

研究报告

海洋野生鱼酶解提取鱼油的工艺分析

钱俊青, 单昱东, 廖启元

浙江工业大学药学院, 杭州 310014

摘要: 海洋野生鱼与养殖鱼比较, 其鱼油中含更多的二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA)、脂溶性维生素等活性成分。为提高海洋野生鱼的利用价值, 以野生小带鱼为原料进行酶法提油工艺研究。分析了不同的温度、时间、pH 值等影响因素下的提取、萃取以及离心效果, 以响应面法确定了最佳的酶解工艺条件: 液固比为 6、pH7.3、酶量 1000 u/g 原料、搅拌速度 200 r/min、45°C 酶解 90 min; 最优萃取条件: 萃取剂 100 mL(每 20 g 鱼糜原料)、pH4.0、40°C 萃取 25 min; 离心条件: 离心速度 3000 r/min (1865 g)、离心时间 10 min。上述工艺条件下提油率为 79.90%。改进了传统的鱼油提取工艺, 在活性成分保护上有较大改善。

关键词: 海洋野生鱼, 鱼油, 酶解, 萃取, 离心, 工艺

Technology Investigation of Extracting Fish Oil by Enzymolysing Ocean Wild Fish

Junqing Qian, Yudong Shan, and Qiyuan Liao

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: Compared with cultured fish, the fish oil of ocean wild fish contains much more Eicosapentenoic acid (EPA), Docosahexenoic acid (DHA), fat-soluble vitamin. To improve the utility value of ocean wild fish, small hairtail was used as raw material to investigate the technology of extracting fish oil with enzyme. The variables to affect the efficiency of extraction, extracting and centrifugation were selected as temperature, reaction time and pH value. Optimal technology conditions were determined by the response surface method: The liquid/solid ratio is 6, pH 7.3, enzyme amount of 1000 u/g raw material, agitation speed of 200 r/min, enzymolysis under 45°C for 90 min. The optimum extraction conditions were as follows: 100 mL extractant (every 20 g surimi), pH4.0, extracted under 40°C for 25 min. The optimal centrifuge conditions were: centrifuge speed of 3000 r/min (1865 g), centrifuged for 10 min. The oil extraction efficiency was 79.9%. This study developed the traditional technology of fish oil extraction, and improved the protection of the active components.

Keywords: ocean wild fish, fish oil, enzymolysis, extraction, centrifuge, technology

鱼油中富含 EPA、DHA、脂溶性维生素及其他成分^[1]。EPA 和 DHA 有抗血小板凝聚、延缓血栓形成^[2]、降血脂和抗动脉硬化^[3,4]、抑制肿瘤生长^[5-7]、

抗炎、抗风湿^[8]、健脑增智^[9-10]、增强免疫力^[11]、保护视力^[12]等生理功效。

随着对鱼油研究的深入, 人们越来越认识到鱼

Received: March 15, 2008; **Accepted:** April 10, 2008

Supported by: Key Program of the Science and Technology Plan of Zhejiang Province, China (No. 001102219).

Corresponding author: Junqing Qian. E-mail: qjq@zjut.edu.cn

浙江省科技计划项目(No. 001102219) 资助。

油功能性成分的重要性,但这些功能性成分对环境都比较敏感,极易受光、氧、过热、金属元素(Fe、Cu 有催化作用)及自由基的影响,产生氧化、酸败、聚合等。传统的鱼油提取方法:淡碱水解法、压榨法、直接干燥法等^[1]由于提取过程中的恶劣操作条件常常会破坏这些功能成分,从而影响鱼油的质量。酶法提油技术以其温和的提取条件等诸多优点已成为现代油脂提取技术的一大热点。小带鱼是东海盛产的野生鱼类,每年捕捞量较大,目前均制作鱼粉。本研究首先提取野生小带鱼中的鱼油,提油后的成分可仍制作鱼粉。

1 实验材料

1.1 原料和试剂

小带鱼,购于浙江温州,原料经高速组织捣碎成糜状,冷藏备用;1398 中性蛋白酶,(食用级。100 000 u/g),无锡酶制剂厂;6号溶剂,食用油加工通用溶剂,杭州长征化工厂。

1.2 仪器和设备

W-201B 旋转蒸发器,上海申腾生物技术有限公司;LD5-10 低速离心机,北京医用离心机厂;电动搅拌器,江苏金坛宏凯仪器厂;酸度计,上海精密仪器仪表有限公司;R-201 旋转蒸发器,上海申胜生物技术有限公司;SHB-III A 循环水式多用真空泵,河南省太康教材仪器厂;DGG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司;METTLER TOLEDO PB602-N 型电子天平,瑞典。

2 方法

2.1 测定方法

蛋白质测定,凯氏定氮法;粗脂肪测定,酸水解法;水分测定,重量法;

$$\text{提油率}(y\%), y\% = \frac{\text{提取的鱼油的质量}}{\text{原料中鱼油的质量}} \times 100\%$$

2.2 小带鱼提取鱼油工艺路线

借鉴酶法提取植物油工艺的经验,我们提出了加酶酶解提油工艺。具体流程如下图所示。



2.3 实验方法

2.3.1 小带鱼的酶解

取小带鱼鱼糜加入一定量的水,加入中性蛋白酶,控制液固比(W/F,质量比)、酶量、pH、温度、酶解时间、搅拌速度等条件进行酶处理,酶解后用6号溶剂在预先固定的萃取条件下萃取分离鱼油,以鱼油的提取率来考察酶解的效果。用 Plackett-Burman(P-B)试验设计从所考察的诸因素中筛选出对提油率有显著影响的因素,再通过响应面分析法(RSM)对酶解条件进行优化。

2.3.2 小带鱼酶解液的萃取分离

固定酶解条件,用6号溶剂做萃取剂,考察萃取时间、萃取剂用量、萃取温度、萃取pH等因素对提油效果的影响,同时也考察离心时间、离心速度对分离效果的影响。通过单因素分析,采用正交实验设计对萃取条件进行优化。

3 结果与分析

3.1 酶解单因素分析

实验参考植物油料酶法提油工艺选择了影响酶解效果的6个因素,经过多组单因素实验后拟合了下面一组单因素实验数据。萃取条件固定为:萃取时间为15 min、溶剂用量75 mL、萃取温度40°C、萃取pH4.0;离心分离采用转速3000 r/min,离心时间为10 min。实验结果总结如下:

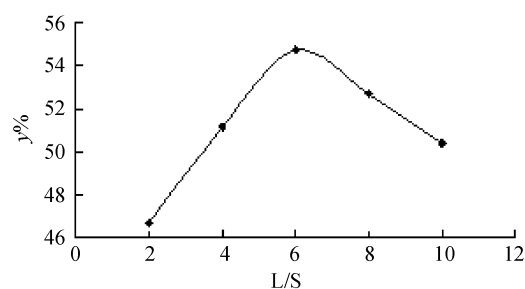


图1 L/S 比对提油率的影响

Fig. 1 Effects of L/S on rate of extraction fish oil (Enzymatic quantity is 400 u/g material, 45°C, pH7.0, 60 min, stirring speed is 200 r/min)

3.1.1 液固比(L/S)比对提油率的影响

如图1,可见随着液固比(L/S)的增大,提油率逐渐增加,当液固比为6时提油率达到最高为54.74%,此后液固比继续增大但提油率降低。所以应选液固比为6。

3.1.2 加酶量对提油率的影响

如图 2, 可见当不外加蛋白酶时, 鱼油的提取率仅为 37.95%, 随着加酶量的不断增加, 提油率迅速提高, 当酶量为 1000 u/g 原料时提油率达到最高为 76.79%, 此后继续增加酶量提油率反而有所下降。所以应选加酶量为 1000 u/g 原料。

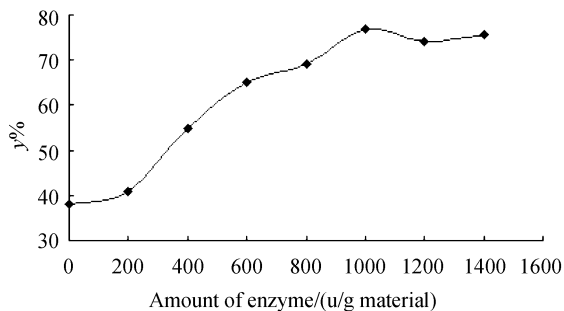


图 2 酶量比对提油率的影响

Fig. 2 Effect of amount of enzyme on rate of extraction fish oil

(L/S is 6, 45°C, pH7.0, 60 min, stirring speed is 200 r/min)

3.1.3 酶解 pH 对提油率的影响

如图 3, 可见 pH 对提油率有极大的影响, 当 pH 从 6.5 增大到 7.5(变化一个 pH 单位)时提油率从 67.18%增加到 78.08%达到最高。提油率随 pH 的增大先增加后减少, 呈钟罩形状。综合分析则 pH 应选 7.5。

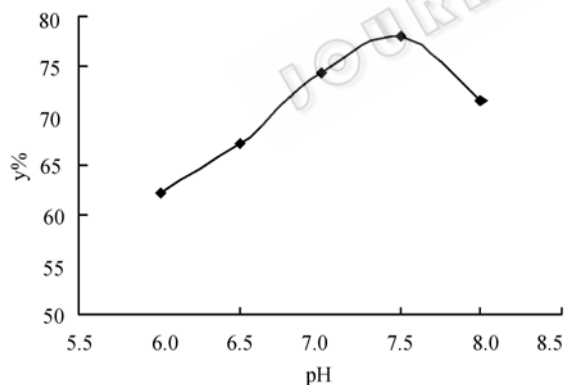


图 3 pH 对提油率的影响

Fig. 3 Effect of pH on rate of extraction fish oil
(Enzymatic quantity is 1000u/g material, L/S is 6, 45°C, 60 min, and stirring speed is 200 r/min)

3.1.4 酶解温度对提油率的影响

如图 4, 可见过高或过低的温度均不利用鱼油的提取, 45°C 时提油率最高为 78.08%, 高于 45°C 提油率降低, 低于 45°C 则提油率尚未达到最高。所以应选温度为 45°C。

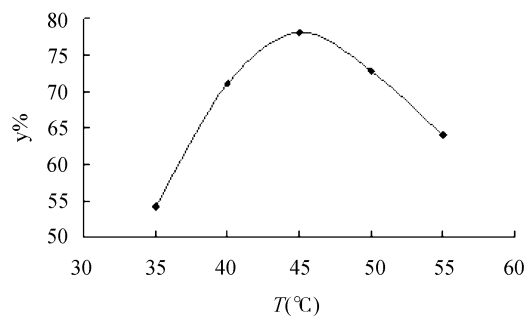


图 4 温度对提油率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on rate of extraction fish oil
(pH7.5, enzymatic quantity is 1000u/g material, L/S is 6, 60 min, and stirring speed is 200 r/min)

3.1.5 酶解时间对提油率的影响

如图 5, 可见酶解反应前 60 min 内提油率有较大变化, 30 min 时为 67.18%, 60 min 时增大到 78.33%, 此后提油率基本不变。从工作效率及设备利用、能耗、增加的提油率等经济衡量的角度考虑, 酶解时间应选择 90 min。

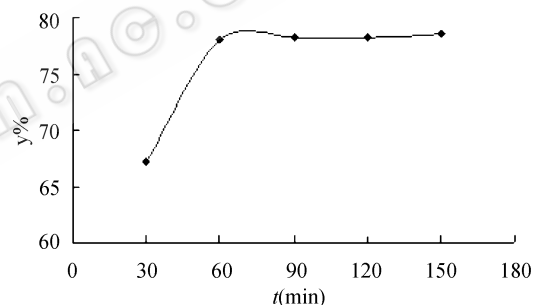


图 5 时间对提油率的影响

Fig. 5 Effects of time on rate of extraction fish oil
(45°C, pH7.5, enzymatic quantity is 1000u/g material, L/S is 6, stirring speed is 200 r/min)

3.1.6 搅拌速度对提油率的影响

如图 6, 可见搅拌速度的变化对提油率的影响不大, 均在 73.9%~778.72%之间。搅拌作用能使反应物的浓度均匀, 促进酶与底物更好的结合, 同时也使鱼油更易于释放。考虑能耗等因素应选择搅拌速度为 200 r/min。

3.2 酶解条件的优化

3.2.1 酶解条件优化的 Plackett-Burman 实验

本实验中考察的影响因素有 6 个: L/S、E/S、pH、温度、时间、搅拌速度, 依据 P-B 设计的要求需至少加 3 个空白因素作为误差估计, 因此选用 M=12 的 P-B 设计, 每个因素设计成高(+1)和低(-1)两个水

平, 高水平与低水平的比值在 1.25 左右, 提油率 $y\%$ 为考察指标。具体实验设计见表 1, 应用 Minitab 软件对实验结果进行统计分析, 结果见表 1:

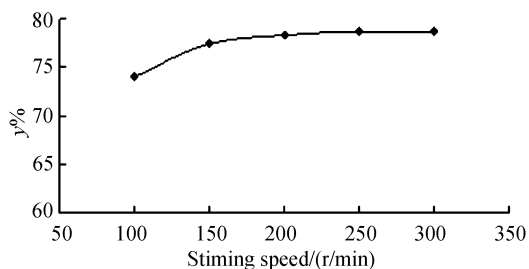


图 6 搅拌速度对提油率的影响

Fig. 6 Effect of stirring speed on rate of fish oil extraction (90 min, 45°C, pH7.5, enzymatic quantity is 1000u/g material, L/S is 6)

表 1 M=12 的 Plackett-Burman 试验设计与结果
Table 1 Experimental design and result of M=12 Plackett-Burman design

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	y%
1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	57.69
2	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	25.77
3	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	76.92
4	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	69.23
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	51.41
6	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	31.92
7	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	78.33
8	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	41.54
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	28.33
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	23.59
11	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	28.21
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	29.23

由表 2 可知, 对提油率($y\%$)有显著影响(可信度 $>90\%$)的因素有: pH、酶量、温度。以上面 3 个因素为自变量, 以提油率为响应值, 采用 RSM 三因素三水平实验设计对酶解条件进行优化, 实验设计如表 3.

应用 Minitab 软件对实验结果进行统计分析, 结果见表 5:

由方差分析结果可知道: 失拟不显著($P=0.748 > 0.05$), 而回归方程达极显著($P=0.000 < 0.01$); pH 对酶解提油效果的影响最大, 酶量其次, 温度的影响最小, 且 3 个因素之间存在显著的交互作用, 其对酶解提油效果的影响如图 7、8、9。用计算机对方程(3-1)在试验范围内提取最佳方案, 得: $X_1 = -0.4066$; $X_2 = -0.0599$; $X_3 = -0.0300$, 即 pH7.3、酶量 990 u/g 原料、

44.8°C, 此条件下理论提油率为 79.38%。为便于实验操作, 选确定 pH7.3、酶量为 1000 u/g 原料、45°C。此条件下进行两次平行实验, 平均提油率为 78.66%。

表 2 各因素、水平及影响结果

Table 2 Effects of each factor, level on the fish oil extraction

Factors		Level		
Code	Parameter	High(+1)	Low(-1)	P
A	L/S	8	6	0.550
B	pH	7.5	6	0.013
C	Blank	-	-	0.109
D	Time(min)	90	60	0.175
E	Enzymatic quantity(u/g material)	1000	800	0.076
F	Blank	-	-	0.146
G	Stirring speed(r/min)	200	150	0.537
H	Temperature(°C)	45	35	0.065
I	Blank	-	-	0.983

表 3 响应面三因素三水平实验设计

Table 3 The experimental design of 3 factors and 3 levels of response surface method

Factor	Level			
	+1	0	-1	
X_1	pH	8.0	7.5	7.0
X_2	Enzymatic quantity(u/g material)	1200	1000	800
X_3	Temperature(°C)	50	45	40

表 4 响应面分析实验及结果

Table 4 The experimental design and results of response surface method

No.	Factors			y%
	X_1	X_2	X_3	
1	0	0	0	78.33
2	0	1	1	58.08
3	0	-1	-1	62.44
4	1	1	0	50.64
5	1	0	-1	58.97
6	0	1	-1	57.31
7	0	-1	1	61.03
8	-1	-1	0	65.64
9	-1	0	1	69.62
10	1	-1	0	56.54
11	0	0	0	78.72
12	1	0	1	57.56
13	-1	0	-1	70.77
14	0	0	0	77.31
15	-1	1	0	64.62

回归方程为:

$$y=78.1200-5.8675X_1-1.8750X_2-0.4000X_3-7.1225X_1^2-11.6375X_2^2-6.7675X_3^2-1.2200X_1X_2-0.0650X_1X_3+0.5450X_2X_3(3-1)$$

表 5 回归分析结果
Table 5 Regression results

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	78.1200	0.3431	227.722	0.000
X ₁	-5.8675	0.2101	-27.931	0.000
X ₂	-1.8750	0.2101	-8.925	0.000
X ₃	-0.4000	0.2101	-1.904	0.115
X ₁ ²	-7.1225	0.3092	-23.034	0.000
X ₂ ²	-11.6375	0.3092	-37.635	0.000
X ₃ ²	-6.7675	0.3092	-21.886	0.000
X ₁ X ₂	-1.2200	0.2971	-4.106	0.009
X ₁ X ₃	-0.0650	0.2971	-0.219	0.835
X ₂ X ₃	0.5450	0.2971	1.834	0.126

表 6 回归分析结果
Table 6 Regression results

S	R-Sq	R-Sq (adj)
0.5942	99.8%	99.5%

表 7 方差分析结果
Table 7 Analysis of standard deviation

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	T	P
Regression	9	1066.05	1066.052	118.450	335.51	0.000
Linear	3	304.83	304.825	101.608	287.80	0.000
Square	3	754.07	754.068	251.356	711.96	0.000
Interaction	3	7.16	754.068	2.386	6.76	0.033
R- Error	5	1.77	7.159	0.353		
Lack-of-Fit	3	0.71	1.765	0.235	0.44	0.748
Pure Error	2	1.06	0.705	0.530		
Total	14	1067.82	1.060			

3.3 萃取单因素分析

选用确定的最优酶解条件制备酶解液体作为萃取分析原料,因其中含有大量经部分酶解的蛋白,为天然的表面活性剂,因此在加入有机溶剂进行萃取时会产生乳化形成O/W体系不利两相分离而影响提油率。参照植物油料酶法提油工艺分别研究萃取时间、溶剂用量、温度和萃取pH对提油率的影响。测定时,小带鱼鱼糜统一酶解后均分成若干份(每份相当于20g鱼糜原料)用于单因素实验,以减小实验误差。离心条件同上。

3.3.1 萃取时间对提油率的影响

如图 10,可见萃取时间对提油率的影响比较复杂,在5~15 min内鱼油的提率随时间的延长而增大,此后又略有降低,继续延长萃取时间提油率又增大。综合分析则萃取时间应15 min。

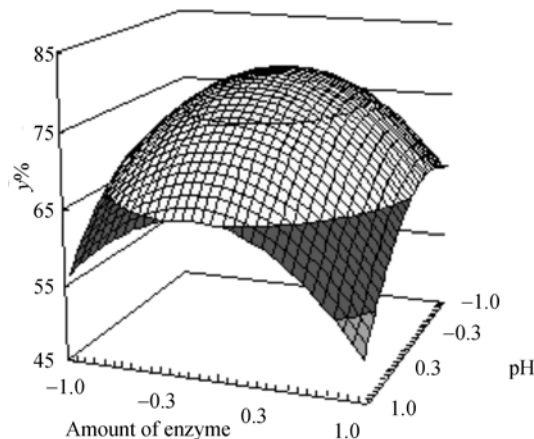


图 7 酶量和 pH 对提油率的响应面图
Fig. 7 Response surface graph of enzyme amount and pH versus oil extraction degree

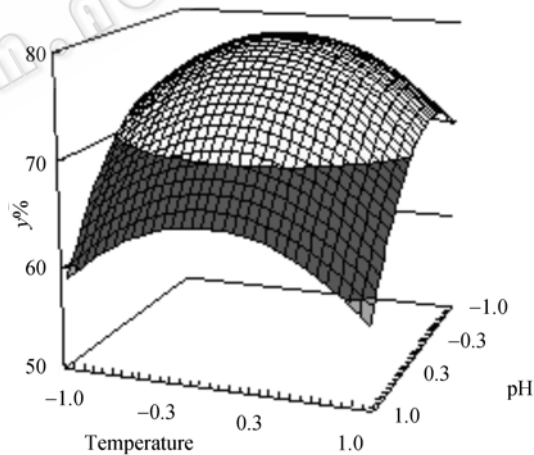


图 8 温度和 pH 对提油率的响应面图
Fig. 8 Response surface graph of temperature and pH versus oil extraction degree

3.3.2 溶剂用量对提油率的影响

如图 11,可见随萃取剂用量的加大,提油效果越好。但当萃取剂大于100 mL后提油率变化已不大。综合实验结果和经济需要则萃取剂用量应选75 mL。

3.3.3 萃取温度对提油率的影响

如图 12,可见随着温度的升高提油率先增加后减少,40°C时达到最高为78.97%。因此综合分析温度应选40°C。

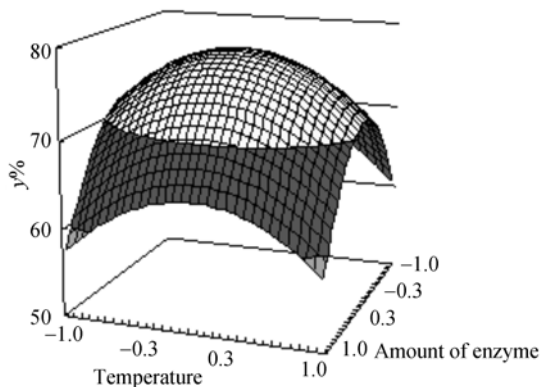


图 9 温度和酶量对提油率的响应面图

Fig. 9 Response surface graph of temperature and enzyme amount versus oil extraction degree

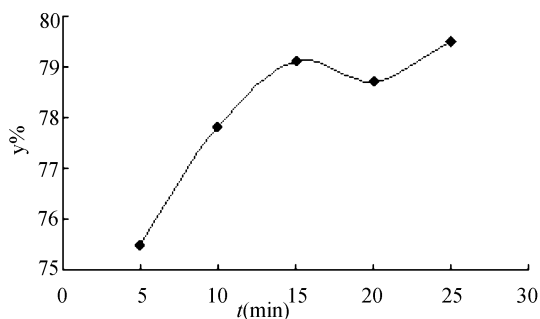


图 10 萃取时间对提油率的影响

Fig. 10 Effects of extraction time on rate of extraction fish oil (40°C, 50 mL extraction solution, pH7.5)

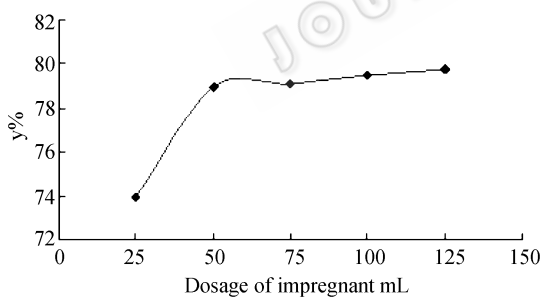


图 11 萃取溶剂量对提油率的影响

Fig. 11 Effects of impregnant dosage on rate of extraction fish oil (15 min, 40°C, pH7.5)

3.3.4 萃取 pH 对提油率的影响

如图 13, 可见提油效果在 pH4.0 时最好, 提油率高达 78.97%。过低或过高的 pH 对提油效果均不利。综合分析则萃取 pH4.0。按最佳萃取条件进行两次平行实验, 平均提油率为 79.81%。

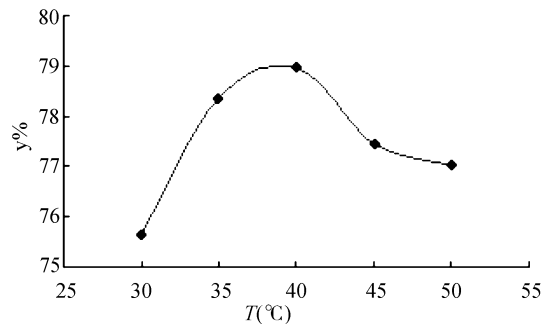


图 12 萃取温度对提油率的影响

Fig. 12 Effect of temperature on rate of extraction fish oil (75 mL Extraction solution, 15 min, pH7.5)

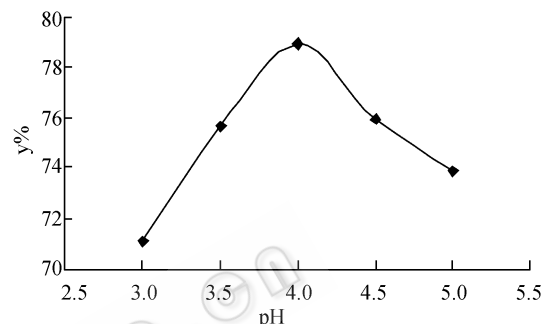


图 13 萃取 pH 对提油率的影响

Fig. 13 Effect of pH on rate of extraction fish oil (40°C, 75 mL extraction solution, 15 min)

3.4 离心条件对提油率的影响

小带鱼酶解液在加入有机溶剂萃取后, 由于乳化作用整个体系呈现乳胶状, 用静置倾析的方法无法进行有效的分离, 为此我们采用离心法, 这里本试验研究了离心分离速率和离心时间对提油效果的影响, 酶解条件、萃取条件均选择最优。

3.4.1 离心速率对提油率的影响

拟固定离心时间 10 min。如图 14, 可见增加离心速率对提油率有利, 但当离心速率大于 3000 r/min 后提油率变化很小, 从能耗角度考虑离心速率应选 3000 r/min, 为 1865 g。

3.4.2 离心时间对提油率的影响

由 3.4.1 确定离心速度 3000 r/min (1865 g)。如图 15, 可见随离心时间的延长提油率慢慢增大, 当离心时间大于 10 min 后对提高提油率作用不大, 从设备利用效率的角度考虑离心时间应选 10 min。

采用最佳酶解条件和最佳萃取条件、离心时间 10 min、离心速率 3000 r/min (1865 g) 做重复试验, 提油率为 79.90%。

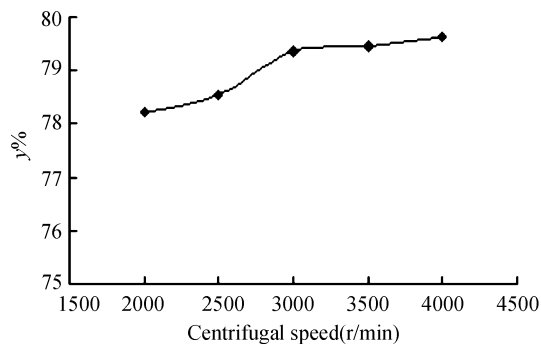


图 14 离心速率对提油率的影响

Fig. 14 Effects of centrifugal speed on rate of extraction fish oil (centrifuged for 10 min)

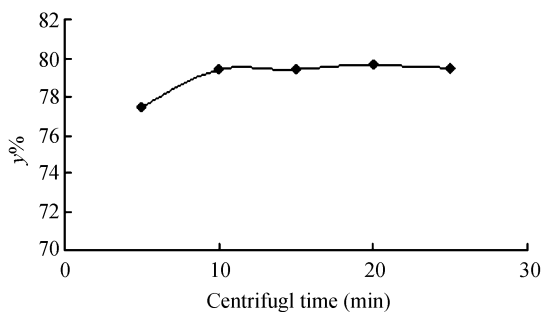


图 15 离心时间对提油率的影响

Fig. 15 Effect of centrifugal time on rate of extraction fish oil (Centrifugal speed: 3000 r/min)

4 讨论

本章研究了小带鱼加酶酶解提油工艺,可以得到以下结论:(1)该工艺在较低的温度下操作,最高温度不超过 60°C(真空回收有机溶剂时采用),条件温和,时间短,对鱼油的破坏小。(2)小带鱼经捣碎按工艺处理,在其最优酶解条件:L/S6、pH7.3、酶量 1000 u/g 原料、搅拌速度 200 r/min、45°C 酶解 90 min;最优萃取条件:萃取剂 100 mL(每 20 g 鱼糜原料)、pH4.0、40°C 萃取 25 min;离心条件:离心速度 3000 r/min (1865 g)、离心时间 10 min,提油率为 79.90%。

酶法提油技术以其温和的操作条件、产品质量高等优点得到人们的普遍重视,目前,国内外学者对植物油脂酶法提取已做了大量的研究工作,但对动物油料酶法提取却鲜有涉及。本课题的研究具有一定的新颖性和实用性,这种提油工艺改变了传统的鱼油提取工艺,在鱼油的活性成分保护上有较大改善。

REFERENCES

- [1] Wu SM. Functional Oil. Beijing: China Light Industry Press, 2004.
吴时敏. 功能性油脂. 北京: 中国轻工业出版社, 2004.
- [2] Wu BJ. The study progress of the relationship between various fatty acids and SCD. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1997, **18**(6): 317-320.
吴葆杰. 各种脂肪酸与冠心病猝死关系的研究进展. 中国生化药物杂志, 1997, **18**(6): 317-320.
- [3] Liu YJ, Sun MT, Zhang SQ, et al. Investigation on the effect of concentrated fish oil on experimental atherosclerosis and its mechanism. *Acta Nutrimenta Sinca*, 1994, **16**(1): 6-12.
刘玉军, 孙明堂, 张枢泉, 等. 浓缩鱼油对实验性动脉粥样硬化的影响及机理探讨. 营养学报, 1994, **16**(1): 6-12.
- [4] Herold PM, Kinsella JE. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials. *Am J Clin Nutr*, 1986, **43**: 566.
- [5] Tisdale MJ. The "cancer cachectic factor". *Support Care Cancer*, 2003, **11**(2): 73-78.
- [6] Chapkin RS, Hong MY, Fan YY, et al. Dietary n-3 PUFA alter colonocyte mitochondrial membrane composition and function. *Lipids*, 2002, **37**(2): 193-199.
- [7] Bradley MO, Stindell CS, Anthony FH, et al. Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel. *Control Release*, 2001, **74**(1-3): 233-236.
- [8] Tidow-Kebritchi S, Mobarhan S. Effects of diets containing fish oil and vitamin E on rheumatoid arthritis. *Nutr Rev*, 2001, **59**(10): B335-338.
- [9] Zhou DQ, Cui B, Hu M. Physiological function of fish oil and its exploitation. *Journal of Shandong Institute of Light Industry*, 1998, **12**(3): 56-60.
周东群, 崔波, 胡敏. 鱼油的保健功能与开发前. 山东轻工业学院学报, 1998, **12**(3): 56-60.
- [10] Chen WL. Progress of study on the biological transformation of DHA. *Guangzhou Food Science & Technology*, 1995, **11**(2): 18-24.
陈文麟. 脑黄金及其生物转化的研究进展. 广州食品工业科技, 1995, **11**(2): 18-24.
- [11] Robert H, Bower MD, Frank B, et al. Early enteral administration of a formula supplemented with arginine, nucleotides, and fish oil in intensive care unit patients: Results of a multicenter, prospective, randomized, clinical trial. *Crit Care Med*, 1995, **23**(3): B436-439.
- [12] Lu DQ, Chen J, Chen J, et al. Docosahexaenoic acid and its effects on brain. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology*, 1996, **17**(5): 10-15.
卢定强, 陈钧, 陈洁, 等. 二十二碳六烯酸和脑的健康. 江苏理工大学学报, 1996, **17**(5): 10-15.