

超临界 CO₂ 提取海鞘脂肪酸的研究

姜爱莉^{1,2}, 郭尽力¹, 王长海^{1,2}

(1. 烟台大学 生物工程系, 山东 烟台 264005; 2. 大连理工大学 生物工程系, 辽宁 大连 116024)

摘要:用超临界 CO₂ 从柄海鞘(*Styela clava*)干粉中提取多不饱和脂肪酸。通过正交实验对提取工艺进行研究, 得其最佳提取条件为: 萃取温度 50℃, 萃取压力 20 MPa, 萃取时间 2 h, 夹带剂乙酸乙酯体积(mL): 柄海鞘干粉质量(g) 为 1: 2。按此工艺, 脂肪酸得率为 19.5%。利用气相色谱进行分析, 其多不饱和脂肪酸含量为 75.77%, 二十碳五烯酸(EPA) 和二十二碳六烯酸(DHA) 含量之和为 19.47%。

关键词: 柄海鞘(*Styela clava*); 超临界; 多不饱和脂肪酸

中图分类号: Q 503 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006) 05-0028-04

柄海鞘(*Styela clava*) 在分类学上属于脊索动物门、尾索动物亚门、海鞘纲、内性目、柄海鞘科, 在我国沿海均有分布^[1, 2]。自从 20 世纪 80 年代以来, 一些科学家陆续从多种海鞘中发现了抗肿瘤、抗病毒以及调节免疫功能的生物活性物质^[3, 4], 如生物碱、肽类等, 但对其中脂肪酸的研究尚未见报道。

多不饱和脂肪酸^[5] (Polyunsaturated fat acid, PUFA) 是一类具有特殊功能的活性物质, 是保证细胞膜的渗透性、可塑性的必需营养物质。其中最具意义的是二十碳五烯酸(EPA) 和二十二碳六烯酸(DHA)^[6]。目前 EPA 和 DHA 主要来源于鱼油, 但因为鱼油的资源及产量均有限, 当前需要探索新的 EPA 和 DHA 资源^[7]。作者最近的研究发现, 生长在中国北方沿海的柄海鞘体内多不饱和脂肪酸含量较高, 可作为多不饱和脂肪酸的新的来源。

超临界流体萃取是近年来兴起的新型分离工艺, 在各种多不饱和脂肪酸油脂、生物活性物质的提取方面已取得很大进展, 有的已实现工业规模生产。作者采用超临界 CO₂ 萃取技术提取海鞘中的脂肪酸, 探讨其工艺可行性并确定适宜的工艺条件, 并与溶剂萃取方法相比较, 为进一步的工业应用提供必要的参数。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

柄海鞘, 由烟台水产研究所提供, 并由该所高级工程师袁继平鉴定。将海鞘晾干, 粉碎, 冷冻保存备用。测定其干粉中脂肪质量分数为 25.2%。

HA 220 40 12 型超临界萃取设备, 江苏南通华安

超临界萃取有限公司制造, 其流程见图 1。

1.2 实验方法

1.2.1 海鞘脂肪的超临界萃取

称取海鞘干粉 500 g 放入料筒, 将料筒装入萃取器, 开启、制冷、冷循环, 将萃取器、分离器 I、II 控温仪分别调整到所需设定的温度。开启 CO₂ 气瓶, 打开高压泵进行加压, 当萃取器达到压力要求后调节萃取器压力平衡, 然后调节分离器 I、II 压力平衡到要求的压力。打开夹带剂阀门, 泵入夹带剂(乙酸乙酯), 进行回流萃取。达到预定时间后, 从分离器 II 出料口出料, 减压回收夹带剂, 真空干燥, 得海鞘脂肪酸。

以海鞘油脂产率为考察指标, 在海鞘干粉粒度为 40 目、萃取压力为 20 MPa、萃取温度 40℃、萃取时间 2 h、夹带剂比例[乙酸乙酯体积(mL)/柄海鞘干粉质量(g)] 为 0.20 的实验条件下, 分别考察各因素的影响:

海鞘干粉粒度(目): 20, 40, 60, 80;

萃取压力(MPa): 10, 15, 20, 25, 30, 35;

萃取温度(℃): 20, 30, 40, 50, 60;

萃取时间(h): 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0;

夹带剂体积(mL)/柄海鞘干粉质量(g) 为 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5, 1: 6。

1.2.2 脂肪酸成分及含量的测定

取油样 2 到 3 滴, 加入 2 mL 环己烷溶解, 加 KOH

收稿日期: 2004-02-25; 修回日期: 2004-07-26

作者简介: 姜爱莉(1973), 女, 山东烟台人, 讲师, 博士研究生, 主要研究方向: 海洋生物活性物质, E-mail: ja19035@srna.com

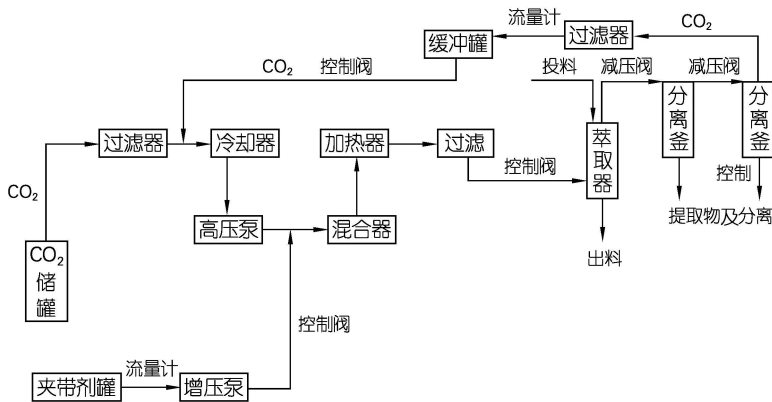


图 1 CO₂萃取流程示意图

Fig. 1 Flow diagram of SCF

甲醇溶液 1 mL, 于 40℃下反应 10 min, 然后加水分层, 取上清液做色谱分析^[8]。

色谱条件^[9]: 60 m× 0.32 mm× 0.25 μm, 交联 PEG 20M 石英毛细管柱; 进样口和检测器温度均为 250℃, 色谱柱程序升温, 初温 180℃, 以 5℃/min 升至 250℃; 载气(N₂) 流速: 15 cm/s, 尾吹 40 mL/min, 进样量 4 μL。

2 结果与讨论

2.1 海鞘粒度对海鞘脂肪酸得率的影响

物料的粒度对脂肪酸得率有很重要的影响, 粉碎的基本目的是将细胞壁破碎以提高萃取效率。另外, 物料变细后, 增加了传质面积, 减少了传质距离和传质阻力, 有利于萃取; 但另一方面, 如果物料太细, 高压下易被压实, 反而增加传质阻力, 形成沟流, 不利于传质。粒度实验结果见图 2。由图中可见, 40~ 60 目粉碎粒度较为适宜。

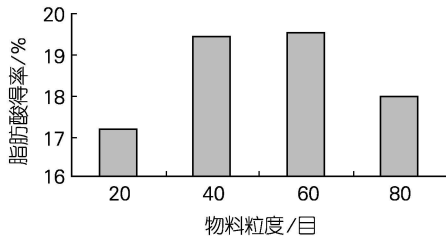


图 2 物料粒度对脂肪酸得率的影响

Fig. 2 Effect of granularity of material on the yield of fatty acid

2.2 萃取压力对海鞘脂肪酸得率的影响

如图 3 所示, 随着萃取压力升高, 脂肪酸得率逐步增加, 但当压力大于 25 MPa 后, 脂肪酸得率增加已很缓慢, 再增加压力没有多大意义。

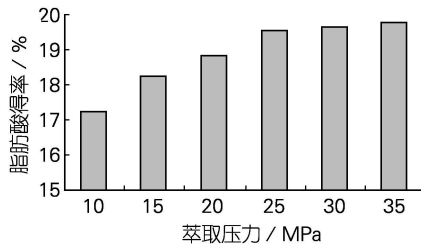


图 3 萃取压力对脂肪酸得率的影响

Fig. 3 Effect of extracting pressure on the yield of fatty acid

2.3 萃取温度对海鞘脂肪酸得率的影响

萃取温度是影响超临界 CO₂ 密度的又一个重要参数。温度升高, 一方面加大分子动能, 增加了物质的扩散系数, 有利于萃取; 另一方面, 升温会引起 CO₂ 密度的降低, 不利于萃取。从图 4 可以看出, 40~ 50℃是比较适宜的萃取温度。

2.4 萃取时间对海鞘脂肪酸得率的影响

从图 5 可以看出, CO₂ 流量一定时, 萃取时间越长, 海鞘脂肪酸的得率增高。萃取 1 h 得率为 16.2%, 2 h 为 19.4%, 但时间再延长, 脂肪酸得率增加有限, 萃取 3 h 得率仅为 19.5%。而且时间延长, 能耗加大。从经济角度考虑, 萃取时间以 2~ 3 h 为好。

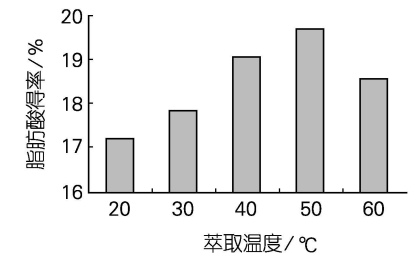


图 4 萃取温度对脂肪酸得率的影响
Fig. 4 Effect of extracting temperature on the yield of fatty acid

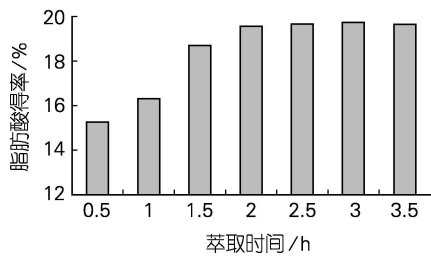


图 5 萃取时间对脂肪酸得率的影响
Fig. 5 Effect of extracting time on the yield of fatty acid

2.5 夹带 剂 量 对 海 鞘 脂 肪 酸 得 率 的 影 响

采取在 CO₂ 中适当添加夹带剂的办法, 通常能使 CO₂ 的萃取能力增强。这样体系操作压力将得以

降低, 这不仅对降低能耗有很大意义, 而且可以使设备的设计压力降低, 大大节省设备投资。随着夹带剂用量的增加, 海鞘脂肪酸的得率不但没有增加, 反而有所下降。这可能是由于加入的夹带剂使萃取流体的极性改变的原因。由图 6 可以看出, 当夹带剂体积 (mL) 与柄海鞘干粉质量 (g) 之比为 1: 2 比较适宜, 再增加夹带剂量, 不仅多耗费溶剂, 而且增加了溶剂回收的时间, 增加能耗, 还可能由于加热时间过长而影响脂肪酸的质量。

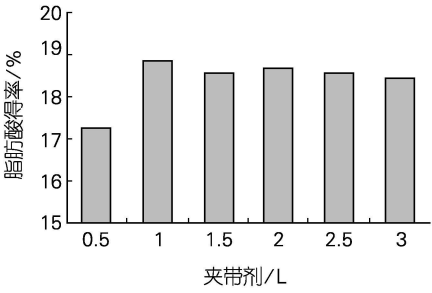


图 6 夹带剂量对脂肪酸得率的影响
Fig. 6 Effect of quantity of carrier on the yield of fatty acid

2.6 正交 实 验

以萃取压力、萃取温度和夹带剂用量为考察因素, 按 L₉(3⁴) 表设计正交实验, 结果及方差处理见表 1 及表 2。

表 1 正交实验结果 L₉(3⁴)

Tab. 1 Results of orthogonal experiment L₉(3⁴)

实验号	压力(MPa)	温度(°C)	夹带剂体积 (mL): 柄海鞘干粉质量 (g)	得率 (%)
1	10	30	1: 1	17.20
2	10	40	1: 2	18.21
3	10	50	1: 3	18.00
4	20	30	1: 2	19.20
5	20	40	1: 3	18.31
6	20	50	1: 1	19.80
7	30	30	1: 3	15.90
8	30	40	1: 1	15.99
9	30	50	1: 2	18.10

表 2 方差分析结果
Tab. 2 Analysis of variance

方差来源	平方和 <i>S</i>	自由度 <i>f</i>	均方 $\bar{s}$	<i>F</i> 值	显著性
萃取压力	0.732	2	0.089 43	102.79	* *
萃取温度	0.360	2	0.027 22	31.29	*
夹带剂量	0.330	2	0.019 83	22.79	*
误差	0.072	2	0.000 87	-	

注: * * 表示极显著, * 表示显著

根据上述分析,对产率影响极显著的因子是萃取压力,显著的是萃取温度和夹带剂用量。通过正交实验,得出超临界 CO₂ 萃取柄海鞘脂肪酸的最佳条件为:海鞘干粉粉碎至 40~ 60 目,萃取温度 50℃,压力 20 MPa,夹带剂体积 (mL): 柄海鞘干粉质量 (g) 为 1: 2,萃取时间 2 h。

按此工艺条件对柄海鞘干粉进行大规模的脂肪

表 3 脂肪酸组成及质量分数
Tab. 3 Ingredient and content of fatty acid

脂肪酸	C12: 0	C16: 0	C16: 1	C16: 2	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3	C18: 4
质量分数(%)	10.828	3.281	0.297	0.384	0.225	4.55	9.64	3.07	3.17
脂肪酸	C20: 2	C20: 3	C20: 4	C20: 5	C22: 1	C22: 3	C22: 4	C22: 5	C22: 6
质量分数(%)	18.93	7.32	3.49	9.82	5.04	6.18	2.17	1.95	9.65

从表 3 中可计算出,在柄海鞘的全部脂肪酸中,饱和脂肪酸占 14.33%,不饱和脂肪酸占 85.67%,其中多不饱和脂肪酸含量为 75.77%,占不饱和脂肪酸的 88.45%,EPA 和 DHA 的质量分数分别为 9.82% 和 9.65%,其和为总脂肪酸质量分数的 19.47%。

2.8 与溶剂提取法的比较

称取海鞘干粉 500 g,以 10 倍体积的乙酸乙酯为萃取剂,50℃ 提取 240 min。减压回收溶剂,真空干燥,得海鞘脂肪酸 90.0 g,得率为 18.0%,略低于超临界提取的得率,但提取时间较超临界长 2 倍。二者的脂肪酸组成差别也不大。但两种产品的内在质量仍存在着较大的差别:超临界 CO₂ 萃取物色泽浅黄,杂质含量低,油脂的氧化稳定性好,60℃ 时氧化诱导期为 55 h;而溶剂法得到的油脂色泽棕褐色,杂质含量较高,由于提取过程中的氧化作用,使油脂的氧化稳定性较差,60℃ 时氧化诱导期仅为 45 h。与传统的溶剂法相比,超临界 CO₂ 萃取具有很大的优势。

3 结论

(1) 通过正交实验得出最佳工艺条件为:海鞘干粉粉碎至 40~ 60 目,萃取温度 50℃,压力 20 MPa,夹带剂乙酸乙酯体积 (mL) / 柄海鞘干粉质量 (g) 为 1:2,萃取时间 2 h。在此条件下进行提取,脂肪酸的产率为 19.5%。

(2) 对提取的脂肪酸进行脂肪酸分析,多不饱和

酸提取(海鞘粉一次投料量为 5 000 g),得脂肪酸 975 g,得率为 19.5%。经过一次提取,可将柄海鞘干粉中脂肪的 77.4% 提取出来。

2.7 脂肪酸成分分析

将提取的脂肪酸甲酯化处理后,进行气相色谱分析,结果如表 3。

脂肪酸质量分数为 75.77%,其中 EPA 和 DHA 的质量分数之和占脂肪酸总量的 19.47%。

(3) 所得脂肪酸与溶剂法的产品相比,产品色泽浅,杂质含量低。

参考文献:

[1] 郑成兴. 中国沿海海鞘的物种多样性[J]. 生物多样性, 1995, 3(4): 201-206.
[2] 张继红,方建光. 几种常见海鞘呼吸代谢研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 16-18.
[3] 董志峰,程云,欧阳藩,等. 海鞘中的抗肿瘤生物活性物质[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 32-34.
[4] 李青选,王学雯. 海鞘中的药理活性物质及其研究概况[J]. 药学进展, 1992, 16(1): 33-36.
[5] 窦学廉,康毅. γ -3 多不饱和脂肪酸的药理研究进展[J]. 天津医科大学学报, 1996, 2(4): 82-83.
[6] Biard J F, Guyot S, Rousskis C, et al. Lepadiformine, a new marine cytotoxic alkaloid from *Clavelina lepadiformis* muller[J]. *Tetrahedron Lett*, 1994; 35(17): 2 691-2 693.
[7] Li Caiping, Blackman A J. Cylindricines H, Novel alkaloids from the ascidian *Clavelina cylindrica*[J]. *Aust J Chem*, 1995; 48: 955-958.
[8] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989. 25-26.
[9] 韩国麒. 油脂化学[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1994. 248-257.

(下转第 39 页)

Extracting fatty acid from *Styela clava* with super critical fluid CO₂

JIANG Ai-li^{1,2}, GUO Jin-li¹, WANG Chang-hai^{1,2}

(1. Department of Biochemical Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Received: Feb. , 25, 2004

Key words: *Styela clava*; super critical fluid CO₂ extraction; polyunsaturated fatty acid

Abstract: Polyunsaturated fatty acid (PUFA) is extracted from dry powder of *Styela clava* with super critical fluid CO₂. The extraction process is studied through orthogonal experiment and the optimization is listed as follows: *S. clava* has been extracted with SPF CO₂ at 20 Mpa pressure, 50℃, for 2 h, and weight ratio of *S. clava*: volume of ethyl acetate is 1:2, and the yield is 19.5% . According to the analysis of GC, the content of PUFA in the product is 75.77%, and the content sum of EPA and DHA is 19.47% .

(本文编辑: 张培新)