

盐藻油微波辅助提取工艺优化

孙协军, 王 珍, 李秀霞*

(渤海大学化学化工与食品安全学院, 辽宁 锦州 121013)

摘 要: 对盐藻油微波辅助提取工艺进行优化, 采用响应面法分析液料比、浸提温度和浸提时间对盐藻油得率的影响, 建立相应的预测模型。方差分析结果表明, 液料比($P < 0.005$)、浸提温度($P < 0.005$)和浸提时间($P < 0.005$)都对盐藻油得率有显著影响, 液料比的二次项($P < 0.005$)和浸提温度的二次项($P < 0.005$)对盐藻油得率有显著影响, 并且液料比和浸提温度间存在交互作用($P < 0.025$)。最佳工艺条件为液料比 10:1(mL/g)、浸提温度 54℃、浸提时间 9.7min, 在该条件下, 盐藻油得率(15.79 ± 0.97)%。微波辅助提取的盐藻油中主要含有棕榈酸、油酸、亚油酸和亚麻酸, 质量分数分别为 13.85%、5.30%、8.60%、23.75%。

关键词: 盐藻; 油; 微波提取; 脂肪酸组成

Optimization of Microwave-assisted Extraction Technology for Oil from *Dunaliella salina*

SUN Xie-jun, WANG Zhen, LI Xiu-xia*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Food Safety, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: Microwave-assisted extraction technology for oil from *Dunaliella salina* was investigated. Response surface methodology was used to optimize the extraction parameters on the basis of the extraction rate of the oil. Three independent factors such as material-liquid ratio, extraction time and extraction temperature were evaluated. The optimal extraction conditions were material-liquid ratio of 1:10 (g/mL), extraction temperature of 54 °C and extraction time of 9.7 min. Under the optimal extraction conditions, the extraction rate of oil from *Dunaliella salina* was (15.79 ± 0.97)%. The major components in *Dunaliella salina* oil were palmitic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid with the contents of 13.85%, 5.30%, 8.60% and 23.75%, respectively.

Key words: *Dunaliella salina*; oil; microwave-assisted extraction; fatty acid composition

中图分类号: TS219

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0087-05

盐藻, 即盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*), 隶属绿藻门(Chlorophyta), 真绿藻纲(Chlorophyta)、团藻目(Volvocales)、盐藻科(Dunaliellaceae)^[1]。为绿色单细胞藻, 形态微小, 没有细胞壁, 可以在从接近淡水一直到饱和盐水的介质中生存、繁殖^[2]。杜氏盐藻可以在盐碱地、盐湖、黏土地、滩涂以及浅海、湖泊养殖^[3]。提取盐藻油脂, 利用其主要组分即功效成分作为食品添加剂、饲料添加剂以及作为新一代可替代石化柴油的生物柴油原料, 对盐藻的开发利用具有很好的推动作用。与回流提取、搅拌提取、索氏抽提及超声提取等提取方法相比, 微波萃取能够穿透萃取溶剂和物料使萃取体系均匀加热, 迅速升温, 微波加热产生大量的热能使细胞破裂后细胞液溢出来并扩散到溶剂中, 从而提高提

取效率^[4], 具有费时短、有机溶剂消耗少、效率高和重现性好等优点^[5-7]。目前, 微波辅助提取方法已经广泛应用于食品中油脂^[8-10]、多糖^[11-12]、多酚^[13]、皂甙^[14]等的提取上, 均取得很好的提取效果。商业盐藻粉主要成分为 40% 左右的蛋白质和 10%~20% 的油脂等, 微波辅助提取方法能有助于分离油脂和其他蛋白质等组分, 加速油脂浸出^[9], 有望起到较好的提取效果。本实验采用响应面法分析对盐藻油微波辅助提取工艺进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

盐藻粉 大连丰源达饵料有限公司。

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(20090460422)

作者简介: 孙协军(1969—), 男, 讲师, 学士, 研究方向为食品分析与检测。E-mail: sxjun1@163.com

* 通信作者: 李秀霞(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品功能因子提取分离。E-mail: lixiuxiaxxx@163.com

37种脂肪酸甲酯标准品(质量浓度30mg/mL) 美国Restek公司;三氟化乙醚溶液、丙酮、乙醚均为分析纯。

1.2 仪器与设备

2014C气相色谱仪 岛津仪器(苏州)有限公司;HGT-300E氮、氢、空气发生器 北京汇龙公司;ETHOST微波消解/浸提系统 意大利Milestone公司;RE-52A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;SHB-3循环水式多用真空泵 河南郑州长城仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 脂肪酸甲酯标准曲线的制作

以二氯甲烷为溶剂将37种脂肪酸甲酯混合标准溶液(质量浓度30mg/mL)稀释成质量浓度(以棕榈酸甲酯为例)分别为0.1938、0.3876、0.7752、1.1628、1.5504、1.9380mg/mL的标准溶液,单次进样1 μ L,以峰面积为横坐标,样品脂肪酸甲酯质量浓度为纵坐标制作标准曲线。

1.3.2 盐藻油微波提取方法优化

1.3.2.1 盐藻油提取方法

准确称取一定量盐藻粉于微波样品罐中,按实验设计加入一定量的提取溶液,设定合适的提取温度、搅拌速度100r/min和风冷时间10min,在不同的微波功率下提取一定时间,到设定风冷时间结束后,取出样品罐,将提取液减压抽滤,滤液置于已质量恒定的磨口平底烧瓶中,旋转蒸发回收溶剂,然后将盛提取物的烧瓶放入105℃烘箱干燥至质量恒定,计算盐藻油得率。盐藻油得率定义为盐藻油质量和样品质量的比值。

1.3.2.2 盐藻油提取的单因素和正交试验设计

固定液料比10:1(mL/g)、微波输出功率600W、提取温度90℃、提取时间3min、搅拌速度100r/min和风冷时间10min,精确称取2份2g盐藻粉,置于微波样品内罐中,绘制丙酮、正己烷、三氧六环和石油醚3种溶剂的微波加热曲线,从而选择出合适的提取溶剂,然后在不同的微波功率下(其他提取条件同提取溶剂选择条件),绘制选定提取溶剂的微波加热曲线,进行升温时间的选择。在确定提取溶剂和升温时间后,精确称取2g盐藻粉,固定微波功率600W、液料比10:1(mL/g)、浸提温度50℃、浸提时间10min、提取1次,进行单因素试验,主要考察浸提温度、微波功率、液料比、浸提时间和提取次数对盐藻油微波提取效果的影响,在单因素试验的基础上进行正交试验,优化盐藻油微波提取方法。

1.3.3 盐藻油主要脂肪酸组成和含量测定

采用三氟化硼甲酯化方法对微波提取所得油脂甲酯化,然后以气相色谱法检测脂肪酸组成及含量。

1.3.3.1 盐藻油脂肪酸甲酯化方法

精确称取盐藻油样品100mg于20mL具塞试管中,加入0.5mol/L氢氧化钾甲醇溶液3mL,60℃恒温水浴保持10min,冷后加入12.5%三氟化硼乙醚溶液2mL,恒温水浴煮沸2min,放冷后加入适量石油醚振荡,试管中溶液全部转移至50mL分液漏斗中,并加入适量饱和氯化钠溶液分层,取上层醚层,水浴蒸干大部分溶剂后,石油醚定容至5mL。

1.3.3.2 色谱条件

色谱柱:Rt-2560(100m \times 0.25mm,0.2 μ m);升温程序:初始温度100℃,以4℃/min升至240℃,保持35min;入口压力135.5kPa,载气氮气,总流量28.1mL/min,柱流量0.49mL/min,线速度11.9mL/min,进样量1 μ L,分流比50:1,汽化室温度225℃,检测器温度250℃。

1.4 数据处理

试验数据采用Excel、SPSS及Matlab数学软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 脂肪酸甲酯标准曲线的制作

几种主要脂肪酸甲酯的标准曲线如下:棕榈酸甲酯: $y = 0.00000418x + 0.05081743$, $R^2 = 0.9992$;油酸甲酯: $y = 0.00000555x + 0.03715490$, $R^2 = 0.9989$;亚油酸甲酯: $y = 0.00000561x + 0.01516141$, $R^2 = 0.9980$;次亚麻酸甲酯: $y = 0.00000563x + 0.01602155$, $R^2 = 0.9948$;亚麻酸甲酯: $y = 0.00000563x + 0.01602155$, $R^2 = 0.9948$;检出限分别为:棕榈酸甲酯71.55mg/L、油酸甲酯60.61mg/L、亚油酸甲酯37.80mg/L、次亚麻酸甲酯,28.50mg/L、亚麻酸甲酯49.96mg/L。

2.2 微波辅助提取试剂的选择

精确称取2份2g盐藻粉,置于微波样品内罐中,按液料比10:1(mL/g)加入相同的提取溶剂,同时放入搅拌子,将内罐置于制样外罐中,拧紧压盖,将全部样品罐放入微波提取系统中,主控罐接上温度和压力传感器,关闭微波炉门。微波输出功率设定为600W、提取温度90℃、提取时间3min、搅拌速度100r/min和风冷时间10min,开启微波提取系统。每2s记录一次温度传感器的温度,绘制时间-温度曲线。不同提取溶剂的微波升温曲线如图1所示。

由图1可知,在设定功率下,不同浸提剂对微波的吸收能力及将微波能转化为热能的能力不同。正己烷、三氧六环和石油醚吸收微波能的能力很弱,因而温度升高幅度很小,而丙酮对微波能吸收较好,并使其温度在1~2min内迅速升高。丙酮溶液升温速率最快,温度达到90℃时只需36s,平均升温速率为1.86℃/s;其

他溶剂在 3min 内均未能升到设定温度。在选择溶剂时,除考虑它对目标提取物有较强的溶解能力外,必须考虑两个参数:介电常数, ϵ' (描述分子在电场的极化率),和介电损失因子 ϵ'' (量度所吸收的微波能转换为热能的效率)。耗散因子: $\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$ 表示一种介质在一定的频率和温度下,将所吸收的微波能量转换为热能的效率,据此应选择一个具有高的 ϵ' 值和 $\tan \delta$ 值的溶剂。

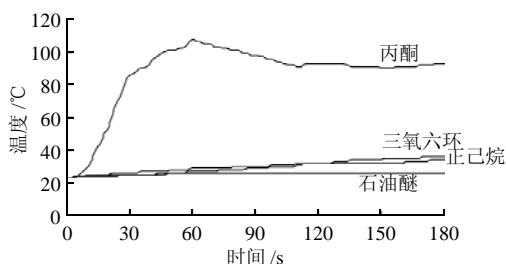


图1 不同溶剂的升温曲线

Fig.1 Temperature curves at the conditions of different solvents

在微波功率 600W、温度 60℃ 和液料比 10:1 条件下,采用以上几种溶剂微波辅助提取盐藻油,盐藻油得率分别为石油醚 12.43%、正己烷 13.89%、丙酮 14.82%、三氧六环 13.18%。丙酮的介电常数(20.7)较大^[15],再加上丙酮的黏度也比较小,有利于溶剂分子的转动,使基体内部很快就能达到设定温度,所以升温速率较快,提取效率较高,而盐藻油虽然在石油醚中溶解度很好,但由于石油醚的介电常数(1.80)过低,提取效果不佳。虽然丙酮的介电损失因子(11.5)也同样较大,但是,丙酮将吸收的微波能转化为热能的效率还是远高于其他几种溶剂,因此,选择丙酮为提取溶剂进行实验。

2.3 不同功率下的丙酮溶液微波加热曲线

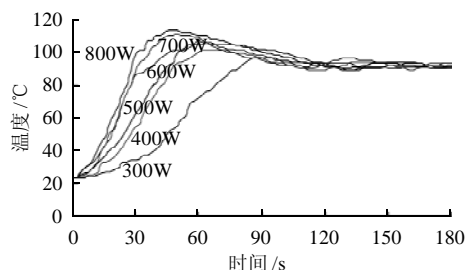


图2 丙酮的升温曲线

Fig.2 Temperature curve of acetone

按 2.2 节方法制作不同微波功率下的加热曲线,结果见图 2 所示。由图 2 可知,随微波功率的增大,丙酮升温速率加快。在 3min 时间内,丙酮溶液温度达到

90℃,微波辐射功率为 300W 时需要 80s,600W 时需要 36s,而 800W 时只需 19s,辐射时间明显缩短,微波功率在 400~800W 范围内,丙酮溶剂的温度在 60s 内均可以达到 90℃,因此设定丙酮升温时间为 60s。

2.4 微波辅助提取盐藻油单因素试验

2.4.1 浸提温度对盐藻油得率的影响

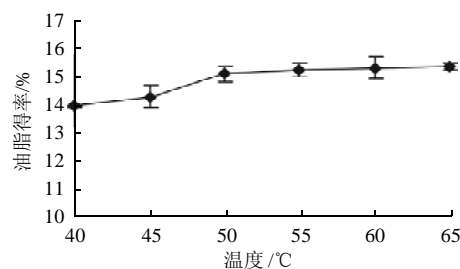


图3 浸提温度对盐藻油脂得率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on oil yield of *D. salina*

由图 3 可知,盐藻油得率随浸提温度的提高而增加,50~65℃范围内的盐藻油得率显著高于 40~45℃范围内的盐藻油得率($P < 0.05$)。本实验采用密闭萃取罐,可以在较高的压力和温度下完成萃取过程,其内部压力升高的同时,溶剂的沸点比常压下提高了很多^[16],但是当温度大于 50℃以后,盐藻油得率增速较慢,主要原因可能是本实验中浸提罐虽然处于高压状态,但丙酮作为溶剂升温速度较快,沸点升高幅度较小,超过 50℃的浸提温度接近丙酮沸点,溶剂挥发导致一部分盐藻粉不能与溶剂充分接触,因此,选择浸提温度 50℃进行响应面试验。

2.4.2 微波功率对盐藻油得率的影响

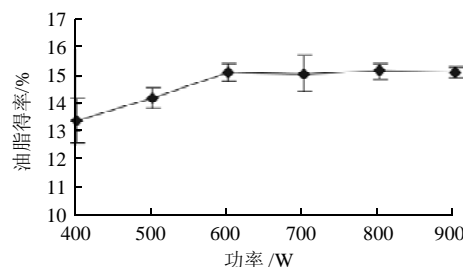


图4 微波功率对盐藻油脂得率的影响

Fig.4 Effect of microwave power on oil yield of *D. salina*

由图 4 可知,盐藻油得率随微波功率的提高而增加,600W 以上微波功率的盐藻油得率显著高于 400~500W 时($P < 0.05$),而微波功率在 600~900W 之间,盐

藻油得率没有显著差异($P < 0.05$), 因此, 选择微波功率 600W 进行响应面试验。

2.4.3 浸提时间对盐藻油得率的影响

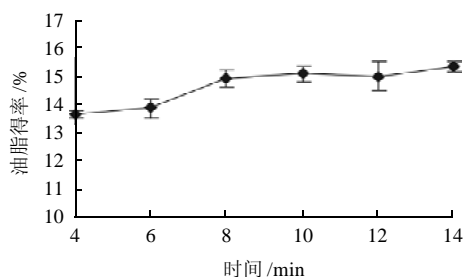


图5 浸提时间对盐藻油脂得率的影响

Fig.5 Effect of extraction time on oil yield of *D. salina*

由图5可知, 盐藻油得率随时间的延长而增加, 4~6min 范围内, 油脂的微波辅助提取效率显著低于提取时间为 8min 以上时($P < 0.05$), 而浸提 8min 以后, 盐藻油得率增加缓慢, 因此取浸提时间 8min 进行响应面试验。

2.4.4 液料比对盐藻油得率的影响

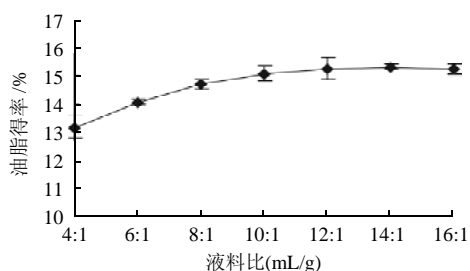


图6 液料比对盐藻油脂得率的影响

Fig.6 Effect of material-liquid ratio on oil yield of *D. salina*

由图6可知, 盐藻油得率均随液料比的增加而增大, 在液料比达到 10:1 后, 盐藻油得率的增加幅度变缓, 取液料比 10:1 进行响应面试验。

2.4.5 提取次数对盐藻油得率的影响

提取 1、2、3 次得盐藻油得率分别为 15.14%、15.30%、15.31%, 之间没有显著差异($P < 0.05$), 考虑到多次提取工序复杂、成本较高, 因此, 固定提取次数为 1 次。

2.5 微波提取盐藻油脂响应面试验

2.5.1 响应面试验设计及结果分析

通过单因素试验, 发现微波功率和提取次数对盐藻油得率影响不大, 因此固定功率为 600W, 提取次数确定为 1 次, 选取液料比(X_1)、浸提温度(X_2)、浸提时间(X_3)进行三因素三水平的二次通用旋转组合试验, 响应面试验设计及结果分析见表 1。

表1 微波提取盐藻油脂响应面试验结果及分析

Table 1 Results of orthogonal tests

试验号	X_1 液料比 (mL/g)	X_2 浸提 温度 / $^{\circ}\text{C}$	X_3 浸提时 间 /min	盐藻油 得率/%
1	1 (12:1)	1 (60)	1 (9)	15.94
2	1	1	-1 (7)	15.75
3	1	-1 (40)	1	15.74
4	1	-1	-1	15.36
5	-1 (8:1)	1	1	15.83
6	-1	1	-1	15.65
7	-1	-1	1	15.30
8	-1	-1	-1	14.57
9	1.682 (13.3:1)	0 (50)	0 (8)	15.40
10	-1.682 (6.7:1)	0	0	15.01
11	0 (10:1)	1.682 (66.8)	0	15.20
12	0	-1.682 (33.2)	0	14.98
13	0	0	1.682 (9.7)	15.78
14	0	0	-1.682 (6.3)	15.13
15	0	0	0	15.86
16	0	0	0	15.28
17	0	0	0	15.68
18	0	0	0	16.08
19	0	0	0	15.38
20	0	0	0	15.94

用 Excel 对表 1 结果进行回归分析, 得到盐藻油得率的回归方程:

$$Y = 15.69 + 0.15X_1 + 0.19X_2 + 0.19X_3 - 0.13X_1X_2 - 0.04X_1X_3 - 0.09X_2X_3 - 0.11X_1^2 - 0.15X_2^2 - 0.02X_3^2$$

回归方程做显著性检验与方差分析, 结果见表 2。以丙酮作为溶剂微波提取盐藻油脂的回归方程检验结果如下: 失拟的 F 值为 $0.65 < F_{0.1(5,5)} = 3.45$, 表明回归方程在 0.1 水平下不失拟, 说明本实验无其他因素的显著影响, 模型拟合合适; 模型的 F 值为 $3.04 > F_{0.05(9,10)} = 3.02$, 表明回归方程显著, 满足二次回归的条件, 获得的方程有效; 回归方程的复相关指数 $R^2 = 94.04\%$, 说明回归方程适合用于丙酮作为溶剂微波辅助提取盐藻油脂的理论预测。

对回归方程一次项和二次项系数的 t 检验结果见表 3, 由表 3 可知, 提取模型中除 X_1X_3 、 X_2X_3 和 X_3^2 项不显著外, 其他各项都有不同程度的显著性, 剔除不显著项后的回归方程如下:

$$Y = 15.69 + 0.15X_1 + 0.19X_2 + 0.19X_3 - 0.13X_1X_2 - 0.11X_1^2 - 0.15X_2^2$$

各因素对盐藻油得率影响的主次顺序为浸提时间 > 浸提温度 > 液料比。

表2 回归方程方差分析

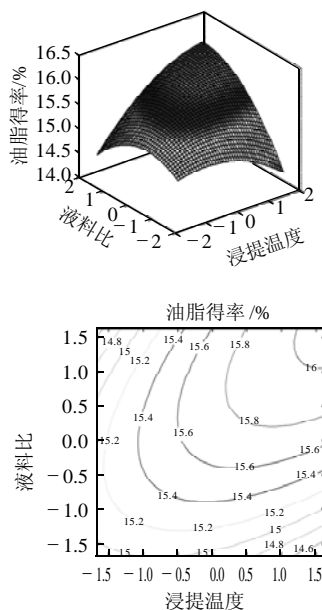
Table 2 Analysis for mean square deviations of regression equation

来源	平方和	自由度	均方差	F 值
模型	2.77	9	0.31	3.04
剩余	0.18	10	0.02	
误差	0.51	5	0.1	
失拟	0.33	5	0.07	0.65

表3 回归系数的 t 检验结果Table 3 t -Test results of regression coefficients

	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	X_1^2	X_2^2	X_3^2
t 值	4.28	5.25	5.25	2.72	0.91	1.97	3.2	4.37	0.66
显著水平	0.005	0.005	0.005	0.025			0.005	0.005	

2.5.2 交互作用分析



固定水平: 浸提时间 8min, 微波功率 600W, 提取 1 次。

图7 液料比与浸提温度交互作用对盐藻油得率的影响

Fig.7 Effect of cross-interaction between extraction temperature and material-liquid ratio on oil yield of *D. salina*

由图7可知, 液料比和浸提温度间存在交互作用, 液料比和浸提温度对得率均有较大影响, 随着浸提温度或液料比的增加, 盐藻油得率都呈逐渐升高再降低的趋势, 说明盐藻油微波辅助提取需要适合的浸提温度和液料比。

2.5.3 提取工艺参数的优化和验证实验

采用约束复合形法对提取工艺参数进行优化, 得到优化结果为液料比 10:1(mL/g)、浸提温度 54℃、浸提时间 9.7min。在该条件下, 模型预测的单位盐藻粉微波辅助提取后盐藻油得率为 15.97%, 对优化条件进行验证实验, 重复 3 次, 得盐藻油得率为 $(15.79 \pm 0.97)\%$, 相对误差的绝对值为 1.63%, 所得模型适合预测微波辅助提取条件下盐藻油得率。

2.6 盐藻油主要脂肪酸组成和含量

采用三氟化硼甲酯化方法对微波提取所得油脂甲酯化, 然后以气相色谱法检测脂肪酸组成及含量, 微波辅助提取盐藻油主要脂肪酸组成和含量为棕榈酸 $(13.85 \pm 0.23)\%$ 、油酸 $(5.30 \pm 0.12)\%$ 、亚油酸 $(8.60 \pm 0.13)\%$ 、

亚麻酸 $(23.75 \pm 0.19)\%$ 。

3 结 论

对微波辅助提取盐藻油工艺进行优化, 以丙酮为提取溶剂, 以盐藻油得率为响应值, 建立微波辅助提取盐藻油脂的数学模型: $Y = 15.69 + 0.15X_1 + 0.19X_2 + 0.19X_3 - 0.13X_1X_2 - 0.11X_1^2 - 0.15X_2^2$ 。各因素对盐藻油得率影响的主次顺序为浸提时间>浸提温度>液料比。采用约束复合形法对提取工艺参数进行优化, 得到优化结果为液料比 10:1(mL/g)、浸提温度 54℃、浸提时间 9.7min, 在该条件下, 模型预测的单位盐藻粉微波辅助提取后盐藻油得率为 15.97%, 对优化的条件进行验证实验, 盐藻油得率实测值为 $(15.79 \pm 0.97)\%$, 相对误差的绝对值为 1.63%, 说明回归方程的预测精度较高, 优化结果可信。微波辅助提取的盐藻油中主要含有棕榈酸 $(13.85 \pm 0.23)\%$ 、油酸 $(5.30 \pm 0.12)\%$ 、亚油酸 $(8.60 \pm 0.13)\%$ 、亚麻酸 $(23.75 \pm 0.19)\%$ 。

参考文献:

- [1] ETTL H. Taxonomische Bemerkungen zuden phytononadina[J]. Nova Hedvigia, 1983, 35(3): 731-736.
- [2] 王铭, 刘然, 徐宁, 等. 13 种微藻的脂肪酸组成分析[J]. 生态科学, 2006, 25(6): 542-544.
- [3] 梁秀芝, 刘成君, 彭峰, 等. 六种盐藻的营养成分[J]. 食品科技, 2007, 32(1): 206-209.
- [4] GOLMAKANI M T, REZAEI K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L[J]. Food Chemistry, 2008, 109(4): 925-930.
- [5] PAN Xuejun, NIU Guoguang, LIU Huizhou. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves[J]. Chemical Engineering and Processing, 2003, 42(2): 129-133.
- [6] YEOH S, SHI J, LANGRISH T A G. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels[J]. Desalination, 2008, 218(1/3): 229-237.
- [7] VIRGINIE P, JEAN-RENÉ C, FIRAS F. Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 59-67.
- [8] 易军鹏, 朱文学, 马海乐, 等. 响应面法优化微波提取牡丹籽油的工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 99-104.
- [9] 贾晓艳, 张清安, 张霞, 等. 响应面法优化微波辅助提取扁杏仁油工艺及成分分析[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(3): 60-63.
- [10] 张佰清, 李龙杰, 张艳艳. 响应面法优化微波辅助提取树莓籽油工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 92-96.
- [11] WANG S J, CHEN F, WU J H, et al. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(2): 693-700.
- [12] 冯颖, 陈巧红, 孟宪军, 等. 响应面法优化无梗五加果多糖超声波、微波法提取工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 268-272.
- [13] SONG J F, LI D J, LIU C Q, et al. Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(3): 282-287.
- [14] CHEN Yi, XIE Mingyong, GONG Xiaofeng. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 81(1): 162-170.
- [15] 李核, 李攻科, 张展霞. 影响微波辅助萃取虎杖中白藜芦醇产率的一些重要操作参数[J]. 分析化学, 2003, 31(11): 1341-1344.
- [16] 卢彦芳, 张福成, 安静, 等. 微波辅助萃取应用研究进展[J]. 分析科学学报, 2011, 27(2): 246-252.