
残差	32.34	14	2.31		
失拟项	30.29	10	3.03	5.90	0.051 0
净误差	2.05	4	0.51		
总误差	869.81	28			

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

从表 3 可以看出,模型的 P 小于 0.000 1,说明模型的回归极显著,可靠性强;失拟项不显著,说明模型与实际情况拟合较好;尿酯比对包合效果的影响极显著,包合温度、醇尿比对包合效果的影响显著;二次交互项对包合效果的影响均不显著;尿酯比和醇尿比的二次项对 EPA + DHA 含量影响极显著。

各因素对 EPA + DHA 含量的影响顺序依次为:尿酯比(A) > 醇尿比(C) > 包合温度(B) > 包合时间(D)。

2.2.3 富集工艺的优化与验证

根据回归模型,通过 Design - Expert 软件分析得到的尿素包合法最优工艺条件为尿酯比 3.47:1、包合温度 0℃、醇尿比 2.61:1、包合时间 1.2 h,在此工艺条件下,EPA + DHA 含量的预测值为 78.17%。考虑到实际操作的便利,将工艺条件修正为尿酯比 3.5:1、包合温度 0℃、醇尿比 2.6:1、包合时间 1.2 h。以修正的最优富集工艺条件进行验证试验,平行 3 次取平均值,得到 EPA + DHA 含量为 $(78.12 \pm 0.12)\%$ (EPA 含量 $(53.35 \pm 0.10)\%$, DHA 含量 $(24.77 \pm 0.02)\%$),近似预测值,且得率为 19.50%。

3 结论

在单因素试验基础上,采用响应面分析法优化乙酯型精制沙丁鱼油尿素包合法富集工艺,以提高 EPA + DHA 含量。得到最优工艺条件为尿酯比 3.5:1、包合温度 0℃、醇尿比 2.6:1、包合时间 1.2 h。在最优工艺条件下,EPA + DHA 含量为 $(78.12 \pm 0.12)\%$ (EPA 含量 $(53.35 \pm 0.10)\%$, DHA 含量 $(24.77 \pm 0.02)\%$),较原料油提高了约 2 倍,且 EPA + DHA 得率为 19.50%。各因素对 EPA + DHA 含量的影响顺序依次为尿酯比 > 醇尿比 > 包合温度 > 包合时间。

参考文献:

- [1] LUCÍA M, LILIANA G F, MANUEL P, et al. Lipid and protein changes related to quality loss in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) previously processed under high - pressure conditions [J]. Food Bioprocess Technol, 2017, 10:296 - 306.
- [2] 黄家成,彭喜春. 双酶法制备沙丁鱼 ACE 抑制肽的工艺研究[J]. 食品工业科技,2015,36(18):295 - 300.
- [3] MORALES M R, DE L G, MUNIO M, et al. Mass transfer modeling of sardine oil polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentration by low temperature crystallization [J]. J Food Eng, 2011, 83:16 - 23.
- [4] 张云竹,柏杨,刘小琴,等. 海洋鱼油资源开发和应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(28):14005 - 14007.
- [5] SAMPATH C, CHANDRASEKAR V, PRASANNA D B, et al. Screening of polymeric membranes for membrane assisted deacidification of sardine oil [J]. Resour Effic Technol, 2016,2(S1):S119 - S123.
- [6] MORAIS S, MOURENTE G, MARTINEZ A, et al. Doco-

- sahehaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and $\Delta 4$ -desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids*, 2015 (5):588-597.
- [7] 张红燕,李晔,袁贝,等. 金枪鱼油冬化前后脂肪酸含量和主体风味的解析[J]. *核农学报*,2017,31(2):314-324.
- [8] 孙文菊,武瑞霞,陈杨扬,等. 尿素包合法富集鱼油中 EPA 和 DHA 的研究[J]. *食品工业*,2016,37(10):37-40.
- [9] 王亚男,徐茂琴,季晓敏,等. 分子蒸馏富集金枪鱼油 ω -3 脂肪酸的研究[J]. *中国食品学报*,2014,14(7):52-58.
- [10] 董志俭,王庆军,邵飞先,等. 明胶/桃胶复合凝聚凝胶化鱼油微胶囊的氧化稳定性研究[J]. *中国食品学报*,2014,14(7):66-72.
- [11] HEROLD P M, KINSELLA J E. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease; a comparison of findings from animal and human feeding trials [J]. *Am J Clin Nutr*, 1986, 43(2):566-598.
- [12] WILLIAM C E. Importance of n -3 fatty acids in health and disease [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71:171S-175S.
- [13] 闵征桥,高盼,何东平,等. 尿素包合法富集鱼油中 EPA 和 DHA 的工艺研究[J]. *粮油食品科技*,2013,21(6):25-29.
- [14] 翟元春,张润光,封斌奎,等. 尿素包合分离核桃油中亚油酸工艺优化[J]. *食品工业科技*,2015,36(10):311-319.
- [15] HAO L P, CAO X J, HUR B K. Separation of single component of EPA and DHA from fish oil using silver ion modified molecular sieve 13X under supercritical condition [J]. *J Ind Eng Chem*, 2008, 14(5):639-643.
- [16] SOLEIMANIAN Y, SAHARI M A, BARZEGAR M. Influence of processing parameters on physicochemical properties of fractionated fish oil at low temperature crystallization[J]. *Nutr Food Sci*, 2015(1):2-19.
- [17] MONTA S F, CATCHPOLE O J, TALLON S, et al. Semi-preparative supercritical chromatography scale plant for polyunsaturated fatty acids purification[J]. *J Supercr Fluids*, 2013, 79:46-54.
- [18] 张楠,林文,戴琳,等. 超临界萃取制备亚麻籽油并用尿素包合提纯亚麻酸的工艺研究[J]. *中国粮油学报*,2016,31(2):39-42.
- [19] 张海祥,方婷婷,潘文娟,等. 响应曲面法优化尿素包合富集蚕蛹油 α -亚麻酸的工艺[J]. *食品科学*,2011,32(4):74-77.

(上接第 41 页)

产上具有一定的参考价值。尿素包合法提纯牡丹籽油过程中尿素可以回收,回收率约 60%,生产成本低,且操作方法简单高效,有利于扩大规模用于工业化生产,具有广阔的发展前景。

参考文献:

- [1] 戚军超,周海梅,马锦琦,等. 牡丹籽油化学成分 GC-MS 分析[J]. *粮食与油脂*,2005,8(11):23-24.
- [2] 姚茂君,李静. 牡丹籽油亚临界流体萃取工艺优化[J]. *食品科学*,2014,35(14):53-57.
- [3] 张海满,刘福祯,戴玲妹. 尿素包合法纯化 α -亚麻酸工艺研究(II)— α -亚麻酸纯化过程正交实验研究[J]. *中国油脂*,2001,26(3):53-54.
- [4] 张海满,刘福祯,戴玲妹. 尿素包合法纯化 α -亚麻酸工艺研究(I)— α -亚麻酸纯化过程单因素实验研究[J]. *中国油脂*,2001,26(2):41-44.
- [5] 毛善巧,李西俊. 牡丹籽油的研究进展及油用牡丹综合利用价值分析[J]. *中国油脂*,2017,42(5):123-126.
- [6] 罗国平,梁宇柱,闫梦茹,等. 超声波辅助提取牡丹籽油的工艺优化研究[J]. *中国油脂*,2017,42(5):1-4.
- [7] 吕秋楠,史高峰,陈学福,等. 尿素包合法纯化蚕蛹油中 α -亚麻酸工艺研究[J]. *中国油脂*,2009,34(8):32-35.
- [8] 宫宇嘉,王鑫,徐丽萍. 尿素包合法纯化 α -亚麻酸方法的研究[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*,2014(4):500-505.
- [9] 张海祥,方婷婷,潘文娟,等. 响应曲面法优化尿素包合富集蚕蛹油 α -亚麻酸的工艺[J]. *食品科学*,2011,32(4):74-77.
- [10] 程安玮,孙金月,王维婷,等. 牡丹籽油的研究进展[J]. *食品科学技术学报*,2016,34(3):79-84.
- [11] 张海满,刘福祯. α -亚麻酸的功能、资源及生产方法[J]. *中国油脂*,2000,25(6):192-194.
- [12] 吴丽雅,黄群,余佶,等. 杜仲籽油混合脂肪酸制备工艺优化及脂肪酸组成分析[J]. *食品工业科技*,2013,34(14):287-291.
- [13] 李莉莉,唐红,魏晋梅,等. 紫斑牡丹籽油提取工艺的优化及脂肪酸组成的研究[J]. *食品工业科技*,2015,36(24):230-234,238.
- [14] 高婷婷,王亚芸,任建武. GC-MS 法分析牡丹籽油的成分及其防晒效果的评定[J]. *食品科技*,2013(6):296-299.