



Selectively extract astaxanthin from wet biomass of *Haematococcus pluvialis*

Xiaoli REN^{1,2}, Lin CHEN^{2*}, Runzhi LI³, Tianzhong LIU²

1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China

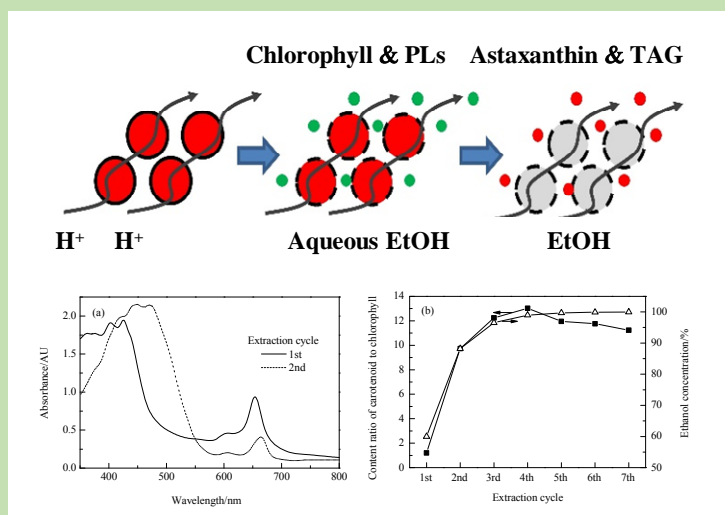
2. Key Laboratory of Biofuel, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China

3. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

Abstract: Microalgae *Haematococcus pluvialis* is the richest natural source of astaxanthin and has become the primary source for astaxanthin production so far. However, its thick resistant cell wall probably represents the biggest barrier for target compound extraction. Therefore, high energy-consuming and cost-intensive downstream processes such as cell disruption and drying are required to improve extraction efficiency. In the present study, an approach to selectively extract astaxanthin and lipid using aqueous ethanol from algal biomass of *H. pluvialis* with moisture content of 80%, following a pre-process of acidic

hydrolysis cell wall disruption, was proposed. Experiments for parameters optimization and for investigation of mechanism of this approach to improve extraction performance were also carried out. The results showed that polar fractions (mainly chlorophyll and polar lipids) and neutral fractions (mainly carotenoids and triglyceride) were selectively extracted in different extraction cycles, thus fraction extraction was achieved as consequence of the change of ethanol concentration in different extraction cycles. Solvent or solvent mixtures with moderate polarity act out better selectivity and efficiency for carotenoids (mainly astaxanthin), i.e. extraction using ethanol/ethyl acetate mixture gave a total yield of carotenoids reaching 25.31 mg/g of dry weight, a recovery rate of 69.35% and a high content ratio of carotenoids to chlorophyll of 10.6. With assistant of acidic cell-wall disruption, the extraction efficiency of astaxanthin and lipid were significantly improved, in particular, the total yield of lipid reached 418 mg/g dry weight and the recovery rate of lipid reached 97% under the optimal acidic hydrolysis cell-wall disruption conditions of HCl 1 mol/L, temperature of 60 °C and time 60 min. The extracted astaxanthin and fatty acid maintained their chemical stability during extraction process. Therefore, this approach for selectivity extraction astaxanthin and triglyceride from wet algal biomass was demonstrated, and could be an alternative with multiple benefits including extraction efficiency improvement and cost reduction, for astaxanthin production from algal biomass of *H. pluvialis*.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; cell-wall disruption; lipid; carotenoid



收稿: 2018-01-05, 修回: 2018-05-08, 网络发表: 2018-09-19, Received: 2018-01-05, Revised: 2018-05-08, Published online: 2018-09-19

基金项目: 山西省煤基科技攻关重点项目(编号: FT-2014-01); 山西省重点研发计划项目(编号: 201603D312005)

作者简介: 任晓丽(1990-), 女, 安徽省芜湖市人, 硕士研究生, 食品科学专业; 陈林, 通讯联系人, Tel: 0532-80662737, Email: chenlin@qibebt.ac.cn.

引用格式: 任晓丽, 陈林, 李润植, 等. 从雨生红球藻藻泥中选择性提取虾青素. 过程工程学报, 2019, 19(1): 136-143.

Ren X L, Chen L, Li R Z, et al. Selectively extract astaxanthin from wet biomass of *Haematococcus pluvialis* (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2019, 19(1): 136-143, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.218102.

从雨生红球藻藻泥中选择性提取虾青素

任晓丽^{1,2}, 陈林^{2*}, 李润植³, 刘天中²

1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所生物燃料重点实验室, 山东 青岛 266101

3. 山西农业大学农学院, 山西 晋中 030801

摘要:以雨生红球藻湿藻泥为原料,研究了不同有机溶剂对胞内油脂和虾青素选择性提取分离的影响,通过酸解破壁提高虾青素和油脂的提取效率。结果表明,连续乙醇提取可对胞内色素和油脂有效分级提取,先提取出极性组分(叶绿素和极性脂),再提取中性组分(类胡萝卜素和中性脂)。中等极性溶剂或溶剂体系对类胡萝卜素的选择性和提取率较好:乙醇/乙酸乙酯混合溶剂提取类胡萝卜素的总得率(干重)达 25.31 mg/g,提取率为 69.35%。对雨生红球藻湿细胞进行酸解破壁处理有助于提高虾青素和油脂的提取率。在最优酸解破壁条件(盐酸浓度 1 mol/L,温度 60℃,时间 60 min)下,含水 80%的雨生红球藻藻泥的油脂总得率(干重)达 418 mg/g,总脂提取率达 97%。

关键词:雨生红球藻; 虾青素; 破壁; 油脂; 类胡萝卜素

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2019)01-0136-08

1 前言

虾青素(3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β' -胡萝卜素)分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$,是一种酮式类胡萝卜素,在保护有机体免受氧化伤害、防治心脑血管疾病、缓解糖尿病症状、保护皮肤免受紫外线损伤、治疗眼部感染、缓解机体疲劳和免疫调节等方面具有应用潜力^[1]。雨生红球藻是目前最主要的天然虾青素来源^[2,3],其厚壁孢子中虾青素主要为酯化的 3S,3'S 构型,含量最高达细胞干重的 7%^[4]。源自雨生红球藻的虾青素已获得我国及国外食品监管机构安全认证,广泛用于食品和化妆品等领域,市场需求持续增长,具有巨大的经济价值。

从雨生红球藻中提取虾青素是其生产工艺的重要环节之一,通常采用溶剂浸提法^[5-7]或用超临界 CO_2 ^[8,9]提取,一般要求原料含水量低于 5%^[8],但传统热风干燥过程的高温和氧接触会导致虾青素降解并破坏其生物活性,损失甚至超过 40%^[10,11]。一些研究者^[12,13]发展了用丙酮或离子液体从湿藻中提取虾青素的方法,免除了干燥过程,但提取率偏低。此外,雨生红球藻中含叶绿素,提取后部分叶绿素会降解成脱镁叶绿酸,而脱镁叶绿酸是引起光敏性皮炎的重要诱因,因此药典限制微藻虾青素产品中脱镁叶绿酸含量不得高于 2.0 mg/g。传统虾青素提取方法不能选择性提取虾青素和叶绿素^[14],尤其当原料藻粉中叶绿素含量过高时,提取的虾青素油中脱镁叶绿酸含量极易超标。Kobayashi 等^[15]采用热丙酮选择性去除叶绿素分步提取方法,分离效率不高,且存在毒性风险和工艺放大障碍。发展新的提取方法,直接以高含水量湿藻泥为原料,同时实现虾青素和叶绿素

的选择性提取将成为雨生红球藻虾青素提取研究的重要方向。

本研究以含水量 80%的雨生红球藻湿藻泥为原料,比较了多种溶剂体系对虾青素和叶绿素的选择性分离效果。在此基础上,优化了用盐酸对雨生红球藻进行酸解破壁的条件,建立了一种直接利用湿藻泥高效选择性提取虾青素的方法。

2 实验

2.1 材料与试剂

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*, 南京中科迈可阿吉生物科技有限公司),藻泥含水量为 79.66%(湿基),总类胡萝卜素含量为 3.65%(干基),总油脂含量为 43.2%(干基)。藻泥在避光和-80℃条件下保存待用。实验用乙醇、氯仿、乙酸乙酯、己烷等均为分析级(上海国药集团);虾青素标准品和甘油三酯(TAG)、甘油二酯(DAG)、甘油单酯(MAG)、固醇酯(SE)和固醇(FS)标准品均为美国 Sigma-Aldrich 公司产品。

2.2 实验方法

2.2.1 湿藻的分级提取工艺流程

称取约 50 g (w_0)雨生红球藻藻泥,分散在 60 mL 乙醇中,置于 250 mL 三口烧瓶中,在设定温度下搅拌提取一定时间。完全转移出混合液,6000 r/min 下离心,分别收集上清和藻渣,藻渣进行下一次提取,重复 n 次至细胞无色。将上清液旋转蒸发浓缩移除溶剂,真空干燥至恒重,根据质量差计算提取物质量(w_1),一次提取油脂得率(干重) $Y_1(\text{mg/g})=1000w_1/w_0$,油脂总得率 $Y=\sum Y_i$ ($i=1\sim n$)。油脂提取率 $R(\%)=100Y/432$ (实验材料中油脂

总含量为 432 mg/g)。将每一次所得提取物溶入一定量氯仿中, 遮光低温下保存, 用于测定其中类胡萝卜素含量, 计算类胡萝卜素总得率和提取率。

2.2.2 酸解破壁辅助虾青素提取条件优化

第 1 次提取(酸解破壁)过程中, 向藻泥和乙醇混合液中加入浓盐酸至设定浓度, 在一定温度下酸解破壁, 提取后加入适量浓氨水中和反应液至中性, 离心收集上清和藻渣。向藻渣中加入不含盐酸的溶剂提取 4 次, 共进行 5 次提取。其中, 后 4 次提取条件相同, 均在 60℃ 下提取 60 min, 第 2 和第 3 次用乙醇提取, 第 4 和第 5 次以乙醇/乙酸乙酯(1:1, vol)提取。每次提取液脱溶剂, 按文献^[16]方法净化后称量提取物质量, 分别计算得率和总得率。通过单因素条件实验优化酸解破壁条件, 考察浓盐酸添加量、接触时间和温度对油脂和色素总得率的影响。分别在盐酸终浓度 0, 0.1, 0.4, 0.7, 1.0 和 2.0 mol/L、接触时间 60 min 和温度 60℃ 下提取; 之后, 分别在接触时间 10, 20, 30, 40, 60 和 90 min、温度 30, 40, 50, 60 和 70℃ 下提取。确定前一因素的最优条件后, 直接用于下一因素的优化实验。

2.2.3 溶剂对色素和油脂提取的影响

雨生红球藻湿藻细胞经 2 次乙醇提取后, 分别以乙醇、乙醇/乙酸乙酯(1:1, vol)、乙酸乙酯、己烷为溶剂对藻渣继续提取 3 次, 测定不同溶剂时提取物中油脂和类胡萝卜素的含量和组成。

2.3 分析方法

2.3.1 油脂含量和组成测定

采用重量法测定雨生红球藻中总脂含量^[16]。称取 50 mg 冻干藻粉, 避光条件下加入液氮和石英砂研磨, 加入甲醇/氯仿混合液萃取 3 次。合并萃取液, 加入氯仿和水调整至氯仿:甲醇:水为 1:1:0.9(vol), 净化后脱溶剂得总脂。计算所得总脂占藻粉干重的比例, 以此提取率为 100%。

油脂组成采用薄层色谱法分析, 用苯:氯仿:无水乙酸:甲醇混合溶剂(150:60:2:17.7, vol)展开 70%, 用苯/己烷(1:1, vol)混合溶剂展开至 100%, 待溶剂挥发后用碘蒸汽显色。

2.3.2 类胡萝卜素含量测定

提取物用氯仿稀释一定倍数(D), 以氯仿为空白对照, 用 Cary 50 紫外-可见分光光度计(美国 Varion 公司)测定 400~700 nm 处的吸光度 OD, 根据式(1)~(3)分别计算总类胡萝卜素 C_{x+c} 、叶绿素 a (C_a)和叶绿素 b (C_b)的含量:

$$C_a(\mu\text{g}/\text{mg})=(10.91\text{OD}_{666}-1.2\text{OD}_{648})D/w \quad (1)$$

$$C_b(\mu\text{g}/\text{mg})=(16.38\text{OD}_{648}-4.57\text{OD}_{666})D/w \quad (2)$$

$$C_{x+c}(\mu\text{g}/\text{mg})=1000\text{OD}_{480}-1.42C_a-46.09C_b)D/(w202) \quad (3)$$

式中, w 为样品质量, 202 为系数。

以计算的类胡萝卜素含量为 100%提取率。

2.3.3 类胡萝卜素的成分分析

雨生红球藻提取物中单一类胡萝卜素含量分析采用 Yuan 等^[17]的方法, 用 Waters 1525 高效液相色谱仪(HPLC, 美国 Waters 公司)和 Waters 2998 光电二极管阵列检测器(PDA, 美国 Waters 公司)分析, 洗脱条件为 100% A 洗脱液(二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=5.0:85.0:5.5:4.5, vol)洗脱 8 min, 6 min 内将 A 线性降低至 0, 维持流动相 B(二氯甲烷:甲醇:乙腈:水=25.0:28.0:42.5:4.5, vol)40 min, 流速为 1.0 mL/min。色谱柱为 C18 反相色谱柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), 柱温 30℃, 扫描范围 250~700 nm。

3 结果与讨论

3.1 分级提取效果

以无水乙醇为溶剂对雨生红球藻藻泥进行连续多次提取, 每次所得提取液的外观差异很大。第 1 次所得提取液为深绿色, 之后所得提取液为红褐色。提取液的颜色与其中类胡萝卜素/叶绿素含量比有关。光谱分析结果[图 1(a)]表明, 第一次所得提取液的最大吸收波长在 400~424 和 660 nm, 成分主要是叶绿素 a 和叶绿素 b; 而第 2 次所得提取液的最大吸收波长在 448~480 和 660 nm, 成分主要是虾青素和叶绿素。类胡萝卜素/叶绿素含量比逐渐升高, 从第 1 次的 1.2 逐渐升至第 3 次的 12.2 [图 1(b)]。

去除溶剂后所得提取物的物理状态随提取次数变化, 第 1 次所得提取物呈膏状, 之后为流动性油状物。提取物的物理状态与其油脂组成有关。薄层色谱分析结果表明, 第 1 次所得提取物主要含糖脂、磷脂等极性组分, 几乎不含甘油三酯; 之后的提取物中甘油三酯含量逐渐增多, 极性脂组分含量降低(图 2)。高含量的胶状极性脂是导致提取物流动性降低的主要原因。可见藻泥多次乙醇提取过程中, 色素和油脂分级提取特性明显, 即先提取的主要是叶绿素和极性脂, 之后提取的主要是类胡萝卜素和中性脂。每次提取物的成分差异应与提取溶剂乙醇的浓度有关。第 1 次提取时, 无水乙醇与藻泥中的水分充分互溶, 导致最终提取液的乙醇浓度仅为 57% [图 1(b)], 稀乙醇溶液具有更高的极性, 对叶绿素和极性脂的溶解度高而对类胡萝卜素和中性脂的溶解度极小, 因而选择性提取叶绿素和极性脂。随提取次数增加, 细胞中的水分含量逐渐降低, 至第 3 次提取时藻细胞中水分含量已很低, 提取液中乙醇含量达

96.5%，极性降低，因此低极性的类胡萝卜素和中性脂

被选择性提取。

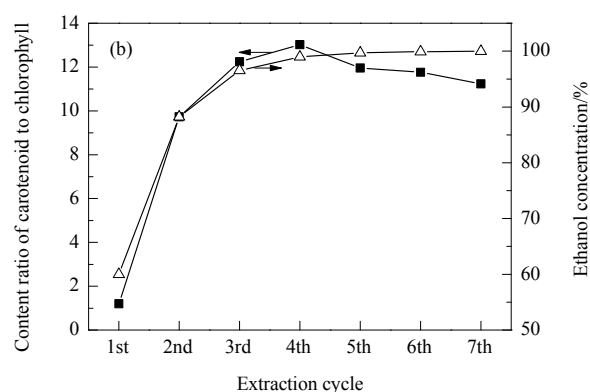
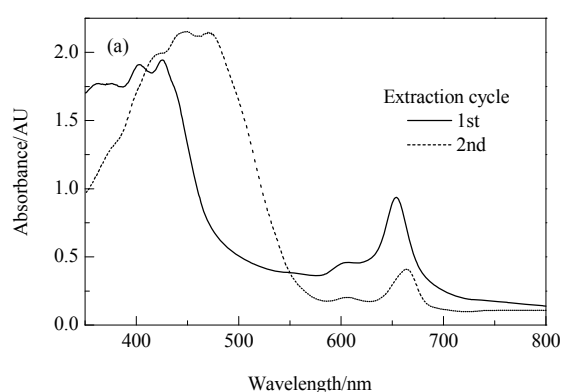
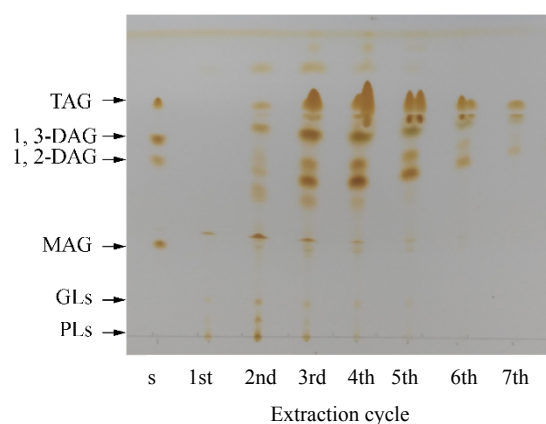


图 1 提取物的吸光度、类胡萝卜素/叶绿素含量比及乙醇浓度

Fig.1 Absorbance of extracts, content ratio of carotenoid to chlorophyll and ethanol concentration in the crude extract



s. Standard mixture, TAG. Triglyceride, DAG. Diacylglycerol, MAG. Monoglyceride, GLs. Glycolipids, PLs. Phospholipids

图 2 提取物的薄层色谱

Fig.2 Thinlayer chromatography of the crude extract

3.2 酸解破壁辅助虾青素提取

由于雨生红球藻厚且致密的细胞壁的阻碍，完整细胞内的油脂和类胡萝卜素很难被提取出来^[18]。实验发现，完整细胞经 5 次提取后油脂和类胡萝卜素总得率(干重，下同)分别为 127 和 3.7 mg/g(图 3)，表明大部分油脂和类胡萝卜素仍留在细胞内。研究^[19]表明，酸解是雨生红球藻破壁的有效方法，可明显促进胞内虾青素提取，且不会破坏虾青素的分子结构。为此，通过优化酸解破壁(第 1 次提取)的盐酸浓度、接触时间和温度等条件，再进行连续 4 次不含盐酸的提取，计算色素和油脂的总得率，考察酸解条件对细胞破壁效果和色素提取效果的影响。

3.2.1 酸浓度的影响

雨生红球藻中，虾青素及其它类胡萝卜素几乎全部溶解并储藏于胞内的脂肪体中，因此类胡萝卜素的提取往往伴随着胞内油脂的提取，二者的提取动力学变化相

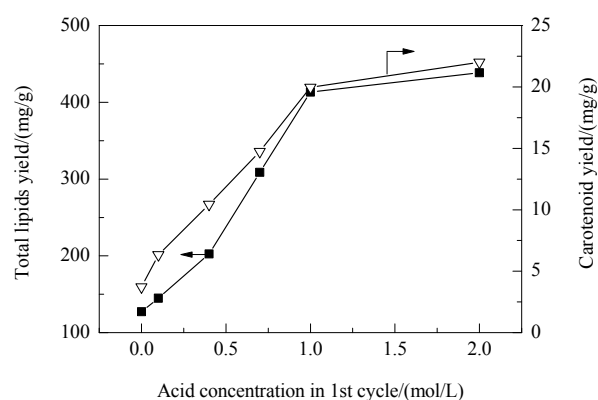


图 3 盐酸浓度对 5 次提取油脂和类胡萝卜素总得率的影响

Fig.3 Effect of acid concentration on total yield of lipids and carotenoids of five extraction cycles

同。酸解破壁温度为 60℃、处理时间 60 min 时，低浓度酸破壁后胞内的类胡萝卜素和油脂总得率升高，但增幅不大(图 3)，与文献^[18]一致。这是由于低浓度酸解很可能仅破坏细胞壁纤维素与蛋白质分子的化学键，形成贯通性的孔洞而非破坏整个细胞结构^[19,20]，因此不能大幅度提高类胡萝卜素和油脂的提取效率。随盐酸浓度升高，油脂和类胡萝卜素总得率显著增加，盐酸浓度达 1 mol/L 时，类胡萝卜素总得率从无盐酸时的 3.7 mg/g 提高至 22 mg/g，油脂总得率从 127 mg/g 提高至 439 mg/g。之后再增大盐酸浓度，油脂和类胡萝卜素总得率不再提高。中等浓度的酸可破坏提取物中的叶绿素，而同时保持类胡萝卜素的稳定性^[18]；但酸浓度过高(超过 4 mol/L)将明显降解虾青素^[19]。综合考虑总得率和类胡萝卜素稳定性，1 mol/L 是最优的盐酸浓度。

3.2.2 处理温度的影响

雨生红球藻在 30~70℃ 下酸解破壁所得提取物中，

虾青素主要以酯化形态存在, 占总虾青素的 97%, 而游离虾青素含量仅为 2% [图 4(a)]。提取物中还含少量角黄素、叶绿素等。虾青素酯 [图 4(a) 峰 4] 的可见吸收光谱 [图 4(b)] 的最大吸收波长为 481 nm, 破壁温度升至 70℃ 时, 最大吸收波长不变, 表明其分子结构未被破坏。低

于 60℃ 时, 虾青素在黑暗条件下 1 h 损失 2%, 而 70~80℃ 时损失率可达 11%~20% [21]。综合考虑温度对虾青素提取率和稳定性的影响, 最佳酸解破壁温度为 60℃。

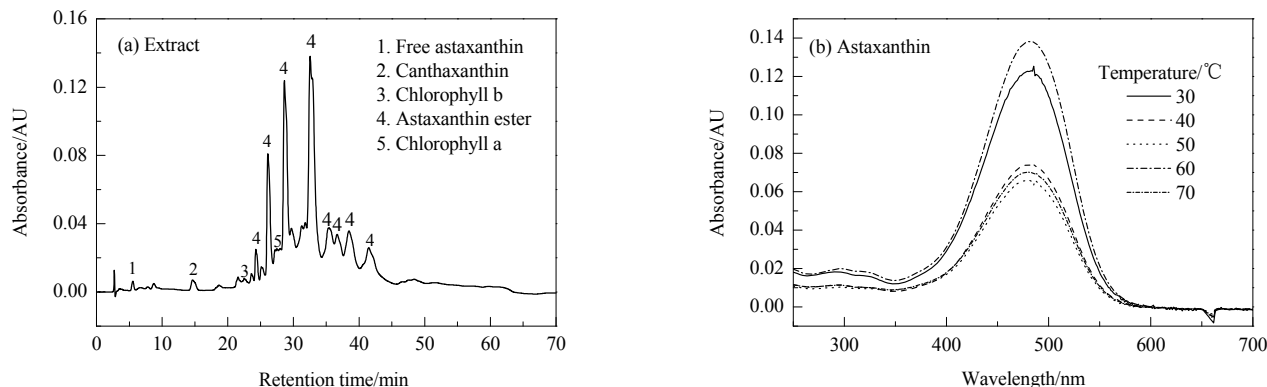


图 4 提取物的 HPLC 色谱和虾青素峰的紫外-可见吸收光谱

Fig. 4 High performance liquid chromatography of the extracts and the UV-Vis spectrum of astaxanthin

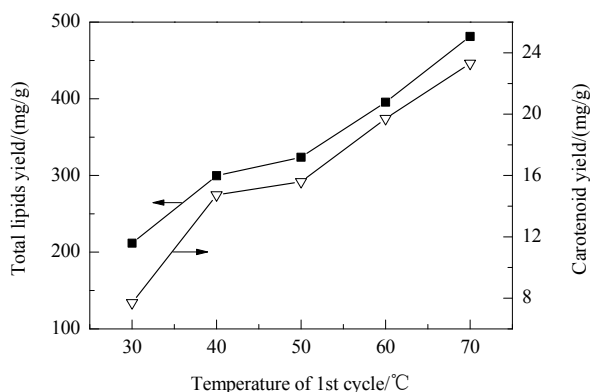


图 5 酸解温度对 5 次提取油脂和类胡萝卜素总得率的影响

Fig. 5 Effect of treatment temperature on total yield of lipids and carotenoids of five extraction cycles

提高酸解破壁温度有助于提高细胞破壁效果, 加速油脂和类胡萝卜素提取。盐酸浓度 1 mol/L、处理时间 60 min 时, 将酸解破壁处理温度从 30℃ 提高至 60℃, 5 次提取类胡萝卜素总得率从 7.7 mg/g 提高至 19.7 mg/g, 油脂总得率从 212 mg/g 提高至 396 mg/g (图 5)。

3.2.3 酸解时间的影响

酸解破壁过程中, 随酸解时间延长, 类胡萝卜素和油脂总得率增加。盐酸浓度 1 mol/L、温度 60℃ 时, 经酸解破壁 60 min 后, 5 次提取的类胡萝卜素和油脂总得率同时达到最大值, 分别为 31.8 和 445 mg/g; 但酸解破壁时间延长至 90 min 时, 类胡萝卜素总得率降至 27.8 mg/g (图 6)。原因可能是提取出的虾青素在酸和高温环境中暴露时间过长而发生破坏降解。

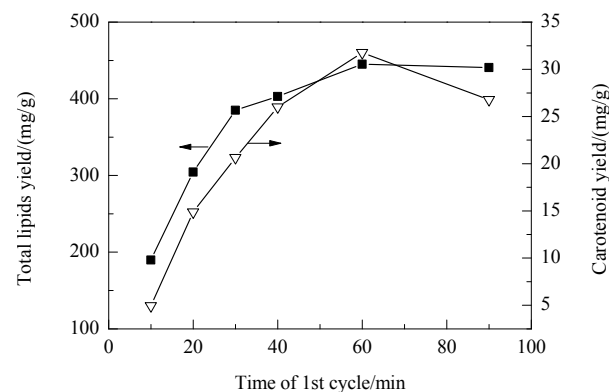


图 6 酸解时间对 5 次提取油脂和类胡萝卜素总得率的影响

Fig. 6 Effect of hydrochloric acid treatment time on total yield of lipids and carotenoids of five extraction cycles

综上所述, 最优的酸解破壁 (第 1 次提取) 条件为盐酸浓度 1 mol/L、温度 60℃、时间 60 min。最优条件下破壁后, 再经 4 次提取, 油脂总得率达 418 mg/g, 与雨生红球藻中总油脂含量 (430 mg/g) 相比, 油脂总提取率达 97%。

3.3 溶剂对色素和油脂提取的影响

经酸解破壁后, 胞内类胡萝卜素和油脂仍需多次才能充分提取。用乙醇为溶剂时共需连续 7 次提取 (图 2), 而从第 3 次开始用乙酸乙酯/乙醇混合液为溶剂仅需 5 次即可充分提取 (图 3), 表明溶剂性质也影响胞内油脂和类胡萝卜素的溶出效率, 其中溶剂极性是影响胞内虾青素和油脂溶出的重要因素。基于此, 本研究选择乙醇、乙酸乙酯、正己烷、乙醇/乙酸乙酯混合液 (1:1, vol) 为溶

剂,比较其对雨生红球藻藻泥的油脂和类胡萝卜素总得率及提取液中类胡萝卜素/叶绿素含量比的影响。

藻泥经酸解破壁后,再经不同溶剂提取 4 次,己烷、乙酸乙酯、乙醇/乙酸乙酯、乙醇提取所得提取物中类胡萝卜素/叶绿素含量比最高值均出现在第 3 次或第 4 次提取时,分别为 12.7, 11.2, 10.6 和 7.14 (图 7),表明己烷和乙酸乙酯对类胡萝卜素的选择性提取效果优于乙醇/乙酸乙酯混合溶剂和乙醇。

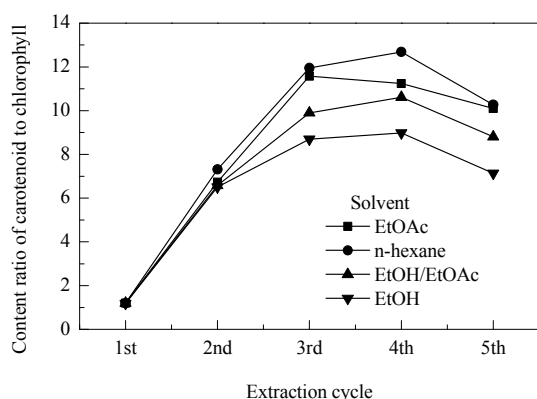


图 7 溶剂体系对提取物中类胡萝卜素/叶绿素含量比的影响
Fig.7 Effect of extraction solvent on content ratio of carotenoid to chlorophyll of *H. pluvialis*

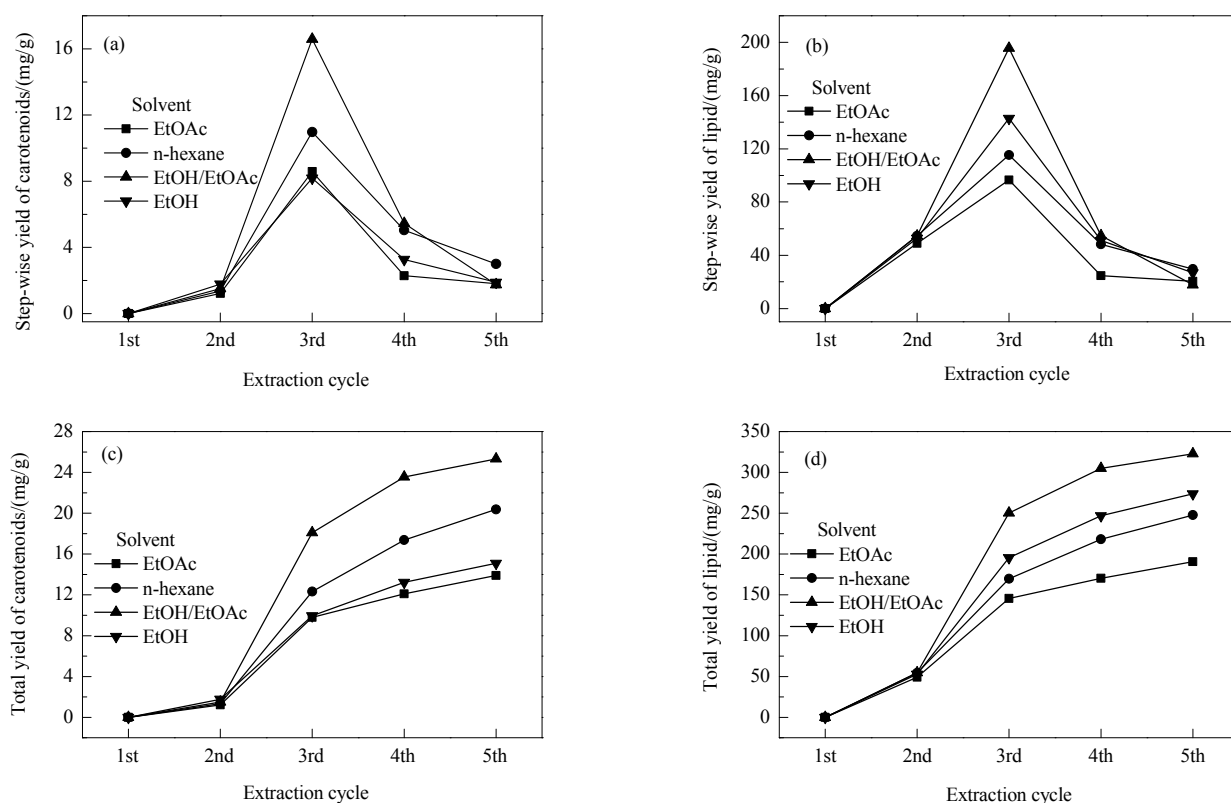


图 8 溶剂体系和提取次数对类胡萝卜素和油脂总得率的影响
Fig.8 Effects of extraction solvent and extraction cycle on total yield of carotenoids and lipids

藻泥经酸解破壁后,分别用不同溶剂提取 4 次,乙醇、乙醇/乙酸乙酯、乙酸乙酯、己烷提取的油脂总得率分别为 274, 323, 191 和 248 mg/g, 类胡萝卜素总得率分别为 15.11, 25.31, 13.90 和 20.38 mg/g[图 8(c), 8(d)]。乙醇/乙酸乙酯混合溶剂提取的油脂和类胡萝卜素总得率最高,而乙酸乙酯提取的类胡萝卜素和油脂总得率均最低。溶剂极性乙醇>乙酸乙酯>己烷,类胡萝卜素和油脂的溶出能力对溶剂极性没有严格的依赖关系。针对雨生红球藻干粉提取的研究^[9,22]表明,非极性溶剂如超临界 CO₂ 对胞内虾青素的提取率很低,需通过添加乙醇等增强极性,提高虾青素提取率;也有研究^[6,14,21]指出强极性溶剂如乙醇、乙腈等并不能得到高虾青素提取率。类胡萝卜素尤其是虾青素可能更倾向溶解于中等极性溶剂或极性溶剂与弱极性溶剂的混合体系中^[7,23,24]。这是由于分子含羟基和酮基等极性基团,虾青素及其酯化形态的极性略大于甘油三酯,而后者已被广泛证明易溶于弱极性溶剂,如己烷等^[16]。虽然对类胡萝卜素的提取选择性己烷和乙酸乙酯优于乙醇/乙酸乙酯混合溶剂和乙醇,但综合考虑类胡萝卜素、油脂总得率和选择性效果,最佳提取剂仍以乙醇/乙酸乙酯为宜。

值得注意的是,使用不同溶剂,油脂和类胡萝卜素的总得率均在第 3 次提取时最高[图 8(a), 8(b)],这是由于湿藻细胞经前两次的乙醇脱水后,细胞含水量已很低,第 3 次加入乙醇后,提取液的含水量很低,溶脂能力大为提高。之后,每次提取的油脂和类胡萝卜素总得率越来越低[图 8(a), 8(b)],原因是一方面胞内残留的油脂和类胡萝卜素越来越少,另一方面提取液吸附在藻细胞表面或留在细胞内,不能完全分离并从中回收提取出油脂和色素(吸附量通常为 2.5 mL/g)。因此,为降低提取液的残留比,可在油脂和类胡萝卜素的高溶出提取次(第 3 次)中,将溶剂/物料比从 6 mL/g 提高到 12 mL/g,从而提高提取物的提取率。

根据雨生红球藻中总类胡萝卜素含量(3.65%)和类胡萝卜素的总得率,计算不同溶剂中类胡萝卜素的提取率,结果见图 9。溶剂分别为乙酸乙酯、乙醇、己烷、乙醇/乙酸乙酯时,类胡萝卜素提取率依次增加,分别为 38.08%, 41.39%, 55.84%和 69.35%。雨生红球藻经提取 5 次后,藻渣呈淡红色,表明胞内的类胡萝卜素已大部分被提取,但类胡萝卜素提取率最高也仅为 69.35%,损失较大。原因可能是提取和转移操作没有完全隔绝光和氧与虾青素的接触,发生了光氧化,特别是提取过程的高温环境可加速虾青素的光氧化而降解损耗^[20]。未来在加工生产过程中应考虑惰性气体保护或加入抗氧化保护剂,及强化加工过程的避光保护,以减少虾青素在加工过程中的损失。

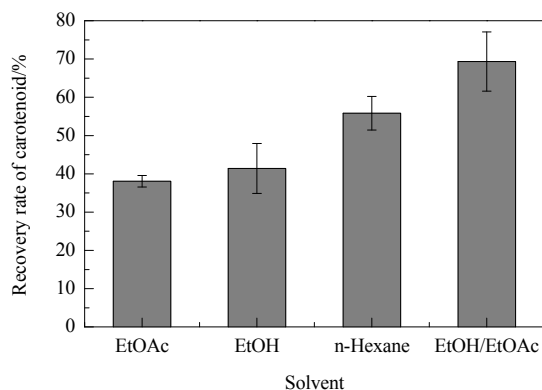


图 9 溶剂对类胡萝卜素提取率的影响

Fig.9 Effect of solvent on carotenoids recovery of *H. pluvialis*

4 结 论

从雨生红球藻藻泥(含水量 80%)中选择性提取类胡萝卜素和油脂,比较了溶剂分级提取对油脂和色素的影响,优化了酸解破壁工艺,得出以下结论:

(1) 多次乙醇提取对色素和油脂有明显的分级提取

效果,先提取叶绿素和极性脂,后提取类胡萝卜素和中性脂。

(2) 酸解破壁有助于提高类胡萝卜素和油脂提取率。酸解破壁的最优条件为盐酸浓度 1 mol/L、温度 60℃、时间 60 min,之后再经 4 次提取,油脂总得率(干重)达 418 mg/g,总脂提取率达 97%。

(3) 类胡萝卜素在中等极性溶剂或溶剂体系中的提取选择性和总得率较好。乙醇/乙酸乙酯混合溶剂提取类胡萝卜素总得率达 25.31 mg/g,提取率为 69.35%,类胡萝卜素/叶绿素含量比为 10.6。

参考文献

- [1] Ambati R R, Phang S M, Ravi S, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 128–152.
- [2] Lorenz R T, Cysewski G R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin [J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(4): 160–167.
- [3] Orosa M, Valero J F, Herrero C, et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(13): 1079–1085.
- [4] Kang C D, Lee J S, Park T H, et al. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(2): 237–241.
- [5] Zhao X Y, Zhang X W, Fu L D, et al. Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, 99: 197–203.
- [6] Ruen-Ngam D, Shotipruk A, Pavasant P. Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Separation Science and Technology*, 2011, 46(4): 64–70.
- [7] 赵立艳, 陈芳, 廖小军, 等. 影响雨生红球藻中虾青素的提取条件的研究 [J]. *食品科学*, 2006, 27(3): 110–114.
Zhao L Y, Chen F, Liao X J, et al. Study on extraction conditions of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Food Science*, 2006, 27(3): 110–114.
- [8] Reyes F A, Munoz L A, Hansen A, et al. Water relationships in *Haematococcus pluvialis* and their effect in high-pressure agglomeration for supercritical CO₂ extraction [J]. *Journal of Food Engineering*, 2015, 162: 18–24.
- [9] Nobre B, Marcelo F, Passos R, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 223(6): 787–790.
- [10] Raposo M F J, Morais A M M B, Morais R M S C. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(3): 1253–1257.
- [11] Ahmed F, Li Y, Fanning K, et al. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Food Research International*, 2015, 74: 231–236.
- [12] Cheng X, Riordon J, Nguyen B, et al. Hydrothermal disruption of algae cells for astaxanthin extraction [J]. *Green Chemistry*, 2017,

- 19(1): 106–111.
- [13] Desai R K, Streefland M, Wijffels R H, et al. Novel astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using cell permeabilising ionic liquids [J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(5): 1261–1267.
- [14] 李婷, 韩丽君, 袁毅. 不同有机溶剂对雨生红球藻中虾青素提取成分的影响 [J]. *海洋科学*, 2012, 36(7): 34–38.
Li T, Han L J, Yuan Y. Effect of solvents on extract of astaxanthin from green algae *Haematococcus pluvialis* [J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(7): 34–38.
- [15] Kobayashi M, Kurimura Y, Sakamoto Y, et al. Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(9): 657–660.
- [16] 陈闽, 陈晓琳, 刘天中, 等. 不同亚临界溶剂从微拟球藻湿藻泥中提取油脂 [J]. *过程工程学报*, 2011, 11(3): 380–385.
Chen M, Chen X L, Liu T Z, et al. Subcritical extraction of lipids from wet microalgae paste of *Nannochloris* sp.[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2011, 11(3): 380–385.
- [17] Yuan J P, Chen F, Liu X, et al. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum* [J]. *Food Chemistry* 2002, 76(3): 319–325.
- [18] Mendes-Pinto M M, Raposo M F J, Bowen J, et al. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13: 19–24.
- [19] Sarada R, Vidhyavathi R, Usha D, et al. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7585–7588.
- [20] Kim D Y, Vijayan D, Praveenkumar R, et al. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus* [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 199: 300–310.
- [21] 王红霞, 杨雯, 田洪, 等. 雨生红球藻中虾青素的提取及稳定性研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2015, (2): 101–106.
Wang H X, Yang W, Tian H, et al. Extraction and stability research of astaxanthin from *H. pluvialis* [J]. *China Food Additives*, 2015, (2): 101–106.
- [22] Reyes F A, Mendiola J A, Ibanez E, et al. Astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO₂-expanded ethanol [J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2014, 92(8): 75–83.
- [23] 王灵昭, 邓家权. 微波法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究 [J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(12): 96–100.
Wang L Z, Deng J Q. Study on the technology of extracting astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by microwave method [J]. *Food Research and Development*, 2007, 28(12): 96–100.
- [24] 齐计英, 姚依婧, 岑琴, 等. 响应面法优化雨生红球藻虾青素的超声提取工艺 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36(6): 313–316, 321.
Qi J Y, Yao Y J, Cen Q, et al. Optimization of ultrasonic extraction technology of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(6): 313–316, 321.