

小球藻不饱和脂肪酸的提取工艺及功能活性研究进展

葛胜晗, 林以琳, 李世洋, 胡嘉森, 林少玲

(福建农林大学 食品科学学院, 福州 350000)

摘要: 不饱和脂肪酸凭借其抗炎、抗氧化、抗肥胖等多种生理活性功能在食品工业中得到了广泛关注和应用。小球藻富含不饱和脂肪酸, 分布广、易培养、生长快, 因此被视为不饱和脂肪酸的重要来源之一。综述了小球藻不饱和脂肪酸的提取工艺及功能活性研究进展, 并对其在食品中的应用进行展望, 以期为小球藻不饱和脂肪酸的进一步开发利用提供参考。

关键词: 小球藻; 不饱和脂肪酸; 提取; 功能活性

中图分类号: TS221; TQ645.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)02-0127-05

Advances in extraction and functional activities of *Chlorella* unsaturated fatty acids

GE Shenghan, LIN Yilin, LI Shiyang, HU Jiamiao, LIN Shaoling

(College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China)

Abstract: Unsaturated fatty acids have been gained wide attention and application in the food industry due to their physiological activities such as anti-inflammatory, anti-oxidation and anti-obesity. *Chlorella* is rich in unsaturated fatty acids, and it is regarded as one of the important sources of unsaturated fatty acids for its wide distribution, easy cultivation and fast growth. The extraction process and functional activities of *Chlorella* unsaturated fatty acids were summarized and its application in food was prospected so as to provide reference for further development and utilization of *Chlorella* unsaturated fatty acids.

Key words: *Chlorella*; unsaturated fatty acids; extraction; functional activity

小球藻 (*Chlorella*) 是单细胞藻类, 是绿藻门小球藻科中的一个重要的属, 包括大约 10 个种, 生态分布广, 易于培养, 生长速度快, 应用价值高^[1]。小球藻活性成分主要有多糖、小球藻生长因子 (CGF)^[2]、多不饱和脂肪酸^[3] 等, 主要成分如表 1 所示。小球藻资源的开发被视为 20 世纪 90 年代世界生物技术领域取得重要进展之一^[4]。

表 1 小球藻主要成分 g/100 g

水分	蛋白质	脂肪	碳水化合物	纤维素	叶绿素	矿物质
6~7	50~65	5~10	10~20	2~5	2~4	5~7

不饱和脂肪酸对人体有重要的生理功能, 能调节人体的脂质代谢、治疗和预防心脑血管疾病、抗炎、抗癌、抗肥胖、促进幼体发育和提高幼体成活率、

收稿日期: 2019-04-24; 修回日期: 2019-10-23

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (2018M630724)

作者简介: 葛胜晗 (1995), 女, 在读硕士, 研究方向为食品化学与营养 (E-mail) gesh21lala@yeah.net。

通信作者: 林少玲, 讲师 (E-mail) shaoling.lin@fafu.edu.cn。

预防和改善老年痴呆等^[5-6]。小球藻油脂中亚油酸、亚麻酸等不饱和脂肪酸含量很高, 不同种类小球藻油脂中的不饱和脂肪酸含量不同, 其中以异养蛋白核小球藻的为最高。小球藻不饱和脂肪酸的研究近年来成为研究热点, 更多高效、环保、便捷的提取方式被开发改进, 其多种生物活性也得到了研究验证。本文对小球藻不饱和脂肪酸的提取、富集和功能活性研究进展进行综述, 为其进一步开发利用提供参考。

1 小球藻不饱和脂肪酸的提取

小球藻不饱和脂肪酸的提取原料一般有小球藻干粉和湿藻两种, 提取流程如图 1 所示。

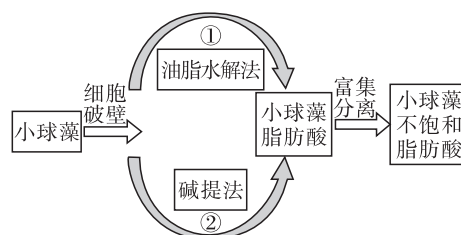


图 1 小球藻不饱和脂肪酸提取流程

1.1 破壁

小球藻油都在藻细胞内,而藻细胞被坚实的细胞壁包裹着,直接提取油脂的效率非常低,因此小球藻的破壁处理极具必要性。破壁方法主要有物理破壁、化学破壁和生物破壁法。物理破壁法选择更多且操作方便,而化学法和生物法相对而言更加快捷、高效。

常见的微藻细胞物理破壁法有机械法和非机械法(如图2所示),其中部分方法因自身限制和技术进步已少有研究应用,目前仍在研究开发利用的方法有超声法、高压均质法、脉冲电场法等。物理破壁法通常可与提取同时进行。

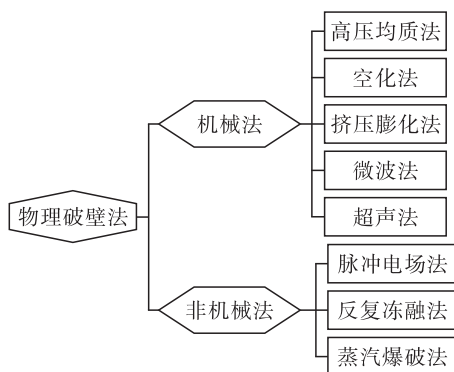


图2 物理破壁法^[7]

化学破壁法主要有化学渗透法、酸热法等。化学渗透法是利用穿透性强的有机溶剂(如甲醇),直接穿透细胞壁进行油脂的提取。鲁龙等^[8]优化浓硫酸破碎小球藻细胞壁工艺条件为:物料质量浓度100 g/L,浓硫酸质量为干物质质量的25%,水浴温度90℃,水浴时间1.5 h。在最优条件下,异养小球藻的脂提率可达55%以上。

生物破壁法主要有酶法和菌法。何扩等^[9]研究发现,复合酶或糖化酶与纤维素酶共同使用在小球藻破壁中,会对小球藻破壁起消极作用,破壁效果不如单一使用纤维素酶。邓春芳等^[10]探究了不同溶藻菌对小球藻破壁效果的影响,得到破壁率由高到低为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) > 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) > 脱氮胞鳃氏菌(*Bowmanella denitrificans*) > 环状芽孢杆菌(*Bacillus circularis*) > 漳州科迪亚菌(*Kordia* sp.)。

1.2 脂肪酸的提取

1.2.1 油脂水解法提取脂肪酸

油脂水解法即先提取油脂,再通过水解油脂得到脂肪酸。小球藻油脂的提取有溶剂浸提法、超临界CO₂萃取法等^[11]。溶剂浸提法已获得十分全面的研究,常以超声辅助进行。常用的提取溶剂有正

己烷、石油醚、甲醇、氯仿、二氯甲烷以及混合溶剂体系。周佩佩^[12]研究发现,二氯甲烷-甲醇溶剂体系对海藻中脂质的提取率最高。Hadrich^[13]、陈炜^[14]、肖艳^[15]等均以氯仿-甲醇(体积比2:1)为浸提溶剂提取小球藻细胞脂质,但氯仿、正己烷等因其有害性而在工业生产中受到严格控制,为此,Mahmood等^[16]研究开发了环境友好型生物溶剂(乙酸乙酯、乳酸乙酯、环戊基甲醚(CPME)和2-四氢呋喃)提取小球藻油,并发现这些生物溶剂的提取性能都优于正己烷,尤其是2-四氢呋喃和乳酸乙酯的提取率分别为正己烷的2倍和3倍。但生物溶剂虽然能提高油脂提取率,但会降低提取的油脂中多不饱和脂肪酸的含量,在食品工业应用中可利用性不高。

与溶剂浸提法相比,超临界CO₂萃取法更加绿色温和^[17],但对于设备和条件要求较为严格。近年来,超临界萃取中各种CO₂扩充液(CXLs)在油脂提取中获得了广泛研究^[18],在CXL中溶解一定量的CO₂可以生成具有良好输运性质的混合物,如密度、黏度、扩散率和溶解度,而适量的极性有机溶剂的存在有利于溶质的溶解^[19]。Yang等^[20]发现,CO₂-甲醇扩充液(CXM)是一种优于甲醇、乙醇、加压甲醇和乙醇的油脂提取溶剂,在优化操作条件(甲醇流速1 mL/min,CO₂流速3 mL/min,压力5.5 MPa,温度358 K)下,小球藻油得率可达16%。宋启煌等^[21]采用超临界CO₂从小球藻中萃取脂质,得到最佳的萃取条件为:压力30 MPa,温度35℃,CO₂耗量250 mL/g,改性剂乙酸乙酯添加量为藻质量的70%。

提取的小球藻油脂的水解一般采用先皂化、除去不皂化物,再用盐酸将pH调到2~3,然后用正己烷萃取、分离得到游离脂肪酸^[22]。

1.2.2 碱提法提取脂肪酸

碱提法也称为皂化提取法,该法跳过脂质提取的步骤,直接将提取和皂化过程在一个操作中实现,相较于油脂提取法更为简便直接,但研究和使用的较少。碱提法常用的碱为NaOH或KOH,常用的溶剂为甲醇,具体操作流程为:往藻粉中加入饱和皂化溶液,反应数小时或4℃过夜;抽滤,滤液中加入HCl调节pH至1~2;加入正己烷萃取分液,即可得到小球藻脂肪酸。吴庆^[23]分别采用甲醇-KOH、乙醇-KOH和异丙醇-KOH 3种皂化剂对小球藻不饱和脂肪酸进行提取,经尿素包含富集多不饱和脂肪酸,发现,以甲醇-KOH作为皂化剂多不饱和脂肪酸色谱峰的分离效果较好,且较乙醇-KOH和异

丙醇-KOH能得到更高的不饱和度。

1.3 不饱和脂肪酸的富集

根据脂肪酸理化性质,如脂肪酸中双键数目、位置、碳链长度、溶解度等的不同,可利用多种方法将不饱和脂肪酸从混合脂肪酸中分离。常用的富集方法有有机溶剂分离法、尿素包合法、银离子络合法、

层析法、分子蒸馏法、酶解法等,几种常见的富集方法的特点如表2所示。目前关于小球藻不饱和脂肪酸的富集研究较少,且以尿素包合法为主^[14]。因此,可探索将分子蒸馏法、吸附分离法、低温结晶法等已用于不饱和脂肪酸富集的方法用于小球藻不饱和脂肪酸富集工艺中。

表2 4种多不饱和脂肪酸富集纯化方法比较(以 α -亚麻酸为例)^[24]

项目	尿素包合法	分子蒸馏法	冷冻结晶法	银离子络合法
工艺流程	复杂	简单	复杂	简单
提取时间	很长	较短	较长	短
溶剂残留	有	无	有	有
提取率	低	较高	低	较高
产品品质	纯度较低	纯度较高	纯度较低	纯度较高
环境污染	严重	无	严重	严重
投资成本	较低	很高	较低	较高
适用性	不饱和度相差较大的脂肪酸,生产规模大	热敏感、价值高的物料,生产规模小	碳链长度差别较大的脂肪酸,生产规模较大	热敏感、不饱和度相差较大的物料,生产规模小

2 小球藻不饱和脂肪酸的功能活性

2.1 改善记忆活性

对于不饱和脂肪酸,尤其是DHA、EPA的改善记忆活性早有大量研究和定论,但是对于小球藻不饱和脂肪酸在这方面的表现近年才得到较多的关注。Yukio等^[25]用添加0.08% DHA的培养液培养的小球藻提取小球藻油(DFCO),发现DFCO的摄食干预能提高小鼠大脑中DHA含量,降低C18:0含量。长期的DFCO膳食干预能显著提高小鼠大脑内DHA的含量,显著提高小鼠对于迷宫的记忆,有望预防和治疗阿尔茨海默病。Morgese等^[26]的研究进一步表明,急性口服富含 $n-3$ 和 $n-6$ 不饱和脂肪酸的小球藻脂提取物(CLE)能使大鼠海马体去甲肾上腺素(NA)和血清素(5-HT)升高,改善其短期记忆。但该项研究同时也表示,经过CLE处理的大鼠在探索能力、运动活动、焦虑和类似抑郁的行为方面无显著变化,而社会行为显著减少,因此在使用CLE作为膳食补充剂时需谨慎,也许具有潜在的毒性作用。

2.2 免疫活性

张士娇^[22]对小球藻EPA对小鼠免疫功能的影响进行研究,结果表明:给小鼠喂食小球藻EPA后可以显著减弱环磷酰胺造成的小鼠脾脏指数、胸腺指数、血清溶血素等免疫器官的影响,减缓环磷酰胺所造成的小鼠免疫低下的程度;在细胞免疫水平上,高剂量的EPA可增强巨噬细胞的增殖活性、吞噬活性以及LPS和ConA诱导的脾细胞的增殖活性,NK细胞的杀伤活性;在mRNA表达水平上,EPA可以

有效预防环磷酰胺对小鼠脾细胞中IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 5种细胞免疫因子及巨噬细胞中IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 5种细胞免疫因子造成的mRNA表达水平的降低,并且可以提高正常小鼠的免疫调节功能。并且该研究还表明,并不是EPA的剂量越高,作用效果越好。万照东^[27]则在此基础上,进一步开发制作了小球藻粉条,就小球藻粉条的免疫活性进行了研究,结果表明,小球藻粉条依旧具有良好的免疫活性,能减轻环磷酰胺造成的小鼠免疫低下的程度,调节与免疫相关的酶活性和mRNA表达水平,并表示其免疫作用是通过小球藻中含量丰富的EPA达到的。

2.3 抗炎和抗氧化活性

厉剑剑等^[28]采用超临界CO₂萃取小球藻油,虽然小球藻油的抗氧化能力不及叶黄素晶体,但由于其含有丰富的不饱和脂肪酸,使其DPPH自由基清除率远高于叶黄素晶体。研究证实,在众多疾病如哮喘^[29-30]、肥胖^[31-32]等的成病机理中,氧化应激和炎症的作用密不可分,而小球藻不饱和脂肪酸的抗氧化和抗炎活性表现良好。Park等^[33]用不同浓度的小球藻二氯甲烷提取物(CDE)孵育用脂多糖(LPS)刺激引起氧化应激和炎症的264.7小鼠巨噬细胞,结果表明,CDE预处理LPS刺激的巨噬细胞能够通过提高谷胱甘肽(GSH)和抗氧化酶(如过氧化物歧化酶)活性以及抑制mRNA转录降低导致的iNOS蛋白表达来抑制NO的产生,从而改善炎症性疾病以及抑制氧化应激。Panahi等^[34]研究表明,含有3.34%不饱和脂肪酸的小球藻提取物(CVE)作

为膳食干预能有效平衡所有氧化应激引起的改变,从而防止哮喘,并且有效促进炎症性肺部疾病患者的气道重塑。

2.4 抗菌活性

肖艳等^[15]对小球藻油进行粗提、多不饱和脂肪酸的分离以及 EPA 的纯化,并将处理后的脂肪酸分别进行甲酯化处理后进行抑菌实验,研究表明,处理后的脂肪酸甲酯对金黄色葡萄球菌和枯草杆菌具有一定的抑制和杀灭作用,而对大肠杆菌和绿脓杆菌没有明显的抑菌效果。江红霞^[35]研究发现小球藻脂肪酸提取物(γ -亚麻酸含量最高)对革兰氏阳性菌的抑制效果要好于革兰氏阴性菌。

2.5 抗肿瘤活性

小球藻不饱和脂肪酸的抗肿瘤活性的研究主要以小球藻油的形式进行。童茜茜等^[36]通过超临界 CO₂ 萃取得到小球藻精油,并就其对人类结肠癌细胞增殖和凋亡的作用进行了研究,结果表明,小球藻精油呈剂量依赖性抑制 HT29 细胞增殖($P < 0.01$),并引起明显的细胞周期阻滞,将细胞周期阻滞在 S (G2/M) 期,从而促进细胞凋亡,对结肠癌细胞具有增殖抑制效应及凋亡诱导效应,推测小球藻精油抗肿瘤作用可能是脂肪酸和小分子挥发性物质协同、多靶点作用的结果。小球藻精油是一种极具发展潜力的抗结肠癌药物,而其中不饱和双键是其抗肿瘤作用的结构基础。

3 小球藻不饱和脂肪酸在食品中的应用与展望

早从 20 世纪 90 年代开始,就已经出现大量与小球藻相关的小球藻食品,如小球藻片、小球藻饮料等。针对小球藻不饱和脂肪酸功能活性所开发的功能性食品中,小球藻粉条已被证实有良好的免疫活性,且其制作工艺和配料也非常常见易得。还有针对小球藻不饱和脂肪酸中富含 DHA、EPA 的特点,开发增强记忆力的保健食品,尤其适用于学生和老年人,已被证实每日定量食用可以达到健脑效果。小球藻不饱和脂肪酸的提取和功能活性近年已得到广泛关注、研究,并且在食品工业生产中得到了一定应用,但有很多期待的功能活性尚未得到研究证明(如降血脂、抗肥胖等),已证明的部分功能活性也缺乏更完善的机理探索。小球藻不饱和脂肪酸还需更广泛、持续、深入的研究,其在食品工业生产中大规模的应用也仍然需要进一步的开发。小球藻不饱和脂肪酸的开发应用将为食品科学注入新的活力。

参考文献:

[1] 胡月薇, 史贤明. 新食品资源小球藻的生理活性与保健功能[J]. 中国食品学报, 2002, 2(2): 69-72.

- [2] 薄香兰, 刘兴, 窦勇, 等. 小球藻生长因子 CGF 的研究与应用进展[J]. 天津农学院学报, 2018, 25(1): 86-89.
- [3] SHEKH A Y, SHRIVASTAVA P, KRISHNAMURTHI K, et al. Stress enhances poly-unsaturation rich lipid accumulation in *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. [J]. Biomass Bioenerg, 2016(84):59-66.
- [4] 罗明典. 世界生物技术领域取得重要进展[J]. 生物工程进展, 1994, 14(3): 16-19.
- [5] YANAI H. Effects of *n*-3 polyunsaturated fatty acids on dementia[J]. J Clin Med Res, 2017, 9(1): 1-9.
- [6] 蔡双莲, 李敏. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 生命科学研究, 2003, 7(4): 289-292.
- [7] 程贺. 微藻的破壁和干燥技术研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2017.
- [8] 鲁龙, 毕生雷, 金洪波, 等. 强酸破碎小球藻细胞壁工艺条件的优化[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(2): 39-42,47.
- [9] 何扩, 张秀媛, 李玉锋. 小球藻破壁技术及其藻片研制[J]. 江西食品工业, 2005(3): 32-33.
- [10] 邓春芳, 崔岩, 章莹颖. 不同溶藻菌对小球藻破碎及油脂提取效果的影响[J]. 中国油脂, 2017, 42(7): 106-110.
- [11] 张萌, 贾文川. 微藻制备生物柴油技术综述[J]. 当代化工, 2018(4):827-830.
- [12] 周佩佩. 海藻中脂肪酸的提取和分析方法研究[D]. 浙江温州:温州大学, 2016.
- [13] HADRICH B, AKREMI I, DAMMAK M, et al. Optimization of lipids' ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface methodology[J]. Lipids Health Dis, 2018, 17(1): 87[2019-04-03]. <http://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z>.
- [14] 陈炜, 王保刚, 李晓东, 等. 从小球藻中提取和富集多不饱和脂肪酸的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2010, 25(3): 275-280.
- [15] 肖艳, 牛荣丽. 海水小球藻中脂类物质的成分分析及其抗菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 60-62.
- [16] MAHMOOD W M A W, THEODOROPOULOS C, GONZALEZ - MIQUEL M. Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production[J]. Green Chem, 2017, 19:5723-5733.
- [17] 张杰, 冯春荣, 谭雪梅, 等. 超临界 CO₂ 萃取花椰菜种子油工艺优化及脂肪酸组成分析[J]. 化学研究与应用, 2018(5): 751-757.
- [18] GOLMAKANI M T, MENDIOLA J A, REZAEI K, et al. Expanded ethanol with CO₂ and pressurized ethyl lactate to obtain fractions enriched in γ -linolenic acid from *Arthrospira platensis* (Spirulina)[J]. J Supercrit Fluids, 2012,

- 62;109-115.
- [19] JESSOP P G, SUBRAMANIAM B. Gas - expanded liquids[J]. Chem Rev, 2007, 107(6): 2666-2694.
- [20] YANG Y H, KLINTHONG W, TAN C S. Optimization of continuous lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by CO₂ - expanded methanol for biodiesel production [J]. Bioresour Technol, 2015, 198;550-556.
- [21] 宋启煌, 高红莲, 张穗, 等. 超临界 CO₂ 从小球藻中萃取 EPA 和 DHA 的工艺研究[J]. 化学世界, 1999(3): 146-150.
- [22] 张士娇. 小球藻中二十碳五烯酸对小鼠免疫活性的影响[D]. 天津:天津科技大学, 2014.
- [23] 吴庆. 微藻 *Nannochloropsis* sp. 的培养和海藻多不饱和脂肪酸提取的初步研究[D]. 北京:北京化工大学, 2004.
- [24] 周端, 王晓宇, 李道明, 等. α -亚麻酸不同富集纯化方法的比较[J]. 中国油脂, 2013, 38(2): 77-80.
- [25] YUKIO S, CHIYOMI T, MIYUKI N, et al. Effect of docosahexaenoic acid - fortified *Chlorella vulgaris* strain CK22 on the radial maze performance in aged mice[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(8): 1090-1092.
- [26] MORGESE M G, MHILLAJ E, FRANCAVILLA M, et al. *Chlorella sorokiniana* extract improves short - term memory in rats[J]. Molecules, 2016, 21(10): 1311.
- [27] 万照东. 小球藻粉条的研发及其免疫活性的研究[D]. 天津:天津科技大学, 2015.
- [28] 厉剑剑, 张文焕, 黄惠华. 超临界 CO₂ 萃取小球藻精油及其抗氧化分析[J]. 现代食品科技, 2011, 27(8): 938-941.
- [29] PAUL K, IRFAN R. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy[J]. Pharmacol Ther, 2006, 111(2): 476-494.
- [30] LIH J L, THOMAS P S. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Copd J Chronic Obstruct Pulmon Dis, 2010, 7(4): 291-306.
- [31] 董静杰, 李拥军, 王梅. 肥胖与脂肪细胞因子[J]. 临床荟萃, 2013, 28(2): 234-236.
- [32] 姜博仁, 陈名道. 氧化应激、肥胖及脂肪细胞[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2007, 27(5): 336-338.
- [33] PARK J Y, CHO H Y, KIM J K, et al. *Chlorella* dichloromethane extract ameliorates NO production and iNOS expression through the down - regulation of NF κ B activity mediated by suppressed oxidative stress in RAW 264. 7 macrophages[J]. Clin Chim Acta, 2005, 351(1): 185-196.
- [34] PANAHY Y, TAVANA S, SAHEBKAR A, et al. Impact of adjunctive therapy with *Chlorella vulgaris* extract on antioxidant status, pulmonary function, and clinical symptoms of patients with obstructive pulmonary diseases[J]. Sci Pharm, 2012, 80(3): 719-730.
- [35] 江红霞. 微藻脂溶性化合物抗菌活性与化学成分分析[D]. 福州:福建师范大学, 2003.
- [36] 童茜茜, 徐嘉杰, 王峰, 等. 小球藻精油对人结肠癌细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(5): 25-31.

· 广告 ·

上海久星导热油股份有限公司

上海股权托管交易中心挂牌 简称:久星股份 代码:E100341



久星导热油 导热承长久

10 多项导热油创新成果助推行业发展

20 多年精细化管理铸就久星品牌

30 多年专业积累汇集《导热油应用手册》

1 0000 多个用户使用数据完整建档

15 0000 多吨导热油销往全国和世界各地



久星官方微信 久星官方网站

油脂行业推荐产品

L-QB300导热油 (高新成果项目、适用于开式系统)

L-QC320合成高温导热油 (最高允许使用温度达320℃)

久星股份创始于20世纪90年代,是集研发、生产、销售和服务于一体的导热油和导热油节能清洗修复剂的专业厂商,中国锅炉水处理协会理事单位。公司荣获高新技术企业、上海五星级诚信创建企业等荣誉称号,通过GB/T 19001-2016/ISO 9001-2015质量体系认证,公司生产产品各项理化指标全部符合GB 23971-2009要求。

地址:上海茂兴路86号22D 总机:021-58708588 热线:4008 810 018 13331833379 生产基地:上海老港工业园良乐路229号