

响应面法优化拟微绿球藻藻油脱色工艺

袁 芝, 朱孝晨, 孙利芹*

(烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘 要: 以海洋微藻拟微绿球藻中提取的富含二十碳五烯酸的粗藻油为原料, 探究脱色材料及脱色工艺对粗藻油脱色效果的影响。在单因素试验结果的基础上, 以脱色剂用量、脱色温度、脱色时间为影响因素, 以藻油脱色率和藻油回收率为响应值, 应用Box-Behnken试验设计建立数学模型, 进行响应面分析, 优化脱色工艺条件。结果表明, 活性炭对拟微绿球藻藻油的脱色效果最好, 响应面优化的最佳脱色工艺条件为: 活性炭用量3.8 g/100 mL、脱色温度68 ℃、脱色时间54 min。在此条件下, 微藻藻油的脱色率达到98.05%, 经3次解吸后, 藻油总回收率达到81.45%。

关键词: 拟微绿球藻; 藻油; 脱色工艺; 响应面试验; 优化

Optimization of Decolorization of *Nannochloropsis oceanica* Oil by Response Surface Methodology

YUAN Zhi, ZHU Xiaochen, SUN Liqin*

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The optimization of the decolorization of crude oil extracted from *Nannochloropsis oceanica*, rich in eicosapentaenoic acid (EPA), was carried out using one-factor-at-a-time method and response surface methodology. Using a Box-Behnken design, a mathematical model was established indicating the effects of decolorizing agent dose, temperature and time on decolorization efficiency and oil recovery, respectively. The results showed that activated carbon exhibited the best decolorization efficiency. A decolorizing agent dose of 3.8 g/100 mL, a temperature of 68 ℃ and a decolorization time of 54 min were found to be the optimal conditions to obtain a higher decolorization efficiency of 98.05% and a higher oil recovery of 81.45% after three desorption cycles.

Key words: *Nannochloropsis oceanica*; microalgae oil; decolorization process; response surface methodology; optimization

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201724029

中图分类号: TS224.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 24-0183-06

引文格式:

袁芝, 朱孝晨, 孙利芹. 响应面法优化拟微绿球藻藻油脱色工艺[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 183-188. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201724029. <http://www.spkx.net.cn>

YUAN Zhi, ZHU Xiaochen, SUN Liqin. Optimization of decolorization of *Nannochloropsis oceanica* oil by response surface methodology[J]. Food Science, 2017, 38(24): 183-188. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201724029. <http://www.spkx.net.cn>

二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)属于 ω -3系列多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 是人体自身不能合成但又不可缺少的重要营养物质, EPA可降低胆固醇和甘油三酯的含量, 促进体内饱和脂肪酸代谢等作用^[1-3]。随着人们日常饮食中的胆固醇、油脂摄入量大幅上升, 心血管疾病等“富贵病”正成为主要健康问题之一。提高EPA的吸收已经证实对

治疗冠状动脉心脏病、高血压和炎症(例如风湿性关节炎)有效^[3-4]。因此, 开发研究EPA产品具有广阔的应用前景和巨大的经济价值。目前市场上的EPA产品多是来源于深海鱼油, 存在胆固醇含量较高、通常带有较重的腥味影响口感等不足。海洋微藻是EPA等PUFAs的最初生产者^[5], 与鱼油相比, 微藻中的脂肪酸组成更为稳定且不含胆固醇和无鱼腥味, 且微藻的培养繁殖简单, 生长

收稿日期: 2017-02-27

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系建设专项(SDAIT-26-03);

山东省2016年度农业重大应用技术创新项目(鲁财农指[2016]36号)

作者简介: 袁芝(1993—), 女, 硕士, 研究方向为藻类食品研究与开发。E-mail: yuanzhiciel@163.com

*通信作者: 孙利芹(1973—), 女, 教授, 博士, 研究方向为藻类资源开发及利用。E-mail: sliqin2005@ytu.edu.cn

周期短,不受时间、地域等影响,可通过控制培养条件提高不饱和脂肪酸含量^[6-8],因此微藻作为EPA等PUFAs的又一来源具有很大的发展潜力。

拟微绿球藻(*Nannochloropsis oceanica*),属于真眼点藻纲(Eustigmatophyceae)^[9],是一种分布广泛的海水藻类,富含不饱和脂肪酸及各种营养物质,其中EPA含量可高达总脂肪酸的30%左右,被认为最有潜力的EPA研究藻种^[10]。目前关于从拟微绿球藻中提取精制EPA的报道尚不多见,多集中在提取工艺的研究^[11-13]。而从微藻中提取的富含EPA的粗藻油中含有较多的杂质和色素,通常呈黑褐色,不仅影响EPA产品的外观,而且在一定程度上降低了EPA产品的质量等级,需要对产品进行精制,其中粗藻油脱色是精制工艺的重要环节,要想达到高级食用油脂标准,必须进行脱色处理。油脂的精制脱色工艺方法大多为物理吸附脱色和化学脱色。常用的物理吸附脱色剂有活性炭^[14]、活性白土^[15]、凹凸棒土^[16]等,主要应用于食用油、鱼油及生物柴油的脱色^[17-19]。目前,对于含有较多的杂质和色素的微藻油脂脱色的研究鲜有报道^[20]。本实验通过对脱色剂的种类与用量、脱色温度、脱色时间等因素进行探究,并采用响应面分析法优化脱色工艺条件,寻找适合拟微绿球藻藻油的最佳脱色工艺,旨在为微藻藻油EPA产品的进一步开发及工业化生产提供一定参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海水拟微绿球藻冻干粉由烟台海融微藻养殖有限公司提供。实验用的藻油为本实验室采用溶剂浸提法获得的粗藻油,料液比为1:10(g/mL)。活性炭(粉末状)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

UV/V-1200紫外分光光度计 上海翱艺仪器有限公司; RE-52A旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; DZF-6050真空干燥箱 上海一恒科技有限公司; GCMS-QP2010气相色谱-质谱联用仪 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 藻油提取工艺^[21]

常温、常压下,采用溶剂浸提法,提取剂为V(石油醚):V(丙酮):V(乙醇)=2:1:0.5,按照料液比1:10(g/mL)在5 L的密封浸提桶中浸提2~3次,合并浸提液,旋转蒸发去除有机试剂得粗藻油。将藻油与提取剂按1:10(g/mL)的比例混合,备用。

1.3.2 藻油脱色工艺

拟微绿球藻→有机溶剂浸提→藻油粗样品→加入脱色剂→加热搅拌→抽滤分离→脱色藻油

活性炭解吸附:取脱色后的活性炭10 g,加入300 mL提取剂(V(石油醚):V(丙酮):V(乙醇)=2:1:0.5)混合搅拌,抽滤得溶液,重复3次,合并滤液。

1.3.3 藻油脱色检测

1.3.3.1 藻油色泽的测定

国际上通用的评定油脂色泽和测试脱色工艺效果的标准方法有2种:罗维朋比色法和分光光度计法。罗维朋比色法多用于浅色粗油,且目测读数结果误差较大,而采用分光光度法测定在250~750 nm波长处的油脂透光曲线或在固定波长下测得的油脂透光率,可操作性强,准确度高,本研究中的粗油颜色较深,故采用分光光度计法测定藻油色度^[22-23]。

1.3.3.2 藻油脱色率的测定

取待测定藻油粗样品,以提取剂(V(石油醚):V(丙酮):V(乙醇)=2:1:0.5)作为参比溶液,在紫外-可见光分光光度计上用1 cm石英比色皿在250~750 nm波长范围进行全波长扫描测量吸光度,确定藻油的最大吸光度所对应波长为409 nm,并以此作为藻油脱色率的标准测定波长,脱色率计算见公式(1):

$$\text{藻油脱色率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为脱色前藻油的吸光度; A_1 为脱色后藻油的吸光度。

1.3.3.3 藻油回收率的测定

分别量取等量的2份藻油置于2个干燥洁净的圆底烧瓶中,一份进行脱色处理,一份作为对照,分别旋转蒸发除掉有机溶剂并真空干燥至恒质量,差量法称量两组的质量,回收率计算见公式(2):

$$\text{藻油回收率}/\% = \frac{B_0 - B_1}{B_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: B_0 为脱色前藻油的质量/g; B_1 为脱色后藻油的质量/g。

1.3.4 脱色材料及脱色条件对脱色效果的影响

1.3.4.1 不同脱色剂脱色效果比较

分别选取皂土、硅藻土、高岭土、活性炭处理藻油粗样品,取100 mL藻油粗样品,分别加入3 g的皂土、硅藻土、高岭土、活性炭,在60℃于磁力搅拌水浴锅中恒温水浴回流30 min,抽滤分离后测定脱色率和回收率,比较不同脱色剂对藻油粗样品的吸附脱色效果,并选择效果最佳的脱色剂进行脱色条件的单因素试验。

1.3.4.2 脱色剂用量对脱色效果的影响

脱色剂用量设置为1、2、3、4、5 g/100 mL 5个水平,脱色温度60℃,脱色时间30 min,考察脱色剂用量对藻油脱色效果的影响。

1.3.4.3 脱色温度对脱色效果的影响

脱色温度设置为40、50、60、70、80℃ 5个水平, 脱色时间30 min, 考察脱色温度对藻油脱色效果的影响。

1.3.4.4 脱色时间对脱色效果的影响

脱色时间设置为30、40、50、60、70 min 5个水平, 脱色温度60℃, 考察脱色时间对藻油脱色效果的影响。

1.3.5 响应面优化试验^[24]

在单因素试验的基础上, 选取活性炭的用量、脱色温度、脱色时间为主要影响参数, 以藻油的脱色率和回收率为响应值, 考察各因素间的交互作用对藻油脱色效果的影响, 采用Design-Expert 7.0软件进行分析, 选择三因素三水平的Box-Behnken设计, 并对结果进行统计分析。试验设计因素与水平如表1所示。

表1 Box-Behnken试验设计因素与水平
Table 1 Coded values and corresponding values of independent variables used in Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 脱色温度/℃	60	70	80
X_2 脱色时间/min	45	50	55
X_3 活性炭用量/(g/100 mL)	3	4	5

1.3.6 藻油脂肪酸组成分析

1.3.6.1 藻油的甲酯化

参照文献[25-26], 采用硫酸-甲醇法, 准确称取微量藻油10 mg加入150 mL三角锥瓶中, 加入质量分数为2%氢氧化钠-甲醇溶液5 mL后置于75℃水浴回流20 min。准确移取0.5 mol/L硫酸-甲醇溶液10 mL从冷凝管上端加入, 75℃水浴回流15 min, 后加入10 mL正己烷回流1 min。取出冷却至室温, 振荡4 min, 取上清液过滤上机。

1.3.6.2 色谱条件

Rtx-5MS色谱柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm); 载气He(纯度≥99.99%); 进样量0.5 μL; 进样方式: 分流进样, 分流比20:1; 流速1.0 mL/min; 进样温度250℃; 色谱-质谱接口温度230℃; 程序升温: 100℃保持2 min, 以4℃/min升温至250℃并保持2 min。

1.3.6.3 质谱条件

电子电离源, 电子能量70 eV, 接口温度230℃, 离子源温度200℃, 质量扫描范围 m/z 29~450。

2 结果与分析

2.1 脱色剂的确定

由表2可知, 在相同的条件下, 硅藻土对藻油的脱色效果最差, 脱色率只有28.41%, 高岭土和皂土的脱色效果依次增加, 活性炭对藻油的脱色效果最好, 脱色率可以达到92.83%, 因此本实验选用活性炭作为藻油的脱色吸附剂。

表2 不同脱色剂对藻油脱色效果的影响

Table 2 Decolorization efficiency of microalgae oil with different decolorizing agents

脱色剂种类	脱色率/%	回收率/%
皂土	43.06±3.24	74.19
硅藻土	28.41±6.61	92.58
高岭土	28.97±4.44	92.11
活性炭	92.83±0.79	45.17

2.2 单因素试验结果

2.2.1 活性炭用量对脱色率的影响

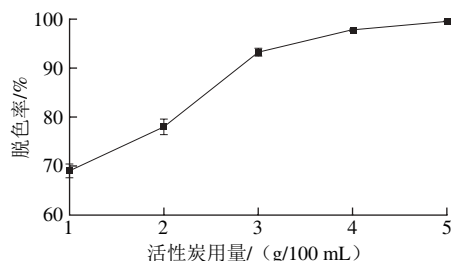


图1 活性炭用量对藻油脱色率的影响

Fig. 1 Influence of adsorbent dosage on decolorization efficiency

通常情况下, 对油脂进行吸附脱色, 吸附剂的添加量原则上控制在1~5 g/100 mL^[27]。由图1可知, 藻油的脱色率随着活性炭用量的增加而增加, 在活性炭用量为5 g/100 mL时, 藻油脱色率达到最大值。此外, 活性炭用量越多, 由活性炭吸附造成的藻油损失和生产成本也相应增加。因此, 活性炭的用量应控制在5 g/100 mL以内。

2.2.2 脱色温度对脱色率的影响

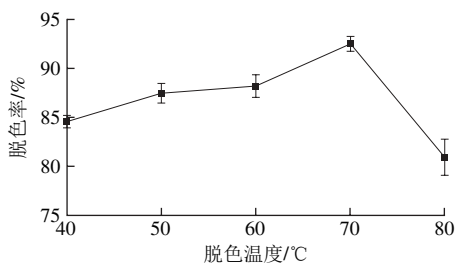


图2 脱色温度对藻油脱色效果的影响

Fig. 2 Influence of temperature on decolorization efficiency

从图2可以看出, 藻油的脱色率随着温度的升高而增加, 当温度达到70℃时, 脱色率达到92.5%, 但温度超过70℃以后, 随着温度的上升, 脱色率反而下降。出现这种现象可能是因为色素等物质在活性炭表面的吸附过程是一个放热反应, 过高的温度不利于色素吸附, 会使藻油中的一些无色物质发生氧化反应, 生产难于除去的新色素^[28], 因此脱色温度应该控制在60~80℃。

2.2.3 脱色时间对脱色率的影响

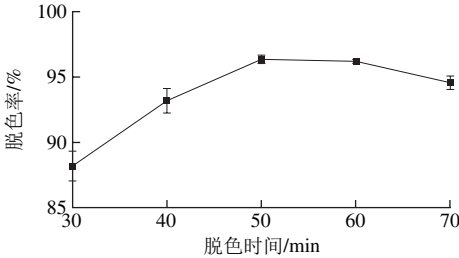


图3 脱色时间对藻油脱色效果的影响
Fig. 3 Influence of adsorption time on decolorization efficiency

由图3可知,藻油的脱色率随着时间的延长而增加,时间越长,脱色效果越好。脱色时间为50 min时,藻油的色度最浅。当藻油与吸附剂的接触时间超过60 min时,已吸附的部分色素可能解吸附,同时可能由于氧化引起色素固化和新的色素等物质的产生^[29],致使藻油色度有所加深。

2.3 脱色工艺条件优化结果

表3 Box-Behnken试验设计与结果
Table 3 Box-Behnken design with experimental and predicted values of response variables

试验号	X_1 脱色温度	X_2 脱色时间	X_3 活性炭用量	脱色率/%		回收率/%	
				测定值	预测值	测定值	预测值
1	-1	-1	0	97.65	97.49	36.42	37.48
2	1	-1	0	96.32	95.73	46.53	46.91
3	-1	1	0	98.12	98.71	39.38	39.00
4	1	1	0	96.71	96.87	42.77	41.71
5	-1	0	-1	95.70	95.78	45.09	45.25
6	1	0	-1	94.99	95.50	43.93	44.78
7	-1	0	1	98.98	98.47	31.36	30.51
8	1	0	1	95.23	95.15	43.28	43.12
9	0	-1	-1	96.56	96.64	45.74	44.51
10	0	1	-1	98.59	97.92	41.84	42.06
11	0	-1	1	97.26	97.92	35.91	35.70
12	0	1	1	99.06	98.98	33.24	34.47
13	0	0	0	97.50	97.20	48.99	48.22
14	0	0	0	97.34	97.20	46.88	48.22
15	0	0	0	97.57	97.20	48.41	48.22
16	0	0	0	96.26	97.20	48.41	48.22
17	0	0	0	97.34	97.20	48.41	48.22

以单因素试验结果为基础,设定活性炭用量、脱色温度、脱色时间作为优化参数,以藻油的脱色率和回收率为响应值,建立响应面模型。由表3可知,第13、14、15、16、17号为区域中心试验点,其余12组为析因试验点,取值在每个因素组成的顶点上。零点试验进行5次重复,用以估计试验误差。

利用Design-Expert 7.0软件对所得数据进行整理分析,得到脱色率二次回归方程为:

$$Y_1=97.20-0.45X_1+0.59X_2+0.59X_3-0.010X_1X_2-0.38X_1X_3-0.058X_2X_3-0.21X_1^2+0.82X_2^2-0.15X_3^2$$

回收率二次回归方程为:

$$Y_2=48.22+1.52X_1-0.92X_2-4.10X_3-0.84X_1X_2+1.64X_1X_3+0.31X_2X_3-0.65X_1^2-4.34X_2^2-4.70X_3^2$$

根据表3结果,用Design-Expert 7.0软件进行多元回归分析,回归方程的方差结果见表4和表5。

表4 脱色率回归模型的方差分析
Table 4 Analysis of variance of the regression model for decolorization efficiency

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	19.80	9	2.20	4.65	0.027 5*
X_1 脱色温度	6.48	1	6.48	13.69	0.007 6**
X_2 脱色时间	2.75	1	2.75	5.81	0.046 7*
X_3 活性炭用量	2.75	1	2.75	5.81	0.046 7*
X_1X_2	0.001 6	1	0.001 6	0.003 4	0.955 3
X_1X_3	2.31	1	2.31	4.88	0.062 8
X_2X_3	0.013	1	0.013	0.028	0.872 0
X_1^2	2.85	1	2.85	6.02	0.043 9*
X_2^2	2.83	1	2.83	5.99	0.044 3*
X_3^2	0.10	1	0.10	0.21	0.658 4
残差	3.31	7	0.47		
失拟项	2.16	3	0.72	2.51	0.197 8
纯误差	1.15	4	0.29		
总和	23.1	16			
$R^2=0.856 7$					$R^2_{Adj}=0.672 4$

注: *. $P<0.05$, 差异显著; **. $P<0.01$, 差异极显著。下同。

表5 回收率回归模型的方差分析
Table 5 Analysis of variance of the regression model for oil recovery

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	492.04	9	54.67	39.67	<0.000 1**
X_1 脱色温度	73.57	1	73.57	53.38	0.000 2**
X_2 脱色时间	6.79	1	6.79	4.93	0.061 9
X_3 活性炭用量	134.56	1	134.56	97.64	<0.000 1**
X_1X_2	11.29	1	11.29	8.19	0.024 3*
X_1X_3	42.77	1	42.77	31.04	0.000 8**
X_2X_3	0.38	1	0.38	0.27	0.616 5
X_1^2	28.60	1	28.60	20.75	0.002 6**
X_2^2	79.26	1	79.26	57.51	0.000 1**
X_3^2	92.96	1	92.96	67.45	<0.000 1**
残差	9.65	7	1.38		
失拟项	7.15	3	2.38	3.82	0.114 2
纯误差	2.50	4	0.62		
总和	501.69	16			
$R^2=0.980 8$					$R^2_{Adj}=0.956 0$

对脱色率回归模型进行分析,该二次多项式回归模型F值为4.65, P值小于0.05,表明模型显著,不同处理间的差异显著;失拟项F值为2.51, $F<F_{0.05(3,9)}=8.81$,失拟项P值为0.197 8大于0.05,不显著。模型的调整确定系数 R^2_{Adj} 值为0.672 4,说明该模型的拟合度良好可以用该模型对藻油的脱色率进行分析与预测。由表4可知, X_1 对二次响应面模型效果极显著; X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 差异显著,其余项的影响不显著。说明脱色温度对藻油的脱色率影响比较明显。

对回收率回归模型进行分析,该二次多项式回归模型 $F=39.67>F_{0.01(4,9)}=14.66$, P 值小于0.000 1表明模型高度显著,不同处理间的差异极显著;失拟项 $F=3.82<F_{0.05(3,9)}=8.81$,失拟项 P 值为0.114 2大于0.05,不显著。模型的调整确定系数 R^2_{Adj} 值为0.956 0,说明该模型能解释95.60%相应值的变化,因而该模型的拟合度良好,试验误差小,可以用该模型对藻油的回收率进行分析与预测。由表5可知, X_1 、 X_3 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对二次响应面模型效果极显著; X_1X_2 差异显著,其余项的影响不显著。说明脱色温度、活性炭用量对藻油的回收率比较明显,脱色温度与脱色剂用量的交互作用比较明显。

为确定响应面最佳工艺条件,运用响应面寻优方法对回归方程进行最优解分析,得到最佳工艺参数为脱色温度68.23℃、脱色时间54.18 min、活性炭用量3.84 g/100 mL粗藻油。在此条件下,藻油的脱色率和回收率分别为98.29%和44.63%。考虑到实际可操作性,将工艺参数修正为脱色温度68℃、脱色时间54 min、活性炭用量3.8 g/100 mL粗藻油。为检验结果的可靠性,采用修正后的工艺参数进行3次平行验证实验,得出藻油的脱色率和回收率分别为98.05%和45.12%,与理论预测值基本吻合。考虑到藻油的回收率不高,将活性炭3次解吸后合并藻油,回收率可以达到81.45%。

2.4 脱色前后藻油主要理化特性比较

溶剂浸提法得到的粗藻油呈黑褐色,脱色后的藻油呈金黄色,较澄清。经测定,脱色前后藻油的主要理化指标发生了一些变化,由表6可知,脱色前后,其酸值和碘值稍有降低,说明脱色工艺合适,而过氧化值稍微增加是由于脱色过程中的高温会引起油脂轻微氧化。

表6 藻油的主要理化特性

Table 6 Physical and chemical properties of crude and decolorized oil

样品	酸值/(mg/g)	过氧化值/(mg/kg)	碘值/(g/100 g)
藻油毛油	2.52	4.85	93
脱色藻油	2.28	5.68	87

2.5 脱色前后藻油脂肪酸组成分析

表7 拟微绿球藻脂肪酸组成及相对含量

Table 7 Fatty acid composition of crude and decolorized oil

序号	脂肪酸名称	脱色前相对含量/%	脱色后相对含量/%
1	十四烷酸(肉豆蔻酸)	8.38	7.35
2	十五烷酸	0.44	0.62
3	9-十六烯酸(棕榈油酸)	25.57	19.75
4	十六烷酸(棕榈酸)	45.54	47.75
5	9,12-十八碳二烯酸(亚油酸)	1.37	1.84
6	9-十八碳烯酸(油酸)	5.89	7.06
7	10-十八碳烯酸	0.46	1.58
8	十八烷酸(硬脂酸)	0.77	1.89
9	5,8,11,14-二十碳四烯酸(花生四烯酸)	1.34	1.67
10	5,8,11,14,17-二十碳五烯酸(EPA)	10.24	10.49

由表7可知,微藻油脂中脂肪酸大多以不饱和脂肪酸为主,占到总脂肪酸含量的45%以上。微藻油脂脱色前后不饱和脂肪酸总相对含量基本没变,EPA相对含量脱色前后分别为10.24%和10.49%,因此,脱色未对微藻油脂中EPA的含量产生影响。本次测定的拟微绿球藻粗藻油中的EPA仅占到总脂肪酸含量的10%左右,相对于一些报道的偏低^[30],推测与藻粉批次和粗藻油制备方法不同有关,但不影响对脱色工艺的探究。

3 结论

活性炭相对于其他几种脱色剂对拟微绿球藻藻油有更好的脱色效果;通过单因素试验和响应面实验对优化活性炭的脱色工艺条件,确定了最优的脱色工艺条件为脱色温度68℃、脱色时间54 min、活性炭用量3.8 g/100 mL藻油。在此条件下,藻油的脱色率和3次解吸后的回收率分别为98.05%和81.45%。建立的二次回归方程模型极显著,对试验拟合度较好,具有一定的应用价值。

对脱色前后的藻油脂肪酸组成成分进行了分析,结果显示脱色前后的总脂肪酸组成种类没有变化,拟微绿球藻的油脂中含有花生四烯酸和EPA等多不饱和脂肪酸;脱色前后各脂肪酸的含量变化不大,尤其是不饱和脂肪酸没有明显的下降,说明脱色未对藻油造成很大程度的氧化。

参考文献:

- [1] 李文宗,王磊.长链多不饱和脂肪酸EPA、DHA的基因工程研究进展[J].生物技术通报,2016,32(8):1-7. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.08.001.
- [2] SWANSON D, BLOCK R, MOUSA S A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life[J]. Advances in Nutrition, 2012, 3(1): 1-7. DOI:10.3945/an.111.000893.
- [3] MOZAFFARIAN D, WU J H. (n-3) Fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary?[J]. Journal of Nutrition, 2012, 142(3): 614-625. DOI:10.3945/jn.111.149633.
- [4] KWAK S M, MYUNG S K, LEE Y J, et al. Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials[J]. Archives of Internal Medicine, 2012, 172(9): 686-694. DOI:10.1001/archinternmed.2012.262.
- [5] 张英俊,朱筠,黄国林,等.利用微藻培养生产多不饱和脂肪酸研究进展[J].食品科学,2006,27(11):609-613. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2006.11.152.
- [6] XU F, HU H H, CONG W, et al. Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(1): 51-53. DOI:10.1023/B:BILE.0000009460.81267.cc.
- [7] 卢美贞,沈林杰,陆向红,等.培养条件对眼点拟微绿球藻油脂含量和EPA产率的影响[J].中国粮油学报,2014,29(5):80-83.

- [8] DONG H P, WILLIAMS E, WANG D Z, et al. Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2): 1110-1126. DOI:10.1104/pp.113.214320.
- [9] HIBBERD D J. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae)[J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2010, 82(2): 93-119. DOI:10.1111/j.1095-8339.1981.tb00954.x.
- [10] 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. DOI:10.3321/j.issn:1000-3207.2003.03.005.
- [11] 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. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2012.05.003.
- [12] 陆向红, 贾俊乾, 张秋红, 等. 响应面法优化眼点拟微绿球藻酶法提油工艺研究[J]. *中国油脂*, 2015, 40(9): 13-17. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2015.09.005.
- [13] PIEBER S, SCHÖBER S, MITTELBACH M. Pressurized fluid extraction of polyunsaturated fatty acids from the microalga *Nannochloropsis oculata*[J]. *Biomass & Bioenergy*, 2012, 47(4): 474-482. DOI:10.1016/j.biombioe.2012.10.019.
- [14] 彭瑶瑶. 牡丹籽油脂和蛋白的提取、精制和性能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 24-25.
- [15] 朱正伟, 曹伟伟, 马建国, 等. 浓香葵花籽油精炼脱色剂及脱色工艺的研究[J]. *中国油脂*, 2015, 40(11): 16-21. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2015.11.004.
- [16] 刘元法, 王兴国. 凹凸棒石吸附剂特征及其在油脂脱色过程中的应用研究[J]. *中国油脂*, 2006, 31(9): 27-30. DOI:10.3321/j.issn:1003-7969.2006.09.007.
- [17] HAMMAN O B, RUBIA T D L, MARTINEZ J. Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavidio-alba*[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2010, 18(18): 2410-2415. DOI:10.1016/j.biombioe.2012.10.019.
- [18] 刘悦, 刘元法, 王兴国. 凹凸棒石在大豆油脱色过程中吸附行为的探讨[J]. *食品科学*, 2007, 28(3): 25-29. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2007.03.001.
- [19] 黄雄超. 微藻油脂的提取及制备生物柴油的研究[D]. 厦门: 华侨大学, 2012: 30-36.
- [20] 孟迎迎, 陆洪斌, 刘娇, 等. 石墨化碳对微藻油脂及微藻生物柴油的脱色研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(10): 53-55. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2016.10.012.
- [21] 翟量, 沈立荣. 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[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(2): 809-815.
- [22] 孙凤霞, 杜红霞, 周展明. 油脂色泽测定方法研究进展[J]. *中国油脂*, 2002, 27(2): 7-9. DOI:10.3321/j.issn:1003-7969.2002.02.002.
- [23] 吴靖, 李德宝, 黄惠华. Lovibond法和分光光度法对茶叶籽油色泽测定的比较研究[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(1): 114-116. DOI:10.3969/j.issn.1673-9078.2009.01.031.
- [24] 魏贞伟, 梁宝生, 张青, 等. 响应面法优化油脂分段脱色工艺[J]. *食品科学*, 2016, 37(14): 32-36. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201614006.
- [25] 彭全材, 宋金明, 李军, 等. 超声萃取-气相色谱法测定扇贝中30 种脂肪酸[J]. *食品科学*, 2012, 33(12): 163-168.
- [26] BRINKS J. Optimization of rapeseed oil fatty acid esterification with methanol in the presence of sulfuric acid[J]. *Polish Journal of Chemical Technology*, 2013, 15(4): 54-59. DOI:10.2478/pjct-2013-0068.
- [27] 谷克仁, 张文, 王晓君. 活性炭脱色对大豆磷脂质量的影响[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2001, 22(1): 16-18. DOI:10.3969/j.issn.1673-2383.2001.01.003.
- [28] 逯与运, 麻成金, 黄伟, 等. 茶叶籽油脱色工艺研究[J]. *食品与发酵科技*, 2010(2): 73-76. DOI:10.3969/j.issn.1674-506X.2010.02-018.
- [29] 程谦伟, 孟陆丽, 许金蓉. 响应面法优化梔子油的脱色工艺[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(22): 4692-4694. DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2011.22.008.
- [30] 卢丽娜, 孙利芹, 田焕玲, 等. 32 株海洋微藻总脂含量及其脂肪酸组成的研究[J]. *中国油脂*, 2009, 34(11): 68-73. DOI:10.3321/j.issn:1003-7969.2009.11.017.