

## СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ И КАРОТИНОИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ БЕЛОГО МОРЕЯ

А.Д. Ивахнов\*, Т.Э. Скребец, К.Г. Боголицын

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск,  
Россия

\*Ivahnov-tema@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2015 г.

Исследован процесс сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода хлорофилла и каротиноидов из морских водорослей *Fucus vesiculosus* и *Laminaria digitata*. Полное извлечение каротиноидов достигается при экстракции диоксидом углерода под давлением 250 атм и при температуре 80 °С в течение 20 мин без использования соразтворителя. Для получения экстрактов с высоким содержанием хлорофиллов необходимо применение полярного соразтворителя (этилового спирта) в количестве 10–15 % об. или увеличение продолжительности экстракции до 50–90 мин при расходе соразтворителя < 5 % об. Предложенный метод является более экспрессным по сравнению с экстракцией в аппарате Сокслета.

Ключевые слова: хлорофиллы, каротиноиды, сверхкритическая флюидная экстракция, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, растительное сырье.

### ВВЕДЕНИЕ

Морские водоросли являются уникальным растительным сырьем, отличающимся высокой продуктивностью и содержащим большое количество биологически активных веществ (БАВ) — антиоксидантов (полифенолы, токоферолы), пигментов (каротиноиды, фикобилины), хлорофиллов [1, 2]. В последние годы основное внимание уделяется извлечению липидов, антиоксидантов и углеводов из биомассы водорослей, причем почти в 2 раза больше научных публикаций посвящено использованию микроводорослей по сравнению с многоклеточными в этих целях [3].

Бурые водоросли, добываемые в водах северных морей, в том числе и в арктической зоне Белого моря (*Fucus vesiculosus* и *Laminaria digitata*), имеют промышленное значение. В настоящее время они используются в основном для получения альгинатов и в некоторых случаях — хлорофиллсодержащих спиртовых экстрактов для нужд фармацевтической и косметической промышленности, хотя известно [2, 3], что *Fucus vesiculosus* и *Laminaria digitata* могут служить и источником каротиноидов. Таким образом, далеко не полностью используется уникальный полезный потенциал этого природного сырья.

Традиционными способами получения биоактивных веществ из биомассы водорослей являются экстракция растворителями и гидролиз. Жидкостную экстракцию

проводят с использованием органических растворителей (ацетон, спирты, гексан и др.), как правило, в аппаратах Сокслета; гидролиз осуществляют в кислой, нейтральной или щелочной среде. Выбор метода зависит от природы извлекаемого компонента с учетом достижения его максимального выхода и высокой чистоты. Современные экстракционные методы (с применением ультразвука, микроволнового излучения, обработки энзимами, сверхкритических флюидов) являются реальной альтернативой существующим технологиям ввиду большей эффективности и селективности, меньшей стоимости, высокой экологичности [3].

Сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) давно известна как метод выделения БАВ и в настоящее время применяется главным образом при промышленном выделении пищевых эфирных масел и кофеина для нужд фармацевтической промышленности. Однако в последнее время СФЭ вызывает большой интерес как метод извлечения антиоксидантов из водорослевого сырья [4—8], но применение сверхкритических флюидов для переработки водорослей коснулось практически только микроводорослей.

Целью данной работы является изучение возможности извлечения хлорофиллов и каротиноидов из водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus* сверхкритическим (СК) диоксидом углерода.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus* были отобраны в 2013 году на Соловецких островах Белого моря. Ламинария представляет собой крупное растение, достигающее в длину 6—10 м; фукус имеет слоевище в виде кустов размером от 10 до 80 см, оливкового цвета, сильно разветвленных, с небольшим округлым стволиком, оканчивающимся конической подошвой.

После промывки дистиллированной водой образцы были высушены на воздухе без воздействия прямых солнечных лучей. Влажность образцов определена высушиванием в сушильном шкафу при 105 °С и составила 10 %. Образцы были размолоты в лабораторной мельнице, и для исследования отобрана фракция 2,0—0,2 мм, составляющая 80 % от размолотого образца.

Сверхкритическая флюидная экстракция проводилась с использованием установки MV-10ASFE («Waters», США).

Навеску сырья (1 г) помещали в автоклав объемом 10 мл и обрабатывали диоксидом углерода при заданных параметрах в течение заданного времени (от 20 до 120 мин) при скорости потока CO<sub>2</sub> 5 мл/мин в пересчете на температуру теплообменника, охлаждающего насос и измеритель потока (2 °С), и давление, при котором проводилась экстракция (100—350 атм). В ходе опытов также варьировали температуру в автоклаве (40, 60, 70, 80 °С).

Содержащий экстракт поток пропускали через ацетон. Общее содержание в экстракте хлорофиллов и каротиноидов определяли по анализу полученного раствора в ацетоне спектрофотометрически.

Определение содержания хлорофилла выполнено спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Specord 250 Plus. Расчет проведен относительно хлорофилла-а на длине волны 662 нм с учетом величины коэффициента экстинкции  $\epsilon = 91,2$  [10].

Каротиноиды также определяли спектрофотометрически после щелочного гидролиза хлорофиллов. Расчет проведен относительно  $\beta$ -каротина на длине волны 450 нм с учетом величины удельной экстинкции  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 2600$  [11].

### Сверхкритическая флюидная экстракция хлорофиллов и каротиноидов водорослей белого моря

Определение содержания хлорофиллов и каротиноидов в исходном сырье проведено исчерпывающей экстракцией ацетоном в течение 12 ч в отсутствие воздействия света в аппарате Сокслета. В предварительных опытах установлено, что для полной экстракции по Сокслету необходимо не менее 6 ч (при близкой навеске и существенно большем количестве растворителя). Приведенные данные о полной экстракции в течение 12 ч соответствуют гарантированному полному извлечению целевых продуктов.

Образец *Fucus vesiculosus* содержит 4,5 мг/г хлорофиллов и 0,09 мг/г каротиноидов, что совпадает с литературными данными [12], образец *Laminaria digitata* — 0,35 мг/г и 0,004 мг/г соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экстракции хлорофиллов и каротиноидов из образцов водорослей в зависимости от температуры и давления CO<sub>2</sub> представлены в таблице. Как видно из полученных данных, оба образца в условиях обработки СК-CO<sub>2</sub> ведут

Таблица

**Зависимость выхода пигментов от температуры и давления CO<sub>2</sub> при экстракции**

Температура, °C	Давление, атм	Выход пигментов, % от общего содержания			
		Хлорофиллы		Каротиноиды	
		<i>Laminaria digitata</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>
40	100	0,1	0,3	1,2	2,2
	200	0,5	0,8	4,5	5,4
	250	2,5	3,2	5,6	6,3
	300	4,6	5,0	12,4	10,4
	350	9,1	6,5	12,8	14,1
60	100	0,1	0,3	2,9	2,5
	200	2,5	3,2	28,5	30,0
	250	6,4	6,2	55,3	50,4
	300	8,8	7,4	66,2	70,2
	350	10,3	9,8	75,5	75,2
70	100	0,3	0,5	5,3	8,0
	200	4,2	8,2	29,9	38,0
	250	10,6	10,6	65,1	68,6
	300	16,4	14,5	87,1	89,4
	350	18,2	16,2	87,5	88,4
80	100	0,5	0,8	12,3	14,0
	200	10,2	15,6	28,8	66,0
	250	26,7	26,7	90,5	92,2
	300	36,2	34,1	100	99,2
	350	44,4	41,2	99,2	100

себя идентично. При всех изученных температурах увеличение давления  $\text{CO}_2$  положительно влияет на выход обоих пигментов. Однако при температуре  $60^\circ\text{C}$  и ниже даже при наибольшем задаваемом давлении удастся извлечь не более 6,5—10,3 % хлорофиллов. Экстракция каротиноидов при этом идет заметно лучше, и при температуре  $60^\circ\text{C}$  удастся выделить до 75 % от их содержания в обоих образцах. Данные закономерности объясняются различным изменением растворимости каротиноидов и хлорофиллов в интервале температур  $30\text{—}60^\circ\text{C}$  [14].

Максимальный выход хлорофиллов из обоих образцов составил 41,2—44,1 % при максимальных давлении и температуре обработки. Очевидно, что СК- $\text{CO}_2$  как неполярный растворитель не способен извлекать существенное количество полярного вещества (хлорофилла). Каротиноиды в этих условиях извлекаются практически полностью.

Поскольку в условиях, описанных выше, выход хлорофиллов из обоих образцов оказался низким, нами была проведена экстракция с добавкой к сверхкритическому диоксиду углерода этилового спирта в количестве 5, 10, 15 и 20 % об. от общего потока растворителя. Использование в качестве соразтворителя этилового спирта позволяет увеличить полярность экстрагента [13, 14] и отказаться от удаления жидкого растворителя из готового продукта ввиду малой физиологической опасности этанола. Эксперимент с использованием соразтворителя выполнен при температуре  $80^\circ\text{C}$  и давлении 300 атм. Представленные на рис. 1 результаты показывают, что добавка уже 5 % об. этилового спирта увеличивает выход хлорофиллов практически в полтора раза, а 10 % — в два раза. Это объясняется более высокой растворимостью хлорофиллов в СК- $\text{CO}_2$ , модифицированных спиртами, в том числе этиловым [13]. Дальнейшее увеличение доли соразтворителя незначительно влияет на выход хлорофиллов.

Таким образом, практически стопроцентное извлечение каротиноидов и хлорофиллов из слоевищ *Fucus vesiculosus* и *Laminaria digitata* возможно при проведении СФЭ диоксидом углерода, модифицированным 15 % об. этилового спирта, при давлении 300 атм и температуре  $80^\circ\text{C}$ ; расход диоксида углерода составляет не менее 85 г/г сырья.

Расход соразтворителя можно снизить путем увеличения продолжительности экстракции, что и было сделано в вышеуказанных условиях при расходе этилового

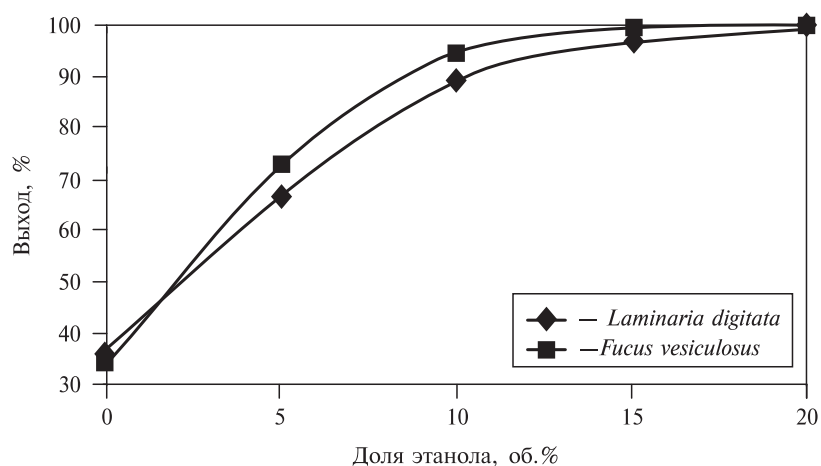


Рис. 1. Зависимость выхода хлорофиллов от состава экстрагента

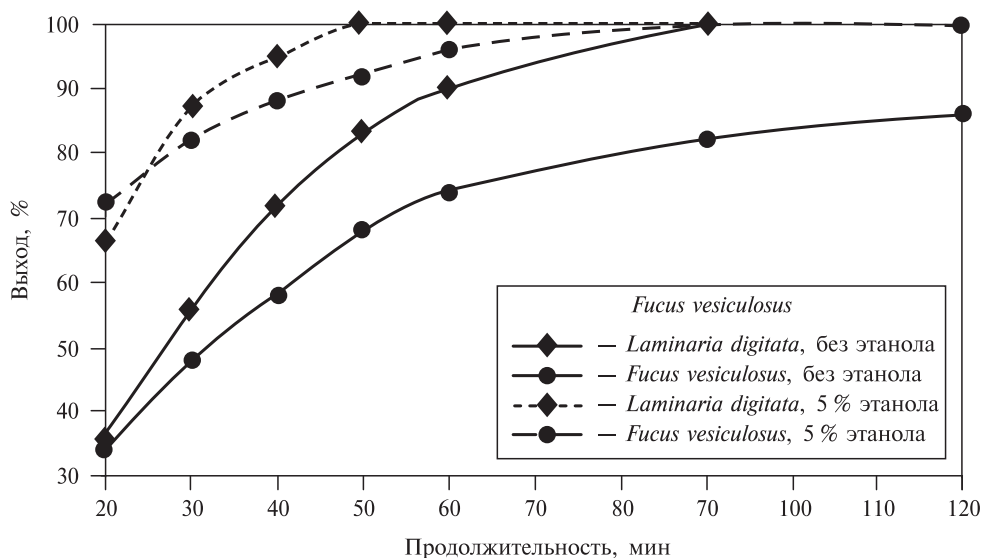


Рис. 2. Зависимость выхода хлорофиллов от продолжительности экстракции

спирта 5 % об. Параллельно проведены опыты с различной продолжительностью экстракции в отсутствие спирта. Выход каротиноидов в этих условиях уже через 20 мин составлял 100 %. Влияние продолжительности процесса на выход хлорофилла показано на рис. 2.

Из представленных данных видно, что практически полное извлечение хлорофиллов в указанных условиях достигается за 90 мин, причем в случае *Laminaria digitata* увеличение продолжительности экстракции позволяет проводить процесс без соразстворителя, а его добавка сокращает время полной экстракции до 40—50 мин. Таким образом, СФЭ в данных условиях является более экспрессным методом по сравнению с экстракцией в аппарате Сокслета. В зависимости от дальнейшего назначения экстрактов можно, варьируя условия СФЭ, получать продукты, насыщенные одним из пигментов или с высоким содержанием комплекса БАВ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракция сверхкритическим диоксидом углерода позволяет практически полностью извлечь хлорофиллы и каротиноиды из морских водорослей *Fucus vesiculosus* и *Laminaria digitata*. Полное извлечение каротиноидов достигается при экстракции диоксидом углерода под давлением 250 атм и при температуре 80 °С в течение 20 мин без использования соразстворителя. Для получения экстрактов с высоким содержанием хлорофиллов необходимо применение соразстворителя (этилового спирта) в количестве 10—15 % об. или увеличение продолжительности экстракции до 50—90 мин при расходе соразстворителя 0—5 % об.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (САФУ) при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, а также при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-03-12238-офи-м-2013.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. New research on antioxidants / Ed. by D. Marín and P. García. New York: Nova Science Publishers, 2008. 300 p.
  2. Barbosa-Filho J.M., Alencar A.A., Nunes X.P., de Andrade Tomaz A.C., Sena-Filho J.G., Athayde-Filho P.F., Silva M.C., Vanderlei de Souza M.F., Leitão da-Cunha E.V. Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian J. of Pharmacognosy. 2008. Vol. 18. No. 1. P. 135.
  3. Michalak I., Chojnacka K. Eng. In Life Science. 2014. DOI: 10.1002/elsc.201400139 (accepted article).
  4. Kadam S.U., Tivari B.K., O'Donnell C.P. J. Agric. Food Chem. 2013. Vol. 61. P. 4667.
  5. Crampon C., Boutin O., Badens E. Ind. Eng. Chem. Res. 2011. Vol. 50. P. 8941.
  6. Mendes R.L., Nobre B.P., Cardoso M.T., Pereira A.P., Palavra A.F. Inorg. Chem. Acta. 2003. Vol. 356. P. 328.
  7. Macias-Sanchez M.D., Fernandez-Sevilla J.M., Fernandez F.G.A., Garcia M.C.C., Grima E.M. Food Chemistry. 2010. Vol. 123. P. 928.
  8. Macias-Sanchez M.D., Mantell C., Rodriguez M., Martinez de la Ossa E., Lubian L.M., Montero O. Talanta. 2009. Vol. 77. Is. 3. P. 948.
  9. Macias-Sanchez M.D., Mantell Serrano C., Rodriguez M., Martinez de la Ossa E., Lubian L.M., Montero O. J. Sep. Sci. 2008. Vol. 31. Is. 8. P. 1352.
  10. Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols / Ed. by D.B. Stengel, S. Connan. New York: Humana Press, 2015. 439 p.
  11. Кутакова Н.А., Селянина Л.И., Селянина С.Б. Анализ БАВ и древесной зелени. Архангельск: Изд-во АГТУ, 2003. 31 с.
  12. Коровкина Н.В., Богданович Н.И., Кутакова Н.А. Химия растительного сырья. 2007. № 1. С. 59.
  13. Gupta R., Shim J-J. Solubility in supercritical carbon dioxide. New York: CRC Press, 2007. 960 p.
  14. Hosikian A., Lim S., Halim R., Danquah M.K. Int. J. Chem. Eng. 2010. DOI: 10.1155/2010/391632
- 
- 

### SUPERCritical FLUID EXTRACTION OF CHLOROPHYLLS AND CAROTENOIDS FROM WHITE SEA ALGAE

**A.D. Ivahnov, T.E. Skrebets, K.G. Bogolitsyn**

*Lomonosov Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, Russia*

The supercritical fluid extraction of chlorophyll and carotenoids from marine algae *Fucus Vesiculosus* and *Laminaria Digitata* with carbon dioxide is studied. Carotenoids can be completely extracted by pure CO<sub>2</sub> during 20 min at 250 atm and 80 °C. To obtain extracts with high content of chlorophylls, the addition of 10–15 % vol. ethanol (polar co-solvent), or prolonged extraction (50–90 min) at ethanol concentration < 5 % vol. are required.

**Key words:** chlorophyll, carotenoids, supercritical fluid extraction, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, plant raw materials.

---

---