

响应面法优化复合酶提取 雨生红球藻中虾青素的工艺

张 晔, 刘志伟*, 谭兴和*

(湖南农业大学食品科技学院, 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410000)

摘 要:本文研究了纤维素酶、果胶酶以及复合酶对雨生红球藻破壁效果, 并通过响应面优化酶解破壁辅助提取虾青素的工艺。结果表明, 当纤维素酶和果胶酶活力配比 1:1 (U/U), 加酶量 7000 U/mL 时, 优化的最佳酶解条件为: 酶解 pH4.9, 酶解温度 49 ℃, 酶解时间为 6 h, 理论提取率为 70.21%, 实际提取率为 71.08% ± 0.26%, 相对误差为 1.2%。综上, 复合酶法辅助提取方法简单、条件温和、绿色安全、效率高, 可在雨生红球藻虾青素实际提取工艺中得到应用。

关键词:雨生红球藻, 虾青素, 复合酶法, 提取工艺, 工艺优化

Optimization of Multi-enzymatic Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by Response Surface Methodology

ZHANG Ye, LIU Zhi-wei*, TAN Xing-he*

(Key Laboratory of Food Science and Biotechnology, College of Food Science and Technology,
Hunan Agricultural University of Hunan Province, Changsha 410000, China)

Abstract: In this study, the efficiency of enzymes (cellulase, pectinase and complex enzyme) on the hydrolysis of cell wall of *H. pluvialis* was studied. And response surface methodology was employed to optimize the hydrolysis conditions. Results indicated that when pectinase and cellulase mixed with the ratio of 1:1 (U/U), enzyme dosage 7000 U/mL, the optimal hydrolysis conditions were as follows: pH4.9, temperature 49 ℃, and time 6 h. Under these conditions, the theoretical and actual crude yield of astaxanthin were reached 70.21% and 71.08% ± 0.26%, with a relative error of 1.2%. This method of multi-enzymatic hydrolysis has the advantages of simple reaction, mild conditions, green security and high efficiency, which can apply in the practical extraction process of astaxanthin from *H. pluvialis*.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; astaxanthin; multi-enzymatic hydrolysis; extraction technology; process optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)22-0087-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.016

引文格式: 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.

虾青素(3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β' -胡萝卜素, $C_{40}H_{52}O_4$)是一种脂溶性酮式类胡萝卜素, 具有极强的抗氧化作用, 其自由基抗氧化活性比维生素 E 高 500 倍, 比 β -胡萝卜素高 38 倍^[1]。同时, 虾青素还具有抗癌^[2]、增强免疫系统^[3]、抵抗组织损伤^[4]和预防心血管疾病等功能^[5]。近年来已被广泛应用于化妆品^[6]、医药^[7]、保健品^[8]及水产养殖领域^[9]。虾青素主要存在于各种微生物以及微藻中, 其中雨生红球藻是天然虾青素最主要的来源^[10-11]。雨生红球藻是一种单细胞双鞭毛微藻, 在逆境条件下(强光、高温、营养盐(氮、磷)饥饿、高盐)经过一系列的形态

变化最终形成一种含较高虾青素含量的成熟红色、非运动性囊胞^[12]。其虾青素积累量最高可达藻细胞干质量的 4.0% 以上, 远远高于水产品废弃物(虾、蟹等甲壳)中和红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*) (0.15%~0.4%) 中虾青素的含量^[13]。但成熟的雨生红球藻厚而致密的细胞壁导致有机溶剂很难直接渗透到细胞内部, 影响胞内虾青素提取效率^[14], 因此雨生红球藻破壁处理成为虾青素提取的关键工艺。

目前常用的虾青素提取方法主要有超声波辅助和微波辅助提取^[15]、有机溶剂浸提^[16]、酶法辅助提取^[17]、超临界流体萃取法^[18]以及高压均质法^[19]。超

收稿日期: 2019-04-02

作者简介: 张晔(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工新技术, E-mail: ye274919161@163.com。

* 通讯作者: 刘志伟(1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品非热加工技术研究, E-mail: zwliu@hunau.edu.cn。

谭兴和(1959-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工技术研究, E-mail: xinghetan@163.com。

基金项目: 湖南省自然科学基金青年基金项目(2019JJ50266)。

声波和微波辅助提取设备昂贵,并且 Zhao 等^[20]发现采用超声波辅助和微波辅助提取会降低虾青素的生物活性。直接使用有机溶剂浸提不仅耗费时长,且提取率较低, Sarada 等^[21]使用了多种有机溶剂进行浸泡提取,其中最好的一种有机溶剂提取率也只有 22%。超临界流体 CO₂ 萃取法成本较高,不适用于工业化大规模生产。高压均质法对均质机设备要求较高,且在生产中设备零件损耗较大,常常不能连续生产。相较于其他几种方法,酶法具有反应条件温和、设备操作简单、用料少、产品纯度高等优点,被认为是最具潜力的一种提取方法。Kobayashi 等^[22]使用了纤维素酶和裂解酶处理雨生红球藻,有效地获得了虾青素但并没有具体探讨工艺参数对虾青素提取率的影响。

雨生红球藻细胞壁是由纤维素蛋白和果胶物质组成的复杂网状结构,采用纤维素酶和果胶酶能够水解植物细胞壁,提高生物细胞壁和细胞膜的通透性,加速细胞内溶物质流出功能^[23-24]。溶菌酶同样能够有效地降解细胞壁的成分,有助于细胞内营养物质的释放^[25-26]。因此,本文采用了纤维素酶、果胶酶和溶菌酶三种单酶以及四种不同比例的复合酶辅助破壁提取雨生红球藻虾青素。通过响应面法对酶法提取条件进行了优化,旨在为工业化大规模生产提供一定的参考条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雨生红球藻粉 云南省白鸥生物技术有限公司,纯度 3.5%;纤维素酶(400 U/mg)、果胶酶(500 U/mg)、溶菌酶(20000 U/mg) 上海瑞永生物科技有限公司;乙酸、乙酸钠、甲醇(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

H-8 数显恒温水浴锅 上海浦东物理化学光学仪器厂;TGW16 台式高速微量离心机 长沙英泰仪器有限公司;WFJ-7200 型可见分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司;AL-204 电子天平(精确至 0.0001 g) 上海梅特勒-托利多仪器有限公司;PHS-3C pH 计 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原料的预处理 雨生红球藻粉末冷冻干燥后用铝箔纸密封储存于-18℃中备用。

1.2.2 酶法提取雨生红球藻中虾青素工艺 参考 Liu 等^[27]的方法,固定料液比为 10:1 (mg/mL)准确称取 10 mg 雨生红球藻粉末置于 10 mL 连盖离心管中,加入 1 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液,调节 pH,分别加入一定量的纤维素酶、果胶酶、溶菌酶以及复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1 (U/U);纤维素酶:果胶酶=2:1 (U/U);纤维素酶:果胶酶=1:2 (U/U);纤维素酶:果胶酶:溶菌酶=1:1:1 (U/U/U)),在预定条件下进行酶解反应,灭酶后用 9000 r/min 的离心机离心 10 min,取离心沉淀物加入 4 mL 甲醇在 50℃水浴锅中提取 1 h,收集上清液再加 4 mL 甲醇于 50℃水浴锅中提取 1 h,合并两次上清液,备用。

1.2.3 酶法提取雨生红球藻中虾青素单因素实验

1.2.3.1 酶的种类和酶含量大小对雨生红球藻虾青素提取率的影响 酶法提取过程中,影响提取率最重要的因素是酶的种类和酶含量大小。为了探究这些因素对虾青素提取率的影响规律,对反应条件进行了设置:在大量预实验的基础上控制酶解温度为 50℃,酶解 pH 为 5.0,酶解时间为 6 h,比较单一酶(纤维素酶、果胶酶、溶菌酶)、复合酶(纤维素:果胶酶=1:1, U/U;纤维素:果胶酶=2:1, U/U;纤维素酶:果胶酶=1:2, U/U;纤维素酶:果胶酶:溶菌酶=1:1:1, U/U)在加酶量为 5000、6000、7000、8000、9000、10000 U/mL 时对雨生红球藻中虾青素提取率的影响,每个处理组设 3 个重复。

1.2.3.2 酶解时间对雨生红球藻虾青素提取率的影响 选取提取率最高的一组酶,固定酶解温度 50℃、pH 5.0,加酶量为 7000 U/mL,分别测定酶解时间为 4、5、6、7、8 h 对雨生红球藻虾青素的提取率的影响。每个处理组设 3 个重复。

1.2.3.3 酶解温度对雨生红球藻虾青素的影响 选取提取率最高的一组酶,固定酶解 pH 5.0、酶解时间 6 h,加酶量为 7000 U/mL,分别测定了酶解温度 30、40、50、60、70℃对雨生红球藻虾青素提取率的影响。每个处理组设 3 个重复。

1.2.3.4 酶解 pH 对雨生红球藻虾青素的影响 选取提取率最高的一组酶,固定酶解时间 6 h、酶解温度 50℃,加酶量为 7000 U/mL,分别测定了酶解 pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 对雨生红球藻虾青素提取率的影响。每个处理组设 3 个重复。

1.2.4 响应面试验 在单因素实验结果基础上,选择纤维素与果胶酶酶活力配比为(1:1, U/U),加酶量为 7000 U/mL,以酶解温度、酶解时间和 pH 作自变量,进行响应面试验,以虾青素提取率为指标,确定复合酶提取雨生红球藻虾青素的最佳工艺参数。试验因素水平编码见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiment design

水平	因素		
	A 酶解 pH	B 酶解温度 (℃)	C 酶解时间 (h)
-1	4.5	40	5
0	5.0	50	6
1	5.5	60	7

1.3 虾青素含量的测定。

采用文献[28]的方法测定虾青素的含量。得到的上清液稀释适当倍数于 476 nm 处测定吸光值,甲醇用于空白测定。提取率表示提取得到的虾青素占雨生红球藻中虾青素总量的比例。按下列公式进行计算。

$$C(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{A}{250}$$

$$X(\text{mg}) = C \times 8 \times 15$$

$$Y(\%) = \left(\frac{\frac{X}{M} \times 80\%}{3.5\%} \right) \times 100$$

式中:C:类胡萝卜素的含量,mg/mL;A:476 nm处的吸光值;250:消光系数。

X:类胡萝卜素的质量,mg;8:甲醇的体积,mL;15:稀释倍数。

Y:雨生红球藻中虾青素的提取率,%;M:样品的质量,mg;80%:类胡萝卜素中虾青素的含量;3.5%:藻粉中虾青素的含量。

1.4 数据分析

利用 Origin 8.5、Design-Expert 8.0 和 SPSS 18.0 数据处理系统对试验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 酶的种类和加酶量对雨生红球藻虾青素提取率的影响 结果如图 1 所示,不同种类的酶对雨生红球藻虾青素的提取率均随着酶添加量的增加呈现先增大后缓慢下降的变化趋势。造成这种现象的原因主要是因为酶解底物有限,当酶解反应达到饱和时,继续增大加酶量会引起酶的竞争性抑制作用,导致提取率的降低^[29]。

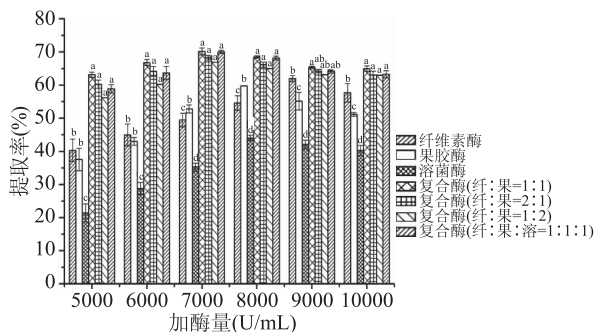


图1 酶种类和酶活力大小对雨生红球藻中虾青素提取率的影响

Fig.1 Effects of type and activity of enzyme on the yield of astaxanthin from *H.pluvialis*

注:同一加酶量不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

当纤维素酶、果胶酶、溶菌酶单独作用时,虾青素的提取率分别在酶含量为 9000、8000、8000 U/mL 时,达到最大为 61.9%、59.73、44.01%。而使用复合酶法辅助破壁提取雨生红球藻虾青素显著高于其他三种单酶单独作用的效果($P < 0.05$)。出现这种现象的原因主要是因为雨生红球藻细胞壁组织结构十分复杂,使用一种酶不足以充分的破坏细胞壁的结构,将不同类型的酶混合使用时,能够激发酶的协同作用能力,有效地提高酶解效果,促进雨生红球藻内次生代谢产物的释放,进一步提高虾青素的提取率。Gerken 等^[30]采用不同种类的酶对小球藻细胞壁进行降解试验,研究发现单个酶对细胞壁结构的削弱及破坏程度往往都不及复合酶的效果好。其中四种不同比例的复合酶中最好的纤维素:果胶酶复合酶(1:1,U/U),当酶含量为 7000 U/mL,虾青素的提取率最高可达 70.15%。因此本实验采用纤维素酶和果胶酶酶活力配比 1:1 (U/U),加酶量为 7000 U/mL 进行后续试验。

2.1.2 酶解时间对雨生红球藻虾青素提取率的影

响 如图 2 所示,当酶解时间小于 6 h 时,虾青素提取率间具有显著差异($P < 0.05$),虾青素的提取率随着酶解时间的增加而增大,由 53.64% 升高到了 70.19%;并且在 6 h 时,虾青素的提取率达到最大,为 70.19%,酶解反应在 4~6 h 内,复合酶的活性逐渐达到最大,能够充分地红球藻细胞壁组织结构反应,增强了酶的渗透效果,促进了细胞内次生代谢产物的流出。继续延长酶解时间提取率反而有所下降,由 70.19% 下降到 66.85%。出现这种变化趋势的原因主要是因为在一定时间范围内,随着酶解时间的延长,酶解反应逐渐反应彻底,超出一定时间范围后,继续延长反应时间反而会抑制酶活性的发挥。此外,从雨生红球藻中释放出的虾青素不稳定,长时间暴露于外部环境中可能发生氧化降解反应,因此延长提取时间内观察到虾青素提取率降低可能反应了由于氧化导致虾青素的损失^[31-32],所以选择最佳酶解时间为 6 h。

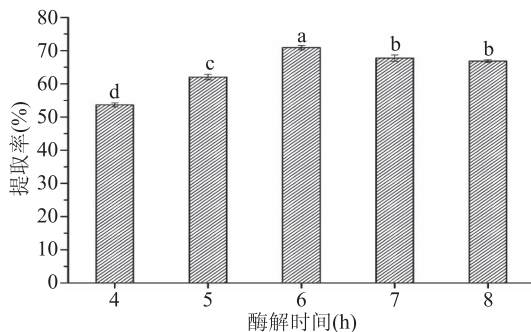


图2 酶解时间对雨生红球藻虾青素提取率的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis time on the yield of astaxanthin from *H.pluvialis*

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);图 3~图 4 同。

2.1.3 酶解温度对雨生红球藻虾青素提取率的影响 如图 3 所示,不同的酶解温度对虾青素的提取率均具有显著性差异($P < 0.05$)。当温度低于 50 ℃ 时,随着温度的升高,虾青素的提取率也随之升高,从 48.76% 升高到了 70.08%,并且在 50 ℃ 提取率达到最大;当温度超过 50 ℃ 时,虾青素提取率急剧下降,从 70.08% 下降到了 40.70%。造成该趋势的主要原因是因为在一定温度范围内,酶的活性会随着温度的升高逐渐升高,当达到酶的最大活性时,继续升高温度酶受热发生变性,导致酶活力的降低甚至失活,从而减缓的虾青素的提取率。这一结果与 Zuorro 等^[33]使用酶法提取微藻中油脂的报道一致,并且温度过高对虾青素的结构也会造成一定的破坏。因此选择最佳酶解温度为 50 ℃。

2.1.4 酶解 pH 对雨生红球藻虾青素提取率的影响 如图 4 所示,当 pH 低于 5.0 时,虾青素提取率随着 pH 的升高逐渐升高且具有显著性差异($P < 0.05$),由 48.41% 升高到了 70.11%,并且在 pH 为 5.0 时达到最大;当 pH 超过 5.0 时,虾青素的提取率显著下降($P < 0.05$),由 70.11% 下降到了 48.96%。说明 pH 过大过小都会对酶解反应造成较大的影响,只有在最适的 pH 范围内,酶与底物才会充分结合,酶解反应速度达到最大。因此,当纤维素-果胶酶复合酶

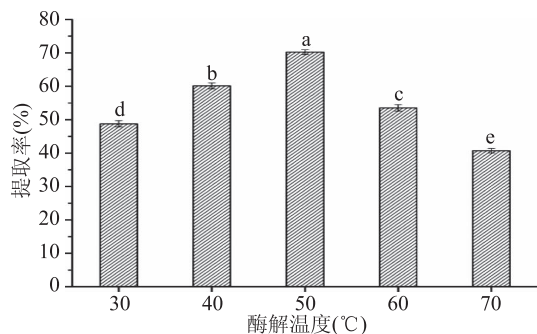


图3 酶解温度对雨生红球藻虾青素提取率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on the yield of astaxanthin from *H.pluvialis*

的 pH 在 5.0 左右时,其酶活性最好,对雨生红球藻细胞壁的降解和破坏达到最大。李亚辉等^[34]使用纤维素酶和果胶酶复合提取芦荟多糖也是在酸性范围内获得最佳 pH。所以选择最佳酶解 pH 为 5.0。

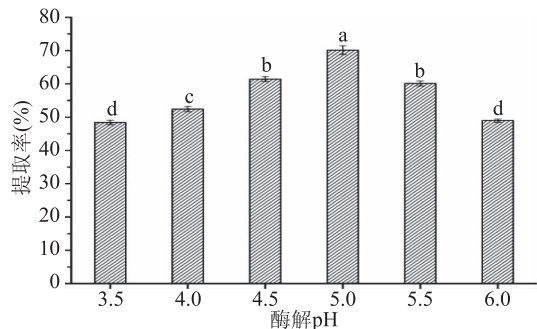


图4 pH对雨生红球藻虾青素提取率的影响

Fig.4 Effect of pH values on the yield of astaxanthin from *H.pluvialis*

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面试验设计结果 响应面设计:固定加酶量为 7000 U/mL,复合酶中纤维素酶和果胶酶酶活力配比为 1:1 (U:U),以酶解时间(A)、酶解温度(B)和酶解 pH(C)为自变量,以雨生红球藻虾青素提取率为响应值,结果见表 2。用 Design-Expert 8.0 软件对表三数据进行回归拟合,得到雨生红球藻虾青素提取率对上述 3 个自变量的二次回归方程: $Y = 69.95 - 1.44A - 3.32B - 1.15C - 4.34AB + 2.22AC - 3.00BC - 4.58A^2 - 15.12B^2 - 6.67C^2$ 。

2.2.2 回归模型方差分析 对回归模型及其系数进行显著性检验(表 3),结果表明该试验选用的模型极显著($P < 0.0001$),方差失拟项不显著($P = 0.3820 > 0.05$),说明模型的选择是合理的;此外,回归模型的总决定系数 $R^2 = 0.9883$,表明二次回归方程与试验结果的拟合度良好,可以用于复合酶提取雨生红球藻虾青素的分析与预测。同时,从表 3 结果还可以得出酶解温度(B)、酶解 pH 和酶解温度交互项(AB)、酶解温度和酶解时间交互项(BC)、酶解 pH 二次项(A^2)、酶解温度二次项(B^2)、酶解时间二次项(C^2)极显著($P < 0.01$),酶解 pH(A)、酶解 pH 和酶解时间交互项(AC)均显著($P < 0.05$),说明这几个因素对虾青素提取率影响较大,根据 F 值大小,可知影响因素的主次顺序为:B(酶解温度) > A(酶解 pH) > C

表2 响应面试验设计及结果
Table 2 Experimental design and corresponding results for response surface analysis

实验号	A	B	C	Y 虾青素提取率(%)
1	0	0	0	71.18
2	0	1	-1	48.72
3	-1	0	-1	63.39
4	1	1	0	39.99
5	0	0	0	69.21
6	0	0	0	69.37
7	0	-1	1	53.60
8	0	0	0	68.11
9	-1	0	1	55.33
10	0	0	0	71.85
11	-1	-1	0	51.83
12	1	-1	0	56.08
13	0	1	1	41.72
14	1	0	1	57.61
15	-1	1	0	53.09
16	0	-1	-1	48.60
17	1	0	1	58.44

表3 二次多项式回归模型的方差分析
Table 3 Analysis of variance the regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1585.90	9	176.21	65.80	<0.0001
A	16.59	1	16.59	6.19	0.0417
B	88.38	1	88.38	32.99	0.0007
C	10.65	1	10.65	3.97	0.0865
AB	75.26	1	75.26	28.09	0.0011
AC	19.76	1	19.76	7.37	0.0300
BC	36.00	1	36.00	13.44	0.0080
A^2	88.40	1	88.40	33.04	0.0007
B^2	961.89	1	961.89	359.18	<0.0001
C^2	187.29	1	187.29	69.97	<0.0001
残差	18.75	7	2.68		
失拟项	9.37	3	3.12	1.33	0.3820
纯误差	9.38	4	2.35		
总误差	1605.40	16			

(酶解时间)。

2.2.3 响应面分析与最优条件的确定 为了进一步分析酶解时间、酶解温度和酶解 pH 对响应面值的影响,固定其中的 1 个因素,使其处于中心水平,绘制其他两个因素交互作用的响应面,对两因素的相互作用进行分析。图 5 所示的 3 组响应面及等高线的形状可以分析出随着各因素水平的升高或延长,虾青素的提取率均呈现先增大后减少的变化特征。并且,响应面的陡峭程度和等高线的形状可以反应两因素之间的作用显著程度。其中,响应面越陡,等高线的形状越偏向椭圆表明两因素之间的交互作用越显著。由图 5 可知,三组交互作用 AB、AC、BC 对响应值的影响均具有显著性。

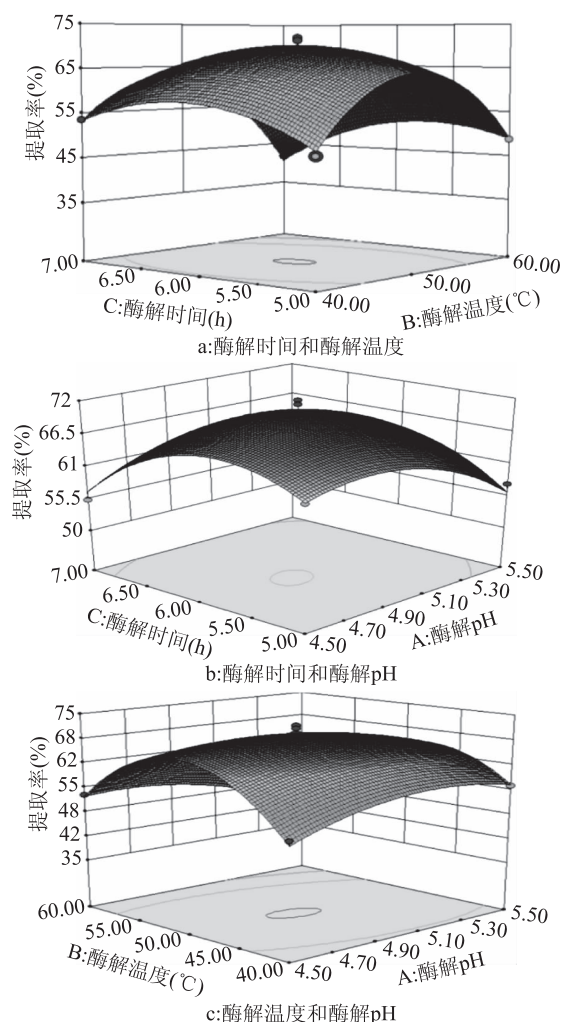


图5 各因素交互作用对雨生红球藻虾青素提取率影响的响应面与等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of interactions among different factors on the extraction yield of astaxanthin from *H. pluvialis*

2.2.4 提取工艺的优化与验证 通过 Design-Expert 8.0 分析优化,得出酶法提取雨生红球藻中的虾青素的最佳工艺条件为酶解时间 5.91 h、酶解 pH4.93、酶解温度 49.19 °C,在此条件下,虾青素的提取率预测值为 70.21%。

为了验证响应面优化的可行性,采取优化后的条件进行酶法提取雨生红球藻中虾青素的验证实验。考虑到操作的可行性,将酶解时间设为 6 h、酶解 pH4.9,酶解温度为 49 °C,在此条件下进行了 5 次重复试验。经上述优化后的条件提取后,雨生红球藻中虾青素的平均提取率为 $71.08\% \pm 0.26\%$,与预测值相比,相对误差为 1.2%,因此响应面优化后的条件是可行的,具有实用价值。

3 结论与讨论

本实验在单因素实验的基础上,利用响应面法对复合酶提取雨生红球藻虾青素的条件进行了优化,并建立了可靠的二次多项模型。通过方差分析表明,模型的拟合度较好。在纤维素酶和果胶酶酶活力配比 1:1 (U/U),加酶量 7000 U/mL 条件下,优

化最优组合为:酶解时间 6 h、酶解 pH4.9、酶解温度为 49 °C。在此条件下重复 5 次实验得到的平均提取率为 $71.08\% \pm 0.26\%$,与预测值相对误差为 1.2%,具有良好的拟合度。其中采用混合有机溶剂直接浸提法^[35]和变频微波辅助提取法^[36],得到的虾青素提取率分别为 36.21% 和 36.88%,相比之下采用复合酶法能够使虾青素的提取率得到大幅度的提升,可为工业化大规模生产提供一定的参考价值。

参考文献

- [1] Hu J, Nagarajan D, Zhang Q, et al. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 36(1): 54-67.
- [2] 李小慧. 雨生红球藻中虾青素生产性提取工艺的优化及虾青素体外抗肿瘤活性的研究[D]. 烟台: 鲁东大学, 2016.
- [3] 海璇隼, 凌雪萍, 卢英华. 虾青素对正常小鼠与衰老模型大鼠免疫指标的影响[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2013, 52(5): 703-709.
- [4] Masoudi A, Dargahi L, Abbaszadehf F, et al. Neuroprotective effects of astaxanthin in a rat model of spinal cord injury [J]. *Behavioural Brain Research*, 2017, 329(4): 104-110.
- [5] 夏棚如, 曲雪峰, 王茵. 虾青素预防心血管疾病作用的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(9): 15-23.
- [6] 周玲燕. 基于菊芋原料的红发夫酵母补料分批培养合成虾青素及其在化妆品中应用的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [7] Higuera - ciapara I, Felix - Valenzuola L, Goycoolea F M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46(2): 185-196.
- [8] Lorenz R T, Cysewski G R. Commercial potential for *Haematococcus microalga* as a natural source of astaxanthin [J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18(4): 160-167.
- [9] Lim K C, Yusoff M, Shariff M, et al. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2017, 10(3): 738-773.
- [10] 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.
- [11] Orosa M, Valero J F, Herrero C, et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N - starvation and high light conditions [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(13): 1079-1085.
- [12] 曹平华, 李晓霞, 禹学礼. 雨生红球藻的初步探讨[J]. *江西饲料*, 2004, 4(3): 20-22.
- [13] 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.
- [14] Kim D Y, Vijayan D, Praveenkumr R, et al. Cell - wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus* [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 96(8): 199.
- [15] 侯会绒, 孙兆远, 贡汉坤. 超声波提取克氏原螯虾壳中虾青素[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(9): 209-214.
- [16] 王宝贝, 张亚敏, 蔡舒琳, 等. 响应面法优化乙醇提取雨

生红球藻中虾青素的工艺[J].食品科技,2017,12(10):239-243.

[17]谈俊晓,赵永强,李来好,等.响应面优化南极磷虾虾青素的复合酶法提取工艺研究[J].大连海洋大学学报,2018,33(4):104-111.

[18]Nobre B, Marcelo F, Passos R, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the *Haematococcus pluvialis* microalga[J]. European Food Research and Technology, 2006, 223(6):787-790.

[19]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(2):48-52.

[20]Zhao X, Zhang X, Fu L, et al. Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*[J]. Food and Bioprocess Technology, 2016, 99(5):97-203.

[21]Sarada R, Vidhuavathi R, Usha D, et al. An Efficient method for extraction of astaxanthin from green alga, *Haematococcus pluvialis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(20):7585-7588.

[22]Kobayashi M, Kurimura Y, Sskamoto Y, et al. Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. Biotechnology Techniques, 1997, 11(9):657-660.

[23]王璐,胡仁和,沈敏,等.纤维素酶和果胶酶共固定化研究[J].广东化工,2013,40(13):79-80.

[24]高文秀,赵文卓,李平平.果胶酶解法辅助超声波法提取山楂中总黄酮的初步工艺优化[J].吉林化工学院学报,2013,30(7):29-32.

[25]Zhou S K, Bi T N, Xu Y F, et al. Extraction optimization of carbohydrate compound from Huangqi using orthogonal design[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58:13-17.

(上接第86页)

[24]Scharbert S, Hofmann T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53:5377-5384.

[25]Kobayashi Y, Habara M, Ikezaki H, et al. Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores[J]. Sensors, 2010, 10(4):3411-3443.

[26]王雪婷.复合发酵菌种对麸皮馒头品质提升的研究[D].重庆:西南大学,2017.

[26]Zuorro A, Fidaleo M, Lavecchia R. Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste[J]. Enzyme Microb Technol, 2011, 49(6):567-573.

[27]Liu Zhi Wei, Z Yue, Zeng Xin 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.

[28]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,2007,20(4):441-445.

[29]黎英,陈雪梅,严月萍.超声波辅助酶法提取红腰豆多糖工艺优化[J].农业工程学报,2015,31(15):293-301.

[30]Gerken H, Donohoe B, Knoshaug E P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorellavulgaris* and other microalgae for biofuels production[J]. Planta (Berlin), 2013, 237(1):239-253.

[31]Ambati R R, Phang S M, Ravi S. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review[J]. Marine Drugs, 2014, 12(1):128-152.

[32]Ahmed F, Li Y, Fanning K, et al. Effect of drying, storage temperature and air exposure on astaxanthin stability from *Haematococcus pluvialis*[J]. Food Research International, 2015, 74(5):231-236.

[33]Zuorro A, Maffei G, Lavecchia R. Optimization of enzyme-assisted lipid extraction from *Nannochloropsis microalgae*[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016, 67:106-114.

[34]李亚辉,马艳弘,黄开红.响应面法优化复合酶提取芦荟多糖工艺及其抗氧化活性分析[J].食品科学,2014,35(18):63-68.

[35]赵晓燕,朱海涛,陈军.响应曲面法优化有机溶剂萃取雨生红球藻中虾青素[J].食品工业,2014(10):124-127.

[36]赵晓燕,陈军,陈锋亮,等.变频微波法辅助萃取雨生红球藻中虾青素的研究[J].食品科技,2014(3):188-193.

[27]李立培.柿子汁对面粉及面制品品质的影响研究[D].保定:河北农业大学,2013.

[28]王璐,黄明泉,孙宝国,等.电子舌技术在甜面酱口感评价中的应用[J].食品科学,2012,33(20):349-350.

[29]赵静,丁奇,孙颖,等.香菇菌汤及酶解液中滋味成分及呈味特性的对比分析[J].食品科学,2016,37(24):99-104.

[30]Liu M, Wang J, Li D, et al. Electronic tongue coupled with physicochemical analysis for the recognition of orange beverages[J]. Journal of Food Quality, 2012, 35(6):429-441.

中国科技核心期刊, 轻工行业优秀期刊