

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

翟 量, 沈立荣*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058)

摘要: **目的** 以富含 EPA 的微拟球藻(*Nannochloropsis* sp.)为原料, 优化超声波辅助溶剂萃取法提取 EPA 微藻油的提取方法, 并对提取出的藻油脂肪酸组成进行分析研究。**方法** 将样品按一定液料比加入提取溶剂, 充分混合后在水温一定的超声设备中超声浸提一定时间。浸提后置于 3000 r/min 转速下离心 5 min, 取上清液旋转蒸发后于 105 °C 下烘干至恒重得藻油。将提取出的藻油甲酯化后利用气相色谱分析其脂肪酸组成。**结果** 提取微藻油的最佳工艺为: 50 °C, 超声 30 min, 液料比 15:1(mL/g), 提取 3 次, 在该条件下微藻油得率为 37.6%。气相色谱分析显示, 所得 EPA 占总微藻油脂肪酸的 39.0%。**结论** 该方法简便、溶剂环保、藻油得率高、脂肪酸组成中 EPA 含量高, 适合微拟球藻油提取。该工艺为 EPA 微藻油产业化提取提供了科学依据。

关键词: 二十碳五烯酸; 微拟球藻; 微藻油; 溶剂提取

Optimization of the solvent extraction with ultrasonic assistance and fatty acid analysis of the microalgae oil enriched EPA

ZHAI Liang, SHEN Li-Rong*

(Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction method of eicosapentaenoic acid microalgae oil by solvent extraction with ultrasonic assistance, with *Nannochloropsis* sp. riched in EPA as raw materials, and analyze the composition of fatty acid of the extracted microalgae oil. **Methods** Samples were added at a certain ratio of liquid extraction solvent, and extracted for a certain time with ultrasonic assistance after thorough mixing. Then the mixed samples were centrifuged at speed of 3000 r/min with 5 min. At last, the supernatant were dried via rotary evaporation method and then were dried at 105 °C. The extracted microalgae oil's fatty acid compositions were analyzed by gas chromatography after methyl esterification. **Results** The optimal extraction conditions were as follows: temperature 50 °C, extraction time 30 min, liquid-solid ratio 15:1, 3 times of extraction. The extraction rate of microalgae oil reached 37.6% under the optimal extraction conditions. Gas chromatography analysis showed that EPA, the main component of the microalgae oil was 39.0% in total fatty acids. **Conclusion** The proposed method is simple, and can get high extraction rate of microalgae oil and high content of EPA, which is suitable for extracting microalgae oil from *Nannochloropsis* sp. The technology will provide a scientific basis for industrialization of microalgae oil of EPA.

KEY WORDS: eicosapentaenoic acid; *Nannochloropsis* sp; microalgae oil; solvent extraction

*通讯作者: 沈立荣, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术、食品营养学。E-mail: shenlirong@zju.edu.cn

*Corresponding author: SHEN Li-Rong, Professor, Department of Food Science and Nutrition in School of Biosystems Engineering & Food Science of Zhejiang University, No.866, Yuhangtang Road, Xihu District, Hangzhou 310058, China. E-mail: shenlirong@zju.edu.cn

1 引言

二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)属于n-3多不饱和脂肪酸,是大脑、神经和视觉细胞中重要的脂肪酸成分,对人体生理功能的正常发挥及多种疾病的防治有着重要作用,如预防心血管疾病,抗癌、抗炎、抑制过敏反应和增强免疫力等^[1,2]。长期以来,EPA和同属于n-3多不饱和脂肪酸的二十二碳六烯酸(docosapentaenoic acid, DHA)主要来源于寒冷地区(南极和北极)深海鱼中提取的深海鱼油。随着渔业资源的日益减少,人类对EPA和DHA需求量的增加,通过人工养殖微藻并提取n-3多不饱和脂肪酸已成为国际上新的n-3多不饱和脂肪酸来源^[3-6],国外已有规模化培养微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)生产高纯度EPA^[7]。在我国采用发酵法人工培养裂壶藻(*Schizochytrium* sp.)、吾肯氏壶藻(*Ulkenia amoeboida*)、寇氏隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)分离、提纯的DHA藻油于2010年3月经原国家卫生部批准为新资源食品,已广泛用于婴儿配方奶粉、糖果、软胶囊、食用调和油及保健食品生产^[8,9]。

微拟球藻是一种黄绿色单细胞超微型藻,富含蛋白质、多种氨基酸、矿物质等,营养价值高,已进入大规模养殖阶段^[10,11]。目前对微拟球藻的研究主要集中在EPA藻油的提取,富集生长环境对藻生长和油脂积累的影响等方面^[12]。国内微拟球藻主要作为动物饲料^[13],藻油提取的方法有溶剂法、超声波提取法、超临界CO₂萃取法、水酶法等^[14-16]。DHA藻油食品已在国内大量生产销售。EPA和DHA都属于n-3多不饱和脂肪酸,具有类似的营养保健功能。可以预期,随着微拟球藻产业化养殖规模的扩大和EPA微藻油提取技术的突破,EPA微藻油进入市场也已指日可待。本研究以提取食用EPA微藻油为目标,开展超声波辅助溶剂法微藻油提取工艺优化研究,为EPA微藻油规模化生产提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

破壁微拟球藻粉(烟台海融生物技术有限公司);三氟化硼-甲醇络合物溶液(Sigma公司);正己烷(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);无水硫酸钠、无水乙醇、正己烷、石油醚(分析纯,国药集团化学试

剂有限公司)。

BS-124S型赛多利斯电子天平(赛多利科学仪器(北京)有限公司);SK30G型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);KA-1000型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);RE-52AAB型旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司);K30干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);DGX-9053B-2型烘箱(上海福玛设备有限公司);GC-14C型气相色谱仪(日本岛津公司);真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 提取工艺流程

精确称取0.5g微拟球藻,按一定液料比加入有机溶剂,充分混匀,在水温一定的超声设备中超声浸提一定时间。超声浸提结束后在3000r/min转速下离心5min,离心后将上清液与沉淀分离。其中沉淀部分需回收进行多次浸提,取上清液旋转蒸发后于105℃下烘干至恒重,即得藻油。

破壁微拟球藻粉→加入溶剂→超声浸提→3000 r/min
离心(或抽滤)

↓
粗藻油←去除残余溶剂←旋转蒸发→溶剂回收

2.2.2 单因素试验

初步比较了正己烷、石油醚、75%乙醇、90%乙醇对提取率影响,确定乙醇为提取溶剂。设定乙醇的9个浓度水平:60%、65%、70%、75%、80%、85%、85%、90%、95%;5个温度水平:35、40、45、50、55℃;8个超声时间水平:2、4、6、8、10、30、60、120min水平;4个液料比水平:5:1、10:1、15:1、20:1;4个提取次数:1、2、3、4,分别考察取溶剂浓度、温度、超声时间、液料比和提取次数对微藻油得率的影响。

2.2.3 正交试验

根据各单因素实验结果,选择适当的溶剂、时间、液料比和提取次数水平,实施L₉(3⁴)正交实验,分析得出优化工艺。

2.2.4 微藻油得率测定^[6]

微藻油得率/%=(样品中油脂含量/样品总重)×100%。

其中样品中油脂含量通过蒸发瓶中样品处理前后的质量差计算得出,样品总重为藻粉取样量。

2.2.5 脂肪酸分析

样品采用三氟化硼法作甲酯化前处理^[17],取甲酯化样品2μL做气相色谱分析。

色谱条件: 色谱柱为 DB-23 (60 m×0.25 mm, 0.25 μm)。调节空气到 50 mL/min, 调节氢气到 75 mL/min, 调节柱温到 140 °C, 火焰离子化检测器(FID)温度到 270 °C, 进样口升温到 270 °C。柱温升温程序: 140 °C(1 min), 6 °C/min, 170 °C(3 min), 9 °C/min, 220 °C(18 min), 2 °C/min, 230 °C(2 min)。用 N2010 色谱数据工作站采集和分析脂肪酸图谱。

2.2.6 统计与分析

所有处理均作 3 次重复, 所得数据采用 SAS 9.1 软件作统计分析。

3 结果与分析

3.1 单因素实验

3.1.1 溶剂对微藻油得率的影响

在初步实验中, 对正己烷、石油醚、75%乙醇、90%乙醇的提取效果进行了比较, 结果(图 1)表明, 以乙醇作为提取溶剂的微藻油得率显著高于正己烷和石油醚为($P < 0.01$)。此外, 发现正己烷、石油醚、在加热过程中挥发性强, 溶剂回收率低, 且正己烷有一定毒性^[18], 所以选择乙醇作为提取微藻油的溶剂。

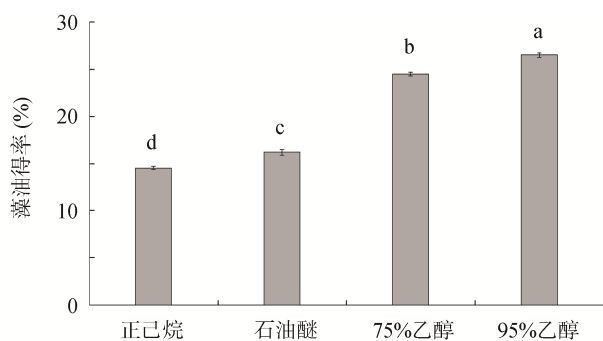


图 1 不同种类溶剂对微藻油得率的影响

Fig. 1 Effects of different solvents on extraction rate of microalgae oil

3.1.2 乙醇浓度对微藻油得率的影响

由于油脂的脂溶性特点, 作为提取溶剂的乙醇浓度不宜过低, 否则产物中水溶性产物较多而不利于油脂提取, 因此将乙醇浓度设定在 60%~95%。不同乙醇浓度提取效果显示(图 2), 乙醇浓度在 60%~90%时, 得率呈上升趋势; 之后随乙醇浓度的进一步提高, 得率呈下降趋势。因此, 将正交实验的乙醇浓度设为 85%、90%和 95% 3 个水平。

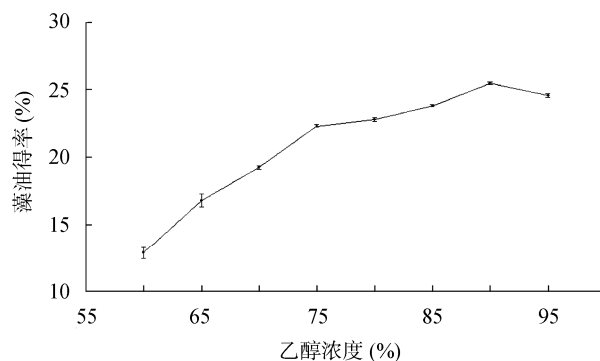


图 2 不同浓度乙醇对微藻油得率的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of ethanol on the extraction rate of microalgae oil

3.1.3 浸提温度对微藻油得率的影响

温度对微藻油对得率的影响效果显示(图 3): 随着温度的提高, 微藻油得率呈上升趋势; 当温度为 50 °C 时, 微藻油得率达到最大; 当温度为 35~50 °C 时, 微藻油得率上升较快; 当温度为 55 °C 时, 微藻油得率增速呈下降趋势。据此, 将正交实验的 3 个温度水平设为 45 °C、50 °C 和 55 °C。

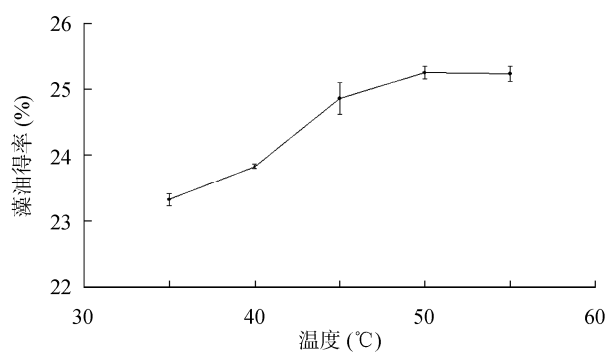


图 3 浸提温度对微藻油得率的影响

Fig. 3 Effects of temperatures on the extraction rate of microalgae oil

3.1.4 浸提时间对微藻油得率的影响

浸提时间对微藻油对得率的影响结果显示(图 4), 微藻油得率总体上呈随时间延长而提高的趋势。在浸提时间 2~30 min 时, 上升趋势明显; 30 min 之后趋于平缓, 不同时间段的微藻油得率相差不到 2%, 变化不大, 超声时间延长对微藻油得率的影响并不大, 30 min 为相对较合适的超声浸提时间。

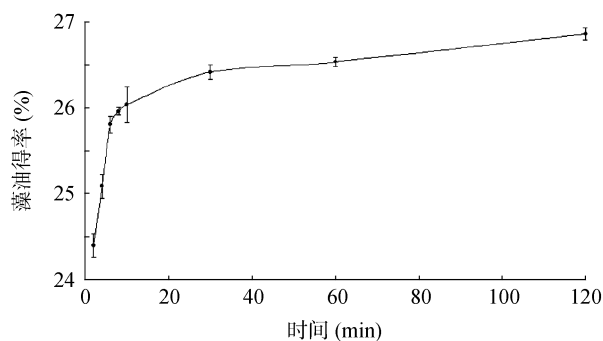


图4 超声浸提时间对微藻油得率的影响

Fig. 4 Effects of ultrasonic time on the extraction rate of microalgae oil

3.1.5 液料比对微藻油得率的影响

液料比对微藻油得率的影响效果表明(图5),随着液料比的升高,微藻油得率总体呈上升趋势。但在实际生产过程中,液料比越大,原料罐单位体积内原料越少,且溶剂蒸发问题不容忽视,因此大大增加了生产成本。在总体上不影响得率的前提下,本实验将正交实验的3个液料比水平设定为:5:1、10:1和15:1。

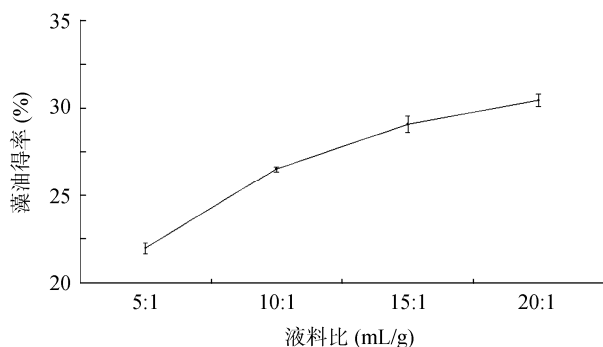


图5 液料比对微藻油得率的影响

Fig. 5 Effects of the ratio of liquid to material on extraction rate of microalgae oil

3.1.6 提取次数对微藻油得率的影响

对1次浸提后的剩渣作索氏抽提分析发现,剩渣中仍有微藻油残留,为此进行了增加提取次数,以提高微藻油得率。在90%乙醇、液料比10:1、温度为50℃、浸提30min的条件下,进行了提取1~4次的效果比较。结果(图6)显示,虽然总体上藻油的得率有随提取次数增加的趋势,但提取2次以后得率增幅逐渐减小。考虑到提取次数过多会导致溶剂损耗和生产成本增加,因此将正交实验提取的次数定为1次、2次和3次。

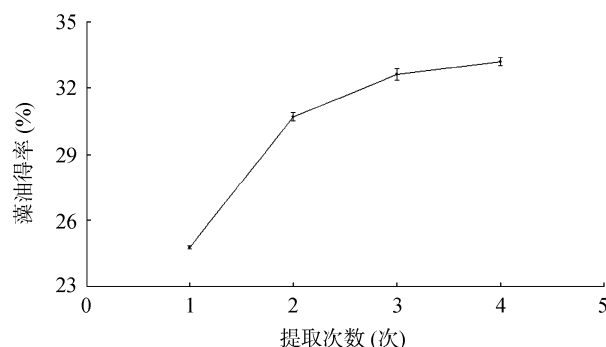


图6 提取次数对微藻油得率的影响

Fig. 6 Effects of extraction times on extraction rate of microalgae oil

3.2 正交实验

综合以上单因素实验结果,选择如表1所示因素水平,进行了 $L_9(3^4)$ 正交实验。实验结果显示(表2、表3),影响藻油得率的因素依次为:提取次数(D) > 液料比(C) > 提取温度(B) > 乙醇浓度(A),统计结果达到极显著水平($P < 0.0001$)。优化工艺组合为 $A_2B_2C_3D_3$,即乙醇浓度90%、提取温度50℃、液料比15:1、提取3次。按照此优化提取工艺条件进行验证,藻油得率为37.6%。

表1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 乙醇浓度(%)	B 提取温度(℃)	C 液料比(mL/g)	D 提取次数
1	85	45	5	1
2	90	50	10	2
3	95	55	15	3

表 2 正交实验结果与分析
Table 2 Analysis of orthogonal experimental results

实验号	A	B	C	D	藻油得率(%)
1	1	1	1	1	16.44±0.47
2	1	2	2	2	32.74±0.42
3	1	3	3	3	37.28±0.21
4	2	1	2	3	34.21±0.46
5	2	2	3	1	30.27±0.48
6	2	3	1	2	28.71±0.14
7	3	1	3	2	34.15±0.02
8	3	2	1	3	29.29±0.36
9	3	3	2	1	26.31±0.15
K ₁	86.46	84.80	74.44	73.02	
K ₂	93.19	92.30	93.26	95.60	
K ₃	89.75	92.30	101.70	100.78	
k ₁	28.82	28.27	24.81	24.34	
k ₂	31.06	30.77	31.09	31.87	
k ₃	29.92	30.77	33.90	33.59	
R	2.243	2.500	9.087	9.253	

表 3 正交实验结果方差分析
Table 3 Variance analysis of orthogonal-test results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	22.65	2	11.33	96.87	< 0.0001
B	37.58	2	18.79	160.73	< 0.0001
C	389.54	2	194.77	1665.93	< 0.0001
D	435.70	2	217.85	1863.30	< 0.0001
误差	2.10	18			
总和	887.58				

3.3 脂肪酸分析

气相色谱分析结果显示(图 7、表 4), 微藻油含棕榈油酸、棕榈酸、油酸、肉豆蔻酸、亚油酸、EPA、花生四烯酸(AA)等 7 种脂肪酸, 其中 EPA 含量占总脂肪酸的 39.0%, 是微藻油中最丰富的脂肪酸成分。

4 结 论

本研究以破壁微拟球藻粉为原料, 通过正交

实验获得了超声波辅助提取粗 EPA 微藻油的最佳工艺: 以 90%乙醇提取溶剂, 液料比 15:1, 在 50 °C 下提取 3 次。优化条件下, 微藻油得率为 37.6%。气相色谱脂肪酸分析表明, 所得 EPA 占总微藻油脂肪酸的 39.0%。此提取方法具有操作简单、设备成本低、便于工厂化生产、乙醇可在生产过程中回收利用的优点, 为 EPA 微藻油产业化提取提供了科学依据。

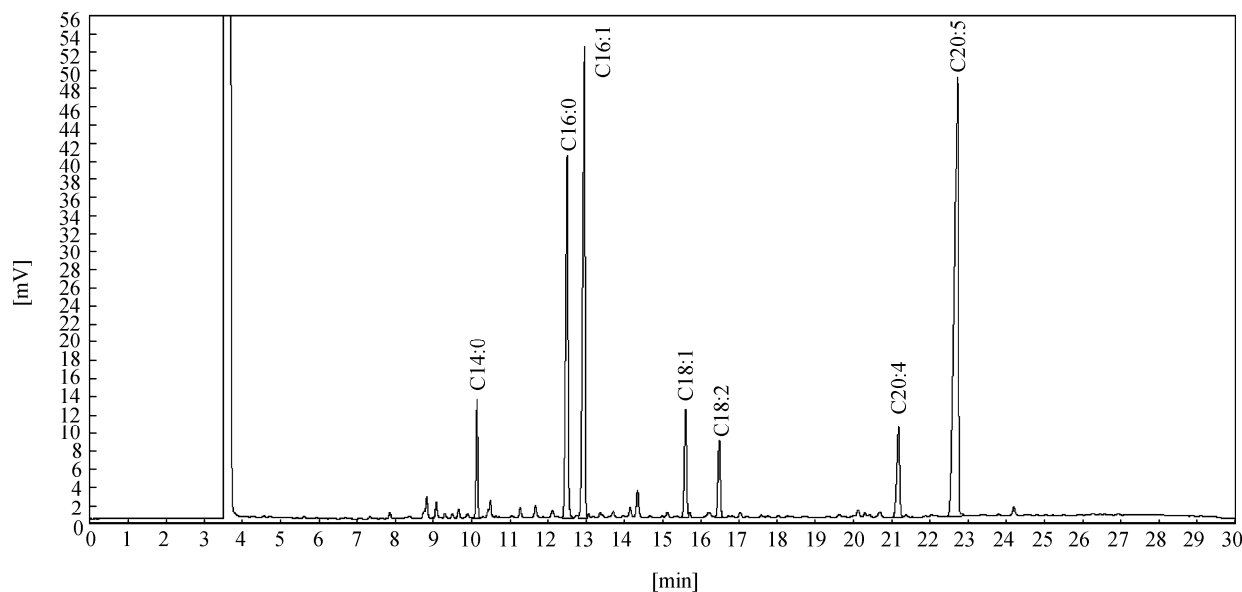


图7 微藻油油气相色谱图

Fig.7 Gas chromatogram of microalgae oil

表4 粗藻油脂肪酸组成

Table 4 The fatty acid compositions of microalgae oil

序号	脂肪酸	保留时间(min)	相对含量(%)
1	肉豆蔻酸	10.14	4.0
2	棕榈酸	12.50	17.9
3	棕榈油酸	12.95	24.2
4	油酸	15.60	5.0
5	亚油酸	16.49	4.0
6	AA	21.18	5.8
7	EPA	22.70	39.0

注: AA: 花生四烯酸; EPA: 二十碳五烯酸。

参考文献

- [1] Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life [J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(1): 1-7.
- [2] Connor WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(1S): 171S-175S.
- [3] Gianpaolo A, Ugo N. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2005, 107(6): 381-386.
- [4] 胡爱军, 丘泰球, 梁汉华. 利用海藻生产 EPA 和 DHA[J]. *中国油脂*, 2001, 26(4): 66-69.
- [5] Hu AJ, Qiu TQ, Liang HH. Production of EPA and DHA by Marine Algae [J]. *China Oils Fats*, 2001, 26(4): 66-69.
- [6] 梁英. 微藻 EPA 和 DHA 的研究现状及前景[J]. *水产学报*, 2000, 24(3): 289-296.
- [7] Liang Y. Current status and prospect of studies on microalgal EPA and DHA [J]. *J Fish China*, 2000, 24(3): 289-296.
- [8] 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.
- [9] Wu Q. The primary research of microalgae *Nannochloropsis* sp. culture and extraction of its' PUFAs [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2004.
- [10] 魏东, 张学成, 隋正红, 等. 氮源和 N/P 对眼点微拟球藻的生长、总脂含量和脂肪酸组成的影响[J]. *海洋科学*, 2000, 24(7): 45-50.
- [11] Wei D, Zhang XC, Sui ZH, et al. Nitrogen and N/P's effect on microspheres algae growth, total fat content and fatty acid composition in *nannochloropsis oculata* [J]. *Marine Sci*, 2000, 24(7): 45-50.
- [12] 黄巍峰, 郑晓辉, 曾远平, 等. DHA 藻油对酸奶品质的影响[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(7): 1615-1619.
- [13] Huang WF, Zheng XH, Zeng YP, et al. Effect of DHA algal oil on the quality of yoghurt [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2013, 29(7): 1615-1619.
- [14] 温雪馨, 李建平, 侯文伟, 等. 微藻 DHA 的营养保健功能及在食品工业中的应用[J]. *食品科学*, 2010, 31(21): 446-450.
- [15] Wen XX, Li JP, Hou WW, et al. The nutrition and health

- protection function and the application in food industry of the microalgal docosahexaenoic acid [J]. Food Sci, 2010, 31(21): 446–450.
- [10] Moazami N, Ashori A, Ranjbar R, *et al.* Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis* [J]. Biores Technol, 2012, 39(S1): 449–453.
- [11] Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, *et al.* Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor [J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 102(1): 100–112.
- [12] 张翼, 李晓明, 王斌贵. 海藻生物活性物质研究的回顾与展望 [J]. 世界科技研究与发展, 2005, 27(5): 56–63.
Zhang Y, Li XM, Wang BG. Review and prospect of sea weed derived bioactive substances [J]. World Sci-Technol Res Dev, 2005, 27(5): 56–63.
- [13] 周歧存, 赵华超. 海藻在罗氏沼虾饲料中的应用研究[J]. 饲料研究, 2001, (8): 5–6.
Zhou QC, Zhao HC. Application of algae in giant freshwater shrimp feed [J]. Feed Res, 2001, (8): 5–6.
- [14] 谭春兰, 袁永俊. 水酶法在植物油脂提取中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(21): 128–130.
Tan CL, Yuan YJ. The application of aqueous enzymatic method in the extraction of plant oil [J]. Food Res Dev, 2006, 27(21): 128–130.
- [15] 韩菊, 魏福祥, 云自厚. 采用低毒溶剂提取脂质[J]. 分析化学, 2002, 30(4): 450–453.
- Han J, Wei DX, Yun ZH. Lipid extraction by using low poison solvent [J]. Chin J Anal Chem, 2002, 30(4): 450–453.
- [16] Wang LJ, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants [J]. Trends Food Sci Technol, 2006, 17(6): 300–312.
- [17] Shen LR, Lai CQ, Feng X, *et al.* *Drosophila* lacks C20 and C22 PUFAs [J]. J Lipid Res, 2010, 51(10): 2985–2992.
- [18] 杜晓凤, 邹宁, 孙东红. 微绿球藻油脂提取方法的优化[J]. 中国油脂, 2012, 37(5): 10–12.
Du XF, Zou N, Sun DH. Optimization on oil extraction from *Nannochloropsis oculata* droop [J]. China Oils Fats, 2012, 37(5): 10–12.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



翟 量, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与营养。
E-mail: ybzan10000@126.com



沈立荣, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与营养。
E-mail: shenlirong@zju.edu.cn