

三种微藻油脂肪酸组成和理化性质分析

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 3 种海水微藻油含量、脂肪酸组成和油脂的理化性质进行分析。结果表明: 盐藻油、螺旋藻油和小球藻油含量分别为 17.69%、6.36% 和 11.64%, 棕榈酸、油酸、亚油酸和亚麻酸是杜氏盐藻油和小球藻油的主要脂肪酸组分, 而螺旋藻油主要含有棕榈酸、亚油酸和 γ -亚麻酸; 盐藻、螺旋藻和小球藻油均具有较高的 C/H 值, 3 种盐藻油的 C/H 值分别为 7.35、7.32 和 7.58; 3 种微藻油酸值分别为盐藻油 12.64mg KOH/g、螺旋藻油 17.65mg KOH/g 和小球藻油 9.8mg KOH/g; 热值分别为盐藻油 36.07MJ/kg、螺旋藻油 37.01MJ/kg 和小球藻油 35.00MJ/kg; 3 种微藻油酸值和黏度均较高, 流动性较差。

关键词: 盐藻; 螺旋藻; 小球藻; 脂肪酸组成; 理化性质

Fatty Acid Composition and Physical and Chemical Properties of Microalga Oils from Three Species

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

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

Abstract: Three species of microalga were analyzed for oil content, fatty acid composition and physiochemical properties. The results showed that the oil contents of *D. salina*, *Spirulina* and *Chlorella* were 17.69%, 6.36% and 11.64%, respectively. Palmitic acid, oleic acid, linoleic acid and linolenic acid were the major fatty acids in *D. salina* oil and *Chlorella* oil, while the major components of *Spirulina* oil were palmitic acid, linoleic acid and sub-linolenic acid. The oils from *D. salina*, *Spirulina* and *Chlorella* had high C/H levels, which were 7.35, 7.32 and 7.58, respectively. The acid value was 12.64 mg KOH/g for *D. salina* oil, 17.65 mg KOH/g for *Spirulina* oil and 9.8 mg KOH/g for *Chlorella* oil, respectively. The heating values were 36.07, 37.01 MJ/kg and 35.00 MJ/kg, respectively. The three microalga oils revealed high acid value and viscosity and poor fluidity.

Key words: *D. salina*; *Spirulina*; *Chlorella*; fatty acid composition; physical and chemical properties

中图分类号: TS219

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)16-0212-04

微藻(microalgae)为单细胞、群体或丝状藻类, 有 2 万多种, 广泛的分布于我国沿海和内地水域。相对于高等植物, 它们能更有效地利用太阳能, 将水和 CO₂ 等无机物质合成为有机物质^[1]。海水微藻具有不消耗淡水、倍增周期短、单位面积产量大等优点, 并且可以在盐碱地、黏土地、滩涂以及浅海、湖泊养殖^[2]。许多微藻能够把光合作用的产物转化成油滴在细胞内贮藏起来, 微藻的脂肪含量远高于大型藻类^[3]。

目前, 国内外对小球藻(*Chlorellasp*)^[4]、等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)^[5-6]、牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)^[5-6]、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)^[5-7]、螺旋藻(*Spirulina*)^[8]、杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)^[5-6]等微藻进

行了大量的研究, 不同微藻的油脂含量和脂肪酸组成上存在很大的差别^[9], 而有关微藻油理化性质方面的研究报道非常少, 本实验以盐藻、螺旋藻和小球藻这 3 种海水微藻为实验材料, 对其主要组分、油脂的脂肪酸组成和理化性质进行研究, 以期微藻生物柴油的开发利用提供原料油的理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

盐藻粉 大连丰源达饵料有限公司; 螺旋藻粉和小球藻粉 陕西森弗生物技术有限公司; Rt-2560 色谱柱 (100m × 0.25mm, 0.2 μm) 美国 Restek 公司。

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目(20090460422)

作者简介: 孙协军(1969—), 男, 讲师, 学士, 主要从事食品分析与检测研究。E-mail: sxjun1@163.com

* 通信作者: 李秀霞(1973—), 女, 副教授, 博士, 主要从事食品功能因子提取分离研究。E-mail: lixiuxiaxxx@163.com

47% 三氟化硼乙醚 国药集团化学试剂有限公司；37 种脂肪酸甲酯混合标准品(30mg/mL) 美国 Restek 公司；石油醚、甲醇、氢氧化钾、正己烷、氯化钠均为分析纯。

GC-2014C 气相色谱仪 日本岛津有限公司；HGT-300E 氮、氢、空气发生器 北京汇龙公司；ZDJ-4A 自动电位滴定仪 上海雷磁精科仪器厂；PHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司；XS105 电子天平(感量 0.01mg) 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司；KQ-500DV 型数控超声波清洗器 昆山超声仪器有限公司；品式黏度计 浙江椒江玻璃仪器厂；SHB-3 循环水式多用真空泵 河南郑州长城仪器厂；RE-52A 型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂；TU-1800SPC 紫外-可见光光度计 北京普析通用仪器公司；6300 全自动氧弹式量热仪 美国 Parr 公司；Vario macro CHNS 元素分析仪 德国 Elementar 元素分析系统公司。

1.2 方法

1.2.1 微藻主要成分测定

水分：称量法，参照 GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》；灰分：参照 GB 5009.4—2010《食品中灰分的测定》；蛋白质：凯氏定氮法，参照 GB/T 5009.5—2003《食品中蛋白质的测定》；脂肪：索氏抽提法，参照 GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》；可溶性糖：苯酚-硫酸法^[10]。

1.2.2 微藻油脂提取

参考万新祥等^[11]和 Lee 等^[12]的微藻油提取方法。向微藻粉中加入适量乙酸乙酯，浸泡一段时间，然后 50℃ 条件下超声波提取一定时间后，减压抽滤，滤渣重复提取多次至滤液呈浅黄或浅绿色，合并滤液并于 40℃ 减压蒸干大部分溶剂，收集于烧杯中，60℃ 烘箱烘至液面无气泡，得到微藻油脂，冰箱冻存备用。

1.2.3 微藻油脂理化性质分析

水分含量测定：参照 GB/T 5528—2008《动植物油脂水分及挥发物含量测定》；运动黏度测定：参照 GB/T 265—1988《石油产品运动粘度测定法和动力粘度计算法》；酸值测定：参照 GB/T 5530—2005《动植物油脂酸值和酸度测定》；皂化值测定：参照 GB/T 5534—2008《动植物油脂皂化值的测定》；过氧化值测定：参照 GB/T 5538—2005《动植物油脂过氧化值测定》；热值和元素分析：使用全自动氧弹式量热仪、Vario macro CHNS 元素分析仪相应测定方法进行。

1.2.4 微藻油脂脂肪酸组成分析

1.2.4.1 色谱条件

色谱柱：Rt-2560；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 1μL，分流比 50:1，汽化室温度 225℃，检测器温度 250℃。

1.2.4.2 样品处理

精确称取微藻油脂样品 100mg 于 20mL 具塞试管中，加入 1mL 0.5mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 3mL，60℃ 恒温水浴保持 10min；冷后加入 1mL 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。

1.2.4.3 定量

采用外标法定量。将 37 种脂肪酸甲酯标准品稀释至适当倍数后，精确进样 1μL，采用色谱工作站处理得到的数据，以各脂肪酸甲酯峰面积(x)为横坐标，相应的质量浓度(y)为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.5 数据处理

所得数据采用 Excel 和 SPSS 数学软件进行数理统计和方差分析。微藻油脂脂肪酸含量按下式计算：

$$Y = \frac{xv}{m}$$

式中：Y 为脂肪酸含量/%；x 为相应的脂肪酸甲酯质量浓度/(mg/mL)；v 为定容体积/mL；m 为样品质量/mg。

2 结果与分析

2.1 微藻主要组分及分析

表 1 几种微藻的主要组成成分及含量(n=3)
Table 1 Major chemical components and contents of three microalgae species (n=3) %

微藻种类	蛋白质含量	可溶性糖含量	水分含量	灰分含量	脂肪含量
盐藻	30.52 ± 2.56	7.89 ± 2.34	7.38 ± 0.25	14.24 ± 0.34	17.69 ± 1.65
螺旋藻	52.87 ± 2.33	13.68 ± 2.14	6.25 ± 0.38	6.35 ± 0.18	6.36 ± 0.98
小球藻	36.08 ± 1.85	19.42 ± 2.87	6.36 ± 0.35	6.12 ± 0.21	11.64 ± 2.55

由表 1 可知，盐藻、螺旋藻及小球藻的主要组成成分为蛋白质、脂类、可溶性糖及灰分。其中，脂肪含量最高的为盐藻(17.69%)，其次为小球藻(11.64%)，最低的为螺旋藻，油脂含量只有 6.36%。实验选用的几种微藻粉中均有较高含量的灰分，这与海水微藻富含矿物质的特性有关。本实验中所选用的 3 种微藻蛋白质含量均明显低于已有报道^[13-15]，这可能与藻株差异及生长环境不同有关。本实验中，3 种微藻的 5 种测定成分含量占总量的比例均在 75%~90% 之间，除上述已测成分外，盐藻、螺旋藻和小球藻中均含有不同质量分数的叶绿素、纤维素等未测成分^[13-15]。

2.2 微藻原料油元素组成及分析

采用超声波提取的方法制备3种微藻油脂,并使用元素分析仪对3种微藻原料油的元素组成情况进行分析,所得结果为两个平行样的平均值(表2)。

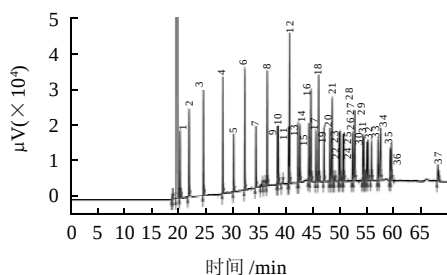
表2 几种微藻油的元素组成

微藻种类	C 含量/%	H 含量/%	C/H	N 含量/%	S 含量/%
盐藻	75.42	10.26	7.35	1.19	0.25
螺旋藻	76.12	10.4	7.32	1.9	0.24
小球藻	74.7	9.86	7.58	2.73	0.26

由表2可知,3种微藻油均含有较高的碳氢元素,其中碳氢元素总和均达到80%以上,C/H均高于0#柴油。另外几种微藻油中也含有少量的氮和硫成分,说明在油脂提取过程中,少量的蛋白质等组分一同提取了出来,微藻油中含有较高的硫元素,需要经过预处理才能作为生物柴油原料油使用。

2.3 微藻油脂脂肪酸组成分析

采用外标法对几种微藻油脂中主要脂肪酸进行定性和定量分析,37种脂肪酸甲酯的气相色谱图(gas chromatography, GC)见图1。从图1可知,在70min内,37种脂肪酸甲酯都已出峰并基本分离。从表3可以看出,几种脂肪酸甲酯线性关系良好,适合于3种微藻中相关脂肪酸的定量分析。



1. C_{4:0}; 2. C_{6:0}; 3. C_{8:0}; 4. C_{10:0}; 5. C_{11:0}; 6. C_{12:0}; 7. C_{13:0}; 8. C_{14:0}; 9. C_{14:1}; 10. C_{15:0}; 11. C_{15:1}; 12. C_{16:0}; 13. C_{16:1}; 14. C_{17:0}; 15. C_{17:1}; 16. C_{18:0}; 17. C_{18:1}(E-9); 18. C_{18:1}(Z-9); 19. C_{18:2}(E-9,12); 20. C_{18:2}(Z-9,12); 21. C_{20:0}; 22. C_{18:3}(Z-6,9,12); 23. C_{20:1}(Z-11); 24. C_{18:3}(Z-9,12,15); 25. C_{21:0}; 26. C_{20:2}(Z-11,14); 27. C_{22:0}; 28. C_{20:3}(Z-8,11,14); 29. C_{22:1}(Z-13); 30. C_{20:3}(Z-11,14,17); 31. C_{20:4}(Z-5,8,7,14); 32. C_{23:0}; 33. C_{22:2}(Z-13,16); 34. C_{24:0}; 35. C_{20:5}(EPA); 36. C_{24:1}(Z-15); 37. C_{22:6}(DHA)。

图1 脂肪酸甲酯标准品的色谱图

Fig.1 Chromatogram of fatty acid methyl ester mixed standards

表3 主要脂肪酸甲酯线性关系实验结果

Table 3 Linear regression equations, linear ranges and detection limits of major fatty acid methyl esters

脂肪酸甲酯名称	线性范围 / (mg/mL)	回归方程	相关系数(r)	检出限 / (mg/L)
棕榈酸甲酯(C _{16:0})	0.1938~1.938	$y = 0.4179x + 0.0508$	0.9996	71.55
棕榈油酸甲酯(C _{16:1})	0.0633~0.633	$y = 0.5601x + 0.0147$	0.9996	77.57
硬脂酸甲酯(C _{18:0})	0.1305~1.305	$y = 0.5502x + 0.0347$	0.9995	55.34
油酸甲酯(C _{18:1})	0.1323~1.323	$y = 0.5554x + 0.0372$	0.9994	60.61
亚油酸甲酯(C _{18:2})	0.0633~0.633	$y = 0.5606x + 0.0152$	0.9990	37.80
γ -亚麻酸甲酯(C _{18:3} , Z-6,9,12)	0.0618~0.618	$y = 0.5631x + 0.016$	0.9974	28.05
亚麻酸甲酯(C _{18:3} , Z-9,12,15)	0.0717~0.717	$y = 0.5989x + 0.0206$	0.9992	49.96

根据标准品出峰及参考前人研究^[3,5-6]结果,对3种微藻的脂肪酸组成进行定量分析,结果见表4。可以看出,3种微藻主要的脂肪酸组分均为C₁₆~C₁₈之间的饱和及不饱和脂肪酸组成。盐藻和小球藻油脂主要由棕榈酸、油酸、亚油酸和亚麻酸等脂肪酸组成,这与蒋霞敏等^[3]的研究结果相一致,小球藻和盐藻中以C_{16:0}和C_{18:3(n-3)}为主要的脂肪酸,而二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic, DHA)含量极少,螺旋藻油脂主要由棕榈酸、亚油酸和 γ -亚麻酸组成,螺旋藻中并不含有EPA和DHA^[7],与蔡心尧等^[16]结果一致,与孙博等^[8]的结果不一致,这可能是与藻株生长环境不同有关^[7]。

2.4 微藻油理化性质分析

从外观上看,3种微藻油脂室温下均呈半固体状态,流动性较差,加热溶解后颜色较深、透明度较差。理化性质分析结果(表5)表明,几种微藻油脂都为酸性油,酸值均大于可作为碱催化酯交换反应制备生物柴油的1mg KOH/g,不能直接经碱催化进行酯交换反应^[17-18];几种微藻油均含有一定的水分,如果作为生物柴油原料油使用,必需经过干燥处理;3种微藻油过氧化值较低,黏度很高,颜色呈黑棕色,溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,有机溶剂稀释后呈绿或红色,说明乙酸乙酯提取的微藻油中含有较多叶绿素或类胡萝卜素等水溶或醇溶组分,必需经脱色、降黏处理后才可作为生物柴油原料油使用。

表4 几种微藻油的脂肪酸组成

Table 4 Major fatty acid composition of microalga oils from three species

微藻种类	棕榈酸	棕榈油酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	γ -亚麻酸	亚麻酸
盐藻油	13.80 ± 0.26	1.06 ± 0.06	0.28 ± 0.03	5.20 ± 0.15	8.55 ± 0.16	0.01 ± 0.00	23.15 ± 0.93
螺旋藻油	12.77 ± 0.04	1.65 ± 0.03	1.49 ± 0.07	1.18 ± 0.01	7.16 ± 0.18	9.75 ± 0.31	0.09 ± 0.00
小球藻油	10.81 ± 0.40	0.15 ± 0.01	0.96 ± 0.06	7.36 ± 0.06	8.38 ± 0.17	0.14 ± 0.01	11.55 ± 0.28

表5 几种微藻油的理化性质分析

Table 5 Physical and chemical property analysis of microalga oils from three species

微藻油种类	水分含量/%	酸值/(mg KOH/g)	POV 值/(mmol/kg)	皂化值/(mg KOH/g)	平均相对分子质量	热值/(MJ/kg)	运动黏度/(mm ² /s)
盐藻油	0.43 ± 0.06	12.64 ± 0.43	6.25 ± 0.24	188.01	959.74	36.07	82.40
螺旋藻油	0.49 ± 0.05	17.65 ± 0.54	7.78 ± 0.32	200.99	917.97	37.01	88.13
小球藻油	0.35 ± 0.03	9.8 ± 0.37	5.32 ± 0.21	191.67	925.39	35.00	82.37

注：平均相对分子质量计算式为 $56.1 \times 1000 \times 3/(\text{皂化值} - \text{酸值})$ ；运动黏度的测定温度为 40℃。

3 结 论

在对 3 种微藻主要成分含量分析的基础上，用超声波辅助的方法提取微藻油，并对微藻油的元素组成、理化性质和脂肪酸组成进行分析，得到如下结论：盐藻、螺旋藻和小球藻油脂含量分别为 17.69%、6.36% 和 11.64%，棕榈酸、油酸、亚油酸和亚麻酸是杜氏盐藻油和小球藻油的主要脂肪酸组分，而螺旋藻油主要含有棕榈酸、亚油酸和 γ -亚麻酸；盐藻、螺旋藻和小球藻油脂均具有较高的 C/H，3 种盐藻油的 C/H 分别为 7.35、7.32 和 7.58，均高于 0# 柴油；3 种微藻油酸值均较高，分别为盐藻油 12.64mg KOH/g、螺旋藻油 17.65mg KOH/g、小球藻油 9.8mg KOH/g；热值分别为盐藻油 36.07MJ/kg、螺旋藻油 37.01MJ/kg 和小球藻油 35.00MJ/kg；3 种微藻油的 40℃ 运动黏度均超过 80mm²/s，流动性较差。

参考文献：

- [1] 王长海. 海洋生化工程概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 9-10.
- [2] 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.
- [3] 蒋霞敏, 郑亦周. 14 种微藻总脂含量和脂肪酸组成研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 243-247.
- [4] XU Han, MIAO Xiaoling, WU Qingyu. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters[J]. J Biotechnol, 2006, 126(4): 499-507.
- [5] 王明清, 迟晓元, 秦松, 等. 海洋微藻总脂含量和脂肪酸组成的测定[J]. 中国油脂, 2008, 33(11): 67-70.
- [6] MATA T M, ANTÓNIO A M, NIDIA S C. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review[J]. Renew Sustain Energy Rev, 2010, 14(1): 217-232.
- [7] LILIANA R, GRAZIELLA C Z, NICCOLÓ B, 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.
- [8] 孙博, 侯冬岩, 回瑞华. 螺旋藻中脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. 鞍山师范学院学报, 2010, 12(4): 36-38.
- [9] 郑洪立, 张齐, 马小琛, 等. 产生物柴油微藻培养研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(3): 110-116.
- [10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004.
- [11] 万新祥, 张立藏, 吉甫. 三角褐指藻中多烯脂肪酸的初步研究[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 19(2): 76-78.
- [12] LEE J Y, YOO C, JUN S Y, et al. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(Suppl 1): 75-77.
- [13] 李师翁, 李虎. 小球藻干粉的营养学与毒理学研究[J]. 食品科学, 1997, 18(7): 48-51.
- [14] 董育红, 封涛, 张振兰, 等. 螺旋藻的营养成分分析[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(3): 70-71.
- [15] 李淑清, 索全伶, 杨伟. 吉兰泰杜氏盐藻中营养成分的分析[J]. 内蒙古工业大学学报, 2000, 19(1): 22-24.
- [16] 蔡心尧, 尹建军. 海藻中多不饱和脂肪酸的测定方法[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(5): 60-64.
- [17] CHISTI Y. Biodiesel from microalgae[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(3): 294-306.
- [18] PEER M S, SKYE R T, EVAN S, et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production[J]. Bioenerg Res, 2008, 1(1): 20-43.