

柄海鞘脂肪酸提取工艺的研究

王长海，张秀妍，姜爱莉

(烟台大学 海洋学院，山东 烟台 264005)

摘要：用乙酸乙酯从柄海鞘(*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：温度 50℃，提取时间 240 min，料液比 1:10，提取次数 2 次。按此工艺，得脂肪酸产率为 5.04%，利用气相色谱进行分析，得其中多不饱和脂肪酸质量分数为 67.79%，EPA 和 DHA 的质量分数之和为 19.47%。

关键词：柄海鞘(*Styela clava*)；提取；多不饱和脂肪酸；EPA；DHA
中图分类号：Q503 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-3096 (2007) 03-0041-05

柄海鞘(*Styela clava*)属于脊索动物门，在中国沿海均有分布^[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 fatty 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。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用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。将海鞘沥水后，于日光下晒干，粉碎 (40~60 目)，分装，冷冻保存备用。另取一部分海鞘沥水后，用冻干机冷冻干燥，备用。

环己烷、石油醚、二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮及乙醇等，均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 海鞘脂肪的提取

称取海鞘晒干粉 (或冻干粉) 100 g，按一定比例加入有机溶剂，在一定温度下，搅拌提取一定时间。

离心分离，取上清液，减压蒸馏，真空干燥，得海鞘脂肪酸粗品。

1.2.2 单因素实验与正交实验

称取海鞘晒干粉 100 g，按不同提取时间、温度、料液比 (g:mL) 及提取次数进行提取，分别测定产物的产率 (以海鞘干粉计) 和皂化值。在此基础上以料液比、提取温度和时间为考察因素，按表 1 设计三因素三水平正交实验。

表 1 海鞘脂肪酸提取工艺的正交实验因素及其水平
Tab.1 Table of factor and level of orthogonal experiment of extraction process of PUFA

考察因素	水平		
	1	2	3
温度 (℃)	30	40	50
时间 (h)	2	3	4
料液比 (g:mL)	1:4	1:7	1:10

1.2.3 皂化值的测定^[8]

按参考文献[8]中所述碱皂化方法对所得产品中的粗脂肪酸含量进行测定。

收稿日期：2004-04-10；修回日期：2004-08-07
基金项目：国家 863 计划资助项目 (2001AA620416)
作者简介：王长海 (1962-)，山东蓬莱人，教授，研究方向为生物活性物质，电话：0535-6706588，E-mail:chwang2001@sina.com

1.2.4 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 1 mol/L 的氢氧化钾-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。

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

表 2 不同溶剂对提取产率的影响

Tab.2 Table of the effect of different solvents on extraction yield

参数	溶 剂						
	乙 醇	乙酸乙酯	石油醚	三氯甲烷	丙 酮	二氯甲烷	环己烷
产率 (%)	8.35	5.54	1.53	1.89	8.57	1.56	1.86
皂化值	49	187	193	115	81	153	177

由表 2 可见，用乙醇、丙酮作为提取溶剂时，产率较大。但是提取物中杂质较多，脂肪酸质量分数较低（皂化值低），不易提纯。另外由于这两种有机溶剂与水互溶，减压蒸馏时所需温度较高，耗时较长。用石油醚、环己烷等非极性溶剂提取时，产率较低，且在实验过程中易发生乳化现象。而用乙酸乙酯作为提取溶剂时，产率较高，产品流动性好，其中脂肪酸质量分数也较高（皂化值为 187），而且乙酸乙酯毒

至 250 ℃；载气（N₂）流速：15 cm/s，尾吹 40 mL/min，进样量 4 μL。

2 实验结果与讨论

2.1 提取溶剂的影响

分别称取海鞘干粉 100 g，按料液比（g:mL）1:5，温度 40 ℃，搅拌提取 2 h，结果如表 2 所示。

性低，容易浓缩回收。所以选择乙酸乙酯作为海鞘脂肪酸的提取溶剂。

2.2 料液比、提取时间、温度及提取次数对提取率的影响

称取海鞘干粉 100 g，分别以不同的料液比、提取时间、温度及提取次数提取海鞘脂肪酸，测定脂肪酸的产率和皂化值，结果如表 3 所示。

表 3 料液比、提取时间、温度及提取次数的变化对提取率的影响

Tab.3 Table of the effects of different ratios of mass to volume, time, temperature and times of extraction on yield

参数	料液比 (g:mL)				
	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10
产率(%)	3.66	3.11	3.89	4.06	5.37
皂化值	209	234	227	199	203
参数	提取时间 (h)				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
产率(%)	3.98	4.40	4.90	5.10	5.04
皂化值	207	206	196	232	211
参数	温度(℃)				
	20	30	40	50	60
产率(%)	3.57	4.33	4.71	4.56	4.52
皂化值	192	189	206	201	197
参数	提取次数				
	1	2	3	4	
产率(%)	5.30	1.37	0.27	0.12	
皂化值	212	168	-	-	

由表 3 可以看出,随着料液比的增加,脂肪酸产率逐渐增大,皂化值先增加后减小,在料液比为 1:6 时达到最大值,之后随着料液比的增加皂化值有所下降并逐渐趋于平稳。

随着提取时间的延长,脂肪酸产率和皂化值均有所增加;当提取时间超过 4 h 时,随着时间的延长,脂肪酸产率逐渐趋于平稳。

随着提取温度的升高,脂肪酸产率及皂化值逐渐增加,40 ℃ 时达到最高(4.71 和 206)。之后随着温度的升高又逐渐降低,这可能是由于高温时部分脂肪

酸氧化所致。

随着提取次数的增加,脂肪酸产率减少,皂化值降低,提取两次,已基本可将海鞘中的脂肪酸提取完全。第 3 次提取时,产率只有 0.27%,再增加提取次数,对产率的影响很小,且消耗大量溶剂,所以确定提取次数为 2 次。

2.3 正交实验

按 $L_9(3^4)$ 表设计正交实验,结果及方差处理见表 4 及表 5。

表 4 正交实验 $L_9(3^4)$ 的结果及分析

Tab.4 Table of the results and analysis of orthogonal experiment $L_9(3^4)$

实验号	水平			产率 (%)
	温度	时间	料液比	
1	1	1	1	4.57
2	1	2	2	4.99
3	1	3	3	4.85
4	2	1	2	4.56
5	2	2	3	4.78
6	2	3	1	4.79
7	3	1	3	4.82
8	3	2	1	5.10
9	3	3	2	5.28
M_1	14.42	13.96	14.47	$T=43.774$
M_2	14.14	14.88	14.85	$y=4.864$
M_3	15.21	14.93	14.46	

表 5 正交实验的方差分析

Tab.5 Table of the analysis of variance of orthogonal experiment $L_9(3^4)$

方差来源	平方和 S	自由度 f	均方 $\bar{s}$	F 值	显著性
温度	0.203 4	2	0.101 7	80.56	显著
料液比	0.197 3	2	0.098 6	78.14	显著
时间	0.032 4	2	0.016 2	12.85	
误差	0.002 5	2	0.001 2	-	

根据上述分析,对产率影响比较显著的因子是温度,其次是料液比,提取时间的影响最小。通过正交实验,得出从柄海鞘中提取脂肪酸的最佳条件为:温度 50 ℃,料液比 1:10,提取时间 4 h,提取次数为 2

次。

按此工艺条件对柄海鞘晒干粉及冻干粉分别进行大规模的脂肪酸提取(海鞘粉一次投料量为 1 000 g),结果如表 6。

表 6 正交实验验证结果

Tab.6 Table of the results of proof test

实验 编号	海鞘 原料	产率 (%)	皂化 值	平均 产率 (%)	平均皂 化值
1	晒干粉	5.02	201		
2	晒干粉	4.98	198	4.98	202
3	晒干粉	4.95	207		
4	冻干粉	5.10	197		
5	冻干粉	5.17	208	5.14	206
6	冻干粉	5.15	213		

表 6 结果表明，采用前述工艺条件提取海鞘脂肪

表 7 脂肪酸的成分及质量分数

Tab.7 Table of 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	C 20:2	C 20:3	C 20:4	C 20: 5	C 22:1	C 22:3	C 22:4	C 22:5	C 22:6
质量分数 (%)	18.93	7.32	3.49	9.82	5.04	6.18	2.17	1.95	9.65

从表 7 中可以得出，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质量分数为 67.79%，占不饱和脂肪酸的 79.13%，EPA 和 DHA 的质量分数分别为 9.82%和 9.65%，其和占总脂肪酸质量分数的 19.47%。

3 结论

（1）从海鞘中提取脂肪酸的最佳溶剂为乙酸乙酯。所得产品流动性好，产率及脂肪酸含量均较高，且该溶剂毒性低，易浓缩回收。

（2）通过正交实验得出最佳工艺条件为：温度 50 ℃，提取时间 4 h，料液比 1:10，提取次数 2 次。在此条件下进行提取，得脂肪酸的产率为 5.04%。

（3）对提取的脂肪酸进行脂肪酸分析，得多不饱和脂肪酸含量为 67.79%，其中 EPA 和 DHA 的含量之和占脂肪酸总量的 19.47%。

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.

酸是可行的，重复实验多次，产品的产率和皂化值均很稳定。同时可以看出，以海鞘冻干粉为原料提取脂肪酸的平均产率及皂化值均较晒干粉的要高一些，但因海鞘含水量大（约为 80%），而冻干设备要求待冻干物料的含水量最好在 10%左右，含水量过高，设备长时间大功率输出，易发生故障，所以在冻干前要使海鞘体内的水尽量减少，目前还没有理想的处理方式，需要进一步摸索。

2.4 脂肪酸分析

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 7。

[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.n-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]. **Tetrohedron Lett**,1994,35(17): 2 691-2 693.

[7] Li Caiping,Blackman A J.Cylindricines H, novel alcoloids from the ascidian *Clavelina cylindrical*[J].**Aust J Chem**, 1995,48(3):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.

Extraction of fatty acid from *Styela clava*

WANG Chang-hai, ZHANG Xiu-yan, JIANG Ai-li

(School of Ocean of Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Apr.,10,2004

Key words: *Styela clava* ; extraction; polyunsaturated fatty acid; EPA; DHA

Abstract: Polyunsaturated fatty acid (PUFA) is extracted from dry powder of *Styela clava* by organic solvent. Extraction process is studied through orthogonal experiment and the optimization conditions of it is listed as follows: *S. clava* has been extracted with ethyl acetate at 50℃ for 240min, w(weight of ascidian):v(volume of ethyl acetate)=1:10, dry powder of *S. clava* is extracted twice, and the yield is 5.04% . According to the analysis of GC, the content of PUFA in the product is 67.79%, and the sum total content of EPA and DHA is 19.47%.

(本文编辑：张培新)

(上接第 40 页)

Effect of salinities on digestive enzyme activities of juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone

HUANG Kai , YANG Hong-kun , ZHAN Ge , WU Lin-hua

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University , Nanning 530005, China)

Received: Jan., 6, 2005

Key words: *Litopenaeus vannamei* Boone; salinity; digestive enzyme activities

Abstract: In this paper, the effect of salinity on digestive enzyme activities of the juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone was studied by means of enzyme analysis. The experiment was made under three levels of salinities equal to 1, 15 and 30 respectively. The results were as follows: (1) In the hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone under the salinity equal to 1, the pepsin has the highest activity[29.58μg/(mg • min)], and the activity of tyrosic-like[92.46 μg/(mg • min)] corresponds to the highest[97.60 μg/(mg • min)] under the salinity equal to 15, and in stomach, both tyrosic-like and pepsin have the highest activity. (2) The lipase has the highest activity in hepatopancreas and stomach under the salinity equal to 1, but the differences among various groups are not prominent ($P>0.05$) through the statistical analysis. (3) The activities of amylase are quite contiguous in hepatopancreas, and there is no prominent difference among various groups of salinities ($P>0.05$), and in stomach the juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone's amylase has the highest activity under the salinity equal to 1, and reaches 109.29 μg/(mg • min), prominently higher than that under the groups of salinities equal to 15 and 30 ($P<0.05$).

(本文编辑：刘珊珊)