

微拟球藻脂质的亚临界提取工艺优化 及其成分分析

贺瑶¹, 曹健¹, 何东平^{1,2}, 郑竟成^{1,2}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023)

摘要: 采用亚临界丁烷提取微拟球藻脂质。在单因素试验的基础上采用正交试验对影响微拟球藻脂质提取率的因素进行优化, 并测定了微拟球藻脂质的酸价、过氧化值、碘值、磷脂含量、脂肪组成以及脂肪酸组成。结果表明: 亚临界丁烷提取微拟球藻脂质的最佳工艺条件为单次提取时间 40 min、提取 4 次、提取温度 45 °C、料液比 1:8, 在此条件下微拟球藻脂质提取率为 41.55%; 提取的微拟球藻脂质呈深绿色油性糊状, 其酸价(KOH) 20.4 mg/g, 过氧化值 0.001 g/100 g, 碘值(I) 86.0 g/100 g, 磷脂含量 107.28 mg/g; 微拟球藻脂质中总脂肪含量为 40.22%, 脂肪酸组成主要以不饱和脂肪酸为主, 其中 EPA 含量为 7.21%。

关键词: 亚临界丁烷; 微拟球藻; 脂质; 理化指标; 磷脂; 脂肪酸

中图分类号: TS224.4; TS227 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)05-0023-04

Optimization of subcritical extraction of *Nannochloropsis* lipid and its component analysis

HE Yao¹, CAO Jian¹, HE Dongping^{1,2}, ZHENG Jingcheng^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Key Laboratory of Deep Processing of Major Grain and Oil, Ministry of Education, Wuhan 430023, China)

Abstract: The *Nannochloropsis* lipid was extracted by subcritical butane. The factors affecting extraction rate of *Nannochloropsis* lipid were optimized by orthogonal experiment on the basis of single factor experiment. The acid value, peroxide value, iodine value, phospholipid content, fat composition and fatty acid composition of the lipid were determined. The results showed that the optimal conditions were obtained as follows: single extraction time 40 min, extraction times 4, extraction temperature 45 °C and ratio of solid to solvent 1:8. Under these conditions, the extraction rate of *Nannochloropsis* lipid was 41.55%. The extracted *Nannochloropsis* lipid was a dark green oily paste, with the acid value 20.4 mgKOH/g, peroxide value 0.001 g/100 g, iodine value 86.0 g/100 g and phospholipid content 107.28 mg/g. The total fat content in the lipid was 40.22%, and the fatty acids in the lipid of *Nannochloropsis* were mainly unsaturated fatty acids with the EPA content 7.21%.

Key words: subcritical butane; *Nannochloropsis*; lipid; physicochemical index; phospholipid; fatty acid

收稿日期: 2019-09-24; 修回日期: 2020-02-03

基金项目: “十三五”国家重点研发计划支持项目(2018YFD0401105-03)

作者简介: 贺瑶(1995), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白(E-mail) hey923@126.com。

通信作者: 郑竟成, 教授, 硕士生导师(E-mail) jingchengzheng@163.com。

微拟球藻, 原属于绿藻门, 后被划归为真眼点藻纲, 是一种分布广泛的海水藻, 也是公认的最有希望用于工业化的高产油藻类。微拟球藻富含各种不饱和脂肪酸, 其中二十碳五烯酸(EPA)含量可达总脂肪酸的30%左右, 因此被称为最有潜力的EPA研究藻种之一^[1]。作为一种单细胞藻类, 微拟球藻除了

脂质含量高,还具有环境适应能力强、个体小、繁殖速度快等特点。因此,微拟球藻及其脂质的开发与利用近年来受到广泛的研究。

EPA 属于 $\omega-3$ 系列多不饱和脂肪酸,可降低甘油三酯和胆固醇的含量,促进饱和脂肪酸在体内的代谢^[1-4]。在现代人的日常饮食中,胆固醇和油脂的摄入量大幅上升,导致心血管疾病成为了主要的健康问题之一。而 EPA 已被证实对治疗动脉粥样硬化、高血压和炎症有效^[4-5]。因此,研究开发富含 EPA 的产品具有广阔的应用前景及经济价值。微藻中脂肪酸组成稳定、培养繁殖简单、生长周期短,因此微藻作为 EPA 等不饱和脂肪酸的来源之一具有很大的发展潜力。

亚临界流体提取技术具有很多独特的优点,如提取效率高、提取压力低、提取温度低等,已被广泛应用于植物脂质^[6-7]和动物脂质^[8-10]的提取,但将该技术应用于微拟球藻脂质的提取鲜有报道。亚临界流体提取技术应用于微拟球藻脂质的提取可以保护多不饱和脂肪酸等生物活性物质,最大程度地减少氧化的发生。本文以微拟球藻膨化料为原料,采用亚临界流体丁烷提取技术对微拟球藻脂质进行提取,在单因素试验的基础上利用正交试验对影响微拟球藻脂质提取率的参数进行优化,确定最佳工艺条件,并检测其基本物性指标,为微拟球藻脂质的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

微拟球藻膨化料,烟台海融微藻养殖有限公司;脂肪酸、磷脂标准品,美国 Sigma 公司;乙醇、硫代硫酸钠、氢氧化钾、三氯甲烷、冰乙酸、碘化钾等均为市售分析纯。

1.1.2 仪器与设备

马弗炉;1100 高效液相色谱仪、8860 气相色谱仪,美国安捷伦科技公司;CBE-5L 亚临界丁烷提取装置,河南亚临界生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 亚临界丁烷提取微拟球藻脂质

称取 500 g 微拟球藻膨化料,以丁烷为提取溶剂,在一定条件下进行亚临界动态提取,提取完毕后,减压蒸发,收集微拟球藻脂质,计算微拟球藻脂质提取率^[8]。每个样品做 3 次平行试验,取平均值。微拟球藻脂质提取率按下式计算。

微拟球藻脂质提取率 = 亚临界提取脂质提取量 / 索氏抽提脂质提取量 $\times 100\%$

1.2.2 微拟球藻脂质相关指标分析

酸价,GB 5009.229—2016 第二法;过氧化值,GB 5009.227—2016 第二法;碘值,GB/T 5532—2008;脂肪和脂肪酸组成,GB 5009.168—2016 第一法;磷脂含量,GB/T 5537—2008。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 提取次数对提取率的影响

在提取温度 45 °C、单次提取时间 40 min、料液比 1:8 的条件下,按提取次数分别为 1、2、3、4、5、6 次进行亚临界丁烷提取,考察提取次数对微拟球藻脂质提取率的影响,结果见图 1。

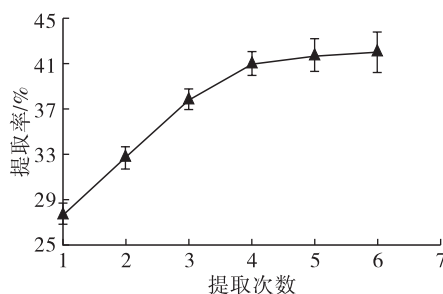


图 1 提取次数对微拟球藻脂质提取率的影响

由图 1 可知,随着提取次数的增加,提取率不断增加。从第 1 次到第 4 次,提取率迅速增加,达到 41.01%;从第 4 次增至第 6 次,提取率趋于平缓,继续增加提取次数意义不大。为了适当简化操作的流程,减少能量的损耗,提高效率,将提取次数确定为 4 次。

2.1.2 单次提取时间对提取率的影响

在提取温度 45 °C、料液比 1:8、提取 4 次的条件下,按单次提取时间分别为 10、20、30、40、50、60 min 进行亚临界丁烷提取,考察单次提取时间对微拟球藻脂质提取率的影响,结果见图 2。

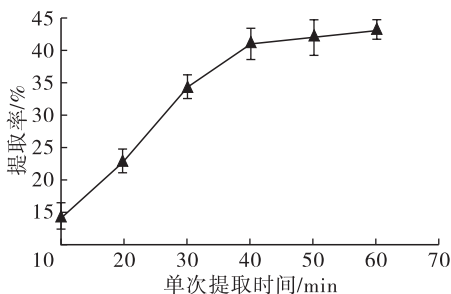


图 2 单次提取时间对微拟球藻脂质提取率的影响

由图 2 可知,随着单次提取时间的延长,提取率逐渐上升。单次提取时间从 10 min 延长至 40 min 时,提取率增至 41.13%。随后单次提取时间逐渐延长至 60 min,提取率增加变缓。10~20 min 时提取刚开始,此时细胞内部油脂还未向外部溶剂扩

散^[11],因此提取率较低;随着提取时间的延长,在20~40 min时细胞内部油脂向外部溶剂扩散,提取率快速升高,40 min时基本达到最高值;40 min之后提取逐渐达到平稳阶段以及慢速传质阶段,细胞内部油脂向外部溶解扩散达到动态平衡之后,提取率增加不明显。综上,选择单次提取时间40 min为宜。

2.1.3 提取温度对提取率的影响

在料液比1:8、单次提取时间40 min、提取4次的条件下,按提取温度分别为30、35、40、45、50、55℃进行亚临界丁烷提取,考察提取温度对微拟球藻脂质提取率的影响,结果见图3。

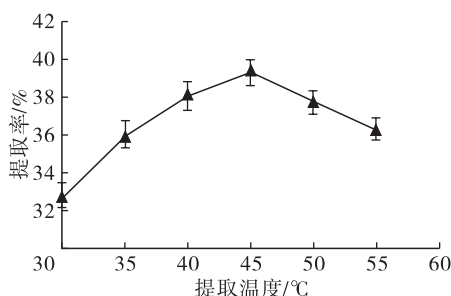


图3 提取温度对微拟球藻脂质提取率的影响

由图3可知:当提取温度在45℃以下时,随着提取温度的升高,微拟球藻脂质提取率随之增加,当提取温度达到45℃时,提取率达到最大;但提取温度超过45℃后,随着丁烷分子运动加速导致其密度有所降低,汽化程度增加,与物料接触面积减少,使提取速率逐渐下降^[12]。此外,提取温度升高还会加速脂质中不饱和脂肪酸的分解,故最佳提取温度选择45℃。

2.1.4 料液比对提取率的影响

在提取温度45℃、单次提取时间40 min、提取4次的条件下,按料液比分别为1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、1:12进行亚临界丁烷提取,考察料液比对微拟球藻脂质提取率的影响,结果见图4。

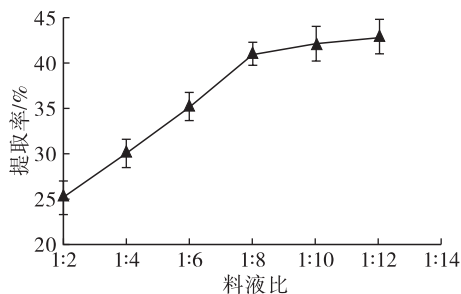


图4 料液比对微拟球藻脂质提取率的影响

由图4可知,随着料液比的增加,提取率逐渐升高,但在料液比超过1:8后,提取率增加不明显,说明此时微拟球藻中的脂溶性成分几乎提取完全,因

此提取率基本稳定,上升缓慢。若继续增加丁烷的用量,会降低总体提取效率,也会增加能耗。综合考虑,选择料液比1:8。

2.2 正交试验

在单因素试验的基础上,以提取率为评价指标,采用四因素三水平正交试验表 $L_9(3^4)$,优化亚临界丁烷提取微拟球藻脂质的工艺条件。选取提取次数、单次提取时间、提取温度、料液比作为优化因素,正交试验因素水平见表1,正交试验设计及结果见表2。

表1 正交试验因素水平

水平	A 提取次数	B 单次提取时间/min	C 提取温度/°C	D 料液比
1	3	30	40	1:6
2	4	40	45	1:8
3	5	50	50	1:10

表2 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	提取率/%
1	1	1	1	1	33.66
2	1	2	2	2	35.82
3	1	3	3	3	33.51
4	2	1	2	3	40.05
5	2	2	3	1	41.53
6	2	3	1	2	39.87
7	3	1	3	2	38.52
8	3	2	1	3	38.01
9	3	3	2	1	38.80
K_1	102.99	112.23	111.54	113.99	
K_2	121.45	115.36	114.67	114.21	
K_3	115.33	112.18	113.56	111.57	
R	18.46	3.18	3.13	2.64	

由表2可知,各因素对微拟球藻脂质提取率影响的主次排序为 $A > B > C > D$,即提取次数>单次提取时间>提取温度>料液比。工艺参数最佳组合为 $A_2B_2C_2D_2$,即提取次数4次,单次提取时间40 min,提取温度45℃,料液比1:8。

2.3 验证试验

取同一批次微拟球藻膨化料3份,每份500 g,在提取次数4次、单次提取时间40 min、提取温度45℃、料液比1:8的条件下进行3组平行试验,微拟球藻脂质的平均提取率为41.55%,说明工艺稳定可行。在最佳条件下提取的微拟球藻脂质呈深绿色油性糊状,其酸价(KOH)20.4 mg/g,过氧化值0.001 g/100 g,碘值(I)86.0 g/100 g,磷脂含量107.28 mg/g。

与其他油脂提取相比,微拟球藻脂质提取率整体偏低,可能是因为虽然经过了膨化处理,但是微拟

球藻的破壁率并不高,导致了在提取过程中,有机溶剂不能很好地渗透到微藻细胞内,从而造成整体提取率偏低。

2.4 亚临界丁烷提取微拟球藻脂质的脂肪分析

亚临界丁烷提取的微拟球藻脂质中含有丰富的脂肪,通过内标法对脂肪的组成和含量进行了分析,结果见表3。

表3 亚临界丁烷提取微拟球藻脂质中脂肪组成及含量

脂肪	含量/%
总脂肪	40.22
饱和脂肪	14.51
不饱和脂肪	25.71
单不饱和脂肪	15.17
多不饱和脂肪	10.54
反式脂肪	0.37
$\omega-3$ 脂肪	7.24
$\omega-6$ 脂肪	3.30
$\omega-9$ 脂肪	4.39

由表3可知,亚临界丁烷提取微拟球藻脂质总脂肪含量40.22%,其中饱和脂肪含量14.51%,不饱和脂肪含量25.71%。 $\omega-3$ 脂肪含量7.24%, $\omega-6$ 脂肪含量3.30%, $\omega-9$ 脂肪含量4.39%。对亚临界丁烷提取的微拟球藻脂质成分进行进一步分析,发现其中还含有甘露醇、叶绿素、类胡萝卜素、植物甾醇等其他成分。

为进一步了解微拟球藻脂质的脂肪酸组成,利用GC对微拟球藻脂质中的脂肪酸组成进行了检测,结果见表4。

表4 亚临界丁烷提取微拟球藻脂质中主要脂肪酸组成及含量

脂肪酸	含量/%
C14:0	2.62
C16:0	10.71
C16:1	10.78
C18:1	4.39
C18:2	1.22
C20:4(ARA)	1.78
C20:5(EPA)	7.21

由表4可知,微拟球藻脂质中脂肪酸主要以不饱和脂肪酸为主,其中EPA含量为7.21%。本次测定的微拟球藻脂质中的EPA含量,相较于一些报道^[13]偏低,推测与藻粉批次和藻粉的膨化工艺有关,但不影响对亚临界丁烷提取工艺的研究。

3 结论

通过单因素试验和正交试验确定了亚临界丁烷

提取微拟球藻脂质的最佳工艺条件为:提取次数4次,单次提取时间40 min,提取温度45℃,料液比1:8。在最佳工艺条件下,微拟球藻脂质提取率为41.55%。提取的微拟球藻脂质呈深绿色油性糊状,其酸价(KOH)20.4 mg/g,碘值(I)86.0 g/100 g,过氧化值0.001 g/100 g,磷脂含量107.28 mg/g。亚临界丁烷提取的微拟球藻脂质中总脂肪含量为40.22%,不饱和脂肪酸含量较高,其中EPA含量为7.21%。

参考文献:

- [1] 袁芝,朱孝晨,孙利芹. 响应面法优化拟微绿球藻藻油脱色工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 183-188.
- [2] 李文宗,王磊. 长链多不饱和脂肪酸EPA、DHA的基因工程研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 1-7.
- [3] SWANSON D, BLOCK R, MOUSA S A. *Omega-3* fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life[J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(1): 1-7.
- [4] MOZAFFARIAN D, WU J H. (*n-3*) Fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? [J]. *J Nutr*, 2012, 142(3): 614-625.
- [5] KWAK S M, MYUNG S K, LEE Y J, et al. Efficacy of *omega-3* fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials[J]. *Arch Intern Med*, 2012, 172(9): 686-694.
- [6] ZANQUI A B, DE MORAIS D R, DA SILVA C M, et al. Subcritical extraction of flaxseed oil with *n*-propane: composition and purity[J]. *Food Chem*, 2015, 188: 452-458.
- [7] ZANQUI A B, DE MORAIS D R, DA SILVA C M, et al. Subcritical extraction of *Salvia hispanica* L. oil with *n*-propane: composition, purity and oxidation stability as compared to the oils obtained by conventional solvent extraction methods[J]. *J Braz Chem Soc*, 2014, 26(2): 282-289.
- [8] 孙德伟,李波,陈洪建,等. 南极磷虾脂质的亚临界提取及磷脂分析[J]. 中国油脂, 2017, 42(10): 1-4, 30.
- [9] LIU K, WANG L, XUE C H, et al. Subcritical R134a extraction of *Euphausia pacifica* oil and analysis of fatty acid composition[J]. *Food Sci*, 2013, 34(14): 96-99.
- [10] LIU P, SHI J, SHEN S J. Subcritical fluid extraction of astaxanthin from shrimp and crab shell waste[J]. *Fine Chem*, 2011, 28(5): 497-500.
- [11] 杨倩,祁颀,王金顺,等. 亚临界萃取牡丹籽油的工艺研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(5): 15-18.
- [12] 徐国良. 亚临界萃取石榴籽油工艺的响应面优化[J]. 江西化工, 2019, 13(1): 47-51.
- [13] 卢丽娜,孙利芹,田焕玲,等. 32株海洋微藻总脂含量及其脂肪酸组成的研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(11): 68-73.