

超临界 CO₂ 萃取裂殖壶藻粗脂工艺研究

马 溢, 郝小红, 王亚兵, 杨 坤

(上海理工大学 能源与动力工程学院, 上海 200093)

摘要: 研究超临界 CO₂ 萃取裂殖壶藻粗脂的最佳条件, 利于后续制备生物柴油. 通过单因素试验考察超声波预处理、原料湿度以及不同携带剂对裂殖壶藻粗脂萃取率的影响, 并通过正交试验优化设计试验条件. 研究表明: 超声强化虽然对产油量影响不大, 但是通过预处理缩短了反应时间; 试验前最好对微藻藻粉进行干燥处理. 经对比甲醇、乙醇和乙酸乙酯, 发现萃取率由大到小依次为: 甲醇, 乙醇, 乙酸乙酯, 考虑到甲醇的毒性和安全问题, 可使用乙醇做携带剂. 超临界 CO₂ 萃取裂殖壶藻粗脂试验最佳工艺条件为: 压力 40 MPa, 温度 65 °C, 时间 1 h, 液固比 1 : 1. 在最佳工艺条件下萃取率可达 18.7%.

关键词: 超临界 CO₂ 萃取; 裂殖壶藻; 正交试验

中图分类号: TK 6 **文献标志码:** A

Lipid Extraction by Supercritical CO₂ from Schizochytrium

MA Yi, HAO Xiaohong, WANG Yabing, YANG Kun

(School of Energy and Power Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The optimum conditions of the supercritical CO₂ extraction of crude oil from schizochytrium were studied. Single factor experiments were conducted to investigate the effects of the ultrasonic pretreatment, humidity of raw materials and different carrying agents on the extraction rate of crude oil from schizochytrium. The results show, although the ultrasonic enhancement has little effect on oil yield, the reaction time is shortened by pretreatment. It is best to dry the microalgae powder before the experiment. Compared with methanol, ethanol and ethyl acetate, the methanol extraction rate was found to be higher than that of ethanol and ethyl acetate. Considering the toxicity of methanol and the safety, ethanol can be used as a carrier. The optimum extraction conditions of the crude oil extraction by supercritical CO₂ are: pressure 40 MPa, temperature 65 °C, time 1 h, and liquid-solid ratio 1 : 1. The extraction rate is 18.7% under the optimum conditions.

Keywords: lipid extraction by supercritical CO₂; schizochytrium; orthogonal test

1 研究现状

微藻在生长过程中将光能、水和 CO₂ 转化为碳

水化合物, 之后再转化成大分子有机物, 大分子有机物主要包括 R—COOCH₃ 或 R—COOCH₂CH₃, 而 R—COOCH₃ 或 R—COOCH₂CH₃ 就是微藻油脂的主要组成部分. 高效提取微藻细胞内的油脂成分是微

收稿日期: 2016-06-22

第一作者: 马 溢(1994-), 男, 硕士研究生. 研究方向: 生物质能. E-mail: mayiyjs@163.com

通信作者: 郝小红(1975-), 女, 讲师. 研究方向: 生物质能. E-mail: haoxh@usst.edu.cn

藻生物柴油制备工艺中的重要环节.超临界 CO₂ 萃取是目前国内外应用广泛的萃取技术之一,相对于其他提取方式,其优势在于:

a. CO₂ 的临界压力和临界温度均不高,分别为 7.39 MPa 和 304.4 K,可以在较低的操作成本下使物质达到超临界状态,并且节省能源.

b. CO₂ 的临界温度低,可以避免一些热敏感物质受到破坏.

c. 超临界 CO₂ 对许多低极性有机物有较好的溶解能力,并且其溶解能力很容易通过调节压力和温度来改变,或者通过添加少量携带剂来调整.CO₂ 无毒性,不可燃,无腐蚀性,化学特性比较稳定,价格便宜,原料可取自环境.

d. CO₂ 具有高度挥发性,在常压下为气态,只需降低压力就可使 CO₂ 与所萃取物质分离,可省去一般溶剂萃取后长时间的分离过程.

目前,许多学者针对超临界萃取作了一些研究,张穗等^[1]选用乙酸乙酯为携带剂,用超临界 CO₂ 萃取日本小球藻、钝顶螺旋藻和亚心形扁藻,与直接酯化法、Bligh-Dyer 法、索氏提取法和乙醇-乙烷法等溶剂法作对比.以提取效率最高的直接醇化法为基础,超临界 CO₂ 萃取日本小球藻中脂肪酸二十碳五烯酸(EPA)的提取率为 92.1%,二十二碳六烯酸(DHA)的提取率为 89.4%,对钝顶黑旋藻和亚心形扁藻的提取率也达到 90% 左右,高于其他溶剂法.这些研究表明,超临界法萃取不仅萃取效率高,而且萃取获得物相较于其他萃取方法品质更好.秦昌蓉等^[2]采用超临界 CO₂ 萃取微藻适宜条件为:时间 2 h,压力 35 MPa,温度 40 °C,乙醇作为携带剂,乙醇和原料物质的量比为 1:1.该条件下得到油脂中 DHA 含量、DHA 提取率分别为 27.49% 及 9.31%.超临界萃取法得到的 DHA 纯度、油脂颜色、气味以及产品品质上相对较优.银建中等^[3]试验研究表明,影响植物油超临界流体萃取的主要因素为萃取压力、温度、颗粒度、空隙率和萃取时间等.建议萃取压力为 20~30 MPa,萃取温度为 30~40 °C,萃取时间为 5 h.经超临界 CO₂ 萃取的大豆油和花生油,色泽清,品质好,且无溶剂残留.

本文进行了超临界萃取裂殖壶藻方面的探讨,考察了超声预处理、原料湿度和携带剂对萃取率的影响,并通过正交试验优化试验条件,寻找最优试验条件,可为超临界流体提取裂殖壶藻油脂的生产工艺提供理论依据,为其他微藻油脂提取提供参考.

2 试 验

2.1 原料与试剂

试验所用原料为裂殖壶藻,由美国 Aquafauna Bio-Marine 公司生产.试验所用试剂为无水乙醇、AR(沪试)、甲醇以及乙酸乙酯,购置于国药集团化学试剂有限公司.

2.2 试验仪器与设备

试验所用设备如表 1 所示.

表 1 试验设备

Tab.1 Experimental equipment

设备名称	型号	产地
超临界流体萃取仪	Spe-ed SFE-prime	美国 Applied-Separations 公司
电子天平	AL-20	梅特勒-托利多仪器有限公司
真空干燥箱	DZF-6090	上海-恒科学仪器有限公司

2.3 试验装置与操作步骤

试验系统如图 1 所示.试验装置主要包括:高压萃取釜、循环水浴锅、高压柱塞泵、单向阀 V1、微控背压调节阀 V2、CO₂ 气体流量计、压力调节阀 P、温度控制器 T 等.

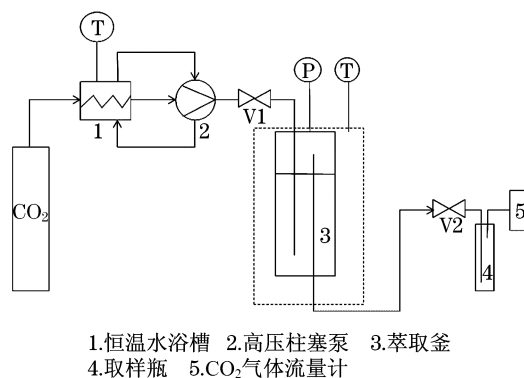


图 1 试验系统图

Fig.1 Experimental system

试验步骤:打开总开关,将萃取釜温度和出口温度调至设定值;打开恒温水浴槽,将其温度设置为 5 °C;打开注入泵开关,排净管道中的空气;将物料装入萃取釜,连接进口和出口处接口;运行注入泵,将携带剂注入萃取釜;浸泡 30 min 后,打开空压泵开关和 CO₂ 阀门,调整压力至设定值;将取样瓶接到 CO₂ 出气口处;打开出气口粗控调节阀,然后打开微控调节阀,调整气体流量计到设定值,开始试验.待试验结束后,取下样品瓶,取出物料,放入干燥箱中进行干燥后称重.

3 结果与讨论

3.1 单因素试验

3.1.1 超声波预处理对油脂萃取率的影响

超声波预处理:将原料和携带剂混合后,置于分散式超声清洗仪中,超声波预处理试验条件设计为:功率 80 W,频率 20 kHz,处理时间 15 min. 超临界萃取试验条件为:萃取温度 40 ℃,萃取压力 35 MPa,萃取时间 120 min,携带剂和原料的液固比 (mL/g) 为 1:1. 对微藻粉进行油脂的萃取,得到的油脂产量同试验组(乙醇作携带剂,湿度 0%,未经超声波预处理)相比较,见图 2.

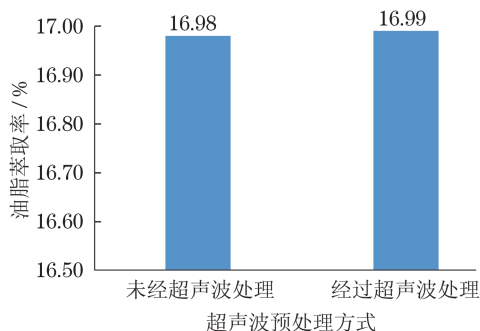


图2 超声波预处理对微藻油脂萃取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic pretreatment on the oil extraction rate of microalgae

从图2可以看出,超声波预处理过的藻粉最终产油量和未经处理的藻粉最终产油量并没有显著变化. Tang等^[4]使用了不同的超声波功率和超声波处理时间来研究其对油脂萃取率和DHA纯度的影响. 但试验证明,不同的超声波功率(80, 120, 160, 200 W)和超声波处理时间(15, 30, 60, 90 min)对微藻油脂的萃取产量也同样没有显著的影响. 但是值得注意的是,通过试验观察得到,经过超声波破壁预处理的试验组萃取时间较未经超声波预处理的试验组有了显著的缩短. 这主要因为高频率超声波使得悬浮液出现空化现象,形成剪切力,进而破坏细胞壁,细胞壁的破坏减小了分子的扩散阻力,从而加快了萃取速度. 虽然超声波预处理(功率 80~200 W, 时间 15~90 min, 频率 20 kHz)并不能提高微藻的油脂萃取率,但是却能在一定程度上缩短萃取过程所需要的时间,减少了操作成本及机器的损耗.

3.1.2 原料湿度对油脂萃取率的影响

试验条件下(萃取温度 40 ℃,萃取压力 35 MPa,萃取时间 120 min,携带剂和原料的液固比

(mL/g)为 1:1),将干燥至恒重的藻粉与蒸馏水混合,通过控制湿度(湿度=加入蒸馏水的质量/(蒸馏水的质量+藻粉的质量))的变化(0%, 10%, 30%, 50%),得到湿度对油脂萃取率的影响,见图3.

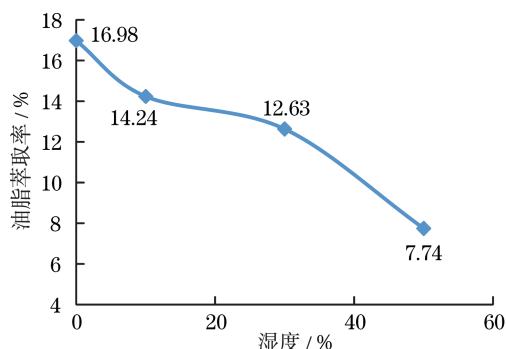


图3 湿度对油脂萃取率的影响

Fig.3 Effect of humidity on the oil extraction rate

从图3可以看出,在一定的温度、压力、萃取时间及携带剂与原料液固比的条件下,随藻粉湿度的增加,微藻油脂的萃取率逐渐降低. 湿度为 0% 时,油脂萃取率最高达 16.98%; 湿度为 50% 时,油脂萃取率仅为 7.74%. 主要原因是:当原料中含水量增加时,由于水和 CO₂ 的不可混溶性,造成在反应釜中形成一个高度压缩粒子区,这会限制 CO₂ 流体在反应釜中的流动;此外过多的含水量会使原料的多孔性降低,超临界 CO₂ 的渗透程度减小,水分在萃取过程中起到了阻碍萃取的作用. 另一方面,乙醇能增加油脂在超临界 CO₂ 中的溶解度是因为乙醇与油脂形成的溶剂化缔合现象^[5],这种溶剂化缔合主要是由乙醇和油脂有机物分子之间的各向异性相互作用,即氢键的作用产生的. 而水分子也可以同乙醇分子形成氢键,这就使得油脂有机物分子与水分子之间形成了竞争,从而会减小乙醇和油脂的溶剂化缔合作用,导致油脂在超临界 CO₂ 中的溶解度降低. 智利的研究学者 Reyes等^[6]在湿藻浆中加入吸附剂(壳聚糖),随后直接对湿藻浆进行超临界 CO₂ 萃取,以此来研究使用湿度较高的原料直接进行超临界 CO₂ 萃取时,类胡萝卜素萃取率和油脂萃取率受到的影响. 结果表明,加入吸附剂后的湿藻浆利用超临界 CO₂ 提取出的类胡萝卜素含量有所提高,而油脂的产量仍然很低. 利用刚采收的微藻直接进行超临界 CO₂ 萃取,从目前的情况来看,还无法获得理想的油脂产量. 所以,采用超临界 CO₂ 对微藻油脂进行萃取时必须事先干燥藻粉,确保原料湿度(水分)低于 5%,否则将会影响萃取效果.

3.1.3 不同携带剂对油脂萃取率的影响

携带剂的作用机理主要通过超临界 CO₂ 中携带剂与溶质之间形成溶剂化缔合现象实现,这种溶剂化缔合现象由两种性质不同的分子之间作用力的共同作用而产生.这种作用力包括各向同性相互作用(静电作用、诱导作用、色散作用)和各向异性相互作用(氢键、电子供给体和电子接受体间作用).不同携带剂与油脂之间形成的分子间作用各不相同,故溶剂化缔合存在差异,并且不同携带剂在超临界流体萃取中对溶质的选择也存在差异,即最终提取出的油脂组成成分不同.因此,本次试验在其他条件均相同时,用乙醇、甲醇、乙酸乙酯作为携带剂对微藻粉进行油脂的萃取,试验结果见图 4.

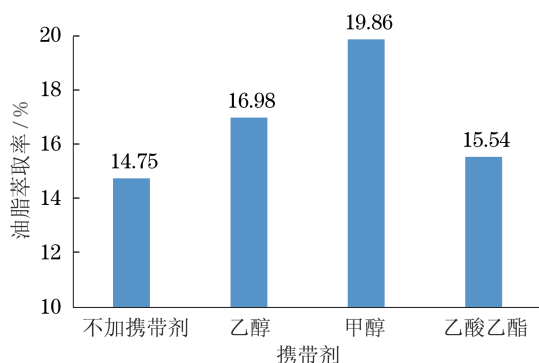


图4 不同携带剂对油脂萃取率的影响

Fig.4 Effects of different carriers on the oil extraction rate

从图4可以看出,加入携带剂可以在一定程度上提高最终的油脂产量,且甲醇作携带剂时的油脂萃取率最高,其次是乙醇,最后则是乙酸乙酯.其主要原因是这3种携带剂的极性由大到小依次为:甲醇,乙醇,乙酸乙酯,所以偶极距由大到小依次为:甲醇,乙醇,乙酸乙酯,即甲醇与油脂有机物分子间的偶极-偶极作用大于乙醇与油脂有机物分子间的偶极-偶极作用,得出甲醇对油脂有机物分子的携带作用最大,乙醇次之,乙酸乙酯相对较差.此外,混合溶剂的极性越大,对生物细胞的双分子层脂膜的破坏程度越大,越有利于萃取的进行.然而,考虑到甲醇的毒性和食品安全问题,而乙醇无毒性加上携带作用相对乙酸乙酯较好,所以,乙醇可以普遍作为超临界流体的携带剂.

3.2 正交优化试验

根据文献[7-9]中相关最佳萃取条件并结合设备相关参数,确定本试验的参数水平,试验因素水平如表2所示.

根据表2的试验因素,设计正交试验,得到的试验数据如表3所示.

表3中, K_1, K_2, K_3, K_4 分别为压力、温度、时间、液固比的水平平均值.压力、液固比两个因素对萃取率的影响较大,温度、时间对萃取率的影响较小.表3压力因素一列中, $K_3 > K_2 > K_1 > K_4$,由此可知,40 MPa为因素A的最优条件.同理可知65℃,1 h,1:1分别为因素B,C,D的最优条件.

表2 试验因素及水平

Tab.2 Experimental factors and levels

编号	A	B	C	D
	压力/MPa	温度/℃	时间/h	液固比
1	20	35	1	0:1
2	30	45	2	1:2
3	40	55	3	1:1
4	50	65	4	2:1

表3 正交试验方法及结果

Tab.3 Methods and results of orthogonal tests

编号	A	B	C	D	萃取率/%
	压力/MPa	温度/℃	时间/h	液固比	
1	1	1	1	1	10.258
2	1	2	2	2	13.099
3	1	3	3	3	17.771
4	1	4	4	4	17.812
5	2	1	2	3	17.712
6	2	2	1	4	18.739
7	2	3	4	1	10.502
8	2	4	3	2	17.289
9	3	1	3	4	16.243
10	3	2	4	3	17.930
11	3	3	1	2	16.521
12	3	4	2	1	16.213
13	4	1	4	2	2.737
14	4	2	3	1	0.249
15	4	3	2	4	10.838
16	4	4	1	3	17.593
K_1	14.735	11.738	15.778	9.306	
K_2	16.061	12.504	14.466	12.412	
K_3	16.727	13.908	12.888	17.752	
K_4	7.854	17.227	12.245	15.908	
极差 R	8.873	5.489	3.533	8.446	

各个因素间的方差分析如表4所示(见下页).根据极差R的大小以及各个因素偏差平方和可知,各因素对萃取率影响程度由大到小依次为:压力,液固比,温度,时间.由此可得,超临界 CO₂ 萃取微藻粗脂试验的最优条件为:压力40 MPa,温度65℃,时间1 h,液固比1:1.试验所得最大萃取率为18.7%.

表4 正交试验方差分析表
Tab.4 Analysis of the variance of orthogonal tests

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值
压力	199.60	3	57.029	9.280
温度	70.70	3	20.200	9.280
时间	30.40	3	8.686	9.280
液固比	168.85	3	48.243	9.280
误差	3.50	3	—	—

压力对超临界 CO₂ 流体的溶解能力影响最大. 因为在温度不变的条件下, 压力较高时, CO₂ 密度较大, 可压缩性较小, 扩散系数与压力成反比例关系. 压力继续增大, 溶质的溶解度会减小, 超临界 CO₂ 的渗透能力也随着压力的增大而减小^[10-11]. 因此, 压力的最优条件是 40 MPa.

温度对超临界流体溶解能力的影响也比较大. 但与压力对超临界流体溶解能力的影响不同, 温度的影响通常表现为双重作用. 一方面, 温度升高, 会使溶质的挥发度增大, 扩散能力增强, 从而使萃取率增大; 另一方面, 温度升高也会导致超临界 CO₂ 流体密度减小, 降低其溶解能力, 进而使萃取率降低. 在实际条件下, 温度升高对萃取率的影响, 关键取决于哪一种因素起到主导作用. 本试验中, 油脂萃取率随温度升高不断升高, 可见在温度升高过程中, 油脂挥发度和扩散系数的提高所引起的萃取率的增加量, 有效补偿了由于 CO₂ 密度下降所导致的萃取率的减少量^[12]. 油脂挥发度和扩散系数的提高在萃取过程中起到了主导作用. 因此, 试验温度的最佳条件是 65 ℃.

超临界萃取通常可以分为静态萃取和动态萃取. 静态萃取有利于溶质有效溶于超临界流体, 动态萃取有利于超临界流体与溶质及时分离, 保证萃取体系的浓度差. 试验中, 当时间为 1 h 时, 萃取率达到最大值 15.778%, 随着时间的延长, 萃取率反而下降. 这主要是因为, 从微藻中萃取所得粗脂含有易挥发成分, 随着试验时间的延长, 粗脂中的易挥发成分被出气口排出的 CO₂ 带出萃取瓶, 从而使萃取率下降. 因此, 试验时间的最佳条件是 1 h.

在超临界 CO₂ 萃取过程中, 加入携带剂, 可以改变超临界流体的临界点, 从而改善其溶解性能. 当液固比在一定范围内增大时, 萃取率会升高; 但是加入携带剂过量会造成溶剂的浪费, 也会增大后期提纯油脂的难度. 为了取一个较优的值, 避免溶剂的浪费和后期提纯的困难, 液固比的最佳试验条件为 1:1.

4 结 论

超声波预处理、原料湿度、不同的携带剂对微藻

油脂萃取过程都有一定的影响. 其中, 超声波预处理虽然对产油量影响不大, 但是通过预处理缩短了反应时间, 减少了操作成本和机器损耗. 在利用超临界 CO₂ 萃取微藻时, 应尽量使用干燥藻粉. 经对比甲醇、乙醇和乙酸乙酯发现, 萃取率由大到小依次为: 甲醇, 乙醇, 乙酸乙酯, 考虑到甲醇的毒性和安全问题, 可使用乙醇做携带剂. 综合以上影响因素, 通过正交试验得到超临界 CO₂ 萃取裂殖壶藻粗脂试验的最佳工艺条件为: 压力 40 MPa, 温度 65 ℃, 时间 1 h, 液固比 1:1. 在最佳工艺条件下萃取率可达 18.7%.

参考文献:

- [1] 张穗, 宋启煌, 陈浩如, 等. 海洋微藻中 EPA 和 DHA 的超临界 CO₂ 提取方法研究[J]. 热带海洋, 1999, 18(2): 33-38.
- [2] 秦昌蓉. 富油微藻中油脂的提取及 DHA 富集纯化的研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [3] 银建中, 孙献文, 李志义, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取植物油的实验研究[J]. 现代化工, 2001, 21(10): 26-27.
- [4] TANG S K, QIN C R, WANG H Q, et al. Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2011, 57(1): 44-49.
- [5] 张建君, 朱美文, 于思平, 等. 在超临界流体萃取中夹带剂作用的研究[J]. 北京化工学院学报(自然科学版), 1993, 20(2): 1-7.
- [6] REYES F A, MENDIOLA J A, SUÁREZ-ALVAREZ S, et al. Adsorbent-assisted supercritical CO₂ extraction of carotenoids from *Neochloris oleoabundans* paste[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2016, 112: 7-13.
- [7] 徐海军, 邓碧玉, 蔡云升, 等. 夹带剂在超临界萃取中的应用[J]. 化学工程, 1991, 19(2): 58-63.
- [8] 王洋, 杨静, 黄雪松. 夹带剂在超临界 CO₂ 萃取天然产物中的应用[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(11): 162-166.
- [9] 朱廷凤, 廖传华. 螺旋藻中 β -胡萝卜素的超临界 CO₂ 萃取实验研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2003(4): 66-67.
- [10] 陈维祖. 超临界流体萃取的原理和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 1-4.
- [11] YANG Y C, WEI M C, HUANG T C, et al. Extraction of protocatechuic acid from *Scutellaria barbata* D. Don using supercritical carbon dioxide[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2013, 81: 55-66.
- [12] 孙永跃, 李淑芬, 全灿. 阿魏酸和川芎嗪在超临界 CO₂ 中溶解度的测定[J]. 高校化学工程学报, 2005, 19(6): 839-842.

(编辑: 丁红艺)