

# 响应面法优化雨生红球藻虾青素的 超声提取工艺

齐计英<sup>1</sup>, 姚依婧<sup>1</sup>, 岑琴<sup>2</sup>, 韩静<sup>1\*</sup>, 郑士彬<sup>1</sup>

(1. 沈阳药科大学, 辽宁沈阳 110016;

2. 沈阳产品质量监督检验院, 辽宁沈阳 110022)

**摘要:**以雨生红球藻为原料, 选取乙酸乙酯:乙醇(v/v, 1:1)为提取溶剂, 采用超声法提取虾青素, 固定液料比为100:1, 以超声功率、超声时间和超声温度为因子, 虾青素提取率为评价指标, 在单因素实验的基础上, 利用响应面法对提取条件进行优化。三因素对虾青素提取率的影响顺序为: 时间>温度>功率。优化得到的最佳提取条件为: 超声功率200W、时间30min、超声提取温度25℃, 在此条件下提取率可达1.045%, 与预测值1.05%相近, 表明模型可用。

**关键词:**雨生红球藻, 虾青素, 响应面法, 超声提取

## Optimization of ultrasonic extraction technology of astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis*

QI Ji-ying<sup>1</sup>, YAO Yi-jing<sup>1</sup>, CEN Qin<sup>2</sup>, HAN Jing<sup>1\*</sup>, ZHENG Shi-bin<sup>1</sup>

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Shenyang Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shenyang 110022, China)

**Abstract:** *Haematococcus pluvialis* powder was used as raw material, ethyl acetate and ethanol (volume ratio 1:1) was selected as the best extraction solvent. Taking astaxanthin yield as the evaluation index and ultrasound power, extraction time, and extraction temperature as the factors, and fixing ratio of solution to material 100:1, the ultrasound method for extracting astaxanthin was researched. And then, based on the single factor experiment, the optimum conditions to ultrasound extracting astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* were got by response surface methodology. The results showed that the effect of the extraction conditions was time > temperature > ultrasound power, and the optimum extraction conditions were ultrasound power 200W, time 30min, temperature 25℃. Under this condition, the extraction rate could reach 1.045% and the content of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* was 1.05%. The optimized model by RSM agreed well with practice.

**Key words:** *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin (ASTA); response surface methodology; ultrasonic extraction

中图分类号: TS202

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)06-0313-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.06.060

虾青素是类胡萝卜素的含氧衍生物, 属于酮式类胡萝卜素, 全称为3, 3'-二羟基-4, 4'-二酮基-β, β'-胡萝卜素<sup>[1]</sup>。虾青素具有极强的清除自由基和猝灭活性氧的活性<sup>[2-4]</sup>, 此外, 虾青素具有抑制肿瘤发生、增强免疫功能等多方面的生理作用<sup>[5]</sup>, 特别是抗氧化功能超强, 被誉为“超级抗氧化剂”, 且对人体绝对无毒害作用<sup>[6]</sup>。虾青素已被广泛应用于食品、医药、化妆品及养殖行业<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>, 是自然界天然虾青素含量最高的生物, 含量达到干细胞的2%~4%<sup>[9]</sup>。由于藻细胞

壁较厚且存在胶质, 加大了虾青素的提取难度, 所以寻找简便、高效的提取方法是大规模培养雨生红球藻及其高值商业化必须解决的问题<sup>[10]</sup>。

目前, 国内外学者已对虾青素的提取方法进行大量研究, 如微波法<sup>[11]</sup>、低温研磨萃取法<sup>[12-13]</sup>、碱提法<sup>[14]</sup>和加液氮研磨法<sup>[12]</sup>等<sup>[15]</sup>。近年来, 超声辅助提取技术得到了广泛的应用<sup>[16]</sup>, 其中超声波提取法在中草药化学成分提取<sup>[17-18]</sup>中已经显示出明显的优势, 具有省时、节能、提取率高等优点<sup>[19-20]</sup>。除了空化和振动作用外, 超声波的许多次级效应, 如乳化、扩散、化学效应等也能促进植物中有效成分的转移, 使其充分

收稿日期: 2014-06-18

作者简介: 齐计英(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物制剂。

\* 通讯作者: 韩静(1967-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 纳米技术制药。

基金项目: 辽宁省沈阳市科学技术局(F13-311-4-00)。

和溶剂混合,促使提取进行<sup>[21]</sup>,现已有超声-正己烷萃取虾青素<sup>[22-23]</sup>等报道。

本实验采用超声水浴提取法从雨生红球藻孢子中提取虾青素,并在单因素实验基础上采用响应面法(response surface methodology)对超声提取过程中的各因素进行优化,以确定提取工艺方案,提高虾青素提取效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)藻粉(<1.5%) 荆州市天然虾青素有限公司;丙酮、乙酸乙酯、无水乙醇、氯仿、二甲基亚砜(DMSO)等均为国产分析纯试剂。

UV2800紫外可见分光光度仪 上海舜宇恒平科学仪器;DF-101S型恒温加热磁力搅拌器 巩义英峪予华;DZF-1型真空干燥箱 北京光明医疗;旋转蒸发仪RE-52 上海亚荣生化仪器;SHZ-D循环水式真空泵 上海博迅实业;JY92-2D超声细胞粉碎机 宁波新芝生物科技。

### 1.2 实验方法

1.2.1 提取溶剂的确定 各取100mg藻粉于烧杯中,分别加入5mL丙酮、乙酸乙酯、无水乙醇、乙酸乙酯:无水乙醇(v/v,1:1)、乙酸乙酯:无水乙醇(v/v,1:2)、氯仿、氯仿:无水乙醇(v/v,1:1)、二甲基亚砜;将烧杯固定在20℃水浴锅中,安装超声探头,将探头浸于烧杯溶液中进行100W超声水浴提取30min;然后进行真空抽滤,将滤液分别用各提取溶剂定容至25mL;取1mL溶液减压浓缩后用DMSO定容至25mL,在492nm波长下测定吸光度。

1.2.2 单因素实验 按照1.2.1提取方法,取100mg藻粉于烧杯中,在液料比100:1,温度20℃条件下,置于100、150、200、250、300、350W下超声提取30min;在功率200W,液料比100:1,温度20℃条件下,设置提取时间10、20、30、40、50、60min 6个水平;在功率200W,液料比100:1,提取时间30min条件下,分别置于10、20、30、40、50、60℃下提取;在功率200W,温度20℃,提取时间30min条件下,分别选取液料比50:1、100:1、150:1、200:1、250:1、300:1共6个水平;各组进行虾青素提取率的测定。

1.2.3 虾青素提取率的测定 采用二甲基亚砜法<sup>[24-25]</sup>测定提取液中虾青素含量。雨生红球藻中提取得到总虾青素的浓度 $C_1$ (mg/mL):

$$C_1 = \frac{1000 \times A_{492}}{100 \times E_{1\%}^{1\text{cm}}}$$

式中: $A_{492}$ —待测溶液在492nm波长下的吸光值; $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ —虾青素溶液体积分数为1%、光径为1cm时的吸光值, $E_{1\%}^{1\text{cm}}=2200$ 。

计算雨生红球藻中虾青素的提取率 $C_2$ (%):

$$C_2 = \frac{C_1 \times V}{M} \times 100\%$$

式中: $V$ —一定容后提取液的总体积,mL; $M$ —所用雨生红球藻的干重,mg。

1.2.4 响应面分析优化提取参数的研究 以超声功

率(A)、超声时间(B)和水浴温度(C)等因素作为考察对象,以虾青素提取率(Y)为响应值,采用Design Expert 8.0统计分析软件的响应面分析法安排实验,共有17个实验点(中心点重复5次,用于估计实验误差),以获取最适工艺参数。实验水平因素安排见表1。

表1 因素水平表

Table 1 The factors and levels

水平	因素		
	A 超声功率(W)	B 超声时间(min)	C 水浴温度(℃)
-1	150	20	10
0	200	30	20
1	250	40	30

## 2 结果与分析

### 2.1 提取溶剂的确定

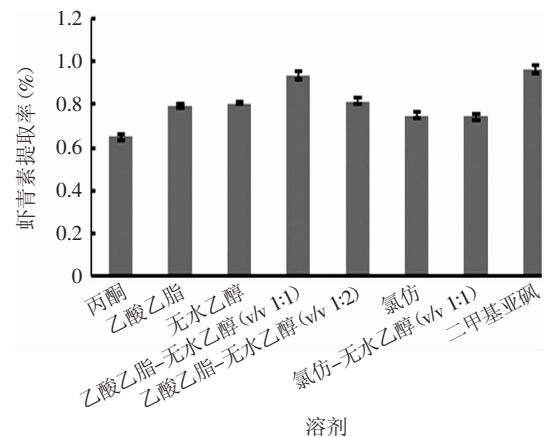


图1 不同有机溶剂的效果

Fig.1 Effect of different organic solvents

由图1可知,不同有机溶剂提取相同质量藻粉所得虾青素提取率有明显的差异。虾青素提取率较大的溶剂为二甲基亚砜、乙酸乙酯:乙醇(v/v,1:1),提取率分别为0.963%、0.934%;其次为乙酸乙酯和无水乙醇分别为0.79%和0.807%,丙酮(0.648%)最低。考虑到产品中溶剂残留的安全性问题,尽量选用无毒无害溶剂,因此最终选用乙酸乙酯:乙醇(v/v,1:1)作为最佳提取溶剂。

### 2.2 单因素实验结果

由图2可知,在提取功率为100~200W时,虾青素提取率随功率的增大而升高,这可能是因为对于一定频率和一定发生面的超声波来说,功率越大,声强越大,单位时间内超声产生的空化事件增多,从而有利于提取效果的提高<sup>[26]</sup>。但在功率超过200W时,虾青素提取率随功率的升高而降低,这是由于超声产生的高能量使虾青素降解或异构化<sup>[27]</sup>。因此,选取200W为超声提取虾青素的最优功率。

由图3可知,在提取时间为10~30min时,虾青素提取率随提取时间的延长而提高,但提取时间超过30min时,虾青素提取率随时间的延长而降低。这是

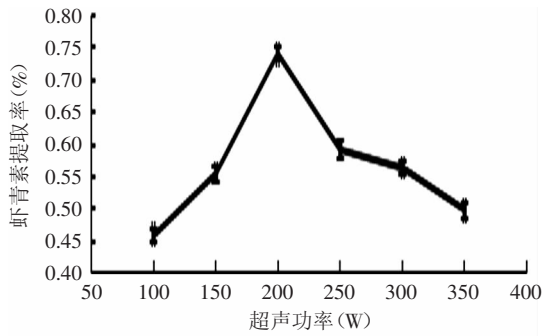


图2 超声功率对虾青素提取率的影响  
Fig.2 Effect of ultrasonication power on the yield of ASTA

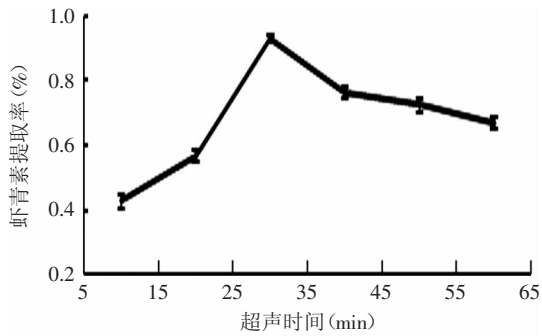


图3 超声提取时间对虾青素提取率的影响  
Fig.3 Effect of ultrasonication time on the yield of ASTA

因为提取时间的延长使绝大部分虾青素提取出来；但是，在没有抗氧化剂的溶液系统内，长时间的浸提会诱导产生一系列的化学反应，虾青素结构中-OH发生部分氧化分解，使提取率降低。因此，选取30min为最佳提取时间。

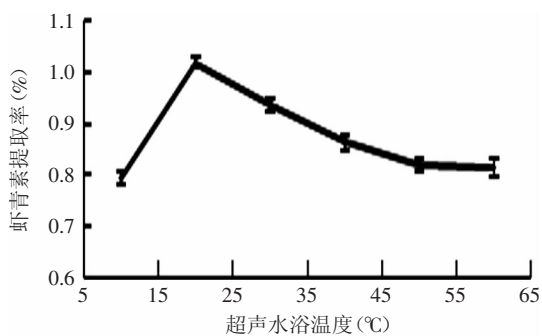


图4 超声水浴温度对虾青素提取率的影响  
Fig.4 Effect of ultrasonication temperature on the yield of ASTA

由图4可知，在提取温度10~20°C时，虾青素提取率随温度升高而升高，这是由于虾青素在提取剂中的溶解度随温度的升高而增加。但超过20°C时虾青素提取率随温度提高而降低，这可能是由于温度升高，不稳定双键在溶液系统产生聚合反应，使虾青素提取率降低。为更好遵循节能原则，选择20°C即可。

由图5可知，当液料比小于100:1时，藻粉不能完全浸入提取溶剂中；当液料比大于等于100:1时，藻粉能够完全浸入提取溶剂中，但是随着液料比的增加，虾青素提取率无明显变化，说明液料比对虾青素的超声提取效果没有明显影响。因此，在响应面优化

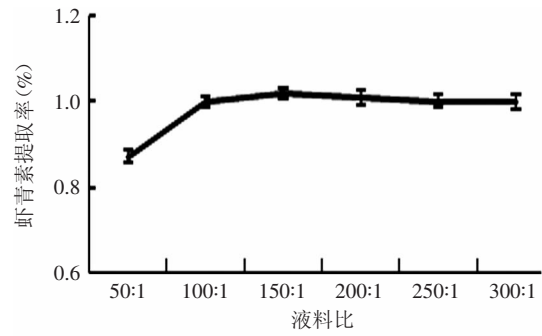


图5 提取液料比对虾青素提取率的影响  
Fig.5 Effect of solid-liquid ratio against astaxanthin extraction yield

实验中固定液料比为100:1。

### 2.3 响应面分析结果

2.3.1 响应值结果 见表2。

表2 实验设计方案及响应值结果

Table 2 Experimental matrix and values of observed responses

实验编号	A	B	C	Y 提取率 (%)
1	-1	0	1	0.838
2	1	0	1	0.875
3	1	1	0	0.682
4	1	0	-1	0.713
5	0	0	0	0.994
6	0	0	0	1.08
7	0	0	0	1.05
8	0	-1	-1	0.455
9	1	-1	0	0.446
10	0	0	0	1.02
11	0	-1	1	0.568
12	-1	1	0	0.659
13	0	1	-1	0.719
14	0	1	1	0.881
15	-1	0	-1	0.645
16	0	0	0	0.934
17	-1	-1	0	0.426

2.3.2 回归方程 利用软件对实验结果进行二次多元回归拟合，对表3的数据进行方差分析后得到模型的二次多项回归方程为： $Y=1.02+0.019A+0.13B+0.079C+7.500E-004AB-7.750E-003AC+0.012BC-0.18A^2-0.29B^2-0.073C^2$

2.3.3 方差分析的结果 由表3方差分析可知，拟合的二次多元方程的 $p<0.0001$ ，说明用上述回归方程描述的因变量与全自变量之间的回归效果高度显著。因此可以用此模型对影响虾青素提取率的因素进行分析。由表3可知，B、C、 $A^2$ 、 $B^2$ 对Y的影响高度显著， $C^2$ 对Y的影响显著；A对Y的影响不显著；AB、AC、BC交互作用不显著。提取因素对虾青素提取率作用强弱的顺序为 $B>C>A$ 。各因素交互作用响应曲面图如图6所示。

由图6可知，响应面等高线曲线越陡，说明实验

表3 响应面方差分析

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p值
模型	0.73	9	0.081	37.37	<0.0001**
A	2.738E-003	1	2.738E-003	1.26	0.2987
B	0.14	1	0.14	62.93	<0.0001**
C	0.050	1	0.050	22.83	0.0020**
AB	2.250E-006	1	2.250E-006	1.035E-003	0.9752
AC	2.402E-004	1	2.402E-004	0.11	0.7493
BC	6.002E-004	1	6.002E-004	0.28	0.6154
A <sup>2</sup>	0.13	1	0.13	59.45	0.0001**
B <sup>2</sup>	0.35	1	0.35	159.77	<0.0001**
C <sup>2</sup>	0.022	1	0.022	10.23	0.0151*
残差	0.015	7	2.173E-003		
失拟项	2.738E-003	3	9.128E-004	0.29	0.8297
纯误差	0.012	4	3.119E-003		
总变异	0.75	16			

注:\*\*表示1%水平差异显著;\*表示5%水平差异显著。

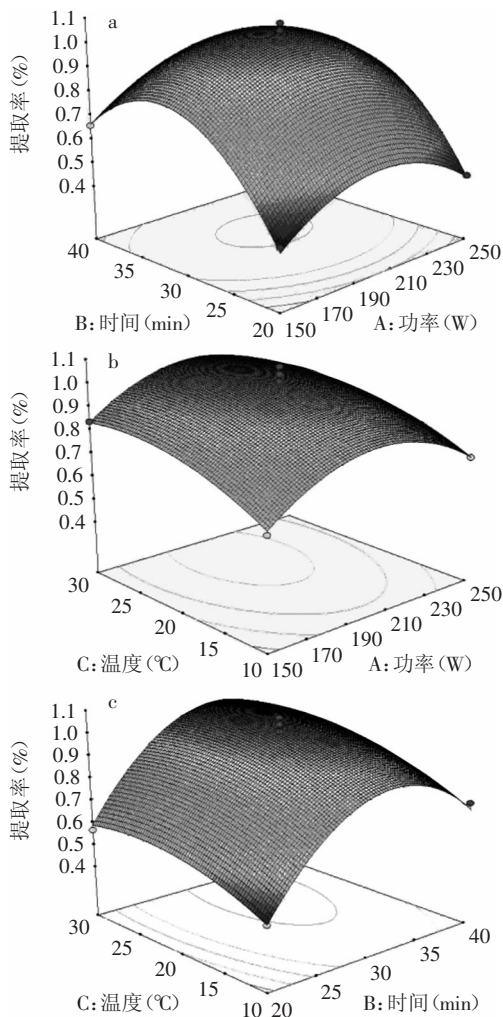


图6 超声功率、时间和超声水浴温度三因素交互作用对虾青素的提取率影响

Fig.6 Response surface (3D) showing the effect of ultrasonication power(A), extraction time(B), and ultrasonication temperature(C) on the response value of extraction yield

因子对虾青素的提取效果影响越显著,这和方差分析的结果相一致。同时软件分析得到的复相关系数 $R^2$ 为97.96%,证明该模型拟合程度良好,实验误差小,该模型是合适的。对回归方程求解,得到最优组合为:功率202.00W、时间32.00min、温度26.00℃。考虑到实验操作可行性,虾青素最优提取条件调整为:功率200W、时间30min、温度25℃,在上述最优条件下实验,重复三次,测得虾青素提取率分别为:1.04%、1.045%、1.05%,取平均值为1.045%,与理论预测值1.05%接近,说明经过优化后的回归方程对提取虾青素进行分析和预测非常可靠。

#### 2.4 超声法与常规法提取的比较

取两份同样的藻粉,分别按上面响应面优化得到的条件,采用超声方法和传统水浴回流方法提取虾青素,结果见表4。

表4 不同提取方法的比较

Table 4 Comparison of different extraction methods

提取方法	A(W)	B(min)	C(℃)	Y(%)
超声提取	200	30	25	1.045
水浴回流提取	-	60	50	0.87

从表4中可以看出,超声方法更节能、省时,提取效率远高于传统水浴回流。这是因为藻细胞壁厚,采用一般水浴回流提取,有效成分渗出需要的时间长、温度高,虾青素长时间接触空气比较容易被氧化;而利用超声提取技术,超声波对细胞产生的空化效应和机械效应,将细胞壁及整个生物体破裂,极大加快了提取过程,减少能耗、节时,提取率提高。

### 3 结论

雨生红球藻中虾青素含量高,是获取虾青素的最好来源,但由于藻细胞壁较厚,且虾青素易被氧化、不适宜高温加热限制了虾青素的提取。实验发

(下转第321页)



- [14] 韩晓雷, 杨增. 测定牛肉pH对其新鲜度判定应用研究[J]. 黑龙江畜牧科技, 1998(3):1.
- [15] Denoyelle C, Lebihan E. Intramuscular variation in beef tenderness[J]. Meat Science, 2004, 66(1): 241-247.
- [16] 孙志昶, 冯晓琴, 韩玲, 等. 牦牛肉宰后成熟嫩化与细胞凋亡酶活力变化研究[J]. 农业机械学报, 2014(1): 191-196, 202.
- [17] 沈月新, 宋立华. 冷却肉、热鲜肉、冻肉超微结构的研究[C]. 食品工业科技, 2001, 增刊: 182.
- [18] 田甲春, 韩玲, 刘昕, 等. 牦牛肉宰后成熟机理与肉用品质研究[J]. 农业机械学报, 2012(12): 146-150.
- [19] 赵立男, 热夏提达·吾来提, 杨随霞, 等. 马肉不同部位的品质特性分析[J]. 肉类研究, 2013(7): 35-39.

(上接第316页)

现, 采用超声波水浴处理更节能、省时, 提取效率远高于传统水浴回流。

通过有机溶剂选择实验, 得到最佳提取溶剂为乙酸乙酯:乙醇(v/v, 1:1); 单因素实验得到提取条件为超声功率200W、时间30min、超声提取温度20℃、液料比100:1; 在单因素的基础上对超声功率、时间、超声提取温度三因素进行响应面优化, 得最优工艺条件: 超声功率、时间、超声提取温度分别为200W、30min、25℃。在最优条件下, 进行验证实验, 结果表明, 虾青素提取率可达到1.045%, 与理论预测值1.05%接近, 表明模型可用, 可为虾青素的实际生产提供理论依据。

#### 参考文献

- [1] 付佳, 杨月欣, 张立实. 天然虾青素的生物保健功能及安全性概述[J]. 国外医学(卫生学分册), 2007, 34(6): 382-386.
- [2] Lee S H, Min D B. Effects, quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photo oxidation of soybean oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(8): 1630-1634.
- [3] Naguib Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2000, 48(4): 1150-1154.
- [4] 柴建新, 万茵, 付桂明, 等. 雨生红球藻中总虾青素提取工艺优化[J]. 中国食品添加剂, 2011(3): 107-111.
- [5] Nishikawa Y, Minenaka Y, Ichimura M. Physiological and biochemical effects of carotenoid(beta-carotene and astaxanthin) on rat[J]. Kashien Daigaku Kiyo, 1997, 25: 19-25.
- [6] 魏东. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 在诱导条件下积累虾青素的调控机理研究新进展[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(2): 60-64.
- [7] 张明祥, 赵建国. 国内外虾青素的研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2002(1): 26-28.
- [8] 殷明焱, 刘建国. 雨生红球藻和虾青素研究述评[J]. 海洋湖沼通报, 1998(2): 53-62.
- [9] 魏东, 臧晓南. 大规模培养雨生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状[J]. 中国海洋药物, 2001(5): 4-8.
- [10] 沈渊, 蔡明刚, 黄水英, 等. 利用光生物反应器培养雨生红球藻的研究初探[J]. 海洋科学, 2010, 10: 83-89.
- [11] Balasubramanian S, Allen J D, Kanitkar A, et al. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system-design, optimization, and quality characterization[J]. Bioresource technology, 2011, 102(3): 3396-3403.
- [12] 周湘池, 刘必谦, 曾庆国, 等. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*) 破壁方法对虾青素提取率的影响[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 424-429.
- [13] 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.
- [14] 丁纯梅, 陶庭先, 吴之传. 龙虾虾壳的综合利用(I)—虾壳红色素的提取及其性质研究[J]. 化学世界, 1995(8): 444-445.
- [15] 刘晓娟, 伍颖华, 何凤林, 等. 响应面法优化雨生红球藻虾青素的提取条件[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 233-238.
- [16] 卢群, 丘泰球, 胡爱军. 超声强化法提取海藻油的研究[J]. 广东药学院学报, 2003, 19(2): 104-105.
- [17] 郭孝武. 超声与常规法对部分中药药类成分提出率的比较[J]. 中国医药工业杂志, 1998, 29(2): 51-54.
- [18] 陈艳莉. 超声法提取绞股蓝皂甙[J]. 现代应用药学, 1994, 11(6): 11-12.
- [19] 项昭保, 霍丹群. 超声波在中草药化学成分提取中的应用[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 289-291.
- [20] 蒲彪, 岳金玫, 陈安均, 等. 响应面法优化块菌多糖的超声波辅助提取工艺[J]. 核农学报, 2013, 27(7): 996-1002.
- [21] 应崇福. 超声波在固体中传播和散射的研究[J]. 中国科学院院刊, 1990(1): 56-59.
- [22] Bock C, Pröschold T, Krienitz L. Two new Dictyosphaerium-morphotype lineages of the Chlorococcales (Trebouxiophyceae): *Heynigia* gen nov and *Hindakia* gen nov[J]. European Journal of Phycology, 2010, 45(3): 267-277.
- [23] Ranjan A, Patil C, Moholkar V S. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2010, 49(6): 2979-2985.
- [24] 陈晓飞, 严小军. 红球藻虾青素含量测定方法的探讨[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2008, 20(4): 441-445.
- [25] Boussiba S, Fan L, Vonshak A. Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Methods in enzymology (USA), 1992, 213(36): 386-391.
- [26] 杨磊, 唐晓溪, 赵春建, 等. 响应面法优选桃儿七中的鬼白毒素的超声提取工艺[J]. 化工进展, 2009, 28(2): 297-304.
- [27] 裘晖, 朱晓立. 虾青素的结构与功能[J]. 食品工程, 2007(1): 16-18.