

文章编号: 1004 - 7271(2008)01 - 0104 - 05

## 鲫鱼卵中脂质提取方法的比较

陆丽丽, 陈舜胜

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘要:** 比较了提取鲫鱼卵的脂质和磷脂的三种方法。酶水解-乙醇法提取的脂质和磷脂的颜色较浅、得率较高, 提取的磷脂主要成分为磷脂酰胆碱; 正己烷-乙醇-丙酮法提取总磷脂、富含固醇的中性脂和含少量固醇类中性脂, 丙酮洗涤能有效地去除磷脂中的中性脂, 特别是易溶于乙醇的固醇和三萜系醇, 最低限度地使用有毒有机溶剂; 而 Bligh-Dyer 提取总脂后液液萃取的经典方法提取脂质虽也较简便, 但其大量使用有毒溶剂, 安全性低。此外, 甲醇单溶剂洗脱, 紫外检测器在线检测进行的低压柱层析, 分离正己烷-乙醇分提的磷脂, 制备了较高纯度的磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。

**关键词:** 鲫鱼卵; 脂质; 磷脂; 提取; 比较

中图分类号: TS 201.2 文献标识码: A

## Comparison on methods of extracting lipids from roes of *Carassius auratus*

LU Li-li, CHEN Shun-sheng

(College of Food Science & Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** The color and yield of the lipids and phospholipids were better by enzymatic hydrolysis and ethanol extraction method, with PC as the main component in the extracted phospholipids. Method of hexane and ethanol extraction and then washing by acetone could easily and efficiently extract total phospholipids, and the neutral lipids rich in sterols and another neutral lipids with lower sterols. Acetone washing could remove the neutral lipids from the phospholipids, especially the sterol and triterpenoic alcohols which are easily dissolved in the alcohol, and only a little poisonous organic solvent was used. Though the classic method Bligh-Dyer is handy, the large amount of noxious solvent it used made it unsafe. In addition, higher purity of PC and PE are prepared from the hexane and ethanol extracted phospholipids by low pressure column chromatography with methanol as washing solvent and SPD-10A detector.

**Key words:** *Carassius auratus* roe; lipids; phospholipids; extraction; comparison

鱼卵的脂质存在形式类似禽蛋, 中性脂被卵磷脂、胆固醇、蛋白和水十分稳定地乳化, 一般的索氏抽提或直接的乙醇提取等法较难充分地提取脂质, 磷脂得率低。水酶法可以破坏这种乳化, 以机械和酶解破碎降解组织、膜、脂蛋白和脂多糖等复合体, 及均质过程部分油滴表面产生的脂蛋白膜乳化胶体<sup>[1]</sup>。蛋白酶预水解, 提高了鳙鱼副产物和沙丁鱼内脏、鸭蛋和鸡蛋等的脂质和磷脂提取率, 且获得具生物活

收稿日期: 2007-03-05

基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD05A18)

作者简介: 陆丽丽(1981-), 女, 江苏如东人, 硕士研究生, 专业方向为水产品加工与贮藏。

通讯作者: 陈舜胜, E-mail: sschen@shfu.edu.cn, Tel: 021-65711922

性的水解蛋白<sup>[2-7]</sup>。乙醇-正己烷分提法<sup>[8]</sup>,方便有效地提取了蛋黄中的脂质和磷脂。本文采用酶水解-乙醇法和乙醇-正己烷分提法提取淡水鱼卵的脂质和磷脂,并与经典的 Bligh-Dyer<sup>[9]</sup>和液液萃取法<sup>[10]</sup>比较,探讨提取方法;并部分精制了磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE)。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

鲫鱼卵于2006年5月购自上海图们路菜市场,去除卵膜,-40℃保藏备用。卵发育至第Ⅲ期,卵膜透明且较薄,卵粒饱满,卵黄积累较多,呈金黄色。Novo公司杆菌蛋白酶 Protamex<sup>TM</sup>。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 脂质的提取

##### 酶水解-乙醇提取脂质

卵4℃解冻过夜,均质2 min,加水,调pH和温度,加酶水解,中和pH后,灭酶(沸水浴搅拌5 min)。pH-stat法测定蛋白质水解度。离心后的沉淀部分加乙醇提取,抽滤,真空浓缩。少量乙醚溶解后,离心去除固体杂质,丙酮(4℃)洗涤,真空脱溶干燥得粗卵磷脂。<sup>[1-7]</sup>

#### 1.2.2 正己烷-乙醇提取脂质

卵4℃解冻过夜,均质2 min,乙醇脱水并主要提取极性脂,正己烷萃取总脂,正己烷(上层,透明,深橘红色)和乙醇(下层,透明,淡黄色)两相于分液漏斗中分离。乙醇相挥去溶剂后,正己烷溶解并离心去除残留的蛋白质,丙酮(4℃)洗涤至丙酮洗涤液无色,以去除残留的中性脂,尤其是固醇类。<sup>[8]</sup>

#### 1.2.3 氯仿-甲醇提取总脂后液液萃取脂质

卵4℃解冻过夜,Bligh-Dyer法提取总脂,液液萃取法分离中性脂和极性脂<sup>[9,10]</sup>。脂质的色泽:5%氯仿溶液(w/v)420 nm比色<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.4 柱层析分离纯化磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺

酶水解-乙醇提取的磷脂,再次加入正己烷5:1(V/W)除去蛋白等杂质后,氮气吹干。上样的磷脂为0.25 g/80 g硅胶(200~300目)。硅胶120℃活化40~60 min,湿法装入2.5 cm×50 cm的层析柱中。甲醇单溶剂作洗脱剂等度洗脱<sup>[12]</sup>,流速3.0 mL/min。Shimadzu SPD-10A紫外检测器在线检测磷脂的洗脱,并收集磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamines, PE)和磷脂酰胆碱(phosphatidylcholines, PC)组分。

#### 1.2.5 薄层层析分析各脂质组分

各样品分别配成20 mg/mL氯仿溶液,薄层层析法(thin-layer chromatography, TLC)分离脂质各组分。氯仿:甲醇(1:1)展开空白板,立即吹干溶剂,以去除板上污物。点状点样后,展开室中预饱和20 min后,正己烷-乙醚-冰乙酸(80:20:2,体积比)展开中性脂,氯仿-甲醇-水-冰乙酸(65:25:4:1,体积比)中上行展开极性脂,挥干溶剂后,碘蒸汽显色8~15 min。Epson900c扫描后,Scion Image软件处理图像并分析结果。

#### 1.2.6 紫外扫描

分别取BR级PC、提取的PC和磷脂,配成1 mg/mL的透光度高的淡黄色乙醇溶液,190~400 nm扫描,测定紫外最大吸收峰。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂质的提取

#### 2.1.1 酶水解-乙醇提取脂质

采用不同的水解温度(35,40,45,50℃)、pH(6.5,7.0,7.2,7.5)、时间(1.5,2,2.5,3,3.5 h)和料液比(1:1,1:2,1:3),4000 r/min离心30 min后,均未见油层从蛋白质中游离出来分布于表层。上层水

解液,较透明并呈现一定的黄色,可能溶解了部分色素蛋白,颜色的深浅随着酶解过程加入水量的多少而变化,但增大底物的量肉眼仍看不出明显的油层,提高转速后,仅有很少量的颜色较浅的脂质。鲫鱼卵在水解后离心,没有形成表层油、中层乳状液和水解液,及下层的蛋白质沉淀<sup>[6]</sup>,而只是分成少量的油层、水解液和下层沉淀。

有报道通过水解蛋白质而提取油<sup>[5]</sup>,被提取原料中脂质需大于6 g/100 g 湿重;并且原料中的蛋白质超过17 g/100 g 原料,水解后油层的形成也会受到阻碍。而鲫鱼卵的脂质低,蛋白质高,故水解后直接离心不能获得明显的油层。甘油三酯等简单脂质,易溶于非极性有机溶剂,如正己烷或超临界CO<sub>2</sub>;而复合脂质如磷脂、糖酯和部分甘油酯,以及游离脂肪酸,与组织的其他组分受疏水键、范德华力和氢键或离子键的较强作用,较难游离出来<sup>[13]</sup>。而且酶水解离心后,磷脂组分也主要分布于底层沉淀中<sup>[5]</sup>。因而考虑用能打断这些相互作用的有机溶剂萃取磷脂。

鱼卵均质后较粘稠,经过测定水解度优化水解方法后,确定料液比1:2,0.5%复合蛋白酶,pH 7.2,此时的水解度DH随时间变化趋势见图。酶水解度过高,产生的游离氨基酸可能会部分溶于乙醇中,影响磷脂的纯度(如N/P比)<sup>[6]</sup>。因而,此条件下水解2 h,4 000 r/min离心30 min后,上层水解液呈鲜艳的透明黄色。直接倾出水解液后,沉淀中加入乙醇提取,获得粗磷脂组分。这样酶对鱼卵进行了初步水解,破坏了均质过程中形成的乳化,使乙醇提取磷脂的效率提高,并方便了后面的操作,同时也避免了一般加酶水解离心后乳化层的产生。

酶水解液,逐步经过95%乙醇提取,料液比1:4,40℃搅拌提取30 min,抽滤,共提取三次,过无水硫酸钠小柱。0℃冷藏12 h,冷冻离心(3 500 r/min,15 min)除去红色凝集态的中性脂,但部分磷脂会同时被沉淀<sup>[14]</sup>,真空浓缩。

酶水解过程有效地提高脂质提取率;降解产物不与提取物反应,保护有价值的提取组分;只用乙醇作溶剂,安全性高;能同时提取低变性的卵蛋白质渣和具有功能和营养特性的鱼蛋白水解液。但乙醇不能完全提取PE和磷脂酰肌醇等醇不溶性磷脂,可以在乙醇提取后的蛋白渣中再添加乙醚,提取醇不溶性磷脂。采用0℃冷藏含磷脂的乙醇溶液,可以有效去除中性脂,避免丙酮处理后留下的类似发霉的干草味道和非常刺激的余味使得感官质量下降,并节约了丙酮的用量,但冷藏过程中部分磷脂同时也随中性脂一起沉淀,使得磷脂的提取率下降<sup>[14]</sup>。适当的去除乙醇相中的水,可以降低磷脂的沉淀。而直接用丙酮去除中性脂,也受水分和温度的影响,磷脂会部分溶解于丙酮溶液。冷藏处理比丙酮处理,更简便、更能保持磷脂的天然风味。此外,酶水解中加入的水较多,影响了水解液的干燥处理,可以采用均质后再加等体积水均质的方法加以改进,使卵与水的混和更均匀,并有效降低卵的粘度。

### 2.1.2 正己烷-乙醇-丙酮分提脂质

该法需要注意溶解了脂质的正己烷和乙醇两相分离时,尽量使两相彻底分开。采用正己烷和丙酮再次对去除溶剂后的乙醇相中的磷脂进行纯化,可以去除混有的少量中性脂,尤其是醇溶性的胆固醇。丙酮洗涤的过程,要求丙酮液和被洗涤液的水分含量低,而且最好在0℃~4℃附近,否则磷脂会部分溶于丙酮液而降低得率。溶有磷脂的乙醇相可以通过无水硫酸钠小柱,以去除水分,否则会使形成乙醇-水的共沸溶液,较难进一步去除较多的溶剂和水,丙酮洗涤过程的损失增加。正己烷-乙醇分提脂质后,直接通过液液萃取分离中性脂和极性脂。但有机溶剂的脱除过程,脂质易发生部分地氧化。乙醇分提脂质的乙醇相,也可以采用冷藏法加以改进。

### 2.1.3 Bligh-Dyer 法提取总脂后液液萃取脂质

Bligh-Dyer 法提取总脂后,液液萃取分离中性脂和极性脂(比柱层析法耗时短,且易操作),该组方

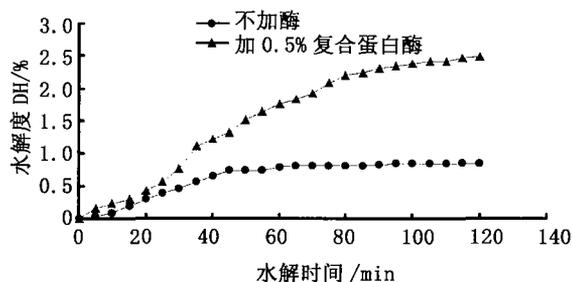


图1 pH 7.2时,0.5%复合蛋白酶水解鲫鱼卵的水解度DH

Fig. 1 DH of roe from *Carassius auratus* hydrolyzed by 0.5% Protamax at pH 7.2

法较方便。而氯仿、甲醇等有机溶剂的毒性较大,对脂质的食用和操作人员有较大安全隐患。

三种方法提取的脂质各组分及其含量和色泽,见表1。塑性蜡状的磷脂固体中,若加少量正己烷或乙醚溶解后旋转蒸发掉溶剂或直接用温和的氮气吹或冷冻干燥等方法,都能进一步降低水分,降低磷脂的粘度,使之成为淡黄色粉末。磷脂没有发生氧化时一般为无色,主要在蒸发溶剂过程中颜色加深。磷脂的胺基和糖类的醛基发生了醛胺缩合反应,产生的这类物质也可以引起磷脂的褐变<sup>[15]</sup>。

表1 不同方法提取的鲫鱼卵脂质的得率与特性

Tab.1 Lipid subclasses from *Carassius auratus* roe extracted with three methods

提取脂质法	得率(g/100g 卵)	色泽	吸光值(420 nm)	形态
Bligh-Dyer 提取的总脂	3.80 ± 0.06	黄偏深红	0.459	液体、油状
Bligh-Dyer 提取的中性脂	2.85 ± 0.07	黄偏深红	0.468	液体、油状
Bligh-Dyer 提取的磷脂	0.95 ± 0.05	淡黄色	0.351	塑性、蜡状
酶法-乙醇提取的总脂	4.03 ± 0.10	偏深红	0.427	塑性、蜡状
酶法-乙醇-冷藏提取的磷脂	0.85 ± 0.04	淡黄色	0.336	粉末状
正己烷-乙醇分提的中性脂1	2.23 ± 0.04	黄偏红	0.405	液体、油状
正己烷-乙醇分提的中性脂2	0.63 ± 0.02	黄偏深红	0.474	半固体
正己烷-乙醇分提的磷脂	0.99 ± 0.09	淡黄色	0.342	粉末状

## 2.2 紫外扫描

测定 BR 级卵磷脂的紫外最大吸收峰 206.5 nm, 231.5 nm 有一小峰, 278.5 nm 有一较小峰。酶法-乙醇提取的磷脂, 最大吸收峰 206.5 nm, 小峰 239.5 nm, 较小峰 279.5 nm。正己烷-乙醇分提的磷脂分别为 206.5 nm, 235.5 nm, 277.5 nm。234nm、270 nm 附近的吸收峰分别为共轭二烯和共轭三烯, 表明磷脂可能已发生了部分氧化。

## 2.3 薄层层析分析各脂质组分

碘蒸汽显色后, 各斑点颜色较深, 表明不饱和脂肪酸含量较高, 而中性脂组分斑点中间呈深黄色, 边缘呈亮黄色。正己烷-乙醇分提的中性脂 1, 中性脂 2 和磷脂, 以及酶法-乙醇分提的磷脂在中性展开剂中薄层展开(图 2)。两种方法提取的磷脂都较纯, 基本不含其他非极性脂。正己烷-乙醇分提的磷脂含有少量固醇和三萜系醇<sup>[16]</sup>, 而酶法-乙醇分提的磷脂基本不含这两种物质。可能是正己烷-乙醇分提的磷脂, 加正己烷溶解, 丙酮沉淀前的乙醇相中含有一定水分, 磷脂粘连在一起, 而不能充分与丙酮接触, 使得部分固醇残留。

正己烷-乙醇分提的磷脂(图 3), 主要为 PC 和 PE, 并含少量的中性脂, 较高的溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, LPC)表明磷脂已在冷藏和提取过程中发生了部分氧化和酯解。酶法-乙醇提取的磷脂主要为 PC, 并含少量的 PE 和 LPC。表明酶法-乙醇提取的磷脂富集了 PC 组分, 这与报道的乙醇或含水乙醇做主要溶剂萃取得到较高纯度富含 PC 的磷脂一致。柱层析分离纯化的 PC 和 PE 组分(图 3)较纯, 而 PE 组分中含一个靠近溶剂前沿的未知物, 可能是收集液中的残留或被污染的中性脂。

## 3 结论

三种提取鱼卵的中性脂和磷脂的方法, 酶水解-乙醇提取-冷藏最温和, 脂质和磷脂的颜色色泽浅、

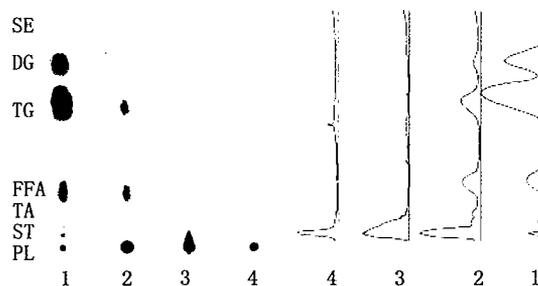


图2 鲫鱼卵各脂质的薄层层析图及其处理图像

Fig.2 TLC of lipids from *Carassius auratus* roe

1-3, 分别为正己烷-乙醇分提提取的中性脂 1、中性脂 2 和磷脂; 4, 酶法-乙醇分提的磷脂。展开的组分从上至下依次为: 固醇酯(sterol esters, SE), 甘油二酯(diacylglycerols, DG), 甘油三酯(triacylglycerols, TG), 游离脂肪酸(FFA), 三萜系醇(triterpenic alcohols, TA)和固醇(sterols, ST), 磷脂(phospholipids, PL)

得率较高,改善了脂质的品质,且提取的磷脂中富集了 PC,但该法不足处是酶水解和冷藏使得工艺耗时较长;正己烷-乙醇分提后丙酮洗涤,有效提取全部的磷脂和中性脂,总磷脂和富含固醇的及含少量固醇类的两部分中性脂,丙酮洗涤能有效地去除磷脂中的中性脂,特别是易溶于乙醇的固醇和三萜系醇,使用的提取溶剂中正己烷的比例较低,但该方法仍使用一定量的低毒性溶剂;而 Bligh-Dyer 经典方法和液液萃取分提脂质虽也较简便,但使用大量有毒溶剂,安全性低。因而,酶水解-乙醇提取-冷藏是最安全有效的方法,可以在进一步改进后广泛使用;正己烷-乙醇分提后丙酮洗涤,简便有效,但仍使用有一定毒性的有机溶剂,且磷脂留有丙酮处理后的不良风味。正己烷-乙醇分提后,可以使用冷藏的方法,以改进丙酮洗涤产生的不良风味。但这两种方法,都需要加无水硫酸钠等方法控制乙醇相的水分,否则乙醇溶剂不容易被回收,并且磷脂干燥处理中的水分去除较困难。甲醇单溶剂洗脱的低压柱层析,分离正己烷-乙醇分提的磷脂,制备了较高纯度的 PC 和 PE。

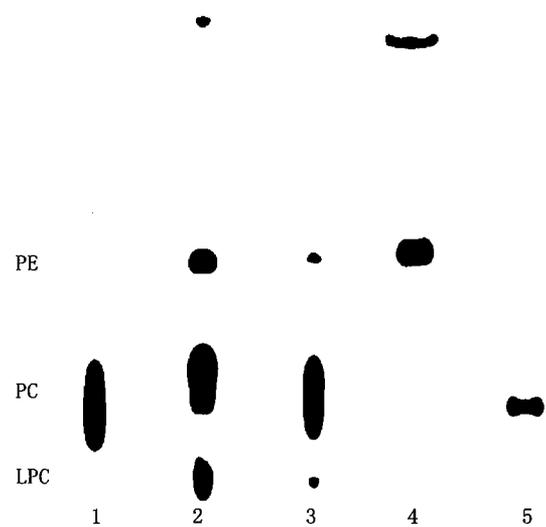


图3 各磷脂的薄层层析图

Fig. 3 TLC of phospholipids from *Carassius auratus roe*

1, PC 标样 (BR 级); 2, 正己烷-乙醇分提的磷脂; 3, 酶法-乙醇-冷藏提取的磷脂; 4, 柱层析分离的 PE; 5, 柱层析分离的 PC

#### 参考文献:

- [1] 李汴生, 彭志英, 宁正祥. 植物油料取油的酶预处理工艺[J]. 中国粮油学报, 1997, 12(6): 24-30.
- [2] Dumay J, Barthomeuf C, Berge J P. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction[J]. J Food Product Technol, 2004, 13(2): 69-84.
- [3] Dumay J, Donnay-Moreno C, Barnathan G, et al. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases[J]. Process Biochem, 2006, (41): 2327-2332.
- [4] Daukšas E, Falch E, Šližytė R, et al. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products[J]. Process Biochem, 2005, 40(8): 2659-2670.
- [5] Rasa Šližytė, Egidijus Daukšas, Eva Falch, et al. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1415-1424.
- [6] 黄素芬. 鸭蛋黄卵磷脂提取技术研究[D]. 浙江大学动物科学学院硕士学位论文, 2004.
- [7] 王辉. 利用酶法-溶剂法分离提取蛋黄油脂成分的工艺研究[D]. 江南大学硕士学位论文, 2003.
- [8] Palacios L E, Tong Wang. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization[J]. J Am Oil Chem Soc, 2005, 82(8): 571-578.
- [9] Bligh E G, Dyer W J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37: 911-917.
- [10] 成永旭, 堵南山, 赖伟. 中华绒螯蟹成熟卵巢的脂类和脂肪酸组成[J]. 中国水产科学, 1996, 61: 79-82.
- [11] Lee Y C, Oh S W, Chang J, et al. Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures[J]. Food Chem, 2004, 84: 1-6.
- [12] Zhang Weinong, He Haibo, Feng Yuqi, et al. Separation and purification of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from soybean degummed oil residues by using solvent extraction and column chromatography[J]. J Chromatography B, 2003, 798: 323-331.
- [13] Gallina Toschi T, Bendini A, Ricci A, et al. Pressurized solvent extraction of total lipids in poultry meat[J]. Food Chemistry, 2003, 83(4): 551-555.
- [14] Nielsen H, Shukla VKS. In situ solid phase extraction of lipids from spray-dried egg yolk by ethanol with subsequent removal of triacylglycerols by cold temperature crystallization[J]. Lebensm-Wiss u-Technol, 2004, 37: 613-618.
- [15] Scholfield C R, Dutton H J. Sources of Color in Soybean "Lecithin" [J]. J Am Oil Chem Soc, 1954, 31: 258-261.
- [16] Zimmerman D C, Klosterman H J. Lipid metabolism in germinating flaxseed[J]. The Journal of the American Oil Chemist' Society, 1965, 42: 58-62.