

小球藻中海藻油的提取工艺研究

刘圣臣, 邹宁*, 孙杰, 孙东红, 梁妍

(鲁东大学生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘 要: 本实验以小球藻为原料, 利用反复冻融技术破碎细胞壁, 并用乙醇作提取剂提取海藻油。研究了乙醇浓度、液料比、冻融次数以及提取温度等因素对油脂提取率的影响。实验结果表明, 最佳工艺条件为反复冻融 1 次、液料比 3:1(V/W)、乙醇浓度 95%、提取温度 45℃, 出油率达 24.28%。小球藻经反复冻融提取海藻油, 提取较完全, 适宜大量生产, 有着较广阔的应用前景。与藻泥直接提取及冷冻干燥后提取相比, 提取效率高, 且差异极显著。

关键词: 小球藻; 海藻油; 提取; 反复冻融; 细胞壁破壁

Study on Extraction Technology of Algae Oil from Chlorella

LIU Sheng-chen, ZOU Ning*, SUN Jie, SUN Dong-hong, LIANG Yan

(College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The repeated freezing and thawing technique was taken to break cell wall of chlorella and then the algae oil was extracted with ethanol. The effects of ethanol concentration, ratio of material to solvent, times of freezing and thawing, and extraction temperature on the oil yield were investigated. The results showed that the optimum ethanol concentration, ratio of solvent to material, times of freezing and thawing, and extraction temperature are 95%, 3:1 (V/W), once, and 45℃, respectively. Under these conditions, the algae oil yield reaches 24.28%. Compared to traditional methods, the combined method of repeated freezing-thawing and ethanol extraction can completely extract the algae oil with a high yield, and is suitable for large-scale industrial production.

Key words: chlorella; algae oil; extraction; repeated freezing and thawing; cell fragmentation

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)08-0120-04

随着经济发展、生活水平的提高, 高血压、高血脂诱发的心血管病已成为威胁人类生命的重要疾病。由于海藻油中含有大量不饱和脂肪酸, 尤其是含有人体必需的 EPA、DHA, 在预防心血管疾病、降血脂、降低胆固醇、减肥、抑制肿瘤生长、抗炎等方面具有明显的作用^[1-2], 因而日趋受到人们的关注。

微藻处于食物链的最低端, 是初级生产力, 可以通过光合自养方式进行大规模人工培养, 具有生长周期短、繁殖快、不受季节和气候的限制、易于提取等优点, 是生产海藻油的最优原料。但大部分微藻尤其是小球藻具有坚韧的细胞壁, 可阻碍油脂的提取, 使其生物利用率低, 因此在海藻油提取前必须对微藻细胞进行破壁处理。反复冻融具有操作简便, 不受外源性杂质污染的特点, 并且设备简单, 能源消耗低, 适合对光和热较敏感的活性物质的提取, 适合较大规模的生产。本实验拟采用反复冻融技术对小球藻进行破壁处

理, 以期小球藻的科学利用提供工艺基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小球藻藻泥(含水量 76%) 烟台富生科技有限公司。
95% 乙醇、氯仿、甲醇、丙酮均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FD-1 型冷冻干燥机、FC204 型电子天平、BCD-236H 型冰箱、SK-1 型快速混匀器、GR21G 型高速冷冻离心机、RE-52 型旋转蒸发器、101A-1E 型电热鼓风干燥箱、HH-S 型水浴锅、UV-2000 型紫外分光光度计。

1.3 方法

1.3.1 小球藻藻泥的预处理

用去离子水清洗小球藻三遍, 以除去营养盐及其他杂质, 清洗后的藻泥备用。

收稿日期: 2008-07-01

作者简介: 刘圣臣(1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为微藻活性物质的提取。E-mail: shengchenliu@163.com

* 通讯作者: 邹宁(1963-), 男, 教授, 博士, 研究方向为微藻细胞工程。E-mail: ningzou76@hotmail.com

1.3.2 海藻油反复冻融提取工艺流程

小球藻 清洗、浓缩 乙醇溶剂提取(反复冻融处理) 离心 小球藻残渣 脱溶 真空干燥 小球藻残渣

混合油 旋转蒸发 真空干燥 海藻油

回收乙醇

称取一定量的小球藻,于-20℃低温下冷冻,以乙醇为溶剂,在不同温度下融解提取1h,提取时用快速混匀器间歇震荡,反复冻融多次提取。提取结束后,3500r/min离心分离10min,收集上清液。上清液于旋转蒸发器上蒸干,得到的海藻油在50℃下干燥至恒重,计算出油率,每组实验三个平行,取平均值。

$$\text{出油率}(\%) = \frac{\text{海藻油质量}}{\text{小球藻干重质量}} \times 100$$

1.3.3 工艺条件对出油率影响的单因素试验

1.3.3.1 乙醇浓度对出油率的影响

在反复冻融4次,提取温度25℃,液料比为3:1的条件下,设置乙醇浓度为45%、55%、65%、75%、85%、95%,研究不同乙醇浓度对小球藻出油率的影响。

1.3.3.2 液料比对出油率的影响

在反复冻融4次,提取温度25℃,乙醇浓度95%的条件下,设置液料比(V/W)为1:1、2:1、3:1、4:1、1:5,研究不同液料比对小球藻出油率的影响。

1.3.3.3 冻融次数对出油率的影响

在提取温度25℃,乙醇浓度为95%,液料比3:1,冷冻温度-20℃条件下,设置冻融次数为1、2、3、4、5、6次,研究冻融次数对小球藻出油率的影响。

1.3.3.4 提取温度对出油率的影响

在反复冻融4次,液料比为3:1,乙醇浓度95%的实验条件下,设置不同提取温度15、25、35、45、55℃,研究不同提取温度对小球藻出油率的影响。

1.3.4 小球藻海藻油反复冻融提取工艺条件的优化

在单因素试验的基础上,选取冻融次数、液料比、乙醇浓度、提取温度为因素,以出油率为指标,设计四因素三水平(表1)正交试验,并按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,每个试验组合设三个平行,取平均值。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test on extraction technology of algae oil

水平	因素			
	A 冻融次数(次)	B 液料比(V/W)	C 乙醇浓度(%)	D 提取温度(℃)
1	1	2	75	25
2	2	3	85	35
3	3	4	95	45

1.3.5 乙醇对不同处理方式的小球藻海藻油提取的比较

将小球藻藻泥进行如下不同方式的处理:冷冻干燥成藻粉,反复冻融3次,新鲜藻泥。在液料比为3:1,提取温度25℃的实验条件下,利用95%乙醇分别进行提取,计算出油率。

1.3.6 小球藻乙醇反复冻融法与 Bligh-Dyer 法^[3]的比较

小球藻藻泥分别用95%乙醇反复冻融提取法和 Bligh-Dyer 法进行提取,计算出油率。检测各提取物中叶绿素的含量,叶绿素的测定参照文献[4]方法。

2 结果与分析

2.1 提取工艺的改变对小球藻出油率的影响

2.1.1 乙醇浓度对出油率的影响

在反复冻融4次,提取温度25℃,液料比为3:1的条件下,乙醇浓度对小球藻出油率的影响见图1。

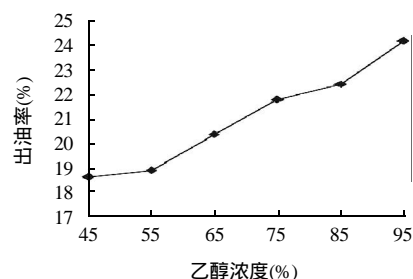


图1 乙醇浓度对出油率的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on oil extraction rate

图1可以看出,随着乙醇浓度的增大,出油率逐渐增大,趋势明显。由于原料小球藻为湿料,水分含量在70%,原料所带水分降低了提取溶剂乙醇的有效浓度,要充分提取海藻油,需要较高浓度的乙醇。

2.1.2 液料比对出油率的影响

在反复冻融4次,提取温度25℃,乙醇浓度95%的条件下,料液比对小球藻出油率的影响见图2。

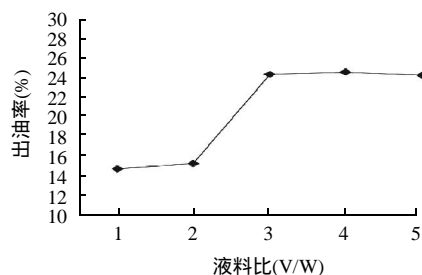


图2 液料比对出油率的影响

Fig.2 Effects of ratio of material to extractant on oil extraction rate

图2可以看出,随提取溶剂剂量的增加,出油率在开始时提高明显;当液料比大于3时,随着液料比的

增大,出油率没有明显变化,对于一定量的小球藻来说,溶剂的增加会降低混合油的浓度,增加了小球藻与溶剂接触面的浓度差,从而提高了油脂与溶剂间的扩散速率,出油率增大。但当液料比继续增大时,小球藻中海藻油大部分已被溶解出来,出油率增加缓慢^[5],而过多的溶剂增加了后续分离过程,从经济角度考虑,选择液料比 3:1 较为合适。

2.1.3 冻融次数对出油率的影响

在提取温度 25℃,乙醇浓度 95%,液料比 3:1 的条件下,冻融次数对小球藻出油率的影响见图 3。

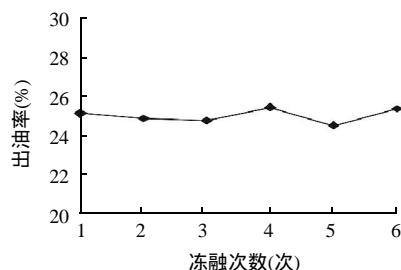


图3 冻融次数对出油率的影响

Fig.3 Effects of freeze-thaw times on oil extraction rate

由图 3 可看出,随着冻融次数的增大,出油率没有明显变化,说明小球藻在冻融一次后就可以进行海藻油的充分提取。从经济角度考虑最佳冻融次数为 1 次。

2.1.4 提取温度对出油率的影响

在反复冻融 4 次,液料比为 3:1,乙醇浓度为 95% 的条件下,提取温度对小球藻出油率的影响见图 4。

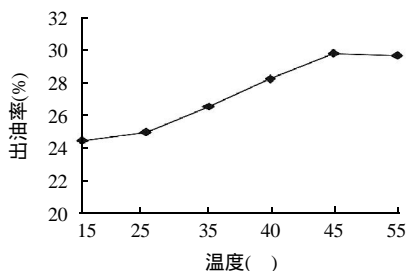


图4 提取温度对出油率的影响

Fig.4 Effects of extraction temperature on oil extraction rate

由图 4 可以看出,随着温度的升高,出油率初始升高明显,当温度升到 45℃以后,出油率趋于平稳,温度过高不但浪费电力而且增加了海藻油中不饱和脂肪酸的氧化,所以选取 45℃为最佳提取温度。

2.2 反复冻融提取小球藻海藻油工艺条件的综合优化

在以上单因素试验基础上采用正交试验,对反复冻融法提取小球藻海藻油工艺条件进行优化,结果见表 2。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results and range analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	因素				出油率(%)
	A 冻融次数 (次)	B 液料比 (V/W)	C 乙醇浓度 (%)	D 提取温度 (°C)	
1	1	2	75	25	18.21
2	1	3	85	35	21.47
3	1	4	95	45	24.28
4	2	2	85	45	22.11
5	2	3	95	25	19.70
6	2	4	75	35	20.45
7	3	2	95	35	19.83
8	3	3	75	45	23.71
9	3	4	85	25	19.92
I	63.96	60.15	62.37	57.83	
II	62.25	64.88	63.50	61.75	
III	63.46	64.66	63.81	62.81	
R	1.71	4.73	4.15	5.92	

由表 2 极差分析可以看出,各试验因素对出油率影响主次顺序为: $D > B > C > A$ 。即提取温度影响最大,其余依次为液料比、乙醇浓度和冻融次数。试验结果表明,选取 $A_1B_2C_3D_3$ 为提取小球藻海藻油的优化工艺条件,即冻融次数 1 次、液料比 3:1、乙醇浓度 95%、提取温度 45℃,在该条件下出油率可达 24.28%。

2.3 小球藻不同处理方式对出油率的影响

对离心浓缩后的小球藻藻泥,利用冷冻干燥、反复冻融方法进行处理,用新鲜藻泥做对照,可以看出,小球藻经反复冻融提取,出油率可以达到 24.28%,与经过冷冻干燥和未经处理直接提取相比(表 3),提取率差异显著。小球藻冷冻干燥成藻粉,得到高质量、易保存的产品。但藻细胞并没有完全破坏,乙醇不能从藻细胞中将海藻油完全提取,生物利用率低,提取率只有 4.21%,并且冷冻干燥因其设备复杂、耗能大等原因,只适用于微藻的储存加工,不适合海藻油的提取。新鲜藻泥不经过处理直接提取,虽然省时省力,但由于藻细胞细胞壁完整,不利于乙醇的渗透,提取率为 21.47%,同样不利于海藻油的提取。

表3 不同处理方式对小球藻出油率的影响

Table 3 Effects of different pre-treatment methods to chlorella on oil extraction rate

处理方法	冷冻干燥	反复冻融	新鲜藻泥
出油率(%)	4.21	24.28**	21.47

注: ** . 差异极显著。

将小球藻置于 -20℃ 的低温中,由于膜脂的不对称性,膜体紧缩不均而出现断裂,因而造成膜的破损渗漏,膜透性增加。藻细胞内外环境中的绝大多数水形

成冰晶,冰晶的形成产生了膨胀压,导致细胞产生机械损伤,最终使细胞破碎。所以藻细胞经反复冻融后,利于乙醇进入细胞抽提脂类。

2.4 反复冻融乙醇提取法与 Bligh-Dyer 法的比较

表4 乙醇反复冻融法与 Bligh-Dyer法的比较
Table 4 Comparison between freezing-thawing method and Bligh-Dyer method

提取方法	乙醇反复冻融提取法	Bligh-Dyer法
出油率(%)	24.28	24.92
海藻油中叶绿素含量(%)	8.79	6.37

由表4可以看出,反复冻融乙醇提取法与经典的 Bligh-Dyer 法相比,出油率相当,说明乙醇提取海藻油比较完全。藻类不饱和脂肪酸主要存在于糖脂、磷脂等极性脂中,由于乙醇的极性较强,所以提取的海藻油中极性的不饱和脂肪酸较多,但提取物中杂质也较多^[6],叶绿素的含量达8.79%,高于 Bligh-Dyer 法的6.37%,叶绿素的去除是海藻油后续纯化中要解决的问题。

与氯仿、甲醇等提取溶剂相比,乙醇对细胞的穿透能力较强,提取时间短、绿色无毒、价格便宜、来源方便,乙醇提取液不易发霉变质,由于这些原因,乙醇提取法是最常用的方法之一^[7]。

3 结 论

3.1 小球藻海藻油提取的优化工艺条件为:冻融次数1次,液料比3:1,乙醇浓度95%,提取温度45℃。

3.2 小球藻经反复冻融,用95%乙醇可以充分提取海藻油,提取率达24.28%。

3.3 与常规法提取相比,反复冻融乙醇提取海藻油的方法具有设备简单、易操作、提取时间短、无需加热、绿色无毒、出油率高等优点,所以有着广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 吴水清,姚汝华.微生物多价不饱和脂肪酸的研究[J].广州食品工业科技,1994(4):5-8.
- [2] 吴国欣,张其昌.高度不饱和脂肪酸的资源开发[J].海峡药学,1995,7(1):57-60.
- [3] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method lipid extraction and purification [J]. C J Biochem Physiol, 1959, 37: 911-923.
- [4] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002:197-199.
- [5] HAMM W, HAMILTON R J. Edible Oil Processing[M]. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2000.
- [6] 温少红,王长海,鞠宝.紫球藻细胞中AA、EPA及色素提取的研究[J].中国海洋药物,1999(2):28-31.
- [7] 毛姗姗.浅谈中药化学成分提取、分离和鉴定的方法[J].中外健康文摘:临床医师,2008,5(1):101-102.