

# 裂殖壶藻油提取及高浓度 EPA/DHA 分离纯化工艺研究

杨玲<sup>1,2</sup>, 欧莹<sup>1,2</sup>, 秦宇<sup>1,2</sup>, 杨海麟<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122; 2. 工业生物技术教育部重点实验室,  
江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:**为实现藻油中 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸( $\omega-3$  PUFAs)的简单、绿色、高效分离纯化工艺,首先利用裂殖壶菌原始菌株及定向驯化菌株 ALE40 为原料提取油脂,通过优势性评估及细胞通透性对比二者提油效果,并通过测定油脂指标对比 3 种提油方法(酸解法、超声干法、超声湿法)优劣。对超声湿法提取的粗藻油采用酯交换法进行乙酯化后,联合尿素包埋法和分子蒸馏技术富集高浓度二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),对酯交换及尿素包埋工艺条件进行单因素实验优化,通过对分子蒸馏重相 DHA 和 EPA 含量测定确定分子蒸馏级数,并对纯化藻油的理化指标进行测定。结果表明:相比裂殖壶菌原始菌株, ALE40 的细胞通透性明显较好,在无需干燥的情况下,超声 10 min 即可达到最高油脂得率(53.2%),缩短超声时间的同时提高了破壁效率;3 种提油方法中超声湿法提取的藻油理化指标较好;酯交换反应最佳条件为反应温度 60 °C、KOH 添加量 3%、醇油比 10:1、反应时间 0.5 h,尿素包埋最佳工艺条件为脲酯比 0.8:1、溶酯比 8:1、包埋温度 4 °C、包埋时间 8 h;尿素包埋后的藻油经二级分子蒸馏纯化后,藻油中 EPA 和 DHA 总含量从 17.40% (酯交换反应)升高到 90.86%,总回收率为 62.28%;得到的纯化藻油的各项理化指标均符合行标要求,且储存 3 个月内无沉淀,具备一定稳定性。综上,该提取分离纯化工艺全程实现试剂循环利用,且制备的藻油酸值低、无异味。

**关键词:**裂殖壶菌;藻油提取;DHA;EPA;尿素包埋;分子蒸馏;分离纯化

中图分类号:TS254.1;TS222+.3 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)09-0092-09

## Extraction of oils from *Schizochytrium* sp. and the separation and purification of high-concentration EPA/DHA

YANG Ling<sup>1,2</sup>, OU Ying<sup>1,2</sup>, QIN Yu<sup>1,2</sup>, YANG Hailin<sup>1,2</sup>

(1. School of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;

2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** To realize a simple, green and efficient separation and purification process of  $\omega-3$  polyunsaturated fatty acids ( $\omega-3$  PUFAs) from algal oil, firstly, the original strain of *Schizochytrium* sp. and the oriented domesticated strain ALE40 were used as raw materials to extract the algal oil, the oil

收稿日期:2023-11-17;修回日期:2024-04-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21776113,21878128);  
国家重点研发计划项目(2022YFC3401300);泰山产业领军人才  
(tscx202306112)

作者简介:杨玲(1996),女,在读硕士,研究方向为藻油提取及高浓度 EPA/DHA 分离纯化(E-mail) 2469501548@qq.com。

通信作者:杨海麟,教授,博士(E-mail)19891996@sina.com。

extraction effects of the two strains were compared through the assessment of dominance and cell permeability, and the advantages and disadvantages of three oil extraction methods (acid digestion, ultrasonic-assisted dry extraction, and ultrasonic-assisted wet extraction) were compared through the determination of the oil indexes. After ethyl esterification by transesterification of algal oil extracted by ultrasound-assisted wet extraction,

high concentrations of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were enriched by the combination of urea complexation and molecular distillation techniques, and the conditions of the transesterification and urea complexation processes were optimized by single factor experiment, as well as the physicochemical indexes of purified oil were determined. The results showed that compared to the original strain of *Schizochytrium* sp., the cell permeability of ALE40 was significantly better, and the highest oil yield of 53.2% could be achieved by ultrasound-assisted wet extraction of ALE40 for 10 min without drying, which shortened the ultrasound time and improved the wall-breaking efficiency. In the three oil extraction methods, the algal oil extracted by ultrasound-assisted wet extraction had better physicochemical indexes. The optimal transesterification reaction conditions were reaction temperature 60 °C, KOH addition 3%, alcohol-oil ratio 10:1 and reaction time 0.5 h. The optimal urea complexation process conditions were urea-ester ratio 0.8:1, solvent-ester ratio 8:1, crystallization temperature 4 °C and crystallization time 8 h. After urea complexation, the algal oil was purified by secondary molecular distillation, the total content of EPA and DHA in the algal oil increased from 17.40% (transesterification reaction) to 90.86%, and the total recovery was 62.28%. The physicochemical indexes of the purified algal oil met the requirements of the industry standard, and there was no precipitation within three months of storage, with a certain degree of stability. In conclusion, the extraction, separation and purification process can realize the recycling of reagents throughout the entire procedure, and the prepared algal oil has low acid value and no peculiar odor.

**Key words:** *Schizochytrium* sp.; algal oil extraction; DHA; EPA; urea complexation; molecular distillation; isolation and purification

裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.) 也称裂殖壶藻, 是符合国家食品安全标准的工业菌株, 其油脂含量最高达细胞干质量的 50% 以上。裂殖壶藻油中  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸 ( $\omega-3$  PUFAs) 二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 的含量最高, 可占总脂肪酸的 35% 以上<sup>[1]</sup>, 同时其含有一定量的二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA)。DHA 是构成人体细胞膜的重要成分, 对大脑的生长及视觉先天发育至关重要。EPA 具有降低血脂、抗炎、抗血小板聚集、维持心血管健康等生理功能。同时二者对胰岛素抵抗均具备有益作用, 能抑制脂肪合成的同时促进消退素 (Resolvins, RvDs/RvEs)、保护素 (Protectins, PDs) 和 Maresins (MaRs) 等衍生介质的生成, 最终促进炎症消解<sup>[2-5]</sup>。裂殖壶菌生长速度快、培养底物范围广、发酵周期短, 目前已成为替代深海鱼油生产 DHA 和 EPA 极具潜力的微生物菌种<sup>[6]</sup>。

藻油提取方法主要包括水酶法、反复冻融法、超声法、微波法、超临界流体萃取法、亚临界萃取法等<sup>[7-8]</sup>。由于天然藻油多以甘油三酯形式存在, 若要得到高浓度长链多不饱和脂肪酸, 则需进行酯交换衍生化反应将甘油酯型藻油转换为空间位阻相对较小的乙酯型藻油, 以便于后续分离纯化。裂殖壶

菌细胞壁牢固, 难以直接破碎, 因此通常采用反复冻融、均质化、研磨和超声等方法进行原料预处理, 增强细胞壁通透性, 使提取溶剂更好地渗透到细胞中去, 从而提高油脂提取率。 $\omega-3$  PUFAs 分离纯化常见的方法包括低温结晶法、分子蒸馏法、尿素包埋法、硝酸银柱色谱法及超临界流体色谱法等<sup>[9]</sup>。其中, 尿素包埋法是根据脂肪酸的不饱和度来将其分离, 是快速、稳健的低成本工艺技术。尿素包埋法无需高温条件, 因此能够比较完整地保留产物的营养成分和生理活性, 另外, 还可保护双键不被氧化, 是大规模富集各种不饱和脂肪酸的理想方法。但要实现高纯度 EPA 和 DHA 制备, 仍需多种方法有机结合<sup>[10]</sup>。分子蒸馏也称短程蒸馏, 是最为绿色安全的分离纯化方法之一<sup>[11]</sup>。该技术是在 0.1 ~ 1.33 Pa 的真空中加热液体混合物, 使其在远低于其沸点的温度下分离。由于在真空条件下进行, 样品停留时间极短 (通常为 1 s ~ 1 min), 蒸发温度也相对较低, 因此能在短时间内达到将目标产物分离的目的, 同时也降低了产物被氧化的风险。目前分子蒸馏技术已经成为热敏性及易氧化物质分离纯化的常用技术, 并且在油脂精炼工艺中也有广泛的应用前景<sup>[12]</sup>。

本研究以定向驯化后的裂殖壶菌代替原始菌

株,考察其相对于原始菌株在提取方面的优势,在此基础上,分别采用超声湿法、超声干法及酸解法提取其中的油脂,同时采用酯交换法将提取的藻油进行乙酯化后联合尿素包埋与分子蒸馏技术,将藻油进行分离纯化,对酯交换及尿素包埋工艺条件进行单因素实验优化,以获得高 DHA 含量产品,以期为开发低污染、低能耗的环境友好型藻油提取及分离纯化工艺及藻油的精简化精炼工艺提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

裂殖壶菌原始菌株(*Schizochytrium* sp. S31),菌种编号 ATCC 20888,美国模式培养物集存库(ATCC);裂殖壶定向驯化菌株 ALE40,实验室内部研究所得;37种脂肪酸甲酯混合标准品(99%),Nu-Chek Prep公司;EPA标准品(99%)、DHA标准品(99%)及C<sub>190</sub>标准品(99%),上海安谱实验科技股份有限公司;正己烷为色谱纯,95%乙醇、无水乙醇、无水硫酸钠、尿素、氯化钠、氢氧化钾等均为分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司。

活化培养基(ATCC By + 790 固体培养基):酵母粉 1 g/L、葡萄糖 5 g/L、胰蛋白胨 1 g/L、海水晶 17.5 g/L、琼脂 20 g/L,121℃灭菌 20 min。种子培养基:葡萄糖 30 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、海水晶 15 g/L、V<sub>B1</sub> 0.05 g/L、V<sub>B6</sub> 0.05 g/L、V<sub>B12</sub> 0.000 5 g/L,115℃灭菌 20 min。发酵培养基:葡萄糖 100 g/L、胰蛋白胨 5.6 g/L、谷氨酸钠 20 g/L、磷酸二氢钾 2.5 g/L、硫酸镁 7.2 g/L、硫酸钠 12.8 g/L、氯化钙 0.4 g/L、海水晶 17.5 g/L、V<sub>B1</sub> 0.1 g/L、V<sub>B6</sub> 0.1 g/L、V<sub>B12</sub> 0.001 g/L,115℃灭菌 20 min<sup>[13]</sup>。

#### 1.1.2 仪器与设备

Bluepard 生化培养箱,一恒科学仪器有限公司;BIOFLO-415 型台式发酵罐,美国新布朗什维克科学公司;3K-15 台式高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司;Shimadzu GC-2010 全自动气相色谱仪,日本岛津公司;Scientz-10ND 真空冷冻干燥机、SB-4200DT 超声波清洗机,宁波新芝冻干设备有限公司;SHZ-D(III)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限公司;ReadMax1500 恒温水浴锅、R-501 旋转蒸发器,申科(无锡)仪器有限公司;VKL70-5 实验室型刮膜式分子蒸馏设备,德国瑞达公司;Olympus CX-31 光学显微镜,百思禾(南京)生物科技有限公司;SBA-40C 生物传感分析仪,山东省科学院生物研究所。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 裂殖壶菌发酵培养

菌种活化:将于-80℃超低温冰箱中甘油管保存的菌种于固体培养基涂布,28℃恒温培养3d进行菌种活化。种子培养:用接种环挑取平板中的单菌落按10%(体积分数)接种量接入装有50mL种子培养基的三角瓶(250mL)中,在温度28℃、转速200r/min下摇床振荡培养48h,传代3次作为种子液,并进行菌种保藏。发酵罐培养:往7L玻璃发酵罐中加入3L发酵培养基,用2mol/L NaOH溶液或HCl溶液调节pH至6.5。按10%(体积分数)接种量接入种子液,在温度28℃、初始转速400r/min、初始通气量3L/min下发酵。发酵72h后改变转速和通气量将发酵液溶氧水平维持在100%继续发酵48h。发酵过程中每12h取样检测菌体细胞形态、底物消耗情况、细胞生长情况及产油情况。当发酵液中葡萄糖含量降至15g/L时,连续流加500g/L的葡萄糖溶液<sup>[14]</sup>。发酵过程中菌体生物量(W)按式(1)计算,采用1.2.2超声湿法提取藻油,油脂产量(P)按式(2)计算。使用生物传感分析仪检测葡萄糖含量。

$$W = m_0 \times 1\ 000 / V \quad (1)$$

$$P = m \times 1\ 000 / V \quad (2)$$

式中: $m_0$ 为菌体干质量,g; $m$ 为藻油质量,g; $V$ 为发酵液体积,mL。

### 1.2.2 藻油的提取

#### (1) 超声湿法提取

取新鲜发酵菌体5g[含水量(80.0±0.5)%],按1:1:2的比例加入无水乙醇和正己烷,充分混匀,于40kHz、20℃超声8min;再加入2mL饱和氯化钠溶液继续超声2min;将上层清液转移至分液漏斗静置,弃去下层乙醇水溶液,上层清液于65℃减压旋蒸除去溶剂,加入10%(以油脂质量计)无水硫酸钠除去残留水分<sup>[15]</sup>,干燥至恒重得粗藻油。

#### (2) 超声干法提取

取与超声湿法提取同质量的冻干藻粉进行油脂提取,提取条件同超声湿法。

#### (3) 酸解法提取

取与超声湿法提取同质量的冻干藻粉,按1:10:5的比例加入盐酸和去离子水,75℃水浴1h。期间每10min振荡一次。冷却后按1:4:10的比例加入无水乙醇和正己烷,充分摇匀,3000r/min离心2min。收集上层液体于旋蒸瓶中,65℃减压旋蒸除去溶剂,加入10%(以油脂质量计)无水硫酸钠除去残留水分,干燥至恒重得粗藻油。

油脂得率(Y)按式(3)计算。

$$Y = m_1/m_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中： $m_0$  为干燥菌体(藻粉)的质量，g； $m_1$  为粗藻油质量，g。

### 1.2.3 乙酯型藻油的制备

称取 5 g 粗藻油(含水量约 0.1%)，水浴预热至一定温度，加入一定量 KOH 和无水乙醇(KOH 和无水乙醇先混合配成溶液后再添加)，恒温水浴冷凝回流反应一定时间；反应后将混合物冷却至 25℃，转移至分液漏斗静置分层，加入 1/4 体积正己烷充分溶解脂质，分离出下层后用超纯水多次洗涤油层中残留的极性化合物，直至下层澄清；上层液体于 65℃ 减压旋蒸除去溶剂，加入 10% (以油脂质量计) 无水硫酸钠干燥即得乙酯型藻油。

向乙酯型藻油中加入其 1 倍体积的戊烷，待其完全溶解后，放入 -20℃ 冰箱过夜，取出过滤。反应产品得率( $Y_1$ )、酯化率( $Y_2$ )、乙酯得率( $Y_3$ ) 分别按式(4)、式(5)、式(6)计算<sup>[16]</sup>。

$$Y_1 = m_1/m \times 100\% \quad (4)$$

$$Y_2 = m_2/m_1 \times 100\% \quad (5)$$

$$Y_3 = m_2/m \times 100\% \quad (6)$$

式中： $m$  为粗藻油质量，g； $m_1$  为乙酯型藻油质量，g； $m_2$  为滤除戊烷后所得样品质量，g。

### 1.2.4 尿素包埋工艺

取一定量尿素溶于 95% 乙醇中，于 55℃ 水浴回流至尿素完全溶解，再加入 1 g 乙酯型藻油，于 60℃ 恒温回流 10 min，结束后 25℃ 恒温水浴冷却 20 min，在尚未出现结晶之前将其置于一定温度下结晶一定时间后迅速抽滤分离(尽量维持温度不变)，用滤液 1/2 体积的正己烷少量多次洗涤滤饼，液相部分转移至分液漏斗，加入 1/4 体积正己烷混匀，用饱和氯化钠溶液多次洗涤除去上层油脂中残留尿素，直至下层水相澄清；分离出上层液体，60℃ 减压旋蒸除去溶剂；加入 10% (以油脂质量计) 无水硫酸钠干燥，即得到多不饱和脂肪酸乙酯。滤饼通过 95% 乙醇溶液 50℃ 水浴搅拌回流 30 min，随即加入正己烷分离出油层，60℃ 旋转蒸发除去溶剂得到饱和及单不饱和脂肪酸乙酯。包埋率( $Y$ )按式(7)计算。

$$Y = m_{UCF}/m_{FREE} \times 100\% \quad (7)$$

式中： $m_{UCF}$  为饱和及单不饱和脂肪酸乙酯回收质量，g； $m_{FREE}$  为乙酯型藻油质量，g。

### 1.2.5 分子蒸馏工艺

参照文献[17-20]并根据物料实际情况对实验条件稍作改动后对尿素包埋后的藻油进行分子蒸馏。基于产品稳定性因素考虑，设置蒸发温度 150℃、真空度 0.1 Pa、刮膜速率 300 r/min、进料功

率 10 Hz、物料温度 30℃、外冷凝温度 20℃、内冷凝温度 45℃ 为实验条件进行一级分子蒸馏。将收集的重相组分倒入料液罐，以同样的操作进行二、三级分子蒸馏。结束后分别对一、二、三级分子蒸馏重组分及轻组分取样保存。

### 1.2.6 细胞壁通透性测定

根据菌体中蛋白质与核酸的含量来表征细胞壁通透性，蛋白质与核酸的含量越高，通透性越好<sup>[21]</sup>。分别取 1 mL 裂殖壶菌原始菌株及裂殖壶定向驯化菌株 ALE40 发酵菌液于离心管中，加入 2 mL 纯水，40 kHz、20℃ 下分别超声处理 0、5、10、15、20、25 min (每个时间梯度为一组，每组进行 3 次重复实验)，4 000 r/min 离心 10 min，利用紫外分光光度计依次测定其上清液在 260 nm 和 280 nm 处吸光度( $A_{260}$ 、 $A_{280}$ )，以此来表征上清液中蛋白质和核酸含量的变化情况。随后按 1.2.2 采用超声湿法提取油脂，考察裂殖壶菌原始菌株与裂殖壶定向驯化菌株 ALE40 的油脂得率随超声时间的变化情况。

### 1.2.7 藻油基础理化指标及 EPA、DHA 含量测定

酸值测定参照 LS/T 6107—2012《动植物油脂酸值和酸度测定 自动滴定分析法》；碘值测定参照 GB/T 5532—2008《动植物油脂碘值的测定》；水分及挥发物含量的测定参照 GB 5009.236—2016《食品安全国家标准 动植物油脂水分及挥发物的测定》；过氧化值的测定参照 GB 5009.227—2016《食品安全国家标准 食品中过氧化值的测定》；皂化物含量的测定参照 GB/T 5535.1—2008《动植物油脂皂化物测定 第 1 部分：乙醚提取法》；皂化值的测定参照 GB/T 5534—2008《动植物油脂皂化值的测定》；EPA、DHA 含量测定参照 GB/T 38095—2019《EPA、DHA 含量测定 气相色谱法》。

### 1.2.8 EPA + DHA 总回收率的计算

EPA + DHA 总回收率( $Y$ )按式(8)计算。

$$Y = \frac{m_1 c_1}{m c} \times 100\% \quad (8)$$

式中： $m$  为各阶段原料质量，g； $c$  为各阶段原料中 EPA + DHA 总含量； $m_1$  为各阶段产物质量，g； $c_1$  为各阶段产物中 EPA + DHA 总含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 定向驯化菌株的优势性评估

图 1 为裂殖壶菌原始菌株(WT)与定向驯化菌株 ALE40 发酵过程中细胞形态的变化。

从图 1 可看出，与原始菌株相比，ALE40 细胞直径变大，发酵后期极少部分细胞出现破裂情况，但依旧能保持细胞结构的完整性。

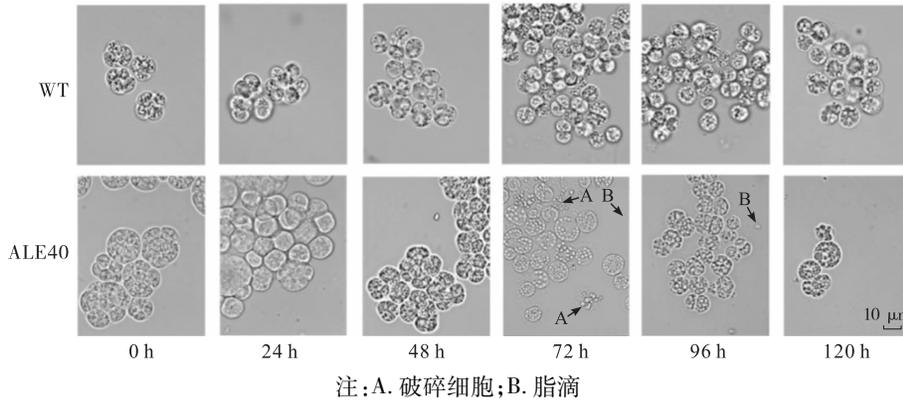


图1 裂殖壶菌原始菌株与 ALE40 发酵过程中细胞形态变化

进一步对 ALE40 与原始菌株(WT) 整个发酵过程中底物的消耗情况、细胞生长情况及产油情况进行考察,结果如图2 所示。

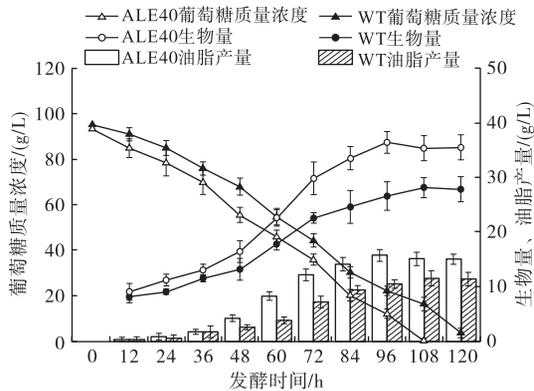


图2 裂殖壶菌原始菌株和 ALE40 发酵过程中生物量、油脂产量及葡萄糖含量变化

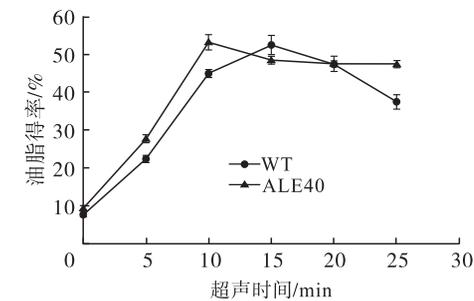
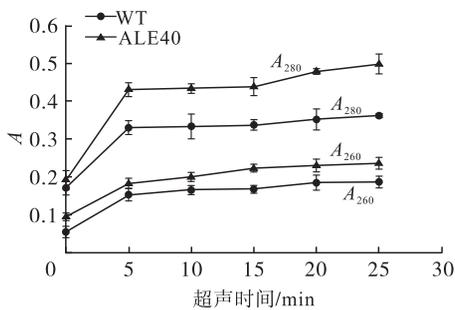


图3 裂殖壶菌原始菌株和 ALE40 细胞壁通透性及油脂提取效果对比

## 2.2 3 种藻油提取方法对比

对比超声湿法、超声干法以及酸解法(干法) 对于 ALE40 中油脂提取的效果,结果如表 1 所示。

由表 1 可知,相比酸解法,超声法提取粗藻油的水分及挥发物含量、酸值、过氧化值均较低。相比超声干法,超声湿法提取的粗藻油酸值和过氧化值低,油脂得率高,二者的 EPA、DHA 含量相差不大。综上可看出,采用超声湿法提取藻油,在无需冻干、无需添加辅助试剂的情况下缩短了提取时间,可实现藻油的高效提取制备<sup>[15,22]</sup>。后续以超声湿法提取的粗藻油为原料进行研究。

由图 2 可知,与原始菌株相比,ALE40 葡萄糖消耗速率明显加快,发酵 108 h 时葡萄糖已基本被消耗完全,且生长速度明显加快,发酵周期明显缩短,生物量及油脂产量也略有提高。

图 3 为裂殖壶菌原始菌株和 ALE40 的细胞壁通透性及油脂得率随超声时间的变化情况。

由图 3 可见,ALE40 细胞壁通透性明显优于原始菌株。相同条件下 ALE40 超声提取时间明显缩短,超声 10 min 即可达到最高油脂得率 53.2%,与原始菌株超声 15 min 时的最高油脂得率无明显差异。这为下一阶段藻油的湿法提取工艺奠定了实验基础。因此,本文以 ALE40 为研究菌株进行后续研究。

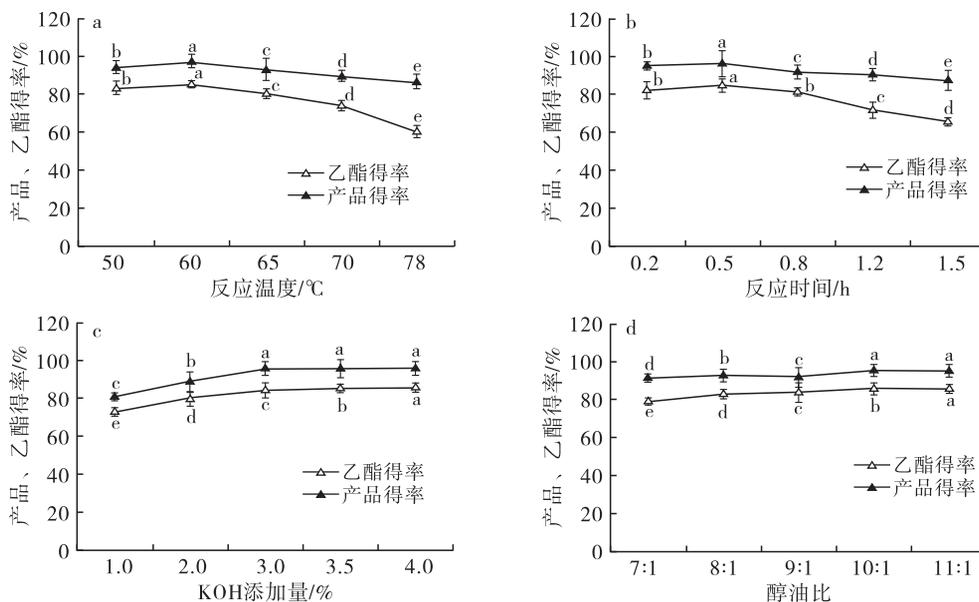
表 1 3 种提取方法粗藻油的理化指标对比

项目	超声干法	超声湿法	酸解法
色泽	深橙红色	橙红色	浅黄色
气味、滋味	微弱藻腥味	微弱藻腥味	藻腥味较重
组织形态	油状液体	油状液体	油状液体
水分及挥发物/%	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.06	0.16 ± 0.11
酸值(KOH)/(mg/g)	4.19 ± 0.22	2.78 ± 0.41	11.41 ± 1.00
过氧化值/(mmol/kg)	24.97 ± 2.10	5.67 ± 0.59	31.44 ± 1.05
碘值(I)/(g/100 g)	211.23 ± 3.37	200.86 ± 2.73	198.36 ± 1.87
EPA 含量/%	0.86 ± 0.16	0.88 ± 0.23	0.73 ± 0.17
DHA 含量/%	17.16 ± 0.33	17.11 ± 0.49	15.25 ± 0.21
油脂得率/%	36.65 ± 0.20	45.00 ± 0.37	45.20 ± 0.41

注:数据为 3 个完整独立实验的“平均值 ± 标准差”

### 2.3 乙酯型藻油制备单因素实验

粗藻油酸值(KOH)(2.78 mg/g)较低,即其中脂肪酸绝大部分以甘油酯形式存在,仅极少部分为游离脂肪酸,因此采用直接酯交换反应将脂肪酸甘油酯转化为脂肪酸乙酯。以乙酯得率及产品得率为



注:进行单因素优化实验时其他因素固定参数:a)醇油比 10:1, KOH 添加量 3%, 反应时间 0.8 h; b)醇油比 10:1, KOH 添加量 3%, 反应温度 60 °C; c)醇油比 10:1, 反应温度 60 °C, 反应时间 0.5 h; d)反应温度 60 °C, 反应时间 0.5 h, KOH 添加量 3%。同一指标不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ ),下同

图4 反应温度、反应时间、KOH 添加量、醇油比对酯交换反应效果的影响

由图 4a 和图 4b 可知,不同反应温度及反应时间下的产品得率及乙酯得率总体存在显著差异。其中反应温度和反应时间分别为 60 °C 和 0.5 h 时,产品得率及乙酯得率均达到最高值,分别为 97.40%、85.45% 和 96.40%、85.10%。故确定反应温度和反应时间分别为 60 °C 和 0.5 h。

由图 4c 可知,随 KOH 添加量增加,乙酯得率和产品得率增加,但 KOH 添加量太高,在反应完成后,加水终止反应时,由于 KOH 碱性很强,会使部分酯交换产物转变为皂而被洗去,而 KOH 添加量太低,则无法起到良好的催化作用<sup>[26]</sup>。因此,选择 KOH 添加量为 3%。

由图 4d 可知,随着乙醇用量的增加,产品得率总体增大,在醇油比大于 10:1 后趋于稳定。相较而言,乙酯得率随乙醇用量的增加呈缓慢上升趋势,醇油比小于 10:1 时变化较为显著。因此,从经济效益角度出发,选择醇油比为 10:1。

综上,确定酯交换反应条件为反应温度 60 °C、KOH 添加量 3%、醇油比 10:1、反应时间 0.5 h,在此条件下产品得率和乙酯得率分别为 97.97% 和 85.00%。酯交换反应后的油脂中 EPA 和 DHA 含

量分别为 0.97% 和 16.43%,较粗藻油无明显差异。

考察指标,通过前期实验摸索以及相关文献<sup>[23-25]</sup>的查阅总结,对酯交换反应过程中的反应温度、催化剂 KOH 添加量(以粗藻油质量计)、反应时间及醇油比进行单因素优化实验,结果如图 4 所示。

量分别为 0.97% 和 16.43%,较粗藻油无明显差异。

### 2.4 尿素包埋单因素实验

尿素包埋技术,是大规模富集各种不饱和脂肪酸的理想方法。参考文献[27-28],根据实际情况微调后分别对脲酯比(尿素与脂肪酸乙酯质量比)、溶酯比(溶剂与脂肪酸乙酯体积质量比)、包埋温度、包埋时间进行单因素优化实验,结果如图 5 所示。

由图 5a 可知,随着体系中尿素比例升高,包埋率、EPA 和 DHA 含量均表现出先增加后下降的趋势。当脲酯比分别为 0.4:1、0.8:1 时,包埋率、EPA 和 DHA 含量最大。尿素用量较小时,饱和/单不饱和脂肪酸优先与尿素形成包埋物并结晶析出,随着尿素用量增加,结晶时包埋的饱和脂肪酸及单不饱和脂肪酸比例也会逐渐升高。然而当尿素过量时,尿素晶体也会物理携带出少部分多不饱和脂肪酸,同时因尿素分子和脂肪酸分子均具备较强极性,互相之间会形成氢键,所以尿素晶体在包埋单不饱和脂肪酸和饱和脂肪酸的同时,也会吸附一部分多不饱和脂肪酸分子,从而导致部分多不饱和脂肪酸损失,因此包埋率并非越高越好<sup>[29]</sup>。且尿素比例过高

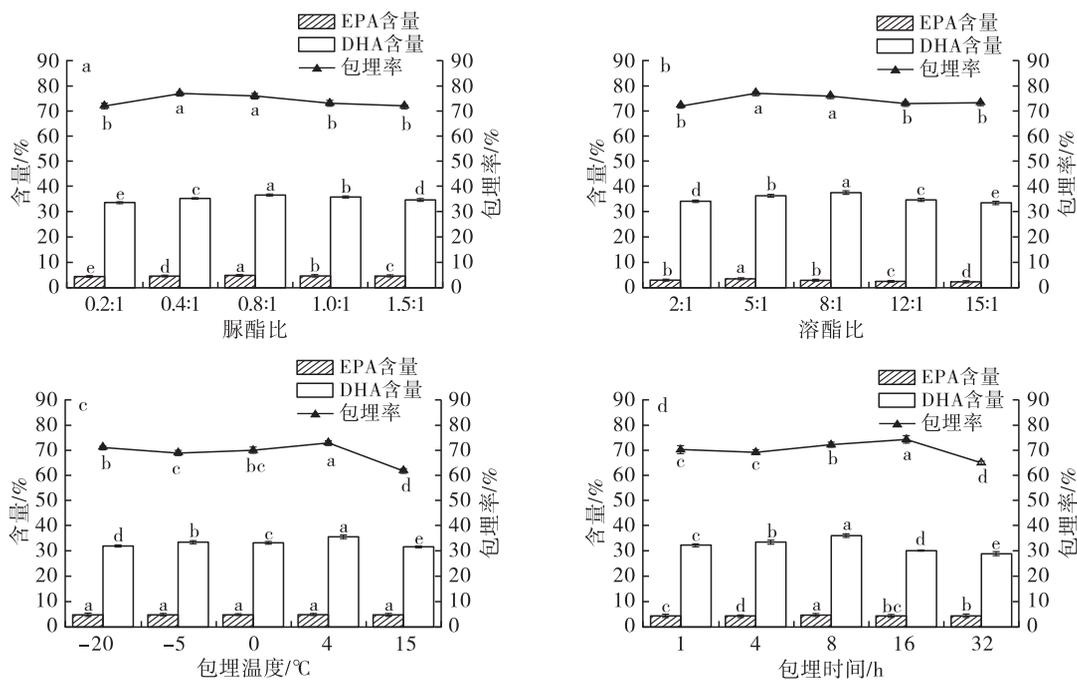
时,短时间内很难溶于体系溶液中,这会增大实验能耗,同时也会在一定程度上降低富集效率。因此,结合包埋率结果,选择最优脲酯比为 0.8:1,此时 EPA 和 DHA 含量均达到最大值,分别为 4.95% 和 36.72%,包埋率为 76.00%。

由图 5b 可知,随着溶酯比的增大,包埋率、EPA 和 DHA 含量呈先增后降的趋势。EPA 和 DHA 含量呈先增后降趋势的原因可能是溶剂是提供结晶过程传质和传热的媒介,随着溶剂用量增加,尿素对脂肪酸的包埋选择程度增大,对多不饱和脂肪酸的包埋程度下降,多不饱和脂肪酸含量增加。但当溶剂用量过多时,溶质分散,尿素与脂肪酸之间的作用力减小,不利于与饱和脂肪酸之间的有效作用,多不饱和脂肪酸含量明显下降<sup>[27]</sup>。当溶酯比为 5:1 时,包埋率和 EPA 含量均达到最大,分别为 77.00% 和 3.70%。而 DHA 含量在溶酯比为 8:1 时达到最大(37.82%),此时 EPA 和 DHA 总含量也达到最大(40.00%),包埋率为 76.00%。综上,确定最佳溶酯比为 8:1。

由图 5c 可知,随包埋温度升高,包埋率、EPA 和 DHA 含量总体呈现先上升后下降趋势,在包埋温度为 4℃ 时,包埋率、EPA 和 DHA 含量达到最大值,分别为 73.00%、5.00% 和 35.79%。虽然尿素包埋反应属于放热过程,低温环境有利于包埋反应的正常发生,但温度过低在能耗增加的同时也不利于尿素包埋物的分离<sup>[29]</sup>。因此,确定最佳包埋温度为 4℃。

由图 5d 可知,随包埋时间延长,包埋率、EPA 和 DHA 含量呈现先上升后下降趋势,包埋时间为 16 h 时,包埋率达到最大(74.00%),包埋时间为 8 h 时,EPA 和 DHA 含量均达到最大,分别为 4.82% 和 36.11%。从节能和高效两个方面考虑,选择包埋时间为 8 h。

综上,得到最优的尿素包埋工艺条件为脲酯比 0.8:1、溶酯比 8:1、包埋温度 4℃、包埋时间 8 h,在此条件下进行 2 次平行放大实验,得到的平均包埋率为 77.50%,EPA 和 DHA 平均含量分别为 5.94% 和 56.47%,总含量达 62.41%,较粗藻油的 EPA 和 DHA 总含量(17.99%)提高了 2.47 倍。



注:进行单因素优化实验时其他因素固定参数:a)溶酯比 10:1,包埋温度 4℃,包埋时间 10 h;b)包埋温度 4℃,包埋时间 10 h,脲酯比 0.8:1;c)脲酯比 0.8:1,溶酯比 8:1,包埋时间 10 h;d)脲酯比 0.8:1,溶酯比 8:1,包埋温度 4℃

图 5 脲酯比、溶酯比、包埋温度及包埋时间对 EPA、DHA 含量和包埋率的影响

## 2.4 分子蒸馏富集

通过测定重相组分和轻相组分发现,EPA 和 DHA 主要存在于重相组分中。分子蒸馏各级重相组分中 EPA 和 DHA 的含量如图 6 所示。

由图 6 可看出,随着分子蒸馏级数的增加,重相组分中 EPA 和 DHA 的含量呈先增加后下降趋势。

其中一级分子蒸馏藻油中 EPA 含量为 7.58%,DHA 含量可达 78.31%;二级分子蒸馏可以得到 EPA 和 DHA 总含量高达 90.86%的乙酯型藻油,而三级分子蒸馏后 EPA 和 DHA 含量显著下降,与 Liu 等<sup>[30]</sup>的实验结论一致。由此可见,对于乙酯型藻油原料而言,二级分子蒸馏富集效果明显,是富集 EPA 和

DHA 较为简单且绿色高效的工艺方法。

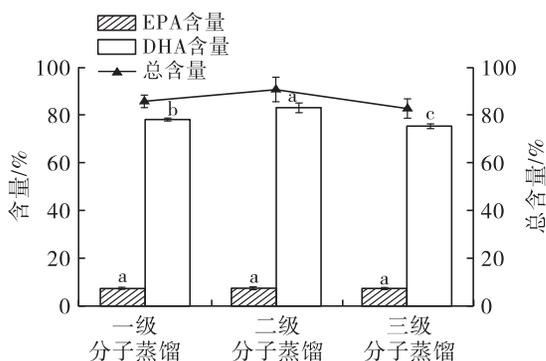


图6 分子蒸馏藻油中 EPA、DHA 含量变化

整个纯化过程中粗藻油、酯交换反应后的乙酯型藻油、包埋藻油以及二级分子蒸馏后的纯化藻油中 EPA、DHA 含量及回收率变化如表 2 所示。

表2 各阶段分离纯化产物含量及回收率变化 %

样品	EPA 含量	DHA 含量	总含量	总回收率
粗藻油	0.88 ± 0.47	17.11 ± 1.04	17.99 ± 1.85	
乙酯型藻油	0.97 ± 0.61	16.43 ± 0.86	17.40 ± 0.97	88.19 ± 1.49
包埋藻油	5.94 ± 0.68	56.47 ± 1.79	62.41 ± 1.70	68.60 ± 2.67
纯化藻油	7.59 ± 1.15	83.27 ± 2.42	90.86 ± 1.42	62.28 ± 1.66

由表 2 可以看出:粗藻油经过酯交换反应后目标产物含量略有降低;经过尿素包埋和二级分子蒸馏处理后,藻油中 EPA + DHA 总含量和总回收率分别从 17.40%、88.19% (酯交换反应) 达到富集后的 62.41%、68.60% (尿素包埋) 和 90.86%、62.28% (二级分子蒸馏重相综合回收率)。

为检验整个纯化工艺对藻油特性的影响,根据 LS/T 3243—2015《DHA 藻油》对二级分子蒸馏后的纯化藻油进行理化指标测定,结果见表 3。

表3 纯化藻油理化指标测定结果

项目	LS/T 3243—2015	粗藻油	纯化藻油
酸值(KOH)/(mg/g)	≤ 3.00	2.78 ± 0.41	0.13 ± 0.02
水分及挥发物/%	≤ 0.10	0.14 ± 0.04	0.03 ± 0.01
过氧化值/(mmol/kg)	≤ 7.50	5.67 ± 0.59	6.29 ± 0.19
碘值(I)/(g/100 g)		200.86 ± 2.73	368.23 ± 2.90
不皂化物/%	≤ 4.00	0.82 ± 0.12	0.43 ± 0.13
皂化值(KOH)/(mg/g)		126.16 ± 1.79	178.06 ± 2.11
色泽、气味及滋味	浅黄色至橙色,具有本品特有的气味及滋味,无异味	橙红色,微弱藻腥味	浅橙色,无异味,无沉淀

由表 3 可看出:经过分离纯化之后,藻油的过氧化值略有升高,可能是藻油在分离纯化过程中发生了一定程度的氧化;纯化藻油的碘值明显升高,与不饱和脂肪酸含量变化相符合,纯化藻油的色泽、气味较粗藻油均有所改善。纯化藻油产品呈浅橙色,无异味,储存 3 个月内无沉淀,具备一定稳定性。此外,分离纯化工艺对粗藻油具有明显的脱酸及脱臭作用,水分及挥发物含量也明显降低,这种效果可能来源于分子蒸馏<sup>[31-33]</sup>。粗藻油经乙酯化、尿素包埋纯化、分子蒸馏纯化后,各指标均符合 LS/T 3243—2015 要求。

### 3 结论

本研究利用实验室定向驯化后的裂殖壶菌 ALE40 为原料,采用超声湿法提取油脂。油脂经乙酯化后,采用尿素包埋法与分子蒸馏技术分离纯化 EPA 和 DHA,同时全程实现试剂循环利用。

对酯交换反应制备藻油乙酯和尿素包埋工艺条件进行单因素实验优化,得到优化的碱催化酯交换反应条件为反应温度 60℃、KOH 添加量 3%、醇油比 10:1、反应时间 0.5 h,在此条件下乙酯得率达 85.00%,EPA 和 DHA 含量分别为 0.97% 和 16.43%,较粗藻油中 EPA 和 DHA 含量无明显差异。优化的尿素包埋工艺条件为脲酯比 0.8:1、溶

酯比 8:1、包埋温度 4℃、包埋时间 8 h,在此条件下 EPA 和 DHA 总含量可达 62.41%,总回收率为 68.60%,较粗藻油中 EPA 和 DHA 含量(17.99%)提高了 2.47 倍。分子蒸馏实验结果显示,二级分子蒸馏富集效果最佳,EPA + DHA 总含量和总回收率分别达到 90.86%、62.28%。经二级分子蒸馏工艺纯化后藻油的各项理化指标均符合行标要求,脱酸、脱臭效果明显,产品稳定,这也预示着分子蒸馏在油脂精炼加工中较为广泛的应用前景。

### 参考文献:

- [1] MA W, LIU M, ZHANG Z, et al. Efficient co-production of EPA and DHA by *Schizochytrium* sp. via regulation of the polyketide synthase pathway [J/OL]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 1356 [2023-11-17]. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04334-4>.
- [2] XU Z Z, ZHANG L, LIU T, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions [J]. *Nat Med*, 2010, 16(5): 592-597.
- [3] SAINI R K, KEUM Y S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance: A review [J]. *Life Sci*, 2018, 203: 255-267.
- [4] REY C, DELPECH J C, MADORE C, et al. Dietary n-3

- long chain PUFA supplementation promotes a pro-resolving oxylipin profile in the brain [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 76: 17–27.
- [5] ORTEA I, GONZÁLEZ – FERNÁNDEZ M J, RAMOS – BUENO R P, et al. Proteomics study reveals that docosahexaenoic and arachidonic acids exert different *in vitro* anticancer activities in colorectal cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(24): 6003–6012.
- [6] DELLERO Y, ROSE S, METTON C, et al. Ecophysiology and lipid dynamics of a eukaryotic mangrove decomposer [J]. *Environ Microbiol*, 2018, 20(8): 3057–3068.
- [7] 荣辉, 吴兵兵, 杨贤庆, 等. 水酶法提取生物油脂的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(2): 374–378.
- [8] 曲孟. 海水小球藻絮凝采收与藻油提取工艺的初步试验研究[D]. 辽宁 大连: 大连海洋大学, 2014.
- [9] GONZÁLEZ – FERNÁNDEZ M J, RAMOS – BUENO R P, RODRÍGUEZ – GARCÍA I, et al. Purification process for MUFA – and PUFA – based monoacylglycerols from edible oils[J]. *Biochimie*, 2017, 139: 107–114.
- [10] MAGALLANES L M, TARDITTO L V, GROSSO N R, et al. Highly concentrated *omega* – 3 fatty acid ethyl esters by urea complexation and molecular distillation[J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99(2): 877–884.
- [11] FREGOLENTE P B L, PINTO G M F, WOLF – MACIEL M R, et al. Monoglyceride and diglyceride production through lipase – catalyzed glycerolysis and molecular distillation [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(7): 1879–1887.
- [12] 孟佳, 刘建, 张旋, 等. 分子蒸馏技术在油脂精炼中应用的研究进展[J]. *中国油脂*, 2021, 46(2): 11–13.
- [13] 秦宇, 欧莹, 王尤婧, 等. 利用酒糟处理液作为氮源培养裂殖壶菌生产 DHA 的发酵工艺优化[J]. *中国油脂*, 2023, 48(3): 116–122.
- [14] 赵彝, 王武, 李昌灵, 等. EMS – ARTP 复合诱变选育高产 DHA 裂殖壶菌[J]. *食品与机械*, 2018, 34(2): 19–24.
- [15] 翟量, 沈立荣. 富含 EPA 微藻油超声波辅助溶剂法提取工艺优化及脂肪酸成分分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(2): 809–815.
- [16] 沈继红, 刘发义, 李光友. 交酯化法制备鱼油脂肪酸乙酯的研究[J]. *黄渤海海洋*, 2001, 19(2): 83–87.
- [17] 曹少谦, 孙程, 秦伟力, 等. 鱼粉加工压榨液中 EPA 和 DHA 富集工艺优化及其特性分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(2): 154–160.
- [18] 周晓娇, 谢枫才, 陈敏嫣, 等. 分子蒸馏联用制备液相色谱法制备高纯度 DHA 乙酯[J]. *中国油脂*, 2021, 46(5): 28–32.
- [19] MAZZELLI A, LUZZI D M, BUONANNO G, et al. An optimized separation process of microalgal lipidic products by molecular distillation: Techno – economic analysis[J]. *Chem Eng Sci*, 2019, 207: 1187–1195.
- [20] ZHANG G, LIU J, LIU Y. Concentration of *omega* – 3 polyunsaturated fatty acids from oil of *Schizochytrium limacinum* by molecular distillation: Optimization of technological conditions[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2013, 52(10): 3918–3925.
- [21] 黎崎均. 富含 EPA 微藻的高效预处理与藻油制备 [D]. 北京: 中国科学院过程工程研究所, 2021.
- [22] REZAEI MOTLAGH S, HARUN R, AWANG BIAK D R, et al. Ionic liquid – based microwave – assisted extraction of lipid and eicosapentaenoic acid from *Nannochloropsis oceanica* biomass: Experimental optimization approach [J]. *J Appl Phycol*, 2021, 33(4): 2015–2029.
- [23] 黄宏飞, 马开创, 张莹, 等. 尿素包埋法富集椰子油中月桂酸工艺条件优化[J]. *中国油脂*, 2019, 44(5): 99–103.
- [24] HAYYAN A, ALAM M Z, MIRGHANI M E S, et al. Reduction of high content of free fatty acid in sludge palm oil via acid catalyst for biodiesel production [J]. *Fuel Process Technol*, 2011, 92(5): 920–924.
- [25] 程楠, 丁辉. 高酸值鱼油两步法制备鱼油乙酯的研究 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(5): 275–277.
- [26] 程楠. 鱼油脂肪酸乙酯制备及分离纯化研究 [D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [27] 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.
- [28] ZHANG M, CHEN Z, SHEN Q. Effect of purification methods on functional properties of sardine oil ethyl esters [J/OL]. *J Food Process Pres*, 2022, 46(1): 16179 [2023 – 11 – 17]. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16179>.
- [29] GÁMEZ – MEZA N, NORIEGA – RODRÍGUEZ J A, MEDINA – JUÁREZ L A, et al. Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation [J]. *Food Res Int*, 2003, 36(7): 721–727.
- [30] LIU S, ZHANG C, HONG P, et al. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: Optimization of process parameters[J]. *J Food Eng*, 2006, 73(3): 203–209.
- [31] 梁井瑞, 胡耀池, 陈园力, 等. 分子蒸馏法纯化 DHA 藻油[J]. *中国油脂*, 2012, 37(6): 6–10.
- [32] 张红燕, 崔晨茜, 袁贝, 等. 乙酯型金枪鱼油不同级分子蒸馏过程中脂肪酸含量及挥发性物质变化[J]. *食品科学*, 2017, 38(10): 208–214.
- [33] 张伟, 谢丹, 金俊, 等. 深海鱼油分子蒸馏法脱酸工艺研究[J]. *中国油脂*, 2014, 39(2): 20–23.