

雨生红球藻天然虾青素提取研究进展

Research progress on the extraction of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*

李艳^{1,2} 高静¹

LI Yan^{1,2} GAO Jing¹

(1. 广东药科大学食品科学学院, 广东 中山 528458; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088)

(1. College of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan, Guangdong 528458, China;

2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

摘要:文章介绍了天然虾青素的生物来源、功能及应用研究的新进展,对比分析了雨生红球藻的不同破壁方法和虾青素的提取方法,重点介绍了近期国内外对雨生红球藻虾青素高效分离提取的新方法,并对其未来发展方向进行了展望。

关键词:雨生红球藻;天然虾青素;破壁;提取

Abstract: Natural astaxanthin has stronger stability, biological activity and safety than chemically synthesized astaxanthin. *Haematococcus pluvialis* is the most important biological source of natural astaxanthin and more attentions have been paid to the extraction of astaxanthin from *H. pluvialis*. This work focuses on the development methods of cell-wall disruption of *H. pluvialis* and the extraction of astaxanthin, which can provides a theoretical basis for the efficient extraction and comprehensive utilization of natural astaxanthin from *H. pluvialis*.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; cell-wall disruption; extraction

虾青素又名虾红素、虾黄质,属于类胡萝卜素衍生物,其分子结构中含有11个共轭双键、2个 β -紫罗兰酮环以及羟基^[1-2]。虾青素具有很强的抗氧化活性,比 β -胡萝卜素、玉米黄质和叶黄素的抗氧化效力高10倍,比维生素E的高100倍^[3]。此外,虾青素具有抗衰老、抗炎、抗癌、增强免疫力等功能^[4-5],还可保护中枢神经系统、用于预防和治疗心血管疾病和动脉粥样硬化等^[6]。虾青

素突出的生物活性使其被广泛应用于食品、化妆品、水产养殖和医药等领域^[7-8]。

化学合成和天然提取是获取虾青素的两种主要途径,但二者获取的虾青素在结构、功能、应用及安全等方面存在较大差异,目前商业中95%以上为化学合成虾青素^[9]。合成虾青素中3S—3'S结构不超过25%,而天然虾青素中90%以上为3S—3'S结构,因此天然虾青素具有更强的生物活性和更高的生物利用率^[10-11]。据报道^[12-13],天然虾青素的抗氧化活性是合成虾青素的90倍,且能与蛋白质或脂质结合,具有更好的稳定性。

雨生红球藻中虾青素的积累量最高可达5%,是天然虾青素的最佳生物来源^[10]。孟春晓等^[14]综述了雨生红球藻中虾青素提取方法的研究进展,介绍了几种常见虾青素提取方法的效果及优缺点,并指出胁迫环境下提高雨生红球藻中虾青素含量的重要性。赵晓燕等^[15]针对雨生红球藻中虾青素的功能、破壁及提取方法的研究进展进行了综述。近年来,随着离子液体(ILs)、低共熔溶剂(DES)等新型溶剂的出现,为虾青素的提取提供了新的技术思路。文章拟介绍天然虾青素的生物来源、功能及应用研究的新进展,对比分析雨生红球藻的不同破壁方法和虾青素的提取方法,重点介绍近期国内外对雨生红球藻虾青素(HP-AX)高效分离提取的新方法,旨在为推动天然虾青素的规模化生产提供依据。

1 天然虾青素的生物来源、功能及应用

与法夫酵母(0.4%)、太平洋磷虾(0.012%)、北极虾(0.12%)等天然来源相比,雨生红球藻中虾青素含量为1%~5%^[16]。虾青素在雨生红球藻中的积累量受光照、温度、激素、营养物质和盐影响^[17-18]。虾青素的共轭双键、酮基和羟基使其具有多种生理功能^[2, 11]。在食品和医药领域利用虾青素抗氧化、抗炎等功效制备功能食品

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:21706040);广东省自然科学基金面上项目(编号:2019A1515010640);广东省创新强校特色创新项目(编号:230419064)

作者简介:李艳,女,广东海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:高静(1985—),女,广东药科大学副教授,博士。

E-mail: gaojing1231@163.com

收稿日期:2020-05-06

与药物^[19-20],而虾青素的抗氧化、抗衰老和防止皮肤损伤的功能可以达到美容养颜和保水保湿的效果^[21-22]。此外,虾青素与肌红蛋白结合,赋予水产动物诱人的红色及色素沉着能力,在水产养殖和饲料业中被广泛应用^[23]。HP-AX 突出的生物功能可能与以下 3 个特性有关^[24]:① 95.7%以酯化形式存在;② 3S-3S 是主要的立体异构体;③ 存在少量叶黄素、 β -胡萝卜素、玉米黄质等辅助类胡萝卜素。

Davinelli 等^[25]对虾青素的安全性及生物利用度进行了论述,并指出 HP-AX 作为一种安全的添加剂被允许添加至动物饲料中的剂量逐渐增大,且在多种动物及人体中均具有较好的生物吸收利用率。Brendler 等^[26]综述了虾青素的安全性,介绍了向 FDA 递交申请作为新食品成分的虾青素均来源于雨生红球藻。上述研究表明,HP-AX 作为一种安全的虾青素来源,其需求量不断增长且应用范围不断增大,从雨生红球藻中高效提取虾青素具有重要意义。

2 雨生红球藻的破壁方法

雨生红球藻壁厚 1.8~2.3 μm ,其成熟红细胞壁是由海藻素、甘露聚糖和纤维素及异质多糖组成的三层结构^[11,27]。这种刚性细胞壁结构严重阻碍了提取溶剂向细胞内渗透,增加了虾青素提取的难度。因此,破壁处理是提取虾青素的必要手段。常用于雨生红球藻壁破碎的方

法有物理、化学和生物法。表 1 列举并比较了在不同破壁、提取方法下获得的 HP-AX 提取率。

2.1 物理破壁法

研磨法、冻融温差法、超声法、高压匀浆法依靠作用过程中产生的机械力、超声波效应、碰撞挤压效应等破坏细胞壁,是雨生红球藻破壁的常用方法^[15,37]。赵晓燕等^[15]列举并比较了以上几种常用物理破壁法对 HP-AX 提取率的影响,发现研磨和超声处理效果较好,但虾青素提取率不超过 4%。孟昂等^[38]用液氮研磨破坏雨生红球藻壁,以 200 W 超声辅助乙酸乙酯—乙醇(1:2,体积比)在料液比 9:50 (mL/mg)和 39 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理雨生红球藻后,将其置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡 20 min,所得 HP-AX 提取率为 85.1%。高压脉冲电场是一种新型的破壁方法,利用高压电流改变细胞的通透性,使胞内化合物选择性释放。Martinez 等^[27]以乙醇为提取溶剂,对雨生红球藻施加 1 kV/cm 的电场预处理 6 h 比采用研磨和超声预处理的提高了 20%。该方法产生的能量适中,不会引起产品温度升高而导致热敏性活性物质变性,利于保持虾青素的稳定性和生物活性,但耗时较长。

物理破壁法引起的原料成分损失较少,但单独使用破壁效果不佳,为获得较高的虾青素提取率往往需与化学溶剂协同作用。此外,物理破壁协同溶剂一步提取是实现短时高效提取 HP-AX 需重点关注的问题。

表 1 破壁、提取方法对 HP-AX 提取率的影响[†]

Table 1 Effects of different cell-wall disruption and extraction methods on the extraction efficiency of HP-AX

破壁方法	破壁条件	提取溶剂	提取条件	提取率/%	参考文献
珠磨	转速 2 000 r/min,30 min	乙醇、二甲基亚砜	85 $^{\circ}\text{C}$,搅拌 2 h	96.52	[28]
球磨	藻粉与硅藻土质量比 5:2, 5 min	丙酮	10 MPa,40 $^{\circ}\text{C}$,60 min	87.00	[29]
超声和 2 mol/L NaOH	超声最大功率 750 W,25 min	甲醇	提取时间 25 min	80.60	[30]
电场	场强 1 kV/cm,6 h	乙醇	22 $^{\circ}\text{C}$,1 h	96.00	[27]
[Emim]CH ₃ SO ₃	[Emim] CH ₃ SO ₃ 浓度 (33.3%),40 $^{\circ}\text{C}$,2 h	正己烷	60 min,30 $^{\circ}\text{C}$	> 99.00	[31]
果胶酶	酶添加量 0.08%,55 $^{\circ}\text{C}$,3 h, pH 4.5	乙酸乙酯	40 $^{\circ}\text{C}$,60 min	75.30	[32]
—	—	橄榄油	提取时间 48 h	93.90	[33]
—	—	辛酸、盐酸、乙醇(100%)	藻粉:平衡溶液:超分子溶液=1:5:2	96.00	[34]
—	—	乙醇	55 MPa,50 $^{\circ}\text{C}$,CO ₂ 流速为 3.62 g/min	98.60	[7]
—	—	[P ₄₄₄₈]Br-K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 双水相	超声功率 75 W,时间 60 min	96.09	[35]
—	—	乙酸乙酯	场强 18 mT,料液比 1:77 (g/mL),提取 50 min	62.72	[36]

[†] “—”表示未进行破壁处理,直接提取。

2.2 化学破壁法

化学破壁法是利用溶剂与雨生红球藻壁间的化学作用使细胞破损,无机酸、有机溶剂和 ILs 是常用的破壁试剂。任晓丽等^[39]利用硫酸在 60 °C 下破坏雨生红球藻壁纤维素和蛋白质分子间的化学键,发现虾青素提取量比对照组提高了近 45 倍。吴世林等^[28]利用二甲基亚砜和乙醇有效结合研磨法使雨生红球藻破壁率高达 99%。化学破壁法与物理破壁法结合使用能有效破坏雨生红球藻壁,且该方法简单、易操作、对设备要求低。然而,无机酸和有机溶剂容易对虾青素造成化学污染。

ILs 是由阴、阳离子组成的一种低温熔融盐,不同阴、阳离子形成的 ILs 显示出不同的极性,但极性大的 ILs 对纤维素等多糖物质具有较高溶解度,利于破坏和穿透雨生红球藻壁。Desai 等^[40]研究发现,1-乙基-3-甲基咪唑磷酸二丁基酯([Emim]DBP)的阴、阳离子通过与细胞壁甘露聚糖的氢键作用,使雨生红球藻细胞周围形成一层糖膜,因此渗透或削弱细胞壁,获得了较高的虾青素提取率(77%)。Choi 等^[31]发现 1-乙基-3-甲基咪唑硫酸氢盐([Emim]HSO₄)、1-乙基-3-甲基咪唑对甲苯磺酸盐([Emim]CH₃SO₃)、1-乙基-3-甲基咪唑双(三氟甲基磺酰基)酰亚胺([Emim](CF₃SO₂)₂N)等多种 ILs 可以有效撕裂、破坏雨生红球藻壁,从而提高虾青素提取率(86%~99%),其破壁前后的细胞形貌如图 1 所示。此外,Liu 等^[41]指出,由于咪唑类 ILs 有效破坏纤维素分子的氢键,其对雨生红球藻壁的破坏程度高于含吡啶和铵基阳离子的离子液体。ILs 破壁法具有温和、有效的优点,但能高效破坏雨生红球藻壁的 ILs 局限于咪唑类,其价格显著高于铵基类 ILs。

2.3 生物酶法破壁

纤维素复合酶、果胶酶和蛋白酶等通过破坏雨生红球藻壁的纤维素、多糖、蛋白质的氢键、糖苷键及肽键,从而导致细胞壁破裂和胞内物质流出。酶解法破壁率通常为 70% 左右^[15]。余绍蕾等^[42]用 0.5% 复合纤维素酶在 45 °C 酶解雨生红球藻 5 h,随后在 40 MPa 压力下均质 2 次,将破壁率提高至 95% 以上,比单独使用高压均质的

破壁率高 18.07%。然而,酶法成本高、耗时长并存在的酶变性问题制约了其应用。

3 虾青素的提取方法

雨生红球藻经破壁后,HP-AX 的提取方法主要包括油溶提取、化学试剂提取、超临界提取、双水相提取、酶解辅助提取等。

3.1 油溶法

常用于 HP-AX 提取的天然植物油有橄榄油、大豆油、玉米油和葡萄籽油。Kang 等^[33]证明,常温下不同植物油对 HP-AX 提取率的顺序为橄榄油(93.9%)> 大豆油(91.7%)> 玉米油(89.3%)> 葡萄籽油(87.5%)。江燕等^[43]发现天然植物油中含有油酸、亚油酸、棕榈酸等大量不饱和脂肪酸(PUFA),且 PUFA 含量为葡萄籽油> 橄榄油> 大豆油> 玉米油。据此推测,PUFA 的不饱和键与末端羧基结构可能为雨生红球藻壁多糖、蛋白质及虾青素提供结合位点。因此,橄榄油对未破壁 HP-AX 提取率较高,但葡萄籽油的 HP-AX 提取率却最低,其组分对虾青素提取的抑制作用需进一步研究。油溶法具有安全无毒、简便、有效的优点,但提取时间长且虾青素与高沸点油的难分离性增加了分离成本。

3.2 化学试剂提取法

3.2.1 有机溶剂 虾青素属于脂溶性物质且带有羟基、羰基等极性基团,因此溶剂的极性与虾青素溶解能力密切相关,且极性大的有机溶剂更容易渗透雨生红球藻壁。赵晓燕等^[15]指出虾青素在有机溶剂中的溶解度随溶剂极性的增加而减小。王红霞等^[44]研究发现,20 °C、2 h 下不同溶剂对破壁 HP-AX 的提取能力依次为二氯甲烷> 乙酸乙酯> 丙酮> 95% 乙醇> 异丙醇。徐煜等^[45]比较了超声辅助提取 HP-AX 的效果,虾青素提取率大小为丙酮> 二氯甲烷/甲醇($V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}=1:3$)> 甲醇> 氯仿。此外,研究^[46]证明极性溶剂与非极性溶剂联合使用时的提取效果更佳,如以正己烷与乙醇混合液为提取溶剂、料液比($m_{\text{料}}:V_{\text{提取剂}}$)1:640 (g/mL)、51 °C 下提取 42 min 可以使 HP-AX 提取率达 92.04%。有机溶剂法相对简单、有效、后续分离技术成熟,但试剂用量大且丙酮等有毒试剂的使用仍存在极大隐患。

3.2.2 超分子溶剂 超分子溶剂(SUPRAS)是两亲化合物(如羧酸、烷醇、烷基酚等)通过分子间有序的自组装过程形成的具有纳米结构的胶束聚集体^[47-48]。SUPRAS 存在离子—离子、离子—偶极、偶极—偶极、氢键、 π — π 和阳离子— π 等多种分子间作用力,可为虾青素提供多种结合位点和萃取力^[48-49]。因此,SUPRAS 能有效透过细胞壁提取 HP-AX, Salatti-Dorado 等^[34]用辛酸、盐酸和 100% 乙醇制成的 SUPRAS 获得了极高的虾青素提取率(96%)。SUPRAS 具有合成简单、极性范围宽、可设计的

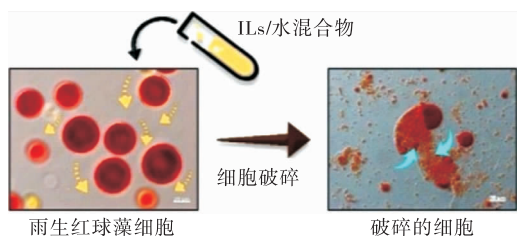


图 1 离子液体预处理雨生红球藻破壁前后的细胞形貌^[31]

Figure 1 Microscopy images of *Haematococcus pluvialis* before and after IL pretreatment

特性,在 HP-AX 提取方面具有巨大潜力,但关于两性分子与虾青素间的主要作用力及作用机制有待进一步研究。

3.2.3 离子液体 ILs 具有低熔点、高热稳定性、强溶解性和可设计性的特点,被广泛应用于虾壳甲壳素、黄连生物碱、牡丹黄酮等天然产物活性物质提取中^[50-51]。ILs 对 HP-AX 的提取效果不仅受阴、阳离子影响,还与其黏度、氢键接受能力(β 值)及极性大小有关。Fan 等^[52]合成了一种成本比咪唑 ILs 低且生物相容性更好的质子 ILs,即己酸乙醇铵(EAC),在固液比 1:20 (g/g)、微波功率 210 W 下,其能有效溶解雨生红球藻壁的甘露聚糖并在 50 s 内一步提取虾青素,其提取效果比方婷等^[53]用丙酮在 50 °C 下水浴提取 1 h 的高约 3.6 倍。此外,与二乙醇己酸铵(DEAC)和三乙醇己酸铵(TEAC)相比,EAC 因具有更高的氢键接受能力($\beta = 1.14$)和更低的极性 $[E_T(30) = 56.3]$,对 HP-AX 的提取效果更为理想。离子液体的黏度大,常通过添加共溶剂来提高传质速率。Liu 等^[41]向纯 ILs 中添加水可以有效降低 ILs 黏度,提高 HP-AX 提取率。ILs 既可以破壁又可以提取,还具有反应条件温和、操作简单、可循环的优点。但 ILs 具有低毒性且价格昂贵。

3.2.4 低共熔溶剂 低共熔溶剂(DES)是由氢键供体与氢键受体组成的一种 ILs 类似物,其出现解决了 ILs 成本高和具有毒性的问题^[54]。除了具有与离子液体相似的物理性质外,DES 还具有低成本和高生物降解的特点,近年来备受关注^[55]。Lee 等^[56]对比了 65 W 超声 90 min 条件下以丙酮为提取溶剂,DES(季磷盐和 1,2-丁二醇组成)或 1-乙基-3-甲基咪唑溴 $[Emim][Br]$ 为添加剂提取梭子蟹虾青素,发现以 DES 为添加剂的虾青素提取率是 $[Emim][Br]$ 的 1.5 倍左右。Rodrigues 等^[55]证明了 DES 在 60 °C、2 h 下对 HP-AX 的提取效率约是丙酮的 5 倍。DES 提取法具有高效、简便、低毒或无毒、成本低的优点,在萃取领域已成为替代 ILs 的良好溶剂。但 DES 的黏度大,通过添加助剂降低黏度或者设计新的低黏度 DES 是推动 DES 广泛应用的前提。

3.3 超临界提取

超临界萃取技术是利用溶剂在超临界状态下对目标产物具有高溶解力而达到萃取的目的^[57]。超临界萃取剂分为非极性溶剂(CO_2 、乙烯、乙烷等)和极性溶剂(甲醇、乙醇、丙酮等)^[58]。其中,非极性 CO_2 具有强溶解能力、化学惰性和低萃取温度,可以保护产物的活性和防止其降解^[7, 59]。为了提高选择性和萃取效率,往往加入共溶剂提高 CO_2 在超临界条件下对目标产物的溶解能力,如超临界 CO_2 以极性乙醇为共溶剂,可以增强溶剂细胞渗透能力,未经破壁处理的 HP-AX 提取率也可达 98%^[60]。超临界萃取技术是一种清洁、绿色的技术,在虾青素的提

取方面具有良好的应用前景。

3.4 双水相提取

双水相提取虾青素主要利用虾青素与互不相溶两相间的相互作用力差异达到高效分离萃取的目的,具有环境友好、能耗低、稳定性好的优势。Khoo 等^[61]用 2-丙醇和硫酸铵构成双水相体系(ABS)提取 HP-AX,其提取率为 95.08%。ILs 构建的 ABS 具有较高的稳定性和生物相容性,其中三丁基膦溴化铵 $[P_{4448}][Br]$ 和磷酸钾(K_3PO_4)ABS 常温下对虾壳虾青素提取率达 93.08%^[62]。张莉莉等^[35]利用 $[P_{4448}][Br]$ 和 K_2HPO_4/KH_2PO_4 组成的 pH 可调节 ABS 直接提取 HP-AX,在超声功率 75 W、超声时间 60 min 的条件下 HP-AX 提取率为 96.09%。ABS 表面性质、电荷作用和其他作用力不仅能有效溶解雨生红球藻壁的多糖,且 $[P_{4448}][Br]$ 的氢原子与虾青素的羟基之间能形成强氢键作用。双水相体系从雨生红球藻中提取虾青素的优势还体现在虾青素溶解于 IL 富集相,其他亲水性分子溶解于盐富集相,利于虾青素的分离纯化。

3.5 酶解辅助提取

酶解法具有装置简单、适用范围广、重现性好的优点。张晔等^[63]用纤维素酶和果胶酶组成的复合酶直接提取 HP-AX,在 pH 4.9、49 °C 下酶解 6 h 得到 71.08% 的 HP-AX 提取率,而 Huang 等^[64]用碱性蛋白酶酶解 1 h 得到的 HP-AX 提取率为 80%。Zhao 等^[32]用果胶酶辅助乙酸乙酯提取 HP-AX 获得 75.30% 的提取率。酶辅助提取避免了化学方法对虾青素活性的影响,但酶制剂比较昂贵,可以联用其他方法以降低成本。

3.6 物理辅助提取

目前,常用的物理辅助提取方法有超声辅助、高压辅助和磁场辅助。超声波产生的空化、乳化、扩散等效应能破坏雨生红球藻壁,提高溶剂的渗透性和传质能力,促进虾青素与溶剂的混合。Khoo 等^[61]研究表明,添加超声辅助双水相提取 HP-AX,其提取率提高了 16.70%。高压辅助利用压力使雨生红球藻细胞相互挤压、变形甚至破碎,加快提取速度和提高提取效率,如使用加压乙醇可在 20 min 内完成 HP-AX 的提取^[29]。磁场辅助提取是一种通过在萃取液中添加磁性敏感添加剂以吸引目标生物分子的新分离技术^[47]。这种磁性敏感剂可以通过改变材料的某些性质(扩散系数、渗透压、黏度、表面张力和溶解度),影响相平衡组成,强化分离过程^[65]。因此,磁场可以改变雨生红球藻壁溶解度、渗透压等,使溶剂直接渗透细胞壁提取虾青素,如与超声辅助相比,磁场辅助萃取雨生红球藻可获得最高的虾青素提取率(40.27%)^[66]。

超声、高压等物理辅助可对雨生红球藻壁造成破坏,与酶辅助相比,物理辅助溶剂提取能节省提取时间,提高虾青素提取率且方法简便、成本低。此外,对于黏度大的

提取溶剂,例如 ILs、DES,采取超声辅助有利于提高传质效率,增大 HP-AX 提取率。

4 展望

近年来,破壁技术和提取技术取得了很大的进展,为雨生红球藻的有效利用和虾青素的高效提取提供了新的方法,如脉冲电场法、离子液体法、DES 法、双水相等破壁提取技术等,但这些研究还处于初步阶段,许多基础科学问题需进一步研究。未来的研究方向将会着力于:① 多种破壁方法结合使用,提高破壁率;② 探索更绿色高效的提取体系,深入研究其提取机理,为工业化生产提供切实可行的理论依据;③ 简化工艺,将破壁和提取同步进行;④ 提取溶剂的循环利用,有效降低提取成本。

参考文献

- [1] HAN S I, YAO Jun-yi, LEE C, et al. A novel approach to enhance astaxanthin production in *Haematococcus lacustris* using a microstructure-based culture platform[J]. Algal Research, 2019, 39: 101464.
- [2] 孟昂, 赵晓燕, 邱月, 等. 雨生红球藻中虾青素及其结晶体的研究进展[J]. 食品工业, 2019, 40(1): 258-261.
- [3] NOOTEM J, CHALORAK P, MEEMON K, et al. Electro-spun cellulose acetate doped with astaxanthin derivatives from *Haematococcus pluvialis* for in vivo anti-aging activity[J]. RSC Advances, 2018, 8(65): 37 151-37 158.
- [4] LIM K C, YUSOFF F M, SHARIFF M, et al. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals[J]. Reviews in Aquaculture, 2018, 10(3): 738-773.
- [5] CHOU Yi-li, CO Chia-yun, YEN Chih-chung, et al. Multiple promoters driving the expression of astaxanthin biosynthesis genes can enhance free-form astaxanthin production[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 160: 20-28.
- [6] ZHAO Tong, YAN Xiao-jia, SUN Li-jun, et al. Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91: 354-361.
- [7] DI SANZO G, MEHARIYA S, MARTINO M, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin, lutein, and fatty acids from *Haematococcus pluvialis* microalgae[J]. Marine Drugs, 2018, 16(9): 334.
- [8] FAN Yun-chang, NIU Ze-yu, XU Chen, et al. Biocompatible protic ionic liquids-based microwave-assisted liquid-solid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. Industrial Crops & Products, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111809.
- [9] AHMED F, LI Yan, FANNING K, et al. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*[J]. Food Research International, 2015, 74: 231-236.
- [10] SUN Wei-hong, XING Li-hong, LIN Hong, et al. Assessment and comparison of in vitro immunoregulatory activity of three astaxanthin stereoisomers[J]. Journal of Ocean University of China, 2016, 15(2): 283-287.
- [11] IRSHAD M, MYINT A A, HONG M E, et al. One-pot, simultaneous cell wall disruption and complete extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* at room temperature[J]. Acs Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(16): 13 898-13 910.
- [12] REGNIER P, BASTIAS J, RODRIGUEZ-RUIZ V, et al. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity[J]. Marine Drugs, 2015, 13(5): 2 857-2 874.
- [13] GAO Xin-wei, SUN Jia-nan, HUANG Wen-can, et al. Highly efficient preparation of free all-trans-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* extract by a rapid biocatalytic method based on crude extracellular enzyme extract[J]. International Journal of Food Science Technology, 2019, 54: 376-386.
- [14] 孟春晓, 高政权, 王依涛, 等. 雨生红球藻中虾青素提取方法研究现状[J]. 水产科学, 2010, 29(12): 745-748.
- [15] 赵晓燕, 朱海涛, 毕玉平, 等. 雨生红球藻中虾青素的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(4): 191-194, 195.
- [16] BAUER A, MINCEVA M. Direct extraction of astaxanthin from the microalgae *Haematococcus pluvialis* using liquid-liquid chromatography[J]. Rsc Advances, 2019, 9 (40): 22 779-22 789.
- [17] CHEN Zhu, CHEN Jun, LIU Jing-hua, et al. Transcriptomic and metabolic analysis of an astaxanthin-hyperproducing *Haematococcus pluvialis* mutant obtained by low-temperature plasma (LTP) mutagenesis under high light irradiation[J]. Algal Research, 2020, 45: 101746.
- [18] ZHAO You-teng, XING Hai-liang, LI Xing-yu, et al. Physiological and metabolomics analyses reveal the roles of fulvic acid in enhancing the production of astaxanthin and lipids in *Haematococcus pluvialis* under abiotic stress conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(45): 12 599-12 609.
- [19] 杭州鑫伟低碳技术研发有限公司. 一种雨生红球藻虾青素豆浆或豆奶的配方: 201711084247.6[P]. 2018-02-23.
- [20] RAO A R, SARADA R, SHYLAKA M D, et al. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant activity of astaxanthin and astaxanthin esters from microalga *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2015, 52(10): 6 703-6 710.
- [21] SHIN J, KIM J E, PAK K J, et al. A combination of soybean and *Haematococcus* extract alleviates ultraviolet B-induced photoaging[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 682.
- [22] 北京科技大学. 抗氧化保湿微生物活细胞制剂和含有该制

- 剂的护肤用品: 201910347517.0[P]. 2019-07-05.
- [23] 高珊, 郭勇, 陈余, 等. 天然虾青素的生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(10): 2 981-2 987.
- [24] CAPELLI B, TALBOTT S, DING L X. Astaxanthin sources; Suitability for human health and nutrition [J]. Function Foods Health Disease, 2019, 9(6): 430-445.
- [25] DAVINELLI S, NIELSEN M E, SCAPAGNIN G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review[J]. Nutrients, 2018, 10(4): 522.
- [26] BRENDLER T, WILLIAMSON E M. Astaxanthin: How much is too much? A safety review[J]. Phytotherapy Research, 2019, 33(1): 1-22.
- [27] MARTINEZ J M, GOJKOVIC Z, FERRO L, et al. Use of pulsed electric field permeabilization to extract astaxanthin from the Nordic microalga *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource Technology, 2019, 289: 121694.
- [28] 广州智特奇生物科技股份有限公司. 一种雨生红球藻破壁提取虾青素酯的方法: 201811489937.4[P]. 2019-02-22.
- [29] MOLINO A, RIMAURO J, CASELLA P, et al. Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 283: 51-61.
- [30] HAQUE F, DUTTA A, THIMMANAGARI M, et al. Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. Food and Bioprocess Technology, 2016, 99: 1-11.
- [31] CHOI S A, OH Y K, LEE J, et al. High-efficiency cell disruption and astaxanthin recovery from *Haematococcus pluvialis* cyst cells using room-temperature imidazolium-based ionic liquid/water mixtures [J]. Bioresource Technology, 2019, 274: 120-126.
- [32] ZHAO Xiao-yan, ZHANG Xiao-wei, LIU Hong-kai, et al. Enzyme-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its stability and antioxidant activity[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(6): 1 637-1 647.
- [33] KANG C D, SIM S J. Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture using vegetable oils [J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(3): 441-444.
- [34] SALATTI-DORADO A J, GARCIA-GOMEZ D, RODRIGUEZ-RUIZ V, et al. Multifunctional green supramolecular solvents for cost-effective production of highly stable astaxanthin-rich formulations from *Haematococcus pluvialis* [J]. Food Chemistry, 2019, 279: 294-302.
- [35] 张莉莉, 高静, 魏媛仪, 等. LCST 型离子液体-一盐双水相体系提取虾青素 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 170-178.
- [36] ZHAO Xiao-yan, FU Li-dan, LIU Di, et al. Magnetic-field-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2016, 40(3): 463-472.
- [37] 陈兴才, 欧阳琴, 黄亚治. 雨生红球藻物理破壁法提取虾青素研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(2): 48-52.
- [38] 孟昂, 王萌, 赵晓燕, 等. 超声波联合研磨破壁法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(3): 91-97.
- [39] 任晓丽, 陈林, 刘天中, 等. 破壁方法对雨生红球藻湿藻生物质中虾青素提取的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 110-117.
- [40] DESAI R K, STREEFLAND M, WIJFFELS R H, et al. Novel astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using cell permeabilising ionic liquids [J]. Green Chemistry, 2016, 18(5): 1 261-1 267.
- [41] LIU Zhi-wei, YUE Zhou, ZENG Xing-an, et al. Ionic liquid as an effective solvent for cell wall deconstructing through astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(2): 583-590.
- [42] 余绍蕾, 杜伟春, 鸭乔. 酶解结合物理法对雨生红球藻破壁处理的工艺研究[J]. 食品工程, 2016(4): 38-40.
- [43] 江燕, 黎贵卿, 张思敏. 11 种食用植物油中脂肪酸组成的 GC-MS 分析[J]. 广西林业科学, 2018, 47(4): 487-489.
- [44] 王红霞, 杨雯, 田洪, 等. 雨生红球藻中虾青素的提取及稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(2): 101-106.
- [45] 徐煜, 张琳, 李亚鹤, 等. 雨生红球藻中虾青素萃取工艺优化[J]. 生物学杂志, 2017, 34(1): 98-102.
- [46] 耿兆艳, 孙翰, 管斌, 等. 雨生红球藻粉虾青素的提取及稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(7): 86-95.
- [47] KHOO K S, LEE S Y, OOI C W, et al. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. Bioresource Technology, 2019, 278: 109933.
- [48] FALSAFI Z, RAOFIE F, ARIYA P A. Supercritical fluid extraction followed by supramolecular solvent microextraction as a fast and efficient preconcentration method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in apple peels [J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(6): 1 154-1 163.
- [49] TORRES-VALENZUELA L S, BALLESTEROS-GOMEZ A, RUBIO S. Supramolecular solvent extraction of bioactives from coffee cherry pulp [J]. Journal of Food Engineering, 2020, 278: 109933.
- [50] 冯靖, 彭效明, 李翠清, 等. 离子液体在提取天然产物活性物质中的应用[J]. 应用化工, 2019, 48(4): 945-949.
- [51] TOLESA L D, GUPTA B S, LEE M J. Chitin and chitosan production from shrimp shells using ammonium-based ionic liquids [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 818-826.
- [52] FAN Yun-chang, NIU Ze-yun, XU Chen, et al. Biocompatible protic ionic liquids-based microwave-assisted liquid-solid

- extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 141: 111809.
- [53] 方婷, 段明慧, 马晋芳, 等. 高压破碎提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究[J]. 中药材, 2018, 41(9): 2163-2166.
- [54] ZHANG Heng, TANG B K, ROW K H. A green deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted method to extract astaxanthin from shrimp byproducts[J]. Analytical Letters, 2014, 47(5): 742-749.
- [55] RODRIGUES L, PEREIRA C, LEONARDO I C, et al. Terpene-based natural deep eutectic systems as efficient solvents to recover astaxanthin from brown crab shell residues[J]. Acs Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(5): 2246-2259.
- [56] LEE Y R, ROW K H. Comparison of ionic liquids and deep eutectic solvents as additives for the ultrasonic extraction of astaxanthin from marine plants[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2016, 39: 87-92.
- [57] 邱采奕. 超临界流体萃取技术及其在食品中的应用[J]. 科技经济导刊, 2019, 27(2): 155, 157.
- [58] 张红英, 姚元虎, 颜雪明, 等. 超临界流体萃取分离技术及其应用[J]. 首都师范大学学报, 2016, 37(6): 50-53.
- [59] 张晓燕, 刘楠, 周德庆. 天然虾青素来源及分离的研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 264-267.
- [60] CHENG Xiang, QI Zhen-bang, BURDYN T, et al. Low pressure supercritical CO₂ extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* demonstrated on a microfluidic chip[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 481-485.
- [61] KHOO K S, CHEW K W, YEW G Y, et al. Integrated ultrasonic assisted liquid biphasic flotation for efficient extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 67: 105052.
- [62] GAO Jing, FANG Chun-li, LIN Yong-zi, et al. Enhanced extraction of astaxanthin using aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and potassiumphosphate[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125672.
- [63] 张晔, 刘志伟, 谭兴和. 响应面法优化复合酶提取雨生红球藻中虾青素的工艺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 87-92.
- [64] HUANG Jin-jin, YANG Zhen, ZHU Rui-yan, et al. Efficient heterologous expression of an alkaline lipase and its application in hydrolytic production of free astaxanthin[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 181.
- [65] ZIELIRISKA-DAWIDZIAK M, MICHALAK M. Influence of magnetic field on extraction of model proteins in polyethylene glycol/magnesium sulfate aqueous two-phase system[J]. Journal of Chromatography B - Analytical Techniques in Biomedicine and Life Sciences, 2019, 1126/1127: 121760.
- [66] ZHAO Xiao-yan, ZHANG Xiao-wei, FU Li-dan, et al. Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. Food and Bioproducts Processing, 2016, 99: 197-203.
-
- (上接第 193 页)
- [40] SONG Yong-ling, LIU Lei, SHEN Hui-xing, et al. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Food Control, 2011, 22(3/4): 608-615.
- [41] QIAN Pan, ZHANG Yi-qi, SHEN Qing, et al. Effect of cryogenic immersion freezing on quality changes of vacuum-packed bighead carp (*Aristichthys nobilis*) during frozen storage[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2018, 42(6): e13640.
- [42] 史咏梅, 李勇勇, 吴迪迪, 等. 不同冻结方式对南美白对虾品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 94-100.
- [43] 梁钻好, 陈海强, 梁凤雪, 等. 液浸速冻对牡蛎水分迁移及品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 233-238.
- [44] SUN Qin-xiu, SUN Fang-da, XIA Xiu-fang, et al. The comparison of ultrasound-assisted immersion freezing, air freezing and immersion freezing on the muscle quality and physicochemical properties of common carp (*Cyprinus carpio*) during freezing storage[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 51: 281-291.
- [45] 向迎春, 黄佳奇, 栾兰兰, 等. 超声辅助冻结中国对虾的冰晶状态与其水分变化的影响研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 203-210.
- [46] 陈聪, 杨大章, 谢晶. 速冻食品的冰晶形态及辅助冻结方法研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(8): 220-225.
- [47] CIPOLLETTI J C, ROBERTSON G H, FARKAS D F. Freezing of vegetables by direct contact with aqueous solutions of ethanol and sodium chloride[J]. Journal of Food Science, 1977, 42(4): 911-916.
- [48] PHAM Q T, LE BAIL A, HAYERT M, et al. Stresses and cracking in freezing spherical foods: A numerical model[J]. Journal of Food Engineering, 2005, 71(4): 408-418.
- [49] 王金锋, 李文俊, 谢晶. 数值模拟在食品冻结过程中的应用[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 200-204.
- [50] LUCAS T, CHOUROT J M, BOHUON P, et al. Freezing of a porous medium in contact with a concentrated aqueous freezant; Numerical modelling of coupled heat and mass transport[J]. International Journal of Heat and Mass Transfer, 2001, 44(11): 2093-2106.
- [51] YU Da-wei, REGENSTEIN J M, XIA Wen-shui. Bio-based edible coatings for the preservation of fishery products: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(15): 2481-2493.
- [52] 张涛. 石斑鱼液体速冻保鲜加工技术及对鱼肉品质的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 9-11.