

## 复合溶剂低温结晶法富集鱼油中的棕榈油酸

尹雪莲<sup>1</sup>, 郑飞洋<sup>1</sup>, 戴志远<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>浙江工商大学海洋食品研究院 杭州 310012

<sup>2</sup>浙江省水产品加工技术研究联合重点实验室 杭州 310012)

**摘要** 为探究鱼油来源单不饱和脂肪酸的富集工艺,本研究以鳀鱼油为原料,采用复合溶剂-低温结晶法提纯 POA。与单一溶剂相比,复合溶剂效果更佳。以 POA 含量及得率为指标,采用单因素实验对单一/复合溶剂种类、复合溶剂体积比、油溶比、结晶温度、结晶时间进行优化。确定最佳工艺条件为丙酮-乙腈体积比为 1:10,鱼油与溶剂质量比为 1:6,结晶温度为 -60℃,结晶时间为 6 h,得到的混合脂肪酸中 POA 含量为 (29.75±0.53)%。进一步进行放大试验,将得率提升至 50%左右,总不饱和脂肪酸含量达 79%以上。本研究为  $\omega$ -7 单不饱和脂肪酸的富集工艺提供了参考。

**关键词** 鳀鱼油; 复合溶剂; 低温结晶; 棕榈油酸

文章编号 1009-7848(2024)02-0151-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.02.014

棕榈油酸(C16:1,POA)属于  $\omega$ -7 系单不饱和脂肪酸,在酰基链的甲基端数第 7 个碳原子上有 1 个双键,属于中长链脂肪酸,难溶于水,易溶于乙醚、正己烷、甲醇等有机溶剂<sup>[1-2]</sup>。 $\omega$ -7 单不饱和脂肪酸作为近些年研究的热点,已被发现在食品、工业、医疗等方面具有广阔的前景<sup>[3]</sup>。POA 作为  $\omega$ -7 单不饱和脂肪酸的代表之一,其在人体健康方面的有益作用也被逐渐发掘。有试验表明,POA 对 2 型糖尿病(T2D)和动脉粥样硬化性心血管疾病具有一定功效<sup>[4]</sup>,其次,POA 还可以改善肥胖,调节黑色素生成,减少炎症因子,提高胰岛素敏感性,改善血脂异常,调节脂肪生成和调节全身代谢<sup>[5-8]</sup>,甚至在代谢的研究前提下被认为是代谢及健康的生物标志<sup>[9-10]</sup>。POA 可以抑制金黄色葡萄球菌、核梭状厌氧杆菌以及淋病奈瑟菌的活性,具有杀菌特性<sup>[11]</sup>。作为多不饱和脂肪酸的前体,研究还发现 POA 具有作为生物燃料的潜在可能性<sup>[12]</sup>。

人在日常饮食中获取的 POA 容易在吸收后被氧化,因此人体需要从外界主动获取 POA 来进行补充<sup>[13]</sup>。然而,POA 的来源比较稀缺<sup>[14]</sup>,最常见的分布为深海鱼油、澳洲坚果油、沙棘果油以及海洋植物,其中澳洲坚果油和沙棘果油中 POA 的含量较高,约为 19%~28%<sup>[15]</sup>。正因如此,我国研究人

员大多选用沙棘果油作为富集提纯 POA 的原料。然而,沙棘的种植受地理位置、气候和天气等多种自然条件限制,这些不确定因素也会影响油的质量。作为一种非商业化植物,沙棘主要用来固土防沙,以此来作为富集 POA 的原料经济成本太高,不是最佳选择<sup>[16]</sup>。我国是一个临海大国,渔业资源丰富,渔业副产物常用于提取油脂。因此,以深海鱼油为原料提纯 POA 或更具经济效益<sup>[17]</sup>。

棕榈油酸成本上涨,而市场需求在不断扩大。在天然来源中 POA 含量普遍较低,因此需要寻找更多的途径,从低成本的原料中富集 POA<sup>[18]</sup>。脂肪酸富集的常用方法有低温结晶、尿素包含、分子蒸馏、CO<sub>2</sub> 超临界萃取、酶法以及色谱法<sup>[19-21]</sup>。结晶分离的依据是不同的脂肪酸熔点不同,而油脂的黏度较高,导致最终分离效果不好,因此可在结晶过程中加入一定的有机溶剂,不同脂肪酸在溶剂中的溶解度不同,最终能实现较好地分离效果<sup>[22]</sup>。一般来说,脂肪酸在有机溶剂中的溶解度与链长和双键数目有关,链长越短,双键数目越多,溶解度越大<sup>[22]</sup>。与其它富集方法相比,低温结晶法所需溶剂量少,不论是时间成本还是经济成本都较低,非常适合用来进行 POA 的初步提纯。在整个反应体系中,溶剂种类、脂肪酸与溶剂的比例、结晶温度、结晶时间是影响富集效果最主要的因素。在以上基础上,本研究选用深海鱼油作原料,用低温结晶法富集 POA,并探究复合溶剂的作用以及最佳

收稿日期: 2023-02-18

第一作者: 尹雪莲,女,硕士生

通信作者: 戴志远 E-mail: dzy@zjgsu.edu.cn

工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鳕鱼油(乙酯型),浙江海力生集团有限公司;丙酮、甲醇、正己烷、无水乙醇均为分析纯级,国药试剂有限公司;无水硫酸钠、乙腈均为分析纯级,常青化工有限公司。

### 1.2 设备与仪器

7890B 气相色谱仪,美国 Agilent 公司;RE-3000 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;HH-2 恒温水浴锅,上海奥旗仪器设备有限公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;MS-H380-Pro 磁力搅拌器,浙江简然仪器设备有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 鱼油脂肪酸组分分析 每个样品鱼油定量为  $(50 \pm 1)$  mg, 分别取至 5 mL 具塞试管中, 加 2 mL 正己烷混匀, 加适量无水硫酸钠吸走残留水分, 取 1 mL 用 0.22  $\mu$ L 的有机滤膜过滤到样品瓶中, 进行气相色谱分析。

色谱条件: HP-88 毛细管色谱柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.2  $\mu$ m); 柱箱温度 70  $^{\circ}$ C, 前进样口温度 250  $^{\circ}$ C, 前检测器温度 220  $^{\circ}$ C; 进样量 1  $\mu$ L; 尾吹气为高纯氮气, 燃气为高纯氢气, 助燃气为空气。初始温度为 70  $^{\circ}$ C, 以 4  $^{\circ}$ C/min 升至 220  $^{\circ}$ C, 稳定 20~30 min。

1.3.2 低温结晶富集 取一定量的鱼油与溶剂, 室温下搅拌 10 min 使其混合均匀, 再将其置于特定温度下进行结晶, 一段时间后取出立即在低温下完成抽滤使两相分离, 非结晶相 50  $^{\circ}$ C 下真空旋蒸去除溶剂, 将得到的脂肪酸用 85  $^{\circ}$ C 以上的热水多次冲洗至下层澄清。

#### 1.3.3 计算 POA 的得率

$$Y_{\text{POA}}(\%) = \frac{m \times C_{\text{POA}}}{m_0 \times C_{0\text{POA}}} \times 100 \quad (1)$$

式中,  $Y_{\text{POA}}$ ——POA 得率, %;  $m$ ——结晶完成后得到的脂肪酸质量, g;  $C_{\text{POA}}$ ——结晶完成后所得到的脂肪酸中 POA 的含量, %;  $m_0$ ——初始鱼油质量, g;  $C_{0\text{POA}}$ ——原料鱼油中 POA 的含量, %。

## 2 结果与分析

### 2.1 原油中的主要脂肪酸及含量

表 1 原油的主要脂肪酸组成

Table 1 The main fatty acid composition of crude oil

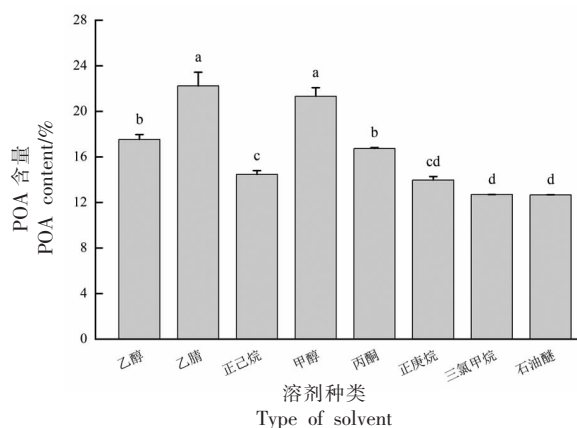
脂肪酸	中文名称	含量/%
C14:0	肉豆蔻酸	20.02 $\pm$ 0.04
C14:1	十四碳烯酸	1.41 $\pm$ 0.01
C15:0	十五碳酸	2.06 $\pm$ 0.00
C16:0	棕榈酸	34.75 $\pm$ 0.04
C16:1	棕榈油酸	12.97 $\pm$ 0.07
C17:0	十七烷酸	2.06 $\pm$ 0.01
C17:1	十七碳烯酸	1.58 $\pm$ 0.01
C18:1 <i>trans</i>	反式油酸	2.39 $\pm$ 0.06
C18:1 <i>cis</i>	顺式油酸	14.34 $\pm$ 0.05
C18:2	亚油酸	1.15 $\pm$ 0.11
C20:1	二十碳烯酸	2.30 $\pm$ 0.00
C20:4	花生四烯酸	1.48 $\pm$ 0.00

由表 1 可以看出, 原油中饱和脂肪酸的含量偏高, 其中肉豆蔻酸(C14:0)和棕榈酸(C16:0)的含量超过了 POA, 分别为  $(20.02 \pm 0.04)\%$  和  $(34.74 \pm 0.04)\%$ 。气相色谱法分析脂肪酸含量, 饱和脂肪酸总含量为 61.80%, 不饱和脂肪酸总含量为 38.20%。一般来说, 单不饱和脂肪酸(MUFA)和多不饱和脂肪酸(PUFA)比饱和脂肪酸(SFA)的极性大, 因此溶解度也更高<sup>[23]</sup>。在低温条件下, 饱和脂肪酸会因不能溶解在有机溶剂中而被结晶出来, 所以用低温结晶法来富集 POA 是可行的。

### 2.2 低温结晶法富集鱼油中的 POA

2.2.1 溶剂种类对富集效果的影响 郑飞洋等<sup>[24]</sup>在不加任何有机溶剂的条件下对鱼油进行低温结晶, 结果发现在低温状态下鱼油几乎全部凝结为固态, 后续难以实现固相和液相的分离, 这证明了低温结晶过程中添加有机溶剂的必要性。溶剂的选择需要考虑溶剂的极性和要富集的目标脂肪酸的极性。根据团队前期研究及理论基础<sup>[24]</sup>, 最终选取了乙醇、乙腈、正己烷、甲醇、丙酮、正庚烷、三氯甲烷、石油醚这 8 种最常用的和可能有用的有机溶剂, 首先进行了单一溶剂种类对富集效果的影响(图 1)。加入溶剂与鱼油的质量比为 1:4, 结晶温度为 -20  $^{\circ}$ C, 结晶时间为 3 h。

由图 1 可以看出,添加乙腈、甲醇、乙醇、丙酮之后 POA 的含量提升较明显,含量分别为 $(21.78 \pm 1.20)\%$ , $(21.64 \pm 0.76)\%$ , $(17.83 \pm 0.44)\%$ , $(16.73 \pm 0.09)\%$ ,这与 Zhang 等<sup>[25]</sup>和 Japir 等<sup>[23]</sup>的研究结果类似。三氯甲烷、正庚烷以及石油醚的效果不明显,不考虑将其作为复合溶剂种类筛选的对象。在许多富集不饱和脂肪酸的研究中,正己烷是一种良好的溶剂,而在本研究中并未达到理想的效果,在加入正己烷之后 POA 的含量仅为 $(14.26 \pm 0.31)\%$ ,这可能是因为正己烷的极性过小,不能很好地将鱼油中的饱和脂肪酸分离出来<sup>[26]</sup>。试验中乙腈和甲醇的富集效果最好,这在以甲醇为溶剂分离饱和脂肪酸的研究中可以找到原因<sup>[27]</sup>,原料油中饱和脂肪酸棕榈酸(C16:0)的含量较高,而高饱和脂肪酸在甲醇这类溶剂中的可溶性比相应的



注:不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

图 1 不同溶剂对 POA 含量的影响

Fig.1 Effect of different solvents on POA content

将溶剂换成复合溶剂之后,POA 的含量均发生了变化,总体表现为上升趋势,其中丙酮-乙腈组、丙酮-乙醇组 POA 含量分别达到了 $(23.84 \pm 2.22)\%$ 和 $(18.06 \pm 0.19)\%$ ,比 2.2.1 节中作为单一溶剂加入时分别增长了 2.06%和 0.23%。丙酮-甲醇组虽然最终得到的 POA 含量也较高【 $(20.81 \pm 0.95)\%$ 】,但与作为单一溶剂时的效果差距不明显,复合溶剂的作用没有表现出来。虽然丙酮-正己烷组的得率最高,其含量明显低于其它 3 组,这可能与本研究中所要分离的脂肪酸种类有关。综合两组结果可知,复合溶剂的富集效果更好,并且

不饱和脂肪酸低得多,因此在低温条件下可形成结晶从而被分离出来,从而实现最终 POA 含量的升高。

2.2.2 复合溶剂对富集效果的影响 在第一步溶剂的筛选之后,选出了效果比较明显的乙醇、甲醇、丙酮、乙腈、正己烷 5 种溶剂来进一步研究复合溶剂对富集效果的影响,最终结果与单一溶剂进行比较。在这 5 种溶剂中,丙酮虽常作为低温结晶的溶剂,但其富集消耗的时间较长,导致富集效率低<sup>[28]</sup>,并且在上一步中丙酮的富集效果处于中级水平,因此选用丙酮来进行溶剂的混合,其它 4 种作为变量考察。在鱼油与溶剂质量比为 1:4,结晶温度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,结晶时间为 3 h 条件下,丙酮与不同溶剂(乙醇、乙腈、正己烷、甲醇)按体积比 1:4 混合,最终 POA 的含量及得率如图 2 所示。

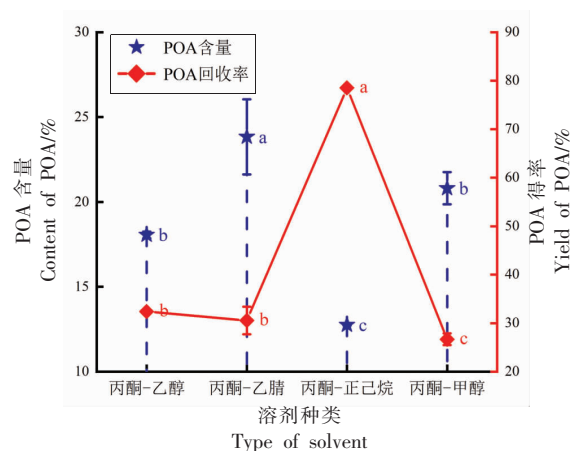


图 2 复合溶剂对 POA 含量和得率的影响

Fig.2 Effects of compound solvents on POA content and yield

复合溶剂还可降低经济成本。如雍梁敏等<sup>[29]</sup>曾用丙酮-乙腈来富集橡胶籽油中的 $\alpha$ -亚麻酸,使其含量提高了 15.20%。试验最终选择丙酮与乙腈复配来进行后续操作,而从图 2 可以看出丙酮-乙腈组的得率较低,仅为 $(30.56 \pm 2.84)\%$ ,因此还需对复合溶剂的富集工艺进一步优化。

2.2.3 复合溶剂的体积比对富集效果的影响 溶剂的体积比是影响富集的重要因素。两种溶剂比例的改变会改变复合溶剂的极性,当二者处在一个合适的体积比时,会形成一种亚稳溶液,有利于晶体的形成<sup>[30]</sup>。在鱼油-溶剂质量比为 1:4,结晶温

度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,结晶时间为3 h的条件下,选择乙腈与丙酮混合,考察了丙酮与乙腈体积比为1:4,1:6,1:8,1:10,1:12 5种比例对POA富集含量及得率的影响(图3)。由图3可以看出当丙酮与乙腈体积比为1:12时,POA的含量及得率均最低,分别为 $(23.24\pm 0.14)\%$ , $(23.84\pm 0.14)\%$ 。当丙酮与乙腈体积比为1:4,1:6,1:8时,三者得到的POA含量无显著差异( $P>0.05$ ),分别为 $(24.61\pm 1.07)\%$ , $(24.83\pm 0.78)\%$ , $(24.97\pm 1.59)\%$ 。然而,这3组的得率却随乙腈体积占比的增大而下降,分别为 $(37.86\pm 1.65)\%$ , $(31.83\pm 0.99)\%$ , $(32.02\pm 2.03)\%$ 。原因可能是丙酮在混合溶剂中的比重增加导致溶剂总体的极性下降,一些目标物之外的其它脂肪酸也溶解到混合体系中,最终非结晶相收集到的油重增加,再结合式(1)计算,导致添加丙酮的比例最大时其得率高于其它组。图3可以明显看出,当丙酮与乙腈体积比为1:10时,不管是POA的含量还是得率都显著优于其它组,分别为 $(26.45\pm 0.32)\%$ , $(33.91\pm 0.41)\%$ 。相比原油,POA的含量共增加了13.48%,并且得率也比使用单一溶剂丙酮时的20%的高得多<sup>[31]</sup>。因此选择丙酮与乙腈体积比1:10来进行后续研究。

**2.2.4 鱼油-溶剂质量比对富集效果的影响** 鱼油与溶剂的质量比是影响体系平衡的重要因素。鱼油质量占比增加会导致混合液的黏度增大,导

致部分不饱和脂肪酸留在晶体空穴内,无法实现更好的分离<sup>[32]</sup>;若溶剂质量占比过大,不仅会溶解部分饱和脂肪酸,还导致溶剂的浪费,后续回收也会更加困难<sup>[33]</sup>。因此需要确定合适的鱼油-溶剂质量比进行富集。首先将鱼油与溶剂质量比设为1:2,1:4,1:6,1:8,1:10,丙酮与乙腈体积比为1:10,结晶温度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,结晶时间为3 h,最终得到的POA含量及得率如图4所示。在鱼油-溶剂质量比从1:2降至1:10的过程中,POA含量呈先上升后下降的趋势,而得率则是不断升高。当鱼油-溶剂质量比为1:2时,不管是含量还是得率均为最低,分别为 $(23.47\pm 0.36)\%$ , $(12.04\pm 0.19)\%$ 。原因为此时油溶比过高,溶液处于过饱和状态,虽然这有利于晶体的形成,但也导致非结晶相丢失了大量的不饱和脂肪酸<sup>[30]</sup>。当鱼油-溶剂质量比小于1:6时,POA含量下降速率变缓,鱼油-溶剂质量比为1:8和1:10时POA的含量分别为 $(26.00\pm 0.42)\%$ , $(25.46\pm 0.70)\%$ 。然而,当鱼油-溶剂质量比为1:6时,POA的含量最高,为 $(26.45\pm 0.18)\%$ ,此时的得率为 $(54.26\pm 0.37)\%$ 。尽管鱼油-溶剂质量比降低对POA得率提高的效果明显,但溶剂比例太大会造成溶剂的大量消耗,不适用于大量富集。因此综合考虑,以含量指标为第一要素选择鱼油-溶剂质量比为1:6进行后续研究。

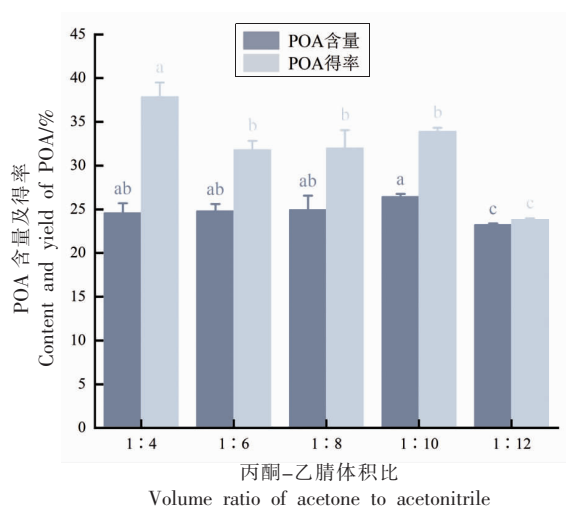


图3 丙酮-乙腈体积比对POA含量及得率的影响

Fig.3 Influence of volume ratio of acetone to acetonitrile on POA content and yield

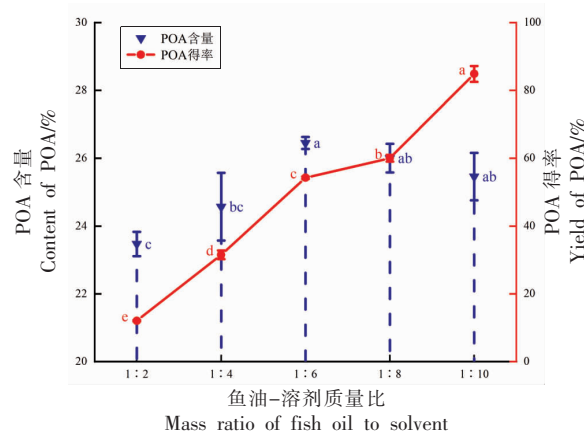


图4 鱼油-溶剂质量比对POA含量及得率的影响

Fig.4 Influence of mass ratio of fish oil to solvent on POA content and yield

2.2.5 结晶温度对富集效果的影响 温度关系着晶体的生长,是低温结晶过程中的重要参数之一。一般来说,在其它条件不变的情况下,温度越低,饱和脂肪酸形成结晶的趋势越强<sup>[34]</sup>。当溶液处于较低温度时,体系黏度较小,有利于分子扩散,同时也增加了分子附着到生长晶体表面的可能性<sup>[35]</sup>。本研究在丙酮-乙腈体积比为 1:10、鱼油-溶剂质量比为 1:6 的条件下,依次将样品放在-5, -20, -30, -40, -60 ℃以及-80 ℃温度下冻结结晶 3 h,考察结晶温度对 POA 含量和得率的影响。如图 5 所示,除-5 ℃外,其它 5 组的 POA 含量没有过于明显的变化。当结晶温度为-5 ℃时,POA 的含量最低,此时得率最高,含量与得率分别为(21.52±1.39)%,(60.68±3.91)%。这是由于结晶温度过高,不能使饱和脂肪酸完全结晶,部分饱和脂肪酸在抽滤分离时被带入非结晶相,导致最终检测的 POA 含量降低。随着结晶温度的降低,其它 5 组的 POA 含量分别为(26.46±0.93)%,(26.97±0.42)%,(27.92±0.20)%,(28.67±0.37)%以及(27.66±0.54)% ,得率分别为(41.49±1.67)%,(48.41±0.75)%,(42.95±0.31)%,(22.05±0.28)%以及(21.28±0.42)%。其中当结晶温度为-60 ℃时,POA 的含量虽最高,但其得率却很低,并且当温度再次降低时,得率也再次下降。原因可能是过低的温度使结晶产生量增大,而结晶为固态,本身具有很高的黏度,导致抽滤分离时一部分滤液被与结

晶无法分离,最终导致收集到的滤液过少,从而得率降低。虽然-20,-30 ℃以及-40 ℃时 POA 的得率较高,但非结晶相饱和脂肪酸的去除并不彻底。考虑到-60 ℃条件下得率的降低可能跟鱼油的添加量有关,后续做了放大试验来改善这一点,因此,选择结晶温度为-60 ℃继续研究。

2.2.6 结晶时间对富集效果的影响 考察了 3, 6, 9, 12, 15 h 这 5 个不同时间对富集效果的影响,其中鱼油-溶剂质量比为 1:6,丙酮-乙腈体积比为 1:10,结晶温度为-60 ℃。由图 6 可以看出,结晶时间的变化对 POA 含量的影响没有其它因素明显。当结晶时间为 3 h 时,POA 得率显著高于其它组,而此时 POA 含量最低,含量与得率分别为(28.67±0.42)%及(22.05±0.32)%。当结晶时间过短,溶液难以达到平衡状态,会导致结晶不能完全析出,也因此最终得到的滤液量较多,这也是 3 h 条件下 POA 得率最高的原因,而这会影响 POA 的含量,因此后续不将 3 h 作为最优条件考虑。结晶过程分为晶核的形成和晶体的生长 2 个阶段,晶核形成之后,晶体则开始生长,而晶体的生长需要一定的时间,若结晶时间过短则系统很难达到平衡,若结晶时间过长则会导致不饱和脂肪酸也形成结晶<sup>[36]</sup>。当结晶时间≥6 h 时,POA 得率虽稍有下降,但含量无明显变化,原因可能是随着结晶时间的增加,溶剂也发生了部分冻结,由于其包裹了部分不饱和脂肪酸,造成了滤液的损耗,导致得

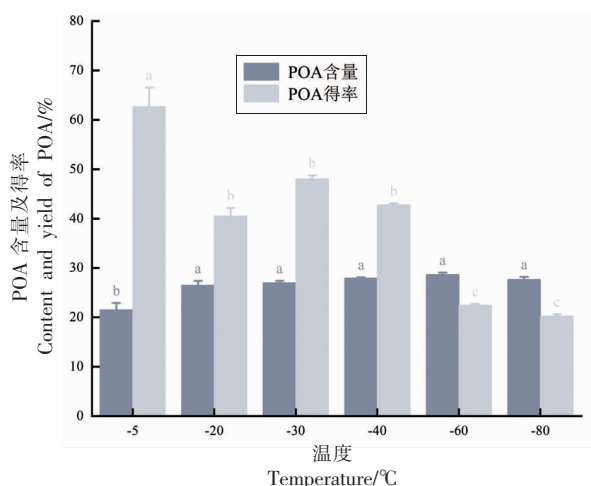


图 5 结晶温度对 POA 含量及得率的影响

Fig.5 Influence of crystallization temperature on POA content and yield

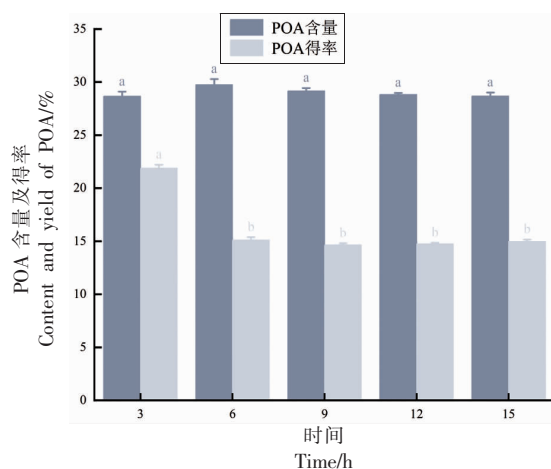


图 6 结晶时间对 POA 含量及得率的影响

Fig.6 Influence of crystallization time on POA content and yield

率下降。当结晶时间为6 h时,POA的含量最高,为(29.75±0.53)%,此时得率为(15.26±0.27)%。当结晶时间为9 h,12 h和15 h时,得率略有下降,分别为(14.95±0.14)%,(14.77±0.09)%,(14.71±0.17)%。综合考虑,最终选择结晶时间为6 h。

### 2.3 放大试验

为提高低温结晶的整体得率,在得出最优条件参数后进行了放大试验,即丙酮-乙腈体积比为1:10,鱼油-溶剂质量比为1:6,结晶温度为-60℃,结晶时间为6 h。分别将鱼油添加量调整至原来的7倍和17倍,最终得到的主要脂肪酸含量如表2所示。可以看出,原油中含量较高的C14:0和C16:0在低温结晶和放大试验后含量下降到了很

低的水平,这2种饱和脂肪酸已形成结晶与不饱和脂肪酸分离。同样含有一个双键的C18:1含量也有所上升,其存在限制了POA含量的进一步增长,这是因为当2种脂肪酸双键数目接近时,低温结晶很难将二者分离<sup>[7]</sup>,可结合其它分离方法提高POA的含量。由表可以看出,放大试验并没有对POA的含量造成太大影响,并且POA的得率大大提升。当鱼油添加量分别增加7倍和17倍时,POA得率分别为(49.73±3.91)%和(53.66±5.99)%。这是因为试验过程中大量脂肪酸附着在容器内壁上,造成了不可避免的损耗,而添加量的增大使损耗率大大降低。因此,此工艺对于富集POA是可行的。

表2 低温结晶、放大试验与原油的主要脂肪酸含量对比(%)

Table 2 The content of main fatty acids in crude oil and the oil after low-temperature crystallization and scale up experiments (%)

脂肪酸	原油	低温结晶	放大7倍	放大17倍
C12:0	0.74 ± 0.00 <sup>c</sup>	1.80 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.12 <sup>a</sup>
C13:0	0.39 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.04 <sup>a</sup>
C14:0	20.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	8.40 ± 0.84 <sup>d</sup>	9.84 ± 0.62 <sup>b</sup>	9.10 ± 3.50 <sup>c</sup>
C14:1	1.41 ± 0.01 <sup>d</sup>	2.83 ± 0.22 <sup>b</sup>	2.70 ± 0.05 <sup>c</sup>	2.84 ± 0.28 <sup>a</sup>
C15:0	2.06 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.18 <sup>d</sup>	0.52 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.31 <sup>c</sup>
C16:0	34.75 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.18 <sup>d</sup>	1.43 ± 0.30 <sup>b</sup>	1.12 ± 0.60 <sup>c</sup>
C16:1	12.97 ± 0.07 <sup>d</sup>	29.71 ± 0.69 <sup>a</sup>	29.38 ± 0.31 <sup>c</sup>	29.34 ± 1.11 <sup>b</sup>
C17:0	2.06 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.42 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.14 <sup>b</sup>
C17:1	1.58 ± 0.01 <sup>d</sup>	3.55 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.37 ± 0.06 <sup>c</sup>	3.40 ± 0.27 <sup>b</sup>
C18:0	0.74 ± 0.01 <sup>d</sup>	3.72 ± 0.28 <sup>a</sup>	3.48 ± 0.11 <sup>c</sup>	3.50 ± 0.45 <sup>b</sup>
C18:1	16.73 ± 0.06 <sup>d</sup>	24.80 ± 0.37 <sup>a</sup>	23.99 ± 1.13 <sup>c</sup>	24.67 ± 0.28 <sup>b</sup>
C18:2 <i>trans</i>	—	0.23 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>a</sup>
C18:2 <i>cis</i>	1.15 ± 0.11 <sup>d</sup>	3.29 ± 0.63 <sup>c</sup>	3.57 ± 0.21 <sup>b</sup>	3.74 ± 0.35 <sup>a</sup>
C18:3 n6	—	2.49 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.05 <sup>c</sup>	2.40 ± 0.25 <sup>b</sup>
C20:1	2.30 ± 0.00 <sup>d</sup>	7.84 ± 0.76 <sup>a</sup>	7.53 ± 0.13 <sup>b</sup>	7.45 ± 1.00 <sup>c</sup>
C20:4	1.48 ± 0.00 <sup>d</sup>	4.94 ± 0.33 <sup>a</sup>	4.69 ± 0.12 <sup>c</sup>	4.70 ± 0.52 <sup>b</sup>

注:同行不同上标字母表示差异显著( $P < 0.05$ );“—”表示未检出。

### 3 结论

本研究用低温结晶法富集鳕鱼油中的POA,在单一溶剂的基础上增加了复合溶剂的筛选,证明了复合溶剂的效果高于单一溶剂。最终确定了丙酮与乙腈以体积比1:10混合,鱼油-溶剂质量比为1:6,结晶温度为-60℃,结晶时间为6 h的最优工艺条件。最终得到了POA含量为(29.75±0.53)%的混合脂肪酸,得率为(15.26±0.27)%。在

此基础上进行了放大试验,在不影响POA含量的前提下将其得率提升至50%左右,鱼油的总不饱和脂肪酸含量达79%以上,提示低温结晶法可有效富集POA,而其对于同样含有一个双键的其它不饱和脂肪酸不能实现有效地分离,在后续的研究中可结合其它分离方法进一步提高POA的含量。

## 参 考 文 献

- [1] LIU B L, SUN Y, XUE J A, et al. Stearoyl-ACP delta (9) desaturase 6 and 8 (GhA-SAD6 and GhD-SAD8) are responsible for biosynthesis of palmitoleic acid specifically in developing endosperm of upland cotton seeds[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 703.
- [2] 刘平. 棕榈油酸功能的研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(3): 4-6.  
LIU P. Research progress on the functional of palmitoleic acid[J]. *Cereals & Oils*, 2020, 33(3): 4-6.
- [3] LIU B L, SUN Y, HANG W, et al. Characterization of a novel Acyl-ACP delta (9) desaturase gene responsible for palmitoleic acid accumulation in a diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 584589.
- [4] ROSTOFF P, FRACZEK-JUCHA M, KONDURACKA E, et al. Serum phospholipid cis-palmitoleic acid in patients with type 2 diabetes and chronic coronary syndrome[J]. *Kardiologia Polska*, 2020, 78(6): 584-587.
- [5] CRUZ M M, LOPES A B, CRISMA A R, et al. Palmitoleic acid (16:1 n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2018, 17(1): 1-12.
- [6] SOUZA C O, TEIXEIRA A A S, BIONDO L A, et al. Palmitoleic acid reduces the inflammation in LPS-stimulated macrophages by inhibition of NF- $\kappa$ B, independently of PPARs[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2017, 44(5): 566-575.
- [7] TSAI Y W, LU C H, CHANG R C A, et al. Palmitoleic acid ameliorates palmitic acid-induced proinflammation in J774A. 1 macrophages via TLR4-dependent and TNF- $\alpha$ -independent signalling[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2021, 169: 102270.
- [8] YANG Z H, PRYOR M, NOGUCHI A, et al. Dietary palmitoleic acid attenuates atherosclerosis progression and hyperlipidemia in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(12): 1900120.
- [9] WEIR N L, STEFFEN B T, GUAN W, et al. Circulating omega-7 fatty acids are differentially related to metabolic dysfunction and incident type II diabetes: The multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA)[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2020, 46(4): 319-325.
- [10] GUILLOCHEAU E, PENHOAT C, DROUIN G, et al. Current intakes of trans-palmitoleic (*trans*-C16:1 n-7) and trans-vaccenic (*trans*-C18:1 n-7) acids in France are exclusively ensured by ruminant milk and ruminant meat: A market basket investigation[J]. *Food Chemistry: X*, 2020, 5: 100081.
- [11] YAMAMOTO Y, KAWAMURA Y, YAMAZAKI Y, et al. Palmitoleic acid calcium salt: A lubricant and bactericidal powder from natural lipids[J]. *Journal of Oleo Science*, 2015, 64(3): 283-288.
- [12] CHEN G, CHEN J, HE Q, et al. Functional expression of the *Arachis hypogaea* L. Acyl-ACP thioesterases AhFatA and AhFatB enhances fatty acid production in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Energies*, 2017, 10(12): 2093.
- [13] ZONG G, YE X, SUN L, et al. Associations of erythrocyte palmitoleic acid with adipokines, inflammatory markers, and the metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, 96(5): 970-976.
- [14] ZHOU W, WANG H, ZHENG L, et al. Comparison of lipid and palmitoleic acid induction of *Triptonema minus* under heterotrophic and phototrophic regimes by using high-density fermented seeds [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18): 4356.
- [15] DUCKETT S K, VOLPI-LAGRECA G, ALENDE M, et al. Palmitoleic acid reduces intramuscular lipid and restores insulin sensitivity in obese sheep [J]. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 2014, 7: 553-563.
- [16] HOONDEE P, PRANIMIT R, TANASUPAWAT S, et al. Evaluation of sugarcane leaves as a substrate for production of palmitoleic acid using *Cyberlindnera subsufficiens* NG8. 2 [J]. *BioResources*, 2021, 16(2): 2472.
- [17] 曹亚伦. 鱼油中棕榈油酸的富集及降血糖活性的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.  
CAO Y L. Enrichment of palmitoleic acid from fish

- oil and its hyperglycemic activities in db/db mice [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [18] NGUYEN H T, PARK H, KOSTER K L, et al. Redirection of metabolic flux for high levels of omega - 7 monounsaturated fatty acid accumulation in camelina seeds [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(1): 38-50.
- [19] LEI Q, BA S, ZHANG H, et al. Enrichment of omega-3 fatty acids in cod liver oil via alternate solvent winterization and enzymatic interesterification [J]. *Food Chemistry*, 2016, 199: 364-371.
- [20] MAGALLANES L M, TARDITTO L V, GROSSO N R, et al. Highly concentrated omega - 3 fatty acid ethyl esters by urea complexation and molecular distillation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(2): 877-884.
- [21] WANG X S, WANG X H, CHEN Y, et al. Enrichment of branched chain fatty acids from lanolin via urea complexation for infant formula use [J]. *LWT*, 2020, 117: 108627.
- [22] 姚静雯. 不饱和脂肪酸的分离纯化[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
- YAO J W. Separation and purification of unsaturated fatty acids [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019.
- [23] JAPIR A A W, SALIMON J, DERAWI D, et al. A highly efficient separation and physicochemical characteristics of saturated fatty acids from crude palm oil fatty acids mixture using methanol crystallisation method[J]. *OCL*, 2018, 25(2): A203.
- [24] 郑飞洋, 戴志远, 崔益玮, 等. 金枪鱼油精制及低温结晶法富集甘油三酯型 EPA、DHA[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(3): 147-158.
- ZHENG F Y, DAI Z Y, CUI Y W, et al. Refinement of tuna oil and enrichment of EPA and DHA as triacylglycerols by low temperature crystallization [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(3): 147-158.
- [25] ZHANG Y, WANG X, XIE D, et al. One - step concentration of highly unsaturated fatty acids from tuna oil by low - temperature crystallization[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2017, 94(3): 475-483.
- [26] VÁZQUEZ L, AKOH C C. Enrichment of stearidonic acid in modified soybean oil by low temperature crystallisation [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130 (1): 147-155.
- [27] JAPIR A A W, SALIMON J, DERAWI D, et al. Optimization of methanol crystallization for highly efficient separation of palmitic acid from palm fatty acid mixture using response surface methodology [J]. *Grasas y Aceites*, 2017, 68(4): e224-e224.
- [28] 张瑜. DHA 和 2-DHA-单甘酯的制备纯化及调节 HepG2 细胞脂质代谢的比较研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- ZHANG Y. Preparation and purification of DHA and 2 -DHA -MAG and their regulation of lipid metabolism in HepG2 cells[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [29] 雍梁敏, 王丽蓉, 刘石生. 双溶剂冷冻结晶法分离橡胶籽油中  $\alpha$ -亚麻酸工艺研究[J]. *食品科技*, 2014, 39(7): 233-237.
- YONG L M, WANG L R, LIU S S. Separation process of  $\alpha$ -linolenic acid from rubber seed oil by double solvent freezing crystallization [J]. *Food Science and Technology*, 2014, 39(7): 233-237.
- [30] VÁZQUEZ L, AKOH C C. Enrichment of stearidonic acid in modified soybean oil by low temperature crystallisation [J]. *Food Chemistry*, 2012, 130 (1): 147-155.
- [31] GUTIÉRREZ L F, BELKACEMI K. Palmitoleic acid enrichment of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) pulp oil by crystallization process [J]. *Separation Science and Technology*, 2008, 43(8): 2003-2022.
- [32] 罗庆华, 王寒, 王苗苗, 等. 大鲵油不饱和和脂肪酸的富集研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(10): 34-38.
- LUO Q H, WANG H, WANG M M, et al. Enrichment of unsaturated fatty acids from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) oil [J]. *China Oils and Fats*, 2016, 41(10): 34-38.
- [33] 罗庆华, 宋英杰, 王海磊, 等. 低温结晶法富集鳃鱼内脏油中多不饱和脂肪酸[J]. *中国油脂*, 2015, 40(10): 36-39.
- LUO Q H, SONG Y J, WANG H L, et al. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from Yellow cheek carp (*Elopichthys bambusa*) viscera oil by low temperature crystallization [J]. *China Oils and Fats*, 2015, 40(10): 36-39.
- [34] 张亚策. 大豆油脚混合脂肪酸的分离工艺研究[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- ZHANG Y C. Research on the separation technology



- of fatty acid produced by soybean oil foots[D]. Tianjin: Tianjin University, 2017.
- [35] MU H, ZHANG H, LI Y, et al. Enrichment of DPAn-6 and DHA from *Schizochytrium* sp. oil by low-temperature solvent crystallization[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2016, 55 (3): 737-746.
- [36] 陈娜. 金枪鱼油精制及鱼油挥发性成分分析研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2016.
- CHEN N. Preparation and analysis of the volatile components of tuna oil[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2016.
- [37] 慕鸿雁. DPA 的富集分离及体外抗炎活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- MU H Y. Enrichment and separation of DPA and the *in vitro* anti-inflammatory effects [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.

### Enrichment of Palmitoleic Acid in Fish Oil by Compound Solvent Low Temperature Crystallization

Yin Xuelian<sup>1</sup>, Zheng Feiyang<sup>1</sup>, Dai Zhiyuan<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012

<sup>2</sup>Key Laboratory of Aquatic Products Processing of Zhejiang Province, Hangzhou 310012)

**Abstract** To explore the enrichment process of monounsaturated fatty acids from fish oil, this study used anchovy oil as raw material and purified POA using a composite solvent low-temperature crystallization method. Compared to a single solvent, composite solvents exhibited superior performance. In order to optimize the process, single-factor experiments were conducted, considering the type and volume ratio of the solvents, massratio of fish oil to solvent, crystallization temperature, and crystallization time, with POA content and yield as indicators. The optimal process conditions were determined as a volume ratio of acetone to acetonitrile of 1:10, a mass ratio of fish oil to solvent of 1:6, a crystallization temperature of  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a crystallization time of 6 h, and the POA content was analyzed as  $(29.75\pm 0.53)\%$  in the obtained mixed fatty acids. Further scaling up experiments were conducted to increase the yield to around 50%, with a total unsaturated fatty acid content of over 79%. This serves as a valuable reference for the enrichment process of  $\omega$ -7 monounsaturated fatty acids.

**Keywords** anchovy oil; compound solvent; low temperature crystallization; palmitoleic acid