

# (乙醇 + 丙酮) / 硫酸铵二元双水相萃取分离螺旋藻中 $\beta$ -胡萝卜素

张喜峰<sup>1</sup>, 杨生辉<sup>2</sup>, 罗光宏<sup>2\*</sup>, 王丹霞<sup>2</sup><sup>1</sup>河西学院农业与生物技术学院; <sup>2</sup>河西学院凯源生物技术开发中心 甘肃省微藻工程技术研究中心, 张掖 734000

**摘要:** 采用(乙醇 + 丙酮)(v/v = 1:2)/硫酸铵双水相体系分离螺旋藻  $\beta$ -胡萝卜素, 确定其体系组成为 15% (乙醇 + 丙酮)(v/v = 1:2) 和 24% 硫酸铵。通过单因素和 Box-Behnken 实验探讨  $\beta$ -胡萝卜素粗提液、pH、萃取温度对萃取效果的影响。结果表明:  $\beta$ -胡萝卜素粗提液质量分数为 6%、体系 pH 8.0、萃取温度 30 °C 时, 萃取率可达 94.55%。研究结果为  $\beta$ -胡萝卜素提取分离提供了新途径, 双水相萃取技术在天然  $\beta$ -胡萝卜素提取中具有良好应用前景。

**关键词:** 螺旋藻;  $\beta$ -胡萝卜素; 双水相

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.005

## Extraction of $\beta$ -Carotene from *Spirulina* Using Ethanol and Acetone-Ammonium Sulphate Aqueous Two-Phase System

ZHANG Xi-feng<sup>1</sup>, YANG Sheng-hui<sup>2</sup>, LUO Guang-hong<sup>2\*</sup>, WANG Dan-xia<sup>2</sup><sup>1</sup>The College of Agriculture and Biotechnology (CAB), Hexi University; <sup>2</sup>Microalgae Engineering

Research Center of Gansu Province, Kaiyuan Bio-tech Development Center, Hexi University, Zhangye 734000, China

**Abstract:** In this study, an aqueous two-phase system composed of 15% (W/W) ethanol and acetone (v/v = 1:2)-24% (W/W) ammonium sulphate was selected to extract  $\beta$ -carotene from *Spirulina*. The effect of crude extract concentration, pH, extraction temperature on the extraction efficiency of  $\beta$ -carotene were investigated by single factor and Box-Behnken design methods. The results showed that the optimal conditions for the extraction of  $\beta$ -carotene were: crude extract concentration of 6% (W/W), pH of 8.0 and extraction temperature of 30 °C. The maximal extraction efficiency (94.55%) was obtained under the optimal conditions. These results suggested that ATPE is efficient in extracting  $\beta$ -carotene and has the potential to be used in natural  $\beta$ -carotene extraction industry.

**Key words:** *Spirulina*;  $\beta$ -carotene; aqueous two-phase

螺旋藻 (*Spirulina*) 是一类低等植物, 属于蓝藻门, 颤藻科。是一种深青色的丝状微藻, 在高倍显微镜下可观察到, 它是由单细胞单列构成的纤细螺旋状藻体, 故称螺旋藻。螺旋藻含有丰富的蛋白质、多糖、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\gamma$ -亚麻酸、叶绿素及多种维生素和矿物质<sup>[1]</sup>。其中  $\beta$ -胡萝卜素含量约是胡萝卜的 15 倍, 具有防癌抗癌、提高免疫力、延缓衰老等多种保健功能<sup>[2]</sup>, 其提取及剂型开发在保健和医疗领域中的应用日益得到了人们的重视。

$\beta$ -胡萝卜素提取方法主要有: 有机溶剂提取<sup>[3]</sup>、微波辅助提取<sup>[4]</sup>、超临界 CO<sub>2</sub> 萃取<sup>[5,6]</sup>、超声波萃取<sup>[7]</sup>、大孔树脂吸附法<sup>[8]</sup>。这些方法或者存在提取

效率较低、溶剂残留、毒性较大, 或存在设备要求高、能耗高、成本高。采用大孔吸附树脂, 前处理方法复杂, 而且提取率较低, 费时。双水相萃取具有不存在有机溶剂残留、分相时间短、能除去大量杂质和固体物质、易于工程放大和连续操作等优点, 被广泛应用于生物化学和生物化工、天然活性产物等领域。至今尚无双水相萃取螺旋藻  $\beta$ -胡萝卜素的研究报道。

本实验在(乙醇 + 丙酮)体系中, 通过加入硫酸铵形成二元双水相体系, 考察了影响双水相形成的因素, 重点研究了  $\beta$ -胡萝卜素粗提液、pH、温度对双水相萃取  $\beta$ -胡萝卜素分配行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

螺旋藻由甘肃微藻工程中心提供。 $\beta$ -胡萝卜素标准品; 氢氧化钠、硫酸铵、乙醇、丙酮、浓盐酸均为

收稿日期: 2014-07-25 接受日期: 2014-12-31

基金项目: 甘肃省高等教育科研项目(2014A-109; 2014B-086); 甘肃省中小企业创新基金(1047GCCG001)

\* 通讯作者 E-mail: luoguanghong@163.com

分析纯。

## 1.2 仪器与设备

PL-203 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),XO-SM50 超声波-微波反应系统(南京先欧仪器制造有限公司),DKB-501 数显超级恒温水浴锅(扬州市三发电子有限公司),DHG-9101.1 电热恒温鼓风干燥箱(上海光谱仪器有限公司),722 型分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 $\beta$ -胡萝卜素粗提液的制备

准确称取 10 g 螺旋藻粉末,以 1:10(g/mL) 料液比加入乙醇:丙酮 = 1:2(v/v) 混合中<sup>[5]</sup>,在超声波反应系统下,超声 10 min,5000 rpm 离心 10 min,上清液  $\beta$ -胡萝卜素粗提液,测定粗提液中  $\beta$ -胡萝卜素的含量。

### 1.3.2 双水相萃取方法

称取一定量乙醇丙酮混合液(v/v = 1:2)、硫酸铵、 $\beta$ -胡萝卜素粗提液、蒸馏水于小烧杯中,使双水相体系总质量为 10.00 g,充分振荡使成相物质溶解,并调节体系 pH,静置 10 min,两相达到相分离, $\beta$ -胡萝卜素富集于双水相系统的上相中,测定相比 R 和  $\beta$ -胡萝卜素的含量,并计算其分配系数 K 及萃取率 Y,如下式:

$$R = \text{上相体积}(V_1) / \text{下相体积}(V_2)$$

$K = \text{上相 } \beta\text{-胡萝卜素浓度}(C_1) / \text{下相 } \beta\text{-胡萝卜素浓度}(C_2)$

$$Y = RK / (1 + RK)$$

### 1.3.3 $\beta$ -胡萝卜素含量测定<sup>[9]</sup>

准确称取一定量的标准  $\beta$ -胡萝卜素,用乙醇丙酮混合液(v/v = 1:2)准确配制浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0  $\mu\text{g/mL}$  的  $\beta$ -胡萝卜素标准溶液于 10 mL 棕色容量瓶中,在 450 nm 处测定其吸光度值,同时以试剂空白作为参比,绘制标准曲线方程: $A = 3.861x - 0.027$ , $R^2 = 0.9992$ 。式中 x 为溶液中  $\beta$ -胡萝卜素浓度  $\mu\text{g/mL}$ ;A 为吸光度值。

### 1.3.4 (乙醇+丙酮)/硫酸铵双水相体系的确定

通过改变(乙醇+丙酮)质量分数、硫酸铵质量分数确定双水相体系的组成。

### 1.3.5 影响螺旋藻 $\beta$ -胡萝卜素萃取的因素

#### 1.3.5.1 单因素实验设计

在确定了双水相体系组成后,研究  $\beta$ -胡萝卜素粗提液质量分数、pH、温度对  $\beta$ -胡萝卜素提取率的影响。

#### 1.3.5.2 Box-Behnken 实验设计

根据单因素实验结果,设计  $\beta$ -胡萝卜素粗提液质量分数、pH、温度三因素三水平 17 个组合 Box-Behnken Design 实验,确定螺旋藻  $\beta$ -胡萝卜素萃取的最佳工艺条件。

#### 1.3.6 数据分析

单因素部试验和中心组合试验结果的分别采用 Excel 和 Design-Expert 7.0 在试验设计的同时按相应方法进行,所有试验均重复 3 次,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 (乙醇+丙酮)质量分数对螺旋藻 $\beta$ -胡萝卜素萃取效果的影响

在(乙醇+丙酮)/硫酸铵双水相体系中,选择 13%、15%、17%、19%、21%(乙醇+丙酮),硫酸铵质量分数 20%,粗提液质量分数为 3% 组成双水相,在 30  $^{\circ}\text{C}$  搅拌至两相充分混匀,对上下相溶液进行分析,结果见图 1。

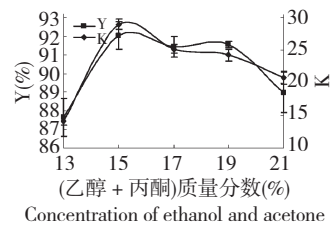


图 1 (乙醇+丙酮)质量分数对  $\beta$ -胡萝卜素分配系数和萃取率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of ethanol and acetone on the partition coefficient and recovery rate of  $\beta$ -carotene

由图 1 可知,在硫酸铵质量分数一定的情况下,随着(乙醇+丙酮)质量分数的增加,螺旋藻  $\beta$ -胡萝卜素萃取率和分配系数都增加,当(乙醇+丙酮)质量分数达到 15% 时, $\beta$ -胡萝卜素萃取率和分配系数达到最大值,此后,随着(乙醇+丙酮)质量分数的增加, $\beta$ -胡萝卜素提取率和分配系数逐渐下降,其主要原因可能是:(乙醇+丙酮)质量分数较低时,利于  $\beta$ -胡萝卜素萃取到有机相,随着(乙醇+丙酮)质量分数逐渐增加,粗提液中水溶性组分在有机相溶解性增加,抑制了  $\beta$ -胡萝卜素的转移。因此,确定(乙醇+丙酮)质量分数为 15%。

### 2.2 硫酸铵质量分数对螺旋藻 $\beta$ -胡萝卜素萃取效果的影响

在(乙醇+丙酮)/硫酸铵双水相体系中,(乙醇

+ 丙酮) 质量分数 15%, 选择 20%、22%、24%、26%、28% 硫酸铵, 粗提液质量分数为 3% 组成双水相, 在 30 °C 搅拌至两相充分混匀, 对上下相溶液进行分析, 结果见图 2。

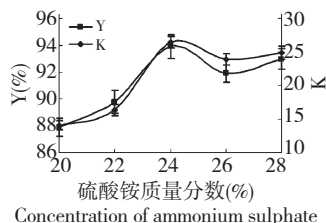


图 2 硫酸铵质量分数对 $\beta$ -胡萝卜素分配系数和萃取率的影响

Fig. 2 Effect of ammonium sulphate concentration on the partition coefficient and recovery rate of  $\beta$ -carotene

由图 2 可知, 在(乙醇+丙酮)质量分数一定双水相体系中, 随着硫酸铵质量分数的增加, $\beta$ -胡萝卜素的萃取率和分配系数逐渐上升。当硫酸铵质量分数为 24% 时, 萃取率和分配系数达到最大值。原因是硫酸铵的质量分数增加, 水合能力增强, 下相的含水率增大, 极性增大, 粗提液 $\beta$ -胡萝卜素利于转移至有机相; 当硫酸铵质量分数大于 24% 时, 分相能力增大, 相比随之减小, 相应地增加了(乙醇+丙酮)质量分数, 导致 $\beta$ -胡萝卜素的萃取率和分配系数趋于下降。因此, 确定硫酸铵质量分数为 24%。

### 2.3 粗提液对螺旋藻 $\beta$ -胡萝卜素萃取效果的影响

在 15% (乙醇+丙酮) 和 24% 硫酸铵双水相体系中, 分别加入 2%、3%、4%、5%、6% 粗提液组成双水相, 在 30 °C 搅拌至两相充分混匀, 对上下相溶液进行分析, 结果见图 3。

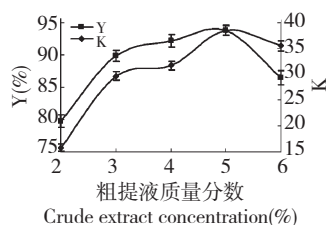


图 3 粗提液质量分数对 $\beta$ -胡萝卜素分配系数和萃取率的影响

Fig. 3 Effect of crude extraction concentration on the partition coefficient and recovery rate of  $\beta$ -carotene

从图 3 可知, 随着粗提液质量分数逐渐增加, 萃取率和分配系数逐渐增大, 在粗提液质量分数为 5% 时, 达到最大值; 随着粗提液质量增加, 出现一定

程度降低。其主要原因是, 当粗提液质量分数为 5% 时, $\beta$ -胡萝卜素转移至有机相达到饱和, 继续增加粗提液造成浪费。因此确定粗提液质量分数为 5%。

### 2.4 pH 对螺旋藻 $\beta$ -胡萝卜素萃取效果的影响

在 15% (乙醇+丙酮) 和 24% 硫酸铵双水相体系中, 加入 5% 粗提液组成双水相, 分别用 1 mol/L HCl 和 NaOH 调节体系 pH 为 5、6、7、8、9, 在 30 °C 搅拌至两相充分混匀, 对上下相溶液进行分析, 结果见图 4。

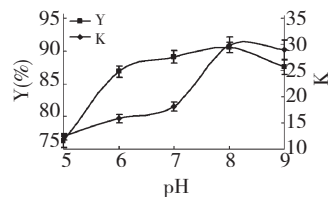


图 4 体系 pH 对 $\beta$ -胡萝卜素分配系数和萃取率的影响

Fig. 4 Effect of pH value on the partition coefficient and recovery rate of  $\beta$ -carotene

图 4 可知, 随着双水相体系 pH 逐渐增加, 萃取率和分配系数达到最大值, 在 pH 8 时达到最大值, 主要原因是酸对 $\beta$ -胡萝卜素有破坏作用, 弱碱性条件 $\beta$ -胡萝卜素的影响较小。

因此确定体系 pH 为 8。

### 2.5 温度对螺旋藻 $\beta$ -胡萝卜素萃取效果的影响

在 15% (乙醇+丙酮) 和 24% 硫酸铵双水相体系中, 加入 5% 粗提液组成双水相, 用 1 mol/L HCl 和 NaOH 调节体系 pH 为 8, 分别在 30、35、40、45、50 °C 搅拌至两相充分混匀, 对上下相溶液进行分析, 结果见图 5。

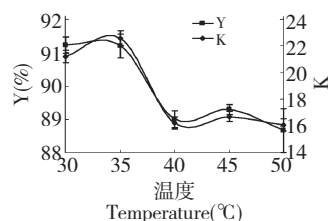


图 5 萃取温度对 $\beta$ -胡萝卜素分配系数和萃取率的影响

Fig. 5 Effect of extraction temperature on the partition coefficient and recovery rate of  $\beta$ -carotene

由图 5 可知, 随着萃取温度逐渐升高, 分配系数和萃取率在 35 °C 达到最大值, 此后, 温度继续升高,  $\beta$ -胡萝卜素萃取率逐渐下降, 其主要原因是, 适当提高萃取温度使分子运动加快, 从而提高 $\beta$ -胡萝卜素

萃取量,但也增加有机相的挥发,导致萃取率降低,另外,温度过高时,可影响 $\beta$ -胡萝卜素的稳定性,从而使 $\beta$ -胡萝卜素被破坏而发生降解<sup>[3]</sup>。

## 2.6 响应面结果分析

根据以上单因素的试验结果,采用响应面方法进一步优化试验条件。根据 Box-Behnken 的组合设计原理,以萃取率为响应值,在 15% (乙醇 + 丙酮) 和 24% 硫酸铵双水相体系中,对粗提液质量分数 (A)、pH (B)、萃取温度 (C) 设计了 3 因素 3 水平的 17 组试验,其中 5 组中心点重复试验。选取的试验因素和水平见表 1,试验方案和结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

水平 Level	因素 Factor		
	(A) 粗提液质量分数 Concentration of crude extract (%)	(B) pH	(C) 萃取温度 Extraction temperature (°C)
-1	4	7	30
0	5	8	35
1	6	9	40

### 2.6.1 Box-Behnken 实验数据分析

利用 Design-Expert 7.0 软件对表 2 中的数据进行二次多项式回归拟合,通过响应面回归过程进行数据分析建立二次响应面回归模型为:

$$Y = 90.6232 + 2.537875A + 0.2165B - 0.08087C - 0.43825AB + 0.1245AC - 0.01975BC - 0.5216A^2 - 0.80165B^2 + 1.0719C^2$$

由表 3 可见,该模型高度显著;失拟项大于 0.05,差异不显著,说明残差由随机误差引起;A、C<sup>2</sup>

影响是极显著的,B<sup>2</sup> 影响是显著的,其余项的影响不显著。决定系数  $R^2 = 96.11\%$ ,即回归方程中所有自变量的变化可以解释 96.11% 的因变量变化,这主要是因为双水相萃取过程中,影响因素较多,未计入方程的变量与回归方程的变量之间总会有交互作用,由于未计入方程的变量较多,故交互作用的累积对回归方程造成一定影响;另一方面是由于实验的过程中总会有不可避免的随机误差。

表 2 Box-Behnken 设计方案与结果

Table 2 Results of Box-Behnken design

试验号 No.	A	B	C	Y (%)
1	-1	-1	0	85.518
2	1	-1	0	92.058
3	-1	1	0	87.418
4	1	1	0	92.205
5	-1	0	-1	89.234
6	1	0	-1	93.473
7	-1	0	1	88.625
8	1	0	1	93.362
9	0	-1	-1	90.934
10	0	1	-1	90.816
11	0	-1	1	91.01
12	0	1	1	90.813
13	0	0	0	90.513
14	0	0	0	91.211
15	0	0	0	89.896
16	0	0	0	90.543
17	0	0	0	90.953

表 3 Box-Behnken 试验结果的回归分析

Table 3 The regression analysis of Box-Behnken experiment results

方差来源 Source	均方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 P value
模型 Model	61.05648	9	6.784053	19.23728	0.0004
A	51.52648	1	51.52648	146.1117	<0.0001
B	0.374978	1	0.374978	1.063311	0.3368
C	0.052326	1	0.052326	0.148379	0.7115
AB	0.768252	1	0.768252	2.178504	0.1835
AC	0.062001	1	0.062001	0.175814	0.6876
BC	0.00156	1	0.00156	0.004424	0.9488
A <sup>2</sup>	1.145543	1	1.145543	3.248374	0.1145
B <sup>2</sup>	2.707214	1	2.707214	7.676744	0.0277

$C^2$	4.837767	1	4.837767	13.71827	0.0076
残差 Residual	2.46856	7	0.352651		
失拟项 Lack of Fit	1.466887	3	0.488962	1.952583	0.2631
纯误差 Pure Error	1.001673	4	0.250418		
差和 Cor Total	63.52504	16			

## 2.6.2 响应面优化及模型验证试验

通过 Design-Expert 7.0 软件对上述回归方程绘制响应面曲线如图 6 所示。由图看到,通过这些动

态图即可对任何两因素交互影响  $\beta$ -胡萝卜素的萃取率进行分析与评价,并从中确定最佳因素水平范围。

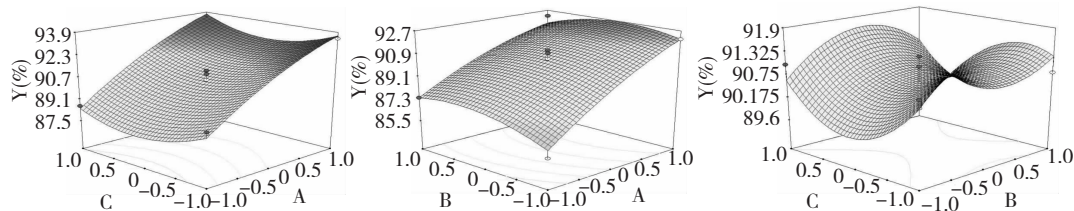


图 6 各因素交互作用的响应面图

Fig. 6 Response surface plots for the pairwise interactive effects

根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程,利用 Design-Expert 7.0 软件获得了各个因素的最佳条件组合:粗提液质量分数 6%、pH 8.13、萃取温度 30.11  $^{\circ}\text{C}$ ,萃取率为 93.53%。根据实验操作实际条件,对最佳条件修正为:粗提液质量分数 6%、pH 8.0、萃取温度 30  $^{\circ}\text{C}$ ,在此萃取条件下,进行三次重复实验,螺旋藻中  $\beta$ -胡萝卜素的平均萃取率可达 94.55%。与模型预测值基本吻合,这能够有效说明该实验选用的模型是合理的。

## 3 结论

实验考察了(乙醇+丙酮)、硫酸铵、 $\beta$ -胡萝卜素粗提液质量分数、pH、温度等因素对双水相体系分配系数及  $\beta$ -胡萝卜素的萃取率的影响,确定萃取分离螺旋藻  $\beta$ -胡萝卜素的二元双水相体系组成为 15% (乙醇+丙酮)和 24% 硫酸铵;在体系中加入质量分数为 6% 螺旋藻粗提液,在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.0 条件下萃取效果较好,平均萃取率为 94.55%。说明无水乙醇+丙酮-硫酸铵二元双水相体系可以更加有效地萃取螺旋藻  $\beta$ -胡萝卜素。

## 参考文献

- 1 Chaiklahan R, Chirasuan N, Triratana P, et al. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 73-78.

- 2 Seshadri CV, Umesh BV, Manoharan R. Beta-carotene studies in *Spirulina*. *Bioresour Technol*, 1991, 38: 111-113.
- 3 Wang HY(王海英), Du WM(杜为民), Li W(李雯), et al. Study on extraction technology of  $\beta$ -carotene from *Spirulina* power. *Food Nutri China* (中国食品与营养), 2010, 6: 64-66.
- 4 Yu P(于平), Li JR(励建荣). Studies on the microwave-assistant solvent extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报), 2008, 8 (2): 80-83.
- 5 Yunnan blue diamond Biological Technology Co., Ltd(云南蓝钻生物科技有限公司). A method to extract  $\beta$ -carotene in *Spirulina* by supercritical carbon dioxide extraction. CN201310152097. 3, 2013-04-27.
- 6 Mendiola JA, Jaime L, Santoyo S, et al. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chem*, 2007, 102: 1357-1367.
- 7 Dey S, Rathod VK. Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20: 271-276.
- 8 Ren DF(任迪峰), Chen L(陈林), Fang M(房明), et al. A method of extraction and preparation of  $\beta$ -carotene in *Spirulina*. CN201210192623. 4, 2012-06-13.
- 9 Liang JJ(梁静娟), Pang CW(庞宗文). Separation and extraction of  $\beta$ -carotene from *Spirulina platensis*. *J Ind Microbiol* (工业微生物), 1997, 27(2): 21-24.