

从微藻中提取多不饱和脂肪酸

吴庆¹ 蔡昭玲² 丛威² 马润宇¹

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029;

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 初步探测了用尿素包合法从一种海洋微藻中提取出的脂肪中富集 16:2, 16:3, 18:2, 20:5 (分别指碳和双键数, 16:2 指十六碳两双键) 四种多不饱和脂肪酸 (PUFAs)。海洋微藻富含 PUFAs, 实验研究得出用无水乙醚和石油醚混合溶剂在体积比 1:2、温度 20℃、提纯时间 5 h 的实验条件下萃取海藻中的脂肪质量最高。皂化过程选取甲醇作为溶剂要明显优于以乙醇作为溶剂的结果, 实验确定采用 KOH-甲醇作为皂化试剂; 研究了作为关键因素的尿素在尿素包合过程中的影响, 得出质量分数为 20% 的尿素试验提纯效果较好, 富集所得的多不饱和脂肪酸总量占脂肪酸的 89%。

关键词: 多不饱和脂肪酸 (PUFAs); 尿素包合法; 海洋微藻

中图分类号: TQ225.18

引言

研究^[1]表明, PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid) 是人及动物生长发育所必需的脂肪酸^[2-3]。PUFAs 目前主要从鱼油中提取, 但其加工处理复杂污染严重^[4]。海藻作为 PUFAs 的又一主要来源具有很大的潜力, 天然海藻资源丰富^[5], 而海洋微藻约占海洋生物物种的 40.86%^[3], 微藻还可以通过简单的营养素的培养, 有生长周期短、收获快等优点, 而且可以通过生物工程方法和培养条件的控制来提高其 PUFAs 的含量。PUFAs 的提取主要有低温冻结结晶法、尿素包合法、吸附分离法、分子蒸馏法、脂肪酶提取法、膜分离法以及二氧化碳超临界萃取法等^[6]。目前报道的从海藻中提取 PUFAs 主要是利用二氧化碳超临界萃取。这一方法设备昂贵、操作条件要求高、工业化困难。尿素包合法利用尿素分子和一些直链分子 (如直链饱和脂肪酸及其酯类) 同时存在时, 会形成内含直链分子的六方柱包合物结构而结晶析出, 当脂肪酸链中含有双键较多时, 使分子形状弯曲, 造成体积很大而不易与尿素形成此类包合物。本实验在已有多不饱和脂肪酸提纯的基础上初步研究了采取尿素包合法利用海藻提取多

不饱和脂肪酸的工艺。

1 材料与方法

1.1 微藻细胞培养

微藻藻粉 藻种 *Nannochloropsis* sp 获自中科院水生生物所 (武汉), 实验所用藻粉系由本实验室自行培养。

培养条件 用 f/2 培养基^[7]在 2.5 L 气升式光反应器内培养, 光培养条件为光照度 60 ($\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 培养温度 23℃, 循环冷凝维持恒温培养 6 d, 收获藻细胞离心 (3 000 r/min, 30 min) 后冻干, 然后在 60℃ 烘干至恒质量得干藻粉。

1.2 主要仪器和实验材料

Varian CP-3800 气相色谱仪, 瓦里安仪器公司; AB104-N 电子天平, 上海 METTLER TOLEDO 有限公司; 十七碳酸甲酯标准品, SIGMA 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 微藻粗脂的提取 由于微藻细胞和其他植物细胞一样具有较厚的细胞壁, 比较难破碎, 酶溶或超声波破碎的方法结果均不好, 本实验采取研磨的方法破碎, 可以加入钢砂加强研磨的效果, 在显微镜下观察, 大部分细胞被破碎。

藻粉经充分研磨后, 加入无水乙醚和石油醚的混合溶剂 (不同体积配比) 粗提取粗脂, 适当振荡混匀。并且加入质量分数 10% 的 KOH 沉淀藻细胞, 然后在 4 000 r/min 条件下离心 15 min 取上层清液。

收稿日期: 2003-12-25

第一作者: 男, 1980 年生, 硕士

E-mail: wtring208@yahoo.com.cn

在 60 ℃ 水浴迅速蒸去多余的溶剂至溶液恒重。

1.3.2 海藻混合脂肪酸的提取 在蒸去多余溶剂后的溶液中加入等体积饱和 KOH-甲醇溶液 (0.4 mol/L, 加热使 KOH 完全溶解) 皂化 6 h 或过夜, 为避免高温氧化, 置于冷藏室进行。然后用 HCl 稀溶液 (商品浓盐酸与去离子水以体积比 9:1 稀释) 调节 pH 值至 1~2, 再加入少量 H₂O 使溶液分层, 离心分离取上层油层。

1.3.3 尿素包合富集海藻多不饱和脂肪酸 配制不同质量浓度的尿素-甲醇溶液, 加入到混合脂肪酸中, 置冰箱冷冻层 (-20 ℃) 形成包合物至不再有结晶析出 (2 h)。水洗后离心得多不饱和脂肪酸粗品。

1.3.4 气相色谱 (GC) 分析脂肪酸含量 参照 Carreau 等 (1978) 的方法^[8], 以脂肪酸甲酯的正己烷浓缩溶液上气相色谱测定。

气相色谱样品处理。取上述多不饱和脂肪酸粗品 0.2 mL 加入 0.1 mL 17:0 (表示十七碳 0 个双键) 脂肪酸甲酯标准样品, 上柱测定。

气相色谱条件。色谱柱为瓦里安 CP-sil 5 CB 毛细管柱, 规格为 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm; 柱压为 110 kPa; 分流进样, 分流进样体积比 30:1, 进样量 0.000 2 mL; 进样口温度 250 ℃; 程序升温条件: 初始温度 150 ℃, 保留 1 min (升温速率 5 ℃/min) 至 220 ℃, 再升温至 280 ℃ (升温速率 20 ℃/min), 保留 15 min; 检测器采取 FID (氢火焰) 检测器, 检测温度 280 ℃。各气流速: 载气 N₂ 为 2 mL/min, H₂ 为 30 mL/min, 空气为 300 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 粗脂肪提纯中溶剂配比的选择

因 E. G. Bligh 和 W. J. Dyer^[9] 的氯仿-甲醇提取油脂的方法的剧毒性和难回收, 实验采取乙醚和石油醚混合溶剂提取粗脂。经实验发现脂肪的提取主要受溶剂配比、温度、提取时间四个因子的影响, 以乙醚体积用量、石油醚体积用量、提取温度、提取时间四因素三水平进行正交实验, 确定实验最佳提取工艺条件。实验安排如表 1 所示。

从藻粉中提取出的粗脂越多, 得到的蒸去多余溶剂的溶液质量也越大, 实验得正交表如表 2 所示。

由正交实验结果 (见表 2) 可见对提取影响最大的为加入石油醚的体积, 其次分别为加入乙醚的体积、提取的温度、提取的时间。从实验结果可知当乙

表 1 L⁹(3⁴) 正交实验安排

Table 1 Arrangement of L⁹(3⁴) orthogonal experiments

实验水平	乙醚体积/mL	石油醚体积/mL	提取温度/℃	提取时间/h
1	0.5	0.5	4	3
2	0.75	0.75	20	5
3	1.0	1.0	40	7

醚和石油醚的体积比为 1:2、提取温度 20 ℃、提取时间 5 h 时为实验室粗油提取的最佳工艺条件。在此条件下, 仍取 0.1 g 同批藻粉做重复试验得提取后质量为 0.326 g。

表 2 L⁹(3⁴) 正交实验结果

Table 2 Results of L⁹(3⁴) orthogonal experiments

实验号	干藻粉质量/g	乙醚体积/mL	石油醚体积/mL	提取温度/℃	提取时间/h	提取后质量 ¹⁾ /g
1	0.1	0.5	0.5	4	3	0.207
2	0.1	0.5	0.75	20	5	0.305
3	0.1	0.5	1.0	40	7	0.302
4	0.1	0.75	0.5	20	7	0.153
5	0.1	0.75	0.75	40	3	0.226
6	0.1	0.75	1.0	4	5	0.272
7	0.1	1.0	0.5	40	5	0.162
8	0.1	1.0	0.75	4	7	0.210
9	0.1	1.0	1.0	20	3	0.330
		0.814	0.522	0.690	0.763	
		0.652	0.741	0.788	0.787	
		0.702	0.905	0.690	0.665	
/3		0.271	0.174	0.230	0.254	
/3		0.217	0.248	0.263	0.262	
/3		0.234	0.302	0.230	0.222	
极差		0.044	0.128	0.033	0.031	

注: 1) 为不饱和脂肪酸与结合的有机溶剂的总质量。

2.2 皂化试剂的选择

皂化试剂可以选用的溶剂有甲醇或乙醇, 实验通过对两种试剂作比较确定选择用甲醇-KOH 或者乙醇-KOH 作为皂化试剂, 分别将提纯的结果作气相色谱分析, 得图 (图 1) 进行比较。气相色谱图中除加入的体积比为 17:0 脂肪酸甲酯标样, 五个明显的峰分别为 14:0, 16:2, 16:3, 18:2, 20:5 脂肪酸甲酯。从图 1 中可以看出, 乙醇-KOH 作皂化试剂时, 色谱峰的拖尾和延时比较严重, 而且对低不饱和脂

- 社,1993,1-9
- [6] 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(6):66-69
- [7] Guillard R R L, Ryther J H, Barrett S M, *et al.* Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatoms [J]. *Phytochemistry*, 1994,35:155-161
- [8] Carreau J P, Dubacq J P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts [J]. *J Chromatograph*, 1978,151:284-290
- [9] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification [J]. *Can J Biochem Physiol*, 1959,37:911-917

A primary study on the extraction and enrichment of the PUFAs from algae

Wu Qing¹ Cai Zhao-ling² Cong Wei² Ma Run-yu¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The paper primarily explores the extraction and enrichment of four kinds of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which are 16:2, 16:3, 18:2 and 20:5 fatty acids, (e. g. 16:2 means there are 16 carbons and 2 double bounds in the carbon chain of the fatty acid), by urea complexation from a microalgae, which is rich in PUFAs. The result shows that the mass of the fat which is extracted from the algae can reach the best result in the following conditions: the ratio of the volume of absolute ether and petroleum benzene is 1:2, the temperature of the extraction is 20℃, and the extraction time is 5 h. In the course of saponification we choose methanol as the solvent which is obviously more excellent than ethanol. Through the experiment, we decide to make the methanol-KOH as the saponifying solvent. The effect of the urea in the enrichment of the PUFAs by urea complexation is also studied, and the result that when the mass concentration of the urea is 20% the purification effect is the best in all the experiments. The enriched PUFAs claim 90% of the total fatty acids.

Key words: PUFAs; urea complexation; microalgae

(责任编辑 云志学)

下期预告

CO₂/DME/CH₃OH 和 CO₂/DME/C₂H₅OH 体系的汽液相平衡研究
超重力碳化法二氧化硅的干燥及应用研究
纳米 CaCO₃ 在有机颜料塑料着色中的应用
超重力旋转床中气液两相流动与传质过程的数值模拟
带锈铸铁在含 Cl⁻ 介质中闭塞区化学状态的研究
单分散聚苯乙烯微球的制备及其影响因素的研究
SiO₂/EPDM 复合材料中的微观形态与动态力学性能关系的研究
工业纯铁在 NaNO₂ + NaCl 溶液中的亚稳态孔蚀及其腐蚀形貌
丙烯酸树脂交联改性水性聚氨酯乳液的研究
硅藻土强化吸附壳聚糖固定化青霉素酰化酶
两种不同槽形气体端面密封泄漏量的试验研究
圆弧齿轮泵传动平稳性的研究

曹文等
陈智涛等
郭志强等
许明等
欧阳维真等
李艺等
林桂等
王虎等
王金平等
宋建彬等
陈伟等
张有忱等