

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 破壁方法对虾青素提取率的影响*

周湘池 刘必谦¹⁾ 曾庆国 蒋霞敏

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

(宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315012)

提要 采用匀浆法、冻融温差法、超声波法、直接研磨法和低温研磨法等 5 种破壁方法,研究了雨生红球藻提取虾青素时破壁方法对虾青素提取率的影响。结果表明,对雨生红球藻进行破壁是必要的。其中匀浆法、冻融温差法、超声波法、直接研磨法和低温研磨法等最佳破壁条件为:匀浆法破壁时间 22min,水为介质;冻融温差法破壁温度为 -70℃,时间为 12h 冻融 2 次,水为介质;超声功率 400W,每次超声时间 5s 共超声 25min;直接研磨法研磨时间 1min;加液氮低温研磨法破壁 2 次,每次时间 0.5min;虾青素的提取率依次为 0.76%、0.93%、1.03%、1.51% 和 3.21%。匀浆法和超声波法破壁由于要使用溶剂或介质,对后续的虾青素提取和分离会有影响,而直接研磨法在破壁过程中产生高温,降低了虾青素的生理活性,所以它们都不是雨生红球藻破壁的最佳方法。加液氮低温研磨法在破壁过程中不添加化学试剂,不产生污染,能最大限度地保留虾青素的生理活性,是所选方法中最好的一种。

关键词 雨生红球藻, 虾青素, 细胞破壁, 虾青素提取

中图分类号 Q946

虾青素 (Astaxanthin) 是唯一能通过血脑屏障的类胡萝卜素,其化学名是: 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β-胡萝卜素;分子式(通式)是: C₄₀H₅₂O₄;分子量为 596.86 虾青素分子由 4 个异戊二烯单位以共轭双键形式连接,两端又有 2 个异戊二烯单位组成六节环结构。虾青素具有水溶性和亲脂性,易溶于二硫化碳、丙酮、苯和氯仿等有机溶剂,化学性质活泼,易于氧化,氧化后变为虾红素(朱明军等, 2000)。在虾青素分子中,有很长的共轭双键,有羟基和在共轭双键链末端的不饱和酮,其中羟基和酮基又构成 α-羟基酮。虾青素的结构特点使其极易与自由基反应而清除自由基,起到抗氧化作用(范荣新, 2000)。研究表明(Miki, 1991),虾青素的抗氧化性比 β-胡萝卜素高了 10 倍以上,同时它还比维生素 E 的抑制脂质过氧化反应特性高 100 倍以上,被誉为“超级抗氧化

剂”,可显著提高人体的免疫力,具有显著的抗疲劳和抗衰老作用,天然虾青素的稳定性、抗氧化活性、生物利用安全性及生物效价等性能均显著优于人工合成产品,鉴于虾青素卓越的生理功能,其已被广泛应用于食品、医药、化妆品及水产养殖业中。

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种单细胞微藻,隶属绿藻门、团藻目、红球藻科、红球藻属(殷明焱等, 1998),是公认自然界中生产天然虾青素的最好生物来源,在极佳的培养条件下,雨生红球藻的虾青素含量可达 3% 以上,远高于红酵母和其他微生物,因此利用雨生红球藻提取虾青素,具有广阔的发展前景,极具大规模工业化生产潜力,已成为各国研究的热点。但是由于其细胞壁较厚,加大了从中提取虾青素的难度,也降低了藻粉直接作饵料的利用率。所以在

* 浙江省自然科学基金资助项目, 301208 号。周湘池, 副研究员, E-mail: zhouxiangch@nbu.edu.cn

1) 通讯作者: 刘必谦, 研究员, E-mail: lbqhy@nbu.edu.cn

收稿日期: 2004-12-07, 收修改稿日期: 2005-04-22

使用前必须将其细胞壁进行破碎(破壁)(Sommer *et al.* 1991)。

目前藻类常用的破壁方法主要有:机械研磨法(Bubrick 1991)、酶法(Mendes-Pinto *et al.* 2001)和化学法(Gudin *et al.* 1994, Judith *et al.* 2004)。在这几种方法中,研磨法对原料营养成分的损失较少;酶法破壁增加了后续分离的难度;化学法研究时间长,方法比较系统,破壁效果也不错,但其过程中用了有机溶剂,不但成本高,工艺复杂,且不够环保,不能达到食品生产的绿色标准。

本文中比较了匀浆法(薛艳华等, 2004)、冻融温差法、直接研磨法、超声波法(卢群等, 2003, Katsuda *et al.* 2004)和低温研磨法等五种破壁方法对雨生红球藻中虾青素提取率的影响,旨在从中选出最优化的破壁处理条件。

1 材料与方法

1.1 材料

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)由宁波大学水产系藻种室提供;虾青素标准样品购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 吸收曲线的绘制 用三氯甲烷配制一定浓度的虾青素标准溶液,用可见与紫外分光光度计扫描不同波长下的吸光度,确定测定虾青素的最佳波长。

1.2.2 标准曲线的绘制 配制一系列浓度不同的虾青素标准溶液,分别在最佳波长下测定吸光度。以标准溶液浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标作图,得标准曲线或工作曲线。

1.2.3 雨生红球藻提取物粗品中虾青素含量的测定 将各破壁条件下的样品用三氯甲烷提取,稀释定容,在最佳波长下测定吸光度。

1.2.4 工艺流程 雨生红球藻收集→离心($\geq 3600\text{r/min}$)→冷冻干燥→破壁→提取→三氯甲烷定容→虾青素含量测定。

1.2.5 破壁方法

(1)匀浆法:准确称取一定量的雨生红球藻样品,加入适量的水,置匀浆机中匀浆,用三氯甲烷提取,稀释定容,备用。

(2)冻融温差法:准确称取一定量的雨生红球藻样品,加入适量的溶剂,于低温下冷冻,再于室温下解冻,如此反复一定次数后,用三氯甲烷提取,稀释定容,备用。

(3)超声波法:准确称取一定量的雨生红球藻,加入适量的三氯甲烷,用频率为 $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5\text{Hz}$ 的超声波进行超声处理,稀释定容,备用。

(4)直接研磨法:准确称取一定量的雨生红球藻样品,置研磨器中研磨1min,加入适量的三氯甲烷提取,稀释定容,备用。

(5)低温研磨法:准确称取一定量的雨生红球藻样品,置研磨器中加液氮研磨0.5min,重复一次。加入适量的三氯甲烷提取,稀释定容,备用。

2 结果与讨论

2.1 吸收曲线

用三氯甲烷配制一定浓度的虾青素标准溶液和红球藻提取物溶液,测定在不同波长下的吸光度(图1、图2)。结果表明:虾青素在波长450—540nm中有一吸收带,其最大吸收波长为486nm。

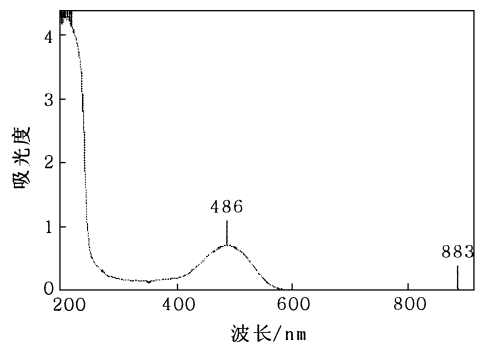


图1 虾青素标准品的吸收曲线

Fig. 1 Standard absorption curve of astaxanthin

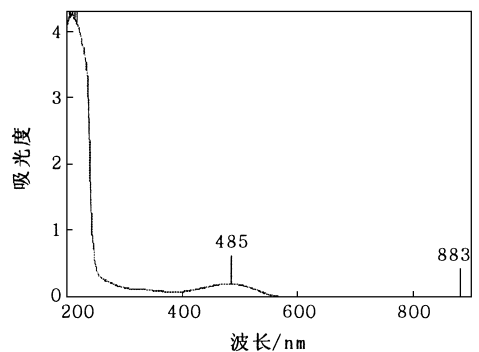


图2 雨生红球藻提取物的吸收曲线

Fig. 2 Absorption curve of astaxanthin extracted from

H. pluvialis

2.2 标准曲线

用一系列不同浓度的虾青素标准溶液分别

在 486nm 波长下测定其吸光度值。以标准溶液浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标作图(图 3)。

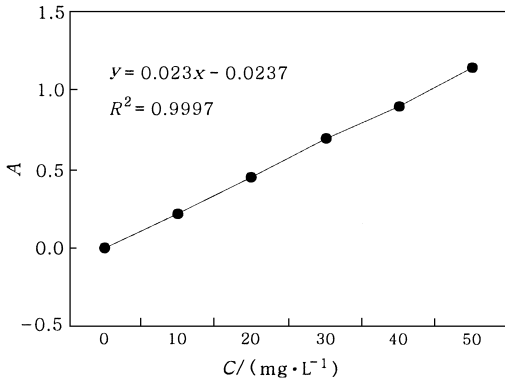


图 3 虾青素标准溶液在 486nm 波长下的吸光度

Fig. 3 Standard absorbency of astaxanthin in 486nm wavelength

2.3 匀浆破壁法虾青素的提取率

匀浆法是利用螺旋桨施加的搅拌离心力、挤压力、剪切力(或固体原料与液体溶剂之间的摩擦力)对细胞进行搅拌进而破碎细胞壁。由实验可知:匀浆破壁时间超过 22min 后,虾青素提取率曲线斜率变化缓慢,故再延长时间,对提取率无明显影响,因此,得出匀浆法破壁最佳时间为 22min 此时虾青素的提取率约为 0.76% (图 4)。

匀浆法破壁的效果不是很好,而且匀浆过程中产生高温,很容易使虾青素氧化而破坏其生理活性,故此法不适宜虾青素的提取。

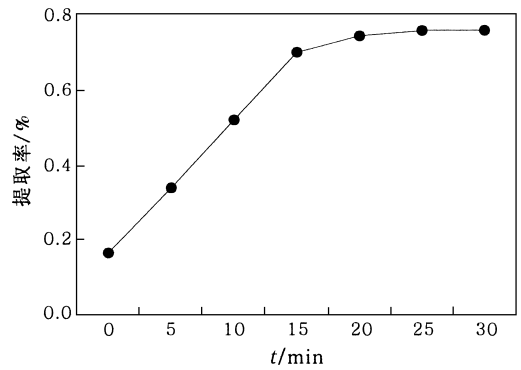


图 4 匀浆破壁法虾青素提取率 (%)

Fig. 4 The extraction rate (%) of astaxanthin in homogenate method

2.4 冻融温差法破壁时虾青素的提取率

冻融温差法是利用细胞温度的骤冷骤热变化导致细胞热胀冷缩从而达到破壁效果。本实验中从选取冻融温度、时间、作用方式及溶剂等四因素,做出 4 因素 3 水平的正交分析,冻融时,采用 9 组不同条件的实验进行比较,结果见表 1。

表 1 利用冻融温差法破壁获得的虾青素提取率

Tab. 1 The extraction rate of astaxanthin in freezing-thawing method

序号	冻融温度 (°C)	冻融时间 (h)	冻融次数	溶剂种类	虾青素提取率 (%)
1	-18	6	1	水	0.445
2	-18	12	2	三氯甲烷	0.337
3	-18	24	3	乙醇	0.324
4	-36	6	2	乙醇	0.511
5	-36	12	3	水	0.658
6	-36	24	1	三氯甲烷	0.529
7	-70	6	3	三氯甲烷	0.753
8	-70	12	1	乙醇	0.731
9	-70	24	2	水	0.926
均值 1	0.462	0.614	0.607	0.682	
均值 2	0.613	0.617	0.620	0.611	
均值 3	0.782	0.626	0.630	0.563	
极差	0.320	0.012	0.023	0.119	

分析结果

实验结果表明, 对实验结果影响的显著性从大到小依次为: 温度、加入的溶剂种类、方式、时间。

从正交表可以得到此时的最佳破壁条件: 温度为 -70°C , 时间为 24h 方式为冻融 3次, 加入的溶剂为水。考虑到一些实际操作因素和经济成本, 将最佳破壁条件调整为: 温度为 -70°C , 时间为 12h 冻融 2次, 加入溶剂为水, 此时虾青素的提取率约为 0.93%。

冻融温差法的优势在于设备简单, 操作比较容易, 适合较大规模的生产, 适合于对光和热较敏感的生理活性物质的提取, 但该方法对雨生红球藻的破壁效果一般。

2.5 超声波法破壁时的虾青素提取率 (功率 400W, 时间 5s 间隙 9s)

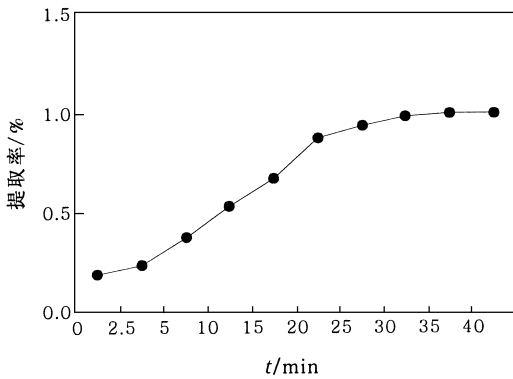


图 5 超声波法破壁时虾青素提取率

Fig. 5 The extraction rate of astaxanthin in ultrasonic method

由图 5 可知, 随着超声时间的增长, 虾青素提取率增加, 但超声破壁时间超过 25min 后, 提取率曲线斜率变化缓慢, 故再延长时间, 对提取率无明显影响, 因此, 认为超声波法破壁时间以 25min 为佳, 此时虾青素的提取率约 0.96%, 最高时已超过 1.0%。

超声波是一种频率为 $2 \times 10^4 - 2 \times 10^9 \text{ Hz}$ 的声波, 具有热效应、机械效应和空化效应, 可有效地破除溶质中的细胞壁, 利用超声波可以集破壁与提取于一体, 强化溶剂提取过程, 缩短提取时间, 提高提取率。超声波对雨生红球藻的破壁效果较好, 但因其破壁过程中产生高温, 为了避免虾青素氧化, 实际操作时要采用冰浴, 不太适合大规模提取; 同时破壁介质与提取时的溶剂要一致, 否则不利于目标产物的分离和纯化, 影响产品质量; 虾青素在有机溶剂中的溶解度较大, 若破壁过程中采用了有机溶剂, 则虾青素的提取方法就只能是溶剂法了, 这将限制后续的提取方法的选择, 如虾青素的二氧化碳超临界流体萃取。若破壁时采用了有机溶剂 (乙醇除外), 则提取的虾青素就不是绿色或有机产品, 使其附加值大大降低。因此, 超声波法不适合于雨生红球藻的破壁。

2.6 研磨法破壁时虾青素的提取率

由表 2 可知, 用研磨法进行破壁的效果较好, 直接研磨破壁时虾青素的提取率能达到 1.5% 左右, 但直接研磨时产生高温, 且研磨时间长, 破壁后部分虾青素暴露在空气中容易被氧化而破坏其生理活性, 故不适合于雨生红球藻的破壁; 加液氮低温研磨破壁后提取率能达到 3.2% 以上, 是所选方法中最好的一种。因为液氮的温度为 -196°C , 液氮挥发时使被研磨物变脆而使研磨时间变短, 所以低温研磨破壁法集中了研磨法和温差破壁两种方法的优点, 且使温差变得更大, 因而使破壁更有效, 且操作简单。破壁过程中不添加化学试剂, 不产生任何污染, 是一种全物理的破壁方法。若能设计特制接口, 将破壁后产物直接输送至二氧化碳超临界流体萃取仪的萃取釜, 则提取的虾青素可保持最大限度的生理活性和最高的提取率。

表 2 研磨法破壁时虾青素的提取率

Tab. 2 The extraction rate of astaxanthin in grinding method

序号	藻重 (g)	研磨条件	溶液体积 (ml)	吸光值	虾青素提取率 (%)
1	0.1502	空白	50	0.109	0.192
2	0.1505	直接研磨	100	0.500	1.514
3	0.1501	加液氮进行研磨	100	1.085	3.212

2.7 各种破壁方法下虾青素提取率(分光光度测定)

由表 3 可得,各破壁法组与空白组间以及低温研磨法与其他破壁法组间,行检验均 $P < 0.01$,差异很显著,且其均数间差异较大,表明各种破壁法均有较好的效果。而低温下机械研磨法的破壁效果最佳。

表 3 几种破壁法破壁结果

Tab. 3 Comparison among the results of several cell-wall breaking methods

萃取法	试验次数	提取率(%)
空白(不破壁)	4	0.192 ± 0.004
匀浆破壁法	4	0.759 ± 0.057
冻融温差破壁法	4	0.926 ± 0.042
超声波破壁法	4	1.027 ± 0.047
直接研磨法	4	1.514 ± 0.100
低温研磨法	4	3.212 ± 0.107

3 结论

3.1 从雨生红球藻中提取虾青素时,对其进行破壁是必要的。

3.2 在本实验所选破壁方法中,按匀浆法、冻融温差法、超声波法、直接研磨法和低温研磨法的顺序,破壁效果依次增强,虾青素的提取率分别为 0.76%、0.93%、1.03%、1.51% 和 3.21%,其中以低温研磨法为最好。

3.3 低温研磨法是雨生红球藻的较理想的破壁方法,破壁过程不影响虾青素的生理活性,无化学溶剂污染,破壁成本较低,工艺流程简单,适合于大规模生产。若能结合二氧化碳超临界流体萃取虾青素,则能最大限度地保留提取物的生理

活性。

参 考 文 献

- 卢 群,丘泰球,胡爱军,2003 超声强化法提取海藻油的研究. 广东药学院学报, 19(2): 104—105
- 朱明军,宗敏华,吴振强等,2000 虾青素研究进展. 食品工业科技, 21(2): 79—81
- 范荣新,2000. 虾青素的性质与开发. 海湖盐与化工, 29(6): 17—19
- 殷明焱,刘建国,张京浦等,1998 雨生红球藻和虾青素研究述评. 海洋湖沼通报, 2: 53—62
- 薛艳华,史 权,庞海河等,2004 灵芝孢子几种破壁方法比较分析. 植物研究, 24(4): 216—218
- Bubrick P, 1991. Production of astaxanthin from *Haematococcus Bionics Technol* 38: 237—239
- Gudin C, Trezzy C, Maillard P, 1994. Method for extracting carotenoids. Particularly astaxanthin, from a culture of microalgae. PCT Int Appl 94/23057: 105
- Judith R D, Klaus D, Tang C S *et al*, 2004. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Analytica Chimica Acta* 501: 175—181
- Katsuda T, Lababpour A, Shinahara K *et al*, 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 81—86
- Mendes-Pinto M M, Raposo M F J Bowen J *et al*, 2001. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis* effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Applied Phycology* 3: 19—24
- Miki W, 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure & Appl Chem*, 63: 141—146
- Sommer T R, Potts W T, Morrissy N M, 1991. Utilization of microalgae astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 94: 79—88

THE BEST CELL-WALL BREAKING METHOD FOR EXTRACTING ASTAXANTHIN FROM *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

ZHOU Xiang-Chi, LU Bi-Qian, ZENG Qing-Guo, JIANG Xia-Min

(Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211)

(Institute of Ocean and Fishers of Ningbo City, Ningbo 315012)

Abstract Astaxanthin, a naturally occurring carotenoid pigment, is a powerful biological antioxidant that exhibits strong free radical scavenging activity and protects against lipid peroxidation and oxidative damage. Astaxanthin has become a focus of research with growing number of scientific publications, and be applied broadly in the fields of food, medicine and aquaculture.

Haematococcus pluvialis, a type of microscopic green algae, is one of the most important natural sources of carotenoid astaxanthin being used as a pigment in aquaculture. However, the astaxanthin extraction from *H. pluvialis* is affected by thick sporopollenin cell wall of its cysts. Therefore, breaking up the cell wall is necessary in the procedure of the extraction. We tested four different cell-wall breaking methods for comparing the extraction efficiency, including homogenization, freezing-thawing, ultrasonication and mortar-grinding. For each method, the optimal condition was examined along with the corresponding extraction rate calculated simultaneously. The results showed that 22-minute homogenization was long enough to break up the cell walls and could reach the extraction rate of 0.76%. For the freezing-thawing method, *H. pluvialis* was frozen at -70°C in water for 12 hours, then the sample was taken out from the refrigerator and thawed at room temperature. This procedure was repeated for two times, the extraction rate was 0.93%. In ultrasonic method, the sample was treated in (2×10^4) Hz - (2×10^9) Hz power of ultrasound for 25 minutes. This method reached the extraction rate at 1.03%. However, the use of organic solvent in the homogenate method and ultrasonic method would cause a negative impact on extraction and purification of astaxanthin.

For the grinding method, mortar-grinding the sample for 1 minute was proper for the extraction of astaxanthin, reaching the extraction rate at 1.51%. Besides, the method is less expensive and simple so that it is applicable for large-scale production. The only side effect is the heat that produced during the grinding, which could destroy the biological activity of astaxanthin. To avoid it, liquid nitrogen was applied during grinding to reduce the air oxidation of astaxanthin, which enhanced the extract rate to 3.21%. Thus, the grinding method at low temperature is recommended. In future, the follow-up work will test the combination of the grinding with carbon dioxide supercritical fluid to protect in maximum the biological activity of astaxanthin.

Key words *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin, Cell-wall breaking, Astaxanthin extraction